



TTAAATCTCACAGC-3', reverse primer, 5'-TGACATGTTGCCTATGGAAGAC-3'; for GAPDH, forward primer, 5'-CGATGCTGGCGCTGAGTAC-3', reverse primer, 5'-CCACCACTGACAGTTGGC3'. Respective gene expression levels were normalized to that of GAPDH.

**TUNEL staining and Immunohistochemistry.** Apoptotic cells were detected with the *In situ* Cell Death detection kit (fluorescein, Roche Diagnostics) in accordance with the manufacturer's instructions. The percentage of TUNEL-positive cells was calculated by scoring TUNEL-positive cells divided by total DAPI-positive cells in three non-overlapping areas (two mm<sup>2</sup> per well).

For immunohistochemical staining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde followed by staining with antibodies against Oct3/4 (POU5F1) (1:100 dilution; sc-5279; Santa Cruz), or ZO-1 (1:200 dilution; Invitrogen). Antibodies were visualized with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (1:1,000; Invitrogen) or Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:1,000; Invitrogen). Fluorescent microscopic images were captured with a fluorescent microscope (Olympus BX51, IX71; Tokyo, Japan).

**Western blotting.** Cell culture supernatants (conditioned media) or recombinant protein samples were loaded onto a 5–20% gradient SDS-polyacrylamide gel, subjected to electrophoresis under reducing conditions and blotted onto a PVDF membrane (BioRad). Blots were blocked with a solution of 3% nonfat dry milk/PBS/0.1% Tween-20 at room temperature, rinsed twice with PBS/0.1% Tween-20 and incubated with 1:200 diluted polyclonal anti-PEDF antibody (BioProducts MD), followed by 1:5000 diluted anti-rabbit IgG-HRP (Amersham). Detection of actin by anti-actin antibody (Santa Cruz I-19) was used as a loading control. Membranes were rinsed three times in PBS/0.1% Tween-20. Signals were detected with horseradish peroxidase using an ECL kit (Promega). Cell lysates were made from iPSCs that were serum-starved for six h (–) or five min or 15 min after addition of PEDF in the absence or presence of p38 MAPK inhibitor SB203580 (Cell Signaling). Lysates were blotted onto PVDF membranes, and anti-phospho-p38 antibody (Cell Signaling), anti-p38 antibody (Cell Signaling) or anti-caspase 3 antibody (Cell Signaling) was used to detect the respective molecules.

- Lu, B. *et al.* Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cell*. **27**, 2126–2135 (2009).
- Schwartz, S. D. *et al.* Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*. **379**, 713–720 (2012).
- Kuroda, T. *et al.* Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPSC cells. *PLoS One*. **7**, e37342 (2012).
- An, E. *et al.* Secreted proteome profiling in human RPE cell cultures derived from donors with age related macular degeneration and age matched healthy donors. *J. Proteome Res.* **5**, 2599–2610 (2006).
- Nakagawa, M. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* **26**, 101–106 (2008).
- Kajiwara, M. *et al.* Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**, 12538–12543 (2012).
- Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. **448**, 313–317 (2007).
- Osakada, F. *et al.* In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J. Cell. Sci.* **122**, 3169–3179 (2009).
- Mori, K. *et al.* Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. *J. Cell. Physiol.* **188**, 253–263 (2001).
- Kiyono, M. & Shibuya, M. Bone morphogenetic protein 4 mediates apoptosis of capillary endothelial cells during rat pupillary membrane regression. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4627–4636 (2003).
- Duh, E. J. *et al.* Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 821–829 (2002).
- Volpert, O. V. *et al.* Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat. Med.* **8**, 349–357 (2002).
- Machida, K. *et al.* Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors. *J. Toxicol. Sci.* **34**, 123–127 (2009).
- Filleur, S., Nelius, T., de Riese, W. & Kennedy, R. C. Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein. *J. Cell. Biochem.* **106**, 769–775 (2009).
- Steele, F. R., Chader, G. J., Johnson, L. V. & Tombran-Tink, J. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 1526–1530 (1993).
- Amaral, J. & Becerra, S. P. Effects of human recombinant PEDF protein and PEDF-derived peptide 34-mer on choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 1318–1326 (2010).
- Dawson, D. W. *et al.* Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*. **285**, 245–248 (1999).
- Tombran-Tink, J. & Barnstable, C. J. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 628–636 (2003).
- Tombran-Tink, J., Chader, G. G. & Johnson, L. V. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp. Eye Res.* **53**, 411–414 (1991).
- Karakousis, P. C. *et al.* Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol. Vis.* **7**, 154–163 (2001).
- Ho, T. C. *et al.* PEDF induces p53-mediated apoptosis through PPAR gamma signaling in human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* **76**, 213–223 (2007).
- Chen, L., Zhang, S. S., Barnstable, C. J. & Tombran-Tink, J. PEDF induces apoptosis in human endothelial cells by activating p38 MAP kinase dependent cleavage of multiple caspases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 1288–1295 (2006).
- Notari, L. *et al.* Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J. Biol. Chem.* **281**, 38022–38037 (2006).
- Cai, J., Jiang, W. G., Grant, M. B. & Boulton, M. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J. Biol. Chem.* **281**, 3604–3613 (2006).
- Zhang, S. X., Wang, J. J., Gao, G., Parke, K. & Ma, J. X. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *J. Mol. Endocrinol.* **37**, 1–12 (2006).
- Guan, M. *et al.* Inhibition of glioma invasion by overexpression of pigment epithelium-derived factor. *Cancer Gene Ther.* **11**, 325–332 (2004).
- Funatsu, H. *et al.* Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*. **113**, 294–301 (2006).
- Gonzalez, R. *et al.* Screening the mammalian extracellular proteome for regulators of embryonic human stem cell pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 3552–3557 (2010).
- Amaral, J. & Becerra, S. P. Effects of human recombinant PEDF protein and PEDF-derived peptide 34-mer on choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 1318–1326 (2010).
- Ablonczy, Z. *et al.* Human retinal pigment epithelium cells as functional models for the RPE in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 8614–8620 (2011).
- Lydia, W. T. *et al.* Pigment epithelium-derived factor is estrogen sensitive and inhibits the growth of human ovarian cancer and ovarian surface epithelial cells. *Endocrinology*. **147**, 4179–4191 (2006).
- Matsuoka, M. *et al.* Expression of pigment epithelium derived factor and vascular endothelial growth factor in choroidal neovascular membranes and polypoidal choroidal vasculopathy. *Br J Ophthalmol.* **88**, 809–815 (2004).

## Acknowledgments

We thank Shin-Ichi Nishikawa for scientific discussion, Masayuki Shikamura for the animal work and statistical analysis of the results, Kentaro Matsushima for the protein work and Riken BRC for supplying iPSC clone 253G1. This study was supported by JST research grant "Safety Tests for Pluripotent Stem Cell (2010-2014)" Japan.

## Author contributions

H. Kanemura conducted all of the biological assays and prepared the manuscript; M.G. designed the research; N.N. analyzed the gene chip data; N.S. supplied the iPSC and iPSC-derived RPE; H. Kamao supplied the RPE sheets; Y.S. performed the statistical analysis of transplantation experiments; M.T. performed the QC for the RPE sheets and interpreted the *in vivo* experiments; S.K. supervised all the experimental results and edited the manuscript.

## Additional information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/scientificreports>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Kanemura, H. *et al.* Pigment Epithelium-Derived Factor Secreted from Retinal Pigment Epithelium Facilitates Apoptotic Cell Death of iPSC. *Sci. Rep.* **3**, 2334; DOI:10.1038/srep02334 (2013).

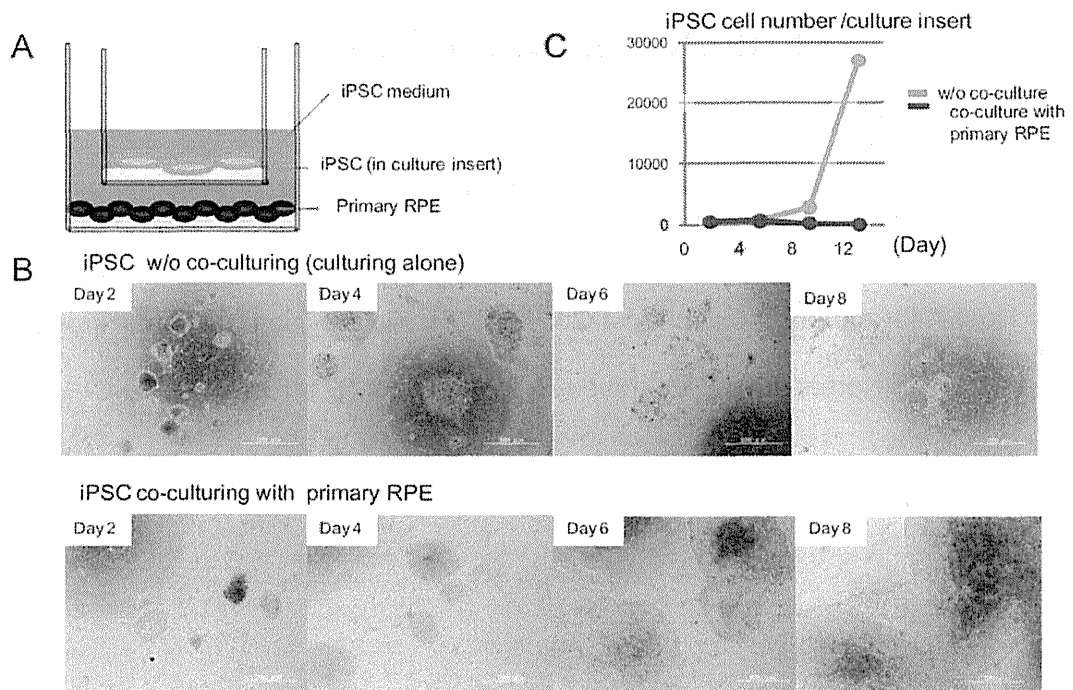


This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported license. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>

## **Supplementary Information**

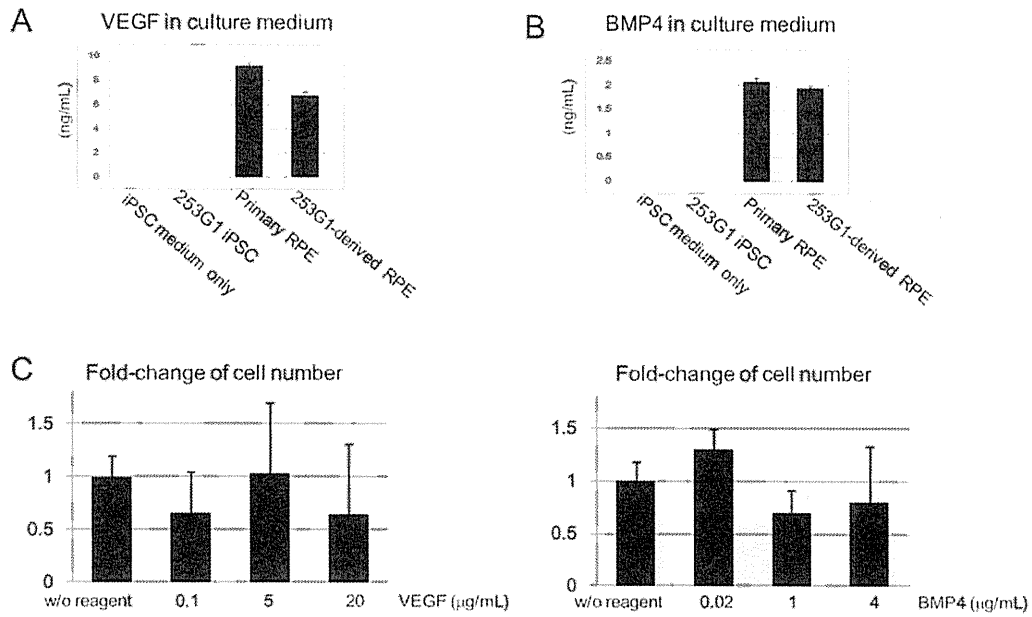
**Pigment Epithelium Derived Factor secreted from Retinal Pigment  
Epithelium facilitates apoptotic cell death of iPSC**

Hoshimi Kanemura, Masahiro J Go, Naoki Nishishita, Noriko Sakai, Hiroyuki  
Kamao, Yoji Sato, Masayo Takahashi & Shin Kawamata



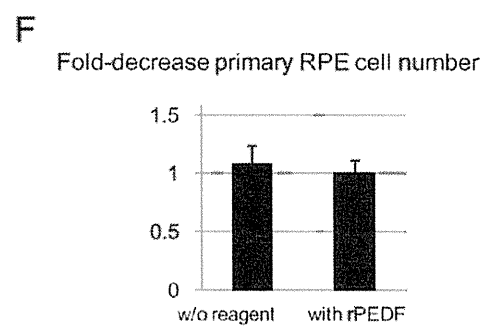
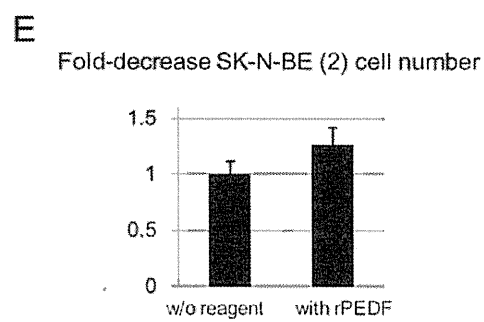
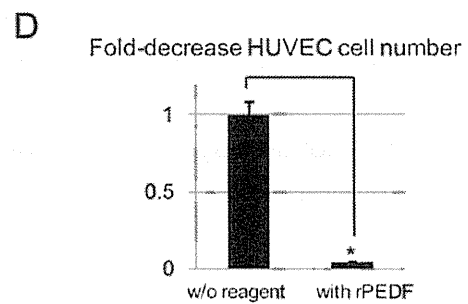
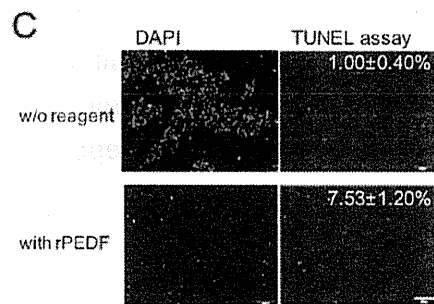
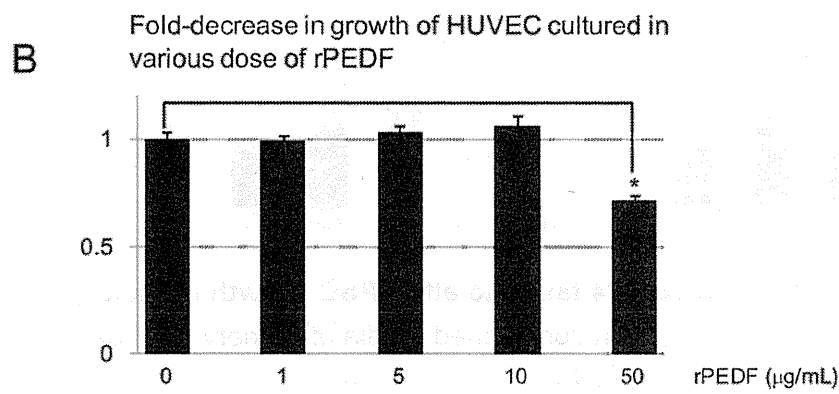
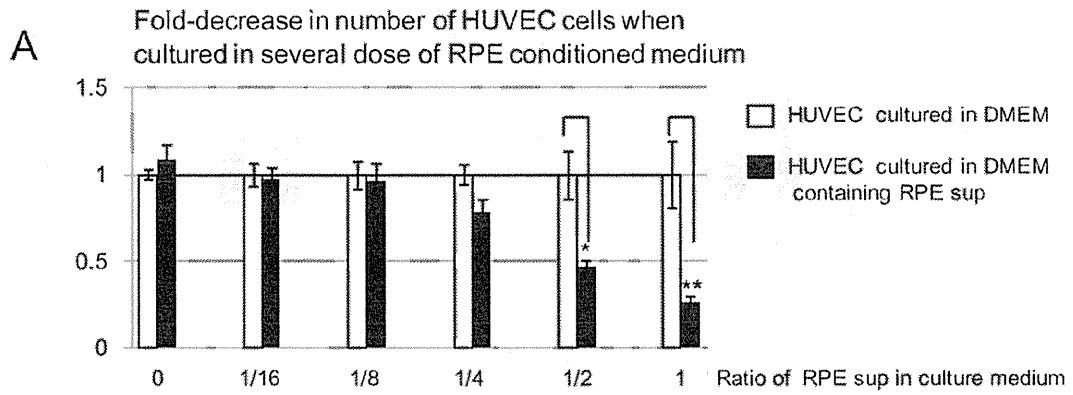
**S1. Cell growth of iPSCs co-cultured with primary RPE was perturbed.**

(A) Schema for co-culturing iPSC with primary RPE. iPSCs were maintained in culture inserts coated with Matrigel and co-cultured with primary RPE seeded on the bottom of the dishes in iPSC culture medium. (B) Phase-contrast images of iPSC clone 253G1 either cultured alone or co-cultured with primary RPE at designated day of culture. Scale bar = 500  $\mu$ m. (C) Growth curve of iPSC clone 253G1 co-cultured with primary RPE. Number of iPSC clone 253G1 cells at designated day of culture was scored.



**S2. Addition of rVEGF or rBMP4 failed to alter iPSC growth markedly.**

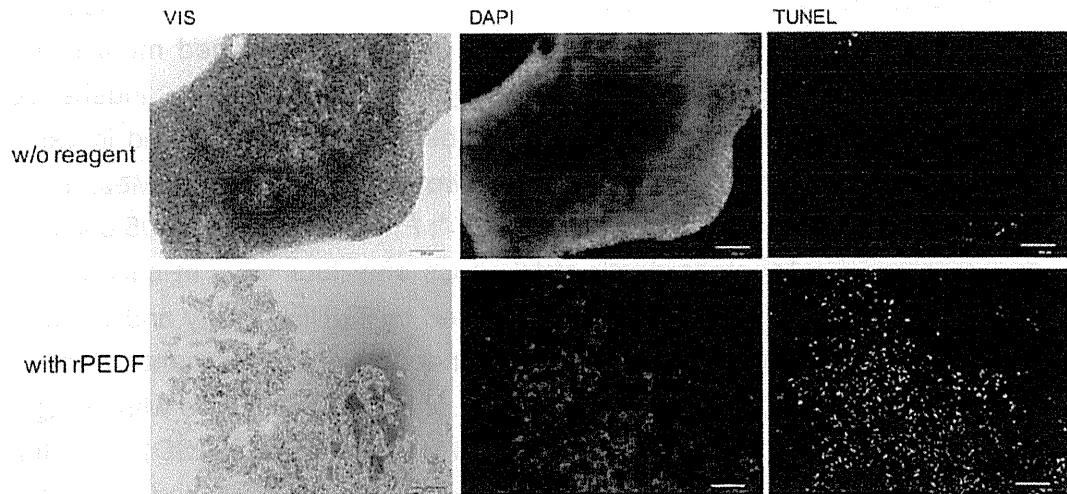
VEGF (A) or BMP4 (B) proteins in conditioned media of primary RPE or 253G1-derived RPE cultures after 24 h was measured by ELISA. iPSC medium was used as a negative control. Mean and (SD) from three independent experiments. (C) Fold-change in the number of 253G1 cells cultured either with VEGF (0.1 µg/mL, 5 µg/mL, or 20 µg/mL) or BMP4 (0.02 µg/mL, 1 µg/mL, 4 µg/mL) after six days of culture. Mean results with (SD) from three independent experiments.



**S3. Fifty  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rPEDF possessed a biological effect on HUVEC, not SK-N-BE(2) or primary RPE.**

(A) Fold-decrease in the number of HUVECs cultured in M-200 supplemented with LSGS mixed with indicated doses of day two conditioned medium from 253G1-derived RPE cells. Mean result with (SD) of three independent experiments. (B) Fold-decrease in the number of HUVECs cultured in various doses of rPEDF (1, 5, 10, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) after two days of incubation. Mean results of three independent experiments with (SD). \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.005$  compared as indicated. (C) Apoptotic death of HUVECs after four days of culture in the presence of rPEDF (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was examined by TUNEL assay and visualized as white spots. Representative trial of four independent experiments. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ . (D) Fold-decrease in the number of HUVECs cultured with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of rPEDF after four days of incubation. Mean results with (SD) from three independent experiments. \*,  $P < 0.005$  compared as indicated. (E) Phase contrast images of neuroblastoma SK-N-BE (2) cultured without or with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of rPEDF for six days. Fold-decrease in number of neuroblastoma cells in the presence or absence of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of rPEDF after six days of culture. Mean results with (SD) from three independent experiments. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ . (F) Phase contrast images of primary RPE cultured without or with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of rPEDF for six days. Fold-decrease in the number of neuroblastoma cells cultured in the presence or absence of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of rPEDF after six days of incubation. Mean results with (SD) from three independent experiments. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ .

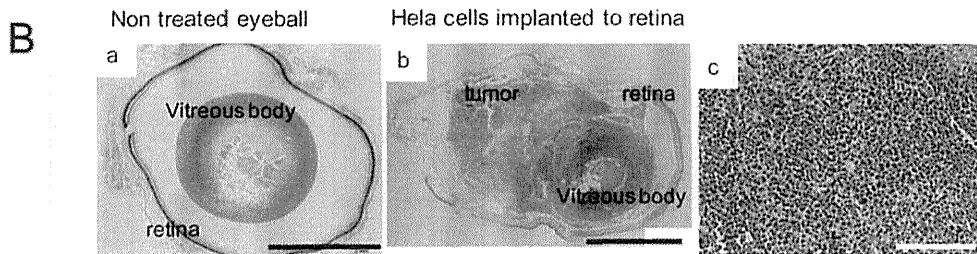
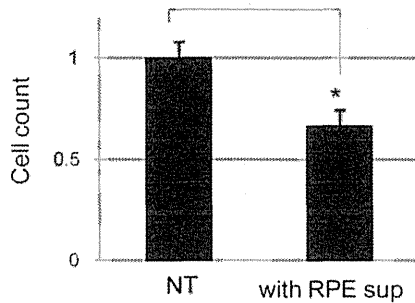
### PEDF induced apoptotic cell death of hESC (hKES01)



#### **S4. PEDF induced apoptotic cell death of hESC (hKES01).**

Apoptotic death of hKES01 cultured without or with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of rPEDF after four days of incubation was examined by TUNEL assay and visualized as a white spots. Phase contrast images (left panels), DAPI staining (middle panels) and TUNEL assay (right panels). Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ .

**A** Cell growth of HeLa cell after RPE-conditioned medium treatment



**S5. Reduction of HeLa cells number was not drastic compared with that of iPSC under existence of RPE.**

(A) Cell growth of HeLa cell after RPE conditioned medium treatment. HeLa cells were treated with or without RPE-conditioned medium for 4 days. Cells number after treatment (with RPE sup) was scored and fold decrease of cell number was shown in a bar graph with an error bar (SD). NT: non-treated HeLa cells.  $n=3$ . \*;  $P < 0.05$  compared as indicated. (B) As few as hundred HeLa cells formed tumor when implanted in retina of nude rat. a) Cross section of non-treated (normal) eyeball. Scale bar = 2 mm. b) Cross section of eyeball injected 100 HeLa cells into retina. 25 weeks after implant. Scale bar = 2 mm. c) Histology of tumor after HeLa cells injection. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ . TPD<sub>50</sub> for iPSCs is 31623 ( $n=20$ , difference between two groups;  $P < 0.05$ ) and TPD<sub>50</sub> for HeLa cells is 32 ( $n=28$  difference between two groups;  $P < 0.05$ ).



### Supplemental Table 1

Key soluble molecules identified from gene chip analyses of iPSC clone 253G1, 253G1-derived RPE, and primary RPE are shown.

Development		Primary RPE	253G1-RPE	253G1	hES03
<i>PEDF</i>	pigment epithelium derived factor	8,457	22,448	709	712
<i>BMP2</i>	bone morphogenetic protein 2	1,040	2,426	357	91
<i>VEGFB</i>	vascular endothelial growth factor B	298	498	185	98
<i>MGST2</i>	microsomal glutathione S-transferase 2	1,065	4,644	585	742
<i>GSTM3</i>	glutathione S-transferase mu 3 (brain)	4,002	1,996	121	233

Protease/protease inhibitor		Primary RPE	253G1-RPE	253G1	hES03
<i>EFEMP1</i>	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	4,237	2,123	0.7	244
<i>PLOD2</i>	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	6,311	2,864	696	837
<i>MMP14</i>	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	1,934	995	159	147
<i>CPA4</i>	Carboxypeptidase A4	1,123	1,886	17	73

Cell adhesion/connective tissue protein		Primary RPE	253G1-RPE	253G1	hES03
<i>COL3A1</i>	collagen, type III, alpha 1	5,104	3,871	34	945
<i>SEMA3C</i>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	7,425	4,926	31	79

Complement regulator/immune response		Primary RPE	253G1-RPE	253G1	hES03
<i>CFI</i>	complement factor I	2,556	5,146	0.4	45
<i>APPBP2</i>	amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein 2	2,147	2,218	302	500

## 再生医療製品の 造腫瘍性・悪性腫瘍形成能の評価

五十嵐友香／いがらしゆか

佐藤陽治／さとうようじ

国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部

再生医療または細胞治療に用いる目的で、ヒト体細胞、体性幹細胞、ES細胞、iPS細胞などに培養などの加工を施して製造・調製されるものは再生医療製品(または細胞・組織加工製品)とよばれている。再生医療製品のリスクのひとつとして“造腫瘍性”があげられる。一般的には“造腫瘍性のリスク”と一口にいわれることが多いが、安全性上の視点から大きく2つ、すなわち“腫瘍による物理的障害のリスク”と“悪性腫瘍形成のリスク”に分けられる。“腫瘍による物理的障害”とは腫瘍形成により周辺組織が圧迫などを受けることによる障害で、関節再生・脊髄再生などのケースで問題となる。この場合はたとえ良性であっても腫瘍自体がリスクファクターとなる。一方、“悪性腫瘍形成”は腫瘍の悪性度がリスクファクターとなる。

### ヒト体細胞・体性幹細胞由来製品

移植医療の現場では細胞・組織の造腫瘍性の評価がほとんど行われていない。つまり、再生医療製品の原材料となるような未加工のヒト体細胞・体性幹細胞には一般的に造腫瘍性がないと考えられていることになる。また、世界各地でヒト体細胞・体性幹細胞に由来する再生医療製品の臨床応用が進んでいるが、これらの製品の投与を原因とする腫瘍形成の学術論文としての報告は、ヒト胎児由来神経幹細胞を用いた毛細血管拡張性運動失調症の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<sup>1)</sup>。成人由来の体細胞または体性幹細胞を原材料とした再生医療製品に限れば、患者への投与による腫瘍形成の報告は著者らの知るところでは存在しない。

過去にヒト間葉系幹細胞の*in vitro*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<sup>2,3)</sup>は癌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<sup>4,5)</sup>では*in vitro*培養時に細胞の不死化が確認されている。これらのことは、最終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細胞増殖特性の把握が重要であることを示している。したがって、十分な工程管理の下に培養・加工され、細胞増殖特性解析で異常がないことを確認した成人体細胞・体性幹細胞由来の再生医療製品については、非臨床安全性試験として免疫不全マウスを用いた造腫瘍性試験を行う必要性はあまり高くないと考えられる。

### ヒトES/iPS細胞由来製品

ヒトES細胞またはiPS細胞に由来する再生医療製品には未分化ES/iPS細胞の残留の可能性はある。したがって、残存未分化ES/iPS細胞に起因する奇形腫形成能(造腫瘍性)の評価・管理が重要となる。ヒトES/iPS細胞が増殖分化して形成する奇形腫は多くの場合、良性であり、正常二倍体のヒトES細胞を免疫不全マウスに移植して悪性腫瘍が発生したという報告はない。一方、ヒト由来iPS細胞に関しては免疫不全マウスに投与した場合に悪性腫瘍が形成されたという報告が存在する<sup>6)</sup>。また、iPS細胞樹立時の細胞初期化過程は悪性形質転換の研究で従来用いられてきた発癌フォーカス形成試験(*in vitro*での遺伝子導入による悪性肉腫形成試験)との間での類似性が指摘され、共通の機序の存在が提唱されている<sup>7)</sup>。

ヒトiPS細胞由来の再生医療製品のなかに残存する未分化iPS細胞の造腫瘍性にはさまざまな要素、すなわち目的細胞への分化の難しさ、ヒトiPS細胞の原材料となる体細胞の種類、ヒトiPS細胞中における初期化因子残存の有無<sup>6)</sup>など、ヒトiPS細胞に付随する要因と、投与部位、投与細胞数、マトリゲルなどの共投与物の有無といった外部要因とが影響する。再生医療製品の原材料としてのヒトiPS細胞に内在する奇形腫悪性化にかかわる因子・機序の詳細は明らかではなく、悪性腫瘍を形成しやすい細胞株の判定方法および使用防止策を明らかにすることは今後の課題である。ただし、ヒトES/iPS細胞由来製品の造腫瘍性を評価するうえでは“原材料となる幹細胞の造腫瘍

性と最終製品の造腫瘍性との相関・因果関係は未解明である”という点に最大の注意が必要である。すなわち、臨床適用に際しては原材料となるヒトES/iPS細胞ではなくあくまで最終製品としてのヒトES/iPS細胞由来製品の造腫瘍性評価がもっとも重要であることにつねに留意しなければならない。

### 新技術による造腫瘍性評価の可能性

最近、ヒトiPS細胞由来の再生医療製品および原材料としてのヒトiPS細胞の造腫瘍性・悪性腫瘍形成能の評価に先端の解析技術である次世代シーケンサーを利用できないかという議論がある。ただし、原材料のiPS細胞またはiPS細胞由来製品に含まれる細胞の遺伝子変異による造腫瘍性の変化の評価を目的として全ゲノムシーケンス解析や全エクソンシーケンス解析を行うことは、現実的にはあまり用をなさない。その理由は再生医療製品の安全性との因果関係が明瞭な遺伝子変異の具体例は非常に乏しく、個々の製品の安全性の指標としての各変異の有用性がいまのところまだほとんど明らかでないからである。あえて行うのならばむしろ、発癌リスクと非常に高い相関があることが既知である少数の遺伝子変異について何らかの高精度・高感度な方法で解析し、わずかな変異の出現を検出する努力をする方が有用と考えられる。再生医療製品の開発における次世代シーケンサーの用途としてはほかに、縦列型反復配列(short tandem repeat: STR)解析などの代替として原材料iPS細胞の同一性評価を目的とした利用や、比較ゲノムハイブリダイゼーション(comparative genomic hybridization: CGH)解析などの代替として細胞のゲノム不安定性の評価を目的とした利用も考えられるが、その際には各目的に応じた試験系の性能と限界についての科学的

検討が事前に必要である。

新しい技術が開発されても、それがただちに製品の安全性評価に適用できるとは限らない。すなわち、その技術による試験の結果を受け、製品開発、製造および臨床の場において具体的にどのような判断が可能なのかが明らかでなければ安全対策としての試験の意味をなさないということに注意しなければならない。要するに、すくなくとも現段階では細胞の造腫瘍性の変化、不死化、悪性形質転換を評価するには、たとえば*in vivo*造腫瘍性試験、軟寒天コロニー形成試験、*in vitro*細胞増殖速度評価など、直接的に細胞増殖特性を評価する試験の実施を考えることが先決であることには変わりないということである。

### 文献

- 1) Amariglio, N. et al.: Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med.*, **6**: e1000029, 2009.
- 2) Rubio, D. et al.: Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.*, **65**: 3035-3039, 2005.
- 3) Røslund, G. V. et al.: Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.*, **69**: 5331-5339, 2009.
- 4) Wang, Y. et al.: Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy*, **7**: 509-519, 2005.
- 5) Tang, D. Q. et al.: *In vitro* generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation. *Am. J. Stem Cells*, **1**: 114-127, 2012.
- 6) Griscelli, F. et al.: Malignant germ cell-like tumors, expressing Ki-1 antigen (CD30), are revealed during *in vivo* differentiation of partially reprogrammed human-induced pluripotent stem cells. *Am. J. Pathol.*, **180**: 2084-2096, 2012.
- 7) Riggs, J. W. et al.: Induced pluripotency and oncogenic transformation are related processes. *Stem Cells Dev.*, **22**: 37-50, 2013.

\* \* \*

## 第7章 品質評価

### 1 安全性評価の総論、造腫瘍性試験の現状と展望

安田 智<sup>\*1</sup>，佐藤陽治<sup>\*2</sup>

#### 1.1 はじめに

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。その中で、ヒト由来の体性幹細胞、胚性幹細胞、さらには人工多能性幹細胞等の幹細胞を用いた製品の開発も盛んに進んでいる。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。本節では、幹細胞を用いた細胞・組織加工製品（幹細胞加工製品）の安全性評価に関して一般的に述べた後に、特にヒト多能性幹細胞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検出する試験系の現状と展望について概説したい。

#### 1.2 細胞・組織加工製品／幹細胞加工製品の安全性評価

細胞・組織加工製品の特性は、化学薬品やタンパク質性医薬品等とは著しく異なる。細胞・組織加工製品に特有の問題として、①形質は置かれる（微小）環境に依存する、②周囲の環境に対して薬理的・免疫学的・物理的に作用する、③長期培養により均一性が低下する場合がある、④脱分化・遊走の可能性がある、⑤壊れやすく寿命が有限である場合が多い、⑥高度な精製やウイルスの不活性化・除去が困難、ということが挙げられる。また、これらの問題の程度や重みは製品の種類により様々である。こうしたことから、細胞・組織加工製品の品質マネジメントの原則は、「リスク・ベース・アプローチ」とするのが妥当とされている。「リスク・ベース・アプローチ」とは、対象となる各製品に固有、かつその品質・安全性・有効性に関連するリスク要因を探

---

\*1 Satoshi Yasuda 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；先端医療振興財団 客員研究員

\*2 Yoji Sato 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 部長；先端医療振興財団 客員研究員；名古屋市立大学 大学院薬学研究科 医薬品質保証学分野 客員教授

り当てることをベースにし、その影響の度合いを科学的に評価することにより品質確保の方針・内容をケース・バイ・ケースで柔軟に定めるアプローチ方法である。なお、ここで言うリスクとは、ある目的（有効性・安全性など）を達成する上での阻害要因を指す。細胞・組織加工製品の安全性面での主なリスクとしては、「ウイルス等の感染性因子の伝搬」、「細胞の遺伝的不安定性と造腫瘍性」、「血清等の不純物混入」、「望まない免疫応答」、「非細胞成分による不必要な免疫応答、炎症反応、毒性」、「製品の意図しない生物応答」が挙げられ、製品開発においては、これらのリスクに対応した品質・安全性確保策が必要となる。特に、幹細胞は多分化能（multipotency）または多能性（pluripotency）と自己複製能という特徴を持ち、幹細胞を加工した製品は、加工内容や適用部位によっては、たとえ自己に由来するものであっても元来の細胞そのものではなく、また、存在していた、あるいは存在すべきであった（微小）環境とは異なる状態の下に臨床適用される可能性が高い。厚生労働省は、これらの点に留意し、各種幹細胞加工製品をより迅速に実用化するための品質・安全性確保に関する5つの指針を平成24年9月7日に発出した<sup>1)</sup>。

冒頭に述べたように、細胞・組織加工製品／幹細胞加工製品は重篤・致命的ないしQOLを著しく損なう疾病・損傷を適用対象として開発される場合が多い。従って、これらの製品を治験・臨床研究でヒトに初めて使用する際には、明らかに想定される製品のリスクを現在の学問・技術を駆使して排除し、その科学的妥当性を明らかにしたうえで、なお残る「未知のリスク」と、重篤で生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患、身体の機能や形態を一定程度損なうことによりQOLを著しく損なう疾患などに罹患し、従来の治療法では限界があり、克服できない患者が「新たな治療機会を失うことにより被るかも知れないリスク」とのリスクの大小を勘案し、かつ、これらすべての情報を開示した上で患者の自己決定権に委ねるという視点を持つこと、すなわち、リスク・期待されるベネフィットの情報を開示した上で、使用するかどうかの意思決定は患者が行うという視点を入れて評価することも重要である。

### 1.3 幹細胞加工製品の造腫瘍性試験

#### 1.3.1 ヒト多能性幹細胞の造腫瘍性と造腫瘍性試験国際ガイドライン

「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細胞株はテラトーマ(奇形腫)形成能、すなわち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(ES/iPS細胞等)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や腫瘍が形成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。

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」<sup>2)</sup>である。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 週間観察し、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。「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 の対象外とされており、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細胞株の均一なバンク（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。

### 1.3.2 ヒト多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品についての造腫瘍性試験には、目的別に以下の 3 種類があり得る。①原材料の品質管理のための造腫瘍性試験、②製造工程管理のための造腫瘍性試験、③最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験、である。以下にこれら 3 種の造腫瘍性試験の特徴と方法について述べる。

#### (1) 原材料（細胞基材）の品質管理のための造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の原材料は、文字通り、ヒト ES 細胞株やヒト iPS 細胞株等である。これらはヒト多能性幹細胞加工製品という生物製剤の一種を製造するための細胞基材である。従って、これらにおける「造腫瘍性」とは、すなわち生物製剤の原材料（細胞基材）の品質特性のひとつと捉えることが出来る。

ヒト多能性幹細胞加工製品の原材料としてのヒト多能性幹細胞バンクの造腫瘍性における懸念事項は、WHO TRS 878 におけるセル・バンクの品質管理の考え方と同様に、「セル・バンクの造腫瘍性が既定の範囲内にあるか？」ということになる。ヒト多能性幹細胞加工製品の原材料としてのヒト多能性幹細胞バンクの造腫瘍性の意味づけは WHO TRS 878 における細胞基材の造腫瘍性の意味づけとほぼ同じであることから、その評価方法についても、WHO TRS 878 の方法を準用することが可能であると考えられる。

#### (2) 製造工程（中間製品）管理のための造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の中間製品となる細胞集団には、目的細胞ないしその前駆細胞に加え残存多能性幹細胞およびその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。中間製品の造腫瘍性試験における「造腫瘍性」とは、製造工程管理のための指標としての意味合いがある。製造工程管理における造腫瘍性関連の懸念事項には、「どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか」

ということと「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」という2点がある。

中間製品の中に「どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか」ということに関しては、多能性幹細胞のマーカー遺伝子／マーカータンパク質を利用した方法により評価することが可能である。手技としては定量 RT-PCR やフローサイトメトリーなどが挙げられる。

中間製品の中に「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということを評価するための方法としては、例えば細胞増殖特性の評価（不死化細胞の検出）や軟寒天コロニー形成試験（足場非依存性増殖細胞の検出、後述）が挙げられる。造腫瘍性形質転換細胞の検出に *in vivo* 造腫瘍性試験系を活用することも考えられるが、最終製品（ないし中間製品）の中に含まれる僅かな造腫瘍性細胞を検出する必要があるため、WHO TRS 878 の方法よりも十分に低い検出限界を備えている必要がある。検出限界の低い試験系としては、T 細胞、B 細胞およびNK 細胞を欠失した NOD/SCID/ $\gamma$ Cnull (NOG) など、ヌードマウスよりも免疫力の低下した重度免疫不全マウス系統を利用することが考えられる<sup>3, 4)</sup>。ただし新規動物モデルを用いた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方法の検討と、その標準化が必要である。

### (3) 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の最終製品中の細胞集団、すなわち「投与細胞」には、目的細胞に加え、混入する前駆細胞や残存多能性幹細胞およびその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。また、最終製品の造腫瘍性試験における「造腫瘍性」には、ヒトでの生着部位での腫瘍形成を考察する材料であることが要求される。すなわち、最終製品における造腫瘍性関連の懸念事項には、「どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか」ということと「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに加え、「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか」ということが挙げられる。

最終製品の中に「どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか」「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに関しては、多能性幹細胞のマーカー遺伝子／マーカータンパク質の検出、細胞増殖特性の評価、軟寒天コロニー形成試験などで評価できる可能性がある。

一方、「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか」という懸念については、*in vivo* 造腫瘍性試験が必要となる。その場合に考慮すべき点としては、①試験系の検出限界、②投与細胞数、③投与部位などが挙げられる。投与部位については可能ならばヒトでの投与部位に相当する部位を選択すべきである。もしも、物理学的障害を生ずるなどの理由により当該部位に対する投与細胞数に限界がある場合には、可能であれば投与部位を変更するのではなく、動物とヒトとの間の当該投与部位の相対的スケール比に応じて投与細胞数を調節する。すなわち、生着する微小環境と投与細胞との相互作用による腫瘍形成の可能性を考察することを優先する。免疫特権、炎症、虚血など、特殊な投与環境における細胞の挙動は動物モデルにおける *in vivo* での評価でなければ、考察することが困難だからである。

### 1.3.3 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* 試験系があるが、それぞれに長所と短所がある。それらを *in vivo* 試験法と併せて表1にまとめた。核型分析などの染色体異常を検出することを目的とする試験は技術的に確立されているものの、得られた結果と細胞の造腫瘍性との相関性が低いことが多く、最終製品の造腫瘍性を評価するというよりも、原材料の品質または製造過程における製品の遺伝的安定性を評価するという目的で実施されるべきものと言える。軟寒天コロニー形成試験は、がん細胞の多くが足場非依存的に増殖するのに対して接着性正常細胞は足場が存在しないとアポトーシス（アノイキス）を起こすという性質を生かした試験系で、細胞を分散して軟寒天に封入し、足場非依存的な細胞増殖を検出する試験である。ただし、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞はトリプシン処理などによる分散によってアポトーシスを起こす特異な性質を持つことが知られており、ヒト多能性幹細胞加工製品の場合、単純には軟寒天コロニー形成試験を適用できない。我々は、分散誘導性アポトーシスを抑制すると言われる ROCK 阻害剤存在下にヒト iPS 細胞を分散、軟寒天中に播種した経験があるが、それでもコロニー形成は認められなかった<sup>5)</sup>。フローサイトメトリーや定量 RT-PCR は、特定のマーカータンパク質・マーカー遺伝子の発現を指標に未分化細胞または造腫瘍性細胞を短時間で検出する簡便な系で、フローサイトメトリーの場合は細胞を分離・回収出来る点、定量 RT-PCR はその高い感度が利点である。我々は、初代培養ヒト体細胞中にヒト iPS 細胞を添加して検討した結果、フローサイトメトリーでは 0.1%、定量 RT-PCR の場合には 0.002% 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<sup>5)</sup>。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、その増殖特性を解析する試験がある。これらを組み合わせて未分化細胞および不死化細胞の存在を否定できれば、最終製品の造腫瘍性はかなり低いことが示唆されるが、臨床試験に進むことの妥当性は、投与細胞数、投与部位、リスクマネジメントプラン、あるいは *in vivo* 造腫瘍性試験データ等によって製品ごとに判断されるべきだと考えられる。

### 1.3.4 ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験

加工されていないヒト体細胞・体性幹細胞を使った移植医療の現場では造腫瘍性試験がほとんど行われていないことから明らかなように、ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品の原材料となる体細胞・体性幹細胞には、造腫瘍性がないと一般的に考えられている。従って、ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品の造腫瘍性に関しては、「加工後の最終製品中に目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が混入しているか」という懸念と「投与細胞が、生着する微小環境において腫瘍を形成するか」という懸念についてのみ検討すればよいということになる。

特に、製品中の細胞がドナーでの基本機能と同様の基本機能を示すことを期待して製品を使用（「相同的使用」(homologous use) という）する場合には、「最終製品中に目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が混入しているか」ということが適切な試験（細胞増殖特性解析等）により十分に否定できれば、造腫瘍性については移植医療と同レベルと考えられ、それ以上の検討は必



表1 主な造腫瘍性関連試験の能力と限界

in vivo 試験法				
試験法	測定事項	目的	利点	欠点
ヌードマウスへの移植	腫瘍形成	造腫瘍性細胞の検出	● 定量化の方策が整備 (WHO TRS 878)	● 時間 (数週間～数カ月)・費用がかかる ● 臍がん, 乳がん, グリア細胞腫, リンパ腫, 白血病細胞に由来する細胞株は腫瘍を形成しない ● 僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
NOD-SCID マウスへの移植			● ヌードマウスよりも高感度	● 時間 (数週間～数カ月)・費用がかかる ● 定量化の方策が未整備 ● 胸腺腫を自然発症
NOG/NSG マウスへの移植			● NOD-SCID よりも高感度/胸腺腫なし	● 時間 (数週間～数カ月)・費用がかかる ● 定量化の方策が未整備
in vitro 試験法				
試験法	測定事項	目的	利点	欠点
細胞増殖特性解析 (所定培養期間を 超えた培養)	細胞増殖速度	不死化細胞 の検出	● 簡便・安価 ● 時にはヌードマウスよりも『高感度』 (不死化していても腫瘍形成のないケース)	● 僅かな不死化細胞の混入の検出には 時間がかかる
フローサイトメトリー	細胞マーカー 蛋白質発現	造腫瘍性 細胞・未分化 細胞の検出	● 短時間 (～1日)・簡便 ● 時には軟寒天コロニー試験よりも『高感度』 ● 細胞を識別・分離・回収できる	● 特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない =マーカー(-)の造腫瘍性細胞を見逃すおそれ ● ゲートの掛け方で結果がばらつく
qRT-PCR	細胞マーカー 遺伝子発現	細胞の検出	● 短時間 (～1日)・簡便 ● 時にはフローサイトメトリーよりも『高感度』	● 特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない =マーカー(-)の造腫瘍性細胞を見逃すおそれ
軟寒天コロニー形成試験	コロニー形成	足場非依存的 増殖の検出	● in vivo 試験より短時間(数週間～1カ月程度) ● 安価 ● 時にはヌードマウスよりも『高感度』	● 浮遊系細胞に使用できない ● 僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない ● ヒト 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	● 相関性の問題 (染色体異常⇔造腫瘍性) ● 僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
染色体 CGH および アレイ CGH	ゲノム DNA の コピー数異常			
蛍光 in situ ハイブリ ダイゼーション(FISH)分析	特定遺伝子の 位置・コピー数			

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

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

要ないと考えられる。

表2に欧米において薬事承認済みのヒト細胞・組織加工製品（すべてヒト体細胞加工製品）を示すと同時に、各製品の審査概要に記載されている造腫瘍性関連試験の内容を示す。ヌードマウスを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験を実施している製品が4件ある。これらの試験では少量の造腫瘍性細胞が混入している場合でも結果はすべて偽陰性になってしまう可能性が高い。もちろん、結果が陰性であることにより、造腫瘍性の高い細胞が極端に大量（数十%程度）には混入していないことを確認することはできるが、それほどの混入ならば、より簡単で安価な細胞増殖特性解析で何らかの明らかな異常が認められるはずである。

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毛細血管拡張性運動失調症の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<sup>6)</sup>。筆者らの知るところでは、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ない。過去にヒト間葉系幹細胞の *in vitro* 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<sup>7, 8)</sup> 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<sup>9, 10)</sup> では *in vitro* 培養時に細胞の不老化が検出されている。これらのことは、GMPによる最終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。したがって、GMPに準拠して培養・加工され、細胞増殖特性解析で異常がないことを確認した成人由来のヒト体細胞・体性幹細胞の移植については、非臨床安全性試験としての *in vivo* 造腫瘍性試験を行う必要性は高くないと考えられる。

### 1.3.5 造腫瘍性試験に関するまとめ

ヒト多能性幹細胞加工製品を含む細胞・組織加工製品を対象にした造腫瘍性試験ガイドラインは今のところ存在しない。WHO TRS 878の造腫瘍性試験は対象・目的が異なるため、細胞・組織加工製品の造腫瘍性評価にそのまま転用することには無理がある。解決策としては、重度免疫不全マウスの利用が考えられ、重度免疫不全マウスを用いた造腫瘍性の定量的評価法の開発と標準化が目下の課題である。造腫瘍性関連試験には *in vitro* の試験系もあり、各試験系の能力と限界を科学的に踏まえ、個別の製品で示すべき具体的な評価事項にどうかで取捨選択する必要がある。

## 文 献

- 1) 薬食発 0907 第2号, 第3号, 第4号, 第5号, 第6号, 厚生労働省医薬食品局長通知別添
- 2) [http://www.who.int/biologicals/Cell\\_Substrates\\_clean\\_version\\_18\\_April.pdf](http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf)

- 3) M. Ito *et al.*, *Blood*, **100**, 3175 (2002)
- 4) K. Machida *et al.*, *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 123 (2009)
- 5) T. Kuroda *et al.*, *PLoS One*, **7**, e37342 (2012)
- 6) N. Amariglio *et al.*, *PLoS Med.*, **6**, e1000029 (2009)
- 7) D. Rubio *et al.*, *Cancer Res.*, **65**, 3035 (2005)
- 8) GV. Røsland *et al.*, *Cancer Res.*, **69**, 5331 (2009)
- 9) Y. Wang *et al.*, *Cytotherapy*, **7**, 509 (2005)
- 10) DQ. Tang *et al.*, *Am. J. Stem. Cells.*, **1**, 114 (2012)