

づけにあると定めた医薬品等製造のための出発素材と定義する(図2)。製造基材にあたるのは、例えば、原血漿、最小限加工した細胞、細胞バンク、プールした尿や乳汁、細胞培養液である。

医薬品等製造基材の原材料としては、例えば、血液・血漿、採取した細胞・組織、親細胞株、体液といったものが挙げられる。したがって原材料に問題があれば、医薬品等製造基材に影響が出てくることは明らかであり、これら2つの医薬品製造の出発素材のウイルス安全性を相互補完的にとらえて、安全性確認していくのが、合理的と考えられる。

2. 医薬品等のウイルスに対する総合的な安全性確保を図るために必要な基本的方策

1) 基本的方策

医薬品等のウイルスに対する総合的な安全性確保を図るために必要な基本的方策として以下のような事項が挙げられる。

- ① ウイルス汚染の可能性(汚染源)について熟知すること。
- ② 原材料およびその起源たるヒトや動物の適格性に関して慎重に吟味すること。
- ③ ヒトに感染性や病原性を示すウイルスが存在しないような製造基材および製造関連物質(培地成分、試薬、抗体カラム、フィーダー細胞など)を選択すること。
- ④ 医薬品等の製造基材と定めた段階のもの(医薬品等製造基材)において徹底的な解析とスクリーニングを行い、ウイルス存在の有無および存在するウイルスの種類・性質について検討すること。ただしこの場合、原材料などにおける検討・評価と相互補完的に実施することが合理的なことも多い。
- ⑤ ウイルスやウイルス様粒子が存在した場合、どの程度ヒトへの有害性が高いかを検討・確認すること。
- ⑥ 必要に応じて製造工程の適当な段階の製品における外来性ウイルス否定試験の実施を考慮すること。
- ⑦ 工程中にウイルスの除去・不活化に関する効果的な方法を用いること。各種の方法の組み合わせによるより高いウイルスクリアランスの達成を図ること。
- ⑧ 周到なウイルスクリアランス試験計画を立てること。
- ⑨ ウイルスクリアランス試験を実施し、評価すること。

これらの方策を、段階的にかつ複数以上、相互補完的に活用していくことによって、医薬品等のウイルス面での安全性を確保、向上させることが重要である。

さらに、事前に予測あるいは検知できないウイルス等による健康被害の発生とその対応に備えて、医薬品等製造基材の貯留保管、感染症発生の有無等の追跡調査、臨床記録・製品記録等の各種記録、製品およびドナーや被験者由来検査試料をしかるべき期間保存する措置、その他関連情報の積極的収集と情報提供なども、必要に応じて実施すべきである。

医薬品等の製造(販売)業者は、それぞれの製品や製造工程について、ウイルスに対する安全性を保証するための総合戦略の中で採用したアプローチを説明し、その妥当性を示す必要がある。

2) ウイルス汚染の可能性

前項で述べたように、ウイルス汚染の可能性(汚染源)について熟知することは、ウイルス安全性確保の第一歩である。医薬品ウイルス汚染の可能性としては、以下に示すように、大別して、原材料や医薬品等製造基材にウイルスが存在する可能性と、医薬品製造過程でウイルスが迷入する可能性を考慮する必要がある(図1)。

(1) 原材料や医薬品等製造基材にウイルスが存在する可能性

- ① 感染したヒトや動物からの原材料/医薬品等製造基材の入手
- ② 医薬品等製造基材(例:細胞株)を樹立するためのウイルスの使用
- ③ 汚染された生物起源由来の調製・加工試薬(例:酵素,動物血清成分)の使用
- ④ 原材料/医薬品等製造基材の取扱い中における汚染

(2) 医薬品製造過程でウイルスが迷入する可能性

- ① 生物起源由来の製造関連物質(例:培地の成分,血清,フィーダー細胞等)の汚染
- ② 目的タンパク質をコードする特定の遺伝子の発現を誘導するためのウイルスの使用
- ③ 精製・加工等に使用する製造関連物質(例:モノクローナル抗体,酵素等)の汚染
- ④ 製剤化に使用する賦形剤等の汚染
- ⑤ 原材料/医薬品等製造基材や製造関連物質の取り扱い中における汚染

3) 原材料や医薬品等製造基材にウイルスが存在する可能性の否定

原材料や医薬品等製造基材にウイルスが存在する可能性は、現在の学問・技術に照らし、これらを可能な限り駆使して否定する必要がある。基本的には、原材料およびその起源たるヒトや動物の適格性に関して慎重に検討し、評価することや、医薬品等の製造基材と定めた段階のもの(例:原血漿,最小限処理した細胞,細胞バンク,プールした尿,細胞培養液)において徹底的なウイルス試験とその解析・評価を行い、ウイルス存在の有無および存在するウイルスの種類・性質について検討することが必要である。この際、原材料やその起源たるヒトや動物における検討・評価と相互補完的に実施することが合理的な場合もある。

原材料や医薬品等製造基材および最終製品の種類に応じた具体的な遵守事項あるいは留意事項は「生物由来原料基準」¹⁾をはじめ、それぞれに関連する指針,ガイドライン/ガイダンス等に示されている。以下にその要点を解説する。詳細については、各指針等を参照されたい。

(1) 血液製剤のヒト/原材料/医薬品等製造基材段階でのウイルス安全性確保策(国内献血)

血液製剤の場合は、以下に示すような安全性確保策がとられている。分画用原料血漿の場合は、貯留保管措置によって、採血後情報や輸血後情報が反映されることで、より医薬品製造基材段階でのセーフティネットが図られている¹⁾。

(a) 献血者について問診,自己申告を実施し,また検査履歴をチェックする。

(b) 献血血液について,①血清学的検査等(梅毒トレポネーマ,B型肝炎ウイルス(HBV),C型肝炎ウイルス(HCV),ヒト免疫不全ウイルス1および2(HIV-1およびHIV-2),ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-1)陰性),②検体保管措置,③20人のプールで核酸増幅検査 nucleic acid amplification test (NAT) (HBV, HCV, HBV 陰性)を実施する。

(c) 分画用原料血漿や輸血用の新鮮凍結血漿の場合,6ヵ月の貯留保管措置を実施し,採血後情報/輸血後情報の反映を図る。

(2) ヒト細胞組織利用製品のウイルス安全性確保策

ヒト細胞組織利用製品の場合には、採取した細胞が製品に直結しているところから、「ドナースクリーニング」を極めて厳密に行うという安全性確保策が必要である。ただし、ヒト細胞組織製品の使用の対象者とドナーが同一の者である場合(自己由来細胞組織)とドナーが自己以外の同種の者である場合(同種由来細胞組織)とでは、合理的な方策は必ずしも同じではない^{2,3)}。

(a) 自己由来細胞組織の場合であっても採取細胞・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必要がある。特に HBV, HCV, HIV, HTLV に留意すること。これらのウイルスにつき、患者の段階で否定し得ず、かつこれらのウイルスを増殖させる可能性のある細胞の場合には、増殖可能性のあるウイルスについて適切な製造(製品)段階でその存在量に関する試験を実施し、製品の投与が患者の不利益にならないことを確認する必要がある。

(b) 同種由来細胞組織の場合、利用の目的に応じてドナーに対する問診等の診断および検査を行う。特に HBV, HCV, HIV, HTLV, パルボウイルス B19 感染症については、問診および検査(血清学的試験や NAT 等)により否定すること。また、サイトメガロウイルス (CMV) および Epstein-Barr ウイルス (EBV) 感染およびウエストナイルウイルス感染については必要に応じて検査により否定する。

(c) 同種由来細胞組織の場合、次に掲げるものについては既往歴、問診等の診断を行うとともに、輸血、移植医療を受けた経験の有無等からドナーとしての適格性を判断する。①梅毒トレポネーマ、クラミジア、淋菌、結核菌等の細菌による感染症、②敗血症およびその疑い、③悪性腫瘍、④重篤な代謝および内分泌疾患、⑤膠原病および血液疾患、⑥肝疾患、⑦伝達性海綿状脳症およびその疑いならびにその他の認知症。

(3) ヒト尿由来・組織由来医薬品のヒト/原材料/医薬品製造基材段階でのウイルス安全性確保策

ヒト尿由来・組織由来医薬品のヒト/原材料/医薬品製造基材段階でのウイルス安全性については、以下に示すような確保策がとられている^{1,4)}。

- ① 尿・組織提供者のレベルで問診、自己申告を実施し、また検査履歴をチェックする。
- ② 組織提供者については、必要で可能な場合、血清学的検査等 (HBV, HCV, HIV-1) を行う。
- ③ 一定処理後のプール尿(原材料/医薬品製造基材)については、HBV 抗原検査、および NAT による HBV, HCV, HIV 検査を実施して陰性であることを示す必要がある。

(4) 細胞基材由来のタンパク質性医薬品のウイルス安全性確保策

組換え医薬品など、細胞基材由来のタンパク質性の医薬品の場合には、細胞の起源たるヒト・動物という最上流のレベルにはあまり拘泥せず、目的タンパク質を産生させるために樹立したクローン細胞株(種細胞株)を一定程度増殖させ、特性解析をしたマスター・セル・バンク master cell bank (MCB) を最重要な医薬品製造基材と位置づけ、このレベルで徹底的なウイルス試験を行うことで安全性を管理する。さらに、念のため、大量培養後の細胞であるいわゆる CAL (cell at the limit : 医薬品製造のための *in vitro* 細胞齢の上限の細胞) の段階でもしかるべきウイルス試験を実施し、安全性を一段と高める方策をとる。

ウイルス試験の内容としては、レトロウイルスおよび内在性ウイルス試験およびいわゆる外来性ウイルスに関する試験は、全て MCB(またはワーキング・セル・バンク working cell bank : WCB) レベルで徹底して実施する。また、培養終了後の細胞では、レトロウイルスが培養により発現して

表1 各細胞レベルで一度は実施すべきウイルス試験

	MCB	WCB	CAL
レトロウイルスおよび内在性ウイルス試験			
感染性試験	+	-	+
電子顕微鏡観察	+	-	+
逆転写酵素活性	+* ¹	-	+* ¹
その他細胞種特異ウイルス試験	適宜実施	-	適宜実施
非内在性ウイルスまたは外来性ウイルス試験			
<i>in vitro</i> 試験	+	-* ²	+
<i>in vivo</i> 試験	+	-* ²	+
抗体産生試験	+* ³	-	-
その他細胞種特異ウイルス試験	適宜実施	-	-

*¹: レトロウイルス感染性試験が陽性のときは不要。

*²: CAL (*in vitro* 細胞齢の上限の細胞) で試験が実施されるときは不要。

*³: 例えばマウス、ラット、ハムスターでの抗体産生試験、通常、げっ歯類由来の細胞に対し適用する。

くる可能性のチェックと、培地に生物由来の成分を使用する場合などでは、細胞大量培養中に外来性ウイルスが迷入することがないことを確認するため、*in vitro*、*in vivo* 試験などを実施する。

表1に各細胞レベルで一度は実施すべきウイルス試験を示した⁵⁾。

(5) 動物由来製品の動物/原材料/医薬品等製造基材段階でのウイルス安全性確保策

動物由来製品の場合は、動物レベルで健康な動物を選択することが重要である。健康な動物とは、例えば、食肉基準に適合した動物、SPF (specific pathogen free) 動物などである。また、動物種毎のウイルス学的特性(特にヒトへの感染性ウイルス存在の可能性)に留意した検討を行った動物である。動物でのウイルス試験の種類や程度は製品の種類や以降の段階での検討を勘案してケース・バイ・ケースで考える必要がある。この動物種ごとのウイルス学的特性に留意した検討については、原材料・医薬品等製造基材で実施するのが合理的な場合もある。最終製品が細胞・組織の場合は、動物レベルでの厳密な検討が必要であり、一方でタンパク質性の医薬品などでは、製造基材レベルでの厳密な検討が必要かつ合理的である。なお、生物由来製品に指定された製品以外の製品については、上記のウイルス試験等は必ずしも必要としない。

4) 医薬品製造基材等にウイルスが検出された場合の対応

医薬品製造基材等にウイルスが検出された場合は、原則使用禁止ということである。しかし、日・米・欧国際調和 (ICH) ガイドラインでは、CHO (Chinese hamster ovary) 細胞のように内在性のレトロウイルスを含むものでも条件付きで使用を認めている。また、内在性のレトロウイルス以外のウイルスその他のウイルスあるいはウイルス由来の塩基配列を含有した細胞株の使用の可否も、①製品のベネフィットや予定される臨床上的用途、②混入するウイルスの種類・性質、③ヒトへの感染性または病原性、④製品の精製工程(ウイルスクリアランスに関する評価データ等)、および⑤精製バルクにおいてどの程度のウイルス試験を実施したかなどに基づくリスク/ベネフィットのバランスを勘案し、ケース・バイ・ケースで規制当局が判断することになる^{5,6)}。

5) 未加工/未精製バルク等におけるウイルス試験

未加工/未精製バルクは、精製工程前の製品であり、最終製品への外来性微生物汚染の可能性を

高確率で測定することができる最も効果的なレベルの一つである。未加工/未精製バルクは、医薬品製造基材と同じである場合もある。未加工/未精製バルクが医薬品製造基材段階から調製される過程で生物由来の試薬・培地成分等が用いられる場合は、ウイルス試験を適切に実施するべきである。ただし、ごく一部工程を進めることによってウイルス試験がより高感度に行える場合には、この限りではない。

試験の内容は、例えば細胞基材由来タンパク質性医薬品の場合、承認申請時に、少なくとも3ロットについての(例えば *in vitro* 試験, NAT 試験)データを提出することとなっている。以降の各製造ロットについても引き続き評価するための計画を策定することが望まれる。ウイルス試験の範囲、程度および頻度を決定するにあたっては、以下のような諸点を考慮する。例えば、①目的産物を生産するために用いられる細胞株の種類・性質、②細胞株の適格性試験のため実施されたウイルス試験の程度と試験結果、③培養方法、原材料の起源とウイルスクリアランス試験の結果などである。ただし、培養に生物由来成分を用いないような場合には、各バッチ毎に試験をする必要はないとされている。

6) 他者よりの原材料等の受け入れ試験としてのウイルス試験

原材料や医薬品等製造基材を他の製造業者より購入し製造に用いる場合がある。この場合、原材料等製造者により実施されている試験の程度に応じて、受け入れ試験としてのウイルス試験の内容や程度を決定し、実施する。また、その内容の合理的根拠を明らかにする必要がある。

7) 最終製品(または前段階の製品)におけるウイルス試験

最終製品(または前段階の製品)において、どの程度のウイルス試験を実施すべきかは、①原材料や医薬品等製造基材の種類、②上流での各種ウイルス試験、③製造工程におけるウイルス除去および不活化に関する評価試験の結果、および④製造工程においてウイルスが迷入あるいは増殖する可能性がどの程度であるか、などを総合的に勘案して決定する必要がある。原材料が例えば不特定多数のヒト由来のものであり、ウインドウピリオドのウイルスの存在の可能性があり、あるいはウイルス試験に固有の検出上の限界、その他ウイルス迷入の可能性が否定しきれない場合などでは、最終製品において原材料等に存在する可能性がある中でも特に危険度の高いウイルスに着目した NAT による検査等を行うことが推奨される場合も考えられる。タンパク質性医薬品の場合には典型的な考え方が ICH ガイドラインで示されている⁵⁾(表2)。ヒト自己由来の細胞・組織加工医薬品等の場合、HBV, HCV, HIV 等を製造工程中に増殖させる可能性のある細胞を用いる際には、中間製品、最終製品等についてもウイルス等の存在を否定する適切な試験を実施する必要がある²⁾。また、製造工程中で生物由来成分を使用する場合には、最終製品で当該成分由来のウイルスについての否定試験の実施を考慮すべき場合もある。ヒト同種由来製品で製造基材の段階でバンク化されておらず、ウインドウピリオドが否定できないような場合で、かつ上記の自己由来のものと同様の懸念があるケースでは、同様の方策を考慮すべきである³⁾。しかし、いずれの場合でも、可能な限り、もとの素材段階での試験やプロセス評価で迷入が否定されていることが望ましい。

ウイルスベクターを用いた遺伝子治療用医薬品の場合には、不可避的に存在する可能性がある複製増殖が可能な野生型のウイルスの混入量を従来の知見と同量もしくはそれ以下であることを確認しておくことが重要である。

表2 ウイルスクリアランスに関する工程評価および精製バルクでのウイルス試験実施要領

	ケースA	ケースB	ケースC	ケースD	ケースE
細胞や未精製バルクでのウイルス試験結果					
ウイルスの存在	—	—	+	+	(+) ^{*1}
ウイルス様粒子の存在	—	—	—	—	(+) ^{*1}
レトロウイルス様粒子の存在	—	+	—	—	(+) ^{*1}
ウイルスの分離同定の可否	適用外	+	+	+	—
ウイルスのヒトへの感染性	適用外	—	—	+	未知
必要とする対応					
ウイルススクリアランスに関する工程特性解析試験	必要 ^{*2}	必要 ^{*2}	必要 ^{*2}	必要 ^{*2}	必要 ^{*4}
ウイルススクリアランスに関する工程評価試験	不要	必要 ^{*3}	必要 ^{*3}	必要 ^{*3}	必要 ^{*4}
精製目的産物でのウイルス否定試験	適用外	必要 ^{*5}	必要 ^{*5}	必要 ^{*5}	必要 ^{*5}

*1: 未知のウイルスまたは(レトロ)ウイルス様粒子が直接あるいは間接法で検出。

*2: 非特異的モデルウイルスを用い、当該精製工程の一般的ウイルス排除能力の特性を解析する。

*3: 検出されたウイルスおよび存在が予測されるウイルスと同じか同種のウイルス(関連ウイルス)、またはそれらと同一の属や科で物理的・化学的性質が類似しているウイルス(特異的モデルウイルス)を用い、当該精製工程の特定ウイルス不活化・除去能力を評価する。

*4: 規制当局に相談する。

*5: 最低3~5ロットについて実施する必要があるが、CHO細胞におけるレトロウイルス様粒子(例: Type A, RまたはC)のようなものについては不要である。

8) ウイルスクリアランス工程評価試験

未精製バルクから、精製バルクにかけての、目的物の精製工程でのウイルス不活化/除去に関する評価試験に関することである。一般にタンパク質性医薬品が有効成分である製品のように、いわゆる精製工程が存在するケースに効果的に適用される。一方、細胞組織加工医薬品等のような細胞が有効成分である製品において細胞を傷つけずに適用することには必ずと限界がある。

(1) ウイルスクリアランス試験の目的

ウイルススクリアランス試験の目的は、(原材料等に存在する可能性がある既知および未知の)ウイルス不活化や除去に有効であると考えられる工程について評価すること、それらの各工程を併せて全体としてウイルスがどの程度減少したかの実験的検証を行い、定量的に評価することにある。

(2) ウイルスクリアランス試験の実施要領

(a) 工程のウイルス除去または不活化能力の定量的評価法

未加工/未精製バルクや、ウイルス除去および不活化に寄与すると考えられる製造工程にしかるべき量のウイルスを意図的に添加(spiking)し、この工程を経る間に添加されたウイルスがどの程度除去または不活化されるかを定量的に評価する。これにより各製造工程および全製造工程におけるウイルスの除去および不活化能力の推定値を得る。

(b) 使用するウイルス

ウイルススクリアランス試験に用いるウイルスは、原材料や試薬等の製造関連物質における特定のウイルスの存在の有無や可能性を考慮して選択する。原材料や製造関連物質に特定のウイルスの存在が知られているか存在が予測されている場合には、これと同じか、同種のウイルス(関連ウイルス)、あるいは同一の属もしくは科のもので、類似した物理的、化学的性質を有するウイルス(特異的モデルウイルス)を用いてクリアランス試験を行い、評価することとされている。ICHガイドラインではこのような方法を「ウイルススクリアランス評価試験」と称している⁵⁾。

一方、不特定多数のウイルスの迷入を対象として、ある工程がもつウイルスを排除する能力を解

析しようとする場合 (ICH ガイドラインでは「工程のウイルスクリアランス特性解析試験」と称している) は、広範囲にウイルス除去および不活化の情報を得るという観点から、DNA ウイルス、RNA ウイルス、エンベロープの有無、粒子径の大小を考慮し、さらに物理的および化学的処理に対する抵抗性が高いものを選択することが望ましいとされている。これらの特性を網羅するには、3種類程度の非特異的モデルウイルスを組み合わせることが必要になる。

(c) ウイルスクリアランスに関する工程の評価および精製バルクでのウイルス試験実施要領

表2は、ICH ガイドラインからのものである。細胞や未精製バルクでの試験結果を受けて、ウイルスが検出されない場合は、工程評価試験は不要、目的産物でのウイルス試験も不要である。ウイルスやウイルス様粒子が検出された場合には、関連ウイルスなどを用いた工程評価試験が必要である。目的産物でのウイルス試験は、3~5ロット実施すればよいとされている。また、CHO細胞に存在するウイルス粒子に対しては実施の必要がないとされている。

(3) ウイルスクリアランス評価試験のデザインと実施要領

ウイルスクリアランス評価試験のデザインと実施要領について以下に列挙する。

- ① 高力価の材料が調製できるウイルスの選択。
- ② 高感度、高精度、再現性のあるウイルス試験法の採用、統計処理可能な測定試料数の確保、サンプリング法と統計学上の問題への配慮。
- ③ ウイルスを扱うのに適切な施設・設備と専門家による試験の実施。
- ④ スケールダウンした製造システムの各要素が実生産スケールのそれを反映した妥当なものであることの証明。
- ⑤ 原理の異なる複数のウイルス不活化/除去工程での試験と評価。
- ⑥ 評価対象の製造(各)工程でのウイルス量(感染性)の低減が不活化によるのか物理的除去によるのかの事前推定。必要に応じた不活化/除去工程の追加導入。ある特定の工程での不活化への寄与分と除去への寄与分を区別して考えること。
- ⑦ ウイルス不活化の評価に際して不活化曲線の作成/再現性の必要性。
- ⑧ 工程中の試料に抗ウイルス抗体が存在する場合の影響に留意。
- ⑨ 工程前の試料への十分な量のウイルス添加の必要性和容量への配慮。
- ⑩ 希釈、濃縮、ろ過、透析、保存など、測定試料調製のための操作を伴う場合、並行したコントロール試験の必要性。
- ⑪ 緩衝液あるいは製品のウイルス力価測定法に対する毒性作用または干渉作用の個別評価と対策。
- ⑫ 同様な緩衝液/カラムの複数工程での繰返し使用の影響に留意。
- ⑬ 製造条件や緩衝液などによる指示細胞やウイルスへの作用が、総ウイルスクリアランス指数を過小評価する可能性への考慮。総ウイルスクリアランス指数が、過大評価される場合もあることに留意。
- ⑭ ある特異的な作用原理・機構による特定のウイルス除去/不活化工程のクリアランス能はウイルスの種類に依存的に異なることに留意。
- ⑮ ウイルスクリアランスは、不活化工程が2段階以上ある場合、相互補完的分離工程が複数ある場合、不活化および分離工程が複数組み合わせられた場合に効果的に達成されることに留意。
- ⑯ 少なくとも2回以上の独立した試験により添加ウイルス量の低減に再現性があることを立証できるよう試験計画の策定。

⑰ カラムの機能評価と再利用に関する留意事項。

⑱ その他、ウイルスクリアランス試験の設計に関しては各種製品を対象とした公的通知等^{4,5,7)}を適宜参考にする。

(4) ウイルスクリアランス試験結果の評価と解釈

ウイルスクリアランス試験の結果を評価する指標としては一般にウイルスクリアランス指数を用いる。ウイルスクリアランス指数は、製造工程においてクリアランス試験の対象とした各製造段階を経る間のウイルス量(ウイルス感染性：力価)の減少度を対数で表したものである。製造工程全体における総ウイルスクリアランス指数は各製造段階でのウイルスクリアランス指数のうち適切に評価できるものを加算することにより得られる。製造(販売)業者は、得られたウイルスクリアランス指数が受け入れ可能かどうかについて、医薬品製造基材等および製造過程に含まれる可能性のある全てのウイルスを念頭において評価し、その妥当性を示すべきである。

ウイルスクリアランス試験結果の妥当性評価に関する留意事項として以下が挙げられる。

(a) 医薬品製造基材等に何らかのウイルスが存在する場合、当該ウイルスが除去あるいは不活化されたかということのみでなく、ウイルスクリアランスに関して必要な程度を上まわる能力が精製工程に組み込まれていて、最終製品の安全性が適切なレベルに確保されていることを示すことが重要である。

(b) 精製工程全体をとおして評価した場合、1回の臨床投与量に相当する量の未加工/未精製バルク中に存在すると推定されるウイルス量よりはるかに多くのウイルスを除去/不活化できる必要がある。

(c) 医薬品製造基材等にウイルス存在や存在量が確認できない場合や、不測の外来性ウイルスの迷入については、一般的な数値目標は設定できない。工程のウイルスクリアランス指数の妥当性は、医薬品製造基材等のウイルス汚染の現実的可能性をめぐる各種の情報やウイルス否定試験の検出感度、その他文献的事例などを勘案しながら考察することになる。

また、クリアランスの機構はウイルスの種類によって異なるので、得られたデータを解釈、評価する際には、①試験に使用されたウイルスの適切さ、②クリアランス試験のデザイン、③対数で表されるウイルス減少度、④不活化の時間依存性、⑤ウイルス不活化/除去に関するプロセス・パラメーターのばらつきによる影響、⑥ウイルスアッセイ法の感度、⑦ある不活化/除去操作過程が特定種類のウイルスに特に有効である可能性など、各種要因を組み合わせる必要がある。

(5) ウイルスクリアランス試験の限界

ウイルスクリアランス試験には一定の限界もあることを留意しておく必要がある。すなわち、ウイルスクリアランス試験は、最終製品がウイルス安全面からみて受け入れられるレベルに達しているという確証を得るのに寄与はするが、それそのものが安全性を保証するわけではない。また、クリアランス試験のデザインや実施にかかわる以下のような様々なファクターが製造工程のウイルス除去能力に関して誤った評価に導くおそれもある。

- ① 組織培養ウイルスの挙動は天然ウイルスとは異なる可能性。
- ② 不活化第1段階を免れたウイルスは次の不活化段階でより強い抵抗力を示すものである可能性。
- ③ 対数で表された各精製段階での減少度を全て加算することなどによりウイルス除去能力を過大評価してしまう可能性。
- ④ 力価の減少度を対数で表してクリアランス指数とするため、力価ゼロにはならないこと。

- ⑤ 実生産スケールとスケールダウン工程のある種の違い。
- ⑥ 類似の不活化機構で得られた各ウイルスクリアランス指数を加算することにより全クリアランスを過大評価する可能性。

9) 統計

ウイルスクリアランス試験における結果の評価にあたってはデータを統計学的手法を活用して解析する必要がある。また、得られた結論が支持されるためには、試験結果が統計学的に検証されたものである必要がある。

10) ウイルスクリアランスの再評価が必要な場合

生産工程あるいは精製工程をそれなりに変更した場合には、必ずその変更がウイルスクリアランス能力に関して、直接あるいは間接に影響しないかを考え、必要に応じてシステムを再度検証する必要がある。

おわりに

医薬品等におけるウイルス安全性確保の基本的方策の要約は、本節 2-1) 項に示されている。これらは、主に医薬品等開発段階で留意すべき点や承認申請時に明示すべき点を網羅的に示している。一方、ウイルス安全性確保への最も確実で、かつ効率的、効果的、合理的アプローチは、原材料の起源(自己または同種のヒト、動物等)・原材料・医薬品等製造基材・製造関連物質の種類・特徴および各最終製品の種類・特徴あるいは製造方法などによって、自ずと異なる。血液製剤や細胞・組織利用医薬品等では、未加工・未精製バルクでの試験やウイルスクリアランス試験というアプローチは一般に適用困難なので、ドナー/原材料/医薬品等製造基材や製造関連物質のレベルでのウイルス存在の可能性の検討が決定的な意味をもつ。また、細胞・組織利用医薬品等の場合、培養等の製造工程で有効成分である細胞・組織や製造関連物質がウイルス増殖の危険性を招く可能性もあり、製造工程のより下流、例えば製品の段階での検討が必要な場合もある。一方、細胞基材由来のタンパク質性医薬品や血液分画製剤の場合は、未加工・未精製バルクでの試験やウイルスクリアランス試験が適用できる点でより確実にウイルス安全性を確保することが可能である。とはいえ、ウイルス学的に徹底して解析し、かつバンク化した CHO 細胞等を医薬品製造基材として無血清培地で培養するという方策が可能な細胞基材由来のタンパク質性医薬品の場合に比較して、不特定多数のドナーからの血液を原材料とし、原血漿を医薬品製造基材とする血液分画製剤の場合には、存在する可能性があるウイルスのヒトへの有害性や、ウイルス否定試験の検出限界の問題もあるのでウイルス安全性に関してはより慎重に対応すべきである。

医薬品等製造(販売)業者にとって最も重要な点は、個々のケースにおいて最も最適、効果的、合理的という意味でのケース・バイ・ケースのアプローチを選択し、その科学的妥当性を示すことである。規制当局はこれらのデータを基に当該医薬品等が少なくともウイルス安全性確保面で妥当か否かを評価することになる。併せて製造販売承認時にそのリスク評価等に基づき「保健衛生上特別の注意を要するもの」は「生物由来製品」、生物由来製品の中でも科学的見地もしくは行政的にみて

感染症伝播に関するリスクについてさらに嚴重な注意が必要なもの、すなわち「保健衛生上の危害の発生または拡大を防止するための措置を講ずることが必要なもの」は「特定生物由来製品」として指定し、ライフサイクルをととしたウイルス安全性確保についてより万全を期することとしている。「生物由来製品」あるいは「特定生物由来製品」として指定されたものについてはその区分に応じて、製造販売業者による原材料の安全性確保、原材料記録の保管管理、構造設備や製造管理、品質管理の方法についての基準の設定、直接の容器・被包・添付文書等への適切な表示、ドナー記録・販売記録の保管、製品または原材料による感染症に関する情報収集・分析・評価結果の定期報告などが義務づけられている。医療機関、薬局においては、患者へ使用に関わるリスクとベネフィットを説明し、理解を得ること、患者や使用製品の記録と保管、危害の発生や拡大を防止するために必要がある場合に患者等の利益になるときに限り記録情報の企業への提供などが必要とされている。現在知られているか、あるいは予測できるリスクを最小限にするための方策を講ずることはもとより、理論的なリスクを推定し、発生時を想定したリスクの管理（例えば、予防的な原則、可能な限り早期の発見、発生拡大の防止、被害者の救済）を従来にも増して、さらに一貫して、かつ合理的に行うということである⁸⁾。

今後さらに、ヒトや動物の生きた組織の利用等による先端医療技術や製品の開発促進が見込まれ、再生医療等の新規な有効性に基づく有望で新たな治療が期待されている。こうした状況の中で、本節で示したような基本的な考え方をベースに、関係者一体となってリスクの可能性の高さに応じた合理的な対応策を講じて、ウイルス安全性を確保し、患者の保護を目指す方策をとることにより先端技術への信頼が深められること、さらに新規製品が適正にかつ合理的に開発されるための方向が目指され、加速されることを期待したい。

(早川堯夫)

文 献

- 1) 生物由来原料基準。平成 15 年厚生労働省告示第 210 号
- 2) 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
- 3) 厚生労働省医薬食品局長：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
- 4) 日局生物製品のウイルス安全性確保の基本的要件。第 15 改正日本薬局方，参考情報
- 5) 厚生労働省医薬安全局審査管理課：人又は動物細胞を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価。医薬審第 329 号，平成 12 年 2 月 22 日
- 6) 早川堯夫，福永悟史：感染性物質概論。早川堯夫(監修)：バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保。エル・アイ・シー，2007，pp125-150
- 7) 厚生労働省医薬安全局長：生物製剤基準。血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン。医薬発第 1047 号，平成 11 年 8 月 30 日
- 8) 早川堯夫：生物由来製品の指定。早川堯夫(監修)：バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保。エル・アイ・シー，2007，pp249-261

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

Tumorigenicity testing of products derived from human pluripotent stem cells



佐藤陽治(写真) 黒田拓也

Yoji SATO¹ and Takuya KURODA^{1,2}

国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部¹,
先端医療振興財団先端医療センター研究部門再生医療基盤研究グループ²

◎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”を由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、腫瘍形成や癌化を防止すること、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、患者に投与する動物また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いまのところ存在しない。本稿ではヒト多能性幹細胞加工製品の開発が精力的に進むなかで、その造腫瘍性の評価法の現状と課題について概説する。



細胞・組織加工製品、ヒト多能性幹細胞、造腫瘍性、非臨床安全性試験

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かつ安定して供給することが可能となると期待されている。すでに2011年1月にアメリカでは、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月には同じくアメリカで、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。

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、新規適用法など、あら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。このなかに実用化に有望と考えられるシーズも数多くあり、たとえば、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とも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。本稿では、多能性幹細胞加工製品に特有かつ重要な安全性上の関心事として、とくに造腫瘍性の評価の現状と課題について紹介することにする。

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いう。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・外胚葉系のさまざまな細胞種に分化することを示すことによつてなされている(「サイドメモ1」参照)。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・癌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。

造腫瘍性試験の国際ガイドライン

— “何の” 造腫瘍性か

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¹⁾』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、調製および特性解析』(ICH Q5D, 医薬審 873号, 平成12年7月14日)²⁾も、このガイドラインに記載

サイド メモ 1

テラトーマ(奇形腫)

多能性幹細胞が増殖分化して形成する、内・中・外胚葉のさまざまな細胞種が無秩序に集合した腫瘍。自然発生的には主として性腺に生じるが、体の各部に生じることもある。

された方法を援用している。WHO TRS 878にある造腫瘍性試験の内容は、きわめて大雑把に言えば「ヌードマウスなどの動物10匹に 10^7 個の細胞を投与して3週間ないし12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蛋白質製剤など、ヒトを対象に *in vivo* または *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または動物由来の連続継代性細胞株(不死化細胞株)である。また、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(「サイドメモ2」参照)の造腫瘍性の程度または有無を正確に把握することである。造腫瘍性の程度的大幅な変化、また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・発癌遺伝子活性化など、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ひとつとして評価し、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

サイド メモ 2

セルバンク

生物薬品の分野でいう“セルバンク”とは、最終製品を製造するための細胞を均質を含む複数のアンプルのことを指す。多種類の細胞株や組織を凍結して取り揃えたものや、それらを貯蔵する施設(ATCC, 理研BRC, 臍帯血バンク, 骨髄バンクなど)を指すものではない点に注意。大本の細胞を一定の培養条件下で最低限の継代数を経て増殖させることにより調製したセルバンクをマスターセルバンクといい、マスターセルバンクから一定の条件で培養して得られる均質な細胞懸濁液を分注して調製した、実際の医薬品製造に使用されるセルバンクをワーキングセルバンクという。

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、造腫瘍性試験はマスターセルバンクまたはワーキング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ときに実施することが求められている。ひるがえってみれば、WHO TRS 878は患者に移植するヒトまた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、具体的にいえば「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。

(注：原材料であるヒト多能性幹細胞株自体は連続継代性細胞であり、かつ通常はセルバンクを構成しているため、その造腫瘍性は現行の WHO TRS 878 の適用対象となるとも考えられる。したがって、原材料としてのヒト多能性幹細胞株は、セルバンクの一連の特性解析のなかで、3胚葉系への分化能の確認という意味だけでなく、WHO TRS 878の意図するところに則った造腫瘍性評価が必要になるかもしれない。ただし、2010年7月に公開された WHO TRS 878 Annex I の改正案³⁾では、患者に移植する細胞だけでなく、治療を目的に患者に移植する細胞株の原料となる細胞も対象外とされ、その特性解析においては規制当局などとの議論が必要とされており、今後の改正作業の行方に注目しておく必要がある。)

WHO TRS878の細胞・組織加工製品への転用

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わずかな未分化細胞・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”とはいっても、WHO TRS 878にあるような「連続継代性細胞株のセルバンク(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。そこで、WHO TRS 878の方法を細胞・組織加工製品に転用することができないか、という課題が生まれてくる。この課題を考える前に、WHO TRS 878の方法、すなわち「ヌードマウスなどの動物に 10^7 個の細胞を投与」の根拠について触れてみたい。

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。たとえば、Endo-CA(ヒト子宮内膜癌細胞由来)、A549(ヒト肺癌細胞由来)、Hela(ヒト子宮頸癌細胞由来)、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 個程度といわれており、一言に“造腫瘍性”といっても細胞株によってその強さは大きく異なる^{4,5)}。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、すくなくとも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 個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、もっと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桁違いに多くの細胞数が必要だといわれている。たとえば、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もっていると仮定し、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} 個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・組織加工製品にわず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おそれがある。

● 重度免疫不全マウスの利用

ヒト細胞・組織加工製品中にわず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)⁶⁾, NOD/SCID/ γ C^{null}(NOG)⁷⁾, NOD/SCID/IL-2rgKO(NSG)⁸⁾などの重度免疫不全マウス系統があげられる。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、ヒト癌細胞を非常に高い効率で生着させることが可能といわれている^{9,10)}。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・混入するわず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、試験系の検出限界・感度・精度の分析的検討、陽性・陰性コントロールのあり方、投与細胞数、投与経路、投与方法、観察期間、ヌードマウスとの比較などがあげられる。

● 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* 試験系があり、それぞれに長所と短所がある。それらを *in vivo* 試験法と合わせて表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いえる。

軟寒天コロニー形成試験は、癌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もつことが知られており¹¹⁾、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。著者らは、分散誘導性アポトーシスを抑制するといわれる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(未公表データ)。

フローサイトメトリーや定量性RT-PCR(qRT-PCR)は、特定のマーカー蛋白質・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・回収できる点、qRT-PCRはその高い感度が利点である。著者らは、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(投稿準備中)。

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などによって製品ごとに判断されるべきと考えられる。

● おわりに

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

表 1 おもな造腫瘍性関連試験の能力と限界

試験法	測定事項	評価事項	利点	欠点
<i>In vivo</i> 試験法				
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)	<ul style="list-style-type: none"> • 時間(数週間～数カ月)・費用がかかる • 膀胱癌, 乳癌, 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 • わず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	<ul style="list-style-type: none"> • 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	<ul style="list-style-type: none"> • 時間(数週間～数カ月)・費用がかかる • 定量化の方策が未整備
<i>In vitro</i> 試験法				
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	<ul style="list-style-type: none"> • 簡便・安価 • とき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) 	<ul style="list-style-type: none"> • わず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	<ul style="list-style-type: none"> • 短時間(～1日)・簡便 • とき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 	<ul style="list-style-type: none"> • 特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない • ゲートのかけ方で結果がばらつく
qRT-PCR	細胞マーカー遺伝子発現		<ul style="list-style-type: none"> • 短時間(～1日)・簡便 • ときには flow cytometry よりも“高感度” 	<ul style="list-style-type: none"> • 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	<ul style="list-style-type: none"> • <i>in vivo</i> 試験より短期間(数週間～1カ月程度) • 安価 • ときにはヌードマウスよりも“高感度” 	<ul style="list-style-type: none"> • 浮遊系細胞に使用できない • わずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない • ヒト ES/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	<ul style="list-style-type: none"> • 相関性の問題(染色体異常⇔造腫瘍性) • わず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 <i>in situ</i> 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			

いま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かなうかどうかで取捨選択し、懸念の強

い製品については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である。

謝辞：本説の執筆にあたりご助言をいただきました近畿大学薬学総合研究所所長・早川堯夫先生、および国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部のメンバーに深く感謝いたします。

文献/URL

- 1) WHO Expert Committee on Biological Standardiza-

tion, 47th Report, 1998 (Technical Report Series No. 878). (http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_878.pdf)

- 2) 厚生省医薬安全局審査管理課長通知(医薬審第873号, 平成12年7月14日)「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)製造用細胞基剤の由来, 調製及び特性解析」について. (http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5d_00_7_14.pdf)
- 3) WHO/BS/10.2132 Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks, 2010 (Proposed replacement of TRS 878, Annex 1). (http://www.who.int/biologicals/BS2132_CS_Recommendations_CLEAN_19_July_2010.pdf)
- 4) Lewis, A. M. Jr. et al.: *Cancer Lett.*, **93**: 179-186, 1995.
- 5) Lewis, A. M. Jr.: Regulatory implications of neoplastic cell substrate tumorigenicity. (http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/slides/5-4188S1_2.PPT)
- 6) Garcia, S. et al.: *Immunity*, **11**: 163-171, 1999.
- 7) Ito, M. et al.: *Blood*, **100**: 3175-3182, 2002.
- 8) Ishikawa, F. et al.: *Blood*, **106**: 1565-1573, 2005.
- 9) Machida, K. et al.: *J. Toxicol. Sci.*, **34**: 123-127, 2009.
- 10) Quintana, E. et al.: *Nature*, **456**: 593-598, 2008.
- 11) Ohgushi, M. et al.: *Cell Stem Cell*, **7**: 225-239, 2010.

* * *

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



Learn and Live SM

Cilostazol Suppresses Angiotensin II–Induced Vasoconstriction via Protein Kinase A –Mediated Phosphorylation of the Transient Receptor Potential Canonical 6 Channel

Kinue Nishioka, Motohiro Nishida, Marina Ariyoshi, Zhong Jian, Shota Saiki, Mayumi Hirano, Michio Nakaya, Yoji Sato, Satomi Kita, Takahiro Iwamoto, Katsuya Hirano, Ryuji Inoue and Hitoshi Kurose

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011, 31:2278-2286: originally published online July 28, 2011

doi: 10.1161/ATVBAHA.110.221010

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 72514

Copyright © 2011 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/31/10/2278>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2011/07/28/ATVBAHA.110.221010.DC1.html>

Subscriptions: Information about subscribing to Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is online at

<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:

journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at

<http://www.lww.com/reprints>

Cilostazol Suppresses Angiotensin II–Induced Vasoconstriction via Protein Kinase A–Mediated Phosphorylation of the Transient Receptor Potential Canonical 6 Channel

Kinue Nishioka, Motohiro Nishida, Marina Ariyoshi, Zhong Jian, Shota Saiki, Mayumi Hirano, Michio Nakaya, Yoji Sato, Satomi Kita, Takahiro Iwamoto, Katsuya Hirano, Ryuji Inoue, Hitoshi Kurose

Objective—The goal of this study was to determine whether inhibition of transient receptor potential canonical (TRPC) channels underlies attenuation of angiotensin II (Ang II)–induced vasoconstriction by phosphodiesterase (PDE) 3 inhibition.

Methods and Results—Pretreatment of rat thoracic aorta with cilostazol, a selective PDE3 inhibitor, suppressed vasoconstriction induced by Ang II but not that induced by KCl. The Ang II–induced contraction was largely dependent on Ca^{2+} influx via receptor-operated cation channels. Cilostazol specifically suppressed diacylglycerol-activated TRPC channels (TRPC3/TRPC6/TRPC7) through protein kinase A (PKA)–dependent phosphorylation of TRPC channels in HEK293 cells. In contrast, we found that phosphorylation of TRPC6 at Thr69 was essential for the suppression of Ang II–induced Ca^{2+} influx by PDE3 inhibition in rat aortic smooth muscle cells (RAoSMCs). Cilostazol specifically induced phosphorylation of endogenous TRPC6 at Thr69. The endogenous TRPC6, but not TRPC3, formed a ternary complex with PDE3 and PKA in RAoSMCs, suggesting the specificity of TRPC6 phosphorylation by PDE3 inhibition. Furthermore, inhibition of PDE3 suppressed the Ang II–induced contraction of reconstituted ring with RAoSMCs, which were abolished by the expression of a phosphorylation-deficient mutant of TRPC6.

Conclusion—PKA-mediated phosphorylation of TRPC6 at Thr69 is essential for the vasorelaxant effects of PDE3 inhibition against the vasoconstrictive actions of Ang II. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2278–2286.)

Key Words: angiotensin II ■ diacylglycerol ■ phosphodiesterase ■ phosphorylation
■ transient receptor potential canonical

Peripheral vascular tone is controlled mainly by agonist stimulation via the sympathetic nerve system, the renin-angiotensin-aldosterone system, and inherent myogenic contraction.¹ Increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in response to neurotransmitters and hormones triggers contraction of vascular smooth muscle cells (VSMCs).² Stimulation of G_q protein-coupled receptor activates phospholipase C and induces production of 2 second messengers, inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DAG).³ IP_3 mobilizes Ca^{2+} release from the internal Ca^{2+} stores through stimulation of IP_3 receptors, leading to a transient increase in $[Ca^{2+}]_i$. Depletion of Ca^{2+} stores by IP_3 -mediated Ca^{2+} release then induces subsequent Ca^{2+} entry through activation of store-operated Ca^{2+} channels.⁴ A variety of evidence has implied the important roles of

store-operated Ca^{2+} channels in vascular tone regulation.⁵ In contrast, DAG is primarily thought to activate protein kinase C, but it also plays a more direct role in activating Ca^{2+} entry,⁶ and recent reports have implied that DAG-mediated Ca^{2+} influx also participates in vascular tone regulation.^{7–9} However, it is unclear which pathway is involved in agonist-induced contraction of aortic VSMCs.

Cilostazol, a selective phosphodiesterase (PDE) 3 inhibitor, is clinically used as an antiplatelet drug and is also applicable to patients with intermittent claudication and arteriosclerosis obliterata.^{10–12} Cilostazol has been shown to induce vascular relaxation through a protein kinase A (PKA)–dependent decrease in $[Ca^{2+}]_i$ of VSMCs.^{13,14} Several PKA target proteins responsible for suppression of agonist-induced vascular contraction have been reported.^{15–18}

Received on: December 2, 2010; final version accepted on: July 12, 2011.

From the Department of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences (K.N., M. Nishida, M.A., S.S., M. Nakaya, H.K.) and Division of Molecular Cardiology, Research Institute of Angiocardiology, Graduate School of Medical Sciences (M.H., K.H.), Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka, Japan; Departments of Physiology (Z.J., R.I.) and Pharmacology (S.K., T.I.), School of Medicine, Fukuoka University, Jyonan-ku, Fukuoka, Japan; Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, Setagaya, Tokyo, Japan (Y.S.).

Correspondence to Hitoshi Kurose, PhD, Department of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8582, Japan. E-mail kurose@phar.kyushu-u.ac.jp

© 2011 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.221010

For example, PKA phosphorylates myosin light chain kinase (MLCK), which leads to decrease in myosin light chain phosphorylation levels.¹⁵ PKA also phosphorylates G protein-coupled receptor kinase 2 and regulator of G protein signaling proteins, enhancing the inactivation of G_{α_q} -mediated signaling in VSMCs and resulting in suppression of agonist-induced vasoconstriction.^{16–18} Thus, the phosphorylation of these targets can explain the mechanism of PKA-dependent vasodilation. However, it is still unclear why cilostazol induces a decrease in $[Ca^{2+}]_i$ of VSMCs through PKA activation.

The transient receptor potential channel was originally identified in a *Drosophila* visual transduction mutation, *trp*, in which the receptor potential is transient on light perception.¹⁹ The canonical subfamily transient receptor potential canonical (TRPC) channels are thought as putative candidates for receptor-operated cation channels (ROCCs).²⁰ Among the 7 members of vertebrate TRPCs (TRPC1 to TRPC7), TRPC2, TRPC3, TRPC6, and TRPC7 have been reported to be activated by DAG.^{21,22} Sustained cation influx induced by activation of DAG-activated TRPC channels leads to membrane depolarization, resulting in increase of $[Ca^{2+}]_i$ through activation of voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels (VDCCs).^{22,23} In addition, DAG-activated TRPC channels associate with the Na^+/Ca^{2+} exchanger, and TRPC-mediated Na^+ influx results in a shift of Na^+/Ca^{2+} exchanger operation to the reverse mode (ie, Ca^{2+} influx).^{24,25} The resultant Ca^{2+} influx mediated by DAG-activated cation influx through TRPC channels are required for muscle contraction^{7,8} and gene expression.^{23,26}

The activity of DAG-activated TRPC channels is negatively regulated by their phosphorylation.^{27–30} Protein kinase C has been implicated in the suppression of TRPC3 channel activity via phosphorylation of human TRPC3 at Ser712, and protein kinase G (PKG)-dependent phosphorylation has been shown to suppress store-operated Ca^{2+} entry in TRPC3-expressing HEK293 cells through phosphorylation of human TRPC3 at Thr11 and Ser263.^{27–29} In addition, PKG-dependent phosphorylation of rodent TRPC6 at Thr69 has been shown to mediate nitric oxide-dependent reduction of TRPC6 channel activity in VSMCs.³⁰ As the inhibition of TRPC6 reduces agonist-induced membrane depolarization in VSMCs, the nitric oxide-mediated inhibition of TRPC6 channels may be partially involved in the mechanism of endothelium-dependent vasodilation. Activation of PKA by stimulation of the β_2 adrenergic receptor or inhibition of PDE3 is known to induce endothelium-independent vascular relaxation. However, it is unknown whether activation of PKA suppresses vasoconstriction through inhibition of TRPC channels.

In this study, we demonstrated that PKA-mediated phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 underlies suppression of agonist-induced contraction of aortic VSMCs by PDE3 inhibition. We further demonstrated the molecular mechanism underlying selective phosphorylation of TRPC6 at Thr69 by PDE3 inhibition in rat aortic smooth muscle cells (RAoSMCs).

Methods

The supplemental materials (available online at <http://atvb.ahajournals.org>) provide expanded descriptions.

Isometric Force Measurements

Rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg IP), and the descending thoracic aorta was carefully isolated and cut into 3-mm-long rings. The rings were stretched to a resting tension of 1.5g. We confirmed that pretreatment with PDE3 inhibitors did not affect the resting tension.

Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ and Rho Activity, Electrophysiology, Immunoprecipitation, and Western Blot Analyses

Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ and Rho activity, patch clamp recording of HEK293 cells, immunoprecipitation of green fluorescent protein (GFP)-fused proteins, and Western blot analyses were performed as described previously.^{30,31,32}

Production of a Reconstituted Ring and Measurement of Tension

Production of a reconstituted ring and measurement of tension were performed as described previously.³³ The cultured primary RAoSMCs were collected with trypsinization and transfected with pCIneo vector encoding wild-type TRPC6 or TRPC6-Thr69Ala mutant and pEGFP-N1 using electroporation (1400 V, 10 ms \times 3, Digital-Bio). Cell suspensions were mixed with the culture medium (5×10^6 cells/mL) containing 0.6 mg/mL type I collagen (Cellmatrix Type I-P). The mixture (100 μ L, 0.5×10^6 cells) was placed around a silicone column ($\phi=2$ mm), which was attached on the center of the silicone disc ($\phi=8$ mm). After the collagen gel became solid, the culture medium was added and cultured for 24 to 48 hours. The ring preparation thus obtained was used for measurements of isometric tension development. The transfection efficiency of electroporation was $70 \pm 5\%$, determined by counting GFP-positive RAoSMCs. Tension recordings are described in the supplemental materials.

Statistical Analysis

The results are shown as mean \pm SEM. All experiments were repeated at least 3 times. Statistical comparisons were made with the 2-tailed Student *t* test or analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls procedure, with significance imparted at probability values <0.05 .

Results

Suppression of Agonist-Induced Vasoconstriction by PDE3 Inhibition

Treatment of rat thoracic aorta with G_q protein-coupled receptor agonists (angiotensin II [Ang II], phenylephrine, and U46619) increased the tension of aortic rings, which was significantly suppressed by pretreatment with cilostazol in a concentration-dependent manner (Figure 1A to 1C). Cilostazol suppressed vasoconstriction induced by Ang II more selectively than phenylephrine and U46619. Cilostazol did not suppress KCl-induced contraction (Figure 1D), indicating that cilostazol does not inhibit voltage-dependent Ca^{2+} channels. In addition, the Ang II-induced contraction was markedly reduced by the removal of extracellular Ca^{2+} , and the effects of cilostazol were abolished in extracellular Ca^{2+} -free solution (Figure 1E and 1F). Cilostazol-induced suppression of Ang II contraction in Ca^{2+} -containing solution was not affected by the removal of endothelium (Figure 1G). Milrinone, another PDE3-selective inhibitor, also suppressed Ang II-induced contraction (Supplemental Figure I). These results suggest that PDE3 inhibition suppresses agonist-induced Ca^{2+} influx in aortic smooth muscle cells. The Ang II-induced contraction was completely suppressed by CV11974, an Ang II type 1 receptor antagonist (Figure 1H). Further-

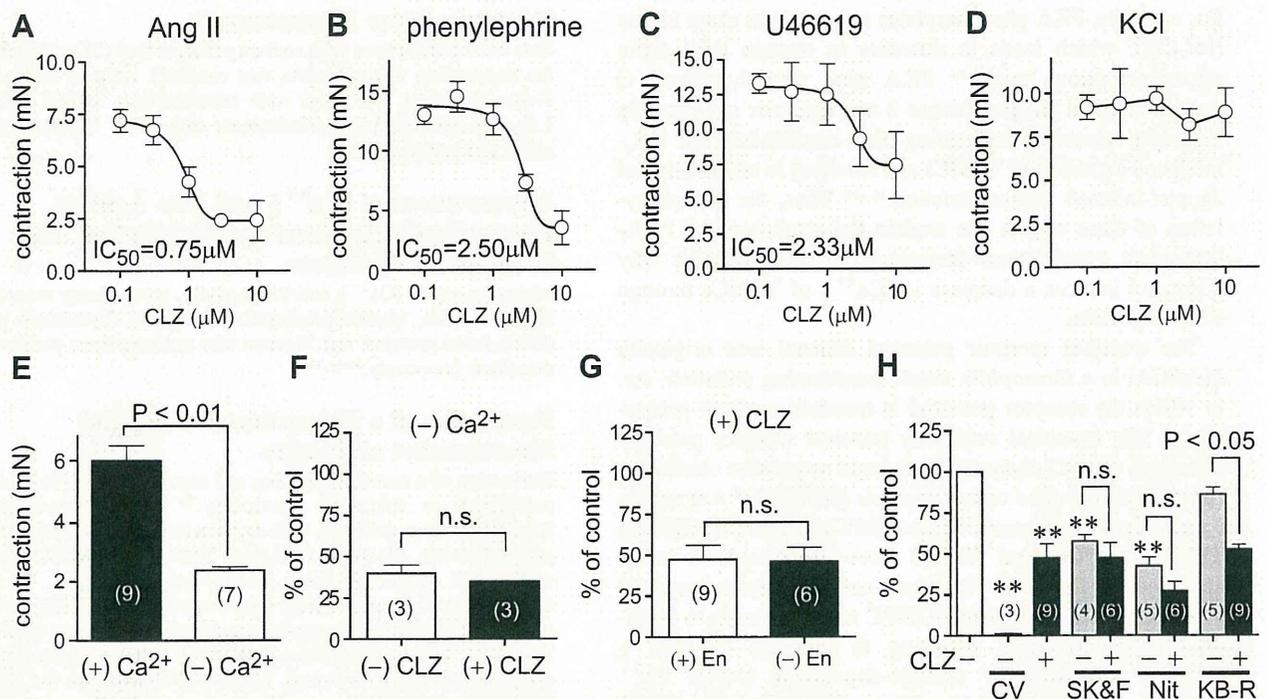


Figure 1. Inhibition of phosphodiesterase (PDE) 3 suppresses agonist-induced vascular contraction in rat thoracic aorta. A to D, Concentration-dependent inhibition of agonist-induced vasoconstriction by cilostazol (CLZ). Vascular contraction was induced by 100 nmol/L angiotensin II (Ang II) (A), 1 μ mol/L phenylephrine (B), 100 nmol/L U46619 (C), and 40 mmol/L KCl (D). Aorta was pretreated with CLZ for 30 minutes before agonist stimulation. E, Requirement of extracellular Ca^{2+} in Ang II-induced vasoconstriction. F, Effects of CLZ on Ang II-induced contraction in the absence of extracellular Ca^{2+} . G, Suppression of Ang II-induced contraction by CLZ treatment in endothelium (En)-denuded aorta. H, Ang II-induced contraction in the aortas pretreated with SK&F96365 (SK&F; 7 μ mol/L), nitrendipine (Nit; 3 μ mol/L), and KB-R7943 (KB-R; 5 μ mol/L) with or without CLZ (5 μ mol/L) for 30 minutes before Ang II stimulation. ** $P < 0.01$ vs control (white column). n.s. indicates not significant.

more, the suppression of Ang II-induced contraction by cilostazol was abolished by inhibitors of ROCCs (SK&F96365) and VDCCs (nitrendipine) but not by a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (KB-R7943). As activation of ROCCs reportedly induces membrane depolarization,^{23,34} these results suggest that PDE3 inhibition suppresses agonist-induced Ca^{2+} influx through VDCCs by inhibiting ROCCs.

Cilostazol Inhibits DAG-Activated TRPC Channels

TRPC channels are believed to be a molecular candidate of ROCCs.²⁰ Among 7 TRPC homologues, TRPC3, TRPC6, and TRPC7 proteins (TRPC3/6/7) are expressed in aorta and function as a DAG-activated cation channels in VSMCs.³⁵ Cilostazol did not affect ATP-induced Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} store but significantly suppressed Ca^{2+} influx-mediated increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in TRPC3-, TRPC6-, or TRPC7-expressing HEK293 cells (Figure 2). The IC_{50} values of inhibition by cilostazol were 0.75 ± 0.06 μ mol/L (for TRPC3), 0.73 ± 0.24 μ mol/L (for TRPC6), and 0.71 ± 0.04 μ mol/L (for TRPC7). Cilostazol also suppressed Ca^{2+} influx-mediated increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by 1-oleoyl-2-acetyl-*sn*-glycerol (OAG) in TRPC3-, TRPC6-, or TRPC7-expressing cells, with IC_{50} values being 0.61 ± 0.19 , 0.68 ± 0.18 , and 0.69 ± 0.22 μ mol/L, respectively (Supplemental Figure II). However, ATP-induced Ca^{2+} influx through TRPC5 channels, which is believed to be insensitive to DAG, and store-operated Ca^{2+} influx induced by ionomycin were not suppressed by cilostazol (Supplemental Figure III). These

results suggest that inhibition of PDE3 specifically suppresses agonist-induced Ca^{2+} influx through DAG-activated TRPC channels.

Involvement of Phosphorylation of TRPC6 at Thr69 in Suppression of TRPC6 Channel Activity by PDE3 Inhibition

As more than 15 minutes of pretreatment with cilostazol was required for the significant suppression of TRPC6-mediated Ca^{2+} influx induced by ATP or OAG (Supplemental Figure IV), cilostazol may not directly inhibit TRPC6 channel activity. In addition, localization of GFP-fused TRPC3 (TRPC3-GFP) and TRPC6 (TRPC6-GFP) proteins on the plasma membrane were not affected by cilostazol treatment (Supplemental Figure V). These results suggest that PDE3 inhibition did not change the membrane localization of TRPC proteins. Takahashi et al has reported that PKG-dependent phosphorylation of TRPC6 at Thr69 suppresses TRPC6 channel activity.³⁰ As PKA and PKG recognize a similar substrate sequence,³⁶ we next examined the involvement of TRPC6 phosphorylation at Thr69 in suppression of TRPC6 channel activity by PDE3 inhibition. The Ca^{2+} influx-mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase induced by OAG was suppressed by cilostazol pretreatment in wild-type TRPC6 (TRPC6-wt)-expressing cells, whereas the suppression of OAG-mediated Ca^{2+} influx by cilostazol was completely abolished in TRPC6-Thr69Ala-expressing cells (Supplemental Figure VI). The inhibition of TRPC6-mediated Ca^{2+} influx by cilostazol