

れるが、少なくとも製造工程に原因するばらつきは最小限度に抑えることは必要であると考えられる。そのような観点からも製造工程の妥当性を明らかにして、可能な限り一定性を保持することは重要な方策である。以下、MCP としての留意点を示す。先述の MCPGTP と重複する箇所も少なからずあるが、製造工程に沿った流れとして考える上で重要な要素を多く含むので改めて記述する。

C-2-4-1 製造方法

ヒト細胞・組織の受け入れから細胞の単離を経て最終製品に至る製造の方法の概要を示すとともに、具体的な処理内容及び必要な工程管理、品質管理の内容を明らかにする。

(1) 受入検査

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

(2) 組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離等

原材料となる細胞・組織から製品を製造する初期の過程で行われる組織の消毒、細切、細胞の分離や単離及びそれらの洗浄等の方法を明らかにする。

(3) 最終製品の構成要素となる細胞の作製

ヒト細胞・組織の採取から細胞の単離を経て、最終製品の構成要素となる細胞

を取得するまでの方法(分化誘導方法、目的とする細胞の分離・培養の方法、培養の各段階での培地、培養条件、培養期間及び収率等)を明確にし、可能な範囲でその妥当性を明らかにする。

(4) 細胞株の樹立と使用

細胞株を樹立する際にはその方法を明確にし、可能な範囲でその妥当性を明らかにする。

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

(5) 細胞のバンク化

ヒト細胞・組織加工製品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。

(6) 製造工程中の取り違い及びクロスコンタミネーション防止対策

ヒト細胞・組織加工製品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。

C-2-4-2 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、既存の薬事法関連指針では、「例えば、目的外の細胞の混入を規定するための細胞純度をはじめとして、細胞生存率、形態学的特徴、細胞増殖特性、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質、核型、その他適切な遺伝型又は表現型の指標を解析するとともに、必要に応じて機能解析を行うこと。また、培養期間の妥当性及び細胞の安定性を評価するために、予定の培養期間を超えて培養した細胞において目的外の変化がないことを適切な細胞特性指標等を用いて示すこと。これらの検討結果から患者に製品を適用する際に選択すべき重要細胞特性指標を明らかにしておくこと。これらの検討に際しては、あらかじめ試験的検体を用いた検討によって実施・検証しておくことでも良いが、これらの検討結果から患者由来の細胞に適用する際に選択すべき重要細胞特性指標を明らかにしておくこと。検討に際しては、検体の量的制限や技術的限界もあり、可能な範囲で考慮すればよい。」と記述されている。

これはもちろん例示であってMCPではない。ここで着目すべきは、「重要細胞特性指標」ということである。最も製品のことを理解し、最終製品の臨床用途すなわち対象とする疾病や患者の状況およびその治療のためにどのような細胞製品が必要かということをもっとよく理解している研究者・開発者が、その有効性・安全性と直接にかつ密接に関係している「重要細胞特性指標」を想定し得る立場にある。本項の趣旨は、こ

の「重要細胞特性指標」を絞り込み、定めるために必要な細胞特性を幅広くとって、まず検討しようというのが本項の趣旨であると考えられる。もとより個々の製品毎のMCPを示すわけにはいかないが、あえて表現するとすれば、一般には「細胞純度、細胞生存率、形態学的特徴 プラス 個別細胞の重要細胞特性指標」がMCPであろう。

なお、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。

C-2-4-3 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。

C-2-4-4 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(C-3-6 参照)。

C-2-4-5 製造方法の恒常性

ヒト細胞加工製品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。

C-2-5 最終製品の品質管理

C-2-5-1 基本的考え方

既に述べたように、ヒト体性幹細胞加工医薬品等の品質管理全体の方策としては、最終製品の規格及び試験方法の設定、個別患者への適用ごとの原材料の品質管理、製造工程の妥当性の検証と一定性の維持管理のほか、中間製品の品質管理を適正に行うこと等が挙げられる (Fig. 1)。

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必要がある。また、製造工程の妥当性の検証と一定性の維持管理法、中間製品の品質管理等との相互補完関係を考慮に入れて、全体として品質管理の目的が達成されるとの観点から、合理的に規格及び試験方法を設定し、その根拠を示すことが肝要である。

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・整備を図る必要がある。

C-2-5-2 最終製品の品質管理法

最終製品について、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必要がある。

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必要がある。

関連指針には一般的な品質管理項目及び試験が参考として挙げられている。それらは、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に関する試験、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力学的適合性試験であるが、このうち、MCPと考えられるのは、①細胞数並びに生存率、②確認試験、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であり、その他の項目については、C-2-5-1 に示したような基本的考え方にに基づき、ケース・バイ・ケースで適宜設定することになる (Table 2)。

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とされている。

C-2-6 ヒト細胞・組織加工製品の安定性

ヒト細胞・組織加工製品や重要中間製品について、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必要がある。

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。

また、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、その妥当性について明らかにする必要がある。

なお、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。

C-2-7 製品レベルと製法レベルでの適切な組合せによる品質管理

製品レベルと製法レベルでの適切な組合せによる品質管理が概念としても、また実体としても品質面からみた MCP の中核をなすことは既述のとおりである (Fig. 1)。

C-3 非臨床安全性試験

非臨床安全性試験は、製品の種類、投与方法、対象疾患などにより評価すべき内容が異なり、また実験動物を用いてヒト由来細胞のヒトでの安全性をどこまでの確に評価できるのかという限界もあり、さらに本分野での経験や知見の蓄積にも乏しいところから技術的な観点からみた確固とした MCP

はない。必須技術要件に近い概念の MCP を無理に適用すると不合理を生ずることもある。そのために、ケース・バイ・ケースの原則で望むのが最も合理的なアプローチとされている。しかし、こうした状況の中でも、関係者が概念としても技術要件としても認識を共有して、可能な限り不合理、不都合に陥らず、合理的、効率的に開発を進める方策を講じることは重要である。

現時点で概念として関係者が共有すべき MCP としては、次の様な事項が挙げられる (Table 3)。

- 1) 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、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* 試験を実施
- 2) 適切な製品モデル/疾患モデル動物の合理的活用
- 3) 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
- 4) 安全性評価は相対的なもの。細胞の種類・特性、適用法、適用量、適用部位、対象疾患、施術者の専門性、適切な安全性対策、有効性、臨床的意義等に依る

また、より技術的な観点で関係者が共有すべき MCP あるいは留意点としては、次の様な事項が挙げられる (Table 4)

- 1) 培養期間を超えて培養した細胞が目的外の形質転換や異常増殖を起こしていないことを明らかにする
- 2) 必要に応じ、製品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生体への影響を考察

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

4) 製品の種類に応じて、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

5) 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

6) 良性腫瘍を含む腫瘍形成及びがん化の可能性

このうち、抗原性の問題、造腫瘍性の課題については後にまとめて考察する (C-11, C-12 項参照)。2) 及び 3) に関連しては、いわゆる安全性薬理試験のようなアプローチとして考えるのが適切かも知れない。なお、評価すべき製品がヒト由来のものであるので、一般に実験動物としては免疫不全動物を用いるのが適切と思われる。

C-4 非臨床有効性 (POC) 試験

非臨床有効性試験は、開発された個別の新規製品が対象とする疾病に対して期待される機能発現、作用持続性及び医療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、体内動態に関する試験等により、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、製品の用法 (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することなどを目的に

試験、評価するものであり、ケース・バイ・ケースのアプローチになることはむしろ必然とさえいえる。このような中で、あえて MCP を挙げるとすれば、次の様な事項であろう (Table 5)。

1) 技術的に可能で、科学的に合理的な範囲で、実験動物や細胞等を用いて、期待される効果や体内動態等を検討。POC を示す

2) 適切な製品モデル/疾患モデル動物の合理的活用

3) 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、治験開始段階では、必ずしも詳細な実験的検討は必要とされない

C-5 臨床試験開始にあたっての考慮事項

MCP は元来、共通の認識、技術基盤のもとでいかに効率的、効果的に臨床試験に至るかの方策である。一方、臨床試験は、適切な試験デザイン及びエンドポイントを設定して実施する必要がある、目的とする細胞・組織の由来、対象疾患及び適用方法等を踏まえて適切に計画することが重要である。その意味で、個々の製品に関する臨床試験の技術要件自体は、まさにケース・バイ・ケースで扱われるべきものである。臨床試験自体の MCP というのは中心課題ではない。

しかし、MCP もしくは上乘せ方策を考える際、あるいは製品の品質、安全性を評価する際、目指す製品の臨床試験の内容を

抜きにしては適正な対応はとれない。また、ヒト細胞を有効成分とする製品による再生医療という先端医療技術の医療上の可能性はヒトで試験してみなければ確かめられないという点と、どのようにすれば科学的合理性、倫理的妥当性、社会的理解、認知のもとで試験を開始することが出来るかという点の兼ね合いをどこに求めるかは、概念的にも技術的にも大きな課題である。この臨床試験の入り口に至るまでと開始に至る隘路を解消するための考え方の整理を試みてみたい。

C-5-1 非臨床安全性評価に必要な臨床試験計画案

ヒト細胞加工製品の治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、临床上の有用性を勘案して評価されるものである。その際、少なくとも以下の項目を踏まえながら評価することになる。

- 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 ヒト細胞加工製品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

C-5-2 臨床試験開始の決定に際してのリスク分析の留意点と倫理

臨床試験開始の決定に際しては単に製品や医療技術のリスク評価のみならず、患者のリスク評価、リスクコミュニケーションを含めたリスク分析の適正な活用と、患者の意志尊重が重要な要素となる。すなわち、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知れないリスク」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。

C-5-3 先端医療としての再生医療のリスク・ベネフィット概念

前項で「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」と述べた。これが現在の先端医療としての再生医療のリスク・ベネフィット概念としてどのように認識すべきかについて改めて考察する。前項で述べたことと重なる部分も多いが、重要なポイント何点かを次に列挙する。

- 1) 患者は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、克服できず、また時間の経過による悪化というきわめて大きなリスクを背負っている。どんな形、程度でも回避・軽減できればベネフィットである。
- 2) 製品等のリスクは対象疾患等との関係で大小が評価されるべき相対的なものであり、対応如何では軽減する。
- 3) 原材料、製法及び製品自体から明らかに想定されるリスクは現在の学問・技術を駆使して可能な限り排除することは前提であるが、科学的関心から製品のリスク自体を問うと際限がない。ケース・バイ・ケースでそれぞれの相対的リスクやリスク軽減を明確にして製品や医療技術をリスク評価すべきである。
- 4) 医療（患者）に焦点をあてた科学的合理性に基づき、患者の持つリスクと、製品や医療技術のもつ相対的なリスクを勘案した総合的なリスク評価が必要である。
- 5) 何よりも、新規療法はヒトでやってみなければわからない。
- 6) 治療しないことのリスク、すなわち「患者が新たな治療機会を失うことにより被るかも知れないリスク」と適用することのリスクの大小を勘案し、すべての情報を開示して徹底的に説明した上で、患者さんの自己決定権に委ねる視点が重要ではないか？

C-5-4 薬事法下における先端的再生医

療の臨床試験として考慮すべき視点

再生医療において最も重要な論点のひとつが、薬事法下で製品を開発していく際に、臨床治験に至るまで必要とされるデータ内容と量、治験で求められるデータ内容と量、とくに後者に関してはヒト幹細胞指針に沿って行われた臨床試験データすら使えない、あるいは資料として認められないということであった。そのため、薬事法下で取り扱うことが、先端的医療としての再生医療の発展を損ねる要因になっており、例えば再生医療法と言った先端的再生医療の特殊性、実情に則すよう特化したルールで再生医療を扱うべきという議論が度々為されてきた。しかし、法律の制定には多くの努力と時間が必要である。そこで現行制度の中でも視点を換え、薬事法の解釈運用を柔軟にすることで隘路を解消するための問題点整理と今後の方向性について考察した。

C-5-4-1 薬事法の根底となる概念としての公衆衛生上の視点

品質・有効性・安全性確保を含めて薬事法の根底となる概念は基本的には公衆衛生上の視点に基づいていると思われる。すなわち、製造販売承認後には大勢の顔の見えない患者に適用されても効能・効果的には普遍性があり、安全性面では問題を最少限度に止めることを想定した評価のあり方、考え方を採用していると思われる。例えば治験データは代表的予測例にすぎない。したがってより多くの患者に対しより確実な予測を可能にするには厳密な信頼性保証が必要である。品質規格の厳密な設定や恒常性確保が強調されるのは、治験で評価された安全性・有効性を品質として継続的に担保していくためである。

C-5-4-2 先端的再生医療においては薬事法に個別型医療の視点を取り込み解釈運用することが重要

当面の再生・細胞医療の試行例の多くは、重篤な疾患、希少疾病等が対象でかつ少数例に対して、きわめて高度な専門医が、直接患者さんに向き合い、その症状を診ながら先端的治療を施そうとするまさに個別型医療である。そして研究・治験の実施が患者さんに治療結果として直接反映する。また、製品は小規模な個別生産が多く、試料は少量できわめて貴重である。細胞の採取と移植は専門医が行う医療行為であり、製品の品質については専門医が最もすぐれた判定者であることも多い。こうした実情を鑑みると従来の公衆衛生型の概念ややり方をそのまま当てはめると合理的ではないところが少なからず生ずることになる。これに対して欧米では患者本位に立つ様々な対処法を整備している。わが国でも従来の公衆衛生上の視点からみた厳密な踏襲ではない柔軟なアプローチ、評価法、保険・補償制度を検討すべきではないか。患者の現状を少しでも救済するとの考え、新たな選択肢提供の考え、その蓄積が次の進歩・発展への足掛かりになるとの見方で支援すべきと考える。もし、従来と同じ要件充足を求めるなら、支援体制の充実が必要不可欠である。

C-6 細胞種別 MCP と上乘せ方策

原材料となる細胞種をカテゴリー別にみると、Table 6 に示したように、「自己」と「同種」、「体性幹細胞」、「iPS (様) 細胞」、「ES 細胞」がある。正確には前 2 者のいず

れかと後 2 者のいずれかの組み合わせになる。

MCP という観点から考えた場合には、典型的には GTP のようにすべての細胞種間に通底し適用されるべき MCP とカテゴリーを同じくする細胞種内での MCP がある。本研究では主に前者を対象としてきた。

後者に関しては、最近「ヒト (自己) 体性幹細胞加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針 (案)」、「ヒト (同種) 体性幹細胞加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針 (案)」、「ヒト (自己) iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針 (案)」、「ヒト (同種) iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針 (案)」、「ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針 (案)」という形で各細胞種別のフルパッケージ版が公表されている。

ここであらためてその経緯を振り返ることとする。

再生医療用製品の実用化の為に必要な要件を開発早期から示すことは、医学研究者や企業が研究・開発を合理的、効率的、効果的に進め、より迅速に実用化するために必須である。また、規制側としても、予想される製品の評価を認識を共有しながら円滑に進めるために必要である。そこで、厚生労働省は 2006 年から厚生労働科学研究班(班長:早川堯夫)による検討を行った。その結果、2008 年 2 月及び 9 月にそれぞれ自己及び細胞・組織加工医薬品等全般に関する指針「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(薬食発第 0208003 号)(以下自己親指針と称する)」及び「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(薬食発第 0912006号)(以下同種親指針と称する)」を通知として発出するに至った。

その間、特にヒト由来の多能性細胞、すなわち間葉系幹細胞などの体性幹細胞、胚性幹細胞(ES 細胞)が細胞・組織加工医薬品等の重要な素材としての研究対象となってきた。さらに山中からはヒト人工多能性幹細胞(ヒト iPS 細胞)の作製に成功し、分化した細胞を人為的にリプログラミング(初期化)できることを示した。これは細胞の分化・脱分化が人為的に自在に操作できる可能性を示唆する金字塔であり、その活用により、生命現象解明のための基礎研究、病因や発症機構解明などの医学研究、毒性・薬効評価系確立などを通じた創薬研究、さらに再生医療の実用化にも無限の可能性が拓かれた。iPS 細胞が細胞・組織を加工医薬品等の素材としてきわめて大きな脚光を浴びることになった。

こうした状況下で、わが国発の技術開発である iPS 細胞をはじめ、各種幹細胞に由来する製品の薬事法下での臨床応用に向けて、研究・開発、品質・安全性の観点からヒトに適用しても差し支えないかの評価に関わる確認(First-in-Man・治験開始の前提条件を充たしているかの評価・確認)等を効率的、効果的、合理的に行う上で、必要と思われる技術、製造方法、特性解析方法、品質管理方法及び安定性、並びに非臨床安全性及び有効性に関する留意事項及びデータに関する指針の作成が強く要望された。

これに対応するため平成 20 年度から厚生労働科学研究事業「ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する研究班(班長:早川堯夫)」が実施された。研究では、ヒト幹細胞の細胞・組織加工医薬

品等への利用に関連した学問・技術の進歩、倫理上の重要ポイント、各種規制、国際動向等を調査・研究し、適切な安全性評価基準の作成や規制のあり方を検討することにより、ヒト幹細胞由来製品の実用化の推進を図ることを目的としていた。

その結果、「自己親指針」をベースとして、ヒト(自己)体性幹細胞及びヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等に関するそれぞれの指針案(中間報告)を作成した。また、「同種親指針」をベースとして、ヒト(同種)体性幹細胞、ヒト ES 細胞、ヒト(同種)iPS(様)細胞に関するそれぞれの指針案(中間報告)を作成し、公表した(再生医療, 9(1) 116-180, 2010)。これをベースにさらに諸外国での状況、その後の当該分野の進歩、さまざまな観点からの論議を踏まえて最終案(以下本指針案と略する)を作成した。これらの案は、現在パブコメを経て、やがて正式通知として発出されようとしている。

この作成過程からも想像されるように、すべての細胞種間に通底し適用されるべき技術要件については可能な限り、整合性を持たせている。一方、カテゴリーを同じくする細胞種内と特殊性はそれぞれ固有の指針として示している。

これらを参考にしつつ、一方では、細胞種に拘わらず通底する MCP 及び各細胞種別 MCP を作成していくのが最も合理的である。当然各細胞種別で特色のあるところはケース・バイ・ケース、上乘せ分での MCP となると考えられる。基本は Table 6 に示したような各細胞種別の特性に基づき考慮されていくことになると考えられる。

この中で、自己体性幹細胞製品や同種体性幹細胞製品の MCP については、基盤的なこととしてすでに本研究に網羅されてい

る。

ES 細胞/iPS 細胞等についても基本的な技術要件は明らかにされている。しかし、細部にわたっては、さらに理解、解釈を深めるべき点あるいは臨床研究や臨床応用をめぐるいくつかの論点が残されている。そこで今後への展開も含め、本研究で論考を進めることとした。

C-6-1 既存の細胞株の取扱について

ヒト ES 細胞の臨床応用は欧米において開始されたばかりであり、安全性に関する知見の集積には今後多くの時間を要する。このような状況の中で、様々な研究に使用されその性質が多面的に分析されている既存の細胞株の使用は、治療の安全性を確保する上で重要な手段である。

日本国内でこれまでに樹立された細胞株の使用に関しては以下の様な観点からの問題がありうる。

・インフォームド・コンセントに関わる問題

- ・文科省指針上の問題点
- ・匿名化の方法

臨床利用についてインフォームドコンセントにがあるかどうかは、その取得時に臨床利用の可能性について説明文書に記載があるかどうかによる。このような説明は通常、作成された細胞株の使用目的・形態として行われている。同意書上では、一般的には「提供した組織・細胞の使用の目的・方法について同意」の形で行われると考えられ、独立して人への使用について項目をもうける必要は必ずしもないと考えられる。

文科省指針への適合性は、計画書や説明文書に将来的な臨床利用の可能性に言及されているかどうかで判断される。上記の様に説明文書などに臨床利用されることが記載されている場合には、その研究計画が大臣確認のうえ実施されていることから、樹立された細胞株が臨床目的に使用されることが、指針に適合していると判断されていることになり、臨床利用については問題無いことになる。

匿名化に関しては、臨床研究に用いられる試料については連結可能匿名化が原則とされているが、ES 細胞の場合は真の提供者が存在しないという特性から、連結情報の不在が被験者へのリスクとなる可能性は著しく低く、また臨床利用の過程で得られた遺伝子異常などの情報や、発生した問題を提供者にフィードバックする必然性も低い。連結情報が必要とされる局面は ES 細胞の臨床利用においてはほとんど考えられない。連結可能匿名化とする場合においては提供者への十分なリスクの説明など適切な対応がとられる必要がある。

C-6-1-2 ES 細胞株の樹立と培養に関する問題

C-6-1-2-1 培養に関わる問題

ES/iPS 細胞の臨床利用においてはその増殖過程で生じうるゲノム・エピゲノム変化がどのような影響を及ぼすかを考慮する必要がある。細胞が分裂・増殖する過程でゲノムに何らかの変化が生じることは不可避であり、それ自体は人の体内でも起こる自然な現象である。実際大半の変化は中立的であり細胞の機能や生存・増殖には影響を及ぼすことはないと考えられるが、きわ

めてまれに発がんなどに至ることがあるのも事実である。よって、培養過程で起こるゲノム・エピゲノム変異のモニタリングとその評価をいかに行うかは重要な問題である。

この問題への一つのアプローチとして、ISCI による国際共同研究として多数のヒト ES 細胞株について培養初期と長期継代後の細胞のゲノム解析が行われ、我々の ES 細胞についてのデータを含めその結果が論文発表された(Nature Biotechnology 2011 Nov 27;29(12):1132-1144)。その結果、核型のような巨視的なレベルにおいても高頻度に変異が認められる染色体や染色体領域が明らかにされた。この中には従来から知られている 12 番、17 番染色体のトリソミーも含まれていた。このほか 1 番、2 番染色体においても増幅が見られるなど、全体的には遺伝子増幅が主な変異であることが明らかにされている (Fig.2)。

また 20 番染色体のごく微少な領域の増幅も検出され、関与する遺伝子についても推定されている。これらの変異は、未分化細胞の増殖や生存に何らかのアドバンテージがある細胞が培養過程で濃縮されていたものと考えられている。その意味では、癌化などが懸念される変異である可能性も考えられるが、一方で分化誘導後の移植に用いられる細胞の安全性に及ぼす影響に関しては情報は得られない。

エピゲノム変異に関してはこれまでのところこのような大規模な比較研究は行われておらず、どのような傾向が見られるかは明らかでない。

現時点でこれらの情報は参照可能であることが好ましいが、有意な情報として利

用可能でない状況を考えると、品質検査項目として挙げることは適切でない。

12 番染色体トリソミーと X 染色体の重複が認められる。これらは比較的高頻度で観察される変異である。このほか 17 番染色体のトリソミーも観察されることの多い変異である。染色体変異のようなゲノム異常は細胞にとって最適化されていない培養条件で維持された場合により高頻度で観察される傾向があるようである。しかしながらこれらの変化が分化細胞にどのような影響があるか明らかでない。

C-6-1-2-2 品質管理について

ES 細胞の品質管理に関しては大きく 2 つの側面に分けて行われる。第一に ES 細胞としての特性であり、第二に安全性に関わる検査である。例えば細胞増殖速度のように両者に関連しうる検査項目もあると思われるが、大半はいずれかに分類されると考えて良い。

C-6-1-2-2-1 ES 細胞としての特性

I 形態

ES 細胞として正常な形態を維持していることを熟練者の目視による判定などによる。

II 遺伝子発現

NANOG, OCT4, SOX2, 等の未分化特異的遺伝子および AFP, PAX6, MIXL1, CDX2 など lineage 特異的遺伝子発現を RT-PCR によりマスターバンク細胞と比較などが考えられる。

III 表面抗原

SSEA-3, SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81, GCTM-2, CD30 などから適当なものを選

択し、FACS 解析により陽性%で評価する。

細胞分化の指標としてSSEA-1などが使用可能である。

陽性/陰性%で評価されるが、数値をあらかじめ決めることは難しい。

そのほかアルカリ性フォスファターゼ活性の染色もよいマーカーであるが数値化が困難。

IV 倍加時間

セルサイクル測定や細胞カウントによる増殖速度の測定を行い、マスターバンク細胞と比較。

V 分化能

EB, teratoma 作成により三胚葉性の分化能を持つことをRT-PCRや組織学的解析により示す。分化能についてはその必要性があるかどうかは疑問なところも多いが、株毎に少なくとも一回は評価されていることが望ましい。

VI 核型・ゲノム

Gバンドによる核型解析とマイクロアレイを用いたゲノムワイドのコピーナンバー解析が推奨されるが、特にコピーナンバー解析については解析結果とそれが及ぼす影響に関して関連づけが不十分である。従って、適切な時点でのデータは参照可能とされるべきであるが、これをもって品質管理を行うことは難しい。

C-6-1-2-2-2 安全性に関わる検査

I. 感染性因子

培養過程で混入しうる細菌やマイコプラズマに関しては適切な方法で否定試験が行われる必要がある。ドナー由来のヒトウイルスなどについてはドナースクリーニングによる否定が主体となるが、情報が得ら

れないものについては培養過程の適当な時期に否定試験が行われればよいと考えられる。細菌性の感染症やガンなどの疾患に関わるドナー情報がES細胞の臨床利用上問題になる可能性はきわめて低く、不必要に多くの情報を要求するべきでない。

II. 移植組織の安全性

内在性のウイルスが細胞分化により活性化されることはあり得るが基本的にES細胞の段階で行われる否定試験で十分である。

移植組織の造腫瘍性については留意が必要である。

C-6-1-3 考察

ES/iPS細胞のいずれの場合にも、比較的長期間にわたる培養増殖が想定されるため、培養期間を通じて感染性物質の混入などを排除するシステムの構築が必要であるが、過去に作製されたなど感染可能性のある環境で培養された細胞株の利用も否定されるべきではない。

過去の培養履歴などに応じて必要とされる検査項目をウシ(FBSなどについて記録がないような場合)、ブタ(トリプシンなど)、齧歯類(フィーダー細胞など)などについて個々に必要とされる感染性因子の項目・試験方法についての基準を策定することが望まれる。

また現に使用されている培養などで用いられる試薬等に対する管理基準と、履歴としてはあるが、培養・維持過程において希釈消滅が期待される因子については別途考慮する必要があることにも留意されるべきである。

C-6-1-4 小括

ES/iPS細胞の臨床利用がもう遠い将来の話では無くなっている以上、一定の科学的合理性をもって安全性の評価基準を具体的に設定することが必要となっている。

C-6-2 細胞治療に用いる最終産物の作成に必要なヒトES細胞を確保するために最小限必要な要件

2010年10月、ヒトES細胞を用いた第1相臨床試験が急性脊髄損傷に対して始まってから1年が経過した。米国Geron社を中心としたグループが、ヒトES細胞H1細胞株を原材料としたオリゴデンドロサイト前駆細胞株(GRNOPC1)を対象に亜急性期の胸部脊髄損傷患者の病辺部に移植する試験であった。Geron社臨床試験は計4症例に対して行われ、安全性に関して有害事象は報告されていない。さらに、米国Advanced Cell Technology (ACT)社は、ヒトES細胞由来網膜色素上皮(RPE)細胞を若年性遺伝性黄斑ジストロフィー症(シュタルガルト病)と萎縮型加齢黄斑変性症の2疾患に対して第1/2相臨床試験が開始され、シュタルガルト病に対して4例(米国3例と英国1例)と萎縮型加齢黄斑変性症に対して1例(米国)の5症例が実施されている。2012年1月には、ACT社臨床試験のプレリミナリーレポートとして安全性とともに治療の有効性もあったとの報告がなされた

(Lancet, 2012;参考1)。このLancet誌上での報告では、ACT社臨床試験で使用された細胞(ヒトES細胞株、フィーダー(MEF)細胞と分化(網膜色素上皮)細胞)の品質・安全性に関する試験項目が記されている。

ヒトES細胞の樹立から最終製品にいたる過程では、そのもととなる未分化なES細胞の安定した供給と最終製品を獲得するまでの工程をよりミニマムな工程とするために細胞バンクを構築することは妥当である。国立成育医療研究センターでは、現在まで4つのヒトES細胞株樹立を報告し、動物由来成分を除去した完全ゼノフリー環境でES細胞樹立にも成功している。難治疾患への細胞治療応用を見据え、ヒトES細胞を細胞治療へ応用するための現状と課題をミニマム・コンセンサス・パッケージ策定へ向けた基盤となるべく検討していく。

C-6-2-1 細胞治療に用いるES細胞

米国ですすでに行われているヒトES細胞の臨床試験工程を参考にすると、出発原料としてのストックから、マスターセルバンクそして拡大培養とともにES細胞とは別の表現型を示す分化細胞株(特定組織幹細胞や前駆細胞を含む)作成とその最終製品としてのバンク、そして最終的に最終製品を用いた細胞治療が所定の医療機関で行われる。複数のステップを経てヒトへの投与となるが、「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(案)―総則、原材料及び製造関連物質、製造工程に関する留意事項について―」にも指摘されているように、品質の確かさを担保した最終産物を安定して製造する工程で最も重要な要素は中間製品としての細胞や細胞バンクである。原材料はヒト胚細胞(余剰胚)から作製されるヒトES細胞(そのファーストストック)である。ヒト胚細胞は不妊治療過程での余剰胚であり、正常ヒト胚細胞採取の規定を「生物由来原料基準：人細胞

組織製品原料基準」に照らし合わせるとすると、ヒト胚細胞のドナー（不妊治療の対象患者）に関する情報（不妊治療を享受する過程での）との充足性については今後検討の余地があると考えられる。

成育医療センターでは、ヒト ES 細胞樹立研究を行っているが、初期のヒト ES 細胞樹立過程とは、胚盤胞の内部細胞塊から増殖を認めた細胞塊を非酵素的に分離・継代していく過程である。非酵素的に細胞継代を行うため、細胞を増やすことの確実性はあるが十分な細胞数を得ることはできない。細胞が一定数得られ、酵素的細胞継代によっても培養維持できるようになることを初期の拡大培養過程としている。この過程で、出発原料としての各種検査を行い、細胞を増やし保存するマスターセルバンク化を行う。フィーダー細胞を使用する場合はガイドラインを参考にして、その特性と微生物学的安全性を担保する必要がある。マスターセルバンク化する細胞の品質管理では規格試験と特性解析試験が行われる。セルバンクの安全性と品質に係る試験をすることで最終製品までの製造工程における安全性を担保する。規格試験項目については、ACT 社臨床試験でヒト ES 細胞由来網膜色素上皮細胞を作製し治験を行った報告を参考にすると、核型試験、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、各種ウイルス試験（参考 2）が上げられる。特性解析試験としては、未分化度試験（マーカー；OCT4, SOX2, NANOG, REX1 等の定量解析）と形態観察（ヒト ES 細胞に特徴的な扁平円形コロニー集団を維持している）による細胞純度試験が考えられる。

ヒト ES 細胞の培養にはフィーダー細胞

が必要となる。我々の培養工程においては、フィーダー細胞としてマウス 13 日齢胎児由来の線維芽細胞 (MEF 細胞) を使用した。MEF 細胞のバンク化の必要性も想定される。生物由来原料基準：動物由来細胞組織製品原料基準への適合が求められる。

ヒト ES 細胞およびフィーダー細胞の培養に使用する製品の品質証明の確保は必須であり、特に牛由来製品の場合原産地証明も必要である。細胞外基質、細胞継代時に使用する酵素や凍結保存液についても品質証明が求められる。

C-6-2-2 ES 細胞を用いる臨床応用の流れ

ヒト幹細胞を用いた細胞治療を日本で行う場合、実用化への出口に向けては、主に以下の 2 つの方法がある。1 つは薬事法に基づき、FIM となる臨床試験から治験（医師主導型治験または企業治験）を行い製造販売承認を申請し臨床利用を目指すラインがあり、もう 1 つは、医師法に基づき治療法に関する臨床研究を行い、治療施設が限定される高度医療・先進医療として細胞治療を行うラインとがある。これまで、医師法に基づく既存のヒト幹細胞による臨床研究は、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（厚生労働省，平成 18 年 9 月 1 日施行）に則って行われてきたが、新たな幹細胞技術の成果としてヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞等が開発され、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の改訂版が施行された（平成 22 年 11 月 1 日）（新ヒト幹指針と略す）。ヒト幹細胞による再生医療では、医師法下で行われる臨床研究と薬事法下での臨床試験・治験という異なる規制環境が

存在するものの双方で取り扱われる幹細胞製品は、そもそも、ヒトに初めて適用する FIM という観点から制度によらない適切な取扱い基準、つまり必要最低限の要件は共通するはずである。薬事法下での細胞・組織加工医薬品等の治験における GTP (Good Tissue Practice) については「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」(厚生省医薬安全局長通知 医薬発第 1314 号別添 1, 平成 12 年 12 月 26 日) (<別添 1>) に含まれるとされる。医師法下での新ヒト幹指針では、治験薬 GMP と GTP に準拠したもので治験開始時と同じレベルの品質管理と安全性確保を求める基準が整備され、厚生労働大臣の確認を受けた臨床研究の実施計画書と同一の内容で治験開始ラインへ移行が可能となった。さらに、再生医療の進展とともに、自己及び同種細胞由来の細胞製品に関する技術要件をより明確にするために、医薬発第 1314 号が改正され「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 (薬食発第 0208003 号)」(自己指針) 及び「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 (薬食発第 0912006 号)」(同種指針) が発せられた。近年、ヒト間葉系幹細胞、ヒト ES 細胞、さらにヒト iPS 細胞による臨床応用を目指した研究の進展はめざましく、これらに特化した留意事項について検討しそれぞれの品質と安全性に根ざした指針整備が必要となる状況になっている。ヒト ES 細胞に関する指針は、ヒト ES 細胞はいずれに対しても同種移植となることからヒト同種由来細胞の系譜として細胞治療の品質及び安全性に関する基本的な技術要件につい

て「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 (案) - 総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について-」が提示され、ヒト ES 細胞に対する具体的な指針が示されてきた。

C-6-2-3 ヒト ES 細胞の再生医療応用に必要な技術的要件

ヒト ES 細胞を臨床応用に用いるために必要な技術的要件として主に以下の 4 つが上げられる。①均一な細胞性質を保つ培養工程を確立することが必要で、培養過程で未分化状態が維持されている性質の保証が必要である。通常、基本的な技術として十分に備わっているはずである。②細胞の品質基準と管理体制を整備する。細胞の品質検査としては、規格試験とミニマムな特性解析試験が行われる。③長期培養工程における細胞品質の管理と評価法の確立と④感染性因子混入リスクの管理である。

ES 細胞の内在する特性として分化多能性があるが、細胞移植の際に懸念される腫瘍化の試験を出発原料の段階で行う意義があるか検討が必要である。分化誘導して得られる最終製品内に奇形腫形成能を有する細胞の混入の有無を確認することは重要であるが、出発原料としての段階で内在特性である造腫瘍性確認試験に意義を見出すことは難しい。ただし、ES 細胞が移植対象になるような条件であれば、造腫瘍性試験として形成した奇形腫内に明らかな悪性組織の有無や移植したレシピエント免疫不全マウスの移植以外の組織や臓器に転移性を示す所見の有無等を行う必要はあるかもしれない。

C-6-2-4 ヒト ES 細胞を用いる臨床研究の課題

臨床研究を見据えたヒト ES 細胞の出発原料は、初期の細胞株化段階におくことで既存の細胞株をゼノフリー培養環境、フィーダーフリー培地や無血清培地などの特定の条件に適応化させた細胞株を規格試験と特性解析を行いマスターセルバンク化することが可能と考えられる。

我々は、ヒト ES 細胞樹立と培養維持工程全てにおいて異種成分にふれることがない培養システムを構築し、樹立した ES 細胞 (SEES4) の特性解析では非ヒト型のシアル酸 (Neu5Gc) の発現は認められなかった (Fig. 3)。次世代の製造工程と細胞品質評価へ発展していく基盤が整備されている。

C-6-2-5 考察および小括

ヒト ES 細胞を用いた細胞治療における細胞及び細胞調整工程で考慮すべき点としては大きく 2 つに分けられる。一つは、他の組織幹細胞を用いる場合のように細胞の調整・加工工程や移植・投与工程等に係る多くの細胞治療が含有するリスクであり、もう一つはこの ES 細胞の性質に起因する事象である。前者については、組織幹細胞を用いた臨床研究において細胞・組織を製品化する際の取扱いに関する基準として細胞組織由来製品の採取、調整、出荷において、感染、試料取違えや異物混入等の予防策をまとめた GTP が整備される。細胞の調整・加工工程や移植・投与工程等に係る安全性を担保するために、ヒト幹細胞や調整工程に由来する感染症の伝播の危険性が懸念されるため、細菌、真菌、ウイルス等に汚染されていない原料の使用、調整工程中

における汚染の防止等を図ることは当然ながらヒト ES 細胞を用いた細胞治療にも必須である。ヒト ES 細胞は樹立の段階から考慮されるべきであるが、初期の細胞株化段階での各種条件への適応化をした細胞株を出発原料として特性解析し品質と安全性を確保することが有用であると思われる。ES 細胞株由来細胞の製造工程や工程管理を先端の知見と技術を応用しより安全性の高い最終製造物を提供することが重要である。

<参考文献>

1. Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*. 2012; 379(9817):713-720.
2. 『ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価』について (平成 12 年 2 月 22 日医薬審第 329 号)

C-6-3 臨床使用を目的とした人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 又は人工多能性幹細胞様細胞 (iPS 様細胞)

C-6-3-1 再生医療の素材としてのヒトiPS細胞とヒトiPS様細胞

言うまでもなく再生医療の究極の目的は治療である。したがって、常に治療(目的)から発想する考え方、アプローチが肝要であり、どのような疾患を対象に、どのような製品を開発するかが第一義的課題である。iPS 細胞の作製による細胞の分化・脱分化に関するパラダイム

シフトは、再生医療への応用に無限の可能性(手段)を提供するが、このことは、初期化の程度や特定iPS細胞の標準化が全ての再生医療への応用の前提であるということ必ずしも意味する訳ではない。初期化の程度を一定にすることができ、iPS細胞の標準化ができることは、再生医療に利用される細胞・組織加工医薬品等の創製のための特性が明かな原材料、すなわち重要な素材(手段)の1つの提供という大きな意義を持つ。しかし、全ての製品のもとが、特定の iPS 細胞でなければならないという必然性はない。ある個別の製品に対して、素材として適切な細胞があれば、それで良い。重要なことは、細胞の分化・脱分化が人為的に操作できるというパラダイムの中で、ある特定の治療(目的)に叶う品質・有効性・安全性を有する最終製品を製造するのに適切な素材として人工的に誘導された多能性の細胞が適切に位置づけられることである。どの細胞から、どの手段で、どの程度初期化(多能性化)した細胞を得て、どのような分化誘導で、どのような細胞を経て目的細胞に至るかが、各開発研究関係者の挑戦課題であると思われる。

以上のような趣旨のもと、「ヒト iPS 細胞」に加え、「ヒト iPS 様細胞」という概念が出されている。それぞれの細胞は暫定的に次のように定義されている。「ヒト 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。また、「ヒト 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。

C-6-3-2 iPS(様)細胞と医薬品製造基材/中間細胞株

C-8 項で述べるように「医薬品等製造基材」は一般に製品製造の出発原料たる「細胞バンク」として樹立され、管理される。中間細胞株がバンクとして利用されることもある。

iPS(様)細胞そのものが上記のような意味での安定的な「医薬品製造基材/バンク」と位置づけられることは必ずしも一般的ではないかも知れない。

C-6-3-3 より安全なヒトiPS(様)細胞の作成とその限界

iPS細胞又はiPS様細胞(以下いずれかを指して iPS(様)細胞という)由来製品においては、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。これは元来 iPS 細胞の最大の特徴の裏返しであり、iPS 細胞のレベルで、これに対策を講ずることは、きわめて困難であると考えられる。iPS 細胞を作製するために用いる誘導剤の改良などにより、安全性上懸念される外因的な要因を取り除くことで「より安全な iPS 細胞」を作製することは可能であり、望ましいことと考えられる。しかし、iPS 細胞を特徴できる固有の内因性の要素を取り除くことは原理的に二律背反であり、困難である。また、「外因性因子の改良により樹立されたより安全な iPS 細胞」は改良前のものに比較して、「より安全な最終製品の出発原材料

料」にはなりえるが、テラトマ形成にアイデンティティがあるような内因性の固有の特性によるものに関しては、「より安全な iPS 細胞」というものの存在しないのではないかと考えられる。したがって、将来的には iPS 細胞レベルでの安全性を主題にするのではなく、製品からみた対策、すなわち、ある製品によっては iPS 細胞そのものよりも、iPS 細胞が持つ特性の必要部分を取り出したような「iPS 様細胞」を原材料にしたり、製造工程や工程管理を工夫することにより、より安全性の高い最終製品を創出する戦略や戦術が大きな意味を持つてくるのではないかと考えられる。それ故、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、目的外の未分化細胞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・除去法や不活化法の開発、適用により、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と思われる。適切な体性幹細胞から iPS(様)細胞、iPS(様)細胞からより安全、安定、特性が明確で、適切な原材料となり得る任意の体性幹細胞の作製を可能にする技術や品質・特性解析技術の開発も重要性である。個々の細胞由来 iPS(様)細胞の多能性や分化できる細胞の種類を予め見極める「検査技術」や、効率よく確実に目的とする細胞に分化誘導したり、分化細胞を未分化細胞から分離する「加工技術」の研究開発は、新たなビジネスチャンスを生むことになると考えられる。

C-6-3-4 ヒト(自己・同種) iPS(様)細胞加工製品特有の製造・評価のポイント

ヒト iPS(様)細胞加工製品は、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こと、また、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ることに特徴がある。また、当然、その増殖性の高さ、多機能性に起因する長所と短所がある。iPS 細胞加工医薬品等の場合、①細胞(出発素材)の特性としての造腫瘍性、製品における未分化細胞の残存などによる②異所性の組織形成、③不適切な分化/造腫瘍性、④目的外の表現型発現に特に留意すべきことは言うまでもない。また、④同種の場合に免疫原性/免疫拒絶反応に対する留意も必要である。iPS 細胞株樹立や増殖、分化等の過程で使用される動物由来成分による動物抗原が検出される製品における抗原性にも注意する必要がある。なお、自己由来 iPS 細胞と同種由来 iPS 細胞に対する技術要件の違いについては、すでに他項で示したとおりである。

Fig. 4 にヒト iPS(様)細胞加工医薬品等の製造、評価のポイントを改めてまとめた。

C-7 細胞バンクの概念と技術要件 MCP

生物起源の医薬品等(バイオリジクス)は、原材料において非特定起源からの由来や複雑さのために品質特性解析及び管理が必ずしも必要十分にはなし得ず、最終製品においても量的制約や複雑な品質特性のために、必要十分な管理ができないことが多い。それらを補完する上で、あらゆるバイオリジクスに通底する最も重要な概念及び方策は、製造工程の一定性・恒常性を確保するということである。その中核をなす最も重要な要素は、全工程のある段階において、最も徹底した品質特性解析

及び管理が可能で、次の段階へのステップを常に確実にかつ安定して進行させ、ゴールとしての最終製品に向かうことを可能にするベースキャンブたる医薬品製造基材である。

細胞・組織加工医薬品等の安定的な製品製造における最も理想的なベースキャンブは、十分に解析され、安定で、増殖性を有し、更新も、安定供給も可能で、かつ目的細胞に適切に分化できる細胞(バンク)や中間細胞株である。ある製品開発戦略としては、原材料段階での困難な検討や解析結果にウエイトをおくよりも、細胞バンクや中間製品としての細胞株(中間細胞株:バンク)を適切に、確実に樹立することが、安全な最終目的製品を安定的に製造する上で重要であり、むしろ科学的にも合理的な場合がある。もちろん、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必要がある。その際、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必要がある。このような中間細胞株の品質の均質性及び安定性を保持するため、各種細胞特性指標(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必要がある。

Fig.5 には iPS 細胞由来製品を例に製造過程で想定される細胞バンクの位置づけ、概念を図示した。

C-8 普遍的に利用可能な新規細胞特性解析手法及び品質評価手法開発(網羅的糖鎖プロファイリング法)

再生医療」の実用化に向けては、製品の品質や安全性等を確保する上で、多種多様で固有の特性を有するヒト体細胞、ヒト幹細胞、人工多能性幹細胞やES細胞などの原材料としての細胞、中間製品としての細胞、最終製品としての特定の細胞、あるいは混在する可能性がある細胞等の様々な特性を把握し、これらの細胞を確認・同定、識別したり、細胞の品質を管理する方法論の存在あるいは新たな開発とそれらの有効活用が必要である。すなわち、様々な特性を持つ細胞のタンパク質や糖鎖を迅速、簡便、かつ特異的・定量的に解析、識別する方法を開発することは、再生医療実用化を加速するうえで不可欠である。

再生医療における細胞の特性・品質の管理では、細胞表面上のタンパク質が分化あるいは未分化マーカーとして専ら利用されている。一方、細胞表面の糖タンパク質糖鎖は糖鎖遺伝子の発現パターン変動から、細胞表面における糖鎖構造が変化し、さらに細胞の分化度等によっても変化することから分化あるいは未分化マーカーとしても期待できる。

一方、iPS細胞などの各種幹細胞を利用する再生医療実用化における課題として、その細胞治療材料としての有用性だけでなく、細胞への異種動物由来成分の混入による抗原性などの安全性の面においてもいくつかの問題が残されている。このような各種幹細胞の安全面での対策においても糖鎖を指標とする評価技術の有用性に期待が寄せられるが、これまでに糖鎖を指標とした幹細胞

胞の安全性評価基準策定に関する検討は殆どされていない。

以上のような背景の下、本研究が目指す MCP あるいはケース・バイ・ケースにおける上乘せ方策において、産・学・官が共通に参照でき活用できる評価技術としてのコンセンサス・パッケージを策定すること、すなわち、細胞特性解析&品質評価に関して普遍的に使える評価試験法や評価指標と評価基準を策定すること、また、必要に応じて新たな評価技術を開発することはきわめて重要と考えられる。

そこで本研究では、個別細胞特性解析、品質評価・管理、未分化細胞等混在細胞検出、目的細胞精製（又は目的外細胞除去）技術等、品質・安全性確保等に普遍的な新規細胞解析技術開発例として網羅的糖鎖プロファイリング法の開発とその有用性と適用可能性について検討してきた。

本年度は各種幹細胞の培養工程で混入しうる異種動物由来成分に着目し、前年度までに開発した糖鎖プロファイリング技術を活用し、異種動物由来成分を含む材料を用いて培養された iPS 細胞における異種動物由来糖鎖の混入の有無を調査した結果について報告する。また、iPS 細胞中に観察された異種動物由来糖鎖の混入原因を調べた結果についても報告する。

C-8-1 iPS 細胞の N-結合型糖鎖解析

iPS 細胞をはじめとする各種幹細胞を再生医療実用化に応用するためには安全性の面で解決すべき問題点が残されている。例えば、培養の際に使用するフィーダー細胞の混入や血清などの異種動物由来成分の混入については、それらが免疫原性を示しうることに留意しておかなければなら

ない。iPS 細胞は、最終製品に至るまでの工程において、マウス胎児組織由来のフィーダー細胞 (MEF)、動物血清あるいは血清代替物 (KSR)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) 等の異種動物由来成分を添加した培養液を用いて培養される。そのため、異種動物由来成分の混入は不可避的であるが、それらが免疫原性を示す可能性があることを考えた場合、混入しうる異種動物由来成分を明らかにし、それらの混入を防ぐ方策を講じなければならない。ここでは培養過程で異種動物由来成分を含む材料を用いて培養されたヒト iPS 細胞 (Toe、UTA-1) の N-結合型糖鎖の網羅的解析を行い、異種動物由来糖鎖混入の有無について調査した。

Toe と UTA-1 の 2 種類の iPS 細胞から N-結合型糖鎖を調製し、2-アミノ安息香酸 (2-AA) により蛍光標識化後、シアル酸残基数に基づきセロトニンアフィニティークロマトグラフィーで分画した結果を Fig. 6 に示す。Toe と UTA-1 のアシアロ/ハイマンノース型糖鎖分画をそれぞれ 73.0、74.7% 含み、MALDI-TOF MS による分析から、マンノース 5、6、7、8、9 残基からなるハイマンノース型糖鎖が主要な糖鎖であった。モノシアロ糖鎖分画については Toe と UTA-1 にそれぞれ 20.0、17.2% 含み、MALDI-TOF MS による分析から、いずれの細胞でも複合型 2 本鎖糖鎖にフコースが 1 あるいは 2 残基修飾した糖鎖が高い含量を示した。なお、いずれの細胞でもアシアロ/ハイマンノース型糖鎖分画とモノシアロ糖鎖分画を合わせて N-結合型糖鎖の 90% 以上を占め、ジシアロ分画、トリシアロ分画、テトラシアロ分画の含量は低かった。次に、各シアロ糖鎖分画を MALDI-TOF MS にて解析すると、N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) により修飾されたと考えられる