

令和二年度

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

奈良県立医科大学 消化器内科学講座

吉治 仁志

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
令和二年度委員名簿
- II. 令和二年度会議議事概要
- III. ヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞加工製品を用いた非代償性肝硬変の
治療に関する評価指標（案）
- IV. ヒト（同種）脂肪組織由来間葉系幹細胞加工製品を用いた非代償性肝硬変
の治療に関する評価指標（案）
- V. ヒト（自己）末梢血 CD34 陽性細胞加工製品を用いた非代償性肝硬変の
治療に関する評価指標（案）
- VI. 調査事項
 - 1. 肝硬変症に対する他家脂肪組織由来間葉系幹細胞治験 寺井 崇二
 - 2. 用語集 鍛冶 孝祐
- VII. 参考資料
 - 1. 平成 24 年 9 月 7 日付薬食発 0907 第 2 号厚生労働省医薬食品局長通知「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関する指針」
 - 2. 平成 24 年 9 月 7 日付薬食発 0907 第 3 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関する指針」
 - 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」
 - 4. 平成 28 年 2 月 4 日付障発 0204 第 1 号厚生労働省社会・援護局障害保健福祉
部長通知「「身体障害者障害程度等級表の解説（身体障害認定基準）について」
の一部改正について」

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 令和二年度委員名簿

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令和二年度委員名簿

座長

吉治仁志 奈良県立医科大学 消化器内科 教授

委員（五十音順）

梅澤明弘 国立成育医療研究センター 研究所 副所長
鍛冶孝祐 奈良県立医科大学 消化器内科 講師
酒井佳夫 金沢大学 医薬保健研究域医学系 准教授
高見太郎 山口大学大学院医学系研究科 消化器内科学 准教授
土屋淳紀 新潟大学医歯学総合病院 消化器内科 講師
中村 徹 久留米大学医学部 内科学講座 消化器内科 講師
中本安成 福井大学学術研究院医学系部門 内科学(2)分野 教授
日浅陽一 愛媛大学大学院 消化器・内分泌・代謝内科学 教授
疋田隼人 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学 講師

厚生労働省

高梨文人 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
佐々木佳名子 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
医療機器規制国際調整官／新医療材料専門官
柳澤真央 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
丸智香子 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

独立行政法人医薬品医療機器総合機構

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
河西翔平 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

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

国立医薬品食品衛生研究所（事務局）

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

II. 令和二年度 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 2 年度第一回会議議事録（概要）

1. 開催日時：2020 年 10 月 23 日（金）15 時 30 分～17 時 30 分

2. 開催場所：オフィス東京 L4 会議室

3. 出席者（座長以下五十音順・敬称略）

委員：吉治仁志（奈良県立医科大学）、梅澤明弘*（国立成育医療研究センター研究所）、鍛冶孝祐*（奈良県立医科大学）、酒井佳夫（金沢大学）、高見太郎*（山口大学）、土屋淳紀（新潟大学）、中村徹（久留米大学）、中本安成（福井大学）、日浅陽一*（愛媛大学）、疋田隼人（大阪大学）

新潟大学：寺井崇二

厚生労働省：柳澤真央

医薬品医療機器総合機構：國枝章義、河西翔平

産業技術総合研究所：廣瀬志弘*

事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：佐藤陽治、澤田留美、河野健、草川森士

*Web 参加

4. 配布資料

1. 令和二年度第一回委員会議事次第

2. 令和二年度委員名簿

3. 次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業について

4. 再生医療審査 WG 令和元年度報告とこれまでの評価指標の内容について

5. 寺井先生プレゼン資料

6. 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 30 年 7 月 25 日付薬生機審発 0725 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「ヒト(同種)表皮(皮膚)再生に関する評価指標」

7. 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関する指針

8. 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関する指針

令和元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 柳澤主査より説明があった。
- ②令和元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2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

吉治仁志 奈良県立医科大学 消化器内科 教授

委員（五十音順）

梅澤明弘 国立成育医療研究センター 研究所 副所長

鍛冶孝祐 奈良県立医科大学 消化器内科 講師

酒井佳夫 金沢大学 医薬保健研究域医学系 准教授

高見太郎 山口大学大学院医学系研究科 消化器内科学 准教授

土屋淳紀 新潟大学医歯学総合病院 消化器内科 講師

中村 徹 久留米大学医学部 内科学講座 消化器内科 講師

中本安成 福井大学学術研究院医学系部門 内科学(2)分野 教授

日浅陽一 愛媛大学大学院 消化器・内分泌・代謝内科学 教授

疋田隼人 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学 講師

- ④新潟大学 寺井先生より「肝硬変症に対する他家脂肪組織由来間葉系幹細胞治療」について講演頂いた。

- ⑤令和元年度の活動方針について討議した。

- ・今年度は非代償性肝硬変の治療を目的とした、ヒト（自己）（同種）間葉系幹細胞、ヒト（自己）末梢血 CD34 陽性細胞を使用した再生医療等製品の評価指標（案）を作成する。細胞の形態としては、凍結製品を含む細胞懸濁液等、投与方法としては静脈または動脈内投与を想定して作成することとなった。

- ・専門外の人が読んでも理解できるように、肝臓治療分野の専門用語を解説する用語集を第二回会議までに作成する（鍛冶委員）。作成した用語集は評価指標案の「用語の定義」とは別で報告書に掲載する。

- ・第二回会議までの作業分担について話し合った。担当は以下の通り。

4. 用語の定義：鍛冶委員

細胞ソース毎の 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 (6) 非臨床試験 (7) 臨床試験 (治験) に関して、

ヒト (自己) 間葉系幹細胞：高見委員

ヒト (同種) 間葉系幹細胞：土屋委員

ヒト (自己) 末梢血 CD34 陽性細胞：中村委員

3つの細胞ソースの (6) 非臨床試験 (7) 臨床試験 (治験) に関して、全体を通しての確認・追加：疋田委員

全体を通しての内容確認：梅澤委員、酒井委員、中本委員、日浅委員

作成したドラフトを第二回会議の 2 週間前 (12 月 11 日) を目処に事務局に送り、その後、事務局で取りまとめ、第二回会議までに委員に一読頂く。

⑥今後の会議日程

第二回会議：令和 2 年 12 月 25 日 (金) 15～17 時 オフィス東京 L4 会議室

第三回会議：令和 3 年 1 月 25 日 (月) 15～17 時 オフィス東京 L4 会議室

第四回会議：令和 3 年 2 月 12 日 (金) 15～17 時 オフィス東京 L4 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 令和二年度第二回会議議事録（概要）

2. 開催日時：2020年12月25日（金）15時00分～17時00分

2. 開催場所：オフィス東京 L4 会議室

3. 出席者（座長以下五十音順・敬称略）

委員：吉治仁志（奈良県立医科大学）、梅澤明弘（国立成育医療研究センター研究所）、
鍛冶孝祐*（奈良県立医科大学）、酒井佳夫（金沢大学）、高見太郎*（山口大
学）、土屋淳紀（新潟大学）、中村徹*（久留米大学）、中本安成（福井大学）、
日浅陽一*（愛媛大学）、疋田隼人（大阪大学）

厚生労働省：高梨文人、丸智香子

医薬品医療機器総合機構：國枝章義*、河西翔平*

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、草川森士

*Web 参加

4. 配布資料

1. 令和二年度第二回委員会議事次第
2. 令和二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:スコープと今後の検討事項の確認
4. 評価指標(案)「ヒト(自己)間葉系幹細胞」
5. 評価指標(案)「ヒト(同種)間葉系幹細胞」
6. 評価指標(案)「ヒト(自己)末梢血 CD34 陽性細胞」
7. 用語集
8. 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30年7月25日付
薬生機審発 0725 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「ヒト(同種)表皮(皮膚)再生に関する評価指標」
9. 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関する指針
10. 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4「ヒト（自己）間葉系幹細胞」、資料5「ヒト（同種）間葉系幹細胞」、資料6「ヒト（自己）末梢血 CD34 陽性細胞」について、全員で討議した。討議内容は以下の通り。

- ・（自己）間葉系幹細胞、（同種）間葉系幹細胞、（自己）末梢血 CD34 陽性細胞の細胞ソース毎に、独立した3つの評価指標案を作成する。

- ・評価指標案の対象を非代償性肝硬変としているが、範囲が広く、既存の治療法でも対応可能な部分があるので、範囲を明確にする。その際に、厚生労働省の身体障害者の基準等を参考にし、それぞれの製品の対象範囲の案を出し、第三回会議で議論する。

- ・造腫瘍性試験は2019年の造腫瘍性試験に関するガイドラインを参考に、同種のみにするか検討する。

- ・臨床有効性評価に関して、肝硬変診療ガイドライン等を参考に、それぞれの製品の評価基準の案を出し、第三回会議で議論する。

- ・肝疾患の方は発がん率が高いので、肝がんの既往のある人を除外する、安全性評価で発がんに関するデータを取るような形にする等を検討し、第三回会議で議論する。

- ・今回の議論を踏まえ、高見委員、土屋委員、中村委員にそれぞれの評価指標案を作成いただく。3つで共通部分に関しては鍛冶委員も加わっていただき、まとめることとなった。鍛冶委員には、評価指標案に入れる用語の定義の案も作成いただく。できたドラフトは、第三回会議の1週間前を目処に事務局に送っていただき、全委員が確認して、第三回会議で議論する。

③今後の会議日程

第三回会議：令和3年1月25日(月)15～17時 ~~オフィス東京 L4会議室~~ Web開催

第四回会議：令和3年2月12日(金)15～17時 ~~オフィス東京 L4会議室~~ Web開催

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 令和二年度第三回会議議事録（概要）

3. 開催日時：2021年1月25日（金）15時00分～17時00分

2. 開催場所：Web開催

3. 出席者（座長以下五十音順・敬称略）

委員：吉治仁志（奈良県立医科大学）、梅澤明弘（国立成育医療研究センター研究所）、
鍛冶孝祐（奈良県立医科大学）、酒井佳夫（金沢大学）、高見太郎（山口大学）、
土屋淳紀（新潟大学）、中村徹（久留米大学）、中本安成（福井大学）、日浅陽
一（愛媛大学）、疋田隼人（大阪大学）

厚生労働省：柳澤真央

医薬品医療機器総合機構：國枝章義、河西翔平

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、草川森士

4. 配布資料

1. 令和二年度第三回委員会議事次第
2. 令和二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:スコープと今後の検討事項の確認
4. 評価指標(案)「ヒト(同種)間葉系幹細胞」
5. 評価指標(案)「ヒト(自己)間葉系幹細胞」
6. 評価指標(案)「ヒト(自己)末梢血 CD34 陽性細胞」
7. 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「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」
8. 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30年7月25日付
薬生機審発 0725 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「ヒト(同種)表皮(皮膚)再生に関する評価指標」
9. 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関する指針
10. 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関する指針

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後の検討事項の確認がなされた。

②資料4「ヒト（同種）間葉系幹細胞」、資料5「ヒト（自己）間葉系幹細胞」、資料6「ヒト（自己）末梢血 CD34 陽性細胞」について、全員で討議した。討議内容は以下の通り。

- ・対象疾患は非代償性肝硬変で治療介入 90 日以上の評価で Child-Pugh スコア 7 点以上 (class B, C)。
- ・(血清のアルブミンが特に 3.5 g/dL 未満が存続する症例) の記載は削除する。
- ・「発がん」に関しては、安全性の評価の中に書き込む。
- ・PT について活性値 (%) と NR の両方の手法で評価する旨を記載する。
- ・無菌試験、エンドトキシン試験は全ての評価指標に書き込む
- ・(5) 非臨床試験の①一般毒性試験の前の序文は全ての評価指標に書き込む
- ・タイトル及び用語の定義について、評価指標案の内容を確認後に作成する（第四回会議にて）。
- ・土屋委員、高見委員、中村委員に今回の議論を踏まえ、それぞれの評価指標案を修正いただき、2月8日（月）までに事務局にお送りいただく。
- ・鍛冶委員に用語の定義のドラフトを作成いただく。

③今後の会議日程

第四回会議：令和3年2月12日(金)15～17時 ~~オフィス東京-L4会議室~~ Web開催

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 令和二年度第四回会議議事録（概要）

4. 開催日時：2021年2月12日（金）15時00分～17時00分

2. 開催場所：Web開催

3. 出席者（座長以下五十音順・敬称略）

委員：吉治仁志（奈良県立医科大学）、鍛冶孝祐（奈良県立医科大学）、酒井佳夫（金沢大学）、高見太郎（山口大学）、土屋淳紀（新潟大学）、中村徹（久留米大学）、中本安成（福井大学）、日浅陽一（愛媛大学）、疋田隼人（大阪大学）

厚生労働省：丸智香子

医薬品医療機器総合機構：國枝章義、河西翔平

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、草川森士

4. 配布資料

1. 令和二年度第四回委員会議事次第
2. 令和二年度第三回委員会議事録(概要)
3. 評価指標(案)作成にあたって:スコープと今後の検討事項の確認
4. 評価指標(案)「ヒト(同種)間葉系幹細胞」
5. 評価指標(案)「ヒト(自己)間葉系幹細胞」
6. 評価指標(案)「ヒト(自己)末梢血 CD34 陽性細胞」
7. 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「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」
8. 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30年7月25日付薬生機審発 0725 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「ヒト(同種)表皮(皮膚)再生に関する評価指標」
9. 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関する指針
10. 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関する指針

5. 議事内容

①事務局より第三回会議の議事録（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4「ヒト（同種）間葉系幹細胞」、資料5「ヒト（自己）間葉系幹細胞」、資料6「ヒト（自己）末梢血 CD34 陽性細胞」について、全員で討議した。討議内容は以下の通り。

- ・ Child-Pugh スコアの評価のプロトロンビン時間（PT）について、エントリーの際には活性値（%）、臨床評価の際には活性値（%）と国際標準比（INR）の両方の手法で評価する。

- ・ 対象疾患においても、腹水、肝性脳症について記述する。

- ・ 臨床試験への「登録」か「組入れ」かについて、事務局がこれまでの評価指標での表現を確認する。

- ・ 土屋委員、高見委員、中村委員に今回の議論を踏まえ、それぞれの評価指標案を修正いただき、事務局にお送りいただく。

- ・ 今後はメールベースで修正等を行い、最終案をまとめる。

III. ヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞加工製品を用いた

非代償性肝硬変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) 非臨床試験
 - (6) 臨床試験（治験）
6. 参考文献
7. 参考資料

ヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞加工製品を用いた非代償性肝硬変の治療に関する評価指標（案）

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（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性を確保するための基本的な技術要件は、平成24年9月7日付け薬食発0907第2号厚生労働省医薬食品局長通知（以下「ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の指針」という。）に定められているところである。本評価指標は、ヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞加工製品のうち特に非代償性肝硬変の治療を目的として適用される再生医療等製品について、上述の基本的な技術要件に加えて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（自己）骨髄由来間葉系幹細胞加工製品が非代償性肝硬変の治療を目的とし適用される際の、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（自己）骨髄由来間葉系幹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、申請内容等に対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

本評価指標における用語の定義は、「ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の指針」の定義による他、以下のとおりとする。

- （1）肝硬変：B型肝炎、C型肝炎、アルコール、自己免疫疾患、代謝異常、胆汁うっ滞などに起因する慢性炎症によって肝傷害が繰り返された結果、肝細胞が壊死して再生していく過程において線維組織が増生し、肝機能が低下した状態、すなわち慢性肝疾患の終末像の病態を指す。

(2) 非代償性肝硬変：肝硬変のうち、比較的肝機能が保たれ、臨床症状がほとんどない代償性肝硬変に対して、肝性脳症、黄疸、腹水、浮腫、出血傾向など肝不全に起因する症状が出現するものを非代償性肝硬変と称する。なお、本指標では(3)で示す Child-Pugh スコア 7 点以上を非代償性肝硬変の目安とすることが多い。

代償性肝硬変と非代償性肝硬変	
1) 代償性肝硬変	<ul style="list-style-type: none"> *肝機能がよく保たれており、臨床症状はほとんどない。 *肝脾腫、クモ状血管腫、手掌紅斑、食道静脈瘤などが存在していても無症候の場合は代償性とする。
2) 非代償性肝硬変	<ul style="list-style-type: none"> *肝性脳症、黄疸、腹水、浮腫、出血傾向など、肝不全に起因する症状が出現する。 *治療を行わない状態で分類し、治療後に無症候性になった症例も非代償性とする。 *現在あるいは以前に非代償性肝硬変であることを次のいずれかの基準で判定する。 Child-Pugh score 7点 (分類B) 以上 「非代償性肝硬変の対象医療行為」[#]の治療歴を現在あるいは以前に有する。
[#] 腹腔穿刺、胸水・腹水濾過濃縮再静注法、内視鏡的食道・胃静脈瘤結紮術、などの肝不全および肝硬変合併症に対する治療。(腹水・肝性脳症・低栄養に対する内服薬治療などを含むものとする。)	

上図：日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン 2020 (改定第 3 版) より改訂

(3) Child-Pugh スコア：肝硬変の機能評価法であり、①肝性脳症(なし：1 点、軽度：2 点、昏睡：3 点)、②腹水(なし：1 点、軽度：2 点、中等量以上：3 点)、③血清ビリルビン値 (mg/dL) (2.0 未満：1 点、2.0～3.0：2 点、3.0 超：3 点)、④血清アルブミン値 (g/dL) (3.5 超：1 点、2.8～3.5：2 点、2.8 未満：3 点)、⑤プロトロンビン時間活性値 (%) (70 超：1 点、40～70：2 点、40 未満：3 点) の 5 項目における点数の合計で評価する。点数により class A (5～6 点)、class B (7～9 点)、class C (10～15 点) に分類され、上述の通り 7 点以上 (class B、C) を非代償性肝硬変と定義する。

Child-Pugh分類			
評点	1点	2点	3点
肝性脳症	なし	軽度 (I～II)	昏睡 (III～IV)
腹水	なし	軽度	中等度以上
血清ビリルビン値 (mg/dL)*	<2	2～3	>3
血清アルブミン値 (g/dL)	>3.5	2.8～3.5	<2.8
プロトロンビン時間活性値 (%)	>70	40～70	<40
国際標準比 (INR)**	<1.7	1.7～2.3	>2.3
	class A	5-6点	
	class B	7-9点	
	class C	10-15点	
*血清ビリルビン値は、胆汁うっ滞 (原発性胆汁性胆管炎) の場合は、4.0 mg/dL未満を 1 点とし 10 mg/dL 以上を 3 点とする。			
**INR: international normalized ratio			

下図：日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン 2020 (改定第 3 版) より改訂

- (4) 間葉系幹細胞：中胚葉性組織(間葉)に由来する体性幹細胞の一種であり、①プラスチック培養容器に接着する、②CD105, CD73, CD90 が陽性かつ CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, HLA-Class II (DR) が陰性、③間葉系細胞(骨、脂肪、軟骨)への分化能を有する、の3条件を満たすものと定義する。脂肪組織、骨髄、臍帯、歯髄から分離することが可能である。また MHC Class-II を発現せず、サイトカインや増殖因子を分泌する等の作用で免疫調整機能を持ち、組織再生・修復を促進するなどの特徴を示す(文献1)。
- (5) MELD スコア：(Model for End-Stage Liver Disease)スコア：12歳以上の非代償性肝硬変患者の短期予後予測および肝移植適応の判断に用いられる予測式である。①血清ビリルビン値、②プロトロンビン時間-国際標準化比(PT-INR)、③血清クレアチニン値の3項目より算出される。
- MELD スコア = $9.571 \ln(\text{血清クレアチニン値 mg/dl}) + 3.781 \ln(\text{血清ビリルビン値 mg/dl}) + 11.201 \ln(\text{PT-INR (血液凝固能)}) + 6.43$ にて算出されるスコア。
- (6) 原材料：再生医療等製品の製造に使用する原料又は材料の由来となるものをいう。(生物由来原料基準(平成15年厚生労働省告示第210号)の定義と同じ)
- (7) 原料等：原料若しくは材料又はそれらの原材料をいう。(生物由来原料基準(平成15年厚生労働省告示第210号)の定義と同じ)
- (8) クロスコンタミネーション：サンプル間の混入のこと。交叉汚染とも呼ばれる。製造に用いられる原料の間、中間体の間等での混入を意味する。例えば、あるセル・バンクに由来する細胞に別のセル・バンクに由来する細胞が混入する場合や、ウイルス不活化後の原料に不活化前の原料が混ざってしまう場合等が挙げられる。

5. 評価に当たって留意すべき事項

本評価指標は、ヒト(自己)間葉系幹細胞を含む骨髄組織(液)を原料として製造所に受け入れ、これを製造所において、加工して製造された細胞を自己の非代償性肝硬変の治療を目的として肝臓に適用することを想定している。

(1) 原料等

原料(自己のヒト骨髄組織(液))及び材料(ウシ血清や培地等)、さらにそれらの製造に用いられる原材料の管理項目については、最終製品に求められる品質が確保できるよう設定することが原則となるが、その原料等を用いても最終製品に安全上の懸念が生じないよう、原料等の品質(無菌性、不純物等)についても考慮し設定することが求められる。ウイルス等の外来性感染性物質の混入リスクについては、「生物由来原料基準」に基づいて必要な情報を得た上で、そのリスクが管理できるよう管理項目を設定する。「生物由来原料基準」の規制対象となる原料等の範囲は、「生物由来原料基準の運用について」(平成26年10月2日付け薬食審査発10021第1号厚生労働省医薬食品局審査管理課長、薬食機参発1002号第5号厚生労働省大臣官房参事官(医療機器・再生医療等製品審査管理担当)通知)を参

照すること。

① ドナーの選択基準、適格性

ヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞を用いる場合は、ドナーがレシピエントになるため、必ずしも当該者のスクリーニングを必要としないが、クロスコンタミネーション防止や製造者の安全性対策の観点から、B 型肝炎ウイルス (HBV)、C 型肝炎ウイルス (HCV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV)、およびパルボウイルス B19 について検査（血清学的試験や核酸増幅法等）の実施を考慮すること。

また、次に掲げるものについては既往歴、問診等の診断を行い、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
- ・伝達性海綿状脳症及びその疑い並びにその他の認知症
- ・原料となる細胞・組織の採取が困難となる病態（易出血性等）

② ヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞を含む組織の採取

ヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞を含む組織（液）の採取部位の選定理由、採取方法を示し、これらが科学的及び倫理的に適切に選定されたものであることを明らかにすること。採取方法については、用いられる器具、微生物汚染防止、取り違え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。

(2) 製造工程において特に注意が必要な事項

最終製品であるヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞加工製品の製造にあたっては、製造方法を明確にし、可能な範囲でその妥当性を以下の項目で検証し、一定の品質を保持すること。

① 製造方法

ヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞を含む組織（液）の製造所への受入れから、ヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞の培養工程等を経て、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

採取したヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞を含む組織（液）について、製造所への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、細胞の生存率、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。また、(ア)組織運搬状況の確認（断熱容器に封印されているか、発送から何時間かかっているか等）及び(イ)ヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞を含む組織の外観の確認（運搬用チューブの破損・液漏れはないか、ヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞を含む

組織（液）が運搬液中に浸漬されているか、運搬液に汚染が無いかなど）を行うこと。

b) 細菌、真菌及びウイルス等の不活化・除去

採取したヒトヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞を含む組織（液）について、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。

c) 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

最終製品であるヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞加工製品の製造に当たっては、製造工程中の取り違え及びクロスコンタミネーションの防止が重要であり、工程管理における防止対策を明らかにすること。

② 加工したヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞の特性解析

加工したヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞については、加工に伴う変化や目的外細胞の混入を調べるために、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、その他適切な表現型（表面マーカーCD73, CD90, CD105等の発現）の指標を解析するとともに、必要に応じて機能解析（脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞への分化確認等）を行うこと¹⁾。ヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞を含む組織（液）からヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞を培養する場合、血球細胞、線維芽細胞、脂肪細胞等の混入が考えられる。

(3) 製品の品質管理

品質規格の設定について、治験を開始する前段階にあつては、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。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つては、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。

① 外観の確認

形状確認として、例えばヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞が倒立型顕微鏡での観察等により、細胞が紡錘状の形態をしていることを確認する。

② 細胞数及び生存率

細胞数を測定する方法としては、最終製品の細胞懸濁液（細胞塊の場合は、一部を酵素処理する）を、血球計算盤やセルカウンターで測定する方法がある。生細胞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、生細胞数及び死細胞数を計算することができる。

③ 確認試験

目的とする細胞の形態学的特徴、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質、その他適切な表現型の指標を選択して、目的とする細胞であることを確認すること。

④ 細胞の純度試験

目的細胞である間葉系幹細胞の割合を算出する試験方法及び判断基準を設定すること。例えば、適切な表現型（表面マーカーCD73, CD90, CD105等の発現）の指標を基に算定する。

⑤ 製造工程由来不純物試験

ウシ血清を使用する場合は、ウシ血清アルブミン残存試験の規格を設定し、実測値をもとに規格値を設定する。動物由来成分、抗生物質等に関しては、該当するアレルギー既往のあるドナーは、ドナーとして適格性があるか適切に検討すること。

(4) 製品の安定性試験

最終製品について、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、貯蔵方法及び有効期間を設定し、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、出発原料や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。空路輸送に関しては、気圧の変化やX線検査等による影響についても考慮すべきである。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) 非臨床試験

ヒト細胞加工製品については、動物試験において異種免疫反応が惹起される場合があること、またヒト細胞加工製品では、低分子医薬品等で実施されるような曝露評価もなじまないことなどから、量的なリスク評価は困難であり、非臨床安全性試験で得られる安全性情報は限定的と考えられる。したがって、このような限界を理解した上で、ヒト細胞加工製品の非臨床安全性試験を検討することが重要である。平成28年6月14日付け再生医療等製品（ヒト細胞加工製品）の品質、非臨床試験及び臨床試験の実施に関する技術的ガイダンスについて（薬機発第0614043号）等を参考とすること。

① 一般毒性試験

ヒト細胞に対する異種免疫反応を回避するために、免疫不全動物の利用が考えられる。用量は対照群と投与群の少なくとも2群で評価可能である。また、その際の最高用量は、

最大耐量、投与可能な最大量及び動物福祉を考慮し、可能な限り多くの細胞数を設定することが重要である。投与回数は可能な限り臨床で予定されている用法と同様とし、臨床適用経路で実施することが望ましい。観察期間については、全身毒性を評価可能と考える最短の期間である 14 日間程度とすることは可能であるが、POC (Proof-of-Concept) 試験等を参考に、適切な試験期間を設定する。

② 造腫瘍性試験

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／体性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（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（薬生機審発0627第1号））。

③ 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、対象疾患に対する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（自己）骨髄由来間葉系幹細胞加工製品として期待される臨床効果のを示すこと。モデル動物としては、四塩化炭素誘導肝硬変モデルマウス・ラット（イヌ）等が挙げられるが、最終製品の効力又は性能を示すための同様な妥当性のあるモデルである必要がある（肝硬変モデル動物での、抗炎症効果：aspartate aminotransferase; AST, alanine aminotransferase; ALT の低下など、肝機能改善効果アルブミンの上昇、総ビリルビン低下など、線維化抑制効果；Sirius Red 染色での線維面積の改善や Hydroxyproline の定量結果の改善などが示されることが望ましい）。最終製品の効力又は性能を発揮する作用機序について、検討することも望まれる。

（6）臨床試験（治験）

臨床データパッケージ及び治験実施計画書は、対象疾患、目的とする効能、効果又は性能、当該治療法に期待される臨床上の位置づけ等に応じて、非臨床データ等も踏まえて計画することが必要である。一般的に臨床試験においては盲検化の有無にかかわらず、臨床試験においてより科学的に有効性及び安全性の情報を収集するためには、内部対照群を設定した比較臨床試験が望ましいが、開発している再生医療等製品の臨床上の位置づけを踏まえた開発可能性を考慮して適切に計画されるべきである。例えば求められる評価項目（エンドポイント）も製品毎に設定する必要がある。医療現場における忍容性や倫理性を考慮し比較試験を行うことが原則であるが、非代償性肝硬変を対象としているため、単腕試験での評価も想定される。なお、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の RS 戦略相談又は治験相談等を利用することが望ましい。

① 臨床試験における評価技術に関する基本的考え方

臨床試験は被験者の人権の保護、安全及び福祉に関するリスク並びにデータの質に関

するリスクを最小限とし被験製品による効果が最大限に評価できるように計画されるべきである。特に目的とする細胞・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ことが推奨される。

評価項目に関しては、その最終目的に応じて主要評価項目 (Primary endpoint)、副次的評価項目 (Secondary endpoint) を設定する。有効性評価項目としては、細胞投与後一定期間での抗炎症・肝障害軽減効果、抗線維化効果、肝機能改善の状態を評価する事ができる項目が一部もしくは全部含むものが望ましい。

② 対象疾患

非代償性肝硬変：

肝硬変はC型肝炎、B型肝炎、非アルコール性脂肪肝炎、アルコール性、自己免疫性などの慢性的な肝障害により肝臓全体に再生結節が形成され、再生結節を線維性隔壁が取り囲む病変であり肝疾患の終末像といえる。肝硬変は肝機能がよく保たれ、臨床症状がほとんど出ない代償性肝硬変と肝性脳症、黄疸、腹水、浮腫、出血傾向など肝不全に起因する症状が出現する非代償性肝硬変に分けられる。一般に Child-Pugh B 以上 (Child-Pugh スコア 7 点以上または過去に非代償性肝硬変の既往、治療歴がある場合に) 非代償性肝硬変とすることが多い。

一般的に肝臓は非常に再生能力が高い臓器として知られているが、肝硬変になるに従いおこる肝機能低下、線維化形成に伴いその再生能力は低下していく。肝硬変に対して、特に代償性肝硬変においてはB型、C型肝炎ウイルス、アルコール、脂肪肝等原因介入により原因が解決されると線維化が改善すること、再生が起こることが知られているが、非代償性肝硬変ではより肝再生、線維化改善能力が落ちていき肝機能改善は乏しいことが知られている。現在、特に非代償性肝硬変に対しては既存の薬物療法に加え、新たな薬物療法の登場で、以前より肝予備能の改善が期待できる時代となっており、対象者の前提としてまずはこのような基本的な治療の介入が一定期間行われていることが望ましい。しかし、そのような治療介入にも関わらず一定期間 (厚生労働省の重度肝機能障害の身体障害認定では、90 日以上 (180 日以内) の間隔をおいた連続する2回の検査により評価している) 評価時点での Child-Pugh スコアが7点以上持続する症例に (血清のアルブミンが特に 3.5g/dL 未満が持続する症例) 関しては、能動的に再生促進、線維化改善を促す細胞療法などの新たな治療法の開発が望まれている。このような症例を臨床試験の対象患者とするのが適切である。また、肝硬変の特に進行例では肝移植は一般的に根本的に解決しうる治療として知られているが、本邦では脳死肝移植の機会は少なく生体肝移植に頼る現状があり、ドナーから提供を受けられる機会は限定されている。細胞治療はこのような背景を持つ患者にとって重要な治療機会になり得るとして期待されている。

非代償性肝硬変には、Child-Pugh C (肝機能高度低下症例) も含まれており、肝機能高度低下例の組み入れは、有害事象が起きた際に重篤になりやすい可能性があり特に注意を

要する。例えば、C型非代償性肝硬変患者に対する直接作用型抗ウイルス剤であるエプクルーサ®配合錠はChild-Pugh分類で13点以上の患者は除外する事が望ましいとされており、これは一つの指標として重要と考えられる。また、これは肝硬変一般に共通する事象であるが、肝硬変は肝細胞癌の発生母地で食道胃静脈瘤の合併もあることが知られているため、事前検査によるスクリーニング、投与後の経過観察は十分に行われる必要がある。

なお、Child-Pughスコアの評価にあたっては、後述の臨床有効性評価の項でも述べるが、プロトロンビン時間（PT）は2種類の評価指標（活性値：%と国際標準比：INR）で表す手法があることや、脳症や腹水の評価には主観が影響しやすいため、評価にあたっては一定の基準の策定が必要になる。PTは活性値（%）で評価を行う、腹水は原則として超音波検査、体重の増減、穿刺による排液量を勘案して見込まれる量が概ね1L以上を軽度（Child-Pughスコアで2点）、3L以上を中等度以上（Child-Pughスコアで3点）とする、脳症は犬山シンポジウムで制定された肝性脳症の昏睡度分類（なし：1点、軽度I～II度：2点、昏睡III度以上：3点）で評価される、ISHEN基準におけるCovert（不顕性）脳症は1点とするなど一定の基準の策定が望ましい。

③ 臨床有効性評価

ア. 臨床情報

臨床情報としては診察所見、血液所見、画像所見、肝生検所見等から目的に応じて必要な検査を選択して行く必要がある。なお、臨床試験の組み入れに関しては、一定期間（例えば、厚生労働省の重度肝機能障害の身体障害認定では3か月：90日以上、180日以内で継続していることを確認している）、既存の治療介入を行っても炎症、線維化、肝機能の変化がないことを確認しておく。さらに有効性を評価するに当たっては、新規薬剤の追加（アルブミン製剤、新鮮凍結血漿などを含む）内服薬の容量変更、腹水穿刺廃液などの処置などが加わると修飾される可能性もあることも考慮に入れる必要がある。

イ. 有効性の評価

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（文献2）。

細胞治療に伴い、肝機能及び線維化の変化が期待される。有効性を評価するにあたり適切な主要評価項目、副次評価項目の設定がなされている必要がある。そしてこれらは改善に一定の期間が必要と考えられるため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（例えば半年、もしくは一年）だけでなく、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。それぞれの評価に際し、ポイントとなり得る項目を下記に示す。

a) 肝機能(予備能)改善効果

有効性の評価としては、非常に重要で主要評価項目になりうる。肝機能は非常に多くの評価項目が有り、評価に当たっては、その特性を理解する事が重要である。代表的なものとして Child-Pugh 分類 (スコア) がある。これはアルブミン値、総ビリルビン値、PT、腹水、肝性脳症の数値もしくは評価を点数化して評価するシステムである。更に肝機能評価には Child-Pugh スコア同様に肝機能の指標から数値化した albumin-bilirubin (ALBI) スコアもしくは grade もある。その他に、肝機能改善に伴い、倦怠感、かゆみ、浮腫なども軽減する事があり、聞き取り調査、身体所見の評価も参考になる場合がある。その他にも MELD スコアがあり、これは総ビリルビン値、PT、血清クレアチニン値からスコアリングし、特に肝移植待機中の肝硬変における予後予測に関しての有用性が報告されている(文献3)。

b) 抗線維化効果

有効性の評価としては、重要な指標で主要もしくは重要な副次評価項目になりうる。血液マーカー検索、血液検査に基づく数式での評価、フィブロスキャン、超音波、MRI などを用いた肝硬度測定、肝生検での肝組織評価など多数が考えられる。一般的一つの検査のみでの評価では評価に一定の傾向を見るのが困難な場合が有り、複数を組み合わせることでの評価が望ましい。なお、非代償性肝硬変は出血傾向を呈しているため、非侵襲的検査で評価できれば肝生検は必須としないことも許容される。

また、評価としては副次的な評価項目に相当すると思われるが、血液検査による以下評価により抗炎症・肝障害軽減効果を評価できる。aspartate aminotransferase (AST) と alanine aminotransferase (ALT) が中心になる。更に alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP)等が評価の対象になりうる。

さらに、非代償性肝疾患関連イベント発生率(食道・胃静脈瘤出血、腹水、肝腎症候群、肝性脳症)や肝細胞癌発生や死亡イベントの追跡を同時に行う事も望まれる。Quality of Life の評価や肝臓、脾臓の体積の測定も、間接的な肝予備能、肝線維化改善、再生の指標になりうる。

なお、肝機能(肝予備能)の評価に当たってはなお、腹水や肝性脳症の評価には主観が影響しやすいため、評価の際には、PT の評価を含め一定の基準、専門医の評価等、一定の評価基準を作成する事が必要である。下記に評価に際し、潜在的に問題となり得る項目を示す。

腹水に関しては

腹水に関しては量的な評価を行う際の指標として、厚生労働省の重度肝機能障害の身体障害認定では、「腹水は原則として超音波検査、体重の増減、穿刺による排液量を勘案

して見込まれる量が概ね 1L 以上を軽度 (Child-Pugh スコアで 2 点)、3L 以上を中等度以上 (Child-Pugh スコアで 3 点) とする。」となっている。腹水は常に変動する可能性があり、治療が介入された時点での評価、例えば利尿剤投与されている患者でも腹水が消失していれば 1 点など一定の基準をもうけている事が望ましい。また、下記の日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン 2020 (改定第 3 版) に記載されている EASL (European Association for the Study of Liver) ガイドラインも参考になる。

単純性腹水と複雑性腹水

A. 単純性腹水：感染や肝腎症候群を伴っていない腹水

Grade 1：少量の腹水で、画像検査でしか診断できないもの

Grade 2：中等量の腹水で、理学的に貯留が明らかなもの

Grade 3：大量の腹水で、腹部が膨満しているもの

B. 複雑性腹水

①難治性腹水 (*)

利尿剤抵抗性腹水：食事の塩分を制限し、利尿剤やアルブミン製剤を使用しても減少しないもの

利尿剤不耐性腹水：利尿剤の増量により、腎機能低下や肝性脳症が発生するもの

②特発性細菌性腹膜炎

(*) 難治性腹水とは、医学的治療により減量困難な腹水、もしくは早期再発がみられる腹水とされる。【注釈】①上記病態の前提として、少なくとも 1 週間の集中的な利尿薬治療と塩分制限を受けていなければならない。

②早期再発とは、医学的治療により、初回の腹水減少が得られたあと、4 週間以内に Grade 2 または Grade 3 の腹水が再発した場合とされる。

(EASL ガイドライン 2018 より)

上図：日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン 2020 (改定第 3 版) より改訂

脳症に関しては

肝性脳症に関しては、下記に示す、本邦では犬山シンポジウムにて制定された肝性脳症昏睡度 I~V に分類する方法や、国際的には、West Heaven Criteria (WHC) や International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) の基準で分けられている。評価に当たっては一定の基準を作成し、評価して行く事が望まれる。例えば評価に当たっては、犬山シンポジウムで制定された肝性脳症昏睡度の評価では肝性脳症(なし：1点、軽度 I~II 度：2点、昏睡 III 度以上：3点)と評価し、ISHEN の基準では Covert (不顕性) 脳症は 1 点とする等一定の基準をもうける事が望ましい。

犬山シンポジウム (1981年)		
昏睡度	精神症状	参考事項
I	睡眠-覚醒リズムの逆転 多幸気分、ときに抑うつ状態 だらしなく、気にもとめない態度	retrospectiveにしか判定できない場合が多い
II	指南力(時・場所)障害、物を取り違える (confusion) 異常行動(例:お金をまく、化粧品をゴミ箱に捨てるなど) ときに傾眠状態(普通の呼びかけで開眼し、会話ができる) 無礼な言動があったりするが、医師の指示に従う態度をみせる	興奮状態がない 尿、便失禁がない 羽ばたき振戦あり
III	しばしば興奮状態または譫妄状態を伴い、反抗的態度をみせる 嗜眠状態(ほとんど眠っている) 外的刺激で開眼しうるが、医師の指示に従わない、または従えない(簡単な命令には応じうる)	羽ばたき振戦あり(患者の協力が得られる場合) 指南力は高度に障害
IV	昏睡(完全な意識の消失) 痛み刺激に反応する	刺激に対して、払いのける動作、顔をしかめる等がみられる
V	深昏睡 痛み刺激にもまったく反応しない	

上図：犬山シンポジウムで制定された肝性脳症昏睡度

肝性脳症の昏睡度分類

WHC	ISHEN	説明	提唱される基準	コメント
異常なし		<ul style="list-style-type: none"> 神経・心理機能検査正常 臨床症状なし 	<ul style="list-style-type: none"> 神経・心理検査実施して正常 	
Minimal	Covert (不顕性)	<ul style="list-style-type: none"> 心理もしくは神経性生理学的試験で異常を示す 臨床的には神経精神症状なし 	<ul style="list-style-type: none"> 確立した心理テストもしくは神経心理テストで異常を示す 臨床症状なし 	<ul style="list-style-type: none"> 普遍的な診断基準なし
Grade I		<ul style="list-style-type: none"> わずかな注意欠如 多幸感もしくは不安 注意力の持続短縮 足し算あるいは引き算が不良 睡眠リズムの変化 	<ul style="list-style-type: none"> 時間空間認識能は保たれているが、患者本来ものと比べて臨床検査もしくは診察で認知・行動低下が存在する 	<ul style="list-style-type: none"> 臨床症状は通常再現性に乏しい
Grade II	Overt (顕性)	<ul style="list-style-type: none"> 無気力・無関心 時間の認識障害 顕著な性格変化 不適切な振る舞い 失調症 固定姿勢保持困難(羽ばたき振戦) 	<ul style="list-style-type: none"> 時間の認識障害(少なくとも次の3つを間違えう; 日付、曜日、月、季節、年) その他のあげた症状を伴うこともある 	<ul style="list-style-type: none"> 臨床症状は様々だが、ある程度再現性ある
Grade III		<ul style="list-style-type: none"> 傾眠～半傾眠 刺激に反応あり 錯乱 全体的な見当識障害 奇妙な行動 	<ul style="list-style-type: none"> 空間の認識障害(少なくとも次の3つを間違えう; 国、地方、市町村、場所) その他のあげた症状を伴うこともある 	<ul style="list-style-type: none"> 臨床症状はある程度再現性あり
Grade IV		<ul style="list-style-type: none"> 昏睡 	<ul style="list-style-type: none"> 痛覚刺激にも無反応 	<ul style="list-style-type: none"> 昏睡状態で再現可能

WHC: West Heaven Criteria

ISHEN: International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism

註: 日本の犬山シンポジウムの昏睡度分類はWHCのGrade IからIVに該当し、この部分をI～Vまでの5段階に分けるものとなっている。わが国の身体障害者手帳制度の肝機能障害の認定では、これを用いたChild-Pugh分類での肝性脳症項目の2点(軽度: I～II)および3点(昏睡: III度以上)が対象となっている。(Vilstrup H et al. Hepatology 2014;60: 715-735を参考に作成)

上図：日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン2020(改定第3版)より改訂

PT に関しては

PT に関しては活性値 (%) で表す手法と、国際標準比 (INR) で表す手法がある。いずれかに統一した評価を行う必要がある。さらにワーファリンなどの抗凝固剤の服用により容易に反動しうる値であり、評価の際には統一した規定がされなければならない。

④ 安全性の評価

ヒト (自己) 骨髄由来間葉系幹細胞加工製品は製品適用時点から観察終了時期まで全身所見、局所所見、自覚症状の有無を確認する。有害事象、感染症やアレルギー反応の有無を観察する。間葉系幹細胞製品は複数回にわたり移植する可能性があることから、製造に動物由来のものを用いた場合、最終製品の製造工程由来不純物及び非細胞成分の安全性評価に応じて、抗体産生の有無についての評価を考慮する。また、細胞投与後は塞栓、血栓所見に十分注意する必要がある。末梢静脈からの投与の際には投与中もしくは投与後一定期間、肺塞栓の所見として、経皮的動脈血酸素飽和度の測定や投与後の D-ダイマー、fibrinogen degradation products (FDP) の測定を行うことが推奨される。さらに、肝動脈経由での投与の際には、カテーテル手技の安全性に加え、投与後の肝胆道系酵素上昇などに注意をする必要がある。

6. 参考文献

1. Dominici M, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.
2. 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.
3. Cholongitas E, Marelli L, Shusang V, et al. A systematic review of the performance of the model for end-stage liver disease (MELD) in the setting of liver transplantation. *Liver Transpl* 12:1049-1061, 2006.

7. 参考資料

犬山シンポジウム資料

日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン 2020 (改定第 3 版)

厚生労働省 重度肝機能障害の身体障害認定基準

IV. ヒト（同種）脂肪組織由来間葉系幹細胞加工製品を用いた非代償性肝硬変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) 非臨床試験
 - (6) 臨床試験（治験）
6. 参考文献
7. 参考資料

ヒト（同種）脂肪組織由来間葉系幹細胞加工製品を用いた非代償性肝硬変の治療に関する 評価指標（案）

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（同種）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、平成24年9月7日付け薬食発0907第3号厚生労働省医薬食品局長通知（以下「ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の指針」という。）に定められているところである。本評価指標は、ヒト（同種）間葉系幹細胞加工製品のうち特に非代償性肝硬変の治療を目的として適用される再生医療等製品について、上述の基本的な技術要件に加えて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）間葉系幹細胞加工製品が非代償性肝硬変の治療を目的として適用される際の、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脂肪組織由来（同種）間葉系幹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、申請内容等に対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

本評価指標における用語の定義は、「ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」の定義による他、以下のとおりとする。

- （1）肝硬変：B型肝炎、C型肝炎、アルコール、自己免疫疾患、代謝異常、胆汁うっ滞などに起因する慢性炎症によって肝傷害が繰り返された結果、肝細胞が壊死して再生していく過程において線維組織が増生し、肝機能が低下した状態、すなわち慢性肝疾患の終末像の病態を指す。

(2) 非代償性肝硬変：肝硬変のうち、比較的肝機能が保たれ、臨床症状がほとんどない代償性肝硬変に対して、肝性脳症、黄疸、腹水、浮腫、出血傾向など肝不全に起因する症状が出現するものを非代償性肝硬変と称する。なお、本指標では(3)で示す Child-Pugh スコア 7 点以上を非代償性肝硬変の目安とすることが多い。

代償性肝硬変と非代償性肝硬変

1) 代償性肝硬変

- * 肝機能がよく保たれており、臨床症状はほとんどない。
- * 肝脾腫、クモ状血管腫、手掌紅斑、食道静脈瘤などが存在していても無症候の場合は代償性とする。

2) 非代償性肝硬変

- * 肝性脳症、黄疸、腹水、浮腫、出血傾向など、肝不全に起因する症状が出現する。
- * 治療を行わない状態で分類し、治療後に無症候性になった症例も非代償性とする。
- * 現在あるいは以前に非代償性肝硬変であることを次のいずれかの基準で判定する。
Child-Pugh score 7 点 (分類B) 以上
「非代償性肝硬変の対象医療行為」⁵⁾ の治療歴を現在あるいは以前に有する。

⁵⁾ 腹腔穿刺、胸水・腹水濾過濃縮再静注法、内視鏡的食道・胃静脈瘤結紮術、などの肝不全および肝硬変合併症に対する治療。(腹水・肝性脳症・低栄養に対する内服薬治療などを含むものとする。)

上図：日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン 2020 (改定第 3 版) より改訂

(3) Child-Pugh スコア：肝硬変の機能評価法であり、①肝性脳症(なし:1 点、軽度:2 点、昏睡:3 点)、②腹水(なし:1 点、軽度:2 点、中等量以上:3 点)、③血清ビリルビン値 (mg/dL)(2.0 未満:1 点、2.0~3.0:2 点、3.0 超:3 点)、④血清アルブミン値(g/dL) (3.5 超:1 点、2.8~3.5:2 点、2.8 未満:3 点)、⑤プロトロンビン時間活性値(%) (70 超:1 点、40~70:2 点、40 未満:3 点)の 5 項目における点数の合計で評価する。点数により class A (5~6 点)、class B (7~9 点)、class C (10~15 点)に分類され、上述の通り 7 点以上(class B、C)を非代償性肝硬変と定義する。

Child-Pugh分類			
評点	1点	2点	3点
肝性脳症	なし	軽度 (I~II)	昏睡 (III~IV)
腹水	なし	軽度	中等度以上
血清ビリルビン値 (mg/dL)*	<2	2~3	>3
血清アルブミン値 (g/dL)	>3.5	2.8~3.5	<2.8
プロトロンビン時間活性値 (%)	>70	40~70	<40
国際標準比 (INR)**	<1.7	1.7~2.3	>2.3

class A	5-6点
class B	7-9点
class C	10-15点

* 血清ビリルビン値は、胆汁うっ滞 (原発性胆汁性胆管炎) の場合は、4.0 mg/dL 未満を 1 点とし 10 mg/dL 以上を 3 点とする。
**INR: international normalized ratio

上図：日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン 2020 (改定第 3 版) より改訂

- (4) 間葉系幹細胞：中胚葉性組織(間葉)に由来する体性幹細胞の一種であり、①プラスチック培養容器に接着する、②CD105, CD73, CD90 が陽性かつ CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, HLA-ClassII (DR) が陰性、③間葉系細胞(骨、脂肪、軟骨)への分化能を有する、の3条件を満たすものと定義する。脂肪組織、骨髄、臍帯、歯髄から分離することが可能である。また MHC Class-II を発現せず、サイトカインや増殖因子を分泌する等の作用で免疫調整機能を持ち、組織再生・修復を促進するなどの特徴を示す(文献1)。
- (5) MELD スコア：(Model for End-Stage Liver Disease)スコア：12歳以上の非代償性肝硬変患者の短期予後予測および肝移植適応の判断に用いられる予測式である。①血清ビリルビン値、②プロトロンビン時間-国際標準化比(PT-INR)、③血清クレアチニン値の3項目より算出される。
- MELD スコア = $9.571 \ln(\text{血清クレアチニン値 mg/dl}) + 3.781 \ln(\text{血清ビリルビン値 mg/dl}) + 11.201 \ln(\text{PT-INR (血液凝固能)}) + 6.43$ にて算出されるスコア。
- (6) 原材料：再生医療等製品の製造に使用する原料又は材料の由来となるものをいう。(生物由来原料基準(平成15年厚生労働省告示第210号)の定義と同じ)
- (7) 原料等：原料若しくは材料又はそれらの原材料をいう。(生物由来原料基準(平成15年厚生労働省告示第210号)の定義と同じ)
- (8) 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)
- (9) クロスコンタミネーション：サンプル間の混入のこと。交叉汚染とも呼ばれる。製造に用いられる原料の間、中間体の間等での混入を意味する。例えば、あるセル・バンクに由来する細胞に別のセル・バンクに由来する細胞が混入する場合や、ウイルス不活化後の原料に不活化前の原料が混ざってしまう場合等が挙げられる。

5. 評価に当たって留意すべき事項

本評価指標は、ヒト(同種)間葉系幹細胞を含む脂肪組織を原料として製造所に受け入れ、これを製造所においてセル・バンク・システムを構築し、加工して製造された細胞を非代償性肝硬変の治療を目的として肝臓に適用することを想定している。

(1) 原料等

原料(ヒト脂肪組織)及び材料(ウシ血清や培地等)、さらにそれらの製造に用いられる原材料の管理項目については、最終製品に求められる品質が確保できるよう設定することが原則となるが、その原料等を用いても最終製品に安全上の懸念が生じないよう、原料等の品質(無菌性、不純物等)についても考慮し設定することが求められる。

ウイルス等の外来性感染性物質の混入リスクについては、「生物由来原料基準」に基づいて必要な情報を得た上で、そのリスクが管理できるよう管理項目を設定する。「生物由来原料基準」の規制対象となる原料等の範囲は、「生物由来原料基準の運用について」（平成 26 年 10 月 2 日付け薬食審査発 10021 第 1 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長、薬食機参発 1002 号第 5 号厚生労働省大臣官房参事官（医療機器・再生医療等製品審査管理担当）通知）を参照すること。

① ドナーの選択基準、適格性

ドナーが倫理的に適切に選択されたことを示すこと。また、年齢、性別、民族学的特徴、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。

特に B 型肝炎ウイルス (HBV) (HBs 抗原、HBV-DNA など持続感染を示唆する指標のみならず、既感染を示唆する HBs 抗体、HBc 抗体も測定されていることが望ましい)、C 型肝炎ウイルス (HCV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症、成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV) およびパルボウイルス B19 感染症については、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 (CMV) 感染、エプスタイン・バーウイルス (EBV) 感染及びウエストナイルウイルス (WNV) 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、問診等の診断を行うとともに、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

② ドナーに関する記録

原料となる細胞・組織について、安全確保有上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。

③ ヒト間葉系幹細胞を含む脂肪組織の採取

ヒト間葉系幹細胞を含む脂肪組織の採取部位の選定理由、採取方法を示し、これらが科学的及び倫理的に適切に選定されたものであることを明らかにすること。採取方法については、用いられる器具、微生物汚染防止、取り違え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。

(2) 製造工程において特に注意が必要な事項

最終製品であるヒト（同種）間葉系幹細胞加工製品の製造にあたっては、製造方法を明確にし、可能な範囲でその妥当性を以下の項目で検証し、一定の品質を保持すること。

① ロット構成の有無とロットの規定

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

② 製造方法

ヒト間葉系幹細胞を含む脂肪組織の製造所への受入れから、ヒト間葉系幹細胞のセル・バンク・システム構築までの履歴、及び間葉系幹細胞の培養工程等を経て、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

採取した間葉系幹細胞を含む脂肪組織について、製造所への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、細胞の生存率、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。また、(ア)組織運搬状況の確認（断熱容器に封印されているか、発送から何時間かかっているか等）及び(イ)間葉系幹細胞を含む脂肪組織の外観の確認（運搬用チューブの破損・液漏れはないか、間葉系幹細胞を含む脂肪組織が組織運搬液中に浸漬されているか、運搬液に汚染が無いか等）を行うこと。

b) 細菌、真菌及びウイルス等の不活化・除去

採取したヒト間葉系幹細胞を含む脂肪組織について、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。

c) 細胞のバンク化

製造所に受入れたヒト間葉系幹細胞を含む脂肪組織から間葉系幹細胞のセル・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。製造工程中のドナーに起因しないリスク、特にウイルス汚染に関しては、マスター・セル・バンク（MCB）及び規定の培養期間を超えて培養した細胞において、必要なウイルス否定試験を行う。

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

最終製品であるヒト（同種）間葉系幹細胞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 加工した間葉系幹細胞の特性解析

加工した間葉系幹細胞については、加工に伴う変化や目的外細胞の混入を調べるために、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、核型、その他適切な表現型（表面マーカーCD73, CD90, CD105 の発現）の指標を解析するとともに、必要に応じて機能解析（脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞への分化確認等）を行うこと（文献 1）。間葉系幹細胞を含む脂肪組織から間葉系幹細胞を培養する場合、血球細胞、線維芽細胞、脂肪細胞等の混入が考えられる。

(3) 製品の品質管理

品質規格の設定について、治験を開始する前段階にあつては、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。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つては、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。

① 外観の確認

形状確認として、例えば間葉系幹細胞が顕微鏡（倒立型もしくは共焦点）での観察等により、細胞が紡錘状の形態をしていることを確認する。

② 細胞数及び生存率

細胞数を測定する方法としては、最終製品の細胞懸濁液（細胞塊の場合は、一部を酵素処理する）を、血球計算盤やセルカウンターで測定する方法がある。生細胞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、生細胞数及び死細胞数を計算することができる。

③ 確認試験

目的とする細胞の形態学的特徴、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質、その他適切な表現型の指標を選択して、目的とする細胞・組織であることを確認すること。

④ 細胞の純度試験

目的である間葉系幹細胞の割合を算出する試験方法及び判断基準を設定すること。例えば適切な表現型（表面マーカーCD73, CD90, CD105 の発現）の指標を基に算定する。

⑤ 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。

⑥ 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。

⑦ 製造工程由来不純物試験

ウシ血清を使用する場合は、ウシ血清アルブミン残存試験の規格を設定し、実測値をもとに規格値を設定する。動物由来成分、抗生物質等に関しては、該当するアレルギー既往の患者に対し、本品を使用しない旨を添付文書等に記載する。

(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、貯蔵方法及び有効期間を設定し、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。空路輸送に関しては、気圧の変化や X 線検査等による影響についても考慮すべきである。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) 非臨床試験

ヒト細胞加工製品については、動物試験において異種免疫反応が惹起される場合があること、またヒト細胞加工製品では、低分子医薬品等で実施されるような曝露評価もなじまないことなどから、量的なリスク評価は困難であり、非臨床安全性試験で得られる安全性情報は限定的と考えられる。したがって、このような限界を理解した上で、ヒト細胞加工製品の非臨床安全性試験を検討することが重要である。平成28年6月14日付け再生医療等製品（ヒト細胞加工製品）の品質、非臨床試験及び臨床試験の実施に関する技術的ガイダンスについて（薬機発第0614043号）等を参考とすること。

① 一般毒性試験

用量は対照群と投与群の少なくとも2群で評価可能である。また、その際の最高用量は、最大耐量、投与可能な最大量及び動物福祉を考慮し、可能な限り多くの細胞数を設定することが重要である。投与回数は可能な限り臨床で予定されている用法と同様とし、臨床適用経路で実施することが望ましい。観察期間については、全身毒性を評価可能と考える最短の期間である14日間程度とすることは可能であるが、Proof-of-Concept (POC) 試験等を参考に、適切な試験期間を設定する。

② 安全性試験（造腫瘍性試験）

最終製品の細胞がヒトで投与後に造腫瘍性を示すかどうかの確認のために、免疫不全動物へ作製した間葉系幹細胞を移植する。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。ただし、移植細胞自体が移植部位の微小環境に大きな影響を与え、移植細胞の総数に依存してアーチファクトを生んでしまう可能性を十分考慮する必要がある。評価に関する留意点については、「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関するガイドライン」（薬生機審発0627第1号）を参考にするのが望ましい。

③ 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、ヒト同種間葉系幹細胞加工製品として期待される臨床効果のPOCを示すこと。モデル動物としては、四塩化炭素誘導肝硬変モデルマウス・ラット（イヌ）等が挙げられるが、最終製品の効力又は性能を示すための妥当性のあるモデルである必要がある。（肝硬変モデル動物での、抗炎症効果；aspartate aminotransferase; AST, alanine aminotransferase; ALTの低下など、肝機能改善効果

アルブミンの上昇、総ビリルビン低下など、線維化効果；Sirius Red 染色での線維面積の改善や Hydroxyproline の定量結果の改善などが示されることが望ましい。）最終製品の効力又は性能を発揮する作用機序について、検討することも望まれる。

（6）臨床試験（治験）

臨床データパッケージ及び治験実施計画書は、対象疾患、目的とする効能、効果又は性能、当該治療法に期待される臨床上の位置づけ等に応じて、非臨床データ等も踏まえて計画することが必要である。一般的に臨床試験においては盲検化の有無にかかわらず、臨床試験においてより科学的に有効性及び安全性の情報を収集するためには、内部対照群を設定した比較臨床試験が望ましいが、開発している再生医療等製品の臨床上の位置づけを踏まえた開発可能性を考慮して適切に計画されるべきである。例えば求められる評価項目（エンドポイント）も製品毎に設定する必要がある。医療現場における忍容性や倫理性を考慮し比較試験を行うことが原則であるが、非代償性肝硬変を対象としているため単腕試験での評価も想定される。なお、できる限り独立行政法人医薬品医療機器総合機構の RS 戦略相談又は治験相談等を利用することが望ましい。

① 臨床試験における評価技術に関する基本的考え方

臨床試験は被験者の人権の保護、安全及び福祉に関するリスク並びにデータの質に関するリスクを最小限とし被験製品による効果が最大限に評価できるように計画されるべきである。特に目的とする細胞・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ことが推奨される。

評価項目に関しては、その最終目的に応じて主要評価項目(Primary endpoint)、副次的評価項目(Secondary endpoint)を設定する。有効性評価項目としては、細胞投与後一定期間での肝機能（予備能）改善効果、抗線維化効果を評価する事ができる項目が一部もしくは全部含むものが望ましい。

② 対象疾患

非代償性肝硬変：

肝硬変は C 型肝炎、B 型肝炎、非アルコール性脂肪肝炎、アルコール性、自己免疫性などの慢性的な肝障害により肝臓全体に再生結節が形成され、再生結節を線維性隔壁が取り囲む病変であり肝疾患の終末像といえる。肝硬変は肝機能がよく保たれ、臨床症状がほとんど出ない代償性肝硬変と肝性脳症、黄疸、腹水、浮腫、出血傾向など肝不全に起因する症状が出現する非代償性肝硬変に分けられる。一般に Child-Pugh B 以上（Child-Pugh スコア 7 点以上または過去に非代償性肝硬変の既往、治療歴がある場合に）非代償性肝硬変とすることが多い。

一般的に肝臓は非常に再生能力が高い臓器として知られているが、肝硬変になるに従

いおこる肝機能低下、線維化形成に伴いその再生能力は低下していく。肝硬変に対して、特に代償性肝硬変においては B 型、C 型肝炎ウイルス、アルコール、脂肪肝等原因介入により原因が解決されると線維化が改善すること、再生が起こることが知られているが、非代償性肝硬変ではより肝再生、線維化改善能力が落ちていき肝機能改善は乏しいことが知られている。現在、特に非代償性肝硬変に対しては既存の薬物療法に加え、新たな薬物療法の登場で、以前より肝予備能の改善が期待できる時代となっており、対象者の前提としてまずはこのような基本的な治療の介入が一定期間行われていることが望ましい。しかし、そのような治療介入にも関わらず一定期間（厚生労働省の重度肝機能障害の身体障害認定では、90 日以上（180 日以内）の間隔をおいた連続する 2 回の検査により評価している）評価時点での Child-Pugh スコアが 7 点以上持続する症例に関しては、能動的に再生促進、線維化改善を促す細胞療法などの新たな治療法の開発が望まれている。このような症例を臨床試験の対象患者とするのが適切である。また、肝硬変の特に進行例では肝移植は一般的に根本的に解決しうる治療として知られているが、本邦では脳死肝移植の機会は少なく生体肝移植に頼る現状があり、ドナーから提供を受けられる機会は限定されている。細胞治療はこのような背景を持つ患者にとって重要な治療機会になり得るとして期待されている。

非代償性肝硬変には、Child-Pugh C（肝機能高度低下症例）も含まれており、肝機能高度低下例の組み入れは、有害事象が起きた際に重篤になりやすい可能性があり特に注意を要する。例えば、C 型非代償性肝硬変患者に対する直接作用型抗ウイルス剤であるエブクルーサ®配合錠は Child-Pugh 分類で 13 点以上の患者は除外する事が望ましいとされており、これは一つの指標として重要と考えられる。また、これは肝硬変一般に共通する事象であるが、肝硬変は肝細胞癌の発生母地で食道胃静脈瘤の合併もあることが知られているため、事前検査によるスクリーニング、投与後の経過観察は十分に行われる必要がある。

なお、Child-Pugh スコアの評価にあたっては、後述の臨床有効性評価の項でも述べるが、プロトロンビン時間（PT）は 2 種類の評価指標（活性値：%と国際標準比：INR）で表す手法があることや、脳症や腹水の評価には主観が影響しやすいため、評価にあたっては一定の基準の策定が必要になる。PT は活性値(%)で評価を行う、腹水は原則として超音波検査、体重の増減、穿刺による排液量を勘案して見込まれる量が概ね 1L 以上を軽度（Child-Pugh スコアで 2 点）、3L 以上を中等度以上（Child-Pugh スコアで 3 点）とする、脳症は犬山シンポジウムで制定された肝性脳症の昏睡度分類（なし：1 点、軽度 I～II 度：2 点、昏睡 III 度以上：3 点）で評価される、ISHEN 基準における Covert（不顕性）脳症は 1 点とするなど一定の基準の策定が望ましい。

③ 臨床有効性評価

ア．臨床情報

臨床情報としては診察所見、血液所見、画像所見、肝生検所見等から目的に応じて必要な検査を選択して行く必要がある。なお、臨床試験の組み入れに関しては、一定期間（例えば、厚生労働省の重度肝機能障害の身体障害認定では3か月：90日以上、180日以内で継続していることを確認している）、既存の治療介入を行っても炎症、線維化、肝機能の変化がないことを確認しておく。さらに有効性を評価するに当たっては、新規薬剤の追加（アルブミン製剤、新鮮凍結血漿などを含む）内服薬の容量変更、腹水穿刺廃液などの処置などが加わると修飾される可能性もあることも考慮に入れる必要がある。

イ. 有効性の評価

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（文献2）。

細胞治療に伴い、肝機能及び線維化の変化が期待される。有効性を評価するにあたり適切な主要評価項目、副次評価項目の設定がなされている必要がある。そしてこれらは改善に一定の期間が必要と考えられるため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（例えば半年、もしくは一年）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。それぞれの評価に際し、ポイントとなり得る項目を下記に示す。

a) 肝機能(予備能)改善効果

有効性の評価としては、非常に重要で主要評価項目になりうる。肝機能は非常に多くの評価項目が有り、評価に当たっては、その特性を理解する事が重要である。代表的なものとして **Child-Pugh** 分類（スコア）がある。これはアルブミン値、総ビリルビン値、PT、腹水、肝性脳症の数値もしくは評価を点数化して評価するシステムである。更に肝機能評価には **Child-Pugh** スコア同様に肝機能の指標から数値化した **albumin-bilirubin (ALBI)** スコアもしくは **grade** もある。その他に、肝機能改善に伴い、倦怠感、かゆみ、浮腫なども軽減する事があり、聞き取り調査、身体所見の評価も参考になる場合がある。その他にも **MELD** スコアがあり、これは総ビリルビン値、PT、血清クレアチニン値からスコアリングし、特に肝移植待機中の肝硬変における予後予測に関しての有用性が報告されている（文献3）。

b) 抗線維化効果

有効性の評価としては、重要な指標で主要もしくは重要な副次評価項目になりうる。血液マーカー検索、血液検査に基づく数式での評価、フィブロスキャン、超音波、MRIなどを用いた肝硬度測定、肝生検での肝組織評価など多数が考えられる。一般的一つ

の検査のみでの評価では評価に一定の傾向を見るのが困難な場合があり、複数を組み合わせることでの評価が望ましい。なお、非代償性肝硬変は出血傾向を呈しているため、非侵襲的検査で評価できれば肝生検は必須としないことも許容される。

また、評価としては副次的な評価項目に相当すると思われるが、血液検査による以下評価により抗炎症・肝障害軽減効果を評価できる。aspartate aminotransferase (AST) と alanine aminotransferase (ALT) が中心になる。更に alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) 等が評価の対象になりうる。

Quality of Life の評価や肝臓、脾臓の体積の測定も、間接的な肝予備能、肝線維化改善、再生の指標になりうる。

なお、肝機能（肝予備能）の評価にあたってはなお、腹水や肝性脳症の評価には主観が影響しやすいため、評価の際には、PT の評価を含め一定の基準、専門医の評価等、一定の評価基準を作成する事が必要である。下記に評価に際し、潜在的に問題となり得る項目を示す。

腹水に関しては

腹水に関しては量的な評価を行う際の指標として、厚生労働省の重度肝機能障害の身体障害認定では、「腹水は原則として超音波検査、体重の増減、穿刺による排液量を勘案して見込まれる量が概ね 1L 以上を軽度（Child-Pugh スコアで 2 点）、3L 以上を中等度以上（Child-Pugh スコアで 3 点）とする。」となっている。腹水は常に変動する可能性があり、治療が介入された時点での評価、例えば利尿剤投与されている患者でも腹水が消失していれば 1 点など一定の基準をもうけている事が望ましい。また、下記の日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン 2020（改定第 3 版）に記載されている EASL（European Association for the Study of Liver）ガイドラインも参考になる。

単純性腹水と複雑性腹水

A. 単純性腹水：感染や肝腎症候群を伴っていない腹水

Grade 1：少量の腹水で、画像検査でしか診断できないもの

Grade 2：中等量の腹水で、理学的に貯留が明らかなもの

Grade 3：大量の腹水で、腹部が膨満しているもの

B. 複雑性腹水

①難治性腹水（*）

利尿剤抵抗性腹水：食事の塩分を制限し、利尿剤やアルブミン製剤を使用しても減少しないもの

利尿剤不耐性腹水：利尿剤の増量により、腎機能低下や肝性脳症が発生するもの

②特発性細菌性腹膜炎

（*）難治性腹水とは、医学的治療により減量困難な腹水、もしくは早期再発がみられる腹水とされる。【注釈】①上記病態の前提として、少なくとも 1 週間の集中的な利尿薬治療と塩分制限を受けていなければならない。

②早期再発とは、医学的治療により、初回の腹水減少が得られたあと、4 週間以内に Grade 2 または Grade 3 の腹水が再発した場合とされる。

（EASL ガイドライン 2018 より）

上図：日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン 2020（改定第 3 版）より改訂

脳症に関しては

肝性脳症に関しては、下記に示す、本邦では犬山シンポジウムにて制定された肝性脳症昏睡度 I~V に分類する方法や、国際的には、West Heaven Criteria (WHC)や International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN)の基準で分けられている。評価に当たっては一定の基準を作成し、評価して行く事が望まれる。例えば評価に当たっては、犬山シンポジウムで制定された肝性脳症昏睡度の評価では肝性脳症(なし: 1点、軽度 I~II 度:2点、昏睡 III 度以上:3点)評価し、ISHEN の基準では Covert (不顕性) 脳症は1点とする等一定の基準をもうける事が望ましい。

犬山シンポジウム (1981年)		
昏睡度	精神症状	参考事項
I	睡眠-覚醒リズムの逆転 多幸気分、ときに抑うつ状態 だらしなく、気にもとめない態度	retrospectiveにしか判定できない場合が多い
II	指南力(時・場所)障害、物を取り違える (confusion) 異常行動(例:お金をまく、化粧品をゴミ箱に捨てるなど) ときに傾眠状態(普通の呼びかけで開眼し、会話ができる) 無礼な言動があったりするが、医師の指示に従う態度をみせる	興奮状態がない 尿、便失禁がない 羽ばたき振戦あり
III	しばしば興奮状態または譫妄状態を伴い、反抗的態度をみせる 嗜眠状態(ほとんど眠っている) 外的刺激で開眼しうるが、医師の指示に従わない、または従えない(簡単な命令には応じうる)	羽ばたき振戦あり(患者の協力が得られる場合) 指南力は高度に障害
IV	昏睡(完全な意識の消失) 痛み刺激に反応する	刺激に対して、払いのける動作、顔をしかめる等がみられる
V	深昏睡 痛み刺激にもまったく反応しない	

上図：犬山シンポジウムで制定された肝性脳症昏睡度より改訂

肝性脳症の昏睡度分類

WHC	ISHEN	説明	提唱される基準	コメント
	異常なし	<ul style="list-style-type: none"> 神経・心理機能検査正常 臨床症状なし 	<ul style="list-style-type: none"> 神経・心理検査実施して正常 	
Minimal	Covert (不顕性)	<ul style="list-style-type: none"> 心理もしくは神経性生理学的試験で異常を示す 臨床的には神経精神症状なし 	<ul style="list-style-type: none"> 確立した心理テストもしくは神経心理テストで異常を示す 臨床症状なし 	<ul style="list-style-type: none"> 普遍的な診断基準なし
Grade I		<ul style="list-style-type: none"> わずかな注意欠如 多幸感もしくは不安 注意力の持続短縮 足し算あるいは引き算が不良 睡眠リズムの変化 	<ul style="list-style-type: none"> 時間空間認識能は保たれているが、患者本来ものと比べて臨床検査もしくは診察で認知・行動低下が存在する 	<ul style="list-style-type: none"> 臨床症状は通常再現性に乏しい
Grade II	Overt (顕性)	<ul style="list-style-type: none"> 無気力・無関心 時間の認識障害 顕著な性格変化 不適切な振る舞い 失調症 固定姿勢保持困難（羽ばたき振戦） 	<ul style="list-style-type: none"> 時間の認識障害（少なくとも次の3つを間違えう；日付、曜日、月、季節、年） その他のあげた症状を伴うこともある 	<ul style="list-style-type: none"> 臨床症状は様々だが、ある程度再現性ある
Grade III		<ul style="list-style-type: none"> 傾眠～半傾眠 刺激に反応あり 錯乱 全体的な見当識障害 奇妙な行動 	<ul style="list-style-type: none"> 空間の認識障害（少なくとも次の3つを間違えう；国、地方、市町村、場所） その他のあげた症状を伴うこともある 	<ul style="list-style-type: none"> 臨床症状はある程度再現性あり
Grade IV		<ul style="list-style-type: none"> 昏睡 	<ul style="list-style-type: none"> 痛覚刺激にも無反応 	<ul style="list-style-type: none"> 昏睡状態で再現可能

WHC: West Heaven Criteria

ISHEN: International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism

註：日本の犬山シンポジウムの昏睡度分類はWHCのGrade IからIVに該当し、この部分をI～Vまでの5段階に分けるものとなっている。わが国の身体障害者手帳制度の肝機能障害の認定では、これを用いたChild-Pugh分類での肝性脳症項目の2点（軽度：I～II）および3点（昏睡：III度以上）が対象となっている。（Vilstrup H et al. Hepatology 2014;60: 715-735を参考に作成）

上図：日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン2020（改定第3版）より改訂

PT に関しては

PT に関しては活性値(%)で表す手法と、国際標準比(INR)で表す手法がある。活性値(%)、国際標準比(INR)の両方を測定しておく事が望ましい。さらにワーファリンなどの抗凝固剤の服用により容易に反動しうる値であり、評価の際には統一した規定がされなければならない。

④ 安全性の評価

ヒト（同種）間葉系幹細胞加工製品は製品適用時点から観察終了時期まで全身所見、局所所見、自覚症状の有無を確認する。有害事象、感染症やアレルギー反応の有無を観察する。特に、ヒト（同種）細胞を用いるため、潜在的なウイルス感染やGVHDなどの発症のリスク等に関しても十分な観察を行う。また、間葉系幹細胞製品は複数回にわたり移植する可能性があることから、製造に動物由来のものをを用いた場合には、抗体産生の有無について評価を行うことが望ましい。

また、細胞投与後、塞栓、血栓所見に十分注意する必要がある。末梢静脈からの投与

の際には投与中もしくは投与後一定期間、肺塞栓の所見として、経皮的動脈血酸素飽和度の測定や投与後の D-ダイマー、fibrinogen degradation products (FDP) の測定を行うことが推奨される。更に、肝動脈経由での投与の際には、カテーテル手技の安全性に加え、投与後の肝胆道系酵素上昇などに注意をする必要がある。更に、非代償性肝疾患関連イベント発生率（食道・胃静脈瘤出血、腹水、肝腎症候群、肝性脳症）や肝細胞癌発生や死亡イベントの追跡を同時に行う事も望まれる。

6. 参考文献

1. Dominici M, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* 2006;8:315-7.
2. 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.
3. Cholongitas E, Marelli L, Shusang V, et al. A systematic review of the performance of the model for end-stage liver disease (MELD) in the setting of liver transplantation. *Liver Transpl* 12:1049-1061, 2006.

7. 参考資料

犬山シンポジウム資料

日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン 2020（改定第3版）

厚生労働省 重度肝機能障害の身体障害認定基準

V. ヒト（自己）末梢血 CD34 陽性細胞加工製品を用いた非代償性肝硬変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) 非臨床試験
 - (6) 臨床試験（治験）
6. 参考資料

ヒト（自己）末梢血 CD34 陽性細胞加工製品を用いた非代償性肝硬変の治療に関する評価指標（案）

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（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性を確保するための基本的な技術要件は、平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発 0907 第 2 号厚生労働省医薬食品局長通知（以下「ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の指針」という。）に定められているところである。本評価指標は、ヒト（自己）末梢血由来 CD34 陽性細胞加工製品のうち特に非代償性肝硬変の治療を目的として適用される再生医療等製品について、上述の基本的な技術要件に加えて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（自己）末梢血由来 CD34 陽性細胞加工製品が非代償性肝硬変の治療を目的とし適用される際の、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（自己）末梢血由来 CD34 陽性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、申請内容等に対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

本評価指標における用語の定義は、「ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の指針」の定義による他、以下のとおりとする。

- (1) 肝硬変：B 型肝炎、C 型肝炎、アルコール、自己免疫疾患、代謝異常、胆汁うっ滞などに起因する慢性炎症によって肝傷害が繰り返された結果、肝細胞が壊死して再生していく過程において線維組織が増生し、肝機能が低下した状態、すなわち慢性肝疾患の終末像の病態を指す。

(2) 非代償性肝硬変：肝硬変のうち、比較的肝機能が保たれ、臨床症状がほとんどない代償性肝硬変に対して、肝性脳症、黄疸、腹水、浮腫、出血傾向など肝不全に起因する症状が出現するものを非代償性肝硬変と称する。なお、本指標では(3)で示すChild-Pugh スコア7点以上を非代償性肝硬変の目安とすることが多い。

代償性肝硬変と非代償性肝硬変	
1) 代償性肝硬変	<ul style="list-style-type: none"> * 肝機能がよく保たれており、臨床症状はほとんどない。 * 肝脾腫、クモ状血管腫、手掌紅斑、食道静脈瘤などが存在していても無症候の場合は代償性とする。
2) 非代償性肝硬変	<ul style="list-style-type: none"> * 肝性脳症、黄疸、腹水、浮腫、出血傾向など、肝不全に起因する症状が出現する。 * 治療を行わない状態で分類し、治療後に無症候性になった症例も非代償性とする。 * 現在あるいは以前に非代償性肝硬変であることを次のいずれかの基準で判定する。 Child-Pugh score 7点(分類B)以上 「非代償性肝硬変の対象医療行為」#の治療歴を現在あるいは以前に有する。
#腹腔穿刺、胸水・腹水濾過濃縮再静注法、内視鏡的食道・胃静脈瘤結紮術、などの肝不全および肝硬変合併症に対する治療。(腹水・肝性脳症・低栄養に対する内服薬治療などを含むものとする。)	

上図：日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン2020(改定第3版)より改訂

(3) Child-Pugh スコア：肝硬変の機能評価法であり、①肝性脳症(なし:1点、軽度:2点、昏睡:3点)、②腹水(なし:1点、軽度:2点、中等量以上:3点)、③血清ビリルビン値(mg/dL)(2.0未満:1点、2.0~3.0:2点、3.0超:3点)、④血清アルブミン値(g/dL)(3.5超:1点、2.8~3.5:2点、2.8未満:3点)、⑤プロトロンビン時間活性値(%) (70超:1点、40~70:2点、40未満:3点)の5項目における点数の合計で評価する。点数によりclass A(5~6点)、class B(7~9点)、class C(10~15点)に分類され、上述の通り7点以上(class B、C)を非代償性肝硬変と定義する。

Child-Pugh分類			
評点	1点	2点	3点
肝性脳症	なし	軽度(I~II)	昏睡(III~IV)
腹水	なし	軽度	中等度以上
血清ビリルビン値(mg/dL)*	<2	2~3	>3
血清アルブミン値(g/dL)	>3.5	2.8~3.5	<2.8
プロトロンビン時間活性値(%)	>70	40~70	<40
国際標準比(INR)**	<1.7	1.7~2.3	>2.3
class A		5-6点	
class B		7-9点	
class C		10-15点	
*血清ビリルビン値は、胆汁うっ滞(原発性胆汁性胆管炎)の場合は、4.0 mg/dL未満を1点とし10 mg/dL以上を3点とする。			
**INR: international normalized ratio			

上図：日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン2020(改定第3版)より改訂

- (4) 末梢血単核球細胞：末梢血から分離された単球やリンパ球を含む単核球を示す。ヒトや動物から採取した新鮮な血液から、血漿成分、赤血球、血小板および顆粒球を除去することで単離可能である。
- (5) CD34 陽性細胞：骨髄・末梢血の造血幹細胞および血管内皮前駆細胞、骨格筋の衛星細胞、上皮の毛包幹細胞、脂肪組織の間葉系幹細胞など、多くの幹細胞に発現している細胞表面マーカー。
- (6) MELD スコア：(Model for End-Stage Liver Disease) スコア：12 歳以上の非代償性肝硬変患者の短期予後予測および肝移植適応の判断に用いられる予測式である。①血清ビリルビン値、②プロトロンビン時間-国際標準化比 (PT-INR)、③血清クレアチニン値の 3 項目より算出される。
- MELD スコア = $9.57 \ln(\text{血清クレアチニン値 mg/dl}) + 3.78 \ln(\text{血清ビリルビン値 mg/dl}) + 11.20 \ln(\text{PT-INR (血液凝固能)}) + 6.43$ にて算出されるスコア。
- (7) 原材料：再生医療等製品の製造に使用する原料又は材料の由来となるものをいう。(生物由来原料基準 (平成 15 年厚生労働省告示第 210 号) の定義と同じ)
- (8) 原料等：原料若しくは材料又はそれらの原材料をいう。(生物由来原料基準 (平成 15 年厚生労働省告示第 210 号) の定義と同じ)
- (9) クロスコンタミネーション：サンプル間の混入のこと。交叉汚染とも呼ばれる。製造に用いられる原料の間、中間体の間等での混入を意味する。例えば、あるセル・バンクに由来する細胞に別のセル・バンクに由来する細胞が混入する場合や、ウイルス不活化後の原料に不活化前の原料が混ざってしまう場合等が挙げられる。

5. 評価に当たって留意すべき事項

本評価指標は、ヒト (自己) CD34 陽性細胞を含む末梢血単核球細胞懸濁液を原料として製造所に受け入れ、これを製造所において、加工して製造された細胞を自己の非代償性肝硬変の治療を目的として肝臓に適用することを想定している。

(1) 原料等：

原料 (ヒト (自己) 末梢血単核球細胞) 及び専用磁気細胞分離装置 (磁気ビーズの結合した幹細胞特異的抗体 (ここでは CD34 抗原に対する抗体を意味する) を用いて CD34 陽性細胞を分離することが可能な医療機器)、さらにそれらの製造に用いられる原材料の管理項目については、最終製品に求められる品質が確保できるよう設定することが原則となるが、その原料等を用いても最終製品に安全上の懸念が生じないよう、原料等の品質 (無菌性、不純物等) についても考慮し設定することが求められる。

また移植細胞となるヒト (自己) 末梢血 CD34 陽性細胞は、専用磁気細胞分離装置により、末梢血単核球細胞懸濁液より CD34 陽性細胞のみに分離したものである。

① ドナーの選択基準、適格性

ヒト (自己) 末梢血由来 CD34 陽性細胞を用いる場合は、ドナーがレシピエントにな

るため、必ずしも当該者のスクリーニングを必要としないが、クロスコンタミネーション防止や製造者の安全性対策の観点から、B 型肝炎ウイルス (HBV)、C 型肝炎ウイルス (HCV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、および成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV) について検査 (血清学的試験や核酸増幅法等) の実施を考慮すること。

また、次に掲げるものについては既往歴、問診等の診断を行い、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
- ・伝達性海綿状脳症及びその疑い並びにその他の認知症
- ・原料となる細胞の採取が困難となる病態 (易出血性等)

② ヒト (自己) 末梢血由来 CD34 陽性細胞を含む末梢血単核球細胞懸濁液の採取

ヒト (自己) 末梢血由来 CD34 陽性細胞を含む末梢血単核球細胞懸濁液の採取方法を示し、これらが科学的及び倫理的に適切に選定されたものであることを明らかにすること。採取方法については、用いられる器具、微生物汚染防止、取り違え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。

(2) 製造工程において特に注意が必要な事項

末梢血 CD34 陽性細胞の製造 (分離) に当たっては、分離方法を明確にし、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 キットの使用期限の確認

磁気細胞分離システムは、磁気細胞分離装置本体とその専用品 (分離用ディスプレイセット) で構成されている。磁気細胞分離装置の専用品については使用期限が設けられているため、使用する際は有効期限内であることを確認すること。

② 製造方法

磁気細胞分離システムとは、抗体ビーズで標識された CD34 抗体をアフエレンス採取液中の CD34 陽性細胞と反応させ、磁石により細胞分離カラムに保持させ、その後、磁石をはずすことで抗体ビーズと結合した CD34 陽性細胞のみを溶出させるという方法によって、末梢血中の不均一な細胞集団から CD34 陽性細胞を選択的にかつ閉鎖的に採取することができるというものである。

製造方法について、ヒト (自己) 末梢血単核球細胞懸濁液の製造所への受入れから、ヒト (自己) 末梢血 CD34 陽性細胞に分離されるまでの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。また製造の際は、当該磁気細胞分離装置の専用品である分離用ディスプレイセット

を使用し、専用の分離プログラムを使用すること。

a) 受入検査

アフレスシスにより採取した単核球（アフレスシス採取バッグに回収されている）について、製造所へ受け入れる際、被検者の病原体検査結果の確認を行う。また、(ア) 細胞運搬状況の確認（緩衝材で覆われているか、保冷剤と共に細胞搬送容器に入れて輸送されていたか等）及び（イ）アフレスシス採取バッグの外観の確認（汚染、損傷、開封はないか、液漏れはないか等）を行うこと。

磁気細胞分離装置の専用品について、開封前に外観の確認（汚染、損傷、開封はないか、液漏れはないか等）を行うこと。

b) 細胞等の混同及び交差汚染の防止措置

汚染防止のため、細胞等に直接接触する器材についてはシングルユース製品を用いること。混同を防止するため、同時に異なるドナーに由来する細胞等を取扱わないようにすること。

③ 分離した CD34 陽性細胞の品質基準の確認

a) CD34 陽性細胞は、分離直後のフローサイトメトリーにより純度および生存率を測定し、事前に設定した判定基準を満たしたことが確認された場合にのみ移植として用いる。

b) 純度および生存率の判断基準の設定については、先行臨床試験における、当該対象疾患患者から採取・分離可能な細胞数や細胞品質のデータ、非臨床試験および先行臨床試験における安全性・有効性の成績等の科学的根拠に基づいて設定すること。

c) 移植細胞感染検査については、移植細胞として用いる CD34 陽性細胞で測定することが望ましいが、同時に分離される CD34 陰性細胞を用いてもよい。

(3) 製品の品質管理

品質規格の設定について、治験を開始する前段階にあつては、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。

① 細胞品質試験

a) 細胞数及び生細胞率（生存率）試験

最終製品における細胞数及び生存率について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。生細胞率を測定する方法として、フローサイトメトリー（International Society for Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) 法）により、生細胞数及び死細胞数を計算することができる。

CD34 陽性細胞の測定は、国際細胞療法学会が推奨する ISHAGE ガイドライン（文献 1-2）等に従って ISHAGE 法で必ず行う。フローサイトメトリー機器（医療機器として薬事承認済み）については各医療機関において制度管理を行う必要性が

ある。測定については各医療機関において ISHAGS 法に習熟した臨床検査技師が行うことを推奨する。

b) 純度試験

CD34 陽性細胞は分離直後のフローサイトメトリーにより、CD34 抗体と CD45 抗体を組み合わせた 2 カラー分析、もしくは、死細胞検出用試薬や絶対数測定用の内部標準粒子試薬を組み合わせた 3～4 カラー分析を行うことで、目的とする細胞であることを確認すること。ISHAGE ガイドライン等の推奨測定項目に準じたプレミックス抗体試薬や測定キットも市販されており、それらを使用して確認してもよい。

c) 無菌試験

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。最終製品の無菌試験の結果は患者への投与後にしか得られないため、投与後に無菌性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、移植細胞として用いる CD34 陽性細胞で検査することが望ましいが、分離される CD34 陰性細胞を移植細胞感染検査に用いてもよい。

d) 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。また、移植細胞として用いる CD34 陽性細胞で測定することが望ましいが、分離される CD34 陰性細胞を移植細胞感染検査に用いてもよい。

e) 製造工程由来不純物試験

CD34 試薬の抗体ビーズがマウス蛋白質由来製品、鉄又は鉄デキストランでできているため、当該物質に対する過敏症、副作用患者に対しては使用しない。

② 分離性能試験

磁気細胞分離システムによる細胞分離性能を評価するため、細胞分離前後の CD34 陽性細胞数にて回収率を確認する。

(4) 製品の安定性試験

最終製品は細胞分離当日中に使用するため、安定性試験は不要である。

(5) 非臨床試験

ヒト細胞加工製品については、動物試験において異種免疫反応が惹起される場合があること、またヒト細胞加工製品では、低分子医薬品等で実施されるような曝露評価もな

じまないことなどから、量的なリスク評価は困難であり、非臨床安全性試験で得られる安全性情報は限定的と考えられる。したがって、このような限界を理解した上で、ヒト細胞加工製品の非臨床安全性試験を検討することが重要である。平成28年6月14日付け再生医療等製品（ヒト細胞加工製品）の品質、非臨床試験及び臨床試験の実施に関する技術的ガイダンスについて（薬機発第0614043号）等を参考とすること。

① 一般毒性試験

ヒト細胞に対する異種免疫反応を回避するために、免疫不全動物の利用が考えられる。用量は対照群と投与群の少なくとも2群で評価可能である。また、その際の最高用量は、最大耐量、投与可能な最大量及び動物福祉を考慮し、可能な限り多くの細胞数を設定することが重要である。投与回数は可能な限り臨床で予定されている用法と同様とし、臨床適用経路で実施することが望ましい。観察期間については、全身毒性を評価可能と考える最短の期間である14日間程度とすることは可能であるが、Proof-of-Concept (POC) 試験等を参考に、適切な試験期間を設定する。

② 造腫瘍性試験

造腫瘍性の懸念が低いと考えられる体性幹細胞由来の製品については、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（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（薬生機審発0627第1号））。

③ 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（自己）末梢血由来 CD34 陽性細胞加工製品として期待される臨床効果の POC を示すこと。モデル動物としては、四塩化炭素誘導肝硬変モデルマウス・ラット（イヌ）等が挙げられるが、最終製品の効力又は性能を示すための妥当性のあるモデルである必要がある。（肝硬変モデル動物での、抗炎症効果； aspartate aminotransferase; AST, alanine aminotransferase; ALT の低下など、肝機能改善効果アルブミンの上昇、総ビリルビン低下など、線維化抑制効果； Sirius Red 染色等での線維面積の改善や Hydroxyproline の定量結果の改善などが示されることが望ましい。）最終製品の効力又は性能を発揮する作用機序について、検討することも望まれる。

(6) 臨床試験（治験）

臨床データパッケージ及び治験実施計画書は、対象疾患、目的とする効能、効果又は性能、当該治療法に期待される臨床上の位置づけ等に応じて、非臨床データ等も踏まえて計画することが必要である。一般的に臨床試験においては盲検化の有無にかかわらず、臨床試験においてより科学的に有効性及び安全性の情報を収集するためには、内部対照群を設定した比較臨床試験が望ましいが、開発している再生医療等製品の臨床上の位置

づけを踏まえた開発可能性を考慮して適切に計画されるべきである。例えば求められる評価項目（エンドポイント）も製品毎に設定する必要がある。医療現場における忍容性や倫理性を考慮し比較試験を行うことが原則であるが、非代償性肝硬変を対象としているため、単腕試験での評価も想定される。なお、できる限り独立行政法人医薬品医療機器総合機構のRS 戦略相談又は治験相談等を利用することが望ましい。

① 臨床試験における評価技術に関する基本的考え方

臨床試験は被験者の人権の保護、安全及び福祉に関するリスク並びにデータの質に関するリスクを最小限とし被験製品による効果が最大限に評価できるように計画されるべきである。特に目的とする細胞・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ことが推奨される。

評価項目に関しては、その最終目的に応じて主要評価項目（Primary endpoint）、副次的評価項目（Secondary endpoint）を設定する。有効性評価項目としては、細胞移植後一定期間での抗炎症・肝障害軽減効果、抗線維化効果、肝機能改善の状態を評価する事ができる項目が一部もしくは全部含むものが望ましい。

② 対象疾患

非代償性肝硬変：

肝硬変はC型肝炎、B型肝炎、非アルコール性脂肪肝炎、アルコール性、自己免疫性などの慢性的な肝障害により肝臓全体に再生結節が形成され、再生結節を線維性隔壁が取り囲む病変であり肝疾患の終末像といえる。肝硬変は肝機能がよく保たれ、臨床症状がほとんど出ない代償性肝硬変と肝性脳症、黄疸、腹水、浮腫、出血傾向など肝不全に起因する症状が出現する非代償性肝硬変に分けられる。一般に Child-Pugh B 以上（Child-Pugh スコア 7 点以上または過去に非代償性肝硬変の既往、治療歴がある場合に）非代償性肝硬変とすることが多い。

一般的に肝臓は非常に再生能力が高い臓器として知られているが、肝硬変になるに従いおこる肝機能低下、線維化形成に伴いその再生能力は低下していく。肝硬変に対して、特に代償性肝硬変においてはB型、C型肝炎ウイルス、アルコール、脂肪肝等原因介入により原因が解決されると線維化が改善すること、再生が起こることが知られているが、非代償性肝硬変ではより肝再生、線維化改善能力が落ちていき肝機能改善は乏しいことが知られている。現在、特に非代償性肝硬変に対しては既存の薬物療法に加え、新たな薬物療法の登場で、以前より肝予備能の改善が期待できる時代となっており、対象者の前提としてまずはこのような基本的な治療の介入が一定期間行われていることが望ましい。しかし、そのような治療介入にも関わらず一定期間（厚生労働省の重度肝機能障害の身体障害認定では、90 日以上（180 日以内）の間隔をおいた連続する 2 回の検査により評価している）評価時点での Child-Pugh スコアが 7 点以上持続する症例に関しては、能動的に再生促進、線維化改善を促す細胞療法などの新たな治療法の開発が望まれている。このような症例を臨床試験の対象患者とするのが適切である。また、肝硬変の

特に進行例では肝移植は一般的に根本的に解決しうる治療として知られているが、本邦では脳死肝移植の機会は少なく生体肝移植に頼る現状があり、ドナーから提供を受けられる機会は限定されている。細胞治療はこのような背景を持つ患者にとって重要な治療機会になり得るとして期待されている。

非代償性肝硬変には、Child-Pugh C（肝機能高度低下症例）も含まれており、肝機能高度低下例の組み入れは、有害事象が起きた際に重篤になりやすい可能性があり特に注意を要する。例えば、C型非代償性肝硬変患者に対する直接作用型抗ウイルス剤であるエブクルーサ®配合錠はChild-Pugh分類で13点以上の患者は除外する事が望ましいとされており、これは一つの指標として重要と考えられる。また、これは肝硬変一般に共通する事象であるが、肝硬変は肝細胞癌の発生母地で食道胃静脈瘤の合併もあることが知られているため、事前検査によるスクリーニング、投与後の経過観察は十分に行われる必要がある。

なお、Child-Pughスコアの評価にあたっては、後述の臨床有効性評価の項でも述べるが、プロトロンビン時間（PT）は2種類の評価指標（活性値：%と国際標準比：INR）で表す手法があることや、脳症や腹水の評価には主観が影響しやすいため、評価にあたっては一定の基準の策定が必要になる。PTは活性値（%）で評価を行う、腹水は原則として超音波検査、体重の増減、穿刺による排液量を勘案して見込まれる量が概ね1L以上を軽度（Child-Pughスコアで2点）、3L以上を中等度以上（Child-Pughスコアで3点）とする、脳症は犬山シンポジウムで制定された肝性脳症の昏睡度分類（なし：1点、軽度I～II度：2点、昏睡III度以上：3点）で評価される、ISHEN基準におけるCovert（不顕性）脳症は1点とするなど一定の基準の策定が望ましい。

一方、特異的に考慮すべき点として、以下のようなことが挙げられる。

- a) 幹細胞採取に用いる薬剤・機器に関する有害事象のハイリスク患者の除外（例：顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）製剤を用いる場合：間質性肺炎、巨脾、血液増殖性疾患などを合併する患者）
- b) 血管再生に関する有害事象のハイリスク患者の除外（例：増殖糖尿病網膜症、悪性腫瘍などを合併する患者）

③ 臨床有効性評価

ア. 臨床情報

臨床情報としては診察所見、血液所見、画像所見、肝生検所見等から目的に応じて必要な検査を選択して行く必要がある。なお、臨床試験への組入れに際しては、一定期間（例えば、厚生労働省の重度肝機能障害の身体障害認定では3か月：90日以上、180日以内で継続していることを確認している）、既存の治療介入を行っても炎症、線維化、肝機能の変化がないことを確認しておく。さらに有効性を評価するに当たっては、新規薬剤の追加（アルブミン製剤、新鮮凍結血漿などを含む）、内服薬の容量変更、腹水穿刺排液などの処置などが加わると修飾される可能性もあることも考慮に

入れる必要がある。

イ. 有効性の評価

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（文献 3）。

細胞治療に伴い、肝機能及び線維化の変化が期待される。有効性を評価するにあたり適切な主要評価項目、副次評価項目の設定がなされている必要がある。そしてこれらは改善に一定の期間が必要と考えられるため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（例えば半年、もしくは一年）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。それぞれの評価に際し、ポイントとなり得る項目を下記に示す。

a) 肝機能（予備能）改善効果

有効性の評価としては、非常に重要で主要評価項目になりうる。肝機能は非常に多くの評価項目が有り、評価に当たっては、その特性を理解する事が重要である。代表的なものとして **Child-Pugh** 分類（スコア）がある。これはアルブミン値、総ビリルビン値、PT、腹水、肝性脳症の数値もしくは評価を点数化して評価するシステムである。更に肝機能評価には **Child-Pugh** スコア同様に肝機能の指標から数値化した **albumin-bilirubin (ALBI)** スコアもしくは **grade** もある。その他に、肝機能改善に伴い、倦怠感、かゆみ、浮腫なども軽減する事があり、聞き取り調査、身体所見の評価も参考になる場合がある。その他にも **MELD** スコアがあり、これは総ビリルビン値、PT、血清クレアチニン値からスコアリングし、特に肝移植待機中の肝硬変における予後予測に関しての有用性が報告されている（文献 4）。

b) 抗線維化効果

有効性の評価としては、重要な指標で主要もしくは重要な副次評価項目になりうる。血液マーカー検索、血液検査に基づく数式での評価、ファイブロスキャン、超音波、MRI などを用いた肝硬度測定、肝生検での肝組織評価など多数が考えられる。一般的に一つの検査のみでの評価では評価に一定の傾向を見るのが困難な場合が有り、複数を組み合わせることでの評価が望ましい。なお、非代償性肝硬変は出血傾向を呈しているため、非侵襲的検査で評価できれば肝生検は必須としないことも許容される。

また、評価としては副次的な評価項目に相当すると思われるが、血液検査による以下評価により抗炎症・肝障害軽減効果を評価できる。**aspartate aminotransferase (AST)** と **alanine aminotransferase (ALT)** が中心になる。更に **alkaline**

phosphatase (ALP) , γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) 等が評価の対象になりうる。

Quality of Life の評価や肝臓、脾臓の体積の測定も、間接的な肝予備能、肝線維化改善、再生の指標になりうる。

なお、肝機能（肝予備能）の評価に当たってはなお、腹水や肝性脳症の評価には主観が影響しやすいため、評価の際には、PT の評価を含め一定の基準、専門医の評価等、一定の評価基準を作成する事が必要である。下記に評価に際し、潜在的に問題となり得る項目を示す。

腹水に関しては

腹水に関しては量的な評価を行う際の指標として、厚生労働省の重度肝機能障害の身体障害認定では、「腹水は原則として超音波検査、体重の増減、穿刺による排液量を勘案して見込まれる量が概ね 1L 以上を軽度（Child-Pugh スコアで 2 点）、3L 以上を中等度以上（Child-Pugh スコアで 3 点）とする。」となっている。腹水は常に変動する可能性があり、治療が介入された時点での評価、例えば利尿剤投与されている患者でも腹水が消失していれば 1 点など一定の基準をもうけている事が望ましい。また、下記の日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン 2020（改定第 3 版）に記載されている EASL（European Association for the Study of Liver）ガイドラインも参考になる。

単純性腹水と複雑性腹水

A. 単純性腹水：感染や肝腎症候群を伴っていない腹水

Grade 1：少量の腹水で、画像検査でしか診断できないもの

Grade 2：中等量の腹水で、理学的に貯留が明らかなもの

Grade 3：大量の腹水で、腹部が膨満しているもの

B. 複雑性腹水

①難治性腹水（*）

利尿剤抵抗性腹水：食事の塩分を制限し、利尿剤やアルブミン製剤を使用しても減少しないもの

利尿剤不耐性腹水：利尿剤の増量により、腎機能低下や肝性脳症が発生するもの

②特発性細菌性腹膜炎

（*）難治性腹水とは、医学的治療により減量困難な腹水、もしくは早期再発がみられる腹水とされる。【注釈】①上記病態の前提として、少なくとも 1 週間の集中的な利尿薬治療と塩分制限を受けていなければならない。

②早期再発とは、医学的治療により、初回の腹水減少が得られたあと、4 週間以内に Grade 2 または Grade 3 の腹水が再発した場合とされる。

（EASL ガイドライン 2018 より）

上図：日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン 2020（改定第 3 版）より改訂

脳症に関しては

肝性脳症に関しては、下記に示す、本邦では犬山シンポジウムにて制定された肝性脳症昏睡度 I～V に分類する方法や、国際的には、West Heaven Criteria (WHC) や International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) の基準で分けられている。評価に当たっては一定の基準を作成し、評価して行く事が望まれる。例えば評価に当たっては、犬山シンポジウムで制定された肝性脳症昏睡度の評価では肝性脳症（なし：1点、軽度 I～II 度：2点、昏睡 III 度以上：3点）と評価し、ISHEN の基準では Covert（不顕性）脳症は1点とする等一定の基準をもうける事が望ましい。

犬山シンポジウム (1981年)		
昏睡度	精神症状	参考事項
I	睡眠－覚醒リズムの逆転 多幸気分、ときに抑うつ状態 だらしなく、気にもとめない態度	retrospectiveにしか判定できない場合が多い
II	指南力（時・場所）障害、物を取り違える（confusion） 異常行動（例：お金をまく、化粧品をゴミ箱に捨てるなど） ときに傾眠状態（普通の呼びかけで開眼し、会話ができる） 無礼な言動があったりするが、医師の指示に従う態度をみせる	興奮状態がない 尿、便失禁がない 羽ばたき振戦あり
III	しばしば興奮状態または譫妄状態を伴い、反抗的態度をみせる 嗜眠状態（ほとんど眠っている） 外的刺激で開眼しうるが、医師の指示に従わない、または従えない（簡単な命令には応じうる）	羽ばたき振戦あり（患者の協力が得られる場合） 指南力は高度に障害
IV	昏睡（完全な意識の消失） 痛み刺激に反応する	刺激に対して、払いのける動作、顔をしかめる等がみられる
V	深昏睡 痛み刺激にもまったく反応しない	

上図：犬山シンポジウムで制定された肝性脳症昏睡度

肝性脳症の昏睡度分類

WHC	ISHEN	説明	提唱される基準	コメント
	異常なし	<ul style="list-style-type: none"> 神経・心理機能検査正常 臨床症状なし 	<ul style="list-style-type: none"> 神経・心理検査実施して正常 	
Minimal	Covert (不顕性)	<ul style="list-style-type: none"> 心理もしくは神経性生理学的試験で異常を示す 臨床的には神経精神症状なし 	<ul style="list-style-type: none"> 確立した心理テストもしくは神経心理テストで異常を示す 臨床症状なし 	<ul style="list-style-type: none"> 普遍的な診断基準なし
Grade I		<ul style="list-style-type: none"> わずかな注意欠如 多幸感もしくは不安 注意力の持続短縮 足し算あるいは引き算が不良 睡眠リズムの変化 	<ul style="list-style-type: none"> 時間空間認識能は保たれているが、患者本来ものと比べて臨床検査もしくは診察で認知・行動低下が存在する 	<ul style="list-style-type: none"> 臨床症状は通常再現性に乏しい
Grade II	Overt (顕性)	<ul style="list-style-type: none"> 無気力・無関心 時間の認識障害 顕著な性格変化 不適切な振る舞い 失調症 固定姿勢保持困難（羽ばたき振戦） 	<ul style="list-style-type: none"> 時間の認識障害（少なくとも次の3つを間違え；日付、曜日、月、季節、年） その他のあげた症状を伴うこともある 	<ul style="list-style-type: none"> 臨床症状は様々だが、ある程度再現性ある
Grade III		<ul style="list-style-type: none"> 傾眠～半傾眠 刺激に反応あり 錯乱 全体的な見当識障害 奇妙な行動 	<ul style="list-style-type: none"> 空間の認識障害（少なくとも次の3つを間違え；国、地方、市町村、場所） その他のあげた症状を伴うこともある 	<ul style="list-style-type: none"> 臨床症状はある程度再現性あり
Grade IV		<ul style="list-style-type: none"> 昏睡 	<ul style="list-style-type: none"> 痛覚刺激にも無反応 	<ul style="list-style-type: none"> 昏睡状態で再現可能

WHC: West Heaven Criteria

ISHEN: International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism

註: 日本の犬山シンポジウムの昏睡度分類はWHCのGrade IからIVに該当し、この部分をI～Vまでの5段階に分けるものとなっている。わが国の身体障害者手帳制度の肝機能障害の認定では、これを用いたChild-Pugh分類での肝性脳症項目の2点（軽度: I～II）および3点（昏睡: III度以上）が対象となっている。（Vilstrup H et al. Hepatology 2014;60; 715-735を参考に作成）

上図: 日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン2020(改定第3版)より改訂

PT に関しては

PT に関しては活性値 (%) で表す手法と、国際標準比 (INR) で表す手法がある。活性値 (%)、国際標準比 (INR) の両方を測定しておく事が望ましい。さらにワーファリンなどの抗凝固剤の服用により容易に反動しうる値であり、評価の際には統一した規定がされなければならない。

④ 安全性の評価

ヒト (自己) 末梢血由来 CD34 陽性細胞加工製品は適用時点から観察終了時期まで全身所見、局所所見、自覚症状の有無を確認する。有害事象、感染症やアレルギー反応の有無を観察する。マウス由来の抗体を使用することから、抗体産生の有無について評価を行うことが望ましい。肝動脈経由での投与の際には、カテーテル手技の安全性に加え、投与後の肝胆道系酵素上昇などに注意をする必要がある。さらに、非代償性肝疾患関連イベント発生率 (食道・胃静脈瘤出血、腹水、肝腎症候群、肝性脳症) や肝細胞癌発生や死亡イベントの追跡を同時に行う事も望まれる。

6. 参考文献

1. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, et al: The ISHAGE guidelines for CD34+ cells determination by flow cytometry. J Hematotherapy. 5: 213-226, 1996
2. 日本臨床検査標準協議会, 血液検査標準化検討委員会, フローサイトメトリーワーキンググループ: フローサイトメトリーによる CD34 陽性細胞検出に関するガイドライン (JCCLS H3-P V2.0) .
https://www.jccls.org/pdf/approval/Guidelines_for_CD34aV2.pdf.
3. 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.
4. Cholongitas E, Marelli L, Shusang V, et al. A systematic review of the performance of the model for end-stage liver disease (MELD) in the setting of liver transplantation. Liver Transpl 12:1049-1061, 2006.

7. 参考資料

犬山シンポジウム資料

日本消化器病学会・日本肝臓学会肝硬変診療ガイドライン 2020 (改定第3版)

厚生労働省 重度肝機能障害の身体障害認定基準

VI. 調査事項

1. 肝硬変症に対する他家脂肪組織由来間葉系幹細胞治療 寺井 崇二
2. 用語集 鍛冶 孝祐

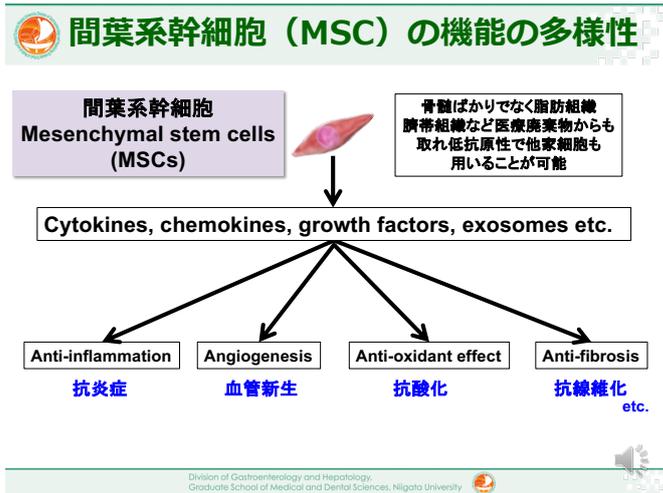
10月23日 2020年



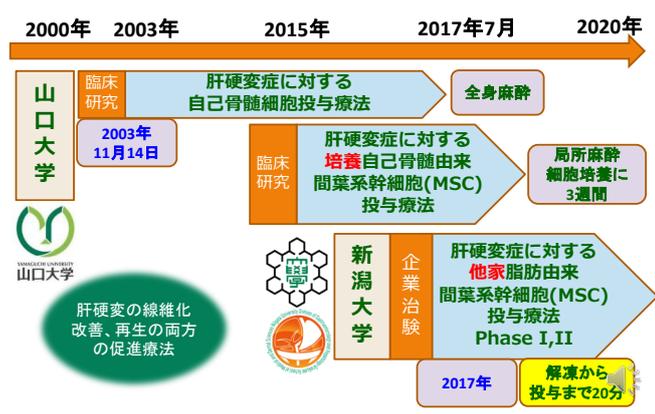
肝硬変症に対する他家脂肪組織由来 間葉系幹細胞治療

寺井 崇二
新潟大学大学院医歯学総合研究科
消化器内科学分野

NIGATA UNIVERSITY
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University



肝硬変治療開発のTime Line



自己骨髄細胞投与療法 臨床研究の対象患者・方法 ABMi (Autologous Bone Marrow Cells infusion) 療法

非代償性肝硬変症患者

2003年11月14日開始

- 診断と治療方針の決定 (適応者の決定)
- 全身麻酔
- 腸骨より自己骨髄液の採取
- 骨髄細胞の洗浄・収集・検査
- 単核球を投与 (造血系・間葉系細胞が含まれる)

点滴2時間 (治療1日) (非培養)

Terai S. Stem Cells 2006

非代償性肝硬変症
総ビリルビン値 <3.0 mg/dl,
血小板値は5万以上
肝細胞癌がない
心肺機能良好
(全身麻酔可能)

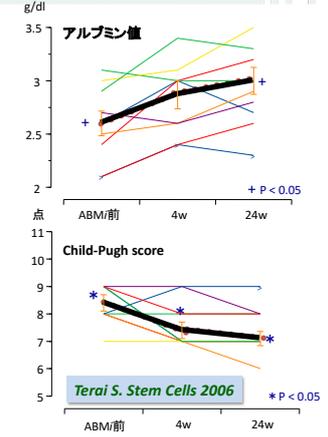
自己骨髄細胞投与療法(ABMi療法)による肝硬変治療

62 症例 (国内42、海外20) 実施 (合併症なし)

1. 診断と治療方針の決定 (適応者の決定)
2. 自己骨髄細胞の採取
3. 細胞の洗浄・収集・検査
4. 自己骨髄細胞の点滴投与 (単核球成分を投与 (造血系・間葉系細胞が含まれる))

Cell Processing Room (GMP Grade)
山口大学医学部附属病院
再生・細胞療法センター
2時間で検査・処理完了

臨床的: シンプルで効果的・培養なし
点滴1時間半(治療1日)
ドナー不要 免疫拒絶無し
臓器移植の1/10コスト
脳梗塞等他重篤疾患に応用可能



自己骨髄細胞投与療法の多施設臨床研究

20例 HBV related LC
Kim JK, Han KH et al.
Cell transplantation 2010

6例 アルコール性 LC
Saito T, Kawata S et al.
Stem cell & Development 2011

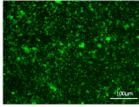
5例 HIV + HCV related LC
国立国際医療研究センター

10例 生活習慣病
沖縄ハートライフ病院
佐久川 廣 先生

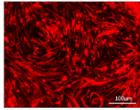
独立行政法人
国立国際医療研究センター
NIGSH
National Center for Global Health and Research

MSCとマクロファージ投与後の動態観察

GFP (+) id-BMM (マクロファージ)



Cell injection from tail vein



DsRed (+)MSC



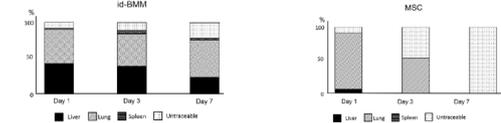
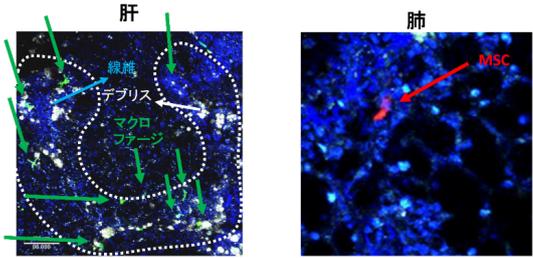
CCl4 liver-damaged mice

二光子励起顕微鏡による
ライブイメージング 大阪大学 菊田先生

緑のマクロファージ、赤のMSCを用いて二光子励起顕微鏡で肝・肺・脾を観察

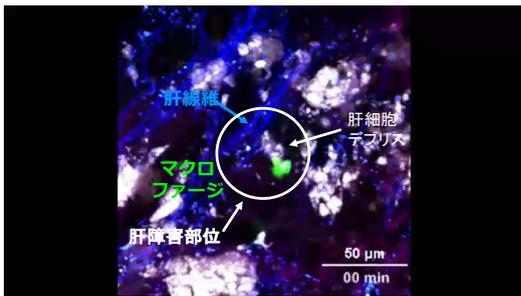
Division of Gastroenterology and Hepatology,
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University

MSCとマクロファージの肝臓、肺、脾臓での分布



マクロファージは1-7日目まで肝臓の障害部と肺に居続ける。
一方、MSCは肺に初期に多く行くが7日間のうちに多くが消失していく。

投与マクロファージの障害部での 活性化・肝線維化改善

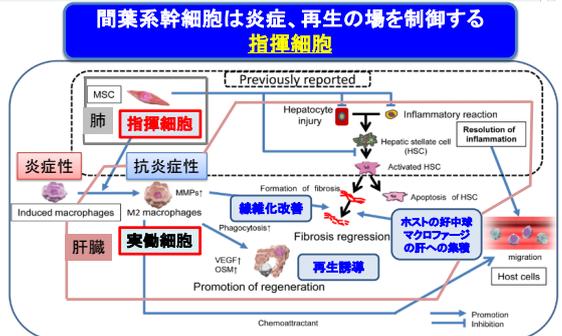


青: 肝線維 緑: マクロファージ

Watanabe, et al., Stem Cells Transl Med, 2018

Division of Gastroenterology and Hepatology,
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University

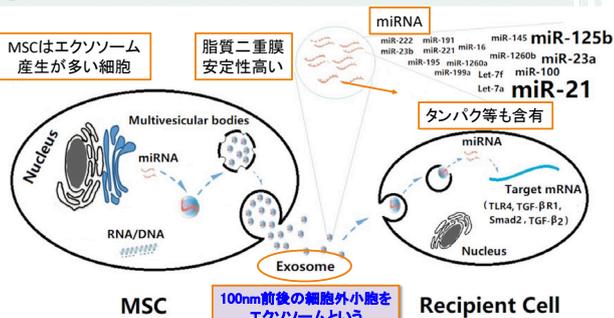
MSCとマクロファージの相互作用 (基礎研究)



Watanabe Y et al. Stem Cell Translational Medicine 2019 Mar;8(3):271-284

MSCやマクロファージによる治療は線維化改善と再生促進をもたらす。
MSCとマクロファージをつなぐ情報伝達としてエクソソームが重要?

MSCのエクソソーム分泌



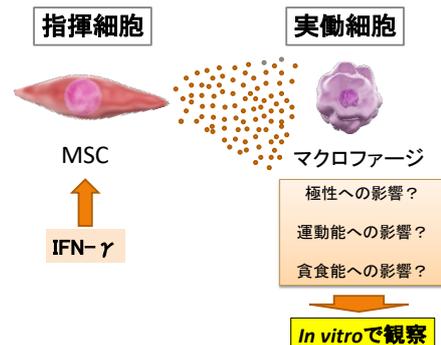
Stem Cell Translational Medicine 2019;00:1-11

細胞間の情報伝達の重要なツール(DDS)

Division of Gastroenterology and Hepatology,
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University

MSC由来エクソソームのマクロファージへの影響

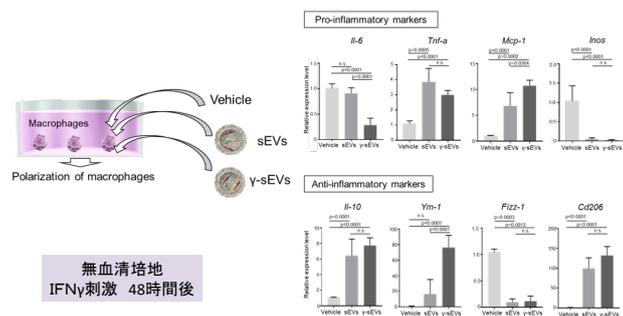
MSC由来エクソソームはマクロファージにどのような効果を与えるか?



Division of Gastroenterology and Hepatology,
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University



MSC由来のエクソソームがどのようなときに効果的に抗炎症性マクロファージへ誘導するか？



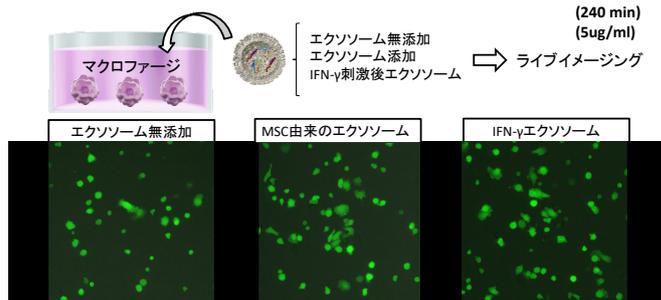
無血清培地
IFN γ 刺激 48時間後

IFN- γ で刺激後のMSC(ヒト脂肪組織由来)から得たエクソソーム(IFN- γ エクソソーム)はマクロファージを抗炎症性へと誘導した。→運動能は？

Division of Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University



エクソソーム投与後のマクロファージの運動の活性化



エクソソームはマクロファージの運動能も向上させた。→食食能は？

Division of Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University

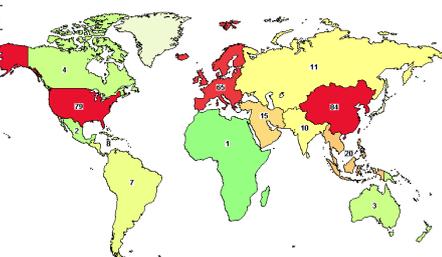
世界の他家間葉系細胞治療の臨床試験の状況

NIH U.S. National Library of Medicine

ClinicalTrials.gov

検索ワード: allogenic mesenchymal cell

対象疾患 (上位10)	試験数
Ischemia	47
Vascular Diseases	46
Musculoskeletal Diseases	41
Central Nervous System Diseases	37
Respiratory Tract Diseases	36
Lung Diseases	32
Collagen Diseases	31
Rheumatic Diseases	31
Autoimmune Diseases	30
Digestive System Diseases	30



他家間葉系幹細胞の安全性は世界的に認知されている

世界の細胞製品の承認状況 (赤字: 他家)

スウェーデン	韓国	カナダ	
Hyalograft-C (自家培養軟骨)	Chondron (自家培養軟骨) Holoderm (自家培養表皮) Kaloderm (同種培養表皮)	Prochymal (同種間葉系幹細胞)	
ドイツ	Keraheal (自家培養表皮細胞スプレー) Innolac (自家活性リンパ球)	米国	
BioSeed-S (自家培養表皮細胞) EpiDex (自家培養表皮) Chondrotransplant (自家培養軟骨) CACI/MACI (自家培養軟骨) BioSeed-C (自家培養軟骨) Chondrokin (培養軟骨細胞) CaRe S (自家培養軟骨) Chondrosphere (自家培養軟骨) CartiGro (自家培養軟骨)	Creavax-RCC (自家樹状細胞) Immuncell-LC (自家活性リンパ球) Hydrograft 3D (自家培養線維芽細胞) Adipocel (自家培養脂肪細胞) NKM (自家活性リンパ球) RMS Ossron (自家骨芽細胞) Artcell (自家培養軟骨) Autostem (自家脂肪細胞) Queencell (自家脂肪細胞) Cureskin (自家培養線維芽細胞) LSK Autograft (自家培養表皮細胞) Hearticellgram-AMI (自家骨髄幹細胞)	Epicel (自家培養表皮) TransCyte (同種凍結培養表皮) Apligraf (同種複合型培養皮膚) OrCel (同種複合型培養皮膚) Cartical (自家培養軟骨) Osteocel plus (同種骨) Provenge (自家免疫細胞) Laviv (自家培養線維芽細胞) Hemacord (同種帯血造血前駆細胞) Gintuit (歯科用同種複合型培養皮膚) MACI (自家培養軟骨) KYMRIAH (CAR-T) TECARTUS (CAR-T) YESCARTA (CAR-T)	
イタリア	Laserskin (自家培養表皮)	ニュージーランド	
欧州	YESCARTA (CAR-T) KYMRIAH (CAR-T) Alofisel (他家脂肪間葉系幹細胞) Spherox (自家培養軟骨) Sphrvelis (自家遺伝子導入CD34陽性細胞) Holoclair (自家培養角膜上皮)	Cartistem (同種帯血幹細胞) Cupistem (自家脂肪幹細胞) Invossa (TGF- β 導入同種培養細胞) JointStem (自家脂肪間葉系幹細胞)	Prochymal (同種間葉系幹細胞)
		オーストラリア	
		Recell/CellSpray (自家培養表皮細胞) Cartogen (自家培養軟骨)	

自家移植 (自家) と同種移植 (他家)

項目	自家移植	同種移植
安全性	拒絶反応	リスクは少ない
	生着性	高い
	感染症 (ウイルスなど)	工程由来のコンタミリスク
品質	組織 (原料)	規格化が困難
	製造方法	一定の標準化は可能
	最終製品	規格化が困難
工業化	組織採取	患者への負担が大きい
	加工期間 (出荷までの期間)	あり
	コスト	高い

品質管理及び工業化の容易さでは同種移植はメリットがある



細胞ソース例

表 1-2 手術摘出物等由来する細胞を利用して今後開発される再生医療製品の例*

手術摘出物	製品	適応例
表皮	培養皮膚	熱傷 慢性下肢潰瘍 表皮水泡症
軟骨	培養軟骨細胞	軟骨欠損
滑膜	滑膜由来幹細胞	軟骨欠損
歯	歯髓由来幹細胞	骨髄損傷 歯髄再生 炎症抑制
臍帯血	臍帯血由来幹細胞	外傷性・変形性関節炎 急性移植片対宿主病 (GVHD) 造血幹細胞移植の代替 (白血病、鎌状赤血球病等)
脂肪	脂肪組織由来間葉系幹細胞	心筋梗塞 肝臓変 クローン病
羊膜	羊膜由来間葉系幹細胞	急性移植片対宿主病 (GVHD) クローン病

必ずしも生着が必要ない

出所) 平成24年度中小企業支援調査 (再生医療の産業化に資する諸外国の制度比較に関する調査) (経済産業省、委託先株式会社三豊化学テクノロジー) 他

他家細胞として利用できる組織は限られる



再生医療等製品事例（9品目）
 (2019年8月31日現在・出典：日本再生医療学会事務局)

一般名/製品名	承認/保険取載	企業	対象疾患	標準治療価格
ヒト（自己）表皮由来細胞シート「ジェイス」	2007年承認 2009年保険取載	ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング	重症熱傷 先天性巨大色素性母斑	1042万円
ヒト（自己）軟骨由来組織「ジャック」	2012年承認 2013年保険取載	ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング	膝関節における外傷性軟骨欠損症又は離断性軟骨炎	212.9万円
ヒト（同種）骨髄由来間葉系幹細胞「テムセル HS 注」	2015年承認 2015年保険取載	JCRファーマ	造血幹細胞治療後の急性移植片対宿主病（GVHD）	1390万円
ヒト（自己）骨格筋由来細胞シート「ハートシート」	2015年承認※ 2015年保険取載	テルモ	重症心不全	1476万円
ヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞「ステミラック注」	2018年承認※ 2019年保険取載	ニプロ	・外傷性脊髄損傷（ASIA 機能障害尺度が A、B または C）	1495万7755円

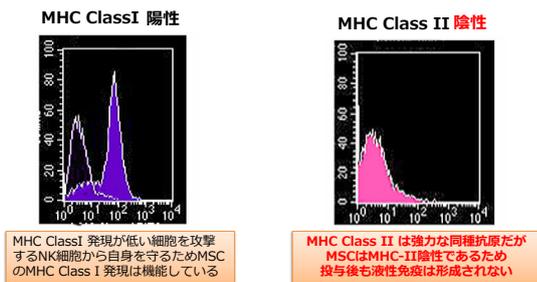
日本そして世界で他家間葉系幹細胞製品が広く安全に使用されている

再生医療等製品事例（9品目）
 (2019年8月31日現在・出典：日本再生医療学会事務局)

一般名/製品名	承認/保険取載	企業	対象疾患	標準治療価格
キメラ抗原受容体 T細胞（CAR T）療法「キムリア点滴静注」	2019年承認 2019年保険取載	ノバルティスファーマ	・再発または難治性 CD19 陽性の B 細胞性急性リンパ芽球性白血病（B-ALL） ・再発または難治性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）	3349万3407円
ヒト肝細胞増殖因子 HGF）遺伝子治療薬「コラテジエン筋注」	2019年承認 2019年保険取載	アンジェス	標準薬物治療の効果が不十分で、血行再建術が難しい慢性動脈閉塞症（閉塞性動脈硬化症・パーチャー病）	120万720円
ヒト運動神経細胞生存（SMN）遺伝子治療薬「フルゲンスマ点滴静注」	2020年承認 2020年保険取載	ノバルティスファーマ	脊髄性筋萎縮症患者（抗 AAV 抗体が陰性）	1億6707万7222円
ヒト（自己）角膜輪部由来角膜上皮細胞シート「ネビック」	2020年承認※ 2020年保険取載	ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング	角膜上皮幹細胞疲労患者（重症度ステージ IIA、IIB または III）	975万円

日本そして世界で他家間葉系幹細胞製品が広く安全に使用されている

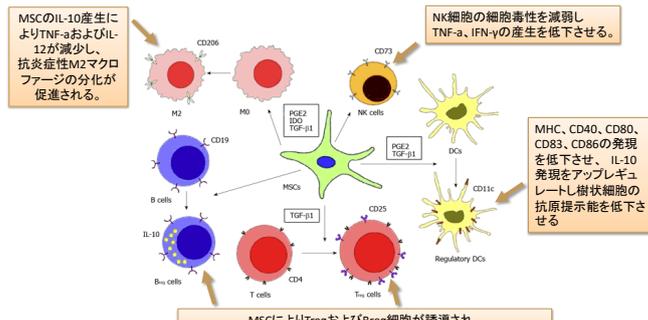
ヒト MSC と MHC 抗原の関係（MSC 一般論）



MSCはMHCII分子の発現レベルが低く、T細胞を活性化する共刺激分子も発現していないため、臨床ではMHC型（HLA型）の適合性に関係なく投与可能である

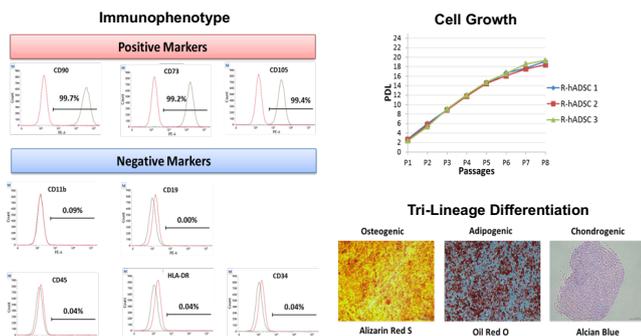
Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. Park JH, et al. J Cell Mol Med. 2008
 Immunomodulation by mesenchymal stem cells: Interplay between mesenchymal stem cells and regulatory lymphocytes. Ma DK, et al. World J Stem Cells. 2010
 Immunomodulation by mesenchymal stem cells: Interplay between mesenchymal stem cells and regulatory lymphocytes. Ma DK, Chen KH, Ma Q, et al. World J Stem Cells. 2010

MSCによる免疫抑制の誘導

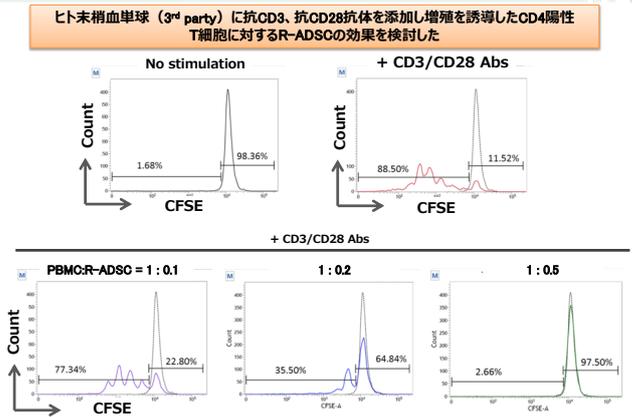


CD11c(+) Gr-1(+) bone marrow cells ameliorate liver fibrosis by producing interleukin-10 in mice. Suh YG, et al. Hepatology. 2012
 Immunomodulation by mesenchymal stem cells: Interplay between mesenchymal stem cells and regulatory lymphocytes. Ma DK, et al. World J Stem Cells. 2010
 Mechanisms Underlying Cell Therapy in Liver Fibrosis: An Overview. Polanco D, et al. Cells. 2019

ヒト脂肪由来間葉系細胞（R-ADSC）の特性



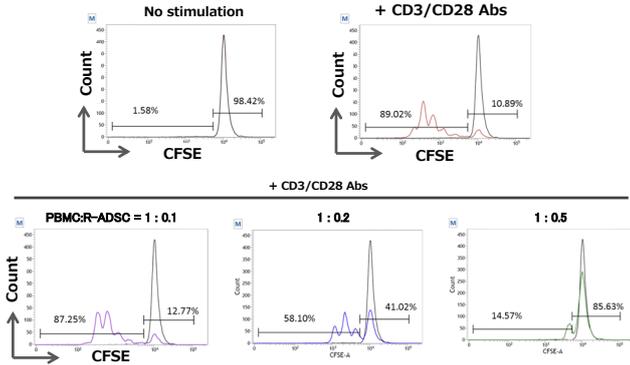
R-ADSCはCD4陽性T細胞の増殖を抑制する





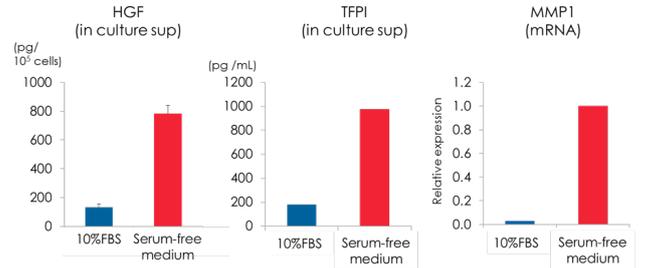
R-ADSCはCD8陽性T細胞の増殖を抑制する

ヒト末梢血単球 (3rd party) に抗CD3、抗CD28抗体を添加し増殖を誘導したCD8陽性T細胞に対するR-ADSCの効果を検討した



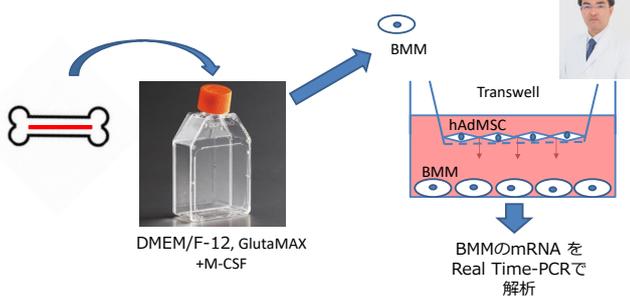
Increased expression of effector molecules in hADSCs expanded with serum-free medium

The expression of effector molecules for the resolution of liver fibrosis



R-ADSCのマウスマクロファージに対する影響

土屋 淳紀 講師

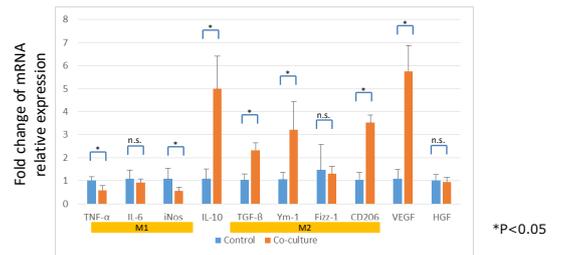


hAdMSCがマウスの骨髄単球からM-CSFにより誘導したマクロファージへの極性に及ぼす影響をみた



R-ADSCのマウスマクロファージに対する影響

n=8 (Control4, Co-culture4)



hAdMSCと共培養するとMacrophageはM2 (Anti-inflammatory) 方向にshiftした



2017年7月27日 プレスリリース

日本初となる、肝硬変を対象とした他家脂肪組織由来幹細胞製剤の治験を開始します

2017年07月27日 木曜日 新島 隆

本学大学院医学総合研究科消化器内科学分野の専任助教授とロート製薬株式会社は、新しい治療方法の開発が望まれている肝硬変を対象とした再生医療研究開発を進めてきました。この度、日本初の新薬候補として他家脂肪組織由来幹細胞製剤 ADR-001 の治験を、治験責任医師の土井貴裕と本学大学院総合研究科にて開始いたします。

詳しくはこちら(PDF:289KB)



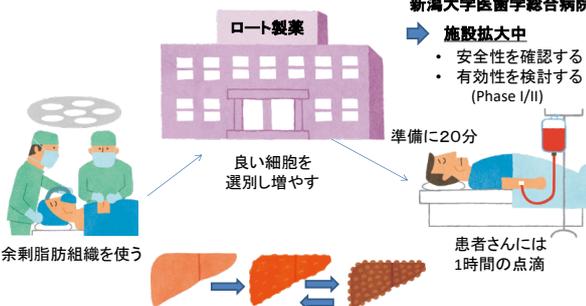
日本初の脂肪組織由来の他家間葉系幹細胞(MSC)を使った肝硬変に対する治験

新潟大学医学総合病院

ロート製薬

施設拡大中

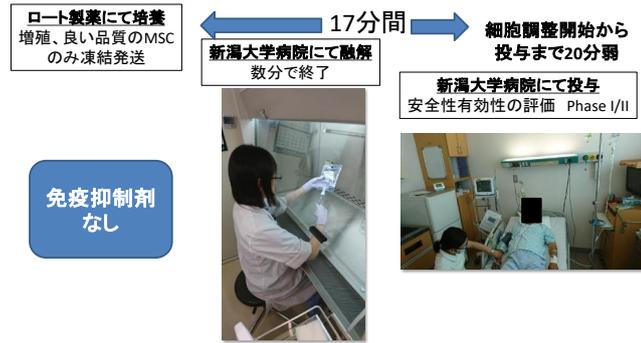
- 安全性を確認する
- 有効性を検討する (Phase I/II)



C型肝炎由来、NASH由来の肝硬変の患者さんで Child-PughスコアがグレードBに相当する患者さんが対象 On demandに細胞が投与できる→産業化が目指せる



肝硬変に対する日本初の他家由来間葉系幹細胞 (MSC) の投与 (2017年)



現在Phase I(安全評価)を順調に終了し、今後Phase IIへ

肝硬変患者を対象とするADR-001の 第 I / II 相臨床試験の概要

【対象者】

C型肝炎又はNASHによる非代償性肝硬変 (Child-Pugh分類*・グレードB) の患者

【目的】

- ◆第 I 相試験
3用量の本治験製品を単回投与し安全性を評価する。また有効性の予備的な評価を行い、総合的に次相試験での投与量 (推奨用量) を決定する。
- ◆第 II 相試験
第 I 相試験で決定した推奨用量を1週間に1回、4週間繰り返し投与した際の有効性の探索及び安全性の検討を行う。

【主な評価項目】

- ◆第 I 相試験
主要評価項目・安全性
- ◆第 II 相試験
主要評価項目・有効性 : Child-Pughスコア 改善率、MRE



ご清聴ありがとうございます

Snow Ship



新潟大学地域医療教育センター
魚沼基幹病院 消化器内科学分野

Sun Ship



新潟大学大学院医学総合研究科
消化器内科学分野

Swan Ship



新潟大学医学部健康寿命延伸
消化器疾患先制医学講座

Sky Ship



新潟大学医学部消化器疾患
低侵襲予防医学開発講座

Soul Ship



新潟大学医学部消化器疾患
診療ネットワーク講座

Sophistication Ship



新潟大学医学部総合病院
肝疾患相談センター

用語集

鍛治 孝祐

あ行			
アフエーシス	アフエーシス	Apheresis	血液から目的の成分を分離し抽出、または排出する方法。本文書では、末梢血中に出現した造血幹細胞を分離・抽出する方法を指す。
アルコールせいかんしょうがい	アルコール性肝障害	Alcoholic liver injury	アルコールの常用飲用(アルコール依存)によって引き起こされる一連の肝臓疾患のこと。アルコール性肝硬変は、全肝硬変の20%程度を占める。
アルブミン	アルブミン	Albumin	血清中に多く存在するタンパク質の一つ。主に肝臓で合成され、血清蛋白の約50～65%を占める。肝硬変では肝機能低下により血清値が低下する。
おうだん	黄疸	Jaundice	身体にビリルビンが過剰蓄積することで眼球や皮膚といった組織や体液が黄染した状態。肝硬変の主要症状の一つ。

か行			
かんいしよく	肝移植	Liver transplantation	肝臓の移植手術のこと。日本では、生体肝移植と死体肝移植が行われ、非代償性肝硬変は肝移植の適応である。
かんこうどそくてい	肝硬度測定	Liver stiffness measurement	肝生検を行わずに、非侵襲的に肝臓の硬さを評価する手法の総称。主に超音波検査を用いて弾性値を測定するフィブロスキャンや、MRI検査を用いるMRエラストグラフィが行われる。
かんこうへん	肝硬変	Liver cirrhosis	種々の原因に起因する肝障害が慢性的に持続した結果、肝臓の大部分が線維に置き換わった状態。肝硬変になると、肝臓に残存する肝細胞が減少し、硬くなった肝臓への血流量は減少するために、肝機能は低下する。
かんさいぼうががん	肝細胞癌	Hepatocellular carcinoma (HCC)	肝臓に発生する腫瘍の一つで原発性肝癌の90%以上を占める。80%~90%が肝硬変あるいはその前段階である慢性肝炎に合併して発生する。
かんしつせいはいえん	間質性肺炎	Interstitial pneumonia	肺の間質組織の線維化が起こる疾患の総称である。特発性、感染、膠原病、薬剤、放射線などが原因となる。
かんじんしょうこうぐん	肝腎症候群	Hepatorenal syndrome	非代償性肝硬変や劇症肝炎に伴う進行性の機能的急性腎不全である。腎血流低下による腎機能障害が病態となる。
かんせいのうしょう	肝性脳症	Hepatic encephalopathy	肝硬変の主要合併症の一つ。肝機能低下による意識障害を指す。肝臓でアンモニア分解能が低下した結果起こるアンモニア蓄積が主な原因である。
かんせんいか	肝線維化	Liver fibrosis	肝臓が持続的に傷害を受け、修復される過程で、瘢痕として線維組織が形成される組織学的変化を指す。慢性肝炎、肝硬変における基本的な病態である。
かんどうみやくとうよ	肝動脈投与	Intraarterial drug administration	再生医療等製品の投与経路の一つ。一般に、鼠径部から大腿動脈にカテーテルを挿入して、カテーテル先端を固有肝動脈あるいは左および右肝動脈を留置したうえで移植細胞を注入する。
かんようけいみきさいぼう	間葉系幹細胞	Mesenchymal stem cell (MSC)	中胚葉性組織(間葉)に由来する体性幹細胞の一種で、骨、脂肪、軟骨への分化能を有する。脂肪組織、骨髄、臍帯、歯髄から分離することが可能で、組織再生・修復を促進する。
かんよびのう	肝予備能	Hepatic reserve	肝臓に保たれた予備能力のことで、肝臓の機能がどの程度保たれているかを示すもの。主に肝硬変を背景にもつ肝細胞癌患者の治療方針を決める上でChild-pughスコアにより評価が行われる。
ひしゅ・きよひ	脾腫・巨脾	Splenomegaly	脾臓が腫大した状態。肝硬変で見られる所見であるが、心機能障害、感染症、骨髄疾患、癌などでも認められる。
こつずいそしき	骨髄組織	Bone marrow tissue	骨の中に存在する柔組織であり、血球細胞を造り出す造血細胞とそれらを支持する間質細胞を含む。間葉系幹細胞は間質細胞に含まれる。

さ行			
さいたいそしき	臍帯組織	Umbilical cord tissue	臍帯の組織および臍帯血のこと。臍帯血には、間葉系幹細胞、造血幹細胞、血管内皮前駆細胞などが存在し、臍帯幹細胞と呼ばれる。
Cがたかんえん	C型肝炎	Hepatitis C	C型肝炎ウイルスの感染によって引き起こされる一連の肝疾患のこと。感染すると約70%が慢性化し、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を発症する。日本の肝硬変の約50%を占める。
しえんかたんそ	四塩化炭素	Carbon tetrachloride	動物研究において主に肝障害を誘発する目的で用いられる化学物質。齧歯類に反復投与することで、肝硬変モデルを作成することができる。
しずいそしき	歯髄組織	Pulp tissue	歯の内部の歯髄腔を満たす軟組織。間葉系幹細胞に属する歯髄幹細胞を含む。
しばうそしき	脂肪組織	Adipose tissue	脂肪細胞により構成された組織で、エネルギーを脂肪の形で蓄積、外界からの衝撃の緩和による内臓などの保護、体温維持といった機能を持つ。間葉系幹細胞である脂肪幹細胞を含む。
じょうみやくちゅうしゃ	静脈注射	Intravenous injection	再生医療等製品の投与経路の一つ。脂肪幹細胞による再生治療の多くは静脈注射により投与される。
しよくどういじょうみやくりゅう	食道胃静脈瘤	Esophagogastric varices	肝硬変の主要合併症の一つ。門脈圧亢進に伴い、食道や胃の粘膜下層の静脈が拡張・蛇行し瘤状に隆起して静脈瘤を形成するものを指す。破裂すると大量吐血を来す。

た行

な行

は行

ひアルコールせいしばうかんえん	非アルコール性脂肪肝炎	Nonalcoholic steatohepatitis (NASH)	メタボリックシンドロームにより肝臓に脂肪が蓄積する脂肪肝の病態の一つ。進行すれば肝炎から肝硬変、肝細胞癌発症に至る。
Bがたかんえん	B型肝炎	Hepatitis B	B型肝炎ウイルスの感染によって引き起こされる一連の肝疾患のこと。日本においてウイルス保有者(キャリア)は、150万人程度で、約95%は自然治癒するが、約5%は肝炎発症となり、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌へと進行することがある。
ひだいししょうせいかんこうへん	非代償性肝硬変	Decompensated liver cirrhosis	肝硬変のうち、肝性脳症、黄疸、腹水、浮腫、出血傾向など肝不全に起因する症状が出現するものを指す。なお、Child-Pugh スコア7点以上を非代償性肝硬変の目安とすることが多い。
ビリルビン	ビリルビン	Bilirubin	赤血球中のヘモグロビンが壊れてできる色素。肝臓で処理(抱合(ほうごう))されて、胆汁を介して十二指腸に排泄される。肝硬変では血清値が上昇する。
ファイブロスキャン	ファイブロスキャン	FibroScan	非侵襲的な肝硬度測定法の一つ。体外から肝臓に振動波を当て、肝臓内を伝搬する速度を測定することで、肝組織の線維化の程度を評価する。
ふくすい	腹水	Ascites	肝硬変の主要合併症の一つ。血清アルブミン値低下や門脈圧亢進が起こった結果、血管外に水分や血漿成分が漏出し、腹腔内に貯留したもの。
ふくすいせんし	腹水穿刺	Paracentesis	腹水の治療として、腹腔内にカテーテルを留置して腹水を排出する処置を指す。
ふくすいろうかのうしゅくさいじょうちゅう	腹水濾過濃縮再静注	Cell-free and Concentrated Ascites Reinfusion Therapy (CART)	利尿剤などでは治療困難な難治性腹水に対して行う治療法。腹水(胸水症を含む)患者の腹水(又は胸水)を採取し、それを濾過、濃縮して、患者に再静注する。
フローサイトメトリー	フローサイトメトリー	Flow cytometry	不均一な混合液中の細胞を計数、選別、および特性解析するためのレーザーを利用した技術。多種の細胞群から目的の細胞を選別する目的で行われる。
プロトロンビンじかん	プロトロンビン時間	Prothrombin Time (PT)	血液の凝固因子に関する指標の一つ。凝固因子を産生しているのは肝臓であるため、肝硬変などで肝臓の機能が低下した場合、因子の欠乏してプロトロンビン時間が延長する。

ま行

まっしょうけつたんかくきゅうさいぼう	末梢血単核球細胞	Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)	末梢血から分離された単球やリンパ球を含む単核球を指す。ヒトや動物から採取した新鮮な血液から、血漿成分、赤血球、血小板および顆粒球を除去することで単離可能である。
--------------------	----------	---	--

や行

ら行

VII. 参考資料

1. 平成 24 年 9 月 7 日付薬食発 0907 第 2 号厚生労働省医薬食品局長通知「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関する指針」
2. 平成 24 年 9 月 7 日付薬食発 0907 第 3 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関する指針」
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」
4. 平成 28 年 2 月 4 日付障発 0204 第 1 号厚生労働省社会・援護局障害保健福祉部長通知「「身体障害者障害程度等級表の解説(身体障害認定基準)について」の一部改正について」

薬食発0907第2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（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

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、ヒト由来の体性幹細胞うち、自己由来体性幹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（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自己由来体性幹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（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関する指針

はじめに

1. 本指針は、ヒト由来の体性幹細胞のうち、自己由来体性幹細胞を加工した医薬品又は医療機器(以下「ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等」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、体性幹細胞加工医薬品等の種類や特性、臨床上の適用法は多種多様であり、また、本分野における科学的進歩や経験の蓄積は日進月歩である。本指針を一律に適用したり、本指針の内容が必要事項すべてを包含しているとみなしたりすることが必ずしも適切でない場合もある。したがって、個々の医薬品等についての試験の実施や評価に際しては本指針の目的を踏まえ、その時点の学問の進歩を反映した合理的根拠に基づき、ケース・バイ・ケースで柔軟に対応することが必要であること。

2. 薬事戦略相談あるいは治験相談におけるヒト体性幹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充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 原材料となるヒト細胞・組織	6
(1) 生物学的構造・機能の特徴と選択理由	6
(2) ドナーに対する留意点	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	7
(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	9
(3) 細胞に遺伝子工学的改変を加える場合	10
第2 製造工程	11
1 ロット構成の有無とロットの規定	11
2 製造方法	11
(1) 受入検査	11
(2) 細菌、真菌及びウイルス等の不活化・除去	11
(3) 組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離等	11
(4) 最終製品の構成要素となる細胞の作成	11
(5) 細胞のバンク化	11
(6) 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	12
3 最終製品の構成要素となる細胞の特性解析	12
4 最終製品の形態、包装	12
5 製品の保存及び運搬	12
6 製造方法の恒常性	12
7 製造方法の変更	13
第3 最終製品の品質管理	13
1 総論	13
2 最終製品の品質管理法	13
(1) 細胞数並びに生存率	13
(2) 確認試験	14
(3) 細胞の純度試験	14
(4) 細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験	14
(5) 製造工程由来不純物試験	14
(6) 無菌試験及びマイコプラズマ否定試験	14

(7)	エンドトキシン試験	15
(8)	ウイルス試験	15
(9)	効能試験	15
(10)	力価試験	15
(11)	力学的適合性試験	15
第3章	ヒト体性幹細胞加工医薬品等の安定性	15
第4章	ヒト体性幹細胞加工医薬品等の非臨床安全性試験	16
第5章	ヒト体性幹細胞加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験	17
第6章	ヒト体性幹細胞加工医薬品等の体内動態	18
第7章	臨床試験	18

第1章 総則

第1 目的

本指針は、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 「ヒト体性幹細胞」とは、ヒトから採取された細胞又は当該細胞の分裂により生ずる細胞であって、多分化能を有し、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ことが推定されるもの及びこれらに由来する細胞のうち、以下のものを指す。すなわち、組織幹細胞（例えば、造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞（骨髄間質幹細胞・脂肪組織由来幹細胞を含む。）、角膜上皮幹細胞、皮膚幹細胞、毛細胞幹細胞、腸管幹細胞、肝幹細胞及び骨格筋幹細胞）及びこれを豊富に含む細胞集団（例えば、造血系幹細胞を含む全骨髄細胞）をいい、血管前駆細胞、臍帯血及び骨髄間質細胞を含む。また、体外でこれらの細胞を培養して得られた細胞を含む。ヒト胚性幹細胞（ES 細胞）、ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）、ヒト人工多能性幹細胞様細胞（iPS 様細胞）、ヒト胚性生殖細胞（EG 細胞）、ヒト多能性生殖系列幹細胞（mGS 細胞）、ヒト単為発生幹細胞、ヒト核移植幹細胞、ヒトがん細胞、ヒトがん幹細胞、及びこれらに由来する細胞は含まない（注：ヒト胚性幹細胞（ES 細胞）、ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）、ヒト人工多能性幹細胞様細胞（iPS 様細胞）の定義はそれぞれ「ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針」、「ヒト（同種/自己）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針」に従う）。
- 2 「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。
- 3 「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(自己)体性幹細胞加工医薬品等を出荷するまでに行う行為をいう。
- 4 「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。
- 5 「ドナー」とは、ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の原料となる細胞・組織を提供するヒトをいう。自己由来体性幹細胞加工医薬品等にあっては、患者はドナーでもある。（注：実際の治療においては患者がドナーとなる。開発段階等において、試験製造を行う場合には、患者以外のドナーから採取した細胞・組織を使用する場

合も想定される。)

- 6 「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。

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の恒常性保証は、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の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 原材料となるヒト細胞・組織

(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、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、当該細胞・組織を原材料として選択した理由を説明すること。特に原材料となる体性幹細胞が有用な分化能を有することを明らかとすること。この場合の分化能とは、多系統への分化能を指しているわけではなく、生体内での機能を期待する細胞への分化能を有することを示すことで良い。また、*in vitro*での分化能の提示が望ましいが、合理的な説明がつけば *in vivo*での分化で示すことは可能である。例えば、体性幹細胞の1つである心筋幹細胞を原材料とする場合には、心筋幹細胞が心筋細胞へと分化しうることを示すことで良い。

なお、治験開始前には、試験的検体を用いた検討によっても良いが、これらの検討結果から患者の細胞に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良い。

(2) ドナーに対する留意点

患者、製造従事者及び医療従事者の安全性を確保する観点等から、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を考慮して感染症に関する検査項目を定め、その妥当性を明らかにすること。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)に留意すること。

また、遺伝的特徴、病歴、健康状態等を考慮して適格性基準を定め、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。

(3) ドナーに関する記録

原材料となる細胞・組織について、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

原材料となる細胞・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

採取した細胞・組織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

目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質を明らかにし、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。

なお、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。

(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。

(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 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

イ 栄養成分及び排泄物の拡散

ウ 非細胞成分が適用部位周辺に及ぼす影響

エ 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とする場合、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。

第2 製造工程

ヒト体性幹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・組織の受け入れから体性幹細胞の単離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・組織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っては、それまでに得られた試験検体での実測値を提示し、これらを踏まえた暫定値を示すこと。

(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、細胞の分離、体性幹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。体性幹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) 最終製品の構成要素となる細胞の作製

ヒト細胞・組織の採取から体性幹細胞の単離を経て、最終製品の構成要素となる細胞を取得するまでの方法（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。

(5) 細胞のバンク化

ヒト体性幹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

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、自己細胞由来であ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。

(6) 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

ヒト体性幹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、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、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由来の細胞に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

ヒト体性幹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、試験的検体を用いてあらかじめ評価しておくこと。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

ヒト体性幹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。

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須なものを除き、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

HBV、HCV、HIV、HTLV につき、患者の段階で否定し得ず、かつこれらのウイルスを増殖させる可能性のある細胞の場合には、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、体性幹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。セル・バンクや中間製品においてウイルス否定試験が実施されている場合はこの限りではない。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体性幹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。

(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 ヒト体性幹細胞加工医薬品等の安定性

製品化したヒト体性幹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、製品化したヒト体性幹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 ヒト体性幹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。

ヒト由来の試験用検体は貴重であり、また、ヒト由来の製品を実験動物等で試験し、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、ヒト体性幹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体性幹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、自己細胞由来であることや、製品の特性及び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 製品の種類に応じて、患者への適用により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。
- 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 良性腫瘍を含む腫瘍形成及びがん化の可能性については、製品の種類や特性、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して考察すること。必要に応じて適切な動物モデル等を利用した検討を行うこと。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。特に、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 ヒト体性幹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、ヒト体性幹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 適切な動物由来細胞・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 ヒト体性幹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 ヒト体性幹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、例えば間葉系幹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

ヒト体性幹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、臨床上有用性を勘案して評価されるものであり、ヒト体性幹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臨床試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 ヒト体性幹細胞加工医薬品等の適用及び併用薬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る、目的とする細胞・組織の由来、対象疾患及び適用方法等を踏まえて適切に計画すること。

薬食発0907第3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）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

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、ヒト由来の体性幹細胞うち、同種由来体性幹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）体性幹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体性幹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）体性幹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、ヒト由来の体性幹細胞のうち、同種由来体性幹細胞（自己由来体性幹細胞を除く）を加工した医薬品又は医療機器（以下「ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等」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、体性幹細胞加工医薬品等の種類や特性、臨床上の適用法は多種多様であり、また、本分野における科学的進歩や経験の蓄積は日進月歩である。本指針を一律に適用したり、本指針の内容が必要事項すべてを包含しているとみなしたりすることが必ずしも適切でない場合もある。したがって、個々の医薬品等についての試験の実施や評価に際しては本指針の目的を踏まえ、その時点の学問の進歩を反映した合理的根拠に基づき、ケース・バイ・ケースで柔軟に対応することが必要であること。

2. 薬事戦略相談あるいは治験相談におけるヒト体性幹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満たし、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 原材料となるヒト細胞・組織	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
第2 製造工程	11
1 ロット構成の有無とロットの規定	11
2 製造方法	11
(1) 受入検査	11
(2) 細菌、真菌及びウイルス等の不活化・除去	12
(3) 組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離等	12
(4) 最終製品の構成要素となる細胞の作成	12
(5) 細胞株の樹立と使用	12
(6) 細胞のバンク化	12
(7) 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	12
3 最終製品の構成要素となる細胞の特性解析	12
4 最終製品の形態、包装	13
5 製品の保存及び運搬	13
6 製造方法の恒常性	13
7 製造方法の変更	13
第3 最終製品の品質管理	13
1 総論	13
2 最終製品の品質管理法	14
(1) 細胞数並びに生存率	14
(2) 確認試験	14
(3) 細胞の純度試験	14
(4) 細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験	14
(5) 製造工程由来不純物試験	15

(6)	無菌試験及びマイコプラズマ否定試験	15
(7)	エンドトキシン試験	15
(8)	ウイルス試験	15
(9)	効能試験	16
(10)	力価試験	16
(11)	力学的適合性試験	16
第3章	ヒト体性幹細胞加工医薬品等の安定性	16
第4章	ヒト体性幹細胞加工医薬品等の非臨床安全性試験	16
第5章	ヒト体性幹細胞加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験	18
第6章	ヒト体性幹細胞加工医薬品等の体内動態	18
第7章	臨床試験	19

第1章 総則

第1 目的

本指針は、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 「ヒト体性幹細胞」とは、ヒトから採取された細胞又は当該細胞の分裂により生ずる細胞であって、多分化能を有し、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ことが推定されるもの及びこれらに由来する細胞のうち、以下のものを指す。すなわち、組織幹細胞(例えば、造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞(骨髄間質幹細胞・脂肪組織由来幹細胞を含む。))、角膜上皮幹細胞、皮膚幹細胞、毛細胞幹細胞、腸管幹細胞、肝幹細胞及び骨格筋幹細胞)及びこれを豊富に含む細胞集団(例えば、造血系幹細胞を含む全骨髄細胞)をいい、血管前駆細胞、臍帯血及び骨髄間質細胞を含む。また、体外でこれらの細胞を培養して得られた細胞を含む。ヒト胚性幹細胞(ES細胞)、ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)、ヒト人工多能性幹細胞様細胞(iPS様細胞)、ヒト胚性生殖細胞(EG細胞)、ヒト多能性生殖系列幹細胞(mGS細胞)、ヒト単為発生幹細胞、ヒト核移植幹細胞、ヒトがん細胞、ヒトがん幹細胞、及びこれらに由来する細胞は含まない(注:ヒト胚性幹細胞(ES細胞)、ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)、ヒト人工多能性幹細胞様細胞(iPS様細胞)の定義はそれぞれ「ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針」、「ヒト(同種/自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針」に従う)。
- 2 「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。
- 3 「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)体性幹細胞加工医薬品等を出荷するまでに行う行為をいう。
- 4 「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。
- 5 「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。
- 6 「ドナー」とは、ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の原料となる細胞・組織を提供するヒトをいう。

- 7 「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。

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の恒常性保証は、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の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 原材料となるヒト細胞・組織

(1) 起源及び由来、選択理由

原材料として用いられる細胞・組織の起源及び由来について説明し、当該細胞・組織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、当該細胞・組織を原材料として選択した理由を説明すること。特に原材料となる体性幹細胞が有用な分化能を有することを明らかとすること。この場合の分化能とは、多系統への分化能を指しているわけではなく、生体内での機能を期待する細胞への分化能を有することを示すことで良い。また、*in vitro* での分化能の提示が望ましいが、合理的な説明がつけば *in vivo* での分化で示すことは可能である。例えば、体性幹細胞の1つである心筋幹細胞を原材料とする場合には、心筋幹細胞が心筋細胞へと分化しうることを示すことで良い。

これらの検討結果から原材料となる細胞・組織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

一のゲノム・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。

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

(3) ドナーに関する記録

原材料となる細胞・組織について、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

原材料となる細胞・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え防止策

採取した細胞・組織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、取り違え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

目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質を明らかにし、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。

なお、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。

(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。

(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。

第2 製造工程

ヒト体性幹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

ヒト細胞・組織の受け入れから体性幹細胞の単離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・組織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っては、それまでに得られた試験検体での実測値を提示し、

これらを踏まえた暫定値を示すこと。

(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

原材料となる細胞・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、細胞の分離、体性幹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。体性幹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) 最終製品の構成要素となる細胞の作製

ヒト細胞・組織の採取から体性幹細胞の単離を経て、最終製品の構成要素となる細胞を取得するまでの方法（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。

(5) 細胞株の樹立と使用

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。樹立の方法を明確にし、可能な範囲でその妥当性を明らかにすること。

株化細胞の品質の均質性及び安定性を保持するため、必要な特性解析要件（細胞純度、形態学的評価、表現型特異的マーカー、核型など）を同定してその基準を設定するとともに、安定性を維持したまま増殖が可能な継代数を示すこと。

株化細胞に関しては、適切な動物モデル等を利用し、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。

(6) 細胞のバンク化

ヒト体性幹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。

(7) 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

ヒト体性幹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、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

学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質、核型、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。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由来の細胞に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

ヒト体性幹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、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

ヒト体性幹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。

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

2 最終製品の品質管理法

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

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

(1) 細胞数並びに生存率

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

(2) 確認試験

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

(3) 細胞の純度試験

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

(4) 細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験

細胞由来の各種目的外生理活性物質のうち、製品中での存在量如何で患者に安全

性上の重大な影響を及ぼす可能性が明らかに想定される場合には、適切な許容量限度試験を設定すること。なお、治験開始時においては、少数の試験的検体での実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

(5) 製造工程由来不純物試験

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

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

(6) 無菌試験及びマイコプラズマ否定試験

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

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

(7) エンドトキシン試験

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

(8) ウイルス試験

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等を製造工程中に増殖させる可能性のある細胞を用いる際には、中間製品、最終製品等

についてもウイルス等の存在を否定する適切な試験を実施すること。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体性幹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。

(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 ヒト体性幹細胞加工医薬品等の安定性

製品化したヒト体性幹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、製品化したヒト体性幹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 ヒト体性幹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。

ヒト由来の試験用検体は貴重であり、また、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製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、ヒト体性幹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体性幹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検討すること。

- 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 製品の種類に応じて、患者への適用により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。
- 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 良性腫瘍を含む腫瘍形成及びがん化の可能性については、製品の種類や特性、投与経路、対象疾患、生着部位及び試験系の妥当性等を総合的に勘案して考察すること。必要に応じて適切な動物モデル等を利用した検討を行うこと。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ている場合には、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。特に、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 ヒト体性幹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、ヒト体性幹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 ヒト体性幹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 ヒト体性幹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、例えば間葉系幹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

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

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

薬生機審発0627第1号
令和元年6月27日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長
（ 公 印 省 略 ）

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

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

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

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

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

1. はじめに

再生医療等製品（「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」（昭和 35 年法律第 145 号）第 2 条第 9 項に規定する「再生医療等製品」をいう。以下同じ。）のうち、ヒト細胞加工製品の品質及び安全性を確保するための基本的な技術要件は、「ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」（平成 20 年 2 月 8 日付け薬食発第 0208003 号厚生労働省医薬食品局長通知。以下「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）及び「ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」（平成 20 年 9 月 12 日付け薬食発第 0912006 号厚生労働省医薬食品局長通知。以下「ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）に定められているところである。また、ヒト細胞加工製品の中でも、ヒト幹細胞加工製品の品質及び安全性の確保については、「ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発第 0907 第 2 号厚生労働省医薬食品局長通知）、「ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発第 0907 第 3 号厚生労働省医薬食品局長通知）、「ヒト（自己）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発第 0907 第 4 号厚生労働省医薬食品局長通知）、「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発第 0907 第 5 号厚生労働省医薬食品局長通知）及び「ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発第 0907 第 6 号厚生労働省医薬食品局長通知）（以下「ヒト幹細胞加工医薬品等 5 指針」と総称する。）にも定められているところである。

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

2. 本文書の位置づけ

本文書は、技術開発の著しい多種多様なヒト細胞加工製品中に混在する可能性がある造腫瘍性細胞の検出を対象とするものである。また、検出試験そのものの開発や技術革新も日進月歩である。したがって、留意すべき事項を網羅的に示したのではなく、現時点で考えられる点について可能な限り示しているに過ぎず、今後の更なる技術革新や知見の集積等を踏まえ改訂されるものであり、そのまま製造販売承認申請において適用されるべきとの拘束力を有するものではない。また、本文書は各試験の特徴・性能を整理したものであって、開発段階のどのステージに適用すべきかを明示するものではない。

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

3. 用語の定義

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

- 1) 造腫瘍性 (tumorigenicity) : 動物に移植された細胞集団が増殖することにより、悪性又は良性の腫瘍を形成する能力のこと。生理活性物質又は化学物質が細胞を不死化して悪性又は良性の腫瘍を誘発する能力 (腫瘍原性、oncogenicity) や、生理活性物質又は化学物質が細胞を不死化して悪性腫瘍を誘発する能力 (がん原性、carcinogenicity) とは区別される。なお、本文書では、ES/iPS 細胞 (製品中では未分化 ES/iPS 細胞と称する) や腫瘍を形成するおそれのある形質転換細胞は動物試験での実証の有無にかかわらず造腫瘍性細胞として取り扱う。
- 2) 細胞基材 : 微生物細胞又はヒト若しくは動物由来の細胞で、ヒトを対象に *in vivo* 又は *ex vivo* で投与される生物製剤 (再生医療等製品を含む) を生産する上で必要な能力を有するもの (「生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析」について) (平成 12 年 7 月 14 日付け医薬審第 873 号厚生省医薬安全局審査管理課長通知) 参照)。
- 3) セル・バンク : 均一な組成の内容物をそれぞれに含む相当数の容器を集めた状態で、一定の条件下で保存しているもの。個々の容器には、単一の細胞プールから分注された細胞が含まれている (「生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析」について) 参照)。
- 4) 原材料 : 医薬品等の製造に使用する原料又は材料の由来となるもの (「生物由来原料基準」(平成 26 年厚生労働省告示第 375 号) 参照)。

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

4. 一般的留意点

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

合的な考察を行うこと。

5. ヒト ES/iPS 細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験

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

5.1. 原料・原材料の品質特性評価・品質管理のための造腫瘍性試験

ヒト ES/iPS 細胞加工製品を製造するための細胞基材として、ヒト ES 細胞又はヒト iPS 細胞のセル・バンクを樹立した際に、セル・バンク中の細胞の増殖性と多能性を検証するためにテラトーマ形成能による造腫瘍性を確認することがある。この際の造腫瘍性試験に当たっては、世界保健機関（WHO）の生物薬品標準化専門委員会第 61 次報告（Technical Report Series No. 978（WHO TRS 978）平成 25 年）の Annex 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生じることに留意し、造腫瘍性試験の実施の意義を検討する。陰性対照群については、陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞の入手と利用の可能性を勘案して、その設定の可否を検討する。

未分化 ES/iPS 細胞は混在せず、一方、混在が想定される形質転換細胞の特徴が明らかで、適切な陽性対照形質転換細胞がある場合は、その評価試験を生着部位で実施して 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限定されている場合等、投与製品の腫瘍形成能において性差の影響が無視できる場合には片性で実施しても構わない。

5.3.4. 試験検体の投与部位と検体中の細胞数及び検体の形態

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

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

5.3.5. 観察期間

各群の全例について、一般状態を毎日観察し、週1回以上の頻度で体重測定すると同時に製品細胞が投与された部位の腫瘍形成の有無の確認を、観察や触診、画像診断などの方法により実施することが望ましい。ただし、実際の観察頻度及び確認項目は、移植部位、麻酔や撮像時間などの動物への負荷を考慮した上で設定すること。観察期間の長さは、陽性対照群の有無や移植細胞及びその分裂により生じた細胞の体内での推定生存期間などによって異なる。陽性対照細胞を最終製品又は同じ細胞種の正常細胞のような陰性対照細胞にスパイクした陽性対照群のある場合は、試験時又は事前検討において、陽性対照群の中で腫瘍形成が認められる TPD_{min} を確認すること。 TPD_{min} における腫瘍形成確率が一定値に達する時点を十分超えた時点まで観察することにより、造腫瘍性の有無を判断することができる。この場合の判断は、混在しうる造腫瘍性細胞の造腫瘍性が陽性対照細胞と同等であり、腫瘍形成に必要な最低用量が TPD_{min} であると仮定した上でのものとなる。NOG マウスに皮下投与した場合には、ヒト iPS 細胞や HeLa 細胞の腫瘍形成率は、4~6 か月でほぼ安定になることが知られているが^{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も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 and substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. WHO technical report series, No 978 Annex 3. 2013, http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.pdf
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	<u>hRPE 中の 0.1% のヒト iPS 細胞</u> (マーカー : TRA-1-60)	<u>hRPE 中の 0.002% 以下のヒト iPS 細胞</u> (マーカー : LIN28)
出典	Kanemura <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2013 Kawamata <i>et al.</i> , <i>J Clin Med.</i> 2015	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012

表 1 (続) 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出・定量法

試験法	Droplet Digital PCR	GlycoStem-HP 法	Essential-8/LN521 培養増幅法
目的	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出
試験期間・分析時間 (斜字)	約 6 時間	3 時間以下 (培養上清回収から測定まで)	約 1 週間
利点	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 迅速 ◆ 簡便 ◆ 高感度 	<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"> ◆ 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 	<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% のヒト iPS 細胞</u> (マーカー: <u>LIN28</u>)	HEK293T 細胞中の <u>0.05% のヒト iPS 細胞</u> (マーカー: H3+ポドカリキシン)	hMSC 中の <u>0.01~0.001% のヒト iPS 細胞</u> ヒト胚葉体中の <u>0.1~0.01% のヒト iPS 細胞</u>
出典	Kuroda <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2015	Tateno <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2014	Tano <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2014

表2 混在する形質転換細胞の検出・定量法

試験法	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験 (マトリゲルとともに NOG マウスに皮下投与)	軟寒天コロニー形成試験	デジタル 軟寒天コロニー形成試験	細胞増殖特性解析
目的	造腫瘍性細胞の検出	足場非依存的増殖 (悪性形質転換細胞) の検出	足場非依存的増殖 (悪性形質転換細胞) の検出	不死化細胞 (形質転換細胞) の検出
試験期間	16 週間以上	3~4 週間	3~4 週間	4 週間以上
利点	<ul style="list-style-type: none"> 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 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ゲル上に捲いてコラーゲンで架橋させたRPE細胞シート作製に用いる。RPE細胞シートは、10%ウシ胎児血清 (FBS) とHam's F10培地で4週間、RPE維持培地で3週間維持培養した後に、コラゲナーゼIでコラーゲンゲルから剥離させる。RPE細胞シートは、懸濁細胞とマトリゲルを混合し皮下投与又はレーザーマイクロダイセクションにより断片化し動物の網膜移植に用いる。

2. 動物実験

2.1 マウス皮下移植

様々な投与量のHeLa細胞を、200 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/*Icr-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нкаラム処理により除去する。PrimeScript RT Master MixとPrimeSTAR MAX DNA Polymeraseを用いて、50 ngの総RNAからcDNAを作製する。定量PCRはSYBR Greenを用いて行い、遺伝子発現量はGAPDHで補正する。定量RT-PCRはQuantiTect Probe RT-PCR Kitを用いて行う。標的遺伝子の発現量は、RNase P転写産物により補正する。定量RT-PCRは、45サイクル行う。本実験で用いるプローブとプライマーの配列は、表.プローブとプライマーの配列 (参考情報1) に記載する。

4. Alu PCR

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

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

5. 免疫組織化学

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

表. プローブとプライマーの配列 (参考情報 1)

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

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

出典：Kuroda *et al.* Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells.

PLoS ONE. 2012;7(5):e37342

【方法】

1. Total RNA 抽出

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

2. 定量 RT-PCR

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

a) PCR mixture (*LIN28*)

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

b) PCR mixture (*GAPDH*)

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

TaqMan® GAPDH Control Reagents (human)を使用

2.2 Total RNA 溶液を以下のように調製する。

a) *LIN28* 測定用

- 検量線用のテンプレートの調製

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

るように RNase free water で希釈したものを調製する。

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

b) *GAPDH* 測定用

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

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

2.4 テンプレート溶液を 5 μL/ウェルずつ添加する（よく混合する）。

2.5 リアルタイム PCR 装置にセットする。

定量 RT-PCR 条件

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

プレート配置図 (サンプル A、B、C とする)

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

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

LIN28 probe、primer 配列

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

Primer は 100 μM、Probe は 20 μM に調製する。

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

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

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

Rege Ther. 2015;2:17-23.

【方法】

1. Total RNA 抽出

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

2. Droplet digital PCR

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

PCR mixture

	Final conc.	Assay/well (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、アスピレーターを使用せず、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キングシステムを使用する。

2. 試験方法

2.1 軟寒天コロニー形成試験

下図に示すような培地組成で細胞の 3 次元培養を行う。

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

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

3. 正常細胞中の悪性形質転換細胞混在の有無の評価

陽性対照細胞の結果に基づいて、陽性対照細胞相当の悪性形質転換細胞の混在の有無の評価を行う。HeLa細胞を陽性対照細胞とする場合、HeLa細胞相当の細胞の混在の有無を判定することになる。陽性対照細胞の結果から、試料を分画した1ウェルにおいてコロニーが未検出となる確率（=コロニーがないウェル数/分画数（コロニーがないウェル数の確率分布））が得られる。1回の試行（複数ウェルへの試料の分画）の全てにおいてコロニーが未検出となる確率 x （=試料を分画した1ウェルにおいてコロニーが未検出となる確率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。

障発0204第1号
平成28年2月4日

都道府県知事
各 指定都市市長 殿
中核市市長

厚生労働省社会・援護局障害保健福祉部長
(公 印 省 略)

「身体障害者障害程度等級表の解説（身体障害認定基準）について」
の一部改正について

身体障害者福祉法施行規則（昭和25年厚生省令第15号）の別表第5号「身体障害者障害程度等級表」については、「身体障害者障害程度等級表の解説（身体障害認定基準）について」（平成15年1月10日障発第0110001号厚生労働省社会・援護局障害保健福祉部長通知）の別紙「身体障害認定基準」により取り扱っているところであるが、今般、身体障害認定基準の一部を別添のとおり改正し、平成28年4月1日から適用することとしたので、留意の上、その取扱いに遺漏なきようお願いしたい。

なお、改正内容につき、平成28年3月31日までに身体障害者福祉法第15条第1項に規定する医師の診断書及び同条第3項に規定する意見書が作成された場合については、従前の取扱いのとおりとする。

本通知は、地方自治法（昭和22年法律第67号）第245条の4第1項の規定に基づく技術的助言（ガイドライン）として位置づけられるものである。

- 身体障害者障害程度等級表の解説（身体障害認定基準）について（平成 15 年 1 月 10 日障発第 0110001 号厚生労働省社会・援護局障害保健福祉部長通知）（抄）

（変更点は下線部）

新	旧
<p>別紙</p> <p style="text-align: center;">身体障害認定基準</p> <p>第 1 (略)</p> <p>第 2 個別事項</p> <p>一～四 (略)</p> <p>五 内臓の機能障害</p> <p>1～6 (略)</p> <p>7 肝臓機能障害</p> <p>ア 等級表 1 級に該当する障害は、次のいずれにも該当するものをいう。</p> <p>(ア) Child-Pugh 分類（注 26）の合計点数が <u>7</u> 点以上であって、<u>肝性脳症、腹水</u>、血清アルブミン値、プロトロンビン時間、血清総ビリルビン値の項目のうち <u>肝性脳症又は腹水の項目を含む 3</u> 項目以上が <u>2 点以上</u> の状態が、90 日以上の間隔をおいた検査において連続して 2 回以上続くもの。</p> <p>(イ) (略)</p> <p>イ 等級表 2 級に該当する障害は、次のいずれにも該当するものをいう。</p> <p>(ア) Child-Pugh 分類（注 26）の合計点数が <u>7</u> 点以上であって、<u>肝性脳症、腹水</u>、血清アルブミン値、プロトロンビン時間、血清総ビリルビン値の項目のうち <u>肝性脳症又は腹水の項目を含む 3</u> 項目以上が <u>2 点以上</u> の状態が、90 日以上の間隔をおいた検査において連続して 2 回以上続くもの。</p> <p>(イ) (略)</p> <p>ウ 等級表 3 級に該当する障害は、次のいずれにも該当するものを</p>	<p>別紙</p> <p style="text-align: center;">身体障害認定基準</p> <p>第 1 (略)</p> <p>第 2 個別事項</p> <p>一～四 (略)</p> <p>五 内臓の機能障害</p> <p>1～6 (略)</p> <p>7 肝臓機能障害</p> <p>ア 等級表 1 級に該当する障害は、次のいずれにも該当するものをいう。</p> <p>(ア) Child-Pugh 分類（注 26）の合計点数が <u>10</u> 点以上であって、血清アルブミン値、プロトロンビン時間、血清総ビリルビン値の項目のうち <u>1</u> 項目以上が <u>3</u> 点の状態が、90 日以上の間隔をおいた検査において連続して 2 回以上続くもの。</p> <p>(イ) (略)</p> <p>イ 等級表 2 級に該当する障害は、次のいずれにも該当するものをいう。</p> <p>(ア) Child-Pugh 分類（注 26）の合計点数が <u>10</u> 点以上であって、血清アルブミン値、プロトロンビン時間、血清総ビリルビン値の項目のうち <u>1</u> 項目以上が <u>3</u> 点の状態が、90 日以上の間隔をおいた検査において連続して 2 回以上続くもの。</p> <p>(イ) (略)</p> <p>ウ 等級表 3 級に該当する障害は、次のいずれにも該当するものを</p>

<p>いう。</p> <p>(ア) Child-Pugh 分類 (注 26) の合計点数が <u>7</u> 点以上の状態が、90 日以上の間隔をおいた検査において連続して 2 回以上続くもの。</p> <p>(イ) (略)</p> <p>エ 等級表 4 級に該当する障害は、次のいずれにも該当するものをいう。</p> <p>(ア) Child-Pugh 分類 (注 26) の合計点数が <u>7</u> 点以上の状態が、90 日以上の間隔をおいた検査において連続して 2 回以上続くもの。</p> <p>(イ) (略)</p> <p>オ (略)</p> <p>(注 26) Child-Pugh 分類 (略)</p> <p>六 (略)</p>	<p>いう。</p> <p>(ア) Child-Pugh 分類 (注 26) の合計点数が <u>10</u> 点以上の状態が、90 日以上の間隔をおいた検査において連続して 2 回以上続くもの。</p> <p>(イ) (略)</p> <p>エ 等級表 4 級に該当する障害は、次のいずれにも該当するものをいう。</p> <p>(ア) Child-Pugh 分類 (注 26) の合計点数が <u>10</u> 点以上の状態が、90 日以上の間隔をおいた検査において連続して 2 回以上続くもの。</p> <p>(イ) (略)</p> <p>オ (略)</p> <p>(注 26) Child-Pugh 分類 (略)</p> <p>六 (略)</p>
---	---