

令和六年度

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

日野病院組合 日野病院

井上 幸次

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 令和六年度委員名簿	1
II. 令和六年度 WG 会議議事概要	3
III. ヒト（同種）iPS 細胞由来角膜内皮細胞に関する評価指標（案）	17
IV. 参考資料	
1. 厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知：平成 22 年 5 月 28 日付薬食機発 0528 第 1 号 「次世代医療機器評価指標の公表について」 ・ 別添 1「角膜内皮細胞シートに関する評価指標」	29
2. ヒト（同種）iPS 細胞由来角膜上皮細胞シートに関する評価指標（案）（令和 5 年度 次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業）	47
3. 厚生労働省医薬局長通知：令和 7 年 1 月 17 日付け医薬発 0117 第 11 号 「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」の一部 改正について」	57
4. 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留意点」	85

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 令和六年度委員名簿

**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6年度委員名簿**

座長

井上 幸次 日野病院組合 日野病院 名誉病院長

ワーキンググループ委員（五十音順）

稲富 勉 国立長寿医療研究センター 感覚器センター センター長

梅澤 明弘 国立成育医療研究センター研究所 所長

堀 裕一 東邦大学医学部 眼科学講座 教授

万代 道子 神戸アイセンター病院 研究センター センター長

タスクフォース委員（五十音順）

臼井 智彦 国際医療福祉大学 医学部眼科 教授

金村 米博 大阪医療センター 臨床研究センター センター長

齋藤 潤 京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 教授

榛村 重人 藤田医科大学 臨床再生医学講座 主任教授（TF 委員長）

宮井 尊史 東京大学医学部 眼科学教室 准教授

厚生労働省

飯野 彬 厚生労働省 医薬局 医療機器審査管理課 革新的製品審査調整官

渋井 雅志 厚生労働省 医薬局 医療機器審査管理課 医療機器係長

上坊 真穂 厚生労働省 医薬局 医療機器審査管理課 係員

独立行政法人医薬品医療機器総合機構

手塚 杏 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

前田憲一郎 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

郭 宜 医薬品医療機器総合機構 医療機器調査・基準部 医療機器基準課 課長

国立医薬品食品衛生研究所（事務局）

安田 智 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長

澤田 留美 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 室長

黒田 拓也 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 室長

草川 森士 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 主任研究官

オブザーバー

十河 友 経済産業省 商務・サービス G ヘルスケア産業課医療・福祉機器産業室 室長補佐

高山 真澄 経済産業省 商務・サービス G ヘルスケア産業課医療・福祉機器産業室 室長補佐

幸寺 玲奈 経済産業省 商務・サービス G 生物化学産業課 課長補佐

芝原 摂也 経済産業省 商務・サービス G 生物化学産業課 専門職

II. 令和六年度 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 令和六年度第一回 TF 委員会議事録（概要）

1. 開催日時：2024 年 9 月 20 日（金）16 時 00 分～18 時 00 分

2. 開催場所：オフィス東京 L2 会議室

3. 出席者（WG 座長、TF 委員長以下 TF 委員五十音順・敬称略）

委員：井上幸次*（日野病院）、榛村重人（藤田医科大学）、臼井智彦*（国際医療福祉大学）、金村米博*（大阪医療センター）、齋藤潤*（京都大学）、宮井尊史（東京大学）

厚生労働省：渋井雅志

医薬品医療機器総合機構：前田憲一郎*、郭宜*

経済産業省（オブザーバー）：高山真澄*、芝原摂也*

事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：安田智*、澤田留美、黒田拓也、草川森士

*Web 参加

4. 配布資料

1. 令和六年度第一回 TF 委員会議事次第

2. 令和六年度委員関係者名簿

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 令和五年度報告とこれまでの評価指標の内容について

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

・別添 1「角膜内皮細胞シートに関する評価指標」

6. 厚生労働省大臣官房参事官通知：平成 26 年 9 月 12 日付薬食機参発 0912 第 2 号「次世代医療機器・再生医療等製品評価指標の公表について」

・別紙 1「同種 iPS(様)細胞由来網膜色素上皮細胞に関する評価指標」

7. 厚生労働省医薬局医療機器審査管理課長通知：令和 6 年 2 月 29 日付医薬機審発 0229 第 1 号「次世代再生医療等製品評価指標の公表について」

・別紙 2「ヒト(同種)iPS 細胞由来心筋球を用いた重症心不全の治療に関する評価指標」

8. ヒト(同種)iPS 細胞由来角膜上皮細胞シートに関する評価指標(案)

9. 厚生労働省医薬食品局長通知:平成 24 年 9 月 7 日付薬食発 0907 第 5 号「ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」

5. 議事内容

- ①令和 6 年度の WG 座長及び TF 委員と出席者による自己紹介が行われた。WG 座長・TF 委員は下記の通り（敬称略）

WG 座長

井上幸次 日野病院組合 日野病院 名誉病院長

TF 委員（五十音順）

臼井智彦 国際医療福祉大学 医学部眼科 教授

金村米博 大阪医療センター 臨床研究センター センター長

齋藤潤 京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 教授

榛村重人 藤田医科大学 臨床再生医学講座 主任教授（TF 委員長）

宮井尊史 東京大学医学部 眼科学教室 准教授

- ②次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業について厚生労働省より、また令和 5 年度までの再生医療審査 WG の活動内容と今年度の TF 活動計画について事務局より説明された。

- ③榛村 TF 委員長を中心に、「角膜内皮疾患に対する再生医療に関する評価指標(案)」の作成に向けて、井上 WG 座長及び TF 委員にて議論された。主な議論の内容は、以下の通り。

➤ 本評価指標の Scope について

- ✓ 対象疾患：角膜内皮障害等
- ✓ 細胞ソース：ヒト（同種）iPS 細胞由来角膜内皮細胞
（組織由来細胞は、本評価指標では対象としない）
- ✓ 形態：細胞懸濁液等（細胞シート、凍結製品も含む）
- ✓ 投与方法：患部へ注入

➤ 評価指標の項目建て

1. はじめに
2. 本評価指標の対象
3. 本評価指標の位置づけ
4. 用語の定義
5. 評価に当たって留意すべき事項
(1) 原料等

- (2) 製造工程において特に注意が必要な事項
- (3) 製品の品質管理
- (4) 製品の安定性試験
- (5) 非細胞材料の品質・安全性
- (6) 非臨床試験
- (7) 臨床試験（治験）

6. 参考資料

➤ 評価指標作成案の作業分担等

- ✓ 「同種 iPS（様）細胞由来網膜色素上皮細胞に関する評価指標（H26. 9. 12 薬食機参発 0912 第 2 号別紙 1）」（資料 6）及び令和 5 年度に作成した「ヒト（同種）iPS 細胞由来角膜上皮細胞シートに関する評価指標（案）」（資料 8）を参考にして角膜内皮細胞に関する評価指標（案）を作成する。
- ✓ 榛村 TF 委員長のグループにてたたき台（「5. 評価に当たって留意すべき事項」について）をご作成頂き、第二回 TF 会議（10/22）にて委員の先生方にその内容についてご議論頂く予定。
- ✓ 「4. 用語の定義」は、本文がある程度出来上がった時点で、どの用語を定義するのかを決定する。
- ✓ 1. ～ 3. については、事務局で作成。

④WG 会議日程については以下の通りで予定されているが、本日の TF 委員会の議論内容から日程の変更を行う可能性があり、井上 WG 座長と事務局で検討することとなった。

次世代医療機器・再生医療等製品評価指標検討会再生医療審査 WG

令和六年度第一回委員会

日時:令和 6 年 10 月 11 日(金) 17～19 時

場所:オフィス東京 L2 会議室

次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業
再生医療審査 WG 令和六年度第二回 TF 委員会議事録（概要）

1. 開催日時：2024 年 10 月 22 日（金）15 時 00 分～17 時 00 分
2. 開催場所：オフィス東京 C5 会議室
3. 出席者（TF 委員長以下 TF 委員五十音順・敬称略）
委員：榛村重人（藤田医科大学）、金村米博*（大阪医療センター）、宮井尊史（東京大学）
厚生労働省：渋井雅志*、上坊真穂*
医薬品医療機器総合機構：手塚杏*、前田憲一郎*
経済産業省（オブザーバー）：芝原摂也*
事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：安田智*、澤田留美、黒田拓也、草川森士
*Web 参加
4. 配布資料
 1. 令和六年度第二回委員会議事次第
 2. 令和六年度委員関係者名簿(更新版)
 3. 令和六年度第一回 TF 委員会議事録(概要)
 4. ヒト(同種)iPS 細胞由来角膜内皮細胞に関する評価指標(案)たたき台
 5. 評価指標(案)たたき台に対する WG 座長 TF 委員コメント
 6. 厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知:平成 22 年 5 月 28 日付薬食機発 0528 第1号「次世代医療機器評価指標の公表について」
 - ・ 別添 1「角膜内皮細胞シートに関する評価指標」
 7. ヒト(同種)iPS 細胞由来角膜上皮細胞シートに関する評価指標(案)
 8. 厚生労働省大臣官房参事官通知:平成 26 年 9 月 12 日付薬食機参発 0912 第 2 号「次世代医療機器・再生医療等製品評価指標の公表について」
 - ・ 別紙 1「同種 iPS(様)細胞由来網膜色素上皮細胞に関する評価指標」
 9. 厚生労働省医薬食品局長通知:平成 24 年 9 月 7 日付薬食発 0907 第 5 号「ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」

5. 議事内容

①令和 6 年度第一回 TF 委員会会議議事録（概要）について事務局より説明があった。

②「ヒト（同種）iPS 細胞由来角膜内皮細胞に関する評価指標（案）」（資料 4）の内容について、榛村 TF 委員長より説明があった。その後、予め内容を確認された WG 座長・TF 委員からのコメント（資料 5）等に応える形で議論し、全てコメント内容に沿って加筆修正することとなった。コメントの概要は以下の通り。

井上 WG 座長：

- ・角膜内皮細胞ではおそらくは懸濁液を使用するケースの方が主になると思われるにもかかわらず、シートについての記載が多くなっており、細胞懸濁液の場合の移植方法の記載がまったくない。またシートの支持体の説明はあるのに、細胞懸濁液の溶液についての説明がほとんどない。
- ・製品の品質管理について、
 - ① 角膜内皮細胞としての品質規格設定のための特性解析項目
 - ② 角膜内皮細胞懸濁液としての品質規格設定のための特性解析項目
 - ③ 角膜内皮細胞シートとしての品質規格設定のための特性解析項目とするとわかりやすいのではないか。

齋藤 TF 委員：

- ・iPS 細胞の規格については、特に追加は必要ない。

金村 TF 委員：

- ・（6）非臨床試験 ①最終製品の品質管理のための造腫瘍性試験 2 行目の、in vivo 評価法として重度免疫不全動物への皮下投与試験等で評価について、「必要に応じて」としてはいかがか。

事務局（安田）：

- ・（3）製品の品質管理 ①角膜内皮細胞としての品質規格設定のための特性解析項目 f) 未分化細胞が混在していないことの確認 の箇所の最後の一文の前に、「また iPS 細胞マーカーの特異性を考慮して、最終製品での未分化細胞の混在を検出するのに最適なマーカー遺伝子を選択すること。」と入れてはいかがか。
- ③ 非臨床試験における「造腫瘍性試験」についての考え方について確認された。ベースの考え方は以下の通り。

「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」

未分化細胞や形質転換細胞等の造腫瘍性不純物細胞が含まれていないという品質を確認／評価するための試験。→in vivo での皮下移植試験／感度が十分

であると検証されていれば皮下に限らない。

「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推測するための試験」＝「非臨床安全性試験」

in vivo での同所での移植試験が望ましい（異所への移動、増殖もあるかなどの検討も含む）。

➤ 最終製品の「品質管理」のための試験と、「非臨床安全性評価」のための試験とを区別して書き分ける。（ちなみに、本文中の（６）非臨床試験の前文にもその旨記載されている。）

✓ 「品質管理」のための造腫瘍性試験

- 重度免疫不全動物への皮下投与実験については、必ずしも必須ではなくケースバイケースであると考ええる。→金村委員のご提案（事前コメント）を採用。
- in vitro での細胞増殖特性試験等で、増殖しないことを確認した上で投与する等の対応が考えられる。（最終分化した細胞＝増殖しない細胞が、最終製品の構成細胞であるということが前提となる。）

✓ 「非臨床安全性評価」のための造腫瘍性試験

- 角膜内皮に関しては、眼球は閉鎖空間なので投与部位と同一の局所環境での試験が可能。（角膜上皮との違い）また、皮下投与実験に比べてより感度の高い試験が可能であると考えている。
- 細胞懸濁液について、細胞シートと異なり角膜以外への移動の可能性の懸念については、動物へのヒト細胞投与後のヒト抗原の有無を確認する等対応可能と考えている。
- 角膜上皮の考え方との違いについて確認し、角膜内皮細胞製品に適した内容とする。昨年度作成した角膜上皮細胞シートについては、以下の通り（＜参考＞）であったが、上記の通り、角膜内皮は投与部位での検討が可能でかつ、より感度の高い試験が可能であると考えられたため。

＜参考＞

最終製品の非臨床安全性評価試験における、投与部位と同一の局所環境での評価の考え方について：①最終製品の投与部位の角膜は無血管組織であり、腫瘍形成等の病変は極めて稀。②品質管理のための造腫瘍性試験として挙げられる重度免疫不全動物（マウス等）への皮下投与試験は、角膜と異なり血管を豊富に有する皮下組織への投与であり、より腫瘍形成を促し易い微小環境であると考えられる。→造腫瘍性評価を主とした最終製品の非臨床安全性評価に関しては、品質管理の

ための造腫瘍性評価としての in vivo 試験をもって、ある程度の評価の類推が可能と考えられる。

- ④ 「角膜内皮」について、考え方を確認された。

角膜内皮の特異的なマーカーは存在しないため、「角膜内皮（様）細胞」という表現も検討した。厳密には言い切れないかもしれないが「角膜内皮細胞」としてよいのかは確認したい。→WG 等で検討&確認。

- ⑤ 上記の議論を基に、第一回 WG 会議（11/28）までに榛村 TF 委員長のグループにて必要な加筆修正等を行い、第一回 WG 会議にて内容を審議することとなった。

- ⑥ 第一回 WG 会議日程については以下の通り。

次世代医療機器・再生医療等製品評価指標検討会再生医療審査 WG

令和六年度第一回会議

日時:令和 6 年 11 月 28 日(金) 18～20 時

場所:オフィス東京 L2 会議室

次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業
再生医療審査 WG 令和六年度第一回会議事録（概要）

1. 開催日時：2024 年 11 月 28 日（木）18 時 00 分～20 時 00 分
2. 開催場所：オフィス東京 L2 会議室
3. 出席者（WG 座長以下委員五十音順・敬称略）
委員：井上幸次（日野病院）、稲富勉（国立長寿医療研究センター）、梅澤明弘*（国立成育医療研究センター研究所）、榛村重人*（藤田医科大学）、堀裕一*（東邦大学）、万代道子*（神戸アイセンター病院）
厚生労働省：渋谷雅志*、上坊真穂*
医薬品医療機器総合機構：手塚杏*、前田憲一郎、郭宜*
経済産業省（オブザーバー）：十河友*
事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：安田智、澤田留美、黒田拓也、草川森士
*Web 参加
4. 配布資料
 1. 令和六年度第一回委員会議事次第
 2. 令和六年度委員関係者名簿
 3. 再生医療審査 WG 令和五年度活動報告
 4. 令和 6 年度第一回第二回 TF 委員会議事概要
 5. ヒト(同種)iPS 細胞由来角膜内皮細胞に関する評価指標(案)TF 作成
 6. 厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知:平成 22 年 5 月 28 日付薬食機発 0528 第1号「次世代医療機器評価指標の公表について」
 - ・別添 1「角膜内皮細胞シートに関する評価指標」
 7. ヒト(同種)iPS 細胞由来角膜上皮細胞シートに関する評価指標(案)
 8. 厚生労働省大臣官房参事官通知:平成 26 年 9 月 12 日付薬食機参発 0912 第 2 号「次世代医療機器・再生医療等製品評価指標の公表について」
 - ・別紙 1「同種 iPS(様)細胞由来網膜色素上皮細胞に関する評価指標」
 9. 厚生労働省医薬食品局長通知:平成 24 年 9 月 7 日付薬食発 0907 第 5 号「ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」

5. 議事内容

①令和 6 年度活動開始にあたって、令和 5 年度の再生医療審査 WG 活動内容報告及び今年度の活動計画について事務局より説明された。本 WG では令和 5 年度よりヒト（同種）iPS 細胞由来細胞製品を用いた角膜疾患に対する再生医療に関する評価指標案を作成しており、角膜上皮シートについての評価指標案は令和 5 年度に作成され現在パブコメ中であること、そして令和 6 年度は角膜内皮細胞について作成予定であることが説明された。

②令和 6 年度 TF 委員会における議事の概要について、事務局より報告された。

③榛村 TF 委員長より、TF にて作成された「ヒト（同種）iPS 細胞由来角膜内皮細胞に関する評価指標（案）」について説明がなされ、その後 WG にて内容について議論された。主な議論の内容は、以下の通り。

➤ 「用語の定義」について

- ✓ 「角膜内皮細胞」の項目を設け、本評価指標では角膜内皮（様）細胞も含むことを示すこととなった（角膜内皮の特異的なマーカーは存在しないため）。
- ✓ 「ETDRS 視力表」及び「経上皮電気抵抗値（TEER）」についても定義してはどうかと提案された。

➤ 「製品の品質管理」について

- ✓ 細胞懸濁液を注入する方法についても言及するよう提案された。

➤ 「製品の安定性試験」について

- ✓ 安定性を担保する必要がある→安定性及び機能を担保する必要がある とすることとなった。

➤ 「最終製品の非臨床安全性及び有効性を評価する試験」について

- ✓ 細胞懸濁液については細胞シートと異なり角膜以外への移動の可能性も懸念されるため、局所だけではなく他臓器への体内動態等の検討（全身のチェック）についても言及してはどうかという提案がなされた。→動物へのヒト細胞投与後のヒト抗原の有無を確認する等対応可能であり他臓器への体内動態等の検討について記載することとなった。
- ✓ 昨年度、評価指標案の対象とした角膜上皮とは異なり角膜内皮に関しては、眼球は閉鎖空間のため投与部位と同一の局所環境での試験が可能であり、皮下投与実験と比べてより感度の高い試験が可能であると説明された。→その試験等について記載することとなった。

④議論の結果を踏まえて、再び TF にて修正作業を進めて次回の WG 会議で再度検

討することとなった。

④第二回 WG 会議日程については以下の通り。

次世代医療機器・再生医療等製品評価指標検討会再生医療審査 WG

令和六年度第二回会議

日時:令和 7 年 2 月 13 日(木) 16:00～18:00

場所:オフィス東京 L2 会議室

次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業
再生医療審査 WG 令和六年度第三回 TF 委員会議事録（概要）

1. 開催期間：2024 年 12 月 5 日（木）～24 日（火）

2. 開催方法：メール等による議論

3. 参加者（WG 座長、TF 委員長以下 TF 委員五十音順・敬称略）

委員：井上幸次（日野病院）、榛村重人（藤田医科大学）、臼井 智彦（国際医療福祉大学）、金村米博（大阪医療センター）、齋藤潤（京都大学）、宮井尊史（東京大学）

4. 議事内容

①再生医療審査 WG 令和 6 年度第 1 回委員会（2024 年 11 月 28 日開催）にて議論された以下の内容について、TF 委員にて検討された。

➤ 「用語の定義」について

- ✓ 「角膜内皮細胞」の項目を設け、本評価指標では角膜内皮（様）細胞も含むことを示す（角膜内皮の特異的なマーカーは存在しないため）。
- ✓ 「ETDRS 視力表」及び「経上皮電気抵抗値（TEER）」についても定義する。

➤ 「製品の品質管理」について

- ✓ 細胞懸濁液を注入する方法についても言及する。

➤ 「製品の安定性試験」について

- ✓ 安定性を担保する必要がある→安定性及び機能を担保する必要があるとする。

➤ 「最終製品の非臨床安全性及び有効性を評価する試験」について

- ✓ 細胞懸濁液については細胞シートと異なり角膜以外への移動の可能性も懸念されるため、局所だけではなく他臓器への体内動態等の検討（全身のチェック）についても言及する。→動物へのヒト細胞投与後のヒト抗原の有無を確認する等対応可能であり他臓器への体内動態等の検討について記載する。
- ✓ 昨年度、評価指標案の対象とした角膜上皮とは異なり角膜内皮に関しては、眼球は閉鎖空間のため投与部位と同一の局所環境での試験が可能であり、皮下投与実験と比べてより感度の高い試験が可能であるため、その試験等について記載する。

②上記を踏まえた加筆修正内容について TF 委員にて確認し、修正案が作成された。

再生医療審査 WG 令和 6 年度第 2 回委員会にて、WG 委員による審議を行う予定。

③次世代医療機器・再生医療等製品評価指標検討会再生医療審査 WG 会議日程(予定)

令和 6 年度第 2 回 WG 委員会

日時:令和 7 年 2 月 13 日(木) 16～18 時

場所:オフィス東京 L2 会議室

次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業
再生医療審査 WG 令和六年度第二回会議事録（概要）

1. 開催期間：2025 年 1 月 14 日（火）～29 日（水）

2. 開催方法：メール等による議論

3. 参加者（WG 座長以下委員五十音順・敬称略）

委員：井上幸次（日野病院）、稲富勉（国立長寿医療研究センター）、梅澤明弘（国立成育医療研究センター研究所）、堀裕一（東邦大学）、万代道子（神戸アイセンター病院）

4. 議事内容

- ①再生医療審査 WG 令和 6 年度第 1 回会議にて議論された内容を受けて、第 3 回 TF 委員会（2024 年 12 月 5 日～24 日開催）にて TF 委員により議論されて加筆修正された。提示された評価指標修正案の内容について、WG 委員にて審議された。
- ②井上 WG 座長より、参考資料への追記（日本眼科学会ガイドライン「角膜内皮障害の重症度分類」等）について、及び重複する文言の削除に関する確認についての指摘がなされた。
- ③井上 WG 座長からの指摘について WG 委員及び事務局にて確認した上で修正を行い、評価指標の最終版として WG にて承認された。

III. ヒト（同種）iPS 細胞由来角膜内皮細胞に関する

評価指標（案）

1. はじめに
2. 本評価指標の対象
3. 本評価指標の位置づけ
4. 用語の定義
5. 評価に当たって留意すべき事項
 - (1) 原料等
 - (2) 製造工程において特に注意が必要な事項
 - (3) 製品の品質管理
 - (4) 製品の安定性試験
 - (5) 非細胞材料の品質・安全性
 - (6) 非臨床試験
 - (7) 臨床試験（治験）
6. 参考資料

ヒト（同種）iPS 細胞由来角膜内皮細胞に関する評価指標（案）

1. はじめに

ヒト由来の人工多能性幹細胞（iPS 細胞）のうち、同種由来 iPS 細胞を加工した製品（以下「ヒト（同種）iPS 細胞加工製品」という。）の品質及び安全性を確保するための基本的な技術要件は、「「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」の一部改正について」（令和 7 年 1 月 17 日付け医薬発 0117 第 11 号厚生労働省医薬局長通知）に定められているところである。

本評価指標は、ヒト（同種）iPS 細胞加工製品のうち特に角膜内皮障害の治療を目的として適用される再生医療等製品（平成 25 年法律第 84 号第 1 条の規定による改正後の薬事法（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）第 2 条第 9 項に規定する「再生医療等製品」をいう。以下同じ。）について、上述の基本的な技術要件に加えて当該製品特有の留意すべき事項を示すものである。

2. 本評価指標の対象

本評価指標は、ヒト（同種）iPS 細胞加工製品のうち特に角膜内皮障害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、基本的な技術要件に加えて品質、有効性及び安全性の評価にあたって留意すべき事項を示すものである。

3. 本評価指標の位置づけ

本評価指標は、技術開発の著しいヒト（同種）iPS 細胞加工製品を対象とするものであることを勘案し、留意すべき事項を網羅的に示したものではなく、現時点で考えられる点について示している。よって、今後の更なる技術革新や知見の集積等を踏まえ改訂されるものであり、申請内容に関して拘束力を有するものではない。製品の評価に当たっては、個別の製品の特性を十分理解した上で、科学的な合理性をもって柔軟に対応することが必要である。なお、本評価指標の他、国内外のその他の関連ガイドラインを参考にすることも考慮すべきである。

また、個別の製品において必要となる評価については、独立行政法人医薬品医療機器総合機構に相談することが強く勧められる。

4. 用語の定義

- (1) 細胞シート：細胞同士、又は細胞と支持体が結合してシート状の形態を呈したものをいう。
- (2) 角膜内皮：角膜は、強膜とともに眼球の外壁を構成する直径11～12mm程度の透明な組織で、外界からの光を屈折させるレンズの役割を果たす。表面から角膜上皮、

角膜実質、角膜内皮の3層で構成される。そのうち、角膜内皮は単層の角膜内皮細胞から成る組織である。

- (3) 角膜内皮細胞：単層の角膜内皮層を形成する細胞。バリア機能とポンプ機能によって角膜の水分量を調節する働きを持つ。本評価指標ではiPS細胞から分化誘導した角膜内皮（様）細胞も含む。
- (4) 角膜内皮障害：眼内手術による侵襲や遺伝性疾患（Fuchs角膜内皮ジストロフィ）等の種々の要因から、角膜内皮の機能が障害された病態全般を指す。
- (5) 水疱性角膜症：角膜内皮障害の中でも特に重症のケースで、角膜が浮腫とともに混濁した状態。日本眼科学会ガイドライン「角膜内皮障害の重症度分類」（参考資料1）におけるGrade4である。
- (6) 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）
- (7) 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。
- (8) 代替指標：目的とする対象指標が測定困難な場合に、事前に相関づけられた代替可能な指標。
- (9) 移植用基材：細胞懸濁液を移植に用いる場合に、細胞を懸濁するための液体をここでは移植用基材と称する。
- (10) 移植用支持体：細胞をシート状に形成する際に足場として非細胞材料を用いる場合があり、ここではそれを移植用支持体と称する。移植・投与される細胞シート製品に含有されるか否かを問わない。
- (11) 角膜内皮バリア機能：角膜内皮細胞の細胞間がタイトジャンクションという接着構造で強固に結合して、前房水を角膜実質内へ自由に通さない構造となっている。この機能をバリア機能という。
- (12) 角膜内皮ポンプ機能：Na、K-ATPaseなどの角膜内皮細胞の持つ分子によって、角膜実質内の水分を前房へ能動輸送する機能。
- (13) 細隙灯顕微鏡検査：細隙光と呼ばれる帯状の光線を眼球に照射し、生体顕微鏡で観察する検査。角膜、前房、虹彩、水晶体など主に前眼部を観察する。専用のレンズを用いることで後眼部の観察も可能である。

- (14) ETDRS視力表：糖尿病の多施設共同研究であるEarly Treatment Diabetic Retinopathy Studyに基づく視力表。1段5文字であり、1段改善ごとにlogMAR 視力での0.1改善に該当する。臨床研究や治験で広く使用されている。
- (15) OCT (optical coherence tomography)：生体角膜や網膜を断層面で観察できる検査。
- (16) 経上皮電気抵抗値 (TEER: Trans-Epithelial Electrical Resistance)：上皮細胞層のバリア機能を評価するための指標。細胞層に一定の交流電圧を負荷し、その際に流れる電流値から計算される抵抗値。内皮細胞でも使用される。
- (17) 短絡電流 (SCC: Short Circuit Current)：上皮細胞層を通過するイオン輸送による純電流。上皮層を通過するイオンの能動輸送を反映しており、上皮のバリア機能やイオンチャネルの活動を評価するための指標。内皮細胞でも使用される。
- (18) VFQ-25：米国National Eye Institute で開発されたThe 25-item Visual Function Questionnaire。日本語版もある。視覚に関連したQOL を数値化して評価することができる。眼科疾患が日常生活に与える影響や、治療・ケアの結果の評価に用いられている。

5. 評価に当たって留意すべき事項

本評価指標は、当面、既に再生医療等製品の原材料として株化されているヒト（同種）iPS 細胞（細胞株）を主たる原材料として製造所に受け入れ、これを製造所において加工して製造された、ヒト（同種）iPS 細胞加工製品としての角膜内皮細胞の評価に適用することを想定している。以下、「角膜内皮細胞」と記載する。角膜内皮細胞の剤形としては、細胞懸濁液のほか、細胞シートも想定している。再生医療等製品の製造所内でヒト（同種）iPS 細胞を体細胞から新たに樹立し、これを原材料とした再生医療等製品の製造を意図するような場合には、本評価指標を参照しつつ、「ヒト（同種）iPS 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発 0907 第 5 号厚生労働省医薬食品局長通知）等を参考とすること。

(1) 原料等

原料等となる iPS 細胞は、再生医療等製品の原材料として株化されたヒト（同種）iPS 細胞であって、一定の製造工程を経ることにより角膜内皮細胞へ分化することが確認されている、又は合理的に予測されるものである必要がある。ヒト体細胞への初期化遺伝子導入による遺伝子リプログラミングによりヒト iPS 細胞が樹立されている場合は、導入された遺伝子の残存が否定されていることが望ましい。残存が否定できない場合には、導入遺伝子が最終製品である角膜内皮細胞の品質及び安全性に悪影響を与えないことを確認する必要がある。

(2) 製造工程において特に注意が必要な事項

角膜内皮細胞（最終製品）の製造にあたっては、製造方法を明確にし、可能な範囲でその妥当性を以下の項目で検証し、一定の品質を保持すること。

①ロット構成の有無とロットの規定

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

②製造方法

原材料となるヒト iPS 細胞株の履歴、および製造所への受入れから、セル・バンクを構築する場合にはその工程を含め、分化段階の進んだ細胞を経て最終製品に至る製造方法の概要を示すとともに、具体的な処理内容及び必要な工程管理、品質管理の内容を明らかにすること。

a) 受入検査

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

なお、技術的な理由により、工程を一部進めた上で検査を行うことが適切な場合にあつては、受入れ後の適切な時点で検査を実施すること。例えば、凍結ヒト iPS 細胞株を原材料製造時の試験（検査）結果（Certificate of Analysis）を基に受入れた後、解凍して拡大培養を実施する際に追加の検査を行うことが挙げられる。治験を開始する前段階の場合は、それまでに得られた試験検体での実測値を提示し、これらを踏まえた暫定値を示すこと。

b) 細胞のバンク化

角膜内皮細胞の製造にあたっては、製造所に受入れたヒト iPS 細胞株から、最終製品の製造までのいずれかの過程において、セル・バンクを構築する場合と、セル・バンクを構築しない場合の両者が想定される。セル・バンクを構築する場合には、その作製方法および特性解析、保存・維持・管理・更新方法、その他の各作業工程及び試験に関する手順等について詳細を明らかにし、ICH Q5D 等を参考として、その妥当性を示すこと。ただし、より上流の過程で評価されていることに起因する正当な理由により検討事項の一部を省略することは差し支えない。

c) 最終製品の構成要素となる細胞の作製

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

d) 製造工程中の取り違い及びクロスコンタミネーション防止対策

角膜内皮細胞（最終製品）の製造にあたっては、製造工程中の取違い及びクロスコンタミネーションの防止が重要であり、工程管理における防止対策を明らかにすること。

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

複数の細胞培養加工施設で製造を完結する場合は、施設間での中間製品の輸送に関する条件をあらかじめ確定し、中間製品の出荷及び受入れ、輸送などの条件が満たされているかのモニタリングを行うこと。

(3) 製品の品質管理

角膜内皮細胞（最終製品）の品質管理における留意点として、例えば以下に挙げた事項が考えられるが、必要かつ適切であれば別の試験項目の採用又は追加を検討すること。その際には、各試験項目の設定根拠及び試験方法の妥当性について説明する必要がある。角膜内皮細胞としての品質規格設定のための特性解析項目（①）に加えて、懸濁液における項目（②）と細胞シートにおける項目（③）をそれぞれの剤形に応じて検討する必要がある。工程内管理の管理値及び品質規格の規格値の設定について、治験を開始する前段階の場合にあつては、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。また、出荷製品そのもの又はその一部に対して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等、代替とする検体を用いて試験を実施すること。

なお、角膜内皮細胞懸濁液または角膜内皮細胞シートの品質管理の設定にあたっては、その移植方法を明らかにすること。移植方法には、例えば、角膜内皮細胞懸濁液の場合は、細胞懸濁液が容器等に収容された状態から、必要数（必要細胞数や懸濁液量）を回収し、適切な適用部位（病的角膜内皮細胞除去後の角膜後面等）へ注射用シリンジで前房内に注入し移植すること等、角膜内皮細胞シートの場合は、細胞シートが容器等に格納された状態から、必要数（1 治療あたり 1 枚等）を回収し、適切な適用部位に貼りつけて移植すること等が考えられる。

①角膜内皮細胞としての品質規格設定のための特性解析項目

a) 形状の確認

最終製品の形状に関して、位相差顕微鏡観察等により内皮細胞特有の細胞形態を確

認すること（例えば、多角形、敷石状細胞形態等）が考えられる。

b) 細胞数及び生存率

最終製品における細胞の数及び生存率について基準を設定する必要がある。細胞数を測定する方法としては、最終製品や中間製品の一部を抜き出して細胞懸濁液とし、バリデーション可能な測定方法（血球計算盤やセルカウンターで測定する方法等）にて測定すること等が考えられる。細胞生存率を測定する方法として、バリデーション可能な方法（トリパンブルーを用いた色素排除法や蛍光色素を用いた方法等）にて、生細胞及び死細胞を計数すること等が考えられる。

c) 角膜内皮細胞としての特異性の確認

最終製品や中間製品の一部を抜き出して、角膜内皮関連分子（例えば、CD166、PITX2、N-cadherin等）（参考資料2、3）が発現していることをフローサイトメトリー、免疫染色、PCR等の方法で確認すること等が考えられる。なお、角膜内皮に特異的なマーカーが存在しないため、角膜内皮細胞と同等の機能を有する細胞も排除しない。

d) 純度確認

特徴的な形態の確認又は陽性マーカーとして CD166、PITX2、N-cadherin 等、あるいは、陰性マーカーとして CD44 等の抗体を用い、最終製品や中間製品の一部を抜き出して、免疫染色、フローサイトメトリー等の方法により判断することが考えられる。または、角膜内皮関連遺伝子の一定レベルの発現を定量 PCR 等の方法で確認することが考えられる。免疫染色においては画像処理等で客観的に数値化して陽性細胞数を判定し、純度の確認を行って差し支えない。

e) 機能評価

最終製品や中間製品の一部を抜き出して、ポンプ機能（Na、K-ATPase 等）、バリア機能（ZO-1、N-cadherin 等）など治療用途に整合性のある機能特性を有することを免疫染色、フローサイトメトリー、PCR 等の方法により確認することが考えられる。

f) 未分化細胞が混在していないことの確認

最終製品への未分化細胞の混在については、フローサイトメトリーや定量 PCR 等によるマーカー遺伝子の発現定量等による評価が考えられる。マーカー遺伝子としては、*OCT3/4*、*LIN28A*、*NANOG* 等の遺伝子定量解析を評価方法として用いることが考えられる。原材料 iPS 細胞株の種類によって、これらマーカー遺伝子の発現量に違いがあるので、それぞれの iPS 細胞株について適切なマーカー遺伝子を選択することが望ましい。また iPS 細胞マーカーの特異性を考慮して、最終製品での未分化細胞の混在を検出するのに最適なマーカー遺伝子を選択すること。なお造腫瘍性評価のための試験に関しては非臨床試験の項目も参照すること。

②角膜内皮細胞懸濁液としての品質規格設定のための特性解析項目

角膜内皮細胞懸濁液については、その性状から、以下のような特性を解析することが考えられる。

g) 生細胞数、生細胞率、細胞密度の他、性状の肉眼的な観察（例：外観上やや濁りのある乳白色の細胞懸濁液）等が考えられる。主構成体である細胞懸濁液の他に、移植用基材や灌流液などの副構成体がある場合は、その性状特性も明らかにしておくこと。

h) 機能評価については、細胞懸濁液という性状であるために、ポンプ機能、バリア機能、未分化細胞残存率等を代替指標を用いたフローサイトメトリーや定量 PCR 等により実施することが考えられる。

③角膜内皮細胞シートとしての品質規格設定のための特性解析項目

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

i) 形状確認として、例えば全体の形状として細胞がシートを形成していることを肉眼的に観察する方法や、位相差顕微鏡観察等によりシートの形状（例えば、透明な膜状組織であること）を確認することが考えられる。

j) 力学的適合性として、剥離、移植片としての準備までを行い、細胞シートとしての破損の有無等を確認する。

k) 機能特性（ポンプ機能、バリア機能）評価として、免疫染色（例、ZO-1 染色）等、角膜内皮機能との相関が報告されている適切なマーカーの発現解析、又は短絡電流（SCC;Short Circuit Current）あるいは経上皮電気抵抗値（TEER;Trans Epithelial Electrical Resistance）等の計測を行う等の方法が考えられる（参考資料 4）。

（4）製品の安定性試験

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、安定性及び機能を担保する必要がある。細胞懸濁液の保存安定性に関する項目としては、細胞数、生細胞率、無菌性等が考えられる。最終製品を細胞シートとし、細胞シートの状態で輸送する場合には、保存安定性に加え、輸送安定性（温度、振動、気圧変化等の影響）を評価した上で保存条件及び使用期限を設定し、適切な容器、保存液及び運搬形態を選択すること。

（５）非細胞材料の品質・安全性

最終製品に関係する非細胞材料として、製造工程中で最終製品と接触するもの（例えば、培養容器等）の他、移植用基材、移植用支持体（例えば、羊膜、フィブリンゲル等）を用いる場合も考えられる。移植用基材、移植用支持体等を用いる場合は、それも含めて材料自体の品質・安全性に関する知見について明らかにすること。

（６）非臨床試験

ヒト（同種）iPS細胞を加工して製造される再生医療等製品の造腫瘍性を評価する上では、「原料となるiPS細胞の造腫瘍性と最終製品の造腫瘍性との相関・因果関係は未解明である」という点に注意が必要である。すなわち、臨床適用に際しては、原料となるヒト（同種）iPS細胞ではなく、あくまで最終製品としてのヒト（同種）iPS細胞加工製品の造腫瘍性評価が最も重要であることを常に留意しなければならない。したがって、造腫瘍性試験については最終製品を用い、検出限界が既知の試験系を用いて造腫瘍性の評価を行うことが有用である。最終製品の造腫瘍性の評価には目的別に大きく２種類ある。「品質管理」のための造腫瘍性試験（造腫瘍性細胞の存在量の確認）及び「非臨床安全性評価」のための造腫瘍性試験（最終製品の細胞がヒトでの投与部位に相当する微小環境で造腫瘍性を示すかどうかの確認）であり、これらは区別して評価することが重要である。なお、造腫瘍性の評価にあたっては、「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関するガイドラインについて」（令和元年6月27日付け薬生機審発0627第1号厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知）（参考資料５）等も参考にすること。

① 最終製品の品質管理のための造腫瘍性試験

製品中の未分化ヒトiPS細胞の混在や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。ただし必要に応じて、高感度な特性を有する*in vivo*評価法として、重度免疫不全動物（例えば、NOD/SCID/γCnull (NOG)マウス、NOD/SCID/IL2ryKO (NSG) マウス、Rag2-γC double-knockout (DKO) マウス）への皮下投与試験等で評価されることも可能である（参考資料５）。未分化細胞の検出のための評価法としては、例えば、未分化細胞マーカー（*OCT3/4*、*LIN28A*、*TRA-1-60*等）を指標にしたフローサイトメトリーや定量PCR、最終製品を原料等のiPS細胞の培養条件に戻して一定期間培養する評価法等が挙げられる。形質転換細胞の検出のための評価法としては、例えば、細胞増殖特性解析（参考資料２）やデジタル軟寒天コロニー形成試験等が挙げられる。最終製品に適した評価法を用い、造腫瘍性リスクを総合的に評価することが重要である。

② 最終製品の非臨床安全性及び有効性を評価する試験

最終製品の非臨床試験の目的は、ヒトでの投与部位と同一の局所環境で最終製品が示す安全性と有効性を評価することにある。

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、ヌードラット（T 細胞が欠失）等、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。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（参考資料 5）。

他臓器への体内動態等の検討については、観察期間終了時に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 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（参考資料 5）。

投与細胞数としては、想定される臨床使用量に種差と個体差の安全係数を掛けた量であることが望ましいが、動物に投与した際に、投与細胞の総容量自体が投与部位の微小環境に大きな影響を与え、アーチファクトとなってしまう可能性を十分考慮する必要がある。すなわち、前房内投与による造腫瘍性試験の目的は、最終製品の細胞がヒトでの投与部位に相当する微小環境で造腫瘍性を示すかどうかの確認にあることに留意しながら投与細胞数を設定することが重要である。

最終製品の有効性を裏付ける非臨床試験については、技術的に可能かつ科学的に合理性のある範囲で、対象疾患に対し適切なモデル動物等を用いて、最終製品の機能発現、作用持続性、ヒト（同種）iPS 細胞加工製品として期待される臨床効果の実現可能性（Proof-of-Concept, POC）を示すことが望ましい。小動物においては角膜内皮障害の自然回復がみられる場合があるため、自然回復しにくい動物モデルを作成して使用することや（参考資料 6）、もともと角膜内皮障害の自然回復が乏しい霊長類の動物モデルを使用すること（参考資料 3，7）等が考えられる。

いずれにしろ、最終製品の非臨床安全性及び有効性の評価にあたっては、現在取得できる科学的に有意な情報から総合的に判断することが重要である。

（7）臨床試験（治験）

①適応

角膜内皮障害を適応対象とする。特に水疱性角膜症が主体となる。

臨床試験においては、有効性及び安全性評価に適した集団を選択するために、適切な診断基準、重症度分類等を用いて、当該治療法に期待される臨床上の位置付け等を明確にした上で、選択・除外基準や評価基準を設定する必要がある。

②症例数の設定

症例数は、科学的合理性に基づき、試験目的、検証すべき仮説、試験の達成基準及び試験デザインに応じて設定する。

③有効性評価

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

眼科領域では、ETDRS 視力表や小数視力表などを用いた矯正視力の測定が国際的に広く普及しており、有効性評価項目として考える。しかしながら治療の対象となる角膜以外の部位の眼疾患（白内障、網膜疾患、緑内障、視神経疾患など）を合併している場合があり、合併している場合には角膜内皮細胞懸濁液前房注入／シート移植が奏功して角膜の透明性が回復しても、他の眼疾患が原因で視力回復には必ずしもつながらないことも想定される。よって、臨床試験において矯正視力を有効性効果判定項目と設定する場合は上記を考慮する必要がある。

解剖学的評価では、角膜浮腫の定量的評価として中心角膜厚測定が考えられる。前眼部 OCT 等の角膜形状解析装置を使用することで測定者の恣意性を排除した客観的な測定が可能であり、中心角膜厚は角膜内皮移植後の視力との関連も強く（参考資料 8）、有用かつ信頼性のある検査法の一つである。

スペキュラーマイクロスコープを用いた角膜内皮細胞密度の測定も評価方法の一つとして考えられる（参考資料 9）。ただし、そもそも iPS 細胞由来角膜内皮細胞が生体の角膜内皮細胞と大きさが同一とは限らないことは、評価のための基準値を決める際に留意すべき点である。

水疱性角膜症の自覚症状として、眼痛も重要である。眼痛を含めた自覚症状の改善度を測定する方法や、NEI VFQ-25 等の適切な質問票を用いて眼科的 QOL を測定する方法も、

視機能評価の一つの指標となりうる。

これらの状況を考慮し、以下のような項目等の術後の術前に対する改善度が有効性評価の項目として挙げられる。

- 1) 矯正視力
- 2) 角膜厚
- 3) 角膜内皮細胞密度
- 4) 自覚症状（眼痛、異物感、流涙、羞明）
- 5) 眼科的 QOL（NEI VFQ-25 等）

④安全性評価

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

臨床試験では、iPS 細胞由来角膜内皮細胞／シート移植後に留意して観察すべき有害事象として、腫瘍形成、眼圧上昇、眼内炎、拒絶反応等が挙げられる。眼科診療で用いられる細隙灯顕微鏡検査によって移植部位を直接観察できることから、これらの発生について鋭敏に観察することができる。

なお、併用薬として術後炎症管理の目的でステロイドの点眼等が考えられるが、想定される有害事象の一つにステロイドに起因する眼圧上昇が挙げられる（参考資料9）。これら併用薬による有害事象にも留意する必要がある。

6. 参考資料

1. 木下茂、天野史郎、井上幸次、大橋裕一、高橋浩、坪田一男、西田幸二「角膜内皮障害の重症度分類」日眼会誌 118 巻 2 号 81-83 (2014)
2. Hamuro, J., Ueno, M., Toda, M., Sotozono, C., Montoya, M., and Kinoshita, S. Cell Homogeneity Indispensable for Regenerative Medicine by Cultured Human Corneal Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Sep 1;57(11):4749-61.
3. Hatou S, Sayano T, Higa K, Inagaki E, Okano Y, Sato Y, Okano H, Tsubota K, Shimmura S. Transplantation of iPSC-derived corneal endothelial substitutes in a monkey corneal edema model. *Stem Cell Res*. 2021 Aug;55:102497.
4. Hatou S, Higa K, Inagaki E, Yoshida S, Kimura E, Hayashi R, Tsujikawa M, Tsubota K, Nishida K, Shimmura S. Validation of Na,K-ATPase pump function of corneal endothelial cells for corneal regenerative medicine. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013 Dec;19(12):901-10.
5. 「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関するガイドラインについて」（令和元年 6 月 27 日付け薬生機審発 0627 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知）
<https://www.jsrm.jp/cms/uploads/2019/07/4801e3695bff4fca9e458121affde4a6.pdf>
6. Yamashita K, Hatou S, Inagaki E, Higa K, Tsubota K, Shimmura S. A Rabbit Corneal Endothelial Dysfunction Model Using Endothelial-Mesenchymal Transformed Cells. *Sci Rep*. 2018 Nov 15;8(1):16868.
7. Okumura N, Sakamoto Y, Fujii K, Kitano J, Nakano S, Tsujimoto Y, Nakamura S, Ueno M, Hagiya M, Hamuro J, Matsuyama A, Suzuki S, Shiina T, Kinoshita S, Koizumi N. Rho kinase inhibitor enables cell-based therapy for corneal endothelial dysfunction. *Sci Rep*. 2016 May 18;6:26113.
8. Moskwa R, Bloch F, Vermion J-C, Zevering Y, Chaussard D, Nessler A, Goetz C, Perone J-M. Postoperative, but not preoperative, central corneal thickness correlates with the postoperative visual outcomes of Descemet membrane endothelial keratoplasty. *PLoS One*. 2023 Mar 3;18(3):e0282594.
9. Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, Okumura N, Imai K, Tanaka H, Yamamoto Y, Nakamura T, Inatomi T, Bush J, Toda M, Hagiya M, Yokota I, Teramukai S, Sotozono C, Hamuro J. Injection of Cultured Cells with a ROCK Inhibitor for Bullous Keratopathy. *N Engl J Med*. 2018 Mar 15;378(11):995-1003.

VI. 参考資料

1. 厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知：平成 22 年 5 月 28 日付薬食機発 0528 第 1 号「次世代医療機器評価指標の公表について」
 - ・ 別添 1「角膜内皮細胞シートに関する評価指標」
2. ヒト（同種）**iPS** 細胞由来角膜上皮細胞シートに関する評価指標（案）（令和 5 年度次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業）
3. 厚生労働省医薬食品局長通知：平成 24 年 9 月 7 日付薬食発 0907 第 5 号「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」
4. 令和元年 6 月 27 日付薬生機審発 0 6 2 7 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知
「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関する留意点」

薬食機発 0528 第 1 号
平成 22 年 5 月 28 日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬食品局審査管理課
医療機器審査管理室長

次世代医療機器評価指標の公表について

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

今般、角膜内皮細胞シート及び軟組織に適用するコンピュータ支援手術装置の評価を行うに当たって必要と考えられる資料、評価のポイント等を評価指標としてとりまとめましたので、下記に留意の上、製造販売承認申請に当たって参考とするよう、貴管下関係業者に対しご周知いただきますよう御配慮願います。

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

記

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

角膜内皮細胞シートに関する評価指標

1. はじめに

ヒト由来細胞・組織を加工した医薬品又は医療機器（以下「細胞・組織加工医薬品等」という。）の品質及び安全性を確保するための基本的な技術要件は、平成 20 年 2 月 8 日付け薬食発第 0208003 号厚生労働省医薬食品局長通知（以下「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）及び平成 20 年 9 月 12 日付け薬食発第 0912006 号厚生労働省医薬食品局長通知（以下「ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）に定められているところである。

本評価指標は、ヒト由来細胞・組織加工医薬品等のうち特に角膜内皮障害等の治療を目的として適用されるものであって細胞シート状の製品について、上述の基本的な技術要件に加えて当該製品特有の留意すべき事項を示すものである。

2. 本評価指標の対象

本評価指標は、角膜内皮障害等の治療を目的として適用される細胞・組織加工医薬品等のうち特に細胞シート状の製品について、基本的な技術要件に加えて品質、有効性及び安全性の評価にあたって留意すべき事項を示すものである。

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

3. 本評価指標の位置づけ

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

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

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

4. 用語の定義

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

- (1) 角膜内皮：角膜は表面から、角膜上皮層、角膜実質層、角膜内皮層の 3 層構造をしている。角膜内皮層は角膜の内側にある 1 層の角膜内皮細胞から構成され

ている組織である。

- (2) 角膜内皮障害：角膜内皮細胞が、外傷や疾患等によって障害され減少したために、角膜が混濁した状態（水疱性角膜症）をいう。
- (3) 細胞シート：細胞同士、または細胞と支持体が結合してシート状の形態を呈したものをいう。
- (4) 支持体：細胞をシート状に形成するための足場となるものをいい、移植・投与される細胞シート製品に含有されるか否かを問わない。なお、支持体の原料として生物由来の原材料が用いられる場合もある。
- (5) ポンプ機能：角膜内皮細胞は角膜実質内のイオンを前房内へ能動輸送することによって浸透圧勾配を生じて、水の移動を生じる。この機能をポンプ機能という。
- (6) バリア機能：角膜内皮細胞では細胞間が接着構造で結合しており、物質が自由に移動できない構造となっている。この機能をバリア機能という。
- (7) 細隙灯顕微鏡（スリットランプ）検査：角膜を含めた眼の表面を拡大して観察する眼科臨床検査のひとつをいう。

5. 評価に当たって留意すべき事項

(1) 製品の品質管理

細胞シート製品の品質管理における留意点として、例えば以下に挙げた事項を含めて検討し、製品の特性に応じて適切に品質管理項目に反映することが必要と考えられる。しかしながら、以下の試験項目及び Appendix 等における例示は必要十分とは限らず、製品の特性に応じ、必要かつ適切であれば、別の試験項目や試験方法、マーカ一等の採用又は追加設定について検討すること。また、各項目について試験項目及び試験方法の妥当性を説明する必要がある。

なお、移植に供する細胞シート製品そのものの評価が困難な場合は、スペアシート（移植枚数に品質管理用のシートも加えた枚数を製造し、無作為に抜き取ったシート）等による評価も考えられる。

① 形状について

- ・位相差顕微鏡観察等により、角膜内皮細胞特有の細胞形態（六角形を主体とする多角形細胞形態）が観察されることの確認。
- ・培養皿等の培養器における細胞層の確認。
- ・組織切片の作製等により、細胞がシートを形成していることの確認。

② 構成細胞、細胞の特性等について

以下のような評価が考えられる。

- ・シートを構成している細胞の分化状態、増殖性等の確認（六角形を主体とする多角形細胞の比率、透明度や細胞密度などを用いた試験等。）。
- ・構成細胞のポピュレーション及びその分布、細胞シート内の細胞均一性（細胞の純度）等についての確認（角膜内皮細胞に発現していることが知られるマーカー

(Appendix 参照) に対する抗体等を用いた試験等。)

- ・角膜内皮細胞の1細胞当たりの面積および移植片における細胞密度の確認。

③ バリア機能について

例えば、バリア機能との相関が報告されている適切なマーカー (Appendix 2 参照) の発現解析、ポンプ機能との相関が報告されている適切なマーカー (Appendix 3 参照) の発現・密度の解析、ポンプ機能の測定 (例えばウッシングチャンバーを用いた short circuit current の測定等) 等により、細胞シートに要求される機能を評価する。

④ 細胞シート製品の運搬について

細胞シート製品を運搬する場合には、運搬容器及び運搬手順 (温度管理等を含む。) 等を定め、容器内の環境等が適切に管理され、製品の品質、有効性及び安全性が確保されることを示すこと。その際、特殊な機能を有する培養皿を使用する場合はその特性を考慮すること。

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

⑤ 支持体について

羊膜やフィブリンゲル等の支持体を用いる場合、必要に応じて規格を設定し、支持体が目的とする機能を有することを評価する必要がある。また、安全性 (例えば、感染症や異物反応等) について説明する必要がある。

(2) 非臨床試験

妥当な疾患動物モデルと、そのモデル動物に由来する原材料を用いた同等品作製および品質保証技術が確立されている場合には、可能な限り、モデル動物を用いた非臨床試験を行うことが望ましい。疾患モデル動物としては、例えば、中大型動物を用いた角膜内皮機能不全モデル等が考えられる。用いた動物モデルの作製方法、試験デザイン、評価期間、評価方法等の妥当性を説明した上で、製品の安全性や効力または性能を説明する必要がある。有効性の検討には、適切な対照群を設定し、統計的手法を用いて評価することが望ましい。なお、有効性に加えて安全性の評価を実施する場合には、製品の特性に応じた安全性に関する試験項目を設定し評価すること。

試験項目としては、例えば以下を検討することが考えられるが、必要かつ適切であれば、試験項目の追加及び新たな試験方法の設定について検討すること。なお、各試験項目及び試験方法の妥当性を説明する必要がある。

① 細隙灯顕微鏡検査による角膜の評価

細隙灯顕微鏡検査により、角膜の透明性を段階的にスコア化して評価を行うことが考えられる。この場合、スコア化については混濁の程度や瞳孔の透見性による指標等が考えられるが、その妥当性について合理的な説明が必要である。

② 角膜厚の評価

超音波パキメーター等を使用した移植後の角膜厚の測定、移植された細胞の角膜内皮細胞層としてのポンプ機能とバリア機能を有していることの確認等が考えられる。

③ スペキュラーマイクロスコープによる角膜内皮細胞の密度・形態の評価

スペキュラーマイクロスコープにより、移植前後の角膜内皮細胞の密度、形態（例えば六角形を主体とする多角形細胞の割合、細胞の大きさ、均一性等）を生体内で評価することが考えられる。

④ 形態学的評価

移植後の角膜組織を採取し、アリザリン染色、免疫染色法等により角膜内皮の状態を評価することが考えられる。アリザリン染色では、角膜内皮の形態及び脱落の有無の確認や移植した角膜内皮細胞の密度を測定することができる。また、角膜内皮細胞に発現していることが知られるマーカー（Appendix 1 参照）等を用いた免疫染色により、角膜内皮面に角膜内皮細胞が生着していることを確認することが考えられる。

⑤ 安全性の評価

前房内の炎症反応、眼圧測定、感染症発生の有無など眼球の生理機能への影響やその他の合併症の有無等を含めて安全性を評価する。

（３） 臨床試験（治験）

治験実施計画書（安全性及び有効性の評価項目を含む）は、対象疾患、目的とする効能および効果、当該治療法に期待される臨床上的位置づけ等に応じて、非臨床データ等も踏まえて適切に計画されるべきである。

6. 参考情報

Appendix

下記の角膜内皮細胞に関するマーカーは例示であり、必要十分とは限らず、製品の特性や試験の目的に応じてマーカーの追加もしくは他のマーカーを用いること等について検討する必要がある。

1. 角膜内皮細胞に発現していることが知られるマーカーとしては、 Na^+/K^+ ATPase、ZO-1、N-cadherin、occludin 等が報告されている。
2. 角膜内皮細胞のバリア機能と関係しているマーカーとして、ZO-1、occludin 等が報告されている。
3. 角膜内皮細胞のポンプ機能と関係しているマーカーとして、 Na^+/K^+ ATPase 等が報告されている。

軟組織に適用するコンピュータ支援手術装置に関する評価指標

1. はじめに

これまでの手術用の医療機器は鉗や鉗子のほか、X線透視装置など、長い歴史のなかで開発、改良され、技術的に確立してきたものであり、その評価方法も定まっている。一方で、科学技術の発達により新たな概念の医療機器や非常に高度な医療機器が開発され、医師が行う医療を補助し始めた現在、これらの医療機器を適切に評価して承認を与える評価の指標が必要である。

産業界では人間の技術を補助又は代替する機器装置の開発が進み、いわゆる産業用ロボットとして画像やコンピュータ支援を得て幅広い領域で活用されている。産業用ロボットは無人化につながるものであるが、それらと異なり、医療に供することを目的とするコンピュータ支援手術装置は、その動作範囲内に患者や医師をはじめとした医療従事者を配置する必要があるため、同装置の設計にあたっては、患者はもちろんのこと、医療従事者に対する安全性に関しても十分に配慮する必要がある。

軟組織に適用するコンピュータ支援手術装置の開発は新たな時代に入り、様々な装置が相次いで開発されてきているが、軟組織の手術では、多くの硬組織手術と異なり、対象部位が動き得ると共に比較的細かい操作が必要な場合が多いなど、その評価に当たっては相応のリスク因子を考慮する必要がある。このような背景を踏まえ、軟組織に適用するコンピュータ支援手術装置について、科学的根拠を基盤にした品質、有効性及び安全性の評価を適正かつ迅速に進めるために本評価指標案を作成した。

2. 本評価指標の対象

本評価指標は、コンピュータ技術を用いて手術を支援する装置（コンピュータ支援手術装置）のうち軟組織に適用する医療機器であって、以下の構造又は機能のいずれか又は複数を有するものを対象とする。（※）

開発するコンピュータ支援手術装置が医療機器に該当するかどうか判断し難い場合は、必要に応じ、厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室に相談すること。

(1) マスター・スレーブ・マニピュレータ機能

マニピュレータとは、離れたところで操作して人間の手と似た動作をさせ、手作業の代行として用いる装置である。マスター・スレーブ・マニピュレータ機能とは、機能面から一台のマニピュレータを分割した場合に、操作する部分をマスター、動作する部分をスレーブと呼び、その各々の機能を指す。（なお、マスター・スレーブ・ロボットとは、一般的に形態面においてマスターとスレーブが分割されているロボットを指す。）

(2) 画像等により取得した医療情報に基づくナビゲーション機能

医療用ナビゲーションは、手術中の患者位置と手術器具の位置関係を表示する機能といえる。患者位置と手術器具の表示方法、また、患者位置と手術器具の計測方

法についてはさまざまな方法がある。表示においては、術前・術中の3次元画像に手術器具をベクトル表示する方法が一般的である。また、計測方法においては機械式・光学式・磁気式などに分類される。

(3) 自動又は半自動処置機能を有するレジストレーション機能

医療用ナビゲーションシステムにおけるレジストレーションとは、本当の患者の位置情報とシステム内の3次元位置情報とを一致させる作業を指す。実際の患者位置とシステム内の位置情報とを一致させる方法は様々である。

この際、自動処置機能とは、レジストレーション機能のうち、患者位置情報を装置が自動的に計測し、その情報をシステム内の位置情報に一致させる機能を指し、半自動処置機能とは、レジストレーション機能のうち、患者位置情報を装置と医師が計測し、その情報をシステム内の位置情報に一致させる機能を指す。

(4) 遠隔操作機能

マスター・スレーブ・ロボットにおいて遠隔操作機能とは、スレーブの動作はマスター部分から入力された情報に従って行われるが、マスターへの入力操作をスレーブの位置から離れて行うことができる機能を指す。形態面からみて、マスター装置とスレーブ装置が別の装置として分離していれば有線で接続されていても遠隔操作と呼ばれる場合もあるが、多くの場合は、各々の装置が、一般的に共有可能とされる線に、コンバーターを介して接続されることで、遠隔操作と呼ばれる。

※ コンピュータ技術を用いて手術を支援する装置すなわち Computer Aided Surgery (CAS) システムには、各種医用画像の再構成像を基にした術前診断・手術計画・手術シミュレーション、術中使用を目的とする各種治療診断機器、治療支援ロボット、術後の経過観察支援システムなどの手術全般にわたって支援を行う多様な装置、システムが含まれるが、今回の評価指標はこれらのうち医療機器と見なされるもののうち術中のみに使用されるものを対象とする。

術中に限定した場合では、術者の判断を助ける装置と、手術手技を行う装置に大きく分類されるが、術者の判断を助ける装置としては、①多数の医師の意見を集約する会議システムのようなもの、②画像診断を利用するナビゲーション装置、③コンピュータを用いた術中診断装置等があり、また手術手技を行う装置には、④画像診断などをもとにあらかじめ組み込まれたデータを用いて装置が手術手技を代替するものと、⑤医師が直接装置を操作して手術手技を行うものがありうる。これらのうち、①のような装置は一般に、医療機器とはみなされないことから本評価指標の対象とはしない。

3. 本評価指標の位置づけ

本評価指標は、技術開発の著しい機器を対象とするものであることを勘案し、問題点、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たものである。よって、今後の更なる技術革新や知見の集積等を踏まえ改訂されるものであり、申請内容に関して拘束力を有するものではない。

軟組織に適用するコンピュータ支援手術装置の評価にあたっては、個別の製品の特徴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、本評価指標のほか、国内外のその他の適切な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. 評価に当たって留意すべき事項

(1) 基本的事項

① 開発の経緯、品目の仕様（装置全体のサイズ及び重量等を含む）、当該品目及び、必要に応じ、類似品の国内外での使用状況、設計開発と装置の原理（アルゴリズムを含む）、目標とされる使用方法等を明確に示す。

② 以下の事項を参考に、装置の設置、運用に当たっての留意事項等について評価する。

(ア) 装置の設置条件

- ・重量（使用場所の床に要求される耐荷重条件）
- ・寸法（格納時も含めて）
- ・転倒防止対策

(イ) 機器の騒音、振動

(ウ) 保守点検

(エ) トレーニング計画の必要性とその内容

(オ) 停電対策（予備電源の要否等）

(カ) 求められるバックアップ体制（術中に装置の使用を中止し、代替手術へ切り替える場合の対応等）

(2) 非臨床試験

以下に示すベンチテスト、動物試験等を通して、装置の安全性及び有効性の評価を適切に行うこと。

なお、コンピュータ支援手術装置を構成する内視鏡、X線装置、CT及びMRI装置等の画像取得装置の性能、品質等については、関連するガイドライン、認証基準等に準じて評価すること。

① 性能に関する評価

以下の各事項中、該当する項目（※）について、それぞれ具体的なデータをもって明らかにすること。

※ なお、精度は、JIS Z8103において、「測定結果の正確さと精密さを含めた、測定量の真の値との一致の度合い」と定義されていることから分かるように、機器の性能表記として用いると曖昧さを生じることがあるため、性能表記に用いる場合には、精度を正確さ、精密さ、又は誤差と言い換えられないか検討すること。

(ア) 可動部分（アーム等）の性能と安全性

- ・可動原理
- ・制御方法
- ・動作精度（位置・空間的な精度、時間的な精度（時間遅れを含む。）、再現性、バリデーション方法等）
- ・精度の妥当性（適応症例に要求される動作精度との相関性等）

- ・動作距離、速度及び出力
- ・空間的配置（他機器、使用者、患者との干渉等）
- (イ) 医療処置部分（鉗子、レーザー等）の性能と安全性
 - ・原理及び期待される効果
 - ・制御方法
 - ・動作精度（位置・空間的な精度、時間的な精度（時間遅れを含む。）、再現性、バリデーション方法等）
 - ・精度の妥当性（適応症例に要求される時間遅れとの相関性等）
 - ・処置の範囲（レーザー等の場合は範囲と到達深度）
 - ・レーザー等の出力
 - ・外乱要因への対応策
- (ウ) レジストレーションの方法と精度
 - ・画像等による空間情報の把握の方法と妥当性
 - ・空間的な精度
 - ・時間的な精度（時間遅れを含む。）、再現性
 - ・バリデーション方法
- (エ) End-to-end 性能評価
 - ・システム全体としての性能の評価
- (オ) 安全機構の種類、構造及び妥当性
 - ・アラーム（種類、表示）（参考：IEC60839-1-1, IEC60601-1-8 等）
 - ・緊急停止対策（参考：ISO10218-1、ISO13850、IEC60204 等）
 - ・緊急停止装置及びその構造
 - ・緊急停止する条件（術者の意に反する誤動作、安全機構作動時等）
 - ・停止中の患者及び医療従事者への安全性の確保（装置姿勢保持等）
 - ・緊急停止後装置の再稼働の容易性
 - ・誤動作予防対策（ユーザーインターフェイス）
- (カ) 装置の動作状況の表示
- (キ) 耐久性（腐食対策、発熱対策等を含む）
- (ク) ソフトウェアのライフサイクル管理（参考：IEC62304 等）
- (ケ) 自己診断機能（上述の動作精度のバリデーションを含む。）

② 安全性に関する評価

- (ア) 電気的安全性（参考：JIS T0601-1, JIS T0601-1-1、JIS T0601-1-2 等）
- (イ) 機械的安全性（アームの耐荷重性を含む。）（参考：ISO10218-1 等）
- (ウ) 生物学的安全性（創傷表面等に接触する部位）（参考：ISO10993-1, JIS T0993 等）
- (エ) 無菌性（創傷表面、手術清潔野等に接触する部位）
 （参考：平成 17 年 3 月 30 日付け薬食監麻発第 033001 号厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知「薬事法及び採血及び供血あっせん

業取締法の一部を改正する法律の施行に伴う医薬品、医療機器などの製造管理及び品質管理(GMP/QMS)に係る省令及び改廃について」、第四章 第4 滅菌バリデーション基準 等)

(オ) 他の医療機器（麻酔機、電気メス、放射線発生装置等）との相互作用による影響（参考：ISO/TR21730 等）

③ 動物試験

動物試験を実施する必要性について考察すること。動物試験を行う必要性が認められた場合は、下記の事項に留意して適切な評価を行う。

(ア) 試験動物

- ・動物の種類とヒトへの外挿性
- ・動物の手術手法と臨床における手術方法との比較考察

(イ) 試験プロトコール

- ・試験プロトコールの詳細
- ・計測データ（生理学的、機械的及び電気的データ等）
- ・例数の設定とその妥当性

(ウ) 評価に当たって考慮すべき点

- ・処置の達成状況
- ・システムの性能に係る設計仕様の満足度（画像取得から操作に至るまでの時間遅れの評価を含む。）
- ・治療状況
- ・生体に対する有害事象の程度と頻度

(3) 臨床試験（治験）

① 治験の要否について

医療機器の臨床的な有効性及び安全性が性能試験、動物試験等の非臨床試験成績又は既存の文献等のみによっては評価できない場合に臨床試験（治験）の実施が必要となり、臨床試験成績に関する資料の提出が求められる。また、その使用目的、手術手技、性能、構造等が既存の医療機器と明らかに異なる場合については、原則として臨床試験の試験成績に関する資料の提出が必要である。

コンピュータ支援手術装置については、従来の手術に比較して有効性及び安全性が同等以上であることの評価が必要であり、従来の手術と同様に目的とする手術が実施できることはもちろんのこと、従来の手術に比して、非劣性であることを具体的な項目を挙げて示す必要がある。コンピュータ支援の程度、すなわち、従来の手術と比較した場合、医師の手術手技への関与の度合いがどの程度異なるのか、また、手技の種類、複雑さ、対象部位・臓器等に応じて、非臨床試験成績等のみによってこれら进行评估できる場合もあると考えられるが、手術成績等进行评估する必要がある場合は治験が必要となる。

治験が求められる事例としては以下のような事例が想定される。

(ア) 当該機器の使用において、対象とする組織並びに部位に対する治療手技の

評価が動物試験のみでは困難な場合（例えば、ヒト組織や腫瘍等と動物のそれとの違いにより、治療効果が判定しがたい場合や、解剖学的違いにより対象とする手術手技の範囲に差がある場合等）。

(イ) 生体反応や解剖学的違いにより、動物試験と臨床試験における有害事象の判定が著しく異なることが予想される場合。

② 臨床評価

治験を実施する場合においては、対象とする治療手技が実施できることを示すとともに、有害事象の程度および頻度を含む適切なエンドポイントを設定してその有効性と安全性を評価する。治験を実施する場合は、以下の事項に留意して治験の計画を立案すべきである。

(ア) コンピュータ支援手術装置の特性

手術は、病変部位に対する医学的侵襲であり、病変に関する生体情報の取得とそれに対する一連の医学的侵襲作業（医行為）の実施により成り立つ。コンピュータ支援手術装置は、生体情報の取得と医学的侵襲作業の実施の二つのフェーズのいずれか又は双方にコンピュータの支援を導入した装置であり、当該装置が手術のための生体情報の取得を支援するだけで手術そのものは医師により行われる場合もあれば、生体情報の取得から病態の診断、手術手技の実施までのほとんどの行為への支援を装置が行うものまで、装置の関与の仕方及び程度には幅がある。コンピュータ支援手術装置の有効性、安全性の評価に当たっては、装置を使用する術者とコンピュータの関与の度合いに応じて適切な評価項目を設定して評価することが必要である。

(イ) コンピュータ支援手術装置を適用する手術の範囲

コンピュータ支援手術装置には、特定領域の特定の術式を想定したもののほか、手術一般に使用しうる汎用性を意図したものもある。治験として実施する手術（又は比較対象となる手術）の選定に当たっては、当該装置がどの範囲の手術に適用されるものであるか、すなわち当該装置の「使用目的、効能又は効果」を明らかにしたうえで、装置の特性、性能を踏まえて、判断することが必要である。

限定された特定の手術に適用される装置であれば、どのような手術を治験として実施し評価すればよいか比較的明確である。

一方、汎用性を意図した装置の場合は、適用しうる手術の範囲が広いため、すべての手術について治験を実施することは現実的でない場合があることから、いかに代表性をもった手術を選定するかが重要になる。このとき、例えば、消化器外科手術、循環器外科手術及び脳外科手術を対象とするコンピュータ支援手術装置の場合、手術領域の空間環境、対象臓器の周辺に位置する臓器等の種類と位置関係、対象臓器の生命維持への寄与の程度、要求される手術手技の種類と精度などがそれぞれの手術で異なることから、これらの中で共通して代表性をもつ手術を選定することは難しいことが考えられるので、消化器外科手術、循環器外科手術及び脳外科手術のそれぞれで代表する手術を選定すること

等を考慮すべきである。治験として実施する手術の選定の妥当性については、十分に説明できることが必要である。

(ウ) 術者の当該機器の使用に関する習熟度の影響

手術時間等の評価項目は、術者の習熟度、技量等により大きく影響を受けることが考えられる。特にコンピュータ支援の程度が小さく、術者の手術手技への関与が大きいタイプのコンピュータ支援手術装置の場合は、術者の習熟度等の影響が大きい。一方、その逆のタイプの場合は術者の習熟度等の影響が小さく、むしろコンピュータ支援手術装置の利用により術者毎の手術結果のばらつきを減らすこと自体が機器の使用目的ともなる。

コンピュータ支援手術装置のうち特に操作が複雑なものやコンピュータ支援の程度が小さく相対的に術者側の因子の影響を受けやすいものについては、個々の術者の習熟度のばらつき等による機器の評価への影響を防ぐため、一定のトレーニングを経た術者により治験を行う等の配慮が必要である。

(エ) 医療従事者の負担の軽減の評価

コンピュータ支援手術装置に期待できる利点の一つとして、手術に携わる医療従事者の負担を軽減することが考えられる。例えば、手術手技の難度の改善、工程数の削減、手術に従事する医療従事者の数の削減、物理的な力の補助等である。これらは機器の性能及び安全性に直接関係しないこともあるが、必要に応じ考察を加えること。

③ 治験の症例数

臨床試験（治験）を実施する場合の症例数は、臨床試験の目的や主要評価項目等を踏まえ、科学的根拠に基づき、当該医療機器の有効性、安全性の評価に適切な症例数とする。

既存手術との比較など、比較対照をおく場合にあっては統計学的に症例数を設定する必要があることに留意すること。また、信頼できる海外データを承認申請の添付資料として使用できることがあるが、そのみで臨床評価を行うことができるかどうかについては十分に検討すること。

【関連規格及び参考資料】

(薬事関連)

1. 平成 17 年 2 月 16 日付け薬食機発第 0216003 号厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知「医療機器の製造販売承認申請書添付資料概要作成の手引きについて」
2. 平成 16 年 11 月 15 日付け医療機器審査 No.19 厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室事務連絡「医療用具の有効性、安全性評価手法に関する国際ハーモナイゼーション研究『医療用具の製造（輸入）承認申請書における原材料記載について』の報告書の送付について」
3. 平成 15 年 2 月 13 日付け医薬審発第 0213001 号厚生労働省医薬局審査管理課長通知「医療用具の製造（輸入）申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について」
4. 平成 15 年 3 月 19 日付け医療機器審査 No.36 厚生労働省医薬局審査管理課事務連絡「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」
5. JIS T 0993-1:2004 医療機器の生物学的評価 ― 第 1 部：評価及び試験方法
6. 「医療機器の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」（平成 17 年厚生労働省令第 37 号）
7. 「医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令」（平成 17 年厚生労働省令第 36 号）
8. 「医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器の製造販売後安全管理の基準に関する省令」（平成 16 年厚生労働省令第 135 号）
9. 「医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器の品質管理の基準に関する省令」（平成 16 年厚生労働省令第 136 号）
10. 「医療機器及び体外診断用医薬品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」（平成 16 年厚生労働省令第 169 号）
11. 「医療機器の製造販売後の調査及び試験の実施の基準に関する省令」（平成 17 年厚生労働省令第 38 号）
12. 平成 20 年 8 月 4 日付け薬食機発第 0804001 号厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知「医療機器に関する臨床試験データの必要な範囲等について」
13. 平成 19 年 3 月 30 日付け医政指発第 0330001 号厚生労働省医政局指導課長通知及び医政研発第 0330018 号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知「医療機器に係る安全管理のための体制確保に係る運用上の留意点について」
14. 平成 18 年 3 月 31 日付け薬食機発第 0331006 号厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知「医療機器に関する臨床試験の試験成績のうち外国で実施したものの取扱いについて」

(品質、生物学的安全性、無菌性)

1. ISO 9000:2000. Quality management systems - Fundamentals and vocabulary

2. ISO 9001:2000. Quality management systems - Requirements
3. ISO 9004:2000. Quality management systems - Guidelines for performance improvements
4. ISO 10993-1:2003. Biological evaluation of medical devices - Part 1 : Evaluation and testing
5. ISO 10993-2:1998. Biological evaluation of medical devices - Part 2 : Animal welfare requirements
6. ISO 10993-3:2003. Biological evaluation of medical devices - Part 3 : Tests for genotoxicity, carcinogenicity, and reproductive toxicity
7. ISO 10993-4:2002. Biological evaluation of medical devices - Part 4 : Selection of tests for interaction with blood
8. ISO 10993-5:1999. Biological evaluation of medical devices - Part 5 : Tests for in vitro cytotoxicity
9. ISO 10993-6:1994. Biological evaluation of medical devices - Part 6 : Tests for local effects after implantation
10. ISO 10993-7:1996. Biological evaluation of medical devices - Part 7 : Ethylene oxide sterilization residuals
11. ISO 10993-9:1999. Biological evaluation of medical devices - Part 9 : Framework for identification and quantification of potential degradation products
12. ISO 10993-10:2002. Biological evaluation of medical devices - Part 10 : Tests for irritation and delayed - type hypersensitivity
13. ISO 10993-11:1996. Biological evaluation of medical devices - Part 11 : Tests for systemic toxicity
14. ISO 10993-12:1996. Biological evaluation of medical devices - Part 12 : Sample preparation and reference materials
15. ISO 10993-13:1998. Biological evaluation of medical devices - Part 13 : Identification and quantification of degradation products from polymeric materials
16. ISO 10993-14:2004. Biological evaluation of medical devices - Part 14 : Identification and quantification of degradation products from ceramics
17. ISO 10993-15:2000. Biological evaluation of medical devices - Part 15 : Identification and quantification of degradation products from metals and alloys
18. ISO 10993-16:1997. Biological evaluation of medical devices - Part 16 : Toxicokinetic study design for degradation products and leachables
19. ISO 10993-17:2003. Biological evaluation of medical devices - Part 17 : Methods for the establishment of allowable limits for leachable substances
20. ISO 10993-18:2004. Biological evaluation of medical devices - Part 18 : Chemical characterization of materials

21. ISO 10993-19 : 2005. Physicochemical, morphological and topographical characterization of materials
22. ISO TS 10993-20:2003. Biological evaluation of medical devices - Part 20 : Principles and methods for immunotoxicology testing of medical devices
23. ISO 14155-1. Clinical investigation of medical devices for human subjects - Part 1 : General requirements
24. ISO 14155-2. Clinical investigation of medical devices for human subjects - Part 2 : Clinical investigation plants
25. ISO 13485:2003. Medical devices - Quality management systems - Requirements for regulatory purposes
26. ISO 13448:1996. Quality systems - Medical devices -Particular requirements for the application of ISO 9002.
27. ISO 14971:2000. Medical Devices -Application of risk management to medical devices.
28. ISO/DIS 22442-1. Application of risk management, Medical devices utilizing animal tissues and their derivatives
29. ISO/DIS 22442-2. Control on sourcing, collection and handling, Medical devices utilizing animal tissues and their derivatives
30. ISO/DIS22442-3. Validation of the elimination and / or inactivation of viruses and transmissible spongiform encephalopathy (TSE) agents, Medical devices utilizing animal tissues and their derivatives
31. ISO 11134. Sterilization of health care products-Requirements for validation and routine control - industrial moist heat sterilization
32. ISO 11135:1994. Medical devices; validation and routine control of ethylene oxide sterilization
33. ISO 11137:1995. Sterilization of health care products -Requirements for validation and routine control - Radiation sterilization
34. ISO 11737-1:1995. Sterilization of medical devices - Microbiological methods -Part 1; Estimation of population of microorganisms on products
35. ISO 13408 series. Aseptic proceeding of health care products
36. ISO 13638:1997. Sterilization of health care products -Requirements for Validation and routine control of moist heat sterilization in health care facilities
37. ISO 14160:1998. Sterilization of single-use medical devices incorporating materials of animal origin - Validation and routine control of sterilization by liquid sterilants
38. ISO 14937. Sterilization of health care products - General requirements for characterization of a sterilizing agent and the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices
39. ISO 17664. Sterilization of medical devices -Information to be provided by

manufacture for the processing of resterilizable medical devices

40. ISO/DIS 17665:2004. Sterilization of health care products – Moist heat –Development, Validation and routine control of a sterilization process for medical devices
41. 平成 17 年 3 月 30 日付け薬食監麻第 033001 号厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知「薬事法及び採血及び供血あっせん業取締法の一部を改正する法律の施行に伴う医薬品、医療機器等の製造管理及び品質管理（GMP/QMS）に係る省令及び告示の制定及び改廃について」（第四章 第 4 滅菌バリデーション基準）

（安全原則）

1. ISO/IEC Guide 51:1999. Safety aspects – Guidelines for their inclusion in standards
2. ISO/IEC Guide 63:1999. Guide to the development and inclusion of safety aspects in International Standards for medical devices

（機械的安全性）

1. JIS B9700-1:2004. 機械類の安全性 – 設計のための基本概念 一般原則 – 第 1 部：基本用語、方法（ISO 12100-1:2003）
2. JIS B9700-2:2004. 機械類の安全性 – 設計のための基本概念 一般原則 – 第 2 部：技術原則（ISO 12100-2:2003）
3. JIS B9702:2000. 機械類の安全性 – リスクアセスメントの原則（ISO 14121:1999）
4. JIS B9703:2000. 機械類の安全性 – 非常停止 – 設計原則（ISO 14121:1999）
5. JIS B9705-1:2000. 機械類の安全性 – 制御システムの安全関連部 – 第 1 部：設計のための一般原則（ISO 13849-1:1999）
6. JIS B9710:2006 機械類の安全性 – ガードと共同するインタロック装置 – 設計及び選択のための原則（ISO 14119:1998）
7. JIS B9711:2002. 機械類の安全性 – 人体部位が押しつぶされることを回避するための最小すきま（ISO 13854:1996）
8. ISO 10218-1:2006. Robots for industrial environments – Safety requirements – Part I : Robot
9. ISO 13849-1:2006. Safety of machinery – Safety-related parts of control systems – Part I : General principles for design
10. ISO 13850:2006. Safety of machinery – Emergency stop – Principles for design
11. ISO 13855:2002. Safety of machinery – Positioning of protective equipment with respect to the approach speeds of parts of the human body
12. ISO 14118:2000. Safety of machinery – Prevention of unexpected start-up
13. IEC 60204-1:2005. Safety of machinery - Electrical equipment of machines – Part I : General requirements
14. IEC/TR 61508-0:2005. Functional safety of electrical/electronic/programmable electronic safety-related systems –

Part 0 : Functional safety and IEC 61508

15. IEC 61508-1:1998. Functional safety of electrical/electronic/programmable electronic safety-related systems – Part I : General requirements

(プロセス管理、リスクマネジメント)

1. JIS T14971:2003. 医療機器 – リスクマネジメントの医療機器への適用 (ISO 14971:2000)
2. IEC 62304:2006. Medical device software – Software lifecycle processes
3. CDRH US-FDA:2002. General principles of software validation : Final guidance for industry and FDA staff
4. CDRH US-FDA:1999. Guidance for Off-the Shelf software use in medical devices; Final

(電気的安全性)

1. JIS T0601-1:1999. 医用電気機器 – 第一部：安全に関する一般的要求事項 (IEC 60601-1 Ed.2)
2. JIS T0601-1-1:2005. 医用電気機器 – 第一部：安全に関する一般的要求事項 – 第一節：副通則 – 医用電気システムの安全要求事項 (IEC 60601-1-1:2000)
3. JIS T0601-1-2:2002. 医用電気機器 – 第一部：安全に関する一般的要求事項 – 第二節：副通則 – 電磁両立性 – 要求事項及び試験 (IEC 60601-1-2:1993)
4. IEC 60601-1:2005. Medical electrical equipment – Part 1 : General requirements for basic safety and essential performance
5. IEC 60601-1-2:2007. Medical electrical equipment – Part 1-2 : General requirements for safety – Collateral standard : Electromagnetic compatibility – Requirements and tests
6. IEC 60601-1-4:1996. Medical electrical equipment – Part 1-4 : General requirements for safety – Collateral standard : Programmable electrical medical systems
7. IEC 60601-1-8:2003. Medical electrical equipment – Part 1-8 : General requirements for basic safety and essential performance – Collateral standard : General requirement, tests and guidance for alarm systems in medical electrical equipment and medical electrical systems
8. IEC 60601-2-46:1998. Medical electrical equipment – Part 2-46 : Particular requirements for the safety of operating tables
9. IEC60839-1-1:1988. Alarm systems. Part 1: General requirements. Section One: General

(その他)

1. JIS B7440-2:2003. 製品の幾何特性仕様 (GPS) – 座標測定機 (CMM) の受入検査及び定期検査 – 第 2 部：寸法測定 (ISO 10360-2:2001)

2. JIS B8431:1999. 産業用マニピュレーティングロボット - 特性の表し方 (ISO 9946:1999)
3. JIS B8432:1999. 産業用マニピュレーティングロボット - 性能項目及び試験方法 (ISO 9283:1998)
4. JIS B8437:1999. 産業用マニピュレーティングロボット - 座標系及び運動の記号 (ISO 9787:1998)
5. JIS Z8101-2:1999. 統計 - 用語と記号 - 第 2 部：統計的品質管理用語
6. JIS Z8103:2000. 計測用語
7. ASTM F1719-96:2002. Standard Specification for Image-Interactive Stereotactic and Localization Systems

ヒト（同種）iPS 細胞由来角膜上皮細胞シートに関する評価指標（案）

1. はじめに

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

本評価指標は、ヒト（同種）iPS 細胞加工製品のうち特に角膜上皮障害等の治療を目的として適用される再生医療等製品（平成 25 年法律第 84 号第 1 条の規定による改正後の薬事法（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）第 2 条第 9 項に規定する「再生医療等製品」をいう。以下同じ。）について、上述の基本的な技術要件に加えて当該製品特有の留意すべき事項を示すものである。

2. 本評価指標の対象

本評価指標は、ヒト（同種）iPS 細胞加工製品のうち特に角膜上皮障害等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、基本的な技術要件に加えて品質、有効性及び安全性の評価にあたって留意すべき事項を示すものである。

3. 本評価指標の位置づけ

本評価指標は、技術開発の著しいヒト（同種）iPS 細胞加工製品を対象とするものであることを勘案し、留意すべき事項を網羅的に示したものではなく、現時点で考えられる点について示している。よって、今後の更なる技術革新や知見の集積等を踏まえ改訂されるものであり、申請内容に関して拘束力を有するものではない。製品の評価に当たっては、個別の製品の特性を十分理解した上で、科学的な合理性をもって柔軟に対応することが必要である。なお、本評価指標の他、国内外のその他の関連ガイドラインを参考にすることも考慮すべきである。

また、個別の製品において必要となる評価については、独立行政法人医薬品医療機器総合機構に相談することが強く勧められる。

4. 用語の定義

- (1) 細胞シート：細胞同士又は細胞と支持体が結合してシート状の形態を呈したものをいう。
- (2) 角膜上皮：角膜は、強膜とともに眼球の外壁を構成する直径 11～12 mm 程度の透明な組織で、外界からの光を屈折させるレンズの役割を果たす。表面から角膜上皮、

角膜実質、角膜内皮の3層で構成される。そのうち、角膜上皮は4～5層の角膜上皮細胞から成る組織である。

- (3) 角膜上皮障害：角膜上皮幹細胞疲弊症をはじめとする種々の要因から、角膜上皮の機能が障害された病態全般を指す。
- (4) 角膜上皮幹細胞疲弊症：角膜上皮障害の中でも特に重症のケースで、角膜輪部に存在する角膜上皮幹細胞が外傷や疾病によって消失した状態を指す。
- (5) 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)
- (6) 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、ウイルス不活化後の原料に不活化前の原料が混入する場合等が挙げられる。
- (7) 代替指標：目的とする対象指標が測定困難な場合に、事前に相関づけられた代替可能な指標。
- (8) 支持体：細胞をシート状に形成する際に足場として非細胞材料を用いる場合があり、ここではそれを支持体と称する。移植・投与される細胞シート製品に含有されるか否かを問わない。
- (9) 角膜上皮バリア機能：角膜上皮層のような重層化している上皮細胞層では、表層細胞の細胞間がタイトジャンクションという接着構造で強固に結合して、異物や水などを自由に通さない構造となっている。この機能をバリア機能という。
- (10) 瞼球癒着：眼瞼の結膜と眼球の結膜が部分的または完全に癒着した状態を指す。
- (11) 細隙灯顕微鏡検査：細隙光と呼ばれる帯状の光線を眼球に照射し、生体顕微鏡で観察する検査。角膜、前房、虹彩、水晶体など主に前眼部を観察する。専用のレンズを用いることで後眼部の観察も可能である。

5. 評価に当たって留意すべき事項

本評価指標は、当面、既に再生医療等製品の原材料として株化されているヒト（同種）iPS細胞（細胞株）を主たる原材料として製造所に受け入れ、これを製造所において加工して製造された、ヒト（同種）iPS細胞加工製品としての角膜上皮細胞を含むシート（以下、角膜上皮細胞シート）の評価に適用することを想定している。再生医療等製品の製造所内でヒト（同種）iPS細胞を体細胞から新たに樹立し、これを原材料とした再生医療等製品の製

造を意図するような場合には、本評価指標を参照しつつ、「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成 24 年 9 月 7 日付け薬食発 0907 第 5 号厚生労働省医薬食品局長通知）等を参考とすること。

（１）原料等

原料等となる iPS 細胞は、再生医療等製品の原材料として株化されたヒト（同種）iPS 細胞であって、一定の製造工程を経ることにより角膜上皮細胞へ分化することが確認されている、又は合理的に予測されるものである必要がある。ヒト体細胞への初期化遺伝子導入による遺伝子リプログラミングによりヒト iPS 細胞が樹立されている場合は、導入された遺伝子の残存が否定されていることが望ましい。残存が否定できない場合には、導入遺伝子が最終製品である角膜上皮細胞シートの品質及び安全性に悪影響を与えないことを確認する必要がある。

（２）製造工程において特に注意が必要な事項

角膜上皮細胞シート（最終製品）の製造にあたっては、製造方法を明確にし、可能な範囲でその妥当性を以下の項目で検証し、一定の品質を保持すること。

①ロット構成の有無とロットの規定

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

②製造方法

原材料となるヒト iPS 細胞株の履歴、及び製造所への受入れから、セル・バンクを構築する場合にはその工程を含め、分化段階の進んだ細胞を経て最終製品に至る製造方法の概要を示すとともに、具体的な処理内容及び必要な工程管理、品質管理の内容を明らかにすること。

a) 受入検査

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

なお、技術的な理由により、工程を一部進めた上で検査を行うことが適切な場合にあっては、受入れ後の適切な時点で検査を実施すること。例えば、凍結ヒト iPS 細胞株を原材料製造時の試験（検査）結果（Certificate of Analysis）を基に受入れた後、解凍して拡

大培養を実施する際に追加の検査を行うことが挙げられる。治験を開始する前段階の場合は、それまでに得られた試験検体での実測値を提示し、これらを踏まえた暫定値を示すこと。

b) 細胞のバンク化

角膜上皮細胞シートの製造にあたっては、製造所に受け入れたヒト iPS 細胞株から、最終製品の製造までのいずれかの過程において、セル・バンクを構築する場合と、セル・バンクを構築しない場合の両者が想定される。セル・バンクを構築する場合には、その作製方法、特性解析、保存・維持・管理・更新方法、その他の各作業工程及び試験に関する手順等について詳細を明らかにし、ICH Q5D 等を参考として、その妥当性を示すこと。ただし、より上流の過程で評価されていることに起因する正当な理由により検討事項の一部を省略することは差し支えない。

c) 最終製品の構成要素となる細胞の作製

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

d) 製造工程中の取り違い及びクロスコンタミネーション防止対策

角膜上皮細胞シート（最終製品）の製造にあたっては、製造工程中の取違い及びクロスコンタミネーションの防止が重要であり、工程管理における防止対策を明らかにすること。

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

複数の細胞培養加工施設で製造を完結する場合は、施設間での中間製品の輸送に関する条件をあらかじめ確定し、中間製品の出荷及び受入れ、輸送などの条件が満たされているかのモニタリングを行うこと。

(3) 製品の品質管理

角膜上皮細胞シート（最終製品）の品質管理における留意点として、例えば以下に挙げた事項が考えられる（参考資料 1、2、3）が、必要かつ適切であれば別の試験項目の採用又は追加を検討すること。その際には、各試験項目の設定根拠及び試験方法の妥当性について説明する必要がある。工程内管理の管理値及び品質規格の規格値の設定について、治験を開始する前段階の場合にあつては、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。また、出荷製品そのもの又はその一部に対して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等、代替とする検体を用いて試験を実施すること。

なお、角膜上皮細胞シート（最終製品）の品質管理の設定にあたっては、その移植方法を明らかにすること。移植方法には、例えば、角膜上皮細胞シート（最終製品）が容器等に格納された状態から、必要数（1 治療あたり 1 枚等）を回収し、適切な適用部位（瘢痕部位除去後の疾患眼表面等）に貼り付けて移植すること等が考えられる。a) 形状の確認、b) 細胞シートとして回収可能であることの確認、c) 細胞数及び生存率、d) 角膜上皮細胞としての特異性の確認、e) 主構成細胞の確認、f) 機能評価、g) 未分化細胞が混在していないことの確認、については検討する必要がある。方法については以下に示す。

a) 形状の確認

最終製品の形状に関して、目視、位相差顕微鏡観察等により、全体の形状（例えば、透明な膜状組織であること）や、上皮細胞特有の細胞形態を確認すること（例えば、敷石状細胞形態等）等が考えられる。

b) 細胞シートとして回収可能であることの確認

最終製品の力学的適合性に関して、例えば、移植時と同様の手法で培養容器等から剥離、回収するまでの操作を行い、細胞シートとしての破損がないことを確認すること等が考えられる。

c) 細胞数及び生存率

最終製品における細胞の数及び生存率について基準を設定する必要がある。細胞数を測定する方法としては、最終製品や中間製品の一部を抜き出して細胞懸濁液とし、バリデーション可能な測定方法（血球計算盤やセルカウンターで測定する方法等）にて測定すること等が考えられる。細胞生存率を測定する方法として、バリデーション可能な方法（トリパンブルーを用いた色素排除法や蛍光色素を用いた方法等）にて、生細胞及び死細胞を計数すること等が考えられる。

d) 角膜上皮細胞としての特異性の確認

最終製品を構成する細胞について、角膜上皮関連遺伝子（例えば、Keratin3、Keratin12 等）（参考資料 4、5）が発現していることを免疫染色で確認すること等が考えられる。

e) 主構成細胞の確認

最終製品を主として構成する細胞の性質と割合について、確認する必要がある。この確認にあたっては、上皮系細胞マーカー（例えば、Keratin14、pancytokeratin 等）の発現率を測定することで、主構成細胞が上皮系細胞であることと、その割合が確認できる（参考資料 1、3）。測定方法については、例えば、最終製品を細胞懸濁液として免疫染色を行い、フローサイトメトリーによって計測する等が考えられる。

f) 機能評価

最終製品について、治療用途に整合性のある機能特性を有することを確認する。角膜

上皮細胞シートとしての特性を解析する場合は、以下が挙げられる。

- ・ 幹細胞、前駆細胞性

角膜上皮細胞シート（最終製品）は、製品内に含まれる上皮幹細胞、前駆細胞が新たな上皮細胞を供給し続けることによって、一定周期で細胞のターンオーバーが繰り返される（参考資料 1）。それにより上皮組織が維持されることで、移植後も長期間に渡り機能を維持する。幹細胞、前駆細胞性の確認として、これらの性質を示すことが報告されているマーカー（例えば、p63 等）（参考資料 6）の発現を免疫染色で確認すること等が考えられる。

- ・ 角膜上皮バリア機能

角膜上皮細胞シート（最終製品）のバリア機能を確認する場合には、同機能との相関が報告されているマーカー（例えば、ZO-1 等）（参考資料 7）の発現を免疫染色で確認すること等が考えられる。

g) 未分化細胞が混在していないことの確認

最終製品への未分化細胞の混在については、定量 RT-PCR によるマーカー遺伝子発現量による評価等が考えられる。マーカー遺伝子としては、特に *LIN28* の遺伝子定量解析が未分化細胞に対する特異性が高くかつ高感度であり、評価方法として用いることができる。なお、造腫瘍性評価のための試験に関しては非臨床試験の項目も参照すること。

（4）製品の安定性試験

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

（5）非細胞材料の品質・安全性

最終製品に関係する非細胞材料として、製造工程中で最終製品と接触するもの（例えば、細胞シート培養工程に用いる培養容器等）のほか、支持体（例えば、羊膜、フィブリンゲル等）を用いる場合も考えられる。支持体不使用でも最終製品の細胞シートを形成することが可能であるが、支持体等を用いる場合は、それも含めて材料自体の品質・安全性に関する知見について明らかにすること。

（6）非臨床試験

ヒト（同種）iPS 細胞を加工して製造される再生医療等製品の造腫瘍性を評価する上で

は、「原料となる iPS 細胞の造腫瘍性と最終製品の造腫瘍性との相関・因果関係は未解明である」という点に注意が必要である。すなわち、臨床適用に際しては、原料となるヒト（同種）iPS 細胞ではなく、あくまで最終製品としてのヒト（同種）iPS 細胞加工製品の造腫瘍性評価が最も重要であることを常に留意しなければならない。したがって、造腫瘍性試験については最終製品を用い、検出限界が既知の試験系を用いて造腫瘍性の評価を行うことが有用である。最終製品の造腫瘍性の評価には目的別に大きく 2 種類ある。「品質管理」のための造腫瘍性試験（造腫瘍性細胞の存在量の確認）及び「非臨床安全性評価」のための造腫瘍性試験（最終製品の細胞がヒトでの投与部位に相当する微小環境で造腫瘍性を示すかどうかの確認）であり、これらは区別して評価することが重要である。なお、造腫瘍性の評価にあたっては、「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関するガイドラインについて」（令和元年 6 月 27 日付け薬生機審発 0627 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知）等も参考にすること。

① 最終製品の品質管理のための造腫瘍性試験

品質管理のための造腫瘍性試験としては、高感度な特性を有する *in vivo* 評価法として、重度免疫不全動物（例えば、NOD/SCID/ γ Cnull (NOG) マウス、NOD/SCID/IL2 γ KO (NSG) マウス、Rag2- γ C double-knockout (DKO) マウス) への皮下投与試験等が挙げられる。最終製品の造腫瘍性の要因となり得る未分化細胞や形質転換細胞を検出する試験としては、*in vitro* 評価法の適用が考えられる。未分化細胞の検出のための評価法としては、例えば、未分化細胞マーカー（*LIN28*、*TRA-I-60* 等）を指標にしたフローサイトメトリーや定量 RT-PCR、最終製品を原料等の iPS 細胞の培養条件に戻して一定期間培養する評価法等が挙げられる。形質転換細胞の検出のための評価法としては、例えば、細胞増殖特性解析（参考資料 1）やデジタル軟寒天コロニー形成試験等が挙げられる。最終製品に適した評価法を用い、造腫瘍性リスクを総合的に評価することが重要である。

② 最終製品の非臨床安全性及び有効性を評価する試験

最終製品の非臨床試験の目的は、ヒトでの投与部位と同一の局所環境で最終製品が示す安全性と有効性を評価することにある。最終製品である角膜上皮細胞シートを、ウサギを用いて作製した疾患モデル動物に移植して評価した報告は有るものの、異種移植のため免疫抑制剤の投与が必要となることや、それでもなお拒絶を抑制できず短期で移植物が脱落すること等から、ヒトと同一の局所環境での有意な評価とは言い難い。また、免疫不全小動物（マウス、ラット等）での角膜上皮細胞シート移植は技術的に困難であり、これまでに報告もされていない。このようにモデル動物を用いた適切な評価が困難な現状に鑑み、ヒト臨床での移植症例があれば、たとえ少数例であったとしても非臨床

試験に優先して参照することも有意であると考えられる。

また、最終製品の投与部位の角膜は無血管組織であり、もとより腫瘍形成等の病変は極めて稀である。それに対し、品質管理のための造腫瘍性試験として挙げられる重度免疫不全動物（マウス等）への皮下投与試験は、角膜と異なり血管を豊富に有する皮下組織への投与であり、より腫瘍形成を促し易い微小環境であると考えられる。したがって、造腫瘍性評価を主とした最終製品の非臨床安全性評価に関しては、品質管理のための造腫瘍性評価としての *in vivo* 試験をもって、ある程度の評価の推定が可能と考えられる。

いずれにしろ、最終製品である角膜上皮細胞シートの非臨床安全性及び有効性の評価にあたっては、現在取得できる科学的に有意な情報から総合的に判断することが重要である。

（７）臨床試験（治験）

①適応

角膜上皮障害を適応対象とする。特に角膜上皮幹細胞疲弊症が多く含まれる。

臨床試験においては、有効性及び安全性評価に適した集団を選択するために、国際的に普及した診断基準、重症度分類等を用いて、当該治療法に期待される臨床上の位置付け等を明確にした上で、選択・除外基準や評価基準を設定する必要がある。

②症例数の設定

症例数は、科学的合理性に基づき、試験目的、検証すべき仮説、試験の達成基準及び試験デザインに応じて設定する。

③有効性評価

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

眼科領域では、ETDRS 視力表や小数視力表などを用いた矯正視力の測定が国際的に広く普及しており、有効性評価項目として考えうる。しかしながら角膜上皮幹細胞疲弊症を含む角膜上皮障害患者においては、シート移植による治療の対象となる角膜上皮以外の部位の眼疾患（角膜実質混濁、白内障、網膜疾患、緑内障、視神経疾患など）を合併している場合があり、合併している場合にはシート移植が奏功して角膜上皮の透明性が回復しても、他の

眼疾患が原因で視力回復には必ずしもつながらないことも想定される。よって、臨床試験において矯正視力を有効性効果判定項目と設定する場合は上記を考慮する必要がある。

これらの状況を考慮し、以下のような項目等の術後の術前に対する改善度が有効性評価の項目として挙げられる。

- 1) 角膜上皮障害（角膜上皮幹細胞疲弊症）の重症度等
- 2) 角膜混濁
- 3) 矯正視力
- 4) 角膜血管新生
- 5) 瞼球癒着
- 6) 自覚症状（眼痛、異物感、流涙、羞明等）

④安全性評価

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

臨床試験では、iPS 細胞由来角膜上皮細胞シート移植後に留意して観察すべき有害事象として、腫瘍形成や拒絶反応が挙げられる。眼科診療で用いられる細隙灯顕微鏡検査によって移植部位を直接観察できることから、腫瘍形成や拒絶反応の発生について鋭敏に観察することができる。

なお、角膜上皮は免疫原性が低いと報告されており（参考資料8）、移植にあたって免疫抑制剤を使用する場合と使用しない場合のどちらのケースも考えられる。免疫抑制剤を使用する場合は、投与による有害事象にも注目が必要である。

6. 参考資料

1. Hayashi R, Ishikawa Y, Sasamoto Y, Katori R, Nomura N, Ichikawa T, Araki S, Soma T, Kawasaki S, Sekiguchi K, Quantock AJ, Tsujikawa M, Nishida K. Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature*. 2016 Mar 17;531(7594):376-80. doi: 10.1038/nature17000.
2. Hayashi R, Ishikawa Y, Katori R, Sasamoto Y, Taniwaki Y, Takayanagi H, Tsujikawa M, Sekiguchi K, Quantock AJ, Nishida K. Coordinated generation of multiple ocular-like cell lineages and fabrication of functional corneal epithelial cell sheets from human iPS cells. *Nat Protoc*. 2017 Apr;12(4):683-696. doi: 10.1038/nprot.2017.007.
3. Hayashi R, Ishikawa Y, Katayama T, Quantock AJ, Nishida K. CD200 facilitates the isolation of corneal epithelial cells derived from human pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2018 Nov 8;8(1):16550. doi: 10.1038/s41598-018-34845-2.
4. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982 Nov;31(1):11-24. doi: 10.1016/0092-8674(82)90400-7.
5. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol*. 1986 Jul;103(1):49-62. doi: 10.1083/jcb.103.1.49.
6. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, Ponzin D, McKeon F, De Luca M. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Mar 13;98(6):3156-61. doi: 10.1073/pnas.061032098.
7. Ko JA, Yanai R, Nishida T. Up-regulation of ZO-1 expression and barrier function in cultured human corneal epithelial cells by substance P. *FEBS Lett*. 2009 Jun 18;583(12):2148-53. doi: 10.1016/j.febslet.2009.05.010.
8. Yoshinaga Y, Soma T, Azuma S, Maruyama K, Hashikawa Y, Katayama T, Sasamoto Y, Takayanagi H, Hosen N, Shiina T, Ogasawara K, Hayashi R, Nishida K. Long-term survival in non-human primates of stem cell-derived, MHC-unmatched corneal epithelial cell sheets. *Stem Cell Reports*. 2022 Jul 12;17(7):1714-1729. doi: 10.1016/j.stemcr.2022.05.018.

医 薬 発 0117 第 11 号
令 和 7 年 1 月 17 日

各都道府県知事 殿

厚 生 労 働 省 医 薬 局 長
(公 印 省 略)

「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について
」の一部改正について

平素より厚生労働行政にご協力いただき厚く御礼申し上げます。

再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成25年法律第85号）のもとで実施する異種移植の研究又は治療の提供を行う場合に実施すべきリスク管理については、本日、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律の下で実施する異種移植の実施について」（令和7年1月17日付け医政研発0117第1号、感感発0117第7号厚生労働省医政局研究開発政策課長、健康・生活衛生局感染症対策部感染症対策課長連名通知）が発出され、実施すべきリスク管理がとりまとめられました。

また、「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ついて」（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」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について」（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）及び「「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」の改定について」（平成28年6月13日付け医政研発0613第1号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知）（以下「関連通知」という。）は廃止されることとなりました。

これに伴い、関連通知を引用している「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成24年9月7日付け薬食発0907第5号厚生労働省医薬食品局長通知。以下「局長通知」という。）について、下記のとおり改めましたので、貴職におかれましては、本内容を御了知の上、貴管下の関係者に対し、周知方お願いします。

なお、本通知による改正後の局長通知は別紙のとおりですので、参考として添付いたします。本通知の写しについて、別記の関係団体宛てに発出するので、念のため申し添えます。

記

該当箇所	改正後	改正前
第2章 第1 2(1) 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」、令和7年1月17日付け医政研発0117第1号・感感発0117第7号厚生労働省医政局研究開発政策課長、健康・生活衛生局感染症対策部感染症対策課長通知「再生医療等の安全性の確保等に関する法律の下で実施する異種移植の実施について」における別添「異種移植の実施に伴う異種移植片由来感染症のリスク管理に関するガイドライン」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。	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。

(別記)

独立行政法人医薬品医療機器総合機構理事長

日本製薬団体連合会会長

日本製薬工業協会会長

東京医薬品工業協会会長

関西医薬品協会会長

米国研究製薬工業協会在日技術委員会委員長

欧州製薬団体連合会在日執行委員会委員長

日本医薬品原薬工業会会長

日本医薬品添加剤協会会長

日本医療機器産業連合会会長

米国医療機器・IVD 工業会会長

欧州ビジネス協会医療機器委員会委員長

一般社団法人再生医療イノベーションフォーラム会長

薬食発 0907 第 5 号
平成 24 年 9 月 7 日
一部改正：令和 3 年 6 月 30 日
(最終改正：令和 7 年 1 月 17 日)

各都道府県知事 殿

厚生労働省医薬食品局長

ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について

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

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

ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針

はじめに

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

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

目次

第1章 総則	5
第1 目的	5
第2 定義	5
第2章 製造方法	6
第1 原材料及び製造関連物質	6
1 iPS（様）細胞作成の原材料となるヒト体細胞	6
(1) 起源及び由来、選択理由	6
(2) 原材料となる細胞・組織の特性と適格性	6
(3) ドナーに関する記録	7
(4) 細胞・組織の採取・保存・運搬	7
2 目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質	8
(1) 細胞の培養を行う場合	8
(2) 非細胞成分と組み合わせる場合	10
(3) 細胞に遺伝子工学的改変を加える場合	11
(4) 細胞にタンパク質を導入する場合	12
(5) 薬剤等の処理により細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合	13
(6) 物理的方法により細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合	13
(7) コンビネーションにより細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合	13
3 ヒト iPS（様）細胞の樹立	13
4 ヒト iPS（様）細胞株の保存及び運搬方法	13
5 記録の作成及び保管方法	14
第2 製造工程	14
1 ロット構成の有無とロットの規定	14
2 製造方法	14
(1) 受入検査	14
(2) 細菌、真菌及びウイルス等の不活化・除去	14
(3) 組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離等	14
(4) ヒト iPS（様）細胞株の樹立	15
(5) ヒト iPS（様）細胞由来の中間細胞株の樹立	15
(6) 最終製品の構成要素となる細胞の作成	15
(7) 細胞のバンク化	15
(8) 製造工程中の取り違い及びクロスコンタミネーション防止対策	16
3 最終製品の構成要素となる細胞の特性解析	16

4	最終製品の形態、包装	16
5	製品の保存及び運搬	16
6	製造方法の恒常性	16
7	製造方法の変更	17
第3	最終製品の品質管理	17
1	総論	17
2	最終製品の品質管理法	18
(1)	細胞数並びに生存率	18
(2)	確認試験	18
(3)	細胞の純度試験	18
(4)	細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験	18
(5)	製造工程由来不純物試験	18
(6)	無菌試験及びマイコプラズマ否定試験	19
(7)	エンドトキシン試験	19
(8)	ウイルス試験	19
(9)	効能試験	20
(10)	力価試験	20
(11)	力学的適合性試験	20
第3章	ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の安定性	20
第4章	ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の非臨床安全性試験	20
第5章	ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験	22
第6章	ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の体内動態	23
第7章	臨床試験	24

第1章 総則

第1 目的

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

第2 定義

本指針における用語の定義は以下のとおりとする。

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

から構成されるものをいう。

- 9 「タンパク質導入体」とは、目的タンパク質を標的細胞に導入するための薬剤及び目的タンパク質等から構成されるものをいう。

第2章 製造方法

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

第1 原材料及び製造関連物質

1 iPS（様）細胞作製の原材料となるヒト体細胞

(1) 起源及び由来、選択理由

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

(2) 原材料となる細胞・組織の特性と適格性

① 生物学的構造・機能の特徴と選択理由

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

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

② ドナーの選択基準、適格性

ドナーの選択が倫理的に適切に行われ、かつ適切な手続きで行われたことを示すこと。また、年齢、性別、民族学的特徴、遺伝的特徴、病歴、健康状態、採取細胞・組織を介して感染する可能性がある各種感染症に関する検査項目、免疫適合性等を考慮して、選択基準、適格性基準を定め、その妥当性を明らかにすること。ドナーのゲノム・遺伝子解析を行う場合は、「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」（令和3年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に従うこ

と。

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

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

- ・梅毒トレポネーマ、クラミジア、淋菌、結核菌等の細菌による感染症
- ・敗血症及びその疑い
- ・悪性腫瘍
- ・重篤な代謝及び内分泌疾患
- ・膠原病及び血液疾患
- ・肝疾患
- ・伝達性海綿状脳症及びその疑い並びにその他の認知症
- ・特定の遺伝性疾患や家族歴

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

(3) ドナーに関する記録

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

(4) 細胞・組織の採取・保存・運搬

① 採取者及び採取医療機関等の適格性

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

② 採取部位及び採取方法の妥当性

細胞・組織の採取部位の選定基準及び採取方法を示し、これらが科学的及び倫理的に適切に選択されたものであることを明らかにすること。

細胞・組織の採取方法については、用いられる器具及び薬剤、微生物汚

染防止、取り違いやクロスコンタミネーション防止のための方策等を具体的に示すこと。

③ ドナーに対する説明及び同意

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

④ ドナーの個人情報の保護

ドナーの個人情報の保護方策について具体的に規定すること。

⑤ ドナーの安全性確保のための試験検査

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

⑥ 保存方法及び取り違い防止策

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

⑦ 運搬方法

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

⑧ 記録の作成及び保管方法

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

2 目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質並びに製造関連事項

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

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

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

(1) 細胞の培養を行う場合

- ① 培地、添加成分(血清、成長因子及び抗生物質等)及び細胞の処理に用いる試薬等のすべての成分等についてその適格性を明らかにし、必要に応じて規格を設定すること。各成分等の適格性の判定及び規格の設定に当たっては、最終製品の適用経路等を考慮すること。
- ② 培地成分については、以下の点に留意すること。
 - ア 培地に使用する成分及び水は、可能な範囲で医薬品又は医薬品原料に相当する基準で品質管理されている生物学的純度の高い品質のものを使用すること。
 - イ 培地に使用する成分は主成分のみでなく使用するすべての成分について明らかにし、選択理由及び必要に応じて品質管理法等を明確にすること。ただし、培地の構成成分が周知のもので、市販品等が一般的に使用されている DMEM、MCDB、HAM、RPMI のような培地は 1 つのものと考えてよい。
 - ウ すべての成分を含有した培地の最終品については、無菌性及び目的とした培養に適していることを判定するための性能試験を実施する必要がある。その他、工程管理上必要と思われる試験項目を規格として設定し、適切な品質管理を行う必要がある。
- ③ 異種血清及び異種もしくは同種の血清に由来する成分については、細胞活性化又は増殖等の加工に必須でなければ使用しないこと。特に繰り返し使用して使用の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」、令和 7 年 1 月 17 日付け医政研発 0117 第 1 号・感感発 0117 第 7 号厚生労働省医政局研究開発政策課長、健康・生活衛生局感染症対策部感染症対策課長通知「再生医療等の安全性の確保等に関する法律の下で実施する異種移植の実施について」における別添「異種移植の実施に伴う異種移植片由来感染症のリスク管理に関するガイドライン」を参考にして品質評価を行い、フィーダー細胞からの細菌、真菌、ウイルス、異常プリオン等の混入・伝播を防止する策を講じるとともに、使用時の分裂能不活化方法及び細胞密度等の条件について明らかにすること。ただし、例えば既に臨床使用されているヒト細胞・組織製品の製造に使用され、その特性や微生物学的安全性等について評価が定まっているフィーダー細胞と同一の細胞を利用する場合には、その妥当性を示すことによってウイルス否定試験等、試験の一部を省略することができる可能性がある。

- ⑤ 抗生物質の使用は極力避けるべきである。ただし製造初期の工程において抗生物質の使用が不可欠と考えられる場合には、その後の工程で可能な限り漸減を図るほか、その科学的理由、最終製品での推定残存量、患者に及ぼす影響などの面から妥当性を説明すること。なお、抗生物質を使用する場合でも十分に除去されることが立証される場合には、その使用を妨げるものではない。一方、原則として、用いる抗生物質に過敏症の既往歴のある患者の場合には、本治療を適応すべきではない。やむを得ず適用する際には十分な注意を払うと同時に、患者からインフォームド・コンセントを得る必要がある。
- ⑥ 成長因子を用いる場合には、細胞培養特性の再現性を保証するために、例えば純度及び力価に関する規格を設定する等適切な品質管理法を示すこと。
- ⑦ 最終製品に含有する可能性のある培地成分や操作のために用いられたその他の成分等については、生体に悪影響を及ぼさないものを選択すること。
- ⑧ フィーダー細胞として異種動物由来の細胞を用いる場合には、異種動物由来の感染症のリスクの観点から安全性を確保すること。

(2) 非細胞成分と組み合わせる場合

① 細胞以外の原材料の品質及び安全性について

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

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

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

② 目的とする細胞との相互作用について

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

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

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

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

③ 細胞と適用部位を隔離する目的で非細胞成分を使用する場合

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

ア 免疫隔離が目的の場合、その程度

イ 最終製品中の細胞由来の目的生理活性物質の膜透過キネティクスと薬理効果

ウ 栄養成分及び排泄物の拡散

エ 非細胞成分が適用部位周辺に及ぼす影響

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

(3) 細胞に遺伝子工学的改変を加える場合

細胞に遺伝子を導入する場合は、次に掲げる事項に関する詳細を示すこと。

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

② 導入遺伝子の性質

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

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

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

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

(4) 細胞にタンパク質を導入する場合

細胞にタンパク質を導入する場合は、次に掲げる事項に関する詳細を示すこと。

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

上記の記述にかかわらず、細胞に導入されるタンパク質が、化学的に

も、機能的にも最終製品の一部を構成せず、製造工程中の試薬として使用される場合は、使用の目的に適う品質及び安全性が確保されていることを明らかにすることにより。

(5) 薬剤等の処理により細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合

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

- ① 目的薬剤等の構造、由来及び生物活性、物理化学的性質等の品質特性
- ② 目的薬剤等の入手方法、製造方法、品質管理方法及び更新方法等に関する情報
- ③ 目的薬剤等による細胞処理の方法

(6) 物理的方法により細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合

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

(7) コンビネーションにより細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合

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

3 ヒト iPS（様）細胞株の樹立

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

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

4 ヒト iPS（様）細胞株の保存及び運搬方法

ヒト iPS（様）細胞株について、保存・流通期間及び保存形態を十分考慮して、細胞の生存率及び力価等に基づく適切な安定性試験を実施し、貯法及び有効期限を設定し、その妥当性を明らかにすること。特に凍結保管及び解凍を行う場合には、凍結及び解凍操作による細胞株の安定性や規格への影響がないかを確認すること。また、必要に応じて標準的な保存期間を

超える長期保存についても検討し、安定性の限界を可能な範囲で確認すること。ただし、細胞株を樹立後直ちに使用するような場合はこの限りではない。

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

5 記録の作成及び保管方法

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

第2 製造工程

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

1 ロット構成の有無とロットの規定

最終製品及び中間製品がロットを構成するか否かを明らかにすること。

ロットを構成する場合には、ロットの内容について規定しておくこと。

2 製造方法

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

(1) 受入検査

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

(2) 細菌、真菌及びウイルス等の不活化・除去

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

(3) 組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離等

採取した細胞・組織から製品を製造する初期の過程で行われる組織の細切、iPS（様）細胞を作製するための体細胞の分離、特定体細胞の単離

及びそれらの洗浄等の方法を明らかにすること。特定体細胞の単離を行う場合には、その確認方法を設定すること。

(4) ヒト iPS（様）細胞株の樹立

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

(5) ヒト iPS（様）細胞由来の中間細胞株の樹立

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

中間細胞株の品質の均質性及び安定性を保持するため、各種細胞特性解析指標（例えば細胞純度、形態学的評価、表現型特異的マーカー、核型、細胞増殖特性、分化能など）のうちから重要細胞特性指標を同定してその基準を設定するとともに、設定された基準による品質を維持したまま増殖が可能な継代数又は分裂回数を示すこと。検討に際しては、細胞の量的制限や技術的限界もあり、可能な範囲で考慮すれば良い。

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

(6) 最終製品の構成要素となる細胞の作製

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

(7) 細胞のバンク化

ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の製造のいずれかの過程で、細胞をバンク化する場合には、その理由、セル・バンクの作製方法及びセル・バンクの特性解析、保存・維持・管理方法・更新方法その他の各作業工程や試験に関する手順等について詳細を明らかにし、妥当性を示すこと。

平成 12 年 7 月 14 日付け医薬審第 873 号厚生省医薬安全局審査管理課長

通知「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析について」等を参考とすること。ただし、より上流の過程で評価されていることに起因する正当な理由により検討事項の一部を省略することは差し支えない。

(8) 製造工程中の取り違い及びクロスコンタミネーション防止対策

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

3 最終製品の構成要素となる細胞の特性解析

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

4 最終製品の形態、包装

最終製品の形態、包装は、製品の品質を確保できるものでなければならない。

5 製品の保存及び運搬

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

6 製造方法の恒常性

ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の製造に当たっては、製造工程を通じて、個別に加工した製品の細胞数、細胞生存率並びに製品の使用目的及び適用方法等からみた特徴（表現型の適切な指標、遺伝型の適切な指標、機能

特性及び目的とする細胞の含有率等)が製品(ロット)間で本質的に損なわれないことを、あらかじめ評価しておくこと。この際、試験的検体を用いても良い。また、中間製品で評価することが、原材料としての細胞・組織の適格性や中間製品までの製造過程の妥当性をよく反映し、また、最終製品に向けての適正な道標となるなど、合理的な場合もあるので、必要に応じて選択肢とすること。

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

7 製造方法の変更

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

第3 最終製品の品質管理

1 総論

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

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

最終製品の規格及び試験方法については、対象とする細胞・組織の種類及び性質、製造方法、各製品の臨床使用目的や使用方法、安定性、利用可能な試験法等によって異なると考えられるため、取り扱う細胞・組織によってこれらの違いを十分に考慮して設定すること。また、製造工程の妥当性の検証と一定性の維持管理法、中間製品の品質管理等との相互補完関係を考慮に入れて、全体として品質管理の目的が達成されとの観点から、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

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

れないが、可能な限り、もとの成分段階での試験やプロセス評価で迷入が否定されていることが望ましい。

(9) 効能試験

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

(10) 力価試験

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

(11) 力学的適合性試験

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

第3章 ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の安定性

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

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

第4章 ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の非臨床安全性試験

製品の特性及び適用法から評価が必要と考えられる安全性関連事項について、技術的に可能であれば、科学的合理性のある範囲で、適切な動物を用いた試験又は *in vitro* での試験を実施すること。なお、非細胞成分及び製造工程由来の不純物等については、可能な限り、動物を用いた試験ではなく理化

学的分析法により評価すること。また、最終製品における未分化細胞の存在が異所性組織形成や腫瘍形成・がん化の可能性など安全性上の重要な関心事であるが、可能な限り、セル・バンクや中間製品段階等での徹底的な解析により、混在の可能性を否定するか、あるいは、目的細胞から未分化細胞の効果的分離・除去法や不活化法を開発し、活用することにより、混在の可能性を最小限にする努力が求められる。さらに、投与経路等の選択も安全性上の懸念を最小限にするための有用な方策である可能性がある。

ヒト由来の製品を実験動物等で試験して必ずしも意義ある結果が得られるとは限らない。このため、動物由来の製品モデルを作成し適切な実験動物に適用する試験系により試験を行うことで、より有用な知見が得られると考えられる場合には、むしろ、このような試験系を用いることに科学的合理性がある可能性がある。その際は、対象疾患ごとに適切なモデル動物を用いた試験の実施を考慮する（注：例えば神経疾患ならばサル等、循環器疾患ならばブタ・イヌ等が適している場合がある）。ただし、ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等を構成する細胞と同一の特徴を有する細胞集団が同一の手法にてヒト以外の動物種からも得られるとは限らず、また同様の培養条件等で同等／同質な製品が製造できるとも限らないことから、このような試験の採用、実施及び評価にあたっては、慎重な事前検討や対応が必要である。ヒト以外の動物種から得た iPS（様）細胞加工製品を用いて動物実験を行った場合、その外挿可能性を説明すること。場合によっては細胞を用いる試験系も考慮し、このようなアプローチにより試験を行なった際には、その試験系の妥当性について明らかにすること。

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

- 1 培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換を起こしていないことや目的細胞以外の細胞が異常増殖していないことを明らかにすること。
- 2 必要に応じて細胞・組織が産生する各種サイトカイン、成長因子等の生理活性物質の定量を行い、生体内へ適用したときの影響に関して考察を行うこと。
- 3 製品の適用が患者の正常な細胞又は組織に影響を与える可能性、及びその安全性について検討、考察すること。
- 4 患者への適用により、製品中の細胞や混入する未分化細胞が異所性組織を形成する可能性、及びその安全性について検討、考察すること。その際、製品の種類や特性、投与経路、対象疾患、及び試験系の妥当性等を総合的に勘案すること。

- 5 製品及び導入遺伝子の発現産物等による望ましくない免疫反応が生じる可能性、及びその安全性について検討、考察すること。
- 6 最終製品の細胞又は中間製品の細胞について、適切な動物モデル等を利用し、良性腫瘍を含む腫瘍形成及びがん化の可能性に関して検討、考察すること。その際、製品の種類や特性、投与量・投与経路、生着部位、対象疾患及び試験系の妥当性等を総合的に勘案すること。また、腫瘍形成又はがん化の可能性がある場合には、期待される有効性との関係等を勘案して、使用することの妥当性及び合理性について明らかにすること。（注：造腫瘍性試験において最も重要なのは、最終製品が患者に適用された場合の製品の造腫瘍性を可能な限りの確に評価することである。しかし、十分な細胞数が得られない等の理由により最終製品を構成する細胞を用いることができず、中間製品の細胞を用いて最終製品の造腫瘍性を評価しなければならない場合も想定される。また、動物モデルを使用した造腫瘍性試験においては、細胞の分散や足場への接着、細胞密度、投与部位等の条件が最終製品と必ずしも一致するものではない。さらに、動物の種・系統・免疫状態による感度差もある。これらの事情を総合的に勘案して、最終製品の造腫瘍性を評価する必要がある。また、最終製品の造腫瘍性に起因する患者へのリスクについては、対象疾患を治療することによる患者へのベネフィット等とのバランスを踏まえて合理的に評価すること）。
- 7 製造工程で外来遺伝子の導入が行われ、最新の知見に基づき、最終製品中で機能している場合や残存していると判断された場合には、遺伝子治療用医薬品指針に定めるところに準じて試験を行うこと。ウイルスベクターを使用した場合には増殖性ウイルスがどの程度存在するかを検査するとともに、検査方法が適切であることについても明らかにすること。
- また、導入遺伝子及びその産物の性状について調査し、安全性について明らかにすること。細胞については、増殖性の変化、良性腫瘍を含む腫瘍形成及びがん化の可能性について考察し、明らかにすること。染色体への挿入の可能性のあるベクターを用いた場合には、挿入変異による細胞の異常増殖性や造腫瘍性についての評価や臨床適応に当たっての長期フォローアップの必要性を考慮すること。
- 8 動物由来のモデル製品を含めて製品の入手が容易であり、かつ臨床上の適用に関連する有用な安全性情報が得られる可能性がある場合には、合理的に設計された一般毒性試験の実施を考慮すること。
- なお、一般毒性試験の実施に当たっては、平成元年9月11日付け薬審1第24号厚生省薬務局新医薬品課長・審査課長連名通知「医薬品の製造(輸入)承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて」の別添「医薬品毒性試験法ガイドライン」等を参照すること。

第5章 ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験

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

第6章 ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の体内動態

- 1 製品を構成する細胞・組織及び導入遺伝子の発現産物について、技術的に可能で、かつ、科学的合理性がある範囲で、実験動物での吸収及び分布等の体内動態に関する試験等により、患者等に適用された製品中の細胞・組織の生存期間、効果持続期間を推測し、目的とする効果が十分得られることを明らかにすること（注：体内動態に関する試験等には、例えば組織学的検討、AluPCR法、磁気共鳴画像診断法(MRI)、陽電子放射断層撮影法(PET)、単一光子放射断層撮影法(SPECT)、バイオイメーjingなどがある）。
- 2 ヒト iPS（様）細胞加工医薬品等の用法（投与方法）について、動物実験を通してその合理性を明らかとすること。特に、全身投与にあつては投与後の細胞の全身分布を動物実験などから外挿し、有用性の観点から議論すること（注：投与経路ごとにどこに生着するかは不明であるが、全身投与よりも局所投与が望ましいと想定される。しかし、全身投与であってもその有用性において被投与患者に有益であると合理的に説明が可能である場合には用法として設定可能である。例えば、生着を期待する臓器以外への分布を最低限に抑えることが合理的な投与方法であると想定される。また、異所性生着しても、被投与患者にとって不利益（生体機能への悪影響）が生じない場合は用法として肯定できる可能性がある。異所性分化による不利益とは、例えば当該細胞が心臓に異所性生着して骨形成する場合が想定され、それが不整脈を惹起したような場合である）。
- 3 当該細胞・組織が特定の部位（組織等）に直接適用又は到達して作用する場合には、その局在性を明らかにし、局在性が製品の有効性・安全性に及ぼす影響を考察すること。

第7章 臨床試験

ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の臨床試験を開始するに当たって支障となる品質及び安全性上の問題が存在するか否かの段階における安全性については、臨床上の有用性を勘案して評価されるものであり、ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等について予定されている国内の臨床試験計画について以下の項目を踏まえて評価すること。その際、明らかに想定される製品のリスクを現在の学問・技術を駆使して排除し、その科学的妥当性を明らかにした上で、なお残る「未知のリスク」と、重篤で生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患、身体の機能や形態を一定程度損なうことにより QOL を著しく損なう疾患などに罹患し、従来の治療法では限界があり、克服できない患者が「新たな治療機会を失うことにより被るかもしれないリスク」とのリスクの大小を勘案し、かつ、これらすべての情報を開示した上で患者の自己決定権に委ねるという視点を持つこと、すなわち、リスク・期待されるベネフィットの情報を開示した上で治験に入るかどうかの意思決定は患者が行うという視点を入れて評価することが望まれる。

1 対象疾患

2 対象とする被験者及び除外すべき被験者の考え方

3 ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等及び併用薬の適用を含めた、被験者に対して行われる治療内容（注：投与・移植した細胞の機能を維持・向上・発揮させるために併用する薬剤が想定される場合、当該薬剤の作用を *in vitro* あるいは *in vivo* で検証すること）。

4 既存の治療法との比較を踏まえた臨床試験実施の妥当性

5 現在得られている情報から想定される製品並びに患者のリスク及びベネフィットを含め、被験者への説明事項の案

なお、臨床試験は、適切な試験デザイン及びエンドポイントを設定して実施する必要があり、目的とする細胞・組織の由来、対象疾患及び適用方法等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ものではなく、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はないことが知られている⁵。なお、ヒト ES/iPS 細胞は酵素処理等により単細胞にまで分散するとアポトーシスを起こす性質をもつため、軟寒天コロニー形成試験により混在する未分化なヒト ES/iPS 細胞を検出することはできない²。

5.2.1.2. *in vivo* 試験

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

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

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

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

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

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

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

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

5.2.2. 中間製品・最終製品の形質転換細胞検出試験

5.2.2.1. *in vitro* 試験

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

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

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

これらの既存の *in vitro* 試験で設定された培養条件で製品細胞が培養できない場合であって、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に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に限定されている場合等、投与製品の腫瘍形成能において性差の影響が無視できる場合には片性で実施しても構わない。

5.3.4. 試験検体の投与部位と検体中の細胞数及び検体の形態

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

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

5.3.5. 観察期間

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

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

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

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

5.3.6. 投与部位の観察

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

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

5.3.7. 病理学的評価

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

5.3.8. 結果の解釈

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

6. ヒト体細胞／体性幹細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験

6.1. 原料・原材料の品質特性評価・品質管理のための造腫瘍性試験

ヒト体細胞／体性幹細胞加工製品を製造するための細胞基材（原料又は原材料）としてヒト体細胞又はヒト体性幹細胞のセル・バンクを樹立した際に、その品質特性評価を目的として造腫瘍性試験を行う場合には、WHO TRS 978 の Annex 3¹ を参考にすること。

6.2. 最終製品のための造腫瘍性関連試験の留意点

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

既に世界各地でヒト細胞の移植医療やヒト体細胞／体性幹細胞加工製品の臨床応用が進んでいる。しかし、これらの細胞移植や製品投与が原因となり腫瘍が形成されたことを示す症例報告は、ヒト胎児由来培養神経幹細胞を用いた毛細血管拡張性運動失調症の治療により脳に良性の腫瘍が形成されたという報告²⁷、脊髄損傷治療を目的とした自己由来嗅粘膜（細胞の加工なし）を移植した後の腫瘍形成事例²⁸、いわゆる「幹細胞ツーリズム」の一環としてクリニックで間葉系幹細胞、ES 細胞及び胎児由来神経幹細胞の髄腔内投与を受けたとされる虚血性脳卒中患者の脊髄における腫瘍形成事例²⁹ など限られたものしかない。なお、非常に稀ではあるが、ドナーにおける血液腫瘍リスクの上昇が認められないにもかかわらず、同種由来造血幹細胞移植後に患者がドナーの細胞に起因する白血病を発症すること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最終製品を非相動的に使用する場合、又は③共通のヒト由来の原料細胞から製造された製品が多くの人に投与されることにより腫瘍形成リスクが拡散するおそれがある場合には、既定の培養期間を超えた細胞の増殖特性解析等の試験に加え、免疫不全動物を用いて上記

5.3 項と同様の造腫瘍性試験の実施を検討すること。

7. 遺伝的安定性に関する一般的留意点

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

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

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

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

<参考文献>

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

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

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

表 1 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出・定量法

試験法	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験 (マトリゲルとともに NOG マウスに 皮下投与)	フローサイトメトリー	qRT-PCR
目的	造腫瘍性細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出
試験期間・分析 時間 (斜字)	17~30 週間	1 日	約 6 時間
利点	- 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	- 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	- 迅速 - 高感度 - 簡便
欠点・留意点	- 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	- 間接的 - ゲーティングが結果に影響	- 間接的 - 個々の細胞でのマーカー分子発現レベルは評価できない
検出能力又は 検出限界 (下線)	hRPE2.5 × 10 ⁵ 個中に 1,000 個 (0.4%) の割合で混在する ヒト iPS 細胞を 50% の 確率で検出	hRPE 中の 0.1% の ヒト iPS 細胞 (マーカー : TRA-1-60)	hRPE 中の 0.002% 以下の ヒト iPS 細胞 (マーカー : LIN28)
出典	Kanemura <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2013 Kawamata <i>et al.</i> , <i>J Clin Med.</i> 2015	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012

表 1 (続) 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出・定量法

試験法	Droplet Digital PCR	GlycoStem-HP 法	Essential-8/LN521 培養増幅法
目的	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出
試験期間・分析時間 (斜字)	約 6 時間	3 時間以下 (培養上清回収から測定まで)	約 1 週間
利点	- 迅速 - 簡便 - 高感度	- 細胞非破壊的 - 簡便 - 高スループット	- 直接的 - 簡便 - 残存 iPS 細胞の特性解析が可能
欠点・留意点	- 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	- 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	- 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 0.05% のヒト iPS 細胞 (マーカー : H3+ポドカリキシン)	hMSC 中の 0.01~0.001% のヒト iPS 細胞 ヒト胚葉体中の 0.1~0.01% のヒト iPS 細胞
出典	Kuroda <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2015	Tateno <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2014	Tano <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2014

表2 混在する形質転換細胞の検出・定量法

試験法	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験 (マトリゲルとともに NOG マウスに皮下投与)	軟寒天コロニー形成試験	デジタル 軟寒天コロニー形成試験	細胞増殖特性解析
目的	造腫瘍性細胞の検出	足場非依存的増殖 (悪性形質転換細胞) の検出	足場非依存的増殖 (悪性形質転換細胞) の検出	不死化細胞 (形質転換細胞) の検出
試験期間	16 週間以上	3~4 週間	3~4 週間	4 週間以上
利点	- 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	- 安価 - 悪性形質転換細胞を単離・特性解析できる	- 高感度 - 悪性形質転換細胞を単離・特性解析できる	- 安価 - 簡便 - 悪性形質転換細胞以外の不死化細胞も幅広く検出
欠点・留意点	- 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	- 造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断 - 浮遊系細胞には使えない - 悪性形質転換細胞以外の不死化細胞は検出不能	- 造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断 - 浮遊系細胞には使えない - イメージスキャナーが高価 - 悪性形質転換細胞以外の不死化細胞は検出不能	- 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、コラーゲナーゼ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-17/1cr-scid/scidJcl)、NOD-SCIDマウス (NOD/ShiJic-scidJcl) 又はNOGマウス (NOD/ShiJic-scid、

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

2.2 ラット網膜下投与

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

3. RT-PCR及び定量RT-PCR

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

4. Alu PCR

ヒト細胞特異的なAlu配列をプライマーのデザインに用いる。PCR反応 (28サイクル) に、Aluプライマー5'-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テンプレートを用いて、Alu PCR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	CCTTCCCATGTGCAGCTTACTC	
<i>POU5F1</i>	GAAACCCACACTGCAGCAGA	TCGCTTGCCCTTCTGGCG	
<i>BEST1</i>	ATCAGAGGCCAGGCTACTACAG	TCCACAGTTTTCCTCCTCCTT	
<i>CRALBP</i>	GACTGGGGTTAAATCTCACAGC	TGACATGTTGCCTATGGAA GAC	
<i>PAX6</i>	TTAACACACTTGAGCCATCACCC	AAATCTCGGATGCTGTCCACT	
<i>TYR</i>	AGCCCAGCATCATCTTCTC	GGCGTTCCATTGCATAAAGA	
<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>	CGCATGGGGTTCTGGCTTCTGTCC	CACGGTGCGGGCATCTG	CCTTCCCATGTGCAGCTTACTC
<i>POU5F1</i>	CGGACCACATCCTTCTCGAGCCCAAGC	GAAACCCACACTGCAGCAGA	TCGCTTGCCCTTCTGGCG

<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 とする。

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)

	<i>GAPDH</i>			<i>LIN28</i>								
	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')	
<i>LIN28</i>	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℃	30 分
Stage 2	95.0℃	5 分
Stage 3	94.0℃	30 秒
	64.0℃	1 分
Stage 3 を 40 サイクル繰り返す。		
Stage 4	98℃	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')	
LIN28	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℃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℃以下で凍結保存する（数回程度の凍結融解は可能）。
- ・測定対象となる試料と同じ新しい培地で希釈して標準曲線を作成する。最初は 30,000 cells/mL から 41 cells/mL まで 3 倍ずつ段階希釈して傾向を確かめ、その後に適切な細胞数から 2 倍ずつ段階希釈して検量線を作成すると良い。また、培地によってはバックグラウンドが高いものもあるため、必ず培地のみのウェルも作成する。
- ・測定毎に Strip の一つを標準曲線用とし、そこで得られる標準曲線から測定対象となる試料の未分化細胞数を算出すると良い。
- ・検体数が多く、測定毎に Strip の一つを標準曲線用に使うことが難しい場合には、標準曲線に使用するウェル数を減らすこともできる（2～4 ウェル）。ただし、直線関係が得られる細胞数を選ぶこと。

【操作】

＜準備＞

- ・使用する前に、rBC2LCN 固相化プレート、陰性コントロール、陽性コントロール、希釈液、洗浄液（10×）、発色停止液、プレートシールを室温にする（HRP 標識抗体溶液及び TMB 溶液以外の試薬）。
- ・洗浄液（10×）を室温の蒸留水で 10 倍希釈する。洗浄液（1×）は 1-Strip あたり少なくとも 40 mL 必要となる（350 μ L/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 μ L に陽性コントロール 5 μ L を添加後ボルテックスで混合して、50 μ L/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 μ L/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 μ L/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 $\mu\text{g/mL}$ に希釈した LN521 を培養用プレートに添加 (1 mL / 10 cm^2) し、37°C で 2 時間以上インキュベートする。その後 LN521 を回収し、PBS で洗浄する。Essential 8 培地で一度洗った後、Essential 8 培地を添加 (2 mL / 10 cm^2) し、細胞を播種するまで 37°C でインキュベートする。

1.2 陽性対照細胞の調製

分化細胞としてヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を用意し、Essential 8 培地中に分散させる。この中に、分化誘導に使用した元の iPS 細胞株を、シングルセルの状態にして Essential 8 培地中に分散させた後、スパイクする。(例えば、iPS 細胞の混在率が 1、0.1、0.01% の場合、 1×10^5 個の MSC 中に 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10 個の割合で iPS 細胞をそれぞれスパイクさせる。また iPS 細胞の混在率が 0.001% の場合、 6×10^5 個の hMSC 中に 6 個の割合で iPS 細胞をスパイクさせる。) 分化細胞とヒト iPS 細胞をよく混ぜた後、1.1 で準備した LN521 コーティングプレートに添加し、37°C 5%CO₂ で培養する。(hMSC が 1×10^5 の場合は 35 mm ディッシュ (又は 6 ウェルプレート)、 6×10^5 の場合は 100 mm ディッシュを使用。) 培養を始めてから 2 日後より毎日培地交換する。目視できるコロニーが形成されるまでの間は、アスピレートを使用せず、チップ又はピペットで培地を回収する。

1.3 テストサンプルの調製

ヒト iPS 細胞から分化誘導した細胞を Accutase で剥がし、Essential 8 培地中に分散させる。1.1 で準備した LN521 コーティングプレートに添加し、37°C 5%CO₂ で培養する。培地交換の方法は 1.2 と同様。

1.4 残存未分化 iPS 細胞の検出

培養開始からおおよそ 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、およその残存率を見積もることができる。

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

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

Regenerative Therapy. 2015;1:30-37.

【方法】

1. NOG マウスを用いた造腫瘍性試験

1.1 細胞培養

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

1.2 細胞移植と腫瘍形成の観察

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

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

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

1.2.4 各細胞濃度群について、腫瘍形成頻度 (腫瘍形成が確認できた匹数/移植匹数) を求め、Spearman-Kärber 法に基づいて、50%腫瘍形成細胞濃度 (TPD₅₀) を算出する。

1.3 正常細胞中の造腫瘍性細胞混在の有無の評価

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

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

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

Sci Rep. 2015;5:17892

【方法】

1. 細胞培養及び試薬類

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

2. 試験方法

2.1 軟寒天コロニー形成試験

下図に示すような培地組成で細胞の 3 次元培養を行う。

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

図. 軟寒天培養 (96 ウェルプレート 1 ウェルの断面図)

準備として、10% FBS 含有 1 × DMEM 培地と 20% FBS 含有 2 × DMEM 培地をそれぞれ 37℃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℃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℃) に移して 30 分間固化させる。

細胞/軟寒天層の調製：細胞は、0.25%トリプシン-EDTA 溶液で剥がし、10% FBS 含有 1 × DMEM 培地を用いて様々な濃度に調製しておく（例えば、1 ウェル辺り 1×10^4 個の細胞を播種する場合、 4×10^5 個/mL の濃度で懸濁液を調製しておく→ 1×10^4 個/25 μ L）。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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ g/mL Hoechst 33342、150 nM MitoTracker Red CMXRos）を 25 μ L ずつ添加し（Hoechst 33342 の最終濃度、1 μ g/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 μ L 添加した後、一緒に取り除く）、4% PFA 溶液を 125 μ L 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 μ L 添加、10 分静置、PBS の除去）を 2 回行った後、50 μ L 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。