



平成27年2月27日

第15回秦野研究所医療機器安全性試験セミナー

再生医療等製品の品質および安全性の確保と 再生医療等製品に係る規制について

国立医薬品食品衛生研究所
再生・細胞医療製品部

佐藤 陽治

本発表で述べられている見解は発表者の私見であって、国立医薬品食品衛生研究所
および厚生労働省の現在の公式な見解では必ずしもありません

再生医療等の実施・開発状況



ヒト幹細胞を用いる臨床研究（再生医療・細胞治療の提供）

（ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成22年厚生労働省告示第380号））

90件の実施承認（2014年2月現在）

がん免疫療法等（再生医療・細胞治療の提供）

6種類の治療が「先進医療」として大学病院にて実施中

保険適用外医療として実施されているものについては統計データなし

再生医療等製品（薬事法・薬機法下での製品開発）

製造販売承認済: 2件

JACE（自己由来培養皮膚細胞）， JACC（自己由来軟骨細胞）

製造販売承認申請中: 2件

同種由来培養間葉系幹細胞，自己由来骨格筋芽細胞シート

治験中・申請準備中: 9件（2件の遺伝子治療製品を含む）

2014年10月現在

今後の再生医療の実用化を促進する制度的枠組み

再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律【議員立法】平成25年4月26日成立、5月10日公布・施行

再生医療の研究開発から実用化までの施策の総合的な推進を図る

自由診療

臨床研究

再生医療等安全性確保法

【平成25年11月20日成立、11月27日公布】
【平成26年11月25日施行】

再生医療等の安全性の確保等を図るため、再生医療等の提供機関及び細胞培養加工施設についての基準を新たに設ける。

迅速性

細胞培養加工について、医療機関から企業への外部委託を可能に

安全性

再生医療等のリスクに応じた三段階の提供基準と計画の届出等の手続、細胞培養加工施設の基準と許可等の手続を定める

安全な再生医療を迅速かつ円滑に

製造販売

薬事法改正法

【平成25年11月20日成立、11月27日公布】
【平成26年11月25日施行】

再生医療の実用化に対応できるよう、再生医療等製品の特性を踏まえた承認・許可制度を新設するため、改正を行う。

再生医療等製品の特性に応じた早期承認制度の導入

患者への説明と同意、使用の対象者に関する事項の記録・保存など市販後の安全対策

多くの製品を、より早く

再生医療等安全性確保法と改正薬事法の関係

臨床研究・自由診療

再生医療等安全性確保法

医療として提供される再生医療等について、採取等の実施手続き、再生医療等を提供する医療機関の基準、細胞を培養・加工する施設の基準等を規定し、安全性等を確保。

再生医療等製品

薬事法

再生医療等製品の製造所の基準等を規定し、再生医療製品の有効性、安全性を確保。

※ 本法律案に基づき医師の責任の下で実施される細胞の培養・加工の委託については、薬事法の適用外。

企業の工場等
※許可を受けた施設

医療機関
※届出した施設

企業の工場等
※許可を受けた施設

細胞の入手

加工・保存

委託

加工・保存

採取

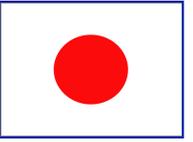
加工・保存

実施(移植)

承認された
製品の購入

対象範囲
再生医療法

薬事法



薬事法の改正

薬事法の改正（平成25年11月）

1. 新しい法律名

「薬事法」

⇒「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」（“医薬品医療機器等法”，“薬機法”）

2. 新しい製品カテゴリー

「医薬品」「医療機器」

⇒「医薬品」「医療機器」「再生医療等製品」

3. 新しい審査制度（再生医療等製品の一部）

⇒条件・期限付製造販売承認（安全性確認＆有効性推定）

再生医療等製品の特性を踏まえた規制の構築(1)

改正の内容①

【医薬品・医療機器と別個の定義付け】

- (1) 医薬品や医療機器とは別に「再生医療等製品」を新たに定義し、「章」を設ける。

＜再生医療等製品の範囲＞

「細胞・組織加工製品」「再生医療製品」

① 人又は動物の細胞に加工を施したものであって、目的が

イ 人又は動物の身体の構造・機能の再建・修復・形成

ロ 人又は動物の疾病の治療・予防

「組織工学製品」

「細胞治療薬」

② 人又は動物の疾病の治療を目的として、人又は動物の細胞に導入されて、体内で遺伝子を発現するもの（→遺伝子治療）

「遺伝子治療薬」「遺伝子治療製品」

再生医療等製品の特性を踏まえた規制の構築(1)

改正の内容①

【医薬品・医療機器と別個の定義付け】

- (1) 医薬品や医療機器とは別に「再生医療等製品」を新たに定義し、「章」を設ける。

<再生医療等製品の範囲>

- ① 人又は動物の細胞に加工を施したものであって、目的が
 - イ 人又は動物の身体の構造・機能の再建・修復・形成
 - ロ 人又は動物の疾病の治療・予防

- ② 人又は動物の疾病の治療を目的として、人又は動物の細胞に導入されて、体内で遺伝子を発現するもの（→遺伝子治療）

“加工”の定義

従来

平成24年9月7日薬食発0907第2-6号“幹細胞5指針”

「細胞・組織の加工」とは、疾患の治療や組織の修復又は再建を目的として、細胞・組織の人為的な増殖・分化、細胞の株化、細胞の活性化等を目的とした薬剤処理、生物学的特性改変、非細胞成分との組み合わせ又は遺伝子工学的改変等を施すことをいう。

組織の分離、組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離、抗生物質による処理、洗浄、ガンマ線等による滅菌、冷凍、解凍等は加工とみなさない。

平成26年8月12日薬食機参発0812第5号

新定義

「再生医療等製品の製造販売承認申請に際し留意すべき事項について」

「加工」とは、疾患の治療や組織の修復又は再建を目的として、細胞・組織の人為的な増殖・分化、細胞の株化、細胞の活性化等を目的とした薬剤処理、生物学的特性改変、非細胞成分との組み合わせ又は遺伝子工学的改変等を施すことをいう。なお、組織の分離、組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離（薬剤等による生物学的・化学的な処理により分離するものを除く。）、抗生物質による処理、洗浄、ガンマ線等による滅菌、冷凍、解凍等は「加工」とみなさない（ただし、本来の細胞と異なる構造・機能を発揮することを目的として細胞を使用するものについてはこの限りでない。）。

(参考)再生医療等製品に該当しないと考えられる製品

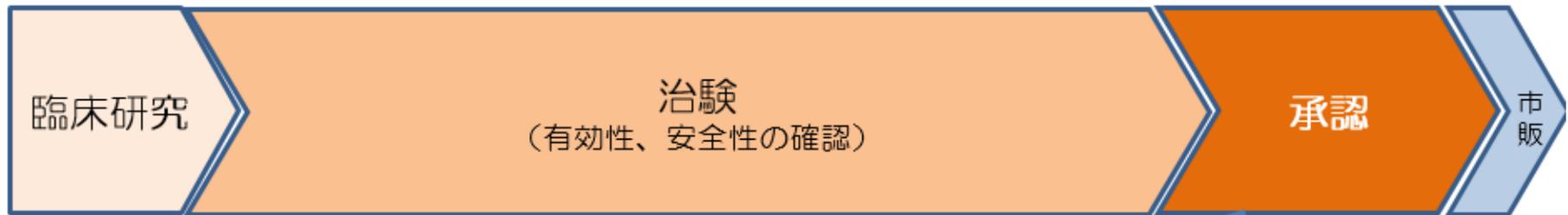
- ✓ ヒト赤血球・ヒト血漿板・新鮮凍結血漿
- ✓ 血漿分画製剤
- ✓ 造血幹細胞移植片
- ✓ 生殖補助医療用の受精胚及び配偶子
- ✓ プラセンタエキス(胎盤組織)
- ✓ ヒト羊膜、ヒト硬膜
- ✓ 生体弁
- ✓ 創傷用ハイドロゲル
- ✓ 入歯・骨セメント
- ✓ 人工関節・人工血管
- ✓ 細胞保存液
- ✓ 生物学的製剤基準に記載されている弱毒生ワクチン
- ✓ アンチセンスオリゴヌクレオチド・核酸誘導體
- ✓ リボザイム、アプタマー

再生医療等製品の特性を踏まえた規制の構築(2)

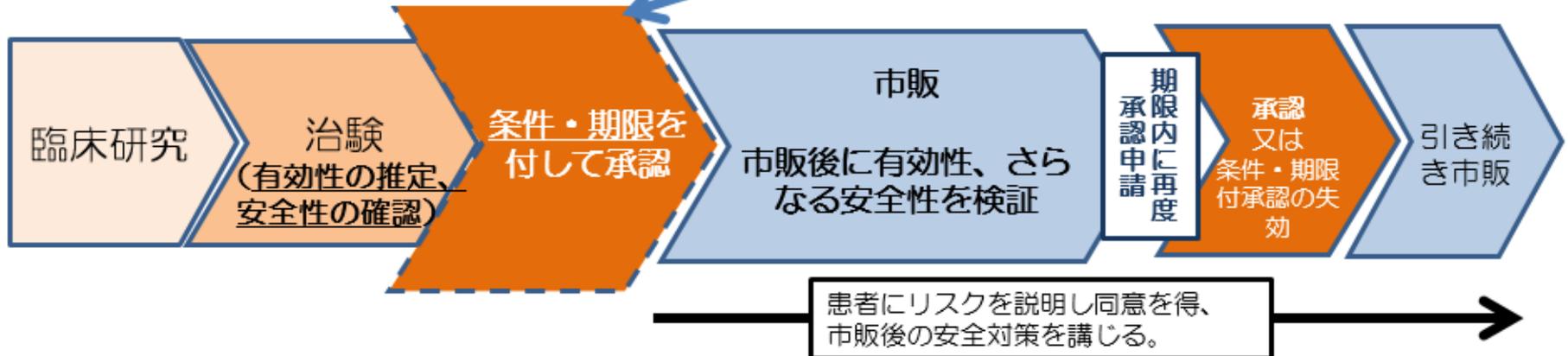
改正の内容② 【条件及び期限付承認制度の導入】

【従来の承認までの道筋】

＜再生医療等製品に従来の承認制度を適用する場合の問題点＞
人の細胞を用いることから、個人差を反映して品質が不均一となるため、有効性を確認するためのデータの収集・評価に長時間を要する。



【再生医療等製品の早期の実用化に対応した承認制度】



- 有効性については、一定数の限られた症例から、従来より短期間で有効性を推定。
- 安全性については、急性期の副作用等は短期間で評価を行うことが可能。

では、有効性に関する情報はどの程度まで要求されるか？

- 再生医療等製品の条件及び期限付承認でも、GCPの下で実施した治験に基づく審査を行うこととしており、有効性のエビデンス確保は、従来のオーファンドラッグの承認と差が無いレベル。
- 今回の法改正では、それを法律上「有効性の推定」として明確に位置づけたもの。

	臨床試験の特徴	有効性のエビデンス特徴	製造販売後の対策
医薬品	○疾患の特性に応じて、必要な規模の臨床試験により評価する	○通常、比較臨床試験で統計的な差が示される	○使用成績調査の実施
オーファンドラッグ	○疾患の希少性により、少数例の患者への治験症例で評価せざるを得ない場合が多い ○比較臨床試験が困難な場合が多い	○統計的に厳密な評価は困難な場合がある	○より多くの症例を収集するため全例を対象とした調査や追加臨床試験を実施(承認条件) ○適正使用の確保のため、医療機関等を限定(承認条件)
再生医療等製品	○疾患の希少性により、少数例の患者への治験症例で評価せざるを得ない場合が多い ○原料となる細胞が不均質であるため、一定数の限られた治験症例では評価が困難である ○比較臨床試験が困難な場合が多い	○統計的に厳密な評価は困難な場合が多い	○より多くの症例を収集するため全例を対象とした調査や追加臨床試験を実施(承認条件) ○適正使用の確保のため、医療機関等を限定(承認条件) ○承認に7年以内の有効期限を付与

再生医療等製品の条件及び期限付承認の類型

有効な既存治療法がない疾患

有効な既存治療法がある疾患

申請段階で得られたエビデンス

単群試験

統計的に確からしい有効性

比較試験

統計的に確からしい
優位性・非劣性

単群試験

臨床的に意味のある有効例の存在
有効性の傾向は示されるが、統計的
な確からしさは未確認
サロゲート・エンドポイントのみでの
探索的な有効性が示されること

※ オープンであれば、これまでも医
薬品等で本承認している水準。

単群

統計的に
確からしい
有効性

比較試験

有効性の傾向
は示されるが、
統計的な確か
らしさは未確
認

製品の
品質の
ばらつき
による

比較試験が実
施困難な治療
形態等による

単群試験

臨床的に意味のある有効例の存在
有効性の傾向は示されるが、統計
的な確からしさは未確認
サロゲート・エンドポイントのみでの
探索的な有効性が示されること

※ 国内の治験に加え、同一、同種製品の国内外の臨床試験情報等も参照

再生医療等製品の特性を踏まえた規制の構築

改正の内容③

【安全対策等の整備】

- (3) 医師等による患者に対して適切な説明を行い、同意を得るよう努めること
- (4) 使用等に関する記録と保存など、市販後の安全対策を講じる。
- (5) 再生医療等製品による健康被害について、副作用被害救済制度及び感染等被害救済制度の対象とする。

…並びに構造施設規則、生物由来原料基準の改訂を実施

【その他の改正事項】

- (6) 製造所における製造管理又は品質管理の基準を作成し、品質・安全性等を確保する。
- (7) 業として人体から採血することは原則禁止されているが、再生医療等製品について、その製造業者や医療機関が人体から採取した血液を原料として、製品を製造することを可能とする。

再生医療等製品の構造設備規則と製造及び品質管理の基準

構造設備規則

- 従来の「**薬局等構造設備規則**」中に再生医療等製品の製造業に係る規定を追加
- 区分は一般と包装等の2種類
- 内容は、医薬品・医療機器の無菌医薬品区分・滅菌医療機器区分、特定生物由来医薬品・医療機器等の製造業の規定を参照しつつ、必要な項目を整備
- **再生医療等安全性確保法における特定細胞加工物の製造施設も同様の基準を適用**

製造管理及び品質管理の基準 (Good gene, Cell & Tissue Practice)

- 「**再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準**」(GCTP省令)を新設
- 生物由来医薬品等の製造管理及び品質管理(GMP省令)を参照しつつ、設定。
- 再生医療等製品の特性から一部変更した事項(バリデーションとベリフィケーション、ワクチン等を想定した病原性微生物や血液製剤の取り扱いの削除)
- **再生医療等安全性確保法における特定細胞加工物の製造及び品質管理については、基本的に同様の基準を適用**しつつ、医療機関からの委託によって行われる等の業態の違いを反映(回収等)

GCTP (Good gene, Cell & Tissue Practice)

「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準」

細胞などの原料は、無菌化などの処理を行うことが困難であることなど、再生医療等製品の特性を考慮し、再生医療等製品の品質システムにおける要件を示したもの

- 品質リスクマネジメント
- 製造管理(無菌保証、交叉汚染防止など)
- 品質管理(バリデーション&ベリフィケーション、品質照査)
- 構造設備

<実践の際の要点>

構造設備(ハード)、品質システム(ソフト)の両面から、個々の製品の品質にどのようなリスクがあるか、そのリスクは管理可能か、受け入れ可能か、という視点から達成レベルを設定し、継続的に改善していくことが求められる

生物由来原料基準の改訂(抜粋)

平成26年9月26日厚生労働省告示第375号

○動物細胞組織原料

フィーダー細胞など、製品の材料を構成するものでセルバンクを構築しているものについては、使用実績とセルバンクの解析が目的に照らして十分に行われている場合には、動物の飼育管理や細胞・組織を採取する作業の過程の確認や記録の保管を不要とする。

○反芻動物由来原料

従来は地理的BSEリスクに基づき原産国を規制してきたが、EU等の動向も踏まえ、国際獣疫事務局(OIE)の評価に沿った見直しを行う。

ゼラチンについては、その高度処理工程を踏まえ、プリオンリスクは十分無視できると判断。ウシ乳についても、海外の規制状況、最近の科学的知見等を踏まえ、原産国にかかわらず使用可とする。

○承認された医薬品等の利用

再生医療等製品の原料若しくは材料又はそれらの原材料として、製造販売承認を受けた医薬品等を適切に用いる場合には、当該原材料の使用については基準に適合しているものとする。

○ヒト又は動物由来原料を作製する作業の記録

原材料を作製する作業の経過に関する記録はGMPの中で必要に応じて確認する。

発出された通知等

- ・再生医療等製品GLP省令施行通知(平成26年8月12日医薬食品局長通知)
- ・再生医療等製品GCP省令施行通知(平成26年8月12日医薬食品局長通知)
- ・再生医療等製品GPSP省令施行通知(平成26年8月12日医薬食品局長通知)
- ・再生医療等製品の製造販売承認申請(平成26年8月12日医薬食品局長通知)
- ・加工細胞等に係る治験の計画等の届出等(平成26年8月12日医薬食品局長通知)
- ・再生医療等製品の構造設備規則、GCTP省令、医薬品等GQP省令施行通知(平成26年8月12日医薬食品局長通知)
- ・医薬品等GVP省令施行通知(平成26年8月12日医薬食品局長通知)
- ・再生医療等製品の感染症定期報告制度(平成26年8月12日医薬食品局長通知)
- ・加工細胞等に係る治験の計画等の届出の取扱い等(平成26年8月12日参事官通知)
- ・再生医療等製品の製造販売承認申請の留意事項(平成26年8月12日参事官通知)
- ・施行前に行う再生医療等製品の申請等の留意点(平成26年9月18日機器・再生室事務連絡)
- ・再生医療等製品の治験中不具合等報告通知(平成26年10月2日医薬食品局長通知、平成26年10月2日参事官通知)
- ・再生医療等製品添付文書・使用上の注意記載事項通知(平成26年10月2日医薬食品局長通知、安全対策課長通知)
- ・生物由来原料基準施行通知、運用通知(平成26年10月2日医薬食品局長通知、審査管理課長・参事官連名通知)

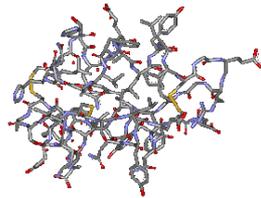
再生医療等製品の 品質と安全性の確保

バイオリジクス(生物製剤)は複雑



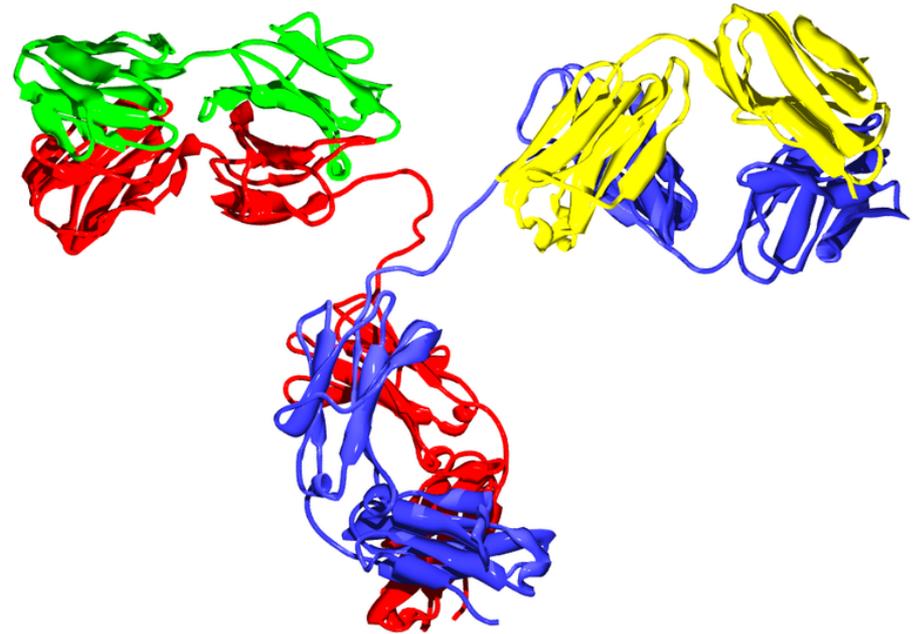
180 Da

アスピリン



5,700 Da

インスリン



150,000 Da

抗体医薬品



細胞加工製品（再生医療等製品）は 従来のバイオリジクスよりもっと複雑

細胞は複雑・・・動的な「生きている」システム

- 細胞の形質は置かれる（微小）環境に依存する
 - 種特異性
 - （ヒトの細胞の安全性を異種動物中（非臨床試験）で評価するのは難しい）
 - 病態特異性（例：正常環境 vs. 虚血環境）
- 細胞は周囲の環境に対して作用する（薬理的・免疫学的・物理的作用等）
- 培養により均一性が低下する可能性がある（例：長期培養中）
- 脱分化する可能性がある（例：長期培養中）
- 遊走する可能性がある（体内動態）
- 壊れやすい・寿命が有限である場合が多い（輸送・有効期間の問題）
- 高度な精製、ウイルス不活化・除去が困難

- 細胞の特性解析が大切
- 従来の品質管理、非臨床試験、臨床試験のやり方が適用できるとは限らない

製品の多様性が高い

- リスクの在り処がさまざま

細胞加工製品(再生医療等製品)の多様性

「自己由来」「皮膚」製品に限定しても・・・

製品	対象疾患	細胞種／足場材料	使用法／使用目的	国名
Epicel (Genzyme Biosurgery)	真皮深層熱傷もしくは全層熱傷	自己角化細胞 ／マウス線維芽細胞	植皮され、表皮の代替となる。	アメリカ
ジェイス (J-TEC)	重症熱傷	自己表皮細胞 ／マウス線維芽細胞	シート状に培養した表皮細胞を受傷部位に移植	日本
Holoderm (Tego Science)	熱傷、尋常性白斑、母斑、潰瘍、肥厚性瘢痕	自己表皮細胞 ／マウス線維芽細胞	植皮され、真皮の再生促進。	韓国
AutoCel (Modern Cell & Tissue Technologies)	熱傷、潰瘍、形成外科による変形	自己表皮細胞	細胞懸濁液を噴霧して使用。	韓国
LASERSKIN (Fidia Advanced Biopolymer)	真皮深層熱傷もしくは全層熱傷	自己表皮細胞 ／ヒアルロンベンジルエステル	真皮・表皮を含む皮膚の代替として植皮。	イタリア
Myskin (Altrika)	熱傷、潰瘍、難治性外傷	自己角化細胞 ／シリコンシート (増幅時にマウス細胞と共培養)	受傷部位に貼付	イギリス
CellSpray (Avita Medical)	熱傷、外傷、瘢痕	自己表皮基底膜細胞 [自己血清]	細胞懸濁液として使用。患部に浸潤・増殖し、治癒を促進。	イギリス、オーストラリア
EpiDex (Euroderm GmbH)	慢性皮膚潰瘍	自己外毛根鞘由来幹細胞	ディスク状で患部表面50~70%を覆い、表皮細胞を増殖。	ドイツ

原材料、製造工程、最終製品の形態、使用法に差＝リスクの所在、その重大性、品質評価／管理のポイントも製品ごとに固有

品質・安全性の確保は、リスク分析を基礎にしたケースバイケースの対応が必要

細胞加工製品(再生医療等製品)の規制の原則 「リスクベースアプローチ」



- 米国 : Docket Number 97N-0068
- EU : Directive 2001/83/EC Annex I Part IV

「リスクベースアプローチ (Risk-Based Approach) 」

前例主義的な安全対策ではなく、審査対象となる各製品の性質に固有、かつその品質・安全性・有効性に関連するリスク要因を探り当てることをベースにし、その影響の度合いを科学的に評価することにより規制の方針・内容を定めるアプローチ方法

日米欧医薬品規制調和会議 (ICH)

品質リスクマネジメント・ガイダンス (Q9) でも採用 (2005年)

＝今日では医薬品規制の一般的な原則

細胞加工製品(再生医療等製品)の規制の原則 「リスクベースアプローチ」の考え方



ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する5指針
(厚労省 薬食発0907第2～6号通知, 平成24年9月7日)

“明らかに想定される製品のリスクを現在の学問・技術を駆使して排除し、その科学的妥当性を明らかにした上で、なお残る「未知のリスク」と、重篤で生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患、身体の機能や形態を一定程度損なうことによりQOLを著しく損なう疾患などに罹患し、従来の治療法では限界があり、克服できない患者が「新たな治療機会を失うことにより被るかも知れないリスク」とのリスクの大小を勘案し、かつ、これらすべての情報を開示した上で患者の自己決定権に委ねるという視点を持つこと、すなわち、リスク・期待されるベネフィットの情報を開示した上で治験に入るかどうかの意思決定は患者が行うという視点を入れて評価することも重要である。”

製品に付随するリスクの「所在」と「その重み」だけでなく、
「新たな治療機会を失うことにより被るかも知れないリスク」の「内容」と「その重み」も様々

細胞加工製品(再生医療等製品)の 「リスクベースアプローチ」の作法



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(GCTP省令)

Good gene, Cell & Tissue Practice

(平成二十六年八月六日厚生労働省令第九十三号)

・・・再生医療等製品の製造管理・品質管理を適切に実施するための運用方法の枠組みを示したもの

- | | | | |
|-------|--------------------|-------|----------------------------|
| ●第1条 | 趣旨 | ●第13条 | 製造所からの出荷の管理 |
| ●第2条 | 定義 | ●第14条 | バリデーション又は <u>ベリファイーション</u> |
| ●第3条 | 適用の範囲 | ●第15条 | <u>製品の品質の照査</u> |
| ●第4条 | <u>品質リスクマネジメント</u> | ●第16条 | 変更の管理 |
| ●第5条 | 製造部門及び品質部門 | ●第17条 | 逸脱の管理 |
| ●第6条 | 製造管理者 | ●第18条 | 品質等に関する情報及び
品質不良等の処理 |
| ●第7条 | 職員 | ●第19条 | 回収処理 |
| ●第8条 | 製品標準書 | ●第20条 | 自己点検 |
| ●第9条 | 手順書 | ●第21条 | 教育訓練 |
| ●第10条 | <u>構造設備</u> | ●第22条 | 文書及び記録の管理 |
| ●第11条 | <u>製造管理</u> | ●第23条 | 記録の保管の特例 |
| ●第12条 | <u>品質管理</u> | | |

※下線:GCTPで新たに規定された事項、二重波線:再生医療等製品の特性を踏まえた事項が考慮

GCTP省令における 「品質リスクマネジメント」



薬食発0812第11号平成26年8月12日

● 定義

製品の初期開発から製造販売が終了するまでの全期間にわたり製品の品質に対するリスク(品質リスク)について適切な手続に従い評価、管理等を行い、製品の製造手順等及び品質の継続的改善を促進する主体的な取組み

● 実施方法

製造業者等が、製造管理及び品質管理を行うに当たって、品質リスクマネジメントの活用を考慮することを規定したものであること。品質リスクマネジメントは、製品の適正な製造管理及び品質管理を構成する要素として品質に対するリスクの特定、分析、評価、低減等において主体的に活用するものであること。

● 実施における留意点

品質システムにおいて、製造手順等に係る各工程すべてを見渡した上で、そのうちリスクマネジメントの対象とすべきもの及びその結果を適用すべきものについて検討すべきものであること。

細胞加工製品（再生医療等製品）のリスク（例）

- 感染症の伝搬（ウイルス、細菌、真菌）
 - 不純物混入（血清、抗生物質、有害細胞の混入も含む）
 - 細胞の遺伝的不安定性と腫瘍形成
 - 好ましくない免疫反応
 - 細胞特性の意図しない変化
 - 非細胞成分による不必要な免疫応答、炎症反応、毒性
 - 好ましくない体内分布
-
- 製品を使用しないことによる治療機会喪失

細胞加工製品（再生医療等製品）のリスク要因（例）

- 細胞・組織の由来（自己 vs. 同種）
 - 増殖能・分化能
 - 免疫反応の惹起（標的または作用主体として）
 - 細胞の加工の程度（培養・活性化・遺伝子導入など）
 - 非細胞成分や生理活性物質との複合化
 - 投与方法・投与部位（局所 vs. 全身）
 - 投与期間（短期 vs. 長期、単回 vs. 頻回）
 - 同様の製品に関する臨床データや経験の有無
-
- 他の有効な治療法の存否、患者の予後・QOL

細胞加工製品（再生医療等製品）のリスク要因とリスク

「何を」「どこまで明らかにすべきか」は製品によりケースバイケース

開発の早い段階から、製品ごとにリスク要因を科学的に評価して、リスクのプロファイルを得ることが必要

- 各リスクに複数の要因
- 1対1には対応しない

リスク要因の程度で単純に「高リスク製品」vs.「低リスク製品」とは区切るのは難しい

リスク要因（例）

- 細胞・組織の由来（自己 vs. 同種）
- 増殖能・分化能
- 免疫反応の惹起（標的または作用主体として）
- 細胞の加工の程度（培養・活性化・遺伝子導入など）
- 非細胞成分や生理活性物質との複合化
- 投与方法・投与部位（局所 vs. 全身）
- 投与期間（短期 vs. 長期、単回 vs. 頻回）
- 同様の製品に関する臨床データや経験の有無
- 他の有効な治療法の存否、患者の予後・QOL

リスク（例）

- 感染症の伝搬（ウイルス、細菌、真菌）
- 不純物混入（血清、抗生物質、有害細胞の混入も含む）
- 細胞の遺伝的不安定性と腫瘍形成
- 好ましくない免疫反応
- 細胞特性の意図しない変化
- 非細胞成分による不必要な免疫応答、炎症反応、毒性
- 好ましくない体内分布
- 製品を使用しないことによる治療機会喪失

(参考)「自己由来」ならば「低リスク」か？

ヒト(自己)由来細胞・組織

<利点>

- 感染因子の混入は同種由来ほど気にする必要はない
- 免疫拒絶の懸念が少ない

注意

同じ工程で多数の患者に供給する場合は、製造工程中のリスクが拡散する恐れがある

<欠点>

- 「オーダーメイド」なので、品質のばらつきを最小限に抑える厳重な品質管理が必要(それでもばらつきは不可避)
- 品質の評価に利用できる検体の量が限られている
- 体内動態の追跡が困難

ヒト(同種)由来細胞・組織

<利点>

- バンク化と徹底した特性解析により一定の品質を確保しやすい
- 異常発生時には、免疫抑制剤中止により移植細胞を除去できる可能性がある

<欠点>

- 感染因子混入に関する厳重な管理が必要となる
- 免疫反応を制御する必要がある

ここまでのまとめ

- 細胞加工製品(再生医療等製品)の品質・安全性の評価・確保は、多様なリスクとリスク要因を考慮した、リスクベースアプローチによりケースバイケースで考えることが原則
- 開発者も審査側も個々の製品について常に合理的なリスク分析が要求される
- リスク分析では
 - ① リスク・リスク要因の同定とこれらの関係性の検討だけでなく
 - ② 予想されるベネフィット、製品を使用しない場合の患者の予後・QOL、リスクマネジメントプラン等を考えたリスクの重み付けが必要
 - ③ 分析結果から管理すべき品質特性を決めていく
= **全ての製品に共通な「チェックリスト」「お作法」にはならない**

再生医療等製品の造腫瘍性評価

再生医療等製品(特に細胞加工製品)の実用化 における主な科学的課題

1. ウイルス安全性(同種由来 vs. 自己由来)
2. 原材料として供される細胞の特性解析と適格性
3. 細胞基材以外のヒト又は動物起源由来製造関連物質の適格性
4. 細胞基材としてのセル・バンクの樹立と管理のありかた
5. 最終製品の品質の再現性を達成するための包括的な製造戦略、製造工程評価
6. 最終製品を構成する細胞の有効成分としての特性解析
7. 最終製品の必須品質特性の同定と規格設定(最終製品の品質管理)
8. 非臨床安全性試験・非臨床POC試験のデザインと解釈
9. 造腫瘍性試験のデザインと解釈(特にES/iPS細胞由来製品)
10. 製法／セル・バンクの変更による新旧製品の同等性の検証
11. 臨床試験のデザインと解釈
12. 有効性・安全性のフォローアップのあり方

“Tumorigenicity” 「造腫瘍性」

動物に移植された細胞集団が増殖することにより腫瘍(悪性・良性)を形成する能力



“Oncogenicity” 「腫瘍原性」

生理活性物質ないし化学物質が細胞を不死化して腫瘍(悪性・良性)を誘導する能力

“Carcinogenicity” 「がん原性」

生理活性物質ないし化学物質が細胞を不死化してがん(悪性腫瘍)を誘導する能力

「造腫瘍性」・・・本当のリスクは何か？

腫瘍による物理的障害

- 最終製品中への**不死化細胞**の混入
(未分化ES/iPS細胞も含む)

⇒ 組織の圧迫等
(腫瘍が良性であっても問題)
・・・関節、脊髄などのケース

悪性腫瘍形成

- 最終製品中への**がん細胞**の混入

テラトーマ(良性腫瘍)

vs. テラトカルシノーマ(悪性腫瘍)

・・・腫瘍悪性度の最終判断は
病理学的検討による



考慮すべき要素

- リスク・マネジメント・プラン
(フォローアップ計画、外科的除去・化学療法・免疫抑制剤中止等の有効性)
- 当該製品を使用しない場合の患者の予後

造腫瘍性試験の国際ガイドライン

- ICH-Q5D (生物薬品製造用細胞基材の由来、調製および特性解析についてのガイドライン)

www.pmda.go.jp/ich/q/q5d_00_7_14.pdf



- WHO “Requirements for Use of Animal Cells as in vitro Substrates for the Production of Biologicals” in WHO Expert Committee on Biological Standardization, 47th Report (1998) (technical report series number 878, TRS 878) <http://www.who.int/biologicals/en/>



(2010年改正 http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf)

概略・・・「ヌードマウス10匹に 10^7 個投与してHeLaなどと比較」(16週間)

WHO TRS 878の造腫瘍性試験

- 最新版(WHO生物製剤標準化委員会最終案, 2010年10月)

http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf

- 適用対象

- **生物製剤製造用**の動物細胞基材

- セル・バンク: 製品製造終了時(終了後)の細胞,
所定の継代数以上にわたって培養したMCB
最初に樹立したWCB
- 細胞種: 二倍体細胞株、幹細胞株、連続継代性細胞株

- 「患者に直接移植する」または「細胞・組織利用製品の原料となる」
動物由来の生細胞は対象外

WHO TRS 878 における 「造腫瘍性」とは



最新版(2010年10月版)における定義:

「**動物モデル**に移植された細胞集団が、移植部位および(または)離れた転移部位で増殖することにより腫瘍を形成する能力」

「**ヒト**に移植された細胞集団が腫瘍を形成する能力」
ではない!

=ヒトにおけるリスクの直接的指標ではない

WHO TRS 878での造腫瘍性試験の目的

- 生物薬品用細胞基材となるセルバンクの造腫瘍性の程度又は有無を正確に把握すること

「造腫瘍性の程度的大幅な変化又はその有無に変化が生じた」



「細胞特性に何らかの異常が起こった」

- 既知／未知のウイルス感染、変異原性物質やストレスによる遺伝子変異・発がん遺伝子活性化etc.・・・原因が何であれ、
- セルバンクの**安定性上の異常発生を検出するための方策として、**
- 造腫瘍性を細胞特性指標の一つとして評価し、**品質管理に活用**

ヒト細胞加工製品の造腫瘍性試験

<目的別に3種類ありうる>

①原料等となる細胞基材(例: ES/iPS細胞など)の品質管理のための試験

⇒WHO TRS 878適用可能

②中間製品／最終製品の品質管理のための試験(不純物としての造腫瘍性細胞の検出)

③最終製品の非臨床安全性評価のための試験

最終製品
中間製品

Q1「目的外細胞として造腫瘍性細胞が含まれる？」

高感度in vivo試験、細胞増殖特性評価、軟寒天コロニー形成試験等

Q2「どのくらいのES/iPS細胞が残存しているのか？」

qRT-PCR、フローサイトメトリー、直接培養法

Q3「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか？」

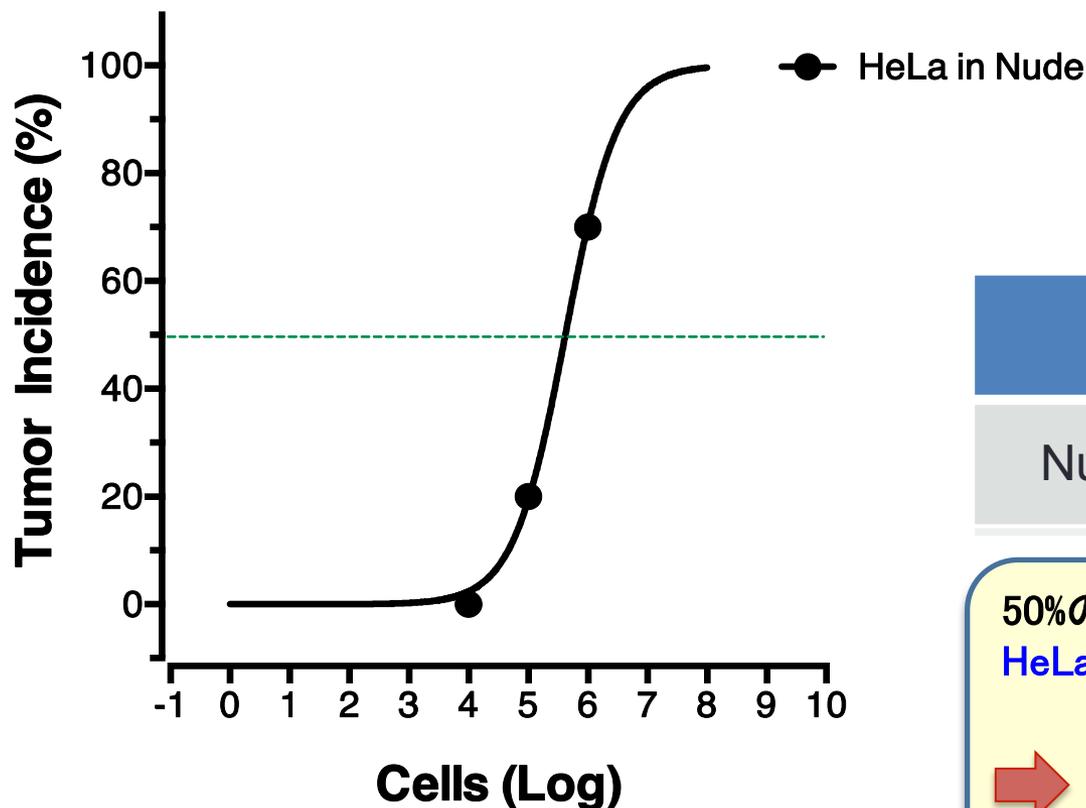
高感度in vivo試験

HeLa細胞単独皮下投与試験 (WHO TRS 878で推奨のヌードマウス試験の感度)

WHO TRS 878: 生物製剤*製造時に細胞基材として用いられる細胞株の品質評価ガイドライン
(*再生医療製品の品質・安全性評価は対象外)



Nodule Formation 16 weeks after Subcutaneous Administration



	TPD50
Nude	4.0×10^5

50%の確率で腫瘍を形成させるためでも
HeLa細胞が40万個も必要

➔ 再生医療製品の品質・安全性評価
には十分な感度とは言えない

WHO TRS 878の細胞・組織製品への転用

—単純な計算—

例: ES/iPS細胞加工製品に必要なES/iPS由来分化細胞の数:
最低でも数万個(網膜疾患治療用の網膜色素上皮細胞)

- 仮定:

ヒト/動物細胞加工製品の最終製品中の細胞の1万分の1がHeLa細胞
(TPD_{50} :約 $4E+5$)の造腫瘍性をもつ



- 半数のヌードマウスに腫瘍を形成させるには、 $4E+9$ 個の投与が必要

既存のガイドラインの方法($1E+7$ 個投与)では、ヒト/動物細胞加工製品
にわずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない可能性が高い

既存のガイドラインの方法では全てが「偽陰性」?

重度免疫不全マウスを用いた造腫瘍性試験系



NOD/SCID/ γ C^{null}(NOG)マウス

- T、BおよびNK細胞欠失、補体活性消失、マクロファージや樹状細胞の機能不全
- 国産(実験動物中央研究所が樹立、2002年に報告)



NOD/SCID/IL2rgKO(NSG)マウス

- T、BおよびNK細胞欠失など、NOGと類似した表現型
- 米国Jackson Labが樹立、2005年に報告

<その他SCID/Beigeや、Rag2- \square C double-knockout (DKO)なども、T、B、NK細胞欠失>



- ノードマウス等、従来の免疫不全動物に比べ、ヒトの細胞や組織の生着性が著しく高く、ヒト癌細胞を高率に生着させることが可能

ただし、科学的リスク評価のためには

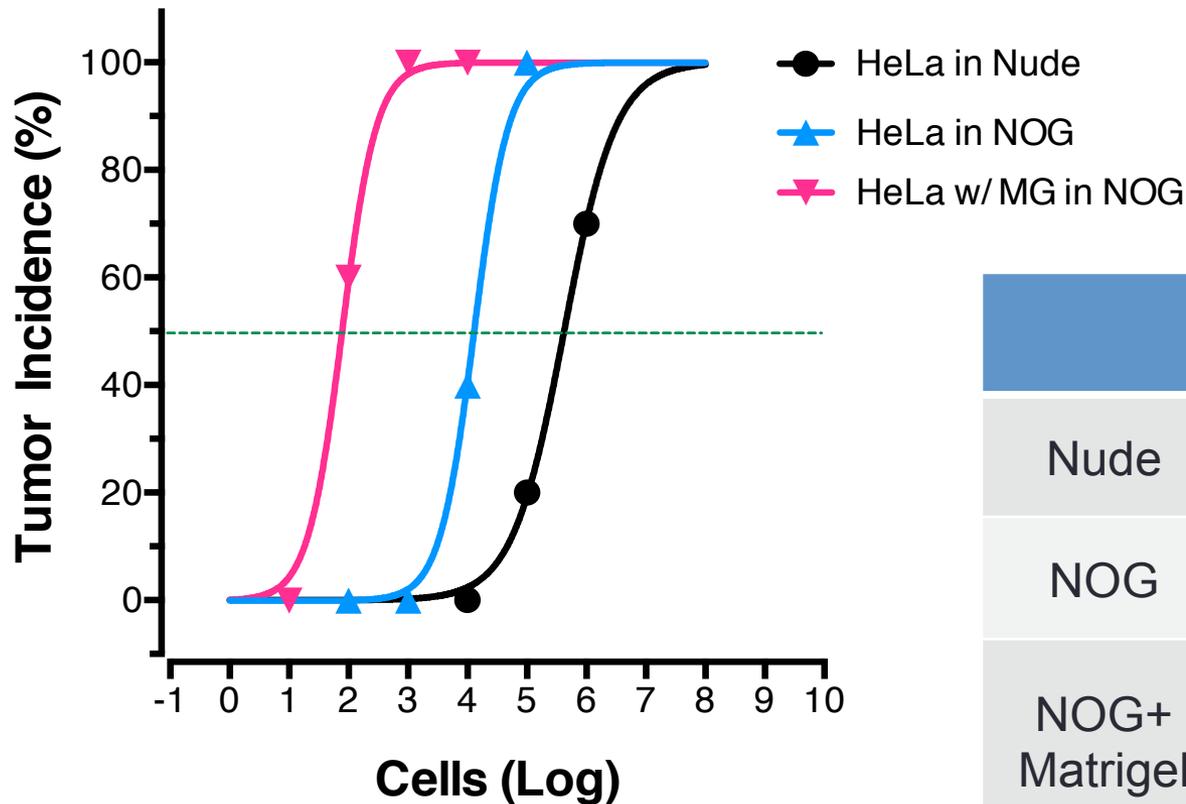
細胞・組織加工製品の造腫瘍性の定量化の方策の検討／標準化が必要

検討課題： 検出限界／感度／精度の分析的検討、陽性・陰性コントロールの在り方、投与細胞数、投与経路、投与方法、観察期間、ノードマウスとの比較試験など

HeLa細胞単独皮下投与試験(ヌードマウスとの感度の比較)



Nodule Formation 16 weeks after Subcutaneous Administration



	TPD50	Fold
Nude	4.0×10^5	1
NOG	1.3×10^4	25
NOG+ Matrigel	7.9×10	5,000

in vivo検出法

正常細胞(ヒト間葉系幹細胞)に混入するHeLa細胞の検出

Kusakawa et al., *Regen Therapy* 2015;1:30-7.

Strain	Group	Tumor incidence at indicated HeLa cell dose at week 16					TPD ₅₀ at week16
		0	1×10	1×10 ²	1×10 ³	1×10 ⁴	
NOG	HeLa/hMSC (1×10 ⁶)	0/6	0/6	3/6	6/6	6/6	1.0×10 ²
NOG	HeLa/hMSC (1×10 ⁷)	0/6	1/6	2/6	-	(6/6) ^a	1.8×10 ²

a: Since not all animals inoculated with the highest dose (10²) have formed tumors, it was assumed that the tumor incidence of animals at an even higher dose step (a dummy set of data) would have been 100%.

∴ Not tested



マトリゲルとNOGマウスを用いた方法では、ヒト間葉系幹細胞中にof 1/10,000-1/50,000 または 1/1,000,000の割合で混入するHeLa細胞を、それぞれ50%および17%の確率で検出できる

例えば、1%の確率で偽陰性の判定をしてしまうことを許容した上で、HeLa細胞相当の造腫瘍性細胞が1/10⁶以上の割合で混入していないことを示すには、
[log0.01/log(1-0.17)=] 25匹に10⁷個ずつ投与し、1匹も腫瘍形成がないことを確認すればよい

ヒト細胞加工製品の造腫瘍性試験

<目的別に3種類ありうる>

①原料等となる細胞基材(例: ES/iPS細胞など)の品質管理のための試験

⇒WHO TRS 878適用可能

②中間製品／最終製品の品質管理のための試験(不純物としての造腫瘍性細胞の検出)

③最終製品の非臨床安全性評価のための試験

最終製品
中間製品

Q1「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれる？」

高感度in vivo試験、細胞増殖特性評価、軟寒天コロニー形成試験等

Q2「どのくらいのES/iPS細胞が残存しているのか？」

qRT-PCR、フローサイトメトリー、直接培養法

Q3「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか？」

高感度in vivo試験

細胞増殖特性解析



European Medicines Agency
Evaluation of Medicines for Human Use

EMA/724428/2009

ASSESSMENT REPORT FOR ChondroCelect

Common name: characterised viable autologous cartilage cells expanded ex vivo expressing specific marker proteins

Procedure No. EMEA/H/C/000878

自家軟骨細胞由来の
組織工学製品
(軟骨欠損治療)



http://www.gezondheid.be/index.cfm?fuseaction=art&art_id=9251

“In order to address the carcinogenic potential of ChondroCelect, the Applicant performed an *in vitro* study to evaluate senescence of human articular chondrocytes after serial passaging, using ChondroCelect culture conditions. Cells were kept beyond the routine cell culturing as suggested in EMEA/CHMP/410869/2006.

既定の期間を越えた継代の後の細胞老化を*in vitro*で評価

The results provide sufficient evidence that immortalisation of human chondrocytes during limited time in *in vitro* culture conditions would not occur, and that the risk of tumorigenic growth is negligible.

培養期間中不死化細胞の出現はない → 造腫瘍性増殖は無視できる
→ それ以上の試験を実施しなくてもよい

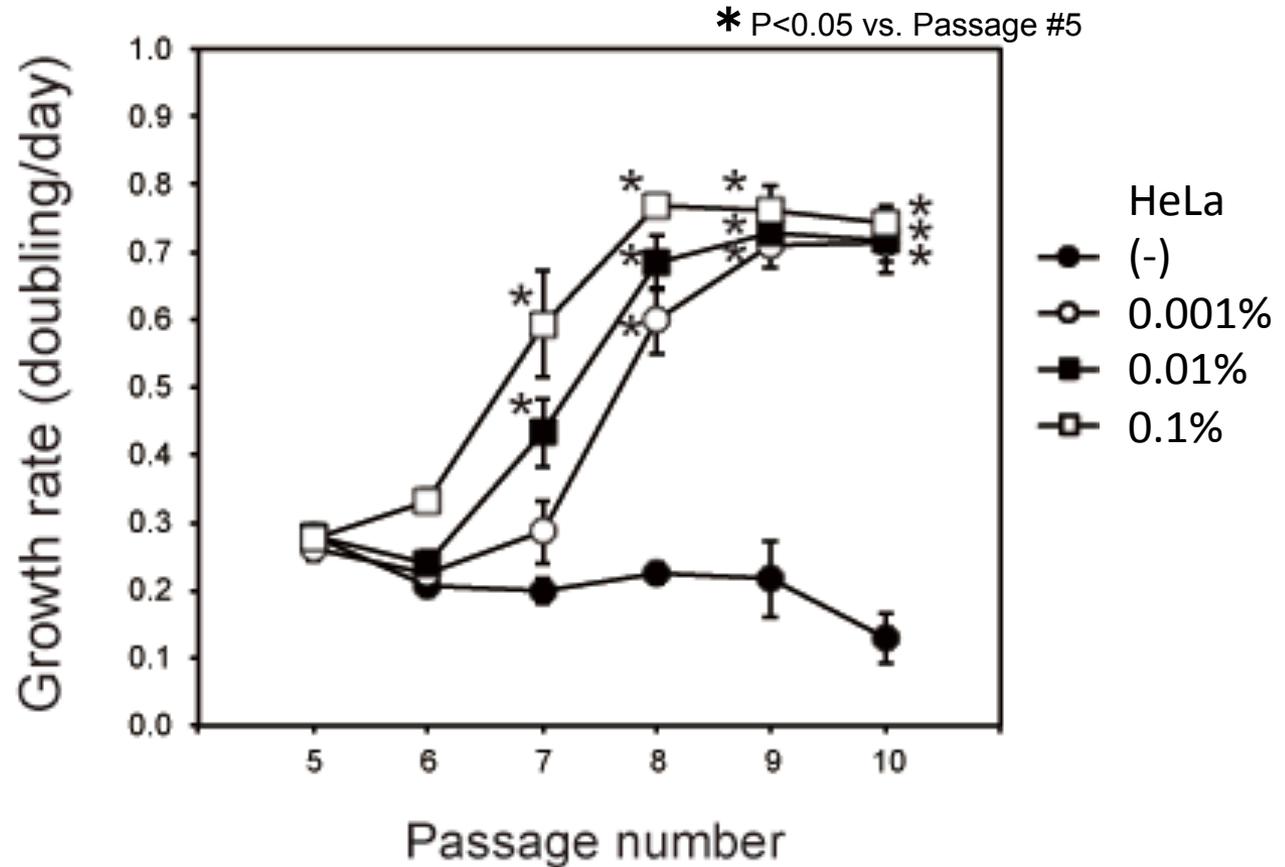
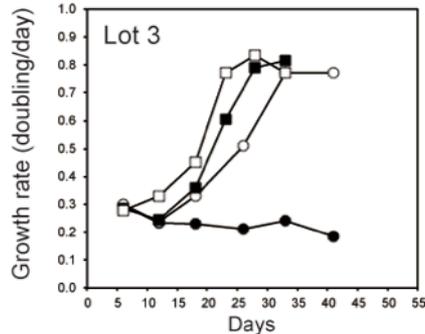
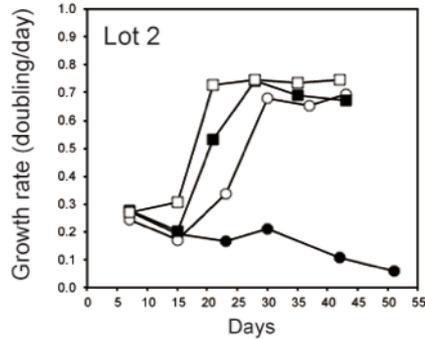
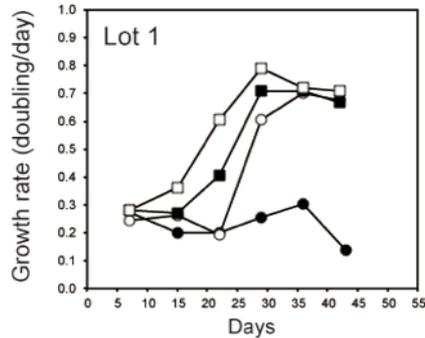
In view of these results, the absence of standard carcinogenicity studies was considered to be acceptable

疑問点: このような細胞増殖特性解析はどのくらいの量の不死化細胞を検出できるのか？

細胞増殖特性解析

正常細胞(ヒト間葉系幹細胞)に混入するHeLa細胞の検出

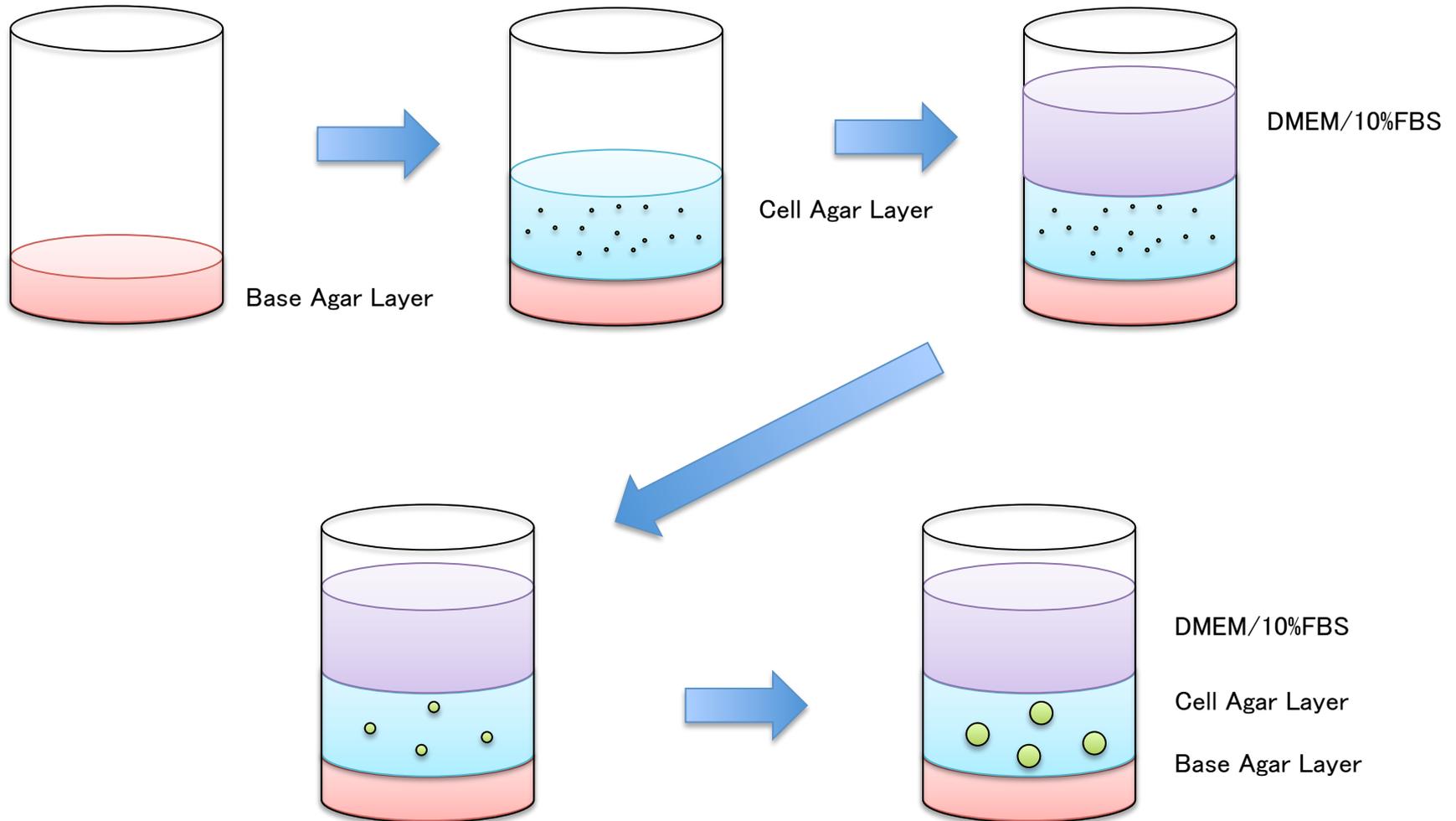
試験目的: **不死化細胞(形質転換細胞)の検出**



実は感度が結構良い

軟寒天コロニー形成試験

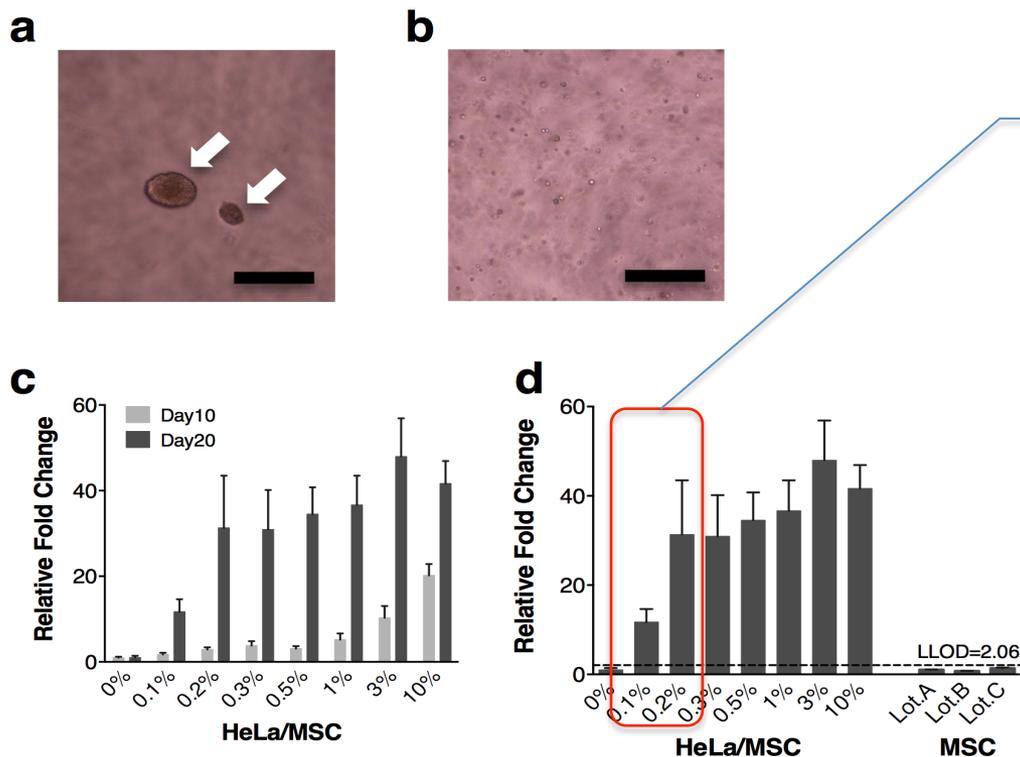
試験目的: 足場非依存的増殖(悪性形質転換細胞)の検出



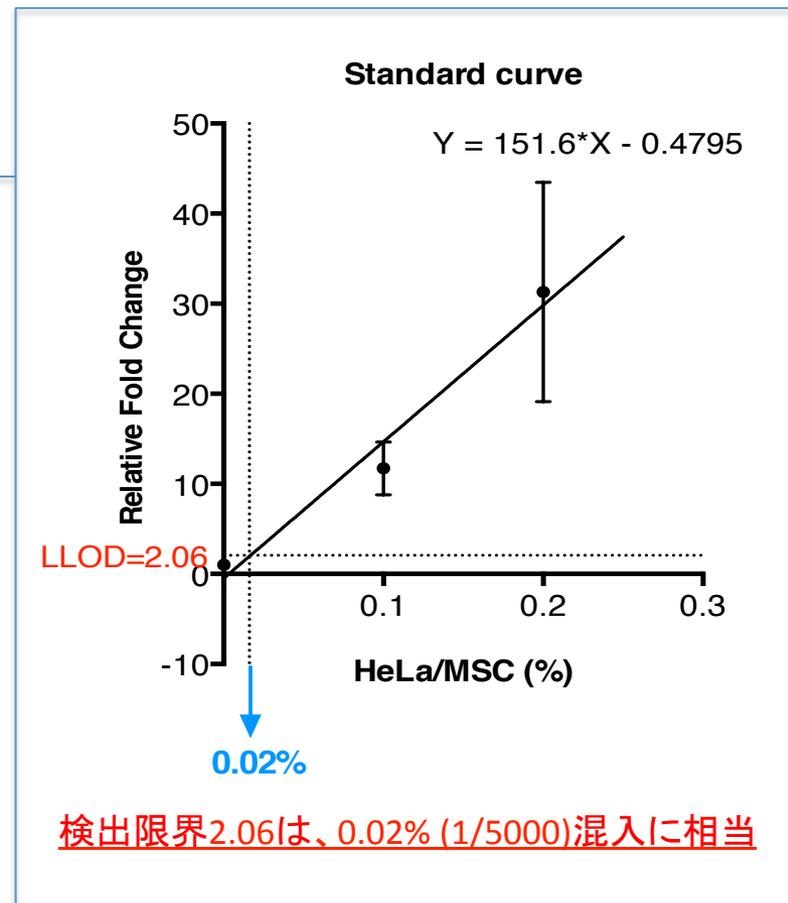
軟寒天コロニー形成試験

正常細胞(ヒト間葉系幹細胞)に混入するHeLa細胞の検出

軟寒天コロニー形成試験(20日間): → HeLa/MSCを0.1%(10/10000)の感度で検出※



※DNA結合性の蛍光色素を用いた細胞数評価

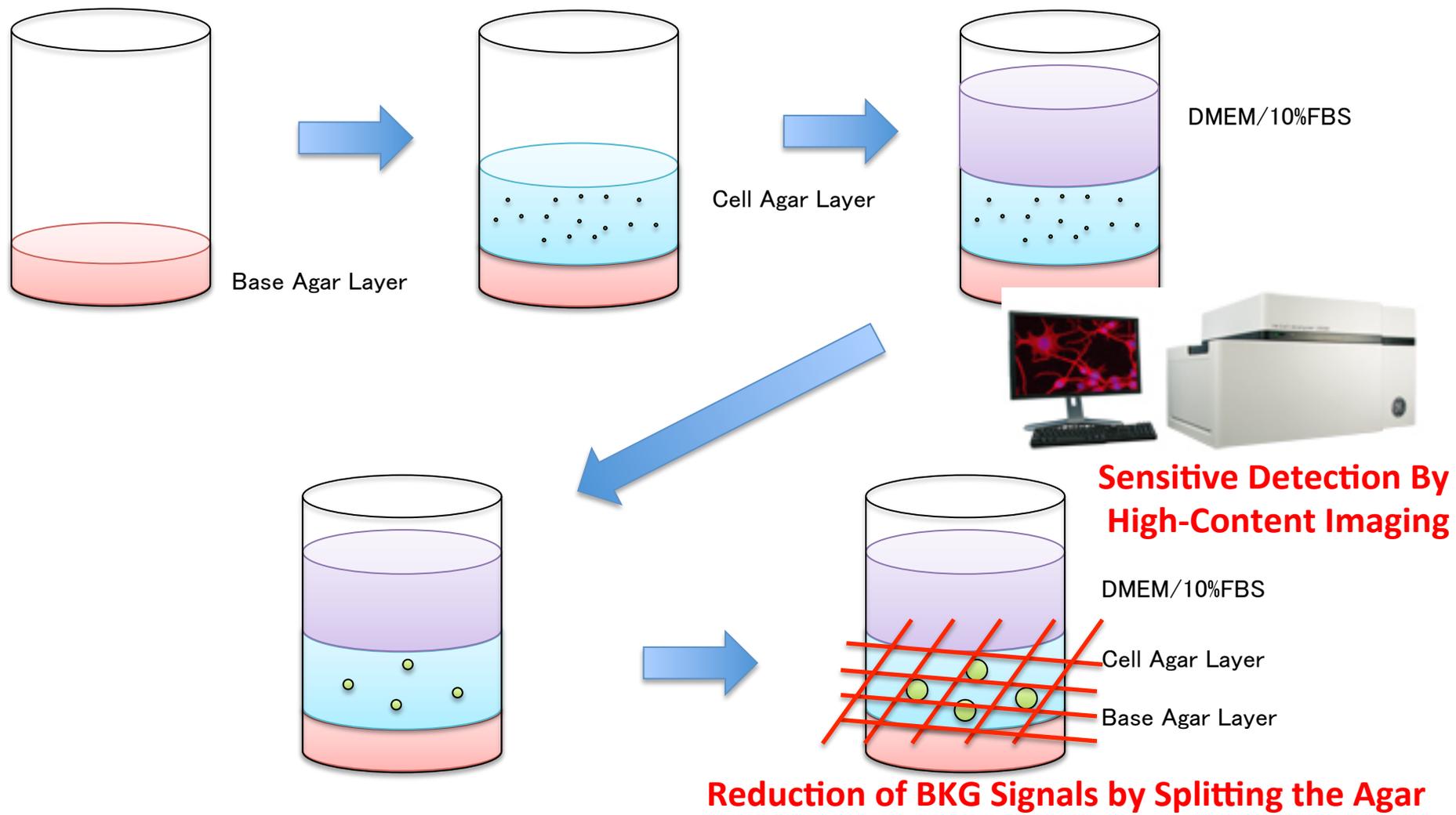


混入する形質転換細胞の検出法

試験法	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験 (NOG x Matrigel, 皮下投与)	軟寒天コロニー形成試験	細胞増殖特性解析
目的	造腫瘍性細胞 の検出	足場非依存的増殖 (悪性形質転換細胞)の検出	不死化細胞 (形質転換細胞)の検出
所要時間	12-16週間	3-4週間	4週間またはそれ以上
利点	<ul style="list-style-type: none"> ●直接的 ●臨床適用相当部位の微小環境での造腫瘍性を評価できる ⇒非臨床安全性評価での利用	<ul style="list-style-type: none"> ●安価 ●悪性形質転換細胞を単離・特性解析できる 	<ul style="list-style-type: none"> ●安価で簡便 ●良性も悪性も幅広く不死化細胞を検出
欠点	<ul style="list-style-type: none"> ●費用と時間がかかる ●専用動物施設が必要 ●良性不死化細胞は検出不能 	<ul style="list-style-type: none"> ●造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断 ●浮遊系細胞には使えない ●良性不死化細胞は検出不能 	<ul style="list-style-type: none"> ●造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断 (●良性か悪性かは区別できない)
LLOD または 検出力	hMSCに 1/1E+6 (0.0001%) の割合で混入するHeLa細胞 (10個)を17%の確率で検出	hMSCに 1/1E+3 (0.1%) の割合で混入するHeLa細胞 (計算上は0.02%)	hMSCに 1/1E+5 (0.001%) の割合で混入するHeLa細胞 は検出可能

軟寒天コロニー形成試験

試験目的: 足場非依存的増殖(悪性形質転換細胞)の検出



in vitro検出法

軟寒天コロニー形成試験を応用した 正常細胞集団中に混入する悪性形質転換細胞の超高感度検出法

単一造腫瘍性細胞のデジタル計数法(仮称:デジタル軟寒天コロニー形成試験)

細胞試料を複数画分に分割

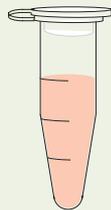


悪性形質転換細胞が1つのウェルあたり1個以下となるように濃度調整して軟寒天培養



各画分におけるコロニーの有無を解析し、コロニーを含む画分数及び
単一悪性形質転換細胞のコロニー形成率から混入細胞数を推定する

多量の細胞からなる試料



複数画分へ分割して培養



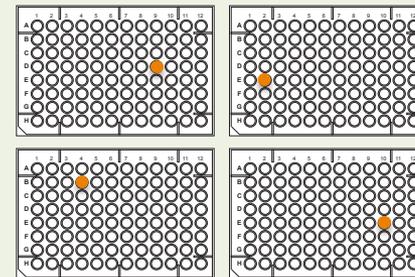
※画像はイメージです



コロニーの有無をハイスループットに解析



コロニーを含む画分数から混入量を推定



● positive well

・HeLa細胞レベルの悪性形質転換細胞の場合、～百万分の1の割合での混入細胞を検出することが可能

・細胞試料を分画及び播種するウェル数、プレート数を増やすことにより、適宜、検出感度を向上させることができる

High-throughput imaging with the *IN Cell Analyzer 2000*

Cell preparation : HeLa 1 / MSC 1,000,000 → 80wells (HeLa 0.0125 / MSC 12,500 / well)

Unpublished Research Data

試料に悪性形質転換細胞が陽性対照同様に混入するとした場合の結果の解釈

Unpublished Research Data

ヒト細胞加工製品の造腫瘍性試験

<目的別に3種類ありうる>

①原料等となる細胞基材(例: ES/iPS細胞など)の品質管理のための試験

⇒WHO TRS 878適用可能

②中間製品／最終製品の品質管理のための試験(不純物としての造腫瘍性細胞の検出)

③最終製品の非臨床安全性評価のための試験

最終製品
中間製品

Q1「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれる？」

高感度in vivo試験、細胞増殖特性評価、軟寒天コロニー形成試験等

Q2「どのくらいのES/iPS細胞が残存しているのか？」

qRT-PCR、フローサイトメトリー、直接培養法

Q3「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか？」

高感度in vivo試験

造腫瘍性をもとにした再生医療製品の分類

- ヒト体細胞/体性幹細胞加工製品
 - ・・・原料となる細胞に造腫瘍性がない

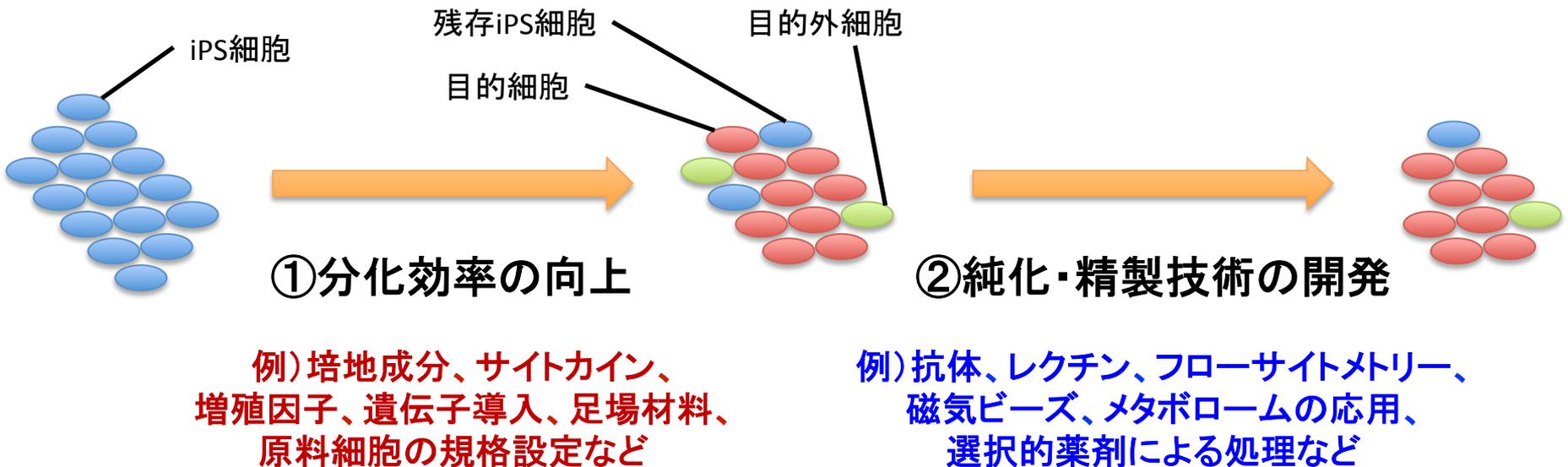
ほとんど

- ヒトES/iPS細胞加工製品
 - ・・・原料となる細胞に造腫瘍性がある

ヒトES/iPS細胞加工製品の品質・安全性

- 加工に伴う造腫瘍性形質転換細胞の出現・混入の可能性の他に、
- 未分化なES/iPS細胞には腫瘍形成能(造腫瘍性)があることから、
残存ES/iPS細胞による腫瘍形成のリスクが存在する

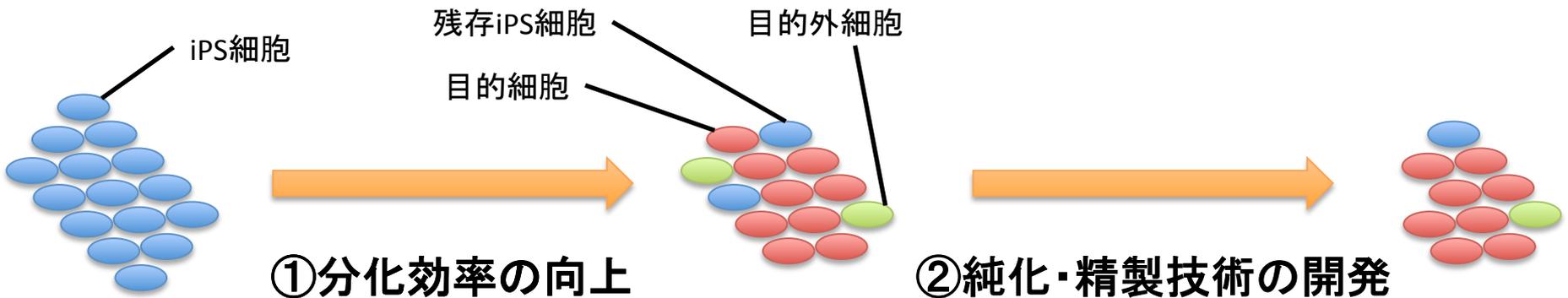
未分化ES/iPS細胞の残存・混入を防止する工夫が必要



ヒトES/iPS細胞加工製品の品質・安全性

- 加工に伴う造腫瘍性形質転換細胞の出現・混入の可能性の他に、
- 未分化なES/iPS細胞には腫瘍形成能(造腫瘍性)があることから、
残存ES/iPS細胞による腫瘍形成のリスクが存在する

未分化ES/iPS細胞の残存・混入を防止する工夫が必要



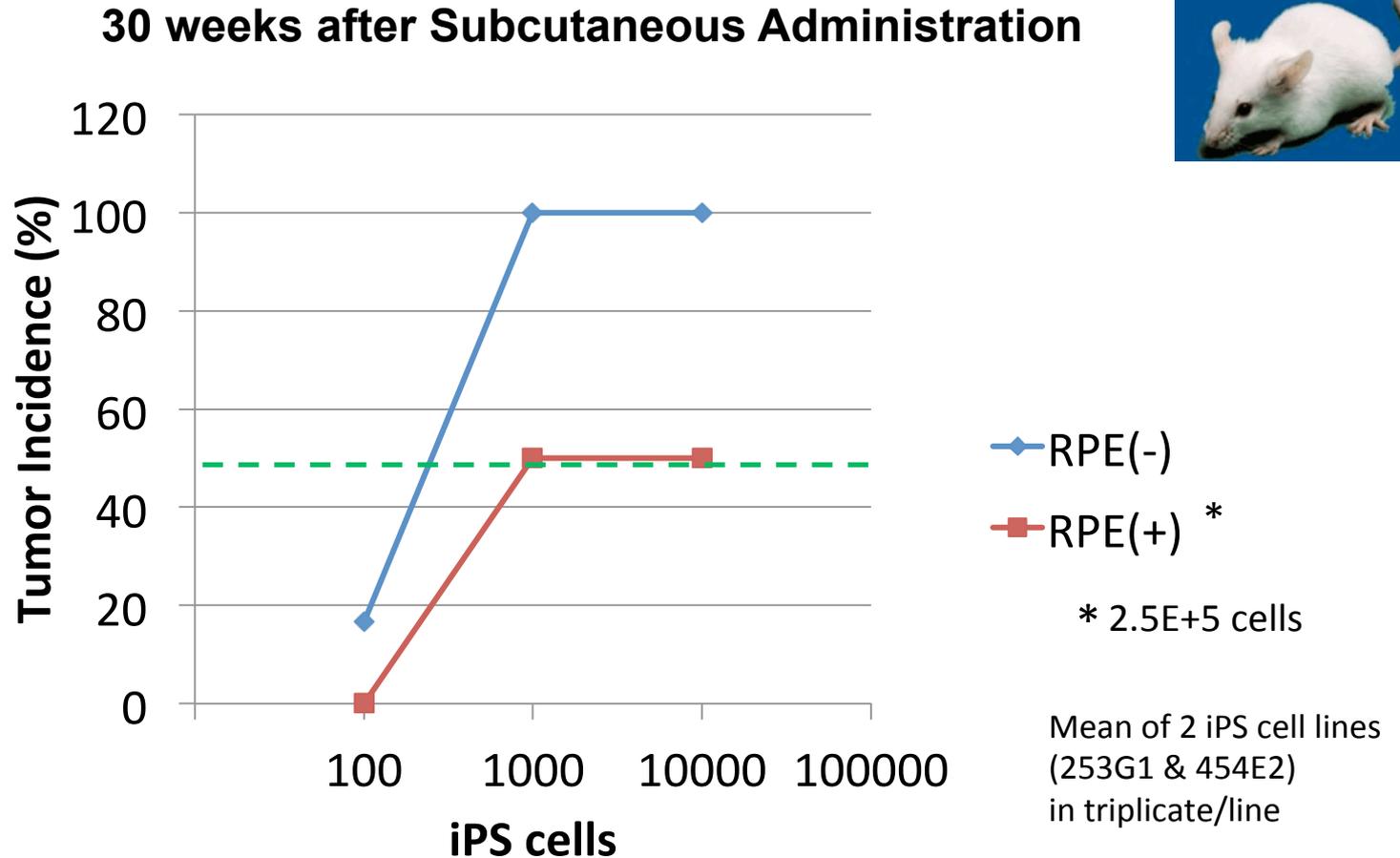
③製品の「実用化」には、未分化ES/iPS細胞の
除去・残留を確認する試験法が不可欠

→ 未分化ES/iPS細胞の高感度検出法の開発と評価

*in vivo*検出法

ヒト網膜色素上皮細胞(RPE)に混入するヒトiPS細胞の検出(NOG & MG)

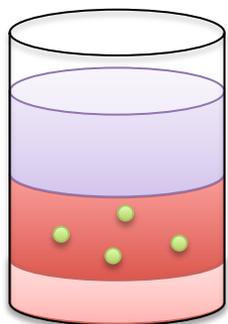
Kanemura et al., *Sci Rep.* 2013; 3: 2334.から改変



iPS細胞単独およびRPEとの混合時のTPD₅₀はiPS細胞数にして、それぞれ数百個および数千個以上

軟寒天コロニー形成試験

ヒト網膜色素上皮細胞(RPE)に混入するヒトiPS細胞の検出

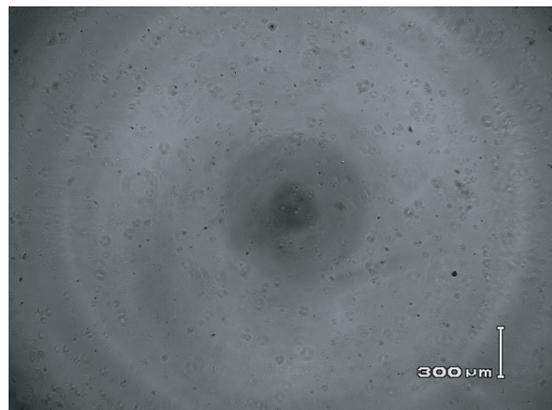


DMEM/10%FBS

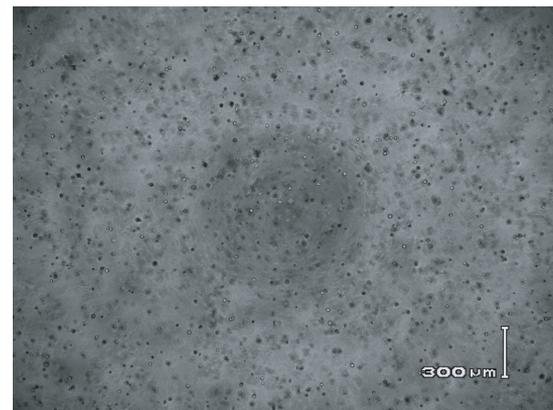
Cell Agar Layer

Base Agar Layer

96-well plate



iPSCs



primary RPE



iPSC-derived RPE



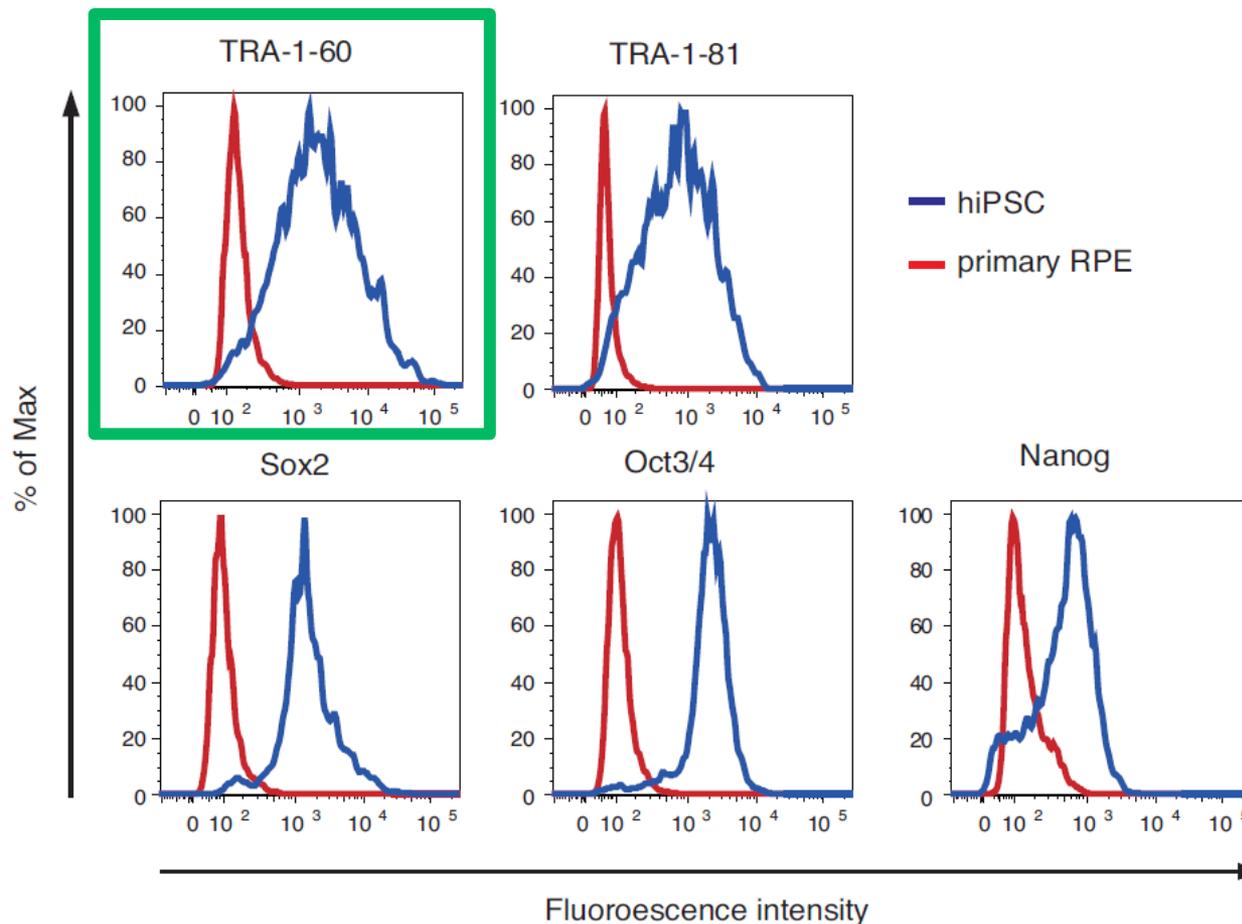
PA-1 (テラトカルシノーマ)



ヒトiPS/ES細胞の検出には使えない

フローサイトメトリー

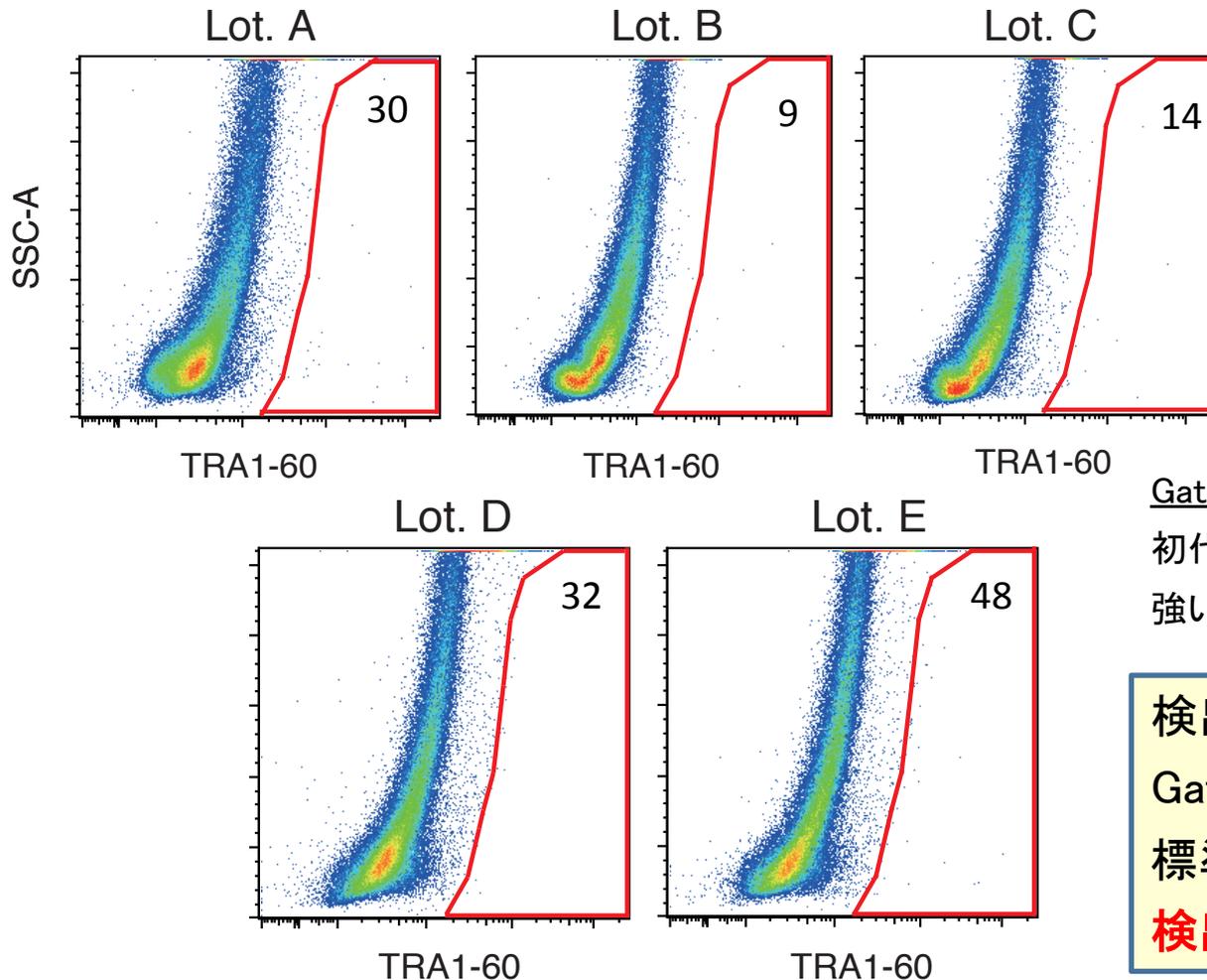
各種マーカーの検討



hiPSCへの選択性が高く、胚性がん(ES)細胞のマーカーでもあるTRA-1-60を採用

フローサイトメトリー

フローサイトメトリー(TRA-1-60)の下方検出限界(LLOD)



初代培養RPE
解析細胞数 10^5
抗体: TRA-1-60

Gateの設定条件

初代培養RPEのmain populationより蛍光の強い細胞の $\leq 0.05\%$ を含む様に設定

検出限界

Gate内細胞数の平均値: 26.6

標準偏差: 15.6

検出限界(平均値 + 3xSD): 73.2

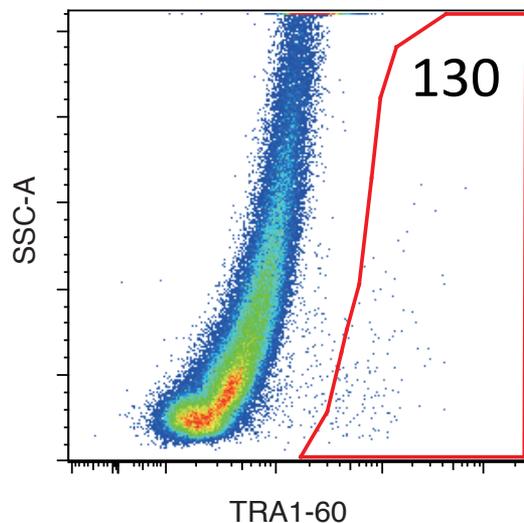
フローサイトメトリー

ヒト網膜色素上皮細胞 (RPE) に混入するヒトiPS細胞の検出

RPE細胞 + iPS細胞スパイク

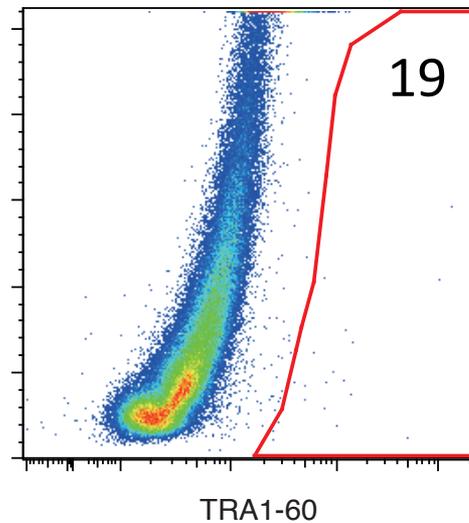
primary RPE 2.5×10^5 cells
+
iPS 2.5×10^2 cells

0.1% iPS spike



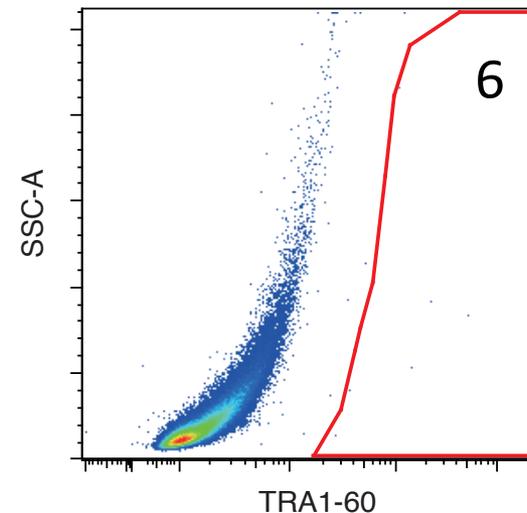
primary RPE 2.5×10^5 cells
+
iPS 2.5×10^1 cells

0.01% iPS spike

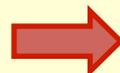


iPS由来RPE

iPS-derived RPE



検出限界 (平均値 + 3xSD) : 73.2

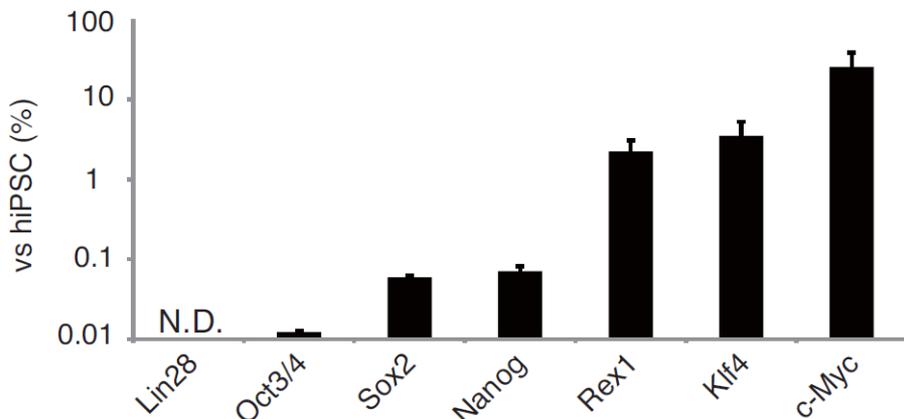


残留・混入iPS細胞の検出限界は約0.1%

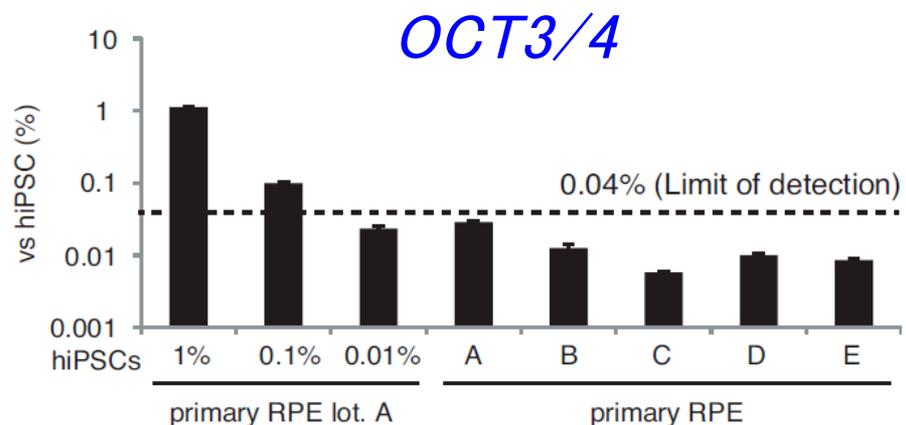
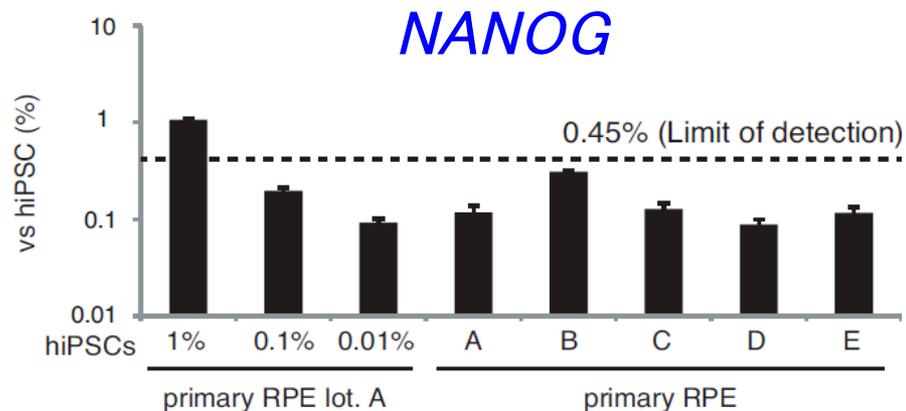
qRT-PCR

ヒト網膜色素上皮細胞 (RPE) に混入するヒトiPS細胞の検出

多能性幹細胞関連遺伝子 (初代培養RPE)



検出限界

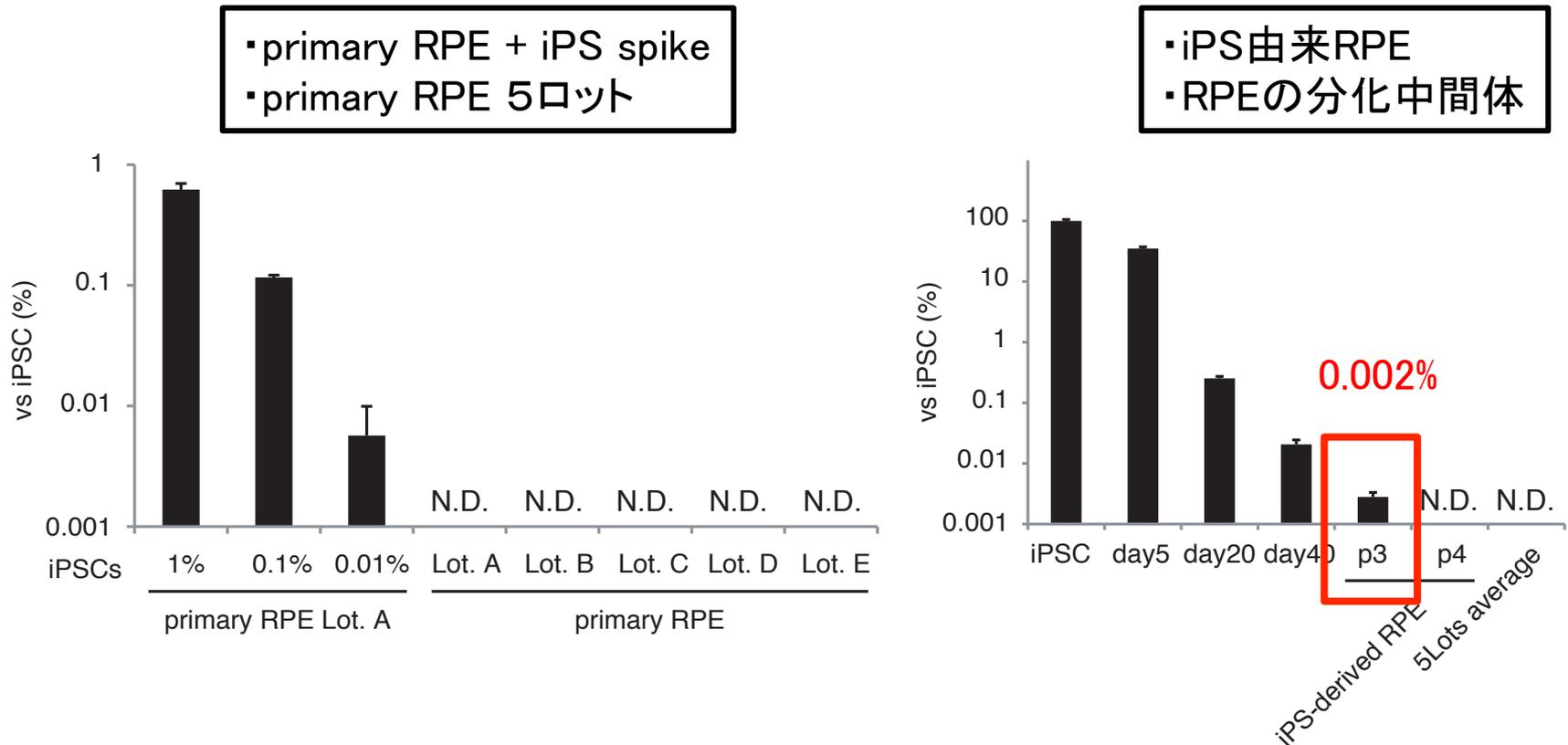


- ・初代培養RPE + iPS spike
- ・初代培養RPE 5ロット

qRT-PCR

ヒト網膜色素上皮細胞 (RPE) に混入するヒトiPS細胞の検出

LIN28



LIN28の発現を指標とすれば5万個 (臨床使用量に匹敵) に1個の割合の混入を検出可能

LIN28/ddPCR

ヒト心筋細胞 (hCMC) に混入するヒトiPS細胞の検出

Unpublished Research Data

心筋におけるLIN28/ddPCR法の検出限界は0.001%

LIN28/RT-PCR: もっと他の細胞・組織に応用可能か？

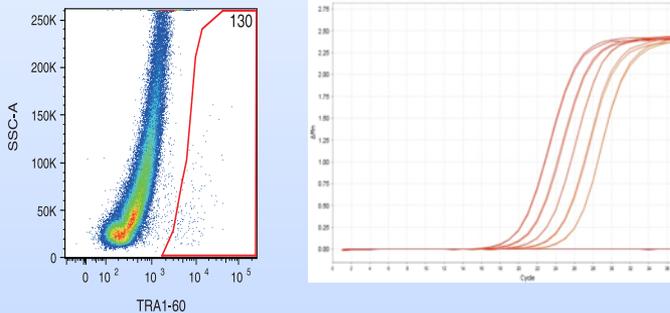
Unpublished Research Data

***LIN28* mRNAは正常組織で非常に発現が低い**

さらに新しい*in vitro*検出法の開発

これまでの*in vitro*検出方法

Flow cytometry, qRT-PCRによる
未分化マーカーの検出

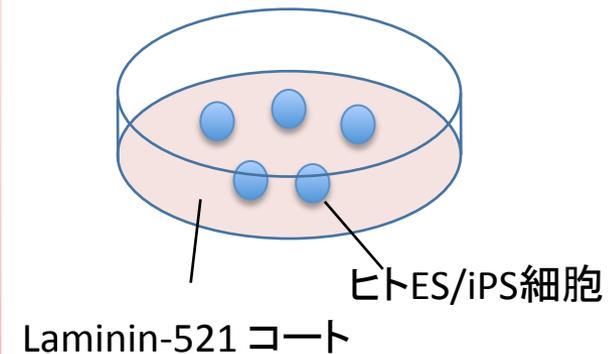


長所: 簡便、高感度
短所: 間接的
(細胞の存在を直接証明していない)

新しい*in vitro*検出方法

培養によって増幅させることで
直接検出できないか？

課題: ヒト多能性幹細胞特異的な
分散誘導性細胞死



Laminin-521を用いた高効率培養法の開発

Essential8 & Laminin-521を用いた培養系による 正常細胞 (hMSC) に混入するiPS細胞の増幅・検出 (スパイク実験)

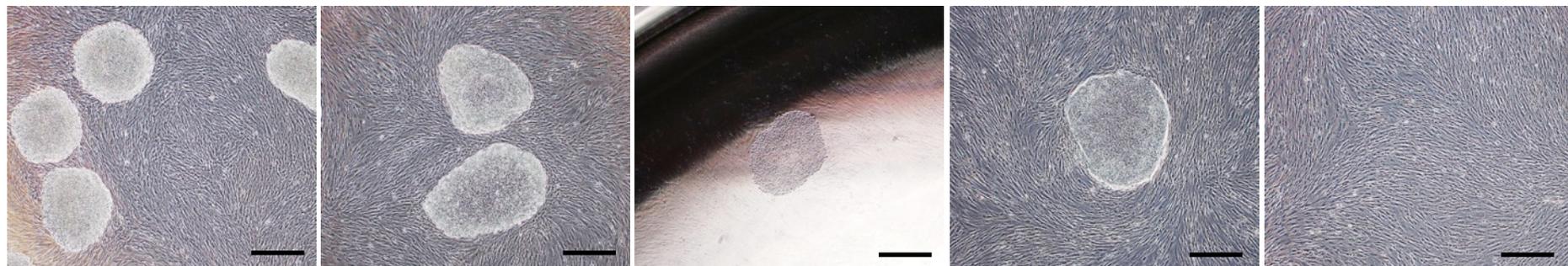
1% iPS

0.1% iPS

0.01% iPS

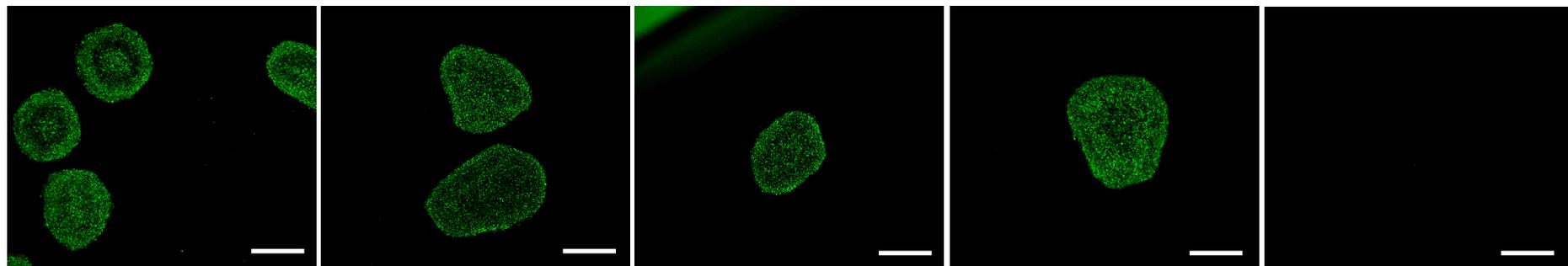
0.001% iPS

0% iPS



TRA-1-60

500μm



コロニー数 約100個

約20個

1個

1個

0個

hMSCの
細胞数
(播種時)
 3×10^4

3×10^4

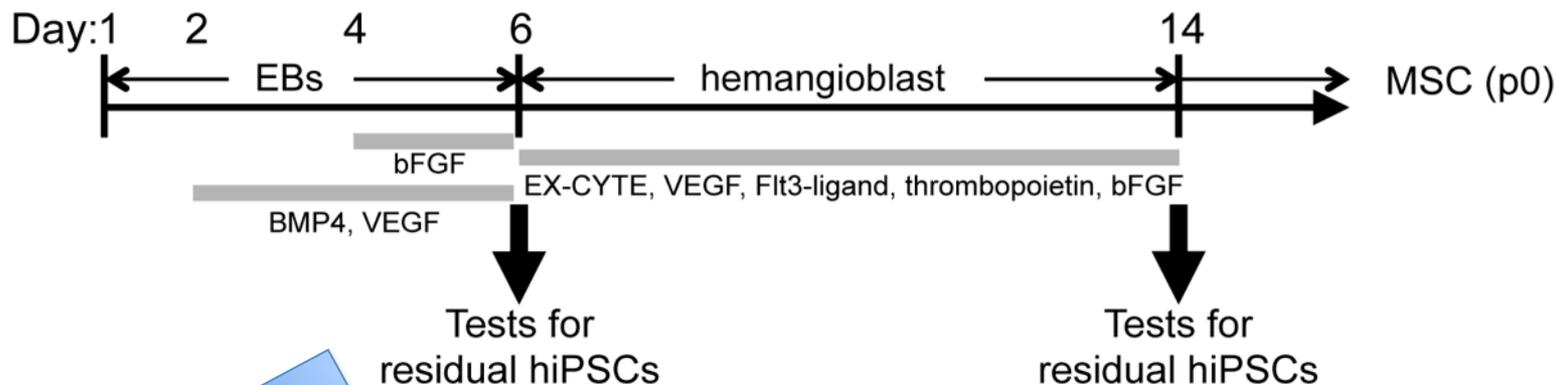
3×10^4

6×10^5

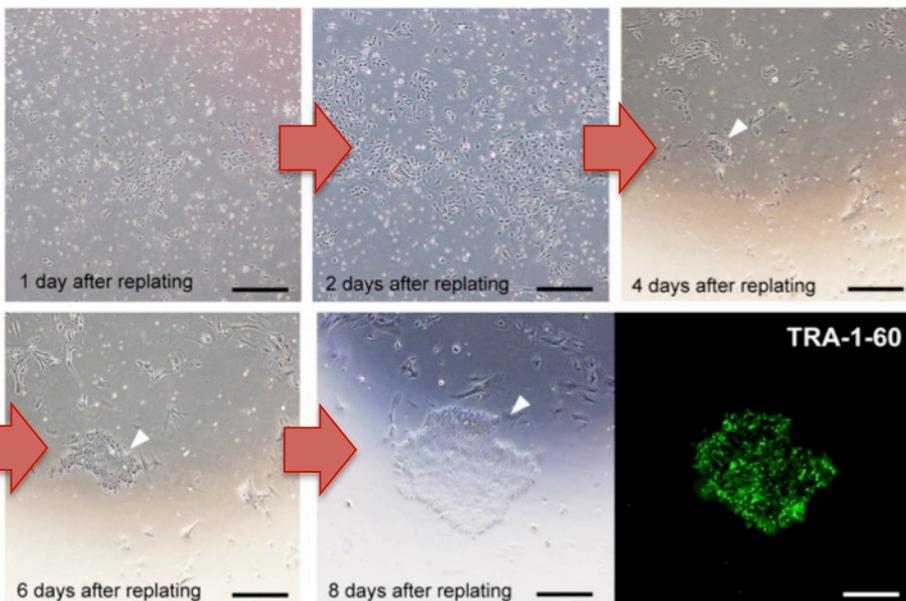
3×10^4

Essential-8/Laminin-521培養増幅法

ヒトiPS細胞から間葉系幹細胞(MSC)への分化過程での残存iPS細胞の検出



Differentiating cells (EBs at Day 6) replated on laminin-521 in Essential 8



No colony formation

EB中のiPS細胞の検出感度が成熟MSC中の場合と同等だとすれば、形成されたコロニー数より、iPS細胞の残存率は0.01-0.1%と推定

残存する未分化iPS/ES細胞の検出法

試験法	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験 (NOG x Matrigel, 皮下投与)	軟寒天コロニー形成試験	フローサイトメトリー
目的	造腫瘍性細胞の検出	足場非依存的増殖 (悪性形質転換細胞)の検出	未分化な多能性細胞の検出
所要時間	12-16週間		1日
利点	<ul style="list-style-type: none"> ●直接的 ●微小環境での造腫瘍性を評価できる 		<ul style="list-style-type: none"> ●短時間・簡便 ●個々の細胞を解析
欠点	<ul style="list-style-type: none"> ●費用と時間がかかる ●専用動物施設が必要 ●臨床適用相当部位の微小環境での造腫瘍性を評価できる →非臨床安全性試験 	<ul style="list-style-type: none"> ●ヒトiPS細胞検出には使用できない (分散誘導性細胞死) 	<ul style="list-style-type: none"> ●間接的 ●既知のマーカー分子を発現する細胞以外は検出不能 ●ゲーティングが結果に影響
LLOD または 検出力	hRPE2.5E+5個中に1000個(0.4%) の割合で混入するhiPS細胞 を50%の確率で検出		hRPE中の 0.1%のiPS細胞 マーカー:TRA-1-60

試験法	qRT-PCR	Droplet Digital PCR	Essential-8/LN521培養増幅法
目的	未分化の多能性細胞の検出	未分化の多能性細胞の検出	未分化の多能性細胞の検出
所要時間	6時間	数時間	約1週間
利点	<ul style="list-style-type: none"> ●迅速 ●簡便 ●定量的 ●高感度 	<ul style="list-style-type: none"> ●迅速 ●簡便 ●定量的 ●高感度 	<ul style="list-style-type: none"> ●直接的 ●簡便 ●残存iPS細胞の特性解析が可能
欠点	<ul style="list-style-type: none"> ●間接的 ●既知のマーカー分子を発現する細胞以外は検出不能 	<ul style="list-style-type: none"> ●間接的 ●既知のマーカー分子を発現する細胞以外は検出不能 	<ul style="list-style-type: none"> ●時間がかかる
LLOD または 検出力	hRPE中の 0.002%以下のiPS細胞 マーカー: LIN28	ヒト心筋細胞中の 0.001%のiPS細胞 マーカー: LIN28	hMSC中の 0.01-0.001%のiPS細胞 (ヒト胚葉体中の0.1-0.01%のiPS細胞)

ヒト細胞加工製品の造腫瘍性試験

<目的別に3種類ありうる>

①原料等となる細胞基材(例: ES/iPS細胞など)の品質管理のための試験

⇒WHO TRS 878適用可能

②中間製品／最終製品の品質管理のための試験(不純物としての造腫瘍性細胞の検出)

③最終製品の非臨床安全性評価のための試験

最終製品
中間製品

Q1「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれる？」

高感度in vivo試験、細胞増殖特性評価、軟寒天コロニー形成試験等

Q2「どのくらいのES/iPS細胞が残存しているのか？」

qRT-PCR、フローサイトメトリー、直接培養法

Q3「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか？」

高感度in vivo試験

In vivo造腫瘍性試験による非臨床安全性評価における留意点

<試験デザイン>

- 動物モデルの特性
 - 免疫抑制状態
 - 検出限界
 - 結果の精度
 - 陽性 (& 陰性) 対照細胞
- 試験プロトコル
 - 観察期間
 - 投与部位・投与経路
(微小環境の影響)
- 細胞の体内分布
 - 移植細胞の残存期間
 - 移植細胞の遊走

<対象製品>

- 製品の特長
 - 同一性
 - 純度
 - 細胞生存率
 - 剤形
 - 非細胞成分

<対象患者>

- 対象患者集団
 - 自己、同種、異種
 - 免疫状態
 - 病態
 - 標的器官・組織のサイズ
 - 投与部位・投与経路
 - 期待される細胞残存期間

製品の投与部位・投与経路

Bailey AM (CBER/FDA) *Sci Transl Med* 2012: 4:147fs28

“..., an animal study that evaluates a route of product administration that is different from what is proposed clinically may not adequately account for the influence of the local host microenvironment, which could affect the product’s ability to form tumors. For instance, results generated from the subcutaneous implantation of a cell-based RM product may not accurately reflect the bioactivity of a product that is intended for intracranial implantation in humans”



ただし、常に当てはまるというわけでもない

異なる微小環境におけるiPS細胞とHeLa細胞の造腫瘍性

Cell Line	TPD ₅₀	TPD ₅₀
iPSCs (201B7)	132	5x10 ⁴
HeLa Cells	12.6	21
Route of Administration	Subcutaneous	Subretinal
Animal	NOG mouse	Nude rat

Kawamata et al., *J Clin Med.* 2015;4:159-71

← iPS細胞の選択的アポトーシスを誘導するサイトカイン(PEDF)が網膜色素上皮細胞から分泌されている

iPS細胞の造腫瘍性は、NOGマウスへの皮下投与の場合と比べ、ヌードラットの網膜下投与の場合に非常に弱くなる。



iPS細胞由来網膜細胞製品の場合は、NOGマウスへの皮下投与のほうが、ヌードラットの網膜下投与よりも残存iPS細胞に対する感度が高いと考えられる。

核型解析/Omics/NGSに関する考察

- 細胞加工製品の開発における**造腫瘍性評価の目的は、手元の製品の開発・臨床利用上の意思決定**にある。
- では、核型解析/Omics/NGSの結果をもとに細胞加工製品の造腫瘍性を評価できるか？評価のためには、核型解析/Omics/NGSのデータと最終製品の造腫瘍性との間に、**意思決定の根拠となるに足る明確な相関があるという具体的証拠がなければならない。**
(が、通常、そのような証拠はなかなかない)
- 核型解析/Omics/NGS は造腫瘍性の評価ではなく、**ゲノムの安定性(遺伝的安定性)の評価に有用**と考えられる。では、核型解析/Omics/NGS をどのように利用すれば製品の**ゲノム安定性を定量的に評価することができるか？その方法の確立・標準化は今後の課題**である。
- Omics/NGS は、製品規格や製法を改善するための**Reverse Translational Researchに将来、有用となる可能性もある**が、そのような目的のデータは**薬事承認申請の要件ではない**。
- 核型解析/Omics/NGS は、勿論、**ゲノムの高いインテグリティと安定性が要求される公的な細胞ストックや製品製造用セル・バンクの品質管理には有用**である。

まとめ

- ①造腫瘍性細胞の混入の検出には*in vivo*試験(NOG&MG)が(今のところ)最も感度が高い
- ② *in vitro*増殖特性解析による不死化細胞検出系の感度は実は悪くない
- ③分化細胞中の残存ヒトiPS細胞の検出にはPCRベースの*LIN28*遺伝子発現解析が高感度
- ④Essential8/LN521培養増幅系では直接かつ半定量的な残存iPS細胞の測定が可能

造腫瘍性試験系は、**試験系の能力と限界を踏まえ、**
個別の製品で示すべき**目的に合うかどうか**で取捨選択

- 懸念の強い製品についてはタイプの異なる試験をいくつか実施して総合的に
- 適切な試験(を組み合わせた)結果・評価についても、
ヒトでの結果を完全に保証するものではないことに注意
- 各試験法の能力と限界を理解した上で、リスク判断・リスクマネジメント立案&IC受領

ヒトES/iPS細胞加工製品の 造腫瘍性に関する2つの課題

- **量的問題**

最新の方法を用いても、 $10^5 \sim 10^6$ 個よりも多い分化細胞中に1個の割合で混入する未分化iPS細胞・造腫瘍性細胞は検出できない。

しかし、ほとんどの細胞加工製品の臨床適用量は、この割合を遥かに超える（例えば、心筋や脊髄の再生を目的とした製品の場合、 $10^7 \sim 10^9$ 個程度必要）。

⇒試験方法の改良や結果の解釈の体系化が必要

- **質的問題**

造腫瘍性があったとしても、腫瘍が良性か悪性かで対応が大きく異なる。

⇒悪性腫瘍形成の防止策（原料や製造方法の工夫）が必要

謝辞(敬称略)

国立医薬品食品衛生研究所

- 安田 智
- 黒田拓也
- 草川森士
- 田埜慶子
- 中島啓行
- 河野健
- 澤田留美
- 平田尚也
- 諫田泰成
- 鈴木和博
- 高田のぞみ
- 松山さと子
- 村岡ひとみ
- 城 しおり

慶應義塾大学

- 福田恵一

国立成育医療研究センター研究所

- 梅澤明弘
- 斎藤博久

近畿大学

- 掛樋一晃
- 早川堯夫

先端医療振興財団

- 川真田伸
- 松山晃文
- 大倉華雪
- 郷正博
- 西下直希
- 金村星余
- 西川伸一

理化学研究所

- 高橋政代

大阪大学

- 西田幸二
- 澤 芳樹

実験動物中央研究所

- 堤秀樹
- 町田一彦
- 伊藤守

IABS (formerly with WHO & CBER/FDA)

- John Petricciani