

Fig.3-1. HPLC chromatogram of sialic acid analysis.

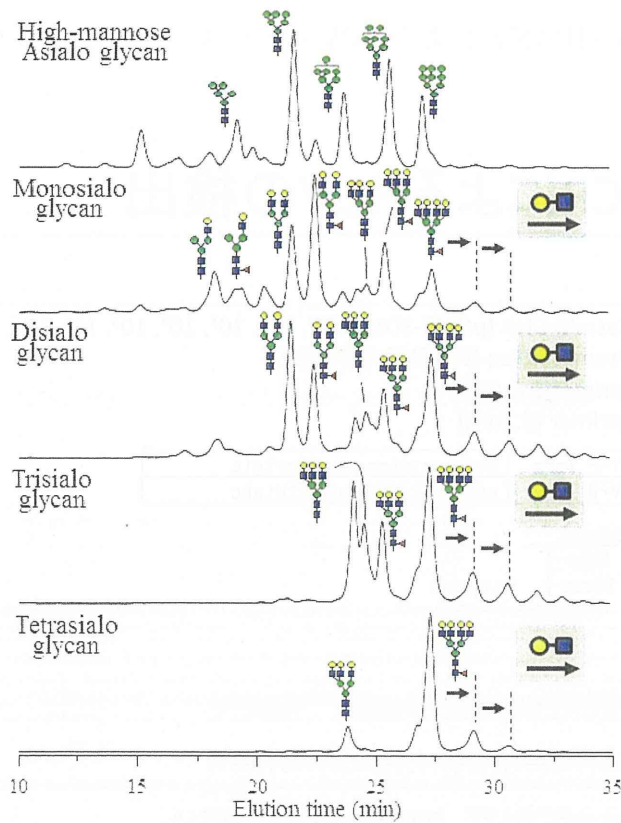
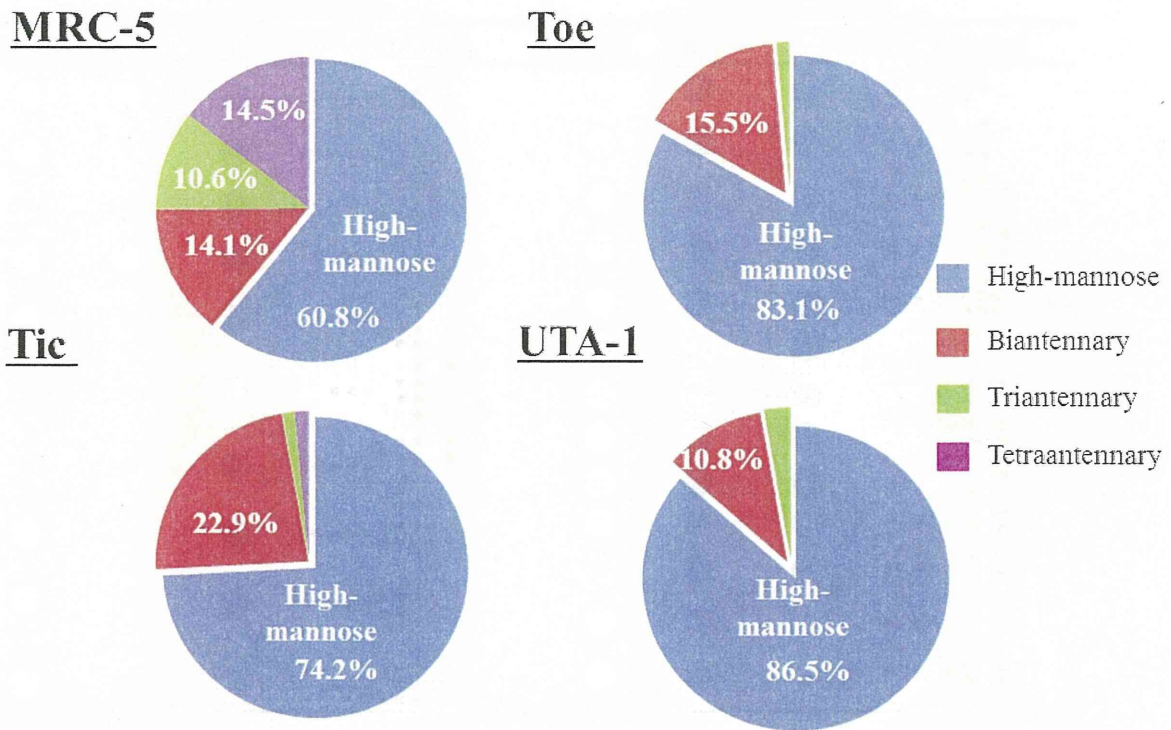


Fig.3-2. NP-HPLC analysis N-glycans expressed in MRC-5 cells

a) Relative abundances of high-mannose-type and complex-type N-glycans



b) Relative abundances of fucosylated and nonfucosylated glycans in complex-type N-glycans

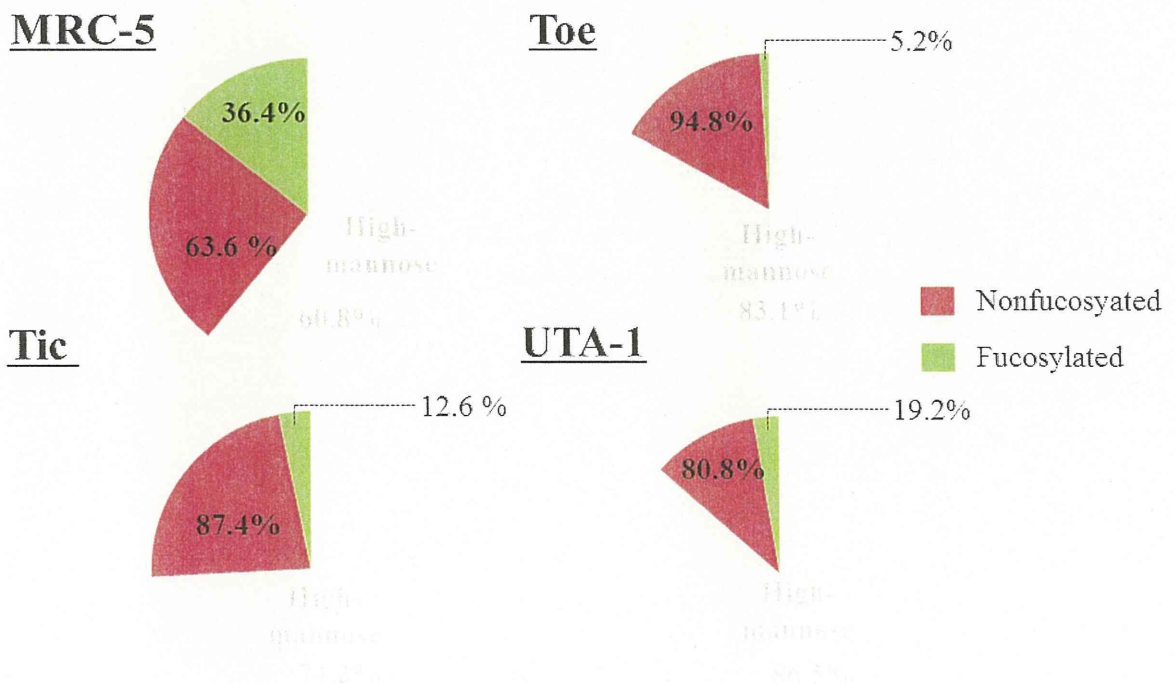


Fig.3-3. Characteristics of N-glycans expressed in three iPS and MRC-5 cells

Table 3-1. Expression of N-glycans in three iPS cells cultured with nonhumanized conditions

Structure	Tic	Toe	UTA-1	Structure	Tic	Toe	UTA-1
	●	●	●		●	●	●
	●	●	●		●	-	●
	●	●	●		●	-	-
	●	●	●		●	●	●
	●	●	●		●	-	●
	●	●	●		●	-	-
	●	●	●		●	-	-
	●	●	●		●	-	●
	●	●	-		●	-	●
	-	●	●		●	-	●
	-	●	●		-	-	●

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（再生・細胞医療製品）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* および *in vitro* 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、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を軟寒天コロニー形成試験と比較した。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、hMSC 中に混入した HeLa 細胞の検出能力を検討したところ、 $10^7$  個の hMSC に混入する HeLa 細胞は、下限として 10 個（混入率 0.0001%）が、17% の確率で検出された。この時の、TPD<sub>50</sub> 値（50%の確率で腫瘍形成が認められる細胞数）は、添加 HeLa 細胞の数にして、180 個（混入率 0.002%）であった。一方、軟寒天コロニー形成試験の検出の下限は、 $10^4$  個の hMSC に混入する HeLa 細胞として 10 個（混入率 0.1%）であった。【結論】これらの結果より、 $10^7$  個の培養ヒト骨髄由来間葉系幹細胞をマトリゲルに懸濁して NOG マウスに移植する試験において、例えば 10 匹の試験がすべて「陰性」である場合、「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、0.0001%（100 万個に 1 個）未満である」ということを示唆するもの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）**

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  
黒田 拓也 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 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  
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4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とし、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。

「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。本分担研究では、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。具体的には、平成 23 年度は *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、ヒト iPS 細胞由来の網膜色素上皮細胞をモデルとして実施した。また、*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

年度および 25 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。また、NOG マウスの造腫瘍性細胞検出系と比較する目的で、hMSC 中に HeLa 細胞を微量に混入させた試料を用い、軟寒天コロニー形成試験における造腫瘍性細胞の検出性能を再評価した。

## 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) 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。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 *in vivo* 造腫瘍性試験における 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  $10^7$  個に対し、HeLa 細胞を 0%, 0.0001%, 0.001% ( $0, 10^1, 10^2$  cells) 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>7</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 軟寒天コロニー形成試験

軟寒天コロニー形成試験は CytoSelect 96-well Cell Transformation Assay Kit (Cell Biolab 社)を用い、メーカーのプロトコールに若干の改変を加えた上で実施した。20%FBS を含む 25 $\mu$ l の 2x DMEM を予め加温し、1.2%寒天水溶液 25 $\mu$ l と混合した後、これを 96 穴プレートに分注し、底部の寒天を固化させるためにプレートを 4 $^{\circ}$ C で 30.分間加冷した。DMEM で懸濁した hMSC に DMEM で懸濁した HeLa 細胞を一定量添加することにより調製された細胞懸濁液 25 $\mu$ l と、20%FBS を含む 25 $\mu$ l の 2x DMEM および 25 $\mu$ l の 1.2%寒天水溶液を混合し、これを上で作成したプレート底部寒天層上に添加した。重力による底部寒天層上への細胞の堆積とそれによる擬陽性の発生を防ぐ目的で、4 $^{\circ}$ C で 10 分間放置し、上部寒天層を急速に固化させた。100 $\mu$ l の 10% FBS 含有 DMEM を各ウェルに添加し、プレートを 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> の条件下、20 日間インキュベートした。培地は 2-3 日ごとに交換した。形成された細胞コロニーを溶解し、CyQuant GR 色素を用いて細胞数を定量した。CyQuant GR の蛍光は 485/520nm のフィルターを用い、Wallac 1420 ARVosx multilabel counter (パーキンエルマー)を用いて測定した。

### B-4 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) 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 *in vivo* 造腫瘍性試験における hMSC 中に混入する HeLa 細胞の検出能力の検討

本研究では、重度免疫不全動物モデルである NOG マウス (T 細胞, B 細胞および NK 細胞欠損) にヒト由来細胞をマトリゲルに封入した状態で移植した群 (NOG+マトリゲル群) の不死化細胞の生着性を検討した。各群で雄性 6 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。

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、平成 24 年度報告書で示した通り、培地に懸濁した場合に比べて非常に高かった。平成 24 年度は 10<sup>6</sup> 個の hMSC 中に混入する HeLa 細胞の検出能力について検討を行ったが、本年度はさらに感度を上昇させた系を確立する目的で、10<sup>7</sup> 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。

その結果、細胞移植後 7 週間後までは HeLa 細胞  $10^1$ ,  $10^2$  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、8 週間後において、 $10^2$  個混入群では結節の形成が認められ、 $10^1$  群でも 10 週目において結節の形成が認められた (Figures 1 & 2)。TPD<sub>50</sub> 値は、16 週目までにほぼ安定した (Figure 3)。16 週目における TPD<sub>50</sub> を、 $10^4$  個 HeLa 細胞のスパイクで 100% というダミー変数を仮定して計算すると、その値は  $1.8 \times 10^2$  で、HeLa 細胞単独投与なし  $10^6$  個の hMSC と HeLa 細胞の同時投与の場合 (平成 25 年度報告書) とほぼ同等であった (Table 1)。

## C-2 軟寒天コロニー形成試験

軟寒天コロニー形成試験は、足場非依存性増殖能を示す悪性形質転換細胞の検出に適した試験として良く知られている。軟寒天中に封入された HeLa 細胞からはコロニー形成が認められるが、 $10^4$  個の hMSC を軟寒天中に封入しても、20 日間の観察期間中、コロニー形成は全く認められなかった (Figure 4)。次に、 $10^4$  個の hMSC に HeLa 細胞を一定量添加し、軟寒天中においてコロニーを形成するのに最低限必要な HeLa 細胞数を求めた。検出限界をブランクの平均値 +  $3.3x$  標準偏差として計算した。その結果、0.2% 以上の比率で混合した場合には 10 日以内でコロニーが有意に検出された。0.1% の比率で混合した場合においても 20 日までの間に有意なコロニーが検出された。

## 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言われている。従って本稿においては、上記最終案の内容を最新の WHO TRS 878 の内容として説明する。]

WHO TRS 878 にある造腫瘍性試験の内容は、極めて大雑把に言えば「ヌードマウス等の動物 10 匹に  $10^7$  個の細胞を投与して 16 週間観察する。陽性対照としては HeLa 細胞などを用いる。」というものであるが、注意しなければならないのはその適用対象と目的である。

WHO TRS 878 の造腫瘍性試験の適用対象は、あくまでワクチンやタンパク質製剤など、ヒトを対象に *in vivo* 又は *ex vivo* で投与される生物薬品を製造する際に *in vitro* 基材として用いられるヒト又は動物由来の細胞株である。細胞種別に見た場合には、対象となる細胞種としては①正常 2 倍体細胞株、②幹細胞株、③連続継代性細胞株が挙げられている。また、セル・バンク別に見た場合には、①製品製造終了時 (終了後) の細胞、②所定の継代数以上にわたって培養したマスター・セル・バンク、③最初に樹立したワーキング・セル・バンクが対

象とされている。注意すべきは、「患者に移植する細胞」および「治療を目的に患者に移植する細胞株の原料となる細胞」は WHO TRS 878 の対象外とされていることで、その特性解析においては規制当局等との議論が必要とされている。

WHO TRS 878 における造腫瘍性試験の目的は、生物薬品用細胞基材となるセル・バンクの造腫瘍性の程度又は有無を正確に把握することにある。造腫瘍性の程度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し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  $TPD_{50}$  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。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  $TPD_{50}$  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<sup>7</sup> 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<sup>7</sup> 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。

ヒト細胞・組織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)。

平成 24 年度、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にしている。

### 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.*, 2009). ヒト成人由来体細胞・体性幹細胞の投与による腫瘍形成の報告はされていない. 過去にヒト間葉系幹細胞の培養時の自発的な悪性形質転換が 4 件報告されているが, このうち 2 件 (Rubio D *et al.*, 2005; Røslund GV *et al.*, 2009) はがん細胞株のクロスコンタミネーションによるものであることが後に判明している. また, 残りの 2 件 (Wang Y *et al.*, 2005; Tang DQ *et al.*, 2012) では培養時に不死化した細胞が検出されている. これらのことは, 製品への悪性腫瘍細胞のクロスコンタミネーション防止および検出が重要であること, および細胞増殖特性の把握が重要であることを示している.

そこで, 本研究ではこれまでに, 細胞組織加工製品への悪性腫瘍細胞のクロスコンタミネーションの検出法としての, NOG マウスとマトリゲルを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験の性能を, hMSC への HeLa 細胞の混入をモデルにして検討してきた. hMSC を選択した理由は, すでに再生医療・細胞治療の原材料および最終製品として広く利用されているためである. また, スパイク用造腫瘍性細胞として HeLa 細胞を用いたのは, すでに本研究で単独投与による腫瘍形成を確認しているためだけでなく, 世界で汎用されている分, 各地の細胞保管施設においてクロスコンタミネーションが多いとされる細胞株だからである.

平成 24 年度に本研究で検討した結果, NOG マウスとマトリゲルを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験系において, hMSC に混入した HeLa 細胞の TPD<sub>50</sub> 値は HeLa 細胞単独投与

時とほぼ同じであり, 1 万個の hMSC 中に混入した 1 個 (0.01%) の割合で混入した HeLa 細胞を検出することが可能であることが明らかとなった.

平成 25 年度は, 「NOG マウス+マトリゲル」の手法をより高感度な方法とするための試験法の改良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を行った. その結果, 10<sup>7</sup> 個の hMSC に混入する HeLa 細胞は, 下限として 10 個 (混入率 0.0001%) が, 17% の確率で検出された. この時の, TPD<sub>50</sub> 値 (50% の確率で腫瘍形成が認められる細胞数) は, 添加 HeLa 細胞の数にして, 180 個 (混入率 0.002%) であった. これらの結果は, 10<sup>7</sup> 個の培養ヒト骨髄由来間葉系幹細胞をマトリゲルに懸濁して NOG マウスに移植する試験において, 例えば 10 匹の試験がすべて「陰性」である場合, 「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, 0.0001% (100 万個に 1 個) 未満である」ということを示唆するものである.

軟寒天コロニー形成試験は足場非依存的増殖性という悪性形質転換細胞の特徴を生かした試験系であり, 悪性形質転換細胞検出の特異性は非常に高い. 本研究において hMSC の品質管理という視点から, 国内外の試験研究機関で汎用される HeLa 細胞の混入を想定した場合の混入の検出感度を検討した結果, 軟寒天コロニー形成試験では少なくとも混入率 0.1% 以上であるならば 20 日間で検出することが可能であることが明らかとなった.

HeLa 細胞の混入量と生細胞の検出シグナルとの間の用量作用関係および検出シグナルのバックグラウンド値およびその標準偏差から算出される検出限界は, HeLa 細胞の混入量に換算して 0.02% であった. これは平成 23 年

度に PA-1 細胞及びヒト網膜色素上皮細胞を用いて検討した検出限界よりも約 50 倍低い。スパイクに用いた細胞種およびバックグラウンドとなる正常細胞の種類により、検出限界が大きく変わり得ること、および製品の品目ごとに、試験系の性能評価および適切なコントロール細胞の選定をすることが、評価品目の品質・安全性の議論をするうえで重要であると考えられる。

軟寒天コロニー形成試験は簡便で安価、かつ *in vivo* 造腫瘍性試験よりも短時間で結果が得られる点で有利である。しかし、NOG マウスとマトリゲルを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験よりも感度が低い(即ち検出限界が高い)ことと、悪性度の低い造腫瘍性細胞(足場非依存的増殖性を示さない、良性の造腫瘍性細胞)は検出されない可能性があることなど、その性能に限界もある。それぞれの造腫瘍性関連試験の性能と限界を理解した上で、対象となる製品の特性、態様および投与方法などを勘案し、適切な評価方法を選択することが重要であると考えられる。

## E. 結論

ヒト体細胞ないしヒト体性幹細胞に由来する細胞・組織加工製品は、ヒト多能性幹細胞加工製品に先行して国内外で開発されている。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・性能評価に関しては、これまでほとんど注意が払われておらず、既存の WHO の方法を無批判に転用するなど、科学的妥当性の低い方法がとられることがほとんどであった。本研究によって、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、著しく高く、細胞・

組織加工製品への造腫瘍性細胞の混入の検出を目的とした場合の有用性が、ヌードマウスよりも高いということが明らかとなった。また、細胞組織加工製品の製造工程評価(品質評価)への応用時を考えた場合、培養 hMSC において本試験を例えば 10 例実施しすべてが「陰性」であることの意味は「造腫瘍性細胞の混入は、仮にその造腫瘍性は HeLa 細胞と同程度だとした場合、0.0001%未満である」という具体的な解釈方法が明らかとなった。

軟寒天コロニー形成試験は、簡便、安価かつ短時間に悪性形質転換細胞を検出できる系であるが、感度の面で NOG マウスおよびマトリゲルを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験系よりも劣っていた。しかしながら、試験系の検出方法を現代の最新技術を駆使しながら改良することなどにより、軟寒天コロニー形成試験の感度の問題は改善されることが期待される。

本研究の結果をもとに、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. Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y. A novel *in vitro* method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One* (submitted)
2. Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Okura H, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Characterization of *in vivo* tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *PLoS One* (submitted)
3. 佐藤陽治 再生医療／細胞治療における細胞培養に関する規制 『再生医療の細胞培養技術開発と応用展開』株式会社シーエムシー出版 (印刷中)
4. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療製品の造腫瘍性評価 最新医学者 (印刷中)
5. 佐藤大作, 佐藤陽治 規制関連 『再生医療用語集』 (印刷中)
6. 村岡ひとみ, 佐藤陽治 再生医療・細胞治療の臨床研究から実用化までの道のり 老年医学 (印刷中)
7. 佐藤陽治 ヒト iPS 細胞由来移植細胞中に混入する造腫瘍性細胞／未分化細胞の *in vitro* 検出法 *Cytometry Research* (印刷中)
8. 安田智, 佐藤陽治 再生医療製品の品質関連規制と対応の留意点 『動物細胞の培養を成功させる条件設定集』技術情報協会 (印刷中)
9. 田埜慶子, 草川森士, 佐藤陽治 「細胞・組織加工製品の製造における造腫瘍性評価」技術情報協会 (印刷中)
10. 田埜慶子, 佐藤陽治 再生医療製品の素材としての多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) の品質 レギュラトリーサイエンス学会誌 2014;4:71-77.
11. 中島啓行, 安田智, 佐藤陽治 ヒト ES・iPS 細胞に由来する再生医療製品の造腫瘍性をどう見るか? 実験医学別冊 ES・iPS 細胞実験スタンダード 羊土社, 東京 (2014), pp. 61-69
12. 佐藤陽治 ヒト人工多能性幹細胞由来移植細胞の製造管理のための *in vitro* 造腫瘍性評価系の開発 薬学雑誌 2013;133:1381-8.
13. Kanemura H, Go MJ, Nishishita N, Sakai N, Kamao H, Sato Y, Takahashi M, Kawamata S. Pigment Epithelium-Derived Factor Secreted from Retinal Pigment Epithelium Facilitates Apoptotic Cell Death of iPSC. *Sci Rep*. 2013;3:2334.
14. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療・細胞治療のレギュレーション—日米欧三極の比較— 再生医療 2013;12(2):145-149.
15. Sato Y, Tsutsumi H, Sawada R, Suzuki T, Yasuda S. Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-processed products. *Bull Natl Inst Health Sci*. 2013;131:16-19.
16. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. *In vitro* detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Methods in Stem Cells and Tissue Repair*, in press.

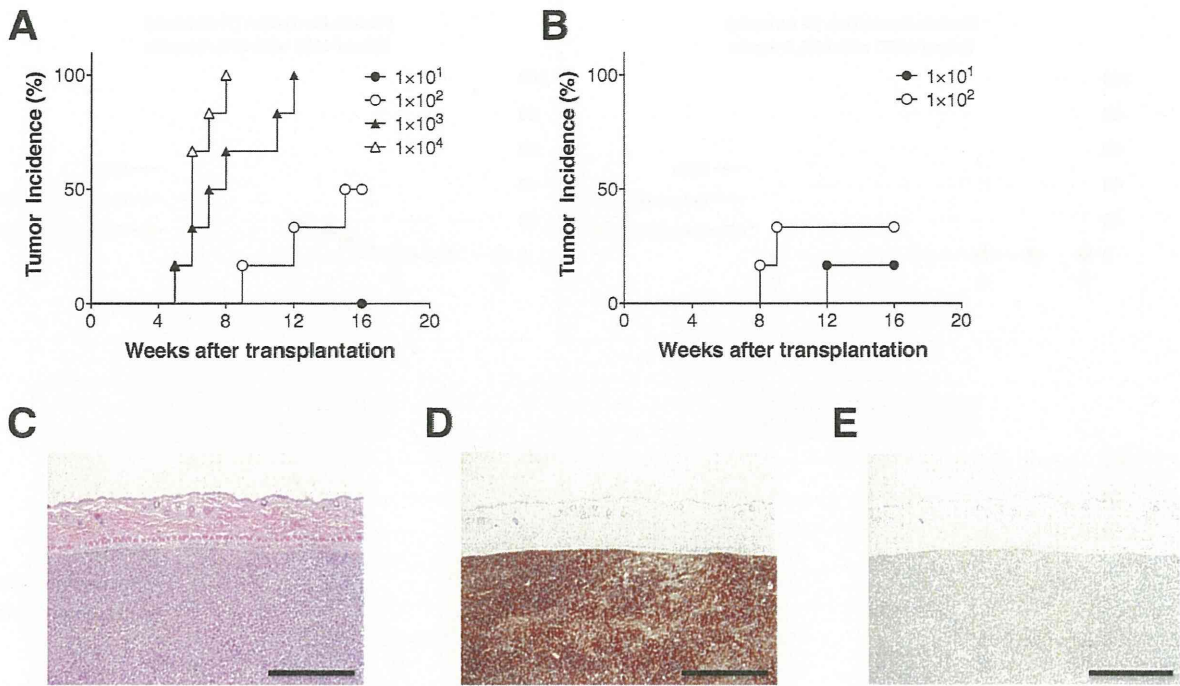
### G-2 学会発表

1. Satoh M, Ohki T, Kubo T, Sato Y, Muto S. Study of immunomodulatory effects in human mesenchymal stem cells. 第 87 回日本薬理学会年会 (2014 年 3 月 21 日, 仙台)
2. Sato Y. Tumorigenicity tests for human cell-processed therapeutic products. IABS-JST Joint Workshop “Challenges Toward Sound Scientific Regulation of Cell Therapy Products”, Kyoto, Japan (2014 年 3 月 7-8 日)
3. 佐藤陽治 再生医療等製品の品質・安全性確保のための技術的課題 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014 年 3 月 6 日, 京都)

4. 佐藤陽治 The Johnson & Johnson Innovation Award 受賞講演「ヒト多能性幹細胞加工製品に残存する未分化多能性幹細胞の高感度検出法の開発」 第13回日本再生医療学会総会 (2014年3月5日, 京都)
5. 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 松山さと子, 川真田伸, 澤芳樹, 佐藤陽治 デジタルPCRを用いたヒトiPS細胞由来分化細胞に残存する未分化iPS細胞の高感度検出法の開発 第13回日本再生医療学会総会 (2014年3月5日, 京都)
6. 城しおり, 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 佐藤陽治 ヒトiPS細胞の分化プロペンシティ予測のための細胞特性プロファイリング 第13回日本再生医療学会総会 (2014年3月4日, 京都)
7. 田埜慶子, 安田智, 梅澤明弘, 佐藤陽治 ヒト多能性幹細胞由来再生医療製品中に混入する未分化細胞の高効率培養法の開発 第13回日本再生医療学会総会 (2014年3月4日, 京都)
8. Suzuki T, Suresh T, Yamada M, Honma M, Suzuki K, Sato Y. Use of the Next Generation Sequencers for the Evaluation of Genomic Integrity of Cellular Therapy Products. The 11<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens, Foz Do Iguacu, Brazil (2013年11月3-8日)
9. Sato Y. Japanese Regulatory Principles for Ensuring Quality and Safety of Cell/Tissue-Processed Products. World Summit on Regenerative Medicine 2013 (by TERMIS-AP), Xi'an, China (2013年10月20-21日)
10. 佐藤陽治 再生医療製品の品質評価法開発—残存造腫瘍性細胞の定量— 第5回MCP策定会議/第5回再生医療薬事講習会 (2013年10月4日, 東京)
11. 佐藤陽治 レギュラトリーサイエンスからみた再生医療実現への課題 第8回レギュラトリーサイエンス学会シンポジウム ~再生医療の早期実現に向けて~ (2013年10月3日, 東京)
12. 佐藤陽治 ヒトiPS細胞由来移植細胞中に残存する未分化細胞の*in vitro*検出法の開発 第23回日本サイトメトリー学会学術集会 (2013年6月23日, 東京)
13. 佐藤陽治 iPS創薬の鍵を握る細胞の品質管理 バイオフィナンスギルド第11期第10回セミナー「iPS細胞創薬の急進展と落とし穴」 (2013年5月17日, 東京)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

<b>H-1 取得特許</b>	なし
<b>H-2 実用新案登録</b>	なし
<b>H-3 その他</b>	なし



**Figure 1 NOG マウスへの HeLa 細胞添加 hMSC の投与と結節形成**

一定量の HeLa 細胞と  $10^6$  個または  $10^7$  個の hMSC とをマトリゲル内で混合した標品を NOG マウスに皮下投与し 16 週間観察した.  $10^6$  個の hMSC に HeLa 細胞を添加した群 (A) と  $10^7$  個の hMSC に HeLa 細胞を添加した群における, 腫瘍発生の時間経過を示す (N=6).  $10^6$  個の hMSC に  $10^4$  個の HeLa 細胞を添加した標品を投与した際に形成された腫瘍の H&E 染色像 (C), HLA 抗体による染色像 (D) およびビメンチン (間葉系細胞のマーカー) に対する抗体による染色像 (E). スケールは  $500\mu\text{m}$

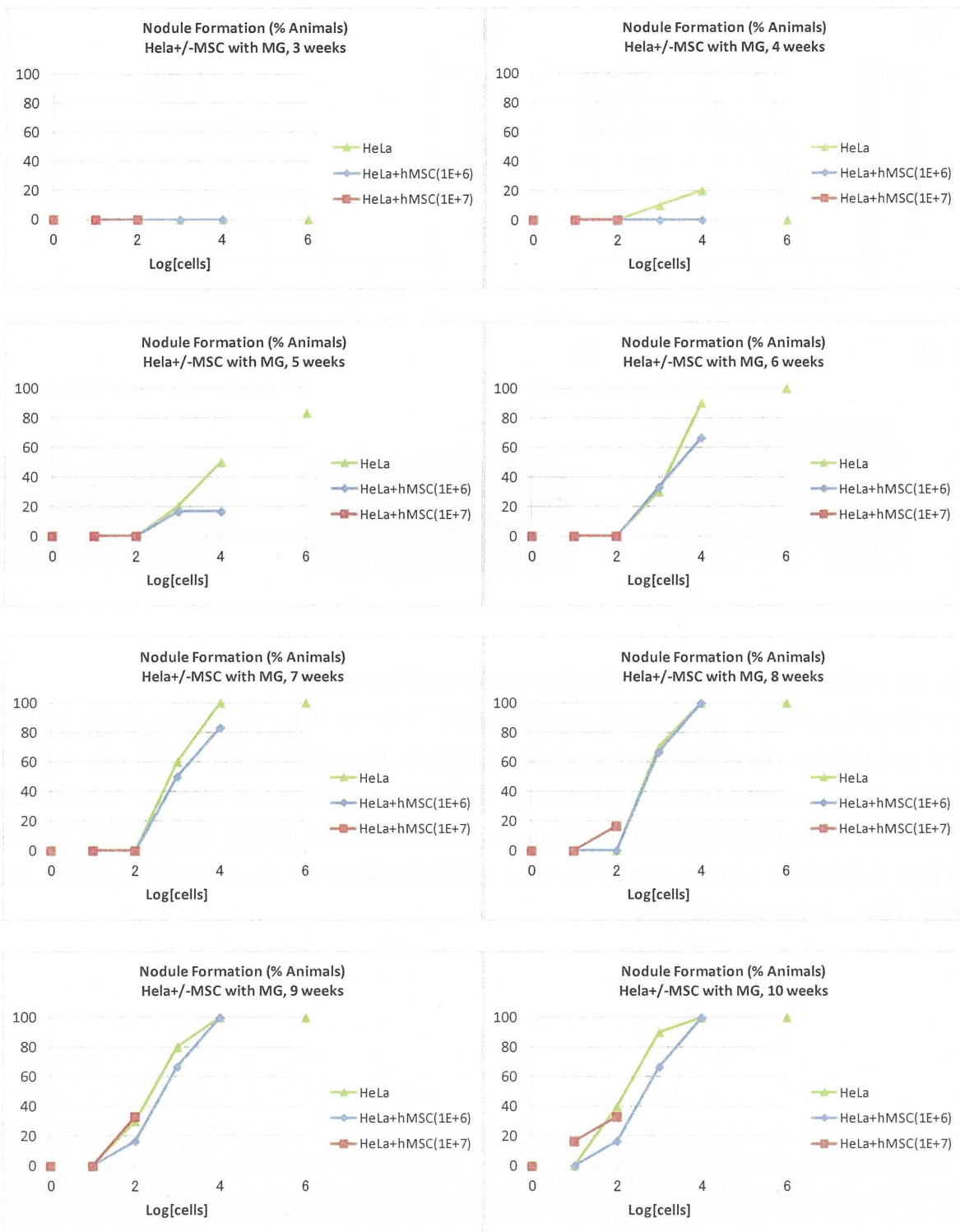
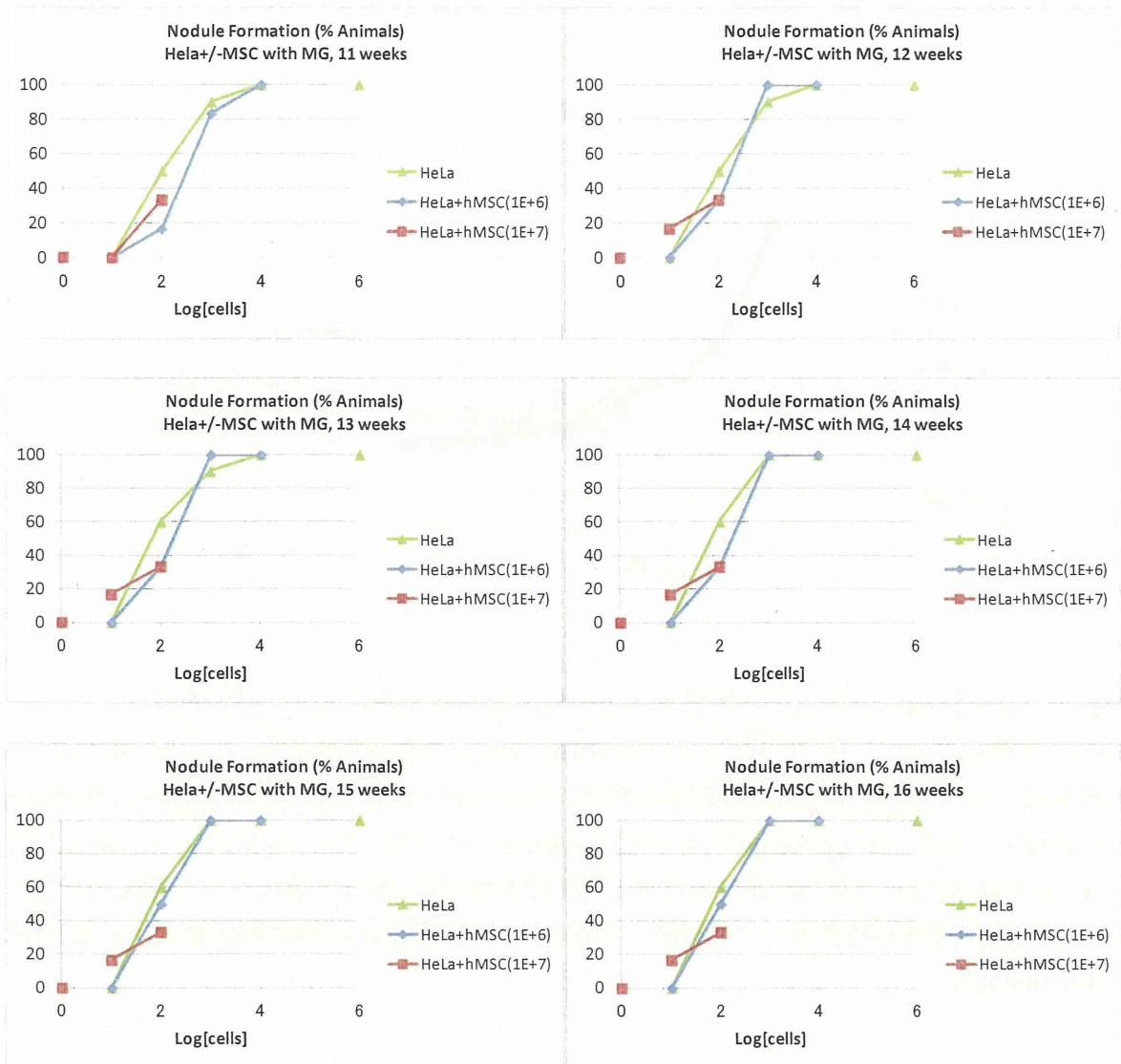


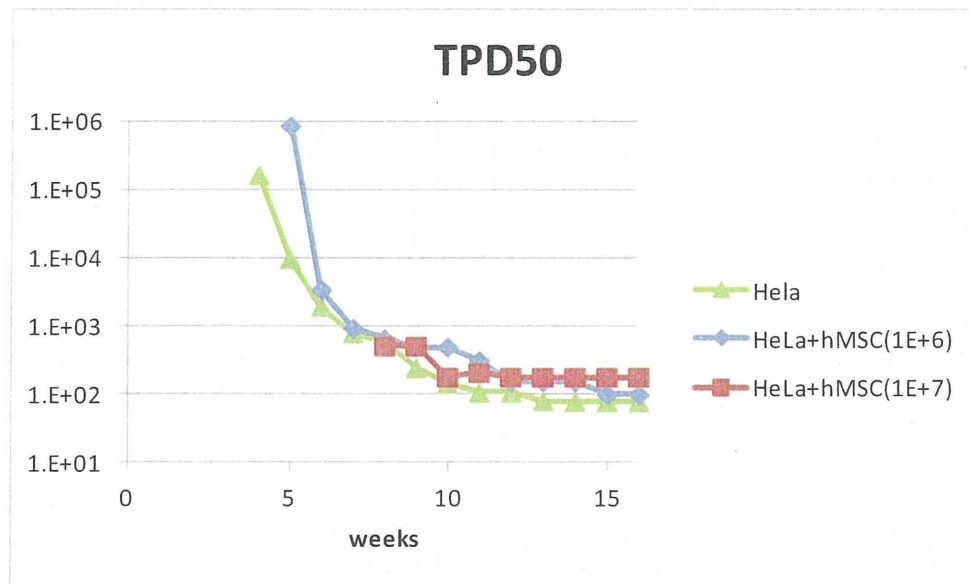
Figure 2 NOG マウスへの HeLa 細胞添加 hMSC の投与と結節形成確率の用量 - 作用関係



**Figure 2 NOG マウスへの HeLa 細胞添加 hMSC の投与と結節形成確率の用量 - 作用関係 (続)**

縦軸は腫瘍発生率，横軸は投与された HeLa 細胞の数。10<sup>7</sup> 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。その結果，細胞移植後 7 週間後までは HeLa 細胞 10, 10<sup>2</sup> 個/10<sup>7</sup> 個 hMSC 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，8 週間後において，10<sup>2</sup> 個混入群では結節の形成が認められ，10 個投与群でも 10 週目において結節の形成が認められた。図は平成 24 年度報告書にあるデータと統合したもの。N=10 (HeLa 単独投与群)または 6 (hMSC との同時投与群)





**Figure 3 NOG マウスへの HeLa 細胞添加 hMSC の投与における TPD<sub>50</sub> 値の推移**

縦軸は TPD<sub>50</sub> 値, 横軸は細胞移植後の経過時間. HeLa 細胞単独投与群, 10<sup>6</sup> 個の hMSC との同時投与群, 10<sup>7</sup> 個の hMSC との同時投与群のいずれにおいても約 16 週目の時点では TPD<sub>50</sub> 値はほぼ安定していた. 10<sup>7</sup> 個の hMSC との同時投与群については, ダミー変数として HeLa 細胞 10<sup>4</sup> 個を 10<sup>7</sup> 個の hMSC と同時に投与した場合の腫瘍形成率を 100%と仮定して TPD<sub>50</sub> を計算した. 図は平成 24 年度報告書にデータと統合したもの. N=10 (HeLa 単独投与群)または 6 (hMSC との同時投与群)

Table 1 HeLa 細胞単独投与後および hMSC との同時投与後 16 週目における TPD<sub>50</sub> 値

Strain	Group	Tumor incidence at indicated HeLa cell dose at 16w					TPD <sub>50</sub> at week 16
		0	1×10	1×10 <sup>2</sup>	1×10 <sup>3</sup>	1×10 <sup>4</sup>	
NOG	HeLa					6/6 <sup>a</sup>	ND (参考値 7.9×10: 平成 24 年度報告書)
NOG	HeLa/hMSC (1×10 <sup>6</sup> )	0/6	0/6	3/6	6/6	6/6	1.0×10 <sup>2</sup>
NOG	HeLa/hMSC (1×10 <sup>7</sup> )	0/6	1/6	2/6	-	(6/6) <sup>c</sup>	1.8×10 <sup>2</sup>

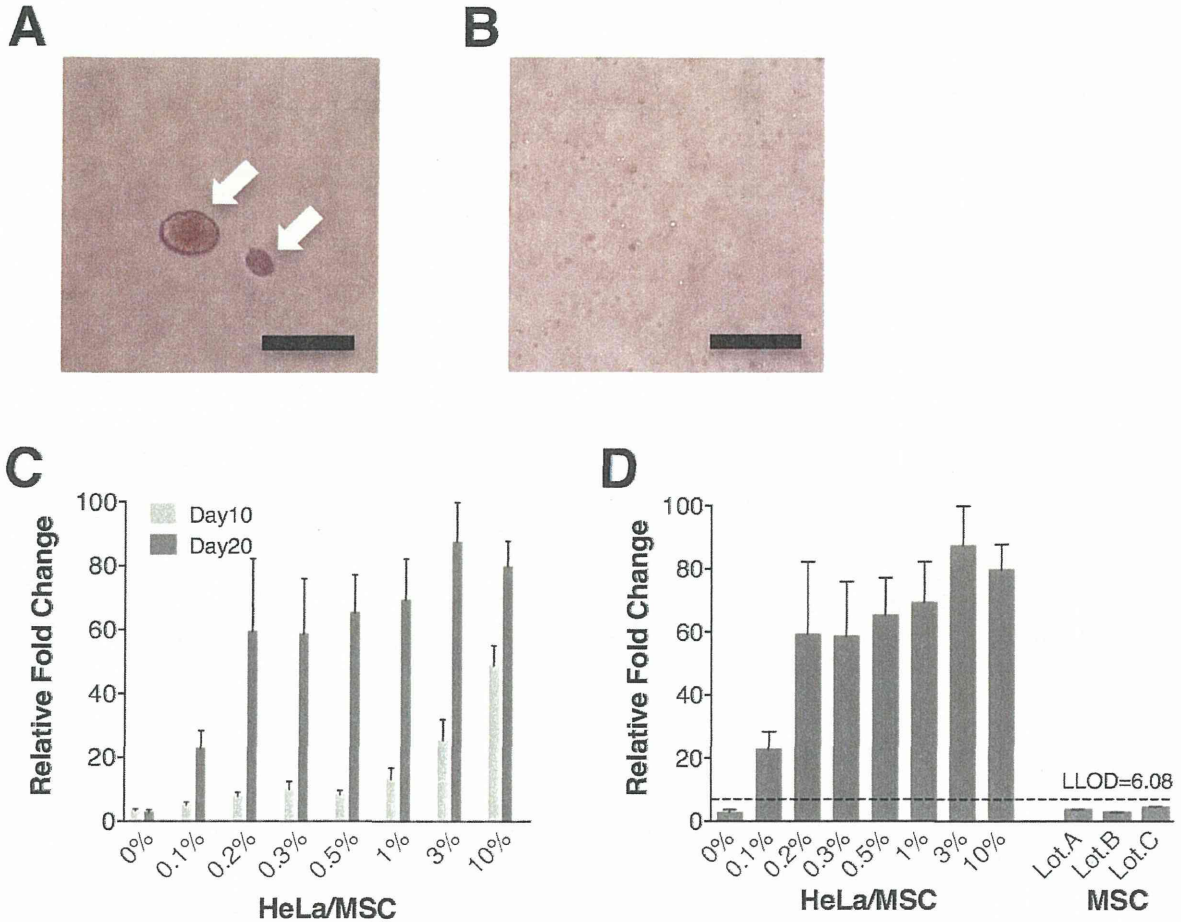
<sup>a</sup>: Positive control

<sup>b</sup>: No. of mice in which tumors formed/total no. of mice inoculated

<sup>c</sup>: Since not all animals inoculated with the highest dose (10<sup>2</sup>) have formed tumors, it was assumed that the tumor incidence of animals at an even higher dose step (a dummy set of data) would have been 100%.

-: Not tested.

ND: Not determined.



**Figure 4 HeLa 細胞を添加した hMSC での軟寒天コロニー形成試験**

軟寒天中では 20 日間の間に HeLa 細胞はコロニーを形成するが (A), hMSC ( $1.0 \times 10^4$  cells/well) は全くコロニーを形成しない (B). 矢印は HeLa 細胞由来のコロニーを指す. スケールは  $250\mu\text{m}$ .  $1.0 \times 10^4$  個の hMSC に一定の混入率で HeLa 細胞をスパイクした際のコロニー形成を, 10 日間ないし 20 日間観察した (C). HeLa 細胞をスパイクした hMSC および 3 ロットの hMSC (HeLa 細胞添加なし) を軟寒天中で 20 日間培養した際の生細胞シグナル (D). 生細胞数は, CytoSelect™ キットを用いて評価した. 下方検出限界は 3 ロットの hMSC の生細胞シグナルの平均値にその標準偏差の 3.3 倍を足した数値として算出した. 数値はブランク (細胞添加なしの軟寒天ウェル) の値でノーマライズし, 平均値 $\pm$ 標準偏差として表示した (N=3).

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・組織加工製品の感染制御法の開発  
（及び免疫原性制御法の開発／均質性・同等性確保の方策の検討）

研究分担者：早川 堯夫 近畿大学薬学総合研究所 所長・特任教授

### 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と適切なウイルス否定試験の実施である。本分担研究課題では、これまでに感染リスク排除対策として無血清・フィーダー細胞フリーで iPS 細胞株を樹立し、維持できることの汎用性を確認している。一方、汎用されている定量的 PCR 法ではウイルス由来核酸を含む細胞の一部しか検出できない問題が未解決であることから、その抜本的解決を目指し、感染検体に含有される全核酸を網羅的に解析でき、かつ高感度なウイルス由来核酸検査を可能とする等温遺伝子増幅法(ICAN 法)の改良を行った。その結果、ICAN 法を改良した HIV 遺伝子検出のための遺伝子特異的等温増幅法(Ladder forming RT-ICAN 法)の開発に成功した。この方法により、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞や無血清・フィーダー細胞フリーで樹立した iPS 細胞株における HIV ウイルス由来遺伝子残存否定試験を実施し、本検出系の有用性を実証した。今年度は測定対象とできるウイルス種の拡充を図るため、ヒト肝炎ウイルス(ヒト B 型肝炎ウイルス: HBV およびヒト C 型肝炎ウイルス:HCV) 由来遺伝子の検出を可能とする Ladder forming RT-ICAN 法の開発に着手した。その結果、HCV については、全ウイルスゲノム情報における Ladder forming RT-ICAN 法の特異的プライマー設定アルゴリズムの絞り込みに至った。一方、HBV については、Ladder forming RT-ICAN 法の開発に成功し、10 コピーの感度までの検出効率を達成するに至った。今年度の研究成果により、感染検体に含有される全核酸を対象とした、ヒト B 型肝炎ウイルスおよびヒト C 型肝炎ウイルスの網羅的ウイルスゲノム検出を可能とするウイルス特異的等温増幅法(Ladder forming RT-ICAN 法)の開発に成功した。

### 研究協力者（順不同）

森山 博由 近畿大学 薬学総合研究所 先端バイオ医薬研究室 准教授  
森山 麻里子 (公財)先端医療振興財団 再生医療開発研究部門 主任研究員  
上森 隆司 (株)タカラバイオ ドラゴンジェノミクスセンター 副センター長  
橋爪 克仁 (株)タカラバイオ 事業開発部部长