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 （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	急性移植片対宿主病
研究開発担当者 所属 役職 氏名	JCR ファーマ株式会社 研究本部兼開発本部 専務取締役　立花　克彦

目次

1. 事業の目的 P. 3

2. 実施内容及び結果 P. 3

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. 4

4. まとめ P. 21

1. 事業の目的

より安全かつ恒常性の高い再生医療等製品の創出を目標に、日本初の他家細胞による再生医療等製品となる JR-031（ヒト間葉系幹細胞）の製造工程の効率化及び製造に使用している原材料等の国産化について検討を行い、より安定的に再生医療等製品を供給できる生産系の構築を目指す。

2. 実施内容及び結果

我々が開発に成功したヒト（同種）骨髄由来間葉系幹細胞「テムセル®HS 注」（右写真）は、他人から採取された細胞を「再生医療等製品」として製造販売承認を受けた日本で初めての製品となった。一般的な化学合成品などの医薬品と異なり、“生きた”細胞が持つ力を応用するため、細胞の人に対する効果や安全性をどのように評価するかなどについて、これまでに日本国内で前例がなかった。また今後、この製品を安定的に市場に届けるために、安定的、継続的に生産、供給していくことが必要となる。このためには「安定供給できる原材料の確保」や「より効率的に細胞を培養する方法の開発」が非常に有効となる。そこで本事業では、以下の 2 つの課題をテーマに検討を行った。

1. 安全性の高い細胞培養方法の開発（動物由来成分不含）

間葉系幹細胞を拡大培養する容器は海外企業製の培養容器を用いているが、細胞種によって細胞接着に好ましい基材表面構造が異なるため、効率的な培養のためにはより好適な足場条件を見出すことが非常に重要となる。そこで、足場材として 1,000 種類以上のポリマーをスクリーニングした結果、本細胞の接着に好適な優れたポリマーを見出した。そして、国内企業の協力のもと、そのポリマーをポリスチレン表面に塗布したプロトタイプの培養器を作製し、その細胞接着及び増殖能について評価した結果、ポリスチレン表面にポリマーは保持され、良好な細胞接着および増殖性が認められた。本結果より、広く臨床応用に用いられている間葉系幹細胞の培養に適した足場材としてポリマーが有用であること、また細胞種にマッチしたポリマーを用いることにより、細胞の接着が促進され、効率的な細胞培養が達成できる可能性が示唆された。

2. 細胞ソース確保システムの構築

本品の細胞ソースである骨髄液は日本国内では入手が困難であることから海外からの輸入に頼っており、製品の永続的な生産において不安がある。また今後国内の再生医療等製品開発促進のためにも国内で細胞ソースを確保できるシステムの構築は必須である。そこで細胞ソースより単離、拡大した細胞の特性が骨髄由来のものと類似し、かつ国内で入手可能な細胞ソースとして医療廃棄物として捨てられる「抜歯体」に着目し、その入手体制について検討を行った。抜歯体を産業に利用できる細胞ソースとして扱うために、デンタルクリニック及び新たに設置した仲介業者と協力し、倫理的観点、細胞ソースの安全性確保及び既に発出されている種々の指針等を参考に入手体制を構築した。

3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容

3-1. 安全性の高い細胞培養方法の開発（動物由来成分不含）

1）背景

現在、テムセルを拡大培養する容器は海外企業製の多層培養容器を用いている。本容器の培養面はポリスチレン構造をしており、親水性を向上させることで細胞接着、伸展を促進させている。しかし、細胞種によって細胞接着に好ましい表面構造が異なること、また、培養面への細胞接着には培地成分の影響も考えられる。したがってそれぞれの細胞に至適な環境（＝培養面）で培養することにより、細胞接着が促進され播種時の細胞密度が増加し、より短時間で拡大培養が可能になると期待される。また培養工程期間が短縮されることに伴い、人件費等のコスト削減も可能である。また、至適なポリマーを選択できれば、種々の培養容器への適用が可能になり、現在海外に依存している培養器材を国内メーカーのものに切り替えることができることから、培養器材の安定供給につながることが期待される。

当該製品開発に向けた全体計画を図 1 に示した。これまでに培養面の至適化を目的に 1,000 種類を超えるポリマー構造についてスクリーニングを行った。その結果、細胞接着に優れたポリマー構造をいくつか見出すことができた。それらポリマーをスケールアップしたガラス製のカバースリップにコーティングし、細胞接着及び細胞増殖について検証を行った。その結果、既存の培養面の容器と比較すると細胞接着及び増殖において同等あるいはそれ以上に優れているものを見出すことができた。しかしながら、これまでの検討により見出したポリマー構造は既合成ポリマーから選択してきたため、側鎖構造などのポリマー骨格やモノマー比などについては詳細な検証が十分になされたとは言えない。そこで本年度においては既に見出したテムセルの接着に優れたモノマーの基本構造に基づき新たなライブラリーをイリカ社にて作製し、それらをプリントしたマイクロアレイに細胞を播種、培養、蛍光染色することでテムセルの接着及び伸展に最適なポリマーを選択することを試みた。

一方、イリカ社で合成されたポリマーを用いて培養容器を作製するためには、それらポリマーをプラスティック面にコーティングする必要が生じる。これまで選択した細胞接着及び増殖に有利なポリマーは、ガラス面へコーティングされているため、通常細胞培養に用いるプラスティック面に当該ポリマーをコーティングするためには種々の検討、至適化が必要となる。それが達成できて初めてテムセルに適した培養容器の開発及び国内調達が可能となる。またポリマーの塗布面がガラスからプラスティックに変わることで細胞の接着性が変化する可能性も考えられる。そこでプラスティック面へのポリマーコーティングの諸条件の検討は、住友ベークライト株式会社へ委託することで検討を進めた。住友ベークライト社は半導体、電子部品、自動車、建材、包装、医療などの分野で利用されるプラスティック製品の総合メーカーであり、プラスティックのパイオニア企業として、薄型パッケージ用基板材料、ハイブリッド自動車部材、バイオ関連事業など、様々な最先端分野に積極的に取り組んでいる。S バイオ事業部においては細胞培養に用いられるあらゆる種類の培養器や培養面をコートした容器の開発などを行っており、本事業の委託先として適切であると考えられた。

本検討では、これまでの事業における検討で良好な細胞接着が認められた複数のポリマーをイリカ社にてバルク合成し、プラスティック培養器の素材として汎用されているポリスチレン面へのポリマーコーティングのための諸条件について検討を行った。得られた結果に基づき、実際に

ポリスチレン培養器にポリマーをコートし、作製された培養器に対する細胞接着及び増殖性評価を行うことで、ポリマーの性能評価を行った。

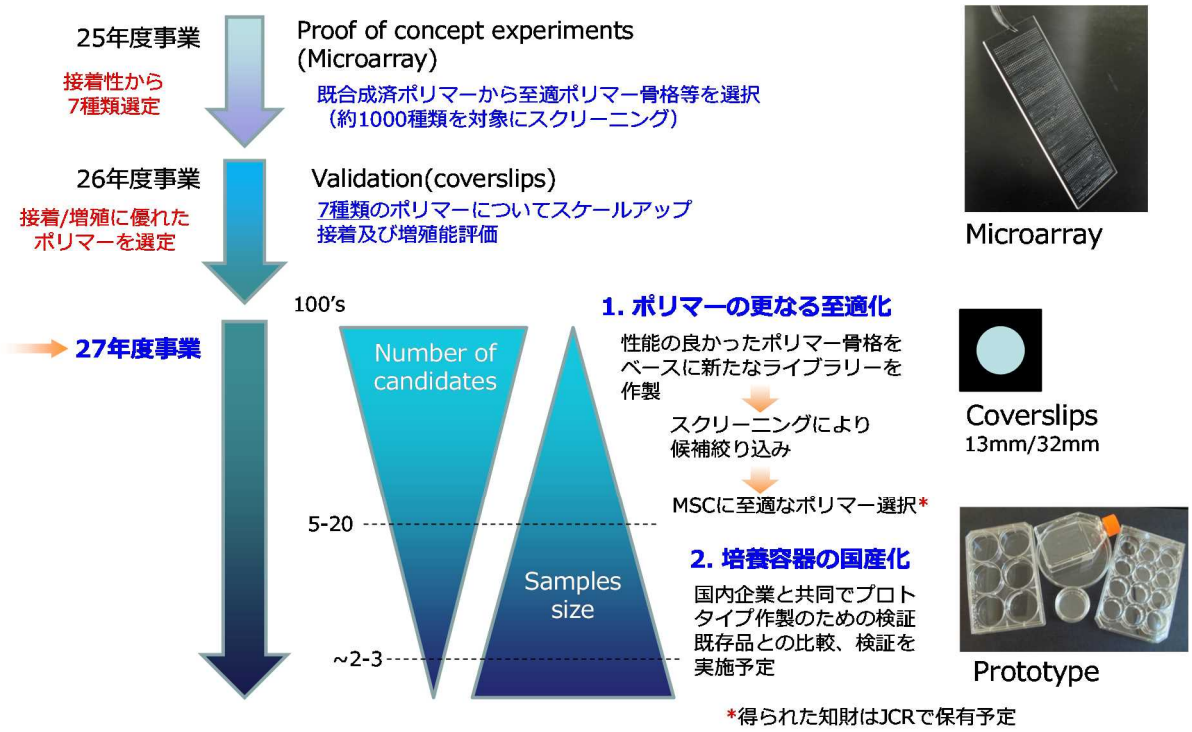

図 1: ポリマーによる細胞培養面の至適化 これまでの経緯及び全体計画

2) 結果

(1) 新規ライブラリー構築による至適ポリマーの選択

新規ライブラリーから至適ポリマーを選択するにあたり、ポリスチレン面へのコーティングを考慮した場合、ポリマーを溶解する溶液はポリスチレン面への影響がないものである必要がある。これまでに選択されたポリマーにおいては THF などの比較的強い有機溶媒にしか溶解しないものも含まれていたことから、新たに合成するポリマーは水、メタノール、エタノールといったポリスチレン面に影響を与えない溶液に溶解するものを前提に構築を行った。

これまで得られたスクリーニングの結果をもとにイリカ社にて新しいポリマーを約 70 種類合成し、それらをスポットしたマイクロアレイを入手した。新たに入手したマイクロアレイに 3 ロット分の細胞を播種し、翌日回収した。マイクロアレイを入れたプレートから培地を除き、PBS で洗浄（5 mL/プレート×3 回）し、4%パラホルムアルデヒドを加え（5 mL/プレート）、15 分間静置し、細胞を固定化した。PBS で洗浄（5 mL/プレート×3 回）し、Hoechst33342（× 5000 希釈）及び Alexa488（×400 希釈）を添加後、暗所にて 60 分間静置し、細胞を染色した。染色後、プレートから染色液を除き、PBS で洗浄（5 mL/プレート× 3 回）後、十分に乾燥させた後、アルミホイルで覆い梱包し、イリカ社に結果の解析を依頼した。ポリマースポットに接着した細胞は前出の 2 種類の蛍光色素（ヘキスト及びファロイジン）で細胞の核及びアクチンを染色し、蛍光強度の強さにより細胞接着能を評価した（代表的な顕微鏡観察図を図 2 に示した）。

イリカ社にて行った解析の結果、新たに合成した新規ポリマーにおいて基本骨格は同様であるものの、側鎖構造が全く異なるモノマーが細胞接着が良好なポリマーとして抽出された。驚いたことに、先に実施した既合成のポリマーを用いたスクリーニングで選択した細胞接着に優れていたモノマー構造が、今回新たに実施したスクリーニングではワースト上位を占めていた。従って、これまで得られているものより細胞接着及び増殖に優れたポリマーが新たに作製したライブラリーから見出される可能性が示唆された。今後、これら新規ポリマーについてバルク合成を行い、ポリスチレン面へのコーティング検討を行った上でプロトタイプの培養器を作製し、改めて細胞接着及び増殖性を評価する予定である

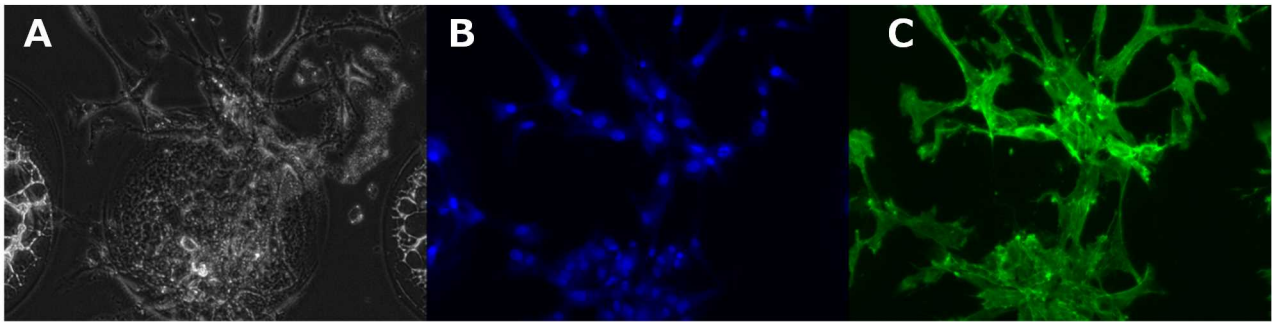

図 2. 蛍光染色した細胞の代表的な顕微鏡観察図
A）位相差、B）ヘキスト染色、C）ファロイジン染色

(2) プロトタイプ培養器の作製及びその評価

プロトタイプの培養器を作製するにあたり、これまで検討した結果から細胞接着及び増殖に優れたポリマーを 2 種類選択し、別途実施しているポリマー構造の至適化に先行して検討を行った。バルクポリマーとして PA1029 と PA880 を選択し、10g ずつイリカ社に合成を依頼した。

入手したバルクポリマーを用いて住友ベークライトにてコーティング条件の検討を行った。

① 塗布溶媒の検討

バルク合成した 2 種類のポリマーについて、どのような溶媒に溶解するかを検討し、ポリスチレン基板への塗布溶媒を選択することを目的とした。ポリマーを溶解する溶媒に求められる特性を以下に示した。

ポリマーを溶解すること 基板（ポリスチレン(PS)）を侵さないこと 速乾性があること

下記に示す条件で 2 種類のポリマーについて溶液を作製し、ポリマーの溶解性を目視で確認した。

・PA1029 ポリマー（濃度：1wt%）

1. THF：エタノール　　0：100、10：90、30：70、50：50、70：30、90：10
2. THF：メタノール　　0：100、10：90、30：70、50：50、70：30、90：10
3. 純水

・PA880 ポリマー（濃度：1wt%）

1. THF
2. エタノール
3. メタノール
4. 純水

結果を図 3 に示した。PA1029 は全ての条件の溶媒にも溶解することが分かった。よって、上記に示した特性を考慮し、「エタノール」を選択した。一方、PA880 ポリマーはメタノール及び純水には溶解したが、エタノール及び THF には溶解しなかった。よって、PA880 は「メタノール」を選択した。

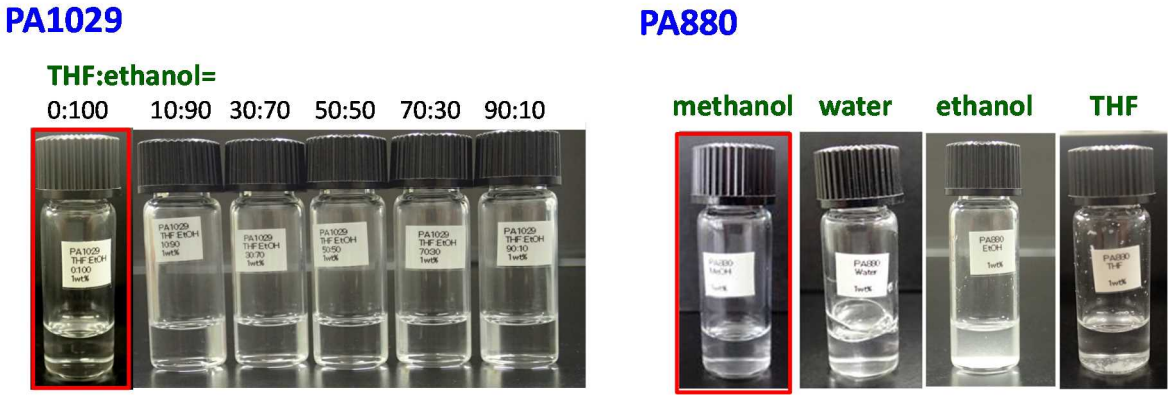

図 3. 塗布溶媒の検討

② 製膜検討

次に選択した溶媒に溶解したそれぞれのポリマーをポリスチレン（以下、PS）基板に塗布し、ポリマーが PS 上にコートされていること、また実際の使用を想定し、純水浸漬後もポリマーが残存していることを確認した。

検討条件を以下に示した。

・使用基板　PS 平板（厚さ 1mm、6 穴プレートと同じ樹脂を用いて成形）

・使用ポリマー　PA1029（1wt%エタノール溶液）

PA880　（1wt%メタノール溶液*）

*不溶物がわずかに認められたのでフィルター濾過

・塗布方法　浮遊細胞用基板をポリマー溶液に浸漬させ、30 分間静置

引き上げたのち、1 時間風乾

純水で数秒間浸漬、3 回洗浄

1 晩風乾

更に 37℃の純水に 1 日浸漬（実際の使用を想定）

（接着細胞用基板についても同様に製膜した）

・評価　膜厚はエリプソメトリーで測定した。

表面の元素濃度比は ESCA で測定した。

エリプソメトリーによる膜厚評価の結果を図 4 に示した。PA1029、PA880 ともコート後は 100 nm 弱～200 nm の膜厚を有していたが、水洗すると 10 nm 前後の膜厚を示した。また 3 回水洗後、実使用を想定した 37℃1 日純水浸漬しても、ほぼ膜厚は変化しなかった。また浮遊細胞用の基板と接着細胞用の基板の違いは認められなかった。

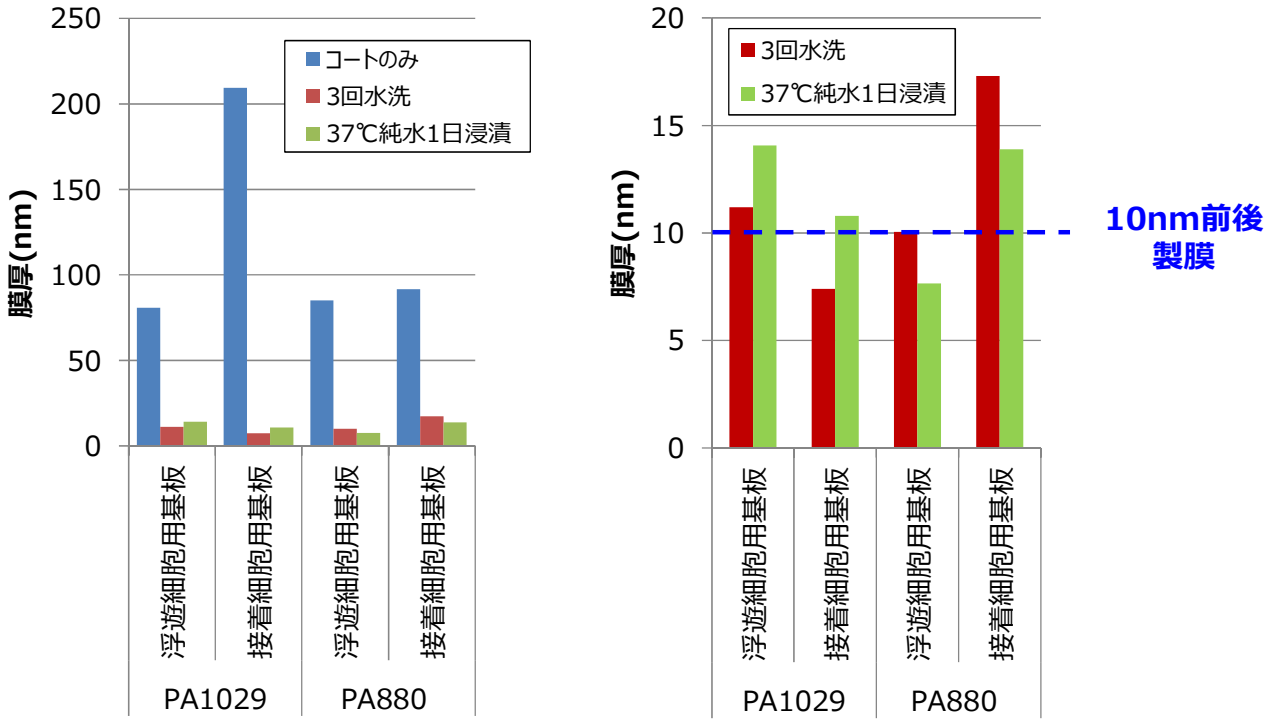

図 4. エリプソメトリーによる膜厚の評価

次に ESCA による元素濃度及び元素濃度比、結合状態について検討を行った。元素濃度及び元素濃度比の評価結果についてまとめたものを表 1 に示した。浮遊細胞用基板に塗布した場合についてのみ評価を行った。その結果、元素濃度について①ポリマーを塗布していない基板と比較して、PA1029 及び PA880 を塗布したプレート（②及び③）では明らかに浮遊細胞用基板のみの場合より N 及び O 濃度が増加し、ポリマーコーティングした場合と元素濃度及び元素濃度比が異なっていることが分かった。

表 1. ESCA による元素濃度及び元素濃度比の評価

試料	元素濃度 (atomic%)				元素濃度比
	C	N	O	Total	O/C
① 浮遊細胞用基板	98.3	-	1.7	100	0.02
② ①に PA1029 塗布 (3 回水洗, 37℃ 1 日純水浸漬)	85.7	1.7	12.6	100	0.14
③ ①に PA880 塗布 (3 回水洗, 37℃ 1 日純水浸漬)	86.2	1.6	12.2	100	0.14

元素濃度は検出元素の濃度合計を 100 とした場合の相対値

また各結合状態に関する評価結果をまとめたものを表 2 に、ピークに関する結果を図 5-1～3 に示した。

C1s ナロースキャンスペクトルにおいて、C-C 結合ピークより高エネルギー側にポリマーの C-N, C-O, O-C=O, N-C=O 結合由来と思われるピークが A：①浮遊細胞用基板のピークより強く認められた。以上の結果より、浮遊細胞あるいは接着細胞用基板の違いによる膜厚に顕著な相違は認められず、選択した溶媒にて溶解したポリマーによりポリスチレン上に製膜が可能であることが示唆された。

表 2. ESCA による結合状態の評価

		① 浮遊細胞用基板		② PA1029 塗布		③ PA880 塗布	
C	1s	A 284.6	C-C	A 284.6	C-C	A 284.6	C-C
		B	C-O	B	C-N, C-O	B	C-N, C-O
		-		C	N-C=O, O-C=O	C	N-C=O, O-C=O
N	1s	-		399.7	有機物 (N-C)	A 399.5	有機物 (N-C)
		-		-		B 401.9	有機物 (N-C), $-N^{+}(CH_3)_3$
O	1s	532.6	O-C	531～534	O=C, O-C	531～534	O=C, O-C

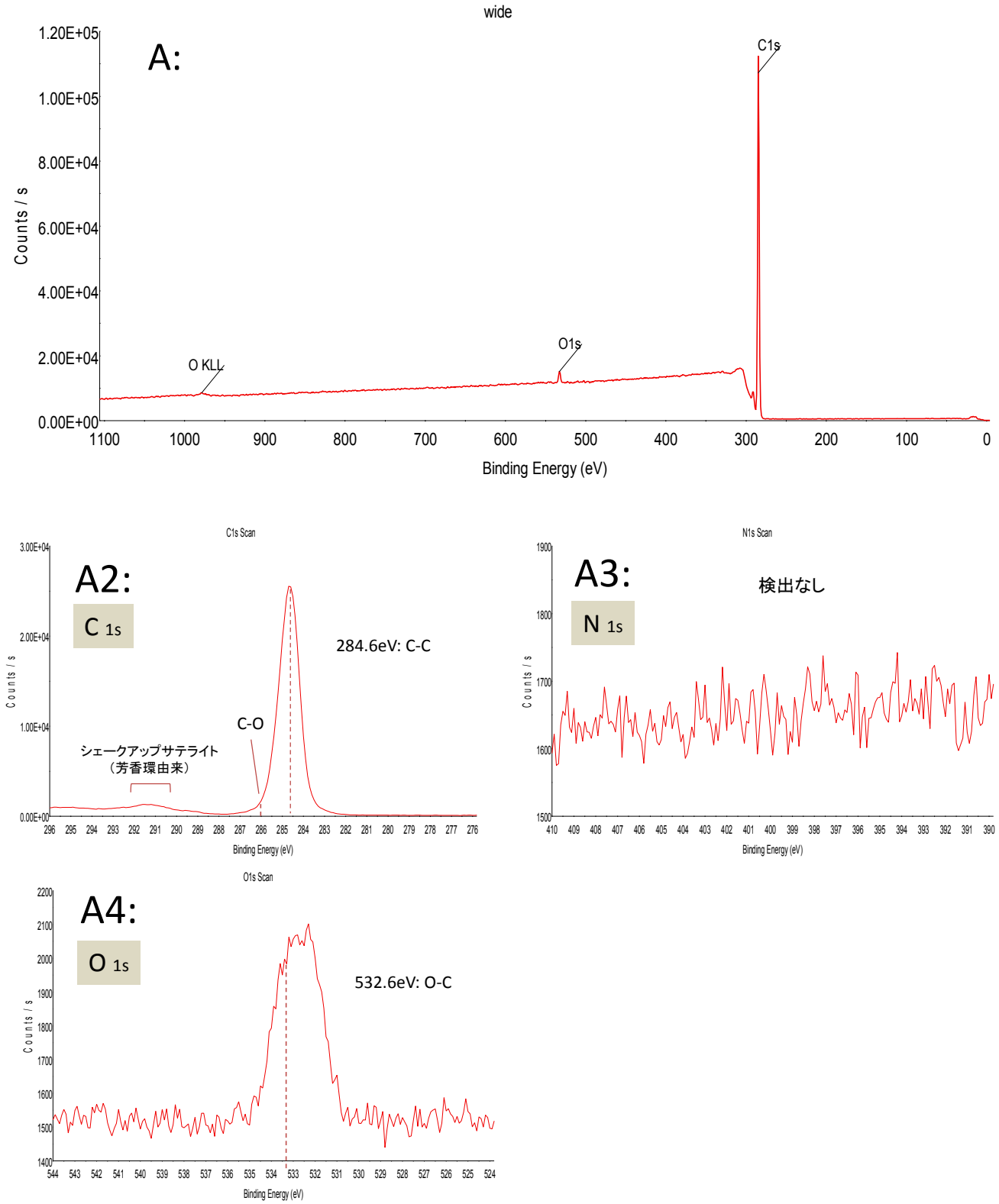

図 5-1. ESCA wide-scan による結合ピーク評価結果 1（A: ①浮遊細胞用基板）

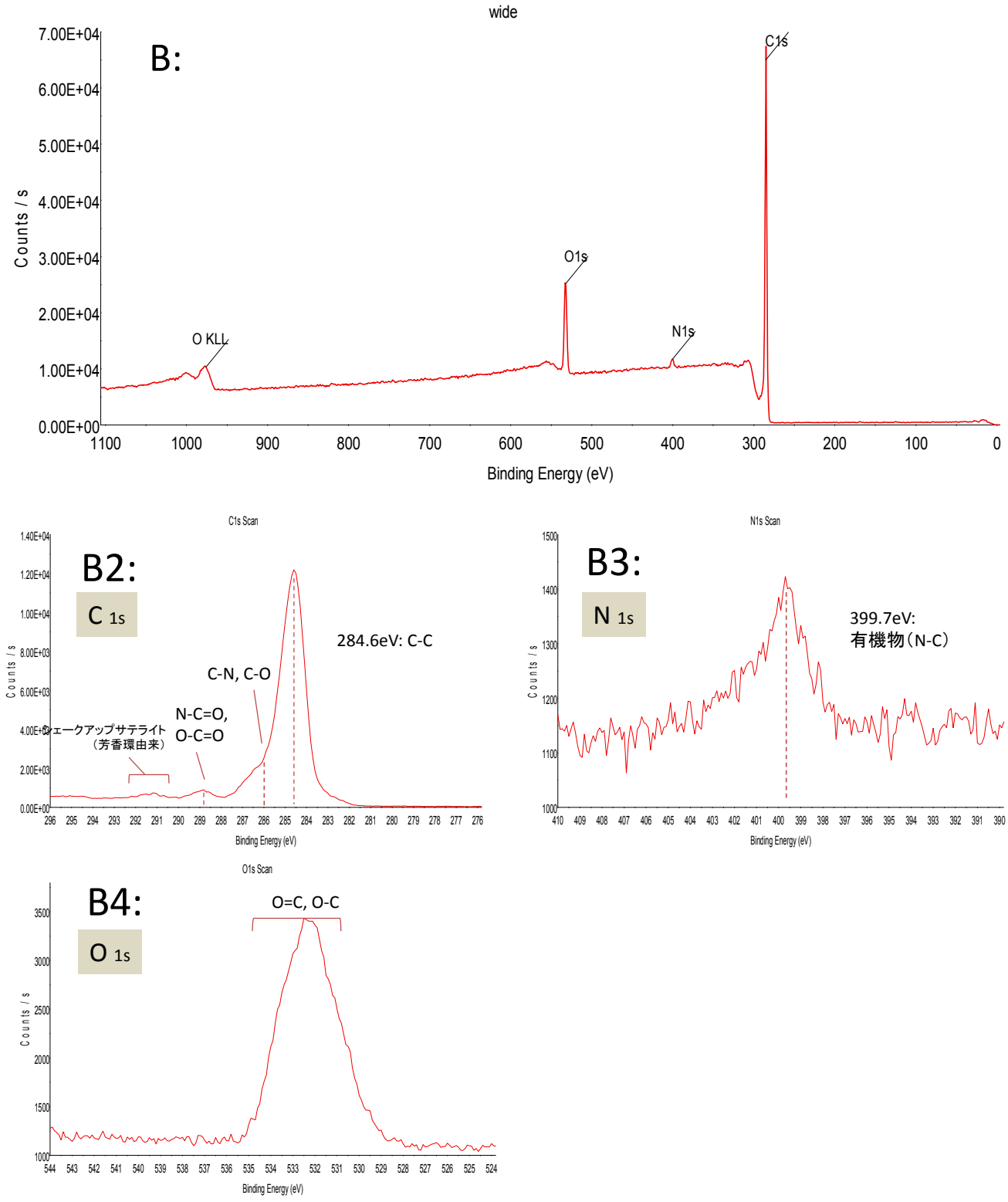

図 5-2. ESCA wide-scan による結合ピーク評価結果（B: PA1029 塗布，3 回水洗，37℃ 1 日純水浸漬後）

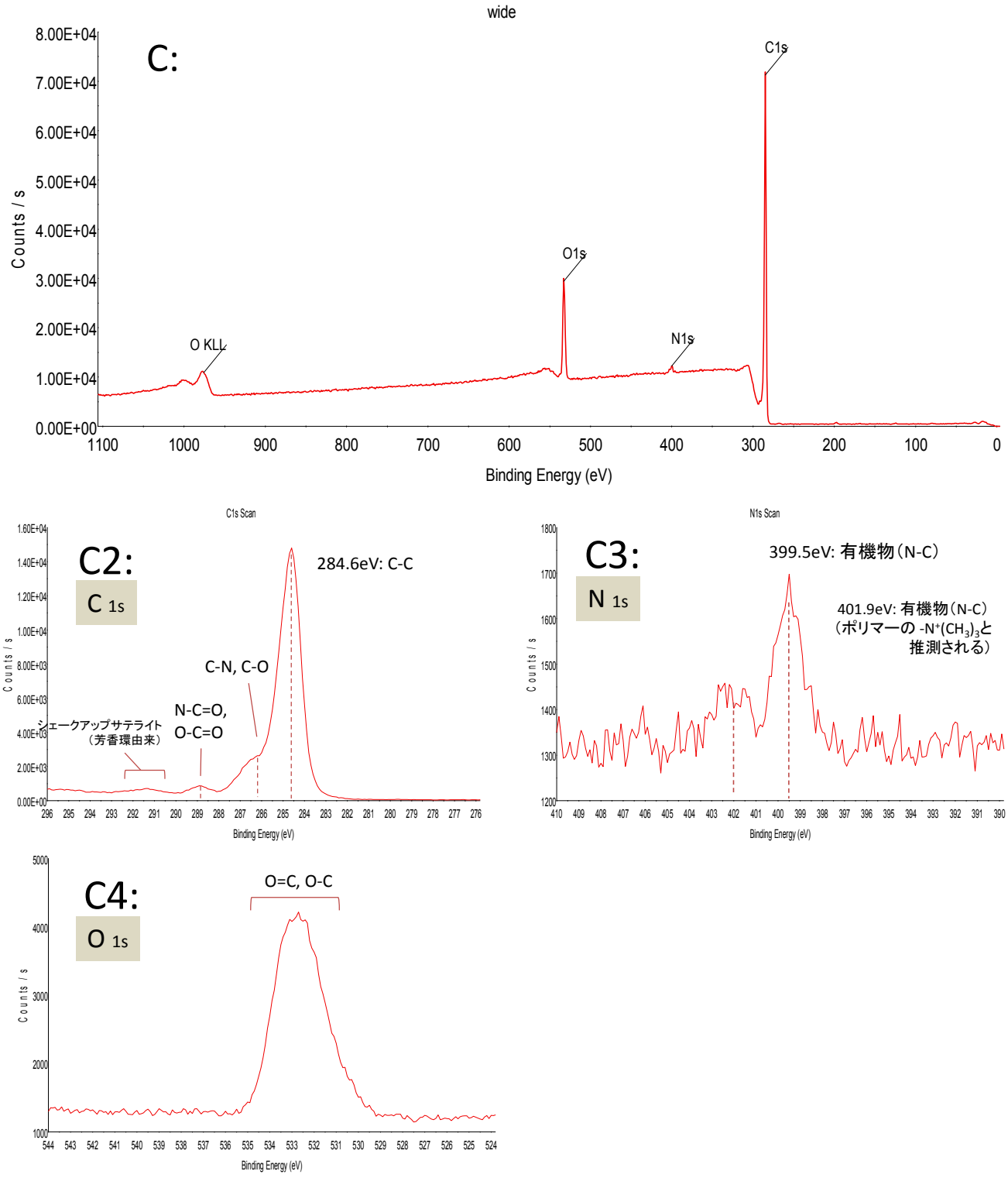

図 5-3. ESCA wide-scan による結合ピーク評価結果（C: PA880 塗布, 3 回水洗, 37℃ 1 日純水浸漬後）

③ プロトタイプ培養器に対する細胞接着及び増殖能の評価

上記で構築した塗布条件により、プロトタイプ培養器を作製し細胞接着及び増殖性の評価を行った。ポリマーの塗布は、6 well プレートに行い浮遊細胞用と接着細胞用両方の基板に実施した。プレートは図 6 に示した包装形態で納品された。プレートは滅菌されていないためプレートを取り出した後、安全キャビネット内で 3 時間 UV 照射して滅菌した後に使用した。

図 6. プロトタイプ培養器（外観）

あらかじめ前培養した MSC（継代数 3）を剥離、回収した細胞について細胞数を測定し、6 well プレートに 7,500 個/cm^2 で播種し、37℃、5% CO_2 で 細胞を培養し、播種後 1 日目及び 3 日目の細胞を観察し、評価した。細胞は以下に示した 6 種類の容器に播種した。

①ポリスチレン（以下、normal）
②ポリスチレン+プラズマ処理（以下、normal+P）
③PA880 コート（以下、880）
④PA 880+プラズマ処理（以下、880+P）
⑤PA 1029（以下、1029）
⑥PA 1029+プラズマ処理（以下、1029+P）

播種後 1 日目の結果を図 7 に示した。ポリマーコートしたプレートのうち、PA880 をコートしたプレートにおいてプラズマ処理の有無に係らず細胞接着が認められたが、PA1029 においては認められなかった。

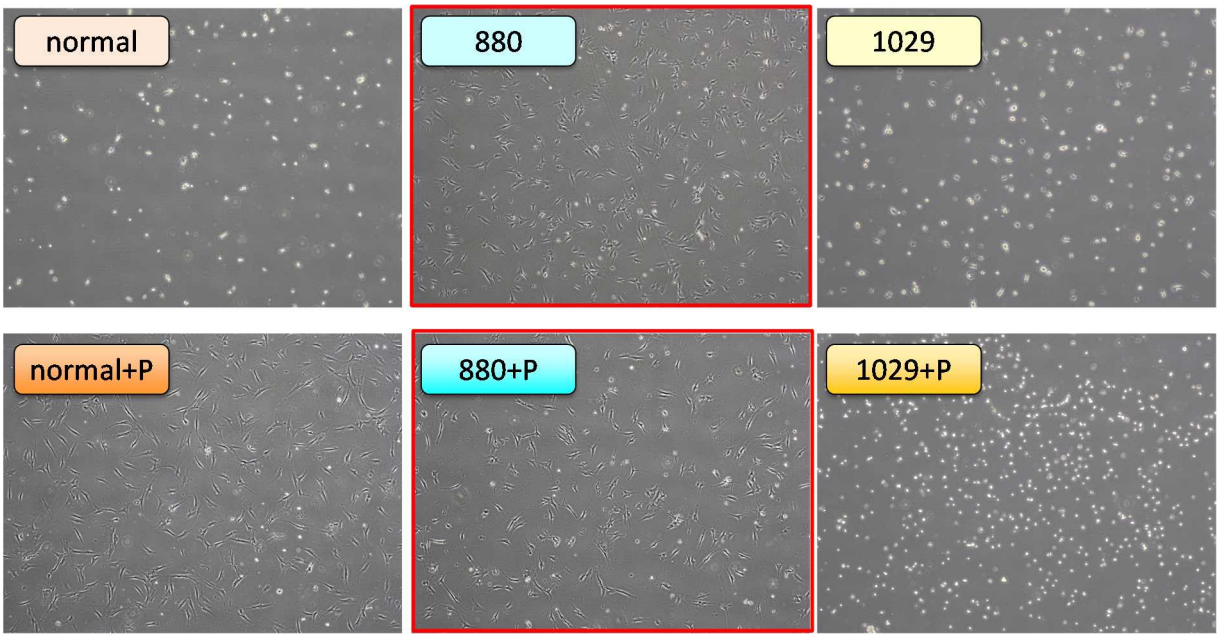

図 7. 細胞接着及び増殖性の評価：1 日目

播種後 3 日目の結果を図 8 に示した。1 日目にて細胞接着が認められた PA880 においてのみ細胞

増殖が認められ、ポリマーコートを実施していないプラズマ処理したポリスチレンプレートと同等あるいはそれ以上の増殖能であった。しかし、ガラス面にコートした場合において細胞接着及び増殖が認められた PA1029 について、ポリスチレン面にコートした場合では細胞接着及び増殖のいずれも認められず、ガラス担体の場合と異なる結果となった。原因の詳細は不明であるが、担体の材質が変わることで担体上でのポリマーの配向性が変化し、その結果細胞が接着しなくなった可能性が考えられた。ポリマースクリーニングはガラス担体で行っていることから、至適ポリマーを選択する際は、プラスティック面にコートした場合に挙動が変化する可能性を考慮する必要性があると思われた。

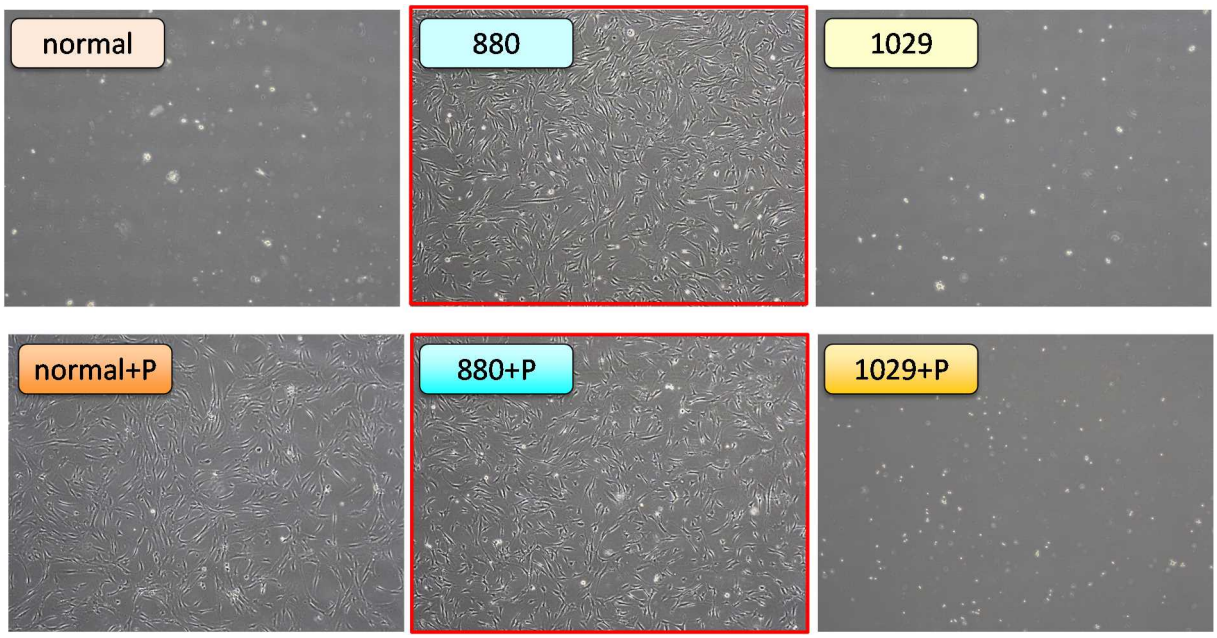

図 8. 細胞接着及び増殖性の評価：Day3

3-2. ヒト細胞ソース入手システムの構築

1）背景

これまでに平成 25 年度「再生医療等産業化促進事業」及び 26 年度「再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業」において、新規細胞ソースである抜歯体入手に関わる受入基準、手順を構築、運用した。その結果、設定した受入基準及び手順により入手、単離した細胞は、設定した安全性に関する試験において全ての基準を満たすことが示された（図 9 参照）。

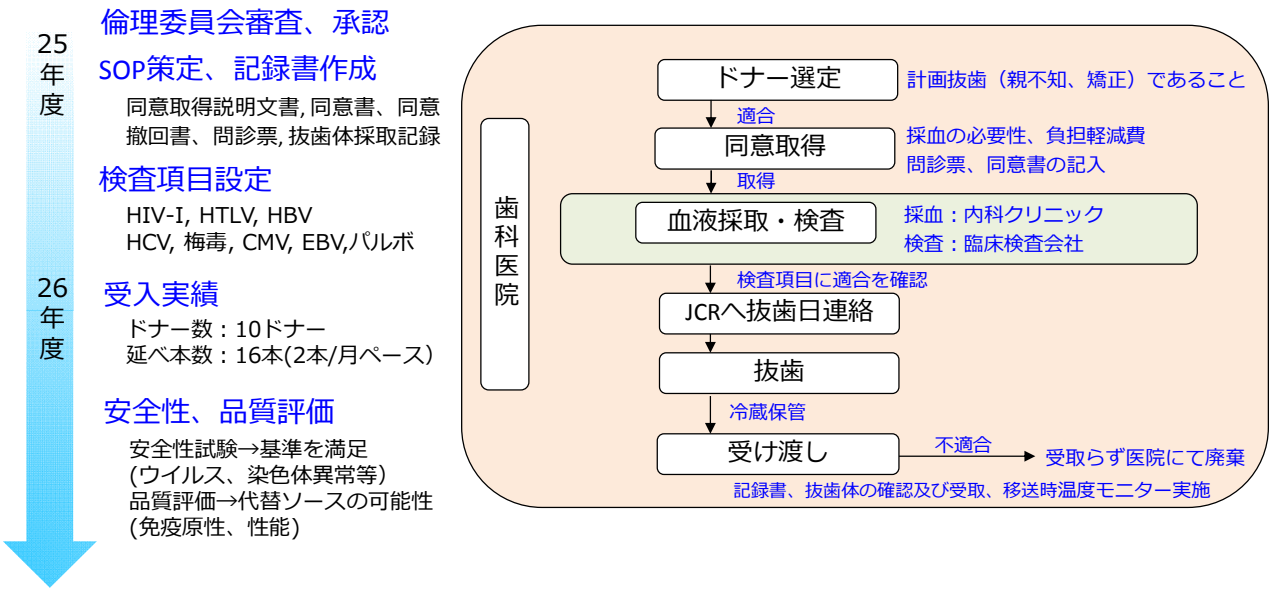

図 9. ヒト細胞ソース入手システム これまでの経緯について

また同事業において、抜歯体より単離、培養した細胞について品質評価を行った結果、骨髄由来のものとほぼ同等の性能を示したことから、他家細胞ソースとしての医療応用の可能性が示唆された。本年度は、本入手システムの至適化を念頭に、これまでの研究用途での入手に加え、将来の医療応用を見据えたシステムの構築及びドナー年齢の細胞に対する影響を検討した。

2）結果

(1) 医療応用に向けた入手システムの構築

① 第三者機関による倫理評価の実施（細胞ソース採取施設及び受入施設）

これまで当該細胞ソース確保システムの倫理評価は、細胞ソースの受入側施設であるＪＣＲファーマ内に設置された倫理委員会にて実施、承認を得て運用してきた。本年度は本年実施予定の変更内容を踏まえた上で細胞ソース採取施設及び受入施設の両方での倫理評価を第三者機関により実施し、より公明正大な審査を実施することで本システムの倫理的充足性を担保することを目的とした。

倫理評価を委託する第三者機関として、特定非営利活動法人「MINS」に委託することを検討した。本機関は外部機関からの臨床研究の倫理審査を製薬企業、大学から受託し、既に多くの審査実績を有する。またヒト組織、細胞を使用した研究に関しても審査した経験があることから、本件の倫理審査に適していると判断した。事前に「秘密保持契約」及び

「人を対象とする医学系研究等の審査に関する契約書」を締結し、審査に必要な書類一式を細胞ソース採取施設であるデンタルクリニック及び受入施設であるＪＣＲファーマでそれぞれ作成し提出した。12 月 16 日に審査会にて倫理審査が実施され、審議の結果、重大な指摘事項等はなく、構築した抜歯体入手経路について承認を得た。

② ウィンドウピリオドを考慮した問診票、入手システムの至適化

現在、研究用抜歯体のドナー適格性評価項目として設定した問診票及びウィルス試験回数は、ウィンドウピリオドが十分に検討されているとはいえない。ウィンドウピリオドを考慮した場合、血清学的検査のみで適格性評価を行った場合、1 回目の採血から少なくとも約 3 ヵ月経過した後再検査が必要となり、ドナーに対する負担が大きくなることが懸念される。そこで、再検査に対する対応として問診票への記載内容について検討した。「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について （平成 12 年 12 月 26 日）（医薬発第 1314 号）」及び「献血の際に使用する問診票」（図 10 参照）を参考に問診票を作成した。採血前の一定期間内に新たな感染症に罹る可能性を評価し、それを否定することで採血時に検出不能な感染症の発生を防ぐことが可能になると思われる。

問　診　票

ID

以下の質問は、献血される方と輸血を受けられる方の安全を守るためにうかがうものです。
表現上、不快の念を抱かれる部分があるかもしれませんが、「責任ある献血」のために、何卒ご理解のほどよろしくお願いいたします。
エイズ検査目的の献血は、血液を必要とする患者さんの安全のためにお断りします。　（注意）法令の規定により、記入された問診票及び献血申込書（診療録）の返却・廃棄はできません。

	質問事項	はい・いいえ
1	今日の体調は良好ですか。	□ □
2	3日以内に出血を伴う歯科治療（抜歯、歯石除去等）を受けましたか。	□ □
3	3日以内に薬を飲んだり、注射を受けましたか。（　　）	□ □
4	次の育毛薬／前立腺肥大症治療薬を使用したことがありますか。プロペシア・プロスカー等（1ヵ月以内）、アボダート・アボルブ等（6ヵ月以内）	□ □
5	次の薬を使用したことがありますか。乾せん治療薬（チガソン）、ヒト由来プラセンタ注射薬（ラエンネック・メルスモン）	□ □
6	24時間以内にインフルエンザの予防接種を受けましたか。	□ □
7	1年以内にインフルエンザ以外の予防接種を受けましたか。（　　）	□ □
8	次の病気や症状がありましたか。3週間以内－はしか、風疹、おたふくかぜ、帯状ほうしん、水ぼうそう　1ヵ月以内－発熱を伴う下痢　6ヵ月以内－伝染性単核球症、リンゴ病（伝染性紅斑）	□ □
9	1ヵ月以内に肝炎やリンゴ病（伝染性紅斑）になった人が家族や職場・学校等にいますか。	□ □
10	6ヵ月以内に次のいずれかに該当することがありましたか。①ピアス、またはいれずみ（刺青）をした。②使用後の注射針を誤って自分に刺した。③肝炎ウイルスの持続感染者（キャリア）と性的接触等頻密な接触があった。	□ □
11	1年以内に次の病気等にかかったか、あるいは現在治療中ですか。外傷、手術、肝臓病、腎臓病、糖尿病、結核、性病、ぜんそく、アレルギー疾患、その他（　　）	□ □
12	今までに次の病気にかかったか、あるいは現在治療中ですか。B型肝炎、がん（悪性腫瘍）、血液疾患、心臓病、脳卒中、てんかん	□ □
13	今までに次の病気にかかったことがありますか。C型肝炎、梅毒、マラリア、パペシア症、シャーガス病、リーシュマニア症、アフリカトリパノソーマ症	□ □

	質問事項	はい・いいえ
14	海外から帰国（入国）して4週間以内ですか。	□ □
15	1年以内に外国（ヨーロッパ・米国・カナダ以外）に滞在しましたか。（国名　　）	□ □
16	4年以内に外国（ヨーロッパ・米国・カナダ以外）に1年以上滞在しましたか。（国名　　）	□ □
17	英国に1980年（昭和55年）～1996年（平成8年）の間に通算1ヵ月以上滞在しましたか。	□ □
18	ヨーロッパ（英国も含む）・サウジアラビアに1980年以降、通算6ヵ月以上滞在しましたか。（国名　　）	□ □
19	エイズ感染が不安で、エイズ検査を受けるための献血ですか。	□ □
20	6ヵ月以内に次のいずれかに該当することがありましたか。①不特定の異性または新たな異性との性的接触があった。②男性どうしの性的接触があった。③麻薬、覚せい剤を使用した。④エイズ検査（ＨＩＶ検査）の結果が陽性だった（6ヵ月以前も含む）。⑤上記①～④に該当する人と性的接触をもった。	□ □
21	今までに輸血（自己血を除く）や臓器の移植を受けたことがありますか。	□ □
22	今までに次のいずれかに該当することがありますか。①クロイツフェルト・ヤコブ病（ＣＪＤ）または類縁疾患と診断された。②血縁者にＣＪＤまたは類縁疾患と診断された人がいる。③ヒト由来成長ホルモンの注射を受けた。④角膜移植を受けた。⑤硬膜移植を伴う脳神経外科手術を受けた。	□ □
23	現在妊娠中または授乳中ですか。（男性の方は「いいえ」と回答してください）6ヵ月以内に出産、流産をしましたか。	□ □

私は以上の質問を理解し、正しく答えました。

「献血の同意説明書」の内容について理解し、献血に同意しますか。　□ □

署　名

（注意）1．献血される方は、「はい・いいえ」欄の該当する方に ■ または 〓 印をご記入願います。
2．それ以外の欄には、問診を行う者が、必要事項を記入いたします。

図 10.　献血の際に使用する問診票

③ ドナー適格性評価の為の評価内容の検討（ウイルス試験手法、下限年齢）

・ウイルス試験手法

ドナー適格性評価の為に実施するウィルス試験は臨床検査会社に委託し、ドナー候補者か

ら採血した検体を用いて血清学的検査を実施しているが、感度的に十分とは言えない。平成25年12月27日（健発1227第3号）「移植に用いる臍帯血の品質の確保のための基準に関する省令の運用に関する指針（ガイドライン）の制定について」の記載内容に基づき、ドナー適格性評価時に実施する検査において「HBV, HCV及びHIVについてはより高感度である核酸増幅検査と同等感度の検査の導入」について記載があることから、これら試験導入の可否について検討を行った。

臨床検査会社において、上記3菌種のPCR法による検査法は別途本試験用に採血が必要となるが実施可能であった。ドナー候補者の感染症への採血後の新たな感染リスクを考慮すると、採血実施後速やかに抜歯体を採取できることが望ましい。しかし各臨床検査会社で実施する場合と委託して実施する場合で結果が得られるまでの日数が異なることから、各検査結果が入手可能な日数を考慮した上で設定する必要がある。そこで各臨床検査会社において、全ての検査項目について採血後結果が判明するまでの期間について確認を行った。その結果、全ての核酸増幅検査及び血清学的検査の結果が 5 日以内に得られる検査会社があることが判明したことから、当該施設に検査を委託することとした。

・下限年齢

ドナー候補者の年齢設定について、現在は16歳から30歳に設定している。一般的に年齢が低い方が細胞の特性が優れていること、また細胞の安全性を考慮すると感染症への感染リスク並びに後天的疾患等のリスクが低いことから、若年齢ドナーから細胞ソースが得られれば、より安全で性能に優れた細胞を得られることが考えられた。そこで今回、下限年齢を12歳に下げ、その場合に必要と考えられる同意取得内容及び手順、また本設定内容に対する倫理評価により設定可否について検討を行った。

若年齢ドナーに対する方策を検討するうえで以下の文書を参考にした。

「小児集団における医薬品の臨床試験に関するガイダンスについて」
平成12年12月15日（医薬審第1334号）
「小児集団における医薬品の臨床試験に関するガイダンスに関する 質疑応答集（Q&A）について」
平成13年6月22日（事務連絡）

これら文書の記載に基づき、低年齢のドナー候補者から抜歯体を提供頂くにあたり、細胞ソース提供に関する目的、意義、使用用途等を理解し、その上で提供に同意してもらうことが重要であると考え、それら内容をより簡単に記載した「インフォームドアセント文書」を作成した。また若年齢のドナー候補者にも「意思確認書」に署名を頂き、内容について理解したことを確認する手順とした。本設定で「① 第三者機関による倫理評価の実施（細胞ソース採取施設及び受入施設）」にて実施した第三者倫理評価において承認を得ることができた。

④ 細胞ソース採取施設における各種手順の標準化

細胞ソースの採取手順について、採取ごとに相違が生じないようにするために全ての作業手順を明文化し、SOP としてデンタルクリニックにて施行することとした。また作業の統一化を目的として、本作業に関わるスタッフの教育訓練を実施し、文書等の承認体系等も明確にした。また⑤で述べるように細胞ソース採取にあたり、採取業務をＪＣＲから仲介業者である ACS Agency に委託した。委託の形態については「業務委託」とし、委託した業務に対する対価を支払うことで仲介業者が業として本作業を実施可能な体制とした。両社間で合意すべき委託内容についても、手順の標準化、文書化することで明確にすることができた。

⑤ 細胞ソース確保のための仲介機関の設置の可能性検討

平成 27 年 5 月に経済産業省より公開された「再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業　原料細胞の入手等に関する調査報告書」の提言にあった仲介機関設置の可能性について検討を行った。仲介機関の設置により、細胞ソース採取施設である医療機関と受入施設である企業の負担が大幅に軽減される可能性がある。

既に事業としてヒト細胞ソースを扱うことができる会社の有無について検索したところ、調査した範囲では見つけることができなかった。そこで既存の会社に新たにヒト細胞ソースを扱う業務を「業」として加えることを前提に仲介機関について検討を進めたところ、デンタルクリニックにスタッフを派遣している会社が協力をしてくれることになった。そこで当該会社において細胞ソースを扱えるような対応を検討した。まず業として細胞ソースを扱うためには「定款」にその旨を盛り込む必要性がある。そこで定款の変更手続きを実施し、合わせて他家の細胞ソースを扱うことから、社名も変更した（ACS Agency：Allogeneic Cell Source Agency、以下 ACS 社)。

細胞ソース業務を ACS 社に委託するにあたり、業務委託の実施体系について検討を行った。抜歯体自体は無償提供が前提となることからそれに対する対価としては費用を計上することはできない。そこで、抜歯体採取に伴い発生する業務に対する対価の位置づけで「業務委託費」を仲介機関に支払うことで費用の支払いをすることとした。つまり、ＪＣＲファーマは ACS 社に抜歯体採取の業務を委託、ACS 社は試料採取業務をデンタルクリニックに委託することにし、それぞれの会社の間で契約書を締結し、業務体系を構築した。業務委託にあたり、委託する内容の詳細はデンタルクリニックにて施行した各種手順書に明文化し、それら作業に対する対価として契約書内に記載することで対応した。

⑥ 歯髄より単離した細胞の年齢に対する影響

抜歯体については、他の細胞ソースと比較すると入手機会が多いのがメリットであり、親不知はもちろん、矯正時に行われる抜歯の場合は、同一ドナーから最大 4 本入手できる機会がある。細胞の品質は一般的に若年齢の方が良いことが知られており、歯髄より単離した細胞においても 30 歳を超えると組織からの細胞単離確率が低下し、品質面でもその性能が劣化することがこれまでの社内での検討により明らかになっている。親不知の抜歯に比べて矯正時の抜歯は若年齢で行われ、矯正のし易さから 11~16 歳の間に抜くことが一般的である。そのため、当該年齢での細胞が入手できれば、より品質の優れた細胞が得られる可能性があ

り、結果的に細胞治療に対する効果がより向上することが期待される。そこで本検討において、上記年齢層の抜歯体を入手し細胞増殖性、性能面を評価することで当該細胞ソースの年齢による品質への影響を評価することを計画した。しかし、本事業の期間内に 11~16 歳からの細胞ソース提供の機会が得られず、若年齢層とそれ以上の年齢のドナーから単離した細胞を用いた細胞増殖性及び性能の評価を行うことができなかった。

一方で 20 歳から 30 歳以下のドナーからは細胞ソースを入手し、細胞の単離、増殖を行った。細胞を単離できたものからドナー年齢を考慮し、20 歳から 30 歳の間での細胞増殖性に対する年齢の影響について比較、評価を行った。評価対象としたドナーの年齢及び性別について表 3 に示した。20 歳から 30 歳の間で幅広くドナーを選択した。細胞増殖性の評価は、積算 PDL 値で行った。結果を図 11 に示した。今回選択したドナーの年齢である 21 歳から 29 歳の間では細胞増殖性に大きな違いはなく、評価を行った積算 PDL 値 50 前後までは大きな違いはなく非常に良好な結果であった。したがって、細胞増殖性に対する年齢の影響は余り認められず、この年齢幅であれば品質に対しても大きな相違は生じない可能性が示唆された。20 歳未満のドナーから得られた細胞においては、今回の結果より優れた細胞増殖性を示す可能性はあるが、今後細胞ソースが入手出来次第、検討を行う予定である。

表 3. 細胞ソース提供者の年齢及び性別

Lot#	DP-1523	DP-1529	DP-1602	DP-1604	DP-1608	DP-1610
年齢/性別	21F	28F	22M	29M	29F	22M

F:女性、M:男性

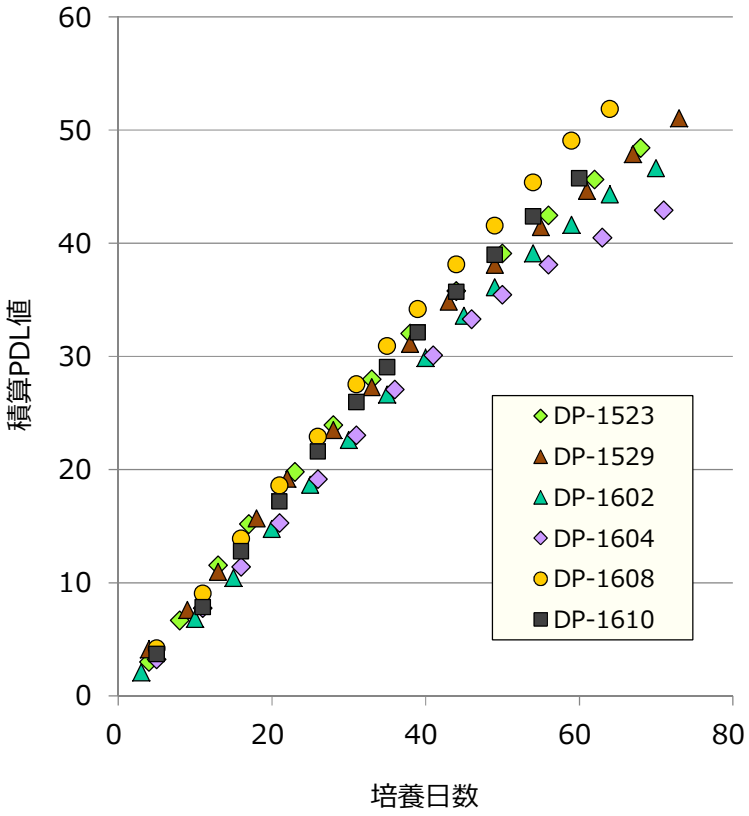

図 11. 細胞増殖性の年齢による影響評価

4. まとめ

1）培養面の至適化のまとめ

細胞培養の際に用いる培養器の培養面の至適化方法の 1 つとして、ポリマーを対象として検討を行った。その結果、「新規ライブラリー構築による至適ポリマーの選択」においては、新たに合成した新規ポリマーにおいて基本骨格は同様であるものの、側鎖構造が全く異なるモノマーが見出され、既存のものより細胞接着が優れている可能性が示唆され、これまで得られているポリマーより MSC の細胞接着及び増殖に優れたポリマーが見出される可能性が示唆された。また、「プロトタイプ培養器の作製及びその評価」では、バルク合成したポリマーをポリスチレン面に塗布し、製膜することが可能な条件を見出し、ポリスチレン面に塗布したポリマー上で細胞接着及び増殖が認められ、プラズマ処理を行ったポリスチレンと同等あるいはそれ以上であった。以上の結果より、細胞培養面を用いる細胞ごとに至適化する方法として、ポリマーを用いることは有用であり、ポリマー選択及びポリスチレン面への塗布が可能となることで国内メーカーにて作製された培養器で細胞調製ができる可能性が示唆された。

2）ヒト細胞ソース入手経路のまとめ

以上、医療応用に向けたヒト細胞ソース入手システムの構築が完了した。今後、当該入手経路にて抜歯体を入手し、一連の手順における問題点等を抽出した後、必要に応じて手順等を修正し入手システムの最終化、運用を行う予定である。