

令和元年度

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

浜松医科大学 整形外科学講座

松山 幸弘

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 令和元年度委員名簿	1
II.	令和元年度会議議事概要	3
III.	ヒト（同種）iPS（様）細胞加工製品を用いた亜急性期脊髄損傷（外傷性）の治療に 関する評価指標（案）	11
IV.	調査事項	
1.	総括	松山 幸弘 29
2.	亜急性期脊髄損傷・再生治療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞	金村 米博 31
3.	用語の定義（詳細）	國府田正雄 緒方徹 波呂浩孝 渡辺雅彦 33
V.	参考資料	
1.	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」	37
2.	令和元年 5 月 8 日付薬生薬審発 0508 第 1 号薬生機審発 0508 第 1 号厚生労働省医薬・ 生活衛生局医薬品審査管理課長通知 「急性期脊髄損傷の治療を目的とした医薬品等の臨床評価に関するガイドライン」	59
3.	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 「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」	76

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 令和元年度委員名簿

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令和元年度委員名簿

座長

松山幸弘 浜松医科大学 整形外科学教室 教授

委員（五十音順）

安達伸生 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 整形外科学 教授

今釜史郎 名古屋大学大学院医学系研究科 整形外科学 准教授

梅澤明弘 国立成育医療研究センター 研究所 副所長

緒方 徹 国立障害者リハビリテーションセンター病院

障害者健康増進・運動医科学支援センター センター長

金村米博 国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター先進医療研究開発部 部長

國府田正雄 筑波大学医学医療系 整形外科 准教授

佐藤正人 東海大学医学部 外科学系整形外科学 教授

中畑龍俊 京都大学iPS細胞研究所(CiRA) 顧問

波呂浩孝 山梨大学医学部 整形外科 教授

渡辺雅彦 東海大学医学部 外科学系整形外科学 主任教授

厚生労働省

鉄橋正士 厚生労働省 医薬・生活衛生局医療機器審査管理課／再生医療等製品審査管理室 課長補佐

江田美沙子 厚生労働省 医薬・生活衛生局医療機器審査管理課／再生医療等製品審査管理室 課長補佐

福澤 学 厚生労働省 医薬・生活衛生局医療機器審査管理課／再生医療等製品審査管理室 主査

独立行政法人医薬品医療機器総合機構

河西正樹 医薬品医療機器総合機構 再生医療製品等審査部 主任専門員

國枝章義 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

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

水上良明 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

遠藤 健 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 主任専門員

オブザーバー

伊藤弓弦 産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 幹細胞工学研究グループ 研究グループ長

廣瀬志弘 産業技術総合研究所 健康工学研究部門 生体材料研究グループ 上級主任研究員

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 第二室 室長

河野 健 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第四室 室長

II. 令和元年度 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 令和元年度第一回会議議事録（概要）

1. 開催日時：2019年9月30日（月）18時00分～20時00分

2. 開催場所：オフィス東京 L4 会議室

3. 出席者（敬称略）

委員：松山幸弘（浜松医科大学）、梅澤明弘（国立成育医療研究センター研究所）、
緒方徹（国立障害者リハビリテーションセンター病院）、金村米博（大阪医療
センター）、國府田正雄（筑波大学）、中畑龍俊（京都大学）、波呂浩孝（山梨
大学）

厚生労働省：福澤学

医薬品医療機器総合機構：河西正樹、國枝章義、遠藤健

産業技術総合研究所：伊藤弓弦、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、河野健

4. 配布資料

1. 令和元年度第一回委員会議事次第
2. 令和元年度委員名簿
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 平成 30 年度報告とこれまでの評価指標の内容について
5. 金村先生プレゼン資料
6. 評価指標（案）作成にあたって：昨年度からの全体的な流れと今後の検討事項の確認
7. 評価指標（案）1.～3.
8. 急性期脊髄損傷の治療を目的とした医薬品等の臨床評価に関するガイドライン
9. 厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知：平成 28 年 6 月 30 日付
薬生機審発 0630 第1号「次世代医療機器・再生医療等製品評価指標の公表につい
て」別紙 2「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工製品を用いた関節軟骨再生に関する評価指
標」
10. ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針

平成 30 年度次世代医療機器評価指標作成事業 再生医療審査 WG 報告書

5. 議事内容

- ①次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業について厚生労働省 福澤主査より説明があった。
- ②平成30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。
- ③令和元年度の座長及び委員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

松山幸弘 浜松医科大学 整形外科学教室 教授

委員（五十音順）

安達伸生 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 整形外科学 教授

今釜史郎 名古屋大学大学院医学系研究科 整形外科学 講師

梅澤明弘 国立成育医療研究センター 研究所 副所長

緒方 徹 国立障害者リハビリテーションセンター病院

障害者健康増進・運動医科学支援センター センター長

金村米博 国立病院機構大阪医療センター

臨床研究センター先進医療研究開発部 部長

國府田正雄 筑波大学医学医療系 整形外科 准教授

佐藤正人 東海大学医学部 外科学系整形外科学 教授

中畑龍俊 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) 顧問

波呂浩孝 山梨大学医学部 整形外科 教授

渡辺雅彦 東海大学医学部 外科学系整形外科学 主任教授

- ④金村委員より「亜急性期脊髄損傷・再生治療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞【製造・品質管理法】」について講演頂いた。質疑応答では、造腫瘍性試験や作用機序、品質管理の規格値等に関する質問があった。
- ⑤令和元年度の活動方針について討議した。

- ・今年度は脊髄損傷の亜急性期の治療を目的としたヒト同種 iPS 細胞由来神経前駆細胞を使用する再生医療等製品の品質管理、非臨床試験部分の評価指標を作成する。
- ・金村委員に「評価に当たって留意すべき事項」のたたき台を作成していただき、次回会議（12/10）で討議する。
- ・「用語の定義」は全ての文章が整った後に波呂委員、渡辺委員にまとめて頂く。

⑥今後の会議日程

第二回会議：令和元年12月10日(火) 16～18時 オフィス東京 L4 会議室

第三回会議：令和二年2月3日(月)18～20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 令和元年度第二回会議議事録（概要）

2. 開催日時：2019年12月10日（月）16時00分～18時00分

2. 開催場所：オフィス東京 L4 会議室

3. 出席者（敬称略）

委員：松山幸弘（浜松医科大学）、安達伸生（広島大学）、今釜史郎（名古屋大学）、梅澤明弘（国立成育医療研究センター研究所）、緒方徹（国立障害者リハビリテーションセンター病院）、金村米博（大阪医療センター）、國府田正雄（筑波大学）、佐藤正人（東海大学）、渡辺雅彦（東海大学）

厚生労働省：福澤学

医薬品医療機器総合機構：河西正樹、國枝章義

産業技術総合研究所：伊藤弓弦、廣瀬志弘

事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：澤田留美、河野健

4. 配布資料

1. 令和元年度第二回委員会議事次第
2. 令和元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:昨年度からの全体的な流れと今後の検討事項の確認
4. 評価指標(案)1.～3.
5. 評価指標(案)5.(1)～(6) 金村委員ご作成
6. 評価指標(案)5.(7)
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事務局より第一回会議の議事録（概要）についての説明と評価指標（案）作成にあたっての全体的な流れと今後の検討事項の確認がなされた。
- ②資料5「評価指標（案）5.(1)～(6)」をもとに、評価指標（案）の「評価に当たって留意すべき事項」について全委員で討議を行った。
 - ・ 主な討議内容
 - ・ 評価指標の対象になるヒト（同種）iPS（様）細胞加工製品として、「神経前駆

細胞及び他の神経系分化細胞」とし、グリア前駆細胞等も含む様な形にする。

- ・ iPS (様) 細胞のゲノムシーケンスの内容は、神経系疾患に関する遺伝子変異について議論が十分されていないことから記載しない。
 - ・ 最終製品の構成要素となる細胞の作製に関して、最終製品が凍結細胞である場合も想定した記載にする。
 - ・ 細胞のバンク化に関して、1) iPS (様) 細胞をバンク化する場合、2) iPS (様) 細胞から作製された神経前駆細胞等をバンク化する場合のどちらもカバーできる様な形にする。
 - ・ 細胞形態の確認は、1) 浮遊培養と 2) 接着培養のどちらも想定した記載にする。
 - ・ 細胞数及び生存率は、蛍光色素を使った測定法も含む形にする。また細胞凝集塊を形成して細胞数、生存数の測定が難しい場合の記述も入れる。
 - ・ 最終製品を iPS (様) 細胞の培養条件で一定期間培養する戻し培養が未分化 iPS (様) 細胞を検出するのに有効であることから、未分化細胞検出法の実例として挙げる。
 - ・ 最終製品の染色体並びにゲノム構造を評価することは重要であると考えられることから、「求められる」という表現で記載する。
 - ・ 機能評価は、効果効能と関連性があるサロゲートマーカーで評価することが望ましいが、確立したサロゲートマーカーがない場合や規格値を立てるのが難しい場合もあるので、「評価することが可能である」という表現にする。
 - ・ 最終製品の移植部位に相当する微小環境での非臨床安全性評価のための造腫瘍性試験に関して、脊髄内移植の代替部位として免疫不全動物の頭蓋内(脳内)を挙げる。
 - ・ 効力または性能を裏付ける試験のモデル動物として、マウス、ラット、サルを挙げ、治療効果の評価方法は行動学的評価にする。
- ③資料 5 に関して、討議内容を反映させた修正版を事務局が作成する。作成した修正版は e-mail で委員に送り確認していただくこととなった。
- ④第三回会議までに「用語の定義」を波呂委員、渡辺委員にまとめて頂く。
- ⑤今後の会議日程
- 第三回会議：令和二年 2 月 3 日(月)18～20 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 令和元年度第三回会議議事録（概要）

3. 開催日時：2020年2月3日（月）18時00分～20時00分

2. 開催場所：オフィス東京 L2 会議室

3. 出席者（敬称略）

委員：松山幸弘（浜松医科大学）、梅澤明弘（国立成育医療研究センター研究所）、
緒方徹（国立障害者リハビリテーションセンター病院）、金村米博（大阪医療
センター）、國府田正雄（筑波大学）、佐藤正人（東海大学）、中畑龍俊（京都
大学）、波呂浩孝（山梨大学）

医薬品医療機器総合機構：河西正樹、國枝章義

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、河野健

4. 配布資料

1. 令和元年度第三回委員会議事次第
2. 令和元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:昨年度からの全体的な流れと今回の検討事項の確認
4. 評価指標(案)4. 用語の定義
5. 評価指標(案)5. 評価に当たって留意すべき事項 (1)～(6)
6. 評価指標(案)1. ～3.
7. 評価指標(案)5. 評価に当たって留意すべき事項 (7)
8. 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
9. 厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知:平成28年6月30日付
薬生機審発 0630 第1号「次世代医療機器・再生医療等製品評価指標の公表について」別紙 2「ヒト(同種)iPS(様)細胞加工製品を用いた関節軟骨再生に関する評価指
標」
10. 厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知:平成28年6月30日付
薬生機審発 0630 第1号「次世代医療機器・再生医療等製品評価指標の公表につい
て」別紙 1「ヒト軟骨細胞又は体性幹細胞加工製品を用いた関節軟骨再生に関する評
価指標」

11. 厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知:令和元年 6 月 27 日付
薬生機審発 0627 第 1 号別添「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. 議事内容

- ①事務局より第二回会議の議事録（概要）についての説明と評価指標（案）作成にあ
たっての全体的な流れと今回の検討事項の確認がなされた。
- ②資料 4「評価指標(案)4. 用語の定義」を國府田委員から説明いただき、修正点等を
討議した。用語の定義は評価指標用にコンパクトにし、今回作成されたバージョン
は参考資料として報告書に掲載する。
- ③資料 5「評価指標(案)5. 評価に当たって留意すべき事項（1）～（6）」を全委員で討議
した。

・主な討議内容

- ・ 原料は iPS(様)細胞と iPS(様)細胞から分化させた神経前駆細胞等を想定した書
き方(原料を原料等に変更)にする。
 - ・ 造腫瘍性試験は非臨床安全性評価に特化し、最終製品の品質評価のための造腫
瘍性試験に関する記述は、令和元年に発出された造腫瘍性試験のガイドライン
（「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」）を引用する形にして、評価指標案
からは除く。
 - ・ 対象疾患は脊髄損傷(外傷性)で麻痺の程度を ASIA スコアの A,B,C としていた
が、D でも上肢の動きが悪い人を対象にする可能性があるため、具体的なスコアは
書かず比較的重症という書き方にする。
 - ・ 投与方法として、「損傷部位に直接投与」としていたが、投与部位が限定される可
能性があるので、「脊髄内移植」とし、その定義は用語の定義で行う。
- ④資料 5 に関して、討議内容を反映させた修正版を事務局が作成する。作成した修正
版は資料 6 及び 7 の評価指標（案）と合わせ、e-mail で委員に送り確認する。作成
した評価指標（案）は厚労省、PMDA の確認後、今年度の報告書にまとめる。

III. ヒト（同種）iPS（様）細胞加工製品を用いた亜急性期

脊髄損傷（外傷性）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）
6. 参考文献

ヒト（同種）iPS（様）細胞加工製品を用いた亜急性期脊髄損傷（外傷性）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）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 様細胞を加工した製品（以下「ヒト（同種）iPS（様）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（様）細胞加工製品のうち特に亜急性期脊髄損傷（外傷性）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（様）細胞加工製品のうち特に亜急性期脊髄損傷（外傷性）の治療を目的として脊髄内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（様）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) 脊髄損傷亜急性期：脊髄損傷急性期は受傷直後～受傷後 1 週間、慢性期は受傷後 6 ヶ月または 1 年、亜急性期は急性期と慢性期の間の期間である。本評価指標では「亜急性期」

を受傷後 2 週から 2 ヶ月程度とした。

(2) 脊髄内移植 (神経組織内への移植) : 脊髄損傷に対する細胞移植療法の投与経路のひとつとして直接注入がある。本評価指標では損傷中心への注入と周辺部への注入をまとめて「脊髄内移植・神経組織内への移植」とした。

(3) 脊髄損傷の重症度 : 脊髄損傷は受傷高位以下の運動・感覚が完全に失われる完全麻痺と何らかの機能が残存する不全麻痺に大別される。概説的な重症度分類として Frankel 分類や American Spinal Injury Association impairment scale (AIS) が頻用され、A:完全麻痺、B:運動完全麻痺・感覚残存、C:運動不全麻痺、D:運動不全麻痺 (立位・歩行可能)、E: 正常の 5 段階に分類する。

(4) 脊髄損傷の高位 : 脊髄損傷はその受傷高位により臨床像が大きく異なる。頸髄損傷では四肢麻痺を胸髄損傷では下肢麻痺をきたす。

(5) 神経細胞、神経幹細胞、神経前駆細胞 : 神経幹細胞 (neural stem cell) は、多分化能と自己複製能を持った細胞であり、何回かの分裂後に特定の分化細胞に分化するよう運命づけられた細胞を前駆細胞 (neural progenitor cell) と呼ぶ。神経細胞に最終分化したものを神経細胞と称する。

(6) 神経系細胞・神経系分化細胞 : 本評価指標では iPS (様) 細胞から in vitro で、または移植後に体内で神経細胞・アストロサイト・オリゴデンドロサイトの神経系 3 系統に分化したものを「神経系分化細胞」と呼称する。

(7) 細胞凝集塊 (neurosphere 構造) : 神経幹/前駆細胞を特定の成長因子存在下で浮遊培養すると未分化な神経幹/前駆細胞・様々な分化過程の細胞が混在した細胞凝集塊 (Neurosphere) を形成する。

(8) MRI (diffusion tensor imaging: DTI)。拡散強調テンソル画像 (DTI) は水分子の拡散方向を評価する MRI の手法である。特定の神経索路の DTI パラメータを頭尾側に追跡し画像化したものが Diffusion tensor tractography で、脊髄白質障害度を視覚的に表現できるので有用性が高い。

(9) 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)

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 (様) 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

システムを構築し加工して製造された、ヒト(同種) iPS(様)細胞加工製品としての神経前駆細胞又は他の神経系分化細胞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(様)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 (様)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 (様)細胞であって、一定の製造工程を経ることにより神経前駆細胞及び他の神経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 (様)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神経前駆細胞及び他の神経系分化細胞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

神経前駆細胞及び他の神経系分化細胞(最終製品)の製造に当たっては、製造方法を明確にし、可能な範囲でその妥当性を以下の項目で検証し、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 (様)細胞株の製造所への受入から出発原料となるヒト iPS (様)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 (様)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(様)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 (様) 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 (様) 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 (様) 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 (様) 細胞株およびそのセル・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移植用細胞投与液を作製する方法 (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え及びクロスコンタミネーション防止対策

iPS (様) 細胞由来の神経前駆細胞及び他の神経系分化細胞 (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) 細胞増殖度の監視

神経前駆細胞は分裂回数の増加に伴って、染色体ならびにゲノム不安定性が発生する可能性が示唆されている。よって最終製品に至るまでの製造工程においては、過度の継代および細胞分裂を避け、細胞品質に影響を及ぼさない適切な範囲内で細胞増殖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。

(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。

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を用いて規格試験を実施すること。

iPS(様)細胞から作られる神経前駆細胞及び他の神経系分化細胞（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(様)細胞から製造される神経前駆細胞及び他の神経系分化細胞（最終製品）を、単離細胞の状態、又は細胞凝集塊（neurosphere 構造）の状態等で、必要数だけ、脊髄の損傷部位又はその周辺部の神経組織内に直接移植することが考えられる。

a) 細胞形態の確認

最終製品の細胞形態に関して、浮遊培養法を用いた製造においては、多くの場合、表面が円滑で色調は半透明～淡白色の細胞凝集塊（neurosphere 構造）を形成する。この形態、大きさに関して、目視確認を行い、その記録を保管することが望ましい。必要に応じて形態及び大きさに基準を定めることも考慮される。培養フラスコ等を用いた単層培養法による製造においては、あらかじめ確認されている目的とする細胞形態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。

b) 細胞数及び生存率

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、最終製品の一部を酵素処理して細胞懸濁液とし、血球計算盤やセルカウンターで測定する方法がある。細胞生存率を測定する方法として、トリパンブルーを用いた色素排除法があり、生細胞及び死細胞を計数することができる。また、DAPI や Acridine Orange 等で蛍光染色された細胞を測定する方法も使用することができる。

なお、細胞凝集塊（neurosphere 構造）を形成する細胞数 及び生存率を測定することが術的に困難である場合にあっては、細胞凝集塊（neurosphere 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。

c) 細胞特異性の確認

最終製品が神経前駆細胞の場合は、mRNA 発現解析において、神経前駆細胞マーカー遺伝子（*SOX1*, *PAX6*, *NES* 等）の相対的発現量を明らかにすること。タンパク質レベルでの発現定量は、免疫細胞染色法、フローサイトメトリー等を用いて *SOX1*、*PSA-NCAM* 等の発現量を明らかにすること。これら解析の中から、複数の異なる手法を用いて神経前駆細胞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。

最終製品がその他の神経系細胞である場合は、その特異性を代表する神経細胞、グリア細胞、あるいはその他の前駆細胞等の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、これら解析の中から、複数の異なる手法を用いて神経系分化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。

d) 未分化細胞が混在していないことの確認

未分化細胞の混在については、定量 PCR によるマーカー遺伝子の定量 (*POU5F1* [*OCT3/4*]、*NANOG* 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 (様) 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、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 (様) 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。

e) 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。

f) 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、最終製品が神経前駆細胞の場合は、各種神経系細胞に分化する能力を有することを確認するため、*in vitro* で一定期間、神経前駆細胞の分化誘導を促進する条件で培養を行った後、神経細胞 (*TUBB3* [*tubulin beta 3 class III*] 等) およびグリア細胞 (*GFAP* 等) のマーカー発現を免疫細胞染色法等で評価することが考えられる。また、分化誘導した神経細胞数の定量的評価としては、抗 *HuC/D* 抗体 (抗原: *ELAVL3/4*)、抗 *NeuN* 抗体 (抗原: *RBFox3*) を用いた染色等の方法が使用可能である。

最終製品がその他の神経系細胞である場合は、あらかじめその効能効果と関連性があることが推定される神経細胞、グリア細胞、あるいはその他の前駆細胞等の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。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、その分泌量を評価することが可能である。

(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。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な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

① 非臨床安全性評価のための造腫瘍性試験

iPS（様）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（様）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（様）細胞ではなくあくまで最終製品としての iPS（様）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。iPS(様)細胞のセル・バンクを樹立する場合には、原則として当該セル・バンクから製造された最終製品を用いて造腫瘍性試験を行う必要がある。当該セル・バンク以外から製造された最終製品を用いた造腫瘍性試験結果を用いる場合には、その妥当性を説明すること。

脊髄内(臨床投与経路)移植については、小動物では手術侵襲が大きく、手術手技により結果判定が困難となる可能性があることに留意する。この際の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、脊髄内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。より高容量の移植細胞の造腫瘍性を脊髄内移植に近い微小環境で評価する代替法としては、免疫不全動物の頭蓋内(脳内)に移植する手法が考慮される。この場合、脊髄と脳組織との微小環境の差異を考慮して、その試験結果を解釈することが重要である。

HLA タイピング等の後に同じ方法で樹立され、最終製品の原料等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(様)細胞セル・バンクから、同一の製造方法により同等の品質特性を持つ神経前駆細胞及び他の神経系分化細胞(最終製品)を製造する場合であっても、原則的には各セル・バンクから製造された最終製品について、ヒトでの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を評価する必要がある。免疫不全動物の脊髄あるいは脳内への移植による最終製品の造腫瘍性試験は、その代表的な方法として挙げられる。

②最終製品の効力又は性能を裏付ける試験

技術的に可能かつ科学的に合理性のある範囲で、対象疾患に対し適切なモデル動物等を用いて、最終製品の機能発現、作用持続性、ヒト(同種)iPS(様)細胞加工製品として期待される臨床効果の実現可能性(Proof-of-Concept, POC)を示すこと。モデル動物としては、マウス、ラット、サルの脊髄損傷を作製したものが挙げられる。ラットやサルのモデル動物にヒト iPS(様)細胞由来神経前駆細胞及び他の神経系分化細胞(最終製品)を移植

する場合は異種移植となり、免疫抑制剤を投与する必要があるが、免疫抑制の効果期間は限られており、短期の観察に限られることに留意すること。治療効果の評価方法には行動学的評価を行うことが考えられるが、妥当性については検討を行うこと。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 (様) 細胞のセル・バンクから同等の品質特性を持つ神経前駆細胞及び他の神経系分化細胞（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。

③その他

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。

(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選択・除外基準を設定する必要がある。脊髄損傷は損傷高位・重症度により症状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、重症度や損傷高位をある程度限定することが適切な場合がある。しかしながら、臨床試験で除外された重症度や損傷高位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り、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

1.1.1. 試験治療の介入時期について

脊髄損傷に対する臨床試験の場合には、受傷後のどの時点で治療介入を行うのかを検討する必要がある。受傷後早期であるほど脊髄ショックの影響もあり神経症状が不安定であるため¹⁾、受傷後早期では、麻痺の重症度や神経症状に関しての適切な評価が難しく、結果として有効性の評価が困難となってしまう可能性がある^{1, 2)}。受傷の数日後には神経症状はやや安定するとされているため¹⁾、被験者の神経症状をより詳細に評価できる。受傷後数ヶ月以降経過した慢性期では脊髄内の空洞形成・瘢痕形成等により再生治療の効果が減弱することも報告されており³⁾、適切な介入時期については、移植細胞の特性や試験の目的に応じて、個別に検討すべきである。

1.1.2. 対象患者の損傷高位について

脊髄損傷では受傷時の損傷高位により改善の程度が異なるため、適切な有効性評価を行うために、対象患者の損傷高位を限定することも検討すべきである⁴⁾。

また、胸髄損傷は頸髄損傷と比較して完全麻痺の割合が高いという損傷程度の違いがある⁵⁾。胸髄損傷では麻痺の回復により神経学的損傷高位が低下しても運動麻痺は不変（神経学的損傷高位の下降が American Spinal Injury Association (ASIA) 運動スコア等の神経学的評価と相関しないことをいう）となるため、ASIA 運動スコアが必ずしも麻痺の回復を反映しない。これに対して、頸髄損傷では神経学的損傷高位の僅かな下降も運動麻痺の改善として鋭敏に捉えることが可能である。以上から、臨床試験の開始前に頸髄損傷患者と胸髄損傷患者を同一の臨床試験で評価する場合には、主要評価項目の選択について慎重に検討すべきであり、統一した主要評価項目を設定することが困難である場合には、それぞれの患者毎に臨床試験を実施することを考慮すべきである。

安全性の観点から、頸髄損傷のなかでも上位頸髄では重篤な呼吸麻痺を生じ得るため、呼吸麻痺を生じた症例を対象集団に組入れるかどうか事前に検討する必要がある。

1.1.3. 対象患者の重症度について

脊髄損傷では受傷時の重症度により改善の程度が異なる可能性があるため、臨床試験において適切な患者選択を行う上で、普及した重症度分類を選択基準として規定することは重要である。細胞移植療法では、完全麻痺や重度の不完全麻痺などの比較的重症者を対象とすることが想定される。対象患者の重症度による選択基準設定については移植細胞の作用機序・試験の目的等に応じて検討が必要である。

1.2. 組入れにおける除外基準

除外基準の設定の際には、脊髄損傷の予後に影響を与える可能性がある手術施行の有無、ステロイド療法その他の薬剤等の因子について検討することが重要である。手術施行が脊髄損傷による麻痺の予後に与える影響については、早期の手術が麻痺を改善させたという報告⁶⁾がある一方、手術の有無は麻痺の予後と関係ないという報告もあり^{7,8)}、コンセンサスが得られていない。ただし、脱臼に関しては早期の整復が良いとされている⁹⁾。手術施行が有効性及び安全性の評価に与える影響については、現時点では不明であるため、手術施行の有無を除外基準として設定あるいは割付因子とするなどの扱いについては、個々の臨床試験の計画段階で検討する必要がある。また、ステロイドや移植細胞の挙動に影響を及ぼす可能性のある薬剤を投与された患者等の組入れについては有効性及び安全性評価に影響を与えうる因子のひとつとして、計画段階で個別の検討が必要である。

1.3. 高齢者・若年者について

脊髄損傷は、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。脊髄損傷後の回復が高齢者では有意に劣るとする報告があるため^{10,11,12,13}、高齢・非高齢を割付因子にする、又はサブ解析を行うなどの方法を行うことを臨床試験の開始前に定め、高齢者・非高齢者をそれぞれ別個に評価できるよう考慮する必要がある。

また、高齢者・小児の組入れについても考慮する必要がある。

2. 症例数の設定

被験者数は、統計学的な考察に基づき、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。

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尺度を用いることが必要であり、評価時における評価尺度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検討するために有用である¹⁴。

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

脊髄損傷治療における真の目的は、神経学的改善にとどまらず、機能予後及び Activity of Daily Living (ADL) を含む QOL の改善にある¹⁵。しかし、現時点では脊髄損傷治療による QOL の改善を客観的に評価することは困難であり、また脊髄損傷において現時点では QOL との関連性が確実に立証されている神経学的な評価法は存在しない。

このため、これまでに実施された臨床試験では、ASIA スコア (運動スコア、感覚スコア：特に胸髄損傷においては神経学的損傷高位を特定するために重要)、ASIA Impairment Scale (AIS) 又は Frankel 分類等の神経学的評価法が有効性の評価項目として設定されることが一般的であった^{9,10}。ASIA スコアは神経症状の詳細を比較的再現性良く評価できるものの¹⁶、日常動作における機能を直接示していない。一方、AIS 及び Frankel 分類は麻痺の概略を簡便に把握しうるため、临床上は有用であり頻用されるものの、実際の ADL を必ずしも反映しないとの報告があり¹⁷、AIS が改善したにもかかわらず ASIA スコアは悪化するという逆転現象も起こり得る¹⁸。

評価時期の設定については、前相試験の結果等を参考にし、移植細胞の作用機序や試験実施可能性等を勘案して検討する必要がある。評価は最終評価時点だけではなく、経時的推移を確認できるように、適切な頻度で実施することが望ましい。

また、主要評価項目を神経学的評価法にする場合においても、頸髄損傷と胸髄損傷では異なる可能性が想定される。頸髄損傷では ASIA 運動スコアで改善・悪化とも詳細に評価しうるので、主要評価項目としては従来通り ASIA 運動スコアの改善が代表的と言える。一方、胸髄損傷では麻痺が改善し神経学的障害レベルが下降しても下肢運動機能には変化がなく運動機能の改善としては捉えられないので、ASIA 感覚スコアの評価により神経学的障害レベル下降を捉えることも検討すべきである。したがって頸髄損傷・胸髄損傷が混在する集団での試験では、主要評価項目の選択について慎重に検討すべきであり、統一した主要評価項目を設定することが困難である場合には、それぞれの患者毎に臨床試験を実施することを考慮すべきである。

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。また、主要評価項目として ASIA スコア等の神経学的評価を設定した試験においては、機能予後に関する評価を設定する必要がある。

副次評価項目としては、AIS が 1 段階以上改善した被験者の割合等の反応例の割合や Neurological Level of Injury (NLI) などの神経学的評価法及び ADL 評価法（例えば脊髄損傷特異的な ADL 評価法である Spinal Cord Independence Measure (SCIM) など）や包括的 QOL 評価指標（例えば Euro-QoL 5-dimension (EQ5D) や MOS 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36) など）等の ADL/QOL 評価の設定を検討すべきである。

主要評価項目として ASIA スコア等の神経学的評価法を設定した場合、機能予後に関する評価、ADL/QOL 評価等を副次評価項目とするか検討の必要がある¹⁴⁾。近年では、脊髄損傷患者における ADL 評価として、SCIM が推奨されている¹⁶⁾。また、頸髄損傷においては NLI の下降は SCIM セルフケア項目との相関があると報告されている¹⁹⁾。一方、SCIM の評価項目の一部は頸髄損傷に特異的であり胸髄損傷には該当しないため、副次的評価項目においてもそれぞれの患者毎に評価可能なよう考慮すべきである。

脊髄損傷では膀胱直腸障害をきたし、これらの症状も被験者の ADL/QOL を著しく損なう場合があるので、膀胱直腸障害についても、SCIM の下位項目等、適切な評価指標を用いて評価することを検討すべきである。脊髄障害性疼痛も患者の ADL/QOL を著しく損なう可能性のある病態であり、評価項目に加えることを検討すべきである。

脊髄損傷治療の客観的評価指標として画像及び電気生理学的検査がある。脊髄損傷治療後の画像評価として脊髄単純 MRI は、移植細胞の生着、腫瘍化の有無や腫瘍化に伴う脊柱管狭窄の確認などのために推奨される。脊髄損傷治療の効果判定において造影 MRI

の有用性は明らかでないが、細胞移植後脊髄の状態を、腫瘍形成を含め詳細に評価するためには、造影 MRI も検討するとよい。さらに近年報告のある拡散テンソル画像 (DTI) なども脊髄再生評価の指標として検討することが望ましい。

脊髄損傷治療後の機能評価として電気生理学的検査 (中枢神経磁気刺激による誘発筋電図など) も推奨され、できる限り客観的指標を得ることが望ましい。

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²⁰⁾。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²¹⁾。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・脊髄損傷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。

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・空洞形成等)
- ⑤ 脊髄空洞症
- ⑥ 免疫抑制剤投与に伴う有害事象

- ⑦ 麻痺の悪化
- ⑧ 肺炎
- ⑨ 呼吸不全
- ⑩ 深部静脈血栓症／肺梗塞
- ⑪ 薬剤性過敏症症候群
- ⑫ 尿路感染症
- ⑬ 褥瘡
- ⑭ 関節拘縮
- ⑮ 脊髄障害性疼痛
- ⑯ 消化管潰瘍
- ⑰ 脳梗塞

5. 併用禁止薬及び併用禁止療法およびリハビリテーションの扱いについて

5.1. 併用禁止薬

有効性評価に影響を与える可能性のある薬剤については、事前に倫理的・臨床的に問題がないかを検討した上で、可能な限り併用禁止とすべきである。倫理的・臨床的に問題があり併用禁止薬に設定できない薬剤についても、試験期間中は用法・用量（頓用の場合は使用頻度）を変更しないよう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脊髄損傷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。しかし、同時に治療介入後のリハビリテーションは標準的内容に限定することなく検討すべきでもある。特に、運動完全麻痺の領域を有する症例や、実用的機能獲得が難しいと予想される四肢・体幹機能への積極的なリハビリテーションは現状で標準的に実施されているとは言えないが、こうした過去の報告において回復困難とされてきた機能の改善を目的とした再生医療を実施する場合は、目的に即したリハビリテーションを選定することが妥当である。その際、先進的なリハビリテーション技術としての機器（ロボットおよび機能的電気刺激等）や刺激療法（磁気刺激および電気刺激等）も検討することが望ましい。ただし、こうしたリハビリテーションのみでも改善が期待できる症状（不全麻痺領域など）への治療効果検証を臨床試験のエンドポイントとする場合は、ヒストリカル・コントロールも含め、適切な対照群を設定することが望まれる。また、各症例に画一的なリハビリテーション実施を担保することが困難であることを考慮し、実際に個々の症例に対して実施したリハビリテーションの内容・時間を記録することにより後方視的に比較できるよう工夫することが望ましい。

6. 用語・略語

略号・略記	英語表記	日本語表記
ADL	Activity of Daily Living	日常生活動作
AIS	ASIA Impairment Scale	米国脊髄損傷学会機能障害分類
ASIA	American Spinal Injury Association	米国脊髄損傷学会
CIOMS	Council for International Organizations of Medical Science	国際医学団体協議会
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for human use	医薬品規制調和国際会議
MedDRA	Medical Dictionary for Regulatory Activities Terminology	ICH 国際医薬用語集
NLI	Neurological Level of Injury	神経学的損傷高位
QOL	Quality Of Life	人生・生活の質
SCIM	Spinal Cord Independence Measure	脊髄障害自立度評価法

6. 参考文献

- 1) Krishna V, Andrews H, Varma A, Mintzer J, Kindy MS, Guest J. Spinal cord injury: how can we improve the classification and quantification of its severity and prognosis? *J Neurotrauma*. **31(3)**:215-227, 2014.
- 2) Fawcett JW, Curt A, Steeves JD, Coleman WP, Tuszynski MH, *et al*. Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP panel: spontaneous recovery after spinal cord injury and statistical power needed for therapeutic clinical trials. *Spinal Cord*. **45(3)**:190-205, 2007.
- 3) Tran AP, Warren PM, Silver J. The biology of regeneration failure and success after spinal cord injury. *Physiol Rev* **98(2)**:881-917, 2018.
- 4) Tuszynski MH, Steeves JD, Fawcett JW, Lammertse D, Kalichman M, *et al*. Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP Panel: clinical trial inclusion/exclusion criteria and ethics. *Spinal Cord*. **5(3)**:222-31, 2007.
- 5) Bransford RJ, Chapman JR, Skelly AC, VanAlstyne EM. What do we currently know about thoracic spinal cord injury recovery and outcomes? A systematic review. *J Neurosurg Spine* **17(1 Suppl)**:52-64, 2012.
- 6) Fehlings MG, Vaccaro A, Wilson JR, Singh A, Cadotte DW, *et al*. Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: Results of the surgical timing in acute spinal cord injury study (STASCIS). *PLoS ONE* **7(2)**, 2012.
- 7) Kawano O, Ueta T, Shiba K, Iwamoto Y. Outcome of decompression surgery for cervical spinal cord injury without bone and disc injury in patients with spinal cord compression: a multicenter prospective study. *Spinal Cord*. **48**: 548553, 2010.
- 8) Mazaki T, Ito Y, Sugimoto Y, Koshimune K, Tanaka M, Ozaki T. Does laminoplasty really improve neurological status in patients with cervical spinal cord injury without bone and disc injury? A prospective study about neurological recovery and early complications. *Arch Orthop Trauma Surg*. **133**:1401-1405, 2013.
- 9) Newton D, England M, Doll H, Gardner BP. The case of early treatment of dislocations of the cervical spine with cord involvement sustained playing rugby. *J Bone Joint Surg Br*; **93-B**:1646–52, 2011.
- 10) Wilson JJ, Cadotte DW, Fehlings MG. Clinical predictors of neurological outcome, functional status, and survival after traumatic spinal cord injury: a systematic review. *J Neurosurg*

- Spine* (1 Supp) **17**:11–26, 2012.
- 11) Burns SP, Golding DG, Rolle WA Jr, Graziani V, Ditunno JF Jr. Recovery of ambulation in motor-incomplete tetraplegia. *Arch Phys Med Rehabil* **78**: 1169-1172, 1997.
 - 12) Furlan JC, Fehlings MG: The impact of age on mortality, impairment, and disability among adults with acute traumatic spinal cord injury. *J Neurotrauma* **26**:1707-1717, 2009.
 - 13) van Middendorp JJ, Hosman AJ, Donders AR, Pouw MH, Ditunno JF Jr., Curt A, *et al.* A clinical prediction rule for ambulation outcomes after traumatic spinal cord injury: a longitudinal cohort study. *Lancet* **377**: 1004–1010, 2011.
 - 14) Lammertse D, Tuszynski MH, Steeves JD, Curt A, Fawcett JW, *et al.* Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP panel: clinical trial design. *Spinal Cord*.**45(3)**:232-242, 2007.
 - 15) Steeves JD, Lammertse D, Curt A, Fawcett JW, Tuszynski MH, *et al.* Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury (SCI) as developed by the ICCP panel: clinical trial outcome measures. *Spinal Cord*. **45(3)**:206-21, 2007.
 - 16) Hadley MN, Walters BC, Aarabi BZ, Dhall SS, Gelb DE, *et al.* Clinical assessment following acute cervical spinal cord injury. *Neurosurgery* **72**: 40-53, 2013.
 - 17) van Middendorp J J, Hosman AJ, Pouw MH, EM-SCI Study Group, and Van de Meent, H. ASIA impairment scale conversion in traumatic SCI: is it related with the ability to walk? A descriptive comparison with functional ambulation outcome measures in 273 patients. *Spinal Cord* **47**: 555–560, 2009
 - 18) Gündoğdu Í, Akyüz M, Öztürk EA, Çaklı FA. Can spinal cord injury patients show a worsening in ASIA impairment scale classification despite actually having neurological improvement? The limitation of ASIA Impairment Scale Classification. *Spinal Cord* **52**: 667-670, 2014.
 - 19) Kramer JL, Lammertse DP, Schubert M, Curt A, Steeves JD. Relationship Between Motor Recovery and Independence After Sensorimotor-Complete Cervical Spinal Cord Injury. *Neurorehabil Neural Repair* **26**: 1064-71, 2012.
 - 20) Management of Safety Information from Clinical Trials : Report of CIOMS Working Group VI, 2005

21) MedDRA® TERM SELECTION: POINTS TO CONSIDER, 2013

IV. 調査事項

1. 総括 松山 幸弘
2. 亜急性期脊髄損傷・再生治療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞
金村 米博
3. 用語の定義（詳細） 國府田正雄 緒方徹 波呂浩孝 渡辺雅彦

総括

浜松医科大学整形外科学教室 教授

松山 幸弘

「ヒト(同種)iPS(様)細胞加工製品を用いた亜急性期脊髄損傷(外傷性)の治療に関する評価指標」

脊髄損傷は、年間100万人当たり40.2人発症し、国内で年間約5000人の新規脊損患者が発症している。また現患者数は約8万人(18歳以上)でそのうち労災患者は約1.5-2万人と報告されている。脊損の原因としては、交通事故、転落、転倒の順に多く、発症年齢は20歳と60歳の二峰性を示し、損傷高位は頸髄60%胸腰髄40%と報告されている。また最近では、非骨傷性頸髄損傷が高齢者に多く、転倒による前額部打撲や過伸展受傷などの軽微な外傷で受傷することが多い。どの年代においても脊髄損傷を被ると、患者の精神的ダメージはもちろんの事、社会的、経済的な損失は多大なものが勘案される。しかしながら、長年にわたり脊髄損傷に対する確定的治療法はなく、脊髄再生治療が期待されてきた。急性期の脊髄損傷に関しては、多くの薬物治療が試されてきており、現在臨床治験を行っているものもある。受傷後早期であるほど脊髄ショックの影響もあり神経症状が不安定であるため、この時期では、麻痺の重症度や神経症状に関する適切な評価が難しく、結果として有効性の評価が困難となってしまう可能性がある。受傷の数日後には神経症状はやや安定するとされているため、被験者の神経症状をより詳細に評価できる。受傷後数ヶ月以降経過した慢性期では脊髄内の空洞形成・癭痕形成等により再生治療の効果が減弱することも報告されており、適切な介入時期については亜急性期(2週間から2ヶ月程度)が適切であろう。

また脊髄再生治療の可能性については、基礎研究、臨床研究を含め世界各国で進められているが、その中でもヒト(同種)iPS(様)細胞への期待は大きい。また出来る限り早く臨床応用が待たれる。そこで今回我々は、ヒト(同種)iPS(様)細胞加工製品を用いた亜急性期脊髄損傷(外傷性)の治療に関する評価指標を策定した。

以下に概要を述べる。

ヒト(同種)iPS(様)細胞加工製品は脊髄内移植されるため、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策定した。

移植する細胞は、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(様)細胞加工製品で、神経前駆細胞又は他の神経系分化細胞である。この細胞の製造工程の注意事項、製品の品質管理と非臨床試験(非臨床安全性評価のための造腫瘍性試験、最終製品の効力又は性能を裏付ける試験)に加えて臨床試験(治験)についての詳細

を策定した。とくに臨床試験(治験)については、投与至適時期、脊髄損傷重症度、有効性、安全性評価方法について十分討論し策定した。

試験治療の介入時期については、受傷後早期であるほど脊髄ショックの影響もあり神経症状が不安定であるため、受傷後早期では麻痺の重症度や神経症状に関しての適切な評価が難しく、結果として有効性の評価が困難となってしまう可能性がある。受傷の数日後には神経症状はやや安定するとされているため被験者の神経症状をより詳細に評価できる。

対象患者の損傷高位については、サブ解析を行うなどにより頸髄損傷・胸髄損傷それぞれを別個に評価できるよう考慮する必要がある。対象患者の重症度については、完全麻痺や重度の不完全麻痺などの比較的重症者を対象とした。

対象者の年齢については脊髄損傷後の回復が高齢者では有意に劣るとする報告があるため高齢・非高齢を割付因子にする、又はサブ解析を行うなどの方法を用いて、高齢者・非高齢者をそれぞれ別個に評価できるよう考慮し、高齢者・小児の組入れについても考慮する必要がある。

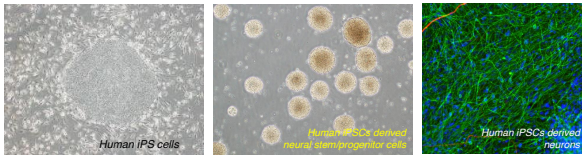
また症例数の設定、有効性評価としては ASIA スコア(運動スコア、感覚スコア:特に胸髄損傷においては神経学的損傷高位を特定するために重要)、ASIA Impairment Scale(AIS)又は Frankel 分類等の神経学的評価法が有効性の評価項目として設定し、また脊髄損傷治療の客観的評価指標として MRI 画像及び電気生理学的検査がある。細胞移植後脊髄の状態を、腫瘍形成を含め詳細に評価するためには、造影 MRI も検討し、さらに近年報告のある拡散テンソル画像(DTI)なども脊髄再生評価の指標として検討する。

また併用禁止薬及び併用禁止療法およびリハビリテーションの扱いについても検討をした。すでに間近に迫った脊髄再生治療は希望を与える治療である。

厳格なガイドラインにのっとり、そして安全性を担保した上で改善したかどうかをいかに評価し、それを応用するかが鍵となるであろう。脊髄損傷患者に少しでも早く光が与えられるとことを切に願うものである。

令和2年3月10日 松山幸弘

亜急性期脊髄損傷・再生治療用 iPS細胞由来神経前駆細胞 【製造・品質管理法】



(独)国立病院機構大阪医療センター
1臨床研究センター・先進医療研究開発、2脳神経外科
3慶應義塾大学医学部・生理学教室
金村米博^{1,2,3}

ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞

基礎研究開発段階

(目的)

- ・iPS細胞からの効率的神経分化誘導技術の選定
- ・未分化細胞残留リスクを最大限低減した分化誘導法の選定
- ・造直産能リスクを最大限低減した分化誘導法の選定

基礎研究レベルでのPOC取得

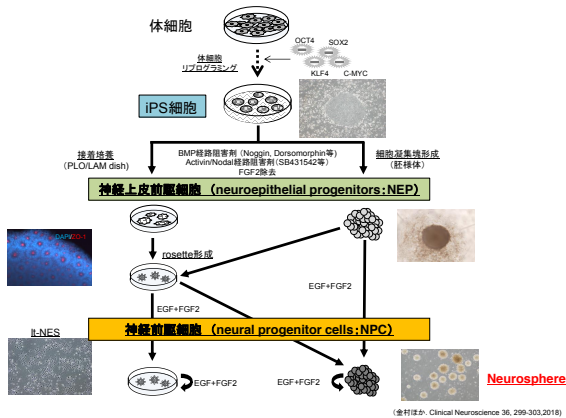
実用化研究開発段階

(目的)

- ・生物由来原料基準対応
- ・最終製品規格
- ・製造工程管理方法の確立
- ・品質管理方法の確立

非臨床POC取得

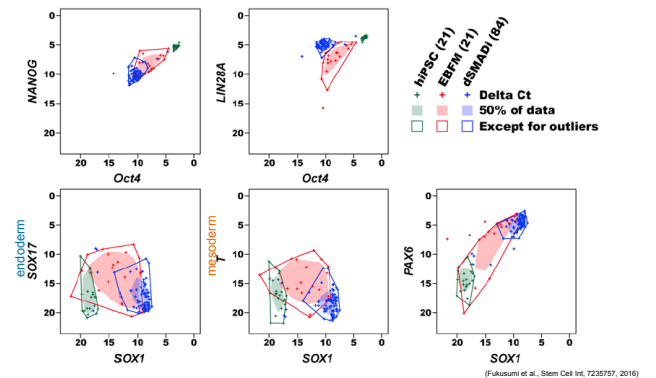
ヒトiPS細胞からの神経前駆細胞製造工程の最適化



(金村米博, Clinical Neuroscience 36, 299-303, 2018)

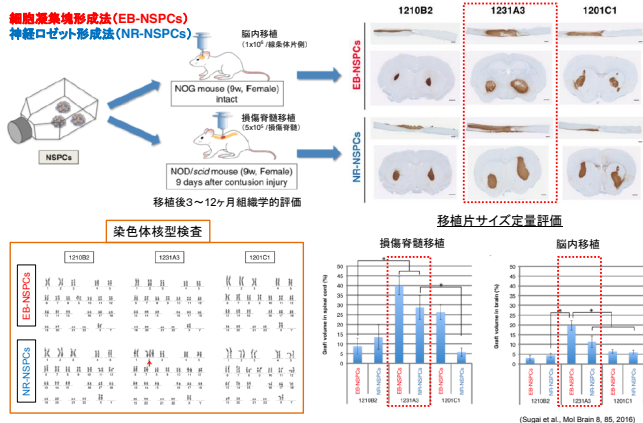
神経分化誘導工程の最適化

Dual SMAD法を用いた効率の良い神経分化誘導法



(Fukushima et al., Stem Cell Int, 7235757, 2016)

in vivo造腫瘍性評価



(Sugita et al., Mol Brain 8, 85, 2016)

治療用細胞・製造品質管理

1. 原材料および製造関連物質

- ・ヒトiPS細胞: 京都大学CiRA作製のHLAホモヒトiPS細胞ストック
- ・試薬・資材: 選定、生物由来原料基準

2. 製造工程管理

- ・製造方法の策定
- ・工程管理指標の策定
- ・ロット構成、製造スケール策定

3. 品質管理法

- ・最終製品(特定細胞加工物)の形態、包装
- ・最終製品の品質規格

細胞数並びに生存率

確認試験

純度試験

細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験

製造工程由来不純物試験

無菌試験及びマイコプラズマ否定試験

エンドキシン試験

ウイルス試験

機能試験

力価試験

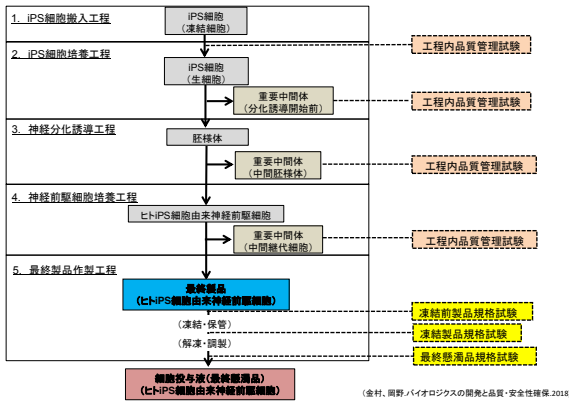
力学的適合性試験

- ・中間製品の品質確認法

再生医療の安全性の確保に関する法律

ヒト(同種)iPS(株)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

臨床試験用ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞



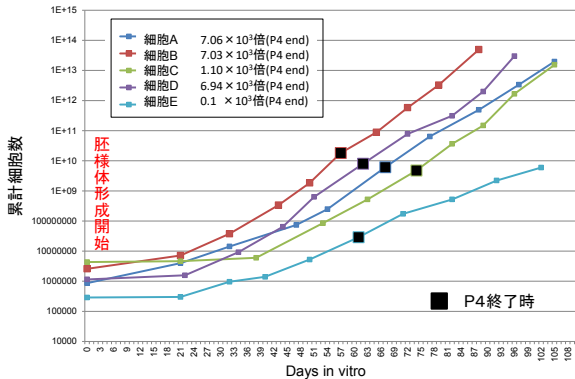
臨床試験用ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞

【最終製品 品質規格】

試験項目	試験媒体	試験方法
細胞数ならびに生存率		
neurosphere形成評価試験	神経前駆細胞 (凍結前製品)	蛍光染色法
遺伝子発現解析	神経前駆細胞 (凍結前製品)	蛍光染色法
細胞表面マーカー発現解析	神経前駆細胞 (凍結前製品)	顕微鏡観察法
確認試験 (目的細胞であることの確認)		
遺伝子発現解析	神経前駆細胞 (凍結前製品)	TagMan PCR法
細胞内マーカー分子発現解析	神経前駆細胞 (凍結前製品)	FCM法: (神経前駆細胞マーカー)
遺伝子発現解析	神経前駆細胞 (凍結前製品)	蛍光細胞免疫染色法: (神経前駆細胞マーカー)
細胞表面マーカー発現解析	神経前駆細胞 (凍結前製品)	TagMan PCR法: (多能性幹細胞マーカー)
細胞内マーカー分子発現解析	神経前駆細胞 (凍結前製品)	FCM法: (多能性幹細胞マーカー)
遺伝子発現解析	神経前駆細胞 (凍結前製品)	蛍光細胞免疫染色法: (多能性幹細胞マーカー)
細胞内マーカー分子発現解析	神経前駆細胞 (凍結前製品)	FCM法: (多能性幹細胞マーカー)
純度試験 (目的細胞の含有率評価)		
顕し培養解析	神経前駆細胞 (凍結前製品)	顕し培養試験法
染色体核型解析	神経前駆細胞 (凍結前製品)	キムザ染色解析法 Gバンド分染法
体細胞コピー数(CNV)解析		
神経前駆細胞 (凍結前製品)	神経前駆細胞 (凍結前製品)	マイクロアレイ法
無菌試験	培養上清 (凍結前製品)	メンブランフィルター法、バクテラード法
神経前駆細胞 (凍結前製品)	神経前駆細胞 (凍結前製品)	日本薬局方(外部委託検査)
感染症試験		
エンドキシン測定試験	培養上清 (凍結前製品)	カイネティック比濁法
マイコプラズマ否定試験	神経前駆細胞 (凍結前製品)	細胞増殖法
ウイルス否定検査	神経前駆細胞 (凍結前製品)	日本薬局方(A法、C法) (外部委託検査) 細胞増殖法 (外部委託検査)
効能試験 (目的細胞としての特性評価)		
神経分化能試験	神経前駆細胞 (凍結前製品)	細胞分化誘導法・蛍光細胞免疫染色法 (神経前駆細胞マーカー・グリア細胞マーカー) 細胞分化誘導法・蛍光細胞免疫染色法 (成体神経マーカー)

製造工程管理

細胞増殖曲線



品質管理上の検討課題

1. どの検査項目(マーカー)を検査すべきか。

確認試験: 再現性をもって目的細胞を同定する
純度試験: 目的外細胞(未分化細胞)を確実に同定する

2. どの検査方法を採用すべきか。

検査感度	遺伝子発現解析
検査の再現性	細胞表面マーカー発現解析
検査手技の複雑性	細胞内マーカー発現解析
検査に使用する細胞数	染色体解析
	ゲノム解析

3. 効能効果をサルゲートする品質指標は何か。

- 基礎研究目的での網羅的検査ではなく、臨床用細胞の品質試験としてポイントを絞った、必要かつ十分な規格の設定と検査法の選定
- 法令順守(再生医療の安全性の確保等に関する法律、再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令[GCTP省令])

用語の定義（詳細）

國府田正雄 緒方徹 波呂浩孝 渡辺雅彦

- (1) 脊髄損傷亜急性期：脊髄損傷は受傷後の時期により急性期・亜急性期・慢性期に大別される。急性期は外力による脊髄組織の損傷（一次損傷と言われる）と、一次損傷が引き金となって引き起こされた虚血・浮腫・興奮性神経伝達物質漏出・炎症性サイトカイン過剰発現・炎症細胞浸潤等の生物学的反応によって組織障害が拡大する過程、いわゆる二次損傷からなり、ヒトでは明確な定義はないが慣例的に受傷直後～受傷後1週間ほどの期間を指すことが多い。急性期には移植細胞生着率が不良、また炎症環境下では移植細胞の分化傾向が偏ることなどが報告され、細胞移植には適さないと考えられている。慢性期は神経症状改善がほぼ終了する時期を指しヒトでは受傷後6ヶ月または1年とする報告が多い。組織学的には損傷部に空洞が形成され、その周辺で密に集簇したアストロサイトにより分厚いグリア瘢痕が形成され、化学的・物理的に軸索進展を阻害する時期を指す。このため空洞部への細胞移植単独による治療効果は極めて限定的であることが報告されている。亜急性期は急性期が終わり慢性期の組織変化が始まるまでの期間で、明確な定義はない。げっ歯類を用いた動物実験では受傷後1週間～2週間ほどの期間が細胞移植に適切とする報告が多い。上記を踏まえて、本ガイドラインでは「亜急性期」を受傷後2週から2ヶ月の間とした。
- (2) 脊髄内移植（神経組織内への移植）：脊髄損傷に対する細胞移植療法の投与経路として、静脈内注射・脳室内/くも膜下腔注入・直接注入などの報告がある。本ガイドラインでは投与経路として神経組織内への直接注入を想定している。神経組織内への直接注入には損傷中心部への注入、損傷部周辺への注入などの様々な報告があり、何れも有効とされているため、本ガイドラインでは損傷中心への注入か周辺部への注入かなどは区別せずに「脊髄内移植・神経組織内への移植」としてまとめた。
- (3) 脊髄損傷の重症度：脊髄損傷は受傷高位以下の運動・感覚が完全に失われる完全麻痺と何らかの機能が残存する不全麻痺に大別される。重症度の代表的評価法に以前より用いられてきた Frankel 分類がある。A: complete(完全麻痺)、B: sensory only（運動完全麻痺・何らかの感覚が残存）、C: motor useless（運動不全麻痺。立位・歩行不能）、D: motor useful（運動不全麻痺、立位・歩行可能）、E: normal（腱反射の異常は残存しうる）の5段階に分類する。非常にシンプルであり臨床現場では有用であるが、詳細な評価で無いことから臨床成績調査などには

必ずしも適さない。北米脊髄損傷学会 American Spinal Injury Association (ASIA) はこの Frankel 分類の欠点を補うために ASIA motor/sensory score (現在では The International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury (ISNCSCI) と称されている)を定め、汎用されている。運動スコアは上下肢それぞれの高位を代表する 5 個の筋肉 (左右合わせて上肢 10 個、下肢 10 個) の徒手筋力テストを行い、合計点を算出する (0 点から 100 点まで)。感覚は痛覚の検査である pin prick と触覚の検査である light touch とがあり、何れも全身の 28 箇所の分節を左右それぞれ検査し、0 : 感覚脱失、1 : 感覚障害、2 : 正常の 3 段階で評価 (すなわち 0-112 点の範囲となる) する。ASIA impairment scale (AIS) は Frankel 分類同様に麻痺の程度 A-E の 5 段階で示す概説的な分類法である。A:完全麻痺、B:運動完全麻痺、E:正常は Frankel 分類同様であるが、C:損傷レベル以下の半分以下の筋が徒手筋力テスト 3 以上、D: 傷レベル以下の半分以上の筋が徒手筋力テスト 3 以上と、C と D の分類が Frankel 分類と異なり ASIA motor/sensory score に基づいて判定される。

本ガイドラインでは重症の不全麻痺または完全麻痺、Frankel 分類 A-C または AIS A-C を主たる対象とするが、Frankel 分類 D または AIS D であっても手指の動きの障害が強く日常生活動作が著しく障害され必ずしも軽症とは言い難い例があることには留意する必要がある。

- (4) 脊髄損傷の高位：脊髄損傷はその受傷高位により臨床像が大きく異なる。上位頸髄損傷 (C2, C3) では四肢麻痺に加えて横隔神経など呼吸筋麻痺が起こりうる。頸髄損傷では四肢麻痺をきたしうる。胸髄損傷では下肢麻痺、腰髄損傷では下肢遠位中心の麻痺や、ときに下肢麻痺がなく膀胱直腸障害のみをきたす例もある。頸髄損傷と比較して胸髄損傷では完全麻痺例が多い、麻痺の回復が運動スコアに反映され難い。すなわち、回復により麻痺のレベルが多少下がっても下肢の麻痺自体は不変で (主に体幹の感覚回復のみで評価しうる)、回復による麻痺レベルの僅かな低下が上肢の動きに大きな影響を与えうる頸髄損傷と大きく異なる。
- (5) 神経細胞、神経幹細胞、神経前駆細胞：神経幹細胞 (neural stem cell) の定義は、複数の違った種類の細胞に分化する多分化能と幹細胞を新たに生み出す自己複製能を持った細胞とされている。一方、何回かの分裂後に特定の分化細胞に分化するよう運命づけられた細胞を前駆細胞 (neural progenitor cell) と呼ぶ。神経細胞に最終分化したものを神経細胞と称する。神経幹細胞と神経前駆細胞は定義上は異なるが、必ずしも区別は容易ではなく、また脊髄損傷への移植に用いる場合は厳密に区別せずとも十分に用を足せることから、neural stem/progenitor cell などのように併記することも多い。

- (6) 神経系細胞・神経系分化細胞：成体哺乳類の中樞神経系は神経細胞・アストロサイト・オリゴデンドロサイト・ミクログリアから成る。神経細胞は神経突起（軸索・樹状突起）を持ち、神経伝達を担っている。哺乳類の中樞神経系においては損傷された軸索は再生・伸長しない。アストロサイトは血管内皮細胞とともに脳・脊髄血管関門を形成し、また種々のサイトカインや神経栄養因子の産生、神経伝達物質の回収など、中樞神経系の恒常性維持に重要な役割を担っている。脊髄損傷を始めとする中樞神経損傷においては損傷部を取り囲むように集族し、グリア癭痕を形成する。オリゴデンドロサイトは中樞神経系における髄鞘形成細胞である。髄鞘は電線の絶縁体の役割を担っており、またランビエ絞輪による跳躍伝導により軸索の伝導能を高めている。オリゴデンドロサイトによる髄鞘の中に軸索進展阻害因子が含まれていることが知られている。これら3種の細胞は神経幹細胞から分化することが知られている。ミクログリアは中樞神経系における免疫担当細胞として認識され、その起源は単球系であると言われている。

本ガイドラインでは iPS（様）細胞から *in vitro* で、または移植後に体内で神経細胞・アストロサイト・オリゴデンドロサイトの神経系3系統に分化したものを「神経系分化細胞」と呼称するが、神経系細胞との明確な区別はない。

- (7) 細胞凝集塊（neurosphere 構造）：神経幹/先駆細胞の培養法には浮遊培養法と接着培養法がある。Raynolds と Weiss らが報告した Neurosphere 法は代表的な手法であり、神経幹細胞を上皮細胞増殖因子（epidermal growth factor: EGF）や線維芽細胞増殖因子（fibroblast growth factor: FGF）など因子の存在下で浮遊培養するとマリモ状の細胞凝集塊を形成し継代培養可能である性質を利用した方法である。Neurosphere を単細胞レベルまで解離し、再び同一条件で培養すると Neurosphere 中に含有されていた神経幹細胞が再び Sphere を形成する。Neurosphere は未分化な神経幹細胞のみならず様々な分化過程の細胞が混在したヘテロな集団であることに留意が必要である。Neurosphere を単細胞にまで解離してから移植する方法と、Sphere のまま移植する方法の両者が報告されている。

- (8) MRI (diffusion tensor imaging: DTI)。MRI は脳・脊髄からなる中樞神経系の臨床において必要不可欠な画像検査であるが、大きな欠点の一つとして、定量的な評価ができないことが挙げられる。脊髄損傷急性期には脊髄損傷部は輝度変化として描出されるが、MRI 所見と脊髄損傷の重症度が必ずしも相関しないこと・予後予測に必ずしも有用でないことが知られている。拡散強調テンソル画像 (DTI) は水分子の拡散方向（＝異方性）を評価する MRI の手法で、通常ブラウン運動に従ってランダムに拡散している状態を異方性 0 と、また神経線維など一方向に水分子の拡散方向が制限されている状態を異方性 1 と、それぞれ理論上定義し定量的な評価を行

う。脊髄白質傷害の定量的評価に有用であることが期待される。脊髄障害の重症度と DTI パラメータが相関するという報告が複数ある。また、特定の索路の DTI パラメータを頭尾側に追跡し画像化したものが Diffusion tensor tractography で、脊髄白質障害度を視覚的に表現できるので有用性が高い。

V. 参考資料

1. 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」
2. 令和元年 5 月 8 日付薬生薬審発 0508 第 1 号薬生機審発 0508 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長通知「急性期脊髄損傷の治療を目的とした医薬品等の臨床評価に関するガイドライン」
3. 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「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」

薬食発0907第5号
平成24年9月7日

各都道府県知事 殿

厚生労働省医薬食品局長

ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について

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

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

ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針

はじめに

1. 本指針は、ヒト由来の人工多能性幹細胞（iPS 細胞）又は人工多能性幹細胞様細胞（iPS 様細胞）のうち、同種由来 iPS 細胞又は iPS 様細胞（自己由来 iPS 細胞又は iPS 様細胞を除く）を加工した医薬品又は医療機器（以下「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等」という）の品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件について定めるものである。しかしながら、ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等は、ヒト体細胞より人為的に作製された各種 iPS（様）細胞を人為的に分化誘導し、得られた特定の細胞をそのまま利用、あるいはさらに加工することにより製造されるため、その製造方法、中間製品や目的細胞の種類及び特性、臨床上的適用法は多種多様であり、また、本分野における科学的進歩や経験の蓄積は日進月歩である。本指針を一律に適用したり、本指針の内容が必要事項すべてを包含しているとみなしたりすることが必ずしも適切でない場合もある。したがって、個々の医薬品等についての試験の実施や評価に際しては本指針の目的を踏まえ、その時点の学問の進歩を反映した合理的根拠に基づき、ケース・バイ・ケースで柔軟に対応することが必要であること。
2. 薬事戦略相談あるいは治験相談におけるヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の治験を開始するに当たっての基本的留意点は、当該製品にヒトへの適用により支障となる品質及び安全性上の明らかな問題が存在するか否か、臨床で得られた知見との関係性を照合できる程度に品質特性が把握され、その一定範囲の恒常性が確保されているか否かを確認することにある。その際、明らかに想定される製品のリスクを現在の学問・技術を駆使して排除し、その科学的妥当性を明らかにした上で、なお残る「未知のリスク」と、重篤で生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患、身体の機能や形態を一定程度損なうことにより QOL を著しく損なう疾患などに罹患し、従来の治療法では限界があり、克服できない患者が「新たな治療機会を失うことにより被るかもしれないリスク」とのリスクの大小を勘案し、かつ、これらすべての情報を開示した上で患者の自己決定権に委ねるという視点を持つこと、すなわち、リスク・期待されるベネフィットの情報を開示した上で、治験に入るかどうかの意思決定は患者が行うという視点を入れて評価することも重要である。したがって、治験開始の場合、その届出に当たって添付すべき資料について本指針に示された要件や内容をすべて満たすことを必ずしも求めている訳ではない。製造販売承認申請時における品質及び安全性の確保のための資料は治験の進行とともに本指針に沿って充実整備されることを前提に、治験開始時点でその趣旨に適う条件を充たし、合理的に作成された適切な資料を提出すること。
また、治験開始に必要なとされる資料の範囲及び程度については、当該製品の由来、対象疾患、対象患者、適用部位、適用方法及び加工方法等により異なり、本指針では具体的に明らかでないことも少なくないので、個別に独立行政法人医薬品医療機器総合機構に相談することが望ましい。

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

目次

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

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

第1章 総則

第1 目的

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

第2 定義

本指針における用語の定義は以下のとおりとする。

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

第2章 製造方法

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

第1 原材料及び製造関連物質

1 iPS（様）細胞作製の原材料となるヒト体細胞

(1) 起源及び由来、選択理由

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

(2) 原材料となる細胞・組織の特性と適格性

① 生物学的構造・機能の特徴と選択理由

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

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

② ドナーの選択基準、適格性

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

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

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

・梅毒トレポネーマ、クラミジア、淋菌、結核菌等の細菌による感染症

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

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

(3) ドナーに関する記録

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

(4) 細胞・組織の採取・保存・運搬

① 採取者及び採取医療機関等の適格性

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

② 採取部位及び採取方法の妥当性

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

③ ドナーに対する説明及び同意

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

④ ドナーの個人情報の保護

ドナーの個人情報の保護方策について具体的に規定すること。

⑤ ドナーの安全性確保のための試験検査

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

⑥ 保存方法及び取り違い防止策

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

⑦ 運搬方法

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

⑧ 記録の作成及び保管方法

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

2 目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質並びに製造関連事項

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

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

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

(1) 細胞の培養を行う場合

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

② 培地成分については、以下の点に留意すること。

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

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

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

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

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

ア 血清等の由来を明確にすること。

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

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

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

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

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

分等については、生体に悪影響を及ぼさないものを選択すること。

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

(2) 非細胞成分と組み合わせる場合

① 細胞以外の原材料の品質及び安全性について

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

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

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

② 目的とする細胞との相互作用について

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

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

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

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

③ 細胞と適用部位を隔離する目的で非細胞成分を使用する場合

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

ア 免疫隔離が目的の場合、その程度

イ 最終製品中の細胞由来の目的生理活性物質の膜透過キネティクスと薬理効果

ウ 栄養成分及び排泄物の拡散

エ 非細胞成分が適用部位周辺に及ぼす影響

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

(3) 細胞に遺伝子工学的改変を加える場合

細胞に遺伝子を導入する場合は、次に掲げる事項に関する詳細を示すこと。

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

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

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

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

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

(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い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。

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ことになるが、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。

薬生薬審発 0508 第 1 号
薬生機審発 0508 第 1 号
令和元年 5 月 8 日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長
（ 公 印 省 略 ）

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 ）

急性期脊髄損傷の治療を目的とした医薬品等
の臨床評価に関するガイドラインについて

急性期脊髄損傷治療を目的とした医薬品等の製造販売の承認申請のために実施される、臨床試験の評価方法に関するガイドラインを、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。本ガイドラインは、主に医薬品の臨床評価に活用するために作成したものです。本ガイドラインに示す考え方は再生医療等製品の臨床評価を行う際にも有用であるため、参考としてください。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。

急性期脊髄損傷の治療を目的とした医薬品等
の臨床評価に関するガイドライン

目次

1. 緒言	3
1.1. 疫学	3
1.2. 病態	3
1.3. 本ガイドラインの位置付け	4
2. 臨床評価方法	4
2.1. 対象集団	5
2.1.1. 組入れにおける選択基準	5
2.1.2. 組入れにおける除外基準	6
2.1.3. 高齢者について	6
2.2. 症例数の設定	6
2.3. 有効性評価	6
2.3.1. 主要評価項目	7
2.3.2. 副次評価項目	7
2.4. 安全性評価	8
2.5. 併用禁止薬及び併用禁止療法の設定	9
2.5.1. 併用禁止薬	9
2.5.2. 併用禁止療法	9
2.6. その他の留意事項	9
2.6.1. 試験実施体制	9
2.6.2. 被験者背景の記録	9
3. 臨床試験	10
3.1. 臨床薬理試験	10
3.1.1. 目的	10
3.1.2. 試験計画に関する留意点	10
3.1.3. その他の留意事項	11
3.2. 探索的試験	11
3.2.1. 目的	11
3.2.2. 試験計画に関する留意点	11
3.3. 検証的試験	11

3.3.1. 目的	11
3.3.2. 試験計画に関する留意点	12
4. 製造販売後調査等	12
5. 用語・略語	12
6. 参考資料	13

1. 緒言

脊髄損傷は全世界で普遍的にみられ、治療によっても十分改善が得られず、長期にわたり患者のみならず家族に対する精神的及び社会的な負担並びに経済的損失は大きく、その対処は重要である。

急性期脊髄損傷の治療を目的とした医薬品等の臨床評価の方法については、千葉大学大学院医学研究院が、厚生労働省革新的医薬品・医療機器・再生医療等製品実用化促進事業再生医療等製品（脊髄損傷・神経再生）の臨床応用において「急性期脊髄損傷における臨床評価に関するガイドライン（案）」を作成し報告した。

今般、前出のガイドライン案を基に、千葉大学大学院医学研究院と独立行政法人医薬品医療機器総合機構との協力の下、さらに検討を行い、急性期脊髄損傷の治療を目的とした医薬品等の開発における臨床評価において考慮すべき点を本ガイドラインとして取りまとめた。

1.1. 疫学

本邦で年間約 4,000～5,000 人が脊髄損傷を罹患しており、その難治性により現在の患者総数は 10～20 万人以上といわれている^{1,2)}。外傷により脊髄が損傷されると、四肢の運動・感覚麻痺、膀胱・直腸機能障害等、種々の症状を呈する。現在の医学では損傷した脊髄そのものを復元させ麻痺を回復させることは不可能であり、脊椎の脱臼・骨折がある場合は、安定化させる手術及び残存した機能を最大限に活用するためのリハビリテーションのみが行われ^{3,4)}、推奨すべき治療法が存在しないのが現状である。したがって、脊髄損傷後の麻痺の予後は受傷・罹病直後の組織損傷の程度によりほぼ決定されてしまっているといえる。

1.2. 病態

脊髄損傷は損傷後の時間経過とともに、損傷に対する生体反応により病態が複雑に変化するため、それぞれの時期にそれぞれの病態に即した適切な治療が必要になる。

急性期：脊髄損傷の急性期は外力による一次損傷と、引き続いて起こる生化学的・生物学的反応である二次損傷に分類される。血腫、虚血、浮腫、炎症細胞浸潤及び神経伝達物質の漏出による細胞毒性等により神経・グリア細胞の細胞死が引き起こされ障害範囲が拡大していく過程を総称して二次損傷と呼んでいる。二次損傷は一次損傷と異なり各種治療の主たるターゲットとなりうる病態である⁵⁾。すなわち、治療により二次損傷を抑制して組織障害を最小限に食い止めることで、機能予後を改善できる可能性がある。急性期には時間的制約等の観点から主に薬物療法が検討されている。なお、海外のガイドラインでは、通常受傷後 3 日以内に実施した治療を急性期治療と考えるが、急性期の期間については議論の余地があるとされている⁶⁾。

亜急性期：急性期の炎症が収束し、血管新生・組織修復反応が盛んに起こる時期である。

慢性期：脊髄損傷部には空洞が形成され組織欠損となる。損傷部周囲に集簇したアストロサイトは硬いグリア瘢痕を形成し、軸索再生に対するバリエーとなる。また脊髄損傷の慢性期では神経細胞の活性が低下し、細胞体の萎縮をきたすことが知られており、治療への反応性が低下している可能性が示唆されている。

このように脊髄損傷では受傷後の時期により病態が大きく異なるため、急性期・亜急性期・慢性期に対する適切な臨床評価の方法はそれぞれ異なる。

1.3. 本ガイドラインの位置付け

本ガイドラインは、主に急性期脊髄損傷の治療を目的とした医薬品の開発において有効性及び安全性を検討するための、臨床試験の計画、実施及び評価法等について標準的方法と手順を概説したものである。脊髄損傷のうち、亜急性期及び慢性期の治療における医薬品等の開発に関しては別途適切な方法で検討すること。また、本ガイドラインでは、対象となる疾患領域によらず共通する事項の記載は可能な限り避けたため、臨床試験実施に係る一般的な事項は関連する法令通知（ICH ガイドラインを含む。）を適宜参照すること。

一方、医学は今後も進歩することが予想され、新しい知見に基づき、本ガイドラインも適宜改訂されるべきである。また、科学的に妥当な理由がある場合には、本ガイドラインの内容に拘ることなく、柔軟な対応が望まれる。

なお、本ガイドラインに示す考え方は、再生医療等製品の臨床評価を行う際にも有用であるため、再生医療等製品の臨床評価においても本ガイドラインを参考にされたい。

また、非外傷性の急性期脊髄損傷の治療を目的とした医薬品等の開発においても、本ガイドラインの考え方を参考にできる。

2. 臨床評価方法

脊髄損傷を対象とした臨床試験に際して考慮すべき疾患の特徴として、①自然回復が少なくない^{6,7)}、②受傷後早期では症状が安定していない、③受傷時の重症度及び損傷高位により神経症状が多彩であり、またその改善程度が異なる^{6,7,8)}、④一般的に用いられることの多い神経症状評価法と日常生活動作（ADL）／生活の質（QOL）との関連が完全には明らかにされていない⁹⁾、⑤介入時期と介入時の重症度で期待される改善効果が異なる¹⁰⁾点等がある。

本項では、急性期脊髄損傷を対象とした薬物療法等に関する臨床試験の計画立案に関する総論として、探索的試験及び検証的試験における留意点について説明する。

2.1. 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、国際的に普及した診断基準、重症度分類等を用いて選択基準を設定する必要がある。脊髄損傷は損傷高位・重症度により症状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基準の設定に際し、被験薬の特性や試験の目的に応じて、重症度や損傷高位をある程度限定することが適切な場合がある。しかしながら、臨床試験で除外された重症度や損傷高位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。

2.1.1. 組入れにおける選択基準

2.1.1.1. 試験治療の介入時期について

急性期脊髄損傷に対する臨床試験の場合には、急性期のどの時点で治療介入を行うのかを検討する必要がある。受傷後早期であるほど脊髄ショックの影響もあり神経症状が不安定であるため¹¹⁾、受傷直後（特に24時間以内）では、麻痺の重症度や神経症状に関する適切な評価が難しく、結果として有効性の評価が困難となってしまう可能性がある^{6,11)}。受傷の数日後には神経症状はやや安定するとされているため¹¹⁾、被験者の神経症状を詳細に評価できる。これらを踏まえ、適切な介入時期については、被験薬の特性や試験の目的に応じて、個別に検討すべきである。また、投与期間、継続投与の要否及び継続投与の場合の投薬中止時期に関しても、被験薬の特性や試験の目的に応じた個別の検討を要する。

2.1.1.2. 対象患者の損傷高位について

脊髄損傷では受傷時の損傷高位により改善の程度が異なるとされているため、急性期脊髄損傷を対象とした試験では、適切な有効性評価を行うために、対象患者の損傷高位を限定することが有用である¹⁰⁾。

胸髄損傷は頸髄損傷と比較して完全麻痺の割合が高いという損傷程度の違いがある¹²⁾。胸髄損傷では麻痺の回復により、神経学的損傷高位が低下しても運動麻痺としては不変（神経学的損傷高位の下降がASIA運動score等の神経学的評価と相関しないことをいう。）となることがあり、ASIA運動scoreが必ずしも麻痺の回復を反映しない。これに対して、頸髄損傷では神経学的損傷高位の僅かな下降も運動麻痺の改善として鋭敏に捉えることが可能である。

安全性の観点から、頸髄損傷高位を限定する場合、一般に上位頸髄等では重篤な呼吸麻痺を生じうるため、呼吸麻痺を生じた症例を対象集団に組み入れるかどうか事前に検討する必要がある。

2.1.1.3. 対象患者の重症度について

脊髄損傷では受傷時の重症度により改善の程度が異なる可能性があるため、臨床試験において適切な患者選択を行う上で、国際的に普及した重症度分類を選択基準として規定することは重要である。薬効評価の観点から、患者集団を代表しており、有効性及び安全性を適切に評価可能な患者を組み入れる必要がある。

2.1.2. 組入れにおける除外基準

除外基準の設定の際には、脊髄損傷の予後に影響を与える可能性がある手術施行の有無、ステロイド療法等の因子について検討することが重要である。手術施行が脊髄損傷による麻痺の予後に与える影響については、早期の手術が麻痺を改善させたという報告¹³⁾がある一方、手術の有無は麻痺の予後と関係ないという報告もあり^{14,15)}、コンセンサスが得られていない。ただし、脱臼に関しては早期の整復が良いとされている¹⁶⁾。手術施行が有効性及び安全性の評価に与える影響については、現時点では不明であるため、手術施行の有無を除外基準として設定するかについては、個々の臨床試験の計画段階で検討する必要がある。また、試験開始前にステロイド療法が施行された患者の組入れについても、有効性及び安全性評価に影響を与える因子のひとつとして、計画段階で検討する必要がある。

2.1.3. 高齢者について

脊髄損傷は、高齢者（65歳以上）でも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。高齢者及び非高齢者の薬物動態プロファイル等に明らかな差異があると考えられる場合には、非高齢者（65歳未満）とは別に高齢者を対象とした臨床試験が必要となる可能性がある。

2.2. 症例数の設定

被験者数は、統計学的な考察に基づき、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。

2.3. 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尺度を用いることが必要であり、評価時における評価尺度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検討するために有用である¹⁷⁾。

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。

2.3.1. 主要評価項目

脊髄損傷治療における真の目標は、神経学的改善にとどまらず、機能予後及びADLを含むQOLの改善にある¹⁸⁾。一方、現時点ではQOLの改善を客観的に評価することは困難と考えられ、また急性期脊髄損傷において、現時点ではQOLとの関連性が確実に立証されている神経学的な評価法は存在しないことから、主要評価項目として用いる評価尺度は、適切な神経学的評価を設定する必要があるが、可能であれば機能予後に関する評価を設定することが望ましい。

これまでに実施された臨床試験では、ASIA score、AIS 又は Frankel 分類等を有効性の評価項目として設定されることが一般的であった^{19, 20)}。ASIA score は神経症状の詳細を比較的再現性良く評価できるものの²⁰⁾、日常動作における機能を直接示していない。一方、AIS 及び Frankel 分類は麻痺の概略を簡便に把握しうるため、临床上は有用であり頻用されるものの、実際のADLを必ずしも反映しないとの報告があり²¹⁾、AISが悪化しているにもかかわらずASIA scoreが改善する等、AISとASIA scoreは逆転する可能性すらありうる²²⁾。

評価時期の設定については、前相試験の結果等を参考にし、被験薬の作用機序や試験実施可能性等を勘案して検討する必要がある。評価は最終評価時点だけではなく、経時的推移を確認できるように、適切な頻度で実施することが望ましい。

2.3.2. 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。また、主要評価項目としてASIA score等の神経学的評価を設定した試験においては、機能予後に関する評価を設定する必要がある。

副次評価項目としては、AISが1段階以上改善した被験者の割合等の反応例の割合やNLIなどの神経学的評価法及びEQ-5D、SF-36、SCIM等のADL/QOL評価の設定を検討すべきである。

検証的試験において、主要評価項目としてASIA score等の神経学的評価法を設定した場合、機能予後に関する評価、ADL/QOL評価等も副次評価項目として設定する必要がある¹⁸⁾。近年では、脊髄損傷患者におけるADL評価として、SCIMが推奨されている²⁰⁾。また、頸髄損傷においてはNLIの下降はSCIMセルフケア項目との相関があると報告されている²³⁾。

脊髄損傷では膀胱直腸障害をきたし、これらの症状も被験者のADL/QOLを著しく損なう場合があるので、膀胱直腸障害についても、SCIMの下位項目等、適切な評価指標を用いて評価することを検討すべきである。また、脊髄障害性疼痛を含む疼痛の評価も重要であるため、適切な評価指標を用いて評価することを検討すべきである。

2.4. 安全性評価

有害事象とは、医薬品（被験薬を含む。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、当該医薬品の投与との因果関係の有無は問わない。つまり、医薬品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、被験薬・対照薬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、及び被験薬・対照薬との因果関係を判定する。それぞれの事象における重症度分類としては、軽度、中等度、高度を用いる。

また、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²⁴⁾。また、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²⁵⁾。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、被験薬に特徴的な有害事象に加えて、急性期脊髄損傷の病態に関連する以下のような有害事象についても注目して収集すべきである。

重要な有害事象

- ① 麻痺の悪化
- ② 肺炎
- ③ 呼吸不全
- ④ 深部静脈血栓症／肺梗塞
- ⑤ 薬剤性過敏症症候群
- ⑥ 尿路感染症
- ⑦ 褥瘡
- ⑧ 関節拘縮
- ⑨ 脊髄障害性疼痛
- ⑩ 消化管潰瘍
- ⑪ 脳梗塞
- ⑫ 起立性低血圧

2.5. 併用禁止薬及び併用禁止療法の設定

2.5.1. 併用禁止薬

有効性評価に影響を与える可能性のある薬剤については、事前に倫理的・臨床的に問題がないかを検討した上で、可能な限り併用禁止とすべきである。倫理的・臨床的に問題があり併用禁止薬に設定できない薬剤についても、被験薬の評価に影響を及ぼさないよう、試験期間中は用法・用量（頓用の場合は使用頻度）を変更しないよう規定する等の対応が必要である。

2.5.2. 併用禁止療法

リハビリテーションが直接受傷した脊髄を修復させる、又は再生させるといったエビデンスはないが、リハビリテーション実施の有無や内容は機能予後に影響を与える可能性がある。したがって、施設間・被験者間のリハビリテーションの差異が有効性評価に与える影響を可能な限り低減できるよう、リハビリテーションの実施内容に関しては一定の基準を設ける必要がある。

また、手術施行が有効性及び安全性の評価に与える影響については、現時点では不明であることを踏まえ、臨床試験期間中の手術の可否については、予め検討を行い、手術実施の基準等を含めて適切に規定する必要がある。

2.6. その他の留意事項

2.6.1. 試験実施体制

急性期脊髄損傷における臨床試験では、被験者は救急患者であり、臨床試験における症例登録は計画的に行えないため、土日祝祭日や夜間を含めて早急かつ適切に対応可能な体制及び患者登録手順を整備することが推奨される。臨床試験参加の同意取得においては、受傷後の精神的にも不安定な患者及び家族に慎重な配慮が必要である。

臨床試験期間が数ヶ月以上におよぶ場合、急性期病院から回復期リハビリテーション病院への転院、またさらなる転院等により被験者の追跡が困難となることが考えられる。したがって、主要な評価の時点におけるデータの欠測が可能な限り発生しないよう、予め検討する必要がある。なお、転院先の医療機関で臨床試験に関するデータを収集する場合には、当該機関も臨床試験実施施設として取り扱う必要がある可能性があるため、留意すること。

2.6.2. 被験者背景の記録

脊髄損傷は損傷高位・重症度により非常に多彩な症状経過を示す。被験薬の特性や試験の目的に応じて、最新の科学的知見も踏まえ、適切に被験者背景に関する情報収集を行い、記録する必要がある。背景因子の例として、損傷からの経過期間、損傷高位、重症度、手術施行の有無、年齢、損傷の原因等が挙げられる。これら各被験者背景を組入れ時にどの程度考

慮するかは「2.1. 対象集団」の項を参照されたい。

3. 臨床試験

本項では開発の各段階において実施される臨床試験計画の留意点を説明する。一般には、臨床薬理試験、探索的試験、検証的試験の順に進み、臨床薬理試験では薬物動態、安全性及び用法・用量の検討、探索的試験では POC の確立、用法・用量及び複数の有効性指標の検討、検証的試験では最も代表的な指標にて有効性の検証及び安全性の検討を行う。前述した内容は、全疾患領域に関する総論であるため、詳しくは、ICH ガイドラインを参照されたい。

3.1. 臨床薬理試験

3.1.1. 目的

一般には、世界で初めて被験薬をヒトに投与する場合は、安全性評価を主たる目的にするため、非臨床試験で得られた情報を元に、健康成人男性を被験者とした臨床薬理試験を行う。既承認医薬品の適応拡大の開発では省略できる場合があるが、用量・投与経路が既承認品と大きく異なる場合は臨床薬理試験の実施が必要となる。臨床薬理試験は、被験薬をヒトに投与する際の安全な用量、投与方法の検討を主な目的とする。また、被験薬の薬物動態学的プロファイルの検討も行う。

3.1.2. 試験計画に関する留意点

比較的少数数を対象とし、短期（原則として、単回又は反復投与）の被験薬の投与を行う。通常は、試験期間中、被験者は入院又はそれに準じた状態で実施する。用法については、臨床現場での使用方法を考慮し設定する。なお、被験薬の薬理作用の上で、健康成人への投与が安全性上大きな問題となる場合、侵襲性の高い手技を用い被験薬を投与する場合等には、患者を対象とすることが適切である場合もある。その際、有効性及び安全性を予備的に検討する第 I/II 相試験として実施することも考えられるが、安全性の確認に最も重点をおく。用法・用量として非臨床試験成績から推定される安全な最低用量の単回投与から開始し、安全性を確認しながら、将来予測される用量以上まで漸次増量させる。なお、ヒトに初めて投与する場合等では、必要に応じて「「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス」について」（平成 24 年 4 月 2 日付け薬食審査発 0402 第 1 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知）及び「「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンスに関する質疑応答集（Q&A）」について」（平成 24 年 4 月 2 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。

安全性評価としては、被験薬に応じて必要な項目を設定する。臨床試験期間中に発生した臨床検査値異常を発見するためには、適切な検査を被験薬投与開始前後に行う必要がある。

3.1.3. その他の留意事項

高齢者（65歳以上）、また被験薬の薬物動態上の特徴により肝機能障害患者、腎機能障害患者等を対象とした検討が必要な場合がある。

薬物相互作用が予測される場合は、特定の薬物との併用による検討も必要な場合がある。詳細は、「医薬品の臨床薬物動態試験について」（平成13年6月1日付け医薬審発第796号厚生労働省医薬局審査管理課長通知）及び「「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」について」（平成30年7月23日付け薬生薬審発0723第4号厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長通知）を参照されたい。

また、その他、「非抗不整脈薬におけるQT/QTc間隔の延長と催不整脈作用の潜在的可能性に関する臨床的評価について」（平成21年10月23日付け薬食審査発1023第1号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知）において規定されるQT/QTc評価試験等の必要な臨床薬理試験を、関連ガイドラインを踏まえて適切に実施する必要がある。

3.2. 探索的試験

3.2.1. 目的

探索的試験の目的は、臨床薬理試験で安全性が確認された薬物について、患者を対象としてPOCを確立すること、用量反応関係を明らかにすること、検証的試験における用法・用量、評価項目及び評価期間を決定すること等にある。

3.2.2. 試験計画に関する留意点

探索的試験で用量反応関係を検討する場合の試験デザインは、現状ではプラセボを対照として、複数の用量群を固定用量で設定した無作為化二重盲検並行群間比較試験とすべきである。用法については、臨床現場での使用方法を考慮し、投与期間についても検証的試験の計画に際して必要な情報の収集ができるように適切に設定する。

被験薬が他の効能・効果で既に承認されている場合であったとしても、臨床試験の評価指標及びベネフィット・リスクバランス評価等は疾患毎に異なるため、最小有効用量及び至適用量は異なる可能性がある。したがって、このような場合であったとしても適切に最小有効用量及び至適用量を検討すべきである。

探索的試験では、脊髄損傷の予後に影響を与えうる被験者背景を限定する等の方策により、群間差の明瞭化に工夫をした集団において有効性評価を検討することも一案である。

3.3. 検証的試験

3.3.1. 目的

検証的試験の目的は、探索的試験によって、有効性及び安全性が検討され、臨床用法・用量が推定された薬物について、有効性を検証し、安全性を確認することにある。

3.3.2. 試験計画に関する留意点

検証的試験ではプラセボに対する優越性を検証する必要がある。なお、現時点では急性期脊髄損傷を対象とした標準治療が確立されていないため、現状ではプラセボの設定には倫理上の大きな問題はないと考えられる。

プラセボを使用する際は、プラセボの「外見」、「におい・味」等が被験薬と識別不能であるべきである。なお、注射剤等で被験薬との識別が不可能な適切なプラセボを製造できない場合や、侵襲性が高い手技での投与が必要となる場合で、シャムの使用が適切と考えられる場合には、薬剤投与を行う非盲検医師を設定した上で、被験者、有効性及び安全性評価を行う医師、その他の臨床試験担当者を盲検下におく方法等により盲検性を担保することが可能な場合がある。また、例えば、臨床試験で用いる被験薬の特性により臨床検査値等が多くの変動すると考えられる薬剤の場合、当該臨床検査値等を知ることによって盲検性が破綻する可能性があることから、盲検下の臨床試験担当者には当該検査値等を知られないようにする等の配慮が必要になる。

4. 製造販売後調査等

急性期脊髄損傷の治療を目的とした医薬品等の評価において、長期的な予後を評価することは重要であり、比較的短期かつ小規模の臨床試験のみでは限界がある。したがって、製造販売後には、医薬品等の特性、安全性プロファイル等を踏まえ、適切なりサーチクエスチョンを設定した上で、製造販売後調査等を実施し、臨床試験において明らかにならなかった点について情報収集する必要がある。なお、製造販売後調査等の実施計画については、「製造販売後調査等の実施計画の策定に関する検討の進め方について」（平成30年1月31日付け公表 医薬品医療機器総合機構）も参照されたい。

5. 用語・略語

略号・略記	英語表記	日本語表記
ADL	Activity of Daily Living	日常生活動作
AIS	ASIA Impairment Scale	米国脊髄損傷学会機能障害分類
ASIA	American Spinal Injury Association	米国脊髄損傷学会
CIOMS	Council for International Organizations of Medical Science	国際医学団体協議会
FAS	Full Analysis Set	最大の解析対象集団
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for human use	医薬品規制調和国際会議
ITT	Intention-To-Treat	-
MedDRA	Medical Dictionary for Regulatory Activities	ICH 国際医薬用語集

	Terminology	
NLI	Neurological Level of Injury	神経学的損傷高位
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency:	医薬品医療機器総合機構
POC	Proof Of Concept	研究仮説が実証されること。
PPS	Per Protocol Set	臨床試験実施計画書に適合した対象集団
QOL	Quality Of Life	人生・生活の質
SCIM	Spinal Cord Independence Measure	脊髄障害自立度評価法

6. 参考資料

・引用文献

- 1) 新宮彦助. 脊髄損傷の予防. 日本パラプレジア医学会雑誌 13: 48-49, 2000.
- 2) 坂井宏旭. 疫学調査. 総合リハ 36: 969-972, 2008.
- 3) Taghva A, Hoh DJ, Laurysen CL. Advances in the management of spinal cord and spinal column injuries. *Handb Clin Neurol.* 109:105-30, 2012.
- 4) Ditunno JF, Cardenas DD, Formal C, Dalal K. Advances in the rehabilitation management of acute spinal cord injury. *Handb Clin Neurol.* 109:181-95, 2012.
- 5) Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp* 71:281-299, 2011.
- 6) Fawcett JW, Curt A, Steeves JD, Coleman WP, Tuszynski MH, *et al.* Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP panel: spontaneous recovery after spinal cord injury and statistical power needed for therapeutic clinical trials. *SpinalCord.* 45(3):190-205, 2007.
- 7) Marino RJ, Ditunno JF Jr, Donovan WH, Maynard FM Jr. Neurologic recovery after traumatic spinal cord injury: data from the Model Spinal Cord Injury Systems. *Arch Phys Med Rehabil.* 80: 1391-1396, 1999.
- 8) Coleman WP, Geisler FH. Injury severity as primary predictor of outcome in acute spinal cord injury: retrospective results from a large multicenter clinical trial. *Spine J* 4; 373-378, 2004.
- 9) Steeves JD, Lammertse D, Curt A, Fawcett JW, Tuszynski MH, *et al.* International Campaign for Cures of Spinal Cord Injury Paralysis. Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury (SCI) as developed by the ICCP panel: clinical trial outcome measures. *Spinal Cord.* 45(3): 206-21, 2007.
- 10) Tuszynski MH, Steeves JD, Fawcett JW, Lammertse D, Kalichman M, *et al.* Guidelines for the

- conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP Panel: clinical trial inclusion/exclusion criteria and ethics. *Spinal Cord*. 5(3):222-31, 2007.
- 11) Krishna V, Andrews H, Varma A, Mintzer J, Kindy MS, Guest J. Spinal cord injury: how can we improve the classification and quantification of its severity and prognosis? *J Neurotrauma*. 31(3):215-227, 2014.
 - 15) Bransford RJ, Chapman JR, Skelly AC, VanAlstyne EM. What do we currently know about thoracic spinal cord injury recovery and outcomes? A systematic review. *J Neurosurg Spine* 17(1 Suppl):52-64, 2012
 - 12) Bransford RJ, Chapman JR, Skelly AC, VanAlstyne EM. What do we currently know about thoracic spinal cord injury recovery and outcomes? A systematic review. *J Neurosurg Spine* 2012 Sep; 17(1 Suppl): 52-64, 2012
 - 13) Fehlings MG, Vaccaro A, Wilson JR, Singh A, Cadotte DW, *et al*. Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: Results of the surgical timing in acute spinal cord injury study (STASCIS). *PLoS ONE* 7(2), 2012.
 - 14) Kawano O, Ueta T, Shiba K, Iwamoto Y. Outcome of decompression surgery for cervical spinal cord injury without bone and disc injury in patients with spinal cord compression: a multicenter prospective study. *Spinal Cord*. 48: 548553, 2010.
 - 15) Mazaki T, Ito Y, Sugimoto Y, Koshimune K, Tanaka M, Ozaki T. Does laminoplasty really improve neurological status in patients with cervical spinal cord injury without bone and disc injury? A prospective study about neurological recovery and early complications. *Arch Orthop Trauma Surg*. 133:1401-1405, 2013.
 - 16) Newton D, England M, Doll H, Gardner BP. The case of early treatment of dislocations of the cervical spine with cord involvement sustained playing rugby. *J Bone Joint Surg Br*; 93-B:1646–52, 2011
 - 17) Lammertse D, Tuszynski MH, Steeves JD, Curt A, Fawcett JW, *et al*. Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP panel: clinical trial design. *Spinal Cord*.45(3):232-242, 2007.
 - 18) Steeves JD, Lammertse D, Curt A, Fawcett JW, Tuszynski MH, *et al*. Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury (SCI) as developed by the ICCP panel: clinical trial outcome measures. *Spinal Cord*. 45(3):206-21, 2007.
 - 19) Alexander MS, Anderson KD, Biering-Sorensen F, Blight AR, Brannon R, *et al*. Outcome measures in spinal cord injury: recent assessments and recommendations for future directions.

Spinal Cord. 47(8):582-91, 2009.

- 20) Hadley MN, Walters BC, Aarabi BZ, Dhall SS, Gelb DE, *et al.* Clinical assessment following acute cervical spinal cord injury. *Neurosurgery* 72: 40-53, 2013.
- 21) van Middendorp J J, Hosman AJ, Pouw MH, EM-SCI Study Group, and Van de Meent, H. ASIA impairment scale conversion in traumatic SCI: is it related with the ability to walk? A descriptive comparison with functional ambulation outcome measures in 273 patients. *Spinal Cord* 47: 555–560, 2009
- 22) Gündoğdu İ, Akyüz M, Öztürk EA, Çakıcı FA. Can spinal cord injury patients show a worsening in ASIA impairment scale classification despite actually having neurological improvement? The limitation of ASIA Impairment Scale Classification. *Spinal Cord* 52: 667-670, 2014.
- 23) Kramer JL, Lammertse DP, Schubert M, Curt A, Steeves JD. Relationship Between Motor Recovery and Independence After Sensorimotor-Complete Cervical Spinal Cord Injury. *Neurorehabil Neural Repair* 26: 1064-71, 2012
- 24) Management of Safety Information from Clinical Trials : Report of CIOMS Working Group VI, 2005
- 25) MedDRA® TERM SELECTION: POINTS TO CONSIDER, 2013

・臨床試験の実施に関する ICH ガイドラインに関する主な通知及び事務連絡

1. ICH-E3 : 「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ついて」(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)、「「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)について」(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)
2. ICH-E4 : 「「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」について」(平成 6 年 7 月 25 日付け薬審第 494 号厚生省薬務局審査課長通知)
3. ICH-E5 : 「外国で実施された医薬品の臨床試験データの取扱いについて」(平成 10 年 8 月 11 日付け医薬発第 739 号厚生省医薬安全局長通知)、「「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の指針」に関する Q&A について」(平成 16 年 2 月 25 日付け厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡)、「「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の指針」に関する Q&A について(その 2)」(平成 18 年 10 月 5 日付け厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡)
4. ICH-E7 : 「「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)、「「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 日付厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡）

5. ICH-E8：「臨床試験の一般指針」について」（平成 10 年 4 月 21 日付け医薬審第 380 号厚生省医薬安全局審査管理課長通知）
6. ICH-E9：「臨床試験のための統計的原則」について」（平成 10 年 11 月 30 日付け医薬審第 1047 号厚生省医薬安全局審査管理課長通知）
7. ICH-E10：「臨床試験における対照群の選択とそれに関連する諸問題」について」（平成 13 年 2 月 27 日付け医薬審発第 136 号厚生労働省医薬局審査管理課長通知）
8. ICH-E14：「非抗不整脈薬における QT/QTc 間隔の延長と催不整脈作用の潜在的可能性に関する臨床的評価について」（平成 21 年 10 月 23 日付け薬食審査発 1023 第 1 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知）、 「非抗不整脈薬における QT/QTc 間隔の延長と催不整脈作用の潜在的可能性に関する臨床的評価」に関する Q&A について」（平成 29 年 5 月 23 日付け厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課事務連絡）
9. ICH-E17：「国際共同治験の計画及びデザインに関する一般原則に関するガイドラインについて」（平成 30 年 6 月 12 日付け薬生薬審発 0612 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長通知）
10. ICH-M3：「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」について」（平成 22 年 2 月 19 日付け薬食審査発 0210 第 4 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知）、 「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」に関する質疑応答集（Q&A）について」（平成 24 年 8 月 16 日付け厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡）

・その他臨床試験の実施にあたり参照すべき主な通知及び事務連絡

1. 「医薬品の臨床薬物動態試験について」（平成 13 年 6 月 1 日付け医薬審発第 796 号厚生労働省医薬局審査管理課長通知）
2. 「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」について」（平成 30 年 7 月 23 日付け薬生薬審発 0723 第 4 号厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長通知）
3. 「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 日付け薬食審査発第 0928010 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知）

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 3¹ 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^{2,3}、及び培養上清中の H3+ポドカリキシンを検出する方法⁴、ラミニン 521 によるヒト多能性幹細胞直接培養増幅法⁵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^{2,3}、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⁵。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²。

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^{scid} Il2rg^{tm1Sug}/Jic マウス（以下「NOG マウス」という。）⁶、NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ マウス（以下「NSG マウス」という。）⁷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^{8,9,10}。C.Cg-Rag2^{tm1Fwa} Il2rg^{tm1Sug}/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^{11,12}。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¹⁰。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^{8,10,13,14}。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^{15,16}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_{min} : 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_{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_{min} 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_{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⁸。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^{17,18} や、軟寒天コロニー形成試験^{2,8} 又はデジタル軟寒天コロニー形成試験¹⁹ 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⁶、NSG マウス⁷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^{8,9,10}。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^{8,10,13,14}。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^{11,12}。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^{8, 10}。

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_{min} 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)¹ 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⁸。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^{20,21}。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^{20,21}、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⁶、NSG マウス⁷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^{8,9,10}。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^{11,12}、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²²。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^{10,14,23}。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あることに留意し、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 TPD₅₀、TPD_{min} 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_{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⁸。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^{8,10,13,14}、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²⁴。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^{25,26} 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_{min} 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⁸。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 3¹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²⁷、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²⁸、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²⁹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があることも知られている³⁰。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^{31,32}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^{33,34}では *in vitro* 培養時に細胞の不老化が確認されている。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 as 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
2. Kuroda T *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: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 γ 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^{null} IL-2R γ ^{null} 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/ γ_C^{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 γ^{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"> ◆ 直接的 ◆ 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 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 短時間 ◆ 個々の細胞を解析し、マーカー分子の発現量を評価可能 ◆ 簡便 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 迅速 ◆ 高感度 ◆ 簡便
欠点・留意点	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 費用と時間がかかる ◆ 専用動物施設が必要 ◆ スループットが低い ◆ 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 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 間接的 ◆ ゲーティングが結果に影響 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 間接的 ◆ 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
検出能力又は検出限界 (下線)	hRPE2.5 × 10 ⁵ 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	hRPE 中の 0.1% の ヒト iPS 細胞 (マーカー : TRA-1-60)	hRPE 中の 0.002% 以下の ヒト iPS 細胞 (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"> ◆ 迅速 ◆ 簡便 ◆ 高感度 ◆ 間接的 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 細胞非破壊的 ◆ 簡便 ◆ 高スループット 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 直接的 ◆ 簡便 ◆ 残存 iPS 細胞の特性解析が可能
欠点・留意点	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 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 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 間接的 ◆ 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 ◆ 培地成分が結果に影響 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 時間がかかる ◆ スループットが低い
検出能力又は検出限界 (下線)	ヒト心筋細胞中の <u>0.001%</u> のヒト iPS 細胞 (マーカー : <u>LIN28</u>)	HEK293T 細胞中の <u>0.05%</u> のヒト iPS 細胞 (マーカー : H3+ポドカリキシン)	hMSC 中の <u>0.01~0.001%</u> のヒト iPS 細胞 ヒト胚葉体中の <u>0.1~0.01%</u> のヒト iPS 細胞
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"> 直接的 高感度 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 	<ul style="list-style-type: none"> 安価 悪性形質転換細胞を単離・特性解析できる 	<ul style="list-style-type: none"> 高感度 悪性形質転換細胞を単離・特性解析できる 	<ul style="list-style-type: none"> 安価 簡便 悪性形質転換細胞以外の不死化細胞も幅広く検出
欠点・留意点	<ul style="list-style-type: none"> 費用と時間がかかると専用動物施設が必要 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 <i>in vivo</i> 造腫瘍性を示さない不死化細胞は検出不能 	<ul style="list-style-type: none"> 造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断 浮遊系細胞には使えない 悪性形質転換細胞以外の不死化細胞は検出不能 	<ul style="list-style-type: none"> 造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断 浮遊系細胞には使えない イメージスキャナーが高価 悪性形質転換細胞以外の不死化細胞は検出不能 	<ul style="list-style-type: none"> 造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断 悪性形質転換細胞の有無を区別できない
検出能力 又は 検出限界 (下線)	hMSCに1/10 ⁶ (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 ³ (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 ⁷ (0.00001%)の割合で混在するHeLa細胞	hMSCに1/10 ⁶ (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 ⁵ (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グ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でコラーゲングルから剥離させる。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 μ Lのマトリゲルと混合又は200 μ 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-17/1cr-*scid/scid*Jcl)、NOD-SCIDマウス (NOD/ShiJic-*scid*Jcl) 又はNOGマウス (NOD/ShiJic-*scid*、

IL-2R γ 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 1×10^6 個のヒトiPS細胞由来RPE細胞を、200 μ Lのマトリゲルと混合又は200 μ 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 μ 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'-AAGTCGCGGCCGCTTGCAGTGAGCCGAGAT-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>	CACGGTGGGGCATCTG	CCTTCCATGTGCAGCTTACTC	
<i>POU5F1</i>	GAAACCCACACTGCAGCAGA	TCGCTTGCCTTCTGGCG	
<i>BEST1</i>	ATCAGAGGCCAGGCTACTACAG	TCCACAGTTTCCCTCCTCACTT	
<i>CRALBP</i>	GACTGGGGTTAAATCTCACAGC	TGACATGTTGCCTATGGAAGAC	
<i>PAX6</i>	TTAACACACTTGAGCCATCACCC	AAATCTCGGATGTCTGTCCACT	
<i>TYR</i>	AGCCCAGCATCATCTTCTC	GGCGTTCCATTGCATAAAGA	
<i>GAPDH</i>	CGATGCTGGCGCTGAGTAC	CCACCAC TGACACGTTGGC	
Probes and primers for qRT-PCR			
Gene	Probe sequence (5'→3')	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
<i>LIN28A</i>	CGCATGGGGTTCGGCTTCCGTGTC	CACGGTGGGGCATCTG	CCTTCCATGTGCAGCTTACTC
<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 (μL)
2 × One-Step RT-ddPCR Supermix	1 ×	10
25 mM Manganese	1 ×	0.8
50 μM Forward Primer	0.75 μM	0.3
50 μM Reverse Primer	0.75 μM	0.3
50 μM Probe	0.25 μM	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/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。

2.3 PCR tube に PCR mixture を 15 μL/ウェルずつ添加する。

2.4 RNA 溶液を 5 μL/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 5×10^6 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 1×10^6 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°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°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、必ず培地のみのウェルも作成する。
- ・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 μL /ウェル×洗浄 12 回 × 8 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 μL に陽性コントロール 5 μL を添加後ボルテックスで混合して、50 μL /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 μL /ウェル × 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 μL /ウェル × 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 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 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、 1×10^5 個の MSC 中に 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10 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、 6×10^5 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%CO₂ で培養する。(hMSC が 1×10^5 の場合は 35 mm ディッシュ (又は 6 ウェルプレート)、 6×10^5 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%CO₂ 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 γ 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) 1×10^6 個の hMSC に 10 個 (0.001%)、 1×10^2 個 (0.01%)、 1×10^3 個 (0.1%)、 1×10^4 個 (1%) 個の HeLa 細胞を混入する。2) 1×10^7 個の hMSC に 10 個 (0.0001%)、 1×10^2 個 (0.001%)、 1×10^4 個 (0.1%) 個の HeLa 細胞を混入する。移植用の細胞懸濁液は、100 μ 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 γ KO Jic) の背部皮下に、25G 針付きの 1 mL シリンジを用いて 100 μ 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 (mm^3) は、長径 (mm) \times 短径² (mm)² \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 (TPD₅₀) 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 1×10^7 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 1×10^7 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シ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 μ L (10% FBS 含有 1 × DMEM 培地)
細胞/軟寒天層 75 μ 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 μ 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 μ 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 × 10⁴ 個の細胞を播種する場合、4 × 10⁵ 個/mL の濃度で懸濁液を調製しておく→1 × 10⁴ 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% CO₂ 濃度環境のインキュベーターで 30 日間培養する。

2.2 ハイコンテンツ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% CO₂ 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、 $10\ \mu\text{L}$ 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×DMEM培地と混ぜ合わせる（例： 2.5×10^6 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×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 μL 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ⁿ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 ⁷ 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 1×10^6 個の hMSC に、それぞれ 1×10^3 個 (0.1%)、 1×10^2 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 1×10^6 個の ADSC に、それぞれ 1×10^3 個 (0.1%)、 1×10^2 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。 1×10^6 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。