

図 2-4 : Cycleave PCR 法の原理. CycleavePCR 法とは, サイクリングプローブ法を使用したリアルタイム PCR である. サイクリングプローブ法は, RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる検出法で, 増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することができる. プローブは RNA 部分を挟んで一方が蛍光物質 (図中の F) で, もう一方がその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質 (クエンチャー: 図中の Q) で標識されている. このプローブは, インタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することは無いが, 増幅産物中の相補的な配列とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されることにより, 強い蛍光を発するようになる. この蛍光強度を測定することで, 増幅産物量をモニターすることができる. プローブの RNA 部分がミスマッチであれば RNase H により切断されることはないため, 一塩基の違いも認識できる非常に特異性の高い検出方法である.

増幅領域	$\Delta G$
211-290	-3.48
221-300	-2.95
231-310	-4.00
241-320	-3.28
251-330	-3.28
261-340	-2.16
271-350	-2.16
281-360	-2.16
291-370	-0.66
296-375	-0.29
300-380	-0.29

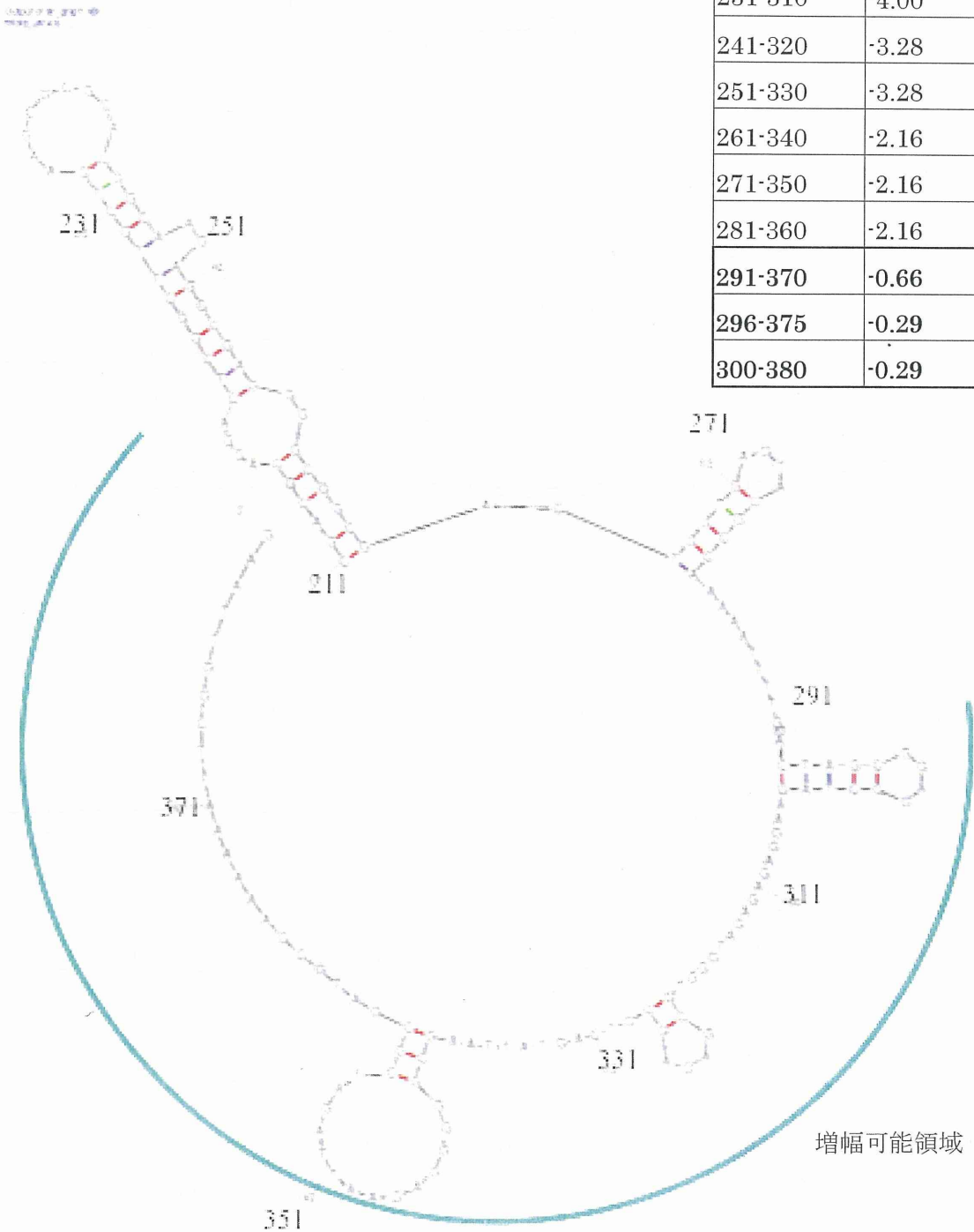
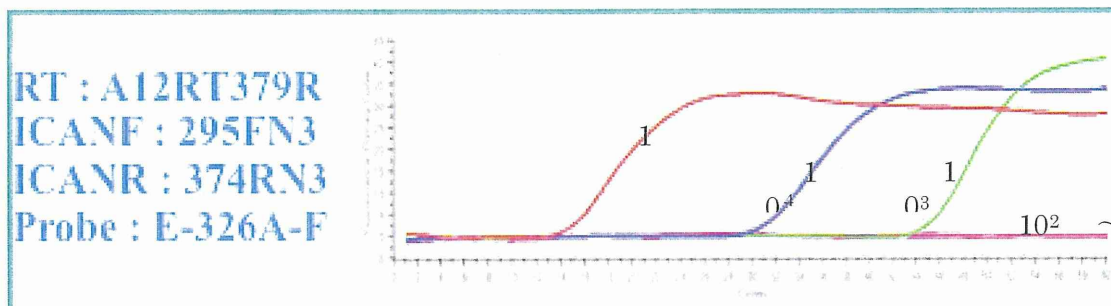


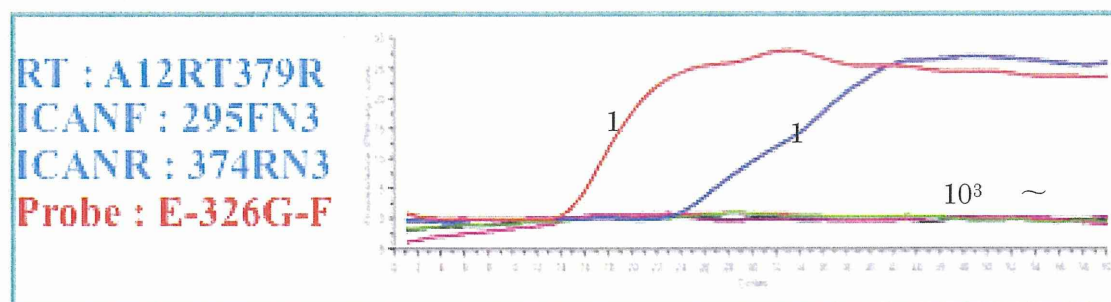
図 2-5 : 増幅可能領域の選定.

dG = 15.23 (2016/27 20:48:37)

### A Primer, Probe set 1



### B Primer, Probe set 2



### C Primer, Probe set 3

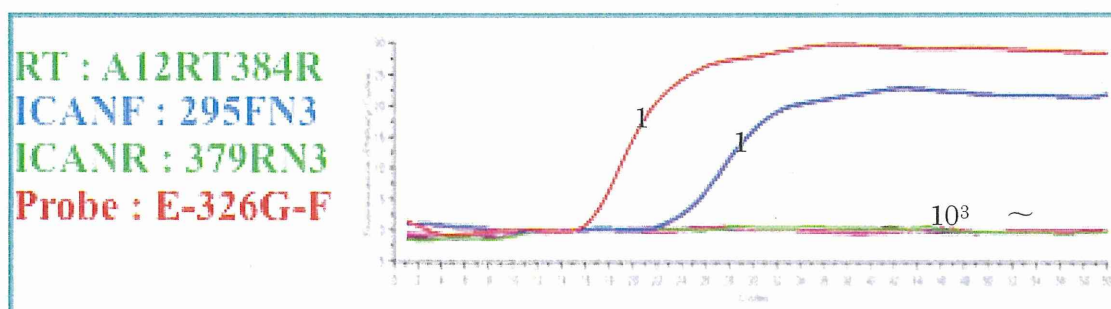
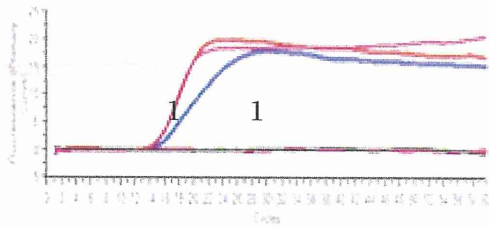
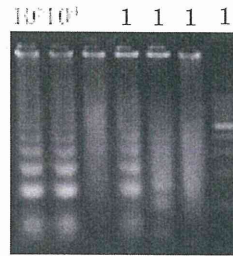


図 2-6 : Cycleleave RT-ICAN 法における感度比較. (A) プライマー, プロブセット 1, (B) プライマー, プロブセット 2, (C) プライマー, プロブセット 3 での結果をそれぞれ示す.

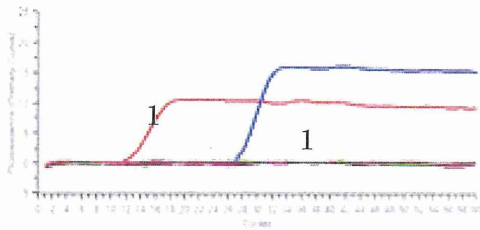
A Tli RNaseH 7.5U



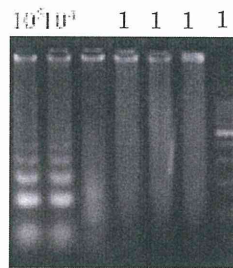
B



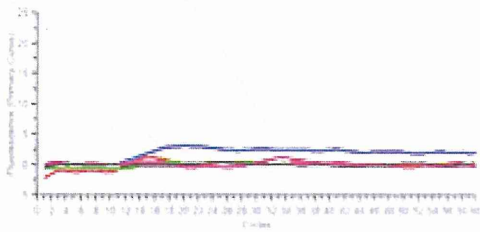
C Tli RNaseH 5U



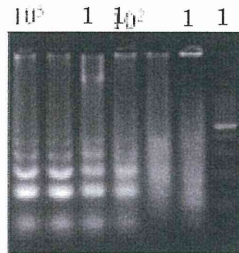
D



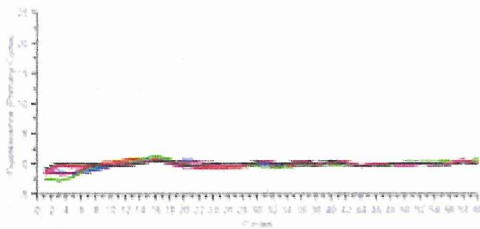
E Tli RNaseH 2.5U



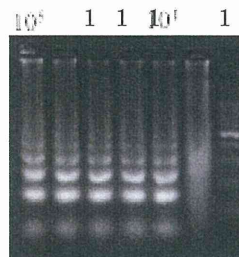
F



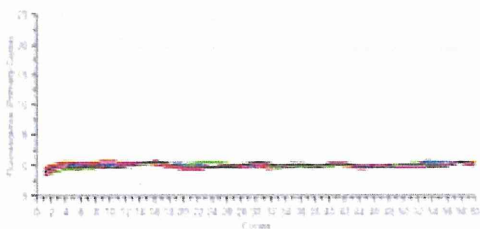
G Tli RNaseH 1U



H



I Tli RNaseH 0.5U



J

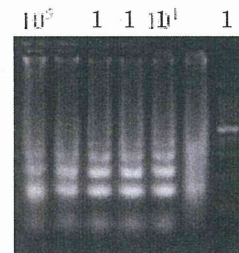
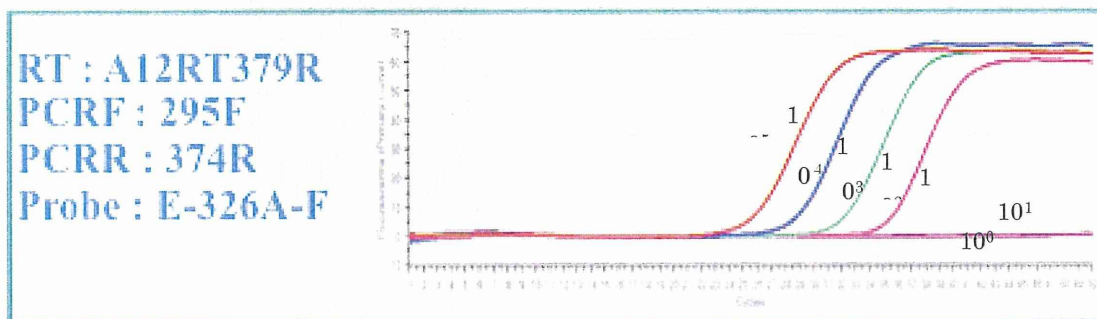
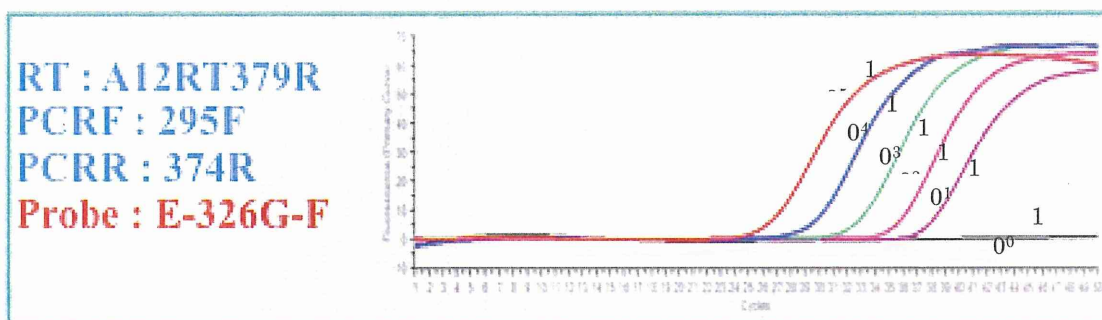


図 2-7 : Cycleave RT-ICAN 法の反応条件検討. 各 Tli RNaseH 濃度において, Cycleave RT-ICAN 反応を, リアルタイム蛍光検出法 (A, C, E, G, I) ならびにアガロースゲル電気泳動法 (B, D, F, H, J) による検出で確認した. (A, B) Tli RNaseH 濃度 7.5 ユニット, (C, D) Tli RNaseH 濃度 5 ユニット, (E, F) Tli RNaseH 濃度 2.5 ユニット, (G, H) Tli RNaseH 濃度 1 ユニット, (I, J) Tli RNaseH 濃度 0.5 ユニット使用での結果をそれぞれ示す.

A Primer, Probe set 1



B Primer, Probe set 2



C Primer, Probe set 3

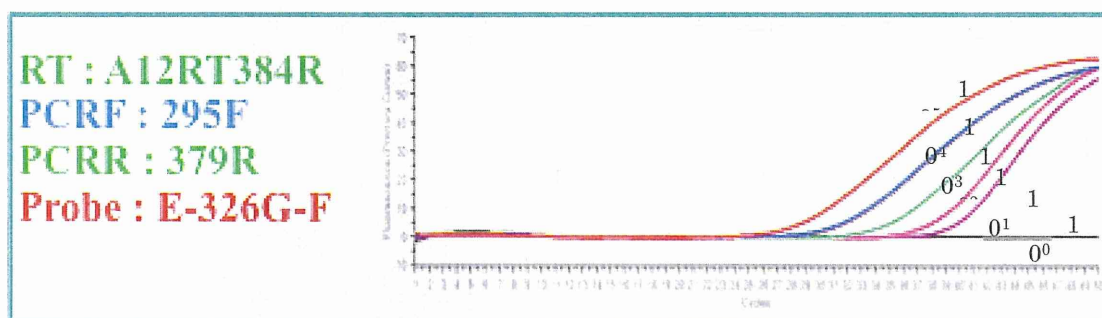


図 2-8 : Cycleave RT-PCR 法の検出感度. 各モデルレンチウイルス核酸コピー数において, Cycleave RT-PCR 反応を行った. (A)プライマー, プローブセット 1, (B)プライマー, プローブセット 2, (C)プライマー, プローブセット 3 を用いた結果をそれぞれ示す.



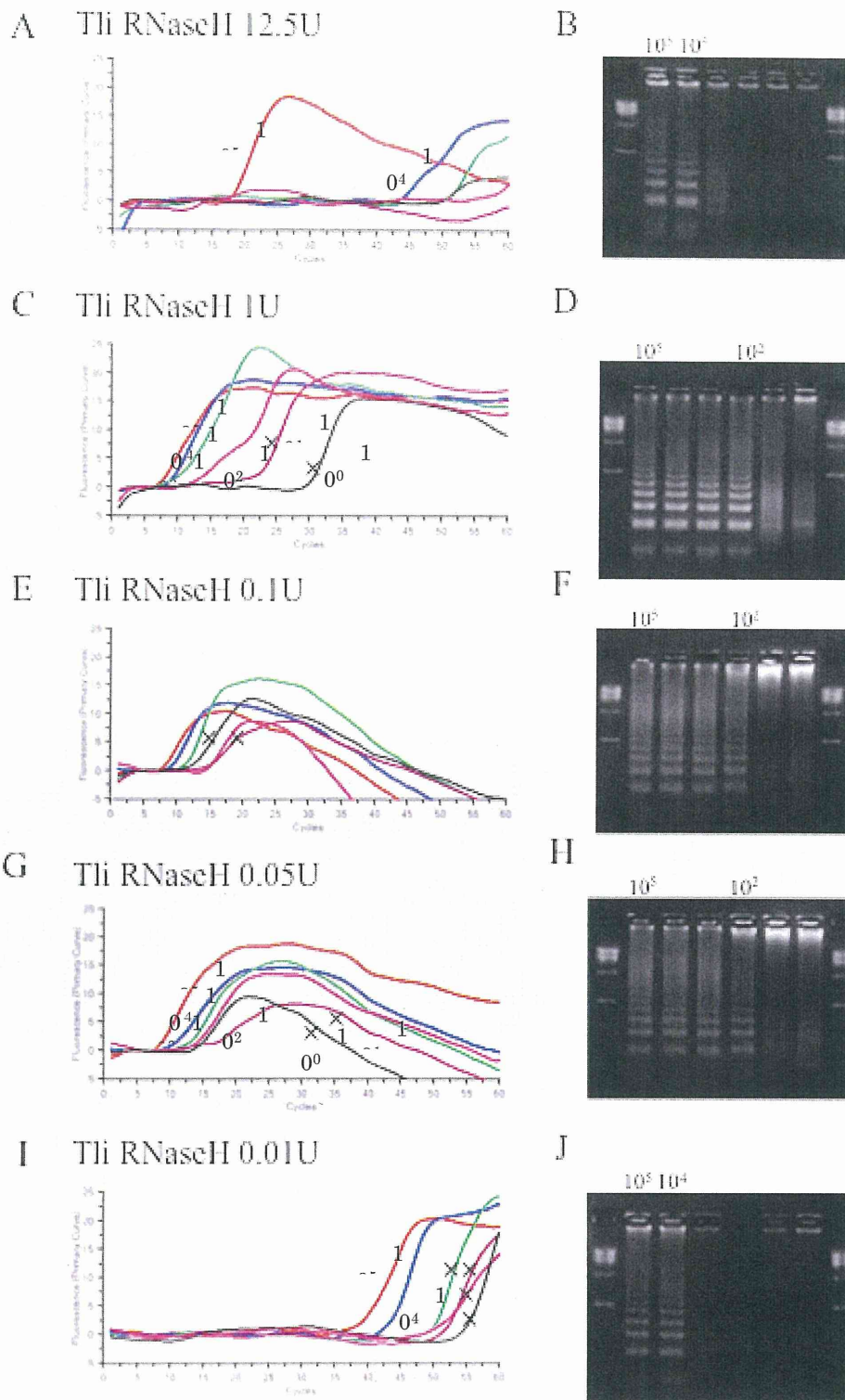


図 2-9 : SYBR Green 検出系を用いた RT-ICAN 法による検出感度. 各 Tli RNaseH 濃度において, SYBR RT-ICAN 反応を, リアルタイム蛍光検出法 (A, C, E, G, I) ならびにアガロースゲル電気泳動法 (B, D, F, H, J) による検出で確認した. (A, B) Tli RNaseH 濃度 12.5 ユニット, (C, D) Tli RNaseH 濃度 1 ユニット, (E, F) Tli RNaseH 濃度 0.1 ユニット, (G, H) Tli RNaseH 濃度 0.05 ユニット, (I, J) Tli RNaseH 濃度 0.01 ユニット使用での結果をそれぞれ示す.

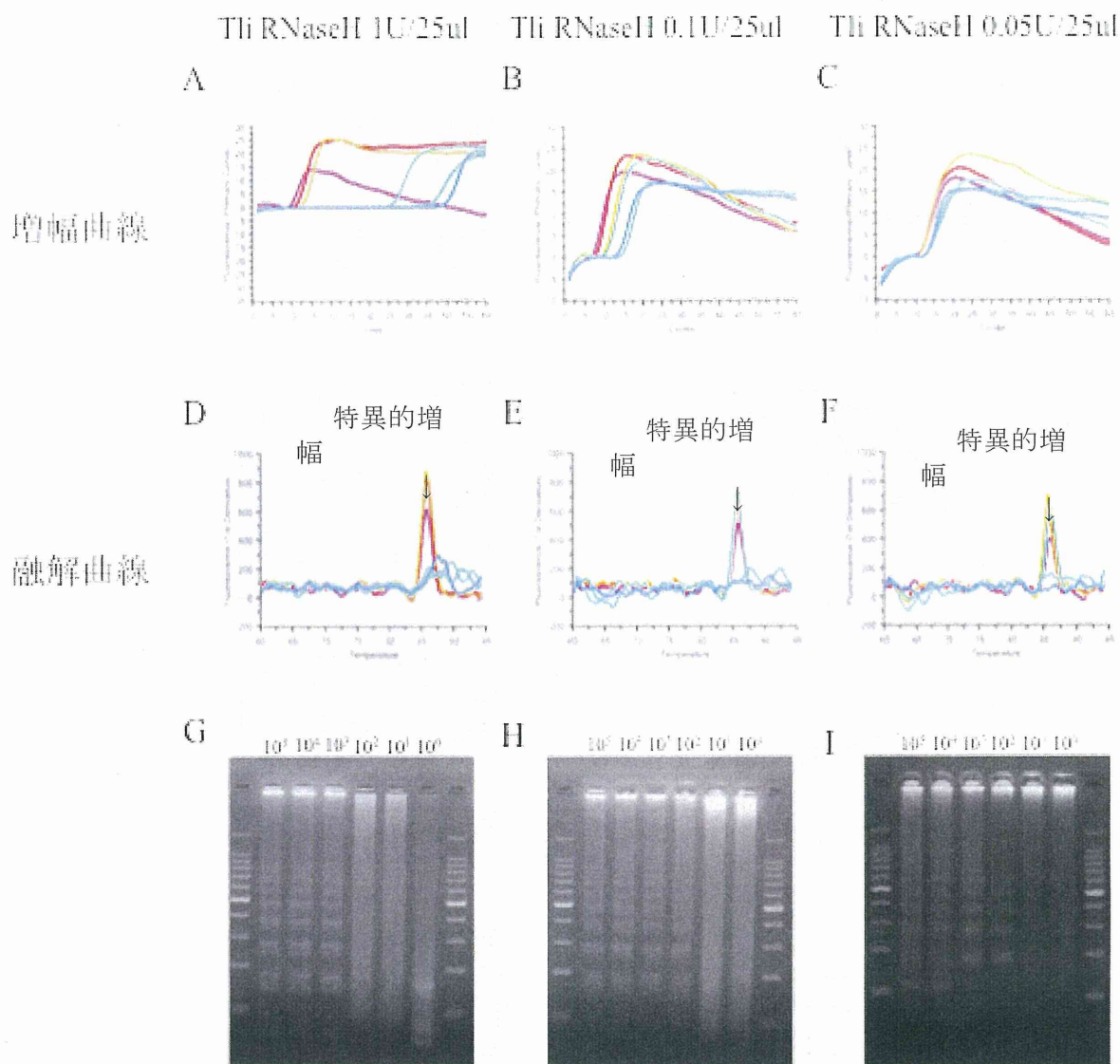
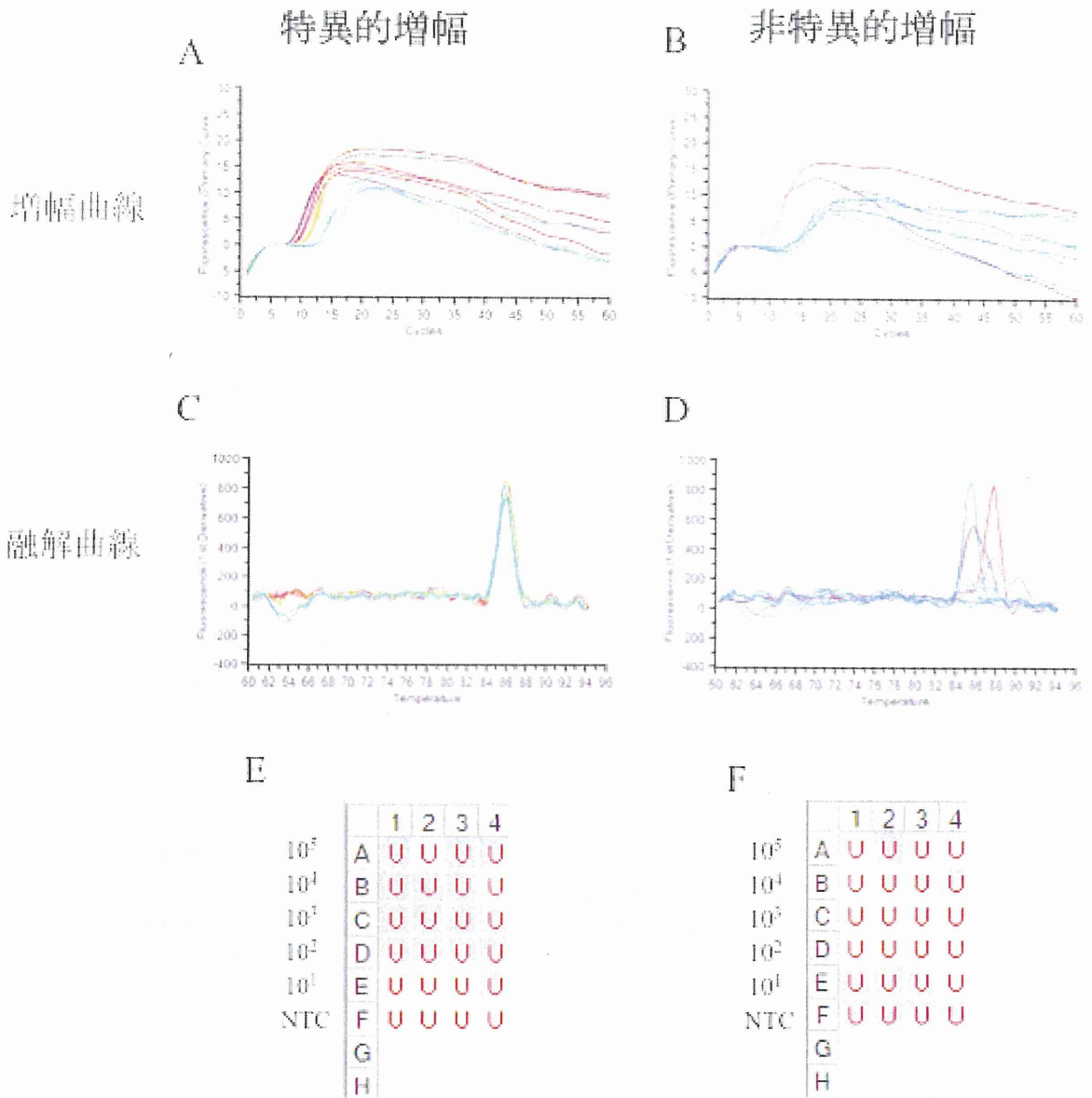


図 2-10 : SYBR Green 検出系における，融解曲線による特異的増幅と非特異的増幅の識別.  
 反応系あたり 1 ユニットの RNaseH (A, D, G), 0.1 ユニットの RNaseH (B, E, H), 0.05 ユニットの RNaseH (C, F, I) を使用して SYBR Green 法を用いた RT-ICAN 反応を行った. (A-C) 増殖曲線, (D-F) 融解曲線, (G-I) RT-ICAN 反応産物のアガロースゲル電気泳動結果を示す. (A-F) 図中の赤線は  $10^5$  コピーを, 橙線は  $10^4$  コピーを, 黄線は  $10^3$  コピーを, 紫線は  $10^2$  コピーを, 水色線は  $10^1$  コピーを, 青線は  $10^0$  コピーでの結果をそれぞれ示す.

反応液量25 $\mu$ lにおける感度

Tli RNaseH: 0.05U/25 $\mu$ l





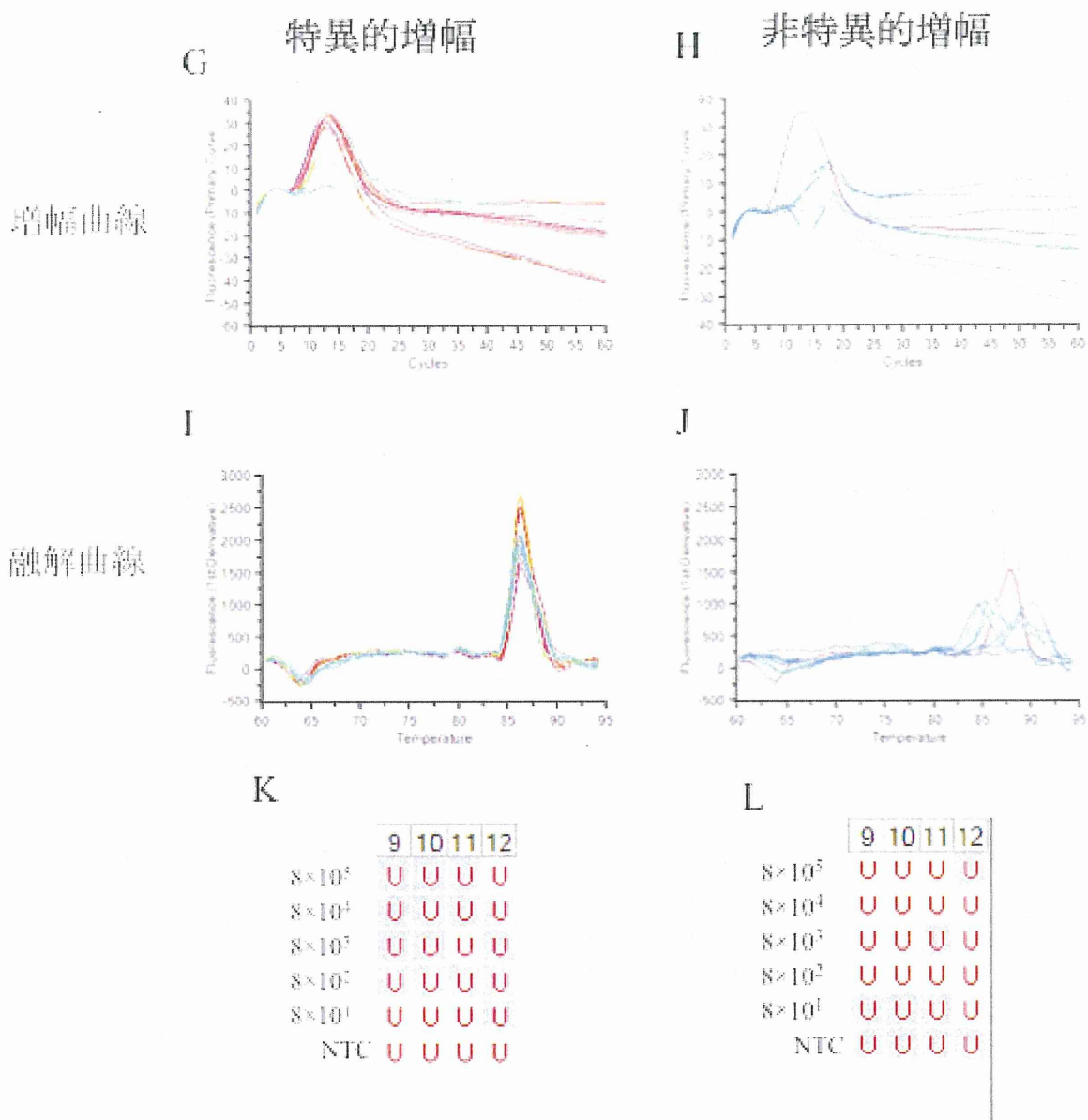


図 2-11 : SYBR Green 検出系を用いた RT-ICAN 法の反応液量における条件検討. (A-F) 反応液量 25  $\mu$ L における RT-ICAN 反応. (G-L) 反応液量 200  $\mu$ L における RT-ICAN 反応. (E, F, K, L) それぞれ, モデルレンチウイルス核酸の各希釈系列を鋳型に, 反応を quadruplicate (4 重) で行った. (A, B, G, H) 増殖曲線, (C, D, I, J) 融解曲線を示す. (A, C, G, I) は融解曲線から判断した特異的増幅を, (B, D, H, J) は融解曲線から判断した非特異的増幅を示す. (E, K) は特異的増幅を示したウェルを水色で示した. (F, L) は非特異的増幅を示したウェルを水色で示した.

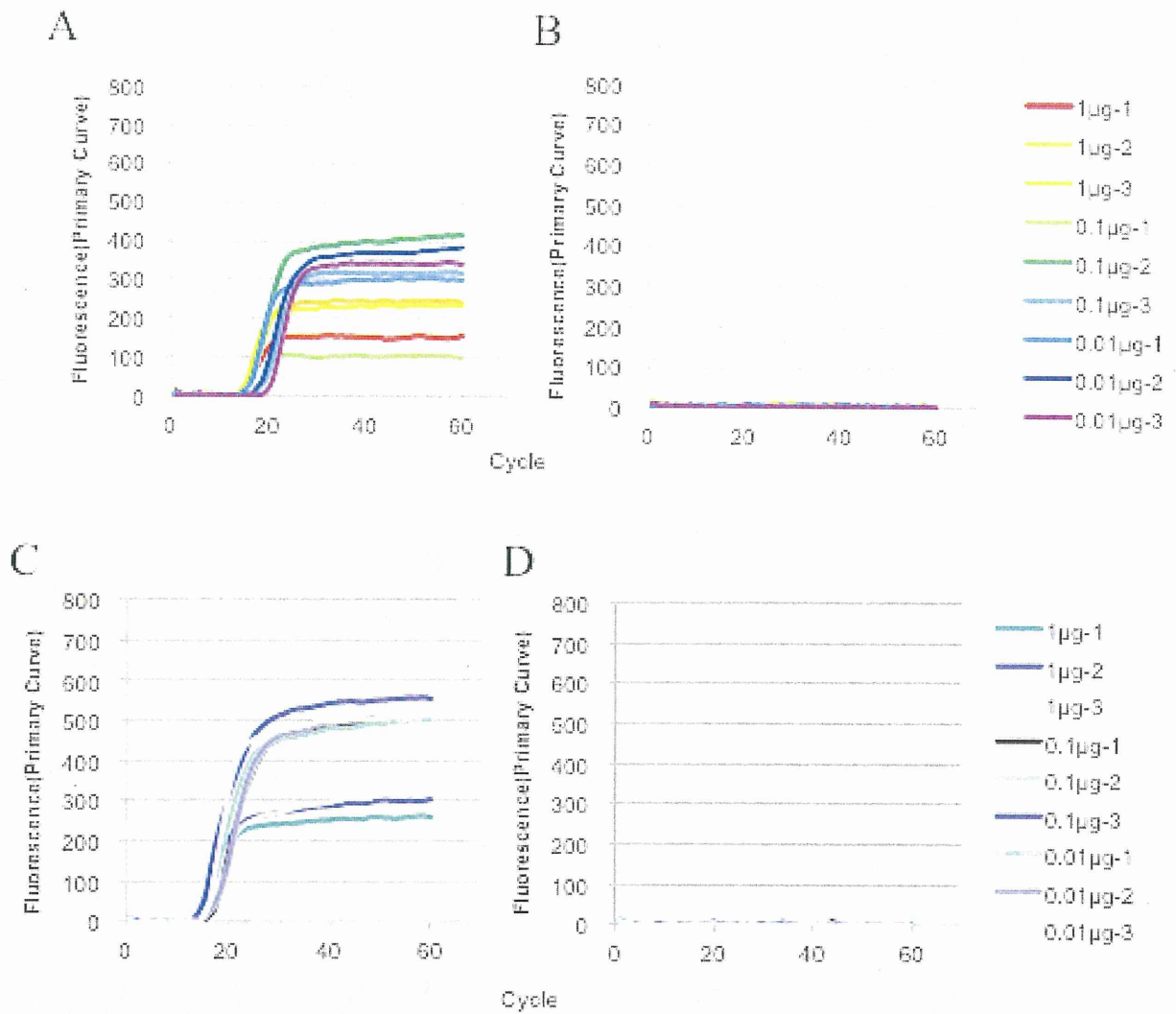


図 2-12 : 幹細胞を用いたウイルス否定試験の実施例. (A, B) hADMPC 細胞, (C, D) iPS 細胞 (Tic, 動物成分不含・フィーダーフリー培養) の結果を示す. (A, C) それぞれの細胞より採取した RNA 各重量に,  $10^4$  コピーのモデルウイルス核酸を混入させたもので Cycleave RT-ICAN を行った増殖曲線. (B, D) それぞれの細胞より採取した RNA より Cycleave RT-ICAN を行った増殖曲線.

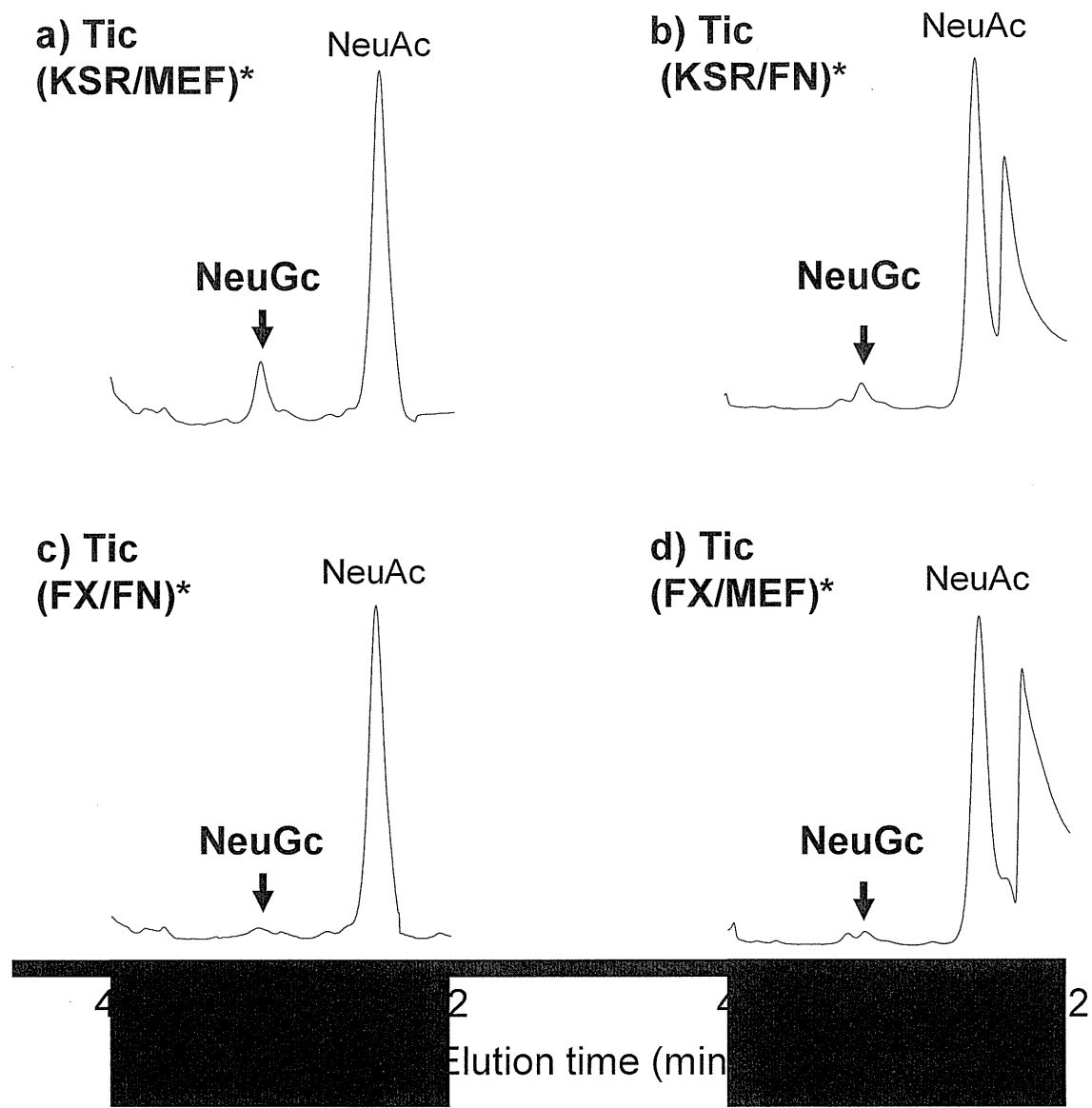


Fig.3-1 HPLC chromatogram of sialic acid analysis.  
 Analytical conditions: Column oven: 40 °C, Flow rate: 0.9 mL/min. Detection: Ex. 375 nm Em. 448 nm, Elution: Acetonitrile:Methanol:Water=2:14:84

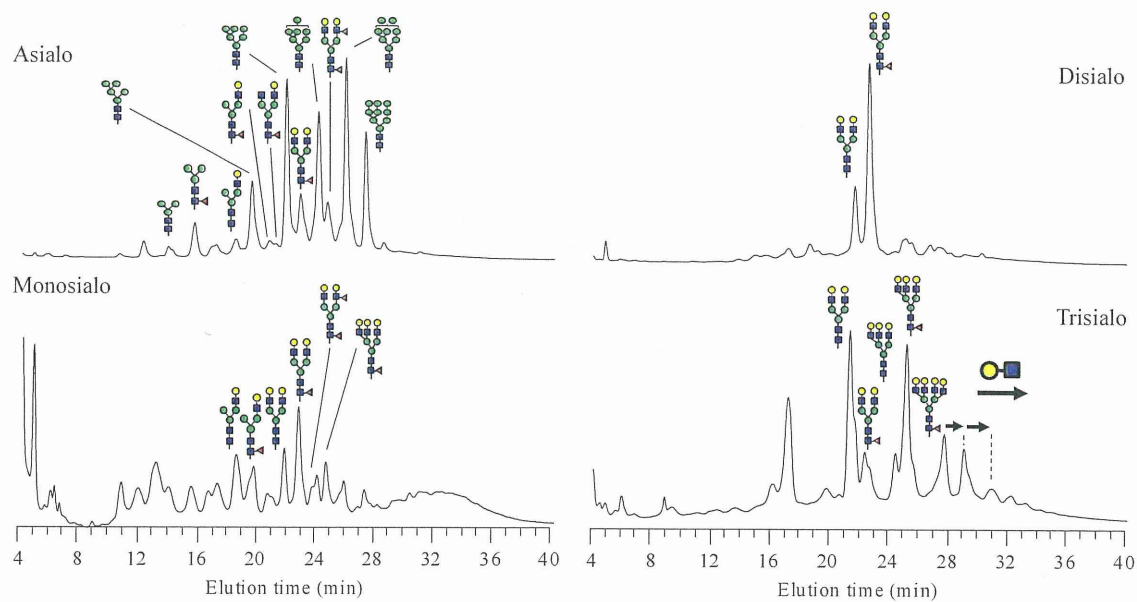


Fig.3-2 HPLC analysis of N-glycan cultured with KSR/MEF medium

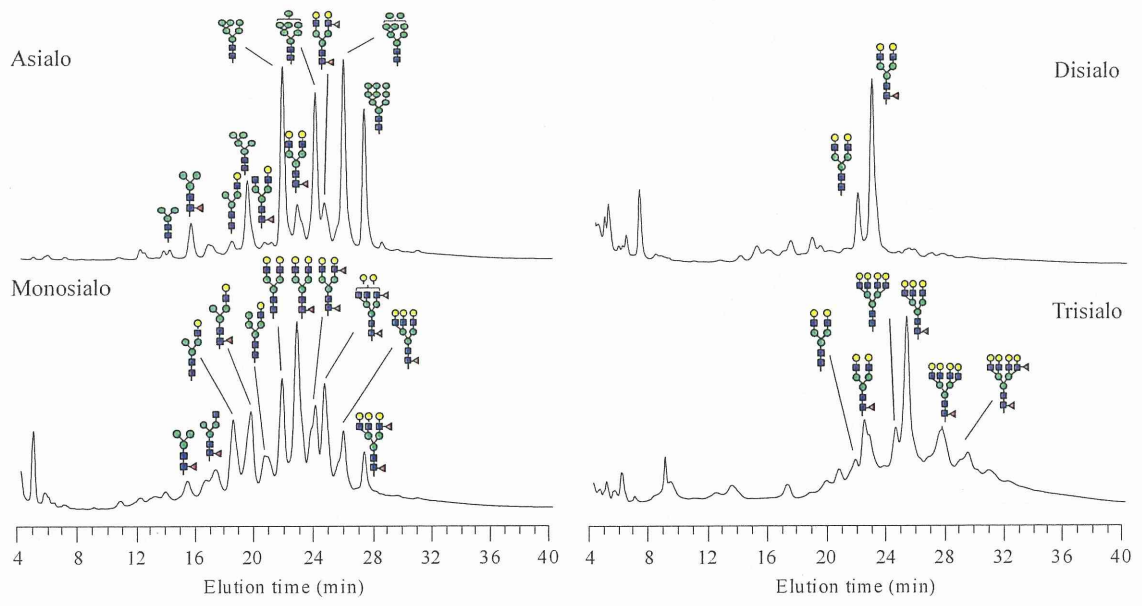


Fig.3-3 HPLC analysis of N-glycan cultured with FX/FN medium



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」  
分担研究報告書

細胞・組織加工製品中の造腫瘍性評価・制御法の開発

研究代表兼分担者：佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部・部長

**研究要旨** 【目的】細胞・組織加工製品において重要な品質管理上および安全性上の関心事である「造腫瘍性」に焦点を当て、製品中への造腫瘍性細胞の混入を *in vivo* で高感度に検出する試験系の評価を行った。【方法】細胞・組織加工製品の製造工程における造腫瘍性細胞の混入の検出を目的とした試験系として、国産の重度免疫不全マウスモデル（NOG マウス）への細胞移植試験の性能評価を実施した。細胞・組織加工製品のモデルケースとしてヒト骨髄間葉系幹細胞（hMSC）を用い、陽性対照として HeLa 細胞を一定量スパイクした hMSC を用いて、試験系の検出感度を評価した。【結果】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場合、TPD<sub>50</sub> 値は 5 千倍低かった。また、同試験系を用いることにより、10<sup>6</sup> 個の hMSC に混入する HeLa 細胞は、その下限として 10<sup>2</sup> 個までが検出可能であった。【結論】これらの結果より、NOG マウスに対しマトリゲルに懸濁した状態で HeLa 細胞を移植した場合、既存の国際ガイドライン（WHO TRS 878）で推奨されているヌードマウスの方法と比較して、およそ 5 千倍その検出感度が高いことが明らかとなった。また、培養ヒト骨髄由来間葉系幹細胞において、NOG マウスおよびマトリゲルを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験系を用いた試験が「陰性」であることの意味は、「造腫瘍性細胞の混入は、仮にその造腫瘍性が HeLa 細胞と同程度だとした場合、0.01%未満である」ということであることが明らかとなった。細胞・組織加工製品の造腫瘍性試験には 2 種類、すなわち原材料・製造工程の品質評価を目的としたもの、および最終製品の非臨床安全性評価を目的としたものが存在する。本研究で検討した試験系を、上の 2 種の目的のうちの前者、すなわち細胞・組織加工製品の品質評価・工程評価に適用することにより、細胞・組織加工製品ならば再生医療・細胞治療の実用化が促進されることが期待される。

**研究協力者（順不同）**

黒田 拓也 (公財)先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 研究員  
草川 森士 (公財)先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 研究員  
川真田 伸 (公財)先端医療振興財団 再生医療基盤研究グループ グループリーダー  
西川 伸一 (公財)先端医療振興財団 副理事長  
伊藤 守 (公財)実験動物中央研究所 実験動物研究部 部長  
町田 一彦 (公財)実験動物中央研究所 試験事業部  
堤 秀樹 (公財)実験動物中央研究所 試験事業部 部長  
澤田 留美 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第3室 室長  
安田 智 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

## 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・致死的ないし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。

本分担研究では、再生医療早期実現化を促進し、汎用性を向上させるための周辺基盤技術開発を最終目的し、基本的命題の一つである安全性・品質の確保を図るための、効果的・効率的・合理的な造腫瘍性の評価と抑制に関する汎用性の高い技術開発を目標とする。

細胞・組織加工製品の細胞ソースとしては、患者自身または他人由来の体細胞の他に、ヒトES細胞（胚性幹細胞）や最近開発されたヒトiPS細胞（人工多能性幹細胞）といった、いわゆる「多能性幹細胞」が近年特に有望視されている。その理由としては、①これら多能性幹細胞は、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ること、および、②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・組織加工製品の原材料として利用できる細胞を大量かつ安定的に供給することが可能となることが期待されることが挙げられる。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。

「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。

本研究では、ヒト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品質管理上および安全性上の関心事である造腫瘍性に焦点を当て、製品中への造腫瘍性細胞の混入を *in vitro* および *in vivo* で高感度に評価する方法の有用性に関する評価を行ってきた。平成 23 年度は具体的には、*in vitro* の試験系として軟寒天コロニー形成試験の性能とその限界の評価を実施し、*in vivo* の系に関しては重度免疫不全マウスモデル (NOG マウス) の造腫瘍性細胞検出系としての性能評価のための基礎的データを取得した。平成 24 年度は *in vivo* の系について、造腫瘍性細胞としての HeLa 細胞の生着性の検討を行ったとともに、細胞・組織加工製品のモデルケースとしてヒト骨髄間葉系幹細胞 (hMSC) を取り上げ、hMSC 中に HeLa 細胞が混入していることを想定し、本研究で開発した方法における造腫瘍性細胞 (HeLa 細胞) の検出感度と検討した。

## B. 研究方法

### B-1 使用動物

本実験に用いた SPF の NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic (NOG マウス) および BALB/cAJcl-nu/nu (ヌードマウス) は日本クレアから入手し、公益財団法人 実験動物中央研究所のバリア区域内の専用飼育室内で飼育した。2 系統ともに 6~8 週齢の雄を搬入し 1 週間の馴化期間の後に細胞の投与を行った。ケージはマウス Hi-TPX ケージ (日本クレア, 155 × 245 × 148mm) を使用し、ケージ内動物数は最高 3 匹、ケージ交換回数は週 1 回、給餌方法は自由摂取とした。

### B-2 HeLa 細胞単回投与造腫瘍性試験

マウスに接種した HeLa 細胞 (JCRB9004, Lot:24222006, 継代数: 114) は (財) ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクから入手し、研究資源バンク推奨のプロトコールに従って、培地 10%FBS およびペニシリン/ストレプトマイシンを添加した MEM 中にて培養・継代した。細胞は培地 (MEM+10%ウシ胎児血清+ペニシリン/ストレプトマイシン) またはマトリゲルに懸濁し、その 100 $\mu$ L を無麻酔で保定した状態のマウスの後背部皮下に、25G の注射針を付けたシリンジで投与した。以下の 14 群について投与後の結節形成を 16 週間観察した：

①NOG (細胞懸濁培地投与) : 細胞用量 5 点 (0, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>; 各 10 例), ②NOG (細胞懸濁マトリゲル投与) : 細胞用量 5 点 (0, 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>; 各 10 例), ③ヌードマウス (細胞懸濁培地投与) : 細胞用量 4 点 (0, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>; 各 10 例)。

### B-2 hMSC 中に混入する HeLa 細胞の検出能力の検討

マウスに接種した HeLa 細胞 (JCRB9004, Lot:24222006, 継代数: 114) は (財) ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクから入手し、研究資源バンク推奨のプロトコールに従って、培地 10%FBS およびペニシリン/ストレプトマイシンを添加した MEM 中に手培養・継代した。hMSC は LONZA 社より入手し、同社推奨のプロトコールに従って、同社の間葉系幹細胞専用増殖培地を用い、培養・継代した。hMSC 10<sup>6</sup> 個に対し、HeLa を 0%, 0.001%, 0.01%, 0.1%, 1% (0, 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> cell) の割合でスパイクし、HeLa 細胞用培地 (MEM+10%ウシ胎児血清+ペニシリン/ストレプトマイシン) に懸濁した状態でマトリゲルと混合し、その 100 $\mu$ L (細胞総数 10<sup>6</sup> 個/100 $\mu$ L) を無麻酔で保定した状態のマウスの後背部皮下に、25G の注射針を

付けたシリンジで投与した (HeLa 細胞の各用量あたり 6 例ずつ). 投与後の結節形成は 16 週間観察した.

### B-3 統計処理

TPD<sub>50</sub> 値 (50%の動物において腫瘍形成が認められる細胞の用量) は, 投与細胞数と腫瘍形成確率との間の用量作用曲線を, 統計計算ソフトウェア ORIGIN 8.6 (OriginLab Corporation) または GraphPad Prism (GraphPad Software を用いてロジスティック曲線に当てはめることにより算出した.

#### (倫理面への配慮)

動物実験を行う際には国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」に基づき, 実験内容の審査と承認をうけた上で実施した. 指針を遵守し, 動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施した. また, ヒト由来の生体試料を用いる場合は, 国立医薬品食品衛生研究所「研究倫理審査委員会規程」を遵守した上で研究を実施した.

## C. 研究結果

### C-1 HeLa 細胞単回投与造腫瘍性試験

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<sup>6</sup> 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<sup>5</sup> 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<sup>4</sup> 個移植群の 2 匹および 10<sup>3</sup> 個移植群の 1 匹に結節が観察された. 5 週間後においては, ヌードマウス群では 10<sup>6</sup> 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<sup>5</sup> 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<sup>4</sup> 個移植群の 5 匹および 10<sup>3</sup> 個移植群の 2 匹に結節が観察された. それ以降 16 週目までの結果を含め, Figure 1A に示した. 腫瘍部位のヘマトキシリン/エオジン染色および抗ヒト HLA 抗体による染色により, 形成された腫瘍がヒト細胞由来であることが確認された (Figure 1B).

各週における投与細胞数と腫瘍形成確率との間の用量作用曲線は Figure 1C の通り. TPD<sub>50</sub> 値の変化をみると, ヌードマウス群 (HeLa in Nude) および NOG マウス群 (HeLa in NOG) では約 12 週目の時点以降でほぼ安定すること, マトリゲルに懸濁した細胞を NOG マウスに投与した群 (HeLa w/ MG in NOG 群) ではこれら 2 群よりも若干遅く, 13-16 週目の時点でほぼ安定することが明らかとなった (Figure 1D). ロジスティック曲線へのフィッティングにより計算された TPD<sub>50</sub> 値は 16 週目にはヌードマウス群, NOG マウス群, NOG+マトリゲル群でそれぞれ  $4.2 \times 10^5$ ,  $1.3 \times 10^4$ ,  $7.8 \times 10^1$  であった.

### C-2 hMSC 中に混入する HeLa 細胞の検出能力の検討

HeLa 細胞をマトリゲルに封入した状態で

NOG マウスに移植した場合 (NOG+マトリゲル群) の HeLa 細胞の生着性は, 前項で示した通り, 培地に懸濁した場合に比べて非常に高かった. そこで, この方法を利用して, hMSC 中に混入する HeLa 細胞の検出を試みた.  $10^6$  個の hMSC に一定量の HeLa 細胞をスパイクし, マトリゲルに懸濁した状態で NOG マウスの背部皮下に移植した後, 腫瘍形成を観察した結果, 細胞移植後 3 週間後までは HeLa 細胞  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  個混入の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, 5 週間後において,  $10^3$  および  $10^4$  個混入群では結節の形成が認められ,  $10^2$  群でも 9 週目において結節の形成が認められた. それ以降 16 週目までの結果を含め, Figure 2A に示した. 各週における投与細胞数と腫瘍形成確率との間の用量作用曲線は Figure 2B の通り.  $TPD_{50}$  値の変化をみると, 前項でのマトリゲルに懸濁した細胞を NOG マウスに投与した群 (HeLa w/ MG in NOG 群) と同様に, 16 週目の時点ではほぼ安定することが明らかとなった (Figure 2C). ロジスティック曲線へのフィッティングにより計算された  $TPD_{50}$  値は 16 週目において  $1.0 \times 10^2$  で, HeLa 細胞単独投与の場合と同等であった.

## D. 考察

### D-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。

#### D-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 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。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 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 ([http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/slides/5-4188S1\\_2\\_files/frame.htm](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 (=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<sup>7</sup>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-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/ $\gamma$ 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言われている。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 $\gamma$ 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)。

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5,000倍高い感度を実現することができることが明らかとなった。

### D-4 「NOG+マトリゲル」の試験の体細胞・体性幹細胞製造における品質試験としての性能評価

一般に、ヒト体細胞・体性幹細胞には造腫瘍性はないと考えられている。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はほとんど存在せず、これまでに科学論文として報告されたものは、ヒト胎児由来神経幹細胞を用いた移植治療により脳腫瘍が形成されたとするもの1件しかない(Amariglio N *et al.*,