

その取扱い案を作成し、逸脱発生報告書に記載する。

- 10) 逸脱管理責任者は、逸脱発生報告書を品質部門責任者に提出する。
- 11) 品質部門責任者は、逸脱管理責任者による措置及び措置案について確認し、必要に応じて調査を行い、妥当と認められる場合は、確認印を押印の上（必要に応じ意見を付す）、製造管理者に報告する。
- 12) 製造管理者は、品質管理責任者及び逸脱管理責任者による措置及び措置案について確認し、必要に応じて調査を行い、妥当と認められる場合は、承認印を押印の上（必要に応じ意見を付す）、逸脱管理責任者に回付する。
- 13) 是正措置の実施に伴い、手順の変更等を行う際には、併せて関係者への教育を実施する。

4. 7. 1. 8 文書及び記録の管理

CPCで製造される製品の製造管理、品質管理及び、衛生管理に必要な文書や記録に関して GMP 省令等に定める期間、保管しなければならない。文書や記録である基準書、標準作業手順書、製品標準書、規格書、指図書、記録書、試験検査結果、生データ等の管理にあたり、文書体系を明確にし、手順書を作成して管理する必要がある。

「文書及び記録の管理」の注意すべき点(ポイント)としては・・・

- 1) 文書及び記録の管理にあたり、手順書を作成しなければならない。
- 2) 製造業者等は、予め指定した者に、手順書に従い文書管理を行わせなくてはならない。
- 3) 手順書に記載する記載項目の一例
目的
適用範囲
用語の定義

文書作成及び管理（作成者、確認者、承認者等）

文書の保存期間

管理番号の付与（図書 No）

文書の改廃手順

文書の保管・配布・回収・廃棄

文書一覧など

- 4) 手順書等を作成し、又は改訂するときは、手順書等にその日付を記載すると共にそれ以前の改訂に係る履歴を保管すること。
- 5) 文書は常に最新の版が使用されるように管理すること。

4. 7. 1. 9 変更管理

変更管理を行う目的は、製造管理、品質管理及び衛生管理を向上させるために行うが、変更による品質への影響を確実に把握し、迅速に組織内で対応する必要がある。変更に伴う文書の改訂や教育訓練、又 当局への手続き、関連部署への連絡などを確実にを行う事が求められる。

「変更管理」の注意すべき点(ポイント)としては・・・

- 1) 変更管理を行うために、手順書を作成しなければならない。
- 2) 製造業者等は、予め指定した者に、手順書に従い変更管理を行わせなくてはならない。
- 3) 品質に影響を及ぼすおそれのある変更事項として、次のような事項がある。

構造設備 : 製造場所、保管場所、試験場所、製造器具、試験器具等

工程・手順 : 製造方法、成分・分量、ロットサイズ、洗浄方法、試験項目一方法等

その他 : 表示ラベル、包装材料、組織の変更、パラメーター等

- 4) 変更管理責任者は、製品への品質、有効性、安全性に影響を及ぼすと考えられる変更を行う場合は、事前に変更の目的、内容を記

載した変更申請書を品質管理者に提出する。

- 5) 品質管理者は、変更申請書の内容を評価し、必要に応じ調査を行い、変更の重要度区分を決定する。変更事項の重要度区分として、次のような区分例がある。

〈変更重要度区分〉

〈変更手続き〉 〈審査様式〉

クラス1 (A) : 製品への影響の大きい変更
一部変更申請 事前審査

クラス2 (B) : 製品への影響がある変更
届出 事後審査

クラス3 (B) : 製品への影響が軽微な変更
届出 事後審査

クラス4 (C) : 製品への影響がない変更
年次報告 審査
なし

- 6) 品質管理者は、評価の結果、変更内容に製品の品質、有効性及び安全性への影響が否定できないと判断した場合は、必要に応じて追加検討事項等を記載の上、再調査を指示する。
- 7) 変更管理責任者は、指示を受け、必要な調査を行った後、文書により、調査の結果を品質管理者に報告する。
- 8) 品質管理者は、再調査の結果の評価を行う。
- 9) 品質管理者は、変更内容が製品の品質に重大な影響を与えるおそれがある場合は、速やかに書面により、改善等の所要の措置を講ずるよう指示する。
- 10) 変更管理責任者は、必要な措置等を行った後、書面により、結果を品質管理者に報告する。
- 11) 品質管理者は、改善措置の結果を評価し、書面に記録し、保管する。
- 12) 変更の実施にともない、変更管理責任者は、関係する文書の改定を行い、関係者に教育を行う。
- 13) 製品への影響が大きい変更を行った場合は、

再バリデーションを実施し、品質及び安全性を再確認する事が重要である。

4. 7. 2 衛生管理

先に説明した「4. 1 製造設備」や「4. 2 空調システム」「4. 4 清掃・消毒」等と重複する部分が多いが、ここでは製品製造の衛生管理に主眼をおいた内容として説明する。但し、大事な項目のため、復習の意味も含めて、種々確認していただきたい。

4. 7. 2. 1 清浄度管理

清浄度管理は清浄度区分を明確に区分し管理するためのものである。例えば、使用細胞が直接露出する作業は、すべて安全キャビネット（グレードA=Class100）内にて作業するように設計されている。そのため、作業室がその設計に適合していることはバリデーションのIQ・OQにて確認されている。確認された設計レベルを、維持管理するための管理方法・手順等について設定し、製造環境を確保するため、清浄度の管理に関する手順を定めることが必要である。

●空調システム

空調は、清浄度を保つための一番大事な項目の一つである。日々の空調の管理、及び定期点検は必須の項目となる。空調は連続運転のため、連続した監視体制・システムが必要である。

・温湿度

主要作業室の温度及び湿度は温・湿度計で管理、記録する。一般的に細胞・組織工学製品については、20～25℃の温度範囲で設定されていることが多く、湿度に関しては、35～65%RHの範囲で設定されていることが多い。これらの範囲より大きい範囲や外れた範囲に設定するのは、特殊な製品の場合を除いて、望ましくない。

また、設定範囲を外れた場合、警報が発令するようなモニタリングシステムを採用するのが望ましい。発令された場合の対処法も予め決めておくことが必要である。

・フィルター

空調設備に付帯しているHEPAフィルター目詰まりの監視のため、各作業室に管理用差圧計(マノスターゲージ)を設置し、1回/週の頻度でその数値の記録を行い、交換時期の把握をする。

定期点検時にHEPAフィルター交換を行うのもよいが、差圧の管理値を決め、それにより交換の管理を行い、それに伴い交換時期を決定することが必要である。安全キャビネットについては、リバリデーション実施時に、その都度確認・判断する。

・室間差圧

清浄度管理するため、室圧及びHEPAフィルターの差圧で管理する。そのために管理値を決め、差圧計及びコンピューターによる中央監視盤等で確認し、管理する。管理を行う作業室はCPC内各室とし、室圧は毎日記録し、HEPAフィルターの差圧は1回/週くらいで記録する。記録は作業開始前とし、判定基準は管理値内とする。

また、スモークテスター（スモークはスチームを使用）等を使用して、室間の差圧を気流方向にて管理を行っている作業室については、衛生管理基準書に「気流方向図」などとして、気流方向を定めた文書を作成しておくことが望ましい。

●清浄度

CPCの清浄度は、一般的に次の清浄度区分となっている。

(詳しくは、4. 1. 2 作業室の清浄度区分を参照)

「グレード A=Class100」, 「グレード B=Class10,000」, 「グレード C=Class100,000」, 「グレード D=Class100,000 相当」, 「(管理区域内)

一般ゾーン」

・浮遊微粒子

製造区域への環境悪化を事前に予知し、製品の品質に悪影響を及ぼすことを防ぐとともに、適切な清浄度管理を行うために、定期的に浮遊微粒子の測定を行い、管理する必要がある。

CPC内の清浄度管理について、パーティクルカウンターを使用し、浮遊微粒子を測定することにより管理を行う。浮遊微粒子については、清浄度ごとに基準値を設け管理を行う。また、測定方法・測定ポイント・測定頻度・検体数・規格等の詳細についても手順書などで規定しておく。

・微生物管理

CPC内の微生物管理については、定期的に浮遊菌、落下菌、付着菌を測定することにより管理を行う。各菌について、測定方法・測定ポイント・測定頻度・検体数・規格等の詳細についても手順書などで規定しておく。

浮遊菌：寒天培地にエアースAMPLERで回収したサンプルを培養して、一般細菌及び真菌の測定を行い、記録し管理する。

落下菌：寒天培地を測定ポイントに規定時間設置し回収。寒天を培養して、一般細菌及び真菌の測定を行い、記録し管理する。

付着菌：付着菌測定は、スワブ法またはスタンプスプレッド法で菌を採取する。培養して一般細菌及び真菌の測定を行い、記録し管理する。

・清掃, 消毒

各作業室の清掃, 消毒は、清掃頻度、作業室の構造設備及び清浄度区分等により異なるため、以下の項目ごとに詳細に定めた手順書等を作成し、それを実施する。

項目：清浄度区分ごと

① グレード A (Class100)

- ② グレード B (Class10,000)
- ③ グレード C (Class100,000)
- ④ グレード D (Class100,000 相当)
- ⑤ 一般ゾーン

項目：場所や設備ごと

・床・壁・扉・ガラス&鏡・流し台&洗面台・ロッカー&棚・機器外面 ・パ
スボックス・安全キャビネット 等。

例えば、「グレード C (Class100,000) の床の清掃・消毒手順」として、以下に示す。

1 HEPAフィルター付真空掃除機で、各作業室の床を吸引清掃する。

2 吸引清掃の後、消毒用アルコールを含ませた不織布を、T字モップに付けて床を拭く。

※ブレイク後等は、別手順にて、清掃・消毒を行う。

上記の作業を週に1回程度行う。

使用消毒液：

その用途によって、使い分けることが必要。日々の消毒には、エタノールによる消毒が良いが、ブレイク後の復帰の際などは高水準消毒剤を使用することが望ましい。

高水準消毒剤：グルタラル（グルタルアルデヒド）、フタラル、過酢酸、二酸化塩素

⇒芽胞を含むすべての微生物を死滅できる。

中水準消毒剤：エタノール、イソプロパノール、次亜塩素酸ナトリウム、過酸化水素

⇒栄養型細菌や、ほとんどのウイルス、真菌等、芽胞以外の微生物を殺滅できる。

低水準消毒剤：グルコン酸クロルヘキシジン、塩化ベンザルコニウム

⇒大半の栄養型細菌と、いくつかのウイルス、真菌を殺滅できる。

消毒剤によっては、人体等へ影響があるので、その点も踏まえて、使用や手順について規定することが必要である。

・防虫，防鼠

CPC への、昆虫及び鼠の侵入及び室内で発生する昆虫からの汚染を避けるために、防虫防鼠の管理に関する手順を定める必要がある。

例えば、二重ドア構造の採用やトラップの設置などがある。日常管理としては、補虫トラップによる昆虫相調査や捕鼠トラップによる鼠の侵入・生息調査などを行い管理する。

室内で繁殖する昆虫として、カビやゴミを食べて繁殖するコナチャタテムシがいる。管理区域外で食物から発生したカビを食べたコナチャタテムシが管理区域内に侵入して消化しきれないカビや細菌を排泄し、環境を汚染することがある。一匹でもCPCに侵入すると、CPC内は天敵がいないのと、単為生殖で大量発生し、原材料・製品及び環境に対して、微生物汚染や混入の危険がある。



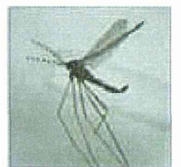
コナチャタテムシ
体長：1～1.5mm



ユスリカ
体長：1～10mm



チョウバエ
体長：1～5mm



クマバエ
体長：1～5mm

4. 7. 2. 2 入退室管理

CPC において製造される製品の微生物及び異物による製品への汚染を避け、製品の品質を確保するために、各作業室及び作業区域ごとの入退室に関する手順を定める必要がある。また、製品への汚染防止のため、各作業区域への入室を制限することが必要である。

●入室制限

入室制限としては、非衛生的な行動・作業はもちろんのこと、飲食や化粧，装飾品の制限など規定する必要がある。また、作業員以外の上室について

も、作業員と同行するなどの規定を設け、入室許可するなどの制限が必要である。

●CPC 設備のチェック

設備が問題なく稼働しているか確認し、暴露や汚染などに対処できるように確認しておく。例えば、各作業室の差圧や温湿度が規定値内であることを確認し、CPC が問題なく稼働していることを確認してから作業を行うなどの規定をすることが必要である。

●健康チェック

健康チェックによる作業員の衛生管理により、作業の安全性や製品等の汚染防止に活用する。

・入室時健康チェック

体調が悪いときは、製造機器による怪我や、手順間違いや秤量間違いなど、作業ミスが発生する確率が高くなることや細菌性の下痢、カゼや外傷(化膿)等の人が作業をすると、環境を汚染すると共に製品も汚染し、不良品を発生させる事になるので、作業員の健康状態を把握する必要がある。

・定期健診

GMP では、6ヶ月以内に健康診断を受信することが義務付けられているので、作業員が製品等を微生物等により汚染するおそれのある疾病にかかっていないことを確認する必要がある。

感染症の確認としては、HBV,HCV,HIV,HTLV の否定を確認する必要があると考える。

・海外渡航

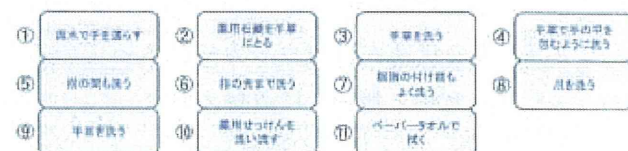
献血などを行う際の一般的な海外渡航の確認と同様に、海外での感染症などの否定を確認した後、作業するように規定することが必要である。海外渡航後すぐに作業する場合は、その対処について予め許可申請の手順など規定しておくこと必要である。

●作業室入室時の手洗・消毒の励行

手洗いをせずに製造作業に従事すると、製品、原材料や製造機器等を汚染し、それにより品質不良をもたらすため、手洗・消毒を励行させることが必要である。以下、手洗及び消毒の手順について、具体例を示す。

- 1) CPC 入室前、作業の前後には、基準書で規定された洗剤、消毒剤を使用し、手順書に基づき定められた方法で手指を消毒する。薬剤は、耐性菌の出来にくいものを使用するか定期的に数種類の薬剤をローテーションさせる。
- 2) 手洗いで、洗ったつもりでも利き手の親指の外側や甲などを洗い残す事が多く、洗剤をつけて手の掌をこすり合わせ、両手を合わせるようにして指と指との間を洗い、左手の甲を右手の掌で洗い、親指や小指の外側を洗うこと。
- 3) 手指の洗浄後は、手順書に基づきペーパータオル等を用いて手指の乾燥後、手指消毒剤を擦り込み、消毒する。
- 4) 病院等で患者と接触した者や、実験動物と接触した者、あるいは実験動物施設へ立ち入った者はシャワーを浴び、白衣等の衣服も清潔なものに着替える。

手洗手順の一例



手指消毒手順の一例



●更衣入室

CPC の各作業室のクリーン度に応じ、定められた服装の規定を行い、正しい更衣の着用手順等を規定する必要がある。

・一般管理エリア（一般空調）へ
 外着で出入りが出来る一般エリアから、一般空調であるが、CPCの管理区域としての一般管理エリアに入るためには、更衣が必要となる。その手順について、具体例を示す。

- 1 一般エリアから、施錠システムなどにより入室制限し、入口から入室する。
- 2 外履きから上履きに履き替える。この際、下駄箱は、外靴は下の段、上靴は上の段とし、雑菌や異物、昆虫の持ち込みに注意する。
- 3 健康チェック表などに、健康状態を記入する。
- 4 手洗い場で「手洗い手順」に従い、手洗い・消毒をする。
- 5 男女各更衣室へ入室する。
- 6 外着を脱ぎ、外着専用のロッカー下段に入れる。
- 7 上段の無塵衣専用ロッカーに入っているツーピース無塵衣に着替える。
- 8 更衣後、備え付けの粘着ローラーで、ツーピース無塵衣に付着した毛髪・ゴミ等を取り除く。
- 9 更衣室から一般管理エリアへ入る際、粘着

マットを踏み、上履きに付着した毛髪・ゴミ等を取り除く。（この服装で、原材料の搬入や廃棄物の搬出作業を行う）

- 10 一般管理エリアから、CPC入口のエントランスに入り、入室者の健康チェック表にチェックをする。

・グレードD・Cへ

CPCの管理区域であるグレードD・Cの作業室への入室について、具体例を示す。

- 1 一般管理エリアから前室へ入室し、手洗いに従い、手洗い・消毒をする。
- 2 CPC内の一次更衣室に入り、一般管理エリア用のツーピース無塵衣を脱ぎロッカー下段に入れる。
- 3 グローブケースからグローブを取り、装着する。
- 4 ロッカーから上段から、滅菌済みツーピース無塵衣を取り出し着用する。
- 5 マスクケースから滅菌マスクを取り、装着する。
- 6 ケースから、ヘアキャップを取り出し、毛髪が隠れるように被る。鏡などで毛髪が出てないか確認する。
- 7 専用靴箱からクリーンシューズを取り、クリーンエリア（グレードD・C側ゾーン）に置き、ダーティゾーン（一般管理エリア側ゾーン）で上履きを脱ぎ、クリーンエリアのクリーンシューズを履く。
- 8 グローブを外し、廃棄容器に入れる。
- 9 グローブケースからグローブを取り、装着する。
- 10 設置している消毒用エタノールをグローブに噴霧し、擦り合わせて乾燥させる。
- 11 CPCのグレードD及びCへ入り、各作業室で作業を行う。
- 12 グレードCに培養室を設置している施設は、クロスコンタミネーション防止対策

として、培養室の入口で、クリーンシューズの上から、滅菌済みオーバーシューズを履く。

- 13 オーバーシューズを履き終わったら、着用していたグローブを廃棄し、グローブケースからグローブを取り、装着する
- 14 設置している消毒用エタノールをグローブに噴霧し、擦り合わせて乾燥させる。
- 15 培養室に入り、作業を行う。インキュベーターを使用する作業を行う場合は、着用していたグローブを廃棄し、無菌グローブを着用し、作業を行う。

・グレードBへ

CPC の Class10,000 (グレードB) の作業室への入室について、具体例を示す。

- 1 グレードD・Cから2次着衣室(グレードC・B)へ入室する。
- 2 滅菌された無菌衣(頭部も包むツナギ)を袋から取り出し、床に着かないようにして着用していたツーピースの無塵衣の上から着る。
- 3 足をダーティゾーン(グレードD・C側ゾーン)に置いたまま、中央の椅子に座る。
- 4 滅菌済シューズカバーを取り、クリーンシューズの上に装着し、クリーンゾーン(グレードC・B側ゾーン)に入る。
- 5 グローブを外し、廃棄容器に入れる。
- 6 無菌グローブを取り、装着する。(このとき、グローブの表側は触らないこと)
- 7 更衣が手順どおり出来ていることを確認する。(露出している部分がないか等を確認する)
- 8 確認後、2次着衣室の塵埃が減少するまで、1~2分間待機する。
- 9 各作業室へ入室する。

・安全キャビネットの Class100 (グレードA) で

の具体例を示す。

- 1 安全キャビネットで作業を行う場合は、滅菌済オーバーシューズを装着し、安全キャビネットの前で、無菌グローブに消毒用エタノールを噴霧して、擦り合わせて乾燥させた後、安全キャビネットに手を入れ作業を行う。
- 2 安全キャビネットから手を出した後、さらに安全キャビネットで作業を続ける場合は、そのつど無菌グローブに消毒用エタノールを噴霧して、擦り合わせて乾燥させた後、安全キャビネットに手を入れ作業を行う。

●更衣退室

CPC の各作業室のクリーン度に応じ、定められた服装の規定があるため、退室の更衣に関しても手順等を規定する必要がある。ただし、グレードBからC・Dへは、退室の際の更衣についての具体的な規定はない。

・グレードBから

CPC の Class10,000 (グレードB) からの退室について、具体例を示す。

- 1 2次脱衣室に入る。
- 2 滅菌済シューズカバー・滅菌済オーバーシューズ・無菌グローブを外し、廃棄容器に入れる。
このとき、ヘアキャップやマスクは外さないこと。
- 3 新しいグローブを装着する。
- 4 無菌衣(頭部も包むツナギ)を脱ぎ、廃棄容器に入れる。
- 5 脱衣室から素早くグレードD・Cへ出る。

・グレードD・Cから

CPC の Class100,000 相当 (グレードD) ・ Class100,000 (グレードC) からの退室について、

具体例を示す。

- 1 更衣室のクリーンゾーンへ入る。
- 2 ヘアキャップ、マスク、グローブを外し、廃棄容器に入れる。
- 3 無塵衣を脱ぎ、ロッカーに入れる。
- 4 クリーンゾーンでクリーンシューズを脱ぎ、ダーティゾーンの上履きを履く。クリーンシューズは専用靴箱に入れる。
- 5 更衣室からグレードD・Cゾーンから出る。

●原料、資材等の搬入・搬出

CPC で使用する機器・原材料等の搬入搬出、及び製造時に発生した各種廃棄物の搬出によるCPCへの汚染を避け、製品の品質を確保するために、搬入搬出に関する手順を定めることが必要である。

<搬入>

・一般管理エリアへの搬入

外部から一般管理エリアへの搬入について、パスルームを有する場合の具体例を示す。

- 1 持ち込むものの記録をする。
- 2 CPC 内に持ち込むものは、パスルームの前で梱包を解き、外装を外す。
- 3 搬入物は必要に応じて、真空掃除機で吸引清掃、または化学雑巾を用い水拭きを行い、消毒用エタノールで清拭する。
- 4 外部からパスルームのクリーンエリアに搬入する。
- 5 入室手順に従い入室し、更衣をして一般管理エリアに入る。
- 6 一般管理エリア側からパスルームのドアを開け、搬入物を取り出す。

※パスルームの外部と一般管理エリア側の扉は、インターロックされており、両方とも開いた状態にならないような構造になっている。

・グレードD・Cへの搬入

一般管理エリアからグレードD・Cへの搬入について、具体例を示す。

- 1 一般管理エリアのパスルームのドアを開け、搬入物をダーティゾーンへ搬入する。
- 2 消毒用エタノールもしくは高水準消毒剤を含ませた不織布で搬入物の清拭、又は消毒用エタノール等を噴霧する。
- 3 搬入物をクリーンゾーンに置く。
- 4 更衣後、グレードD側からパスルームのドアを開け、搬入物を各作業室へ搬入する。

・グレードBへの搬入

グレードD・CからグレードBへの搬入については、パスボックスを介するが、搬入物の大きさによっては、パスボックスを通らないものがある。それぞれの場合について、具体例を示す。

パスボックスを通せる場合

- 1 搬入物をパスボックスの前に搬入する。
- 2 消毒用エタノールを含ませた不織布で搬入物の清拭、又は消毒用エタノールを噴霧する。
- 3 パスボックスの扉を開け、消毒用エタノールをパスボックスの床面に噴霧し、滅菌済不織布で清拭する。
- 4 搬入物をパスボックスに入れ、扉を閉める。
- 5 グレードB側からパスボックスの扉を開け、搬入物を取り出す。

パスボックスを通せない場合

- 1 クリーンアップ(清掃・消毒)された搬入物を着衣室へ搬入する。
- 2 消毒用エタノールを含ませた滅菌済不織布で搬入物の清拭、又は消毒用エタノールを噴霧する。
- 3 着衣室から、グレードBの作業室へ搬入する。

・安全キャビネット(グレードA:Class100)への搬入

安全キャビネット(グレードA:Class100)への搬入について、具体例を示す。

- 1 安全キャビネットの前で、消毒用エタノールを含ませた滅菌済不織布で搬入物の清拭、又は消毒用エタノールを噴霧する。
- 2 安全キャビネットの中に搬入する。

<搬出>

・安全キャビネット（グレード A : Class100）からの搬出

安全キャビネット（グレード A : Class100）からの搬出について、具体例を示す

- 1 安全キャビネットで調製したものは、蓋をした状態にする。
- 2 安全キャビネットが必要に応じて、消毒用エタノールを含ませた滅菌済不織布で清拭、又は消毒用エタノールを噴霧する。

※感染性のものが含まれる可能性がある場合など、暴露すると問題のあるものは、密封できる容器に入れて搬出すること。これは、すべての区域に関係することである。

・グレード B からの搬出

パスボックスを有するので、パスボックスを通るものと通らないものの場合について、それぞれ具体例を示す。

パスボックスを通せる場合

- (1) 培養室側のパスボックスの扉を開け、消毒用エタノールをパスボックスの床面等に噴霧し、滅菌済不織布で清拭する。
- (2) 搬出物をパスボックスに入れる。
- (3) パスボックスのグレード D・C 側の扉を開け、搬出物を取り出す。
- (4) 搬出物によっては、保管室等の所定の場所へ保管する。

パスボックスを通せない場合

- (1) グレード B から脱衣室に搬出する。
- (2) 搬出物を脱衣室から、搬出物をグレード D・C へ持ち出す。

(3) 搬出物によっては、保管室等の所定の場所へ保管する。

・グレード D・C からの搬出

グレード D・C から一般管理エリアへの搬出について、具体例を示す。

- 1 搬出物をグレード D・C のパスルームのクリーンエリアに搬出する。
- 2 一般管理エリア側のパスルーム扉を開け、搬出物をに一般管理エリアに搬出する。

・一般管理エリアからの搬出

一般管理エリアから外部への搬出について、パスルームを有する場合の具体例を示す。

- 1 一般管理エリア側のパスルームのドアを開け、搬出物を入れ、扉を閉める。
- 2 退室手順に従い外部へ退室し、外部側のパスルームの扉を開き、搬出物を搬出する。

4. 7. 2. 3 衛生管理教育訓練

CPC 内で製造作業に従事するものが、衛生管理として必要な微生物等による汚染を避け、かつ暴露による設備等への汚染を避けるため、微生物等に関する適切な知識や手技を得るため必要な教育を受ける必要がある。

●教育者

衛生管理の教育訓練担当者は、使用する CPC の衛生管理の教育訓練に必要な技能を有していることが必要で、品質管理者もしくは教育訓練担当として任命を受けたものが教育訓練責任者として行う。

●計画

教育訓練責任者は、品質管理者と協議の上、毎年の教育訓練に関する計画を作成する必要がある。

●訓練内容

内容に関しては、使用する CPC や使用する細胞により、衛生上必要と思われる知識や手技・操作等の教育内容となる。

例として、以下のような内容がある。

- ・入退室手順
- ・微生物学的基礎知識
- ・微生物と手洗い
- ・清掃・消毒方法
- ・更衣手順
- ・健康管理
- ・搬入搬出手順
- ・清浄度管理手順
- ・使用する CPC の管理上必要なルールや使用細胞に必要なルール など。

4. 7. 3 品質管理

4. 7. 3. 1 試験項目実施計画

「製造計画書」に基づき「試験項目実施計画書」を発行しなければならない。記載内容としては、品名・製品ロット・試験内容・日程・試験サンプル・工程等が必要となる。もし、外部に試験検査を委託する場合は、「製造計画書」が発行された時点で委託先に連絡し、検査日程を確認及び調整後、「試験項目実施計画書」を発行する。その際、記載内容に依頼先や依頼内容、依頼日等を追加記載する必要がある。

4. 7. 3. 2 試験検査用試薬の管理

品質部門責任者は、品質部門担当者に試薬管理を任命し、適切な管理が行われるようにしなければならない。試験検査で使用する試薬は、試験成績書やメーカーにより定められた資料に基づき、適切な条件（温度や暗所などの条件）で保管ことを規定し、有効期限やロット管理をしっかりと行い、有効期限が過ぎた試薬を使用しないように規定する必要がある。

試薬を分注する場合には、試薬が識別できるように容器に記載（試薬名、ロット番号、有効期限 等）して保管し、管理する必要がある。

4. 7. 3. 3 原材料規格試験

CPC において製品を製造する際に使用する原材料の入荷、規格試験方法、原材料の保管方法について定めることが必要である。また、試薬調製した試薬についても同様である。

●規格及び試験

製品の製造に必要な原材料（原料・副原料・資材 等）について、受け取った原材料が発注した原材料と一致していることを確認し、冷蔵品は原材料が凍結していないことなどを確認し、原材料に適した温度状態のまま搬入、保管を行う必要がある。使用して良い原材料なのか、試験中の原材料かはつきりと区別する必要がある。品質部門担当者は、試験中と区別された原材料および調製試薬の規格試験を「原材料規格書」に従って実施し、その結果を「試験検査結果報告書」に記載する。

●解析、評価

一般的には、規格試験の結果、「原材料規格書」の各試験検査項目の規格を満たしている場合には合格とする。しかし、規格を満たしていない場合には不合格とする。調製試薬については、規格試験後に品質部門責任者によって合格または不合格の判定をするように規定する。

●ラベル（表示、表記）

ラベルにより、そのサンプルの状態や区別がわかるように表示もしくは表記する。例えば、サンプリング実施後は、「サンプリング実施済」のラベルを貼付し、サンプリングを実施しなかった原材料に関しては、「試験中」のラベルが貼付されているなどの規定をする。また、規格試験終了後、合格となった原材料に関しては「適合品」ラベルを貼

付し、不合格となった原材料に関しては「不適合品」ラベルを貼付するなど、区別をはっきりさせるようにする。

●保管

入荷・規格試験期間中は仮保管として、未試験品置場に一時的に保管されることや規格試験に合格した原材料は、「適合品」ラベルが貼付されていることを確認し、未試験品置場から適合品置場へ移動させる等の保管に関する規定をする。

場所に余裕があるなら、区別にそれぞれの場所を準備するのが望ましいが、場所に余裕がない場合は、原材料における未試験品置場、適合品置場、不適合品置場の保管について判別できるようにする。これ以降の保管および管理については、製造部門が担当する。

●不適合品の取り扱い

不適合品となった原材料は、適合品に混入しないよう「廃棄物処理手順書」等により、速やかに廃棄もしくは、別処理するような取り扱いの規定をする。

4. 7. 3. 4 原料受入

CPCにおいて製品を製造するとき、出発原料である組織などの受入管理方法に関して定める。

●輸送

原料の輸送に関して、適正な輸送方法を記載する。例えば、病院で採取された組織は、生理食塩水に浮遊させ、滅菌カップに入れ、更にパッキング式の輸送容器に入れて、冷蔵で輸送される等の記載となる。

CPCへ搬入する際の規定もあれば、記載しておくとい。

●受入検査

受け入れ検査は、品質部門が担当し、必要な検査内容を記載する。また、「原材料規格書」の試験検査項目に基づいて、各検査項目の判定を行うことを記載する。

●解析、評価

受入検査の結果を解析し、評価の可否判定することを記載する。結果における解析方法や判定方法を記載する。

4. 7. 3. 5 細胞数と生存率の測定

CPCにおいて製品を製造する際、製造工程内で実施される品質管理試験の一項目として「細胞数と生存率」がある。この手順について定めることが必要である。また、工程検査としての生存率なども規定するとよい。通常の細胞の生存率としては、80%以上が望ましい。

4. 7. 3. 6 微生物試験、無菌試験

品質試験等として「微生物試験、無菌試験」がある。この方法について手順を示す必要がある。また、その判定方法についても規定する。外部へ委託する場合も、それについて記載する。

4. 7. 3. 7 検体及び中間体の保管

CPCにおいて製品を製造する工程で生じる保管検体の手順、保管条件、保管期間について定める必要がある。また、培養細胞の一部を凍結保存する場合は、その凍結保存方法および取り扱いについて規定することが必要である。

4. 7. 3. 8 試験の委託

品質管理者及び品質部門責任者はGMPに適合していることを評価し、委託先を選定する。また、秘密保持契約及び委受託契約を締結させ、委託先の施設を監査する権利を有することを記載する。試験検査にかかる時間や搬送時間等における検体の影響を考慮し、選定を行うことが必要である。

4. 7. 3. 9 製品出荷判定

CPC で製造した製品の出荷判定方法について規定する。例えば、以下の規格を満たす場合、出荷することを品質部門責任者が判断する。

- ・原材料が規格を満たしていること。
- ・製造工程が正常に実施されていること。
- ・製造工程内の品質試験が規格を満たしていること。
- ・CPC 内の環境清浄度が保たれていること。
- ・最終製品の品質試験が規格を満たしていること。

記録などを確認し、製品の規格が満たしていることを保障するものとなる「製品出荷報告書」などについても、記載する。

4. 7. 3. 10 製品不適合品の取り扱い

製品の製造の不適合品取り扱いの管理（廃棄や移動など）、品質管理の試験不適合時取り扱いに関する基本的要件を定め、記載する。また、不適合品の廃棄に関する手順についても規定して記載することが望ましい。

4. 7. 3. 11 品質管理教育訓練

CPC 内で製造する製品について、直接品質管理試験に従事する品質部門の者は、その作業内容に関して、適切な教育訓練を受けた上で実務に当たる必要がある。そのため、必要な知識及び技術の習得手順を示す必要がある。また、品質管理試験に従事する者は定期的に力量を評価・判定することが望ましい。

4. 7. 3. 12 各種機器取り扱い

品質試験に必要な機器の取り扱いについて、手順を定める必要がある。例えば、定量用 PCR、フローサイトメトリー、マイコプラズマ否定試験用 PCR、エンドトキシン濃度測定用機器等 について使用方法の手順を定める必要がある。

4. 7. 4 製造管理

4. 7. 4. 1 製造標準書

製造する製品についての基本的な基準や製法を記載する書類である。

以下に記載必要項目を挙げる。

●品名

製品の名称で、1 品につき、1 つの名称とすること。

●形状及び特徴

形状としては、細胞形状や採取条件などがある。特徴としては、生存率や特徴的なマーカーなどがある。

●原料、中間体、製品の規格及び試験方法

原料は細胞の最初の状態のもので、体性幹細胞などは採取した組織などになり、その規格や試験項目を記載する。中間体は各工程で得られる状態のもので、各々の工程における規格や試験項目を記載する。最終製品についての規格や試験項目も記載する。

●製造方法

概要を記載するが、工程を明確にする。詳細については、各 SOP 等に記載する。

●製品の保管及び使用期限

最終製品や場合によっては原料・中間体の保管条件及び使用期限の規格を記載する。

4. 7. 4. 2 製造依頼

CPC において製品を製造するため、ユーザーからの製造依頼の受理から製造開始までの工程の管理に関する基本的要件を定める。製造を開始する元となるべき情報の管理である。例えば、「製造依頼書」などを持って依頼の管理を行い、「製造計画書」を持って開始の管理とする。

4. 7. 4. 3 CPC の環境確認

CPC において製品の製造を開始する際、CPC 内の環境が基準値を満たしているか確認する方法を規定する必要がある。つまり、製造部門責任者が製造計画書を発行する際に確認する手順である。製造部門責任者は、CPC 環境が基準値を満たしていることを確認してから「製造計画書」を発行する。また、CPC 環境を清浄に保つため日頃より清掃・消毒を実施することが必要である。

4. 7. 4. 4 製造計画書の作成

CPC において製品を製造する際、製造依頼の受理、製造計画の立案及び日程作成、製造終了までの工程管理に関する基本的要件を定め、作成するものである。

4. 7. 4. 5 製造指図書及び記録書

製造指図書・記録書の発行、承認、保管について規定する必要がある。

●製造指図書

指図書は、製造番号ごとに発行され、製造部門責任者の指示を受け、製造部門担当者が発行する。指図書には少なくとも、製造番号、原材料のロット番号、サンプリングする指図量、その他製造において必要な事項などを記載することが必要である。製造部門責任者は、記入内容を確認し、指図に誤りがないことを確認および承認する。

●製造記録書

製造工程から出荷までの全ての作業内容は、製造記録書に記録される。当日の作業内容は、製造部門の記録担当者（確認者）が記録する。すべての作業終了後、記録された記録書は、製造部門責任者によって照査した上で承認される。

記録された記録書は承認後、製造部門にて 10 年間保管される。

●ラベル

CPC において製品の製造工程内で採取される検体に貼付するラベルの発行及び使用について定めるものである。ラベルは、製造工程内で採取する検体のクロスコンタミネーションを防止するためのものである。

ラベルに限定する必要性はないが、CPC 内での作業で塵埃が出ないことやエタノールなどの消毒液で文字が消えないこと等を考慮して、ラベルを使用する方が良いと考える。

4. 7. 4. 6 製造時環境測定

CPC において製品を製造する際、製造作業時の CPC 内環境モニタリング及び無菌操作終了直後の作業者のモニタリング方法について規定する必要がある。基本的には、浮遊性微粒子(パーティクル)と落下菌・付着菌・浮遊菌の測定を行う手順について記載する。

例えば、浮遊性微粒子については、作業室内と安全キャビネット内の作業前と作業後に測定を 3 回ずつ行い、その平均値を規格値と比較して判断する。浮遊菌については、作業後に安全キャビネット内の空気を回収し、培養の後、判定する。落下菌については、作業前に安全キャビネット内に寒天培地をセットし、作業後に回収して、培養の後、判定する。付着菌については、作業後に細胞を扱う手などから採取し、培養の後、判定する等の手順を定める。

また、CPC 内の温・湿度に関しても、作業前かが設定された範囲内であることを確認の上、作業にあたることが望ましい。

4. 7. 4. 7 原材料の発注・受入・在庫管理

CPC において製品を製造するために使用する原材料等の発注・在庫及び保管、管理に関する事項を定める。例えば、以下のような内容となる。

・発注 → ・入荷 → ・規格試験（受入検査） → ・在庫 → ・出庫

上記の内容を管理し、特に品質及び数量について、しっかり把握することが必要である。

4. 7. 4. 8 検体採取

製造工程内で採取される製品の品質管理試験用検体・工程検査用サンプルに関して、分注、識別および検体の搬送方法について記載する。

4. 7. 4. 9 細胞培養

培地調整・原料からの分離もしくは採取・細胞培養・培地交換・細胞継代・分化・凍結等の全般について、SOPを用意し、各工程の詳細を記載する。各工程に使用される原料、副原料、資材、機器については、品名、メーカー、ロットや製品番号（製品を特定する番号）等を記載する。

4. 7. 4. 10 製品出荷包装・輸送

CPCにおいて製品を製造した最終製品の出荷方法である梱包、輸送方法および製品引渡し方法について定める。包装及び梱包に関しては、グレードAの環境下である細胞処理室の安全キャビネット内で無菌的に実施するところから記載する。

4. 7. 4. 11 廃棄物処理

CPCにおいて製品を製造する際に発生する廃棄物処理の手順について記載する。例えば、廃棄物の定義や種類（感染性、非感染性廃棄物など）、廃棄物搬出手順等について、記載する。

4. 7. 4. 12 製造管理教育訓練

新たにCPC内で作業する者はもちろんのこと、通常CPC内で製造作業に従事する者も教育を受け、技能の判断・判定することが必要ある。これにより、作業による製品の劣化や逸脱を防ぎ、高品質な製品を製造し続けることができるのである。

製品となる細胞の種類や使用CPCによっては、必要ない項目もある可能性もあるが、基本的に上記の衛生・品質・製造管理において、記載のある

項目は、標準作業手順書（SOP）を作成する必要がある。

D. 考察

昨今、多くの研究機関などでCPCが設置されているが、その構造設備にソフトでは対応しづらい課題があるものが散見され、本調査研究で研究者がおさなりにしがちなCPC構造設備について、議論が深まったと考える。

E. 結論

GMPではハードウェアとソフトウェアの両立が必要で、ハードとしての施設・設備・機器と、ソフトとしての文書・製造・試験方法・清掃・組織・教育訓練を両輪として初めて成り立つ品質保証システムであると言える。本研究では、CPCハードにかかる項目MCPについて調査を行った。最後には、試験物製造と非臨床試験をそれぞれの段階（相）に応じて品質管理・品質保証を行うことが肝要で、いわゆる品質の作りこみのため、本調査結果を参考にして研究開発が進められると信じる。

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 第四期 第 20 巻 栗屋剛・金森修編 丸善書店, 東京, 2012 年 11 月刊行
 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 α 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

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

研究分担者 大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座 心臓血管外科

宮川繁・澤芳樹

研究要旨

主任研究者の松山らは、大量に簡便・安全・容易に採取可能なヒト皮下脂肪組織から、新規間葉系幹細胞として脂肪組織由来多系統前駆細胞の単離・培養法を確立、当該細胞から誘導した心筋芽細胞が慢性心筋梗塞モデルラットへの移植で心機能と長期生存率を改善し、被投与細胞が慢性心筋梗塞モデルラット心筋組織内で心筋細胞への分化を組織学的に確認している。本分担研究では、大阪大学心臓血管外科が経験した自己骨格筋芽細胞シートのテルモ社への企業治験での導出の経緯をとりまとめ、脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いる本剤の開発経緯の取りまとめを行うこととした。

A. 研究目的

心筋梗塞に対し、これまでも従前の治療法により多くの患者さんが救われてきた。しかし、頻回の虚血障害により残存心筋幹細胞が消失する虚血性心筋症など重症心不全においては、これまでの内科的治療も十分な効果を上げ得ず、PCI (Percutaneous Coronary Intervention)による血流改善も限定的な効果しかない。これら治療抵抗性の重症心不全 end-stage にあつては1年死亡率が75%とされ、新規治療法・医薬品の開発が待たれている。

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。

B. 研究方法

本研究においては、臨床医工学融合研究教育センターの松山晃文招聘教授が進めている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自己脂肪組織由来多系統前駆細胞を細胞医薬品としての開発を支援するため、テルモ社の実施している自己骨格筋芽細胞シートの経緯と、脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いる本剤の開発経緯の取りまとめを行うこととした。

(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

1. はじめに

心筋梗塞に対し、これまでも従前の治療法により多くの患者さんが救われてきた。しかし、頻回の虚血障害により残存心筋幹細胞が消失する虚血性心筋症など重症心不全においては、これまでの内科的治療も十分な効果を上げ得ず、PCI (Percutaneous Coronary Intervention)による血流改善も限定的な効果しかない。これら治療抵抗性の重症心不全 end-stage にあつては1年死亡率が75%とされ、新規治療法・医薬品の開発が待たれている。特に重症心不全に対する治療として心移植、心移植にかわる新規治療法として補助人工心臓の開発が進められてきた。心臓移植では移植時年間5000万円の費用、補助人工心臓においても初年度で3000万円の費用と、翌年以降1000万円の維持費用がかかる。医療保険財政の逼迫が提起する費用対効果の問題に加え、心臓移植では絶対的ドナー不足による誰がレシピエントになるべきかという倫理的課題がある。補助人工心臓では永久植込み型補助人工心臓 (destination use) がその歴史30年によってさえ未だ開発途上にあるという問題が残っている。これら問題意識を背景に、私たちは心疾患に対する新規治療法の一つとして再生医療研究を進めるべきである。

2. 心疾患を対象とする再生医療開発の現状

重症心不全に対する補助人工心臓併用細胞治療として大阪大学の骨格筋芽細胞シート技術が先鞭をつけ、テルモ株式会社が当該技術を引き継ぎ企業治験を開始している。京都府立医大では、自己培養心筋幹細胞と bFGF 含有ハイドロゲルの冠動脈バイパス術時同時移植によるEF40%以上の中等度心不全に対する臨床研究が開始されている。間葉系組織の一つである脂肪組織をもちいる心不全治療としては、PRECISE 試験と APOLLO 試験が欧州の一部で行われている。これら細胞治療は、移植した細胞によるサイトカイン効果による血管系再構築と残存心筋幹細胞の活性化がその機序であると想定される。間葉系幹細胞を用いての心不全治療にあつては、抗炎症効果を期待している場合もあろう。頻回に繰り返す心筋虚血の終末像としての虚血性心筋症では、血流が改善しても臓器幹細胞 (心筋幹細胞) が枯渇するため、外部から心筋幹細胞あるいは前駆細胞を補充する必要がある。末期虚血性心筋症を対象として有用性が予測できる再生医療研究は、これまで報告されていなかった。

3. 脂肪組織由来細胞を用いる心筋再生医療

今まで実施されている体性幹細胞を用いる心筋再生細胞治療法は、骨格筋芽細胞で移植であれば大腿筋肉から骨格筋肉組織を採取し、心筋幹細胞移植であれば心筋バイオプシーにて組織塊を得るため侵襲性が高く、同種への展開はない。死体からの採取を想定されることもあるがは、「墓地および埋葬に関する法律」等の規定により、日本国内では法的整備がなされない限り産業展開は望めない。

ヒト皮下脂肪組織は、大量に簡便・安全・容易に採取可能で、倫理的に乗り越えるべきハードルは低い。自己から安全かつ簡易に採取できるのみならず、形成外科領域で手術時余剰医療廃棄物として大量に得ることができるため、現行法制度下でも自己由来細胞移植のみならず同種由来細胞移

植を用いる再生医療へ展開可能な数少ない組織・細胞の一つである。一方、脂肪組織を採取する際のデメリットもある。欧米人と異なり、日本人は皮下脂肪採取に際して、有害事象として内出血の頻度・量が多いことが知られている。特に大量採取では、疼痛を含め心負荷が過大となる可能性も否定しえない。骨髄採取であってもドナーの心負荷増加による心不全悪化例があり、健常人でも死亡例の報告がある。皮下脂肪採取でもチューリップ針が腹壁を突き破っての死亡例も知られており、採取にあたっては、形成外科専門医等によって行われることが望ましい。

4. 脂肪組織由来細胞に期待される心機能再生メカニズム

重症心不全は心臓のポンプ機能の低下を示す症候群であり、その発症機序と病理病態はバラエティーに富んでいる。したがって、重症心不全をきたす疾患の病理病態を要素分解し、その各々に移植細胞に期待される薬効薬理作用を理解する必要がある。

心筋虚血を発症機序とする心不全の場合、抗炎症作用、血管網再生・構築、抗線維化作用、内因性心筋幹細胞の活性化が期待される。心筋梗塞急性期にあつては炎症に伴う心筋組織浮腫も虚血を増悪させ虚血再還流障害も炎症機序の一環であるため、抗炎症作用が一義的に期待される。この点で、脂肪組織由来幹細胞をはじめとする間葉系幹細胞は抗炎症作用を有することが知られており優位にたつ。心筋梗塞後遠隔期（慢性期）にあつては、血管網再生・構築、抗線維化・線維退縮、加えて内因性心筋幹細胞活性化が求められる。脂肪組織をコラゲナーゼにて処理して得られる Stromal Vascular Fraction は血管内皮細胞が豊富に含まれているため、血管網構築には有効と推測される。抗線維化・線維退縮に関しても、脂肪組織由来幹細胞は Matrix Metalloproteinase (MMPs)を発現しているため有効性が想定される。

脂肪組織由来幹細胞を脂肪分化させると急性心筋梗塞モデルラットでは有効であったとの報告がなされている⁽¹⁾が、Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy は心外膜直下の脂肪変性はその病態であり、また脂肪分化に従い MMPs の発現は低下するため遠隔期心筋梗塞に用いるには今後の検討をまたなければならない。内因性心筋幹細胞活性化においては、移植細胞によるいわゆるサイトカイン効果が期待され、我々は Cell-based cytokine delivery と呼んでいる。移植細胞から分泌されるサイトカインには、血管網を再生構築するもののみならず、HGFをはじめとする内因性残存心筋幹細胞を活性化させるものもある。この作用機序を基盤とし、ADSC をシート化して移植することで心筋梗塞モデルラットの心機能を改善させたとの報告がある⁽²⁾。頻回に心筋虚血を繰り返すと、内因性心筋幹細胞も消費・枯渇してしまう。この病態が虚血性心筋症であり、細胞治療による有効性を期待するのであれば心筋幹（前駆）細胞あるいは心筋細胞が移植される必要がある。

心筋虚血を発症機序としない心不全として拡張型心筋症が挙げられる。心筋細胞・心筋幹細胞そのものの疾患であり、外部から心筋（幹）細胞の移植が治療法となる。遺伝性心疾患（ミトコンドリア脳筋症など）であれば、従前のサイトカイン効果を期待する再生細胞治療は無効である。

5. 新規間葉系幹細胞としての脂肪組織由来多系統前駆細胞

ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞（human Adipose tissue-derived Multi-lineage Progenitor Cells: hADMPCs）は、間葉系幹細胞の一つであり、ヒト脂肪組織に由来し接着培養系において EDTA 反応性の違いから獲得される細胞群で、自己複製能並びに骨芽細胞、軟骨細胞及び脂肪細胞への分化能を有する⁽³⁾。これまでに、ヒト脂肪組織からは、さまざまな stemness を有する間葉系

幹細胞が見出され、その採取方法が報告されている。1978年には、Bjornthropらが皮下脂肪に脂肪幹細胞 (preadipocyte) の存在を見出し、その単離培養法の確立に成功している⁽⁴⁾。1999年には、脂肪組織もその範疇に入る間葉系組織に「間葉系幹細胞」が存在することが報告されている⁽⁵⁾。2001年には、Zukらが脂肪幹細胞は「間葉系幹細胞」としての potency を有していることを報告し、脂肪組織由来幹細胞 (Adipose tissue derived stromal cells: ADSCs) とした⁽⁶⁾。我々は、脂肪組織をコラゲナーゼ処理した後得られる stromal vascular fraction の中から、新規の間葉系幹細胞として ADSCs とは異なる細胞群(ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 ; human Adipose tissue-derived Multilineage Progenitor Cells: hADMPCs) の単離培養法を確立し、当該細胞から肝細胞・膵島細胞の分化誘導法を報告している⁽⁷⁻¹¹⁾。

hADMPCs は、従前報告されている各種間葉系幹細胞と同様に骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化能を有する⁽³⁾。多くの間葉系幹細胞と同様に CD90、CD105、CD166 を発現するのみならず、SSEA-3/4 を発現し、心筋指向核内転写因子である Islet-1 や Nkx2.5 を発現している。また、多くの間葉系幹細胞と同様に MHC class II を発現せず、ウシ胎児血清含有培地での培養にても拒絶反応が低い⁽³⁾。

6. 脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いる心筋再生

ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞が心筋芽様細胞に誘導され、慢性心筋梗塞モデルラットへの移植で心機能と長期生存率が改善することを見出した。また、被投与細胞が慢性心筋梗塞モデルラット心筋組織内で心筋細胞への分化を組織学的に確認している⁽¹²⁾。

げっ歯類で有効性を確認しても、First-in-Man への根拠としては薄弱である。そこで、我々は、低

分子化合物における非臨床試験項目を参考に非臨床試験の組み立てを行い、ヒト幹細胞臨床研究あるいは治験 (薬事開発) をめざしている。

毒性試験のうち単回投与毒性試験 (一般毒性試験) として、げっ歯類 (ヌードラット) を用いた安全性用量設定試験 (non-GLP) にて安全性を担保する投与細胞用量を見出し、当該最大安全用量にて単回投与毒性試験 (経左心室腔内投与・経静脈投与) を GLP 下にて実施、毒性を認めなかった。脂肪組織由来多系統前駆細胞から誘導する心筋芽様細胞にあつては、投与後心筋細胞として生着機能することから、単回投与でも長期細胞に暴露された状態となり蓄積毒性を考慮する必要はないと考えた。

特殊毒性試験としては、細胞固有特性の評価として造腫瘍試験、軟寒天コロニー形成試験、核型分析試験を GLP にて終了し、当該細胞の遺伝毒性試験はほぼ終了している。

薬理試験のうち安全性薬理コア・バッテリー試験では、中枢・呼吸安全性薬理試験 (GLP) が終了し、中枢毒性、呼吸毒性ともに認められなかった。安全性循環薬理試験については、通常のコア・バッテリー試験では不十分と想定されるため不整脈観察を中心にフォローアップ試験項目の追加が必要となろう。薬効薬理試験は効能効果を裏付ける試験であり、有効性用量設定試験を実施している。

薬物動態試験に相当する試験として、体内動態試験 (運命試験) がある。これまでの細胞の投与後体内動態は、細胞を放射性同位元素標識しその分布を追うものであったが、半減期による追跡期間の限界と特異度の観点から限界があつた。そこで、我々は3頭の慢性心筋梗塞モデルブタへの細胞投与後6カ月経過観察し、30余臓器をリストアップ、各々につき肉眼的所見、組織学的病理所見を確認、異所性生着および慢性毒性試験として病的所見を認めないことを報告している⁽¹³⁾。加えて、我々は *Alu*-PCR 法をもちいるヒト由来細胞の非ヒ