

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	膝関節における外傷性軟骨欠損症又は離断性骨軟骨炎（変形性膝関節症を除く）
研究開発担当者 所属 役職 氏名	株式会社ツーセル gMSC センター センター長 長谷川 森一

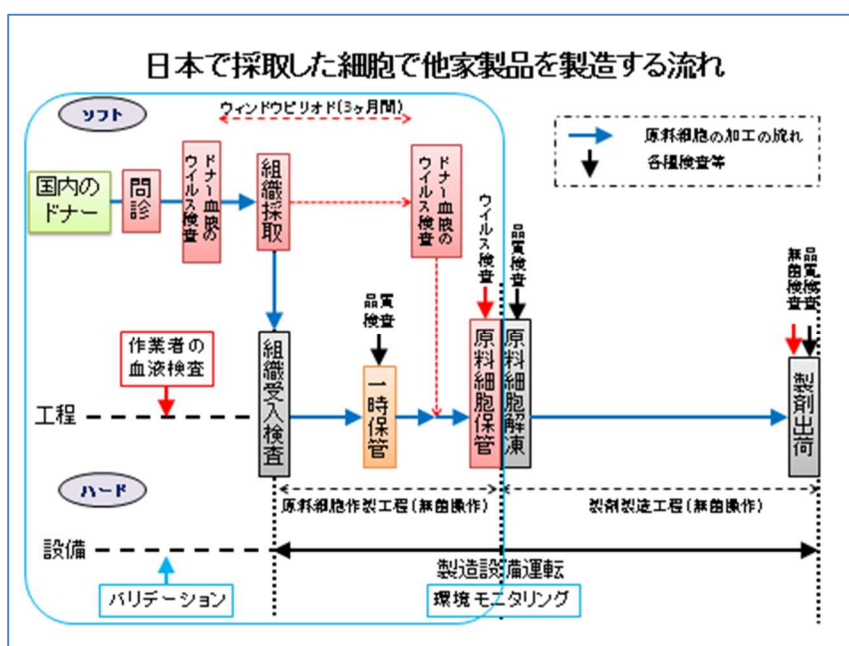
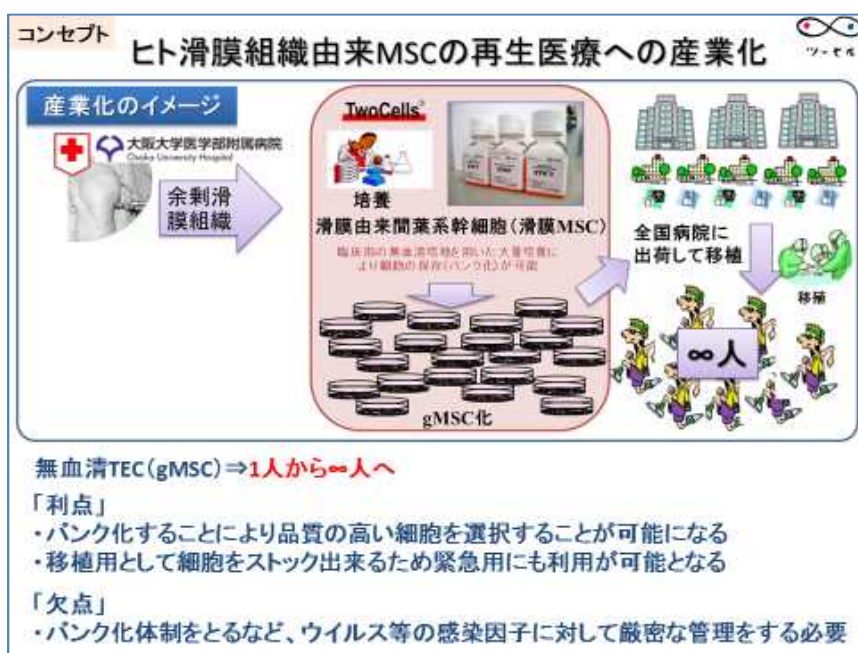
目次

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. 24
4. まとめ	P. 28

1. 事業の目的

我々はこれまでに、複数回に渡り日本で採取した細胞で製造する他家滑膜組織由来 MSC を用いた細胞製品に関する薬事戦略相談の対面助言を実施した。これらの助言に基づいて、他家（同種）の滑膜組織由来 MSC の入手方法に関する検討、同細胞を製造工程に組み入れるための検討、更に他家細胞の有用性の評価等の検討を行った。また、他家細胞としての臍帯組織由来 MSC の入手方法に関する検討も行った。

幹細胞を用いた再生医療の実現と産業化のためには、移植用細胞製品やその周辺機器、加工プロセス等に関する安全性、有効性、品質性等の評価手法の開発が必要である。本事業では、再生医療等製品等の優れた技術シーズの製品化を促進させるべく承認審査、適合性評価等について事業者が示すべき安全性等の論拠の作成に資する複数項目における指標を示すことを目的とした。



2. 実施内容及び結果

1-1) 原料細胞としての他家（同種）細胞の入手方法に関する検討／滑膜組織からの原料細胞の作製工程および品質評価法の妥当性検証

原料細胞としての他家（同種）細胞の入手方法に関する検討において、治験製品製造に留まらず、将来的に採取した組織を商業利用することを目的として、組織採取及び製造施設である大阪大学医学部附属病院倫理審査委員会に倫理審査を依頼した。当院で商業利用を目的とした原料細胞を入手することは初の試みであり、特定の企業や治療にのみ原料細胞を用いることに関しての承認は難航することが予想されたため、その対応に関して議論を重ねた。その中で得た結論として、原料細胞はMSCのソースとして有用であることが実証された場合、将来的にgMSCではなく別の再生医療等製品（特定細胞加工物を含む）への利用を他企業が行う事も考えられた。そこで、重要ポイントを精査し委員会に付議した。

1. 中間製品製造までを一つの研究にとらえ、組織採取～中間製品製造を一つ目の研究（以下、研究①）とし、品質検査項目の規格値を満たすかどうかのデータを取得し、再生医療等製品に使用できる品質を持っているかどうかを調査することを目的とした。
2. これにより、中間製品までの工程はMSCをバンキングすることを主目的とする形を作り上げた。

中間製品製造～gMSC出荷を二つ目の研究（以下、研究②）とし、研究①で取得した全ての規格値を満たしたものを利用し、gMSCを製造することとした。これは前述したように将来的には大学や他の企業が研究①で得た細胞を利用する場合に、研究②という形で切り分ける事により製品項目ごとに審議できる仕組みとした。研究①に関して、組織提供者に同意取得を行う際に、包括同意として基礎研究・臨床研究・治験・商業利用と目的の異なる下記に示した4つの項目から提供しても良いものを組織提供者が個々に選択出来るようにした。

以下、同意いただける内容にチェックを入れてください。

- ☐ ① 基礎研究あるいは医学教育
- ☐ ② 研究や承認申請を目的とした人への投与（臨床研究および治験）
- ☐ ③ 治療を目的とした医療機関による使用
- ☐ ④ 商業利用を目的とした再生医療等製品の製造に利用

この時、治験・商業利用の部分にも同意が得られた組織提供者の検体のみを研究②において使用が可能となる候補株とする。ただし、同意取得の段階では、組織提供者は自分の検体が将来何を目的として利用されるかが不明なため、提供者においては、未来医療開発部未来医療センターのホームページ上で同意した組織の使用用途についての詳細が確認でき、同意撤回の機会が保持されるシステムとした。

また、上記の内容について、大阪大学医学部整形外科、同附属病院未来医療開発部未来医療センターの医師、看護師、コーディネーター等医療関係者と、説明と組織入手に向けた連携体制に関する議論を行うことで理解を深め、個人情報保護を考慮しつつ、スムーズかつ連絡漏れがないよう連携体制を強化し、入手における流れを整備した。

滑膜組織からの原料細胞の作製工程および品質評価法の妥当性検証において、図2に示す製造フローに則して連続的な製造を3回以上実施する中で、以下の3項目を達成目標とした。

- A) 組織入手における確認項目の妥当性検証
- B) 組織受入検査項目の妥当性検証
- C) 凍結保存までの品質評価項目の妥当性検証

A) 組織入手における確認項目の妥当性検証

研究開発分担者である大阪大学医学部整形外科の名井先生と連携を図りながら、同意説明や血液検査（ウイルス否定試験（ドナー/採取前））をクリアした後に症例登録の作成を行い、手術・組織採取が完了した（図 1, 2）。この工程において、これまでに整備してきた確認項目及び組織スクリーニング方法の流れで逸脱が見られるようなところはなかったものの、組織入手には大阪大学医学部整形外科、同附属病院未来医療開発部未来医療センターの医師、看護師、コーディネーター等医療関係者など多岐に渡る部門が介在しており、情報共有に多くの時間を要する必要があることを再認識することとなった。特に感染症検査の項目にある、パルボウイルス B19 は検査会社による測定日が毎週火曜日と決められていることから、検査結果が出るまでに最長で採血管提出後 10 日程度を要する。術前検査は手術日の 2~4 週間前に行われることが多いものの、組織提供の同意を頂ける患者は整形外科に来院してから術前検査や手術日確定までが短時間で慌ただしく決定されることから、部門間の共有が 1 日滞るだけでも準備にクリティカルな影響を及ぼすことが明らかとなった。

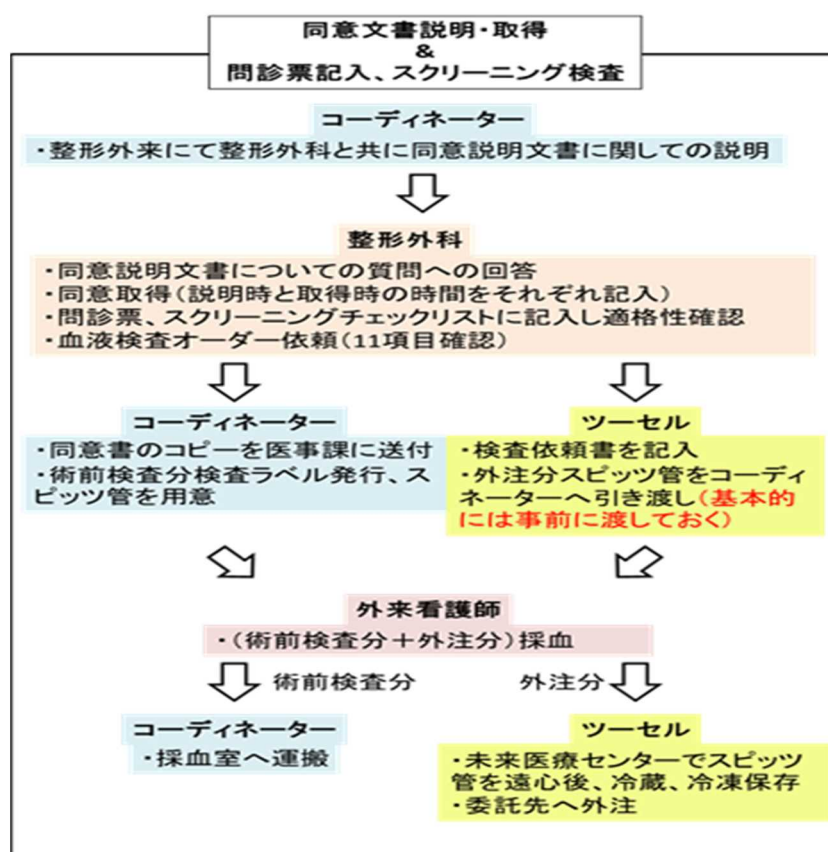


図 1 症例登録の流れ（同意説明文書・取得&問診票記入、スクリーニング検査）

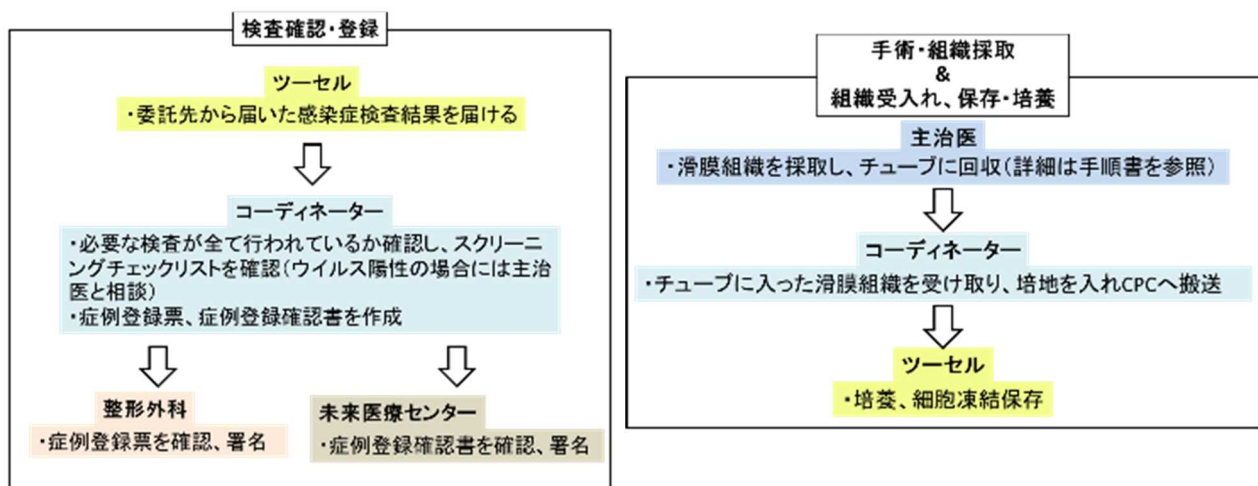


図2 症例登録の流れ（検査確認・登録、手術・組織採取&組織受入れ、保存・培養）

また、研究参加に同意が得られた患者から問診、採血検査により感染症の否定を行った。具体的には、これまでに採血検査の規格として設定した9種類のウイルス（B型肝炎、C型肝炎、HIV、HTLV1、パルボウイルスB19、サイトメガロウイルス、EBウイルス、梅毒、マイコプラズマ）の検査を行った。ウエストナイルウイルスなど、その他の入手する原料細胞のリスクとなる感染症、もしくは感染症の疑いを問診において、渡航歴や病歴等の確認で否定することとした。結果、新規に入手したMB01-006、MB01-007の2株において、採血検査で全項目陰性であることを確認すると共に、問診でも受け入れに影響するような内容は確認されなかった。過去の株も含めて、これまでに確立した項目を用いることで、一定のドナー選定が可能であることが確認できた。

一方で、薬事戦略相談を進める中で、採血検査で行うIgGやIgMなどの抗体検査では既往歴や直近の感染有無を確認できるものの、ヘルペス族のウイルスは一度ドナーに潜伏すると終生体内に留まることから、ドナー選定の際の確認項目だけでなく、中間製品の検査の段階で樹立した細胞がこうした持続感染するウイルスに汚染されていない事をしっかりと否定する確認を行うことを求められた。そこで、滑膜組織由来で持続感染が認められそうなヘルペス属などに関しては中間製品の段階でPCR検査を行う方針に変更した。

B) 組織受入検査項目の妥当性検証

組織受入検査を運用により検証し、検査の適否結果により、組織受入検査項目の妥当性を評価した。

実施した、MB01-006、MB01-007の2株において、2例とも組織受入検査項目の無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験において、培養上清の試験では、陰性を確認した（表1）。また、これまで実施してきた7例の結果からも全て陰性であったことを確認した。このことから、受け入れ検査方法が実行可能であるという妥当性を確認すると共に、受入検査項目として組織の安定性が増すことを確認した。

表 1

検査項目	MB01-001	MB01-003	MB01-004	MB01-006	MB01-007
マイコプラズマ否定試験	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
エンドトキシン定量その他 (pg/mL)	1.0 以下	1.0 以下	1.0 以下	1.0 以下	1.0 以下
無菌検査 (MIC ; μ g/mL)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

C)凍結保存までの品質評価項目の妥当性検証

2014 年 10 月から 2015 年 8 月にかけて入手した組織に関して凍結保存までの品質評価項目である、増幅培養時検査ならびにロット検査を実施した。

増幅培養検査実施項目である、細胞増殖率（回収細胞数）（図 3-1, 2）、生存率、確認検査（外観検査）では、規格を満たすことを確認しいずれの株でも差異がないことを確認した。細胞純度試験において、MSC マーカーの発現を認め、造血細胞マーカーの発現は認めなかった（図 4-1）。骨芽細胞（図 4-2）、脂肪細胞（図 4-3）の混入に関しても確認されなかった。このことから、新たに樹立した 2 株（MB01-006、MB01-007）は従来の規定した規格値と比較しても、MSC としての純度・生存率・軟骨分化能を同程度に保持しており、品質評価項目の妥当性が確認できた。

ウイルス否定試験（ドナー/ウインドウピリオド後）の結果、MB01-006、MB01-007 の 2 株とも全項目陰性であった。ウイルス否定試験は『ドナー/採取前』と『ドナー/ウインドウピリオド後』の 2 点を確認することによって、ウインドウピリオドを考慮した設計としているが、これまでの結果からは『ドナー/採取前』に陰性であったドナーから『ドナー/ウインドウピリオド後』で陽性となるようなデータは得られていない。引き続き、本項目の設定が妥当であるかの検証を続ける為、例数を増やしていく予定である。一方で、これまでの採血検査においてサイトメガロウイルス陽性の判断とされるドナーから樹立した細胞（MB01-003）が陰性となることもあった（表 2）。従って、ヘルペスウイルス科のウイルスは滑膜組織から樹立した MSC を潜伏先としない可能性があるとも考えられる。そこで、現時点ではドナーの採血検査で安全性が疑われた滑膜組織は、樹立した細胞が陰性であっても製品の原料に用いないこととした。ただし、安全性が疑われた滑膜組織であっても、将来的に樹立した細胞が完全に陰性であるということが証明されるのであればこの限りではないとも考えている。

また、一般的にリスクが低いと考えられるその他の感染症を引き起こすウイルスであっても、原料細胞に感染していた場合、移植後に重篤な問題を引き起こすことを否定できない為、開発初期段階においては、ICH-Q5A に基づくウイルスクリアランス試験（In vivo ウイルス試験、In vitro ウイルス試験、電子顕微鏡観察試験、逆転写酵素活性試験）を実施することで安全性の確保に努めることとした（表 3）。現在、保存細胞が非特定のウイルスに汚染されていないかどうかの確認を進めている。

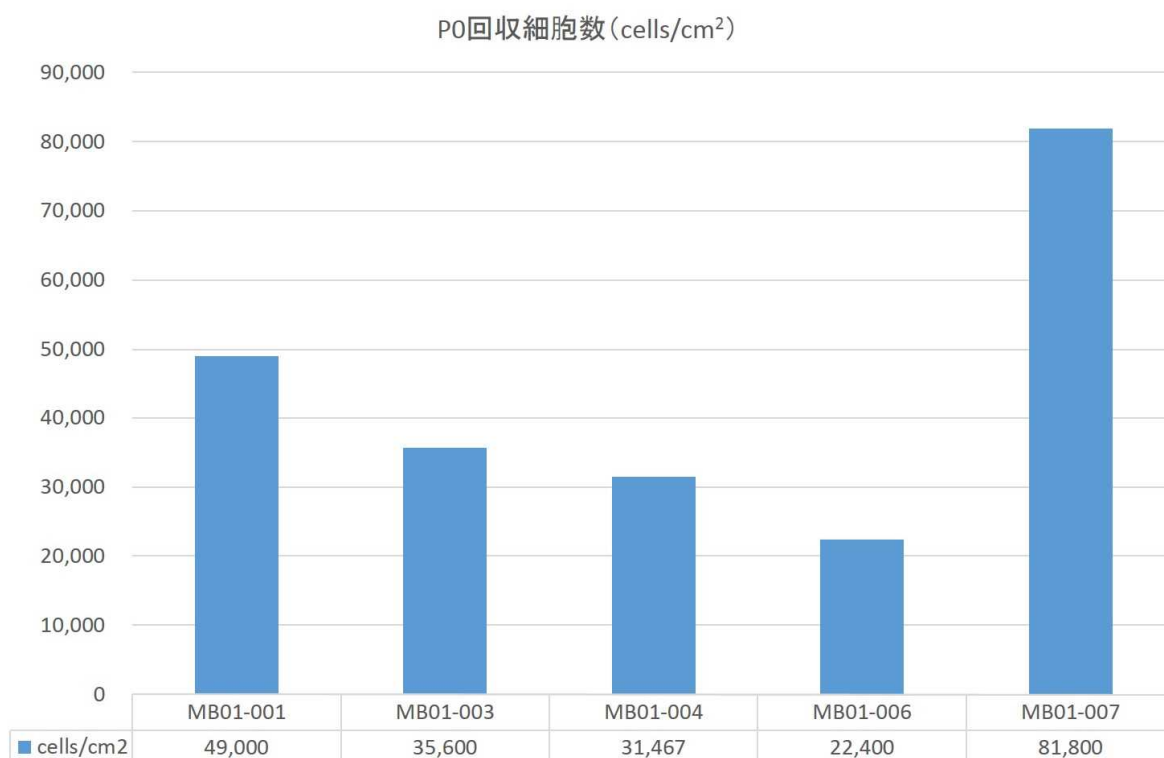


図3-1. P0回収細胞数

P0培養14日後の回収細胞数を単位面積あたりに換算した値 (cells/cm²) を示す。

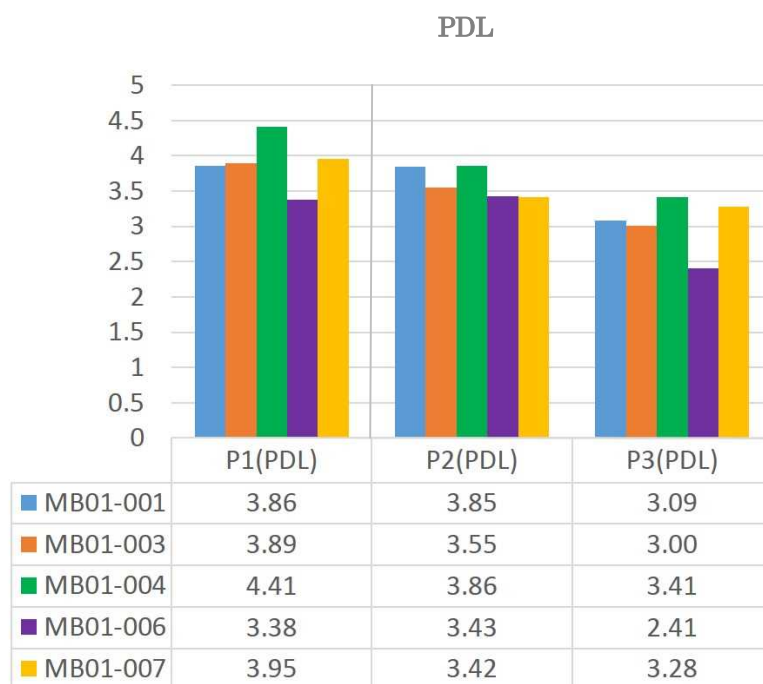


図3-2. 継代時の PDL (5日間培養)

各継代時の増殖能を5日間の PDL を算出して示した。

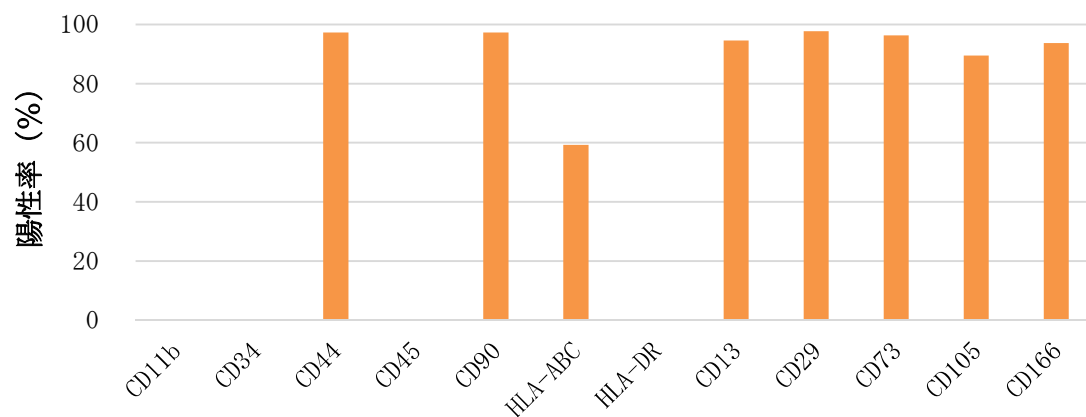


図 4-1. MSC の細胞純度試験（代表例）

各マーカーの陽性率を表す。MSC マーカー（CD13、CD44、CD73、CD90）の陽性、及び造血細胞マーカー（CD11b、CD34、CD45）陰性であった。



図 4-2 骨芽細胞混入否定試験

増殖培養5日後（試験群）及び、骨分化誘導14日後（陽性対照群）の細胞をアリザリン染色した。陽性対照群では赤色に染まる陽性細胞が確認されたが、試験群では確認されなかった。

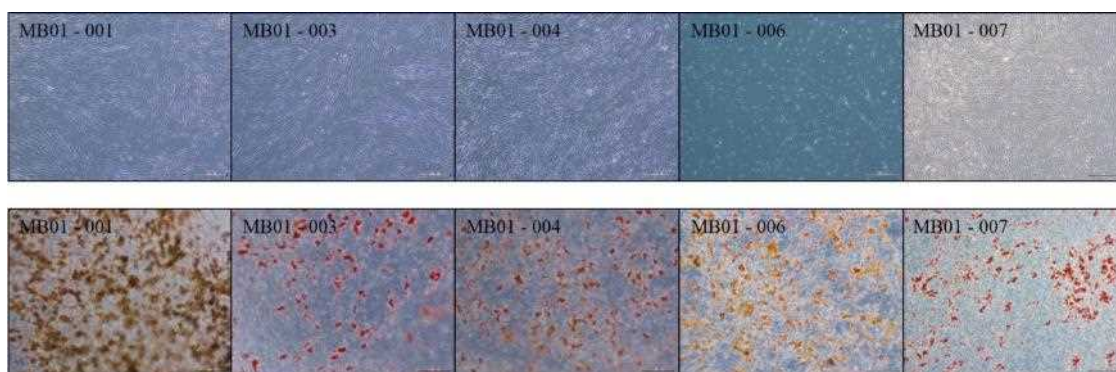


図4-3 脂肪細胞混入否定試験

増殖培養5日後（試験群）及び、脂肪分化誘導14日後（陽性対照群）の細胞をオイルレッドO染色した。陽性対照群では赤色に染まる脂肪滴が確認されたが、試験群では確認されなかった。

表 2. ウイルス否定試験と培養液の無菌試験・マイコプラズマエンドトキシン否定試験

検査項目	MB01-001	MB01-003	MB01-004	MB01-006	MB01-007
培養細胞ウイルス否定試験：HBV	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
培養細胞ウイルス否定試験：HCV	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
培養細胞ウイルス否定試験：HIV-1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
培養細胞ウイルス否定試験：HTLV-1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
培養細胞ウイルス否定試験：パルボウイルス	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
培養細胞ウイルス否定試験：CMV (コピー/ μ gDNA)	4×10E1 未満	4×10E1 未満	4×10E1 未満	4×10E1 未満	4×10E1 未満
培養細胞ウイルス否定試験：EBV (コピー/ μ gDNA)	4×10E1 未満	4×10E1 未満	4×10E1 未満	4×10E1 未満	4×10E1 未満
マイコプラズマ否定試験	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
エンドトキシン定量その他 (pg/mL)	1.0 以下	1.0 以下	1.0 以下	1.0 以下	1.0 以下
無菌検査 (MIC ; μ g/mL)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

表 3

検査項目	MB01-001	MB01-004	MB01-006	MB01-007
In vivo ウイルス試験	実施中	実施中	negative	実施中
In vitro ウイルス試験	実施中	実施中	negative	実施中
電子顕微鏡観察試験	実施中	実施中	negative	実施中
逆転写酵素活性試験	実施中	実施中	negative	実施中

1-2) 他家（同種）細胞を製造工程に組み入れるための検討／他家（同種）由来原料細胞を用いた製剤製造工程および品質評価法の妥当性検証

製造フローに則して連続的な製造を3回以上実施する中で、以下の3項目を達成目標とした。

- A) 凍結細胞解凍時の品質評価法の妥当性検証
- B) gMSC 化における品質評価法の妥当性検証
- C) 出荷試験の品質評価法の妥当性検証

A) 凍結細胞解凍時の品質評価法の妥当性検証

凍結細胞解凍時の生存率、細胞の純度試験、軟骨分化能の検討を行った。

解凍時の生存率は3回の製造時のいずれも規格値（数値非開示）を超える値であった（表4）。このことから、凍結保存された細胞はMSCとしての純度を保ち、生存率、軟骨分化誘導の結果からも軟骨分化能を保持した細胞が安定的に保存されており、保存細胞を解凍した際の評価方法が確立できたと考えている。

表 4 凍結細胞解凍時の生存率

	MB01-006-広島	MB01-007-広島	MB01-007-阪大
細胞生存率 (%)	82.44	95.43	93.13

B) gMSC 化における品質評価法の妥当性検証

gMSC 製造までの品質評価項目である、細胞増殖率（回収細胞数）、細胞生存率、確認検査（外観検査）について3回の製造のSD（standard deviation、以下SD）をとったが、全てにおいて規格値を満たしていた（図5）。このことから、規格項目を満たせばgMSC化を行うことが出来る為、規格値の妥当性が確認できた。

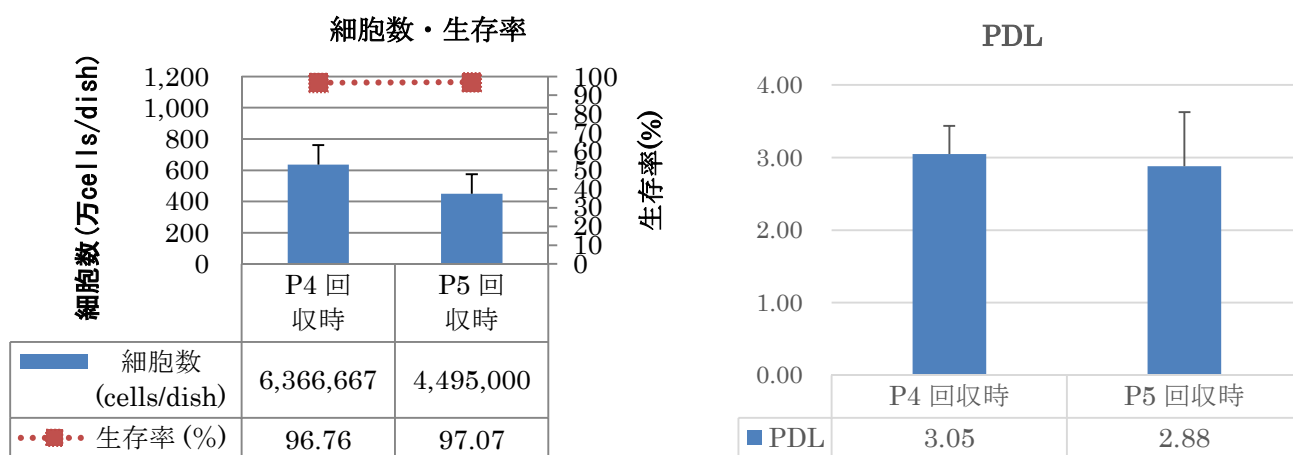


図5 gMSC 化までの品質評価結果
各継代時の回収細胞数、細胞生存率（左）、増殖率（右）の平均を示す。

C) 出荷試験の品質評価法の妥当性検証

出荷試験の品質評価を運用し、品質評価項目の妥当性を検証する。輸送における細胞への影響を測定したデータを基に、輸送条件の妥当性を検証した。

輸送条件は、輸送可能な輸送ボックスを用いて、3回の輸送試験を行い、全てにおいて輸送温度の規定範囲内での輸送が実施できた（代表例を図6に示す）。

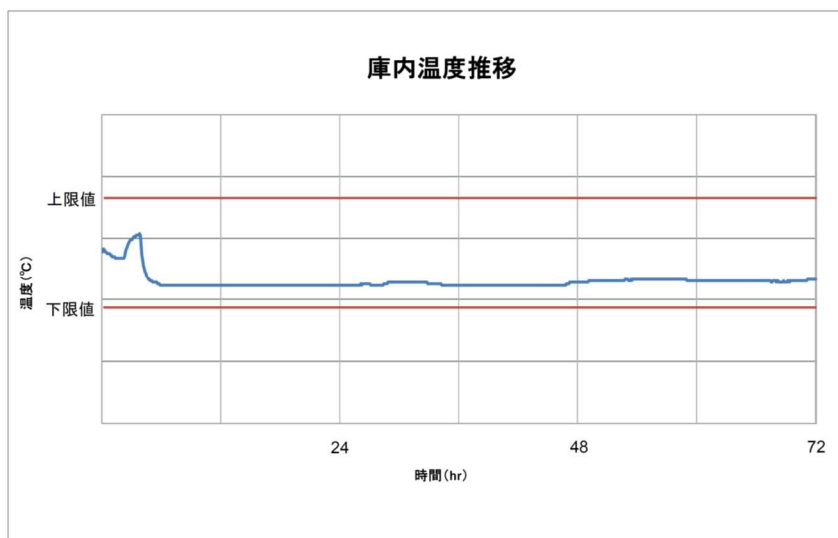


図6 輸送ボックスによる gMSC 輸送時の庫内温度推移
発送時（0 hr）から輸送後（24 hr で受け取り、72 hr まで室温に静置）までの庫内温度の推移をグラフ化した。

gMSC の品質評価項目である、細胞数、生存率、回収時と輸送後湿重量について3回の製造のSDをとったが（図7）、全てにおいて規格を満たしており、これまでに設定した規格の妥当性が確認された。gMSC の純度試験に関しても MSC マーカーの発現を認め、造血細胞マーカーの発現は認めなかった（図8）。ま

た、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験において、培養上清の試験では、陰性を確認した（表 5）。また、軟骨分化能に関しても輸送後も GAG 量の増加率の結果から、軟骨分化能は維持されていたことが示された。

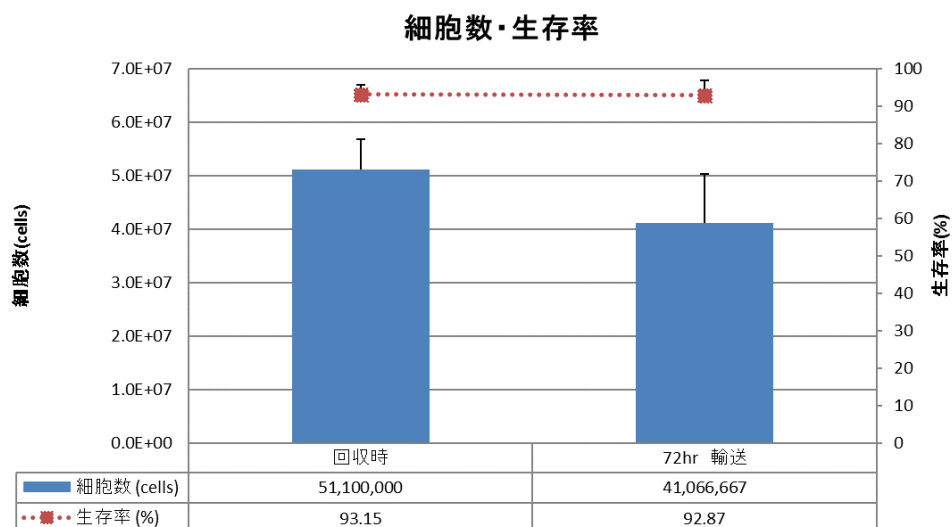


図 7 gMSC 回収時及び輸送後の細胞数・生存率

gMSC 回収時と輸送後の細胞数及び生存率の平均値を示す。

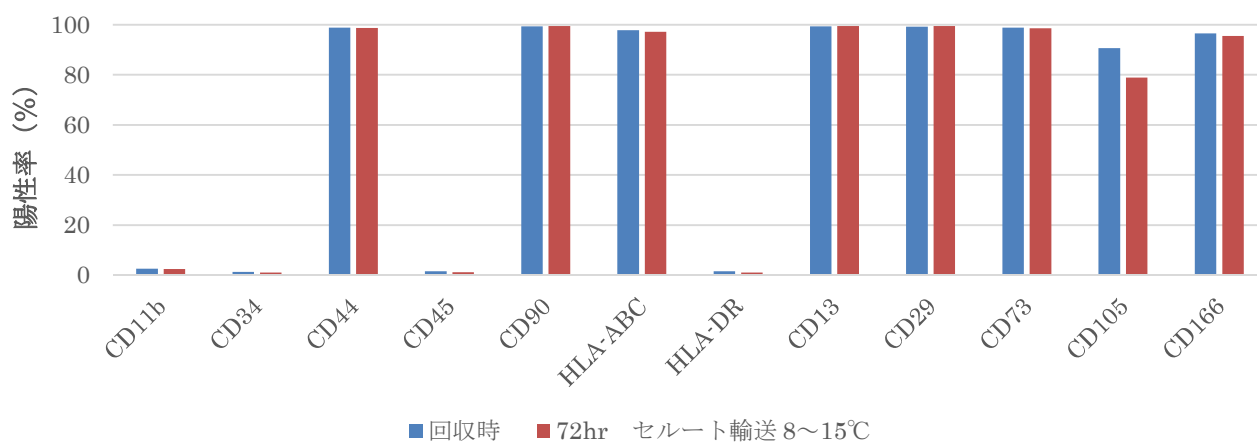


図 8 gMSC の細胞純度試験（FACS 解析）

gMSC 回収時及び輸送後の各マーカーの陽性率を表す。MSC マーカー（CD13、CD44、CD73、CD90）の陽性、及び造血幹細胞マーカー（CD11b、CD34、CD45）陰性であった。

表 5 無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験結果（MB01-007）

	培養液
無菌試験	陰性
マイコプラズマ否定試験	陰性
エンドトキシン試験	0.02246 EU/mL 以下

1-3) 製造プロセスおよび製造設備の影響度の基礎データ収集

A) 製造設備の管理項目をまとめる

2016年1月7日～25日までにおける製造の前後での付着菌及び浮遊菌に関する検査結果を表6にまとめた。結果、製造に利用した細胞調製室とその中で使用した安全キャビネット、細胞調製室への行き帰りの動線となる1次ガウニング室、2次ガウニング室、並びにデガウニング室いずれの箇所においても付着菌または浮遊菌の検査結果に適合しており、製造中の汚染リスクとなるような菌は認められなかった。即ち、現在の製造プロセスは一定の無菌性の保持が出来ていると考えている。引き続き、測定例数を増やしていく事で製造作業が与える製造設備への影響度の基礎データを収集していく。

また、現在製造に利用している広島施設の施設稼働から丸2年が経過している。CPC内のグレードC環境でコバエの死骸が見られるなど、設備面で不備が出てきている可能性があったことから、捕虫検査を実施した。結果、動線での捕虫はなかったことからコバエの死骸が発生した部屋の施設不備が疑われた。そこで、年次の設備の定期メンテナンスにおいて、HEPAフィルターの交換を実施した。こうした消耗品の耐用期間は2年よりも長いものが存在するものの、国道沿いに面した施設である場合予想以上に集塵していた。当施設の場合、HEPAフィルターの交換頻度を上げるほうが、空調配管など施設全体の老朽化を遅くすることが出来ると想定している。

表6

付着菌検査記録		利用前	製造中				利用後
		2015/12/15	2016/1/6	2016/1/20	2016/2/3	2016/2/24	
細胞調製室内の安全キャビネット	グレードA CFU/25cm ² (許容: <1)	0	0	0	0	0	
	適合/不適合	適合	適合	適合	適合	適合	

浮遊菌検査記録		利用前	製造中				利用後
		2015/12/15	2016/1/6	2016/1/20	2016/2/3	2016/2/24	
1次ガウニング室	グレードC CFU/m ² (許容: <100)	0	0	0	0	0	
	適合/不適合	適合	適合	適合	適合	適合	
2次ガウニング室	グレードB CFU/m ² (許容: <10)	0	0	0	0	0	
	適合/不適合	適合	適合	適合	適合	適合	
細胞調製室	グレードB CFU/m ² (許容: <10)	0	0	0	0	0	
	適合/不適合	適合	適合	適合	適合	適合	
デガウニング室	グレードC CFU/m ² (許容: <100)	3	0	0	0	0	
	適合/不適合	適合	適合	適合	適合	適合	

2-1) 原料細胞としての他家（同種）細胞の入手方法に関する検討／臍帯組織からの原料細胞の作製工程および品質評価法の確立

臍帯組織由来 MSC を再生医療の原料細胞として用いるための実用化基盤として、基礎研究段階において、非臨床試験段階（GLP）や、その後の臨床試験段階（GCP）以降の基盤となる品質評価の規格を整備

する必要がある。このことから、他家（同種）細胞を安定的に入手するための組織体制を整備し、臍帯組織より樹立した MSC において、滑膜組織由来 MSC と共通する品質試験項目、安全性評価項目、基準値等を創案し、臍帯組織由来 MSC の品質評価法とその規格整備の足掛かりとした。

詳細を述べる。

A) 臍帯組織入手体制の整備

再生医療の原料細胞としての臍帯組織入手時に必要となる規制上の要求事項を整理し、入手するための組織体制を整備した。

大阪大学医学部付属病院 観察研究倫理審査委員会において承認された「ヒト臍帯における間葉系幹細胞の探索的研究」（承認番号 13135-3）において、大阪大学・血液腫瘍内科学研究室と同・産科婦人科学研究室が連携し、患者リクルート、同意説明、組織入手を行う体制を整備した。ツーセルは、血液腫瘍内科学との共同研究契約と承認された研究計画の研究協力者（組織提供先）への参画に基づき、患者情報を匿名化された状態で組織提供を受けた。臍帯組織、及び樹立細胞の管理上必要なデータ（年齢、感染症の有無等）に関しては、患者の個人情報に結びつかない状態で、情報を取得し、血液腫瘍内科学、ツーセルで「臍帯組織処理情報データベース」の構築を行った。特に、ツーセルでは、組織入手時の輸送状況（時間、温度等）及び入手後の培養状況に関して、とりまとめを行った。

現在、臍帯組織から得られた MSC の入手、使用に関しては、上述の体制内のみで可能としている。今後は、将来的に品質評価が保証された他家（同種）細胞として他機関への提供が必要になることが見込まれる。この際、現在の同意説明に併せて、他の機関への配布や他の研究に使用する可能性がある旨を説明して、包括同意を取得することや、包括同意の範疇で実施する研究をそれぞれの機関の倫理委員会に諮り、承認された機関で研究を実施するようにするなどの体制構築が必要になる。具体的には、滑膜組織と同様に未来医療開発部未来医療センターのホームページ上で同意いただいた臍帯組織の使用用途についての詳細を確認できるよう研究の承認内容を公開し、包括同意を得た患者がそれを確認、拒否できる機会を提供することが必要となると考えており、自社事業として進めていく方針である。

B) 臍帯組織由来 MSC の培養方法の確立

平成 27 年度は 2 例の臍帯組織由来 MSC を実用化するための基盤研究として、臍帯組織由来 MSC の分離ならびに大量培養条件の至適条件の検討、表面抗原や分化能などの細胞特性の解析、非臨床試験段階（GLP）以降の基盤となる品質評価の規格を整備に関する検討を予定した。

実際に大阪大学医学部付属病院周産期センターにて帝王切開分娩時に娩出されたヒト臍帯組織 6 例のうち大阪大学において 5 例の臍帯由来 MSC 株の樹立を組織の前処理（血管除去をする／しない）、細胞分離方法（エクスプラント法／酵素処理法）、培養（有血清培地 FBS+DMEM/ 自社開発無血清培地 STK1/STK2）の条件の組み合わせで試み、全ての臍帯組織から MSC 様細胞株の樹立に成功した（図 9）。これらの細胞株は無血清培養条件において良好な細胞増殖を示し、継代培養とともに紡錘形の細胞形態を持つ均質な細胞集団となった。一方、有血清条件では供与臍帯による細胞増殖の差異が大きく、樹立出来ないあるいは増殖不良の細胞株も存在した。細胞形態は紡錘形から細胞質が平坦で広がったものや繊維状に長く伸びた像も観察された。樹立できた臍帯由来 MSC の表面抗原の発現は、代表的な MSC マーカー（CD13, CD44, CD73, CD90, CD105）は陽性であった。血球系マーカー（CD11b, CD34）は陰性であった（図 10）。

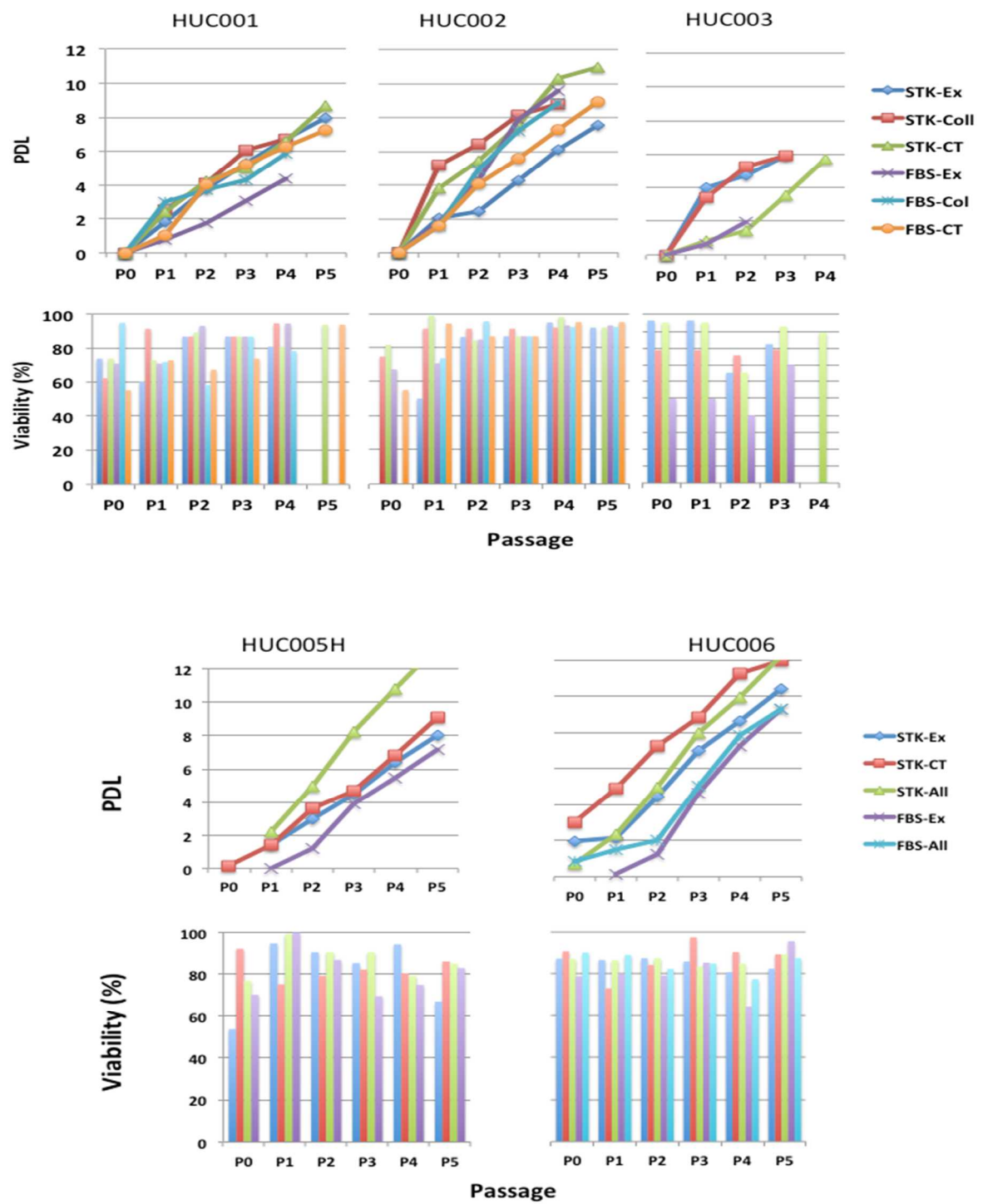


図9 臍帯由来MSCの増殖曲線

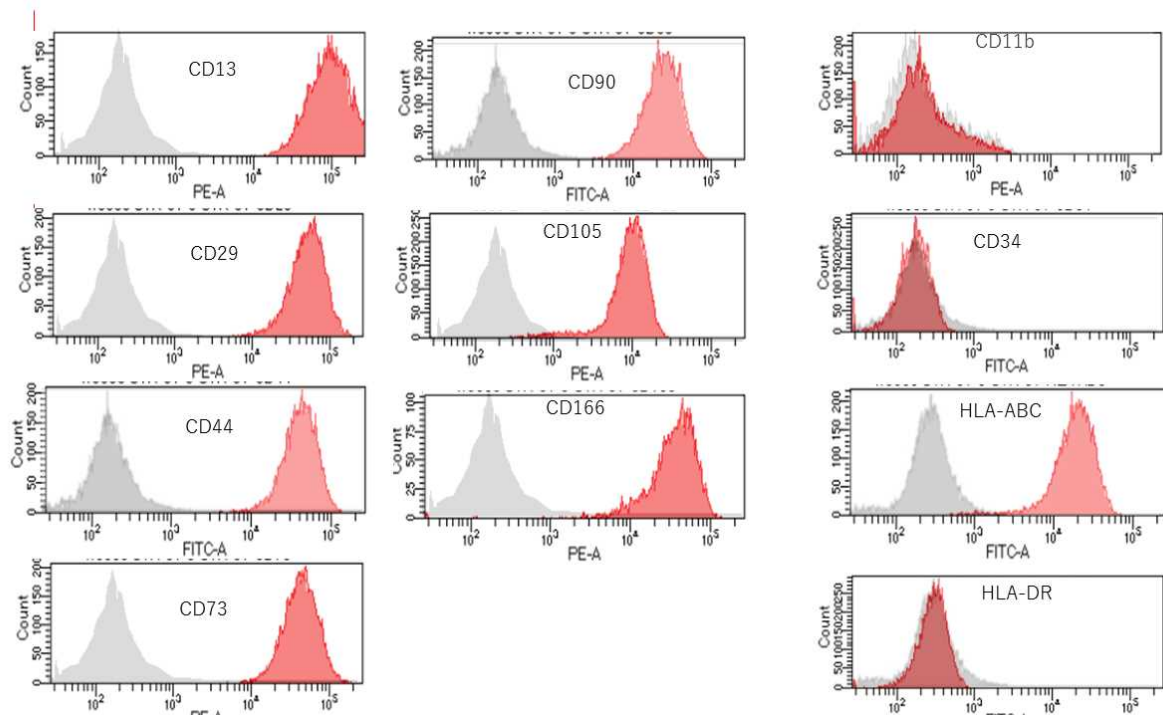


図 10 表面抗原マーカー解析の一例 (HUC003-STK-Ex)

骨・脂肪・軟骨への分化能試験では、骨髄由来ならびに滑膜由来 MSC で分化誘導が確認されている既存の誘導条件ではいずれも再現性を持った分化は確認されなかった。今後、自社事業で分化条件の最適化を進める。

樹立方法に関して、①臍帯から血管を除去、細断した後、コラゲナーゼ、トリプルセレクトの酵素試薬中で反応させることで組織から細胞を分離して播種する酵素処理法 (C+T)、②細断までした状態でそのまま播種する Explant 法 (EX)、もしくは、③血管を除去せずに細断してそのまま播種する (ALL-EX) の 3 種の樹立方法をそれぞれ無血清培地条件 (STK) 及び有血清培地条件 (10 %) で検討した。

HUC004 株において、C+T-10 %と比較して、EX-STK もしくは C+T-STK 条件で良好な増殖を確認した。HUC005 株では、ALL-EX-STK 条件で最も良好な増殖が得られた。2 例の樹立培養において、C+T-10 %と比較して、EX-STK もしくは ALL-EX-STK の条件の培養で得られた細胞が多くなった (図 11, 12)。いずれの細胞も、細胞表面マーカーの解析では、MSC のマーカーの発現陽性、造血系細胞マーカーの発現陰性を確認した。

生産レベルで培養する場合、酵素処理反応は数時間必要であるのに比較して、Explant 法では播種までの時間が短縮でき、酵素による細胞へのダメージの懸念も無いため、今後自社事業で進めていく樹立方法の検討では、Explant 法を優先的に検討していく計画である。

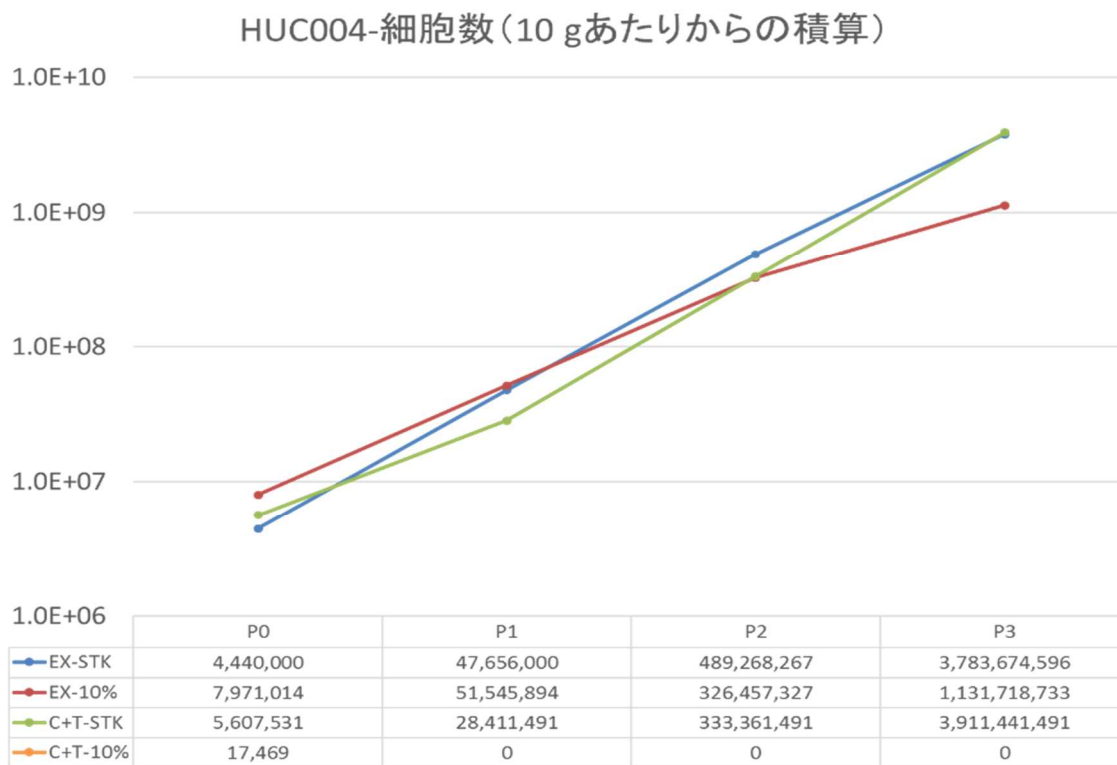


図 11 HUC004 株増殖曲線 (理論値)

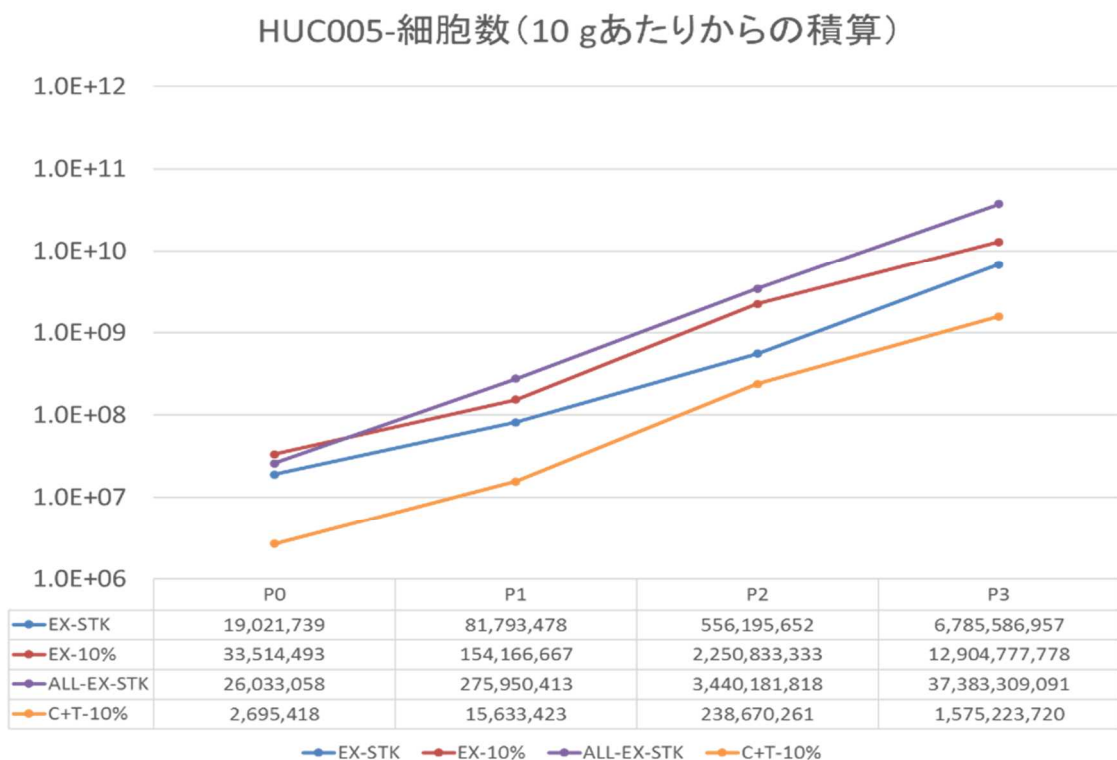


図 12 HUC005 株増殖曲線 (理論値)

また、大阪大学で樹立した細胞のデータも加えて平均値を算出した場合、現状は ALL-EX-STK 条件、もしくは EX-STK 条件が大量培養の目的のうえでは適していると考えられる。今後、品質評価項目の検討も踏まえて最適な樹立条件を検討する。

また、現在得られている細胞数では、理論上の生産レベルでは P3 時点で、無血清培養では、100 億個程度の細胞が得られる計算となる（図 13）。滑膜由来間葉系幹細胞と同様に、この細胞を中間製品として凍結保存し、2 継代後に製剤を製造すると同様の増殖曲線を描くとして、およそ 3,000 人分の細胞製剤が 1 ロットあたりから製造可能になる計算となる。今後は、手培養での実生産として、どこまでの培養が可能であるか、及び自動化によってどこまで理論値に近づけていけるかを自社事業で検討していく必要があると考えている。

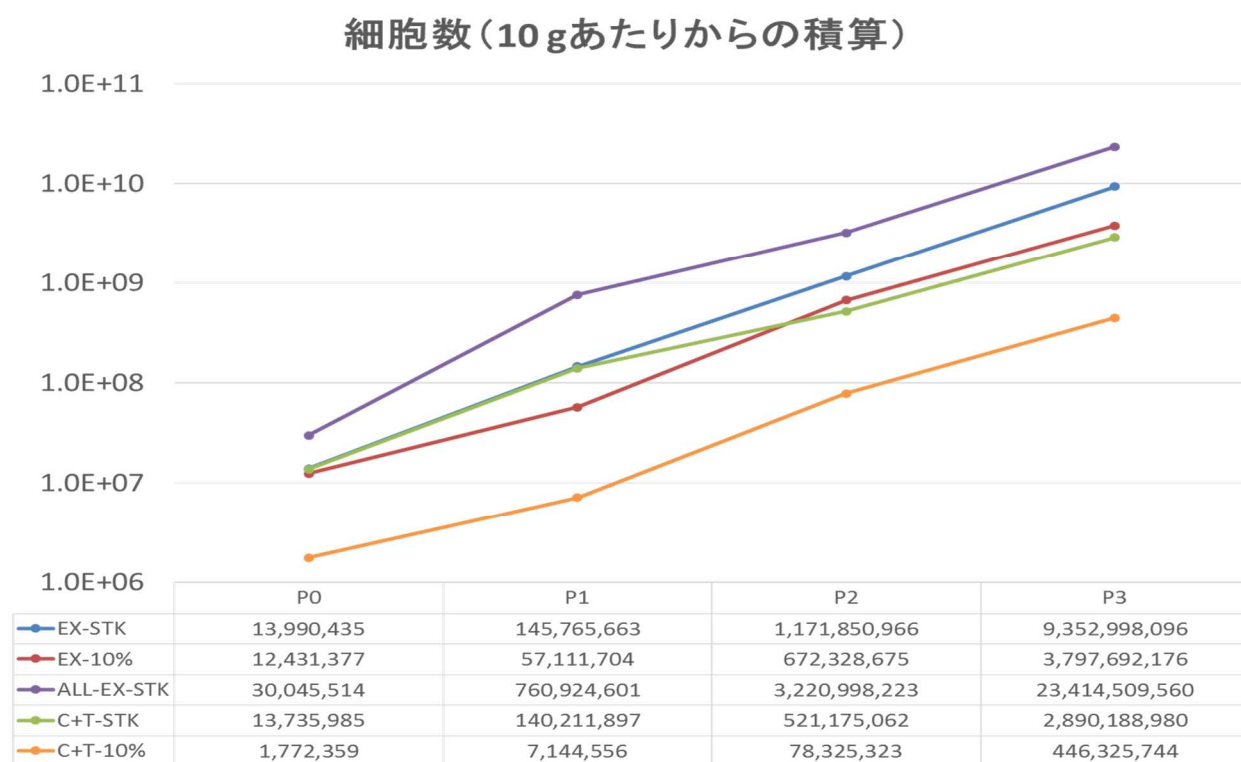


図 13 入手株全ての平均増殖曲線（理論値）

C) 臍帯組織由来 MSC の品質評価項目の創案

樹立培養によって得られた細胞の表面抗原解析、骨、脂肪、軟骨分化能の解析を行った。

表面抗原マーカーの解析に関して、MSC の発現パターンから大きく外れないデータが得られた。

骨、脂肪、軟骨分化能に関して、脂肪分化に関しては、全株で確認できた（図 14）。一方で、骨分化に関しては、1 株を除いて非常に弱い分化能であった（図 15）。軟骨分化能に関しては、全株において分化が確認できなかった（図 16）。

臍帯由来 MSC の骨、軟骨の分化能は骨髓よりも低いことが知られており、骨、軟骨への分化能に関しては、それらに関わる疾患が治療の対象でない限り、微弱な変化でも分化能が示されれば問題ないと考ええる。

今後は、臍帯由来MSC独自の品質評価項目を確立していくための検討を行う計画である。候補としては、より安定的に分化が確認できる細胞（神経細胞、内皮細胞など）に分化誘導することや、分泌する液性因子の評価等が考えている。

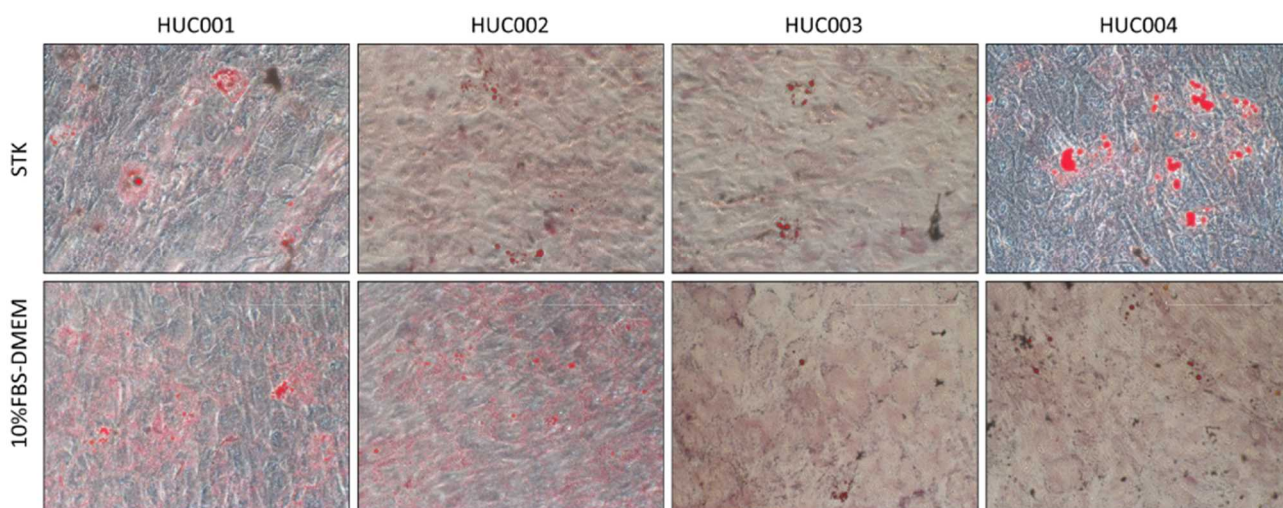


図 14 オイルレッドO染色

無血清培養で得られた臍帯由来間葉系幹細胞の脂肪分化誘導 28 日後のオイルレッドO 染色結果
全株において、赤色に染色される脂肪滴が確認された。

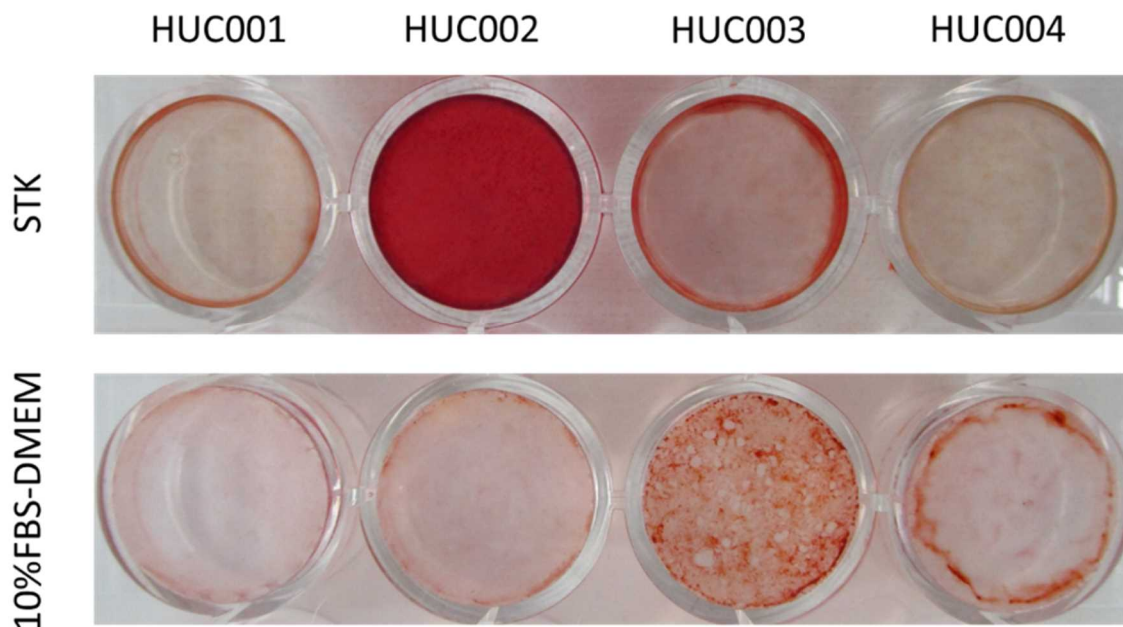


図 15 アリザリンレッド染色

無血清培養で得られた臍帯由来間葉系幹細胞の骨分化誘導 28 日後のアリザリンレッド染色結果
HUC002 株で強染されたが、他の株では染色性は弱かった。

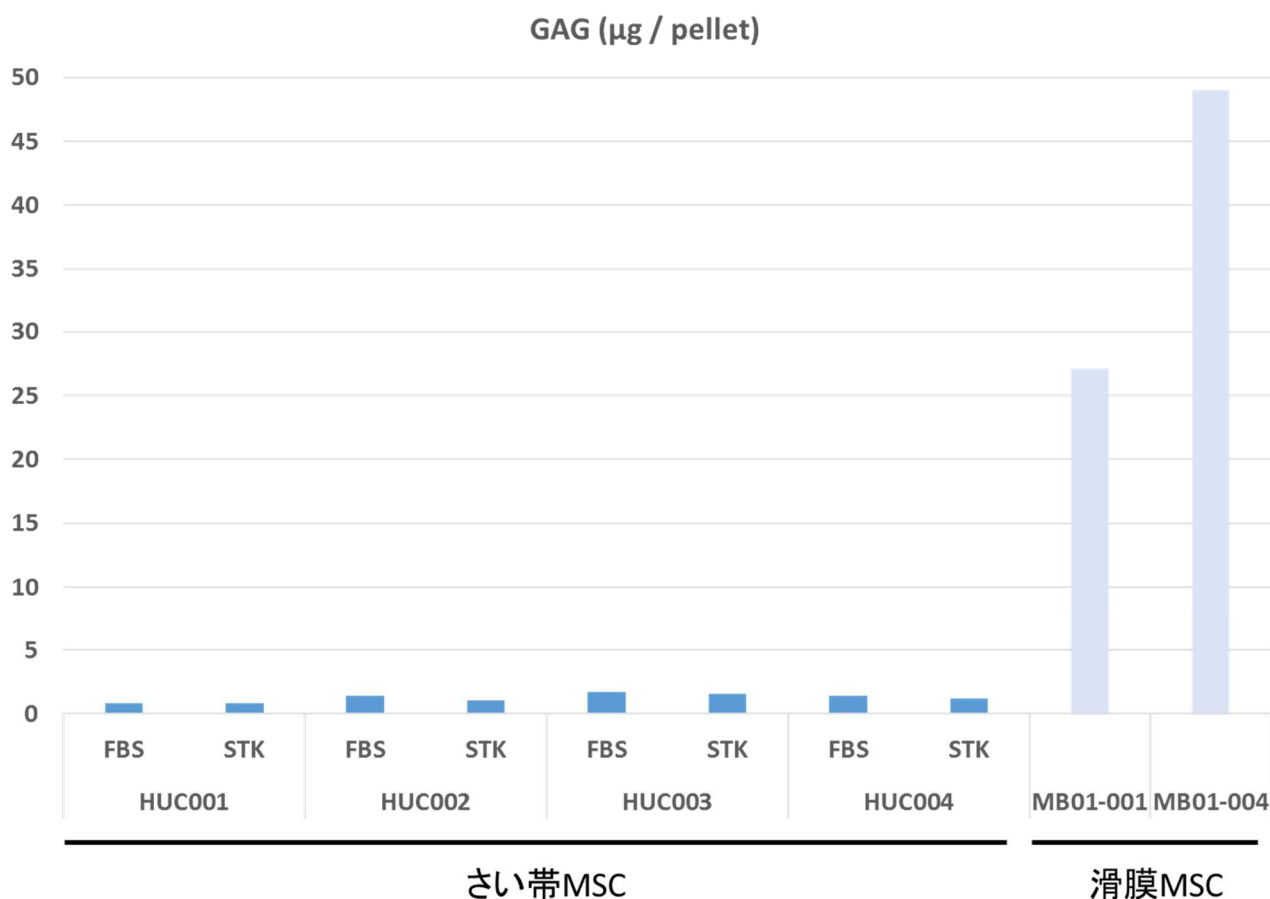


図 16 GAG 量解析結果

有血清無血清それぞれで培養した臍帯由来間葉系幹細胞の軟骨分化誘導 28 日後の GAG 量解析結果
滑膜 MSC の値（陽性対照）と比較して非常に低い値であった。

① 研究開発項目の実施状況及びマイルストーンの達成状況

予定していた 2 例を上回る臍帯組織由来 MSC の分離ならびに大量培養条件の検討が行え、至適条件を示唆する結果が得られた。表面抗原や分化能などの臍帯由来 MSC の特性の解析が行えた。品質評価の規格を整備に向けた検討も行え、品質評価項目における課題が見いだせたことから目標を 100% 達成した。

3) 有識者会議の開催

本事業で妥当性検証を進めてきた他家滑膜由来 MSC の軟骨再生医療等製品におけるウイルスの否定試験について、検査対象ウイルスの選定範囲や選定基準・選定方法、血液検査から得られる数値を基とした陽性・陰性の判断基準の考え方について、有識者から助言を受け、再生医療の産業化に向けた評価手法の整備につなげることを目的に、2016 年 1 月 29 日に有識者会議を開催した。会議において得られた見解について項目ごとに報告する。

議事内容：

- ・検査対象ウイルス再選定範囲や選定基準・選定方法について
- ・血液検査から得られる数値を基にした陽性・陰性の判断基準について
- ・国内で進んでいる再生医療等製品の開発におけるウイルスの否定試験の状況について

会議の報告：

① 他家移植時の生着、修復機能について

有識者より、他家移植の動物実験では移植した細胞がその場に残っているという報告は無い。一方で、関節内は免疫寛容の環境であり、生着したときは移植細胞かレシピエント由来の細胞か判別出来ないがどのように考えているか。また、移植細胞がレシピエントの組織修復を活性化させているのはサイトカインによる効果と考えているのかとの質問があった。

これに対して、移植細胞が生着した場合は、時間をかけてレシピエント由来の細胞に置き換わって行くのではないかとこの当社の考えを伝えた。

② 製品のロット試験について

有識者より、ロット試験の試験項目の確認がされた。

これに対して、品質管理試験として *in vitro* 軟骨分化、湿重量測定、FACS 解析等を実施している事を伝えた。

③ 組織採取、受け入れからウイルス検査までの期間について

有識者より、組織採取、受け入れからウイルス検査までの期間の確認がされた。

これに対し、中間製品のウイルス試験結果で判断する。ウインドウ・ピリオド後の再採血が中間製品のウイルス試験と同時期になることを伝えた。

有識者から、受け入れ時からウイルス感染を完全に否定出来るのであれば、原材細胞株のウイルス検査は必ずしも必要ない。バンク化した細胞のロット検査でウイルス感染が否定出来れば、最終製品のウイルス試験は必要ないだろうとの見解が示された。

④ 原材料について

原材料として滑膜の他に臍帯についても話題としてあがったが、原材料として用いる組織によって感染しやすいバクテリアやウイルスが違ってくる可能性がある。例えば滑膜のドナーであれば滑膜ドナーの場合は再診を行うことは比較的容易であり、3 カ月後に再度採血依頼をすることは出来るかもしれない。しかしながら、臍帯ドナーとなると定期的に再診を受けるものでもないことから対応策を考えておく必要があるとの見解が示された。また、臍帯の場合、採取方法として通常分娩あるいは帝王切開分娩の2種類が存在するが、有識者の見解としては、母体血液の付着、混入のリスクがある通常分娩より、帝王切開の方が良いだろうとの見解が有識者より示された。

⑤ 再生医療等製品におけるウイルス検査の考え方について（非特定）

ウイルス検査は危険性を考えると慎重にならざるを得ない。ICH-Q5A は絶対で、ICH-Q5A をやらなくて良いと云う考え方は無い。現時点においては ICH-Q5A と同等の代替法がないことから薬事法下での

製品では ICH-Q5A は絶対実施すべきであろう。また、ICH-Q5A を実施するロット数を限定する事は出来ない。ウイルスの有無はそれぞれの個体で確認が必要であり、抜きとり試験では難しいとの見解が有識者より示された。

ICH-Q5A の中の in vitro 試験では Vero, MRC5 以外にもう 1 株選定することになるが、試験委託先により選定される細胞株は異なるが、どのように考えるべきかとの当社からの質問に対して、委託先に任せて良いと思う、試験（時期）によって細胞株が違っていると、当局には変更した理由を聞かれるので対応することなどの見解が有識者より示された。

ICH-Q5A に日本も合意して作成している。もともとはバイオ医薬品を対象としているので、げっ歯類の細胞と関連するウイルスが多くなっている。しかし他基準が無いので ICH-Q5A を行う事となるであろう。こうしたことから、再生医療に特化したものではないが、基本的には従うべきである。他家移植の場合、移植に用いる細胞（今回の場合は MSC の中で）でウイルスが増幅するかどうか重要であり、増幅しない事が証明し安全性を担保するべきとの見解が有識者より示された。

⑥ 再生医療等製品におけるウイルス検査の考え方について（特定）

特定ウイルスの PCR については何を基準に選定すべきかという当社からの質問に対して以下のような見解が示された。

EB ウイルスは一旦感染するとウイルスは消滅する事無く、体内にずっと存在する。抗体値はウイルスの活性化状態を見るものであり、日本人の多くは EB ウイルス感染を起こしている。移植に用いる細胞（今回の場合は MSC の中で）で PCR 検査を実施して、ウイルスの増幅を確認できない事を証明するべきであり、MSC の PCR 結果が陰性なら EB ウイルス感染は陰性と考えてよいだろう。

骨髄由来 MSC に CMV が感染するという報告があるので、ドナーは CMV 陰性とした方が良い。EB 感染は日本人に多いので、EB 陽性でもアクティブでなければドナーになりえる。

ドナーはヘルペス属陽性でも、原材料が陰性とする方が良い。

いずれにおいても、得られる検査結果について、ベリフィケーションを実施することが重要。

⑦ 再生医療等製品における無菌試験、マイコプラズマ否定試験の実施について

無菌検査は動かしがたい、無菌検査は出荷後試験をしてくれ、となると思う。

無菌試験に用いるサンプルは培養上清でよい。出荷 2 日前の出荷前試験は実施しても構わないが、出荷時試験をしなくても良いとはならない。

最終製品の検査サンプルは、最終製品の培養上清か？あるいは移植前の輸送液か？との質問に対して、以下のような見解が示された。

培養液の方が、感度が高いはずだが、輸送液が最終サンプルと言い切ってしまうと良い。

マイコプラズマ試験は、培養上清では感度が落ちることから基本的には細胞を使う。培養上清でしか試験が出来ないなら、その理由が必要である。また培養上清を遠心してやると感度が上がる。

マイコプラズマ試験は 4 月に改訂される十七局方で変更があり、NAT 法対応の製品がニッスイと TAKARA からでると聞いている。

受け入れ試験などのように、局方に準じて行えない検査はロット試験で担保出来ると考える。最終バッチでまとめて、さらに分注した場合は、抜き取り試験として受け入れやすい。

3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容

1-1) 原料細胞としての他家（同種）細胞の入手方法に関する検討／滑膜組織からの原料細胞の作製工程および品質評価法の妥当性検証

滑膜組織由来 MSC における、原料細胞としての他家（同種）細胞の入手方法において、一企業にのみ組織を提供するのではなく、大学や企業が細胞を利用出来るバンキングの仕組みを大阪大学未来医療開発部未来医療センターに構築した。

滑膜組織については品質リスクマネジメントを基とした管理戦略を構築し、バリフィケーション等の手法を実施して、一昨年度の組織と今年度入手した組織間で規格値の妥当性を検証し、これまでに樹立した滑膜組織はいずれも我々が設定した規格値をクリアしていることを確認した。その結果、後続の企業に対して、原料細胞としての他家（同種）細胞の入手方法に関する検討／滑膜組織からの原料細胞の作製工程および品質評価法における A) 組織入手における確認項目、B) 組織受入検査項目、C) 凍結保存までの品質評価項目の指標（表 7）を示す。

表 7 組織入手～原料細胞作製までの工程における品質検査項目

	実施項目	実施方法	規格
採取前検査	ウイルス否定試験（ドナー/採取前）	採血、B 型肝炎（HBV）、C 型肝炎（HCV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、成人 T 細胞白血病（HTLV）、パルボウイルス B19、サイトメガロウイルス、EB ウイルス、梅毒、マイコプラズマなどの検査を行う	感染なきこと
組織受入れ検査	組織輸送液の無菌試験	直接法	陰性
	組織輸送液のマイコプラズマ否定試験	A 法+C 法又は A 法+NAT 法	陰性
	組織輸送液のエンドトキシン試験	比濁法	1.0 EU/mL 以下
	確認試験（外観検査）	目視による確認	滑膜組織由来以外の異物、不純物の混入が無いこと

増幅培養時検査	細胞増殖率 (回収細胞数)	血球計算盤による計測	定めた細胞数の範囲内
	細胞生存率	トリパンブルー染色で生存率を測定する	70%以上
	確認試験(外観検査)	目視による確認	滑膜組織由来以外の異物、不純物の混入が無いこと 細胞形態が紡錘状であること
ロット検査	細胞純度試験	MSC の細胞の表面抗原を FACS 解析により確認	MSC マーカーの発現が陽性 造血細胞系マーカーの発現が陰性
		分化能維持確認	陰性
	培養液の無菌試験	メンブランフィルター法	陰性
	培養液のマイコプラズマ否定試験	A 法+C 法又は A 法+NAT 法(日本薬局方に基づく)	陰性
	培養液のエンドトキシン試験	比濁法(日本薬局方に基づく)	1.0 EU/mL 以下
	ウイルス否定試験	中間製品に対し、B 型肝炎(HBV)、C 型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1, 2)、成人 T 細胞白血病(HTLV-1, 2)、パルボウイルス B19 などの存在確認を行う	感染なきこと
	ウイルスクリアランス試験	in vivo ウイルス試験、in vitro ウイルス試験、電子顕微鏡観察試験、逆転写酵素活性試験においてウイルスの存在確認を行う	陰性
	軟骨分化能	ロットの一部を軟骨分化誘導する	分化能が維持されていること

	ウイルス否定試験（ドナー/ウインドウピリオド後）	採血し、B 型肝炎（HBV）、C 型肝炎（HCV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、成人 T 細胞白血病（HTLV）、パルボウイルス B19、サイトメガロウイルス、EB ウイルス、梅毒、マイコプラズマなどの存在確認を行う	感染なきこと
--	--------------------------	--	--------

1-2) 他家（同種）細胞を製造工程に組み入れるための検討／他家（同種）由来原料細胞を用いた製剤製造工程および品質評価法の妥当性検証

滑膜組織については品質リスクマネジメントを基とした管理戦略を構築し、ベリフィケーション等の手法を実施して、一昨年度の組織と今年度入手した組織間で規格値の妥当性を検証し、これまでに樹立した滑膜組織はいずれも我々が設定した規格値をクリアしていることを確認した。その結果、後続の企業に対して、他家（同種）細胞を製造工程に組み入れるための検討／他家（同種）由来原料細胞を用いた製剤製造工程および品質評価法において、A) 凍結細胞解凍時の品質評価法、B) 製剤化における品質評価法の妥当性検証、C) 出荷試験の品質評価法の指標（表 8）を示す。

表 8 凍結した原料細胞の解凍から製剤製造までの工程における品質検査項目

	試験項目	試験方法	規格
細胞増幅 解凍時検査	細胞増殖率 (回収細胞数)	血球計算盤による計測	定めた細胞数の範囲内
	細胞生存率	トリパンブルー染色で生存率を測定する	70%以上
	確認検査(外観検査)	目視による確認	滑膜組織由来以外の異物、不純物の混入が無いこと 細胞形態が紡錘状であること
出荷試験	細胞数	gMSC の細胞数を血球計算盤により測定	定めた細胞数の範囲内
	生存率	トリパンブルー染色で生存率を測定	70 %以上
	湿重量	gMSC ひとつの湿重量を電子天秤にて測定	定めた湿重量の範囲内
	確認検査(外観検査)	目視による確認	異物、不純物の混入がないこと 細胞形態が敷石状であること
	性状	目視による確認	乳黄色のゲル状 3 次元人工組織で異物を認めない
	無菌試験（出荷時でなく gMSC 回収の 2 日前に回収した培養液をまとめて測定）	直接法又は迅速法	陰性

マイコプラズマ否定試験 (gMSC 回収時に回収した培養液全例)	C 法	陰性
エンドトキシン試験 (gMSC 回収時に回収した培養液全例)	比濁法	1.0 EU/mL 以下
無菌試験 (品質管理用検体)	直接法又は迅速法	陰性
マイコプラズマ否定試験 (品質管理用検体)	C 法又は NAT 法	陰性
エンドトキシン試験 (品質管理用検体)	比濁法	1.0 EU/mL 以下
細胞純度試験	gMSC の細胞の表面抗原を FACS 解析により確認	MSC マーカーの発現が陽性 造血細胞系マーカーの発現が陰性

1-3) 製造プロセスおよび製造設備の影響度の基礎データ収集

製造の前後での付着菌及び浮遊菌に関して多項目における検査を行い、基礎データを収集し、製造に利用した細胞調製室とその中で使用した安全キャビネット、細胞調製室への行き帰りの動線となる 1 次ガウニング室、2 次ガウニング室、並びにデガウニング室いずれの箇所において、現在の製造プロセスにおいては一定の無菌性の保持が出来ているということが確認できた。また、グレード C 環境における捕虫調査と原因究明において、国道沿いに面した施設である場合は HEPA フィルターの交換頻度を上げるなど、クリーン環境保持における HEPA フィルターの管理が重要であるという結果を導いた。

2-1) 原料細胞としての他家 (同種) 細胞の入手方法に関する検討／臍帯組織からの原料細胞の作製工程および品質評価法の確立

臍帯 MSC に関して、母体の感染症の有無、分娩時の状態、さらに臍帯 MSC 樹立時の細胞増殖能、細胞形態、分化能などの情報を集約し、データベースを構築した (表 9)。臍帯組織由来 MSC の分離ならびに大量培養条件の検討を行い、ヒト臍帯組織 6 例のうち大阪大学において 5 例の臍帯由来 MSC 株の樹立を組織の前処理 (血管除去をする／しない)、細胞分離方法 (エキスプラント法／酵素処理法)、培養 (有血清培地 FBS+DMEM/自社開発無血清培地 STK1/STK2) の条件の組み合わせで試み、全ての臍帯組織から MSC 様細胞株の樹立に成功した (前出 図 9 臍帯由来 MSC の増殖曲線)。

臍帯組織由来 MSC の品質評価項目の創案のために、樹立培養によって得られた細胞の表面抗原解析、骨、脂肪、軟骨分化能の解析を行った。表面抗原マーカーの解析に関して、MSC の発現パターンから大きく外れないデータが得られた。骨、脂肪、軟骨分化能に関して、脂肪分化に関しては、全株で確認できた (前出 図 14 オイルレッド O 染色)。一方で、骨分化に関しては、1 株を除いて非常に弱い分化

能であった（前出 図 15 アリザリンレッド染色）。軟骨分化能に関しては、全株において分化が確認できなかった。臍帯由来MSCの骨、軟骨の分化能は骨髄よりも低いことが知られており、骨、軟骨への分化能に関しては、それらに関わる疾患が治療の対象でない限り、微弱な変化でも分化能が示されれば問題ないと考えられることができた。

これらの結果より、ドナーから同意が得られて組織提供を受けるに至る成功頻度が非常に高かったことと、現在得られている細胞数では、理論上の生産レベルではP3時点で、無血清培養では、100億個程度の細胞が得られる計算となることが確認でき、臍帯組織が他家移植用製品の原料としてマイナス要因を凌ぐ「魅力」があること示す。

表 9 臍帯組織 MSC 樹立データベース

組織株名	HUC001	HUC002	HUC003	HUC004	HUC005H HUC005T	HUC006
採取年月日	2015/8/25	2015/8/25	2015/10/29	2015/10/29	2016/2/2	2016/3/15
母体年齢	36	34	35	35	42	30
妊娠合併症	前置胎盤	正常胎盤	多(二)胎妊娠	多(二)胎妊娠	正常胎盤	正常胎盤
分娩方法	帝王切開	帝王切開	帝王切開	帝王切開	帝王切開	帝王切開
採取組織量	31g	15.47g	11.76g	9.31g	8.79g	14.79g
培養場所	大阪大学	大阪大学	大阪大学	ソーセル	大阪大学(H) / ソーセル(T)	大阪大学

4. まとめ

我々は他社にさきがけて日本で採取された原料細胞により製造する他家再生医療等製品の治験を実施する段階へ進める中で、「安全性、有効性、品質性等の評価において規格を設定」「PMDA に対して安全性等の論拠をどの様に示すか」「それによりどの様な見解が示されるか」「示された見解に対してどの様な対応をして規格を修正し確定させるか」を基に、日本で採取された細胞を原料細胞とすることについて活路を開けたと考えている。