

革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業（厚生労働省）

本書は、厚生労働省 革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業の一環として、平成 27 年度に、PMDA の協力を得て、血小板誘導に適したヒト（同種）iPS 細胞の品質に関する留意点と課題（案）を中間的にとりまとめたものです。本書に関するご意見については、京都大学 iPS 細胞研究所医療応用推進室（ips-promotion@cira.kyoto-u.ac.jp）までお寄せください。今後、寄せられたご意見と、本事業における研究の成果や国内外で集積される最新の科学的知見も踏まえてさらに検討を行う予定です。

血小板誘導に適したヒト（同種）iPS 細胞の品質に関する留意点と課題 （中間とりまとめ）（案）

京都大学 iPS 細胞研究所
臨床応用研究部門 江藤研究室
医療応用推進室

1. はじめに

ヒト由来の人工多能性幹細胞（iPS 細胞）又は人工多能性幹細胞様細胞（iPS 様細胞）のうち、同種由来 iPS 細胞又は iPS 様細胞を加工した製品（以下「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工製品」という。）の品質及び安全性を確保するための基本的な技術要件は、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「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」（以下「同種 iPS 細胞局長通知」という。）に定められているところである。

平成 24 年度から厚生労働省・独立行政法人医薬品医療機器総合機構（以下「PMDA」という。）により「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業」が開始された。京都大学 iPS 細胞研究所では、本事業において、血小板製剤の原料として使用するのに適した再生医療用 iPS 細胞の評価方法に関する研究を行っており、これまでに、「血小板誘導に適したヒト（自己）iPS 細胞の品質に関する留意点と課題（中間とりまとめ）（案）」及び「細胞製品に含まれる不純物の安全性評価に関する基本的な考え方（案）」を公表してきた。本書は、本事業の一環として実施した PMDA との対面助言等の結果を踏まえ、ヒト（同種）iPS 細胞加工製品のうち特に不死化巨核球細胞株を用いて製造される血小板製剤の原料となる末梢血等に由来する iPS 細胞及び不死化巨核球細胞株のマスター・セル・バンクの作製までの工程について、同種 iPS 細胞局長通知の基本的な技術要件に加えて、現時点での血小板製剤の原料として用いる同種由来 iPS 細胞に特有の品質に関する留意点を中間的にとりまとめたものである。

2. 本書の位置づけ

本書は、技術開発の著しい 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のではなく、現時点で考えられる点について中間とりまとめとして示している。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、本書の他、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。

3. 用語の定義

本書における用語の定義は、同種 iPS 細胞局長通知の定義による他、以下のとおりとする。

- (1) 不死化巨核球細胞株：iPS 細胞から樹立され、一定以上の期間に亘る自己複製能力に基づく再生能を持ち、血小板を産生する巨核球細胞株。
- (2) シード・ストック及びシード・セル・バンク：本書では、血小板製剤のマスター・セル・バンク（iPS 細胞由来不死化巨核球細胞株）と区別するため、樹立した iPS 細胞のコロニーを分離して拡大培養し、セル・バンク化したものを iPS 細胞シード・ストックと呼ぶ。本書で想定する製造工程の概略については別添を参照すること。本シード・ストックのうち血小板への分化誘導に適した iPS 細胞株のシード・ストックより、不死化巨核球細胞株のマスター・セル・バンクの候補として樹立された不死化巨核球細胞株をシード・セル・バンクと呼び、不死化巨核球細胞株のマスター・セル・バンクを構築するための原料として使用される。

4. 留意すべき事項

- (1) iPS 細胞及び不死化巨核球細胞株の原材料及び製造関連物質の品質管理

①原材料となるヒト細胞の採取

同種 iPS 細胞局長通知第 2 章第 1 の 1 による他、以下の点に留意すること。

a) ドナーからの同意取得及び細胞の採取

同種 iPS 細胞由来血小板の原材料となる血液等は、あらかじめ「ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 25 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号）」に基づく臨床研究として、ドナー又は該当する場合には代諾者の同意のもとで、提供を受け、iPS 細胞株、不死化巨核球細胞株、血小板製剤を作製し、非臨床試験まで行うことができる。この場合、

以下の点に留意すること。

(1)当初の臨床研究計画には、患者への投与は含まないこと、患者への投与に用いる場合には新たに患者より同意を取得することを説明内容に含めておくこと。「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。以下「医薬品医療機器法」という。）」の規定に基づく治験に用いる場合には、治験計画届書の提出後に、患者より、投与についての同意を取得する必要がある。

(2)将来的に作製した血小板製剤を治験に用いることを想定し、生物由来原料基準（平成 15 年厚生労働省告示第 210 号。以下「原料基準」という。）第 3 の 1 「ヒト細胞組織原料基準」の規定を遵守しておくこと。

b) 試料の保管

樹立した iPS 細胞及び最終製品の品質又は安全性に問題が生じた場合に備えて一定量のドナー由来試料を凍結保管しておくこと。末梢血は、単核球として分離後、他の細胞又は組織については初代培養したうえで凍結することもできる。

②製造関連物質

原材料となるヒト細胞以外の原材料の取り扱いについては、原則として、原料基準及び同種 iPS 細胞局長通知第 2 章第 1 の 2 による。

「生物由来原料基準の運用について」（平成 26 年 10 月 2 日付け薬食審査発 1002 第 1 号・薬食機参発 1002 第 5 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長・同省大臣官房参事官（医療機器・再生医療等製品審査管理担当）連名通知。以下「運用通知」という。）1 の（2）に原料基準に規定される原材料が例示されており、その例 5 に基づくと、不死化巨核球細胞株のマスター・セル・バンクに対する十分な特性解析及びウイルス試験が実施され、その妥当性が審査において確認されれば、マスター・セル・バンク樹立過程で使用された原材料は、原料基準に規定する原材料としての規制を受けない可能性がある。ただし、人又は動物に由来する特性解析されたセル・バンク（CHO 細胞、HEK293 細胞等）を出発基材とした細胞培養により生産される原材料（目的細胞の分離に用いる抗体、細胞培養基質等）については、可能な限り、DNA トランスフェクションしたセル・バンクに対するウイルス試験、製造工程における、細菌、真菌、ウイルス等を不活化又は除去する処理とその評価、適切な段階でのウイルス試験を実施することが望ましい。不死化巨核球細胞株のマスター・セル・バンク樹立過程及びそれ以前の段階で使用される生物由来の原材料について、原料基準への対応状況に関する情報は可能な限り保持しておくことが望ましい。

(2) iPS 細胞及び不死化巨核球細胞株作製工程の製造管理及び品質管理

ヒト（同種）iPS（様）細胞加工製品について、「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」という。）」又は「治験薬の製造管理、品質管理等の基準（治験薬 GMP）について」（平成 20 年 7 月 9 日付け薬食発第 0709002 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知）は、原則としてマスター・セル・バンクの樹立以降の工程に適用される。従って、本書で想定する別添の製造工程の概略に基づき、医薬品医療機器法上の再生医療等製品に該当する血小板製剤の原料となる不死化巨核球細胞株をマスター・セル・バンクとして樹立する場合には、マスター・セル・バンクとした当該不死化巨核球細胞株以降の製造工程に GCTP 又は治験薬 GMP が適用され、iPS 細胞作製工程には GCTP 又は治験薬 GMP は適用されない。一方、再生医療等安全性確保法に基づく臨床研究として再生医療等の提供を行う場合には iPS 細胞作製段階から同法第 44 条の規定により定められた事項を遵守する必要があることから、原則として医薬品医療機器法で用いる不死化巨核球細胞株のマスター・セル・バンクの樹立であっても、再生医療等安全性確保法第 44 条を参考とした管理を行うことが望ましい。

(3) 血小板誘導に適した iPS 細胞の選定と不死化巨核球細胞株のマスター・セル・バンク樹立

同一ドナー由来の iPS 細胞にも品質にばらつきがあることから、細胞調製施設における iPS 細胞の樹立の際、なるべく多くの iPS 細胞のクローンを分離、拡大培養し、この段階で iPS 細胞のシード・ストックを構築し、次に、iPS 細胞のスクリーニング工程として、一旦、細胞調製施設外で、iPS 細胞の拡大培養、不死化巨核球への分化誘導及び血小板産生を行ったうえで、血小板誘導に適した iPS 細胞株を選び、改めて選ばれた iPS 細胞株のシード・ストックより、細胞調製施設において不死化巨核球細胞株のセル・バンクであるマスター・セル・バンク候補（シード・セル・バンク）を構築することが現時点での標準的な製造フローと想定される。さらに、一旦樹立したヘテロな不死化巨核球細胞株を限外希釈法などによるクローニングにより、また場合によっては iPS 細胞に再度初期化した上で、単一細胞として選別化することでクローニングした上で再度、不死化巨核球に分化誘導して、より均一な不死化巨核球集団から構成されるマスター・セル・バンクを構築することも可能である。

巨核球への誘導に適した iPS 細胞株の選定について、以下のようなスクリーニング基準が想定される。

a) iPS 細胞の外観

iPS 細胞として適切な形態を有し、未分化状態を維持していること。

b) iPS 細胞の増殖能

iPS 細胞として、適切な増殖能を有すること。

c) 血球系前駆細胞への分化能

iPS 細胞から CD34 陽性、CD43 陽性、一部が CD41a 陽性を示す血球系前駆細胞に分化誘導させたとき、その血球細胞の産生効率が高く、出来た血球細胞の外観がより均一な血球系前駆細胞として適切な形態を有していること。

d) 巨核球への分化能、増殖安定性及び血小板産生能

血球系前駆細胞から、さらに巨核球への分化を行い、巨核球としての表面マーカー (CD41a や CD42b など) 発現を確認した結果、その陽性株の比率が高いこと、かつ継代を繰り返しても巨核球としての機能が維持され、安定な増殖を示すこと。更に血小板産生能とその機能を評価すること。

血球系前駆細胞を巨核球へ分化させるに先立ち、前駆細胞の表面マーカーに基づき巨核球分化への lineage にある血球系前駆細胞をセルソーターやビーズ法により分画する事も有効な手段である。また、血球系前駆細胞への分化抵抗性のある iPS 細胞株には、ラミニン 121E8 フラグメント上で培養し、分化抵抗性を解除することも有効な手段である。ただし、これらの付加的な方法に係る抗体、ビーズ、ラミニンなどは、原料基準に基づき、製造に必須な細胞株のウイルス試験、製造工程における、細菌、真菌、ウイルス等を不活化又は除去する処理とその評価、適切な段階でのウイルス試験を実施することが望ましい。

(4) 不死化巨核球細胞株のマスター・セル・バンクの特性解析及び品質評価

不死化巨核球細胞株のマスター・セル・バンクについては、同種 iPS 細胞局長通知第 2 章第 2 の 2 (5) 及び (7) 並びに「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 (ICH-Q5D)」(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) 等を参考に特性解析及び品質評価を行うこと。以下のような試験項目が想定される。

a) 生存率

セル・バンクから解凍後の不死化巨核球が適切な生存率を有すること。

b) 増殖能

血小板産生に用いる不死化巨核球として、適切な増殖能と巨核球株としての安定性 (2 ヶ月以上安定して増殖する能力) を有すること。

c) 血小板産生能

血小板産生に用いる不死化巨核球として、適切な機能を有する血小板を適切な効率で産生する能力を有すること。

d) 表面マーカー

CD41a と CD42b 等の巨核球として適切なマーカーの発現及び不適切な分化

細胞や未分化の iPS 細胞の残存がないことを確認すること。

e) 核型解析

20 細胞について G バンド染色を行い熟練者が観察した結果、核型が正常であること。FISH により 12 番、17 番染色体に増幅や転座がないこと。

f) ベクターの残存

iPS 細胞又は不死化巨核球の樹立にウイルスベクターを用いた場合、ウイルスベクターの残存について確認すること。

g) 汚染検査

無菌試験、マイコプラズマ試験及びエンドトキシン試験を行うこと。

h) ウイルス混入否定試験

「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 (ICH-Q5A) (平成 12 年 2 月 22 日付け医薬審第 329 号厚生省医薬安全局審査管理課長通知) を参考にすること。また、iPS 細胞の作製にセンダイウイルスを用いた場合や不死化巨核球の樹立に用いた遺伝子導入用レンチウイルスに関連し、感染性センダイウイルスやレンチウイルスの存在を否定する試験を実施すること。

j) 造腫瘍性試験

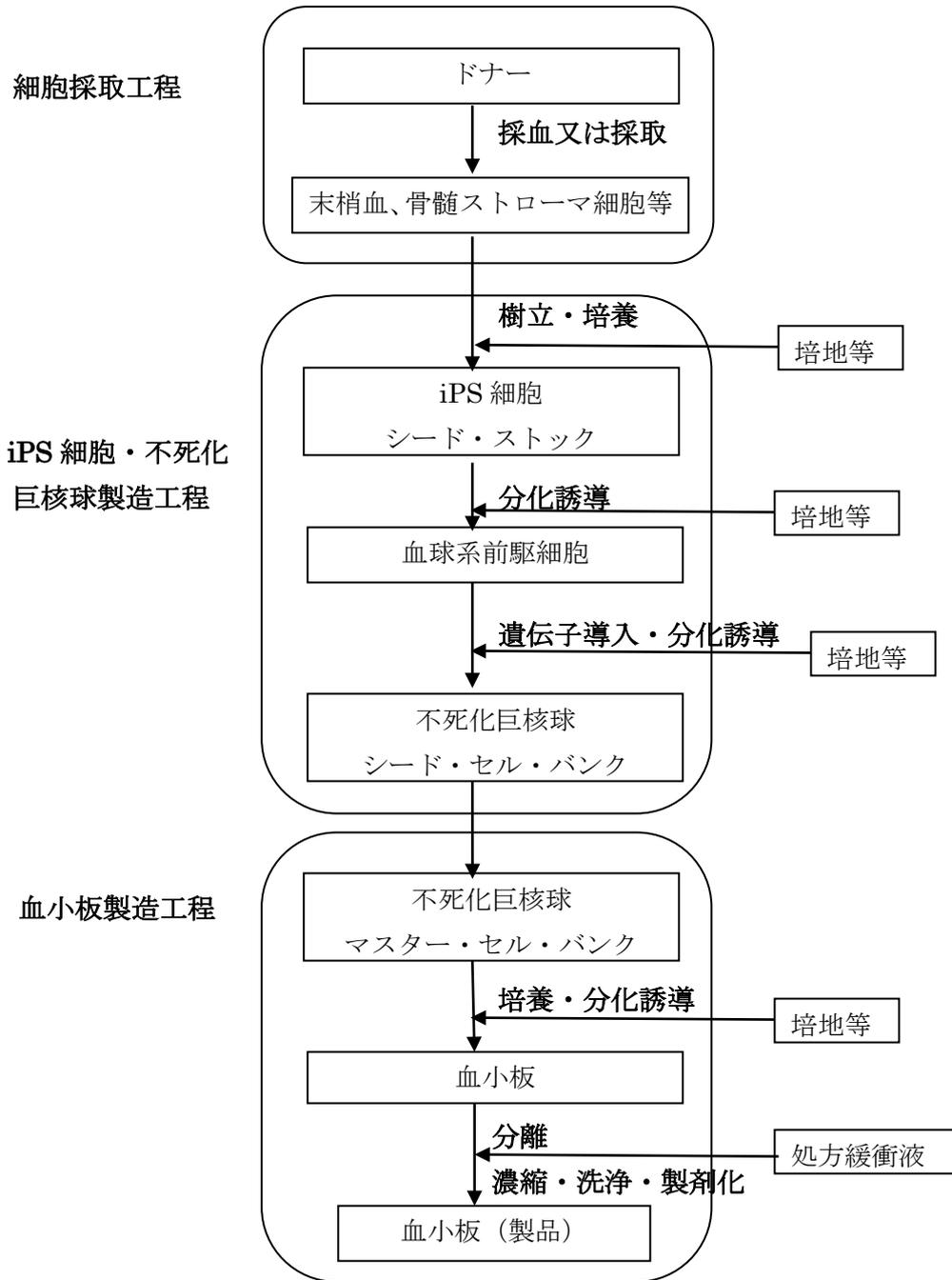
NOG マウス又はヌードラットを被験動物とし、1 匹当たり 10^6 から 10^7 個の巨核球を静脈内に投与し、巨核球が分布する臓器を中心に病理解析を行い、腫瘍形成がみられないこと。最終製品への残存を想定し、 γ 線照射したもので行うこと。

j) HLA 解析及び STR 解析

必要に応じ、HLA 型及び STR のパターンがドナーと一致することを確認すること。

別添：想定される血小板製造工程のフロー

(本中間まとめは不死化巨核球マスター・セル・バンクまでの工程を対象とする)



【参考】 ※中間取りまとめの範囲外

「iPS 細胞由来血小板の品質評価ガイドライン」（最終成果物）での追加予定事項原案

(5) 不死化巨核球細胞株からの血小板製造工程において特に注意が必要な事項

血小板製剤（最終製品）の製造に当たっては、製造方法を明確にし、可能な範囲でその妥当性を以下の項目で検証し、一定の品質を保持すること。

①ロット構成の有無とロットの規定

最終製品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

原料となる不死化巨核球マスター・セル・バンクから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) ワーキング・セル・バンクの樹立

不死化巨核球細胞株のマスター・セル・バンクからワーキング・セル・バンクを樹立する場合には、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及び試験に関する手順等について ICH-Q5A 及び ICH-Q5D を参照してその詳細を明らかにし、その妥当性を示すこと。

b) 血小板製剤（最終製品）の製造

不死化巨核球細胞株から最終製品の構成要素となる細胞を作製する方法（不死化巨核球の拡大培養方法、血小板の産生方法、血小板の分離・濃縮・洗浄・製剤化の方法、製造の各段階での培地、添加物、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。製造工程中で、濃縮フィルターとして新規の材料を用いる場合には、必要に応じ、日本薬局方「プラスチック製医薬品容器試験法」、医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方（平成 24 年 3 月 1 日付け薬食機発 0301 第 20 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）等を参考に、当該フィルターの安全性を評価すること。

(6) 血小板製剤（最終製品）の品質評価

品質規格の値の設定について、治験を開始する前段階の場合にあつては、それまでに得られた試験検体での実測値を提示し、これらを踏まえた暫定値を示すこと。

血小板製剤の有効期限が短いことから、出荷試験については、短時間で実施できる試験法を採用すると共に試験項目についても考慮すること。また Real Time Release Test を活用することが勧められる。特に無菌試験の様に試験に時間が掛る試験では有効であると考えられる。

a) 外観の確認

本剤は、重炭酸リンゲル液 (bicarbonate) に浮遊した血小板で、白色の液剤である。

b) pH

電極法により製剤 pH を測定し、規格値を設定すること。

c) 血小板数

自動血球計数器または FACS を用いて試験するときの、1 バッグ中の血小板総数に関する規格を設定すること。

d) 確認試験

血小板特異的な細胞表面分子 (CD 41 a、CD 42 b) 等の血小板として適切なマーカーの発現を確認すること。不死化巨核球が残存する場合には、残存量が設定した規格内にあることを、確認すること。(測定法は検討中)

e) 機能評価試験

FACS を用いて PAC-1 や P-Selectin といった血小板としての機能を有していることを確認する。

治療用途に整合性のある血小板としての機能特性を有することを製造工程中又は最終製品で確認する。例えば、最終製剤量のアネキシン V 陽性率は 12-15% 未満であることが望まれる。

f) エンドトキシン試験

トキシノメーターを用いるゲル化法によりエンドトキシン含量を測定し、規格を設定し、規格値内である事を確認する。

下記の試験については工程検査の結果 (Real Time Release Test) で出荷することも考慮されるべきである。

a) マイコプラズマ試験

PCR 試験法(日局)によりマイコプラズマの混入否定試験を行う。血小板産生工程への移行時でサンプリングして試験する。

b) 無菌試験

バクテアラート試験法により微生物混入否定試験を行う。血小板産生工程でサンプリングして試験する。

c) ウイルス否定試験

不死化巨核球細胞株の MCB に関するウイルス試験を実施していない場合は、qPCR 法により HIV、HTLV、HCV、HBV、パルボ B19 の混入否定試験を行う。
血小板産生工程でサンプリングを行う。

また、次の試験項目については試験に時間を要するため、参考試験としてデータを採取し、出荷判定には使用しないことも考えられる。

a) 添加物・不純物の残存量の確認

製造工程中の添加物又はそれに由来する不純物の残存量について適切な規格を設定し、確認すること。なお、残存する添加物・不純物の安全性評価については、別紙「細胞製品に含まれる不純物の安全性評価に関する基本的な考え方」を参考とすること。

b) 無菌試験（日局）

発育阻止試験による試験法を検証した後、日本薬局方に準じて直接法による無菌試験を実施すること。播種後、試験結果が出るのに2週間の期間がかかるので、参考試験との位置付けになる。

別紙

細胞製品に含まれる不純物の安全性評価に関する基本的な考え方

1. 序論

本書は、血小板製剤をはじめとする細胞製品に含まれる不純物の安全性評価についての基本的な考え方をとりまとめたものである。なお、使用する生物由来原料のウイルス安全性等については、生物由来原料基準及びその関連通知・ガイダンスを参照すること。

2. 主文

細胞製品に含まれる不純物については、製造工程において不純物の残存の低減化を図るとともに、安全性上懸念のある不純物（例えば、抗生物質や毒劇物等）については、治験届出時まで、原則として、最終製品中の残存量を実測する必要がある。その他の不純物の安全性評価に際しては、特定の不純物の除去率を全ての不純物に一律に外挿するのではなく、製造工程（例えば、製造工程における希釈率）を考慮した上で、個々の不純物について最終製品中の残存量を推定又は実測する必要がある。

最終製品中に含まれる不純物がヒトに投与された際の安全性については、個々の不純物の特性及び臨床試験の用法・用量を踏まえて、以下に示した「ヒト生体内物質」及び「化学物質」の観点から評価することが必要になる。

(1) ヒト生体内物質

医薬品又は医薬品添加物としての使用実績、ヒト血清中の濃度、許容一日摂取量等の情報から、ヒトへの安全性を説明すること。一方で、これらの情報から不純物のヒトへの安全性が説明できない場合には、医薬品開発における非臨床ガイダンス（「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス（ICH M3（R2）ガイダンス）（平成 22 年 2 月 19 日付け薬食審査発 0219 第 4 号）」、「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス（平成 24 年 4 月 2 日付け薬食審査発 0402 第 1 号）」）及び「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価（平成 24 年 3 月 23 日付け薬食審査発 0323 第 1 号）」を参考に、GLP（「医薬品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 9 年厚生省令第 21 号）、「再生医療等製品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 26 年厚生労働省令第 88 号））下で実施された非臨床安全性試験成績等を用いて、臨床試験におけるヒトへの安全性を確保する必要がある。

(2) 化学物質

① 毒性学的懸念の閾値以下でのヒトへの曝露が想定される場合

臨床試験における当該不純物の曝露量が、「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理」ガイドラインに示されている、一生涯よりも短い期間（LTL: less-than-lifetime）の曝露に関する許容摂取量¹（以下、「毒性学的懸念の閾値」）以下である場合、閾値以下であることを以てヒトへの安全性を説明することが可能である。

② 毒性学的懸念の閾値を超えたヒトへの曝露が懸念される場合

a) ヒトでの使用実績がある場合

医薬品又は医薬品添加物の承認された用法・用量の範囲内であれば、当該不純物のヒトへの安全性を説明することが可能である。

b) ヒトでの使用実績がない若しくは使用実績を超える場合

非臨床安全性試験成績を用いて安全性を説明する場合には、原則として GLP 下で実施された試験成績に基づくことが必要である。

個々の不純物について臨床試験におけるヒトへの安全性を確保するためには、個々の不純物の非臨床安全性試験成績を用いて、医薬品開発における非臨床ガイダンスを参考にして、安全性を説明する必要がある。

なお、不純物の安全性を最終製品の非臨床安全性試験成績に基づき評価することについて、遺伝毒性の評価は困難と考えるが、一般毒性については、医薬品開発における非臨床ガイダンスを参考に評価することが可能と考えられる。

3. 関連通知

- ・平成 22 年 2 月 19 日付け薬食審査発 0219 第 4 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」（ICH M3（R2）ガイダンス）
- ・平成 24 年 4 月 2 日付け薬食審査発 0402 第 1 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス」
- ・平成 24 年 3 月 23 日付け薬食審査発 0323 第 1 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」（ICH S6（R1）ガイダンス）

¹「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理」ガイドライン（ASSESSMENT AND CONTROL OF DNA REACTIVE (MUTAGENIC) IMPURITIES IN PHARMACEUTICALS TO LIMIT POTENTIAL CARCINOGENIC RISK, Step 4, 2014 年 6 月 23 日）における「7.3 一生涯よりも短い期間（LTL: less-than-lifetime）の曝露に関する許容摂取量」