

令和四年度

次世代医療機器・再生医療等製品  
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

東京大学大学院 工学研究科／医学研究科

鄭 雄一

# 目次

- I. 次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業再生医療審査 WG  
令和四年度委員名簿
- II. 令和四年度 WG 会議議事概要
- III. ヒト (同種) iPS 細胞由来心筋球を用いた重症心不全の治療に関する評価指標 (案)
- IV. ヒト (同種) iPS 細胞由来心血管系細胞多層体を用いた重症心不全の治療に関する  
評価指標 (案)
- V. 調査事項  
iPS 細胞由来心血管系細胞多層体 (IHJ 301) の臨床開発 升本 英利
- VI. 参考資料
  1. 平成 22 年 1 月 18 日付薬食機発 0118 第 1 号厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知  
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」
  2. 平成 23 年 3 月 29 日付薬食審査発 0329 第 18 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知  
別添 「抗心不全薬の臨床評価方法に関するガイドライン」
  3. 平成 24 年 9 月 7 日付薬食発 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関する指針」
  4. 令和元年 6 月 27 日付薬生機審発 0627 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知  
別添 「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関する留意点」
  5. ヒト (同種) iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた虚血性心筋症の治療に関する評価指標 (案) (令和 3 年度次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業)

# I. 次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業

## 再生医療審査WG令和四年度委員名簿

次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業  
再生医療審査WG令和4年度委員名簿

座長

鄭 雄一 東京大学大学院 工学研究科／医学研究科 教授  
神奈川県立保健福祉大学 ヘルスイノベーション研究科 研究科長

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 所長  
岡田 潔 大阪大学 医学部附属病院未来医療開発部再生医療等支援室 副室長  
紀ノ岡 正博 大阪大学大学院 工学研究科生物工学専攻生物プロセスシステム工学領域 教授  
佐野 元昭 慶應義塾大学 医学部内科学教室（循環器） 准教授  
城 潤一郎 大阪歯科大学 歯学部歯科理工学講座 准教授  
前川 裕一郎 浜松医科大学 内科学第三講座 教授  
升本 英利 理化学研究所 生命機能科学研究センター（BDR） 上級研究員  
八代 嘉美 神奈川県立保健福祉大学 ヘルスイノベーション研究科 教授

厚生労働省

飯野 彬 厚生労働省 医薬・生活衛生局 医療機器審査管理課 革新的製品審査調整官  
田辺 江業 厚生労働省 医薬・生活衛生局 医療機器審査管理課 医療機器規制国際調整官  
大場 崇史 厚生労働省 医薬・生活衛生局 医療機器審査管理課 係員

独立行政法人医薬品医療機器総合機構

中村 直子 医薬品医療機器総合機構 再生医療製品等審査部 審査専門員  
大倉 成美 医薬品医療機器総合機構 再生医療製品等審査部 審査役補佐  
小野寺 陽一 医薬品医療機器総合機構 医療機器調査・基準部 部長  
郭 宜 医薬品医療機器総合機構 医療機器調査・基準部 医療機器基準課 課長  
熊谷 康頭 医薬品医療機器総合機構 医療機器調査・基準部 医療機器基準課 調査専門員

オブザーバー

鎮西 清行 産業技術総合研究所 健康医工学研究部門 副研究部門長  
廣瀬 志弘 産業技術総合研究所 健康医工学研究部門 生体材料研究グループ 研究グループ長

国立医薬品食品衛生研究所（事務局）

佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長  
澤田 留美 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 室長  
草川 森士 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 主任研究官  
平井 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 研究員

## II. 令和四年度 WG 会議議事概要

次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業  
再生医療審査 WG 令和 4 年度第一回会議議事録（概要）

1. 開催日時：2022 年 8 月 19 日（金）16 時 00 分～18 時 00 分

2. 開催場所：オフィス東京 L2 会議室

3. 出席者（座長以下委員五十音順・敬称略）

委員：鄭雄一（東京大学）、梅澤明弘（国立成育医療研究センター研究所）、岡田潔\*（大阪大学）、紀ノ岡正博（大阪大学）、佐野元昭\*（慶應義塾大学）、城潤一郎\*（大阪歯科大学）、前川裕一郎\*（浜松医科大学）、升本英利\*（理化学研究所）、八代嘉美\*（神奈川県立保健福祉大学）

厚生労働省：田辺江業、大場崇史

医薬品医療機器総合機構：中村直子\*、大倉成美\*、郭宜\*、熊谷康顕\*

産業技術総合研究所：鎮西清行\*

事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：佐藤陽治、澤田留美、草川森士、平井孝昌

\*Web 参加

4. 配布資料

1. 令和四年度第一回委員会議事次第

2. 令和四年度委員名簿

3. 次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業について

4. 再生医療審査 WG 令和三年度報告とこれまでの評価指標の内容について

5. 講演資料「iPS 細胞由来心血管系細胞多層体(IHJ-301)の臨床開発」(升本委員)

6. 検討事項の確認

7. 「ヒト(同種) iPS 細胞由来心筋細胞球を用いた重症心不全の治療に関する評価指標(案)」(佐野委員)

8. ヒト(同種) iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた虚血性心筋症の治療に関する評価指標(案)

9. 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

## 5. 議事内容

- ①令和4年度の座長及び委員と出席者による自己紹介が行われた。座長・委員は下記の通り（敬称略）

### 座長

鄭雄一 東京大学大学院 工学研究科／医学研究科 教授  
神奈川県立保健福祉大学 ヘルスイノベーション研究科 研究科長

### 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 所長  
岡田潔 大阪大学医学部附属病院未来医療開発部再生医療等支援室 副室長  
紀ノ岡正博 大阪大学大学院 工学研究科生物工学専攻 教授  
佐野元昭 慶應義塾大学 医学部内科学教室（循環器） 准教授  
城潤一郎 大阪歯科大学 歯学部歯科理工学講座 准教授  
前川裕一郎 浜松医科大学 内科学第三講座 教授  
升本英利 理化学研究所 生命機能科学研究センター（BDR）上級研究員  
八代嘉美 神奈川県立保健福祉大学 ヘルスイノベーション研究科 教授

- ②次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業について厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課 田辺医療機器規制国際調整官より説明があった。
- ③令和3年度までの再生医療審査WGの活動内容及び今年度の活動計画について、事務局より説明があった。
- ④升本委員より「iPS細胞由来心血管系細胞多層体(IHJ-301)の臨床開発」について講演頂き、その後質疑応答を行った。
- ⑤事務局より、評価指標（案）作成にあたって検討事項の確認が行われた。
- ⑥佐野委員より、作成された「ヒト（同種）iPS細胞由来心筋細胞球を用いた重症心不全の治療に関する評価指標（案）」について説明がなされた。その後、今年度の活動方針について討議した。討議内容は、以下の通り。
- ✓ 昨年度作成した「iPS細胞由来心筋細胞シート」の評価指標案を参考にして、「心筋球」「心血管系細胞多層体」に特化した内容を入れ込む形で作成する。
  - ✓ 作業分担について
    - ・「非臨床試験」及び「臨床試験（治験）」について
      - iPS細胞由来心筋球：前川委員、佐野委員
      - iPS細胞由来心血管系細胞多層体：升本委員、城委員（基材関係含む）
    - ・「品質」に関わる項目について：梅澤委員、紀ノ岡委員、岡田委員、八代委員、事務局

- ✓ 「iPS 細胞由来心筋球」に関する評価指標案について
  - ・対象疾患としては「重症心不全」とする。
  - ・最終製品は「心筋球」とする。
  - ・「1. はじめに」から「5. 評価に当たって留意すべき事項 (5) 非細胞材料及び最終製品の生体適合性」までについて、討議した。コメント等の概要は以下の通り。
    - \* 「心筋球」に統一 → タイトルを修正
    - \* 5. 評価に当たって留意すべき事項
      - (2) 製造工程において特に注意が必要な事項 c) 最終製品の構成要素となる細胞の作製の 5 行目  
投与液を作製 → 心筋球懸濁液を調製 にされたらどうか？
      - (2) 製造工程において特に注意が必要な事項 e) 細胞培養工程の設定の 3 行目  
「除去するための純化工程」は必要か？ → 「心筋球」においては、シート等と比較して心筋内に深く注入し生着することで効果が期待できるため、安全性の観点からこだわりの部分である → 大変重要な点であるため、「なぜこう考えるのか？」についての背景を書き入れてはどうか？
      - (3) 製品の品質管理 最後の段落
        - 「特性解析」は不要ではないか？
        - マイコプラズマ試験の後に「等」を付けたらどうか？
        - 望ましくない結果が出た場合のマネージメントプランを示したらどうか？ → ここでなくても良いが、適切な箇所。
      - (3) 製品の品質管理 a) 性状、細胞形態の確認
        - 「細胞形態」は b)細胞数及び生存率、細胞形態 でよいのではないか？
        - 「自発的な拍動を確認するための形態観察を行い」 → 拍動する心筋球の頻度や方法等をもう少し具体的に書いてはどうか？
      - (4) 製品の安定性試験 2 段落目の後半  
「また、非凍結状態で輸送する場合の輸送液等も同様であるが、心筋球の長期間の保存は技術的に困難である場合もある。その場合にあっては、一部の試験データの確認を待たずに使用することができる。ただし、その指標の妥当性について明らかにし、後日完全な適格性を確認すること。例えば、追加培養による心筋細胞の特性解析、無菌試験やマイコプラズ



マ試験の実施中に製品を使用する場合、製造工程中の結果等を代替指標とすることでもよい。」

→ この部分は不要ではないかとのコメントがあり、削除する方向。

「(6) 非臨床試験」以降は、次回会議(9/29)で行う予定。

・第二回会議(9/29)までに、今回の討議内容を踏まえて、加筆修正等を行う。

✓ 「iPS細胞由来心血管系細胞多層体」に関する評価指標案について

・第三回会議(11/17)までに、今回の升本委員のご講演を参考にしてたたき台を作成。

#### ⑦今後の会議日程

第二回会議：令和4年9月29日(木) 16～18時 オフィス東京 L2会議室

第三回会議：令和4年11月17日(木) 16～18時 オフィス東京 L2会議室

第四回会議：令和4年12月15日(木) 16～18時 オフィス東京 L2会議室

第五回会議：令和5年1月26日(木) 15～17時 オフィス東京 L2会議室

次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業  
再生医療審査WG 令和4年度第二回会議議事録（概要）

1. 開催日時：2022年9月29日（木）16時00分～18時00分

2. 開催場所：オフィス東京 L2会議室

3. 出席者（座長以下委員五十音順・敬称略）

委員：鄭雄一（東京大学）、梅澤明弘（国立成育医療研究センター研究所）、岡田潔\*（大阪大学）、紀ノ岡正博\*（大阪大学）、佐野元昭\*（慶應義塾大学）、城潤一郎\*（大阪歯科大学）、前川裕一郎\*（浜松医科大学）、升本英利\*（理化学研究所）、八代嘉美\*（神奈川県立保健福祉大学）

厚生労働省：田辺江業、大場崇史\*

医薬品医療機器総合機構：中村直子\*、大倉成美\*、郭宜\*、熊谷康顕\*

産業技術総合研究所：廣瀬志弘\*

事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：澤田留美、草川森士、平井孝昌

\*Web参加

4. 配布資料

1. 令和四年度第二回委員会議事次第

2. 令和4年度第一回委員会議事録（概要）

3. 評価指標（案）作成にあたって：これまでの討議内容及び今年度の検討事項の確認

4. ヒト（同種）iPS 細胞由来心筋球を用いた重症心不全の治療に関する評価指標（案）たたき台

5. iPS 細胞由来心筋球評価指標案 ver6 心筋シート評価指標との比較版

6. ヒト（同種）iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた虚血性心筋症の治療に関する評価指標（案）

7. 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

## 5. 議事内容

- ①令和4年度第一回委員会会議議事録（概要）について事務局より説明があった。
- ②評価指標（案）作成にあたって、事務局よりこれまでの討議内容及び今年度の検討事項の確認がなされた。

③「ヒト（同種）iPS細胞由来心筋細胞球を用いた重症心不全の治療に関する評価指標（案）」について、作成を担当された佐野委員より、第一回での議論による修正点とさらに「5.（6）非臨床試験」と「5.（7）臨床試験（治験）」について説明がなされ、その後討議した。討議内容は、以下の通り。

- ✓ 「投与手技」に関する安全性について、新たに5.（6）非臨床試験と（7）臨床試験（治験）に書き込む。
- ✓ 5.（6）非臨床試験②催不整脈性の評価  
2行目「心筋シート」→「心筋球」へ修正。
- ✓ 5.（6）非臨床試験⑥心機能評価  
「心機能の改善」が「心筋球の生着」によって生じる ← エビデンスを確認しその内容を加筆する。
- ✓ 5.（7）臨床試験（治験）2.症例数の設定  
「原則として…」の段落の内容は、3.2.副次評価項目の最後の段落へ移動した。
- ✓ 5.（7）臨床試験（治験）3.有効性評価  
・駆出率が低下（40%以下）の妥当性について質問があり、心不全の定義として国内外の標準であることが説明された。  
・最終段落の「一方」は不要。
- ✓ 5.（7）臨床試験（治験）3.1.主要評価項目  
（削除予定となっていた）最初の段落の内容を活かし、「重症心不全」を対象とする場合の内容への修正を改めて検討する。（前項 p13 の 9-10 行目の説明となるような内容に）
- ✓ 5.（7）臨床試験（治験）4.安全性評価  
重要な有害事象において、④移植手技に伴う有害事象（出血、致死性不整脈の発生等）の記述が十分であるか検討し、加筆修正する。

次回会議（11/17）までに、今回の討議内容を踏まえて、加筆修正等を行う（佐野委員）。また、「iPS細胞由来心血管系細胞多層体」に関する評価指標案については、次回会議までにたたき台を作成する（升本委員、城委員）。

### ④今後の会議日程

第三回会議：令和4年11月17日（木）16～18時 オフィス東京 L2 会議室

第四回会議 : 令和 4 年 12 月 15 日(木) 16~18 時 オフィス東京 L2 会議室

第五回会議 : 令和 5 年 1 月 26 日(木) 15~17 時 オフィス東京 L2 会議室

次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業  
再生医療審査WG 令和4年度第三回会議議事録（概要）

1. 開催日時：2022年11月17日（木）16時00分～18時00分

2. 開催場所：オフィス東京 L2会議室

3. 出席者（座長以下委員五十音順・敬称略）

委員：鄭雄一（東京大学）、梅澤明弘（国立成育医療研究センター研究所）、岡田潔\*  
（大阪大学）、佐野元昭\*（慶應義塾大学）、城潤一郎\*（大阪歯科大学）、前川  
裕一郎\*（浜松医科大学）、升本英利\*（理化学研究所）、八代嘉美\*（神奈川県  
立保健福祉大学）

厚生労働省：田辺江業、大場崇史\*

医薬品医療機器総合機構：中村直子\*、大倉成美\*、郭宜\*、熊谷康顕\*

産業技術総合研究所：廣瀬志弘\*

事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：佐藤陽治、澤田留美、草川森士、平井孝昌

\*Web参加

4. 配布資料

1. 令和4年度第三回委員会議事次第

2. 令和4年度第二回委員会議事録（概要）

3. 評価指標（案）作成にあたって：これまでの討議内容及び今年度の検討事項の確認

4. ヒト（同種）iPS細胞由来心筋球を用いた重症心不全の治療に関する評価指標（案）  
ver8

5. iPS細胞由来心筋球評価指標案 ver8 ver7との比較版

6. ヒト（同種）iPS細胞由来心血管系細胞多層体を用いた重症心不全の治療に関する評  
価指標（案）

補足資料 1. ヒト（同種）iPS細胞由来心筋細胞シートを用いた虚血性心筋症の治療に関  
する評価指標（案）

補足資料 2. 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

## 5. 議事内容

- ①令和4年度第二回委員会会議議事録（概要）について事務局より説明があった。
- ②委員のCOIについて事務局より報告があった。今年度、2. 本事業に係る医薬品等メーカーより報酬を得て相談に応じまたは調査・試験・研究を「行っています」と回答された委員が1名いたが、今年度より「行っている」というメーカーは、本評価指標作成に係る対象メーカーではないことが事務局により確認できた。よって、本委員のWGへの参画に問題はないと考えられ、座長・他の委員からも了承された。
- ③評価指標（案）作成にあたって、事務局よりこれまでの討議内容及び今年度の検討事項の確認がなされた。
- ④「ヒト（同種）iPS細胞由来心筋細胞球を用いた重症心不全の治療に関する評価指標（案）」について、作成を担当された佐野委員より、第二回での議論による修正点について説明がなされ、その後討議した。討議内容は、以下の通り。
- ✓（7）臨床試験（治験）3. 有効性評価について
    - 3.1.主要評価項目において、本WGにて昨年度作成した「心筋細胞シート」に関する評価指標案との違い等について指摘されたが、移植した心筋球の生着と心機能の回復（収縮力の補強）との関係性について科学的妥当性をもって説明した上で、「心筋細胞シート」との作用機序の違いから、「心筋細胞シート」の評価指標案と同様の記載に加えて「心筋球」に特化した内容となっているという説明がなされ、特に修正不要であると判断された。
  - ✓（7）臨床試験（治験）4. 安全性評価の重要な有害事象における⑧ 深部静脈血栓症／肺梗塞の部分について、脳梗塞等も考慮して修正する。

次回会議（12/15）までに、今回の討議内容を踏まえて、加筆修正等を行う（佐野委員）。
- ⑤「ヒト（同種）iPS細胞由来心血管系細胞多層体を用いた重症心不全の治療に関する評価指標（案）」について、作成を担当された升本委員より「5.（6）非臨床試験」までについて説明がなされ、その後討議した。討議内容は、以下の通り。
- ✓ 本評価指標案は、主に心筋細胞シートの評価指標（昨年度作成）をベースに、心筋球（今年度作成中）の内容も少し取り入れつつ、作成している。
  - ✓ 「薄膜」→「細胞シート」へ変更。
  - ✓ 5.（2）製造工程において特に注意が必要な事項②製造方法
    - ・「細胞シート形成工程」についても設定する。
  - ✓ 5.（4）製品の安定性試験
    - ・「物性が変化しないこと」→「最終製品の品質に悪影響を与えない」等への変

更を検討。

- ✓ 5. (5) 非細胞材料及び最終製品の生体適合性
  - ・ 「非細胞材料」と「非細胞生体材料」が混在。→「非細胞生体材料」に統一。
  - ・ 4行目～：これらの試験が...の文章の内容について、表現を含めて再考し、加筆修正する。
- ✓ 5. (6) 非臨床試験 ①病理学的評価
  - ・ 最後の「望ましい」は不要。
- ✓ 5. (6) 非臨床試験 ⑥心機能評価
  - ・ 最後の文章：「主に移植により生着した多層体から分泌される因子によって生じるため…」について、表現を再考。p6の最後の文章「細胞に由来する液性因子等が最終製品の効能効果と関連すると推定される場合は…」という表現との整合性を考慮する。

次回会議（12/15）までに、今回の討議内容を踏まえて、加筆修正等を行う（升本委員、城委員）。「5.（7）臨床試験（治験）」については、次回会議にて討議する予定。

#### ⑥今後の会議日程

第四回会議：令和4年12月15日（木）16～18時 オフィス東京 L2 会議室

第五回会議：令和5年1月26日（木）15～17時 オフィス東京 L2 会議室

次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業  
再生医療審査WG 令和4年度第四回会議議事録（概要）

1. 開催日時：2022年12月15日（木）16時00分～18時00分

2. 開催場所：オフィス東京 L2会議室

3. 出席者（座長以下委員五十音順・敬称略）

委員：鄭雄一（東京大学）、梅澤明弘（国立成育医療研究センター研究所）、岡田潔\*（大阪大学）、紀ノ岡正博\*（大阪大学）、佐野元昭\*（慶應義塾大学）、城潤一郎\*（大阪歯科大学）、升本英利\*（理化学研究所）、八代嘉美\*（神奈川県立保健福祉大学）

厚生労働省：田辺江業、大場崇史\*

医薬品医療機器総合機構：中村直子\*、大倉成美\*

事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：澤田留美、草川森士、平井孝昌

\*Web参加

4. 配布資料

1. 令和4年度第四回委員会議事次第

2. 令和4年度第三回委員会議事録（概要）

3. 評価指標（案）作成にあたって：これまでの討議内容及び今年度の検討事項の確認

4. ヒト（同種）iPS細胞由来心筋球を用いた重症心不全の治療に関する評価指標（案）  
ver9 ver8との比較版

5. ヒト（同種）iPS細胞由来心筋球を用いた重症心不全の治療に関する評価指標（案）  
ver9 ver8との比較版 文章付き

6. ヒト（同種）iPS細胞由来心血管系細胞多層体を用いた重症心不全の治療に関する評価指標（案）

補足資料 1. ヒト（同種）iPS細胞由来心筋細胞シートを用いた虚血性心筋症の治療に関する評価指標（案）

補足資料 2. 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



## 5. 議事内容

- ①令和4年度第二回委員会会議議事録（概要）について事務局より説明があった。
- ②評価指標（案）作成にあたって、事務局よりこれまでの討議内容及び今年度の検討事項の確認がなされた。
- ③「ヒト（同種）iPS細胞由来心筋細胞球を用いた重症心不全の治療に関する評価指標（案）」について、作成を担当された佐野委員より、第三回での議論による修正点について説明がなされ、その後討議して修正点が承認されほぼ最終版とされた。
- ④「ヒト（同種）iPS細胞由来心血管系細胞多層体を用いた重症心不全の治療に関する評価指標（案）」について、作成を担当された升本委員より説明がなされ、その後討議した。討議内容は、以下の通り。

✓ 5. (2) 製造工程において特に注意が必要な事項 ②製造方法

- ・ f) 細胞シート形成工程の設定、g) 細胞シート積層工程の設定について、「心筋細胞シート」の評価指標案には設定されていないが、本評価指標案には設定することで合意。
- ・ g) 細胞シート積層工程の設定において、「アイソレータなどの」を削除し「無菌操作にて用手的あるいは…」との表現に修正する。

✓ 5. (3) 製品の品質管理

- ・ 細胞シートを積層化することによる品質への影響について明示する。（多層体のため内部に虚血が起これ壊死する可能性や、そういった状態のものが投与されることによって炎症が惹起される可能性等についても考慮。）

✓ 5. (5) 非細胞材料及び最終製品の生体適合性

- ・ 「例えば既に医療材料として用いられている…同等と考えてよい。」の文章を削除する。

✓ 5. (7) 臨床試験(治験)②症例数、対照群の設定

- ・ 「あるいは治療後の同一患者における…」の文章について、「心筋細胞シート」の評価指標案には記されていないが、本評価指標案では示すことで合意。表現については、少々加筆修正を検討。

✓ 5. (7) 臨床試験(治験)③有効性評価

- ・ 最後の文の「有効性、安全性を支持するメカニズム…」の「安全性」を削除せずに残す。

✓ 5. (7) 臨床試験(治験)③安全性評価

- ・ 「心筋細胞シート」の評価指標にはなく「心筋球」では示されていた「また、Council for International Organizations of Medical Science (CIOMS) …参照されたい。」の部分については、本評価指標内でも示すことで合意。

今回の討議内容を踏まえて、加筆修正等を行う（升本委員、城委員）。

⑤「ヒト（同種）iPS 細胞由来心血管系細胞多層体を用いた重症心不全の治療に関する評価指標（案）」について、加筆修正された内容に特に大きな問題がない場合には、次回の会議は開催せずにメールベースでの審議を行う。会議の形式の最終決定は、修正案を確認後の1月初旬を目途とする。

⑥今後の会議日程（予定）

第五回会議：令和5年1月26日（木）15～17時 オフィス東京 L2 会議室

### III. ヒト（同種）iPS 細胞由来心筋球を用いた重症心不全の

#### 治療に関する評価指標（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) 原料等
  - (2) 製造工程において特に注意が必要な事項
  - (3) 製品の品質管理
  - (4) 製品の安定性試験
  - (5) 非細胞材料及び最終製品の生体適合性
  - (6) 非臨床試験
  - (7) 臨床試験（治験）

# ヒト（同種）iPS 細胞由来心筋球を用いた重症心不全の治療に関する評価指標 （案）

## 1. はじめに

ヒト由来の人工多能性幹細胞（iPS 細胞）のうち、同種由来 iPS 細胞を加工した製品（以下「ヒト（同種）iPS 細胞加工製品」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、「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」（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）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 細胞加工製品のうち特に重症心不全の治療を目的として適用される再生医療等製品（医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和 35 年法律第 145 号）第 2 条第 9 項に規定する「再生医療等製品」をいう。以下同じ。）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 細胞加工製品のうち特に重症心不全の治療を目的として心臓へ移植され、心筋内に生着することで効果が期待される再生医療等製品について、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。

## 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 細胞加工製品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。

製品の評価に当たっては、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

- （1）心筋球：心筋細胞が細胞塊を形成し球状の形態を呈しているものをいう。

- (2) 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。( ICH Q5D 「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」(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) の定義と同じ)
- (3) 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。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等が挙げられる。
- (4) 代替指標：目的とする対象指標が測定困難な場合に、事前に相関づけられた代替可能な指標。
- (5) 構造体：細胞を含みシート状や球状など立体的構造を有する移植体。
- (6) 心筋系細胞：心筋分化の際に発生する細胞。(心筋細胞, 線維芽細胞, 平滑筋細胞, 内皮細胞など)

## 5. 評価に当たって留意すべき事項

本評価指標は、当面、既に再生医療等製品の原材料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製造所に受け入れ、製造所においてセル・バンク・システムを構築し加工して製造された、ヒト（同種）iPS 細胞加工製品としての心筋細胞による球状の細胞塊（以下、心筋球）の評価に適用することを想定している。再生医療等製品の製造所内でヒト（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再生医療等製品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、「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」（平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発食発 0907 第 5 号厚生労働省医薬食品局長通知）等を参考とすること。

### (1) 原料等

原料等となる iPS 細胞は、再生医療等製品の原材料として株化され、セル・バンク・システムを構築したヒト（同種）iPS 細胞であって、一定の製造工程を経ることにより心筋細胞及び他の心筋系分化細胞へ分化することが確認されている、又は合理的に予測されるものである必要がある。

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心筋球の品質及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。

## (2) 製造工程において特に注意が必要な事項

心筋球（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、一定の品質を保持すること。

### 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 iPS 細胞株の製造所への受入から出発原料となるヒト iPS 細胞からのセル・バンク・システム構築までの履歴、及び出発原料から分化段階の進んだ細胞を経て最終製品に至る製造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。

#### a) 受入検査

原材料となる iPS 細胞株について、製造所への受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、細菌、真菌、ウイルス等の混入の否定等）と各項目の判定基準を設定すること。表現型、遺伝形質、特有の機能等の特性、細胞生存率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、ウイルス等の検査を行うこと。結果が陽性の場合には、iPS 細胞株のストック及びその輸送における汚染の有無を確認した上で、改めて iPS 細胞株を入手する。

なお、技術的な理由により、工程を一部進めた上で検査を行うことが適切な場合にあっては、受入れ後の適切な時点で検査を実施すること。例えば、凍結ヒト（同種）iPS 細胞株を原材料製造時の試験検査結果（Certificate of Analysis）を基に受入れた後、解凍して拡大培養を実施する際に追加の検査を行うことが挙げられる。治験を開始する前段階の場合は、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。

#### b) 細胞のバンク化

製造所に受入れた iPS 細胞株からのセル・バンクを作製する方法及びセル・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及び試験に関する手順等について詳細を明らかにし、その妥当性を示すこと。ICH Q5D 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。

#### c) 最終製品の構成要素となる細胞の作製

原料等となる製造所に受入れた iPS 細胞株及びそのセル・バンク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、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。また、最終製品が凍結製品である場合、細胞凍結方法とその凍結細胞から心筋球懸濁液を調整する方法（細胞解凍法、最終投与液調整法等）を明らかにし、同様に可能な範囲でその妥当性を明らかにすること。

d) 製造工程中の取り違い及びクロスコンタミネーション防止対策

心筋球（最終製品）の製造にあたっては、製造工程中の取違い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。

e) 細胞培養工程の設定

心筋分化誘導を伴う培養工程では、工程が不安定であるため、最終製品の心筋細胞および残存する未分化 iPS 細胞の比率等が変動することが示唆されている。心臓へ移植され心筋内に長期に生着し、機能的心筋組織の再生を目的としている製品では、最終製品に至るまでの製造工程において、未分化 iPS 細胞を除去するための純化工程を組み込み、残存未分化 iPS 細胞の頻度および心筋細胞の純度を管理することが望まれ、そのための対策を明らかにすること。

f) 複数の細胞培養加工施設での製造、並びに病院内での細胞加工を行う際の工程の条件の設定

複数の細胞培養加工施設で製造を完結する場合は、施設間での中間製品の輸送に関する条件をあらかじめ確定し、中間製品の出荷及び受け入れ、輸送などの条件が満たされているかのモニタリングを行うこと。また、最終製品を出荷後、病院等で受け入れ院内での細胞加工を行う際も、あらかじめ加工条件を確定し、実施における妥当性を示すこと。

(3) 製品の品質管理

品質規格の値の設定について、治験を開始する前段階の場合にあつては、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。

心筋球（最終製品）の移植方法を明らかにすること。移植方法には、例えば iPS 細胞から製造される心筋細胞を、心筋球（最終製品）の状態、必要数だけ、心臓に直接移植することが考えられる。

心筋球の品質管理における留意点として、例えば以下に挙げた事項が考えられるが、必要かつ適切であれば別の試験項目の採用又は追加を検討すること。なお、各試験項目の設定根拠及び試験方法の妥当性については説明する必要がある。品質規格の値の設定について、治験を開始する前段階の場合にあつては、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。

なお、出荷製品そのもの又はその一部に対して規格試験の実施が技術的に困難である場合にあっては、妥当性を示した上で、代替指標を用いる、あるいは並行して製造した製品を用いて規格試験を実施するなどを施すこと。

心筋球の長期間の保存が、技術的に困難である場合、一部の試験データの確認を待たずに使用することができる。ただし、その指標の妥当性について明らかにし、後日完全な適格性を確認すること。例えば、追加培養による心筋細胞の特性解析、無菌試験やマイコプラズマ試験の実施中に製品を使用する場合、製造工程中の結果等を代替指標とすることもよい。

#### a) 性状の確認

最終製品の性状に関して、あらかじめ確認されている目的とする性状を有することを目視確認し、その記録を保管することが望ましい。なお、最終製品が心筋球の場合、構造体（例えば、細胞塊であること）や、色味（例えば、白色～淡黄色であること）の目視での確認を設定することが考えられる。最終製品を構成する心筋細胞については、製造工程において、自発的な拍動を確認するための形態観察を行い、その記録を保管することが望ましい。

#### b) 細胞数及び生存率

細胞の数及び生存率についても基準を設定する必要がある。細胞数を測定する方法としては、最終製品や中間製品の一部を抜き出し、細胞懸濁液とし、バリデーション可能な測定方法（血球計算盤やセルカウンターで測定する方法など）にて測定する。細胞生存率を測定する方法として、バリデーション可能な方法（トリパンブルーを用いた色素排除法や蛍光色素を用いた方法など）にて、生細胞及び死細胞を計数する。なお、最終製品が心筋球である場合、心筋球に含まれる細胞数及び生存率を測定することが技術的に困難である。この場合にあっては、その構造に含まれる細胞数及び生存率を裏付ける代替指標を用いてよい。ただし、その指標の妥当性について明らかにすること。例えば、あらかじめ、心筋球形成前の心筋細胞の細胞数及び生存細胞率を代替指標とすることもよい。

#### c) 細胞特異性の確認

最終製品を構成する心筋細胞を、フローサイトメトリー等を用いて心筋トロポニンT等の発現量を明らかにすること。

最終製品の主構成細胞がその他の心筋系細胞である場合は、その特異性を代表するマーカー分子に関して、mRNA 発現解析、免疫細胞染色法、フローサイトメトリー等を用いて発現量を評価することが考えられる。また、これら解析に加え、複数の異なる



手法を用いて心筋細胞等としての特異性とその細胞数を評価することが望ましい。

なお、最終製品が心筋球である場合、心筋球に含まれる細胞特異性を測定することが技術的に困難である。この場合にあつては、その構造に含まれる指標を裏付ける代替指標を用いてよい。ただし、その指標の妥当性について明らかにすること。例えば、あらかじめ、心筋球形成前後の相関を得たうえ、心筋球形成前の細胞特異性（心筋トロポニン T 陽性率など）を代替指標とすることもよい。

#### d) 機能評価

治療用途に整合性のある細胞としての機能特性を有することを製造工程中又は最終製品で確認する。例えば、最終製品が心筋細胞の場合は、心筋細胞のマーカー発現を mRNA 発現解析、免疫細胞染色法、フローサイトメトリーや、拍動の観察等で評価することが考えられる。

細胞に由来する液性因子等が最終製品の効能効果と関連すると推定される場合は、その評価の実施可能性を検討する。

なお、最終製品が心筋球である場合、心筋球の機能評価を測定することが技術的に困難である。この場合にあつては、その構造に含まれる指標を機能評価の代替指標としてもよい。ただし、その指標の妥当性について明らかにすること。例えば、あらかじめ、心筋球形成前後の相関を得たうえ、心筋球形成前の細胞特異性（例えば、トロポニン陽性細胞率）を代替指標とすることもよい。

#### e) 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、定量 PCR によるマーカー遺伝子の定量、免疫細胞染色、フローサイトメトリー等を用いた未分化細胞マーカー抗原の発現定量等による評価などが考えられる。また、最終製品を原料等の iPS 細胞の培養条件で一定期間培養する戻し培養法等も挙げられる。これら解析の中から、移植細胞数を考慮し、評価に必要な検出力を備えている試験方法を選択すべきであり、可能であれば、複数の異なる手法を用いて未分化細胞の混在を評価することが望ましい。

なお、未分化の iPS 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であり、造腫瘍性試験に関しては非臨床試験の項目を参照すること。

#### f) 染色体並びにゲノム構造評価

最終製品の染色体並びにゲノム構造を評価することが求められる。染色体構造は、ギムザ染色法及び G バンド分染法等を用いて、染色体核型構造の評価を行うことが望ましい。また、マイクロアレイ法等を用いて、全ゲノムレベルでのゲノム構造の評価を行う手法も使用することもできる。遺伝的安定性評価については、「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関するガイドラインについて」（令和元年 6 月 27 日付け薬生機審発 0627 第 1

号厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知) 等も参考にすること。

#### (4) 製品の安定性試験

最終製品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、細胞の生存率及び効能を裏付ける代替指標等を指標に実保存条件での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、凍結及び解凍操作が製品の解凍後の培養可能期間や品質へ与える影響を確認すること。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、製造終了後直ちに使用するような場合はこの限りではない。

また、出発原料、中間製品及び最終製品を運搬する場合には、それぞれの条件と手順(容器、輸送液、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。細胞を凍結状態で輸送する場合には、凍結時に使用する培地又は凍結保存液、凍結保護剤等について、製造工程で使用する材料と同様に適切に選択すること。

なお、最終製品を心筋球とし、心筋球の状態を輸送する場合には、保存安定性に加え、輸送安定性(温度、振動、気圧変化等の影響)を評価した上で保存条件及び使用期限を設定し、適切な容器、保存液及び運搬形態を選択すること。製品形態又は細胞種によって、製品安定性を保つための適切な保存形態、温度条件、輸送液等が異なる可能性があるため、製品毎に適切な組み合わせを検討し、安定性を担保する必要がある。

#### (5) 非細胞材料及び最終製品の生体適合性

製品に関係する非細胞材料については、製造工程中で細胞と接触する材料だけでなく、細胞とともに最終製品の一部を構成する副成分となるものや、副構成体等として適用時に併用されるもの(局所封入用の膜、フィブリン糊等)に関しても、材料自体の品質・安全性に関する知見について明らかにするとともに、生体適合性等、患者及び製品中の細胞との相互作用に関する知見について明らかにすること。また、最終製品総体についても患者の細胞組織、特に適用部位周辺組織との相互作用について評価すること。また、最終製品の副成分となる非細胞材料の、製造工程中(培地中)及び体内での分解特性、体内での再吸収特性、分解物の安全性に関して適切な情報を収集すること。特に、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。非細胞材料の生体適合性については、ISO10993-1、JIS T 0993-1 又は ASTM F748-04、医療機器の製造販売承認申請等に必要となる生物学的安全性評価の基本的考え方について(平成24年3月1日付け薬食機発0301第20号)等を参考にすること。

## (6) 非臨床試験

動物に心筋球を適用して有効性及び安全性を評価する際には、必要に応じて対象疾患を考慮して疾患モデル動物を作成すること。用いた動物モデルについては、その選択の根拠、試験系の妥当性及び得られた結果のヒトへの外挿性について説明する必要がある。有効性及び安全性の評価のために、心筋球を適用した群、対照物質を適用した対照群、さらに必要であれば sham オペ群を用いた比較試験の実施も考慮すること。評価期間についても、その設定根拠について説明すること。移植した心筋球とそれによってもたらされる効能について、心筋球の移植部位における局在性を確認するなど経時的に評価し、その関連性について考察すること。また、動物試験は、使用方法に関する試験の意味合いも含んでいることから、動物への適用方法は、可能な限り臨床での使用方法（例えば、開胸手術、内視鏡的手術など）を反映することが望ましい。安全性評価と有効性評価については、それぞれの手法において区別して評価する必要があるが、評価項目としては、例えば安全性については主に以下の①～④を、有効性については⑤、⑥の項目を踏まえて総合的に検討することが考えられる。また、必要かつ適切であれば別の試験項目の採用又は追加も検討すること。なお、HLA タイピング等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 細胞のセル・バンクから同等の品質特性を持つ心筋細胞及び他の心筋系分化細胞（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。

### ①病理学的評価

心筋球を移植した部位の病理学的検査を実施し、移植部位及び周辺組織の状態を評価すること。例えば、移植部位における心筋球の生着、移植周辺部位の線維変性及び炎症細胞の浸潤の有無、移植部位及び周辺組織の変化（形状、厚み、細胞数、分化状態など）の検討を行うことが考えられる。

### ②催不整脈性の評価

催不整脈性に関しては、普遍的に受容されたモデル動物は確立されていないため、評価に適切と考えられる動物（サル、イヌまたはブタなど）を用いて評価すること。例えば、移植前後における、各群の長時間の心電図記録を、ホルター心電図等を用いて比較し、不整脈の有無と重症度について検討すること等が考えられる。

### ③血清学的評価

一般的に利用されているマーカー因子を用いて、腎機能、肝機能、心筋障害等について評価すること。

### ④造腫瘍性に関する評価

iPS 細胞を加工して製造される再生医療等製品の造腫瘍性を評価する上では、「原料等

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。すなわち、臨床適用に際しては、原料等となる iPS 細胞ではなくあくまで最終製品としての iPS 細胞加工製品の造腫瘍性評価が最も重要であることを常に留意しなければならない。したがって、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評価を行うことが有用である。尚、造腫瘍性試験を実施するにあたっては、「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関するガイドラインについて」（令和元年 6 月 27 日付け薬生機審発 0627 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知）等も参考にすること。

非臨床安全性評価のための造腫瘍性試験に使用する動物種としては、高感度な特性から、免疫不全動物（NOG マウス、NSG マウス等）移植にて評価することが望ましい。

なお、移植細胞数としては、想定される臨床使用量に種差と個体差の安全係数を掛けた量であることが望ましいが、動物に移植した際に、移植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、心臓への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移植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。

#### ⑤ 心筋球の使用法、投与手技に関する評価

梗塞・拡張等の部位に対し、適切な移植方法等を検討すること。移植に機器を用いる場合は、安全に移植を行えるように、ある一定の深さ以上には刺入できないようにする等、機器の設計段階から安全性対策を考慮すること。また、移植時の手技的な安全性の確認、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等、臨床応用において必要かつ科学的に妥当と考えられる項目については、目的に応じて例えば中型又は大型動物を利用することにより確認を行うことが望ましい。具体的には、ヒトと同サイズの心臓を持つブタなどに、治験で使用する移植デバイスを用いて、治験と同じ移植方法で、可能な限り治験での最大移植細胞数を移植し、心筋内への移植を安全に行うことができるか、細胞の心腔内への漏出がないかを確認することが望ましい。

#### ⑥ 心機能評価

心機能の改善は、主に移植した心筋球が生着すること、そして生着した心筋がホストの心筋と協調して収縮力を補強することにより生じるため、この 2 点を評価する必要がある。まず前者は病理組織学的検査によって心筋細胞の生着を確認することが必要である。また、後者は心臓超音波検査や造影 MRI 等によって移植局所の収縮能・拡張能を評価することも重要である。その他、必要であれば、左室内腔短縮率、左室壁運動、左

室駆出率等の評価を検討すること。前者と後者の関連については、生着した心筋量（病理組織検査上での梗塞部位や左室全体に対する割合等）と、左室駆出率の改善に相関があることが報告されており（Shiba Y et al, Nature 2016 Oct 20;538(7625):388-391）、何らかの手法を用いて確認をすることが望ましい。

## （7）臨床試験（治験）

### 1. 対象集団

臨床試験においては、有効性及び安全性評価に適した集団を選択するために、普及した診断基準、重症度分類等を用いて、当該治療法に期待される臨床上的位置付け等を明確にした上で、選択・除外基準や評価基準を設定する必要がある。心不全は、心筋細胞数の減少および個々の心筋細胞の機能低下の程度により症状や予後が多彩であることから、有効性評価に適した集団を絞り込むための選択・除外基準の設定に際し、移植細胞の特性や試験の目的に応じて、対象とする症例の重症度を設定することが適切な場合がある。ただし、試験で除外された重症度の症例に対して使用した際の有効性及び安全性について、臨床試験で得られた成績の一般化への可能性の検討や、追加の臨床試験等による情報収集を検討する必要がある、独立行政法人医薬品医療機器総合機構と事前に協議することが勧められる。

#### 1.1. 組入れにおける選択基準

重症心不全に対する臨床試験の場合には、治療介入を開始するのに適切な時期、重症度を、製品の特性を踏まえて検討する必要がある。急性期にはまず既存治療法が第一選択となることが多く、細胞培養等、評価となる製品の特性を踏まえると、慢性期のものが対象となることが想定される。また、軽症例では、当該製品でなくても既存治療にて十分にコントロールが可能となる場合が考えられる一方、最重症例では、心移植以外に適切な選択肢がない場合や、侵襲的治療そのものが困難な場合も想定される。評価の対象となる製品の特性に応じて、心不全治療の介入時期・治療期間や、NYHA 分類、LVEF 値を基にした重症度を適切に設定する必要があることを念頭に置くべきと考えられる。

#### 1.2. 組入れにおける除外基準

除外基準の設定の際には、評価の対象となる製品を用いる際のリスクについて、考慮することが重要である。同種細胞を用いることから、HLA 型の適合の有無を考慮に入れても、心臓においては一定の免疫拒絶反応が起きることが予測され、免疫抑制剤の使用は不可避となることも予測される。ヒト（同種）製品に対する免疫拒絶反応を抑制する目的で免疫抑制剤を使用するため、免疫抑制剤の使用が困難な基礎疾患を有する場合には、免疫のコントロールが困難となり、安全性上の懸念が生じることに加え、製品そ

のものの評価も困難となることから、臨床試験においては対象としづらいことも想定される。また、免疫抑制剤使用に関して、アレルギー、過敏症を有する場合も対象とすることは適切ではないと考えられる。さらに、免疫抑制剤を用いることや、腫瘍化等のリスクを含む製品の特性を鑑みると、基礎疾患に悪性腫瘍を有する場合にも、その安全性の評価が困難となることが予測されるため、除外基準に組み入れることを考慮すべきと考えられる。その他、活動性を伴う感染症を有する場合、妊婦、小児であること等、製品の臨床評価の上で対象とする疾患以外のリスクを伴い、一般的に臨床試験に組み入れることが適切でない群についても配慮が必要である。

### 1.3. 高齢者・若年者について

重症心不全は、高齢者（65歳以上）に多く認められるため、「高齢者に使用される医薬品の臨床評価法に関するガイドライン」について」（平成5年12月2日付け薬新薬第104号厚生省薬務局新医薬品課長通知）及び「高齢者に使用される医薬品の臨床評価法に関するガイドライン」に関する質疑応答集（Q&A）について」（平成22年9月17日付け厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡）を踏まえた有効性及び安全性の検討が必要となる。ただし、心不全症状の重症度は、必ずしも年齢には依存しないため、高齢・非高齢を割付因子にする必要性については、既存疾患の有無なども含めて考慮すべきと考えられる。また、若年者（20歳未満）に関しては、成人の心不全とは病態が異なることから、組み入れや、評価基準を分けることや、他試験として実施することも検討すべきである。

## 2. 症例数の設定

被験者数は、試験目的、検証すべき仮説及び試験デザインに応じて設定する。製品の臨床上の位置づけや作用機序を踏まえて適切に計画されるべきである。

## 3. 有効性評価

駆出率が低下（40%以下）した心不全（HF<sub>r</sub>EF）は、種々の原因（心筋梗塞、心筋炎、サルコイドーシス、心筋症、抗癌剤等）による心筋細胞数の減少、および個々の心筋細胞が機能低下することに起因している。心筋細胞は組織幹細胞から分化したり細胞分裂をすることがないため、生体内で再生されることは無いことが知られている。このため、これまでの心不全治療は、心筋細胞の数を増加させる治療ではなく、個々の心筋細胞の機能低下を改善させる治療であった。これに対し、心筋補填による心不全治療では、体外で再生させた心筋細胞を移植することにより不足している心筋細胞を補い、心機能の改善を図るものである。このため、心筋補填による心筋再生医療の有効性は、いかに移植心筋細胞を心筋組織内に生着させ、周囲の心筋細胞と同期させて収縮させるか

にかかってくる。

心不全治療の有効性・安全性評価については、従来より、薬物療法と補助人工心臓 (LVAD) 等では異なる方法が取られてきた。薬物療法は、個々の薬物が有する薬理作用と、心機能保護の機序の関連が不明あるいは間接的である場合が多いため、プラセボ群と実薬群を設けて、心血管死や心不全入院などのイベント数や Activity of Daily Living (ADL) 等を含む QOL 等の臨床状態の変化を、統計学的手法を用いて比較検討することにより、有効性や安全性が評価されてきた。一方、LVAD は、多数例を用いた統計学的解析の実施が非現実的であること、コントロールを取り 2 群間比較を実施することは困難であること、心拍出量を直接増加させることは明確であること等から、1 例 1 例を詳細に解析するという方法で有効性と安全性の評価がなされてきた。同様に、心筋補填による心筋再生医療は作用機序が明確であること、多数例を用いた統計学的解析を実施することが現実的でないこと、コントロールを用いた 2 群間比較が困難なこと等を勘案すると、評価法は LVAD の評価法に準じた形にすることが適切であると考えられる。従って、心筋補填による心筋再生医療の評価法は、1) 移植した心筋が移植局所にいかに生着し心筋容量を保持しているか、2) 移植心筋が既存の心筋と協調して収縮力を向上させているか、を症例ごとに詳細に評価することとした。副次的な有効性評価は、主要評価項目で得られた結果の妥当性を検討するだけでなく、得られた結果の臨床的意義を幅広く検討するために有用である。主観が影響する検査項目や、測定機器の使用方法によってバラツキが想定される検査項目では、評価者間で統一した評価を行い、評価者間のばらつきを最小限とすることができるよう、評価者に対する教育訓練等の方策を十分に検討する必要がある。特に、国際共同試験においては実施地域により評価方法が異なることがないよう配慮する必要がある。また臨床試験開始前には評価者の適格性についても評価することが必要である。

### 3.1. 主要評価項目

重症心不全治療における真のエンドポイントは、死亡、入院といった心イベント、MACE 等の複数の心イベントの回避や、Activity of Daily Living (ADL) 等を含む QOL 等の臨床状態の改善にある。しかし、QOL の改善は多角的な要素を含み、本製剤の特性を踏まえた有効性とは必ずしも関連しない可能性があり、また主観によるバイアスの要素が強く影響されるため、主要評価項目として設定することは、評価を困難とすることが想定される。現時点では、客観的に数値化することが可能であり、短期的に虚血性変化や心機能改善を直接的に評価することができる項目を、サロゲートエンドポイントとして用いることも一案と考えられる。一方、心筋補填による心不全治療法は、前述の通り、作用機序が明確であること、多数例を用いた統計学的解析を実施すること

が現実的でないこと、コントロールを用いた2群間比較が困難な事等を勘案すると、評価法はLVADの評価法に準じた形にすることが適切であると考えられる。評価においては補填した心筋の生着していること、そして生着した心筋がホストの心筋収縮を補強していることを確認することが重要である。そのため、移植した心筋の生着を、画像等を用いて解析し主要評価項目として設定すべきである。画像等で移植した心筋の生着を確認するには、心臓MRIでの移植部心筋の容積の増加、Scar size（左室内瘢痕部と左室心筋組織の体積比）、心エコーでの心筋移植部の壁厚の増加等があげられる。虚血性心疾患では心筋SPECTの安静時合計欠損スコア（SRS）も有用であると考えられる。将来的には移植部心筋を定量化出来る方法の確立が望ましい。また、移植心筋が既存の心筋と協調して収縮力増強をしているか否かを判定するために、心エコー、MRI等を用いた局所心筋ストレイン解析等を用いることができる。

### 3.2. 副次評価項目

副次評価項目は、主要評価項目を補足するための有効性に関する評価項目を設定する。例えば、NYHA心機能分類、心エコーや心臓MRIによる駆出率の評価、LVESVI評価、NT-proBNP (BNP)のようなバイオマーカーを用いた評価など、心機能に関与する評価項目を、主要評価項目を補足する形で設定しておくべきと考えられる。また、ADL、QOLの改善評価のために、6MWD・SAS等の身体活動評価、運動耐容能評価、各種の包括的QOL評価（例えばEuro-QoL 5-dimension (EQ5D) やMOS 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36) など）の設定も検討するべきと考えられる。また、疾患特異的QOLや患者報告アウトカム(PRO)（例えばKansas City Cardiomyopathy Questionnaire (KCCQ) やMinnesota Living with Heart Failure Questionnaire (MLHFQ)など）についても、FDAをはじめとして評価指標とすることの検討が進んでおり、これらの設定も検討すべきと考えられる。上記以外にも、心不全の原因疾患に合わせた評価項目を追加することも可能である。

原則として、様々な要因を除き、これらの副次評価項目を適切に評価するためには、重症心不全に対する保存療法群などを対照群として設定することが妥当である。一方、対象とする集団の重症度を鑑みると、適切な対照群の設定が困難であることも想定される。そのため、評価において同様な重症度の心不全患者の外部対照やレジストリデータを用いることが許容される場合も考えられるが、既存の論文等の公表情報との単純比較では比較対照の適切性の観点から不十分であり、使用されるべき対照となるデータは慎重に吟味されなくてはならない。「承認申請等におけるレジストリの活用に関する基本的考え方」（令和3年3月23日薬生薬審発0323第1号薬生機審発0323第1号）を参考にした上で、最低限、使用される情報は前向きに収集されるものであること、臨床試



験の組み入れ対象の患者集団とレジストリで使用される患者集団は、その評価において傾向スコアを用いたマッチングや重み付け推定法により少なくとも既知の交絡因子の影響は排除できるように十分な患者背景情報を有するものであること、そして収集されたデータの倫理性や信頼性は十分に確保されたものである必要がある。そういったデータとの比較により、これらの副次評価項目の評価を行う必要がある。

#### 4. 安全性評価

有害事象とは、医薬品等（再生医療等製品を含む。以下この項において同じ。）を投与された患者又は被験者に生じたあらゆる好ましくない医療上の出来事であり、当該製品の投与との因果関係の有無は問わない。つまり、医薬品等が投与された際に起こる、あらゆる好ましくない、又は意図しない徴候（臨床検査値の異常を含む）、症状又は病気のことである。有害事象が認められた場合は、症例報告書に事象名、重症度、転帰、発現及び転帰が確認された時期、治験薬等（治験製品を含む、以下この項において同じ。）の服薬状況並びに処置の有無及びその内容等を記録するとともに、重篤な有害事象か否か、及び治験薬等との因果関係を判定する。

また、Council for International Organizations of Medical Science (CIOMS) VI Working Group では、症例報告書への有害事象名の記載を個々の症状・徴候ではなく、可能な限り診断名とすることが提言されている。また、Medical Dictionary for Regulatory Activities Terminology (MedDRA) の Point to Consider においても、有害事象の報告方法について、診断名が症状・徴候を包含しているのであれば、情報の喪失には当たらないと書かれている。ただし、注目すべき特定の症状・徴候が存在する場合、有害事象名としての診断名とは別に、個々の症状名・徴候名を収集し評価することが重要な場合があることに留意すべきである。詳細は、「治験の総括報告書の構成と内容に関するガイドライン」（平成 8 年 5 月 1 日付け薬審第 335 号厚生省薬務局審査課長通知）及び「「治験の総括報告書の構成と内容に関するガイドライン」に関する質疑応答集 (Q&A)」（平成 24 年 10 月 18 日付け厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡）を参照されたい。

臨床試験では、以下のような細胞移植に特徴的な有害事象・心不全の病態に関連する有害事象についてとくに注目して収集すべきである。なお、同種細胞の移植に伴い使用する免疫抑制剤の投与による有害事象にも注目が必要であり、特に腎機能障害が重要な有害事象と考えられる。

重要な有害事象

- ① 腫瘍化
- ② 感染

- ③ 拒絶反応
- ④ 移植手技に伴う有害事象（出血、致死性不整脈の発生等）
- ⑤ 致死性不整脈
- ⑥ 肺炎
- ⑦ 呼吸不全
- ⑧ 深部静脈血栓症／肺梗塞
- ⑨ 薬剤性過敏症症候群
- ⑩ 心不全の増悪

④は注射針を用いて心筋細胞をホスト心筋壁に移植する際に懸念される有害事象である。移植の際には、心エコー等での評価にて心筋壁の厚さを確認し、一定の深さ以上に刺入しない方法を用いて投与を行うことが求められる。⑤は心筋細胞移植後のホスト心筋では移植後のある一定期間、心室頻拍等の不整脈が発生する可能性があるため、安全対策として移植後一定期間は入院し、心電図モニタリングを継続的に実施する。入院期間は非臨床試験等で得られた所見を踏まえて判断する。ループ式植込型心電計の移植による不整脈評価や、着用型自動除細動器（WCD: Wearable Cardioverter Defibrillator）の使用などの対策をすることも1つの選択肢である。

## 5. 併用禁止薬及び併用禁止療法並びにリハビリテーションの扱いについて

### 5.1. 併用禁止薬

有効性、安全性評価に影響を与える可能性のある薬剤については、評価を困難とすることから、できる限り避けることが望ましい。しかし、対象とする疾患の重症度を鑑みると、「抗心不全薬の臨床評価方法に関するガイドライン」（薬食審査発 0329 第18号）に例示されるエビデンスに基づいて実施される標準治療、すなわちジギタリスや利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬、ベータ遮断薬、アルドステロン拮抗薬などは、試験期間中、周術期管理等で状態が安定しない期間を除き、用法・用量を不変とすることで用いることが可能と考えられる。この際、試験期間中の標準治療の内容については、試験実施前に明確な規定を設けておく必要がある。また、有効性評価に影響を与える可能性のある薬剤を、やむを得ず、追加、変更、用法・用量（頓用の場合は使用頻度）を変更する場合は、その理由と記録を残すように規定する必要がある。

### 5.2 リハビリテーションの扱いについて

リハビリテーションは心不全後の機能回復に影響を与える要因であり、臨床試験においては症例ごとのリハビリテーション実施の差異が有効性評価に与える影響を考慮すべ

きである。治療介入後のリハビリテーションを実施する場合は、心機能の客観的評価に基づき、比較対照群間で差異が発生しないように留意した、適切なリハビリテーション計画の設定がなされていることが妥当と考えられる。

## IV. ヒト（同種）iPS 細胞由来心血管系細胞多層体を

### 用いた重症心不全の治療に関する評価指標（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) 原料等
  - (2) 製造工程において特に注意が必要な事項
  - (3) 製品の品質管理
  - (4) 製品の安定性試験
  - (5) 非細胞生体材料及び最終製品の生体適合性
  - (6) 非臨床試験
  - (7) 臨床試験（治験）

# ヒト（同種）iPS 細胞由来心血管系細胞多層体を用いた重症心不全の治療 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）のうち、同種由来 iPS 細胞を加工した製品（以下「ヒト（同種）iPS 細胞加工製品」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、「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」（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）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 細胞加工製品のうち特に重症心不全の治療を目的として適用される再生医療等製品（医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和 35 年法律第 145 号）第 2 条第 9 項に規定する「再生医療等製品」をいう。以下同じ。）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 細胞加工製品のうち特に重症心不全の治療を目的として心臓へ移植される再生医療等製品について、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。

## 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 細胞加工製品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。

製品の評価に当たっては、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。

また、個別の製品において必要となる評価については、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強く勧められる。

## 4. 用語の定義

- (1) 細胞シート：細胞同士が直接、あるいは間接的に結合してシート状の形態を呈しているものをいう。
- (2) 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。（ICH Q5D「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」（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）の定義と同じ）
- (3) 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。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等が挙げられる。
- (4) 代替指標：目的とする対象指標が測定困難な場合に、事前に相関づけられた代替可能な指標。
- (5) 生体材料：生体に直接接触する材料のこと。生体適合性を有することが望ましい。
- (6) 多層体：細胞シートを生体材料等を用いて多層化することにより立体的構造を有する移植体。
- (7) 心血管系細胞：心筋分化の際に発生する細胞。（心筋細胞，線維芽細胞，平滑筋細胞，血管内皮細胞，血管壁細胞など）

## 5. 評価に当たって留意すべき事項

本評価指標は、当面、既に再生医療等製品の原材料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製造所に受け入れ、製造所においてセル・バンク・システムを構築し加工して製造された、ヒト（同種）iPS 細胞加工製品としての心血管系細胞を含む多層体（以下、多層体）の評価に適用することを想定している。再生医療等製品の製造所内でヒト（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再生医療等製品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、「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」（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）等を参考とすること。

### (1) 原料等

原料等となる iPS 細胞は、再生医療等製品の原材料として株化され、セル・バンク・システムを構築したヒト（同種）iPS 細胞であって、一定の製造工程を経ることにより心血管系細胞へ分化することが確認されている、又は合理的に予測されるものである必要がある。

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 細胞が樹立さ

れている場合は、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多層体の品質及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。

## (2) 製造工程において特に注意が必要な事項

多層体(最終製品)の製造にあたっては、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、一定の品質を保持すること。

### 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 iPS 細胞株の製造所への受入れから出発原料となるヒト iPS 細胞のセル・バンク・システム構築までの履歴、及び出発原料から分化段階の進んだ細胞を経て最終製品に至る製造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。

多層体の製造においては拡大培養工程・分化誘導工程・細胞シート形成工程・細胞シート積層工程・包装梱包工程など、複数の工程を経ることが想定されるため、各工程において工程内検査を行うことが望ましい。

#### a) 受入検査

原材料となる iPS 細胞株について、製造所への受入れのための試験(検査)項目(例えば、目視検査、顕微鏡検査、生存率、細胞の特性解析、細菌、真菌、ウイルス等の混入の否定等)と各項目の判定基準を設定すること。表現型、遺伝形質、特有の機能等の特性、細胞生存率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、ウイルス等の検査を行うこと。結果が陽性の場合には、iPS 細胞株のストック及びその輸送における汚染の有無を確認した上で、改めて iPS 細胞株を入手する。

なお、技術的な理由により、工程を一部進めた上で検査を行うことが適切な場合にあっては、受入れ後の適切な時点で検査を実施すること。例えば、凍結ヒト(同種)iPS 細胞株を原材料製造時の試験(検査)結果(Certificate of Analysis)を基に受入れた後、解凍して拡大培養を実施する際に追加の検査を行うことが挙げられる。治験を開始する前段階の場合は、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。

#### b) 細胞のバンク化

製造所に受入れた iPS 細胞株からのセル・バンクを作製する方法及びセル・バンクの特性解析、保存・維持・管理・更新方法、その他の各作業工程及び試験に関する手順等

について詳細を明らかにし、その妥当性を示すこと。ICH Q5D 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。

c) 最終製品の構成要素となる細胞の作製

原料等となる製造所に受入れた iPS 細胞株及びそのセル・バンクから最終製品の構成要素となる細胞を作製する方法(例えば、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、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。また、最終製品が凍結製品である場合、細胞凍結方法とその凍結細胞から移植用多層体を作製する方法(細胞解凍法、細胞シートの製造法、多層化法等)を明らかにし、同様に可能な範囲でその妥当性を明らかにすること。

d) 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

多層体(最終製品)の製造にあたっては、製造工程中の取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。

e) 細胞培養工程の設定

心血管系細胞分化誘導を伴う培養工程では、細胞の状態や培養に関わる多くのパラメータの影響を受け、最終製品の心血管系細胞の比率が変動しやすいことが示唆されている。さらに、細胞シート形成を行う培養(細胞シート形成培養)においても、シート内に含まれる細胞の比率等を変化させる可能性がある。よって最終製品に至るまでの製造工程においては、細胞品質に影響を及ぼさない適切な範囲内で構成細胞比率および構成細胞数を管理することが望まれ、そのための対策を明らかにすること。

f) 細胞シート形成工程の設定

細胞シートは温度感受性培養器材を用いた技術など、既報により確立された方法を用いて形成されることが望まれる。播種する細胞数などについて事前に設定し、十分な歩留まりで細胞シートを形成しうることを確認すること。

g) 細胞シート積層工程の設定

形成された細胞シートの積層化工程においては、無菌操作にて用手的あるいは機械による積層化が必要となる。この積層化工程を安定して実施するため、標準作業手順を事前に設定し、確実に実施しうることを確認すること。

h) 複数の細胞培養加工施設での製造及び病院内での細胞加工を行う際の工程の条件の設定

複数の細胞培養加工施設で製造工程の一部を分担する場合は、施設間での中間製品の輸送に関する条件をあらかじめ確定し、中間製品の出荷及び受入れ、輸送などの条件が満たされているかのモニタリングを行うこと。また、最終製品を出荷後、病院等で受入れ院内での細胞加工を行う際も、あらかじめ加工条件を確定し、実施における妥当性を



示すこと。

### (3) 製品の品質管理

多層体(最終製品)の移植方法を明らかにすること。移植方法には、例えば iPS 細胞から製造される心血管系細胞を含む多層体(最終製品)の状態、必要数だけ、心臓における適切な適用部位に移植することが考えられる。

多層体の品質管理における留意点として、例えば以下に挙げた事項が考えられるが、必要かつ適切であれば別の試験項目の採用又は追加を検討すること。なお、各試験項目の設定根拠及び試験方法の妥当性について説明する必要がある。工程内管理の管理値及び品質規格の規格値の設定について、治験を開始する前段階の場合にあっては、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。

なお、出荷製品そのもの又はその一部に対して規格試験の実施が技術的に困難である場合にあっては、妥当性を示した上で、並行して製造した製品等、代替とする検体を用いて規格試験を実施すること。

多層体の長期間の保存が、技術的に困難である場合、一部の試験データの確認を待たずに使用することができる。ただし、その指標の妥当性について明らかにし、後日完全な適格性を確認すること。例えば、追加培養による心血管系細胞の特性解析、無菌試験やマイコプラズマ試験の実施中に製品を使用する場合、製造工程中の結果等を代替指標とすることもよい。

#### a) 性状、細胞形態の確認

最終製品の性状に関して、目的とする性状を有することを目視確認し、その形状を記録することが望ましい。なお、最終製品が多層体の場合、多層体(例えば、膜状構造物を多層化したものであること)や、色味(例えば、白色～淡黄色であること)を目視での確認を基準として設定することが考えられる。最終製品を構成する細胞シートについては、製造工程において、自発的な拍動を確認するための形態観察を行い、その記録を保管することが望ましい。

#### b) 細胞数及び生存率

細胞の数及び生存率についても基準を設定する必要がある。細胞数を測定する方法としては、最終製品や中間製品の一部を抜き出し、細胞懸濁液とし、バリデーション可能な測定方法(血球計算盤計やセルカウンターで測定する方法など)にて測定する。細胞生存率を測定する方法として、バリデーション可能な方法(トリパンブルーを用いた色素排除法や蛍光色素を用いた方法など)にて、生細胞及び死細胞を計数する。なお、最終製品が多層体である場合、その多層体に含まれる細胞数及び生存率を測定することが技術的に困難なことがある。この場合にあっては、その構造に含まれる細胞数及び生存率を

裏付ける代替指標を用いてよい。ただし、その指標の妥当性について明らかにすること。例えば、多層化する前の細胞シートにおける細胞数及び生存細胞率を代替指標とすることもよい。

#### c) 細胞特異性の確認

最終製品を構成する心血管系細胞について、フローサイトメトリー等を用いて心筋トロポニン T (心筋細胞)、VE-カドヘリン (血管内皮細胞)、血小板由来増殖因子受容体  $\beta$  (血管壁細胞) 等各構成細胞の特異性を代表するマーカー分子の発現量を明らかにすること。その他、mRNA 発現解析、免疫細胞染色法等を用いて発現量を評価することが考えられる。また、これら解析に加え、複数の異なる手法を用いて心血管系細胞としての特異性とその特異性を有する細胞の割合を評価することが望ましい。

なお、最終製品が多層体である場合、その多層体に含まれる細胞特異性を測定することが技術的に困難なことがある。この場合にあっては、その構造に含まれる指標を裏付ける代替指標を用いてよい。ただし、その指標の妥当性について明らかにすること。例えば、多層体形成前の細胞シートにおける細胞特異性 (例えば心筋トロポニン T など各構成細胞に特異的なマーカー分子陽性細胞数あるいは陽性率) を代替指標とすることもよい。

#### d) 機能評価

治療用途に整合性のある細胞としての機能特性を有することを製造工程中又は最終製品で確認する。例えば、最終製品が多層体の場合は、多層化する前の細胞シートにおけるフローサイトメトリーによる各構成細胞の特異的マーカー発現や、拍動の観察等で評価することが考えられる。

細胞に由来する液性因子等が最終製品の効能効果と関連すると推定される場合は、その評価の実施可能性を検討する。

なお、最終製品が多層体である場合、その多層体の機能評価を測定することが技術的に困難なことがある。この場合にあっては、その構造に含まれる指標を機能評価の代替指標としてもよい。ただし、その指標の妥当性について明らかにすること。例えば、あらかじめ、多層体形成前後の相関を得たうえ、多層体形成前の細胞シートにおける細胞特異性 (例えば心筋トロポニン T など各構成細胞に特異的なマーカー分子陽性細胞数あるいは陽性率) を代替指標とすることもよい。

#### e) 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、定量 PCR によるマーカー遺伝子の定量、免疫細胞染色、フローサイトメトリー等を用いた未分化細胞マーカー抗原の発現定量等による評価などが考えられる。また、最終製品を原料等の iPS 細胞の培養条件で一定期間培養する戻し培養法等も挙げられる。これら解析の中から、移植細胞数を考慮し、評価に必要な検

出力を備えている試験方法を選択すべきであり、可能であれば、複数の異なる手法を用いて未分化細胞の混在を評価することが望ましい。

なお、未分化の iPS 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であり、造腫瘍性試験に関しては非臨床試験の項目を参照すること。

#### f) 染色体及びゲノム構造評価

最終製品の染色体及びゲノム構造を評価することが求められる。染色体構造は、ギムザ染色法及び G バンド分染法等を用いて、染色体核型構造の評価を行うことが望ましい。また、マイクロアレイ法等を用いて、全ゲノムレベルでのゲノム構造の評価を行う手法も使用することもできる。遺伝的安定性評価については、「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関するガイドラインについて」(令和元年 6 月 27 日付け薬生機審発 0627 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知)等も参考にすること。

#### g) 細胞シート積層工程の適合性に関する評価

細胞シートの積層工程については「(2) 製造工程において特に注意が必要な事項 ② 製造方法 g) 細胞シート積層工程の設定」に示した指標に従い実施されるべきであるが、その工程が正確に実施され、臨床使用に適合した多層体を作製できたかどうかについては別途評価を行うことが望ましい。具体的には、目視での性状確認、細胞数および生存率、細胞特異性、特異的マーカー発現、拍動観察などによる評価を行うことが望ましいが、多層体における評価が技術的に困難である場合は、代替指標を用いてもよい。ただし、その指標の妥当性については明らかにする必要がある。また、多層化により生じうる内部虚血に伴う細胞の壊死の有無についても評価を行うことが望ましい。

### (4) 製品の安定性試験

最終製品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、細胞の生存率及び効能を裏付ける代替指標等を指標に、実保存条件での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、凍結及び解凍操作が製品の解凍後の培養可能期間や品質へ与える影響を確認すること。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、製造終了後直ちに使用するような場合はこの限りではない。

また、出発原料、中間製品及び最終製品を運搬する場合には、それぞれの条件と手順(容器、輸送液、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。また、それらを凍結状態で輸送する場合には、凍結時に使用する培地又は凍結保存液、凍結保護剤等について、製造工程で使用する材料と同様に適切に選択すること。さらに、使

用している非細胞成分が凍結融解の過程により最終製品の品質に悪影響を与えないことを事前に確認すること。また、非凍結状態で輸送する場合の輸送液等も同様に、適切に選択すること。

なお、最終製品を多層体とし、多層体の状態で輸送する場合には、保存安定性に加え、輸送安定性(温度、振動、気圧変化等の影響)を評価した上で保存条件及び使用期限を設定し、適切な容器、保存液及び運搬形態を選択すること。製品形態、細胞種または含まれる生体材料によって、製品安定性を保つための適切な保存形態、温度条件、輸送液等が異なる可能性があるため、製品毎に適切な組み合わせを検討し、安定性を担保する必要がある。

#### (5) 非細胞生体材料及び最終製品の生体適合性

細胞とともに最終製品の一部を構成する最終製品の副成分となる非細胞生体材料の、製造工程中(培地中)及び体内での分解特性、体内での再吸収特性、分解物の安全性に関して適切な情報を収集すること。特に、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。これらの試験が技術的に困難である場合は、使用する非細胞生体材料の分解産物が人体に無害であることに蓋然性があることを示すこと。非細胞生体材料の生体適合性については、ISO10993-1、JIS T 0993-1 又は ASTM F748-04、「医療機器の製造販売承認申請等に必要なる生物学的安全性評価の基本的考え方についての改正について」(令和2年1月6日薬生機審発 0106 第1号)等を参考にすること。

製品に関係する非細胞生体材料については、製造工程中で細胞と接触する生体材料だけでなく、適用時に併用されるもの(局所封入用の膜、フィブリン糊等)に関しても、材料自体の品質・安全性に関する知見について明らかにするとともに、生体適合性等、患者及び製品中の細胞との相互作用に関する知見について明らかにすること。また、最終製品総体についても患者の細胞組織、特に適用部位周辺組織との相互作用について評価すること。

#### (6) 非臨床試験

動物に多層体を適用して有効性及び安全性を評価する際には、必要に応じて対象疾患を考慮して疾患モデル動物を作成すること。用いた動物モデルについては、その選択の根拠、試験系の妥当性及び得られた結果のヒトへの外挿性について説明する必要がある。有効性及び安全性の評価のために、多層体を適用した群及び対照群(無処置群又は偽手術群)を用いた比較試験の実施も考慮すること。評価期間についても、その設定根拠について説明すること。移植した多層体とそれによってもたらされる効能について、多層体を含む

まれる細胞の移植部位における局在性を確認するなど経時的に評価し、その関連性について考察すること。また、動物試験は、使用方法に関する試験の意味合いも含んでいることから、動物への適用方法は、可能な限り臨床での使用法(例えば、開胸手術、内視鏡的手術など)を反映することが望ましい。安全性評価と有効性評価については、それぞれの手法において区別して評価する必要があるが、評価項目としては、例えば安全性については主に以下の①～④を、有効性については⑤、⑥の項目を踏まえて総合的に検討することが考えられる。また、必要かつ適切であれば別の試験項目の採用又は追加も検討すること。なお、HLA タイピング等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 細胞のセル・バンクから同等の品質特性を持つ心血管系細胞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あるいは中間産物について、POC を示すことで良い。

#### ①病理学的評価

多層体においては、心筋層への注入移植ではなく心表面への貼付による移植が想定され、その治療効果は移植部位および周囲組織への液性因子を介したメカニズムにより主にもたらされると推定される。そのため、多層体を適用した部位の病理学的検討を行い、適用部位及び周辺組織の状態を評価することが望ましい。例えば、適用部位における多層体の生着、適用周辺部位の線維変性及び炎症細胞の浸潤の有無、適用部位及び周辺組織の変化(形状、厚み、細胞数、分化状態など)の検討を行うことが考えられる。また、移植された多層体の形状、性質及び機能を維持するために必要な構造的な要素(例えば血管網など)がある場合には、免疫組織化学的検討等の手法により確認することが望ましい。また、積層による内部虚血に伴う壊死細胞が、移植後に局所炎症反応を惹起する可能性が考えられるため、局所炎症についても病理学的に評価することが望ましい。

#### ②催不整脈性の評価

催不整脈性に関しては、普遍的に受容されたモデル動物は確立されていないため、評価に適切と考えられる動物(サル、イヌまたはブタなど)を用いて評価すること。例えば、心筋細胞シートの適用前後における、各群の長時間の心電図記録を、ホルター心電図等を用いて比較し、不整脈の有無と重症度について検討すること等が考えられる。

#### ③血清学的評価

一般的に利用されているマーカー因子を用いて、腎機能、肝機能、心筋障害等について評価すること。

#### ④造腫瘍性に関する評価

iPS 細胞を加工して製造される再生医療等製品の造腫瘍性を評価する上では、「原料等となる 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。すなわち、臨床適用に際しては、原料等となる iPS 細胞ではな

くあくまで最終製品としての iPS 細胞加工製品の造腫瘍性評価が最も重要であることを常に留意しなければならない。したがって、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腫瘍細胞発生の検出限界が既知の試験系を用いて評価を行うことが有用である。尚、造腫瘍性試験を実施するにあたっては、「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関するガイドラインについて」(令和元年 6 月 27 日付け薬生機審発 0627 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知)等も参考にすること。

非臨床安全性評価のための造腫瘍性試験に使用する動物種としては、高感度な特性から、免疫不全動物(NOG マウス、NSG マウス等)移植にて評価することが望ましい。

なお、移植細胞数としては、想定される臨床使用量に種差と個体差の安全係数を掛けた量であることが望ましいが、動物に移植した際に、移植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、心臓表面への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移植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。

#### ⑤多層体の使用方法、投与手技および使用量等に関する評価

梗塞・拡張等の部位・面積等に対し、適切な多層体移植量(例えば多層体の面積、細胞シート積層数あるいは個数)及び移植方法を検討することが望ましい。また、移植時の手技的な安全性の確認、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等、臨床応用において必要かつ科学的に妥当と考えられる項目については、目的に応じて例えば中型又は大型動物を利用することにより確認を行うことが望ましい。

#### ⑥心機能評価

心機能に関しては、心臓超音波検査や造影 MRI 等によって収縮能・拡張能を評価する必要がある。その他要すれば左室内腔短縮率、左室壁運動等の評価を検討すること。必要に応じて、多層体製品適用後における血流を評価すること。評価法としては、例えば FDG-PET による検討、あるいは心臓超音波検査等が考えられる。また、当該有効性が持続する期間についても検討すること。また心機能の改善が、主に移植により生着した多層体に由来する液性因子に関連すると推察される場合は、病理組織学的検査等によって心血管系細胞の生着を確認することが必要である。

### (7)臨床試験(治験)

#### ①対象集団

臨床試験においては、有効性及び安全性評価に適した集団を選択するために、普及した診断基準、重症度分類等を用いて、当該治療法に期待される臨床上的位置付け等を明

確にした上で、選択・除外基準や評価基準を設定する必要がある。心不全は、重症度により症状や予後が多彩であることから、有効性評価に適した集団を絞り込むための選択・除外基準の設定に際し、既存治療法の有無や、その有効性、安全性についても考慮して、対象とする症例の重症度を設定することが適切な場合がある。ただし、試験で除外された重症度の症例に対して使用した際の有効性及び安全性について、臨床試験で得られた成績の外挿の可能性の検討や、追加の臨床試験等による情報収集を検討する必要があることも考慮しておくこと。

#### a) 組入れにおける選択基準

重症心不全に対する臨床試験の場合には、治療介入を開始するのに適切な時期、重症度を、その診断方法及び妥当性や、製品の特性を踏まえて検討する必要がある。急性期にはまず既存治療法が第一選択となることが多く、細胞培養等、評価となる製品の特性を踏まえると、慢性期が対象となることが想定される。また、軽症例では、当該製品でなくても既存治療にて十分にコントロールが可能となる場合が考えられる一方、最重症例では、心移植以外に適切な選択肢がない場合や、侵襲的治療そのものが困難な場合も想定される。評価の対象となる製品の特性に応じて、心不全治療の介入時期・治療期間や、NYHA 分類、LVEF 値等を基にした重症度を適切に設定する必要があることを念頭に置くべきと考えられる。

#### b) 組入れにおける除外基準

除外基準の設定の際には、評価の対象となる製品を用いる際のリスクについて、考慮することが重要である。同種細胞を用いることから、HLA 型の適合の有無を考慮に入れても、心臓においては一定の免疫拒絶反応が起きることが予測され、免疫抑制剤の使用は不可避となることも予測される。ヒト(同種)製品に対する免疫拒絶反応を抑制する目的で免疫抑制剤の使用が必要となるが、免疫抑制剤の使用が困難な基礎疾患を有する場合には、免疫のコントロールが困難となり、安全性上の懸念が生じることに加え、製品そのものの評価も困難となることから、臨床試験においては対象としづらいことも想定される。また、免疫抑制剤使用に関して、アレルギー、過敏症を有する場合も対象とすることは適切ではないと考えられる。さらに、免疫抑制剤を用いることや、腫瘍化等のリスクを含む製品の特性を鑑みると、基礎疾患に悪性腫瘍を有する場合にも、その安全性の評価が困難となることが予測されるため、除外基準に組み入れることを考慮するべきと考えられる。その他、活動性を伴う感染症を有する場合、妊婦、小児であること等、製品の臨床評価の上で対象とする疾患以外のリスクを伴い、一般的に臨床試験に組み入れることが適切でない群についても配慮が必要である。

#### c) 高齢者・若年者について

重症心不全は、高齢者(65 歳以上)に多く認められるため、「高齢者に使用される医薬

品の臨床評価法に関するガイドライン」について」(平成5年12月2日付け薬新薬第104号厚生省薬務局新医薬品課長通知)及び「「高齢者に使用される医薬品の臨床評価法に関するガイドライン」に関する質疑応答集(Q&A)について」(平成22年9月17日付け厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡)を踏まえた有効性及び安全性の検討が必要となる。ただし、心不全症状の重症度は、必ずしも年齢には依存しないため、高齢・非高齢を割付因子にする必要性については、既存疾患の有無なども含めて考慮するべきと考えられる。また、若年者(20歳未満)に関しては、成人の心不全とは病態が異なることから、組み入れや、評価基準を分けることや、他試験として実施することも検討するべきである。

## ② 症例数、対照群の設定

被験者数は、科学的合理性に基づき、試験目的、検証すべき仮説、試験の達成基準及び試験デザインに応じて設定する。対照群としては、ヒト(同種) iPS 細胞由来心血管系細胞多層体に限らず当該疾患分野における再生医療等製品全般の話として以下に述べる。

原則として、様々な要因を除き、適切にその安全性、有効性を評価するためには、心不全に対する保存療法群などを対照群として設定することが妥当である。一方、対象とする集団の重症度を鑑みると、適切な対照群の設定が困難であることも想定される。そのため、評価において同様な重症度の心不全患者の外部対照やレジストリデータを用いることが許容される場合も考えられる。「承認申請等におけるレジストリの活用に関する基本的考え方」(令和3年3月23日薬生薬審発0323第1号、薬生機審発0323第1号厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長、厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長連名通知)を参考にした上で、最低限、使用される情報は前向きに収集されるものであること、臨床試験の組入れ対象の患者集団とレジストリで使用される患者集団は、その評価において傾向スコアを用いたマッチングや重み付け推定法により少なくとも既知の交絡因子の影響は排除できるように十分な患者背景情報を有するものであること、そして収集されたデータの倫理性や信頼性は十分に確保されたものである必要がある。また、治療後の同一患者における心機能指標あるいは臨床症状等の経過を比較・検討することは、有効性評価において患者背景のばらつきを排したひとつの方法である。なお、臨床試験で集積されるデータの各症例の評価に対しては、施術者と評価者を分けることや、第三者委員会を設置するなど、客観的に比較できるよう工夫することも必要である。

## ③ 有効性評価

一般的に主要な有効性評価は、信頼性及び妥当性が検討され国際的に普及した評価項目を用いることが必要であり、評価時における評価項目のベースラインからの変化や改善症例の割合等を評価に用いる。副次的な有効性評価は、主要評価項目で得られた結果の妥当性を検討するだけでなく、得られた結果の臨床的意義を幅広く検討するために有用である。主観が影響する検査項目や、測定機器の使用方法によってバラツキが想定される



検査項目では、評価者間で統一した評価を行い、評価者間のばらつきを最小限とすることができるよう、評価者に対する教育訓練等の方策を十分に検討する必要がある。特に、国際共同試験においては実施地域により評価方法が異なることがないよう配慮する必要がある。また臨床試験開始前には評価者の適格性についても評価することが必要である。

なお、「抗心不全薬の臨床評価方法に関するガイドライン」の改訂について(平成23年3月29日付け薬食審査発0329第18号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知)の記載も参考とすることが望ましい。

#### a) 主要評価項目

心不全治療における真のエンドポイントは、死亡、入院といった心イベント、MACE等の複数の心イベントの回避や、Activity of Daily Living(ADL)等を含む QOL 等の臨床状態の改善にある。しかし、QOL の改善は多角的な要素を含み、本製品の特性を踏まえた有効性とは必ずしも相関しない可能性がある。また主観によるバイアスの要素が強く影響されるため、主要評価項目として設定することは、評価を困難とすることが想定される。現時点では、客観的に数値化することが可能であり、短期的に虚血性変化や心機能改善を直接的に評価することができる項目を、サロゲートエンドポイントとして用いることも一案と考えられる。その他、「抗心不全薬の臨床評価方法に関するガイドライン」の改訂について(平成23年3月29日付け薬食審査発0329第18号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知)で示される心機能評価の項目も、本製品の評価項目として検討するべきと考えられる。加えて、長期的な真のエンドポイントについての評価は当然必須であり、その評価ができるように長期的なデータを追跡して収集できるような追跡試験をデザインすると共に、外部対照やレジストリデータとの比較により有効性の考察または検証が行えるように事前に計画しておかなくてはならない。

#### b) 副次評価項目

副次評価項目としては、主要評価項目を補足するための有効性に関する評価項目を設定する。「抗心不全薬の臨床評価方法に関するガイドライン」の改訂について(平成23年3月29日付け薬食審査発0329第18号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知)で例示される項目を踏まえ、例えば、NYHA心機能分類、心エコー図、心臓MRIによる駆出率や虚血性変化の評価(虚血性疾患の場合)、LVESVI評価、血行動態評価、NT-proBNP のようなバイオマーカーを用いた評価など、心機能に関与する評価項目を、主要評価項目を補足する形で設定しておくべきと考えられる。また、ADL、QOLの改善評価のために、6MWD・SAS等の身体活動評価、運動耐容能評価、各種の包括的QOL評価(例えばEuro-QoL 5-dimension(EQ5D)やMOS 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36)など)の設定も検討するべきと考えられる。上記以外にも、心機能臨床イベント発生率など安全性にも関わる評価を設定することで、心不全の改善を多角的、総合的に評価し、有

効性、安全性を支持するメカニズムについて明らかにしていくことが重要と考えられる。

#### ④ 安全性評価

有害事象とは、医薬品等(再生医療等製品を含む。以下この項において同じ。)を投与された患者又は被験者に生じたあらゆる好ましくない医療上の出来事であり、当該製品の投与との因果関係の有無は問わない。つまり、医薬品等が投与された際に起こる、あらゆる好ましくない、又は意図しない徴候(臨床検査値の異常を含む)、症状又は病気のことである。有害事象が認められた場合は、症例報告書に事象名、重症度、転帰、発現及び転帰が確認された時期、治験薬等(治験製品を含む、以下この項において同じ。)の服薬状況並びに処置の有無及びその内容等を記録するとともに、重篤な有害事象か否か、及び治験薬等との因果関係を判定する。

また、Council for International Organizations of Medical Science(CIOMS) VI Working Group では、症例報告書への有害事象名の記載を個々の症状・徴候ではなく、可能な限り診断名とすることが提言されている。また、Medical Dictionary for Regulatory Activities Terminology(MedDRA)の Point to Consider においても、有害事象の報告方法について、診断名が症状・徴候を包含しているのであれば、情報の喪失には当たらないと書かれている。ただし、注目すべき特定の症状・徴候が存在する等、有害事象名としての診断名とは別に、個々の症状名・徴候名を収集し評価することが重要な場合があることに留意すべきである。詳細は、「治験の総括報告書の構成と内容に関するガイドライン」(平成 8 年 5 月 1 日付け薬審第 335 号厚生省薬務局審査課長通知)及び「治験の総括報告書の構成と内容に関するガイドライン」に関する質疑応答集(Q&A)」(平成 24 年 10 月 18 日付け厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡)を参照されたい。

臨床試験では、以下のような細胞移植に特徴的な有害事象・心不全の病態に関連する有害事象について特に注目して収集すべきである。なお、同種細胞の移植に伴い使用する免疫抑制剤の投与による有害事象にも注目が必要であり、特に腎機能障害が重要な有害事象と考えられる。

##### 重要な有害事象

- ① 腫瘍化
- ② 感染
- ③ 拒絶反応
- ④ 移植手技に伴う有害事象(出血、致死性不整脈の発生等)
- ⑤ 不整脈
- ⑥ 肺炎
- ⑦ 呼吸不全
- ⑧ 深部静脈血栓症／肺梗塞

⑨ 薬剤性過敏症症候群

⑩ 心不全の増悪

⑤ 併用薬並びにリハビリテーションの扱いについて

a) 併用薬

有効性、安全性評価に影響を与える可能性のある薬剤については、評価を困難とすることから、できる限り避けることが望ましい。しかし、対象とする疾患の重症度を鑑みると、直近の関連学会ガイドラインを参照の上、標準的治療、すなわちジギタリスや利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬、ベータ遮断薬、アルドステロン拮抗薬、アンジオテンシン受容体ネプリライシン阻害薬(ARNI)、ナトリウム・グルコース共輸送体 2(SGLT2)阻害薬などは、試験期間中、周術期管理等で状態が安定しない期間を除き、用法・用量を不変とすることで用いることが可能と考えられる。この際、試験期間中の標準治療の内容については、試験実施前に明確な規定を設けておく必要がある。また、有効性評価に影響を与える可能性のある薬剤を、やむを得ず、追加、変更、用法・用量(頓用の場合は使用頻度)を変更する場合は、その理由と記録を残すように規定する必要がある。

b) リハビリテーションの扱いについて

リハビリテーションは心不全後の機能回復に影響を与える要因であり、臨床試験においては症例ごとのリハビリテーション実施の差異が有効性評価に与える影響を考慮すべきである。治療介入後のリハビリテーションを実施する場合は、心機能の客観的評価に基づき、比較対照群間で差異が発生しないように留意した、適切なリハビリテーション計画の設定がなされていることが妥当と考えられる。

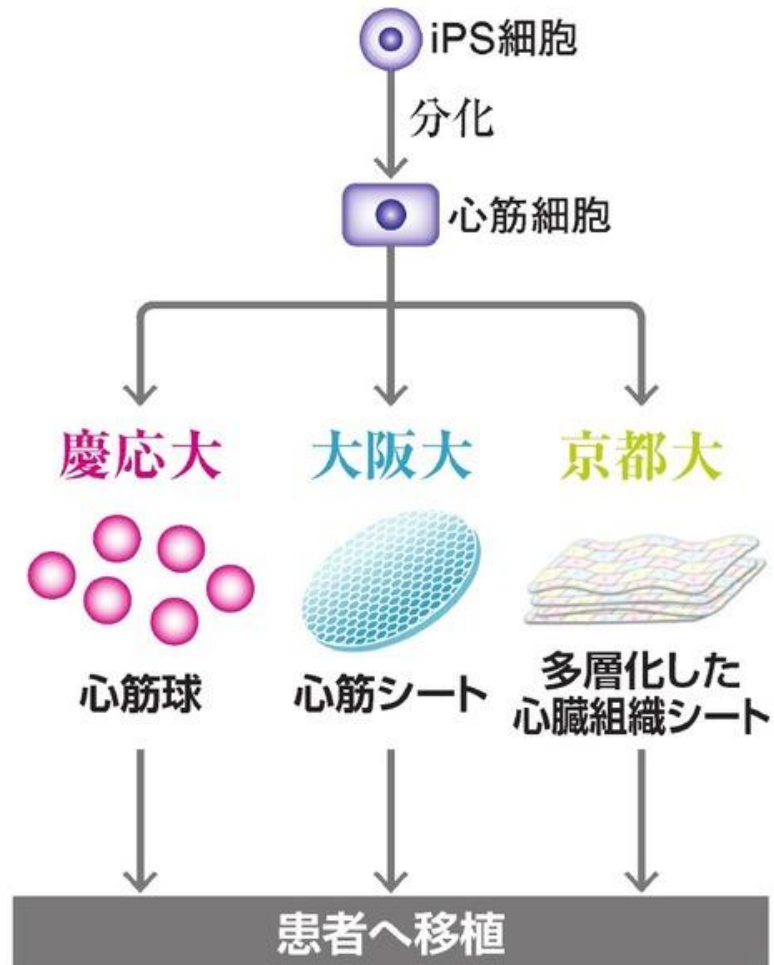
## V. 調査事項

iPS 細胞由来心血管系細胞多層体 (IHJ 301) の臨床開発

升本 英利

# iPS細胞を用いた心臓再生医療

## iPS細胞を使った心臓病治療の違い



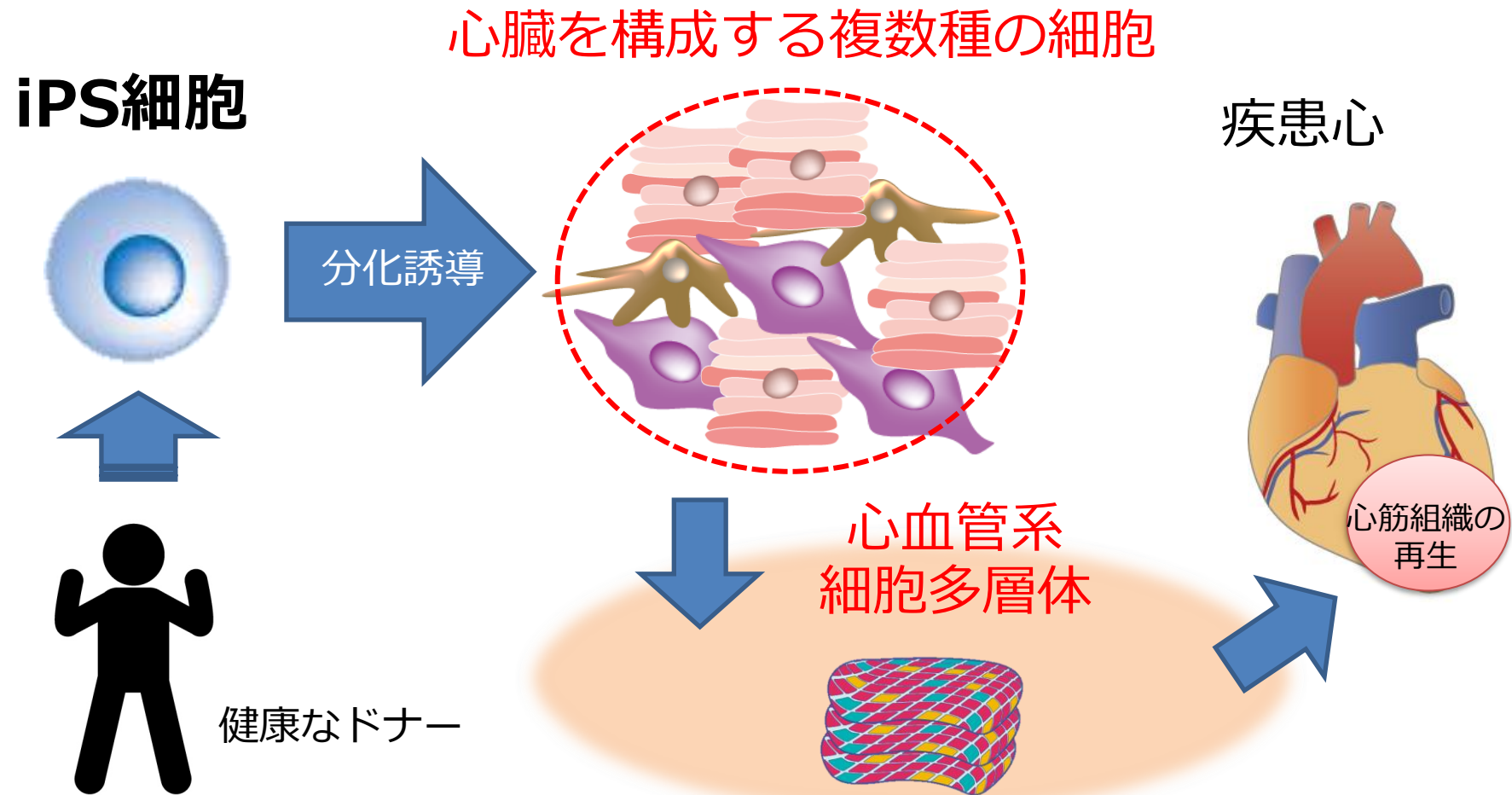
(2020/9/3 朝日新聞デジタル)

# IHJ-301のiPS心筋再生医薬における独自性

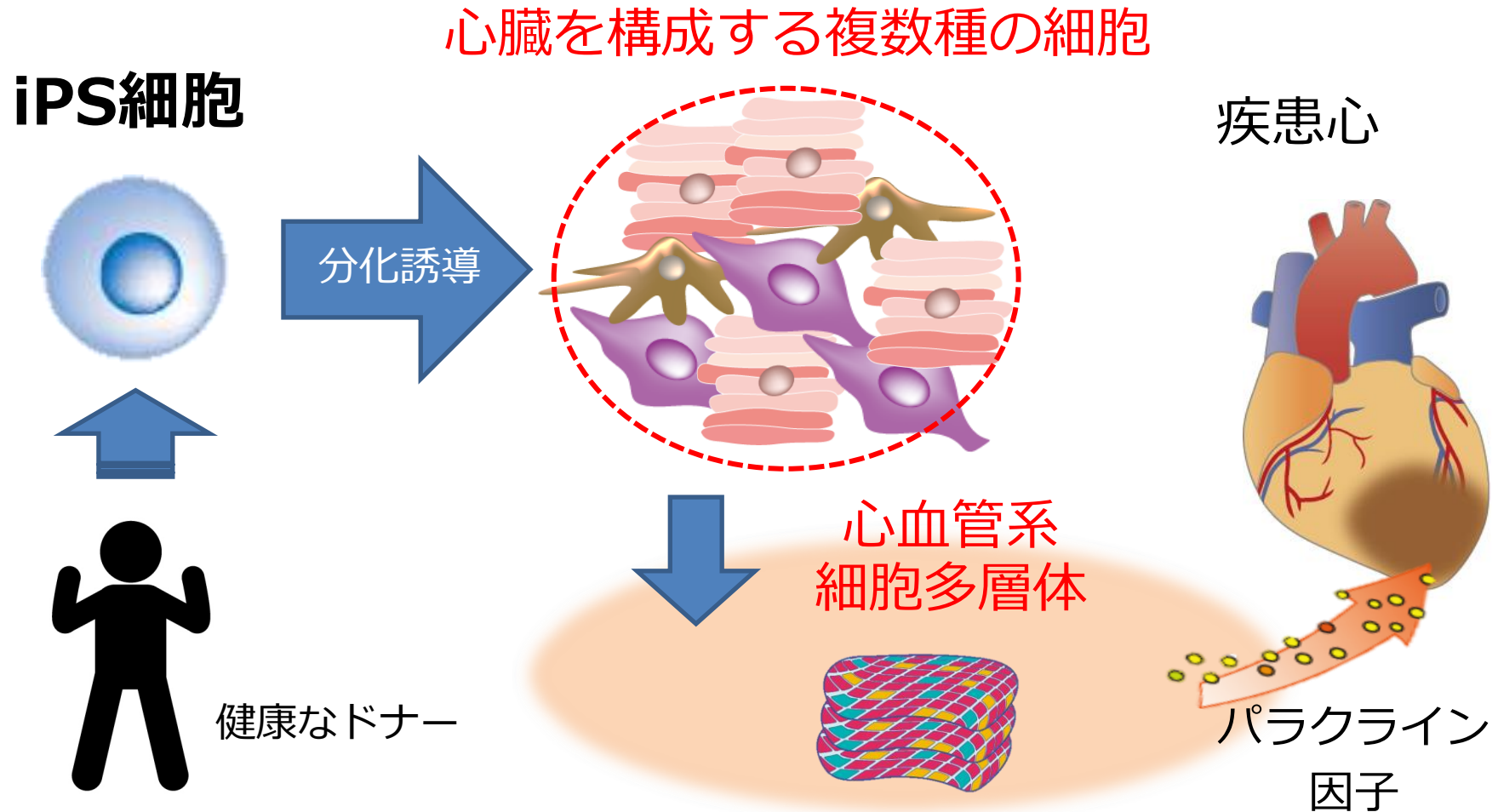
---

- ① 心筋細胞のみではなく、**複数の心血管系細胞**を含む
- ② 単層シートではなく、**厚みを持つシート積層体**

# 独自性①：複数の心血管系細胞



# 独自性①：複数の心血管系細胞



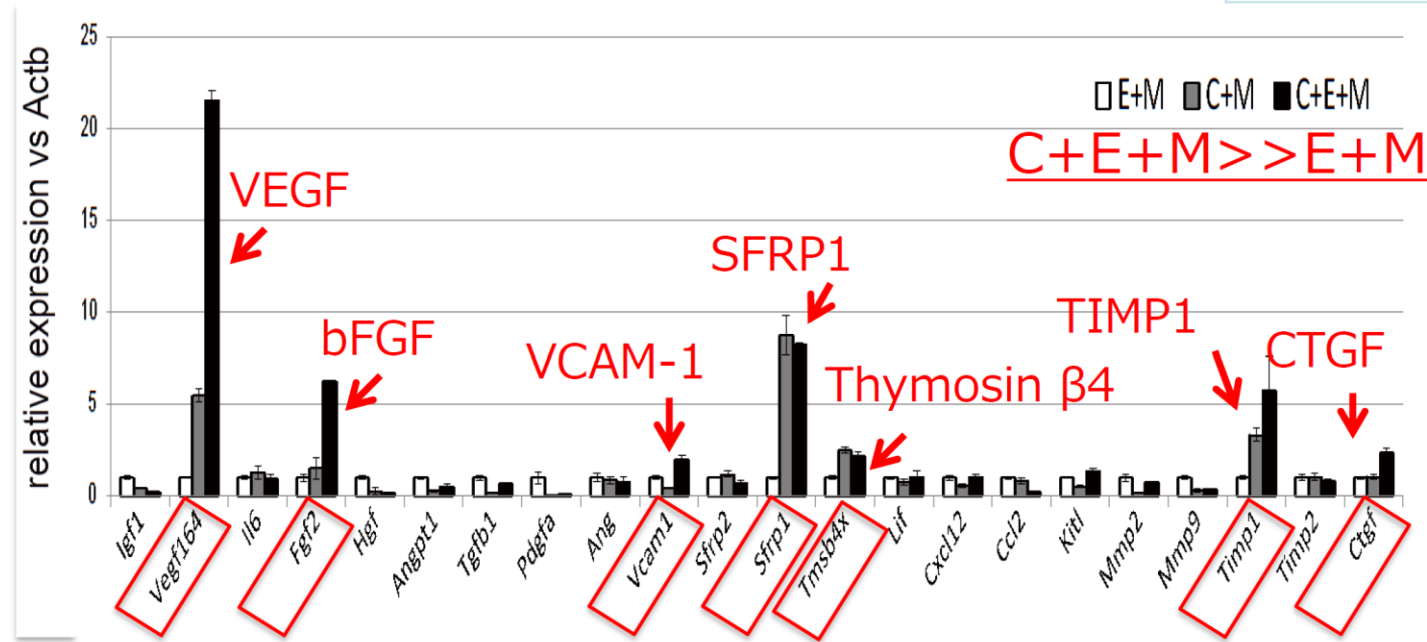


# 独自性①：複数の心血管系細胞

## 複数種の心血管系細胞の共存による効果

### 細胞種別シート解析

C : 心筋細胞  
E : 血管内皮細胞  
M : 血管壁細胞



(定量RT-PCR；マウスES細胞を用いた心臓組織シートによる検討)

複数種の細胞が細胞シート内に共存する方が治療に関連する  
複数のサイトカインの発現量が多い

# 独自性②：シートの積層化

JAHA

Journal of the American Heart Association

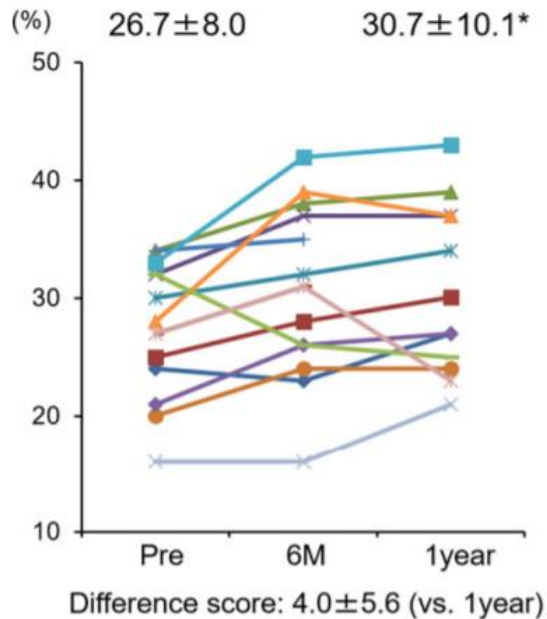
ORIGINAL RESEARCH



## Phase I Clinical Trial of Autologous Stem Cell–Sheet Transplantation Therapy for Treating Cardiomyopathy

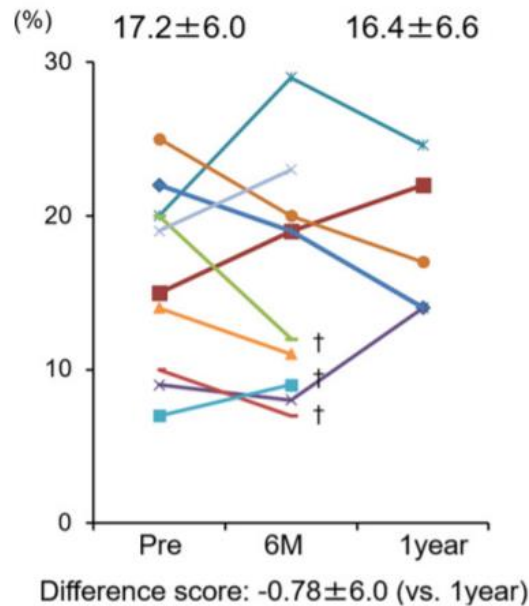
Shigeru Miyagawa, MD, PhD; Keitaro Domae, MD; Yasushi Yoshikawa, MD; Satsuki Fukushima, MD, PhD; Teruya Nakamura, MD, PhD; Atsuhiko Saito, PhD; Yasushi Sakata, MD, PhD; Seiki Hamada, MD; Koichi Toda, MD, PhD; Kyongsun Pak; Masahiro Takeuchi, PhD; Yoshiki Sawa, MD, PhD

A LVEF (%)



虚血性心筋症 (N=15)

c LVEF (%)



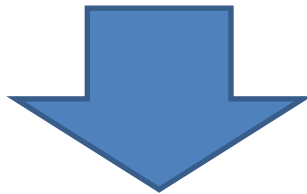
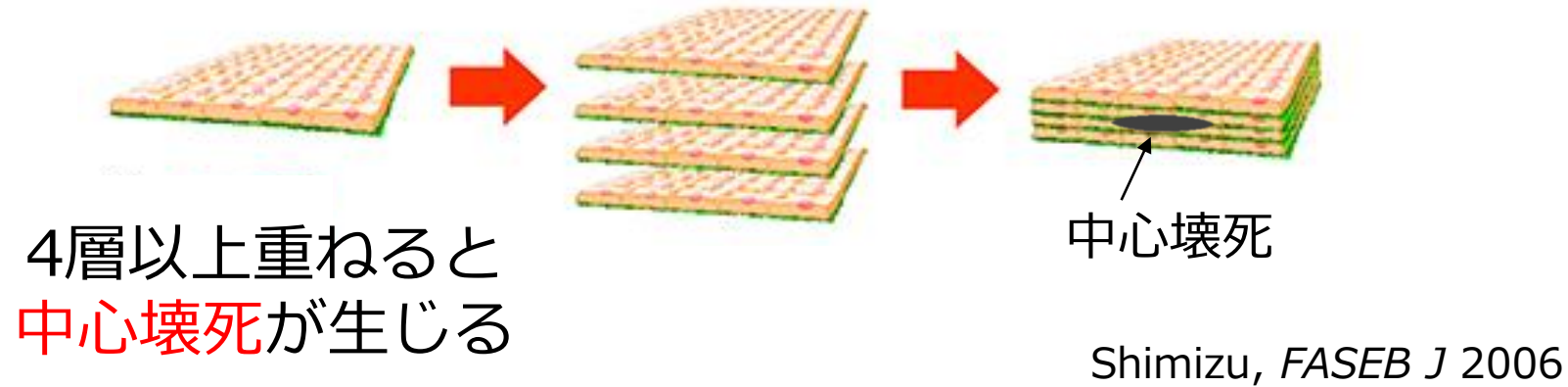
拡張型心筋症 (N=12)

自己骨格筋芽細胞  
単層シート移植の  
治療効果には  
限界がある

Miyagawa, *J Am Heart Assoc* 2017

# 独自性②：シートの積層化

細胞シートを分厚くするには？



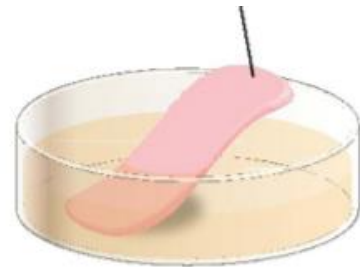
ゼラチンハイドロゲル粒子（GHM）による  
細胞集合体への**栄養・酸素供給**

田畑泰彦 教授 (京都大学医生物学研究所; iHeartJapan株式会社 科学顧問) との共同研究

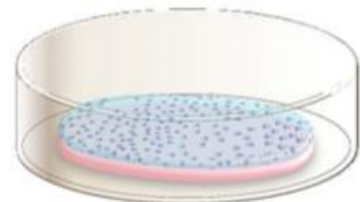
# 独自性②：シートの積層化

## GHMを用いた多層積層化による心血管系細胞多層体作製

1層目シートを  
培養皿に固着



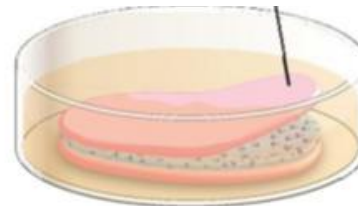
45-60分静置



培地を除去



2層目シートを  
1層目の上におく



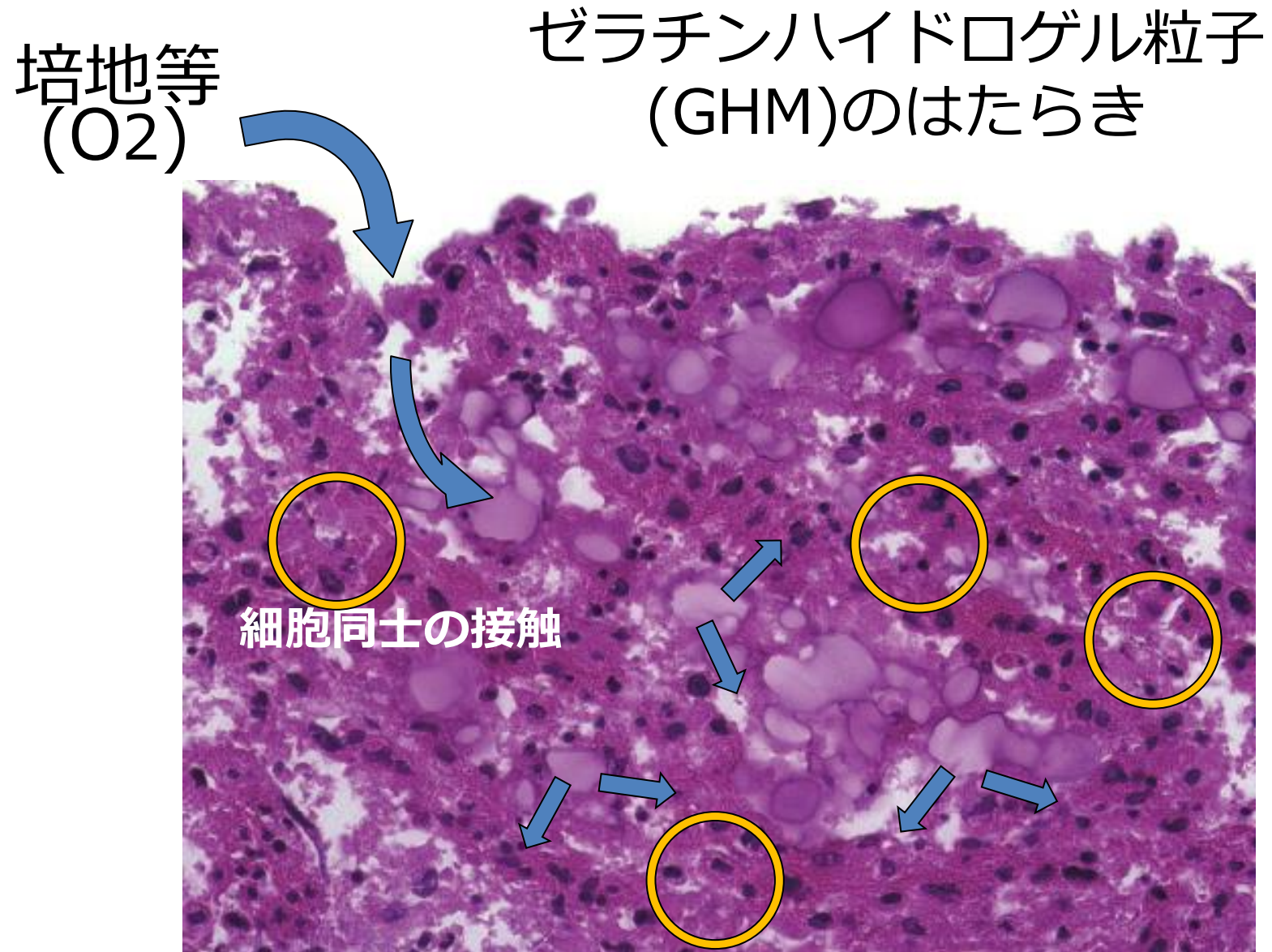
ゼラチンハイドロゲル  
微粒子(GHM)を塗布



この手順を繰り返す  
(5層まで)

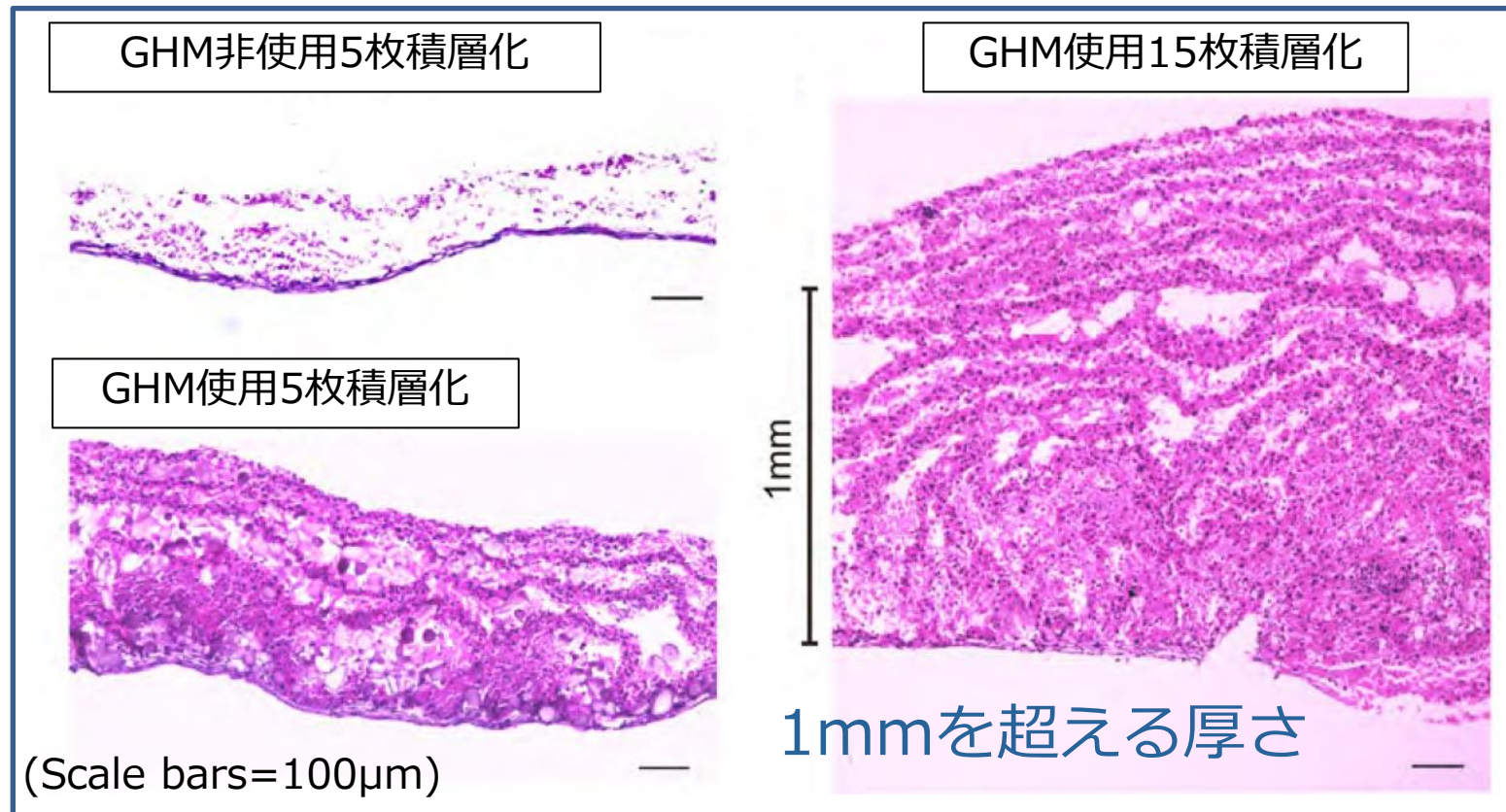


## 独自性②：シートの積層化



# 独自性②：シートの積層化

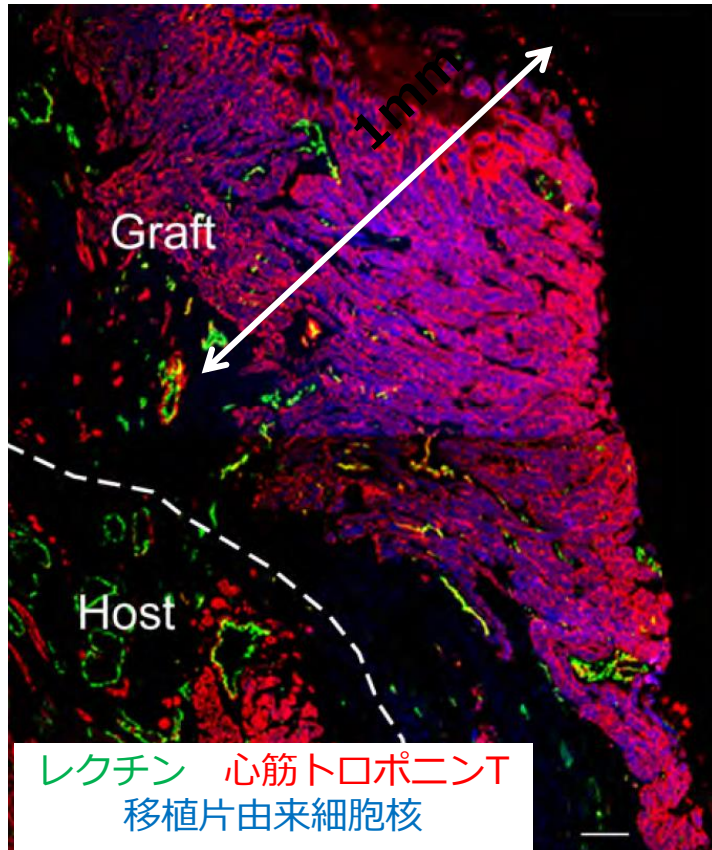
マウスES細胞由来心臓組織シートのGHMによる積層化



(積層後1週間培養)

# 独自性②：シート積層化

積層化シートをラット虚血心へ移植



(Scale bar=100 $\mu$ m)

移植後12週において  
血流供給を有する  
再生心筋組織を形成

Matsuo, *Sci Rep* 2015

GHM使用5枚積層化シート移植  
緑：血液灌流のある血管

# iPS細胞由来心血管系細胞多層体 = IHJ-301

iPS細胞から分化させた、心筋細胞、内皮細胞、壁細胞の三種類の細胞を混合し、シート状にしたものを、何枚も積み重ねた多層体



特許5920741号、指定国移行済み (US, DE, GB, FR, IT)



拡張型心筋症 (DCM)  
虚血性心筋症 (ICM)

できた多層体を重症心不全患者の心臓に直接貼り付ける

特許5862915号、指定国移行済み  
(US, CN, KR, DE, GB, FR, IT)



# 前臨床有効性試験：ラット心筋梗塞モデルへの移植

---

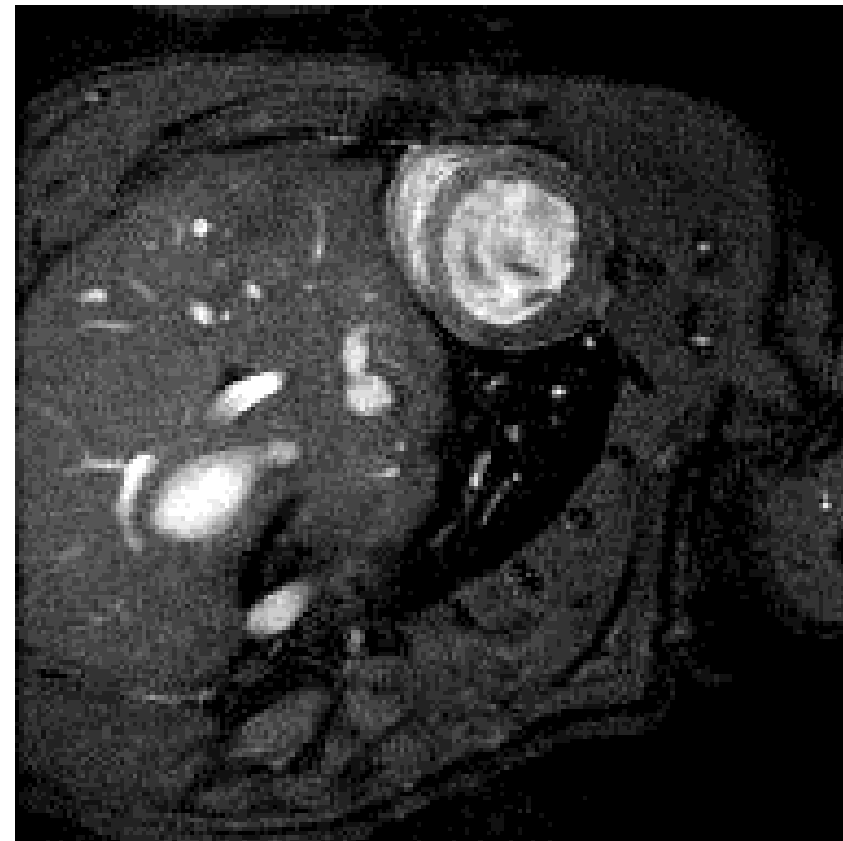
MRI

臨床用iPS細胞を使用

Sham



多層体移植 (移植後4週)



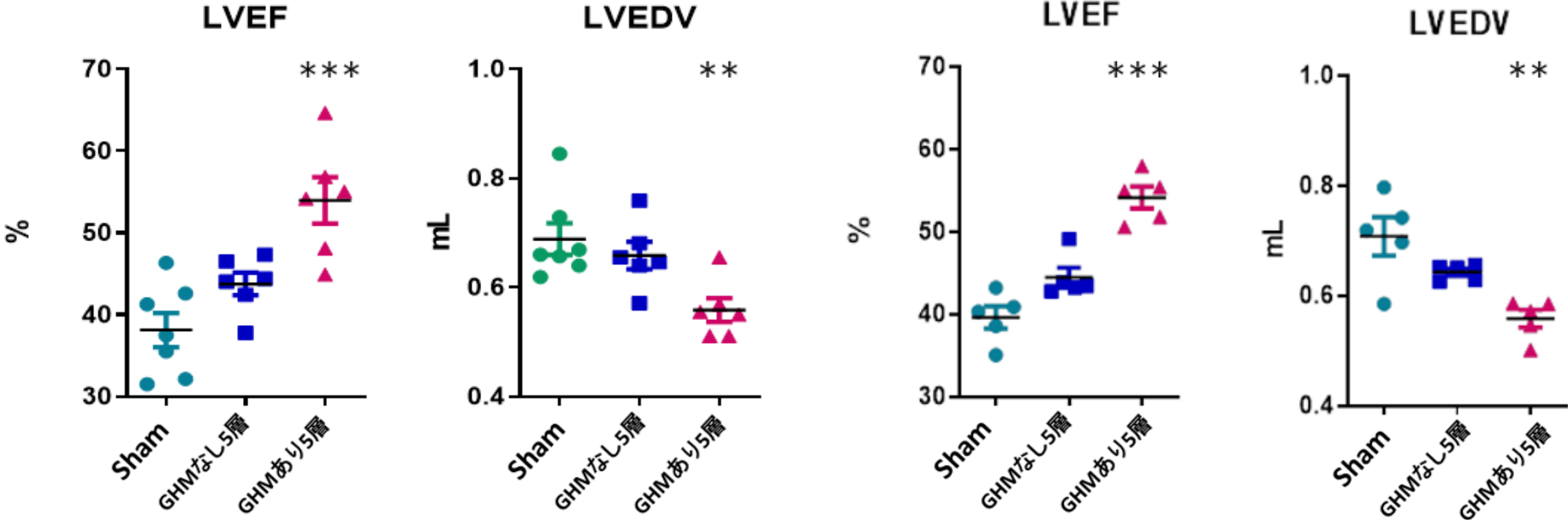
# 前臨床有効性試験：ラット心筋梗塞モデルへの移植

## MRI

臨床用iPS細胞を使用

移植後4週

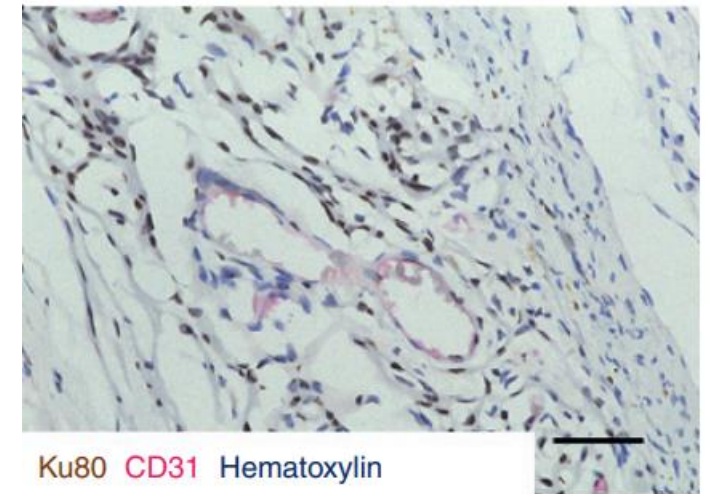
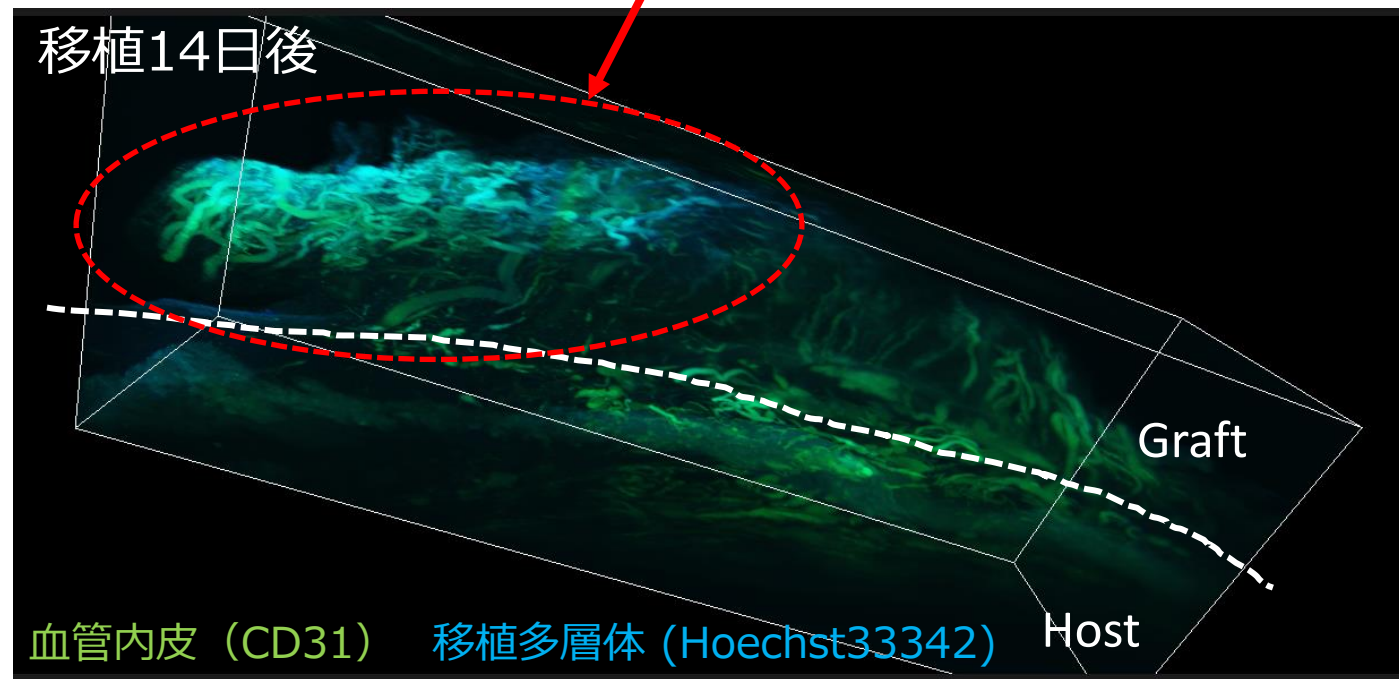
移植後12週



# 前臨床有効性試験：ラット心筋梗塞モデルへの移植

## 移植組織内血管網形成の三次元的評価

移植グラフト内に  
豊富な血管網を認める



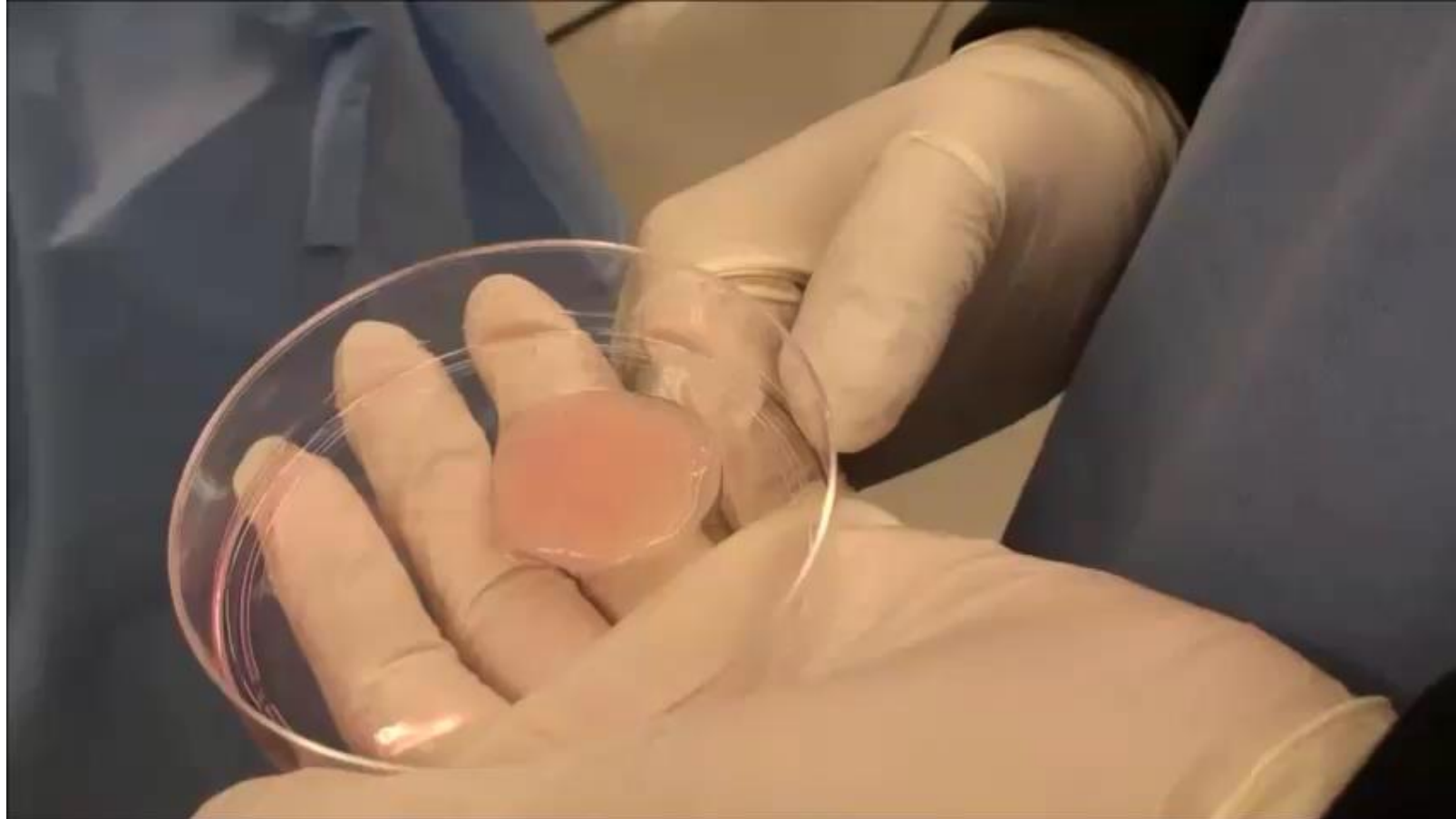
ヒト細胞とラット細胞の両方により血管網が形成されている

(CUBIC法による組織透明化)  
(Zeiss Lightsheet Z.1)

Osada, *JTCVS Open* 2021

# 前臨床有効性試験：ミニブタ心筋梗塞モデルへの移植

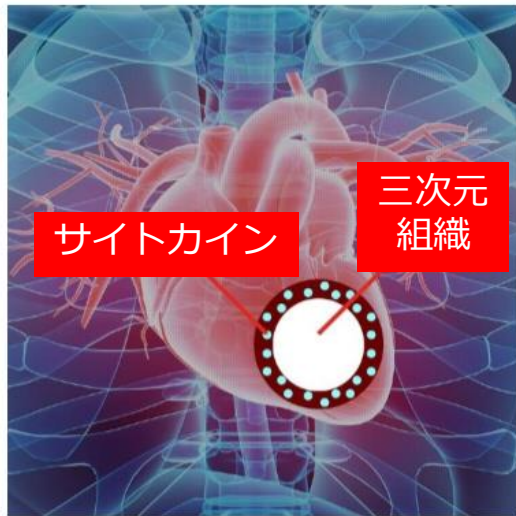
---



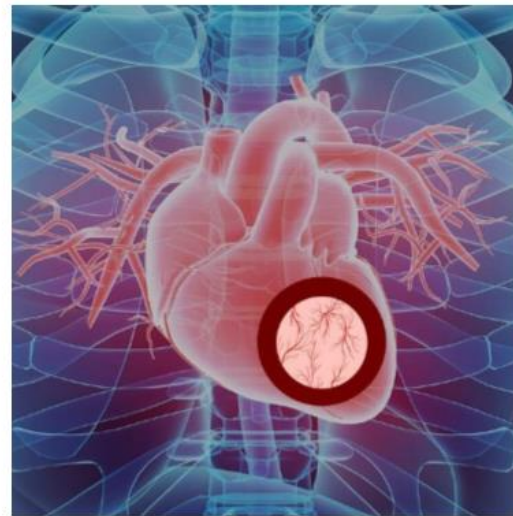
神戸医療機器開発センター;MEDDEC  
@神戸ポートアイランド

# IHJ-301の治療メカニズム

これまでの同様製品では期待できなかった治療効果の持続



三次元組織からのサイトカインによる治療効果  
(血管新生・抗アポトーシスなど)



宿主からの血流供給による再生三次元組織の灌流

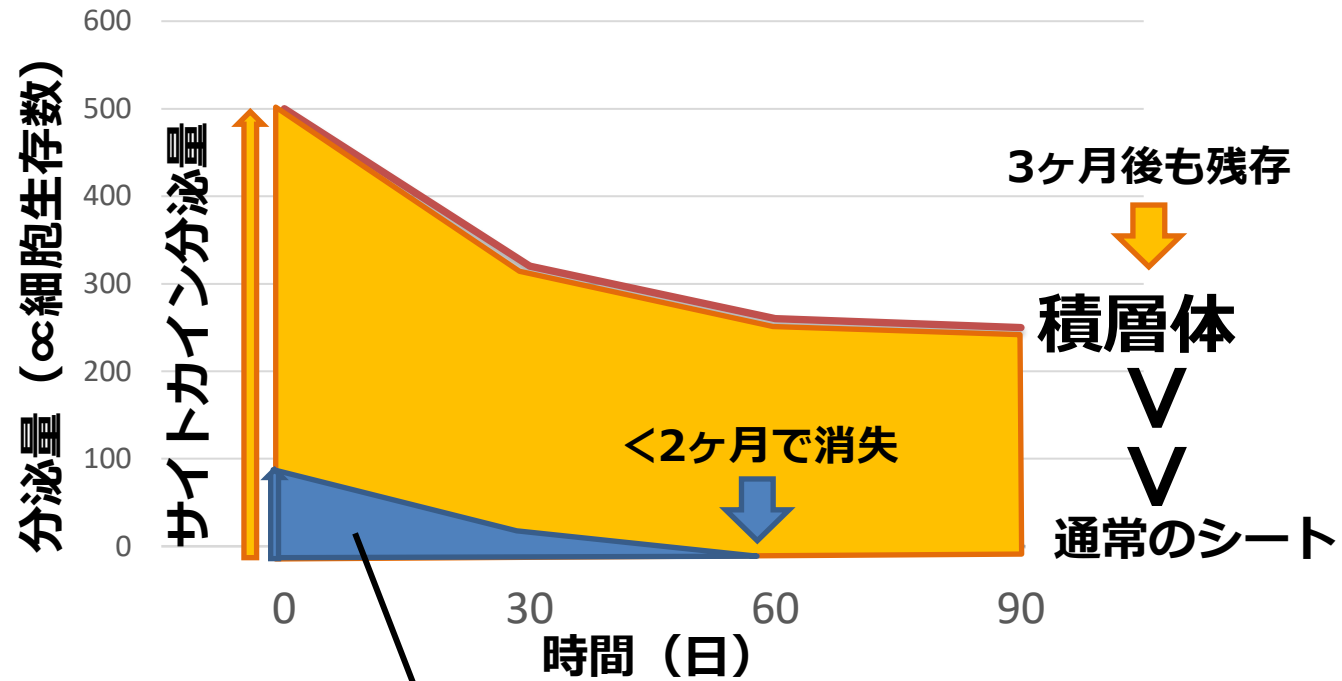


三次元組織の長期にわたる生着および持続的治療効果

(iHeart Japan株式会社HPより・一部改変)

# IHJ-301の治療メカニズム

## パラクライン効果の概算比較



総パラクライン効果 $\propto$ グラフエリア

強力なパラクライン効果

アンメットメディカル  
ニーズに応える

# 臨床用特定細胞加工物製造体制



細胞培養アイソレーター・Cpi 2511（澁谷工業株式会社）

<https://www.shibuya.co.jp/regenerative/cpi.html>



iHeartJapan社細胞培養加工施設

（2018年4月18日 日経バイオテク）

- iHeartJapan株式会社御車研究室に細胞培養加工施設を設置済
  - 近畿厚生局による特定細胞加工物の製造許可済（2019年3月）
- 臨床研究用セルバンク構築済
  - AMED 未来医療を実現する医療機器・システム研究開発事業; H26-30

# 京都大学病院での臨床研究

試験目的	重症心不全で、年齢などが理由で心臓移植や補助人工心臓の適応にならない成人患者を対象に、ヒトiPS細胞由来心血管系細胞多層体（IHJ-301）を移植し、移植後12ヵ月までの安全性及び有効性を評価する。
試験デザイン	単施設 単群 非盲検 非対照 探索的臨床研究
評価項目	主要エンドポイント：安全性（有害事象発生の有無） 副次エンドポイント：有効性（心機能・臨床症状改善）
対象疾患	拡張型心筋症、虚血性心筋症
予定症例数	3例
研究実施責任者	湊谷 謙司 教授（京都大学 心臓血管外科）

- 2020年4月14日：京都大学 特定認定再生医療等委員会 承認
- 現在 臨床研究契約および厚生科学審議会再生医療等評価部会への計画提出準備中
- 臨床研究に引き続き治験を実施予定（京都大学・東京大学など）；準備中



(2020年6月19日 朝日新聞朝刊)



# まとめ

---

同種iPS細胞を用いた心血管系細胞多層体であるIHJ-301は既存の治療方法では効果不十分なさまざまな重症循環器疾患に対する再生治療において近未来のアンメット・メディカルニーズを満たすものと期待される。

## VI. 参考資料

1. 平成 22 年 1 月 18 日付薬食機発 0118 第 1 号厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知 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」
2. 平成 23 年 3 月 29 日付薬食審査発 0329 第 18 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知 別添「抗心不全薬の臨床評価方法に関するガイドライン」
3. 平成 24 年 9 月 7 日付薬食発 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関する指針」
4. 令和元年 6 月 27 日付薬生機審発 0627 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知 別添「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関する留意点」
5. ヒト (同種) iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた虚血性心筋症の治療に関する評価指標 (案) (令和 3 年度次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業)

薬食機発0118第1号  
平成22年1月18日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬食品局審査管理課  
医療機器審査管理室長

### 次世代医療機器評価指標の公表について

厚生労働省では、医療ニーズが高く実用可能性のある次世代医療機器について、審査時に用いる技術評価指標等をあらかじめ作成し、公表することにより、製品開発の効率化及び承認審査の迅速化を図る目的で、検討分野を選定して評価指標を検討してきたところです。

今般、骨折整復支援装置、関節手術支援装置、重症心不全細胞治療用細胞シート及び角膜上皮細胞シートの評価を行うに当たって必要と考えられる資料、評価のポイント等を評価指標としてとりまとめましたので、下記に留意の上、製造販売承認申請に当たって参考とするよう、貴管下関係業者に対しご周知いただきますよう御配慮願います。

なお、本通知の写しを独立行政法人医薬品医療機器総合機構理事長、日本医療機器産業連合会会長、米国医療機器・IVD工業会会長及び欧州ビジネス協会医療機器委員会委員長あて送付することとしております。

### 記

1. 評価指標とは、承認申請資料の収集やその審査の迅速化等の観点から、製品の評価において着目すべき事項（評価項目）を示すものである。評価指標は、法的な基準という位置付けではなく、技術開発の著しい次世代医療機器を対象として現時点で考えられる評価項目を示したものであり、製品の特性に応じて、評価指標に示すもの以外の評価が必要である場合や評価指標に示す評価項目のうち適用しなくてもよい項目があり得ることに留意すること。
2. 個々の製品の承認申請に当たって必要な資料・データを収集する際は、評価指標に示す事項について予め検討するほか、可能な限り早期に独立行政法人医薬品医療機器総合機構の対面助言を活用することが望ましい。

## 重症心不全細胞治療用細胞シートに関する評価指標

### 1. はじめに

ヒト由来細胞・組織を加工した医薬品又は医療機器（以下「細胞・組織加工医薬品等」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 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（以下「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）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（以下「ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）に定められているところである。

本評価指標は、ヒト由来細胞・組織加工医薬品等のうち特に重症心不全等の治療を目的として心臓に適用されるものであって細胞シート状の製品について、上述の基本的な技術要件のうち当該製品に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、重症心不全治療を目的として適用される細胞・組織加工医薬品等のうち特に細胞シート状の製品について、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したものである。重症心不全とは、一般に NYHA 分類でⅢ度以上のものをいうが、製品の適応疾患については、単に重症心不全とするのではなく、例えば、NYHA 分類でⅢ度以上、左室駆出率（LVEF）35%未満、心臓移植以外に治療手段がない等、既存の治療方法も考慮し、適切かつ具体的な基準を設定すること。

なお、開発する細胞シート製品が医療機器に該当するかどう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由来細胞・組織加工医薬品等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ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針及びヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の指針の定義による他、以下のとおりとする。

- (1) 心不全：心臓自体の障害により心臓のポンプ機能が低下した結果生じる循環不全であって、組織・臓器が必要とする酸素や血液を十分に供給できなくなった状態をいう。心不全の重症度の評価方法としては NYHA 分類等臨床症状による方法や LVEF 等心機能による方法等が考えられる。
- (2) 細胞シート：細胞同士、または細胞と支持体が結合してシート状の形態を呈したものをいう。
- (3) 支持体：細胞をシート状に形成するための足場となるものをいい、移植・投与される細胞シート製品に含有されるか否かを問わない。なお、支持体の原料として生物由来の原材料が用いられる場合もある。

#### 5. 評価に当たって留意すべき事項

##### (1) 製品の品質管理

細胞シート製品の品質管理における留意点として、例えば以下に挙げた事項が考えられるが、必要かつ適切であれば別の試験項目の採用又は追加を検討すること。なお、各試験項目の設定根拠及び試験方法の妥当性については説明する必要がある。

##### ① 形状について

必要な面積、穴・欠損の有無等の適切な項目を製品の特性に応じて設定すること。

##### ② 構造について

細胞シート製品の厚さあるいは細胞の層数等について規格を設定すること。例えば血管網などの構造的な要素が細胞シート製品の品質、有効性及び安全性の確保に必要である場合は、それが形成されていることを免疫組織化学的検討等の手法により確認し、必要かつ可能であれば適切な定量的規格を設定すること。

##### ③ 力学的特性について

細胞シート製品としての形状維持やその有効性及び安全性のために一定の強度が必要とされる場合には、引っ張り応力等の力学的適合性及び耐久性に関する規格を設定すること。

#### ④ 構成細胞及び細胞の分化度について

構成細胞のポピュレーション分布の定量的規格を設定し、フローサイトメトリー法等により、それを確認すること。また、細胞特異的マーカーに対する抗体等を用いてシートを構成している細胞の分化状態を確認し、可能であれば製品に必要とされる細胞の分化度についても規格を設定すること。細胞から産生される因子等が有効性に寄与する可能性が想定される場合には、産生量と臨床試験効果との相関性に関する情報を収集すること。

#### ⑤ 細胞シート製品の運搬について

細胞シート製品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、容器内の環境等が適切に管理され、製品の品質、有効性及び安全性が確保されることを示すこと。その際、特殊な機能を有する培養皿を使用する場合はその特性を考慮すること。

例えば、温度感受性培養皿のように細胞シートを製造するために細胞との接触面に特殊処理を施している場合、当該培養皿を用いて製造された細胞シート製品は、温度低下により細胞が培養皿から脱着して細胞生存率や細胞機能が低下する可能性があるため、輸送の際は温度管理が特に重要となる。

## （２）非臨床試験

動物に細胞シート製品を適用して有効性及び安全性を評価する際には、対象疾患を考慮して疾患モデル動物を作成すること。疾患モデル動物作成方法の例として、冠動脈結紮による心筋梗塞モデル又は overdriving 法による拡張型心筋症モデル等が挙げられるが、用いた動物モデルについては、その選択の根拠、試験系の妥当性及び得られた結果のヒトへの外挿性について説明する必要がある。有効性及び安全性の評価のために、細胞シート製品を適用した群、対照物質を適用した対照群、さらに必要であれば sham オペ群を用いた比較試験を実施すること。評価期間についても、その設定根拠について説明すること。移植した細胞シート製品とそれによってもたらされる効果について、細胞シートに含まれる細胞の移植部位における局在性を確認するなど経時的に評価し、その関連性について考察すること。

また、動物試験は、使用方法に関する試験の意味合いも含んでいることから、動物への適用方法は、可能な限り臨床での使用法（例えば、開胸手術、

内視鏡的手術など)を反映することが望ましい。

評価項目としては、例えば以下を検討することが考えられるが、必要かつ適切であれば別の試験項目の採用又は追加を検討すること。

#### ① 形態学的評価

細胞シート製品を適用した部位の組織学的検討を行い、適用部位及び周辺組織の状態を評価すること。例えば、適用部位におけるシート細胞の生着(生存数などを含む)、適用周辺部位の線維変性及び炎症細胞の浸潤の有無、適用部位及び周辺組織の変化(形状、厚み、細胞数、分化状態など)の検討を行うことが考えられる。また、移植された細胞シートの形状、性質及び機能を維持するために必要な構造的な要素(例えば血管網など)がある場合には、免疫組織化学的検討等の手法により確認すること。

#### ② 催不整脈性の評価

催不整脈性に関しては、普遍的に受容されたモデル動物は確立されていないため、対象疾患等を考慮して作成した疾患モデル動物(イヌまたはブタなど)を用いて評価すること。例えば、細胞シート製品の適用前後における、各群の長時間の心電図記録をホルター心電図等を用いて比較し、不整脈の有無と重症度について検討すること等が考えられる。

#### ③ 血清学的評価

一般的に利用されているマーカー因子を用いて、腎機能、肝機能、急性心筋障害、慢性心筋障害等について評価すること。

#### ④ 心機能、血流評価

心機能に関しては、心臓超音波検査や造影MRI等によって収縮能・拡張能を評価する必要がある。その他要すれば左室内腔短縮率、左室壁運動等の評価を検討すること。必要であれば、目的とする疾患、効能及び効果に応じて細胞シート製品適用後における血流を評価すること。評価法としては、例えばFDG-PETによる検討、あるいは心臓超音波検査等が考えられる。また、当該有効性が持続する期間についても検討すること。

#### ⑤ 細胞シートの使用方法、使用量等に関する評価

梗塞・拡張等の部位・面積等に対し、適切な細胞シート移植量(例えば移植シートの面積、細胞数、層数など)及び移植方法等を検討すること。

### (3) 臨床試験(治験)

治験実施計画書(安全性及び有効性の評価項目を含む。)は、対象疾患、目的とする効能及び効果、当該治療法に期待される臨床上的位置付け等を明確にした上で、それらに応じた評価項目を設定し、非臨床データ等も踏まえ

て適切に計画されるべきである。

特に被験者の心筋と適用した細胞シートの細胞の間での適切な電氣的結合の欠如等の原因により、致死的不整脈が誘発される可能性が否定できないことから、細胞シート製品の適用前後の適切な時期に継続的に心電図等の不整脈に関する電気生理学的検査等を実施すること。検査方法としては、標準12誘導心電図、ホルター心電図、加算平均心電図、T波交互脈 (T wave alternans) などがある。また、必要に応じて抗不整脈薬の投与または植込み型除細動器の挿入等の緊急時の対応についても検討すること。

また、用いる細胞によっては腫瘍または石灰化の有無を確認すべき場合もあるため、必要に応じて、細胞シート製品の適用後に定期的に検査等（例えばCT検査等）を実施することを検討すること。



薬食審査発 0329 第 18 号  
平成 23 年 3 月 29 日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬食品局審査管理課長

「抗心不全薬の臨床評価方法に関するガイドライン」の改訂について

抗心不全薬の臨床評価方法に関するガイドラインについては、昭和 63 年 10 月 19 日付け薬審 1 第 84 号厚生省薬務局審査第一課長通知「抗心不全薬の臨床評価方法に関するガイドラインについて」（以下「現行ガイドライン」という。）として通知され、抗心不全薬の承認申請の目的で実施される臨床試験の評価方法の標準的方法として適用されてきたところである。今般、現行ガイドラインが通知されてから 10 年以上の年月が経過し、この間に抗心不全薬の開発・審査を巡る状況に大きな変化が認められたことから、別添のとおり現行ガイドラインを改め、下記により取り扱うこととしたので、貴管下関係業者に対し周知方よろしくご配慮願いたい。

#### 記

##### 1. 適用日等

- (1) 本ガイドラインは平成 24 年 4 月 1 日より適用する。
- (2) 本ガイドラインの施行に伴い、現行ガイドラインは平成 24 年 3 月 31 日をもって廃止すること。
- (3) 本通知日以降、可能な範囲で本ガイドラインに示された方法等を開発計画に取り入れることは差し支えないこと。

##### 2. 留意事項

学問の進歩等を反映した合理的根拠に基づいたものであれば、必ずしもここに示した方法を固守するよう求めるものではないこと。

(別添)

## 抗心不全薬の臨床評価方法に関するガイドライン

### I 緒言

本ガイドラインは、抗心不全薬として開発される新医薬品の臨床的有用性を検討するための臨床試験の標準的実施方法について概説したものである。なお、本ガイドラインは、「抗心不全薬の臨床評価方法に関するガイドライン」について（昭和63年10月19日薬審1第84号）（以下「旧ガイドライン」という。）を、心不全の概念が時代と共に大きな変遷を遂げ、治療の目的も、昭和63年当時の「心機能の改善」から、現在の「患者の生活の質と生存率の向上」に移っていることから、医学薬学的知見を踏まえて改定したものである。

#### 1. 本ガイドライン改定の主旨について

昭和63年の旧ガイドライン策定から20年以上が経過し、旧ガイドラインには必ずしも最新の医学薬学的知見を反映していない内容がある。策定当時、抗心不全薬の臨床試験の試験期間（観察期間）は極めて短く、旧ガイドラインでは試験期間については「一般的に、急性心不全では数時間～72時間、慢性心不全では4週間以上（通常3カ月）」とされている。しかし、抗心不全薬の有効性・安全性の評価にはより長期間の評価が必要であるという意見がある。本ガイドラインにおいては、旧ガイドラインの内容を現在の医学薬学的水準を踏まえて改訂する。

最近では抗心不全薬の臨床試験に関していくつか議論になっている項目がある。例えば評価項目に関して、欧米では、生存率の向上以外に有意な効果を期待していないという現状がある。我が国では、心不全による死亡は欧米に比べて少なく、我が国で実施する臨床試験について、生存率を評価項目に設定するか、また、QOL（Quality of life 生活の質）の向上をどう位置づけるか等の検討の必要性が生じている。これらについて生物統計学的見地も踏まえ検討を行い、本ガイドラインの内容に盛り込む。

本ガイドラインを参考に臨床試験が計画・実施されることにより、我が国の臨床試験データの信頼性向上につながり、結果として有効で安全な医薬品を国民に迅速に提供することにつながるものと考えられる。

以上のような主旨でのガイドライン改訂のために、これまでに発表された抗心不全薬の臨床試験のレビュー、旧ガイドラインの改訂作業、薬効評価における倫理的側面に配慮し、我が国の状況に応じた適切な評価項目が設定されるなど科学的な厳密さを備えた臨床試験計画等について言及した。

## II 非臨床試験

非臨床試験として、想定される当該薬物の臨床的位置付けを踏まえた有効性プロファイルを適切に評価できる薬効薬理試験（適切な心不全モデル動物における循環動態の検討等を含む）を実施する必要がある、その他に、安全性プロファイルを検討する試験（毒性試験、安全性薬理試験、薬物動態試験）の実施が必要となる。毒性試験、安全性薬理試験及び薬物動態試験の実施時期は、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）における合意に基づく「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドラインについて」（平成 10 年 11 月 13 日医薬審第 1019 号）、「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドラインの改正について」（平成 12 年 12 月 27 日医薬審第 1831 号）等の通知で定められているが、臨床試験で得られた安全性情報により、新たな試験の実施が必要となることもある。なお、規制当局が求める安全性プロファイルを検討する試験の詳細については、ICH での議論・合意に基づき逐次改訂等なされていくので、随時最新の非臨床試験に係るガイドライン等に基づいて試験を実施する必要がある。

これらの試験から得られる情報は、ヒトでの投与量の推定のためだけでなく、臨床試験での有害事象のモニタリングを規定する際にも参考にすべきである。

また、本ガイドラインには記載しないが、原薬及び製剤の品質・規格に関する試験等を実施することも要求される。

## III 急性心不全

### 1. 急性心不全の概念と急性心不全治療薬（抗急性心不全薬）の承認に必要な条件

#### 1) 急性心不全の概念

急性心不全とは、“心臓に器質的・機能的異常が生じ、急速に心ポンプ機能が破綻し、心室充満圧の上昇や主要臓器への灌流不全をきたし、それに基づくうっ血や低拍出状態の症状や徴候が出現した状態”をいい、急性心筋梗塞症など新規発症のタイプと拡張型心筋症など慢性心不全の急性増悪タイプの二つの病態がある。心不全の原因は心筋の一次的あるいは二次的な障害にある。それにより、心臓の収縮機能や拡張機能、リズム機能に障害をきたし、心拍出量の低下または循環障害による全身的な機能障害を惹起する。

#### 2) 急性心不全の病態

急性心不全には、①急性非代償性心不全：心不全の徴候や症状が軽度で、心原性ショック、肺水腫や高血圧性急性心不全などの診断基準を満たさない新規急性心不全、または慢性心不全で病態が急に明らかに変化した場合、②高血圧性急性心不全：高血圧を原因として、心不全の徴候や症状を伴い、多くは胸部 X 線写真で急性肺うっ血・肺水腫を認める、③急性心原性肺水腫：呼吸困難や起坐呼吸を認め、湿性ラ音を聴取する。胸部 X 線写真で肺水腫を認め、治療前の動脈血酸素飽和度は 90 % 未満であることが多い、④心原性ショック：心ポンプ失調により末梢及び全身の主要臓器の微小循環が著しく障害され、組織低灌流に続発する重篤な病態、⑤高拍出性心不全：通常、甲状腺中毒症、貧血、シャント疾患、脚気心、Paget 病、医原性などを基礎疾患とし、末梢は暖かく、肺うっ血を認める。しばしば、敗血症性ショックでも認められる、⑥急性右心不全：頸静脈圧の上昇、肝腫大を伴った低血圧、低心拍出量症候群を呈している場合、の 6 病態がある。

### 3) 急性心不全の治療目標と臨床試験のあり方

急性心不全における治療目標は、自覚症状・他覚所見の改善、血行動態の改善、短期的生命予後の改善、QOL の改善にある。急性心不全を対象とした臨床試験では、上記の治療目標の達成度を評価する必要があり、第Ⅲ相試験の主要評価項目としては、救命の可否、総死亡率、心血管系罹患率、自覚症状が適切と考えられ、血行動態の改善、QOL の良否等は有効性の評価に際して補助的な役割を果たすと考えられる。被験薬の急性効果判定に用いる指標としては、種々の自覚症状や他覚所見、血行動態指標、短期的生命予後が有用である。また、観察時期は、入院時、ICU 退室時、退院時、退院後などそれぞれの被験薬の特性に合わせて設定し、投与前(例:2時間～直前)、投与後急性期(例:0～48時間～2週間)、投与後長期(例:2～4週間後相当)に分けて適切な観察項目を設定すべきである。

試験対象は急性心不全患者(慢性心不全の急性増悪を含む)である。有効性、安全性の評価を、急性心不全患者と慢性心不全の急性増悪患者とで分けて行うことが適切な場合も考えられる。一般に、被験者が心肺危機に曝されていることを考慮し、患者に不利益をきたさぬよう十分な安全性及び倫理性への配慮を必要とする。有効性を検討する臨床試験においてはプラセボを対照薬とすることが原則である。しかし、試験の安全性や倫理的観点から止むを得ない場合には、既存の標準的急性心不全の基礎治療を維持しながら行う、プラセボを対照薬とする比較試験、あるいは既存の抗心不全薬を対照とした比較試験等が考えられる。但し、第Ⅲ相試験でプラセボを対照薬として採用しない場合、第Ⅲ相試験を実施する以前のいずれかの段階で、当該被験

薬がプラセボよりも有用であることを示さなければならない。

臨床試験の実施に際しては、被験者（必要な場合は代諾者）に臨床試験の意義、当該試験の安全性と有効性、試験に参加しなくともいかなる不利益も当該患者に発生しないことなどについて十分な説明を行い、理解と文書による同意を得た後に実施しなければならない。

#### 4) 急性心不全の予後と QOL の考え方

急性心不全の臨床試験では、①救命達成の可否（短期予後）、②自覚症状をはじめとする患者負担の軽減、③退院時や退院後の障害程度の軽減（長期予後）が検討されるべきと考えられるが、とりわけ、急性心不全の特性上、救命達成の可否の検討は重要である。

具体的には、急性心不全の臨床試験において、必須な有効性の評価項目は、臨床徴候・症状（Clinical signs and symptoms）、血行動態、予後である。臨床徴候・症状の指標には、呼吸困難、ラ音、Ⅲ音などが含まれる。血行動態の指標には、体重、尿量、肺動脈楔入圧（Pulmonary Capillary Wedge Pressure：PCWP）、BNP、心エコー指標等が含まれる。血行動態の評価は、心機能とは分けて考えられるべきである。血漿中 BNP 値については心不全の診断や治療の予測因子としての重要性は認められているものの、抗心不全薬の有効性の評価指標としての意義は確立していない。予後については、急性期における救命達成などの短期予後と、退院 6 ヶ月後の死亡率等の長期予後の両方の評価が必要である。死亡率（Mortality）、罹患率（Morbidity）の評価が必要であり、その指標としては、救命達成の可否、自発呼吸回復までの時間、ICU 退室までの時間、退院までの時間、退院後の心事故再発、再入院等が含まれる。被験薬の投与終了後においても、短期及び長期の生命予後への影響を検討する目的で、入院中、急性心不全発現から 1 ヶ月、6 ヶ月以上の時点での死亡率に関する情報収集が必要である。また、腎機能は予後に大きく影響することが想定されるため、同時に腎機能に関する情報収集もされるべきである。さらに、QOL の改善も評価することが望ましい。急性心不全に関連した ADL（Activities of daily living）や認知機能、QOL については未だ標準的な評価指標が確立していない実情はあるが、高齢化社会におけるこれら指標の重要性について異論はないのも事実である。

#### 5) 抗急性心不全薬の承認に必要な条件

抗急性心不全薬として承認を得るためには、死亡率、罹患率を含めた急性期の予後に関する主要評価項目を用いた臨床試験において、有効性が示される必要がある。また、急性期の生命予後のみでなく、同時に少なくとも 6

ヶ月以上の長期予後を悪化させないことが示される必要がある（必ずしも、長期予後の改善までが示される必要はない）。

また、急性期の臨床徴候・症状の改善が臨床試験で示されることが必要である。

血行動態の評価は、開発段階の適切な時点で適宜実施される必要があるが、血行動態の指標の改善は、必ずしも生存率の改善と相関しないため、急性期の血行動態の改善が示されるだけでは、不十分と考えられる。例えば、PCWPの低下が示されるのみでは不十分であり、同時に、死亡率の低下が示されるか、あるいは、肺うっ血に基づく呼吸困難の改善など、血行動態的な背景を持った臨床徴候・症状の改善のいずれかが示される必要がある。血行動態については、第Ⅱ相試験で改善が示された場合には、第Ⅲ相試験における評価は必須ではないが、少なくとも血行動態の悪化がみられないことは示される必要がある。

## IV 慢性心不全

### 1. 慢性心不全の概念と慢性心不全治療薬（抗慢性心不全薬）の承認に必要な条件

#### 1) 慢性心不全の概念

慢性心不全とは、心筋の何らかの異常により心臓の収縮機能・拡張機能・調律機能に障害を生じ、心拍出能の低下または循環障害による臓器のうっ血により全身的な機能障害を呈する病態であり、長期にわたって機能障害が継続している場合をいう。心筋構成要素の構造・機能異常の他、虚血性、代謝性炎症性変化など原因によって心筋異常の程度や様式に差があるが、結果としては惹起される心不全病態は、原因によらず共通の特色をもつ。しかし、心筋異常に基づく心機能障害があっても、必ずしも、心不全症状は出現しない。成人における慢性心不全の診断と管理に関する ACC/AHA ガイドライン（2005年改訂版）では、心不全のステージ分類（A-D）を提唱しているが、心不全はステージ C より病期が進行したものと定義されており、抗心不全薬の対象としてステージ C 以上の病態を扱い、ステージ A 及び B は、心不全の予防を考える場合のみ対象とされている。

#### 2) 慢性心不全の病態

慢性心不全は多くの場合進行性であるが、心筋障害の程度は必ずしも心不全症状の重症度と一致しない。心不全症状は、心機能のみならず全身臓器

の機能（状態）に大きく影響されているからである。したがって、心機能の障害程度は不変であっても、心不全の程度は全身状態や介入（治療）によって大きく変化することに留意する必要がある、心不全は可逆的であることを銘記すべきである。

従来、心機能障害のうち、収縮不全に基づく心不全が抗心不全薬の対象病態として考えられ、抗心不全薬の治療でも、左室駆出率が 35%以下の心不全患者または既往者がその対象となることがほとんどであった。このような、収縮性心不全（systolic heart failure）では、神経体液性因子の賦活化及び心筋リモデリング（心拡大、心室の球状化など）が病態進行の促進因子になることが明らかになっている。心筋リモデリング（とくに心肥大・心筋線維化）、心筋虚血、電解質異常は致死性不整脈の促進因子となるが、現在、突然死を予測するバイオマーカーは確立していない。

一方、V-HeFT 試験や DIG 試験の被験者の中には、左室駆出率が 50%以上の心不全患者が存在し、疫学研究より左室駆出率の維持された心不全（Heart failure with preserved ejection fraction; HF-PEF）または拡張性心不全（diastolic heart failure）が、全心不全患者の 40~50%存在し、高齢の女性、高血圧または高血圧の既往者に多いことが明らかになっている。また、併存症として、腎機能障害、貧血、糖尿病が多いことも分かっている。しかし、この拡張性心不全は、収縮性心不全の進展経過の一病型ではなく、互いに独立した疾患と考えられている。今後病態解明がすすめば、治療の適応も収縮性心不全と拡張性心不全を分けて考える必要性が生じる可能性もある。

### 3) 慢性心不全の治療目標と臨床試験のあり方

慢性心不全における治療目標は、①生命予後の改善、②社会復帰・家庭生活の維持（罹患率の改善）、③自覚症状の改善・生活における快適度（狭義の QOL）の保持である。したがって、慢性心不全を対象とした臨床試験では、上記の治療目標の達成度を評価する必要があり、主要評価項目としては、総死亡率、心血管系罹患率、自覚症状が適切と考えられ、QOL、運動耐容能、身体所見、血行動態の変化（EF など）、腎機能、神経体液性因子は副次評価項目として、有効性の評価に際して補助的な役割を果たすものと考えられる。QOL の評価方法については、後述するが、自覚症状の改善は少なくとも 6 ヶ月以上の期間で評価されるべきである。

試験対象は、慢性心不全患者であり、予後不良で QOL の低下した患者を対象にすることから、臨床試験の遂行にあたっては患者に不利益をもたらさぬよう安全性及び倫理性に十分な配慮を必要とする。

第Ⅲ相試験においては、現行の適切な慢性心不全の基礎治療を維持しながら

ら、プラセボを対照薬とする比較試験、あるいは既存の抗心不全薬を対照とした比較試験等が考えられるが、無作為化二重盲検比較試験とすることが必要である。但し、第Ⅲ相試験でプラセボを対照薬としない場合には、何らかの方法を用いて第Ⅲ相試験に入る以前のいずれかの段階で、治療薬がプラセボより有用であることを示さなければならない。

多くの薬剤は、申請効能・効果の内容にかかわらず、承認前に主要評価項目に死亡（率）を含む試験が必要となると考えられる。薬剤が、新規作用機序であるか、同じクラスの薬剤が死亡率について有害な影響をもたらすことが示されている場合には、前向きは無作為化対照試験における死亡に関する検討が必要となる。

慢性心不全においては、従来国際的には死亡が主要評価項目とされてきたが、心不全による死亡率が低い本邦においては死亡を主要評価項目として第Ⅲ相試験を実施することは困難なことが多いと考えられる。また、死亡に替わる適切な代替評価項目が存在しないため、国内における第Ⅲ相試験では、罹患率（入院や基礎治療の変更等）を主要評価項目とすることが、現実的な対応として許容される場合もあると考えられる。あるいは、第Ⅲ相試験として、死亡を主要評価項目とした、大規模な国際共同治験への参加が可能と判断される場合には、当該国際共同治験を検証試験と位置付けることも考えられる。

抗慢性心不全薬の開発における、大規模な国際共同第Ⅲ相試験への参加に際しては、以下の点に留意する必要がある。民族差に基づく用法・用量の国内外差の存在が想定される領域であることから、国際共同第Ⅲ相試験への参加の前に、通常、日本人についての用量設定のための第Ⅱ相試験が必要である。少なくとも国際共同第Ⅲ相試験での検討用量が、日本人において妥当であることがあらかじめ示されている必要がある。国内外での第Ⅱ相試験の成績からでは、用法・用量を1用量に絞り込めない場合には、高低2用量などの複数用量の国際共同第Ⅲ相試験を実施し、結果により承認用量を国別に検討する開発方針も可能であろう。

第Ⅲ相試験で生命予後の評価が困難な場合、製造販売後の臨床試験において、可能な限り予後を検討する必要がある。なお、観察期間は、治療薬の種類や特性などを考慮して1年以上に設定すべきである。

臨床試験の実施にあたっては、被験者に臨床試験の意義、想定される安全性と有用性について十分な説明を行い、被験者の理解と文書による同意のもとに実施しなければならない。

#### 4) 慢性心不全の予後と QOL の考え方



慢性心不全の生命予後と QOL は必ずしも相関しないことが明らかになっている。慢性心不全の生命予後の規定因子は、心ポンプ不全による臓器不全と突然死であり、突然死は心血管死の 40～50% を占める。突然死の頻度は、QOL と相関がなく、QOL の良好な患者群からの発症も多い。慢性心不全患者の QOL は身体的側面（運動能）と精神的側面の両面から規定される。運動耐容能は最大運動能力で定義され、心肺機能検査における PVO<sub>2</sub> で表現されるが、簡便法として 6 分間歩行距離も頻用される。身体活動指数 SAS : specific activity scale も日常生活における運動能の評価法であるが、最大運動能を反映するものではない。一方、QOL は、患者個人の自己評価に基づくものであり、主観的な評価は、通常質問に対する回答から得られるため、この目的で慢性心不全患者 QOL 評価のための質問票が幾つか提案され使用されている。

慢性心不全患者の治療の目標は、まず生命予後の改善であり、次に QOL の改善である。したがって、慢性心不全治療における抗心不全薬に求められる要件も、QOL 改善につながる心不全症状の改善が第一義ではなく、生命予後の改善が QOL の改善に優先されるべきである。

## 5) 生命予後に及ぼす治療薬剤の評価

慢性心不全の予後は、5 年生存率が 50～60% と報告されている<sup>1</sup>が、1 年予後と 5 年予後の間に乖離はみられない。しかし、これまでの慢性心不全に対する複数の臨床試験で 6 ヶ月予後と 1 年予後の間に乖離がみられることから、少なくとも 1 年以上の経過観察による長期予後の追跡が必要である。予後の解析には、科学的に妥当な症例数とプロトコールに沿った検討が必要であるが、死亡に代わる代替指標は存在しないため、全死亡あるいは心血管死のいずれかを主要評価項目に含めるべきである。心不全の悪化による入院は罹患率の指標となるが、心不全は可逆的な病態であるため死亡率の代替指標とはならず、死亡率の評価指標としての臨床的な重要性は、罹患率とは異なる点に留意が必要である。但し、心不全の悪化による入院と、心不全の悪化に対応する治療内容の変更や追加については、程度の差はあっても同一の性質を有するため同じ罹患率の指標として取り扱うことは可能と考えられる。

## 6) QOL に及ぼす治療薬剤の評価

慢性心不全における QOL の改善は、その原因から、①心不全の病態の改善、②運動耐容能の改善、③精神・心理的な改善に分類される。

心不全病態の改善による QOL の改善は、心ポンプ不全による臓器不全の改善か、臓器うっ血の改善のいずれかにより、心不全症状の改善が得られた

場合にみられる。心拍出量の増加に伴う臓器血流の改善は、臓器不全を改善させ QOL も改善させる。肺うっ血の減少や肝うっ血、下腿浮腫の減少も QOL の改善に寄与する。しかし、心不全病態は改善しても QOL が改善しない場合もある。

運動耐容能の改善は、QOL を改善する大きな要因である。運動耐容能は、最大運動時の運動骨格筋への血流供給量に規定され、肺の酸素換気要因が規定因子になることは少ない。運動耐容能は、骨格筋の最大酸素利用能を表現しているため、強心薬や血管拡張薬のように運動骨格筋への血流を増加させる薬剤以外にも骨格筋の酸素摂取・利用率を向上させる薬剤も運動耐容能を改善する。

精神・心理的な側面は QOL の大きな規定因子である。しかし、身体的要因が精神的要因に影響を与えることも少なくない。温熱療法や運動療法、転地療法（環境の変化）には、このような効果も含まれると考えられる。選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRI）や睡眠改善薬など直接的な向精神作用が期待できる薬剤もある。また薬剤以外に、家族や医療供給者からのサポートやコミュニケーションも QOL 改善に大きく寄与することは言うまでもない。

一方、QOL の評価のために今世界中で多くの質問票が用意されているが、抗心不全薬の有効性の評価が量的に行われるのは身体領域（physical domain）の質問が中心で、情緒領域（emotional domain）の質問で有意な治療効果が示された臨床試験は無い。

## 7) 抗慢性心不全薬の承認に必要な条件

抗慢性心不全薬の目的は、患者の生命予後改善と QOL 改善である。両者が満足できる場合が最も望ましいが、両者の改善に不一致がある場合、生命予後改善が QOL 改善より優先される。したがって、生命予後改善が認められれば、QOL の改善が認められなくても薬剤の承認を考慮する。しかし、QOL の悪化が著しい場合（例えば、臥床安静を余儀なくさせられる、高頻度に呼吸困難を訴えるなど）、その内容・程度・頻度により承認されない場合あるいは、条件付承認となる場合が考えられる。

一方、生命予後の改善は認められないが、生命予後の悪化がみられない場合、QOL 改善が認められれば、慢性心不全治療に有用な薬剤と考え承認を考慮する。しかし、QOL 改善が運動耐容能の改善によらない場合、抗心不全薬とは定義されない可能性もあることに留意する必要がある。生命予後改善も QOL 改善もみられない場合は承認しない。

長期生命予後が悪化する場合は QOL 改善が認められても抗心不全薬とし

て承認すべきではないと考えられる。しかし、生命予後の悪化が、特定のサブグループに限定されており、そのグループを識別する因子が明らかで、かつ他のサブグループにおいては QOL の改善が明確な場合、付帯条件をつけて承認を考慮する場合もある。

生命予後の評価には、通常、大規模臨床試験が必要であるが、国内で十分な症例数が得られない場合に、海外の成績を外挿して国内での承認審査に利用可能な場合があるが、海外成績の利用については、内因的、外因的要因の検討が必要である（「外国臨床データを受け入れる際に考慮すべき民族的要因について」（平成 10 年 8 月 11 日医薬審第 672 号）、「国際共同治験に関する基本的考え方について」（平成 19 年 9 月 28 日薬食審査発第 0928010 号）参照）。慢性心不全治療の領域は、内因的要因と医療環境等による外因的要因に基づく民族差が大きな臨床領域と考えられており、特に被験薬の国内外の用法・用量の相違、試験対象患者の重症度等の相違及び基礎治療の相違についての十分な検討が必要である。被験薬の用量に関しては、日本人における標準用量について、薬物動態学・薬力学試験の結果等により、何らかの評価指標を用いて海外と同等の有効性が期待できる用量であることが示された場合には、生命予後についても日本人でも海外と同等の効果が期待されると判断されることもあろう。一方、日本人における標準用量として、同等の有効性が期待される海外の標準用量よりも低用量が選択される場合には、海外試験の利用については注意が必要である。基礎治療薬については国内外に著しい差がないことが前提となるが、海外試験における慢性心不全の標準治療の内容（治療薬の種類、用法・用量等を含む）について精査し、国内外での比較と共に、被験薬の有効性、安全性に及ぼす影響を検討する必要がある。海外の成績を外挿して承認された薬剤については、製造販売後調査等（製造販売後臨床試験を含む）の実施が勧められる。

一方、国内における罹患率の評価は、抗慢性心不全薬の承認時に必須要件と考えられる。海外で生命予後の改善が検証されており、当該海外試験成績が日本において利用可能な場合、国内において罹患率の改善が示されれば承認を考慮する。国内では罹患率の統計学的に有意な改善を検討できる規模の臨床試験が実施不可能な場合であっても、少なくとも日本人の罹患率の改善を評価した臨床試験の結果が海外と同様の傾向であることが示される必要があり、かつ他の副次的な有効性の評価指標も含めて、日本人における有効性について十分説明できれば承認を考慮する場合もある。将来的に、生命予後との因果関係の明らかな要因が明確となれば、それらを代替評価項目として日本人における有効性が示されれば、承認する可能性があるが、現時点では、これに該当する要因は確立していない。（BNP などのバイオマー

カー、画像診断による心室リモデリングの改善、致死性不整脈の改善、体液量の改善等の指標が検討対象と考えられている。)

QOL（身体的側面、精神的側面）の評価については、国による医療環境（入院加療の条件、外来診療の実態、薬剤の使用状況など）や生活環境の相違は大きく、また生命観の違いも否定できないことから、抗慢性心不全薬の開発において、QOL の評価は国内で実施する必要がある。特に長期的な症状の改善は、重要な評価項目の一つであり、前述のように、QOL の改善が示された薬剤は、慢性心不全治療に有用な薬剤として承認を考慮するが、少なくとも罹患率の改善傾向が示され、かつ生命予後の悪化がみられないことが前提となる。

## V 心不全治療薬（抗心不全薬〔急性・慢性〕）の臨床試験

臨床試験の目的は、被験薬の有効性や安全性を健康成人及び患者集団において総合的に評価し、当該薬剤の臨床的有用性を検討することにあるが、非臨床試験の情報をもとに、治療薬がヒトにおいて許容される安全性の枠内で有効性を示すものと期待される場合に限り臨床試験に進むことができる。

臨床試験はヘルシンキ宣言などの人権尊重の精神に則り、かつ Good Clinical Practice（GCP）に定められた手続きに沿って実施する。第一段階（第Ⅰ相試験）では健康成人での安全性や薬物動態を確認する。第二段階（第Ⅱ相）では被験薬の効果が期待される心不全患者少数を対象として安全性、有効性、用量反応性等を検討する。その成績に基づいて第三段階（第Ⅲ相）で、実臨床での被験薬の投与対象となる心不全患者を試験目的に鑑み適切な例数を用いて有効性と安全性を網羅的に検討する。いずれの段階においても、有効性や安全性に疑義が生じたならば非臨床試験を含めた前段階に立ち戻って再検討せねばならない。基本的に、第Ⅲ相試験の成績を基に承認の可否が検討されるが、薬剤が臨床現場に提供された後にも前段階までに検出できなかった予期せぬ有害事象や副作用を検出する調査等が実施され、必要に応じて第四段階（第Ⅳ相）として製造販売後の臨床試験の実施が考慮される。

第Ⅱ相試験以降では心不全患者を直接対象とする。各臨床試験開始前に前相までの試験で得られた当該被験薬に関するあらゆる成績を多角的・多面的に検討し、その薬剤に最も適した心不全治療の到達目標を設定し、試験の対象患者、臨床試験方法、薬効評価の指標や薬効判定法などを決定する。

### 1. 第Ⅰ相試験

第Ⅰ相試験にて治療薬がはじめて人体に投与される。この段階では、当該治

療薬の安全な投与量や投与法の検索が主目的である。プラセボを対照薬としてヒトにおける被験薬の特性を確認する。特に安全性の確保については格別な配慮が払われる。

1) 試験担当者

抗心不全薬について十分な知識や経験を有する臨床医が、非臨床試験責任者や臨床薬理学に精通した専門家との協力のもとに実施する。

2) 被験者

原則として、健康成人からの志願者を対象とし、入院、あるいはそれに準じた状況で行う。

3) 安全性の確認

自覚症状、身体所見、臨床生理・臨床検体検査所見に基づき、予期されたあるいは予期されない異常（副作用）の有無を検索する。

4) 試験方法

(1) 用法・用量

a. 単回投与

投与量は非臨床試験で確認された無毒性量から十分な安全性マージンを加味した開始用量を設定し、安全性を確認しながら漸増する。

b. 反復投与

単回投与試験にて安全性を確認した後、さらに将来予想される用法や用量を考慮して、適切な期間にわたり反復投与を試みる。経口薬の場合には、薬剤の最高安全量もしくは推奨用量を用いて、血中濃度が定常状態に達するまで反復投与を行う。また、経皮薬など非経口薬の場合には、想定される薬物動態に応じた時間間隔で連続投与を行う。

(2) 観察項目

a. 薬物動態

技術的に可能な限り、薬物の吸収・分布・代謝・排泄に関わる特性を明らかにし、投与量及び投与間隔決定のための基礎的な情報を得る。すなわち、被験薬の生物学的利用性、血中半減期、分布容量、代謝臓器、体内消失経路、代謝産物の同定などの項目について検討する。さらに、反復投与時に適当な間隔で薬物の血中濃度の判定を行い、該当被験薬の薬物動態学的特性を明らかにする。

b. 薬力学

観察項目は、自覚症状、身体所見、尿量、体重、体温、血圧、呼吸数、心拍数、心電図、心エコー図などであり、適切な間隔において観察する。さらに、心機能を表すできるだけ多くの循環動態に関わるパラメーターを適宜測定することが望ましい。また、少なくとも試験前

後には必要な臨床検査を行い、異常が生じた場合には追加調査や追加観察を実施する。長期にわたって使用することが予想される薬物の場合はより長期の反復投与による忍容性を検討する試験を実施することが望ましい。

## 2. 第Ⅱ相試験

第Ⅱ相試験は効果が期待される患者を対象として被験薬の安全性と有効性を確認することを目的とする。急性心不全においては、用量設定のために臨床的な対象患者に近い患者集団での血行動態のデータを収集すべきであり、最小有効量、増量、最大投与期間等の情報を PCWP と安全性面の情報をもとに得られるよう計画すべきである。本質的には用法・用量の設定を含めた探索試験であり、第Ⅱ相試験によって第Ⅲ相試験の内容が決められる。従って、この段階では被験薬に関する安全性の情報が十分蓄積されていないので、予期されない事象が招来されやすい重症例、あるいは血行動態が不安定な患者の参加を出来るだけ避けるべきである。臨床試験の遂行に当たっては安全性への配慮は常に優先されるべきである。なお、症例数、解析計画等については「臨床試験のための統計的原則」（平成 10 年 11 月 30 日医薬審第 1047 号）等を参考に適切に設定し、試験の目的に応じた検出力を確保する必要がある。

### 1) 前期第Ⅱ相試験

第Ⅰ相試験が終了した後に、被験薬を対象患者に試用し安全性や有効性について検討する前期第Ⅱ相試験を行う。なお、試験実施前に得られている各種情報から、前期第Ⅱ相試験と後述の後期第Ⅱ相試験での検討は、一つの試験中で行うことが可能と判断される場合もある。

#### (1) 試験担当者

心不全の臨床に十分な経験を有し、抗心不全薬の薬効評価に精通している医師がこの試験を担当する。

#### (2) 被験者

被験薬の効果が期待される心不全患者を対象とする。原則として、幼小児、妊婦又は妊娠の可能性の高い女性、超高齢者は含めない。当該試験は安全管理の観点から入院にて施行することが望ましい。

#### (3) 用法・用量

第Ⅰ相試験の結果から適切と判断された用法・用量で実施する。

#### (4) 試験期間

一定の観察期をおいた後に被験薬の投与を開始する。試験期間は対象患者の状態及び被験薬の薬力学的・薬物動態学的特性に従って決める。

## (5) 併用薬

被験薬の安全性や有効性の評価を妨げる薬剤（たとえば既存の抗心不全薬や治療薬と相互作用を示す薬剤）の併用は、結果の解釈を困難にするので、できる限り避けることが望ましい。しかし、重症の急性心不全あるいは予後不良な慢性心不全患者を対象とする関係上、病態を考慮し、エビデンスに基づいて実施されている標準治療、すなわち投与されているジギタリスや利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬、 $\beta$ 遮断薬、アルドステロン拮抗薬などの標準治療薬は、用法や用量を不変とすることで使用することができる。試験期間中の標準治療の内容（治療薬の種類、投与量等）については、試験実施前に明確な規定を設けておく必要がある。

## (6) 観察項目

急性及び慢性心不全について観察すべき主な項目例を以下に提示する（治験の特性や新評価法の出現等に応じて選択・追加する）。

### a. 死亡率

### b. 自覚症状

全身倦怠感、易疲労感、労作性呼吸困難、起座呼吸、狭心症（様）症状など。

### c. 身体所見

体重、心拍数、不整脈、血圧、呼吸数、肺ラ音、浮腫、肝腫大、頸静脈怒張、過剰心音、心雑音、四肢冷感、チアノーゼなど。

### d. 心機能重症度分類

NYHA 心機能分類

### e. 胸部X線

肺うっ血、肺水腫、心胸郭比

### f. 心電図・長時間記録心電図

心拍数、不整脈、房室伝導障害、心筋虚血所見など。

### g. 心エコー図

心腔内径サイズ、心室壁運動、左室短縮率（Fractional Shortening : FS）、左室駆出分画（Ejection Fraction:EF）、下大静脈径、三尖弁逆流圧較差（Tricuspid Regurgitation Pressure Gradient:TRPG）、左室流入速波形（拡張早期波/心房収縮期波：E/A、E波の減速時間 Deceleration Time :DT、等容拡張時間 Isovolumic Relaxation Period :IRT）、左室拡張早期波/僧帽弁輪部の移動速度：E/E'、心嚢液貯留の有無など（Mモード法、断層法、ドプラ法）。

### h. 核医学検査

RI心プールシンチ、<sup>201</sup>Tl心筋シンチグラフィによる Quantitative Gate SPECT : QGS 評価

i. CT、MRI 検査

j. 運動耐容能

呼気ガス分析による最大酸素摂取量 (PVO<sub>2</sub>)、6 分間歩行検査、身体活動指数 (SAS : Specific activity scale) など

k. 薬物血中濃度

投与時の適当な間隔で被験薬の血中濃度を測定し、被験薬の薬物動態・薬力学と上述の諸指標との関係を明らかにすることが望ましい。

l. 生物学的活性組織物質及び循環物質活性

ナトリウム利尿ペプチド (血漿 BNP 値、血清 NT-Pro BNP 値)、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系体液性因子、交感神経系 (ノルエピネフリン)、血管拡張物質 (ブラジキニン、一酸化窒素、プロスタグランジン)、サイトカイン (エンドセリン、腫瘍壊死因子、インターフェロン)、バソプレッシン、マトリックスメタロプロテアーゼなど

m. 急性心不全においては、観血的循環動態検査

動脈圧、右房圧、肺動脈圧、肺毛細管圧、心拍出量の測定、心係数、1 回拍出量、全末梢血管抵抗、肺血管抵抗、Double product などの算出。

n. その他

①. 尿量 (特に急性心不全)

②. 血液ガス分析 (動脈血酸素飽和度) (特に急性心不全)

③. 肝機能検査、腎機能検査

④. 尿一般検査、血液一般検査、血清生化学検査

⑤. QOL の評価 認知能力指数 (MMSE) 等

安全性確保のため、必要に応じ適切な間隔で繰り返し測定する。

## 2) 後期第 II 相試験

より多くの患者について、被験薬の安全性と有効性をさらに検討し、より詳細な適応や用量反応関係を明らかにするために、適切な計画に基づいて試験を実施する。心不全 (急性・慢性) の基礎疾患の種類あるいは重症度により反応性に相違があると思われる場合や、臨床で頻回に併用される薬物がある場合、及び腎疾患や動脈硬化症などの合併症を有する患者での使用が想定される場合には、それらを考慮した試験計画が求められる。なお、用量設定のためには、基本的にプラセボ群と少なくとも 2 用量の被験薬群を設定す



ることが必要と考えられ、用量反応関係の検討は、「新医薬品の承認に必要な用量－反応関係の検討のための指針」（平成6年7月25日薬審第494号）等も参考に適切に行う必要がある。

(1) 試験担当者

前期第Ⅱ相試験に準ずる。

(2) 被験者

前期第Ⅱ相試験で得られた情報に基づいて、効果が予想される特定の循環動態下にある心不全状態の患者（重症例を含む適切な数の患者）を対象として実施する。ただし、重症心不全患者、幼小児、妊婦又は妊娠の可能性の高い女性、超高齢者を対象とする場合には、試験方法に特別な配慮が必要である。

(3) 用法・用量

前期第Ⅱ相試験の結果から適切と判断された用法・用量で実施する。二重盲検並行群間比較試験として実施して臨床推奨用量を検討することが望ましい。最大用量が前相までの経験を超える場合には、新たに安全性を検討しておく必要がある。

(4) 試験期間

試験期間は、対象患者の状態、被験薬の薬力学的・薬物動態学的特性及び前期第Ⅱ相試験で得られた情報に基づいて決める。一般的に慢性心不全では少なくとも3ヶ月以上が妥当である。急性心不全においては、一般的に数時間～72時間程度であるが、場合によっては治療後のアウトカムを4週間程度まで長期にわたって評価することも必要となる。

(5) 対照薬

プラセボを対照薬とすることが望ましいが、臨床試験の安全性や倫理的観点から適切な標準薬を対照薬とすることも選択肢のひとつである。その場合の標準薬の選択に際しては以下の2点を考慮する。

a. 評価が既に確立しているか。

臨床的評価が確立している薬剤の中から選ぶ。

b. 類似性があるか。

被験薬との化学的・薬理的類似性、及び臨床適応の類似性についても考慮する。

(6) 併用薬

前期第Ⅱ相試験に準ずる。

(7) 観察項目

前期第Ⅱ相試験に準ずる。

#### (8) 長期投与

慢性心不全治療において、被験薬の長期投与が有用であることを示すには、長期投与が可能で、かつ適切と考えられる症例を選んで数ヶ月以上の投与・観察を行う。長期投与を予定した症例は途中中止や脱落、それに耐性発現についても十分な検討を行う。投与期間中は適当な間隔で観察し異常の有無を調査する。

#### (9) 追加試験

第Ⅰ相試験・第Ⅱ相試験において、症状や身体所見、あるいは臨床検体検査、臨床生理検査に異常変動が認められた場合、あるいは非臨床試験での成績から予想された結果と実際の臨床試験での結果とが大きく異なる場合、それに血液、神経、肝臓、腎臓やカテコラミン、レニン・アンジオテンシン系、BNP などの体液性因子に対する被験薬の影響を知るためには、目的に応じた追加試験を実施する必要がある。

### 3. 第Ⅲ相試験

第Ⅲ相試験では、第Ⅱ相試験で明確にされた被験薬の適応範囲や用法・用量において、適切な対照薬を選び被験薬の有効性（優越性（又は非劣性））を検証する。原則として十分に管理された二重盲検比較試験として実施する必要がある。ただし、重篤な心不全患者を主たる対象とする薬剤では患者の利益を第一に考え、被験薬の使用目的、有効性及び第Ⅱ相試験の成績をふまえてその試験方法（対照薬、観察項目、治験期間など）を適切に設定する必要がある。なお、症例数、解析計画等については「臨床試験のための統計的原則」（平成 10 年 11 月 30 日医薬審第 1047 号）、「国際共同治験に関する基本的考え方」（平成 19 年 9 月 28 日薬食審査第 0928010 号）等を参考に適切に設定する必要がある。

#### 1) 試験担当者

複数の施設より選ばれた循環器疾患治療に経験の深い臨床医が行う。

#### 2) 実施施設

心不全治療の施設差を考慮し、複数の施設に適切な症例数を割り振る必要がある。

#### 3) 被験者

被験薬の良い適応となると期待される心不全患者を対象とする。ただし、幼小児、妊婦又は妊娠の可能性の高い女性、超高齢者を対象とする場合には、試験方法に関して特別な配慮が必要である。

#### 4) 用法・用量

第Ⅱ相試験の成績から決められた用法・用量に従う。

#### 5) 試験期間

第Ⅱ相試験の成績から決められた試験期間に従う。急性心不全では、試験終了後においても、短期及び長期の生命予後への影響を検討する目的で、入院中、急性心不全発現から1ヶ月、6ヶ月以上の時点での死亡率に関する評価等が望まれる。慢性心不全の予後の評価には1年以上の試験期間が必要である。

#### 6) 対照薬

後期第Ⅱ相試験に準ずる。

#### 7) 併用薬

前期第Ⅱ相試験に準ずる。

#### 8) 観察項目

前期第Ⅱ相試験に準ずる。その他非臨床試験・第Ⅰ相試験・第Ⅱ相試験を含め、前相までの試験等で問題になった項目。総死亡率、心血管系罹患率等の予後に関する項目。

### 4. 第Ⅳ相試験

第Ⅳ相試験は、薬剤の承認後に必要に応じて実施される臨床試験である。慢性心不全においては、第Ⅲ相試験で生命予後に対する薬剤の効果が十分に検討できず、海外の成績を外挿して承認された場合などで、我が国での少なくとも1年間以上の期間にわたる生命予後に関する第Ⅳ相試験の実施が望ましい場合もある。

心不全は慢性に経過するものが多いため、薬剤の長期使用による経験が重要となる。薬剤の生命予後及びQOLに対する効果についても検討する必要がある。また、薬剤の抗心不全作用を検討すると同時に、薬剤耐性や副作用の出現、薬剤中止後の症状悪化（*withdrawal syndrome*）の出現についても詳細に検討すべきである。これらの情報は、製造販売後の調査として収集できる場合もあるが、調査の範囲を超えるデータや精度の高いデータが必要な場合は第Ⅳ相試験を実施すべきである。さらに、薬剤の臨床的位置付けを評価するための標準治療との（非劣性）比較試験、他薬剤との併用試験、用量設定の妥当性の検討ための付加的な臨床試験が実施されることが望ましい場合も考えられる。第Ⅳ相試験では、血液及び血清生化学的所見を含め、比較的広範な観点から抗心不全薬の長期連用結果を分析し、安全性の確認と適用範囲を明らかにする。

### VI 効能・効果の記載

本ガイドラインの直接対象は急性及び慢性心不全である。したがって、本ガ

イドラインに基づき抗心不全薬の臨床試験を行い、その有用性が認められた場合には、効能・効果は、原則として「急性心不全（慢性心不全の急性増悪期を含む）」または「慢性心不全」とする。

- 
- <sup>1</sup> (1) The Natural History of Congestive Heart Failure: The Framingham Study PA McKee, WP Castelli, PM McNamara, and W Kannel, N Engl J Med 1971 285:1441-1446 (December 23, 1971)
- (2) Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. N Engl J Med. 2006 355(3):251-9 (July 21, 2006)
- (3) Chronic heart failure in the elderly: a current medical problem. Nessler J, Skrzypek A. Pol Arch Med Wewn. 2008 118(10):572-80 (Oct. 2008)
- (4) Heart failure survival among older adults in the United States: Poor prognosis for an emerging epidemic in the medicare population, JB Croft, WH Giles, RA Pollard, NL Keenam, ML Capser, RF Anda, Arch Intern Med 1999 159:505-510 (March 8, 1999)
- (5) Characteristics of "Stage D" heart failure: Insights from the acute decompensated heart failure National Registry Longitudinal Module (ADHERE LM). Costanzo MR, Mills RM, Wynne J. Am Heart J. 2008 Feb;155(2):341-49. Epub 2007 Dec 19
- (6) Chronic heart failure in Japan: Implications of the CHART studies. N. Shiba, H. Shimokawa J Cardiol. 2011 Jan;57(1):8-17. Epub 2010 Oct 27.

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、臨床上の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りよい。

#### (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りよい。

#### (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は想定され、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。

薬生機審発0627第1号  
令和元年6月27日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長  
（ 公 印 省 略 ）

ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、  
造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関するガイドラインについて

ヒト細胞加工製品中に混在する未分化多能性幹細胞及び形質転換細胞について、代表的検出試験例及び特定のヒト細胞加工製品の品質・安全性評価のために実施する試験を選択する際に留意すべき事項を示すガイドラインを、別紙のとおり作成しましたので、貴管下関係業者等に対し周知方御配慮願います。

なお、本ガイドラインは、現時点における科学的知見に基づく基本的考え方をまとめたものであり、学問上の進歩等を反映した合理的根拠に基づいたものであれば、必ずしもここに示した方法を固守するよう求めるものではありません。

## ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関する留意点

目次	頁
1. はじめに	1
2. 本文書の位置づけ	2
3. 用語の定義	2
4. 一般的留意点	3
5. ヒト ES/iPS 細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験	4
5.1. 原料・原材料の品質特性評価・品質管理のための造腫瘍性試験	4
5.2. 中間製品又は最終製品の造腫瘍性細胞の混在を評価するための試験	4
5.2.1. 中間製品・最終製品の未分化多能性幹細胞検出試験	4
5.2.1.1. <i>in vitro</i> 試験	4
5.2.1.2. <i>in vivo</i> 試験	5
5.2.2. 中間製品・最終製品の形質転換細胞検出試験	6
5.2.2.1. <i>in vitro</i> 試験	6
5.2.2.2. <i>in vivo</i> 試験	7
5.3. 最終製品細胞のヒトにおける生着部位での腫瘍形成能を評価するための試験	9
5.3.1. 試験動物の選択	10
5.3.2. 対照細胞の選択	10
5.3.3. 試験動物の数と性別	11
5.3.4. 試験検体の投与部位と検体中の細胞数及び検体の形態	11
5.3.5. 観察期間	12
5.3.6. 投与部位の観察	13
5.3.7. 病理学的評価	13
5.3.8. 結果の解釈	13
6. ヒト体細胞／体性幹細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験	14
6.1. 原料・原材料の品質特性評価・品質管理のための造腫瘍性試験	14
6.2. 最終製品のための造腫瘍性関連試験の留意点	14
7. 遺伝的安定性に関する一般的留意点	15
参考文献	16
表 1 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出法の詳細	19
表 2 混在する形質転換細胞の検出法の詳細	21
参考情報（各種試験法プロトコール）	22

## 1. はじめに

再生医療等製品（「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」（昭和 35 年法律第 145 号）第 2 条第 9 項に規定する「再生医療等製品」をいう。以下同じ。）のうち、ヒト細胞加工製品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、「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」（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。以下「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）及び「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」（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。以下「ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）に定められているところである。また、ヒト細胞加工製品の中でも、ヒト幹細胞加工製品の品質及び安全性の確保については、「ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発第 0907 第 2 号厚生労働省医薬食品局長通知）、「ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発第 0907 第 3 号厚生労働省医薬食品局長通知）、「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ついて」（平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発第 0907 第 4 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」（平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発第 0907 第 5 号厚生労働省医薬食品局長通知）及び「ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発第 0907 第 6 号厚生労働省医薬食品局長通知）（以下「ヒト幹細胞加工医薬品等 5 指針」と総称する。）にも定められているところである。

ヒト細胞加工製品に特有の安全性関連リスクとしては、製品中に混在する形質転換細胞に起因する腫瘍形成のリスクがある。また、ヒト胚性幹細胞加工製品（以下「ヒト ES 細胞加工製品」という。）やヒト人工多能性幹細胞加工製品（以下「ヒト iPS 細胞加工製品」という。）のようにテラトーマ形成能を固有の性質とするヒト多能性幹細胞を原料とする場合には、最終製品に残存する未分化な多能性幹細胞に起因する腫瘍形成のリスクもある。すなわち、ヒト細胞加工製品中に混在する形質転換細胞及び未分化な多能性幹細胞等の造腫瘍性細胞はハザードであり、その存在量及び種類の情報を把握することは、ヒト細胞加工製品の品質及び安全性の確保において重要である。本文書は、ヒト細胞加工製品の品質及び安全性を非臨床的に評価する際に参考とすべき事項及び留意点のうち、特にヒト細胞加工製品中に混在する未分化多能性幹細胞及び形質転換細胞について、その代表的検出試験例を示すと同時に、これらの試験の中から、特定のヒト細胞加工製品の品質・安全性評価のために実施する試験を選択する際に留意すべき事項を示すものである。

## 2. 本文書の位置づけ

本文書は、技術開発の著しい多種多様なヒト細胞加工製品中に混在する可能性がある造腫瘍性細胞の検出を対象とするものである。また、検出試験そのものの開発や技術革新も日進月歩である。したがって、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可能な限り示しているに過ぎず、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、そのまま製造販売承認申請において適用されるべきとの拘束力を有するものではない。また、本文書は各試験の特徴・性能を整理したものであって、開発段階のどのステージに適用すべきかを明示するものではない。

製品の評価に当たっては、個別の製品の特性を十分理解した上で、科学的な合理性・妥当性をもって柔軟に対応することが必要である。本文書で提示された試験法やその詳細についても、試験の目的に適うよう一部改変することや、省略することも、その科学的な合理性・妥当性が示されればむしろ奨励される。なお、本文書のほか、国内外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。

## 3. 用語の定義

本文書における用語の定義は、ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針、ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の指針、ヒト幹細胞加工医薬品等 5 指針の定義によるほか、以下のとおりとする。

- 1) 造腫瘍性 (tumorigenicity) : 動物に移植された細胞集団が増殖することにより、悪性又は良性の腫瘍を形成する能力のこと。生理活性物質又は化学物質が細胞を不死化して悪性又は良性の腫瘍を誘発する能力 (腫瘍原性、oncogenicity) や、生理活性物質又は化学物質が細胞を不死化して悪性腫瘍を誘発する能力 (がん原性、carcinogenicity) とは区別される。なお、本文書では、ES/iPS 細胞 (製品中では未分化 ES/iPS 細胞と称する) や腫瘍を形成するおそれのある形質転換細胞は動物試験での実証の有無にかかわらず造腫瘍性細胞として取り扱う。
- 2) 細胞基材 : 微生物細胞又はヒト若しくは動物由来の細胞で、ヒトを対象に *in vivo* 又は *ex vivo* で投与される生物製剤 (再生医療等製品を含む) を生産する上で必要な能力を有するもの (「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) 製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析」について) (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) 参照)。
- 3) 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。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 (「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) 製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析」について) 参照)。
- 4) 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 (「生物由来原料基準」(平成 26 年厚生労働省告示第 375 号) 参照)。

- 5) 中間製品：製造の中間工程で造られたものであって、以後の製造工程を経ることによって製品となるもの（「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」（平成 26 年厚生労働省令第 93 号。以下「GCTP 省令」という。）参照）。
- 6) 腫瘍：細胞が生体内の制御に反して自律的に過剰に増殖することによってできる組織。「悪性腫瘍」又は「良性腫瘍」に分けられる。
- 7) テラトーマ（奇形腫）： 2 胚葉性成分又は 3 胚葉性成分を有する胚細胞性腫瘍。「成熟奇形腫」と「未熟奇形腫」がある。
- 8) 悪性腫瘍：腫瘍の中でも特に浸潤性を有し、遠隔部へ転移するなど悪性を示すものを指す。
- 9) がん：平仮名の「がん」は、「癌」、「肉腫」及び「白血病」などの血液悪性腫瘍も含めた広義の悪性腫瘍を指す。漢字で表記する「癌」は、悪性腫瘍のなかでも特に上皮由来の「癌腫（上皮腫）」のことを指す。「肉腫」とは非上皮性の結合組織、筋、内皮細胞等に由来する悪性腫瘍である。
- 10) 腫瘤：発生原因に関わらず、体表や体内で確認された何らかの塊。いわゆる「しこり」や「こぶ」を指す。腫瘤と腫瘍の違いについては、腫瘤は膿瘍なども含む「形態」であり、腫瘍は細胞が増殖した「病態」である。
- 11) 形質転換細胞：不死化や悪性化など、造腫瘍性に関連した形質転換が生じた細胞を指す。
- 12) 製品細胞：製品に含まれる細胞
- 13) 最終製品細胞：最終製品に含まれる細胞
- 14) ハザード：危害の潜在的な原因。危害は、健康への被害を指す。（「品質リスクマネジメントに関するガイドライン」（平成 18 年 9 月 1 日付け薬食審査発第 0901004 号及び薬食監麻発第 0901005 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長及び監視指導・麻薬対策課長連名通知）参照）
- 15) リスク：危害の発生の確率とそれが発生したときの重大性の組み合わせ。重大性は、ハザードから生じうる結果の大きさを指す。（「品質リスクマネジメントに関するガイドライン」参照）

#### 4. 一般的留意点

ヒト細胞加工製品の出発原料の種類は、体細胞、体性幹細胞、ES 細胞、iPS 細胞など、多岐にわたる。さらに、出発原料細胞の由来については、自己又は同種、同種のうちでは HLA ホモ接合型又はそれ以外など、様々な分類が想定される。ヒト細胞加工製品は構造又は剤形（例：細胞懸濁液、細胞シート等）も多様であり、その臨床適用に際して必要な細胞数も製品ごとに異なる。その上、適用の経路、適用部位、免疫抑制剤の使用の有無、患者の病状の緊急性等についても、様々なケースが想定される。したがって、個別製品における造腫瘍性のリスク評価とリスク管理においては、各試験法の能力と限界を科学的に理解した上で、総

合的な考察を行うこと。

## 5. ヒト ES/iPS 細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験

ヒト胚性幹細胞加工製品又はヒト人工多能性細胞加工製品（ヒト ES/iPS 細胞加工製品）の製造における造腫瘍性関連試験には、目的別に、①原料・原材料の品質特性評価・品質管理のための造腫瘍性試験、②中間製品又は最終製品の造腫瘍性細胞の混在を評価するための試験、③最終製品細胞のヒトにおける生着部位での腫瘍形成能を評価するための試験、の3種類がある。①、②、③の試験については、それぞれ 5.1、5.2、5.3 項で述べる。特にこれらのうち②の例として、いくつかの *in vitro* 試験法又は *in vivo* 試験法を表 1 及び表 2 に例示した。造腫瘍性の評価においては、各試験法の原理を理解し、検出限界等の性能を確認した上で、試験法を取捨選択し、目的に応じた評価系をデザインすること。

### 5.1. 原料・原材料の品質特性評価・品質管理のための造腫瘍性試験

ヒト ES/iPS 細胞加工製品を製造するための細胞基材として、ヒト ES 細胞又はヒト iPS 細胞のセル・バンクを樹立した際に、セル・バンク中の細胞の増殖性と多能性を検証するためにテラトーマ形成能による造腫瘍性を確認することがある。この際の造腫瘍性試験に当たっては、世界保健機関（WHO）の生物薬品標準化専門委員会第 61 次報告（Technical Report Series No. 978（WHO TRS 978）平成 25 年）の Annex 3<sup>1</sup> が参考になる。

### 5.2. 中間製品又は最終製品の造腫瘍性細胞の混在を評価するための試験

ヒト ES/iPS 細胞加工製品の中間製品又は最終製品となる細胞集団には、目的細胞又はその前駆細胞に加え、未分化なヒト ES/iPS 細胞及びその他の目的外細胞が混在している可能性がある。ヒト ES/iPS 細胞はテラトーマ形成能による造腫瘍性を元来の特性として保持していることから、中間製品又は最終製品における未分化ヒト ES/iPS 細胞の混在量を、腫瘍を形成するおそれのある目的外細胞である形質転換細胞の混在量とともに品質特性（造腫瘍性細胞の混在）として評価し、管理することが必要である。

#### 5.2.1. 中間製品・最終製品の未分化多能性幹細胞検出試験

##### 5.2.1.1. *in vitro* 試験

中間製品又は最終製品の中に混在する未分化ヒト ES/iPS 細胞に関しては、ヒト ES/iPS 細胞の分子マーカーを検出することによって評価することが可能である。方法としてはフローサイトメトリーや定量 RT-PCR<sup>2,3</sup>、及び培養上清中の H3+ポドカリキシンを検出する方法<sup>4</sup>、ラミニン 521 によるヒト多能性幹細胞直接培養増幅法<sup>5</sup>などが挙げられる。ただし、使用する分子マーカーの妥当性は、試験対象となる細胞種ごとに予め確認しておく必要がある。例えば *LIN28* は様々な正常ヒト分化細胞・ヒト組織において発現が認められず、優れたヒト ES/iPS 細胞のマーカーと考えられているが<sup>2,3</sup>、ヒト iPS 細胞から間葉系幹細胞への分



化誘導においては、iPS 細胞マーカーとしての特異性は高くないことが知られている<sup>5</sup>。なお、ヒト ES/iPS 細胞は酵素処理等により単細胞にまで分散するとアポトーシスを起こす性質をもつため、軟寒天コロニー形成試験により混在する未分化なヒト ES/iPS 細胞を検出することはできない<sup>2</sup>。

#### 5.2.1.2. *in vivo* 試験

製品中の未分化ヒト ES/iPS 細胞の混在は、適切な細胞特性指標を用いて *in vitro* 試験で検査し、評価することが望ましい。ただし、製品における未分化ヒト ES/iPS 細胞の混在量は、免疫不全動物での造腫瘍性を指標にして評価することも必須ではないが可能である。免疫不全動物としては、NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Sug</sup>/Jic マウス（以下「NOG マウス」という。）<sup>6</sup>、NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ マウス（以下「NSG マウス」という。）<sup>7</sup>などの重度免疫不全マウス系統が挙げられる。これらのマウスは T 細胞、B 細胞及び NK 細胞を欠失しており、ヌードマウスと比べてヒトの細胞や組織の生着性が高い<sup>8,9,10</sup>。C.Cg-Rag2<sup>tm1Fwa</sup> Il2rg<sup>tm1Sug</sup>/Jic マウス（以下「BRG」マウス）という。）も T 細胞、B 細胞及び NK 細胞を欠失した系統だが、ヒト造血幹細胞の生着性が NOG マウスや NSG マウスよりも低いことが知られている<sup>11,12</sup>。SCID マウスや NOD/SCID マウスについては、自然発生的な胸腺腫が見られるため、長期観察が必要となる造腫瘍性試験目的では、使用を推奨しない。WHO TRS 978 で推奨されるヌードマウスを用いる方法は、僅かに残存する未分化ヒト ES/iPS 細胞を検出するには感度が低く、結果が偽陰性になってしまう恐れがあるため、製品の未分化ヒト ES/iPS 細胞の混在を評価する目的には適さない<sup>10</sup>。投与部位については、手技が簡単で、手技熟練度による結果のバラツキを防げること、多くの製品細胞を投与することが可能であること、かつ、容易に腫瘍形成の時間経過を観察することができることから、背部皮下が一般的に用いられる。投与部位の観察方法に関しては、5.3.6.項を参考にすること。

製品細胞に混在する未分化ヒト ES/iPS 細胞を定量化するのみの目的で *in vivo* 試験を実施することは例外的と考えられるが、仮にそうした目的のために試験するには、陽性対照細胞の同等な条件（投与部位・方法）での細胞移植による試験の設定が、製品細胞の試験時又は事前検討において必須である。陽性対照細胞としては、製品中の未分化ヒト ES/iPS 細胞の残存を対象とするのであれば、一般に、製品細胞に混在する可能性が考えられる製品の製造用細胞基材である未分化ヒト ES/iPS 細胞を用いる。製品細胞を投与する際には、細胞をマトリゲルに懸濁して投与した方が検出感度は高くなる<sup>8,10,13,14</sup>。なお、ヒト ES/iPS 細胞はトリプシン処理等による単一細胞への分散によりアポトーシスを起こす性質を持つため、マウスへの投与時にはこれを防ぐ対策が必要である。分散誘導性アポトーシス防止策としては、トリプシン処理等を行わずに製品を投与する方法以外に、トリプシン処理等により分散した製品細胞を ROCK 阻害薬及びヒト新生児由来線維芽細胞とともにマトリゲルに懸濁して投与する<sup>15,16</sup>などの方法がある。製品細胞の移植では、実際の臨床応用時の細胞用量を勘案し、移植行為自体もアーチファクトが生じない範囲で、できるだけ多くの製品細胞を移植

することが望ましい。また試験動物の数は、移植行為の難易度や試験動物の生存率等を考慮した上で設定する。1群につき最終評価可能な匹数として10匹以上で実施することが望ましいが、1群につき最終評価可能な匹数として最低でも6匹以上で実施すれば、定量的測定項目におけるデータのバラツキが母集団のバラツキを概ね反映していると考えられる。

陽性対照細胞と同様な未分化ヒト ES/iPS 細胞の残存を想定した上で試験を行うので、製品細胞の投与時に使用する培地は、ヒトに投与する際に用いられるものよりも陽性対照細胞の増殖に適したものが利用可能ならば、それを使用する。

中間製品又は最終製品における未分化ヒト ES/iPS 細胞の混在量を評価するために、製品細胞又は陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞に未分化ヒト ES/iPS 細胞をスパイクした陽性対照群を設定することが必要である。陰性対照群については、陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞の入手と利用の可能性を勘案して、その設定の可否を検討する。試験時又は事前に検討する陽性対照群においては、異なる用量の未分化ヒト ES/iPS 細胞を含む細胞試料を移植した複数の群を設定し、最低腫瘍形成用量 (TPD<sub>min</sub> : minimum tumor-producing dose) と腫瘍出現までの期間を確認する必要がある。観察期間については、陽性対照群の中の TPD<sub>min</sub> における腫瘍形成確率が一定値に達する時点を十分超える期間とする。

なお、未分化ヒト ES/iPS 細胞の混在を評価することが目的の場合には、試験系の精度向上のために片性の動物のみを使用することも許容されうる。

TPD<sub>min</sub> における腫瘍形成確率をもとに、被験製品から得られた結果が偽陰性である確率を求めておくこと。なお、TPD<sub>min</sub> 以上の混在がないことを統計学的確からしさとともに示すための匹数の設定方法も知られている<sup>8</sup>。その他の技術的な詳細については、5.3.6.項を参考にすること。

なお一般には、未分化 ES/iPS 細胞検出 *in vivo* 試験は、中間製品・最終製品の形質転換細胞検出試験 (5.2.2.2.項) を兼ねて実施するのが現実的である。

## 5.2.2. 中間製品・最終製品の形質転換細胞検出試験

### 5.2.2.1. *in vitro* 試験

中間製品又は最終製品の中に混在する形質転換細胞に関しては、既定の培養期間を超えた細胞の増殖特性解析による不死化した形質転換細胞検出<sup>17,18</sup> や、軟寒天コロニー形成試験<sup>2,8</sup> 又はデジタル軟寒天コロニー形成試験<sup>19</sup> による足場非依存性増殖細胞 (悪性形質転換細胞) の検出などによって評価が可能である。ただし、臨床での製品使用時には、いずれの *in vitro* 試験でも検出困難な形質転換細胞の存在の可能性を考慮したうえでリスク評価を行うこと。

細胞増殖特性解析は、形質転換により不死化した細胞を、悪性度の有無にかかわらず検出することのできる試験である。一方、デジタル軟寒天コロニー形成試験は、高い感度で形質転換細胞を検出することができる試験であるが、検出できるのは足場非依存性増殖能を持つ細胞、すなわち悪性度の高い形質転換細胞に限られる。

いずれにしても、中間製品又は最終製品における形質転換細胞の混在量を評価するために、陽性対照細胞とする造腫瘍性形質転換細胞を設定する。また試験を行う際には、製品細胞又は陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞に陽性対照細胞をスパイクした陽性対照群を設ける。被験製品中の形質転換細胞の混在量は、混在しうる形質転換細胞の造腫瘍性を陽性対照細胞と同等と仮定したうえで定量化することができる。混在する可能性のある形質転換細胞の特性があらかじめ推定されており、かつ、これに類似する表現型を示す細胞株が利用可能な場合以外は、腫瘍形成能が良く研究され認知されている HeLa 細胞等を陽性対照細胞として使用する。なお、陽性対照細胞には、適切に品質管理された細胞提供機関から入手した細胞株を使用することが望ましい。

これらの既存の *in vitro* 試験で設定された培養条件で製品細胞が培養できない場合であつて、中間製品又は最終製品の中に混在する形質転換細胞に特徴的な遺伝子や分子を同定することが可能な場合は、種々のバリデーション試験を実施した上で培養をせずに、分子生物学的に混在が定量化できるような検出系の設定を行うことが考えられるが、極めて個別的な試験となるので、一般的技術要求とすることや標準法を本文書で示すことはできない。

#### 5.2.2.2. *in vivo* 試験

製品中の腫瘍形成能を持つ形質転換細胞の混在は、適切な細胞特性指標を用いて *in vitro* 試験で検査し、評価することが望ましい。ただし、製品における形質転換細胞の混在量は免疫不全動物での造腫瘍性を指標にして評価することも必須ではないが可能である。免疫不全動物としては、NOG マウス<sup>6</sup>、NSG マウス<sup>7</sup>などの重度免疫不全マウス系統が挙げられる。これらのマウスは T 細胞、B 細胞及び NK 細胞を欠失しており、ヌードマウスと比べてヒトの細胞や組織の生着性が高い<sup>8,9,10</sup>。トリプシン処理などにより分散した製品細胞を投与する場合には、細胞をマトリゲルに懸濁して投与した方が検出感度は高くなる<sup>8,10,13,14</sup>。BRG マウスも T 細胞、B 細胞及び NK 細胞を欠失した系統だが、ヒト造血幹細胞の生着性が NOG マウスや NSG マウスよりも低いことが知られている<sup>11,12</sup>。SCID マウスや NOD/SCID マウスについては、自然発生的な胸腺腫が見られるため、長期観察が必要となる造腫瘍性試験目的では使用を推奨しない。WHO TRS 978 で推奨されるヌードマウスを用いる方法も、僅かに混在する形質転換細胞を検出するには感度が低く、結果が偽陰性になってしまう恐れがあるため、本項の目的には適さない<sup>8, 10</sup>。

中間製品又は最終製品における形質転換細胞の混在量を評価する際には、陽性対照細胞とする形質転換細胞を設定する必要がある。すなわち、陽性対照細胞を製品細胞又は陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞にスパイクした陽性対照群を設定し、製品細胞の試験時又は事前検討において、その造腫瘍性を確認する。設定した陽性対照群においては、異なる用量の陽性対照細胞を含む細胞試料を移植した複数の群を設定し、TPD<sub>min</sub> と腫瘍出現までの期間をあらかじめ確認しておく。このような検討を行うことにより、製品細胞中の形質転換細胞の定量的評価が可能となる。

混在する可能性のある形質転換細胞の特性があらかじめ推定されており、かつこれに類似する表現型を示す細胞株が利用可能である場合以外は、腫瘍形成能が良く研究され認知されている HeLa 細胞等を陽性対照細胞として使用する。用量の異なる陽性対照細胞をスパイクした陽性対照群を設定し、陽性対照細胞の  $TPD_{min}$  を事前に評価しておく。算出される形質転換細胞の混在量は、あくまで混在しうる形質転換細胞の造腫瘍性を陽性対照細胞と同等と仮定したうえで定量化されたものであることに注意すること。なお、陽性対照細胞には、適切に品質管理された細胞提供機関から入手した細胞株を使用することが望ましい。

投与部位については、手技が簡単で、手技熟練度による結果のバラツキを防げること、多くの製品細胞を投与することが可能であること、かつ、容易に腫瘍形成の時間経過を観察することができることから、背部皮下が一般的に用いられるが、臨床上の移植経路や移植部位と造腫瘍性との関連について特に関心が高い場合（5.3 項参照）には、可能な範囲で臨床適用と同様とすることを考慮する。投与部位の観察方法に関しては、5.3.6.項を参考にすること。

試験時又は事前検討において、陽性対照群の中で腫瘍形成が認められる  $TPD_{min}$  を確認するとともに、陽性対照群の中の  $TPD_{min}$  における腫瘍形成確率が一定値に達する時点を十分超えた時点まで観察する。その際、移植した動物の 50%に腫瘍が出来る用量 ( $TPD_{50}$ : tumor-producing dose at the 50% end-point)<sup>1</sup> を算出しておくことも有用である。 $TPD_{50}$  値は陽性対照細胞の造腫瘍性を定量的に示す指標であり、製品細胞中の形質転換細胞の造腫瘍性を議論する際の比較対象となる。試験動物の数は、移植行為の難易度や試験動物の生存率等を考慮した上で設定する。1群につき最終評価可能な匹数として 10 匹以上で実施することが望ましいが、1群につき最終評価可能な匹数として最低でも 6 匹以上で実施すれば、定量的測定項目におけるデータのバラツキが母集団のバラツキを概ね反映していると考えられる。

製品細胞と同時に投与する培地として、製品細胞の増殖又は生存に適した培地を使用する場合には、その培地でも陽性対照細胞の造腫瘍性が保持されていること又は増殖が阻害されないことが確認される必要がある点に注意する。陽性対照細胞の増殖に適した培地を使用する場合は、製品細胞中に混在する可能性のある形質転換細胞の中には、その培地が生存や増殖に適さないものもありうることに注意する必要がある。

製品細胞の移植では、実際の臨床応用時の細胞用量を勘案し、移植行為自体もアーチファクトが生じない範囲で、できるだけ多くの製品細胞を移植することが望ましい。腫瘍が観察されなかった場合は、被験製品から得られた結果が偽陰性である確率を、陽性対照細胞の  $TPD_{min}$  における腫瘍形成確率をもとにして求めておくこと。なお、 $TPD_{min}$  以上の混在がないことを統計学的確からしさとともに示すための匹数の設定方法も知られている<sup>8</sup>。その他の技術的な詳細については、5.3.項を参考にすること。なお、造腫瘍性を持つ形質転換細胞の混在を評価することが目的の場合には、試験系の精度向上のために片性の動物のみを使用することも許容されうる。また、陰性対照群については、陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞の入手と利用の可能性を勘案して、その設定の可否を検討する。

本試験はあくまで、中間製品又は最終製品における造腫瘍性細胞の混在の有無を評価するものであって、ヒトでの腫瘍化を直接評価する試験ではないことを認識しておく必要がある。また上記は、最も厳密に製品中の形質転換細胞の混在を評価する場合の例である。*in vivo* 試験は *in vitro* 試験の結果を十分踏まえた上で計画することが望ましい。*in vitro* 試験での結果を踏まえた上で、念のため、*in vivo* で確認しようとする場合などには、*in vitro* 試験での検出感度、精度などを考慮し、目的に沿う内容と程度でもよい。なお、形質転換細胞の造腫瘍性に対して移植部位の微小環境が影響を与えることが知られている<sup>20,21</sup>。したがって、例えば背部皮下移植試験を行う場合、皮下移植以外の投与での臨床使用が想定されている製品については、背部皮下移植では腫瘍を形成しない形質転換細胞の存在の可能性を考慮したうえで製品のリスク評価を行うこと。もし得られれば、特定のヒトがん細胞種の動物体内への移植試験（PDX： Patient-Derived Xenograft）に関する文献情報なども参考とする。

### 5.3. 最終製品細胞のヒトにおける生着部位での腫瘍形成能を評価するための試験

最終製品の造腫瘍性を評価するにあたって主に必要な情報としては、①未分化ヒト ES/iPS 細胞の混在量、②形質転換細胞の混在量に加え、③生着部位での投与細胞の腫瘍形成能、が挙げられる。①、②については、多能性幹細胞の分子マーカーの検出、不死化細胞の検出や足場非依存性増殖細胞の検出などでそれぞれ評価が可能である。また、5.2.1.2.及び 5.2.2.2.で示したような *in vivo* 試験も考えられる。一方、③生着部位での投与細胞の腫瘍形成能については生着部位での *in vivo* 造腫瘍性試験を行う以外に評価方法はない。その場合に考慮すべき点としては、a) 試験動物の選択、b) 対照細胞の選択・試験系の検出能力、c) 試験動物の数、d) 試験検体の投与部位と検体中の細胞数及び検体の形態、e) 観察期間、f) 投与部位の観察、g) 投与部位の組織学的評価、投与ヒト細胞の同定や生着していたことの確認、分化度を示す組織学的評価、h) 結果の解釈法などが挙げられる。特に投与部位は、可能な範囲でヒトでの投与部位に相当する部位を選択することを考慮する。これは、生着部位の微小環境の違いによって腫瘍形成能や、腫瘍のタイプが異なるおそれがあり<sup>20,21</sup>、ヒトへの外挿性を考えるときに問題となる可能性があるためである。もし、物理的障害を生ずるなどの理由により当該部位に対する投与細胞数に限界がある場合には、可能であれば投与部位を変更するのではなく、動物とヒトとの間の当該投与部位の相対的スケール比に応じた投与細胞数の調節などを検討する。すなわち、生着する微小環境と投与細胞との相互作用による腫瘍形成の可能性を考察することを優先する。免疫特権、炎症、虚血など、特殊な投与環境における細胞の挙動はモデル動物における *in vivo* での試験が意義のある情報を提供する可能性が高いと考えられるからである。ただし、前臨床段階での試験結果のヒトへの外挿性を検討するときには、ヒト体内局所微小環境を形成する液性因子や受容体タンパク質等の要素はそれぞれ高いヒト特異性を示し、生着部位の微小環境が動物においてどの程度モデル化できているかが不明であることにも留意する。

### 5.3.1. 試験動物の選択

ヒト細胞加工製品を安定的に体内で生着させるための免疫不全動物としては、NOG マウス<sup>6</sup>、NSG マウス<sup>7</sup>などの重度免疫不全マウス系統が挙げられる。これらのマウスは T 細胞、B 細胞及びNK 細胞を欠失しており、ヌードマウスと比べてヒトの細胞や組織の生着性が高い<sup>8,9,10</sup>。BRG マウスも T 細胞、B 細胞及びNK 細胞を欠失した系統だが、ヒト造血幹細胞の生着性が NOG マウスや NSG マウスよりも低いことが知られているため<sup>11,12</sup>、使用時には目的などを勘案して選定することが必要である。

T 細胞と B 細胞を欠失した SCID マウスや NOD/SCID マウスは、頻繁に胸腺腫を自然発症することが知られており、結果の解釈に影響を与える恐れがあるため使用を推奨しない。なお、48 週齢未満の NOG マウスは腫瘍を自然発症することは稀である<sup>22</sup>。免疫特権、炎症、虚血など特殊な投与環境における細胞の挙動が問題となる場合は、疾患モデル動物の使用も考慮する。この場合、疾患モデル動物がどれだけ適応症となる疾病の病態的特徴を代表しているかの事前の検討も必要となる。ただし、有用性が評価された疾患モデル動物を用いた試験系は、有効性の試験評価には有用であるが、免疫抑制剤の長期投与が必要であり、安定した長期間の試験系で一定の統計学的結論を出す造腫瘍性試験には評価が難しく不向きな場合がある。したがって、試験目的等も勘案して疾患モデル動物を採用するかどうかを決定すべきである。実際、前述の理由から、造腫瘍性試験においては、疾患モデル動物ではなくヒト細胞の移植が容易な免疫不全動物を用いることが多い。NOG や NSG ほど免疫状態が抑制されている系統が利用可能な動物種はマウスの他にはないが、マウスでは投与部位のサイズが小さすぎる又は疾患モデルを作製することが困難などの問題がある。その場合、T 細胞が欠失しているヌードラットなど、マウスよりも大型の免疫抑制動物が用いられることがある<sup>10,14,23</sup>。さらに大きな動物の場合は、強く免疫が抑制された個体を入手することが難しいため、免疫抑制剤を併用することになるが、短期のうちに効力や性能を裏付けるデータを得る試験には利用可能でも、造腫瘍性試験のような時間を要する試験には不向きである。

### 5.3.2. 対照細胞の選択

免疫不全動物を用いた *in vivo* 造腫瘍性試験では、製品細胞又は陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞に陽性対照細胞をスパイクした陽性対照群が設けられていることが望ましい。陽性対照細胞の種類は、製品中に含まれている造腫瘍性細胞として何を想定するかによって異なる。製品中に含まれている造腫瘍性細胞の特性が予め推定されており、かつこれに類似する表現型を示す細胞株が利用可能な場合には、その細胞株を選択する。そのような細胞株が利用可能でない場合は、腫瘍形成能が良く研究され認知されている HeLa 細胞等を陽性対照細胞として使用する。なお、陽性対照細胞には、適切に品質管理された細胞提供機関から入手した細胞株を使用することが望ましい。陽性対照群として造腫瘍性を示す中間製品を用いる場合には、当該中間製品中の造腫瘍性細胞の量を別途、*in vitro* 試験法等により確

認することが必要である。陽性対照群が設定できない場合には、試験結果が陰性であっても真の陰性なのか偽陰性なのかの評価が困難になる点、つまり、期待する性能の試験が実施できたのか、及び試験結果によってどのような評価が可能であるのかという点を説明する必要が生じることに留意し、造腫瘍性試験の実施の意義を検討する。陰性対照群については、陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞の入手と利用の可能性を勘案して、その設定の可否を検討する。

未分化 ES/iPS 細胞は混在せず、一方、混在が想定される形質転換細胞の特徴が明らかで、適切な陽性対照形質転換細胞がある場合は、その評価試験を生着部位で実施して TPD<sub>50</sub>、TPD<sub>min</sub> 及びその腫瘍検出期間を設定した上で、製品細胞の生着部位への移植を実施することが肝要であるが、そのような例は稀であると考えられる。製品中に含まれている造腫瘍性細胞の特性が事前に不明である場合には、試験結果の解釈は、あくまで混在造腫瘍性細胞の造腫瘍性を陽性対照細胞と同等と仮定した上でなされるものであることに注意すること。

### 5.3.3. 試験動物の数と性別

試験動物の数は、移植行為の難易度や試験動物の生存率等を考慮した上で設定する。1群につき最終評価可能な匹数として10匹以上で実施することが望ましいが、1群につき最終評価可能な匹数として最低でも6匹以上で実施すれば、定量的測定項目におけるデータのバラツキが母集団のバラツキを概ね反映していると考えられる。陽性対照群の TPD<sub>min</sub> 以上の混在がないことを統計学的確からしさとともに示すための匹数の設定方法も知られている<sup>8</sup>。最終製品細胞のヒトにおける生着部位での腫瘍形成能を評価するための試験では、原則として1群に雌雄の動物が同数含まれるようにした方が性差の影響評価は行いやすくなる。ただし、臨床適用が一方の性のみに限定されている場合等、投与製品の腫瘍形成能において性差の影響が無視できる場合には片性で実施しても構わない。

### 5.3.4. 試験検体の投与部位と検体中の細胞数及び検体の形態

動物を用いた低分子医薬品の非臨床安全性試験における検体投与量は一般に、種差と個体差を考慮した不確実係数（安全係数）を加味し、ヒトへの投与量以上に設定される。しかし、ヒト細胞加工製品の *in vivo* 造腫瘍性試験の場合、動物のサイズの制約から、ヒトへの投与量と同数又はそれ以上の数の細胞を投与することが困難な場合が多い。もし、物理的障害を生ずるなどの理由により、ヒトでの投与時と同様の部位に同様の経路で投与する細胞数に限界がある場合には、可能であれば投与部位を変更するのではなく、動物とヒトとの間の当該投与部位の相対的スケール比に応じた投与細胞数の調節などを行う。すなわち、生着する微小環境と投与細胞との相互作用による腫瘍形成の可能性を考察することを優先する。相対的スケール比としては面積比や体積比などが考えられるが、どの比率を選択するかは、製品の構造、剤形や、その適用方法の特徴をもとに製品ごとに説明されるべきものである。部位を優先する理由は、免疫特権、炎症、虚血など、特殊な投与環境における細胞の挙動は

モデル動物における *in vivo* での評価でなければ、考察することが困難だからである。ただし、ヒトでの投与部位に相当する部位への投与が技術的に困難な場合、試験結果の解釈が困難である場合、別の部位に投与する方が手技や感度などの試験性能面で優れることが明らかかな場合など、合理的に妥当性が説明できる場合にはこの限りではない。投与検体の形態は、可能であれば最終製品の構造又は剤形と同様のものとする。

### 5.3.5. 観察期間

各群の全例について、一般状態を毎日観察し、週1回以上の頻度で体重測定すると同時に製品細胞が投与された部位の腫瘍形成の有無の確認を、観察や触診、画像診断などの方法により実施することが望ましい。ただし、実際の観察頻度及び確認項目は、移植部位、麻酔や撮像時間などの動物への負荷を考慮した上で設定すること。観察期間の長さは、陽性対照群の有無や移植細胞及びその分裂により生じた細胞の体内での推定生存期間などによって異なる。陽性対照細胞を最終製品又は同じ細胞種の正常細胞のような陰性対照細胞にスパイクした陽性対照群のある場合は、試験時又は事前検討において、陽性対照群の中で腫瘍形成が認められる  $TPD_{min}$  を確認すること。 $TPD_{min}$  における腫瘍形成確率が一定値に達する時点を十分超えた時点まで観察することにより、造腫瘍性の有無を判断することができる。この場合の判断は、混在しうる造腫瘍性細胞の造腫瘍性が陽性対照細胞と同等であり、腫瘍形成に必要な最低用量が  $TPD_{min}$  であると仮定した上でのものとなる。NOG マウスに皮下投与した場合には、ヒト iPS 細胞や HeLa 細胞の腫瘍形成率は、4~6 か月でほぼ安定になることが知られているが<sup>8,10,13,14</sup>、手技や細胞の取り扱い、培養履歴などにより、腫瘍形成率が安定するまでに要する時間はばらつくので、 $TPD_{min}$  における腫瘍形成確率が一定値に達するまでの期間は、試験施設において確認する必要がある。

陽性対照群がある場合でも、最終製品中の細胞の遺伝的安定性が低いことが明らかな場合など、投与後に生着部位において投与された細胞が形質転換することにより腫瘍が形成されることが強く懸念される場合には、より長期の観察が必要になると考えられる。ただし、動物の寿命もあり、観察の延長にも限界がある<sup>24</sup>。したがって、より長期の観察によっても腫瘍形成が認められなかったとしても、臨床投与後の形質転換による腫瘍形成の可能性については、例えばフォローアップ及び外科的切除や薬剤治療などによるリスクマネジメントのプランを予め講じておくことが重要である。

陽性対照群の設定をせずに試験する場合は、最終製品細胞の投与後から動物が死亡するまでの期間、自然発生病変や寿命が評価に影響を与えない最長期間又は移植細胞及びその分裂により生じた細胞が確認できなくなるまでの期間、腫瘍形成の有無を観察することが望ましい。

陽性対照群の有無の他に、動物種、系統、病態、免疫抑制状態なども勘案し、合理的に説明可能な観察期間を設定すること。



### 5.3.6. 投与部位の観察

投与部位に腫瘍の形成が確認された場合には、その検出日を記載する。皮下等の外観により腫瘍形成の確認が可能な場合は、その短径と長径を最低 1 週間に 1 回の頻度で測定し、腫瘍の成長を評価することが望ましい。ただし、実際の測定は、麻酔や測定時間などの動物への負荷を考慮した上で計画し、実施する。

腫瘍の成長が過度な場合には、動物福祉の観点から、動物を定められた方法により安楽死させる。腫瘍の退縮が認められる場合には、定められた観察期間終了までは安楽死させないこと。腫瘍の成長が認められない場合には、即座に腫瘍とは判断しないこと。

### 5.3.7. 病理学的評価

観察期間終了時に、すべての動物を安楽死させ、投与部位及び形成された腫瘍について剖検を行う。肉眼的に認められた腫瘍組織に加えて血流が豊富な主要臓器（肝臓、脾臓、腎臓、肺、リンパ節など）を摘出し、腫瘍組織については、HE 染色や免疫染色等で、ヒト由来細胞がどのような組織の腫瘍を形成したか確認する。また、摘出した他の臓器については目視で腫瘍の有無を確認する。ヒト細胞の浸潤・遠隔転移がないかを、ヒト細胞遺伝子に特異的な Alu 配列に着目した Alu PCR<sup>25,26</sup> や抗ヒト HLA 抗体等を用いた免疫染色等で評価することも有用である。この際には、評価方法の性能（例えば感度や特異性など）は事前に確認しておく必要がある。摘出した組織は全て保存する。一方、観察期間中に腫瘍が観察されなかった場合でも、偽陰性の判定を防ぐため、移植した細胞製品を摘出し移植したヒト細胞の組織像を検討する。その際、病理組織学的検査によって、移植細胞が移植片摘出前まで生存していたこと、腫瘍形成能がないこと、及び製品の使用目的に適った組織像であることを適切な免疫染色法の組みあわせで証明することが肝要である。なお、前述と同様に、血流が豊富な主要臓器（例えば肝臓、脾臓、腎臓、肺、リンパ節など）を摘出し、後日必要となる解析のため保存しておく。

### 5.3.8. 結果の解釈

製品細胞投与群において腫瘍形成が認められた場合には、腫瘍を構成する細胞がヒト由来の細胞であるか否かについて明らかにするとともに、製品中の造腫瘍性細胞の混在量を確認しつつ、製品の製法や品質規格の変更を検討すること。製品細胞投与群において腫瘍形成が認められなかった場合には、偽陰性の可能性について、陽性対照細胞の TPD<sub>min</sub> 値などから考えられる *in vivo* 造腫瘍性試験の性能を踏まえて考察する<sup>8</sup>。がん細胞などの造腫瘍性形質転換細胞は多様性に富み、*in vivo* 造腫瘍性試験では検出されにくい細胞種がある可能性がある。したがって、もし得られれば、特定のヒトがん細胞種の動物体内への移植試験（PDX : Patient-Derived Xenograft）に関する文献情報なども参考とする。試験結果の解釈は、あくまで混在造腫瘍性細胞の造腫瘍性を陽性対照細胞と同等と仮定した上でなされるものであることに留意すること。

## 6. ヒト体細胞／体性幹細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験

### 6.1. 原料・原材料の品質特性評価・品質管理のための造腫瘍性試験

ヒト体細胞／体性幹細胞加工製品を製造するための細胞基材（原料又は原材料）としてヒト体細胞又はヒト体性幹細胞のセル・バンクを樹立した際に、その品質特性評価を目的として造腫瘍性試験を行う場合には、WHO TRS 978 の Annex 3<sup>1</sup>を参考にすること。

### 6.2. 最終製品のための造腫瘍性関連試験の留意点

最終製品としてのヒト体細胞／体性幹細胞加工製品の造腫瘍性に関しては、形質転換細胞の混在量と、生着部位での投与細胞の腫瘍形成能について、試験データ又は文献等の情報をもとに検討する必要がある。

既に世界各地でヒト細胞の移植医療やヒト体細胞／体性幹細胞加工製品の臨床応用が進んでいる。しかし、これらの細胞移植や製品投与が原因となり腫瘍が形成されたことを示す症例報告は、ヒト胎児由来培養神経幹細胞を用いた毛細血管拡張性運動失調症の治療により脳に良性の腫瘍が形成されたという報告<sup>27</sup>、脊髄損傷治療を目的とした自己由来嗅粘膜（細胞の加工なし）を移植した後の腫瘍形成事例<sup>28</sup>、いわゆる「幹細胞ツーリズム」の一環としてクリニックで間葉系幹細胞、ES 細胞及び胎児由来神経幹細胞の髄腔内投与を受けたとされる虚血性脳卒中患者の脊髄における腫瘍形成事例<sup>29</sup>など限られたものしかない。なお、非常に稀ではあるが、ドナーにおける血液腫瘍リスクの上昇が認められないにもかかわらず、同種由来造血幹細胞移植後に患者がドナーの細胞に起因する白血病を発症することもあることも知られている<sup>30</sup>。再生医療・細胞治療に汎用されるヒト間葉系幹細胞を原料とした製品に限れば、臨床での単独投与による腫瘍形成の報告は存在しない。過去にヒト間葉系幹細胞の *in vitro* 培養時の悪性形質転換が4件報告されているが、このうち2件<sup>31,32</sup>はがん細胞株のクロスコンタミネーションによるものであることが後に判明している。また、残りの2件<sup>33,34</sup>では *in vitro* 培養時に細胞の不死亡が確認されている。これらのことは、最終製品への造腫瘍性細胞のクロスコンタミネーション防止及び細胞増殖特性の把握が重要であることを示している。したがって、GCTP 省令に準拠した工程管理の下に培養・加工され、既定の培養期間を超えた細胞の増殖特性解析で異常がないことを確認したヒト体細胞／間葉系幹細胞加工製品については、一般的には免疫不全動物を用いた *in vivo* 造腫瘍性試験を行う必要はない。

ただし、①最終製品中の細胞の増殖性や未分化度が高い、過去に腫瘍形成が報告された製品に含まれていた細胞種若しくはそれと同様の細胞が投与製品中に含まれるなどの理由により投与後に生着部位において腫瘍が形成されることが非常に強く懸念される場合、②最終製品を非相同的に使用する場合、又は③共通のヒト由来の原料細胞から製造された製品が多くの人に投与されることにより腫瘍形成リスクが拡散するおそれがある場合には、既定の培養期間を超えた細胞の増殖特性解析等の試験に加え、免疫不全動物を用いて上記

5.3 項と同様の造腫瘍性試験の実施を検討すること。

## 7. 遺伝的安定性に関する一般的留意点

遺伝的安定性の低下は、核型異常や遺伝子変異の発生確率を上昇させることを通じて形質転換細胞の発生確率を上昇させると推定されることから、造腫瘍性リスクに関する潜在的ハザードである。

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

遺伝的安定性試験法として、G バンド核型解析、FISH、アレイ CGH、SNP アレイ、次世代シーケンサーなどによる解析が挙げられる。G バンド核型解析は、一細胞の染色体数の変化、転座やその他の再構成を確かめることができる。この手法により、一定の継代数又は分裂数ごとに、核型が二倍体で保たれていることを示すのは、大まかな遺伝的安定性の指標として有用である。アレイ CGH はより狭い遺伝子領域のコピー数変化を検出できるという点で利点を有する。FISH や次世代シーケンサーによる情報については、遺伝子変化（変異のタイプとそのアレル頻度）に対する検出感度と適切なコントロールの入手可能性を課題として検討しつつ、造腫瘍性との関連性について科学的検証を進め、試験法として利用することの妥当性を評価すべきである。なお、性能の妥当性が示されるならば、次世代シーケンサーによる簡易染色体検査（digital karyotyping）は、日数がかかり定量性に欠ける点が問題とされる G バンド核型解析を代替することができるかもしれない。

概して、これらの試験は製品細胞の特性解析として有用であるが、現時点では出荷基準というよりも細胞の特性等に関する参考情報を得るという目的で実施されるものである。

## <参考文献>

1. World Health Organization. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures and substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. WHO technical report series, No 978 Annex 3. 2013, [http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS\\_978\\_Annex\\_3.pdf](http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.pdf)
2. Kuroda T *et al.* Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPSCs. *PLoS One*. 2012;7:e37342.
3. Kuroda, T *et al.* Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of residual undifferentiated cells in cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Regen Therapy* 2015;2:17–23.
4. Tateno H *et al.* A medium hyperglycosylated podocalyxin enables noninvasive and quantitative detection of tumorigenic human pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2014;4:4069.
5. Tano K *et al.* A novel in vitro method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One*. 2014;9:e110496.
6. Ito M *et al.* NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 2002;100:3175-82.
7. Shultz LD *et al.* Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 2005;174:6477-89.
8. Kusakawa S *et al.* Characterization of in vivo tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2R $\gamma$ null mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regen Therapy*. 2015;1:30-7.
9. Machida K *et al.* Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors. *J Toxicol Sci* 2009;34:123-7.
10. Kanemura H *et al.* Tumorigenicity studies of induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived retinal pigment epithelium (RPE) for the treatment of age-related macular degeneration. *PLoS One*. 2014;9:e85336.
11. Katano I *et al.* NOD-Rag2<sup>null</sup> IL-2R $\gamma$ <sup>null</sup> mice: an alternative to NOG mice for generation of humanized mice. *Exp Anim*. 2014;63:321-30.
12. Brehm MA *et al.* Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the IL2rgamma(null) mutation. *Clin Immunol*. 2010;135:84-98.
13. Kanemura H *et al.* Pigment epithelium-derived factor secreted from retinal pigment epithelium facilitates apoptotic cell death of iPSC. *Sci Rep*. 2013;3:2334.
14. Kawamata S *et al.* Design of a tumorigenicity test for induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cell products. *J Clin Med*. 2015;4:159-71.

15. Gropp M *et al.* Standardization of the teratoma assay for analysis of pluripotency of human ES cells and biosafety of their differentiated progeny. *PLoS ONE*. 2012;7:e45532.
16. Yasuda S *et al.* Tumorigenicity-associated characteristics of human iPS cell lines. *PLoS One*. 2018;13:e0205022.
17. Kono K, Takada N *et al.* Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. *Biologicals*. 2015;43:146-9. (See also: Kono K, Takada N *et al.* Corrigendum to "Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells" [Biologicals 43 (2) (March 2015) 146-149]. *Biologicals*. 2017;45:106.)
18. Hasebe-Takada N, Kono K *et al.* Application of cell growth analysis to the quality assessment of human cell-processed therapeutic products as a testing method for immortalized cellular impurities. *Regen Ther*. 2016;5:49-54. (A corrigendum is in press.)
19. Kusakawa S *et al.* Ultra-sensitive detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products by digital analysis of soft agar colony formation. *Sci Rep*. 2015;5:17892
20. Suzuki M *et al.* Dormant cancer cells retrieved from metastasis-free organs regain tumorigenic and metastatic potency. *Am J Pathol*. 2006;169:673-81.
21. Shih CC *et al.* Human embryonic stem cells are prone to generate primitive, undifferentiated tumors in engrafted human fetal tissues in severe combined immunodeficient mice. *Stem Cells Dev*. 2007;16:893-902.
22. Fujii E *et al.* Establishment and characterization of in vivo human tumor models in the NOD/SCID/ $\gamma_C^{\text{null}}$  mouse. *Pathol Int*. 2008;58:559-67.
23. Priest CA *et al.* Preclinical safety of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors supporting clinical trials in spinal cord injury. *Regen Med*. 2015;10:939-58.
24. Watanabe S *et al.* Humanized NOD/SCID/IL2R $\gamma^{\text{null}}$  mice transplanted with hematopoietic stem cells under nonmyeloablative conditions show prolonged life spans and allow detailed analysis of human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *J Virol*. 2007;81:13259-64.
25. Nelson DL *et al.* Alu polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:6686-90.
26. Schneider T *et al.* Quantification of human Alu sequences by real-time PCR--an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19:571-82.
27. Amariglio N *et al.* Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 2009;6: e1000029.
28. Dlouhy BJ *et al.* Autograft-derived spinal cord mass following olfactory mucosal cell transplantation in a spinal cord injury patient. *J Neurosurg. Spine* 2014;21:618-22.

29. Berkowitz AL *et al.* Glioproliferative lesion of the spinal cord as a complication of “Stem-Cell Tourism”. *N Engl J Med.* 2016;375:196-8.
30. Hertenstein B *et al.* Development of leukemia in donor cells after allogeneic stem cell transplantation—a survey of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica.* 2005;90:969-75.
31. Garcia S *et al.* Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2010;316:1648-50.
32. Torsvik A *et al.* Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Res.* 2010;70:6393-96.
33. Wang Y *et al.* Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 2005;7:509-19.
34. Tang DQ *et al.* In vitro generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation. *Am J Stem Cells* 2012;1:114-27.

表 1 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出・定量法

試験法	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験 (マトリゲルとともに NOG マウスに皮下投与)	フローサイトメトリー	qRT-PCR
目的	造腫瘍性細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出
試験期間・分析時間 (斜字)	17~30 週間	1 日	約 6 時間
利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 直接的</li> <li>◆ 臨床適用相当部位への移植により微小環境での造腫瘍性を評価可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 短時間</li> <li>◆ 個々の細胞を解析し、マーカー分子の発現量を評価可能</li> <li>◆ 簡便</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 迅速</li> <li>◆ 高感度</li> <li>◆ 簡便</li> </ul>
欠点・留意点	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 費用と時間がかかる</li> <li>◆ 専用動物施設が必要</li> <li>◆ スループットが低い</li> <li>◆ 腫瘍の由来が形質転換細胞か多能性幹細胞かを区別するには、病理的評価等が必要</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 間接的</li> <li>◆ ゲーティングが結果に影響</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 間接的</li> <li>◆ 個々の細胞でのマーカー分子発現レベルは評価できない</li> </ul>
検出能力又は検出限界 (下線)	hRPE2.5 × 10 <sup>5</sup> 個中に 1,000 個 (0.4%) の割合で混在するヒト iPS 細胞を 50% の確率で検出	<u>hRPE 中の 0.1% のヒト iPS 細胞</u> (マーカー : TRA-1-60)	<u>hRPE 中の 0.002% 以下のヒト iPS 細胞</u> (マーカー : LIN28)
出典	Kanemura <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2013 Kawamata <i>et al.</i> , <i>J Clin Med.</i> 2015	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012

表 1 (続) 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出・定量法

試験法	Droplet Digital PCR	GlycoStem-HP 法	Essential-8/LN521 培養増幅法
目的	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出
試験期間・分析時間 (斜字)	約 6 時間	3 時間以下 (培養上清回収から測定まで)	約 1 週間
利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 迅速</li> <li>◆ 簡便</li> <li>◆ 高感度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 細胞非破壊的</li> <li>◆ 簡便</li> <li>◆ 高スループット</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 直接的</li> <li>◆ 簡便</li> <li>◆ 残存 iPS 細胞の特性解析が可能</li> </ul>
欠点・留意点	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 間接的</li> <li>◆ 個々の細胞でのマーカー分子発現レベルは評価できない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 間接的</li> <li>◆ 個々の細胞でのマーカー分子発現レベルは評価できない</li> <li>◆ 培地成分が結果に影響</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 時間がかかる</li> <li>◆ スループットが低い</li> </ul>
検出能力又は検出限界 (下線)	ヒト心筋細胞中の <u>0.001% のヒト iPS 細胞</u> (マーカー: <u>LIN28</u> )	HEK293T 細胞中の <u>0.05% のヒト iPS 細胞</u> (マーカー: H3+ポドカリキシン)	hMSC 中の <u>0.01~0.001% のヒト iPS 細胞</u>  ヒト胚葉体中の <u>0.1~0.01% のヒト iPS 細胞</u>
出典	Kuroda <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2015	Tateno <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2014	Tano <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2014



表2 混在する形質転換細胞の検出・定量法

試験法	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験 (マトリゲルとともに NOG マウスに皮下投与)	軟寒天コロニー形成試験	デジタル 軟寒天コロニー形成試験	細胞増殖特性解析
目的	造腫瘍性細胞の検出	足場非依存的増殖 (悪性形質転換細胞) の検出	足場非依存的増殖 (悪性形質転換細胞) の検出	不死化細胞 (形質転換細胞) の検出
試験期間	16 週間以上	3~4 週間	3~4 週間	4 週間以上
利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>直接的</li> <li>高感度</li> <li>臨床適用相当部位への移植により微小環境での造腫瘍性を評価可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>安価</li> <li>悪性形質転換細胞を単離・特性解析できる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>高感度</li> <li>悪性形質転換細胞を単離・特性解析できる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>安価</li> <li>簡便</li> <li>悪性形質転換細胞以外不死化細胞も幅広く検出</li> </ul>
欠点・留意点	<ul style="list-style-type: none"> <li>費用と時間がかかる</li> <li>専用動物施設が必要</li> <li>腫瘍の由来が形質転換細胞か多能性幹細胞かを区別するには、病理的評価等が必要</li> <li><i>in vivo</i> 造腫瘍性を示さない不死化細胞は検出不能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断</li> <li>浮遊系細胞には使えない</li> <li>悪性形質転換細胞以外不死化細胞は検出不能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断</li> <li>浮遊系細胞には使えない</li> <li>イメージスキャナーが高価</li> <li>悪性形質転換細胞以外不死化細胞は検出不能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断</li> <li>悪性形質転換細胞の有無を区別できない</li> </ul>
検出能力 又は 検出限界 (下線)	hMSC に 1/10 <sup>6</sup> (0.0001%) の割合で混在する HeLa 細胞 (10 個) を 17% の確率で検出可能	hMSC に 1/10 <sup>3</sup> (0.1%) の割合で混在する HeLa 細胞 (計算上の検出限界は 0.02%)	hMSC に 1/10 <sup>7</sup> (0.00001%) の割合で混在する HeLa 細胞	hMSC に 1/10 <sup>6</sup> (0.0001%) の割合で混在する HeLa 細胞及び脂肪由来幹細胞に 1/10 <sup>5</sup> (0.001%) の割合で混在する不死化脂肪由来幹細胞
出典	Kusakawa et al., <i>Regen Ther.</i> 2015	Kusakawa et al., <i>Regen Ther.</i> 2015	Kusakawa et al., <i>Sci Rep.</i> 2015	Kono et al., <i>Biologicals.</i> 2015&2017 Hasebe-Takada et al., <i>Regen Ther.</i> 2016

## <参考情報1>混在する未分化ES/iPS細胞の検出法としての *in vivo* 造腫瘍性試験

出典：Kanemura *et al.* Tumorigenicity studies of induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived retinal pigment epithelium (RPE) for the treatment of age-related macular degeneration.

*PLoS ONE*. 2014;9:e85336.

### 【方法】

#### 1. 細胞培養

皮膚線維芽細胞にレトロウイルスpMXs-POU5F1、-Sox2、-c-Myc、-Klf4を導入して作製されたヒトiPS細胞株201B7は、SNLフィーダー細胞上で5 ng/mL bFGFを含むReproFF2培地を用いて維持培養する。細胞株836B1は健常人から採取した皮膚線維芽細胞から樹立された。細胞株59、K11、K21、101、RNT9又はRNT10は、同意を得た6名の光受容体特異的遺伝子変異を伴う網膜色素変性症患者の皮膚線維芽細胞に由来する。皮膚線維芽細胞から、POU5F1、SOX2、KLF4、MYCL、LIN28A及びGLIS1 (iPS細胞株59-G、K21-G、101-G、RNT9、RNT10) 又はPOU5F1、SOX2、KLF4、MYCL、LIN28A及びp53shRNA (iPS細胞株101-EV、K11-EV、K21-EV) が挿入されたENBAエピソーマルベクターにより、iPS細胞を樹立した。これらのiPS細胞は、自己線維芽細胞由来フィーダー細胞上で、5 ng/mL bFGFを含むprimate ES培地を用いて維持培養する。iPS細胞由来網膜色素上皮 (RPE) 細胞クローン (59-G3 RPE、K21-G18 RPE、101-G25 RPE、RNT9 RPE、RNT10 RPE、101-EV RPE、K11-EV9 RPE又はK21-EV15 RPE) は、RPE維持培地 [B-27サプリメント、2 mM L-グルタミン、0.5 nM SB431542 及び10 ng/mL bFGFを含むDulbecco's Modified Eagle's Medium: Ham's F12 Medium (7:3)] で維持培養する。ヒト初代培養RPEは、L-グルタミン、GA-1000及びbFGFを含むRetinal Pigment Epithelial Cell Basal Mediumで維持培養する。浮遊培養したヒトiPS細胞由来RPE細胞は、皮下投与又はコラーゲンゲル上に捲いてコラーゲンで架橋させたRPE細胞シート作製に用いる。RPE細胞シートは、10%ウシ胎児血清 (FBS) とHam's F10培地で4週間、RPE維持培地で3週間維持培養した後に、コラゲナーゼIでコラーゲンゲルから剥離させる。RPE細胞シートは、懸濁細胞とマトリゲルを混合し皮下投与又はレーザーマイクロダイセクションにより断片化し動物の網膜移植に用いる。

#### 2. 動物実験

##### 2.1 マウス皮下移植

様々な投与量のHeLa細胞を、200  $\mu$ Lのマトリゲルと混合又は200  $\mu$ LのPBS (マトリゲルなし) に懸濁し、7~8週齢の雌性ヌードマウス (BALB/cAJCl-*nu/nu*)、SCIDマウス (C.B-17/*Icr-scid/scid*Jcl)、NOD-SCIDマウス (NOD/ShiJic-*scid*Jcl) 又はNOGマウス (NOD/ShiJic-*scid*、

IL-2R $\gamma$ KO Jic) の皮下組織に、26G注射針を付けた1 mLシリンジを用いて注射する。動物は36週間モニターする。実験の終わりにマウスを安楽死させ、腫瘍を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定する。パラフィン切片は、病理学的な観察のためHE染色する。様々な投与量のヒトiPS細胞201B7又は $1 \times 10^6$ 個のヒトiPS細胞由来RPE細胞を、200  $\mu$ Lのマトリゲルと混合又は200  $\mu$ LのPBS (マトリゲルなし) に懸濁し、7~8週齢の雌性NOGマウスに、26G注射針を付けた1 mLシリンジを用いて皮下投与し、6~15ヶ月観察する。実験の終わりにマウスを安楽死させ、移植片をピンセットで採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定する。

## 2.2 ラット網膜下投与

3週齢雌性ヌードラット (F344/NJcl-*rnu/rnu*) を、ケタミン100 mg/kgとキシラジン10 mg/kgとの混液の腹腔内投与により麻酔する。散瞳薬 (0.5%トロピカミド、0.5%フェニレフリン塩酸塩) により右眼の瞳孔を拡大する。27G注射針を用いて右眼隅の強膜を小さく切開する。その後、様々な濃度のHeLa細胞、ヒトiPS細胞又は2  $\mu$ LのDMEM/F12培地に浸した1 mm四方のヒトiPS細胞由来RPE細胞シートを、33G注射針の付いたハミルトンシリンジを用いて、強膜切開部から網膜下スペースに注射する。細胞又はRPE細胞シートは、外科用顕微鏡下で拡大した瞳孔を通してハミルトンシリンジの位置を確認しながら、網膜下の毛細血管集網に移植する。網膜下の毛細血管集網は、アルビノのヌードラットにおいて容易に観察でき、網膜下スペースの目印として使う。移植したヌードラットは8~82週間モニターする。実験の終わりにラットは安楽死させ、移植した全眼球を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定する。

## 3. RT-PCR及び定量RT-PCR

総RNAはキットにより抽出し、混在するゲノムDNAはスピンカラム処理により除去する。PrimeScript RT Master MixとPrimeSTAR MAX DNA Polymeraseを用いて、50 ngの総RNAからcDNAを作製する。定量PCRはSYBR Greenを用いて行い、遺伝子発現量はGAPDHで補正する。定量RT-PCRはQuantiTect Probe RT-PCR Kitを用いて行う。標的遺伝子の発現量は、RNase P転写産物により補正する。定量RT-PCRは、45サイクル行う。本実験で用いるプローブとプライマーの配列は、表.プローブとプライマーの配列 (参考情報1) に記載する。

## 4. Alu PCR

ヒト細胞特異的なAlu配列をプライマーのデザインに用いる。PCR反応 (28サイクル) に、Aluプライマー5'-AAGTCGCGGCCGCTTGACAGTGAGCCGAGAT-3'、50 ng DNAテンプレート及びPrimeSTAR Max DNA Polymeraseを用いる。ヒトHeLa細胞 DNA : マウスNIH3T3 DNA

が様々な割合のDNAテンプレートを、AluPCRの検出感度を決定するために用いる。PCR産物は1%アガロースゲルを用いた電気泳動で分離し、その画像はデジタル化して取り込む。

## 5. 免疫組織化学

移植した組織は 4%パラホルムアルデヒドで固定する。パラフィン包埋した組織切片は、HE 染色する。その後、パラフィン切片は脱パラフィン化のため、キシレンで処理し、100%、95%、80%、70%エタノールで各々5 分間ずつ連続して処理を行う。切片は 10 mM クエン酸 (pH 6) で 95°C、50 分間処理し、0.4%Triton-X100/PBS で室温、30 分間処理する。脱パラフィン化切片は、抗ヒト Lamin-A 抗体、抗 BEST1 抗体及び抗 Ki-67 抗体で染色する。核は、Hoechst 33258 又は DAPI で染色する。浮遊状態のヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞は、4%パラホルムアルデヒドで固定し、抗 POU5F1 (OCT3/4) 抗体又は抗 BEST1 抗体で染色する。抗体は、Alexa Fluor 488 goat anti-mouse 又は Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit を用いて可視化する。蛍光顕微画像は、蛍光顕微鏡により取り込む。

表. プローブとプライマーの配列 (参考情報 1)

Primers for RT-PCR			
Gene	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')	
<i>LIN28A</i>	CACGGTGCGGGCATCTG	CCTCCATGTGCAGCTTACTC	
<i>POU5F1</i>	GAAACCCACACTGCAGCAGA	TCGCTTGCCTTCTGGCG	
<i>BEST1</i>	ATCAGAGGCCAGGCTACTACAG	TCCACAGTTTTCTCCTCACTT	
<i>CRALBP</i>	GACTGGGGTTAAATCTCACAGC	TGACATGTTGCCTATGGAAGAC	
<i>PAX6</i>	TTAACACACTTGAGCCATCACC	AAATCTCGGATGTCTGTCCACT	
<i>TYR</i>	AGCCCAGCATCATTCTTCTC	GGCGTCCATTGCATAAAGA	
<i>GAPDH</i>	CGATGCTGGCGCTGAGTAC	CCACCACTGACACGTTGGC	
Probes and primers for qRT-PCR			
Gene	Probe sequence (5'→3')	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
<i>LIN28A</i>	CGCATGGGGTTCGGCTTCTGTCC	CACGGTGCGGGCATCTG	CCTCCATGTGCAGCTTACTC
<i>POU5F1</i>	CGGACCACATCCTTCTCGAGCCCAAGC	GAAACCCACACTGCAGCAGA	TCGCTTGCCTTCTGGCG

## <参考情報 2> 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出法としての qRT-PCR

出典：Kuroda *et al.* 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

### 【方法】

#### 1. Total RNA 抽出

キットに添付されているプロトコールに従って、サンプルとなる細胞（iPS 細胞を分化させた細胞など）から総 RNA を抽出し、DNase 処理を行う。

#### 2. 定量 RT-PCR

2.1 PCR mixture を QuantiTect Probe RT-PCR Kit を用いて以下のように調製する。

##### a) PCR mixture (*LIN28*)

	Final conc.	Assay/well (μL)
QuantiTect RT Mix	1 ×	0.25
2 × QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	1 ×	12.5
100 μM Forward Primer	0.4 μM	0.1
100 μM Reverse Primer	0.4 μM	0.1
20 μM Probe	0.1 μM	0.125
RNAase free water	-	6.93
		Total 20

##### b) PCR mixture (*GAPDH*)

	Final conc.	Assay/well (μL)
QuantiTect RT Mix	1 ×	0.25
2 × QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	1 ×	12.5
10 μM Forward Primer	0.2 μM	0.5
10 μM Reverse Primer	0.2 μM	0.5
5 μM Probe	0.1 μM	0.5
RNAase free water	-	5.75
		Total 20

TaqMan® GAPDH Control Reagents (human)を使用

2.2 Total RNA 溶液を以下のように調製する。

##### a) *LIN28* 測定用

- 検量線用のテンプレートの調製

未分化 iPS 細胞由来 RNA 濃度を 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01, 0.003, 0.001, 0 ng/μL とな

るように RNase free water で希釈したものを調製する。

- サンプル RNA の調製  
サンプル RNA の濃度が 10 ng/μL になるように調製する。

b) *GAPDH* 測定用

- 検量線用のテンプレートの調製  
未分化 iPS 細胞由来 RNA 濃度を 10, 3, 1, 0.3, 0.01, 0 ng/μL となるように RNase free water で希釈したものを調製する。
- サンプル RNA の調製  
サンプル RNA の濃度が 1 ng/μL になるように RNase free water で希釈したものを調製する。

2.3 PCR 用 96 ウェルプレートに PCR mixture を 20 μL/ウェルずつ添加する。

2.4 テンプレート溶液を 5 μL/ウェルずつ添加する（よく混合する）。

2.5 リアルタイム PCR 装置にセットする。

定量 RT-PCR 条件

Stage	温度	時間
Stage 1	50.0°C	30 分
Stage 2	95.0°C	15 分
Stage 3	94.0°C	15 秒
	60.0°C	1 分
Stage 3 を 45 サイクル繰り返す。（ <i>GAPDH</i> は 40 サイクル）		

プレート配置図 (サンプル A、B、C とする)

	GAPDH			LIN28								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	201B7	201B7	201B7	201B7*	201B7*	201B7*						
B	A	A	A	A	A	A						
C	B	B	B	B	B	B						
D	C	C	C	C	C	C						
E	S10	S3	S1	S3	S1	S0.3						
F	S0.3	S0.1	DW	S0.1	S0.03	S0.01						
G				S0.003	S0.001	DW						
H												

\*未分化マーカーを測定する 201B7 は 1 ng/μL で調製する (陽性対照)。

LIN28 probe、primer 配列

Gene	Probe Primer set (5' → 3')	
LIN28	Probe sequences (5' FAM/3' TAMRA)	CGCATGGGGTTCGGCTTCCTGTCC
	Forward primer sequences	CACGGTGCGGGCATCTG
	Reverse primer sequences	CCTTCCATGTGCAGCTTACTC

Primer は 100 μM、Probe は 20 μM に調製する。

**注意点:**ごく微量な LIN28 を検出した場合の判断基準として、Ct 値が 35 を超えた場合は未検出とする。(Ct 値>35 ではバラツキが大きくなるため)



### <参考情報 3> 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出法としての Droplet Digital PCR

出典 : Kuroda *et al.* Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of residual undifferentiated cells in cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells.

*Rege Ther.* 2015;2:17-23.

#### 【方法】

##### 1. Total RNA 抽出

キットに添付されているプロトコールに従って、サンプルとなる細胞 (iPS 細胞を分化させた細胞など) から総 RNA を抽出し、DNase 処理を行う。

##### 2. Droplet digital PCR

2.1 PCR mixture を One-Step RT-ddPCR Kit for Probes を用いて以下のように調製する。

PCR mixture

	Final conc.	Assay/well ( $\mu\text{L}$ )
2 × One-Step RT-ddPCR Supermix	1 ×	10
25 mM Manganese	1 ×	0.8
50 $\mu\text{M}$ Forward Primer	0.75 $\mu\text{M}$	0.3
50 $\mu\text{M}$ Reverse Primer	0.75 $\mu\text{M}$	0.3
50 $\mu\text{M}$ Probe	0.25 $\mu\text{M}$	0.1
RNAase free water	-	3.5
		Total 15

2.2 Total RNA 溶液を以下のように調製する。

LIN28 測定用

- 検量線用のテンプレートの調製  
未分化 iPS 細胞由来 RNA 濃度を 0.1, 0.03, 0.01, 0.003, 0.001, 0 ng/ $\mu\text{L}$  となるように RNase free water で希釈したものを調製する。
- サンプル RNA の調製  
サンプル RNA の濃度が 10 ng/ $\mu\text{L}$  になるように調製する。

2.3 PCR tube に PCR mixture を 15  $\mu\text{L}$ /ウェルずつ添加する。

2.4 RNA 溶液を 5  $\mu\text{L}$ /ウェルずつ添加する。(よく混合する)

2.5 Droplet Generator を用いて、ドロップレット作製を行う。

2.6 作成したドロップレット液を 96 ウェルプレートに移す。

2.7 RT-PCR 反応

サーマルサイクラー条件

Stage	温度	時間
Stage 1	60.0°C	30 分
Stage 2	95.0°C	5 分
Stage 3	94.0°C	30 秒
	64.0°C	1 分
Stage 3 を 40 サイクル繰り返す。		
Stage 4	98°C	10 分

2.8 PCR 反応液を QX100 Droplet Reader を用いて解析する。

LIN28 probe、 primer 配列

Gene	Sequence (5' → 3')	
<i>LIN28</i>	Probe sequences (5' FAM/3' BHQ1)	CGCATGGGGTTCGGCTTCCTGTCC
	Forward primer sequences	CACGGTGCGGGCATCTG
	Reverse primer sequences	CCTTCCATGTGCAGCTTACTC

Primer 及び Probe は、50 μM に調製する。

#### 注意点

- ・ プライマーによって至適アニーリング温度が異なるので、条件検討が必要。
- ・ 閾値の設定により結果が大きく変化することに注意が必要。

#### <参考情報 4>培養上清を用いた非破壊での *in vitro* 造腫瘍性試験

出典：Tateno *et al.* A medium hyperglycosylated podocalyxin enables noninvasive and quantitative detection of tumorigenic human pluripotent stem cells.

*Sci Rep.* 2014;4:4069.

#### 【測定に必要なキット・機器】

- ・ヒトES/iPS細胞モニタリングキット
- ・遠心機（1,700 x gで遠心が可能な遠心機）
- ・試験管ミキサー
- ・プレートミキサー（あれば好ましい）
- ・96ウェルプレート洗浄機（あれば好ましい）
- ・96ウェルプレートリーダー（吸光度測定：主波長 450 nm、副波長 600 nm～650 nm）

#### 【注意】

<測定に関すること>

- ・培地交換した翌日に培養上清をサンプリングし、その後に細胞を剥がしてヒト多能性幹細胞数を測定する。例えば培地が 5 mL、細胞数が  $5 \times 10^6$  cells であった場合、サンプリングした培養上清の未分化細胞数を  $1 \times 10^6$  cells/mL とする。
- ・本方法では、未分化維持培養条件下の培養上清の測定値に基づく標準曲線を作成し、それを一つの基準にして測定対象となる試料中の未分化細胞数を算出する。
- ・細胞株又は培地の種類などの培養条件により、シグナル強度と細胞数（cells/mL）の関係が異なる場合がある。標準曲線は細胞株毎及び未分化維持培養条件毎に作成する。

<キットの使用>

- ・使用前は 20℃～25℃に保管すること。
- ・プレート洗浄機などを使って洗浄を終えた後は、プレートを逆さにしてペーパータオルなどに軽く叩きつけてウェルに残っている余分な洗浄液を取り除く。
- ・プレートシール以外のキット構成試薬は、使用後速やかに冷蔵に戻して保管する。

<試料（培養上清）の調製法>

- ・測定対象試料及び標準曲線作成用試料は、培地交換後 18 時間～24 時間培養した上清をサンプリングする。
  - \* 全培地交換を基本とし、その後の培養時間にも影響されるため、できるだけ培地交換後サンプリングまでの時間を統一する。
- ・サンプリングした培養上清を 1,700 × g（3,000 rpm）、10 min、室温で遠心すること。回収される遠心上清を「試料」とする。

- ・すぐに測定に供しない場合は、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存する。

#### <標準曲線作成>

- ・細胞株毎及び未分化維持培養条件毎に標準曲線を作成する。
- ・全培地交換した 18 時間～24 時間後の培養上清をサンプリングした後、細胞を剥がして未分化細胞数を測定し、<試料（培養上清）の調製法>に従って培養上清から試料を調製する。測定に供するまで $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存する（数回程度の凍結融解は可能）。
- ・測定対象となる試料と同じ新しい培地で希釈して標準曲線を作成する。最初は 30,000 cells/mL から 41 cells/mL まで 3 倍ずつ段階希釈して傾向を確かめ、その後に適切な細胞数から 2 倍ずつ段階希釈して検量線を作成すると良い。また、培地によってはバックグラウンドが高いものもあるため、必ず培地のみウェルも作成する。
- ・測定毎に Strip の一つを標準曲線用とし、そこで得られる標準曲線から測定対象となる試料の未分化細胞数を算出すると良い。
- ・検体数が多く、測定毎に Strip の一つを標準曲線用に使うことが難しい場合には、標準曲線に使用するウェル数を減らすこともできる（2~4 ウェル）。ただし、直線関係が得られる細胞数を選ぶこと。

### 【操作】

#### <準備>

- ・使用する前に、rBC2LCN 固相化プレート、陰性コントロール、陽性コントロール、希釈液、洗浄液（10×）、発色停止液、プレートシールを室温にする（HRP 標識抗体溶液及び TMB 溶液以外の試薬）。
- ・洗浄液（10×）を室温の蒸留水で 10 倍希釈する。洗浄液（1×）は 1-Strip あたり少なくとも 40 mL 必要となる（ $350\ \mu\text{L}/\text{ウェル} \times \text{洗浄 12 回} \times 8\ \text{ウェル}$ ）。測定数（使用する Strip 数）にあわせて調製する。ただし、プレート洗浄機を使う場合は、機械のセッティングに要する液量を考慮し多目に調製すること。
- ・反応の成否を確かめるための陽性コントロールは、使用直前に希釈液で 40 倍希釈する（希釈液 195  $\mu\text{L}$  に陽性コントロール 5  $\mu\text{L}$  を添加後ボルテックスで混合して、50  $\mu\text{L}/\text{ウェル}$  で空いているウェルに添加する）。
- ・陰性コントロールは、希釈せずそのままウェルに添加する
- ・HRP 標識抗体溶液は、使用直前に希釈液で 20 倍希釈して必要量（50  $\mu\text{L}/\text{ウェル} \times \text{ウェル数}$ ）を調製すること。必要量を取り出した後の HRP 標識抗体溶液は速やかに冷蔵に戻すこと。
- ・TMB 溶液は、発色反応の 20 分前～30 分前に、必要量（50  $\mu\text{L}/\text{ウェル} \times \text{ウェル数}$ ）を滅菌された新しいチューブに分けて、使用するまで光を避けて室温で保管すること。必要量を取り出した後の TMB 溶液は速やかに冷蔵に戻すこと。

<測定手順>

- (1) rBC2LCN 固相化プレートが室温になったことを確認した後、袋からプレートを取り出し、測定に使用しない Strip をプレート枠から外して袋に戻し、チャックを閉じて冷蔵に保管する。
- (2) プレート枠のホルダーを閉じて Strip を固定し、洗浄液 (×1)、350  $\mu$ L/ウェルで3回洗浄する。その後、プレートを逆さにしてペーパータオルなどに軽く叩きつけてウェルに残っている洗浄液を取り除く。
- (3) 標準曲線用試料、測定対象試料、必要ならば陰性コントロール及び陽性コントロールを、各々 50  $\mu$ L/ウェル添加し、プレートミキサーなどで軽く攪拌した後、プレートシールを貼って室温で1時間静置反応させる。
- (4) プレートシールをはがし、洗浄液 (×1)、350  $\mu$ L/ウェルで3回洗浄する。その後、プレートを逆さにしてペーパータオルなどに軽く叩きつけてウェルに残っている洗浄液を取り除く。
- (5) 20倍希釈した HRP 標識抗体溶液を、50  $\mu$ L/ウェル添加しプレートミキサーなどで軽く攪拌した後、プレートシールを貼って室温で1時間静置反応させる。
- (6) プレートシールを剥がし、洗浄液 (1×)、350  $\mu$ L/ウェルで6回洗浄する。その後、プレートを逆さにしてペーパータオルなどに軽く叩きつけてウェルに残っている洗浄液を取り除く。
- (7) TMB 溶液を、50  $\mu$ L/ウェル添加し、プレートミキサーなどで軽く攪拌した後、室温で30分間静置反応させる (アルミホイルなどで上からカバーして光を避ける)
- (8) 発色停止液を、50  $\mu$ L/ウェル添加し、軽く攪拌して反応を停止させ、プレートリーダーで吸光度 [主波長 450 nm、副波長 620 nm~650 nm] を測定する。泡などが生じている場合は、チップの先などで消してから測定する。
- (9) 標準曲線に基づいて、測定対象となる試料中の未分化細胞数を算出する。  
\*陽性コントロールを使用になった場合は、その吸光度が 0.5 以上であること、陰性コントロールを使用した場合はその吸光度が 0.15 未満であることを確認すること。

操作手順 (フローチャート)

rBC2LCN 固相化プレート

↓洗浄3回

標準曲線用試料、測定対象試料、場合により陰性及び陽性コントロールを 50  $\mu$ L/ウェル添加

↓攪拌、室温、1時間反応 (静置)

↓洗浄3回

HRP 標識抗体溶液 (20倍希釈) を 50  $\mu$ L/ウェル添加

↓ 攪拌、室温、1 時間反応（静置）

↓ 洗浄 6 回

TMB 溶液を 50  $\mu$ L/ウェル添加

↓ 攪拌、室温、30 分間反応（静置、遮光）

発色停止液を 50  $\mu$ L/ウェル添加

↓ 攪拌

吸光度測定（主波長 450 nm、副波長 600～650 nm）

## <参考情報 5> 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出法としての Essential8/LN521 培養増幅法

出典：Tano *et al.* A novel *in vitro* method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system  
*PLoS ONE*. 2014;9:e110496.

### 【方法】

#### 1. ヒト iPS 細胞から間葉系幹細胞への分化途中で残存する未分化 iPS 細胞の検出

##### 1.1 laminin-521 (LN521) コーティングプレートの作製

PBS で 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した LN521 を培養用プレートに添加 (1 mL / 10  $\text{cm}^2$ ) し、37°C で 2 時間以上インキュベートする。その後 LN521 を回収し、PBS で洗浄する。Essential 8 培地で一度洗った後、Essential 8 培地を添加 (2 mL / 10  $\text{cm}^2$ ) し、細胞を播種するまで 37°C でインキュベートする。

##### 1.2 陽性対照細胞の調製

分化細胞としてヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を用意し、Essential 8 培地中に分散させる。この中に、分化誘導に使用した元の iPS 細胞株を、シングルセルの状態にして Essential 8 培地中に分散させた後、スパイクする。(例えば、iPS 細胞の混在率が 1、0.1、0.01% の場合、 $1 \times 10^5$  個の MSC 中に  $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10$  個の割合で iPS 細胞をそれぞれスパイクさせる。また iPS 細胞の混在率が 0.001% の場合、 $6 \times 10^5$  個の hMSC 中に 6 個の割合で iPS 細胞をスパイクさせる。) 分化細胞とヒト iPS 細胞をよく混ぜた後、1.1 で準備した LN521 コーティングプレートに添加し、37°C 5%CO<sub>2</sub> で培養する。(hMSC が  $1 \times 10^5$  の場合は 35 mm ディッシュ (又は 6 ウェルプレート)、 $6 \times 10^5$  の場合は 100 mm ディッシュを使用。) 培養を始めてから 2 日後より毎日培地交換する。目視できるコロニーが形成されるまでの間は、アスピレートを使用せず、チップ又はピペットで培地を回収する。

##### 1.3 テストサンプルの調製

ヒト iPS 細胞から分化誘導した細胞を Accutase で剥がし、Essential 8 培地中に分散させる。1.1 で準備した LN521 コーティングプレートに添加し、37°C 5%CO<sub>2</sub> で培養する。培地交換の方法は 1.2 と同様。

##### 1.4 残存未分化 iPS 細胞の検出

培養開始からおよそ 1 週間以内に残存 iPS 細胞が増殖し、コロニーを形成する。このコロニーの有無を確認し、数を計測する。形成されたコロニーが未分化 iPS 細胞に由来することの確認として、TRA-1-60 などの未分化マーカーに対する抗体で免疫染色する。

残存の有無を判断するには、陽性対照で残存 iPS 細胞の検出感度を確認しておく必要が

ある。また、本方法では、陽性対照で検出されるコロニー数と比較することで、おおよその残存率を見積もることができる。



## <参考情報 6> 混在する形質転換細胞の検出法としての *in vivo* 造腫瘍性試験

出典：Kusakawa *et al.* Characterization of *in vivo* tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2R $\gamma$ null mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products.

*Regenerative Therapy*. 2015;1:30-37.

### 【方法】

#### 1. NOG マウスを用いた造腫瘍性試験

##### 1.1 細胞培養

移植細胞として、形質転換細胞である HeLa 細胞を、正常細胞であるヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を用いる。培地は、HeLa 細胞の培養では 10%FBS 含有 Eagle's minimum essential medium (MEM) 培地を用い、hMSC の培養では Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) 培地を用いる。

##### 1.2 細胞移植と腫瘍形成の観察

1.2.1 フラスコの面積の 80% を細胞が覆い尽くした状態に達した各細胞を 0.25% トリプシン-EDTA 溶液で剥がし、以下の濃度の細胞懸濁液を調製する。1)  $1 \times 10^6$  個の hMSC に 10 個 (0.001%)、 $1 \times 10^2$  個 (0.01%)、 $1 \times 10^3$  個 (0.1%)、 $1 \times 10^4$  個 (1%) 個の HeLa 細胞を混入する。2)  $1 \times 10^7$  個の hMSC に 10 個 (0.0001%)、 $1 \times 10^2$  個 (0.001%)、 $1 \times 10^4$  個 (0.1%) 個の HeLa 細胞を混入する。移植用の細胞懸濁液は、100  $\mu$ L 中に上記の量の細胞を含むように、10%FBS 含有 MEM 培地とマトリゲルを 1:1 の割合で含む培地中に調製し、移植の直前まで氷上に置いておく。

1.2.2 6~8 週齢の雄性 NOG マウス (NOD/Shi-scid IL2R $\gamma$ KO Jic) の背部皮下に、25G 針付きの 1 mL シリンジを用いて 100  $\mu$ L 移植する。1 群あたり 6 匹以上を用いる。

1.2.3 毎週、視診及び触診によって腫瘍形成の有無を確認する (16 週間)。腫瘍の形成が確認されたら、ノギスを用い長径と短径の長さを計測する。腫瘍体積 ( $\text{mm}^3$ ) は、長径 (mm)  $\times$  短径<sup>2</sup> (mm)<sup>2</sup>  $\times$  1/2 の計算式で求める。腫瘍重量 (比重を 1 として体積より計算) が体重の 10% を超える大きさに達した場合又は 16 週を経過した場合、全ての動物を安楽死させ剖検し、病理学的評価のために単離した腫瘍組織を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液に保存する。

1.2.4 各細胞濃度群について、腫瘍形成頻度 (腫瘍形成が確認できた匹数 / 移植匹数) を求め、Spearman-Kärber 法に基づいて、50% 腫瘍形成細胞濃度 (TPD<sub>50</sub>) を算出する。

### 1.3 正常細胞中の造腫瘍性細胞混在の有無の評価

陽性対照細胞の結果から、1匹のマウスにおける腫瘍形成が起こらない確率（偽陰性率） $x$ （ $=1 - \text{腫瘍形成頻度}$ ）が得られる。 $n$ 匹のマウスに移植して全く腫瘍形成が観察されない確率  $y$  は、 $y = x^n$  と表される。 $n = \log y / \log x$  という式が導かれ、許容できる偽陰性率に応じた試験に必要な動物数を算出することが可能である。例えば、10個のHeLa細胞を混入させたhMSC  $1 \times 10^7$ 個（HeLa細胞混在率0.0001%）を移植した時の腫瘍形成率が17%という結果が得られていた場合、HeLa細胞相当の造腫瘍性細胞が  $1/10^6$  の割合で混在する細胞を移植した1匹のマウスにおいて腫瘍が形成されない確率（偽陰性率） $x$  は0.83とする。1%の確率で偽陰性の判定してしまうことを許容できるとすると、HeLa細胞相当の造腫瘍性細胞が  $1/10^6$  の割合で混在していないことを示すには、25匹（ $= \log 0.01 / \log 0.83$ ）の動物それぞれに  $1 \times 10^7$  個を移植し、1匹も腫瘍形成がないことが確認できればよい。

## <参考情報 7>混在する形質転換細胞の検出法としてのデジタル軟寒天コロニー形成試験

出典：Kusakawa *et al.* Ultra-sensitive detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products by digital analysis of soft agar colony formation.

*Sci Rep.* 2015;5:17892

### 【方法】

#### 1. 細胞培養及び試薬類

形質転換細胞として HeLa 細胞を、正常細胞としてヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を用いる。通常の HeLa 細胞の維持培養には 10% FBS 含有 MEM 培地を、hMSC の維持培養には Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) 培地を用いる。軟寒天培養用培地として、DMEM 粉末培地 (フェノールレッドフリー) を用いて調製した 10% FBS 含有 1 × DMEM 培地及び 20% FBS 含有 2 × DMEM 培地、低融点アガロース SeaPlaque と滅菌水で調製した 1.2%アガロース溶液を使用する。生細胞染色用蛍光試薬として、MitoTracker Red CMXRos 及び Hoechst 33342 を用いる。96 ウェルプレートは、底面の素材は、プラスチックかつ細胞培養処理がなされていないものが望ましく、さらにウェル側面が黒のものが画像解析に適している。テラサキプレート、0.25%トリプシン-EDTA 溶液、4% PFA 溶液、PBS、Buffer QG (寒天培地溶解用バッファー)、ハイコンテツイメーキングシステムを使用する。

#### 2. 試験方法

##### 2.1 軟寒天コロニー形成試験

下図に示すような培地組成で細胞の 3 次元培養を行う。

培地層 100 $\mu$ L (10% FBS 含有 1 × DMEM 培地)
細胞/軟寒天層 75 $\mu$ L (10% FBS 含有 1 × DMEM 培地、0.4%アガロース 含)
底部寒天培地層 50 $\mu$ L (10% FBS 含有 1 × DMEM 培地、0.6%アガロース 含)

図. 軟寒天培養 (96 ウェルプレート 1 ウェルの断面図)

準備として、10% FBS 含有 1 × DMEM 培地と 20% FBS 含有 2 × DMEM 培地をそれぞれ 37°C に温めておく。1.2%アガロース溶液は電子レンジで溶解し、37°C に保っておく。

底部寒天培地層の調製：20% FBS 含有 2 × DMEM 培地と 1.2%アガロース溶液を 1:1 の割合で混ぜ、96 ウェルプレートの各ウェルに 50  $\mu$ l ずつ分注し、プレートを冷蔵庫 (4 °C) に移して 30 分間固化させる。

細胞/軟寒天層の調製：細胞は、0.25%トリプシン-EDTA 溶液で剥がし、10% FBS 含有 1 × DMEM 培地を用いて様々な濃度に調製しておく（例えば、1 ウェル辺り 1 × 10<sup>4</sup> 個の細胞を播種する場合、4 × 10<sup>5</sup> 個/mL の濃度で懸濁液を調製しておく→1 × 10<sup>4</sup> 個/25 μL）。10% FBS 含有 1 × DMEM 培地で調製した細胞懸濁液、20%FBS 含有 2 × DMEM 培地、1.2%アガロース溶液を 1:1:1 の割合で混ぜ、96 ウェルプレートの固化した底部寒天培地層上に 75 μL ずつ分注し、プレートを冷蔵庫（4℃）に移す（15 分間）。

培地層：10% FBS 含有 1 × DMEM 培地 100 μL を細胞/軟寒天層上に添加する。培地交換は 3~4 日に一度の頻度で行い、37℃、5% CO<sub>2</sub> 濃度環境のインキュベーターで 30 日間培養する。

## 2.2 ハイコンテントイメージングシステムを用いたコロニーの画像解析

染色：30 日間の培養後、各ウェルから培地 100 μL をピペットで取り除き、生細胞染色試薬を含む 10% FBS 含有 1 × DMEM 培地（6 μg/mL Hoechst 33342、150 nM MitoTracker Red CMXRos）を 25 μL ずつ添加し（Hoechst 33342 の最終濃度、1 μg/mL；MitoTracker Red CMXRos の最終濃度、25 nM）、37℃、5% CO<sub>2</sub> 濃度環境のインキュベーターで 1 時間培養する。固定：生細胞染色試薬を含む 10% FBS 含有 1 × DMEM 培地をピペットで取り除き（PBS を 100 μL 添加した後、一緒に取り除く）、4% PFA 溶液を 125 μL 各ウェルに添加し（PFA 最終濃度は 2%）、室温で 30 分間静置する。溶解及び沈降処理：PFA を除き、PBS による洗浄（100 μL 添加、10 分静置、PBS の除去）を 2 回行った後、50 μL の Buffer QG を各ウェルに添加し、37℃で 1 時間培養する。以上の処理によって、形成されたコロニーの核とミトコンドリアがそれぞれ青、赤に染色され、さらにコロニーはウェル底部に沈降する。

画像解析を行うときまで、プレートは遮光し冷蔵庫で保管しておく（培地の蒸発を防ぐため、PBS を各ウェルに添加しておく）。

## 2.3 画像の取得

4 倍の対物レンズを使用し、96 ウェルプレート 1 ウェル辺り、4 視野の画像を各ウェルで取得する。3 つのチャンネル（青、赤、明視野）で、それぞれで取得する。

## 2.4 画像解析

1 ウェル辺り 4 視野の画像のつなぎ合わせ処理を行い、1 ウェル全体の画像を生成しておく。あらかじめ設定した解析スクリプトを用い（評価指標：大きさ、真円度、蛍光強度）、青及び赤のそれぞれの蛍光画像から認識された領域を抽出し、それらが重なり合った場合、コロニー有りと判定する。またデブリ等の非特異的な染色ではないことなどを確認するため、明視野像でコロニーを目視する。

## 2.5 陽性対照細胞における検出感度の確認（ $10^7$ 個のhMSC中に混在する1個のHeLa細胞の検出の場合）

HeLa細胞の調製：HeLa単一細胞は、50~100個/mlのHeLa細胞懸濁液を調製し、10  $\mu$ Lずつテラサキプレートの各ウェルに分注する。顕微鏡下でHeLa細胞単一細胞が存在するウェルを確認しておく。hMSCの調製：hMSC  $10^7$ 個からなる細胞懸濁液を調製し、リザーバー内で1.2%アガロース溶液、20%FBS含有2 $\times$ DMEM培地と混ぜ合わせる（例：2.5  $\times 10^6$ 個/mLのhMSC懸濁液4.4 mL+1.2%アガロース溶液4.4 mL+20% FBS 含有2  $\times$  DMEM培地4.4 mL）。さらに、テラサキプレート上よりピペットで単離したHeLa単一細胞を混入させ、マルチチャンネルピペットを用い、160ウェル（2枚の96ウェルプレートに80ウェルずつ）に分注する。75  $\mu$ Lの細胞/軟寒天層中に62,500個のMSCと0.00625個のHeLa細胞が含まれ、すなわち160ウェル中1ウェルに1個のHeLa細胞が含まれることになる。

前述の方法に沿って、軟寒天培養及び画像解析を行う。また、HeLa細胞が未混入であるhMSCのみでの培養も併せて行うことにより、陰性対照としてコロニーが全く検出されないことを確認する。

## 3. 正常細胞中の悪性形質転換細胞混在の有無の評価

陽性対照細胞の結果に基づいて、陽性対照細胞相当の悪性形質転換細胞の混在の有無の評価を行う。HeLa細胞を陽性対照細胞とする場合、HeLa細胞相当の細胞の混在の有無を判定することになる。陽性対照細胞の結果から、試料を分画した1ウェルにおいてコロニーが未検出となる確率（=コロニーがないウェル数/分画数（コロニーがないウェル数の確率分布））が得られる。1回の試行（複数ウェルへの試料の分画）の全てにおいてコロニーが未検出となる確率  $x$ （=試料を分画した1ウェルにおいてコロニーが未検出となる確率<sup>n</sup>/分画ウェル数）が得られる。n回の試行全てにおいてコロニーが未検出となる確率（偽陰性率） $y$ は、 $y = x^n$ と表され、 $n = \log y / \log x$ という式が導かれる。この式を用いて、許容できる偽陰性率に応じた試行回数を算出することが可能である。すなわち、試験細胞試料における悪性形質転換細胞の混在の否定に必要な試行回数を陽性対照細胞の結果から見積もることが可能となる。以下に例を示す。

$10^7$ 個のhMSCに1個のHeLa細胞を混入させた細胞試料を陽性対照とし、以下の表に示すような結果が得られているとする。

1ウェル内のコロニー数	10 <sup>7</sup> 個のhMSCに1個のHeLa細胞を混入させた細胞試料を160ウェルに分画し、軟寒天コロニー形成試験を行った（試行回数6回）							ウェル数の確率分布
	試行1	試行2	試行3	試行4	試行5	試行6	平均	
0	159	160	159	159	160	159	159.3	0.9956
1	1	0	1	1	0	1	0.7	0.0044

1 ウェルにおいてコロニーが未検出となる確率、すなわちコロニーがないウェル数の確率分布（コロニーがないウェル数/分画数=159.3/160）は、0.9956 である。1 回の試行（複数ウェルへの試料の分画=160）の全てにおいてコロニーが未検出となる確率  $x$ 、すなわち試料を分画した 1 ウェルにおいてコロニーが未検出となる確率分画ウェル数は、 $0.9956^{160} = 0.4938$  となる。例えば、1%の確率で偽陰性があることを許容する場合、 $n = \log(0.01)/\log(0.4938) = 6.526$  という値が得られる。すなわち、ある細胞試料中に HeLa 細胞相当の悪性形質転換細胞が  $1/10^7$  の割合で混在していないことを示すには、陽性対照細胞と同様の操作を 7 回試行し、コロニーが未検出であることが確認できればよいと考えられる。

## <参考情報 8> 混在する形質転換細胞の検出法としての細胞増殖特性解析

出典1 : Kono K, Takada N *et al.* Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. *Biologicals*. 2015;43:146-9. (See also: Kono K, Takada N *et al.* Corrigendum to "Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells" [*Biologicals* 43 (2) (March 2015) 146-149]. *Biologicals*. 2017;45:106.)

出典2 : Hasebe-Takada N, Kono K *et al.* Application of cell growth analysis to the quality assessment of human cell-processed therapeutic products as a testing method for immortalized cellular impurities. *Regen Ther*. 2016;5:49-54. (A corrigendum is in press.)

### 【方法】

#### 1. 細胞

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) は、5 継代目までは Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) で培養する。ヒト脂肪由来幹細胞 (ADSC) は、5 継代目までは ADSC-BulletKit で培養する。HeLa 細胞は、Eagle's minimum essential medium に 10% ウシ胎児血清 (FBS)、0.1 mM 非必須アミノ酸溶液、50 U/mL ペニシリン、50 mg/mL ストレプトマイシンを加えた培地で培養する。hTERT で不死化した脂肪由来間葉系幹細胞 (ASC52telo) は、ADSC-BulletKit で培養する。

#### 2. 細胞増殖特性解析

5 継代目の  $1 \times 10^6$  個の hMSC に、それぞれ  $1 \times 10^3$  個 (0.1%)、 $1 \times 10^2$  個 (0.01%)、10 個 (0.001%)、1 個 (0.0001%) の HeLa 細胞を混入させ、T175 フラスコに播種する、又は、5 継代目の  $1 \times 10^6$  個の ADSC に、それぞれ  $1 \times 10^3$  個 (0.1%)、 $1 \times 10^2$  個 (0.01%)、10 個 (0.001%) の HeLa 細胞を混入させ、T175 フラスコに播種する。細胞は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) に 10% FBS、50 U/mL ペニシリン、50 mg/mL ストレプトマイシンを加えた培地 40 mL で培養し、2~3 日毎に培地交換する。およそ 90%コンフルエントに達した細胞は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗い、0.05% トリプシン-EDTA 溶液でフラスコから剥離する。剥離した細胞は、 $450 \times g$ 、5 分間遠心分離し、培地上清を除いた後、新鮮培地で細胞を懸濁する。懸濁した細胞の一部を、トリパンブルー溶液で染色し、自動セルカウンターで細胞数を計測する。 $1 \times 10^6$  個の細胞を T175 フラスコに播種し、次の継代まで培養する。この一連の操作を 10 継代目 (HeLa 細胞をスパイクした hMSC) 又は 20 継代目 (ASC52telo 細胞をスパイクした ADSC) まで繰り返す。細胞増殖速度は下記の式を用いて算出する。

$$R_n = [\log_2(N_{n+1} / N_n)] / (D_{n+1} - D_n)$$

$N_k$  ; k 継代時の細胞数、  $D_k$  ; k 継代時の日数

不死化細胞混在の判定は、細胞増殖速度を5継代目と比較し、有意な差の有無で判断する、又は、陰性対照の経時的な細胞増殖速度と比較して判断する。



# ヒト（同種）iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた虚血性心筋症の治療 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）のうち、同種由来 iPS 細胞を加工した製品（以下「ヒト（同種）iPS 細胞加工製品」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、「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」（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）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 細胞加工製品のうち特に虚血性心筋症の治療を目的として適用される再生医療等製品（医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和 35 年法律第 145 号）第 2 条第 9 項に規定する「再生医療等製品」をいう。以下同じ。）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 細胞加工製品のうち特に虚血性心筋症の治療を目的として心臓へ移植される再生医療等製品について、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。

## 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 細胞加工製品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。

製品の評価に当たっては、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。

また、個別の製品において必要となる評価については、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強く勧められる。

## 4. 用語の定義

- (1) 細胞シート：細胞同士が直接、あるいは間接的に結合してシート状の形態を呈しているものをいう。
- (2) 虚血性心筋症：高度の左室駆出率の低下と冠動脈造影による冠動脈狭窄病変を認め、心機能低下を引き起こした病態。
- (3) 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。（ICH Q5D「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」（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）の定義と同じ）
- (4) 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。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等が挙げられる。
- (5) 代替指標：目的とする対象指標が測定困難な場合に、事前に相関づけられた代替可能な指標。
- (6) 構造体：細胞を含みシート状や球状など立体的構造を有する移植体。
- (7) 心筋系細胞：心筋分化の際に発生する細胞。（心筋細胞，線維芽細胞，平滑筋細胞，内皮細胞など）

## 5. 評価に当たって留意すべき事項

本評価指標は、当面、既に再生医療等製品の原材料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製造所に受け入れ、製造所においてセル・バンク・システムを構築し加工して製造された、ヒト(同種)iPS細胞加工製品としての心筋細胞を含むシート(以下、心筋細胞シート)の評価に適用することを想定している。再生医療等製品の製造所内でヒト(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再生医療等製品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、「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」(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)等を参考とすること。

### (1) 原料等

原料等となるiPS細胞は、再生医療等製品の原材料として株化され、セル・バンク・システムを構築したヒト(同種)iPS細胞であって、一定の製造工程を経ることにより心筋系細胞へ分化することが確認されている、又は合理的に予測されるものである必要がある。

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 細胞が樹立されている場合は、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心筋細胞シートの品質及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。

## (2) 製造工程において特に注意が必要な事項

心筋細胞シート(最終製品)の製造にあたっては、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、一定の品質を保持すること。

### 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 iPS 細胞株の製造所への受入れから出発原料となるヒト iPS 細胞のセル・バンク・システム構築までの履歴、及び出発原料から分化段階の進んだ細胞を経て最終製品に至る製造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。

#### a) 受入検査

原材料となる iPS 細胞株について、製造所への受入れのための試験(検査)項目(例えば、目視検査、顕微鏡検査、生存率、細胞の特性解析、細菌、真菌、ウイルス等の混入の否定等)と各項目の判定基準を設定すること。表現型、遺伝形質、特有の機能等の特性、細胞生存率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、ウイルス等の検査を行うこと。結果が陽性の場合には、iPS 細胞株のストック及びその輸送における汚染の有無を確認した上で、改めて iPS 細胞株を入手する。

なお、技術的な理由により、工程を一部進めた上で検査を行うことが適切な場合にあつては、受入れ後の適切な時点で検査を実施すること。例えば、凍結ヒト(同種)iPS 細胞株を原材料製造時の試験(検査)結果(Certificate of Analysis)を基に受入れた後、解凍して拡大培養を実施する際に追加の検査を行うことが挙げられる。治験を開始する前段階の場合は、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。

#### b) 細胞のバンク化

製造所に受入れた iPS 細胞株からのセル・バンクを作製する方法及びセル・バンクの特性解析、保存・維持・管理・更新方法、その他の各作業工程及び試験に関する手順等について詳細を明らかにし、その妥当性を示すこと。ICH Q5D 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。

c) 最終製品の構成要素となる細胞の作製

原料等となる製造所に受入れた iPS 細胞株及びそのセル・バンクから最終製品の構成要素となる細胞を作製する方法(例えば、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、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。また、最終製品が凍結製品である場合、細胞凍結方法とその凍結細胞から移植用細胞シートを作製する方法(細胞解凍法、細胞シートの製造法等)を明らかにし、同様に可能な範囲でその妥当性を明らかにすること。

d) 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

心筋細胞シート(最終製品)の製造にあたっては、製造工程中の取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。

e) 細胞培養工程の設定

心筋分化誘導を伴う培養工程では、細胞の状態や培養に関わる多くのパラメータの影響を受け、最終製品の心筋細胞の比率が変動しやすいことが示唆されている。さらに、シート形成を行う培養(シート形成培養)においても、シート内に含まれる細胞の比率等を変化させる可能性がある。よって最終製品に至るまでの製造工程においては、細胞品質に影響を及ぼさない適切な範囲内で細胞増殖や分化細胞比率を管理することが望まれ、そのための対策を明らかにすること。

f) 複数の細胞培養加工施設での製造及び病院内での細胞加工を行う際の工程の条件の設定

複数の細胞培養加工施設で製造を完結する場合は、施設間での中間製品の輸送に関する条件をあらかじめ確定し、中間製品の出荷及び受入れ、輸送などの条件が満たされているかのモニタリングを行うこと。また、最終製品を出荷後、病院等で受入れ院内での細胞加工を行う際も、あらかじめ加工条件を確定し、実施における妥当性を示すこと。

(3) 製品の品質管理

心筋細胞シート(最終製品)の移植方法を明らかにすること。移植方法には、例えば iPS 細胞から製造される心筋細胞シート(最終製品)の状態、必要数だけ、適切な適用部位に移植することが考えられる。

心筋細胞シートの品質管理における留意点として、例えば以下に挙げた事項が考えられるが、必要かつ適切であれば別の試験項目の採用又は追加を検討すること。なお、各試験項目の設定根拠及び試験方法の妥当性について説明する必要がある。工程内管理の管理値及び品質規格の規格値の設定について、治験を開始する前段階の場合にあっては、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。

なお、出荷製品そのもの又はその一部に対して規格試験の実施が技術的に困難である場合にあっては、妥当性を示した上で、並行して製造した製品等、代替とする検体を用いて規格試験を実施すること。

a) 性状の確認

最終製品の性状に関して、目的とする性状を有することを目視確認し、その形状を記録することが望ましい。なお、最終製品が細胞シートの場合、構造体(例えば、膜状であること)や、色味(例えば、白色であること)を目視で確認することを基準として設定することが考えられる。

b) 細胞数及び生存率、細胞形態

最終製品における細胞の数及び生存率についても基準を設定する必要がある。細胞数を測定する方法としては、最終製品や中間製品の一部を抜き出し、細胞懸濁液とし、バリデーション可能な測定方法(血球計算盤計やセルカウンターで測定する方法など)にて測定する。細胞生存率を測定する方法として、バリデーション可能な方法(トリパンブルーを用いた色素排除法や蛍光色素を用いた方法など)にて、生細胞及び死細胞を計数する。その際、懸濁中の細胞形態について確認すること。なお、最終製品が心筋細胞シートである場合、そのシートに含まれる細胞数及び生存率を測定することが技術的に困難である。この場合にあっては、その構造に含まれる細胞数及び生存率を裏付ける代替指標を用いてよい。ただし、その指標の妥当性について明らかにすること。例えば、あらかじめ、心筋細胞シート形成前後の相関を得たうえ、心筋細胞シート形成前の細胞数及び生存細胞率を代替指標とすることもよい。

c) 細胞特異性の確認

最終製品を構成する心筋細胞をフローサイトメトリー等を用いて心筋トロポニン T 等の発現量を明らかにすること。

最終製品の主構成細胞がその他の心筋系細胞を含む場合は、その特異性を代表するマーカー分子に関して、mRNA 発現解析、免疫細胞染色法、フローサイトメトリー等を用いて発現量を評価することが考えられる。また、これら解析に加え、複数の異なる手法を用いて心筋細胞等としての特異性とその特異性を有する細胞の割合を評価することが望ましい。

なお、最終製品が心筋細胞シートである場合、そのシートに含まれる細胞特異性を測定することが技術的に困難である。この場合にあっては、その構造に含まれる指標を裏付ける代替指標を用いてよい。ただし、その指標の妥当性について明らかにすること。例えば、あらかじめ、心筋細胞シート形成前後の相関を得たうえ、心筋細胞シート形成前の細胞特異性(例えば心筋トロポニン T 発現など)を代替指標とすることもよい。

d) 機能評価

治療用途に整合性のある細胞としての機能特性を有することを製造工程中又は最終製品で確認する。例えば、最終製品が心筋細胞の場合は、細胞内カルシウム活性、拍動の観察等で評価することが考えられる。

細胞に由来する液性因子等が最終製品の効能効果と関連すると推定される場合は、その評価の実施可能性を検討する。

なお、最終製品が心筋細胞シートである場合、そのシートの機能評価を測定することが技術的に困難である。この場合にあっては、その構造に含まれる指標を機能評価の代替指標としてもよい。ただし、その指標の妥当性について明らかにすること。例えば、あらかじめ、心筋細胞シート形成前後の相関を得たうえ、心筋細胞シート形成前の細胞特異性(例えば、心筋トロポニン T 発現)を代替指標とすることもよい。

#### e) 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、定量 PCR によるマーカー遺伝子の定量(*LIN28A*等の遺伝子発現量の評価)、免疫細胞染色、フローサイトメトリー等を用いた未分化細胞マーカー抗原(POU5F1[OCT3/4]、TRA1-60 抗体認識抗原、SSEA-3 抗体認識抗原等)の発現定量等による評価などが考えられる。また、最終製品を原料等の iPS 細胞の培養条件で一定期間培養する戻す培養法等も挙げられる。これら解析の中から、移植細胞数を考慮し、評価に必要な検出力を備えている試験方法を選択すべきであり、可能であれば、複数の異なる手法を用いて未分化細胞の混在を評価することが望ましい。

なお、未分化の iPS 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であり、造腫瘍性試験に関しては非臨床試験の項目を参照すること。

#### f) 染色体及びゲノム構造評価

最終製品での評価が可能な場合は、最終製品の染色体及びゲノム構造を評価することが求められる。最終製品での評価が困難な場合は、例えば、あらかじめ、心筋細胞シート形成前後の相関を得たうえ、心筋細胞シート形成前の細胞の染色体及びゲノム構造を代替指標とすることもよい。染色体構造は、ギムザ染色法及び G バンド分染法等を用いて、染色体核型構造の評価を行うことが望ましい。また、マイクロアレイ法等を用いて、全ゲノムレベルでのゲノム構造の評価を行う手法も使用することもできる。遺伝的安定性評価については、「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関するガイドラインについて」(令和元年 6 月 27 日付け薬生機審発 0627 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知)等も参考にすること。

#### (4) 製品の安定性試験

最終製品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、細胞の生存率及び効能を裏付ける代替指標等を指標に実保存条件での安定

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、凍結及び解凍操作が製品の解凍後の培養可能期間や品質へ与える影響を確認すること。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、製造終了後直ちに使用するような場合はこの限りではない。

また、出発原料、中間製品及び最終製品を運搬する場合には、それぞれの条件と手順（容器、輸送液、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。細胞を凍結状態で輸送する場合には、凍結時に使用する培地又は凍結保存液、凍結保護剤等について、製造工程で使用する材料と同様に適切に選択すること。また、非凍結状態で輸送する場合の輸送液等も同様である。

なお、最終製品を細胞シートとし、細胞シートの状態で輸送する場合には、保存安定性に加え、輸送安定性（温度、振動、気圧変化等の影響）を評価した上で保存条件及び使用期限を設定し、適切な容器、保存液及び運搬形態を選択すること。製品形態又は細胞種によって、製品安定性を保つための適切な保存形態、温度条件、輸送液等が異なる可能性があるため、製品毎に適切な組み合わせを検討し、安定性を担保する必要がある。

#### (5) 非細胞材料及び最終製品の生体適合性

製品に関係する非細胞材料については、製造工程中で細胞と接触する材料だけでなく、細胞とともに最終製品の一部を構成する副成分となるものや、副構成体等として適用時に併用されるもの（局所封入用の膜、フィブリン糊等）に関しても、材料自体の品質・安全性に関する知見について明らかにするとともに、生体適合性等、患者及び製品中の細胞との相互作用に関する知見について明らかにすること。また、最終製品総体についても患者の細胞組織、特に適用部位周辺組織との相互作用について考慮すること。また、最終製品の副成分となる非細胞材料の、製造工程中（培地中）及び体内での分解特性、体内での再吸収特性、分解物の安全性に関して適切な情報を収集すること。特に、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。非細胞材料の生体適合性については、ISO10993-1、JIS T 0993-1 又は ASTM F748-04、「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」の改正について（令和2年1月6日薬生機審発0106第1号）等を参考にすること。

#### (6) 非臨床試験

動物に心筋細胞シートを適用して有効性及び安全性を評価する際には、必要に応じて対象疾患を考慮して疾患モデル動物を作成すること。虚血性心筋症モデル動物作成方法の例として、冠動脈結紮による心筋梗塞モデル等が挙げられるが、用いた動物モデルにつ

いては、その選択の根拠、試験系の妥当性及び得られた結果のヒトへの外挿性について説明する必要がある。有効性及び安全性の評価のために、心筋細胞シートを適用した群及び対照群(無処置群又は sham オペ群)を用いた比較試験の実施も考慮すること。評価期間についても、その設定根拠について説明すること。移植した心筋細胞シートとそれによってもたらされる効能について、心筋細胞シートに含まれる細胞の移植部位における局在性を確認するなど経時的に評価し、その関連性について考察すること。また、動物試験は、使用方法に関する試験の意味合いも含んでいることから、動物への適用方法は、可能な限り臨床での使用法(例えば、開胸手術、内視鏡的手術など)を反映することが望ましい。安全性評価と有効性評価については、それぞれの手法において区別して評価する必要があるが、評価項目としては、例えば安全性については主に以下の①～④を、有効性については⑤、⑥の項目を踏まえて総合的に検討することが考えられる。また、必要かつ適切であれば別の試験項目の採用又は追加も検討すること。なお、HLA タイピング等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 細胞のセル・バンクから同等の品質特性を持つ心筋系細胞(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。

#### ①形態学的評価

心筋細胞シートを適用した部位の組織学的検討を行い、適用部位及び周辺組織の状態を評価すること。例えば、適用部位におけるシート細胞の生着(生存数などを含む)、適用周辺部位の線維変性及び炎症細胞の浸潤の有無、適用部位及び周辺組織の変化(形状、厚み、細胞数、分化状態など)の検討を行うことが考えられる。また、移植された心筋細胞シートの形状、性質及び機能を維持するために必要な構造的な要素(例えば血管網など)がある場合には、免疫組織化学的検討等の手法により確認すること。

#### ②催不整脈性の評価

催不整脈性に関しては、普遍的に受容されたモデル動物は確立されていないため、評価に適切と考えられる動物(イヌまたはブタなど)を用いて評価すること。例えば、心筋細胞シートの適用前後における、各群の長時間の心電図記録を、ホルター心電図等を用いて比較し、不整脈の有無と重症度について検討すること等が考えられる。

#### ③血清学的評価

一般的に利用されているマーカー因子を用いて、腎機能、肝機能、心筋障害等について評価すること。

#### ④造腫瘍性に関する評価

iPS 細胞を加工して製造される再生医療等製品の造腫瘍性を評価する上では、「原料等となる 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。すなわち、臨床適用に際しては、原料等となる iPS 細胞ではな



くあくまで最終製品としての iPS 細胞加工製品の造腫瘍性評価が最も重要であることを常に留意しなければならない。したがって、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腫瘍発生の検出限界が既知の試験系を用いて評価を行うことが有用である。尚、造腫瘍性試験を実施するにあたっては、「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関するガイドラインについて」(令和元年6月27日付け薬生機審発0627第1号厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知)等も参考にすること。

非臨床安全性評価のための造腫瘍性試験に使用する動物種としては、高感度な特性から、免疫不全動物(NOG マウス、NSG マウス等)移植にて評価することが望ましい。

なお、移植細胞数としては、想定される臨床使用量に種差と個体差の安全係数を掛けた量であることが望ましいが、動物に移植した際に、移植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、心臓表面への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移植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。

#### ⑤心筋細胞シートの使用法、使用量等に関する評価

梗塞・拡張等の部位・面積等に対し、適切な細胞シート移植量(例えば 移植シートの面積、細胞数、層数など)及び移植方法を検討すること。また、移植時の手技的な安全性の確認、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等、臨床応用において必要かつ科学的に妥当と考えられる項目については、目的に応じて例えば中型又は大型動物を利用することにより確認を行うことが望ましい。

#### ⑥心機能、血流評価

心機能に関しては、心臓超音波検査や造影 MRI 等によって収縮能・拡張能を評価する必要がある。その他要すれば左室内腔短縮率、左室壁運動等の評価を検討すること。必要に応じて、細胞シート製品適用後における血流を評価すること。評価法としては、例えば FDG-PET による検討、あるいは心臓超音波検査等が考えられる。また、当該有効性が持続する期間についても検討すること。

### (7)臨床試験(治験)

#### ①対象集団

臨床試験においては、有効性及び安全性評価に適した集団を選択するために、普及した診断基準、重症度分類等を用いて、当該治療法に期待される臨床上の位置付け等を明確にした上で、選択・除外基準や評価基準を設定する必要がある。虚血性心筋症に伴う心不全症状については、重症度により、既存治療法の選択肢もあり、有効性評価に適した集

団を絞り込むための選択・除外基準の設定に際し、既存治療法の有無や、その有効性、安全性についても考慮して、対象とする症例の重症度を設定する必要がある場合も考えられる。ただし、試験で除外された重症度の症例に対して使用した際の有効性及び安全性について、臨床試験で得られた成績の外挿の可能性の検討や、追加の臨床試験等による情報収集を検討する必要があることも考慮しておくこと。

a) 組入れにおける選択基準

虚血性心筋症に伴う心不全に対する臨床試験の場合には、治療介入を開始するのに適切な時期、重症度を、その診断方法及び妥当性や、製剤の特性を踏まえて検討する必要がある。急性期にはまず既存治療法が第一選択となることが多く、細胞培養等、評価となる製剤の特性を踏まえると、慢性期が対象となることが想定される。また、軽症例では、当該製剤でなくても既存治療にて十分にコントロールが可能となる場合が考えられる一方、最重症例では、心移植以外に適切な選択肢がない場合や、侵襲的治療そのものが困難な場合も想定される。評価の対象となる製剤の特性に応じて、心不全治療の介入時期・治療期間や、NYHA 分類、LVEF 値等を基にした重症度を適切に設定する必要があることを念頭に置くべきと考えられる。

b) 組入れにおける除外基準

除外基準の設定の際には、評価の対象となる製剤を用いる際のリスクについて、考慮することが重要である。同種細胞を用いることから、HLA 型の適合の有無を考慮に入れても、心臓においては一定の免疫拒絶反応が起きることが予測され、免疫抑制剤の使用は不可避となることも予測される。ヒト(同種)製剤に対する免疫拒絶反応を抑制する目的で免疫抑制剤の使用が必要となるが、自己免疫疾患を基礎疾患として有する場合には、すでに免疫抑制剤やステロイド等が使用されているため、免疫のコントロールが困難となり、安全性上の懸念が生じることに加え、製剤そのものの評価も困難となることから、臨床試験においては対象としづらいことも想定される。また、免疫抑制剤使用に関して、アレルギー、過敏症を有する場合も対象とすることは適切ではないと考えられる。また、免疫抑制剤を用いることや、腫瘍化等のリスクを含む製剤の特性を鑑みると、基礎疾患に悪性腫瘍を有する場合にも、その安全性の評価が困難となることが予測されるため、除外基準に組み入れることを考慮するべきと考えられる。その他、活動性を伴う感染症を有する場合、妊婦、小児であること等、製剤の臨床評価の上で対象とする疾患以外のリスクを伴い、一般的に臨床試験に組み入れることが適切でない群についても配慮が必要である。

c) 高齢者・若年者について

虚血性心筋症は、高齢者(65 歳以上)に多く認められるため、「「高齢者に使用される医薬品の臨床評価法に関するガイドライン」について」(平成 5 年 12 月 2 日付け薬新薬第 104 号厚生省薬務局新医薬品課長通知)及び「「高齢者に使用される医薬品の臨床評価

法に関するガイドライン」に関する質疑応答集(Q&A)について」(平成22年9月17日付け厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡)を踏まえた有効性及び安全性の検討が必要となる。ただし、虚血性心筋症による心不全症状の重症度は、必ずしも年齢には依存しないため、高齢・非高齢を割付因子にする必要性については、既存疾患の有無なども含めて考慮するべきと考えられる。また、若年者(20歳未満)に関しては、成人の虚血性疾患とは病態が異なることから、組み入れや、評価基準を分けることや、他試験として実施することも検討するべきである。

## ② 症例数、対照群の設定

被験者数は、科学的合理性に基づき、試験目的、検証すべき仮説、試験の達成基準及び試験デザインに応じて設定する。対照群としては、ヒト(同種) iPS細胞由来心筋細胞シートに限らず当該疾患分野における再生医療等製品全般の話として以下に述べる。

原則として、様々な要因を除き、適切にその安全性、有効性を評価するためには、虚血性心筋症に対する保存療法群などを対照群として設定することが妥当である。一方、対象とする集団の重症度を鑑みると、適切な対照群の設定が困難であることも想定される。そのため、評価において同様な重症度の心不全患者の外部対照やレジストリデータを用いることが許容される場合も考えられる。「承認申請等におけるレジストリの活用に関する基本的考え方」(令和3年3月23日薬生薬審発0323第1号、薬生機審発0323第1号厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長、厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長連名通知)を参考にした上で、最低限、使用される情報は前向きに収集されるものであること、臨床試験の組入れ対象の患者集団とレジストリで使用される患者集団は、その評価において傾向スコアを用いたマッチングや重み付け推定法により少なくとも既知の交絡因子の影響は排除できるように十分な患者背景情報を有するものであること、そして収集されたデータの倫理性や信頼性は十分に確保されたものである必要がある。なお、臨床試験で集積されるデータの各症例の評価に対しては、施術者と評価者を分けることや、第三者委員会を設置するなど、客観的に比較できるよう工夫することも必要である。

## ③ 有効性評価

一般的に主要な有効性評価は、信頼性及び妥当性が検討され国際的に普及した評価項目を用いることが必要であり、評価時における評価項目のベースラインからの変化や改善症例の割合等を評価に用いる。副次的な有効性評価は、主要評価項目で得られた結果の妥当性を検討するだけでなく、得られた結果の臨床的意義を幅広く検討するために有用である。主観が影響する検査項目や、測定機器の使用方法によってバラツキが想定される検査項目では、評価者間で統一した評価を行い、評価者間のばらつきを最小限とすることができるよう、評価者に対する教育訓練等の方策を十分に検討する必要がある。特に、国際共同試験においては実施地域により評価方法が異なることがないよう配慮する必要がある。

る。また臨床試験開始前には評価者の適格性についても評価することが必要である。

なお、「抗心不全薬の臨床評価方法に関するガイドライン」の改訂について(平成 23 年 3 月 29 日付け薬食審査発 0329 第 18 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知)の記載も参考とすることが望ましい。

#### a) 主要評価項目

虚血性心筋症治療における真のエンドポイントは、死亡、入院といった心イベント、MACE 等の複数の心イベントの回避や、Activity of Daily Living (ADL) 等を含む QOL 等の臨床状態の改善にある。しかし、QOL の改善は多角的な要素を含み、本製品の特性を踏まえた有効性とは必ずしも相関しない可能性があり、また主観によるバイアスの要素が強く影響されるため、主要評価項目として設定することは、評価を困難とすることが想定される。現時点では、客観的に数値化することが可能であり、短期的に虚血性変化や心機能改善を直接的に評価することができる項目を、サロゲートエンドポイントとして用いることも一案と考えられる。その他、「抗心不全薬の臨床評価方法に関するガイドライン」の改訂について(平成 23 年 3 月 29 日付け薬食審査発 0329 第 18 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知)で示される心機能評価の項目も、本製品の評価項目として検討するべきと考えられる。加えて、長期的な真のエンドポイントについての評価は当然必須であり、その評価ができるように長期的なデータを追跡して収集できるような追跡試験をデザインすると共に、外部対照やレジストリデータとの比較により有効性の考察または検証が行えるように事前に計画しておかなくてはならない。

#### b) 副次評価項目

副次評価項目としては、主要評価項目を補足するための有効性に関する評価項目を設定する。「抗心不全薬の臨床評価方法に関するガイドライン」の改訂について(平成 23 年 3 月 29 日付け薬食審査発 0329 第 18 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知)で例示される項目を踏まえ、例えば、NYHA 心機能分類、心エコー図、心臓 MRI による駆出率や虚血性変化の評価、LVESVI 評価、血行動態評価、NT-proBNP ((BNp) のようなバイオマーカーを用いた評価など、心機能に関与する評価項目を、主要評価項目を補足する形で設定しておくべきと考えられる。また、ADL、QOL の改善評価のために、6MWD・SAS 等の身体活動評価、運動耐容能評価、各種の包括的 QOL 評価(例えば Euro-QoL 5-dimension (EQ5D) や MOS 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36) など)の設定も検討するべきと考えられる。上記以外にも、心機能臨床イベント発生率など安全性にも関わる評価を設定することで、虚血性心疾患に伴う心不全の改善を多角的、総合的に評価し、有効性、安全性を支持するメカニズムについて明らかにしていくことが重要と考えられる。

#### ④ 安全性評価

有害事象とは、医薬品等(再生医療等製品を含む。以下この項において同じ。)を投与さ

れた患者又は被験者に生じたあらゆる好ましくない医療上のできごとであり、当該製品の投与との因果関係の有無は問わない。つまり、医薬品等が投与された際に起こる、あらゆる好ましくない、又は意図しない徴候（臨床検査値の異常を含む）、症状又は病気のことである。有害事象が認められた場合は、症例報告書に事象名、重症度、転帰、発現及び転帰が確認された時期、治験薬等（治験製品を含む、以下この項において同じ。）の服薬状況並びに処置の有無及びその内容等を記録するとともに、重篤な有害事象か否か、及び治験薬等との因果関係を判定する。

臨床試験では、以下のような細胞移植に特徴的な有害事象・虚血性心疾患の病態に関連する有害事象についてとくに注目して収集すべきである。なお、同種細胞の移植に伴い使用する免疫抑制剤の投与による有害事象にも注目が必要であり、特に腎機能障害が重要な有害事象と考えられる。

#### 重要な有害事象

- i 腫瘍化
- ii 感染
- iii 拒絶反応
- iv 移植手技に伴う有害事象（出血、致死性不整脈の発生等）
- v 不整脈
- vi 肺炎
- vii 呼吸不全
- viii 深部静脈血栓症／肺梗塞
- ix 薬剤性過敏症症候群
- x 心不全の増悪

#### ⑤ 併用薬並びにリハビリテーションの扱いについて

##### a) 併用薬

有効性、安全性評価に影響を与える可能性のある薬剤については、評価を困難とすることから、できる限り避けることが望ましい。しかし、対象とする疾患の重症度を鑑みると、直近の関連学会ガイドラインを参照の上、標準的治療、すなわちジギタリスや利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬、ベータ遮断薬、アルドステロン拮抗薬、アンジオテンシン受容体ネプリライシン阻害薬（ARNI）、ナトリウム・グルコース共輸送体 2（SGLT2）阻害薬などは、試験期間中、周術期管理等で状態が安定しない期間を除き、用法・用量を不変とすることで用いることが可能と考えられる。この際、試験期間中の標準治療の内容については、試験実施前に明確な規定を設けておく必要がある。また、有効性評価に影響を与える可能性のある薬剤を、やむを得ず、追加、変更、用法・用量

(頓用の場合は使用頻度)を変更する場合は、その理由と記録を残すように規定する必要がある。

b) リハビリテーションの扱いについて

リハビリテーションは虚血性心筋症後の機能回復に影響を与える要因であり、臨床試験においては症例ごとのリハビリテーション実施の差異が有効性評価に与える影響を考慮すべきである。治療介入後のリハビリテーションについては、心機能の客観的評価に基づき、比較対照群間で差異が発生しないように留意した、適切なリハビリテーション計画の設定がなされていることが妥当と考えられる。