

対面助言実施日 2019年6月17日（月）

相 談 者 京都大学iPS細胞研究所

相談内容

相談者は、健康成人から採取したヒト末梢血又はヒト臍帯血から作製した高頻度 HLA ホモ接合体ドナー由来の iPS 細胞ストックを作製している。相談者は、iPS 細胞セカンダリーセルストック（以下、「SCS」）を分化機関に提供しているが、分化機関より、再生医療等製品の出発基材として使用する iPS 細胞マスターセルバンク（以下、「MCB」）までの製造を相談者で行ってほしいとの要望を受けており、SCS を拡大培養して作製した MCB を分化機関へ提供することを検討している。

SCSからMCBを作製する工程で使用する材料は、SCSの作製までに使用する材料から追加はなく、原料等のうちヒト・動物由来成分は「生物由来原料基準」（平成15年厚生労働省告示第210号）に適合している。したがって、SCSとMCBのウイルスリスクには差がないと考えており、SCSにおいてICH-Q5Aに準拠したウイルス試験を実施していれば、MCBに対して同試験を実施しなくても、ウイルスリスクの観点からはSCS及びMCBのいずれも再生医療等製品の原料として提供することは可能と考えている。以上の考えについて、機構の意見を聞きたい。

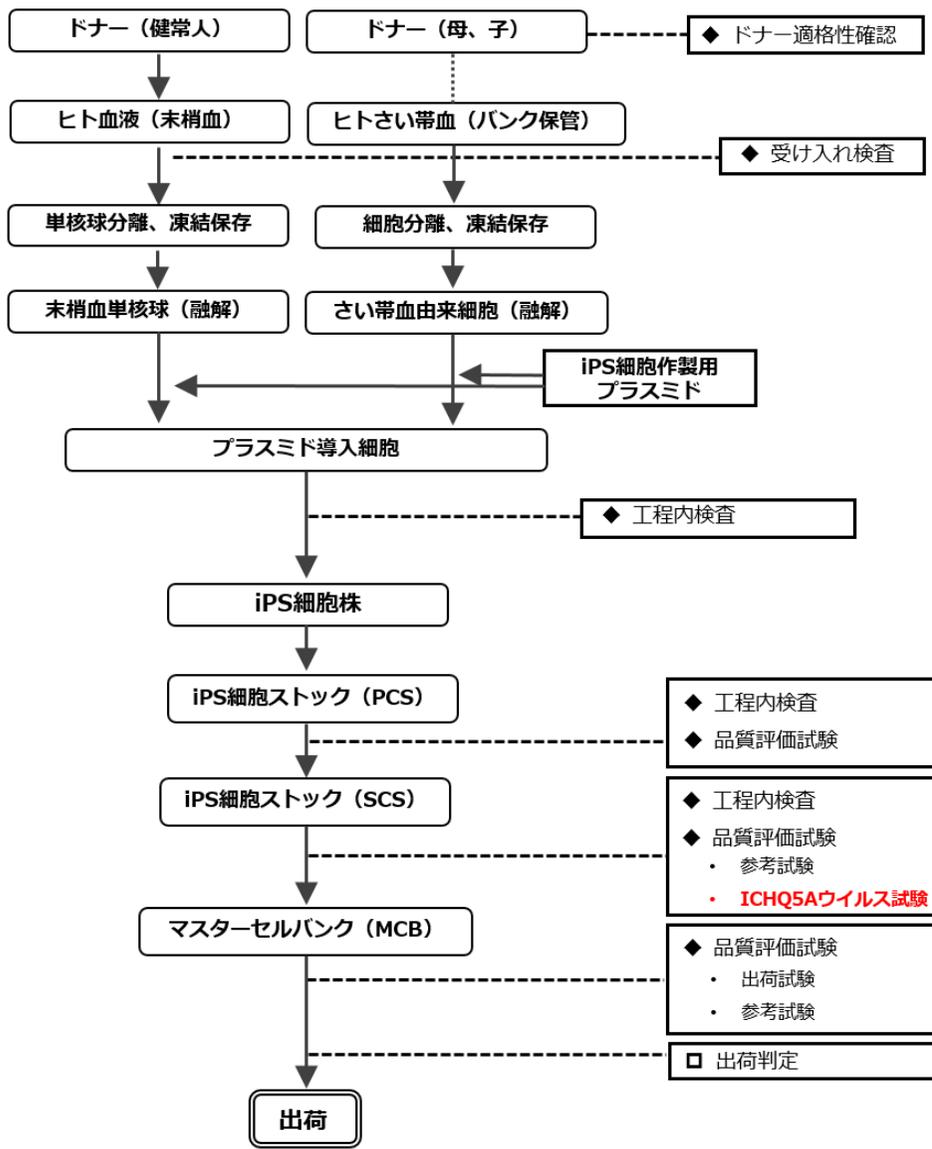
PMDAの意見

機構は、SCS及びMCBのウイルスリスクに差がないとする相談者の考えは**受入れ可能**と考える。また、SCS及びMCBの製造工程に使用される原料等の生物由来原料基準への適合性が確認されていることから、SCS及びMCBを再生医療等製品の原料として提供することは可能との相談者の考えも受入れ可能である。なお、再生医療等製品の製造者となるSCS又はMCBの使用者は、再生医療等製品の製造工程全体を通じたウイルスリスク管理の適切性を説明する必要があるため、SCS及びMCBの提供時には、ウイルス試験に使用した検体を含め、相談者が実施した全てのウイルス試験の試験結果を使用者に提供する必要がある。

財団注：相談記録を部分的に要約したものであり、当財団の相談品目以外の品目に一律に一般化できるものではないことにご留意ください。

iPS細胞ストックのMCBの製造フロー

- 問診
- 採血
- ① 単核球細胞分離工程
- ② 単核球細胞培養工程
- ③ 遺伝子導入
(エレクトロポレーション)
- ④ iPS細胞の樹立・単離・株化工程
・ iPS細胞の選抜
- ⑤ iPS細胞PCS製造工程
・ iPS細胞の拡大培養、凍結保管
- ⑥ iPS細胞SCS製造工程
・ iPS細胞の拡大培養、凍結保管
- ⑦ iPS細胞MCB製造工程
・ iPS細胞の拡大培養、凍結保管



SCS/MCBで実施する出荷試験項目

<SCS>

| 試験項目 | 試験検体 | 試験方法 | 規格 |
|--------|------------------|-----------------------------|--|
| 汚染検査 | 無菌試験※ | SCSを融解し回収した細胞懸濁液 | 日局（直接法） 陰性 |
| | マイコプラズマ 否定試験※ | SCSを融解し回収した細胞懸濁液 | 日局参考情報（培養法、DNA染色 法） 陰性 |
| | エンドトキシン 試験※ | SCSを融解し回収した細胞の上清 | 日局（比濁法） ≤ 5EU/mL |
| | ウイルス検査※ | 凍結後のバイアルを融解し回収した 細胞および上清 | ICHQ5A準拠※※ 陰性 |
| HLA解析※ | SCSから調整したDNA | PCR-SBT法 | ・HLA-A、B、DRについて各々1種類であること ・ドナー細胞と一致していること |
| STR解析※ | SCSから調整したDNA | PCR・キャピラリー電気泳動法 | STRのパターンがドナー細胞と一致していること |
| 形態評価 | SCS作製直前の細胞 | 顕微鏡観察 | ヒトES細胞様であること |

<MCB>

| 試験項目 | 試験検体 | 試験方法 | 規格 |
|--------|-------------------|-------------------------------|---|
| 汚染検査 | 無菌試験 | 凍結後のバイアルを融解し回収した細 胞懸濁液 | バクテアラート法 陰性 |
| | マイコプラズマ 否定試験 | 凍結後のバイアルを融解し回収した細 胞懸濁液 | PCR法 陰性 |
| | エンドトキシン 試験 | 凍結後のバイアルを融解し回収した細 胞の培養上清 | カイネティック比濁法 ≤ 5EU/mL |
| | ウイルス検査 | 凍結後のバイアルを融解し回収した細 胞および培養上清 | PCR法（HBV、HCV、HIV、HTLV、 Parvovirus B19） 陰性 |
| HLA解析※ | 凍結後のバイアルから調整したDNA | PCR-SBT法 | ・HLA-A、B、DRについて各々1種類であること ・ドナー細胞と一致していること |
| STR解析※ | 凍結後のバイアルから調整したDNA | PCR・キャピラリー電気泳動法 | STRのパターンがドナー細胞と一致していること |

※外部委託試験

SCSで実施予定のウイルス試験項目

| 試験項目 | 試験方法 | 規格 |
|--------------------------|--|-------------------|
| In vitro試験 | 指標細胞株を用いて外来性ウイルスの感染性を確認する | 陰性 |
| In vivo試験 | 検体の細胞破碎液を乳のみマウス、モルモット、鶏卵に接種しウイルスの存在を確認する。 | 陰性 |
| ウイルス様粒子確認試験 (電子顕微鏡試験) | 電子顕微鏡観察 | 感染性のウイルス様粒子の存在は否定 |
| 逆転写酵素活性の確認試験 | 逆転写反応産物をPCR法で確認する。 PBRT(PCR-based reverse Transcriptase)法 | 陰性 |
| ヒト由来細胞特異的試験 | NAT試験によりヒト特異的ウイルスの存在を確認する | ウイルスは検出されない |
| 感染性試験 | S+L-フォーカスアッセイにより、感染性レトロウイルスの有無を調べる。 | 感染性レトロウイルスは不検出 |

SCS/MCBで実施する参考試験項目

| 試験項目 | 試験方法 | 留意点等 |
|------------------------------------|---|--|
| 核型解析 | Conventional Giemsa (50細胞) G-band (20細胞) | 核型の異常 |
| CNV検出 | SNPアレイ解析および全ゲノム解析 | COSMIC Cancer Gene Census/Shibata list に登録されている遺伝子 |
| SNV/Indel検出 | 全エクソーム解析および全ゲノム解析 | 同上 |
| クローン構造解析 | 全ゲノム解析 | iPS細胞の均一性を確認 |
| プラスミド残存 ・凍結ストック ・培養初期 (+3継代) | qPCR | 導入Plasmidの残存コピー数 |
| 未分化マーカーの発現 | マイクロアレイ フローサイトメトリー | PO5F1、NANOGの発現量 TRA-1-60、SSEA4、TRA-2-49の陽性率 |
| 解凍後の生細胞数および生存率 | セルカウント | 情報収集 |
| 解凍後の増殖細胞数 | セルカウント | 情報収集 |
| 増殖速度 (インフォメーション用) | セルカウント | インフォメーション用のため情報収集 |
| 分化能 (インフォメーション用) ★ | 神経分化 (SFEBq法) フローサイトメトリーでNCAMの陽性率を確認 | インフォメーション用のため情報収集 |
| 分化抵抗性マーカーの発現★ | マイクロアレイ | C4orf51、ABHD12B、HHLA1の発現量 |

★データ取得のため実施 (報告書には記載しない)