

平成 2 5 年度再生医療等産業化促進事業
(脳梗塞、自己骨髄由来間葉系幹細胞)
報告書

平成 2 5 年 3 月
ニプロ株式会社

目次

1 本事業の背景・目的

1-1 製造工程の検討

1-1-1 アイソレータによる無菌的製造

1-1-2 自動培養装置による製造方法

1-1-3 消耗品類の変更

1-2 評価方法の検討

1-2-1 マイコプラズマ試験に関する背景・目的

1-2-2 無菌試験に関する背景・目的

2 本事業の検討過程

2-1 製造工程の検討

2-1-1 アイソレータによる無菌的製造に関する検討過程

2-1-2 自動培養装置による製造方法に関する検討過程

2-1-3 消耗品類の変更に関する検討過程

2-2 評価方法の検討

2-2-1 マイコプラズマ試験に関する検討過程

2-2-2 無菌試験に関する検討過程

3 本事業の結果

3-1 製造工程の検討

3-1-1 アイソレータによる無菌的製造に関する検討結果

3-1-2 自動培養装置による製造方法に関する検討結果

3-1-3 消耗品類の変更に関する検討結果

3-2 評価方法の検討

3-2-1 マイコプラズマ試験に関する検討結果

3-2-2 無菌試験に関する検討結果

4 本事業の総括と今後の展望

4-1 製造工程について

4-1-1 アイソレータによる無菌的製造

4-1-2 自動培養装置による製造方法

4-1-3 消耗品類の変更

4-2 評価方法について

4-2-1 マイコプラズマ試験

4-2-2 無菌試験

5 参考資料

5-1 製造工程の検討に使用した機材・消耗品類一覧

5-1-1 アイソレータによる無菌的製造

- 5－1－2 自動培養装置による製造方法
- 5－1－3 消耗品類の変更
- 5－2 評価方法の検討に使用した機材・消耗品類一覧
 - 5－2－1 マイコプラズマ試験
 - 5－2－2 無菌試験
- 5－3 独立行政法人医薬品医療機器総合機構との対面助言の結果
- 5－4 有識者委員会概要
 - 5－4－1 有識者委員会委員名簿
 - 5－4－2 第1回委員会概要
 - 5－4－3 第2回委員会概要
- 5－5 参考文献

1 本事業の背景・目的

1-1 製造工程の検討

1-1-1 アイソレータによる無菌的製造

最終滅菌の出来ない細胞医薬品の無菌操作工程を担保するため、アイソレータを用いた製造方法を検討する。まず札幌医大が既に設置されている市販のアイソレータを使用し、治験薬製造を模擬的に実施する。これにより細胞医薬品の無菌製造工程について、量産を想定した際の課題点を抽出し、量産設備に要求される仕様を検討する。

1-1-2 自動培養装置による製造方法

細胞医薬品の量産設備として、現在当社が開発しているバッグ型自動培養装置が将来的に適用可能かどうかの可能性を検討するため、今年度は培養バッグを使用したマニュアル培養の評価を行い、骨髄由来の細胞がバッグ培養可能かを検討する。

1-1-3 消耗品類の変更

再生医療製品の製造に使用されている培地、試薬やディスプレイ製品については、研究用として販売されている市販品であり、海外メーカーの製品が多く使用されている。再生医療製品は GMP 管理下で製造されることから、原材料や使用機材はトレーサビリティがとれ、かつ安全性等が担保されていることが重要である。また安全性や製造方法に係る様々なデータ等が細胞医薬品の製造者に明示されることも必要である。しかし、現在使用されている培地、試薬及びディスプレイ製品は、製造方法、安全性データなどの必要な情報が入手できないこともあり、承認申請などの際に支障となる場合もある。特に海外メーカーの製品では必要な情報の入手が難しいことが多い。よって、これらの消耗品については、トレーサビリティがとれ、安全性が担保された製品への変更を検討していく。特に、ディスプレイ製品は、医療機器の安全性と品質レベルのものを検討していく。

1-2 評価方法の検討

1-2-1 マイコプラズマ試験に関する背景・目的

マイコプラズマ否定試験法としては、A 法(培養法)、B 法(指標細胞を用いた DNA 染色法)および C 法(ポリメラーゼ連鎖法(PCR)による検出法)が日本薬局方で規定されている

しかしながら、A 法は試験に要する検体量が 20mL 以上であり、また培養期間も少なくとも 28 日間かかる。B 法はマイコプラズマを Vero 細胞に感染させて増殖させる為、準備から判定までに 2 週間以上が必要となる。またいずれの試験でも常に生育菌を使用することから、試験施設の汚染拡大防止のために取り扱いに注意が必要であり、専用の施設が必要となる。一方で C 法は nested PCR 法により目的のマイコプラズマ DNA を増幅し、アガロースゲル電気泳動により分離することで、マイコ

プラズマの検出を行う方法であるが、検出感度があまりに鋭敏である為に、偽陽性が出やすいといった問題がある。また、C法は電気泳動による定性的な試験方法である。自己細胞を原料とした細胞医薬品の場合、患者由来のマイコプラズマが持ち込まれる可能性も否定出来ない。このようなケースなども考慮し、よりの確に対応するために定量性のある試験方法が好ましい。

そこで、局方に定められた試験法以外の検査方法を調査し、使用評価を行う。

また、細胞医薬品の場合、最終製品の液中に細胞の保存性を維持するため様々な試薬等が添加されることが予想される。例えばジメチルスルホキシドのような凍害保護剤などが挙げられる。これらの試薬が検査において阻害因子となる可能性が考えられる。そこで最終製品に添加される可能性の高い凍結保存用の試薬が、検査試験にどの程度影響を及ぼすかの確認を実施する。

1-2-2 無菌試験に関する背景・目的

自己の細胞を原料とする細胞医薬品は、製造できる細胞数に限りがあり、また製造した細胞を出来る限り治療に使用することが望まれている、よって最終製品の検査は出来る限り少量にすることが要求されている。しかし局方に定められた無菌試験法は、例えば1mL以上40mL以下の液剤に対しては半量（最低1mL以上）が最小必要量である。自己細胞を使用した細胞医薬品において半量を無菌検査だけに使用することは現実的ではない。しかし単純に検査量を減らすことは、検出感度が現行法よりも低下することが推測される、そこで、細胞培養工程中に使用した培養液や洗浄液を出来る限り試験することで、無菌試験として補完することは有用であると考えられる。一回の工程で試験に使用する培養液や洗浄液の量は、培養する細胞の数によって異なるが、自己細胞を使用する場合は、1工程で数リットル廃棄される。数リットルの廃液を既存の無菌試験用フィルターセットで試験するとフィルターが詰まる恐れがある。そこで、本件では、工程で廃棄される培養液や洗浄液をメンブランフィルター法で無菌試験を実施できる手法の開発を目的とする。

2 本事業の検討過程

2-1 製造工程の検討

2-1-1 アイソレータによる無菌的製造に関する検討過程

現在、札幌大が保有している Panasonic 社製アイソレータ(2013 年 札幌医科大学納入)を使用して、実際の治験薬製造工程の培養細胞の回収と製品容器への充填作業を実施した結果、ワーキングスペースやインキュベータの容量不足といった課題が挙げられた。特にワーキングスペース不足についてはディッシュなどの物品がかなりの面積を占有しており、実際の培養操作を行う際に、作業スペースを確保するために物品を移動させる時間が余分にかかることから、作業時間が標準時間に比較して 1.5~2 倍の時間を要した。また培養作業を行うスペースと使用前の物品と使用後の物品をエリア別に整理出来ないことから、GMP や無菌操作上も課題であると考えられる。よって、専用のアイソレータを開発する必要があると判断された。

2-1-2 自動培養装置による製造方法に関する検討過程

将来的に弊社が開発しているバッグ型自動培養装置の適用が可能かどうかを検討するため、まず現状使用しているプラスチックディッシュと培養バッグでヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の培養評価を実施した。

2-1-3 消耗品類の変更に関する検討過程

細胞医薬品製造に適した消耗品として、製品容器、ディッシュ、遠沈管、パストゥールピペット、培地、等について、変更の検討を行った。

2-2 評価方法の検討

2-2-1 マイコプラズマ試験に関する検討過程

マイコプラズマ試験方法として、迅速かつ少量サンプルで測定可能な方法を調査した。その結果、ライフテクノロジーズ社の MycoSEQ 法が候補となった。この方法を用いて試験評価を実施した。また同時に、細胞を凍結する際に添加する試薬が増幅効率に影響を与えるかどうかを確認した。

実験1 添加試薬による増幅工程への影響の検討

下記の試験液に *Mycoplasma hyorhinis* ATCC® 17981D を添加し検討した。凍結保存液としては、臍帯血や末梢血幹細胞の保存などに用いられているジメチルスルホキシド(DMSO)、デキストラン、血清、培地の混合液とした。

・試験サンプル条件

条件1 保存液

条件2 10倍希釈保存液

条件3 水

条件4 ネガティブコントロール

各条件において MycoSEQ による *Mycoplasma hyorhinis* ATCC® 17981D の定量を行う。

実験2 凍結保存液中の各成分が増幅工程に及ぼす影響の検討

凍結保存液中の成分ごとに増幅阻害実験を行い、どの成分が増幅反応に影響を与えているのかを検討する。

・試験サンプル条件

条件1 血清

条件2 培地

条件3 1%デキストラン

条件4 10%DMSO

条件5 水

各条件において MycoSEQ による *Mycoplasma hyorhinis* ATCC® 17981D の定量を行う。

2-2-2 無菌試験に関する検討過程

工程内試験として、培養に使用した培養液について、局方のメンブランフィルター法による無菌試験を実施した。その結果、培養液数百 mL を流したところで、フィルターが目詰まりを起こした。これは培養中に発生した細胞の死骸や析出物などの影響によるものと推測された。そこで、これらの浮遊物を除去する方法を検討した。除去方法は無菌試験の検出感度を著しく低下させてはならない。特に菌数を大きくロスすることがあってはならない。これらの点も考慮し、目詰まりを防ぎつつメンブランフィルター法による無菌試験を可能とする方策を検討した。

3 本事業の結果

3-1 製造工程の検討

3-1-1 アイソレータによる無菌的製造に関する検討結果

既存のアイソレータによる細胞医薬品の回収工程を模擬的に実施した。結果を下記に示した。

	アイソレータ使用
細胞回収・製品容器充填 に要した時間	標準時間の1.5～2倍

作業時間については、標準作業時間の1.5～2倍の時間を要し、また作業スペースと物品スペースとの区分けが出来ない。これにより気流の乱れなども予想されることから、無菌製剤の製造環境としては適さないことが判明した。物品の設置スペースについては、棚などの設置などで作業スペースとの区分けを検討したが、絶対にワーキングスペースが不足しており、改善に至らなかった。

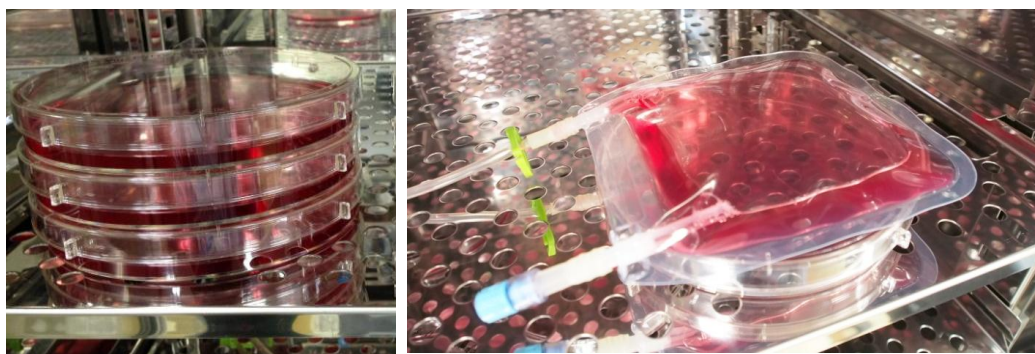
そこで、上記の得られた課題点を踏まえて細胞医薬品製造へ対応できる専用アイソレータの設計に着手した。

以前、札幌医大が規制当局と行った対面助言にて、細胞医薬品の治験品製造工程について、可能であればアイソレータを使用した製造方法を検討することが望ましいとの提案を受けられている。そこで、市販の細胞培養用アイソレータの使用を検討したが、様々な課題があり、専用のアイソレータの開発が必要であると考えられる。アイソレータの仕様確定、テスト製造などの結果をもって、規制当局に協議する必要があると考える。

3-1-2 自動培養装置による製造方法に関する検討結果

将来的にバッグ型自動培養装置を使用することを考慮し、培養バッグの細胞増殖性能評価を実施した。

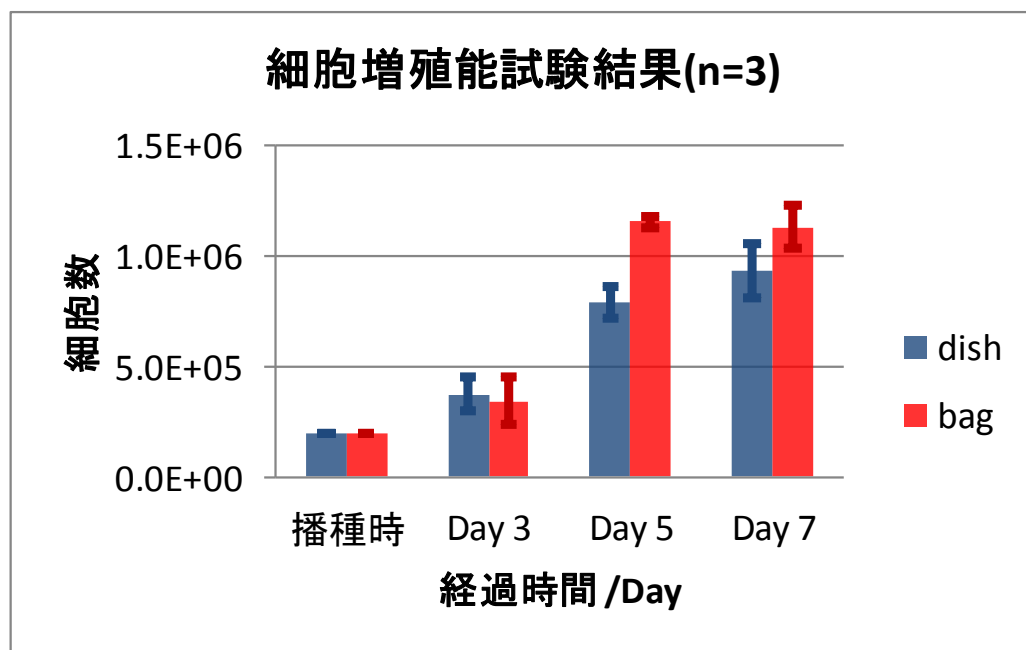
まず、既存のプラスチックディッシュと試作した培養バッグによる比較を行った。培養7日目の細胞を回収し、総細胞数を測定した。結果を下記に示した。



	ディッシュ培養	バッグ培養
	Day7	Day7
n=1	100%	130%
n=2	100%	117%
n=3	100%	118%
Ave	100%	122%
S.D.	–	7.5%

プラスチックディッシュから得られた細胞数を 100%として、培養バッグで得られた細胞数を比率で示した。これらの実験から、培養バッグはプラスチックディッシュと比較して遜色ない増殖性能を有することが示唆された。

更に、培養日数によって、プラスチックディッシュと培養バッグで細胞増殖性能の比較を行った。培養開始から 3, 5, 7 日目の増殖を下記に示した。

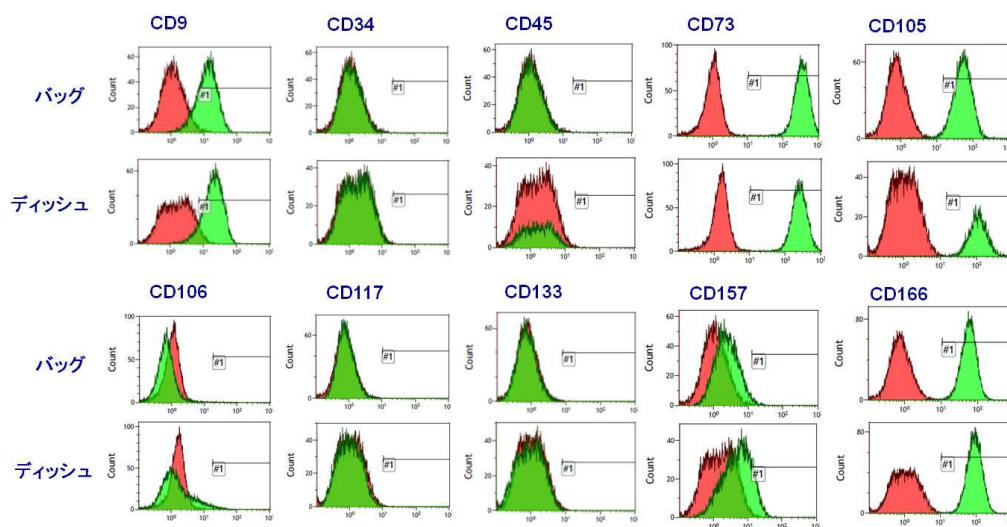


培養日数による検討の結果、ほぼディッシュと培養バッグに大差ないことが示唆された。今回の実験では培養バッグは培養 5 日目に既にピークを示す結果となった。

以上の結果から培養バッグは細胞の増殖性能はディッシュと比較して同等であることが示唆された。

次に、培養した細胞の性状を検討するためにフローサイトメトリー解析を実施した。

結果を次頁に示す。培養7日目に回収した細胞についてディッシュと培養バッグの結果を比較した。

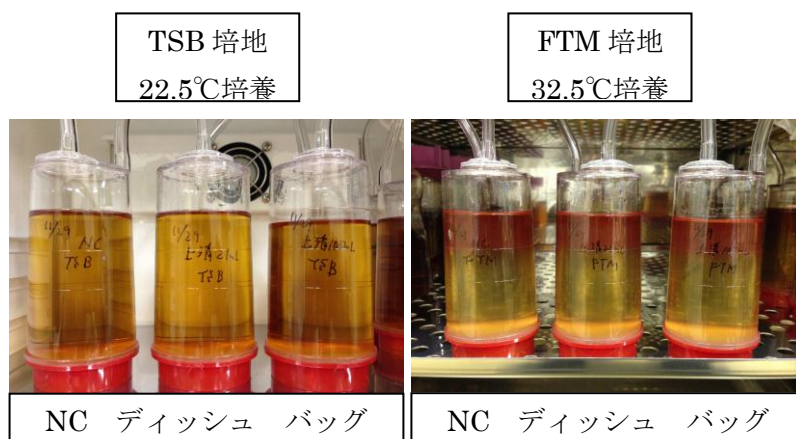


(赤: IsotypeControl, 緑: 図中の抗体染色)

※上記測定に使用した抗体は Honma T, Honmou O, Iihoshi S, et al. Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Exp Neurol*. 2006;199:56–66.を参照した

図中の赤色のヒストグラムは IsotypeControl で緑色のヒストグラムはそれぞれ図中の抗体で染色したものである。一部バッグ培養で得られたピークがディッシュより若干シャープな印象があるが、これは実験の都合上、測定に使用した細胞数が少ない際にややピークがブロードになっているもので、どちらも $CD9^+CD34^+CD45^+CD73^+CD105^+CD106^+CD117^+CD133^+CD157^+CD166^+$ の細胞であり、表面抗原の発現に大きな差異は認められなかった。

培養期間中に菌汚染がなかったかを確認するため、培養上清による無菌試験を実施した。ディッシュ培養及びバッグ培養をそれぞれ3継代繰り返した細胞の培養上



清について、メルク社製ステリテスト EZ ユニットを用いて無菌試験を実施した。

培養上清の無菌試験の結果から、菌の発育を認めなかった。

以上の実験結果から、間葉系幹細胞の培養にバッグ型培養容器が使用できる可能性が示唆された。実際の製造への適用については、更に細胞の評価を進め、また実製造に適したバッグの仕様を検討する必要があると考えられる。

3-1-3 消耗品類の変更に関する検討結果

細胞医薬品製造に使用する消耗品等について、今年度は製品容器について開発に着手し、形状見本の試作を行った。

形状見本を用いた操作性に関する検討を行った結果、投与の際の作業性を向上するため、更に形状変更が必要との意見があった。現在、金型等の作製を進めている。規制当局から製品容器は、薬との相互反応など安全性を十分確認すること及び製品と品質試験サンプルが均一であることが求められており、今後、容器形状が決定次第、安全性や均一性などのデータを取得していく。

培地試薬類については、今期は培地について（株）細胞科学研究所と協議し専用品の試作を協議している。グレードAの無菌性をより向上し、安全性を高めるため、グレード毎に包装を外から順に除去可能な多重包装の培地試作について検討を行っている。今期は包装部材の選定や製造工程の準備が出来なかったため、試作評価までには至っていない。今後、継続検討する必要がある。

培養ディッシュについて、製造環境の無菌性向上のため多重包装、滅菌製品の検討を国内メーカーと行い、多重包装品の試作を行った。

市販品 一重包装



試作品 多重包装



多重包装により、グレードが変わる際に包装を外から順番に除去し、作業環境に搬入できる。これによりグレードAの作業環境の汚染を低減し、無菌性を向上させることができると考えられる。この多重包装滅菌した培養ディッシュを用いた培養シミュレーションでは、現時点で特に問題はなかった。また培養試験では下記に一例を示すが、既存製品と多重包装品で培養後の細胞数に大きな差はなかった。これらの結果から、更に試験を継続するが、準備が整備出来れば、製造に使用できるものと考えられ

る。

培養結果	回収総細胞数	培養シュミレーションによる操作性
多重包装	4.3x10 ⁷	グレード毎に外側から包装を除去して搬入するので簡便
既存製品	4.4x10 ⁷	消毒剤による清拭が必要で面倒

試薬類として酵素類の内製化を検討した。まず医薬品レベルの原薬入手について調査を行い、供給可能な原薬メーカーを調査した。原薬サンプルの入手について協議中である。今後、試作を実施し、機能や安全性等について評価する必要がある。

その他の消耗品についても、承認申請時に製造方法等の情報開示が求められる可能性もある。また産業化した後も、トレーサビリティや安全性の情報などが必要であることから、専用品の開発を含め必要と考えられる。

3-2 評価方法の検討

3-2-1 マイコプラズマ試験に関する検討結果

まず、マイコプラズマ否定試験について PCR 法に関する調査を実施した。結果を下記にまとめた。

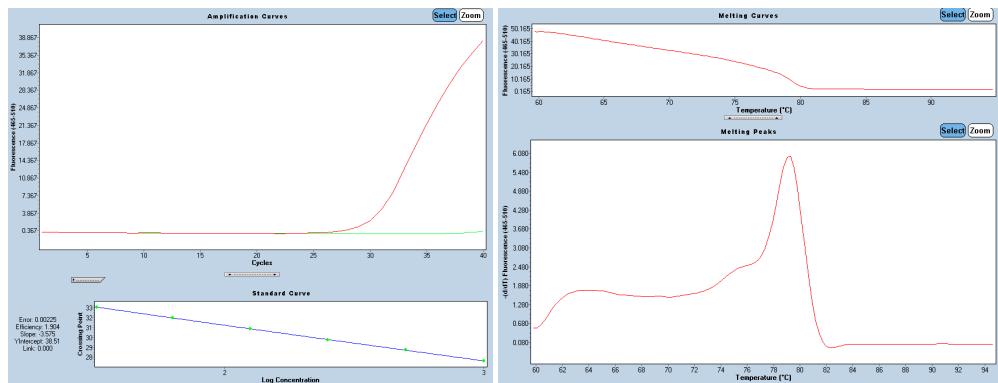
項目	C法(PCR法)	MycoTOOL	MycoSEQ
測定原理	2段階PCR	2段階PCR	Realtime PCR
判定までの時間	1日で判定可能 (約10時間)	1日で判定可能 (約10時間)	1日で判定可能 (5時間以内)
試験検体量	600μ L	1mL	100μ L
性能	定性的 ※偽陽性が出やすい	定性的	定量的
対応菌種	3種	ほぼ全菌種	ほぼ全菌種
認可等	日本薬局方収載	EMAおよびFDAで認可 日本薬局方も収載予定	欧州薬局方に準拠

調査の結果、使用に適した市販の検査キットとしてロシュ・ダイアグノスティックス社の MycoTOOL とライフテクノロジーズ社の MycoSEQ 法の 2 製品が挙げられた。

これらを比較したところ、試験検体量が少なく、定量的に測定可能な MycoSEQ 法を候補として検討することとした。

まず、局方に収載されている C 法と MycoSEQ でそれぞれ測定を実施し比較を行った。以下に結果を示す。

MycoSEQ 法による測定結果



検量線による増幅曲線の定量

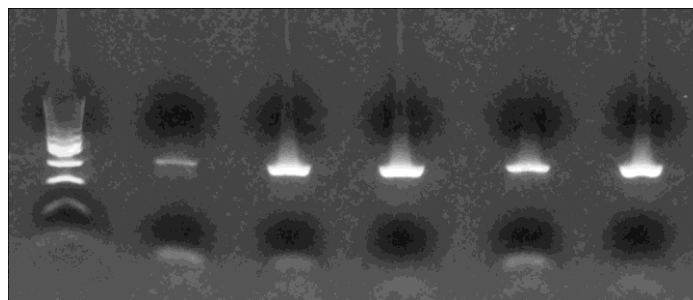
融解曲線

Cp値 ※増幅曲線が立ち上がる時のサイクル数	融解温度(°C)	定量されたコピー数 (copy/μL)	判定結果
30.33	79.2	177	+

サンプル濃度 (copy/ul)	陽性率 (%)
0.5	100
0.25	60
0.125	50
0.0625	30
0.0312	20
0.0156	20

C 法によるマイコプラズマ否定試験結果

100bp Ladder	2ndPCR ネガティブ コントロール	0.75 copy/ul	0.325 copy/ul	0.16 copy/ul	0.08 copy/ul
-----------------	---------------------------	-----------------	------------------	-----------------	-----------------

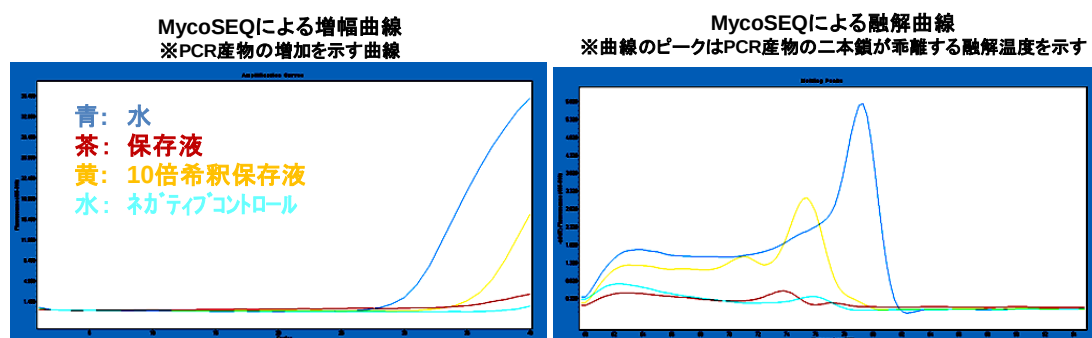


MycoSEQ 法はプロビット解析の結果、95%検出感度は $0.45\text{copy}/\mu\text{L}$ であった。一方で C 法については、今回プロビット解析までは実施しなかったが、予備試験の結果では、最も低い濃度の $0.08\text{copy}/\mu\text{L}$ の試験液でも陽性であった。この結果から nested PCR である C 法の方が高い検出感度であると考えられる。しかしながら C 法では、偽陽性が検出されたケースが認められた。また C 法は 2 段階で PCR をかけるため定量的な測定は難しいが、MycoSEQ では定量性をもった測定が容易に可能であった（コピー数 $177\text{copy}/\mu\text{L}$ ）。

自己細胞を原料とする細胞医薬品の場合は、原料由来のマイコプラズマ汚染の可能性が否定出来ないことから、臨床試験で得られた有害事象なども加味して検討するためにも、定量性をもった MycoSEQ 法は、細胞医薬品製造において合理的な評価手法と考えられる。

今後、C 法の代替法として、製品の出荷試験に適用可能かについては、更に比較試験などを継続していき、規制当局との協議が必要であると考えられる。

次に、MycoSEQ 法を用い、*Mycoplasma hyorhinis* ATCC® 17981D を水、細胞保存液（DMSO、デキストラン、血清、培地の混合液）、10 倍希釈した細胞保存液にそれぞれスパイクし、核酸増幅工程において、反応阻害などがないかを検討した。結果を以下に示す。



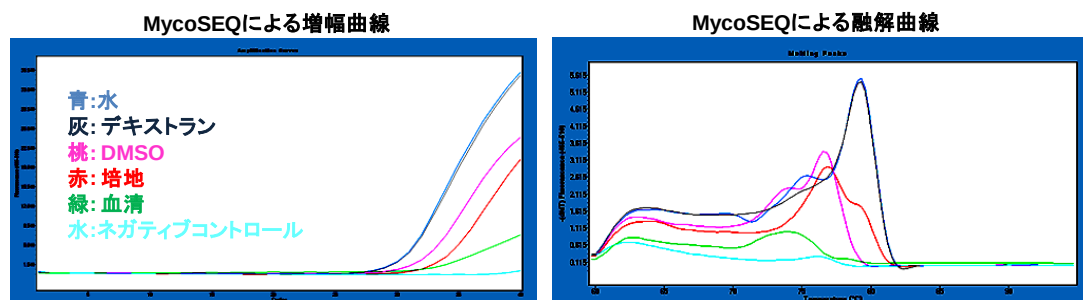
試験液	Cp値 ※増幅曲線が立ち上がる時のサイクル数	融解温度(℃)	定量されたコピー数 (copy/ μL)	判定結果
水	30.5	79.3	148.4	+
10倍希釈 保存液	35.0 *	75.8	N.D.	-
保存液	35.0 *	N.D	N.D.	-

*Extrapolated concentration in standard curve (n=5)

これまでの結果と同様、水では定量的に測定が可能であった。一方で、保存液、10 倍希釈保存液ともに、増幅阻害が認められた。

この結果から、増幅工程に影響している阻害物質を検討するため、これらの液中の

それぞれの成分について、同様の試験を行った。結果を下記に示す。



試験液	Cp値	融解温度(°C)	定量されたコピー数 (copy/μL)	判定結果
水	30.5	79.3	148.4	+
デキストラン	30.6	79.3	137.2	+
DMSO	32.0	76.6	51.5	+/-
培地	33.3	65.5 77.4	21.1	-
血清	33.9	74.7	13.8	-

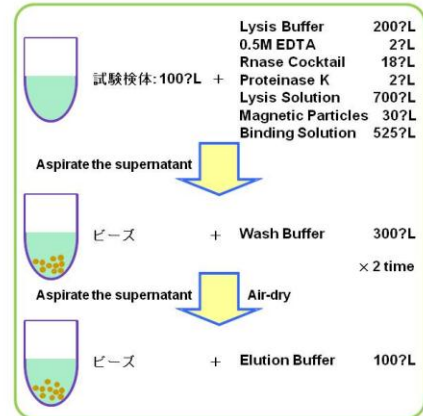
(n=5)

試験結果から、水、デキストランでは定量的な測定が可能であった。しかし、それ以外の成分(DMSO, 血清, 培地)では Cp 値と融解温度の結果から、増幅反応を阻害することが示唆された。阻害機序については明確ではないが、液中に含まれる金属イオンや酵素、添加成分と核酸との親和性などがポリメラーゼ反応に影響しているものと考えられる。

では、実際にこれらの成分が、測定作業で盛り込まれる可能性を検討した。作業手順と希釈について下記に検討した。

増幅反応への持ち込み量検討

試験検体を100%、吸引後の残留液量を10μL、風乾後の残留液量を5μLと仮定(ワーストケース)



※細胞保存液の増幅反応への持ち越しは、ほぼ無いと言える

実際の測定では、PCR 反応の前に DNA/RNA の抽出作業において複数回の遠心操作やカラム分離作業が行われることから、計算上はPCR 反応に持ち込む量は0.00033%程度と考えられる。よって、実際の測定に試薬による阻害反応は問題ないものと考えられる。手作業による検査である場合は、作業者に十分注意喚起する必要がある。また自動検査などを検討する場合、検査機器の構造によっては、阻害成分の持ち込み量が多くなる可能性もあることから、注意が必要と考えられる。

以上のことから、MycoSEQ 法は C 法よりも検出感度がやや低い傾向があるものの、定量性や迅速性、少量検査が可能といった点で代替法の候補として十分可能性のある試験方法と考えられる。特に、自己細胞を原料とするオーダーメイド型の細胞医薬品では、原料由来の汚染がありうることもあり、定量的に試験できる点は有用であろう。今後は、試験を継続し臨床的な意見も考慮して、規制当局とも検討していく必要があると考えられる。

3-2-2 無菌試験に関する検討結果

オーダーメイド型の細胞医薬品は、製造できる量が限られていることから無菌試験に使用できる検体量は局方で定められた十分量がサンプリング出来ない可能性がある。一方で細胞医薬品は最終滅菌出来ないことから、製造全般にわたり無菌操作による製造を行わなければならない。また製造に使用する試薬や環境温度は、菌が繁殖し易いこともあり、厳重な管理が必要となる。その管理の一助として、製造に使用した培地

や洗浄液について無菌試験を実施することが有用である。しかしながら培養上清には、細胞の死骸や析出成分などもありメンブランフィルター法で無菌試験を行うと数百 mL で目詰まりを起こしてしまう。

そこで、製造に使用した培地や洗浄液について、目詰まりを防ぎつつメンブランフィルター法による無菌試験が可能な方策の検討を実施した。今回は異物の除去方法について検討を行った。検討の結果、目詰まりを抑えて試験に使用できる培地量は、細胞の培養状態により異なり、安定した結果が得られなかった。なぜ濾過量が安定しないかについては、原因は定かではないが、培養する細胞の状態や、試験に使用する培地の保存状態によると考えられる、今後、実験を継続する必要がある。

4 本事業の総括と今後の展望

4-1 製造工程について

4-1-1 アイソレータによる無菌的製造

以前に札幌医科大学が実際した対面助言にて、アイソレータ等のグレード A に人が介在しない設備が推奨されていることから、今事業では、その整備の一環として、既存のアイソレータによる製造を試みた。既存のアイソレータでは、作業スペースが不足していることなどから、産業化のためには専用アイソレータの開発が必要であることがわかった。これら設備の仕様や運用方法については、今後、規制当局との連携が必要であると考えられる。

4-1-2 自動培養装置による製造方法

細胞医薬品の品質安定化のためには、自動化培養は有用であると考えられる。今年度は、将来的に当社が開発中のバッグ型自動培養装置の使用を視野に入れ、まずは培養バッグにて骨髄由来間葉系幹細胞が培養可能かを手培養で確認した。増殖性や表面抗原解析の結果からは、良好な結果が得られ、バッグ培養が製造に使用出来る可能性が示唆された。しかしながら、培養容器は長時間細胞に接触する容器であることから、切り替えには十分な検証が必要と考えられる。また自動化に至っては製造方法が大きく異なることから、製造した医薬品の同等性を示さなくてはならない。これらの点については規制当局との連携が必要であると考えられる。

4-1-3 消耗品類の変更

現状の細胞医薬品製造には、市販の消耗品が使用されているが、専用の設計でないことから製造効率の点や、滅菌性の点で課題がある。また医薬品としての承認申請には、使用する消耗品や試薬類の安全性などの情報や原材料受け入れ時に必要な情報も必要だが、これらが製造元より円滑に入手可能でなければならない。そこで消耗品について、専用のものへの変更を含め検討した。特に製品容器については事前相談において、薬品への溶出物が影響ないかや製品と試験サンプルの同等性確認について確認

していくことが必要との意見があり、専用容器を開発していくこととなった。今後規制当局と相談を進めていく必要があると考えられる。

4－2 評価方法について

4－2－1 マイコプラズマ試験

マイコプラズマ試験の調査結果から、ライフテクノロジーズ社の MycoSEQ 法を候補として検討を行った。細胞保存液として一般的に用いられる試薬が、PCR 反応を阻害することが判明したが、反応前に十分除去することを心がければ適用可能な合理的評価方法である可能性が示唆された。今後、局方に収載された方法と比較して検討を継続して、規制当局とも十分な議論を行っていく必要がある。

4－2－2 無菌試験

製造に使用した培地や洗浄液を無菌試験することは、品質管理、衛生管理上に有用な方法と考えられる。今年度はその方策を検討するため、デバイスの試作を実施した。今回は十分な性能をもった方法まで達成することは出来なかったが、今後このような方策が合理的な評価手法として妥当かどうかを規制当局とも議論していく必要があると考えられる。

5 参考資料

5-1 製造工程の検討に使用した機材・消耗品類一覧

検討項目	使用機器・機材
5-1-1 アイソレータによる無菌的製造	・パナソニックヘルスケア(株)製アイソレータ 閉鎖型細胞調製システム CPWS (Cell Processing Work Station)
5-1-2 自動培養装置による製造方法	・ベックマンコールター(株)製 Navios フローサイトメータ ・各種 FCM 用抗体 ・メルク(株)製 ステリテストエキノクスポンプ ・プラスチックディッシュ ・試作培養バッグ ・各種試薬類(培地、血清等)
5-1-3 消耗品類の変更	—

5-2 評価方法の検討に使用した機材・消耗品類一覧

検討項目	使用機器・機材
5-2-1 マイコプラズマ試験	・ロシュ(株)製 リアルタイム PCR システム Lightcycler 480 ・ MycoSEQ™ Mycoplasma Detection System ・ <i>Mycoplasma hyorhinis</i> ATCC ® 17981D
5-2-2 無菌試験	・メルク(株)製 ステリテストエキノクスポンプ ・メルク(株)製 ステリテスト EZ ユニット

5-3 独立行政法人医薬品医療機器総合機構との対面助言の結果

昨年1月に共同連携先である札幌医科大学が実施した対面助言において下記の指摘を受けた。

「アイソレータ等のグレード A の要求エリアに人が介入しない設備での製造を推奨する」(戦P31 抜粋)

以上の指摘より、製造について、無菌性を向上するためにアイソレータの使用を検討した。

また、昨年8月に実際された札幌医科大学の事前相談においては、製品容器について、容器から薬剤への溶出が影響ないこと、製品と試験に使用するサンプルが均一であることなどを留意するよう助言があったと認識している。これに基づき、専用の製品容器の開発に着手した。

5-4 有識者委員会概要

5-4-1 有識者委員会委員名簿

大学名	所属・役職	氏名
国立大学法人 東北大学	未来科学技術共同研究センター 教授	後藤 昌史
国立大学法人 大阪大学	大学院工学研究科生命先端工学専攻生 物プロセスシステム工学領域 教授	紀ノ岡 正博

5-4-2 第1回委員会概要

各委員と別々の開催となった。下記に概要を示す。詳細は会議報告書参照のこと。

日時 : 平成26年1月30日(木) 13:00~15:00
 場所 : 東北大学未来科学技術共同研究センター会議室
 会議内容 : 経済産業省委託事業「再生医療等産業化促進事業」
 平成25年度 有識者会議
 参加者 : 後藤教授
 ニプロ(株) 吉川、舘山、宮崎

① アイソレータによる無菌的製造に関する検討

番号	先生からのご質問およびコメント	ニプロの回答
1	アイソレータは新規なのか、現行機の改造なのか。	専用機の製作を考えており、現在各メーカーと打ち合わせを実施中。
	医薬品製造専用アイソレータについては、需要もあり画期的である。	
2	培養の容器はディッシュで行っているが、これは酸素透過性などの理由からなのか。フラスコでは駄目なのか。	我々が参加した時には、ディッシュを使用することが既に決定されていた。
	大量なので、フラスコ培養やバッグ培養の方が、コンタミリスクが減ると考えられる。	培養容器変更に関しては産業化の際には、検討したい。

② 自動培養装置による製造方法に関する検討

番号	先生からのご質問およびコメント	ニプロの回答
1	この自動培養装置は実用化しているのか。	産業用自動培養装置は、顧客の要望を聞きながら監視装置等を取り付ける必要があり、実用化を進めている段階。実験用としては、販売することを計画している。
2	培養中での培地交換は可能か。 培地交換の際は傾けたりしているのか。	可能です。バッグなので傾けたりするなど、色々と出来るのが特徴です。

3	表面抗原マーカーが同様に発現していたとしても、実際に細胞が機能することが重要であるため、トロフィックファクターのサイトカインやグロースファクターの発現など、もっといろいろな指標を調査する必要があり、本当に必要な細胞が出したタンパク質が変わらないというデータが必要となる。 培養した細胞の同等性を示すことはとても難しい。例えばディッシュの表面コーティング等の特別な処理をしていないのであれば、バッグの素材等が細胞に悪影響を及ぼさないといった、特に大きな作用を与えない様なデータを示すのも製造の同等性を言う上では有効であろう。これらは早い段階から PMDA に事前相談等で相談する等、責任の所在を投げかけると良い。	ご意見を考慮し、今後の検討を進める。
---	---	--------------------

③ 消耗品類の変更にに関する検討

番号	先生からのご質問およびコメント	ニプロの回答
1	(事業に直接関係する質問はなかった)	

④ マイコプラズマ試験に関する検討

番号	先生からのご質問およびコメント	ニプロの回答
1	判定に時間がかかるという問題に対して、判定後に検出された場合、抗生剤等に対応することが海外では実施されているが、この対処法について問題か。	考え方の問題で、医師が実施する医療行為と、薬事法下における細胞医薬品は異なっており、当然ながら医薬品中は無菌であることが当然という風に考えられる点が難しい。
	一度、PMDA に確認取っておくことも一つの手かも知れない。	考慮させていただきます。
	新法になった時に、再生医療の現場と踏まえて臨機応変に対応できるべき。	新しい方法として市場にある物で使えるものがあるかを検討するのも大事だと思う。
2	迅速法だとどの程度の時間で判定が出来るのか。	日局 C 法だと約 10 時間で判定可能であり、SEQ 法だと約 5 時間で判定可能である。 但し、生死の区別はできない。

⑤ 無菌試験に関する検討

番号	先生からのご質問およびコメント	ニプロの回答
1	試作デバイスについては、コロンプスの卵みたいで、言われてみれば単純だがなかなか思いつかないという点で素晴らしい。	

日時 : 平成 26 年 1 月 31 日 (金) 13 : 00～15 : 00

場 所 : 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻
生物プロセスシステム工学領域 会議室

会議内容 : 経済産業省委託事業「再生医療等産業化促進事業」
平成 25 年度 有識者会議

参加者 : 紀ノ岡教授
ニプロ (株) 吉川、舘山、宮崎

⑥ アイソレータによる無菌的製造に関する検討

番号	先生からのご質問およびコメント	ニプロの回答
1	産業化アイソレータを考える上で重要なのは、一つにバリデーションが丁寧にとれるかどうかの問題になってくる。 コンタミネーションする可能性のある物質を入れた場合に、どうやって無菌環境を維持しているという根拠をどうやってするのかというのを、浮遊微粒子管理でいいのかというのが議論となる。	
2	チェンジオーバーの考え方として、現状、除染で良いのか、どこまで除染するのかという文書もなく、通常は Log で算出するが、本当に 6 必要かという点も議論が必要となる。数字より実運用が正しいので、バリデーションは注意が必要となる。ガイドラインでは数字を出さず、将来、過酸化水素以外の方法が出てきた際のために、消毒の方法も残している。導入やチェンジオーバーの部分について、経産省を含めて(次世代医療機器研究開発委員会)ガイドラインを作成しているところなので、一度確認して作ろうとしている SOP と擦り合わせて、議論しておいた方がよい。この文書は概念的な部分なのでオープンな情報であり、委員会に連絡すると(産総研の廣瀬先生)、閲覧させて頂けると思う。	我々も出来るだけ簡易的な方法で、除染できる方向にしていきたいと考えております。
3	手作業から自動化するに際し、互換性(製造なので同等性評価に相当)とはという議論の前に、こういう考え方で互換性が取れているのかといった指針がないと厚労省に持っていけない。最終会議が終わって、これから報告書をまとめているところなので、一度、確認した方がよい。	参考にさせていただきます。

4	(ニプロから「アイソレータをグレード C に置こうと思っているが、グレード B に設置する様な規制がかかることになる可能性があるという噂を聞いたが、どうですか」という質問に対して) 良く議論になる点で、ISO の観点から言うとグレード C となっているが、議事録ではグレード D となっている。但しグレード D に置くとなると悪い環境中に置くことになるのでバリデーションが困難となるため、一般的にグレード C に置いているという実状がある。製薬会社でグレード B に置いているところは大ロットにおける回収のリスクマネジメントを意識しているが、再生医療の培養は 1 検体 1 患者なので、出口の回収のリスクは低いからグレード B に置く必要性はないと思う。 封じ込めの概念からすると、検体の患者さんがどういう感染症を持っているかで変わるが、厚労省の佐々木先生の文書(無菌製剤製造に関する文書)に記載されているが、基本的にはバイオセーフティレベル(BSL)2 であると言える。BSL2 は危険性が少ないため、一般的には封じ込めとは言わない。 感染症研究所のクラス分けに準じるとほとんど BSL2 であるので、重症な患者さんでない限り、グレード C で良いと思う。	我々もグレード C で良いと思っています。
---	---	-----------------------

⑦ 自動培養装置による製造方法に関する検討

番号	先生からのご質問およびコメント	ニプロの回答
1	手動のアイソレータから別の部屋の自動のアイソレータに移動する際に、移動式の搬送機を作っており、手動のアイソレータから細胞や試薬等を搬送し、自動のアイソレータに無菌接続をして、自動アイソレータからアームが出てきてアイソレータ内に導入する方式の開発をやってきた。 アイソレータの場合、外のマシンとの接続が難しいので、どう繋ぐかということを問題意識として考えておいて欲しい。	参考にさせていただきます。
2	グレード C または D の部屋で良いので、大きな部屋で出来るので、複数台並べて使用することができ、日ごとに切り替えながら使用するといった方法が出来るようになる。但し、接続したり離したりする際に、どうやってバリデーションの取り方が難しい。	メーカーの立場から言うと、個々に繋いでバリデーションの方が品質保証しやすい。
	バリデーションの方法は意識しておいた方が良い。	参考にさせていただきます。

⑧ 消耗品類の変更に関する検討

番号	先生からのご質問およびコメント	ニプロの回答
1	治験中に変更する場合、培養容器の変更については無理なのではないかと思われる。作成中のガイドラインにも、互換性の観点から、容器を変更する場合、細胞に直接触れており、増殖を変えたりする可能性があるため、何を持って変更するかは良く検討する様にと記載している。	治験中に大きく変更するつもりはなく、また製品容器なども取り扱い易いように形状を改良する必要があり、直ぐに変更は実際できない。

⑨ マイコプラズマ試験に関する検討

番号	先生からのご質問およびコメント	ニプロの回答
1	細胞自体を見るのか、上清を見ているのか。	局方 C 法だと上清を試験します。
2	上清を見る場合、どれだけの量サンプリングすれば良いのかを PMDA と議論する必要がある、全量見る必要があると言われると思う。 薬事法だと、どれだけサンプリングするかという議論になってきて、一部を試験するとなると、他の細胞に付着している可能性があるため、少ない検体で済むというのをメリットとするのが本当に良いかは分からない。	参考にさせていただきます。
3	定量的に分析できるという点は良いと思う。	
4	もともと保有している患者さんの場合で培養後に増幅されている場合、薬事法では認められないと思うが、良く分からない。	
5	マイコプラズマ除去剤を入れるのはダメなのだろうか。	

⑩ 無菌試験に関する検討

番号	先生からのご質問およびコメント	ニプロの回答
1	全量培地を実施するという点は良いと思う。但し、今後培地量が増えた場合に、善良を濾過するのは厳しくなる可能性があるため、何 cc 以上とするのが良いと思われる。	参考にさせていただきます。

5-5 参考文献

- ・ Honma T, Honmou O, Iihoshi S, et al. Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Exp Neurol*. 2006;199:56-66.