

# ヒト細胞加工製品の品質・安全性評価のための未分化多能性幹細胞検出試験 及び形質転換細胞検出試験に関する留意点（案）

## 目次

1. はじめに
2. 本文書の位置づけ
3. 用語の定義
4. 一般的留意点
5. ヒト ES/iPS 細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験
  - 5.1. 原料・原材料の品質特性解析のための造腫瘍性試験
  - 5.2. 中間製品又は最終製品の造腫瘍性細胞の定量のための試験
    - 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
      - 5.2.1.2. *in vivo* 試験
    - 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
      - 5.2.2.2. *in vivo* 試験
  - 5.3. 最終製品細胞のヒトでの生着部位での腫瘍形成能を評価するための試験
    - 5.3.1. 試験動物の選択
    - 5.3.2. 対照細胞の選択
    - 5.3.3. 試験動物の数
    - 5.3.4. 細胞投与の部位と投与細胞の数及び態様
    - 5.3.5. 観察期間
    - 5.3.6. 投与部位の観察
    - 5.3.7. 投与部位の病理学的評価
    - 5.3.8. 結果の解釈
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・原材料の品質特性解析のための造腫瘍性試験
  - 6.2. 最終製品のための造腫瘍性関連試験の留意点
7. 遺伝的安定性に関する一般的留意点

## 参考文献

表1 残存する未分化 iPS/ES 細胞の検出法の詳細

表2 混入する形質転換細胞の検出法の詳細

参考情報（各種試験法プロトコール）

## 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、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なか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、平成24年9月7日付け薬食発第0907第2～6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」という。）にも定められているところである。

生物由来医薬品等の安全性関連リスクの中でもヒト細胞加工製品に特有のリスクとしては、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（ヒトES細胞加工製品）やヒト人工多能性細胞加工製品（ヒトiPS細胞加工製品）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。従って、ヒト細胞加工製品中に存在する造腫瘍性細胞（形質転換細胞及び多能性幹細胞）はハザードであり、その存在量を品質・安全性関連情報として把握することは、ヒト細胞加工製品の評価において重要である。本文書は、ヒト細胞加工製品の品質・安全性を非臨床的に評価する際の参考に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極力示しているにすぎない。よって、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、申請内容に関して拘束力を有するものではない。

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、その完全な遵守を必ずしも求めるものではない。試験の目的に叶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、本文書の他、国内外のそ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 指針の定義による他、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。生理活性物質ないし化学物質が細胞を不死化して腫瘍を誘導する能力 (腫瘍原性, oncogenicity) や、生理活性物質ないし化学物質が細胞を不死化してがんを誘導する能力 (がん原性, carcinogenicity) とは区別される。なお、本文書では、iPS/ES 細胞 (製品中では未分化 iPS/ES 細胞と称する) や腫瘍形成を惹起する恐れのある目的外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 : 微生物細胞あるいはヒト又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
- 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。
- 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をいう
- 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。
- 6) 腫瘍 : 組織、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塊
- 7) テラトーマ (奇形腫) : 2 胚葉性あるいは 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、増殖・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」とは非上皮性細胞由来の結合組織細胞に発生する悪性腫瘍である。
- 10) 腫瘤 : 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。

#### 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、同種、及びHLAホモ接合型の同種のものなどが想定される。ヒト細胞加工製品は態様（例：細胞懸濁液や細胞シート等）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、このような多様性にに基づき、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的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・原材料の品質特性解析のための造腫瘍性試験、②中間製品又は最終製品中に混在する可能性のある造腫瘍性細胞の検出・定量のための試験、③最終製品に含まれる可能性のある造腫瘍性細胞の動物体内での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。原料・原材料としての細胞集団の造腫瘍性あるいは製品細胞集団中に混在する可能性のある造腫瘍性細胞を検出する系としていくつかの*in vitro*試験法又は*in vivo*試験法がある（表1、表2）。これらの試験法の原理を理解し、検出限界等の性能を確認したうえで取捨選択し、評価目的に応じた試験系をデザインすること。

##### 5.1. 原料・原材料の品質特性解析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（原料又は原材料）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、その品質特性の一つとしてテラトーマ形成能（造腫瘍性）を確認することになる。この際の造腫瘍性試験にあたっては、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中の造腫瘍性細胞の定量のための試験

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、目的細胞ないしその前駆細胞に加え、残存する未分化なヒトES/iPS細胞及びその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。ヒトES/iPS細胞は生体に移植されればテラトーマ形成能（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、腫瘍形成を惹起する恐れのある目的外形質転換細胞の混在量とともに品質特性（目的外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 細胞及びヒト 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、*LIN28* 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、中間製品の段階で未分化なヒト ES/iPS 細胞の混在が否定された場合には、最終製品での混在量の検討を省略することができる。また、軟寒天コロニー形成試験により混在ヒト 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 細胞の検出や混在量については、評価対象や感度を考慮すると、一般に適切な *in vitro* 試験が考慮されることになる。ただし、中間製品又は最終製品における未分化ヒト ES/iPS 細胞の混在量は、免疫不全動物への移植後の腫瘍形成を指標にして、数か月に及ぶ長期間の（生体内）培養により評価することも可能である。この *in vivo* 試験により、*in vitro* 試験では評価できない異所を含む生体内細胞環境下での長期増殖における製品細胞中の混在造腫瘍性細胞の検出や腫瘍形成に関する情報が得られる可能性がある。*In vitro* 試験のみでは不十分と考えられる製造方法、製品細胞の品質特性、あるいは移植法などで懸念が残る場合には、*in vivo* 試験法の適用を考慮する。なお、免疫不全動物としては、NOD/SCID/ $\gamma$ Cnull (NOG)<sup>6</sup>, NOD/SCID/IL-2R $\gamma$ KO (NSG)<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>。Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup>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 NSG マウスよりも低いことが知られているため<sup>11</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。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、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本項の目的には適さない<sup>10</sup>。

製品細胞に混入する未分化ヒト 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細胞移植による試験の設定が必須である。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>8,10,12</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、製品をトリプシン処理せずに投与する方法以外に、トリプシン処理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繊維芽細胞とともにマトリゲルに懸濁して投与する<sup>13</sup>、などの方法がある。

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、もし、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。投与部位については、手技が簡単で、手技熟練度によるバラツキを防ぎ、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背部皮下が一般的に用いられる。

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。設定した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皮下に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あらかじめ確認しておく。

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>以上の混入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。

中間製品の段階で未分化なヒト ES/iPS 細胞の混在が否定された場合には、最終製品での混在量の検討を省略することができる。また一般には、ES/iPS 未分化細胞検出 *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) と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細胞検出<sup>14</sup>や、軟寒天コロニー形成試験<sup>2,8</sup>及びデジタル軟寒天コロニー形成試験<sup>15</sup>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。

不死化細胞検出のための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悪性度の高い形質転換細胞に限られる。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。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うえで培養をせずに、分子生物学的に混入量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、きわ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ここで示すことはできない。なお、臨床での使用時には、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マネジメントプランを予め講じておくこと。

#### 5.2.2.2. *in vivo* 試験

腫瘍形成能を持つ形質転換細胞は、適切な細胞特性指標を用いて *in vitro* 試験で検査し、否定することが望ましい。ただし、中間製品又は最終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可能である。免疫不全動物としては、NOD/SCID/ $\gamma$ Cnull (NOG)<sup>6</sup>、NOD/SCID/IL-2R $\gamma$ KO (NSG)<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>8,10,12</sup>。Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup>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NSGマウスよりも低いことが知られているため<sup>11</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。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、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ためには、陽性対照細胞とする造腫瘍性形質転換細胞が設定されていないと評価系試験の結果を基にした混在量の定量化ができない。したがって、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定すること。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皮下に移植した複数の群を設定し、最低腫瘍形成用量 (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。この場合、製品細胞中の形質転換細胞の定量化は可能である。

混在する可能性のある形質転換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 細胞を陽性対照細胞として用量を変えて移植し、HeLa 細胞による腫瘍形成の検出限界移植用量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 HeLa 細胞等の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、手技熟練度によるバラツキを防ぎ、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深い場合（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。

陽性対照群の中で腫瘍形成が認められる最低腫瘍形成用量 (TPD<sub>min</sub>) を確認するとともに、陽性対照群の中のすべての用量において腫瘍形成確率が一定値に達する時点を十分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<sub>50</sub>, tumor-producing dose at the 50% end-point)<sup>1</sup> も算出し、これを *in vivo* 評価試験系の造腫瘍性検出感度の指標としたうえで、製品細胞を一定期間皮下移植し、製品細胞中の造腫瘍性細胞の推定混入量の議論を行う。試験系の性能及び試験結果の信頼度を確保するため、陽性対照群中の各々の細胞用量群の匹数は最低でも 6 匹にすることが望ましい。

製品細胞の投与時に使用する培地は、陽性対照細胞の増殖に適したものが利用可能で、しかもその培地が製品細胞の増殖を阻害しないものであるならば、それを使用する。

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現実的に一匹に投与できる細胞数の最大量を移植する。また匹数は同一製品細胞を 1 ロットとして 10 匹/ロット、最低でも事象発生時の統計学処理が可能となる最低数 6 匹/ロットを確保する。腫瘍が観察されなかった（陰性であった）場合は、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> 以上の混入がないことを統計学的確からしき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。

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、ヒトでの悪性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、上述した作業や評価は、最も厳密な意味で試験を実施する場合の例である。*In vivo* 試験は *in vitro* 試験の結果を十分ふまえた上で計画することが望ましい。例えば、*in vitro* 試験での結果をふまえた上で、念のため、*in vivo* で確認しようとする目的の場合などには、*in vitro* 試験での感度、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>16,17</sup>。したがって、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リスクマネジメントプランを予め講じておくこと。

### 5.3. 最終製品細胞のヒトでの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必要な情報例としては、①未分化ヒト ES/iPS 細胞の残存量、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。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) 試験動物の選択、b) 対照細胞の選択・試験系の検出限界、c) 試験動物の数、d) 細胞投与の部位と投与細胞の数及び態様、e) 観察期間、f) 投与部位の観察、g) 投与部位の組織評価、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>16,17</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を考える。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* での評価が意義のある情報を提供する可能性が高いからである。

#### 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、NOD/SCID/ $\gamma$ Cnull (NOG)<sup>6</sup>、NOD/SCID/IL-2R $\gamma$ KO (NSG)<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>。Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup>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NSGマウスよりも低いことが知られているため<sup>11</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まれである。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が問題となる場合は、動物疾患モデルの使用も考慮する。この場合、動物疾患モデル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動物疾患モデルを用いた試験系は、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、かつ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の場合がある。それゆえ試験目的等も勘案して、動物疾患モデル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、あるいは疾患モデルを作成することが困難などの問題がある。その場合、ヌードラット（T 細胞が欠失）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>10,18</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。

残存未分化 ES/iPS 細胞は混在せず、一方想定される形質転換細胞の存在が明らかで、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>、腫瘍形成最少容量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、そのような例はまれ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うえでなされるものであることに注意すること。

使用する試験動物が腫瘍を自然発症しやすい場合には、ヒト正常二倍体細胞などの陰性対照細胞を投与する試験を考慮する。

### 5.3.3. 試験動物の数

試験動物の数は、1 群につき 10 匹以上で実施することが望ましい。定量的測定項目におけるデータのばらつきが母集団のばらつきを概ね反映しているようにするためには、1 群につき最低でも 6 匹以上で実施することが望ましい。陽性対照群の TPD<sub>min</sub> 以上の混入がない

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>。

#### 5.3.4. 細胞投与の部位と投与細胞の数及び態様

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の細胞を投与することすら困難な場合も多い。もしも、物理学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な部位に同様な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。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。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であったり、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。投与細胞の態様は、可能であれば、最終製品の態様と同様なものとする。

#### 5.3.5. 観察期間

最低1週間に3回の頻度で、製品細胞が投与された部位の腫瘍形成を観察や触診、画像診断などの方法により確認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、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、陽性対照群の中で腫瘍形成が認められる最低腫瘍形成用量（ $TPD_{min}$ , minimum tumor-producing dose）を確認し、 $TPD_{min}$  における腫瘍形成確率が一定値に達する時点を十分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、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ると仮定し、かつ検出限界を  $TPD_{min}$  としたうえでの判断になる。NOG マウスに皮下投与した場合、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>8,10,12</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な場合など、投与後に生着部位において投与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。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、フォローアップおよ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。陽性対照群のない場合は、被験製品の投与後か

ら動物が死亡するまでの間、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。その短径と長径を望ましくは最低1週間に3回の頻度で測定し、腫瘍の成長を評価すること。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、実施すること。

腫瘍の成長が過度な場合には、苦痛を停止させる目的で、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殺処分しないこと。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。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・記載しておく。また他の提出臓器については目視で腫瘍の有無を確認し、ヒト細胞の浸潤・遠隔転移がないかヒト細胞遺伝子特異的なAlu配列に着目したAlu PCR<sup>19</sup>等で確認しておく。摘出した組織は全て保存しておく。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、移植組織を摘出し移植したヒト細胞の組織像を検討する。その際“移植細胞が移植片摘出前まで生存していたが、腫瘍形成能はなかった、また目的の組織像であった”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(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の由来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、試験系の検出限界を踏まえて考察すること<sup>8)</sup>。

## 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・原材料の品質特性解析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、その品質特性評価として造腫瘍性試験をする場合には、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>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のみ検討すればよい。

既に世界各地でヒト細胞の移植医療やヒト体細胞加工製品及びヒト体性幹細胞加工製品の臨床応用が進んでいるが、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という科学論文や症例報告などとして報告されたものは、ヒト胎児由来神経幹細胞を用いた毛細血管拡張性運動失調症の治療により良性の脳腫瘍が形成されたとするもの<sup>20</sup>や、自家嗅粘膜移植後の腫瘍形成事例<sup>21</sup>、広域かつ複数回の自家培養皮膚移植後の腫瘍発生の例<sup>22,23</sup>のような限られたものしかない。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、投与による腫瘍形成の報告はない。過去にヒト間葉系幹細胞の *in vitro* 培養時の自発的な悪性形質転換が 4 件報告されているが、このうち 2 件<sup>24,25</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>26,27</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、平成 26 年 8 月 6 日厚生労働省令第 93 号「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準」（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・体性幹細胞加工製品については、一般的には、非臨床安全性試験として免疫不全動物を用いた *in vivo* 造腫瘍性試験を行う必要性はない。

ただし、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又はそれと同様な細胞が投与製品中に含まれる場合など、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を実施すること。

## 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（SNP）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、潜在的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、一定の継代数もしくは分裂数ごとに、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、これらの技術は臨床用細胞の特性解析として有用であるが、出荷基準というよりも現時点ではまず参考情報を得るために解析されるものである。

## <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. 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.
12. Kanemura H *et al.* Pigment epithelium-derived factor secreted from retinal pigment epithelium facilitates apoptotic cell death of iPSC. *Sci Rep*. 2015;5:17892.
13. Hentze H *et al.* Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res*. 2009;2:198-210.

14. 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.
15. 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
16. Suzuki M *et al.* Dormant cancer cells retrieved from metastasis-free organs regain tumorigenic and metastatic potency. *Am J Pathol*. 2006;169:673-81.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Amariglio N *et al.* Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 2009;6: e1000029.
21. Mamelak AN *et al.* Fatal cyst formation after fetal mesencephalic allograft transplant for Parkinson's disease. *J Neurosurg*. 1998;89:592-8.
22. Theopold C *et al.* Graft site malignancy following treatment of full-thickness burn with cultured epidermal autograft. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114:1215-9.
23. Singh M *et al.* Invasive squamous cell carcinoma in full-thickness burn wounds after treatment with cultured epithelial autografts. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2015;3:e460.
24. Garcia S *et al.* Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 2010;316:1648-50.
25. 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.
26. Wang Y *et al.* Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 2005;7:509-19.
27. 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 iPS/ES 細胞の検出・定量法

試験法	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験 (NOG x Matrigel, 皮下投与)	軟寒天コロニー形成試験	フローサイトメトリー
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	未分化な多能性幹細胞の検出
所要時間	12-16 週間		1 日
利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>直接的</li> <li>臨床適用相当部位の微小環境での造腫瘍性を評価可能</li> </ul> ⇒非臨床安全性試験に適用可能		<ul style="list-style-type: none"> <li>短時間・簡便</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> </ul>
欠点・注意点	<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>ヒト iPS 細胞検出には使用できない (分散誘導性細胞死のため)</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>
検出限界又は検出力	hRPE2.5 出力に <sup>5</sup> 個中に 1,000 個 (0.4%) の割合で混入する hiPS 細胞を 50% の確率で検出		hRPE 中の 0.1% の iPS 細胞 (マーカー:TRA-1-60)
出典	Kanemura <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2013	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 iPS/ES 細胞の検出・定量法

試験法	qRT-PCR	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	未分化な多能性幹細胞の検出
所要時間	6 時間	数時間	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> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 迅速</li> <li>◆ 簡便</li> <li>◆ 高感度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 非破壊的</li> <li>◆ 簡便</li> <li>◆ 高スループット</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> </ul>
欠点・注意点	<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>	<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>	<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> <li>◆ 培地成分が結果に影響</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 時間がかかる</li> <li>◆ スループットが低い</li> </ul>
検出限界 又は 検出力	hRPE 中の 0.002%以下の iPS 細胞 (マーカー: <i>LIN28</i> )	ヒト心筋細胞中の 0.001%の iPS 細胞 (マーカー: <i>LIN28</i> )	HEK293T 中の 0.05%の iPS 細胞 (マーカー: H3+ポドカリキシン)	hMSC 中の 0.01-0.001%の iPS 細胞  ヒト胚葉体中の 0.1-0.01%の iPS 細胞
出典	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE</i> . 2012	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 (NOG x Matrigel, 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
所要時間	16 週間以上	3-4 週間	3-4 週間	4 週間又はそれ以上
利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>直接的</li> <li>高感度</li> <li>臨床適用相当部位の微小環境での造腫瘍性を評価可能 ⇒非臨床安全性試験に適用可能</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>安価で簡便</li> <li>良性も悪性も幅広く不死化細胞を検出</li> </ul>
欠点・注意点	<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 (・良性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 (・良性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 (・良性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 (・良性と悪性を区別できない)</li> </ul>
検出限界 又は 検出力	hMSC に 1/10 <sup>6</sup> (0.0001%) の割合で混入する HeLa 細胞 (10 個) を 17% の確率で検出可能	hMSC に 1/10 <sup>3</sup> (0.1%) の割合で混入する HeLa 細胞 (計算上は 0.02%)	hMSC に 1/10 <sup>7</sup> (0.00001%) の割合で混入する HeLa 細胞	hMSC に 1/10 <sup>5</sup> (0.001%) の割合で混入する HeLa 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

## <参考情報1>混在する未分化 iPS/ES 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(1):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(リプロセル)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もしくは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 (59-G, K21-G, 101-G, RNT9, RNT10)又はPOU5F1, SOX2, KLF4, MYCL, LIN28A及びp53shRNA (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(リプロセル)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もしくは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DMEM:F12 (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(ロンザ)で維持培養する. 浮遊培養したヒトiPS細胞由来RPE細胞は, 皮下投与に用いるか, もしくはコラーゲンゲル上に捲き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%FBSと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するか, 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もしくは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/cA, JCl-nu/nu), SCIDマウス(C.B-17/Icr-scid/scid, Jcl), NOD-SCIDマウス(NOD/ShiJic-scid, Jcl)もしくはNOGマウス

(NOD/ShiJic-scld, IL-2R $\gamma$ OD/S 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ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色する。様々な投与量のヒトiPS細胞201B7又は $1 \times 10^6$ 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もしくは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、200  $\mu$ Lのマトリゲルと混合したRPEを含む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1 mm四方のヒトiPS細胞由来RPE細胞シートの入った2  $\mu$ LのDMEM/F12培地を、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RNeasy plus Mini Kit (キアゲン) を用いて抽出する。混入するゲノムDNAはgDNA Eliminator spin columnで除去する。PrimeScript RT Master Mix (タカラバイオ) とPrimeSTAR MAX DNA Polymerase (タカラバイオ)を用いて、50 ngの総RNAからcDNAを作製する。リアルタイムPCRはABI 7000 Sequence Detection System (アプライドバイオシステムズ) とSYBR-greenで、説明書に従い行う。遺伝子発現量はGAPDHで補正する。定量RT-PCRはQuantiTect Probe one-step RT-PCR Kit (キアゲン) を用いて行う。標的遺伝子の発現量は、TaqMan human RNase P control reagents (アプライドバイオシステムズ) で測定した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、下表に記載。

#### 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 (タカラ) を用いる。ヒトHeLa DNA : マウスNIH3T3 DNAが様々な割合のDNAテンプレートを, Alu PCR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、ヘマトキシリン・エオジン (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 (1:200; ab108595; Abcam), 抗BEST1 抗体 (1:200; ab2182; Abcam) 及び抗 Ki-67 抗体 (1:400; #9449; Cell Signaling) で染色する。核は、Hoechst 33258 (同仁化学) もしくは DAPI (同仁化学) 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 (1: 100; sc-5279; Santa Cruz) 又は抗 BEST1 抗体 (1: 200; ab2182; Abcam) で染色する。抗体は、Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (1: 1,000; Invitrogen) 又は Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1: 1,000; Invitrogen) を用いて可視化する。蛍光顕微画像は、蛍光顕微鏡 (Olympus BX51, IX71) により取り込む。

表 プローブとプライマーの配列

Primers for RT-PCR			
Gene	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')	
<i>LIN28A</i>	CACGGTGCGGGCATCTG	CCTTCCATGTGCAGCTTACTC	
<i>POU5F1</i>	GAAACCCACACTGCAGCAGA	TCGCTTGCCCTTCTGGCG	
<i>BEST1</i>	ATCAGAGGCCAGGCTACTACAG	TCCACAGTTTTTCCTCCTCACTT	
<i>CRALBP</i>	GACTGGGGTTAAATCTCACAGC	TGACATGTTGCCTATGGAAGAC	
<i>PAX6</i>	TTAACACACTTGAGCCATCACC	AAATCTCGGATGTCTGTCCACT	
<i>TYR</i>	AGCCCAGCATCATCTTCTC	GGCGTTCATTGCATAAAGA	
<i>GAPDH</i>	CGATGCTGGCGCTGAGTAC	CCACCACTGACACGTTGGC	
Probes and primers for qRT-PCR			
Gene	Probe sequence (5'→3')	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
<i>LIN28A</i>	CGCATGGGGTTCGGCTTCCTGTCC	CACGGTGCGGGCATCTG	CCTTCCATGTGCAGCTTACTC
<i>POU5F1</i>	CGGACCACATCCTTCTCGAGCCCAAGC	GAAACCCACACTGCAGCAGA	TCGCTTGCCCTTCTGGCG

## <参考情報 2> 混在する未分化 iPS/ES 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

サンプルとなる細胞 (iPS を分化させた細胞など) から Total RNA を抽出する. RNeasy Mini Kit プロトコールに従う. QIAshredder 処理と DNase 処理を行う.

#### 2. Quantitative RT-PCR

2.1 PCR mixture を以下のように調製する.

##### a) PCR mixture (LIN28)

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

##### b) PCR mixture (GAPDH)

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

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整

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.

b) GAPDH 測定用

- 検量線用のテンプレートの調整  
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 well プレートに PCR mixture を 20 μL/well ずつ添加する.

2.4 テンプレート溶液を 5 μL/well 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 (ABI 7300 等).

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 サイクルで OK)		

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 で調整する (陽性対照)。

使用試薬

品名	メーカー名	型番
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74106
QIAshredder	Qiagen	79656
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	Qiagen	204445
TaqMan® GAPDH Control Reagents (human)	Life technologies	402869
LIN28 Probe Primer set	Sigma Genosys	下表参照

LIN28 probe, primer 配列

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

Primer: 100 μM, Probe: 20 μM に調整する。

**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 iPS/ES 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.

*Regenerative Therapy.* 2015;2:17-23.

#### 【方法】

##### 1. Total RNA 抽出

サンプルとなる細胞 (iPS を分化させた細胞など) から Total RNA を抽出する. RNeasy Mini Kit プロトコールに従う. QIAshredder 処理と DNase 処理を行う.

##### 2. Droplet digital PCR

2.1 PCR mixture を以下のように調製する.

PCR mixture

	Final conc.	Assay/well ( $\mu$ L)
2 x One-Step RT-ddPCR Supermix	1x	10
25 mM Manganese	1x	0.8
50 uM Forward Primer	0.75 $\mu$ M	0.3
50 uM Reverse Primer	0.75 $\mu$ M	0.3
50 uM TaqMan Probe	0.25 $\mu$ M	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整  
未分化 iPS 細胞由来 RNA 濃度を 0.1, 0.03, 0.01, 0.003, 0.001, 0 ng/ $\mu$ L 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/ $\mu$ L になるように調製する.

2.3 PCR tube に PCR mixture を 15 $\mu$ L/well ずつ添加する.

2.4 RNA 溶液を 5 $\mu$ L/well ずつ添加する. (よく混合する)

2.5 Droplet Generator (Bio-Rad) 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 96well plate に移す.

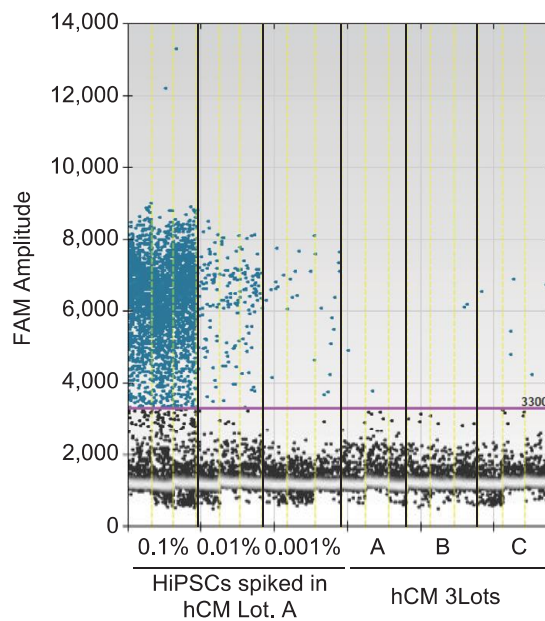
2.7 RT-PCR 反応 (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad)

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 (Bio-Rad) を用いて解析する.

図. ヒト心筋細胞に iPS 細胞をスパイクして LIN28 mRNA を測定したデジタル PCR の例



使用試薬

品名	メーカー名	型番
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74106
QIAshredder	Qiagen	79656
One-Step RT-ddPCR Kit for Probes	Bio-Rad	1863022
LIN28 Probe Primer set	Sigma Genosys	下表参照

LIN28 probe, primer 配列

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

Primer, Probe: 50 μM に調整する.

**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.
- ・ Threshold 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 Wako Code#: 299-78301
- ・遠心機 (1,700 x gで遠心が可能な遠心機)
- ・ボルテックスミキサー
- ・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、あるい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) の関係は異なる場合がある。標準曲線は細胞株毎およ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°C ~ 25°C 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、使用後速やかに冷蔵に戻して保管する。

<試料 (培養上清) の調整法>

- ・測定対象試料およ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>

- ・細胞株毎およ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）]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 倍ず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 倍ず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（10x）、発色停止液、プレートシールを室温にする（HRP 標識抗体溶液および TMB 溶液以外の試薬）。
- ・洗浄液（10x）を室温の蒸留水で 10 倍希釈する。洗浄液（1x）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  $5\ \mu\text{L}$  を添加して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 (x1)、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およ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 (x1)、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 (1x)、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、場合により陰性およ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 iPS/ES 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(10):e110496.

### 【方法】

1. ヒト iPS 細胞から間葉系幹細胞 (MSC) 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

DPBS(-)で 20 µg/ml に希釈した LN521 (BioLamina 社) を培養用プレート (BD 社等) に添加 (1 ml / 10 cm<sup>2</sup>) 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, DPBS(-)で洗浄. Essential 8 培地 (Invitrogen 社) で一度洗った後, Essential 8 培地を添加 (2 ml / 10 cm<sup>2</sup>) し, 細胞を播種するまで 37°C でインキュベートする.

#### 1.2 ポジティブコントロールの調製

分化細胞として MSC (Lonza 社) 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 細胞の混入率が 1, 0.1, 0.01% の場合, 1x10<sup>5</sup> 個の MSC 中に 1x10<sup>3</sup>, 1x10<sup>2</sup>, 1x10<sup>1</sup> 個の割合で iPS 細胞をそれぞれスパイクさせる. また iPS 細胞の混入率が 0.001% の場合, 6x10<sup>5</sup> 個の MSC 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. (MSC 細胞が 1x10<sup>5</sup> の場合は 35 mm dish (又は 6 well), 6 x 10<sup>5</sup> の場合は 100 mm dish 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, チップあるい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, ポジティブコントロールで, 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, ポジティブコントロールで検出されるコロニー

数と比較することで、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 (JCRB 細胞バンクから入手) 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 MEM 培地を用い、hMSC の培養では Lonza 社の MSCGM 培地を用いる。

##### 1.2 細胞移植と腫瘍形成の観察

1.2.1 80%コンフルエントに達した各細胞を 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)  $10^6$  個の hMSC に  $10^1$  個 (0.001%),  $10^2$  個 (0.01%),  $10^3$  個 (0.1%),  $10^4$  個 (1%) 個の HeLa を混入する。2)  $10^7$  個の hMSC に  $10^1$  個 (0.0001%),  $10^2$  個 (0.001%),  $10^4$  個 (0.1%) 個の HeLa 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、HeLa 培地とマトリゲル (Corning #354234) 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 $\gamma$ null マウス) 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 群辺り 6 匹以上を用いる。

1.2.3 毎週、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。腫瘍が 20 mm<sup>3</sup> を超える大きさに達した場合、もしくは 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 4%パラホルムアルデヒド溶液に保存する。

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-Karber 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入の有無の評価

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)  $x$  ( $=1 -$  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 を混入させた hMSC  $10^7$  個 (HeLa 混入率 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 相当の造腫瘍性細胞が  $1/1000000$  の割合で混入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 相当の造腫瘍性細胞が  $1/1000000$  の割合で混入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  $10^7$  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.

*Scientific Reports.* 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 (JCRB 細胞バンクから入手) 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 MEM 培地を, hMSC の維持培養には MSCGM 培地 (Lonza 社) 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 1×DMEM 培地及び 20%FBS 含 2×DMEM 培地, 低融点アガロース (Lonza 社, 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, Black wall glass-bottom 96-well plates (Greiner) 又は clear, flat-bottom non-treated 96-well plates (BD Falcon)を用いており, 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 (Watson), 0.25%トリプシン-EDTA 溶液, 4% PFA 溶液, PBS, Buffer QG (Qiagen) (寒天培地溶解用バッファー), ハイコンテツイメーjingシステム (IN Cell Analyzer (GE Healthcare) 等) 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 100µl (10%FBS 含 1×DMEM 培地)
細胞/軟寒天層 75µl (10%FBS 含 1×DMEM 培地, 0.4%アガロース含)
底部寒天培地層 50µl (10%FBS 含 1×DMEM 培地, 0.6%アガロース含)

図. 軟寒天培養 (96well プレート 1 ウェルの断面図)

準備として, 10%FBS 含 1×DMEM 培地と 20%FBS 含 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 2×DMEM 培地と 1.2%アガロース溶液を 1:1 の割合で混ぜ, 96well プレートの各ウェルに 50 µl 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 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 10,000 個の細胞を播種する場合、400,000 個/ml の濃度で懸濁液を調製しておく→10,000 個/25  $\mu$ l）。10%FBS 含 1×DMEM 培地で調製した細胞懸濁液、20%FBS 含 2×DMEM 培地、1.2%アガロース溶液を 1:1:1 の割合で混ぜ、96 well 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 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 ハイコンテンツイメージ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 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 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（IN Cell Analyzer 2000 を利用）

4 倍の対物レンズを使用し、96 well 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（IN Cell Developer Toolbox v1.9 softwareを使用）

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（1000万個のhMSC中に混入する1個のHeLaの検出の場合）

HeLa細胞の調製：HeLa単一細胞は、50-100個/mlのHeLa懸濁液を調製し、10 µlずつテラサキプレート各ウェルに分注する。顕微鏡下でHeLa単一細胞が存在するウェルを確認しておく。hMSCの調製：hMSC 10,000,000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2×DMEM培地と混ぜ合わせる（例：2.5 x 10<sup>6</sup>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2×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 wellプレートに80ウェルずつ）に分注する。75 µlの細胞/軟寒天層中に62,500個のMSCと0.00625個のHeLa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、ネガコン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入の有無の評価

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入の有無の評価を行う。HeLaを陽性対照細胞とする場合、HeLa相当の細胞の混入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入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。

1000万個のhMSCに1個のHeLa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	1000万個のhMSCに1個のHeLa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<sup>n</sup>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 相当の悪性形質転換細胞が 1/10,000,000 の割合で混入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良いと考えられる.

## <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：Kono *et al.* Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells.

*Biologicals.* 2015;43:146-9.

### 【方法】

#### 1. 細胞

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC; Lonza) は、5 継代目までは Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCGM; Lonza) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (Lonza) を加えた Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) で培養する。HeLa 細胞 (Japan Collection of Research Bioresources 細胞バンク) は、Eagle's minimum essential medium (Sigma) に 10% ウシ胎児血清, 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。

#### 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 1000 個 (0.1%), 100 個 (0.01%), 10 個 (0.001%) の HeLa 細胞を混入させ、T175 フラスコ (Corning) に播種する。細胞は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco) に 10% ウシ胎児血清, 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 (Gibco) 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、Countess 自動セルカウンター (Invitrogen) 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

不死化細胞混入の判定は、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。