

も検出限界未満であった。従って、ヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞に混入する未分化細胞ないし異常形質転換細胞は、その足場非依存性が PA-1 細胞と同等だとした場合、1%未満であることが示唆された。

C-2 NOG マウスを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験の性能評価

本研究では、免疫不全の度合いの違う 2 系統のマウス、すなわちヌードマウス (T 細胞欠損) と NOG マウス (T 細胞, B 細胞および NK 細胞欠損) の不死化細胞の生着性を比較するだけでなく、移植細胞をマトリゲルに封入した状態で NOG マウスに移植した群 (NOG+マトリゲル群) の不死化細胞の生着性も検討した。各群で雄性 10 匹ずつを用い、移植する不死化細胞としては、生物薬品の細胞基材の品質評価のための造腫瘍性試験のための国際ガイドライン WHO TRS878 でポジティブコントロールとして推奨されている Hela 細胞を使用した。その結果、Hela 細胞移植後 3 週間後まではいずれの群においても移植細胞由来と推定される結節の形成は認められなかったが、4 週間後において、ヌードマウス群では 10^6 個移植群の 1 匹に結節の形成が認められ、NOG マウス群では 10^5 個移植群の 5 匹に結節形成が認められた。また、NOG+マトリゲル群では、 10^4 個移植群の 2 匹および 10^3 個移植群の 1 匹に結節が観察された (Figure 4)。5 週間後においては、ヌードマウス群では 10^6 個移植群の 3 匹に結節の形成が認められ、NOG マウス群では 10^5 個移植群の 4 匹に結節形成が認められた (4 週目で結節が認められた 5 匹のうち、1 匹の結節が小型化し測定不能となっていた)。また、NOG+マトリゲル群では、 10^4 個移植群の 5 匹および 10^3 個移植群の 2 匹に結節が観察された。

D. 考察

D-1 軟寒天コロニー形成試験の性能評価

ヒト多能性幹細胞加工製品の臨床応用において、最終製品の有効性と安全性の確保は本出的な問題である。ヒト多能性幹細胞加工製品の安全性に関する大きなハードルの一つとして、最終製品に混入する未分化な多能性幹細胞に起因する腫瘍形成のリスクが挙げられる。ヒト多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性については、細胞株の樹立方法、あるいは残存未分化細胞の除去法の開発などに工夫をこらす試みがなされてきた。しかしながら、最終製品への未分化細胞・造腫瘍性形質転換細胞の混入を評価する試験系の性能とその限界に関するバリデーションはほとんどなされてこなかった。

足場非依存的な増殖は細胞の腫瘍性獲得の指標となることが知られており、悪性形質転換を検出するための *in vitro* アッセイ系としては最も正確な系だとされている。足場非依存的な細胞増殖を検出する方法として、軟寒天コロニー形成試験法がこれまで一般的に用いられてきた。軟寒天コロニー形成試験の利点としては、①ヌードマウス移植試験ほどは長期間を要しない (半年以上 vs. 1 ヶ月程度)、②ヌードマウス移植試験よりも安価、③培養条件を変化させることで様々な環境下で細胞の特性評価が可能、などが挙げられる。逆に欠点としては、①実験の手間が煩雑、②通常 80・100mm ディッシュを用いるため多検体に向かない、③コロニーの計数・コロニーサイズのカットオフ値等に主観が入り、実験者間で結果がばらつく、④ *in vivo* 試験系の結果と整合しないことがある、などが挙げられる。また、軟寒天コロニー形成試験は非常に古典的な試験法だが、新種の製品群である細胞組織製品の造腫瘍性評価における有用性・妥当性を裏付けるデータが不十分である点も問題である。つまり、正常細胞中に混入した微量な悪性細胞の検出を目的としたバ

リレーションが不十分であった。

本研究で検討した結果、軟寒天コロニー形成試験は、ヒト iPS 細胞加工製品中に残存するヒト iPS 細胞を検出するには適当な方法ではないことが明らかになった。その理由は、おそらく、ヒト iPS 細胞特有の分散誘導性アポトーシスによるものだと考えられる。また、PA-1 細胞と RPE 細胞を用いた結果より、軟寒天コロニー形成試験系を用いて初代培養 RPE 細胞中に混入する PA-1 細胞の検出限界は約 1%であることが示唆された。

D-2 NOG マウスを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験の性能評価

D-2-1 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は、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されている。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。

D-2-2 WHO TRS 878 の造腫瘍性試験における検出限界

細胞・組織加工製品の安全性上のリスクの一つとして、「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。目的が違う WHO TRS 878 の試験を適用することは妥当なのか、という問題を考える前に、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 TPD₅₀ 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。米国 FDA/CBER の Andrew Lewis のデータによれば、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 TPD₅₀ 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 (http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/slides/5-4188S1_2_files/frame.htm), 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 (=TPD₅₀ 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 TPD₅₀

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 (10⁷ 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。

D-2-3 重度免疫不全マウスとマトリゲル

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。その有力な候補の一つとして、わが国で開発された重度免疫不全マウス系統 NOD/SCID/ γ Cnull (NOG) が挙げられる。NOG 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。NOG 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、まだ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、その標準化が必要とされてきた。

2008 年に米国ミシガン大学の Sean Morrison は、がん生物学における根本的な問題の 1 つ「ヒトのがんの中で、造腫瘍性をもつ細胞は一般的なものなのか、それともまれなのか」という問いに答えるための研究方法として、患者由来の任意のメラノーマ細胞 (直接患者から採取した原発性および転移メラノーマ由来の細胞) を限界希釈し、これをマトリゲルに懸濁したものを、NOG マウスに類似した重度免疫不全 NOD/SCID/IL2 γ KO マウス (NSG) に

投与することにより、マトリゲルに懸濁しなかった場合よりもメラノーマ細胞を高感度で検出できるようになることを示している (Quintana *et al.*, *Nature*. 2008;456:593-8)。そこで本研究では、Hela 細胞の希釈系列をマトリゲルに懸濁し、NOG マウスに投与することにより、WHO TRS 878 の方法と比較した場合にどの程度の感度になるのかを検討した。その結果、既存のガイドラインにあるヌードマウスを用いた方法と比較した場合、およそ数百倍~千倍感度が高いことが明らかとなった。今後は、「NOG マウス+マトリゲル」の手法が TRS 878 の高感度な代替法となり得るのかを検討するとともに、細胞・組織加工製品の品質試験および非臨床安全性試験としての有用性、位置づけを見極めるための検討が必要と考えられる。

E. 結論

ヒト iPS 細胞加工製品をはじめとする多くの細胞・組織加工製品の開発が、国内外で精力的に進められている。しかし、その最終製品中に残存ないし混入する未分化造腫瘍性細胞および悪性形質転換細胞を検出する方法の開発に関しては、これまでほとんど注意が払われてこなかった。本研究によって、*in vitro* 造腫瘍性試験としての軟寒天コロニー形成試験系の性能を評価した結果、その能力 (検出限界) と限界 (ヒト多能性幹細胞への適用可能性) を明らかにすることができた。また、NOG マウスおよびマトリゲルを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験系に関しては、Hela 細胞の検出能力について、既存のガイドラインにあるヌードマウスを用いた方法と比較した結果、およそ数百倍~千倍感度が高いことが明らかとなった。

これらの結果をもとに、更に各種の造腫瘍性試験系のバリデーションを進め、それらの能力と限界を見極めたうえで、一段と高性能な造

腫瘍性試験の開発を行うと同時に、試験法の標準化をすすめることにより、細胞・組織加工製品の品質評価・工程評価および安全性評価を容易にし、細胞・組織加工製品ならびに再生医療・細胞治療の実用化が促進されることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
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(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.
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(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.
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 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.
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.
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.
11. 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.

12. Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S, Hoshijima M, Ikeda Y, Nakaya M, Ide T, Mori Y, Kurose H, Nishida M. 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.
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 10th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011年6月15-18日)

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回医薬品等ウイ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)
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 10th 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

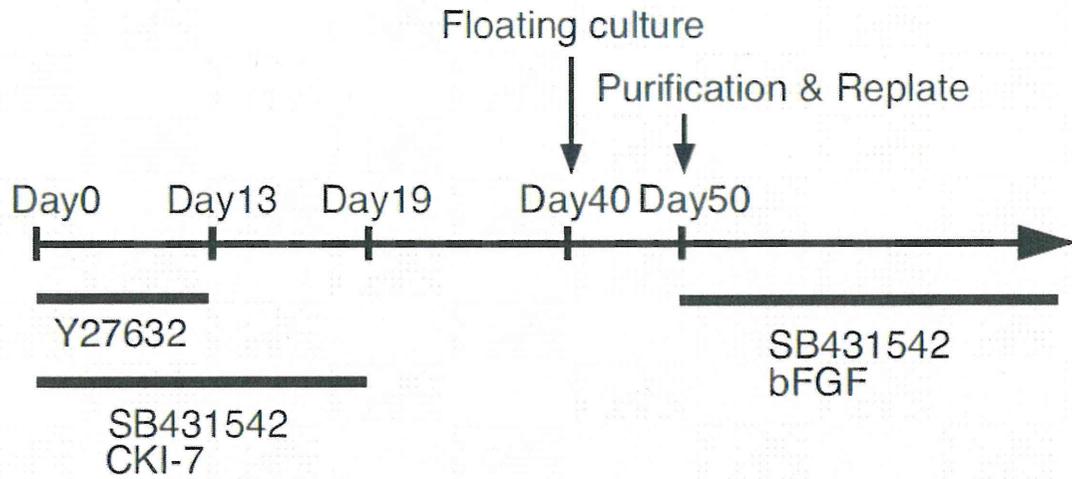


Figure 1 ヒト iPS 細胞から網膜色素上皮細胞への *in vitro* における分化誘導

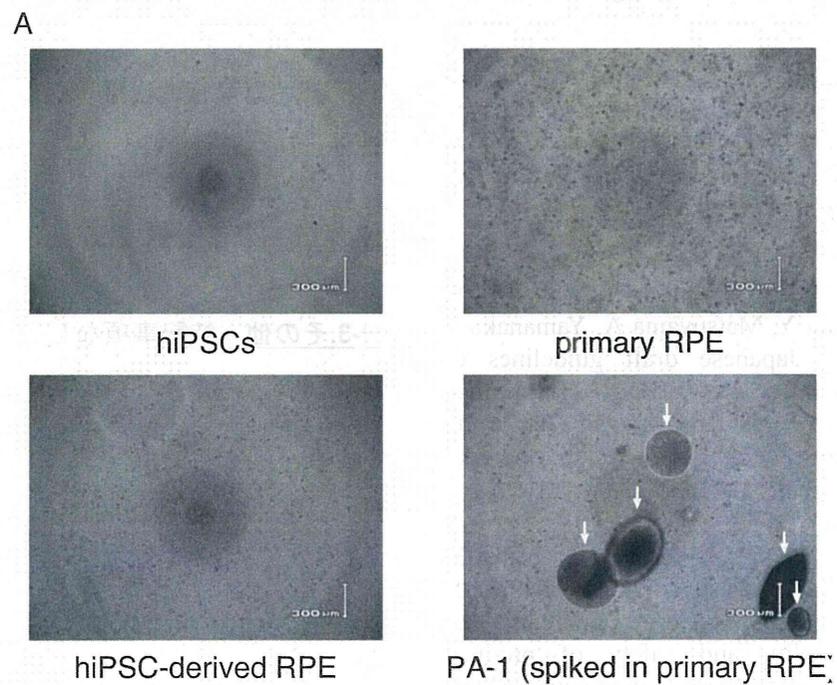


Figure 2 ヒト iPS 細胞およびヒトテラトカルシノーマ細胞株 PA-1 の軟寒天コロニー形成試験
 (A) ヒト iPS 細胞, 初代培養ヒト網膜色素上皮細胞 (RPE), 初代培養ヒト RPE 細胞にスパイクしたヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞および PA-1 細胞 (1%) を軟寒天培地中で 30 日間培養した際の位相差顕微鏡造像.

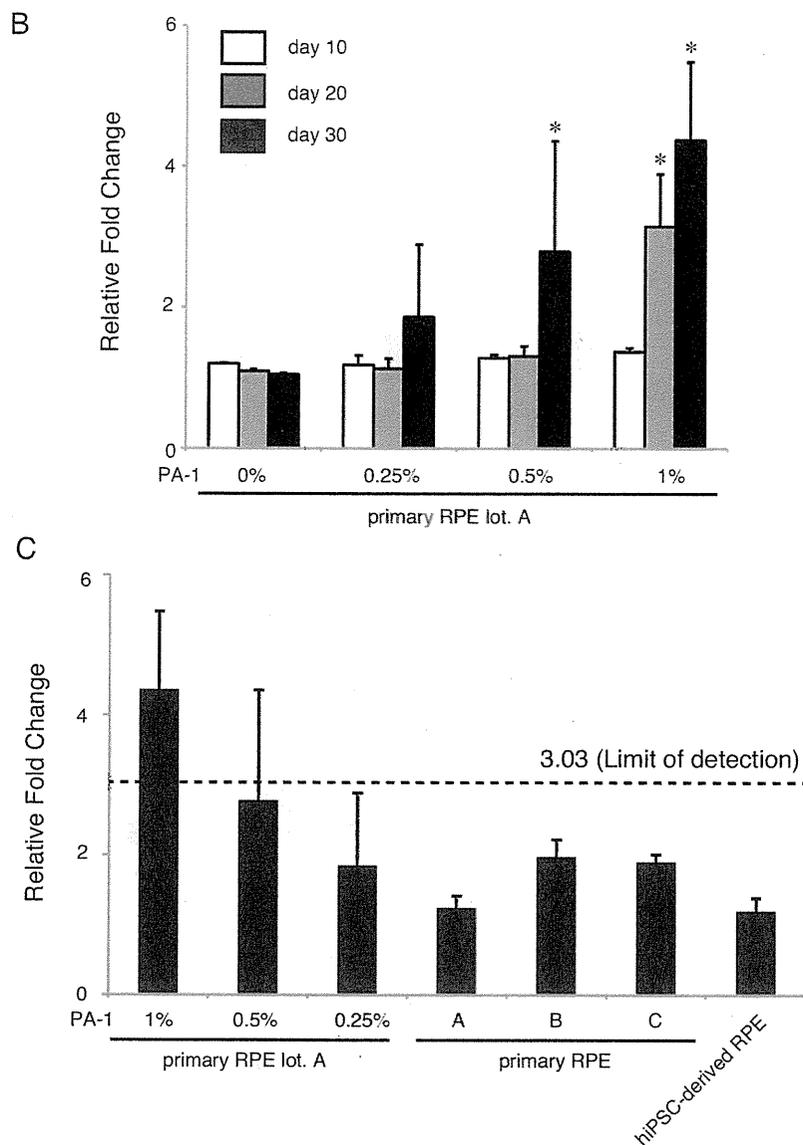


Figure 2 (続き) ヒト iPS 細胞およびヒトテラトカルシノーマ細胞株 PA-1 の軟寒天コロニー形成試験 (B) PA-1 細胞を 10^4 個のヒト初代培養ヒト RPE 細胞に 1% (100 個), 0.5% (50 個), 0.25% (25 個), および 0% (0 個) の割合でスパイクし, 軟寒天培地中で 10, 20 ないし 30 日間培養した. 細胞数は CytoSelect キットにより定量化し, ブランクの値に対する相対値として表示した. 統計的有意差は, Two-way ANOVA と Bonferroni 多重検定により算出した. (* $P < 0.05$ vs. 0%コントロール) (C) PA-1 細胞をヒト初代培養ヒト RPE 細胞 (ロット A) に一定の割合でスパイクしたもの, 3 ロットのヒト初代培養ヒト RPE 細胞およびヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞を軟寒天培地中で 30 日間培養した. 細胞数は上の (B) と同様に表した. 検出限界は点線で示す. 棒グラフのエラーバーは標準偏差 ($n=3$).

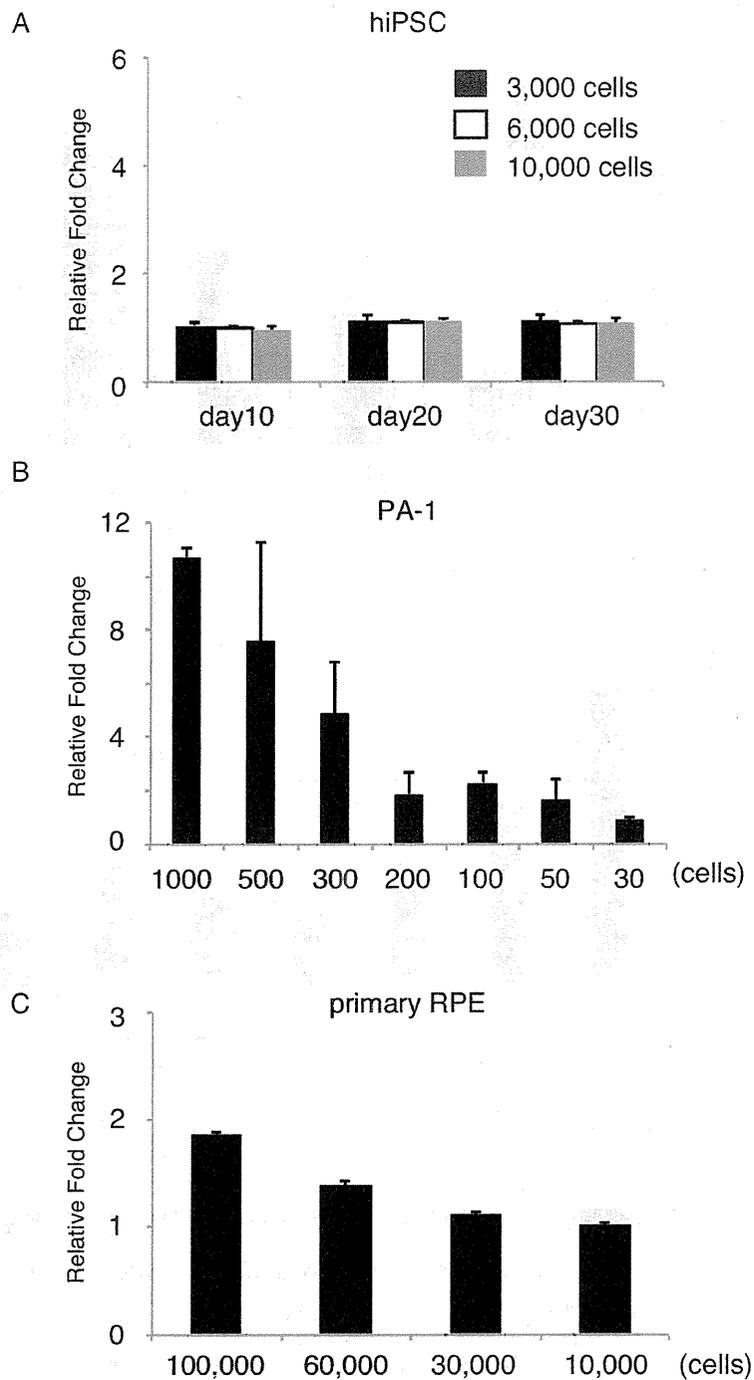
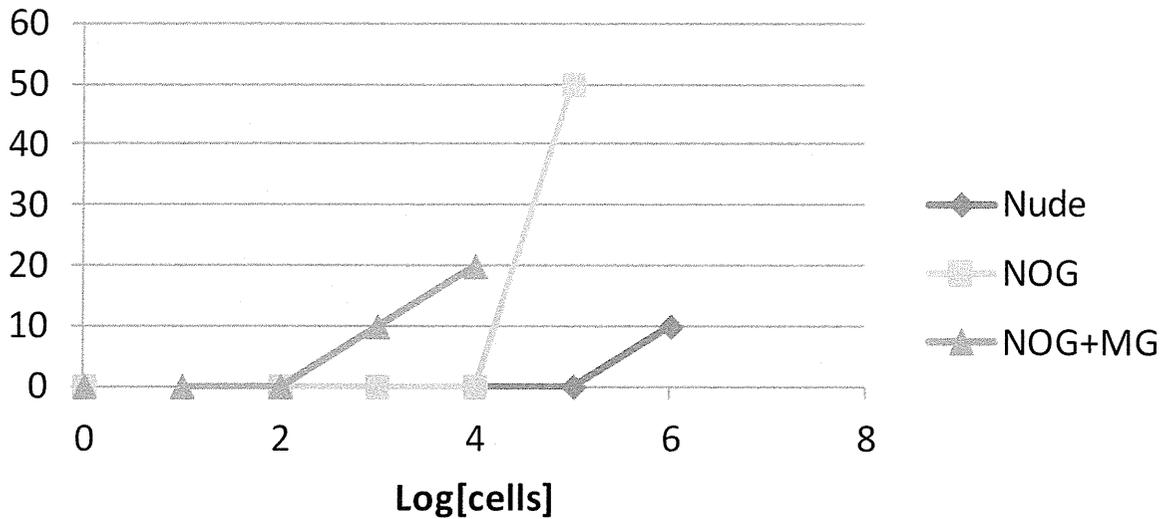


Figure 3 ヒト iPS 細胞, PA-1 細胞および初代培養 RPE 細胞の軟寒天コロニー形成試験

(A) ヒト iPS 細胞 (10,000 個, 6,000 個, 3,000 個/ウェル) を $10 \mu\text{M}$ Y-27632 存在下に 10, 20 ないし 30 日間培養した. (B) PA-1 細胞 (1,000~30 個/ウェル) を軟寒天培地中で 20 日間培養した. (C) 初代培養 RPE 細胞 (ロット A: 100,000~10,000 個/ウェル) を軟寒天培地中で 30 日間培養した. (A-C) 細胞数は CytoSelect キットにより定量化し, ブランクの値に対する相対値として表示した. . 棒グラフのエラーバーは標準偏差 ($n=3$).

Nodule Formation (% Animals) Hela cells, 4 weeks



Nodule Formation (% Animals) Hela cells, 5 weeks

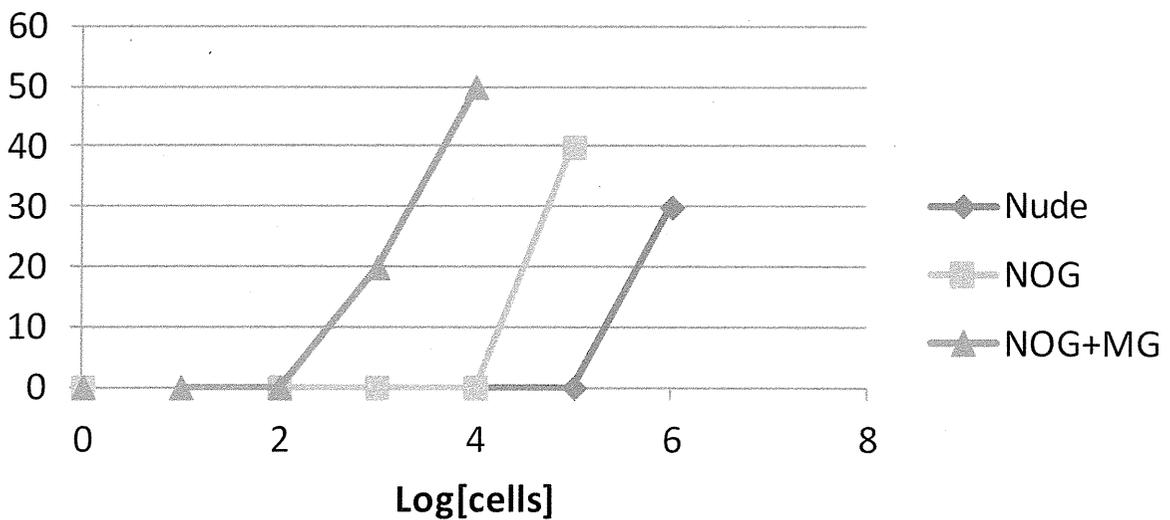


Figure 4 免疫不全マウスへの HeLa 細胞の生着とマトリゲルの効果

HeLa 細胞移植後 3 週間後までにはいずれの群においても移植細胞由来と推定される明らかな結節形成は認められなかったが、4 週間後からは結節が認められ、5 週間後には結節形成の用量依存性が明らかになった。細胞をマトリゲルに懸濁したうえで投与した NOG マウス (NOG+MG) の群の HeLa 細胞生着性はヌードマウスと比較して数百倍～千倍高いことが分かる。

分担研究課題：細胞・組織加工製品の感染制御法の開発

研究分担者 氏名 早川 堯夫 所属 近畿大学 薬学総合研究所

研究要旨：製品の感染リスク・汚染の排除の最も基本的な方策は、原料としての細胞の感染制御と製品製造過程での動物由来物質の排除である。当該研究年度では、無血清・フィーダー細胞なしで iPS 細胞株を樹立、維持できることの汎用性を確認した。また、これらの細胞等における感染性物質否定試験法の開発研究では、微量のモデルレトロウイルス核酸をスパイクさせた細胞からウイルス由来核酸の検出を試みたところ、汎用されている定量的 PCR 法を用いた場合、反応系容量の限界からスパイクしたウイルス由来核酸の一部しか検出されなかった。そこでこれらの問題を解決すべく、感染細胞検体に含有される全核酸中のウイルス核酸をもれなく解析でき、かつ高感度、高精度、簡便な検出法となる基盤検出法を探索したところ、等温遺伝子増幅法 (ICAN 法) が有用であるという見解に至った。

A. 研究目的

細胞・組織加工製品を用いた再生医療は、治療法に乏しく、重篤・致命的ないし QOL を著しく損なう疾病・損傷に対して極めて有効な治療法になると期待されており、細胞・組織加工製品の開発は世界的にも熾烈な競争が展開している。難治性疾患等の患者にいち早く有効な再生医療を届けるためにも、国際的な再生医療の開発・ビジネス競争でわが国が主導的地位を得るためにも、将来の開発動向を見据えつつ、細胞・組織加工製品の品質・安全性に関して新規かつ汎用性の高い評価技術・製造法の開発を行い、わが国から世界に向けて先導的に提示していくとともに、より高品質で安全性及び有効性の高い製品の開発・実用化を国内で適正に推進することが急務である。

細胞・組織加工製品の安全性上の問題としてウイルス汚染の可能性が挙げられる。これには細胞基材に起因するものと製造工程中のウイルスの迷入に起因するものがある。細胞基材へのウイルス混入の可能性としては、感染したヒト（動物）からの細胞株の入手や、細胞株樹立を目的としたウイルス使用などが考えられる。製造工程での外来ウイルス迷入経路としては、

培養等に使用する血清成分のような動物由来の試薬が汚染していることや、特定のタンパク質を発現させるためのウイルス使用などが考えられる。そのため、製品の感染リスク・汚染の排除の最も基本的な方策は、原料としての細胞基材の感染制御と製品製造過程での動物由来物質の排除である。一般に人工多能性（様）幹細胞（iPS（様）細胞）を含む各種幹細胞の培養には、現段階で動物由来の血清やフィーダー細胞などを用いることが多い。そこで今回我々は、動物由来物質を排除することを目的とした無血清・フィーダー細胞非存在下にて iPS 細胞株が樹立・維持が可能であるかを検討し、iPS 細胞樹立と維持系の汎用性を確認し、一般化するに至った。

一方、ウイルス汚染の危険性を可能な限り排除するとしても、それだけでは細胞基材そのものの汚染や、細胞および培養液取扱い中の汚染などの人的作業に関わる汚染等を完全に排除したとは科学的に必ずしもいえない。科学的に実証するには、汚染の有無を的確に検出できる検査により汚染ウイルスの存在を否定することが必須となる。またそのために、細胞原料や製品に関するより高感度で高精度、かつ簡便な

ウイルス否定試験法が必要であり、再生医療の実用化加速に資する重要な技術要件としてその開発が望まれている。

現在までにさまざまなウイルス否定試験法が用いられている。その一つである核酸増幅法は特定のウイルス塩基配列を検出する方法である。この試験法は、生きた増殖性の感染ウイルスそのものの有無を検出するものではないが、高感度で迅速にウイルス由来核酸の有無に関する情報を得られるという利点がある。しかし、従来から汎用されている定量的PCR法を用いた場合、反応系容量の限界があるため、ウイルス由来核酸が細胞に存在していたとしても、必ずそれが検出できるとは限らない。たとえば 1×10^7 個の細胞に1粒子のウイルスが汚染していた場合、理論値のPCR法の検出限界が反応系あたり1コピーであったとしても、 1×10^7 個の細胞にランダムに局在しているウイルス核酸、まして細胞から抽出した細胞由来核酸を含む全核酸中に分散局在するウイルス核酸をもち、一つのPCR反応系で検出することは、反応容量の限界から不可能である。全細胞から得た全核酸中からサンプリングした一部の核酸のみを鋳型にした核酸増幅検査で陰性になっても、それは全ての細胞集団において、ウイルス核酸の存在を否定出来たことにはならないと考えられる。それを、反応系の数を増やすことで補うとなれば、被験サンプル数に乗じて膨大な数の反応系を調製しなければならない。

我々は今回、まず従来から汎用されている定量的PCR法の問題点を明らかにしようと試みた。また、これらの問題を解決すべく、感染細胞由来のウイルス核酸をもれなく解析でき、かつ高感度で簡便な検出法となる検出法を探索した。

B. 研究方法

B-1. モデルレトロウイルス核酸の作製

HIV-1ならびに第3世代HIV-1由来レンチウイルスベクター共通に含まれる配列である

5'LTRの一部とパッケージングシグナル (ψ) を含む配列を、pSPT19ベクターに組み込んだ。得られたプラスミドを SP6、T7プライマーを用い、PCRにて増幅し、モデルレンチウイルス核酸を作製するための鋳型を作製した。得られたPCR産物を鋳型にし、T7 RNAポリメラーゼを用い、*in vitro* transcriptionを行った。*in vitro* transcription法にて得られたRNAはDNaseI処理を十分に行うことで鋳型DNAを除去した後、Qiagen RNeasy Mini Kitで精製を行い、図1に示したモデルレトロウイルス核酸 (single strand RNA) を作製した。

B-2. モデルレトロウイルス核酸の定量的PCR法を用いた解析

正常ヒト繊維芽細胞由来の total RNA (1×10^7 細胞分に相当) にモデルレトロウイルス核酸 (680 base) を 7400 コピー ($2.84 \times 10^{-9} \mu\text{g}$) となるように添加した。この混合RNAを $1 \mu\text{g}$ ずつ分注し、Qiagen QuantiTect SYBR Green RT-PCR kitを用いて One Step qRT-PCRを行った。標的とする増幅配列は、5'LTRの部分と、 ψ (ψ) 領域に設定することとし、今回のモデル系に至適なプライマー配列やプライマー長を精査、検討したうえで、最終的に以下のプライマー配列の決定に至った。

HIV-1 LTR (F)

5'- CCACTGCTAGAGATTTTCCAC -3'

HIV-1 LTR (R)

5'- TGAGTGCTTCAAGTAGTGTG -3'

HIV-1 ψ (F)

5'- CCCGCTTAATACTGACGCTCT -3'

HIV-1 ψ (R)

5'- CGACTGGTGAGTACGCCAA -3'

また、同様に定量的PCRの反応条件も詳細に検討し、今回Bio-Rad社製CFX96 thermal cyclerを用いた場合の反応サイクル等の至適条件は、以下の通りに確定した。

50°C 20分

95°C 15分

94°C 15秒

} 45 サイクル

60°C 1分

+ 解離曲線

(倫理面への配慮)

本研究は、近畿大学薬学総合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・承認に係る一切の研究項目に該当しないものである。また、ヒト検体等を一切用いるものでもなく、特段に倫理面への配慮に該当するような懸案は皆無である。

C. 研究結果

モデルレトロウイルス核酸として、レンチウイルスである HIV-1 ならびに HIV-1 由来レンチウイルスベクター共通に含まれる配列である 5' LTR の一部とパッケージングシグナル(ψ)を含む配列を選定した。この配列は、レトロウイルスがウイルスゲノムをウイルス粒子中にパッケージングする際に必須のものであり、つまりは増殖可能な感染性ウイルスのゲノム RNA には必ず包含される必須配列である。

今回、この配列を持つ RNA を試験管内で合成することにより、モデルレトロウイルスゲノム RNA の一部を得た。このモデルレトロウイルスゲノム RNA を段階希釈し、従来の定量的 PCR 法を用いて、一つの反応系中での検出限界を求めたところ、反応系あたり最小 50 コピーのモデルレトロウイルス核酸を検出することが可能であると判明した。また、汎用的な定量的 PCR 法では、 1×10^2 コピーから 5×10^7 コピーの範囲で高い直線性を示すことが分かった (図 2)。

そこで、検出感度の限界値付近における検出反応系ごとのばらつき (各々の PCR 反応ウェル間での検出差違) を確かめるために、7400 コピーのモデルレトロウイルスゲノム RNA を 1×10^7 個の細胞より得た RNA 150 μg と混合し、十分に攪拌・混合処理した後、この混合 RNA を反応系あたり 1 μg ずつ 150 等分 (150 ウェル反応系分) した。その結果、理論上は十分に攪

拌され等分散した鋳型モデルレトロウイルスゲノム RNA が、1 反応液あたり 49.3 コピー混入している計算となる。しかし、実際にはおそらく反応系 (各ウェル) によって±数コピー〜十数コピーのばらつきが生じるものと考えられる。これは、現状の汎用的な定量的 PCR 法を用いるときに不可避免的に生じる各反応系調製作業の鋳型持ち込み量のゆらぎが想定されるからである。そこで実態を調べるために、このように設定された反応系を、それぞれ定量的 PCR 法を用いた検出に供した。その代表的な実験結果を表 1 にまとめた。150 検体中、LTR プライマーを用いた検出系では平均 42 検体、psi プライマーを用いた検出系では平均 46 検体のみがウイルス由来核酸が陽性と判断され、残りの検体は陰性 (検出限界以下) という結果となった。

このことは、段階希釈された上記検出限界レベル近辺のレンチウイルスベクターを用いてスパイクさせた細胞から、ウイルス由来核酸を検出しようとしても、汎用されている定量的 PCR 法を用いた場合では、一つの反応系容量の限界 (1 ウェルの反応量に持ち込まれるウイルス由来核酸持ち込みの確率論的限界) からウイルス由来核酸を含む細胞の一部しか検出されず、感染・非感染の科学的立証が不完全に終わることを意味している。つまりは、特定の反応系のみをもってして感染の是非を決定することに問題があり、すなわち、安全性を担保すべき検査がきわめて不確実なものであることを意味している。

この問題を汎用的な定量的 PCR 法のみで解決しようとする場合、評価系に供される細胞全てから抽出した核酸 (鋳型となりうるゲノム総量) の全てがなくなるまで PCR 反応系を調製することにより検出を完全なものにしなければならない。上述のモデル系の場合でも、150 ウェル分の PCR 反応系が必要になることを勘案すると、実際は相当量の反応系の調製が必須となる。このことは、時間的、労力的に多大な負担となるのみならず、検出系のコストの問題に

も大きくのしかかることとなる。

そこでこの問題を解決すべく、感染細胞検体に含有される全核酸中のウイルス核酸をもれなく測定でき、かつ高感度、簡便な検出法の検討と探索を行った。その結果、検出反応系が大きく、またある程度の容量の可変増大も可能であり、それゆえ比較的多量の核酸を一度に一つの大容量反応系（チューブ単位での検出系）で検査することが可能である等温遺伝子増幅法（ICAN 法）を改良することが最も有用であるという見解に至った。現在までに ICAN 法を用いてのウイルス検出への応用は全くなされておらず、ICAN 法改良型のウイルス検出系は、確実で、高感度、高精度、簡便な新規感染性ウイルス検出法となる可能性を秘めている。

現在のところ、ICAN 法をウイルス検出系に適用せしめるべく、ICAN 法の開発者・研究者（タカラバイオ株式会社）より情報の入手と技術協力をを行い、諸条件の設定と基礎的な実験準備に着手しているところである。

D. 考察

多量の細胞中及びそれより調製した核酸中に分散分布し、かつ相対量比が低いウイルス核酸の検出にあたって、従来の定量的 PCR 法を適用すると、反応系の容量制限により細胞由来核酸の一部のみしか反応に供することが出来ないため偽陰性が生じる可能性がある。実際、今回我々が行った研究では、 1×10^7 個の細胞から抽出した total RNA 150 μg に、モデルレトロウイルスゲノム RNA を 7400 コピー (2.84×10^{-9} μg) 添加し、その混合 RNA を 1 μg ずつ 150 等分したところ、そのうちの約 29.4%のみがウイルス由来核酸陽性と判定される結果となった。つまり、従前より汎用的に利用されてきた定量的 PCR 法を用いて検査を行うと、約 70.6%の確率でウイルス由来核酸が陰性（検出限界以下）もしくは擬陽性（極微量低感度として捉えられ閾値を引くのが難しい）と誤って判断されてしまう可能性があるということになる。

この問題を克服するために考えられる改善

策のひとつは現行の核酸増幅法の感度をさらに高めることである。今回は SYBR Green 法を使用した。別法として汎用的に用いられる TaqMan Probe 法（Cobas taqman）を利用すれば今回の結果よりいくらか感度向上は見込まれると予想されるものの、根本的な問題点は変わらない。また、検出機器の技術的な観点から考察すると、現段階で定量的 PCR 機器の検出感度はほぼ限界まで向上しており、これ以上の大幅な感度向上は、エポックメイキングな機械的技術革新を待たねばならず、一朝一夕には解決できないと考えられる。そこで我々は、核酸増幅法を用いるという概念は踏襲しつつも、検出反応系を見直すことに着眼した。そこで、反応系に持ち込むことの出来る検体核酸量を増やすこと、すなわち反応系にウイルス核酸を（可能な限り）全て持ち込み、増幅し検出することで、総体的に感度、精度及び簡便性の向上を図るという創案に至った。ここで鍵となるのが、感染細胞検体由来の全核酸（ひいては全ウイルス核酸）を検出対象とでき、もれなく反応系に持ち込める基礎技術である。このような反応系を既存の RT-PCR 技術を基盤に改良を加えて創出すべく試行錯誤を繰り返したが目的を果たせなかった。そこで、改めて目的に叶う基盤検出法を探索したところ、等温遺伝子増幅法（ICAN法）が有用であるという見解に至った。ICAN法はDNAとRNAのキメラプライマーを用いて等温で遺伝子を増幅させることができるという特徴を持ち、反応系を大容量にすることで、持ち込む核酸の量を増やすことが可能である。また、最近では、このICAN法に検出特異性が非常に高いサイクリングプローブ法を組み合わせた、Cycleave ICAN法という方法が開発されている。このCycleave ICAN法は現在のところ、キクワイ化病原因ウイルス、ポテトスピンドルチューバーウイルス、トマトクロロティックドワーフウイルスなどの検出にも利用されており、ヒトウイルスゲノムの検出にも十分利用可能ではないかと考えられる。

E. 結論

細胞由来の多量の検体核酸に微量のウイルスゲノム核酸が混入していた場合、従来の遺伝子増幅法では反応系容量の限界により、ウイルス由来核酸陽性と検出されない可能性が高くなる。もちろん、何重にも検査することにより、偽陰性と判定される危険性は下がるものの、かかるコストや操作の煩雑さを考えると、より簡便で操作数が少なく、かつ高感度な検出法である ICAN 法の利用が望ましい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yagi Y, Yamamoto S, Kakehi K, Hayakawa T, Ohya Y, Suzuki S. Application of partial-filling capillary electrophoresis using lectins and glycosidases for the characterization of oligosaccharides in a therapeutic antibody. *Electrophoresis*. 2011 Nov;32(21):2979-85
- 2) Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Katayama K, Higuchi M, Tashiro K, Nonaka A, Sakurai F, Hayakawa T, Kusuda Furue M, Mizuguchi H. Efficient Generation of Functional Hepatocytes From Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells by HNF4 α Transduction. *Mol Ther*. 2011 Nov 8. doi: 10.1038/mt.2011.234. [Epub ahead of print]
- 3) Tashiro K, Kawabata K, Omori M, Yamaguchi T, Sakurai F, Katayama K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction. *Stem Cell Res*. 2011 Sep 16. [Epub ahead of print]
- 4) Oyama T, Yodohsi M, Yamane A, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Rapid and sensitive analyses of glycoprotein-derived oligosaccharides by liquid chromatography and laser-induced fluorometric detection capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011 Oct 1;879(27):2928-34.
- 5) Saga A, Okura H, Soeda M, Tani J, Fumimoto Y, Komoda H, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Daimon T, Hayakawa T, Matsuyama A. HMG-CoA reductase inhibitor augments the serum total cholesterol-lowering effect of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells in hyperlipidemic homozygous Watanabe rabbits. *Biochem Biophys Res Commun*. 412(1): 50-4 (2011)
- 6) Takao HAYAKAWA and Akiko Ishii: Japanese Regulatory Perspective on Immunogenicity. *Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals : Practical and Applied Considerations* (ed. by Michael G. Tovey), John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA, August 2011 (著書)
- 7) Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Tashiro K, Katayama K, Sakurai F, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One*. 2011;6(7):e21780.
- 8) Yamamoto S, Shinohara C, Fukushima E, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Partial-filling affinity capillary electrophoresis of glycoprotein oligosaccharides derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid. *J Chromatogr A*. 2011 Jul 22;1218(29):4772-8.
- 9) 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 Jul 15;437(2):345-55.
- 10) Yodoshi M, Oyama T, Masaki K, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S.: Affinity entrapment of oligosaccharides and glycopeptides using free lectin solution. *Anal Sci*. , 2011;27(4):395.
- 11) Suzuki T, Sasaki T, Yano K, Sakurai F, Kawabata K, Kondoh M, Hayakawa T, Yagi K, Mizuguchi H. Development of a recombinant adenovirus vector production system free of replication-competent adenovirus by utilizing a packaging size limit of the viral genome. *Virus Res*. 2011 Jun;158(1-2):154-60.
- 12) Sugio K, Sakurai F, Katayama K, Tashiro K, Ma H, Kawabata K, Kawase A, Iwaki M, Hayakawa T, Fujiwara T, Mizuguchi H.

- Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences. *Clin Cancer Res.* 2011 May 1;17(9):2807-18.
- 13) Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Kakehi K. Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Biomed Chromatogr.* 2011 May ;25(5):588-93. (*Article first published online: 26 JUL 2010*)
 - 14) Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol. Ther., Mol Ther.* 2011 Feb;19(2):400-7.
 - 15) Okura H, Saga A, Fumimoto Y, Soeda M, Moriyama M, Moriyama H, Nagai K, Lee CM, Yamashita S, Ichinose A, Hayakawa T, Matsuyama A. Transplantation of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011 Feb;17(2):145-54.
 - 16) Yamada K, Kakehi K. Recent advances in the analysis of carbohydrates for biomedical use. *J Pharm Biomed Anal.* 2011 55(4):702-27.
 - 17) Yamada K, Kakehi K. One-pot characterization of cancer cells by the analysis of mucin-type glycans and glycosaminoglycans. *Anal. Biochem.* (in press)
 - 18) 早川堯夫、水口裕之：iPS細胞と創薬、*Brain and Nerve* 64、(印刷中)
 - 19) 早川堯夫：第十六改正日本薬局方について、*日本薬局方試験法ガイド*（一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団編）、pp.3-13 (2011) じほう、東京
 - 20) 早川堯夫：ヒト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2つの指針案。医学のあゆみ、239、14 (2011)
 - 21)
 - 22) 木下充弘、掛樋一晃：糖タンパク質性バイオ医薬品に求められる分析技術。バイオ医薬品開発における糖鎖技術（早川堯夫、掛樋一晃、平林 淳 監修）pp191-208 (2011)、シーエムシー出版、東京
 - 23) 早川堯夫：再生医療推進のための規制環境の整備。医薬ジャーナル、10 (2011)
 - 24) 早川堯夫、青井貴之、梅澤明弘、山中伸弥、小澤敬也、大和雅之、澤 芳樹、松山晃文、佐藤陽治：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研究（その1）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、10(3),86-90 (2011)
 - 25) 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研究（その2）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、10(3), 91-98 (2011)
 - 26) 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研究（その3）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、10(3),99-106 (2011)
 - 27) 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研究（その4）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、10(3), 107-117 (2011)
 - 28) 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研究（その5）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、10(3), 118-128 (2011)
- 29) 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研究(その6)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、10(3), 129-140 (2011)
 - 30) 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研究(その7)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、10(3), 141-146 (2011)
 - 31) 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研究(その8)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)－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、10(3), 147-152 (2011)
 - 32) 早川堯夫：医薬品製造とウイルス安全性確認の基本的考え方. 医薬品の品質管理とウイルス安全性(日本医薬品等ウイルス安全性研究会編)文光堂、東京、2011
 - 33) 早川堯夫：第十六改正日本薬局方について. *Phar.Tech.Japan.*, 27(8)、7-14(2011)
 - 34) 佐藤陽治、鈴木和博、早川堯夫：EUにおける細胞・組織加工製品の規制動向、医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス. 42、142-8 (2011)
2. 学会等発表
- 1) 早川堯夫：再生医療の規制制度の現状と今後の展望. (独)日本学術振興会(JSPS)第9回「再生医療の実用化」に関する研究開発専門委員会, 東京(平成23年5月26日)
 - 2) 早川堯夫：規制環境を再生医療実用化の水先案内、牽引力、推進力にするために. JSPS「再生医療の実用化」に関する研究開発専門委員シンポジウム「オールジャパンで目指す再生医療実用化」, 東京(平成23年7月30日)
 - 3) 早川堯夫：再生医療の現状と課題. 兵庫県製薬協会創立70周年記念行事, 神戸(平成23年6月10日)
 - 4) Saga A, Okura H, Soeda M, Tani J, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Tahara S, Hayakawa T and Matsuyama A: Transplantation of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells reduces serum cholesterol and the effects could be augmented by HMG-CoA reductase inhibitor in hyperlipidemic Watanabe rabbits. The 9th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011.6.15-18)
 - 5) Soeda M, Okura H, Saga A, Tani J, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Tahara S, Hayakawa T and Matsuyama A: Transplantation of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells but not adipose tissue-derived stromal/stem cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. The 9th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011.6.15-18)
 - 6) Okura H, Saga A, Soeda M, Tani J, Moriyama M, Moriyama H, Miyagawa S, Sawa Y, Ichinose A, Tahara S, Hayakawa T and Matsuyama A: Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction and survival in a swine chronic myocardial infarction model, The 9th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011.6.15-18)
 - 7) 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 9th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011.6.15-18)
 - 8) 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 (2011.10.3-5)
- 9) 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 (2011.10.3-5)
- 10) 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 (2011.11.2-4)
- 11) Okura H, Saga A, Soeda M, Tani J, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Tahara S, Hayakawa T and Matsuyama A: In situ stem cell therapy using human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells combined with HMG-CoA reductase inhibitor synergistically reduce serum cholesterol level in hyperlipidemic Watanabe rabbits, 84th American Heart Association Scientific Sessions, Orlando, USA(2011.11.12-16)
- 12) Okura H, Saga A, Soeda M, Tani J, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Tahara S, Hayakawa T and Matsuyama A: Transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits, 84th American Heart Association Scientific Sessions, Orlando, USA(2011.11.12-16)
- 13) 早川堯夫: 規制環境を再生医療実用化の水先案内、牽引力、推進力にするために「幹細胞医薬の薬事法下の開発ガイドラインの現状」。バイオファイナンスギルド第10期第5回セミナー「幹細胞は、本当に医薬品になるのか?」、東京(平成23年12月16日)
- 14) 早川堯夫: ミニマム・コンセンサス・パッケージ(MCP)策定に向けて。第1回ミニマム・コンセンサス・パッケージ(MCP)策定会議: 第1回再生医療薬事講習会- 医療革新のために Scientific Common Sense を -、神戸(平成24年1月06日)
- 15) Hayakawa T: Some Aspects of Development, Evaluation and Control of

Cell/Tissue-Based Products in Japan. International Forum on Challenges and Opportunities Posed by Biopharmaceuticals, KFDA, Seoul, Korea (2012.3.27-29)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許
特記事項なし
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他
特記事項なし

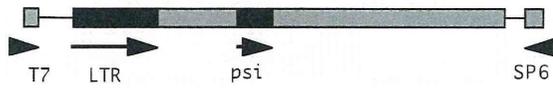


図 1：モデルレトロウイルス核酸を作製するために利用した鋳型 DNA

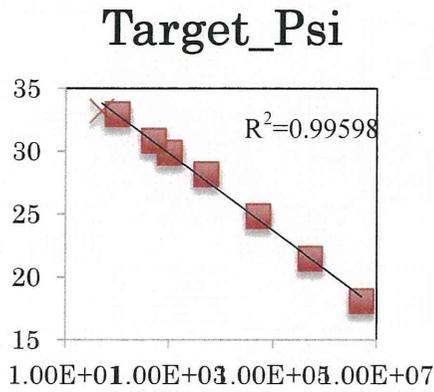


図 2：今回の qPCR の直線性テスト。1×10² コピーまでは高い直線性を示している。縦軸は、Ct 値（PCR 増幅産物（Psi 配列）がある一定量（閾値）に達したときのサイクル数）を示し、横軸はモデルウイルスゲノム RNA のコピー数を示している。

primer	HIV-1 LTR	HIV-1 psi
陽性数	42 ± 5	46 ± 7
%	平均 28.0	平均 30.7

表 1：7400 コピーのモデルレトロウイルス核酸を 150 等分して定量的 PCR をかけたときの陽性検体数

再生医療早期実用化促進及び汎用性向上のための周辺基盤技術開発

（分担研究課題名）細胞・組織加工製品の免疫原性制御法の開発

研究分担者 掛樋一晃 近畿大学薬学部・薬学総合研究所

研究要旨：細胞・組織加工製品を用いる再生医療は、有効な治療法の乏しい疾病・損傷に対して高い効果が期待できる治療法として期待されており、世界的にも研究・開発競争が熾烈になっている。一方、国際的な再生医療の開発競争においてわが国が主導的地位を得るためには、細胞・組織加工製品の品質と安全性に関する汎用性の高い評価技術を開発し、高品質で安全かつ高い有効性を担保できる製品を開発するための周辺基盤技術の開発が急務となっている。

細胞・組織加工製品の安全性と品質を確保する上で、各種幹細胞の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は、最終製品において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は極めて重要な項目である。これらの周辺基盤技術は将来の再生医療の開発動向を見据えた場合、細胞・組織加工製品の汎用性評価技術・製造法の開発に繋がり、高品質で安全性及び有効性の高い製品の開発・実用化を国内で推進し、わが国における再生医療早期実用化を促進する基盤となりうる。本研究では「細胞・組織加工製品の免疫原性制御法の開発」に繋がる周辺基盤技術として、各種幹細胞の培養工程からの異種動物由来成分の混入を糖鎖を指標として明らかにする方法の開発ならびに異種動物由来成分の混入原因を調査した結果について報告する。

A. 研究目的

治療効果を有する細胞を直接あるいは増殖、薬剤処理、遺伝子改変、分化などの加工を行い治療目的のための細胞を作製し体内に移植する「再生医療」分野で、実用化に向けた研究が活発となっている。一方、「再生医療」の実用化に向けては、製品の品質や安全性等を確保する上で、原材料としての細胞、中間製品としての細胞、最終製品としての特定の細胞、あるいは混在する可能性がある細胞や成分の特性を把握し、細胞の品質を管理する方法論の確立が急務となりつつある。

iPS細胞などの各種幹細胞の臨床応用を図るとき、細胞治療材料としての有用性だけでなく、異種動物由来成分等の混入による免疫原性などの安全性において解決すべき重要な問題が残されている。一般に各種の幹細胞を培養するとき、細胞の樹立あるいは未分化能の維持のために、異種動物由来成分を含む環境で培養され

るが、それらの成分がiPS細胞等に混入し、抗原性を示す可能性を否定できない。再生医療に用いる各種幹細胞の特性評価ならびに品質の管理では、細胞の分化の程度、移植に用いる細胞集団としての均一性などだけに留まらず、生物由来製品としての免疫原性を含めた安全性にも十分に留意しなければならない。

ヒトにおいて免疫原性を示しうる異種動物抗原糖鎖としては、N-グリコシルノイラミン酸（NeuGc）や α Gal エピトープ（Gal α 1-3Gal）が知られている。ヒト細胞内にこれらの生合成にかかわる酵素がないにも関わらず、細胞を基材として用いて生産される培養細胞由来の複合糖質の糖鎖中にこれらが観察される場合がある。ヒト細胞におけるこのような異種動物抗原糖鎖は、細胞培養工程で使用される異種動物由来の血清やその他の添加物に起因すると考えられるものの、混入原因や混入経路については不明な点が多い。iPS細胞などの各種幹細胞