厚生労働科学研究費補助金

（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）

分担研究報告書

我が国における今後の国際標準獲得推進（医療機器分野）を担う人材育成推進事業

（24KC5001）

４．医療機器・再生医療等製品基準策定のための実証研究

4-3. 医療機器・再生医療等製品基準策定のための実証研究―造腫瘍性・ゲノム不安定性

研究分担者：安田 智　国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長

研究要旨

再生医療等製品（細胞加工製品）に共通する品質・安全性上の課題として、製品に混在する可能性のある形質転換細胞による腫瘍形成の潜在的リスクがある。ゲノム不安定性は、腫瘍形成リスクにおけるハザードと認識されている。近年開発の進む iPS 細胞由来製品については、製造工程において残存する未分化細胞による腫瘍形成の可能性も懸念されている。再生医療等製品の実用化促進が期待される国際情勢においては、これらの造腫瘍性細胞を検出・定量し、不純物として管理する試験法が強く求められており、検証された造腫瘍性試験法の標準とゲノム不安定性評価の考え方の国際的な共有が強く望まれるが、国際ガイドラインは未発出である。令和 6 年度は再生医療等製品基準策定のための実証研究として、①国立医薬品食品衛生研究所（国立衛研）と再生医療イノベーションフォーラム（FIRM）ISO/TC 276 国内委員会が協働して、iPS 細胞加工製品の造腫瘍性試験法とゲノム不安定性に関する国際標準原案を ISO/TC 276/SC 1/WG 2 国際会議にて提案し、国内外のステークホルダーのコンサルテーションによる継続的な文書改訂を行い、コンセンサス形成に向けた標準策定作業を進めた。②HESI CT-TRACS をプラットホームとした国際連携活動では、国立衛研と FIRM 多能性幹細胞安全性評価委員会（CoNCEPT）が参画し、多能性幹細胞の奇形腫形成リスク評価について総説論文を公表した。③標準の推進に資するデータの取得として、ゲノム構造異常を検出する試験法の性能について検証した。本研究成果は、細胞加工製品の造腫瘍性とゲノム不安定性の評価方法の開発と検証を促進し、国際標準化を主導的に進めるものである。国際的な規制調和をもたらすことで、日本企業が国内開発する iPS 細胞加工製品の国際競争での優位性確保に資する。国際標準化に携わる人材育成に貢献するとともに、細胞加工製品の臨床応用における品質・安全性上の課題である造腫瘍性に関する種々の評価法の能力と限界についての国際的認知・科学的議論の深化に繋がり、ISO 国際標準プラットフォームでの審議化が強く望まれる。

担当協力者（順不同）

伊藤　弓弦	筑波大学 生命環境系 教授
河内　幾生	再生医療イノベーションフォーラム ISO/TC 276 国内委員会委員長
渡辺　武志	再生医療イノベーションフォーラム多能性幹細胞安全性評価委員会委員長
佐藤　陽治	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 部長
三浦　巧	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第 1 室 室長
澤田　留美	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第 2 室 室長
黒田　拓也	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第 3 室 室長
河野　健	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第 4 室 室長
草川　森士	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 主任研究官
田埜　慶子	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 主任研究官
平井　孝昌	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 主任研究官
清水　直登	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 研究員

Ａ．研究目的

再生医療等製品（細胞加工製品）を用いた治療は、重篤・希少な疾患や代替法に乏しい疾患に対する有効な治療法として期待されている。細胞加工製品の原材料として使用される iPS 細胞は多能性と自己増殖能を有することから、ヒト iPS 細胞を目的細胞に分化させて製造する細胞加工製品の開発が活発化している。しかしながら、細胞加工製品に共通する品質・安全性上の課題として、製品に混在する可能性のある形質転換細胞による腫瘍形成の潜在的リスクがある。また iPS 細胞の免疫不全動物への投与は奇形腫を誘発することが知られており、製品の製造工程において残存する未分化 iPS 細胞による腫瘍形成の可能性も懸念されている。したがって、形質転換細胞や未分化 iPS 細胞といった造腫瘍性細胞の混在を確認することが、細胞加工製品の品質・安全性の確保のためには重要であり、造腫瘍性細胞を検出・定量し、不純物として管理する試験法が強く求められる。細胞加工製品の実用化には、汎用性の高い造腫瘍性試験法の確立が必要であり、これらの試験法の検証と標準化を速やかに進めることが不可欠である。さらに iPS 細胞加工製品においては、iPS 細胞株樹立、セルバンク化、拡大培養、分化といった長期培養を要する工程によって製造されるため、遺伝子変異が蓄積する機会が多いと考えられ、ゲノム不安定性が高まりやすいと想定される。ゲノム不安定性は腫瘍形成リスクにおけるハザードと認識されるが、細胞加工製品のゲノム不安定性評価においては、製品の品質・安全性確保に資する科学的合理性のあるコンセンサス形成には未だ至っていない。再

生医療等製品の実用化促進が期待される国際情勢においては、検証された造腫瘍性試験法の標準とゲノム不安定性評価の考え方の国際的な共有が強く望まれるが、これらの国際標準化や国際規制調和は未だなく、国際ガイドラインも未発出である。

日本では、iPS 細胞加工製品の造腫瘍性評価について、試験法の確立と国際標準化を迅速に図るべく、世界に先駆けて国内で評価法開発が展開され、その留意点がいち早くガイドライン化・共有されている。これまで国立医薬品食品衛生研究所（国立衛研）と再生医療イノベーションフォーラム（FIRM）の多能性幹細胞安全性評価委員会（FIRM-CoNCEPT）は、国際標準化を目指した活動として iPS 細胞由来製品の造腫瘍性評価に係る多施設検証を協働して行ってきており、Health and Environmental Sciences Institute（HESI）の細胞治療委員会（CT-TRACS）の国際実験コンソーシアム活動にも参加している。昨年度の事業において、国立衛研は筑波大学と FIRM ISO/TC 276 国内委員会と連携し、造腫瘍性試験標準の ISO の国際プラットホームでの審議化を目指した標準文書案の作成を行った。また iPS 細胞加工製品の造腫瘍性評価の考え方に関するグローバルなコンセンサスがまだ不足しているため、再生医療の標準作成の場の中心である ISO/TC 276/SC 1（分析方法）を牽引する米国国立標準技術研究所（NIST）において US-JP Biotechnology Standards Meeting を開催した。日本側からは、厚生労働省から発出されている造腫瘍性試験ガイドラインの概要、HESI CT-TRACS における未分化 iPS 細胞高感度検出試験法の国際多施設検証、ISO 国際標準文書案の骨子および日本での ISO 国際標準化活動の枠組みの説明等を行い、iPS 細胞加工製品の造腫瘍性試験の標準化に向けた素地づくりのための協議を実施した。

令和 6 年度は、再生医療等製品基準策定のための実証研究として、iPS 細胞加工製品の造腫瘍性試験法とゲノム不安定性に関する国際標準原案を ISO/TC 276/SC 1/WG 2 国際会議にて日本から提案し、国内外のステークホルダーのコンサルテーションによる継続的な文書改訂を行い、コンセンサス形成に向けた標準策定作業を進めた。HESI CT-TRACS をプラットホームとした国際連携活動では、多能性幹細胞の奇形腫形成リスク評価について論文を公表した。また標準の推進に資するデータの取得として、造腫瘍性・ゲノム不安定性試験法の性能を検証した。

Ｂ．研究方法

B-1 国際標準原案の作成と提案

令和 5 年度の本事業で作成した iPS 細胞加工製品の造腫瘍性試験法とゲノム不安定性に関する国際標準原案に関しては、英訳とコンサルテーションによるコメントに対応した改訂作業が行われ、国際標準化の達成を目標とした ISO/TC 276/SC 1/WG 2 での提案戦略が練られた。国立衛研と ISO/TC 276 国内委員会が協働して会議を開催し、協議が進められた。令和 6 年度は、7 回の

対面またはオンライン会議（第 1 回 令和 6 年 4 月 22 日；第 2 回 令和 6 年 5 月 15 日；第 3 回 令和 6 年 7 月 18 日；第 4 回 令和 6 年 9 月 17 日；第 5 回 令和 6 年 10 月 8 日；第 6 回 令和 7 年 2 月 6 日；第 7 回 令和 7 年 4 月 1 日）を実施した。

B-2 HESI CT-TRACS における国際連携活動

HESI CT-TRACS のプラットホームにおいて、国立衛研と FIRM CoNCEPT が協働し、細胞加工製品に混在する残存未分化 iPS 細胞の検出に特化した *in vivo* および *in vitro* 試験法に関する情報のアップデートを図った。関連する文献調査を行い、ポジションペーパーの作成と投稿を進めた。

B-3　ゲノム不安定性試験の性能評価

腫瘍形成リスクにおける危険因子（ハザード）である遺伝子変異の一種であるコピー数多型（CNV）は、相同性組換えや二本鎖 DNA 切断などから生じることが報告されており、ゲノム構造の不安定性の一つの指標とされている。CNV は、ゲノム DNA 断片のコピー数が、通常 2 コピーのところ 1 コピー以下（欠失）または 3 コピー以上（重複）となっている状態を指し、CNV 検出の方法としては、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション（FISH）、比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション （aCGH）などの方法がある。今回、細胞加工製品のゲノム不安定性試験法の性能評価として従来の手法とは異なる、KaryoStat，KaryoStat HD，Saphyr の 3 種類の CNV 測定法の性能を明らかにする目的で、同一サンプルを用いた測定比較を行った。本研究では、iPS 細胞加工製品の CNV 測定を想定し、臨床株でも採用されている作製法であるエピソーマルベクターでリプログラミングを行ったヒト iPS 細胞株 1231A3 を親株に用い、心筋分化誘導を行い、1231A3 株由来心筋細胞における CNV 解析を上述の 3 手法により実施した。

（倫理面への配慮）

ヒト由来の生体試料の使用、取り扱いについては、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 国際標準原案の作成と提案

国内では厚生労働省から「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関する留意点」（薬生機審発 0627 第 1 号別添、令和元年 6 月 27 日）が発出されている。本文書は、ヒト細胞加工製品中に混在する未分化多能性幹細胞及び形質転換細胞について、その代表的検出試験例を示すと同時に、これらの試験の中から、特定のヒト細胞加工製品の品質・安全性評価のために実施する試験を選択する際に留意すべき事項を示している。また、記載されている試験法については、既に国内で多施設検証を行っており、国内受託試験機関の体

制は整備されている。したがって、この国内で運用されている造腫瘍性試験法ガイドラインを基に ISO 文書案を策定し、ISO/TC 276 での標準化を目指すことは、本邦の国際優位性を保ちつつ、主要国の規制当局の審査に関する国際的な規制調和が促進され、国際ビジネス展開のための環境整備の進展に資すると考えられた。令和 5 年度に作成した ISO 文書案は、国内造腫瘍性試験法ガイドラインから要求事項と推奨事項を抽出し、ハザードである未分化残存 iPS 細胞と形質転換細胞を可能な範囲で高感度に検出するという考えを基本にしている。更に分析法バリデーションの観点からの留意事項を新たに追加しており、iPS 細胞加工製品の形質転換細胞の発生に寄与すると考えられるゲノム不安定に関する一般的留意点についても記載されている。

ISO/TC 276 ではバイオテクノロジーに関する標準が審議されており、TC 276 の分科委員会である SC1 は分析方法、SC 1 の一つのワーキンググループである WG 2 は細胞の特性評価を取り扱っている。したがって、細胞加工製品の評価分析法については、ISO/TC 276/SC 1/WG 2 が主な対象となっている。現在 ISO/TC 276/SC 1 の積極参加国は 19 カ国、オブザーバー国は 7 カ国に上る。

2024 年 6 月 19 日に英国グラスゴーにて開催された ISO/TC 276/SC 1/WG 2 国際会議では、“General requirements and considerations for the pluripotent stem cell/transformed cell detection test and tumorigenicity test of cellular therapeutic products”「細胞治療製品の多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験及び造腫瘍性試験に関する一般要求事項及び考慮事項」の文書案の提案を日本から行った。この文書案における序文、適用範囲、構成、造腫瘍性の一般的概念および多能性幹細胞由来製品の造腫瘍性関連試験について説明し、ISO/TC 276/SC 1/WG 2 メンバーによるコンサルテーションの希望を申し出た。グラスゴー会議では、WG メンバーから文書案の適用範囲に関してコメントを得て、議論を継続することが確認された。

2024 年 6 月のグラスゴー国際会議での議論も踏まえ、国内外のステールホルダーによるコンサルテーションを実施した。国内では、京都大学 iPS 細胞研究財団（CiRA-F）、FIRM-CoNCEPT、国内 ISO/TC 276 委員会メンバーに ISO 文書案を回付し、82 のコメントを得た。これらの意見を整理・集約し、各コメントに対する対応を検討し、ISO 文書案の改訂を行った。国外では、ISO/TC 276/SC 1/WG 2 メンバーに ISO 文書案を回付し、令和 6 年 7 月 31 日から 9 月 25 日までの 8 週間のコンサルテーションを実施し、25 名から「コメントなし」との返答を得た。

国内外のコンサルテーション後の改訂文章案については、2024 年 12 月 9 日にオンライン開催された ISO/TC 276/SC 1/WG 2 国際会議で、タイトルを“General requirements and considerations for the undifferentiated pluripotent stem cell and transformed cell detection test, and tumorigenicity test of cellular

therapeutic products”「細胞治療製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験及び造腫瘍性試験に関する一般要求事項及び考慮事項」に変更し、グラスゴー国際会議での提案から修正した点を中心に説明し、New Work Item Proposal (NP)投票に向けた意見伺いを行った。12 月のオンライン国際会議では、WG メンバーから文書案のタイトルと付随する内容に関してコメントを得た。また先に実施した 8 週間の文書回付によるコンサルテーションでコメントを得られなかったため、本オンライン国際会議での議論を反映させた文書案を回付し、WG メンバーによるコンサルテーションを再度実施することが、ISO/TC 276/SC 1/WG 2 の総意とされた。

2024 年 12 月のオンライン国際会議での議論の後、ISO 文書案の修正を行い、令和 6 年 3 月 21 日から 4 月 18 日までの 5 週間のコンサルテーションを再び実施した結果、返答のあった 24 名の WG メンバー中 3 名から 23 のコメントを得ることができた。当コメントに対する回答およびコメントを反映させた改訂文書案を、6 月にオーストラリアのケアンズで開催される ISO/TC 276/SC 1/WG 2 国際会議で提案し、NP 投票への移行について協議する予定である。

以下に、ISO 文書案に関するコンサルテーションで得られた代表的なコメントを抜粋し、その要点を示した。

【2024 年 6 月国際会議】

- iPS 細胞加工製品のみを対象に ISO 文書案は作成されているが、試験法や考え方は CAR-T 細胞製品といった *ex vivo* 遺伝子治療にも応用可能であるので、適用範囲を広げるべきである。

【国内コンサルテーション】

- 多能性幹細胞由来製品に限定したガイドラインとしない場合、形質転換細胞に関する記載を最初に論じた後で、未分化多能性幹細胞の残存リスクについて記載した方が良い。
- CAR-T 細胞製品などの浮遊培養細胞の形質転換の特性指標として、サイトカイン依存性増殖アッセイなどについて言及する。
- 投与細胞の調製方法について、検出感度を向上するため、マトリゲルの使用を推奨するとした方が良い（ヒト投与部位でない場合）。
- 自己 CAR-T 細胞製品など、分化細胞を starting material とする細胞製品については *in vivo* 造腫瘍性試験は一般的に不要との考えもあるため、試験実施の要否についてもコメントがあれば良い。
- 試験法の適格性評価/妥当性確認の項目について、定量試験の場合と限度試験の場合で、それぞれどの項目の確認が必要かを明記する。
- ゲノム不安定に関して、染色体レベルでの異常と塩基レベルでの異常は異なる概念なので、分けて書いた方がよい。

【2024 年 12 月国際会議】

- 造腫瘍性細胞として、未分化多能性幹細胞と形質転換細胞の 2 つが示されているが、これらが対になっている関係性が分かりにくい。
- タイトルが、未分化多能性幹細胞と形質転換細胞の検出となっているが、標準文書であるため幅広な表現にし、内容もそれに合わせるべきである。

【TC 276/SC 1/WG 2 コンサルテーション】

- オルガノイドにも適用可能であることを記載する。
- “Cellular therapeutic products”に関する用語と定義を追加する。
- CAR 製剤を投与された患者における二次性悪性腫瘍は、形質転換細胞や未分化細胞とは関連していないという観察結果も考慮すべきである。したがって、細胞治療薬中の未分化細胞や形質転換細胞の存在によって、腫瘍発生のリスクを完全に評価することはできない。
- 腫瘍形成細胞の定量は、その数が実際の腫瘍形成と関連していないため、あまり重要ではない。マトリックス・アプローチの必要性は、選択する試験法によって異なる。
- 細胞治療薬の使用目的は造腫瘍性とは無関係であるが、投与部位により、どの細胞マーカーが造腫瘍性に関連するか、また、どの遺伝子が造腫瘍性に関連するかを知ることができる。目的に適合したアッセイ法の設計は、例えば軟寒天コロニー形成法などの試験法の限界に基づいて行われる。

得られたコメントに対応した修正を行い、“General requirements and considerations for tumorigenic cell detection tests and tumorigenicity testing of cellular therapeutic product”「細胞治療製品の造腫瘍性細胞検出試験及び造腫瘍性試験に関する一般要求事項及び考慮事項」をタイトルとする文書案を作成した［The Table of Contents 目次］。2025 年 6 月に豪州ケアンズで開催される ISO/TC 276/SC 1/WG 2 国際会議で、NP 投票の移行を確認する予定である。

C-2 HESI CT-TRACS における国際連携活動

HESI CT-TRACS では、ステークホルダーによる細胞加工製品の造腫瘍性評価に関するポジションペーパーを既に公表しており、規制および技術的な観点から、国際的なコンセンサスの必要性と留意点について述べている（Sato *et al*., *Cytotherapy*, 2019）。その後、現在まで数々の未分化 iPS 細胞の検出手法が新たに報告されており、技術的な進展を反映させた総説を再度作成・公表する必要が生じた。新たに HESI CT-TRACS の枠組みで作成した総説は、多能性幹細胞由来製品の奇形腫形成リスク評価について、CT-TRACS でコンセンサスが形成された提言として取りまとめられた。まず多能性幹細胞由来製品の造腫瘍性について背景とリスクが概説されており、続いて製品に残存する未分化多能性幹細胞を評価する *in vivo* および *in vitro* アッセイについて、論文とし

て報告されている各種試験法の性能（手法、検体、試験期間（時間）、検出限界など）が整理され、情報がアップデートされている。実際に HESI CT-TRACS での国際実験コンソーシアムで実施された *in vitro* 試験法の多施設検証で得られた成果が述べられており、その実用性について考察している。また日米欧の多能性幹細胞由来製品の奇形腫形成評価に関連するガイドラインと規制当局の考え方についても考察が加えられている。この総説論文は、改訂を経て、2025 年 4 月に国際科学雑誌に受理された（Watanabe *et al*., *Cytotherapy*, in press. DOI: 10.1016/j.jcyt.2025.04.062）。著者の所属は、製薬企業、国立研究所、規制当局、非営利団体からなり、公平性に配慮がなされている。

C-3 ゲノム不安定性試験の性能評価

まず初めに、測定に用いる心筋分化細胞の調製を実施した。iPS 細胞を心筋細胞に分化するための分化プロトコールの検討を行い、STEMdiff™ Ventricular Cardiomyocyte Differentiation Kit（STEM CELL technologies 社）を採用した。また、残存する未分化細胞を除去する目的で、全工程 18 日間のうちの day14-16 においてグルコースを排除し乳酸を添加した培地で培養する工程を取り入れ、心筋分化プロトコールを確定した。分化後の細胞について、心筋細胞マーカーの抗 TNNT2 抗体を用いたフローサイトメトリー解析、また、分化後の細胞から Total RNA を抽出し qRT-PCR により心筋分化マーカー遺伝子（*GATA4*, *TNNT2*）と未分化マーカー遺伝子（*ESRG*, *LIN28A*）の測定を行い、分化効率を確認した。

次に、分化細胞から DNeasy® Blood & Tissue キット（Qiagen）を用いて gDNA を抽出し、KaryoStat および KaryoStat HD 解析を実施した。KaryoStat 解析はマイクロアレイの原理を応用した核型解析手法で、KaryoStat は 2MB 以上、KaryoStat HD は 25～50 kb の CNV を検出することが可能である。KaryoStat 解析の結果、1231A3 由来心筋細胞では CNV は検出されなかった（図 1）。一方、KaryoStat HD では、76 箇所の CNV（Gain: 54, Loss: 22）を検出した（図 2）。Saphyr 解析については、解析用 gDNA サンプルを調製するため、Saphyr サンプル調製用試薬キット（Bionano）を用いて 1231A3 由来心筋細胞を固定化後、以降の解析はアズワン社の受託解析に委託した。Saphyr は、配列特異的な Nickase で特異的なモチーフを蛍光ラベルしたゲノム DNA をナノチャネルアレイ上で整列させ、モチーフの出現パターンを画像解析することでゲノムマップを作成し（オプティカルゲノムマッピング）、1kb 以上の挿入や欠失だけでなく、繰り返し、逆位、転座を伴う複雑な構造変化を捉えることが可能な解析手法である。Saphyr 解析の結果、1231A3 由来心筋細胞では CNV を検出されなかった（図 3）

D．考察

D-1 国際標準原案の作成と提案

再生医療のような先端的な医療モダリテ

ィについては、安全性や品質の確保のための個別の評価技術の国際標準化を推進することが、規制当局の評価・意思決定の効率化・迅速化に有効である。既に国内で活用・運用されている造腫瘍性ガイドラインに基づき、日本での試験方法を国際標準化することで、主要国の規制当局の審査に関する国際規制調和が促進され、日本で実施した試験と評価がそのまま海外での承認審査でも活用され易くなることが期待される。

本事業では、ISO 標準化を目指して、iPS 細胞加工製品の造腫瘍性試験法の文書案を作成し、再生医療等製品の分析法に関する標準化を主に担っている ISO/TC 276/SC 1/WG 2 での国際会議に提案した。コンサルテーションでは、近年の CAR-T 細胞製品といった *ex vivo* 遺伝子治療製品やオルガノイドを利用した製品の開発の活発化を反映して、適用対象に含めることが助言された。したがって、細胞加工製品に共通する課題である形質転換細胞の検出を主にし、未分化細胞の検出においては多能性幹細胞由来製品に限定する書きぶりに修正した。国外での製品開発動向を勘案した上で、iPS 細胞由来製品以外の潜在的な造腫瘍性リスクがある遺伝子改変細胞製品も対象とした幅広な造腫瘍性試験の標準化文書が求められ、本規格に対する期待の大きさが伺われた。

本文書案は、*in vivo* 造腫瘍性試験の性能と限界についても述べており、世界の趨勢である動物試験代替法促進（3Rs）を促進するためにも、国際的な理解を得ていくことが重要である。細胞加工製品のヒトへの外挿性に乏しい *in vivo* 試験の代替となる *in vitro* 試験の推進に貢献するものと考える。また本文書案では、細胞加工製品の *in vivo* 造腫瘍性試験は通常、従来の医薬品の非臨床安全性試験のように安全係数を加味した用量の投与が不可能であるため、ヒトにおける製品の安全性を直接的に検討するために実施されるものではなく、むしろ特定の環境下で造腫瘍性を示す細胞を検出するための限度試験とみなされるべきであるとの画期的見解も述べられている。

この改訂文書案は、2025 年 6 月に開催される ISO/TC 276/SC 1/WG 2 国際会議で提案される予定である。NP 投票での審議がされた後に、各国のコンセンサスを得ながら、段階的に作業原案、委員会原案、国際規格案の策定・改訂作業を経て、最終国際規格案の承認を目指すことになる。

D-2 HESI CT-TRACS における国際連携活動

HESI CT-TRACS は、細胞治療のステークホルダーによって構成される国際的なネットワークであり、細胞治療の安全性を評価するために必要なツール、方法、知識の開発を推進することにより、細胞治療の臨床への移行を促進することをミッションとしている。これまで国立衛研は FIRM-CoNCEPT と共同して、HESI CT-TRACS をプラットホームとした国際実験コンソーシアムによる *in vitro* 造腫瘍性試験法の多施設検証を実施してきた。iPS 細胞由来心筋細胞をモデルにして、未分化 iPS 細胞の高感度検出試験法であるドロップレットデジタ

ル PCR（ddPCR）アッセイと Highly Efficient Culture（HEC）アッセイの多施設での性能評価を行って施設間差を明らかにし、試験法の性能パラメーターである室間再現精度、検出限界、偽陰性率などにより頑健性を示した（Yasuda et al., *Stem Cells Transl. Med.,* 2024; Watanabe et al., *Regen. Med.*, 2023）。HESI CT-TRACS で新たに公表した総説論文では、これらの *in vitro* アッセイ法は、従来の *in vivo* アッセイ法よりも有意に高感度であることを示唆している。多能性幹細胞由来細胞加工製品の潜在的な造腫瘍性リスクを評価する際は、より感度の高い有効な *in vitro* アッセイ法が確立された場合には、*in vivo* アッセイ法の代わりに *in vitro* アッセイ法を用いることが推奨される。

D-3 ゲノム不安定性試験の性能評価

KaryoStat，KaryoStat HD，Saphyr の 3 種類の CNV 測定法の性能を明らかにする目的で、1231A3 株由来心筋細胞の CNV 測定を実施した結果、KaryoStat HD でのみ CNV 異常が検出された。しかしながら、本 KaryoStat HD 解析において、測定 QC 項目の一つである Waviness SD 値（シグナル値のバラツキの大きさを示す）が 0.234 であり、QC 範囲（<0.2）を Pass しておらず、適正な解析が出来ていなかった。Copy number state を示す Smooth signal plot 図で確認したところ、KaryoStat HD で測定されたコピー数は KaryoStat に比べて明らかにバラツキが大きかった（図 4）。KaryoStat HD では、ヘテロな細胞の集団である固形腫瘍サンプルで Waviness SD や SNP QC がパスしないケースがあることが知られており、今回測定した iPS 細胞由来心筋細胞においても、心筋分化マーカーの発現を確認しているものの、抗 TNNT2 抗体陽性細胞は 42%であり、心筋細胞以外の分化細胞を含むヘテロな細胞集団であると考えられ、KaryoStat HD のシグナルのバラツキが大きくなった原因の一つと考えられた。一方で、KaryoStat と Saphyr の解析は QC を pass しており、両解析とも CNV は未検出であった。本研究で作製したサンプルの特殊性はあるが、KaryoStat HD でのみ検出された CNV 異常は測定方法によるアーチファクトである可能性が高いと考えられた。

我々は、先行研究において、未分化 iPS 細胞の細胞周期同調を行うことによりシグナルのバラツキを低減させ、Karyo Stat HD 解析の感度を向上させる検討を行っており、その結果、細胞周期の同調によって、Waviness SD 値が有意に低下（t-test、P<0.05）することを確認している。iPS 細胞由来分化細胞においても、測定前に細胞周期同調を行うことにより、Karyo Stat HD のシグナルのバラツキを低減させることが有用であると考えられた。

Saphyr 解析は、DNA 断片を増幅せずにダイレクトに画像解析するため、体細胞に比べて S 期の割合の高い未分化 iPS 細胞や増殖能が高くヘテロな細胞集団である iPS 細胞分化細胞の CNV 解析において非常に有効な解析手法であると考えられた。

E. 結論

本研究成果は、細胞加工製品の造腫瘍性とゲノム不安定性の評価方法の開発と検証を促進し、国際標準化を主導的に進めるものである。国際的な規制調和をもたらすことで、日本企業が国内開発する iPS 細胞加工製品の国際競争での優位性確保に資する。国際標準化に携わる人材育成に貢献するとともに、細胞加工製品の臨床応用における品質・安全性上の課題である造腫瘍性に関する種々の評価法の能力と限界についての国際的認知・科学的議論の深化に繋がり、ISO 国際標準プラットフォームでの審議化が強く望まれる。

＜参考文献＞

Sato Y, Bando H, Di Piazza M, Gowing G, Herberts C, Jackman S, Leoni G, Libertini S, MacLachlan T, McBlane JW, Pereira Mouriès L, Sharpe M, Shingleton W, Surmacz-Cordle B, Yamamoto K, van der Laan JW. Tumorigenicity assessment of cell therapy products: The need for global consensus and points to consider. *Cytotherapy* 2019; 21:1095-1111. Doi: 10.1016/j.jcyt.2019.10.001.

Watanabe T, Yasuda S, Chen CL, Delsing L, Fellows MD, Foldes G, Kusakawa S, Mouriès LP, Sato Y. International evaluation study of a highly efficient culture assay for detection of residual human pluripotent stem cells in cell therapies. *Regen Med.* 2023; 18(3):219-227. Doi: 10.2217/rme-2022-0207.

F. 研究危険情報

なし

G．研究発表

G-1 論文発表

1. Watanabe T, Shu S, del Rio-Espinola A, Ferreira JR, Bando K, Lemmens M, Pande P, de Wolf C, Chen CL, Elke E, Rao GK, van den Hoorn T, Pereira Mouriès L, Myers MB, Yasuda S. Evaluating teratoma formation risk of pluripotent stem cell-derived cell therapy products: a consensus recommendation from the Health and Environmental Sciences Institute's International Cell Therapy Committee. *Cytotherapy*, in press. DOI: 10.1016/j.jcyt.2025.04.062

2. Sawada R, Kusakawa S, Kusuhara M, Tanaka K, Miura T, Yasuda S, Sato Y. Increasing robustness of *in vitro* assay for immnosuppressive effect of mesenchymal stromal/stem cells: The role of inflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. (2025) *Regen Ther.* 28, 321-332. DOI: 10.1016/j.reth.2024.12.016

3. Fujita E, Yamamoto S, Hanada T, Jogasaki S, Koga Y, Yatsuda Y, Kakizaki Y, Jo Y, Asano Y, Yonezawa K, Moriya Y, Nakayama M, Arimura Y, Okawa Y, Komatsu H, Ito M, Suzuki S, Kuroda T, Yasuda S, Kamiyama Y, Sato Y. Using qPCR and ddPCR to study biodistribution of cell therapy products: a multi-site evaluation. (2025) *Cytotherapy* 27(1), 51-65. DOI: 10.1016/j.jcyt.2024.09.003

4. Yasuda S, Bando K, Henry MP, Libertini S, Watanabe T, Bando H, Chen C, Fujimori K, Harada K, Kuroda T, Lemmens M, Marginean D, Moss D, Pereira Mouriès L, Nicholas NS, Smart MJ, Terai O, Sato Y. Detection of residual pluripotent stem cells in cell therapy products utilizing droplet digital PCR: an international multisite evaluation study. (2024) *Stem Cells Transl. Med.* 13(10), 1001-1014. DOI: 10.1093/stcltm/szae058

5. Watanabe T, Yasuda S, Kusakawa S, Kuroda T, Furukawa H, Futamura M, Shimizu S, Morishita A, Hata S, Koeda A, Komatsu K, Sato Y. Multisite studies for optimization of a highly efficient culture assay used for *in vitro* detection of residual undifferentiated human pluripotent stem cells intermingled in cell therapy products. (2024) *Regen Ther.* 26, 315-323. DOI: 10.1016/j.reth.2024.06.007

6. 安田 智　レギュラトリーサイエンス教材ポイントシリーズ―細胞加工製品の造腫瘍性評価の考え方と試験法（2024）*PHARM TECH JAPAN* 40(7), 88-90.

G-2 学会発表

1. 平井 孝昌、河野 健、安田 智　次世代シーケンサーによるウイルス検出における核酸分解酵素の有用性評価　日本薬学会第145年会（福岡）2025年3月27日

2. 草川 森士、楊 婷舒、澤田 留美、佐藤 陽治、安田 智　形質転換細胞検出を目的としたin vitro評価系の最適化　第24回日本再生医療学会総会（横浜）2025年3月21日

3. 黒田 拓也、松山 さと子、佐藤 陽治、安田 智　TP53変異ヒトiPS細胞を用いた細胞加工製品のゲノム不安定性評価に関する研究　第24回日本再生医療学会総会（横浜）　2025年3月21日

4. 澤田 留美、草川 森士、楠原 美香、井上 玲菜、三浦 巧、安田 智、佐藤 陽治　Quality by Design（QbD）アプローチにおける重要品質特性としての間葉系幹細胞免疫調節能評価法の安定性の検討　第24回日本再生医療学会総会（横浜）　2025年3月21日

5. 三浦 巧、高野 慈美、河野 掌、草川 森士、黒田 拓也、平井 孝昌、西村 仁孝、山元 智史、石黒 斉、澤田 留美、石井 明子、佐藤 陽治、安田 智　細胞外小胞（EV）製剤製造用細胞基材の品質特性の探索に関する研究　第 24 回日本再生医療学会総会（横浜）　2025 年 3 月 20 日

6. 平井 孝昌、片岡 清子、佐藤 陽治、安田 智、河野 健　ゲノム解析による感染性ブタ内在性レトロウイルスの同

定　第24回日本再生医療学会総会(横浜)　2025年3月22日

7. 田中 健二郎、椎名 健、平井 孝昌、草川 森士、河野 健、安田 智、加藤 竜司　深層学習を用いたウィルス誘発性細胞障害効果の検出　化学工学会第90回年会（東京）2025年3月12-14日

8. Yasuda S. Japan's regulatory perspective of quality and safety of hPSC-derived cell therapy products. PSConf 2024, Beijin, China (Virtual), Oct. 31, 2024.

9. Yasuda S. Challenges for evaluating tumorigenicity of hPSC-derived cell therapy products. PSConf 2024, Beijin, China (Virtual), Oct. 30, 2024.

10. Miura T, Takano M, Hirai T, Kuroda T, Kusakawa S, Sawada R, Ishii-Watabe A, Sato Y, Yasuda S. Approach to understand the correlation between the functions of extracellular vesicles and the properties of their cell sources. ISCT Europe 2024 Regional Meeting, Sweden, Sep. 4-6, 2024.

11. 黒田 拓也、松山 さと子、佐藤 陽治、安田 智　多能性幹細胞加工製品のゲノム不安定性評価法に関する研究　第10回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム（草津）2024年9月21日

12. Kuroda T, Matsuyama S, Ohtake F, Sato Y, Yasuda S. Functional analysis of SALL3 in the regulation of differentiation propensity of human iPS cells. 2024 ISSCR Annual Meeting, Hamburg, July 10-13, 2024.

13. Yasuda S. Challenges in the practical application of cell therapy products derived from iPS/ES cells. 2024 KSCPT Spring Meeting & The 17th KSCPT-JSCPT Joint Symposium, Jeju-si, Apr. 26, 2024.

14. 安田 智　再生医療等製品の実用化において取り組むべき課題 京浜臨海部ライフイノベーション国際連略総合特区推進セミナー「再生医療の実用化に向けて」（Web開催）2025年1月21日

15. 安田 智　再生医療製品の品質評価法の開発と標準化に向けた取り組み　第58回Tonomachi Café（川崎）2024年6月28日

H．知的財産権の出願・登録状況

H-1. 取得特許

なし

H-2. 実用新案登録

なし

H-3. その他

なし

The Table of Contents 目次

Biotechnology－Analytical methods－

バイオテクノロジー－分析法－

General requirements and considerations for tumorigenic cell detection tests and tumorigenicity testing of cellular therapeutic product

細胞治療製品の造腫瘍性細胞検出試験及び造腫瘍性試験に関する一般要求事項及び考慮事項

Introduction 前書き

1. Scope 適用範囲

2. Normative references 引用規格

3. Terms and definitions 用語及び定義

4. Symbols and abbreviated terms 記号及び略語

5. General concepts of tumorigenicity evaluation 造腫瘍性評価の一般的概念

5.1 Consideration of tumorigenicity testing 造腫瘍性試験の考慮事項

6. Design of fit-for-purpose test methods for evaluating tumorigenicity 造腫瘍性評価のための目的適合性のある試験法デザイン

6.1 General concepts 一般的概念

6.2 Design of fit-for-purpose test methods 目的適合性のある試験法デザイン

6.3 Design of a matrix for test method 試験法マトリックスのデザイン

6.4 Documentation of test method procedure 試験法手順の文書化

7. Analytical method qualification, validation and continued validation 分析法の適格性評価、妥当性確認及び継続性検証

7.1 General 一般

7.2 Analytical method qualification 分析法の適格性評価

7.3 Analytical method validation and continued verification 分析法の妥当性確認及び継続性検証

7.3.1 Validation 妥当性確認

7.3.2 Continued verification 継続性検証

8. Tumorigenicity-related tests for human cellular therapeutic products ヒト細胞治療製品の造腫瘍性関連試験法

8.1 General 一般

8.2 Tests to detect tumorigenic cells in a product 製品中の造腫瘍性細胞を検出する試験

8.2.1 General 一般

8.2.2 Tests to detect transformed cells in a product 形質転換細胞を検出する試験

8.2.3 Tests to detect undifferentiated pluripotent stem cells in a product 未分化多能性幹細胞を

検出する試験
8.2.4 Tests to detect tumorigenic cells (transformed cells and undifferentiated pluripotent stem cells) in a product 造腫瘍性細胞(形質転換細胞と未分化多能性幹細胞)を検出する試験
8.3 Tests to evaluate the tumor-forming ability of product cells at the engraftment site in humans ヒトでの生着部位における製品細胞の腫瘍形成能を評価するための試験
8.3.1 General 一般
8.3.2 Selection of test animals 試験動物の選択
8.3.3 Selection of control cells 対照細胞の選択
8.3.4 Number and sex of test animals 試験動物の数と性別
8.3.5 Administration site of the test specimen, number of cells in specimens, and morphology of the specimen 検体の投与部位、検体中の細胞数および検体の形態
8.3.6 Observation period 観察期間
8.3.7 Observation of administration site 投与部位の観察
8.3.8 Histological evaluation of the administration site, identification of the administered human cells and confirmation of the engraftment, and histological evaluation indicating the degree of differentiation 投与部位の組織学的評価、投与部位でのヒト細胞の同定や生着の確認、分化度の組織学的評価
8.3.9 Interpretation of results 結果の解釈
9 General Considerations for Genomic Stability ゲノム安定性に関する一般的留意点
10 Reporting 報告
10.1 General 一般
10.2 General requirements 一般的要求事項
Annex A (informative) Examples of detection and quantification methods for intermingled transformed cells 混在する形質転換細胞の検出・定量法の例
Annex B (informative) Examples of detection and quantification methods for intermingled ESCs/iPSCs 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出・定量法の例
Annex C (informative) Examples of tumorigenicity-related tests for PSC-derived CTPs assessed in non-clinical studies 非臨床試験で評価される PSC 由来細胞治療製品の造腫瘍性関連試験の例
Bibliography 参考文献