

## ヒト（自己）表皮（皮膚）再生に関する評価指標

### 1. はじめに

再生医療等製品（医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和 35 年法律第 145 号）第 2 条第 9 項に規定する「再生医療等製品」をいう。以下同じ。）のうち、ヒト（自己）細胞加工製品の品質及び安全性を確保するための基本的な技術要件は、平成 20 年 2 月 8 日付け薬食発第 0208003 号厚生労働省医薬食品局長通知（以下「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）に定められているところである。本評価指標は、ヒト（自己）皮膚組織由来細胞加工製品のうち特に重症皮膚疾患の治療を目的として皮膚に適用される再生医療等製品について、上述の基本的な技術要件に加えて留意すべき事項を示すものである。

### 2. 本評価指標の対象

本評価指標は、ヒト（自己）皮膚組織由来細胞加工製品のうち特に重症皮膚疾患の治療を目的として皮膚に適用されるヒト（自己）表皮由来細胞シートについて、基本的な技術要件に加えて品質、有効性及び安全性の評価にあたって留意すべき事項を示すものである。

### 3. 本評価指標の位置づけ

本評価指標は、技術開発の著しいヒト（自己）皮膚組織由来細胞加工製品を対象とするものであることを勘案し、留意すべき事項を網羅的に示したのではなく、現時点で考えられる点について示している。よって、今後の更なる技術革新や知見の集積等を踏まえ改訂されるものであり、申請内容に関して拘束力を有するものではない。

製品の評価に当たっては、個別の製品の特性を十分理解した上で、科学的な合理性をもって柔軟に対応することが必要である。

なお、本評価指標の他、国内外のその他の関連ガイドラインを参考にすることも考慮すべきである。

### 4. 用語の定義

本評価指標における用語の定義は、「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」の定義による他、以下のとおりとする。

(1) 皮膚組織：皮膚とは体表を覆う臓器であり、表皮、真皮、皮下組織の 3 層からなる。

本評価指標においては、皮膚組織を、「皮下組織を除いた表皮と真皮を含む組織」と定義する。

(2) 表皮細胞：表皮を構成する扁平上皮細胞を「表皮細胞」と定義する。なお、表皮に

は、表皮細胞以外に、血液幹細胞由来のランゲルハンス細胞や神経堤由来のメラノサイトなどが存在する。

- (3) 重症熱傷：自家植皮のための患皮面積が十分に確保できない重篤な熱傷を「重症熱傷」と定義する。具体的には、受傷面積として深達性Ⅱ度熱傷創及びⅢ度熱傷創の合計面積が体表面積の30%以上の熱傷を念頭に置く。
- (4) 先天性巨大色素性母斑：生下時より巨大な色素性母斑が存在する疾患と定義する。巨大、については明確な定義がされていないが、直径20cm以上（成人時に）である母斑、体表面積の5%以上、10%以上、頭頸部では体表面積の1%以上である母斑などの定義がある。
- (5) 表皮水疱症：表皮水疱症は、皮膚の表皮および表皮真皮境界部に分布するタンパクをコードする遺伝子の変異に伴い、表皮もしくは表皮下に水疱を生じる遺伝性疾患群である。日常生活で外力の加わる部位に水疱や潰瘍を反復して生ずることを主な臨床症状とする。電子顕微鏡観察による水疱形成部位は、①基底細胞内（単純型）、②透明帯（接合部型）、③基板下方（栄養障害型）のいずれかであることが多い（括弧内はそれぞれの病型（三大病型）を示す）。遺伝形式、臨床症状、電子顕微鏡所見、免疫蛍光抗体法による皮膚基底膜タンパクの発現所見に基づき病型診断される。遺伝子変異検査は診断に必須ではない。
- (6) 原材料：再生医療等製品の製造に使用する原料又は材料の由来となるものをいう。（生物由来原料基準（平成15年厚生労働省告示第210号）の定義と同じ）
- (7) 原料等：原料若しくは材料又はそれらの原材料をいう。（生物由来原料基準（平成15年厚生労働省告示第210号）の定義と同じ）
- (8) セル・バンク：均一な組成の内容物をそれぞれに含む相当数の容器を集めた状態で、一定の条件下で保存しているものである。個々の容器には、単一の細胞プールから分注された細胞が含まれている。（ICH-Q5D「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」について（平成12年7月14日付け医薬審第873号厚生省医薬安全局審査管理課長通知）の定義と同じ）
- (9) クロスコンタミネーション：サンプル間の混入のこと。交叉汚染とも呼ばれる。製造に用いられる原料の間、中間体の間等での混入を意味する。例えば、あるセル・バンクに由来する細胞に別のセル・バンクに由来する細胞が混入する場合や、ウイルス不活化後の原料に不活化前の原料が混ざってしまう場合等が挙げられる。
- (10) 細胞シート：細胞同士が直接、あるいは間接的に結合してシート状の形態を呈しているものをいう。

## 5. 評価に当たって留意すべき事項

本評価指標は、ヒト皮膚組織を原料として製造所に受け入れ、これを製造施設において

加工して製造されたヒト（自己）表皮由来細胞シートを重症熱傷、先天性巨大色素性母斑、表皮水疱症の治療を目的として皮膚に適用することを想定している。

#### （１）原料等

原料（ヒト皮膚組織）及び材料（ウシ血清、フィーダー細胞等）、さらにそれらの製造に用いられる原材料の管理項目については、最終製品に求められる品質が確保できるよう設定することが原則となるが、その原料等を用いても最終製品に安全上の懸念が生じないよう、原料等の品質（無菌性、不純物等）についても考慮し設定することが求められる。ウイルス等の外来性感感染性物質の混入リスクについては、「生物由来原料基準」に基づいて必要な情報を得た上で、そのリスクが管理できるよう管理項目を設定する。「生物由来原料基準」の規制対象となる原料等の範囲は、「生物由来原料基準の運用について」（平成 26 年 10 月 2 日付け薬食審査発 10021 第 1 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長、薬食機参発 1002 号第 5 号厚生労働省大臣官房参事官（医療機器・再生医療等製品審査管理担当）通知）を参照すること。

##### ① ヒト皮膚組織の採取

ヒト皮膚組織の採取部位の選定理由、採取方法を示し、これらが科学的及び倫理的に適切に選定されたものであることを明らかにすること。採取方法については、用いられる器具、微生物汚染防止、取り違えやクロスコンタミネーション防止のための方策等を具体的に示すこと。

##### ② フィーダー細胞

フィーダー細胞を使用する場合には、ICH-Q5D 「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」について、「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」（平成 28 年 6 月 13 日付け医政研発第 0613 第 1 号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知）及び「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく 3T3J2 株及び 3T3NIH 株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針」を参考にして品質評価を行い、フィーダー細胞からの細菌、真菌、ウイルス、異常プリオン等の混入・伝播を防止する策を講じるとともに、使用時の増殖能不活化方法及び細胞密度等の条件について明らかにすること。ただし、例えば既に臨床使用されているヒト細胞・組織製品の製造に使用され、その特性や微生物学的安全性等について評価が定まっているフィーダー細胞と同一の細胞を利用する場合には、その妥当性を示すことによってウイルス否定試験等、試験の一部を省略することができる可能性がある。

#### （２）製造工程において特に注意が必要な事項

最終製品であるヒト（自己）表皮由来細胞シートの製造にあたっては、製造方法を明確にし、可能な範囲でその妥当性を以下の項目で検証し、一定の品質を保持するこ

と。

原料となるヒト皮膚組織の製造所への受入れから、表皮細胞の分離・培養工程を経て、最終製品に至る製造方法の概要を示すとともに、具体的な処理内容及び必要な工程管理、品質管理の内容を明らかにすること。

#### ① 受入検査

採取したヒト皮膚組織について、製造施設への受入のための試験検査の項目（例えば、目視検査、顕微鏡検査、細胞の生存率、細胞の特性解析、細菌、真菌、ウイルス等の混入の否定等）と各項目の判定基準を設定すること。また、(ア)組織運搬状況の確認（断熱容器に封印されているか、発送から何時間かかっているか等）及び(イ)皮膚組織の外観の確認（運搬用チューブの破損・液漏れはないか、皮膚組織が組織運搬液中に浸漬されているか、運搬液に汚染が無いかなど）を行うこと。

#### ② 細菌、真菌及びウイルス等の不活化・除去

採取したヒト皮膚組織について、表現型、遺伝形質、特有の機能等の特性、細胞生存率及び品質に影響を及ぼさない範囲で、必要かつ可能な場合は細菌、真菌及びウイルス等を不活化又は除去する処理を行うこと。当該処理に関する方策と評価方法について明らかにすること。

#### ③ 製造工程中の取り違え及びクロスコンタミネーション防止対策

最終製品であるヒト（自己）表皮由来細胞シートの製造に当たっては、製造工程中の取り違え及びクロスコンタミネーションの防止が重要であり、工程管理における防止対策を明らかにすること。

#### ④ 加工した表皮細胞の特性解析

加工した表皮細胞については、加工に伴う変化や目的外細胞の混入を調べるために、例えば、形態学的特徴、増殖特性、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質、核型、その他適切な遺伝型又は表現型の指標を解析するとともに、必要に応じて機能解析を行うこと。皮膚組織から作られる表皮細胞シートの場合、ランゲルハンス細胞、メルケル細胞、線維芽細胞、脂肪細胞、フィーダー細胞（フィーダー細胞を使用した場合）等の混入が考えられる。

また、培養期間の妥当性及び細胞の安定性を評価するために、予定の培養期間を超えて培養した細胞において目的外の変化がないことを示すこと。異常増殖細胞や形質転換細胞の検出法としては、増殖特性解析、軟寒天コロニー形成試験、免疫不全動物への皮下投与試験等があるが、いずれにしても試験系の検出限界を確認しておくことが結果の解釈において重要である。また核型分析は、皮膚組織を採取する患者の年齢や原疾患によっては、ある頻度で染色体異常が生じている場合があるので、染色体異常が認められた場合にそれが患者に起因するのか、あるいは培養に起因するのかを明らかにできるような試験計画の立案を検討すること。

### (3) 製品の品質管理

品質規格の設定について、治験を開始する前段階にあつては、それまでに得られた試験検体での実測値を提示し、これらを踏まえた暫定値を示すこと。なお、出荷製品そのもの又はその一部に対して規格試験の実施が技術的に困難である場合にあつては、妥当性を示した上で並行して製造した製品を用いて規格試験を実施すること。

#### ① 外観の確認

形状確認として、例えばシートの組織切片の作製や共焦点顕微鏡での3次元観察等により、細胞がシートを形成していることを確認する。

#### ② 細胞数及び生存率

細胞数を測定する方法としては、最終製品の一部を酵素処理して細胞懸濁液とし、血球計算盤やセルカウンターで測定する方法がある。生細胞率を測定する方法として、トリパンブルーを用いた色素排除法があり、生細胞数及び死細胞数を計算することができる。

#### ③ 確認試験

目的とする細胞・組織の形態学的特徴、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的生産物質その他適切な遺伝型又は表現型の指標を選択して、目的とする細胞・組織であることを確認すること。例えば、重症熱傷の場合、細胞シートの基底膜構造や基底膜タンパク質の状態が治療成績に影響を与えることが予想される<sup>1)</sup>ため、確認すべきである。また、治療目的に対して必要に応じてメラノサイトの含有率も確認する。

#### ④ 細胞の純度試験

異常増殖細胞や形質転換細胞等の目的細胞以外の細胞、フィーダー細胞の検出法及びその混入率の定量法、並びにその安全性を確認する試験方法及び判断基準を設定すること。

#### ⑤ 製造工程由来不純物試験

ウシ血清を使用する場合は、ウシ血清アルブミン残存試験の規格を設定し、実測値をもとに規格値を設定する。動物由来成分、抗生物質等に関しては、アレルギー既往の患者に対し、本品を使用しない旨を添付文書等に記載する。

#### ⑥ 力学的適合性試験

剥離・洗浄・移植操作に耐えうる強度を有していることを確認する。無菌性又は非破壊性を保った状態で行うことが困難でない場合は、並行して製造した試験用検体を用いて実施することでも構わない。

### (4) 製品の安定性試験

最終製品又は重要なそれらの中間製品について、保存・流通期間及び保存形態を十分考慮して、細胞の生存率及び効能を裏付ける代替指標等を指標に実保存条件での安定性試験を実施し、貯蔵方法及び有効期間を設定し、その妥当性を明らかにすること。

特に凍結保管及び解凍を行う場合には、凍結及び解凍操作が製品の解凍後の培養可能期間や品質へ与える影響を確認すること。また、必要に応じて標準的な製造期間を超える場合や標準的な保存期間を超える長期保存についても検討し、安定性の限界を可能な範囲で確認すること。ただし、製造終了後直ちに使用するような場合はこの限りではない。

また、出発原料、中間製品及び最終製品を運搬する場合には、それぞれの条件と手順（容器、輸送液、温度管理等を含む）等を定め、その妥当性について明らかにすること。空路輸送に関しては、気圧の変化や X 線検査等による影響についても考慮すべきである。細胞を凍結状態で輸送する場合には、凍結時に使用する培地又は凍結保存液、凍結保護剤等について、製造工程で使用する材料と同様に適切に選択すること。また、非凍結状態で輸送する場合の輸送液等も同様である。製品形態又は細胞種によって、製品安定性を保つための適切な保存形態、温度条件、輸送液等が異なる可能性があるため、製品毎に適切な組み合わせを検討し、安定性を担保する必要がある。

#### （5）非臨床試験

##### ① 安全性試験（造腫瘍性試験）

最終製品の細胞がヒトでの移植部位に相当する微小環境で造腫瘍性を示すかどうかの確認のために、皮膚を欠損させた免疫不全動物へ作製した表皮細胞シートを移植する。移植細胞数としては、想定される臨床使用量（細胞数）に種差と個体差の安全係数を掛けた量であることが望ましい。ただし、移植細胞自体が移植部位の微小環境に大きな影響を与え、移植細胞の総数に依存してアーチファクトを生んでしまう可能性を十分考慮する必要がある。

##### ② 最終製品の効力又は性能を裏付ける試験

技術的に可能かつ科学的に合理性のある範囲で、対象疾患に対し適切なモデル動物等を用いて、最終製品の機能発現、作用持続性、ヒト（自己）皮膚組織由来細胞加工製品として期待される臨床効果の実現可能性（Proof-of-Concept, POC）を示すこと。モデル動物としては、重症熱傷、先天性巨大色素性母斑では免疫不全動物に皮膚欠損創を作製したもの等が挙げられるが、最終製品の効力又は性能を示すための各疾患のモデル動物は今のところ確立されていない。

#### （6）臨床試験（治験）

臨床データパッケージ及び治験実施計画書は、対象疾患、目的とする効能、効果又は性能、当該治療法に期待される臨床上の位置づけ等に応じて、非臨床データ等も踏まえて計画することが必要である。一般的に臨床試験においては盲検化の有無にかかわらず、より科学的に有効性及び安全性の情報を収集するためには、内部対照群を設定した比較臨床試験が望ましいが、開発している再生医療等製品の臨床上の位置づけ

を踏まえた開発可能性を考慮して適切に計画されるべきである。例えば下記②に示した対象疾患においては標準的治療法が確立されておらず、求められる評価項目（エンドポイント）も製品毎に設定する必要がある。医療現場における忍容性や倫理性を考慮し比較試験を行うことが原則であるが、単腕試験での評価も想定される。なお、できる限り独立行政法人医薬品医療機器総合機構の RS 戦略相談、治験相談等を利用すること。

#### ① 臨床試験における評価技術に関する基本的考え方

臨床試験は被験者の人権の保護、安全及び福祉に関するリスク並びにデータの質に関するリスクを最小限とし被験製品による効果が最大限に評価できるように計画されるべきである。特に目的とする細胞・組織の由来、対象疾患及び適用方法を踏まえて適切な試験デザイン及びエンドポイントを設定して実施することが推奨される。

評価項目に関しては、その最終目的に応じて主要評価項目 (Primary endpoint)、副次的評価項目 (Secondary endpoint) を設定する。有効性評価項目としては、移植後一定期間での表皮形成率、長期経過での創の状態を評価することができる項目を含むものとする。

また、表皮シート移植においては、移植手技が効果に影響する可能性があるため、複数施設での治験を行うことが望ましい。さらに複数の真皮再構築の方法・移植母床が考えられる場合には代表的な幾つかの方法で効果を確認することが推奨されるが、有効性及び安全性評価を行う上で結果にバラツキが生じた場合の解釈については慎重に行うこと。

#### ② 対象疾患

##### a) 重症熱傷

自家植皮のための患皮面積が確保できない重篤な広範囲熱傷で、かつ、受傷面積として深達性Ⅱ度熱傷創及びⅢ度熱傷創の合計面積が体表面積の 30%以上の熱傷が対象と考えられる<sup>2)</sup>。

##### b) 先天性巨大色素性母斑

体表面積の 5%以上の先天性巨大色素性母斑を有する患者が対象と考えられる。ただし、母斑の部位等によって標準的治療法の適用が困難な場合は 5%以下の母斑を有する患者も対象と考えられる。

##### c) 表皮水疱症

皮膚基底膜部タンパクの局在発現や電子顕微鏡学的所見、遺伝子変異解析等に基づき病型が確定している表皮水疱症患者を対象とし、おおむね 1 ヶ月以上の期間をみて上皮化しない、あるいは潰瘍形成と上皮化を繰り返す、難治性および再発性皮膚潰瘍を対象とする。

安全性評価が困難になる恐れがあることから有棘細胞癌などの皮膚悪性腫瘍を合併又は既往がある症例においては、皮膚悪性腫瘍を生じた部位を臨床試験の対象としないことが望ましい。

### ③ 臨床有効性評価

#### ア. 臨床情報

臨床情報としては表皮シートの移植床に関する情報および表皮シートの移植方法に関する情報が求められる。

表皮シートの移植方法に関する情報として、自家植皮の併用の有無、併用する場合はその方法に関する情報、移植後のコンタクトレーヤー、ドレッシング方法に関する情報が必要である。

##### a) 重症熱傷

表皮シートの移植床に関して以下の情報を収集すること。

- 適応する熱傷創の深度・面積等の状態に関する情報
- 真皮再構築の方法（同種皮膚、人工真皮、その他）
- 移植前の移植床状態及び手術（デブリドマン施行の有無等）に関する情報
- 細菌コロナイゼーションの状態等

##### b) 先天性巨大色素性母斑

表皮シートの移植床に関して以下の情報を収集すること。

- 治験対象となる母斑の治療歴
- 母斑の切除方法（キュレタージュ又は分層で切除（薄削）した場合は、キュレタージュ又は薄削した方法）
- 切除した母斑の状態（深度・面積等の状態に関する情報。母斑を全層で切除した場合は、真皮再構築を行ったか、行った場合の再構築の方法（人工真皮、その他）

##### c) 表皮水疱症

表皮シートの移植床に関して以下の情報を収集すること。

- 潰瘍の面積
- 壊死組織の有無
- 細菌コロナイゼーションの状態等

#### イ. 有効性の評価

##### a) 重症熱傷

有効性の評価としては、総移植面積に対する表皮形成率を主要評価項目とし、長期の創閉鎖の状態、症例あたりの移植回数、使用枚数、予後、採皮部位とその面積などを評価することが一般的である。表皮形成率の評価方法は、肉眼的観察

や写真での判定により行うとともに、可能な範囲で組織生検による判定を行うことも考慮する。有効性評価の結果解釈が困難になることから自家植皮を併用した場合は、自家植皮の面積を差し引いて表皮形成率を計算する。

表皮形成率の評価時期に関しては、急性期の評価として、移植後 1,2,4 週後、亜急性期（脱落の評価）として移植後 8 週後に評価がされることが望ましい。長期の創閉鎖の状態に関しては、1年後程度での肉眼的（写真による）判定にて、頻回の水疱の形成、肥厚性瘢痕の形成、色素異常の状態、瘢痕拘縮の発生、拘縮解除手術の有無等をフォローアップとして観察することが必要である。

#### b) 先天性巨大色素性母斑

有効性の評価としては、総移植面積に対する表皮形成率を主要評価項目とし、長期的な瘢痕化の評価、母斑再発評価、びらん・水疱・潰瘍形成などの有害事象、治療部位あたりの移植回数、採皮部位とその面積、移植された表皮シート面積などを評価することが一般的である。表皮形成率の評価方法は a) 重症熱傷と同様である。また、瘢痕化の評価方法は、肉眼的な観察と共に経時的に Vancouver Scar Scale<sup>3)</sup>などのスケールによる評価を行うことが望ましい。

表皮形成率の評価時期は、急性期の評価として、移植後 1,2,4 週後、亜急性期（脱落の評価）として移植後 8 週後に評価がされることが望ましい。また、瘢痕化の評価時期は、移植 6,12 ヶ月において評価を行うことが望ましい。長期の移植部位の状態については、母斑の再発に関して色調の経時的な肉眼的観察及び可能な範囲で組織生検による観察を移植後 1 年程度までフォローアップにより行うことが必要である。

#### c) 表皮水疱症

有効性の評価としては、総移植面積に対する表皮形成率を主要評価項目とする。移植前の潰瘍の状態、症例あたり部位ごとの移植回数、使用枚数、採皮部位とその面積、移植された表皮シート面積などを評価することが一般的である。表皮形成率の評価方法は、a) 重症熱傷と同様である。

表皮形成率に関しては、急性期の評価として、移植後 1,2,4 週後、亜急性期（脱落の評価）として移植後 8 週後に評価がされることが望ましい。長期の創閉鎖の状態に関しては、1年後程度での肉眼的（写真による）判定にて、頻回の水疱、びらん及び潰瘍形成、肥厚性瘢痕の有無等をフォローアップにより観察することが必要である。

### ウ. 安全性の評価

ヒト（自己）皮膚組織由来細胞加工製品は採皮時点から観察終了時期まで全身所見、局所所見、自覚症状の有無を確認する。有害事象、感染症やアレルギー反応の有無を観察する。特に、ヒト（自己）皮膚組織由来細胞加工製品は複数回にわたり

移植する可能性があることから、製造に動物由来のものを用いた場合には、抗体産生の有無について評価を行うことが望ましい。

表皮水疱症では病型により有棘細胞癌を合併する症例があるため、難治性潰瘍や腫瘍の形成がないか評価し、確認された場合は組織生検を行い診断すること。

## 6. 参考資料

- 1) Matsumura H, Gondo M, Imai R, Shibata D, Watanabe K. Chronological histological findings of cultured epidermal autograft over bilayer artificial dermis. *Burns*. 2013;39(4):705-13.
- 2) Matsumura H, Matsushima A, Ueyama M, Kumagai N. Application of the cultured epidermal autograft "JACE" for treatment of severe burns: Results of a 6-year multicenter surveillance in Japan. *Burns*. 2016 Jun;42(4):769-76. doi: 10.1016/j.burns.2016.01.019. Epub 2016 Mar 2.
- 3) Fearmonti R, Bond J, Erdmann D, Levinson H. A review of scar scales and scar measuring devices. *Eplasty*. 2010 Jun 21;10:e43.