

2012/5022A

厚生労働科学研究費補助金  
医療技術実用化研究事業

重症心不全を対象とする  
脂肪組織由来多系統前駆細胞による  
心筋再生細胞医薬品の開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

主任研究者  
大阪大学臨床医工学融合研究教育センター  
松山 晃文

平成 25 年 3 月

## 目 次

### I. 統括研究報告

- 重症心不全を対象とする脂肪組織由来多系統前駆細胞による  
心筋再生細胞医薬品の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2  
松山晃文

### II. 分担研究報告

1. C P C 構造設備について「最低限必要とされる要求事項」  
MCP (Minimum Consensus Package)の提案・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・8  
松山晃文
2. 自己骨格筋芽細胞シート技術の導出経験と自己脂肪組織由来多系統前駆細胞  
を用いる重症心不全治療細胞組織加工医薬品の開発への展開支援・・・・・・・・・・75  
宮川繁・澤芳樹
3. C P C での作業における各種管理業務について「最低限必要とされる要求事項」  
MCP (Minimum Consensus Package)の提案・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・81  
早川堯夫

### III. 研究成果の刊行物・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・104

### IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・108

# I . 統括研究報告

重症心不全を対象とする脂肪組織由来多系統前駆細胞による  
心筋再生細胞医薬品の開発

研究代表者 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 松山晃文

研究要旨

重篤な虚血性心疾患症例に選択される冠動脈バイパス術によっても、残存心筋細胞の枯渇により治療効果が得られない症例（poor-responder）が存在する。本研究において研究を進めている再生医療製品は、重症心不全を対象疾患とし、冠動脈バイパス術poor-responderに適用する自己由来細胞製剤である。本年度、当該細胞製剤の有効性用量は $3 \times 10^5$  cells/kg、安全性用量は $1 \times 10^6$  cells/kg以上と確認した。頻回投与も有効で、同一病変部に2回投与が最適であることを見出した。平成26年度におけるヒト幹細胞臨床研究あるいは治験届提出に向け、臨床試験関連文書の作成を継続する。

A. 研究目的

わが国の心不全による年間死亡数は約4万3千人であり、その多くが末期虚血性心疾患による。重篤な虚血性心疾患・心筋梗塞症例に選択される冠動脈バイパス術によっても、残存心筋細胞の枯渇により治療効果が得られない症例（poor-responder）が存在する。そのため、サイトカイン効果による血管新生を期待した第1世代の再生医療を超えた、枯渇した心筋細胞を再生する第2世代の再生医療が待たれている。本研究においては、重症心不全を対象疾患とし、冠動脈バイパス術poor-responderに適用する経冠動脈的投与脂肪組織由来多系統前駆細胞を細胞医薬品として開発する。

B. 研究方法

自己脂肪組織由来多系統細胞を用いる重症心不全治療の、速やかなヒト幹細胞臨床研究への展開

を目指し、

1. 有効性用量設定試験
2. 頻回投与有効性蓄積試験
3. Confidence-in-Mechanism 検証
4. 安全性検証
5. 品質検証
6. プロトコル関連文書作成

の6項目を Working Breakdown Structure (WBS)として設定し、研究開発を進めることとした。

1. 有効用量設定試験：

冠動脈形成術・冠動脈バイパス術 poor-responder の重症心不全の病態を反映したモデル動物の設定を目指し、ブタ慢性心筋梗塞モデル作製技術を確立することとした。なんとなれば、Takehara et al. (JACC. 2011) に記載の方法によると、ブタの生存率が 20%以下であり、かつ生存個体の EF も不均一で、再現が認められなかったためである。

ブタ慢性心筋梗塞モデル作製技術が確立次第、当該

モデルブタのヒトへの外挿性 (Root of Administration および transmission) を利用して有効性用量を設定することを旨とし、用量として 0,  $1 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  cells/kg の細胞製剤を経冠動脈的に投与し、細胞投与による有効性(心機能改善)を心臓超音波検査(心駆出率)にて心機能を検証することとした。なお、心機能の検証にあつては、EF の改善率が 5%以上であることを評価基準とした。

## 2. 頻回投与有効性蓄積試験：

本細胞製剤の利点は、経冠動脈的投与であるため侵襲が少なくかつ頻回投与が可能であることにある。その利点を検証することをめざし、項目 1 にて設定された最適有効性用量による細胞投与を 1 回、2 回、3 回繰返し、頻回投与による有効性蓄積を心臓超音波検査(心駆出率)にて検証することとした。本試験では、投与回数により有効性の蓄積の観ならず、複数回投与による不整脈発生頻度の増加、投与後心筋組織学的検討により、病理的異常が発生していない事も確認する。

## 3. Confidence-in-Mechanism (CIM) 検証：

*in vitro*・*in vivo* での当該細胞の心筋細胞への分化機序解析を目指し、生体由来心筋細胞と薬剤誘導細胞製剤を共培養し、nkx2.5 を指標に心筋系細胞系譜への分化誘導を検討する。本試験結果は、効能裏付けの根拠とする。

## 4. 安全性検証：

安全性試験(毒性試験)の実施を目指し、単回投与毒性試験(安全性薬理併合試験)を立案する。特に、PMDA との薬事戦略相談により、試験期間について適正な期間を設定する。また、長期安全性の確認を目指し、平成 24 年度から 25 年度にかけての単回投与慢性毒性試験として長期ブタ試験の計画を立案する。またヒト由来細胞の体内動態追跡手法としての *Ahu*-PCR 法の有用性を検討する。

## 5. 品質(製造)検証：

本研究で開発する細胞製剤は自己由来である。そのため、品質のばらつきは否定できず、特に高齢患者由来である場合、核型異常を呈する細胞を細胞製剤として用いざるを得ないかもしれない。ここで、核型異常を呈する細胞が細胞製剤(原薬を含む)として用いるかの検証をめざし、核型異常を呈する細胞ロットを選択して軟寒天コロニー形成試験を実施する

## 6. プロトコール関連文書作成：

薬食審査発 0420 第 1 号治験通知を参考に、治験届関連文書作成を開始する。具体的には、治験薬概要書、治験計画書、製品標準書、標準手順書、製造指図書・記録書および三管理基準書の作成を行う。

(倫理面への配慮)

1. 非臨床試験(研究)において遺伝子改変動物、プラスミドDNA あるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施する。
2. 動物操作に当たっては、国立大学法人大阪大学の動物実験規定に従って行なう。
3. 臨床試験の実施にあつては、計画書(プロトコール)に関して医学倫理委員会での承認を受け、本人の書面による informed consent を取得した患者のみを対象とする。

## C. 研究結果

### 1. 有効用量設定試験：

冠動脈形成術・冠動脈バイパス術 poor-responder の重症心不全の病態を反映したモデル動物の設定を目指し、虚血再灌流 2 段階法を考案、ブタ心筋梗塞モデル作製技術として報告した(Okura et al. BBRC. 2012.)。当該モデルブタのヒトへの外挿性 (Root of Administration および transmission) を利用して有効性用量を設定することを旨とし、用量として 0,  $1 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  cells/kg の細胞製剤を経冠動脈的に投与し、細胞投与による有効性(心機能改善)を心臓超音波検査(心駆出率)にて検証、最適有効性用量が  $3 \times 10^5$ /kg であることを明らかとした。

### 2. 頻回投与有効性蓄積試験(前倒しして実施)：

本細胞製剤の利点は、経冠動脈的投与であるため侵襲が少なくかつ頻回投与が可能であることにある。その利点を検証することをめざし、最適有効性用量 ( $3 \times 10^5$ /kg) による細胞投与を 1 回、2 回、

3 回繰返し、頻回投与による有効性蓄積を心臓超音波検査（心駆出率）にて検証した。2 回投与により有効性は最大となり、2 回投与と 3 回投与では差は認められず、2 回投与が最適であることを見出した。

### 3. Confidence-in-Mechanism (CIM) 検証：

*in vitro*・*in vivo* での当該細胞の心筋細胞への分化機序解析を目指し、生体由来心筋細胞と薬剤誘導細胞製剤を共培養し、nkx2.5 を指標に心筋系細胞系譜への分化誘導を検討した。心筋系細胞系譜で誘導の一序が、心筋から分泌される *exosome* による可能性を見出した。これら結果をもとに、心筋系に誘導された細胞が *in vivo* にて心筋として分化生着することから、*in situ* reprogramming との概念を提唱した (Okura et al. 2012. 米国心臓病学会にて発表)。

### 4. 安全性検証：

安全性試験（毒性試験）の実施を目指し、単回投与毒性試験（安全性薬理併合試験）を立案した。4 月と 10 月に実施した薬事戦略相談での示唆に基づき、試験観察期間を 14 日間に延長、試験実施計画書を 7 版まで改定を加えた。当該 GLP 準拠単回移植急性毒性試験は日本バイオリサーチにて実施する（平成 25 年 2 月実施）。次いで、長期安全性の確認を目指し、単回投与慢性毒性試験として長期ブタ試験の計画を立案した。年度をまたいでの研究費執行ができないため、平成 25 年度早々に開始する予定である。本試験の体内動態試験との同時試験を可能とするため臓器パネルを構築した。一方、*Alu*-PCR 法による体内動態試験は、感度特異度ともに低いことが明らかとなった。

### 5. 品質（製造）検証：

核型異常を呈する細胞が細胞製剤（原薬を含む）として用いるかの検証をめざし、核型異常を呈する細胞ロットを選択して軟寒天コロニー形成試験を実施した。コロニー形成率が 1.1% であり、陰性基準（1% 未満）を満たさず、核型異常細胞は投与細胞としては不適格との結論が得られた。次いで、治験薬 GMP 化を目指し、培養工程で用いる生物由来原料の見直しを行った。遺伝子組み換えへの資材変更により、FBS、フィブロネクチン、ヒトアルブミンのみが薬事法 42 条基準（生物由来原料基準）の適応となるが、FBS とフィブロネクチンは  $\gamma$ -irradiation を実施、ヒトアルブミンは献血アルブミンを用いることで適合性確保

に目途を立てた。

### 6. プロトコール関連文書作成：

薬食審査発 0420 第 1 号治験通知を参考に、治験届関連文書作成を開始した。具体的には、治験薬概要書、治験計画書、製品標準書、標準手順書、製造指図書・記録書および三管理基準書の作成を行い、製品標準書、標準手順書、製造指図書・記録書の第 1 版は完成した。

## D. 考察

### 1) 有効性確認試験

これまで実施した有効性確認試験は、ヒト由来細胞を免疫抑制下のブタに投与した試験系、すなわち異種移植であるため免疫抑制剤の影響を否定できない。平成 25 年度にあつては、免疫抑制剤の影響を排除するため、ブタ自己脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いて有効性を確認する必要がある。

### 2) Confidence-in-Mechanism (CIM) 検証

*in situ* reprogramming に関し、作用機序は *exosome* による可能性が示された。関与する *exosome* 内 miRNA を解析することで、心筋系譜細胞誘導 miRNA が決定されれば、より安定的な分化誘導系を検証しうる可能性がある。

### 3) 長期安全性評価

慢性毒性試験の体内動態（運命）試験との同時試験を可能とするため、ブタを用いる臓器パネルを検証する必要がある。また、*Alu*-PCR 法は感度・特異度ともに十分ではないと考えられるため、細胞を標識しての追跡試験を考慮する。この場合、ラットあるいはマウスを用いてのイメージングシステムが最適と想定される。本細胞製剤は経冠動脈的とうよであることから、ラットあるいはマウスに経冠動脈の投与が可能であるかを検証し、可能であれば、健全な免疫不全ラットあるいはマウスを被試験物投与動物として、イメージングシステムによる体内動態試験を実施すべきである。

### 4) 治験薬 GMP 化

治験薬 GMP 対応 CPC にてコールドランは、最低 3 例実施する必要がある。

### 5) プロトコール関連文書作成

製品標準書、標準手順書、製造指図書・記録書および三管理基準書を作成・第1版を完成させ、本文書にてコールドランが実施可能か検証作業を行う必要がある。

#### E. 結論

自己脂肪組織由来多系統前駆細胞は、薬剤添加24時間培養により心筋指向細胞へと commitment し、経冠動脈的に投与する細胞浮遊製剤として有用性が示しえた。その有効性用量は  $3 \times 10^5$  cells/kg であり、 $1 \times 10^6$  cells/kg では安全性が確認された。頻回投与も有効で、同一病変部に2回投与が最適であった。これら試験結果は、同種脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いる心筋再生細胞製剤を薬事法下にて開発している（公財）先端医療振興財団に提供することとした。本年度までの試験結果から Feasible は確認されたと言え、平成26年度におけるヒト幹細胞臨床研究の開始、あるいは同年度における治験届提出に向け、臨床試験（治験含む）関連文書の作成を継続することとした。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

松山晃文

1. Okura H, Saga A, Soeda M, Miyagawa S, Sawa Y, Daimon T, Ichinose A, Matsuyama A. Intracoronary artery transplantation of cardiomyoblast-like cells from human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction and survival in a swine model of chronic myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;425(4):859-65.
2. Moriyama M, Moriyama H, Ueda A, Nishibata Y,

Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling. *BMC Cell Biol.* 2012;13:21

3. Okura H, Saga A, Soeda M, Ichinose A, Matsuyama A. Adipose Tissue-Derived Multi-lineage Progenitor Cells as a Promising Tool for In Situ Stem Cell Therapy. *Current Tissue Engineering,* 2012;1(1):43.
  4. 松山晃文：「再生細胞治療とレギュラトリーサイエンス」臨床血液 2012;53(10). 1801-1807.
  5. 大倉華雪 松山晃文：「再生医療とレギュラトリーサイエンス」*Medical Science Digest.* 2012; 39(11). 486-489.
  6. 松山晃文：「ものづくり特許戦略」：ものづくり技術からみる再生医療—細胞研究・創薬・治療—, 田端泰彦監修. pp264-268
  7. 松山晃文：「トランスレーショナルリサーチと生命倫理」生命倫理のフロンティア：シリーズ生命倫理学 第IV期 第20巻 粟屋剛・金森修編 丸善書店, 東京, 2012年11月30日刊行 pp190-207
  8. 松山晃文：「再生医療における臨床試験のあり方」最新医学 67(11), 2660-2664, 2012.
  9. 大倉華雪 松山晃文：「再生医療とレギュラトリーサイエンス」整形・災害外科 *in press.*
- 宮川繁
1. Uchinaka A, Kawaguchi N, Hamada Y, Miyagawa S, Saito A, Mori S, Sawa Y, Matsuura N. Transplantation of elastin-secreting myoblast sheets improves cardiac function in infarcted rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2012 Sep;368(1-2):203-14
- 早川堯夫
2. Moriyama M, Moriyama H, Ueda A, Nishibata Y, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa

T. :Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling. BMC Cell Biol. 2012 Aug 7;13(1):21.

3. Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. : Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 $\alpha$  transduction. J. Hepatol., 2012 Sep;57(3):628-36.
5. Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Hayakawa H., Furue MK., Mizuguchi H.: Promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using Type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. Biomaterials, 2012 Jun;33(18):4526-34.
6. Tashiro K., Kawabata K., Omori M., Yamaguchi T., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa T., Mizuguchi H. Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction. Stem Cell Res., 2012 Mar;8(2):300-11.

## 2. 学会発表

### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし



## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総研究事業）  
研究報告書

CPC構造設備について「最低限必要とされる要求事項」  
MCP (Minimum Consensus Package)の提案

研究代表者 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 松山晃文

研究要旨

CPCとは、Cell Processing Center = 細胞培養センターのことである。CPCは、GMP管理され、細胞を培養・増殖する施設である。現在、各種幹細胞から作製する再生医療で扱う細胞・組織工学製品を製造するためには欠かせない施設となっており、本調査研究では、その構造設備（ハード）と管理等について説明し、別稿のソフトとの並列による品質管理にむけた情報収集の一助とした。

て調査取りまとめを行った。

A. 研究目的

わが国の心不全による年間死亡数は約4万3千人であり、その多くが末期虚血性心疾患による。重篤な虚血性心疾患・心筋梗塞症例に選択される冠動脈バイパス術によっても、残存心筋細胞の枯渇により治療効果が得られない症例

(poor-responder)が存在する。そのため、サイトカイン効果による血管新生を期待した第1世代の再生医療を超えた、枯渇した心筋細胞を再生する第2世代の再生医療が待たれている。本研究においては、重症心不全を対象疾患とし、冠動脈バイパス術poor-responderに適用する経冠動脈的投与脂肪組織由来多系統前駆細胞を細胞医薬品として開発する。

B. 研究方法

いわゆる5指針を基盤に、下記の項目に沿っ

1 製造施設

1. 1 汚染防止
1. 2 作業室の清浄度区分
1. 3 CPCの内装
1. 4 内装部分に係る消毒液・塵埃・昆虫対策
1. 5 殺菌灯管理
1. 6 パスボックス・パスルームの管理
1. 7 特殊ガス供給設備の管理

2 空調システム

2. 1 原理
2. 2 フィルトレーションシステム
2. 3 陽圧のクリーンルーム
2. 4 陰圧のクリーンルーム
2. 5 温湿度制御
2. 6 換気回数と清浄度
2. 7 差圧
2. 8 空調設備と作業室の環境に影響する要因
2. 9 日常管理とメンテナンス
2. 10 HEPA フィルターが目詰まり管理
2. 11 プレフィルタ-と中性能フィルタ-及びび廃棄フアンVバルブの取替え

- 2.12 ドレン排水ピットとストレーナーのメンテナンス
- 3 防虫防鼠対策 . . . .
- 3.1 防虫対策
- 3.2 防鼠対策
- 4 清掃・消毒 . . . .
- 4.1 清掃・消毒手順について
- 4.2 消毒剤
- 4.3 清掃・消毒後の環境測定
- 5 清浄度に応じた作業衣 . . . .
- 5.1 清浄度別の作業衣
- 5.2 使用済み作業衣等の処理
- 6 緊急時の対応 . . . .
- 6.1 災害発生後のCPC性能維持確認項目
- 6.2 停電発生時の対応
- 6.3 製造施設のパニックオープン

(倫理面への配慮)

1. 非臨床試験(研究)において遺伝子改変動物、プラスミドDNAあるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施する。
2. 動物操作に当たっては、国立大学法人大阪大学の動物実験規定に従って行なう。
3. 臨床試研究の実施にあつては、計画書(プロトコール)に関して医学倫理委員会での承認を受け、本人の書面によるinformed consentを取得した患者のみを対象とする。

## C. 研究結果

CPCとは、Cell Processing Center = 細胞培養センターのことである。CPCは、GMP管理され、細胞を培養・増殖する施設である。現在、各種幹細胞から作製する再生医療で扱う細胞・組織工学製品を製造するためには欠かせない

施設となっており、ここでは、その構造設備と管理等について説明する。

## 1 製造施設

### 1.1 汚染防止

細胞製剤に対する汚染防止の原則は、次の3つに尽きる。

- 持ち込まない
- 拡散させない
- 増加させない

これら3つの原則を満足させるには、構造設備の完備、衛生管理、作業員の教育と作業管理を確立し、遵守していく以外、方法はない。

- 1) 構造設備の完備として、動線を考慮した作業室の配置、製造機器の配置・管理、空調設備の適切管理がある。
- 2) 衛生管理としては、施設の消毒方法の確立、消毒効果の確認方法及び原材料の搬入方法の確立、感染性廃棄物の適切な処理方法の確立がある。
- 3) 作業員の教育訓練と作業管理は、教育の年間スケジュールに基づき、衛生管理教育及び製造管理教育を行い、適切な作業方法を確立・遵守する。

### 1.2 作業室の清浄度区分

CPC内のゾーニング(エリア分け)を決定する上で重要な項目として、清浄度区分がある。この清浄度区分により、人と物品(製品や原材料等)の動線や気流方向も左右されるため、適切に設定する必要がある。

CPCにおける一般的な清浄度区分の例を下記に示す。

CPC内 作業室	清浄度クラス※		
	FED-STD-209D	EU-GMP・日本薬局方	ISO14644-1
居室（管理室）	一般空調～10万相当	一般空調～グレードD	ISOクラス8～9
前室	10万相当～10万	グレードD～グレードC	ISOクラス8
パスルーム	10万相当～10万	グレードD～グレードC	ISOクラス8
一次更衣室	10万相当～10万	グレードD～グレードC	ISOクラス8
二次更衣室	10万～1万	グレードC～グレードB	ISOクラス7～8
脱衣室	10万相当～10万	グレードD～グレードC	ISOクラス8
処理室	1万	グレードB	ISOクラス7
陰圧系バッファゾーン	10万～1万	グレードC～グレードB	ISOクラス7～8

清浄度区分で、清浄度が高い方が良いからと言って、全エリアをクラス1万にした場合、クラス1万を維持するための換気回数は、40回～50回と、他のクラスに比べ、20回～30回多い。この換気回数を維持するための電気量や室温、湿度を維持するための冷水、温水等の使用量を考えると、コスト高になる。また、環境測定を行う場合、クラス1万エリアと、クラス10万エリアとでは、クラス1万エリアの方が、測定頻度や測定ポイント数が増え、管理基準も厳しくなり、維持

管理するには、技術的にも経済的にも負担が増すため、製品の品質を維持しながら、用途に応じた適切なクラス設定を行う必要がある。

※ 清浄度のクラスの規格については、下記の清浄度クラスの規格及び4.4.3 清掃・消毒後の環境測定の規格を参照のこと。

清浄度クラスの規格

清浄度クラス 規格		指定粒径以上の許容粒子濃度（個/m <sup>3</sup> ）					
FED-STD-209D	ISO14644-1	0.1μm	0.2μm	0.3μm	0.5μm	1μm	5μm
—	ISOクラス1	10	2	—	—	—	—
—	ISOクラス2	100	24	10	4	—	—
クラス1	ISOクラス3	1,000	237	102	35	8	—
クラス10	ISOクラス4	10,000	2,370	1,020	352	83	—
クラス100	ISOクラス5	100,000	23,700	10,200	3,520	832	29
クラス1,000	ISOクラス6	1,000,000	237,000	102,000	35,200	8,320	293
クラス10,000	ISOクラス7	—	—	—	352,000	83,200	2,930
クラス100,000	ISOクラス8	—	—	—	3,520,000	832,000	29,300
—	ISOクラス9	—	—	—	—	8,320,000	293,000

### 1.3 CPCの内装

CPC内での製造では、作業室内の浮遊塵埃、浮遊菌、付着菌からの汚染を防ぐため、機器、天井、壁、床等の消毒を行う。CPC施設の内装は、

消毒剤に耐え、発塵の少ない建材を選択し、使用しなければならない。

場所	下地	表面仕上げ
天井	化粧珪カル板	耐水性ビニール系塗装
	石膏ボード	
	塩ビ板	
壁	30mmカラー鋼板	樹脂焼付け塗装・フッソ樹脂焼付け塗装
	化粧珪カル板	
	石膏ボード	耐水性ビニール系塗装
	ステンレス	
床	フリーアクセスフローア	塩ビ長尺シート
	コンクリート・モルタル	エポキシ・ウレタンライニング
窓	アルミ枠・ガラス	耐水性ビニール系塗装
ドア	鋼板・アルミ	樹脂焼付け塗装

#### 1. 4 内装部分に係る消毒液・塵埃・昆虫対策

##### [天井・壁・床部分]

天井及び壁と床の接合部分は、清掃が容易なようにR（アール）を付ける。また、建材に鉄や木材の使用を避ける。これは、鉄による錆の発生や、木材からの発塵・異物発生及び昆虫の発生を防ぐためである。天井や壁の接合部分は、防腐剤入りのコーキング材で消毒液が浸み込まないように処理する。床のシートも、塩ビシート等の溶接を行い消毒液の侵入を防ぐ。

##### [点検口]

天井や床に設置されている点検口は、気密を確保するため、エアータイト仕様のもので設置するのが望ましい。エアータイト仕様でないものが設置されていれば、防腐剤入りのコーキング材で目張りを行う。これにより、天井や床からの塵埃、昆虫の侵入を防ぐと共に、空気の漏れを防ぎ、室圧の維持を図る。

##### [電源コンセント及び消防設備等]

CPC内に設置されているコンセント及び消防設備であるスプリンクラー、煙感知器、熱感知器、スピーカーは、建材に穴を開けて取り付け、CPC側からカバーを設置し、この穴を塞いでいる。コンセントに関しては、施工業者にもよるが、

この部分が不完全に施工されている事が多い。一般用で、カバーにパッキンが無く、2箇所止めをされているものが使用されていれば、ゴムパッキン又は、シリコンパッキン入りで、4～6箇所止めのカバーに変更するか、防腐剤入りのコーキング材でカバーと建材との隙間を塞ぎ、塵埃、昆虫の侵入を防ぐと共に、空気の漏れも防ぐ。また、消毒液による漏電の危険性があるコンセントには、蓋付きのコンセントか、シャッター付きのコンセントを設置するのが望ましい。他消防設備に関しては、比較的穴が大きいので、天井裏部分から、防腐剤入りのコーキング材で隙間を塞ぐ等、対応する。

##### [照明器具]

CPC内に設置される照明器具は、クリーンルーム対応のもので、埋込型と直付型の2つのタイプがある。埋込型は器具本体を天井に埋め込むタイプで、比較的密閉度が高く、クラス100～クラス1000程度のクリーンルームに使用され、直付型は、本体が天井に露出するタイプで、クラス1万～クラス10万のクリーンルームに使用されることが多い。埋込型は、本体と同じ大きさの開口部を天井に開けて、はめ込むため、本体と天井部分との隙間が出来やすい。直付型は、天井とCPC内との貫通部の取り付け部分と電源引き込み部分にパッキンを設置し、気密させている

が、完全ではなく、埋込型、直付型共に、防腐剤入りのコーキング材で隙間を塞ぎ、異物の流入や

空気の漏れを防止する必要がある。

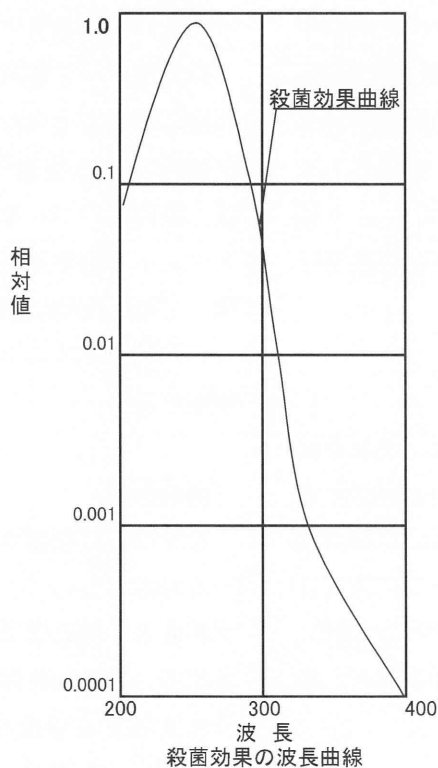


### 1. 5 殺菌灯管理

製造環境や製造工程において、器具や資材等に付着している微生物を死滅又は、減少させる手段の一つとして、殺菌灯が使用されるが、殺菌灯は使用時間と共に、殺菌力が低下する。そのため、殺菌灯の使用に際して、殺菌効果が十分に発揮されるように検討すると共に、効力の維持・管理に

努めなければならない。

CPCで使用されている殺菌灯の主要な波長は、253.7nmで、紫外線の中で殺菌効果の強い紫外線で、この波長を「殺菌線」という。この「殺菌線」は目に見えないが、市販されている殺菌灯は、「殺菌線」以外に若干の可視光線を出すため、点灯時に紫色に見える。



紫外線によって、微生物が死滅する原理は、微生物の原形質である核酸に作用して、変質破壊させるとされている。一般的には、グラム陰性細菌、グラム陽性細菌、カビの順に死滅しやすいが、カビは殺菌灯に対して、耐性があるものが多く、芽

胞は死滅しにくいとされている。

殺菌灯で製造機器や資材等を殺菌する場合は、直接照射を行う。この他、作業室の空気の殺菌は、作業室の上層部分を照射し、気流の流れを利用した殺菌、ダクト内部照射による空気の殺菌と、

水槽や水の配管に設置する、水の殺菌がある。

[殺菌灯の利点・欠点]

1) 利点

- ① 殺菌灯を照射するだけで殺菌ができ、使用が簡便である。
- ② 広い範囲の殺菌が可能である。
- ③ 作業員に直接照射するのを避ければ、作業中でも空気の殺菌が可能である。
- ④ 微生物に耐性を生じない。
- ⑤ 照射物に変化・変質を残すことが少ない。

2) 欠点

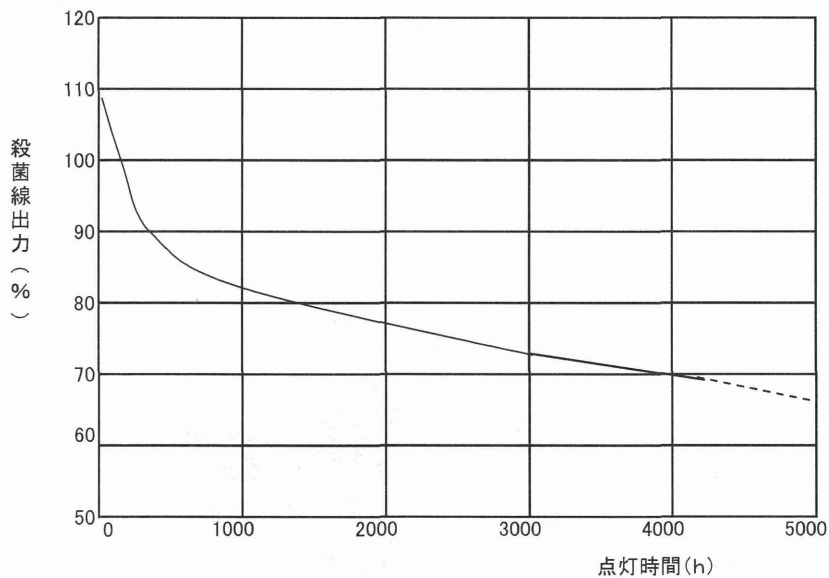
- ① 短時間の照射では、カビや芽胞のように、死

滅しない微生物が存在する。

- ② 直接、殺菌灯が照射されている部分は、殺菌効果が期待されるが、影になっている部分は、殺菌効果が期待できない。
- ③ 殺菌灯を直接又は間接的に、皮膚や目にあたると炎症の原因になる。
- ④ 殺菌灯の照射は、対象物の菌数を減少させるには有効であるが、完全な殺菌は困難である。

[殺菌灯の交換管理]

殺菌灯は、点灯時間が多くなれば、殺菌線の出力が減退し、殺菌効果が低下する。メーカーの仕様では、100時間点灯後の定格出力が、70%まで低下すれば、定格寿命としている。



殺菌灯の交換は、次の2つの方法がある。

1) 点灯時間による方法

メーカーの仕様に記載されている定格寿命に従い、交換する。

4～8W で3000時間

15～30Wで4000時間

一日の平均点灯時間から、定格寿命を計算し、交換・管理することが出来る。

2) 紫外線強度計による方法

殺菌灯直下1mの距離の照射強度を定期的に測定し、初期値の70%以下になれば交換する。

(15Wの殺菌灯直下1mの距離の、初期照射強度は、 $30 \sim 31 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ )

また、市販されている紫外線強度測定用ラベルで確認する方法もある。

[殺菌性能のマイナス要因]

殺菌灯の殺菌性能は、次の項目により影響される。

- 1) 電源の電圧
- 2) 点灯時間
- 3) 殺菌灯本体のガラスの汚れ
- 4) 反射板の汚れ



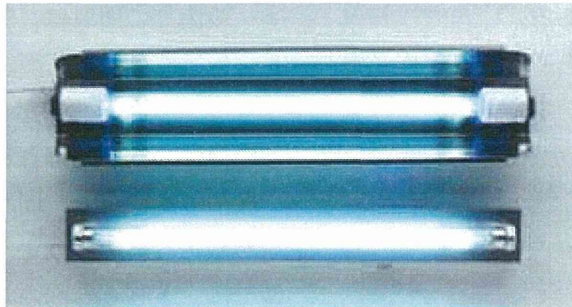
## 5) 設置環境の温湿度

### [殺菌灯使用上の注意]

殺菌灯の欠点の項でも記載したが、目に許容量以上の殺菌線を受けると、角膜炎や結膜炎を起す

ことがある。作業開始時には、殺菌灯を消灯し、点検や測定のため、殺菌線を暴露する場合は、紫外線用保護メガネを着用すること。

露出している皮膚に殺菌線を受けると、皮膚の炎症が起こることがあるので、注意すること。



殺菌灯

### [手洗い器の殺菌灯管理]

あまり知られていないが、手洗い器の送水口に、殺菌灯が装着されている。手洗いが終わった後、送水口には少量の水が溜まり、時間経過と共に、雑菌が繁殖し、手洗い時に指手が汚染を起すことがある。これを防止するために、溜まり水を殺菌

する殺菌灯が装備されている。この殺菌灯の出力は小さく、外部からも見え難いため、交換することを忘れがちであるが、殺菌灯の効力維持やコンタミネーション防止のため、照射時間を管理し、交換時期を明記して、定期的に交換することが重要である。



殺菌灯設置箇所

## 1. 6 パスボックス・パスルームの管理

パスボックス・パスルームは、クリーンルームへの搬入搬出に際し、一定量以上の空気の流入・流出を防ぎ、クリーンルーム内の室圧の異常な変化を防止する機能を有する。扉は密閉度の高い、エアータイトのものが使用される。

かないように、インターロック機能を有し、パスボックスの底板は、物品の搬入搬出の際に、発塵の少ない素材を使用する。一般的には、殺菌灯付きのパスボックスもあり、発塵対策と耐紫外線対策を兼ねて、ステンレスを使用することが多い。また、底板や側面にステンレスを使用することで、パスボックスの天井部分に取り付けられた殺菌灯の反射を

1) パスボックスは、入口と出口の扉が同時に開



利用し、殺菌力は低下するが、殺菌灯の光が直接当たらない部分の殺菌も期待できる。

- 2) パスルームは、比較的大きな物品や機器の搬入搬出に使用され、パスボックス同様、クリーンルームへの一定量以上の空気の流入・流出を防ぎ、室圧の異常な変化を防止する機能を有する。扉はエアタイトのものが使用されることが多い。パスボックスと違い、人がパスルームに入り、消毒作業等を行うことから、パスルーム内をダーティーゾーンとクリーンゾーンに分け、クリーンアップ前の物品や機器の置き場と、クリーンアップ後のものを置く場所を区別する必要がある。また、パスルームの清浄度と室圧は、隣接しているクリーンルームより低く設定され、扉は、インターロック機能を有し、自動的に閉じられるようにする。

- 3) パスボックスやパスルームを物品置き場に使用している施設が見受けられるが、清浄度管理の視点から、好ましい状態ではない。パスボックスやパスルームの機能維持のため、定期的に次の項目を行い、清浄度を維持管理する必要がある。

#### 1. 7 特殊ガス供給設備の管理

特殊ガス供給設備は、培養に使用する炭酸ガス及び窒素ガスをインキュベーターに供給する設備で、一次圧力計、二次圧力計、圧力調整器の機器で構成されている。

配管材は、SUS304のステンレス鋼継目無鋼管が使用されることが多い。管の接合は、2圧縮リング継手が使用され、外れにくくなっている。各ポンペを設置する架台は、一般構造用軽量形鋼を使用し、焼付け塗装されることが多い。圧力調整器は、気体が小さな間隙を通る際

#### 共通項目

- ① インターロック機能の確認
- ② 扉部分のゴムバッキンの亀裂や劣化の確認
- ③ 床・天井・壁・扉の清掃・消毒

#### パスボックス

- ① 底板等、付着菌の測定
- ② 殺菌灯の取替え

#### パスルーム

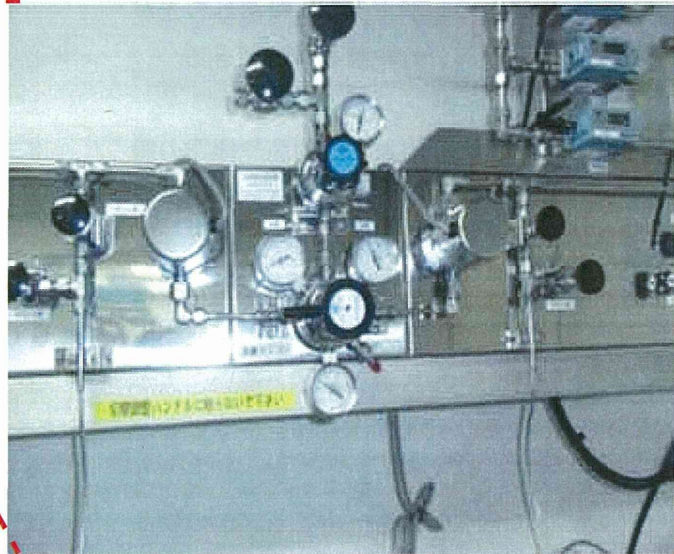
- ① 室圧・浮遊塵埃・付着菌・浮遊菌・落下菌の測定
- ② 昆虫相調査の実施

に、凍結することがあるため、この部分を加温するヒーターが設置されている。ボンペを設置する架台は、ボンペの転倒防止のため、壁等にボルトで固定するか、安全なラックを設置し、チェーンでボンペの上下2箇所以上を固定する。

CPCの付帯設備として、ガスを使用する作業室に、酸素濃度計を設置し、ガス漏れを感知し、作業員の安全を守る。また、酸素濃度計と連動させたパトライトをCPC外に設置し、外部にもガス漏れを知らせるシステムを構築するのが望ましい。



ボンベラック設置例



圧力計・ヒーター・圧力調整器



酸素濃度計



パトライト設置例

特殊ガス供給設備の項目を点検・校正する。

- ① 配管の気密検査
- ② 圧力計の校正
- ③ 酸素濃度計の校正
- ④ 各接合部分のガス漏れ検査
- ⑤ ヒーターの断線やコンセント抜け確認
- ⑥ 架台とチェーンの設置状態の確認

## 2 空調システム

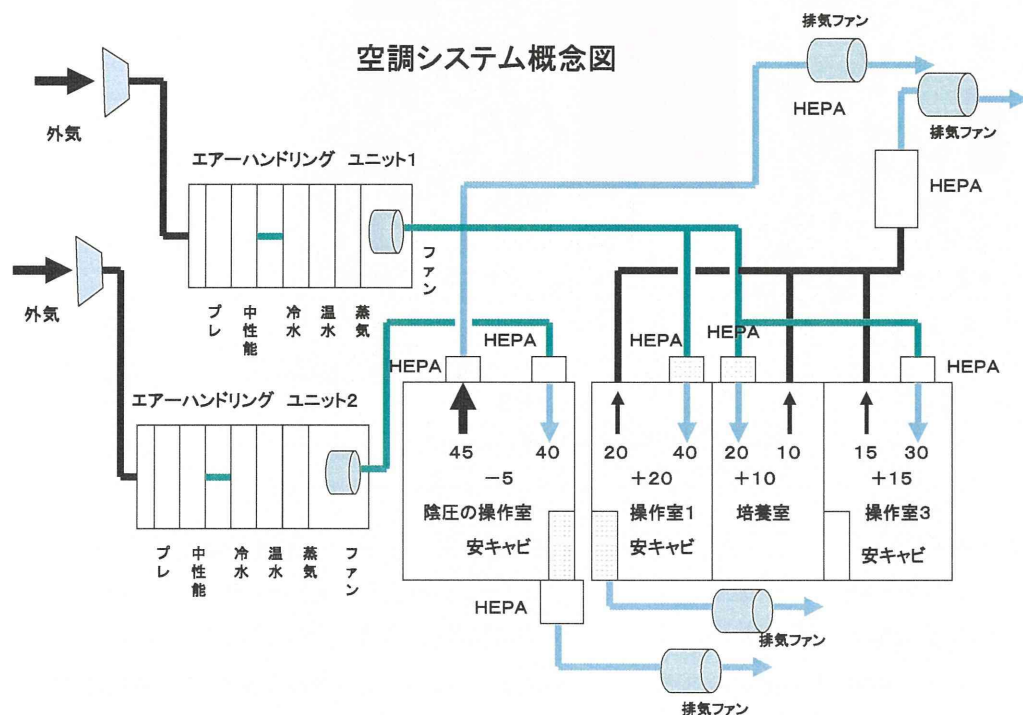
細胞製剤は、その特徴として滅菌工程がないことが挙げられる。滅菌工程がない細胞製剤の無菌性、安全性については、製造工程での影響が大きく、構造設備における工夫や配慮が必要となる。CPCの構造設備は、薬事法のみならず、建築法や消防法等の数々の法規を満足させると共に、品質の良い製品を製造する施設とし

て、GMP上、重要な位置づけとなっている。原材料の搬入から製品の出荷に至る全工程において、異物の混入、微生物汚染、他製品からのクロスコンタミネーションを防止できる構造設備とすることが重要である。CPCの構造設備の中で、クロスコンタミネーション防止を考える時、最も重要な設備として、空調システムが挙げられる。

## 2. 1 原理

CPCで用いられている空調機は、エアハンドリングユニット（AHU）と呼ばれる比較的規模の大きな空調機が多い。外部熱源設備から供給される冷水、温水、蒸気等を用いて、外気をプレフィルターと中性能フィルターに通した後、空気の温度や湿度を調節して室内に供

給する。一つのケーシングの中に、プレフィルター、中性能フィルター、冷温水コイル、加湿器、ドレンパン、送風機を組み合わせ、調節された空気をダクトから、CPC室内の天井に設置されたHEPAフィルターに供給する。HEPAフィルターから供給された清浄な空気は、室内の排気口からダクトを通過して、排気ファンを経て室外へと排出される。



## 2. 2 フィルトレーションシステム

空調システムにおいて、フィルトレーションシステムは、プレフィルター、中性能フィルター、高性能フィルターを組み合わせることにより、CPC内の清浄度を確保するシステムである。CPCが設置されている外気環境、すなわち外気塵埃の量と塵埃の粒径分布によっても、フィルトレーションの組み合わせが異なる。例えば、CPCが設置されている環境が海に近い場合、塩分によるサビの発生及び飛散等を考慮し、塩害対策用のフィルターを設置する等、環境に合わせた要素が必要である。また、排気側のフィルトレーションシステムも、細胞製剤の製造を考慮した高性能フィルターを設置し、外気を汚染しない様に配慮することが重要であ

る。

## 2. 3 陽圧のクリーンルーム

HEPAフィルターから、クリーンルーム室内に供給される空気量と、排気される空気量との差が、プラスであれば、陽圧のクリーンルームとなる。陽圧であるため、空気の流れは、室内から外への流れとなる。このため、陽圧のクリーンルームで処理される検体は、感染症陰性の検体が主である。陽圧管理のクリーンルームは、2つのタイプがある。

隣接している着衣室に対して、室圧が高いタイプと室圧が低いタイプである。

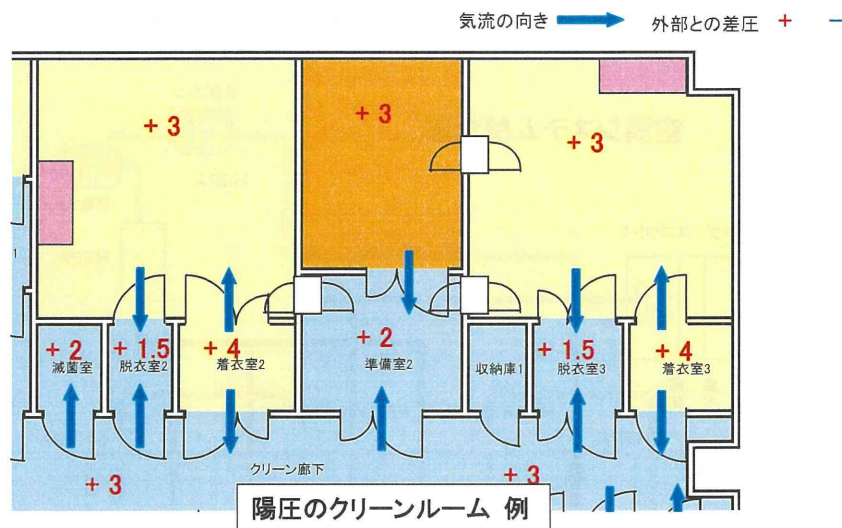
着衣室に対して、室圧が高いタイプの長所は、空気が着衣室方向に流れるため、着衣室で発生



した塵埃等を封じ込める事が出来る。短所は、クリーンルームで発生した塵埃等が着衣室に流れ込むため、感染の危険がある検体は取り扱うことが難しい点である。

着衣室に対して、室圧が低いタイプの長所は、着衣室からクリーンルーム方向へ、空気を押し込めることが出来るため、擬陽性の検体を処理

することが可能である点。短所は、着衣室で発生した塵埃が、クリーンルームに流れ込む点である。この欠点を解消するには、着衣行為で発生した塵埃が治まるまで、着衣室で待機し、その後、クリーンルームに入室することで解消できる。一連の手順については、更衣手順書等に記載することが重要である。



## 2. 4 陰圧のクリーンルーム

陽圧のクリーンルームとは逆で、クリーンルーム室内に供給される空気量と、排気される空気量との差が、マイナスであれば、陰圧のクリーンルームとなる。いわゆる封じ込めのクリーンルームで、室外に漏れると危険なベクターや感染性の検体を取り扱われる。

陽圧のクリーンルームでは、排気ダクトの先端

にある排気ファンに、排気用 HEPA フィルターが設置してあるが、陰圧のクリーンルームでは、室内の排気口に排気用 HEPA フィルターが設置してある。これは、消毒作業時に、排気用 HEPA フィルターが排気ファン近くにあると、汚染された排気ダクトの奥まで消毒が困難であるため、それを防止する意味で、室内の排気口に排気用 HEPA フィルターが設置されている。