



平成28年7月1日

第43回日本毒性学会学術年会 シンポジウム17
再生医療・細胞治療の品質・安全性評価のありかた
—患者様のリスク最小化に向けたアプローチ—

ヒト細胞加工製品の造腫瘍性試験 及び造腫瘍性細胞検出試験 —関連ガイドラインの作成状況—

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

厚労省系のガイドライン等策定事業

AMED再生医療関連事業 厚労科研費事業 (厚労省/AMED)

【既出(例)】

- 「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準等に関する質疑応答集(Q&A)について」(H27.3.17)
- 「同その2」(H27.7.28)
- 「特定認定再生医療等委員会におけるヒト多能性幹細胞を用いる再生医療等提供計画の造腫瘍性評価の審査のポイント」(H28.6.13)

【予定(例)】

- 「幹細胞等由来製品評価に最低限必須・共通の技術要件・基準に関するGL」(研究期間H26-28)
- 「再生医療等製品の製造における無菌性保証に関するGL」(研究期間H26-28)

次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業 (厚労省/経産省)

品目別モノグラフ的文書

【既出(例)】

- 「同種iPS細胞由来網膜色素上皮細胞に関する評価指標」(H26.9.12)
- 「鼻軟骨再生に関する評価指標」(H27.9.25)
- 「同種iPS(様)細胞加工製品を用いた関節軟骨再生に関する評価指標」(H28.6.30)
- 「軟骨細胞又は体性幹細胞加工製品を用いた関節軟骨再生に関する評価指標」(H28.6.30)

革新的医薬品・医療機器・再生医療等製品実用化促進事業 (厚労省, ~H28年度)

開発経験を反映した文書

【既出(例)】

- 「生物由来原料基準」改訂(阪大)

【予定(例)】

- 「脳梗塞に対する細胞治療の開発GL」(北大)
- 「ヒト細胞加工製品の品質・安全性評価のための未分化多能性幹細胞検出試験及び形質転換細胞検出試験に関する留意点(阪大・国成育)」
- 「経冠動脈的投与再生医療等製品に関する評価指標」(基盤研)
- 「iPS細胞由来血小板の品質評価GL」(京大)
- 「急性脊髄損傷における臨床評価に関するGL」(千葉大)

造腫瘍性関連ガイドラインの策定作業

臨床研究 再生医療安全性確保法トラック

- 幹細胞・再生医学戦略作業部会
(文科省、H27.8.7)
 - 再生医療の安全性確保に関する考え方についての早急な整理の必要性
 - 細胞の遺伝子変異の研究は不十分で腫瘍化の可能性についても未解明であるとの指摘
- ↓
- iPS細胞等を用いた臨床研究を実施する際の移植細胞の安全性評価の在り方に係る研究
(厚労省・福井班、H27.12～)
 - 造腫瘍性を含む安全性に関し、臨床研究における評価指標・基準の当面の考え方に関する議論
- ↓
- 「特定認定再生医療等委員会におけるヒト多能性幹細胞を用いる再生医療等提供計画の造腫瘍性評価の審査のポイント」
(H28.6.13, 厚労省医政局研発課長通知)

薬機法トラック

- 革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業(厚労省、H24～)

【採択課題】

- 阪大院(医) 心筋・角膜・軟骨製品
- 国成育セ(研究所) ES細胞由来製品

「再生医療等製品の腫瘍形成リスクに関する明らかなハザード(*)」の評価方法に関するガイドラインの合同検討班
(H27年度～)

* 未分化・形質転換細胞の検出、*in vivo*造腫瘍性試験の方法・留意点

主に考え方(←)

(→)主に具体的試験法

ともに両トラックで共通に利用可能なものとなるのが理想的

再生医療等製品(ヒト細胞加工製品)のための未分化・ 形質転換細胞検出試験ガイドライン案策定合同WG

WGメンバー

- 総括研究代表者 澤 芳樹 大阪大学大学院医学系研究科(心筋・角膜・軟骨)
斎藤博久 国立成育医療研究センター研究所(ES細胞)
- 研究分担者 齋藤充弘 大阪大学医学部附属病院
岡田 潔 大阪大学医学部附属病院
佐藤陽治 国立医薬品食品衛生研究所(座長・事務局)
安田 智 国立医薬品食品衛生研究所
- 研究協力者 青井貴之 神戸大学大学院医学研究科
梅澤明弘 国立成育医療研究センター研究所
川真田伸 先端医療振興財団
中村雅也 慶應義塾大学医学部整形外科学
松山晃文 医薬基盤・健康・栄養研究所
森尾友宏 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
- スーパーバイザー 早川堯夫 近畿大学薬学総合研究所(課題PO)

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)

先端医療の安全性評価で大切なこと①

「新しい製品の
新しい安全性イシューには
新しい評価コンセプトを」

ヒト細胞加工製品の造腫瘍性関連試験

<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

⇒従来のバイオリジクスの細胞基材のためのアプローチ(WHO TRS 978)が適用可能

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

「ヒト細胞加工製品の品質・安全性評価のための未分化多能性幹細胞検出試験及び形質転換細胞検出試験に関する留意点(案)」 平成28年1月16日現在

目次

1. はじめに
 2. 本文書の位置づけ
 3. 用語の定義
 4. 一般的留意点
 5. ヒトES/iPS細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験
 - 5.1. 原料・原材料の品質特性解析のための造腫瘍性試験
 - 5.2. 中間製品又は最終製品の造腫瘍性細胞の定量のための試験
 - 5.2.1. 中間製品・最終製品の未分化多能性幹細胞検出試験
 - 5.2.1.1. *in vitro*試験
 - 5.2.1.2. *in vivo*試験
 - 5.2.2. 中間製品・最終製品の形質転換細胞検出試験
 - 5.2.2.1. *in vitro*試験
 - 5.2.2.2. *in vivo*試験
 - 5.3. 最終製品細胞のヒトでの生着部位での腫瘍形成能を評価するための試験
 - 5.3.1. 試験動物の選択
 - 5.3.2. 対照細胞の選択
 - 5.3.3. 試験動物の数
 - 5.3.4. 細胞投与の部位と投与細胞の数および態様
 - 5.3.5. 観察期間
 - 5.3.6. 投与部位の観察
 - 5.3.7. 投与部位の病理学的評価
 - 5.3.8. 結果の解釈
 6. ヒト体細胞／体性幹細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験
 - 6.1. 原料・原材料の品質特性解析のための造腫瘍性試験
 - 6.2. 最終製品のための造腫瘍性関連試験の留意点
 7. 遺伝的安定性に関する一般的留意点
- 参考文献
- 表1 残存する未分化iPS/ES細胞の検出法の詳細
- 表2 混入する形質転換細胞の検出法の詳細
- 参考情報(各種試験法プロトコール)

先端医療の安全性評価で大切なこと②

「目的に適った評価法を作る」

先端医療の安全性評価で大切なこと③

「各評価法の能力と限界を知る」

付表1 混在する未分化iPS/ES細胞の検出法の詳細

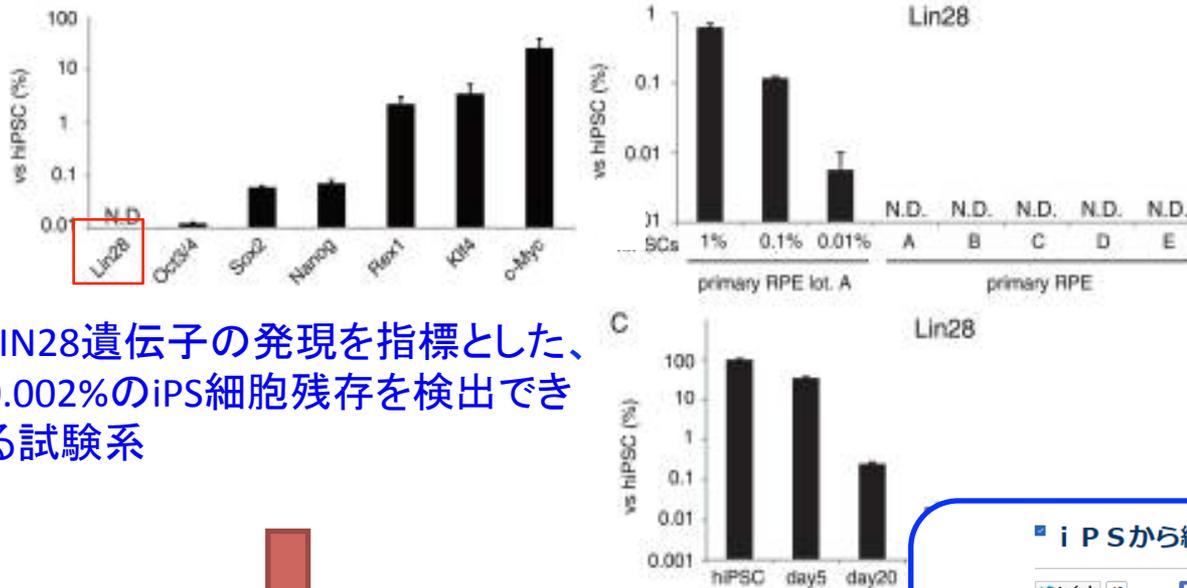
試験法	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験 (NOG x Matrigel, 皮下投与)	軟寒天コロニー形成試験	フローサイトメトリー
目的	造腫瘍性細胞の検出	足場非依存的増殖 (悪性形質転換細胞)の検出	未分化な多能性幹細胞の検出
所要時間	12-16週間		1日
利点	<ul style="list-style-type: none"> 直接的 微小環境での造腫瘍性を評価できる 		<ul style="list-style-type: none"> 短時間・簡便 個々の細胞を解析
欠点	<ul style="list-style-type: none"> 費用と時間がかかる 専用動物施設が必要 臨床適用相当部位の微小環境での造腫瘍性を評価可能 ⇒非臨床安全性試験に適用可能 	<ul style="list-style-type: none"> ヒトiPS細胞検出には使用できない (分散誘導性細胞死のため) 	<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 1,000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)
出典	Kanemura <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2013	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012

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"> I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)
出典	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012	Kuroda <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2015	Tano <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2014

JST「健康研究成果の実用化加速のための研究・開発システム関連の隘路解消を支援するプログラム」 『多能性幹細胞由来移植細胞の安全性評価研究』（平成22-26年度）

先端医療振興財団との共同研究

Kuroda et al. PLoS ONE 2012



LIN28遺伝子の発現を指標とした、
0.002%のiPS細胞残存を検出できる試験系



造腫瘍性を否定する根拠となる品質試験として採用

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



会場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）

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検証する。

臨床研究
視力が急激

神戸新聞
(2014/9/12)

付表2 混在する形質転換細胞の検出法の詳細

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	デジタル 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	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	16週間以上	3-4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可能 <p style="text-align: center;">↓</p> 非臨床安全性試験に適用可能	<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"> 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 良性不死化細胞検出不能 イメージスキャナーが高価 	<ul style="list-style-type: none"> 造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断 (良性と悪性を区別できない)
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)を検出可能	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 $1/1E+7$ (0.00001%) の割合で混入するHeLa細胞 を検出可能	hMSCに $1/1E+5$ (0.001%) の割合で混入するHeLa細胞 は検出可能
出典	Kusakawa <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2015	Kusakawa <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2015	Kusakawa <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2015	Kono <i>et al.</i> , <i>Biologicals.</i> 2015

参考情報 *n 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

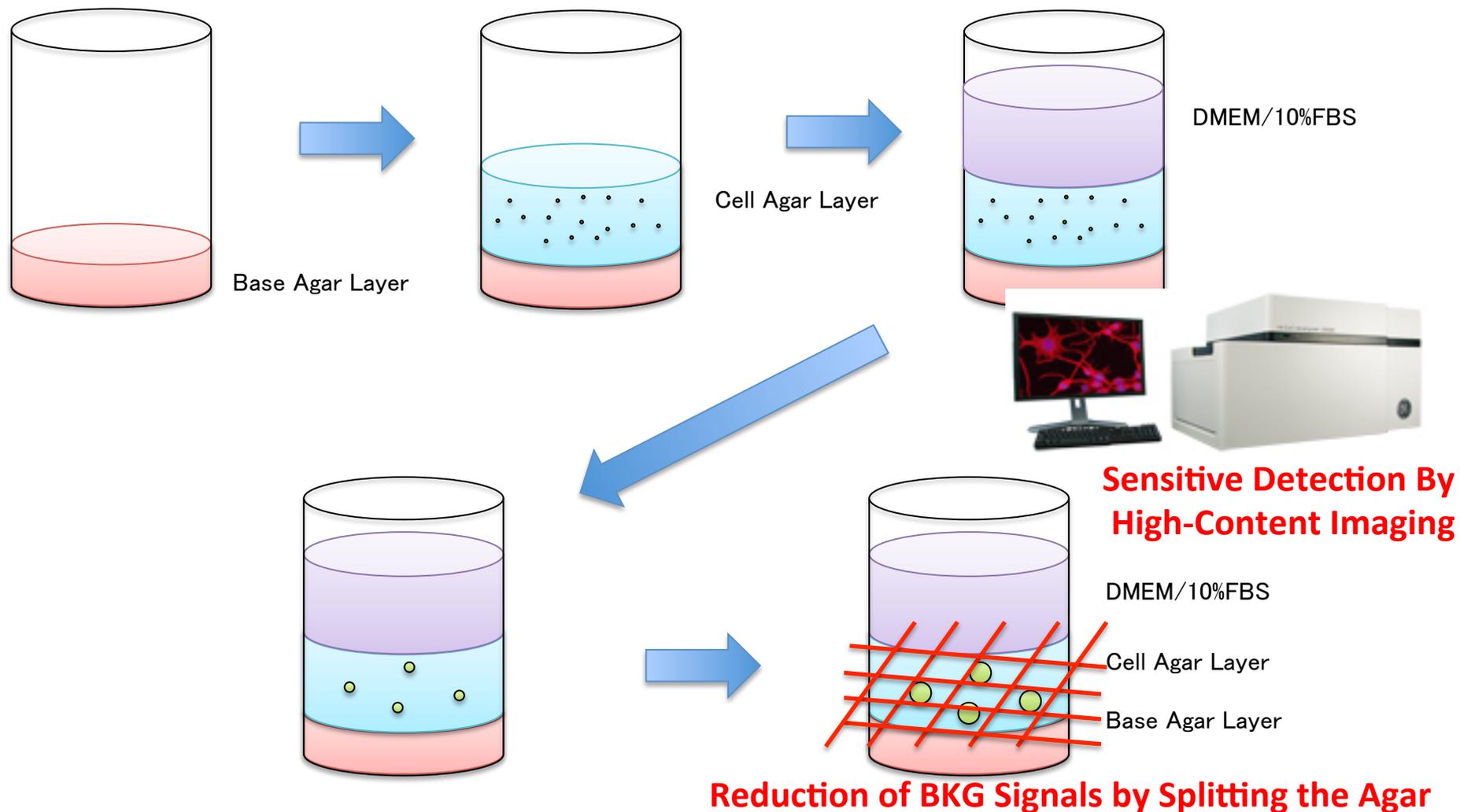
例えば、1%の確率で偽陰性の判定をしてしまうことを許容した上で、HeLa細胞相当の造腫瘍性細胞が1/10⁶以上の割合で混入していないことを示すには、
[log0.01/log(1-0.17)=] 25匹に10⁷個ずつ投与し、1匹も腫瘍形成がないことを確認すればよい

付表2 混在する形質転換細胞の検出法の詳細

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	デジタル 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	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	16週間以上	3-4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可能 <p style="text-align: center;">↓</p> 非臨床安全性試験に適用可能	<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"> 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 良性不死化細胞検出不能 イメージスキャナーが高価 	<ul style="list-style-type: none"> 造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断 (良性と悪性を区別できない)
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)を検出可能	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 $1/1E+7$ (0.00001%) の割合で混入するHeLa細胞 を検出可能	hMSCに $1/1E+5$ (0.001%) の割合で混入するHeLa細胞 は検出可能
出典	Kusakawa <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2015	Kusakawa <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2015	Kusakawa <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2015	Kono <i>et al.</i> , <i>Biologicals.</i> 2015

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

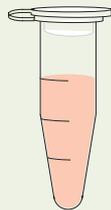


悪性形質転換細胞が1つのウェルあたり1個以下となるように濃度調整して軟寒天培養



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



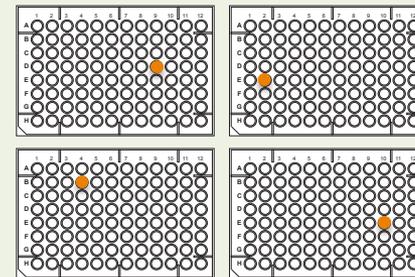
※画像はイメージです



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



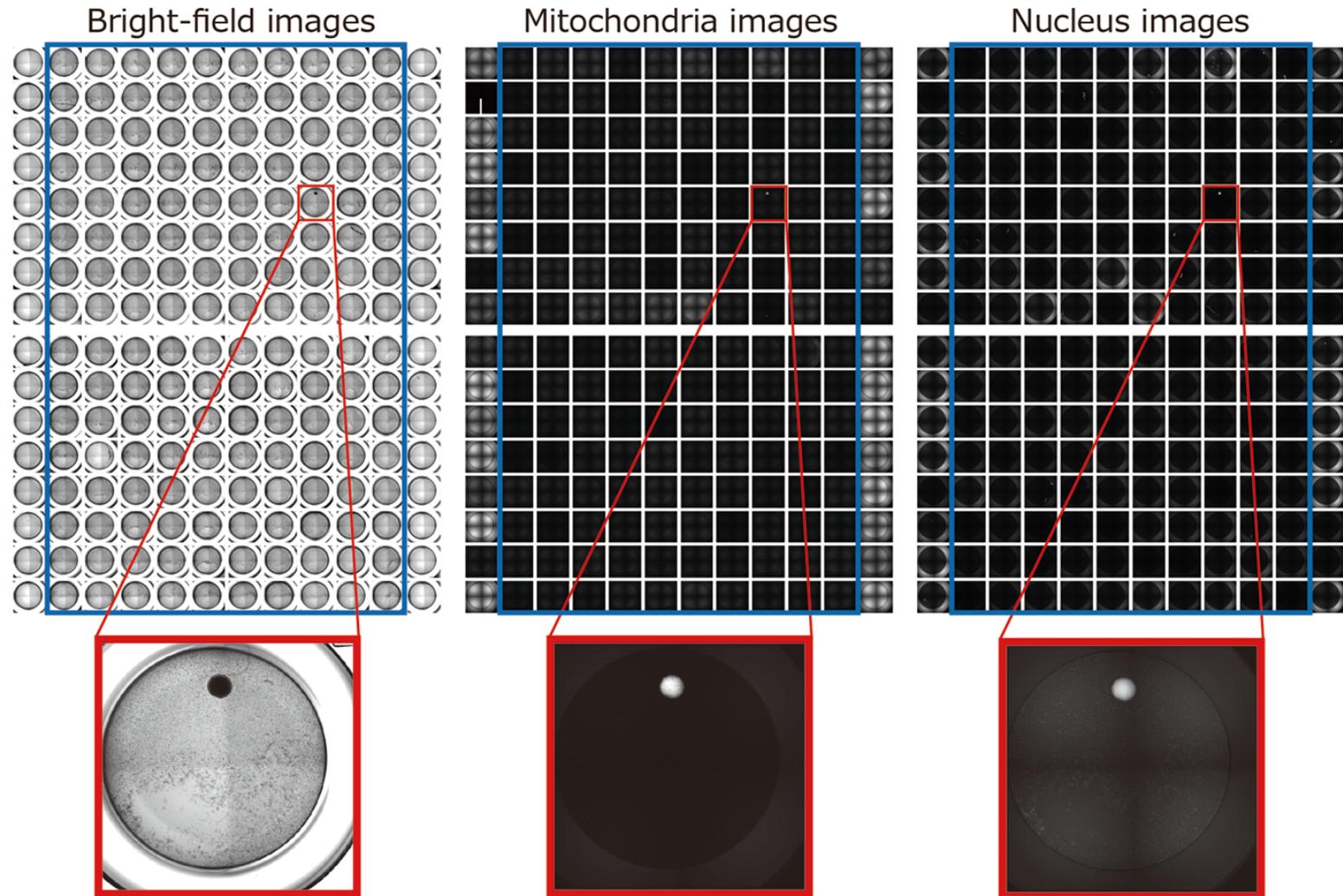
● positive well

・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.

再生医療等製品(ヒト細胞加工製品)のための未分化・形質転換細胞検出試験ガイドライン案策定合同WG

混入未分化・形質転換細胞検出試験GL (検討課題*)	H26	H27	H28
目的外の形質転換細胞の混入・発生と異常増殖	データの取得・調査・まとめ 各採択課題研究班	GL案作成 WG	ドラフト 調整 パブコメ・発出 厚労省・PMDA
未分化細胞の混入・残存と異所性組織形成	データの取得・調査・まとめ 各採択課題研究班	GL案作成 WG	ドラフト 調整 パブコメ・発出 厚労省・PMDA
投与環境における腫瘍形成・がん化の可能性の評価	データの取得・調査・まとめ 各採択課題研究班	GL案作成 WG	ドラフト 調整 パブコメ・発出 厚労省・PMDA

* 自己・同種指針、幹細胞5指針の「非臨床安全性試験」に挙げられた造腫瘍性関連の評価項目

造腫瘍性関連ガイドラインの策定作業

臨床研究 再生医療安全性確保法トラック

- 幹細胞・再生医学戦略作業部会
(文科省、H27.8.7)
 - 再生医療の安全性確保に関する考え方についての早急な整理の必要性
 - 細胞の遺伝子変異の研究は不十分で腫瘍化の可能性についても未解明であるとの指摘
- ↓
- iPS細胞等を用いた臨床研究を実施する際の移植細胞の安全性評価の在り方に係る研究
(厚労省・福井班、H27.12～)
 - 造腫瘍性を含む安全性に関し、臨床研究における評価指標・基準の当面の考え方に関する議論
- ↓
- 「特定認定再生医療等委員会におけるヒト多能性幹細胞を用いる再生医療等提供計画の造腫瘍性評価の審査のポイント」
(H28.6.13, 厚労省医政局研発課長通知)

薬機法トラック

- 革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業(厚労省、H24～)

【採択課題】

- 阪大院(医) 心筋・角膜・軟骨製品
- 国成育セ(研究所) ES細胞由来製品

「再生医療等製品の腫瘍形成リスクに関する明らかなハザード(*)」の評価方法に関するガイドラインの合同検討班
(H27年度～)

* 未分化・形質転換細胞の検出、*in vivo*造腫瘍性試験の方法・留意点

主に考え方(←)

(→)主に具体的試験法

ともに両トラックで共通に利用可能なものとなるのが理想的

平成27年度 厚生労働科学研究費補助金特別研究事業
「iPS細胞等を用いた臨床研究を実施する際の移植細胞の
安全性評価の在り方に係る研究」

メンバー

- 研究代表者 福井 次矢 (聖路加国際大学 聖路加国際病院)
- 研究分担者 赤澤 智宏 (東京医科歯科大学)
油谷 浩幸 (東京大学先端科学技術研究センター)
牛島 俊和 (国立がん研究センター)
梅澤 明弘 (国立成育医療研究センター研究所)
岡野 栄之 (慶應義塾大学医学部)
小川 誠司 (京都大学大学院医学研究科)
掛江 直子 (国立成育医療研究センター)
後藤 弘子 (千葉大学大学院専門法務研究科)
佐藤 陽治 (国立医薬品食品衛生研究所)
澤 芳樹 (大阪大学大学院医学系研究科)
永井 良三 (自治医科大学)
早川 堯夫 (近畿大学薬学総合研究所・所長)
松山 晃文 (医薬基盤・健康・栄養研究所)
森尾 友宏 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)
山口 照英 (日本薬科大学)
山中 伸弥 (京都大学 iPS 細胞研究所)
- 研究協力者 平家 勇司 (聖路加国際病院)
角田 聡 (医薬品医療機器総合機構)
南 砂 (読売新聞東京本社)

「特定認定再生医療等委員会におけるヒト多能性幹細胞を用いる再生医療等提供計画の造腫瘍性評価の審査のポイント」

(H28.6.13, 厚労省医政局研究課長通知)

【対象】再生医療等安全性確保法の下で臨床使用されるヒト多能性幹細胞加工物

【構成】

1. 原材料としての多能性幹細胞に求められる安全性等の審査のポイント

(1) 余剰胚又は原料細胞についての確認事項(倫理面・品質面)

(2) 原材料となる多能性幹細胞における造腫瘍性関連ゲノム所見

2. 多能性幹細胞由来特定細胞加工物の造腫瘍性評価の審査のポイント

(1) 臨床利用を目的とした原材料の確認事項

(2) 最終加工物の*in vitro*試験に関する確認事項

(3) 最終加工物の*in vivo*試験に関する検討事項

(4) リスクマネジメントプランの妥当性の確認

(5) ポテンシャルベネフィットの観点からの提供計画の妥当性についての確認

3. 参考情報

3. 参考情報

(H28.6.13, 厚労省医政局研究課長通知)

ヒト細胞では培養により核型変化などの遺伝子変異が生じることが知られている。核型が安定しているヒト二倍体線維芽細胞でさえも一塩基遺伝子多型(SNP)アレイによる解析では若干の変異を示し、また非二倍体の核型が、明らかな正常組織においても時々観察されることがある。in vitroで観察される核型異常細胞やその他の**遺伝子変異を持つ細胞の安全性に関しては、世界的にもまだ結論は出ていない**。遺伝的安定性のベースラインとなる遺伝子情報は、細胞種や培養方法によって異なる。継代培養において遺伝子複製の絶対的安定性を示す細胞はない。したがって、潜在的ハザードである遺伝的不安定性を最小限にするため培養期間及び継代回数を制限し、培養条件の方法や変更の影響に対するリスク評価を行うべきである。

現状・・・個々の遺伝子変異が本当にハザードなのか、
だとすればどの程度のハザードなのか、がわからない
＝変異が発見されても多くの場合、それに基づいたリスク評価が困難

3. 参考情報(続き)

(H28.6.13, 厚労省医政局研究課長通知)

次世代シーケンサー等の先端技術によるゲノム情報・エピゲノム情報については、遺伝子変化(変異のタイプとそのアليل頻度)に対する**検出感度と適切なコントロールの入手可能性を今後の課題**として検討しつつ、造腫瘍性との関連性について科学的検証を進め、**試験法として利用することの妥当性を評価すべき**である。なお、製品の造腫瘍性等の安全性との関連性が科学的に明らかになった変異に関しては、例えば、

- ① 超長期培養後、既知の腫瘍関連SNV/IndelやCNVを検出するための検査
- ② 超長期培養後、既知の腫瘍関連エピゲノム変化を検出するための検査
- ③ 対象疾患との関連性又は製品中の分化細胞の機能異常との相関が既知の遺伝子変異を検出するための検査

といった検査を実施することにより、特定細胞加工物の安全性向上が期待される。

3. 参考情報(続き)

(H28.6.13, 厚労省医政局研究課長通知)

ただし、特に多能性幹細胞由来特定細胞加工物については、新規性が極めて高くリスク予測が困難なため、安全性確保のための議論の参考情報(reassuranceのための補完情報)として、腫瘍発生その他の有害事象との関連性が既知の遺伝子変異について、あらかじめ確認しておくことが望ましい。すなわち、低アリル頻度遺伝子変異の分析学的検出限界など、試験法の性能を明らかにした上で、上記①～③を確認することが望ましい。①～③の変異が検出された場合の多能性幹細胞由来特定細胞加工物の臨床投与の判断については、患者の重篤度、治療の緊急性等を踏まえて判断する。

多能性幹細胞加工物の遺伝子変異解析の位置づけ
＝Reassuranceのための参考情報

1. 原材料としての多能性幹細胞に求められる安全性等の審査のポイント

(H28.6.13, 厚労省医政局研究課長通知)

(2)原材料となる多能性幹細胞における造腫瘍性関連ゲノム所見

- 核型異常 (Conventional 又はG-Band)
- 腫瘍関連遺伝子 (Cosmic census + Shibata list) のSNV/Indel及びコピー数異常(CNV)を含む構造異常
- 腫瘍化促進の可能性のある外来因子の有意な残存

* 上記3項目において1つでも異常を有する場合は、リスク・ベネフィットを厳密に検討し、臨床利用の妥当性を判断する。

2. 多能性幹細胞由来特定細胞加工物の造腫瘍性評価の審査のポイント

(H28.6.13, 厚労省医政局研究課長通知)

(2) 最終加工物の*in vitro*試験に関する確認事項

- 原材料である多能性幹細胞の拡大培養や分化誘導中に新たに生じた核型異常(Conventional 又はG-Band)や、**腫瘍関連遺伝子(Cosmic census + Shibata list)のSNV/Indel及びコピー数異常(CNV)を含む構造異常**、体細胞変異で確認される細胞亜集団の明らかな増大
- 未分化な**多能性幹細胞の残存**
- 培養期間を超えて培養した場合の、目的外の**形質転換**や目的細胞以外の細胞の**異常増殖**

* 上記3項目において1つでも異常を有する場合は、原則として使用を推奨しないが、対象疾患・投与方法など、リスク・ベネフィットを厳密に検証することで使用が妥当と判断し得る場合も想定される。

2. 多能性幹細胞由来特定細胞加工物の造腫瘍性評価の審査のポイント (H28.6.13, 厚労省医政局研究課長通知)

(3)最終加工物の*in vivo*試験に関する検討事項

- ① その目的とヒトへの外挿性と限界
- ② 動物種と免疫抑制・不全状態
- ③ 提供計画で予定される投与の手技
- ④ 試験での加工物投与部位
- ⑤ 試験での投与・移植形態
- ⑥ 予定投与細胞数と*in vivo* 造腫瘍性試験投与細胞数
- ⑦ 試験観察期間と中間解析する場合の妥当性
- ⑧ 観察評価項目
- ⑨ 観察された病理学的所見の評価
- ⑩ 移植後の観察計画
- ⑪ 加工物の一部保存計画

造腫瘍性関連試験法のドラフト
GLにある内容と同じ

in vivo 造腫瘍性試験は、がん化のリスクを直接評価するものではなく、ある試験条件下で、ハザードの有無や存在量、免疫不全動物内での要因の発現程度を評価するものである。

また、がん細胞は多様性に富むため、*in vivo* 造腫瘍性試験では検出率が低いがん細胞種があることにも留意し、対象患者への説明同意文書に分かりやすく記載されていることを確認すること。

まとめ

1. ヒト細胞加工製品の造腫瘍性の評価に関して、合理的な考え方の議論や試験法の開発が進んでいる。
2. 国内では各種のガイドライン等の整備が進んでいる。最近、特定細胞加工物としてのヒト多能性幹細胞加工物の造腫瘍性評価に特化したPTC文書が公表された。平成28年度中には、ヒト細胞加工製品(薬事トラック)の造腫瘍性関連試験法の技術的留意点に関する文書も発出される予定。
3. 細胞加工製品については、国際的な規制調和の動きは、まだ本格的とは言えない。したがって、発出される国内ガイドライン等をできるだけ早く海外に発信すること国産の製品の国際展開には重要。