

Ex vivo 増幅臍帯血の製造法の確立に関する研究

【背景】

トランスレーショナルリサーチとは、大きく「臨床研究を正当とするに足る必要な非臨床研究を終了し、その結果から人に適用する妥当性が倫理的かつ科学的視点から公式に認められたときに人を対象として行われる細胞、組織等を用いた臨床研究」と定義され、その実施には試験薬/試験製品概要書、厳格な臨床研究実施計画書(臨床プロトコル)の作成、高い水準の診療体制、及び倫理審査体制など総合的な基盤整備が要求される。特に生体外で培養や加工した細胞を臨床研究に用いる場合には、細胞の機能、品質及びその安全性が科学的に保証されていなければならない。細胞治療の普及に伴い 2001 年米国の食品医薬品局 (FDA) から「ヒト細胞治療における GTP (Good Tissue Practice) ガイドライン」が施行された。これを受け我が国でも、2003 年 7 月に薬事法の改正が行われ「細胞治療用生物製剤の取り扱い」に関しての基準が明確にされており、細胞療法を行うにあたってはこれら基準に合致した細胞の加工が必要である。具体的には、伝染物質の混入などを防止するための閉鎖系培養や無血清培養法の確立、無菌的な細胞操作のための CPC の整備、更にこれらの作業の均質化のための文書体系の整備、及び品質管理体制の確立などが必要と考えられる。

我々はこれまでに 5 種のサイトカインを組み合わせることで、体外において効率よく造血幹/前駆細胞を増幅する方法を開発し、その基礎的成果を実際の臍帯血移植に応用するトランスレーショナルリサーチを計画、ソフト及びハード面の総合的な研究を進めてきた(「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 (平成 14~16 年度厚生労働科学研究費補助金基礎研究成果の臨床研究推進事業)」、「サイトカインによる増幅培養臍帯血による臍帯血移植の臨床試験 (平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金ヒトゲノム再生医療等研究事業)」。本研究では、現在の臍帯血移植の欠点である造血幹/前駆細胞の絶対数不足から生じる様々な問題(生着不全、感染、及び医療費の高騰など)を解決するため、ex vivo 増幅した臍帯血を臍帯血移植及び DLI へ臨床応用し、その有効性及び安全性を証明すること、さらには ex vivo 増幅臍帯血移植、同 DLI を新たな治療法として確立することを目的としている。本研究の成果は造血幹細胞移植への展望を開くだけでなく、造血幹細胞の遺伝子治療、さらにはその可塑性を利用した再生医療など多方面への応用が期待されている。

【目的】

本分担研究では、GTP に準拠した臍帯血の ex vivo 増幅法を確立すること、製造環境を整備すること、及び全作業工程の文書体系を作成すること等により、

トランスレーショナルリサーチに不可欠なGMPに準拠した細胞プロセッシングのための基盤整備を行うことを目的としている。本実施期間中は他の研究者との共同で、これまで我々が確立した閉鎖系無血清培養法を用いた試験製造を繰り返し行ない、製造条件の改変と製造再現性の確認を実施すると共に、製造で必要となる各種手順書・指示書・記録書等の作成を行った。また環境衛生を担保することを目的として室内、特にCO₂インキュベータの庫内を中心とした環境モニタリングを行ない、定期清掃・消毒の方法、及びその頻度について検討した。以下に

1. *ex vivo* 増幅臍帯血の製造法の確立
 2. 全作業工程の文書体系の整備
 3. CPCの整備
- さらに今後の予定として、
4. 製造バリデーションの実施計画について報告する。

【研究成果】

1. 「*ex vivo* 増幅臍帯血の製造法の確立」

1) 方法

我々はこれまでにサイトカインと無血清培地を用いて、閉鎖系バッグ培養による製造条件を検討し、その結果、ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を、37℃、炭酸ガス濃度5%、酸素濃度5%の条件下、stem cell factor (SCF)、thrombopoietin (TPO)、Flt-3 ligand (FL)、及びIL-6/可溶性IL-6receptor複合体 (FP6)を各々100ng/mLを含むQBSF-60培地で12日間培養する方法を開発した。本実施期間中は、臨床研究の実施を見据えた培養方法の試験製造を実施し、製造条件の改変と再現性の確認を行なった。

2) 結果

まずFig. 1に9回の試験製造におけるCD34陽性細胞の割合の推移を示した。磁気分離装置での分離前の臍帯血中CD34陽性細胞率は $0.54 \pm 0.16\%$ であり、分離後の陽性率は $35.77 \pm 15.71\%$ であった。培養初日に約36%であった陽性率は培養7日目において上昇したが、以降は減少し14日目には約12%となった。培養細胞の表面抗原解析の結果、その他多くの細胞はCD33陽性の骨髄球系細胞であった。また基礎的検討ではあるが、無血清培養で長期間(50日以上)培養した場合には、CD34陽性細胞率の減少は止まり、10%前後の陽性率を示し続け、これらの細胞にはマウス骨髄再建能が維持されていることを確認している。

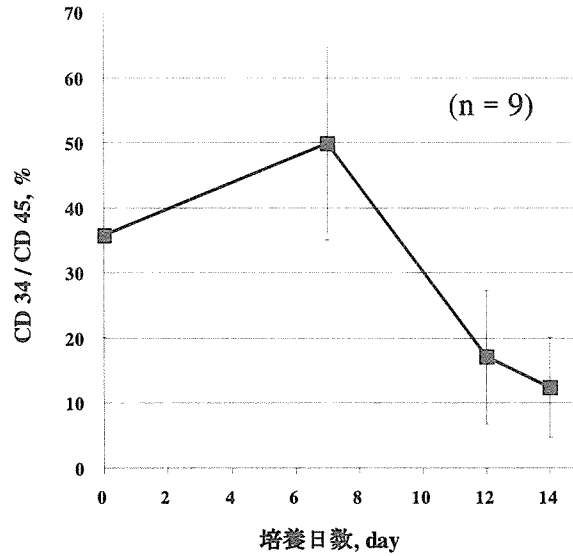


Fig. 1 閉鎖系培養法における CD 34 陽性細胞の割合

次に 14 日間の培養における増幅率について検討を行った結果、試験製造毎の差が大きく、総細胞数で 128.0 ± 85.8 倍、CD34 陽性細胞数で 21.9 ± 20.5 倍であった (Fig. 2A)。一方培養期間中の細胞生存率はいずれの試験製造においても培養 1 週間で約 80%を示し、その後はプラトーを保持していた。(Fig. 2B)。

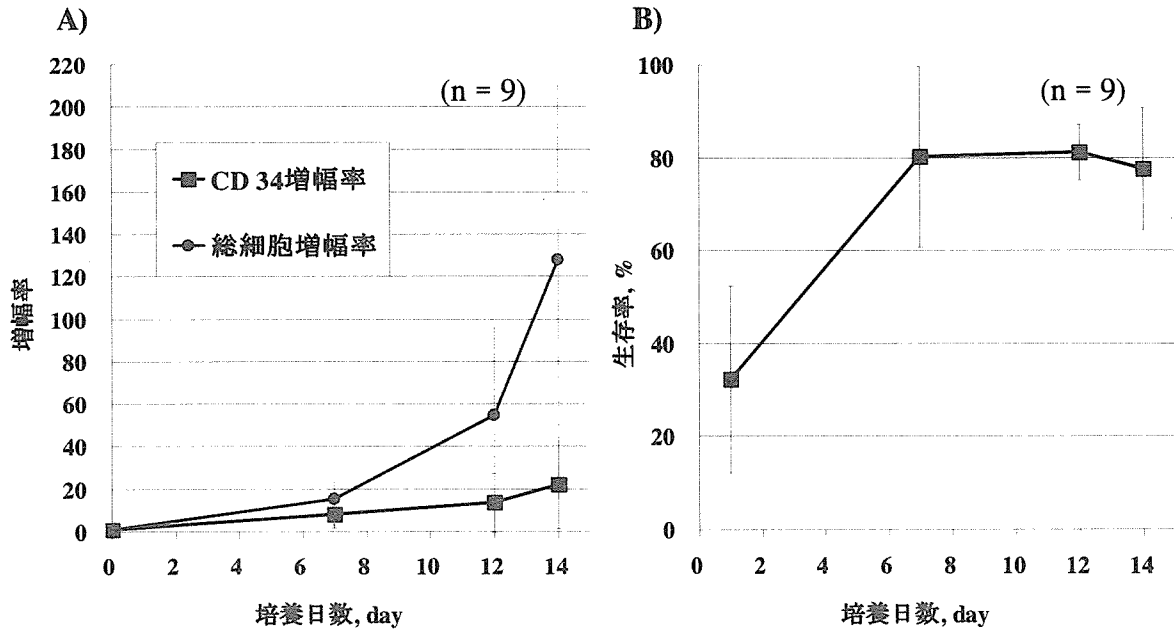


Fig. 2 閉鎖系培養法における増幅率及び生存率

さらに有核細胞数 1×10^3 換算の CFU-GM、BFU-E、CFU-Mix 及びコロニー形成細胞数の無血清閉鎖系培養における増幅率を検討した結果、細胞増幅率と同様に試験毎の増幅率に差が認められ、14 日間の培養において、CFU-GM で 80.40 ± 55.10 倍、BFU-E で 19.36 ± 7.04 倍、CFU-Mix で 37.56 ± 28.69 倍、総コロニー形成細胞として 57.50 ± 35.18 倍であった (Fig. 3A-D)。

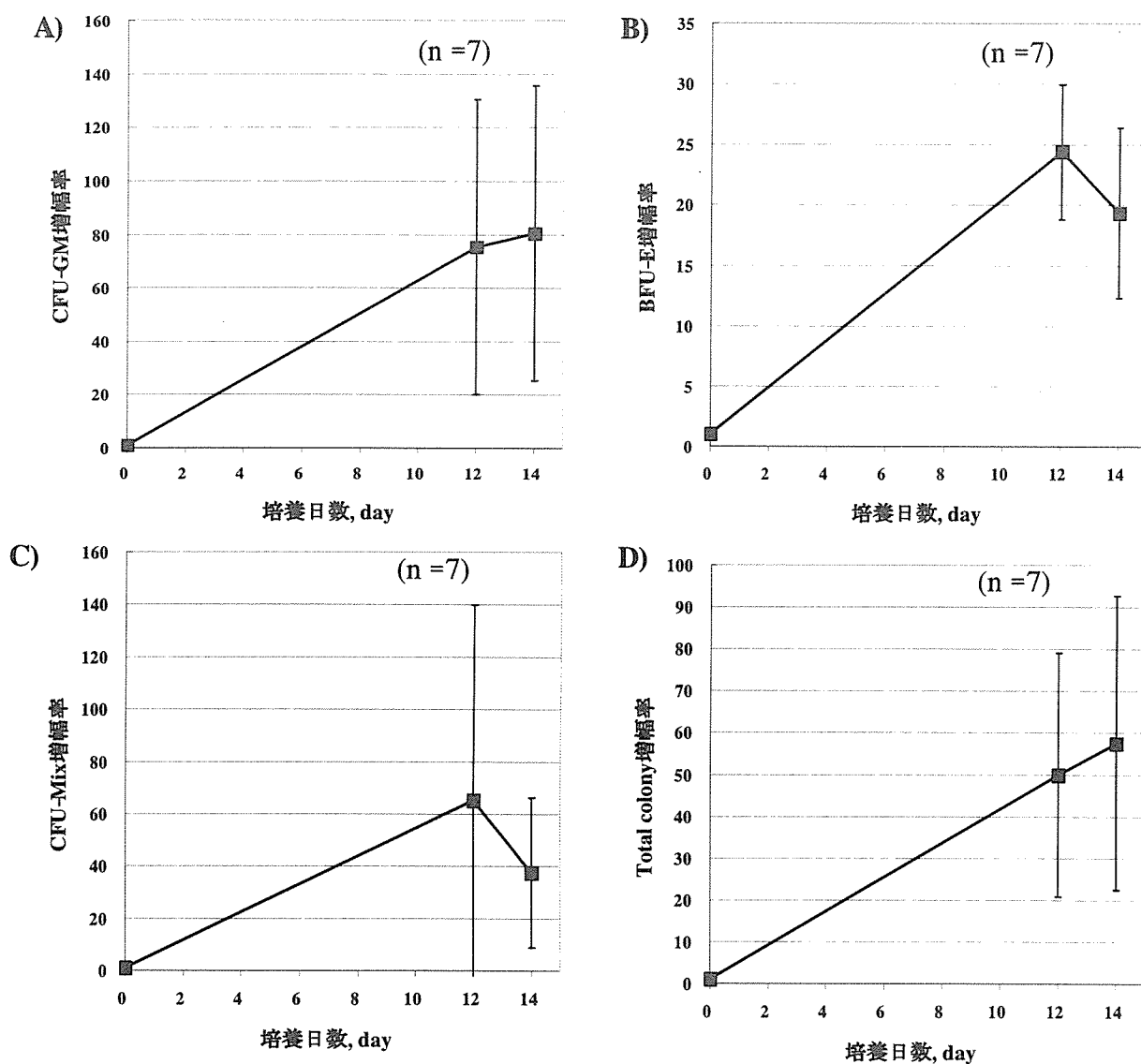


Fig. 3 閉鎖系培養法におけるコロニー形成細胞数

3) 考察

本研究の結果、我々の開発した製造方法により CD34 陽性細胞を平均で 20 倍以上増幅できることが示された。この値は、これまで基礎検討してきた結果に合致するものであり、本製造方法の再現性が高いことが示唆される。一方、細胞数やコロニー形成細胞数の増幅率に関して、増幅が良いものは CD34 陽性細胞の初期コロニー形成能が高く、増幅が悪いものは初期コロニー形成能が低い傾向にあり、初期コロニー形成能の差が、今回行った試験製造における増幅率が不安定であった要因の一つであると考えられた。このことは、安定した製造を実施するためには、原料となる凍結臍帯血の受け入れ基準として、さい帯血バンクから提示される初期コロニー形成能を設定することが必要であることを示唆している。また使用した無血清培地にも性能格差が認められ、細胞増幅率に

大きな影響を与えたことから、同様に培地の受け入れ基準も設定することが必要であると考えられた。これらの基準は、今後、以下 2.において策定した規格書において改変、反映させていく予定である。

2. 全作業工程の文書体系の整備

1) 方法

GMP に準拠した細胞治療製剤を製造するためには、製造方法、品質管理方法、及び環境衛生に関する基準を定めること、原材料及び製品に関する一定の規格値を定めること、さらには実際の作業工程における指図及び確認を行うことなどが必要であると考えられる。そのため、我々は 1.で報告した試験製造結果を踏まえ、製造方法、品質管理方法、及び環境衛生等に関する以下の文書体系(Fig.4)を整備した

2) 結果

まず先端医療センターCPC管理規定書を基に、製造管理基準書(原料、製品等の保管及び設備器具、従業員、作業管理に関する文書)、製造衛生管理基準書(製造作業を行う場所ごとの設備器具や従業員の衛生管理に関する文書)、及び品質管理基準書(検体採取方法、試験検査結果の判定方法、その他品質管理に関する基本的要件を定めた文書)を定めた。これら三管理基準書を基に製品標準書(原料、規格試験項目及び製造方法等の Ex vivo 増幅培養、管理に必要な項目を標準化し、記載した文書)、規格書を作成し、これらの中に品目ごとの製造方法、規格試験方法、保管条件等の製造及び品質管理、及び原材料の規格に関する事項を記載した。さらにこれらに記された製造方法や規格試験毎に標準作業手順書(作業工程の正しい手順及び方法を記載した文書)を作成した。また実際の作業は、指図書(製造工程での指図項目、注意事項、その他必要な事項を記載した文書)を用い、その記録には記録書(指図書に従って製造した結果をロットごとに記録した文書)を用いて行うこととした。また記載する全ての工程はダブルチェックにて行い、安全性かつ均一な作業できるよう配慮した。Table 1-3 に今回作成した規格書、標準作業手順書、指図書、及び記録書の項目を示す。

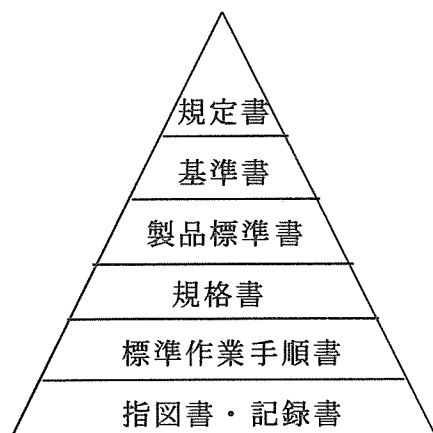


Fig. 4 文書体系

Table 1 関連文書一覧

製品標準書		ex vivo 増幅臍帯血
		品質管理手順書
規格書	原材料	臍帯血
		SCF
		TPO (KRN9000)
		FP6 (FP6 (Yeast) 87.5 mg 0.5 mL)
		FL
		QBSF-60
		デキストラン 40 注射液
		献血アルブミン-Wf
		献血ヴェノグロブリン-HH ヨシトミ
		大塚生食注
		Clini MACS CD 34 Reagent
		Clini MACS PBS / EDTA Buffer
		テルモ分離バッグ (製品バッグ)
		Afc 培養バッグ
		ニプロフローズバッグ
		CP-1
		a-MEM
	中間体	解凍後臍帯血
		CD 34 陽性画分
		CD 34 陰性画分
培養 7 日目培養液		
製品	ex vivo 増幅臍帯血	
標準作業手順書	その他	「ex vivo 増幅臍帯血」 製造・品質管理関連文書一覧
		「ex vivo 増幅臍帯血」CPC 製造機器一覧表
		番号の付与 (製造番号、製品番号、試験検査番号、管理番号)
		製品の使用可否判定及び出荷判定の手順
		不適格品取り扱い方法
		バリデーションマスタープラン

Table 2 関連文書一覧

標準作業手順書	製造方法	製造依頼の受取から製造開始までの手順（凍結臍帯血の受入、保管及び出庫手順を含む）
		凍結臍帯血の解凍方法
		工程ラベルの作成手順
		ex vivo 増幅臍帯血の製造方法（第0日目）
		CD 34 陰性画分の処理、保存方法
		ex vivo 増幅臍帯血の製造方法（第4日目）
		ex vivo 増幅臍帯血の製造方法（第7日目）
		ex vivo 増幅臍帯血の製造方法（第10日目）
		ex vivo 増幅臍帯血の製造方法（最終日）
		ex vivo 増幅臍帯血の製造方法（製品梱包）
		QBSF-60 の受入、保管、出庫の手順
		原材料の受入、保管、出庫の手順
		製品ラベルの作成手順
		製造作業時のモニタリング方法
		検体採取・識別・運搬方法
	TPO・FP6 の送付依頼及び入庫	
	製造指図書 ・記録書	ex vivo 増幅臍帯血の製造（第-1日目）
		ex vivo 増幅臍帯血の製造（第0日目）
		ex vivo 増幅臍帯血の製造（第4日目）
		ex vivo 増幅臍帯血の製造（第7日目）
		ex vivo 増幅臍帯血の製造（第10日目）
		ex vivo 増幅臍帯血の製造（第12日目）
		ex vivo 増幅臍帯血の製造（最終日）
		ex vivo 増幅臍帯血の製造（培地試験）
		CD 34 陰性画分の処理、保存方法
		臍帯血解凍手順指図書・記録書
		「ex vivo 増幅臍帯血」 培地充填試験（第0日目）
「ex vivo 増幅臍帯血」 培地充填試験（第4日目～最終日）		
「ex vivo 増幅臍帯血」 培地充填試験（改良バッグ操作）		

Table 3 関連文書一覧

標準作業手順書	製造設備 機器操作	Clini MACS の操作手順
		セルウォッシャーACP215 の操作方法
		シリンジポンプの操作方法
		プログラムフリーザーの操作方法
		無菌接合装置の操作手順
		チューブシーラーの操作手順
		遠心分離機の操作手順
	試験検査方法	CD 34 陽性細胞数測定法
		増幅臍帯血 CD 34 陽性細胞数測定法
		細胞数測定法
		細胞形態観察
		コロニー培養測定法
		増幅臍帯血無菌試験
		CD 34 陰性画分無菌試験
		エンドトキシン試験
		DNA ウイルス定性 (DNA multiplex 法)
		RNA ウイルス定性
		サイトメガロウイルス定量
		マイコプラズマ試験
		CD 34 陰性画分 CD 3 陽性細胞数測定法
		解凍後臍帯血表面抗原解析
		増幅臍帯血表面抗原解析
		培地受け入れ試験 (ロットチェック) 方法
		Daudi 細胞株培養増幅・保存方法
	培地受け入れ試験 (ボトルチェック) 方法	
	試験検査 記録書	CD 34 陽性細胞数測定法
		増幅臍帯血 CD 34 陽性細胞数測定法
		細胞数測定法
		細胞形態観察
		コロニー培養測定法
		CD 34 陰性画分 CD 3 陽性細胞数測定法
		解凍後臍帯血表面抗原解析
	増幅臍帯血表面抗原解析	

3) 考察

上記文書体系は GMP の理念である、人為的な誤りを最小限に止めること、製剤の汚染及び品質低下の防止、及び高い品質を保証するために不可欠であると考えられる。今回我々が作成した一連の文書体系により、一定の品質を保った細胞の製造に留まらず、原材料の使用状況や在庫等の確認、さらには不具合が生じた際のトラブルシューティングを迅速に行うことが可能となったと考えられる。

3. CPC (cell processing center) の整備

1) 方法

上述した製造衛生管理基準書に則り、CPC 各室への入退出手順、及び作業手順を決定し、月一回の定期的な環境モニタリングを行うことにより一連の手順の検証を行った。モニタリングでは添付資料 1 に示す CPC 内測定点において落下菌、浮遊浮菌、付着菌、及びパーティクルカウンターによる塵埃数の測定を行った。各測定における合否の基準は、製造衛生管理基準書に記載されている「清浄度の管理基準」を用いた。

また細胞を培養する環境である CO₂ インキュベータ内のモニタリングに関しては、過去に真菌汚染が認められた CO₂ インキュベータを用いて、グルタールアルデヒド、及び 70%エタノールによる定期清掃を行い、清掃前後での庫内落下菌を測定することにより、清掃の頻度とその方法について検討を行った。落下菌測定における合否の基準は、クラス 10,000 の EU 基準である、1 時間暴露にて 5 個/10cm 以下を用いた。

2) 結果

まず、先端医療センターCPC の概要を示す (Fig.5)。先端医療センターCPC 内には、異なる細胞治療製剤を独立して安全に製造するための培養操作室が 2 室と培養室が 1 室整備されている。また、センター全体をプレハブ構造の中に配置し、更に CPC 全体を外の環境より陽圧とすることによって外気を完全にシャットアウトしている。CPC 内の清浄度はクラス 100,000、クラス 10,000、クラス 100 の 3 つのエリアに区分されている。クラス 100,000 は培養室、準備室、サンプル保管庫、更衣室があり、クラス 10,000 は細胞操作室、着衣室、クラス 100 は細胞培養室内の安全キャビネット内となっている。これら各エリアの清浄度、温湿度及び室間圧差は随時モニタリングされており、GMP 準拠細胞プロセッシングを行う具備すべき基準を満たしていると考えられる。以下我々が実施している CPC 各室への入退出手順、及び作業手順の概略を示す。

製造作業を行う作業員は細胞調整エリアへの入室に際し手指を洗浄し、アルコール消毒をした上で、更衣室で無塵衣、手袋を着用する(Fig.5①)。着用後、作

業に使用する原材料や器具を整え、アルコール消毒をし、エアロック(A/L)室1に入室する(Fig.5②)。入室後マスク、手袋を装着し、準備室に入りパスボックスを通して培養操作室へ原材料等を搬入する(Fig.5③)。培養操作室へは着衣室へ入り、滅菌消毒された無塵衣を頭から足先まで覆い、手袋を着用してから入室する(Fig.5④)。作業終了後、原材料等はパスボックスを通して準備室もしくは培養室へ搬出する。培養操作室の退出の際には、脱衣室にて無塵衣を脱ぎ、脱衣室を通過して退出する(Fig.5⑤)。これら一連の手順において、作業員の動線及び原材料等の動線が一方方向へ流れ、交差しないよう配慮した。

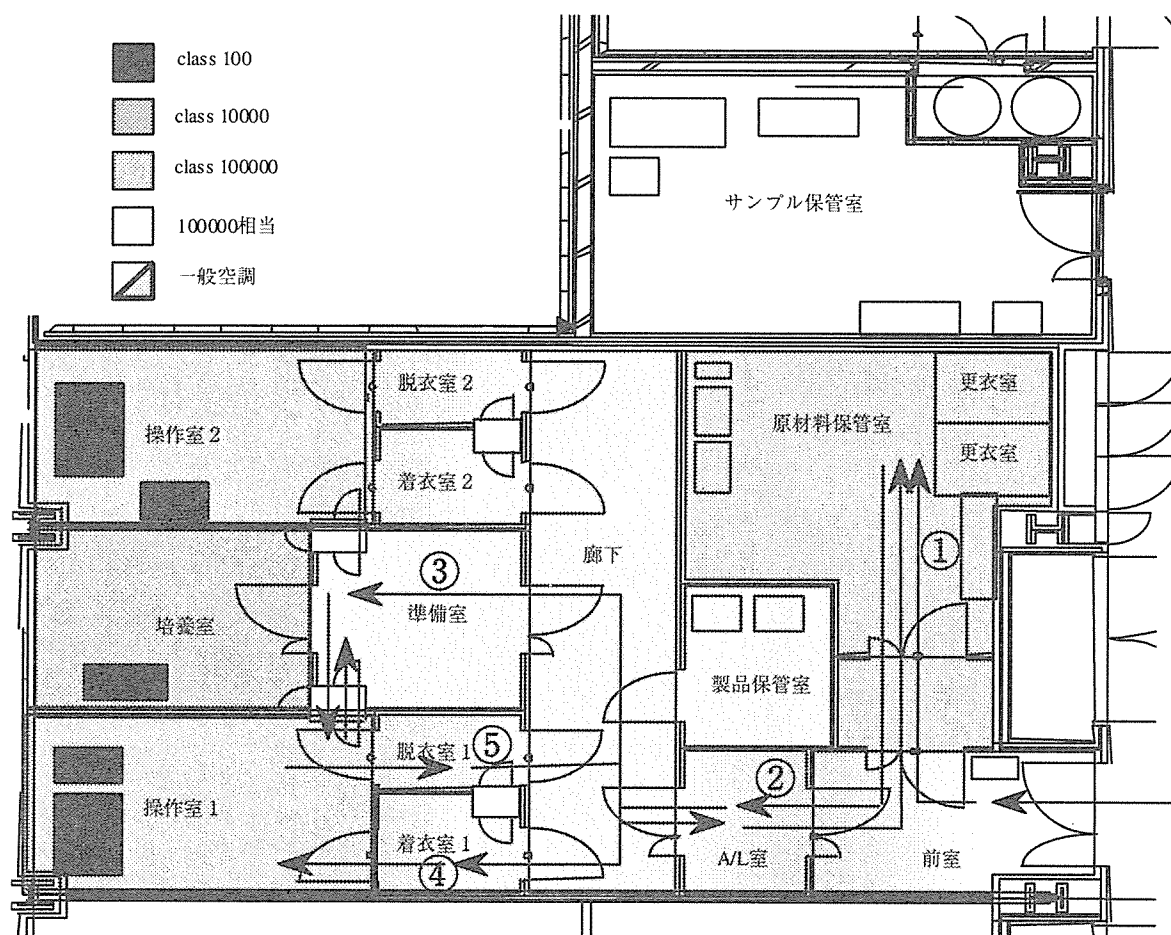


Fig. 5 CPC 内の空調制御及び入退出路

これら手順の検証のため行った環境モニタリング結果の一例を別表として添付した(添付資料 2)。実施期間中、いずれの項目においても基準範囲内であった。

次に、過去真菌汚染が認められた CO₂ インキュベータを用いた、清掃前後での庫内落下菌の測定結果を Fig.6 に示す。稼働時には庫内環境を通常培養条件下

(37℃、炭酸ガス濃度 5%、酸素濃度 5%、湿度 95%)とし、停止時にはトレイ等内部備品を完全に取り除いた状態で、加湿用蒸留水を除去し乾燥させた。

まず 9/21 上下段を 70%エタノールにより消毒し稼働させた結果、一旦は菌数の減少が見られたが、稼働 6 日目には規格を大きく上回る菌が検出された。そこで 9/28 に上下段をグルタールアルデヒドにより消毒し、70%エタノール、滅菌蒸留水による拭き取り後、上段を稼働、下段を停止した。その結果稼働していた上段には 7 日目までに規格を上回る菌が検出されたが、停止していた下段は規格内を維持していた。さらに 10/5 上下段を 70%エタノールにより消毒し上段を停止、下段を稼働した結果、7 日目いずれの庫内も規格内を維持していた。

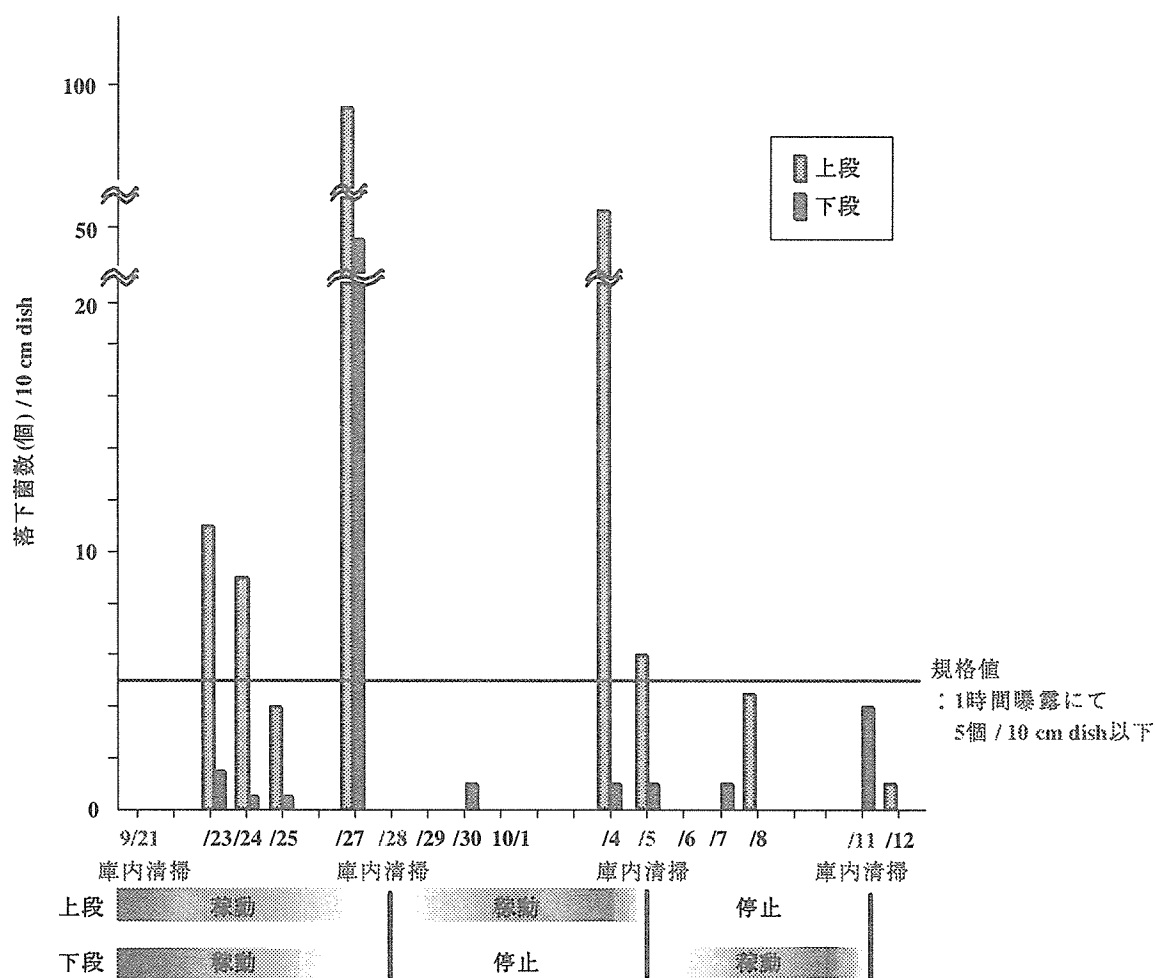


Fig. 6 CO2 インキュベータ内の落下菌数の推移

以上の結果から

- ・ 除菌消毒にはグルタールアルデヒドが有効であること
- ・ 庫内乾燥により菌の増殖が抑制できること
- ・ 稼働時には週 1 回の 70%エタノールによる清掃・消毒が必要であること

が明らかとなった。

この結果を受け、現在我々は CPC 内の CO₂ インキュベータの定期清掃・消毒を以下の内容で行っており、開始以降庫内からの菌検出は認めていない。

- ・ 月 1 回グルタルアルデヒドによる庫内消毒
- ・ 稼働時には週 1 回 70%エタノールによる定期清掃・消毒
- ・ 上段下段の一週間ごとの交替使用
- ・ 停止時の庫内乾燥

3) 考察

今回上述した標準作業手順書に従って室内の清掃・消毒を定期的に行った結果、コンタミネーションの原因となる菌及び浮遊微粒子は基準値以下であったことから、現在の清掃・消毒方法が GMP 準拠施設の環境維持に適切であると考えられた。また試験製造における無菌試験においても菌の混入検出は認められず、一連の作業工程においても安全な製品を製造可能であると考えられた。

現在、CPC が満たすべきハード面での基準は、ある程度確立されつつあるが、求められる環境を維持するための清掃・消毒方法やそれらの回数といったソフト面に関する基準は、未だ確立されておらず、今回我々は、細胞を培養する環境である CO₂ インキュベータ内の落下菌数をモニタリングし、その結果をもとに定期清掃・消毒方法を決定した。今後もこのような科学的根拠を蓄積することによる、より実践的(効果的かつ廉価)な整備を行っていく必要があると考えられた。

4. 「製造バリデーシヨンの実施計画」

「バリデーシヨン試験」は、細胞生物製剤を製造する際に使用する設備や環境、また製造工程や試験方法によって得られた結果が目的とした通りであり、科学的に正しいものであることを検証するために実施されるものである。製造バリデーシヨン試験を行うことにより、1-3.で述べた閉鎖系無血清培養方法、環境衛生のための手順、さらには文書体系の運用を含めた全作業工程が GMP に準拠した細胞プロセッシングを行う上で適切であるかどうか検証することが可能である。

1)実施方法

製造管理責任者は、上述した文書体系に基づき製造に適した臍帯血を決定し、標準作業書に基づいて製造計画書を作成、関係部門に送付する。各関係部門は原料等の在庫確認を行い、不足分の発注を行う。製造部門は CPC の環境モニタリングや環境衛生試験等を行い、細胞を安全に加工できる体制を整える。培養開始予定日より、以下 Fig.7 に示す閉鎖系無血清培養を行う。

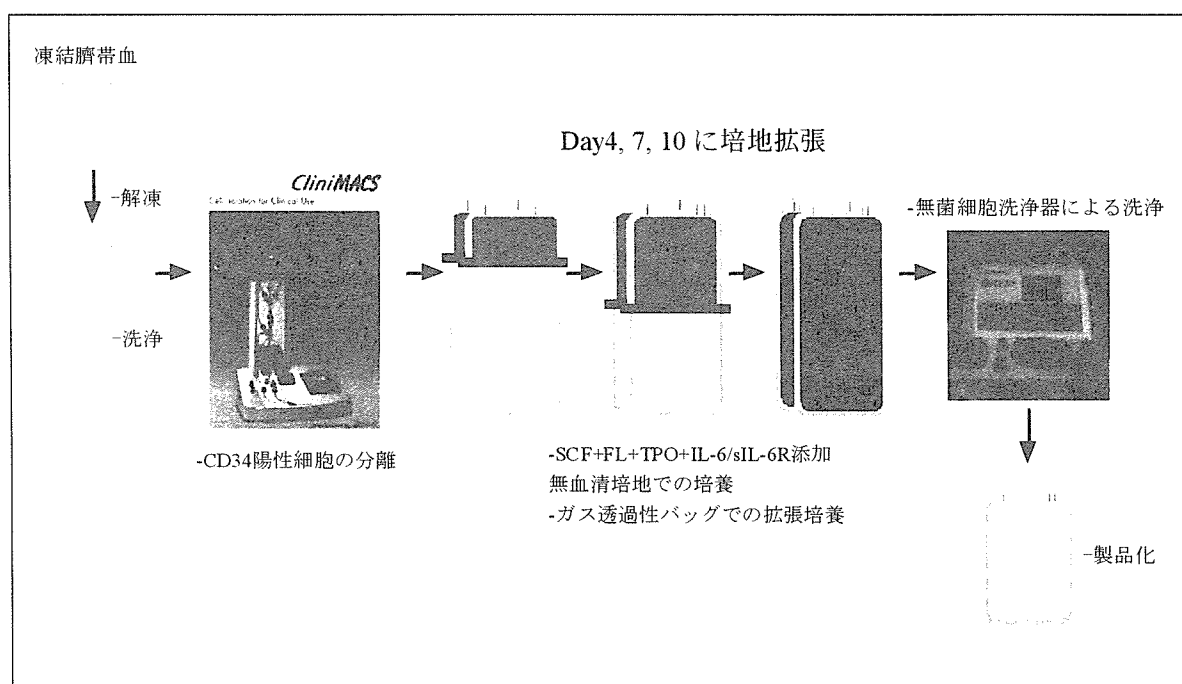


Fig.7 無血清閉鎖系培養法フローチャート

さい帯血バンクより供与された凍結ヒト臍帯血を解凍後、CD34 陽性細胞を磁気ビーズ法 (CliniMACS) にて分離し、SCF (100ng/mL)、TPO (100ng/mL)、FL (100ng/mL)、FP6 (100ng/mL) 添加 QBSF[®]-60 培地 (米国 Quality Biological 社製) 中で 12 日間培養した。ガス透過性培養バッグは、VueLife[™] (米国 American Fluoroseal Corporation 社製) を用いる。

(1) 増幅用臍帯血の洗浄

増幅用臍帯血は、ニューヨーク血液センターにおいて Rubinstein らの確立した方法に準じて、保護剤として Dextran 40 及び 5% ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液を用いて洗浄を実施する。

(2) CD34 陽性細胞の分離

洗浄臍帯血からの CD34 陽性細胞の分離には CliniMACS 磁気細胞分離システムを用いる。洗浄臍帯血中の CD34 陽性細胞を CD34 試薬と反応させ、磁気標識する。細胞を CliniMACS 装置に供し、CD34 陽性細胞を分離する。

(3) CD34 陽性細胞の *ex vivo* 増幅培養

分離した CD34 陽性細胞の *ex vivo* 増幅培養は SCF、TPO、FP6、FL それぞれ 100ng/ml を含む QBSF-60 培地を用いて行う。培養は、ガス透過性のテフロン製バッグ (American Fluoroseal 社製) に細胞を充填して閉鎖的に実施し、CD34 陽性細胞数で約 10,000 個/mL の濃度から開始する。1 バッグあたり、15mL の培養液から開始し、4 日目に 2 倍、7 日目に 2 倍、更に 10 日目に 2 倍に拡張培養を

行い、最終的に 120mL の培養液量とする。1 回の製造で培養に使用するバッグの数は、分離された CD34 陽性細胞数に合わせて設定する。尚、第 2 期以降の試験製造においては、使用する QBSF-60 培地について所定の受入れ検査(ロットチェック、ボトルチェック)を実施し、決められた規格値を満たした培地のみを使用する。

(4) 増幅細胞の洗浄及び製剤化

複数の培養バッグから培養液を 1 つの輸注用バッグに集め、自動細胞洗浄装置セルウォッシャー ACP215 を使用して余剰のサイトカインや培地成分を除去する。最終的に 0.5% ヒト血清アルブミン含有生理食塩液 100mL に懸濁し、輸注用バッグに充填して製品とする。

尚、培養に用いる原料は SCF, FL を除き医薬品グレードのものを用い、それぞれの原料は製品標準書に記載した規格に沿うものを用いる。

○臍帯血 (さい帯血バンクより提供)

インフォームドコンセントのもとに母親から提供され、臍帯血提供機関(兵庫及び東海さい帯血バンク)及び先端医療センターにおいて倫理審査が済んでいるものを用いる。

○サイトカイン

- ・ Recombinant Human Stem Cell Factor (R&D Systems, Inc.)
- ・ Recombinant Human Flt-3 / Flk-2 ligand (R&D Systems, Inc.)
- ・ KRN9000 (麒麟麦酒 (株))
- ・ FP6 (麒麟麦酒 (株))

○無血清培地

QBSF-60 (QUALITY BIOLOGICAL, Inc.)

○ガス透過性培養バッグ VueLife™ (American Fluoroseal Corporation 社製)

○デキストラン 40 注射液 (テルモ (株))

○献血アルブミン-Wf (三菱ウェルファーマ (株))

○献血ヴェノグロブリン-IH ヨシトミ (三菱ウェルファーマ (株))

○大塚生食注 (大塚製薬 (株))

また各製造工程において使用する器具類は事前にバリデーションを行う。

さらに CPC 内での製造に係る作業を行うものは、製造管理責任者により作業員として認定された者が行う。作業員の認定は規程の教育訓練を受け、無菌培地充填試験を行い、合格した者に対して行われる。

2) 判定

最終的な判定は、原材料の受け入れ試験をはじめ、以下の臍帯血、中間体、

製品の試験検査、及び環境衛生試験結果をもとに作業工程の検証を行う。

増幅用臍帯血品質規格、CD34 陽性画分の品質規格、培養 7 日目培養液の品質規格、および増幅 CD34 陽性細胞の製品規格はそれぞれ table 4-7 の通りであり、各品質管理試験は、標準作業手順書に従って実施される。

増幅用臍帯血の品質規格は、製造で必要となる最低限の原料を担保する目的で設定している。解凍後の臍帯血を対象に受け入れ試験を実施し、製造に使用する CD34 陽性細胞数を最終確認する。また、感染症伝播防止の観点から、培養 7 日目培養液の工程内規格として無菌試験を設定した。また、CD34 陽性画分の品質規格は、安定な培養に必要となる最低限の細胞数として設定した。

製品規格として、細胞生存率、無菌試験、エンドトキシン否定試験、ウイルス否定試験、マイコプラズマ否定試験を設定した。細胞生存率については、*ex vivo* 増幅 CD34 陽性細胞の 8 時間後の安定性試験結果が 80~90%の範囲内であったことから、70%以上を製品規格として設定した。無菌試験、エンドトキシン否定試験、ウイルス否定試験、マイコプラズマ否定試験は、感染症伝播防止の観点から実施し、無菌試験は被験者への投与前に結果を得ることが困難なため、無菌性確認の補助的な試験としてエンドトキシン否定試験を加えている。May-Giemsa 染色では原材料となる臍帯血に異型細胞がモノクローナルに増殖していないことを確認する。なお、参考試験として CD34 陽性細胞数の測定を実施するが、製品の効能、効果を示す指標として実施するものであり、規格値を設定しない。

Table 4 増幅用臍帯血の品質規格

試験検査項目	規格値
CD34 陽性細胞数	6x10 ⁵ 個以上 (解凍後、ISHAGE 法による)
細胞形態	異型性細胞のモノクローナルな増幅を認めない

Table 5 CD34 陽性画分の品質規格

試験検査項目	規格値
CD34 陽性細胞数	1.2x10 ⁵ 個以上 (ISHAGE 法による)

Table 6 培養 7 日目培養液の品質規格

試験検査項目	規格値
無菌性	菌の発育を認めない

Table 7 増幅 CD34 陽性細胞の製品規格

試験検査項目	規格値
細胞生存率	70%以上（総細胞数あたり）
無菌性（結果判定は 14 日後）	菌の発育を認めない
エンドトキシン	0.12EU/mL 未満
ウイルス（PCR 法）	HBV、HCV、HIV、HTLV、パルボウイルス B19、CMV を認めない
マイコプラズマ（PCR 法）	マイコプラズマを認めない

3)実施予定期間

第 1 回：平成 18 年 1 月 12 日 18 年 1 月 26 日

第 2 回：平成 18 年 2 月 8 日 18 年 2 月 22 日

以後定期的に検証する予定である。

【まとめと今後の展望】

GMP に準拠した細胞治療製剤を製造する上で、その安全性を担保することは無論のこと、可能な限り均一な製品を製造することは重要かつ難解な課題である。生物製剤における安全に安定した細胞プロセッシングのための規格化がなされていない現状にあって、少なくとも製造環境である CPC 等のハード面の整備に加え、文書体系を整備することが、これらを同時に解決するためには必要であると考えられる。本分担研究では、これまでに我々が確立した閉鎖系無血清培養法の試験製造を繰り返し行うことで、安全で均一な製品を製造するための製造条件の改変を行うと共に、製造で必要となる文書体系の整備を行った。今後、製造バリデーションにより、文書体系に基づいた全作業工程が GMP に準拠した細胞プロセッシングとして適切であるかどうかを検証し、臨床研究に推進する予定である。

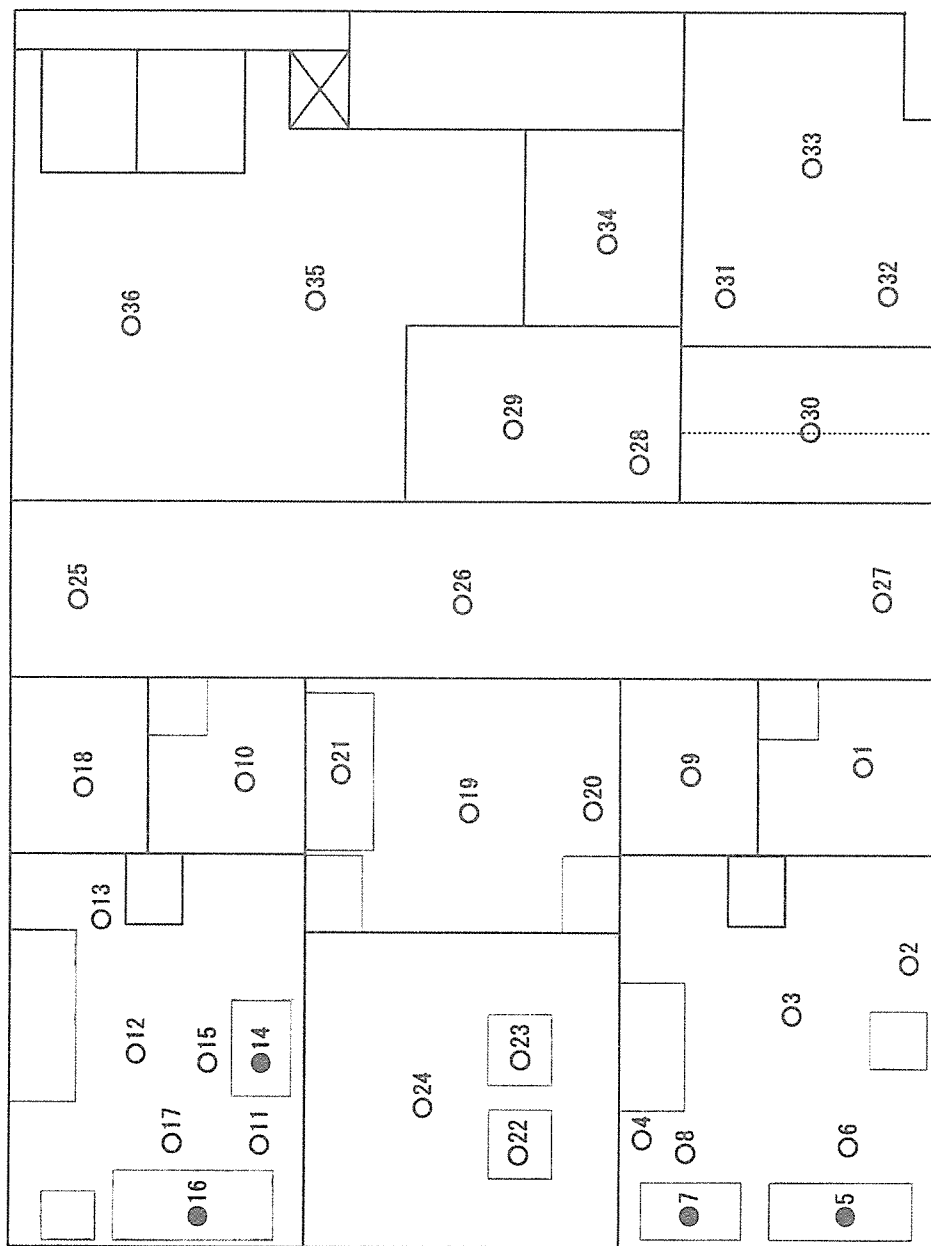
また今回整備したハード及びソフト類は、臍帯血の *ex vivo* 増幅法に留まらず、その他の細胞治療製剤の製造においても有用なものである。我々は今後この基盤を応用して、臍帯血 DLI に向けた培養法の臨床応用を目指している。本研究は臍帯血移植後、必要に応じて品質管理用に保存されている少量のサンプルから、T 細胞を選択的に活性化、増幅し DLI を行うものであり、臍帯血移植の欠点の 1 つである難治性感染症、及び移植後再発に対する新たな治療法として期待されている技術である。さらに現在我々は、製造部門 3 名(うち 1 名が製造管理責任者)、品質管理部門 2 名(うち 1 名が品質管理責任者)の他 CPC 管理部、病院スタッフ等とのチーム体制で作業を行っているが、適切な力量や認識を持った人材の不足は否めない。今回整備した基盤を利用することで、教育訓練や実

技指導等細胞プロセッシングのための幅広い人材の育成が可能になると考えられる。

今後製造バリデーションにより *Ex vivo* 増幅臍帯血が GMP に準拠した細胞治療製剤であることを検証した上で、臨床研究を行うことを予定している。この中で製造部門の一員として関わり、技術の安定化及び個々のバリデーション文書の作成を行う。また、臍帯血 DLI に向けた活性化リンパ球の培養法を確立し、作業工程の文書体系の整備を目指す。

1～36：測定ポイント

●：安全キャビネット内

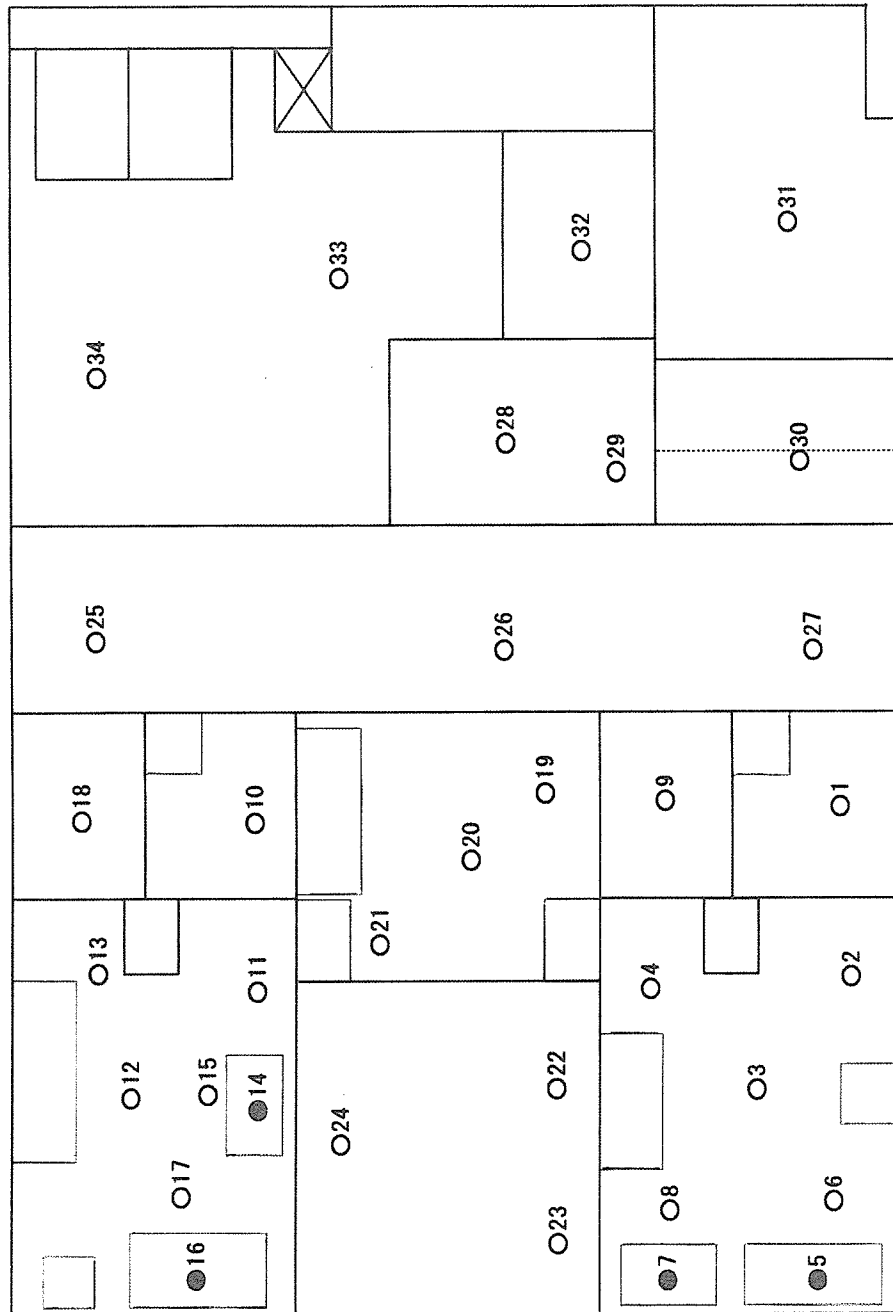


落下箇調査場所

(添付 1-1)

1,000円 : 5、7、14、16
 250円 : 1~4、6、8、10~13、15、17、22~24
 100円 : その他

1~34 : 測定ポイント

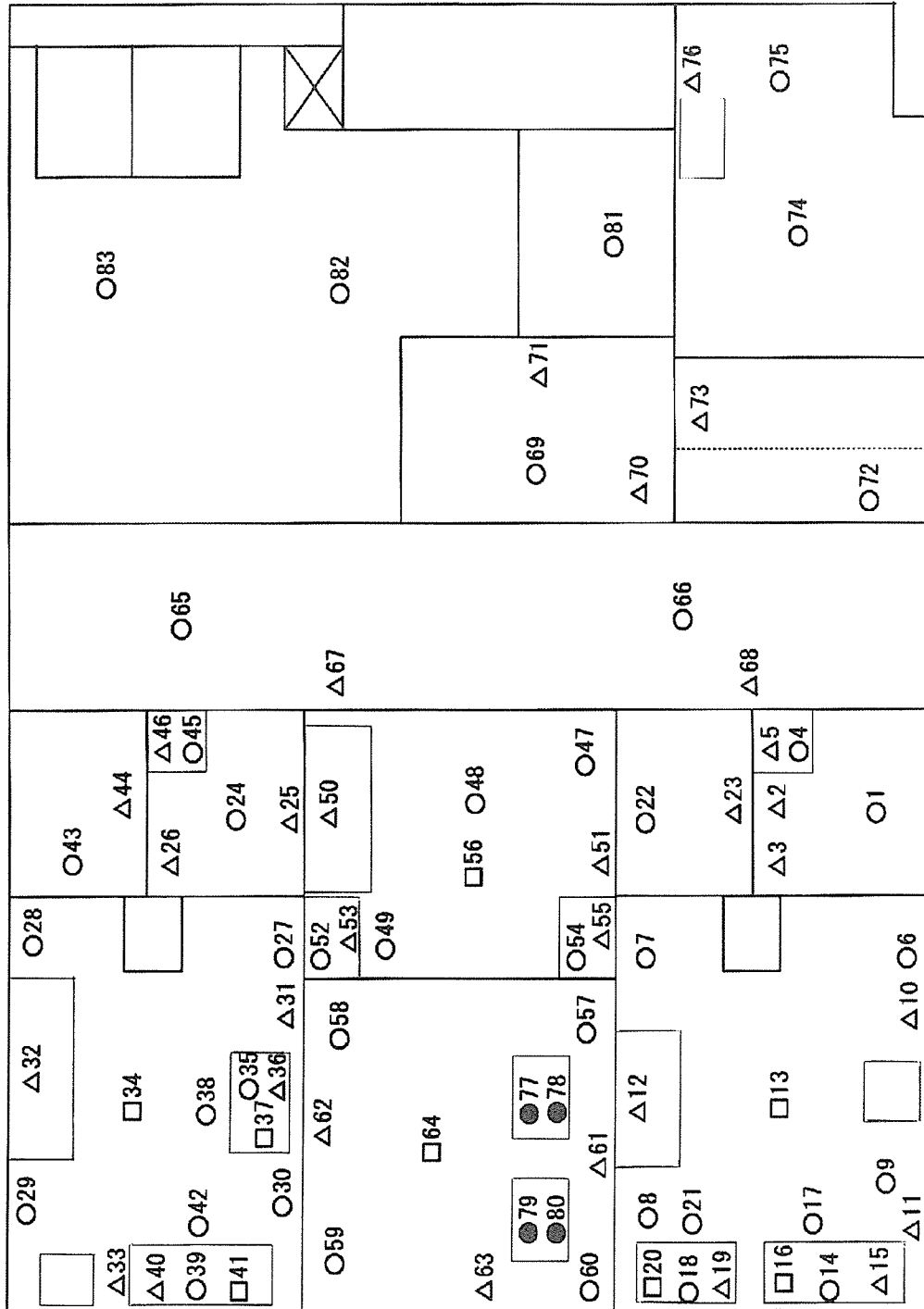


浮遊菌調査場所

(添付 1-2)

1～83：測定ポイント

△：壁面
○：床面
□：天井
●：器材



付着箇 (クリーンスタンプ)調査場所

(添付1-3)