

日薬連発第 525 号  
2019 年 6 月 28 日

加盟団体 殿

日本製薬団体連合会

**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ガイドラインについて**

標記の通知を、各都道府県衛生主管部（局）長宛てに通知した旨の通知が、厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長より当連合会会長宛てにありましたので送付いたします。

つきましては、貴会会員への周知方宜しくお願いいたします。

記

令和元年 6 月 27 日付け

○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ガイドラインについて

厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長  
薬生機審発 0627 第 3 号



薬生機審発0627第3号  
令和元年6月27日

日本製薬団体連合会会長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長



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ガイドラインについて

標記について、別添写しのとおり各都道府県衛生主管部（局）長宛てに通知  
しましたので、貴会会員への周知方御配慮願います。



写

薬生機審発0627第1号  
令和元年6月27日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長  
（ 公 印 省 略 ）

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ガイドラインについて

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、代表的検出試験例及び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すガイドラインを、別紙のとおり作成しましたので、貴管下関係業者等に対し周知方御配慮願います。

なお、本ガイドラインは、現時点における科学的知見に基づく基本的考え方をまとめたものであり、学問上の進歩等を反映した合理的根拠に基づいたものであれば、必ずしもここに示した方法を固守するよう求めるものではありません。

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

目次	頁
1. はじめに	1
2. 本文書の位置づけ	2
3. 用語の定義	2
4. 一般的留意点	3
5. ヒト ES/iPS 細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験	4
5.1. 原料・原材料の品質特性評価・品質管理のための造腫瘍性試験	4
5.2. 中間製品又は最終製品の造腫瘍性細胞の混在を評価するための試験	4
5.2.1. 中間製品・最終製品の未分化多能性幹細胞検出試験	4
5.2.1.1. <i>in vitro</i> 試験	4
5.2.1.2. <i>in vivo</i> 試験	5
5.2.2. 中間製品・最終製品の形質転換細胞検出試験	6
5.2.2.1. <i>in vitro</i> 試験	6
5.2.2.2. <i>in vivo</i> 試験	7
5.3. 最終製品細胞のヒトにおける生着部位での腫瘍形成能を評価するための試験	9
5.3.1. 試験動物の選択	10
5.3.2. 対照細胞の選択	10
5.3.3. 試験動物の数と性別	11
5.3.4. 試験検体の投与部位と検体中の細胞数及び検体の形態	11
5.3.5. 観察期間	12
5.3.6. 投与部位の観察	13
5.3.7. 病理学的評価	13
5.3.8. 結果の解釈	13
6. ヒト体細胞／体性幹細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験	14
6.1. 原料・原材料の品質特性評価・品質管理のための造腫瘍性試験	14
6.2. 最終製品のための造腫瘍性関連試験の留意点	14
7. 遺伝的安定性に関する一般的留意点	15
参考文献	16
表 1 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出法の詳細	19
表 2 混在する形質転換細胞の検出法の詳細	21
参考情報（各種試験法プロトコール）	22

## 1. はじめに

再生医療等製品（「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」（昭和35年法律第145号）第2条第9項に規定する「再生医療等製品」をいう。以下同じ。）のうち、ヒト細胞加工製品の品質及び安全性を確保するための基本的な技術要件は、「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ついて」（平成20年2月8日付け薬食発第0208003号厚生労働省医薬食品局長通知。以下「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）及び「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ついて」（平成20年9月12日付け薬食発第0912006号厚生労働省医薬食品局長通知。以下「ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）に定められているところである。また、ヒト細胞加工製品の中でも、ヒト幹細胞加工製品の品質及び安全性の確保については、「ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成24年9月7日付け薬食発第0907第2号厚生労働省医薬食品局長通知）、「ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成24年9月7日付け薬食発第0907第3号厚生労働省医薬食品局長通知）、「ヒト（自己）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成24年9月7日付け薬食発第0907第4号厚生労働省医薬食品局長通知）、「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成24年9月7日付け薬食発第0907第5号厚生労働省医薬食品局長通知）及び「ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成24年9月7日付け薬食発第0907第6号厚生労働省医薬食品局長通知）（以下「ヒト幹細胞加工医薬品等5指針」と総称する。）にも定められているところである。

ヒト細胞加工製品に特有の安全性関連リスクとしては、製品中に混在する形質転換細胞に起因する腫瘍形成のリスクがある。また、ヒト胚性幹細胞加工製品（以下「ヒトES細胞加工製品」という。）やヒト人工多能性幹細胞加工製品（以下「ヒトiPS細胞加工製品」という。）のようにテラトーマ形成能を固有の性質とするヒト多能性幹細胞を原料とする場合には、最終製品に残存する未分化な多能性幹細胞に起因する腫瘍形成のリスクもある。すなわち、ヒト細胞加工製品中に混在する形質転換細胞及び未分化な多能性幹細胞等の造腫瘍性細胞はハザードであり、その存在量及び種類の情報を把握することは、ヒト細胞加工製品の品質及び安全性の確保において重要である。本文書は、ヒト細胞加工製品の品質及び安全性を非臨床的に評価する際に参考とすべき事項及び留意点のうち、特に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すものである。

## 2. 本文書の位置づけ

本文書は、技術開発の著しい多種多様なヒト細胞加工製品中に混在する可能性がある造腫瘍性細胞の検出を対象とするものである。また、検出試験そのものの開発や技術革新も日進月歩である。したがって、留意すべき事項を網羅的に示したのではなく、現時点で考えられる点について可能な限り示しているに過ぎず、今後の更なる技術革新や知見の集積等を踏まえ改訂されるものであり、そのまま製造販売承認申請において適用されるべきとの拘束力を有するものではない。また、本文書は各試験の特徴・性能を整理したものであって、開発段階のどのステージに適用すべきかを明示するものではない。

製品の評価に当たっては、個別の製品の特性を十分理解した上で、科学的な合理性・妥当性をもって柔軟に対応することが必要である。本文書で提示された試験法やその詳細についても、試験の目的に合うよう一部改変することや、省略することも、その科学的な合理性・妥当性が示されればむしろ奨励される。なお、本文書のほか、国内外の他の関連ガイドラインを参考にすることも考慮すべきである。

## 3. 用語の定義

本文書における用語の定義は、ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針、ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の指針、ヒト幹細胞加工医薬品等 5 指針の定義によるほか、以下のとおりとする。

- 1) 造腫瘍性 (tumorigenicity) : 動物に移植された細胞集団が増殖することにより、悪性又は良性の腫瘍を形成する能力のこと。生理活性物質又は化学物質が細胞を不死化して悪性又は良性の腫瘍を誘発する能力 (腫瘍原性、oncogenicity) や、生理活性物質又は化学物質が細胞を不死化して悪性腫瘍を誘発する能力 (がん原性、carcinogenicity) とは区別される。なお、本文書では、ES/iPS 細胞 (製品中では未分化 ES/iPS 細胞と称する) や腫瘍を形成するおそれのある形質転換細胞は動物試験での実証の有無にかかわらず造腫瘍性細胞として取り扱う。
- 2) 細胞基材 : 微生物細胞又はヒト若しくは動物由来の細胞で、ヒトを対象に *in vivo* 又は *ex vivo* で投与される生物製剤 (再生医療等製品を含む) を生産する上で必要な能力を有するもの (「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」について) (平成 12 年 7 月 14 日付け医薬審第 873 号厚生省医薬安全局審査管理課長通知) 参照)。
- 3) セル・バンク : 均一な組成の内容物をそれぞれに含む相当数の容器を集めた状態で、一定の条件下で保存しているもの。個々の容器には、単一の細胞プールから分注された細胞が含まれている (「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」について) 参照)。
- 4) 原材料 : 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 (「生物由来原料基準」(平成 26 年厚生労働省告示第 375 号) 参照)。

- 5) 中間製品：製造の中間工程で造られたものであって、以後の製造工程を経ることによって製品となるもの（「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」（平成26年厚生労働省令第93号。以下「GCTP省令」という。）参照）。
- 6) 腫瘍：細胞が生体内の制御に反して自律的に過剰に増殖することによってできる組織。「悪性腫瘍」又は「良性腫瘍」に分けられる。
- 7) テラトーマ（奇形腫）：2胚葉性成分又は3胚葉性成分を有する胚細胞性腫瘍。「成熟奇形腫」と「未熟奇形腫」がある。
- 8) 悪性腫瘍：腫瘍の中でも特に浸潤性を有し、遠隔部へ転移するなど悪性を示すものを指す。
- 9) がん：平仮名の「がん」は、「癌」、「肉腫」及び「白血病」などの血液悪性腫瘍も含めた広義の悪性腫瘍を指す。漢字で表記する「癌」は、悪性腫瘍のなかでも特に上皮由来の「癌腫（上皮腫）」のことを指す。「肉腫」とは非上皮性の結合組織、筋、内皮細胞等に由来する悪性腫瘍である。
- 10) 腫瘤：発生原因に関わらず、体表や体内で確認された何らかの塊。いわゆる「しこり」や「こぶ」を指す。腫瘤と腫瘍の違いについては、腫瘤は膿瘍なども含む「形態」であり、腫瘍は細胞が増殖した「病態」である。
- 11) 形質転換細胞：不死化や悪性化など、造腫瘍性に関連した形質転換が生じた細胞を指す。
- 12) 製品細胞：製品に含まれる細胞
- 13) 最終製品細胞：最終製品に含まれる細胞
- 14) ハザード：危害の潜在的な原因。危害は、健康への被害を指す。（「品質リスクマネジメントに関するガイドライン」（平成18年9月1日付け薬食審査発第0901004号及び薬食監麻発第0901005号厚生労働省医薬食品局審査管理課長及び監視指導・麻薬対策課長連名通知）参照）
- 15) リスク：危害の発生の確率とそれが発生したときの重大性の組み合わせ。重大性は、ハザードから生じうる結果の大きさを指す。（「品質リスクマネジメントに関するガイドライン」参照）

#### 4. 一般的留意点

ヒト細胞加工製品の出発原料の種類は、体細胞、体性幹細胞、ES細胞、iPS細胞など、多岐にわたる。さらに、出発原料細胞の由来については、自己又は同種、同種のうちではHLAホモ接合型又はそれ以外など、様々な分類が想定される。ヒト細胞加工製品は構造又は剤形（例：細胞懸濁液、細胞シート等）も多様であり、その臨床適用に際して必要な細胞数も製品ごとに異なる。その上、適用の経路、適用部位、免疫抑制剤の使用の有無、患者の病状の緊急性等についても、様々なケースが想定される。したがって、個別製品における造腫瘍性のリスク評価とリスク管理においては、各試験法の能力と限界を科学的に理解した上で、総

合的な考察を行うこと。

## 5. ヒト ES/iPS 細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験

ヒト胚性幹細胞加工製品又はヒト人工多能性細胞加工製品（ヒト ES/iPS 細胞加工製品）の製造における造腫瘍性関連試験には、目的別に、①原料・原材料の品質特性評価・品質管理のための造腫瘍性試験、②中間製品又は最終製品の造腫瘍性細胞の混在を評価するための試験、③最終製品細胞のヒトにおける生着部位での腫瘍形成能を評価するための試験、の3種類がある。①、②、③の試験については、それぞれ5.1、5.2、5.3項で述べる。特にこれらのうち②の例として、いくつかの *in vitro* 試験法又は *in vivo* 試験法を表1及び表2に例示した。造腫瘍性の評価においては、各試験法の原理を理解し、検出限界等の性能を確認した上で、試験法を取捨選択し、目的に応じた評価系をデザインすること。

### 5.1. 原料・原材料の品質特性評価・品質管理のための造腫瘍性試験

ヒト ES/iPS 細胞加工製品を製造するための細胞基材として、ヒト ES 細胞又はヒト iPS 細胞のセル・バンクを樹立した際に、セル・バンク中の細胞の増殖性と多能性を検証するためにテラトーマ形成能による造腫瘍性を確認することがある。この際の造腫瘍性試験に当たっては、世界保健機関（WHO）の生物薬品標準化専門委員会第61次報告（Technical Report Series No. 978（WHO TRS 978）平成25年）の Annex 3<sup>1</sup>が参考になる。

### 5.2. 中間製品又は最終製品の造腫瘍性細胞の混在を評価するための試験

ヒト ES/iPS 細胞加工製品の中間製品又は最終製品となる細胞集団には、目的細胞又はその前駆細胞に加え、未分化なヒト ES/iPS 細胞及びその他の目的外細胞が混在している可能性がある。ヒト ES/iPS 細胞はテラトーマ形成能による造腫瘍性を元来の特性として保持していることから、中間製品又は最終製品における未分化ヒト ES/iPS 細胞の混在量を、腫瘍を形成するおそれのある目的外細胞である形質転換細胞の混在量とともに品質特性（造腫瘍性細胞の混在）として評価し、管理することが必要である。

#### 5.2.1. 中間製品・最終製品の未分化多能性幹細胞検出試験

##### 5.2.1.1. *in vitro* 試験

中間製品又は最終製品の中に混在する未分化ヒト ES/iPS 細胞に関しては、ヒト ES/iPS 細胞の分子マーカー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<sup>2,3</sup>、及び培養上清中の H3+ポドカリキシンを検出する方法<sup>4</sup>、ラミニン 521 によるヒト多能性幹細胞直接培養増幅法<sup>5</sup>などが挙げられる。ただし、使用する分子マーカーの妥当性は、試験対象となる細胞種ごとに予め確認しておく必要がある。例えば *LN28* は様々な正常ヒト分化細胞・ヒト組織において発現が認められず、優れたヒト ES/iPS 細胞のマーカーと考えられているが<sup>2,3</sup>、ヒト iPS 細胞から間葉系幹細胞への分

化誘導においては、iPS 細胞マーカーとしての特異性は高くないことが知られている<sup>5</sup>。なお、ヒト ES/iPS 細胞は酵素処理等により単細胞にまで分散するとアポトーシスを起こす性質をもつため、軟寒天コロニー形成試験により混在する未分化なヒト ES/iPS 細胞を検出することはできない<sup>2</sup>。

#### 5.2.1.2. *in vivo* 試験

製品中の未分化ヒト ES/iPS 細胞の混在は、適切な細胞特性指標を用いて *in vitro* 試験で検査し、評価することが望ましい。ただし、製品における未分化ヒト ES/iPS 細胞の混在量は、免疫不全動物での造腫瘍性を指標にして評価することも必須ではないが可能である。免疫不全動物としては、NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Sug/Jic</sup> マウス (以下「NOG マウス」という。)<sup>6</sup>、NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl/SzJ</sup> マウス (以下「NSG マウス」という。)<sup>7</sup> などの重度免疫不全マウス系統が挙げられる。これらのマウスは T 細胞、B 細胞及び NK 細胞を欠失しており、ヌードマウスと比べてヒトの細胞や組織の生着性が高い<sup>8,9,10</sup>。C.Cg-Rag2<sup>tm1Fwa</sup> Il2rg<sup>tm1Sug/Jic</sup> マウス (以下「BRG マウス」という。) も T 細胞、B 細胞及び NK 細胞を欠失した系統だが、ヒト造血幹細胞の生着性が NOG マウスや NSG マウスよりも低いことが知られている<sup>11,12</sup>。SCID マウスや NOD/SCID マウスについては、自然発生的な胸腺腫が見られるため、長期観察が必要となる造腫瘍性試験目的では、使用を推奨しない。WHO TRS 978 で推奨されるヌードマウスを用いる方法は、僅かに残存する未分化ヒト ES/iPS 細胞を検出するには感度が低く、結果が偽陰性になってしまう恐れがあるため、製品の未分化ヒト ES/iPS 細胞の混在を評価する目的には適さない<sup>10</sup>。投与部位については、手技が簡単で、手技熟練度による結果のバラツキを防げること、多くの製品細胞を投与することが可能であること、かつ、容易に腫瘍形成の時間経過を観察することができることから、背部皮下が一般的に用いられる。投与部位の観察方法に関しては、5.3.6.項を参考にすること。

製品細胞に混在する未分化ヒト ES/iPS 細胞を定量化するのみの目的で *in vivo* 試験を実施することは例外的と考えられるが、仮にそうした目的のために試験するには、陽性対照細胞の同等な条件 (投与部位・方法) での細胞移植による試験の設定が、製品細胞の試験時又は事前検討において必須である。陽性対照細胞としては、製品中の未分化ヒト ES/iPS 細胞の残存を対象とするのであれば、一般に、製品細胞に混在する可能性が考えられる製品の製造用細胞基材である未分化ヒト ES/iPS 細胞を用いる。製品細胞を投与する際には、細胞をマトリゲルに懸濁して投与した方が検出感度は高くなる<sup>8,10,13,14</sup>。なお、ヒト ES/iPS 細胞はトリプシン処理等による単一細胞への分散によりアポトーシスを起こす性質を持つため、マウスへの投与時にはこれを防ぐ対策が必要である。分散誘導性アポトーシス防止策としては、トリプシン処理等を行わずに製品を投与する方法以外に、トリプシン処理等により分散した製品細胞を ROCK 阻害薬及びヒト新生児由来線維芽細胞とともにマトリゲルに懸濁して投与する<sup>15,16</sup> などの方法がある。製品細胞の移植では、実際の臨床応用時の細胞用量を勘案し、移植行為自体もアーチファクトが生じない範囲で、できるだけ多くの製品細胞を移植

することが望ましい。また試験動物の数は、移植行為の難易度や試験動物の生存率等を考慮した上で設定する。1群につき最終評価可能な匹数として10匹以上で実施することが望ましいが、1群につき最終評価可能な匹数として最低でも6匹以上で実施すれば、定量的測定項目におけるデータのバラツキが母集団のバラツキを概ね反映していると考えられる。

陽性対照細胞と同様な未分化ヒトES/iPS細胞の残存を想定した上で試験を行うので、製品細胞の投与時に使用する培地は、ヒトに投与する際に用いられるものよりも陽性対照細胞の増殖に適したものが利用可能ならば、それを使用する。

中間製品又は最終製品における未分化ヒトES/iPS細胞の混在量を評価するために、製品細胞又は陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞に未分化ヒトES/iPS細胞をスパイクした陽性対照群を設定することが必要である。陰性対照群については、陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞の入手と利用の可能性を勘案して、その設定の可否を検討する。試験時又は事前に検討する陽性対照群においては、異なる用量の未分化ヒトES/iPS細胞を含む細胞試料を移植した複数の群を設定し、最低腫瘍形成用量 (TPD<sub>min</sub> : minimum tumor-producing dose) と腫瘍出現までの期間を確認する必要がある。観察期間については、陽性対照群の中のTPD<sub>min</sub>における腫瘍形成確率が一定値に達する時点を超えて十分超える期間とする。

なお、未分化ヒトES/iPS細胞の混在を評価することが目的の場合には、試験系の精度向上のために片性の動物のみを使用することも許容されうる。

TPD<sub>min</sub>における腫瘍形成確率をもとに、被験製品から得られた結果が偽陰性である確率を求めておくこと。なお、TPD<sub>min</sub>以上の混在がないことを統計学的確からしさとともに示すための匹数の設定方法も知られている<sup>8</sup>。その他の技術的な詳細については、5.3.6.項を参考にすること。

なお一般には、未分化ES/iPS細胞検出 *in vivo* 試験は、中間製品・最終製品の形質転換細胞検出試験 (5.2.2.2.項) を兼ねて実施するのが現実的である。

## 5.2.2. 中間製品・最終製品の形質転換細胞検出試験

### 5.2.2.1. *in vitro* 試験

中間製品又は最終製品の中に混在する形質転換細胞に関しては、既定の培養期間を超えた細胞の増殖特性解析による不死化した形質転換細胞検出<sup>17,18</sup>や、軟寒天コロニー形成試験<sup>2,8</sup>又はデジタル軟寒天コロニー形成試験<sup>19</sup>による足場非依存性増殖細胞 (悪性形質転換細胞) の検出などによって評価が可能である。ただし、臨床での製品使用時には、いずれの *in vitro* 試験でも検出困難な形質転換細胞の存在の可能性を考慮したうえでリスク評価を行うこと。

細胞増殖特性解析は、形質転換により不死化した細胞を、悪性度の有無にかかわらず検出することのできる試験である。一方、デジタル軟寒天コロニー形成試験は、高い感度で形質転換細胞を検出することができる試験であるが、検出できるのは足場非依存性増殖能を持つ細胞、すなわち悪性度の高い形質転換細胞に限られる。

いずれにしても、中間製品又は最終製品における形質転換細胞の混在量を評価するために、陽性対照細胞とする造腫瘍性形質転換細胞を設定する。また試験を行う際には、製品細胞又は陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞に陽性対照細胞をスパイクした陽性対照群を設ける。被験製品中の形質転換細胞の混在量は、混在しうる形質転換細胞の造腫瘍性を陽性対照細胞と同等と仮定したうえで定量化することができる。混在する可能性のある形質転換細胞の特性があらかじめ推定されており、かつ、これに類似する表現型を示す細胞株が利用可能な場合以外は、腫瘍形成能が良く研究され認知されている HeLa 細胞等を陽性対照細胞として使用する。なお、陽性対照細胞には、適切に品質管理された細胞提供機関から入手した細胞株を使用することが望ましい。

これらの既存の *in vitro* 試験で設定された培養条件で製品細胞が培養できない場合であつて、中間製品又は最終製品の中に混在する形質転換細胞に特徴的な遺伝子や分子を同定することが可能な場合は、種々のバリデーション試験を実施した上で培養をせずに、分子生物学的に混在が定量化できるような検出系の設定を行うことが考えられるが、極めて個別的な試験となるので、一般的技術要求とすることや標準法を本文書で示すことはできない。

#### 5.2.2.2. *in vivo* 試験

製品中の腫瘍形成能を持つ形質転換細胞の混在は、適切な細胞特性指標を用いて *in vitro* 試験で検査し、評価することが望ましい。ただし、製品における形質転換細胞の混在量は免疫不全動物での造腫瘍性を指標にして評価することも必須ではないが可能である。免疫不全動物としては、NOG マウス<sup>6</sup>、NSG マウス<sup>7</sup>などの重度免疫不全マウス系統が挙げられる。これらのマウスは T 細胞、B 細胞及び NK 細胞を欠失しており、ヌードマウスと比べてヒトの細胞や組織の生着性が高い<sup>8,9,10</sup>。トリプシン処理などにより分散した製品細胞を投与する場合には、細胞をマトリゲルに懸濁して投与した方が検出感度は高くなる<sup>8,10,13,14</sup>。BRG マウスも T 細胞、B 細胞及び NK 細胞を欠失した系統だが、ヒト造血幹細胞の生着性が NOG マウスや NSG マウスよりも低いことが知られている<sup>11,12</sup>。SCID マウスや NOD/SCID マウスについては、自然発生的な胸腺腫が見られるため、長期観察が必要となる造腫瘍性試験目的では使用を推奨しない。WHO TRS 978 で推奨されるヌードマウスを用いる方法も、僅かに混在する形質転換細胞を検出するには感度が低く、結果が偽陰性になってしまう恐れがあるため、本項の目的には適さない<sup>8, 10</sup>。

中間製品又は最終製品における形質転換細胞の混在量を評価する際には、陽性対照細胞とする形質転換細胞を設定する必要がある。すなわち、陽性対照細胞を製品細胞又は陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞にスパイクした陽性対照群を設定し、製品細胞の試験時又は事前検討において、その造腫瘍性を確認する。設定した陽性対照群においては、異なる用量の陽性対照細胞を含む細胞試料を移植した複数の群を設定し、TPD<sub>min</sub> と腫瘍出現までの期間をあらかじめ確認しておく。このような検討を行うことにより、製品細胞中の形質転換細胞の定量的評価が可能となる。

混在する可能性のある形質転換細胞の特性があらかじめ推定されており、かつこれに類似する表現型を示す細胞株が利用可能である場合以外は、腫瘍形成能が良く研究され認知されている HeLa 細胞等を陽性対照細胞として使用する。用量の異なる陽性対照細胞をスパイクした陽性対照群を設定し、陽性対照細胞の  $TPD_{min}$  を事前に評価しておく。算出される形質転換細胞の混在量は、あくまで混在しうる形質転換細胞の造腫瘍性を陽性対照細胞と同等と仮定したうえで定量化されたものであることに注意すること。なお、陽性対照細胞には、適切に品質管理された細胞提供機関から入手した細胞株を使用することが望ましい。

投与部位については、手技が簡単で、手技熟練度による結果のバラツキを防げること、多くの製品細胞を投与することが可能であること、かつ、容易に腫瘍形成の時間経過を観察することができることから、背部皮下が一般的に用いられるが、臨床上の移植経路や移植部位と造腫瘍性との関連について特に関心が高い場合（5.3 項参照）には、可能な範囲で臨床適用と同様とすることを考慮する。投与部位の観察方法に関しては、5.3.6.項を参考にすること。

試験時又は事前検討において、陽性対照群の中で腫瘍形成が認められる  $TPD_{min}$  を確認するとともに、陽性対照群の中の  $TPD_{min}$  における腫瘍形成確率が一定値に達する時点を超えた時点まで観察する。その際、移植した動物の 50% に腫瘍が出来る用量 ( $TPD_{50}$ : tumor-producing dose at the 50% end-point)<sup>1</sup> を算出しておくことも有用である。 $TPD_{50}$  値は陽性対照細胞の造腫瘍性を定量的に示す指標であり、製品細胞中の形質転換細胞の造腫瘍性を議論する際の比較対象となる。試験動物の数は、移植行為の難易度や試験動物の生存率等を考慮した上で設定する。1 群につき最終評価可能な匹数として 10 匹以上で実施することが望ましいが、1 群につき最終評価可能な匹数として最低でも 6 匹以上で実施すれば、定量的測定項目におけるデータのバラツキが母集団のバラツキを概ね反映していると考えられる。

製品細胞と同時に投与する培地として、製品細胞の増殖又は生存に適した培地を使用する場合には、その培地でも陽性対照細胞の造腫瘍性が保持されていること又は増殖が阻害されないことが確認される必要がある点に注意する。陽性対照細胞の増殖に適した培地を使用する場合は、製品細胞中に混在する可能性のある形質転換細胞の中には、その培地が生存や増殖に適さないものもありうることに注意する必要がある。

製品細胞の移植では、実際の臨床応用時の細胞用量を勘案し、移植行為自体もアーチファクトが生じない範囲で、できるだけ多くの製品細胞を移植することが望ましい。腫瘍が観察されなかった場合は、被験製品から得られた結果が偽陰性である確率を、陽性対照細胞の  $TPD_{min}$  における腫瘍形成確率をもとにして求めておくこと。なお、 $TPD_{min}$  以上の混在がないことを統計学的確からしさとともに示すための匹数の設定方法も知られている<sup>8</sup>。その他の技術的な詳細については、5.3.項を参考にすること。なお、造腫瘍性を持つ形質転換細胞の混在を評価することが目的の場合には、試験系の精度向上のために片性の動物のみを使用することも許容されうる。また、陰性対照群については、陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞の入手と利用の可能性を勘案して、その設定の可否を検討する。

本試験はあくまで、中間製品又は最終製品における造腫瘍性細胞の混在の有無を評価するものであって、ヒトでの腫瘍化を直接評価する試験ではないことを認識しておく必要がある。また上記は、最も厳密に製品中の形質転換細胞の混在を評価する場合の例である。*in vivo* 試験は *in vitro* 試験の結果を十分踏まえた上で計画することが望ましい。*in vitro* 試験での結果を踏まえた上で、念のため、*in vivo* で確認しようとする場合などには、*in vitro* 試験での検出感度、精度などを考慮し、目的に沿う内容と程度でもよい。なお、形質転換細胞の造腫瘍性に対して移植部位の微小環境が影響を与えることが知られている<sup>20,21</sup>。したがって、例えば背部皮下移植試験を行う場合、皮下移植以外の投与での臨床使用が想定されている製品については、背部皮下移植では腫瘍を形成しない形質転換細胞の存在の可能性を考慮したうえで製品のリスク評価を行うこと。もし得られれば、特定のヒトがん細胞種の動物体内への移植試験 (PDX : Patient-Derived Xenograft) に関する文献情報なども参考とする。

### 5.3. 最終製品細胞のヒトにおける生着部位での腫瘍形成能を評価するための試験

最終製品の造腫瘍性を評価するにあたって主に必要な情報としては、①未分化ヒト ES/iPS 細胞の混在量、②形質転換細胞の混在量に加え、③生着部位での投与細胞の腫瘍形成能、が挙げられる。①、②については、多能性幹細胞の分子マーカーの検出、不死化細胞の検出や足場非依存性増殖細胞の検出などでそれぞれ評価が可能である。また、5.2.1.2.及び 5.2.2.2.で示したような *in vivo* 試験も考えられる。一方、③生着部位での投与細胞の腫瘍形成能については生着部位での *in vivo* 造腫瘍性試験を行う以外に評価方法はない。その場合に考慮すべき点としては、a) 試験動物の選択、b) 対照細胞の選択・試験系の検出能力、c) 試験動物の数、d) 試験検体の投与部位と検体中の細胞数及び検体の形態、e) 観察期間、f) 投与部位の観察、g) 投与部位の組織学的評価、投与ヒト細胞の同定や生着していたことの確認、分化度を示す組織学的評価、h) 結果の解釈法などが挙げられる。特に投与部位は、可能な範囲でヒトでの投与部位に相当する部位を選択することを考慮する。これは、生着部位の微小環境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<sup>20,21</sup>、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、物理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を検討する。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モデル動物における *in vivo* での試験が意義のある情報を提供する可能性が高いと考えられるからである。ただし、前臨床段階での試験結果のヒトへの外挿性を検討するときには、ヒト体内局所微小環境を形成する液性因子や受容体タンパク質等の要素はそれぞれ高いヒト特異性を示し、生着部位の微小環境が動物においてどの程度モデル化できているかが不明であることにも留意する。

### 5.3.1. 試験動物の選択

ヒト細胞加工製品を安定的に体内で生着させるための免疫不全動物としては、NOG マウス<sup>6</sup>、NSG マウス<sup>7</sup>などの重度免疫不全マウス系統が挙げられる。これらのマウスは T 細胞、B 細胞及びNK 細胞を欠失しており、ヌードマウスと比べてヒトの細胞や組織の生着性が高い<sup>8,9,10</sup>。BRG マウスも T 細胞、B 細胞及びNK 細胞を欠失した系統だが、ヒト造血幹細胞の生着性が NOG マウスや NSG マウスよりも低いことが知られているため<sup>11,12</sup>、使用時には目的などを勘案して選定することが必要である。

T 細胞と B 細胞を欠失した SCID マウスや NOD/SCID マウスは、頻繁に胸腺腫を自然発症することが知られており、結果の解釈に影響を与える恐れがあるため使用を推奨しない。なお、48 週齢未満の NOG マウスは腫瘍を自然発症することは稀である<sup>22</sup>。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が問題となる場合は、疾患モデル動物の使用も考慮する。この場合、疾患モデル動物がどれだけ適応症となる疾病の病態的特徴を代表しているかの事前の検討も必要となる。ただし、有用性が評価された疾患モデル動物を用いた試験系は、有効性の試験評価には有用であるが、免疫抑制剤の長期投与が必要であり、安定した長期間の試験系で一定の統計学的結論を出す造腫瘍性試験には評価が難しく不向きな場合がある。したがって、試験目的等も勘案して疾患モデル動物を採用するかどうかを決定すべきである。実際、前述の理由から、造腫瘍性試験においては、疾患モデル動物ではなくヒト細胞の移植が容易な免疫不全動物を用いることが多い。NOG や NSG ほど免疫状態が抑制されている系統が利用可能な動物種はマウスの他にはないが、マウスでは投与部位のサイズが小さすぎる又は疾患モデルを作製することが困難などの問題がある。その場合、T 細胞が欠失しているヌードラットなど、マウスよりも大型の免疫抑制動物が用いられることがある<sup>10,14,23</sup>。さらに大きな動物の場合は、強く免疫が抑制された個体を入手することが難しいため、免疫抑制剤を併用することになるが、短期のうちに効力や性能を裏付けるデータを得る試験には利用可能でも、造腫瘍性試験のような時間を要する試験には不向きである。

### 5.3.2. 対照細胞の選択

免疫不全動物を用いた *in vivo* 造腫瘍性試験では、製品細胞又は陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞に陽性対照細胞をスパイクした陽性対照群が設けられていることが望ましい。陽性対照細胞の種類は、製品中に含まれている造腫瘍性細胞として何を想定するかによって異なる。製品中に含まれている造腫瘍性細胞の特性が予め推定されており、かつこれに類似する表現型を示す細胞株が利用可能な場合には、その細胞株を選択する。そのような細胞株が利用可能でない場合は、腫瘍形成能が良く研究され認知されている HeLa 細胞等を陽性対照細胞として使用する。なお、陽性対照細胞には、適切に品質管理された細胞提供機関から入手した細胞株を使用することが望ましい。陽性対照群として造腫瘍性を示す中間製品を用いる場合には、当該中間製品中の造腫瘍性細胞の量を別途、*in vitro* 試験法等により確

認することが必要である。陽性対照群が設定できない場合には、試験結果が陰性であっても真の陰性なのか偽陰性なのかの評価が困難になる点、つまり、期待する性能の試験が実施できたのか、及び試験結果によってどのような評価が可能であるのかという点を説明する必要が生じることに留意し、造腫瘍性試験の実施の意義を検討する。陰性対照群については、陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞の入手と利用の可能性を勘案して、その設定の可否を検討する。

未分化 ES/iPS 細胞は混在せず、一方、混在が想定される形質転換細胞の特徴が明らかで、適切な陽性対照形質転換細胞がある場合は、その評価試験を生着部位で実施して TPD<sub>50</sub>、TPD<sub>min</sub> 及びその腫瘍検出期間を設定した上で、製品細胞の生着部位への移植を実施することが肝要であるが、そのような例は稀であると考えられる。製品中に含まれている造腫瘍性細胞の特性が事前に不明である場合には、試験結果の解釈は、あくまで混在造腫瘍性細胞の造腫瘍性を陽性対照細胞と同等と仮定した上でなされるものであることに注意すること。

### 5.3.3. 試験動物の数と性別

試験動物の数は、移植行為の難易度や試験動物の生存率等を考慮した上で設定する。1群につき最終評価可能な匹数として10匹以上で実施することが望ましいが、1群につき最終評価可能な匹数として最低でも6匹以上で実施すれば、定量的測定項目におけるデータのバラツキが母集団のバラツキを概ね反映していると考えられる。陽性対照群の TPD<sub>min</sub> 以上の混在がないことを統計学的確からしさとともに示すための匹数の設定方法も知られている<sup>8</sup>。最終製品細胞のヒトにおける生着部位での腫瘍形成能を評価するための試験では、原則として1群に雌雄の動物が同数含まれるようにした方が性差の影響評価は行いやすくなる。ただし、臨床適用が一方の性のみ限定されている場合等、投与製品の腫瘍形成能において性差の影響が無視できる場合には片性で実施しても構わない。

### 5.3.4. 試験検体の投与部位と検体中の細胞数及び検体の形態

動物を用いた低分子医薬品の非臨床安全性試験における検体投与量は一般に、種差と個体差を考慮した不確実係数（安全係数）を加味し、ヒトへの投与量以上に設定される。しかし、ヒト細胞加工製品の *in vivo* 造腫瘍性試験の場合、動物のサイズの制約から、ヒトへの投与量と同数又はそれ以上の数の細胞を投与することが困難な場合が多い。もし、物理的障害を生ずるなどの理由により、ヒトでの投与時と同様の部位に同様の経路で投与する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を行う。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。相対的スケール比としては面積比や体積比などが考えられるが、どの比率を選択するかは、製品の構造、剤形や、その適用方法の特徴をもとに製品ごとに説明されるべきものである。部位を優先する理由は、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

モデル動物における *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。ただし、ヒトでの投与部位に相当する部位への投与が技術的に困難な場合、試験結果の解釈が困難である場合、別の部位に投与する方が手技や感度などの試験性能面で優れることが明らかかな場合など、合理的に妥当性が説明できる場合にはこの限りではない。投与検体の形態は、可能であれば最終製品の構造又は剤形と同様のものとする。

### 5.3.5. 観察期間

各群の全例について、一般状態を毎日観察し、週1回以上の頻度で体重測定すると同時に製品細胞が投与された部位の腫瘍形成の有無の確認を、観察や触診、画像診断などの方法により実施することが望ましい。ただし、実際の観察頻度及び確認項目は、移植部位、麻酔や撮像時間などの動物への負荷を考慮した上で設定すること。観察期間の長さは、陽性対照群の有無や移植細胞及びその分裂により生じた細胞の体内での推定生存期間などによって異なる。陽性対照細胞を最終製品又は同じ細胞種の正常細胞のような陰性対照細胞にスパイクした陽性対照群のある場合は、試験時又は事前検討において、陽性対照群の中で腫瘍形成が認められる  $TPD_{min}$  を確認すること。 $TPD_{min}$  における腫瘍形成確率が一定値に達する時点を超えた時点まで観察することにより、造腫瘍性の有無を判断することができる。この場合の判断は、混在しうる造腫瘍性細胞の造腫瘍性が陽性対照細胞と同等であり、腫瘍形成に必要な最低用量が  $TPD_{min}$  であると仮定した上でのものとなる。NOG マウスに皮下投与した場合には、ヒト iPS 細胞や HeLa 細胞の腫瘍形成率は、4~6 か月でほぼ安定になることが知られているが<sup>8,10,13,14</sup>、手技や細胞の取り扱い、培養履歴などにより、腫瘍形成率が安定するまでに要する時間はばらつくので、 $TPD_{min}$  における腫瘍形成確率が一定値に達するまでの期間は、試験施設において確認する必要がある。

陽性対照群がある場合でも、最終製品中の細胞の遺伝的安定性が低いことが明らかかな場合など、投与後に生着部位において投与された細胞が形質転換することにより腫瘍が形成されることが強く懸念される場合には、より長期の観察が必要になると考えられる。ただし、動物の寿命もあり、観察の延長にも限界がある<sup>24</sup>。したがって、より長期の観察によっても腫瘍形成が認められなかったとしても、臨床投与後の形質転換による腫瘍形成の可能性については、例えばフォローアップ及び外科的切除や薬剤治療などによるリスクマネジメントのプランを予め講じておくことが重要である。

陽性対照群の設定をせずに試験する場合は、最終製品細胞の投与後から動物が死亡するまでの期間、自然発生病変や寿命が評価に影響を与えない最長期間又は移植細胞及びその分裂により生じた細胞が確認できなくなるまでの期間、腫瘍形成の有無を観察することが望ましい。

陽性対照群の有無の他に、動物種、系統、病態、免疫抑制状態なども勘案し、合理的に説明可能な観察期間を設定すること。

### 5.3.6. 投与部位の観察

投与部位に腫瘍の形成が確認された場合には、その検出日を記載する。皮下等の外観により腫瘍形成の確認が可能な場合は、その短径と長径を最低 1 週間に 1 回の頻度で測定し、腫瘍の成長を評価することが望ましい。ただし、実際の測定は、麻酔や測定時間などの動物への負荷を考慮した上で計画し、実施する。

腫瘍の成長が過度な場合には、動物福祉の観点から、動物を定められた方法により安楽死させる。腫瘍の退縮が認められる場合には、定められた観察期間終了までは安楽死させないこと。腫瘍の成長が認められない場合には、即座に腫瘍とは判断しないこと。

### 5.3.7. 病理学的評価

観察期間終了時に、すべての動物を安楽死させ、投与部位及び形成された腫瘍について剖検を行う。肉眼的に認められた腫瘍組織に加えて血流が豊富な主要臓器（肝臓、脾臓、腎臓、肺、リンパ節など）を摘出し、腫瘍組織については、HE 染色や免疫染色等で、ヒト由来細胞がどのような組織の腫瘍を形成したか確認する。また、摘出した他の臓器については目視で腫瘍の有無を確認する。ヒト細胞の浸潤・遠隔転移がないかを、ヒト細胞遺伝子に特異的な Alu 配列に着目した Alu PCR<sup>25,26</sup> や抗ヒト HLA 抗体等を用いた免疫染色等で評価することも有用である。この際には、評価方法の性能（例えば感度や特異性など）は事前に確認しておく必要がある。摘出した組織は全て保存する。一方、観察期間中に腫瘍が観察されなかった場合でも、偽陰性の判定を防ぐため、移植した細胞製品を摘出し移植したヒト細胞の組織像を検討する。その際、病理組織学的検査によって、移植細胞が移植片摘出前まで生存していたこと、腫瘍形成能がないこと、及び製品の使用目的に適った組織像であることを適切な免疫染色法の組みあわせで証明することが肝要である。なお、前述と同様に、血流が豊富な主要臓器（例えば肝臓、脾臓、腎臓、肺、リンパ節など）を摘出し、後日必要となる解析のため保存しておく。

### 5.3.8. 結果の解釈

製品細胞投与群において腫瘍形成が認められた場合には、腫瘍を構成する細胞がヒト由来の細胞であるか否かについて明らかにするとともに、製品中の造腫瘍性細胞の混在量を確認しつつ、製品の製法や品質規格の変更を検討すること。製品細胞投与群において腫瘍形成が認められなかった場合には、偽陰性の可能性について、陽性対照細胞の TPD<sub>min</sub> 値などから考えられる *in vivo* 造腫瘍性試験の性能を踏まえて考察する<sup>8</sup>。がん細胞などの造腫瘍性形質転換細胞は多様性に富み、*in vivo* 造腫瘍性試験では検出されにくい細胞種がある可能性がある。したがって、もし得られれば、特定のヒトがん細胞種の動物体内への移植試験（PDX: Patient-Derived Xenograft）に関する文献情報なども参考とする。試験結果の解釈は、あくまで混在造腫瘍性細胞の造腫瘍性を陽性対照細胞と同等と仮定した上でなされるものであることに留意すること。

## 6. ヒト体細胞／体性幹細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験

### 6.1. 原料・原材料の品質特性評価・品質管理のための造腫瘍性試験

ヒト体細胞／体性幹細胞加工製品を製造するための細胞基材（原料又は原材料）としてヒト体細胞又はヒト体性幹細胞のセル・バンクを樹立した際に、その品質特性評価を目的として造腫瘍性試験を行う場合には、WHO TRS 978 の Annex 3<sup>1</sup>を参考にすること。

### 6.2. 最終製品のための造腫瘍性関連試験の留意点

最終製品としてのヒト体細胞／体性幹細胞加工製品の造腫瘍性に関しては、形質転換細胞の混在量と、生着部位での投与細胞の腫瘍形成能について、試験データ又は文献等の情報をもとに検討する必要がある。

既に世界各地でヒト細胞の移植医療やヒト体細胞／体性幹細胞加工製品の臨床応用が進んでいる。しかし、これらの細胞移植や製品投与が原因となり腫瘍が形成されたことを示す症例報告は、ヒト胎児由来培養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に良性の腫瘍が形成されたという報告<sup>27</sup>、脊髄損傷治療を目的とした自己由来嗅粘膜（細胞の加工なし）を移植した後の腫瘍形成事例<sup>28</sup>、いわゆる「幹細胞ツーリズム」の一環としてクリニックで間葉系幹細胞、ES 細胞及び胎児由来神経幹細胞の髄腔内投与を受けたとされる虚血性脳卒中患者の脊髄における腫瘍形成事例<sup>29</sup>など限られたものしかない。なお、非常に稀ではあるが、ドナーにおける血液腫瘍リスクの上昇が認められないにもかかわらず、同種由来造血幹細胞移植後に患者がドナーの細胞に起因する白血病を発症することがあることも知られている<sup>30</sup>。再生医療・細胞治療に汎用されるヒト間葉系幹細胞を原料とした製品に限れば、臨床での単独投与による腫瘍形成の報告は存在しない。過去にヒト間葉系幹細胞の *in vitro* 培養時の悪性形質転換が4件報告されているが、このうち2件<sup>31,32</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>33,34</sup>では *in vitro* 培養時に細胞の不老化が確認されている。これらのことは、最終製品への造腫瘍性細胞のクロスコンタミネーション防止及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、GCTP 省令に準拠した工程管理の下に培養・加工され、既定の培養期間を超えた細胞の増殖特性解析で異常がないことを確認したヒト体細胞／間葉系幹細胞加工製品については、一般的には免疫不全動物を用いた *in vivo* 造腫瘍性試験を行う必要はない。

ただし、①最終製品中の細胞の増殖性や未分化度が高い、過去に腫瘍形成が報告された製品に含まれていた細胞種若しくはそれと同様の細胞が投与製品中に含まれるなどの理由により投与後に生着部位において腫瘍が形成されることが非常に強く懸念される場合、②最終製品を非相同的に使用する場合、又は③共通のヒト由来の原料細胞から製造された製品が多くの患者に投与されることにより腫瘍形成リスクが拡散するおそれがある場合には、既定の培養期間を超えた細胞の増殖特性解析等の試験に加え、免疫不全動物を用いて上記

5.3 項と同様の造腫瘍性試験の実施を検討すること。

## 7. 遺伝的安定性に関する一般的留意点

遺伝的安定性の低下は、核型異常や遺伝子変異の発生確率を上昇させることを通じて形質転換細胞の発生確率を上昇させると推定されることから、造腫瘍性リスクに関する潜在的ハザードである。

ヒト細胞では、培養により核型変化などの遺伝子変異が生じることが知られている。核型が安定しているヒト二倍体線維芽細胞でさえも一塩基遺伝子多型（以下「SNP」という。）アレイによる解析では若干の変異を示し、また、非二倍体の核型が、明らかな正常組織においても時々観察されることがある。*in vitro* で観察される核型異常細胞など遺伝子変異を持つ細胞の安全性に関してはまだ結論は出ていない。遺伝的安定性のベースラインとなる遺伝子情報は、細胞種や培養方法によって異なる。継代培養において遺伝子複製の絶対的安定性を示す細胞は無い。したがって、ハザードである遺伝的不安定性を最小限にするため培養期間及び継代回数を制限し、培養条件の方法や変更の影響に対するリスク評価を行うべきである。

遺伝的安定性試験法として、Gバンド核型解析、FISH、アレイ CGH、SNP アレイ、次世代シーケンサーなどによる解析が挙げられる。Gバンド核型解析は、一細胞の染色体数の変化、転座やその他の再構成を確かめることができる。この手法により、一定の継代数又は分裂数ごとに、核型が二倍体で保たれていることを示すのは、大まかな遺伝的安定性の指標として有用である。アレイ CGH はより狭い遺伝子領域のコピー数変化を検出できるという点で利点を有する。FISH や次世代シーケンサーによる情報については、遺伝子変化（変異のタイプとそのアレル頻度）に対する検出感度と適切なコントロールの入手可能性を課題として検討しつつ、造腫瘍性との関連性について科学的検証を進め、試験法として利用することの妥当性を評価すべきである。なお、性能の妥当性が示されるならば、次世代シーケンサーによる簡易染色体検査（digital karyotyping）は、日数がかかり定量性に欠ける点が問題とされる G バンド核型解析を代替することができるかもしれない。

概して、これらの試験は製品細胞の特性解析として有用であるが、現時点では出荷基準というよりも細胞の特性等に関する参考情報を得るという目的で実施されるものである。

### <参考文献>

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. WHO technical report series, No 978 Annex 3. 2013, [http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS\\_978\\_Annex\\_3.pdf](http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.pdf)
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.* 2012;7:e37342.
3. Kuroda, T *et al.* Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of residual undifferentiated cells in cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Regen Therapy* 2015;2:17–23.
4. Tateno H *et al.* A medium hyperglycosylated podocalyxin enables noninvasive and quantitative detection of tumorigenic human pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 2014;4:4069.
5. Tano K *et al.* 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.* 2014;9:e110496.
6. Ito M *et al.* NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 2002;100:3175-82.
7. Shultz LD *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* 2005;174:6477-89.
8. Kusakawa S *et al.* Characterization of in vivo tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2R $\gamma$ null mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regen Therapy.* 2015;1:30-7.
9. Machida K *et al.* Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors. *J Toxicol Sci* 2009;34:123-7.
10. Kanemura H *et al.* Tumorigenicity studies of induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived retinal pigment epithelium (RPE) for the treatment of age-related macular degeneration. *PLoS One.* 2014;9:e85336.
11. Katano I *et al.* NOD-Rag2<sup>null</sup> IL-2R $\gamma$ <sup>null</sup> mice: an alternative to NOG mice for generation of humanized mice. *Exp Anim.* 2014;63:321-30.
12. Brehm MA *et al.* Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the IL2Rgamma(null) mutation. *Clin Immunol.* 2010;135:84-98.
13. Kanemura H *et al.* Pigment epithelium-derived factor secreted from retinal pigment epithelium facilitates apoptotic cell death of iPSC. *Sci Rep.* 2013;3:2334.
14. Kawamata S *et al.* Design of a tumorigenicity test for induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cell products. *J Clin Med.* 2015;4:159-71.

15. Gropp M *et al.* Standardization of the teratoma assay for analysis of pluripotency of human ES cells and biosafety of their differentiated progeny. *PLoS ONE*. 2012;7:e45532.
16. Yasuda S *et al.* Tumorigenicity-associated characteristics of human iPS cell lines. *PLoS One*. 2018;13:e0205022.
17. Kono K, Takada N *et al.* Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. *Biologicals*. 2015;43:146-9. (See also: Kono K, Takada N *et al.* Corrigendum to "Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells" [Biologicals 43 (2) (March 2015) 146-149]. *Biologicals*. 2017;45:106.)
18. Hasebe-Takada N, Kono K *et al.* Application of cell growth analysis to the quality assessment of human cell-processed therapeutic products as a testing method for immortalized cellular impurities. *Regen Ther*. 2016;5:49-54. (A corrigendum is in press.)
19. Kusakawa S *et al.* Ultra-sensitive detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products by digital analysis of soft agar colony formation. *Sci Rep*. 2015;5:17892
20. Suzuki M *et al.* Dormant cancer cells retrieved from metastasis-free organs regain tumorigenic and metastatic potency. *Am J Pathol*. 2006;169:673-81.
21. Shih CC *et al.* Human embryonic stem cells are prone to generate primitive, undifferentiated tumors in engrafted human fetal tissues in severe combined immunodeficient mice. *Stem Cells Dev*. 2007;16:893-902.
22. Fujii E *et al.* Establishment and characterization of in vivo human tumor models in the NOD/SCID/ $\gamma$ C<sup>null</sup> mouse. *Pathol Int*. 2008;58:559-67.
23. Priest CA *et al.* Preclinical safety of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors supporting clinical trials in spinal cord injury. *Regen Med*. 2015;10:939-58.
24. Watanabe S *et al.* Humanized NOD/SCID/IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> mice transplanted with hematopoietic stem cells under nonmyeloablative conditions show prolonged life spans and allow detailed analysis of human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *J Virol*. 2007;81:13259-64.
25. Nelson DL *et al.* Alu polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:6686-90.
26. Schneider T *et al.* Quantification of human Alu sequences by real-time PCR--an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19:571-82.
27. Amariglio N *et al.* Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 2009;6: e1000029.
28. Dlouhy BJ *et al.* Autograft-derived spinal cord mass following olfactory mucosal cell transplantation in a spinal cord injury patient. *J Neurosurg. Spine* 2014;21:618-22.

29. Berkowitz AL *et al.* Glioproliferative lesion of the spinal cord as a complication of “Stem-Cell Tourism”. *N Engl J Med.* 2016;375:196-8.
30. Hertenstein B *et al.* Development of leukemia in donor cells after allogeneic stem cell transplantation—a survey of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica.* 2005;90:969-75.
31. Garcia S *et al.* Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2010;316:1648-50.
32. Torsvik A *et al.* Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Res.* 2010;70:6393-96.
33. Wang Y *et al.* Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 2005;7:509-19.
34. Tang DQ *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* 2012;1:114-27.

表 1 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出・定量法

試験法	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験 (マトリゲルとともに NOG マウスに皮下投与)	フローサイトメトリー	qRT-PCR
目的	造腫瘍性細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出
試験期間・分析時間 (斜字)	17~30 週間	1 日	約 6 時間
利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 直接的</li> <li>◆ 臨床適用相当部位への移植により微小環境での造腫瘍性を評価可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 短時間</li> <li>◆ 個々の細胞を解析し、マーカー分子の発現量を評価可能</li> <li>◆ 簡便</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 迅速</li> <li>◆ 高感度</li> <li>◆ 簡便</li> </ul>
欠点・留意点	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 費用と時間がかかる</li> <li>◆ 専用動物施設が必要</li> <li>◆ スループットが低い</li> <li>◆ 腫瘍の由来が形質転換細胞か多能性幹細胞かを区別するには、病理的評価等が必要</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 間接的</li> <li>◆ ゲーティングが結果に影響</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 間接的</li> <li>◆ 個々の細胞でのマーカー分子発現レベルは評価できない</li> </ul>
検出能力又は検出限界 (下線)	hrPE2.5 × 10 <sup>5</sup> 個中に 1,000 個 (0.4%) の割合で混在するヒト iPS 細胞を 50% の確率で検出	hrPE 中の 0.1% のヒト iPS 細胞 (マーカー: TRA-1-60)	hrPE 中の 0.002% 以下のヒト iPS 細胞 (マーカー: LIN28)
出典	Kanemura <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2013 . Kawamata <i>et al.</i> , <i>J Clin Med.</i> 2015	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012

表 1 (続) 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出・定量法

試験法	Droplet Digital PCR	GlycoStem-HP 法	Essential-8/LN521 培養増幅法
目的	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出
試験期間・分析時間 (斜字)	約 6 時間	3 時間以下 (培養上清回収から測定まで)	約 1 週間
利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 迅速</li> <li>◆ 簡便</li> <li>◆ 高感度</li> <li>◆ 間接的</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 細胞非破壊的</li> <li>◆ 簡便</li> <li>◆ 高スループット</li> <li>◆ 間接的</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 直接的</li> <li>◆ 簡便</li> <li>◆ 残存 iPS 細胞の特性解析が可能</li> <li>◆ 時間がかかる</li> <li>◆ スループットが低い</li> </ul>
欠点・留意点	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 個々の細胞でのマーカー分子発現レベルは評価できない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 個々の細胞でのマーカー分子発現レベルは評価できない</li> <li>◆ 培地成分が結果に影響</li> </ul>	
検出能力又は検出限界 (下線)	ヒト心筋細胞中の <u>0.001%</u> のヒト iPS 細胞 (マーカー: <u>LIN28</u> )	HEK293T 細胞中の 0.05% のヒト iPS 細胞 (マーカー: H3+ポドカリキシン)	hMSC 中の 0.01~0.001% のヒト iPS 細胞 ヒト胚葉体中の 0.1~0.01% のヒト iPS 細胞
出典	Kuroda <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2015	Tateno <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2014	Tano <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2014

表2 混在する形質転換細胞の検出・定量法

試験法	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験 (マトリゲルとともにNOGマウスに皮下投与)	軟寒天コロニー形成試験	デジタル 軟寒天コロニー形成試験	細胞増殖特性解析
目的	造腫瘍性細胞の検出	足場非依存的増殖 (悪性形質転換細胞)の検出	足場非依存的増殖 (悪性形質転換細胞)の検出	不死化細胞 (形質転換細胞)の検出
試験期間	16週間以上	3~4週間	3~4週間	4週間以上
利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>直接的</li> <li>高感度</li> <li>臨床適用相当部位への移植により微小環境での造腫瘍性を評価可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>安価</li> <li>悪性形質転換細胞を単離・特性解析できる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>高感度</li> <li>悪性形質転換細胞を単離・特性解析できる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>安価</li> <li>簡便</li> <li>悪性形質転換細胞以外の不死化細胞も幅広く検出</li> </ul>
欠点・留意点	<ul style="list-style-type: none"> <li>費用と時間がかかる</li> <li>専用動物施設が必要</li> <li>腫瘍の由来が形質転換細胞か多能性幹細胞かを区別するには、病理的評価等が必要</li> <li><i>in vivo</i> 造腫瘍性を示さない不死化細胞は検出不能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断</li> <li>浮遊系細胞には使えない</li> <li>悪性形質転換細胞以外の不死化細胞は検出不能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断</li> <li>浮遊系細胞には使えない</li> <li>イメージスキャナーが高価</li> <li>悪性形質転換細胞以外の不死化細胞は検出不能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断</li> <li>悪性形質転換細胞の有無を区別できない</li> </ul>
検出能力 又は 検出限界 (下線)	hMSCに1/10 <sup>6</sup> (0.0001%)の割合で混在するHeLa細胞(10個)を17%の確率で検出可能	hMSCに1/10 <sup>3</sup> (0.1%)の割合で混在するHeLa細胞(計算上の検出限界は0.02%)	hMSCに1/10 <sup>7</sup> (0.00001%)の割合で混在するHeLa細胞	hMSCに1/10 <sup>6</sup> (0.0001%)の割合で混在するHeLa細胞及び脂肪由来幹細胞に1/10 <sup>5</sup> (0.001%)の割合で混在する不死化脂肪由来幹細胞
出典	Kusakawa et al., <i>Regen Ther.</i> 2015	Kusakawa et al., <i>Regen Ther.</i> 2015	Kusakawa et al., <i>Sci Rep.</i> 2015	Kono et al., <i>Biologicals.</i> 2015&2017 Hasebe-Takada et al., <i>Regen Ther.</i> 2016

## <参考情報1>混在する未分化ES/iPS細胞の検出法としての *in vivo* 造腫瘍性試験

出典 : Kanemura *et al.* Tumorigenicity studies of induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived retinal pigment epithelium (RPE) for the treatment of age-related macular degeneration.

*PLoS ONE*. 2014;9:e85336.

### 【方法】

#### 1. 細胞培養

皮膚線維芽細胞にレトロウイルスpMXs-POU5F1、-Sox2、-c-Myc、-Klf4を導入して作製されたヒトiPS細胞株201B7は、SNLフィーダー細胞上で5 ng/mL bFGFを含むReproFF2培地を用いて維持培養する。細胞株836B1は健常人から採取した皮膚線維芽細胞から樹立された。細胞株59、K11、K21、101、RNT9又はRNT10は、同意を得た6名の光受容体特異的遺伝子変異を伴う網膜色素変性症患者の皮膚線維芽細胞に由来する。皮膚線維芽細胞から、POU5F1、SOX2、KLF4、MYCL、LIN28A及びGLIS1 (iPS細胞株59-G、K21-G、101-G、RNT9、RNT10) 又はPOU5F1、SOX2、KLF4、MYCL、LIN28A及びp53shRNA (iPS細胞株101-EV、K11-EV、K21-EV) が挿入されたENBAエピソーマルベクターにより、iPS細胞を樹立した。これらのiPS細胞は、自己線維芽細胞由来フィーダー細胞上で、5 ng/mL bFGFを含むprimate ES培地を用いて維持培養する。iPS細胞由来網膜色素上皮 (RPE) 細胞クローン (59-G3 RPE、K21-G18 RPE、101-G25 RPE、RNT9 RPE、RNT10 RPE、101-EV RPE、K11-EV9 RPE又はK21-EV15 RPE) は、RPE維持培地 [B-27サプリメント、2 mM L-グルタミン、0.5 nM SB431542 及び10 ng/mL bFGFを含むDulbecco's Modified Eagle's Medium: Ham's F12 Medium (7:3)] で維持培養する。ヒト初代培養RPEは、L-グルタミン、GA-1000及びbFGFを含むRetinal Pigment Epithelial Cell Basal Mediumで維持培養する。浮遊培養したヒトiPS細胞由来RPE細胞は、皮下投与又はコラーゲンゲル上に捲いてコラーゲンで架橋させたRPE細胞シート作製に用いる。RPE細胞シートは、10%ウシ胎児血清 (FBS) とHam's F10培地で4週間、RPE維持培地で3週間維持培養した後に、コラーゲナーゼIでコラーゲンゲルから剥離させる。RPE細胞シートは、懸濁細胞とマトリゲルを混合し皮下投与又はレーザーマイクロダイセクションにより断片化し動物の網膜移植に用いる。

#### 2. 動物実験

##### 2.1 マウス皮下移植

様々な投与量のHeLa細胞を、200  $\mu$ Lのマトリゲルと混合又は200  $\mu$ LのPBS (マトリゲルなし) に懸濁し、7~8週齢の雌性ヌードマウス (BALB/cAJCl-nu/nu)、SCIDマウス (C.B-17/Icr-scid/scidJcl)、NOD-SCIDマウス (NOD/ShiJic-scidJcl) 又はNOGマウス (NOD/ShiJic-scid、

IL-2R $\gamma$ KO Jic) の皮下組織に、26G注射針を付けた1 mLシリンジを用いて注射する。動物は36週間モニターする。実験の終わりにマウスを安楽死させ、腫瘍を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定する。パラフィン切片は、病理学的な観察のためHE染色する。様々な投与量のヒトiPS細胞201B7又は1 x 10<sup>6</sup>個のヒトiPS細胞由来RPE細胞を、200  $\mu$ Lのマトリゲルと混合又は200  $\mu$ LのPBS (マトリゲルなし) に懸濁し、7~8週齢の雌性NOGマウスに、26G注射針を付けた1 mLシリンジを用いて皮下投与し、6~15ヶ月観察する。実験の終わりにマウスを安楽死させ、移植片をピンセットで採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定する。

## 2.2 ラット網膜下投与

3週齢雌性ヌードラット (F344/NJcl-rnu/rnu) を、ケタミン100 mg/kgとキシラジン10 mg/kgとの混液の腹腔内投与により麻酔する。散瞳薬 (0.5%トロピカミド、0.5%フェニレフリン塩酸塩) により右眼の瞳孔を拡大する。27G注射針を用いて右眼隅の強膜を小さく切開する。その後、様々な濃度のHeLa細胞、ヒトiPS細胞又は2  $\mu$ LのDMEM/F12培地に浸した1 mm四方のヒトiPS細胞由来RPE細胞シートを、33G注射針の付いたハミルトンシリンジを用いて、強膜切開部から網膜下スペースに注射する。細胞又はRPE細胞シートは、外科用顕微鏡下で拡大した瞳孔を通してハミルトンシリンジの位置を確認しながら、網膜下の毛細血管集網に移植する。網膜下の毛細血管集網は、アルビノのヌードラットにおいて容易に観察でき、網膜下スペースの目印として使う。移植したヌードラットは8~82週間モニターする。実験の終わりにラットは安楽死させ、移植した全眼球を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定する。

## 3. RT-PCR及び定量RT-PCR

総RNAはキットにより抽出し、混在するゲノムDNAはスピンカラム処理により除去する。PrimeScript RT Master MixとPrimeSTAR MAX DNA Polymeraseを用いて、50 ngの総RNAからcDNAを作製する。定量PCRはSYBR Greenを用いて行い、遺伝子発現量はGAPDHで補正する。定量RT-PCRはQuantiTect Probe RT-PCR Kitを用いて行う。標的遺伝子の発現量は、RNase P転写産物により補正する。定量RT-PCRは、45サイクル行う。本実験で用いるプローブとプライマーの配列は、表.プローブとプライマーの配列 (参考情報1) に記載する。

## 4. Alu PCR

ヒト細胞特異的なAlu配列をプライマーのデザインに用いる。PCR反応 (28サイクル) に、Aluプライマー5'-AAGTCGCGGCCGCTTGACAGTGAGCCGAGAT-3'、50 ng DNAテンプレート及びPrimeSTAR Max DNA Polymeraseを用いる。ヒトHeLa細胞 DNA : マウスNIH3T3 DNA

が様々な割合のDNAテンプレートを、AluPCRの検出感度を決定するために用いる。PCR産物は1%アガロースゲルを用いた電気泳動で分離し、その画像はデジタル化して取り込む。

#### 5. 免疫組織化学

移植した組織は 4%パラホルムアルデヒドで固定する。パラフィン包埋した組織切片は、HE 染色する。その後、パラフィン切片は脱パラフィン化のため、キシレンで処理し、100%、95%、80%、70%エタノールで各々5分間ずつ連続して処理を行う。切片は 10 mM クエン酸 (pH 6) で 95°C、50 分間処理し、0.4%Triton-X100/PBS で室温、30 分間処理する。脱パラフィン化切片は、抗ヒト Lamin-A 抗体、抗 BEST1 抗体及び抗 Ki-67 抗体で染色する。核は、Hoechst 33258 又は DAPI で染色する。浮遊状態のヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞は、4%パラホルムアルデヒドで固定し、抗 POU5F1 (OCT3/4) 抗体又は抗 BEST1 抗体で染色する。抗体は、Alexa Fluor 488 goat anti-mouse 又は Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit を用いて可視化する。蛍光顕微画像は、蛍光顕微鏡により取り込む。

表. プローブとプライマーの配列 (参考情報 1)

Primers for RT-PCR			
Gene	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')	
<i>LIN28A</i>	CACGGTGGGGCATCTG	CCITCCATGTGCAGCTTACTC	
<i>POU5F1</i>	GAAACCCACACTGCAGCAGA	TCGCTTGCCCTTCTGGCG	
<i>BEST1</i>	ATCAGAGGCCAGGCTACTACAG	TCCACAGTTTTCCTCCTCACTT	
<i>CRALBP</i>	GACTGGGGTTAAATCTCACAGC	TGACATGTTGCCATGGAAGAC	
<i>PAX6</i>	TTAACACACTTGAGCCATCACC	AAATCTGGGATGCTGTCCACT	
<i>TYR</i>	AGCCAGCATCATCTTCTC	GGCGTTCCATTGCATAAAGA	
<i>GAPDH</i>	CGATGCTGGGCTGAGTAC	CCACCACTGACACAGTTGGC	
Probes and primers for qRT-PCR			
Gene	Probe sequence (5'→3')	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
<i>LIN28A</i>	CGCATGGGGTTCGGCTTCTCTGTCC	CACGGTGGGGGCATCTG	CCITCCATGTGCAGCTTACTC
<i>POU5F1</i>	CGGACCCACATCCTTCTCGAGCCCAAGC	GAAACCCACACTGCAGCAGA	TCGCTTGCCCTTCTGGCG

<参考情報 2> 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出法としての qRT-PCR

出典 : Kuroda *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*. 2012;7(5):e37342

**【方法】**

1. Total RNA 抽出

キットに添付されているプロトコールに従って、サンプルとなる細胞 (iPS 細胞を分化させた細胞など) から総 RNA を抽出し、DNase 処理を行う。

2. 定量 RT-PCR

2.1 PCR mixture を QuantiTect Probe RT-PCR Kit を用いて以下のように調製する。

a) PCR mixture (*LIN28*)

	Final conc.	Assay/well (μL)
QuantiTect RT Mix	1 ×	0.25
2 × QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	1 ×	12.5
100 μM Forward Primer	0.4 μM	0.1
100 μM Reverse Primer	0.4 μM	0.1
20 μM Probe	0.1 μM	0.125
RNAase free water	-	6.93
		Total 20

b) PCR mixture (*GAPDH*)

	Final conc.	Assay/well (μL)
QuantiTect RT Mix	1 ×	0.25
2 × QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	1 ×	12.5
10 μM Forward Primer	0.2 μM	0.5
10 μM Reverse Primer	0.2 μM	0.5
5 μM Probe	0.1 μM	0.5
RNAase free water	-	5.75
		Total 20

TaqMan® GAPDH Control Reagents (human)を使用

2.2 Total RNA 溶液を以下のように調製する。

a) *LIN28* 測定用

- 検量線用のテンプレートの調製

未分化 iPS 細胞由来 RNA 濃度を 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01, 0.003, 0.001, 0 ng/μL とす

るように RNase free water で希釈したものを調製する。

- ・ サンプル RNA の調製

サンプル RNA の濃度が 10 ng/μL になるように調製する。

b) *GAPDH* 測定用

- ・ 検量線用のテンプレートの調製

未分化 iPS 細胞由来 RNA 濃度を 10, 3, 1, 0.3, 0.01, 0 ng/μL となるように RNase free water で希釈したものを調製する。

- ・ サンプル RNA の調製

サンプル RNA の濃度が 1 ng/μL になるように RNase free water で希釈したものを調製する。

2.3 PCR 用 96 ウェルプレートに PCR mixture を 20 μL/ウェルずつ添加する。

2.4 テンプレート溶液を 5 μL/ウェルずつ添加する (よく混合する)。

2.5 リアルタイム PCR 装置にセットする。

定量 RT-PCR 条件

Stage	温度	時間
Stage 1	50.0°C	30 分
Stage 2	95.0°C	15 分
Stage 3	94.0°C	15 秒
	60.0°C	1 分
Stage 3 を 45 サイクル繰り返す。(GAPDH は 40 サイクル)		

プレート配置図 (サンプル A、B、C とする)

	GAPDH			LIN28								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	201B7	201B7	201B7	201B7*	201B7*	201B7*						
B	A	A	A	A	A	A						
C	B	B	B	B	B	B						
D	C	C	C	C	C	C						
E	S10	S3	S1	S3	S1	S0.3						
F	S0.3	S0.1	DW	S0.1	S0.03	S0.01						
G				S0.003	S0.001	DW						
H												

\*未分化マーカーを測定する 201B7 は 1 ng/μL で調製する (陽性対照)。

LIN28 probe、primer 配列

Gene	Probe Primer set (5' → 3')	
LIN28	Probe sequences (5' FAM/3' TAMRA)	CGCATGGGGTTCGGCTTCCTGTCC
	Forward primer sequences	CACGGTGCGGGCATCTG
	Reverse primer sequences	CCTCCATGTGCAGCTTACTC

Primer は 100 μM、Probe は 20 μM に調製する。

**注意点:**ごく微量な LIN28 を検出した場合の判断基準として、Ct 値が 35 を超えた場合は未検出とする。(Ct 値>35 ではバラツキが大きくなるため)

### <参考情報 3> 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出法としての Droplet Digital PCR

出典 : Kuroda *et al.* Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of residual undifferentiated cells in cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells.

*Rege Ther.* 2015;2:17-23.

#### 【方法】

##### 1. Total RNA 抽出

キットに添付されているプロトコールに従って、サンプルとなる細胞 (iPS 細胞を分化させた細胞など) から総 RNA を抽出し、DNase 処理を行う。

##### 2. Droplet digital PCR

2.1 PCR mixture を One-Step RT-ddPCR Kit for Probes を用いて以下のように調製する。

PCR mixture

	Final conc.	Assay/well (μL)
2 × One-Step RT-ddPCR Supermix	1 ×	10
25 mM Manganese	1 ×	0.8
50 μM Forward Primer	0.75 μM	0.3
50 μM Reverse Primer	0.75 μM	0.3
50 μM Probe	0.25 μM	0.1
RNAase free water	-	3.5
		Total 15

2.2 Total RNA 溶液を以下のように調製する。

LIN28 測定用

- ・ 検量線用のテンプレートの調製  
未分化 iPS 細胞由来 RNA 濃度を 0.1, 0.03, 0.01, 0.003, 0.001, 0 ng/μL となるように RNase free water で希釈したものを調製する。
- ・ サンプル RNA の調製  
サンプル RNA の濃度が 10 ng/μL になるように調製する。

2.3 PCR tube に PCR mixture を 15 μL/ウェルずつ添加する。

2.4 RNA 溶液を 5 μL/ウェルずつ添加する。(よく混合する)

2.5 Droplet Generator を用いて、ドロップレット作製を行う。

2.6 作成したドロップレット液を 96 ウェルプレートに移す。

2.7 RT-PCR 反応

サーマルサイクラー条件

Stage	温度	時間
Stage 1	60.0°C	30 分
Stage 2	95.0°C	5 分
Stage 3	94.0°C	30 秒
	64.0°C	1 分
Stage 3 を 40 サイクル繰り返す。		
Stage 4	98°C	10 分

2.8 PCR 反応液を QX100 Droplet Reader を用いて解析する。

LIN28 probe、 primer 配列

Gene	Sequence (5' → 3')	
LIN28	Probe sequences (5' FAM/3' BHQ1)	CGCATGGGGTTCGGCTTCCTGTCC
	Forward primer sequences	CACGGTGCGGGCATCTG
	Reverse primer sequences	CCTTCCATGTGCAGCTTACTC

Primer 及び Probe は、50 μM に調製する。

#### 注意点

- ・ プライマーによって至適アニーリング温度が異なるので、条件検討が必要。
- ・ 閾値の設定により結果が大きく変化することに注意が必要。

#### <参考情報 4>培養上清を用いた非破壊での *in vitro* 造腫瘍性試験

出典：Tateno *et al.* A medium hyperglycosylated podocalyxin enables noninvasive and quantitative detection of tumorigenic human pluripotent stem cells.

*Sci Rep.* 2014;4:4069.

#### 【測定に必要なキット・機器】

- ・ヒトES/iPS細胞モニタリングキット
- ・遠心機（1,700 x gで遠心が可能な遠心機）
- ・試験管ミキサー
- ・プレートミキサー（あれば好ましい）
- ・96ウェルプレート洗浄機（あれば好ましい）
- ・96ウェルプレートリーダー（吸光度測定：主波長 450 nm、副波長 600 nm～650 nm）

#### 【注意】

##### <測定に関すること>

- ・培地交換した翌日に培養上清をサンプリングし、その後に細胞を剥がしてヒト多能性幹細胞数を測定する。例えば培地が 5 mL、細胞数が  $5 \times 10^6$  cells であった場合、サンプリングした培養上清の未分化細胞数を  $1 \times 10^6$  cells/mL とする。
- ・本方法では、未分化維持培養条件下の培養上清の測定値に基づく標準曲線を作成し、それを一つの基準にして測定対象となる試料中の未分化細胞数を算出する。
- ・細胞株又は培地の種類などの培養条件により、シグナル強度と細胞数 (cells/mL) の関係が異なる場合がある。標準曲線は細胞株毎及び未分化維持培養条件毎に作成する。

##### <キットの使用>

- ・使用前は 20℃～25℃に保管すること。
- ・プレート洗浄機などを使って洗浄を終えた後は、プレートを逆さにしてペーパータオルなどに軽く叩きつけてウェルに残っている余分な洗浄液を取り除く。
- ・プレートシール以外のキット構成試薬は、使用后速やかに冷蔵に戻して保管する。

##### <試料（培養上清）の調製法>

- ・測定対象試料及び標準曲線作成用試料は、培地交換後 18 時間～24 時間培養した上清をサンプリングする。  
\*全培地交換を基本とし、その後の培養時間にも影響されるため、できるだけ培地交換後サンプリングまでの時間を統一する。
- ・サンプリングした培養上清を 1,700 x g（3,000 rpm）、10 min、室温で遠心すること。回収される遠心上清を「試料」とする。

- ・すぐに測定に供しない場合は、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存する。

#### <標準曲線作成>

- ・細胞株毎及び未分化維持培養条件毎に標準曲線を作成する。
- ・全培地交換した18時間～24時間後の培養上清をサンプリングした後、細胞を剥がして未分化細胞数を測定し、<試料（培養上清）の調製法>に従って培養上清から試料を調製する。測定に供するまで $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存する（数回程度の凍結融解は可能）。
- ・測定対象となる試料と同じ新しい培地で希釈して標準曲線を作成する。最初は30,000 cells/mLから41 cells/mLまで3倍づつ段階希釈して傾向を確かめ、その後に適切な細胞数から2倍づつ段階希釈して検量線を作成すると良い。また、培地によってはバックグラウンドが高いものもあるため、必ず培地のみウェルも作成する。
- ・測定毎にStripの一つを標準曲線用とし、そこで得られる標準曲線から測定対象となる試料の未分化細胞数を算出すると良い。
- ・検体数が多く、測定毎にStripの一つを標準曲線用に使うことが難しい場合には、標準曲線に使用するウェル数を減らすこともできる（2～4ウェル）。ただし、直線関係が得られる細胞数を選ぶこと。

#### 【操作】

##### <準備>

- ・使用する前に、rBC2LCN固相化プレート、陰性コントロール、陽性コントロール、希釈液、洗浄液（10×）、発色停止液、プレートシールを室温にする（HRP標識抗体溶液及びTMB溶液以外の試薬）。
- ・洗浄液（10×）を室温の蒸留水で10倍希釈する。洗浄液（1×）は1-Stripあたり少なくとも40 mL必要となる（ $350\ \mu\text{L}/\text{ウェル} \times \text{洗浄} 12\ \text{回} \times 8\ \text{ウェル}$ ）。測定数（使用するStrip数）にあわせて調製する。ただし、プレート洗浄機を使う場合は、機械のセッティングに要する液量を考慮し多目に調製すること。
- ・反応の成否を確かめるための陽性コントロールは、使用直前に希釈液で40倍希釈する（希釈液195  $\mu\text{L}$ に陽性コントロール5  $\mu\text{L}$ を添加後ボルテックスで混合して、50  $\mu\text{L}/\text{ウェル}$ で空いているウェルに添加する）。
- ・陰性コントロールは、希釈せずそのままウェルに添加する
- ・HRP標識抗体溶液は、使用直前に希釈液で20倍希釈して必要量（50  $\mu\text{L}/\text{ウェル} \times \text{ウェル数}$ ）を調製すること。必要量を取り出した後のHRP標識抗体溶液は速やかに冷蔵に戻すこと。
- ・TMB溶液は、発色反応の20分前～30分前に、必要量（50  $\mu\text{L}/\text{ウェル} \times \text{ウェル数}$ ）を滅菌された新しいチューブに分けて、使用するまで光を避けて室温で保管すること。必要量を取り出した後のTMB溶液は速やかに冷蔵に戻すこと。

<測定手順>

- (1) rBC2LCN 固相化プレートが室温になったことを確認した後、袋からプレートを取り出し、測定に使用しない Strip をプレート枠から外して袋に戻し、チャックを閉じて冷蔵に保管する。
- (2) プレート枠のホルダーを閉じて Strip を固定し、洗浄液 (×1)、350  $\mu$ L/ウェルで3回洗浄する。その後、プレートを逆さにしてペーパータオルなどに軽く叩きつけてウェルに残っている洗浄液を取り除く。
- (3) 標準曲線用試料、測定対象試料、必要ならば陰性コントロール及び陽性コントロールを、各々50  $\mu$ L/ウェル添加し、プレートミキサーなどで軽く攪拌した後、プレートシールを貼って室温で1時間静置反応させる。
- (4) プレートシールをはがし、洗浄液 (×1)、350  $\mu$ L/ウェルで3回洗浄する。その後、プレートを逆さにしてペーパータオルなどに軽く叩きつけてウェルに残っている洗浄液を取り除く。
- (5) 20倍希釈した HRP 標識抗体溶液を、50  $\mu$ L/ウェル添加しプレートミキサーなどで軽く攪拌した後、プレートシールを貼って室温で1時間静置反応させる。
- (6) プレートシールを剥がし、洗浄液 (1×)、350  $\mu$ L/ウェルで6回洗浄する。その後、プレートを逆さにしてペーパータオルなどに軽く叩きつけてウェルに残っている洗浄液を取り除く。
- (7) TMB 溶液を、50  $\mu$ L/ウェル添加し、プレートミキサーなどで軽く攪拌した後、室温で30分間静置反応させる (アルミホイルなどで上からカバーして光を避ける)
- (8) 発色停止液を、50  $\mu$ L/ウェル添加し、軽く攪拌して反応を停止させ、プレートリーダーで吸光度 [主波長 450 nm、副波長 620 nm~650 nm] を測定する。泡などが生じている場合は、チップの先などで消してから測定する。
- (9) 標準曲線に基づいて、測定対象となる試料中の未分化細胞数を算出する。  
\*陽性コントロールを使用になった場合は、その吸光度が0.5以上であること、陰性コントロールを使用した場合はその吸光度が0.15未満であることを確認すること。

操作手順 (フローチャート)

rBC2LCN 固相化プレート

↓ 洗浄 3回

標準曲線用試料、測定対象試料、場合により陰性及び陽性コントロールを 50  $\mu$ L/ウェル添加

↓ 攪拌、室温、1時間反応 (静置)

↓ 洗浄 3回

HRP 標識抗体溶液 (20倍希釈) を 50  $\mu$ L/ウェル添加

↓ 攪拌、室温、1 時間反応（静置）

↓ 洗浄 6 回

TMB 溶液を 50  $\mu$ L/ウェル添加

↓ 攪拌、室温、30 分間反応（静置、遮光）

発色停止液を 50  $\mu$ L/ウェル添加

↓ 攪拌

吸光度測定（主波長 450 nm、副波長 600~650 nm）

## <参考情報 5> 混在する未分化 ES/iPS 細胞の検出法としての Essential 8/LN521 培養増幅法

出典 : Tano *et al.* 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*. 2014;9:e110496.

### 【方法】

#### 1. ヒト iPS 細胞から間葉系幹細胞への分化途中で残存する未分化 iPS 細胞の検出

##### 1.1 laminin-521 (LN521) コーティングプレートの作製

PBS で 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した LN521 を培養用プレートに添加 (1 mL / 10  $\text{cm}^2$ ) し、37°C で 2 時間以上インキュベートする。その後 LN521 を回収し、PBS で洗浄する。Essential 8 培地で一度洗った後、Essential 8 培地を添加 (2 mL / 10  $\text{cm}^2$ ) し、細胞を播種するまで 37°C でインキュベートする。

##### 1.2 陽性対照細胞の調製

分化細胞としてヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を用意し、Essential 8 培地中に分散させる。この中に、分化誘導に使用した元の iPS 細胞株を、シングルセルの状態にして Essential 8 培地中に分散させた後、スパイクする。(例えば、iPS 細胞の混在率が 1、0.1、0.01% の場合、 $1 \times 10^5$  個の MSC 中に  $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10$  個の割合で iPS 細胞をそれぞれスパイクさせる。また iPS 細胞の混在率が 0.001% の場合、 $6 \times 10^5$  個の hMSC 中に 6 個の割合で iPS 細胞をスパイクさせる。) 分化細胞とヒト iPS 細胞をよく混ぜた後、1.1 で準備した LN521 コーティングプレートに添加し、37°C 5%CO<sub>2</sub> で培養する。(hMSC が  $1 \times 10^5$  の場合は 35 mm ディッシュ (又は 6 ウェルプレート)、 $6 \times 10^5$  の場合は 100 mm ディッシュを使用。) 培養を始めてから 2 日後より毎日培地交換する。目視できるコロニーが形成されるまでの間は、アスピレートを使用せず、チップ又はピペットで培地を回収する。

##### 1.3 テストサンプルの調製

ヒト iPS 細胞から分化誘導した細胞を Accutase で剥がし、Essential 8 培地中に分散させる。1.1 で準備した LN521 コーティングプレートに添加し、37°C 5%CO<sub>2</sub> で培養する。培地交換の方法は 1.2 と同様。

##### 1.4 残存未分化 iPS 細胞の検出

培養開始からおよそ 1 週間以内に残存 iPS 細胞が増殖し、コロニーを形成する。このコロニーの有無を確認し、数を計測する。形成されたコロニーが未分化 iPS 細胞に由来することの確認として、TRA-1-60 などの未分化マーカーに対する抗体で免疫染色する。

残存の有無を判断するには、陽性対照で残存 iPS 細胞の検出感度を確認しておく必要が

ある。また、本方法では、陽性対照で検出されるコロニー数と比較することで、おおよその残存率を見積もることができる。

## <参考情報 6> 混在する形質転換細胞の検出法としての *in vivo* 造腫瘍性試験

出典：Kusakawa *et al.* Characterization of *in vivo* tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2R $\gamma$  null mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products.

*Regenerative Therapy*. 2015;1:30-37.

### 【方法】

#### 1. NOG マウスを用いた造腫瘍性試験

##### 1.1 細胞培養

移植細胞として、形質転換細胞である HeLa 細胞を、正常細胞であるヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を用いる。培地は、HeLa 細胞の培養では 10%FBS 含有 Eagle's minimum essential medium (MEM) 培地を用い、hMSC の培養では Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) 培地を用いる。

##### 1.2 細胞移植と腫瘍形成の観察

1.2.1 フラスコの面積の 80% を細胞が覆い尽くした状態に達した各細胞を 0.25% トリプシン-EDTA 溶液で剥がし、以下の濃度の細胞懸濁液を調製する。1)  $1 \times 10^6$  個の hMSC に 10 個 (0.001%)、 $1 \times 10^2$  個 (0.01%)、 $1 \times 10^3$  個 (0.1%)、 $1 \times 10^4$  個 (1%) 個の HeLa 細胞を混入する。2)  $1 \times 10^7$  個の hMSC に 10 個 (0.0001%)、 $1 \times 10^2$  個 (0.001%)、 $1 \times 10^4$  個 (0.1%) 個の HeLa 細胞を混入する。移植用の細胞懸濁液は、100  $\mu$ L 中に上記の量の細胞を含むように、10%FBS 含有 MEM 培地とマトリゲルを 1:1 の割合で含む培地中に調製し、移植の直前まで氷上に置いておく。

1.2.2 6~8 週齢の雄性 NOG マウス (NOD/Shi-scid IL2R $\gamma$  KO Jic) の背部皮下に、25G 針付きの 1 mL シリンジを用いて 100  $\mu$ L 移植する。1 群あたり 6 匹以上を用いる。

1.2.3 毎週、視診及び触診によって腫瘍形成の有無を確認する (16 週間)。腫瘍の形成が確認されたら、ノギスを用い長径と短径の長さを計測する。腫瘍体積 ( $\text{mm}^3$ ) は、長径 (mm)  $\times$  短径<sup>2</sup> (mm)<sup>2</sup>  $\times$  1/2 の計算式で求める。腫瘍重量 (比重を 1 として体積より計算) が体重の 10% を超える大きさに達した場合又は 16 週を経過した場合、全ての動物を安楽死させ剖検し、病理学的評価のために単離した腫瘍組織を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液に保存する。

1.2.4 各細胞濃度群について、腫瘍形成頻度 (腫瘍形成が確認できた匹数 / 移植匹数) を求め、Spearman-Kärber 法に基づいて、50% 腫瘍形成細胞濃度 (TPD<sub>50</sub>) を算出する。

### 1.3 正常細胞中の造腫瘍性細胞混在の有無の評価

陽性対照細胞の結果から、1匹のマウスにおける腫瘍形成が起こらない確率（偽陰性率） $x$ （ $=1 - \text{腫瘍形成頻度}$ ）が得られる。 $n$ 匹のマウスに移植して全く腫瘍形成が観察されない確率 $y$ は、 $y = x^n$ と表される。 $n = \log y / \log x$ という式が導かれ、許容できる偽陰性率に応じた試験に必要な動物数を算出することが可能である。例えば、10個のHeLa細胞を混入させたhMSC  $1 \times 10^7$ 個（HeLa細胞混在率0.0001%）を移植した時の腫瘍形成率が17%という結果が得られていた場合、HeLa細胞相当の造腫瘍性細胞が $1/10^6$ の割合で混在する細胞を移植した1匹のマウスにおいて腫瘍が形成されない確率（偽陰性率） $x$ は0.83とする。1%の確率で偽陰性の判定してしまうことを許容できるとすると、HeLa細胞相当の造腫瘍性細胞が $1/10^6$ の割合で混在していないことを示すには、25匹（ $= \log 0.01 / \log 0.83$ ）の動物それぞれに $1 \times 10^7$ 個を移植し、1匹も腫瘍形成がないことが確認できればよい。

### <参考情報 7> 混在する形質転換細胞の検出法としてのデジタル軟寒天コロニー形成試験

出典：Kusakawa *et al.* Ultra-sensitive detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products by digital analysis of soft agar colony formation.

*Sci Rep.* 2015;5:17892

#### 【方法】

##### 1. 細胞培養及び試薬類

形質転換細胞として HeLa 細胞を、正常細胞としてヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を用いる。通常の HeLa 細胞の維持培養には 10% FBS 含有 MEM 培地を、hMSC の維持培養には Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) 培地を用いる。軟寒天培養用培地として、DMEM 粉末培地 (フェノールレッドフリー) を用いて調製した 10% FBS 含有 1 × DMEM 培地及び 20% FBS 含有 2 × DMEM 培地、低融点アガロース SeaPlaque と滅菌水で調製した 1.2%アガロース溶液を使用する。生細胞染色用蛍光試薬として、MitoTracker Red CMXRos 及び Hoechst 33342 を用いる。96 ウェルプレートは、底面の素材は、プラスチックかつ細胞培養処理がなされていないものが望ましく、さらにウェル側面が黒のものが画像解析に適している。テラサキプレート、0.25%トリプシン-EDTA 溶液、4% PFA 溶液、PBS、Buffer QG (寒天培地溶解用バッファー)、ハイコンテツイメーキングシステムを使用する。

##### 2. 試験方法

###### 2.1 軟寒天コロニー形成試験

下図に示すような培地組成で細胞の 3 次元培養を行う。

培地層 100 $\mu$ L (10% FBS 含有 1 × DMEM 培地)
細胞/軟寒天層 75 $\mu$ L (10% FBS 含有 1 × DMEM 培地、0.4%アガロース 含)
底部寒天培地層 50 $\mu$ L (10% FBS 含有 1 × DMEM 培地、0.6%アガロース 含)

図. 軟寒天培養 (96 ウェルプレート 1 ウェルの断面図)

準備として、10% FBS 含有 1 × DMEM 培地と 20% FBS 含有 2 × DMEM 培地をそれぞれ 37°C に温めておく。1.2%アガロース溶液は電子レンジで溶解し、37°C に保っておく。

底部寒天培地層の調製：20% FBS 含有 2 × DMEM 培地と 1.2%アガロース溶液を 1:1 の割合で混ぜ、96 ウェルプレートの各ウェルに 50  $\mu$ l ずつ分注し、プレートを冷蔵庫 (4°C) に移して 30 分間固化させる。

細胞/軟寒天層の調製：細胞は、0.25%トリプシン-EDTA 溶液で剥がし、10%FBS 含有 1×DMEM 培地を用いて様々な濃度に調製しておく（例えば、1 ウェル辺り  $1 \times 10^4$  個の細胞を播種する場合、 $4 \times 10^5$  個/mL の濃度で懸濁液を調製しておく→ $1 \times 10^4$  個/25  $\mu$ L）。10% FBS 含有 1×DMEM 培地で調製した細胞懸濁液、20%FBS 含有 2×DMEM 培地、1.2%アガロース溶液を 1:1:1 の割合で混ぜ、96 ウェルプレートの固化した底部寒天培地層上に 75  $\mu$ L ずつ分注し、プレートを冷蔵庫（4℃）に移す（15 分間）。

培地層：10% FBS 含有 1×DMEM 培地 100  $\mu$ L を細胞/軟寒天層上に添加する。培地交換は 3~4 日に一度の頻度で行い、37℃、5% CO<sub>2</sub> 濃度環境のインキュベーターで 30 日間培養する。

## 2.2 ハイコンテツイメーキングシステムを用いたコロニーの画像解析

染色：30 日間の培養後、各ウェルから培地 100  $\mu$ L をピペットで取り除き、生細胞染色試薬を含む 10% FBS 含有 1×DMEM 培地（6  $\mu$ g/mL Hoechst 33342、150 nM MitoTracker Red CMXRos）を 25  $\mu$ L ずつ添加し（Hoechst 33342 の最終濃度、1 $\mu$ g/mL；MitoTracker Red CMXRos の最終濃度、25 nM）、37℃、5% CO<sub>2</sub> 濃度環境のインキュベーターで 1 時間培養する。固定：生細胞染色試薬を含む 10% FBS 含有 1×DMEM 培地をピペットで取り除き（PBS を 100  $\mu$ L 添加した後、一緒に取り除く）、4% PFA 溶液を 125  $\mu$ L 各ウェルに添加し（PFA 最終濃度は 2%）、室温で 30 分間静置する。溶解及び沈降処理：PFA を除き、PBS による洗浄（100  $\mu$ L 添加、10 分静置、PBS の除去）を 2 回行った後、50  $\mu$ L の Buffer QG を各ウェルに添加し、37℃で 1 時間培養する。以上の処理によって、形成されたコロニーの核とミトコンドリアがそれぞれ青、赤に染色され、さらにコロニーはウェル底部に沈降する。

画像解析を行うときまで、プレートは遮光し冷蔵庫で保管しておく（培地の蒸発を防ぐため、PBS を各ウェルに添加しておく）。

## 2.3 画像の取得

4 倍の対物レンズを使用し、96 ウェルプレート 1 ウェル辺り、4 視野の画像を各ウェルで取得する。3 つのチャンネル（青、赤、明視野）で、それぞれで取得する。

## 2.4 画像解析

1 ウェル辺り 4 視野の画像のつなぎ合わせ処理を行い、1 ウェル全体の画像を生成しておく。あらかじめ設定した解析スクリプトを用い（評価指標：大きさ、真円度、蛍光強度）、青及び赤のそれぞれの蛍光画像から認識された領域を抽出し、それらが重なり合った場合、コロニー有りと判定する。またデブリ等の非特異的な染色ではないことなどを確認するため、明視野像でコロニーを目視する。

## 2.5 陽性対照細胞における検出感度の確認（ $10^7$ 個のhMSC中に混在する1個のHeLa細胞の検出の場合）

HeLa細胞の調製：HeLa単一細胞は、50~100個/mlのHeLa細胞懸濁液を調製し、10  $\mu$ Lずつテラサキプレートの各ウェルに分注する。顕微鏡下でHeLa細胞単一細胞が存在するウェルを確認しておく。hMSCの調製：hMSC  $10^7$ 個からなる細胞懸濁液を調製し、リザーバー内で1.2%アガロース溶液、20%FBS含有2 $\times$ DMEM培地と混ぜ合わせる（例： $2.5 \times 10^6$ 個/mLのhMSC懸濁液4.4 mL+1.2%アガロース溶液4.4 mL+20% FBS 含有2 $\times$ DMEM培地4.4 mL）。さらに、テラサキプレート上よりピペットで単離したHeLa単一細胞を混入させ、マルチチャンネルピペットを用い、160ウェル（2枚の96ウェルプレートに80ウェルずつ）に分注する。75  $\mu$ Lの細胞/軟寒天層中に62,500個のMSCと0.00625個のHeLa細胞が含まれ、すなわち160ウェル中1ウェルに1個のHeLa細胞が含まれることになる。

前述の方法に沿って、軟寒天培養及び画像解析を行う。また、HeLa細胞が未混入であるhMSCのみでの培養も併せて行うことにより、陰性対照としてコロニーが全く検出されないことを確認する。

## 3. 正常細胞中の悪性形質転換細胞混在の有無の評価

陽性対照細胞の結果に基づいて、陽性対照細胞相当の悪性形質転換細胞の混在の有無の評価を行う。HeLa細胞を陽性対照細胞とする場合、HeLa細胞相当の細胞の混在の有無を判定することになる。陽性対照細胞の結果から、試料を分画した1ウェルにおいてコロニーが未検出となる確率（=コロニーがないウェル数/分画数（コロニーがないウェル数の確率分布））が得られる。1回の試行（複数ウェルへの試料の分画）の全てにおいてコロニーが未検出となる確率  $x$ （=試料を分画した1ウェルにおいてコロニーが未検出となる確率<sup>n</sup>分画ウェル数）が得られる。n回の試行全てにおいてコロニーが未検出となる確率（偽陰性率） $y$ は、 $y = x^n$ と表され、 $n = \log y / \log x$ という式が導かれる。この式を用いて、許容できる偽陰性率に応じた試行回数を算出することが可能である。すなわち、試験細胞試料における悪性形質転換細胞の混在の否定に必要な試行回数を陽性対照細胞の結果から見積もることが可能となる。以下に例を示す。

$10^7$ 個のhMSCに1個のHeLa細胞を混入させた細胞試料を陽性対照とし、以下の表に示すような結果が得られているとする。

1ウェル内のコロニー数	10 <sup>7</sup> 個のhMSCに1個のHeLa細胞を混入させた細胞試料を160ウェルに分画し、軟寒天コロニー形成試験を行った（試行回数6回）							ウェル数の確率分布
	試行1	試行2	試行3	試行4	試行5	試行6	平均	
0	159	160	159	159	160	159	159.3	0.9956
1	1	0	1	1	0	1	0.7	0.0044

1 ウェルにおいてコロニーが未検出となる確率、すなわちコロニーがないウェル数の確率分布（コロニーがないウェル数/分画数=159.3/160）は、0.9956である。1回の試行（複数ウェルへの試料の分画=160）の全てにおいてコロニーが未検出となる確率  $x$ 、すなわち試料を分画した1ウェルにおいてコロニーが未検出となる確率分画ウェル数は、 $0.9956^{160} = 0.4938$  となる。例えば、1%の確率で偽陰性があることを許容する場合、 $n = \log(0.01)/\log(0.4938) = 6.526$  という値が得られる。すなわち、ある細胞試料中に HeLa 細胞相当の悪性形質転換細胞が  $1/10^7$  の割合で混在していないことを示すには、陽性対照細胞と同様の操作を7回試行し、コロニーが未検出であることが確認できればよいと考えられる。

### <参考情報 8>混在する形質転換細胞の検出法としての細胞増殖特性解析

出典1 : Kono K, Takada N *et al.* Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. *Biologicals*. 2015;43:146-9. (See also: Kono K, Takada N *et al.* Corrigendum to "Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells" [*Biologicals* 43 (2) (March 2015) 146-149]. *Biologicals*. 2017;45:106.)

出典2 : Hasebe-Takada N, Kono K *et al.* Application of cell growth analysis to the quality assessment of human cell-processed therapeutic products as a testing method for immortalized cellular impurities. *Regen Ther*. 2016;5:49-54. (A corrigendum is in press.)

#### 【方法】

##### 1. 細胞

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) は、5 継代目までは Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) で培養する。ヒト脂肪由来幹細胞 (ADSC) は、5 継代目までは ADSC-BulletKit で培養する。HeLa 細胞は、Eagle's minimum essential medium に 10% ウシ胎児血清 (FBS)、0.1 mM 非必須アミノ酸溶液、50 U/mL ペニシリン、50 mg/mL ストレプトマイシンを加えた培地で培養する。hTERT で不死化した脂肪由来間葉系幹細胞 (ASC52telo) は、ADSC-BulletKit で培養する。

##### 2. 細胞増殖特性解析

5 継代目の  $1 \times 10^6$  個の hMSC に、それぞれ  $1 \times 10^3$  個 (0.1%)、 $1 \times 10^2$  個 (0.01%)、10 個 (0.001%)、1 個 (0.0001%) の HeLa 細胞を混入させ、T175 フラスコに播種する、又は、5 継代目の  $1 \times 10^6$  個の ADSC に、それぞれ  $1 \times 10^3$  個 (0.1%)、 $1 \times 10^2$  個 (0.01%)、10 個 (0.001%) の HeLa 細胞を混入させ、T175 フラスコに播種する。細胞は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) に 10% FBS、50 U/mL ペニシリン、50 mg/mL ストレプトマイシンを加えた培地 40 mL で培養し、2~3 日毎に培地交換する。およそ 90%コンフルエントに達した細胞は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗い、0.05% トリプシン-EDTA 溶液でフラスコから剥離する。剥離した細胞は、 $450 \times g$ 、5 分間遠心分離し、培地上清を除いた後、新鮮培地で細胞を懸濁する。懸濁した細胞の一部を、トリパンブルー溶液で染色し、自動セルカウンターで細胞数を計測する。 $1 \times 10^6$  個の細胞を T175 フラスコに播種し、次の継代まで培養する。この一連の操作を 10 継代目 (HeLa 細胞をスパイクした hMSC) 又は 20 継代目 (ASC52telo 細胞をスパイクした ADSC) まで繰り返す。細胞増殖速度は下記の式を用いて算出する。

$$R_n = [\log_2(N_{n+1} / N_n)] / (D_{n+1} - D_n)$$

$N_k$ ; k 継代時の細胞数、 $D_k$ ; k 継代時の日数

不死化細胞混在の判定は、細胞増殖速度を5継代目と比較し、有意な差の有無で判断する、又は、陰性対照の経時的な細胞増殖速度と比較して判断する。