

平成25年度 再生医療等産業化促進事業
①固形癌、MAGE-A4 TCR 遺伝子改変 T リンパ球、
②造血器悪性腫瘍、HSV-TK 遺伝子改変 T リンパ球)
報告書

平成26年3月

委託元 経済産業省

委託先 タカラバイオ株式会社

目次

1.	事業の目的.....	3
2.	実施内容及び結果.....	3
1)	背景と目的.....	3
1)-1	当社が開発する再生医療等製品.....	3
1)-2	治験実施に向けた当局との対面助言・意見交換、及び治験準備.....	4
2)	実施内容詳細と評価手法について.....	5
2)-1	安全性・有効性に関して承認までに必要とされる試験項目の評価手法.....	5
2)-2	原材料の変更に伴う同等性を証明するための評価手法.....	16
2)-3	製造工程の変更に伴う同等性を証明するための評価手法.....	25
3)	有識者会議.....	32

1. 事業の目的

iPS 細胞等の幹細胞を用いた再生医療は、臨床現場の新たな治療の選択肢となり、国民の健康増進に大きく寄与することから、市場の急速な拡大が予想され、国際競争も激化している。しかしながら、我が国においては、再生医療等製品やその周辺機器、加工プロセスなどに関する安全性等の評価手法は必ずしもすべてが確立しているわけではないのが現状である。本事業では、我が国の再生医療等製品の優れた技術シーズを製品化させるべく、規制当局の円滑な審査に資することを目指した評価手法の開発を行う。具体的には、個々の再生医療等製品に特有となる安全性、有効性等に関する評価項目やその基準値等を明確にし、合理的な評価手法を開発することによって、製品化されつつある後続の再生医療等製品の実用化基盤を整備する。

2. 実施内容及び結果

本事業において当社が策定に取り組んだ評価手法は以下である。

遺伝子改変 T リンパ球における

- 安全性・有効性に関して承認までに必要とされる試験項目/規格
- 原材料（培地成分、精製用原料、リンパ球刺激成分等）の変更に伴う同等性を証明するための評価手法
- 製造工程の変更に伴う同等性を証明するための評価手法

以下に本事業で実施した内容及び結果を記す。

1) 背景と目的

1)-1 当社が開発する再生医療等製品

当社が開発する再生医療等製品は、目的遺伝子を導入した T リンパ球を有効成分として含有する遺伝子治療用医薬品、かつヒト（自己又は同種）細胞・組織加工医薬品である。現在国内で開発中の品目として、以下 2 種類のパイプラインを保有している。

- ① 腫瘍抗原 MAGE-A4 特異的 T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子を導入し、固形癌に対する治療を目指した遺伝子改変 T リンパ球（以下、「MAGE-A4 TCR 遺伝子改変 T リンパ球」）
- ② 変異導入単純ヘルペスウイルス 1 型—チミジンキナーゼ（変異導入 HSV-TK）遺伝子及び細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体（truncated low-affinity nerve growth factor receptor; Δ LNGFR）遺伝子を導入し、造血器悪性腫瘍に対する同種造血幹細胞移植後に寛解導入不能もしくは再発又は重篤な感染症をきたした患者を対象としたドナーリンパ球輸注（Donor Lymphocyte Infusion; DLI）療法に使用する遺伝子改変 T リンパ球（以下、「HSV-TK 遺伝子改変 T リンパ球」）

これらの遺伝子改変 T リンパ球はいずれも、患者又はドナーから採取された末梢血リンパ球を、体外で活性化した後にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行い、拡大培養後に患者に輸注されるものである。

また、商業化後の再生医療等製品の流通モデルとして、企業内に設置されたハブ細胞調製施設で患者またはドナー由来 T リンパ球への遺伝子導入や細胞培養調製を集中的に行い、各医療機関へ供給するシステムを確立し、細胞調製施設を所有しない各地域（国内外を含む）の医療機関でも治療が実施可能な「誰でも何処でも」受けられる細胞療法のシステム構築を目指している。

1)-2 治験実施に向けた当局との対面助言・意見交換、及び治験準備

当社は上述の①、②の再生医療等製品の治験実施を目指し、開発当初から独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）との対面助言を実施して、両品目の品質・安全性の評価に必要となる試験項目について助言を受けるとともに当社の考えに対する意見交換を重ねてきた。

本事業では、2つの開発品目に関する、PMDA とのこれまでの対面助言で受けた指摘・議論内容、及び今年度を実施する対面助言の中での助言・議論を元に、必要となる試験を実施し、以下に述べる各種評価手法の確立を行うことを目的とした。

遺伝子改変 T リンパ球として、2つの開発品目に共通する評価手法は、今後開発される他の遺伝子改変 T リンパ球の実用化基盤として有用なものとなる。また、各開発品目に特有の評価手法に関しても、今後同様の製造手法が利用される後発品の実用化基盤として利用されるものである。

2) 実施内容詳細と評価手法について

<評価手法 1>

2)-1 安全性・有効性に関して承認までに必要とされる試験項目の評価手法

これまでの PMDA との対面助言により、MAGE-A4 TCR 遺伝子改変 T リンパ球と HSV-TK 遺伝子改変 T リンパ球の 2 つの開発品目に関して、それぞれの非臨床試験での安全性、有効性を示すために必要とされる試験項目に関する議論を重ねてきた。そして、実際に健常人ボランティアの血液を使用した遺伝子改変 T リンパ球を試験製造することにより、各試験項目についての非臨床データを取得し、そのデータと解釈について PMDA との対面助言等の中で、その妥当性について相談を継続実施した。本事業期間中に実施した PMDA との対面助言の一覧を以下に記す。

(本事業期間中に実施した PMDA との対面助言)

MAGE-A4 TCR 遺伝子改変 T リンパ球		
実施日	相談名	相談内容
2013 年 10 月 31 日	医薬品戦略相談 (戦 P83)	治験プロトコール
2013 年 11 月 13 日	医薬品戦略相談 (戦確 P6-3)	品質・安全性
HSV-TK 遺伝子改変 T リンパ球		
実施日	相談名	相談内容
2013 年 10 月 30 日～11 月 1 日	医薬品戦略相談 (戦 P88) 実地調査 (訪問確認)	当社 CPC の治験薬 GMP 適合性についての調査
両遺伝子改変 T リンパ球共通		
2013 年 11 月 13 日	医薬品戦略相談 (戦 P96) 事前打ち合わせ	当社新 GMP 製造施設の治験薬 GMP 適合性についての調査

また、上記の対面助言及びこれまでに実施した対面助言を含めて、PMDA との主な議論について以下にまとめた。

①MAGE-A4 TCR 遺伝子改変 T リンパ球

評価方法	PMDA 対面助言	結果
<p>1 遺伝子改変 T リンパ球の規格、安全性／有効性に関する試験項目を策定する (PMDA 対面助言で妥当性を確認する)。</p>	<p>(2010 年) (2011 年) (2013 年 2 月) 2013 年 9 月 2013 年 11 月</p>	<p>MAGE-A4 TCR 遺伝子改変 T リンパ球について、PMDA との対面助言として、医薬品品質相談 (2010 年実施) において、治験届を提出する前の段階で実施すべき、工程内管理試験、特性解析試験、製造工程由来不純物試験、及び規格試験の試験項目の妥当性を確認した。その中で、治験届を提出する前の段階で患者由来の細胞を使用して試験製造をすることは倫理的に困難であるとの相談者側の見解を踏まえ、健常成人由来の細胞を用いて確認申請におけるデータを取得することはやむを得ないとの考えが示された。工程内管理試験については、試験製造段階である状況を踏まえ、最終産物に限定せず、培養開始後から経時的に全ての工程について幅広くデータを収集することが適切であるとの考えが示された。特性解析については、品質特性について試験項目を限定せず多角的に情報収集することが必要であるという考えが示された。規格試験のマイコプラズマ否定試験については、治験薬を速やかに投与する必要があることから迅速法の結果によって判断することはやむを得ないものの、追加の確認試験を並行して実施する必要があるとの考えが示された。</p> <p>また、PMDA との対面助言として、医薬品安全性相談 (2011 年実施) においては、治験届を提出する前の段階で実施すべき、安全性及び有効性に関する非臨床試験の試験項目の妥当性を確認した。その中で、in vivo 安全性試験について、病理組織学的評価の対象組織としてリンパ球の特性上で重要と思われる組織を追加する必要があるとの考えが示された。また、造腫瘍性評価としての核型分析試験については、治験届を提出する前の段階では必須ではないものの、培養工程において核型異常を有する細胞が有意に増加しないことを確認できる点で、工程評価として有用な手法の 1 つと考え</p>

			<p>られ、承認申請までの実施を検討すべきとの考えが示された。</p>
2	<p>健常人血液を原材料とする試験製造品についての非臨床データから、試験項目・規格の妥当性を検証する。</p>		<p>MAGE-A4 TCR 遺伝子改変 T リンパ球について、医薬品戦略相談（2013年2月実施）において、治験開始前までに必要な品質及び安全性に関する、健常人血液を原材料とする試験製造品のデータをまとめた資料の充足性について、PMDA の意見・助言を求めた。その中で、生物由来原材料に関して、治験届提出までに生物由来原料基準への適合性を説明し、根拠となる情報を提出するように指示があった。なお、生物由来原料基準への適合性を説明できない原材料を用いて開発を進める場合には、遅くとも承認申請までには生物由来原料基準に適合した原材料への切替えを行うように指示があった。</p> <p>上記の医薬品戦略相談（2013年2月実施）で PMDA から指摘のあった、原材料の生物由来原料基準への適合性に関して、2013年9月に2回目の医薬品戦略相談を実施した。ヒト血清アルブミンについては、生物由来原料基準への適合性を判断するために必要な情報を製造元から入手することはできなかったが、製造元の品質管理者から当該製品が生物由来原料基準に適合している旨の陳述書入手しPMDAに提出することにより、当該製品が日本で承認されている医薬品であることから、詳細情報は入手できていなくても治験届提出時に必要な対応はなされているという考えに対して、PMDA は異論を示さなかった。抗 CD3 抗体（過去に日本で承認されていた医薬品）についても、生物由来原料基準への適合性を判断するために必要な情報を製造元から入手することはできなかったことに対して、PMDA は当該基準に適合した原材料への切替えを行ったうえで治験薬を製造することが適切であるという考えを示した。ただし、適当な代替品が確定できておらず、治験開始前までに切り替えが困難であることから、やむを得ず、入手済みの抗 CD3 抗体を用いて今回の治験を行うのであれば、開封・分注の操作が加わり医薬品としての無菌性等の保証が破綻しているため無菌性等の確認</p>

			をすること、原料基準への適合性が確認できていない原材料が使用されていることを患者同意説明文書に追記すること等の対応が初回治験届提出時まで必要であるという考えを示した。
3	原材料（抗 CD3 抗体）の変更に伴う同等性の評価に必要な試験項目を検討する。	—	原材料の変更に伴う同等性の評価に必要な試験項目については、上記の PMDA との対面助言では議論にならなかった。
4	製造工程（遺伝子導入方法、凍結保存条件）の変更に伴う同等性の評価に必要な試験項目を検討する。	—	製造工程の変更に伴う同等性の評価に必要な試験項目については、上記の PMDA との対面助言では議論にならなかった。

②HSV-TK 遺伝子改変 T リンパ球

評価方法	規制当局相談	結果
1 遺伝子改変 T リンパ球の規格、安全性／有効性に関する試験項目を策定する（PMDA 対面助言で妥当性を確認する）。	（2013 年 3 月）	HSV-TK 遺伝子改変 T リンパ球の有効成分は HSV-TK 遺伝子導入ドナー T リンパ球であり、造血器悪性腫瘍に対する造血幹細胞移植後に、再発、寛解導入不能又は重篤な感染症にある患者を対象としている。HSV-TK 遺伝子改変 T リンパ球について、「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」に基づく確認を 2012 年 9 月 26 日に申請し、細胞・組織加工製品の品質及び安全性に関わる薬事戦略相談対面助言（戦確 P7）を 2013 年 3 月 27 日に実施した。対面助言では、治験開始前までに必要な品質及び安全性上の要件に対する資料の充足性等に関して相談した。これらにおける PMDA の主な指摘は以下であった。

			<p>1. 生物由来原材料の生物由来原料基準への適合性について、根拠資料を示して説明する必要がある。</p> <p>2. 原材料に由来する感染症リスクを可能な限り否定するという考え方にに基づき、ドナースクリーニング時のウイルス検査において、ウィンドウピリオドを勘案した再検査を実施する必要がある。患者の病状によって再検査の結果が判明する前にやむを得ず本剤を投与するという状況を想定するのであれば、初回検査で感度が高い検査方法を用いて感染症を否定しておくことが重要。</p> <p>3. 最終製品の品質試験項目のうち、ウイルス試験については、試験合格を確認した後に本剤を投与するよう方策を講じること。また、最終製品の品質試験項目として実施するガンシクロビル感受性試験に関して、ガンシクロビル存在下で自殺機能が発揮されるか <i>in vitro</i> で確認されていない段階で本剤を投与することは安全性を担保する上で問題がある。</p> <p>薬事戦略相談対面助言以降、フォローアップ面談等を通じて PMDA とさらに議論したところ、1.に関して、医薬品（血漿分画製剤）として承認されている品目については上記①2. と同様の対応となった。しかし、一部の原材料については生物由来原料基準への適合性確認が困難と考えられ、また、製造中止により今後入手できなくなるため、原材料及び製造工程の一部を変更することを決定した。</p> <p>2.について、可能な項目については再検査を実施することとした。</p> <p>3.のウイルス試験については、4週間を要するため、治療が急がれる患者のベネフィットを考慮して試験結果を待たずに投与することを予定していたが、2週間で結果を得られる体制が構築できたことから、PMDA の指摘を受け入れることとした。</p> <p>上記の議論の後、遺伝子導入細胞分離工程及びこの工程に用いる原材料を変更することを決定した。このため、変更後の製造法によるデータを取得した後に薬事戦略相</p>
--	--	--	--

			<p>談を再開することになった。なお、遺伝子治療用医薬品の確認申請制度が 2013 年 8 月 31 日をもって廃止されたため、薬事戦略相談に移行するために確認申請を取り下げた。</p> <p>上記のとおり、PMDA と議論した結果、原材料の安全性や最終製品の品質試験項目についてある程度の合意に至った。しかし、試験項目の最終決定には製造法変更後のデータを蓄積した後に当局と改めて相談する必要がある。</p>
2	健常人血液を原材料とする試験製造品についての非臨床データから、試験項目・規格の妥当性を検証する。		<p>相談者は HSV-TK 遺伝子改変 T リンパ球は造血幹細胞移植と同一のドナー（原則として健常人）のリンパ球を用いて製造されるために、患者血液を原材料とした遺伝子改変 T リンパ球の特性や規格の妥当性の検証は該当しないと考える。</p>
3	原材料（抗 CD3 抗体、抗 LNGFR 磁気ビーズ）の変更に伴う同等性の評価に必要な試験項目を検討する。		<p>原材料の変更に伴う同等性の評価に必要な試験項目については、PMDA との議論はなかった。</p>
4	製造工程（遺伝子導入細胞の分離方法）の変更に伴う同等性の評価に必要な試験項目を検討する。		<p>製造工程の変更に伴う同等性の評価に必要な試験項目については、PMDA との議論はなかった。</p>

MAGE-A4 TCR 遺伝子改変 T リンパ球に関しては治験開始前の全ての薬事相談を終了しており、その結果を元に治験開始前及び開始後にそれぞれ必要とされる試験項目について以下にまとめた。一方、HSV-TK 遺伝子改変 T リンパ球に関しては、前述のとおり、製造法変更の作業後に薬事戦略相談を再開する予定であり、治験開始前及び開始後にそれぞれ必要とされる各試験項目についてはまだ確定していない。

<MAGE-A4 TCR 遺伝子改変 T リンパ球 試験項目>

健常人血液による実スケール試験製造品のデータをもとに設定した。

試験項目	試験検体	薬事戦略相談において 機構へ提出したデータ
外観試験	凍結前の最終製品	健常人血液を用いた 実スケール試験製造品 によるデータ
細胞濃度試験	最終製品と同様の分注品* (凍結保存前)	健常人血液を用いた 実スケール試験製造品 によるデータ
細胞生存率試験	最終製品と同様の分注品* (凍結保存細胞)	
免疫表現型試験	最終製品と同様の分注品* (凍結保存細胞)	
IL-2 依存的増殖試験	最終製品と同様の分注品* (凍結保存細胞)	
サイトカイン産生試験	最終製品と同様の分注品* (凍結保存細胞)	
Galv RCR 試験	最終製品と同様の分注品* (凍結保存細胞)	
無菌試験	最終製品と同様の分注品* (凍結保存細胞)	
マイコプラズマ否定試験	最終製品と同様の分注品* (凍結保存細胞)	

エンドトキシン試験	最終製品と同様の分注品* (凍結保存細胞)	
HTLV 試験	最終製品と同様の分注品* (凍結保存細胞)	健常人血液を用いた 実スケール試験製造品 によるデータ
HBV 試験	最終製品と同様の分注品* (凍結保存細胞)	
HCV 試験	最終製品と同様の分注品* (凍結保存細胞)	
HIV 試験	最終製品と同様の分注品* (凍結保存細胞)	

*: 凍結保存用バッグに入れた後に小分け分注した検体

(非臨床安全性試験)

試験項目 (<i>in vitro</i>)	薬事戦略相談において機構へ提出したデータ
増殖性レトロウイルス (RCR) 試験	健常人血液を用いた実スケール試験製造品 によるデータ
導入遺伝子コピー数試験	
クローナリティ解析 (LAM-PCR)	
長期培養後のクローナリティ解析 (LAM-PCR)	
IL-2 依存的増殖試験	
IL-2 依存的増殖試験 (予定よりも長く培養した細胞)	
免疫表現型試験	
免疫表現型試験 (予定よりも長く培養した細胞)	
ベクターの完全性試験	
ベクターの完全性試験 (予定よりも長く培養した細胞)	

siTCR ベクターのオフターゲット効果検証	健常人血液を用いた小スケール試験製造品によるデータ
試験項目 (<i>in vivo</i>)	
実験動物を用いた安全性比較試験	健常人血液を用いた実スケール試験製造品によるデータ

(非臨床有効性試験)

試験項目 (<i>in vitro</i>)	薬事戦略相談において機構へ提出したデータ
テトラマー解析試験	健常人血液を用いた実スケール試験製造品によるデータ
導入遺伝子コピー数試験	
ベクターの完全性試験	
長期培養後のベクターの完全性試験	
長期培養後のテトラマー解析試験	
テトラマー結合細胞のサイトカイン産生試験	健常人血液を用いた小スケール試験製造品によるデータ
細胞傷害活性試験	健常人血液を用いた実スケール試験製造品によるデータ
siRNA ノックダウン効率試験	健常人血液を用いた実スケール試験製造品によるデータ
免疫表現型試験	
試験項目 (<i>in vivo</i>)	薬事戦略相談において機構へ提出したデータ
実験動物を用いた抗腫瘍効果評価	健常人血液を用いた小スケール試験製造品によるデータ

PMDA との対面助言（品質相談、安全性相談、薬事戦略相談）での議論において製造販売承認申請時には患者由来の細胞を用いて取得した工程内管理試験、特性解析、規格及び試験方法等の結果等のデータパッケージが必要との助言を受けている。

当局との相談を踏まえ、今後、治験中に実施を予定している患者由来の細胞を用いた特性解析試験項目は以下である。なお、PMDA より、健常人血液による試験製造品で取得したデータと同様の検体数で実施する必要があるとの指摘を受けている。規格試験に相当するものは全例のデータ取得となる。

特性解析試験項目	規格試験に相当	予定より長く培養した細胞 ^{*1} での実施
細胞生存率試験	○	要
免疫表現型試験	-	要
導入遺伝子コピー数試験	-	-
テトラマー解析試験	-	-
サイトカイン産生試験	○	要
サイトカイン産生試験	-	-
siRNA ノックダウン効率試験	-	-
IL-2 依存的増殖試験	-	要
ベクターの完全性試験	-	要
テトラマー結合細胞のサイトカイン産生試験	-	-
細胞傷害活性試験	-	-

*1 予め設定された治験薬の培養日数よりも長く培養する必要があるが生じた場合を想定した評価を行う。

(治験準備の状況)

MAGE-A4 TCR 遺伝子改変 T リンパ球については、品質・安全性及び治験プロトコールに関する PMDA 対面助言を 2013 年内に全て終了し、三重大学を中心とした多施設医師主導治験として実施準備を進めた。2014 年 2 月 5 日に三重大学・珠玖教授より治験計画届出書が PMDA に提出され、30 日調査を経た後、2014 年 3 月 8 日より治験開始可能となった。症例登録はまだ行われていない。

HSV-TK 遺伝子改変 T リンパ球については、製造方法の変更等の理由により、非臨床試験データの取得を行っており、治験開始には至っていない。

<評価手法 2>

2)-2 原材料の変更に伴う同等性を証明するための評価手法

原材料の変更に伴う同等性を証明するための評価手法について、遺伝子改変 T リンパ球の分離・精製に使用する抗 LNGFR 抗体磁気ビーズや T リンパ球の活性化に使用する抗 CD3 抗体などについて、変更に伴う評価方法を検討する。これにより、従来の原材料を用いた既存データと新規に取得したデータによる同等性の評価に必要な試験項目が明らかになることから同等性を証明するための評価手法として実施する。

平成 25 年度に於いては、以下の 2 項目について検討を行った。

実施内容	対象となる製造物
① 遺伝子導入細胞を選別する工程で用いる、抗 LNGFR 抗体及び磁気ビーズ並びに磁気細胞分離装置を変更するための検討。	HSV-TK 遺伝子改変 T リンパ球
② リンパ球を刺激する際に使用する抗 CD3 抗体 (OKT3) のメーカーを変更するための検討。	HSV-TK 遺伝子改変 T リンパ球 MAGE-A4 TCR 遺伝子改変 T リンパ球

① 抗 LNGFR 抗体及び磁気ビーズ並びに磁気細胞分離装置の変更に伴う同等性評価

HSV-TK 遺伝子治療において、活性化リンパ球に対して HSV-TK および Δ LNGFR を発現する遺伝子を導入した後に、 Δ LNGFR を発現する細胞を遺伝子導入細胞 (GMC) として選別を行う。GMC の分離には抗 LNGFR 抗体 (抗 CD271 抗体) および常磁性ビーズを用い、抗体およびビーズに結合した細胞を磁気細胞分離装置により選別を行う。

従来法の場合は、以下の工程で選別を行っていた。①GMC に対してマウス抗 LNGFR 抗体を反応させた後にヒツジ抗マウス抗体を結合したビーズ (SAM ビーズ) を結合させる。②SAM ビーズに結合した細胞を磁気細胞分離装置 (Isolex300i) により分離を行う。③更に一晚培養した後に SAM ビーズから遊離した細胞を GMC として回収する。しかし、SAM ビーズの生産中止により GMC 分離用原材料の変更が必要となり、それに伴い、磁気細胞分離装置も同時に変更する必要が生じた。原材料を変更した方法では、抗 LNGFR 抗体磁気ビーズを用いて直接 GMC に反応させた後に、当該ビーズ専用の磁気細胞分離装置により分離を行う。両者は、選択に用いる材料及び機器が異なるため、選別後の細胞の比較評価のための検討を行った。

評価のための手順として、以下に従い実施した。

- (i) 小スケールでの抗 LNGFR 抗体磁気ビーズと SAM ビーズとの比較
- (ii) 抗 LNGFR 抗体磁気ビーズと専用磁気細胞分離装置を使用した細胞調製手順の確立

(iii) 細胞調製施設（国立がん研究センター）での実製造機器を用いた製造検討とデータ取得

(i) 小スケールでの抗 LNGFR 抗体磁気ビーズと SAM ビーズとの比較

抗 LNGFR 抗体磁気ビーズによる LNGFR 陽性細胞の分離能を検討するために、細胞株 (MOLT4) を用いて検討を行った。非導入細胞 (MOLT4 (-)) と LNGFR 遺伝子を導入した MOLT4 (MOLT4 (CD271+)) を 1 : 9、3 : 7、5 : 5 の比率で混合し、分離供与細胞を $1 \times 10^7 / 60 \mu\text{L}$ となる様に Buffer に懸濁し、 $20 \mu\text{L}$ の抗 LNGFR 抗体磁気ビーズを加え小スケール分離装置により分離を行った。

(結果) 抗 LNGFR 抗体磁気ビーズにより Δ LNGFR 発現細胞が、90%以上の高純度で分離される事が確認できた (陽性分画)。一方、MOLT4 (CD271+) 混合比 50%では、陰性分画に Δ LNGFR 発現細胞が漏れ出ることが確認されたが、陽性分画の純度は他の条件と同等であった。

次に、抗 LNGFR 抗体磁気ビーズの LNGFR 陽性細胞の結合限界を検討するために、異なる LNGFR 発現細胞混合比の細胞懸濁液に一定量の抗 LNGFR 抗体磁気ビーズを反応させ、回収可能な陽性細胞と抗 LNGFR 抗体磁気ビーズの比を測定した。

(結果) 2回の検討結果から抗 LNGFR 抗体磁気ビーズ $1 \mu\text{L}$ あたり LNGFR 陽性細胞として約 3.0×10^5 個まで一定の陽性細胞回収率が維持できることが確認された。また、 3.0×10^5 個/ μL の比率を超えた場合でも、陽性分画の陽性率は維持できることが確認された。更に、ヒト末梢血単核球 (PBMC) を用いて GMC の分離検討を行った検討においても、細胞株 MOLT4 同様に高い GMC 分離能が確認できた

次に、抗 LNGFR 抗体磁気ビーズで分離した細胞と、抗 LNGFR 抗体および SAM ビーズの組み合わせにより分離した細胞との比較を行った。

ヒト PBMC を抗 CD3 抗体で刺激し、遺伝子導入を行った後に、抗 LNGFR 抗体磁気ビーズまたは抗 LNGFR 抗体および SAM ビーズの組み合わせで GMC を分離した。分離後の細胞を第 14 日 (検討-1) または第 10 日 (検討-2) まで培養し、比較検討項目として、①継時的な陽性細胞分画の変化、及び②導入遺伝子のプロウイルスコピー数を測定した。

(結果) 今回の検討において、何れの分離方法においても分離後の GMC は高い純度を示した。プロウイルスコピー数は、検討-1 においては、抗 LNGFR 抗体磁気ビーズで分離した GMC (1.19 copies/cell) に比べ、抗 LNGFR 抗体および SAM ビーズで分離した GMC

(1.22 copies/cell)の方が、高い LNGFR 発現とプロウイルスコピー数を示した。一方、検討-2 においては両者の間にプロウイルスコピー数の大きな差は無く (抗 LNGFR 抗体磁気ビーズにおいて 0.90 copies/cell、SAM ビーズにおいて 0.81 copies/cell)、分離方法による明確な差は確認されなかった。

(ii) 抗 LNGFR 抗体磁気ビーズおよび専用磁気細胞分離装置を使用した細胞調製手順の確立

細胞調製手順の確立のため、磁気細胞分離装置の使用プログラムおよび操作方法の確定と手順書の作成を行った。

当該磁気細胞分離装置の専用品である分離用ディスポーザブルセットを使用し、また専用の分離プログラムを使用した。その他バッファーおよび細胞懸濁液は模擬溶液を使用し、機器の動作確認を行った。本検討に先立ち、細胞調製室での使用を想定した手順書を作成し、機器の動作確認と共に手順書の内容の確認も行った。

(結果) 磁気細胞分離装置の正常動作が確認され、手順書の修正点も確認された。修正点を基に手順書を整備し細胞調製検討に使用した。

(iii) 細胞調製施設 (国立がん研究センター) での実製造機器を用いた製造検討とデータ取得

これまでの検討結果を合わせた治験薬 GMP での製造に対応した手順書を作成した。作成した手順書により実際に製造を行う機器で細胞調製が可能か検討するとともに、培養スケジュールの検討を行う目的で、細胞調製を行う国立がん研究センター細胞調整室で細胞調製を実施した。

(結果) 培養スケジュールの検討として、第 6 日目に選別した GMC を、第 9 日目および第 10 日目に希釈培養し、その後それぞれ 4 日間拡大培養し第 13 日目および第 14 日目まで培養を行った。その結果、第 9 日目に希釈培養した条件で第 10 から 12 日目にわずかに高い増殖倍率を示したが、第 13 日目においては第 10 日目希釈条件と同等の細胞数となった。分離後の Δ LNGFR 陽性率には培養スケジュール間での違いは確認されなかった。

GMC 分離工程では、抗 LNGFR 抗体磁気ビーズの性能規定量に準じた分離操作を行い、陽性細胞の回収率の検討を行った。その結果、本工程の Δ LNGFR 陽性回収率は 35.9%であった。この値は、検討前に予測した 46~86%の回収率よりも低い値であった。これらの細胞について品質試験を実施中である。

(結果まとめ)

抗 LNGFR 抗体磁気ビーズについて、切り替えのための同等性を評価する際に、小スケールの検討によって、選択後の GMC の Δ LNGFR 発現率および導入遺伝子のコピー数測定により、変更前後の材料による GMC の選択能の比較評価が可能なが確認できた。

小スケール検討では各種特性解析等の測定項目に対して対応することは難しい為、実際の製造施設および資材を用いた実調製レベルの製造検討により、特性解析試験等の結果を従来の結果と比較する必要がある。今年度の検討においては、小スケール検討結果および専用磁気細胞分離装置の手順書を作成し、実スケール調製のための予備検討を行った。本検討により、分離細胞の回収率等の追加検討が必要な項目が確認されており、今後製造工程の見直しを行う。これにより、特性解析可能な遺伝子改変 T リンパ球を製造し、同等性評価法のための特性解析項目の検討を行う。

② リンパ球を刺激する際に使用する抗 CD3 抗体 (OKT3) を変更するための検討

抗 CD3 抗体は遺伝子改変 T リンパ球を製造する際に、リンパ球に活性化刺激を加えるために使用する。リンパ球刺激用の抗 CD3 抗体としてはモノクローナル抗体 OKT3 が広く使用されており、製品としては従来医薬品として販売されていたオルソクロン OKT3 注が使用されてきた。しかし、医薬品としてのオルソクロン OKT3 注の販売が終了したため、同等品への変更が必要とされる。そこで本検討では、OKT3 の切り替えのために必要となる試験、評価方法を検討することにより、同等性についての考え方、評価法を確立することを目指し、評価対象となり得る項目について、比較検討可能なデータが得られるか各項目について検討を行った。

評価検討を行った項目を以下の表に示す。性状（濃度測定、分子量の確認、）および機能に関する項目を比較検討項目とし、機能については抗 CD3 抗体の抗原に対する直接的な機能（機能-1：バッグ・プレートへの結合、CD3 への結合能、PBMC 刺激能）と抗原刺激後の細胞増殖または遺伝子導入効率などの細胞に対する機能（機能-2：PBMC 刺激培養、遺伝子導入培養）に分けて検討を行った。

(材料)

- ・ヤンセンファーマ社 オルソクロン OKT3 注 凍結保存品
- ・A 社 抗 CD3 抗体 凍結保存品および非凍結品

メーカー (ロット数)	使用期限	凍結日
ヤンセンファーマ (3 ロット)	2005/07	2009/7/1
	2009/07	2009/7/1
	2011/11	2011/7/21

A 社 (2 ロット)	2013/02	2011/2/21
	2014/07	非凍結

(結果) メーカーおよび凍結期間の異なる複数の lot.の抗 CD3 抗体を用いて、性状、機能評価の検討を行った。

性状検討の結果から、タンパク濃度については、複数の測定法で同様の傾向を確認できた。保存期間の違いによるタンパク質濃度の違いが検出できることが確認された。分子量の確認については、抗体の H,L 鎖の比較は出来るが、分解産物の検出までは出来ないことが確認できた。

機能-1 の検討結果から、CD3 結合能、PBMC 刺激能により、凍結保存期間が異なる検体間で、両項目について変化の検出が出来ることが確認された。

機能-2 の検討結果から、液相・固層化刺激、遺伝子導入有りおよび無しの検討条件について、本機能に連動する明らかな差は確認できなかった。

上記の結果、以下の項目について直接的に変更品と比較することにより評価が出来る事が確認された。今後、抗 CD3 抗体等の原材料の変更時には、これらの項目について評価する予定である。

- ・濃度及び分子量比較
- ・培養による比較
- ・抗原結合能
- ・刺激能

③ TCR 遺伝子改変 T リンパ球の免疫機能の評価法開発 (再委託)

TCR 遺伝子改変 T リンパ球のような細胞製剤、再生医療製剤においては、個々の患者から製造される製品の個別性という特徴があり、これまでの製剤と同様の評価方法によりその同等性を論じることには、不合理性と困難が予測される。したがって、細胞製剤、再生医療製剤の特徴を踏まえつつ、有効性と安全性の相似性を担保可能な新しい同等性評価法の開発が必須である。本事業においては、TCR 遺伝子改変 T リンパ球の免疫機能の新しい評価方法の開発を行い、以下の結果を得た。

(i) 外来性及び内在性発現抗原への反応性の評価法の開発

MHC とペプチドの複合体を認識する抗体をファージディスプレイ・ライブラリー法を用いて取得した。これらの抗体を用いて、外来性にパルスした抗原に加えて標的細胞がナチュラルに発現提示する抗原を定量的に評価した。

(ii) 抗原特異的免疫反応の鋭敏かつ定量的な評価法の開発

T 細胞の抗原特異的反応性を感度良く検出可能なサイトカイン・ケモカインのスクリー

ニングを行い、従来法に比べ 10 倍以上の感度で抗原特異的免疫反応を鋭敏かつ定量的に検出できる候補分子を同定した。

上記の (i) (ii) に関しては、本事業の評価手法 2 及び 3 において同等性を評価する際、最終製品の機能性評価において有用となると考えられる。(i) の成果により、TCR 遺伝子改変 T リンパ球が抗原を認識する能力を、より定量的に評価できるようになると考えられる。TCR 遺伝子改変 T リンパ球の抗原特異的反応性を定量的に測定する為には、その標的となる分子の定量的測定が必須の前提条件となる。TCR 遺伝子改変 T リンパ球が腫瘍細胞を認識する際には、腫瘍細胞の腫瘍抗原由来ペプチドが腫瘍細胞に発現する MHC 分子に結合した MHC/抗原ペプチド複合体を認識するが、腫瘍細胞の MHC のうちどれくらいが目的の腫瘍抗原由来ペプチドを自然に提示しているのかを知る方法がこれまで存在しなかった。今回、特定の腫瘍抗原由来ペプチドと特定の MHC の複合体を特異的に認識する抗体が作製されたことにより、TCR 遺伝子改変 T リンパ球が認識する MHC/抗原ペプチド複合体の腫瘍細胞表面上の量を定量的に測定することが可能となり、TCR 改変 T リンパ球機能の定量的測定の前提条件をひとつ解決することになる。(ii) に関しては、現在、多くの検査にて免疫機能の指標としている IFN- γ 等のサイトカインに代わる高感度な評価系となり得る。これまでのサイトカイン測定では、目的の T 細胞の数、頻度が低い場合には、検出感度を高めるために測定前に T 細胞を刺激、増殖させる必要があることが多い。しかし、刺激、培養は T 細胞の性質を変えると共に、増殖によるバイアスにより T 細胞の頻度の推測も困難となる。このことは特に、*in vivo* 評価系における T 細胞の高感度な評価の際に大きな問題点となる。したがって、従来法を上回る高感度な抗原特異的免疫反応測定系の開発は TCR 遺伝子改変 T リンパ球の機能及び動態評価、特に *in vivo* 機能、*in vivo* 動態評価に重要である。以上の理由により、上記の (i) (ii) はいずれも今後さらに検討を継続する予定である。

④原材料の国産化検討

海外製原材料の多くは高価であり、再生医療製品のコスト高の主要因の一つとなっている。今後、安価な原材料入手によるコスト削減、安定的な供給体制の確保、また各種製造情報の入手を容易とするためには国産の原材料に切り替えていくことは非常に重要な課題である。その例として、リンパ球培養の際に用いられる抗 CD3 抗体はこれまで医薬品として使用されてきた OKT3 (ヤンセンファーマ社製) が終売となり、医薬品製造に使用できるレベルの代替品の入手が困難となっている。その対策として、当社では、すでに GMP 製造が可能な工場の建設を開始しており、また、遺伝子改変 T リンパ球培養の際に必須となる GMP グレード抗 CD3 抗体の自社子会社での開発・製造にも着手しており、GMP 準拠の製品としての提供を目指した取り組みを行った。

※GMP 準拠とは適合性は確認されていないが GMP 省令に基づいた製造法で実施した場合を指す。

GMP 製造とは GMP 省令への適合性が確認された製造を指す。

(1) 抗 CD3 抗体の国産原材料への切り替え

目的：

安価な原材料入手によるコスト削減、安定的な供給体制の確保、容易な製造情報入手の対策として、原材料の国産化を目指す。その足掛かりとして、今年度内に抗 CD3 抗体の GMP 準拠製品としての提供を目指す。

抗 CD3 抗体の開発と製造

- i. MCB 調製
- ii. 培養工程の確立
- iii. 精製工程の確立
- iv. GMP 製造工程の構築
- v. 試験製造

i. MCB 調製

抗 CD3 抗体発現ハイブリドーマである OKT3 (ATCC_CRL - 8001) を入手し、Mycoplasma の否定試験を行った。試験的な培養を行い、5~7 µg/mL 程度の IgG の産生を確認した。セルバンク作製と培地の無血清化を進める為、市販の無血清培地製品を用いてハイブリドーマの培養を行い、凍結融解後の生存率、抗体産生能を比較検討して、細胞増殖、抗体産生能、生存率の安定性に優れる培地を選択した。

セルバンクを用いて安定的な抗体製造を行う為、ハイブリドーマのリクローニングを行い、凍結保存後の安定性、抗体産生能の確認を行った。得られた複数のクローンを無血清馴化し、抗体産生能、生存率の安定性等の比較と長期培養、高密度培養の可否を確認した。その結果、候補株から製造用クローンを選択し、GMP 施設においてマスターセルバンク (MCB) の製造を行った。

ii. 培養工程の確立

安定的に高密度培養を行う為の培養容器の選定を行った。3 種の培養容器の比較検討を行った結果、GMP 製造が可能で、発現量に優れ、スケールアップの容易な製造用の培養容器を選択した。また、約 1 g の抗体取得に必要な培養スケール、回収時期の検討を行い、培養プロトコルを決定した。合わせて、使用する培養器での細胞起床、培養を検討し、細胞起床から回収までの工程を閉鎖系で組めるようにした。

iii. 精製工程の確立

抗体医薬品の精製工程を参考にして、抗 CD3 抗体の精製工程に関し、以下の工程の至適化を行った。

培養液の清澄化

Affinity Chromatography

Cation exchange

Anion exchange

Ultrafiltration / Diafiltration / Virus Clearance / Final Filtration

iv. GMP 製造工程の構築

「ii. 培養工程の確立」および「iii. 精製工程の確立」で至適化した条件に従い、実スケールで培養、精製を行い、工程内収率、最終収率、収量を求めた。回収した抗 CD3 抗体溶液のエンドトキシン含量も規格値以下であった。

v. 試験製造

上記検討結果を踏まえ、実スケールの試験製造、GMP 製造施設での試験製造、同施設での 2 回目の試験製造を実施し、収率の比較を行った。その結果、抗 CD3 抗体を安定的に製造できることを確認した。

すでに当社 GMP 準拠品に関して、国内試験機関への紹介、評価が開始されている。今後、医薬品製造に使用できる水準の品質管理法、性能評価を継続検討していく予定である。抗 CD3 抗体は、当社の再生医療製品に使用されるのみならず、自由診療として広く日本で行われているがん免疫療法（活性化リンパ球療法等）の細胞調製や各種リンパ球培養製品に必須の原材料であり、これらを国産品に置き換えていくことによって、今後、開発される他の再生医療製品を含め、国内の再生医療全体への波及効果が見込まれる。

(2) 自社で開発・製造を行う原材料の調査

目的：

今後開発される再生医療製品の製造に必要と考えられる原材料の一部について、抗 CD3 抗体における製造、品質・安全性評価の実績を生かし、自社での開発・製造を視野に入れて調査を行う。

結果：

細胞の分離、拡大培養に用いる抗体を対象としてハイブリドーマの入手の可否、産生する抗体のサブクラス、知的財産等を調査した。候補抗体の内、臨床で使用された実績のあるハイブリドーマが入手可能な抗体 A を次期製造品の候補として選択した。抗体 A の発現ハイブリドーマを入手し、製造検討を進めている。抗体 A は、遺伝子改変 T 細胞培養の際の刺激方法として広く普及している方法で使用されており、今後の細胞培養法の改良の中で評価が必要になると考えられる。

細胞の分化、刺激、拡大培養に用いるサイトカイン類を対象として既存品の発現系、知的財産等を調査した。候補の内、今後の需要が期待できるサイトカイン類を次期製造品の候補として選択した。塩基配列情報データベースを用いて各遺伝子情報を検索し、組換えタンパク質として発現させるべき塩基配列を抽出した。サイトカイン類の機能を評価する為の試験項目について検討を行っている。

(3) サイトカインの評価

目的：

今後開発される再生医療製品の製造に必要と考えられる原材料の一部としてサイトカイン類が候補に挙げられるが、製造したサイトカインの評価を行うに当たり、遺伝子導入 T 細胞に対する機能評価項目の決定が必要である。今回は、市販されている各種サイトカイン類を用いて TCR 遺伝子改変 T リンパ球の増殖や機能や表現型を比較し、各サイトカインの既知の特徴が得られるかどうか、また、その特徴を確認できるサイトカイン濃度の閾値を確認した。

方法：

健常人ドナーPBMC に HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4 特異的 TCR 発現レトロウイルスベクター(MS-MS24siTCR)を感染させ、TCR 遺伝子改変 T リンパ球を作製した。遺伝子導入 4 日後に IL-7 (PEPROTECH 200-07), IL-12 (PEPROTECH 200-12), IL-15 (PEPROTECH 200-15), IL-21(PEPROTECH 200-21)を終濃度 0.25, 1, 5, 20 ng/ml にて添加し、継時的に細胞増殖能を測定し、また、MAGE-A4 ペプチド特異的なサイトカイン産生能及び細胞傷害活性の測定及び細胞表現型の測定を行った。

結果：

IL-7 の添加により細胞増殖促進、Naive 比率の増加が確認され、細胞傷害活性に影響は見られなかった。これらの特徴は既に論文等にて報告されている特徴に一致した。IL-12 の添加により、IFN γ 産生の上昇及び effector 細胞への分化が確認され、これらはこれまでの知見に一致した。IL-15 の添加では既知の知見と一致した項目は細胞増殖促進及び CD8 比率の増加であり、またその他 IFN γ 産生能の増強が確認された。IL-21 の添加では既に報告されているように、細胞傷害活性の増強が確認できた。

各サイトカインの効果が確認できたのは、1 ng/ml - 5 ng/ml であり、効果がはっきりと確認できたのは 5 ng/ml 以上添加した場合であった。サイトカインの評価には濃度を振る必要性があると考えられる。

<評価手法 3>

2)-3 製造工程の変更に伴う同等性を証明するための評価手法

製造工程の変更に伴う同等性を証明するための評価手法について、同等性比較評価方法を検討する。これにより治験も含めた開発段階で製造法を変更する際の評価方法の明確化が出来る事から本事業で実施する意義がある。

平成 25 年度に於いては、以下の 3 項目について検討を行った。

実施内容	対象となる製造物
① 自動化に適した製造手順を確立し、製品レベルの試験製造を行う。	TCR 遺伝子改変 T リンパ球
② 最終製品の凍結保存時の濃度や液量などの保存条件について、比較データを取得するための製品レベルの試験製造を行う。	TCR 遺伝子改変 T リンパ球
③ 細胞製造自動化装置に関する調査	—

① 自動化に適した遺伝子導入法の変更に伴う同等性評価

TCR 遺伝子改変 T リンパ球の細胞調製工程において、遺伝子導入操作では遺伝子導入用バッグを作製する工程および遺伝子導入用バッグを用いてリンパ球に遺伝子導入を行う工程がある。MAGE-A4 TCR 遺伝子改変 T リンパ球の細胞調製の調製手順では、何れの工程でも遠心分離機を用いた遺伝子導入法（RBV-Spin 法）により調製を行う。

将来的に TCR 遺伝子改変 T リンパ球を自動化する場合、遠心分離機を用いた遺伝子導入法は、遠心機にかけられるバッグが小型でバッグ数が多くなり作業に時間がかかること、遠心機を複数台必要とするため設備が大型になることなどにより自動化には不向きと考えられる。これらの課題を解決するために、遠心分離機を使用しない新規導入法である低温振盪法（RBV-LTS 法）を実験室レベルで検討を行ってきた。本検討では、現行の RBV-Spin 法による TCR 遺伝子改変 T リンパ球調製法から RBV-LTS 法に変更し、これに伴う最終製品の同等性の評価手法を構築する目的で、GMP 製造に対応する手順書の構築とこれに従った試験製造を行った。

(i) GMP 製造に対応した手順書の構築

RBV-Spin 法では、遺伝子導入用のバッグとして底面積約 60cm² の CultiLife spin バッグを最大 16 バッグ使用し、細胞に対して遺伝子導入を行う。一方、RBV-LTS 法では、底面積約 320cm² の遺伝子導入用バッグ (PL325) を遺伝子導入用バッグとして使用する。

RBV-Spin 法における遺伝子導入細胞数を基に、RBV-LTS 法による遺伝子導入条件を検討し、PL325 バッグを 3 バッグ使用して遺伝子導入工程を実施する手順とした。これに従い、細胞調製用の治験薬 GMP 製造用手順書の遺伝子導入工程を修正し、RBV-LTS 法による手順書を作成した。

(ii) 細胞調製検討

調製法の概要

RBV-Spin 法により以前に検討した健常人ドナー (ドナーTC1800) の全血 50 mL から末梢血単核球 (PBMC) を分離した。OKT3 および Retronectin を結合させた培養用バッグ (CultiLife 215) 2 バッグに細胞を播種してリンパ球を刺激した。第 3 日目に Retronectin コートした PL325 バッグに MS-MA24-siTCR ウイルスを加え、一晚 4°C で振とう (50rpm) を行いウイルス結合バッグを作製した。第 4 日目に遺伝子導入を行った。同様の操作を第 5 日目に実施し、計 2 回の遺伝子導入操作を行った後、遺伝子導入後の細胞を第 7 日目まで培養した。第 7 日目に希釈培養を行い、さらに第 10 日目まで培養を行った。第 10 日目に細胞を回収洗浄を行い、保存条件に従ったバッグへの分注および凍結と検体調製を行った。

(結果)

TC1800 全血から分離した PBMC は、 6.5×10^7 個 (全血 1mL あたり 1.3×10^6 個) であった。10 日間培養後の TCR 遺伝子改変 T リンパ球の細胞数は 7.6×10^9 個 (総増殖倍率 281 倍) であった。これは、同ドナーを用いた RBV-Spin 法による細胞調製の総増殖倍率 660 倍の凡そ半分程度の増殖倍率であった。また、第 10 日目の遺伝子導入効率を測定した結果、テトラマー陽性細胞として 13.3%、プロウイルスコピー数で 1.5 コピー/細胞であった。これは、同ドナーの RBV-Spin 法の結果 42.5%、4.2 コピー/細胞よりも低い値であった。免疫表現型の比較においては両方法による違いはなかった。

本検討において TCR 遺伝子改変 T リンパ球は得られたが、従来の方針に対して細胞数および遺伝子導入効率が異なっている。今後、従来法との同等性評価を行う前に、遺伝子導入法を含めた細胞調製法の修正と細胞調製検討を行う。

②最終製品の凍結保存条件変更に伴う同等性評価

MAGE-A4 TCR 遺伝子改変 T リンパ球を用いた治験において、治験での安全性・有効性の評価等により投与細胞数が当初の予定から変更となる場合、最終製品の凍結保存時の濃度、液量および凍結保存容器などの保存条件についても変更が必要となる場合がある。この様な変更に伴う最終製品の同等性の評価手法を構築する目的で、手順書に従って細胞を

調製した後に、既存の凍結保存条件と異なる変更条件で最終製品を凍結保存する。凍結保存した細胞を使用し、品質試験及び長期保存データの評価を行い、従来保存条件の評価データとの比較検証を行う。

本検討において、以下の項目について変更した条件での凍結保存細胞を調製した。

項目
投与細胞数
保存容器
バッグあたり細胞数
液量
細胞濃度

(細胞調製の概要)

本検討においては、従来法である RBV-Spin 法で TCR 遺伝子改変 T リンパ球の細胞調製を行い、凍結保存条件のみを変更して調製検討を行った。

健康人全血 60 mL (ドナーTC3300) から末梢血単核球 (PBMC) を分離した。OKT3 および Retronectin を結合させた培養用バッグ (CultiLife 215) に細胞を播種してリンパ球を刺激した。4 日間培養後、MS-MA24-siTCR ウイルスを結合させた遺伝子導入用バッグ (CultiLife spin) にて RBV-Spin 法による遺伝子導入を行った。同様の操作を第 5 日目、第 6 日目に実施し、計 3 回の遺伝子導入操作を行った。遺伝子導入後の細胞を第 7 日目まで培養した。第 7 日目に希釈培養を行い、第 10 日目まで培養を行った。

第 10 日目に細胞を回収洗浄し、保存条件に従ったバッグへの分注および凍結と検体調製を行った。

評価項目は以下に示す。

品質試験

(規格試験)

- ・ 外観試験 (性状及び外観)
- ・ 細胞濃度試験
- ・ 細胞生存率試験
- ・ 無菌試験
- ・ エンドトキシン試験
- ・ マイコプラズマ否定試験
- ・ Galv RCR 試験
- ・ 免疫表現型試験

- ・ サイトカイン産生試験
- ・ IL-2 依存的増殖試験
- ・ HTLV, HBV, HCV, HIV 試験

(特性試験)

- ・ コピー数試験
- ・ テトラマー解析試験

(長期保存安定性試験)

−80±5°Cで一定期間保存した最終製品について実施する。

- ・ 外観試験 (性状及び外観)
- ・ 細胞濃度試験
- ・ 細胞生存率試験
- ・ 免疫表現型試験
- ・ サイトカイン産生試験
- ・ IL-2 依存的増殖試験

(結果)

三重大学 CPC において、手順書に従い細胞調製を行い、検討に必要な TCR 遺伝子改変 T リンパ球細胞数が得られた。第 10 日目の細胞を洗浄回収後、分注・凍結と検体調製を行った。

		製造スケール	細胞数(培養直後)
			x10 ⁸ cells
Day0	セットアップ	CultiLife 215 1 bag	0.3
Day4	遺伝子導入	CultiLife Spin 16 bags	-
Day7	培養直後	CultiLife Eva 6 bags	9.5
Day10	培養直後	-	32.2

調製した検体を用いて品質試験を実施し、細胞調製直後の凍結細胞について、規格試験については、IL-2 依存的増殖試験および HTLV, HBV, HCV, HIV 試験を除く項目については規格を満たす結果が得られていることを確認した。特性試験 (コピー数試験 テトラマー解析試験) を実施中である。また、長期保存安定性試験についても実施を予定している。

③ 細胞製造自動化装置に関する調査

遺伝子改変 T リンパ球の製造方法、特に遺伝子導入法や培養法に関しては、周辺機器、原材料の開発に伴い、改良が続けられている。開発途上である再生医療製品においては、より有効性の高い製品の開発や製造コスト削減のために製造方法の改良を継続して行う必要がある。特に細胞培養の自動化はいまだ確立していない技術であり、治験初期段階では手作業で製造する製品であっても、上市に向けたコスト削減等のために自動化を目指すことは必然の流れである。当社では、国内メーカーと連携して、製造工程の自動化装置を共同開発することも検討しており、本事業においては、その第一段階としての各種調査実施を目的とした。

細胞製造工程の自動化

製造工程の自動化装置を共同開発することの第一段階としての各種調査、feasibility study 的な取り組みを実施した。

2013年10月11日、BioJapan 2013 World Business Forum に参加、展示会場を訪問し、再生医療製品の製造に使用可能な装置・資材の調査を実施した。装置に関しては、川崎重工の iPS 細胞培養装置やアステック社の間葉系幹細胞培養用インキュベーター、ソニーのセルソーター等、すでに発表済みの物ばかりで、目新しい装置の展示はなかった。資材ではオランダ ATMI LifeSciences 社の幹細胞培養装置の展示が目をつけた。これはセルスタックやハイパースタックなど、多段式フラスコと同じ使用方法で、以下のスペックを持つ。

資材名	MPB10	MPB50	MPB100	MPB200
表面面積 (cm ²)	6,120	30,600	61,200	122,400
溶液量 (L)	1.6	5.6	11.2	21.9
溶液密度 (mL/cm ²)	0.26	0.18	0.18	0.18

円形の多段式フラスコで、真ん中下部にスターラーがあり、トリプシンを充填させて細胞回収や、培地と細胞の懸濁液を充填して細胞継代が可能。既に大手製薬メーカーが評価終了、実製造に使用しているメーカーもあるとのことである。さらに、ATMI LifeSciences 社では、閉鎖系での細胞の洗浄・濃縮が可能な CellSaver のような装置を開発中とのことであった。ATMI LifeSciences 社の日本代理店マツボー社の展示担当者の説明によると、このシステムを組み合わせることにより、欧州では細胞調製は class 100,000 (Grade C) の部屋での実施が認められたとのこと。ただし、どのような幹細胞であるのか、その細胞の使用目的は何か、どの指針に基づくのか、に関しては情報を得られなかった。細胞洗浄・

濃縮装置は次回来年の日本再生医療学会で発表展示するとのことである。日本における細胞調製室（CPC）は、Grade B の部屋（class 10,000、class 1,000 が望ましいとの声もある）に Grade A(class 100)のキャビネット、もしくは Grade C（class100,000）の部屋に Grade A のアイソレーターが一般的であるが、再生医療新法により欧米並みの規制に揃う可能性もあり、その場合、本システムを使用して省スペースで多品目の再生医療製品を製造することが可能になる。その他、石英ガラス表面に金属を薄く(厚さナノメートル)塗装して電気パルスを施すことでガラス面を均一に温める技術の展示が BLAST(株)から、細胞の様子を数値化するソフトウェアを株式会社 DITECT から、真空断熱材を採用した配送用 BOX の紹介をヤマトシステム開発株式会社から受けた。ヤマトシステム開発株式会社のシステムは-5℃～35℃でのバリデーション(3 日間)付きとのこと。電気錠で施錠し GPS を利用したトレーシング機能と開錠連絡機能を持つとのこと、再生医療製品の原材料となる患者細胞や、遺伝子導入細胞などの再生医療製品、再生医療実施後の患者のモニタリング用検体などの輸送を GMP 的に実施する事が可能と考えられる。

また、インターネットによる検索および Phacilitate Cell and Gene Forum 2014 におけるプレゼンテーションから、細胞調製の機械化に関する情報収集を行った。

次ページ以降に概略をまとめる。

製品、技術等	特徴
--------	----

<p>CliniMACS® Prodigy (Miltenyi Biotec 社)</p>	<p>細胞の洗浄やサンプルの分画処理を自動で行う専用の遠心分離ユニットが搭載されている。ユニット内部にはカメラが搭載されており、また画像認識ソフトウェアによって顕微鏡レベルの微視的な分離層（例えば血液分画による赤血球、 Buffy コート、血漿の各境界層）を識別でき、血液細胞の分画が可能である。さらに、MACS 細胞分離システムを搭載しており、マイクロビーズによる細胞分離プロセスを自動で行うことができる。また、遠心分離ユニットのチャンバーは細胞培養プロトコールに対応しており、閉鎖系での細胞の分化や増幅、抗原刺激（樹状細胞のペプチドパルス他）などを行うことができる。</p> 
<p>Engineered TCR T cell (Adaptimmune)</p>	<p>がん抗原特異的な TCR 改変遺伝子導入細胞を製品として、がんの遺伝子治療を目指している。アフェレーシスによって得た末梢血から T 細胞を分離し、CD3/CD28 抗体により刺激を行い、レンチウイルスベクターで TCR 遺伝子導入し、閉鎖系の Bag 培養システムで 10^{10} 個の細胞を製造している。</p>
<p>Xuri WAVE Technology (GE Healthcare)</p>	<p>上記 TCR 遺伝子導入細胞を 10^{10} 個調製するに当たり、培養フラスコではスケールに限界があるため、培養バッグを用いた Perfusion 培養による高密度培養が有効であり、GE Healthcare の WAVE システムがこれを提供する。</p>
<p>Allogeneic Cell Product (LONZA 社)</p>	<p>Allogeneic Cell Product のラージスケールでの製造に関して取り組んでいる (Mesenchymal Stem Cell など)。多段フラスコ (Cell Factory) での培養から、Bioreactor を用いての 3 次元培養、浮遊培養のシステムを用いている。</p>

Human Fibroblasts seeded and grown on a bioabsorbable mesh scaffold (OrganoGenesis 社)	人工皮膚のシートを生産する。開発のフェーズが上がっていくにつれて、製造の自動化を行うことが、コスト削減と大量製造につながる。Phase 2 では半自動化、Phase 3 以降は全自動化が望ましい。
Quantum Cell Expansion System (TERUMO BCT 社)	フォローファイバーを用いた閉鎖系培養システム。40 段の多段フラスコに匹敵する培養面積が確保でき、閉鎖系で骨髄細胞や Mesenchymal Stem Cell の大量培養を行うことができる。

上記調査結果を含め、先行している海外企業の動向や技術についての情報をもとに、今後の国内企業との連携、技術開発を検討する予定である。

3) 有識者会議

薬事戦略相談における PMDA との議論等を含めて、当社が進める、1) 遺伝子改変 T リンパ球における安全性・有効性に関して承認までに必要とされる試験項目/規格、2) 原材料(培地成分、精製用原料、リンパ球刺激成分等) の変更に伴う同等性を証明するための評価手法、3) 製造工程の変更に伴う同等性を証明するための評価手法について、評価の状況を報告して、その内容についてご意見を頂くために有識者会議を 2 回開催した。

●有識者会議委員 (五十音順、敬称略)

氏 名	所 属
荒戸 照世	北海道大学大学院医学研究科 レギュラトリーサイエンス部門
大津 真	東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター
清水 則夫	東京医科歯科大学 難治疾患研究所フロンティア研究室 ウイルス治療学
鳥海 亙	POC クリニカルリサーチ株式会社
内藤 浩志	メディシア RA 株式会社

1) 第一回有識者会議

【日時】平成 25 年 11 月 21 日 (木) 15:00~17:30

【場所】タカラバイオ株式会社東京支店 6 階プレゼンルーム

【目的】本事業内容説明

2) 第二回有識者会議

【日時】平成 26 年 3 月 17 日 (月) 16:00~18:30

【場所】タカラバイオ株式会社東京支店 6階プレゼンルーム

【目的】本事業において策定・検討した評価手法の内容に対する意見交換

【主な内容】

- 非臨床試験検体の組成・包装について
 - 最終製品と同じ組成・包装の検体で試験を求められるケースもある（有識者）。
- 用量漸増試験における製剤の用法・用量について
 - 高用量の製剤の用量で詰め口を行い、投与量で用量を調整することは可能ではないか（有識者）。
- 試験が必要なウイルス腫と陽性患者の扱いについて
 - 品質試験の規格として設置されていないウイルスの増殖の可能性はある。承認後はウイルス陽性患者も受け入れる検討が必要ではないか（有識者）。
- 生物由来原料基準の規定は細部にわたり、欧米で使用できる原料も日本では使用できない場合が考えられる。医薬品として承認されているものは適用しなくても良いのではないか（有識者）。
- 原料の受け入れ検査では、全てについて全品検査は必要とされないのではないか（有識者）。
- 再生医療等製品の原材料について、マスターファイル登録制度はまだあまり利用されておらず、今後登録の増加が望まれる（有識者）。
- 長期保存安定性試験の試験項目としてはマイコプラズマ否定試験やエンドトキシン試験も実施すべきではないか（有識者）。
 - 凍結前後で結果が変化しないと想定される試験は実施しない方向で PMDA と議論して試験項目を設定した（当社）。
- 細胞輸送時の安定性確認では、現状は生存率測定のみを実施している（当社）。
 - 機能評価も行った方が望ましいが、輸送先での実施困難が予想される。
一度だけ往復させて自社で確認する方法も考えられる。凍結細胞でない場合は振動等の影響もあるので実搬送での試験が必須と考える（有識者）。
- 製剤の性質上、ヒトリンパ球に導入遺伝子を変えただけの製品でも、新たな申請時に個別に試験が必要となるのか疑問である（当社）。
 - 考え方としてリーズナブルであれば、PMDA と議論すべきである（有識者）。

以上