

Table 2 Relative abundances of five N-linked glycans from three different lots of MKN45 cells

	Peak Area (%)				SD	RSD
	Lot1	Lot2	Lot3	Average		
a	20.5	17.9	20.4	19.6	1.47	7.51 %
b	19.7	18.2	17.9	18.6	0.915	4.91 %
c	22.5	23.9	22.4	22.9	0.854	3.72 %
d	21.5	22.1	22.3	21.9	0.386	1.76 %
e	15.9	17.9	16.3	16.9	1.02	6.06%

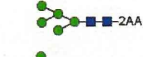
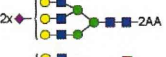
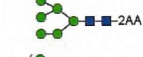
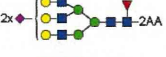
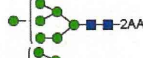
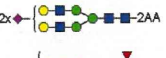
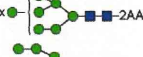
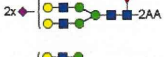
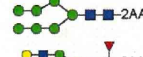
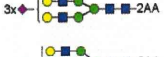
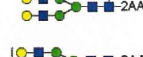
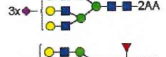
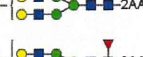
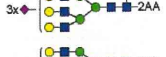
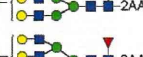
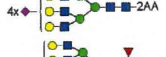
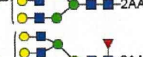
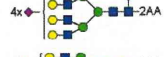
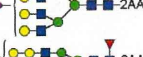
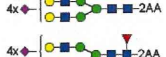


Table 3 Expression level of three characteristic glycan species on cancer cells

	MKN 45	MKN 7	PAN C1	BxP C3	HCT 15	LS17 4T	U93 7	K562	Jurkat	HL- 60
Bisecting GlcNAc	+	+	+	++	+	+	++	++	-	+
Polylectosamine -type	+	-	++	++	++	+	+	+	++	+++
Sulfated glycans	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Table4 Proposed structure of N-glycans observed in Toe and UTA-1 cell

Peak No.	Observed m/z	Proposed Structure	Peak No.	Observed m/z	Proposed Structure
1	1176		14	1744	
2	1379		15	1760	
3	1582		16	1906	
4	1354		17	2052	
5	1516		18	2272	
6	1678		19	1760	2x
7	1906		20	1906	2x
8	1840	2x	21	2068	2x
9	2053		22	2085	2x
10	2002		23	1986	SO <sup>+</sup> + 3x
11	2166	2x	24	1760	3x
12	1395		25	2272	3x
13	1541		26	1906	3x

Table5 Proposed structure of N-glycans observed in MEF and KSR

Peak No.	Observed m/z	Proposed Structure	Peak No.	Observed m/z	Proposed Structure
1	1354		12	2125	2x 
2	1516		13	2272	2x 
3	1678		14	1760	2x 
4	1840	2x 	15	1906	2x 
5	2002		16	1760	3x 
6	1906		17	2125	3x 
7	1760		18	2272	3x 
8	1906		19	2125	4x 
9	2272		20	2637	4x 
10	2637		21	1760	4x 
11	2068		22	1906	4x 

## 厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

### 「再生医療実用化加速に資する評価基準ミニマム・コンセンサス・パッケージ策定に関する研究」 分担研究報告書

#### ヒト細胞・組織加工製品の造腫瘍性試験の現状に関する調査研究

研究分担者：佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部・第2室・室長

#### 研究要旨

ヒト胚性幹細胞(ES 細胞)やヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) などの、いわゆるヒト多能性幹細胞を原材料として細胞・組織加工製品を製造し、再生医療・細胞治療へ応用しようとする試みが、現在、国内外で非常に活発に進んでいる。ヒト多能性幹細胞は動物体内に移植された際に腫瘍を形成する能力、いわゆる「造腫瘍性」を元来の特性として保持しており、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・残留による異所性組織形成や腫瘍形成・がん化を防止すること、すなわち最終製品の造腫瘍性の評価と管理が重要な課題となる。しかしながら、患者に投与する動物又はヒト由来の生細胞を対象にした造腫瘍性試験のガイドラインは今のところ存在しない。ヒト多能性幹細胞加工製品を含むヒト細胞・組織加工製品の開発が精力的に進む中、本研究では、その造腫瘍性の評価法の現状と課題について調査した。

#### A. 研究目的

ヒト胚性幹細胞(ES 細胞)やヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) などの「多能性幹細胞」は、その幅広い多能性ゆえに、いままで入手が困難であった各種細胞を作製することのできる素材となることが期待され、またその無限の自己複製能ゆえに、ひとたび目的細胞への効率的分化誘導方法が確立すれば、細胞・組織加工医薬品などの原材料として再生医療・細胞治療に利用できる細胞を大量に、安定に供給することが可能となることが期待されている。既に 2011 年 1 月に米国では、ヒト ES 細胞を加工した医薬品の再生医療における活用例として、

世界初の治験(脊髄損傷治療)が開始され、2011 年 7 月には同じく米国で網膜疾患治療を目的としたヒト ES 細胞加工製品の治験が開始されている(ただし、前者の治験は 2011 年 11 月に経済的理由により中断)。また、2007 年に山中らによって世界初のヒト iPS 細胞が樹立されたことを契機に、細胞のプログラミングを人為的に操作、制御できる時代が到来し、新規細胞基材、新規製造関連資材、新規製造方法、新規適用法等、新たなイノベーションを推進し、再生医療・細胞治療へ応用しようとする研究展開が国内外できわめて活発化している。この中に実用化に有望と考えられるシーズも数

多くあり、例えば、近年中にはわが国において iPS 細胞を加工して作製した網膜色素上皮細胞を加齢黄斑変性の患者らに対して臨床応用することが開始されると期待されている。このような、一昔前には実現が想定されていなかった製品（多能性幹細胞加工製品）の開発には、多能性幹細胞に関するイノベーションの進展と共に登場してくるリスクの評価法や、多能性幹細胞加工製品に特有の品質・安全性確保のための基盤技術が必須である。本分担研究では、多能性幹細胞加工製品を中心に、細胞・組織加工製品において重要な安全性上の関心事として、特に造腫瘍性の評価の現状と課題について調査を行った。

## B. 研究方法

米国のヒト細胞、組織または細胞・組織利用製品（HCT/P）に関しては米国食品医薬品局（FDA）の生物製剤評価研究センター（CBER）の Steven Bauer 博士、EU の先端医療製品（ATMP）に関しては欧州医薬品庁（EMA）の先端医療委員会（CAT）／独国ポールエールリッヒ研究所（PEI）の Egbert Flory 博士・Bettina Klug 博士ら、ならびに国際生物製剤標準化連合（IABS）／WHO 細胞基材研究班 John C Petricciani 博士らに聞き取り調査を行った。これと同時に各種メディア中の公開情報の収集を行った。

### （倫理面への配慮）

本研究は動物・ヒト試料等を用いない調査型研究のため、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験指針、研究倫理審査委員会規程等にある倫理面の審査・承認が必要とは

ならなかった。

## C. 研究結果

### C-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-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) の生物製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「生物製品製造用の *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「生物製品 (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  $10^7$  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。造腫瘍性の程度の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-3 ヒト多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験**

#### **C-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。

- |                        |
|------------------------|
| ④ 原材料の品質管理のための造腫瘍性試験   |
| ⑤ 製造工程管理のための造腫瘍性試験     |
| ⑥ 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-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の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-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学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-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<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> 値はそれぞれ 10,  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^6$  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<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> 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  $3 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^{10}$  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-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- $\gamma$ C double-knockout (DKO) , NOD/SCID/ $\gamma$ 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言われている。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-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。

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」ということについても、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-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-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-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学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-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点, 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-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, TPD<sub>50</sub> 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-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-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* 試験法と併せて表 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-5 ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験**

C-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。表 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。

#### D. 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適用かどうかで取捨選択する必要があると考えられる。

#### E. 結論

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。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

1. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S-I, Kawamata S, Sato Y. Highly sensitive *in vitro* methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One* (投稿中)
2. 安田智, 佐藤陽治 再生医療に対する規制・制度等について：欧米の動向 幹細胞技術の標準化－再生医療への期待 (一般財団法人バイオインダストリー協会 堀友繁 監修) 2012 (印刷中)
3. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療における細胞・組織加工製品の治験とレギュレーション *実験医学増刊* 2012 (印刷中)
4. 佐藤陽治, 黒田拓也 ヒト多能性幹細胞を使った再生医療・細胞治療における造腫瘍性試験の現状 *医学のあゆみ* 2011; 239:1460-5.
5. Nishioka K, Nishida M, Ariyoshi M, Jian Z, Saiki S, Hirano M, Nakaya M, Sato Y, Kita S, Iwamoto T, Hirano K, Inoue R, Kurose H. Cilostazol Suppresses Angiotensin II-induced Vasoconstriction via Protein Kinase A-mediated phosphorylation of TRPC6 channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31:2278-86.
6. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥：ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全

性確保に関する指針整備と主なポイント  
*再生医療* 2011; 10:206-10.

7. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥：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関する指針(案)－総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について－ *再生医療* 2011; 10:211-8.
8. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥：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関する指針(案)－総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について－ *再生医療* 2011; 10:219-26.
9. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥：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関する指針(案)－総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について－ *再生医療* 2011; 10:227-37.
10. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥：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関する指針(案)－総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について－ *再生医療* 2011; 10:238-48.
11. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥：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)－総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について－ *再生医療* 2011; 10:249-60.

12. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト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) — ヒト体性幹細胞, iPS(様)細胞又は ES 細胞を加工して製造される医薬品等(ヒト幹細胞加工医薬品等)の最終製品の品質管理 — *再生医療* 2011; 10:261-6.

13. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト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) — ヒト体性幹細胞, iPS(様)細胞又は ES 細胞を加工して製造される医薬品等(ヒト幹細胞加工医薬品等)の非臨床試験及び臨床試験について — *再生医療* 2011; 10:267-72.

14. Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Watanabe K, Ono K, Shimizu S, Hayakawa T, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y. AW551984: a novel regulator of cardiomyogenesis from pluripotent embryonic cells. *Biochem J*. 2011;437:345-55.

15. Nishida M, Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S, Hoshijima M, Ikeda Y, Nakaya M, Ide T, Mori Y, Kurose H. TRPC3-mediated  $Ca^{2+}$  influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;409:108-13.

## **G-2 学会発表**

1. Kuramochi T, Satoh M, Atsuki H, Yasuda S, Hayakawa T, Suzuki K, Sato Y. Modes of action of genes facilitating ischemia-induced VEGF secretion in human mesenchymal stem cells. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都 (2012 年 3 月 14-16 日)

2. 佐藤陽治 細胞治療・再生医療の規制の国際比較 第 12 回医薬品等ウィルス安全性シンポジウム, 東京 (2012 年 2 月 4 日)

3. Sato Y. Update on the Regulation and Development of Cell/Tissue-Based Products in Japan. 2011 International Convention of the Pharmaceutical Society of Korea, 仁川, 韓国 (2011 年 11 月 8 日)

4. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human stem cells. World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany (2011 年 11 月 2-4 日)

5. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human somatic stem cells. World Stem Cell Summit 2011, Pasadena, USA (2011 年 11 月 3-5 日)

6. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human pluripotent stem cells. World Stem Cell Summit 2011, Pasadena, USA (2011 年 11 月 3-5 日)

7. 佐藤陽治 ヒト iPS(様)細胞を加工して製造される分化細胞の品質 第 1 回レギュラトリーサイエンス学会学術大会, 東京 (2011 年 9 月 3 日)

8. Sato Y, Atsuki H, Satoh M, Tanabe S, Yamaguchi T, Hayakawa T, Suzuki K. Identification of genes that regulate



cardiomyogenesis in mouse embryonic cells.  
The 10<sup>th</sup> Annual Meeting of the International  
Society for Stem Cell Research, Tronto,  
Canada (2011年6月15-18日)

9. Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T,  
Satoh M, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y.  
Genes associated with ischemia-induced  
VEGF secretion of human bone marrow  
mesenchymal stem cells. The 10<sup>th</sup> Annual  
Meeting of the International Society for  
Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011  
年6月15-18日)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

**H-1. 特許取得** なし

**H-2. 実用新案登録** なし

**H-3. その他** 特記事項なし

表 1 主な造腫瘍性関連試験の能力と限界

**in vivo試験法**

試験法	測定事項	評価事項	利点	欠点
ヌードマウスへの移植	腫瘍形成	造腫瘍性細胞の検出	●定量化の方策が整備 (WHO TRS 878)	●時間 (数週間～数カ月)・費用がかかる ●膀胱がん、乳がん、グリア細胞腫、リンパ腫、白血病細胞に由来する細胞株は腫瘍を形成しない ●僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
NOD-SCIDマウスへの移植			●ヌードマウスよりも高感度	●時間 (数週間～数カ月)・費用がかかる ●定量化の方策が未整備 ●胸腺腫を自然発症
DKO/NOG/NSGマウスへの移植			●NOD-SCIDよりも高感度 (?) / 胸腺腫なし	●時間(数週間～数カ月)・費用がかかる ●定量化の方策が未整備

**in vitro試験法**

試験法	測定事項	評価事項	利点	欠点
細胞増殖特性解析 (所定培養期間を超えた培養)	細胞増殖速度	不死化細胞の検出	●簡便・安価 ●時にはヌードマウスよりも『高感度』 ●不死化していても腫瘍形成のないケース)	●僅かな不死化細胞の混入の検出には時間がかかる
フローサイトメトリー	細胞マーカー 蛋白質発現	造腫瘍性細胞・ 未分化細胞 の検出	●短時間 (～1日)・簡便 ●時には軟寒天コロニー試験よりも『高感度』 ●細胞を識別・分離・回収できる	●特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない ●ゲートの掛け方で結果がばらつく
qRT-PCR	細胞マーカー 遺伝子発現		●短時間 (～1日)・簡便 ●時にはフローサイトメトリーよりも『高感度』	●特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない
軟寒天コロニー形成試験	コロニー形成	足場非依存的 増殖の検出	●In vivo試験より短時間 (数週間～1カ月程度) ●安価 ●時にはヌードマウスよりも『高感度』	●浮遊系細胞に使用できない ●僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない ●ヒ HES/iPS細胞は検出不能 (分散誘導性細胞死)
核型分析	染色体の 数・サイズ・形	染色体異常 の検出	●技術的に確立	●相関性の問題 (染色体異常⇔造腫瘍性) ●僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
染色体CGH およびアレイCGH	ゲノムDNAの コピー数異常			
蛍光in situハイブリ ダイゼーション(FISH)分析	特定遺伝子の 位置・コピー数			

表2 欧米で承認済みのヒト細胞・組織加工製品の造腫瘍性関連試験  
(それぞれの審査概要から抽出・整理)

	製品名	細胞/足場材料	適用	造腫瘍性試験			核型分析	免疫不全動物を用いた他の試験(動物)	備考
				in vivo(動物)	軟寒天コロニー形成試験	細胞増殖特性解析			
USA	Carticel	自己軟骨細胞	軟骨損傷						
	Provenge	自己樹状細胞(PAP抗原提示)	転移性前立腺がん						自己由来製品なので非臨床安全性試験なし
	laViv (azficel-T)	自己線維芽細胞	ほうれい線解消(美容整形)						ヒトでの経験が豊富なので非臨床試験なし、なお臨床試験中に腫瘍形成1例
	HemaCord(HPC-C)	同種臍帯血造血前駆細胞	造血幹細胞移植			○			Colony forming unit測定
	Epicel	自己角化細胞/マウス細胞層	熱傷	○ (ヌードマウス)	○		○	○ (ヌードマウス)	ヌードマウス・軟寒天ともに陰性
	Apligraf(Graftskin)	同種角化細胞+同種線維芽細胞/ウシ由来コラーゲン	皮膚潰瘍				○	○ (Ku-SCDマウス)	
	TransCyte(Dermagraft-TC)	同種線維芽細胞/ナイロン基材	熱傷		○			○ (ヌードマウス)	軟寒天で陰性
	Dermagraft	同種線維芽細胞/ポリグラクチンメッシュ	皮膚潰瘍	○ (ヌードマウス)			○	○ (ヌードマウス)	ヌードマウスで陰性
	OrCel	同種角化細胞+同種線維芽細胞/ウシ由来コラーゲン	熱傷 表皮水疱症					○ SCDマウス, ヌードマウス)	
EU	ChondroSelect	自己軟骨細胞	軟骨損傷			○	○ (ヌードマウス)	既定期間を越えた培養で細胞老化確認	

## 厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

「再生医療実用化加速に資する評価基準ミニマム・コンセンサス・パッケージ策定に関する研究」

### 分担研究報告書

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必要な品質・安全性確保の技術要件およびケース別上乘せ評価方策の同定法に関する研究

研究分担者：佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部・第2室・室長

#### 研究要旨

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。

#### A. 研究目的

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「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に限られると同時に製