

ヒトES細胞の臨床利用の安全性確保について

リスク管理の観点から

原材料/中間体としてのヒトES細胞の安全性の確保に関わる要因 バンク構築？を前提として

感染性因子

- ・ドナー由来
- ・培養工程由来

既知/未知それぞれについて考慮

細胞株の遺伝的特性

- ・ドナー胚由来
- ・樹立培養工程でのゲノム変異由来

多くは潜在的リスクと考えられる??

ヒト(自己・同種)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(案)

治験開始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評価の際には、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も重要である。

ドナーに由来する感染性因子の制御

ドナースクリーニング

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)

- ・ドナーの選択基準、適格性

年齢、性別、遺伝的特徴、病歴、健康状態、採取した配偶子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、ドナー選択基準、適格性基準を定め、その妥当性を明らかにする。

- ・適格性に関わる感染症などの検討

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、パルボウイルスB19感染症の問診及び検査

- ・サイトメガロウイルス、EBウイルス、西ナイルウイルス検査(必要に応じて)

既往歴、問診等より適格性を判断

- ・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、内分泌疾患

- ・膠原病、血液疾患、肝疾患

- ・認知症(伝達性海綿状脳症及びその疑いのあるもの)

- ・輸血、移植医療を受けた経験の有無等も加味する

ドナーの特性

・ドナー

他の幹細胞同種移植では、ドナーを健常人と想定する場合が多い。しかし、ES細胞の場合不妊治療を受ける患者である。

・ドナーセレクションに関わる健康情報の取得時期
余剰胚の提供は胚作製から通常1から数年年以上経過後。

不妊治療時に行われる一般的検査問診で十分か。

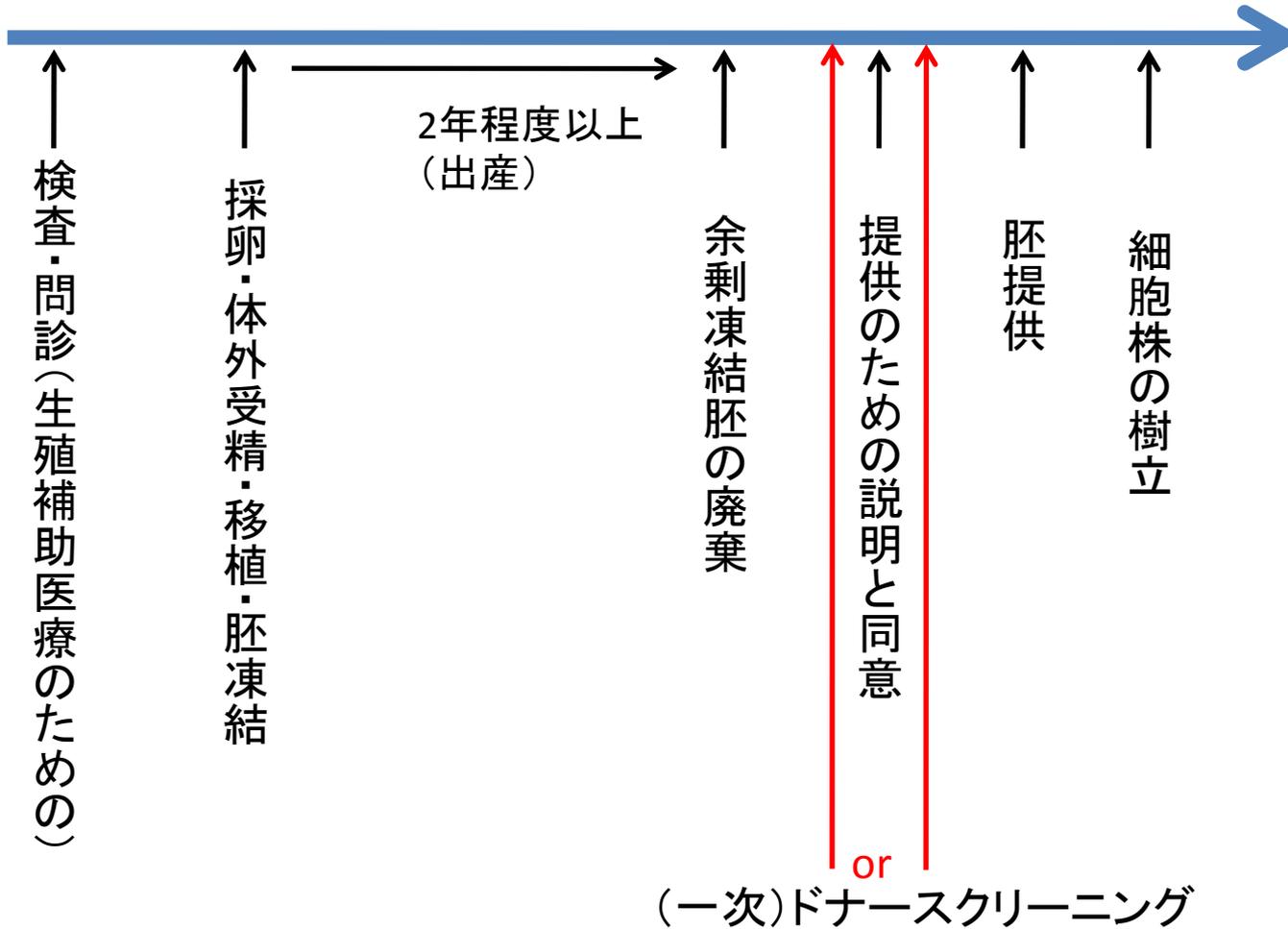
提供時点で追加的検査を行うか。

感染症検査などについて、胚作製から提供までの期間をウィンドウピリオドと見なすことは適切か。

血液サンプル等の保存が必要か。(いつの時点の)

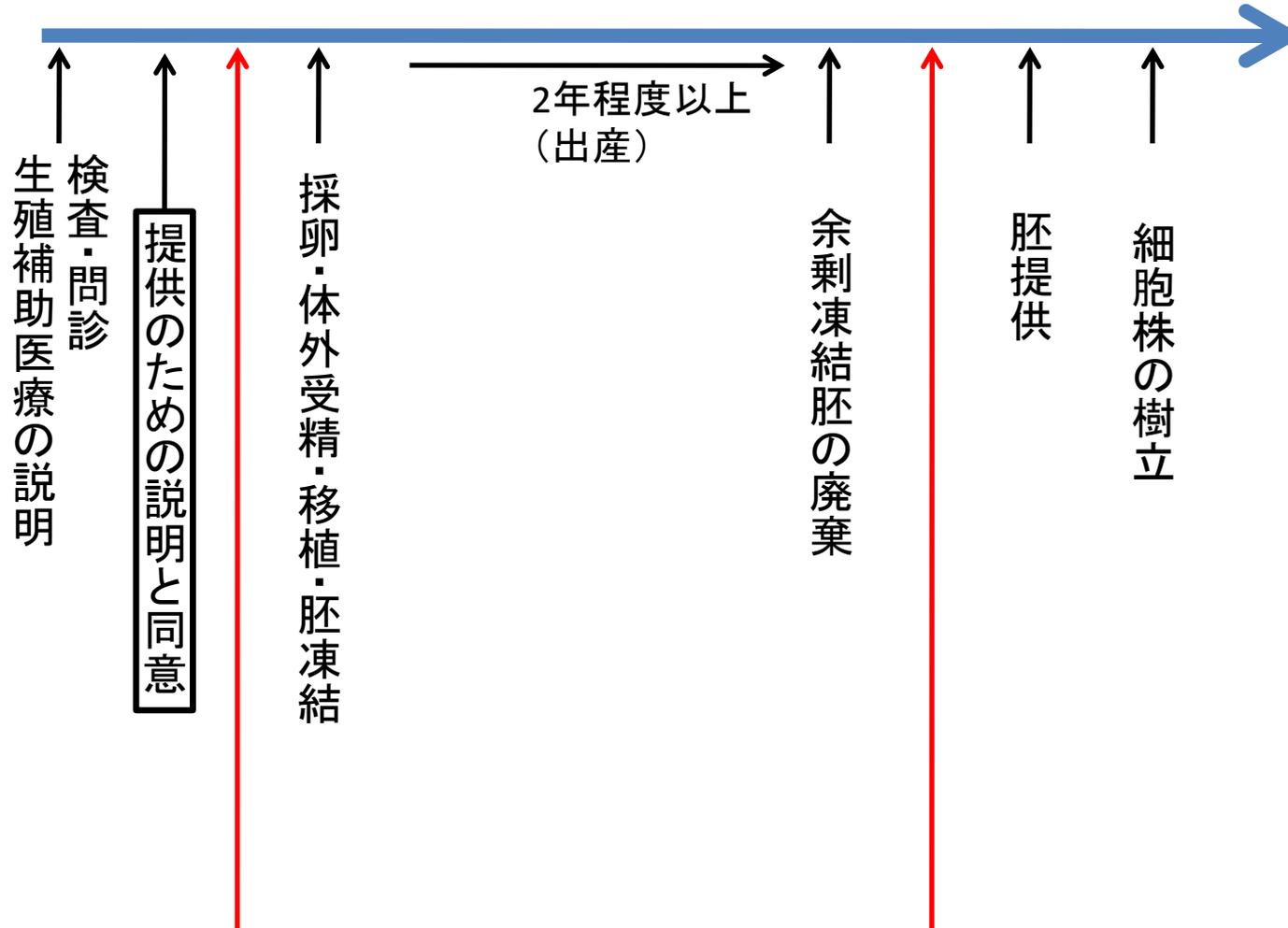
ケース1

余剰胚の提供



スクリーニングのためのドナーの健康情報は数年前かつ治療を目的としたもの

余剰胚の提供



(一次)ドナースクリーニング

ヒト幹指針などに規定の検査/問診、ドナーの血液等の試料の保存が可能

(二次)ドナースクリーニング

ウィンドウ期間が必要な検査など

ドナースクリーニング

・ドナーの選択基準、適格性

年齢、性別、遺伝的特徴、病歴、健康状態、採取した配偶子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、ドナー選択基準、適格性基準を定め、その妥当性を明らかにする。。

一般的な不妊治療の対象であることから、ドナーの年齢、性別は問題とならない。

樹立が予想される細胞株数から考え、免疫適合性を考慮する必要があるか。

病歴や感染症の有無やその可能性が重要である。
ドナーの疾患/感染症が配偶子作製を介して伝達し
うるかどうかを合わせて検討する。

ドナースクリーニング

- ・適格性に関わる感染症などの検討
 - ・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、パルボウイルスB19感染症の問診及び検査
 - ・サイトメガロウイルス、EBウイルス、西ナイルウイルス検査(必要に応じて)
- ・既往歴、問診等より適格性を判断
 - ・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、内分泌疾患
 - ・膠原病、血液疾患、肝疾患
 - ・認知症(伝達性海綿状脳症及びその疑いのあるもの)
 - ・輸血、移植医療を受けた経験の有無等も加味する

通常の治療の過程で男女ともHBV,HCV,HIV,梅毒についての血清学的検査が行われている。

妊婦に関してはクラミジア、HTLV-Iが行われる。

他の疾患に関しても多くは問診の過程で有無は判断されうる。

しかしながら、細胞移植医療を意識した検査・問診ではない

敗血症、悪性腫瘍、内分泌疾患、膠原病、認知症等は問診の過程で把握される。明示的に「なし」の記録がない場合でも、不妊治療が実施されているならば、その可能性を排除できるか。胚作製を通じて樹立された細胞株に影響を及ぼすか。

体外受精操作を通じて、胚に伝達/維持されうる疾患/感染症はどのようなものがあり得るか、検討の必要がある。

培養条件下でウイルス等が維持される可能性。
(採取した組織/細胞を短時間のうちに移植する場合と状況が異なる)

受精卵の作製/保存過程の管理

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)

4) 配偶子の採取・体外受精胚の作製及び保存・運搬

1 採取者及び採取医療機関等の適格性

ヒト体外受精胚を作製して使用する場合には雄性及び雌性配偶子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 受精胚の作製方法の妥当性

体外受精胚の作製方法を示し、これらが科学的及び倫理的に適切に選択され、かつ適切な手続きが行われたものであることを明らかにすること。配偶子の採取方法、及び体外受精の方法については、用いられる器具及び薬剤、微生物汚染防止、取り違え やクロスコンタミネーション防止のための方策等を具体的に示すこと。

3 ドナーに対する説明及び同意

配偶子のドナーに対する説明及び同意の内容を、臨床利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

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

6 保存方法及び取り違え防止策

採取した配偶子、もしくは作製した体外受精胚を一定期間保存する必要がある場合には、保存条件や保存期間及びその設定の妥当性について明らかにすること。また、取り違えを避けるための手段や手順等については、平成 21 年 2 月 20 日付け雇児母発 第 0220001 号通知厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課長通知「不妊治療における安全管理の徹底について」等を参考にし、その内容を具体的に説明すること。

7, 8略

配偶子の採取/受精卵の作製は医療行為の一環として行われ、臨床研究として行われるわけでない。

ES細胞作製に用いられる胚は相当程度過去に作製されたものである。

配偶子の採取などは医療行為であり臨床研究等のプロトコールとして2-6の記述が必要か？患者への治療に関する説明資料や病院内の規則等に記載されているものでよいか。

試薬、検体等の保存は基本的に行われぬ。
(ロットなどは記録されていない可能性がある)

手技は常に改良、患者の状況に応じて変化しうる。

ヒト幹3章1-5 手術等で摘出されたヒト幹細胞又はヒト分化細胞を利用する場合
手術等で摘出されたヒト幹細胞又はヒト分化細胞を利用する場合には、1から4までに従って、手術を受けた患者又は代諾者からインフォームド・コンセントを受けなければならない。なお、ヒト幹細胞又はヒト分化細胞の採取の目的を優先して、手術等の治療方針を変更してはならない。

指針の枠外で作製された細胞株（既存/海外株など）の場合

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)第2章第1の3-(2) なお、輸入された ES 細胞株や古くに樹立された ES 細胞株等から樹立された分化細胞株においても満たすべき要件は同様である。しかし、その樹立・維持の過程が不明で「生物由来原料基準」の規定などを満たさない原材料が使用された履歴もしくは疑いのある場合が想定される。そのような細胞株の使用の妥当性については、製品ごとに個別の審査・評価となるので医薬品医療機器総合機構と相談すること。(注:使用しようとするヒト ES 細胞由来分化細胞株に関して感染症関連の情報が十分得られない場合は、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、検査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。ドナーの遺伝的特徴が得られない場合は、ES 細胞由来分化細胞株自体の遺伝情報から遺伝的疾患関連因子の有無に関する解析が必要となることがある。

バンク化の時点での無菌試験、HIV等のウイルス否定試験により代替が可能である。

培養にマウスフィーダー細胞や由来が明らかでない動物由来成分などの使用履歴がある(疑われる)場合はバンク化の時点で適切な残存否定試験を行う。(マウス細胞の存在否定、ウシ/ブタ/齧歯類ウイルスの否定、プリオンタンパクの否定、など)

これらの点に留意してバンク化を行うことにより一定の安全性は担保されるが、想定されるリスクについて被験者への十分な説明のもと同意を得る必要がある。

原材料/中間体としてのヒトES細胞の安全性の確保に関わる要因

感染性因子

- ・ドナー由来
- ・培養工程由来

細胞株の遺伝的特性

- ・ドナー胚由来
- ・樹立培養工程でのゲノム変異由来

細胞株の遺伝的背景/変異の移植組織の 機能/増殖性への影響

ドナーの遺伝的特性

他の幹細胞の臨床利用と異なり、余剰胚とドナーは遺伝的には親子の関係にある。

ドナーセレクションにおいて考慮されるべき(顕在化した)遺伝的特徴

遺伝性疾患の有無等が想定されるが、ドナーと余剰胚の遺伝的関連性から、考慮すべき事例が明らかにされていることが望ましい。

治療を受けているというドナーの状況から、ES細胞の臨床利用において問題になりうる遺伝的特徴が存在する可能性は低い。

一般論としては、情報が多い方が好ましいが、
状況に応じた判断が必要

連結情報の有用性

—安全性の観点から

連結情報が必要とされるのは大きく以下の2つに分類される。

(1) ES細胞の解析/臨床研究での結果 → ドナーへの情報提供

(2) ドナーにおける遅発性疾患などの情報 → 臨床利用での安全性への影響評価

いずれの場合も連結情報が必須となるような事例が発生する可能性はきわめて低く、被験者への十分な説明と同意をうることで良いと思われる。

もっとも可能性の高いケースとして、ES細胞のゲノム解析により遺伝性疾患の原因遺伝子が見いだされる場合が考えられる。しかしながらこれは基礎的研究に置いても起こりうる事が想定されたうえでドナーに通知しないことが適当であると判断されている。(ES指針)

未知の感染症のリスクコントロールとしての連結情報の有用性

Case1: ドナーが(提供以前に)保有していた感染症を発症



受精卵を經由しES細胞に保持される



被験者に感染かつ第三者へ伝搬

Case2: 被験者が移植組織に由来する重篤かつ伝染性の高い感染症を発症



ドナーの追跡によるドナーの保護と第三者への伝搬防止

いずれもドナーでの発症や被験者での発症が相当長期間後におこる場合に限定される。

- ・胚作成から提供まで通常2年程度またはそれ以上が経過している。
- ・被験者に移植直後に発症する場合は小規模の感染にとどまる。

指針外で作製された細胞株について連結情報は不可欠とは言えない
ドナーへの説明と同意により利用も可能とすべきである。

原材料としての細胞の生物学的構造・機能の特徴例

例えば以下の指標から適宜選択その理由を示す。実際に用いる重要細胞特性指標を定める。

- 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(同種)
- その他適切な遺伝型又は表現型
- 網羅的解析

1) CGHゲノム、2) エピジェネティクス(DNAメチル化)、3) RNA、4) 糖鎖に関してアレイやチップ、糖鎖プロファイリング法等を用いた解析が有用な場合もある

MCB/WCBでの特性に関する基準/規格

出荷後、使用医療機関での増殖を考慮して、WCBから適当な期間増殖ののちの結果が示される。

- ・形態

 - 有資格者による判定??

- ・増殖速度

 - PDL等

- ・遺伝子発現

 - OCT,NANOGなど未分化特異的遺伝子の高発現

 - 分化に特徴的な遺伝子の低発現

- ・細胞表面抗原

 - ALP、SSEA-3,4、TRA1-60, etc.

- ・分化能

 - テラトーマ形成、胚様体形成による三胚葉形成

- ・ゲノム情報

 - 核型、HLA、血液型など

- ・
- ・

MCB/WCB,使用機関での増殖などの間での細胞の同等性を一定レベルで保証するために必要な基準値が示されていることが望ましい。

MCB/WCBでの安全性に関わる基準/規格

基本的にMCBで検査され、その後のプロセス管理によりWCB/利用機関での検査の必要性を判断する。

無菌試験/マイコプラズマ否定試験

ウイルス否定試験

HIV,HBV,HCV等

エンドトキシン

抗生物質？

遺伝子解析

・核型、SNP、CNV、DNAメチル化など

ゲノム解析

ES細胞の場合は他の幹細胞、iPS細胞などと異なり、真のゲノム情報が存在しない。そのため遺伝的変異に関する情報は樹立初期のゲノムとの差、の形で表現されることに、他の幹細胞との違いがある。

解析の対象としては以下の様なものが想定される。

- (1) 核型
- (2) SNP
- (3) CNV
- (4) エピゲノム (DNAメチル化、ヒストン修飾など)
- (5) 遺伝子発現プロファイル

- ・核型解析によりES/iPS細胞において比較的高頻度で見られる変異が明らかにされている。

これらは培養の過程で偶然発生した変異のうちで未分化細胞の増殖などに有利な性質を持つ変異である場合、継代の過程で集団のなかで優位になったものと考えられる。従って未分化維持条件においてはより高い増殖性を持つことが考えられるが、高い増殖性が分化誘導後の機能細胞においてその増殖性などに影響するという根拠はない。

ガンなどの疾患に関連した染色体異常と相同な変異はあり得る。

(XY→XXYは報告があるが生体機能に重大な欠陥は知られていない?)

- ・マイクロアレイ解析によりSNPやCNV変異が長期培養後に見いだされる。

共通性の高いものは20番染色体の一部領域のみであり、この領域の疾患等の関連は不明である。

現時点でES細胞の培養過程で生じるこれらのゲノム変異が臨床利用においてリスクになるという明確なデータは存在しない。

・可能性として例えば、ガン抑制遺伝子の両アレルでの不活化方のSNPなどの変異や欠損、重篤な疾患に関連した染色体転座 (bcr/abl t(9:22)など) が見いだされた場合は排除されるべきと言う考え方もありうる。しかし移植に用いる細胞種によっては影響を受けないことが予想されることもありうるため、一律の規制は困難である。

一方で、核型の安定性は用いる培養システムの良い評価系とされている。(長期間核型を安定に維持出来る培養系はES細胞を"正常"に保つ能力が高いと推定されている)

population 中の少数の細胞(検出できない)のSNPやCNV変異が移植組織の造腫瘍性に影響する可能性は排除しない。

動物実験や臨床研究を進める過程で、ゲノムワイドでの遺伝子配列情報の持つ意味があきらかにされていく関係にある。

例えば、バンク化の時点での全ゲノム情報は有用であるが、これを一律に求めることはコスト面からも今のところ推奨されるべきでない。

ゲノムワイドのエピゲノム情報、遺伝子発現プロファイルは安全性という観点からは現時点では評価が困難である。

樹立培養工程での感染性因子混入の制御

樹立/培養(特に分化誘導工程)の方法は多様であり、培養等に用いられる生物由来成分が「生物由来原料基準」に適合していることの確認が得られない場合、また医薬品でなく試薬レベルの管理がなされているものについてトレーサビリティが十分に担保されないケースが想定される。

培地と培養基質の問題

一般的な認識として、現時点ではMEFフィーダー上でKSR+bFGF含有培養液で培養するのが最も安定的に維持出来ると考えられている。???

・培地

基礎培地: DMEM, DMED/F-12が汎用されている

KO-DMEM(LifeTech)DMEM,は成分不詳

・血清/血清由来成分: ウシアルブミン、トランスフェリン etc.

その他の成分:

増殖因子: bFGF, TGFb, Activin, insulin etc.

多くは大腸菌を用いたヒトrecombinantタンパクが試薬として製造されている。
医療利用の観点からのcertificateは不十分である可能性がある。

脂質: 多くは合成品だと思われるが確認が必要

・培養基質

フィーダー細胞

細胞株の樹立初期のみ用いる場合と継続的に使用する場合があり得る。継続使用の場合は最終製品で、一時的使用の場合はバンク化の時点で残存否定試験を行うなどが必要。

マウス由来

細胞株 : STO, 3T3

初代培養細胞 : embryonic fibroblast

ヒト由来

初代培養細胞 (有限増殖細胞) : fibroblast from skin, cord, placenta etc.

細胞株 : ??

ヒト、マウスいずれに由来するものの方が好ましいか？

ヒトの場合はドナースクリーニングを行うことで一定の安全性は担保される。

- ・マトリゲル

マウスガン細胞由来マトリックス。

マウス由来ウイルス否定試験により一定の安全性が確保される。

カンマ線照射も可能とされている。

- ・ラミニン、ファイブロネクチン、ビトロネクチン

ヒト胎盤や血清から抽出される。

- ・コラーゲン

主にブタ由来。医療用として製造されているものがある。

- ・組換えタンパク質

組換えラミニン: HEK293, CHOなどの動物培養細胞を用いた組換えタンパク

- ・合成基質

・細胞解離

タンパク分解酵素処理

トリプシン:ブタ由来。類似のプロテアーゼとして、海産無脊椎動物由来のトリプシン様プロテアーゼや組換えトリプシンがある。

コラゲナーゼ:細菌由来。cGMP準拠で製造。

ディスパーゼ:細菌由来。cGMP準拠で製造。

非酵素的解離

細胞接着阻害試薬(EDTAその他)

造腫瘍性(テラトーマ形成能)

ES細胞のテラトーマ形成能は分化能の指標であり、有効性/安全性の検査にはならない。

特定の組織の形成が不良であっても、それ自体が臨床利用に適さない訳ではない。試験は行われるべきであるが、特性を記述する上での1項目であり、規格ではない。

安全性に関わる項目としての造腫瘍性は最終製品に動物実験などにより検証される。

・保存及び分配

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)

第2章 第1-4 ヒト ES 細胞株及びヒト ES 細胞由来分化細胞株の保存及び運搬方法

ヒト ES 細胞株や製造に使用される場合のヒト ES 細胞由来分化細胞株について、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。樹立した細胞株をもとに別に細胞バンクを構築し、医薬品等製造用細胞基材として用いる場合も、当該バンクの段階で詳細な検討を行うことでよい。

また、ヒト ES 細胞株やヒト ES 細胞由来分化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。

基本的には凍結保存によるバンク化を前提とする

バンクにおける細胞の保存

- ・ES細胞の生存率、分化能に影響を有害な影響を及ぼさない凍結保存法の選択
凍結培地成分についてもその安全性等を十分に検討する
動物由来成分、DMSO、etc.
- ・必要に応じて、保存温度の管理・記録
液体窒素保存が想定される。気相式が好ましいが、液相保存の場合はその必要性や汚染防止方法について記載
- ・入庫/出庫管理の方法、取り違えの防止方法
- ・有効期限の設定とその理由
MCBには有効期限を設定しない(WCBの作成MCBの更新時に細胞のQCを行うため)。WCBでも数年以上の保存が想定されるが、事前にデータを示すことは困難。

分配(輸送)について

- ・バンク化の時点で品質検査が行われるため、出荷に当たり検疫等は必要がない。
- ・配送の際には、温度管理等製品の品質を保つために必要な措置を講ずること。
凍結保存容器での輸送が想定されるが、生細胞の常温輸送を行う場合などはその有効性についての試験等が必要となる。
- ・出荷/受け取りについて追跡/確認方法を明らかにすること。
- ・事故時の対応について明らかにすること。
感染性は事実上ないものと考えて良いが、輸送容器などについては一般的な培養細胞と同等又はそれ以上の防護措置が望まれる。

追記

1314号 別添1第4章

第3 健康管理

1 製造業者は、製造従事者に対し、定期健康診断を行い、細胞・組織利用医薬品等を取り扱うのに不適當な者を製造作業に従事させないこと。

2 製造業者は、細胞・組織利用医薬品等の製造に当たって、あらかじめ作業区域内における感染の予防及び治療の方策について検討すること。

記録

製造工程の記録の保存期間

ドナー情報の保存やドナーの追跡の推奨期間が設定されるか？