

がん免疫療法開発のガイダンス 2016
～がん免疫療法に用いる細胞製品の
品質、非臨床試験の考え方～
(案)

2016年7月19日案

はじめに

最近の免疫チェックポイント阻害薬、遺伝子改変リンパ球の輸注療法等における明確な臨床効果は、がん免疫療法に対する大きな期待と関心を集めている。一方、その顕著な臨床効果は副作用の出現可能性と表裏一体であることも明らかになりつつあり、今後はより有効で、かつ安全性の高い治療法の開発戦略が必須になる。同時に国内では新たに制定された医薬品医療機器法の中で再生医療等製品と分類されるヒト細胞加工製品の利用が様々な医療分野で拡大しており、がん免疫療法の分野でもヒト細胞加工製品（以下、「細胞製品」）を利用した治療が今後さらに拡大することが予想される。

がん免疫療法に用いる細胞製品には、患者体内における直接的な抗腫瘍免疫応答を誘導する（抗原特異的又は抗原非特異的）目的で投与される $\alpha\beta$ -T 細胞、 $\gamma\delta$ -T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞等のエフェクター細胞（以下、「エフェクター細胞」）と、患者体内における抗腫瘍免疫応答を賦活する目的（ワクチン）で投与される樹状細胞等の抗原提示細胞、又は患者体内の免疫環境や腫瘍局所の環境を改変する目的で投与される間葉系幹細胞等の非エフェクター細胞（以下、「非エフェクター細胞」）がある。

その原料又はその原材料としては、自己細胞、同種細胞、体性幹細胞、iPS 細胞、ES 細胞等様々な場合があり、製造方法には、培養を行う場合、非細胞成分と組み合わせる場合、遺伝子改変を加える場合、様々な処理により細胞を初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合等がある。それぞれの原料等や製造方法に起因する特有の課題に対する細胞製品の品質及び安全性の確保に関しては参照すべき指針に従う必要がある。

今般、急速に発展するがん免疫分野において蓄積された情報と、細胞製品の利用機会の増大という現況に鑑み、この分野の今後の発展の方向性も踏まえて、がん免疫療法に用いる細胞製品の開発に際しての留意点を抽出・整理するとともに、レギュラトリーサイエンスの視点と十分に調和が図られた効率的な開発のための方法論が望まれる。本ガイダンスは、がんに対する免疫療法を対象として細胞製品を開発する際に特に留意すべき点とがん免疫療法としての特殊性に重点をおいて細胞製品に求められる基本的要件の考え方を中心に、がん免疫療法における細胞製品の品質、安全性及び非臨床有効性に関する基本的な要

件についての考え方を述べるものである。また、本ガイダンスは細胞製品ごとに異なる特性に応じ合理的かつ実効性の高い運用がなされる必要がある。

細胞製品の品質及び安全性の確保に関して参照すべき通知として以下のものがあげられる。

- 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日付け薬食発第0208003号）
- 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日付け薬食発第0912006号）
- ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について（平成24年9月7日付け薬食発0907第2号）
- 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ついて（平成24年9月7日付け薬食発0907第3号）
- 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ついて（平成24年9月7日付け薬食発0907第4号）
- 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（平成24年9月7日付け薬食発0907第5号）
- ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について（平成24年9月7日付け薬食発0907第6号）
- 生物由来原料基準（平成26年9月26日付け厚生労働省告示第375号）

また、遺伝子改変を行った場合には、参照すべき通知として以下のものがあげられる。

- 遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保について（平成25年7月1日付け薬食審査発0701第4号）
- ICH 見解「ウイルスとベクターの排出に関する基本的な考え方」について（平成27年6月23日付け事務連絡）

目次

第1章 総則

第1 目的

第2 定義

第2章 製造及び品質管理

第1 製造及び品質管理の考え方

第2 ドナーに関する事項

第3 製造方法に関する事項

第4 最終製品の品質管理に関する事項

1) エフェクター細胞製品

2) 非エフェクター細胞製品

第5 運搬方法

第3章 非臨床安全性試験

第1 非臨床安全性試験の考え方

1) 毒性の評価の考え方

2) 動物種を選択と免疫不全動物の特殊性

第2 一般毒性試験

第3 造腫瘍性試験

第4章 効力又は性能を裏付ける試験

第1 効力又は性能を裏付ける試験の考え方

第2 *in vitro* 試験と *in vivo* 試験

1) *in vitro* 試験

2) *in vivo* 試験

第5章 体内動態に関する試験

第1 体内動態に関する試験の考え方

第2 試験方法

第 6 章 臨床試験

参考

引用文献

第1章 総則

第1 目的

本ガイドランスは、がんに対する免疫療法として、ヒト由来細胞を加工した細胞製品の品質、非臨床安全性、効力又は性能を裏付け及び体内動態に関する基本的な要件についての考え方を述べるものである。

第2 定義

1. ヒト由来細胞を加工した「細胞製品」とは、ヒト（自己又は同種）由来細胞を加工した製品、ヒト（自己又は同種）体性幹細胞、ヒト（自己又は同種）iPS（様）細胞、ヒトES細胞加工製品等を含むものをいう。
2. 細胞の「加工」とは、疾患の治療や組織の修復又は再建を目的として、細胞の人為的な増殖・分化、細胞の株化、細胞の活性化等を目的とした薬剤処理、生物学的特性改変、非細胞成分との組合せ又は遺伝子改変等を施すことをいう。細胞の分離、特定細胞の単離、抗生物質による処理、洗浄、ガンマ線等による滅菌、冷凍、解凍等は加工とみなさない。
3. 「製造」とは、加工に加え、細胞の分離、特定細胞の単離、抗生物質による処理、洗浄、ガンマ線等による滅菌、冷凍、解凍等、当該細胞の本来の性質を改変しない操作を含む行為であり、最終製品の品質を確保する上で管理が求められる原料の受入から最終製品であるヒト細胞製品を出荷するまでに行う行為をいう。
4. 「ドナー」とは、「細胞製品」の原材料となる細胞・組織を提供するヒトをいう。
5. 「表現型」とは、ある一定の環境条件のもとで、ある遺伝子によって表現される形態学的及び生理学的な性質をいう。
6. 「ベクター」とは、目的遺伝子を宿主細胞に導入するときに使われる運搬体をいう。ただし、組換えウイルスを使用する場合には導入遺伝子を含めてウイルスベクターという。目的遺伝子を含むプラスミドを直接細胞に導入する場合にはプラスミドDNAをベクターという。

7. 「ウイルスベクター」とは、ベクターとして用いられる組換えウイルスであって、野生型ウイルスゲノムの代わりに目的遺伝子を組み込んだ組換えウイルスゲノムがウイルス粒子内にパッケージされているものをいう。
8. *in vitro*試験とは、ヒト又は動物の生体外において実施する試験のことをいい、*in vivo*試験とは、動物の生体内に細胞製品を投与して実施する試験のことをいう。

第2章 製造及び品質管理

第1 製造及び品質管理の考え方

がん免疫療法に用いる細胞製品を含む再生医療等製品は、その使用目的や特性、製造規模やリスク対象の規模を踏まえ、その時点における最新の知見等を反映した合理的な根拠等に基づいた製造方法及び品質管理が求められる。

特に、原料となる細胞等がドナーの感染により汚染されている可能性があることや、滅菌あるいはウイルスの不活化/除去等が不可能であることから、従来の医薬品と同様の方法論による無菌性の担保は困難であることが多い。そのため、それぞれの細胞製品の特性や製造方法に応じて、最終製品に加え工程内管理試験等により製品の無菌性を慎重に検討する必要がある。

「はじめに」の項に提示した細胞製品の品質及び安全性の確保に関して参照すべき通知を踏まえ、がん免疫療法に用いる細胞製品の製造方法及び品質管理に関する基本的な要件及び考え方を示す。

第2 ドナーに関する事項

原料等として自己細胞を用いる場合は、取り違い又は交差汚染を除き、自己細胞であることから感染症伝播リスクは想定されないため、感染症検査の実施は製造従事者及び医療従事者に対する安全性の確保が主な目的となる等の細胞製品ごとの固有のリスクを踏まえ、目的に応じた検査項目及び管理基準を設定する必要がある。同種移植後の移植ドナー由来の同種細胞を用いる場合も、感染症リスクに関しては、自己細胞を用いる場合と同様の考え方が可能である。

第3 製造方法に関する事項

特に製造に係る経験や知見に乏しい開発の初期段階において、有効性及び安全性に関係する重要な品質特性を特定することは難しく、例えば、原料等となる細胞において有効性に影響を与える可能性が高い細胞数等の基準値を一律に設けて管理することが、必ずしも適切でない場合も想定される。その際には、例えば、増殖を伴う製造を行う場合の製造開始時点の細胞数について、治験の

初期段階の治験製品の管理においては、非臨床試験の成績等を踏まえ有効性が期待できる下限値を設定する、一方で、安全性の確認が可能な範囲において調整を行えるようにするなど柔軟な対応が求められる。ただし、開発の相が進むに応じ、前相で確認された安全性が確保できるような管理値を設定していくことが求められる。

一般的に、通常の方法により採取された末梢血から微生物、マイコプラズマ等が検出される可能性は少ないと考えられるが、摘出した腫瘍組織等を原材料として用いる場合は、原材料の汚染のリスクに応じて原材料においても試験を実施し、製造管理として微生物、マイコプラズマに対し有効な抗生物質を用いるか否かを判断することは有用である。

第4 最終製品の品質管理に関する事項

がん免疫療法に用いる細胞製品で共通して設定する必要がある試験としては、細胞数並びに生存率試験、確認試験、細胞の純度試験、製造工程由来不純物試験、無菌試験及びマイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験、ウイルス否定試験、効力試験、力価試験がある。規格及び試験方法の設定においては、細胞製品ごとの特性に応じた設定（参考1）が必要である。

無菌医薬品における無菌試験において、当該医薬品に増殖阻害因子を含む場合は、試験サンプルから微生物等の増殖阻害因子が無菌試験に及ぼす影響を除いた無菌試験方法にて一般的に実施される。細胞製品の製造に際して微生物等の増殖抑制を目的として抗生物質を用いる場合は、無菌試験結果に及ぼす影響に留意した上で、適切な試験方法及び規格を設定する必要がある。日本薬局方に定める無菌試験法だけでなく、微生物迅速試験法を応用した試験方法等を設定することも可能である。

また、ウイルス否定試験の対象ウイルスについては、製造に伴うウイルスの増幅リスクに留意する必要がある。そのリスク等が明らかとなっていない場合は、マルチアッセイによる網羅的な試験の設定は可能であるが、対象となる患者に対して、同意を得る必要がある。

1) エフェクター細胞製品

エフェクター細胞製品における試験方法として、がん免疫療法に用いる細胞

製品で共通して設定する必要がある試験に加え、サイトカイン産生能試験等の効力試験及び力価試験を設定する必要がある。さらに、遺伝子改変 T 細胞製品においては、増殖性ウイルス (Replication Competent Virus : RCV) 試験、インターロイキン (Interleukin (以下、「IL」)) -2 依存性増殖試験を設定する必要がある。導入遺伝子コピー数試験、クローナリティー試験、テトラマー解析試験、ベクター完全性試験等の設定について検討する必要がある。なお、活性化リンパ球療法に用いられる自己由来のエフェクター細胞における効力試験及び力価試験の設定は、標的細胞の設定が難しく、試験方法の妥当性に限界があることを踏まえて、合理的な試験方法を設定することが望ましい。

2) 非エフェクター細胞製品

非エフェクター細胞製品における試験方法として、がん免疫療法に用いる細胞製品で共通して設定する必要がある試験に加え、アロ混合リンパ球反応試験等による細胞増殖試験、サイトカイン産生能試験等の効力試験及び力価試験を設定する必要がある。なお、効力試験及び力価試験の設定は、標的細胞の設定が難しく、試験方法の妥当性に限界があること、及び技術的な観点から試験に用いる最終製品のサンプルの確保に限界があることを踏まえて、合理的な試験方法を設定することが望ましい。

第5 運搬方法

原料となる血液等を運搬する場合は、品質に影響を及ぼす可能性があるため、温度、期間、容器、運搬手段等の運搬方法について管理する必要がある。製造に自己血清を用いる場合は、用いる細胞だけでなく、血清の品質も同様に管理する必要がある。

細胞製品を運搬する場合は、細胞の凍結保存、運搬、実施施設での解凍、輸注等により品質に影響を及ぼす可能性がある。運搬方法の管理に加えて、輸注時の細胞生存率を評価する必要があるが、検体とする製品用に出荷用の細胞製品とは別の包装 (生存率算定用テストサンプル) を用いることにより、輸注時の細胞製品に含まれる細胞数を正確に評価することが可能である。なお、非臨床試験において、細胞傷害作用に用量依存性が認められる場合は、用量依存性を担保するため冷凍保存前の細胞数を過量に充填することで、細胞製品の機能

的・量的均一性に代えて良い。

第3章 非臨床安全性試験

第1 非臨床安全性試験の考え方

1) 毒性の評価の考え方

がん免疫療法に用いる細胞製品が誘導する特異的免疫応答に伴う毒性、意図しない受容体への結合等に基づく毒性について、動物を用いた評価は、種差の影響から困難である場合が多い。しかしながら、エフェクター細胞のうち、受容体遺伝子改変 T 細胞製品は、がん細胞を標的とする細胞傷害性を人為的に付与したものであり、受容体の標的となる分子又はそれと構造的に類似した分子が生命維持において重要な組織や細胞に発現していた場合に重篤な毒性が生じる可能性がある。そのため、新たに自己細胞への応答性（自己反応性）を獲得していないこと（例えば、これらに対する反応性インターフェロン（Interferon : IFN）- γ 産生が無いこと）を評価（参考2）する必要がある。また、今後開発される T 細胞受容体（T cell receptor、以下、「TCR」）遺伝子導入 T 細胞（以下、「TCR-T 細胞」）製品については、内因性 TCR- α/β 遺伝子発現を抑制するように対応すべきである（参考3）。なお、キメラ型抗原受容体（Chimeric Antigen Receptor、以下、「CAR」）遺伝子導入 T 細胞（以下、「CAR-T 細胞」）製品の場合は、有効性と表裏一体である有害事象について、*in vitro* 試験においてリスクを予測することは理論的に不合理であるため、*in vitro* 試験における毒性の評価は必要ない（参考2）。

2) 動物種の選択と免疫不全動物の特殊性

非臨床安全性試験の実施に際して、ヒトと動物の間に、サイトカイン等の活性タンパク質及び細胞間相互作用に種差があるため、ヒトの細胞製品を通常の免疫応答能力を有する動物に投与した場合は、投与した細胞は免疫学的機序により短時間に死滅し、ゼノ免疫反応等に起因する炎症が生じることにより、ヒトでの安全性の評価を外挿する上で有用な情報を得る事は困難である。また、動物同等品（モデル細胞）を動物に投与する場合は、作用の評価には有用であるものの、実際の細胞製品とは異なることから適切な毒性評価が得られない場

合がある。したがって、非臨床安全性試験の使用動物は、がん免疫療法に用いるヒト血液系細胞が生着しやすい免疫不全動物を選択すべきである（参考4）。

現在、非臨床安全性試験に供する事が可能な免疫不全動物としては、ヌードマウス（T細胞欠損）、SCIDマウス（T及びB細胞欠損）、RAG遺伝子欠損マウス（T及びB細胞欠損）、NOD-SCIDマウス（T及びB細胞欠損、NK細胞部分欠損）、NOGマウス（T、B及びNK細胞欠損）等がある。細胞の種類に応じた適切な種類の免疫不全動物（遺伝子導入ヒトTリンパ球の細胞製品の場合は、ヒトの血球系細胞が生着しやすいNOGマウスを用いる等）を選択する必要がある。一方、免疫不全動物は、通常のマウスに病原性を示さない微生物に対して感受性があることから、SPF（Specific Pathogen-Free）環境下においても、コントロールされていない（モニタリング対象外の）微生物に感染する可能性があることに留意する必要がある。また、免疫不全マウスの系統¹によっては、正常な免疫を有するマウスよりも生存期間が短い場合もあるため、長期間の観察を要する試験の実施が困難になることにも留意する必要がある。

第2 一般毒性試験

細胞製品の用量反応性、投与後の細胞の増殖の有無等を踏まえ、「医薬品の製造（輸入）承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて」（平成元年9月11日付け薬審1第24号）の別添「医薬品毒性試験法ガイドライン」、「単回及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について」（平成5年8月10日付け薬新薬第88号）、及び「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 Consensus Guidance」（平成22年2月19日付け薬食審査発0219第4号）を参考に、一般毒性試験を実施する必要がある。また、当該試験の実施に際して、以下の点にも留意する必要がある。

- 基本的に、細胞製品の臨床投与経路と同じ投与経路で投与し評価する。量的なリスク評価は困難であることから、ハザード（有害性）を確認するための用量段階は、対照群と細胞製品投与群の2群以上で不足はないが、最高投与量は全身毒性が評価可能な最大量²を投与する必要がある。投与回数は可能

¹ NOD-SCIDマウスでは約8.5ヶ月：Strain Information from The Jackson Laboratory

² 最大耐量（Maximum Tolerated Dose：MTD）及び投与可能な最大量（Maximum Feasible Dose：MFD）の観点から、投与（移植）量は可能な限り多くの細胞数とする。

な限り臨床で予定されている用法と同様にすることが望ましいが、反復投与しても細胞製品が生体内で蓄積されず、新規の毒性所見や毒性の増悪が生じる可能性が低い場合には、必ずしも反復投与毒性試験の実施は必要ない。

- 非細胞成分については、特性や含有量を踏まえ安全性を評価し、必要に応じて非細胞成分に注目した非臨床安全性試験を別途実施する。不純物については、不純物の残存量（推定残存量）を示した上で、安全性の担保が可能と判断した根拠を説明する必要がある。既知の情報に基づいた推定残存量の不純物の安全性の説明が困難である場合は、不純物の毒性を評価する試験を実施する必要がある。
- 免疫不全動物が用いられることから、動物種は1種類でよく、必ずしも非げっ歯類（あるいは、非ヒト霊長類）での検討は必要ではない。
- 陰性対照群を適切に設定し評価する場合も考えられ、例えば、遺伝子改変 T 細胞製品を免疫不全動物に投与する場合は、ヒト T 細胞の投与による影響を除くために、非遺伝子導入ヒト T 細胞を対照群に用いることも検討する必要がある。

なお、安全性薬理試験の実施は、ヒトへの外挿性に乏しく量的なリスク評価が困難であること等から、通常求められていない。しかしながら、生命維持に重要な影響を及ぼす器官系（循環器系、呼吸器系、中枢神経系）に重大な影響を与えないことを一般毒性試験等で（一般状態観察も含めて）評価した上で、ヒトへの安全性が懸念される毒性が認められる場合には、ヒトへの安全性を説明する目的で、追加の試験の実施を検討する。

第3 造腫瘍性試験

原材料に用いられる細胞を基準とした場合、ES/iPS 細胞、体性幹細胞、体細胞の順に悪性形質転換のリスクは高く、さらに ES/iPS 細胞由来製品では、多能性幹細胞の残存による奇形腫形成のリスクについても評価する必要がある。

造腫瘍性試験として、*in vitro* 試験では、遺伝的安定性を確認するための核型分析試験、足場非依存的な増殖能を確認するための軟寒天コロニー形成試験が、*in vivo* 試験では、免疫不全動物を用いた腫瘍形成能を評価する試験が知られている。一般毒性試験に免疫不全動物を用いる場合は、一般毒性試験の一部とし

て *in vivo* 試験における造腫瘍性を評価することは可能である。*in vivo* 試験の実施に際して、以下の点に留意する必要がある。

- 細胞製品における悪性形質転換細胞による腫瘍形成のリスク評価：腫瘍細胞が生体内において増殖し腫瘍を形成するか否かは、局所の組織学的構造、サイトカイン環境、血流及びリンパ流の状態、免疫監視状態、細胞外基質及び間質細胞の特性等により、生体内各組織における局所環境の影響を強く受け、転移性腫瘍の好発部位は原発のがん種によって異なる。そのため、最終製品に由来する悪性形質転換細胞の造腫瘍性リスクは、原則として、臨床投与経路と同じ移植経路により評価すべきである。
- ES/iPS 細胞由来製品における多能性幹細胞の残存による奇形腫形成リスク評価：多能性幹細胞の残存リスクを評価するために、背部皮下移植を実施し奇形腫形成能を評価することが望ましい。
- 造腫瘍性を有する細胞の移植細胞数が腫瘍形成の閾値を満たさない場合には、造腫瘍性が陰性と判定される可能性があることから、臨床での用法・用量に関わらず、移植可能最大量²の細胞を単回移植して評価する。そのため、対照群（陰性）と細胞製品移植群の2群で評価が可能である。
- 動物数については、細胞製品は対象外であるが、WHO Technical Report Series 978 を参考に1群10匹で検討することが考えられる。ただし、長期の観察期間が必要な場合には、動物の自然発生病変等による死亡を考慮して、最終評価（最終剖検）の段階で、1群あたり10匹程度の動物が生存するように、試験開始時の動物数を適宜設定する。
- 最終製品に由来する造腫瘍性リスク評価を目的とした観察期間は、移植した細胞が確認できなくなる期間、免疫不全動物の加齢又は自然発生病変が影響を与えない期間とし、生体内での生着期間も考慮する必要がある。特に、ES/iPS 細胞由来の最終製品の造腫瘍性リスクについては、体細胞由来製品と比較して高いことから、使用動物の生存期間を考慮した可能な限り長期間の観察が必要と考える。また、最終製品に残存するES/iPS細胞の奇形腫形成リスク評価³を目的とした試験を実施する場合の観察期間は、公表文献等を参考に、奇形腫形成が検出可能な期間を適宜設定する。

³ 最終製品中の残存するES/iPS細胞数で奇形腫が形成されない閾値を評価。

なお、ヒト血球由来細胞等の分化した細胞は、未分化な多能性幹細胞等と比較して、製造工程の中で悪性形質転換細胞が生じる懸念は低いと考えることから、*in vivo* 造腫瘍性試験を実施する意義は低い。ただし、遺伝子改変を行った T 細胞では、遺伝子導入による細胞の悪性形質転換に着目する必要がある、当該懸念は IL-2 依存的増殖試験又はクローナリティー解析により評価できる可能性がある。

第4章 効力又は性能を裏付ける試験

第1 効力又は性能を裏付ける試験の考え方

急速に進む本領域の技術的進歩及び臨床的知見を踏まえた合理的根拠に基づき、細胞種、自己又は同種細胞、臨床使用目的、特性等に応じて、適切かつ意義のある効力又は性能を裏付ける試験を効率的に実施すべきである。当該試験の実施に際して、以下の点に留意する必要がある。

- 動物、細胞等を用いて、細胞の加工（参考5）による発現産物の生物活性、細胞、組織及び個体における機能発現及び作用持続性から期待される作用を評価する必要がある。なお、細胞の加工（参考5）による発現産物の生物活性については、品質特性を踏まえた効力、性能を明らかにするため、適したモデルを工夫する必要がある。
- 遺伝子を導入した場合の目的とする産物の発現の効率及び持続性、並びに導入した遺伝子の発現産物の生物活性を評価する必要がある。
- 適切な動物由来細胞、疾患モデルの動物がある場合には、それを用いて試験を実施する必要がある。また、腫瘍部位等を考慮に入れ、がん種の差異が作用に及ぼす影響を検討することが望ましい。
- 臨床試験の開始段階において、細胞製品の効力又は性能の裏付けが文献又は知見等により合理的な評価が可能である場合は、必ずしも詳細な実験的検討は必要ではない。

第2 *in vitro* 試験と *in vivo* 試験

効力又は性能を裏付ける試験としては *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験（動物モデル又は免疫不全マウス等を用いたヒト細胞移植モデル）がある。複数の免疫細胞が関与するような細胞製品の場合は、腫瘍細胞に特異的な細胞傷害作用を *in vitro* 試験のみで評価することは困難であるため、細胞製品の特徴に基づき、*in vitro* 試験と *in vivo* 試験との組合せにより評価することが望ましい。

1) *in vitro* 試験

細胞の種類及びサブセットを同定するために、フローサイトメトリー法によ

り、細胞製品に特有の表現型及び機能に関わる分子の発現（機能に結びつく接着分子、共刺激分子の発現等）、並びに目的とする細胞の割合を評価する必要がある。さらに、分化誘導して得られた細胞製品においては、分化誘導前後の細胞の比較、並びに表現型及び機能に関わる分子の発現について目的とする細胞との同等性を評価する必要がある。

腫瘍細胞に特異的な細胞傷害作用の評価に際して、エフェクター細胞においては、直接的に評価することが可能であり、非エフェクター細胞においては、誘導される免疫応答により間接的に評価することが可能である。細胞製品を用いた *in vitro* 試験では、腫瘍細胞、ヒト末梢単核球等を標的細胞として用いる方法があるが、T 細胞の細胞製品においては、当該細胞製品の対象となるヒト白血球抗原（Human Leukocyte Antigen（以下、「HLA」））遺伝子を導入した腫瘍細胞株、又は当該細胞製品の対象として要件を満たすがん患者由来の臨床検体等を標的細胞として用いた試験を行うことが望ましい。

腫瘍細胞に特異的な細胞傷害作用の評価に際して、以下の試験方法により評価可能である。

- サイトカイン産生能試験：細胞内サイトカイン産生（フローサイトメトリー法）、細胞外サイトカイン産生（ELISA（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay）法又は ELISPOT（Enzyme-Linked ImmunoSpot）法）の評価等
- 細胞増殖能試験：チミジン、BrdU（Bromodeoxyuridine）、MTT（3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide）による増殖能の評価等
- 腫瘍細胞傷害性脱顆粒試験：CD107a 発現の評価等
- 腫瘍細胞傷害性試験： ^{51}Cr 放出の評価等

また、がん抗原に特異的に反応する TCR 遺伝子を他の T 細胞に導入した遺伝子改変 T 細胞（TCR-T 細胞）の細胞製品においては、抗 HLA class I 抗体又は抗 HLA class II 抗体を用いた特異的細胞傷害作用阻害試験を実施することにより、HLA 拘束性が保持されていることを評価する必要がある。対象となるがん種及び HLA を有する患者由来の末梢血リンパ球から作成した TCR-T 細胞の患者自身とがん細胞に対する反応性、並びに同一のがん種を有するものの対象としない HLA を有する患者由来の当該細胞を用いた反応性を評価することにより、HLA 拘束性の特異的細胞傷害作用を評価することが望ましい。

2) *in vivo* 試験

① 動物モデルを用いた評価

対象とする疾患に類似した動物モデルがあり、用いる動物細胞とヒト細胞における表現型及び機能に関わる分子の発現の同等性が明確である場合は、動物同等品（モデル細胞）を用いた動物モデルによる細胞傷害作用の評価は可能である。しかしながら、使用する動物とヒトとの間で免疫応答等の差異により、動物における評価がヒトに外挿可能とは限らないことに留意する必要があることから、動物種及びがん種における作用の差異等を検討する必要がある。また、T細胞が腫瘍部位に存在することによる炎症の有無により、効果が異なることから（引用文献 1）、動物モデルによる腫瘍部位を解析し、用いる動物とヒトの差異を評価する必要がある。なお、がん種の差異が有効性に及ぼす影響の検討の必要性が示されている（参考 6）ことから、動物モデルにより検討する必要がある。

② ヒト細胞移植モデルを用いた評価

動物細胞とヒト細胞における表現型及び機能に関わる分子の発現の同等性が明確ではない細胞製品、又はエフェクター細胞製品の評価に際して、免疫不全マウス等を用いたヒト細胞移植モデルを用いる場合は、現段階では完全にヒトの免疫を免疫不全動物で再現できない（造血系・免疫系、特にがんの発生母地である間質組織）。そのため、目的に応じてそれぞれのモデル動物を作製する必要がある、得られる評価は限定的であることに留意する必要がある。また、長期的な評価に際して、異種であることにより発生する移植片対宿主病（**Graft Versus Host Disease : GVHD**）が細胞傷害作用に及ぼす影響に留意する必要がある。

第5章 体内動態に関する試験

第1 体内動態に関する試験の考え方

細胞製品を構成する細胞及び導入遺伝子の発現産物について、技術的に可能であり、かつ科学的合理性がある範囲で、動物における体内動態に関する試験等により、投与方法の適切性、投与された細胞製品の持続性及び局在性を評価する必要がある。

第2 試験方法

体内動態の解析に際して、組織学的解析、PCR法、磁気共鳴画像診断法(MRI)、陽電子放射断層撮影法(PET)、単一光子放射断層撮影法(SPECT)、バイオイメージング(細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入、あるいは色素又はアイソトープ標識による *in vivo* イメージング等)等により評価可能である。

細胞製品の投与方法の適切性について、投与した細胞の動物における体内動態を評価することにより、その合理性を明らかにする必要がある。特に、全身投与に際して、投与後の細胞の全身分布を動物モデル等から評価し、ヒトに外挿する必要がある。

投与する細胞が特定の部位(組織等)に直接投与又は到達して作用する場合には、その局在性を明らかにし、細胞製品の有効性・安全性に及ぼす影響を考察する必要がある。エフェクター細胞製品においては、腫瘍組織への遊走が重要であり、非エフェクター細胞製品においては、リンパ組織等の組織への移行性及び機能の持続性が重要である。そのため、*in vivo* イメージングで全身性に生体内分布を評価し、移行すると思われる標的組織、腫瘍組織又はリンパ組織において、投与する細胞に特異的な分子を免疫染色及びフローサイトメトリー法で詳細に解析すべきである。なお、各臓器における投与した細胞を、イメージング又は細胞特異的な遺伝子をPCR法で確認することが望ましい。

また、投与された細胞の持続性を評価するために、免疫不全マウス又はヒト化マウスを用いて、投与した細胞を経時的に投与後一定期間まで行う必要がある。なお、エフェクター細胞製品の場合は、免疫不全マウスにヒトがん細胞(株化細胞又は患者由来のがん細胞)を移植したマウスを用いたモデルを用いて、

投与方法の適切性、投与されたエフェクター細胞の持続性、腫瘍集積性等の評価が可能である（参考7）。

第6章 臨床試験

細胞製品の臨床上の有用性については、臨床試験で得られた有効性、安全性等の情報を踏まえ評価されるが、細胞製品の臨床試験計画に際して、以下の点等を踏まえて、適切な試験デザインを設定する必要がある。

- 対象疾患
- 細胞製品の特性
- 適用方法
- 選択基準及び除外基準の設定
- 細胞製品の適用を含め、被験者に対して行われる治療内容
- 既存の治療法を踏まえた臨床試験実施の妥当性
- 現在得られている情報から想定されるリスク及びベネフィットを含めた被験者への説明事項

がん免疫療法の対象患者におけるリスクと期待されるベネフィットの大小を勘案することは特に重要である。明らかに想定されるリスクを現在の知見・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、「未知のリスク」と、がんが、生命を脅かすこと、身体の機能を著しく損なうこと及び身体の機能や形態を一定程度損なうことにより、QOL (Quality Of Life) を著しく損なう等の事態に対して、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しれないリスク」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が望まれる。

参考

参考 1 細胞製品の均一化の例

高度に抗がん剤治療を受けた患者又は高齢患者のドナー、目的の遺伝子の導入効率、培養条件等による複合的な要因がその収量に影響するため、高純度に均一化した細胞集団を多量に得ることは困難である場合がある。そのため、モノクローナル抗体、ビーズ等を用いて細胞製品を数的に均一化する方法がある。

樹状細胞の場合は、確認試験における T 細胞の刺激に関与する分子群（HLA クラス I、HLA クラス II、CD80、CD86 等）の発現の有無の確認、サイトカイン産生能試験におけるサイトカイン産生パターン（IL-12/IL-10 比等）の確認等により、機能を評価する必要がある。また、間葉系幹細胞の場合は、確認試験における細胞表面マーカー（CD34、CD45、CD73、CD29、CD73、CD90、CD105、CD166 等）の発現の有無の確認、細胞増殖・軟骨、骨、脂肪への分化能の確認、染色体異常試験等により、評価する必要がある。

参考 2 受容体遺伝子改変 T 細胞製品における非臨床安全性試験の際に留意すべき点の例

1) TCR-T 細胞

臨床試験に用いられる TCR の親和性が人為的に非生理的レベルまで高められた現在では、致死的なオン・ターゲット毒性又はオフ・ターゲット毒性が生じる可能性がある。

例として、がん細胞と正常精巣組織に選択的に発現しているがん精巣抗原（Cancer Testis Antigen : CTA）の一つである Melanoma-Associated Antigen（以下、「MAGE」）-A3 に特異的な HLA-A2 拘束性 TCR-T 細胞療法を使ったメラノーマに対する臨床試験において、中枢神経系に僅かに発現する MAGE-A3 family タンパクである MAGE-A12 由来の類似ペプチド抗原が HLA-A2 上に提示され、投与した TCR-T 細胞が認識・攻撃した結果、致死的な中枢神経傷害が発症した（引用文献 2）。

また、MAGE-A3 に特異的な HLA-A1 拘束性 TCR-T 細胞療法を使ったメラノーマおよび多発性骨髄腫に対する臨床試験において、生理的に心筋は MAGE-A3 を全く発現していないが、心筋の構成タンパクである Titin がこの MAGE-A3 特異的 TCR が認識するアミノ酸配列のエピトープを有していたことから、心筋の

収縮期に同期して (context-dependent に) HLA-A1 上に提示された Titin 由来の抗原エпитープとの複合体を投与した TCR-T 細胞により致死的心筋傷害が発症した (引用文献 3)。

現状では、TCR-T 細胞のオン・ターゲット毒性又はオフ・ターゲット毒性を正確に予測することは出来ない。しかしながら、可能な限り予測する試みがなされている。新たに作成した TCR-T 又は TCR に準じた抗原エпитープ・HLA 複合体特異的 CAR-T 細胞療法に関して、標的抗原エпитープの構成アミノ酸をアラニン置換したアミノ酸からなるペプチドライブラリーに対する反応性に基づいて、データベースからその構造と類似した既知のアミノ酸配列を検索する方法が開発された (アラニンスクラン法) (引用文献 4)。他にも、目的の HLA を持った iPS 細胞から重要臓器を構成する細胞パネルを作り、エフェクター細胞の反応の有無を検討する試みが提案されている (引用文献 3)。iPS 細胞の利用には時間を要するが、アラニンスクラン法は、リスクを完全に否定できないものの、現時点で実施可能であり、これからの新規 TCR-T 細胞療法や一部の CAR-T 細胞療法の開発においては、安全性に関する基礎データの一つとなる可能性がある。

2) CAR-T 細胞

複数回輸注された CAR-T 細胞のマウス由来のモノクローナル抗体から作成した細胞外ドメインに対して患者体内に形成されたヒト抗マウス抗体 (Human Anti-Mouse Antibody : HAMA) が介在するアナフィラキシーショックによる致死的な有害事象の発症した例 (引用文献 5) を除いて、CAR-T 細胞による有害事象の大部分はオン・ターゲット毒性又はオフ・ターゲット毒性に起因する。抗 CD19-CAR-T 細胞療法に見られる正常 B リンパ球消失や、抗 Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Her2/neu) -CAR-T 細胞療法で見られた致死的な肺傷害 (正常肺上皮にも少量の Her2 が発現している) を発症した例等がある (引用文献 6)。

参考 3 TCR-T 細胞療法における内因性 TCR- α/β 遺伝子発現の抑制

自己 T 細胞を用いた TCR-T 細胞が、新たに獲得する自己反応性は、遺伝子導入される側の T 細胞が持つ内因性 TCR- α/β 鎖と導入される治療用 TCR- α/β 鎖との間で、意図しない α/β 鎖の組換え体が生じることに起因する (mispairing)。現

在、この内因性 TCR- α/β 遺伝子発現を様々な方法を用いて抑制することで、TCR-T 細胞が未知の自己反応性を獲得するリスクを減らすことができる（引用文献 7, 8）。

参考 4 HLA 遺伝子導入免疫不全マウスにおける毒性を評価した例

例えば、生理的に造血前駆細胞、肺・胸膜、腹膜、腎糸球体タコ足細胞に比較的高い発現が認められるがん関連抗原である Wilms Tumor 1（以下、「WT1」）は、ヒトとマウスの間で 95%以上のアミノ酸配列相同性がある。WT1 特異的 TCR-T 細胞のこれら臓器、特に腎臓に対するオン・ターゲット毒性に関して、対象となる HLA を遺伝子導入した免疫不全マウスを用いて毒性を検討した報告がある（引用文献 9）。HLA を遺伝子導入した免疫不全マウスは、一般的に造血系・免疫系は、ヒト化されているものの、間質組織はヒト化されていないことから、オン・ターゲット毒性の評価には不十分である。寧ろ、マウスの評価系で完結する方が得られる情報は多い。従って、より適切な疾患モデルマウスの作成が改めて重要であると言える。

参考 5 細胞加工の種類

細胞加工の定義は「再生医療等製品の製造販売承認申請に際し留意すべき事項について」（平成 26 年 8 月 12 日付け薬食機参発 0812 第 5 号）によるところであるが、その種類として以下の点等が含まれる。

- 非細胞成分（マトリックス、医療材料、支持膜、ファイバー及びビーズ等）と組み合わせる場合
- 細胞に遺伝子工学的改変を加える場合
- 細胞にタンパク質を導入する場合
- 薬剤等の処理により細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合
- 物理的方法により細胞の初期化、脱分化又は分化誘導を行う場合

参考 6 変異遺伝子の存在と予後との関連性の例

例えば、メラノーマにおいて、BRAF、NRAS 等の変異遺伝子の存在と予後との関連性等が指摘されている（引用文献 10）。

参考 7 投与されたエフェクター細胞の持続性、腫瘍集積性の評価例

移植するがん細胞と輸注するエフェクター細胞に異なる色調のルシフェラーゼ遺伝子を導入することにより、腫瘍集積性を剖検すること無く評価が可能である。

引用文献

1. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, Seja E, Cherry G, Gutierrez AJ, Grogan TR, Mateus C, Tomasic G, Glaspy JA, Emerson RO, Robins H, Pierce RH, Elashoff DA, Robert C, Ribas A. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 515(7528):568-71, 2014.
2. Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga D, Gros A, Robbins PF, Zheng Z, Dudley ME, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Phan GQ, Hughes MS, Kammula US, Miller AD, Hessman CJ, Stewart AA, Restifo NP, Quezado MM, Alimchandani M, Rosenberg AZ, Nath A, Wang T, Bielekova B, Wuest SC, Akula N, McMahon FJ, Wilde S, Mosetter B, Schendel DJ, Laurencot CM, Rosenberg SA. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother*. 36(2):133-51, 2013.
3. Cameron BJ, Gerry AB, Dukes J, Harper JV, Kannan V, Bianchi FC, Grand F, Brewer JE, Gupta M, Plesa G, Bossi G, Vuidepot A, Powlesland AS, Legg A, Adams KJ, Bennett AD, Pumphrey NJ, Williams DD, Binder-Scholl G, Kulikovskaya I, Levine BL, Riley JL, Varela-Rohena A, Stadtmauer EA, Rapoport AP, Linette GP, June CH, Hassan NJ, Kalos M, Jakobsen BK. Identification of a Titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells. *Sci Transl Med*. 5(197):197ra103, 2013.
4. Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu YC, Dudley ME, Wunderlich JR, Somerville RP, Hogan K, Hinrichs CS, Parkhurst MR, Yang JC, Rosenberg SA. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science*. 344(6184):641-5, 2014.
5. Beatty GL, Haas AR, Maus MV, Torigian DA, Soulen MC, Plesa G, Chew A, Zhao Y, Levine BL, Albelda SM, Kalos M, June CH. T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans. *Cancer Immunol Res*. 2:112-120, 2014.

6. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther.* 18: 843-851, 2010.
7. Okamoto S, Mineno J, Ikeda H, Fujiwara H, Yasukawa M, Shiku H, Kato I. Improved expression and reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by specific silencing of endogenous TCR. *Cancer Res.* 69: 9003-9011, 2009.
8. Torikai H, Reik A, Liu PQ, Zhou Y, Zhang L, Maiti S, Huls H, Miller JC, Kebriaei P, Rabinovitch B, Lee DA, Champlin RE, Bonini C, Naldini L, Rebar EJ, Gregory PD, Holmes MC, Cooper LJ. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. *Blood.* 119: 5697-5705, 2012.
9. Asai H, Fujiwara H, Kitazawa S, Kobayashi N, Ochi T, Miyazaki Y, Ochi F, Akatsuka Y, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Ikeda H, Shiku H, Yasukawa M. Adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury. *J Hematol Oncol.* 7:3, 2014.
10. Bhatia P, Friedlander P, Zakaria E, Kandil E. Impact of BRAF mutation status in the prognosis of cutaneous melanoma: an area of ongoing research. *Ann Transl Med* 3: 24-31, 2015.