

平成 25 年度

次世代医療機器評価指標作成事業

再生医療審査 WG 報告書

再生医療審査 WG 座長

大阪大学大学院医学系研究科
脳神経感覚器外科学（眼科学）

西田 幸二

目次

- I. 次世代医療機器評価指標作成事業再生医療審査 WG 平成 25 年度委員名簿
- II. 平成 25 年度会議議事概要
- III. 同種 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞に関する評価指標 (案)
- IV. 調査事項
 - 1. 同種 iPS 細胞に関して
 - 1-1. 移植における免疫に関して 熊ノ郷 淳
 - 1-2. 再生医療用 iPS 細胞ストックの概要について 齋藤 潤
 - 1-3. 再生医療用同種 iPS 細胞ストックのドナー適格性判断とインフォームドコンセントについて 齋藤 潤
 - 1-4. ヒト多能性幹細胞由来再生医療製品の原料・材料に関する留意点について 佐藤 陽治
 - 2. 気管・鼻軟骨再生について
 - 2-1. ヒト軟骨前駆細胞操作法の現状 谷口 英樹
 - 2-2. 細胞シートによる関節軟骨再生 佐藤 正人
 - 2-3. 生分解性ポリマー足場素材を用いたインプラント型再生軟骨の研究開発と臨床導入 星 和人
- V. 参考資料
 - 1. 平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発 0907 第 5 号厚生労働省医薬食品局長通知「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」
 - 2. 平成 12 年 2 月 22 日付け医薬審第 329 号厚生省医薬安全局審査管理課長通知「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生評価について」

I. 次世代医療機器評価指標作成事業

再生医療審査 WG 平成 25 年度委員名簿

**次世代医療機器評価指標作成事業
再生医療審査WG平成25年度委員名簿（敬称略）**

座長

西田幸二 大阪大学大学院医学系研究科 脳神経感覚器外科学(眼科学) 教授

委員（五十音順）

梅澤明弘 国立成育医療研究センター研究所 副所長
小沢洋子 慶応義塾大学医学部 眼科学教室 専任講師
瓶井資弘 大阪大学大学院医学系研究科 脳神経感覚器外科学(眼科学) 准教授
熊ノ郷淳 大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫アレルギー内科学 教授
齋藤 潤 京都大学iPS細胞研究所 臨床研究応用部門 准教授
佐藤正人 東海大学医学部外科学系（整形外科） 教授
佐藤陽治 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 部長
谷口英樹 横浜市立大学大学院医学研究科 臓器再生医学 教授
星 和人 東京大学大学院医学系研究科 軟骨・骨再生医療寄付講座 特任准教授
万代道子 理化学研究所 網膜再生医療研究開発プロジェクト 副プロジェクトリーダー
先端医療振興財団先端医療センター病院 診療部眼科 副部長
森永千佳子 理化学研究所 網膜再生医療研究開発プロジェクト 研究員
大和雅之 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 教授

厚生労働省

古元重和 厚生労働省 医療機器審査管理室 室長
近藤英幸 厚生労働省 医療機器審査管理室 新医療材料専門官
境 啓満 厚生労働省 医療機器審査管理室 企画調整専門官
藤田倫寛 厚生労働省 医療機器審査管理課 先進医療機器審査調整官
津田 亮 厚生労働省 医療機器審査管理室 主査
山下雄大 厚生労働省 医療機器審査管理室 係員

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構

奥田大樹 医薬品医療機器総合機構 再生医療製品等審査部 主任専門員
松岡厚子 医薬品医療機器総合機構 規格基準部 医療機器基準課 テクニカルエキスパート

オブザーバー

鎮西清行 産業技術総合研究所ヒューマンライフテクノロジー研究部門 副研究部門長
廣瀬志弘 産業技術総合研究所ヒューマンライフテクノロジー研究部門
高機能生体材料グループ 主任研究員
伊藤弓弦 産業技術総合研究所幹細胞工学研究センター 器官発生研究チーム チーム長
東健太郎 京都大学iPS細胞研究所 医療応用推進室・再生医療G

国立医薬品食品衛生研究所（事務局）

新見伸吾 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 部長
澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第三室 室長
河野 健 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第三室 研究員

II. 平成 25 年度 WG 会議議事概要

次世代医療機器評価指標作成事業再生医療審査 WG

平成 25 年度第一回会議議事録（概要）

1. 開催日時：2013 年 10 月 4 日（金）10 時～12 時

2. 開催場所：オフィス東京 L4 会議室

3. 出席者（座長以下五十音順・敬称略）

委員：西田 幸二（大阪大学）、梅澤 明弘（国立成育医療研究センター研究所）、
小沢 洋子（慶応義塾大学）瓶井 資弘（大阪大学）、熊ノ郷 淳（大阪大
学）、齋藤 潤（京都大学）、佐藤 正人（東海大学）、佐藤 陽治（国立医
薬品食品衛生研究所）、谷口 英樹（横浜市立大学）、星 和人（東京大学）
万代 道子（理化学研究所）、森永 千佳子（理化学研究所）、大和 雅之（東
京女子医科大学）

厚生労働省：古元 重和、津田 亮

医薬品医療機器総合機構：日下部 哲也、奥田 大樹

京都大学：東 健太郎

産業技術総合研究所：廣瀬 志弘、伊藤 弓弦

事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：新見 伸吾、澤田 留美、河野 健

4. 配布資料

1. 平成 25 年度第一回委員会議事次第

2. 平成 25 年度委員名簿

3. 次世代医療機器評価指標作成事業について

4. 再生医療審査 WG 平成 24 年度報告

5. 厚生労働省医療機器審査管理室長通知：平成 22 年 1 月 18 日付薬食機発 0118 第 1
号「次世代医療機器評価指標の公表について」

・ 別添3「重症心不全細胞治療用細胞シートに関する評価指標」

・ 別添4「角膜上皮細胞シートに関する評価指標」

6. 厚生労働省医療機器審査管理室長通知：平成 22 年 5 月 28 日付薬食機発 0528 第 1
号「次世代医療機器評価指標の公表について」

・ 別添1「角膜内皮細胞シートに関する評価指標」

7. 厚生労働省医療機器審査管理室長通知:平成 22 年 12 月 15 日付薬食機発 1215 第 1 号「次世代医療機器評価指標の公表について」
 - ・ 別添1「関節軟骨再生に関する評価指標」
8. 厚生労働省医療機器審査管理室長通知:平成 23 年 12 月 7 日付薬食機発 1207 第 1 号「次世代医療機器評価指標の公表について」
 - ・ 別添1「歯周組織治療用細胞シートに関する評価指標」
9. 厚生労働省医療機器審査管理室長通知:平成 25 年 5 月 29 日付薬食機発 0529 第 1 号「次世代医療機器評価指標の公表について」
 - ・ 別添1「自己 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞に関する評価指標」
10. Guidance on Evaluation of Autologous Induced Pluripotent Stem Cells-derived Retinal Pigment Epithelial Cells
11. ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針
12. ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針

平成 24 年度次世代医療機器評価指標作成事業 再生医療審査 WG 報告書

5. 議事内容

- ①次世代医療機器評価指標作成事業について厚生労働省古元室長より説明が行われた。
- ②平成 24 年度までの再生医療審査 WG の活動内容について、事務局より報告された。
- ③平成 25 年度の座長及び委員による自己紹介が行われた。委員は下記の通り(敬称略)

座長

西田 幸二 大阪大学大学院医学系研究科脳神経感覚器外科学(眼科学) 教授

委員(五十音順)

梅澤明弘	国立成育医療研究センター研究所 副所長
小沢洋子	慶応義塾大学医学部 眼科学教室 専任講師
瓶井資弘	大阪大学大学院医学系研究科 脳神経感覚器外科学(眼科学) 准教授
熊ノ郷淳	大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫アレルギー内科学 教授
齋藤 潤	京都大学iPS細胞研究所 臨床研究応用部門 准教授
佐藤正人	東海大学医学部外科学系(整形外科学) 教授
佐藤陽治	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 部長
谷口英樹	横浜市立大学大学院医学研究科 臓器再生医学 教授
星 和人	東京大学大学院医学系研究科 軟骨・骨再生医療寄付講座 特任准教授

万代道子 理化学研究所 網膜再生医療研究開発プロジェクト
副プロジェクトリーダー
先端医療振興財団先端医療センター病院 診療部眼科 副部長
森永千佳子 理化学研究所 網膜再生医療研究開発プロジェクト 研究員
大和雅之 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 教授

④谷口委員、星委員、佐藤（正）委員より自身の専門分野についての発表があり、その後、発表内容についての質疑応答がなされた。

「ヒト軟骨前駆細胞操作法の現況」 谷口委員

「生分解性ポリマー足場素材を用いたインプラント型再生軟骨の
研究開発と臨床導入」 星委員

「細胞シートによる関節軟骨再生」 佐藤委員

⑤平成 25 年度の活動方針について討議した。

主な討議内容

- ・「ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」をベースに網膜色素上皮細胞に特化した部分についてまとめる。
- ・「気管・鼻軟骨再生」に関する調査を行う。
- ・細胞バンクの管理について、網膜色素上皮細胞に特化したものがあれば(網膜特異的な病気と関連する mutation のチェック等)指標に組み込む。
- ・網膜色素上皮細胞に適した iPS 細胞株の条件があるのであれば指標に入れる。
- ・ウイルス試験において、網膜で問題となるウイルスがある場合は指標に入れる。
- ・臨床試験の中に免疫抑制剤の使用について考え方など入れる。

⑥第二回会議までの作業分担について討議した。

評価指標案のたたき台作成

- ・非臨床 - 万代委員、森永委員、佐藤(陽)委員
- ・臨床 - 瓶井委員、小沢委員

講演

- ・免疫抑制に関して : 熊ノ郷委員
- ・CiRA における iPS 細胞ストックについて : 齋藤委員
- ・『再生医療等製品原材料基準』のあり方に関する検討 WG』の内容について
: 佐藤(陽)委員

⑦今後の会議日程

第二回会議 : 平成 25 年 11 月 22 日(金)10-12 時 オフィス東京 L4 会議室

第三回会議 : 平成 25 年 12 月 20 日(金)10-12 時 オフィス東京 L4 会議室

第四会会議 : 平成 26 年 1 月 22 日(水)10-12 時 オフィス東京 L4 会議室

次世代医療機器評価指標作成事業再生医療審査 WG

平成 25 年度第二回会議議事録（概要）

2. 開催日時：2013 年 11 月 22 日（金）10 時～12 時

2. 開催場所：オフィス東京 L4 会議室

3. 出席者（座長以下五十音順・敬称略）

委員：西田 幸二（大阪大学）、梅澤 明弘（国立成育医療研究センター研究所）、
小沢 洋子（慶応義塾大学）瓶井 資弘（大阪大学）、熊ノ郷 淳（大阪大
学）、齋藤 潤（京都大学）、佐藤 正人（東海大学）、佐藤 陽治（国立医
薬品食品衛生研究所）、谷口 英樹（横浜市立大学）、星 和人（東京大学）
万代 道子（理化学研究所）、森永 千佳子（理化学研究所）、大和 雅之（東
京女子医科大学）

厚生労働省：古元 重和、近藤 英幸、野村 由美子、境 啓満、藤田 倫寛、
津田 亮

医薬品医療機器総合機構：日下部 哲也、奥田 大樹、松岡 厚子

オブザーバー：東 健太郎（京都大学）、伊藤 弓弦（産業技術総合研究所）

事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：新見 伸吾、澤田 留美、河野 健

4. 配布資料

1. 平成 25 年度第二回委員会議事次第
2. 平成 25 年度第一回委員会議事録(概要)
3. 「移植における免疫に関して」(熊ノ郷委員発表原稿)
4. 「再生医療用 iPS 細胞ストックの概要について」(齋藤委員発表原稿)
5. 「ヒト多能性幹細胞由来再生医療製品の原料・材料に関する留意点について」
(佐藤(陽)委員発表原稿)
6. 生物由来原料基準に規定する原材料の取り扱いについて
7. 非臨床について たたき台(森永委員、万代委員、佐藤(陽)委員作成)

5. 議事内容

- ①熊ノ郷委員に移植における免疫について、齋藤委員に京都大学 iPS 細胞研究所にお
ける iPS 細胞ストックについて、佐藤(陽)委員にヒト多能性幹細胞由来再生医療

製品の原料・材料に関する留意点について発表いただき、その後、発表内容について質疑応答がなされた。

- ②森永委員に評価指標案たたき台（非臨床部分）について説明していただきながら、全委員で討議した。

「原材料となる iPS 細胞」に網膜変性疾患の原因遺伝子のスクリーニング及び、網膜色素上皮細胞に親和性のあるウイルスについてチェックについて盛り込む。

「品質管理」のための造腫瘍性試験（皮下）と「非臨床安全性評価」のための造腫瘍性試験（網膜下）を区別する。「品質管理」の試験には qRT-PCR や軟寒天コロニー形成試験、細胞の増殖特性を見る等がある。

網膜下への細胞移植は微小環境に影響を及ぼさない細胞数で行う。

非臨床試験は HLA 3 座ホモから作られた各株全てで原則行う。「ただし」以下は入れる。

- ③瓶井委員、小沢委員に臨床試験について留意しないといけない点を説明していただいた。

同種移植で問題となる免疫反応＝拒絶反応を中心にまとめる。

- ④第三回会議までに②、③での討議内容をもとに指標案の修正をおこなう。

自己 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の評価指標で触れられていなくても、今年度 WG の討議の中で重要と思われる部分は盛り込む。

- ⑤今後の会議日程

第三回会議：平成 25 年 12 月 20 日(金)10-12 時 オフィス東京 L4 会議室

第四回会議：平成 26 年 1 月 22 日(水)10-12 時 オフィス東京 L4 会議室

次世代医療機器評価指標作成事業再生医療審査 WG

平成 25 年度第三回会議議事録（概要）

3. 開催日時：2013 年 12 月 20 日（金）10 時～12 時

2. 開催場所：オフィス東京 L4 会議室

3. 出席者（座長以下五十音順・敬称略）

委員：西田 幸二（大阪大学）、梅澤 明弘（国立成育医療研究センター研究所）、
小沢 洋子（慶応義塾大学）瓶井 資弘（大阪大学）、齋藤 潤（京都大学）、
佐藤 正人（東海大学）、佐藤 陽治（国立医薬品食品衛生研究所）、谷口 英
樹（横浜市立大学）、星 和人（東京大学）万代 道子（理化学研究所）、森
永 千佳子（理化学研究所）、大和 雅之（東京女子医科大学）

厚生労働省：古元 重和、近藤 英幸、野村 由美子、境 啓満、津田 亮

医薬品医療機器総合機構：奥田 大樹、松岡 厚子

オブザーバー：東 健太郎（京都大学）、鎮西 清行（産業技術総合研究所）、
伊藤 弓弦（産業技術総合研究所）

事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：澤田 留美、河野 健

4. 配布資料

1. 平成 25 年度第三回委員会議事次第

2. 平成 25 年度第二回委員会議事録(概要)

3. 製造工程、品質試験、非臨床試験について たたき台(万代委員、森永委員、佐藤委員作成)

4. 臨床試験について たたき台（瓶井委員、小沢委員作成）

5. ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針

6. 厚生労働省医療機器審査管理室長通知:平成 25 年 5 月 29 日付薬食機発 0529 第 1 号「次世代医療機器評価指標の公表について」

・ 別添1「自己 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞に関する評価指標」

7. 厚生労働省医療機器審査管理室長通知:平成 22 年 12 月 15 日付薬食機発 1215 第 1 号「次世代医療機器評価指標の公表について」

・ 別添1「関節軟骨再生に関する評価指標」

5. 議事内容

- ①佐藤（陽）委員、森永委員に評価指標案たたき台（非臨床部分）について説明していただきながら、全委員で討議した。

リプログラミングに使用した遺伝子の残存は完全に否定しなければその iPS 細胞は使用できないと縛る形にはしないで否定される事が望ましいという表現にする。

ウイルス試験については ICH-Q5A のガイドラインに従う。

品質管理のための造腫瘍性試験には重度免疫不全動物、非臨床安全性評価のための造腫瘍性試験は免疫不全動物となっている。品質管理では造腫瘍性を持つ細胞がどれくらい存在しているかを見る試験で *in vitro* の系でも代用できる場合もある。非臨床安全性評価では最終製品が臨床投与経路で造腫瘍性を示すかみる試験。その際、微小環境を壊してはいけないので、網膜に関してはラットサイズ以上の動物が想定される。

異常増殖する細胞の否定試験として培養期間を越えて培養した細胞の確認について入れた方が良いのではないかと意見が出た。

- ②小沢委員、瓶井委員に臨床試験について留意しないといけない点を説明していただきながら、全委員で討議した。

免疫抑制剤の使用に関して、まだ未知な部分が多いため具体的には書かない。

- ③①、②での討議内容をもとに指標案の修正をおこなう。今後はメールベースで修正を行い、第四回会議は行わない事となった。

- ④評価指標案の中にある「用語の定義」について、本文部分が出来上がった段階で、必要な用語を瓶井委員に加えて頂く。

- ⑤報告書への執筆内容とその分担について討議した。

熊ノ郷委員	:	移植における免疫について
齋藤委員	:	CiRA における iPS 細胞ストックの現状と今後の展望について
佐藤(陽)委員	:	造腫瘍性試験の考え方について
佐藤(正)委員	:	細胞シートによる関節軟骨再生
谷口委員	:	ヒト軟骨前駆細胞操作法の現況
星委員	:	生分解性ポリマー足場素材を用いたインプラント型再生軟骨の研究開発と臨床導入

III. 同種 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞に関する

評価指標（案）

1. はじめに
2. 本評価指標の対象
3. 本評価指標の位置づけ
4. 用語の定義
5. 評価に当たって留意すべき事項
 - (1) 原料
 - (2) 製品の品質管理
 - (3) 非臨床試験
 - (4) 臨床試験（治験）
6. 参考資料

同種 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞に関する評価指標（案）

1. はじめに

ヒト由来の人工多能性幹細胞（iPS 細胞）又は人工多能性幹細胞様細胞（iPS 様細胞）のうち、同種由来 iPS 細胞又は iPS 様細胞を加工した医薬品又は医療機器（以下「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等」という。）の品質及び安全性を確保するための基本的な技術要件は、平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発 0907 第 5 号厚生労働省医薬食品局長通知「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」に定められているところである。

本評価指標は、ヒト（同種）iPS 細胞加工医薬品等のうち特に網膜色素上皮障害等の治療を目的として適用される医療機器について、上述の基本的な技術要件に加えて当該製品特有の留意すべき事項を示すものである。

2. 本評価指標の対象

本評価指標は、ヒト（同種）iPS 細胞加工医薬品等のうち特に網膜色素上皮障害等の治療を目的として適用される医療機器について、基本的な技術要件に加えて品質、有効性及び安全性の評価にあたって留意すべき事項を示すものである。

なお、開発する製品が医療機器に該当するか判断し難い場合は、必要に応じ、厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室に相談すること。

3. 本評価指標の位置づけ

本評価指標は、技術開発の著しいヒト（同種）iPS 細胞加工医薬品等のうち医療機器を対象とするものであることを勘案し、留意すべき事項を網羅的に示したのではなく、現時点で考えられる点について示している。よって、今後の更なる技術革新や知見の集積等を踏まえ改訂されるものであり、申請内容に関して拘束力を有するものではない。

製品の評価にあたっては、個別の製品の特性を十分理解した上で、科学的な合理性をもって柔軟に対応することが必要である。

なお、本評価指標の他、国内外のその他の関連ガイドラインを参考にすることも考慮すべきである。

4. 用語の定義

本評価指標における用語の定義は、平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発 0907 第 5 号厚生労働省医薬食品局長通知「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」の定義による他、以下のとおりとする。

（1）網膜色素上皮細胞：網膜 10 層の最外層。単層上皮細胞で、視細胞貪食や視物質

(レチナールなど)再生能を持ち、血液網膜関門を構成する。加齢黄斑変性の主病巣。

- (2) 視細胞：網膜を構成する細胞の1つ。光受容体と言われ、光エネルギーを電気エネルギーに変換する。神経網膜の最外層に位置し、外節と呼ばれる先端部は、網膜色素上皮に恒常的に貪食され、新しいものと入れ替わっている。
- (3) 原材料：医薬品等の製造に使用する原料又は材料の由来となるものをいう。(平成15年厚生労働省告示第210号「生物由来原料基準」の定義と同じ)
- (4) セル・バンク：均一な組成の内容物をそれぞれに含む相当数の容器を集めた状態で、一定の条件下で保存しているものである。個々の容器には、単一の細胞プールから分注された細胞が含まれている。(平成12年7月14日付け医薬審第873号厚生省医薬安全局審査管理課長通知「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」の定義と同じ)
- (5) クロスコンタミネーション：サンプル間の混入のこと。交叉汚染とも呼ばれる。医薬品等の製造の場合は、製造に用いられる原料の間、中間体の間等での混入を意味する。例えばあるセル・バンクに由来する細胞に別のセル・バンクに由来する細胞が混入する場合や、ウイルス不活化後の原料に不活化前の原料が混ざってしまう場合などが挙げられる。
- (6) 貪食能：網膜色素上皮細胞はマクロファージ等と同様に、異物(細菌や細胞の残骸など)を自身の細胞体内に取り込み消化する能力を持っている。正常状態では視細胞の先端を恒常的に取り込んでいる。
- (7) 細胞シート：細胞同士が結合してシート状の形態を呈しているものをいう。
- (8) バリア機能：網膜色素上皮細胞では細胞間が接着構造で結合しており、物質が自由に移動できない構造となっている。この機能をバリア機能という。
- (9) 網膜下移植：網膜下腔(感覚網膜と網膜色素上皮細胞の間)に意図的にスペースを作成し、組織や器具などを挿入する手術治療をいう。
- (10) 眼底検査：眼球の前方から瞳孔を通して眼底に光を入れ、倒像鏡・直像鏡・前置レンズなどを用いて網膜・脈絡膜の変化を観察する検査。
- (11) 造影検査：静脈内に蛍光物質(フルオレセインなど)を投与したのち、蛍光専用のカメラで眼底を観察、撮影する検査。眼底の血行動態やバリア機能の評価、新生血管の検出ができる。
- (12) 網膜断層検査：OCT(optical coherence tomography)と呼ばれる、生体網膜を断層面で観察できる検査。脈絡膜新生血管、網膜剥離などの検出に優れる。
- (13) 滲出性病巣：加齢黄斑変性で脈絡膜新生血管が生じた病態。網膜下に貯留した浸出液や新生血管組織により、網膜の構造が乱れ、急速に高度な視力低下を呈する。

- (14) ドライタイプ：加齢黄斑変性の1つの型。網膜色素上皮・視細胞・脈絡膜毛細血管板の委縮を主体とする。急激な視力低下はきたさないが、最終的には読書視力は失う。欧米では加齢黄斑変性の8割を占めるとされている。
- (15) 電気生理学的検査：光刺激を受けた時に網膜や視神経等に発生する弱い電位を検出する検査。網膜の活動電位を記録する網膜電図検査、視神経や脳が発する脳波を測定する視覚誘発電位検査、眼球運動で生じる電位を測定する眼球電図検査などがあり、網膜・視神経・視中枢の機能や、眼球運動の異常などを評価する。
- (16) 中心視力：一般に視力検査で測定する視機能の1つ。最も解像度に優れた視野の中心（黄斑部に相当する）での2点弁別能（解像度）を評価する。文字や図形の形（わが国ではランドルト環（Cの字切れ目）を用いることが大半）を判別ができるかで評価する。
- (17) 網膜感度検査：網膜上に小さな光を投射し、一点一点の明るさを変化させることで被検者が見える範囲を調べる検査。マイクロペリメトリーや静的量的視野測定などがある。
- (18) VFQ-25：米国 National Eye Institute で開発された The 25-item Visual Function Questionnaire。日本語版もある。視覚に関連した QOL を数値化して評価できる。眼科疾患が日常生活に与える影響や、治療・ケアの結果の評価に用いられている。
- (19) 眼底自発蛍光：主に網膜色素上皮内に蓄積したリポフスチンの発する蛍光のこと。専用フィルターを搭載した眼底カメラを用い、その有無および多寡を測定することができ、網膜色素上皮の機能を評価できる。

5. 評価に当たって留意すべき事項

本評価指標は、当面、既に臨床用として株化されているヒト（同種）iPS細胞（細胞株）を主たる原材料として外部から製造所に受入れ、これを製造所において加工して製造されたヒト（同種）iPS細胞加工医薬品等としての網膜色素上皮細胞に適用されることを想定している。医療機器の製造所内でヒト（同種）iPS細胞を体細胞から新たに樹立し、これを原材料とした医療機器の製造を意図するような場合には、本評価指標を参照しつつ、平成24年9月7日薬食発0907第5号「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」等を参考とすること。

（1）原料

①原料となるiPS細胞

原料となるiPS細胞は、臨床用として株化され、セル・バンク化されたヒト（同種）iPS細胞であって、一定の製造工程を経ることにより網膜色素上皮へ分化することが確認されている、または合理的に予測されるものである必要がある。また、ゲノムシーケンスにより、網膜色素上皮細胞の機能に関わる遺伝子変異を持たないことを確認しておくことが望ましい。網膜色素上皮の機能に影響する可能性のある遺伝子としては、RPE65、ベストロフィン、SEMA4A、LRAT、RDH12、RP9、RP11などが挙げられる。

ヒト体細胞への初期化遺伝子導入による遺伝子リプログラミングによりiPS細胞を樹立した場合には、導入された遺伝子の残存が否定されていることが望ましい。残存が否定できない場合には、導入遺伝子が最終製品である網膜色素上皮細胞の品質および安全性に悪影響を与えないことを確認する必要がある。

また、網膜色素上皮に親和性の高いウイルスの感染（ヒトヘルペスウイルスなど）について、ICH-Q5A（平成12年2月22日付け医薬審第329号厚生省医薬安全局審査管理課長通知「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）に従った検査により否定されていることが望ましい。網膜色素上皮に感染する可能性があるウイルスとしては、ヒトヘルペスウイルスHHV1-8型の中でHSV-1（HHV1）（参考資料1）、HSV-2（HHV2）（参考資料2）、VZV（HHV3）（参考資料3）、EBV（HHV4）（参考資料4）、CMV（HHV5）（参考資料5）、HHV6（参考資料6）などが挙げられる。

②ドナーの適格性

最終製品の移植部位が脳に近いことから、伝達性海綿状脳症及びその疑い並びにその他の認知症について、既往歴の聴取、問診等を行うとともに、輸血、移植医療を受けた経験の有無等からドナーとしての適格性を判断すること。また可能であれば遺伝性の網膜変性疾患の可能性について問診等により確認すること。

③製造工程において特に注意が必要な事項

網膜色素上皮細胞（最終製品）の製造に当たっては、製造方法を明確にし、可能な範囲でその妥当性を以下の項目で検証し、品質の一定性を保持すること。

a) ロット構成の有無とロットの規定

最終製品及び中間製品がロットを構成するか否かを明らかにすること。ロットを構成する場合には、ロットの内容について規定しておくこと。

b) 製造方法

原材料となるヒト iPS 細胞株の製造所への受け入れから、原料となるヒト iPS 細胞、分化段階の進んだ細胞を経て最終製品に至る製造の方法の概要を示すとともに、具体的な処理内容及び必要な工程管理、品質管理の内容を明らかにすること。

(1)受入検査

原材料となるヒト iPS 細胞株について、製造所への受け入れのための試験検査の項目(例えば、目視検査、顕微鏡検査、生存率、細胞の特性解析及び微生物試験等)と各項目の判定基準を設定すること。治験開始前段階にあつては、それまでに得られた試験検体での実測値を提示し、これらを踏まえた暫定値を示すこと。

(2)細菌、真菌及びウイルス等の不活化・除去

原材料となるヒト iPS 細胞株を製造所に受け入れた際には、その細胞生存率や表現型、遺伝形質及び特有の機能その他の特性及び品質に影響を及ぼさない範囲で、必要かつ可能な場合は細菌、真菌及びウイルス等を不活化又は除去する処理を行うこと。当該処理に関する方策と評価方法について明らかにすること。

(3)最終製品の構成要素となる細胞の作製

製造所に受け入れたヒト（同種）iPS 細胞株から最終製品の構成要素となる細胞を作製する方法（分化誘導方法、目的とする細胞の分離・培養の方法、培養の各段階での培地、培養条件、培養期間及び収率等）を明確にし、可能な範囲でその妥当性を明らかにすること。

(4)細胞のバンク化

製造所に受け入れたヒト（同種）iPS 細胞株からセル・バンクを樹立するなど、網膜色素上皮細胞（最終製品）の製造のいずれかの過程で、細胞をバンク化する場合には、その理由、セル・バンクの作製方法及びセル・バンクの特性解析、保存・維持・管理方法・更新方法その他の各作業工程や試験に関する手順等について詳細を明らかにし、妥当性を示すこと。平成 12 年 7 月 14 日付け医薬審第 873 号厚生省医薬安全局審査管理課長通知「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」等を参考とすること。ただし、より上流の過程で評価されていることに起因する正当な理由により検討事項の一部を省略することは差し支えない。

(5)製造工程中の取り違え及びクロスコンタミネーション防止対策

ヒト(同種) iPS 細胞由来の網膜色素上皮細胞(最終製品)の製造にあたっては、製造工程中の取り違え及びクロスコンタミネーションの防止が重要であり、工程管理における防止対策を明らかにすること。

(2) 製品の品質管理

①網膜色素上皮細胞としての品質規格設定のための特性解析項目

a) 形状確認

位相差顕微鏡観察等により、網膜色素上皮細胞特有の細胞形態(例えば茶褐色の色素、多角形・敷石状細胞形態など)が観察されることを確認する。

b) 網膜色素上皮細胞としての特異性の確認

網膜色素上皮関連遺伝子(RPE65, CRALBP, MERTK, BEST1などのうちいずれか)が発現していることを確認する。

c) 純度確認

RPE65、ベストロフィン、PAX6などの複数抗体を用いた免疫染色により判断する。あるいは関連遺伝子を確認して純化培養をしたもので、特徴的な形態をもつ細胞ではほぼ色素含有細胞は網膜色素上皮と考えられるため、画像処理などで客観的に数値化して有色素細胞数を判定し純度の確認を行うこともできる。

d) 未分化細胞が混在していないことの確認

未分化細胞の混在については、文献的には、未分化マーカーの免疫染色(Oct3/4, Sox2, TRA-1-60)によるフローサイトメトリーによる解析、定量PCRによるマーカー遺伝子の定量(one step 45 サイクル定量等によるOCT3/4, NANOG, LIN28などの遺伝子発現量の評価)などが報告されている。この中で特にLIN28の遺伝子定量解析は、未分化細胞に対する特異性が高くかつ高感度であり、一般的に評価方法として代表的に用いることができる(参考資料7)。

なお、iPS未分化細胞の混在と造腫瘍性については必ずしも一致しないものがあり、造腫瘍性試験に関しては非臨床試験の項目を参照のこと。

e) 機能評価

治療用途に整合性のある網膜色素上皮細胞としての機能特性をもつことを、製造工程中に確認する。一般的な検査としては例えば以下のようなものがある。

・食食能 (蛍光ラベルを行った視細胞外節や蛍光ビーズなどを培養液に添加して細胞のとりこみ状態をフローサイトメトリー等を用いて評価する)

・増殖因子分泌能 (VEGF (vascular endothelial growth factor), PEDF (Pigment epithelium-derived factor) などの分泌量をELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)で測定する)

②網膜色素上皮細胞シートとしての品質規格設定のための特性解析項目

網膜色素上皮細胞シートとしての特性を解析する場合は、以下のように形状確認、力学的適合性、機能特性について評価を行い、シート作製方法としての製造工程の妥当性についても明らかにしておく。

- a) 形状確認として、シートの組織切片の作製、または共焦点顕微鏡での3次元観察等により、細胞がシートを形成していることを確認する。
- b) 力学的適合性として、剥離、移植片としての準備まで行い、細胞シートとしての破損の有無などを確認する。
- c) 機能特性（バリア機能）評価として、免疫染色（ZO-1染色）などバリア機能との相関が報告されている適切なマーカーの発現解析、または経上皮電気抵抗値（TEER:Trans Epithelial Electrical Resistance）の計測等を行う。

（3）非臨床試験

①最終製品の品質管理又は非臨床安全性評価のための造腫瘍性試験

ヒト iPS 細胞を加工して製造される医薬品等の造腫瘍性を評価する上では、「原料となる iPS 細胞の造腫瘍性と最終製品の造腫瘍性との相関・因果関係は未解明である」という点に注意が必要である。即ち、臨床適用に際しては、原料となる iPS 細胞ではなくあくまで最終製品としてのヒト iPS 細胞加工医薬品等の造腫瘍性評価が最も重要であることに常に留意しなければならない。従って、造腫瘍性試験については最終製品を用い、免疫不全動物を利用した検出限界が既知の試験系を用いて造腫瘍性の評価を行うことが有用である。（なお、原材料または原料としての iPS 細胞セル・バンクの品質評価を目的とした造腫瘍性試験を行う場合については、ICH-Q5D に準じた形で実施して差し支えない。）

最終製品の造腫瘍性の評価には目的別に大きく 2 種類ある。すなわち、「品質管理」のための造腫瘍性試験（造腫瘍性細胞の存在量の確認）と「非臨床安全性評価」のための造腫瘍性試験（最終製品の細胞がヒトでの投与部位に相当する微小環境で造腫瘍性を示すかどうかの確認）であり、これらは区別することが重要である。前者の例としては観察の簡便性と高感度な特性から、重度免疫不全動物（例：NOD/SCID/ γ C^{null} (NOG)マウス（参考資料 8、9）、NOD/SCID/IL2 γ KO (NSG)マウス、Rag2- γ C double-knockout (DKO) マウス）への皮下投与試験が挙げられ、後者の例としては免疫不全動物への網膜下投与が挙げられる（参考資料 9、10、11）。最終製品の造腫瘍性に関する品質評価と言う意味では、免疫不全動物への皮下投与試験以外に、最終製品中に残存する未分化細胞の量を *in vitro* で確認することも有用である。*in vitro* の評価法としては例えば、未分化細胞マーカー分子を指標にしたフローサイトメトリー（例：TRA-1-60）や定量 RT-PCR（例：LIN28）が挙げられ（参考資料 7）、いずれにしても試験系の検出限界を確認しておくことが結果の

解釈において重要である。

網膜下（臨床投与経路）移植については、小動物では手術侵襲が大きく、手術手技により結果判定が困難となる可能性があることに留意する。この際の投与細胞数としては、想定臨床使用量に種差と個体差の安全係数を掛けた量が理想であるが、動物に投与した際に、投与細胞の総容量自体が投与部位の微小環境に大きな影響を与え、アーチファクトとなってしまう可能性を十分考慮する必要がある。すなわち、網膜下移植による造腫瘍性試験の目的は最終製品の細胞がヒトでの投与部位に相当する微小環境で造腫瘍性を示すかどうかの確認にあることに留意しながら投与細胞数を設定することが重要である。

HLA タイピングなどの後に同じ方法で樹立され、最終製品の原料として同等の品質特性を持つことが確認された複数の iPS 細胞セル・バンクから同等の品質特性を持つ網膜色素上皮細胞（最終製品）を製造する場合であっても、原則的には各セル・バンクから製造された最終製品について、ヒトでの投与部位に相当する微小環境で造腫瘍性を示すかどうかを評価する必要がある。免疫不全動物の網膜下への移植による最終製品の造腫瘍性試験は、その代表的な方法として挙げられる。ただし、ヒトでの投与部位に相当する微小環境における最終製品の造腫瘍性のプロファイルを、他の品質特性データから合理的に説明することが可能と判断される場合には、各セル・バンク由来の最終製品に関する当該品質特性データにより、それぞれのセル・バンク由来の最終製品のヒト網膜下での造腫瘍性を推定することができる。

②最終製品の効力又は性能を裏付ける試験

技術的に可能かつ科学的に合理性のある範囲で、対象疾患に対し適切なモデル動物等を用いて、最終製品の機能発現、作用持続性及びヒト iPS 細胞加工医薬品等として期待される臨床効果の実現可能性（Proof-of-Concept, POC）を示すこと（参考資料 10）。

HLA タイピングなどの後に同じ方法で樹立され、最終製品の原料として同等の品質特性を持つことが確認された複数の iPS 細胞セル・バンクから同等の品質特性を持つ網膜色素上皮細胞（最終製品）を製造する場合には、代表的な株から製造された最終製品について、POC を示すことで良い。

③その他

シート挿入などで特別な手技を必要とする場合、手技的な安全性の確認、及びその手技を用いての移植後の局所における短期間での反応など、臨床応用において必要かつ科学的に妥当と思われる項目については、中、大型動物での確認を行う事が望ましい。

(4) 臨床試験（治験）

① 適応

網膜色素上皮等の障害のある疾患

加齢黄斑変性、変性近視、スターガルト病、外傷、網膜色素変性、など。

② 全身モニタリング項目

移植後に眼以外に腫瘍が発見された時にそれが移植細胞に由来するものかどうか判断するために、術前に、必要と思われる悪性腫瘍の全身的なスクリーニングを行っておく事が望ましい。移植手術後妥当と思われる期間を設定し腫瘍発生などに注意する。

③ 移植治療の評価方法

本評価指標で対象とする疾患において、治療効果の評価項目としては、主に以下の a) 及び b) に示す解剖学的評価及び視機能評価の 2 種類がある。どちらをどのタイミングで評価項目として用いるかについては、対象疾患と治療内容により妥当なものを検討する。対照（コントロール）については、従来の治療（加齢黄斑変性における抗 VEGF 療法など）で効果が十分に得られない症例を対象とする場合、既存治療の効果を問わず一定基準の症例を対象とする場合等、それぞれの研究デザインに応じて、過去に報告されている治療成績及びその対照群などの中から比較に適切と思われる群と比較するのが妥当と思われる。また遺伝性変性疾患などで両眼がほぼ同様に進行するものについては反対眼を対照とするのが妥当と思われる。

以下、評価項目についての眼科該当専門領域での現在の流れをまとめるが、眼科領域における検査法の進歩は著しく、随時それぞれの試験に妥当、適切と思われる評価方法を用いるのが望ましい。

a) 解剖学的評価

眼底検査及び画像診断（造影検査、網膜光干渉断層像検査など）など。

近年の眼科検査において画像診断手法の進歩は著しく、例えば網膜光干渉断層像検査（OCT）は眼底の詳細な断層イメージを非侵襲的かつ高解像度で観察できるため、加齢黄斑変性のような滲出性病巣の活動性の有無、またドライタイプも含めて、治療後の実際の視細胞の定量的な残存状態など、網膜の保護効果を客観的、経時的に評価するにあたり、非常に有用かつ信頼性のある検査法の一つである。従って、移植細胞の生着、効果を判定する上で、OCT のような画像診断法を用いるのは評価法として最も妥当である。また安全性の評価についても、拒絶反応、腫瘍形成を含め、造影検査、及び OCT から判断するのが最も感度もよく妥当である。

b) 視機能検査

視力、網膜感度、視野検査、電気生理学的検査など。

黄斑部の色素上皮障害及びそこから派生する滲出性加齢黄斑変性にみられる

ような脈絡膜新生血管等の滲出性の病態発生は、それらが原因となって、徐々に上にある黄斑部の視細胞の変性を進行させる。視機能はこの視細胞の状態に依存するものであり、移植治療の主目的は、これらの疾患においては発症後不可避である黄斑部の視機能障害（視力低下）をなるべく早い時期に食い止めて、健全な色素上皮を黄斑部に補うことにより、残された視細胞機能を保護することである。基本的に失われた視細胞についてはそれを回復することは現状では不可能であり、本治療の目的とはならない。

視機能の代表としては中心視力というものが一般に用いられるが、これは厳密には中心部の健全な視細胞の残存位置に影響をうける。つまり一般的にはより中心部に近い視細胞が残存しているほど視力は良好となるが、加齢黄斑変性などでは同心円状に均一に視細胞が失われていく訳ではなく、ある意味で無作為、無秩序に失われる。そのため、黄斑部エリア内での視細胞残存範囲と視力とは必ずしも相関せず、また主観的な視機能の捉え方にもいずれに重点があるかは個人差がある。（主観的には、「視力検査で数字はでるけれども見えている気がしない」又は、「視力は数値としては低いが案外不自由がない」といった乖離が実際に生ずる。）

疾患早期に治療するほど、より中心部に近い視細胞がより多く保護され、一般的には良好な視力が維持される。

一方進行期に治療すると、既に中心部の視細胞は失われているため、視力の改善は望めないが、更にもその周辺の視細胞が保護できれば、中心暗点（真ん中の見えない部分）の減少、といった改善が得られる。

従って、視機能の評価にあたっては、対象疾患の進行時期に応じて、視力のみでの判定が不適切と思われる場合は、視力に加えて網膜感度の検査または中心視野など、黄斑部内のさらに局所での反応性、範囲に関する指標を含めて総合的に判断するのが望ましい。

対象疾患によっては局所解析が可能であれば電気生理学的検査なども客観的視機能検査として良い指標となる。

また、両眼性の患者において、視力優位眼に治療を行う場合は、QOL (quality of life) 試験として NEI VFQ-25 なども、視機能評価の一つの指標となりうる（参考資料 12）。

④同種移植（免疫抑制剤投与）の際に必要な評価項目

免疫抑制剤を術前後に全身投与されると考えられるが、未だコンセンサスの得られた方法が無い事についてインフォームドコンセントを得ること。おそらく術前後の数ヶ月にわたる投与が必要と思われる、そのための合併症にも留意すること。そのために必要な評価項目を列挙する。

a) 解剖学的評価のために、眼底検査及び画像診断（造影検査、網膜光干渉断層像

- 検査、眼底自発蛍光など)を継時的に行う。移植部分だけでなく眼底全体の色調や網膜硝子体・前房を含む眼内の炎症・滲出性変化等に注目する。
- b) 視機能検査のために視力、網膜感度、視野検査、電気生理学的検査などを行う。術後回復傾向にあったものが低下した場合等は、特に注意を払う。
- c) 免疫抑制剤の全身投与に伴う全身合併症のスクリーニング及び定期的な採血を行う。

6. 参考資料

1. Tiwari V, Oh MJ, Kovacs M, Shukla SY, Valyi-Nagy T, Shukla D. Role for nectin-1 in herpes simplex virus 1 entry and spread in human retinal pigment epithelial cells. *FEBS J.* 2008 Nov;275(21):5272-85.
2. Shukla SY, Singh YK, Shukla D. Role of nectin-1, HVEM, and PILR-alpha in HSV-2 entry into human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Jun;50(6):2878-87.
3. Milikan JC, Baarsma GS, Kuijpers RW, Osterhaus AD, Verjans GM. Human ocular-derived virus-specific CD4+ T cells control varicella zoster virus replication in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Feb;50(2):743-51.
4. Usui N. Detection of herpesvirus DNA in intraocular tissues. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi.* 1994 May;98(5):443-8.
5. Tugizov S, Maidji E, Pereira L. Role of apical and basolateral membranes in replication of human cytomegalovirus in polarized retinal pigment epithelial cells. *J Gen Virol.* 1996 Jan;77 (Pt 1):61-74.
6. Arao Y, Soushi S, Sato Y, Moriishi E, Ando Y, Yamada M, Padilla J, Uno F, Nii S, Kurata T. Infection of a human retinal pigment epithelial cell line with human herpesvirus 6 variant A. *J Med Virol.* 1997 Oct;53(2):105-10.
7. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, Sato Y. Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One.* 2012;7(5):e37342.
8. Kanemura H, Go MJ, Nishishita N, Sakai N, Kamao H, Sato Y, Takahashi M, Kawamata S. Pigment epithelium-derived factor secreted from retinal pigment epithelium facilitates apoptotic cell death of iPSC. *Sci Rep.* 2013;3:2334.
9. Kanemura H, Go MJ, Shikamura M, Nishishita N, Sakai N, Kamao H, Mandai M, Morinaga C, Takahashi M, Kawamata S. Tumorigenicity studies of induced

- pluripotent stem Cell (iPSC)-derived retinal pigment epithelium (RPE) for the treatment of age-related macular degeneration. *PLoS One*. 2013;9(1):e85336.
10. Lu B, Malcuit C, Wang S, Girman S, Francis P, Lemieux L, Lanza R, Lund R. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of mascular degeneration. *Stem Cells*. 2009 Sep;27(9):2126-2135.
 11. Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*. 2012 Feb 25;379(9817): 713-720.
 12. Orr P, Rentz AM, Marfolis MK, Revicki DA, Dolan CM, Colman S, Fine JT, Bressler NM. Validation of the National Eye Institute Visual Function Questionnaire-25 (NEI VFQ-25) in age related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci*. 2011; 52:3354-3359.

IV. 調査事項

1. 同種 iPS 細胞に関して
 - 1-1. 移植における免疫に関して 熊ノ郷 淳
 - 1-2. 再生医療用 iPS 細胞ストックの概要について 齋藤 潤
 - 1-3. 再生医療用同種 iPS 細胞ストックのドナー適格性判断とインフォームドコンセントについて 齋藤 潤
 - 1-4. ヒト多能性幹細胞由来再生医療製品の原料・材料に関する留意点について 佐藤 陽治
2. 気管・鼻軟骨再生について
 - 2-1. ヒト軟骨前駆細胞操作法の現状 谷口 英樹
 - 2-2. 細胞シートによる関節軟骨再生 佐藤 正人
 - 2-3. 生分解性ポリマー足場素材を用いたインプラント型再生軟骨の研究開発と臨床導入 星 和人

1) 自己紹介

2) 移植とHLA

3) 内在性リガンド

大阪大学・呼吸器免疫アレルギー内科教室
免疫学フロンティア研究センター・感染症態部門

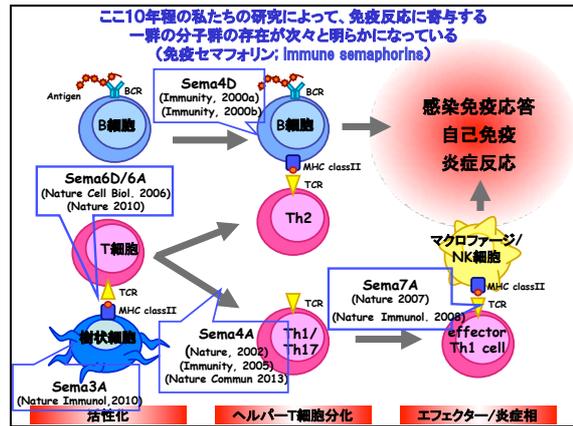
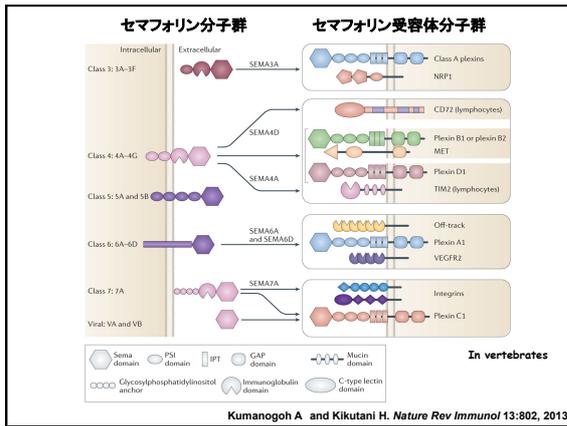
基礎的アプローチ

- セマフォリン分子群による免疫制御機構の研究
- 免疫制御分子の機能解析



臨床的アプローチ

- 抗IL-6受容体抗体の適応拡大を目指した臨床研究
- WT-1ペプチドワクチン 臨床研究
- 難治性疾患の診断マーカーの開発
- セマフォリン阻害抗体の開発
- IFREC研究者のシーズの臨床応用を目指した研究



免疫研究が一つの契機となりセマフォリン分子群が「病気の鍵分子」であることが次々に明らかになっている → 疾患治療の新たな創薬ターゲットとして注目されている

クラス3型
Sema3A: 心臓の交感神経分布異常→突然死の原因 (*Nat Med*, 2007), アトピー性皮膚炎 骨粗鬆症 (*Nature* 2012)
Sema3B, Sema3F: 肺がんのがん抑制遺伝子 (*PNAS* 2002等)
Sema3E: がん転移 (*JCI* 2010)

クラス4型
Sema4A: アトピー性皮膚炎 (*Immunity* 2005), 多発性硬化症 (*Nature* 2002)
Sema4D: 免疫不全症 (*Immunity* 2000), がん浸潤 (*J Exp Med* 2009), 骨粗鬆症 (*Nat Med* 2010)

クラス7型
Sema7A: 神経走行異常, 接触性皮膚炎抵抗性 (*Nature* 2003, *Nature* 2007, *Cell* 2010)

セマフォリン受容体
Plexin-A1: 骨粗鬆症 (*Nat Cell Biol* 2006)
統合失調症 NP-1: 肝がんの進展 (*J Hepatology* 2011)

免疫難病克服のための開発プロジェクト

セマフォリンを標的とした新しい免疫抑制法の開発
“免疫を制御する” 大阪大学医学部附属病院
免疫を抑制することによる自己免疫/アレルギー疾患、がんの診断・治療の発展
“免疫を見る” 免疫マーカーの発見
免疫反応の可視化による免疫療法の開発
“免疫を支える” 抗体医薬の開発
抗体医薬の開発 診断マーカーの開発
抗体医薬の進展! セマフォリンの発見

開発ロードマップ

2012 2013 2014 2015

臨床研究開発 (評価と治療) → リーディング博士後期研究・特別研究、学術的価値の検証、新薬の創製・評価の準備 → 臨床試験の実施
創薬の進展 (可視化技術) → 光学技術・顕微鏡技術開発 → 機器小型化・経口薬化・モデル化 → 評価・低コスト化
次世代型抗体・診断マーカーの開発 → 抗体特性評価・標的分子決定 → 抗体の最適化・学際協力の促進 → 臨床試験・安全性評価

1) 自己紹介

2) 移植とHLA

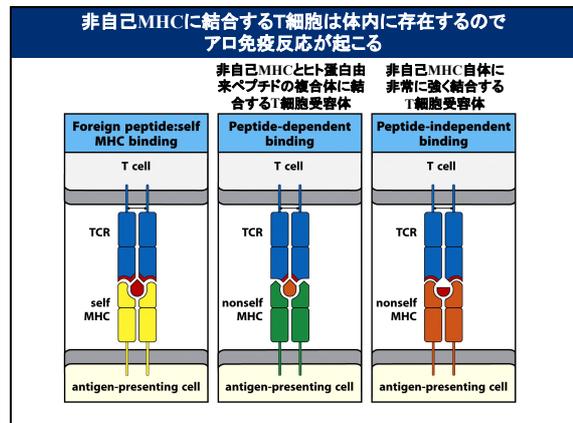
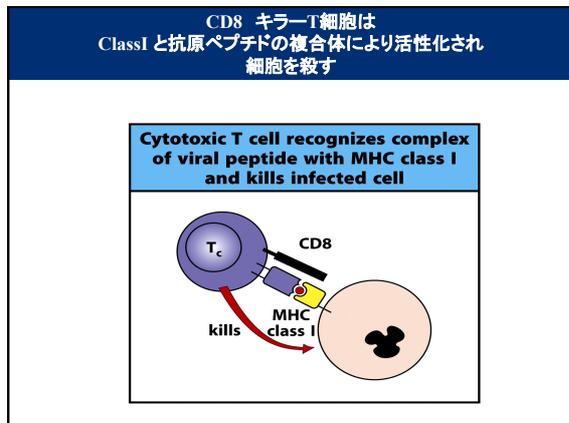
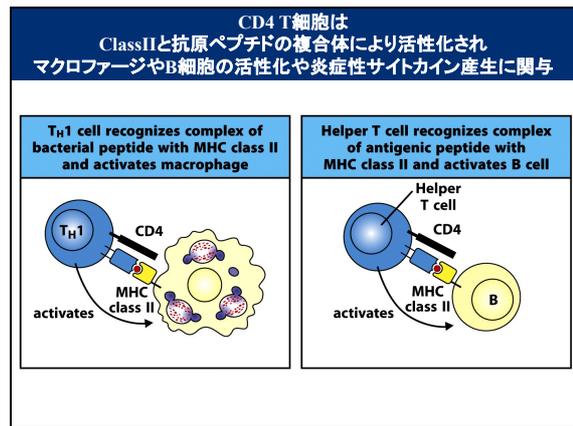
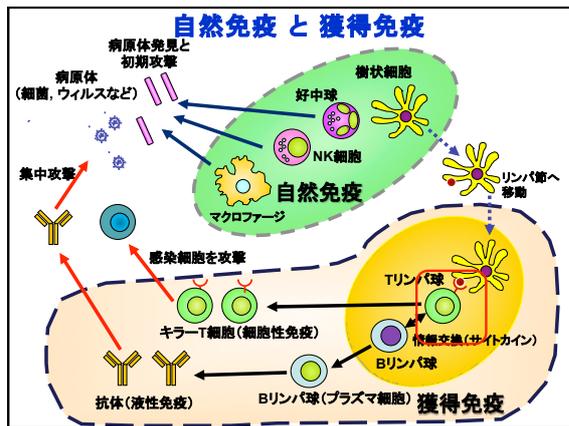
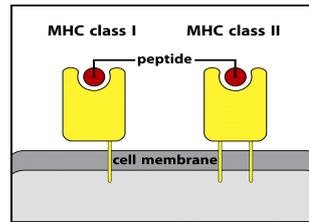
(阪大保仙直毅先生、HLA研究所佐治博夫先生より資料提供)

3) 内在性リガンド

臓器移植

拒絶反応はT細胞によっておこる

主要組織適合抗原(MHC、ヒトではHLA)
Class IとClass IIの二つがあり、抗原ペプチドを
T細胞に提示する



HLAはどこに発現しているか？

Class I: ほぼ全ての組織に発現

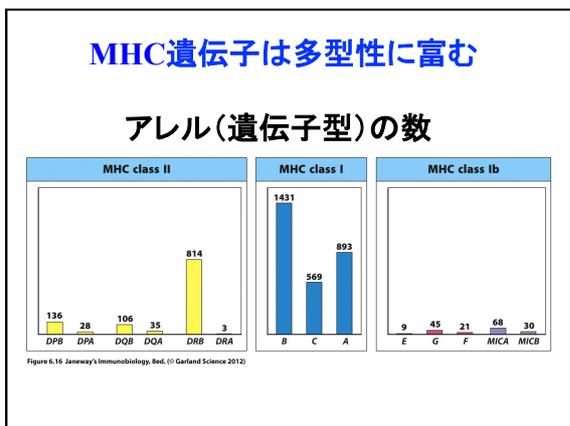
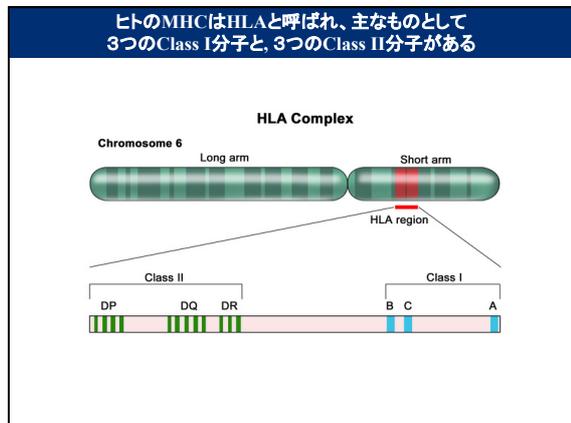
➔ 適合していないとallo 反応性のCD8T細胞が活性化され、Class I-HLAを発現する臓器は攻撃を受ける

注意) NK細胞も活性化される!!

Class II: 抗原提示細胞(マクロファージ、樹状細胞、B細胞)、血管内皮細胞など限られた細胞にのみ発現

➔ 適合していないとallo 反応性のCD4T細胞が活性化され、免疫反応の賦活化が起こる

注意) 病的な状態ではそれ以外の細胞にも発現する(例、T細胞、血管内皮細胞、肺胞上皮、繊維芽細胞)



- ### 造血幹細胞移植におけるHLA matching
- Class I=A,B,C, Class II=DR に関してそれぞれ両アレルが一致していることが、GVHD/生着不全の防止には良い。
 - HLA-A,B,C,DRミスマッチ移植では、液性拒絶の防止のため、クロスマッチが必要。
- ### 臓器移植におけるHLA matching
- 腎/肝移植では血縁/非血縁間とも HLAのmatchingが行われるが、それ以外の心臓、肺の移植ではHLAのmatchingは事実上できない。
 - ただし液性免疫拒絶予防のためのクロスマッチ/バーチャル適合試験が行われる。

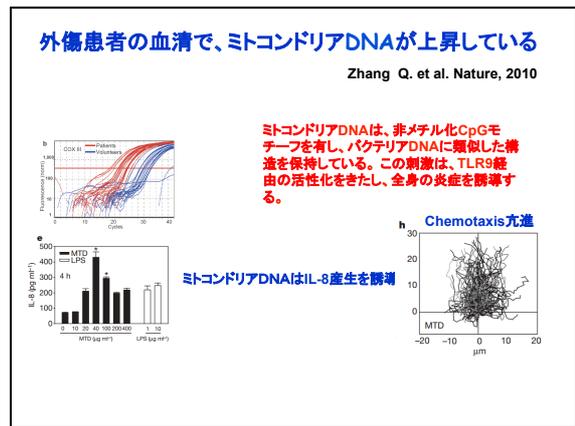
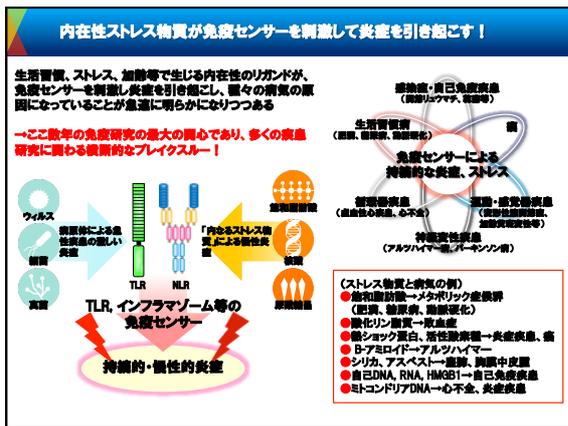
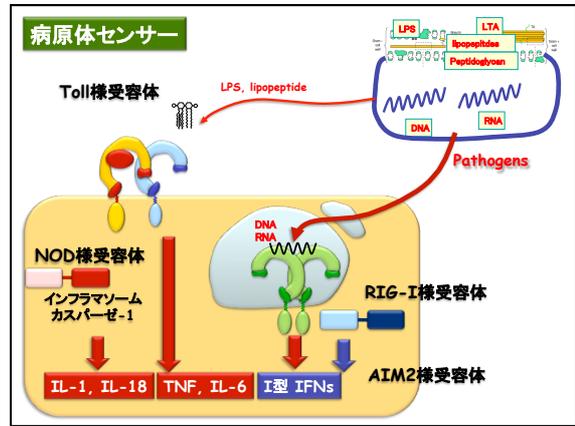
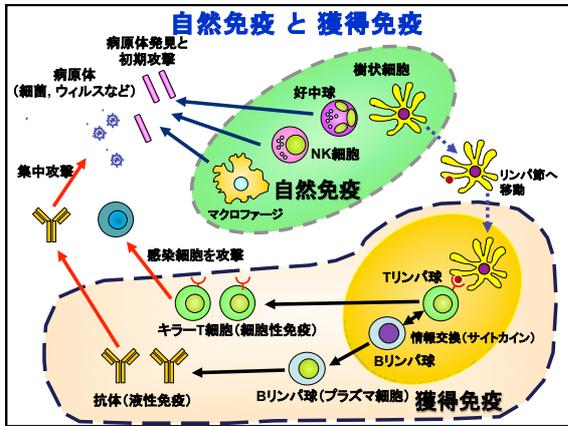
iPS細胞由来細胞移植におけるHLA matching

- 自家iPS細胞由来細胞/組織移植**
HLA適合性が保証できる
- 他家(アロ)iPS細胞由来細胞/組織移植**
HLAハプロタイプ ホモ接合のiPS細胞由来細胞/組織を移植すればHLAハプロタイプを共有する患者は拒絶方向適合になる

	A	B	C	DR
Donor (iPS cells)	*24:02	*12:02	*52:01	*15:02
	*24:02	*12:02	*52:01	*15:02
Recipient	A	B	C	DR
	*24:02	*12:02	*52:01	*15:02
	*33:03	*14:03	*44:03	*13:02

Recipientから見ればDonorのHLAは自己である

- 1) 自己紹介
- 2) 移植とHLA
- 3) 内在性リガンド





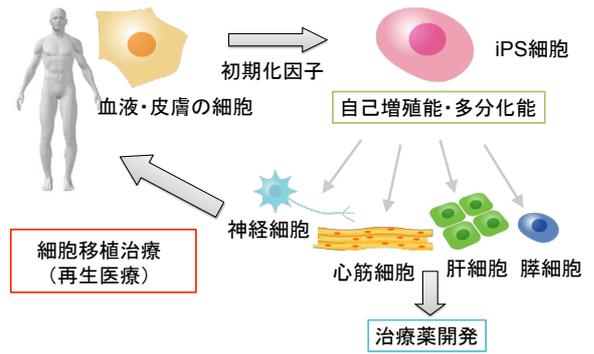
再生医療用iPS細胞ストック の概要について

2013年11月22日

京都大学iPS細胞研究所(CiRA)
斎藤 潤

1

iPS細胞: 治療応用への道筋



2

臨床研究に近い再生医療



3

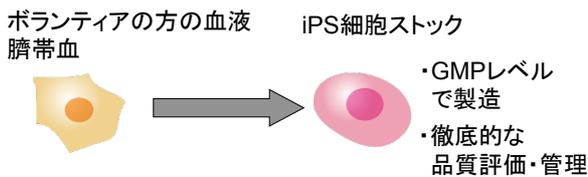
iPS細胞による再生医療

患者さん本人からiPS細胞を作ると
倫理的問題、拒絶反応を回避
しかし、費用と時間がかかる

再生医療用iPS細胞ストック

4

京都大学再生医療用iPS細胞ストック

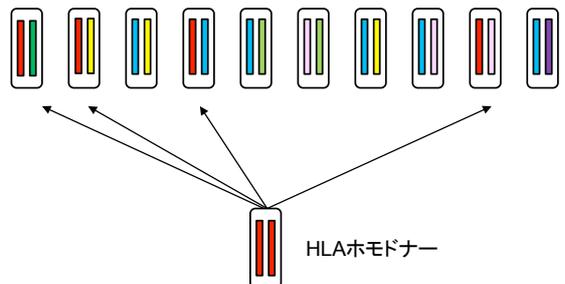


拒絶反応を少なくするためには
HLA型を合わせる必要がある

HLA型: 細胞の“血液型” 数万種類以上

5

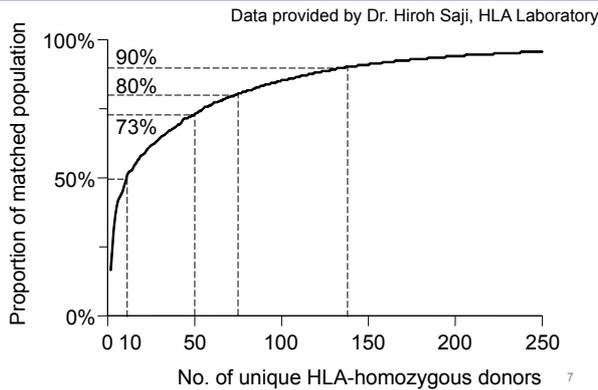
HLAホモドナーの有用性



最頻度HLAホモドナー1名で日本人の20%がカバーできる。
75名では80%

6

No. of Unique Homozygotes Required



iPS細胞ストック作製目標

phase 1

5年以内
日本人の30~50%をカバーする
iPS細胞ストックを作製

phase 2

10年以内
日本人の大半に適用できる
iPS細胞ストックを作製

ドナーリクルート計画

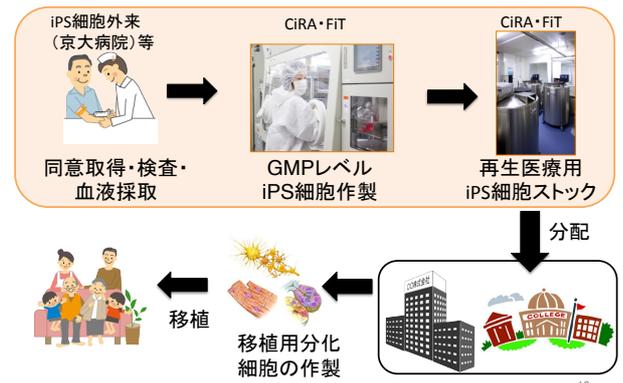
Phase 1 日本人カバー率 30~50%
5年以内 HLAホモドナー 最頻度から5~10種

京大病院で過去にHLA検査した方 (承認済)
日赤血液事業との連携 (承認済)
臍帯血バンクとの連携 (相談中)

Phase 2 日本人カバー率 80~90%
10年以内 HLAホモドナー 75種~150種 計画の見直しあり

日赤血液事業との更なる連携
臍帯血バンクとの更なる連携

iPS細胞ストックの作製と利用(概要)



京大病院との連携

京大病院で過去にHLA検査をした健康な方

「高頻度HLAホモドナー由来の医療用iPS細胞ストック構築」に関する臨床研究計画が、京大医の倫理委員会により H24.9.24承認済み

ドナーリクルート方法

診療科の先生からドナー候補者(HLAホモの方)に、研究協力についてご紹介いただく

その後はドナー候補者の **自由意思** で、CiRAIにご連絡をいただく

日赤との連携

日赤・成分献血者

「成分献血者を対象としたHLAホモドナー由来の医療用iPS細胞ストック構築」に関する臨床研究計画が、京大医の倫理委員会により H25.1.21(臨床研究)、およびH25.2.20(遺伝子解析)承認済み

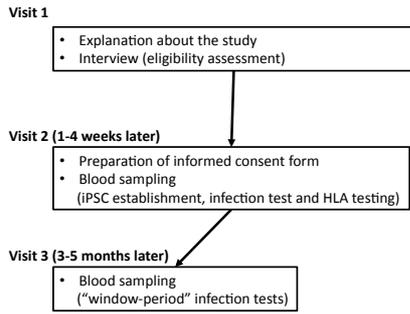
ドナーリクルート方法

献血ルームに成分献血に来られた方に、ポスター、チラシで周知

日赤よりドナー候補者(HLAホモの方)に、研究協力依頼文を発送

その後はドナー候補者の **自由意思** で、CiRAIにご連絡をいただく

ドナー受診の流れ



13

ドナー選択基準

- 計画書は「臨床研究指針」「ゲノム指針」に則って作製・申請
- 下記の指針の要件を満たすことを念頭に置く
 - 「ヒト(同種) iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」
 - 「生物由来原料基準」
 - 「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」
- 日赤の献血者に対する問診内容を参考に

14

ドナー選択基準

- 同意取得時の年齢が20歳以上。
- 本研究の参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、対象者本人の自由意思による文書同意が得られる方(代諾者を必要とするような方は対象としない)。
- 性別・人種は限定しない。

15

ドナー除外基準

- 下記の感染症については、問診及び血液検査を行い、陽性例については、除外する。
 - B型肝炎 (HBs抗原陽性例、HBV-DNA PCR陽性例)
 - C型肝炎 (HCV抗体陽性例、HCV-RNA PCR陽性例)
 - ヒト免疫不全ウイルス感染症 (HIV-1抗体及びHIV-2抗体陽性例、HIV-1-RNA PCR陽性例)
 - 成人T細胞白血病ウイルス感染症 (HTLV1抗体陽性例、HTLV-1プロウイルスDNA PCR陽性例)
 - パルボウイルスB19感染症 (PVB19-IgM陽性例、PV B19DNA PCR陽性例)
 - 梅毒 (STS陽性例、TPHA陽性例)
 - ウエストナイル熱 (WNV) (WNV-IgM/IgG陽性例、WNV-RNA PCR陽性例)
- 下記については、問診により、既往歴・現病歴がある場合は除外する。
 - 梅毒、クラミジア感染症、淋病、結核、マラリア、バベシア症、シャーガス病、リーシュマニア症、アフリカトリパノソーマ症等の細菌による感染症
 - 悪性腫瘍
 - 伝達性海綿状脳症及びその疑い並びにその他の認知症、脳卒中、てんかん
 - その他、iPSストックの作製・使用に支障をきたしうる遺伝性の重篤な疾患を有する場合
- その他
 - 妊娠中・授乳中あるいは妊娠の可能性のある女性
 - その他、研究責任医師がドナーとして不適当と判断した者

16

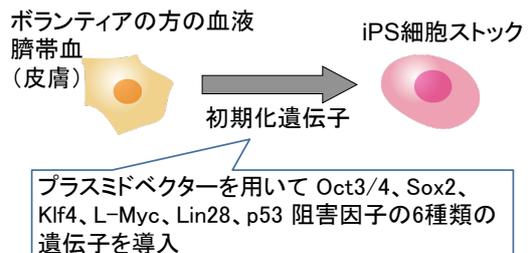
CiRAの細胞調製施設(FIT)



臨床研究に対応するGMPレベルの細胞調製が可能

17

iPS細胞の作製法



フィーダー細胞を用いる方法、フィーダー細胞を用いない方法の、2種類の方法でiPS細胞を作製

18

2つのプロジェクト

1) SNL-iPS細胞プロジェクト

- SNL細胞をマイトマイシンCで処理し、分裂を止めてフィーダー細胞として使用
- 広く研究室で使われている方法で多くの知見がある。

2) Ff-iPS細胞プロジェクト

- Feeder-freeの条件、xeno-free培地を用いる
- 分化能力などの知見が増えつつある
- 培養操作が簡便

19

iPS細胞の品質評価

• 品質評価

遺伝子発現、ゲノム解析、エピゲノム解析、核型など
ウイルス・細菌等汚染検査

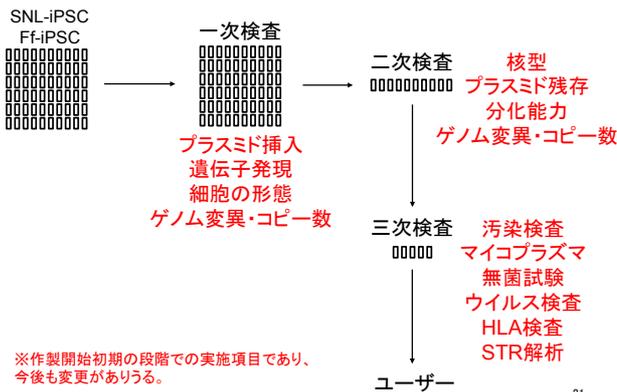
• 安全性、有用性評価

CiRA内外の共同研究者に配布
分化能の評価
非臨床試験(安全性、有効性の評価)

※作製開始初期の段階での実施項目であり、
今後も変更がありうる。

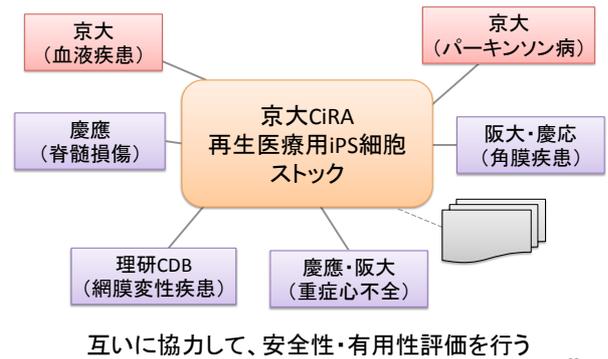
20

iPSC評価の流れ



21

研究推進のための協力体制



22

再生医療用同種 iPS 細胞ストックのドナー適格性判断とインフォームドコンセントについて

京都大学 iPS 細胞研究所
齋藤 潤

はじめに

2006 年、京都大学の山中伸弥教授らはマウス線維芽細胞にレトロウイルス・ベクターを用いて 4 種類の遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を強制発現させるという手法により、体細胞から多能性幹細胞を誘導することに世界に先駆けて成功し、この細胞を人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS 細胞) と名付けた(1)。さらに 2007 年には、ヒト皮膚細胞からも iPS 細胞を作製できるという成果を発表した(2)。

iPS 細胞は、形態、自己複製能、多分化能および遺伝子発現プロファイルなどから胚性幹細胞 (Embryonic stem cells: ES 細胞) に極めて類似しているが、樹立が非常に困難な ES 細胞と異なり、手順に従えば、基本的にあらゆるドナーの体細胞から作製できるという大きなメリットを有する。このため、(1)iPS 細胞由来分化細胞を用いた薬物の毒性/有効性評価試験系の開発、(2)疾患特異的 iPS 細胞の病態解明や創薬への応用、(3)細胞移植治療用ソースとしての利用、などの幅広い医療分野への貢献が期待されている。特に、細胞移植治療用ソースとしての利用は、ES 細胞の持つ倫理的問題 (ヒトの胚を滅失して作製する) と免疫学的問題 (樹立された ES 細胞株が数株のみであり HLA 型の適合性が担保出来ない) を回避できることから、極めて大きな期待がもたれている。

iPS 細胞を用いた細胞移植医療を移植免疫の観点からみると、自分の iPS 細胞由来の目的細胞を自分に移植するといった、自家移植が最も望ましい。しかし、自家移植にもいくつかの問題がある。例えば、1) iPS 細胞の樹立及び品質評価と目的細胞への分化に 1 年近くかかるので、疾病・創傷の発生後に速やかに細胞移植を行わないと効果が期待できない場合、発生後に iPS 細胞を作製開始しても間に合わない、2)患者が遺伝疾患を持っている場合、作製した iPS 細胞も同じ遺伝子変異を持つので、細胞レベルでの遺伝子治療が必要になる、3)すべての人に自家移植用の iPS 細胞を作製するのは、コスト面から不可能である、といった理由である。このため、HLA 適合ドナーからの同種 (他家) 移植を選択肢に入れる必要がある。

iPS 細胞由来分化細胞が同種 (他家) 移植後に十分に生着し機能を発揮するためには、患

者／ドナー間 HLA 完全一致が理想的である。その場合、骨髄バンクやさい帯血バンクのように HLA ドナーからの細胞供与をうけたストックの整備が必要となるが、骨髄やさい帯血とは異なり iPS 細胞の製造および品質管理には多くの時間とコストがかかるため、実現性に乏しい。そこで京都大学 iPS 細胞研究所では、HLA-A, -B, -DR の 3 座においてホモ接合体のドナー(国民の約 2%)から樹立した複数の iPS 細胞株を樹立し、将来の細胞移植医療に利用可能な医療用 iPS 細胞ストックを確立することを計画している。日本人で高頻度に見られる HLA ハプロタイプをホモ接合体として持つドナー (HLA ホモ接合体ドナー：表 1) から iPS 細胞を樹立すると、この iPS 細胞由来の細胞は同じハプロタイプを持つヘテロ接合体レシピエントにも拒絶のリスクが少なく移植できる。HLA (3 座) ホモ・ドナー由来の iPS 細胞を 50 株樹立し、ストックとして供給できれば、国民の 7 割へ 3 座一致により拒絶反応のリスクを低減した移植が可能と試算される (図 1) (3)。

本ワーキンググループで評価指標を作成する同種 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞は、同種 iPS 細胞ストックより製造されることが想定されるため、網膜色素上皮細胞の安全性を評価するためには、同種 iPS 細胞ストックのドナー選択基準を考慮に入れる必要がある。そこで、本報告書では、京都大学 iPS 細胞研究所の主導により進められている同種 iPS 細胞ストックのドナー選択基準とインフォームドコンセントの要点について報告する。

医療用 HLA ホモ iPS 細胞ストックのドナー適格性判定

医療用 HLA ホモ iPS 細胞ストック作製プロジェクト（以下、本プロジェクト）では、最終的に、向こう 10 年間で 100 種類程度の HLA ホモ接合体ドナーから iPS 細胞を樹立することを考えており、これで日本人人口の約 90% をカバーする。これを単純な公募で行った場合、上位 10 種まで行うのに 10 万人以上のスクリーニングが必要と推定され、物理的/金銭的なコストの面から非現実的である。そのため、何らかの目的で既に HLA 型を検査し、ハプロタイプが判明している方の情報を得、これらのドナー候補者のうち HLA ホモ接合体である方を対象として、研究への自由意思での参加をお願いする。現在までに、京都大学医学部医の倫理委員会で、このようは HLA 検査済みのドナー候補者からの iPS 細胞ストック樹立に関する研究計画が承認されている。また、iPS 細胞の樹立及び品質評価の詳細については現在検討中である。

ドナー（候補者）の受診の流れを図 2 に示す。ドナー適格性判定は以下の基準に従って行う。

選択基準

以下の基準をすべて満たす方を対象者とする。性別・人種は限定しない。

- ・ 同意取得時の年齢が 20 歳以上。
- ・ 本研究の参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、対象者本人の自由意思による文書同意が得られる人（代諾者を必要とするような方は対象としない）。
- ・ HLA 検査において、A, B, DR の少なくとも三座についてホモ接合体であること。

除外基準

以下のいずれかに該当する方は対象者から除外する。ただし、これらの項目については、各種法制・指針の改定等があった場合など、必要に応じて検査項目を追加・変更する場合があります。

■ 下記の感染症については、問診及び血液検査を行い、陽性例については、除外する。血清学的検査については、ウインドウピリオドによる偽陰性を避けるため、試料採取数ヶ月後に感染症の再検査を行う（図 2）。

- B 型肝炎 (HBV) (HBs 抗原陽性例、HBV-DNA PCR 陽性例)
- C 型肝炎 (HCV) (HCV 抗体陽性例、HCV-RNA PCR 陽性例)
- ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症 (HIV-1 抗体及び HIV-2 抗体陽性例、HIV-1-RNA PCR 陽性例)

- 成人T細胞白血病ウイルス感染症(HTLV) (HTLV1抗体陽性例、HTLV-1プロウイルスDNA PCR陽性例)
- パルボウイルスB19感染症 (パルボウイルスB19-IgM陽性例、パルボウイルスB19DNA PCR陽性例)
- 梅毒(TP) (STS陽性例、TPHA陽性例)

■下記については、問診により、既往歴・現病歴がある場合は除外する。

- 梅毒、クラミジア感染症、淋病、結核、マラリア、パペシア症、シャーガス病、リーシュマニア症、アフリカトリパノソーマ症等の細菌による感染症
- 悪性腫瘍
- 伝達性海綿状脳症及びその疑い並びにその他の認知症、脳卒中、てんかん
- その他、iPS細胞ストックの作製・使用に支障をきたしうる遺伝性の重篤な疾患を有すると判断される場合

■その他

- 妊娠中・授乳中あるいは妊娠の可能性のある女性
- その他、研究責任医師がドナーとして不相当と判断した人

インフォームドコンセントの詳細について

ドナー候補者への説明、インフォームドコンセントの取得及び試料採取は京都大学医学部附属病院で行う。対象者への説明、同意取得、試料採取などは、原則として京都大学医学部附属病院・iPS細胞臨床開発部 iPS細胞外来で行う。説明文書及び同意書を含む研究計画書は、京都大学医学部医の倫理委員会で承認を受けている。なお、以下の事項については、今後の法令・指針の改正や、国際的な議論により見直す可能性がある。

本プロジェクトでは、研究担当者のみが説明と同意取得を行うことによって、同意が強要されることを避け、対象者の匿名性と任意性を担保するため、研究に対して利害関係の無いリサーチコーディネーターが説明と同意取得の補助、及び個人情報管理者の監督下での個人情報取り扱いに当たる。リサーチコーディネーターは、対象者に対して本研究の内容等を十分に説明する。ドナー候補者には、本研究への参加の可否を充分考慮していただく必要があることから、説明後一旦帰宅していただき、考慮期間を置いた後、日を改めて再度来院していただき、同意を取得する。

個人情報は、個人情報管理者によって厳密に管理される。

インフォームドコンセントの内容

説明文書・同意書には、以下の項目を含む。

- 1) 研究の目的
- 2) 倫理委員会における審査について
- 3) 対象者の選択基準について
- 4) 研究期間
- 5) 医療用 iPS 細胞ストックについて
 - iPS 細胞ストックとは
 - iPS 細胞ストックの配布先
 - 研究への利用
 - 治療への利用
- 6) 具体的な手順
- 7) 研究に協力することによる利益と不利益
- 8) 提供に際しての危険や負担
 - 組織（血液や皮膚など）の採取の危険性
 - 個人情報が漏えいする危険性
 - その他の負担
- 9) 遺伝子解析について

- 10) 同意の任意性と同意撤回の期限
- 11) 検査結果の取り扱い
- 12) 検体の取扱方針
- 13) 研究の進捗と成果の公表
- 14) 知的財産権などの取り扱い
- 15) 研究組織と資金源
- 16) 問い合わせ先など

以下、個別の項目のうち幾つかについて詳細を記述する。

同意撤回について

同意撤回は文書を持って行う。医療用 iPS 細胞ストックを作製し、移植医療への利用が開始された後でも撤回は可能である。この場合、医療用 iPS 細胞ストックを含む、当該ドナー由来の全ての細胞と付随情報は破棄される。ただし、実際に特定のレシピエントへの細胞治療へ用いることが決まった後は、当該レシピエントに対する治療への影響が大きいことから、当該レシピエントへの治療については細胞の使用を中止することはできない、としている。また、医療用 iPS 細胞ストックを用いて製品化した場合、その製品については同意撤回はできない、としている。

禁止事項について

多能性幹細胞から生殖細胞や胚を作製することについては、倫理的な議論が継続して行われている。iPS 細胞から生殖細胞を作製し、これを同種移植（もしくはヒト個体の作製）に用いることは考えにくいため、本プロジェクトでは医療用同種 iPS 細胞ストックから生殖細胞を作製することは行わないとしている。またこれに関連して、現行のヒト ES 細胞の使用に関する指針第 6 条における禁止行為の規定を準用し、医療用同種ヒト iPS 細胞ストックを用いた研究について、以下の行為を行わないものと定めている。

- 1) ヒト iPS 細胞を使用して作製した胚の人又は動物の胎内への移植その他の方法によりヒト iPS 細胞から個体を作製すること。
- 2) ヒト胚へヒト iPS 細胞を導入すること。
- 3) ヒト胎児へヒト iPS 細胞を導入すること。

知的財産権及び所有権について

ドナー候補者への説明として、このプロジェクトを含む一連の研究より知的財産権等が生じる場合、その権利は京都大学が管理し、本研究に参加した対象者には帰属しないこととしている。また、樹立した iPS 細胞の所有権についても、京都大学に帰属することとして

いる。

研究・治療への利用

このプロジェクトの目的は、多くの日本人をカバーする医療用の iPS 細胞ストックを作ることであるが、最終的には、配布先の機関で iPS 細胞を目的の細胞・組織へ分化させ、移植治療に用いることを想定している。このような場合、当該の機関で国が指針などで定める手続きに則って研究計画が申請される必要があるが、個々の計画についてドナーに再同意を得ることはしない旨説明している。また、分化細胞が医薬品などの製品として販売される場合があること、そのような場合にドナーが利益を得ることはない、と説明している。なお、対象者の死後も、生前の明示的な意思が存在せず、当該細胞を用いた移植医療の計画が存在する場合は、細胞の利用は継続される。

おわりに

免疫拒絶の観点からは、同種移植よりは自家移植の方が望ましく、iPS 細胞を用いた細胞移植治療においても、同様の考え方がありうる。しかし、現状の技術では、iPS 細胞の株毎に質のばらつきが生じるため、1 株の品質管理・保証には大きなコストや時間を要する。一方、iPS 細胞はほぼ無限の自己複製能を有する。従って、できるだけ汎用性の高い株を樹立し、徹底した品質管理のもと供給できる体制を構築することが現実的な方策である。この観点からも、オーダーメイドで iPS 細胞を作製し、品質管理を行うより、HLA ホモ接合体ドナー由来の医療用 iPS 細胞ストックを作製し、厳密な品質管理を行う方が望ましいと考えられる。

近い将来、網膜色素上皮細胞を含む様々な細胞を医療用 iPS 細胞ストックから分化誘導し、実際に細胞移植に用いることになるだろう。多能性幹細胞からの分化誘導法とそれを細胞治療に用いる戦略は驚異的な速度で発展しており、多くの傷病に対する再生医療が提供される日も遠くないと想像される。医療用 iPS 細胞ストックのドナーは、すなわち全ての iPS 細胞由来細胞移植治療のドナーとなり得るため、その適格性判断とインフォームドコンセント取得には相当の配慮が要求される。幹細胞医療を巡る規制や倫理、あるいは社会的情勢は刻々と変化しており、適切に対応しながら、ドナーの人権に配慮しつつ、ドナー選択を進めることが肝要である。

謝辞

以下の皆様方に深謝いたします。京都大学 iPS 細胞研究所 山中伸弥先生、高須直子さん、金子新先生、沖田圭介先生、中川誠人先生、高橋和利先生、星野利彦先生、阿曾沼慎司先生、松永亜佑美さん、東健太郎さん。京都大学発達小児科学 平家俊男先生。京都大学肝胆膵・移植外科/小児外科 上本伸二先生。

文献

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76. PubMed PMID: 16904174.
2. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72. PubMed PMID: 18035408.
3. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature methods*. 2011 May;8(5):409-12. PubMed PMID: 21460823. Epub 2011/04/05. eng.

図1: HLAホモ接合体 (HLA-A,B,DRB1)ドナー数と日本人における人口カバー率の関連 (文献3より引用)。

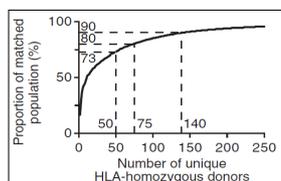
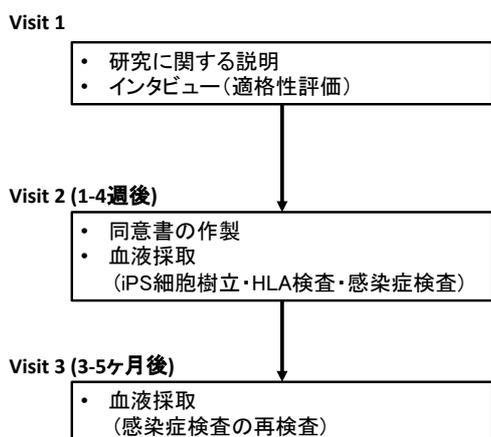


表: 日本人HLAハプロタイプ頻度 (出典: HLA研究所 <http://www.hla.or.jp/haplo/haplodl.php?lang=ja>)

順位	A	B	DRB1	ABR	ハプロタイプ頻度
1	*24:02	*52:01	*15:02	*24:02-*52:01-*15:02	8.275%
2	*33:03	*44:03	*13:02	*33:03-*44:03-*13:02	4.248%
3	*24:02	*07:02	*01:01	*24:02-*07:02-*01:01	3.769%
4	*24:02	*54:01	*04:05	*24:02-*54:01-*04:05	2.695%
5	*02:07	*46:01	*08:03	*02:07-*46:01-*08:03	1.940%
6	*11:01	*15:01	*04:06	*11:01-*15:01-*04:06	1.391%
7	*24:02	*59:01	*04:05	*24:02-*59:01-*04:05	1.097%
8	*11:01	*54:01	*04:05	*11:01-*54:01-*04:05	0.995%
9	*24:02	*40:06	*09:01	*24:02-*40:06-*09:01	0.857%
10	*26:01	*40:02	*09:01	*26:01-*40:02-*09:01	0.797%

図2: ドナー受診の流れ



NIHS Since 1874 平成25年11月22日

次世代医療機器評価指標再生医療分野審査WG
(ヒト同種iPS細胞由来網膜色素上皮細胞)

ヒト多能性幹細胞由来再生医療製品の原料・材料に関する留意点について

国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
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の見解ではありません。

再生医療等製品の実用化における主な課題

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製造の適格性
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. 製法変更による新旧製品の同等性の検証

再生医療等製品の実用化における主な課題 原料・材料に関する留意点の明確化

- 改正薬事法案(平成25年11月成立)
 - … 「再生医療製品」が「遺伝子治療薬」とともに医薬品・医療機器から独立し、第3の категория 「再生医療等製品」として切り出される見込み
- ヒトや動物に由来する成分を含む原材料等を使用した再生医療製品を製造・販売する場合

[現行業事法下]

ヒトや動物に由来する成分は生物由来原料基準(平成15年厚生労働省告示第210号)を満たすことが必要
- 『再生医療等製品原料基準』のあり方に関する検討WG
 - … 再生医療等製品の製造に用いられる、ヒト又は動物に由来する成分を含む原材料等の現状に関して情報収集し、これら原材料等が満たすべき基準のあり方についての検討を行う

厚生労働省 革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業 「再生医療製品の臨床応用に向けた評価方法の開発・検証」

[総括研究代表者]
澤 芳樹 (大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科学・教授)

『再生医療等製品原料基準』のあり方に関する検討WG
[研究分担者・WG代表]
佐藤 陽治 (国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 部長)

[WGメンバー]
阿曾沼慎司 (京都大学iPS細胞研究所 顧問)
梅澤 明弘 (国立成育医療研究センター 再生医療センター生体・細胞医療研究部 部長)
岡田 深 (大阪大学医学部附属病院 特任講師)
岡田 義昭 (埼玉医科大学病院 輸血・細胞移植部 部長)
小澤 敬也 (自治医科大学内科学講座 血液学部門 教授)
片倉 健男 (国立医薬品食品衛生研究所 スーパー特区対応部門 特任研究員)
澤 芳樹 (大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科学・教授)
杉浦 直 (独国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 感染・免疫研究部 部長)
松山 亮文 ((公財)先端医療連携財団 再生医療実現拠点ネットワーク開発支援室 室長)
宮田 俊男 (京都大学 臨床研究総合センター 客員研究員)
山口 佳之 (川崎医科大学 臨床腫瘍学教室 教授)
大和 雅之 (東京女子医科大学大学院医学研究科 再生医工学分野 教授)
脇田 隆宇 (国立感染症研究所 ウイルス第二部 部長)

『再生医療等製品原料基準』(案)の策定方針

- 生物由来原料基準との関係
 - 生物由来原料基準を改正するものではない
 - = 生物由来原料基準を再生医療等製品向けに特別に緩和するような形にはできない
 - ⇒ …とは言っても、現実にそぐわない要求は不合理・非効率
 - ⇒ 別のフレキシブルで合理的な対策で、安全性を担保することを目指す
 - (例:「トレーサビリティの確保」は「原則的には必要」とする。ただし、それが困難なケースにおいて、何が追加的にあれば出口規制でOKとできるか、ということを検討する)
- 告示と通知とで多層構造化
 - 原料基準に書き込むべきこと、原料基準に付随する「参考情報」で書き込むべきこと、下位の通知で書き込むべきことを区別・整理

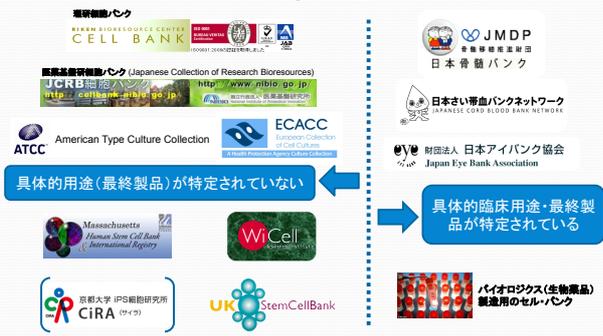
『再生医療等製品原料基準』のあり方に関する検討WG

- スケジュール
 - 今秋、改正薬事法成立
 - ⇒ 施行は平成26年度夏～秋か?
 - 平成25年度末に「再生医療等製品用原料基準(案)」の策定、審査課に提出
 - 年明けにパブコメ案公表を目指す

再生医療等製品の実用化における主な課題

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製造の適格性
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. 製法変更による新旧製品の同等性の検証

セル・バンク(細胞バンク)



“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**」

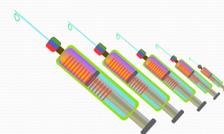
- 「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」での定義(文科・厚労・経産省)
「提供されたヒトの細胞(中略)等について、研究用資源として品質管理を実施して、不特定多数の研究者に分譲する**非営利的事業**」

- バイオロジクス(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/アンブル)。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。」


* http://i.dailymail.co.uk/pxiv/2009/01/19/article-1121302-00EBB0F80000044C-557_468x286.jpg

バイオロジクス(生物薬品)製造におけるセル・バンク化の目的

一定の品質の最終目的製品を
安定的・継続的に製造するため

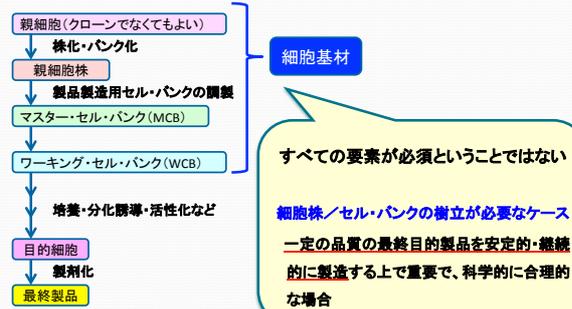


“細胞基材”(Cell Substrate)

「微生物細胞あるいはヒト又は動物由来の**細胞**で、ヒトを対象に*in vivo*又は*ex vivo*で投与されるバイオロジクス(生物薬品)を生産する上で必要な能力を有するもの」

再生医療製品の素材となる細胞も「細胞基材」

再生医療製品の製造



セル・バンク(細胞バンク)

移植医療

JMDD
日本移植医療財団
日本移植バンク

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

移植医療

ATCC American Type Culture Collection

ECACC European Collection of Cell Cultures

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

細胞基材のセル・バンク

Massachusetts
Human Stem Cell Bank
International Registry

WiCell
WILSON CELL CULTURE

京都大学 幹細胞研究所
CIRA (イラ)

UK StemCellBank

“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 [作業者・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細胞株の細胞」を「iPS細胞」としてバンク化する際は、三胚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・作業者の安全性]
 - 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という目的に達した原料としての特性**とその安定性
(例:リプログラミングされた「iPS細胞株の細胞」を特定の分化細胞製造用の原材料として「iPS細胞」としてバンク化する際は、目的とする細胞への分化効率とその再現性の高さが多分化能よりも重要)

「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

ES/iPS cells

Non-directed EB differentiation (16 days, 2-6 replicates)

Expression profiling for 500 lineage marker genes

Quantification of expression differences versus reference

Gene set enrichment analysis for lineage marker genes

Lineage scorecard estimate of differentiation propensities

scorecard

「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
HUES11	-0.03	-0.03	-0.03	0.03	-0.03
HUES13	-0.29	-0.01	-0.23	-0.07	0.04
HUES14	-0.38	-0.26	-0.31	-0.25	-0.47
HUES16	-0.11	0.05	-0.17	0.04	0.04
HUES19	-0.08	-0.11	-0.29	0.11	-0.17
HUES23	-1.38	-0.11	-0.91	0.28	-0.07
HUES44	0.39	0.27	0.12	-0.46	-0.62
HUES45	-0.46	-0.26	-0.69	-0.12	0.03
HUES49	-0.09	0.18	0.26	0.24	0.55
HUES49	0.22	0.07	0.03	0.08	-0.24
HUES52	-0.08	0.05	0.08	-0.22	-0.26
HUES52	0.25	-0.15	0.15	-0.60	-0.24
HUES63	0.02	0.39	0.72	0.54	0.81
HUES64	0.08	0.07	0.08	-0.60	-0.61
HUES65	0.19	0.02	0.22	0.59	-0.15
HUES66	0.28	0.07	0.26	0.28	-0.12
H1	1.58	-0.29	1.71	0.77	-0.96
H9	1.08	0.03	1.08	0.30	-0.55

Cell line

Cell line	Neural lineage	Hematopoietic lineage	Ectoderm germ layer	Mesoderm germ layer	Endoderm germ layer
HPS 11a	-0.03	-0.03	-0.27	-0.23	-0.08
HPS 11b	-0.27	-0.27	-0.96	-0.99	0.47
HPS 11c	-0.27	-0.96	-0.99	-0.99	-0.27
HPS 17a	-0.41	-0.78	-0.43	-1.11	-0.89
HPS 17b	0.07	0.05	0.05	0.05	0.05
HPS 18a	0.28	-0.52	0.15	-0.47	0.03
HPS 18b	0.02	-0.72	0.08	-0.42	0.13
HPS 18c	0.01	-0.48	0.08	-0.42	0.13
HPS 20a	-0.37	-0.47	-0.30	-1.14	-0.56
HPS 20b	-0.37	-0.47	-0.30	-1.14	-0.56
HPS 27a	0.52	0.52	0.52	-0.71	-0.42
HPS 27b	0.52	0.52	0.52	-0.71	-0.42
HPS 29a	-0.25	-0.04	0.00	-0.11	0.01
HPS 29b	-0.25	-0.04	0.00	-0.11	0.01

Differentiation propensity: High Medium Low

ヒトiPS/ES細胞株のセル・バンクを学問的に定義通り「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傾向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

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

セル・バンクの課題

「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(iPS株)細胞株を選択する(囲い込む)ことが重要

「彼ら」はもう理解している

March 4, 2013

Life Technologies Signs License and Collaborative Stem Cell Research Agreement with Harvard University

Research collaboration aimed at yielding standardized method for evaluating iPS cell quality; deepens Life's investment to its expanding stem cell product portfolio

CARLSBAD, Calif., March 4, 2013 (PRNewswire) -- Life Technologies Corporation (NASDAQ: LIFE) announced today that it has signed a collaborative research agreement and related license with Harvard University under which it has acquired exclusive rights to develop a panel of characterization assays designed to rapidly evaluate human pluripotent stem (iPS) cells for their utility in a variety of discovery and translational research applications. The license expands Life's growing portfolio of [stem cell research products](#) and deepens its commitment to customers in the field.

The panel, which will be offered on the company's market-leading semiconductor sequencing and PCR-based genetic analysis platforms, will help overcome major hurdles that impede stem cell technology from moving into the clinic. Current methods for evaluating pluripotency — the potential for induced pluripotent stem (iPS) cells to differentiate into any cell type — are laborious, costly and can produce ambiguous results.

Standardizing the way researchers characterize iPS cells will allow them to quickly identify the most promising cell lines and avoid wasting time and resources on cells that do not possess the appropriate characteristics. Such efficiency could accelerate applications ranging from development of "disease-in-a-dish" models from patient-derived cells and drug screening to the eventual use of pluripotent cells as a renewable source for transplantation medicine.

「彼ら」はもう理解している

2013年3月6日 09:00 (JST)

大西淳子

Life Technologies社とHarvard大学、多能性幹細胞株の特性分析ツールの開発目指し協力

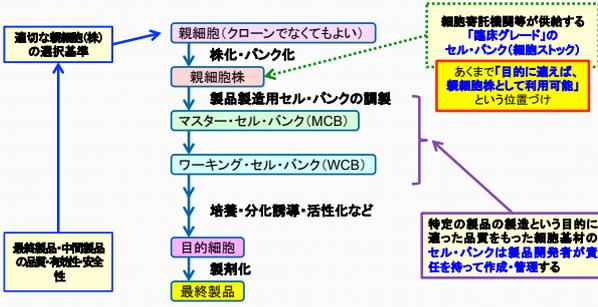
米Life Technologies社は、2013年3月4日、米Harvard大学と共同研究契約を結び、ヒト多能性幹細胞(ヒトES細胞とヒトiPS細胞)株の有用性を迅速に評価する技術を開発するための独占的な権利を得たと発表した。

同社は、市場をリードする半導体シーケンシング技術とPCRベースの遺伝子解析技術を提供している。新たに得た権利は、幹細胞技術の利用を妨げる大きな壁を乗り越えることを可能にし、発見を目的とする基礎研究やトランスレーショナルな研究におけるヒト多能性幹細胞株の有用性を高めると期待される。

現在、iPS細胞の分化能力を評価するために用いられている方法は、多くの時間と労力を要し、ハイコストであるのに、常に明瞭な結果を提示できるとは限らない。標準化されたiPS細胞分析技術が完成すれば、必要な特性を有する最も有望な細胞株を迅速に選択できるようになり、時間とリソースの浪費はなくなるだろう。これにより、患者細胞に由来する疾病モデルの開発や新薬候補のスクリーニングから、移植医療のための再生可能なソースの構築に至るiPS細胞の活用は加速されるはずだ。

(出典: 日経バイオテクONLINE)

iPS細胞加工製品等の継続的・安定的製造に関し、わが国でまだあまり認識されていない重要な注意点



道具としての「ハンマー」の「品質」も目的次第

Zuhandensein
道具的存在



Martin Heidegger (1889 - 1976)

<一般的定義(必要条件)>
Vorhandensein
容体的存在

<使用目的>

- 木工工作
- 解体工事
- 裁判所
- 罰ゲーム

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

「セル・バンク」に関するまとめ

- 細胞基材のセル・バンクの品質の妥当性は、個々の最終製品の品質・態様・適用法・対象疾患等で決まる
 - … 一定品質の再生医療製品を再現性よく製造するためにセル・バンクの品質・規格が決まる。「はじめにセル・バンクの品質ありき」ではない。

(標準化された部品から最終製品の品質が設計可能な多くの工業製品とは発想が異なる。ただし「細胞株/セル・バンク・システムの標準化」自体は学問的には重要)
- 一般的留意事項(必要条件)のみを満たした「臨床グレード」のセル・バンクから特定の再生医療製品を製造する場合には、それまで管理されていなかった幾つかのセル・バンクの特性のバラツキにより、目的とする最終製品の品質が確保できない可能性がある
 - … 製品ごとに具体的目的に適った品質のセル・バンクが必要

(細胞寄託機関等が供給する「臨床グレード」のセル・バンクは、安価で簡単にアクセス可能な整理された細胞基材供給源(親細胞株)として有用な可能性がある。ただしその場合でも開発者はそこから改めて特定の製品製造に適う品質のセル・バンクを作成する必要がある)

第1回 次世代医療機器評価指標作成事業
再生医療審査WG H25.10.4

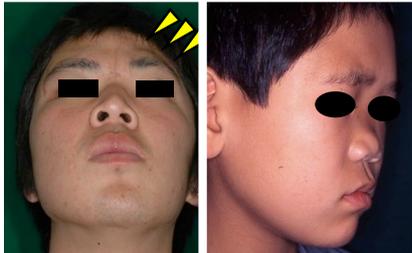
ヒト軟骨前駆細胞操作法の現況

横浜市立大学大学院 医学研究科 臓器再生医学
谷口 英樹

顔面変形・奇形に対する形成外科治療

Millions of reconstructive surgeries
are performed per year worldwide

Auto-(rib) cartilage graft is used
for reconstructive surgery



現行の形成外科治療における解決課題

自己組織採取部位の問題



1. 過度な侵襲
(痛み・変形・気胸等)
2. 採取量の制限

再建部位の問題

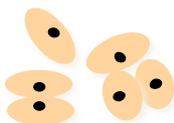


1. 長期形態維持性
(変形・穿孔・骨折等)
2. 移植組織量の不足

低侵襲的かつ長期形態維持性に優れた、
弾性軟骨再生治療の開発が待望されている！

従来の軟骨再生治療戦略とその課題

成熟軟骨細胞



未解決課題

1. 採取時に侵襲が生じる
2. 採取量に制限がある
3. 組織を維持する幹/前駆細胞が存在しない

そこで我々は、誘導

“軟骨組織特異的な幹/前駆細胞”に着目した

骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs)



脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSCs)



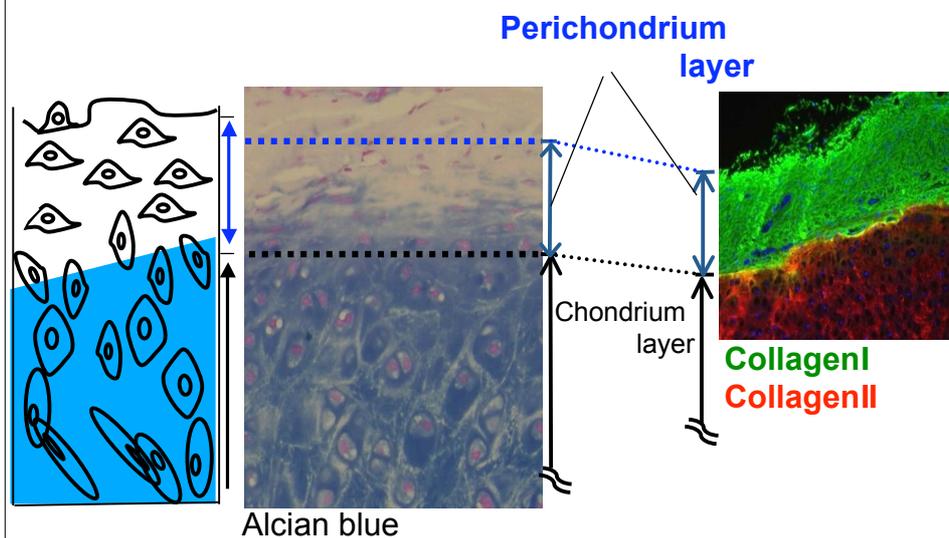
欠損部位への移植

未解決課題

1. 個人差が大きく、軟骨分化能が低い
2. 石灰化等の異所性組織形成が生じる

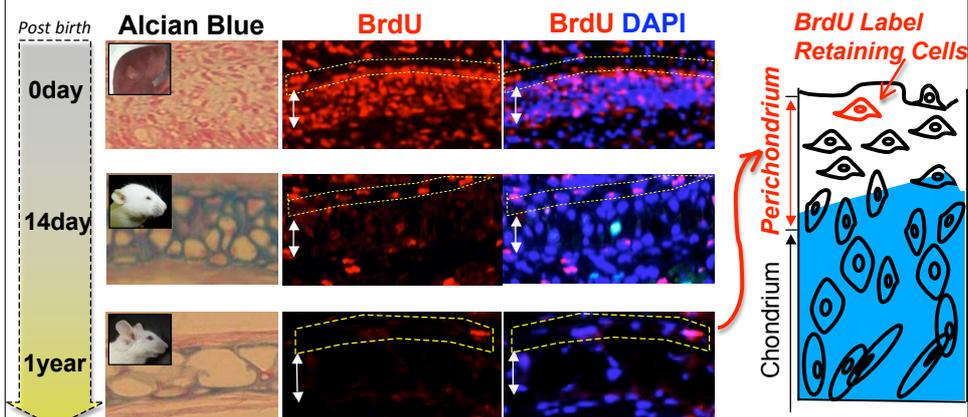
・ Afizah H, et al. Tissue Eng. 2007 13(4):659-66.
 ・ Mehlhorn AT, et al. Tissue Eng. 2006 12(10):2853-62.
 ・ Togo T, et al. Lab Invest. 2006 86(5):445-57.

正常ヒト耳介軟骨の構造



Where are cartilage stem/progenitors in the ear ?

耳介軟骨膜中に前駆細胞集団が存在する！



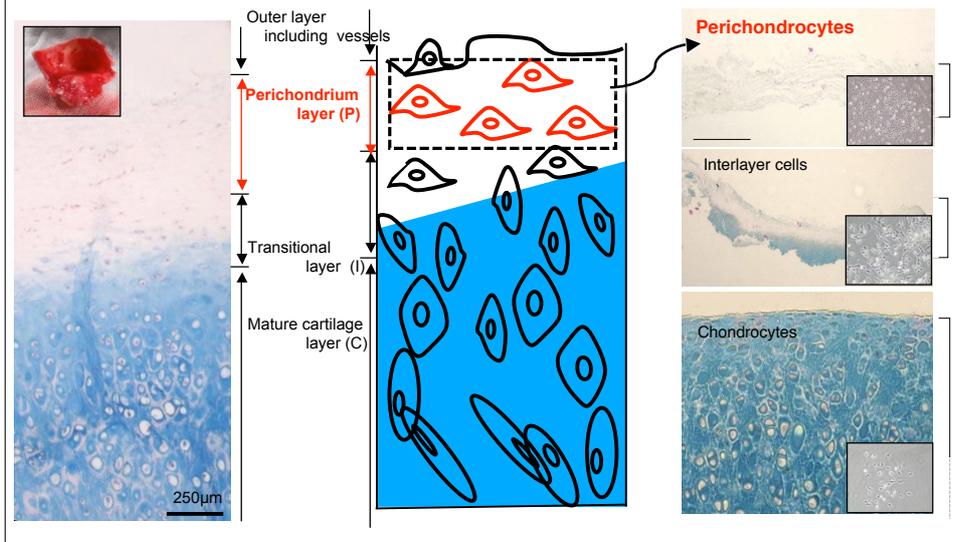
Putative cartilage stem cells resided specifically in perichondrium layer at a rate of 0.08%

Takanori Takebe, Shinji Kobayashi *et al*: Presence of cartilage stem/progenitor cells in adult mice auricular perichondrium. *PLoS ONE*, 6(10): e26393, 2011

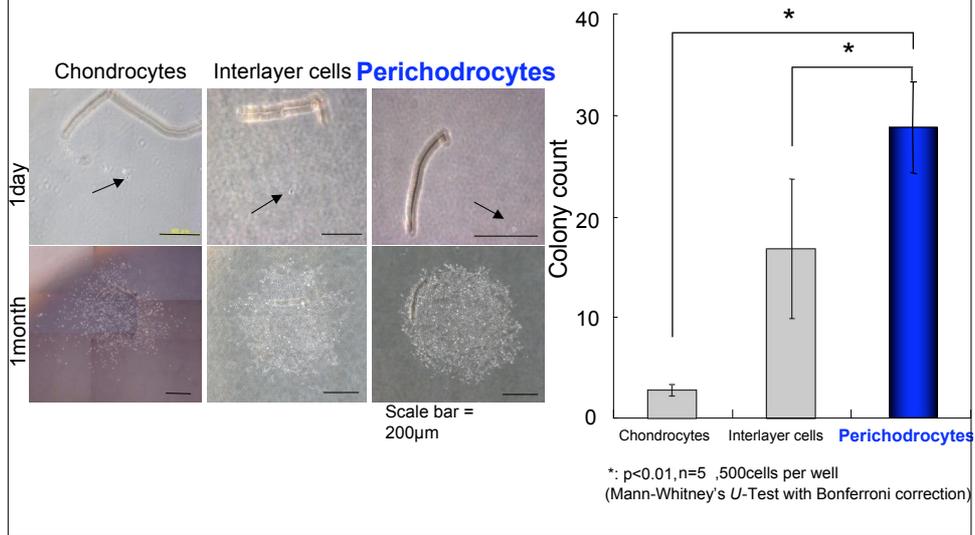
Patients profile

No.	Gender	Age(year)	Disease	No.	Gender	Age(year)	Disease
1	F	10	Microtia	16	M	11	Microtia
2	F	10	Microtia	17	F	10	Microtia
3	M	15	Microtia	18	F	12	Microtia
4	M	11	Microtia	19	M	9	Microtia
5	M	9	Microtia	20	F	10	Microtia
6	M	9	Microtia	21	M	10	Microtia
7	F	10	Microtia	22	M	9	Microtia
8	F	10	Microtia	23	M	11	Microtia
9	M	9	Microtia	24	F	13	Microtia
10	M	11	Microtia	25	M	9	Microtia
11	M	12	Microtia	26	M	13	Microtia
12	M	11	Microtia	27	F	11	Microtia
13	F	10	Microtia	28	M	12	Microtia
14	F	10	Microtia	29	M	9	Microtia
15	M	10	Microtia	30	M	11	Microtia

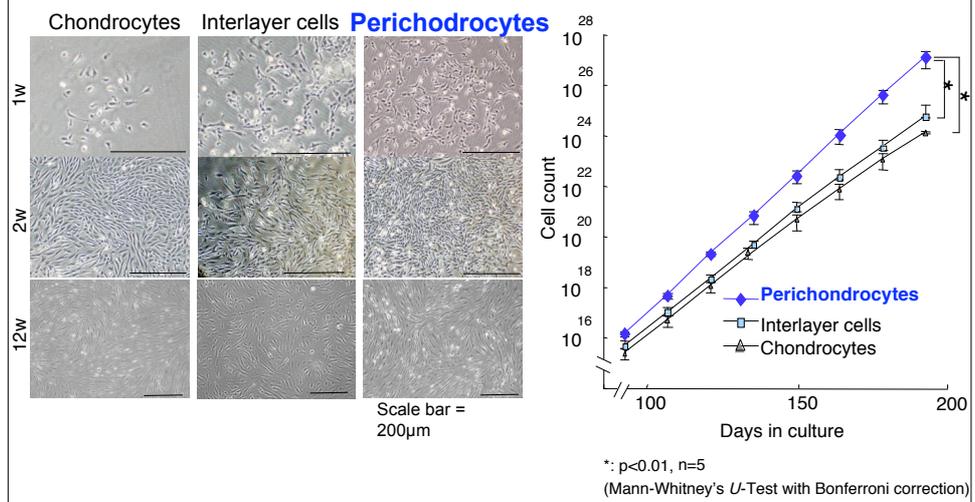
ヒト耳介軟骨膜中に存在する軟骨前駆細胞の同定



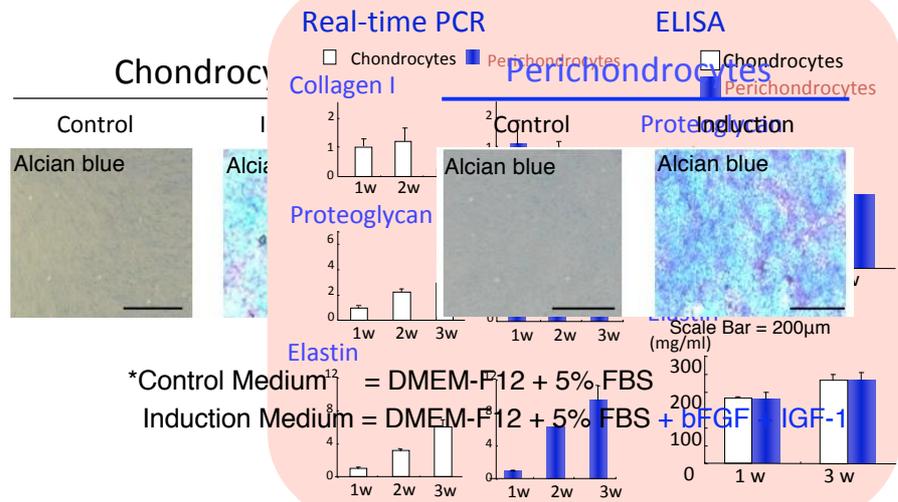
ヒト耳介由来軟骨前駆細胞は、 高いコロニー形成活性を有する



ヒト耳介由来軟骨前駆細胞は、 長期的に高い増殖活性を維持する

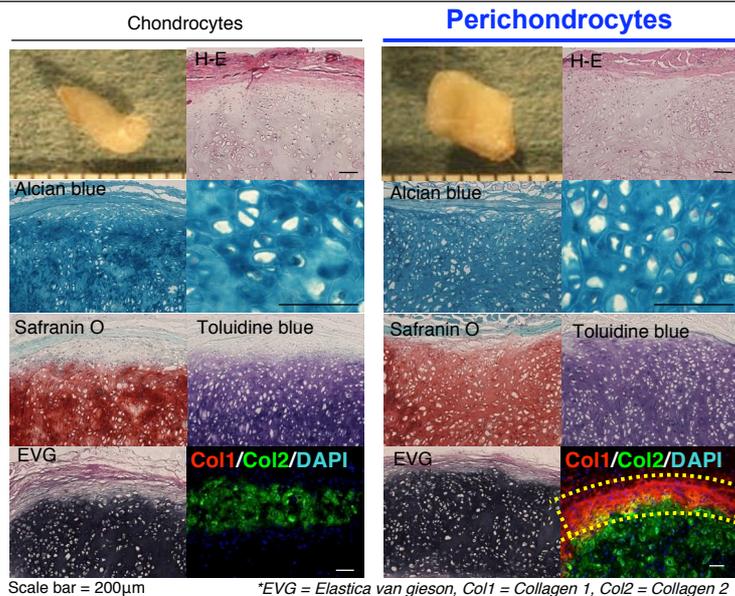


ヒト軟骨前駆細胞は高い軟骨分化能を有している

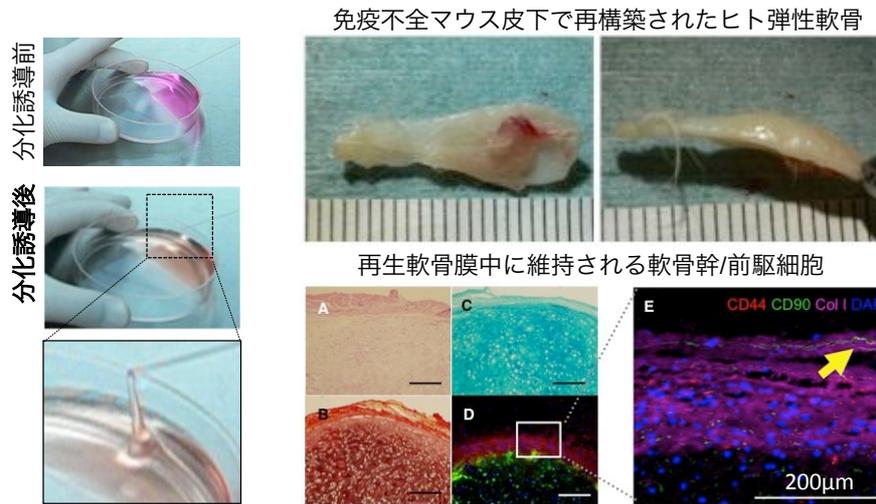


Methods for preparation of cartilage cells ; PCT JP2008/051327, WO2008/091013

ヒト軟骨前駆細胞の弾性軟骨再構築能

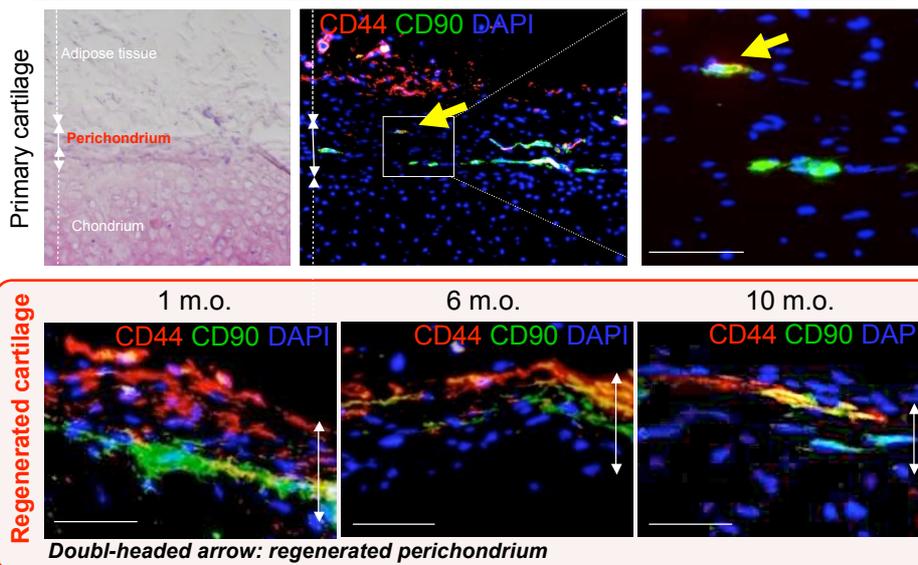


軟骨幹/前駆細胞を用いて 高品質なヒト弾性軟骨を再構築する方法を開発！



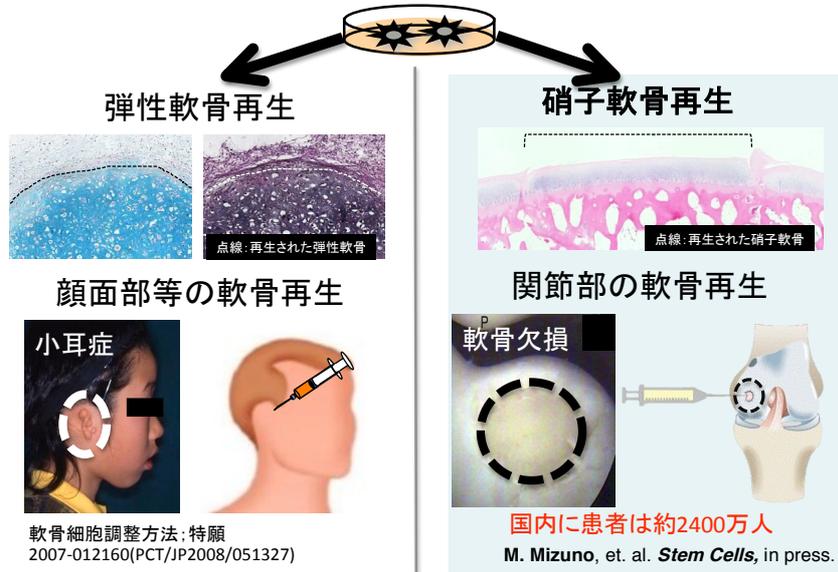
軟骨細胞調整方法；特願：2007-012160 (PCT/JP2008/051327)

再構築されたヒト弾性軟骨中には 長期に渡り軟骨前駆細胞が維持される！



関節（硝子）軟骨への分化能も有している！

軟骨前駆細胞の培養と移植



横浜市大が先行する基盤技術

世界に先駆けてヒト耳介軟骨膜中に存在する 軟骨前駆細胞の分離・同定に成功！

1. 高い増殖活性を有する。
2. 高い軟骨分化能を有する。
3. 長期組織維持の期待できる高品質なヒト弾性軟骨を再構築する。
4. 力学的強度を有した硝子軟骨を再構築する(イヌ)。

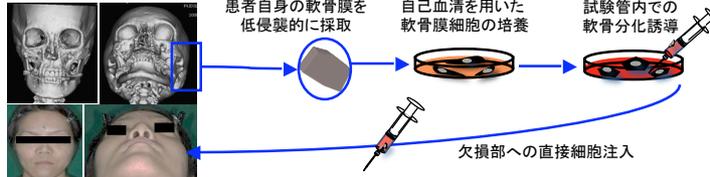
- *Methods for preparation of cartilage cells ; PCT JP2008/051327, WO2008/091013*
- Takanori Takebe, Shinji Kobayashi, et al: Reconstruction of human elastic cartilage by a CD44+ CD90+ stem cell in the ear perichondrium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011
- Takanori Takebe, Shinji Kobayashi, et al: Presence of cartilage stem/progenitor cells in adult mice auricular perichondrium. *PLoS ONE*. 2011
- Mizuno Mitsuru, Shinji Kobayashi, et al: Reconstruction of joint hyaline cartilage by autologous progenitor cells derived from ear elastic cartilage. *Stem Cells*. 2013

適応疾患および将来展望

成人例

2015年 開始予定の臨床研究により安全性・有効性の検証

交通外傷後 高度顔面変形



小児例

成人例での十分な検討の後、小児例適応拡大を目指す



先天奇形例: 150出生に1人

〈疾患例〉

口唇口蓋裂: 500出生に1人

小耳症: 6000出生に1人

将来的な拡張性

関節例

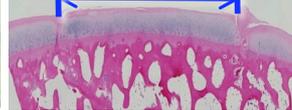
2009年 我が国における
変形性膝関節症患者は
2500万人!

ROADプロジェクト ベースライン調査より

関節軟骨欠損部位への
互介軟骨膜細胞移植



互介軟骨膜細胞移植部位



「細胞シートによる関節軟骨再生」

次世代医療機器評価指標作成事業
再生医療審査WG
2013. 10. 4



東海大学 医学部 外科学系 整形外科学

佐藤 正人

DEPARTMENT OF ORTHOPAEDIC SURGERY
TOKAI UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE



軟骨を作るのはやさしいの？



関節軟骨の再生は難しいです

- 耳や鼻の形を司る軟骨(弾性軟骨)は簡単に作れますが、関節の軟骨は難しいです。
- 関節軟骨は荷重に耐え、優れた潤滑性を発揮しなければなりません。そのため、組織学的に**硝子軟骨**という特殊な軟骨でできています。



Hunter W. in 1743

Ulcerated cartilage is universally allowed to be a troublesome disease.

潰瘍化した軟骨は全く厄介な病気と言わざるを得ない



自己(自家)培養軟骨細胞移植(ACI/ACT)



自家培養軟骨「ジャック」の使用要件等の基準について

公益社団法人日本整形外科学会
自家培養軟骨使用要件等基準策定ワーキンググループ
委員長 松末吉隆

自家培養軟骨「ジャック」は整形外科領域においては日本で初めての自家細胞を使用した製品で2012年7月に製造販売が承認され、2013年4月から保険収載された。本品の適応は、膝関節における**外傷性軟骨欠損症又は離断性骨軟骨炎(変形性膝関節症を除く)の臨床症状の緩和であり、他に治療法がなく、かつ軟骨欠損面積が4 cm²以上の軟骨欠損部位に適用する場合に限るとされている。**

ジャックの使用にあたっては、その有効性及び安全性を十分に理解し、膝関節の外傷性軟骨欠損症及び離断性骨軟骨炎の治療に対する十分な知識・経験を有する医師及び施設において、適切な症例を選択して用いられるように必要な措置を講じること、さらに製造販売後の一定期間は、**本品の使用症例の全例を対象に使用成績調査を実施し、本品の有効性及び安全性に関するデータを収集し、必要により適切な措置を講じることが義務づけられている。**このため、日本整形外科学会は、厚生労働省の新医療機器使用要件等基準策定事業において「**ジャック®使用の施設基準および実施医基準**」を策定した。ジャックは、本基準に基づいて使用されなければならないので、ここにその考え方と基準を示す。



培養軟骨細胞移植の問題点

なぜ今までの軟骨再生ではダメなのか？

- 健常部 2 箇所（軟骨採取部位と骨膜採取部位）に侵襲
- 再生組織の構築の不具合（組織過形成、石灰化、適合性）
- 部分損傷や変形性関節症は適応外

再生軟骨 = { 骨膜
骨髄由来細胞（内在性）
培養軟骨細胞
スキャフォールド } 組織工学的軟骨

多数要素の最適化は困難
至適修復・再生は困難



培養軟骨細胞移植の問題点

修復機序を考慮した再生医療であるべき

- 健常部 2 箇所（軟骨採取部位と骨膜採取部位）に侵襲
- 再生組織の構築の不具合（組織過形成、石灰化、適合性）
- 部分損傷や変形性関節症は適応外

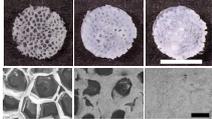
再生軟骨 = { ~~骨膜~~
骨髄由来細胞（内在性）
培養軟骨細胞
スキャ~~X~~フォールド } 組織工学的軟骨

組織修復に適した環境を提供することが重要

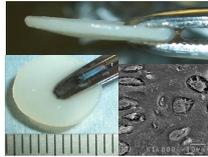


どの組織工学的軟骨でも同じ結果！ （軟骨全層欠損に対する動物実験での治療効果に関して）

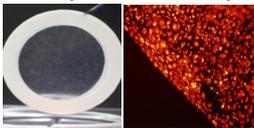
TE Cartilage with Scaffold
J Biomed Mater Res Part B 2005
J Biomed Mater Res Part B 2006
J Biomed Mater Res Part B 2007



TE Cartilage without Scaffold
Tissue Eng Part A 2008-a
Tissue Eng Part A 2008-b
Med Biol Eng Comp 2008



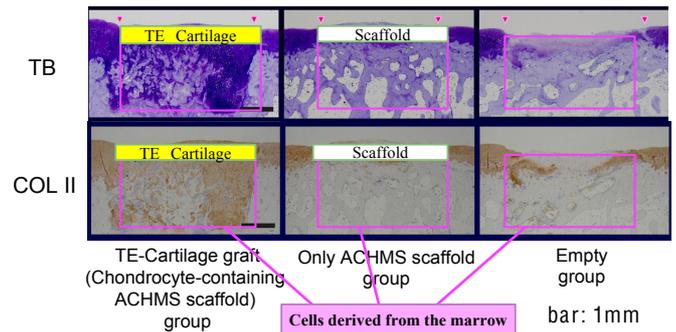
Layered Chondrocyte Sheet



BBRC 2006
Eur Cells Mater 2007
BMC Biotechnol 2009
CBC Press LLC 2010
Biomaterials 2012-a
Biomaterials 2012-b
JTERM 2012
JTERM 2013



移植後12週での再生組織の比較



K. Masuoka, et al. J Biomed Mater Res 75B (2005)



細胞シートによる関節軟骨修復・再生

細胞シート工学を応用した関節軟骨修復・再生



厚生労働省発医政 1003 第 3 号
平成 23 年 10 月 3 日

東海大学医学部
医学部長 今井 裕 殿

厚生労働大臣 小宮山 洋子

ヒト幹細胞臨床研究実施計画について

平成 23 年 3 月 3 日付で申請のあった下記の臨床研究については、実施して差し支えない。
なお、臨床研究の中止、終了などに伴う厚生労働大臣への報告については、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）の定めるところによるほか、定期的に中間報告書を提出するようお願いする。

記

課 題 名：細胞シートによる関節治療を旨とした臨床研究

研究責任者：佐藤 正人
（東海大学医学部・外科学系整形外科・准教授）



報道ステーションHP 特集(2013.7.13)から全編(約20分)がご覧いただけます。
「軟骨細胞シートを使った変形性ひざ関節症の治療法」

【対象患者】

- ・20~60歳
- ・外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷
軟骨損傷を合併した観血的整復固定術、靭帯再建術、高位脛骨骨切り術、関節鏡視下手術の適応患者で、関節鏡所見で膝関節軟骨損傷部 Outerbridge分類Grade III以上の症例を対象とする。
- ・大きさ4.2cm²以下の軟骨損傷

→ 様々な程度の軟骨変性度を有する患者に適用する

【エンドポイント】

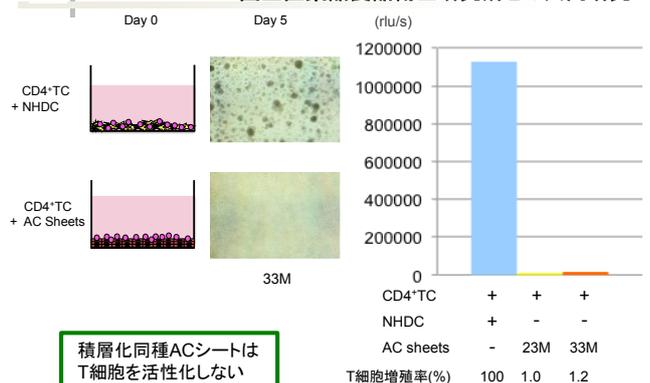
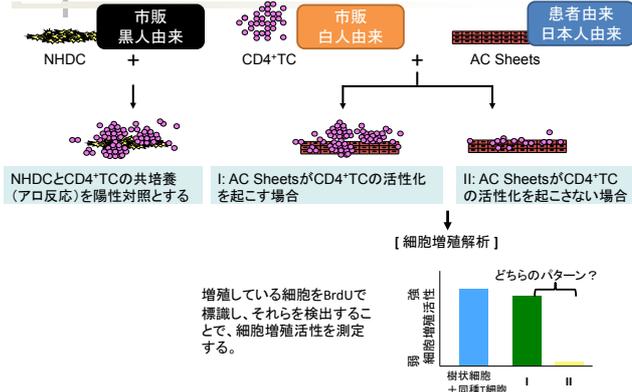
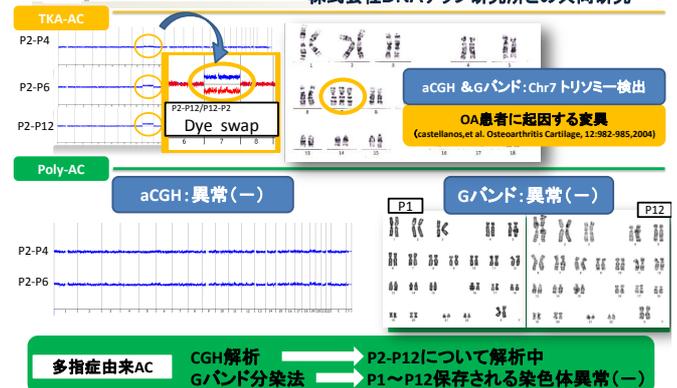
- ①有害事象の頻度
- ②術後1年までの臨床評価基準における点数
- ③術後1年までの単純レントゲン写真評価基準における点数
- ④術後1年までのMRI評価基準における点数
- ⑤術後1年時での超音波検査による粘弾性評価（関節鏡）
- ⑥術後1年時での組織学的評価点数（関節鏡視下生検サンプル）

1. 多指症軟骨細胞

優れた増殖性、手術時廃棄組織



国立成育医療研究センターとの共同研究
株式会社DNAチップ研究所との共同研究



本研究は、
厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業により
行われております。詳細は下記URLをご覧ください。
URL:<http://cellsheets.med.u-tokai.ac.jp/>



生分解性ポリマー足場素材を用いたインプラント型再生軟骨の研究開発と臨床導入

東京大学医学部附属病院 ティッシュ・エンジニアリング部
星 和人

1. 軟骨再生医療の現況

現在、軟骨領域では、自家軟骨細胞移植 (autologous chondrocyte implantation, ACI) が現実的な医療として世界的に普及している。ACI 原法は、スポーツ外傷や離断性骨軟骨炎などによって生じる関節軟骨の局所的欠損を治療対象としている。非荷重部の関節軟骨を少量採取して軟骨細胞を単離し、培養増殖させた後に細胞懸濁液として欠損部に投与し、さらに漏出を防ぐため骨膜パッチで被覆する治療方法である [Brittberg 1994]。ACI 原法は米国 Genzyme 社で産業化され、製造された再生軟骨は Carticel™ として販売されており、過去十数年の実績を経てスポーツ外傷や離断性骨軟骨炎に対し既に使用例は 20000 件を超えたとされている。しかし、同期間に行われた変形性関節症に対する人工関節手術数が約 600 万例であることを考えるとこの数字の 1% にも満たず、現状の軟骨再生医療 ACI の適応範囲は依然限局的であるといわざるを得ない。さらに、その後の報告では、グラフト逸脱、層剥離、骨膜パッチの肥厚、などの問題点が指摘されている [Wood 2006]。また ACI 原法に関する systematic review では、軟骨欠損部に対するドリリング (マイクロフラクチャー法) や、シリンダー型あるいはモザイク型自家軟骨・骨移植にくらべ明らかな臨床上的優位性が認められないなどの治療成績上の限界が指摘されており [Ruano-Ravina 2006]、改良の必要があると考えられる。

顎顔面領域の軟骨に関しては、隆鼻術後のシリコンインプラント抜去例や鞍鼻などに対して、自家耳介軟骨細胞を注入した臨床応用例が報告されている [Yanaga, 2006]。耳介軟骨を局所麻酔下で採取し、自己血清を用いて軟骨細胞を培養して、注入用自家耳介培養軟骨細胞を準備する。シリコンインプラント抜去後の皮下ポケットや移植部位の骨上、骨膜

上を剥離してできた皮下ポケットに、注入用自家耳介培養軟骨細胞を注入し、外固定を 7 日間行う。その後、夜のみ 3 週間テープ固定を行うことにより、皮下再生軟骨を得る。さらに、同グループはこの様な皮下再生軟骨を一旦患者の腹部皮下で作製して摘出し、必要な形を整えて患部に移植するという治療も行っている [Yanaga 2009]。この方法では、有形の再生軟骨を患部に移植することができるが、軟骨採取、軟骨細胞の腹部への移植、回収した再生軟骨の再移植、といった合計 3 回の手術が必要となる。また採植部、患部のほかに、腹部という第 3 の部位にも手術創ができる。さらに軟骨細胞の腹部への移植によって回収できる再生軟骨の量、形状を厳密には管理することができないため最終的な再生軟骨の形状を術前にあらかじめ想定することが困難である、軟骨を採取してから患部に再生軟骨を移植するまで、7 ヶ月以上の長期間を要する、などといった課題も残されている。

3. 生体材料の導入による自家軟骨細胞移植の改良

このように従来の軟骨再生医療は、局所的な軟骨欠損部位に細胞懸濁液あるいはゲル状細胞塊を注入する方法を用いている。しかし、口腔外科領域の重要疾患である口唇口蓋裂の鼻変形を再生軟骨組織で修正するためには、再生組織に力学的強度と、鼻に特有の 3 次元形態を付与する必要がある。口唇口蓋裂の鼻変形その他、小耳症などの先天性形態異常の修正術や広範な軟骨損傷を伴う変形性関節症などへの適応を拡大するためにも、再生組織に強度と 3 次元形態を付与する必要がある。そのためには、力学強度を補強できる足場素材を導入することが不可欠である。

現在、自家軟骨細胞移植の課題を克服するため、生体材料が導入されつつある。ACI 原法における骨膜パッチの代替としてコラーゲン膜 (Chondro-Gide™) などを使用して、骨膜採取時の侵襲や骨膜肥厚を予防する方法が検討されている。また、骨膜パッチを使用せずに、細胞保持性の高いコラーゲン多孔体 (Maix™) やヒアルロン酸多孔体 (Hyaff-11™) などに細胞を浸透させて関節欠損部に投与し、漏出予防のパッチを使用しない” all-in-one” 方式の再生軟骨も開発されている [Marlovits 2006]。all-in-one 方式の再生軟骨は、関節鏡視下でのアプローチが可能となるため、骨膜採取や直視下手術が必要な原法とくらべ、手術侵襲を軽減することができる。これらの一部はすでに欧米で臨床応用されており、治

療成績の報告が待たれる[Bartlett 2005]。

本邦でも広島大学整形外科の越智教授グループがアテロコラーゲンゲルを用いて、採取した軟骨細胞を3次元培養する方法を開発した。アテロコラーゲンは、コラーゲン分子の両端にあるテロペプチドを酵素処理によって除去し、免疫活性や抗原性を削減したコラーゲンである。同グループは、軟骨細胞をこのコラーゲンゲルで1ヶ月程度、包埋培養した後、そのまま、一塊として投与する治療法を実施している。この方法は、細胞をゲルで包埋することにより移植操作性を向上させることができる。さらに、軟骨細胞は平面培養すると軟骨基質産生能の低下、すなわち脱分化を生じるため、アテロコラーゲン3次元包埋培養は軟骨細胞の生理的な3次元環境を再現し、平面培養に伴う脱分化の進行を抑制することができる[Ochi 2002][Takahashi 2007]。同技術は株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングに移転され、臨床試験の実施や産業化が進められている。

しかし、現在の改良型自家軟骨細胞移植に使用されている生体材料はコラーゲンやヒアルロン酸などの生体組織を由来とする素材が主流であり、細胞親和性や生分解性に優れるものの、水分を吸収すると軟化し、荷重を支えるほどの力学特性を有していない。軟骨再生医療の適応を拡大し、臨床にニーズに即した再生軟骨を作製するためには、力学強度を有し、局所的な軟骨欠損のみならず、周囲に正常な軟骨がないような広範な部位にも移植できる再生軟骨の製造技術が必要である。

4. 力学強度と3次元形状を有する「インプラント型再生軟骨」作製の試み

そのため、われわれは、生体組織由来素材に代わり、生分解性ポリマーを検討した。生分解性ポリマーは、生体内で緩徐に加水分解され、そして最終的には水と二酸化炭素に分解される有機化合物の総称である。代表的なものとして、接合用のプレートやスクリューの素材として臨床実績があるポリ乳酸(poly-L-lactic acid, PLLA)、手術用吸収糸の素材であるポリグリコール酸(poly-glycol acid, PGA)や乳酸・グリコール酸共重合体(poly-(lactic acid/glycol acid), PLGA)などが挙げられる。われわれは、このようなポリマーを用いて多孔体を作製し、再生軟骨用の足場素材として使用する検討を行った[Tanaka 2010]。このような足場素材は含水後も剛性を有するため移植後も力学強度を保つ

ことができ、また、軟骨欠損部に即した3次元形態を付与することも可能である。

多孔体の構造については、孔径が大きすぎると多孔体に細胞を均一に播種することが困難になり、また小さすぎると多孔体の内部まで十分に細胞を浸透させることが困難になる。そのため、われわれは孔径0.3mmと比較的孔径の大きなものを用いつつ、細胞が多孔体から容易には流出しないよう、アテロコラーゲンゲルと混和した後に多孔体に投与する方法[Yamaoka 2006][Yamaoka 2010]を採用することにした。また、組成に関しては、移植後分解が急速に進むPLGAを用いた場合、軟骨再生が成立するために重要な移植後1カ月程度の初期に激しい組織異物反応がおこるため、再生軟骨組織の成熟が阻害される可能性があった。そのため、われわれは分解が比較的緩徐に進むPLLAを用いることにより移植初期の組織異物反応を抑制した[Asawa in press]。これらの検討の結果、われわれはPLLA多孔体とアテロコラーゲンを併用する足場素材システムを用い、生理的な軟骨組織に匹敵する力学的強度を有するインプラント型再生軟骨を作製した。

われわれは口唇口蓋裂の鼻変形に対して、インプラント型再生軟骨の臨床応用を行っていった。元来、口唇口蓋裂の鼻変形患者においては、適切なロッド状の自家軟骨組織が採取できないため、代替として自家腸骨移植などを行っており、硬い鼻になってしまう、骨折がおこるなどの課題が残っていた。そのため、生理的な軟骨に近い物性で再建できることが予想されるインプラント型再生軟骨の導入が期待されている。われわれは、アテロコラーゲンハイドロゲルとポリ乳酸多孔体によって構成される足場素材に培養自家耳介軟骨細胞を投与して作製するインプラント型再生軟骨を口唇口蓋裂の鼻変形の治療に使用する臨床研究を、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」にもとづく審議を経て実施した。

5. 展望

培養軟骨細胞を注入する自家軟骨細胞移植が第一世代の軟骨再生医療として、軟骨の局所的な欠損の修復に一定の成果を得た。今後、軟骨再生医療の適応を拡大してゆくためには、足場素材を積極的に導入し、機能性、操作性を高めてゆく必要がある。さらには、無血清培地の開発、増殖中の細胞劣化の抑制、などの研究も必要になってくると思われる。

また、細胞単離方法の改善、三次元培養法の開発、大量培養を実現する自動化システムの開発、再生軟骨の評価技術の確立、などの支援技術も充実させなければならないだろう。これらのアプローチによって、軟骨再生医療による治療体系を構築し、さらなる再生医療の発展を求めてゆきたい。

文献

1. Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O., Peterson L.: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331:889-895, 1994.
2. Wood JJ., Malek MA., Frassica FJ., Polder JA., Mohan AK., Bloom ET., Braun MM., Cote TR.: Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *J Bone Joint Surg Am* 88(3):503-507, 2006.
3. Ruano-Ravina A., and Jato Diaz M.: Autologous chondrocyte implantation: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 14(1):47-51, 2006.
4. Yanaga H., Yanaga K., Imai K., Koga M., Soejima C., Ohmori K.: Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plast Reconstr Surg* 117(6):2019-2030, 2006.
5. Yanaga H., Imai K., Fujimoto T., Yanaga K.: Generating ears from cultured autologous auricular chondrocytes by using two-stage implantation in treatment of microtia. *Plast Reconstr Surg* 124(3):817-25, 2009.
6. Marlovits S., Zeller P., Singer P., Resinger C., Vecsei V.: Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur J Radiol* 57(1):24-31, 2006.
7. Bartlett W., Skinner JA., Gooding CR., Carrington RW., Flanagan AM., Briggs TW., Bentley G.: *J Bone Joint Surg Br* 87(5):640-5, 2005.
8. Ochi M., Uchio Y., Kawasaki K., Wakitani S., Iwasa J.: Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 84(4):571-8, 2002.

9. Takahashi T., Ogasawara T., Asawa Y, Mori Y., Uchinuma E., Takato T., Hoshi K.: Three-dimensional microenvironments retain chondrocyte phenotypes during proliferation culture. *Tissue Eng* 13(7):1583-1592, 2007.
10. Tanaka Y., Yamaoka H., Nishizawa S., Nagata S., Ogasawara T., Asawa Y., Fujihara Y., Takato T., Hoshi K.: The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte /atelocollagen based tissue-engineered cartilage. *Biomaterials* 31(16):4506-4516, 2010.
11. Yamaoka H., Asato H., Ogasawara T., Nishizawa S., Takahashi T., Nakatsuka T., Koshima I., Nakamura K., Kawaguchi H., Chung UI., Takato T., Hoshi K.: Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A* 78(1):1-11, 2006.
12. Yamaoka H., Tanaka Y., Nishizawa S., Asawa Y., Takato T., Hoshi K.: The application of atelocollagen gel in combination with porous scaffolds for cartilage tissue engineering and its suitable conditions. *J Biomed Mater Res A* 93(1):123-132, 2010.



2013年10月4日
次世代医療機器評価指標作成事業
再生医療審査WG

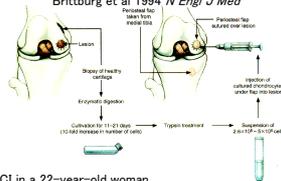
生分解性ポリマー足場素材を用いた インプラント型再生軟骨の研究開発と臨床導入

星 和人

東京大学
医学部附属病院 ティッシュ・エンジニアリング部
大学院医学系研究科 軟骨再生医療寄付講座

再生医療の実施例：関節軟骨欠損に対する自家軟骨細胞移植

Autologous chondrocyte Implantation (ACI) 自家軟骨細胞懸濁液 + 骨膜パッチ



過去13年間で15,000件の手術例
(スポーツ外傷、変形性膝関節炎)

同期間で変形性膝関節症に対して
人工関節手術を受けた患者数
約5,000,000例

Adverse events
Wood et al 2006 *J Bone Joint Surg Am*
285/7500 (3.8%)
graft failure, delimitation, tissue hypertrophy

Systematic review
Ruano-Ravina et al 2006 *Osteoarthritis Cartilage*
not indicative of its being more effective
than other therapeutic strategies

細胞懸濁液という性状に課題が残る

ACI in a 22-year-old woman



生体材料（足場素材）導入の試み

コラーゲンゲルと混和

軟骨の一部を採取
軟骨組織
アテロコラーゲンゲル生体材料（足場）
J-TEC, Aichi, Japan
<http://www.jppte.co.jp/>より

3次元培養で脱分化を抑制

骨膜の代わりにコラーゲン膜を使用

コラーゲン膜
Artrocell, Cellgenix(DE)
CACI, Verigen(DE)
Marlovits 2006 Eu J Radiolより

手術侵襲の軽減

バイオマテリアル多孔体に細胞を播種

バイオマテリアル多孔体
CaRes, Ars Arthro(TR)
Novocart, Teteo(DE)
Marlovits 2006 Eu J Radiolより

"all-in-one"型再生組織が実現
関節鏡アプローチが可能

軟骨機能の発現に必要な力学強度の確保に課題が残る

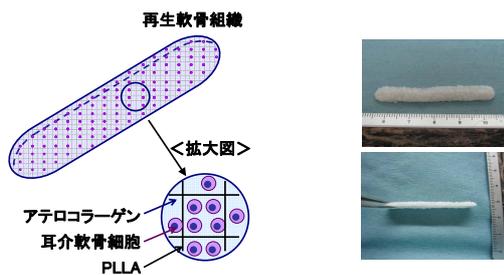
軟骨再生医療の展開

技術的展開度 →

臨床導入時期 ↓

	細胞懸濁液	ゲル状	シート状	インプラント型
使用細胞	少	少	少	多
足場素材	不要	不要	不要	要
適応	限定的	限定的	限定的	汎用的

臨床研究に使用するインプラント型再生軟骨

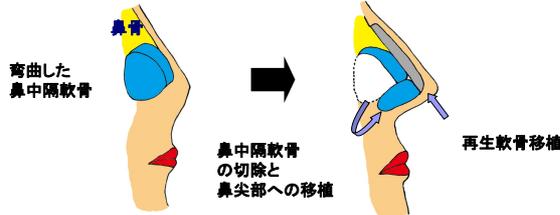


インプラント型再生軟骨を用いたヒト幹細胞臨床研究

鼻用インプラント型再生軟骨

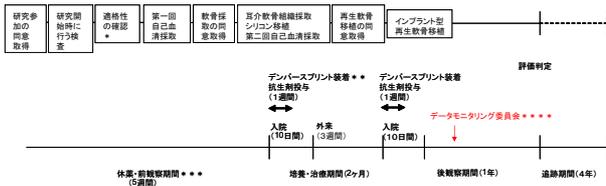
平成22年9月29日
東京大学大学院医学系研究科・医学部
ヒト幹細胞を用いる臨床研究審査委員会承認
平成23年3月15日
厚生労働大臣の同意
(研究代表者 高戸 毅 先生)

口唇口蓋裂における鼻変形のうち、隆鼻術
および鼻尖形成が必要な、高度な変形を有する患者(3名)



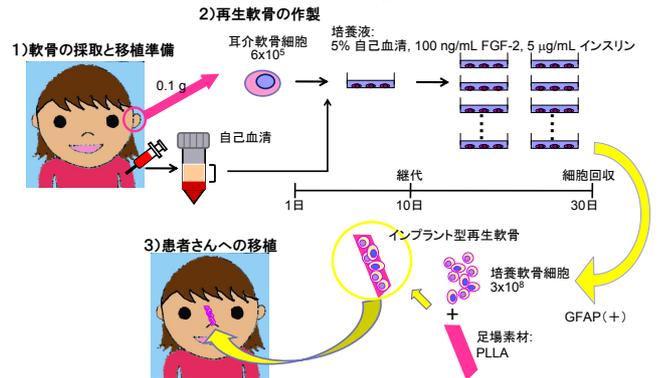
主要評価項目： 重大な有害事象の有無を指標として、安全性を確認する。
副次評価項目： 軟骨再生組織の評価指標を探索的に用いて、有効性を確認する。

臨床研究のフローチャート

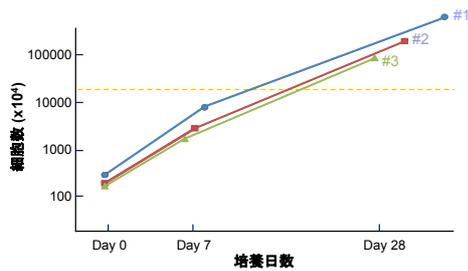


- * 移植適格性確認委員会が、研究開始時に行う検査の情報をもとに患者の適格性を確認する。
- ** 手術後に鼻にギプスを装着すること。
- *** 休業を行う場合は、3か月の休業期間を置くこと。
- **** 移植後2カ月でデータモニタリング委員会を開催し、次例の実施を判断する。

インプラント型再生軟骨の製造プロトコール



患者由来耳介軟骨細胞の増殖曲線



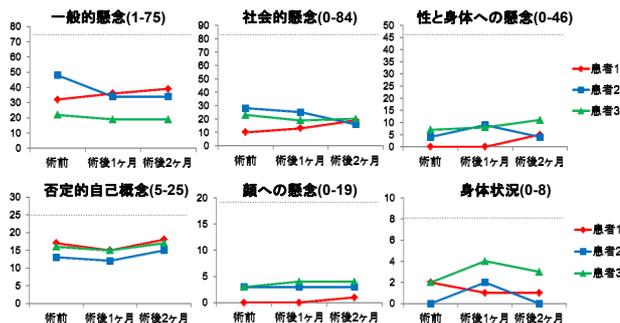
高橋ほか A-1-2

インプラント型再生軟骨の移植



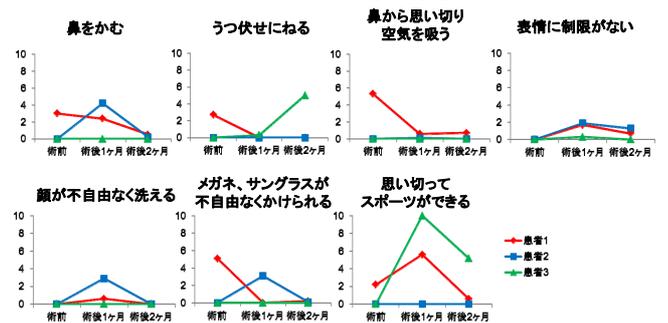
患者満足度の評価

顔面の整容的満足度(DAS59)による評価

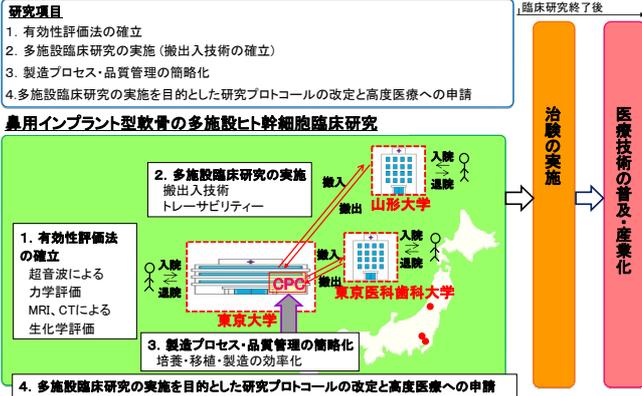


日常生活動作の評価

VASによる評価(最良0—最悪10)



インプラント型再生軟骨の多施設臨床研究への展開



再生気管への応用

従来治療との比較

	肋軟骨移植	非吸収性素材を用いた再生気管	同種生体素材を用いた再生気管	試験物: 吸収性素材を用いた複合型再生気管軟骨
製法	肋軟骨を摘出し、必要な大きさにトリミングして、気道形成部に移植する。 <small>Journal of Pediatric Surgery 38:1703-6,2003</small>	非吸収性ポリプロピレンメッシュとコラーゲンによる足母を患者の血液を含ませて移植する。 <small>Annals of Otolaryngology 114:429-33,2005</small>	脱細胞化した同種気管に、骨髄由来間葉系幹細胞を接合させて移植する。 <small>Lancet 372:2023-30, 2008 380:994-1000, 2012</small>	吸収性素材と培養自己軟骨細胞を混和し、移植する。
課題	肋軟骨採取部位への侵襲。 肋軟骨の石灰化。 機械的な粘膜炎再生不良。 内腔への肉芽形成。 大きな欠損には対応困難。	軟骨再生は起こらない。 異物反応、成長に伴う不適合、脱落、の危険性。	軟骨再生は確認されていない。感染、力学強度の低下、未知の病原体感染、などが懸念。	<p>本技術の特徴</p> <ul style="list-style-type: none"> 気管軟骨を再生 粘膜再生を誘導 自己由来組織で置換 未知の病原体感染リスク低

再生気管による気管狭窄の治療例

12歳男児 先天性気管狭窄 ロンドン在住
3歳時に同種気管移植（ホモグラフト）
大動脈との間に瘻孔をつくり緊急手術

MJ Elliott, et al Lancet 2012

ロンドン
脱細胞化した同種気管に
・患者由来間葉系幹細胞を投与
・内腔に気道粘膜パッチを貼付
・吸収性ステント

フィレンツェ
同種気管の脱細胞化

V. 参考資料

1. 平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発 0907 第 5 号厚生労働省医薬食品局長通知「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」
2. 平成 12 年 2 月 22 日付け医薬審第 329 号厚生省医薬安全局審査管理課長通知「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」

薬食発0907第5号
平成24年9月7日

各都道府県知事 殿

厚生労働省医薬食品局長

ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について

ヒト由来の細胞・組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性を確保するための基本的な技術要件については、平成20年2月8日付け薬食発第0208003号厚生労働省医薬食品局長通知「ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」の別添及び平成20年9月12日付け薬食発第0912006号厚生労働省医薬食品局長通知「ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」の別添（以下、「平成20年2指針」という。）により通知したところである。

今般、ヒト由来の人工多能性幹細胞（iPS細胞）又は人工多能性幹細胞様細胞（iPS様細胞）のうち、同種由来iPS細胞又はiPS様細胞を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件については、平成20年2指針に代えて、新たな指針を別添「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」のとおりとりまとめたので、御了知の上、貴管内関係業者等が同種由来iPS細胞又はiPS様細胞を加工した医薬品又は医療機器を開発する際等に参考として利用できるよう周知願いたい。

ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針

はじめに

1. 本指針は、ヒト由来の人工多能性幹細胞（iPS 細胞）又は人工多能性幹細胞様細胞（iPS 様細胞）のうち、同種由来 iPS 細胞又は iPS 様細胞（自己由来 iPS 細胞又は iPS 様細胞を除く）を加工した医薬品又は医療機器（以下「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等」という）の品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件について定めるものである。しかしながら、ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等は、ヒト体細胞より人為的に作製された各種 iPS（様）細胞を人為的に分化誘導し、得られた特定の細胞をそのまま利用、あるいはさらに加工することにより製造されるため、その製造方法、中間製品や目的細胞の種類及び特性、臨床上的適用法は多種多様であり、また、本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。本指針を一律に適用したり、本指針の内容が必要事項すべてを包含しているとみなしたりすることが必ずしも適切でない場合もある。したがって、個々の医薬品等についての試験の実施や評価に際しては本指針の目的を踏まえ、その時点の学問の進歩を反映した合理的根拠に基づき、ケース・バイ・ケースで柔軟に対応することが必要であること。
2. 薬事戦略相談あるいは治験相談におけるヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の治験を開始するに当たっての基本的留意点は、当該製品にヒトへの適用により支障となる品質及び安全性上の明らかな問題が存在するか否か、臨床で得られた知見との関係性を照合できる程度に品質特性が把握され、その一定範囲の恒常性が確保されているか否かを確認することにある。その際、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しれないリスク」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。したがって、治験開始の場合、その届出に当たって添付すべき資料について本指針に示された要件や内容をすべて満たすことを必ずしも求めている訳ではない。製造販売承認申請時における品質及び安全性の確保のための資料は治験の進行とともに本指針に沿って充実整備されることを前提に、治験開始時点でその趣旨に適う条件を充たし、合理的に作成された適切な資料を提出すること。
また、治験開始に必要なとされる資料の範囲及び程度については、当該製品の由来、対象疾患、対象患者、適用部位、適用方法及び加工方法等により異なり、本指針では具体的に明らかでないことも少なくないので、個別に独立行政法人医薬品医療機器総合機構に相談することが望ましい。

3. 本指針に記述された事項、試験方法、基準その他の技術要件は、それぞれの目的に適う内容と程度をもとに考慮、選択、適用、及び評価されるべきことを意図しており、必ずしも常に同一（最高）水準での解釈、運用を求めている訳ではない。この趣旨を踏まえ、申請者は、考慮した背景、選択、適用、及び評価した内容と程度がそれぞれの目的に相応しく、科学的合理性からみて妥当であることを明らかにすること。

目次

第1章 総則	5
第1 目的	5
第2 定義	5
第2章 製造方法	6
第1 原材料及び製造関連物質	6
1 iPS（様）細胞作成の原材料となるヒト体細胞	6
(1) 起源及び由来、選択理由	6
(2) 原材料となる細胞・組織の特性と適格性	6
(3) ドナーに関する記録	7
(4) 細胞・組織の採取・保存・運搬	7
2 目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質	8
(1) 細胞の培養を行う場合	8
(2) 非細胞成分と組み合わせる場合	10
(3) 細胞に遺伝子工学的改変を加える場合	10
(4) 細胞にタンパク質を導入する場合	11
(5) 薬剤等の処理により細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合	11
(6) 物理的方法により細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合	12
(7) コンビネーションにより細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合	12
3 ヒト iPS（様）細胞の樹立	12
4 ヒト iPS（様）細胞株の保存及び運搬方法	12
5 記録の作成及び保管方法	12
第2 製造工程	12
1 ロット構成の有無とロットの規定	13
2 製造方法	13
(1) 受入検査	13
(2) 細菌、真菌及びウイルス等の不活化・除去	13
(3) 組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離等	13
(4) ヒト iPS（様）細胞株の樹立	13
(5) ヒト iPS（様）細胞由来の中間細胞株の樹立	13
(6) 最終製品の構成要素となる細胞の作成	14
(7) 細胞のバンク化	14
(8) 製造工程中の取り違え及びクロスコンタミネーション防止対策	14
3 最終製品の構成要素となる細胞の特性解析	14
4 最終製品の形態、包装	14
5 製品の保存及び運搬	15
6 製造方法の恒常性	15
7 製造方法の変更	15

第3章	最終製品の品質管理	15
1	総論	15
2	最終製品の品質管理法	16
(1)	細胞数並びに生存率	16
(2)	確認試験	16
(3)	細胞の純度試験	16
(4)	細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験	16
(5)	製造工程由来不純物試験	16
(6)	無菌試験及びマイコプラズマ否定試験	17
(7)	エンドトキシン試験	17
(8)	ウイルス試験	17
(9)	効能試験	17
(10)	力価試験	17
(11)	力学的適合性試験	18
第3章	ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の安定性	18
第4章	ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の非臨床安全性試験	18
第5章	ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験	20
第6章	ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の体内動態	20
第7章	臨床試験	21

第1章 総則

第1 目的

本指針は、ヒト(同種) iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件について定めるものである。

第2 定義

本指針における用語の定義は以下のとおりとする。

- 1 「ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)」とは、ヒト体細胞を遺伝子導入・タンパク質導入・薬剤処理等により人為的に初期化して得られる細胞又は当該細胞の分裂により生ずる細胞であって、内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞に分化する性質を有し、かつ、自己複製能力を維持しているもの又はそれに類する能力を有することが推定されるものをいう。
- 2 「ヒト人工多能性幹細胞様細胞 (iPS 様細胞)」とは、ヒト体細胞を、遺伝子導入・タンパク質導入・薬剤処理等により人為的に脱分化して得られる細胞又は当該細胞の分裂により生ずる細胞であって、少なくとも内胚葉、中胚葉又は外胚葉の一部の細胞に分化する性質を有し、自己複製能を維持しているもの又はそれに類する能力を有することが推定されるものを指す。
- 3 「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。
- 4 「製造」とは、加工に加え、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、当該細胞・組織の本来の性質を改変しない操作を含む行為で、最終製品であるヒト(同種) iPS (様) 細胞加工医薬品等を出荷するまでに行う行為をいう。
- 5 「表現型」とは、ある一定の環境条件のもとで、ある遺伝子によって表現される形態学的及び生理学的な性質をいう。
- 6 「HLA タイピング」とは、ヒトの主要組織適合性抗原型である HLA(ヒト白血球抗原)のタイプを特定することをいう。
- 7 「ドナー」とは、ヒト(同種) iPS (様) 細胞加工医薬品等の原料となる体細胞を提供するヒトをいう。
- 8 「遺伝子導入構成体」とは、目的遺伝子を標的細胞に導入するための運搬体、目的遺伝子及びその機能発現に必要な要素をコードする塩基配列等から構成されるものをいう。
- 9 「タンパク質導入体」とは、目的タンパク質を標的細胞に導入するための薬剤及び目的タンパク質等から構成されるものをいう。

第2章 製造方法

製造方法について、下記の事項に留意し、必要な情報を明らかにすること。これらの情報等は、最終製品の品質や安全性等の確保に資するとともに、品質の恒常性を製造方法面から保証するために重要なものである。しかし、品質・安全性等の確保や品質恒常性保証は、製造方法全体で相互補完的方策により達成され、その方策が合理的で合目的性に叶うことが最も肝要である。したがって、最終製品や中間製品における品質試験や管理あるいは製造過程における管理において、品質・安全性等の確保や品質恒常性保証という目的が達成されるのであれば、その科学的妥当性を明示した上で下記の措置や情報の一部を省略しても差し支えない。

第1 原材料及び製造関連物質

1 iPS（様）細胞作製の原材料となるヒト体細胞

(1) 起源及び由来、選択理由

ヒト iPS（様）細胞株の樹立に使用する体細胞の起源及び由来について説明し、当該体細胞を選択した理由を明らかにすること。

(2) 原材料となる細胞・組織の特性と適格性

① 生物学的構造・機能の特徴と選択理由

原材料として用いられる細胞・組織について、その生物学的構造・機能の特徴を、例えば、形態学的特徴、増殖特性、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質、HLA タイピング、その他適切な遺伝型又は表現型の指標から適宜選択して示し、当該体細胞を原材料として選択した理由を説明すること。

これらの検討結果から原材料となる体細胞を新たに調製する際に選択すべき重要細胞特性指標を明らかにしておくこと。検討に際しては、検体の量的制限や技術的限界もあり、可能な範囲で考慮すれば良い。

② ドナーの選択基準、適格性

ドナーの選択が倫理的に適切に行われ、かつ適切な手続きで行われたことを示すこと。また、年齢、性別、民族学的特徴、遺伝的特徴、病歴、健康状態、採取細胞・組織を介して感染する可能性がある各種感染症に関する検査項目、免疫適合性等を考慮して、選択基準、適格性基準を定め、その妥当性を明らかにすること。ドナーのゲノム・遺伝子解析を行う場合は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に従うこと。

感染症に関連しては、特にB型肝炎(HBV)、C型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、成人T細胞白血病(HTLV)、パルボウイルスB19感染症については、問診及び検査(血清学的試験や核酸増幅法等)により否定すること。また、サイトメガロウイルス感染、EBウイルス感染及びウエストナイルウイルス感染については必要に応じて検査により否定すること。

この他、次に掲げるものについては既往歴の聴取、問診等を行うとともに、輸血、移植医療を受けた経験の有無等からドナーとしての適格性を判断すること。

・梅毒トレポネーマ、クラミジア、淋菌、結核菌等の細菌による感染症

- ・敗血症及びその疑い
- ・悪性腫瘍
- ・重篤な代謝及び内分泌疾患
- ・膠原病及び血液疾患
- ・肝疾患
- ・伝達性海綿状脳症及びその疑い並びにその他の認知症
- ・特定の遺伝性疾患や家族歴

なお、特定の遺伝的特徴や各種感染症に関する調査等で iPS（様）細胞から分化が進んだ細胞の段階（中間製品やセル・バンク）で行うことが可能で、かつ科学的合理性からみてより適切な項目については、その妥当性を明示した上で、分化細胞の段階での検討に委ねてもよい。

(3) ドナーに関する記録

原材料となる体細胞について、安全性を確保するために必要な情報が確認できるよう、ドナーに関する記録が整備、保管されていること。また、その具体的方策を示すこと。なお、試験的検体のドナー及び患者のそれぞれについて、それぞれの細胞の使用目的に応じた情報の整備及び保管方策でよい。

(4) 細胞・組織の採取・保存・運搬

① 採取者及び採取医療機関等の適格性

細胞・組織の採取者及び採取医療機関等に求めるべき技術的要件について、明らかにすること。

② 採取部位及び採取方法の妥当性

細胞・組織の採取部位の選定基準及び採取方法を示し、これらが科学的及び倫理的に適切に選択されたものであることを明らかにすること。細胞・組織の採取方法については、用いられる器具及び薬剤、微生物汚染防止、取り違いやクロスコンタミネーション防止のための方策等を具体的に示すこと。

③ ドナーに対する説明及び同意

細胞・組織のドナーに対する説明及び同意の内容を、臨床応用も含めて規定すること。

④ ドナーの個人情報の保護

ドナーの個人情報の保護方策について具体的に規定すること。

⑤ ドナーの安全性確保のための試験検査

細胞・組織採取時にドナーの安全性確保のために採取部位の状態の確認など試験検査を行わなければならない場合には、その内容、検査結果等に問題があった場合の対処法について具体的に規定すること。

⑥ 保存方法及び取り違い防止策

採取した体細胞を一定期間保存する必要がある場合には、保存条件や保存期間及びその設定の妥当性について明らかにすること。また、取り違いを避けるための手段や手順等について具体的に説明すること。

⑦ 運搬方法

採取した細胞・組織や iPS（様）細胞作製原料となる体細胞を運搬する必要がある場合には、運搬容器、運搬手順(温度管理等を含む。)を定め、その妥当性について明らかにすること。

⑧ 記録の作成及び保管方法

①～⑦に関する事項について、実施の記録を文書で作成し、適切に保管する方法について明らかにすること。

2 目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質並びに製造関連事項

目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質並びに製造関連事項を明らかにし、その適格性を示すとともに、必要に応じて規格を設定し、適切な品質管理を行うことが必要である。

生物由来製品又は特定生物由来製品を原材料として使用する場合は、その使用量を必要最小限とし、「生物由来原料基準」（平成 15 年厚生労働省告示第 210 号）をはじめとする関連法令及び通知を遵守すること。特に、ウイルス不活化及び除去に関する情報を十分に評価する必要があるほか、遡及調査等を確保する方策についても明らかにすること。

なお、この項に記載された技術要件は、iPS（様）細胞作製の原材料となるヒト体細胞から iPS（様）細胞への初期化や脱分化及び iPS（様）細胞から最終製品に至る分化誘導過程において該当する場合に留意されるべき事項である。

(1) 細胞の培養を行う場合

① 培地、添加成分(血清、成長因子及び抗生物質等)及び細胞の処理に用いる試薬等のすべての成分等についてその適格性を明らかにし、必要に応じて規格を設定すること。各成分等の適格性の判定及び規格の設定に当たっては、最終製品の適用経路等を考慮すること。

② 培地成分については、以下の点に留意すること。

ア 培地に使用する成分及び水は、可能な範囲で医薬品又は医薬品原料に相当する基準で品質管理されている生物学的純度の高い品質のものを使用すること。

イ 培地に使用する成分は主成分のみでなく使用するすべての成分について明らかにし、選択理由及び必要に応じて品質管理法等を明確にすること。ただし、培地の構成成分が周知のもので、市販品等が一般的に使用されている DMEM、MCDB、HAM、RPMI のような培地は 1 つのものと考えてよい。

ウ すべての成分を含有した培地の最終品については、無菌性及び目的とした培養に適していることを判定するための性能試験を実施する必要がある。その他、工程管理上必要と思われる試験項目を規格として設定し、適切な品質管理を行う必要がある。

③ 異種血清及び異種もしくは同種の血清に由来する成分については、細胞活性化又は増殖等の加工に必須でなければ使用しないこと。特に繰り返して使用する可能性のある製品では可能な限り使用を避けるよう検討すること。血清等の使用が避けられない場合には、以下の点を考慮し、血清等からの細菌、真菌、ウイルス及び異常プ

リオン等の混入・伝播を防止するとともに、最終製品から可能な限り除去するよう処理方法等を検討すること。

ア 血清等の由来を明確にすること。

イ 牛海綿状脳症発生地域からの血清を極力避ける等感染症リスクの低減に努めること。

ウ 由来動物種に特異的なウイルスやマイコプラズマに関する適切な否定試験を行い、ウイルス等に汚染されていないことを確認した上で使用すること。

エ 細胞の活性化、増殖に影響を与えない範囲で細菌、真菌及びウイルス等に対する適切な不活化処理及び除去処理を行う。例えば、潜在的なウイルス混入の危険性を避けるために、必要に応じて加熱処理、フィルター処理、放射線処理又は紫外線処理等を組み合わせて行うこと。

オ 培養細胞でのウイルス感染のモニター、患者レベルでのウイルス性疾患の発症に対するモニター及び異種血清成分に対する抗体産生等の調査のために、使用した血清の一部を保管すること。

- ④ フィーダー細胞を使用する場合には、平成 12 年 7 月 14 日付け医薬審第 873 号通知厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」、平成 14 年 7 月 9 日付け医政研発第 0709001 号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」及び平成 16 年 7 月 2 日付け医政研発第 0702001 号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知「「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく 3T3J2 株及び 3T3NIH 株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針」を参考にして品質評価を行い、フィーダー細胞からの細菌、真菌、ウイルス、異常プリオン等の混入・伝播を防止する策を講じるとともに、使用時の分裂能不活化方法及び細胞密度等の条件について明らかにすること。ただし、例えば既に臨床使用されているヒト細胞・組織製品の製造に使用され、その特性や微生物学的安全性等について評価が定まっているフィーダー細胞と同一の細胞を利用する場合には、その妥当性を示すことによってウイルス否定試験等、試験の一部を省略することができる可能性がある。
- ⑤ 抗生物質の使用は極力避けるべきである。ただし製造初期の工程において抗生物質の使用が不可欠と考えられる場合には、その後の工程で可能な限り漸減を図るほか、その科学的理由、最終製品での推定残存量、患者に及ぼす影響などの面から妥当性を説明すること。なお、抗生物質を使用する場合でも十分に除去されることが立証される場合には、その使用を妨げるものではない。一方、原則として、用いる抗生物質に過敏症の既往歴のある患者の場合には、本治療を適応すべきではない。やむを得ず適用する際には十分な注意を払うと同時に、患者からインフォームド・コンセントを得る必要がある。
- ⑥ 成長因子を用いる場合には、細胞培養特性の再現性を保証するために、例えば純度及び力価に関する規格を設定する等適切な品質管理法を示すこと。
- ⑦ 最終製品に含有する可能性のある培地成分や操作のために用いられたその他の成

分等については、生体に悪影響を及ぼさないものを選択すること。

- ⑧ フィーダー細胞として異種動物由来の細胞を用いる場合には、異種動物由来の感染症のリスクの観点から安全性を確保すること。

(2) 非細胞成分と組み合わせる場合

① 細胞以外の原材料の品質及び安全性について

細胞とともに最終製品の一部を構成する非細胞の原材料(マトリックス、医療材料、スキャフォールド、支持膜、ファイバー及びビーズ等)がある場合には、その品質及び安全性に関する知見について明らかにすること。

当該原材料の種類と特性、最終製品における形態・機能及び想定される臨床適応の観点から見た品質、安全性及び有効性評価との関連を勘案して、適切な情報を提供すること。生体吸収性材料を用いる場合には、分解生成物に関して必要な試験を実施すること。

なお、必要な試験等については、平成 15 年 2 月 13 日付け医薬審発第 0213001 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知「医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的試験の基本的考え方について」等を参照し、試験結果及び当該原材料を使用することの妥当性を示すこと。文献からの知見、情報を合理的に活用すること。

② 目的とする細胞との相互作用について

最終製品中又は中間製品中の細胞との相互作用に関し、以下の事項について、確認方法及び確認結果を示すこと。

ア 非細胞成分が、想定される臨床適応に必要な最終製品中又は中間製品中の細胞の機能、生育能力、活性及び安定性に悪影響を与えないこと。

イ 非細胞成分との相互作用によって起こり得る、最終製品中又は中間製品中の細胞の変異、形質転換及び脱分化等を考慮し、その影響を可能な範囲で評価すること。

ウ 想定される臨床適応において期待される非細胞成分の性質が、最終製品中又は中間製品中の細胞との相互作用によって損なわれないこと。

③ 細胞と適用部位を隔離する目的で非細胞成分を使用する場合

非細胞成分を細胞と適用部位を隔離する目的で使用する場合、下記の項目を参考に効果、安全性を確認すること。

ア 免疫隔離が目的の場合、その程度

イ 最終製品中の細胞由来の目的生理活性物質の膜透過キネティクスと薬理効果

ウ 栄養成分及び排泄物の拡散

エ 非細胞成分が適用部位周辺に及ぼす影響

オ 目的細胞由来の目的生理活性物質の薬理効果に期待し、かつ目的細胞や未分化細胞と適用部位との隔離を目的する場合、非細胞成分の崩壊等により細胞等が漏出しないこと。

(3) 細胞に遺伝子工学的改変を加える場合

細胞に遺伝子を導入する場合は、次に掲げる事項に関する詳細を示すこと。

- ① 目的遺伝子の構造、由来、入手方法、クローニング方法並びにセル・バンクの調製方法、管理方法及び更新方法等に関する情報

- ② 導入遺伝子の性質
- ③ 目的遺伝子産物の構造、生物活性及び性質
- ④ 遺伝子導入構成体を作製するために必要なすべての原材料、性質及び手順(遺伝子導入法並びに遺伝子導入用ベクターの由来、性質及び入手方法等)
- ⑤ 遺伝子導入構成体の構造や特性
- ⑥ ベクターや遺伝子導入構成体を作製するための細胞やウイルスのバンク化及びバンクの管理方法

遺伝子導入細胞の製造方法については、平成7年11月15日付け薬発第1062号厚生省薬務局長通知「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」(以下、「遺伝子治療用医薬品指針」という。)の別添「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」第2章等を参照すること。また、同通知の別記に準じて設定の妥当性等を明らかにすること。

なお、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成15年法律第97号)に基づき、「ヒトの細胞等」若しくは「分化する能力を有する、又は分化した細胞等であって、自然条件において個体に成育しないもの」以外の細胞、「ウイルス」及び「ウイロイド」に対して遺伝子工学的改変を加える場合には、別途手続きが必要となるので留意すること。

上記の記述にかかわらず、最新の知見に基づき、細胞に導入される遺伝子が、化学的にも、機能的にも最終製品の一部を構成せず、製造工程中の試薬として使用されると判断された場合は、使用の目的に適う品質及び安全性が確保されていることを明らかにすることによい。

(4) 細胞にタンパク質を導入する場合

細胞にタンパク質を導入する場合は、次に掲げる事項に関する詳細を示すこと。

- ① 導入タンパク質の構造、由来及び生物活性、物理化学的性質等の品質特性
- ② 導入タンパク質の入手方法、製造方法、品質管理方法及び更新方法等に関する情報
- ③ 導入タンパク質の細胞への導入方法
- ④ タンパク質導入のために使用される化学物質等については、その構造及び生物活性、物理化学的性質等の品質特性
- ⑤ タンパク質導入体を作製する場合にはその製造方法、品質管理方法及び更新方法等に関する情報
- ⑥ 導入タンパク質を作製するための細胞のバンク化及びバンクの管理方法

上記の記述にかかわらず、細胞に導入されるタンパク質が、化学的にも、機能的にも最終製品の一部を構成せず、製造工程中の試薬として使用される場合は、使用の目的に適う品質及び安全性が確保されていることを明らかにすることによい。

(5) 薬剤等の処理により細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合

薬剤等の処理により細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合は、次に掲げる事項に関する詳細を示すこと。

- ① 目的薬剤等の構造、由来及び生物活性、物理化学的性質等の品質特性
- ② 目的薬剤等の入手方法、製造方法、品質管理方法及び更新方法等に関する情報

③ 目的薬剤等による細胞処理の方法

(6) 物理的方法により細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合

物理的方法により細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合は、その方法の詳細を示すこと。

(7) コンビネーションにより細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合

遺伝子工学的改変、タンパク質導入、薬剤処理及び物理的方法のうち、複数の方法のコンビネーションにより細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合は、その方法の詳細を示すこと。

3 ヒト iPS (様) 細胞株の樹立

ヒト iPS (様) 細胞株の樹立に当たっては、ドナーの遺伝的背景を可能な範囲で理解したうえで樹立すること。原材料となる体細胞から iPS (様) 細胞株樹立までの方法 (ヒト体細胞を得るための方法、体細胞の分離・培養、体細胞の初期化/脱分化、初期化/脱分化細胞の分離及び株化の方法、ヒト iPS (様) 細胞株樹立までの各段階での培地、培養条件、培養期間及び収率等) を明確にし、可能な範囲でその妥当性を明らかにすること。

ヒト iPS (様) 細胞株の品質の均質性及び安定性を保持するため、各種細胞特性指標 (例えば細胞純度、形態学的評価、HLA タイピング、表現型特異的マーカー、核型、DNA フィンガープリンティング、細胞増殖特性、多分化能など) のうちから重要細胞特性指標を同定してその基準を設定するとともに、設定された基準による品質を維持したまま増殖が可能な継代数又は分裂回数を示すこと。

4 ヒト iPS (様) 細胞株の保存及び運搬方法

ヒト iPS (様) 細胞株について、保存・流通期間及び保存形態を十分考慮して、細胞の生存率及び力価等に基づく適切な安定性試験を実施し、貯法及び有効期限を設定し、その妥当性を明らかにすること。特に凍結保管及び解凍を行う場合には、凍結及び解凍操作による細胞株の安定性や規格への影響がないかを確認すること。また、必要に応じて標準的な保存期間を超える長期保存についても検討し、安定性の限界を可能な範囲で確認すること。ただし、細胞株を樹立後直ちに使用するような場合はこの限りではない。

また、ヒト iPS (様) 細胞株を運搬する場合には、運搬容器及び運搬手順 (温度管理等を含む) 等を定め、その妥当性について明らかにすること。

5 記録の作成及び保管方法

2～4に関する事項について、実施の記録を文書で作成し、適切に保管する方法について明らかにすること。

第2 製造工程

ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の製造に当たっては、製造方法を明確にし、可能な範囲でその妥当性を以下の項目で検証し、品質の一定性を保持すること。

1 ロット構成の有無とロットの規定

最終製品及び中間製品がロットを構成するか否かを明らかにすること。ロットを構成する場合には、ロットの内容について規定しておくこと。

2 製造方法

原材料となる細胞・組織や体細胞の受け入れからヒト iPS (様) 細胞株の樹立及び分化段階の進んだ細胞を経て最終製品に至る製造の方法の概要を示すとともに、具体的な処理内容及び必要な工程管理、品質管理の内容を明らかにすること。

(1) 受入検査

原材料となる細胞・組織や体細胞、ヒト iPS (様) 細胞株について、細胞・組織の種類や使用目的に応じて実施する受入のための試験検査の項目(例えば、目視検査、顕微鏡検査、採取収率、生存率、細胞の特性解析及び微生物試験等)と各項目の判定基準を設定すること。治験開始前段階にあつては、それまでに得られた試験検体での実測値を提示し、これらを踏まえた暫定値を示すこと。

(2) 細菌、真菌及びウイルス等の不活化・除去

原材料となる細胞・組織、ヒト体細胞あるいはヒト iPS (様) 細胞株について、その細胞生存率や表現型、遺伝形質及び特有の機能その他の特性及び品質に影響を及ぼさない範囲で、必要かつ可能な場合は細菌、真菌及びウイルス等を不活化又は除去する処理を行うこと。当該処理に関する方策と評価方法について明らかにすること。

(3) 組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離等

採取した細胞・組織から製品を製造する初期の過程で行われる組織の細切、iPS (様) 細胞を作製するための体細胞の分離、特定体細胞の単離及びそれらの洗浄等の方法を明らかにすること。特定体細胞の単離を行う場合には、その確認方法を設定すること。

(4) ヒト iPS (様) 細胞株の樹立

ヒト iPS (様) 細胞株の樹立に当たっては、ドナーの遺伝的背景を可能な範囲で理解したうえで樹立すること。原材料となる体細胞から iPS (様) 細胞株樹立までの方法を明確にし、可能な範囲でその妥当性を明らかにすること。また、重要細胞特性指標を同定してその基準を設定するとともに、設定された基準による品質を維持したまま増殖が可能な継代数又は分裂回数を示すこと(第2章第1の3を参照)。

(5) ヒト iPS (様) 細胞由来の中間細胞株の樹立

中間製品としての細胞株(中間細胞株)を樹立することが、安全な最終目的製品を安定的に製造する上で重要でむしろ科学的に合理的な場合が考えられる。そのような方策を選択した場合は、その利点と妥当性を説明しておくこと。別の表現型を示す細胞株を段階的に樹立する際は、それぞれの細胞株樹立までの方法(分化誘導方法、目的とする細胞の分離・培養及び株化の方法、細胞株樹立までの各段階での培地、培養条件、培養期間及び収率等)を明確にし、可能な範囲でその妥当性を明らかにすること。

中間細胞株の品質の均質性及び安定性を保持するため、各種細胞特性解析指標(例えば細胞純度、形態学的評価、表現型特異的マーカー、核型、細胞増殖特性、

分化能など)のうちから重要細胞特性指標を同定してその基準を設定するとともに、設定された基準による品質を維持したまま増殖が可能な継代数又は分裂回数を示すこと。検討に際しては、細胞の量的制限や技術的限界もあり、可能な範囲で考慮すれば良い。

なお、このように樹立した中間細胞株をバンク化して活用する場合も考えられるが、その際は、(7)を参照すること。

(6) 最終製品の構成要素となる細胞の作製

ヒト iPS (様) 細胞株から直接、あるいはヒト iPS (様) 細胞由来中間細胞株を経て、最終製品の構成要素となる細胞を作製する方法(分化誘導方法、目的とする細胞の分離・培養の方法、培養の各段階での培地、培養条件、培養期間及び収率等)を明確にし、可能な範囲でその妥当性を明らかにすること。

(7) 細胞のバンク化

ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の製造のいずれかの過程で、細胞をバンク化する場合には、その理由、セル・バンクの作製方法及びセル・バンクの特性解析、保存・維持・管理方法・更新方法その他の各作業工程や試験に関する手順等について詳細を明らかにし、妥当性を示すこと。平成 12 年 7 月 14 日付け医薬審第 873 号厚生省医薬安全局審査管理課長通知「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」等を参考とすること。ただし、より上流の過程で評価されていることに起因する正当な理由により検討事項の一部を省略することは差し支えない。

(8) 製造工程中の取り違え及びクロスコンタミネーション防止対策

ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の製造にあたっては、製造工程中の取り違え及びクロスコンタミネーションの防止が重要であり、工程管理における防止対策を明らかにすること。

3 最終製品の構成要素となる細胞の特性解析

最終製品の構成要素となる細胞については、例えば、未分化細胞の混入や目的外の細胞の混入を規定するための細胞純度をはじめとして、細胞生存率、形態学的特徴、細胞増殖特性、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質、核型、分化能その他適切な遺伝型又は表現型の指標を解析するとともに、必要に応じて機能解析を行うこと。また、培養期間の妥当性及び細胞の安定性を評価するために、予定の培養期間を超えて培養した細胞において目的外の変化がないことを適切な細胞特性指標等を用いて示すこと。これらの検討に際しては、あらかじめ試験的検体を用いた検討によって実施・検証しておくことでも良いが、これらの検討結果から患者に製品を適用する際に選択すべき重要細胞特性指標を明らかにしておくこと。検討に際しては、検体の量的制限や技術的限界もあり、可能な範囲で考慮すればよい。適用後に体内での増殖等を期待する場合には、設定された基準による継代数又は分裂回数で期待された機能を発揮することを明らかにすること。

4 最終製品の形態、包装

最終製品の形態、包装は、製品の品質を確保できるものでなければならない。

5 製品の保存及び運搬

中間製品又は最終製品を保存及び運搬する必要がある場合には、保存方法や期間及び運搬容器、運搬手段（温度管理等を含む。）を定め、その妥当性を明らかにすること（第3章参照）。

6 製造方法の恒常性

ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の製造に当たっては、製造工程を通じて、個別に加工した製品の細胞数、細胞生存率並びに製品の使用目的及び適用方法等からみた特徴（表現型の適切な指標、遺伝型の適切な指標、機能特性及び目的とする細胞の含有率等）が製品（ロット）間で本質的に損なわれないことを、あらかじめ評価しておくこと。この際、試験的検体を用いても良い。また、中間製品で評価することが、原材料としての細胞・組織の適格性や中間製品までの製造過程の妥当性をよく反映し、また、最終製品に向けての適正な道標となるなど、合理的な場合もあるので、必要に応じて選択肢とすること。

製造工程中の凍結保存期間や加工に伴う細胞培養の期間が長期に及ぶ場合には一定期間ごとに無菌試験を行うなど、無菌性が確保されることを確認すること。

7 製造方法の変更

開発途中に製造方法を変更した場合、変更前の製造方法による製品を用いて得た試験成績を治験開始時又は承認申請に使用するときは、製造方法変更前後の製品の同等性／同質性を示すこと。

第3 最終製品の品質管理

1 総論

ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の品質管理全体の方策としては、最終製品の規格及び試験方法の設定、個別患者への適用ごとの原材料の品質管理、製造工程の妥当性の検証と一定性の維持管理のほか、中間製品の品質管理を適正に行うこと等が挙げられる。

ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等においては目的細胞以外の未分化細胞の混入を否定するための方策が最も重要な要件の一つである。可能な限り中間製品の段階で目的細胞以外の未分化細胞の混入を否定することが望ましい。

最終製品の規格及び試験方法については、対象とする細胞・組織の種類及び性質、製造方法、各製品の臨床使用目的や使用方法、安定性、利用可能な試験法等によって異なると考えられるため、取り扱う細胞・組織によってこれらの違いを十分に考慮して設定すること。また、製造工程の妥当性の検証と一定性の維持管理法、中間製品の品質管理等との相互補完関係を考慮に入れて、全体として品質管理の目的が達成されるとの観点から、合理的に規格及び試験方法を設定し、その根拠を示すこと。なお、治験開始前の評価は、治験を実施する製品の品質として問題がないとみなせることを

確認することを目的としている。したがって、無菌性やマイコプラズマの否定など必要なものを除き、治験後に臨床試験成績と品質の関係を論ずるために必要な品質特性については、やむを得ない場合は少数の試験的検体の実測値をもとにその変動をしかるべき範囲内に設定する暫定的な規格及び試験方法を設定することで差し支えない。ただし、規格及び試験方法を含む品質管理法は治験の進行とともに充実・整備を図ること。

2 最終製品の品質管理法

最終製品について、以下に示す一般的な品質管理項目及び試験を参考として、必要で適切な規格及び試験方法を設定し、その根拠を明らかにすること。

ロットを構成しない製品を製造する場合は個別製品ごとに、ロットを構成する製品を製造する場合には、通常、各個別製品ではなく各ロットが品質管理の対象となるので、これを踏まえてそれぞれ適切な規格、試験方法を設定すること。

(1) 細胞数並びに生存率

得られた細胞の数と生存率は、最終製品又は必要に応じて適切な製造工程の製品で測定すること。なお、治験開始時においては、少数の試験的検体での実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

(2) 確認試験

目的とする細胞・組織の形態学的特徴、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質その他適切な遺伝型あるいは表現型のうち、重要細胞特性指標を選択して、目的とする細胞であることを確認すること。

(3) 細胞の純度試験

目的細胞以外の未分化細胞、異常増殖細胞、形質転換細胞の有無や混入細胞の有無等の細胞の純度について、目的とする細胞・組織の由来、培養条件等の製造工程、中間製品の品質管理等を勘案し、必要に応じて試験項目、試験方法及び判定基準を示すこと。なお、治験開始時においては、少数の試験的検体での実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

(4) 細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験

細胞由来の各種目的外生理活性物質のうち、製品中での存在量如何で患者に安全性上の重大な影響を及ぼす可能性が明らかに想定される場合には、適切な許容量限度試験を設定すること。なお、治験開始時においては、少数の試験的検体での実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

(5) 製造工程由来不純物試験

原材料に存在するか又は製造過程で非細胞成分、培地成分（フィーダー細胞を含む）、資材、試薬等に由来し、製品中に混入物、残留物、又は新たな生成物、分解物等として存在する可能性があるもので、かつ、品質及び安全性の面からみて望ましくない物質等（例えば、ウシ胎児血清由来のアルブミン、抗生物質等）については、当該物質の除去に関するプロセス評価や当該物質に対する工程内管理試験の結果を考慮してその存在を否定するか、又は適切な試験を設定して存在許容量を規定すること。試験対象物質の選定及び規格値の設定に当たっては、設定の妥当性につい

て明らかにすること。

なお、治験開始時においては、少数の試験的検体での実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

(6) 無菌試験及びマイコプラズマ否定試験

最終製品の無菌性については、あらかじめ試験的検体を用いて全製造工程を通じて無菌性を確保できることを十分に評価しておく必要がある。最終製品について、患者に適用する前に無菌性(一般細菌及び真菌否定)を試験により示すこと。また、適切なマイコプラズマ否定試験を実施すること。マイコプラズマ否定試験については、検証された核酸増幅法を用いることでもよい。最終製品の無菌試験等の結果が、患者への投与後にしか得られない場合には、投与後に無菌性等が否定された場合の対処方法をあらかじめ設定しておくこと。また、この場合、中間製品で無菌性を試験により示し、最終製品に至る工程の無菌性を厳密に管理する必要がある。また、同一施設・同一工程で以前に他の患者への適用例がある場合には、全例において試験により無菌性が確認されていること。ロットを構成する製品で密封性が保証されている場合には、代表例による試験でよい。適用ごとに試験を実施する必要がある場合で、無菌試験等の結果が、患者への投与後にしか得られない場合には、適用の可否は直近のデータを参考にするようになるが、この場合でも最終製品の無菌試験等は必ず行うこと。

抗生物質は細胞培養系で極力使用しないことが望まれるが、使用した場合には、無菌試験に影響を及ぼさないよう処置すること。

(7) エンドトキシン試験

試料中の夾雑物の影響を考慮して試験を実施すること。規格値は必ずしも実測値によらず、日本薬局方等で示されている最終製品の1回投与量を基にした安全域を考慮して設定すればよい。また、工程内管理試験として設定することも考えられるが、その場合には、バリデーションの結果を含めて基準等を設定し、その妥当性を説明すること。

(8) ウイルス試験

原材料ないし製造工程においてバンク化されておらず、ウインドウピリオドが否定できず、HBV、HCV、HIV、HTLVを増殖させる可能性のある細胞の場合には、中間製品、最終製品等について、増殖可能性のあるウイルスについてその存在量に関する試験を実施し、iPS(様)細胞加工医薬品等の投与が患者の不利益にならないことを確認する必要がある。また、製造工程中で生物由来成分を使用する場合には、最終製品で当該成分由来のウイルスについての否定試験の実施を考慮すべき場合もあるかもしれないが、可能な限り、もとの成分段階での試験やプロセス評価で迷入が否定されていることが望ましい。

(9) 効能試験

細胞種、臨床使用目的又は特性等に応じた適切な効能試験の実施を考慮すべき場合もある。なお、治験開始時においては、少数の試験的検体による実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

(10) 力価試験

細胞・組織から分泌される特定の生理活性物質の分泌が当該ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の効能又は効果の本質である場合には、その目的としている必要な効果を発揮することを示すために、当該生理活性物質に関する検査項目及び規格を設定すること。遺伝子を導入した場合の発現産物又は細胞から分泌される目的の生成物等について、力価、産生量等の規格を設定すること。なお、治験開始においては、少数の試験的検体による実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

(11) 力学的適合性試験

一定の力学的強度を必要とする製品については、適用部位を考慮した力学的適合性及び耐久性を確認するための規格を設定すること。なお、治験開始時においては、少数の試験的検体による実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

第3章 ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の安定性

製品化したヒト iPS（様）細胞加工医薬品等又は重要なそれらの中間製品について、保存・流通期間及び保存形態を十分考慮して、細胞の生存率及び力価等に基づく適切な安定性試験を実施し、貯法及び有効期限を設定し、その妥当性を明らかにすること。特に凍結保管及び解凍を行う場合には、凍結及び解凍操作による製品の安定性や規格への影響がないかを確認すること。また、必要に応じて標準的な製造期間を超える場合や標準的な保存期間を超える長期保存についても検討し、安定性の限界を可能な範囲で確認すること。ただし、製品化後直ちに使用するような場合はこの限りではない。

また、製品化したヒト iPS（様）細胞加工医薬品等を運搬する場合には、運搬容器及び運搬手順(温度管理等を含む。)等を定め、その妥当性について明らかにすること。

第4章 ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の非臨床安全性試験

製品の特性及び適用法から評価が必要と考えられる安全性関連事項について、技術的に可能であれば、科学的合理性のある範囲で、適切な動物を用いた試験又は *in vitro* での試験を実施すること。なお、非細胞成分及び製造工程由来の不純物等については、可能な限り、動物を用いた試験ではなく理化学的分析法により評価すること。また、最終製品における未分化細胞の存在が異所性組織形成や腫瘍形成・がん化の可能性など安全性上の重要な関心事であるが、可能な限り、セル・バンクや中間製品段階等での徹底的な解析により、混在の可能性を否定するか、あるいは、目的細胞から未分化細胞の効果的分離・除去法や不活化法を開発し、活用することにより、混在の可能性を最小限にする努力が求められる。さらに、投与経路等の選択も安全性上の懸念を最小限にするための有用な方策である可能性がある。

ヒト由来の製品を実験動物等で試験して必ずしも意義ある結果が得られるとは限らない。このため、動物由来の製品モデルを作成し適切な実験動物に適用する試験系により試験を行うことで、より有用な知見が得られると考えられる場合には、むしろ、このような試験系を用いることに科学的合理性がある可能性がある。その際は、対象疾患ごとに適切なモデル動物を用いた試験の実施を考慮する（注：例えば神経疾患ならばサル等、循環器疾患ならばブタ・イヌ等が適している場合がある）。ただし、ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等を構成する細胞と同一の特徴を有する細胞集団が同一の手法にてヒ

ト以外の動物種からも得られるとは限らず、また同様の培養条件等で同等／同質な製品が製造できるとも限らないことから、このような試験の採用、実施及び評価にあたっては、慎重な事前検討や対応が必要である。ヒト以外の動物種から得た iPS (様) 細胞加工製品を用いて動物実験を行った場合、その外挿可能性を説明すること。場合によっては細胞を用いる試験系も考慮し、このようなアプローチにより試験を行なった際には、その試験系の妥当性について明らかにすること。

以下に、必要に応じて非臨床的に安全性を確認する際の参考にすべき事項及び留意点の例を示す。これらは例示であって、合理性のない試験の実施を求める趣旨ではなく、製品の特性及び臨床適用法等を考慮して、必要かつ適切な試験を実施し、その結果について総合的な観点から評価、考察すること。

- 1 培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換を起こしていないことや目的細胞以外の細胞が異常増殖していないことを明らかにすること。
- 2 必要に応じて細胞・組織が産生する各種サイトカイン、成長因子等の生理活性物質の定量を行い、生体内へ適用したときの影響に関して考察を行うこと。
- 3 製品の適用が患者の正常な細胞又は組織に影響を与える可能性、及びその安全性について検討、考察すること。
- 4 患者への適用により、製品中の細胞や混入する未分化細胞が異所性組織を形成する可能性、及びその安全性について検討、考察すること。その際、製品の種類や特性、投与経路、対象疾患、及び試験系の妥当性等を総合的に勘案すること。
- 5 製品及び導入遺伝子の発現産物等による望ましくない免疫反応が生じる可能性、及びその安全性について検討、考察すること。
- 6 最終製品の細胞又は中間製品の細胞について、適切な動物モデル等を利用し、良性腫瘍を含む腫瘍形成及びがん化の可能性に関して検討、考察すること。その際、製品の種類や特性、投与量・投与経路、生着部位、対象疾患及び試験系の妥当性等を総合的に勘案すること。また、腫瘍形成又はがん化の可能性がある場合には、期待される有効性との関係等を勘案して、使用することの妥当性及び合理性について明らかにすること。(注：造腫瘍性試験において最も重要なのは、最終製品が患者に適用された場合の製品の造腫瘍性を可能な限りの確に評価することである。しかし、十分な細胞数が得られない等の理由により最終製品を構成する細胞を用いることができず、中間製品の細胞を用いて最終製品の造腫瘍性を評価しなければならない場合も想定される。また、動物モデルを使用した造腫瘍性試験においては、細胞の分散や足場への接着、細胞密度、投与部位等の条件が最終製品と必ずしも一致するものではない。さらに、動物の種・系統・免疫状態による感度差もある。これらの事情を総合的に勘案して、最終製品の造腫瘍性を評価する必要がある。また、最終製品の造腫瘍性に起因する患者へのリスクについては、対象疾患を治療することによる患者へのベネフィット等とのバランスを踏まえて合理的に評価すること)。
- 7 製造工程で外来遺伝子の導入が行われ、最新の知見に基づき、最終製品中で機能している場合や残存していると判断された場合には、遺伝子治療用医薬品指針に定めるところに準じて試験を行うこと。ウイルスベクターを使用した場合には増殖性ウイルスがどの程度存在するかを検査するとともに、検査方法が適切であることについても

明らかにすること。

また、導入遺伝子及びその産物の性状について調査し、安全性について明らかにすること。細胞については、増殖性の変化、良性腫瘍を含む腫瘍形成及びがん化の可能性について考察し、明らかにすること。染色体への挿入の可能性のあるベクターを用いた場合には、挿入変異による細胞の異常増殖性や造腫瘍性についての評価や臨床適応に当たっての長期フォローアップの必要性を考慮すること。

- 8 動物由来のモデル製品を含めて製品の入手が容易であり、かつ临床上の適用に関連する有用な安全性情報が得られる可能性がある場合には、合理的に設計された一般毒性試験の実施を考慮すること。

なお、一般毒性試験の実施に当たっては、平成元年9月11日付け薬審1第24号厚生省薬務局新医薬品課長・審査課長連名通知「医薬品の製造(輸入)承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて」の別添「医薬品毒性試験法ガイドライン」等を参照すること。

第5章 ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験

- 1 技術的に可能かつ科学的に合理性のある範囲で、実験動物又は細胞等を用い、適切に設計された試験により、ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の機能発現、作用持続性及び医薬品・医療機器として期待される臨床効果の実現可能性(Proof-of-Concept)を示すこと。
- 2 遺伝子導入細胞にあつては、導入遺伝子からの目的産物の発現効率及び発現の持続性、導入遺伝子の発現産物の生物活性並びに医薬品等として期待される臨床効果の実現可能性(Proof-of-Concept)を示すこと。
- 3 適当な動物由来細胞・組織製品モデル又は疾患モデル動物がある場合には、それを用いて治療効果を検討すること。
- 4 治験開始段階では、当該製品の効力又は性能による治療が他の治療法と比較したときはるかに優れて期待できることが国内外の文献又は知見等により合理的に明らかにされている場合には、必ずしも詳細な実験的検討は必要とされない。

第6章 ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の体内動態

- 1 製品を構成する細胞・組織及び導入遺伝子の発現産物について、技術的に可能で、かつ、科学的合理性がある範囲で、実験動物での吸収及び分布等の体内動態に関する試験等により、患者等に適用された製品中の細胞・組織の生存期間、効果持続期間を推測し、目的とする効果が十分得られることを明らかにすること(注:体内動態に関する試験等には、例えば組織学的検討、AluPCR法、磁気共鳴画像診断法(MRI)、陽電子放射断層撮影法(PET)、単一光子放射断層撮影法(SPECT)、バイオイメージングなどがある)。
- 2 ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の用法(投与方法)について、動物実験を通してその合理性を明らかとすること。特に、全身投与にあつては投与後の細胞の全身分布を動物実験などから外挿し、有用性の観点から議論すること(注:投与経路ごとにどこに生着するかは不明であるが、全身投与よりも局所投与が望ましいと想定される)。

しかし、全身投与であってもその有用性において被投与患者に有益であると合理的に説明が可能である場合には用法として設定可能である。例えば、生着を期待する臓器以外への分布を最低限に抑えることが合理的な投与方法であると想定される。また、異所性生着しても、被投与患者にとって不利益（生体機能への悪影響）が生じない場合は用法として肯定できる可能性がある。異所性分化による不利益とは、例えば当該細胞が心臓に異所性生着して骨形成する場合が想定され、それが不整脈を惹起したような場合である）。

- 3 当該細胞・組織が特定の部位（組織等）に直接適用又は到達して作用する場合には、その局在性を明らかにし、局在性が製品の有効性・安全性に及ぼす影響を考察すること。

第7章 臨床試験

ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の臨床試験を開始するに当たって支障となる品質及び安全性上の問題が存在するか否かの段階における安全性については、臨床上的有用性を勘案して評価されるものであり、ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等について予定されている国内の臨床試験計画について以下の項目を踏まえて評価すること。その際、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しれないリスク」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が望まれる。

- 1 対象疾患
- 2 対象とする被験者及び除外すべき被験者の考え方
- 3 ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等及び併用薬の適用を含めた、被験者に対して行われる治療内容（注：投与・移植した細胞の機能を維持・向上・発揮させるために併用する薬剤が想定される場合、当該薬剤の作用を *in vitro* あるいは *in vivo* で検証すること）。
- 4 既存の治療法との比較を踏まえた臨床試験実施の妥当性
- 5 現在得られている情報から想定される製品並びに患者のリスク及びベネフィットを含め、被験者への説明事項の案

なお、臨床試験は、適切な試験デザイン及びエンドポイントを設定して実施する必要があり、目的とする細胞・組織の由来、対象疾患及び適用方法を踏まえて適切に計画すること。

医 薬 審 第 3 2 9 号

平成 1 2 年 2 月 2 2 日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生省医薬安全局審査管理課長

「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

近年、優れた新医薬品の地球的規模での研究開発の促進と、患者への迅速な提供を図るため、承認審査資料の国際的ハーモナイゼーション推進の必要性が指摘されている。

このような要請に応えるため、日・米・EU三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議（ICH）が組織され、品質、安全性及び有効性の3分野でハーモナイゼーションの促進を図るための活動が行われている。

本ガイドラインは、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、ICHにおける三極の合意事項に基づき、その標準的と思われる方法を示したものである。

貴管下関係業者に対し周知方よろしくご配慮願いたい。

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

目次

I. 緒言	1
II. ウイルス汚染の可能性	2
A. マスター・セル・バンク (MCB) にウイルスが存在する可能性	2
B. 医薬品製造過程で迷入する可能性	3
III. 細胞株適格性試験：ウイルス試験	3
A. マスター・セル・バンク (MCB)、ワーキング・セル・バンク (WCB) 又は医薬品製造のために <i>in vitro</i> 細胞齢の上限にまで培養された細胞 (CAL) におけるウイルス試験	3
1. マスター・セル・バンク	3
2. ワーキング・セル・バンク	3
3. 医薬品製造のために <i>in vitro</i> 細胞齢の上限にまで培養された細胞 (CAL)	4
B. ウイルス検出及び確認のために推奨される試験	4
1. レトロウイルス試験	4
2. <i>In vitro</i> 試験	5
3. <i>In vivo</i> 試験	5
4. 抗体産生試験	5
C. ウイルスが検出された細胞株の使用について	5
IV. 未加工／未精製バルクにおけるウイルス試験	5
V. ウイルスクリアランス試験と精製バルクにおけるウイルス試験の意義、考え方及び実施要領	6
VI. ウイルスクリアランスの工程評価及び工程特性解析	9
A. ウイルスクリアランスの工程評価及び工程特性解析のためのウイルスの選択	10
1. 「関連ウイルス」と「モデルウイルス」	10
2. その他の留意事項	11
B. ウイルスクリアランスの工程評価試験及び工程特性解析試験のデザインと実施要領	11
1. 施設とスタッフ	11

2. 製造システムのスケールダウン11
3. ウイルス不活化／除去に関する製造段階毎の解析12
4. 不活化と物理的除去の区別12
5. 不活化に関する事前評価13
6. カラムの機能と再利用13
7. 特別な留意事項13
C. ウイルスクリアランス試験の解釈14
D. ウイルスクリアランス試験の限界16
E. 統計17
F. ウイルスクリアランスの再評価が必要な場合17
VII. まとめ 17
用語解説 19

表 1 : 各細胞レベルで 1 度は実施すべきウイルス試験

表 2 : ウイルス試験に用いられるアッセイ法の例とその限界

表 3 : 抗体産生試験において検出されるウイルス

表 4 : ウイルスクリアランス工程評価と精製バルクにおけるウイルス試験に関する実施要領

付録 1 : 特性解析されたセル・バンクを *in vivo* で増殖することにより生産される製品

付録 2 : ウイルスクリアランス試験のためのウイルスの選択

表 A-1 : ウイルスクリアランス試験に用いられたことのあるウイルスの例

付録 3 : ウイルス力価測定における統計学とその留意点
低濃度ウイルス液の検出確率

付録 4 : ウイルスクリアランス試験でのクリアランス指数の計算方法

付録 5 : 投与量当たりの推定ウイルス粒子数の計算方法

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

I. 緒言

本文書は、ヒトや動物（哺乳類、鳥類、昆虫類）由来の特性解析がなされた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にかかわる試験及び評価のあり方に関するものである。また、承認申請書に添付されるべきデータの概略を述べたものである。本文書において、ウイルスという用語には、ウシ海綿状脳症（BSE）やスクレーパーに関連する従来の特異にはない伝播因子は含まないものとする。BSEに関しては申請者が規制当局に個別に相談すること。

本文書の適用範囲は、特性解析されたセル・バンクを出発基材とした細胞培養により生産された医薬品とする。適用対象には、インターフェロン、モノクローナル抗体、組換えサブユニットワクチンを含む組換え DNA 技術応用医薬品など、*in vitro* 細胞培養から得られた医薬品が含まれる。また、ハイブリドーマを *in vivo* で増殖し、腹水から得られた医薬品なども含まれる。後者の場合、特別な考慮が必要である。細胞を *in vivo* で増殖して得た製品について検討する際の必要な情報は付録 1 に追加記載されている。不活化ワクチンや自己複製因子を含むすべての生ワクチン、遺伝子工学によって作られた生きたベクターは本文書の適用範囲から除外する。

製品へのウイルス汚染の危険性は、細胞株由来のバイオテクノロジー応用医薬品すべてに共通するものである。そのようなウイルス汚染が発生すれば、臨床的使用において深刻な事態を招く可能性がある。製品のウイルス汚染は、医薬品生産基材としての細胞株自身のウイルス汚染、あるいは製造過程における外部からのウイルスの迷入によりもたらされる可能性があるが、今日まで、細胞株由来のバイオテクノロジー応用医薬品によりウイルス感染が発生したという事例はない。しかし、ウイルス汚染に関するこれらの製品の安全性は、しかるべき方策によって合理的に保証することが望まれる。その方策とは、以下に述べるように、適切なウイルス試験プログラムを適用すること、並びに製造工程におけるウイルス不活化及び除去に関する評価を行うことである。

バイオテクノロジー応用医薬品において発生する可能性があるウイルス汚染を防ぐためには、以下の 3 つの主要な相補的アプローチがある。

- a) ヒトに対して感染性や病原性を示す可能性のあるウイルスの存在を否定するために、細胞株、その他培地成分を含む原材料を選択し、試験すること。
- b) 製造工程の感染性ウイルス不活化／除去能力を評価すること。

c) 製造工程の適切な段階において、製品の感染性ウイルス否定試験を行うこと。

ウイルス試験には、統計的理由により低濃度のウイルスを検出するときの感度がサンプルサイズに依存するなど、定量性の面で固有の限界がある。したがって、それだけで医薬品の安全性を確立するのに十分というアプローチはない。最終製品に感染性ウイルスが存在しないという、より確実な保証は、多くの場合、製品を直接試験して否定することのみでは得られず、その精製法のウイルス不活化／除去能力を併せて示すことによって得られる。

製造の各段階でどのようなウイルス試験及びウイルスクリアランス試験をどの程度実施すべきかは様々な要素により異なるので、ケースバイケースかつステップバイステップの原則で考える必要がある。考慮すべき要素としては、①セル・バンクの特性解析と適格性確認の程度、②検出されたすべてのウイルスの種類・性質、③培地成分、④培養方法、⑤施設及び設備の仕様、⑥細胞培養後のウイルス試験の結果、⑦工程のウイルス不活化／除去能力、⑧製品のタイプや臨床上的使用目的・用法等が含まれる。

本文書の目的は、ウイルス試験及びウイルスクリアランスの評価に必要な試験並びにそれらをどのようにデザインすればよいかについての方策を関係付け、包括的に示すことである。用語解説を末尾に、関連事項を付録に記載した。

製造業者は、それぞれの製品や製造工程について、ウイルスに対する安全性を保証するための総合戦略の中で採用したアプローチを説明し、その妥当性を示す必要がある。その際、本文書で推奨されているアプローチを、合理性がある限り適用すべきである。承認審査を迅速に行うため、詳細なデータに加えて、ウイルス安全性評価に関する総括を記載すること。この総括には、本文書に記載されているようなウイルス汚染を防ぐための方策とウイルス安全性に関する試験すべてを網羅した見解を簡潔に記述する必要がある。

II. ウイルス汚染の可能性

バイオテクノロジー応用医薬品のウイルス汚染は、細胞株に起因するものと製造工程中におけるウイルスの迷入に起因するものがある。

A. マスター・セル・バンク (MCB) にウイルスが存在する可能性

細胞には、潜伏感染又は持続感染状態のウイルス（例えばヘルペスウイルス）、あるいは内在的なレトロウイルスが存在している可能性がある。これは、ウイルスゲノムが細胞内に持続的に保持されているためである。これらのウイルスは1つの細胞世代から次の世代に垂直伝播することができ、細胞内に構成的に発現している、あるいは感染性ウイルスとして予期せぬ発現をしているものと考えられる。

ウイルスは次のような経緯により MCB に混入してくる可能性がある。1) 感染した

動物からの細胞株の入手、2) 細胞株を樹立するためのウイルスの使用、3) 汚染された生物起源由来の試薬（例：動物血清成分）の使用、4) 細胞取扱い中における汚染。

B. 医薬品製造過程で迷入する可能性

外来性ウイルスは、次のような経路により最終製品に迷入する可能性がある（ただし、これに限定されるわけではない）。1) 培養等に使用する血清成分のような生物起源由来の試薬が汚染されている、2) 目的タンパク質をコードする特定の遺伝子の発現を誘導するためのウイルスの使用、3) 精製等に使用するモノクローナル抗体アフィニティクロマトグラフ用カラムのような試薬が汚染されている、4) 製剤化に使用する添加剤が汚染されている、5) 細胞及び培養液の取扱い中における汚染。なお、細胞培養パラメータをモニターすれば、外来性ウイルスの汚染の早期発見に役立つ。

III. 細胞株適格性試験：ウイルス試験

バイオテクノロジー応用医薬品の製造に用いる細胞株の適格性試験において、ウイルス試験は重要な項目の1つである。

A. マスター・セル・バンク (MCB)、ワーキング・セル・バンク (WCB) 又は医薬品製造のために *in vitro* 細胞齢の上限にまで培養された細胞 (CAL) におけるウイルス試験

表1に MCB、WCB 又は CAL の各細胞レベルで1度は実施すべきウイルス試験の例を示す。

1. マスター・セル・バンク

MCB においては、内在性及び非内在性のウイルスによる汚染の有無を徹底的に検討する必要がある。ヒト又はヒト以外の霊長類細胞に由来するウイルス汚染は特に安全性上問題となる可能性があるため、これらの細胞をパートナーとするヘテロな融合細胞株については、ヒトを含む霊長類に特有のウイルスを検出するための試験を実施すること。

非内在性ウイルスの存在の有無を検討するには、*in vitro* 試験、*in vivo* 試験、及びその他細胞種特異ウイルス試験（マウス抗体産生 (MAP) 試験のような種特異性試験を含む）が必要である。細胞種特異ウイルス試験とは、細胞株個々の継代経歴から混入が予測されるウイルスを検出するために適した試験である。

2. ワーキング・セル・バンク

医薬品製造のための出発細胞基材としての各 WCB については、それ自体を対象に、又は WCB を培養した CAL の段階で、外来性ウイルスに関する試験を実施すること。適切な非内在性ウイルスの試験が、WCB のもとである MCB で実施され、かつその WCB に由来する CAL において外来性ウイルスの試験が実施されている場合、同様の試験は当該 WCB では不要である。抗体産生試験は、通常、WCB では不要である。もう1つのア

アプローチとして、WCB について、MCB において必要とされるすべての試験を実施し、MCB における試験の代わりとしてもよい。

3. 医薬品製造のために *in vitro* 細胞齢の上限にまで培養された細胞 (CAL)

医薬品製造に用いる際の細胞の *in vitro* 細胞齢の上限は、医薬品製造のために提案された *in vitro* 細胞齢又はそれを超えて、パイロットプラントスケール又は実生産スケールの条件で培養された製造細胞のデータに基づいて設定すること。この場合、製造細胞は WCB から調製されるのが一般的であるが、MCB から調製してもよい。

内在性ウイルスについては、MCB、WCB で検出されないものもありうるので、CAL で必ず 1 度は、その存在の有無について試験を実施し、評価する必要がある。

なお、CAL について、適切なウイルス試験（例えば *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験）を少なくとも 1 度は実施することによって、製造工程が外来性ウイルスに汚染されていないことがより一層確実になる。この段階で外来性ウイルスが認められた場合、原因を明らかにするため製造工程を厳密に調査し、対応策を講ずること。場合によっては工程を根本的に設計しなおす必要がある。

B. ウイルス検出及び確認のために推奨される試験

内在性ウイルスや外来性ウイルスを検出するための試験には様々なものがある。代表的な試験の例を表 2 に示す。これらは現時点において推奨される方法ではあるが、必ずしもすべての試験法が網羅されているわけではない。また、これらを用いなければならぬと定めたものでもない。最も適切な技術は科学の進歩とともに変わると考えられるので、適切な資料が提出されれば記載されたもの以外でもよい。製造業者は新たに提案する技術について、当局と協議することを勧める。

表 2 に示された試験以外の特殊な試験が必要なケースもある。

試験を実施する際には十分な感度と特異性を確認するための適切なコントロールを置く必要がある。

細胞基材の由来からみて、当該種に特異的に存在する可能性が高い特定のウイルスが予想される場合は、それに対応する試験及びアプローチが必要であろう。製造に用いられる細胞がヒト又はヒト以外の霊長類由来である場合、妥当な理由がない限り、免疫不全症や肝炎などの疾病を引き起こす可能性のあるヒトウイルスに関する試験を追加実施すべきである。NAT 法（核酸増幅法）は、これらのヒトウイルスやその他のウイルスの存在の有無を塩基配列の面から検出するのに適切な方法である。以下には、製造業者が試験の実施計画を立案し、あるいは実施した試験を評価する際、その妥当性を総括し、また、理論的根拠を示す上で参考になる事項を概説する。

1. レトロウイルス試験

MCB と CAL については、感受性細胞を用いた感染性試験と電子顕微鏡観察を含むレトロウイルス試験を行うこと。感染性が認められず、レトロウイルス又はレトロウイルス様粒子が電顕で認められない場合、非感染性のレトロウイルスの有無について検討するため、逆転写酵素活性の試験を含む適切な試験を実施すること。なお、レトロウイルスを試験するための誘導試験（induction）は、有用な方法ではないことが明らかになっ

てきている。

2. *In vitro* 試験

In vitro 試験は、広範囲のヒトウイルスやある種の動物ウイルスを検出することができる感受性を有する各種指示細胞に、被検試料を接種することにより実施する。本試験に使用する細胞の種類は試験対象となるセル・バンクがどのような種由来であるかによって左右されるが、ヒトウイルスに感受性のあるヒト及びヒト以外の霊長類に由来する細胞を含むべきである。どのような試験方法及び被検試料で試験を実施するかは、細胞基材の由来やその調製過程からみて混入の可能性が考えられるウイルスの種類に応じて決定すること。細胞変性及び血球凝集を判定法とするウイルス検査を実施すること。

3. *In vivo* 試験

被検試料（表2）を乳飲みマウス、成熟マウスを含む動物、及び発育鶏卵に接種することにより、細胞培養（*in vitro* 試験）では増殖できないウイルスを検出するための試験である。細胞基材の特性や由来によっては、動物種を追加して試験を実施する場合もありうる。被検動物の健康状態を観察し、異常が認められた場合は、その病因を調査すること。

4. 抗体産生試験

げっ歯類由来細胞株中に存在する可能性がある種特異的ウイルスについては、被検試料（表2）をウイルスフリーの動物に接種し、一定期間後、被検動物血清中の抗体レベルあるいは酵素活性を測定することにより検出できる。例としてマウス抗体産生（MAP）試験、ラット抗体産生（RAP）試験、ハムスター抗体産生（HAP）試験がある。現在、これら抗体産生試験によりスクリーニングされているウイルスを表3に示す。

C. ウイルスが検出された細胞株の使用について

医薬品の製造に用いる細胞株には、内在性のレトロウイルス、その他のウイルス、あるいはウイルス由来の塩基配列を含むことが知られているものがある。そのような場合に製造業者が行うべき対応策が本文書の第V章に記載されている。内在性のレトロウイルス以外のウイルスが存在する細胞株の使用の可否は、ケースバイケースで規制当局が考慮することになるが、その際、製品のベネフィットや予定される臨床上的用途、混入するウイルスの種類・性質、ヒトへの感染性又は病原性、製品の精製工程（ウイルスクリアランスに関する評価データ等）、及び精製バルクにおいてどの程度のウイルス試験を実施したかなどに基づくりスク／ベネフィットのバランスを勘案し、判断することになる。

IV. 未加工／未精製バルクにおけるウイルス試験

未加工／未精製バルクは、培養後にハーベストされた細胞及び培養液の単一又は複数のプールからなる。未加工／未精製バルクが必ずしも細胞を含まず培養液からなる場合もあ

る。すなわち、中空糸又は類似のシステムなどの例では、細胞がハーベストとして採取されにくい場合もある。

未加工／未精製バルクとして典型的なサンプルは、培養槽から取り出されたのち処理を行っていないものである。これは、外来性ウイルス汚染の可能性を高確率で検出するのに最も効果的な段階の1つである。ウイルス試験はこの未加工／未精製バルクの段階で適切に実施されるべきである。ただし、ごく一部工程を進めることによってウイルス試験がより高感度に行える場合には、この限りではない（例：未加工／未精製バルクがウイルス試験に用いる培養細胞に毒性を示すが、部分的に処理したバルクにおいては毒性を示さないようなケース）。培養槽から取り出されたそのままの細胞、破碎細胞及び培養上清からなる混合物を、処理を施すことなく試験することが、より適切な場合もある。

承認申請時には、パイロットプラントスケール又は実生産スケールから得た未加工／未精製バルクの少なくとも3ロットのデータを申請資料の一部として提出する必要がある。

なお、以降の各製造バッチ中の外来性ウイルスについても、製造業者が引き続き評価するための計画を作成することが望まれる。この未加工／未精製バルクにおけるウイルス試験の範囲、程度及び頻度を決定するにあたっては、以下のような諸点を考慮する必要がある。例えば、目的産物を生産するために用いられる細胞株の種類・性質、細胞株の適格性試験のため実施されたウイルス試験の程度と試験結果、培養方法、原材料の起源とウイルスクリアランス試験の結果などである。未加工／未精製バルクにおける試験として一般に用いられているのは、1種又は数種の細胞株を用いる *in vitro* スクリーニング試験である。なお、適宜、NAT法その他の適切な試験法を用いるとよい。

一般に、外来性ウイルスが検出されたハーベストは、医薬品等を製造するために用いるべきではない。もしこの段階で何らかの外来性ウイルスが検出されたならば、その汚染の原因を突きとめるために製造工程を注意深く点検し、適切な対応をとるべきである。

V. ウイルスクリアランス試験と精製バルクにおけるウイルス試験の意義、考え方及び実施要領

MCB から医薬品製造の様々な段階を経て最終製品に至る間において、それぞれに最も適切で合理的なウイルス試験、及び未加工／未精製バルクからのウイルスクリアランスの評価試験・特性解析試験を実施するためのプロトコールを設定することは重要である。

このうち、ウイルスクリアランス評価試験と特性解析試験は、特に中心的な役割を果たす。プロトコールの設定にあたっては、製品がウイルスに汚染されていないことを最も確実に、かつ合理的に保証することを目標とするべきである。

クリアランス試験に用いるウイルスを選定するにあたって、存在することが知られているウイルスを除去する能力について製造工程を評価する必要がある場合と、「非特異的モデルウイルス」（後述）を用い製造工程のウイルスクリアランスに関する特性を解析する

ことにより工程のもつクリアランス能力 (robustness) を評価したい場合とを区別して考えた方がよい。「関連 (relevant) ウイルス」、「特異的 (specific) モデルウイルス」及び「非特異的 (non-specific) モデルウイルス」の定義については、用語解説を参照のこと。ウイルスクリアランスの工程評価にあたっては、①未加工／未精製バルク等の製造工程中にウイルスがどれだけの量存在するか、②製造工程でウイルスがどの程度不活化／除去され、生産物の安全性を評価できるか、に関する知見が必要である。不活化工程の効果を保証するために、不活化の時間依存性を調べることは有用である。存在することが知られているウイルスのクリアランスを評価する場合には、不活化の時間依存性に関する詳細な検討、不活化／除去の再現性の実証、及びプロセスパラメータの評価が必要である。「非特異的モデルウイルス」を用いて製造工程のもつクリアランス能力の特性を解析する場合には、試験デザインの際に、非エンベロープ型ウイルスの使用を考慮することが必要である。ウイルスクリアランス工程特性解析試験をどの程度まで行うかは、細胞株及び未加工／未精製バルクに関するウイルス試験結果により判断されなければならない。これらの試験は後述 (第VI章) のごとく実施されるべきである。

表4は、細胞及び未加工／未精製バルクについてのウイルス試験の結果に対応したウイルスクリアランス工程評価試験、ウイルスクリアランス工程特性解析試験及び精製バルクにおけるウイルス試験に関する実施要領を示している。様々なケースが想定されるが、以下のすべてのケース (A、B、C、D、E) において、「非特異的モデルウイルス」を用いたクリアランスの特性解析を実施するべきである。最も一般的なケースは、ケースAとケースBである。げっ歯類のレトロウイルス以外のウイルスに汚染されたケースは、通常、医薬品の製造方法としては使用しない。ケースC、D又はEにあたる細胞株を用いて医薬品製造を行おうとする場合で、その必要性が認められ、かつ理由を十分に説明できるという場合は、その使用について規制当局と協議すべきである。ケースC、D及びEの場合、当該ウイルスを有効に不活化／除去することが検証された工程を、製造工程中に有していることが重要である。

ケースA：細胞又は未加工／未精製バルク中にウイルス、ウイルス様粒子又はレトロウイルス様粒子のいずれの存在も認められないケースである。本ケースでは前述のごとく、ウイルスの不活化／除去の検討は「非特異的モデルウイルス」を用いて実施すること。

ケースB：げっ歯動物のレトロウイルス (又は、げっ歯動物のA型粒子及びR型粒子のような非病原性であるとされているレトロウイルス様粒子) のみが細胞又は未加工／未精製バルク中に存在するケースである。本ケースでは、マウス白血病ウイルス (Murine Leukemia Virus) 等の「特異的モデルウイルス」を用いた工程評価試験が実施されるべきである。

精製バルクについては、当該ウイルスに対する高い特異性と感度を有する適切な検出方法を用いて試験すること。承認申請の際には、パイロットプラントスケール又は実生産スケールで製造された少なくとも3ロットの精製バルクに関するウイルス試験データを提出すること。CHO、C127、BHK等の細胞株、及びネズミのハイブリドーマ細胞株は医薬品製造にしばしば用いられているが、ウイルス汚染に起因する安全上の問題は報告

されていない。これらの細胞株の内在性レトロウイルス様粒子は十分に解析されており、クリアランスも示されていることから、精製バルクでの内在性レトロウイルス様粒子に関する試験は、通常、不要である。ケースAに述べたような「非特異的モデルウイルス」を用いた検討は、実施する必要がある。

ケースC：細胞又は未加工／未精製バルク中に、げっ歯類のレトロウイルス以外のウイルスが存在しているが、ヒトへの感染性は知られていないケースである（表3、脚注2で特定されているもの等で、げっ歯類動物のレトロウイルス（ケースB）以外のもの）。本ケースでウイルスの不活化／除去の工程評価試験を行う際には、存在しているウイルスそのものを用いること。そのウイルスを用いることが不可能な場合、「関連ウイルス」又は「特異的モデルウイルス」を使用し、クリアランスの程度が受け入れられるに足るものであることを示すこと。工程評価試験には、これらのウイルスの不活化試験が含まれるべきであり、そのうちの特に重要な不活化工程においては、同定されたウイルス（又は「関連／特異的モデルウイルス」）の不活化の時間依存性に関してデータを得ること。

精製バルクについては、当該ウイルスに対する高い特異性と感度を有する検出方法を用いた試験を実施すること。承認申請の際には、パイロットプラントスケール又は実生産スケールで製造された少なくとも3ロットの精製バルクに関するウイルス試験データを提出すること。

ケースD：ヒトへの病原性が知られているウイルス（表3、脚注1などに示されたもの）が細胞又は未加工／未精製バルク中に検出され、同定されたケースである。本ケースからの製品は、例外的な場合のみ認められることになる。この場合、検出されたウイルスそのものをウイルス不活化／除去の評価試験に用いること、及び当該ウイルスに対する高い特異性と感度を有する検出方法を用いることを推奨する。検出されたウイルスそのものを使用することができない場合は、「関連ウイルス」や「特異的モデルウイルス」を使用すること。精製工程及び不活化工程において当該ウイルスが不活化／除去されることを証明すること。工程評価試験には当該ウイルスの不活化工程を含み、そのうちの特に重要な不活化工程においては、不活化の時間依存性に関してデータを得ること。

精製バルクについては、当該ウイルスに対する高い特異性と感度を有する適切な検出方法を用いた試験を実施すること。承認申請の際には、パイロットプラントスケール又は実生産スケールで製造された少なくとも3ロットの精製バルクに関するウイルス試験データを提出すること。

ケースE：現在適用可能な方法によっては分類することができないウイルスが細胞又は未加工／未精製バルクに検出された場合、そのウイルスに関して病原性が示されることもありうるので、その生産物は、通常、認められないと考えられる。極めて希なケースとして、そのような細胞株を用いた医薬品製造を行おうとする場合で、その必要性が認められ、かつ理由を十分に説明できるという場合であっても、開発を進める前に規制当局と協議するべきである。

VI. ウイルスクリアランスの工程評価及び工程特性解析

ウイルス不活化や除去に関する工程評価と工程特性解析は、バイオテクノロジー応用医薬品の安全性を確立するために重要である。過去におけるウイルス汚染の事例の多くは、存在が知られていない、あるいは予測だにされていなかったウイルスにより引き起こされている。こうした過去の事例は、様々な起源に由来する生物起源由来製品で起こったことであって、十分に特性解析された細胞株での例ではない。しかし、十分に特性解析された細胞株由来の製品においても、ウイルススクリアランスに関する評価を行っておくことは、未知の、あるいは不測の有害ウイルスを除去できることへの一定限の保証になる。ウイルススクリアランス試験の実施にあたっては、試験の計画、経過、結果及び評価を文書化するとともに、試験の管理を十分に行う必要がある。

ウイルススクリアランス試験の目的は、ウイルス不活化や除去に有効であると考えられる工程について評価すること、及びそれらの各工程を併せて、全体としてウイルスがどの程度減少したかを定量的に評価することにある。この目的を達成するには、未加工／未精製バルクや製造工程における様々な段階に、しかるべき量のウイルスを意図的に添加（スパイク）し、以降のそれぞれの工程を経る間に、添加されたウイルスがどの程度除去又は不活化されるかを示す必要がある。もし、いくつかのステップにより十分なクリアランスが示されるのであれば、必ずしも製造工程のすべての工程について工程評価又は工程特性解析する必要はない。しかし、評価対象以外のステップが、ウイルスの不活化／除去に関する結果に、間接的に影響を与える可能性についても留意しておくべきである。製造業者は、ウイルススクリアランス試験に用いたアプローチについて説明し、その妥当性を明らかにする必要がある。

ウイルス量（ウイルス感染性）は、ウイルス粒子の除去又はウイルス感染性の不活化により減少する。ウイルススクリアランスに関して評価の対象とした各製造工程については、ウイルス量減少のメカニズムが不活化によるのか除去によるのかに関して推定し、記載すること。不活化を評価しようとする工程における試験に際しては、時間を変えて検体をサンプリングし、不活化曲線が描けるように計画すべきである（第VI章、B.5参照）。

ウイルススクリアランス工程評価試験は、MCBに存在することが知られているウイルスのクリアランスを証明するために実施される。これに加えて、検出を免れた外来性ウイルス、又は製造工程中に迷入する可能性がある外来性ウイルスのクリアランスに関しても、ある程度の保証を与えるために実施される。減少度は、通常、対数で表わされる。したがって、残存ウイルス量がゼロにまで減少することはない一方で、残存ウイルス量が数学的にみると大きめに減少することもありうる。

上記のような、細胞などに存在が知られたウイルスを対象とするウイルススクリアランス工程評価試験に加えて、それ以外のウイルスを不活化／除去する能力に関する工程の特性を評価する試験を行うべきである。この工程特性解析試験では、細胞などに存在が知られていないか又は存在が予測されていないウイルスで、かつ広範な生化学的・生物物理的性

質を有するウイルスを用いる。その目的は、特定のウイルスの不活化／除去を達成するという目的のものとは異なり、対象とする工程のもつクリアランス能力の特性を解析することにある。どの製造工程がどの程度のウイルス不活化／除去能力を有するのかを明らかにすることが望ましい（第VI章、C参照）。これらの試験は、特定のウイルスによるリスクに対する安全性を評価するために行うわけではない。したがって、クリアランスに関して特定の数値目標が達成される必要はない。

A. ウイルスクリアランスの工程評価及び工程特性解析のためのウイルスの選択

クリアランス工程評価及び工程特性解析に使用されるウイルスとしては、製品を汚染する可能性のあるウイルスと同様とみなされるウイルス、及び一般的にウイルスを排除するためのシステムの能力をテストする目的に適う物理的・化学的に広範な特性を持ったウイルスを選択すべきである。製造業者は、工程評価試験及び工程特性解析試験の目的並びに本ガイドラインに示されたガイダンスに従って、ウイルスの選択の妥当性を説明する必要がある。

1. 「関連ウイルス」と「モデルウイルス」

ウイルススクリアランス試験を実施する上での重要な点は、どのようなウイルスを使用するか決定することである。使用するウイルスは「関連ウイルス」、「特異的モデルウイルス」及び「非特異的モデルウイルス」の3つのカテゴリーに分けられる。

「関連ウイルス」とは、製造工程で使用される細胞基材、その他の試薬類や各種物質に混在することが知られているか、あるいは存在の可能性があるウイルス類と同一又は同種のウイルスで、ウイルススクリアランスに関する工程評価試験に用いられるものである。精製工程や不活化工程がこれら「関連ウイルス」を不活化／除去する能力があることを示す必要がある。この「関連ウイルス」の入手が困難であったり、ウイルススクリアランスに関する工程評価試験にうまく適用できない（例えば、*in vitro* で十分に高力価になるまで培養できない）場合には、代替として「特異的モデルウイルス」を用いることになる。適切な「特異的モデルウイルス」とは、存在が知られている、あるいは存在が疑われるウイルスに密接に関連しているウイルス、すなわち同一の属もしくは科のもので、検出されたウイルスあるいは存在が疑われるウイルスと類似した物理的・化学的性質を有するものである。

げっ歯類由来の細胞株には、通常、内在性レトロウイルス粒子又はレトロウイルス様粒子が存在しており、それらには感染性のもの（C型粒子）又は非感染性のもの（細胞質A型又はR型粒子）がある。それらの細胞由来の生産物については、その製造工程がげっ歯類レトロウイルスを不活化／除去する能力を有していることを明らかにしておく必要がある。このためには、ネズミ由来の細胞の場合、マウス白血病ウイルス（Murine Leukemia Virus）を「特異的モデルウイルス」として用いるとよい。エプスタインバーウイルス（Epstein-Barr Virus、EBV）によりBリンパ球を不死化することで得られたモノクローナル抗体を分泌するヒト細胞株の場合は、その製造工程が（何らかの）ヘルペスウイルスを不活化／除去する能力を有することを明らかにしておくべきである。仮性

狂犬病ウイルス（Pseudorabies Virus）も「特異的モデルウイルス」として使用できる。

ある工程がウイルスの除去や不活化に関して一般にどの程度の能力を有するかを解析することが目的である場合、すなわち当該工程が確実にウイルスクリアランス能力を発揮するという面での特性（robustness）を解析することが目的である場合に実施するウイルスクリアランス特性解析試験では、異なる性質を持つ様々な「非特異的モデルウイルス」を用いる必要がある。

「関連ウイルス」や「特異的モデルウイルス」を用いた試験により得られたデータが、こうした面での評価資料として利用できる場合もある。ウイルスタイプのすべてにわたって試験する必要はない。物理的処理や化学的処理に対して特に抵抗性を示すウイルスを優先して選択するべきである。それらのウイルスにより得られた結果は、製造工程のウイルス不活化／除去能力に関する一般的で有益な情報となる。どのようなウイルスを何種類選択するかは、細胞株の品質とこれをどう解析したかやどのような製造工程であるかに依存する。

広範囲な物理的・化学的構造を示す有用なモデルウイルスの例、及び過去にウイルスクリアランス試験に使用された実績のあるウイルスの例を付録2と表A-1に示す。

2. その他の留意事項

その他の留意点は以下のとおりである。

- a) 高力価の材料が調製できるウイルスが望ましい。ただし、これがいつも可能であるとは限らない。
- b) 使用するそれぞれのウイルスの検出に関して、試験対象の各製造工程において、効果的で信頼性の高いアッセイ法が確立されている必要がある。
- c) ウイルスの選択にあたっては、クリアランス試験従事者に健康被害をもたらす可能性を考慮するべきである。

B. ウイルスクリアランスの工程評価試験及び工程特性解析試験のデザインと実施要領

1. 施設とスタッフ

製造施設にウイルスを持ち込むことは、GMP上からみて適切ではない。したがって、ウイルスクリアランス試験は、ウイルスを取り扱う上で適切な設備を備えた別の実験施設で行われるべきである。また、精製工程のスケールダウンを設計し、準備に関与した製造担当者とうイルスの専門知識を有する者が共同して試験を実施するべきである。

2. 製造システムのスケールダウン

スケールダウンの妥当性を明らかにすること。スケールダウンした精製工程の各要素は、実際の製造工程をできるかぎり反映したものとすべきである。クロマトグラフ装置については、カラムベッド高、線流速、ベッド容量に対する流速の比率（すなわち接触

時間)、緩衝液やカラム充填材の種類、pH、温度、タンパク濃度、塩濃度及び目的物質濃度のすべてに関して、実生産スケールにおける製造のそれに相応していることを示す必要がある。また、溶出のプロフィールも同様のものが得られなければならない。同様な考え方をその他の工程についても適用すること。やむを得ない事情により実際の製造工程を反映させることができない場合には、それが結果へどのような影響を及ぼすかを考察しておくべきである。

3. ウイルス不活化／除去に関する製造段階毎の解析

ウイルスクリアランス試験を行う際、2 つ以上の製造工程について、それらがどのようなウイルス不活化／除去能力を有するかを評価することが望ましい。ウイルスを不活化／除去することが予想される工程について、その能力を個々に評価し、それぞれが不活化工程なのか、除去工程なのか、あるいは不活化／除去いずれにも関与しているのかを慎重に検討・考察する必要がある。各工程での効果を適切に評価するために、試験に供する各工程段階の試料には十分な量のウイルスを添加するべきである。通常は、試験対象となる各段階の出発物質（前段階から得られた工程内各中間製品）にウイルスを添加する。場合によっては、未加工／未精製バルクに高力価のウイルスを添加し、工程間のウイルス濃度を試験することで十分である。ウイルス除去が分離操作による場合で、適切かつ可能な場合には、ウイルスがどのように分離・分画されたのかを検討することが望ましい。殺ウイルス能を有するような緩衝液を製造工程中で2 つ以上の段階にわたって用い、スパイク試験を行うような場合、並行して殺ウイルス能の低い緩衝液を用いてスパイク試験を行うというような方策をとり、これを総合評価の一部に加えてもよい。試験対象である各工程段階を経る前と経た後で、ウイルスの力価を測定すること。感染性を定量するためのアッセイは十分な感度と再現性を有する必要がある。その結果に関して統計的に適切で妥当な処理が行えるよう、十分な測定サンプル数で実施すること。感染性を指標としない定量試験も、その妥当性を明らかにした上で使用してもよい。感染性試験を行う際には常に、感度を保証するために、適切なウイルスコントロールを含むべきである。また、低濃度のウイルス試料（例えば、ウイルス粒子数が1L 当たり1~1000）を取り扱う場合、ウイルス試料のサンプリングの仕方によって生じる統計学上の問題を考慮に入れるべきである（付録3参照）。

4. 不活化と物理的除去の区別

ウイルスの感染性はウイルスの不活化又は除去によって低減する。評価対象の各工程におけるウイルス感染性低減の機序が不活化によるのか、除去によるのかを推測し、記述すべきである。もし、ウイルスクリアランスが製品の安全性確保にとって重要な因子と考えられるにもかかわらず、（既存の）製造工程では感染性に関するクリアランスが少ししか達成されない場合には、状況に応じて特別な不活化／除去工程あるいは付加的な不活化／除去工程を導入するべきである。

特定の工程に関して、除去と不活化を区別する必要がある場合もある。例として、複数のクリアランス工程で使用される緩衝液が、各工程の不活化に寄与する可能性が挙げられる。この場合、これらのクロマトグラフィー工程において共通に使用される緩衝液による不活化への寄与分と、クロマトグラフィー工程の各々によって達成される除去と

は区別されるべきである。

5. 不活化に関する事前評価

ウイルスの不活化を評価するためには、未加工／未精製の原材料（未加工／未精製バルク）あるいは中間製品に感染性のウイルスをスパイクし、減少度を計算すべきである。ウイルスの不活化は単純な1次反応でなく、通常、速い「第1相」と遅い「第2相」から構成される複雑な反応であることに留意すべきである。それゆえ、試験に際しては、時間を変えて検体をサンプリングし、不活化曲線が描けるように計画すべきである。不活化試験においては、最短曝露時間でのポイントに加えて、曝露ゼロ時より長く、かつ最短曝露時間よりも短い時間でのポイントを少なくとも1点はとることを勧める。

試験対象としているウイルスが、ヒトへの病原性が知られている「関連ウイルス」である場合には、その不活化に効果的な工程をクリアランス試験に組み込むよう計画し、さらに詳しいデータ（より多数のポイント）をとることが、特に重要である。

一方、「非特異的モデルウイルス」を用いた不活化試験、あるいは「特異的モデルウイルス」を使用する不活化試験でも、CHO細胞の細胞質に存在するレトロウイルス様粒子のようなウイルス粒子に対する代替ウイルスを用いるという場合には、少なくとも2回の独立した試験を実施して、クリアランスにおいて再現性があることが示されればよい。

ウイルス負荷量は、可能な限り、スパイクした出発物質中のウイルス量の実測値に基づいて定めるべきである。これが不可能な場合、スパイクに用いられるウイルス溶液の力価からウイルス負荷量を算出することになる。

試験対象の工程条件下では不活化があまりにも速く、不活化曲線を作成することができない場合、実際に不活化により感染性が失われていることを、適切な試験系により示す必要がある。

6. カラムの機能と再利用

精製工程に使用するクロマトグラフ用カラムとその他の装置のウイルスを除去する能力は、経時的に、あるいは繰り返し使用した後に変化する可能性がある。カラムを数回使用した後にウイルスクリアランスに関する性能を示す指標が変化しないことを測定することによって、カラムのこのような繰り返し使用ができるかどうかの判断材料が提供される。これらの再使用にあたっては、保持される可能性のあるウイルスは、すべて適切に破壊あるいは除去されていることを保証しておくべきである。例えば、洗浄手順や再生手順でウイルスが不活化／除去されることを証明することによって、そのような保証としてよい。

7. 特別な留意事項

- a) 高力価のウイルスを調製する場合には、凝集を避けるよう注意を払うべきである。さもなくば、物理的除去が過大に評価されたり、不活化が過小に評価され、実際の製造での状況を反映しなくなる可能性が生ずる。
- b) 評価に値するウイルスアッセイ結果が得られるような最小ウイルス量に留意すべき

である。

- c) 力価を測定するにあたっては、測定に至るまでの試料の希釈、濃縮、濾過あるいは保管などによりウイルス感染性が減少するかどうかを評価するため、並行したコントロール実験を含むべきである。
- d) 添加（スパイク）するウイルスは、製品の変えたり希釈することがないように少ない容量で製品に添加されるべきである。希釈された試験試料中のタンパク質は、実生産スケールで得られる製品中のそれと全く同一とはいえないからである。
- e) 例えば、緩衝液、培地あるいは試薬類におけるわずかな相違が、ウイルスクリアランスに大きな影響を及ぼす可能性についても留意すべきである。
- f) ウイルスの不活化は時間に依存するので、スパイクされた試料が特定の緩衝液あるいは特定のクロマトグラフ用カラム内に存在する時間の長さは、商業生産スケールの工程条件を反映したものであるべきである。
- g) 緩衝液や製品は指示細胞に望ましくない影響を及ぼす可能性がある。したがって、これらのウイルス力価測定法に対する毒性作用又は干渉作用をそれぞれ個別に評価して、測定に支障のないような対策を講ずるべきである。緩衝液が指示細胞に対して毒性を有する場合は、希釈、pHの調整、あるいはスパイクウイルスを含む緩衝液の透析等を試みるとよい。製品そのものが抗ウイルス活性を持っている場合、疑似的なアプローチ（mock run）、すなわち製品そのものは含まない条件下でのクリアランス試験を実施する必要がある。しかし、製造工程によっては、製品を除去すること又は抗ウイルス活性を持たない類似タンパク質で代替することがウイルスの挙動に影響することもありうる。また、例えば、透析、保存など、測定試料調製の手順による影響をみるために、同様な調製手順を経るコントロール試験も実施する必要がある。
- h) 同様な緩衝液又はカラムを複数の精製工程で繰り返し使用するケースでは、データを解析する際に、この繰り返し使用の影響を考慮すべきである。ウイルス除去の効果は、その方法が使用される製造工程の段階により変化する可能性があることに留意する必要がある。
- i) 総ウイルスクリアランス指数は、製造条件が非常に強い殺ウイルス性を有している場合、あるいは緩衝液などが指示細胞に対し非常に強い毒性や殺ウイルス性を有している場合には過小評価される可能性があるため、ケースバイケースの考え方に立脚して議論されるべきである。逆に、総ウイルスクリアランス指数は、ウイルスクリアランス試験に固有の限界ないしは不適當な試験計画のために過大評価される場合もあることに留意する必要がある。

C. ウイルスクリアランス試験の解釈

試験の適格性（試験結果の妥当性評価）

ウイルスの不活化／除去に関する評価の目的は、ウイルス不活化や除去に有効であると考えられる工程について工程評価及び工程特性解析すること、並びにそれらの各工程を併せて、全体としてウイルスがどの程度減少したかを定量的に評価することにある。ケースBからEのようにウイルス汚染がみられる場合、当該ウイルスが排除あるいは不活化されたということのみでなく、ウイルスクリアランスに関して必要な程度を上まわる能力が精製工程に組み込まれていて、最終製品の安全性が適切なレベルに確保されていることを示すことが重要である。製造工程により除去され、あるいは不活化されたウイルスの量は、未加工／未精製バルク中に存在が推定されるウイルス量と比較されるべきである。

比較をする上で、未加工／未精製バルク中のウイルス量を測定することが重要である。この測定値は、感染性の測定あるいはその他の方法、例えば電子顕微鏡（TEM）により、得られるべきである。精製工程全体を通して評価した場合、1回の臨床投与量に相当する未加工／未精製バルク中に存在すると推定されるウイルス量をはるかに上まわる量のウイルスを、排除することができなければならない。ウイルスクリアランス指数の計算に関しては付録4を参照すること。また、投与量当たりの推定粒子数の計算に関しては付録5を参照すること。

クリアランスの機構はウイルスの種類によって異なる可能性があることを認識する必要がある。

ウイルス不活化／除去工程の有効性に関するデータを評価する際には、以下のような様々な要因を組み合わせる必要がある。

- 1) 試験に使用されたウイルスの適切さ。
- 2) クリアランス試験のデザイン。
- 3) 対数で表されるウイルス減少度。
- 4) 不活化の時間依存性。
- 5) ウイルス不活化／除去に関するプロセスパラメータのばらつきによる影響。
- 6) ウイルスアッセイ法の感度。
- 7) ある不活化／除去工程が特定種類のウイルスに特に有効である可能性。

ウイルスクリアランスは、例えば、不活化工程が2段階以上ある場合、相互補完的分離工程が複数ある場合、あるいは不活化及び分離工程が複数組み合わせられたような場合に効果的に達成される。

分離工程においては、個々のウイルスが持つ際だって特異的な物理的・化学的特性がゲルマトリクスとの相互作用や沈降特性にどのように影響するのかに大きく依存する場合がある。そのため、モデルウイルスが目的ウイルスとは異なる機序により分離される可能性がある。

分離に影響するパラメータにはどのようなものがあるかを明らかにして、これらを適切に管理する必要がある。

糖鎖付加のようなウイルスの表面特性の変化によって、分離状況に違いが生ずる可能

性がある。

しかしながら、こうした変動要因にもかかわらず、相互補完的分離工程の組み合わせ、あるいは不活性化工程と分離工程との組み合わせにより、効果的なクリアランスが達成される。したがって、クロマトグラフィー工程、濾過工程及び抽出工程等のような分離工程で、十分に吟味してデザインしたものは、適切にコントロールされた条件下で操作を行った場合、効果的なウイルス除去工程となりうる。ウイルスクリアランス工程として有効であることを示すためには、少なくとも2回以上の独立した試験により添加ウイルス量の低減に再現性があることを立証する必要がある。

総クリアランス指数は、通常、個々のクリアランス指数の総和として示される。しかし、ウイルス力価の除去が $1 \log_0$ 以下の場合には、合理的な理由がない限り加算しない。

ウイルスクリアランスが製品の安全性確保にとって重要な因子と考えられるにもかかわらず、製造工程による感染性に関するクリアランスの達成度が不十分である場合には、1つ又は複数の特別な不活性化／除去工程あるいは追加的な不活性化／除去工程を新たに導入すべきである。製造業者は、得られたクリアランス指数が受け入れ可能かどうかについて、関係するすべてのウイルスを念頭において評価し、その妥当性を示すべきである。その際、得られた結果の評価は、以上に述べられた要因に基づいて行うことになる。

D. ウイルスクリアランス試験の限界

ウイルスクリアランス試験は、最終製品がウイルス安全面からみて受け入れられるレベルに達しているという確証を得るのに寄与はするが、それそのものが安全性を保証するわけではない。また、ウイルスクリアランス試験のデザインや実施にかかわる様々な要因が、製造工程のウイルス感染性除去能力について誤った評価に導くおそれもある。このような要因には以下のものがある。

1. 製造工程のクリアランス試験に使用されるウイルス標品は、通常、組織培養で製造される。製造工程中において、組織培養ウイルスの挙動は、自然界に存在するウイルスの挙動とは異なっている可能性がある。例えば、自然界に存在するウイルスと培養ウイルスとでは純度や凝集の程度が異なっている場合がある。
2. ウイルス感染性の不活性化は、しばしば急速な初期相とそれに続く遅い相からなる2相性の曲線を示す。そのような工程で不活性化を免れたウイルスは、次の不活性化工程でより強い抵抗力を示す可能性がある。例えば、抵抗性画分が凝集形態をとるとすれば、各種化学的処理や熱処理に対しても抵抗力を示す可能性がある。
3. 総クリアランス指数は、対数で表された各精製段階での減少度を加算することにより算出される。しかし複数の工程、特にほとんど減少を伴わない工程（例えば $1 \log_0$ 以下の工程）の減少度を加算すると、工程全体を通してのウイルス除去能力を過大評価してしまう可能性がある。なお、同一又は近似した方法を繰り返して達成されたクリアランス指数は、合理的な理由がない限り加算するべきでない。

4. ウイルス力価の減少度を対数で表してクリアランス指数とするため、残存感染性ウイルス量が著しく低減することは示されるが、力価は決してゼロにはならないという限界がある。例えば、1mL 当たり $8 \log_{10}$ 感染単位を含む標品から感染性が $8 \log_{10}$ 低減したとしても、試験の検出限界をも考慮すれば、1mL 当たりゼロ \log_{10} 、すなわち 1 感染単位を残していることになる。
5. スケールダウンした工程のデザインに万全を期したとしても、実生産スケールとスケールダウン工程に違いが生じる可能性がある。
6. 製造工程中の類似の不活化機構で得られた各ウイルスクリアランス指数を加算することにより総クリアランス能を過大評価する可能性がある。

E. 統計

ウイルスクリアランス試験における結果の評価にあたっては統計学的手法を活用してデータを解析する必要がある。また、得られた結論が支持されるためには、試験結果の妥当性が統計学的に検証されたものである必要がある（付録 3 参照）。

F. ウイルスクリアランスの再評価が必要な場合

生産工程又は精製工程を変更する場合には、必ず、その変更がウイルスクリアランス能力に関して、直接又は間接に影響しないかを考慮し、必要に応じてシステムを再度検証する必要がある。例えば、生産工程を変更すると、細胞株によって生み出されるウイルス量に重大な変化を引き起こす可能性がある。また、精製工程を変更すると、ウイルスクリアランスの程度が変わる可能性がある。

VII. まとめ

このガイドラインは、ウイルス汚染の危険性を評価し、製品からウイルスを排除し、もってヒト又は動物細胞由来の安全なバイオテクノロジー応用医薬品を製造するためにどのようなアプローチをすればよいかを示唆している。また、そのうち特に重要な方策を以下に示す。

- A. 出発素材である細胞基材につき徹底的な解析とスクリーニングを行い、どのようなウイルス混入があるかを確認すること。
- B. 汚染ウイルスが、どの程度ヒトへの有害性が高いかを決定すること。
- C. 未加工／未精製バルクにおいて外来性ウイルスを検出するための適切な試験計画を設定すること。

- D. 周到なウイルスクリアランス試験計画を立てること。ウイルスクリアランスを最大限達成するために、製造工程中にウイルスの除去／不活化に関する各種の方法を用いること。
- E. ウイルス不活化及び除去を評価する試験を実施すること。

用語解説

***In vitro* 細胞齢 (*In vitro* Cell Age)**

マスター・セル・バンク (MCB) の融解時より、製造容器から培養細胞 (又は培養液) をハーベストするときまでの時間的尺度で、培養期間、細胞数倍加レベル (PDL)、又は培養細胞液を一定の倍数で希釈して継代する場合の細胞継代数で示される。

ウイルス (Virus)

病原性を示す可能性があり、単一のタイプの核酸 (RNA もしくは DNA のいずれか) を有し、成長も 2 分裂もせず、それらの遺伝物質が細胞内で複製する感染単位。

外来性ウイルス (Adventitious Virus)

意図に反して迷入したウイルス。

関連ウイルス (Relevant Virus)

製造工程で使用される細胞基材、その他の試薬類や各種物質に混在することが知られているか、あるいは存在の可能性のあるウイルス類と同一又は同種のウイルスで、ウイルスクリアランス工程評価試験に用いられるもの。

特異的モデルウイルス (Specific Model Virus)

存在が知られている、あるいは存在が疑われるウイルスに、密接に関連しているウイルス。すなわち、同一の属もしくは科のもので、検出されたウイルスあるいは存在が疑われるウイルスと類似した物理的・化学的性質を有するもの。

内在性ウイルス (Endogenous Virus)

本来は、ゲノムが細胞株と同一の生物種のジャームライン (生殖系列の遺伝子) の一部であり、親細胞株の起源動物のゲノム中に共有結合的に組み込まれたウイルス。本文中では、細胞基材を不死化するために用いられたエプスタイン・バーウイルス (Epstein-Barr Virus, EBV) のように意図的に導入され、宿主ゲノムには組み込まれていないウイルス、及びウシパピローマウイルス (Bovine Papilloma Virus) もこの範疇に当てはめる。

非特異的モデルウイルス (Non-specific Model Virus)

製造工程がウイルスの除去や不活化に関して一般にどの程度の能力を有するかを解析する目的、すなわち工程が確実にウイルスクリアランス能力を発揮するという面での特性 (robustness) を解析する目的で行うウイルスクリアランス工程特性解析試験に使用されるウイルス。

非内在性ウイルス (Non-endogenous Virus)

MCB に存在する外来性ウイルス。

ウイルスクリアランス (Viral Clearance)

対象ウイルスを、ウイルス粒子の除去又はウイルス感染性の不活化により排除すること。

ウイルスクリアランス工程特性解析試験 (Process Characterization of Viral Clearance)

製造工程がウイルスの不活化／除去能力を確実に発揮するという面での特性 (robustness) を解析することを目的に、「非特異的モデルウイルス」を用いて行われるウイルスクリアランス試験。

ウイルスクリアランス工程評価試験 (Process Evaluation Studies of Viral Clearance)

存在が知られているか予測されるウイルスに関して製造工程が有する不活化／除去能力を解析することを目的に、「関連ウイルス」や「特異的モデルウイルス」を用いて行われるウイルスクリアランス試験。

ウイルス除去 (Virus Removal)

目的とする製品からのウイルス粒子の物理的分離。

ウイルス様粒子 (Virus-like Particles)

電子顕微鏡下で形態的に既知ウイルスとの関連性がうかがわれる構造体。

外来性ウイルス (Adventitious Virus)

「ウイルス」をみよ。

最短曝露時間 (Minimum Exposure Time)

不活化処理段階における時間設定の根拠となった最大限の不活化に必要な最短時間。実際の製造工程における曝露時間は、最短曝露時間を十分超えた時間として設定される。

細胞基材 (Cell Substrate)

医薬品製造のために用いられる細胞。

製造用細胞 (Production Cells)

医薬品を製造するために用いられている細胞基材。

内在性ウイルス (Endogenous Virus)

「ウイルス」をみよ。

非内在性ウイルス (Non-endogenous Virus)

「ウイルス」をみよ。

不活化 (Inactivation)

化学的又は物理的修飾によって引き起こされるウイルス感染性の減少。

マスター・セル・バンク (MCB) (Master Cell Bank)

単一の細胞プールからの分注液で、一般的には、選択されたクローン細胞株から一定の方法で調製され、複数の容器（アンプルやバイアル）に分注され、一定の条件下で保存される。MCB は WCB を調製するのに用いられる。新たに調製された MCB（前回用いたクローン細胞株、MCB 又は WCB から調製される）について実施される試験は、特に合理的な理由がない限り元の MCB について実施された試験と同じである必要がある。

未加工／未精製バルク (Unprocessed Bulk)

生産培養後にハーベストされた細胞及び培養液の単一又は複数のプール。未加工／未精製バルクは、必ずしも細胞を含むとは限らず、培養液のみからなる場合もある。

ワーキング・セル・バンク (WCB) (Working Cell Bank)

WCB は、MCB から一定の条件で培養して得られる均一な細胞懸濁液を分注して調製される。

表 1. 各細胞レベルで1度は実施すべきウイルス試験

	MCB	WCB ^a	CAL ^b
レトロウイルス及び内在性ウイルス試験			
感染性試験	+	—	+
電子顕微鏡観察 ^c	+ ^c	—	+ ^c
逆転写酵素活性 ^d	+ ^d	—	+ ^d
その他細胞種特異ウイルス試験 ^e	適宜実施 ^e	—	適宜実施 ^e
非内在性ウイルス又は外来性ウイルス試験			
<i>In vitro</i> 試験	+	— ^f	+
<i>In vivo</i> 試験	+	— ^f	+
抗体産生試験 ^g	+ ^g	—	—
その他細胞種特異ウイルス試験 ^h	+ ^h	—	—

a. 第III章、A.2 参照。

b. CAL：医薬品製造のために *in vitro* 細胞齢の上限にまで培養された細胞（第III章、A.3 参照）。

c. 他の因子も検出可能。

d. レトロウイルス感染性試験が陽性のときは不要。

e. 細胞株個々の起源・由来から存在が予測されるウイルスを検出するために適した試験。

f. 第1回目の WCB については、CAL の段階で実施すること。それ以降の WCB については、それ自体又は CAL の段階で *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験をそれぞれ1種類ずつ実施すること。

g. げっ歯類由来細胞株に対する試験の例として、マウス抗体産生（MAP）試験、ラット抗体産生（RAP）試験、ハムスター抗体産生（HAP）試験がある。

h. ヒト由来細胞株、ヒト以外の霊長類由来細胞株あるいはげっ歯類以外の動物由来細胞株である場合は、それぞれの細胞株に適切な試験を適宜実施すること。

表 2. ウイルス試験に用いられるアッセイ法の例とその限界

試験方法	試験検体	検出可能な対象	試験方法としての限界
抗体産生試験	溶解処理後の細胞／培養液	特異的ウイルス抗原	動物に感染性を示さないウイルスの抗原は検出できない
<i>In vivo</i> 試験	溶解処理後の細胞／培養液	ヒトへの病原性を有する広範なウイルス	当該試験系で複製しない又は病原性を示さないウイルスは検出できない
<i>In vitro</i> 試験 適用： 1. セル・バンクの解析 2. 製造工程中での検査	1. 溶解処理後の細胞／培養液（混合培養の場合、試験検体として細胞そのものを用いること） 2. 未加工／未精製バルク又は製造用培養器から採取した培養液／溶解処理後の細胞	ヒトへの病原性を有する広範なウイルス	当該試験系で複製しない又は病原性を示さないウイルスは検出できない
電子顕微鏡観察 1. 細胞基材 2. 細胞培養液上清	1. 生細胞 2. 細胞フリー培養上清	ウイルス及びウイルス様粒子	同定評価法であり定性的である
逆転写酵素活性 (RT)	細胞フリー培養上清	レトロウイルス及び発現されたレトロウイルスの RT	適切な条件下で活性を最大限に発現した酵素のみを検出。細胞由来酵素の活性の存在により評価が困難な場合がある。濃縮された検体ではバックグラウンドが高くなることもある
レトロウイルス (RV) 感染性試験	細胞フリー培養上清	感染性レトロウイルス	当該試験系で複製しない又はフォーカスやプラークを形成しないレトロウイルスは検出できない
混合培養 エンドポイント： 1. 感染性による場合 2. TEM による場合 3. RT による場合	生細胞	感染性レトロウイルス	当該試験系で複製しないレトロウイルスは検出できない 1. 「レトロウイルス (RV) 感染性試験」を参照 2. 「電子顕微鏡観察」を参照 3. 「逆転写酵素活性 (RT)」を参照
NAT 法 (核酸増幅法)	細胞、培養液及びその他の材料	特異ウイルス塩基配列	プライマーの配列と対応する配列の存在が必要である。ウイルスの感染性の有無は示されない

a. 加えて、指標細胞から試験検体を識別することが困難。

表 3. 抗体産生試験において検出されるウイルス

MAP	HAP	RAP
エクトメリアウイルス (Ectromelia Virus) ^{2,3}	リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (Lymphocytic Choriomeningitis Virus、LCM) ^{1,3}	ハンタンウイルス (Hantaan Virus) ^{1,3}
ハンタンウイルス (Hantaan Virus) ^{1,3}	マウス肺炎ウイルス (Pneumonia Virus of Mice、PVM) ^{2,3}	キルハムラットウイルス (Kilham Rat Virus、KRV) ^{2,3}
K ウイルス (K Virus) ²	レオウイルス 3 型 (Reovirus Type 3、Reo3) ^{1,3}	マウス脳脊髄炎ウイルス (Mouse Encephalomyelitis Virus) (Theiler's、GDVII) ²
乳酸脱水素酵素ウイルス (Lactic Dehydrogenase Virus、LDH) ^{1,3}	センダイウイルス (Sendai Virus) ^{1,3}	マウス肺炎ウイルス (Pneumonia Virus of Mice、PVM) ^{2,3}
リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (Lymphocytic Choriomeningitis Virus、LCM) ^{1,3}	SV5	ラットコロナウイルス (Rat Coronavirus、RCV) ²
マウスマイニュートウイルス (Minute Virus of Mice) ^{2,3}		レオウイルス 3 型 (Reovirus Type 3、Reo3) ^{1,3}
マウスアデノウイルス (Mouse Adenovirus、MAV) ^{2,3}		センダイウイルス (Sendai Virus) ^{1,3}
マウスサイトメガロウイルス (Mouse Cytomegalovirus、MCMV) ^{2,3}		唾液腺涙腺炎ウイルス (Sialoacryoadenitis Virus、SDAV) ²
マウス脳脊髄炎ウイルス (Mouse Encephalomyelitis Virus) (Theiler's、GDVII) ²		トールンウイルス (Toolan Virus) (HI) ^{2,3}
マウス肝炎ウイルス (Mouse Hepatitis Virus、MHV) ²		
マウスロタウイルス (Mouse Rotavirus) (EDIM) ^{2,3}		
マウス肺炎ウイルス (Pneumonia Virus of Mice、PVM) ^{2,3}		
ポリオーマウイルス (Polyoma Virus) ²		
レオウイルス 3 型 (Reovirus Type 3、Reo3) ^{1,3}		
センダイウイルス (Sendai Virus) ^{1,3}		
胸腺ウイルス (Thymic Virus) ²		

1. ヒト又は霊長類への感染性が知られているウイルス。
2. ヒトへの感染性が知られていないウイルス。
3. ヒト又は霊長類由来の細胞において *in vitro* で複製できるウイルス。

表 4. ウイルスクリアランス工程評価と精製バルクにおけるウイルス試験に関する実施要領

	ケース A	ケース B	ケース C ²	ケース D ²	ケース E ²
[細胞や未精製バルクでのウイルス試験結果]					
ウイルスの存在 ¹	－	－	＋	＋	(+) ³
ウイルス様粒子の存在 ¹	－	－	－	－	(+) ³
レトロウイルス様粒子の存在 ¹	－	＋	－	－	(+) ³
ウイルスの分離同定の否定	適用外	＋	＋	＋	－
ウイルスのヒトへの感染性	適用外	－ ⁴	－ ⁴	＋	未知
[必要とする対応]					
「非特異的モデルウイルス」を用いたウイルススクリアランス工程特性解析試験	必要 ⁵	必要 ⁵	必要 ⁵	必要 ⁵	必要 ⁷
「関連ウイルス」又は「特異的モデルウイルス」を用いたウイルススクリアランス工程評価試験	不要	必要 ⁶	必要 ⁶	必要 ⁶	必要 ⁷
精製目的産物でのウイルス否定試験	適用外	必要 ⁸	必要 ⁸	必要 ⁸	必要 ⁸

1. 細胞及び未加工／未精製バルクについてのウイルス試験の結果。ウイルスで汚染された細胞／培養液は、通常、使用しない。MCBの構成要素の一部となっているレトロウイルス等の内在性ウイルス又はウイルス類が存在する細胞については、適切なウイルススクリアランス評価試験を行えば、その限りではない。
2. ウイルスに汚染された細胞及び未加工／未精製バルクの使用は、そのウイルスのヒトへの感染性及び病原性の有無にかかわらず、例外的な場合にしか認められない。
3. 未知のウイルス、ウイルス様粒子又はレトロウイルス様粒子を、直接法あるいは間接法で検出。
4. 非病原性とされているケース。
5. 「非特異的モデルウイルス」を用いたウイルススクリアランス工程特性解析試験を実施すること。
6. 「関連ウイルス」又は「特異的モデルウイルス」を用いたウイルススクリアランス工程評価試験を実施すること。
7. 本文中のケースEの項を参照すること。
8. 精製バルクについては、当該ウイルスに対する高い特異性と感度を有する検出方法を用いてウイルスの存在を否定すること。承認申請の際には、パイロットプラントスケール又は実生産スケールで製造された少なくとも3ロットの精製バルクに関するウイルス試験データを提出すること。一方、細胞株における内在性レトロウイルス様粒子が十分に解析され、適切なクリアランスも示されている場合のCHO細胞などの例では、精製バルクでの非病原性レトロウイルス様粒子に関する試験は、通常、不要である。

付録 1

特性解析されたセル・バンクを *in vivo* で増殖することにより生産される製品

特性解析されたセル・バンク由来の細胞を接種した動物から採取した液体原料由来の製品については、動物に関する追加情報を提供する必要がある。

バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品の製造に使用する動物は、可能な限り、適切に規定された特定病原体感染防止条件（SPF：Specific Pathogen-Free）に適合したコロニーから入手する必要がある。これらに対して、表 3 に挙げたようなウイルスのうち適当と考えられるものについて、適切な試験を実施するべきである。新しく入荷した動物や病的状態を示す動物に対する検疫方法についての情報を提供する必要がある。また、施設内で行われているすべての封じ込め、洗浄及び除染方法が、迷入因子の伝播の封じ込めに適切であると保証されている必要がある。この目的を達成するには、しかるべき監視プログラムを利用するとよい。プログラムには試験の実施対象とする迷入因子をリストアップしておくことも必要である。施設内で直接獣医学的な対応が可能かあるいは容易に対応できる状態にしておく必要がある。他の製造施設エリアから動物舎までどの程度隔離されているかについても示されるべきである。職員の業務内容は安全性保証面から適切なものでなければならない。

動物の飼育維持の方法についての詳細な情報を提供する必要がある。これには次のような事項が含まれる。1) 食餌、清掃及び給餌スケジュール、2) 定期的な獣医学的なケアを計画している場合には、その内容、3) ハイブリドーマ等を移植された動物の取扱いにあたって特別なことを必要とする場合には、その内容の詳細。また、動物の前処理法、移植用細胞の調製方法、移植部位及び移植経路も明らかにする必要がある。

動物から直接採取した物は、バイオリクターから採取した未加工／未精製バルクに相応する製造段階のものであると考えられる。したがって、この文書の第 4 章に記述してある試験についての考え方がそのまま適用されるべきである。加えて、製造業者は動物から採取した未加工／未精製バルクの細菌・真菌汚染について評価し、またマイコプラズマに汚染されていないことを確認し、さらに成熟マウス及び乳飲みマウスを用いた *in vivo* 試験及び種特異的ウイルス試験を実施すべきである。

付録 2

ウイルスクリアランス試験のためのウイルスの選択

A. 有用なモデルウイルスの例

1. 「非特異的モデルウイルス」：物理的・化学的構造の異なる様々なウイルスの代表例

SV40 (Polyomavirus maccacae 1)、ヒトポリオウイルス Sabin 1 型 (Human Polio Virus 1 (Sabin))、動物パルボウイルス、その他の小型・非エンベロップ型ウイルス

パラインフルエンザウイルス (Parainfluenza Virus)、インフルエンザウイルス (Influenza Virus)、シンドビスウイルス (Sindbis Virus)、その他の中～大型・エンベロップ型・RNA ウイルス

ヘルペスウイルス (例：HSV-1、仮性狂犬病ウイルス (Pseudorabies Virus))、その他の中～大型・DNA ウイルス

これらのウイルスは単なる例であり、使用を強制するものではない。

2. げっ歯動物の細胞基材の場合には、ネズミ科レトロウイルス類が「特異的モデルウイルス」として、通常、使用されている。

B. ウウイルスクリアランス試験に用いられるウイルスの例

ウイルスクリアランス試験において使用されてきたウイルスを表 A-1 に示している。しかし、これらは単なる例であり、使用を強制するものではない。製造業者は、その他のウイルスの使用を考慮してもよい。特に、個々の製品の製造工程を評価するのに、より適切なウイルスを使用するよう考慮すること。通常、異なる性質を持つ、少なくとも 3 種の異なるウイルスをクリアランスする能力について、製造工程を評価するべきである。

表 A-1. ウイルスクリアランス試験に用いられたことのあるウイルスの例

ウイルス	科	属	宿主	ゲノム	外被	サイズ (nm)	形状	抵抗性*
水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus)	ラブドウイルス科 (Rhabdo)	ベジクロウイルス属 (Vesiculovirus)	ウマ ウシ	RNA	有	70×150	弾丸形	低
パラインフルエンザウイルス (Parainfluenza Virus)	パラミクソウイルス科 (Paramyxo)	パラミクソウイルス属 (Paramyxovirus)	多種	RNA	有	100~200 超	多様/球形	低
マウス白血病ウイルス (MuLV)	レトロウイルス科 (Retro)	C型オンコウイルス属 (Type C Oncovirus)	マウス	RNA	有	80~110	球形	低
シンドビスウイルス (Sindbis Virus)	トガウイルス科 (Toga)	アルファウイルス属 (Alphavirus)	ヒト	RNA	有	60~70	球形	低
ウシ下痢症ウイルス (BVDV)	フラビウイルス科 (Flavi)	ペスチウイルス属 (Pestivirus)	ウシ	RNA	有	50~70	多様/球形	低
仮性狂犬病ウイルス (Pseudorabies Virus)	ヘルペスウイルス科 (Herpes)		ブタ	DNA	有	120~200	球形	中
ポリオウイルス Sabin 1型 (Poliovirus Sabin Type 1)	ピコルナウイルス科 (Picorna)	エンテロウイルス属 (Enterovirus)	ヒト	RNA	無	25~30	正 20 面体	中
脳心筋炎ウイルス (Encephalomyocarditis Virus, EMC)	ピコルナウイルス科 (Picorna)	カルジオウイルス属 (Cardiovirus)	マウス	RNA	無	25~30	正 20 面体	中
レオウイルス 3 型 (Reovirus 3)	レオウイルス科 (Reo)	オルトレオウイルス属 (Orthoreovirus)	多種	RNA	無	60~80	球形	中
SV40	パポーバウイルス科 (Papova)	ポリオーマウイルス属 (Polyomavirus)	サル	DNA	無	40~50	正 20 面体	高
パルボウイルス (Parvoviruses) (イヌ、ブタ)	パルボウイルス科 (Parvo)	パルボウイルス属 (Parvovirus)	イヌ ブタ	DNA	無	18~24	正 20 面体	高

*：物理的・化学的処理に対する抵抗性（過去の製造工程試験の経験に基づいた目安である）。こうした抵抗性は、特定の処理毎に相対的に変わりうるものである。内容的には、製造工程の種類・特性とウイルスの生物学とを勘案して、抵抗性の目安としている。実際の結果は処理毎に変わりうるものである。

なお、ここに掲げたウイルスは単なる例示であり、これらの使用を強制するものではない。

付録 3

ウイルス力価測定における統計学とその留意点

ウイルスの力価測定は、他の生物活性の測定と同様、ばらつきが大きい。ウイルスクリアランス試験を信頼性のあるものとするため、ウイルス力価測定の正確さとその測定値から得られるクリアランス指数の正確さ、並びに試験方法の妥当性を評価する必要がある。統計学的評価の目的は、実施したウイルスクリアランス試験がウイルス学的に適切な水準で実施されていることを裏付けることである。

1. 試験方法は半定量法 (quantal method) の場合と定量法 (quantitative method) の場合がある。半定量法は、動物を用いた感染性試験や TCID 法 (組織培養感染性試験: Tissue-Culture-Infectious-Dose assays) で、動物や培養細胞の感染の有無をスコアする方法である。感染価は、感染した動物や培養細胞の割合で決められる。定量法においては、ウイルス量と測定される感染性は直線的な関係にある。定量法としてはプラーク法などがある。プラーク法では 1 プラークが 1 感染単位に相当する。半定量法、定量法ともに、統計学的評価の対象となる。
2. 試験の変動は、希釈誤差、統計的な要因、及び測定法に固有な未知又は制御不能な要因に由来するばらつきにより生じる。通常、独立して実施した試験間のばらつき (試験間変動) は、1 試験内で得られた結果のばらつき (試験内変動) より大きい。
3. 試験内変動の 95%信頼限界を求めるとき、通常、平均値 $\pm 0.5 \log$ のレベルに収まるようにすること。試験内変動は一般教科書的な方法で計算する。試験間変動は試験にウイルス標品を用いることでモニターできるが、この際のウイルス標品の力価の実測値は、別途、当該試験法を用いて研究室で測定・確立しておいた試験結果の平均値の、およそ $0.5 \log$ 以内であるべきである。妥当な理由があれば、より低い精度の試験も採用できる場合がある。
4. 「関連ウイルス」や「特異的モデルウイルス」を用いたクリアランス試験におけるクリアランス指数の 95%信頼限界も、可能な限り、算出する必要がある。出発材料中のウイルス測定値の 95%信頼限界が $\pm s$ で、工程後のウイルス測定値の 95%信頼限界が $\pm a$ の場合、クリアランス指数の 95%信頼限界は $\pm \sqrt{(s^2 + a^2)}$ である。

低濃度ウイルス液の検出確率

低いウイルス濃度の場合 (例えば、1L 当たりの感染性粒子が 10~1000 の範囲の場合)、数 mL のサンプルでは感染性粒子が含まれない可能性があることは明らかである。このサンプルが感染性粒子を含まない可能性 p は

$$p = ((V - v) / V)^n$$

ここで $V(L)$ は試験対象液の全容量、 $v(L)$ はサンプルの容量、 n は V の中に統計的に分布する感染性粒子の総数とする。

$V \gg v$ の場合、この式はポアソン分布により近似される。

$$p = e^{-cv}$$

ここで c は 1L 当たりの感染性粒子数とする。

$$\text{又は、 } c = \ln p / -v$$

例えば、1mL のサンプルを試験する場合、ウイルス濃度が 1L 当たり 10 から 1000 感染性粒子のときの p 値は、以下のようになる。

c	10	100	1000
p	0.99	0.90	0.37

このことは、1L 当たりウイルス粒子が 1000 の場合、1mL ずつサンプリングしたうち 37% ではウイルス粒子が存在しないことを示している。

サンプルの一部について試験を行い、ウイルスが検出されないときは、サンプル中にどの程度のウイルス量が存在していればポジティブな結果が得られるかについて計算しておくべきである。その値は、クリアランス指数を計算するときに考慮に入れるべきである。信頼限界は 95% であることが望ましい。しかし、これは、サンプルにおける様々な制限のため、実際的とはいえない場合もある。

付録 4

ウイルスクリアランス試験でのクリアランス指数の計算方法

各精製段階あるいは不活化段階のウイルスクリアランス指数は次のように定義される。精製前の試料のウイルス負荷量と次の工程段階に供される精製後の試料のウイルス含有量との比率の常用対数 (\log_{10})。以下の略号を使用した場合

出発試料：容量 V' 、タイター $10^{a'}$ のとき
ウイルス負荷量： $(V') \times (10^{a'})$

最終試料：容量 V'' 、タイター $10^{a''}$ のとき
ウイルス含有量： $(V'') \times (10^{a''})$

各々のクリアランス指数 R_i は次式によって計算される。

$$10^{R_i} = ((V') \times (10^{a'})) / ((V'') \times (10^{a''}))$$

この計算式には、精製工程の開始時及び終了後のタイターと容量が考慮されている。

ウイルスの力価測定は元来、精度が低いため、総クリアランス指数を計算する際には 1 より大きい個々のクリアランス指数を用いるべきである。

製造工程全体にわたる指数としての総クリアランス指数は、個々の製造段階のクリアランス指数の合計である。これは、クリアランス工程の開始段階に負荷されたウイルスと工程クリアランス最終段階におけるウイルス量との比率の常用対数に相当する。クリアランス指数は、通常、対数スケールで表される。この意味するところは、残存するウイルス感染性がゼロになることはないものの、数学的には極めて小さくなるということである。

付録 5

投与量当たりの推定ウイルス粒子数の計算方法

本計算方法は、出発材料に存在するウイルス量を推定できる場合、例えば内在性レトロウイルスに応用できる。

例：

I. 仮説

細胞培養ハーベスト液中のウイルス濃度の測定値又は推定値 = 10^6 / mL

算出されたウイルスクリアランス指数 = $>10^{15}$

1 投与量の目的産物を得るために必要な培養ハーベスト液の量 = 1L (10^3 mL)

II. 1 投与量当たりの推定ウイルス粒子の計算方法

$$\begin{aligned} & \frac{(10^6 \text{ ウイルス粒子} / \text{mL}) \times (10^3 \text{ mL} / \text{投与量})}{\text{クリアランス指数} (>10^{15})} \\ = & \frac{10^9 \text{ 粒子} / \text{投与量}}{\text{クリアランス指数} (>10^{15})} \\ = & <10^{-6} \text{ 粒子} / \text{投与量} \end{aligned}$$

したがって、 10^6 投与量当たり 1 ウイルス粒子未満と予想される。