

をとって GMP 準拠細胞プロセッシングの開発に積極的に参入することは困難である。したがって、大学や先端医療センターが主導するかたちで、研究者、臨床研究医、薬剤師、技師 GMP コンサルタント、企業の先端医療開発部門の研究者が一致協力して、世界的ルールに基づいたものを構築して行く必要がある⁹⁾。

E 結論

わが国でも、細胞治療や再生治療開発に細胞プロセッシングが必要であることがようやく認識されてきたか、なかには単なる実験室のなかにクリーンベンチを置いて、同じインキュベーターで何人も細胞を同時に培養したり、倫理委員会で承認されたから良しとして、マウス細胞と共培養したり、ウシ胎児血清で培養した細胞の投与を予定している施設がある。現時点でこれを規制する法律はわが国にはないか、だからこそ、安全性や有効性が十分確認されていない先端医療、とくに細胞治療や再生治療でヒト細胞を培養したり 遺伝子導入したりといった操作を行う場合、GMP 準拠の細胞プロセッシングが必須であり、先端医療開発に携わるものすべてが遵守しなければならない基本的ルールである。安全性や治療効果もまた不確実な実験的な探索医療であるからこそ厳格な規制は必須であり、最初からルーズなやり方では取り返しかつけないことになる。規制に従って行いここまでは大丈夫ということになっては

しめて規制を緩和して行く方向に持って行くべきである。細胞治療に関する先端医療開発のためには、大学や先端医療センターで行う細胞プロセッシングを対象とした institutional GMP の構築が喫緊の課題であり、関係者の慧眼に期待したい。

文献

- 1) Maekawa T Current good manufacturing practices (cGMP) controlled cell processing for the development of novel advanced cell and gene therapy Education program book pp 43-48 2003 The 65th Annual meeting of Japanese Society of Hematology and The 45th Annual meeting of Japanese Society of Clinical Hematology
- 2) 前川 平 平成 14 年度厚生労働科学研究 (医薬安全総合研究事業)「先端医療センター等における細胞治療・再生治療開発のための GMP 準拠細胞プロセッシング指針の作成に関する研究 (総合研究報告書)」(主任研究者 前川平) pp 454 2003 3
- 3) 前川 平 先端医療開発に必要な GMP 準拠細胞プロセッシング - Institutional GMP 構築の必要性 - 臨床血液、45 32-38 2004

F 健康危険情報

特記事項なし

G 研究発表

1 論文発表

1) Maekawa T Current good manufacturing practices (cGMP) controlled cell processing for the development of novel advanced cell and gene therapy Education program book pp 43-48 2003 The 65th Annual meeting of Japanese Society of Hematology and The 45th Annual meeting of Japanese Society of Clinical Hematology

2) 前川 平 細胞治療・再生治療開発に必要な GMP 準拠無菌的細胞プロセス—わか国の現状— 医学のあゆみ、205 (5) 361-366, 2003

3) 前川 平 細胞治療 再生治療などの先端治療開発に必要な GMP 準拠無菌的細胞—プロセス—臨床医としての立場から— PDA Journal of GMP and Validation in Japan)、5 21-27 2003

4) 前川 平 先端医療開発に必要な GMP 準拠細胞プロセス— Institutional GMP 構築の必要性— 臨床血液、45 32-38 2004

5) Maekawa T GMP cell processing

facilities in Japan- status quo- ISCT Telegraft 10 (1) 6 2003

6) 前川 平 先端的細胞治療開発と GMP 準拠細胞プロセス—日本医師会雑誌 (印刷中、2004)

7) 前川 平 細胞治療・再生治療などの先端治療開発に必要な GMP 準拠無菌的細胞プロセス—低温医学 (印刷中、2004)

8) 前川 平 細胞治療・再生治療開発に必要な GMP 準拠細胞プロセス—日本内科学会雑誌 (印刷中、2004)

9) Nagayama H Sato K Morishita M Uchamaru K Oyaizu N Inazawa T Yamasaki T Enomoto M Nakaoka T Nakamura T Maekawa T Yamamoto A, Shimada S Saida, T Kawakami Y Asano S Tanı K Takahashi T A and Yamashita N Results of a phase I clinical study using autologous tumour lysate-pulsed monocyte-derived mature dendritic cell vaccinations for stage IV malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2 Melanoma Res 13 (5) 521-530 2003

- 10) Kuroda, J Kimura S Kobayashi Y Yoshikawa T Urasaki Y Ueda T Enjo F Tokuda H, Ottmann O G, Maekawa T The third-generation bisphosphonate zoledronate synergistically augments the anti-Ph+ leukemia activity of imatinib mesylate *Blood* 102 2229-2235 2003
- 11) Yoshimasu T Manabe, A Ebihara Y Tanaka R Ooi J Iseki T Shirafuji N Maekawa T Asano S Yoshikawa N Tsuji K Mx1 expression in patients with viral infection after allogeneic stem cell transplantation *Bone Marrow Transplant* 32 (3) 313-316 2003
- 12) Kuroda J Kimura S Kobayashi Y Ivoko N Kamitsuji Y Murotani Y Fukuda W Akaogi T Havashi H Yoshikawa T Maekawa T Variable manifestation in natural killer cell leukaemias *Clin Lab Haematol*, 25 239-245, 2003
- 13) Kimura S Kuroda J Segawa H Sato K Nogawa M Yuasa T Ottmann O G Maekawa T Anti-proliferative efficacy of the third generation bisphosphonate Zoledronic acid combined with other anti-cancer drugs in leukemic cell lines *Int J Hematol* 78 37-43 2004
- 14) Kuroda J Kimura S Segawa H Sato K Matsumoto S Nogawa M Yuasa T Kobayashi Y Yoshikawa T Ottmann O G Maekawa T p53-independent anti-leukemic effect of the nitrogen-containing bisphosphonate zoledronic acid (*Cancer Sci* in press 2004)
- 15) 木村晋也 里田純也、前川 平 Ras 関連蛋白 および BCR/ABL タフルフロクによるフィラテルフィア 染色体陽性白血病の治療 炎症再生学会雑誌 (印刷中 2004)
- 16) 方木紀美子、木村晋也、辻 博昭、丹羽紀夫、竹川良子、菱田理恵 笠井泰成、赤井洋子 湯浅 健、柏井三郎、佐原敏之、前川 平 京都大学病院における輸血検査 24 時間体制の構築過程から学んだこと *日本輸血学会雑誌* 49 (5) 673-677 2003
- 17) 辻博昭、丹羽紀夫、方木紀美子、湯浅健、木村晋也、前川 平 生体肝移植と輸血、*Modern Physician* 23 1479-1483 2003

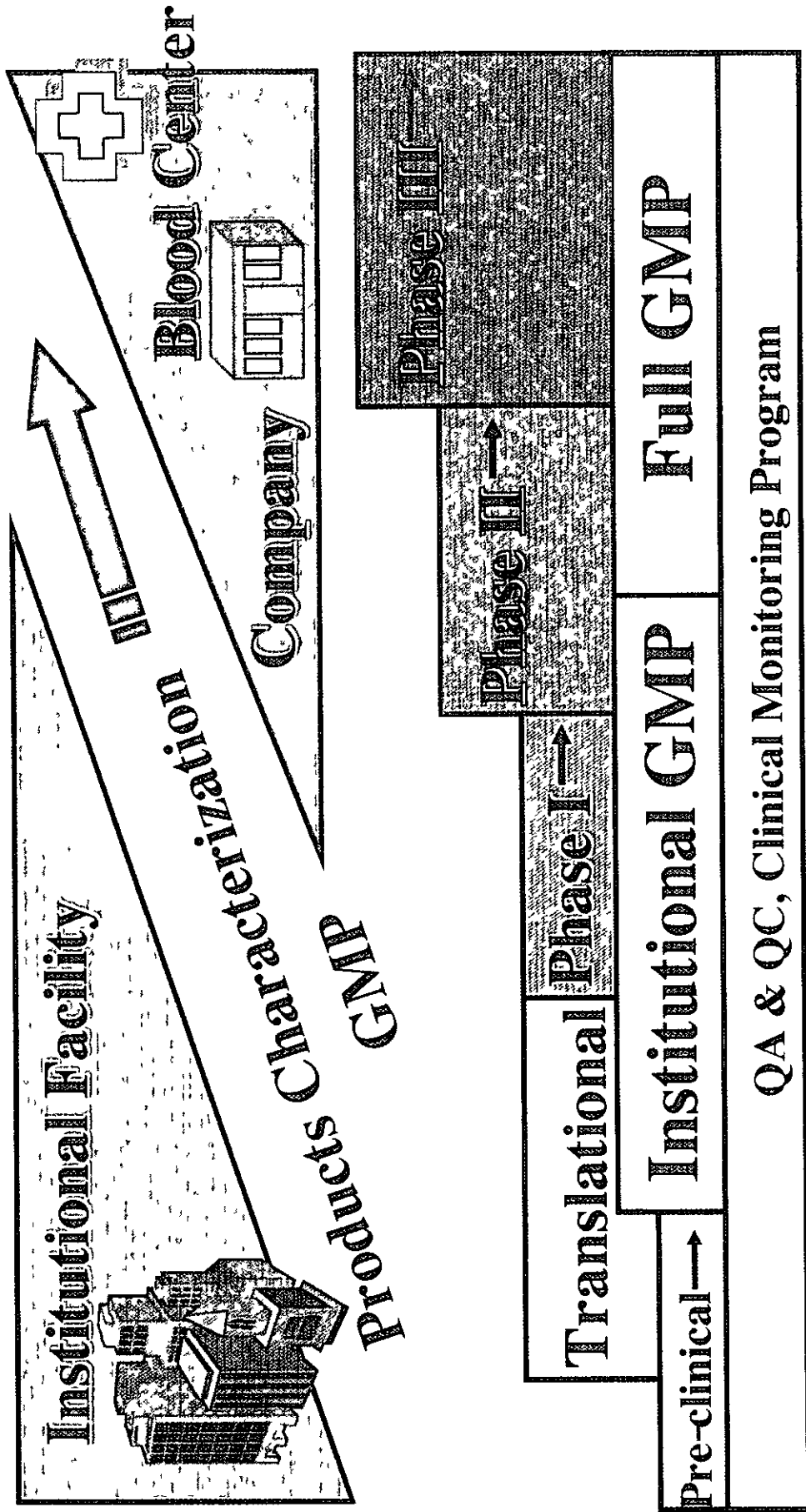
- 18) 丹羽紀実、湯浅 健、木村晋也、辻 博
昭 万木紀美子、竹川良子、菱田理恵、
赤井洋子、笠井泰成、江川裕人、田中
祐一、河村朋子、横山繁樹、前川 平
京都大学における生体肝移植と輸血管
理・輸血療法に関する検討 (第1報)
(日本輸血学会雑誌、印刷中 2004)
- 2 学会発表
(特別講演)
- 1) 前川 平 京都大学における分子標的
治療と細胞治療の開発、第3回北陸造
血細胞移植研究会(金沢)平成15年6
月21日(2003)
- 2) 前川 平 京都大学における先端医療
の開発、日本新薬東部創薬研究所講演
会(つくは市)平成15年6月27日
(2003)
- 3) 前川 平 先端医療開発に必要なGMP
準拠細胞プロセス用治療用細胞
の品質及び安全性確保のためにー
(教育講演)、第65回日本血液学会総
会 第45回日本臨床血液学会総会(大
阪)、平成15年8月28日(2003)
- 4) 前川 平 京都大学における生体肝移
植と輸血(公開講座)、第27回日本血
液事業学会総会(京都)平成15年9
月19日(2003)
- 5) 前川 平 血液型の話から先端医療開
発まで、平成15年度献血功労表彰伝
達式(京都)、平成15年10月7日
(2003)
- 6) 前川 平 先端医療開発に向けてー京
都大学の挑戦ー、滋賀医科大学特別講
義(滋賀医科大学)、平成15年10月17
日(2003)
- 7) 前川 平 わか国の先端医療開発に必
要なインフラストラクチャーーあた
らしい細胞治療、再生治療の発展のた
めにー 関西TLO技術情報クラブ1
0月例会、平成15年10月21日
(2003)
- 8) 前川 平 輸血管理から先端医療開発
へー京都大学の挑戦ー 第11回岐阜
臨床輸血研究会(岐阜)、平成15年11
月14日(2003)
- 9) 前川 平 21世紀の輸血医学と先端
治療開発の接点ー京都大学の挑戦ー、
平成15年度第6回院内学術講演会(兵
庫県成人病センター、明石市)、平成
16年1月16日(2004)
- 10) 前川 平 慢性骨髄性白血病治療の過
去、現在そして未来 第5回京滋エ
リア血液疾患治療研究会(ホテルクラ
ンウィア京都)平成16年2月13(2004)
(院内学会シンポジウム)

- 11) 前川 平 血管再生医療における GMP 細胞プロセッシングと輸血部の関わり、シンポジウム III「血管再生医療の現状と将来展望」、第 51 回日本輸血学会総会（北九州、小倉）、平成 15 年 5 月 29 日（2003）
- 12) 前川 平 骨髄移植後の顆粒球輸血の効果 第 10 回日本輸血学会秋季シンポジウム（弘前市）平成 15 年 10 月 4 日（2003）
- 13) 前川 平 先端医療開発と臨床検査技師の大学院教育、シンポジウム「臨床検査技師の大学院教育」、第 43 回日本臨床化学会年会、第 50 回日本臨床検査医学会総会連合大会－検査 2003－（広島）平成 15 年 10 月 30 日（2003）
- 14) 野河正輝、湯浅 健、木村晋也、前川平 PLK-1 siRNA を用いた膀胱癌治療をめざして（共）第 13 回アンチセンスシンポジウム（大阪）平成 15 年 12 月 1-2 日（2003）
- 15) 前川 平 先端医療開発に必要なインフラストラクチャー JST 異分野研究者交流フォーラム「ケノムケミストリーに基づく総合的遺伝子診断・治療法の新技术創出」（主催 科学技術振興機構）（高知県 芸西村、土佐ロイヤルホテル）平成 16 年 1 月 22 日（2004）
- （国際学会一般講演）
- 16) Matsumoto S Kimura S Segawa H Kuroda J Kono Y Tanaka F Maekawa T Wada H Efficacy of combining the third generation bisphosphonate zoledronate with imatinib mesylate in suppressing small cell lung cancer cell line proliferation The American Society Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting (Chicago Illinois USA) (May 31-June 3, 2003) Abstract # 2750
- 17) Kuroda J Kimura S Segawa H Kobayashi Y Ottmann O G Yoshikawa T Maekawa T p53 signaling cascade independent apoptotic induction by zoledronate in BV173 leukemic cell line The 32nd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (Paris France) (5-8th July 2003) Abstract #107 Experimental Hematology 31 7 (supple1) 95-96 2003
- 18) Segawa H Kimura S Kuroda J Hodohara K Fujiyama Y Ottmann, O G Maekawa T YM529 a novel bisphosphonate inhibits the growth of human leukemic cells *in vitro* via induction of apoptosis The 32nd

- Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (Paris France) (6th July 2003) Abstract #520 Experimental Hematology 31 7 (supple 1) 233 2003
- 19) Kimura S Kuroda J Segawa H Ottmann O G Maekawa T The third-generation bisphosphonate zoledronate synergistically augments the anti-Ph+ leukemia activity of imatinib mesylate The 32nd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (Paris France) (6th July, 2003) Abstract # 109 Exp Hematol 31 96 (supple1) 109 2003
- 20) Matsumoto S Kimura S Kono Y Yanagihara K Tanaka F Maekawa, T Wada H Combination Efficacy of Bisphosphonate Zoledronate with imatinib mesylate (Gleevec) in Small Cell Lung Cancer Cell Line 10th World Conference on Lung Cancer (Vancouver Canada) (August 14 2003)
- 21) Segawa H Kimura, S Kuroda J Hodohara K Fujiyama Y Maekawa, T ONO 5920/IM529 a third generation bisphosphonate inhibits the growth of human leukemic cells both in vitro and in vivo The 45th Annual Meeting of The American Society of Hematology (San Diego California USA) (7th December 2003) Abstract # 2191 Blood, 102 11 (supple) 594a 2003
- 22) Kuroda J Kimura S Segawa H Ottmann O G Maekawa, T The anti-leukemic effects of third-generation bisphosphonate zoledronic acid The 45th Annual Meeting of The American Society of Hematology (San Diego California USA) (7th December 2003) Abstract # 2199 Blood, 102 11 (supple) 596a 2003
- 23) Kimura, S Segawa, H Kuroda, J, Maekawa T Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from Calophyllum graciliense that acts by induction of apoptosis via extrinsic pathway The 45th Annual Meeting of The American Society of Hematology (San Diego California USA) (December 2003) Abstract # 4550 Blood 102 11 (supple) 208b 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許願（特願 2003-18321） 抗癌、抗菌又は抗ウイルス作用を有する医薬組成物（2003 1 28）、現在 JST（科学技術振興機構）の補助を得て、国際特許出願準備中。



Prior to Phase I: need product safety and basic characterization information

Stepwise approach: regulatory requirements increase with product development. Institutional GMP should be established to advance translational research in academia.

厚生労働科学研究補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）

分担研究報告書

2 GMP に準拠した培養のシステムの開発、基準整備

2-2 GMP に準拠した細胞製造のためのデバイスの開発 (1) 一培養 bag の開発

分担研究者 白数昭雄

(ニプロ株式会社 総合研究所 第6研究開発部部長代行)

研究協力者 槻木裕志

(ニプロ株式会社 総合研究所 第6研究開発部研究員

兼 先端医療センター再生医療研究部 特別研究員)

研究要旨

臍帯血は採取量が少なく、 2×10^7 個/kg の移植基準細胞数を満たして成人に移植されることは稀である。そこで、臍帯血中の CD34 陽性細胞を分離後、培養増幅して成人に移植する治療法が検討されている。そのための閉鎖系の培養バッグに関する検討を行なった。

ヒト臍帯血より磁性ビースを用いて精製した CD 3 4 陽性細胞を、各種培養バッグ (37mm×65mm) に播種し、培養試験を行なった。SCF 100ng/ml、TPO 100ng/ml、Flk2/Flt3 100ng/ml、IL-6 と sIL-6R の融合タンパクである FP6 100ng/ml を添加した培養液 QBSF-60 の 5ml に 1.0×10^4 cells/ml で懸濁し、14 日間培養した。総細胞数、CD34 陽性細胞数の増幅倍率を測定したところ、海外で使用実績のある FEP 製培養バッグと比較して、試作したポリエチレン製培養バッグでは、細胞数の増幅は大きいものの、CD 3 4 陽性細胞の増幅は小さく、造血幹細胞の培養増幅にはあまり適さないことが示唆された。それに対し試作した FEP 製培養バッグでは、細胞数の増幅に若干差が出たものの、CD 3 4 陽性細胞の増幅倍率は同等で、造血幹細胞の培養増幅に適する可能性が示された。さらに、新たに作製したバッグを用いたところ、細胞数の増幅が大きく、CD 3 4 陽性細胞の増幅も同等以上であった。

以上のことより、新たに作製したバッグが造血幹細胞の培養増幅に適する可能性が示唆された。

A. 研究目的

臍帯血は採取量が少なく、 2×10^7 個/kg の移植基準細胞数を満たして成人に移植されることは稀である。そこで、臍帯血中の CD34 陽性細胞を分離後、培養増幅して成人に移植する治療法が検討されている。その際、開放系のフラスコを用いた培養では微生物によるコンタミネーションの可能性が排除できないため、閉鎖系の培養ハックに関する検討を行なう。

B. 研究方法

ヒト臍帯血にヒトロキシエチルテンブンを加えて赤血球を沈降除去した後、磁性ビーズを用いて CD34 陽性細胞を標識、精製した。その細胞を用いて、各種培養ハック (37mm×65mm) を用いた細胞培養試験を行なった。SCF (Stem Cell Factor) 100ng/ml、TPO (Thrombopoietin) 100ng/ml、Flk2/Flt3 リカント 100ng/ml、IL-6 と sIL-6R の融合タンパクである FP6 100ng/ml を添加した培養液 QBSF-60 (Quality Biological 社) を用い、5%CO₂、5%O₂、湿度 95% の環境下で培養を行なった。培養開始 7 日後、12 日後に上記培地で希釈を行い、7 日後、12 日後、14 日後に血球計算盤で細胞数を計数すると共に、フローサイトメーターを用いて CD34 陽性細胞の割合を測定した。

C. 研究結果

CD34 陽性細胞を 1.0×10^4 cells/ml で懸濁した、SCF (キリンヒール社製) 100ng/ml、TPO (キリンヒール社製) 100ng/ml、Flk2/Flt3 リカント (TECHNE 社) 100ng/ml、FP6 (キリンヒール社製)

100ng/ml を含む QBSF-60 培地 (Quality Biological 社製) 5ml を播種し、14 日間培養を行った。海外で使用実績のある 4-フルオロエチレン-6 フッ化フロピレン共重合体 (FEP) 製の培養ハック (American Fluoroseal 社) では、細胞数の増幅が、 27 ± 13 倍 (7 日後)、 155 ± 82 倍 (12 日後)、 247 ± 96 倍 (14 日後) であった。CD34 陽性細胞の増幅倍率は、 16 ± 5 倍 (7 日後)、 30 ± 15 倍 (12 日後)、 27 ± 22 倍 (14 日後) であった。それに対し試作したポリエチレン製培養ハックでは、細胞数の増幅が、 45 ± 37 倍 (7 日後)、 312 ± 205 倍 (12 日後)、 333 ± 18 倍 (14 日後)、CD34 陽性細胞の増幅倍率は、 16 ± 12 倍 (7 日後)、 23 ± 17 倍 (12 日後)、 18 ± 21 倍 (14 日後) であった。試作した FEP 製培養ハックでは、細胞数の増幅が、 39 ± 30 倍 (7 日後)、 232 ± 125 倍 (12 日後)、 335 ± 189 倍 (14 日後)、CD34 陽性細胞の増幅倍率は、 16 ± 10 倍 (7 日後)、 28 ± 16 倍 (12 日後)、 26 ± 14 倍 (14 日後) であった。さらに、新たに作製したハックでは、細胞数の増幅が、 57 ± 34 倍 (7 日後)、 488 ± 207 倍 (12 日後)、 591 ± 209 倍 (14 日後)、CD34 陽性細胞の増幅倍率は、 17 ± 7 倍 (7 日後)、 38 ± 18 倍 (12 日後)、 34 ± 22 倍 (14 日後) であった。

D. 考察

海外で使用実績のある FEP 製培養ハックと比較して、試作したポリエチレン製培養ハックでは、細胞数の増幅は大きいものの、CD34 陽性細胞の増幅は小さく、造血幹細胞の培養増幅にはあまり適さないことが示唆された。それに対し試作し

た FEP 製培養ハックでは、細胞数の増幅に若干差が出たものの、CD3 4 陽性細胞の増幅倍率は同等で、造血幹細胞の培養増幅に適する可能性が示された。さらに、新たに作製したハックを用いたところ、細胞数の増幅が大きく、CD3 4 陽性細胞の増幅も同等以上であった。よって、新たに作製したハックが造血幹細胞の培養増幅に適する可能性が大きいと考えられる。

E 結論

5ml 容量の臍帯血 CD3 4 陽性細胞の培養試験では、新たに作製したハックでの総細胞数の増幅、CD3 4 陽性細胞の増幅が良好であり、造血幹細胞の増幅に適する可能性が示された。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

なし

H 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

厚生労働科学研究補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）

分担研究報告書

2・GMP に準拠した培養のシステムの開発、基準整備

2-3 GMPに準拠した細胞製造のためのテハイスの開発(2)

-取違え防止CO₂ インキュベーター、細胞カルテシステムの開発-

分担研究者 西川茂道

(和研薬株式会社 R&D部 部長)

研究協力者 山内土郎、馬場敏則、藤田仁

(和研薬株式会社 R&D部)

研究要旨

薬事法の改正により、これまで再生医療に用いられていたヒト細胞も細胞製剤として安全性確保の対策が求められている。

細胞製剤の安全性確保として「細胞製剤の製造工程において、細菌汚染の防止、細胞の取違えミスの防止や培養細胞の培養条件の履歴保管などが行われるか、従来市販されている自動炭酸ガス細胞培養装置（CO₂ インキュベーター）は、実験動物細胞用に開発されてきたものであり、再生医療分野で求められている細胞製剤への配慮した装置ではない。

再生医療現場では、「細胞製剤の安全性確保」のための GLP/GMP 対応の基盤整備が進められているか、上記のように細胞製剤への安全性を配慮した自動炭酸ガス細胞培養装置（CO₂ インキュベーター）はなく、その必要性が求められている。

本研究は「細胞の取違えミスの防止や培養細胞の培養条件の履歴保管などを配慮したヒト細胞培養用 CO₂ インキュベーター開発のため、

- a 庫内での感染予防対策
 - b 培養細胞カルテシステム
 - b-1 人為的ミスによる細胞の取違え防止対策
 - b-2 培養細胞培養条件の履歴保管の完成
- を目指した。

A 研究目的

従来の医薬品と異なるヒト細胞を用いての癌や、不妊、火傷などの治療を行う細胞治療、臍帯血移植、皮膚移植、体外受精、遺伝子治療、養子免疫療法などを始めとする、新しい細胞治療法が開発されつつある。薬事法の改正にともない、これらヒト細胞を原料として製造される医薬品等の品質および安全性確保の必要性については薬事審議会（ハイオテクノロジー特別部会）でも言及されている。

ヒト細胞の安全性とは、患者検体である細胞の培養時、人為的ミスによる取り違いと言った操作上の問題（細胞取り違いミス）又ヒト細胞の培養には、CO₂ インキュベーター（温度 37 度、CO₂ 濃度 5% 湿度 90% 以上）装置の庫内で細胞の培養を行うか、CO₂ インキュベーターの加湿用水が細菌やカビの繁殖の温床となっており、常にこれらの細菌や真菌が患者検体細胞へ感染する危険性（細菌汚染）をはらんでいる。

GMP に準拠した医薬品製造管理には細胞製剤の品質保証に必要な細菌汚染の防止対策や細胞の取り違いミスを防止、過去の細胞培養状態の履歴保存などが求められている。

B 研究方法

GMP に準拠した細胞製造のためのテハイスの開発には、細胞の安全性への配慮（細菌などの感染予防）（取り違い防止 CO₂ インキュベーター）、細胞品質管理のための培養条件のモニタリングと履歴管理等が必要不可欠である。

a 庫内での感染予防対策

a-1 細菌等の飛散防止

既存の CO₂ インキュベーターの庫内には温度、炭酸ガスの均一化を計る目的でエアークレージングファンが設置されている。この循環ファンにカビ等が付着することで、庫内に孢子などが飛散する可能性がある。

フランス製シヨアン社の CO₂ インキュベーターは庫内に循環ファンを設置せず、HEPA フィルターを介して庫内のエアークレージングをサンプリングすることで、CO₂ 温度の分布の均一化に成功している。弊社においてこの CO₂ インキュベーターを採用することで、孢子や細菌等の飛散防止を計る。

シヨアン社 CO₂ インキュベーターの仕様

モデル	6500
庫内容積 (L)	156.3
ウォーターチャケット容積	91 (L)
温度制御範囲 (°C)	室温+5~50
CO ₂ 濃度制御範囲 (%)	0~20
CO ₂ 濃度測定方式	IR (非分散赤外線)
電源	AC100V
外形寸法	752 (W) × 596 (D) × 920 (H)
内寸法	452 (W) × 452 (D) × 607 (H)
本体重量 (kg)	85

表 1

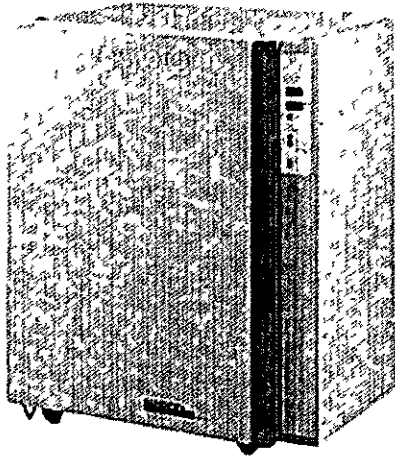


Fig1

庫内にはファンやファンダクトがない構造になっている。

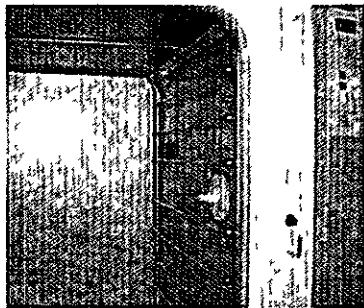


Fig2

コーナーは、R構造のため洗浄が容易になっている。

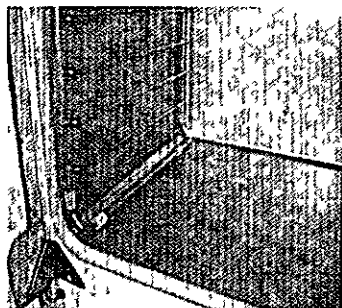


Fig3

a-2 細菌等の繁殖防止

現在の市販されているCO₂インキュベーターは、細胞培養に必要な環境である温度37度、CO₂濃度5%、湿度90%以上を維持するため、加湿用の水を庫内に置いている。しかし、このような環境下に置かれた加湿用水ではカビや細菌の繁殖が避けられず、ヒト細胞への感染の危険がある。

加湿方法を改良して、加湿用容器の天上部にメンブランを貼りつけた加湿容器を作成し、この中に滅菌蒸留水を入れることで外部よりの菌の侵入や繁殖を防止することが可能となり、加湿された水蒸気は気孔率が0.45μメンブランを通過することで、除菌された水蒸気として庫内に供給される。

b 培養細胞カルテシステム

培養細胞カルテシステムが実際の再生医療の製造現場においてSOPに応じたソフトで実施でき、不都合が発生してもオーダーメイドにて設定が可能ないように培養法に応じた柔軟に対応できるソフトの開発を行う。

b-1 人為的ミスによる細胞の取り違い防止対策

細胞培養容器にバーコードの標識を処置しコンピューターに登録する。コンピューターが指定したCO₂インキュベーターしかドアが開かず、他をロックすることで、取り違い予防を行うことが可能になる。

b-2 培養細胞の培養条件の履歴保管

細胞培養容器のバーコード標識をIDとして利用し、このIDに対応した培養条件(培養温度、CO₂濃度、湿度)をモニタリングし保存する。

c 培養機器の機能試験

ヒト細胞である細胞製剤の生産において、その培養環境が常に適正であるか検証し、正常であることを実証しなければならない。培養環境すなわち、CO₂インキュベーターの機能を構成している温度、CO₂濃度、湿度については重要なファクターであり、各々のファクターを標準器にて測定し、検証を行う。

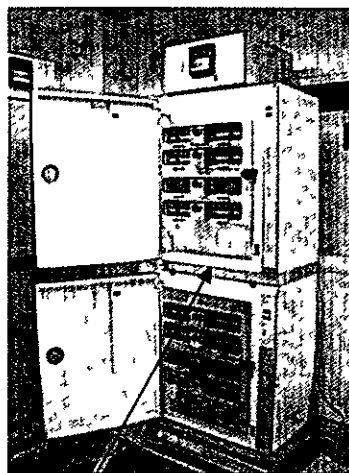
C 研究結果

a モニター装置付細胞取り違い CO₂ インキュベーター（以下多段型 6500）の構成

a-1 フランス製シヨアン社のCO₂ インキュベーターをヘースにモニター装置と細胞の取り違い防止対策を施す改造を行った。



Fig4
6500 2 段積み



6500 に小扉を取付ける。

Fig5

多段型 6500 の庫内にはその制御用センサーとは別に重要計器としての温度・CO₂濃度 相対湿度のセンサーを設置し、それらのセンサーは別置のモニター装置の記録計により表示・記録した。

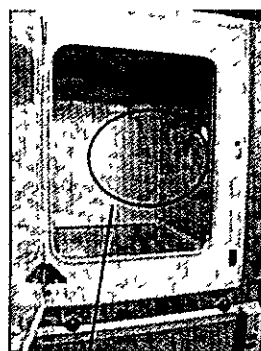


Fig6 排気口

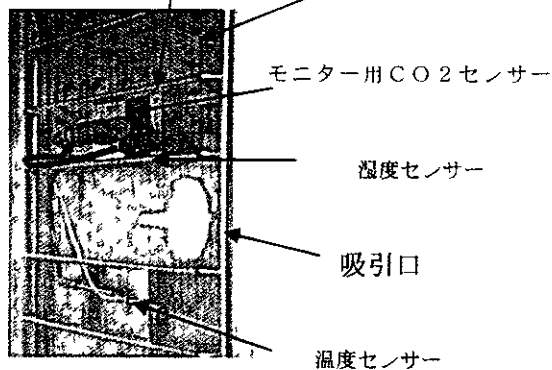


Fig7

a-2 細胞取り換え用小扉の設置

ガラスドアを外し、4箇所の小窓付ドアを取り付ける。

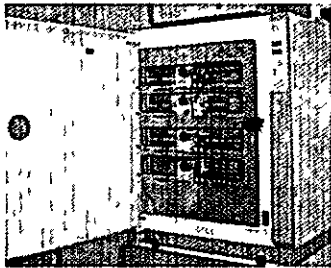


Fig8

各小扉にオートロック式のノブを取り付けコンピューターによる遠隔操作が可能になるよう工夫する。

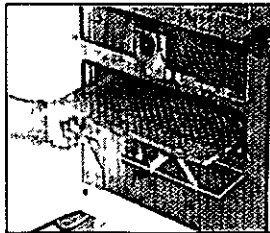


Fig9

a-3 細胞取り換え管理システム用コンピューター及びハーコートシステムを設置する。

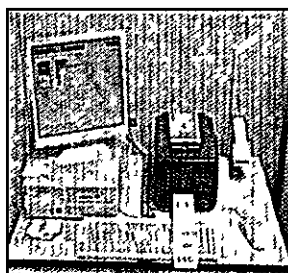


Fig10

b 庫内での感染予防対策

b-1 細菌等の飛散防止

フランス製ジョアン社のCO₂ インキュベーターの採用 (fig1, 2, 3 参照)

庫内エアーク循環ファンやエアダクトがなく、棚受けも針金状に工夫され、カビの温存となる死角部分を無くすことで、清掃も極めて容易になっている。

b-2 サンプル機構 (fig7 参照)

庫内のエアーク循環とCO₂ 濃度の測定は、ヘパフィルターより庫内のエアークを吸引し、別室に設置されたCO₂ センサーにてCO₂ 濃度の測定を行い、設定濃度に達するようCO₂ ガスが供給される。

庫内のエアーク循環は、常にサンプリング機構によるヘパフィルターを経由してエアーク循環が行なわれおり、外気より侵入したカビ胞子や細菌の浄化の役割を果たしている。

b-3 細菌等の繁殖防止

組織培養装置 (CO₂ インキュベーター) 内の湿度を、蒸発ハットを使用せず加湿する方法として、蒸発用の水の入った容器の蓋にメンブランを貼ることで容器内の無菌性が維持され、同時に培養フラスコへの細菌、カビの感染を予防することが可能である。



Fig11

加湿容器の上部にメンブランフィルターを貼り付ける。

事前にガンマ線やオートクレーブ処理にて無菌処置を行っている加湿容器に加湿用の滅菌水を入れる。加湿容器内の滅菌水は、加湿容器に貼られたメンブランフィルターにより外部よりの雑菌の混入がなく無菌を維持した状態である。又加湿容器内の無菌水は、蒸気となってメンブランフィルター(0.45 μ)を通過してCO₂インキュベーター内に拡散し、庫内を加湿することか可能。

c 培養細胞カルテシステム

培養細胞カルテシステム構成図①別紙参照
カルテシステム用 CO₂ インキュベーター構成図② 別紙参照

c-1 カルテ管理システム

— 取り違い防止方法 —

取り違い防止手段としてID照合による認証システムを採用した。具体的には、検体を新規登録する際にIDコードを発行し、IDコートとその検体の担当者をデータベースに登録すると共にIDコードをハーコードラベルに印刷し、そのラベルを検体が入れられている容器及び、その検体の実質的な管理媒体であるカルテに各々貼り付ける。

登録された検体は、このIDコートと検体を取り扱う権限が与えられた作業者のパスワードが一致した時のみ取り扱うことかできる。(Fig12 参照)

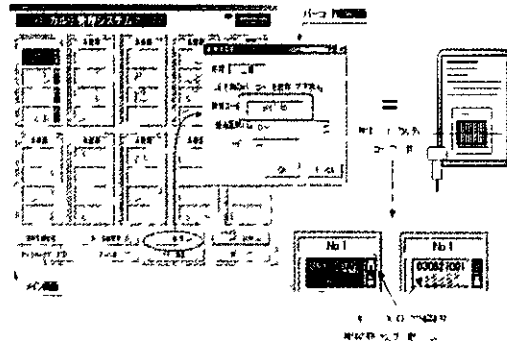


Fig12 IDコード照合画面

下記に代表的な作業(出庫、入庫)の作業手順を示す。

① 検体の出庫

カルテシステム検体出庫説明図③
別紙参照

- 操作1 処理メニューより“検体出庫”の処理を選択する。
- 操作2 出庫する検体のカルテに貼り付けてあるハーコードよりIDコードを読み取る。
- 操作3 処理実行のパスワードを入力する。
- 操作4 システム画面上に目的の検体が保存される場所が示され、その検体の保存されているボックスのロックが解除される。
- 操作5 システム画面の指示する保存場所から目的の検体を取り出す。

② 検体の入庫

カルテシステム検体入庫説明図④
別紙参照

- 操作1 処理メニューより“検体入庫”の処理を選択する。
- 操作2 入庫する検体容器に貼り付けてあるハーコートよりIDコードを読み取

- る。
- 操作3 処理実行のパスワードを入力する。
- 操作4 システム画面上に目的の検体を保存すべき場所が示され、そのボックスのロックが解除される。
- 操作5 システム画面の指示する保存場所へ検体を保管する。

以上の処理により検体を取り扱う際にカルテの読み違い等による出庫検体間違いや、入庫検体の保管場所間違いを防止できる。

c-2 カルテ管理システム ー履歴管理ー

カルテ管理システム説明図⑤別紙参照

カルテ管理システム説明図⑥別紙参照

カルテ管理システム説明図⑦別紙参照

本システムは取り違え防止機能の他に検体の入出庫履歴管理や、検体の培養状況を監視する機能も備えている。管理されている検体のIDコード毎に入出庫履歴や各作業のコメント等が処理を実施する度にデータベースに保存され、又、管理されている検体が培養されているインキュベーター内の環境データ（温度、CO2濃度、湿度）が一定時間毎にモニターシステムより読み取られ、履歴と共にデータベースに保存される。

データベースに管理データとして記録される項目を下記に示す。

<入出庫履歴データ>

- 1・処理回数（シリアルNo）
- 2・処理内容（登録／入庫／出庫

／終了)

- 3・作業担当者名
- 4・作業日時
- 5・作業コメント

<環境データ> ×時系列データとして保存される。

- 1・記録日時
- 2・温度
- 3・CO2濃度
- 4・湿度

その他の機能として、本システムは管理データを印刷する機能も有しており、上記に示した管理データを特定日の管理履歴（日報）及び、特定検体の指定期間履歴が無塵紙に印刷できる。又、同様のデータをファイル出力（CSV形式）することもできる。

下記 Fig13 にシステム画面上に表示された履歴データを示す。

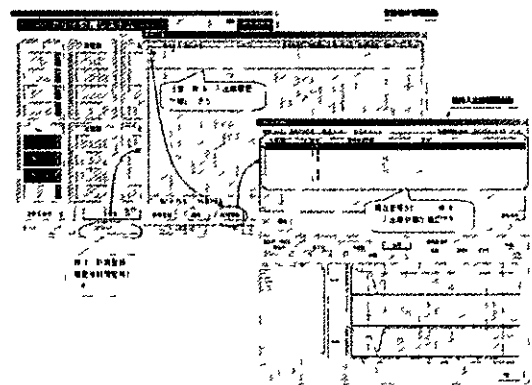


Fig13 履歴データ表示画面

d 培養機器の機能試験

ヒト細胞である細胞製剤の生産において、その培養環境が常に適正であるか検証し、正常であることを実証しなければならない。培養環境すなわち、CO2 インキ

ュベーターの機能を構成している温度、CO₂ 濃度、湿度については重要なファクターであり、各々のファクターを標準器にて測定し、検証を行う。

細胞培養に不可欠な CO₂ インキュベーターの温度、CO₂ 濃度等は国家基準にトレサブルなセンサーを用いて測定、検証することで精度を保証することかてきる。

モニター装置付き CO₂ インキュベーター6500 を検証するために文書化された手順書に従い付帯する計器のキャリブレーション作業及び機能試験を実施した。

多段型 6500 の庫内にはその制御用センサーとは別に重要計器としての温度・CO₂ 濃度・相対湿度のセンサーを設置し、これらのセンサーは別置のモニター装置の記録計により表示・記録した。

キャリブレーション及び機能試験の方法は以下の通りである

- ① 多段型 6500 を温度 37.0℃, CO₂ 濃度 5.0% の条件で作動させ、庫内の中央付近に設置した標準測定器の値を基準に制御の調整を行い、設定値と標準器測定値との差が許容内に入るようにする。相対湿度については自然蒸発方式を採用しているため、制御の調整は行わない。
- ② 上記調整後に庫内の安定を待って、標準器測定値とモニター装置表示値を比較し、その差が許容範囲になるようにキャリブレーションを行う。
- ③ 温度についてはキャリブレーションの確認測定として、設定温度を 35.0℃ と 38.0℃ に変更し標準器測

定値とモニター表示値との比較測定を実施した。

- ④ キャリブレーション完了後に機能試験としての温度分布の測定は JTM K01 に準拠した方法で庫内の 15 ポイントに於いてこれを測定した。表 1) に温度分布を示す。表 2) に標準測定器はトレサビリティの取れた測定機器を使用した試験器一覧を示す。表 3) に温度センサー 15 ポイント設置図を示す。

D 考察

感染した患者検体を CO₂ インキュベーターといった装置の庫内に置き培養することで、正常な他の患者検体か並行感染（クロスコンタミネーション）する危険への防止対策としては、1 サンプル 1 検体か理想的である。その意味において、多段型として 1 チャンバーに 4 箇所の小窓を設置しても、庫内は共通化しており、ファンなどによる強制攪拌機構が無い CO₂ インキュベーターであっても、厳密な意味において並行感染予防とは言えない。

ただ、本研究テーマとしては、バックを利用したバック培養であり、バック間での並行感染はありえないとした。

コストパフォーマンスについては、既存のインキュベーターの改造であり、1 チャンバーに 4 つの検体を並行培養できるため、従来機種と比べて安価である。

GMP に準拠した細胞製造のためのデハイスの開発には、細胞の安全性への配慮（細菌などの感染予防）（取り違え防止 CO₂ インキュベーター）、細胞品質管理の

ための培養条件のモニタリングと、履歴管理等が必要不可欠であり、本研究テーマとして安全性に配慮された工夫をハード面（小扉の取り付け）とソフト（取り換え防止ソフト開発）より施した。

次期のテーマとして、細胞取り換え防止 CO2 インキュベーターシステムが実作業上機能しているか検証するには、庫内での無菌試験、培養ハックを用いての負荷試験、SOP 作業手順書に従った細胞取り換え防止システムのソフトの検証試験を実施する予定である。

E 結論

GMP に準拠した細胞製造のためのテハイスである細胞取り換え防止システム開発、細胞品質管理のためのモニタリング装置開発、履歴管理のためのソフト開発を行った。装置の機能試験として温度分布測定をおこなった。

F 健康危険情報

特になし

G 論文発表

特になし

H 知的財産権の出願・登録状況

特許出願中

特 2003-009157 検体（細胞）取り換え防止及び検体（細胞）管理システム

特 2002-165225 組織培養用装置