

**厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）**  
**分担研究報告書**

**「滑膜幹細胞の品質管理」**

**研究分担者**

**清水 則夫 東京医科歯科大学・再生医療研究センター 准教授**

**研究要旨**

臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治癒促進」の副次評価項目 1) 自家滑膜間葉系幹細胞移植術の実施・完遂の可否では、滑膜採取から滑膜幹細胞の培養過程において、汚染や取り違えのミスがないように品質管理を適切に実施し、安全性の担保された滑膜幹細胞を臨床部門に供給することを目標とした。今年度は5例の滑膜幹細胞の品質管理を実施した。品質管理基準書に定めたすべての工程内管理試験の規格・判定基準に適合する滑膜幹細胞を供給することができた。

**A. 研究目的**

体性幹細胞加工医薬品等の製造においては、原材料となる組織・細胞の採取や培養の工程中に絶えず微生物汚染のリスクがあり、また最終製品からの微生物クリアランスや滅菌操作ができない特性があるため、微生物汚染の有無・程度を正しく評価し治療の安全性を確保することが重要である。安全性の担保された滑膜幹細胞を提供するために、厚生労働省医薬食品局長通知「ヒト（自己）由来体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」を参考にして製造工程で実施する工程内管理試験を検討し、品質管理基準書を定めた。また、品質管理責任者から品質管理実務者への指図書と、実務者が試験結果を記録する記録書を併せた、品質管理標準作業手順書を定めた。今年度の臨床研究ではこの手順

書に従い品質管理を適切に実施し、安全性の担保された滑膜幹細胞を臨床部門に供給することを目標とした。

**B. 研究方法**

1. 製造工程のフローチャート

製造工程のフローチャートおよび各工程で実施する工程内管理試験を図1に示す。

2. 品質管理

滑膜および血液の受け入れ時に実施する原材料受入検査、製造工程で実施する工程内管理試験、時間を要するため患者への移植後に結果が得られる試験およびデータの収集を目的として行うモニタリング項目を実施した。工程内管理試験の試験項目、試験に供する試験検体、規格・判定基準を表1に示した。

図 1. 製造工程のフローチャート

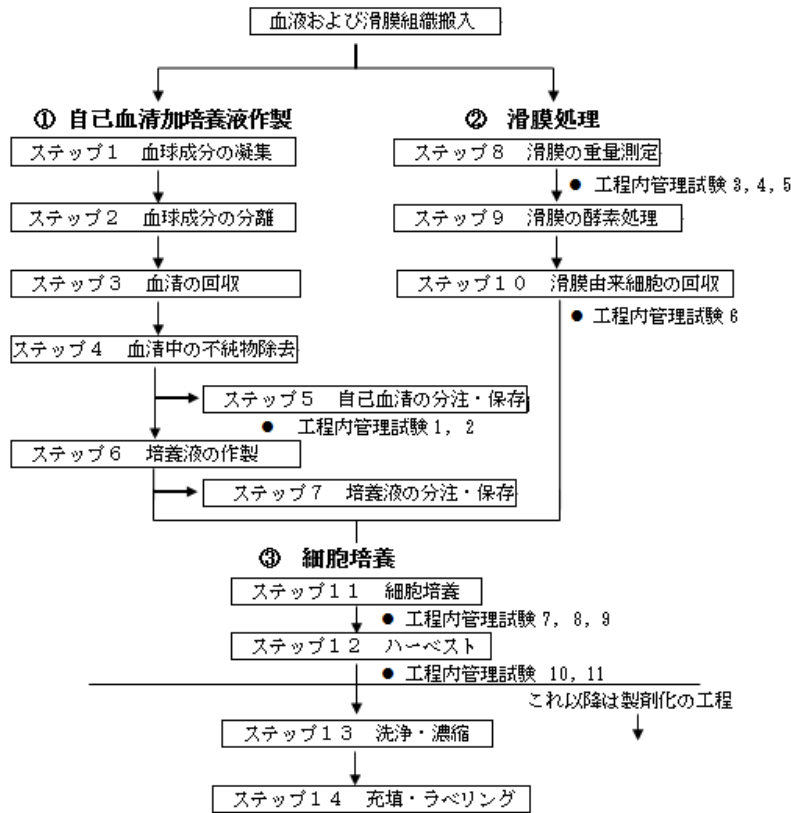


表 1. 工程内管理試験の試験項目および規格・判定基準

ステップ	試験項目	試験検体	規格・判定基準
5	ウイルス検査	患者血清	被験者の除外基準のウイルスが陰性
5	細胞増殖性確認試験	患者血清	FBS と同等以上
8	無菌試験	滑膜保存液	菌の発育が認められないこと
	ウイルス検査	患者滑膜	被験者の除外基準のウイルスが陰性
	マイコプラズマ否定試験 (PCR法)	患者滑膜	陰性
10	細胞数算定	酵素処理後の滑膜細胞	回収生細胞数 $1 \times 10^6$ 個以上
11	無菌試験	滑膜由来細胞の培養上清 (8日目)	菌の発育が認められないこと
	ウイルス検査	培養 12 日目の滑膜由来細胞	被験者の除外基準のウイルスが陰性
	マイコプラズマ否定試験 (PCR法)	培養 12 日目の滑膜由来細胞	陰性
12	エンドトキシン試験	滑膜由来細胞の培養上清 (14日目)	$< 0.25$ EU/mL
	細胞数算定	培養 14 日目の滑膜由来細胞	回収生細胞数 $1 \times 10^7$ 個以上

### 3. 原材料受入検査

患者本人から採取した滑膜組織は、容器に匿名化番号が記載されていること、容器に記載されている匿名化番号と出荷依頼書に記載してある匿名化番号が一致していること、容器から保存液の漏れがないことを確認して受入れた。

### 4. 工程内管理試験

表 1 の工程内管理試験を実施し、試験の結果が不適合になった場合は製造中止とした。試験項目の概略は以下のとおりである。

#### 無菌試験：

日本薬局方の微生物限度試験（メンブレンフィルター法）に準拠して実施した。細菌はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地で 37℃、5 日間、真菌はサブロー・ブドウ糖寒天培地で室温、5 日間培養し、コロニーの生育が認められないことを判定基準とした。

#### ウイルス・マイコプラズマ検査：

各種指針に記載のウイルスや持続感染するウイルスを中心に選定した 17 種類のウイルス（HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8, CMV, Parvovirus B19, HBV, BKV, JCV, HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, HCV）をすべて検出可能な、また、日本・欧州・米国の 3 極薬局方収載の 9 種類のマイコプラズマ（*M. orale*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hyorhinae*, *M. pneumoniae*, *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *A. laidlawii*, *S. citri*）をすべて検出可能なマルチプレックス PCR 検査系を確立した。ウイルス検

査は被験者の除外基準である HBV、HCV、HIV、HTLV が陰性であることを判定基準とした。それ以外のウイルスは判定基準としていないが、検出された場合は定量試験を実施し、ウイルス量が製造の段階を経るに従い減っていく場合のみ製造を続行することとした。マイコプラズマ検査は上記 9 種類が陰性であることを判定基準とした。

#### エンドトキシン試験：

日本薬局方エンドトキシン試験法に準拠して実施した。トキシメーターを用いた比濁法で定量し、試験検体のエンドトキシン濃度が 0.25EU/mL 未満を判定基準とした。

#### 細胞数算定：

血球計算板にてトリパンブルーで染まらない生細胞数をカウントした。培養 14 日目の回収生細胞数が  $1 \times 10^7$  個以上を判定基準とした。

#### 細胞増殖性確認試験：

昨年度の培養不成立を受けて新たに設定した。滑膜採取前に自己血清の細胞増殖性を他家の滑膜幹細胞を用いて予め確認した。細胞増殖性が FBS と同等以上を自己血清の規格とした。

### 5. モニタリング項目

#### 最終製品のウイルス・マイコプラズマ検査：

工程内管理試験では培養 12 日目の滑膜幹細胞を用いて試験したが、最終製品でも同様に試験し結果を残した。患者への移植後に結果が得られるためモニタリング項目とした。

最終製品の無菌試験：

工程内管理試験では培養 8 日目の培養上清を用いて試験したが、最終製品の一部をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地とサブロー・ブドウ糖寒天培地に塗抹し、工程内管理試験と同様に培養し結果を残した。患者への移植後に結果が得られるためモニタリング項目とした。

細胞表面抗原：

14 日間培養した滑膜幹細胞の特性および目的外細胞の有無を調べるために、細胞表面抗原をフローサイトメトリーで解析した。

細胞の染色体検査：

培養した滑膜幹細胞の細胞遺伝学的安定性を調べるために、培養後の細胞の染色体検査（核型分析試験）を実施した。この試験は委託試験として実施した。

## 6. 出荷判定

品質管理責任者は工程内管理試験の結果を確認し、すべての工程内管理試験において判定基準に適合する場合は、製造および品質管理責任者が出荷を承認し、出荷承認書を添付して出荷した。

（倫理面への配慮）

臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治癒促進」は東京医科歯科大学医学部ヒト幹細胞倫理審査委員会の承認を得て実施した。また、ヒト幹細胞を用いる臨床研究として厚生労働大臣の了承を得て実施した。分担する研究に関してもその中の一部として含有されて

いる。

## C: 結果

### 1. 工程内管理試験の結果

表 2. 5 例の工程内管理試験の結果

試験項目	試験結果
血清のウイルス検査	5 例とも陰性
血清の細胞増殖性確認試験	5 例とも FBS 以上
滑膜の無菌試験	5 例とも陰性
滑膜のウイルス検査	5 例とも陰性
滑膜のマイクプラズマ否定試験	5 例とも陰性
酵素処理後の細胞数算定	Lot.1 $1.9 \times 10^6$ Lot.2 $4.1 \times 10^6$ Lot.3 $2.1 \times 10^6$ Lot.4 $2.0 \times 10^6$ Lot.5 $2.5 \times 10^6$
滑膜幹細胞の無菌試験	5 例とも陰性
滑膜幹細胞のウイルス検査	5 例とも陰性
滑膜幹細胞のマイクプラズマ否定試験	5 例とも陰性
エンドトキシン試験	5 例とも $<0.1$ EU/mL
回収した滑膜幹細胞の生細胞数算定（生細胞率）	$6.2 \times 10^7$ (93.5%) $5.8 \times 10^7$ (97%) $3.3 \times 10^7$ (97%) $6.8 \times 10^7$ (100%) $7.1 \times 10^7$ (98.6%)

### 2. モニタリング項目の試験結果

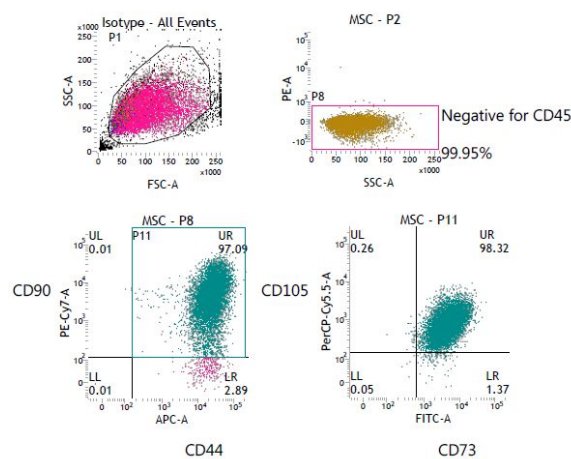
最終製品のウイルス・マイクプラズマ検査および無菌試験：すべて陰性だった。

細胞表面抗原：

細胞治療の国際学会 International Society for Cellular Therapy (ISCT) のコンセンサスとして、CD90, CD105, CD73 を間葉系幹細胞のマーカーとすることが報告されている

(Cytotherapy 2006; 8: 315-7)。本臨床研究では上記の表面抗原の発現および、滑膜由来の間葉系幹細胞で発現が報告されている CD44 (ヒアルロン酸レセプター) の発現を調べた。目的外の細胞として、血球系の細胞 (CD45<sup>+</sup>) および血管内皮細胞 (CD31<sup>+</sup>) の存在割合を調べた。

図 2 に 14 日培養後の滑膜幹細胞の解析データの 1 例を示した。debris を除いた細胞 (P1) かつ CD45<sup>-</sup> の細胞 (P2) にゲートをかけ、CD90<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup> の存在比 (P8) を求めた。さらに CD90<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup> (P8) にゲートをかけ、CD105<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup> (P11) の存在比を求めた。P1 × P2 × P8 × P11 を計算し、CD90<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> の細胞の存在比を求めた。



CD45<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD73<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> population

99.95% X 97.09% X 98.32% = 95.41%

図 2. 14 日培養後細胞の FACS 解析例

表 3 に臨床研究 5 症例の解析結果を示したが、目的外の細胞として血球系の細胞 (CD45<sup>+</sup>) や血管内皮細胞 (CD31<sup>+</sup>) は 1% 未満しか存在しなかった。CD105 の陽性率に個体差があり、CD105 の発現が低い症例では CD90<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> の % も若干低めになったが、CD90<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> の存在比は 90% 以上であった。

表 3. 臨床研究 5 症例の解析結果

Lot	CD45 <sup>-</sup> CD90 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD105 <sup>+</sup> CD73 <sup>+</sup> (%)	CD45 <sup>+</sup> (%)	CD31 <sup>+</sup> (%)
1	95.4	0.05	0.67
2	96.7	0.45	0.24
3	90.5	0.27	0.02
4	91.8	0.06	0.50
5	98.4	0.02	0.30

細胞の染色体検査：

この結果に関しては、研究分担者の赤澤から報告する。

## D: 考察

今年度の臨床研究 5 例の滑膜幹細胞の品質管理に関しては滞りなく実施され、全例で品質管理基準書に定めたすべての工程内管理試験の規格・判定基準に適合する滑膜幹細胞を供給することができた。工程内管理試験の項目に関しては、安全性を確認するための項目は網羅できていると考える。ウイルス・マイコプラズマ検査に関しては、既承認品目よりも詳しく検査していると考えます。私たちは、各種指針に記載のあるウイルスだけでなく、多くの成人が既感染であり持続感染しているウイルスも検査した。自己由来のヒト幹細胞

を用いる場合は必ずしも提供者のウイルス検査は必要とされておらず、製造工程中での交差汚染の防止、製造者への安全対策等の観点から、HBV, HCV, HIV 等の検査は実施を考慮することとされている。上記以外のウイルスに関しては、被験者から採取した組織に持続感染しているウイルスが検出された場合、細胞の培養中にそのウイルスが増殖するか否かのデータがない。もし、培養中にウイルスが増殖するならば、製造者への安全性を検討する必要がある。parvoB19 等、多くの成人が既感染のウイルスに関しては、実際に細胞にウイルスを感染した場合の細胞増殖への影響やウイルスの動態に関する基礎データが必要であると考え（再生医療の実現化ハイウェイで実施中）。

再生医療製品は保存可能期間が短いため、品質管理試験は出荷前の短時間に集中して実施しなければならず、品質管理実務者には大きな負担をかけている。細胞移植前に品質管理試験の結果を出すために試験を前倒して実施するのは、ある程度は仕方のないことだと考えるが、本来は投与する細胞で試験するのが望ましい。そのためにはより短時間で結果が出て、品質管理実務者の負担も減らせるような検査技術の開発が重要であると考え。私たちは現在、ウイルス検査系の自動化を検討している（再生医療のネットワークで実施中）。

## E: 結論

臨床研究の 5 例に対して、すべての工程内管理試験の規格・判定基準に適合する滑膜幹

細胞を供給することができた。

## F: 健康危険情報

なし

## G . 研究発表

### 論文発表

国際誌

- 1) Ng SB, Ohshima K, Selvarajan V, Huang G, Choo SN, Miyoshi H, **Shimizu N**, Reghunathan R, Chua HC, Yeoh AE, Quah TC, Koh LP, Tan PL, Chng WJ. EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder in children and young adults has similar molecular signature to extranodal nasal NK/T-cell lymphoma but shows distinctive stem cell-like phenotype. *Luek Lymphoma* 2015 Jan 21: 1-8 Epub ahead of print
- 2) Yoshimori M, Imadome K, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, Kurata M, Koyama T, **Shimizu N**, Fujiwara S, Miura O, Arai A. CD137 Expression Is Induced by Epstein-Barr Virus Infection through LMP1 in T or NK Cells and Mediates Survival Promoting Signals. *PLoS One* 9:e112564, 2014.
- 3) Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, **Shimizu N**. Detection of herpes viruses by multiplex and real-time polymerase chain reaction in

bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome. *Respiration* 87:279-86, 2014.

- 4) Yagasaki H, Shichino H, **Shimizu N**, Ohye T, Kurahashi H, Yoshikawa T, Takahashi S. Nine-year follow-up in a child with chromosomal integration of human herpesvirus 6 transmitted from an unrelated donor through the Japan Marrow Donor Program. *Transpl Infect Dis.* 17:160-1, 2015.
- 5) Endo A, Watanabe K, Ohya T, Matsubara T. **Shimizu N**, Kurahashi H, Yoshikawa T, Katano H, Inoue N, Imai K, Takagi M, Morio T, Mizutani S. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated HHV-6A in a patient with X-SCID. *Clin Infect Dis.* 59:545-8, 2014.
- 6) Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama E, Morio T, **Shimizu N**, Wakiguchi H. Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatr Int.* 56:159-66, 2014.

#### 著書

- 1) **清水則夫**、渡邊 健、高橋秀行、外丸靖浩、森尾友宏 再生医療等細胞製剤の品質評価法：ウイルス・マイコプラズマ試験 紀ノ岡正博監修 再生医療の細胞培養技術と産業展開 シーエムシー出版 p51-62、2014

#### 国内雑誌

- 1) 関矢一郎、**清水則夫**、森尾友宏、宗田大、滑膜間葉系幹細胞を用いる軟骨再生医療の手順. 日本整形外科学会雑誌 88:212-215, 2014
- 2) 木村秀樹、池 裕明、岡正朗、鈴木弘行、谷憲三朗、徳久剛史、中面哲也、森尾友宏、山口佳之、阿曾沼元博、河上裕、紀ノ岡正博、澤芳樹、**清水則夫** 免疫細胞療法細胞培養ガイドライン 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 45:411-433,2014

#### 学会発表

##### 国際学会

- 1) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, **Shimizu N**, Fujiwara S. Applications of mouse models of EBV-associated diseases for the evaluation of novel therapies. The 16<sup>th</sup> International symposium on Epstein Barr Virus & Associated Diseases. 16-19 July, 2014 Brisbane
- 2) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, **Shimizu N**, Fujiwara S. Preclinical studies of novel therapies for Epstein-Barr virus-associated diseases in humanized mouse models. The 39<sup>th</sup> Annual International Herpesvirus Workshop. 19-23 July, 2014. Kobe

##### 国内学会

- 1) 廣瀬千紘、坂下千瑞子、山本正英、今留謙一、富田誠、藤原成悦、森尾友宏、**清水則夫**、三浦修、新井文子 成人 EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症に対する同種造血幹細胞移植成績の後方視的解析 造血幹細胞移植学会 平成 27 年 3 月 (神戸市)
- 2) 渡邊 健、島田ひかり、湯之前雄太、外丸靖浩、関矢一郎、森尾友宏、**清水則夫**、岸本加恵、前田忠郎、澤田昌典 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞を利用した再生医療の安全性確保：ウイルススパイク試験 日本再生医療学会 平成 27 年 3 月 (横浜市)
- 3) 外丸靖浩、渡邊 健、太田洋子、小島尚美、関矢一郎、森尾友宏、**清水則夫** 再生医療の微生物安全性検査：ウイルス・マイコプラズマ同時検出系の開発 日本再生医療学会 平成 27 年 3 月 (横浜市)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特願 2014-145146 (2014/07/15)  
「滑膜由来間葉幹細胞 (MSCs) の軟骨半月板再生への応用」
- 2) 特願 2014-184379 (2014/09/10)  
「マイコプラズマを検出する方法」
- 3) 特願 2014-212496 (2014/10/17)  
「新規な陽性コントロール核酸を利用した、被検試料中の標的核酸の検出・定量法」
- 4) 特許第 5656183 号 (2014/12/05)  
「滑膜由来間葉幹細胞 (MSCs) の軟骨・半月板再生への応用」