

平成 27 年度

再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業

(再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発)

事業報告書

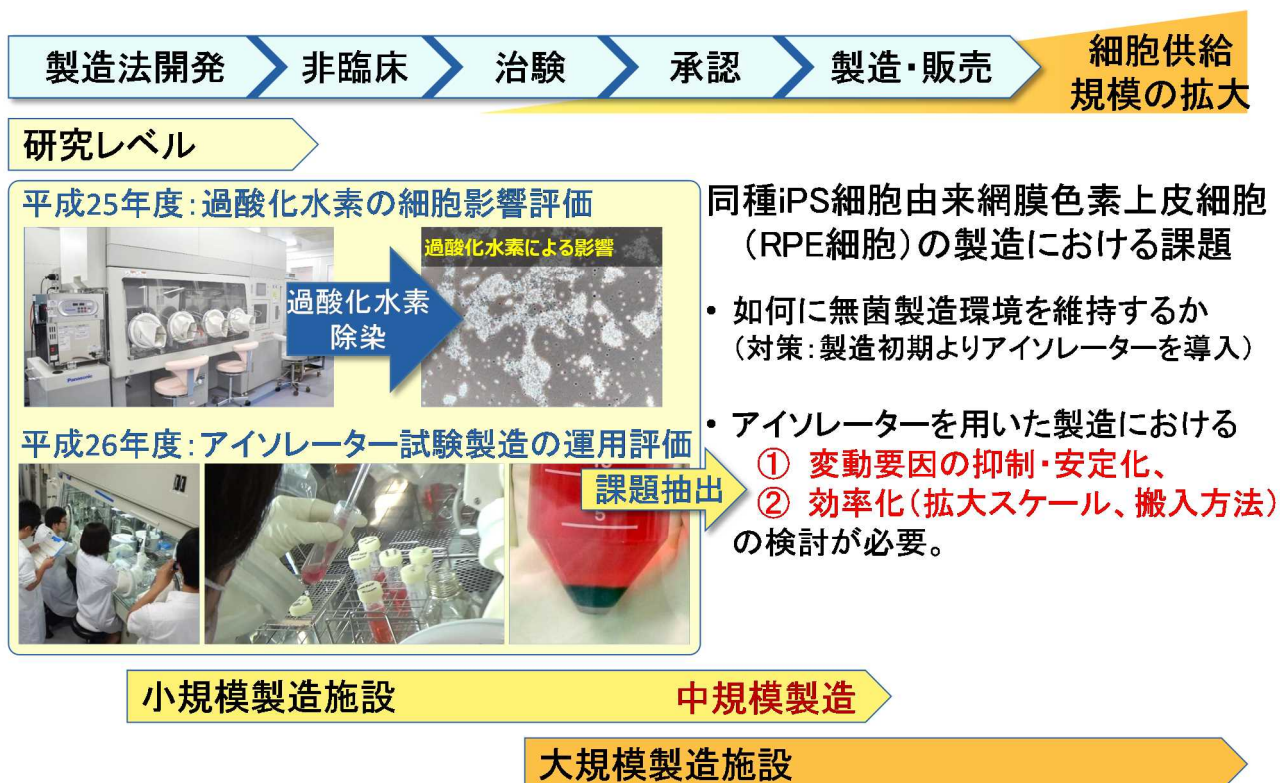
|                     |                                                   |
|---------------------|---------------------------------------------------|
| 事業名                 | 再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業<br>(再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発) |
| 研究開発課題名             | 加齢黄斑変性の治療を目指した同種 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の研究開発            |
| 研究開発担当者<br>所属 役職 氏名 | 株式会社ヘリオス<br>専務取締役 澤田 昌典                           |

## 目次

|                             |       |
|-----------------------------|-------|
| 1. 事業の目的                    | P. 3  |
| 2. 実施内容及び結果                 | P. 4  |
| 3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容 | P. 11 |
| 4. まとめ                      | P. 12 |

## 1. 事業の目的

同種 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の製造においては無菌製造環境の維持が重要であり、本事業ではアイソレータを用いた細胞製造における運用法について検討した。平成 25 年度事業ではアイソレータの除染に用いる過酸化水素による細胞への影響について評価し、平成 26 年度事業ではアイソレータを用いた同種 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の試験製造を実施し、安全キャビネットと同様に網膜色素上皮細胞を製造できることを確認した。また試験製造を通じてアイソレータ運用の経験を蓄積し、今後実製造に活かすための課題として、製造における変動要因の安定化や製造の効率化が必要であることが明らかとなった。今年度事業ではこれらのアイソレータ運用における課題について、製造における変動要因の安定化や製造の効率化につながる道具や運用法について検討を行った。



## 2. 実施内容及び結果

### 研究開発項目：細胞操作における操作性向上を目的とした道具の開発及び評価

従来の電動ピペッターと流量固定の電動ピペッターを検討し吐出速度のばらつきを評価した。吐出速度の評価方法として吐出の様子を動画撮影し、目盛りを確認することで吐出量を継続的に計測した。その結果、従来の電動ピペッターでは操作者ごとに吐出速度が異なるほか、同じ操作者でも操作ごとに吐出速度がばらつくことが明らかとなった（図 1）。一方で流量固定の電動ピペッターでは再現良く一定流量で吐出できることが示された（図 2）。

アイソレータを用いた細胞製造に適した流量固定ピペッターに求められる要素としては、再現性の高い液体操作に加えて滅菌処理への対応、グローブ越しの操作性などが挙げられる。これらの要求に加えて有識者の助言として、温度等の環境による吸入、排出量の変動を抑制やアイソレータ内での操作性向上のための小型化と軽量化、また無線機能によるアイソレータ外からの流量／容量の設定といった要求が挙げられた。これらを踏まえて、製造向けの流量固定ピペッターを試作し評価した（図 3）。温度などの環境による吸入・排出量の変動を抑制するために、エアークッションシリンジ方式のポンプを採用した。また滅菌処理への対応として EOG 滅菌に対応しつつ、小型化・軽量化を図った。この他に無線によってアイソレータ外部から流量や容量を変更したり、動作記録などを取得することで指示・記録をサポートする機能を実装した。この電動ピペッターを異なる流量設定で評価した結果、いずれの設定でも再現良く吸引・吐出できることが確認された（図 4）。今後このようなピペッターが開発されることで、熟練者の操作を必要としない細胞製造に適した流量固定ピペッターの運用が期待される。

またピペットの振動による操作性の低下を抑制するための検討として、図 5 に示すような短いピペットを開発・評価した。振動の評価方法として図 6 に示すような状態でピペット先端の動画を撮影し、画像解析にてピペット先端に貼ったマーカーの重心位置を測定した。その結果、短いピペットの方が振動を抑制することができた（図 7、図 8）。

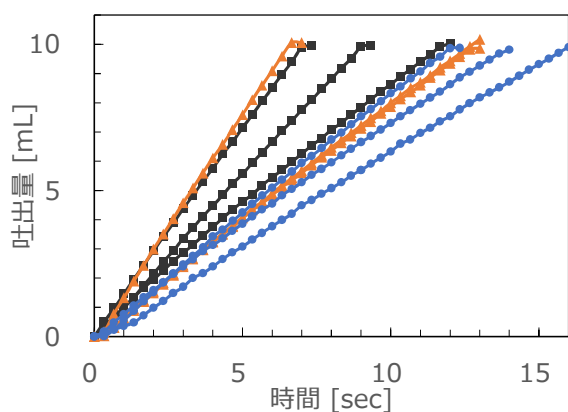


図 1 一般的な電動ピペッターの吐出速度  
3 人（青、オレンジ、黒）が 3 回ずつ実施

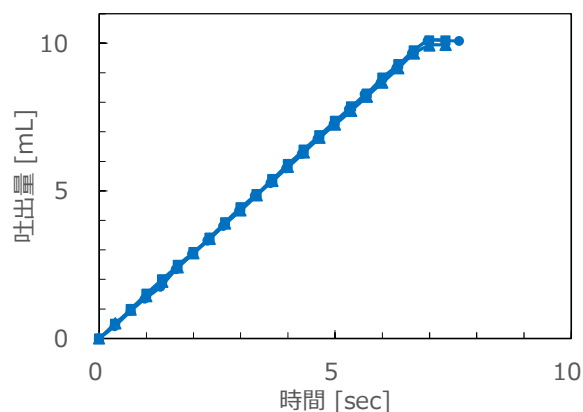


図 2 流量固定の電動ピペッター吐出速度  
1 人が 3 回実施



図 3 製造向け流量固定ピペッター試作品

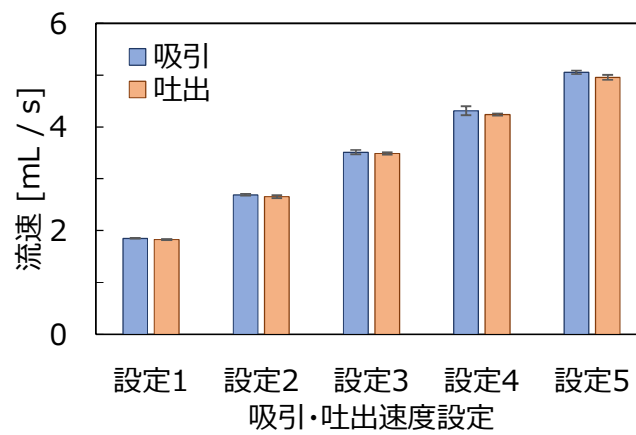


図 4 製造向け流量固定ピペッター試作品の流量評価 (n=7)



図 5 ピペット外観の比較（電動ピペッターに装着時）  
 (左) 従来品 10 mL ピペット、(右) 新規開発した短いピペット



図 6 ピペット先端の振動評価方法

(左) 動画撮影による評価法の模式図、(右) アイソレータ内での評価の様子

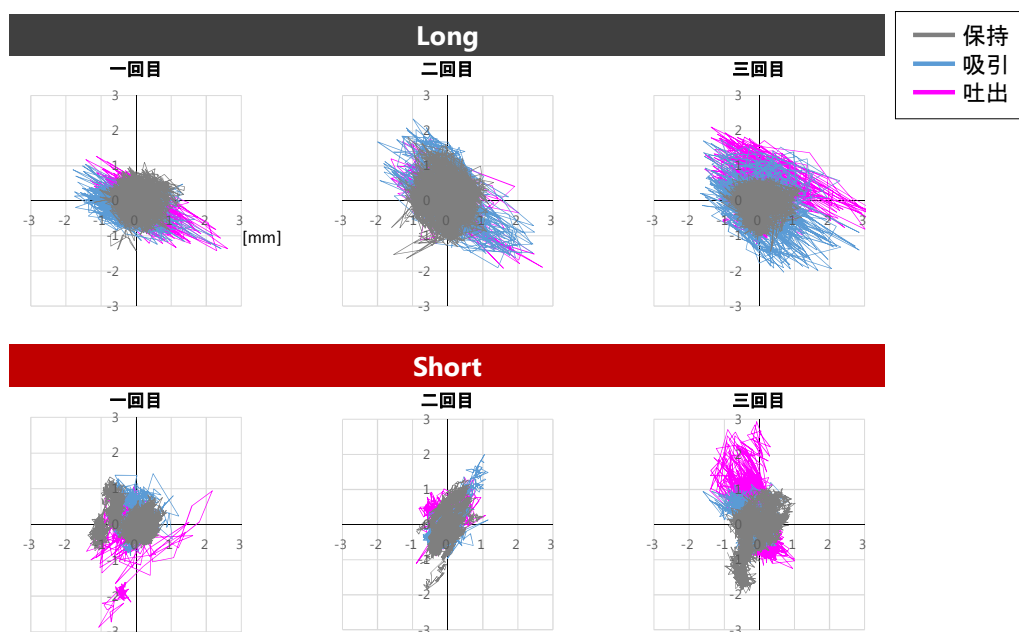


図 7 ピペット先端の振動評価 (n=3)

(上段) 従来品 10 mL、(下段) 新規開発した短いピペット

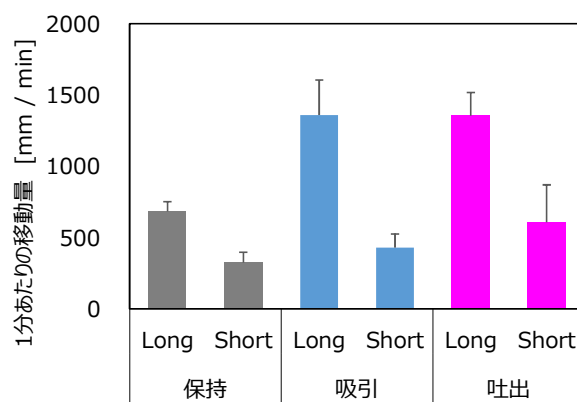


図 8 ピペット先端の移動量 (1 分当たり)

(Long) 従来品 10 mL、(Short) 新規開発した短いピペット

製造の効率化に向けた取り組みについて、培養スケールを拡大するための道具として、スクレーパー操作に対応した閉鎖型の大型培養容器を開発した（図 9）。細胞播種時の容器攪拌操作や容器輸送時に培地がこぼれるリスクを回避するために閉鎖系の構造としつつ、細胞回収時は天面のフィルムを剥がすことによって培養ディッシュと同様にスクレーパー操作ができるよう設計した（図 10、図 11）。この容器を用いて iPS 細胞を培養した結果、細胞培養ディッシュと同様に培養・回収することができた。

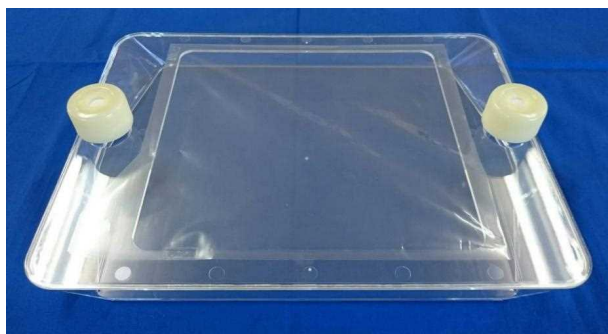


図 9 大型培養容器試作品

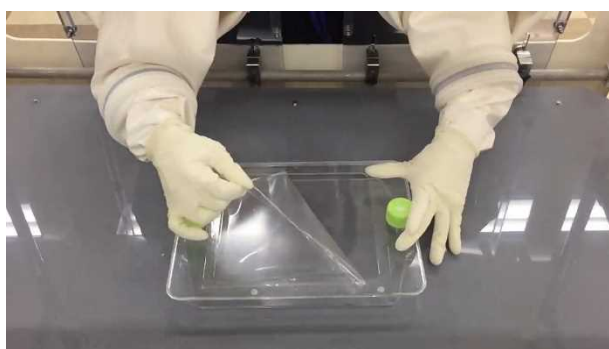


図 10 フィルムの剥離操作

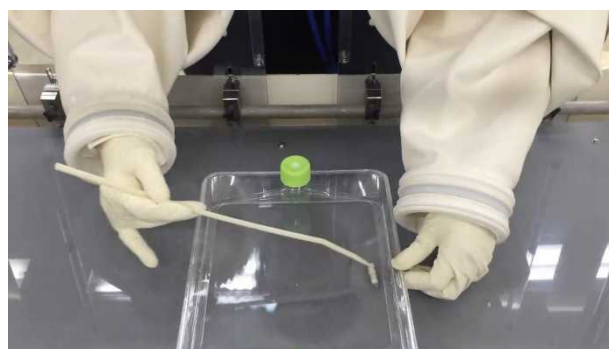


図 11 スクレーパー操作

#### 研究開発項目：大規模製造に向けたアイソレータ運用に関する検討

アイソレータ運用における製造の効率化について、初期の製造施設・製法をできるだけ変えずに製造スケールを拡大することで、大規模製造施設を用意するまでの「つなぎ」としての運用が期待される。製造スケールを拡大する方法として、培養容器の数を増やすアプローチ、培養容器 1 個当たりの面積を大きくするアプローチの 2 つを検討した。培養容器の数を増やすアプローチとして、アイソレータを用いて細胞培養ディッシュ 40 枚の細胞培養・継代操作を行い運用の可能性を示した。また従来の工程をなるべく変えずにスケールを拡大できる道具として、スクレーパー操作に対応した閉鎖型の大型培養容器を開発した。この容器を想定して、細胞培養ディッシュ 40 枚相当の継代操作の工数を評価した結果、およそ 3 時間の時間短縮ができることが明らかとなった（図 12）。



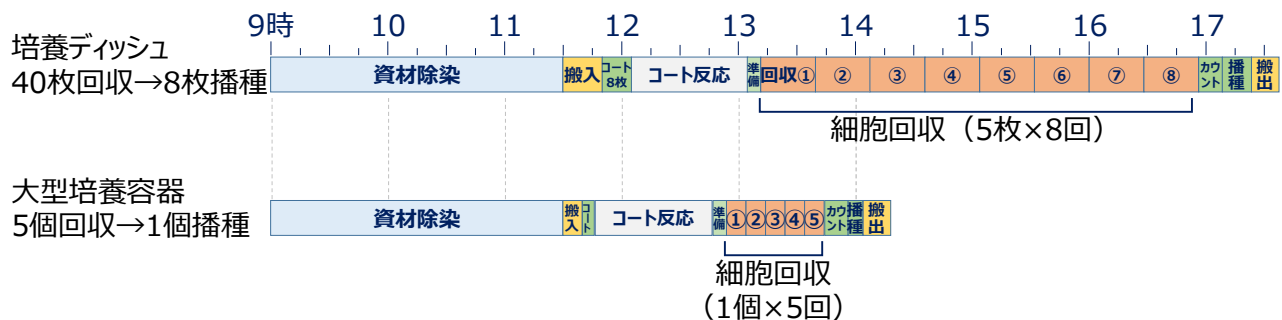


図 12 iPS 細胞継代工程の工数評価

製造の効率化においては資材の搬入も課題となっており、昨年度は清拭による搬入を行ったが、拭き残しのリスクや大量資材搬入時における工数の増加が課題となった。今年度は過酸化水素除染に対応した包材を用いて複数の資材をまとめてパッキングすることで、細胞培養ディッシュ 40 枚相当の継代操作に必要な資材を一度に除染搬入できることを確認した (図 13)。



図 13 大量資材の除染搬入レイアウト (ディッシュ 40 枚に播種する場合)  
(左) 最適化なし、(右) 資材を詰め直して最適化。中身は同じ。

#### 研究開発項目：細胞培養における安定性の向上を目的とした培養環境及び培養法の検討

細胞製造における変動要因については培養操作だけでなく培養環境による不安定性も課題となっている。培養容器内の細胞の質に不均一性を生じさせる要因として、本検討ではインキュベーター内の温度環境について検討を行った。図 14 の矢印に示すようにトレイの金属部分と穴が開いている部分で培養面の温度を評価し、温度環境を安定化させる方法として、図 15 に示すような熱均一プレートを培養ディッシュトレイ間に挟んで同様に温度評価を行った。その結果、インキュベーター内へ搬入した直後の温度環境変化において温度差を抑制することができた (図 16)。



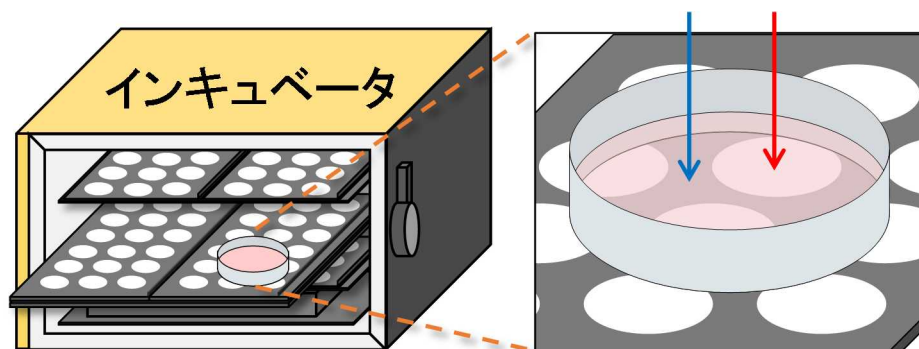


図 14 インキュベーター内の環境の違い（青矢印：トレイ金属部分、赤矢印：トレイの穴の部分）



図 15 熱均一プレート

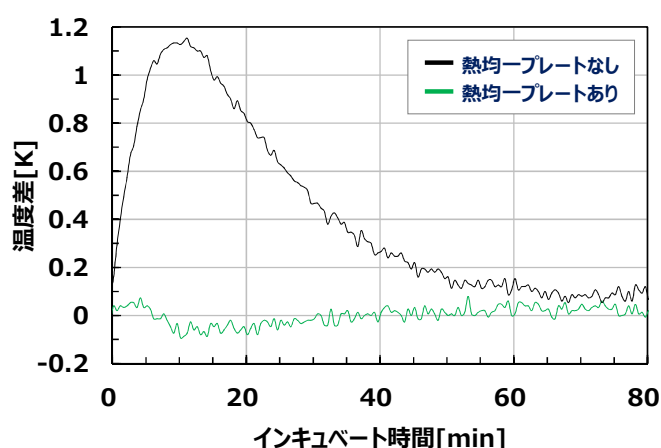


図 16 インキュベーター搬入後の培養面の温度差の経時変化

#### 研究開発項目：アイソレータ及びインキュベーター内の環境モニタリング評価

iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の製造においては無菌環境の維持が大きな課題となっており、昨年度の事業ではアイソレータを 100 日以上連続運転させ iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の試験製造を達成した。本検討では昨年度事業の製造工程を参考にアイソレータ運用の堅牢性について評価を行った。

図 17 にモニタリングの流れを示す。アイソレータを 26 日間連続運転させ、運転 1 日目、5 日目、8 日目、12 日目、15 日目、19 日目、22 日目、26 日目で模擬操作を実施し、パーティクルを測定すると共に落下菌、浮遊菌、付着菌を測定した。過酸化水素除染は運転 0 日目のみ実施し、連続運転中の定期除染は行わなかった。

評価の結果、パーティクルは搬入室で多く検出されたが、清拭用スプレー由来のパーティクルも検出されることから、外部からのパーティクル持ち込み量のみを評価することは難しかった。一方でパスボックス、細胞操作室はパーティクルが少なく、ISO Class 5 相当の環境が維持されていた。パスボックス内でパーティクルが検出されたのは資材の開封操作が主な原因だと考えられた。細胞操作室では基本的にパーティクルは検出されなかったが、包装された資材を移動した際にはパーティクルが検出された。これらの結果より、パーティクルの発生は外から持ち込んだ資材に由来すると考えられた。また細胞操作室、パスボックスでは落下菌、浮遊菌、付着菌いずれも検出されなかった。搬入室では連続運転

最終日に浮遊菌が検出されるケースが確認された。搬入室は汚染源となりうる資材を持ち込むエリアであることから、連続運転と共に汚染源が搬入室に蓄積したことが原因と考えられた。これらの結果より、搬入操作について、過酸化水素除染による搬入を適用し、搬入室内の汚染蓄積や清拭における拭き残しといったリスクを根本的に解決することで堅牢な運用が可能になると期待された。

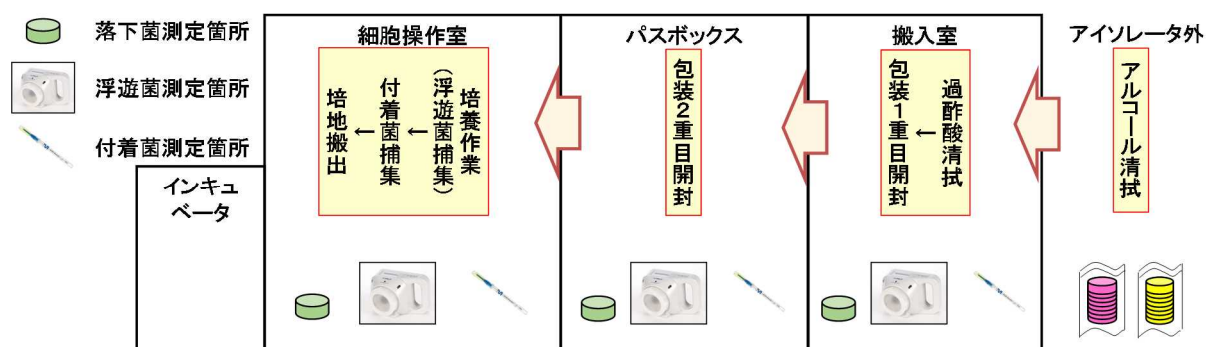


図 17 アイソレータ連続運転下における模擬操作のモニタリング手順

#### 研究開発項目：アイソレータ向けの包材及び除染運用法の検討

アイソレータを用いた細胞製造においては過酸化水素除染による資材搬入を行い、汚染源を持ち込むリスクや搬入室の汚染リスクを抑制することで、堅牢な運用が期待される。昨年度事業において包装形態や包装材質が異なる資材への過酸化水素除染を検討した結果、資材内部に過酸化水素が浸透していることが明らかとなった。本検討は過酸化水素に対してバリア性を有する包材で梱包された資材の除染搬入を評価した結果、除染を行わなかった資材と同様に過酸化水素が殆ど検出されず包材のバリア性を確認できた（図 18）。また iPS 細胞を培養・比較した結果でも、除染を行わなかった資材と同様に細胞が培養できることを確認できた（図 19）。

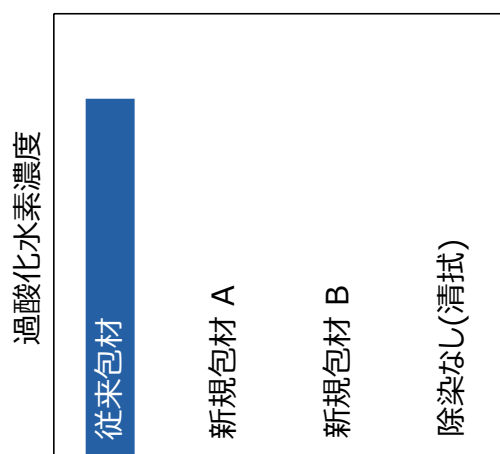


図 18 除染搬入した資材の  
溶存過酸化水素濃度評価

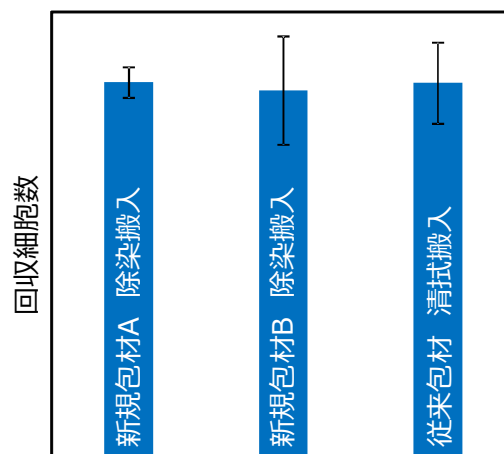


図 19 iPS 細胞培養評価  
(継代培養後の回収細胞数)

## 研究開発項目：アイソレータ外の環境モニタリング評価

アイソレータ運用の堅牢性について評価するために、アイソレータ内環境のモニタリングと並行してアイソレータ外環境のモニタリングを実施し、図 20 に示す位置でパーティクルと、浮遊菌・落下菌・付着菌を測定した。アイソレータは清浄度管理されていない一般環境に設置されたものを使用した。評価の結果、パーティクルと浮遊菌の傾向として、測定位置による変動よりも測定日ごとの変動が支配的であった。落下菌、付着菌はアイソレータ手前側のエリアの方が多く検出される傾向が見られた。今回測定を行った設置環境はグレードDの許容値を一部超える環境であった。しかしながら並行して実施したアイソレータ内の環境モニタリング評価では、連続運用の最終日のみ搬入室で浮遊菌が検出されただけであり、アイソレータの外環境に対する堅牢性が明らかとなった。

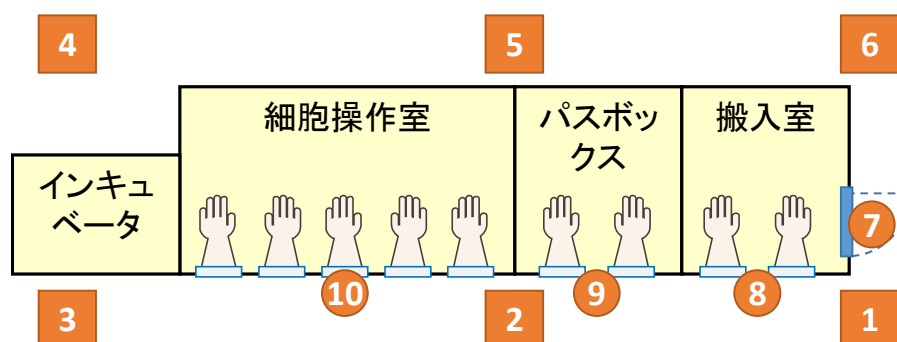


図 20 アイソレータ外環境モニタリング箇所（パーティクル、落下菌：1-6 の位置で測定）  
（浮遊菌：2, 5 で測定）（付着菌：1-6 は床面、7-10 はアイソレータ側面で測定。）

## 3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容

再生医療等製品の製造においては最終製品の品質を担保するための要求として工程の再現性が求められている。既存の細胞製造は手作業による作業工程が多く、細胞の品質が作業者の技術に左右されることが課題となっている。特にピペット操作は細胞に直接作用する操作であり、また iPS 細胞由来再生医療等製品の製造においては長期の培養維持が必要であることから、日々の培養工程におけるピペット操作の変動を抑制することで製品品質の安定化が期待される。昨年度事業においてアイソレータを用いた試験製造を実施し作業工程を分析した結果、培地交換の所要時間にばらつきがあることが明らかとなった。この原因として、既存の電動ピペッターはボタンの押し加減で流量が変化するように設計されていることが挙げられた。本事業では流量固定の電動ピペッターと既存品を比較・検討し、流量のばらつきを評価することで、より再現性の高い操作を実現するための道具を提案することができた。またピペットについても短いピペットを開発・評価し、操作の安定性の指標としてピペット先端の振動を評価することで安定性を向上できることを示した。

再生医療等製品の開発においては、研究室レベルで開発された培養工程を基準として初期の製造法が確立することが多く、将来の製造規模拡大に当たっては製法の同等性を確保することが要求される。iPS 細胞由来再生医療等製品の製造においてはスクレーパーを用いた細胞回収工程が含まれることが多いが、既存の大型培養容器は閉鎖系であることから、いかに同等性を担保してスケールアップできるかが課題となっている。本事業ではスクレーパーが使用可能な大型培養容器を開発することで、細胞回収

工程の同等性を確保しつつ大量の細胞を製造するための方法について提案することができた。また大量製造用のアイソレータを用いて培養ディッシュ 40 枚の細胞継代工程の評価を行い、既存の培養ディッシュを大量に用いる方法と本大型培養容器を用いる場合で工数の比較・評価した結果、大型培養容器を用いることで所要時間を約 3 時間短縮できることが示された。

iPS 細胞由来再生医療等製品の製造においては無菌培養環境の長期維持が求められる。昨年度事業においてはアイソレータを用いた試験製造を行い、既存の安全キャビネットを用いた製造よりも無菌空間を維持しやすい運用法について検討した。本事業では試験製造の作業工程を参考に環境モニタリング試験を実施し、アイソレータの堅牢性について検討した。また過酸化水素除染による資材搬入について検討を行い、いくつかの包材を検討した結果、細胞製造における除染に対応していることを確認できた。これによって既存の清拭搬入法の課題であった手作業による拭き残しのリスクや、外部環境から搬入した後アイソレータ内を除染できない問題を克服することができた。これらの結果を踏まえて、今後アイソレータ運用における環境モニタリングについて、既存の安全キャビネット運用よりもモニタリング頻度を下げるための議論に有効活用されることを期待したい。

#### 4. まとめ

本事業ではアイソレータ運用における操作の安定化や製造の効率化について取り組んだ。操作の安定化については流量固定の電動ピペッターの提案や短いピペットの開発を行った。製造の効率化については大量培養におけるアイソレータの作業工数評価、大型培養容器の開発、除染搬入法の提案を行った。また環境モニタリング評価を通してアイソレータの堅牢性について示した。

開発した短いピペット、大型培養容器および電動ピペッターについては、今回の検討結果を受け、さらに市販に向けた取り組みを進めている。また電動ピペッター評価、アイソレータの作業工数評価、除染搬入法の提案、環境モニタリングについては今後アイソレータを用いた細胞製造を目指す事業者にとって参考となる先行例を示すことができた。