



平成28年9月29日

創薬薬理フォーラム第24回シンポジウム

再生・細胞医療製品の品質と安全性の評価について

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並びに日本再生医療学会の現在の公式な見解では必ずしもありません

新しい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」（再生医療推進法）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。

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

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

製造販売

薬機法（改正薬事法）

【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

迅速性

安全性

安全な再生医療を迅速かつ円滑に

多くの製品を、より早く

再生医療等の実施・開発状況



再生医療等安全性確保法

再生医療・細胞治療の提供

治療

3,232 件

(2016年8月31日現在)

Class 1: 0
Class 2: 70
Class 3: 3,162



臨床研究

99 件

(2016年8月31日現在)

Class 1: 15
Class 2: 35
Class 3: 49



薬機法

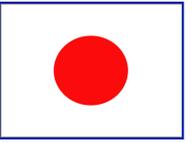
再生医療等製品の販売

再生医療等製品

既承認：4 品目

- 自己由来培養表皮
- 自己由来培養軟骨
- 同種由来間葉系幹細胞
- 自己由来骨格筋芽細胞シート
(条件・期限付き承認)





I. 薬事法の改正（薬機法）

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)

新たな製品カテゴリーの導入

【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＞

「再生医療製品」「細胞加工製品」

- 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）

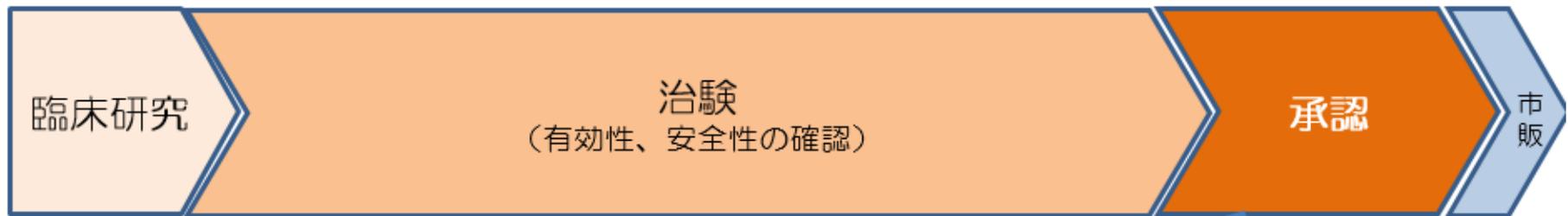
「遺伝子治療薬」「遺伝子治療用製品」

再生医療等製品の特性を踏まえた規制の構築(2)

条件・期限付製造販売承認制度の導入

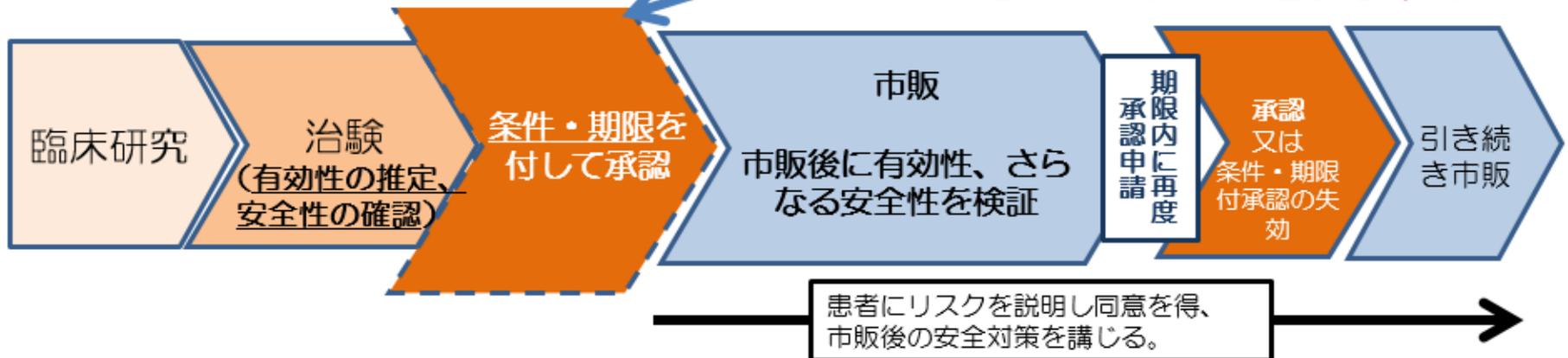
【従来の承認までの道筋】

＜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】

※患者のアクセスをより早く！



- 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。



II. 再生医療等安全性確保法

再生医療等安全性確保法の概要

趣 旨

再生医療等の迅速かつ安全な提供等を図るため、再生医療等を提供しようとする者が講ずべき措置を明らかにするとともに、**特定細胞加工物の製造の許可等の制度等を定める。**

法案の内容

1. 再生医療等の分類

再生医療等について、人の生命及び健康に与える影響の程度に応じ、「第1種再生医療等」「第2種再生医療等」「第3種再生医療等」に3分類して、それぞれ必要な手続を定める。

※ 分類は、細胞や投与方法等を総合的に勘案し、厚生科学審議会の意見を聴いて厚生労働省令で定めるが、以下の例を想定。第1種:iPS細胞等、第2種:体性幹細胞等、第3種:体細胞等。

2. 再生医療等の提供に係る手続

- 第1種再生医療等 提供計画について、特定認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出して実施。一定期間の実施制限期間を設け、その期間内に、厚生労働大臣が厚生科学審議会の意見を聴いて安全性等について確認。安全性等の基準に適合していないときは、計画の変更を命令。
- 第2種再生医療等 提供計画について、特定認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出して実施。
- 第3種再生医療等 提供計画について、認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出して実施。
※ 特定認定再生医療等委員会は、特に高度な審査能力と第三者性を有するもの。
※ 第1種再生医療等、第2種再生医療等を提供する医療機関については、一定の施設・人員要件を課す。

3. 適正な提供のための措置等

- インフォームド・コンセント、個人情報保護のための措置等について定める。
- 疾病等の発生は、厚生労働大臣へ報告。厚生労働大臣は、厚生科学審議会の意見を聴いて、必要な措置をとる。
- 安全性確保等のため必要なときは、改善命令を実施。改善命令違反の場合は再生医療等の提供を制限。保健衛生上の危害の発生拡大防止のため必要なときは、再生医療等の提供の一時停止など応急措置を命令。
- 厚生労働大臣は、定期的に再生医療等の実施状況について把握し、その概要について公表する。

4. 特定細胞加工物の製造の許可等

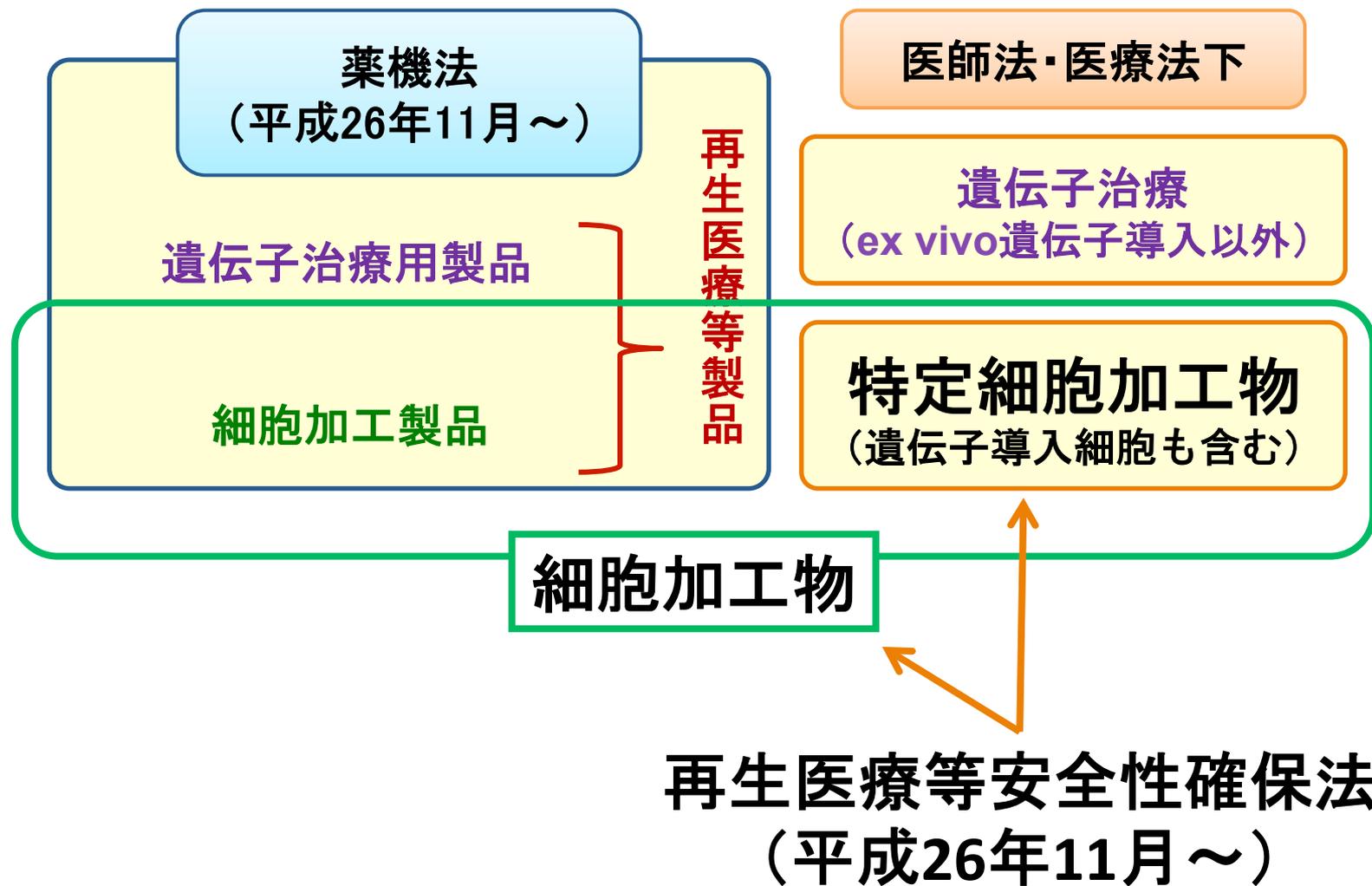
- 特定細胞加工物の製造を許可制(医療機関等の場合には届出)とし、医療機関が特定細胞加工物の製造を委託する場合には、許可等を受けた者又は届出をした者に委託しなければならないこととする。

施行期日

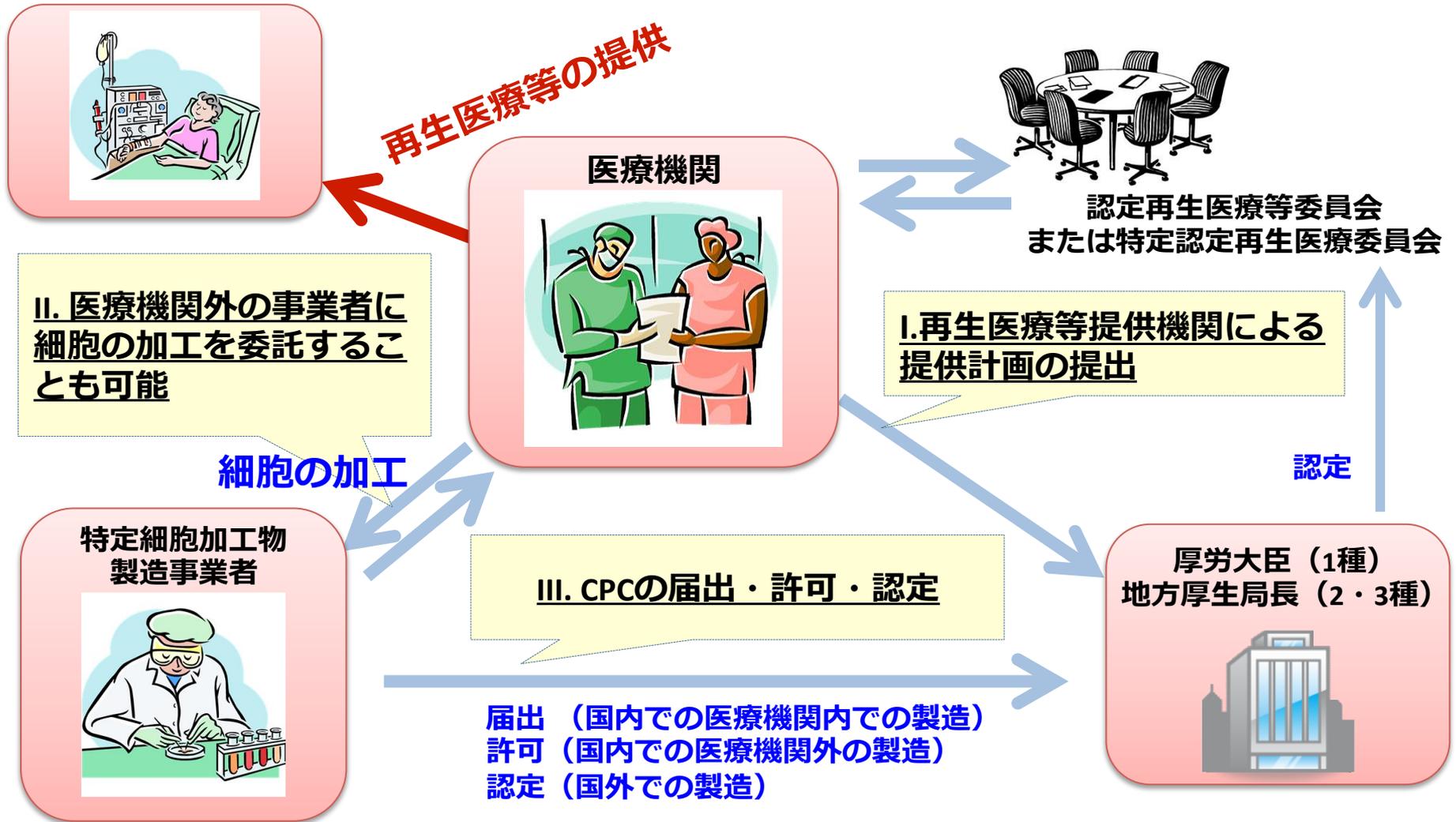
薬事法等の一部を改正する法律の施行の日(公布の日から1年を超えない範囲内において政令で定める日)

「特定細胞加工物」

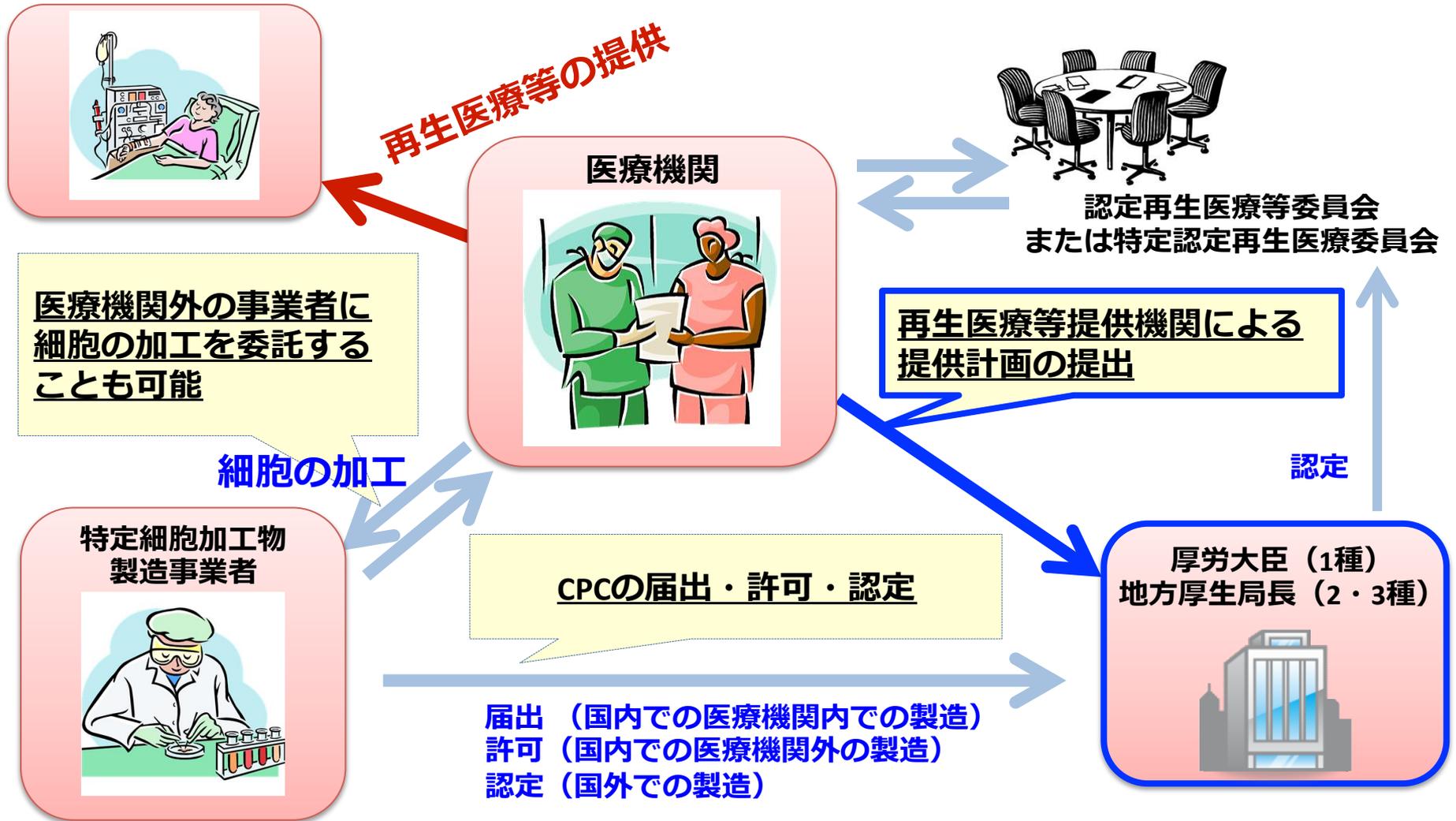
…『再生医療等安全性確保法』の規制対象



再生医療等安全性確保法の概要

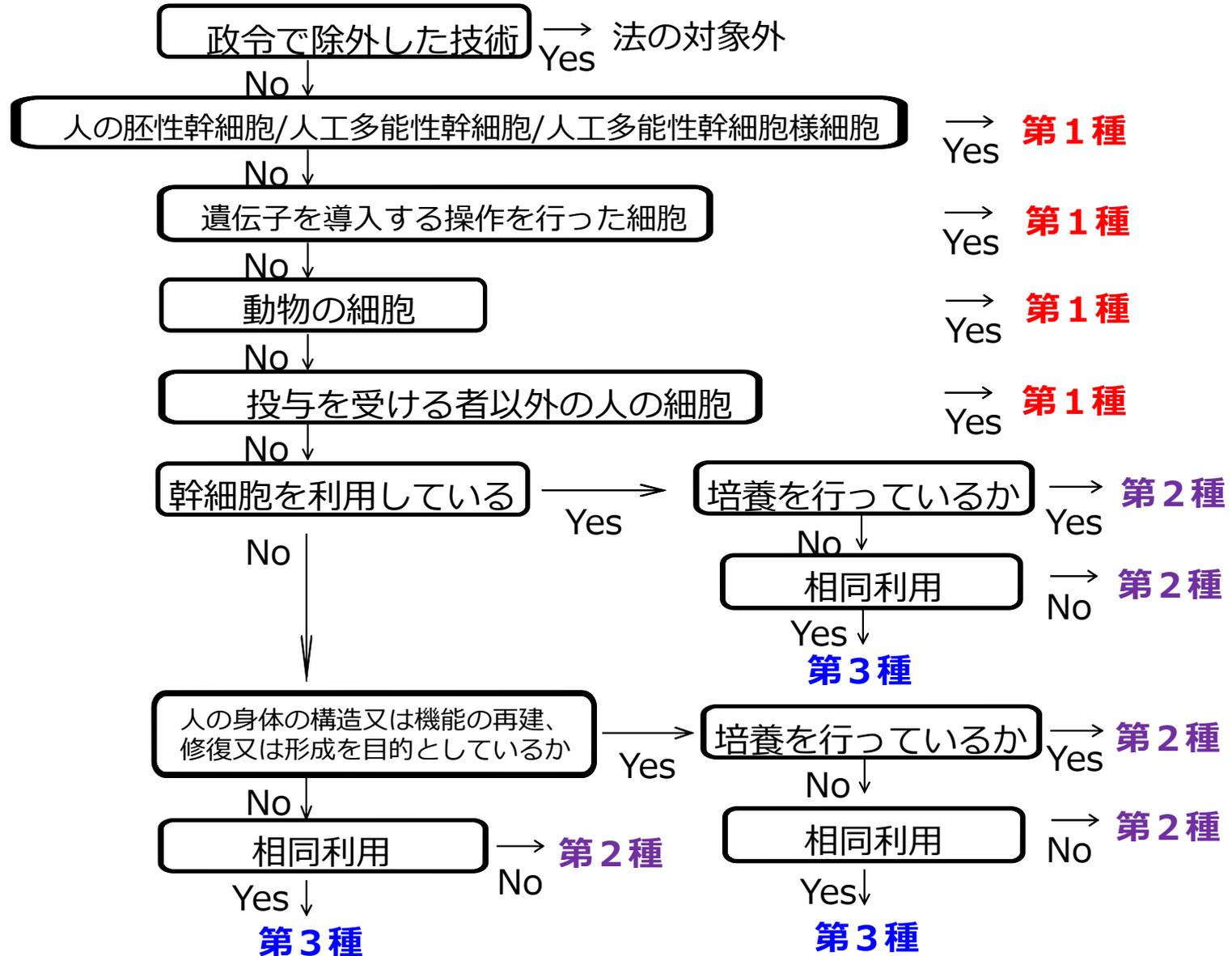


再生医療等安全性確保法の概要

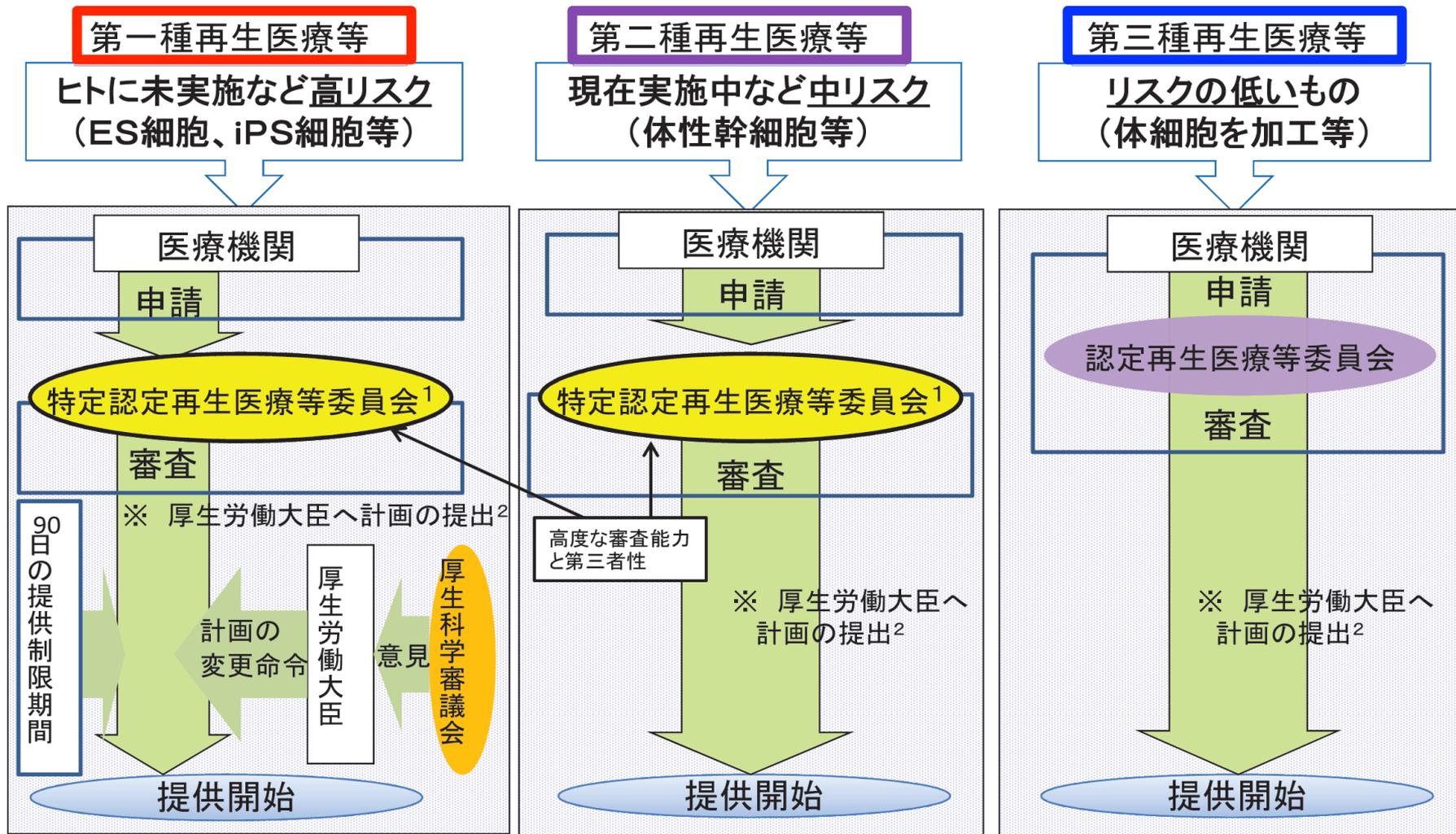


第1種・第2種・第3種再生医療等技術のリスク分類

投与細胞のリスク要因 & 治療法の新規性・投与の部位/方法等によるリスク要因 で分類



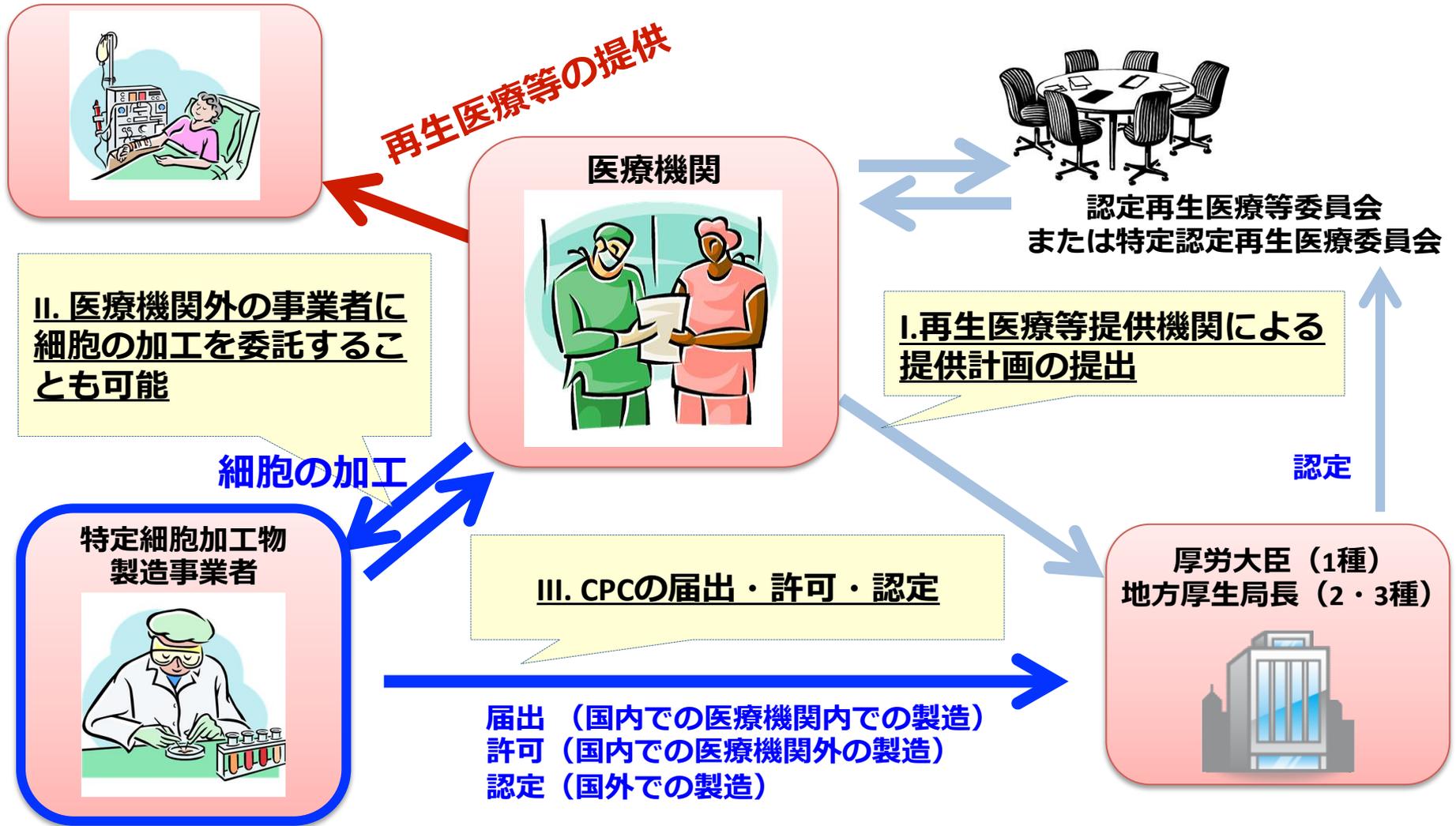
リスクに応じた再生医療等提供の手続き



(注1)「認定再生医療等委員会」とは、再生医療等技術や法律の専門家等の有識者からなる合議制の委員会で、一定の手続により厚生労働大臣の認定を受けたものをいい、「特定認定再生医療等委員会」は、認定再生医療等委員会のうち、特に高度な審査能力、第三者性を有するもの。

(注2) 厚生労働大臣への提供計画の提出の手續を義務付ける。提供計画を提出せずに再生医療等を提供した場合は、罰則が適用される。

再生医療等安全性確保法の概要



改正薬事法との比較

	再生医療等安全性確保法	改正薬事法（再生医療等製品）
構造設備	<u>法第42条に基づく基準（省令）</u> 院外：許可（PMDA調査） 海外：認定（PMDA調査） 院内等：届出	<u>薬局等構造設備規則</u> （PMDA調査）
製造管理・品質管理等	<u>法第44条に基づく基準（省令）</u> ＊ 場合により厚生労働大臣又はPMDAによる立入検査又は質問	<u>GCTP省令</u> （PMDA調査）

- ・ 法第42条、第44条ともに、再生医療等技術のリスク分類、特定細胞加工物の製造場所が院内か院外かに関わらず、**同じ基準が適用**される。
- ・ 細胞培養加工施設の許可、認定又は届出にあたり必要になるのは法第42条への適合。

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

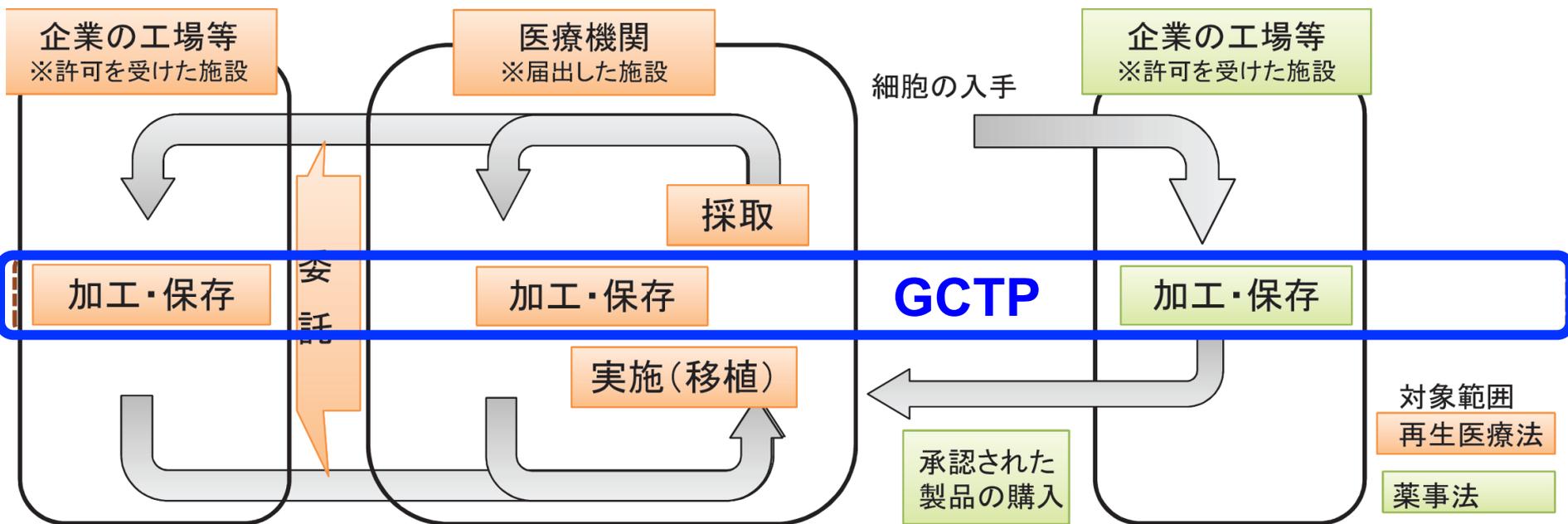
医療として提供される再生医療等について、採取等の実施手続き、再生医療等を提供する医療機関の基準、細胞を培養・加工する施設の基準等を規定し、安全性等を確保。

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。



III. 細胞加工製品の品質・安全性確保のための 評価法開発 — 造腫瘍性評価法の開発を中心に —

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. 製法／セル・バンクの変更による新旧製品の同等性の検証
9. 非臨床安全性試験・非臨床POC試験のデザインと解釈
10. 造腫瘍性試験のデザインと解釈(特にES/iPS細胞由来製品)
11. 最終製品の免疫原性評価
12. 臨床試験のデザインと解釈
13. 有効性・安全性のフォローアップのあり方

原料の安全性・適格性

最終製品の品質確保

前臨床段階での
安全性・有効性の予測

臨床評価の
あり方

再生医療等製品(細胞加工物)の造腫瘍性評価の問題点

再生医療等製品(細胞加工物)は生きた細胞を含む

＝製品中の細胞が異常増殖をして腫瘍を形成する恐れ

・・・ここまでは誰もが理解できる

では、どうすれば造腫瘍性の評価が可能か？

・・・実は誰もよく知らない(FDAもEMAもよく知らない)

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



- World Health Organization. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. WHO technical report series, No 978 Annex 3



(Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 878)

http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.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 978の造腫瘍性試験



- 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 978の造腫瘍性試験 本当の目的



*



- 生物薬品の材料(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**

先端医療の評価法開発①

「新しい製品には新しい考え方を」

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

⇒従来のWHO TRS 978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？」

高感度in vivo試験、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

先端医療の評価法開発②

「目的に適った評価法を作る」

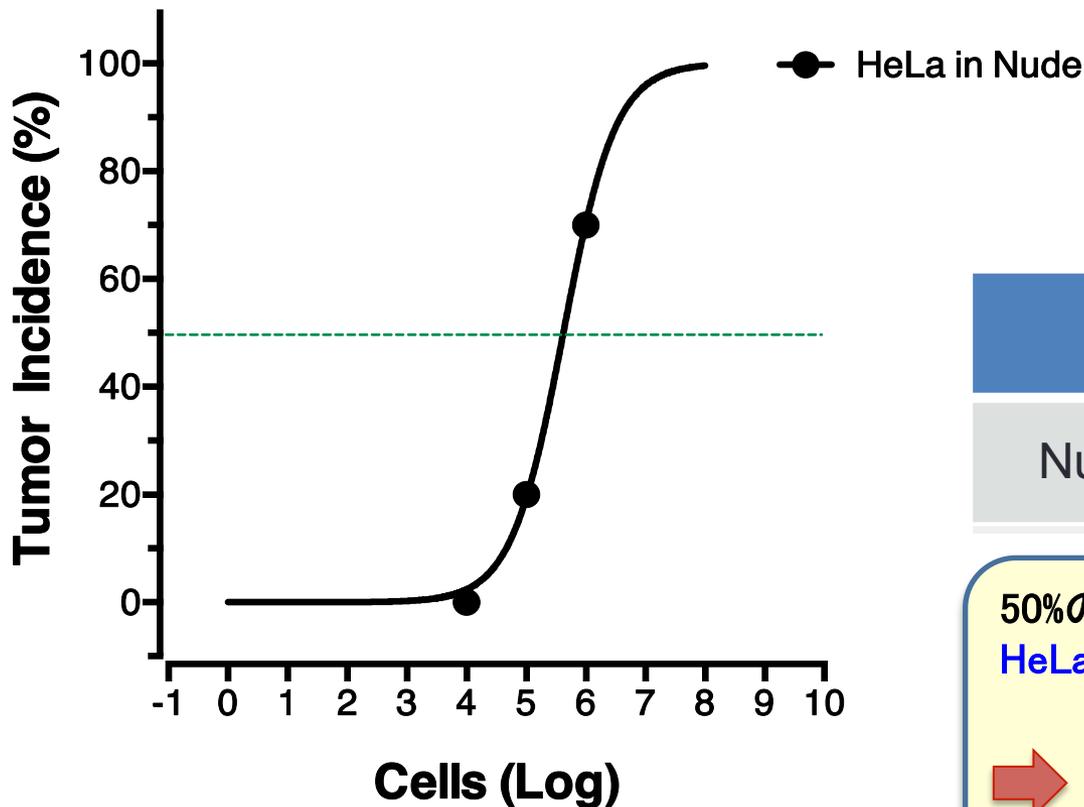
HeLa細胞単独皮下投与試験 (WHO TRS 978で推奨のヌードマウス試験の感度)

WHO TRS 978: 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
(*細胞加工物の品質・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

➔ 細胞加工物の品質・安全性評価
には十分な感度とは言えない

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

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

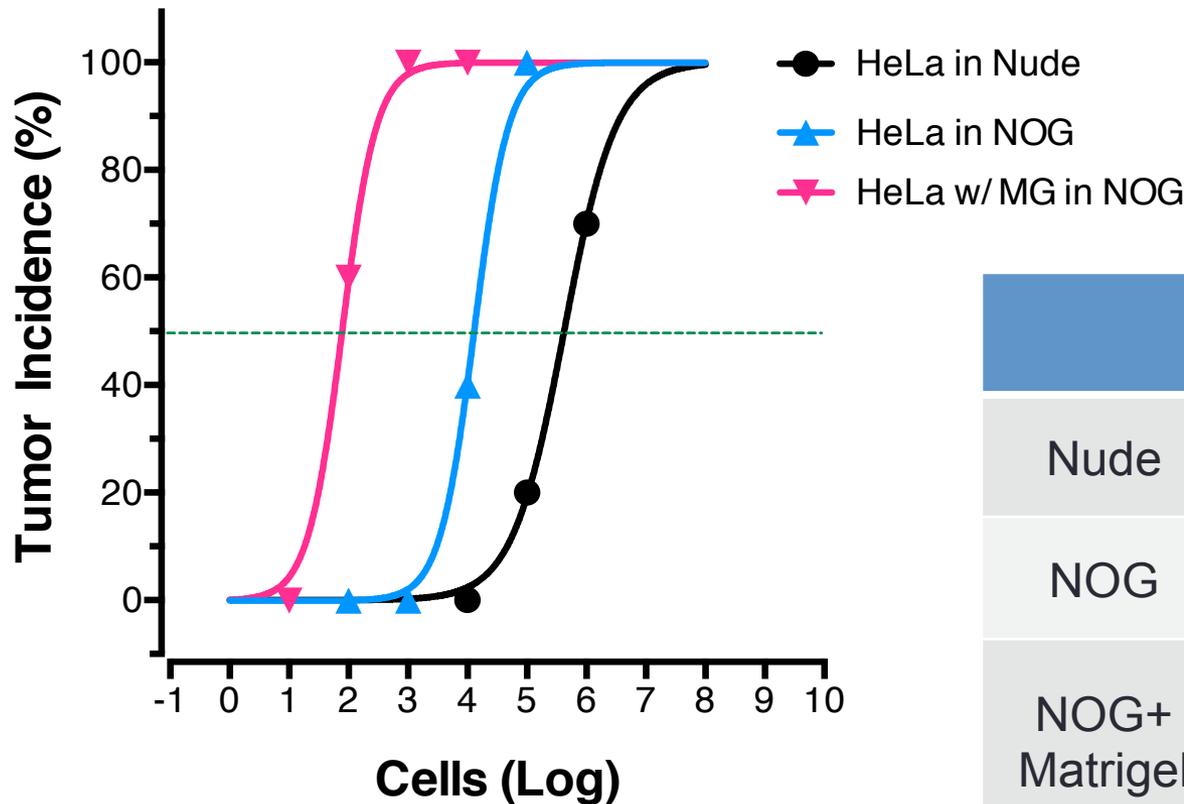
細胞・組織加工製品の造腫瘍性の**定量化の方策**の検討／**標準化**が必要

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

⇒従来の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？」

高感度in vivo試験、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

先端医療の評価法開発③

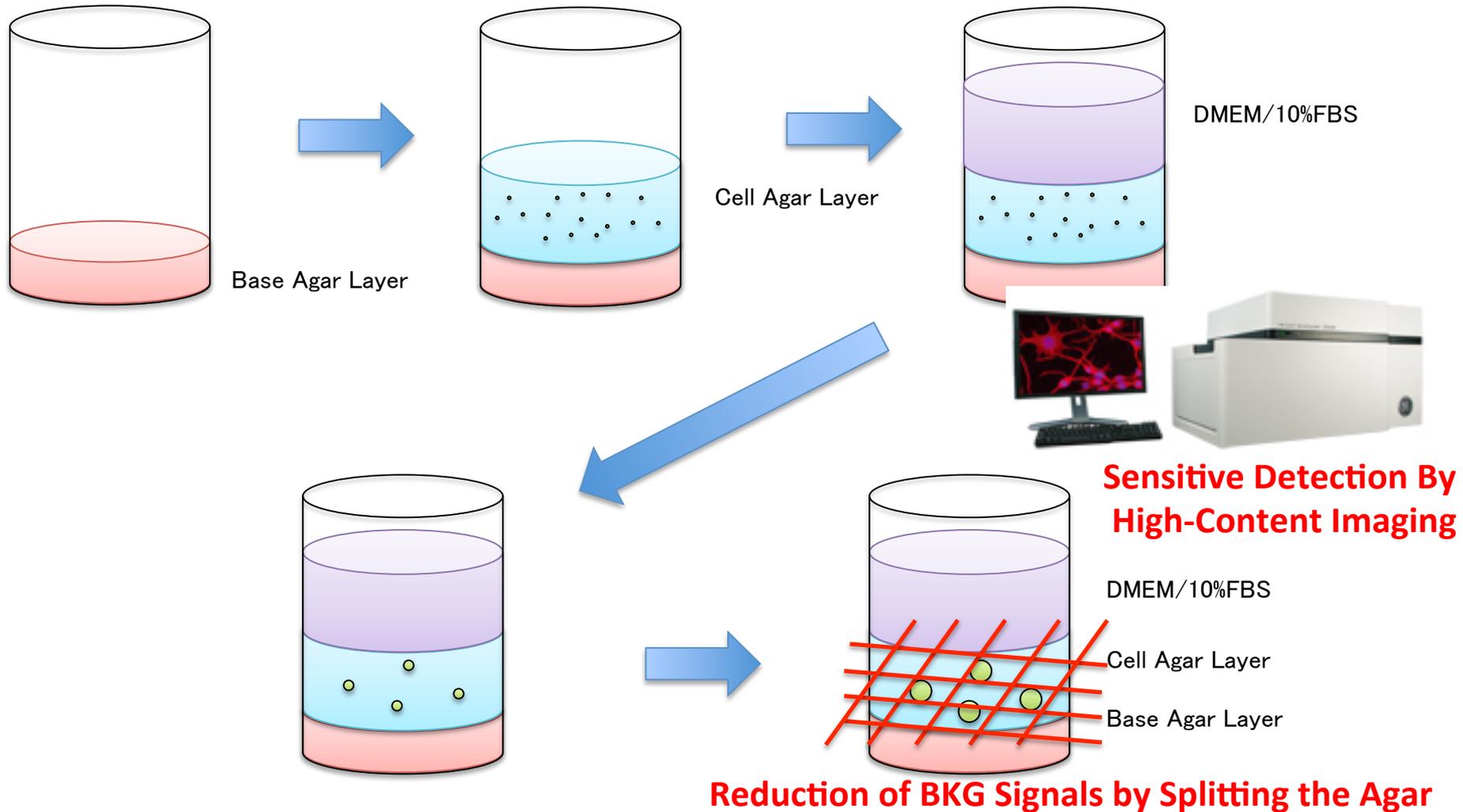
「各評価法の能力と限界を知る」

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の大幅な改良

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

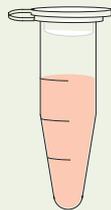


悪性形質転換細胞が1つのウェルあたり1個以下となるように濃度調整して軟寒天培養



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



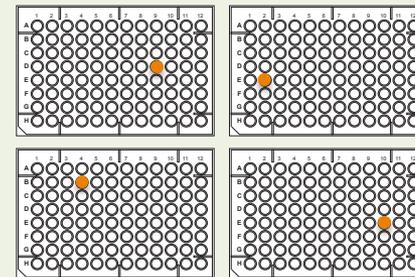
※画像はイメージです



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



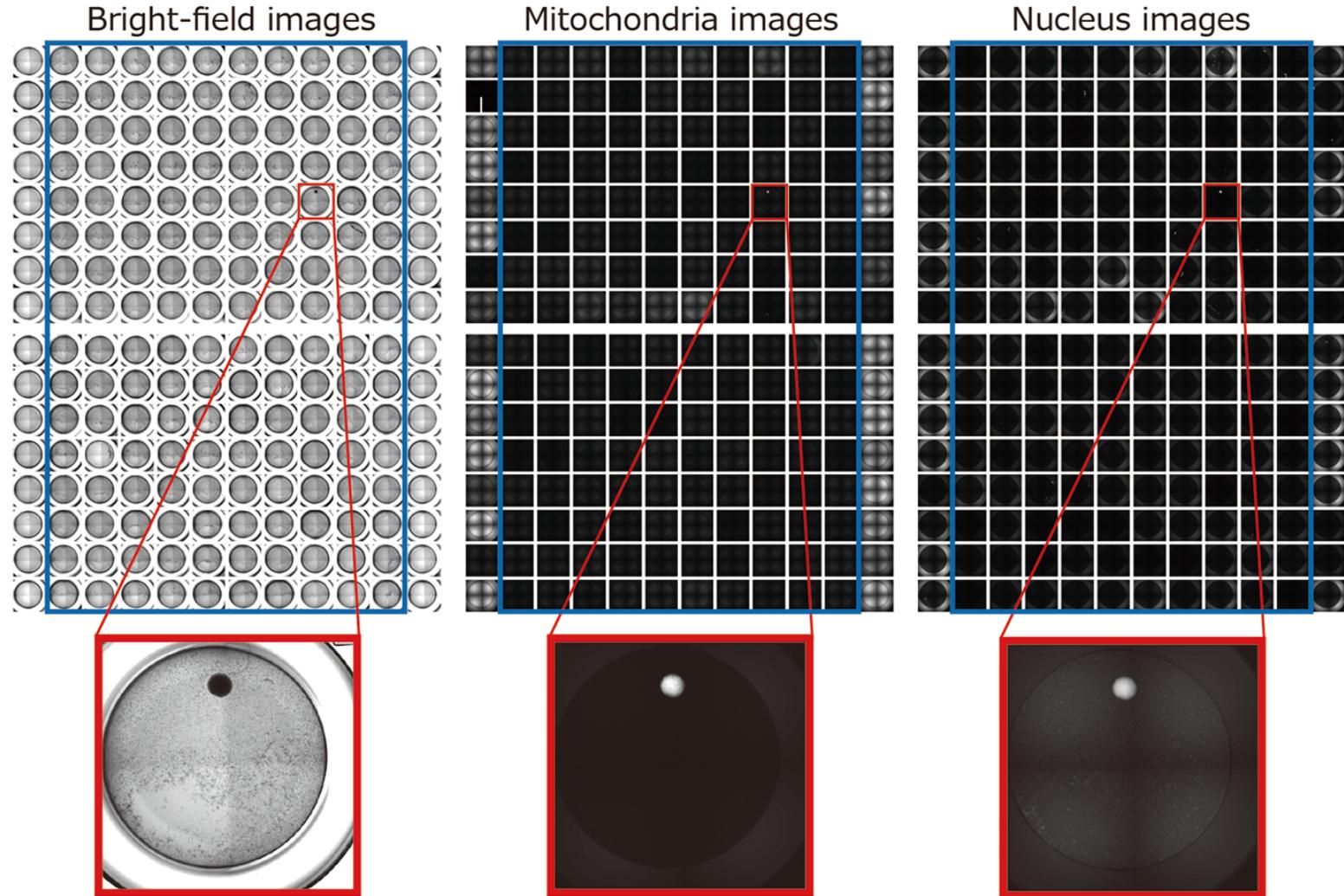
● positive well

・HeLa細胞レベルの悪性形質転換細胞の場合、~1千万分の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 10,000,000 → 160wells (HeLa 0.0125 / MSC 62,500 / well)



Colonies derived from 0.00001% (1/10,000,000) HeLa cells in hMSCs are detectable.

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

⇒従来のWHO TRS 978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？」

高感度in vivo試験、qRT-PCR、フローサイトメリー、直接培養法

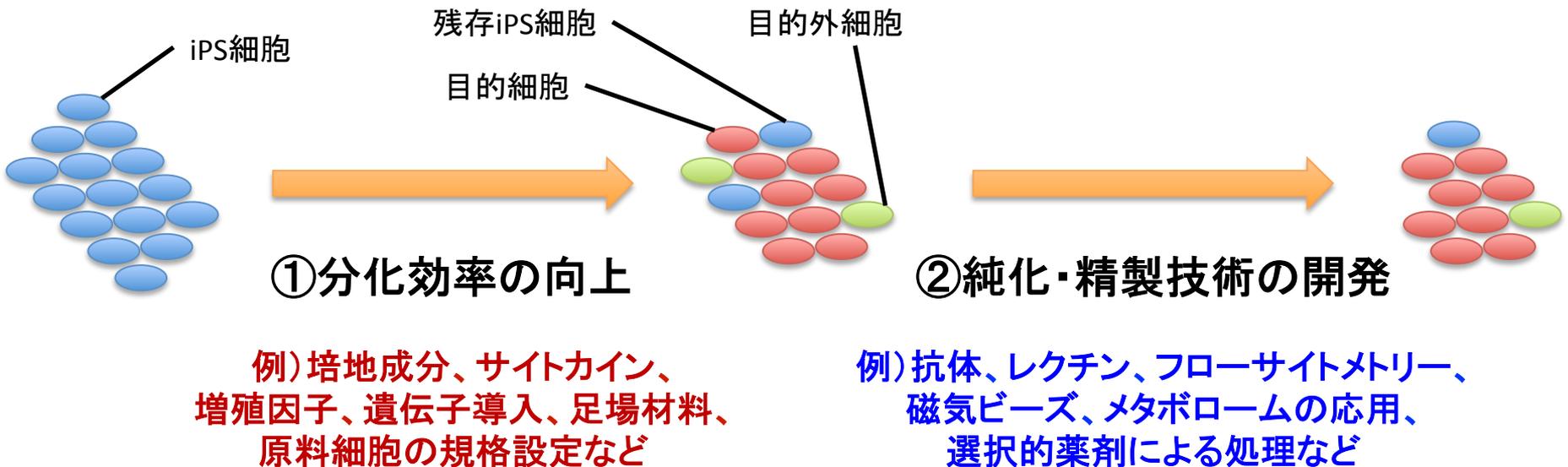
Q3「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか？」

高感度in vivo試験

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

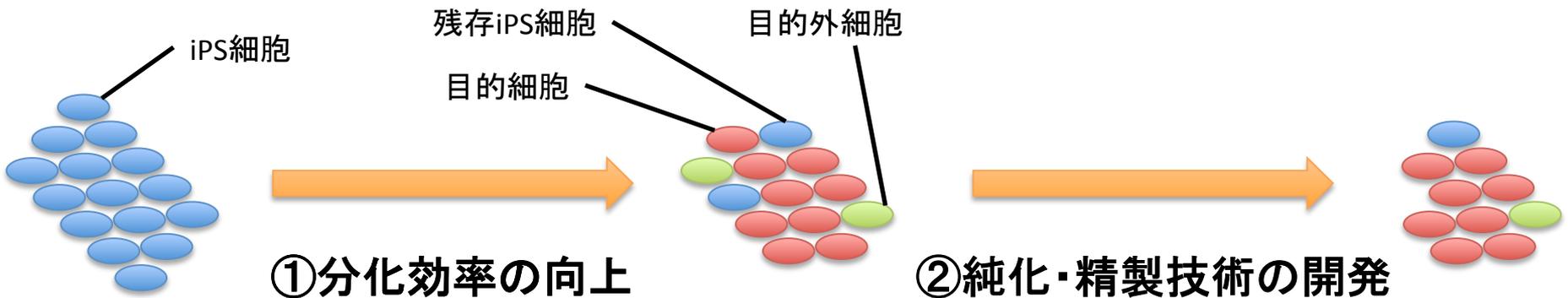
未分化ES/iPS細胞の残存・混入を防止する工夫が必要



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



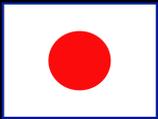
③製品の「実用化」には、未分化ES/iPS細胞の
除去・残留を確認する試験法が不可欠

→ 未分化ES/iPS細胞の高感度検出法の開発と評価

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iPS細胞由来移植細胞の臨床研究開始

iPSから網膜細胞 世界初の移植手術実施 神戸

ツイート 48

おすすめ 103

印刷



会見で笑顔を見せる高橋政代プロジェクトリーダー=12日夜、神戸市中央区港島中町6 (撮影・峰大二郎)

拡大

先端医療センター病院（神戸市中央区）と理化学研究所発生・再生科学総合研究センター（同）は12日午後、人工多能性幹細胞（iPS細胞）から網膜の細胞を作り、目の難病患者の網膜を再生させる臨床研究で、兵庫県内の70代女性に1例目の移植手術を実施した。iPS細胞から作った細胞が人の体に移植されるのは世界初。同病院は「患者の状態は安定し、成功と考えている」とし、今後は腫瘍ができないかなどの安全性や、視野の改善などの効果を検証する。

臨床研究は、目の奥にある網膜が傷んで視力が急激に落ち、失明の恐れもある「滲出（しんしゅつ）型加齢黄斑変性」の患者

神戸新聞(2014/9/12)



残存iPS細胞／造腫瘍性細胞の検出法の開発で貢献

造腫瘍性試験の開発に関するまとめ

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

細胞加工製品の造腫瘍性評価については、H28年度中にガイドライン案作成予定

研究機関・組織の間での連携

実験動物開発拠点

(公財)実験動物中央研究所

ヒト細胞由来移植細胞開発拠点等

京都大

大阪大

国成育セ

慶應義塾大学

先端医療振興財団

近畿大

医薬基盤・栄養・健康研

理研

東医歯大

免疫不全動物モデルの提供
などの研究協力



研究協力・対話
(厚労省「革新的医薬品等実用化促進事業」など)

委託研究
契約



再生医療等製品(細胞加工物)のレギュラトリーサイエンス



国立衛研 再生・細胞医療製品部

AMED

日本再生医療学会、
IABS(国際生物製剤標準化連盟)、HESIなどの
国内外関連団体

厚生労働省/PMDA

<主なウェット研究>

- 細胞加工物のウイルス安全性評価法の開発
- 細胞加工物の造腫瘍性評価方法の開発
- 細胞加工物の遺伝的不安定性評価法の開発
- 細胞加工物およびその原料の特性解析法の開発
- 複合製品における非細胞成分と細胞成分との適合性評価

<主なドライ研究>

- 各種ガイドライン案作成(CMC, GMP(GCTP), 非臨床)

対話

- 科学的合理性のある造腫瘍性評価法の確立
- 各種の細胞加工製品に適応
- 非臨床安全性・品質評価の隘路解消による細胞加工製品の迅速な実用化を促進

各種細胞加工製品について、それぞれの特性及び臨床適用法に応じた
適正な品質・安全性・有効性評価法の体系化

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. 製法／セル・バンクの変更による新旧製品の同等性の検証
9. 非臨床安全性試験・非臨床POC試験のデザインと解釈
10. 造腫瘍性試験のデザインと解釈(特にES/iPS細胞由来製品)
11. 最終製品の免疫原性評価
12. 臨床試験のデザインと解釈
13. 有効性・安全性のフォローアップのあり方

原料の安全性・適格性

最終製品の品質確保

前臨床段階での
安全性・有効性の予測

臨床評価の
あり方

“セル・バンク”の定義

- **辞書的な定義** (Mosby's Medical Dictionary, 8th edition. 2009)

「研究目的または体の損傷部位の外科的再建を目的とした凍結組織標本を保管する**貯蔵施設**」



- 「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」での定義 (文科・厚労・経産省)

「提供されたヒトの細胞(中略)等について、研究用資源として品質管理を実施して、不特定多数の研究者に分譲する**非営利的事業**」



- **バイオリジクス(生物薬品)製造における定義** (ICH-Q5D)

「**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(チューブ/アンプル)**。
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。」



*

セル・バンク(細胞バンク)

移植医療

理研細胞バンク

RIKEN BIORESOURCE CENTER
CELL BANK



ISO9001:2008の認証を取得しました

医薬基盤研細胞バンク (Japanese Collection of Research Bioresources)



具体的用途(最終製品)が特定されていない

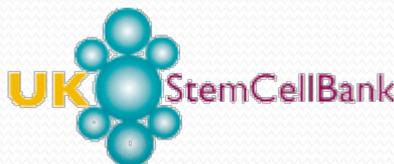


具体的臨床用途・最終製品が特定されている

日本骨髄バンク

日本さい帯血バンクネットワーク
JAPANESE CORD BLOOD BANK NETWORK

財団法人 日本アイバンク協会
Japan Eye Bank Association



細胞基材のセル・バンク

“品質”の意味合いの違い

- 具体的臨床用途が未特定のセルバンク（非臨床グレード／臨床グレード）

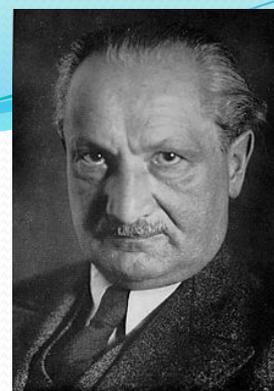
- ① 感染因子混入などの汚染がないことの保証 [作業員・患者の安全性]
- ② 学問的定義（一般的定義）に基づく**細胞種としての特性**とその安定性
（例：リプログラミングされた「iPS細胞様の細胞」を「iPS細胞」としてバンク化する際は、三胚葉系への多分化能を確認することが必須）



- 特定の臨床用途・最終製品のためのセル・バンク（細胞基材のセル・バンク）

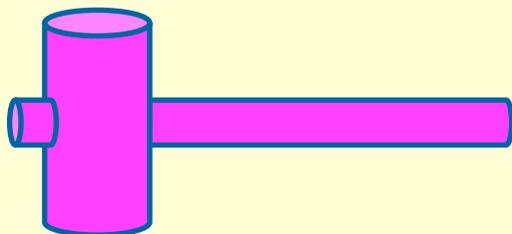
- ① 感染因子混入などの汚染がないことの保証 [患者・作業員の安全性]
- ② 患者に投与される**最終製品の品質・有効性・安全性の再現性を確保するための原材料としての特性**とその安定性
（例：リプログラミングされた「iPS細胞様の細胞」を特定の分化細胞製造用の原材料としてバンク化する際には、目的とする細胞への分化効率の高さの方が多分化能よりも重要な場合もありうる）

例) 道具としての「ハンマー」の「品質」も目的次第



Martin Heidegger
(1889 -1976)

<一般的定義(必要条件)「客体的存在」>



- 手で持つ柄の部分と頭部からなる
- 頭部は柄の部分よりは重い
- 柄を持って振り、その慣性で頭部を対象物に叩きつけて力を加える道具



ここにハンマーのコレクションがあるとする

http://yamamoto.bun.ne.jp/yamamoto/show.cgi?p_cd=P00016481

<使用目的別「道具的存在」>

木工工作



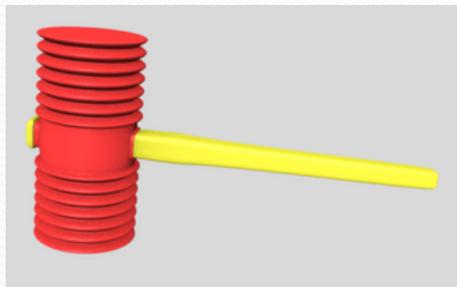
<http://yama206.up.d.seesaa.net/yama206/image/bbandr19-d35b1.jpg?d=a19>

解体工事



<http://note.ha-ku.com/?month=200708>

罰ゲーム



<http://f.hatena.ne.jp/jkani4/20071010125436>

裁判所



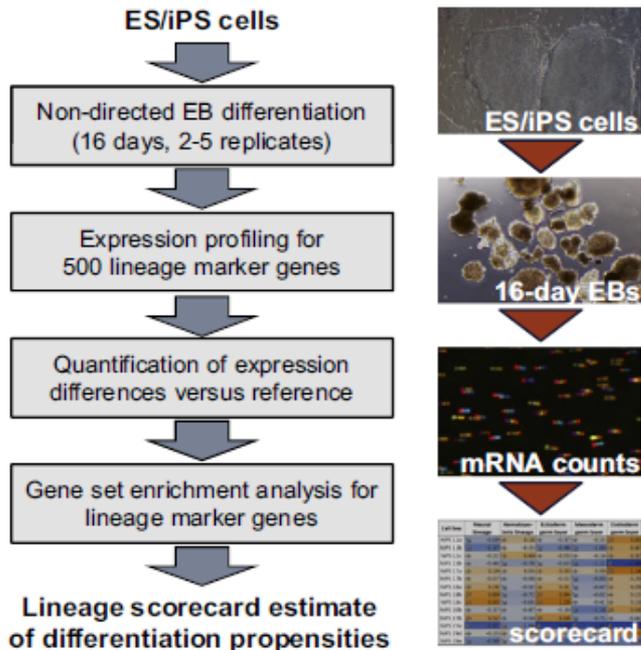
<http://www.infirmiersapeurpompier.com/category/L-ISP-et-les-PISUA.html>

十分な「重さ」、「硬さ」、「大きさ」、「デザイン」は目的により様々なコレクション中のハンマーが使えるかどうかは目的次第

「目的に適った細胞基材／セル・バンク」とは？

例) ヒト多能性幹細胞株間における各種細胞への分化傾向(propensity)の差

Bock *et al. Cell.* 2011;144:439-52



「多能性」は確かにあるが、株間で「分化傾向」がさまざま

Cell line	Neural lineage	Hematopoietic lineage	Ectoderm germ layer	Mesoderm germ layer	Endoderm germ layer
HUES1	↓ -1.84	⇒ -0.30	⇒ -1.56	⇒ 0.06	⇒ -0.59
HUES3	⇒ -0.29	⇒ -0.01	⇒ -0.23	⇒ -0.07	⇒ 0.08
HUES6	⇒ -0.78	⇒ -0.26	⇒ -0.51	⇒ -0.05	⇒ -0.47
HUES8	⇒ -0.15	⇒ 0.69	⇒ -0.17	⇒ 0.68	⇒ 1.45
HUES9	⇒ -0.89	⇒ 0.31	⇒ -0.75	⇒ 0.51	⇒ 0.37
HUES28	⇒ -1.33	⇒ -0.11	⇒ -0.91	⇒ 1.03	⇒ -0.07
HUES44	⇒ 0.70	⇒ -0.27	⇒ 0.52	⇒ -0.48	⇒ -0.45
HUES45	⇒ -0.46	⇒ -0.26	⇒ -0.49	⇒ -0.02	⇒ 0.65
HUES48	⇒ 0.83	⇒ 0.18	⇒ 0.70	⇒ 0.24	⇒ 0.55
HUES49	⇒ 0.19	⇒ 0.07	⇒ 0.03	⇒ -0.66	⇒ -0.26
HUES53	⇒ -0.95	⇒ 0.65	⇒ -1.19	⇒ -0.22	⇒ -0.20
HUES62	⇒ 0.25	⇒ -0.15	⇒ 0.15	⇒ -0.60	⇒ 0.24
HUES63	⇒ 0.62	⇒ 0.39	⇒ 0.72	⇒ 0.34	⇒ 0.61
HUES64	⇒ 1.45	⇒ -0.07	⇒ 1.44	⇒ -0.56	⇒ -0.61
HUES65	⇒ 0.19	⇒ 0.02	⇒ 0.22	⇒ 0.19	⇒ -0.15
HUES66	⇒ 0.59	⇒ -0.67	⇒ 0.36	⇒ -1.22	⇒ -0.37
H1	↑ 1.54	⇒ -0.29	⇒ 1.21	⇒ 0.07	⇒ -0.56
H9	⇒ 1.08	⇒ 0.01	⇒ 1.10	⇒ 0.55	⇒ -0.16

Cell line	Neural lineage	Hematopoietic lineage	Ectoderm germ layer	Mesoderm germ layer	Endoderm germ layer
hiPS 11a	⇒ -0.69	⇒ 0.18	⇒ -0.37	⇒ -0.23	⇒ 0.83
hiPS 11b	⇒ -1.17	⇒ -0.23	⇒ -0.96	⇒ -1.03	⇒ 0.47
hiPS 11c	⇒ -0.22	⇒ 0.40	⇒ -0.03	⇒ -0.16	⇒ 0.37
hiPS 15b	⇒ -0.48	⇒ -0.78	⇒ -0.63	⇒ -1.11	⇒ -2.49
hiPS 17a	⇒ 0.19	⇒ 0.05	⇒ 0.33	⇒ 0.00	⇒ 1.16
hiPS 17b	⇒ -0.07	⇒ -0.48	⇒ -0.02	⇒ -0.83	⇒ 0.20
hiPS 18a	⇒ 0.28	⇒ -0.52	⇒ 0.31	⇒ -0.67	⇒ 0.20
hiPS 18b	⇒ 0.80	⇒ -0.72	⇒ 0.84	⇒ -0.62	⇒ 0.15
hiPS 18c	⇒ 0.93	⇒ -0.65	⇒ 1.05	⇒ -0.41	⇒ 0.10
hiPS 20b	⇒ -0.37	⇒ -0.47	⇒ -0.30	⇒ -1.16	⇒ 0.56
hiPS 27b	⇒ 0.52	⇒ -0.50	⇒ 0.68	⇒ -0.71	⇒ -0.42
hiPS 27e	⇒ -1.61	⇒ -1.04	⇒ -2.12	⇒ -1.82	⇒ -3.27
hiPS 29d	⇒ -0.25	⇒ -0.04	⇒ 0.00	⇒ -0.11	⇒ 0.83
hiPS 29e	⇒ -0.99	⇒ -0.60	⇒ -1.15	⇒ -1.14	⇒ -1.08

Differentiation propensity: high medium low
 ↑ ⇔ ⇔ ⇔ ↓

ヒトiPS/ES細胞株のセル・バンクを「未分化性」や「多能性」のみで品質管理していると、目的とする細胞への分化効率にバラツキが生じやすい

そのまま使えるか？

細胞基材のセルバンクでは「目的に適った分化傾向」を品質特性とする必要があるかもしれない

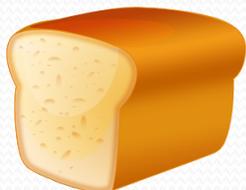
「高度経済成長」のような機械・電機工業等の成功による製品ではなく…

昔から連綿と続く、「生きた素材」を使った

先人の知恵

日本の「ものづくり」

パン酵母



ビール酵母

ワイン酵母



味噌酵母



目的に合った酵母を使い分けることで、各品目で高品質な(美味しい)製品を作ることができる
「素材へのこだわり」「至高の素材」「厳選素材」「選び抜かれた素材」



<http://www.fnn-news.com>



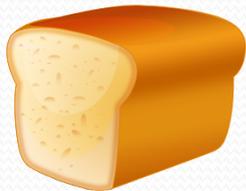
初の世界最高賞受賞!

ワールド・ウイスキー・アワード (WWA) 2012
ブレンデッドモルト・ウイスキー部門 世界最高賞



「生きた素材」を使った「ものづくり」

パン酵母



ビール酵母

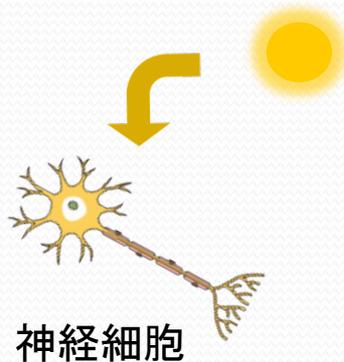
ワイン酵母



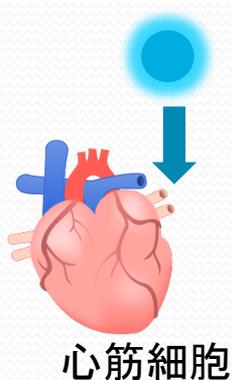
味噌酵母



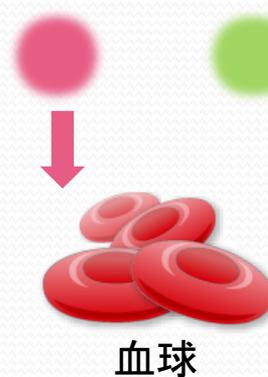
目的に合った酵母を使い分けることで、各品目で高品質な(美味しい)製品を作ることができる
「素材へのこだわり」「至高の素材」「厳選素材」「選び抜かれた素材」



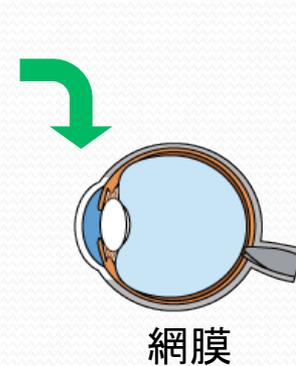
神経細胞



心筋細胞



血球



網膜

「高い再現性で品質の高い最終製品(分化細胞)を製造(誘導)する」
という目的に適った素材(例:専用のiPS細胞株)を選択することが重要

細胞基材(セル・バンク)の特性指標の探索(例)

Yasuda et al., *Biochem J.* 2011 Jul 15;437(2):345-55.

心筋梗塞などで傷害を受け、心筋収縮能の低下した心臓の細胞治療薬として、多能性幹細胞から作製した心筋細胞が期待されている。

心筋細胞の収率を上げるためには、効率的な分化を誘導することが必要。

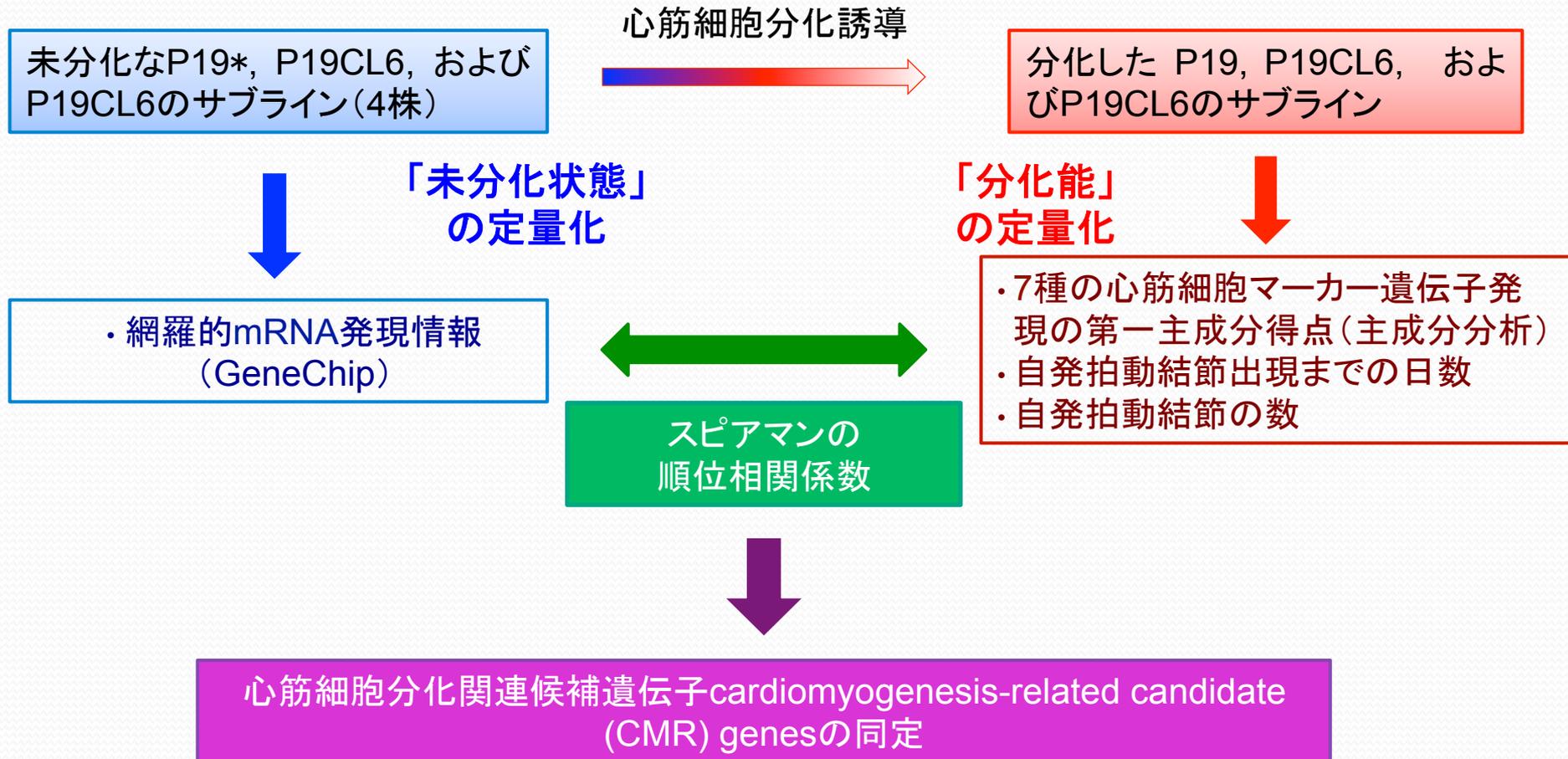
⇒ 心筋分化メカニズムの解明

細胞株の効率的なスクリーニングのため、未分化の状態で心筋分化能の高い株を予測できないか？

⇒ 心筋分化能マーカーの探索

* P19細胞・・・胚性がん細胞(EC細胞)株
P19CL6は心筋分化能が高いP19の子株

● 方法



CMR2, 10および12はEC細胞、ES細胞双方で心筋細胞分化を制御

Targeted genes	α MHC		β MHC		MLC2a		MLC2v		Beating nodules (EC cells)
	EC cells	ES cells	EC cells	ES cells	EC cells	ES cells	EC cells	ES cells	
CMR1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CMR2	Down	Down	Down	Down	Down	Down	Down	Down	Down
CMR3	Down	NS	NS	NS	NS	NS	Down	NS	Down
CMR4	Down	NS	NS	NS	Down	NS	Down	NS	Down
CNR5	Down	NS	NS	NS	NS	NS	Down	NS	Down
CMR6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	Down	NS	NS
CMR7	NS	NS	NS	Up	NS	Up	Up	NS	Up
CMR8	NS	Down	NS	Down	Down	Down	NS	NS	NS
CMR9	NS	NS	NS	Up	NS	Up	NS	Up	Down
CMR10	Down	Down	NS	Down	Down	Down	Down	Down	Down
CMR12	Up	Up	NS	Up	NS	Up	Up	NS	Up
CMR13	Down	NS	Down	NS	NS	NS	Down	NS	Down
CMR14	NS	Down	NS	Down	NS	Down	NS	Down	NS
CMR15	NS	Down	NS	Down	NS	Down	NS	Down	NS
CMR16	NS	NS	Up	NS	Up	NS	Up	NS	Up
CMR17	NS	NS	Up	NS	NS	NS	NS	NS	Up
CMR18	Down	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	Down
CMR20	NS	Down	NS	NS	Down	Down	NS	NS	NS
CMR21	NS	NS	NS	Up	NS	Up	NS	NS	Up
CMR23	Up	Down	Up	Down	Down	Down	Up	Down	Up
CMR24	NS	NS	NS	Up	NS	Up	NS	NS	Down

機能未知

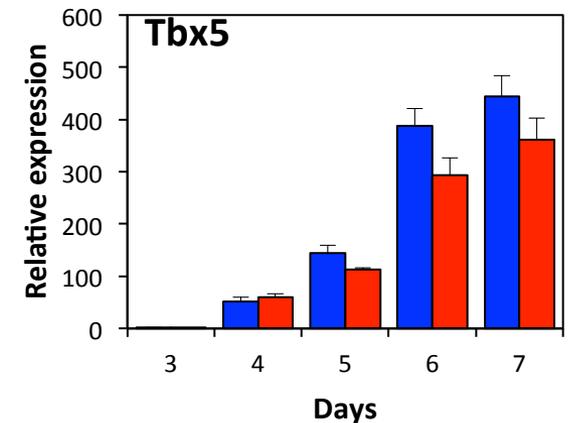
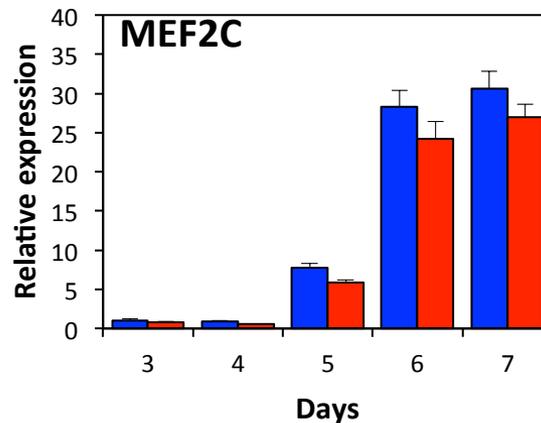
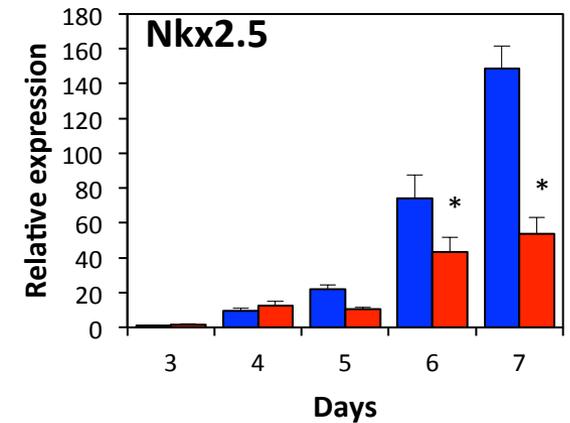
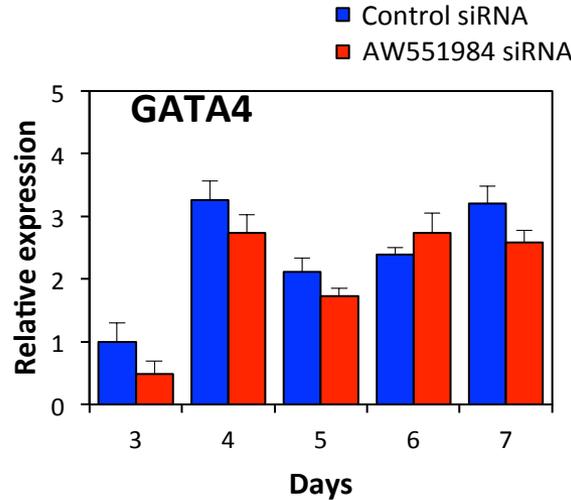
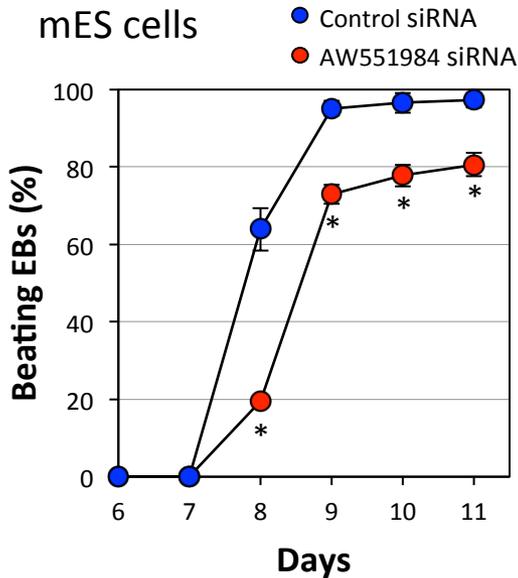
機能未知

機能未知

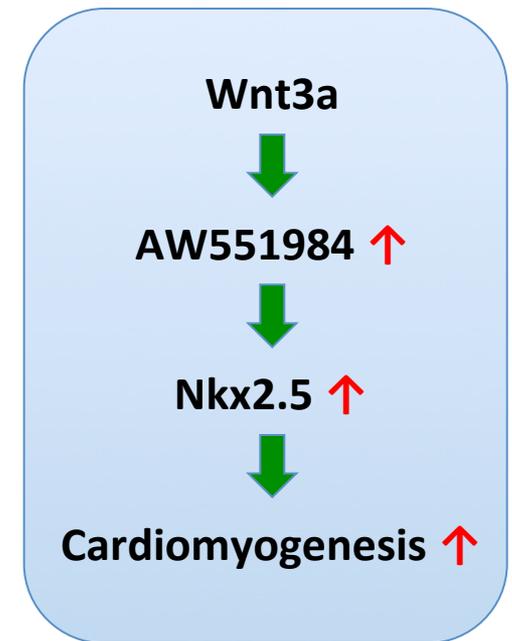
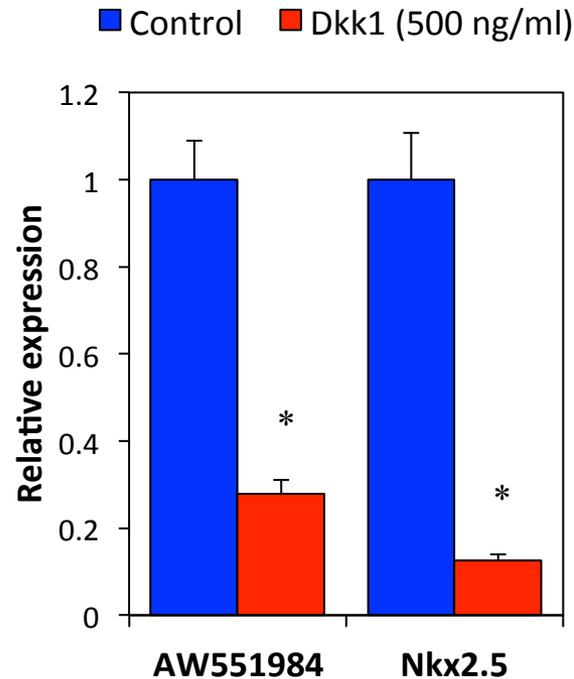
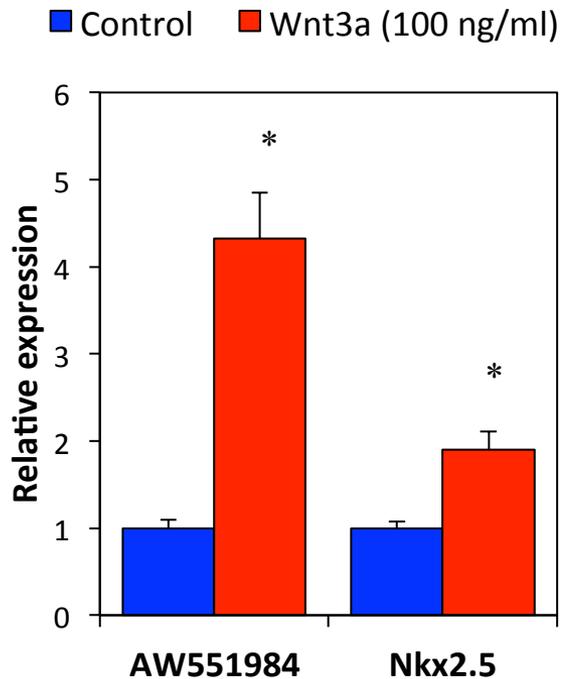
転写因子Nkx2.5の遺伝子発現にはAW551984(CMR2)の発現が必要

心筋細胞分化関連転写因子のmRNA発現

AW551984(CMR2)のRNAiによる胚葉体自動拍動の抑制



胚葉体形成時のAW551984およびNkx2.5の遺伝子発現は Wnt/b-catenin情報伝達系により制御されている



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