

A. 研究目的

従来の医薬品と異なるヒト細胞を用いるの癌や、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・バ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えと言った操作上の問題（細胞取り違えミス）や患者検体細胞への細菌汚染の問題、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が、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えミスを防止、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デバイスの開発には、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ループ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。

フランス製ジョアン社の 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ループ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。

ジョアン社 CO₂ インキュベーターの仕様

モデル	6500
庫内容積 (L)	156.3
ウォータージャケット容積	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
外寸法	75.2 (W) × 59.6 (D) × 92.0 (H)
内寸法	45.2 (W) × 45.2 (D) × 60.7 (H)
本体重量 (Kg)	85

表 1

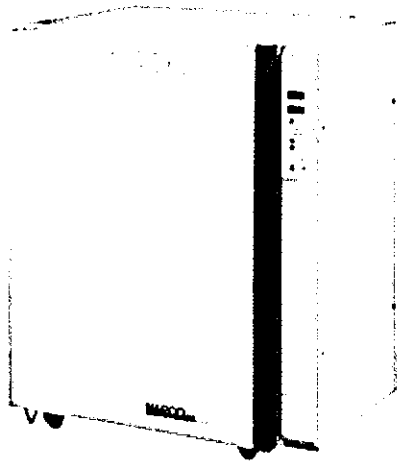


Fig1

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。

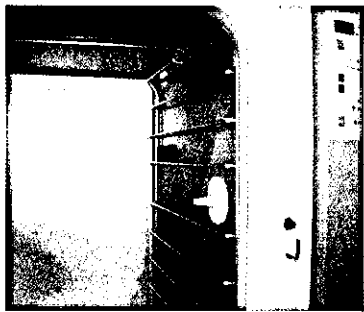


Fig2

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の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え防止対策

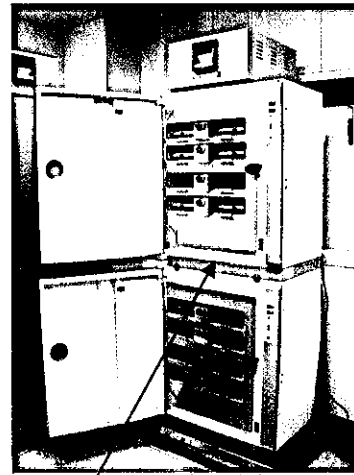
細胞培養容器にバーコードの標識を処置しコンピューターに登録する。コンピューターが指定したCO₂インキュベーターしかドアが開かず、他をロックすることで、取り違え予防を行うことが可能になる。

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。



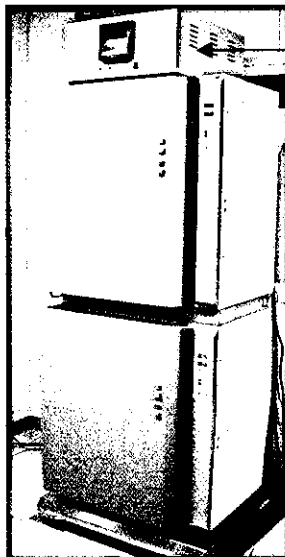
6500 に小扉を取付ける。

Fig5

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. フランス製ジョアン社のCO₂ インキュベーターをベ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。



温度、CO₂濃度、湿度
モニター装置

Fig4

6500 2 段積み

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。

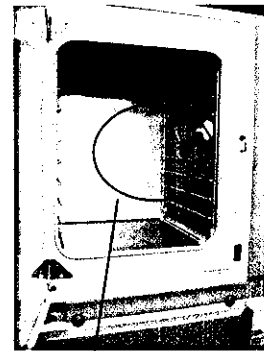


Fig6 排気口

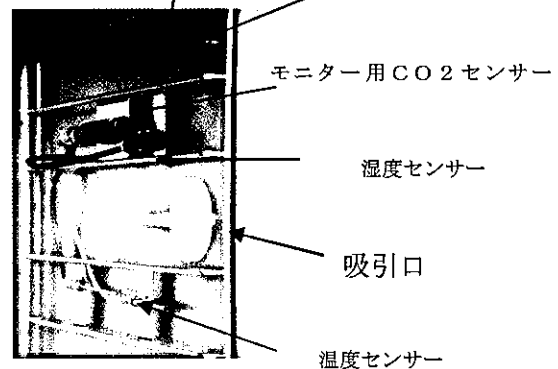


Fig7

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。

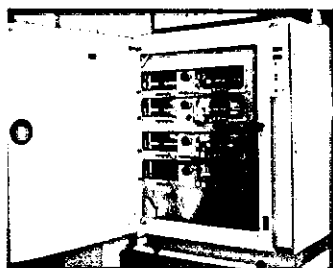


Fig8

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。

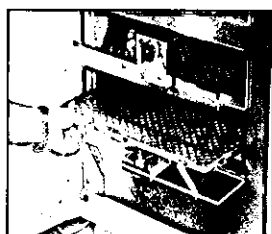


Fig9

a-3. 細胞取り換え管理システム用コンピューター及びバーコード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. サンプルング機構 (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、常にサンプル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、蒸発バ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が可能。

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コード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コードをバ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コード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ができる。(Fig12 参照)

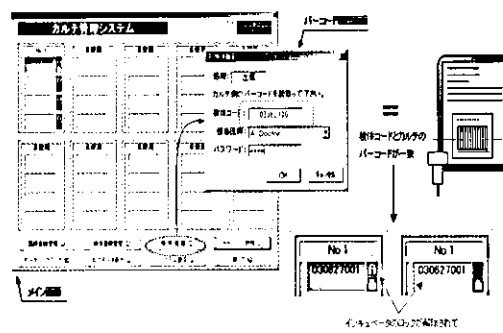


Fig12. IDコード照合画面

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バーコードより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バーコードより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 —履歴管理—

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。

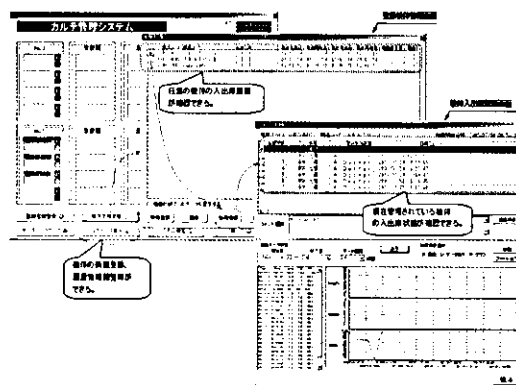


Fig13. 履歴データ表示画面

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ができる。

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、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。

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

誤って感染した患者検体をCO₂インキュベーターの庫内で培養することで、正常な他の患者検体へ並行感染(クロスコンタミネーション)する危険性が考えられる。並行感染(クロスコンタミネーション)の防止対策としては、1検体1チャンバーが理想的である。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、従来機種と比べて極めて安価である。

GMPに準拠した細胞製造のためのデ

バイスの開発には、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（取り違え防止ソフト開発）より施した。

E 結論

GMP に準拠した細胞製造のためのデバイスである細胞取り違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）取り違え防止及び検体（細胞）管理システム

特 2002-165225 組織培養用装置

別紙参照図

表2 温度分布測定 (°C)

回数	多段型 6500 上段 測定点(1~15)データ														
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
1	36.8	36.8	36.7	36.7	36.8	36.6	36.8	36.8	36.6	36.7	36.5	36.5	36.4	36.4	36.5
2	36.8	36.8	36.7	36.8	36.8	36.6	36.8	36.7	36.6	36.7	36.5	36.5	36.4	36.4	36.4
3	36.8	36.8	36.8	36.7	36.8	36.6	36.8	36.7	36.6	36.7	36.5	36.4	36.4	36.4	36.4
4	36.8	36.8	36.7	36.7	36.9	36.6	36.7	36.7	36.6	36.7	36.4	36.4	36.3	36.4	36.4
5	36.8	36.8	36.7	36.7	36.8	36.6	36.8	36.7	36.5	36.7	36.4	36.4	36.3	36.4	36.4
6	36.8	36.8	36.7	36.7	36.9	36.6	36.8	36.7	36.5	36.7	36.4	36.4	36.3	36.3	36.4
7	36.8	36.8	36.7	36.7	36.9	36.6	36.8	36.7	36.5	36.6	36.4	36.4	36.3	36.3	36.4
8	36.9	36.8	36.7	36.8	36.9	36.6	36.7	36.7	36.5	36.6	36.4	36.4	36.3	36.3	36.4
9	36.8	36.8	36.7	36.8	36.9	36.6	36.7	36.7	36.5	36.7	36.4	36.4	36.3	36.3	36.4
10	36.9	36.8	36.7	36.7	36.9	36.6	36.7	36.6	36.5	36.6	36.4	36.4	36.3	36.3	36.3
回数	多段型 6500 下段 測定点(1~15)データ														
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
1	37.0	37.3	36.9	36.8	37.0	37.0	37.0	36.9	36.9	36.9	36.8	36.8	36.7	36.9	36.8
2	37.0	37.3	36.9	36.8	37.0	36.9	37.0	36.9	36.9	36.9	36.8	36.8	36.7	36.8	36.8
3	37.0	36.9	36.9	36.9	37.1	36.9	37.0	36.9	36.9	36.9	36.8	36.8	36.7	36.8	36.8
4	37.0	36.9	36.9	36.8	37.1	36.9	37.0	36.9	36.9	36.9	36.8	36.8	36.7	36.8	36.8
5	37.0	36.8	36.9	36.8	37.1	36.9	37.0	36.9	36.9	36.9	36.8	36.7	36.6	36.8	36.8
6	37.0	36.9	36.9	36.9	37.2	36.9	37.0	36.9	36.9	36.9	36.8	36.8	36.6	36.8	36.8
7	37.1	36.9	36.9	36.8	37.1	36.9	37.0	36.9	36.9	36.9	36.8	36.8	36.6	36.8	36.8
8	37.1	36.8	36.9	36.8	37.1	36.9	37.0	36.9	36.9	36.9	36.7	36.7	36.6	36.8	36.7
9	37.1	36.8	36.9	36.8	37.1	36.9	37.0	36.9	36.9	36.9	36.8	36.8	36.6	36.8	36.8
10	37.1	36.8	36.9	36.8	37.2	36.9	37.0	36.9	36.9	36.9	36.8	36.7	36.6	36.8	36.8

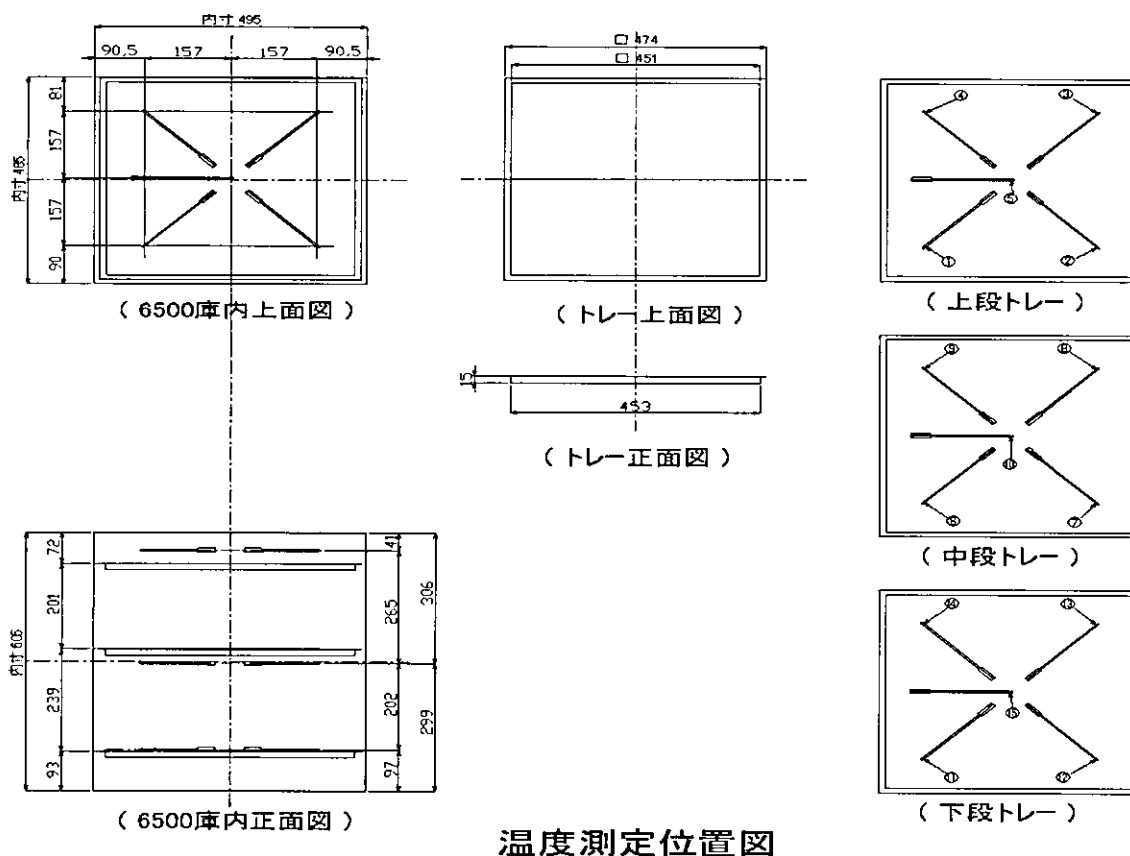
表3 相对湿度、CO2 濃度測定結果

	CO2 濃度 (%)	相对湿度 (%)
	モニター指示値	モニター指示値
多段 6500 上段	4.9	91
多段 6500 下段	5.0	96

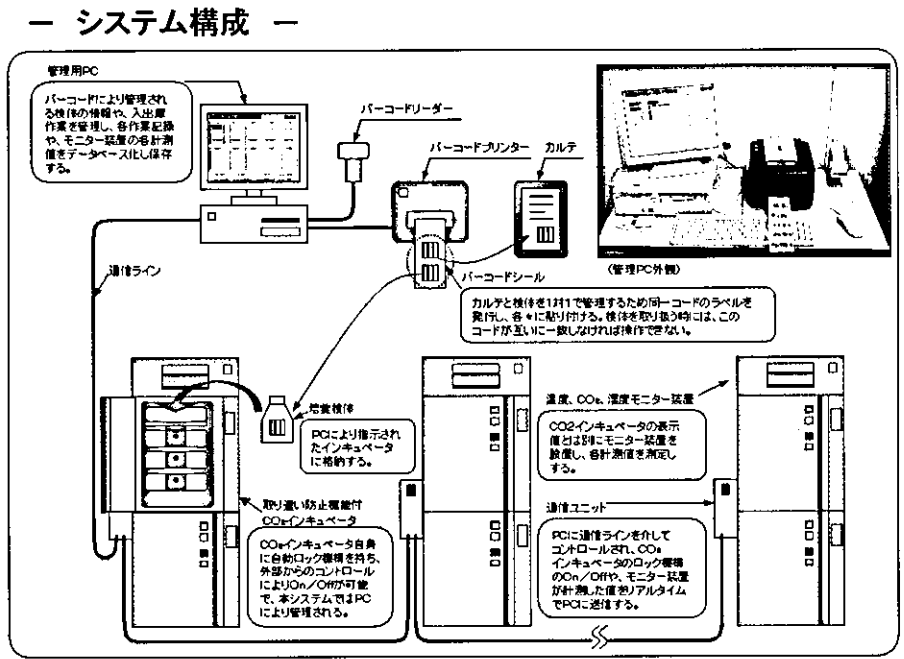
表4 標準測定器はトレーサビリティの取れた測定機器を使用した試験器一覧を示す。

	試験機名称	メーカー名	型 式
1	24 打点記録計	横河電機	4370-24
2	シース測温抵抗体	林電工	SR-6-S3.2-100-5ED-A
3	露点温度変換器	ヴァイサラ	HMP247
4	赤外線ガスモニター	理研計器	RI-555
5	標準ガス 5%	大陽東洋酸素	CO2 5%ガス
6	標準ガス 0%	大陽東洋酸素	CO2 0%ガス (N2)

表5 温度センサー15ポイント設定位置を示す。

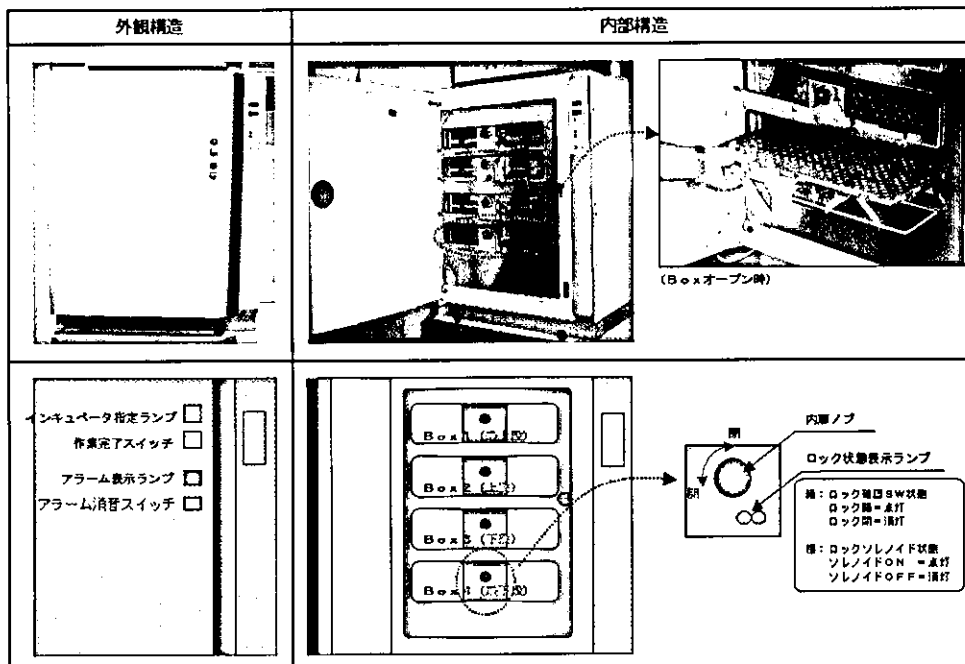


培養細胞カルテシステム構成図①参照

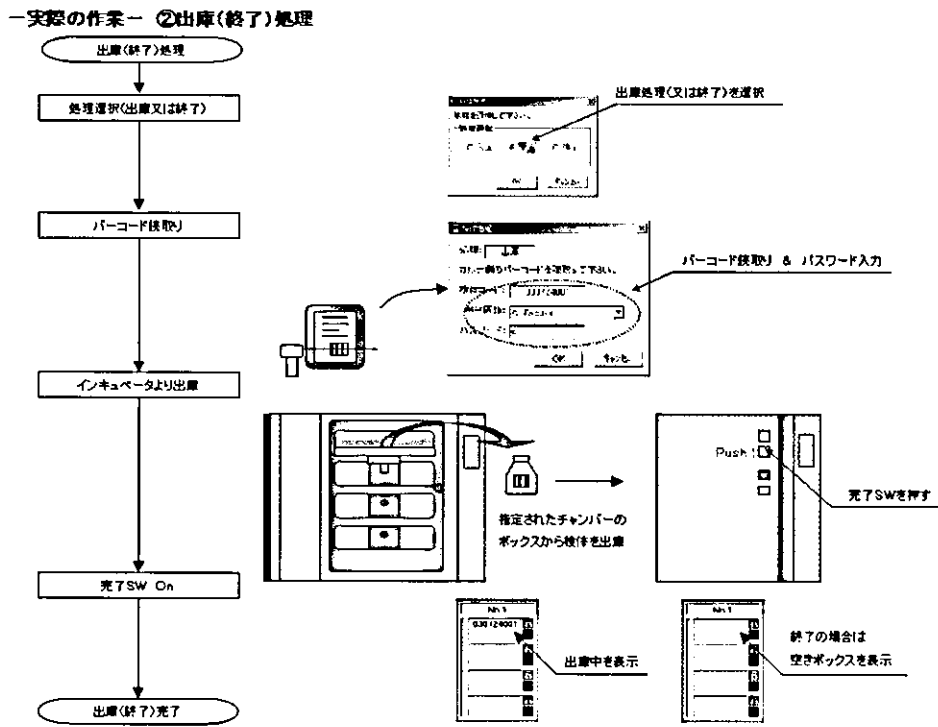


カルテシステム用CO₂インキュベータ構成図②参照

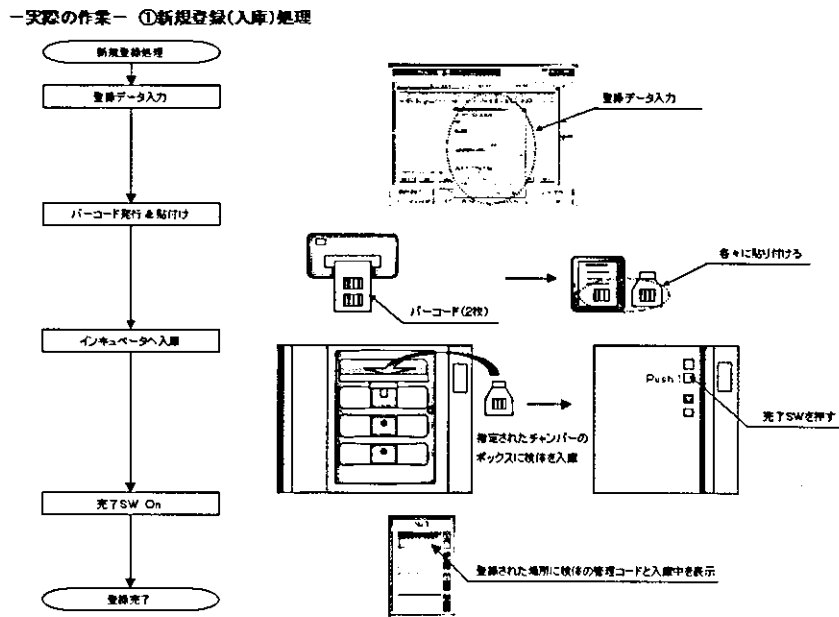
— カルテ管理システム用CO₂インキュベータ構造 —



カルテシステム検体出庫説明図③



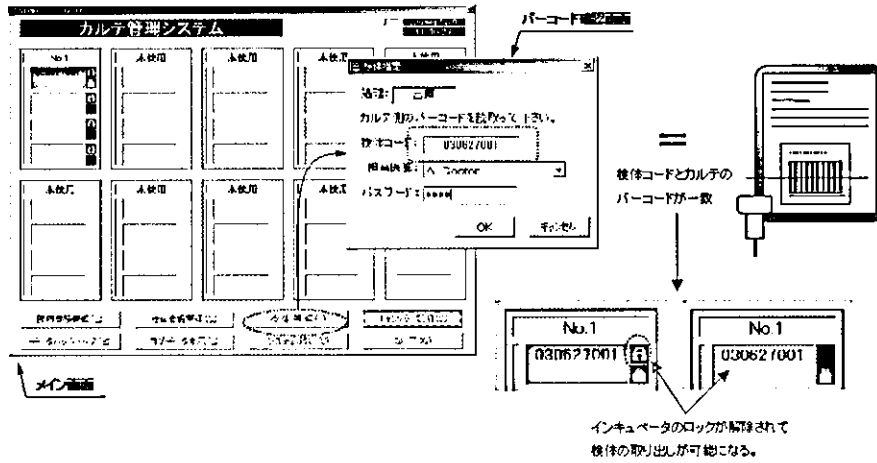
カルテシステム検体入庫説明図④



カルテ管理システム説明図⑤

— システムの特徴 ① —

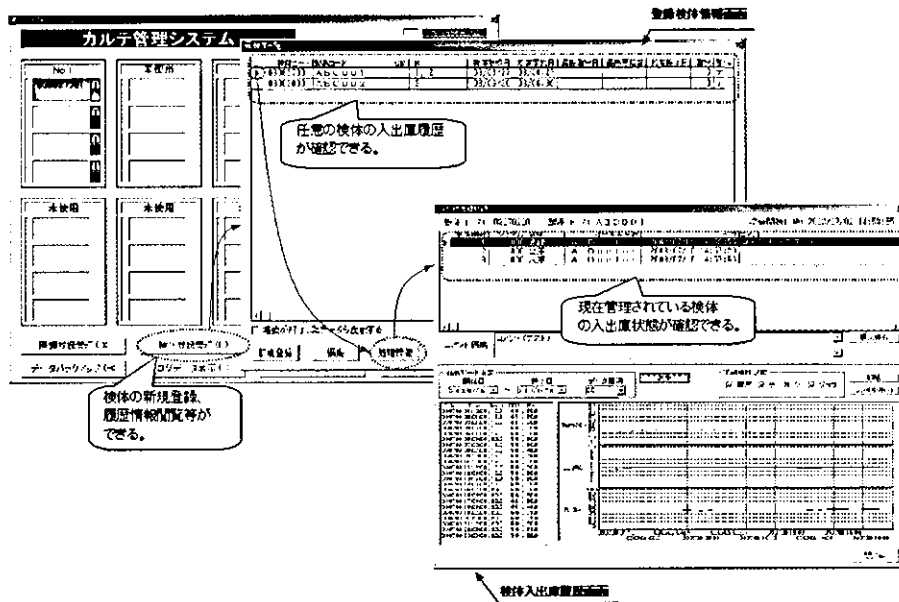
・培養する検体とそのカルテに1対1で対応するバーコードラベルを発行し、検体をインキュベータに格納する時や、取り出すとき等の作業時にこのバーコードが一致するかどうかを確認し、一致したときのみ検体の取り扱いを可能にするようコンピュータとそれに連携したCO₂インキュベータにより管理する。



カルテ管理システム説明図⑥

— システムの特徴 ② —

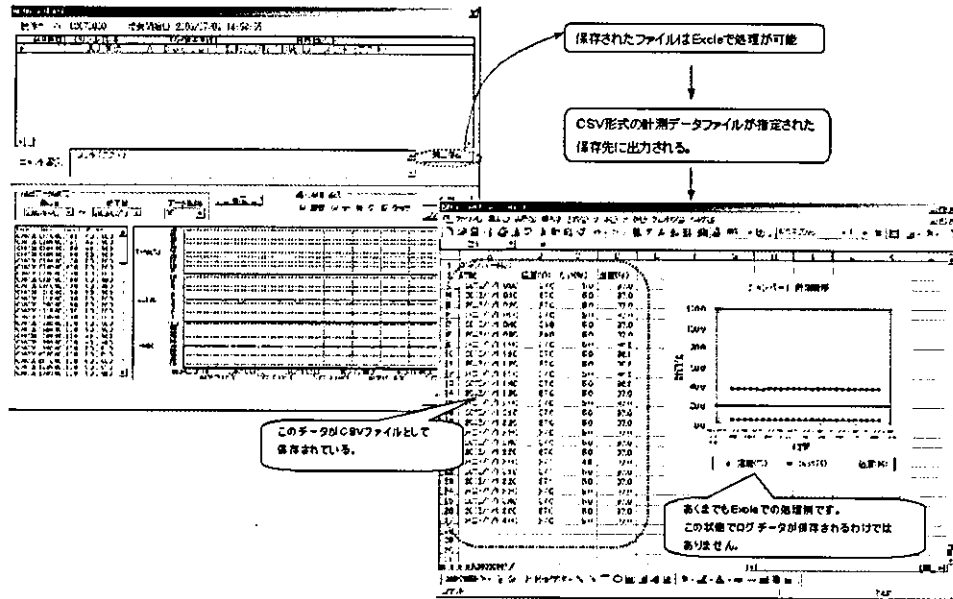
・検体のインキュベータへの入庫状況をコンピュータにより管理しデータベースとして保存する。



カルテ管理システム説明図⑦

— システムの特徴 ③ —

・インキュベータとは別にモニター装置を設置し、温度、CO2濃度、湿度のデータを計測する。又、計測データを通信ユニットを介してリアルタイムに送信しPCにデータベースとして保存する。



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

4. 品質管理法の開発

4-1 ex vivo 増幅臍帯血における製品規格の確立

研究協力者:丸山 京子

(先端医療センター再生医療研究部技術員)

分担研究者:伊藤 仁也

(先端医療センター再生医療研究部主任研究員)

研究要旨

細胞治療、再生医療において科学的根拠に基づいた臨床プロトコルを作成する研究は、歴史的にまだ浅く解析法などの体系が整っていないのが現状である。

体外増幅された臍帯血幹細胞移植を臨床応用するには、培養した細胞の安全性、効果の予測を行うことが必要となる。我々は、製品規格の確立を目的とし、細胞の安全性と効果の検証から、規格試験として製造毎の品質管理規格項目を設定した。

A. 研究目的

ex vivo 増幅させた臍帯血移植の臨床応用のためには培養細胞の安全性の評価が必要不可欠である。現在、細胞治療製剤の品質、安全性については厚生労働省から医薬第906号により示されている。我々はこれをもとに製品の安全性の評価に必要なと思われる各試験項目を1) 形態学的な異型細胞の有無、細胞分画の確認 2) がん化 3) 生理活性物質の産生 4) 培養過程における汚染確認 に分類して設定し、その中から規格試験項目とそのスケジュールを定めることを目的とし本研究を実施した。

B. 研究方法

最終製品の安全性の評価のための試験として、細胞形態、製品の細胞特性の確認という観点からサイトスピン標本でのメイ・ギムザ染色の他、ペルオキシダーゼ染色、アルカリホスファターゼ染色、非特異的・特異的エステラーゼ二重染色、PAS染色、鉄染色を含む各種特殊染色を行った。また、Flow CytometryによるLineage解析を行った。Lineage markerとしてCD3、CD56、CD19、CD14、CD66b、CD33、GlycophorinA、CD41について検討した。がん化に関する検査としてはG-band分染およびマルチカラーFISH解析に

よる染色体解析の他、転座型白血病において頻度が高いとされる8種類のキメラ遺伝子解析を行った。

細胞機能評価として生理活性物質の産生の有無を調べるためサイトカイン産生能試験を行った。本試験ではスクリーニング的にプロテインアレイ法を用いて79種類のサイトカインについて検討した。

また、汚染否定を目的としてTaq-Man PCRによるウイルス試験、Light Cycler PCRによるマイコプラズマ試験、無菌試験、比濁時間分析法によるエンドトキシン試験を実施した。ウイルス検査に関しては、改正薬事法によりドナー検査として必須と定められるHBV、HCV、HIV、HTLVウイルスに加えパルボB19ウイルス、また健常人でも常在するとされるヘルペスウイルスについて解析した。マイコプラズマ試験は、培養細胞およびヒトからの検出例のある18菌種を対象としたプライマーを用いて測定した。無菌試験は局法に従い、チオグリコール酸培地、ソイビーン・ガゼイン・ダイジェスト(SCD)培地による直説法で行った。本試験は判定に2週間と時間を有するため、迅速な判定が可能なエンドトキシン試験と合わせて無菌性に関する試験とした。とりわけ培養過程のContamination等の汚染否定を目的とした無菌試験、エンドトキシン試験に

においては培養7日目培養液と最終製品にて実施した。

C. 研究結果

A) 形態解析 (メイ・ギムザ染色および各種特殊染色)

最終製品 3 例について解析を行った。メイ・ギムザ染色の結果、顆粒球、単球系への分化を認め、また幼若な芽球が 35%維持されていることが確認された (Fig.1-1)。顆粒球への分化マーカーであるペルオキシダーゼ染色、エステラーゼ二重染色特異的反応の陽性所見からも顆粒球系への分化を認めた。しかし、アルカリホスファターゼ染色により陽性顆粒を認めなかったことから成熟好中球の存在は否定された。単球系への分化は非特異的反応の陽性所見により確認された。なお、鉄染色においては陽性を認めず鉄代謝異常等を疑う所見は認めなかった。好中球、巨核球、単球などで陽性を示す PAS 染色においては約半数が陽性を示し多糖類を有する細胞であることが確認された (Fig.1-2)。

以上の染色結果より、異常を示唆する形態および生化学的所見は認めなかった。

メイ・ギムザ染色	(%)
骨髓芽球	35.3
前骨髓球	31
骨髓球	10.3
単球	20.3
巨核球	3

Fig.1-1

特殊染色陽性率	(%)
ペルオキシダーゼ染色	41
エステラーゼ染色	
非特異的反応	53.7
特異的反応	20
PAS染色	47
アルカリホスファターゼ染色	0
鉄染色	0

Fig.1-2

B) Flow Cytometry による Lineage 解析
最終製品 3 例にて表面抗原解析を実施した結果、T 細胞、B 細胞、成熟顆粒球への分化は認められず、単球、赤血球、巨核球系への分化を認めた (Fig.2)。

Lineage		%
CD 3	成熟T 細胞	0
CD56	NK 細胞	3.5
CD19	B 細胞	0
CD14	単球、顆粒球	7.3
CD66b	成熟顆粒球	0.3
CD33	骨髓顆粒球、単球系細胞	73.7
GPA	赤芽球、赤血球	11.3
CD41	巨核球、血小板	31
CD34		43.9

Fig.2

C) 染色体解析

最終製品 2 例で G-band 分染およびマルチカラー-FISH 解析を行った結果、各解析細胞数において異常所見は認めなかった。

D) 白血病キメラ遺伝子解析

major bcr/abl、minor bcr/abl、AML/MTG8、PML/RAR α 、CBF β /MYH11、MLL/LTG4、MLL/LTG9、E2A/PBX1 の 8 種のキメラ遺伝子の検索を行った。最終製品 2 例にて実施した結果、いずれのキメラ遺伝子も検出しなかった。

E) サイトカイン産生能試験

最終製品の 24 時間後培養上清 3 例をプロテインアレイ法にて検討した結果、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-15、IFN- γ 、SCF、SDF-1、LIF、LIGHT、MIF、NAP-2、TIMP-1、TIMP-2 の検出を認めた。中でも IL-8 の著名な産生を認めたため、ELISA 法による IL-8 の定量を行った (Fig.3)。

	IL-8 concentration
Lot (1)	348.7 pg/ml
Lot (2)	599.1 pg/ml
Lot (3)	1057.9 pg/ml
Mean	668.6 pg/ml

Fig.3

F) ウイルス試験

解凍後臍帯血上清および最終製品の洗浄前サンプルの 3 例において実施した結果いずれのウイルスも検出しなかった。

G) マイコプラズマ試験

最終製品の洗浄前サンプルの 3 例において実施した結果、マイコプラズマの検出は認めなかった。

H) 無菌試験

培養 7 日目培養液および最終製品 (3 例) にて実施した結果、14 日間の培養でいずれのサンプルも菌の発育を認めなかった。

I) エンドトキシン試験

無菌試験と同様、培養 7 日目培養液および最終製品 (3 例) にて実施した結果、いずれも下限値 0.035EU/ml 以下で局法基準の 0.12EU/ml 未満を満たす結果であった。

D. 結論

今回、形態異常、がん化、ウイルスおよびマイコプラズマ検出、無菌性について検討した結果、製品の一定の安全性が実証された。サイトカイン産生能試験に関しては IL-8 産生能の検討の結果、その定量結果がヒト血清に含まれる IL-8 濃度 8pg/ml に比し高濃度で

あることがわかった。この点については今後、通常の臍帯血移植に比べ憂慮される事象であるかどうか検討する必要性がある。

今後製造を行うにあたり、安全性に関する規格試験としては、ウイルス試験、マイコプラズマ試験、無菌試験、エンドトキシン試験を設定することとした。さらに、原料受け入れ試験として解凍後臍帯血でのメイ・ギムザ染色による形態解析を実施する事とした。なお、ウイルス試験の検討項目においては、HBV、HCV、HIV、HTLV、パルボB19ウイルス、サイトメガロウイルスに限定し実施することとした。これらの規格試験の実施スケジュールとその規格値を以下に示す (Fig.4 Fig.5)。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

ex vivo 増幅臍帯血の臨床試験にむけた品質管理法の確立

丸山 京子、伊藤 仁也、鈴木 秀文、小林 典孝、芦原 義久、中畑 龍俊
第27回日本造血細胞移植学会

2. 論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

day 0	解凍後臍帯血	形態解析(メイ・ギムザ染色)
day 7	培養液	無菌試験
day 12	培養液(洗浄前)	ウイルス試験 マイコプラズマ試験
	最終製品	無菌試験 エンドトキシン試験

Fig.4

形態解析(メイ・ギムザ染色)	異型細胞のモノクローナルな増殖を認めない
ウイルス試験	HBV、HCV、HIV、HTLV、パルボB19、CMVを認めない
マイコプラズマ試験	マイコプラズマを認めない
無菌試験	菌の発育を認めない
エンドトキシン試験	0.12EU/mL未満

Fig.5

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）

分担研究報告書

4. 品質管理法の開発

4-2 神戸バイオメディカル創造センターにおける品質管理試験の立ち上げ

分担研究者：上遠野 延行

（株式会社三菱化学ビーシーエル研究開発部長）

研究協力者：松本 浩、島田康司

（株式会社三菱化学ビーシーエル研究開発部）

研究要旨

Ex vivo 増幅臍帯血移植を臨床応用化するにあたり、実際の製造工程に連動した品質管理試験（マイコプラズマ否定試験、ウイルス否定試験、エンドトキシン試験）体制の整備が必要である。本研究では Ex vivo 増幅臍帯血の製造を行う先端医療センターに隣接した施設である神戸バイオメディカル創造センター（以下 BMA）内に実製造と連動した品質管理試験体制を整備することを目的として、（1）品質管理試験法の確立（2）実製造試験に連動した試験体制の構築（3）実試料測定試験 を行った。

〔結果〕PCR 法によるマイコプラズマ否定試験、PCR 法によるウイルス否定試験、カイネティック比色法によるエンドトキシン試験を実施し、その精度について確認した。実試料である凍結臍帯血の融解から、最終製品（培養 12 日目の Ex vivo 増幅臍帯血）の出荷までをシミュレートした Ex vivo 増幅臍帯血製造規格試験工程に先に確立した品質管理試験を適用し、実製造に則した試験手順を確認するとともに標準作業手順書を作成した。また実試料の測定において、試料の測定反応への干渉作用が無いことを確認した。