

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医薬品等規制調和・評価研究事業  
(英語) Research on Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices

研究開発課題名： (日本語) セル・バンク等を構築する幹細胞等由来製品のウイルス否定試験における評価技術要件に関する研究  
(英語) Studies on viral safety of stem cell products which are manufactured using cell-bank system.

研究開発担当者 (日本語) 都築学園 日本薬科大学薬学部 客員教授  
所属 役職 氏名： (英語) Teruhide Yamaguchi、Visiting Professor、Nihon Pharmaceutical University

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 安全性の高い再生医療製品に用いる原材料のウイルス不活化・除去の評価法の確立  
開発課題名： (英語) Viral clearance study on raw materials for the highly safety regenerative medicines

研究開発分担者 (日本語) 難治性疾患研究開発・支援センター センター長 松山 晃文  
所属 役職 氏名： (英語) Akifumi Matsuyama , Director ,Center for Rare Disease Research.

分担研究 (日本語) インビトロウイルス試験のための陽性コントロールの設定等の整備や試験法の標準化最適化  
研究開発課題名 (英語) Preparation of positive control for in vitro virus tests and optimization of test methods  
研究開発分担者 (日本語) 難治性疾患研究開発・支援センター プロジェクトリーダー 小原有弘  
所属 役職 氏名： (英語) Arihiro Kohara, Leader of Project, Center for Rare Disease Research.

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### （和文）

#### 1. インビトロウイルス試験系を最適化するためのウイルス感受性の高い細胞の樹立

これまでインビトロ試験法として汎用されている Vero 細胞、HEK293 細胞等のクローニングおよび最適化を行った。これらの細胞を用いた試験法の SOP を作製した。さらに、これらの細胞ストックの品質管理を実施し、一部の細胞の配布できる体制を整えた。

#### 2. インビトロウイルス試験のための陽性コントロールの設定等の整備や試験法の標準化最適化

潜在性ウイルスの活性化検出のためのモデル系の確立を目指し、TPA 等の薬剤により EBV の再活性化がみられる細胞株を新たに見出した。この細胞株は従来 EBV が潜在化していると報告されている RAJI 細胞よりさらに高い再活性化が認められ、再活性化をスクリーニングする陽性コントロールとなることが期待される。

#### 3. 安全性の高い再生医療製品に用いる原材料のウイルス不活化・除去の評価法の確立

加温法、ガンマ線照射法、電子線照射法等を用いた再生医療等製品の製造に用いる原材料のウイルスクリアランスについて検討した。血清等の高濃度タンパク質原材料のウイルス不活化法として、エンベロープウイルスについては頑健性の高い（4log 以上）のクリアランス工程を 2 つ以上組み合わせることにより 9log 以上のクリアランス工程を明確化した。

### （英文）

#### 1. Optimization of in vitro virus tests

Vero cells and HEK293 cells have been cloned and selected for optimized in vitro virus tests, and then SOP for in vitro tests using these optimized cells has been described. These cell stocks will be available for researchers.

#### 2. Preparation of positive control for in vitro virus tests and optimization of test methods

In order to establish the positive cells for the virus-latent cells, the screening for EBV-positive cells which are induced by TPA or other stimulants have been successfully surveyed. A novel cell has been identified and will be useful for the detection of latent virus.

#### 3. Viral clearance study on raw materials for the highly safety regenerative medicines

The pasteurization, gamma ray irradiation, and electron beam irradiation methods have been evaluated for virus clearance of raw materials used for manufacturing of regenerative medicinal products. As a virus inactivation method of raw materials with high concentration of proteins such as serum, 9 logs or more clearance should be attained by combining two or more clearance steps, of which viral clearances have high robustness (4 log or more).

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌2件、国際誌3件）

#### 山口照英(研究開発代表者)

##### 英文業績

1. Yamaguchi,T., Uchida,E.: Oncolytic Virus: Regulatory Aspects from Quality Control to Clinical Studies. *Curr Cancer Drug Targets*. 2017 Feb 22. doi: 10.2174/1568009617666170222142650.
2. Kanayasu-Toyoda T, Tanaka T, Kikuchi,Y. Uchida,E. Matsuyama,A. Yamaguchi T.:Cell-surface MMP-9 protein is a novel functional marker to identify and separate pro-angiogenic cells from early endothelial progenitor cells derived from CD133+ cells. *Stem Cells*. 34, 1251–1262 (2016)
3. Medina,RJ. Barber,CH. Dignat-George,F. Melero-Martin,JM. Khosroterani,K. Ohneda,O. Randi,AM. ChanJKY. Iruela-Arispe,ML. Yamaguchi,T. Hinsbergh,VV. Yoder,MC. Stitt,A.: Endothelial Progenitor: A consensus statement on nomenclature. *Stem Cells Transl. Med* in press
4. Okura H and MatsuyamaA. History of Development and Regulations for Regenerative Medicines in Japan. *J Stem Cell Res Ther*. 2017. 7:1.
5. Okura H and Matsuyama A. Current available rapid microbial tests for translational medicine. *Translational Biomedicine*. 2016, 7:3.
6. Okura H and Matsuyama A. Regulatory aspect of pre-clinical studies for regenerative medicine. *Translational Medicine*. 2016, 6:4.
7. Okura H and Matsuyama A. Critical Path Initiative for Regenerative Medicine in Japan. *Gene Therapy and Cell Therapy Through the Liver*. Springer Japan. 2016.139-146.
8. Uchio-Yamada K, Kasai F, Ozawa M, Kohara A.: Incorrect strain information for mouse cell lines; sequential influence of misidentification on sublines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2017, 53(3), 225-230.
9. Kasai F, Hirayama N, Ozawa M, Iemura M, Kohara A.: Changes of heterogeneous cell populations in the Ishikawa cell line during long-term culture: Proposal for an in vitro clonal evolution model of tumor cells. *Genomics*. 2016, 107(6), 259-66.
10. Lorge M, Moore M.M, Clements J, O'Donovan M, Fellows M.D, Honma M, Kohara A, Galloway S, Armstrong J, Thybaud V, Gollapudi B, Aardema M.J, Tanir J.Y.: Standardized cell sources and recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing. *Mut. Res*. 2016, 809, 1-15.
11. Kasai F, Pereira J, Hirayama N, Shioda S, Kohara A, Ferguson-Smith M.: Characterization of Translocation by Chromosome Sequencing on Flow-Sorted Chromosomes: Robust Methods for Identification of Genomic Breakpoint Junctions. *Cytogenet Genome Res*. 2016, 148(2-3), 151
12. Chondrogenic potentials of human synoviocytes prepared from osteo- or rheumatoid arthritis joints. Kasamatsu-Onishi A, Kosaka T, Satoh M, Uchio-Yamada K, Yoshida T, Kohara A. *Tissue Culture Research Communications*. 2016, in press.

##### 和文業績

1. 山口照英、内田恵理子: 遺伝子治療関連法規。(細胞治療認定管理師制度指定カリキュラム)PP. 28-38、(2016)
2. 内田恵理子、古田美玲、山口照英: 再生医療・細胞治療製品のマイコプラズマ検査。(月刊バイオインダストリー2016年9月号)
3. 大倉華雪・松山晃文 「新GMP微生物試験法第3版」第22章微生物迅速試験法の実際 P. 555-561 じほう 2016年9月刊行
4. 松山晃文 「再生医療研究が果たしうる医療・社会変革」再生医療 2016 (15) p5 -OPINION-
5. 松山晃文 「再生医療実現にむけた課題」 *BioClinica* 31 (3) 2016 (253) PP. 43-46
6. 厚生労働省の生物資源バンクの取り組みについて. 小原 有弘, 佐藤 元信, 小阪 拓男, 吉田 東歩, 松山 晃文. *Organ Biology*. 2016, 22(1), 142-146.

7. 厚生労働省の生物資源バンクの取り組みについて. 小原 有弘, 佐藤 元信, 小阪 拓男, 吉田 東歩, 松山 晃文. Organ Biology. 2016, 22(1), 142-146.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「再生医療の実現化・行程管理への取り組み」, 口頭, 松山晃文, 日本再生医療学会 (仙台国際センター), 2017/3/9, 国内
2. 「再生医療の臨床はどこまですすんだのか?」共同座長, 口頭, 松山晃文,
3. 「再生医療と OMICS」, 共同座長, 口頭, 松山晃文, 第 15 回日本再生医療学会総会 スポンサーシップシンポジウム 2 第 15 回日本再生医療学会総会 大阪国際会議場於, 2016/3/19, 国内
4. 多指 (趾) 症の形成外科的手術において摘出される余剰組織の研究資源化及び分譲, ポスター, 杉原望, 小阪拓男, 佐藤元信, 大西礼, 吉田東歩, 小原有弘, 絵野沢伸, 松山晃文, 日本組織培養学会第 89 回大会, 2016/5/25, 国内
5. Characterisation of translocation by chromosome sequencing on flow sorted chromosomes; robust methods for identification of genomic breakpoint junctions, 口頭, Kasai F, Pereira J, Hirayama N, Shioda S, Kohara A, Ferguson-Smith M., 21st International Chromosome Conference, 2016/7/13, 国外
6. Collection of Japanese Research Bioresources (Cell Line, Tissue, and DNA) in National Institute of Biomedical Innovation., ポスター, Arihiro Kohara, Europe Biobank Week Biobanking for Health Innovation, 2016/9/14, 国外
7. Human Tissue Bank at the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) : Availability of Surplus Surgical Tissues for Biomedical Research, ポスター, Aya Kasamatsu-Onishi, Takuo Kosaka, Nozomi Sugihara, Motonobu Satoh, Arihiro Kohara, Akifumi Matsuyama, Asian Network of Research Resource Centers (ANRRC) 2016, 2016/9/21, 国内
8. 日本人由来凍結肝細胞における解凍法の検討, ポスター, 大西一笠松礼, 小阪拓男, 中村和昭, 小原有弘, Cryopreservation Conference 2016, 2016/11/10, 国内
9. アリルを識別した変異解析; 染色体特異的シーケンスによる染色体ゲノミクス, 口頭, 小原有弘, 日本環境変異原学会第 45 回大会, 2016/11/17, 国内
10. An Establishment of the Cell Line Panel for the Mutation Standards against Cancer-related Gene Panels for Clinical Sequencing, ポスター, Arihiro Kohara, Revolutionizing Next-Generation Sequencing, 2017/3/20, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「再生医療等の安全性確保のためのリスク評価に係る現状と課題」, 口頭, 松山晃文, 再生医療等提供に係る教育・研修会 (京都大学), 2016/7/13, 国内
2. 「再生医療等製品における CMC について」, 口頭, 松山晃文, (公財) ヒューマンサイエンス振興財団, 2016/8/2, 国内
3. 「イノベーションと再生医療」, 口頭, 松山晃文, 旭化成, 2016/9/1, 国内
4. 「イノベーションと再生医療」, 口頭, 松山晃文, 神戸再生医療勉強会, 2016/11/22, 国内

5. 「多能性幹細胞由来製品の造腫瘍性を評価する 品質と安全性の観点から」,口頭,松山晃文,慶應義塾大学病院,2017/2/16,国内
6. 「日本の将来に向けた細胞治療の展望」(招待講演),口頭,松山晃文,株式会社メディネット・医療法人社団滉志会 合同社員総会 新横浜プリンスホテル於,2016/2/6,国内
7. 「iPS 細胞活用の国際動向」,口頭,松山晃文,2017/2/24,疾患 iPS 成果発表会 (TKP 大手町カンファレンスセンター),国内
8. 医薬基盤・健康・栄養研究所の生物資源事業,小原有弘, メディカルジャパン, 2017/2/16, 国内

(4) 特許出願

なし

## 平成28年度医療研究開発推進事業費補助金 (再生医療実用化研究事業) 成果報告書

### I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実用化研究事業  
(英語) Research Project for Practical Application of Regenerative Medicine

補助事業課題名： (日本語) セル・バンク等を構築する幹細胞等由来製品のウイルス否定試験における評価技術要件に関する研究  
(英語) Study on viral safety evaluation of the cell therapy products derived from human stem cells and development of new test methods

補助事業担当者 (日本語) 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 第一室長 内田 恵理子  
所属 役職 氏名： (英語) Eriko Uchida, Head of 1<sup>st</sup> section, Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 原材料のウイルス安全性に関する研究  
分担課題名： (英語) Study on viral safety of raw materials of cell therapy products

補助事業分担者 (日本語) 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 第一室長 内田 恵理子  
所属 役職 氏名： (英語) Eriko Uchida, Head of 1<sup>st</sup> section, Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者： 日本薬科大学・客員教授・山口 照英 総括研究報告を参照。

## III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 5件、国際誌 1件)

1. 内田恵理子. 「実践 微生物試験法 Q&A」第3章 2) マイコプラズマ否定試験法 核酸増幅法に市販キットを用いる場合の考え方と核酸増幅法の位置づけ、じほう、2017, 56-58.
2. 内田恵理子、古田美玲、山口照英. 「再生医療・細胞治療のための細胞加工物評価技術」第1編 第1章 再生医療・細胞治療製品のマイコプラズマ検査、シーエムシー出版、2016, 3-15.
3. 佐々木裕子、内田恵理子. 「新 GMP 微生物試験法第3版」第Ⅲ編第9章 マイコプラズマ否定試験、じほう、2016, 201-222.
4. 内田恵理子、古田美玲、山口照英. 再生医療・細胞治療製品のマイコプラズマ検査、*BIO INDUSTRY* 2016, 33 (9), 4-14.
5. Kanayasu-Toyoda T, Tanaka T, Matsuyama A, Kikuchi H, Uchida E, Yamaguchi T : Cell-surface MMP-9 protein is a novel functional marker to identify and separate pro-angiogenic cells from early endothelial progenitor cells derived from CD133+ cells, *Stem Cells*, 2016, 34(5), 1251-1262.
6. 内田恵理子、佐々木裕子. 「第十七改正 日本薬局方 技術情報 JPTI2016」バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験、じほう、2016, 359-363.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. パルボウイルス B19 感染性の迅速測定系の開発、ポスター、内田 恵理子、豊田淑江、古田美玲、山口照英、日本薬学会第137年会、2017/3/27, 国内
2. CD133 由来血管内皮前駆細胞の細胞浸潤における膜結合 MMP-9 の役割とヒアルロニダーゼ処理による阻害効果、豊田淑江、田中健志、菊池裕、内田恵理子、山口照英、第89回日本生化学会大会、2016/9/27-29, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし