

ンルームで、かつ前室あるいは準備室へ空気が流れ込まないように設計であること。

- ⑥ ⑤に関連して、遺伝子導入操作を行うエリアと前室あるいは準備室との間にはエアロック室を設け、空気の流れは遺伝子導入操作室からエアロック室へ移動するが、前室や準備室へは流れ出ない構造であること。
- ⑦ エアシャワー室はコンタミネーションの原因ともなり、クリーン度とは無関係であることが明らかになっており、設置する必要はない。各エリアの独立性は各エリアの差圧によって行うこと。
- ⑧ 各遺伝子導入エリアの空調設備は完全に独立したものであること。
- ⑨ セキュリティーには十分な配慮を行うこと。
- ⑩ 各部屋に設置されている機器（例えば冷蔵庫や冷凍庫の庫内温度、インキュベーターの庫内温度、湿度、CO₂濃度など）を外部で自動監視できるシステムを構築することが望ましい。

IV. GMP に準拠した細胞プロセッシングの運用

GMP に準拠した細胞プロセッシングを行うための運用の方法を下記に列挙する。

- ① 細胞処理管理プロセスでは、まず細胞プロセッシングを開始するまでに臨床試験研究者が、前臨床試験段階で基礎的検討を行い臨床試験研究計画を立案する。臨床試験研究者からのニーズに対して、センター長が

プロジェクトの内容を「品質方針」に照らし合わせて CPC での実施に適切なプロジェクトであるか否かを判断する。その後、品質管理責任者や製造管理責任者のよって各プロジェクトの品質目標が立てられ、センター長の承認を得る。プロジェクトの作業内容に対して製造担当者の力量・認識を調査し、必要な教育・訓練計画を立て実施する。また、プロジェクトに必要なインフラや作業環境の準備を行う。

- ② 製造準備プロセスでは、各種情報を元に工程検討を行いバリデーション実施後、製品標準書や標準作業手順書(SOP)の作成を行う。製品標準書やSOPの検証を行った後にセンター長から製造承認が下りる。
- ③ 購買プロセスでは、品質目標に従って資材等の購入先を決定後、発注・検収・受け入れを行う。
- ④ 受注プロセスで臨床試験研究を行なおうとする研究者からの発注を受け、製造プロセスが動き出す。
- ⑤ 製造プロセスでは、製造計画に従って作業を進め、工程内検査、最終検査を経て出荷判定がされる。その後、製品は臨床試験研究者へ引き渡される。
- ⑥ 臨床試験研究を行なおうとする研究者は、製品を受け取り治療（治験）を開始する。
- ⑦ 出荷後の製品あるいは製造中の製品について不具合やクレームが発生す

れば、品質管理者がそれを受け付ける。担当者は、不具合の内容を確認し原因の特定や是正の必要性など検討する。是正が必要である不具合については、是正処置を立案しセンター長がそれを承認する。是正処置を実施し、そのプロジェクトの品質目標にも反映させる。

- ⑧ 品質の向上に関わる新しい情報や知見が得られた場合にも内容を検証して品質目標へ反映させる。
- ⑨ 内部監査やマネージメント・レビューによっても是正処置や予防処置が行われ、品質目標が改善されていく。

D. 結論

今後、わが国でも細胞治療や再生医療などの開発を行う上で GMP に準拠した細胞プロセッシングは必須である。また、細胞プロセッシングを行うための環境整備を進めると共に CPC の管理運営をするための人材の教育・訓練も必要である。基礎研究を行うための研究者は多くの教育・研究機関や企業などから育成されてくるが、GMP に準拠した CPC が設立されれば CPC を管理運営するための人材も必要となる。CPC の管理運営は研究者が片手間に行えるものではなく、また SOP などが作成されルーチン化した作業は研究者の手から離れていく。この様な作業を行うために適切な力量や認識を持った人材の育成も今後の課題の一つであり（臨床検査技師や薬剤師のあらたな活躍分野とも言える）、インフラや規則の整備など先端

的細胞治療・再生治療開発に向けて解決すべき問題は山積している。

E. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

1). 論文発表

1. 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.
2. 前川 平：細胞プロセッシングセンター. Hematological Malignancy Review 27:5-6, 2004.
3. 前川 平：先端的細胞治療開発と GMP 準拠細胞プロセッシング. 日本医師会雑誌、131:911- 913, 2004
4. 興津 輝、松本慎一、岩永康裕、野口洋文、小林直哉、田中紀章、前川 平、田中紘一：臨床臍島移植のための臍島分離技術. 再生医療（日本再生医療学会雑誌）、3(2): 81-89, 2004.
5. 前川 平：先端医療開発と臨床検査技師の大学院教育. 臨床病理 52(5):430-434, 2004.
6. 前川 平、笠井泰成：細胞治療・再生治療とトランスレーショナル・リ

- サーチ? 輸血部門の変革を求めて? . 日本内科学会雑誌、93(7): 1404-1410, 2004.
7. 阿部 充、木村 剛、木村晋也、前川 平：治療的血管新生療法と輸血部門の役割 . 臨床医、30(10):1900-1902, 2004.
 8. Tani, K., Azuma, M., Nakazaki, Y., Oyaizu, N., Hase, H., Ohata, J., Takahashi, K., Oiwa-Monna. M., Hanazawa, K., Wakumoto, Y., Kawai, K., Noguchi, M., Soda, Y., Kunisaki, R., Watari, K., Takahashi, S., Machida, U., Satoh, N., Tojo, A., Maekawa, T., Eriguchi, M., Tomikawa, S., Tahara, H., Inoue, Y., Yoshikawa, H., Yamada, Y., Iwamoto, A., Hamada, H., Yamashita, N., Okumura, K., Kakizoe, T., Akaza, H., Fujime, M., Clift, S., Ando, D., Mulligan, R., Asano, S.: Phase I Study of Autologous Tumor Vaccines Transduced with the GM-CSF Gene in Four Patients with Stage IV Renal Cell Cancer in Japan: Clinical and Immunological Findings. Mol Ther. 10(4):799-816, 2004.
 9. 笠井泰成、前川 平：細胞治療・再生治療開発に関するレギュレーションと細胞プロセッシング。「再生医療へのブレイクスルー-その革新技術と今後の方向性」、遺伝子医学 MOOK (田畑泰彦 編集)、メディカル ドゥ社、大阪、pp.245-250, 2004.
 10. 山田祐一郎、松本慎一、福田一仁、濱崎暁洋、小倉雅仁、松岡啓子、藤本新平、興津 輝、岩永康裕、野口洋文、米川幸秀、永田英生、柴田登志也、笠井泰成、前川 平、清野 裕、田中紘一：心停止ドナーからの脾臓移植によってインスリン離脱した 1 型糖尿病の一症例 . 糖尿病、47(12):945-950, 2004.
 11. 笠井泰成、前川 平：細胞プロセッシングと GMP. 臨床検査 (印刷中)
 12. Maekawa, T., Kimura, S., Kasai Y: Development of novel advanced cell and gene therapy and GMP-controlled cell processing. JMAJ 2005 (in press).

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用研究事業）

分担研究報告書

2. セルプロセッシングの基盤整備

2-2 先端医療センターにおけるセルプロセッシングセンターの基盤整備

研究協力者：小林 健一郎

（先端医療センター再生医療研究部）

分担研究者：伊藤 仁也

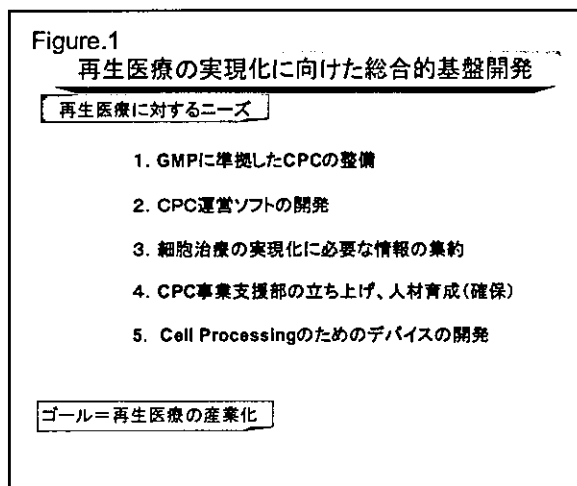
（先端医療センター再生医療研究部）

研究要旨

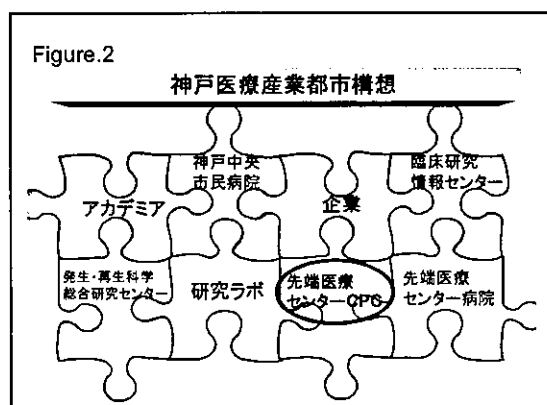
先端医療センター研究棟5階に臨床研究用の細胞プロセッシングセンターを整備した。CPCの運営では施設面（ハード）のみならず、それを活用するソフトの整備が肝要である。CPCで安全に安定して細胞製剤を供給するためにはGMP (Good Manufacturing Practice)の体制を確立する必要がある。今回、GMPソフトの構築のため研究者のみならず、病院薬剤部、臨床検査部、GMPアドバイザー、企業、事務職、行政等の複数の専門職によるチーム体制で継続的な検討を行った。今後、細胞治療に求められるregulationのハードルが高くなることを踏まえると、施設改築や文書改訂も視野に入れて柔軟に対応できるような体制づくりが必要になる。

A. 研究目的

再生医療研究の最終ゴールはその再生医療の実現化=産業化である。その最終目標に到達するためには、下記に示す総合的基盤開発に取り組む必要がある(Fig.1)。



神戸医療産業都市構想では産官学のクラスターが集結し、再生医療の実現化に向けた総合基盤開発を行っている。先端医療センターはその中核施設として臨床研究を推進すると同時に、再生医療の実現化に向けた総合基盤開発の一環として細胞プロセッシングセンター(CPC)の整備に取り組んできた(Fig.2)。



細胞治療に特化したGMP体制は施設の建設ハードのみならず、それを運用するソフトの両輪が円滑に動くことで初めて機能する。ヒト細胞を用いた治療開発を行おうとする大学や当センターに特化した Institutional GMPを構築する必要があるが、その体系は施設の研究プロトコル、GMP構成によって異なるため独自にGMPソフトを構築する必要がある。今回の Ex vivo 増幅臍帯血幹細胞を用いたトランスレーショナルリサーチを行うにあたり、安全かつ安定したセルプロセッシングが行なえる基盤をつくることを目標に本分担研究を開始した。

B. 研究方法

前年度までの研究の中で、GMPハードについての検証はほぼ完了したと考へ、平成16年度は臨床研究プロトコルに基づきGMPに準拠したシステムで Ex vivo 増幅臍帯血幹細胞の製造が遂行できるGMPソフトの開発に主軸をおいた。本研究は分担研究者が神戸医療産業都市構想で神戸に進出してきた医薬系カンパニー、産官学の研究者、GMPアドバイザー等と継続的な議論を行い遂行した。

C. 研究結果

(a). CPC 運営組織

先端医療センター内にGMPに準拠したCPCの管理運営母体であるCPC事業支援部を立ち上げ、オープン型レンタルCPC(研究者にCPCをレンタルするスキーム)として整備した。CPC事業支援部は厳格な空調管理・衛生管理を行いクリーンな製造環境を維持し、同時に製造機器のバリデーション、それらを利用するためのGMPソフトを完備した。利用者はすでに構築された細胞プロセシングのシステムをいち早く活用することで臨床からのニーズに対して迅速なる対応が可能となるスキームである (Fig.3,4)。

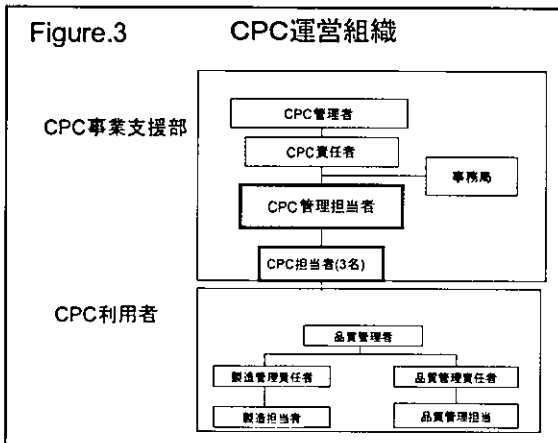
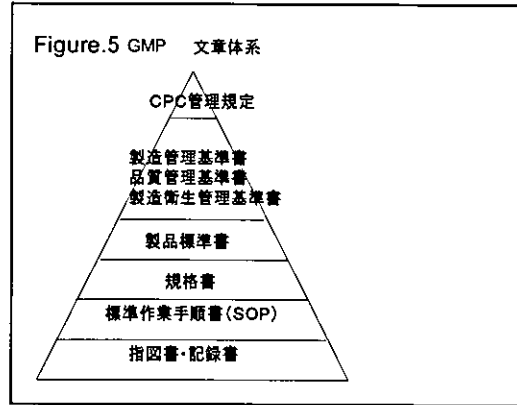


Figure.4

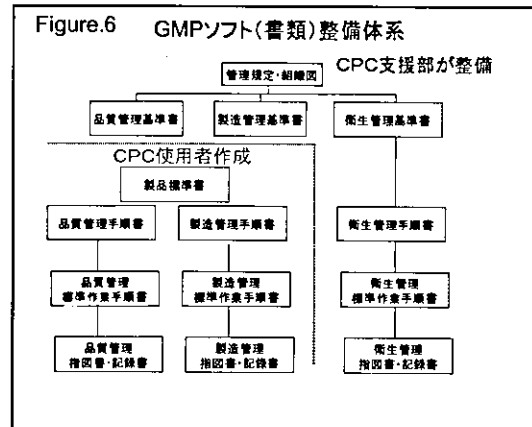
	【設備管理/空調/衛生】	【CPC管理、空調・品質管理】	【設備の作成、管理】
【CPC-管理】	・空調管理	・空調設備の点検	・設備の点検管理 (空調設備/点検)
【設備】	・空調設備	・設備管理 ・空調設備の点検 ・CPC/空調管理	・設備管理 ・空調設備 ・設備の点検管理、点検、記録等 (空調設備/点検)
【設備の作成】	・空調設備の点検	・設備管理 ・空調設備の点検 ・CPC/空調管理	・設備管理 ・空調設備 ・設備の点検管理、点検、記録等 (空調設備/点検)

(b). GMP 書類体系

GMPソフトについては、Fig 5に従い必要書類を整備した。



CPC事業支援部はこの文書体系に基づき当施設のGMPハード、人的配置などの実情に基づいて、CPC管理規定、3基準書、製造衛生管理に掛かるすべての文書を整備した。これらの文書ソフトはどのような研究プロジェクトでも利用できる汎用性の高いものを目指した。また、この文書は利用者に対して施設利用にあたっての使用のクライテリアとしての意味も持つ(Fig. 6)。



D. 考察

医薬品GMPでは「薬局等構造設備規則」により製造を行う設備の規定などが詳細に規格化されているが、その一方で、生物製剤では安全に安定して細胞を処理加工するための細胞プロセッシングの規格化は行われていない。細胞治療に関する先端医療開発のためには、大学や当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る。その構築は細胞治療プロトコル、施設基準、人的配置を基に独自に構築する必要があるが、本邦のいずれの施設もまさにその体制の構築を模索している状態である。当センターでは神戸医療産業都市構想で神戸に集結した産官学のクラスターによる情報インフラを活用し、研究者のみならず病院薬剤部、臨床検査部、GMPアドバイザー、企業、事務職等の複数の専門職によるチーム体制で協議を行い、自施設の実情を踏まえたGMP体制を構築し得た。

E. 結論

今後、細胞治療に求められる regulation のハードルが高くなることを踏まえると、施設改築やさらなる文書改訂も視野に入れて柔軟に対応できるような体制づくりが今後の課題となる。本研究は細胞治療を如何に安全に臨床

応用するか具体的に示す先駆け研究として位置づけられていると考えられ、今後とも当センターでは institutional GMP のモデルを構築すべく当センターでは継続的に検討を行い、再生医療の実現化に向けた取り組みを行ってゆく方針である。

F. 健康危険情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

3. GMP に準拠した細胞製剤製造のためのデバイスの開発

3-1 無菌閉鎖型細胞洗浄装置システムの開発

分担研究者：桜田 洋
ヘモネティクスジャパン株式会社 開発室長
研究協力者：多田 典子
(先端医療センター再生医療研究部技術員)

研究要旨

細胞を用いる細胞療法（再生医療）の基本整備の1つに細胞プロセッシング過程での細胞の品質管理、安全な細胞操作法の確立が挙げられる。

細胞プロセッシングには、細胞増幅に用いた培養液や薬剤(サイトカイン等)の洗浄操作があり、従来法では遠心チューブに細胞懸濁液を分注し、洗浄液を添加して遠心をかけ、上澄みを除去する操作を2回以上繰り返して洗浄してきた。このような処理方法は開放系の操作となるため、微生物が混入するリスクを除去できない。また、複数の遠心チューブを処理することから他の細胞が混入する可能性も除去できない。

本分担研究では、この様な開放系で行われていたこれまでの細胞プロセッシング過程内にヘモネティクスセルウォッシャーACP215を用いて、培養バッグの細胞懸濁液と処理回路を無菌接続して処理する完全閉鎖型自動洗浄システムを開発し、その導入検討を行った。

その結果、ACP215を用いて製造された細胞製剤の性状及び機能は、洗浄前と比較し同等であること、培養に添加された薬剤は、99%以上除去できることが判明した。この細胞プロセッシングの工程はGMPに準拠した処理が可能であることが確認された。

A. 研究目的

ex vivo 増幅臍帯血細胞(以下 ex vivo 増幅細胞)の洗浄回収工程を完全閉鎖型自動洗浄システムとして確立し、その最適化設定条件を検討し、回収された細胞の性状及び洗浄効率の有用性を評価する。

B. 研究方法

B-1) 使用する装置と回路

ヘモネティクスセルウォッシャーACP215(以下 ACP215)による活性化リンパ球細胞(以下リンパ球細胞)の洗浄プロトコールは、既に 200ml 容量ボウル(以下 200ml ボウル)を使った回路を用いて無菌閉鎖型細胞洗浄装置システムとしての有用性が確認されている。ex vivo 増幅細胞を対象細胞とする再生医療では、製造される細胞容量を 100ml 以下にする必要があり、その最終容量は使用するボウル容量に依存することから 70ml 容量ボウル(以下 70ml ボウル)が装着された処理回路を選択した。

B-2) リンパ球細胞を用いた基礎検討

用手法冷却遠心機(TOMY: LK-130)と ACP215 を用いてリンパ球細胞に対する最適な遠心回転数を検討した。

B-2-1) 用手法による遠心回転数と洗浄液組成の検討

最適な遠心回転数と洗浄液組成を選択するために、冷却遠心機の遠心回転数を 1000rpm~3000rpm の 500rpm 毎の 5 条件と洗浄液組成(0.1%と 0.5%アルブミン加生食)の違う 2 条件を用いて処理したリンパ球細胞の回収率と Viability を検討し

た。測定は細胞をトリパンブルーで染色した後、目視によるカウントで行った。

B-2-2) ACP215 による遠心回転数と流速の検討

70ml ボウルに対するリンパ球細胞の最適遠心回転数と流速を選択するために、遠心回転数 3500, 4000, 4500rpm の 3 条件と流速 30, 50, 70ml/min の 3 条件を組み合わせ、処理したリンパ球細胞の回収率と Viability を検討した。

B-2-3) 遠心回転数と流速によるスピルアウトの検討

遠心回転数 3000, 3500, 4000, 4500rpm の 4 条件と流速 30, 50, 70ml/min の 3 条件を組み合わせ、前細胞数と細胞スピルアウト数の割合を比較検討した。

B-2-4) ACP215 で洗浄回収したリンパ球細胞の検討

これまでの B-2-1) と B-2-3) の結果から検討した設定条件(遠心回転数 3000rpm、流速 30ml/min、希釈 2 回、希釈量 140ml×2 回、リンス量 100ml×3 回とリンス速度を 30, 40, 50, 60, 70ml/min に変えた設定)を用いて洗浄回収したリンパ球細胞の回収率、Viability、及び細胞機能を検討した。

B-3) ex vivo 増幅細胞を用いた検討

実際の再生医療で用いる ex vivo 増幅細胞を用いて以下の検討を行った。

B-3-1) 洗浄効率の検討

培地濃度を変えた 3 種類の検体(細胞を含まない)を用いてリンス量、リンス速度による洗浄効率を検討した。洗浄効率は

洗浄前後の培養液中のマイクロアルブミンを測定して、その除去率から求めた。
B-3-2) ex vivo 増幅細胞に対する遠心回転数と流速の検討

リンパ球細胞で行った細胞スピルアウト試験を ex vivo 増幅細胞でも行った。但し、遠心回転数 3000rpm と 3500rpm の 2 条件と流速 30ml/min と 40ml/min の 2 条件を組み合わせて検討した。

B-3-3) 最適化設定条件の検討

最適化設定条件を割り出すために、3つのレベルの目標洗浄効率を定め、それぞれのレベルでシミュレーションし、試算した遠心負荷時間を比較して最適化設定条件を検討した。

B-3-4) 最適化設定値による検討

ex vivo 増幅細胞で割り出した最適化設定値で 2 検体の ex vivo 増幅細胞を洗浄回収し、その回収率、Viability、洗浄効率、細胞機能について検討した。

B-4) GMP 対応への検討

GMP とは製造管理及び品質管理に係わる品質評価に関する管理規定である。使用される機器は医療用具輸入許可承認が必要であること、細胞プロセシングの記録管理、工程管理、そして装置の操作性と安全面から検討した。

C. 研究結果

C-1) B-2-1)の検討の結果、冷却遠心機(TOMY LK-130)によるリンパ球細胞の遠心回転による Viability は 740G 以上で急激に減少していた。洗浄液組成による

Viability は 1160G 以上になると 0.1%アルブミンの方が有意に低下していた。リンパ球細胞に対する遠心負荷は回収率と Viability から検討すると 420G 以下が望ましいことが分かった。また 420G 以下では洗浄液組成の違いによる有意差は認められなかった。(Table 1 参照)

Table 1 機種:TOMY遠心器LK-130

回転数	0.1アルブミン溶液		0.5アルブミン溶液	
	回収率	Viability	回収率	Viability
G(rpm)	(%)	(%)	(%)	(%)
190G(1000)	81	92.3	80.1	86.3
420G(1500)	99.4	90.5	99.4	94.3
740G(2000)	73.4	73.2	87.0	76.4
1160G(2500)	53.1	52.8	74.2	66.5
1670G(3000)	40.2	46.3	63.8	63.4

Control:98.2%(Viability)

C-2) B-2-2)の検討の結果、遠心回転数が 3500rpm 以上になると遠心負荷(G フォース)が強すぎて細胞破壊が極度に進行していることが推察され、十分な回収率は得られなかった。しかし破壊された細胞がスピルアウトして廃液バッグへ流出しているために洗浄後の Viability は高かった。

(Table2、巻末 Figure 1 参照)

Table 2 機種:ACP215

回転数	流速	時間	処理細胞数	回収率	Viability	IL-2除去率
G(rpm)	(ml/min)	(min)	x10e7 (cell)	(%)	(%)	(%)
570G(3500)	30	52	5.4	59.2	76.3	97.8
	50	34	5.4	52.2	84.0	98.0
	70	25	5.4	49.2	82.9	98.0
745G(4000)	70	25	5.4	44.2	78.4	97.8
943G(4500)	70	25	5.4	33.4	92.5	97.9

C-3) B-2-3)の検討の結果、遠心回転数と流速の関係は遠心回転数が上がると細胞スピルアウトは少なくなり、流速が速くなれば

ば細胞スピルアウトが増えていた。3000rpm と 30ml/min の組み合わせでも細胞スピルアウト割合は 0.7% と、スピルアウトによる回収率への影響は殆どないと推察された。(Table 3、Table 4 参照)

Table 3 機種：ACP215

回転数 rpm	細胞濃度 x10e4/ml	30ml/min		50ml/min		70ml/min	
		濃度	割合	濃度	割合	濃度	割合
3000	49.7	0.35	0.7%	0.7	1.4%	1.06	2.1%
3000		0.41	0.8%	0.74	1.5%	1.14	2.3%

Table 4 機種：ACP215

回転数 rpm	細胞濃度 x10e4/ml	30ml/min		50ml/min		70ml/min	
		濃度	割合	濃度	割合	濃度	割合
3500	63.8	1.10	1.7%	1.90	3.0%	2.77	4.3%
4000		0.76	1.2%	1.54	2.4%	2.25	3.5%
4500		0.52	0.8%	0.99	1.6%	1.30	2.0%

このことから 70ml ボウルに対する ACP215 の遠心回転数と流速はそれぞれ 3000rpm と 30ml/min の組み合わせで使用できることが示唆されたので、200ml ボウルの設定条件を参考に希釈回数 2 回、希釈量 140ml, 140ml とリンス量 100ml, 100ml, 100ml の設定でリンパ球細胞の洗浄を行った。その結果 Viability と洗浄効率はそれぞれ 95.5%、99.7% と良好であった。

(Table 5 参照)

Table 5 機種：ACP215

使用ボウル (ml)	遠心回転数 rpm	流速 (min)	処理細胞数 x10e7 (cells)	回収率 (%)	Viability (%)	IL-2 除去率 (%)
70	3000	30	14.9	77.3	95.5	99.7

C-4) B-2-4) の検討の結果、回収率、Viability、IL-2 の除去率は、それぞれ平均で 83.2%、96.1%、99.0% であった。またこの結果からリンス速度の違いによる影響は見られなかった。(Table 6 参照)

Table 6 回転数: 419G(3000rpm) 機種：ACP215

処理量 (ml)	リンス流速 (min)	処理細胞数 x10e7 (cells)	回収率 (%)	Viability (%)	IL-2 除去率 (%)
500	30	16.8	89.8	93.8	99.3
500	40	19.6	66.1	92.6	98.5
500	50	16.3	84.7	97.1	99.3
500	60	14.2	95.1	98.1	99.4
500	70	16.0	80.1	99.1	98.8
Ave			83.2	96.1	99.1

洗浄後の細胞機能は、走査電顕像による細胞骨格の変形や微絨毛の脱落を認めず洗浄による形態の変化は認められなかった。(巻末 Figure 2 参照)

リンパ球の機能は PHA に対するリンパ球幼若化反応、LAK 活性化においては洗浄前後で差は認めなかった。(巻末 Figure 3、Figure 4 参照)

洗浄後長期(2W)に渡る IL-2 による増殖反応でも、洗浄による影響は認められなかった。(巻末 Figure 5 参照)

C-4) B-3-1) の検討の結果、従来の 200ml ボウルではリンス量を増やしても、洗浄効率は上がらなかった。70ml ボウルでは、ボウル構造の違いからリンス量を増やすほど、そして検体濃度が薄くなるほど洗浄効率は格段に向上していた。しかし、リンス速度を速くしても洗浄効率への影響は見られなかった。(Table 7 参照)

Table 7

洗浄効率 (除去率)

培地濃度 1%

Rinse speed ml/min	Rins Volume		
	50	100	150
70	59.5%	73.4%	82.2%
50	57.7%	77.0%	82.5%
30	55.9%	79.1%	90.9%
Ave	57.7%	76.5%	85.2%

培地濃度 30%

70	47.0%	56.8%	61.2%
50	47.3%	55.4%	59.7%
30	47.0%	54.3%	60.1%
Ave	47.1%	55.5%	60.3%

培地濃度 100%

70	43.6%	55.6%	58.2%
50	44.0%	53.7%	66.3%
30	42.5%	52.2%	56.4%
Ave	43.3%	53.8%	60.3%

C-5) B-3-2)の検討の結果、3000rpm より 3500rpm のスピルアウト%が低値を示すものの細胞スピルアウトは 10%と高値の結果であった。3000rpm では一部逆転データもあり、リンパ球細胞と比べても非常に高値であった。(巻末料 Table 8 参照)

Table 8

遠心回転数	流速	
	30ml/min	40ml/min
3000rpm	10.1%	9.9%
	14.9%	9.5%
	17.1%	11.9%
	10.1%	12.3%
3500rpm	9.3%	8.5%
3500rpm	6.8%	6.3%

しかし検体サンプルの Viability は 84.9%と死細胞の比率が高いことからスピルアウト細胞は死細胞が流出したと考えられた。その傾向は細胞数測定装置の図からも推察された。(巻末 Figure 6 参照)

C-6) B-3-3)の検討の結果、70ml ボウルに対する ACP215 の設定パラメーターである遠心回転数、流速、リンス速度はそれぞれ 3000rpm、30ml/min、50ml/min とし、最終目標とする洗浄効率を 3つのレベルを仮定してシミュレーションした。洗浄効率を上げると 2 回希釈との比較で、3 回希釈の方が遠心負荷時間は短くなり有効であった。(巻末 Table 9 参照)

Table 9

目標洗浄効率	99.80%		99.65%		99.50%	
処理液の重量	300	300	300	300	300	300
希釈回数	2	3	2	3	2	3
遠心回転数	3000	3000	3000	3000	3000	3000
リンス量	50	50	50	50	50	50
再リンス量#1	150	100	100	50	100	50
再リンス量#2	150	100	150	50	150	50
再リンス量#3	0	150	0	150	0	50
希釈量# 1	260	70	210	70	140	100
希釈量# 2	210	70	140	70	140	100
希釈量# 3	0	70	0	70	0	70
遠心負荷時間	37.3	32.0	32.3	30.0	30.0	30.0

C-7) B-3-4)の検討の結果、最適化設定値を決定した。(Table 10 参照)

Table 10

最適設定パラメーター値

項目	設定値	項目	設定値
処理量	****	再リンス量(#2)	150
ボウルサイズ	70	再リンス量(#3)	150
エンシンスピード	3000	再リンス速度(#1)	70
希釈回数	3	再リンス速度(#2)	70
リンス量	50	再リンス速度(#3)	70
リンス速度	70	ソリューションレイ	5
希釈量 (#1)	100	濃縮速度	30
希釈量 (#2)	100	再濃縮速度	30
希釈量 (#3)	40	洗浄回数	1
希釈速度(#1)	200	洗浄量 (#1)	20
希釈速度(#2)	200	洗浄速度(#1)	100
希釈速度(#3)	200	保存液の添加	0
再リンス量(#1)	100	ボウル流出速度	100

その設定条件を用いて ex vivo 増幅細胞を洗浄回収して製造された細胞の回収率は 87.8%,72.5%,77.4%であった。Viability は 94.9%,95.2%,96.0%であった。洗浄効率 (SCF サイトカインの除去率)は 99.76%と 99.8%であった。(Table 11 参照)

また洗浄前後のコロニ形成能においても有意差はなかった。

Table 11

洗浄前			
Sample No	細胞数 x10E6	SCF濃度 pg/ml	Viability
1	11.56	10931.4	97.50%
2-1	7.66	6254.8	95.50%
2-2	0.77	-----	95.50%
洗浄後			
1	10.15	17.86	94.9%
2-1	5.55	14.75	95.2%
2-2	0.59	-----	96.0%
	細胞回収率	洗浄効率 SCF	
1	87.8%	99.80%	
2-1	72.5%	99.76%	
2-2	77.4%	-----	

C-8) B-4)の検討の結果、ACP215 は既に

医療用具として承認 (承認番号: 21300BZY00239000) された製品であること、細胞プロセッシング終了後毎に処理情報を印刷(印字内容は、装置 No、実施日、検体 No、処理時間、処理条件、最終製品量 実施者名等)できること等、管理記録及び操作上の面からも簡便であり GMP に準拠した処理が可能である。

D.考察

再生医療に用いる ex vivo 増幅細胞を 70ml ボウルで処理するときの ACP215 の遠心回転数は 3000rpm、流速は 30ml/min に設定することが回収率、Viability の検討から最適であること、また洗浄効率では希釈回数を 3 回とし、希釈量は 100ml,100ml,40ml に、リンス量はサイクル後半に多く設定する方がより高い洗浄効率を得られることから 50ml,100ml,150ml,150ml が最適設定値であることが判明した。

E.結論

本分担研究では 70ml ボウルを用いて ex vivo 増幅細胞を ACP215 で処理する時の最適化設定値を開発した。開発された設定条件を用いて洗浄回収した ex vivo 増幅細胞の回収率は 79.2%と若干低値であったが、Viability は 95.4%で問題なかった。また洗浄効率は 99.8%と十分な洗浄効率であった。コロニ形成能は洗浄前後で有意差は認められなかった。回収率についての更なる改善検討が必要であるものの、この最適化設定値を用いて製造された細胞は十分な細胞機能を保持しており、洗浄による細胞性状への傷害は認められなかった。完全閉鎖型自動洗浄システムとしての装置取り扱いも非

常に簡便であり、GMPに準拠した記録管理
ならびに品質管理上の安全性も確保できた。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

多田典子、井田卓見、伊藤仁也：無菌閉鎖
系濃縮洗浄回収システムの培養リンパ球に
及ぼす影響 第6回日本組織工学会、平成
15年6月12～13日

鈴木秀文、伊藤仁也、小林典孝、田中宏和、
渋谷和憲、後藤真澄美、逢坂 敦、平家俊男、
前川 平、金倉 譲：Ex vivo増幅臍帯血の
非臨床試験(その1)：閉鎖系培養法を用いた
Ex vivo増幅臍帯血の製造 第26回日本造
血細胞移植学会、平成15年12月19～20
日

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 用新案登録

なし

3. その他

なし

巻末 Figure

Figure 1

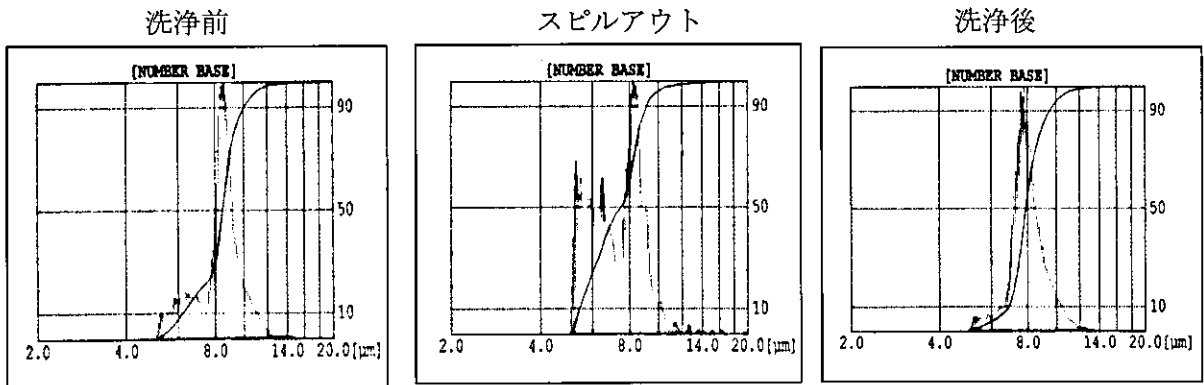


Figure 2

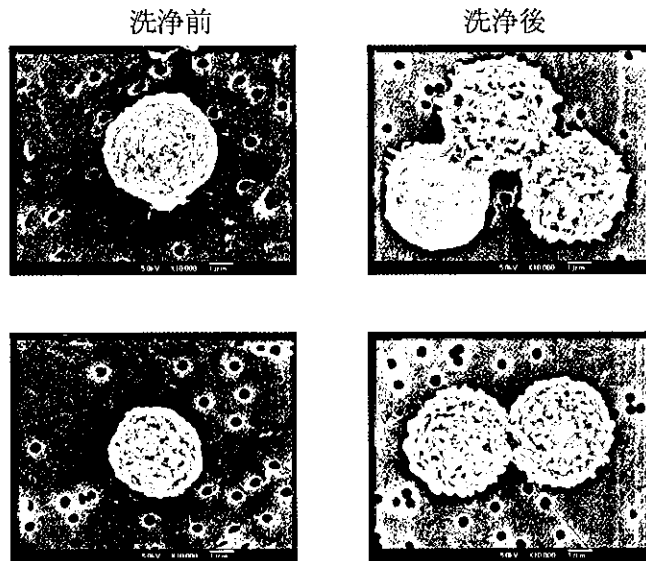


Figure 3

リンパ球幼若化試験
(分離培養法)

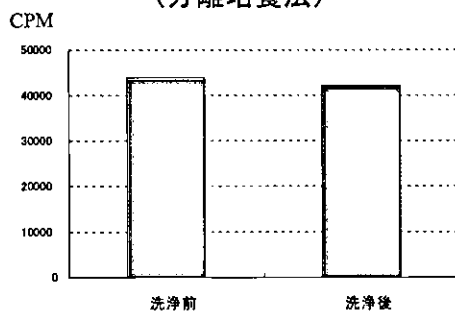


Figure 4

LAK細胞活性(誘導)

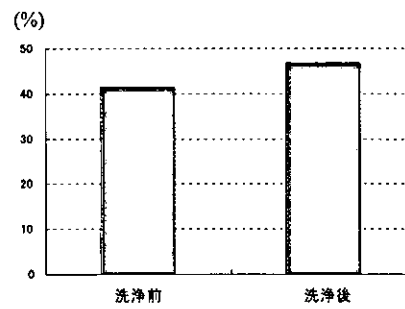


Figure 5

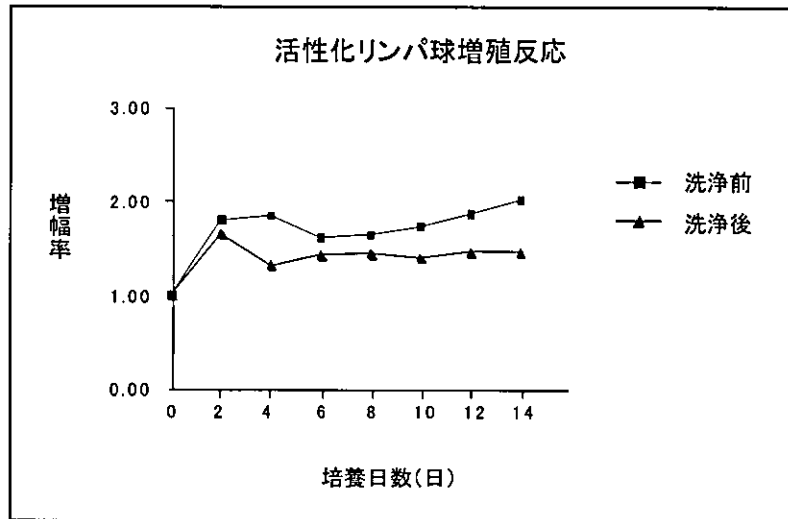
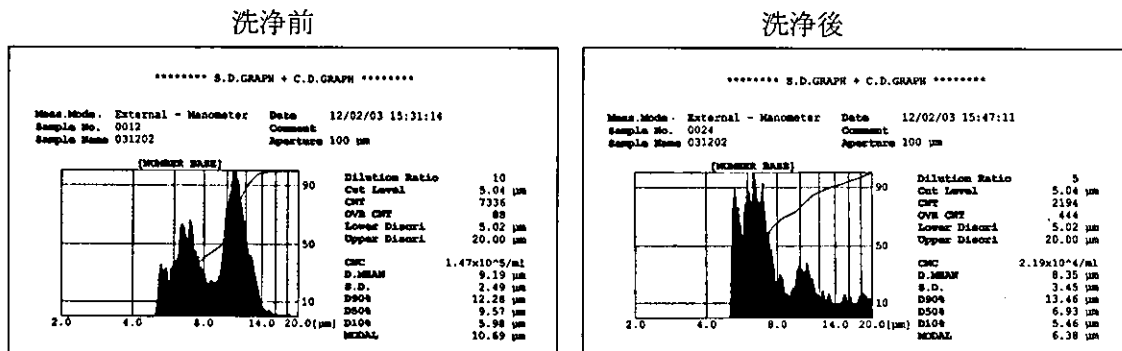


Figure 6



分担研究報告書

3. GMP に準拠した細胞製剤製造のためのデバイスの開発

3-2 Ex vivo 増幅造血幹細胞培養バッグの開発

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ズを用いて精製した 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、ポリエチレン・フッ素培養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、ポリエチレン・フッ素培養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、閉鎖系の培養バッグに関する検討を行なう。

B.研究方法

ヒト臍帯血にヒドロキシエチルデンプ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 CD 3 4 陽性細胞を標識、精製した。その細胞を用いて、各種培養バッグ (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 リガンド 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 CD 3 4 陽性細胞の割合を測定した。

C.研究結果

CD 3 4 陽性細胞を 1.0×10^4 cells/ml で懸濁した、SCF (キリンビール社製) 100ng/ml、TPO (キリンビール社製) 100ng/ml、Flk2/Flt3 リガンド (TECHNE 社) 100ng/ml、FP6 (キリンビール社製) 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-フッ化エチレン-6 フッ化プロピレン共重合体 (FEP) 製の培養バッグ (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。CD 3 4 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バッグでは、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)、CD 3 4 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 製培養バッグでは、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)、CD 3 4 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。試作したポリエチレン製培養バッグの内面にフッ素樹脂層を形成したポリエチレン・フッ素培養バッグでは、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)、CD 3 4 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、ポリエチレン・フッ素培養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。よって、ポリエチレン・フッ素培養バッグ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 CD 3 4 陽性細胞の培養試験では、ポリエチレン・フッ素培養バッグでの総細胞数の増幅、CD 3 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

造血幹細胞の培養システム：特願

2004-102529

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

3. GMPに準拠した細胞製剤製造のためのデバイスの開発

3-3 取違い防止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：山内士郎、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、細胞の取違いミスの防止や培養細胞の培養条件の履歴保管などが必要とされる。しかし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」の為に GLP, GMP 対応の基盤整備が進められているが、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、細胞の取違い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
 - c. 培養機器への機能試験
- を目指した。