

これらを利用(時に組み合わせて利用)することで,それぞれの目的に応じた評価が可能であると考えられる。

1. 原料・原材料の造腫瘍性評価

ヒトES細胞株やヒトiPS細胞株などは,文字どおり,ヒトES/iPS細胞加工製品の原料または原材料である。したがって,ヒトES/iPS細胞加工製品という生物製剤の一種を製造するための原料・原材料として,それらのセル・バンクの造腫瘍性を評価し,品質特性の1つとしてとらえておくことが重要である。ヒトES/iPS細胞加工製品の原料・原材料の品質管理のため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ES/iPS細胞バンクの造腫瘍性の程度に大幅な変化が生じた場合,細胞特性に何らかの異常が起ったということが示唆される。つまり,原因はいずれにせよ,ヒトES/iPS細胞バンクの安定性に異常が生じたことを検出するための方策として,ヒトES/iPS細胞バンクの造腫瘍性を細胞特性指標の1つとして評価すれば,品質管理に活用できることになる。その評価方法については,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)評価のための造腫瘍性試験

ヒトES/iPS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,残存する未分化ES/iPS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。したがって,中間製品には,①「どのくらい未分化のヒトES/iPS細胞が残存しているか」ということと,②「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,製造工程(中間製品)評価における造腫瘍性の懸念事項となる。

中間製品の中に,①「どのくらい未分化のヒトES/iPS細胞が残存しているか」ということに関しては,ES/iPS細胞のマーカータン

注2:薬事規制においては,“原材料”とは,“原料又は材料”を指すのではなく,「医薬品等の製造に使用する原料又は材料の由来となるもの」を指す。(「生物由来原料基準」(平成15年厚生労働省告示210号)による定義)

パク/マーカー遺伝子を検出することによって評価することが可能である。方法としてはフローサイトメトリーや定量 RT-PCR が挙げられる。これらは感度が高いことが利点である。

一方、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」ということに関しては、細胞増殖特性解析（不死化細胞の検出）や、軟寒天コロニー形成試験による足場非依存性増殖細胞の検出などによって評価が可能である。ただし、ヒト ES/iPS 細胞は、トリプシン処理などによる単一細胞への分散によりアポトーシスを起す特異な性質を持つため、残存するヒト ES/iPS 細胞の検出のために、軟寒天コロニー形成試験は不向きであることに注意が必要である²⁾。

また、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」ということを検証するために、*in vivo* の方法を活用することも可能である。しかし、WHO TRS 878 にある方法（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 16 週間観察する方法）では、再生医療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く、結果が偽陰性になってしまうおそれがある。そのため、WHO TRS 878 の方法よりも十分に感度の高い系を用いる必要がある。そこで有力な選択肢として挙げられるのが、NOD/SCID/ γC^{null} (NOG)³⁾、NOD/SCID/IL-2 γ KO (NSG)⁴⁾ などの重度免疫不全マウスシステムを利用する、従来よりも高感度な検出系である。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⁵⁾。これらの重度免疫不全マウスを利用することにより、再生医療製品中に残留・混入するわずかな造腫瘍性細胞を検出できる可能性は高い。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再生医療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、a) 試験系の検出限界・感度・精度の分析的検討、b) 陽性・陰性コントロールのあり方、c) 投与細胞数、d) 投与経路、e) 投与方法、f) 観察期間、g) ヌードマウスとの比較、などが挙げられる。

3. 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験

ヒト ES/iPS 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。さらに, 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能を考察する材料であることが要求される。したがって, 最終製品における造腫瘍性関連の懸念事項には, ①「どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか」, ②「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, ③「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。①, ②については, 中間製品評価の場合と同様, 多能性幹細胞のマーカートンパク/マーカ遺伝子の検出(①), 不死化細胞の検出や足場非依存性増殖細胞の検出など(②)で, それぞれ評価が可能であると考えられる。一方, ③「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, a) 試験系の検出限界, b) 投与細胞数, c) 投与部位, d) 例数, e) 観察期間, f) 陽性・陰性コントロールのあり方, などが挙げられる。特に, 投与部位は, 可能な限り, ヒトでの投与部位に相当する部位を選択すべきである。これは, 生着部位の違いによって腫瘍形成能や, 腫瘍のタイプが異なるおそれがあり, ヒトへの外挿性を考えるときに問題となる可能性があるためである。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た投与細胞数の調節などが必要となる。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。

4. ヒト iPS 細胞加工製品の課題

近年我が国では, ヒト iPS 細胞に由来する再生医療製品(ヒト iPS 細胞加工製品)の開発に特に期待が高まっているが, ヒト iPS 細胞加

工製品の場合、原料・原材料としての iPS 細胞が持つ造腫瘍性、および最終製品に残存する未分化 iPS 細胞の造腫瘍性にはさまざまな要素がかかわってくる。すなわち、ヒト iPS 細胞の由来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、さらにはその細胞株自身の目的細胞への分化抵抗性などが、造腫瘍性に影響すると考えられる。目的細胞に効率的に分化するような細胞株、または悪性腫瘍を形成しやすい細胞株の判定方法を明らかにすることが、今後の課題である。

しかしながら、このような判定の根拠となるような特性（例えば特定遺伝子の変異や発現など）が、あらゆるヒト iPS 細胞加工製品の安全性の必要十分条件であるわけではない。つまり、ヒト iPS 細胞加工製品の造腫瘍性を評価するうえでは、「原料・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・因果関係の有無は未解明あるいは最終製品次第」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、原料・原材料ではなくあくまで最終製品としてのヒト iPS 細胞加工製品の造腫瘍性評価が最も重要であることに、常に留意しなければならない。

ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品

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ことから、ヒト体細胞・体性幹細胞に由来する再生医療製品についても、原料・原材料となる未加工の体細胞・体性幹細胞には、一般的に造腫瘍性がないと考えられる。したがって、ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品の造腫瘍性に関しては、「最終製品（ないし中間製品）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良い、ということになる。

すでに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⁶⁾。成人由来の体細胞ないし体性幹細胞を原料とした製

品に限れば、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されていない。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⁷⁾⁸⁾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⁹⁾¹⁰⁾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、GMPに準拠した厳密な工程管理の下に、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高くないと考えられる。

おわりに

再生医療製品を対象にした造腫瘍性試験ガイドラインは、いまだに存在しない。再生医療製品の開発を適切に推進するためには、科学的に想定される懸念事項に対し、現時点で認識しうる問題をできる限り整理したうえで、実施可能性をも考慮した対応が成されなければならない。したがって、再生医療製品の中でも特に造腫瘍性に関して懸念の強い製品については、本稿で挙げたタイプの異なる試験を複数実施し、総合的に判断すべきであると考えられる。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、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、原料・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。

また、再生医療製品の開発、各種試験法の開発・改良に関しては、今まさに、さまざまな研究が進行中であり、現時点での知見は限られている。近い将来、関連データが集積された段階で随時検討を重ねていかなければならない。

文 献

- 1) World Health Organization: Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. WHO Technical Report Series, No 878 Annex 1, 1998.
- 2) Kuroda T, et al: Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One* 7: e37342, 2012.
- 3) Ito M, et al: NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100: 3175-3182, 2002.
- 4) Shultz L D, et al: Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 174: 6477-6489, 2005.
- 5) Machida K, et al: Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors. *J Toxicol Sci* 34: 123-127, 2009.
- 6) Amariglio N, et al: Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 6: e1000029, 2009.
- 7) Garcia S, et al: Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 316: 1648-1650, 2010.
- 8) Torsvik A, et al: Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track-letter. *Cancer Res* 70: 6393-6396, 2010.
- 9) Wang Y, et al: Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytherapy* 7: 509-519, 2005.
- 10) 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.

**Tumorigenicity Tests for Human Cell-processed
Therapeutic Products**

Shinji Kusakawa¹, Yoji Sato²

¹ Foundation for Biomedical Research and Innovation

² Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences

