

細胞外小胞等の臨床応用に関するガイドンス（第1版）

2024年4月30日

座長	寺井崇二
メンバー	阿曾沼元博
	落谷孝広
	紀ノ岡正博
	佐藤陽治
	高橋有己
	飛田護邦
	星野歩子
書記	土屋淳紀
オブザーバー	岡田 潔

一般社団法人日本再生医療学会
協力：日本細胞外小胞学会

<目次>

ガイドンス作成に至った現状.....	2
1. リスク・プロファイリング	4
1-1. リスク・プロファイリングの概要	4
1-2. リスク・プロファイリングの方法	5
2. 調製工程（製造工程）・品質.....	7
2-1. 調製（製造）におけるリスクについて	7
2-2. 調製（製造）における基本的な考え方	8
3. EV 調製物のチェック項目並びに効果検証	9
3-1. 調製物（製品）の規格として一般的に設定される項目とその評価	9
3-2. 対象疾患および調製方法（製造方法）ごとに重要品質特性（CQA）として設定され る項目とその評価.....	10
3-3. 疾患と関連して行われることが望ましい評価	12
重要項目のまとめ.....	13
利益相反（COI）に関する開示	15
（図 1）	17
（図 2）	18

ガイダンス作成に至った現状

現在、細胞外小胞（Extracellular Vesicles; EVs）もしくはエクソソームまたはこれらを含むとされる細胞培養上清など（細胞外小胞等）を用いた治療（以下、本文書では「EV 療法」と呼ぶ）が世界的に注目を集めている。EVs とは、細胞から分泌される小胞で、組織の再生を促す成長因子や細胞間の情報伝達物質を含んだエクソソームなどからなる（図 1）。EVs は細胞培養上清から修飾を施さずにそのまま採取される天然型や特定の細胞株培養上清液や特定の動植物やその培養細胞などから EVs を精製・回収した後にペプチド付与などの修飾を施したり、EVs の供給元である細胞あるいは動植物等に遺伝子改変を施したりすることで、特定の機能を EVs に付与するもの、また特定の治療薬を内包することでドラッグデリバリーシステム（DDS）の担体として利用する改変型 EVs があり、今後対象となる分野・疾患の範囲が多岐にわたる可能性があり、その発展性が期待されている分野である。しかしながら、現状においては EVs を主な有効成分とする医薬品に薬事上の販売承認を与えた国はなく、また、International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) や各国において、ガイダンスもしくは指針（ガイドライン）の策定が十分ではない。

本会では 2021 年 3 月 10 日に、EVs の中でも特にエクソソームについて「エクソソーム等の調製・治療に対する考え方」¹を示し、このような発展性のある分野が、安全性高く推進され国民に届くことを目的に発表してきた。そこから 3 年経過し、その間の知見・技術の進歩により、3 年前に比し具体的に臨床を目指して治験を行おうとする方向に進んできた一方で世界的には、EVs やエクソソームを謳った薬事未承認の製品・調製物の投与がクリニックなどで行われている現状が依然としてあり、その安全性、有効性への懸念が生じている現状がある。また、2023 年 12 月 25 日に日本細胞外小胞学会（The Japanese Society for Extracellular Vesicles; JSEV）からも「細胞外小胞を用いた医療行為に対する日本細胞外小胞学会の見解」が発表され、本会と同様に懸念を表明している。

今回は、安心、安全な EV 療法の発展、開発のために EV 療法の実施者が確認すべき「現状確認項目」「推奨項目」を挙げて解説を行い、今後の健全な方向性を示すことを目的とした。今回、(1) リスク・プロファイリング、(2) 調製工程（製造工程）・品質、(3) EVs のチェック項目並びに効果検証の 3 つの項目を策定した。また現時点での文献的なレビューや独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）の科学委員会「エクソソームを含む細胞外小胞（EV）を利用した治療用製剤に関する報告書」²や各構成員の状況把握や経験を元にまとめた。

EVs に関しては、細胞源の種類は多岐におよぶ可能性があり、天然型以外にも改変型が発展してくる見込みがある。こうした多様性や進歩に伴い、今後発展が期待される分野であり、

¹ <https://www.jsrm.jp/news/news-8031/>（最終アクセス 2024 年 4 月 9 日）

² <https://www.pmda.go.jp/files/000249829.pdf>（最終アクセス 2024 年 4 月 9 日）

一方で研究発展にともによりよい方向に改訂されていく分野である。そのため、本ガイドンス作成においては現状において利用が想定される「間葉系幹細胞」の「天然型の EVs」を意識し、上記の 3 つの項目に重要項目を絞ってまとめている。

なお、本ガイドンスは、現在の最新の知見を集めたもので、科学の進歩や発展、実際の治療等の実施例を踏まえ今後必要に応じて改訂するものとする。

1. リスク・プロファイリング

1-1. リスク・プロファイリングの概要

現状確認項目

EVs を医師または歯科医師の指示の下に調製（製造）しこれらの所属する医療機関の患者に施用する医療行為は、国内では「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」（安確法）の対象外とされており、特定認定再生医療等委員会や認定再生医療等委員会の審査を受けることはない。したがって薬事未承認の EVs（EV 調製物）を用いた治療（EV 療法）を提供する医師または歯科医師は、EV 調製物の品質及びリスクのプロファイルに関して自ら十分に理解した上で患者の安全確保に努めなければならない。

（解説）

EV 療法には臨床上的様々なリスクと、それぞれの原因となる危険因子が存在する。危険因子は、EVs の細胞原料採取から調製工程（製造工程）、輸送、保管、臨床投与、投与後の管理までのあらゆる段階に存在する。また、「最終投与物（製剤）としての EVs」（以下、本文書では「EV 調製物」と呼ぶ）は複雑で不均一かつ感染因子の不活化や除去が困難な EV 成分を含み、特定のリスクには複数の危険因子が関与することが想定される。従って、特定の EV 調製物を臨床使用するにあたっては、リスクを特定した上で、それぞれのリスクの原因となる危険因子を特定するとともに、各危険因子の当該リスクへの寄与の大きさを評価、すなわちリスクのプロファイリングを行った上で危険因子の低減及び管理の方法を決定し、これを実施する必要がある。

なお、「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」（薬機法）に基づく製造販売承認を受けていない EV 調製物を、医師または歯科医師の指示の下に調製（製造）しこれらの所属する医療機関の患者に施用する医療行為は、国内では「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」（安確法）の対象外とされており、特定認定再生医療等委員会や認定再生医療等委員会の審査を受けることはない。したがって薬事未承認の EV 調製物を用いた治療（EV 療法）を提供する医師または歯科医師は、EV 調製物の品質及びリスクのプロファイルに関して自ら十分に理解した上で患者の安全確保に努めるとともに、当該医療の潜在的ベネフィットと比較して各リスクが十分に低減されていることを自ら確認した上で実施すべきである。

1-2. リスク・プロファイリングの方法

推奨項目

リスクと危険因子の特定ならびにこれらの低減策の検討は、EV 療法の開発早期から実施すべきである。一般に、EV 調製物のリスクは薬機法の下で開発されるバイオ医薬品と大きく変わるところはない。特定のリスクに關与する可能性のある危険因子は様々な段階、例えば、EV 調製物の特性や組成、原料調達、調製工程（製造工程）、輸送、保管、非臨床評価、臨床評価、臨床投与方法、臨床適用現場での EV 調製物の取扱い、などに存在している可能性がある。なお、EVs は複雑で不均質・不均一であるため、認識しうる品質特性をすべて列挙したとしても、製品の有効性や安全性を阻害する危険因子に關連する重要品質特性（CQA; Critical Quality Attribute）をすべて特定・管理することが困難なことにも留意しておく必要がある。

推奨項目

EV 療法のリスクマネジメントでは、有害事象発生時の原因究明のために検体（例えば、臨床利用されたものと同じロットの EV 調製物や生物由来原料）および調製（製造）・投与記録を保管することが重要になる。

（解説）

（ア）臨床使用に關連するリスクの特定

リスクの特定とその低減策の検討は、EV 療法の開発早期から実施すべきである。一般に、EV 調製物のリスクは薬機法の下で開発されるバイオ医薬品と大きく変わるところはない。薬機法の下で開発される再生医療等製品のリスク及び安確法に基づく再生医療等の提供時に用いられる特定細胞加工物のリスクとも、製品中の生細胞の異常増殖による腫瘍形成のリスク（造腫瘍性）以外は大きく変わるところはない。EV 調製物の臨床使用に關連する安全上の一般的リスクには、例えば、(a) 感染症の伝搬（例：ウイルス、細菌、真菌）、(b) 望ましくない免疫反応、(c) 不純物混入、(d) EVs の特性の意図しない変化、(e) EVs の望ましくない体内分布、(f) 重要臓器・生殖系列・発生に対する毒性、(g) 患者の細胞に由来する腫瘍・望ましくない組織の形成、(h) 期待する有効性が発揮されないこと、などが挙げられる。またこれらのリスクには、製剤（最終投与物）の主成分である EVs の特性または品質に由来するものと、EVs 以外の成分の特性または品質に由来するものがありうる。

（イ）各リスクに關与する危険因子の特定

特定のリスクに關与する可能性のある危険因子は様々な段階、すなわち、EV 調製物の特性や組成、原料調達、調製工程（製造工程）、輸送、保管、非臨床評価、臨床評価、

臨床投与方法、臨床適用現場での EV 調製物の取扱い、などに存在している可能性がある。危険因子の例としては、

- (a) 細胞基材³ (またはセルバンク)⁴の由来 (例: 自己、同種、異種)
- (b) 細胞基材 (またはセルバンク) の細胞種・培養条件・継代数
- (c) 免疫の標的となる分子・免疫反応を増強する分子
- (d) EVs の精製法
- (e) EVs の安定性・保管方法
- (f) EVs 以外の成分の毒性
- (g) 投与方法・投与部位 (例: 局所 vs. 全身)
- (h) 投与期間 (短期 vs. 長期、単回 vs. 頻回)
- (i) 品質管理・調製管理 (製造管理) の頑健性 (例: GMP⁵/GCTP⁶準拠 vs. 非準拠)
- (j) 調製現場 (製造現場)・医療現場の構造設備 (例: 無菌性)
- (k) 調製現場 (製造現場)・医療現場の作業者の熟練度 (例: 無菌操作)
- (l) 同様の製品に関する臨床データや経験の有無

などが挙げられる。これらの危険因子は、いくつかのリスクに寄与する可能性があり、特定のリスクへの影響において相互に関連している可能性もある。EV 調製物とその臨床応用に関連する危険因子を特定する作業は、出発原料の調達から製品開発全体、臨床試験中、さらには治療として提供する中でも継続して行うことが望ましい。

(ウ) リスクと危険因子との関係性の理解

特定のリスクに対する各危険因子の関与を評価するためには、例えば、各危険因子に関する定性的もしくは定量的なデータや情報を、危険因子を縦軸 (横軸)、リスクを横軸 (縦軸) にした二次元のマトリックスにマッピングすることが有用である。このようなマトリックスを利用すれば、リスクと危険因子の関連性を体系的に俯瞰することができる。そのうえで次に以下の (a)～(f)を実施する。

- (a) 関係が明らかなリスクと危険因子の組み合わせを同定する

³ 細胞基材 (cell substrate): 微生物細胞あるいはヒト又は動物由来の細胞株で、ヒトを対象に *in vivo* 又は *ex vivo* で投与される生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) を生産する上で必要な能力を有するもの。

⁴ セルバンク (cell bank): 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。

[^{1,2} ともに ICH Q5D ガイドライン「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」(平成 12 年 7 月 14 日 医薬審第 873 号 厚生省医薬安全局審査管理課長通知)

<https://www.pmda.go.jp/files/000156150.pdf> (最終アクセス 2024 年 4 月 9 日) の定義]

⁵ GMP (Good Manufacturing Practice): 「医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」(平成 16 年厚生労働省令第 179 号) に定められている医薬品及び医薬部外品の製造管理および品質管理の基準

⁶ GCTP (Good Gene, Cellular, and Tissue-based Products Manufacturing Practice): 「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」(平成 26 年厚生労働省令第 93 号) に定められている再生医療等製品の製造管理および品質管理の基準、または「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則」(平成 26 年厚生労働省令第 110 号) 第 92 条～第 110 条に定められている特定細胞加工物の製造管理および品質管理の基準

- (b) 関係性の科学的背景を既存知識から考察する
- (c) 特定の細菌、真菌のコンタミネーションなどの危険因子が関連するリスクに与える影響を評価する研究を実施する
- (d) (b) または (c) が実施されない場合は、実施されないことの妥当性をリスクの重大性や潜在的ベネフィットとのバランスなどから明らかにする
- (e) リスク低減のための危険因子の低減策・管理法を決定し、実施する
- (f) 危険因子の管理を技術的に可能な範囲で適切に行った上でもなお残るリスクに関するマネジメント計画を策定、実施する。なお、リスクマネジメント計画時には、有害事象発生時の原因究明のための検体（例えば、臨床利用されたものと同じロットの EV 調製物や生物由来原料）および調製（製造）・投与記録の保管も検討する。

2. 調製工程（製造工程）・品質

2-1. 調製（製造）におけるリスクについて

推奨項目

原料・材料の段階から一貫して、工程中の無菌操作ならびに種々の成分の混入防止策を必要とする。また、調製（製造）に用いられる細胞の状態が変化しやすく、その細胞から放出される EVs の品質・有効性・安全性も調製工程（製造工程）によって大きく影響を受けるため、工程の管理が重要である。

（解説）

臨床利用する EV 調製物の具体的リスクのうち特に調製（製造）に関連するものとしては、

- (a) 細胞を含め原料等からのウイルス・細菌・真菌のような感染因子の混入
- (b) 原料等からのアレルギーや拒絶反応などを引き起こす EVs 以外物質の混入
- (c) 工程資材からの微粒子や溶出物のような EVs 以外物質の混入
- (d) 工程中の汚染物質（生物的，化学的）の混入
- (e) 工程中に発生する細胞や EVs の残差蓄積物の混入
- (f) バッチ間の有効性や品質のばらつき
- (g) EV 調製物の保管中における品質劣化
- (h) 自家の EV 調製物の場合のクロスコンタミネーションや取違い

などが挙げられる。EVs はそもそも細胞が放出するものであることから、その調製工程（製造工程）は細胞加工物の場合との類似点が多く、安全性・有効性確保のうえでのリスクにおいても共通点が多い。

例えば、調製工程（製造工程）中での高度な精製やウイルスの不活化や除去が困難であることから、原料・材料の段階から一貫して、工程中の無菌操作ならびに種々の成分の混入防

止策を必要とする。また、調製（製造）に用いられる細胞の状態が変化しやすく、細胞から放出される EVs の品質・有効性・安全性も調製工程（製造工程）によって大きく影響を受けるため、工程の管理が重要である。さらに、調製（製造）後の保管中に管理状態が悪い場合、EVs の品質が変化する恐れもある。一方で、細胞加工物⁷と同様に EV 調製物は、その複雑な特徴ゆえに規格・特性解析で品質のすべて把握することが困難である。したがって、EV 調製物の品質は、その規格・特性解析による管理に加え、原料・材料の品質管理及び調製工程（製造工程）の管理にて確保することが基本となる。

なお、現状において、限られた中での品質特性しか測定できないという特徴をもつ EV 調製物においては、認識しうる品質特性の比較によって調製方法（製法）変更前後での品質の同等性／同質性が十分評価可能であるかどうかが不確かであり、調製方法（製法）を柔軟に変更してスケールアップやコストダウンなどを図ることが難しい場合が多いと想定される。この問題を解決し、製法変更後に改めて非臨床試験や臨床試験を実施することを回避するためには、EV 調製物の *in vitro* 力価測定系の確立や重要品質特性⁸の方法の継続的探索、開発を行うことが望ましい。

2-2. 調製（製造）における基本的な考え方

推奨項目

EV 調製物の品質・有効性・安全性確保のためには、再生医療等安全性確保法下の再生医療等提供基準及び医薬品医療機器等法（薬機法）下の再生医療等製品（細胞加工製品）の品質管理・製造管理基準に準じた品質管理・調製管理（製造管理）を実施するべきである。

（解説）

EV 調製物の品質・有効性・安全性確保のためには、再生医療等安全性確保法下の再生医療等提供基準、または医薬品医療機器等法（薬機法）下の再生医療等製品（細胞加工製品）の品質管理・製造管理基準に準じた品質管理・調製管理（製造管理）を実施するべきである。

薬機法下での製造を除く、臨床利用する EV 調製物の調製（製造）における無菌操作については、日本再生医療学会が発表している「再生医療等安全性確保法における細胞培養加工施設での無菌操作に関する考え方」の最新版を参照し、その基準と同等の製造を行うべきで

⁷ 「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）の定めるヒト細胞加工製品もしくは動物細胞加工製品または「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」（平成 25 年法律第 85 号）の定める特定細胞加工物を指す

⁸ 重要品質特性（critical quality attribute; CQA）：要求される製品品質を保証するため、適切な限度内、範囲内、分布内であるべき物理学的、化学的、生物学的、微生物学的特性又は性質 [ICH Q11 ガイドライン「原薬の開発と製造（化学薬品及びバイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）」（平成 26 年 7 月 10 日 薬食審査発 0710 第 9 号 厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知別添）<https://www.pmda.go.jp/files/000156136.pdf>（最終アクセス 2024 年 4 月 9 日）の定義]

ある。

また、特定細胞加工物の調製（製造）ではあまり見られない凍結乾燥を行う場合は、その工程中での無菌操作のリスクを以下の項目を鑑み、構築を行う必要がある。

- ・ 無菌操作の一つであることから、無菌操作等区域での実施
- ・ 真空処理を行う際の真空ポンプからの逆流防止等による投与物への汚染防止
- ・ ポンプ排気におけるオイルミスト拡散防止による無菌操作等区域の環境維持

3. EV 調製物のチェック項目並びに効果検証

3-1. 調製物（製品）の規格として一般的に設定される項目とその評価

採取・濃縮後の EVs の証明

推奨項目

(1) EVs としての形状・サイズを有する粒子が存在すること、(2) EV マーカー分子が存在することの証明の 2 つが必要である。

(解説)

【具体例】

例えば、Nano-flowcytometry (FCM) や免疫電子顕微鏡、Single EVs immunodetection 等の手法を用いると (1) (2) が同時に評価しうる。同時の証明は困難な場合は、電子顕微鏡・Nanoparticle tracking analysis (NTA)・Tunable Resistive Pulse (TRP)・Dynamic Light Scattering (DLS)・Field Flow Fractionation (FFF) などで (1) の証明を、proteomics, Western blotting, ELISA などで (2) の証明をする必要がある。

PMDA 科学委員会報告書では以下の様に記載されており、参考になる。

EVs マーカー分子 として、テトラスパニン (CD9、CD63、CD81 など)、後期エンドソーム関連因子 (Tsg101、Alix など)、などが一般的に知られている。ISEV ポジショニングペーパー⁹では、EVs 画分に特異的とされるタンパク質もしくは他の EVs 関連分子を少なくとも 3 種類、半定量的に解析すべきであると記載されている。

【補足】

RNA や DNA の内容も把握できればより好ましい¹⁰。更に、EVs の劣化もしくは老化細

⁹ Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. Journal of extracellular vesicles. 2015;4:30087

¹⁰ Silva AKA, Morille M, Piffoux M, Arumugam S, Mauduit P, Larghero J, Bianchi A, Aubertin K, Blanc-Brude O, Noël D, Velot E, Ravel C, Elie-Caille C, Sebbagh A, Boulanger C, Wilhelm C, Rahmi G, Raymond-Letron I, Cherukula K, Montier T, Martinaud C, Bach JM, Favre-Bulle O, Spadavecchia J, Jorgensen C, Menasché P, Aussel C, Chopineau J, Mosser M, Ullah M, Sailliet N, Luciani N, Mathieu N, Rautou PE, Brouard S, Boireau W, Jauliac S, Dedier M, Trouvin

胞から産生される EVs の特徴を捉える事ができる場合、それらが指標として用いられればなおよい。

EVs 以外の混入物質の評価

推奨項目

動物由来成分を含まない Xeno-free の培地を使うべきである。人工合成した血清代替物 (Knock Out Serum Replacement) 等の使用などの可能性も視野に入れ検討すべきである。

(解説)

PMDA 科学委員会報告書では以下の様に記載されており参考になる。

ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum: FBS) やサイトカインなどの添加因子を含む培養液の組成や培養温度、酸素濃度、CO₂ 濃度の管理を行うことが重要である。特に培地に添加する因子などの原材料の安全性やその最終製品での残存性などの評価が必要である。なお、動物由来成分を含む FBS などの生物由来原料を用いる場合には感染因子についてのリスクを含めた評価が求められる。またこれらの成分が精製工程において、十分な除去・低減が行われているかの評価も必要となる。

EV 調製物の製造においては、動物由来原料 (ヒトを含む) の使用を可能な限り避けることが望ましい。ヒトまたは動物由来添加物の場合は、ウイルス混入の可能性があることに加え、FBS を使用した場合、ウシ血清由来 EVs が混入し、予期しない生物活性を発現する恐れがある。一般に動物由来成分を含まない試薬やリコンビナントタンパク質の使用が推奨される。

【補足】

ウシ血清を用いる場合に具体的に危惧される物質の例としてアルブミンまたはフィブリノーゲン、フィブロネクチン、フィラミン、アポ B、マクログロブリン、ヘモグロビンやその他の血液凝固因子等があげられる。

3-2. 対象疾患および調製方法 (製造方法) ごとに重要品質特性 (CQA) として

設定される項目とその評価

安全性または対象疾患に対する有効性との関連が予想される EV 含有物質の評価

推奨項目

安全性または対象疾患に対する有効性と関連があると推定される EV 調製物の品質特性

JH, Gazeau F, Trouillas M, Peltzer J, Monsel A, Banzet S. Development of extracellular vesicle-based medicinal products: A position paper of the group "Extracellular Vesicle translation to clinical perspectives - EVOLVE France". Adv Drug Deliv Rev. 2021 Dec;179:114001.

(例えば EVs の含有タンパク質や miRNA 等) を重要品質特性(CQA) と設定して解析を実施すべきである。

(解説)

EV 調製物の安全性に関する CQA としては、病原性感染因子の混入がないことや、望ましくない免疫原性物質の混入がないことなどが挙げられるが、有効性に関する CQA として特定されている品質特性は現状では限定的である。

【具体例】

EV 調製物の安全性または有効性に関係すると推定される場合には、プロテオミクス解析もしくは ELISA などによる EVs の特定のタンパク質の含有の確認または網羅的 miRNA 解析もしくは標的特異的 PCR などによる EVs の特定の miRNA の含有の確認を、調製工程(製造工程)構築時もしくは調製(製造)時の適切な段階で行うべきである。

Lai, Lim らは、EVs 中の CD59 が皮膚疾患である乾癬において重要な CQA になると発表している¹¹。機序として、CD59 は補体である C5b9 を抑制し、そのことが最終的に好中球から産生される IL-17 を抑制する事で乾癬を改善したと述べている。

PMDA 科学委員会報告書では以下の様に記載されており参考になる。

EVs の機能分子のほとんどはタンパク質や核酸であり、その内容物が、何であるかの評価が必要である。

推奨項目

対象疾患に対する有効性への外挿性が推定される *in vitro* 力価評価系または非臨床 *in vivo* 評価系を確立すべきである。

(解説)

【具体例 1; 肝硬変に対する EVs 治療開発での一例】

(背景) EVs が肝硬変の肝障害軽減、線維化改善などの組織修復に、マクロファージを介して関与する事が知られている。また、過去の報告ではマウス実験等にて、肝臓には尾静脈注射にて投与後一日以内に肝臓以外の臓器に比し、高い集積性が確認されている。更に、実際肝臓の障害部にも高い集積性がある事を明らかにしている。

(*in vitro*) EVs 添加に対するマクロファージの反応性を PCR で評価する。評価する PCR の項目として、マクロファージの抗炎症性のマーカー、炎症性のマーカー、貪食に関連するマーカー、MMP などの線維溶解と関連するマーカーがある。

(*in vivo*) *in vitro* で一定の効果をもたらした EVs の投与を行うと、持続的四塩化炭素肝障害モデルにおいて投与していないコントロールマウスに比べて、肝障害の指標である ALT などの低下がみられたり、線維化の改善が線維化面積の低下やコラーゲン含有量の低下などの指標で得ることで、EV 調製物の肝線維化改善、肝機能改善の評価をすることが可能になる。

【具体例 2 ; PMDA 科学委員会報告書に記載されているもの】

MSC 由来 EVs は障害を受けた様々な組織の機能修復や抗炎症・線維化抑制効果が期待されており、評価項目としては、組織中の炎症性・抗炎症性メディエーター (IL-1 β 、IL-5、IL-10、IL12、ケモカイン、TGF- β 1 など)、線維化マーカー (コラーゲン 1、フィブロネクチン、 α SMA、ヒドロキシプロリンなど)、炎症性細胞の浸潤 (好中球数、好酸球数、リンパ球数など)、組織機能 (例えば、肺であれば努力肺活量 [FVC]、労作時 SpO₂、Saint George's Respiratory Questionnaire [SGRQ]総スコアなど)、臨床所見 (急性増悪発現率) を、対象疾患に応じて組み合わせて評価することが想定される。

3-3. 疾患と関連して行われることが望ましい評価

体内動態の評価

推奨項目

モデル動物において、投与された EVs のうち、投与状況に応じて一定の割合以上が標的となる細胞、組織または臓器へ届くことが証明されていることが好ましい。

(解説)

【具体例】

動態のトラッキング方法としては、PKH、NIR、DiR、放射性標識等があり、観察方法としては蛍光顕微鏡や化学発光検出機 (例えば、Odyssey、IVIS など)、および放射性同位元素イメージングなどがある。ただし、PKH、NIR、DiR などの脂質結合性の色素を用いた場合、EV 膜からの色素の解離やミセルの形成、そして、*in vivo* での半減期が長いことによる遊離色素による体内動態に関するデータの信頼性に疑問が出ていることがあるので注意が必要である¹¹。

用量の違いによる安全性・治療効果の確認・体内動態の評価

推奨項目

in vitro, *in vivo* での評価系で、EV 調製物の投与量と安全性・効果の関係は十分検証されるべきである。

(解説)

【具体例】

in vitro で投与する用量をかえる事による標的細胞への影響を確認する。更に *in vivo* では肺塞栓などの所見が現れないかの観察とともに、治療効果が異なるかを検証する。投与にあたっては EVs の定量性を示す指標に粒子数とタンパク量が頻用されるが、これらに相関関係があることが望ましい。

¹¹ Arifin DR, Witwer KW, Bulte JWM. Non-Invasive imaging of extracellular vesicles: Quo vaditis in vivo? J Extracell Vesicles. 2022 Jul;11(7):e12241. doi: 10.1002/jev2.12241. Erratum in: J Extracell Vesicles. 2022 Dec;11(12):e12284.

重要項目のまとめ

(本ガイダンスで述べられている領域を図2で示す)

現状確認項目

EVsを医師または歯科医師の指示の下に調製(製造)しこれらの所属する医療機関の患者に施用する医療行為は、国内では「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」(安確法)の対象外とされており、特定認定再生医療等委員会や認定再生医療等委員会の審査を受けることはない。したがって、薬事未承認のEV療法を提供する医師または歯科医師は、本ガイダンスに示すように、臨床投与されるEVs(EV調製物)の品質及びリスクのプロファイルに関して自ら十分に理解した上で、EVs(EV調製物)を用いることの科学的妥当性と患者への安全性の確保に努めなければならない。

推奨項目

リスクと危険因子の特定ならびにこれらの低減策の検討は、EV療法の開発早期から実施すべきである。一般に、EV調製物のリスクは薬機法の下で開発されるバイオ医薬品と大きく変わるところはない。特定のリスクに関与する可能性のある危険因子は様々な段階、例えば、最終製品としてのEV調製物の特性や組成、原料調達、調製工程(製造工程)、輸送、保管、非臨床評価、臨床評価、臨床投与方法、臨床適用現場でのEV調製物の取扱い、などに存在している可能性がある。なお、EVsは複雑で不均質・不均一であるため、認識しうる品質特性をすべて列挙したとしても、製品の有効性や安全性を阻害する危険因子に関連する重要品質特性(CQA)をすべて特定・管理することが困難なことにも留意しておく必要がある。

推奨項目

EV療法のリスクマネジメントでは、有害事象発生時の原因究明のために検体(例えば、臨床利用されたものと同じロットのEV調製物や生物由来原料)および調製(製造)・投与記録を保管することが重要になる。

推奨項目

原料・材料の段階から一貫して、工程中の無菌操作ならびに種々の成分の混入防止策を必要とする。また、製造に用いられる細胞の状態が変化しやすく、その細胞から放出されるEVsの品質・有効性・安全性も調製工程(製造工程)によって大きく影響を受けるため、工程の管理が重要である。

推奨項目

EV 調製物の品質・有効性・安全性確保のためには、再生医療等安全性確保法下の再生医療等提供基準及び医薬品医療機器等法（薬機法）下の再生医療等製品（細胞加工製品）の品質管理・製造管理基準に準じた品質管理・調製管理（製造管理）を実施すべきである。

推奨項目

(1) EVs としての形状・サイズを有する粒子が存在すること、(2) EV マーカー分子が存在することの証明の 2 つが必要である。

推奨項目

動物由来成分を含まない Xeno-Free の培地を使うべきである。人工合成した血清代替物 (Knock Out Serum Replacement) 等の使用などの可能性も検討すべきである。

推奨項目

安全性または対象疾患に対する有効性と関連があると推定される EV 調製物の品質特性（例えば EVs の含有タンパク質や miRNA 等）を重要品質特性 (CQA; Critical Quality Attribute) と設定して調製工程（製造工程）構築時もしくは調製（製造）時の適切な段階で解析を実施すべきである。

推奨項目

対象疾患に対する有効性への外挿性が推定される *in vitro* 力価評価系または非臨床 *in vivo* 評価系を確立すべきである。

推奨項目

モデル動物において、投与された EVs のうち、投与状況に応じて一定の割合以上が標的となる細胞、組織または臓器へ届くことが証明されていることが好ましい。

推奨項目

in vitro, *in vivo* での評価系で、EV 調製物の投与量と安全性・効果の関係は十分検証されるべきである。

利益相反（COI）に関する開示

日本再生医療学会では、細胞外小胞等の臨床応用に関するガイドンス策定 WG と特定企業との経済的な関係につき、以下項目について各構成員から利益相反状況の申告を得た。

A. 自己申告者自身の申告事項

1. 企業や営利を目的とした団体の役員、顧問職の有無と報酬額
2. 株の保有と、その株式から得られる利益（最近 1 年間の本株式による利益）
3. 企業や営利を目的とした団体から特許権使用料として支払われた報酬
4. 企業や営利を目的とした企業や団体より会議の出席（発表、助言など）に対し、研究者を拘束した時間・労力に対して支払われた日当・講演料などの報酬
5. 企業や営利を目的とした団体がパンフレットなどの執筆に対して支払った原稿料
6. 企業や営利を目的とした団体が契約に基づいて提供する研究費
7. 非営利法人や公益法人からの受託研究費や研究助成費
8. 企業や営利を目的とした団体が提供する奨学（奨励）寄付金
9. 企業などが提供する寄付講座
10. その他の報酬（研究とは直接無関係な、旅行、贈答品など

B. 申告者の配偶者、一親等の親族、または収入・財産を共有する者の申告事項

上記 A の 1～10 までの 10 項目事項

対象期間は、2023 年 1 月～2023 年 12 月とし、利益相反の扱いに関しては、本会再生医療研究の利益相反（COI）に関する細則（2020 年 12 月 14 日改訂版）に従った。

各委員は、本ガイドンスの内容と作成法について、医療・医学の専門家として科学的・医学的な公正さと透明性を担保しつつ、適正な診断と治療の補助ならびに患者の quality of life の向上を第一義として作業を行った。

すべての申告事項に該当がない構成員については、表末尾に記載した。

役割	氏名	開示項目 A	開示項目 B
座長	寺井崇二	4. あすか製薬、アッヴィ合同会社、カイ オムバイオサイエンス、武田薬品工業 6. クオリプス 7. 大塚製薬 ※1, 2, 3, 5, 8, 9, 10 該当なし	該当なし
メンバー	紀ノ岡正博	1. Cell Exosome Therapeutics、Gaudi Clinical 6. Gaudi Clinical、澁谷工業、岩谷産業、 Cell Exosome Therapeutics、藤森工業、日 立製作所、日産化学、東ソー、積水化学工 業、SCREEN ホールディングス、三菱重工 業 8. 藤森工業 ※2, 3, 4, 5, 7, 9, 10 該当なし	該当なし
メンバー	高橋有己	6. 日産化学 ※1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 該当なし	該当なし
メンバー	飛田護邦	1. 護國、Gaudi Clinical、Cell Exosome Therapeutics 2. Gaudi Clinical 6. Gaudi Clinical、シスメックス ※3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 該当なし	該当なし
メンバー	星野歩子	4. トヨタコンポン研究所 6. 旭化成メディカル、協和キリン、トヨ タコンポン研究所 ※1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10 該当 なし	該当なし
書記	土屋淳紀	6. 塩野義製薬 ※1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 該当なし	該当なし

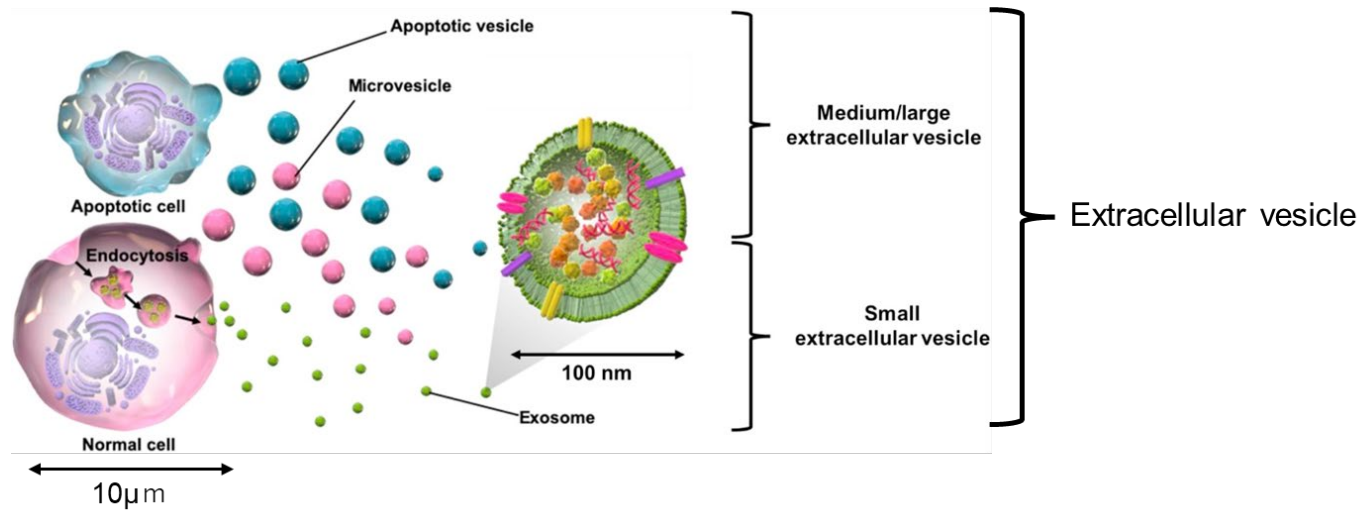
次の構成員については申告事項なし

委員：阿曾沼元博、落谷孝広、佐藤陽治

オブザーバー：岡田 潔

(図 1)

細胞外小胞とは何か



Tsuchiya A, Terai S, Kino-Oka M et al. Regen Ther. 2022 May 19;21:19-24.を改変

細胞外小胞（EVs: Extracellular Vesicles）とは、細胞が分泌する物質で、組織の再生を促す成長因子や細胞間の情報伝達物質を含んだエクソソーム(Exosome)などからなるもの。細胞外小胞は細胞間コミュニケーションに重要な役割を担っており、様々な疾患への応用が期待されている。

(図 2)

リスクの特定並びに品質管理・調製（製造）管理を原材料の調達から一貫して行う

