

201106015A

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業

ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の  
汎用性向上のための基盤技術の創成

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 梅澤 明弘

平成24（2012）年4月

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業

ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の  
汎用性向上のための基盤技術の創成

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 梅澤 明弘

平成24（2012）年4月

# 目 次

I. 総括研究報告書	
ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の汎用性向上のための 基盤技術の創成 .....	3
梅澤 明弘	
II. 分担研究報告書	
1. ヒト多能性幹細胞加工製品におけるセル・バンクの品質に関する 調査研究 .....	17
佐藤 陽治	
2. 霊長類 ES 細胞の多能性維持機構, 自己複製能に関する基盤研究 .....	27
末盛 博文	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	29
VI. 研究成果の刊行物・別刷り .....	35

# I. 総括研究報告書

## ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の汎用性向上のための 基盤技術の創成（H23－再生－一般－004）

研究代表者：梅澤 明弘

独立行政法人国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部長

**研究要旨：**細胞・組織加工医薬品等による再生医療は、ヒトの臓器や組織の確保が難しいわが国の医療状況下において強く期待されており、研究の進歩に伴う技術的な実現可能性の高まりとともに、医療としての実用化を望む声がますます強くなっている。その中で、わが国をあげて再生医療の実用化に向けた動きが急速に進められており、特にヒト由来の多能性幹細胞、すなわち間葉系幹細胞、胚性幹細胞（ES 細胞）について、近い将来に予想される製品の評価を円滑に進めるための準備を早期に行う必要がある。各種幹細胞の実用化のために必要な要件を開発初期から示すことは、これらをより迅速に実用化するために必須である。本研究では原材料及び製造関連物質、製造工程、加工した細胞の特性解析、最終製品の形態・包装、製造方法の恒常性及び妥当性、製造方法の変更、製造施設・設備の概要、感染性物質の安全性評価、最終製品の品質管理法、試験方法のバリデーション、規格及び試験方法の妥当性、試験に用いた検体の分析結果、細胞・組織加工医薬品の非臨床安全性試験、細胞・組織加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験、細胞・組織加工医薬品等の体内動態、臨床試験に関して詳細に検討し、細胞医療の安全性及び有効性に関するデータの蓄積と周辺基盤技術を構築する。小児難治性疾患（特に先天性代謝異常症）に対する再生移植療法応用を視野に入れた早期実用化に資することを目的とし、研究を実施した。

### 研究分担者

佐藤陽治（国立医薬品食品衛生研究所 室長）

末盛博文（京都大学 准教授）

秦 順一（（独）国立成育医療研究センター・  
名誉総長）

### A. 研究目的

細胞・組織加工医薬品等による再生医療は、ヒトの臓器や組織の確保が難しいわが国の医療状況下において強く期待されており、研究の進歩に伴う技術的な実現可能性の高まりとともに、医療としての実用化を望む声がますます強くなっている。その中で、わが国をあげて再生医療の実用化に向けた動きが急速に進められており、特にヒト由来の多能性幹細胞、すなわち間葉系幹細胞、胚性幹細胞（ES 細胞）について、近い将来に予想される製品の評価を円滑に進めるための準備を早期に行う必要があ

る。各種幹細胞の実用化のために必要な要件を開発初期から示すことは、これらをより迅速に実用化するために必須である。「細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確認申請記載要領（薬食審査発 0420 第 1 号平成 22 年 4 月 20 日）」に従い、ES 細胞の安全性・有効性に関する検討を行う。具体的には原材料及び製造関連物質、製造工程、加工した細胞の特性解析、最終製品の形態・包装、製造方法の恒常性及び妥当性、製造方法の変更、製造施設・設備の概要、感染性物質の安全性評価、最終製品の品質管理法、試験方法のバリデーション、規格及び試験方法の妥当性、試験に用いた検体の分析結果、細胞・組織加工医薬品の非臨床安全性試験、細胞・組織加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験、細胞・組織加工医薬品等の体内動態、臨床試験に関して詳細に検討し、細胞医療の安全性及び有効性に関するデータの蓄積と周辺基盤技術を構築する。特に小児難治性

疾患（特に先天性代謝異常症）に対する再生移植療法応用を視野に入れた早期実用化に資することを目的とする。

## B. 研究方法

### B-1 原材料及び製造関連物質、製造工程、加工した細胞の特性解析

臨床試験研究に提供できる新たなES細胞の培養を行う。特に、幹細胞を未分化状態に保つための維持培養に必須の要素について検討を行う。

### B-2 細胞・組織加工医薬品の非臨床安全性試験

ヒトES細胞株に関して感染症について検査し、否定試験を行う。

### B-3 ヒトES製剤の製造方法

ヒトES製剤の製造方法について検討を行う。

#### （倫理面への配慮）

#### 1. ES細胞に関する倫理

国立成育医療研究センターでは「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、ヒトES細胞に関する医学研究が適性に行われるよう、ヒトES細胞研究倫理審査委員会が組織されている。ヒトES細胞研究に関する各種規程（「ヒトES細胞研究倫理審査委員会規程」、「ヒトES細胞樹立に関する規程」、「ヒトES細胞分配に関する規程」、「ヒトES細胞使用に関する規程」）も整備され、機関全体として生命倫理及び医の倫理に基づき適切に行う（国立成育医療センターヒトES細胞研究倫理審査委員会：<http://www.ncchd.go.jp/essaibou/es.htm>）。申請者らは、当該センターが定期的（年2回以上）に開催している生命倫理に関する講演を受講し、適切な生命倫理観をみにつけ常に配慮し研究を実施する。

国立成育医療研究センター（機関内番号ES倫2）  
文部科学大臣確認番号：18 諸文科振第 832 号

#### 2. ヒト細胞を用いることに対する倫理的配慮

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。機関の外部委員

を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療研究センター受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認、受付番号 197、平成 18 年 6 月承認、受付番号 201、237、238、平成 19 年 6 月承認）。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないよう、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う予定である。

#### 3. 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号 2003-002,2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

## C. 研究結果

### C-1 原材料及び製造関連物質、製造工程、加工した細胞の特性解析

既に、樹立されたヒトES細胞を用いた。臨床試験研究に提供する新たなES細胞の培養工程に関する検討を行った。ES細胞、フィーダー細胞ならびに必須液性因子からなる閉鎖系培養ユニットの開発に着手し、特に培養に使用する試薬類、細胞剥離に使用する薬剤、細胞凍結に使用する薬剤についての洗い出しを行い、ゼノフリー環境を構築した。来年度以降に未分

化度試験、細胞純度試験をパッケージとして行う予定である。

### C-2 細胞・組織加工医薬品の非臨床安全性試験

ヒト ES 細胞株に関して感染症について検査し、否定試験を行った。細菌・真菌否定試験(好気性)、細菌・真菌否定試験(嫌気性)、糸状性真菌否定試験、エンドトキシン、マイコプラズマ否定試験、培養細胞ウイルス否定試験 (HCV-RNA、HBV-DNA、パルボウイルス DNA、HTLV-1 プロウイルス DNA、HIV-1 プロウイルス DNA) を行い、すべて陰性であった。

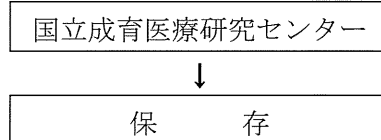
### C-3 ヒト ES 製剤の製造方法

#### C-3-1 原材料および製造関連物質

原材料は独立行政法人国立成育医療研究センターにて、ヒト胚から樹立された ES 細胞 (SEiiiES3) である。使用した胚は、体外受精による不妊治療において、母体に戻されず凍結保存されている胚のうち破棄されることが決定した余剰胚である。正常なヒト胚由来細胞から作成される ES 細胞は無限に増加する特性を有しているうえに、正常な機能を有する多様な細胞への分化能をもつ細胞である。また、均質な細胞集団として大量培養が可能であり、これをバンキングすることにより長期安定して供給することが可能となる。従って、ヒト ES 細胞を原材料とすれば、対象疾患の治療に必要な細胞の製造を大量かつ安定的に行うことが可能である。

#### C-3-2 胚細胞の保存方法

医療機関で採取されたヒト胚細胞を当研究センターが受領し、適切に保存するまでのフローを以下に示す。



※体外受精による不妊治療において、母体に戻されず凍結保存されている胚のうち破棄されることが決定した余剰胚がある旨の連絡が医療機関からくると、国立成育医療研究センターでは、倫理委員会の承認のもと、その入手を決定した場合には、当該細胞の発送依頼を文書にて行う。

#### C-3-3 目的とする細胞以外の原材料及び製造関連物質

目的とする細胞以外のすべての原材料及び製造関連物質は、表 1. の通りである。

表 1. 目的とする細胞以外のすべての原材料および製造関連物質の一覧

	原材料名・製造関連物質名	医薬品、試薬の区別	供給元	用途
培養に使用	DMEM/F12	試薬	インビトロジェン	フィーダー
	ウシ胎児血清 (生物由来成分)	試薬	HyClone	フィーダー
	GlutaMAX™-1	試薬	インビトロジェン	フィーダー、SEiiiES、HAES
	MEM Non-Essential Amino Acids	試薬	インビトロジェン	フィーダー、SEiiiES、HAES
	Knockout DMEM	試薬	インビトロジェン	SEiiiES、HAES
	KNOCKOUT™ Serum Replacement (生物由来成分)	試薬	インビトロジェン	SEiiiES
	ペニシリン/ストレプトマイシン	試薬	インビトロジェン	SEiiiES、HAES
	Sodium Pyruvate Solution	試薬	インビトロジェン	SEiiiES、HAES
	Recombinant Human bFGF	試薬	インビトロジェン	SEiiiES、HAES
	KNOCKOUT™ Serum Replacement -XenoFree (生物由来成分)	試薬	インビトロジェン	HAES
	IGF1 (recombinant)	試薬	Sigma-Aldrich	HAES
	Heleglin beta I (recombinant)	試薬	R&D Systems	HAES
	L-Ascorbic acid	試薬	シグマ	HAES
PBS(Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> 不含)	試薬	インビトロジェン	フィーダー	
細胞処理用	TrypLE Select (Recombinant)	試薬	インビトロジェン	フィーダー細胞、HAES
	ディスパーゼ II	試薬	エーティアイ	SEiiiES
細胞凍結用	セルバンカー	試薬		SEiiiES、HAES
基質	医療用コラーゲン	医薬品	ニッポンハム	SEiiiES

### C-3-4 ヒト胚細胞（及びES細胞）の培養に使用する培地の組成

表 2. にヒト胚細胞及び ES 細胞の培養に使用する培地の組成を示す。

表 2. ヒト胚細胞（及び ES 細胞）の培養に使用する培地の組成

成分名	分量	承認番号・規格等	供給元
KnockoutDMEM 培地		製品名 Knockout DMEM 規格は製造元規格による。	㈱インビトロジエン
KNOCKOUT™ Serum Replacement (血清代替物)	20%	製品名 Knockout Serum Replacement 規格は製造元規格による。	㈱インビトロジエン
ヒト bFGF (遺伝子組み換え)	10ng/ml	製品名 HU FGF BASIC FULL LENGTH 規格は製造元規格による。	㈱インビトロジエン
NEAA (非必須アミノ酸)	100µM	製品名 MEM 非必須アミノ酸溶液 規格は製造元規格による。	㈱インビトロジエン
ピルビン酸ナトリウム	1mM	製品名ピルビン酸ナトリウム溶液 100mM 液体 規格は製造元規格による。	㈱インビトロジエン
グルタミン	2mM	製品名 GULTAMAX I 200mM 規格は製造元規格による。	㈱インビトロジエン
ペニシリン/ストレプトマイシン		製品名ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 規格は製造元規格による。	㈱インビトロジエン

### C-3-5 マウス胎児繊維芽細胞（MEF）及びフィーダー細胞の培養に使用する培地の組成

表 3. に MEF およびフィーダー細胞の培養に使用する培地の組成を示す。

表 3. MEF 及びフィーダー細胞の培養に使用する培地の組成

成分名	分量	承認番号・規格等	供給元
DMEM/F12 培地		製品名 DMEM/F12 規格は製造元規格による。	㈱インビトロジエン
ウシ胎児血清 (生物由来成分)	10%	製品名 規格は製造元規格による。	Hyclone
NEAA (非必須アミノ酸)	100µM	製品名 MEM 非必須アミノ酸溶液 規格は製造元規格による。	㈱インビトロジエン
グルタミン	2mM	製品名 GULTAMAX I 200mM 規格は製造元規格による。別紙規格 参照	㈱インビトロジエン

### C-3-6 原材料由来物質

残存する可能性がある原材料由来物質の種類は、以下のとおりである。

#### 特定生物由来原料

- ・ KNOCKOUT™ Serum Replacement (KSR) – Xen Free

#### 生物由来原料

- ・ ウシ胎児血清
- ・ ディスパーゼ
- ・ 遺伝子組換えヒト bFGF
- ・ 遺伝子組み換え IGF1
- ・ 遺伝子組み換え Heleglin beta1
- ・ 遺伝子組み換え TrypLE Select
- ・ 医療用コラーゲン

#### 抗生物質

- ・ ペニシリン (抗生物質)
- ・ ストレプトマイシン (抗生物質)

#### その他リスクレベルが高いと考えられる培地由来物質

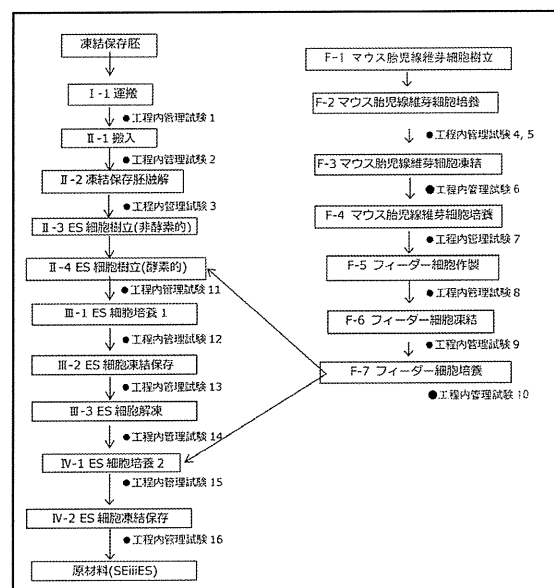
- ・ KNOCKOUT™ Serum Replacement (KSR)
- ・ セルバンカー (確認中)

#### リスクレベルが低いと考えられる培地由来物質

- ・ 無機塩類、糖質、アミノ酸、ビタミン類

### C-3-7 原材料となる細胞の作製方法

以下に原材料となる細胞の作製のワークフローを示す。





### I-1 凍結保存胚運搬工程

担当医師より第三者立ち会いのもと、凍結保存胚の入った輸送用凍結保存容器を受け取った作業者は、受領証明書に記載漏れが無いことを確認し必要事項を記載する。輸送用凍結保存容器は専用輸送ケースに静置する。適切な交通手段によって、温度-100℃以下で24時間以内に製造場所へ運搬する。

### II-1 凍結保存胚搬入工程

(標準所要時間 10分)

第三者立ち会いのもと、輸送用凍結保存容器から凍結保存胚を液体窒素保存用タンク内に保存する。輸送用凍結保存容器から取り出したチューブの肉眼検査(凍結チューブ数、破損の有無、凍結液の性状)を実施する。凍結保存胚移送記録書に項目を記載する。

### II-2 凍結保存胚融解工程

(標準所要時間 60分)

融解後の胚培養用プレートを準備し、CO<sub>2</sub>インキュベータ(37℃)に入れる。専用の凍結胚融解プロトコールに従い無菌的に行う(Cryotop Safety Thawing Kit)。全ての操作は、安全キャビネット内で行う。融解後回収した胚は胚培養用培地でCO<sub>2</sub>インキュベータ(37℃)内で適切な時期まで培養を行う。融解胚の性状を記載する。

### II-3 ES細胞樹立(非酵素的)工程

(標準所要時間 20~40日間)

胚盤胞期まで発生した胚の内部細胞塊(ICM)を選択的に採取し、放射線処理したマウス胎児線維芽細胞を播種した培養プレート上でES細胞培地下にCO<sub>2</sub>インキュベータ(37℃)内で培養する。増殖してきた細胞塊を分離し新たな培養プレートで培養し細胞を増やす。その際、ES細胞は細胞が集団を形成(コロニー)し増殖するため、培養プレート内では複数の特徴的なコロニー群が観察される。

### ステップ1: 培養

II-3のICMをES細胞用培地500μlを加えたIVF 4-well培養プレート(以下、4-Wプレートとする)に播種する。2日目以降、毎日、各4-Wプレートの培地をES細胞用培地①300培地で培地交換して、適度な大きさに達するまで最長14日間培養する。

初代培養に必要な期間には個体差・サンプル差があるが、通常は初代培養開始後7~10日で4-Wプレート内で分離継代できる状態に達する。

4-Wプレートを毎日観察することにより培養液に濁りがないことを確認し、濁りが疑われた場合は直ちに顕微鏡下で微生物の確認を行い、「陽性」の場合には製造を中止することとする。

### ステップ2: 非酵素的継代

4-Wプレート内の増殖したICMを無菌的にガラスピペットで小片毎に分離し新たな4-Wプレートで培養する。コロニー数が7個/ウェル以上で4-Wプレートから35mmプレートへ播種する。更に、良好なコロニーが10個/35mmプレート以上増殖する場合は、60mmプレートで培養する。増殖細胞塊を分離する全ての操作は、安全キャビネット内で行う。

### II-4 ES細胞樹立(酵素的)工程

(標準所要時間 30~60日間)

35mmプレートまたは、60mmプレート内の培地を除去し、各プレート内をPBS液2-4mLにて2度洗浄する。2.0PU(Protease Unit)/mLディスパーゼII処理液を加えて37℃で酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞が剥離し始めるのが観察された後に、ゆっくりピペット操作を行ってES細胞様コロニー形成細胞を培養プレート底面から剥離し、細胞浮遊液をES細胞用培地6-8mLの入った培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を800rpm、4分間遠心後、沈渣にES細胞用培地4mLを加えて細胞を浮遊し、新たなプレートで培養する。

#### F-1 マウス胎児線維芽細胞(MEF)樹立工程

妊娠マウス 2 匹より、13 日齢胎児を剖出する。実体顕微鏡下でハサミ、ピンセットを用いて胎児の頭部および内臓を切除する。残りの組織を新しい Dish に移し、Tryple Select 処理液を 5ml 加えて、37°C で酵素処理を行う。大部分が懸濁状態になった後に MEF 培地を 20ml 加えて培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地 30mL を加えて細胞を浮遊し、100mm プレートに播種する。CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養する。

#### F-2 マウス胎児線維芽細胞(MEF)培養工程

インキュベーターのプレートを取り出して、位相差顕微鏡下で観察する。プレート表面の少なくとも 90% が細胞の層で覆われている場合は、凍結作業に進む。90%未満の場合は、細胞が成長するまで数日待つ。1 日おきに培地を吸引し、新鮮な MEF 培地と交換する。

#### F-3 マウス胎児線維芽細胞凍結工程

MEF 培地を吸引後、PBS で一度洗浄する。Tryple Select 処理液を 2mL 加えて、37°C で酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞の剥離が観察された後に、MEF 培地 10mL を加え、ゆっくりピペット操作を行って MEF を培養プレート底面から剥離し、培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地 10mL を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に凍結保存培地を  $4 \times 10^6$  cells/mL となるように加え、凍結保存用チューブに 1.0mL ずつ分注する。

分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて -80°C の超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80°C に凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。

#### F-4 マウス胎児線維芽細胞(MEF)培養工程

液体窒素保存用タンク内から III-4 で保存し

た凍結保存チューブを取り出し、37°C の恒温水槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液と等量の MEF 培地を加える。この細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地 10mL を加えて細胞を浮遊し、100mm プレートに播種する。プレート表面の少なくとも 90% が細胞の層で覆われている場合は、放射線照射処理に進む。90%未満の場合は、細胞が成長するまで数日待つ。1 日おきに培地を吸引し、新鮮な MEF 培地と交換する。

#### F-5 フィーダー細胞作製工程

MEF 培地を吸引後、PBS で一度洗浄する。Tryple Select 処理液を 2mL 加えて、37°C で酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞の剥離が観察された後に、MEF 培地 10mL を加え、ゆっくりピペット操作を行って MEF を培養プレート底面から剥離し、培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地 10mL を加えて細胞を浮遊し、HEPES を加える。丸底チューブに細胞を移し、ふたをする。丸底チューブをビーカーに移動し、30Gy の放射線処理を行う。

#### F-6 フィーダー細胞凍結工程

30Gy の放射線処理が終了したのち、細胞数及び生存率を決定する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に凍結保存培地を  $4 \times 10^6$  cells/mL となるように加え、凍結保存用チューブに 1.0mL ずつ分注する。

分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて -80°C の超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80°C に凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。

#### F-7 フィーダー細胞培養工程

液体窒素保存用タンク内から III-6 で保存した凍結保存チューブを取り出し、37°C の恒温水槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液と等量の

MEF 培地を加える。この細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地 10mL を加えて細胞を浮遊し、100mm プレートに播種する。

### III-1 ES 細胞培養工程

60mm プレート内の培地を除去し、各プレート内を PBS 液 2-4mL にて 2 度洗浄する。2.0PU (Protease Unit) /mL ディスパーゼ II 処理液を加えて 37°C で酵素処理を行う。

上記酵素処理後、ゆっくりピペット操作し、ES 細胞コロニーを分散する。コロニーが分散されたディスパーゼ浮遊液に ES 細胞用培地 10mL を加えて酵素反応を停止する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に ES 細胞用培地を加えて細胞を再浮遊し、新たなプレートへ播種する。

なお、細胞の遠心・洗浄操作は常温 (15~25°C) で行う (以下、同様)。培養フラスコを毎日観察することにより培養液に濁りがないことを確認し、濁りが疑われた場合は直ちに顕微鏡下で微生物の確認を行い、「陽性」の場合には製造を中止することとする。

### III-2 ES 細胞凍結保存工程

#### 回収

60mm プレート内の細胞密度がほぼ飽和状態に達したら、II-4 と同様に細胞の酵素処理を行い、沈渣に ES 細胞用培地を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。

#### 凍結 (標準所要時間 30-60 分)

60mm プレートから回収した ES 細胞に凍結保存培地を加え、細胞浮遊液を調製後、4°C の凍結保存培地で混合する。この際、 $1.0\sim 2.0\times 10^6$  個/mL の濃度になるように細胞浮遊液を調製する。

混合した細胞浮遊液を凍結保存用チューブに 1.0mL ずつ分注する。

分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて -80°C の超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80°C に凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク

内に保存する。

### III-3 ES 細胞解凍工程

#### 解凍 (標準所要時間 2 時間)

液体窒素保存用タンク内から IV-2 で保存した凍結保存チューブを取り出し、37°C の恒温水槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液と等量の ES 細胞用培地を加える。この細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に ES 細胞用培地 5mL を加えて細胞を浮遊する。

### IV-1 培養

(標準所要時間 18~24 日間)

III-3 で調製した ES 細胞浮遊液を 60mm プレートに各 5mL 播種して 37°C、5%CO<sub>2</sub>、95%air 下にて、60mm プレート内の細胞密度がほぼ飽和状態 ( $2.0\sim 3.0\times 10^6$  個/60mm プレート) に達するまで培養する。

培養フラスコを毎日観察することにより培養液に濁りがないことを確認し、濁りが疑われた場合は直ちに顕微鏡下で微生物の確認を行い、「陽性」の場合には製造を中止することとする。

培地交換は毎日行う。

#### 継代

継代は 7-10 日に一度実施する。

### IV-2 ES 細胞凍結保存工程

#### 回収

60mm プレート内の細胞密度がほぼ飽和状態に達したら、II-4 と同様に細胞の酵素処理を行い、沈渣に ES 細胞用培地を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。

#### 凍結 (標準所要時間 30-60 分)

60mm プレートから回収した ES 細胞に凍結保存培地を加え、細胞浮遊液を調製後、4°C の凍結保存培地で混合する。この際、 $1.0\sim 2.0\times 10^6$  個/mL の濃度になるように細胞浮遊液を調製

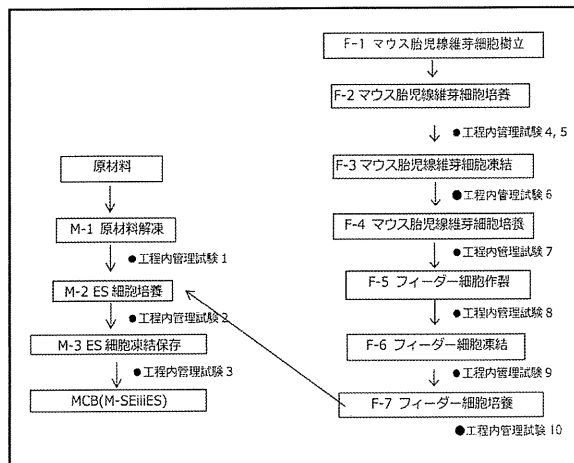
する。

混合した細胞浮遊液を凍結保存用チューブに1.0mL ずつ分注する。

分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて-80℃の超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80℃に凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。

### C-3-8 MCB の作製方法

MCBは原材料となるSEiiiES3(ヒトES細胞)を培養後に得られる均一な細胞ストックである。



#### M-1 原材料細胞解凍工程

解凍 (標準所要時間 30分)

液体窒素保存用タンク内から原材料凍結保存チューブを取り出し、37℃の恒温水槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液と等量のES細胞用培地を加える。この細胞浮遊液を800rpm、4分間遠心後、沈渣にES細胞用培地5mLを加えて細胞を浮遊する。

#### M-1 培養工程

(標準所要時間 18~24日間)

M-1で調製したES細胞浮遊液を加え、60mmプレートに各5mL播種して37℃、5%CO<sub>2</sub>、95% air下にて、60mmプレート内の細胞密度がほぼ飽和状態(2.0~3.0x10<sup>6</sup>個/60mmプレート)

に達するまで培養する。培地交換は毎日行う。

培養フラスコを毎日観察することにより培養液に濁りがないことを確認し、濁りが疑われた場合は直ちに顕微鏡下で微生物の確認を行い、「陽性」の場合には製造を中止することとする。

#### 継代

継代は週1で実施する。MCBから起算して、40倍以上に増殖するまで培養を継代培養を繰り返す。

#### M-3 MCB細胞凍結保存工程

#### 回収

60mmプレート内の細胞密度がほぼ飽和状態に達したら、プレート内の培地を除去し、各プレート内をPBS液2-4mLにて2度洗浄する。2.0PU (Protease Unit) /mL ディスパーゼII処理液を加えて37℃で酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞が剥離し始めるのが観察された後に、ゆっくりピペット操作を行ってES細胞様コロニー形成細胞を培養プレート底面から剥離し、細胞浮遊液をES細胞用培地6-8mLの入った培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を800rpm、4分間遠心後、沈渣にES細胞用培地を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。

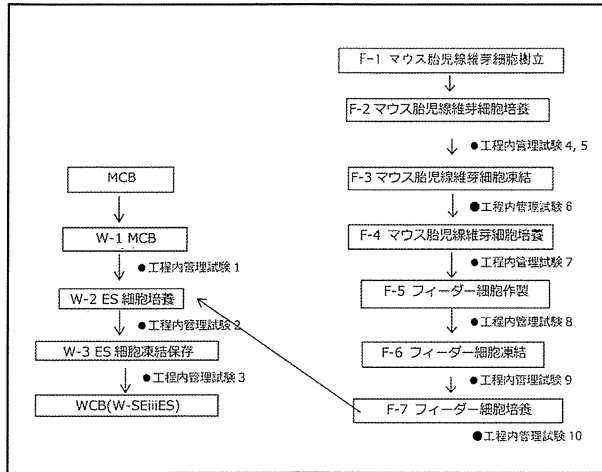
#### 凍結 (標準所要時間 30-60分)

60mmプレートから回収したES細胞に凍結保存培地を加え、細胞浮遊液を調製後、4℃の凍結保存培地で混合する。この際、1.0~2.0x10<sup>6</sup>個/mLの濃度になるように細胞浮遊液を調製する。混合した細胞浮遊液を凍結保存用チューブに1.0mL ずつ分注する。分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて-80℃の超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80℃に凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。

これをMCBとする。

### C-3-9 WCB の作製方法

WCBはMCBであるSEiiiES3(ヒトES細胞)を培養後に得られる均一な細胞ストックである。



#### W-1 MCB 細胞解凍工程

解凍 (標準所要時間 30 分)

液体窒素保存用タンク内から原材料凍結保存チューブを取り出し、37℃の恒温水槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液と等量のES細胞用培地を加える。この細胞浮遊液を800rpm、4分間遠心後、沈渣にES細胞用培地5mLを加えて細胞を浮遊する。

#### W-1 培養工程

(標準所要時間 18~24 日間)

M-1で調製したES細胞浮遊液を加え、60mmプレートに各5mL播種して37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%air下にて、60mmプレート内の細胞密度がほぼ飽和状態(2.0~3.0x10<sup>6</sup>個/60mmプレート)に達するまで培養する。培地交換は毎日行う。培養フラスコを毎日観察することにより培養液に濁りが無いことを確認し、濁りが疑われた場合は直ちに顕微鏡下で微生物の確認を行い、「陽性」の場合には製造を中止することとする。

#### 継代

継代は週1で実施する。MCBから起算して、40倍以上に増殖するまで培養を継代培養を繰

り返す。

#### W-3 WCB 細胞凍結保存工程

#### 回収

60mmプレート内の細胞密度がほぼ飽和状態に達したら、プレート内の培地を除去し、各プレート内をPBS液2-4mLにて2度洗浄する。2.0PU (Protease Unit) /mL ディスパーゼII処理液を加えて37℃で酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞が剥離し始めるのが観察された後に、ゆっくりピペット操作を行ってES細胞様コロニー形成細胞を培養プレート底面から剥離し、細胞浮遊液をES細胞用培地6-8mLの入った培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を800rpm、4分間遠心後、沈渣にES細胞用培地を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。

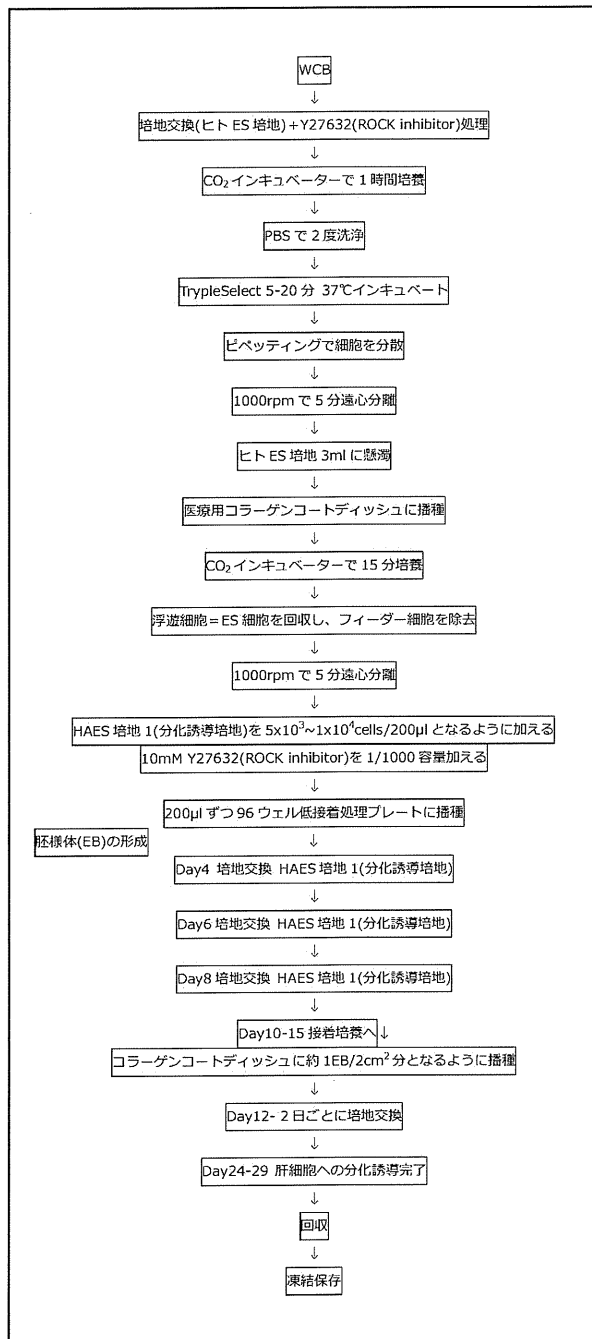
#### 凍結 (標準所要時間 30-60 分)

60mmプレートから回収したES細胞に凍結保存培地を加え、細胞浮遊液を調製後、4℃の凍結保存培地で混合する。この際、1.0~2.0x10<sup>6</sup>個/mLの濃度になるように細胞浮遊液を調製する。混合した細胞浮遊液を凍結保存用チューブに1.0mLずつ分注する。分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて-80℃の超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80℃に凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。

これをWCBとする。

### C-3-10 最終製品の作製方法

WCBから肝細胞(HAES)を作製し、最終製品(凍結品)までの製造フローを示す。



今後、セルバンクの安全性、品質にかかわる試験についての項目設定に当たり、医薬審第 329 号 (ICH Q5A)・医薬審第 873 号 (ICH Q5D)・「生物由来原料基準」・「同種指針」を基に、核型分析、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、ウイルス試験 (感染性試験、電子顕微鏡観察、In vitro 試験、In vivo 試験、抗体産生試験、ウシ及びブタ迷入ウイルス試験)、特性解析試験 (未分化度試験、細胞純度試験) を適宜行う予定である。

## D. 考察

再生医療における細胞の供給源として、胚性幹細胞 (ES 細胞)、組織幹細胞、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) があげられる。これらの原料細胞は、従来まで同じ指針のもとで運用されてきたが、細胞性状が多岐に渡るため、個別の指針として運用することが現実的であるという提言がなされ、現在、我が国の研究開発がその方向で進みつつある。本研究は ES 細胞に特化して研究を推進する。ES 細胞はその増殖能、多分化能より、将来的に期待されており、最適のドナー細胞の選択肢となりつつある。また、人工多能性幹細胞の臨床応用を先導することができる再生医療技術となりうる。ヒト ES 細胞をはじめとする未分化性の非常に高いヒト細胞は、再生医療での重要な細胞ソースとなるばかりでなくその培養システムでは発生分化研究等のヒト発生メカニズム探求や創薬開発研究の基盤となる。これを異種由来の影響を排除して完全ヒト型培養システムの下で行う意義は大きい。より安全性の高い再生医療基盤を社会へ提示することが可能となる。

## E. 結論

現在までに国内で 2 施設がその樹立機関として認定されている (京都大学、国立成育医療研究センター)。しかしながら臨床応用を開始するまでは多くの基盤研究ならびに細胞の整備が必要となる。本申請に用いる ES 細胞は、主任研究者である梅澤 (樹立責任者 18 諸文科振第 832 号平成 19 年 3 月 5 日) らが、樹立初期から「ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案」を意識した、樹立・培養を進行させており、その、初期培養された細胞が蓄積されている。さらにこれらの細胞を用いた神経、心筋、肝臓、骨を構築する研究が進行している。この ES 細胞を用いた再生医療が現実味を帯びてきており、再生医療・細胞移植の最適の対象になっている。ES 細胞自体を生体内マイクロデバイスとして利用する新たな治療戦略を現実するために必要なステップとして、1) 原材料及び製造関連物質の明確化 (体外受精胚の起源・選択理由の明示、ド

ナー選択の倫理的妥当性、培養方法、培養材料の明示等)、2) 製造工程の明確化、3) 最終製品の品質管理法の確立がある。このような世界的な状況の中で、ヒト ES 細胞の維持および可塑性の分子基盤を明確にすることを旨とし、その評価・検証システムの元に ES 細胞の提供までを視野に入れた「ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の汎用性向上のための基盤技術開発」は再生医療促進にとって必要不可欠なものであり、速やかな確立が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Nakamura N, Saeki K, Mitsumoto M, Matsuyama S, Nishio M, Saeki K, Hasegawa M, Miyagawa Y, Ohkita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Akutsu H, **Umezawa A**, Yuo A. Feeder-Free and Serum-Free Production of Hepatocytes, Cholangiocytes, and Their Proliferating Progenitors from Human Pluripotent Stem Cells: Application to Liver-Specific Functional and Cytotoxic Assays. *Cell Rerogram*. 2012 (in press).

Sugawara T, Nishino K, **Umezawa A**, Akutsu H. Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 3(2):8, 2012.

Yokoi T, Seko Y, Yokoi T, Makino H, Hatou S, Yamada M, Kiyono T, **Umezawa A**, Nishina H, Azuma N. Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. *PLoS One*. 7(1):e29677, 2012.

Gojo S, Toyoda M, **Umezawa A**. Tissue engineering and cell-based therapy toward integrated strategy with artificial organs. *J Artif Organs*. 14(3):171-177, 2011.

Kami D, Takeda S, Makino H, Toyoda M, Itakura Y, Gojo S, Kyo S, **Umezawa A**, Watanabe M. Efficient transfection method using deacylated polyethylenimine-coated magnetic nanoparticles. *J Artif Organs*. 14(3):215-222, 2011.

Isshiki H, Sato K, Horiuchi K, Tsutsumi S, Kano M, Ikegami H, Abe H, **Umezawa A**, Aburatani H, Toyama Y. Gene expression profiling of mouse growth plate cartilage by laser microdissection and microarray analysis. *J Orthop Sci*. 16(5):670-672, 2011.

Numasawa Y, Kimura T, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Tsuji H, Tsuruta H, Segawa K,

Ogawa S, **Umezawa A**. Treatment of human mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blocker improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and improved cardiac function via angiogenesis. *Stem Cells*. 29(9):1405-1414, 2011.

Gokoh M, Nishio M, Nakamura N, Matsuyama S, Nakahara M, Suzuki S, Mitsumoto M, Akutsu H, **Umezawa A**, Yasuda K, Yuo A, Saeki K. Early senescence is not an inevitable fate of human-induced pluripotent stem-derived cells. *Cell Rerogram*. 13(4):361-370, 2011.

Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito H, Takahashi Y, Akutsu H, **Umezawa A**.  $\beta$ -catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Sci Rep*. 1:68, 2011.

Nakamura A, Miyado K, Takezawa Y, Ohnami N, Sato M, Ono C, Harada Y, Yoshida K, Kawano N, Kanai S, Miyado M, **Umezawa A**. Innate immune system still works at diapause, a physiological state of dormancy in insects. *Biochem Biophys Res Commun*. 410(2):351-357, 2011.

Hankowski KE, Hamazaki T, **Umezawa A**, Terada N. Induced pluripotent stem cells as a next-generation biomedical interface. *Lab Invest*. 91(7):972-977, 2011.

Saito S, Onuma Y, Ito Y, Tateno H, Toyoda M, Hidenori A, Nishino K, Chikazawa E, Fukawatase Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Shimma Y, **Umezawa A**, Hirabayashi J, Horimoto K, Asashima M. Possible linkages between the inner and outer cellular states of human induced pluripotent stem cells. *BMC Syst Biol*. 5 Suppl 1:S17, 2011.

Tateno H, Toyota M, Saito S, Onuma Y, Ito Y, Hiemori K, Fukumura M, Matsushima A, Nakanishi M, Ohnuma K, Akutsu H, **Umezawa A**, Horimoto K, Hirabayashi J, Asashima M. Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem*. 286(23):20345-20353, 2011.

Higuchi A, Ling QD, Ko YA, Chang Y, **Umezawa A**. Biomaterials for the feeder-free culture of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Chem Rev*. 111(5):3021-3035, 2011.

Hasebe Y, Hasegawa S, Hashimoto N, Toyoda M, Matsumoto K, **Umezawa A**, Yagami A, Matsunaga K, Mizutani H, Nakata S, Akamatsu H. Analysis of cell characterization using cell

surface markers in the dermis. *J Dermatol Sci.* 62(2):98-106, 2011.

Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet.* 7(5):e1002085, 2011.

Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol.* 11:22, 2011.

Yazawa T, Kawabe S, Inaoka Y, Okada R, Mizutani T, Imamichi Y, Ju Y, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol Cell Endocrinol.* 336(1-2):127-132, 2011.

Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem.* 286(13):11593-11603, 2011.

Sato T, Iso Y, Uyama T, Kawachi K, Wakabayashi K, Omori Y, Soda T, Shoji M, Koba S, Yokoyama S, Fukuda N, Saito S, Katagiri T, Kobayashi Y, Takeyama Y, Umezawa A, Suzuki H. Coronary vein infusion of multipotent stromal cells from bone marrow preserves cardiac function in swine ischemic cardiomyopathy via enhanced neovascularization. *Lab Invest.* 91(4):553-564, 2011.

## 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 取得特許

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



## II. 分担研究報告書

## ヒト多能性幹細胞加工製品におけるセル・バンクの品質に関する調査研究

研究分担者：佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部・第2室・室長

**研究要旨：**ヒト胚性幹細胞(ES細胞)やヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)などの、いわゆるヒト多能性幹細胞を原材料として細胞・組織加工製品(多能性幹細胞加工製品)を製造し、再生医療・細胞治療へ応用しようとする試みが、現在、国内外で非常に活発に進んでいる。多能性幹細胞加工製品の製造においては、一定の品質の最終目的製品を安定的・継続的に製造するための細胞基材として、セル・バンク・システムを構築する機会が多い。セル・バンクの品質は、最終製品としての多能性幹細胞加工製品の特性および安全性に大きな影響を与えるものであり、最終製品の品質・安全性・有効性上の懸念事項に対応するための品質管理システムを構築するためには、細胞基材／セル・バンクの特性を十分に把握することが必須である。ヒト多能性幹細胞加工製品を含むヒト細胞・組織加工製品の開発が精力的に進む中、本研究では、細胞基材としてのセル・バンクの品質のあり方について調査を行った。

### A. 研究目的

ヒト胚性幹細胞(ES細胞)やヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)などの「多能性幹細胞」は、その幅広い多能性ゆえに、いままで入手が困難であった各種細胞を作製することのできる素材となることが期待され、またその無限の自己複製能ゆえに、ひとたび目的細胞への効率的分化誘導方法が確立すれば、細胞・組織加工医薬品などの原材料として再生医療・細胞治療に利用できる細胞を大量に、安定に供給することが可能となることが期待されている。既に2011年1月に米国では、ヒトES細胞を加工した医薬品の再生医療における活用例として、世界初の治験(脊髄損傷治療)が開始され、2011年7月には同じく米国で網膜疾患治療を目的としたヒトES細胞加工製品の治験が開始されている(ただし、前者の治験は2011年11月に経済的理由により中断)。また、2007年に山中らによって世界初のヒトiPS細胞が樹立されたことを契機に、細胞のプログラミングを人為的に操作、制御できる時代が到来し、新規細胞基材、新規製造関連資材、新規製造方法、新規適用法等、新たなイノベーションを推進し、再生医療・細胞治療へ応用しようとする研究展開が国内外できわめて活発化している。この中に実用

化に有望と考えられるシーズも数多くあり、例えば、近年中にはわが国においてiPS細胞を加工して作製した網膜色素上皮細胞を加齢黄斑変性の患者らに対して臨床応用することが開始されると期待されている。このような、一昔前には実現が想定されていなかった製品(多能性幹細胞加工製品)の開発には、多能性幹細胞に関するイノベーションの進展と共に登場してくるリスクの評価法や、多能性幹細胞加工製品に特有の品質・安全性確保のための基盤技術が必須である。本分担研究では、多能性幹細胞加工製品の製造において重要な、細胞基材としてのセル・バンクの品質のあり方について調査を行った。

### B. 研究方法

米国のヒト細胞、組織または細胞・組織利用製品(HCT/P)に関しては米国食品医薬品局(FDA)の生物製剤評価研究センター(CBER)のSteven Bauer博士、EUの先端医療製品(ATMP)に関しては欧州医薬品庁(EMA)の先端医療委員会(CAT)／独国ポールエールリッヒ研究所(PEI)のEgbert Flory博士・Bettina Klug博士ら、ならびに国際生物製剤標準化連合(IABS)／WHO細胞基材研究班John C.

Petricciani 博士らに聞き取り調査を行った。これと同時に各種メディア中の公開情報の収集を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究は動物・ヒト試料等を用いない調査型研究のため、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験指針、研究倫理審査委員会規程等にある倫理面の審査・承認が必要とはならなかった。

## C. 研究結果

### C-1 様々なセル・バンク

「セル・バンク」ないし「細胞バンク」と呼ばれるものは国内外に数多く存在する。これらは大きく2種類に分けられる。即ち、具体的な臨床用途・最終製品が特定されているものと、そうでないものである。前者には、骨髄バンク、さい帯血バンク、アイバンクや、抗体・タンパク質製剤・ワクチン等のバイオリジクス（生物製剤）製造用に各製薬メーカーが保有するセル・バンクが含まれる。一方、具体的な臨床用途・最終製品が特定されていないセル・バンクとしては、海外では American Type Culture Collection (ATCC), European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Massachusetts Human Stem Cell Bank & International Registry, WiCell Research Institute Stem Cell Bank (WISC Bank), UK Stem Cell Bank などがあり、国内では理化学研究所細胞バンク、医薬基盤研究所細胞バンクなどの他に、京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) で準備中の iPS 細胞バンクも含まれる。

### C-2 セル・バンクの定義

「セル・バンク」ないし「細胞バンク」という言葉はアカデミアから産業界まで幅広く用いられているが、その定義は、立場や目的によって複数あり、それぞれ意味合いが異なる。例えば、Mosby's Medical Dictionary, 8th edition では、“storage facility for frozen tissue samples held for research purposes and for surgical reconstruction of damaged body structures”（研究目的または体の損傷部位の外科的再建を目的とした凍結組織標本を保管する貯蔵施設）と定

義されている。また、わが国の文部科学省・厚生労働省および経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」においては、「提供されたヒトの細胞（中略）等について、研究用資源として品質管理を実施して、不特定多数の研究者に分譲する非営利的事業」と定義されている。一方、日米 EU 医薬品規制調和国際会議(ICH)のガイドライン Q5D 「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」においては、「均一な組成の内容物をそれぞれに含む相当数の容器を集めた状態で、一定の条件下で保存しているもの。個々の容器には、単一の細胞プールから分注された細胞が含まれている。」とされ、チューブないしアンプルに入った凍結細胞という実体を指す。ヒト多能性幹細胞加工製品はバイオリジクス的一种であることから、本稿では「セル・バンク」という言葉を ICH-Q5D の定義に従って用いることとする。

### C-3 セル・バンク・システム構築の目的

ICH-Q5D に基づくセル・バンク・システムは大抵の場合 2 段階のシステムから成り立っている。即ち、大本の細胞を一定の培養条件下で最低限の継代数を経て増殖させることにより調製したセル・バンクをマスター・セル・バンク(MCB)と呼び、MCB から一定の条件で培養して得られる均質な細胞懸濁液を分注して調製した、実際の製造に使用されるセル・バンクをワーキング・セル・バンク(WCB)と呼ぶ。

なお、「微生物細胞あるいはヒト又は動物由来の細胞で、ヒトを対象に in vivo 又は in vitro で投与されるバイオリジクスを生産する上で必要な能力を有するもの」は「細胞基材」(cell substrate) と呼ばれる。ヒト多能性幹細胞加工製品をはじめとする細胞・組織加工製品の原材料となる細胞は細胞基材である。従って、セル・バンクも細胞基材の一種である。また、MCB を調製する元になる親細胞株や親細胞株を樹立するために使用される親細胞も細胞基材である (図 1)。

バイオリジクスの製造におけるセル・バン

ク・システム構築の目的は、一定の品質の特定の最終製品を安定的かつ継続的に製造することにある。逆に言えば、一定の品質の最終目的製品を安定的かつ継続的に製造する上で重要かつ科学的に合理的な場合に、セル・バンク・システムの構築またはその他の細胞基材の調製が必要となるのであって、細胞・組織加工製品の製造において全ての種類の細胞基材が必須であるというわけでない点、注意が必要である。

#### **C-4 セル・バンクの「品質」**

C-1 項でセル・バンクは特定の臨床用途の有無により大きく 2 種類に分類されることを述べたが、分類の違いによってセル・バンクの品質の意味合いも異なる。

##### **C-4-1 具体的臨床用途が未特定のセル・バンクの「品質」**

「具体的臨床用途が未特定のセル・バンク」(※)における品質上の注意点は2つある。その一つは、①感染因子混入などの汚染が無いことの保証である。これは作業従事者ないし患者の安全性の確保の意味合いがある。もう一点は、②学問的定義(一般的定義)に基づく細胞種としての同一性・純度とその安定性を保証することである。例えば、リプログラミングされた「iPS 細胞様細胞」を「iPS 細胞」としてバンク化する場合には、3 胚葉系への多分化能を確認することが必須である。

※注: 臨床用途が未特定であるにもかかわらず「臨床グレード」と呼ばれるセル・バンクが国内外に存在するが、これは感染因子の厳重な管理に加えて、免疫原性を示す恐れのある動物由来成分等を含んだ試薬を細胞の樹立・維持に使用しないなど、より厳密な規格の下に製造された細胞であることを意味している。

##### **C-4-2 特定の臨床用途・最終製品製造のためのセル・バンクの「品質」**

「特定の臨床用途・最終製品製造のためのセル・バンク」すなわち「細胞基材としてのセル・

バンク」における品質上の注意点の1つは上の場合と同様に①感染因子混入などの汚染が無いことの保証である。ただし、臨床用であることから、患者の安全性の確保の意味合いがより強い。もう一つの注意点は具体的臨床用途が未特定のセル・バンクの場合とは異なり、②患者に投与される最終製品の品質・有効性・安全性の再現性を確保するための原材料としての特性とその安定性である。例えば、リプログラミングされた「iPS 細胞様細胞」を特定の分化細胞製造用の原材料としてバンク化する場合には、目的とする細胞への分化効率の高さや分化効率の安定性の方が多分化能よりも重要な場合もありうる。

つまり、ヒト細胞・組織加工製品の製造における、原材料・中間製品としての細胞基材(細胞バンク等)の品質・規格については、製造プロセス全体として最終製品の有効性・安全性が確保できるように設定することが原則である。

例えばヒト iPS 細胞加工製品の場合には、対照疾患、患者の QOL (Quality of Life)、標的となる臓器・細胞・分子、製品の使用方法、製品の安全性・有効性など (First-in-Man の場合には、非臨床安全性試験や非臨床 Proof-of-Concept 試験(非臨床薬力学試験)等のデータ)をもとに、最終製品の品質・規格が設定され、最終製品の品質・規格から目的細胞の品質・規格が決定される。同様に、目的細胞の品質・規格からセル・バンクの品質・規格が決定され、セル・バンクの品質・規格から親細胞となる体細胞の品質・規格が決定される(図 2)。

細胞・組織加工製品の製造においては、細胞という極めて複雑な構造と不確実性の高い特性を持つ要素が存在するために、原材料や中間製品の品質をもとに最終製品の品質を設計・デザインすることは不可能である(図 3)。近年、比較的単純な構造の医薬品の製造において、プロセスシステム工学の思想を応用し、原材料・中間製品および製造プロセスにおいて最終製品の品質に影響を与える重要な特性を広くかつ深く評価して一定の品質の最終製品を保証するためのデザインスペースを設定(さらには