

再生医療や再生医療製品の品質・安全性に関して

2019ライフサイエンスマテリアル研究会

2019年10月4日

山口照英
金沢工業大学
日本薬科大学



本日の話題

- 再生医療法の制定と薬機法によらない再生医療
- 再生医療等製品に関する基準や指針
- 再生医療等製品の製法確立と特性解析
 - ウイルス安全性
 - 再生医療等製品の原材料の安全性
 - 製造開発と特性解析
 - 最終製品の規格／試験法
- 安全性試験

京都Bethesdaクリニックでの死亡事故の概要

2010年5月 韓国バイオ関連会社「RNL」の協力病院として開院

2010年9月 幹細胞投与を受けた韓国人(73歳)が、**肺動脈塞栓症**で死亡

(2010年10月23日付け東亜日報)

幹細胞投与との因果関係は不明

2011年12月 中国でも2009年10月にメディカルツーリズムで幹細胞治療を受けた韓国人が死亡していたことが判明

(2011年12月6日 読売新聞)

Scientists raise awareness of unregulated stem cell treatments for respiratory diseases
Stem cell medical tourism and unproven stem cell interventions are growing and concerning issues for patients afflicted with lung disease

Stem cell tourism is becoming a global problem with more and more unregulated clinics preying on desperate patients with incurable diseases. According to an editorial authored by researchers at Boston University School of Medicine (MA, USA), there are an increasing number of clinics worldwide offering expensive stem cell-based therapies that are ineffective or have no proven benefit to patients with respiratory diseases. The article was recently published online in the Annals of the American Thoracic Society.

The prevalence of such unregulated clinics in the USA was reasonably well known. Online-advertised 'stem cell tourism' was generally considered to mainly take place in countries in South East Asia, Russia and Eastern Europe, however, a study by Berger et al and other recent studies (such as into clinics in Japan and the USA) are disproving this theory.

http://www.eurekalert.org/pub_releases/2016-08/bumc-usc081116.php,

海外からも有効性の確立していない治療が提供されているとの批判

米国で美容目的のバンパイア治療で HIVや肝炎ウイルスの感染？

- The "Vampire Facial" May Have Exposed Patients to HIV and Hepatitis B and C in a New Mexico Spa, Says the New Mexico Department of Health
- May 1, 2019): Last September, it was reported by the New Mexico Department of Health (NMDOH) that "vampire facials" at VIP Spa in Albuquerque may have exposed patients to HIV and hepatitis B and C. Now, the New Mexico Department of Health is advising anyone who's gotten a vampire facial at the spa to get tested for HIV, hepatitis B, and hepatitis C as soon as possible. In addition, the NMDOH is recommending that former clients get tested if they had any injection-related procedure performed at VIP Spa, especially if it was done in May or June 2018.



FDA Warns Genetech Over Unapproved Stem-Cell Products Linked to Infections

- Megan Brooks
December 20, 2018

- The US Food and Drug Administration (FDA) has sent a warning letter to Genetech, Inc in San Diego, California, over marketing "dangerous" unapproved stem-cell products and for "significant" deviations from current good tissue practice (CGTP) and current good manufacturing practice (CGMP) requirements.
- Some violations may have led to **microbial contamination**, potentially causing serious blood infections in some patients, the [FDA announced today](#) in a news release.

我が国のみならずFDAが全ての臨床適用を管理しているはずの米国でも、不適切な細胞治療によって感染症を引き起こすことがある。生きている細胞を本質とする製品を患者に投与するリスクがあることを念頭に！

再生医療法の制定とその目的

• 再生医療法制定の背景

- 医薬品や医療機器は国の薬事法に基づいた承認を得て、初めて患者に提供可能になる。その承認を得るために治験の実施が求められ、安全性と有効性を示す必要がある。
- 我が国では多くの薬事法に基づかない臨床研究や医療提供が国の関与なく医師と患者の合意の下に行われてきた。このような国の承認を得ていない臨床提供の実施に際しては、機関内の倫理委員会の承認をえることはあっても国の関与はなかった
- 一方で欧米では全ての臨床研究の実施に際しては国が関与しており、安全性や期待される有効性の確保が図られてきた
- 特に再生医療(細胞治療)で重篤な副作用が報告され、海外からも再生医療のような先端医療研究の実施に際して適切な国の関与が求められてきた
- このような背景の下に、再生医療研究のみならず医療の提供についても直接、あるいは間接的に国が関与する仕組みとして再生医療法が制定された

再生医療等の安全性の確保等に関する法律の概要

趣旨

再生医療等の迅速かつ安全な提供等を図るため、再生医療等を提供しようとする者が講ずべき措置を明らかにするとともに、特定細胞加工物の製造の許可等の制度等を定める。

内容

1. 再生医療等の分類

再生医療等について、人の生命及び健康に与える影響の程度に応じ、「**第1種再生医療等**」「**第2種再生医療等**」「**第3種再生医療等**」に3分類して、それぞれ必要な手続を定める。

2. 再生医療等の提供に係る手続

○ **第1種再生医療等提供計画について、特定認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出して実施**

一定期間の実施制限期間を設け、その期間内に、厚生労働大臣が厚生科学審議会の意見を聴いて安全性等について確認。**安全性等の基準に適合していないときは、計画の変更を命令。**

○ **第2種再生医療等提供計画について、特定認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出して実施。**

○ **第3種再生医療等提供計画について、認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出して実施。**

3. 適正な提供のための措置等

○ **インフォームド・コンセント、個人情報保護のための措置等について定める。**

○ **疾病等の発生は、厚生労働大臣へ報告。厚生労働大臣は、厚生科学審議会の意見を聴いて、必要な措置をとる。**

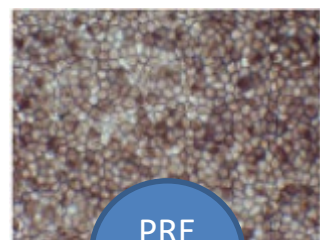
○ **安全性確保等のため必要なときは、改善命令を実施。改善命令違反の場合は再生医療等の提供を制限。保健衛生上の危害の発生拡大防止のため必要なときは、再生医療等の提供の一時停止など応急措置を命令。**

4. 特定細胞加工物の製造の許可等

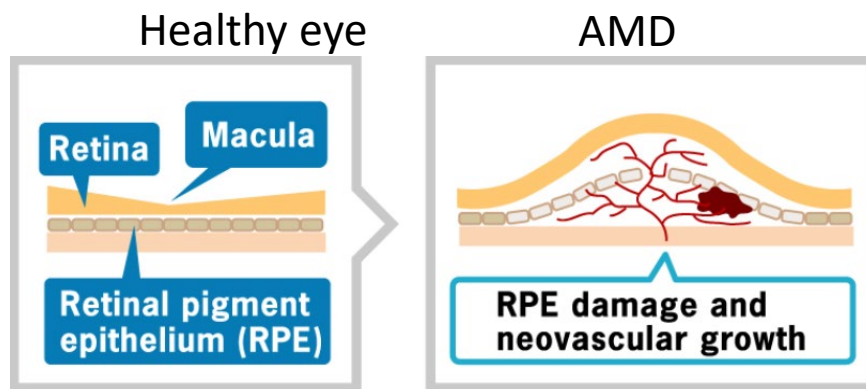
○ **特定細胞加工物の製造を許可制(医療機関等の場合には届出)とし、医療機関が特定細胞加工物の製造を委託する場合には、許可等を受けた者又は届出をした者に委託しなければならないこととする。**

iPS由来網膜色素細胞を用いた加齢黄斑変性治療研究

- 自己由来iPSを用いた加齢黄斑変性治療研究がヒト幹細胞臨床研究審査委員会にて審査
- 同種由来を用いた加齢黄斑変性治療研究の審査が再生医療等評価部会で審査された



PRE cells



From Riken Institute

臨床研究

- 自己iPS細胞RPE
- 同種iPS細胞RPE
- ↓
- 治験

First clinical research was conducted using RPE cell from autologous iPS cells.
Next clinical research will use RPE cells from allogeneic HLA-homo iPS cells.

As there was potential risk for Genome mutations during not only establishment of iPS cells but also manufacturing of RPE from iPS cell, whole genome analysis by NGS and in vivo tumorigenicity test have been conducted according to the concept paper.

iPS細胞由来再生医療等製品開発

- 京都大学:iPS細胞由来ドパミン神経前駆細胞を用いた医師主導治験を平成30年6月4日付で独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)に提出、平成30年8月1日より治験を開始
- iPS細胞:[再生医療用iPS細胞ストック](#)(再生医療用iPS細胞ストックプロジェクトでは、[HLA\(Human Leukocyte Antigen:ヒト白血球型抗原\)型](#)を、免疫拒絶反応が起きにくい組み合わせ(ホモ接合体)で持つ健康なボランティアより細胞の提供を受け、医療用のiPS細胞を作製



臍帯血

iPS作製

作製したiPS細胞のストック化



本日の話題

- 再生医療法の制定と薬機法によらない再生医療
- 再生医療等製品に関する基準や指針
- 再生医療等製品の製法確立と特性解析
 - ウイルス安全性
 - 再生医療等製品の原材料の安全性
 - 製造開発と特性解析
 - 最終製品の規格／試験法
- 安全性試験

細胞・組織加工医薬品等の製造に係る品質・安全性確保

- 「細胞・組織を利用した医療機器又は医薬品の品質及び安全性の確保について」平成21年5月18日医薬発第906号
- 「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」平成12年12月26日医薬発第1314号
- 「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日薬食発第0208003号
- 「ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針に係るQ&Aについて」平成20年3月12日事務連絡
- 「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日薬食発第0912006号
- 「ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針に係るQ&Aについて」平成20年10月3日事務連絡
- 「ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」薬食発0907第3号 平成24年9月7日
- 「ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」薬食発0907第4号 平成24年9月7日
- 「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」薬食発0907第5号 平成24年9月7日
- 「ヒトES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」薬食発0907第6号 平成24年9月7日

- 生物由来原料基準
- ヒト細胞組織加工製品原料基準
- 細胞の培養や加工に用いる試薬等

異種動物由来細胞・組織を用いる場合

- 「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
- 「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

細胞に遺伝子工学的改変を加える場合

- 「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」平成31年7月9日

次世代医療機器評価指標

- 「関節軟膏再生に関する評価指標」薬食機発1215第1号(別添1)平成22年12月15日
- 「角膜内皮細胞シートに関する評価指標」薬食機発0528第1号(別添1)平成22年5月28日
- 「重症心不全細胞治療用細胞シートに関する評価指標、角膜上皮細胞シートに関する評価指標」薬食機発0118第1号別添3及び4 平成22年1月18日

再生医療等製品の開発

製法開発とフィードバック

- 患者の前処置(例:末梢血CD34陽性細胞採取のためのG-CSF投与)
- 細胞組織の採取・加工・選別・分離
- 採取施設要件
- 細胞受入れ試験
- 培養、工程管理
- 培養打ち切り条件(培養期間)
- 製品の特性解析
- 品質規格／出荷判定

製法開発は一方方向に行くのではなく、品質特性評価のフィードバックを受けながら進める

細胞の特性解析や安全性データ等に基づいて製法の見直し

非臨床試験や臨床試験に応じて生産工程を見直す

開発に際して

- バイオ医薬品のように目的とする製品の本質が必ずしも明確でない
- 細胞の分化ステージや培養経過の中で特性が刻一刻と変化していく可能性

製法の確立

細胞の採取

自己細胞

- 血球系細胞

- リンパ球 (NKC、T細胞)
- 樹状細胞
- 骨髄CD34陽性細胞
- 骨髄単核球細胞
- 末梢血CD34⁺細胞

→ CART療法

→ がんワクチン

→ 虚血疾患

- 間葉系幹細胞 (MSC細胞)

- 骨髄由来MSC細胞
- 脂肪細胞由来MSC細胞
- 滑膜由来MSC細胞

- 軟骨細胞

→ 軟骨損傷

- 骨格筋芽細胞

- 皮膚細胞

→ 重症熱傷

- 真皮細胞

- 自己の細胞を用いる場合には侵襲性の高い採取方法であっても許容可能
- Homologous-use (軟骨細胞を拡大培養して投与)
- Non-homologous-use (MSCを神経細胞や骨細胞へ分化誘導して投与)
- iPS細胞を用いる場合; **リプログラミング**に由来する**安全性**や**費用対効果**

同種細胞

- 間葉系幹細胞

- 骨髄由来MSC細胞

→ GVHD

- 心筋幹細胞

→ 心不全

- 網膜色素細胞

→ 加齢性黄斑変性

同種細胞ソースとしては多くがiPS細胞由来。多指症や親知らずなど不要となる組織由来からの細胞リソース化も試みられている (AMED 予算)。倫理的配慮などに課題

ドナー適格性と細胞の試験

ドナーとしての適格性(同種製品)

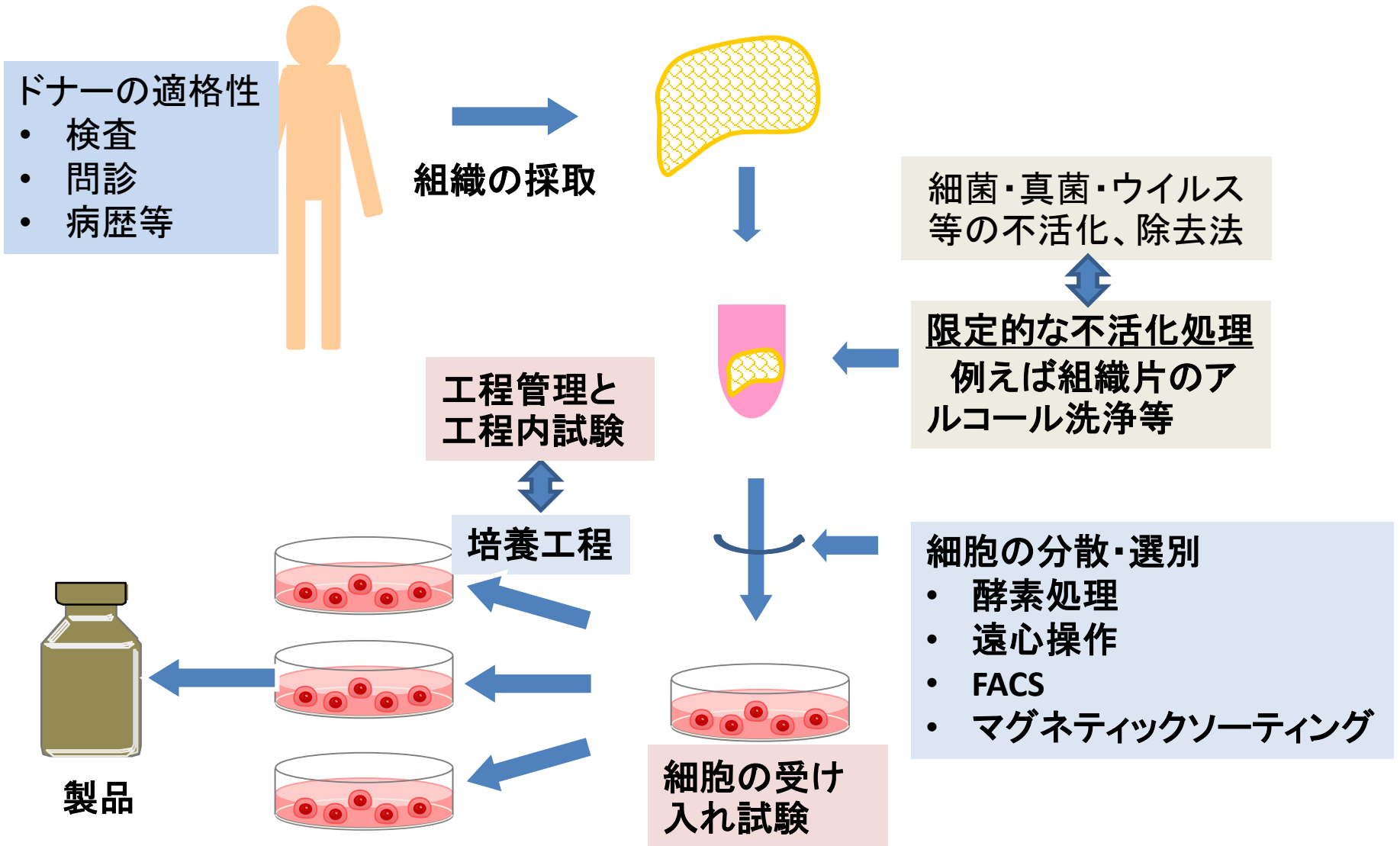
- 病歴(がんや腫瘍、神経疾患等)
- 輸血や臓器移植を受けたことのないもの(未知の感染症の排除)
- 海外滞在歴(輸入感染症やBSE)
- ウイルス検査(HIV、HCV、HBV、HTLV-1/2、パルボウイルスB19); NAT検査、血清学的検査、問診、サイトメガロウイルス感染、EBウイルス感染及びウエストナイルウイルス感染については必要に応じて検査
- 梅毒トレポネーマ、クラミジア、淋菌、結核菌等の細菌による感染症
- 重篤な代謝及び内分泌疾患
- 肝疾患
- 特定の遺伝性疾患や家族歴

同種細胞候補

血液細胞
骨髄細胞由来MSC
脂肪組織由来MSC
胎盤由来MSC
臍帯血由来細胞
多指症由来細胞

ウイルス安全性に関して**ウインドウ期によるウイルス汚染リスク**を排除するために再試験の実施を考慮すること

細胞／組織の採取と細胞組織可能製品の製造工程への受け入れ

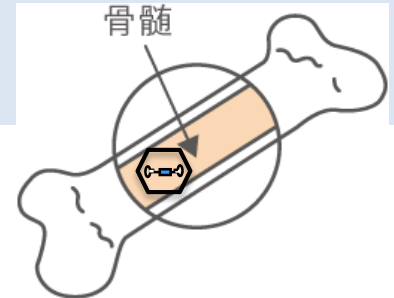


細胞の受け入れ試験

- 無菌試験
 - 試験結果が受け入れ時の後に得られるケースも
 - 必ずしも適用できない(口腔内細胞、角膜細胞)
 - 抗生物質を用いた培養
- ウイルス試験
- マイコプラズマ試験
 - 無菌試験同様に適用できない場合もある
- 表面抗原の発現試験

血清等を用いたスクリーニング
検査と異なる結果もありえる*

*: Ferri C et al: Parvovirus B19 infection of bone marrow in systemic sclerosis patients. ClinExpRheumatol. 17, 718-720, 1999 ; Lundqvista,A et al. High frequency of parvovirus B19 DNA in bone marrow samples from rheumatic patients. J. Clin. Virol. 33, 71-74, 2005



生きた細胞を用いる再生医療製品では、ウイルス等の不活性化工程を導入することが不可能であり、ウイルス試験のみではウイルス安全性を担保することには限界がある。ウイルス安全性は再生医療等製品の重要な柱

本日の話題

- 再生医療法の制定と薬機法によらない再生医療
- 再生医療等製品に関する基準や指針
- 再生医療等製品の製法確立と特性解析
 - ウイルス安全性
 - 再生医療等製品の原材料の安全性
 - 製造開発と特性解析
 - 最終製品の規格／試験法
- 安全性試験

ウイルス検査

- 自己細胞と同種細胞での試験要件の違い
 - 自己細胞の場合にはスクリーニング試験としての必要性は必須とはされていない: 但し、製造工程の汚染や製造従事者の安全性確保の観点求められる
- 献血時の試験項目
 - 問診: 患者の健康状態、過去の病歴(輸血歴等)
 - 海外渡航歴
 - 血清学的試験
 - HCV: 抗体検査
 - HBV: 抗HBe抗原検査、抗HBc抗体検査
 - HIV: 抗体検査
 - HTLV-1/2: 抗体検査
 - 核酸増幅検査(NAT検査)
 - HBV、HCV、HIV
 - 感度・精度・頑健性の設定

血清学的試験とNAT
を組み合わせたこと
が有用

ウイルス検査（自己製品）

検査対象ウイルス、検査手法を考慮する必要

- 試験項目
- HBV, HCV, HIV,
- 潜在ウイルスが存在する可能性を前提に採用した培養工程でのウイルス増幅を評価
- 適切な製品の取り扱いによる汚染の回避
- 自己製品ではあるが投与部位を考慮して試験を実施すること
 - 網膜色素細胞（加齢性黄斑変性）
 - 神経細胞（パーキンソン病）

製剤の特性に応じて合理的な試験法を適用

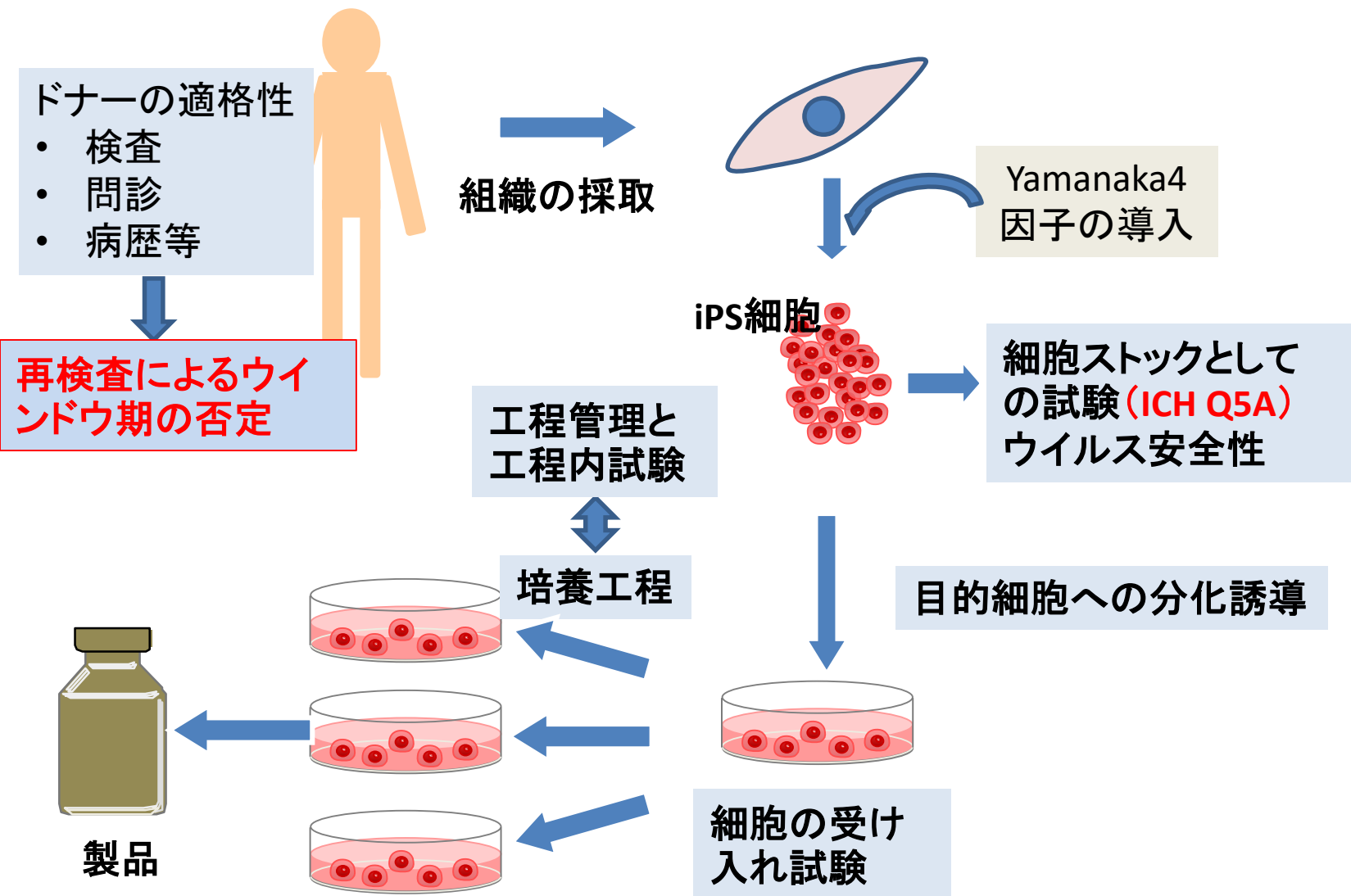
その他のウイルス検査（同種製品）

- CMV
 - 抗CMV抗体 (IgM)
 - 核酸増幅検査
- パルボウイルスB19
 - NAT
 - 抗原検査
- E型肝炎ウイルス (HEV)
 - NAT
 - 抗体検査 (IgM)
- 感度の設定

- 主として同種細胞を用いる際に考慮すべきウイルス
- 想定される全てのウイルスを検査すべきかの判断
- 対照患者の免疫状態によって検査の必要性を判断
- 検査でなく問診でドナーとしての適格性を判断
- NAT検査はジェノタイプのバリエーションが高い場合には偽陰性の可能性も考慮すること

健常人には重篤な症状を示さないにもかかわらず移植医療等の免疫抑制状態の患者では持続感染症を引き起こすリスクがある (HEV)

製法においてストックを構成する細胞 - 細胞バンクを含む



同種ヒト細胞を原材料として多数の患者に投与するためにバンクを構成する場合

ICH Q5A 細胞バンクレベルで一度は実施すべきウイルス試験

	MCB	WCB	CAL
レトロウイルス及び内在性ウイルス試験			
感染性試験	+	—	+
電子顕微鏡観察	+	—	+
逆転写酵素活性	+*1	—	+*1
その他細胞種特異ウイルス試験	適宜実施	—	適宜実施
非内在性ウイルスまたは外来性ウイルス試験			
in vitro試験	+	—*2	+
in vivo試験	+	—*2	+
抗体産生試験	+*3	—	—
その他細胞種特異ウイルス試験	適宜実施	—	—

*1:レトロウイルス感染性試験が陽性のときは不要

*2:CAL (イン・ビトロ細胞齢の上限の細胞) で試験が実施されるときは不要

*3:例えばマウス, ラット, ハムスターでの抗体産生試験, 通常, げっ歯類由来の細胞に対し適用する.

本日の話題

- 再生医療法の制定と薬機法によらない再生医療
- 再生医療等製品に関する基準や指針
- 再生医療等製品の製法確立と特性解析
 - ウイルス安全性
 - 再生医療等製品の原材料の安全性
 - 製造工程での評価
 - 製品の特性解析
 - 最終製品の規格／試験法
- 安全性試験

生物由来原料基準

• ヒト細胞組織加工製品原料基準

– ヒト細胞組織原料等を採取するに当たって、それらの利用の目的に応じ、問診、検診、検査等により、細菌、真菌、ウイルス等の感染が否定されていること

感染症による重大な副作用発症の防止

– ウイルス等の検査項目、検査手法の適切性

血液凝固因子によるHIV感染やフィブリ

– ウイルス検査でのウィンドウ期を考慮した検査の実施

– ドナーの適格性：輸血や移植医療を受けたものの排除

再生医療等製品では工程による感染医

• 細胞の培養や加工に用いる試薬等

師の除去や不活化が不可能

– 動物由来原料基準(培養細胞由来サイトカインや増殖因子)

– 反芻動物由来原料基準(ウシ血清)

– 血漿分画製剤総則(アルブミン等)

製造工程での汚染

- 原材料の細胞の汚染(口腔粘膜細胞、角膜細胞)
- 細胞採取における汚染(皮膚常在細菌)
- 細胞の加工(ブタトリプシン)
- 血清や添加剤、増殖因子(ヒトトランスフェリン)
- 作業従事者からの汚染
 - 不適切な取り扱い(無菌操作)
 - 従業員の教育の重要性

Raw Material Control

原材料 (Raw Materials) 受け入れ

- 培養添加物
 - ウシ胎児血清
 - ヒトトランスフェリン
 - ヒト繊維芽細胞増殖因子 (FGF)
 - インターロイキン: e.g. IL-2、IL-4
- 培養マトリックス
 - フィブロネクチン
 - コラーゲン
 - ゼラチン
- 細胞加工
 - ブタトリプシン
 - コラゲナーゼ
- 安定化剤
 - ヒトアルブミン (医薬品: 安全性)

ヒト血清成分
動物由来原料
反芻動物由来原料
組換えタンパク質

ウシ胎児血清

米国連邦規制基準9CFR 113.53

- BVDV、B. adenovirus type、Bovine parvovirus、Bluetongue virus、Bovine respiratory syncytial virus、Rabies virus、Reovirus type 3
- 細胞変性性病原体
- 赤血球吸着性病原体
- マイコプラズマ
- 無菌試験

USP:GC BFS

- 細胞増殖試験
- ウイルス不活性化工程
- γ 線照射(25-35Gr): 30Gr 以上では細胞の増殖促進効果が減衰
- UV照射: 十分な不活性化効果がえられるか?

ヒト血清

• 自己血清

- 採取量に限界
- 十分な効果がない場合(高齢の患者)
- 安全性は高い

• 同種血清

- 十分なウイルス検査/問診等が必要
- 原料の調達(採血基準の関係から外国製品?)
- ウイルス不活性化工程?
 - ガンマ線照射

Raw-materialのウイルス安全性

血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドラインについて (平成11年8月30日) (医薬発第1047号 医薬食品局通知)

- ヒト血漿成分より製造される、結晶分画製剤のウイルスクリアランスの評価指針
- 現行指針は主としてHCV、HIV、HBVをターゲットとしたウイルスクリアランスや原料や中間工程でのウイルス検査などの要件を記載している。また、この指針を保管するものとして血漿分画製剤の求めるべきウイルスクリアランス値が明示されている(10^9 以上のウイルスクリアランス)。ただし、汚染がどれだけあってもウイルスクリアランスが 10^9 以上あれば良いというのではなく、ウイルス検査で100IU/ml以上の感度でウイルス汚染が否定されている場合となっている。
- 一方、非エンベロープウイルスや他のウイルスのクリアランス値については明確な基準はないが、この指針を参考に適切なウイルスクリアランスが説明できれば、少なくとも血漿由来製品のウイルス安全性の考え方として参考にできる。

—血漿分画製剤のウイルス安全性に関する 欧州・WHO・日本のガイドライン比較—

	欧州 ¹⁾	WHO ²⁾	日本 ^{3), 4)}
製造工程に含めるべきウイルス不活化／除去に「有効」*な工程の数	原則として、機序の異なるものを2工程	機序の異なるものを2工程 (エンベロープウイルス)	原則として、機序の異なるものを2工程以上 (但し、「有効」の定義は無し)
	このうち少なくとも1工程は 非エンベロープウイルスに有効なもの —	このうち少なくとも1工程は 非エンベロープウイルスに有効なもの このうち少なくとも1工程は不活化工程	— —
総RF値の許容範囲	エンベロープウイルスに対して原則8以上 (「有効」*工程×2) —	エンベロープウイルスに対して8以上 (「有効」*工程×2) —	— HIV, HBV, HCV各モデルウイルスに対して9以上
	非エンベロープウイルスに対して原則4以上 (「有効」*工程×1)	非エンベロープウイルスに対して4以上 (「有効」*工程×1)	—
	原材料をはじめ、製造工程で混入し得ると見積られるウイルス量より明らかに	原材料中に最大存在し得ると見積られるウイルス量よりかなり大きいことが原則	原材料中に含まれる可能性のある全てのウイルスを念頭において評価
ウイルスバリデーション評価に際して含めるべきウイルスの種類	<ul style="list-style-type: none"> △ HIV-1 ・HBV/HSVモデルウイルス (例: PRV) ・HCVモデルウイルス (例: BVDV) ・HAV/B19モデルウイルス (例: 動物パルボウイルス) 	原材料中に存在する可能性のあるウイルス (HIV、HBV、HCV (及びHAV、B19)) に類似したもの	DNA又はRNA、エンベロープの有無、粒子径の大小を考慮し、さらに物理的処理及び化学的処理に対する抵抗性が高いものを選択。 3種類程度のモデルウイルスを組み合わせたことが原則

* RF値に関しては、4以上であること

- 1) CPMP, "NOTE FOR GUIDANCE ON PLASMA-DERIVED MEDICINAL PRODUCTS" (CPMP/BWP/269/95 rev.3, 2001.1/25) & "NOTE FOR GUIDANCE ON ASSESSING THE RISK FOR VIRUS TRANSMISSION—NEW CHAPTER 6 OF THE NOTE FOR GUIDANCE ON PLASMA-DERIVED MEDICINAL PRODUCTS (CPMP/BWP/269/95)" (CPMP/BWP/5180/03, 2004. 10 / 21)
- 2) WHO EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARIZATION (Geneva, 2001. 11 / 26~30) "Guidelines on Viral Inactivation and Removal Procedures Intended to Assure the Viral Safety of Human Blood Plasma Products" (2003. 1)
- 3) 厚生省医薬安全局長, 「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドラインについて」(医薬発第1047号, 1999.8/30)
- 4) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長, 同安全対策課長, 同監視指導・麻薬対策課長, 同血液対策課長, 「血漿分画製剤のウイルス安全対策について」(薬食審査発第1107001号・薬食安発第1107001号・薬食監発第1107001号・薬食血発第1107001号, 2003.11/7)

一米国との比較

	米 国 ¹⁾	参考) 日本ガイドライン ^{2), 3)}
製造工程に含めるべきウイルス不活化／除去に「有効」*な工程の数	機序の異なるものを2工程以上	原則として、機序の異なるものを2工程以上 (但し、「有効」の定義は無し)
	このうち少なくとも1工程は非エンベロップウイルスに有効なものこのうち少なくとも1工程は不活化工程	— —
総RF値の許容範囲	「有効」*工程×2	
	HIV、HBVモデルウイルス及びHCVモデルウイルスに対して10以上	HIV、HBV、HCV各モデルウイルスに対して9以上
	非エンベロップウイルスに対して6以上	—
	原材料中に最大存在し得ると見積もられるウイルス量の3～5 log以上であることが原則	原材料中に含まれる可能性のある全てのウイルスを念頭において評価
ウイルスバリデーション評価に際して含めるべきウイルスの種類	<ul style="list-style-type: none"> ・ HIV (技術的に可能なかぎり) ・ HBVモデルウイルス ・ HCVモデルウイルス 	DNA又はRNA、エンベロップの有無、粒子径の大小を考慮し、さらに物理的処理及び化学的処理に対する抵抗性が高いものを選択。3種類程度のモデルウイルスを組み合わせることが原則

* RF値に関しては、4以上であること

- 1) OBRR/CBER, Transmissible Spongiform Encephalopathies Advisory Committee (2002.6/26, 2003.2/20) & Blood Product Advisory Committee (2003.9/18)
- 2) 厚生省医薬安全局長, 「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドラインについて」 (医薬発第1047号, 1999.8/30)
- 3) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長, 同安全対策課長, 同監視指導・麻薬対策課長, 同血液対策課長, 「血漿分画製剤のウイルス安全対策について」 (薬食審査発第1107001号・薬食安発第1107001号・薬食監発第1107001号・薬食血発第1107001号, 2003.11/7)

生物由来原料のウイルス安全性に関して、血漿分画製剤に基づくウイルス安全性対策を取ると共に4課長通知に示されたクリアランス能の達成が一つの目安に

- マイコプラズマ試験や無菌試験について
 - 細胞の受入試験として

マイコプラズマ否定試験法の比較

試験法	特徴	長所	短所
①培養法	人工培地（液体培地、寒天培地）に検体を接種してマイコプラズマを培養し、マイコプラズマ特有のコロニーを検出する 所要日数：4週間以上 検出感度：1-10cfu/ml	・マイコプラズマの直接培養法	・判定まで非常に時間がかかる ・培養細胞を汚染するマイコプラズマは人工培地では増殖しないものもある
②指標細胞を用いたDNA染色法	指標細胞(Vero細胞)に検体を接種し、細胞に依存して増殖したマイコプラズマをDNA特異的蛍光色素で染色して細胞核外の微小なDNA蛍光斑点として検出する間接検出法 所要日数：4～7日 検出感度：10-100cfu/ml	・培養細胞を汚染するマイコプラズマは細胞に依存して増殖しやすいため、培養法で検出されないマイコプラズマも検出できる	・DNAを蛍光染色する間接検出法であり、マイコプラズマDNAを特異的に検出するわけではない ・細胞由来DNAも染色されるため、判定に熟練を要する
③PCR法	検体からDNAを抽出し、マイコプラズマ特異的プライマーにより増幅して検出する方法 所要日数：1～2日 検出感度：1-10 copy/reaction	・迅速に判定できる ・検出感度、特異性に優れている	・マイコプラズマの不活性菌、DNA断片も検出され、感染性のあるマイコプラズマを検出するとは限らない ・プライマーに依存して検出されるマイコプラズマ種が規定される ・キャリーオーバーによる偽陽性が出やすい



16局では補助的な試験法ではあったが迅速法としてもメリット

無菌試験

- 再生医療等製品:受け入れ試験としての迅速性が必要
- FDA及びUSP
 - Guidance for Industry Validation of Growth-Based Rapid Microbiological Methods for Sterility Testing of Cellular and Gene Therapy Products. FDA DRAFT GUIDANCE 2008 (2015 May 6; 2013年以前のDraftガイダンスを取り下げ)
 - USP 1223 VALIDATION OF ALTERNATIVE MICROBIOLOGICAL METHODS
- 日局
 - 国際調和試験法
 - 日局試験法は大量の製品を製造する医薬品を対象としている
 - 再生医療製品: **角膜細胞などのように少量の細胞製品**もある
 - 被検液量についてはBPやUSPに考え方も参考に
 - 結果判定ができるまでに時間を要する:迅速法での確認

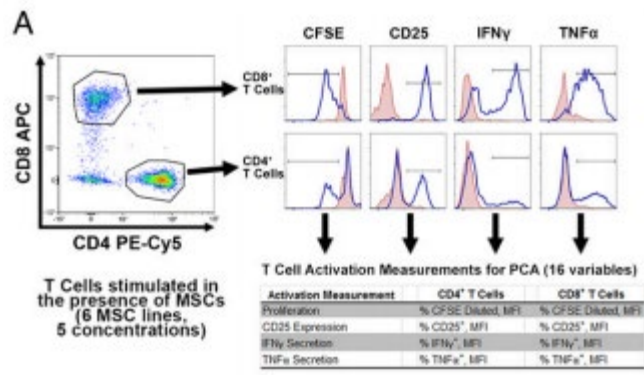
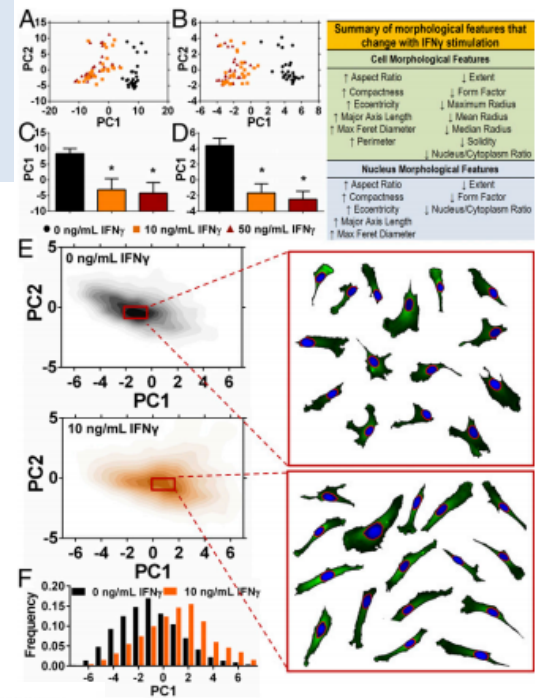
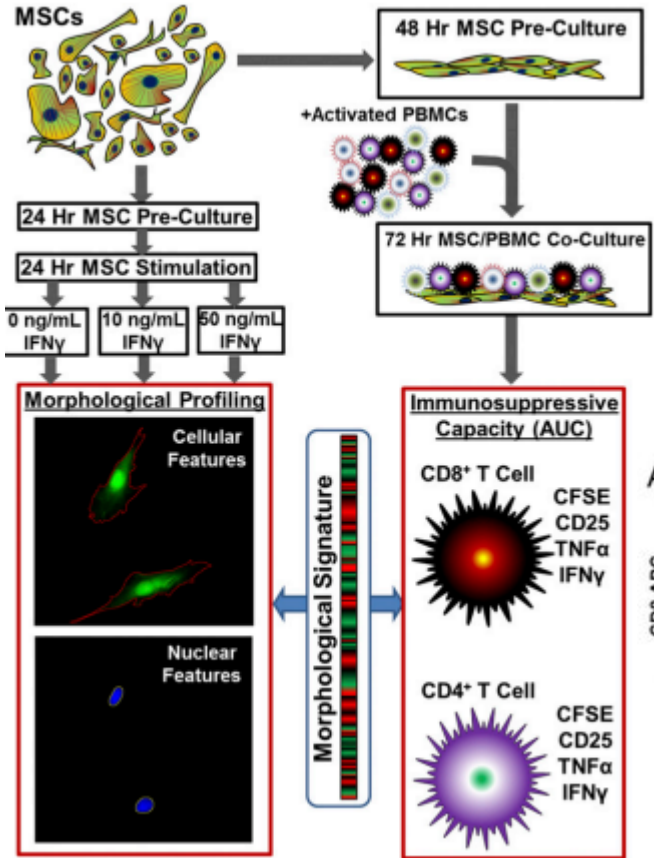
本日の話題

- 再生医療法の制定と薬機法によらない再生医療
- 再生医療等製品に関する基準や指針
- 再生医療等製品の製法確立と特性解析
 - ウイルス安全性
 - 再生医療等製品の原材料の安全性
 - 製造開発と特性解析
 - 最終製品の規格／試験法
- 安全性試験

FDA MSC Consortium

- MSCの免疫抑制機能に期待する細胞治療開発が進む⇒予測する指標の開発

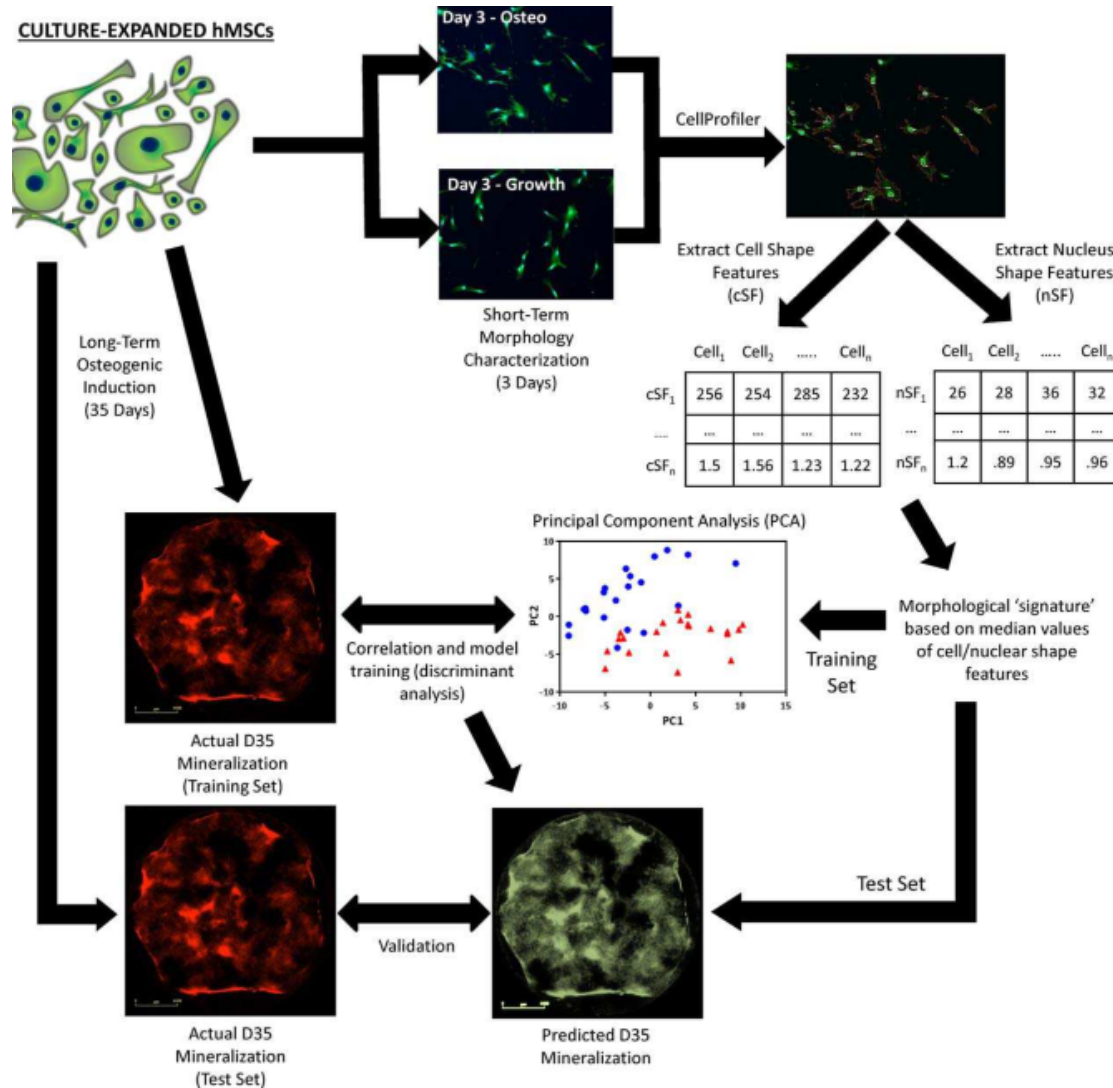
- **FDA's perspective:**
First of all, agency noted the lack of consensus in MSC field:
- Although **not an FDA requirement**, stakeholder efforts toward generating consensus on MSC definitions would be a useful development for the field, which would allow comparison across multiple studies and could facilitate potential clinical use.



経時的に細胞の形態変化をおっていきることにより、培養前の細胞の機能分化能を予測すること指標を開発。

FDA MSC Consortium

- Development of strategies to improve cell therapy product characterization



FDAはMSC Consortiumを立ち上げ開発が進むMSCの品質特性解析を進めている。その一つとして、MSCの機能分化を予測する指標を開発



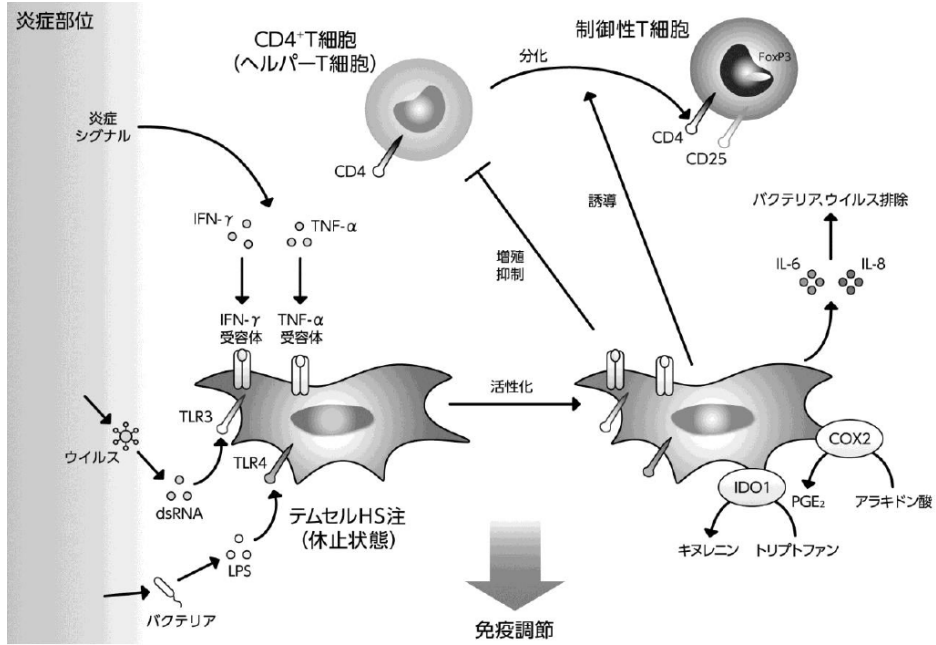
MSCを用いた再生医療の開発が進むが、培養条件、培養経緯、由来等を含めてMSCと総称できる均一な機能を持つ細胞ではない

Marklein et al (2016) Size and shape of human mesenchymal stem cells may predict future biochemical behavior potentially linked to supporting bone growth, *Stem cells*, 34:935–947

**FDA MSC Consortium MSCの特性指標:
Cell Surface Marker Characterization Proposed in MSC-Based Product INDs**

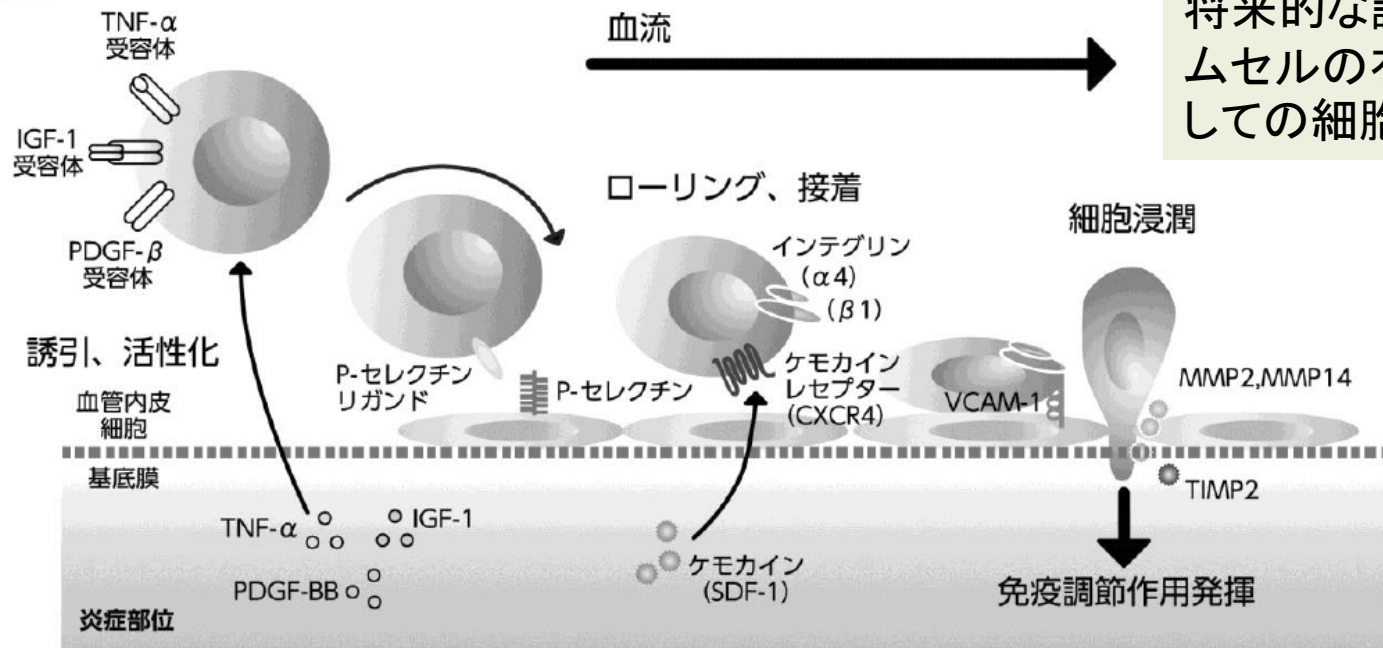
Table 1 MSC-Based Product Phenotypic Marker Expression Proposed in MSC-Based Product INDs						
Usage RANK	Common Product Marker Name	% Usage	Range Described RANK	% with Range Described	Av. Min. % \pm SD	Av. Max. % \pm SD
1	CD45	91	2	58	0 \pm 0	7 \pm 6.84
2	CD105	73	1	67	88 \pm 7.54	100 \pm 0
3	CD90	61	3	36	87 \pm 7.17	100 \pm 0
4	CD73	52	4	29	86 \pm 7.24	100 \pm 0
5	CD34	48	7	21	0 \pm 0	9 \pm 6.56
6	CD14	47	6	24	0 \pm 0	7 \pm 7.00
7	HLA Class II	44	5	27	0 \pm 0	9 \pm 7.15
8	CD44	30	—	—	—	—
9	HLA Class I	26	10	14	74 \pm 18.60	100 \pm 0
10	CD29	24	—	—	—	—
11	CD106	23	—	—	—	—
12	CD19	21	—	—	—	—
13	CD80	21	—	—	—	—
14	CD86	21	—	—	—	—
15	CD166	20	8	18	92 \pm 4.52	100 \pm 0
16	CD10	18	—	—	—	—
17	CD146	15	9	15	67 \pm 4.83	100 \pm 0
18	CD40	15	—	—	—	—
19	CD11b	14	—	—	—	—
20	CD200	12	—	—	—	—

テムセル: JCR 造血幹細胞移植後の急性移植片対宿主病 (GVHD)



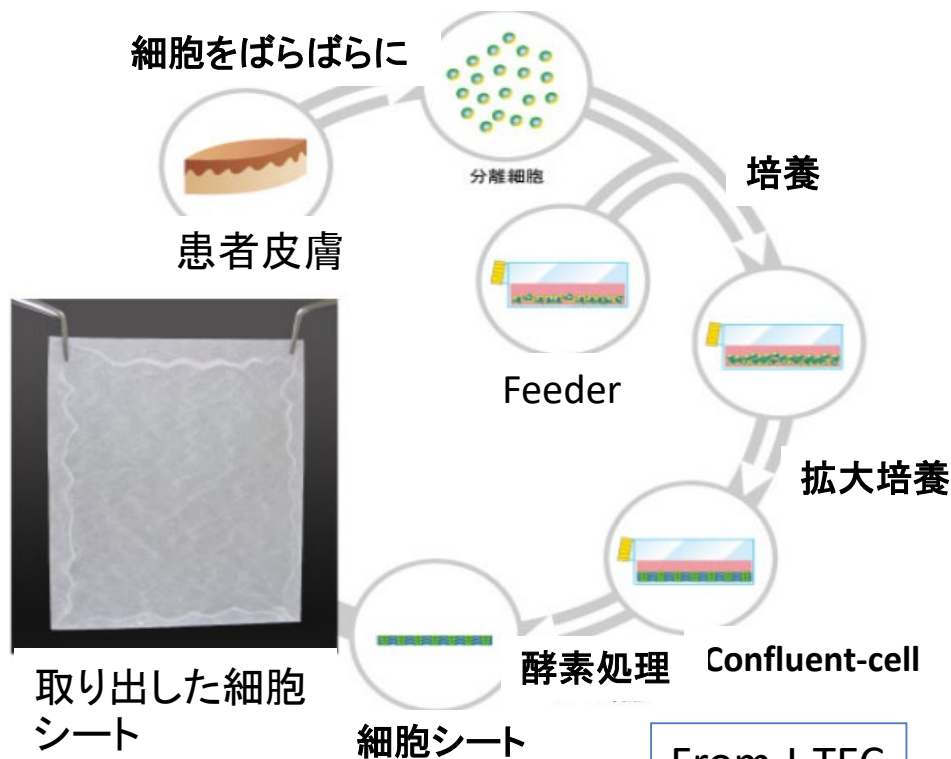
造血幹細胞移植における急性GVHDを効能とする。
 MSCが免疫抑制機能を持つことは広く知られているが、投与された全ての細胞が同じ機能を持つのかという課題
 例えば将来的に製法変更をした時に、MOAを担う細胞が製法変更前後で同等であるか。

将来的な課題としてテムセルの有効成分としての細胞特性は？



自家培養皮膚ジェイス (JACE)

- 米国グリーン教授の方法に準じて製造された自家培養表皮
- 適用疾患: 自家植皮のための患皮面積が確保できない重篤な広範囲熱傷。体表面積の30%以上の熱傷を適応対象。先天性巨大色素性母斑
- 採取皮膚組織: 最低1cm²以上
- 移植された自家培養表皮は、通常、1週間程度で生着し、3~4週で基底膜が完成、移植してから1年後には真皮と表皮の境界に緩やかな波状の表皮突起が形成されと考えられている



移植した細胞シートから幹細胞が増幅してきている可能性 ⇒ 長期の生着に寄与しているのでは



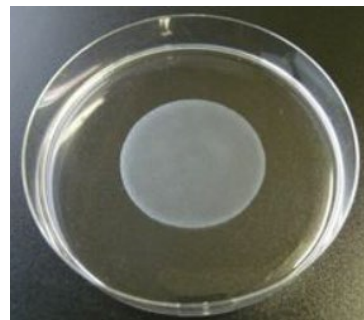
長期生着に寄与する細胞の特性解析の必要性

幹細胞が同定できれば長期生着の指標となる

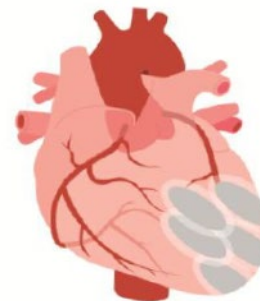
ヒト(自己)骨格筋由来 細胞シート(ハートシート)

虚血性心疾患による重症心不全患者を対象とした再生医療製品
患者自身の大腿部から骨格筋芽細胞(骨格筋のもとになる幹細胞)を採取し、試験管ないで培養増幅させる(細胞を増やす)。
できた細胞をシート状にして患者の心筋の表面に貼り付ける
貼り付けた細胞シートが心筋細胞になるわけではない(分泌された因子が心不全を回復させると考えている)

再生医療に用いる細胞は、患者自身の細胞を用いる自家細胞製品と他人の細胞を用いる他家細胞製品に分類することができる。自家細胞製品は拒絶反応がないという反面、完全オーダーメイド製品なので高コストになると予想され、また疾病を持つ患者さんからの細胞を摂取するために身体的負担が掛かる。さらに製造している間に感受の病状が進行することもある



骨格筋芽細胞シート



患者の心筋に貼り付ける

心筋のリモデリングに寄与する細胞の同定



STEM CELLS 2 GO

BY DAVID CYRANSKI

Japan has turned regenerative medicine into a regulatory free-for-all. Patients across the world could pay the price.

Tucked away in Tokyo's trendiest fashion district — two floors above a pricey French patisserie, and alongside mall salons and jewelers — the clinicians at Helene Clinic are infusing people with stem cells to treat cardiovascular disease. Smartly dressed female concierges with large bows on their collars shuttle Chinese medical tourists past an aquarium and into the clinic's examination rooms.

In a typical treatment at Helene, clinicians take skin biopsies from behind the ear and extract stem cells from the fat tissue within. Then they multiply the cells, infuse them intravenously and, they claim, let them home in on the damage — in this case, arteries stiffened by atherosclerosis.

Two posters on the wall outline promising results backed by major pharmaceutical companies and published in top scientific journals. They lend an air of legitimacy, but neither presents data on treatments offered at the clinic. When pressed for details by a visitor (who did not identify himself as a journalist), a concierge said that she could not offer evidence that Helene's services are effective at treating the condition, mainly because results vary by patient. She eventually explained that the treatment is more for prevention. "It's for anti-aging," she said.

When Nature later contacted the company with a list of questions, a representative declined to provide evidence that the treatment works or

【Natures誌】日本の条件付き承認制度への批判：条件期限付き承認でまだ有効性がしめせていないのでは？「ハートシート」、「ステラミック」

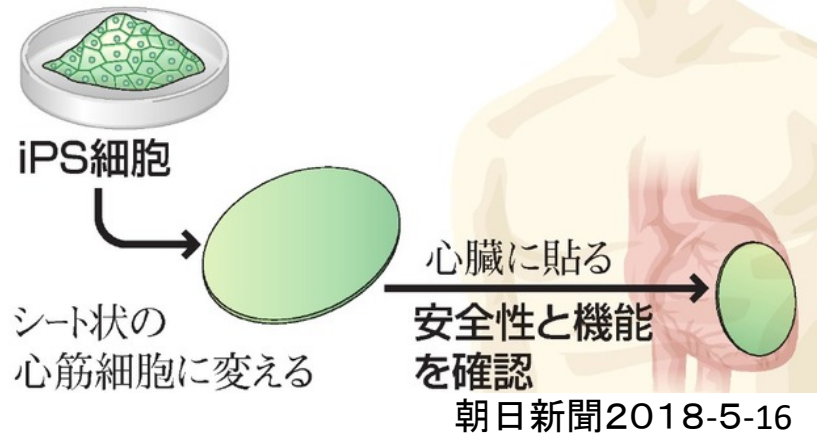
条件期限付き承認は有効性を必ずしも担保してはいない。EUの最初の遺伝子治療で承認されたGlyberaも正規の承認には至らなかった。

ただ、再生医療製品は特にどの細胞が有効性を本質か示せていないケースが多い（製品が複数の細胞種から構成されていることや細胞の特性の変化）

有効性を本質である細胞を特定すること、またそのMOAを明確にすることが重要

iPS細胞の心筋シート移植、臨床研究を国が了承

iPS細胞を使う心不全の
臨床研究のイメージ



主要評価項目は安全性、副次評価
項目で有効性
対象患者は3人

- 骨格筋芽細胞シートと異なる点：
 - iPS細胞から製造した心筋細胞シートを用いる点
- 想定されているMOA：
 - 投与したiPS由来心筋細胞はいずれ消失していくが、
産生されるサイトカイン等により心筋のリモデリン
グがおこる

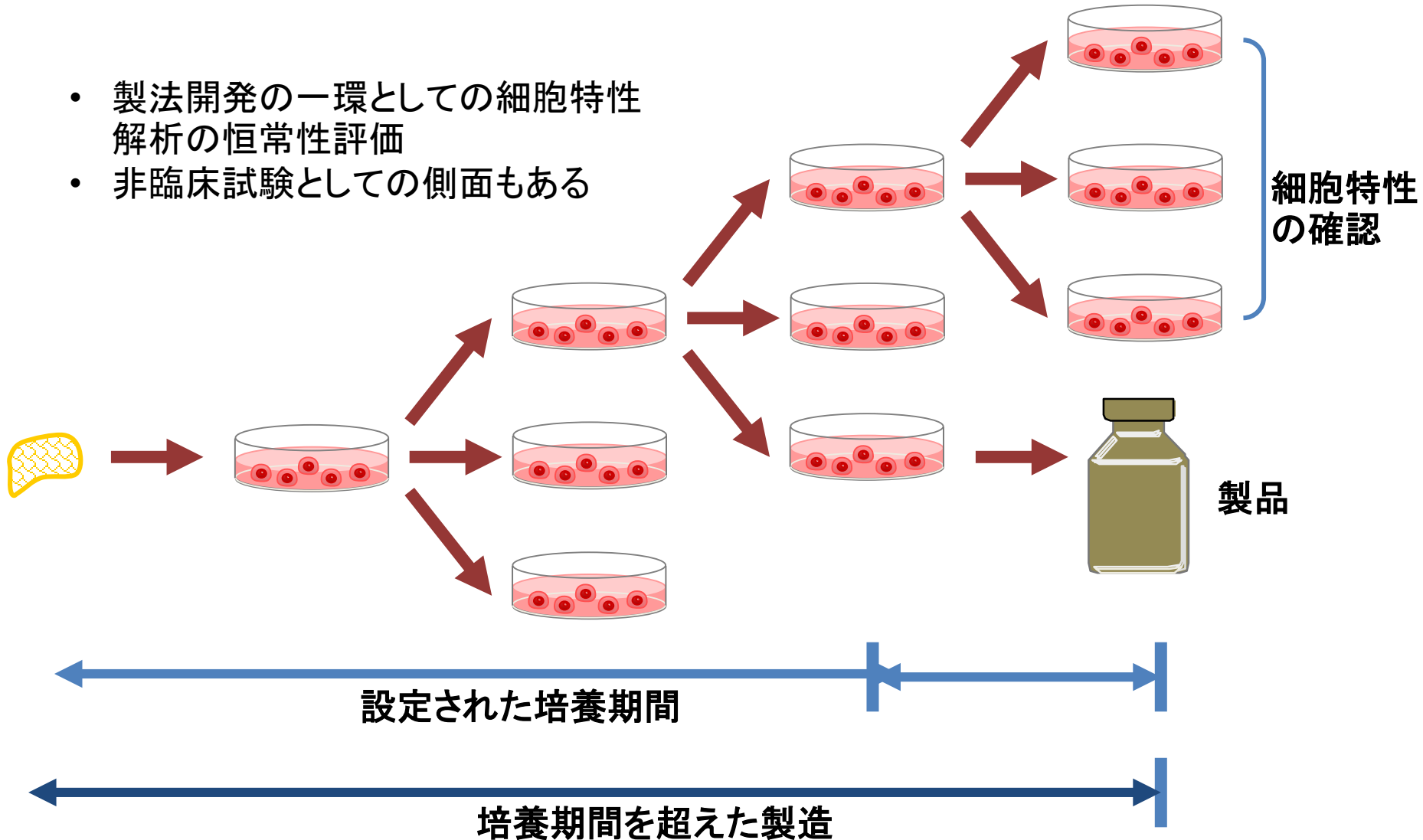
どの細胞が有効成分
なのかを明らかにす
る必要がある

将来的な課題として心筋シートを構成するどの細胞がリモデリング
などの有効に寄与するのか？

製法変更した場合にどのように旧製法との同等性を担保するか

培養期間を超えて培養した細胞の確認

- 製法開発の一環としての細胞特性解析の恒常性評価
- 非臨床試験としての側面もある



iPS細胞／ES細胞の造腫瘍性試験

- **iPS細胞やES細胞は奇形腫を形成する細胞**
 - iPSやES細胞を用いた再生医療製品を開発する際に作製されたiPS細胞やES細胞ストックでの造腫瘍性試験と機能分化をさせた最終製品での造腫瘍性試験の意味は異なる
- **樹立したiPS細胞／ES細胞ストックでの試験**
- **ゲノム変異の解析**
 - 核型(G-バンド解析)、及び全エクソンの塩基配列の異常を解析
 - 既知発がん遺伝子における異常; がんゲノム変異データベース
 - iPS細胞では誘導に用いた遺伝子の染色体への挿入の有無
 - ゲノムの不安定性 (**Cosmic census + Shibata list**)
- **iPS細胞／ES細胞由来細胞組織加工製品の試験**
 - 最終製品の試験では少量しか含まれない未分化細胞を検出できる必要性
 - 最終製品を未分化多能性幹細胞培養条件に戻して培養してiPS細胞等のコロニーが出現しないことの確認
 - 軟寒天コロニー形成試験、フォーカス形成試験、成長因子非依存性増殖アッセイ、ヌードマウスへの皮下移植(感度の十分性の評価が必要)

本日の話題

- 再生医療等製品に関する基準や指針
- 再生医療等製品の製法確立と特性解析
 - ウイルス安全性
 - 再生医療等製品の原材料の安全性
 - 製法開発と特性解析
 - 最終製品の規格／試験法
- 安全性試験

最終製品の品質管理

- (1) 細胞数並びに生存率
- (2) 確認試験
- (3) 細胞の純度試験
- (4) 細胞由来の目的外生理活性物質の試験
- (5) 製造工程由来不純物試験
- (6) 無菌試験及びマイコプラズマ否定試験
- (7) エンドトキシン試験
- (8) ウイルス試験
- (9) 効能試験
- (10) 力価試験
- (11) 力学的適合性試験

- 全ての品質管理項目の実施を求めている
- 恒常性が担保されていれば最終製品ごとの試験が不要の場合も
- 中間工程試験で品質・安全性を担保できれば最終製品での試験は不要

最終製品の品質管理

(1) 細胞数並びに生存率

- 期待される効果に必要な細胞数(力価)
- 一定の生存率がなければ有害事象を引き起こす可能性(>70%)

(2) 確認試験

- 目的とする細胞であることの確認
- 組織特異的な因子の発現
 - 軟骨製品:コンドロイチン硫酸
- 膜抗原
 - 間葉系幹細胞: CD44、CD73、CD90

(3) 細胞の純度試験

- フローサイトメーターによる膜抗原の解析
- 形態
- 目的外細胞の規格設定が必要な場合
 - iPS細胞から分化させた細胞に含まれる未分化細胞

無菌試験・マイコプラズマ否定試験

- 「無菌試験及びマイコプラズマ否定試験」は、日本薬局方に従って実施とされている。
- 多くは製品自体の量が少ないことから、局方で規定されている最小の採取量を満たすことが出来ないことも多い



- 無菌試験等は細胞ではなく培養液を対象としての試験も可能（妥当性の説明が必要）
- 日本薬局方が適応できない場合には、可能な限り日本薬局方等の公定書を参考にして試験を実施し、その妥当性を説明すること

各種迅速試験法の特徴 — 測定原理、検出限界等

代表的な検出法	技術要件	検出限界 (cfu/ml)	解析に要する時間	サンプルサイズ (ml)	長所と欠点
グラム染色	クラシカルな染色	$10^4 \sim 10^5$	30分	0.1	
バクトアラート	呼吸法(CO ₂ 測定)	1-10	ON~7日間	5-10	高価、生細菌測定
ScanRDI システム	固相サイトメトリー	1-10	2-3 時間	1-500	特殊機器
Milliflex迅速系	ATP検出法	1-10	5-7 日間	1-500	
FACS 解析	フローサオトメリー解析	10-100	6-8 時間	0.1-2	汎用機器
PCR(多数の核酸増幅法)	核酸増幅法	1-100	2-4 時間	0.2-2	迅速、高感度、儀陽性、汚染リスク
TAM V	マイクロカロリーメトリー	1-10	2-7 日間	1	特殊機器

USP 43(3) Compedial Rapid Sterility Test 改正案

これら以外に多様な無菌試験法のための機器やキットが市販されている
 培養法を組合わせ、公定書の無菌試験法の代替となる方法も提案されている
 細胞加工物は有効期間が短いために、短時間で結果が判明することが必要

第17日局: マイコプラズマ試験の改正について

2014年6月に公表*・パブコメ、2016年3月7日厚生労働省告示第64号

■主な改正点: C法(PCR法)の全面改正

C. 核酸増幅法(NAT)

■16局: 特定のプライマーを用いたPCR法の例示

⇒**NATのバリデーション法の提示(様々な手法が利用可能)**

■**C法の位置づけを改正**: 「培養法(A法)」と「指標細胞を用いたDNA蛍光染色法(B法)」による試験を実施する。ただし、**適切なバリデーションを実施することにより、C法をA法やB法の代替法として用いることができる。**

■欧米薬局方との国際調和、生物学的製剤基準との調和

■同等性試験を実施し、NATとA法又はB法の検出感度を比較

NATをA法、B法の代替法とする場合

A法を代替する場合:

7種のマイコプラズマ全てについて**10 CFU/mL**を検出可能なことを示す

B法を代替する場合:

7種のマイコプラズマ全てについて**100 CFU/mL**を検出可能なことを示す

*http://www.pmda.go.jp/public/pubcome_201406_2/file/029-1406.pdf

細胞及び測定市販キットの比較

細胞

Vero細胞(JCRB細胞バンクJCRB0111)

Mesenchymal stem cell(MSC; Lonza)

CHO-DG44細胞(Life Technologies)

マイコプラズマ測定市販製品

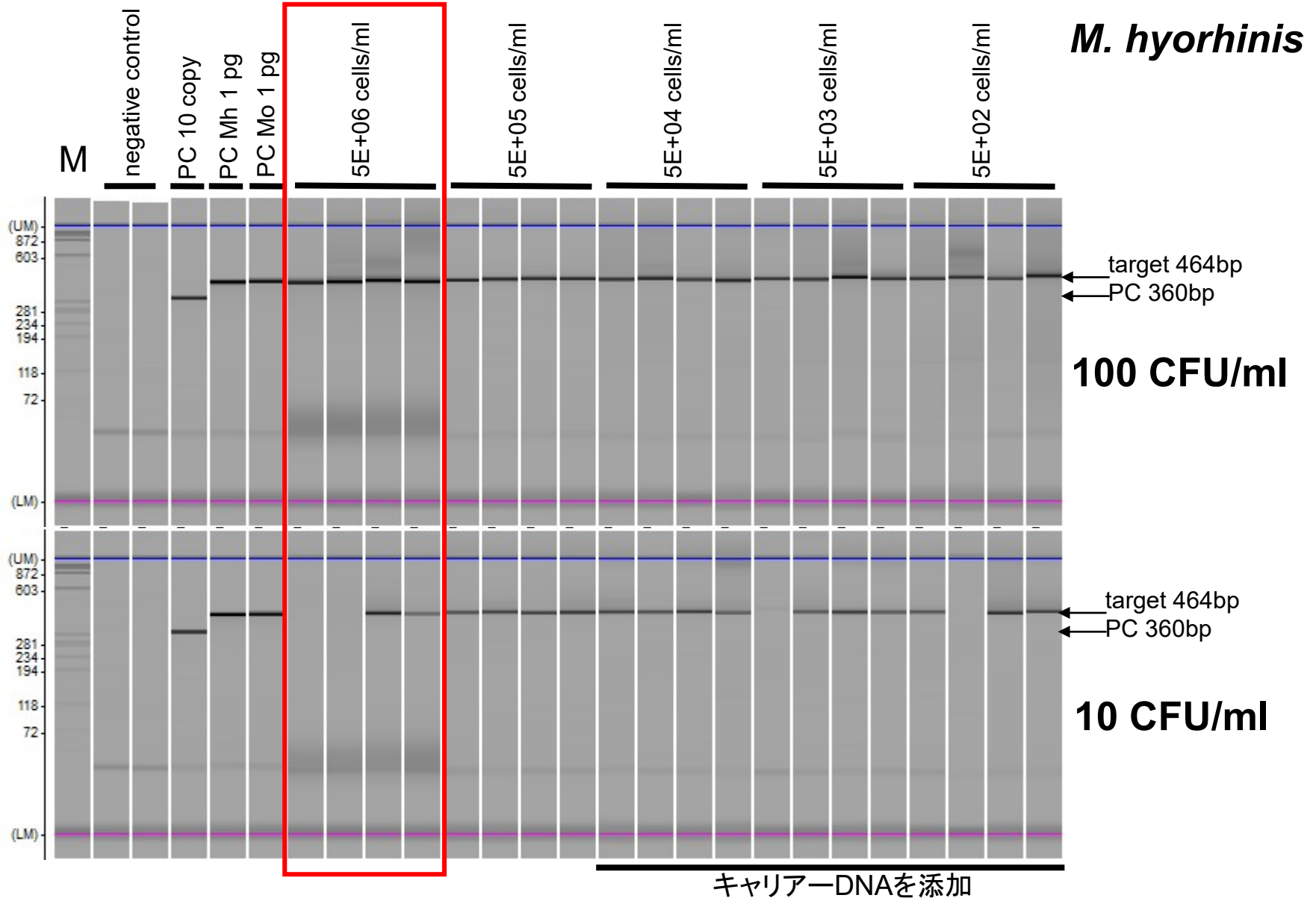
MycotoOL PCR Mycoplasma Detection Prep Kit (Roche Diagnostics)

MycotoOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit (Roche Diagnostics)

Mycoseq Mycoplasma Detection Kit (Life Technologies)

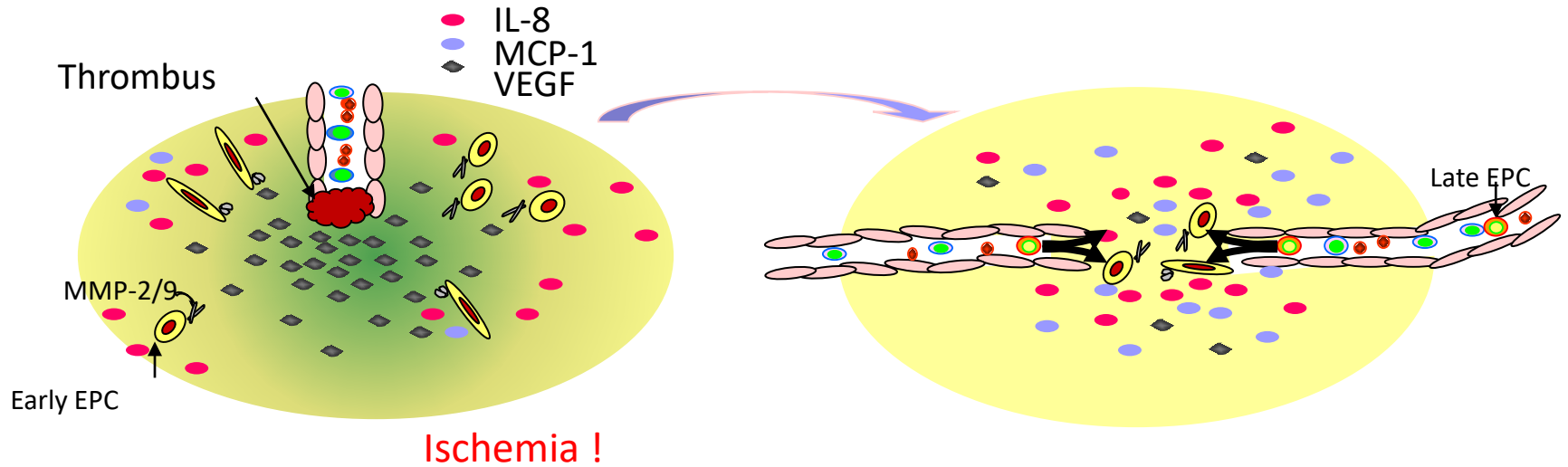
キット名		MycotoOL (PCR)	MycotoOL (real-time PCR)	Mycoseq
会社		Roche Diagnostics		Life Technologies
特化		CHO-DG44		特にない
抽出	沈殿媒体	1E+05 cells/ml以下の場合、沈殿媒体の使用が推奨(オプション)		マイコプラズマゲノムDNAを結合できる磁石ビーズ(常備)
	推奨検体量	1 ml		10 ml
	細胞濃度上限	5E+06 cells/ml		1E+06 cells 1E+06 cells以上 2E+08 cells以下の場合、細胞を取り除き上清を使用
核酸増幅	ターゲット	16S rRNA	16S rRNA	非公開
	配列	公開	非公開	非公開
	real-time PCR原理	-	probe法	インターカレーター法 SYBR Green I 51
公表検出下限		< 10 CFU/ml	< 10 CFU/ml	< 10 CFU/ml

細胞変更によるマイコプラズマ検出への影響__ヒトMSCの場合



再生医療の品質特性解析のモデルと して血管内皮前駆細胞

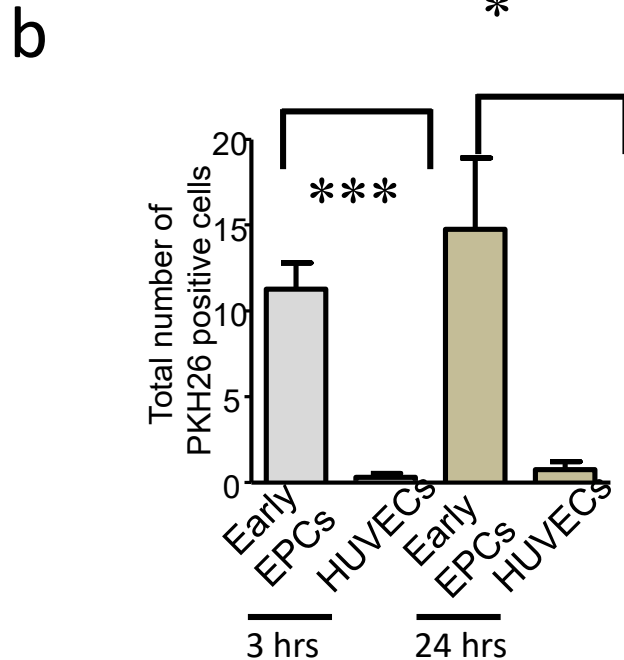
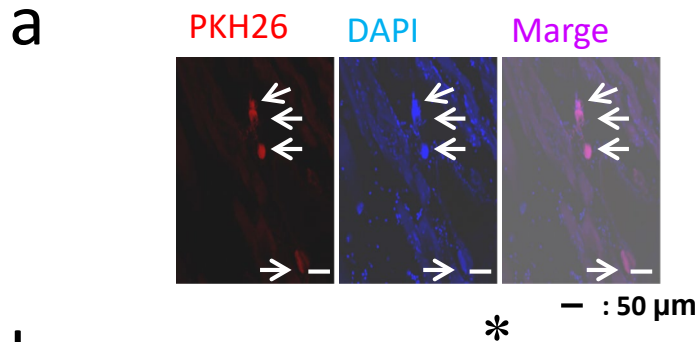
血管内皮前駆細胞を用いた血管再生医療の開発



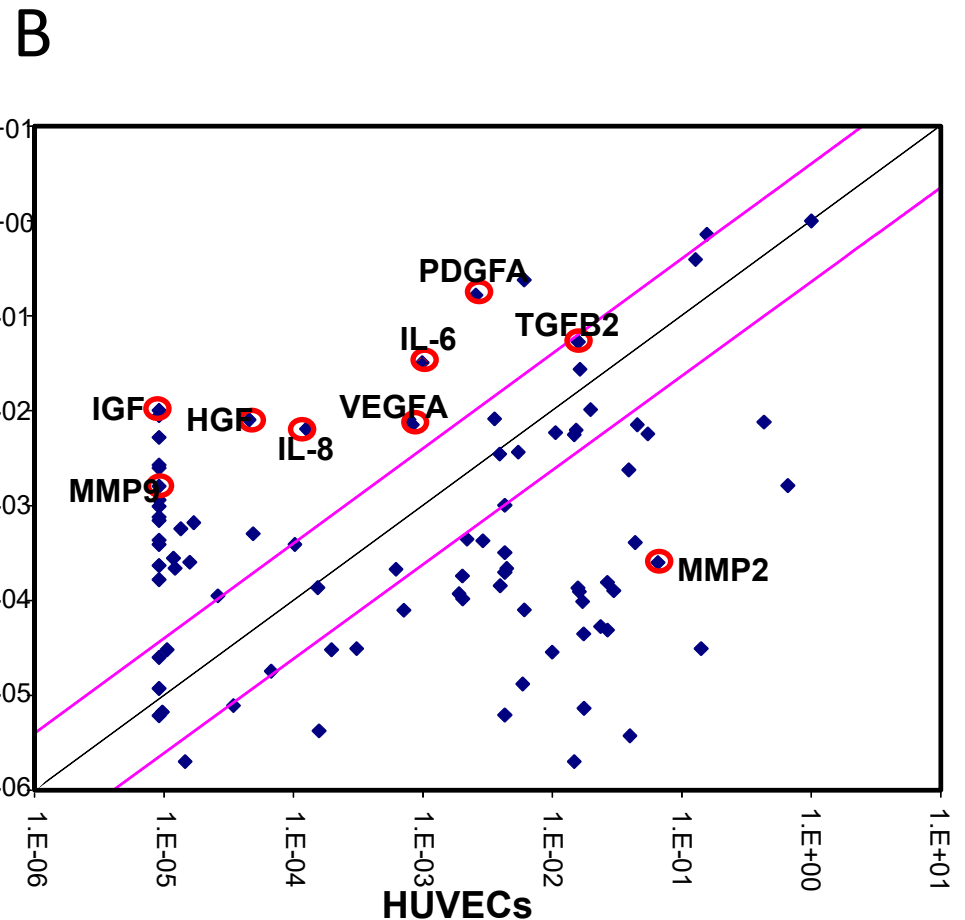
血管梗塞部位へEPCを導入することにより血管新生を促す再生医療開発を目指す。

MAC: Myeloid –ageniogenic –Cellにより血管系誘導
OEC: Outgrowth EPC (血管内皮細胞になる前駆細胞)

•eEPC血管内皮前駆細胞の特性解析



eEPCはVEGFに対して迅速に、かつ高い走化性を示す



eEPCは血管内皮細胞としての表現系のみならず特定のサイトカイン等を高産生している

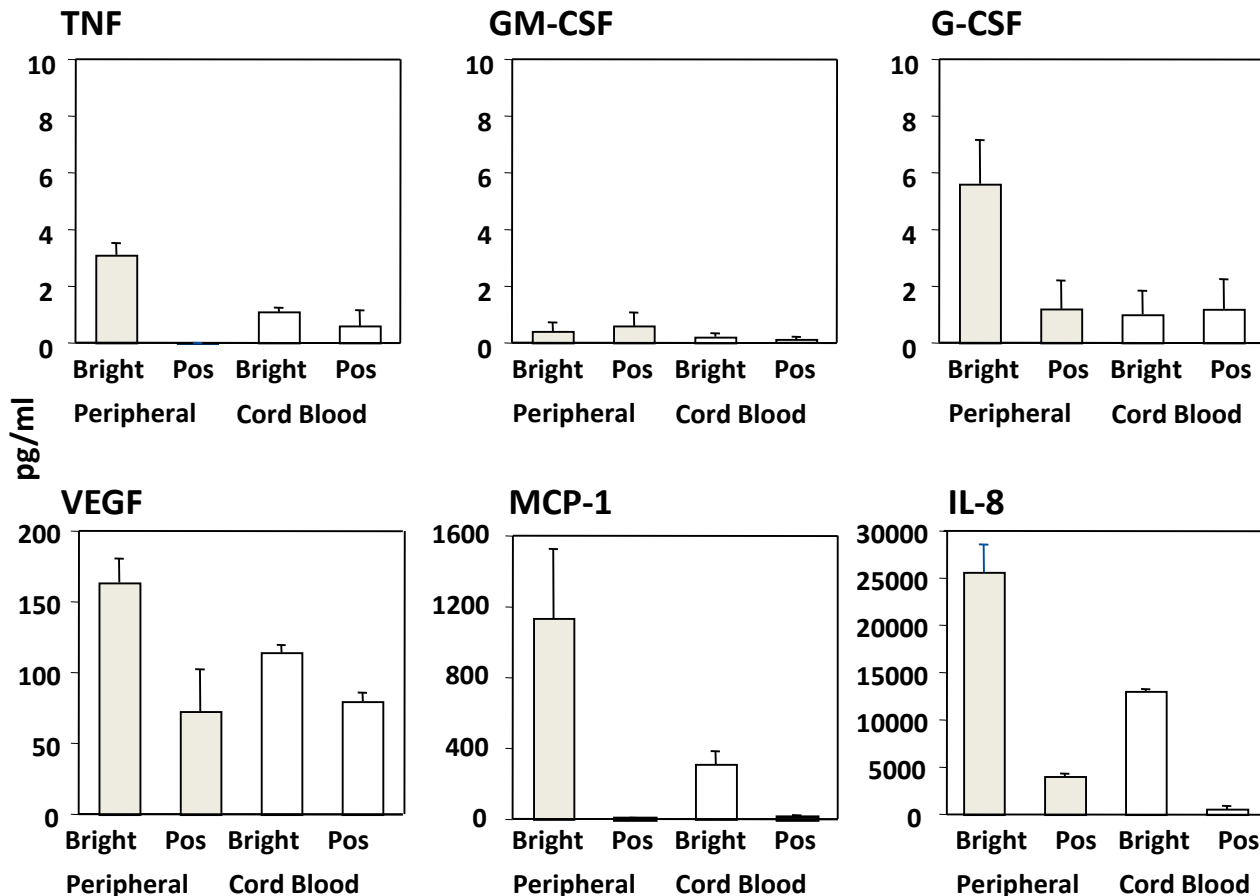
まとめ

- 再生医療等の安全性を確保することを目的として再生医療新法が制定
- 特にウイルス等の感染因子に対する安全性確保が重要であり、適切なウイルス等の検査や細胞可能に用いる原材料のウイルス安全性確保
- 生きていいる細胞という非常に不安定で刻一刻と変化する細胞を一定の品質を担保して製造するための製法管理の重要性
- 再生医療製品の有効性の本質をあきらかにすることの重要性
- 通常の医薬品と異なり、製造後の有効期間の短い再生医療等製品の出荷試験については合理的な試験設定。規格値や判定アルゴリズムの適切性
- 迅速試験法の適用による安全性確認の有用性.

ご静聴ありがとうございました
ご質問があれば

細胞特性解析: サイトカイン産生能

血管内皮前駆細胞が放出するサイトカインの解析



有効性及び安全性の面から細胞の産生する増殖因子等の評価をする必要

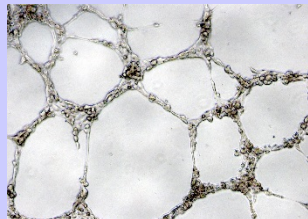
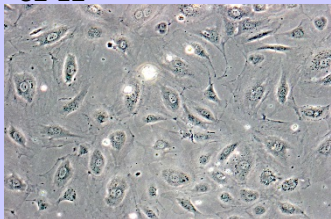
細胞の産生能は刻一刻と変化している
産生される因子が有効成分と考えられる場合には出荷規格としての設定の必要性を考慮

- EPCそのものが血管内皮細胞へ分化するのではなく、血管内皮細胞を誘導し、血管形成を促進する可能性
- 細胞が分泌するサイトカインや増殖因子の役割

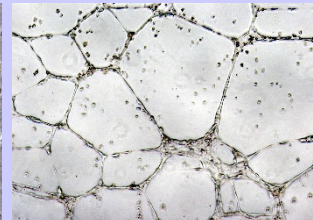
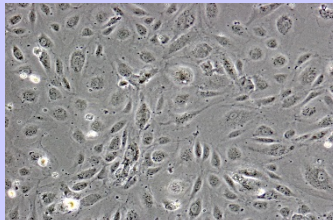
細胞特性解析：生物活性

臍帯血由来複数のlate EPCの形態と管腔形成能

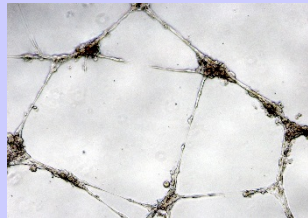
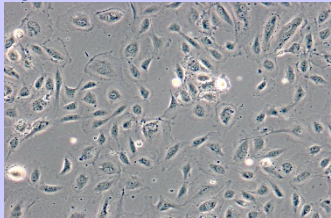
S2-12



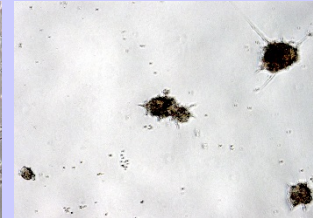
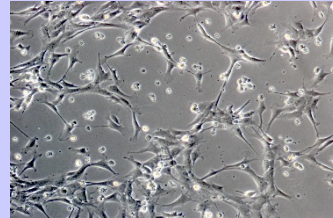
2R32



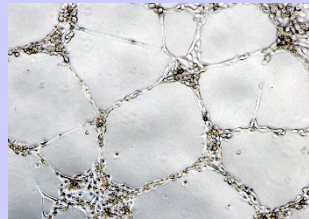
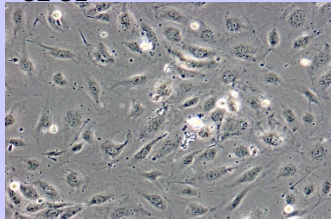
S2-22



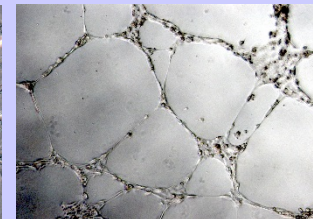
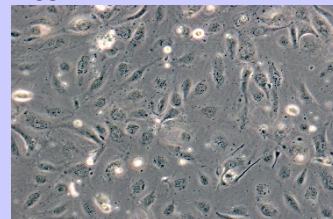
S3



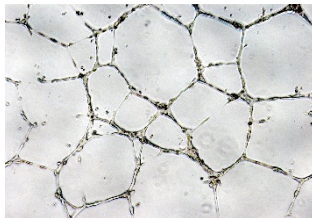
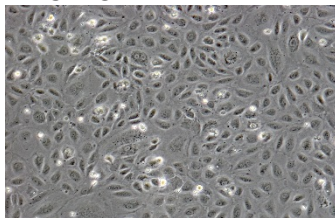
S2-31



S5



HUVEC



CTL

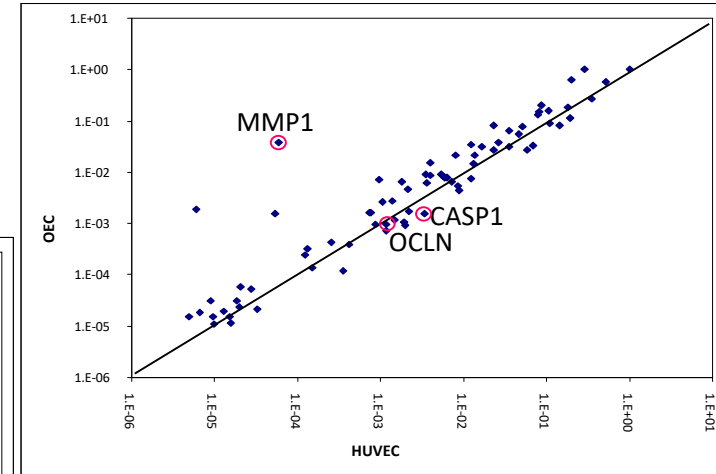
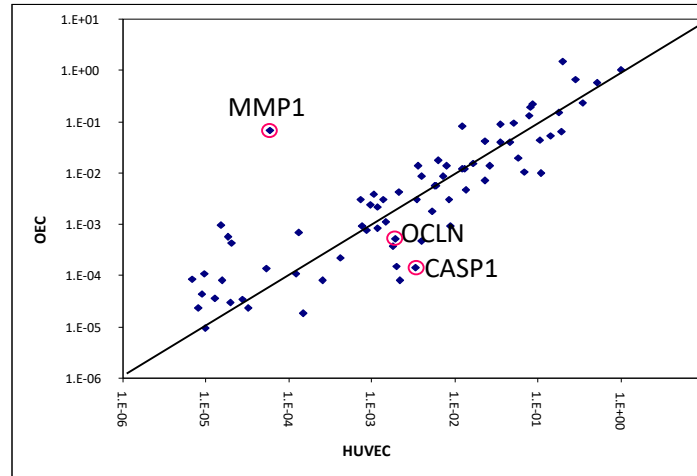
- 細胞傷害性活性
- 樹状細胞
- 抗原提示能

- 最も管腔形成の高い条件の探索
- 製法開発の重要な要素

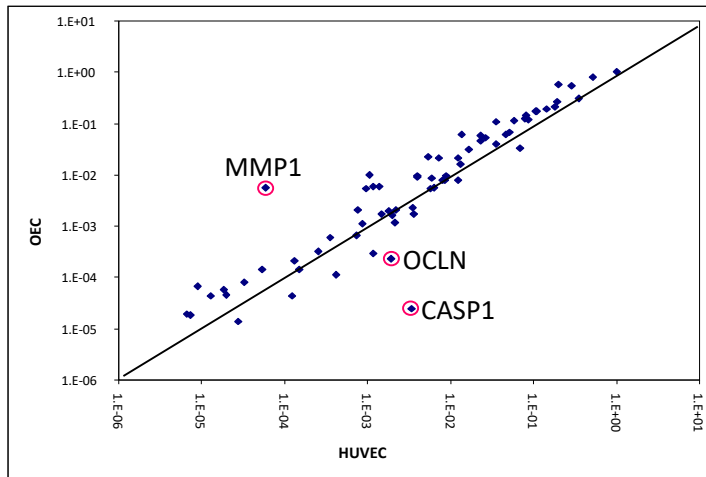
細胞特性解析：特定遺伝子発現

遺伝子発現比較結果

S222 (管腔形成能 中)



S3 (管腔形成能 低)



- 管腔形成に関わる遺伝子の探索
- 製法開発における培養条件の最適化

開発対症である細胞に求めるその機能に関連する品質特性、生物活性を、表現系をあきらかする