

● 再生医療普及のための基盤技術

再生医療製品の造腫瘍性評価

*1 公益財団法人 先端医療振興財団

*2 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 部長

草川 森 士*1 佐藤 陽 治*2

要 旨

“造腫瘍性”とは、動物体内に移植された細胞集団が、悪性または良性の腫瘍を形成する能力を言う。造腫瘍性は再生医療製品のリスクの1つであり、臨床適用される最終製品の造腫瘍性の評価と管理は、安全性確保のための重要な課題である。しかしながら、再生医療製品は、原料となる（幹）細胞の多様性に加え、最終製品の適用法についてもさまざまなケースが想定されるため、造腫瘍性の評価においては、総合的な考察が求められる。

はじめに

“再生医療”とは、端的に言えば、病気やけがで機能不全になった組織や臓器を再生させる医療である。近年では革新的な医療として、ヒト体細胞、ヒト体性幹細胞、ヒト胚性幹細胞（ES細胞）あるいはヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）といった細胞を加工した製品（再生医療製品）を用いて再生医療を行おうとする取り組みが、国内外で急速に進んでいる。

2013年5月に、議員立法「再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律」が成立し

キーワード：造腫瘍性，再生医療製品，体性幹細胞，多能性幹細胞，
免疫不全動物

た。その目的は、「再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするために、その研究開発及び提供並びに普及の促進に関し、基本理念を定め、国、医師等、研究者及び事業者の責務を明らかにするとともに、再生医療の研究開発から実用化までの施策の総合的な推進を図り、もって国民が受ける医療の質及び保健衛生の向上に寄与すること」とされている。さらに、具体的な施策として、「薬事法」が「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」と名称も新たに改正され、再生医療製品は遺伝子治療薬と共に、医薬品からも医療機器からも独立した第3のカテゴリー“再生医療等製品”(注1)として分類されることになった。また、“再生医療等製品”には、治験により有効性の推定と安全性の確認が行われれば条件および期限付きで製造販売承認を得ることができるようになるなど、特別な規制が設けられることとなっている。同時に成立した「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」では、再生医療の臨床研究および自由診療が法律による規制を受けることになる。これらの法律は、現在施行に向けて準備が進められている。再生医療等製品の開発者、医療従事者らの安全性に対する意識がますます高まり、適切な対策がとられることが期待される。

上述のとおり、最近我が国では、iPS細胞に由来する再生医療製品のような、新しいタイプの再生医療製品の開発も精力的に進められている。しかし、その実用化には、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、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。とりわけ、ES細胞やiPS細胞といった多能性幹細胞は、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”を元来の特性として保持しているため、ヒトES細胞またはiPS細胞を原料とした再生医療製品

注1：“再生医療等製品”とは、『医療又は獣医療のうち「人又は動物の身体の構造又は機能の再建、修復又は形成」、又は「人又は動物の疾病の治療又は予防」に使用されることが目的とされている物のうち、人又は動物の細胞に培養その他の加工を施したもの』又は『人又は動物の疾病の治療に使用されることが目的とされている物のうち、人又は動物の細胞に導入され、これらの体内で発現する遺伝子を含有させたもの』であって政令で定めるものを言う。

(ヒト ES/iPS 細胞加工製品)においては、最終製品の造腫瘍性の評価と管理が重要な課題となる。しかしながら、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、今のところ存在しない。本稿では、再生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、造腫瘍性の評価法の現状と課題について概説する。

“造腫瘍性”とは

再生医療製品のリスクの1つとして、“造腫瘍性”が挙げられる。“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、動物体内において良性腫瘍である奇形腫 (teratoma) が形成されることを確認し、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って成されている。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 ES/iPS 細胞加工製品においては、未分化な ES/iPS 細胞の残留・混入に起因する腫瘍形成がリスクとなる。

造腫瘍性国際ガイドライン

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⁾ は、現在唯一存在する造腫瘍性国際ガイドラインである (以下、WHO TRS 878 とする)。WHO TRS 878 にある造腫瘍性試験の内容は、大まかに言うと、「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。ただし、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* 細胞基材として用いられるヒトまたは動物由来の細胞株であり、患者に移植する生細胞、すなわち再生医療製品は、対象としていない。また、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または有無を正確に把握することにある。セル・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、造腫瘍性を細胞特性の指標の1つとして評価し、品質管理に活用するということである。つまり、WHO TRS 878 の試験は、細胞株という均一な細胞集団の造腫瘍性評価を対象にしており、再生医療製品(中に極わずかに存在する造腫瘍性細胞に起因する)の造腫瘍性の評価とは目的が異なるため、そのまま転用することには、感度などの面で問題がある。

再生医療製品における造腫瘍性

再生医療製品の由来細胞の種類(例:体細胞,体性幹細胞,iPS細胞など)は多様である。さらに、由来する細胞については、自己,同種,およびHLAホモ接合型の同種のもの,などが想定される。再生医療製品の臨床利用に際しては、その態様(例:細胞懸濁液や細胞シートなど)もさまざまなものとなり、最終製品ごとに必要な細胞数も異なる(例:網膜色素上皮細胞製品では 10^4 個,心筋細胞製品では $10^8 \sim 10^9$ 個)。そのうえ、適用の経路,適用部位,免疫抑制薬の使用の有無,患者の病状の緊急性などについても、さまざまなケースが想定される。したがって、このような多様性に基づき、造腫瘍性の評価においては、総合的な考察が求められる。

ヒトES/iPS細胞加工製品における造腫瘍性評価

ヒトES/iPS細胞加工製品の製造における造腫瘍性試験には、目的別に、①原料・原材料(注2)の品質管理のための造腫瘍性試験,②製造工程(中間製品)評価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,の3種類が想定される。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、幾つかの*in vitro*試験系または*in vivo*試験法がある(表1)ので、

表1 主な造腫瘍性関連試験

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 | ● 定量化の方案が整備 (WHO TRS 878) | ● 時間 (数週間 ~ 数ヵ月)・費用がかかる ● 膵がん、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 ● 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』 | ● 時間 (数週間 ~ 数ヵ月)・費用がかかる ● 定量化の方案が未整備 ● 胸腺腫を自然発症 |
| NOG/NSG マウスへの移植 | | | ● NOD-SCID マウスよりも『高感度』/胸腺腫なし | ● 時間 (数週間 ~ 数ヵ月)・費用がかかる ● 定量化の方案が未整備 |

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) | ● 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 | 細胞マーカータンパク発現 | 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 |
| 定量 RT-PCR | 細胞マーカー遺伝子発現 | | ● 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ヵ月程度) ● 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 ● 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/遺伝子異常の検出 | ● 技術的に確立 ● 外部機関による受託解析もあり ● 細胞の遺伝的安定性について評価可能 | ● 相関性の問題 = “染色体や特定遺伝子の異常” と “造腫瘍性” との相関は未解明 ● 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 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 | | | |
| 次世代シーケンサー | 遺伝子配列 | | ● 外部機関による受託解析もあり ● 細胞の遺伝的安定性について評価可能 | |

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タンパク/マーカー遺伝子の検出(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) Amarglio 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. *Cytotherapy* 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

2014年度
日本再生医療学会

Johnson & Johnson
Innovation Award

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

Development of highly sensitive methods for detection of residual undifferentiated pluripotent stem cells in products derived from processing of human pluripotent stem cells

佐藤 陽治

Sato, Yoji

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部

E-mail: yoji@nih.go.jp

Summary

Human pluripotent stem cells (hPSCs), e.g. human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), have promising potential as raw materials of cell-based therapeutic products. However, there are some technical challenges that must be overcome before their clinical use. One of the challenges is the lack of highly sensitive methods for detection of residual undifferentiated hPSCs that have tumorigenic potential. We characterized and established *in vitro* assays for detection of tumorigenic/undifferentiated cells in hiPSC-derived products. The soft agar colony formation assay appeared unable to detect hiPSCs, presumably attributable to dissociation-induced apoptosis, a unique property of hPSCs. The flow cytometry assay using anti-TRA-1-60 antibody detected 0.1% undifferentiated hiPSCs that were spiked in primary retinal pigment epithelial (RPE) cells. Moreover, qRT-PCR was found to detect a trace amount of *LIN28* mRNA, which is equivalent to that present in a mixture of a single hiPSC and about 50,000 RPE cells. Our studies provide highly sensitive and quantitative *in vitro* assays for safety/quality profiling of hPSC-derived products.

KEY WORDS

iPS細胞 再生医療 造腫瘍性 安全性 品質管理

はじめに

現在、ヒトES細胞やヒトiPS細胞といった多能性幹細胞に由来する移植細胞を用いた再生医療・細胞治療の開発が世界中で広く展開されており、難病治療への期待が高まっている。しかし、ヒト多能性幹細胞由来移植細胞に関する汎用性の高い品質・安全性評価方法の開発とその体系化・標準化が大きく立ち遅れており、実用化における隘路となっている。特に大きな問題としては、移植細胞中に残存する未分化なヒト多能性幹細胞に起因する製品の造腫瘍性の評価法・管理法が確立されていないことが挙げられる。こうした方法の確立なしには、どのようなヒト多能性幹細胞由来移植細胞であれ、実用化・産業化を達成することは非常に難しい。

本稿では、ヒト多能性幹細胞由来移植細胞の品質・安全性の確保の上で重要な、未分化細胞の残存の評価方法に関し、ヒトiPS細胞由来網膜色素上皮細胞での例を中心に我々のこれまでの経験を紹介する。[本稿は、第13回日本再生医療学会総会(平成26年3月)でのJohnson & Johnson Innovation Award受賞講演をもとに記述したものである。]



多能性幹細胞由来移植細胞の造腫瘍性

「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腫瘍を形成する能力をいう¹⁾。ヒトES細胞やヒトiPS細胞を樹立した時には、細胞の多能性(多分化能)を確認する目的で、免疫不全動物に細胞を移植し、その体内でのテラトーマ(teratoma; 奇形腫)の形成、すなわち移植した細胞が3つの胚葉系の様々な細胞種に分化することを確認する。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持っていることになる。この点がヒト体細胞・体性幹細胞と大きく異なる。したがって、ヒト多能性幹細胞由来移植細胞においては、未分化な多能性幹細胞の混入・残留により異所性組織形成や腫瘍形成が惹起されるリスクがある。このことは、移植細胞中に残存する未分化な多能性幹細胞を可能な限り除去する工夫が必要であることを意味し、実際、その取り組みに関する報告はこれまでに多く存在する²⁾⁻⁷⁾。しかし、忘れられがちだが、ヒト多能性幹細胞由来移植細胞の実用化・品質評価においては、実際に未分化な多能性幹細胞が除去できたかを確認する手段、すなわち未分化な多能性幹細胞の混入・残留量を高感度で確認する方法も重要であり、必要である。こうした方法の開発は、多能性幹細胞から特定の細胞種への効率的な分化誘導法の開発や、残存未分化多能性幹細胞の除去方法の開発などに比べて著しく立ち遅れており、ヒト多能性幹細胞由来移植細胞を用いた再生医療・細胞治療の実現における隘路として残されたままの状態にある。

多能性幹細胞・造腫瘍性細胞の検出

ヒト多能性幹細胞由来移植細胞は、通常、目的とする細胞以外にその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と考えられる。こうした細胞集団における造腫瘍性に関するリスクファクターとしては、「ヒト多能性幹細胞の残存」および「造腫瘍性形質転換細胞の出現・混入」の2点が挙げられる。

「ヒト多能性幹細胞の残存」に関しては、多能性幹細胞のマーカ―遺伝子ないしマーカ―蛋白質を利用した方法により評価することが可能である。手技としては後述する定量RT-PCR (qRT-PCR)やフローサイトメトリーなどが挙げられる。一方、「造腫瘍性形質転換細胞の出現・混入」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。造腫瘍性細胞の検出を目的とした方法として、*in vivo*造腫瘍性試験系(製品を免疫不全動物に移植して腫瘍形成を評価する方法)を活用することも考えられるが、製品の中に含まれるわずかな造腫瘍性細胞を検出する必要があるため、十分に高い感度を備えている必要がある。検出感度の高い試験系としては、NOD/SCID/ γ 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⁸⁾⁻¹⁰⁾。ただし新規免疫不全動物モデルを用いた方法は、高価かつ時間がかかる点が問題とされ、また評価方法が未整備であり、その標準化・体系化が課題となっている。

造腫瘍性関連 *in vitro* 試験¹¹⁾

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。それぞれの長所と短所を*in vivo*試験法と併せて表にまとめた。なお、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については、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、最終製品の非臨床安全性という面での造腫瘍性の評価よりも、原材料の品質の安定性、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。この試験系では、細胞のクランプ残存や寒天



表 造腫瘍性関連試験の比較

| 試験法 | 軟寒天コロニー形成試験 | フローサイトメトリー | qRT-PCR | <i>in vivo</i> 造腫瘍性試験* |
|--------|---|---|-------------------------------------|--|
| 目的 | 足場非依存的増殖(悪性形質転換細胞)の検出 | 未分化な多能性幹細胞の検出 | 未分化の多能性幹細胞の検出 | 悪性形質転換細胞および未分化な多能性幹細胞の検出 |
| 期間 | 30日 | 1日 | 6時間 | 12~16週間 |
| 利点 | ●安価 | ●短時間・簡便 ●個々の細胞を解析 | ●迅速 ●簡便 ●定量的 ●高感度 | ●直接的 ●微小環境での造腫瘍性を評価できる |
| 欠点 | ●間接的 ●浮遊系細胞には使えない ●ヒトiPS細胞検出には使用不可能(分散誘導性細胞死) | ●間接的 ●既知のマーカー分子を発現する細胞以外は検出不能 ●ゲーティングが結果に影響 | ●間接的 ●既知のマーカー分子を発現する細胞以外は検出不能 | ●費用と時間がかかる |
| 下方検出限界 | 網膜色素上皮細胞中の1%のPA-1細胞(ヒトテラトカルシノーマ由来細胞) | 網膜色素上皮細胞中の0.1%のiPS細胞マーカー: TRA-1-60 | 網膜色素上皮細胞中の0.002%以下のiPS細胞マーカー: LIN28 | 10 ⁶ 個のフィーダー細胞中に含まれる245個(0.02%)の未分化ES細胞 |

(*Hentze H, et al: Stem Cell Res 2: 198-210, 2009)

中での凝集による足場依存的細胞増殖を防ぐという意味で、単一細胞への分散が重要である。一方、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いる。そこで、単一細胞に分散したヒトiPS細胞の軟寒天培地中での増殖を検討したところ、分散誘導性アポトーシスを抑制するといわれているROCK阻害剤Y-27632存在下であっても、軟寒天培地中での増殖は認められなかった。すなわち、軟寒天コロニー形成試験は未分化なヒト多能性幹細胞の混入を検出する目的には不適であるということが確認された。次に、モデルケースとして初代培養ヒト網膜色素上皮細胞(RPE細胞)にヒト卵巣テラトカルシノーマ細胞株PA-1を一定量添加した標本を用い、正常細胞中への悪性形質転換細胞の混入に関する軟寒天コロニー形成試験の検出限界を検討した。その結果、混入するPA-1細胞を検出するには、混入率がRPE細胞の数の1%以上必要であることが明らかとなった。

特定のマーカー蛋白質を指標に未分化ヒトiPS細胞を検出する系として、フローサイトメトリーがある。正常細胞のモデルケースとして初代培養RPE細胞を

用いて我々が検討したところでは、未分化細胞マーカーとされるOct3/4, Sox2およびTRA-1-60に対する特異的抗体によって、未分化iPS細胞と分化細胞とが峻別できることが確認された。初代培養RPE細胞にiPS細胞をスパイクする実験により、正常細胞(初代培養RPE細胞)に混入する未分化細胞の検出限界を検討した結果、0.1%以上の混入量であれば有意な検出シグナルが得られることが明らかとなった。

qRT-PCRは、特定のマーカー遺伝子発現を指標に未分化ヒトiPS細胞を検出する高感度な系であるが、どのマーカーが最適であるか、そして検出感度はどのくらいか、ということに関する情報はこれまでほとんどなかった。そこで我々は、未分化細胞に選択的に発現するとされる遺伝子としてOCT3/4, KLF4, C-MYC, SOX2, NANOG, LIN28, REX1を選び、これらの中でどの遺伝子発現が未分化細胞の混入指標として最適か、最適な遺伝子を使用した場合の混入未分化細胞の検出限界はどのくらいかを検討した。正常細胞のモデルケースとしては、軟寒天コロニー形成試験およびフローサイトメトリーの時と同様、初代培養RPE細胞を用いた。検討の結果、初代培養RPE細胞



であっても、*C-MYC*, *KLF4*および*REX1*は、ヒトiPS細胞での発現を100%とした場合、数%~25%のレベルで発現していることが明らかとなった。しかしながら、患者1回あたりの投与量が $10^4 \sim 10^9$ とされるiPS細胞由来移植細胞の中にわずかに残留するiPS細胞の検出を行うには、この程度の選択性では全く不十分である。一方、*OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28*の初代培養RPE細胞における遺伝子発現量は、対iPS細胞比で1/1,000未満であった。RPE細胞にiPS細胞をスパイクして検討した結果、*OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*を指標にしたiPS細胞の検出限界はそれぞれ、0.01%, 0.06%, 0.07%であった。*LIN28*については、初代培養RPE細胞中の発現が全く検出されなかったため、「ネガティブコントロールのシグナル値の平均値+標準偏差の3倍」という通常の方法により下方検出限界を求めることはできなかった。しかしながら、スパイク実験およびヒトiPS細胞由来RPE細胞を用いた検討から、0.002%程度のiPS細胞が混入した際にも*LIN28*の有意な発現シグナルが観測されることが明らかとなっている。すなわち、*LIN28*を指標にすれば、約50,000個RPE細胞中に1個の割合で混入する未分化iPS細胞を検出できることになる。この方法は、我々の知り得る限り、分化細胞中の残存ヒトiPS細胞の検出方法としては、学術論文として公表されている方法の中で最も感度が高く、平成25年8月から開始されている神戸の理化学研究所と先端医療センター病院の自己iPS細胞由来RPE細胞を用いた臨床研究計画の中でも品質管理試験として採用されるに至っている。

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未だに存在しない。したがって、現時点では、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ヒトiPS細胞由来移植細胞をはじめとする製品については、本稿で挙げたような、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。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。なお、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上で、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。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導をくださいました西川伸一先生、川真田伸先生、松山晃文先生、郷正博先生をはじめとする先端医療振興財団の先生方および高橋政代先生をはじめとする理化学研究所の先生方、品質・安全性の考え方について多くのご示唆を下さいました近畿大学 早川堯夫先生、一丸となって多くの実験に取り組んでくださった安田智先生、黒田拓也先生、草川森士先生他、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

- 1) World Health Organization : Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks (Proposed replacement of TRS 878. Annex 1), 2010
- 2) Lee MO, Moon SH, Jeong HC, et al : Inhibition of pluripotent stem cell-derived teratoma formation by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** : E3281-E3290, 2013
- 3) Schuldiner M, Itskovitz-Eldor J, Benvenisty N : Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a "suicide" gene. *Stem Cells* **21** : 257-265, 2003
- 4) Chung S, Shin BS, Hedlund E, et al : Genetic selection of sox1GFP-expressing neural precursors removes residual tumorigenic pluripotent stem cells and attenuates tumor formation after transplantation. *J Neurochem* **97** : 1467-1480, 2006
- 5) Tang C, Lee AS, Volkmer JP, et al : An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cell. *Nat Biotechnol* **29** :

再生医療・細胞治療の規制動向と レギュラトリーサイエンス

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部*

村岡ひとみ・佐藤陽治*

New Japanese regulatory framework and scientific hurdles for translation of regenerative/cellular therapies

In 2013, the Japanese Diet passed the Regenerative Medicine Promotion Act and the Act Regarding Ensuring Safety of Regenerative Medicine (the "Regenerative Medicine Safety Act"), as well as the revisions to the Pharmaceutical Affairs Act (new PAA). One of the aims of the new/revised Acts is to promote the development and translation of and access to regenerative/cellular therapies. In the new PAA, a cell-processed product for regenerative/cellular therapy is defined as a "regenerative medical product", a product distinct from pharmaceuticals and medical devices, allowing regenerative medical products to obtain a conditional and time-limited marketing authorization much earlier than that under the conventional system. The Regenerative Medicine Safety Act enables medical institutions/hospitals to outsource cell processing to companies. This minireview provides perspectives on the new regulatory framework and scientific hurdles for translation of regenerative/cellular therapies.

平成25年、わが国の再生医療・細胞治療の実用化を目的とした3つの重要な法律が成立した。これらの法律では、再生医療・細胞治療の臨床試験や関連する産業に対する規制について、新たな整備が行われている。特に重要な変更点としては、薬事法改正により「再生医療等製品」が「医薬品」や「医療機器」から独立した新しいカテゴリーとして分類され、一部の再生医療等製品については条件及び期限つき承認制度が導入されたことと、再生医療等安全性確保法により、医師が患者から採取した細胞を医療のために加工する作業を外部事業者に委託することが認められたことが挙げられる。本稿では、これらの新たな再生医療等に関する規制について概説するとともに、再生医療の早期実用化に必要なレギュラトリーサイエンス上の課題について解説する。

*Hitomi Muraoka, Yoji Sato**

Keywords: Regenerative Medicine, Cellular Therapy, Regulation, Regulatory Science, Safety

はじめに

近年のヒト胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)などの多能性幹細胞の登場により、これらを利用して失われた組織の再生を目指す再生医療や、従来有効な治療法がなかった重篤な疾病やQOLが顕著に低下する疾病などの治療を目的とした細胞治療が現実のものになると期待されている。また、体細胞や体性幹細胞を利用した再生医療や細胞治療の開発も国内外で活発に行われており、すで

に実用化段階にあるものも存在する。これら再生医療・細胞治療(再生医療等)は、将来の日本を支える成長産業としても期待を集めている。しかし、再生医療等という先進的・革新的な技術を、これまでの医療や医薬品・医療機器の規制の枠組みの中で実用化することは容易ではない。逆に、既存の規制の枠組みに囚われすぎることが、こうした先進的・革新的技術の実用化を阻害しているのではないかという議論も存在する。そのため、専門家によって規制改革の検討が続けられ、新たな枠組みが平成25年に法律として定められた。本稿では、これらの新たな再生医療等の規制について概説するとともに、再生

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

医療等の実用化における科学的課題について、レギュラトリーサイエンスの点から解説する。

1. 2つの開発トラック

わが国において、ヒトまたは動物の細胞に培養その他の加工を施したものをを用いた再生医療等を実用化するためには、「製品としての開発トラック」と「医療としての開発トラック」との2つの道筋がある。

ヒトまたは動物の細胞に培養その他の加工を施し、再生医療等に用いられることを目的とした製品(再生医療等製品)を開発するトラックでは、『薬事法』の規制を受け、薬事法に基づき、治験を行ったうえで品質、有効性及び安全性を示し、厚生労働省の製造販売承認を受けなければならない。

一方、医師・歯科医師が自らの患者に「医療」を施すことを目的に、ヒトまたは動物の細胞に医師・歯科医師が自ら加工を施し、これを患者に投与することは、これまで『医師法』『医療法』などの医事関連法規や『ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針』などの行政指針に従い、「臨床研究」および、その結果を踏まえた「先進医療」(保険診療との併用が認められる保険外診療)あるいは「保険外診療」として行われてきた。

「製品としての開発トラック」では、薬事法に記載され、かつ医薬品国際ガイドライン(ICHガイドライン)に沿った国内基準(例えば Good Laboratory Practice(GLP)、Good Manufacturing Practice(GMP)/Quality Management System(QMS)、Good Clinical Practice(GCP)など)に従う必要があるが、「医療としての開発トラック」にはその必要がない。すなわち、「製品としての開発トラック」は「医療としての開発トラック」と比べ、費用も時間も余計にかかる。ただし、「医療」としての「臨床研究」は研究費が尽きれば実施不可能になるという点で持続可能な医療ではないことが問題である。「先進医療」では実施可能な医療機関が限定されると同時に、製品の品質にばらつきが生じる恐れがあり、また、「保険外診療」は開発に多くの投資を要する新規製品を用いるために高額となりやすく、いずれの場合も多くの国民が享受できない恐れがある。したがって、

国民が広く享受できるようにするためには、治験を通じて薬事法上の承認を得て、保険診療として実施されることが好ましい。

2. 3つの再生医療等関連法

平成25年、わが国では再生医療等に関する規制を大きく変化させる3つの法律、すなわち『再生医療を国民が迅速かつ安全に受け入れられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律』(通称『再生医療推進法』)、『再生医療等の安全性の確保等に関する法律』(通称『再生医療等安全性確保法』または『再生医療新法』)、および『医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律』(通称『医薬品医療機器等法』)が成立した。平成25年5月に成立した『再生医療推進法』は、再生医療の実用化に向けて、研究開発や普及を促進する際の国の責務を明記した議員立法である。平成25年11月に成立した『医薬品医療機器等法』は、『薬事法』を改正するとともに法律名を変更したものである。同法では、再生医療等製品(遺伝子治療用製品を含む)は、医薬品からも医療機器からも独立した第3のカテゴリーとして分類される。再生医療等製品のうち、申請に係る再生医療等製品が均一でない場合、治験により効能、効果または性能を有すると推定され、安全性の確認が行われたものは、条件及び期限付製造販売承認を得ることができるようになるなど、特別な規制が適用される。また、『医薬品医療機器等法』と同時に成立した『再生医療等安全性確保法』は、「医療としての再生医療等」を規制するものである。同法により、医師・歯科医師は細胞の加工を外部の「特定細胞加工物製造業者」に委託することが可能となる一方、そのリスク区分に応じて、再生医療等提供計画を厚生労働大臣等に提出しなければならないようになった。

3. 『薬事法』から『医薬品医療機器等法』へ

今般の『薬事法』の『医薬品医療機器等法』への改正における主な変更点には、①医薬品、医療機器等に係わる安全対策の強化、②医療機器の特性を踏まえ

た規制の構築、③再生医療等製品の特性を踏まえた規制の構築、がある。以下、再生医療等製品に係わる項目に限定して解説する。

『医薬品医療機器等法』では、「再生医療等製品」が以下のように新たに定義づけられている：

- 一 次に掲げる医療又は獣医療に使用されることが目的とされている物のうち、人又は動物の細胞に培養その他の加工を施したもの
 - イ 人又は動物の身体の構造又は機能の再建、修復又は形成
 - ロ 人又は動物の疾病の治療又は予防
- 二 人又は動物の疾病の治療に使用されることが目的とされている物のうち、人又は動物の細胞に導入され、これらの体内で発現する遺伝子を含有させたもの

上記一および二は、それぞれ従来のいわゆる再生医療製品(細胞・組織加工製品)と遺伝子治療薬を指す。つまり、これらを併せた製品群が「再生医療等製品」ということになる。一のイとロはそれぞれ組織工学製品と細胞治療薬を指す。なお、内因性幹細胞を活性化・分化させ組織再生を行う細胞増殖分化因子やスキャホールドのような、ヒトまたは動物由来の細胞の投与を伴わない広義の再生医療を目的として使用される製品は、「再生医療等製品」の定義には含まれていない。特筆すべき点は、本法律第23条の26にある。本項によれば、①再生医療等製品が均質でないこと、②効能、効果又は性能を有すると推定されるものであること、③効能、効果又は性能に比して著しく有害な作用を有することにより再生医療等製品としての使用価値がないと推定されるものでないこと、のいずれにも該当する再生医療等製品である場合は、厚生労働大臣は薬事・食品衛生審議会の意見を聴き、その適正な使用の確保のために必要な条件および7年を超えない範囲内の期限を付して製造販売承認を与えることが可能となる。これは再生医療等製品の条件及び期限付承認制度であり、人における製品の安全性が治験により確認され、その有効性の推定ができれば、早期に暫定的な製造販売承認が与えられることを意味している。通常の製造販売承認を得るには、市販後に有効性とさらなる安全性を検証し、期限内に再度承認申請を行う必要がある。

4. 「医療行為としての再生医療等」に関する規制

『再生医療等安全性確保法』の主な内容としては、①再生医療等の分類、②再生医療等の提供に係わる手続き、③適正な提供のための措置等、④特定細胞加工物の製造の許可等が挙げられる。「再生医療等」は、「再生医療等技術を用いて行われる医療」と定義づけられている。なお、本法律では、「細胞加工物」を、人または動物の細胞に培養その他の加工を施したものを指し、「特定細胞加工物」を、「再生医療等に用いられる細胞加工物のうち再生医療等製品であるもの以外のもの」と定義し、『医薬品医療機器等法』との棲み分けをしている。

上記①「再生医療等の分類」に関しては、人の生命および健康に与える影響の程度に応じ、人に未実施等の高リスクな医療等は「第1種再生医療等」、現在実施中等の中リスクな医療等は「第2種再生医療等」、第1種と第2種以外のリスクの低い医療等は「第3種再生医療等」に分類するというものである。具体的には以下の通り：

第1種：人に未実施などの高リスクな医療等

医療機関から申請された提供計画は、特定認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で厚生労働大臣に提出して実施することになるが、一定の提供制限期間を設け、その期間内に厚生労働大臣が厚生科学審議会の意見を聴いて安全性等について確認する。提供計画が安全性等の基準に適合していないときは、計画の変更が厚生労働大臣によって命令される。

第2種：現在実施中などの中リスクな医療等

提供計画について特定認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出して実施する。

第3種：第1種と第2種以外のリスクの低い医療等

提供計画について認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出して実施する。

第1種は、例えば、iPS細胞/ES細胞に由来するものや人為的に導入された外来遺伝子が含まれているものなど、第2種は、例えば、体性幹細胞に由来するものなど、第3種は、例えば、体細胞に由来するものなどが想定されているが、実際の分類にはさまざまなリスク要因を考慮した総合的な判断が必要

になる。また、上記③「適正な提供のための措置等」としては、再生医療等の安全性確保のために必要なときは、厚生労働大臣による改善命令が実施でき、改善命令違反の場合は再生医療等の提供が制限されるなどがある。

上記④「特定細胞加工物の製造の許可等」に関しては、『再生医療等安全性確保法』では、特定細胞加工物の製造を許可制(医療機関等の場合には届出)とし、医療機関が特定細胞加工物の製造を委託する場合には、許可等を受けた者又は届け出をした者に委託しなければならないこととする旨が記載されている。すなわち、医療機関で採取された細胞・組織の細胞培養加工施設への外部委託が可能となり、許可を受けた施設ならば再生医療等に使用する細胞の加工培養を行うことができるようになる。なお、この法律に基づき、医師の責任のもとで実施される細胞の培養・加工の委託については『医薬品医療機器等法』の適用外になる。上記②「再生医療等の提供に係わる手続き」については次項で詳述する。

5. 再生医療等に関する基準・指針など

再生医療等を実用化するためには、これまでに説明した法律のみならず、いくつかの関連した基準や指針に従う必要がある。例えば、再生医療等製品には主にヒトの血液や組織に由来する原料または材料を用いた製品が含まれ、『医薬品医療機器等法』(薬事法)上の「特定生物由来製品」に相当する場合も想定される。その場合、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必要がある。再生医療等製品は、先端的製品であるために臨床使用経験や情報の蓄積が乏しく、製品の態様も多種多様であることからリスクの特定自体が難しく、有用と期待される医療技術であると同時に、リスクを抱えていることを認識する必要がある。したがって、医療行為あるいは製品開発に関わらず、規制当局が作成した評価基準を十分に理解しつつ、研究開発を実施する企業や医師・研究者、審査官が、再生医療等におけるリスクをどのようにマネジメントすべきかについて、課題を共有し、議論を深め、迅速に対応するなどの取り組みを継続していくことが大変重

要である。

再生医療等に関する現在の主な基準・指針等を表1に示した。

1) ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針

『ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針』は、「医療としての開発トラック」において、ヒト幹細胞を用いる臨床研究が社会の理解を得て適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重し、かつ科学的知見に基づいた有効性および安全性を確保するために遵守すべき事項を定めたものである。本指針は平成25年10月に改正され、ヒト胚性幹(ES)細胞を含むヒト幹細胞の樹立と分配に関し、疾病の治療を目的として人の体内にヒト幹細胞などを移植または投与する臨床研究のみならず、臨床研究における使用を目的としてヒト幹細胞等を調整または保管する研究にもその適用範囲が広がられた。

また、これまでヒトES細胞を用いる臨床研究は実施しないこととされていたが、一部のヒトES細胞を用いた臨床研究が可能となった。一部のES細胞には、①外国で樹立されたヒトES細胞で文部科学省の『ヒトES細胞の樹立及び分配に関する指針』と同等の基準に基づき樹立されたものと認められるものと、②文部科学省の関連指針におけるヒトES細胞の臨床研究利用に関する考え方が示された後に新規に樹立するヒトES細胞が該当する。現時点においては、文部科学省の『ヒトES細胞の樹立及び分配に関する指針』に基づき、国内ですでに樹立されたヒトES細胞は、樹立・使用が基礎研究に限定されており、臨床利用におけるインフォームド・コンセントが不明確である理由から、品質および安全性が確保されている場合であってもそのまま臨床研究に用いることができないとされている。なお、『ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針』は、『再生医療等安全性確保法』と内容が重複するため、平成26年秋に予定されている同法の施行とともに廃止される予定である。

2) 生物由来原料基準

『生物由来原料基準』は、『薬事法』第42条に基づき、厚生労働大臣が保健衛生上特別の注意を要する

表1 再生医療等の開発に係る主な基準・指針等

| 文書名 | 初版/最新版 (平成26年5月現在) | 概略 |
|--|---|---|
| ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針 | 平成18年7月3日厚生労働省告示第425号/平成25年10月1日厚生労働省告示第317号 | ヒト幹細胞臨床研究が社会の理解を得て、適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重し、かつ、科学的知見に基づいた有効性及び安全性を確保するための指針。 |
| 生物由来原料基準 | 平成15年5月20日厚生労働省告示第210号/平成17年3月31日厚生労働省告示第177号 | 医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器に使用されるヒトや動物に由来する原料又は材料について、製造に使用される際に講ずべき必要な措置に関する基準を定めることにより、医薬品等の品質、有効性及び安全性を確保することを目的とする。 |
| 細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方 | 平成12年12月26日医薬発第1314号別添1 | 「生物由来原料基準」と併せてGTPの根幹を形成する。細胞・組織を取り扱う際の基本的要件を示すとともに、細胞・組織を利用した製品の品質・安全性、並びに細胞・組織の取扱いに関する科学的及び倫理的妥当性を確保することを目的とする。 |
| ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保について | 平成24年9月7日薬食発第0907第2, 3, 4, 5, 6号 | ヒト幹細胞を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件を定めたもの。自己体性幹細胞、同種体性幹細胞、自己iPS(様)細胞、同種iPS(様)細胞およびES細胞加工医薬品等に特化した留意事項を示した。 |
| ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保について | | |
| ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保について | | |
| ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保について | | |
| ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保について | | |
| ヒト(自己)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器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 | ヒト細胞・組織を加工した医薬品又は医療機器について品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件について定めたもの。細胞提供者が自己(患者本人)の場合と同種(他人)の場合を区別して整理し、それぞれの注意事項をまとめている。 |
| ヒト(同種)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器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 | |
| 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令 | 平成9年3月26日厚生省令第21号/平成20年厚生労働省令第114号 | GLP省令。非臨床試験施設の構造設備、標準操作手順書の作成、動物の管理、プロトコールや最終報告書の作成などを規定。承認申請時に提出する非臨床安全性試験の結果はGLPに従っていることが原則。 |
| 医療機器の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令 | 平成17年3月23日厚生労働省令第37号/平成20年厚生労働省令第115号 | |
| 医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令 | 平成16年12月24日厚生労働省令第179号 | GMP省令。医薬品及び医薬部外品の製造販売承認の要件として、医薬品および医薬部外品の製造所における製造管理・品質管理の基準を定めたもの。 |
| 医療機器及び体外診断用医薬品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令 | 平成16年12月17日厚生労働省令第169号 | QMS省令(医薬品のGMP省令に相当)。医療機器及び体外診断用医薬品の製造販売承認の要件として、医療機器及び体外診断用医薬品の製造管理・品質管理の基準を定めたもの。 |
| 治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準(治験薬GMP) | 平成20年7月9日薬食発第0709002号別添 | 治験薬GMP。企業から提供を受けた医薬品を治験薬として取り扱う際の製造管理・品質管理等の基準。 |
| ヒト(自己)細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方について | 平成20年3月27日薬食監麻発0327025号 | ヒト自己由来細胞・組織加工製品のGMP。患者本人から直接細胞・組織を採取するという特殊性等を踏まえた製造管理・品質管理の考え方。 |
| 医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令 | 平成9年3月27日厚生省令第28号/平成24年12月28日厚生労働省令第161号 | GCP省令。治験を依頼する者、治験を自ら(医師主導治験)実施しようとする者に係る「治験の準備に関する基準」及び「治験の管理に関する基準」、治験を実施する医療機関が行うべき「治験を行う基準」などを定めたもの。 |
| 医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令 | 平成17年3月23日厚生労働省令第36号/平成25年2月8日厚生労働省令第11号 | |