

糖鎖より m/z 16 大きなイオンシグナルが観察されたことから、各シアロ糖鎖分画には、N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) により修飾を受けた糖鎖が含まれることがわかった。

次に、テトラシアロ分画を除く 4 分画について、シアリダーゼ処理を行いアジアロ糖鎖としたものについて、順相分配モードの HPLC により分離し、分離された各ピークを分取し、MALDI-TOFMS にて分析した。結果を Fig. 7 と Table 7 に示す。アジアロ/ハイマンノース型糖鎖分画ではピーク 4、5、6、10 のハイマンノース型糖鎖の他、ピーク 7 と 9 のフコースによる修飾を受けた複合型 2 本鎖糖鎖が共通して観察された。モノシアロ分画ではピーク 15、16、18 のフコースが 0~2 残基付加した複合型 2 本鎖糖鎖が共通して観察された他、フコースを 1 残基持つ複合型 3 本鎖糖鎖であるピーク 18 も両方の細胞に観察された。ジシアロ分画では Toe 細胞でフコースを持たない複合型 2 本鎖糖鎖であるピーク 19 とフコースを 1 残基持つ複合型 2 本鎖糖鎖であるピーク 20 の糖鎖が主要な糖鎖として観察された。一方、UTA-1 細胞では、複合型 2 本鎖糖鎖にさらにヘキソースが 1 あるいは 2 残基付加した分子量に相当する 2068 (ピーク 21) と 2085 (ピーク 22) に相当する糖鎖が観察された。これらの糖鎖は複合型 2 本鎖糖鎖の非還元末端 Gal にさらに α 1-3 結合した Gal を有する α Gal エピトープを持つと考えられる糖鎖であると考えられた。

トリシアロ分画ではいずれの細胞からも複合型 2 本鎖糖鎖 (ピーク 23、24、26) と複合型 3 本鎖糖鎖 (ピーク 25) が観察された。一般にヒト細胞では複合型 2 本鎖糖鎖にシアル酸が 3 残基付加した糖鎖は生合成されないため観察されない。一方、マウス

やラットなどのげっ歯類では複合型 2 本鎖糖鎖にシアル酸が 3 残基付加した糖鎖を生合成しうることから、ピーク 23、24、26 のトリシアロ 2 本鎖糖鎖は異種動物由来成分に由来すると考えられた。

C-8-2 iPS 細胞中に観察される異種動物由来 N-結合型糖鎖の MSMS による解析

前項のヒト iPS 細胞 (Toe、UTA-1) の N-結合型糖鎖の網羅的解析の結果、N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) により修飾を受けた糖鎖や α Gal エピトープを持つと考えられる糖鎖が観察された。そこで、これらヒト以外の異種動物に特有の糖鎖についてイオントラップ型質量分析計を用いた MSMS 解析を行い、構造解析を行った。

最初に複合型 2 本鎖糖鎖末端に N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を 1 残基持つと考えられる m/z 2067 のイオンをプレカーサーイオンとして MSMS 解析した結果を Fig. 8 に示す。 m/z 2067 をプレカーサーイオンとして MSMS 解析すると、 m/z 307 (NeuGc-H₂O) 小さな m/z 1760 のイオン (Y_7) が観察されたことから、 m/z 2067 は非還元末端に N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を 1 残基持つ糖鎖であることがわかった。さらに、MS² により生じた m/z 1760 のイオンをプレカーサーイオンとして MS³ 解析した結果、Gal-GlcNAc が順次脱離した m/z 1395 (Y_{5a} or Y_{5b}) と m/z 1030 (Y_{5a}/Y_{5b}) のフラグメントイオンが観察され、還元末端側に GlcNAc-GlcNAc-2AA (m/z 544、 Y_3) を持つフラグメントも観察されたことから、複合型 2 本鎖糖鎖を基本骨格とする糖鎖であることがわかった。以上の結果から、 m/z 2067 を示すモノシアロ糖鎖は非還元末端に N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を 1 残基持つ複合型 2 本鎖

糖鎖であることがわかった。

次に、 α Gal エピトープを持つと考えられる $m/z2068$ のイオンをプレカーサーイオンとして MSMS 解析した結果を Fig. 9 に示す。 $m/z2068$ をプレカーサーイオンとして MSMS 解析すると、 $m/z544$ 質量の小さな Gal-Gal-GlcNAc が脱離した $m/z1541$ のイオン (Y_{5n}) が観察されたことから、 $m/z2068$ は非還元末端に α Gal エピトープを持つ糖鎖であることがわかった。また、還元末端側にフコースを持つ GlcNAc-GlcNAc-2AA ($m/z690$, Y_3) を持つフラグメントも観察された。以上の結果から、 $m/z2068$ の糖鎖はコアフコースを持つ複合型 2 本鎖糖鎖を基本骨格とし、非還元末端に α Gal エピトープを持つ糖鎖であることがわかった。

以上、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の結果、 α Gal エピトープや N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を持つ糖鎖などのヒトでは生合成されない糖鎖が観察された。このことから、異種動物由来成分を含む材料を用いて iPS 細胞を培養した場合、異種動物由来糖鎖が混入しうることがわかった。

C-8-3 iPS 細胞培養過程で用いる異種動物由来成分の N-結合型糖鎖解析

iPS 細胞をはじめとする各種幹細胞をの培養の際に使用するフィーダー細胞の混入や血清代替物などの異種動物に由来する成分の混入については、培養方法の完全ヒト化への移行に伴い、マスターセルバンク、ワーキングセルバンクの構築においては回避されつつある。しかしながら、細胞樹立時や未分化能維持の目的で異種動物由来成分を使用する場合においては、最終製品においても異種動物由来成分混入の有無を確

認することと、混入しうる異種動物由来成分とその原因を明らかにしておくことが必要である。iPS 細胞等の各種幹細胞の培養では、フィーダーレイヤーとして、マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) や細胞外マトリックス構成成分であるマトリジェル、フィブロネクチン、培養液には血清代替物 (KSR) の他、各種細胞増殖因子等を添加した培養液を用いて培養される。すなわち、これら材料中に異種動物由来成分が含まれるか否かを調査し、幹細胞への異種動物由来糖鎖混入の原因としての可能性を明らかにしておくことは重要であると言える。本項では Toe ならびに UTA-1 の N-結合型糖鎖中に観察された異種動物由来糖鎖の混入原因として、血清代替物 (KSR) とマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) に着目し、前述した N-結合型糖鎖の網羅的解析法を用いて α Gal エピトープや N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を持つ糖鎖の有無について調べた。

iPS 細胞の解析と同様に、MEF と KSR 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. 10 に示す。MEF ではアシアロ/ハイマンノース型糖鎖分画が最も含量が高く 57.8% 含み、続いてモノシアロ、ジシアロ、トリシアロ、テトラシアロ分画がそれぞれ 18.3、12.5、9.2、2.2% 含まれていた。一方、KSR はシアル酸を含有する糖鎖量が高く、モノシアロ糖鎖が 4.8%、ジシアロ糖鎖が 37.2%、トリシアロ糖鎖が 38.9%、テトラシアロ糖鎖が 10.8% であり、全糖鎖の 90% 以上がシアル酸を含有する糖鎖であった。また、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糖鎖より m/z 16 大きなイオンシグナルが観察されたことから、各シアロ糖鎖分画には、N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) により修飾を受けた糖鎖が含まれることがわかった。

次に、全ての分画について、シアリダーゼ処理を行いシアロ糖鎖としたものについて、順相分配モードの HPLC により分離し、分離された各ピークを分取し、MALDI-TOFMS にて分析した。結果を Fig. 11 に示す。MEF のアジアロ/ハイマンノース型糖鎖分画ではマンノース残基 5~9 残基からなるピーク 1~5 のハイマンノース型糖鎖が主要な糖鎖として観察された。KSR ではマンノース残基 5、6、8、9 残基からなるハイマンノース型糖鎖(ピーク 1、2、4、5) の他、コアフコースを持つ複合型 2 本鎖糖鎖も観察された。モノシアロ分画でいずれにも複合型 2 本鎖糖鎖 (ピーク 7) とコアフコースを持つ複合型 2 本鎖糖鎖 (ピーク 8) が共通して観察された他、MEF では複合型 3 本鎖 (ピーク 9) と 4 本鎖糖鎖 (ピーク 10) も観察された。一方、KSR には m/z 2068 を示す α Gal エピトープを持つ糖鎖 (ピーク 11) が観察された。

ジシアロ分画については、MEF では複合型 3 本鎖 (ピーク 12)、KSR では MEF では複合型 2 本鎖 (ピーク 14) が主要な糖鎖として観察された。一方、トリシアロ分画について、MEF では複合型 3 本鎖(ピーク 17)、KSR では MEF では複合型 2 本鎖 (ピーク 16) が主要な糖鎖として観察された。テトラシアロ分画については、MEF では複合型 3 本鎖 (ピーク 19)、KSR では複合型 2 本鎖 (ピーク 21、22) が主要な糖鎖として観察された。

以上、KSR には α Gal エピトープを持つ糖鎖 (ピーク 11)、複合型 2 本鎖糖鎖にシアル酸が 3 あるいは 4 残基結合したと考えられる糖鎖 (ピーク 16、22) などのヒトでは生合成されない糖鎖が観察された。このことから、KSR は Toe と UTA-1 の 2 種の iPS 細胞で観察された異種動物由来と考えられる糖鎖の混入原因となりうることがわかった。

C-8-4 小括

本年度研究では各種幹細胞の培養工程で混入しうる異種動物由来糖鎖に着目し、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得られた 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。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としてマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) と血清代替物 (KSR) の糖鎖解析を行った。

本研究により、KSR や MEF を用いて培養した iPS 細胞の N-型糖鎖解析の結果から、iPS 細胞中には異種動物由来と考えられる α Gal エピトープや NeuGc を持つ糖鎖、複合型 2 本鎖糖鎖にシアル酸が 3 あるいは 4 残基修飾した糖鎖が観察された。一方、iPS 細胞の培養で使用する KSR 中に α Gal エピトープや NeuGc が観察され、iPS 細胞中に観察された異種動物由来糖鎖混入の原因の一つとして考えられた。外来からの異種動物由来糖鎖の混入については、例えば NeuGc については単糖のサルベージ経路での混入の他、 α Gal エピトープについては細胞表面への非特異的吸着なども考えられ、今後各種幹細胞の再生医療への応用に向けては、細胞培養法の完全ヒト化への移行に加え、培養過程で混入した異種動物由来成分を取り除くためのクリーニング方法など

についても検討が必要であると言える。

C-9 ウイルス安全性 MCP

ウイルス安全性については C-3-3 項をはじめ、様々な関連セクションで言及しているが、改めて MCP としてまとめると、以下のごとくなる。

1. 「生物由来原料基準」(H17 年厚生労働省 告示第 177 号) 適合
2. 自己細胞加工製品、同種細胞加工製品の原材料としての細胞別のウイルスチェックリストに適合
3. 培地成分等の製造関連物質でのウイルス安全性留意事項に適合
4. 細胞バンク・中間製品段階でのウイルス安全性留意事項に適合
5. 自己細胞加工製品、同種細胞加工製品の最終製品ウイルス試験の留意点に適合

C-10 造腫瘍性 MCP

動物に移植された細胞集団が増殖することにより悪性または良性の腫瘍を形成する能力を「造腫瘍性」と称する。造腫瘍性はヒト幹細胞、とりわけ iPS 細胞や ES 細胞などの多能性幹細胞を出発素材とした場合に安全性面で感染物質による安全性問題と並んで最も関心が高い問題の一つである。

正確に言えば、造腫瘍性には、「品質：細胞特性問題」及び「安全性問題」という 2 面性がある。

すなわち、出発素材としての ES/iPS 細胞におけるテラトーマ形成はこれらの細胞を特徴付ける「細胞特性」そのものである。細胞の樹立やバンクとした場合は、その特性において異常性を示す大幅な変動があってはならない。ES 細胞はその出発素材（受精卵余剰杯）からの調製自体が identity という側面をもっているが、iPS（様）細胞の場合には細胞特性として MCP に不可欠な一要素である。

一方で ES/iPS 細胞加工製品においては、その未分化能を製品の効能・効果のもとと

する特殊なケース以外、中間製品であれ、最終目的製品であれ、残存未分化細胞や、製造過程で生成する可能性のある増殖性形質転換細胞の混在が「造腫瘍性」として「安全性問題」となる。「安全性問題」には品質面 (*in vitro*) からのアプローチと生物学的な面 (*in vivo*) からのアプローチがある。

品質面からのアプローチとは、中間製品や最終製品に残存未分化細胞や製造過程で生成する可能性のある増殖性形質転換細胞が混在するかどうか、また混在量について、未分化細胞に特異的に発現しているマーカー遺伝子/マーカータンパク質を検出する定量性 RT-PCR (qRT-PCR) やフローサイトメトリー、超培養期間培養細胞における増殖曲線、目的外の形質転換の検出の有無により検討することである。これらは MCP として提言したい。中間製品における工程管理試験として混在が否定出来れば最も望ましい。なお、軟寒天コロニー形成試験（足場非依存性増殖細胞の検出）は試験操作途中で ES/iPS 細胞がアポトーシスを起こすため、残存するヒト多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) の検出には不向きとされている。増殖性形質転換細胞の混在には有用であるかも知れない。

問題は生物学的な面 (*in vivo*) からのアプローチ、*in vivo* 造腫瘍性試験の必要性の程度である。試験を実施しなければならない科学的合理性があるとすれば、① *in vivo* 試験が混在する可能性のある細胞の検出に関して上記の *in vitro* 試験より感度、精度等において優れていること、② 「投与細胞が (混在細胞も含めて)、生着する微小環境で腫瘍を形成するか」という懸念に答えられること、にある。このうち、①につ

いては、本研究の中で初代培養ヒト体細胞中にヒト iPS 細胞を添加して検討した結果、フローサイトメトリーでは 0.1%、qRT-PCR の場合には 0.01%の存在比のヒト iPS 細胞を有意に検出することができる、という結果が得られていることを考えると、それらの方法でより簡便に正確に未分化細胞の検出が可能であるので、あえてさらに in vivo 試験を実施すべき必然性は低い。したがって、一般には②の懸念に対して情報を得るために試験を実施しなければならない場合を想定した試験計画となる。この試験計画の立案は、ケース・バイ・ケースで考えることになる。つまり、製品の種類、製品中の細胞の純化度（あるいは混在する造腫瘍性細胞量比）、製品の形状、移植細胞数、移植方法、移植部位、移植部位におけるがん発生の確率、事後処置・対策等を勘案して in vivo 造腫瘍性試験実施の必要性の有無、内容を考えることになる。

試験に際しては、①試験系の検出限界、②投与細胞数、③投与部位、④例数、⑤観察期間、⑥陽性・陰性コントロールのあり方、⑦評価法などについて、試験の対象や目的との関係における適切性を吟味しておく必要がある。

試験系の検出限界については、どのような重症度の免疫不全マウスを用いるかによって変わってくるが、検出をより高感度にするために免疫不全のより重症度の高いモデル動物を使用すればするほど、それなりの免疫力を備えているヒトへの外挿性は低下することになる。もちろん、免疫不全度の低いモデル動物では、投与するヒト細胞製品への免疫拒絶度が高まるので、その兼ね合いも考慮する必要がある。

投与細胞数は、ヒトでの臨床投与量がベースになる。安全性試験という性格を考えた場合、ある程度の安全係数（例えば臨床投与量の 10 倍）を掛けることが望ましいともいえる。また、多ければ多いほど感度が高くなり、僅かな量比の混在造腫瘍性細胞を検出できる確率は高まる。しかし、ある系における検出度とヒトでの安全性（移植部位での造腫瘍性）との間に直接的な関係付けがなされた知見がないところで、感度を上げることが合理的な安全性評価といえるかどうか疑問が残る。試料が貴重であることや、技術上の問題も考慮しなければならない。

投与部位は目的から考えて、臨床投与部位（ヒトでの生着部位に相当する部位）である。

例数は統計学的に信頼性におけるデータを提供できる例数であることが望ましい。

観察期間については、とりあえず試験しようとする評価モデル免疫不全マウスにヒト多能性幹細胞を投与した際の腫瘍形成の時間経過を観察し、TPD₅₀ がほぼ一定になるまでの時間とする。

陽性・陰性コントロールのあり方、すなわち対照群については、出発材料であるヒト多能性幹細胞を陽性対照とすることを原則とする。陰性対照群については、重度免疫不全動物を使用する場合、当該動物における腫瘍の自然発生率を予め調査し、発生率が著しく高い場合には、陰性対照群を設けてバックグラウンドとしての腫瘍形成率を評価する必要がある。

評価法については、移植部位で腫瘍形成（良性／悪性）、がん化を検査する。異所性組織形成の同時評価も場合によっては可能

かも知れない。しかし、細胞シートのようなものでは異所性の組織形成は考えにくい。

以上のようなリスク評価及び結果の運用については、細胞の種類・特性、臨床目的、対象疾患、患者のリスク、ベネフィット等を勘案する必要がある。

結局、*in vivo* 造腫瘍性試験は、①免疫不全マウスという患者とは異なる免疫状態にあるモデル動物を用いる試験である。造腫瘍性の発現は選択された試験条件下での細胞製品の品質・安全性特性を表現しているが、免疫状態等の異なるヒトでのリスク（がん化）と同義ではない。

ある iPS/ES 細胞由来製品について *in vivo* 造腫瘍性試験を実施する場合、実施すべきと考えた理由、試験条件・方法とそれらを選択した理由と妥当性、試験結果の解釈を述べることとなるが、これはあくまで事実としての情報であり、現在蓄積されている知見の範囲ではそのことからヒトでの製品の造腫瘍性に関する安全性保証や逆に安全性上の懸念を確実に語るには限界があることを認識しておくべきである。ただ、将来に向けての知見の蓄積には資するものと思われる。

全体としての提言は、ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品については相同時的使用、非相同時的使用ともに一般に *in vivo* 造腫瘍性試験を実施すべきとする根拠はないということである。「相同時的使用」(homologous use)とは、製品中の細胞がドナーでの基本機能と同様の基本機能を示す製品またはドナーでの場合と同様に患者で機能する製品を用いて患者の細胞の修復、再建、置換または補充をする場合を指している。もうひとつの提言は、iPS/ES 細胞加工製品につ

いても、相同時的使用である場合で、「最終製品中に目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が混入しているか」ということが適切な試験（細胞増殖特性解析等）により十分に否定できれば、造腫瘍性については移植医療と同レベルと考えられ、それ以上の造腫瘍性に関する検討は必要ないということである。

C-10-1 多能性幹細胞の造腫瘍性

「造腫瘍性」(tumorigenicity)とは、動物に移植された細胞集団が増殖することにより悪性または良性の腫瘍を形成する能力を言う。ヒト ES 細胞株やヒト iPS 細胞株を樹立した際には、どのくらい初期胚内の多能性幹細胞の性質を保っているかを確認する必要があるが、その際、細胞の多能性の証明は通常、免疫不全動物に細胞を移植して動物体内でのテラトーマ (teratoma, 奇形腫) の形成を確認し、移植した細胞が内・中・外胚葉系の様々な細胞種に分化することを示すことによってなされている。つまり、ヒト多能性幹細胞は造腫瘍性を元来の特性として保持しており、この点がヒト体細胞・体性幹細胞とは大きく異なる。したがって、ヒト多能性幹細胞を原材料とした医薬品・医療機器においては、未分化細胞の混入・残留により異所性組織形成や腫瘍形成・がん化が惹起される可能性があり、最終製品の造腫瘍性の評価と管理が重要な課題となる。

C-10-2 造腫瘍性試験の国際ガイドライン

現在、細胞の造腫瘍性試験に関する国際的なガイドラインとして唯一存在するのは、

世界保健機関（WHO）の生物薬品標準化専門委員会第 47 次報告(1998) (Technical Report Series No. 878, TRS 878)にある Annex I「生物薬品製造用の *in vitro* 基材としての動物細胞の使用の要件」である。日米欧医薬品規制調和国際会議(ICH)のガイドライン「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」（ICH Q5D, 医薬審 873 号, 平成 12 年 7 月 14 日）も，このガイドラインに記載された方法を援用している。

注：WHO TRS 878 Annex I の細胞基材に関する部分は最近改訂作業が行われており，平成 24 年 3 月現在の段階での最新のもの，平成 22 年（2010 年）10 月に公表された WHO 生物製剤標準化委員会最終案である。この最終案はまだ公式な TRS にはなっていないものの，TRS として発出されるまでに内容の変更が加わることはないと言われている。従って本稿においては，上記最終案の内容を最新の WHO TRS 878 の内容として説明する。

WHO TRS 878 にある造腫瘍性試験の内容は，極めて大雑把に言えば「ヌードマウス等の動物 10 匹に 10⁷ 個の細胞を投与して 16 週間観察する。陽性対照としては Hela 細胞などを用いる。」というものであるが，注意しなければならないのはその適用対象と目的である。

WHO TRS 878 の造腫瘍性試験の適用対象は，あくまでワクチンやタンパク質製剤など，ヒトを対象に *in vivo* 又は *ex vivo* で投与される生物薬品を製造する際に *in vitro* 基材として用いられるヒト又は動物由来の細胞株である。細胞種別に見た場合

には，対象となる細胞種としては①正常 2 倍体細胞株，②幹細胞株，③連続継代性細胞株が挙げられている。また，セル・バンク別に見た場合には，①製品製造終了時（終了後）の細胞，②所定の継代数以上にわたって培養したマスター・セル・バンク，③最初に樹立したワーキング・セル・バンクが対象とされている。注意すべきは，「患者に移植する細胞」および「治療を目的に患者に移植する細胞株の原料となる細胞」は WHO TRS 878 の対象外とされていることで，その特性解析においては規制当局等との議論が必要とされている。

WHO TRS 878 における造腫瘍性試験の目的は，生物薬品用細胞基材となるセル・バンクの造腫瘍性の程度又は有無を正確に把握することにある。造腫瘍性の程度的大幅な変化又はその有無に変化が生じた場合，細胞特性に何らかの異常が起こったという指標となる。つまり，既知あるいは未知のウイルス感染，変異原性物質やストレスによる遺伝子変異・発がん遺伝子活性化など，原因はいずれにせよ，セル・バンクの安定性上の異常が発生したことを検出するための方策として，セル・バンクの造腫瘍性を細胞特性指標の一つとして評価し，品質管理に活用することが必要とされるわけである。生物薬品の製造には通常，二段式の細胞基材のセル・バンキングシステム，すなわちマスター・セル・バンクおよびワーキング・セル・バンクの確立が必要であるが，WHO TRS 878 では上で述べた目的に則した形で，造腫瘍性試験は製品製造終了時やマスター・セル・バンクの細胞を所定の継代数以上にわたって培養した時，あるいはワーキング・セル・バンクを樹立し

た時に実施することが求められている。翻ってみれば、WHO TRS 878 は患者に移植するヒト又は動物に由来する生細胞、すなわち再生医療や細胞治療においてヒトに投与される細胞・組織加工製品は対象とはしていない。また、WHO TRS 878 における「造腫瘍性」とは、具体的に言えば「動物モデルに移植された細胞集団が、移植部位および（または）離れた転移部位で増殖することにより腫瘍を形成する能力」のことであって、ヒトにおけるリスクの直接的指標、すなわち「ヒトに移植された細胞集団が腫瘍を形成する能力」ではない。

C-10-3 ヒト多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験

C-10-3-1 目的別の 3 種の造腫瘍性試験

ヒト細胞・組織加工製品は、原材料の造腫瘍性というリスク・ファクターの観点から、大きく 2 つに分類される。即ち、原材料の細胞に造腫瘍性があるヒト多能性幹細胞加工製品と、原材料の細胞に造腫瘍性がないと一般的に考えられているヒト体細胞・体性幹細胞加工製品とに分けられる。

また、ヒト多能性幹細胞加工製品についての造腫瘍性試験には、目的別に以下の 3 種類があり得る。

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">① 原材料の品質管理のための造腫瘍性試験② 製造工程管理のための造腫瘍性試験③ 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験 |
|--|

以下にこれら 3 種造腫瘍性試験の特徴と方法について述べる。

C-10-3-2 原材料（細胞基材）の品質管理

のための造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の原材料は、文字通り、ヒト ES 細胞株やヒト iPS 細胞株等であり、その実体としてヒト ES 細胞バンクやヒト iPS 細胞バンク等が作成される。これらはヒト多能性幹細胞加工製品というバイオリジクス（生物製剤）の一種を製造するための細胞基材であり、連続継代性細胞株のセル・バンクでもある。従って、これらにおける「造腫瘍性」とは、すなわちバイオリジクスの原材料としてのヒト多能性幹細胞バンクの造腫瘍性であり、細胞基材の品質特性のひとつと捉えることが出来る。

ヒト多能性幹細胞加工製品の原材料としてのヒト ES/iPS 細胞バンクの造腫瘍性における懸念事項は、WHO TRS 878 におけるセル・バンクの品質管理の考え方と同様に、「セル・バンクの造腫瘍性が既定の範囲内にあるか？」ということになる。すなわち、ヒト ES/iPS 細胞バンクの造腫瘍性の程度的大幅な変化に変化が生じた場合、細胞特性に何らかの異常が起こったということが示唆される。つまり、既知あるいは未知のウイルス感染、変異原性物質やストレスによる遺伝子変異・発がん遺伝子活性化など、原因はいずれにせよ、ヒト ES/iPS 細胞バンクの安定性上の異常が発生したことを検出するための方策として、ヒト ES/iPS 細胞バンクの造腫瘍性を細胞特性指標の一つとして評価すれば、品質管理に活用できることになる。

ヒト多能性幹細胞加工製品の原材料としてのヒト ES 細胞バンクやヒト iPS 細胞バンク等の造腫瘍性の意味づけは WHO TRS 878 における細胞基材の造腫瘍性の意味づ

けとほぼ同じであることから、その評価方法についても、WHO TRS 878の方法を準用することが可能であると考えられる。

C-10-3-3 製造工程（中間製品）管理のための造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の中間製品となる細胞集団には、目的細胞ないしその前駆細胞に加え残存多能性幹細胞およびその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。中間製品の造腫瘍性試験における「造腫瘍性」とは、製造工程管理のための指標としての意味合いがある。製造工程管理における造腫瘍性関連の懸念事項には、「どのくらいヒト多能性幹細胞（ES/iPS細胞）が残存しているか」ということと「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」という2点がある。

中間製品の中に「どのくらいヒト多能性幹細胞（ES/iPS細胞）が残存しているか」ということに関しては、多能性幹細胞のマーカー遺伝子／マーカータンパク質を利用した方法により評価することが可能である。手技としては定量性RT-PCRやフローサイトメトリーなどが挙げられる。これらは一種の純度試験でもある。

中間製品の中に「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに関しては、細胞増殖特性の評価（不死化細胞の検出）や軟寒天コロニー形成試験（足場非依存性増殖細胞の検出）などで評価が可能である。なお、軟寒天コロニー形成試験は残存するヒト多能性幹細胞（ES/iPS細胞）の検出には不向きと考えられる。その理由は、ヒト多能性幹細胞はトリプシン処理等の分散によりアポトーシス

を起こす特異な性質を持つからである。すなわち、製品中にヒト多能性幹細胞が混入していたとしても軟寒天に細胞を分散して封入する際にアポトーシスを起こしてしまうと予想され、結果が偽陰性となるおそれが高い。

ある条件が満たされれば、中間製品の中に「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということを検証するために *in vivo* の方法を活用することも可能である。その条件とは「十分に低い検出限界を持つ系ならば」という条件である。なぜならば、多くの場合、最終製品（ないし中間製品）の主成分は分化細胞（ないし前駆細胞）と予想され、その場合、製品中に含まれるごく僅かな造腫瘍性細胞を検出する必要があり、均一な細胞集団を対象にしたWHO TRS 878の方法（ヌードマウス等の動物10匹に 10^7 個の細胞を投与して16週間観察する。陽性対照としてはHela細胞などを用いるという方法）よりも低い検出限界が必要になるからである。

十分に低い検出限界を持つことが明らかであれば、*in vivo*の造腫瘍性試験における細胞の投与部位はどこでも構わない。ただし、検出限界・感度・精度等について分析的評価を予め実施する必要がある。また、投与細胞数については当該 *in vivo* 造腫瘍性試験の性能次第である。

C-10-3-4 WHO TRS 878の造腫瘍性試験における検出限界

ヒト多能性幹細胞加工製品を含む細胞・組織加工製品のリスクとしては「最終製品をヒトに投与した際に製品中の細胞が腫瘍を形成する可能性」がある。すなわち、ヒ

ト多能性幹細胞を分化誘導せずにそのまま患者に投与するような特殊なケースを除いた多くの場合、最終製品に存在する僅かな未分化細胞・異常細胞に起因する造腫瘍性を評価しなければならない。その場合には「造腫瘍性」とは言っても、WHO TRS 878にあるようなセル・バンク（均一集団）の造腫瘍性とは区別して理解する必要がある。しかしながら現実には前述のように、造腫瘍性試験のガイドラインはWHO TRS 878しか存在しない。しかし前述のように、WHO TRS 878の方法をそのまま細胞・組織加工製品に転用することには無理がある。この課題を考える前に、WHO TRS 878の方法、すなわち「ヌードマウス等の動物に 10^7 個の細胞を投与」の根拠について触れる。

造腫瘍性の単位としては TPD_{50} というものが使われる。これは“tumor producing dose at the 50% endpoint”の略で、動物に移植した際に50%の確率で腫瘍を形成するのに必要な細胞数のことである。例えばEndo-CA(ヒト子宮内膜がん細胞由来)、A549(ヒト肺がん細胞由来)、Hela(ヒト子宮頸がん細胞由来)、293(ヒト胎児腎細胞由来)のヌードマウスでの TPD_{50} 値はそれぞれ10, 3×10^3 , 3×10^4 , 3×10^6 程度と言われており、一言に「造腫瘍性」と言っても細胞株によってその強さは大きく異なる。WHO TRS 878における「 10^7 個」の根拠は、293細胞のようにヌードマウスにおける造腫瘍性が低い(= TPD_{50} 値の高い)連続継代性細胞株の場合には、少なくとも10匹中数匹のヌードマウスにおいて腫瘍形成を検出するには 10^7 程度は接種する必要があるということにある。なお、Hela細胞程度の造腫瘍性細胞ならば、 10^7 個投与すればす

べてのマウスで腫瘍を形成するはずで、広く使用されている株でもあるため、陽性対照として利用できることになる。

ヒト多能性幹細胞加工製品としてヒト多能性幹細胞由来分化細胞をヒトに投与する場合、最も少ない細胞数で治療可能と考えられている網膜疾患治療用の網膜色素上皮細胞でも1回の移植に数万個は必要とされ、脊髄損傷治療に用いる神経細胞や心不全治療に用いる心筋細胞ではこれよりも何桁も多くの細胞数が必要だと言われている。例えばここで、ヒト細胞・組織加工製品の最終製品中の細胞の1万分の1がHela細胞並み、または293細胞並みの造腫瘍性を持っていると仮定し、上述の TPD_{50} 値を考慮すれば、半数のヌードマウスで腫瘍を形成させるためには単純計算でそれぞれ 3×10^8 , 3×10^{10} 程度の細胞が必要とされることになる。つまり、WHO TRS 878にある方法(10^7 個接種)では、ヒト細胞・組織加工製品に僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない可能性が高い。言い換えれば、WHO TRS 878にある既存の方法では、結果はすべて偽陰性になってしまう恐れがある。

C-10-3-5 重度免疫不全マウスの利用

ヒト細胞・組織加工製品中に僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出するためには、より高感度な動物を用いるという選択肢がある。その有力な候補としては、Rag2- γ C double-knockout (DKO) , NOD/SCID/ γ Cnull (NOG) , NOD/SCID/IL2rgKO (NSG)などの重度免疫不全マウス系統が挙げられる。これらのマウスはT細胞、B細胞およびNK細胞を欠失しており、ヌードマウスなどの従来の

免疫不全マウスと比べてヒトの細胞や組織の生着性が高く、ヒトがん細胞を非常に高い効率で生着させることが可能とされている。これらの重度免疫不全マウスを利用することにより、ヒト細胞・組織加工製品中に残留・混入する僅かな造腫瘍性細胞を検出することが可能となる可能性は高い。ただし、現時点ではその方法は未確立であり、科学的リスク評価のためには細胞・組織加工製品の造腫瘍性の定量化の方策の検討と、その標準化が必要である。試験系開発における検討課題としては、①試験系の検出限界・感度・精度の分析的検討、②陽性・陰性コントロールのあり方、③投与細胞数、④投与経路、⑤投与方法、⑥観察期間、⑦ヌードマウスとの比較などが挙げられる。そのために観察すべき事項としては、①腫瘍形成確率（10匹中何匹か）、②腫瘍出現までの時間、③腫瘍のサイズ、④腫瘍形成に必要最低限の接種細胞数、⑤転移性腫瘍形成の有無、⑥腫瘍の自然発生率などが挙げられる。

C-10-3-6 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の最終製品中の細胞集団、すなわち「投与細胞」には、目的細胞に加え、混入する前駆細胞や残存多能性幹細胞およびその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。また、最終製品の造腫瘍性試験における「造腫瘍性」には、ヒトでの生着部位での腫瘍形成能を考察する材料であることが要求される。

最終製品における造腫瘍性関連の懸念事項には、「どのくらいヒト多能性幹細胞（ES/iPS細胞）が残存しているか」という

ことと「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに加え、「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか」ということが挙げられる。

最終製品の中に「どのくらいヒト多能性幹細胞（ES/iPS細胞）が残存しているか」ということに関しては、C-3-3項の中間製品の場合と同様に、多能性幹細胞のマーカ―遺伝子／マーカ―タンパク質を利用した方法により評価することが可能である。手技としては定量性RT-PCRやフローサイトメトリーなどが挙げられる。

最終製品の中に「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに関しても、C-3-3項で中間製品について述べた際と同様に、細胞増殖特性の評価（不死化細胞の検出）や軟寒天コロニー形成試験（足場非依存性増殖細胞の検出）などで評価が可能である。

一方、「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか」という懸念については、*in vivo* 造腫瘍性試験が必要となる。その場合に考慮すべき点としては、①試験系の検出限界、②投与細胞数、③投与部位、④例数、⑤観察期間、⑥陽性・陰性コントロールのあり方などが挙げられる。

C-10-3-6-1 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験～①試験系の検出限界～

最終製品中に含まれるごく少数の造腫瘍性細胞を検出するには、C-3-3～C-3-4項での中間製品の場合と同様に、WHO TRS 878の造腫瘍性試験よりも低い検出限界が必要かもしれない。ここで「必要である」と断定しないことには理由がある。

T 細胞を持たないヌードマウス、T 細胞と B 細胞を持たない SCID マウスおよび T 細胞と B 細胞に加えて NK 細胞も持たず、なおかつ樹状細胞機能も低下した NOG マウスとで、Hela-S3 細胞を皮下投与した際の検出限界を検討した研究がある (Machda *et al.*, *J Toxicol Sci.* 2009;34:123-7). この研究によれば、免疫不全の重症度に従って、Hela-S3 細胞の検出限界が低くなっている。ただし、モデル動物の免疫系が抑制されているほど、通常の免疫力を備えたヒトに実験結果を外挿することが困難になると考えられる。例えば、最終製品中に残存する ES/iPS 細胞に由来する腫瘍が NOG マウスで検出されたとしても、特に自己由来製品や HLA 適合製品などの場合、残存 ES/iPS 細胞等は実際には患者の免疫機能により排除されるかもしれない。即ち、重度免疫不全マウスを使用した試験の結果からは「辛すぎる評価」を生む恐れがあることに注意が必要である。

C-10-3-6-2 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験～②投与細胞数～

「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか」という懸念の検討材料としてモデル動物を用いて *in vivo* 造腫瘍性試験を実施する場合には、種差と個体差を考慮に入れて、可能ならばヒトでの投与量の 10～100 倍量の細胞数を投与する。Erdo ら (*J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:780-5) は、サイクロスポリン A で免疫を抑制したマウスないしラットにマウス ES 細胞を移植したところ、マウスでは 500 個の細胞移植で 75～100% の確率で腫瘍形成が認められたのに対し、ラットでは

80 万個の細胞移植でも腫瘍形成が認められなかったことを報告している。こうした報告から考えれば、ヒト由来の造腫瘍性細胞をマウスに移植した場合、同種由来の類似細胞の移植よりも拒絶が起こりやすい可能性があると考えられる。即ち、マウスを用いてヒト細胞・組織加工製品の造腫瘍性を評価する場合には「甘すぎる評価」を生む懸念がある。従って、可能ならばヒトでの投与量に安全係数 (10～100) を掛けた細胞数を投与することが望ましい。

C-10-3-6-3 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験～③投与部位～

「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか」という懸念の検討材料としてモデル動物を用いて *in vivo* 造腫瘍性試験を実施する場合には、細胞を投与する部位は、可能ならばヒトでの投与部位に相当する部位にすべきである。また、当該投与部位における造腫瘍性細胞の検出限界、感度、精度等について分析的評価が必要となる。もしも、物理学的障害を生ずるなどの理由により当該部位に対する投与細胞数に限界がある場合には、可能であれば投与部位を変更するのではなく、動物とヒトとの間の当該投与部位の相対的スケール比に応じて投与細胞数を調節する。すなわち、生着する微小環境と投与細胞との相互作用による腫瘍形成の可能性を考察することを優先する。免疫特権、炎症、虚血など、特殊な投与環境における細胞の挙動は動物モデルにおける *in vivo* での評価でなければ、考察することが困難だからである。

生着部位の違いによる腫瘍形成の影響について、Przyborski は 2005 年の総説の中

で、ヒト ES 細胞を免疫不全動物に移植したとしても移植部位の差によりテラトーマのタイプが異なると述べている (*Stem Cells*. 2005 Oct;23(9):1242-50). また、Suzuki らは、休眠状態にある造腫瘍性細胞が生着部位の環境により活性化されることを示唆する結果を報告している (*Am J Pathol*. 2006 Aug;169(2):673-81). これらの報告からすれば、*in vivo* 造腫瘍性試験においてはヒトの生着部位に相当する部位に移植細胞が生着していない場合には、得られた結果のヒトへの外挿性が弱くなってしまふと考えられる。

C-10-3-6-4 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験～④例数～

Geron 社が脊髄損傷治療を目的とした製品 (GRNOPC1) の非臨床試験において膨大な数の動物を使用したと発表したことから、モデル動物を用いて *in vivo* 造腫瘍性試験を実施する場合、1 群あたり何例ずつの動物を試験すべきか、という問題が話題になることが多い。しかしこの点についての答えは明確であり、単純に統計学的に信頼性におけるデータを構成するだけの例数でよい。

例えばここに、最終製品中への ES/iPS 細胞の混入の検出限界が 10% の試験系 (すなわち総数 200 万個を動物に投与する場合、そのうち 20 万個以上が ES/iPS 細胞でなければ腫瘍形成が検出できない系) が存在したとする。その系を用いた場合、例数を増やせば、統計学の「大数の法則」により検出限界以上の測定値の信頼性は上昇する。しかし、例数を増やせば 10% 未満の ES/iPS 細胞の混入が検出できるかという、

そんなことはありえない。検出限界未満の極僅かな ES/iPS 細胞の混入は何度測定しても検出されることはない。極僅かな ES/iPS 細胞の混入を検出することを目的にいたずらに例数を増やすことはナンセンスである。従って、単純に統計学的に信頼性におけるデータを構成するだけの必要最低限の例数でよいということになる。

C-10-3-6-5 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験～⑤観察期間～

モデル動物を用いて *in vivo* 造腫瘍性試験を実施する場合のもう一つの大きな検討事項に観察期間の長さが挙げられる。

WHO TRS 878 では、ヌードマウスに Hela 細胞等の汎用連続継代性細胞株を投与した際の腫瘍形成の時間経過を観察し、TPD₅₀ がほぼ一定になるまでの時間という形で観察期間 (16 週間) が定められている。ヌードマウスよりも重度な免疫不全の動物モデルを使用してヒト多能性幹細胞加工製品 (の最終製品) の造腫瘍性を評価しようとする場合には、ヒト多能性幹細胞を用いて同様な検討を実施し、適切な観察期間を設定する必要がある。

C-10-3-6-6 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験～⑥対照群～

最終製品の安全性評価のための *in vivo* 造腫瘍性試験における、陽性対照のあり方については以下のように考える。

ヒト多能性幹細胞加工製品の場合、造腫瘍性の原因としては、原材料の多能性幹細胞の残留と、加工による造腫瘍性細胞の出現が考えられる。ただし、後者については造腫瘍性細胞が出現していたとしてもその

具体的表現型が予測できないことから陽性対照を設定することは不可能である。従って、ヒト多能性幹細胞加工製品の場合には、出発材料であるヒト多能性幹細胞を陽性対象とすることが原則と考えられる。

なお、例えば投与量に制限がある場合や出発材料に陽性が期待できない場合（ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品のような場合）においては、汎用される連続継代性細胞株などの適切な造腫瘍性細胞を使用する。

WHO TRS 878 ではヌードマウスにおける腫瘍の自然発症率は低く陰性対照群は必要ないとされているが、重度免疫不全動物を使用する際には、当該動物における腫瘍の自然発生率を予め調査し、発生率が著しく高い場合には、陰性対照群を設けてバックグラウンドとしての腫瘍形成率を評価する必要がある。

C-10-4 造腫瘍性関連 *in vitro* 試験

細胞集団の造腫瘍性、あるいは細胞集団中の造腫瘍性細胞を検出する系としていくつかの *in vitro* 試験系もあり、それぞれに長所と短所がある。それらを *in vivo* 試験法と併せて Table 8-1 にまとめた。核型分析などの染色体異常を検出することを目的とする試験は技術的に確立されているものの、得られた結果と細胞の造腫瘍性との相関性が低いことが多く、造腫瘍性を評価するというよりも製品の遺伝的安定性を評価するという目的で実施されるべきものと言える。軟寒天コロニー形成試験は、がん細胞の多くが足場非依存的に増殖するのに対して接着性正常細胞は足場が存在しないとアポトーシス（アノイキス）を起こすという性質を生かした試験系で、細胞を分散して軟寒

天に封入し、足場非依存的な細胞増殖を検出する試験である。ただし、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞はトリプシン処理などによる分散によってアポトーシスを起こす特異的な性質を持つことが知られており、ヒト多能性幹細胞加工製品の場合、単純には軟寒天コロニー形成試験を適用できない。我々は、分散誘導性アポトーシスを抑制されると言われる ROCK 阻害剤存在下にヒト iPS 細胞を分散、軟寒天中に播種した経験があるが、それでもコロニー形成は認められなかった（投稿中）。フローサイトメトリーや定量性 RT-PCR (qRT-PCR) は、特定のマーカータンパク質・マーカー遺伝子の発現を指標に未分化細胞または造腫瘍性細胞を短時間で検出する簡便な系で、フローサイトメトリーの場合は細胞を分離・回収出来る点、qRT-PCR はその高い感度が利点である。我々は、初代培養ヒト体細胞中にヒト iPS 細胞を添加して検討した結果、フローサイトメトリーでは 0.1%、qRT-PCR の場合には 0.01% の存在比のヒト iPS 細胞を有意に検出することができることを明らかにしている（投稿中）。不死化細胞を *in vitro* で検出する系としては、所定の培養期間を超えて細胞を培養し、その増殖特性を評価する試験がある。これらを組み合わせて未分化細胞および不死化細胞の存在を否定できれば、最終製品の造腫瘍性はかなり低いことが示唆されるが、臨床試験に進むことの妥当性は、投与細胞数、投与部位、リスクマネジメントプラン、あるいは *in vivo* 造腫瘍性試験データ等によって製品ごとに判断されるべきと考えられる。

C-10-5 ヒト体細胞・体性幹細胞加工製

品の造腫瘍性試験

C-10-3-1 項で述べたように、ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品の原材料の細胞には造腫瘍性がないと一般的に考えられている。従って、ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品の造腫瘍性に関しては、「最終製品中に目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が混入しているか」という懸念と「投与細胞が、生着する微小環境において腫瘍を形成するか」という懸念についてのみ検討すればよいということになる。

特に、製品中の細胞がドナーでの基本機能と同様の基本機能を示す製品またはドナーでの場合と同様に患者で機能する製品を用いて患者の細胞の修復、再建、置換または補充をする場合（「相同的使用」(homologous use)という）には、「最終製品中に目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が混入しているか」ということが適切な試験（細胞増殖特性解析等）により十分に否定できれば、造腫瘍性については移植医療と同レベルと考えられ、それ以上の造腫瘍性に関する検討は必要ないと考えられる。

表 2 に欧米において薬事承認済みのヒト細胞・組織加工製品（すべてヒト体細胞加工製品）を示すと同時に、各製品の審査概要に記載されている造腫瘍性関連試験の内容を示す。Table 8-2 に示された製品の多くに関し、*in vivo* 造腫瘍性試験は要求されていないことが明らかである。ヌードマウスを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験を実施している製品が 2 件あるが、C-3-4 項で述べた通り、これらの試験では、たとえ実際には僅かに造腫瘍性細胞が混入していたとしても結果はすべて偽陰性になってしまう可能性が高いと考えられる。

なお、ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品は相同的使用、非相同的使用ともに、世界各地で臨床応用が進んでいるが、製品の投与を原因とする腫瘍形成の報告ほとんど存在せず、これまでに科学論文として報告されたものは 1 件しかない (Amariglio N *et al. PLoS Med.* 2009;6(2):e1000029)。即ちヒト体細胞・体性幹細胞が体外培養によって悪性形質転換を起こすことは非常に稀であると考えられる。

C-10-6 考察

ヒト多能性幹細胞加工製品を含む細胞・組織加工製品を対象にした造腫瘍性試験ガイドラインは今のところ存在しない。

WHO TRS 878 の造腫瘍性試験は対象・目的が異なるため、細胞・組織加工製品の造腫瘍性評価にそのまま転用することには無理がある。解決策としては、重度免疫不全マウスの利用が考えられ、重度免疫不全マウスを用いた造腫瘍性の定量的評価法の開発と標準化が目下の課題である。造腫瘍性関連試験には *in vitro* の試験系もあり、各試験系の能力と限界を科学的に踏まえ、個別の製品で示すべき具体的な評価事項にどうかで取捨選択する必要があると考えられる。

C-10-7 小括

細胞・組織加工製品の中でも造腫瘍性に関して懸念の強い製品については、本稿で挙げたタイプの異なる試験を複数実施して総合的に判断すべきと考えられる。なお、個別の製品で示すべき具体的な評価事項は、原材料や製品の特性・対象疾患・リスクマネジメントプランなどを勘案して製品ごと

に判断されるものである。適切な試験（を組み合わせた）結果・評価についても、ヒトでの結果を完全に保証するものではなく、各試験法の能力と限界を理解したうえで、リスク評価・リスクマネジメント立案およびインフォームド・コンセントの受領を行うことが重要と考えられる。

C-11 抗原性

抗原性の問題も、細胞・組織加工製品にとって、安全性上の重要な懸念事項である。

これには、目的とする細胞における抗原性の問題と、目的細胞以外の細胞や製造関連物質に起因する抗原性の問題がある。

目的細胞自体の抗原性の問題では、自己細胞加工製品は一般的に考慮外である。同種細胞加工製品の場合、臨床適用時に一般的には免疫抑制剤を併用することや、将来的に検討されているように HLA が適合した iPS 細胞から製品を得る場合があるとしても、いずれにしても抗原性問題克服のための対策がとられることになる。もとより、これらヒト目的細胞の抗原性を実験動物を用いた方法で評価しようとするには意義がない。ただし、こうした見解はあくまで目的細胞製品がヒト型であることを前提としている。最近明らかになりつつあるように（C-8 項参照）、細胞培養時における動物由来のフィーダー細胞や培地成分による細胞への動物抗原糖鎖の発現（存在）が懸念される。これには培養法改良か培養後の処置で対処するのが最善であると思われるが、糖鎖解析などでの現状把握やモニターが重要な関心事項である。

もう一つの課題である製造工程由来不純物に由来する抗原性問題は、製法の改善、

品質コントロールで対処するのが最善の策であろう。この場合も実験動物を用いた方法で評価しようとするには意義がない。

結局、抗原性問題に対する MCP は、製造関連物質から極力ヒトへの抗原性を示す可能性のある物質、とりわけ異種動物由来成分を用いないか、あるいは製造工程中で懸念ある物質を可能な限り除去すること、そのモニターを確実にすることである。

C-12 ケース別上乗せ評価方策の策定

C-12-1 ケース別の MCP と上乗せ評価方策を検討する際の基本的考え方（リスク評価によるケース・バイ・ケースアプローチ）

自己と同種細胞及び体性幹細胞、ES/iPS 細胞由来製品の種類・特性、適用法、適用部位、対象疾患に応じた品質・安全性試験、評価基準に関するケース別の MCP や上乗せ方策を策定する際、どのような観点からアプローチすべきかについて検討を行った。その結果、国際的整合性を含めリスクをベースにしたアプローチが適切と結論した。

この考え方は、すでに薬事法に基づく一連の「ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する研究 ヒト（自己/同種）体性幹細胞/iPS（様）細胞/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、10(3),86-90（2011）；再生医療、10(3), 91-98（2011）；再生医療、10(3),99-106（2011）；再生医療、10(3), 107-117（2011）；再生医療、10(3), 118-128（2011）；再生医療、10(3), 129-140（2011）；再生医療、10(3), 141-146（2011）；再生医療、10(3), 141-146（2011）；再生医療、10(3), 147-152（2011）」に盛り込まれ

ている。また、再生医療枠組み検討会及び内閣官房医療イノベーション推進室（再生医療 WT）からも支持された。

そのポイントは、まず、患者さんのもつ疾患というリスク、それが時間経過に伴い増大するというリスク、これと製品や適用技術におけるリスクをはかりにかける、その際、①対象疾患（重篤度、緊急度、希少性、QOL 損失度等）、②患者数（限定的であれば直接顔が見える治療となる。臨床研究・治験がそのまま治療）、③ウイルス等感染性物質（原材料細胞は可及的上流で制御、脱動物資材の使用）、④原材料たる細胞の種類・特性（自己/同種、分化細胞/複機能性/多機能性）；⑤製品の種類・特性（自己/同種、未分化細胞の残存、生理活性物質分泌能、安定性）、⑥適用法、適用量、適用部位（局所/全身、細胞数、シート/構造物、腫瘍形成環境）、⑦採取・移植・治療施設と従事者の専門性（高度であるほどリスク軽減効果大）、⑧適用後の適切な安全性対策（副作用や健康被害への適切な対応策を前提に適用）、⑨有効性（顕著な有効性が大きくリスクを上回ることによる有用性）、⑩ベネフィット（重篤・緊急・QOL 損失の進行停止、治療の選択肢増大も臨床的意義あり）などの各要素、特に括弧内にも一部例示したリスク軽減要素や軽減対策を総合的に勘案し、リスクを相対化して、その大きさ、特徴、合理性から、必要な試験の内容と程度を考える、ということである。さらに、評価試験等にかかる時間、労力、コスト、科学的意義からみた合理性も勘案する必要があると考えられる（Table. 9）。

この考え方に基づき再生医療学会の協力のもと、産・官・学が共通に活用できる試

案等の作成を開始した。

C-12-2 ケース別のMCPと上乘せ評価方策の検討想定例

前項での考え方に基づき、現在 iPS 細胞由来製品において最も早期に実用化が期待されているモデルとしてとして、網膜色素上皮細胞の老人性加齢黄斑変性症に対する臨床応用における MCP+ケース別（細胞種・特性、製品の種類、適用法、適用疾患、開発段階別）上乘せ例のイメージ表を作成してみた（Table. 10）。これはあくまできわめて大まかな想定モデル表であり、また現実の適用を意図するものではない。実際には、同じ疾患でも自己由来製品を用いるか、同種由来製品を用いるかにより MCP は異なり、また、例えば、製造・品質のところにおいても、さらに細部の各項目についてはケース毎に試験実施の有無や、試験実施有りとしても試験法及び評価基準についてのケース別に最も適切な対応が考えられる。その際の基本的な考え方をさらにきめ細かく提示する必要があると考えられる。さらに、特に注目されている造腫瘍性試験などについては、別途、デシジョンツリーのようなものを作成して、どのような製品であっても、とりあえずどのような考え方で当該問題にアプローチすべきかの一般的な方策を示すことが有益であると考えられる。

C-13 関連指針の相互比較からみたヒト細胞・組織加工製品（ヒト細胞調製品）の臨床研究と薬事開発に共通して参照可能な品質・安全性確保の技術要件の抽出・同定および

リスク・ベース・アプローチに基づいたケース別上乗せ評価方策に関する考察

わが国では、再生医療に利用される細胞・組織加工製品の実用化には主に、治験を経て薬事承認を受けるルートと、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究」を経て先進医療・高度医療等に向かうルートがあるが、国民のアクセシビリティと産業化という面からは前者を採ることが必要になる。「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」では、研究に用いるヒト細胞・組織製品について、商品化を目指した製品の治験に準じる品質管理を求めており、今後は臨床研究で用いられる製品でも一定の品質・安全性が確保されていくと予想される。ただし、現状ではヒト細胞組織製品の臨床研究のデータが医薬品等の申請資料として利用できずに改めてデータを取得し直すケースがまだ多く、細胞・組織加工製品の実用化の上での大きな時間的・経済的な障害として問題となっている。そこで、本研究では、ヒト幹細胞臨床研究の推進から薬事上の製造販売承認への切れ目のない展開を効果的・効率的・合理的にすすめることを目指し、臨床研究と薬事開発とが共通して参照可能な技術要件を関連ガイドラインから抽出することを試みるとともに、製品別の上乗せ評価方策の同定法のあり方を検討した。

C-13-1 背景と目指すもの

再生医療を目的とした新規の細胞・組織加工製品の国内実用化には主に2つのルートがある。1つは治験を行った上で厚生労働省の製造販売承認を受けて保険適用医療として実現するルート、言い換えれば薬事

法上の「業」としての実用化である。もう1つは、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に則った臨床研究（ヒト幹細胞臨床研究）の成果に基づく、先進医療・高度医療評価制度による医療、もしくは保険適用外医療としての実用化であり、これらは医療法・医師法の下での「医療行為」として実施される。ただし先進医療・高度医療評価制度による医療の場合、実施可能な医療機関が限られると同時に製品の品質にばらつきが生じる可能性があり、また、開発に多くの投資を要する新規製品を用いた保険適用外医療は高額となりやすいため、いずれの場合も多くの国民が簡単には享受できない恐れがある。従って、国民が広くアクセスできるという観点からすれば、治験を通じて薬事法上の承認を得る必要がある。また、ヒト幹細胞臨床研究は手続きや費用などの面で治験よりも実施が比較的容易であるものの、治験の国際ガイドライン（ICH-GCP）に沿った国内GCP（Good Clinical Practice）ガイドライン（後述）の準拠が義務ではなく、得られたデータを製品の薬事承認申請資料としてそのまま使用できない場合が多い。つまり、新規の細胞・組織加工製品に関して、ヒト幹細胞臨床研究で有効性・安全性を確認してから産業化を目指して薬事承認を得ようとしても、多くの場合には、GCPに則った治験をやり直さなければならない。そこで、本研究では、ヒト幹細胞臨床研究の推進から薬事上の製造販売承認への切れ目のない展開を効果的・効率的・合理的にすすめることを目指し、臨床研究と薬事開発に共通して必要な、ヒト細胞・組織加工製品（ヒト細胞調製品）の品質・安全性確保のための

技術要件について、関連ガイドラインを相互参照しながら同定・抽出することを試みた。これとともに、リスク・ベース・アプローチを応用し、製品ごとのケース別上乘せ評価方を同定する方法の開発を試みた。

C-13-2 ヒト幹細胞臨床研究と薬事開発に共通して必要な品質・安全性確保の技術要件の抽出

これまで本研究課題では、ヒト幹細胞臨床研究とヒト細胞・組織加工製品の薬事開発に共通した品質・安全性確保に関する基本的考え方、すなわち汎用的な Good Tissue Practice を整理・提示してきた。その結果は平成 22 年度の「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の改正に反映されるに至っている。本年度は、ヒト幹細胞臨床研究とヒト細胞・組織加工製品の薬事開発とにおいて共通の、施設・製造工程・製品評価面での基本的技術要件を抽出する目的で、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（平成 22 年厚生労働省告示第 380 号、以下「ヒト幹細胞臨床研究指針」）、「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」（平成 20 年 2 月 8 日：薬食発第 0208003 号、平成 20 年 9 月 12 日訂正、以下「自己製品指針」）、および「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」（平成 20 年 9 月 12 日：薬食発第 0912006 号、以下「同種製品指針」）の 3 つの指針について、品質・安全性・有効性に関する 26 の項目に関する比較を行った。以下に各項目についての比較表を示す。

（なお、以下の表の左右カラムにある項目番号については、例えば「第 1 章 第 2 3 (4) ⑤」項の場合、「1-2-3-4-5」と表記されている）

C-13-2-1 技術面におけるドナーの適格性

1. 技術面におけるドナーの適格性				
	ヒト幹細胞臨床研究での有効性・安全性確保策	薬事トラックにおける品質・安全性確保のための基本的技術要件		
項(ヒト幹指針)	ヒト幹細胞臨床研究指針	自己製品指針	同種製品指針	項(自己/同種製品 GL)
4-1-3	3 原材料となるヒト幹細胞又はヒト分化細胞の受入れ 研究者等は、原材料となるヒト幹細胞又はヒト分化細胞を受け入れる際には、第3章第2の3(1)に掲げる記録により、必要な基準を満たした適切なものであることを確認しなければならない。	(2)ドナーの感染症に対する留意点 患者、製造従事者及び医療従事者の安全性を確保する観点等から、採取細胞・組織を介して感染する可能性がある各種感染症を考慮して感染症に関する検査項目を定め、その妥当性を明らかにすること。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)に留意すること。	(2)原材料となる細胞・組織の特性と適格性	2-1-1-2
			① 生物学的構造・機能の特徴と選択理由 原材料として用いられる細胞・組織について、その生物学的	2-1-1-2-1