

食中毒菌試験の国際調和に関する取り組み

国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部・第一室長
山崎 栄樹

【はじめに】

コーデックス委員会では食品衛生に関する規制の国際的な整合性の確保を目的として、食品微生物基準を策定するためのガイドラインを示しており、その中で微生物基準に付随する試験に関しては科学的に妥当性を確認した試験法を採用することを求めている。一方で、国内の食品微生物試験法の多くはその妥当性について確認されることなく、公定法あるいは標準的試験法として公表されている。食品流通のグローバル化が進む近年において、国内外で利用される試験法のハーモナイゼーションについての要求は増しており、妥当性が確認された国際的通用性を持つ標準試験法の国内における整備は急務の課題である。これらの課題を受け食品衛生管理部第三室が事務局を運営する「食品からの微生物標準試験法検討委員会」（以下、検討委員会）において、国際整合性を踏まえた主要食中毒原因微生物等の標準試験法の作成が進められている。演者は本年 3 月に食品衛生管理部に着任したばかりであるが、前職在職中より約 6 年間に渡って同委員会の活動の一環としてボツリヌス菌試験法の整備を行ってきた。本発表では、検討委員会の活動の紹介を兼ねて、演者が行ってきたボツリヌス菌試験法の構築について紹介する。

【検討委員会の試験法作成方針】

検討委員会ではバリデートされた標準試験法構築において統一した方向性を持った試験法作成方針の提示が重要であるとの考えから、科学的な妥当性の確認が可能でありかつ国際的に認められる標準試験法の構築に求められる 4 つの手順（ステージ）を以下の通りに示している。

- ・**原案作成（ステージ 1）**：関連する国際的な標準法の比較を行い、構築しようとする試験法の方向性を確認した上で、試験法の原案をまとめる。
- ・**作業部会案作成（ステージ 2）**：国立研究機関、地方衛生研究所、大学等の協力を受けながら試験法原案について審議が必要な箇所を抽出し、必要な場合にはコラボスタディの開始に必要な実験データの取得を行う。
- ・**コラボ実施案作成（ステージ 3）**：コラボスタディの目的を設定し、目的に応じたコラボスタディ計画を作成する。
- ・**標準試験法作成（最終ステージ）**：コラボスタディによりプロトコールの妥当性を評価した後、‐NIHSJ（標準試験）法‐として公開する。

【ボツリヌス菌試験法構築に関する検討】

ボツリヌス感染症は発生時に死亡を含む極めて高い健康危害性を顕す国内でも慎重な対策が求められる感染症である。原因微生物のボツリヌス菌は芽胞を形成する偏性嫌気性グラム陽性桿菌であり、菌が産生するボツリヌス毒素の抗原性の違いによって A 型から G 型までの 7 つの型に分けられている。このうち、ヒトにボツリヌス症を引き起こすのは主に A、B、E 及び F 型毒素産生菌である。ボツリヌス症は乳児がボツリヌス菌芽胞を経口的に摂取した後に消化管内で菌が増殖し産生された毒素の作用によって発症する乳児ボツリヌス症と、食品中で増殖した菌が食品内で産生したボツリヌス毒素を経口的に摂取することで発症する食餌性ボツリヌス症に分けられる。前者についてはハチミツが主要な原因食品として知られており、後者については様々な食品を原因とした事例が報告されている。ボツリヌス菌およびボツリヌス毒素は感染症法における特定二種病原体に指定されており、その取り扱いが厳格な法的規制の対象となっている。

ボツリヌス菌試験法の構築については、検討委員会の試験法作成方針に従って下記の手

順で検討が進められた。

・原案作成（ステージ1）

ボツリヌス菌試験法に関する国際動向の調査および、国内法と国際的に利用されている方法の比較検討を行い、検討委員会で整備・提案するボツリヌス菌試験法としてボツリヌス遺伝子を検出指標とした試験法が妥当であると合意された。さらに、国際的整合性の観点から ISO/TS 17191:2013 Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne

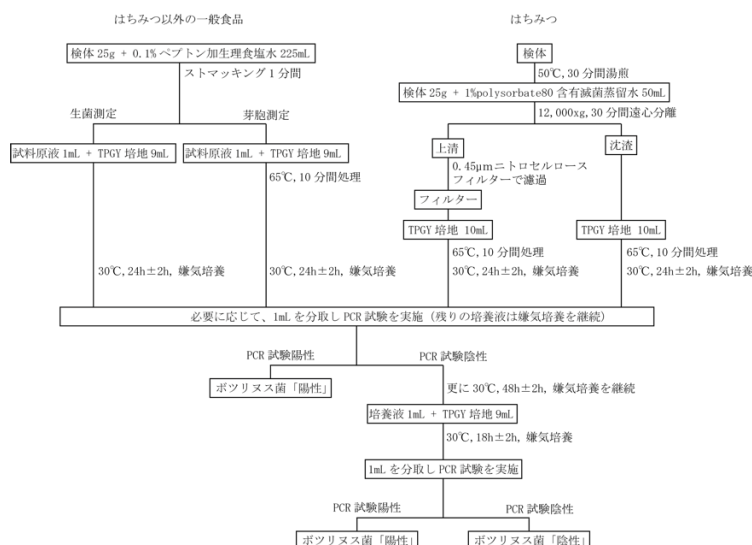


図1 NIHSJ-20TS の概要

pathogens – Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia に基づいた試験法を構築することで合意され、試験法（NIHSJ-20TS）の原案が作成された。NIHSJ-20TS では ISO/TS 17191:2013 と同様にハチミツと、ハチミツ以外の一般食品に対して異なった試料調整方法を採用している（図1）。

・作業部会案作成（ステージ2）

原案について国内の食品衛生に関わる専門家によるレビューが行われ、コラボスタディ実施において事前に検討が必要である項目として以下の事項が抽出され、ワーキンググループにおいて検討が実施された。

1. 添加回収試験で使用する菌液調整プロトコール整備の必要性

通常のコラボスタディにおいては対象微生物を添加した食品をコラボスタディ参加機関に配布して室間再現性の検討が行われる。しかしながら、二種病原体であるボツリヌス菌については菌添加済み試料の配布は現実的には不可能である。このため、各機関が保有する菌株ストックを用いて個別に食品への添加を行わざるを得ない。ボツリヌス菌は前述の通り芽胞形成菌として知られているが、培養条件により培養液内の Vegetative form と Spore form の割合が大きく変化することがよく知られている。この特性から、各々の機関で添加菌液を作成せざるを得ない本コラボスタディにおいては、添加菌液作成法の厳密な制御の必要性が指摘された。これを受けてワーキンググループより検討委員会へ複数の菌液調整プロトコールの提案がなされた。その結果、食基発第 0630002 号・食監発第 0630004 号「容器包装詰食品に関するボツリヌス食中毒対策について」で指定される菌液調整法について、国内での使用実績等の優位性から本コラボスタディへの適用が妥当であるとの結論に至った。さらにワーキンググループでは菌液調整プロトコールの安定性の向上を目指して、使用する培養液組成と培養時間についての検討を行い、複数の試験室で安定的な添加用菌液の調整が可能なプロトコールの作成に至った。

2. 簡易 DNA 抽出法の使用に関する妥当性検証の必要性

NIHSJ-20TS においては ISO/TS 17191:2013 に従って DNA 抽出法として CTAB 抽出法を指定している。しかしながら CTAB 法は手技が煩雑であることやクロロホルムを使用すること等、取扱い制限の多いボツリヌス菌を用いたコラボスタディ実施にあたっては最適とは言い難いことが指摘され、代替となる簡易法選定の必要性が抽出された。ワーキンググループでは複数の市販の簡易 DNA 抽出キットについて検討を行い、NIHSJ-20TS に適用した際に CTAB 法を用いた場合と同等の結果を取得可能なキットを選定し、検討委員会において同簡易代替法のコラボスタディでの使用が承認された。

・コラボ実施案作成（ステージ3）

コラボスタディにおいては添加菌型（A, B, E, F 型）と食品種（ハチミツと、ハチミツ以外の一般食品）の組み合わせの多様性を考慮しつつも、法的制限を勘案して必要最小限のコラボスタディ計画の構築が必要であった。本検討では、目的を明確化したコラボスタディパートとシングルラボスタディパートを組み合わせたコラボスタディ計画を提案した（図2）。すなわち、「NIHSJ-20TS を複数の試験室で使用した場合の室間再現性の検証」を目的としてすべてのコラボスタディ参加機関でハチミツ試料に対する A 型菌添加回収試験を実施するコラボスタディパートと、「NIHSJ-20TS が複数の菌型-食品種の組み合わせについて利用可能なプロトコールであることの検証」を目的としたシングルラボスタディパートからなる計画を構築した。シングルラボスタディパートにおいては、過去の食中毒事例の発生状況等を勘案し、B 型菌についてはハチミツと一般食品については、E 型菌および F 型菌についてはハチミツの喫食を通じた健康被害との関連性が見受けられない実態を踏まえ一般食品についてのみ添加回収試験を行うこととした。これらの提案については検討委員会にて承認され、コラボスタディ開始の承認に至った。

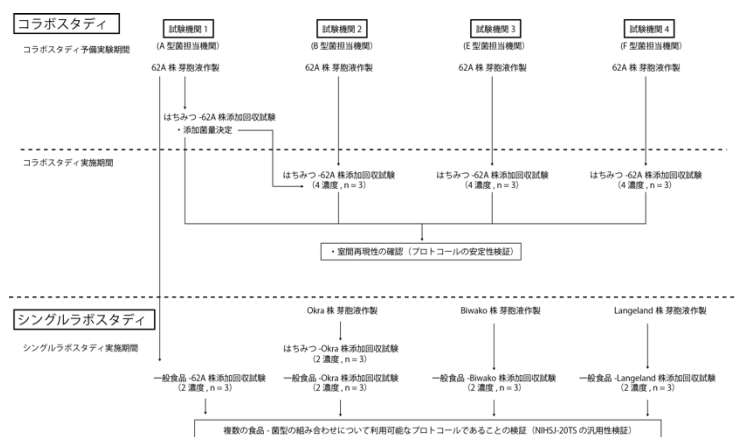


図2 コラボスタディ実施計画の概要

・標準試験法作成（最終ステージ）

構築したコラボスタディ計画に従い、各コラボスタディ参加機関において添加回収試験が実施された。コラボスタディ開始に際しては、菌接種済み食品試料の配布に代わって、添加用菌液調整プロトコールと非接種食品の配布が行われた。コラボスタディ完了後には、コラボスタディの結果に基づいて検討委員会においてプロトコールの安定性及び汎用性の評価が行われ、NIHSJ-20TS の最終案が承認された。

【おわりに】

ボツリヌス菌については法的な規制が強く、菌株の移動が現実的には困難な状況にある。また、ボツリヌス菌の取扱いに求められる施設・設備要件に起因する制約を理由として、コラボスタディ参加機関で実施可能な解析も限定的なものとなっていた。ボツリヌス菌を対象としたコラボスタディはこの様な制限の下に実施される解析であったため、取扱いが容易な他種の病原体に対して行われる解析とは異なったスキーム構築が必要であった。本検討では上記の課題に対して、通常のコラボスタディにおいて実施される標準試験品配布の代替法として添加用菌液作成プロトコールの標準化を行い、菌株移動を行うことなくコラボスタディを実施可能なスキームを構築した。加えて、コラボスタディの目的を明確にしてコラボスタディパートとシングルラボスタディパートを組み合わせたコンパクトかつ効果的なコラボスタディ作業スキームを構築した。これらのスキーム構築は、取扱いが制約的な病原体を用いたコラボスタディのモデルケースになりうるものであり、食品の衛生試験法構築の際にバリデーションを行う上で重要なモデルになるものと考えられる。

NIHSJ-20TS については今後、検討委員会より国内の様々な試験所で参照可能な方法として広く公開される。同法は海外で利用されている試験法と同等性を持った国内試験法として利用可能であり、食品の微生物試験法の国際調和を図る上で重要な成果を与えるものであると期待している。

This image shows a full page of a document template designed for handwritten notes or essays. It features approximately 30 evenly spaced, thin grey horizontal lines across the entire width of the page. The margins are consistent on all sides, providing ample space for writing. There are no titles, headers, or other markings present on the page.

「動物用ウェアラブルデバイスによる毒性試験の発展的継承」と「動物試験とは異なる概念に基づく細胞試験法の創出」

安全性生物試験研究センター 毒性部 第四室長

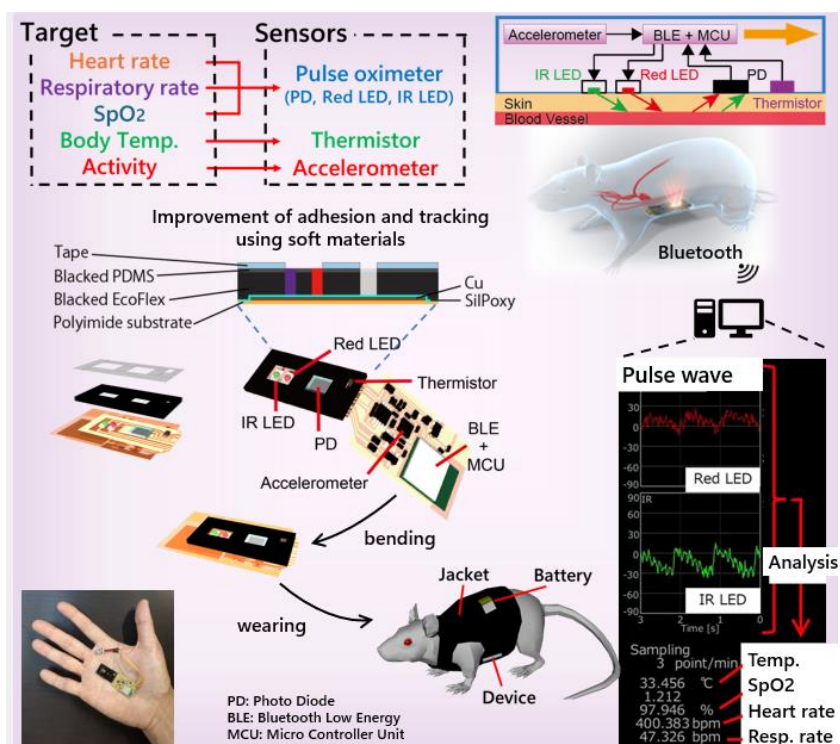
大久保 佑亮

はじめに

毒性部第四室の所掌は、一 家庭用品の毒性学的試験及び研究及び、二 業務関連物質の後世代に及ぼす影響に関する試験及び研究です。今回は、これらに関わるこれまでの取り組みと今後の研究に関して紹介いたします。

動物用ウェアラブルデバイスによる毒性試験の発展的継承

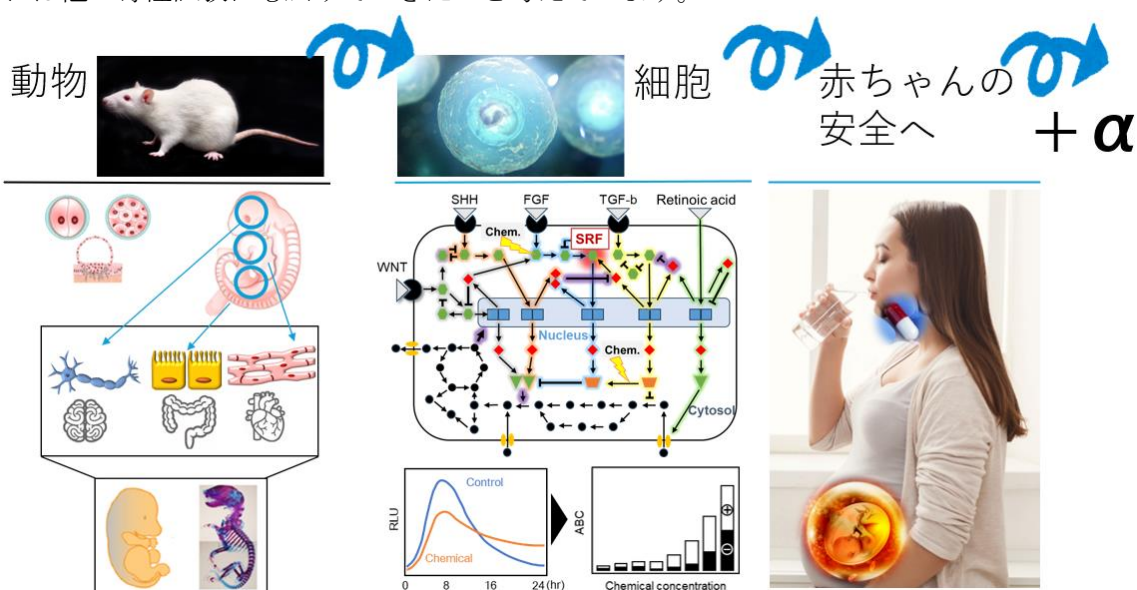
現代と比較して利用可能なリソースが限られていた当時の毒性研究者の多大なる尽力により、毒性評価技術は今日まで信頼性が保証されている頑健な毒性評価システムとして構築され、継承されてきました。しかしながら、動物を用いた毒性試験は、動物試験代替法の推進による動物試験の削減・廃止と、熟練の毒性研究者の定年退職に伴う毒性評価技術の断絶という危機的状況に陥っています。我々はラットにジャケットを装着するのみで従来の毒性試験法に適用可能なウェアラブルパルスオキシメーターを開発し、この課題に取り組んでいます。現在、パルスオキシメーター、体温計、加速度センサを統合したマルチバイタルサイン測定デバイスを用いて、覚醒化非拘束ラットから、脈拍数、呼吸数、体温、SpO₂、活動量を 24 時間以上の定量連続計測が可能です。これまでに、複数の薬剤投与による影響の計測にも成功しています。今後は、マルチモーダルなバイタルサインから機械学習を用いた一般状態の自動判別システムなどを開発し、毒性評価技術の形式化に挑戦したいと考えています。また、これらの DX により毒性評価技術を安価簡便な形式として一般化し、アカデミア創薬研究者など幅広い研究領域に毒性学を浸透させることで、新たな毒性学の創出基盤を担いたいと考えています。



動物試験とは異なる概念に基づく細胞試験法の創出

数ある毒性試験の中でも、妊婦が摂取することで胚・胎児への影響を評価する発生毒性試験は、ヒトと動物の種差が大きいことが知られています。そのため、医薬品の発生毒性試験は複数種の数多くの供与動物が必要であり、時間的、金銭的成本が大きな試験となっています。一方で、近年の動物福祉精神の高まりを受け、供与動物数の削減、さらには動物試験の廃止が求められています。したがって、ヒトの発生毒性を適切に評価可能な、動物を使用しない、ハイスループットな試験系が求められています。

適切な発生には形態形成に加えて、外因・内因による様々なノイズ（エラー）から発生プログラムを守るノイズ抵抗性の両輪が必要です。これらを繋ぎ、発生を制御している機構としてシグナル伝達相互作用が挙げられます。我々は、化学物質暴露によってこのシグナル伝達相互作用がかく乱され、ノイズ抵抗システムが破綻することにより発生毒性が生じると仮説を立てました。つまり化学物質のシグナルかく乱作用を検出することで、個体を用いることなく発生毒性を評価できると考えました。そこで、ヒト iPS 細胞を用いた生細胞ルシフェーラスアッセイ法による、リアルタイムシグナルレポーター系を構築しました。また、化学物質のシグナルかく乱作用の比較法も開発しました。これまでに FGF 誘導性の Serum response factor (SRF) のモニタリングのみで、発生毒性物質 21 種類と陰性物質 14 種類を特異度 100%、感度 81%、正確度 89% で分類することに成功しました。現在は、モニタリングの自動化、他のシグナルかく乱作用の検証、内部標準を含んだ多色ルシフェーラスアッセイの構築、新規モダリティ医薬品評価への応用など、多くの研究を進めています。また、本法の技術移転を目的としたコンソーシアムを立ち上げ、本試験法の実用化に向けて協議しています。この手法は、発生毒性以外の試験法にも応用可能であると考えており、将来的には他の毒性試験にも広げていきたいと考えています。



MEMO

This image shows a full page of white paper with horizontal dotted lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page, providing a guide for handwriting or typing. There are no margins, text, or other markings on the page.

ゲノム編集食品のリスクコミュニケーションと安全性確保に関する調査研究

国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・主任研究官
田口千恵

【はじめに（現在に至るまで）】

私は学生時代には栄養学を専攻し、前職は大学にて食と健康に関する研究に従事してきた。大学で研究を行う中で私は、研究成果を論文で発信するだけでなく、実際の生活に役立てるような仕事にも携わってみたいと感じていた。大学での任期が満了するタイミングに、専門分野が違うのは承知の上で生化学部の研究助手の公募に応募した。2020年4月より、生化学部でゲノム編集食品に関する仕事の一部を担当してきたが、当初は知識不足を痛感することが多く、必死で勉強したもののなかなか理解しにくい部分も多かった。そこで、私が知らなかったこと/理解しにくかったことは一般消費者も知らない/理解できない状態なのではないか、と気持ちを切り替え、ゲノム編集食品の国民理解に関する研究を行うこととした。その後、2021年10月に主任研究官（任期付き）として採用いただき、本年4月に生化学部第三室の主任研究官に着任した。

本発表では、ゲノム編集食品のリスクコミュニケーションに関する研究や安全性確保に関する研究について紹介したい。

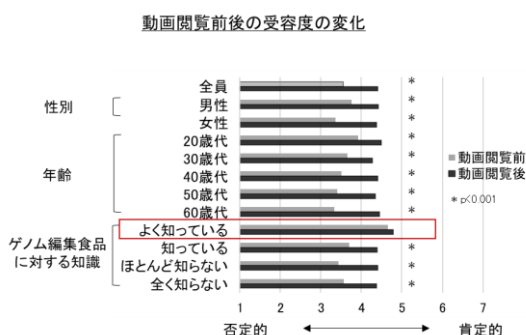
【ゲノム編集食品における現状と課題】

ゲノム編集技術を用いた新たな食品の研究開発が国内外で活発に行なわれている一方、ゲノム編集食品を不安視する声が多く、国民に受け入れられているとは言い難い。消費者の信頼を得ることは食品安全行政においても極めて重要な課題の一つである。ゲノム編集食品の取扱いに関しては、「リスクコミュニケーションの推進」、「調査研究の推進」、「新たな知見等が得られた場合の取扱いの見直し」について取り組む必要があることが明記された。そこでゲノム編集食品に対する受容の調査や、安全性確認過程の周知、安全性確認手法の検証などを行った。

【ゲノム編集食品のリスクコミュニケーションに関する研究】

遺伝子組換え食品とは異なり、外来遺伝子を加えないため明確にハザードを特定できないゲノム編集食品に関する国民理解を深める必要があるが、どのようなリスクコミュニケーションを行うと効果的であるかについては検討されていない。どのような内容の情報提供を行うとゲノム編集食品に懸念を感じる国民の理解を深めることができるかを明らかにするため、ゲノム編集食品についての情報を提供する動画を作成し、一般消費者を対象にゲノム編集食品の受容に関する調査を行った。

ゲノム編集食品に関する詳しい知識を持っていた人では、動画閲覧前におけるゲノム編集食品の受容の程度はそれ以外の人と比べて受容が高かった（ $p<0.001$ ）。動画の閲覧によって、53%の対象者で受容が増加し、中でも科学的知識が低い人ほど受容度の増加が大きかった。知識の多寡でゲノム編集食品に対する受容は変わることが示された。動画の理解度と受容の増加の関係をみると、動画を理解できた人は、できなかった人と比べて受容の増加が大きかった（ $p<0.001$ ）。回帰分析では、「なぜゲノム編集食品が必要か」（ $p<0.001$ ）と「ゲノム編集食品が流通するまでの過程」（ $p<0.05$ ）の理解が増すとゲノム編集食品に対する受容は増加することが示された。

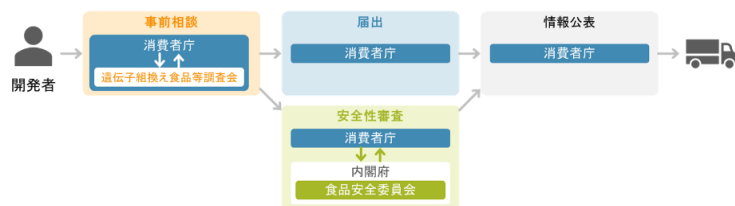


以上より、日本人のゲノム編集食品に対する受容は情報提供により向上し、特に「なぜゲノム編集食品が必要か」と「ゲノム編集食品が流通するまでの過程」についての理解が重要であることが明らかとなった。また、ゲノム編集食品に関する詳しい知識を持っていた人では動画閲覧前の受容も高かったことから、正しい知識を持つことはゲノム編集食品に対する理解や受容の向上に有用であることが示された。

【ゲノム編集食品の安全性確保に関する研究】

消費者庁（2024年3月までは厚生労働省）が運用するゲノム編集食品の届出制度における事前相談では、開発されたゲノム編集食品が届出に該当するかの確認とともに、食品の安全性に関する解析が十分

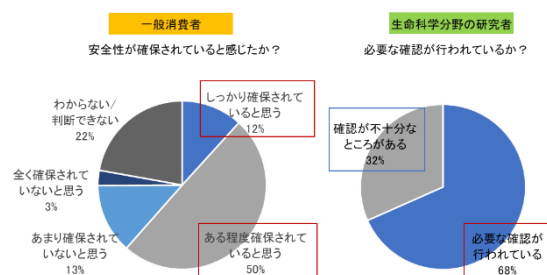
ゲノム編集食品が上市するまで



分になされているかの確認が行われているが、その過程の詳細を国民が知る機会はほとんどなかった。加えて、ゲノム編集は急速に開発が進む新しい技術であるため、今後の技術の進歩をふまえて、現在の安全性確認手法の良い点や改良の余地がある点を検討しておく必要がある。そこで、ゲノム編集食品に関して事前相談で行われている安全性確保の取り組みを紹介する多様な情報提供媒体を作成し、1) ゲノム編集食品の安全性は十分に確保されていると国民は感じるのか、2) 安全性確保に関する情報提供による国民の受容は変化するのか、3) 現在の安全性確認手法に課題や今後取り入れるべき新たな視点はあるか、を明らかにすることを目的とした調査を、一般消費者と生命科学分野の研究者を対象に実施した。

ゲノム編集食品の届出制度において事前相談で安全性の確認が行われていることを知らないと回答したのは、一般消費者で71%、生命科学分野の研究者で34%であった。情報提供後、一般消費者を対象にゲノム編集食品の安全性は確保されていると感じたかについて質問したところ、しっかり確保されていると思う、ある程度確保されていると思うを合わせると、62%は安全性が確保されていると認識していた。安全性確保の認識別に受容度の変化を比べると、しっかり確保されていると思うと答えた群とある程度確保されていると思うと答えた群においては受容が増加したのに対し（それぞれ $p<0.001$ ）、全く確保されていないと答えた群の受容は減少した（ $p<0.05$ ）。生命科学分野の研究者を対象に事前相談で行われている現在の安全性確認手法についてどう感じたかを質問したところ、68%が必要な確認が行われていると回答した一方、32%は確認が不十分なところがあると回答した。必要な確認が行われていると答えた群では情報提供で受容が増加したものの（ $p<0.001$ ）、不十分なところがあると答えた群では受容の増加はみられなかった。

情報提供媒体閲覧後の安全性確認に関する認識



事前相談で行われている安全性確認手法について生命科学分野の研究者から得た良い点、改善すべき点、取り入れるべき視点などの意見を収集し、確認が不十分なところがあると答えた群（以下、不十分）と、必要な解析が行われていると答えた群（以下、十分）に分けて集計した。良いと感じた点においては、どちらの群も複数回にわたり安全性の確認を行っている点を、十分だと答えた群では複数の方法で安全の確認を行っている点や科学的に説明可能で論理的である点を評価する意見が多かった。改善すべきと感じた点においては、不十分と答えた群では第三者の検査がないことを指摘する意見が多かったが、十分と答えた群では、手続きが煩雑なため簡素化/迅速化しこの技術を推進すべきとの意見も多かった。取り入れるべき新たな視点においては、現在用いられていない新たな解析技術や確認手法に

関する意見は寄せられなかった。現在のゲノム編集食品の安全性確認手法に関して生命科学分野の研究者から収集した多くの意見を行政に提案することで、さらなる安全性確保と国民理解につなげたい。

以上より、ゲノム編集食品に関する国民理解を得るためには、十分に安全性が確保されていると多くの人が認識できる制度を確立することや、事前相談で行われている安全性確保の取り組みをわかりやすく発信して国民に周知していくことが有用である可能性が示唆された。

【おわりに】

衛研例会での発表の機会を頂戴したことが、これまでの自分を改めて振り返る良いきっかけとなった。研究者としての歩みはゆっくりではあったが、今の自分にできることは何かを常に考えて研究に向き合ってきたと思っている。これまでのご縁や恵まれた環境に感謝し、今後も一研究者としてレギュラトリーサイエンスに貢献できるよう精一杯業務に取り組んでいきたい。

【参考文献】

1. Kondo K, Taguchi C: Japanese regulatory framework and approach for genome-edited foods based on latest scientific findings. *Food Safety*. **10**: 113-128, 2022
2. Taguchi C, Shibata N, Soga K, Yoshiba S, Narushima J, Sugino M, Kondo K: Providing appropriate information to consumers boosts the acceptability of genome-edited foods in Japan. *GM Crops Food* **14**: 1, 1-14, 2023
3. 田口千恵、近藤一成：ゲノム編集食品の安全性確認の考え方と今後の課題：化学と生物 **61**: 603-611, 2023
4. 田口千恵、柴田識人、近藤一成：ゲノム編集食品安全性確保の取り組み周知と現在の安全性確認手法に関する調査研究：食品衛生学雑誌（2024年8月号掲載予定）

MEMO

[illegible]

ヒト iPS 細胞加工製品の品質・安全性に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 室長

黒田 拓也

【はじめに】

再生・細胞医療製品部第3室では、hiPS細胞を加工して製造される再生医療製品の試験、検査及び試験的製造並びにこれらに必要な研究を進めている。私は、2010年10月から協力研究員として遺伝子細胞医薬部に配属され、衛研で初めてヒト iPS 細胞の培養を確立するところから研究をスタートした。本発表では、これまでにヒト iPS 細胞加工製品の早期実用化に向けて再生・細胞医療製品部で開発してきた、ヒト iPS 細胞加工製品の品質・安全性に関する評価法について紹介する。

【ヒト iPS 細胞加工製品の残存未分化細胞検出法の開発と評価】

「造腫瘍性(tumorigenicity)」とは、動物に移植された細胞集団が増殖することにより悪性または良性の腫瘍を形成する能力をいう。ヒト iPS 細胞やヒト ES 細胞は、元来、奇形腫形成という造腫瘍性を有しており、この点がヒト体細胞・体性幹細胞とは大きく異なる。そのため、iPS 細胞加工製品特有の安全性上の懸念として、製品中に残存する未分化 iPS 細胞が移植後に腫瘍化するリスクが挙げられる。

そこで我々は、残存未分化 hiPS 細胞を高感度に検出する *in vitro* 造腫瘍性関連試験の開発と評価を目的とし研究を行った。*in vitro* 造腫瘍性関連試験として 1) 軟寒天コロニー試験、2) フローサイトメトリー、3) qRT-PCR の3種類の方法を評価した。当時 iPS 細胞の臨床応用に最も近いとされた網膜色素上皮 (RPE) をモデルとして、初代培養ヒト網膜色素上皮 (RPE) 細胞に対し、未分化 hiPSC をスパイクし、各試験方法の下方検出限界の評価を行った。その結果、hiPS 細胞は軟寒天培地中で成育できず、軟寒天コロニー試験は hiPS 細胞検出には不適格である事が分かった。一方、フローサイトメトリー

では、TRA-1-60 抗体 (iPS 細胞の表面マーカー抗体) を用いた場合、スパイクした 0.1% の hiPS 細胞を検出可能であることを示した。そして、qRT-PCR では *LIN28A* 遺伝子 (ES 細胞および iPS 細胞に特異的に発現) が優れた未分化細胞マーカー遺伝子として利用できることを発見し、スパイクした 0.01% の hiPSC を検出できる非常に高感度な試験法の開発に成功した (*Kuroda T. et al., Plos One., 2012*)。この試験法は、hiPS 細胞を利用した網膜疾患治療臨床研究において品質評価法の一つとして採用された。さらに、*LIN28A*/qRT-PCR 法の感度向上と RPE 細胞以外での汎用性を検討するため、droplet digital PCR を用いた *LIN28A*/ddPCR 法を開発し、hiPS 細胞由来心筋細胞において 0.001% の hiPSC を検出可能であることを示した (*Kuroda T. et al., Regen Ther., 2015*)。これら一連の *in vitro* 造腫瘍性関連試験は、「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」として、令和元年 6 月に本省より発出されている (表 1)。

試験法	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験 (NOG x Matrigel, 皮下投与)	フローサイトメトリー	GlycoStem-HP法
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
所要時間	12-16週間	1日	3時間以下 (培養上清回収から測定まで)
利点	- 直接的 - 微小環境での造腫瘍性を評価できる	- 短時間・簡便 - 個々の細胞を解析	- 非破壊的 - 簡便 - 高スループット
欠点・注意点	- 費用と時間がかかる - 専用動物施設が必要 - 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応用可能	- 間接的 - 既知のマーカー分子を発現する細胞以外は検出不能 - ゲーティングが結果に影響	- 間接的 - 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 - 培地成分が結果に影響
LLOD または 検出力	hRPE2.5E+5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)	HEK293T中の0.05%のiPS細胞 (マーカー:H3+ボドカリキシン)
出典	Kanemura <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2013	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012	Tateno <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2014

試験法	qRT-PCR	Droplet Digital PCR	Essential-8/LN521培養増幅法
目的	未分化の多能性細胞の検出	未分化の多能性細胞の検出	未分化の多能性細胞の検出
所要時間	6時間	数時間	約1週間
利点	- 迅速 - 簡便 - 高感度	- 迅速 - 簡便 - 高感度	- 直接的 - 簡便 - 残存iPS細胞の特性解析が可能
欠点・注意点	- 間接的 - 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	- 間接的 - 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	- 時間がかかる - スループットが低い
LLOD または 検出力	hRPE中の 0.002%以下のiPS細胞 (マーカー:LIN28)	ヒト心筋細胞中の 0.001%のiPS細胞 (マーカー:LIN28)	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	Tano <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2014

表1. 残存未分化 iPS 細胞検出法の性能比較表

【細胞加工製品の原料としてのヒト iPS 細胞の品質に関する研究】

hiPS 細胞は多分化能を持つことから、すべての胚葉（内胚葉・中胚葉・外胚葉）に分化することが可能である。しかしながら、各胚葉への分化のしやすさ（分化指向性）は細胞株間でバラツキがある。目的細胞への分化効率が低い iPS 細胞株が原料となると、製造の歩留まりが悪だけでなく、造腫瘍性リスクのある未分化 hiPS 細胞が残存する恐れも高くなるため、製品の効率的な製造や安全性確保・品質管理を行う上では、製造に適した原料細胞株の選別のためのバイオマーカーの開発が必要とされていた。

そこで我々は、特定の細胞系譜への分化傾向を予測するマーカーの探索とその機能解析を実施し、hiPS 細胞株の細胞加工製品の原料としての品質試験法開発を試みた。ま

ず、10 株の hiPS 細胞を用い分化指向性と相関の高い遺伝子を網羅的に探索することにより、分化指向性予測マーカーの同定を行った。その結果、外胚葉に分化しやすい株で発現が高く、中・内胚葉へ分化しやすい株で発現の低い *SALL3* 遺伝子を同定した。この *SALL3* 遺伝子の過剰発現株は外胚葉への分化が促進され、逆に、発現抑制株は中・内胚葉への分化が促進されることを示し、*SALL3* が hiPS 細胞の分化傾向を制御していることを明らかにした。さらに *SALL3* の機能解析を進め、*SALL3* は DNA メチル転移活性の一つである DNMT3B に結合し、Wnt シグナル関連遺伝子の Gene body 特異的 DNA メチル化を阻害していることが明らかにした。Gene body 特異的 DNA メチル化は遺伝子発現を促進する働きがあることが近年報告されており、*SALL3* はエピジェネティック修飾を制御することにより、各胚葉系への分化指向性を調節していることが示唆された。*SALL3* を利用した目的細胞への分化しやすい hiPSC 株の選択は(1)最終製品への目的外細胞混入リスクの低減、(2)最終製品へ残存未分化細胞混入リスクの低減、(3)最終製品の収率の改善、(4)製造工程の期間短縮などに貢献することが期待される (*Kuroda T. et al., Nat Commun., 2019*)。

さらに、本研究で用いたアプローチを他の目的細胞への分化予測マーカーの同定方法としても応用し、心筋細胞分化予測マーカーとして *CXCL4*、神経前駆細胞分化予測マーカーとして *ROR2* の同定に成功している (*Kuroda T. et al., Scientific Reports., 2024*)。

【終わりに】

今回紹介した *LIN28A* をマーカーとした残存未分化細胞検出法は、平成 26 年に理化学研究所で行われた世界初の hiPS 細胞由来網膜色素上皮細胞を用いた臨床研究において、移植細胞の品質評価試験法として採用された。衛研で初めて携わった研究が、社会的にも期待の大きい iPS 細胞を使った再生医療に貢献できたことは、私の研究に対する大きなモチベーションに繋がっている。今後も、この様な経験を活かし、日本の再生医療が成長し医療として普及していくために解決しなくてはならない課題に取り組んでいきたいと考えている。

[illegible]