

主担当教員連絡先

高桑徹也 (内 3956/3931)

細胞育成学実践論 2012

1. 目的

再生医療を展開する人材には 1. 細胞治療の基礎知識の理解、2. 細胞調製施設 (Cell Processing Center: CPC) の運営管理の考え方の理解と実践、3. 安全な細胞の育成、調製法の理解と実践、4. 細胞治療研究に必要な基礎技術の修得、5. 細胞治療研究の実際と多岐にわたる能力が求められる。本カリキュラムでは Good Manufacturing Practice (GMP) に準拠した細胞製造、品質管理、セルプロセッシングセンター管理の実際を学習することを目的とする。

2. 日程

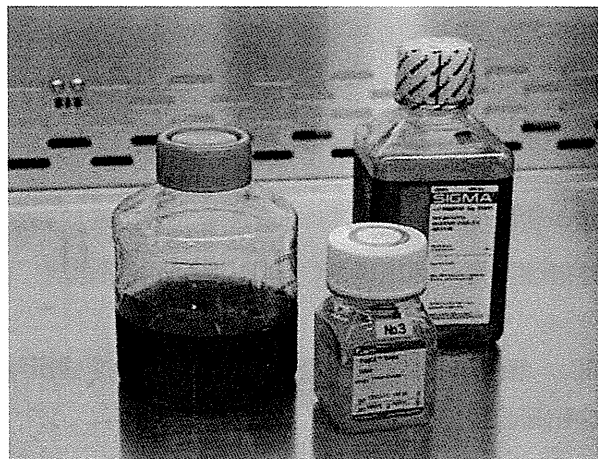
集中講義 3 日間 平成 24 年 1 月 23, 25, 27 日 (月、水、金)

3. スタッフ

人間健康科系専攻	教授	高桑 徹也 (単位認定責任者)
	准教授	伊吹 謙太郎
	准教授	青山 朋樹
	教務補佐	上田 路子
分子細胞治療センター	主任技師	笠井 泰成
iPS 細胞研究所	教授	木村 貴文
	テクニカルスタッフ	谷 美穂
先端医療振興財団	GL	川真田 伸

4. スケジュール

次ページ



[1月23日：第1日]

9：00－9：10

オリエンテーション（実施場所：人間健康科学系専攻 実習室）

オリエンテーション：高桑 徹也

実習説明：青山 朋樹

9：10－9：40

講演Ⅰ：細胞培養とは？（実施場所：人間健康科学系専攻 実習室）

人間健康科学系専攻：上田 路子

9：40－10：10

講演Ⅱ：滅菌、消毒とは？（実施場所：人間健康科学系専攻 実習室）

分子細胞治療センター：笠井 泰成

10：10－10：20

〈休憩〉

10：20－11：30（実施場所：人間健康科学系専攻 培養室）

実習Ⅰ：バイオハザードキャビネット、CO₂ インキュベーターの構造

分子細胞治療センター：笠井 泰成

実習Ⅱ：ロット管理

人間健康科学系専攻：上田 路子

11：30－12：30

〈休憩〉

12：30－17：00

無菌性培養実習（実施場所：人間健康科学系専攻 実習室および培養室）

講演Ⅲ：無菌培養について（実施場所：人間健康科学系専攻 実習室）

iPS細胞研究所：谷 美穂

無菌性細胞製造実習 I (実施場所：人間健康科学系専攻 培養室)

- ・ 培養液調製
- ・ 付着細胞剥離
- ・ 細胞数カウント
- ・ 細胞播種

〈休憩〉は適宜

担当：伊吹 謙太郎、青山 朋樹、上田 路子、谷 美穂

レポート作成

[1月25日：第2日目]

8:50 人間健康科学科正面玄関集合→分子細胞治療センター移動

9:00-12:00

品質管理Ⅰ（実施場所：分子細胞治療センター）

- ・ エンドトキシン測定オリエンテーション
- ・ エンドトキシン測定実践Ⅰ

〈休憩〉は適宜

担当：笠井 泰成

CPC管理Ⅰ（実施場所：分子細胞治療センター）

- ・ CPC管理

担当：笠井 泰成

12:00-13:00

〈休憩〉

13:00-16:00

無菌性細胞製造実習Ⅱ（実施場所：人間健康科学系専攻 培養室）

- ・ 無塵衣、手袋装着訓練
- ・ 細胞観察
- ・ 付着細胞剥離
- ・ 細胞数カウント

〈休憩〉は適宜

担当：伊吹 謙太郎、青山 朋樹、上田 路子、谷 美穂

16:00-17:00

レポート作成

[1月27日：第3日]

9：00—12：00

無菌性細胞製造Ⅲ（実施場所：人間健康科学系専攻 培養室）

- ・ 細胞観察
- ・ 付着細胞剥離
- ・ 細胞数カウント
- ・ 倍加時間算定

〈休憩〉は適宜

担当：伊吹 謙太郎、上田 路子、谷 美穂

12：00—13：00

〈休憩〉

13：00—14：00

品質管理Ⅱ（実施場所：分子細胞治療センター）

- ・ エンドトキシン測定実践Ⅱ

〈休憩〉は適宜

担当：笠井 泰成

FiTへ移動（引率：上田）

14：00—15：00

CPC管理Ⅱ（実施場所：iPS研究所 FiT）

- ・ CPC管理

担当：木村 貴文、谷 美穂

15：00—17：00

小括（実施場所：人間健康科学系専攻 実習室）

レポート提出、実習結果評価：青山 朋樹、笠井 泰成

実習総括：高桑 徹也

[2月8日：第4日（任意）]

CPC 管理Ⅲ（実施場所：先端医療振興財団）

14:15 ポートライナー先端医療センター前 集合

14:30～

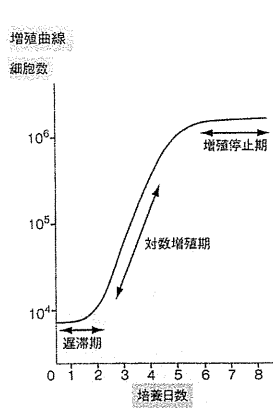
先端医療センター施設見学

討論会

- ・ 細胞治療の適正価格
- ・ 出荷判定基準

担当：川真田 伸

細胞の性質 増殖曲線 (Growth curve)



細胞数の変化を経時的に追いかけて描いたもの

遅滞期 播種直後の損傷回復や新しい環境への適応で増殖の見られない期間。

対数増殖期 活発に増殖する期間。

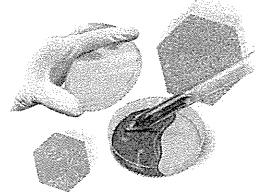
増殖停止期 細胞密度が高くなり接触阻止を起こす。または栄養成分の枯渇や老廃物の蓄積などにより増殖を停止する期間。

* 接触阻止 (contact inhibition)
細胞が相互に隙間無く接触する事により増殖が止まること。

細胞育成学実践論

細胞培養とは？

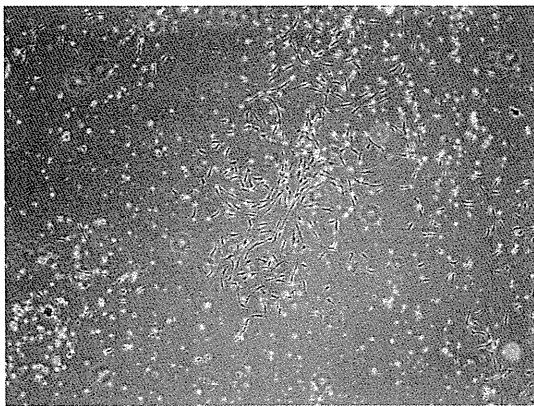
参考 細胞培養入門ノート(羊土社)
細胞培養なるほどQ&A(羊土社)
バイオ実験イラストレイテッド(秀潤社)



上田 路子

2012年 1月 23日
京都大学大学院医学研究科
人間健康科学系専攻

骨髄間葉系幹細胞 培養 5日目

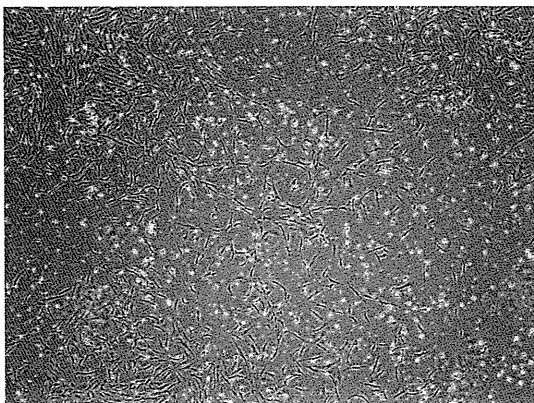


細胞培養とは

体の中から組織や細胞を取り出して、培養容器の中で、細胞を生かし続けたり増殖させたりすること。

狭義 一つ一つばらばらにした細胞の培養
広義 組織培養や器官培養も含めて総称

骨髄間葉系幹細胞 培養 7日目

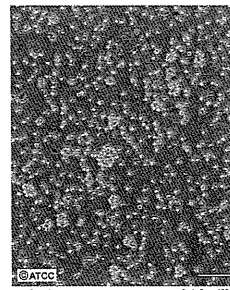


細胞の種類(増殖形態で分類)

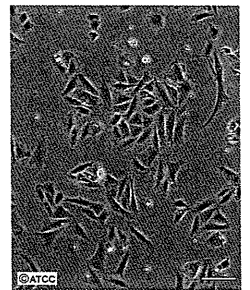
浮遊培養系細胞
主に血液由来細胞

接着培養系細胞
主に組織由来の細胞
繊維芽細胞・上皮様細胞など

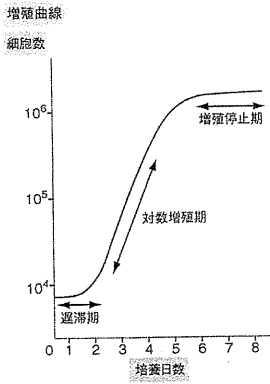
Jurkat
(ヒト急性リンパ芽球白血病由来)



Saos-2
(ヒト骨肉腫由来)



細胞の性質 増殖曲線 (Growth curve)



細胞数の変化を経時的に追いかけて描いたもの

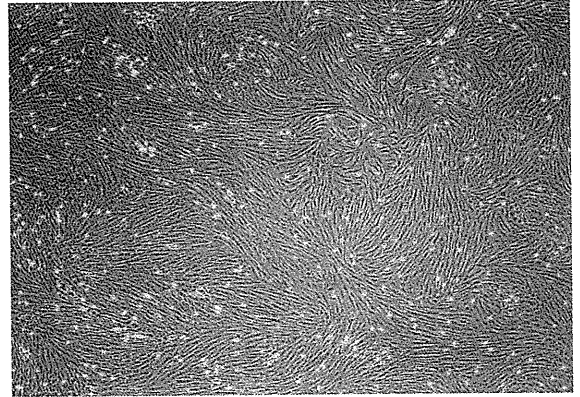
遅滞期 播種直後の損傷回復や新しい環境への適応で増殖の見られない期間。

対数増殖期 活発に増殖する期間。

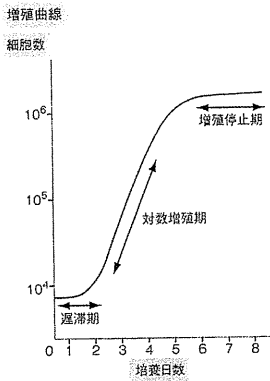
増殖停止期 細胞密度が高くなり接触阻止を起こす。または栄養成分の枯渇や老廃物の蓄積などにより増殖を停止する期間。

* 接触阻止 (contact inhibition)
細胞が相互に隙間無く接触する事により増殖が止まること。

骨髄間葉系幹細胞 培養 10日目



細胞の性質 増殖曲線 (Growth curve)



細胞数の変化を経時的に追いかけて描いたもの

遅滞期 播種直後の損傷回復や新しい環境への適応で増殖の見られない期間。

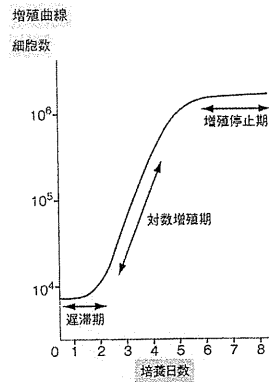
対数増殖期 活発に増殖する期間。

増殖停止期 細胞密度が高くなり接触阻止を起こす。または栄養成分の枯渇や老廃物の蓄積などにより増殖を停止する期間。

* 接触阻止 (contact inhibition)
細胞が相互に隙間無く接触する事により増殖が止まること。

➡ **継代**
細胞を植え継ぐこと。細胞を剥がしてその一部を新しい容器に移す。

細胞の性質 増殖曲線 (Growth curve)



細胞数の変化を経時的に追いかけて描いたもの

遅滞期 播種直後の損傷回復や新しい環境への適応で増殖の見られない期間。

対数増殖期 活発に増殖する期間。

増殖停止期 細胞密度が高くなり接触阻止を起こす。または栄養成分の枯渇や老廃物の蓄積などにより増殖を停止する期間。

* 接触阻止 (contact inhibition)
細胞が相互に隙間無く接触する事により増殖が止まること。

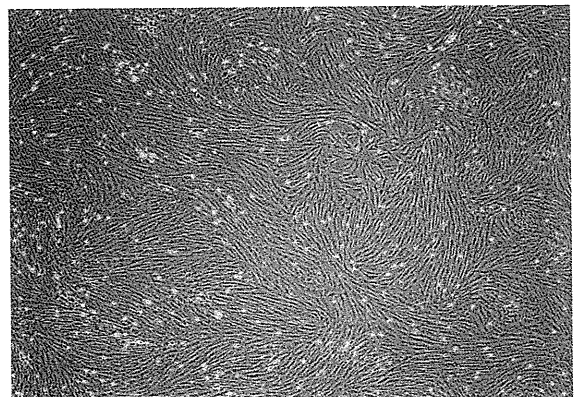
細胞培養を行う環境と周辺機器

細胞培養を行う部屋 (無菌作業を行う部屋)
培養室 Cell Processing Center (CPC)

無菌作業を行う機器
安全キャビネット
クリーンベンチ

細胞培養器
CO₂インキュベーター
通常温度37°C CO₂濃度 5%

骨髄間葉系幹細胞 培養 10日目



細胞培養でよく使う試薬－1

培地

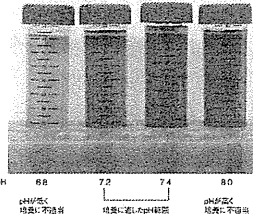
“えさ” 細胞を培養し、増殖させる為の栄養素を供給
アミノ酸・ビタミン・ミネラル・ブドウ糖など

pH緩衝作用

(pH指示薬フェノールレッド)

血清

(血液を凝固させ上清を取ったもの)
細胞増殖促進物質(成長因子)
・細胞障害保護因子・栄養因子



細胞培養でよく使う器材

培養容器

ディッシュ(シャーレ)
35mm, 60mm, 100mm, 150mm
フラスコ
25cm², 75cm², 175cm²
マルチウェルプレート
6well, 12well, 24well, 96well

メスピペット

1mL, 2mL, 5mL, 10mL, 25m, 50mL

遠沈管

15mL, 50mL, 250mL, 500mL

凍結用チューブ など

細胞培養でよく使う試薬－1

培地

“えさ” 細胞を培養し、増殖させる為の栄養素を供給
アミノ酸・ビタミン・ミネラル・ブドウ糖など

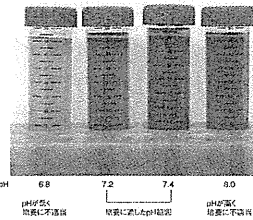
バクテリアやカビは
非常によく生える！

pH緩衝作用

(pH指示薬フェノールレッド)

血清

(血液を凝固させ上清を取ったもの)
細胞増殖促進物質(成長因子)
・細胞障害保護因子・栄養因子



細胞培養でよく使う器材

培養容器

ディッシュ(シャーレ)
35mm, 60mm, 100mm, 150mm
フラスコ
25cm², 75cm², 175cm²
マルチウェルプレート
6well, 12well, 24well, 96well

メスピペット

1mL, 2mL, 5mL, 10mL, 25m, 50mL

遠沈管

15mL, 50mL, 250mL, 500mL

凍結用チューブ など

➡ ロットナンバー
使用期限、製造(滅菌)年月日の確認

細胞培養でよく使う試薬－1

培地

“えさ” 細胞を培養し、増殖させる為の栄養素を供給
アミノ酸・ビタミン・ミネラル・ブドウ糖など

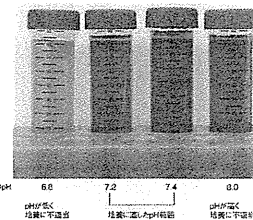
バクテリアやカビは
非常によく生える！

pH緩衝作用

(pH指示薬フェノールレッド)

血清

(血液を凝固させ上清を取ったもの)
細胞増殖促進物質(成長因子)
・細胞障害保護因子・栄養因子



➡ ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum)
自己血清

細胞培養でよく使う器材

培養容器

ディッシュ(シャーレ)
35mm, 60mm, 100mm, 150mm
フラスコ
25cm², 75cm², 175cm²
マルチウェルプレート
6well, 12well, 24well, 96well

メスピペット

1mL, 2mL, 5mL, 10mL, 25m, 50mL

遠沈管

15mL, 50mL, 250mL, 500mL

凍結用チューブ など

➡ ロットナンバー
使用期限、製造(滅菌)年月日の確認

記録をとる

細胞培養でよく使う試薬－2

抗生物質

細胞にとって毒性のない濃度、
種類の異なる菌に広く作用するものを選ぶ
ペニシリンG・硫酸ストレプトマイシン
アンホテリシンB・ゲンタマイシン・カナマイシン

トリプシン-EDTA

細胞と細胞同士、細胞とディッシュとの接着を剥がす
トリプシン: タンパク質による接着を壊す
EDTA: カルシウムを介した結合を壊す

PBS(-)

NaClで等張にしたリン酸緩衝液
細胞の洗浄、試薬の調製に使用する

細胞培養でよく使う試薬－2

抗生物質

細胞にとって毒性のない濃度、
種類の異なる菌に広く作用するものを選ぶ
ペニシリンG・硫酸ストレプトマイシン
アンホテリシンB・ゲンタマイシン・カナマイシン

トリプシン-EDTA

細胞と細胞同士、細胞とディッシュとの接着を剥がす
トリプシン: タンパク質による接着を壊す
EDTA: カルシウムを介した結合を壊す

PBS(-)

NaClで等張にしたリン酸緩衝液
細胞の洗浄、試薬の調製に使用する

細胞培養でよく使う試薬－2

抗生物質

細胞にとって毒性のない濃度、
種類の異なる菌に広く作用するものを選ぶ
ペニシリンG・硫酸ストレプトマイシン
アンホテリシンB・ゲンタマイシン・カナマイシン

トリプシン-EDTA

細胞と細胞同士、細胞とディッシュとの接着を剥がす
トリプシン: タンパク質による接着を壊す
EDTA: カルシウムを介した結合を壊す
➡ TrypLE Select (動物由来成分不含)

PBS(-)

NaClで等張にしたリン酸緩衝液
細胞の洗浄、試薬の調製に使用する

細胞培養でよく使う試薬－2

抗生物質

細胞にとって毒性のない濃度、
種類の異なる菌に広く作用するものを選ぶ
ペニシリンG・硫酸ストレプトマイシン
アンホテリシンB・ゲンタマイシン・カナマイシン

トリプシン-EDTA

細胞と細胞同士、細胞とディッシュとの接着を剥がす
トリプシン: タンパク質による接着を壊す
EDTA: カルシウムを介した結合を壊す

PBS(-)

NaClで等張にしたリン酸緩衝液
細胞の洗浄、試薬の調製に使用する

ロットナンバー
使用期限

➡ 記録をとる

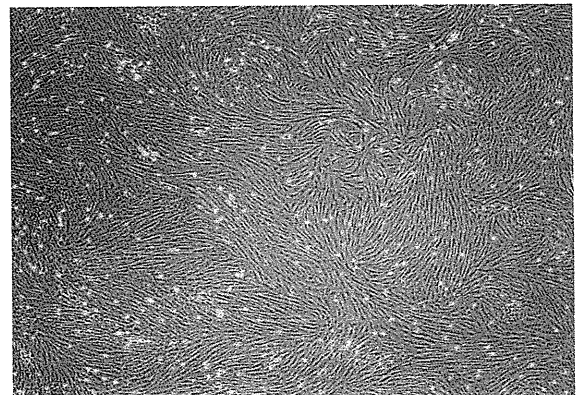
CoA
Certificate of Analysis

Certificate of Analysis

TEST	SPECIFICATION	LOT#N084647 RESULTS
Product Name	グルベック培養イーグル細胞培養シローム	SIGMA-CELLCULT
Strength	With 1000 mg/L glucose, L-glutamine, and sodium bicarbonate, 10x10, sterile, serum, cell culture tested	
Product Number	D044	
Product Brand	SIGMA	
Lot#		LOT#N084647
Expiry date		18 AUG 2010
Date of QC Release		JUL 2010
Place of Manufacture		18 AUG 2010
Production Date		18 AUG 2010
Appearance (Turbidity)	Clear	Clear
Appearance (Form)	Solution	Solution
pH	7.0 - 7.6	7.3
Osmolality	300 - 340 mOsm/kg	328 mOsm/kg
Cell Culture Testing - MTT	Pass	Pass
Cell Line	Cell Line - Cell Types	3T3
Key Element Conc - ICP	Pass	Pass
Amino Acid Analysis	Pass	Pass
Stability	Pass	Pass
Endotoxin Level	<= 1 EU/ml	< 1 EU/ml
Glucose Concentration	0.9 - 1.1 g/l	1.0 g/l

Jane Findlay
Jane Findlay, Manager
Quality Control
Irvine, United Kingdom

骨髄間葉系幹細胞 培養 10日目



CCMT A08-02 試薬の準備調整の手順書及び記録書(抜粋)

試薬・器材の在庫確認

記載されている試薬・器材が揃っていることを確認し、ロット番号・使用期限を記載する。

試薬	容量	メーカー	物品番号	数量	備考
<input type="checkbox"/> αMEM培地	500mL	GIBCO	32571-036	8	
<input type="checkbox"/> ペニシリン・ストربتマイシン	100mL	GIBCO	15070-063	1	
<input type="checkbox"/> TrypLE Select	100mL	GIBCO	12563-011	4	
<input type="checkbox"/> CP-1	68mL	極東製薬		1	
<input type="checkbox"/> 25%ヒト血清アルブミン	50mL			1	
<input type="checkbox"/> 精製水				1	バランス用

器材	容量	メーカー	物品番号	数量	備考
<input type="checkbox"/> 150mm培養皿		IWAKI	3030-150	25	
<input type="checkbox"/> 60mmグリッド入り培養皿		Corning	430195	4	
<input type="checkbox"/> 滅菌チューブ(1.5mL)	1.5mL	Eppendorf	0030 121.589	10	
<input type="checkbox"/> クライオチューブ	2.0mL	Nunc	375418	6	

試薬	ロット番号	使用期限
αMEM培地		
ペニシリン・ストربتマイシン		
TrypLE Select		
CP-1		
25%ヒト血清アルブミン		

器材	ロット番号	製造年月日
150mm培養皿	0490801	2008/02/18

器材	ロット番号	使用期限
60mmグリッド入り培養皿	31006003	2009/11
滅菌チューブ(1.5mL)	W128383J	2012/02
クライオチューブ	098860	2012/10

施設(CPC)の管理・運営

製造(細胞の分離・培養)

品質検査・管理

機器、器具の選定

機器

- ・遠心器(スイングロータータイプ) KUBOTA
- ・インキュベーター SANYO

器具

- ・骨髄穿刺針 Medical Device Tech
- ・ピペットエイド FALCON
- ・ピペット FALCON
- ・培養皿 Corning
- ・遠心管 IWAKI
- ・ストレージボトル Corning
- ・クライオチューブ Nunc
- ・滅菌チューブ Eppendorf
- ・マイクロピペット Gilson
- ・シリンジ Terumo
- ・注射針 Terumo
- ・血液バッグ Terumo
- ・セルカウントプレート One Cell



全て医療器具or cGMP or ISO対応のもの

施設(CPC)の管理・運営

製造(細胞の分離・培養)

品質検査・管理

機器、器具の選定

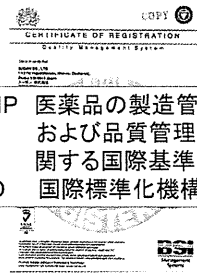
機器

- ・遠心器(スイングロータータイプ) KUBOTA
- ・インキュベーター SANYO

器具

- ・骨髄穿刺針 Medical Device Tech
- ・ピペットエイド FALCON
- ・ピペット FALCON
- ・培養皿 Corning
- ・遠心管 IWAKI
- ・ストレージボトル Corning
- ・クライオチューブ Nunc
- ・滅菌チューブ Eppendorf
- ・マイクロピペット Gilson
- ・シリンジ Terumo
- ・注射針 Terumo
- ・血液バッグ Terumo
- ・セルカウントプレート One Cell

GMP 医薬品の製造管理
および品質管理に
関する国際基準
ISO 国際標準化機構

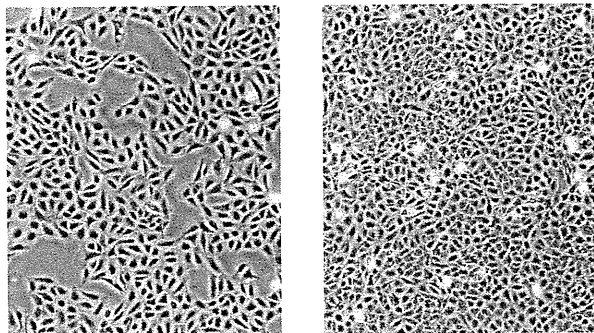


全て医療器具or cGMP or ISO対応のもの

- ・使用物品の発注・管理
使用期限 ロットナンバーなど
- ・器材の滅菌
- ・文書の管理
- ・細胞分離・培養の準備
使用器材の準備、試薬調整など
- ・細胞の分離・培養
- ・細胞の機能評価など
膵島のインスリン分泌能の測定
遺伝子検査(染色体解析、p16メチル化検査)
腫瘍形成 など

実習で使用する細胞

ヒト骨肉腫由来 U-2OS

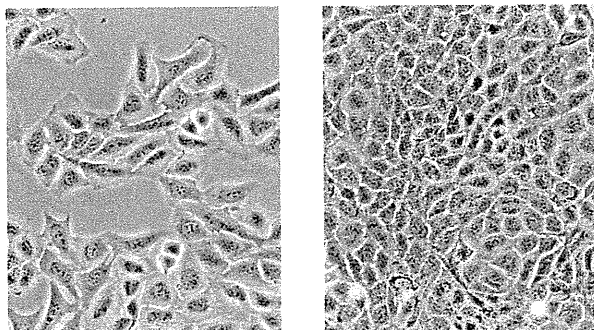


試薬の選定

- ・培養液
α-MEM glutamax (Invitrogen)
FDAよりcGMPグレード認可
- ・細胞解離液
TrypLE Select (Invitrogen)
組み換えプロテアーゼ(動物由来成分不含有)
FDAより cGMPグレード認可
- ・培養用血清
自己血清
- ・細胞凍結保存液
CP-1
細胞生存率 90%
- ・抗生剤
ペニシリン、ストレプトマイシン(Invitrogen)
FDAよりcGMPグレード認可

実習で使用する細胞

ヒト骨肉腫由来 U-2OS



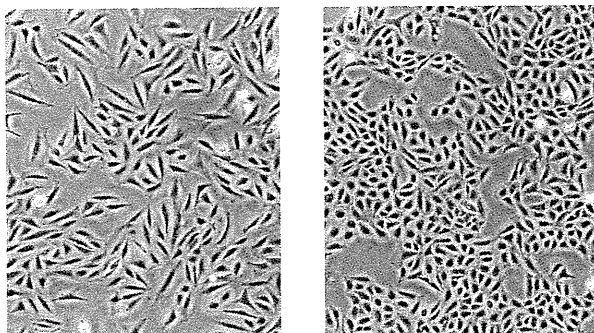
CPC内での細胞培養の様子



ヒト骨肉腫由来

Saos-2

U-2OS



細胞培養の手順 (実習内容)

<試薬・器材の準備>

1. Lot, 使用期限, 製造年月日, 滅菌(製造)年月日の確認及び記録
2. 試薬・器材のアルコール清拭、安全キャビネットへの持ち込み

<細胞播種>

1. 細胞観察
2. 培養皿からの細胞剥離
3. 細胞数の測定
4. 細胞の播種

➡ 2日目、4日目 細胞数を計測 ➡ 倍加時間を求める

細胞培養の手順（実習内容）

<試薬・器材の準備>

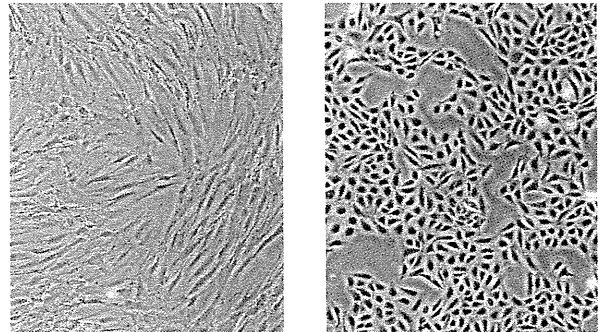
1. Lot, 使用期限, 製造年月日, 滅菌(製造)年月日の確認及び記録
2. 試薬・器材のアルコール清拭、安全キャビネットへの持ち込み

<細胞播種>

1. 細胞観察
2. 培養皿からの細胞剥離
3. 細胞数の測定
4. 細胞の播種

➡ 2日目、4日目 細胞数を計測 ➡ 倍加時間を求める

骨髄間葉系幹細胞と骨肉腫由来U-2OS



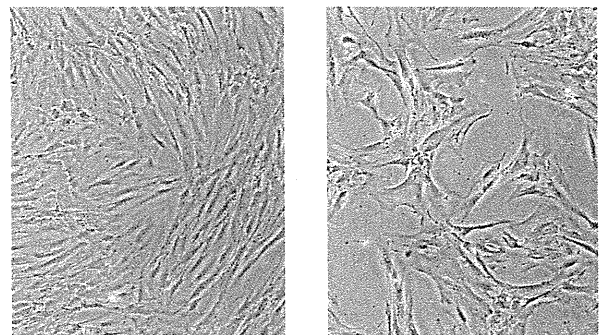
実践編

無菌操作説明 & デモンストレーション



谷 美穂 & 上田路子

骨髄間葉系幹細胞



培養室に入る前に

白衣着用・髪をまとめる・アクセサリーを外す

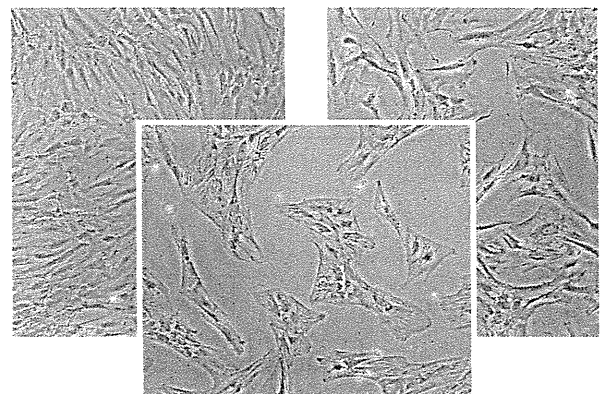
手洗い & 消毒

手を石鹸で洗い、アルコール消毒をする

手袋・マスク着用

手袋の上からもアルコール消毒する

骨髄間葉系幹細胞



ピペットエイド、ピペットマンの取り扱い

ピペットエイド F 10 mL/sec
M 5 mL/sec
S 1 mL/sec

ピペットマン P-1000 P-200

ピペットの開封とピペットエイドへの取り付け方

バナナピール
元の部分(数cmくらいの範囲)だけを持つ

➡ 常にピペットの先に注意する

ボトルの取り扱い(蓋の開け閉め)
遠沈管の取り扱い(蓋の開け閉め)

手洗いの手順

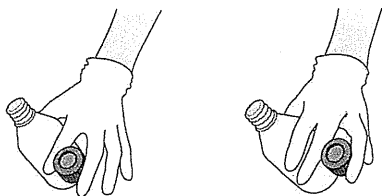


ボトル・遠沈管の取り扱い方

フタの持ち方

人差し指と中指ではさむ

中指と薬指ではさむ



フタを持ったまま作業がしにくい場合は、清潔な場所に置く

培養室に入る前に

白衣着用・髪をまとめる・アクセサリーを外す

手洗い&消毒

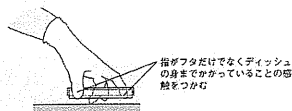
手を石鹸で洗い、アルコール消毒をする

手袋・マスク着用

手袋の上からもアルコール消毒をする

培養皿の持ち方

ディッシュのフタだけを持たない



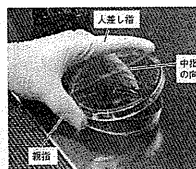
良い持ち方

指が縁に触れないように



悪い持ち方

指が縁に触れている



フタを置く場合は、清潔な場所に置く

安全キャビネットの用意

安全キャビネット内をアルコール清拭する
滅菌敷布を敷く(吸水面を上)

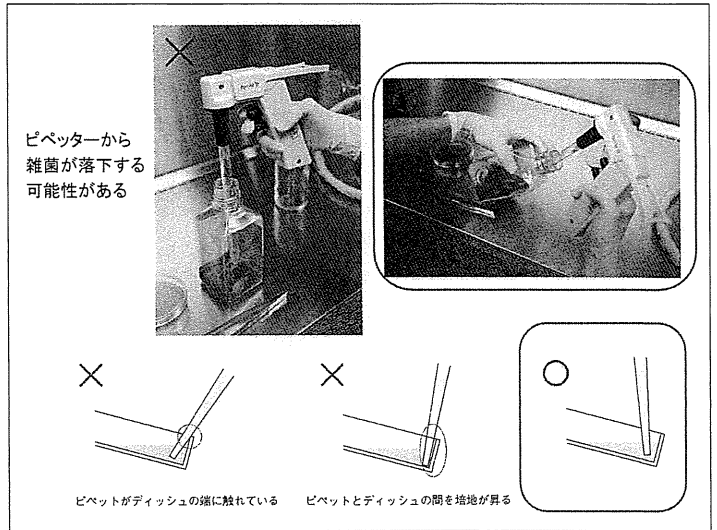
必要な物品を安全キャビネットへ入れる

アルコール清拭して安全キャビネット内へ入れる

★ 物品を置くときに配置を考える

手が交差しないか？

手が器具の上を通らないか？



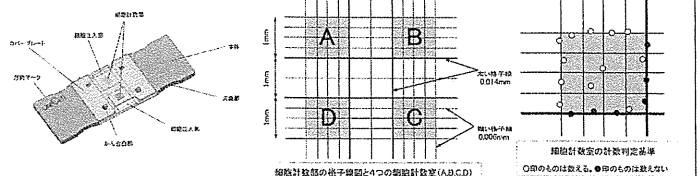
細胞培養でよく使う用語

- 継代** 細胞を植え継ぐこと。細胞を剥がしてその一部を新しい容器に移す。
- コンタミ** 汚染を意味する英語 Contamination を略した言い方。培養中の細胞に微生物や他の種類の細胞が混入すること。
- サスペンド** 「浮遊する」を意味する英語 suspend 「懸濁する」とも言う。培地などの溶液に細胞を浮遊させること。
振る・指でたたく・指ではじく(タッピング)・ピペッティング
- ピペッティング** ピペットで液を吸ったり吐いたりすること。細胞の塊を小さくしたり、細胞を浮遊させる為に行う。
あまり激しくやると細胞を傷つけるので注意!

セルカウンター(細胞計数盤)

取扱説明書

構造



- * 本体中央のスケージには細胞注入部が4箇所あり、それぞれに細胞計数室が設けられています。
- * 細胞計数室のA(左上)、B(右上)、C(右下)、D(左下)の4つのコーナーの正方形を細胞計数室として使います。細い格子線に乗っている細胞は数え、太い格子線に乗っている細胞は数えない。
- * 各細胞計数室の正方形の辺の長さ(=1格子線の中央と、隣り格子線の中央との間)は1.00mmあります。
- * 細胞計数室での本体とカバープレートとの間は、0.10mmの間隔がありますので、各細胞計数室での容積は、 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0.1\text{mm} = 0.1\text{mm}^3 = 10^{-4}\text{mL}$ となります。

$$1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0.1\text{mm} = 0.1\text{cm} \times 0.1\text{cm} \times 0.01\text{cm} = 0.0001\text{cm}^3 = 1.0 \times 10^{-4}\text{mL} \quad (1.0\text{cm}^3 = 1.0\text{mL})$$

- ① 細胞懸濁液を、細胞注入部に注入する
- ② 細胞が沈むのを30秒～1分待つ
- ③ 4つの細胞計数室の細胞を順次カウンターで数える

細胞治療における 安全性の確保と品質管理

平成23年度 細胞育成学実践論

言葉の意味

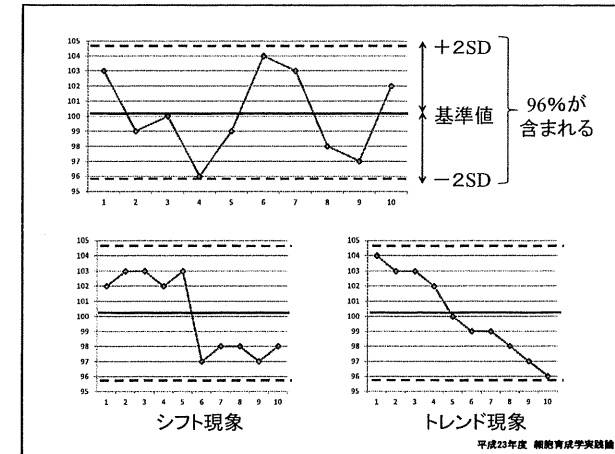
・ 安全性・・・「安らかで危険のないこと。」

- > 医薬品は、投与量や使い方次第でクスリにも毒にもなる。
- > 原則として、医薬品は純粋な化学物質を原料とし製造されている。
しかし、細胞や組織は様々な物質が含まれており、個体差もある。

・ 品質管理・・・「定められた規格に合っていることを統計学的に解析し確認すること。」

- > 管理幅(許容範囲)の設定が重要。
- > 許容範囲内であっても、トレンド解析が必要。

平成23年度 細胞育成学実践論



言葉の意味

・ 安全性・・・「安らかで危険のないこと。」

品質を保証し、安全性を高めるには、潜在している危険を見付けだす必要がある。

厄介なのは「ヒューマンエラー(人為的過誤)」

許容範囲内でも解析が必要。

平成23年度 細胞育成学実践論

ヒューマンエラーを減らすには、

- 教育訓練を受け、一定レベルの技術と知識を身につける。

- > どのような作業であっても、十分に理解したうえで実施する。
- > 小さな異変でも、原因が明らかでない場合には要注意。
- > 定期的に再教育訓練を受ける。

- 重要な作業は、複数の作業員で実施する。

- > ダブル・チェック（人と人、人とコンピューターなど）
- > 作業手順書に従って作業を実施し、作業記録を残す。

平成23年度 細胞育成学実践論

「滅菌」と「消毒」

平成23年度 細胞育成学実践論

どこが違うのか・・・ 「滅菌」「消毒」「殺菌」などの用語

「滅菌」は

すべての菌（微生物やウイルスなど）を死滅させ除去すること。菌を取り除くため最も厳しい対応。人体に対しては行えないので、器具などの菌に対する用語。

「消毒」は

病原性微生物を死滅または除去し、害のない程度まで減らしたり、あるいは感染力を失わせるなどして、毒性を無力化させること。滅菌しても毒素だけが残ることがある。

「殺菌」は

この用語には、殺す菌の対象や殺した程度を含んでいない。このため、一部の菌を殺しただけでも殺菌といえる。この用語を使う場合、厳密な有効性は保証されない。

平成23年度 細胞育成学実践論

ついでに・・・ 「除菌」「抗菌」などの用語

「除菌」は

「限られた空間に含まれている微生物の数を減らし、清浄度を高める」という意味があるが、学術的な専門用語としてはあまり使われない。

「抗菌」は

この用語には「菌の繁殖を防止する」という意味があるが、経済産業省の規定では細菌のみを対象としていて、カビ等は対象外である。これも対象や程度を含まない概念。

日常生活でのイメージでは、「消毒」が菌を取り除くイメージが最も強い。

平成23年度 細胞育成学実践論

無菌と無菌の保証レベル

無菌 (Sterile) とは、

「生菌の存在しない状態」

註: 無菌状態の完全な証明は、現実的に不可能である。

平成23年度 細胞育成学実践論

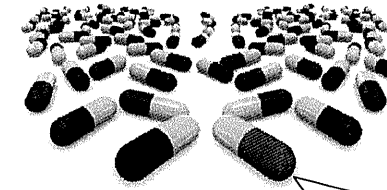
滅菌医薬品の無菌性保証水準 (Sterility Assurance Level)

「通常、 1×10^{-6} 以下の無菌性保証水準が得られる条で滅菌を行わなければならない。」

(第16改正 日本薬局方)

平成23年度 細胞育成学実践論

無菌性保証水準

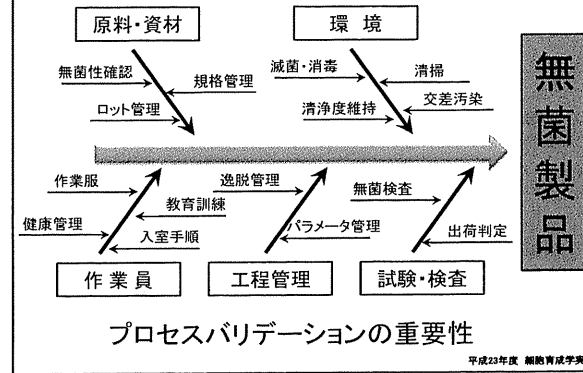


100万個に1個以下

このレベルは、無菌試験の保証限度を超えるものであり、プロセスバリデーションの実施によりはじめて保証される。

平成23年度 細胞育成学実践論

無菌製品製造の特性要因図



オーバーキルアプローチ

オーバーキルアプローチとは、初期菌数の調査を必要としない滅菌条件をいう。

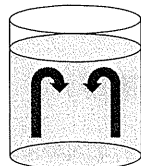
- 菌数の減少が $12 \log(10^{-12})$ 桁以上
- 滅菌後の到達菌数が $10^{-6}/\text{ml}$ 又はg以下を満足する。

【例】 高圧蒸気滅菌 121Ⅲ 12分以上
 乾熱滅菌 170Ⅲ 30分以上

平成23年度 細胞育成学実践論

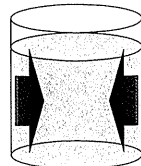
滅菌を行う際の注意点

滅菌を行う物質中で、熱がどの様に伝わるか考慮する。



液体

対流があれば、均一になりやすい。



粉末など

温度上昇の度合いが、不均一になる。

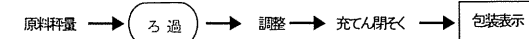
平成23年度 細胞育成学実践論

無菌製品の製造工程

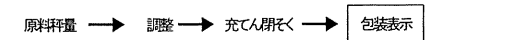
1. 最終滅菌有の無菌製品



2. ろ過により無菌化する無菌製品



3. 無菌操作により製する無菌製品



平成23年度 細胞育成学実践論

高圧蒸気滅菌と干熱滅菌の比較

	オートクレーブ	乾熱滅菌
滅菌条件	121℃ 12分以上	170℃ 30分以上
メリット	比較的低温で滅菌できる。 芽胞を形成する菌にも効果的。	180℃、30分以上で、芽胞も完全に殺せる。 250℃、30分以上で、エンドキシンを分解できる。
デメリット	エンドキシンは分解できない。 熱に弱いプラスチック器具を滅菌できない。	水分を多く含むものは滅菌できない。 高熱に弱い素材は滅菌できない。

平成23年度 細胞育成学実践論