

事 務 連 絡  
令和 5 年 1 月 1 7 日

各都道府県衛生主管部（局）薬務主管課 御中

厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課

「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」の送付について

今般、独立行政法人医薬品医療機器総合機構に設置されている科学委員会において、別添「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」が取りまとめられましたので、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の開発に際し、参考とするよう、貴管下関係事業者に対し、周知願います。

なお、本事務連絡の写しを別記の関係団体並びに独立行政法人医薬品医療機器総合機構宛てに送付しますこと、念のため申し添えます。

## 別記

日本製薬団体連合会

日本製薬工業協会

米国研究製薬工業協会

一般社団法人 欧州製薬団体連合会

## 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

## 目次

1. Introduction.....	2
1.1 細胞外小胞 (EV) とは.....	2
1.2 EV の構成分子.....	2
1.3 EV を用いた治療用製剤の開発.....	3
1.4 開発における問題点.....	4
2. 製法開発と品質特性解析.....	6
2.1 セルバンクの構築とその特性解析.....	6
2.2 EV 製剤の製造方法.....	9
2.3 EV 特有の品質特性解析.....	11
2.4 EV に混入するウイルス等の感染因子に対する安全性評価 — 製法工程を俯瞰した対策.....	14
3. 非臨床試験.....	17
3.1 薬物動態.....	17
3.2 薬理試験.....	20
3.3 非臨床安全性試験.....	20
4. 臨床開発.....	24
4.1 PK/PD や有効性の評価.....	24
4.2 アレルギーや拒絶反応などの好ましくない免疫反応.....	25
4.3 ヒト初回投与試験の試験計画.....	26

## 1. Introduction

### 1.1 細胞外小胞 (EV) とは

細胞は脂質二重膜を有する小胞にタンパク質や核酸などの機能分子を内包し、分泌している(1)。生体において、分泌された小胞は体液を通じて周囲の細胞や遠隔地の細胞へと運ばれ、受容した細胞に機能分子を受け渡している。細胞外小胞は生体が有する機能性分子のデリバリーシステムの一員であり、細胞間コミュニケーションツールとして様々な生命現象および疾患に関与することが明らかになってきている(2)。また、コミュニケーションツールとしての用途以外にも、細胞内の不要物質の排出用途としても利用されていることが報告されている(3)。このような細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) は、その産生経路もしくはサイズによって、エンドソームに由来する約 100 nm の小胞エクソソーム (Exosome)、細胞膜に由来するマイクロサイズの小胞マイクロベシクル (Microvesicle)、死細胞の膜に由来するアポトーシス小体/小胞 (Apoptotic body) の 3 種類に分別できる。しかし、これら細胞外小胞の定義が曖昧であることや産生経路に関してはライブイメージング技術による放出の瞬間を捉えない限りは特定することが困難であるため、そして、名称についても実際は統一がなされていなかったため、しばしば混乱を招いていた。そのような状況下で、2011 年に国際細胞外小胞学会 (International Society for Extracellular Vesicles: ISEV) が設立され、ISEV は細胞外小胞の定義や名称の整備、そして研究に関するガイドラインなどの制定を行なっている。ISEV から上記で述べた細胞外小胞をまとめて“Extracellular Vesicles (EVs)” という名称の使用を推奨されている(4)。さらに 2018 年には ISEV が発行している学会誌 *Journal of Extracellular Vesicle* においてガイドラインとなる *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018)* が発表され、その中で EV のサイズや密度によって *medium/large EV (m/LEV)* と *small EV (sEV)* と分けて呼ぶことが推奨された(1)。sEV は 200 nm 以下であるとされているため、エクソソームは sEV となる。しかし、必ずしもサイズや密度が単一の小胞を扱えるわけではなく、さらに、それらサイズの正確な測定は難しいため、本報告書では細胞外小胞を一括りにして EV という名称を使用する。ただし、現在(2022 年 9 月 1 日)、ISEV では MISEV2018 の改訂版である MISEV2022 の発行準備中であり、上記事項について、変更もありうる。

### 1.2 EV の構成分子

EV は分子の複合体であり、その構成因子は様々なタンパク質をはじめ、microRNA (miRNA) や mRNA などの核酸も含まれている。細胞は EV にこれら分子を内包して、他の細胞へと機能性分子を受け渡し、受け取った細胞はそれに呼応するように表現型(フェノタイプ)の変化などが見られる。EV がもたらす作用は様々であり、分泌される EV は細胞種や同じ細胞であっても周囲の環境などによって構成分子が異なっている(5)。また、EV は EV マーカーと呼ばれる分子を有しており、それらの存在を確認することが EV であることの証明や EV の品質評価に使われるケースもあるが、全ての EV に必ず存在するとは限らない(6)。以上のように、EV は分子の複合体であるため、1

つ1つの EV が同じ構成要素を持っているとは限らない。さらに EV のサブタイプによっても構成分子群は異なることも報告されているため(7)、EV と一括りにしても分子群は多様性を持ち、特定の分子で EV の性質を規定することは、現状では困難である。したがって、EV とは特定の分子を指す言葉ではなく、細胞由来で数十 nm~数  $\mu$  m サイズの脂質膜に多様な分子を含む複合体のことである。

### 1.3 EV を用いた治療用製剤の開発

ここで述べる EV を用いた治療用製剤とは、細胞に由来する EV を体内に投与することを想定した製剤であり、それらは大きく 2 種類に分けられる。一つは、EV そのものが治療効果を有していることを利用した製剤であり、細胞培養上清等からの回収後に、修飾を施さずに用いるものである(天然型 EV)。もう一つは、特定の細胞株培養上清液や体液もしくは果汁液などから EV 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、EV の供給元である細胞を遺伝子改変したりすることで、特定の機能を EV 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ものである(改変型 EV)。以下、これら 2 種類の様式ごとに、その特徴と実用化研究の例を記述する。

#### 1.3.1 天然型 EV の特徴と治療用製剤としての例

EV は細胞、組織・臓器に対して様々な作用をもたらす。それら作用の中でも抗炎症作用や免疫制御作用、組織修復作用などは特定の疾患に対する治療薬として活用できることが期待されている。特に、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell, MSC)由来の EV に注目が集まっている。MSC は様々な形で傷害を受けた組織の修復をサポートする能力を持つことが知られており、現在、再生医療における細胞ソースになると期待されている(8)。近年の研究成果から、MSC が持つ治療効果は細胞自身が組織の細胞へ分化して修復する場合もあるが、MSC の分泌物(Secretome)による効果が高いと考えられている。分泌物には様々な EV も含まれており、実際、MSC の EV を用いた治療効果も多く報告されている(9, 10)。近年ではヒトに対する治療効果も確認されており、オーストリアとドイツのグループは人工内耳装着による副反応の炎症を抑える目的として内耳に臍帯由来 MSC の EV を添加する臨床試験を行った(11)。その結果、音声知覚の改善が認められた。また、難聴を引き起こす音響性外傷に関しても、マウスを用いた実験ではあるが、内耳に臍帯由来 MSC の EV を添加(投与)することで、難聴が改善され、騒音による外傷から有毛細胞が保護されることが明らかになっており、臍帯由来 MSC の EV の治療効果が実証されている(12)。

また、EV が免疫制御に関わることは、初期の EV 研究で明らかになっており、B 細胞や樹状細胞(dendritic cell: DC)由来 EV が抗原提示や CD4 陽性 T 細胞の活性化に関与することが報告されている(13-15)。これらの報告から、EV を用いて免疫を活性化させ、ワクチンとして免疫療法に用いることや予防的に使用する方法が提案されており、2002 年に phase I 試験がメラノーマに対してフランスで(16)、非小細胞肺癌(NSCLC)の患者に対して米国で臨床試験が行われた(17)。試験内容は患者由来の単球から樹状細胞を分化させ、がんペプチドで抗原提示させた後に回収した EV を皮下などに投与するものであった。さらに、進行した NSCLC に対して、interferon- $\gamma$  を

表面に有する樹状細胞由来の EV についての phase II の試験がフランスで 2012-2014 年に行われた(18)。期待していたほど治療成果は得られなかったようだが、一部の患者でナチュラルキラー細胞を活性化する傾向が見られ、無増悪生存期間の延長が見られている。現在、他のグループによる臨床試験も行われており、実用化に向けて開発が進んでいる。

### 1.3.2 改変型 EV の特徴と治療用製剤の例

改変型 EV とは天然型 EV に対して、供給元の細胞へ遺伝子導入したりすることで EV 内包物を変化させた EV や、細胞から分泌後の EV に対して、その表面にペプチド や抗体を付加させたもの、または物理的な力を加えるなどして、特定の医薬品を EV に内包させたものを指す(19, 20)。改変型 EV の用途に関しては DDS への利用目的が主であり、その理由として、EV が遠隔臓器や特定の組織・細胞に機能分子を送達する能力を有しているためである。主にエクソソームなどのナノサイズの EV については、ウイルス性のキャリアと比較して免疫原性、変異原性が低く、生体適合性を有し、さらに EV に内包された核酸は血中の核酸分解酵素などにも抵抗性があることが報告されており、安定な DDS キャリアとしての可能性に期待が高まっている。また、EV は送達指向性を有している可能性が示唆されており、低毒性や安定性に加えて特異性の高いデリバリーシステムの構築が期待される(21)。上記の特徴を有した EV に治療薬を内封、または目的に合った機能を付加した改変型 EV の作製および治療効果の検証がなされている。2011 年にイギリス・オックスフォード大学から EV の DDS キャリアとしての可能性を示唆する報告があった。この報告では樹状細胞に狂犬病ウイルス特異的糖タンパク質由来ペプチド(RVG ペプチド)を発現させた後に EV を回収し、エレクトロポレーション法を用いて、siRNA を搭載させている(22)。すなわち、RVG ペプチドによって神経細胞への送達特異性を持たせ、医薬品として siRNA を封入した DDS 製剤としている。この報告を皮切りに EV を DDS に応用する研究報告が増えてきている。日本からも 2013 年に東京医科大学から EGFR を発現している腫瘍を標的として、EGFR の人工リガンドである GE11 ペプチドを膜上に搭載した EV を作製した報告がある(23)。さらに、let-7a というがん抑制 miRNA を細胞に導入し、let-7a を多く含む EV を回収して、治療への応用を試みた報告があり、遺伝子改変による改変型 EV を DDS へと応用している。これらは一例ではあるが、現在、細胞への遺伝子導入によって改変型 EV(DDS 製剤)を分泌させて、それらを回収、もしくは、EV 精製後に特定の分子を付加したり、医薬品を搭載させたりして DDS 製剤を得る方法が取られている(これら二つを組み合わせる場合もある)。しかし、現在までに実用化は成されておらず、実用化に向けた問題点が挙げられている。

## 1.4 開発における問題点

EV 治療製剤の可能性については、多くの論文や臨床試験からの報告があるが、実際に製品(治療薬)の製造を行うとなると、レギュラトリーサイエンスに基づく知見は乏しく、様々な課題が散見されている。以下に、問題点およびチェック項目を列挙する。

### 1.4.1 原料の選択

EV は細胞に由来する生物活性物質であるが、特定の物質ではなく、由来する細胞や細胞の状態によって内包物が異なる。したがって、EV 治療製剤において、製剤の品質管理の面や目的とする活性を有する EV を得るためには、EV の原料となる細胞の品質管理が重要となる。また、細胞の培養法の確立や培地の品質管理も必要となる。さらに遺伝子改変細胞を使う際の規定をどのように行うのか決定する必要があるだろう。また、EV の原料としては培養細胞のみならず、例えば、体液や牛乳由来の EV、さらには果汁などから得られた小胞を DDS に用いる研究があり(21)、培養などを介さないケースにどのように対応すべきか検討が必要となる。ただし、本報告書では、主な対象をヒト細胞由来 EV とする。

#### 1.4.2 安全性

安全性については 2 通りの安全面での問題点がある。1 つは、EV そのものの安全性である。2 つ目はマイコプラズマやウイルス、エンドトキシン、培地成分などのコンタミネーションに関することである。1 つ目に関しては、EV は様々な生理現象および疾患に関与しており、治療効果を示すような良い効果を示す EV だけではない。例えば、がん細胞に由来する EV は、がんの悪性を引き起こすことも知られており(24)、思わぬ副反応が見られる場合もあるため、開発、製造にあたっては十分に配慮が必要である。2 つ目に関しては、2 章にも関わることであるが、EV 以外の成分による副反応などが挙げられる。マイコプラズマやウイルス、エンドトキシン、培地成分などに関しては、品質管理でかなり防げる部分があるので、適切な管理手法の構築が重要である。

#### 1.4.3 EV 精製法

EV 精製法については、現段階でベストな方法は存在せず多くの方法があることが問題となっている。論文などでは、超遠心法などを使って検討していることが多いが実用化の際には、多サンプル、多量処理ができないため、そのまま超遠心法を持ち込むことは難しいと考えられる。また、精製方法によっては EV 以外の不純物の混入が多いため、どのような方法で精製するかを検討する際に、副反応を減らすためにも、EV の精製度による評価を行うことが重要である。さらに EV のサイズによる活性成分の違いや特定のサイズ以外の EV は有効成分を含まない場合、それは不純物として捉えることもできるため、サイズの確認も重要になりうる。その上で活性成分を含む EV のみを精製する方法などであれば、なお良いと言える。

#### 1.4.4 有効成分の規定方法および投与量の規定方法

EV は分子の複合体であるため、全ての分子が有効成分とは限らない。そのため、製剤の組成成分のリスト化が望ましいが、多様性があるため、全ての組成成分を毎回のロットごとにリスト化するのは現実的ではないと思われる。したがって、製剤化する際には有効成分ないし、作用機序 (Mode of Action) が明らかになっていることが望ましく、それら有効成分量は最低限明確にすることがさらに望ましい。そのためには、それら有効性に関する *in vitro* 評価系を確立し用いることが有用である。しかし、作用機序の解明が困難な場合もあり、そのような場合には、複数の *in vitro* 評価系を活用して多面的な評価を行うか、必要に応じて *in vivo* の評価系を用いて、有効性の担保を行う必要がある。さらに体内に投与する際は、どのような単位で投与するかを明確にすべきである。例えば、EV タンパク質量なのか、EV 粒子数なのか、または有効成分量とするのかなどが考え

られる。その際、どのような試薬や機器を用いてタンパク質濃度および粒子数の測定を行なったか、条件等を明らかにし、測定条件を固定する必要がある。

## 2. 製法開発と品質特性解析

### 2.1 セルバンクの構築とその特性解析

EV 製剤の品質確保のためには、適切な製造用細胞の単離または細胞株の樹立とその管理が必要であり、製品品質に影響する各種の特性が生産培養の期間を通じて適切な範囲で維持されることが重要である。表 1 に示すとおり、EV 製剤の製造には、ヒト自己由来細胞、間葉系幹細胞等のヒト同種由来細胞、iPS 細胞/ES 細胞由来細胞、株化細胞等が用いられる。これらのうち、自己由来細胞を用いる場合を除き、ICH Q5D ガイドライン(25)等を参照し、セルバンクを構築して、その適格性を評価した上で、製造に用いる必要がある。

表 1

細胞ソース		製造用セルバンクの構築	シングルクローンからのセルバンク構築	細胞の均質性*
初代細胞	自己	×(不可能～不要)	×(不可能)	×
	同種	○	△(困難)	△
iPS/ES 細胞由来細胞		○	○	○
株化細胞		○	○	○

\*医薬品製造で既に汎用されている株化細胞を基準にして相対評価した場合

表 1 の他、特定の遺伝子の導入等により作製した遺伝子改変細胞が用いられる場合がある。以下に、細胞ソースごとの特徴と製造用細胞株の樹立に際しての留意事項、セルバンクの構築と評価・管理において推奨される事項を示す。これらについては、バイオ医薬品や再生医療等製品でのセルバンクの構築と管理の手法が参考になる。

#### 細胞ソースごとの特徴と製造用細胞株の樹立に際しての留意事項

生産培養期間を通じた細胞特性の恒常性を確保するため、可能な場合は、クローン化された細胞から均質な細胞集団を得て、製造用細胞株を樹立する。均質な細胞集団を得ることが困難な場合は、不均質な細胞集団の中で、有効成分となる EV を産生する細胞を可能な範囲で明らかにしておくことが望ましいが、そのための方法はまだ十分には確立されていない。セルバンク構築に用いる細胞の単離や細胞株樹立の過程については、その履歴を明確に記録しておく必要がある。

ヒト同種細胞：

均質な細胞集団を得ることが難しく、複数の細胞が含まれる可能性がある。ドナーごとにセルバンクを構築することから、ウイルス安全性が課題となる。また、セルバンクを更新する際には、その前後における最終産物としての EV の品質の同等性の確保が課題となる。

#### iPS/ES 細胞由来細胞:

クローン化された細胞から製造用の細胞株を樹立することができるが、表現型が安定であるとは限らないため、樹立された細胞株およびこれに由来するセルバンクは必ずしも均質な細胞集団でない。細胞由来の DNA や、セルバンク中の不純物として存在する造腫瘍性細胞に由来する EV が EV 製品に混入することによる造腫瘍性のリスクを考慮する必要があるかもしれない。

#### 株化細胞:

大量生産が可能であり、製法開発はバイオ医薬品で確立された手法が参考になる。クローン化された細胞から製造用細胞株を樹立することができるため、均質な細胞集団を用いてセルバンクを構築することが期待できる。ただし、細胞株を新たに樹立した際は、継代を長期に亘って繰り返した際の表現型の安定性に関する情報がないことに注意する。細胞由来の DNA や、セルバンク中の不純物として混入した造腫瘍性細胞に由来する EV が EV 製品に混入することによる造腫瘍性のリスクを考慮する必要があるかもしれない。

遺伝子改変細胞の場合は、上記の留意事項に加え、ICH ガイドライン Q5B(26)等を参照して、遺伝子発現構成体の解析やセルバンクの管理を行う。

#### セルバンクの構築

ヒト同種細胞を用いる場合は、適格性が確認されたドナーから採取された原料から調製された細胞を用い、ドナーセルバンク(DCB)を構築する。iPS/ES 細胞由来細胞、株化細胞、遺伝子改変細胞の場合は、樹立された細胞からマスターセルバンク(MCB)を構築し、その一部からワーキングセルバンク(WCB)を構築する。通常の製造は WCB を用いて行い、WCB の補充が必要な場合は、MCB から再度細胞を調製し、WCB を更新する。

構築したセルバンクについては、表 2 に示すように、特性解析試験、純度試験、保存安定性試験を行い、その適格性を評価する。遺伝子改変細胞を用いる場合は、これらに加えて、遺伝子発現構成体の評価が必要である。また、生産培養期間を通じた安定性を評価するため、EV 製造のための *in vitro* 細胞齢上限の細胞 (Limit for *in vitro* cell age: LIVCA) についても、同様の試験を行う。

表 2

	特性解析試験	純度試験	保存安定性試験	遺伝子発現構成体*
DCB	○	○	△	—

MCB	○	○	○	○
WCB	—	—	○	—
LIVCA	○	○	—	○

\*遺伝子改変細胞の場合

#### セルバンクの特性解析試験

特性解析試験では、細胞の特性、及び、産生される EV の特性の評価を行う。細胞の特性に関しては、意図した細胞であることを確認するため、遺伝子型や、アイソザイム分析、細胞表面マーカー分子の発現等の表現型の解析を行う。産生される EV の特性に関しては、本稿の「EV 特有の品質特性解析」を参考に、その変動が有効性・安全性に影響を及ぼす可能性のある品質特性(すなわち重要品質特性)の中から生産用細胞の評価に適した項目の解析を行い、意図した特性を持つ EV が産生されることを確認する。改変型 EV の場合には、改変により意図した分子が EV に含まれることを確認する。

脚注:間葉系幹細胞については、由来する組織によって細胞の特性が異なることが知られていることから、適切な細胞表面マーカーの確認を含め、必要な特性解析を実施する、

#### セルバンクの純度試験(ウイルス等の混入汚染物質の評価)

EV 製剤は粒子径や荷電等の物理的・化学的特性がウイルスに類似していることから、精製工程でのウイルス除去・不活化が難しいと想定される。そのため、製造に用いる細胞については、ICH Q5A ガイドラインや再生医療等製品の品質・安全性に関する厚生労働省の諸指針等を参照し、ウイルス安全性に関する解析を十分に行う必要がある(27)。レトロウイルス試験、in vitro 試験等を行い、明らかなハザードとして知られている種類の内在性ウイルスあるいはそのようなウイルス様粒子が検出された細胞は、EV 製剤の製造に使うべきではない。真菌やマイコプラズマ等の細菌による汚染がないことも確認が必要である。

(製造工程での外来性ウイルス等の混入防止、および、精製工程での除去・不活化の対応については、本稿 2.4 を参照)

#### 遺伝子発現構成体の解析

遺伝子改変細胞を用いる場合は、遺伝子発現構成体に関する解析が必要である。ICH Q5B ガイドライン等を参照し、遺伝子導入に用いるベクターの塩基配列を明らかにするとともに、樹立された細胞に導入されている目的遺伝子の全塩基配列、導入遺伝子コピー数の解析を行う。導入された目的遺伝子中に挿入や欠損がないことを確認しておく。

#### in vitro 細胞齢の上限 (LIVCA) の解析

MCB、WCB、あるいはDCBの解析に加え、EV製造のための最長(またはそれ以上)の培養期間で到達する *in vitro* 細胞齢の細胞に関し、特性解析のうち、産生されるEVの特性を中心に、主要な項目に関する解析を行い、生産培養期間を通じて、求められる細胞特性が維持されていることを確認する。遺伝子改変細胞を用いる場合は、導入遺伝子の配列やコピー数等についても確認が必要である。内在性および外来性ウイルスに関する試験も行う。

#### セルバンクの保存安定性試験

セルバンクは凍結して保存されるため、定期的に安定性の確認が必要である。保存安定性試験における評価項目は、セルバンク構築の際に実施した特性解析試験の内容に準じる。

#### セルバンクの更新

MCBやWCBは製品ライフサイクルを通じて恒久的に保存されるが、製造に使用する本数によっては更新が必要になる。更新が想定される場合は、更新方法と更新時の基準を予め定めておく。DCBは反復的に新たなドナーから作製されるため、予め定められたDCBの作製方法に従って作製し、基準への適合性を確認する。いずれの場合も、更新時の基準は、セルバンク構築の際に実施した特性解析試験や純度試験の結果をもとに設定する。セルバンク更新に際して、ウイルス安全性の評価は必須である。

## 2.2 EV製剤の製造方法

EV製剤の製造における細胞培養方法は、2.1で記載されているような細胞ソースを用いることを基本とし、培養条件によっても分泌されるEVの構成因子が変化するため、恒常性のある培養方法とウイルスなどの外部環境からの因子の混入を防ぐことが重要である。そのような条件下で細胞から分泌されたEVそのものが目的とした薬理作用の本体であることがEV治療薬の前提にある。すなわち、EVの精製過程を経ずに培養上清そのものを製剤とした場合、EV以外、例えば、EVに由来しないサイトカインなどが薬理活性の本体である可能性もあるが、そのような場合はEV製剤には該当しない。したがって、可能な限り、EVのみを精製することが望ましいが、現状の技術ではEVとそれ以外の物質を完全に分離することは困難である(28)。この点を踏まえて、培養から有効成分とするEVを精製・回収し、製剤化する工程における留意事項を下記に示す。

### 2.2.1 培養方法

EVを治療用製剤として使用する場合、用いる細胞の状態やその培養条件によって製造されるEVの品質特性が影響をうけることが想定される。このために細胞の十分な特性解析や恒常性のあるEVを製造するための製造工程の確立、及び製造における工程管理が非常に重要となる。さらに、その上で、EV特有の注意事項を以下に記載する。

EVの特性上、細胞は培地成分や培養条件およびこれらによって変化する細胞自身の状態を反映してEVを分泌するため(5)、対象とするEVに求められる品質特性を管理するための工程管理も重要である。例えば、EVの一種としてアポトーシス小胞が知られているが、アポトーシス小胞

は死細胞から分泌され、他の EV、エクソソームやマイクロベシクルとは異なる機能・役割を持つとされているため(2)、EV 製剤では不純物となる可能性がある。したがって、培養における死細胞率などは、モニターすることが有用な可能性がある。また、上述の通り、細胞の状態やその特性に応じて EV の構成分子が異なることが想定され、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、CO<sub>2</sub> 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。さらに細胞密度も EV の分泌量および構成分子に関わってくるため、製造スケールアップなどでは、変更前後の同等性・同質性の評価を行うことが重要となる。したがって、培養から EV 精製までの間に、いくつかチェックポイントを設けることを推奨する。つまり、細胞を播種した後の細胞の状態(形態や死細胞率、生存率)、EV 精製する前に培養液中にどの程度 EV が存在するか、またそのうち有効成分がどの程度含まれるかなど、一定の基準を満たしているかを、精製前に確認すると良い。また、外部環境からの不純物の混入、特にウイルスなどの感染因子に関する留意事項の詳細は 2.4 に記載している。

### 2.2.2 EV 精製法

EV の精製方法は、多様な方法が提唱されているが、開発初期での Pilot スケールでの精製工程から承認後の商用製造を考慮した開発を行う必要がある。また開発初期では有効成分の特性が十分に理解されていない可能性があり、精製法も確立されていない場合もあるが、非臨床試験に用いるロットを製造するまでには精製法を確立しておくことが望ましい。すなわち EV としての有効成分を十分に単離できない場合であってもその生物活性(有効性)に必要な成分(活性成分 active-ingredient)を明らかにし、活性成分を含む EV の精製法を確立していくことが求められる。さらに、目的外の EV や培養液成分の混入を低減できるような精製工程を確立する必要がある。また、市販製剤は多数の患者に投与されることが想定され、商用製剤に適用できるようなスケールでの製造が必要となり、培養スケールの拡大に応じてスケールアップが可能なカラムクロマトグラフィーなどを用いることが望ましい。例えば、分子サイズでふるいをかけるサイズ排除クロマトグラフィー法や電荷などの物理化学的な性質によって分離する陰イオン交換クロマトグラフィー法を用いることで、EV の精製、分離実績が既に報告されている(29, 30)。ただし、カラムクロマトグラフィーに限定する必要はなく、目的とした生物活性を有する EV の特性に合わせて精製法を選択する。以下にそれぞれの特性を利用した精製法の例と留意事項を記載する。また、いずれの精製法においても、培養工程終了時に回収したバルクハーベストに対して必要に応じて限外濃縮などの適用を考慮すること。さらに、いずれの精製過程においても、工程由来不純物(培養工程由来や精製工程で用いるリガンドやカラム担体など)や目的外の関連物質の除去などの指標を定めた製法を確立する必要があり、場合によっては、精製前後を比較し、不純物をどの程度除去できたかを指標にすることも考えられる。

研究段階やラボベースでは、超遠心法による精製が行われることが多いが、上記のような商用製剤に適用できるようなスケールでの製造が難しく、前処理としてバルクハーベットの濃縮が必須である。また超遠心同様に研究段階やラボベースでは市販されている EV 精製試薬として、PEG などのポリマーを用いて低速遠心で EV を沈殿、濃縮する方法があるが、これらは試薬の残留が懸念される。したがって、精製後の不純物残量を確認する方法の確立が必須である。

有効成分もしくは活性成分が明らかになっており、さらにそれら物質が EV 膜上のタンパク質などの場合、それらを指標に精製する方法として抗体などを用いたアフィニティ精製が有用である。また、EV マーカーと言われる CD63 や CD9 に対するアフィニティ精製も考えられるが、1.2 項に述べたように必ずしもこれらマーカーは全ての EV に存在するわけではなく(6)、EV 内包分子の多様性(ヘテロジェナイティ)の観点からも、精製してきた CD63 ないし CD9 陽性 EV が目的の生物活性を有するか検討する必要がある。また、抗体などから EV を外し、精製するために用いるバッファー試薬等の不純物の混入による安全性も確認し、必要であれば、さらに別の方法で溶媒を置換する。

目的の生物活性を有する EV が、そのサイズにより規定される場合、例えば sEV とと言われる 200 nm 以下の微粒子が目的の生物活性を強く有する場合や、逆に 200 nm 以上の大きな粒子(m/IEV)が活性を有する場合などは、サイズによる精製も有用である。例えば、サイズ排除クロマトグラフィーや限外ろ過膜を利用したフィルトレーションによる分離などが該当する。ただし、これらの方法はタンパク質の凝集体などがサイズの同じ大きさとなる場合、不純物としての残留も多くなりうるため、不純物の残留量の確認方法の確立が必要である。

## 2.3 EV 特有の品質特性解析

EV 製剤は細胞を由来として製造されるバイオ医薬品の一種と考えられるため、その品質特性解析においては、「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)の規格及び試験方法の設定」(ICH Q6B)に記載される留意事項が参考になる。

これに加え、EV 特有の性質に留意した品質特性解析が必要である。目的とする生物活性や活性成分を有する EV を可能な限り純化ないしは一定程度の精製を行う製法開発を十分検討した上で(2.2 参照)、その精製方法により得られた EV の性状を EV 特有の特性解析により明らかにする(2.3.1 参照)。一方、EV の分離・精製法はまだ十分に確立していないため、精製後も残存する目的 EV 以外の成分の混入に十分注意する必要がある。また、製造工程や保存期間中における EV の安定性(分解物や変化物生成の可能性)にも留意すべきである。想定される不純物や分解物等については、定性的・定量的検出、混入許容限度の設定、および安全性評価が求められる(2.3.2 参照)。

### 2.3.1 EV 特有の特性解析

EV 特有の特性解析としては、EV 組成、物理的・化学的性質、生物活性に関する解析が挙げられる。EV は不均一な粒子集団から構成されるため、粒子全体の平均特性値の評価に加え、粒子ごとの特性値の分布やバラツキを評価することがより重要と考えられる。単一粒子レベルの解像度

で EV の不均一性を評価しようとする手法は、EV 製剤の品質特性を理解する上で有用と考えられるため、そのような解析法を試験項目に組み込むことが望ましい。なお、EV 研究分野においては、新しい精製・分析技術の開発や既存技術の改良が日々進められているため、適時取り入れるべきである。

#### 2.3.1.1 組成解析

分子組成、EV マーカー分子の陽性率、表面分子プロファイルなどに関する解析が挙げられる。EV の表面や内部に存在するタンパク質、脂質、糖鎖、RNA、代謝物などの EV 関連分子の有無や定量的解析を行う。また、目的とする活性成分が特定できている場合や、改変型 EV を使用する場合は、目的成分や改変により導入された分子の定性定量解析が必要である。EV 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。他には、ガングリオシド GM1 がエンドソーム由来 EV のマーカーとして用いられた例や、主要組織適合性複合体 (Major histocompatibility complex: MHC) クラス II が DC 由来 EV の投与量基準に用いられた例がある。いずれにしても、現時点ではコンセンサスの取れた EV マーカー分子が存在しないことに留意し、目的に合う EV マーカー分子を複数組み合わせる解析することが重要である。実際、ISEV ガイドライン(31)では、EV 画分に特異的とされるタンパク質もしくは他の EV 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。また、MISEV 2018 では、EV は製造・保存過程で分解・変化する可能性があることを考慮し、粒子のトポロジーの評価、つまり EV の構成分子が粒子内部に存在するか、粒子表面に存在するかを確認することの必要性も追記されている(1)。一方、EV とは関係のない成分(もしくは関連性が低いと考えられる成分)が不純物として EV 製剤に混入する可能性がある。一例として、ミトコンドリアやゴルジ体などの細胞内オルガネラ関連因子や、血清タンパク質などの培養液由来成分、ウイルス粒子やその断片などが挙げられる。混入が想定される不純物については、それらの検出法や定量法についても検討することが必要である。EV の組成解析には、主にウェスタンブロッティング法や質量分析法といったバルク解析手法が汎用される。一方、フローサイトメトリー法は、単一粒子レベルで様々な分子組成解析が可能になると期待され、近年精力的に開発が進められている。

#### 2.3.1.2 物理的・化学的性質に関する解析

粒子径、粒子数、表面電位の解析などが挙げられる。電子顕微鏡、原子間力顕微鏡などを用いる高解像度イメージングは、直接観察により粒子径を測定できるが、統計学的に十分な数のデータの取得が実質的に困難である。動的光散乱法 (DLS) はサブミクロン領域の微小粒子の粒径分布の評価に広く用いられる確立された手法であるが、多分散粒子では測定精度が劣化する場合があることに注意する必要がある。単一粒子分析法は、不均一な微小粒子の粒子径および粒子数の解析に好適と考えられており、ナノ粒子追跡解析 (NTA)、抵抗性パルスセンシング法、蛍光相関分光法 (FCS) などが使用されることが多い。粒径分布の測定値は、測定方法(原理)、装置(機種)によって差異が生じやすいことに留意する必要がある。ゼータ電位については、光散乱法と電気泳動法を組み合わせた電気泳動光散乱法 (ELS) が多く用いられているが、近年、NTA や抵抗性

パルスセンシング法を改良した単一粒子レベルのゼータ電位の解析装置が開発されている。いずれの解析においても粒子は凝集せず、1つ1つが分散された状態にあることが求められる。

#### 2.3.1.3 生物活性および関連分子の評価

EVの生物学的性質は、力価試験(Potency assay)により明らかにする(32)。一般に力価試験には、医薬品の臨床的作用機序を反映した試験法が用いられる。しかしEVはその特性上、作用機序を十分に明らかにすることが困難な場合も多い。したがって、できるかぎりEVの作用機序の検討を行った上で、EVの薬理作用に基づく複数の試験を設定し、多面的に生物活性的特性を明らかにすることが望ましい。力価試験は、*in vitro*での生化学試験に加え、細胞、組織、動物個体などを用いて行われる。例えば*in vitro*試験では、EV活性成分(miRNA、mRNA、タンパク質など)の定量測定、酵素活性測定などが挙げられる。また、細胞試験では、細胞増殖、遊走、毒性、免疫細胞の活性/抑制、遺伝子発現調節、シグナル伝達などを対象とした細胞活性評価が挙げられる。得られた活性値については、目的に応じて粒子数やタンパク質量で標準化し、比活性として評価することが考えられる。EVの生物活性的評価は、EV特性を明らかにするだけでなく、EVの品質管理、恒常性担保においても重要である。

#### 2.3.2 EV製剤における不純物

EV製剤は、目的とする活性成分を有するEV(目的EV、すなわち有効成分)だけでなく、活性成分を持たないEV(目的外EV)や製造・保存過程で変化・分解したEV(EV変化体)などといったEV関連物質を含むことが予想される。クロマトグラフィー、もしくは表面分子や表面電荷などに着目した精製工程を検討することにより、目的外EVや変化体をできるだけ除くことが望ましい。また、EV製剤製造における培養工程や精製濃縮工程、製剤化工程などにおいて、細胞基材や細胞培養液、精製濃縮に用いる機器や試薬などを由来として、他の細胞外小胞、ウイルス/ウイルス様粒子/微生物/マイコプラズマ、培地成分/試薬などの混入の可能性が考えられる。また、作業環境中の浮遊微粒子やチューブといったラボウェアなどを由来とする人工微小粒子の混入の可能性も十分に考えられる。一般にEVと同様の粒子径を有するパーティクルは、由来が生物であれ、人工物であれ、一旦混入すると分離が困難となる場合が多いことに留意する必要がある。したがって、目的EV以外の成分の混入を最小限に抑えることを目的とした、適切な製造工程の設計・管理が極めて重要である。また、混入が想定される不純物についての定性的・定量的試験法の設定はもちろんのこと、有効性・安全性の観点から不純物の許容限度について検討することが重要である。目的EV以外の成分の混入を評価するための指標としては、粒子のプロファイル解析により目的EV粒子の割合を評価したり、生物学的試験によりEV製剤の力価測定を行い、粒子数などで標準化して比較評価したりすることが挙げられる。

EV製剤の製造においては、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、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EV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。

### 2.3.3 EV の免疫原性

EV の免疫原性については、EV 自身の免疫原性と、EV 以外の成分の免疫原性に分けられる。前者は、EV の表面抗原により惹起される免疫反応が異なるため、EV の由来する細胞(自家、他家、細胞種)や表面抗原発現パターンに留意する(4.2.1 参照)。後者は、主に EV 製剤に含まれる不純物(2.3.2 参照)によるものである。

### 2.4 EV に混入するウイルス等の感染因子に対する安全性評価 — 製法工程を俯瞰した対策

EV のウイルス安全性に関して、EV とウイルスの大きさが類似していることや EV が多様な分子を内包する不均一な構造物であるために、1. 製造においてウイルスクリアランス工程を適用することが困難であること、2. EV がその特性から精製などの工程でウイルスと同じ挙動を示す可能性が高いことが知られている(33, 34)。このためにウイルス安全性に関しては、ウイルスに汚染されていない細胞を EV の生産基材として用いることが最も重要であり、そのために EV の産生に用いる細胞のドナーに対してウイルススクリーニングを実施することにより適格性を確認することが重要である。採取された細胞については、多面的にウイルス等の感染因子の検査が実施される。採取された細胞・組織より、目的細胞を分離、増幅することによりセルバンク(2.1 参照)が樹立される。一方、使用の対象者とドナーが同一の者である場合(いわゆる自己製品)は、製造工程への交差汚染の十分な対策がなされることを前提にドナースクリーニングは必要としない。

樹立されたセルバンクは EV 製造の出発原料であり、GMP に沿った製法の起点となる。このため、樹立したセルバンクに対して、ICH Q5A の細胞バンクにおけるウイルス安全性評価に沿った試験を実施する必要がある。特に内在性のレトロウイルス試験や *in vitro* ウイルス試験、*in vivo* ウイルス試験などを実施することによりウイルスの汚染がないことを示す必要がある。

MCB から製造用に WCB が樹立されることもあるが、ヒト由来細胞が原料であることから *continuous cell line* (CCL) を用いるような大きなバンクを作成することが困難な場合もあり、そのような場合には異なるドナーからの DCB が新たに樹立されていく可能性がある。この場合にはバンクの更新ごとに上記したようなウイルス試験の実施が求められる。

EV の生産において、例えば生産細胞の培養において生物由来原料を用いる場合にウイルス等の汚染がないものを用いることが重要である。また製造において不適切な取扱いによるウイルス等の感染因子の迷入に対する対処が重要となる。

培養工程で生産されたバルクハーベストに対して外来性ウイルス試験を実施することが求められる。バルクハーベストから EV が調製されるが、EV の精製工程においていわゆるウイルスクリアランス工程の適用は困難な場合が多いと想定されることから、ハーベストないしはその後の工程での工程管理としてウイルス試験が重要となる。特に EV を濃縮する工程が実施される場合には、ウイルスの混入があった場合にはウイルスも濃縮される可能性が高いため、濃縮後の中間工程製品を対象として無菌試験やウイルス試験を実施する方が合理的な場合もある。

EV に混入する可能性のあるウイルスとしては脂質膜のあるエンベロープウイルスが EV との特性の類似性から同様の挙動を示す可能性が高いと想定されてきた。一方、非エンベロープウイルスの中には細胞からの放出に際してエンベロープをもっている場合があることが報告されており、バルクハーベスト等の試験に際してこのような点について十分配慮する必要がある(35)。

## 【別紙】 生産細胞の樹立から EV の製造

### ー バンク化された同種細胞を用いた EV の製造と各ステップでのウイルス等の安全対策

#### 1. ドナー適格性評価

ドナースクリーニングとして基本的には血液製剤や再生医療等製品製造時に実施されるドナースクリーニングを参考とした問診や検査を行うことが必要である。

- ウイルス検査: HBV、HCV、HIV、HTLV-I/II 等についての血清学的検査及び核酸増幅検査 (NAT) を行うと共にウインドウ期を考慮した対策も検討する
- 輸血や移植及び再生医療等を受けたことの有無
- 硬膜移植や下垂体由来ヒト成長ホルモンの投与の有無
- 肝炎等の感染履歴を含む病歴
- 上記以外に梅毒・結核などの感染症の病歴、あるいは細胞ドナーが海外在住である場合にはそれぞれの地域における疫学的な感染症の発症状況を考慮した検査

検査すべき項目や問診等による病歴の確認については、「安全な血液製剤の安定供給確保等に関する法律第 25 条に基づく健康診断並びに生物由来原料基準 2(1) 及び 2(1) に規定する問診等について」、「生物由来原料基準」、「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方(改定版)」などを参考にすることが必要である(36-38)。

#### 2. 採取した細胞の検査

採取・分離した細胞・組織の検査: スクリーニングにおけるウイルス等の検査に加えて採取した細胞・組織に応じたウイルス等の検査の実施(血液サンプルを用いた Parvovirus B19 で陰性であっても骨髄細胞では陽性の場合がありえる。また、ヒトヘルペス6型は多くの人で潜伏感染している場合も多い)。また無菌試験やマイコプラズマ否定試験などの実施が求められる。

#### 3. バンク化とその特性評価におけるウイルス等の試験

採取した細胞・組織から目的とする細胞の純化・拡大培養によるバンク化した細胞や DCB: ICH Q5A の細胞バンクに対する試験を参考に広範なウイルス検査の実施

- 電子顕微鏡観察
- 逆転写酵素活性
- レトロウイルス感染性試験
- in vitro ウイルス試験
- in vivo ウイルス試験
- NAT 検査

NAT 検査の対象としては、生産細胞のドナーであるヒト由来ウイルス及び投与部位・経路を勘案して感染リスクの高いウイルスなどに着目して選択する必要がある。

#### 4. 製造における感染因子に対する安全対策

WCB(あるいは MCB)を拡大培養して EV を生産する場合には、培養に用いる培地に生物由来原料を用いる際に安全性の観点からの評価が必要。また生産時における不適切な取扱いによるウイルス等の感染因子の迷入を防ぐ対策

#### 5. 製造したバルクハーベストでの試験

生産された EV を含むバルクハーベストないしは濃縮された中間工程製品等を対象として、外来性ウイルス検査の実施。

- in vitro ウイルス試験
- NAT 検査等

#### 6. 原薬・製剤での試験

原薬や製剤での無菌試験やマイコプラズマ試験を実施。一般的にバイオ医薬品の原薬や製剤ではバルクハーベストよりも感度が上昇することはないためにウイルス試験の実施が求められることはない。しかしながら、バイオ医薬品では精製工程でウイルス不活化・除去処理がなされる一方で、EVではウイルス不活化・除去工程が組み入れられないことも想定される。特にEVの製造ではEVの濃縮工程が含まれる可能性が高いため、ウイルスが濃縮される可能性がある。そのような場合には細菌やウイルスが濃縮される可能性があるため、原薬や製剤での無菌試験やウイルス試験が非常に有用な可能性もある。

### 3. 非臨床試験

#### 3.1 薬物動態

通常、医薬品では、薬物動態を明らかにするために吸収、分布、代謝及び排泄試験が実施されるが、EV製剤は、含まれるEV等が必ずしも均一でないこと、現時点では活性成分を含む特定のEVを分別し解析する評価法が確立しているとはいえない等の理由により、通常、医薬品で実施される血中濃度、吸収や排泄速度等の評価は困難と考えられ、薬物動態の評価には技術的限界がある。また、ヒトから採取した細胞を産生細胞とする天然型のEV製剤については、ヒト由来成分から構成されると考えられることから代謝や排泄を評価する必要性も少ないと考えられるが、改変型のEV製剤で化学物質が含まれる場合は、当該物質の曝露量に応じた吸収、分布代謝、排泄を定量的に評価することが重要と考えられる(3.3.2-2)-(1)-①-iiを参照のこと)。一方、EVの生体内分布については、過去の報告例を参考に、以下に示した方法により評価することが可能だと考えられ、当該EV製剤の薬理学的及び毒性学的な標的臓器、作用持続時間、作用機序の解明にあたり、重要な情報になりうると考えられる。ただし、いかなる方法でEVを可視化しても、人工的に標識されたEVが生理学的な動態を反映しない可能性があることについては留意するべきである。

##### 3.1.1 EVの種類による生体内分布の違い

EVは、大きく多胞性の後期エンドソームに由来するエクソソーム(sEV)と細胞膜(プラズマ膜)に由来するマイクロベシクル(IEV)に分けられる。マウスを用いたエクソソーム (sEV)のPK試験で

は、腎臓、肝臓、肺、脾臓といった全身への分布が報告されているのに対して、マイクロベシクル (IEV)は肝臓への蓄積が優位とする報告が多い(39)。超遠心法やゲル濾過等で分離されたエクソソームを含むEVでのPK検討では、肝臓への有意な分布と共に、腎臓、肝臓、肺、脾臓、膀胱、骨髄、心臓といった全身への分布が多くの論文で報告され、脳への分布に関する報告も散見される(40)。

### 3.1.2 生体内分布の評価法

#### 3.1.2.1 EVの標識法

生体内分布試験に用いるEV標識法には、現時点では以下のような方法がある。

##### 3.1.2.1.1 細胞膜標識用色素を用いた標識法

PKH色素やDil色素及び近赤外吸収色素(NIR)のDiRやDiDなど脂溶性色素を用いたEV膜標識法がある(41)。

これら色素は、脂質二重膜に挿入される脂質様分子プローブであり、簡単な標識法として多くのPK試験で採用されているが、調製されたEVの中にリポタンパク質など脂溶性のタンパク質が共存している場合はそれも染色されるため、誤った結果を招く場合があることに留意すべきである。例えば、この標識法を用いたEVの生体内分布試験で観られる肝臓への多量の蓄積は、誤った結果の一つと考えられている。しかしながら、本標識法は最も簡便であることから、特に開発初期での探索的な臓器・細胞レベルでの検討に推奨される。

##### 3.1.2.1.2 EVに特徴的なタンパク質を用いた標識法

EVに濃縮されるCD63やLamp2や、EVに親和性を持つLactadherinと、gLucやGFPなどのレポータータンパク質との融合タンパク質、またはEV膜内葉に多いPI(4,5)P2に結合するGag (Moloney murine leukemia virus-derived protein) タンパク質とgLucやGFPとの融合タンパク質を用いた標識法がある(42, 43)。

これらの標識法は、3.1.2.1.1に示した標識法よりも高感度で定量性に富み、in vivoイメージングに適切と考えられる。しかしながら、用いられるEVタンパク質は全てのEVに共通して同じ量存在するわけではないため、得られた結果にバイアスが生じる可能性があり、さらに遺伝子操作により作製されたこれらの融合タンパク質がEVの生物学的特性に変化を及ぼす可能性も懸念されている。したがって、この標識法は高感度ではあるものの、3.1.2.1.1の標識法と合わせ臓器レベルでの生体内分布の評価に利用することが推奨される。なお、レポータータンパク質がGFPである場合は、細胞レベルでの検討に推奨されるが、発光を特徴とするgLucの細胞レベルでの検討は推奨されない。

##### 3.1.2.1.3 放射性同位体を用いた標識法

Lactadherin-streptavidin融合タンパク質とビオチン化<sup>125</sup>Iまたは<sup>99m</sup>Tcなど放射性同位元素を用いた標識法がある(44)。

これら標識法は、エクソソーム親和性タンパク質であるLactadherinを利用した標識法であり、現在報告されている標識法として最も感度が高く、定量的in vivoイメージングに適切でありバイアスもかかりにくいが、動物実験もできるRI施設での作業が必要となる。そのため低用量のEVを用

いた生体内分布の検討には推奨されるが、中用量や高用量での検討には、3.1.2.1.1か3.1.2.1.2を用いるべきである。

#### 3.1.2.1.4 EV内腔の蛍光染色法

SytoRNASelectやCFSEなどを用いたEV内腔の蛍光染色法がある。

膜透過性の蛍光色素であるSytoRNASelectやCFSEはEV内の物質との相互作用で蛍光を発するので、体内動態という点では最もバイアスがかからず良い方法である。しかしながら現状では蛍光が弱く十分な感度が得られない可能性がある。タンパク質マーカーが不在なマイクロベシクル(IEV)での報告が多く、エクソソーム(sEV)での報告はほとんどないため、エクソソーム(sEV)を用いたPK検討では、3.1.2.1.1-3.1.2.1.3を用いるべきである。組織染色による細胞レベルの生体内分布試験で推奨される。

#### 3.1.2.2 EVの検出法(41-44)

臓器レベルの検討では、3.1.2.1.1ではIVISが、3.1.2.1.2ではIVISとBLIが、3.1.2.1.3ではPET、SPECT/CTが、3.1.2.1.3ではIVISがよく用いられる。蛍光物質を使った場合には、臓器レベルでの検討とともに、組織染色や組織由来細胞のフローサイトメトリーを用いた細胞レベルでの検討を行う報告が多い。

#### 3.1.3 臓器・細胞での取り込みに関する解釈

多くの報告から、投与したEVは、放出細胞の由来や投与する動物種を問わず、全身臓器への分布を示すようである(39, 40)。しかしながら、適切なコントロールEVを用い、非臨床試験におけるEVの標的臓器や標的細胞以外への分布の増減を観察することは、ヒトでの安全性を予測する上で有用だと考えられる。これらの評価のためには、目的EVの複数の標識法による臓器・細胞レベルでのPK試験を実施するとともに、そのコントロールEV(例：目的EVが間葉系幹細胞(MSC)由来EVであれば線維芽細胞由来EV等、目的EVがCD8<sup>+</sup>T細胞由来EVであればCD4<sup>+</sup>T細胞由来EVやナチュラルキラー(NK)細胞由来EV等、目的EVが樹状細胞(DC)由来EVであればマクロファージ由来EV等、目的EVが改変型のEV製剤であれば改変前のEV製剤等)の投与群を、当該試験に組み入れることが望まれる。安全性が懸念される場合には、3.1.4のような対応が考えられる。

#### 3.1.4 標的臓器・細胞以外への分布により、安全性が懸念される場合の方策

生体内分布試験において目的外の臓器・細胞(非標的細胞)への望ましくない分布が認められ、その分布を低減したい場合には、以下のような対処法が考えられる。

- ・ 目的とするEVのEVポピュレーション(エクソソーム(sEV))かマイクロベシクル(IEV)かなどが判明している場合、そのEVポピュレーションを可能な限り分離・精製する。
- ・ 改変型EV製剤の場合、標的細胞指向性(標的細胞との結合能力)をより高める。
- ・ 目的EV分画に不要なタンパク質や脂質等が多く含まれる場合、精製度の高い調製法(アフィニティー法やイオン交換法等)を用いてEVを調製する。

## 3.2 薬理試験

EV 製剤を用いた薬理試験は、低分子薬あるいはタンパク質製剤などで実施される試験と基本的には同様であり、細胞、組織、動物個体などを用いて、それぞれの疾患に応じた試験を実施する。ただし、比較対照群の選択、EV 投与量の単位については EV 特有の事項として、以下のような対応が考えられる。また、EV の活性成分としてはタンパク質や核酸である場合が多く、薬理試験における動物種差の取り扱いにも注意が必要である。

### 3.2.1 比較対照群

EV の機能研究では、用量反応関係を評価することが基本となる。MISEV2018 に従い、高回収・低特異的 EV 単離の場合には、EV 含有試料液、EV 除去後の試料液、EV のみの 3 者間で、低回収・高特異的 EV 単離の場合には、EV 分画とそれ以外の分画との間での機能活性の定量的比較が必要である。また、比較対照群として、天然型 EV の場合は異なる生体液や組織・細胞から採取した天然型の EV 製剤を、改変型の EV 製剤の場合は機能分子を含まないあるいは変異体に置換えた EV を用いることが考えられる。

### 3.2.2 EV 投与量の単位

EV 投与量の単位としては、粒子数や総タンパク質量が広く用いられており、非臨床試験においてもこれらの単位の使用が想定される。一方で、これらの単位は EV の純度や質の影響を受けやすく、安定した試験結果を得づらいつ場合がある。そのような場合、活性成分が明確であれば、その含量を EV 活性の単位として用いることも可能である(例えば、IL-2 XXmg 相当、miRNA XX コピー相当など)。一方、機能分子が不明である場合は、代表的な薬理試験において定義した生物学的力価を単位(ユニット)として用いることも想定される。

### 3.2.3 動物種を選択

EV の機能分子のほとんどはタンパク質や核酸であり、動物種差の影響が大きい為、EV 製剤に対して、ヒトで意図する薬理作用を発現する動物種を選択することが望ましい。当該動物種が得られない場合、バイオテクノロジー応用医薬品等では、動物由来の同等品を用いて評価することも考えられるが、EV 製剤では、動物由来 EV 製品との同等性を示すことは困難と考えられる。その場合には、公表されている様々な情報から得られる科学的根拠に基づいて、EV 製剤の効力を説明する必要がある。

## 3.3 非臨床安全性試験

### 3.3.1. 一般原則

EV 製剤の非臨床安全性試験は、各製品の特性を十分に把握した上で、ケースバイケースで立案する必要があり、原則として、GLP に従って実施する必要がある。なお、EV の分野における科学的進歩や経験の蓄積は日進月歩であることから、以下に示した非臨床安全性評価に代わる新たな戦略や試験方法が開発されれば、それらを非臨床安全性評価に利用することも考えられる。

### 3.3.2. 評価戦略

EV製剤の非臨床安全性評価を実施する上では、他の医薬品と同様に、意図する薬理作用により発現するオンターゲット毒性と、意図する薬理作用に関連しないオフターゲット毒性の2つの観点から、ヒトに投与した際の安全性を評価する必要がある。

#### 1) オンターゲット毒性

EV製剤のオンターゲット毒性は、活性成分として含まれるタンパク質、核酸(mRNA, miRNA, DNA)等を介して惹起されると考えられ、その作用機序に基づいて評価する必要がある。したがって、タンパク質に起因するオンターゲット毒性を評価する場合には、「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」(45)、mRNAやDNAの場合には、「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保」(46)、miRNAの場合には、「核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン」(47)が参考になる。

#### 2) オフターゲット毒性

##### (1) 細胞外小胞に関する安全性

###### ① 一般毒性

EV製剤は、様々な種類のEVにより構成され各EVに含まれるタンパク質や核酸の標的特異性は高いと考えられることから、これらに起因するオフターゲット毒性の懸念は低く、また種特異性も高いと考えられる。一方、化学修飾(例:修飾核酸、コンジュゲート)などを利用した改変型のEV製剤をヒトに投与した際に懸念されるオフターゲット毒性は、科学的合理的な範囲で、ケースバイケースで評価する必要がある。

##### i. 天然型のEV製剤

再生医療等製品で既に用いられている細胞などヒトでの安全性に懸念の少ない細胞から調製されるEV製剤については、オフターゲット毒性に関連する安全性上の懸念は少ないと考えられる。したがって、天然型EV製剤のオフターゲット毒性を評価するために、独立した試験を実施する必要はなく、オンターゲット毒性を評価する非臨床安全性試験の中で評価することで十分と考えられる。

##### ii. 改変型のEV製剤

ヒトでの安全性が担保されていない化学物質(例えば、バイオコンジュゲート等による化学修飾)が改変型のEV製剤として利用される場合には、使用される化学物質に注目し「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」(48)(ICH M3)等を参考に非臨床安全性試験を実施することが考えられる。

###### ② がん化リスク

がん細胞由来のEVには、レトロウイルスのRNA及びDNA配列が多く含まれ、レトロウイルスを介して、正常細胞にがん細胞由来の悪性形質を伝達しうることが報告されている(49)。さらに、レトロウイルスは、細胞培養に用いられるFBS中にも報告されている(50-52)。レトロウイルスに起因するこれらのリスクを非臨床試験で評価することは困難であるが、少なくともEV製剤を製造する際には、再生医療等製品で既に用いられている細胞などヒトでの安全性に懸念の少ない細胞を使用することを優先し、EV製剤の製造工程ではFBS等の使用は可能な限り避けるべきと考えられる。しかしながら、やむを得ず、ヒトでの安全性が不明な細胞を使用せざるを得ない場合には、少なくとも細胞基材におけるレトロウイルス活性を測定して、当該リスクが低いことを確認する必要がある。

また、EV製剤のがん原性については、天然型のEV製剤はもちろんのこと、ヒトでの安全性が担保されていない化学物質が使用されている改変型のEV製剤の場合であっても、臨床で長期間(6カ月以上)継続して使用されない限り、当該化学物質に関するがん原性試験を実施する必要はない(「医薬品のがん原性試験に関するガイドライン」)(53)。

## (2) 不純物

EV製剤の製造過程で使用した試薬等の製造工程由来不純物については、製造に関する情報を踏まえて可能な限り低減化することが重要である。そのうえで、可能な限り製剤に残存する不純物量を把握し、製剤の非臨床安全性試験成績、公表データ(例えば、毒性プロファイル、ヒト内因性物質に関する情報、ヒトへの投与実績)、不純物に関するガイドライン(54-58)、毒性学的な概念(毒性学的懸念の閾値等)を踏まえて安全性を評価することが適切と考えられる。

### 3.3.3. 非臨床安全性試験の試験デザイン

#### 1) 動物種を選択

##### (1) オンターゲット毒性

EV製剤のオンターゲット毒性を評価する上では、通常、EV製剤を投与した際に、ヒトで意図する薬理作用を発現する1種の動物種で非臨床安全性試験を実施することが適切と考えられる。バイオテクノロジー応用医薬品や細胞加工製品では、ヒトで意図する薬理作用を示す動物が得られない場合、動物由来の同等品等を用いた代替モデルの利用が検討される。しかしながらEV製剤については、動物由来の同等品との類似性を評価することは困難と考えられる。したがって、EV製剤の意図する薬理作用を発現する動物が得られない場合には、公表されている様々な情報から得られる科学的根拠に基づいて、EV製剤の薬理作用に起因する有害性(ハザード)を評価して、ヒトでのリスク管理に活かすべきである。

##### (2) オフターゲット毒性

正常なヒト細胞に由来する天然型のEV製剤については、ヒトに投与した際のオフターゲット毒性の懸念は低いと考えられ、げっ歯類を含むいずれか1種の動物種を用いた毒性試験(例:単回

投与毒性試験、反復投与毒性試験)の中で評価することで十分と考えられる。一方、改変型のEV製剤として、ヒトでの安全性が担保されていない化学物質が利用されている場合には、当該化学物質に着目し、ICH M3を参考に、通常2種の動物種(げっ歯類、非げっ歯類)を用いてオフターゲット毒性を評価する必要がある。

## 2) 用法・用量

### (1) 投与経路及び投与頻度

EV製剤の非臨床安全性試験では、原則として、臨床適用経路で、臨床での投与頻度と同等以上で投与することが望ましい。やむを得ず、臨床適用経路以外の投与経路を選択する場合には、投与経路の違いが安全性評価に与える影響を十分に説明する必要がある。また、ヒトや動物にEV製剤を繰り返し投与しても、生体内での蓄積やそれに伴う毒性所見の増悪が考えにくい場合には、必ずしも反復投与する必要はない。

### (2) 用量

エクソソームには多種多様なタンパク質や核酸が含まれ、EV製剤の生物活性には動物種差が想定されることを考慮すると、EV製剤のオンターゲット毒性は、ヒトでの量的なリスク評価は困難であり、有害性(ハザード)を確認するために実施されるものと考えられる。したがって、天然型のEV製剤での用量段階は、対照群及び投与群の少なくとも2群で評価可能と考えられる。一方、改変型のEV製剤において、ヒトでの安全性が担保されていない化学物質が利用される場合には、化学合成医薬品と同様に、用量反応関係が評価できるよう、複数の用量群を設定することが望ましい。また、いずれのEV製剤においても、最高用量は、最大耐量(MTD)、投与可能な最大量(MFD)及び動物福祉(3Rs)を考慮して可能な限り多くのEV製剤を投与することが重要と考えられる。

## 3) 回復性

非臨床安全性試験で重篤な毒性所見が認められ、かつヒトへの外挿性が懸念される場合には、ICH M3を参考に回復性を評価する必要がある

## 4) トキシコキネティクス

通常の医薬品では、非臨床安全性試験成績のヒトへの外挿性を評価するために、トキシコキネティクスデータ(毒性試験における全身暴露データ)が収集される。しかしながら、EV製剤は必ずしも均一ではなく、特定のEVを分別して解析する評価法も確立されていないことから、現時点ではEV製剤のトキシコキネティクスを評価することは困難である。さらに、多くのEV製剤については、生物活性に動物種差があることも考慮すると、ヒトでの安全性を評価する上で、必ずしも非臨床安全性試験でトキシコキネティクスデータを収集する必要はないと考えられる。一方、改変型のEV製剤において、ヒトでの安全性が担保されていない化学物質が利用され、その安全性に特段の懸念がある場合には、当該化学物質に注目したトキシコキネティクスデータ収集の必要性を検討する。

## 4. 臨床開発

### 4.1 PK/PD や有効性の評価

薬物による治療効果の最大化と有害作用の最小化を評価するためには PK/PD 試験が重要であるが、EV 製剤の生体内濃度を定量することが困難である現状を踏まえると、ADME/PK/PD については厳密に求める必要はなく、用法・用量と効果・作用について解析することが現実的である。臨床試験における評価が望ましいが、困難な項目については非臨床試験あるいは *in vitro* 試験を実施する。ただし、動物試験のデータは、必ずしもヒトには適用できない点に留意すべきである。評価する効果・作用については以下の例に示すように疾患や目的ごとに異なる。同じ種類の作用を持った薬物あるいは関連する作用を持った薬物の併用により主作用が増強される可能性がある場合、併用による相互作用の検証も必要である。臨床開発における有効性及び安全性評価については、EV の特殊性として、免疫原性・オンターゲット/オフターゲット毒性に考慮の上、開発手法としては低分子化合物、RNA・タンパク質医薬品を参照にする。免疫原性に関して反復投与する場合には、EV 上の分子に対する抗体産生による効果・作用の減弱の可能性に注意を要する。また、EV の定量法に関しては、測定条件により値に差が生じることもある為、意図した量が正確に投与されるか注意が必要である。

#### 4.1.1 MSC 由来 EV による組織障害の修復及び抗炎症作用

MSC 由来 EV 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 $\beta$ 、IL-5、IL-10、IL-12、ケモカイン、TGF- $\beta$ 1 など)、線維化マーカー (コラーゲン 1、フィブロネクチン、 $\alpha$ 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 SpO $_2$ 、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。

#### 4.1.2 DC 由来 EV による免疫の活性化

DC 由来 EV などは T 細胞活性化を誘導してがんあるいは感染症に対する免疫賦活効果が期待されている。がんに対するワクチンの場合は、キラー T 細胞による細胞傷害活性、ヘルパー T 細胞の活性化 (T 細胞増殖、IL-2・IFN- $\gamma$  産生など)、抗原特異的 T 細胞の増加、腫瘍増殖抑制、奏効率、無増悪生存期間、全生存期間などが評価項目として想定される。感染症に対するワクチン場合は更に、中和抗体価、発症・重症化予防などが評価項目として想定される。作用発現時間・持続時間についても可能な限り解析することが望ましい。いずれのワクチンにおいても、アレルギー反応 (アナフィラキシーショックを含む)、自己に対する免疫誘導など有害作用の評価が重要である。

#### 4.1.3 miRNA 含有 EV による疾患関連タンパク質発現の制御

EV に含まれる特定の miRNA は疾患関連タンパク質の発現を低下させる効果が期待されており、評価項目としては、miRNA が標的とする疾患関連タンパク質の発現量、その作用発現時間・

持続時間、それによる細胞活性・細胞機能の変化、臨床上の利益に関係すると考えられる作用（バイオマーカー、血液検査数値など）、最終的な臨床上の利益（奏効率、重症化率、生存期間など）が挙げられる。miRNA は複数のタンパク質の発現を制御することから、疾患関連タンパク質以外の発現制御を引き起こす可能性も考えられる。これらオフターゲットのタンパク質発現制御によって引き起こされる可能性のある有害作用の評価が必要である。

#### 4.2 アレルギーや拒絶反応などの好ましくない免疫反応

同種他家のヒトやヒト以外の動物もしくは植物を由来とする EV をヒトに投与した際には、アレルギーや拒絶反応などの好ましくない免疫反応によるリスクも想定されるが、当該リスクを、動物を用いた非臨床試験で評価する意義は限定的である。したがって、臨床試験においては、以下の観点から、ヒトでの好ましくない免疫反応に関連するリスクの低減策を検討した上で、慎重に臨床試験を進める必要がある。

##### 4.2.1 EV に対する免疫反応

EV 製剤の製造細胞の由来により免疫原性が異なる。

自己細胞由来の場合は EV 自身の免疫原性を考慮する必要性はない。同種ヒト由来の場合、EV 自身の発現する組織適合性複合体、特に表面抗原の主要組織適合性複合体 MHC クラス I および II の不適合に起因する免疫原性を考慮する必要がある。

急性移植片対宿主病の治療薬として用いられている MSC など短期的な効果を期待する再生医療等製品や細胞加工物では免疫抑制剤は用いられていない(59)。また、現時点で米国の臨床試験登録データベース(ClinicalTrials.gov)等の公開情報を用いた EV 関連臨床試験の調査では、MHC についての対応(MHC の一致)を求めている記載は見いだされない。さらに、Human leukocyte antigen (HLA)-A 及び HLA-B を発現している血小板輸血(いわゆるランダム血小板輸血)が我が国を含めグローバルに長年行われていることを考慮すれば、EV 製剤の臨床適用において MHC を介した重篤な免疫応答の可能性は低く、安全性の観点からの懸念は低いと考えられる。

一方、長期の生着を期待する同種ヒト細胞由来の再生医療等製品や細胞加工物では免疫抑制剤が使用されており、長期の生着には MHC の不一致による拒絶反応の制御が必要とされている(60)。急性拒絶や慢性拒絶などの免疫反応の低減として、造血細胞移植の際と同様の考え方、すなわち MHC クラス I の A 座、B 座、C 座およびクラス II の DR 座をレシピエント(患者)からドナー(投与される EV)方向(いわゆる HVG 方向:Host versus graft 方向)に可能な限りマッチさせることが有用かもしれない。

MHC クラスをマッチさせる必要性については、EV 製剤が適応される目的を踏まえ、検討することが重要である。

##### 4.2.2 EV 以外の不純物(抗生物質や培地成分等)に対する免疫反応

EV を用いた治療製剤に含まれる不純物(抗生物質や培地成分等)についてはアレルギーなどのリスクが考えられ、当該リスクを回避するために抗ヒスタミン薬、抗炎症薬や解熱鎮痛薬などを適

宜組み合わせでEV製剤使用前に投与するという選択肢もありうるが、少なくとも当該製剤をヒトに投与する際には、可能な限り当該リスクを軽減した上で(2.3.2項参照)、被験者及び治験実施者に対して十分な説明と注意喚起を行う等、適切な臨床での安全管理が必要であろう。

#### 4.2.3 EVによって誘導される免疫反応

4.2.1で述べたEVの免疫原性に起因する反応とは逆に、EVによって誘導される免疫反応が意図する薬理作用(オンターゲット作用)であることもあるが、過剰に発現する可能性に留意すべきである(オンターゲット毒性)(3.3項参照)。例えば、MSC由来EVは意図する薬理効果が免疫抑制であることから、過度の免疫抑制がひきおこされることによる感染症の発現の可能性がある。逆にDC由来EVは免疫反応を活性化することが意図する薬理効果であり(1.3項参照)、過度の免疫反応(例:サイトカインストームなど)に対して、予防的、治療的に免疫抑制剤等の使用を考慮すべきである。

#### 4.3 ヒト初回投与試験の試験計画

臨床試験におけるヒトでの安全性担保は極めて重要な課題であり、特にヒトにはじめて投与される臨床試験(FIH試験)の実施にあたっては、入手可能なすべての情報を踏まえて、初回投与量、投与間隔、リスク管理方法等を含む、FIH試験計画を慎重に定める必要がある。

多くのEV製剤は、種特異性の高いタンパク質、核酸(mRNA, miRNA, DNA)等を介して生物学的反応を惹起すると想定されることから、FIH試験における初回投与量を動物での非臨床試験成績から推定することには限界がある。したがって、既に類似したEV製剤での臨床試験成績等が得られているのであれば、可能な限り当該情報を活用して、初回投与量等を含むFIH試験計画を立案することが推奨される。一方、類似したEV製剤の情報が利用できない場合には、開発するEV製剤を用いた非臨床試験成績を利用して、オンターゲット及びオフターゲット毒性の観点から、FIH試験における初回投与量を検討する必要がある。EV製剤のオンターゲット毒性の観点から、当該製剤をヒトに投与した際に過剰な薬理作用によって安全性上の重大な懸念が想定される場合には、「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンスの改訂等について」(61)(FIH試験ガイダンス)を参考に、EV製剤の臨床試験における最小薬理作用量(MABEL)を推定して、初回投与量を設定する必要がある。一方、EV製剤のオンターゲット毒性に重大な懸念がない場合には、必ずしもMABELを算出する必要はない。また、オフターゲット毒性の観点から、安全性上の懸念が想定される場合には、EV製剤の一般毒性試験から算出される無毒性量(NOEL)に基づいて初回投与量を設定することが求められる。以上を踏まえ、FIH試験では、MABEL及び/又はNOELで求められるいずれかの用量のうち低い用量を選択し、適切な安全係数を乗じた上で初回投与量とすることが適切と考えられる。なお、FIH試験の実施におけるその他の留意点については、FIH試験ガイダンス及び「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス に関する質疑応答集(Q&A)」(62)が参考になる。

1. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*. 2018;7(1):1535750.
2. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*. 2015;4:27066.
3. Vidal M. Exosomes: Revisiting their role as "garbage bags". *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2019;20(11):815-28.
4. Witwer KW, Théry C. Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. *Journal of extracellular vesicles*. 2019;8(1):1648167.
5. de Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, Vader P, Gremmels H, Posthuma G, et al. Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *Journal of extracellular vesicles*. 2012;1.
6. Yoshioka Y, Konishi Y, Kosaka N, Katsuda T, Kato T, Ochiya T. Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *Journal of extracellular vesicles*. 2013;2.
7. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(8):E968-77.
8. Fernández-Francos S, Eiro N, Costa LA, Escudero-Cernuda S, Fernández-Sánchez ML, Vizoso FJ. Mesenchymal Stem Cells as a Cornerstone in a Galaxy of Intercellular Signals: Basis for a New Era of Medicine. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(7).
9. Hassanzadeh A, Rahman HS, Markov A, Endjun JJ, Zekiy AO, Chartrand MS, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes in regenerative medicine and cancer; overview of development, challenges, and opportunities. *Stem cell research & therapy*. 2021;12(1):297.
10. Nagelkerke A, Ojansivu M, van der Koog L, Whittaker TE, Cunnane EM, Silva AM, et al. Extracellular vesicles for tissue repair and regeneration: Evidence, challenges and opportunities. *Advanced drug delivery reviews*. 2021;175:113775.
11. Warnecke A, Prenzler N, Harre J, Köhl U, Gärtner L, Lenarz T, et al. First-in-human intracochlear application of human stromal cell-derived extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*. 2021;10(8):e12094.

12. Warnecke A, Harre J, Staecker H, Prenzler N, Strunk D, Couillard-Despres S, et al. Extracellular vesicles from human multipotent stromal cells protect against hearing loss after noise trauma in vivo. *Clinical and translational medicine*. 2020;10(8):e262.
13. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(3):1161-72.
14. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature medicine*. 1998;4(5):594-600.
15. Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O, Amigorena S. Indirect activation of naïve CD4<sup>+</sup> T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature immunology*. 2002;3(12):1156-62.
16. Escudier B, Dorval T, Chaput N, André F, Caby MP, Novault S, et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *Journal of translational medicine*. 2005;3(1):10.
17. Morse MA, Garst J, Osada T, Khan S, Hobeika A, Clay TM, et al. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of translational medicine*. 2005;3(1):9.
18. Besse B, Charrier M, Lapierre V, Dansin E, Lantz O, Planchard D, et al. Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *Oncoimmunology*. 2016;5(4):e1071008.
19. García-Manrique P, Matos M, Gutiérrez G, Pazos C, Blanco-López MC. Therapeutic biomaterials based on extracellular vesicles: classification of bio-engineering and mimetic preparation routes. *Journal of extracellular vesicles*. 2018;7(1):1422676.
20. Kuriyama N, Yoshioka Y, Kikuchi S, Okamura A, Azuma N, Ochiya T. Challenges for the Development of Extracellular Vesicle-Based Nucleic Acid Medicines. *Cancers*. 2021;13(23).
21. Yoshioka YO, T. Extracellular Vesicles as Novel Nanocarriers for Therapeutic Delivery. *Nucleic Acid Nanotheranostics*. 2019:391-407.
22. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Likhalsky S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology*. 2011;29(4):341-5.
23. Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21(1):185-91.

24. Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(4):1163-72.
25. 平成 12 年 7 月 14 日付 厚生省医薬安全局審査管理課長 医薬審第 873 号「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 <https://www.pmda.go.jp/files/000156150.pdf>.
26. 平成 10 年 1 月 6 日付 厚生省医薬安全局審査管理課長通知 医薬審第 3 号「組換え DNA 技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析について」<https://www.pmda.go.jp/files/000156706.pdf>.
27. 平成 12 年 2 月 22 日付 厚生省医薬安全局審査管理課長 医薬審第 329 号「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」について <https://www.pmda.go.jp/files/000156380.pdf>.
28. Veerman RE, Teeuwen L, Czarnewski P, Güclüler Akpınar G, Sandberg A, Cao X, et al. Molecular evaluation of five different isolation methods for extracellular vesicles reveals different clinical applicability and subcellular origin. *Journal of extracellular vesicles*. 2021;10(9):e12128.
29. Monguió-Tortajada M, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A, Roura S, Borràs FE. Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2019;76(12):2369-82.
30. Seo N, Nakamura J, Kaneda T, Tateno H, Shimoda A, Ichiki T, et al. Distinguishing functional exosomes and other extracellular vesicles as a nucleic acid cargo by the anion-exchange method. *Journal of extracellular vesicles*. 2022;11(3):e12205.
31. 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.
32. Gimona M, Brizzi MF, Choo ABH, Dominici M, Davidson SM, Grillari J, et al. Critical considerations for the development of potency tests for therapeutic applications of mesenchymal stromal cell-derived small extracellular vesicles. *Cytotherapy*. 2021;23(5):373-80.
33. Ipinmoroti AO, Matthews QL. Extracellular Vesicles: Roles in Human Viral Infections, Immune-Diagnostic, and Therapeutic Applications. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 2020;9(12).
34. Anderson MR, Kashanchi F, Jacobson S. Exosomes in Viral Disease. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2016;13(3):535-46.

35. Saad MH, Badierah R, Redwan EM, El-Fakharany EM. A Comprehensive Insight into the Role of Exosomes in Viral Infection: Dual Faces Bearing Different Functions. *Pharmaceutics*. 2021;13(9).
36. 令和 2 年 8 月 27 日付 厚生労働省医薬・生活衛生局長 薬生発第 0827 第 7 号 安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律第 25 条に基づく健康診断並びに生物由来原料基準第 2 の 1 (1) 及び 2 (1) に規定する問診等について <https://www.mhlw.go.jp/content/000667264.pdf>.
37. 平成 30 年 2 月 28 日制定 厚生労働省告示第 37 号 生物由来原料基準 <https://www.pmda.go.jp/files/000223393.pdf>.
38. 平成 12 年 12 月 26 日付 厚生省医薬安全局長 医薬発第 1314 号 ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について <https://www.pmda.go.jp/files/000205395.pdf>.
39. Kang M, Jordan V, Blenkiron C, Chamley LW. Biodistribution of extracellular vesicles following administration into animals: A systematic review. *Journal of extracellular vesicles*. 2021;10(8):e12085.
40. Yi YW, Lee JH, Kim SY, Pack CG, Ha DH, Park SR, et al. Advances in Analysis of Biodistribution of Exosomes by Molecular Imaging. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(2).
41. Imai T, Takahashi Y, Nishikawa M, Kato K, Morishita M, Yamashita T, et al. Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice. *Journal of extracellular vesicles*. 2015;4:26238.
42. Takahashi Y, Nishikawa M, Shinotsuka H, Matsui Y, Ohara S, Imai T, et al. Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *Journal of biotechnology*. 2013;165(2):77-84.
43. Charoenviriyakul C, Takahashi Y, Morishita M, Nishikawa M, Takakura Y. Role of Extracellular Vesicle Surface Proteins in the Pharmacokinetics of Extracellular Vesicles. *Molecular pharmaceutics*. 2018;15(3):1073-80.
44. Morishita M, Takahashi Y, Nishikawa M, Sano K, Kato K, Yamashita T, et al. Quantitative analysis of tissue distribution of the B16BL6-derived exosomes using a streptavidin-lactadherin fusion protein and iodine-125-labeled biotin derivative after intravenous injection in mice. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2015;104(2):705-13.
45. 平成 24 年 3 月 23 日付 厚生労働省医薬食品局審査管理課長 薬食審査発 0323 第 1 号 「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について <https://www.pmda.go.jp/files/000156471.pdf>.
46. 令和元年 7 月 9 日付 厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長 薬生機審発 0709 第 2 号 「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保」について <https://www.pmda.go.jp/files/000230508.pdf>.

47. 令和2年3月30日付 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長通知 薬生食審発 0330 第3号 「核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン」について [https://www.mhlw.go.jp/web/t\\_doc?dataId=00tc4871&dataType=1&pageNo=1](https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tc4871&dataType=1&pageNo=1).
48. 平成22年2月19日付 厚生労働省医薬食品局審査管理課長 薬食審査発 0219 第4号 「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施 についてのガイダンス」について <https://www.pmda.go.jp/files/000156948.pdf>.
49. Kawamura Y, Yamamoto Y, Sato TA, Ochiya T. Extracellular vesicles as trans-genomic agents: Emerging roles in disease and evolution. *Cancer science*. 2017;108(5):824-30.
50. Coufal NG, Garcia-Perez JL, Peng GE, Yeo GW, Mu Y, Lovci MT, et al. L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature*. 2009;460(7259):1127-31.
51. Lewinson O, Lee AT, Locher KP, Rees DC. A distinct mechanism for the ABC transporter BtuCD-BtuF revealed by the dynamics of complex formation. *Nature structural & molecular biology*. 2010;17(3):332-8.
52. Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y. Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Communications biology*. 2019;2:57.
53. 平成9年4月14日付 厚生省薬務局審査課長 薬審第315号 医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンスについて <https://www.pmda.go.jp/files/000156340.pdf>.
54. 平成18年12月4日付 厚生労働省医薬食品局審査管理課長 薬食審査発第1204001号 「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドラインの改定について」の一部改定について <https://www.pmda.go.jp/files/000156885.pdf>.
55. 平成18年7月3日付 厚生労働省医薬食品局審査管理課長 薬食審査発第0703004号 「新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドラインの改定について」の改定について <https://www.pmda.go.jp/files/000156311.pdf>.
56. 令和3年8月13日付 薬生薬審発 0813 第3号 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長 医薬品の残留溶媒ガイドラインの改正について <https://www.pmda.go.jp/files/000242518.pdf>.
57. 令和2年6月26日付 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長 薬生薬審発 0626 第1号 医薬品の元素不純物ガイドラインの改正について <https://www.pmda.go.jp/files/000235612.pdf>.
58. 平成30年6月27日付 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長 薬生薬審発 0627 第1号 「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性(変異原性)不純物の評価及び管理ガイドラインについて」の一部改正について <https://www.pmda.go.jp/files/000224891.pdf>.

59. Muroi K, Miyamura K, Okada M, Yamashita T, Murata M, Ishikawa T, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (JR-031) for steroid-refractory grade III or IV acute graft-versus-host disease: a phase II/III study. *International journal of hematology*. 2016;103(2):243-50.
60. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *The New England journal of medicine*. 2000;343(4):230-8.
61. 令和元年 12 月 25 日付 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長 薬食審査発 1225 第 1 号「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス」の改訂等について <https://www.mhlw.go.jp/hourei/doc/tsuchi/T191227I0050.pdf>.
62. 平成 24 年 4 月 2 日付 厚生労働省医薬食品局審査管理課 事務連絡 「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンスに関する質疑応答集(Q&A)」について [https://www.japal.org/wp-content/uploads/mt/20120402\\_jimu.pdf](https://www.japal.org/wp-content/uploads/mt/20120402_jimu.pdf).

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専門部会 委員名簿

あきよし かずなり  
秋吉 一成

京都大学大学院工学研究科 高分子化学専攻 生体機能高分子研究室 教授

いしい あきこ  
石井 明子

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長

いちき たかのり  
一木 隆範

東京大学大学院工学系研究科 マテリアル工学専攻 教授

おかだ よしあき  
岡田 義昭

埼玉医科大学医学部 輸血・細胞移植部 准教授

くろだ まさひこ  
黒田 雅彦

東京医科大学 分子病理学分野 主任教授

せ お なおひろ  
瀬尾 尚宏

三重大学大学院医学系研究科 個別化がん免疫治療学 / 複合的がん免疫療法センター 特任講師

◎ たかくら よしのぶ  
高倉 喜信

京都大学大学院薬学研究科 病態情報薬学分野 教授

たけうち としひで  
武内 敏秀

近畿大学 ライフサイエンス研究所 / 医学部脳神経内科 特任講師

○ はなやま りきなり  
華山 力成

金沢大学 ナノ生命科学研究所 / 医薬保健研究域 医学系 教授

ひ だ きょうこ  
樋田 京子

北海道大学大学院歯学研究院 口腔病態学分野 血管生物分子病理学教室 教授

ふたき しろう  
二木 史朗

京都大学化学研究所 生体機能設計化学研究領域 教授

みうら やすお  
三浦 康生

藤田医科大学医学部 輸血細胞治療科 教授

やまぐち てるひで  
山口 照英

金沢工業大学 特任教授

よしおか ゆうすけ  
吉岡 祐亮

東京医科大学医学総合研究所 分子細胞治療研究部門 講師

◎部会長、○副部会長  
(五十音順)