

201432006A

平成26年度厚生労働科学研究委託費

再生医療実用化研究事業

無血清培養法により製造した同種滑膜間葉系幹細胞由来

三次元人工組織の薬事承認申請に資する非臨床試験

成果報告書

研究代表者 名井 陽

平成27年(2015年)3月

本報告書は、厚生労働省の科学研究委託事業による委託業務として、大阪大学が実施した平成26年度「無血清培養法により製造した同種滑膜間葉系幹細胞由来三次元人工組織の薬事承認申請に資する非臨床試験（26220201）」の成果を取りまとめたものです。

平成26年度厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）
企業の協力を得ながらプロトコルを組む治験又は非臨床試験
(26220201)

「無血清培養法により製造した同種滑膜間葉系幹細胞由来
三次元人工組織の薬事承認申請に資する非臨床試験」
成果報告書

名井 陽

大阪大学医学部附属病院未来医療開発部
未来医療センター・准教授/副センター長

吉川 秀樹

大阪大学大学院医学系研究科 整形外科学・教授

中村 憲正

大阪大学臨床医工学融合研究教育センター・招へい教授

辻 紘一郎

株式会社ツーセル・取締役

目次

I. 研究組織

研究組織の構成.....	1
--------------	---

II. 総括研究報告

研究要旨.....	3
-----------	---

1. 研究の目的.....	3
---------------	---

2. 研究の実施計画.....	4
-----------------	---

①適正な手続きで入手した滑膜由来間葉系幹細胞の無血清培養技術の開発・評価	4
---	---

②gMSC の作成、品質管理、非臨床試験の実施.....	4
------------------------------	---

③滑膜 MSC の安定性の検討・各種組織構成細胞への分化誘導の検討.....	4
--	---

3. 研究の実施内容.....	5
-----------------	---

①適正な手続きで入手した滑膜由来間葉系幹細胞の無血清培養技術の開発・評価	5
---	---

②gMSC の作成、品質管理、非臨床試験の実施.....	7
------------------------------	---

③滑膜 MSC の安定性の検討・各種組織構成細胞への分化誘導の検討	7
---	---

4. 研究の実施結果と考察、今後の課題.....	8
--------------------------	---

①適正な手続きで入手した滑膜由来間葉系幹細胞の無血清培養技術の開発・評価	8
---	---

②gMSC の作成、品質管理、非臨床試験の実施.....	17
------------------------------	----

③滑膜 MSC の安定性の検討・各種組織構成細胞への分化誘導の検討	17
---	----

5. まとめ.....	20
-------------	----

III. 添付資料

gMSC のウサギ膝関節腔内埋植による埋植試験の予備試験 最終報告書.....	21
---	----

I . 研究組織

研究組織の構成

区分	研究者名	所属研究機関	職名
研究代表者	名井 陽	大阪大学医学部附属病院未来医療開発部未来医療センター	准教授・副センター長
研究分担者	吉川 秀樹	大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学（整形外科）	教授
研究分担者	中村 憲正	大阪大学臨床医工学融合研究教育センター	招へい教授
研究分担者	辻 紘一郎	株式会社ツーセル	取締役

Ⅱ. 総括研究報告

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）

「無血清培養法により製造した同種滑膜間葉系幹細胞由来
三次元人工組織の薬事承認申請に資する非臨床試験」

総括研究報告書

研究代表者 名井 陽 大阪大学医学部附属病院 准教授

【研究要旨】

我々は滑膜由来の間葉系幹細胞（以下、MSC）を培養し、立体的な構造をとらせたスキャフォールドフリー三次元人工組織（以下TEC）を作製し、動物実験において関節軟骨損傷の治療に有効であることを示し、現在、TECによる関節軟骨損傷治療法についての臨床研究を実施中である。今後、本技術の実用化を目指すに当たり、同種の滑膜由来MSCを用いた軟骨損傷治療法の治験の実施に向けて、大阪大学整形外科、同附属病院未来医療センター、株式会社ツーセルは協力体制を構築し、同社らが開発した新規無血清培地を利用した高品質な同種滑膜由来MSCを用いたTEC（以下、gMSC）の非臨床試験を実施した。また、この非臨床試験を実施するに当たり、PMDAとの相談で確立された「本品の原料である細胞ソース（滑膜細胞）の入手手続きと管理体制」をもとに、大阪大学医学部附属病院における滑膜組織の入手方法の確立、CPCを利用したGMP準拠MSC樹立法および品質管理法の確立、幹細胞バンクの設置、運用手順の確立を経て、細胞を非臨床試験に提供した。本研究では、5名の関節鏡手術患者から同意が得られてドナースクリーニングを実施し、3名から滑膜を入手して、滑膜MSC3株を樹立した。3株について無菌試験、マイコプラズマ試験、エンドトキシン試験、細胞数、生存率、細胞純度試験（FACS）、ウイルス試験を含む品質検査、規格検査を実施した。その内1株はサイトメガロウイルス抗体擬陽性との判定であったため、動物における安全性試験の対象から除外した。局所刺激性および全身毒性に関する安全性試験は、ウサギを用いた膝関節内埋植予備試験を実施し、移植部位以外に大きな影響は見られないことを確認した。滑膜由来MSCの分化誘導能については、骨、軟骨、脂肪への分化能を予備的に確認した。

1. 研究の目的

我々は滑膜由来の間葉系幹細胞（以下、MSC）を培養し、立体的な構造をとらせたスキャフォールドフリー三次元人工組織（以下TEC）による関節軟骨損傷治療法の実用化を目指して臨床研究を実施中（関節軟骨病変に対する自己滑膜間葉系幹細胞由来三次元人工組織移植法）である。当該臨床研究は、自己滑膜MSCを有血清培地にて培養しているが、株式会社ツーセルらが開発した新規無血清培地の技術を応用して、この滑膜MSCを

自己から同種に変更し、無血清培地で培養することで、均一で高品質の同種滑膜由来のTEC（以下、gMSC）を開発し、企業での製品化を通じて、実用化を目指している。

本委託業務では、同種滑膜由来MSCを用いた再生医療技術を確立するために、PMDAとの相談で確立された「本品の原料である細胞ソース（滑膜細胞）の入手手続きと管理体制」をもとに滑膜組織より樹立させたMSCをバンク化させ、その細胞を用いて非臨床試験を実施し、その安全性、有効性を検討することを目的とする。

このうち、大阪大学ではプロジェクトの総合的推進及びドナーの選定と滑膜の採取、MSC培養およびバンク化に関わる技術開発、非臨床試験の実施を、株式会社ツーセルでは、MSC培養およびバンク化に関わる技術開発、gMSCの作成、品質管理、非臨床試験の実施を行う。

2. 研究の実実施計画

①適正な手続きで入手した滑膜由来間葉系幹細胞の無血清培養技術の開発・評価

a. プロジェクトの総合推進

実施中の自己滑膜由来細胞を用いた臨床研究で得た知見を生かしつつ、滑膜MSCを自己から同種に、培養方法を有血清培地から無血清培地での培養に変更する。大阪大学と株式会社ツーセルは本委託業務を含む実用化プロジェクト全体に関して、その方法、進捗、体制などについて、密接な協議を行いながら遅滞なく推進する。また、薬事に関しては必要に応じ、PMDA等の相談を利用して適切な対応を行う。

b. ドナーの選定と滑膜の採取、MSC培養およびバンク化に関わる技術開発・評価

将来の商用利用のためのマスターセルバンクを構築する際に想定しているドナーの基準に適合する患者に対して、非臨床研究目的での利用に関するインフォームドコンセントを取得し、本院の整形外科で実施される膝関節手術で採取された余剰の滑膜組織からMSCを分離し、無血清培地を用いて大量に培養増幅し、バンクとして保存する。この際、バンク化に至るまでの工程のフィージビリティについて検討する。また、将来想定している工程内検査を実施し、細胞の品質に関するデータを蓄積する。さらに、間葉系幹細胞の多方面における移植・再生医療分野への応用実用化に資するため、「ヒト滑膜由来間葉系幹細胞」を学内外の研究者にも供するバンキングの体制を整える。

②gMSCの作成、品質管理、非臨床試験の実施

滑膜MSCを、無血清培地を用いて増幅培養した後、さらに無血清培地を用いて高密度培養を行うことで、自らの細胞とマトリックスのみで構成される三次元人工組織、gMSCを作製する。得られた滑膜MSCまたはgMSCを用いて、①核型分析試験、②軟寒天コロニー形成試験、③ウサギを用いた埋植試験、④免疫不全マウスを用いた造腫瘍試験を実施し、非臨床の安全性評価を行う。

③滑膜MSCの安定性の検討・各種組織構成細胞への分化誘導の検討

a. 滑膜MSCの安定性の検討

長期凍結保存することにより細胞の品質が変化しないかを検討するため、一定期間保存した滑膜MSCを溶解して再培養し、細胞形態、細胞倍加時間、生細胞率、gMSC作成可能性等を評価する。

b. 各種組織構成細胞への分化誘導法の検討確立

骨髄由来間葉系幹細胞等で確立されてきた特定組織（骨、軟骨、靭帯、神経、皮膚、血管、脂肪、結合組織等）構成細胞への分化誘導法がヒト滑膜MSCに応用可能かを評価する。必要に応じ埋植試験等の動物実験を行って分化誘導の評価を行う。

3. 研究の実施内容

①適正な手続きで入手した滑膜由来間葉系幹細胞の無血清培養技術の開発・評価

a. プロジェクトの総合推進

実施中の自己滑膜由来細胞を用いた臨床研究で得た知見を生かしつつ、滑膜MSCを自己から同種に、培養方法を有血清培地から無血清培地での培養に変更した。以下詳細を述べる。

大阪大学医学部医学倫理委員会の承認のもと、本院の整形外科で膝の手術予定のある患者から各種非臨床試験に資する滑膜組織を入手し、未来医療センター細胞培養加工施設（CPC）で滑膜組織からMSCを樹立、増幅培養を行い、最終製品であるgMSCの作製を試みた。一連の作業を通じて、ドナースクリーニング、同種移植を前提とした適切な生体組織採取手順の確認、gMSC製造のための品質管理試験、安全性試験を行い、治験実施までに必要な各種データを取得し総合的な評価の資料とした。また、将来的に未来医療センターCPCを治験薬製造施設として予定しているため、GCTP省令（治験薬GMP）に則って実施できるかPMDAによる調査も行った。

製造の過程で得られたMSCの一部については将来の商用利用を目指したマスターセルバンクとして凍結保存し、今後大阪大学主体で実施予定の臨床用グレードのMSCバンク事業創設に向けた基礎的なデータの一部として学内研究者への譲渡を開始し、軟骨損傷以外の疾患への適応に向けた基礎研究に資した。

大阪大学と株式会社ツーセルは本委託業務を含む実用化プロジェクト全体に関して、その方法、進捗、体制などについて、密接な協議を行った。以下詳細を述べる。

大阪大学（医師、治験コーディネーター、研究員）、及び株式会社ツーセル（研究員）間で品質、安全性の確保、倫理的妥当性について検証を重ね、試験全体の流れを確認した。また本試験においては本院の整形外科で実施中の臨床研究の関係者が多く含まれているため、既に実績が豊富であるが、自己から同種、培地の相違、ヒト幹指針による臨床研究から治験のためのデータ取得といった変更点も多いの

で、その点を重点的に見直した。

定期的に製造、品質管理試験、手順に関する報告、相談、修正を行い治験に向けた連携体制を確立した。確立後、未来医療センター内で株式会社ツーセルが行う再生医療製品製造をモデルケースとしてPMDAによる訪問確認（2015/1/28-1/30）を受けた。

b. ドナーの選定と滑膜の採取、MSC培養およびバンク化に関わる技術開発・評価

将来の商用利用のためのマスターセルバンクを構築する際に想定しているドナーの基準に適合する患者に対して、本院の整形外科で実施される膝関節手術で採取された余剰の滑膜組織からMSCを分離し、無血清培地を用いて大量に培養増幅し、バンクとして保存した。

保存したMSCの培養は、株式会社ツーセルが開発した無血清培地を用いたことから、無血清培地によるMSC樹立、増幅技術については株式会社ツーセルの技術を基盤とした。一方、バンク化の運営主体は大阪大学とし、MSCバンク化に必要な技術の移管・共有を大阪大学と株式会社ツーセルの両者で行った。また、マスターセルバンク構築に必要な細胞保存室をCPCエリア内に導入し、品質維持、不測の事態への対応を目的とした24時間体制のモニタリング環境、非常時のバックアップ用機材を設置した。

この際、バンク化に至るまでの工程のフィージビリティについて検討した。また、将来想定している工程内検査を実施し、細胞の品質に関するデータを蓄積した。

具体的には、マスターセルバンクとして凍結保存する細胞の培養工程内検査について、試験項目及び暫定的な規格値を設定し、工程毎に試験を行った。組織から得られた細胞のバンク化までの増殖能、感染症検査、MSCとしての純度試験、軟骨分化能の試験を実施した。また、中間製品から大量に増幅培養し、高密度播種して作製したgMSCの湿重量、細胞数、生存率、MSCとしての純度試験、最終製品時点での感染症検査に関しても試験を実施した。

研究目的の幹細胞バンクとして、大阪大学内の研究者に非臨床試験目的で細胞を供給する体制の整備を併せて行った。バンク細胞の提供にあたり、共同研究者に対してMSCバンキングの主旨及び提供方法等について説明会を行った。提供依頼者は、匿名化したドナー情報リスト（年齢、性別、継代数等）から希望のロットを選択し、インフォームドコンセントの取得内容に則する研究計画書等必要書類の提出を行うなどの手続き及び書式を決定し、運用を開始した。未来医療センターは研究目的等を確認後、順次、MSCの配布を行っている。また、細胞培養時の技術相談等を受ける体制を整えた。

②gMSCの作成、品質管理、非臨床試験の実施

滑膜MSCを、無血清培地を用いて増幅培養した後、さらに無血清培地を用いて高密度培養を行うことで、自らの細胞とマトリックスのみで構成される三次元人工組織、gMSCを作製する。得られた滑膜MSCまたはgMSCを用いて、ウサギを用いた埋植試験（予備試験）を以下の通り実施した。（予備試験実施報告書添付）

被験物質：細切したgMSC あるいは細切したDiI-gMSC を注射筒1本あたりに0.25 g充填し、試験実施試験に送付。埋植量は0.25 g/片膝とした。

生存率：移植時に品質管理用のサンプルを用いて被験物質の生存率を3回測定したところ、それぞれ84.6%、84.6%、83.9%であった。

対照物質：ヒアルロン酸製剤を注射筒1本あたりに0.25 g充填し、試験実施施設に送付。埋植量は0.25 g/片膝とした。

なお、核型分析試験、軟寒天コロニー形成試験、ウサギを用いた埋植試験（本試験）については、PMDAの訪問確認による助言を精査検討の上、施設や書類の体制を充実させたいうでの実施が適当であると判断した。

③滑膜MSCの安定性の検討・各種組織構成細胞への分化誘導の検討

a. 滑膜MSCの安定性の検討

長期凍結保存することにより細胞の品質が変化しないかを検討するため、一定期間保存した滑膜MSCを溶解して再培養し、細胞形態、細胞倍加時間、生細胞率、gMSC作成可能性等を評価した。

具体的には、P3で 8×10^6 cells/vialでSTEM-CELLBANKER®(タカラバイオ社、CB041)を用いて凍結保存した滑膜MSCの凍結直後、保存後3カ月、6カ月、12カ月、24カ月、（随時延長）という期間で融解培養し、融解時の細胞数、生存率及びその後の増殖率や作製したgMSCの品質検査を実施することで、どの程度の期間安定性を保つか検討した。

b. 各種組織構成細胞への分化誘導法の検討確立

骨髄由来間葉系幹細胞等で確立されてきた特定組織（骨、軟骨、靭帯、神経、皮膚、血管、脂肪、結合組織等）構成細胞への分化誘導法がヒト滑膜MSCに応用可能かを評価する。本年度は、細胞バンク樹立から、分化誘導法の検討を実施するまでの時間が限られていたため、骨、脂肪、軟骨組織への分化誘導能の検討を実施した。

骨芽細胞分化誘導および評価は、数種類の方法を平行して実施した。1) 無血清の骨分化誘導培地STK3 (DSファーマ、KBDSTC103) を用い、滑膜MSCを5,000cells/cm²

で24 wellプレートに播種しコンフルエントまで増殖させた後に、無血清骨分化誘導培地STK3にて21日間培養を行った。培地交換は2～3日毎に行った。評価はAlizarin red (Sigma、40-1009-5-500ML-J) 染色法を用いた。2) 通常のDMEM (血清添加なし) またはMSC増殖用無血清培地STK2に骨分化誘導因子であるDexamethasone(wako) 100nM、Ascorbic acid (SIGMA) 50 μ M、 β -glycerophosphate(SIGMA) 10mMを添加した培地、さらにこれらに1%ITS-A (wako) またはBMP-2 (オステオファーマ) 200ng/mlを加えた効果も検討した。

軟骨への分化誘導に関しては、STK2で培養した滑膜MSCをアスコルビン酸を添加した培地で高密度培養し、シート状の組織 (gMSC) を作製した後に、DMEM (血清添加なし) に1%ITS、0.2mMアスコルビン酸を加えた培地にBMP2:200ng/ml、TGF β 3:10ng/ml、BMP2+TGF β 3、BMP2で数日間分化誘導後にBMP2+TGF β 3へ変更 (期間により3群設定) を加えた培地で3週間培養を行った。

4. 研究の実施結果と考察、今後の課題

①適正な手続きで入手した滑膜由来間葉系幹細胞の無血清培養技術の開発・評価

a. プロジェクトの総合推進

実施中の自己滑膜由来細胞を用いた臨床研究で得た知見を生かしつつ、滑膜MSCを自己から同種に、培養方法を有血清培地から無血清培地での培養に変更した。

本院の整形外科で膝の手術予定の5名のドナー候補から試験参加の同意を取得し、全ての患者に対して、スクリーニングのため血液検査を行った。この試験はGLPグレードで行い、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エイズウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、パルボウイルスB19、サイトメガロウイルス、EBウイルス、梅毒、マイコプラズマ合計9項目全て外注した。その結果、5例中1例でサイトメガロウイルス偽陽性のドナーが見つかった。サイトメガロウイルスは日本人の60～90%が既感染であると言われており、通常は潜伏感染状態であるため陽性にはならないが、たびたび再活性化し、陽性反応が起こると言われている。今回は培養データ取得のため、この1例についても受け入れ、CPC内で培養を行ったが、安全性試験については信頼性の観点から全ての項目で陰性となった別ドナーの細胞を用いた。また別の1例では余剰組織がなく、試験を中止し、もう1例では連絡の行き違いで採取が行われなかった。以下の表に滑膜組織に入手状況をまとめた。

表 1 滑膜組織に入手状況

コード番号	採取可否	採取中止理由	備考
MB01-001	○	—	安全性試験に使用
MB01-002	×	余剰組織無し	—
MB01-003	○	—	サイトメガロウイルス偽陽性のため培養のみ実施
MB01-004	○	—	—
MB01-005	×	連係ミス	—

組織採取を行った3例についてはウインドウピリオド後を考慮して3ヵ月後以降の外來受診日にスクリーニング時と同様の検査を行った。その結果、スクリーニング時と同じ判定結果になった。すなわちスクリーニング時検査をすり抜けた偽陰性のウイルスはなかったことが示唆された。

本院の整形外科で膝手術の患者から約500 mgの滑膜組織を採取後、輸送専用バックに入れて速やかにCPC内に搬送し、培養作業に取り掛かった。培養では全ての工程に対し、標準操作手順書（SOP）を準備して各操作に間違いが生じないようにダブルチェック体制を取って行った。株式会社ツーセルらが開発した生物由来原料基準に準拠した臨床用グレードの無血清培地STK1（臨床用）、及びSTK2（臨床用）を用いて継代回数5回（P0～P5）までの細胞数、生存率を下記の図1にまとめた。その結果、3例とも培養後期でも増殖能の低下は現れず、継代数によらず100%近い高い生存率を示した。今回の結果から鑑みて、最終製品であるgMSCを一個作製するのに 6.0×10^7 個の細胞が必要であることから算出すると1ドナー（約500 mg）の滑膜組織から1万個から10万個のgMSCを作製できることが明らかとなった。また、無血清培地STK1（臨床用）、及びSTK2（臨床用）も本試験に十分適用できる培地であることも分かり、安全で高品質な細胞を用意できることが示唆された。

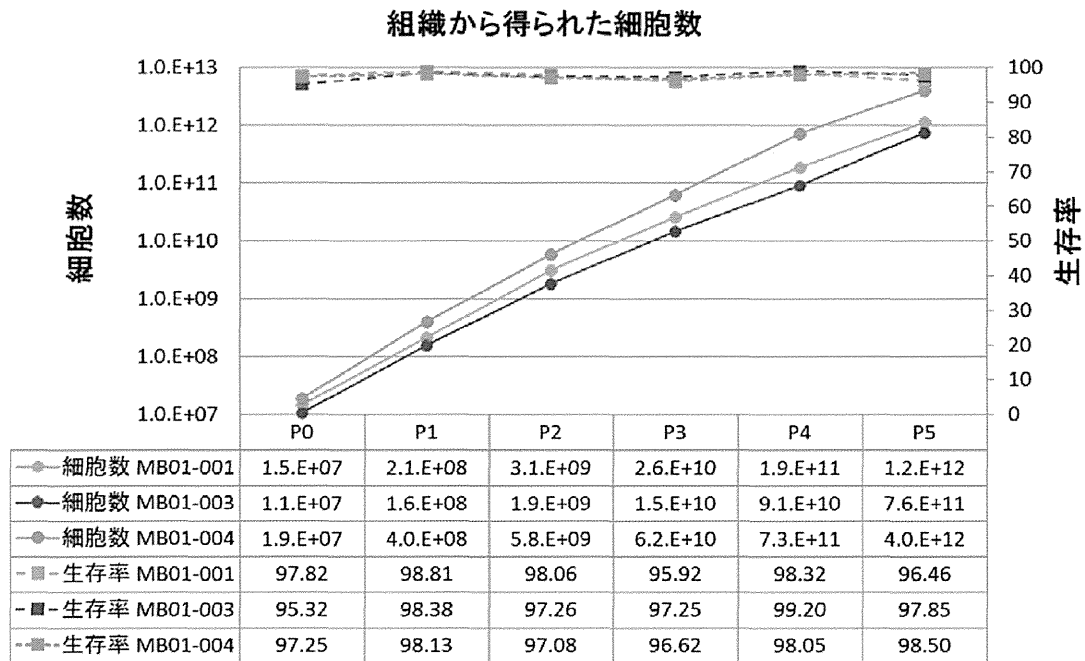


図1 提供された組織から得られた細胞数と生存率

大阪大学と株式会社ツーセルは本委託業務を含む実用化プロジェクト全体に関して、その方法、進捗、体制などについて、密接な協議を行い、遅滞なく推進できた。

医師、コーディネーター、看護師、研究者など立場の異なる関係者がお互いの知識、経験を持ち寄って体制を構築していくことは試験推進のためには非常に重要である。本試験においても、研究代表者の指揮のもと患者のリクルートからウインドウピリオド後の採血検査に関しては、医療関係者である医師、コーディネーター、看護師の3者間で紙媒体、電子カルテ等を用いて厳密な情報管理のもと共有できる体制を取り、培養や安全性試験は、医師、研究者とデータの情報共有を行った。医療行為と再生医療等製品製造の間の連携は特に盲点となりやすい点が多く存在し、製品の安全性や質の担保のため多くの議論を費やした。

また、薬事面に関して、PMDAによる訪問確認（2015/1/28-1/30）を受け表2に記載した13項目の助言を頂いた。本件に関する、最終的な報告は3月中に当局より文書通知を受ける事となっている。

表2 PMDAの訪問確認時の助言一覧

1	工程内管理試験に関するバリデーション（品質管理室）及び施設、機器、試験法に関するバリデーションの体制の整備する事。設備を共用する場合のルール作りとその遵守の徹底する事。
2	外部試験委託先の選定においては、試験法バリデーションを実施して、試験方法等の査察も実施。委託先との相互にサンプルの受け渡し等の取り決め、手順を確認しあう事。
3	モニタリング結果（作業時、否作業時）の把握を施設使用者、利用者共に把握・確認する事。スモークテスト等で最大入室許可人数での作業時の気流の確認を行う事。清掃も含めて使用している消毒剤の妥当性を確認する事。
4	CPCのゾーニングコンセプトを再確認し、更衣手順の見直しを行う事。（クラスCゾーン・最初の更衣室での追加更衣の必要性も考慮する事）
5	CPC施設の付着菌・落下菌の測定手順と試験結果について、使用者側での評価を行い、実施試験の意味・妥当性について、測定結果を踏まえて確認する事。
6	包装形態の最終容器を定め、輸送バリデーションを考慮する事。また、出荷可否判断の手順の整備も必要。
7	廃棄物の処理が、施設側の定められた手順で行われているかどうか使用者側も検証すべき。また、病院内での対応状況と規制との合致についても確認する事。
8	適切な人員の確保及び人員配置を行う事。
9	原材料（ボランティアから入手する滑膜組織）の記録整備を行う事。また、管理の方法〔責任体制（受け渡し）、セキュリティ、感染リスク〕も併せて、整備構築する事。
10	全体的に、自己点検を通してSOPの整備を進める事。
11	資材を保管するスペース（倉庫）を確保する事。
12	施設側の設備（安全キャビネット、インキュベータ等）校正については、その手順と頻度を規定し、実施計画のスケジュール管理を行う事。
13	施設・設備の緊急時の連絡体制（施設側・使用者側）を文書に明記し、確実に連絡が行える体制で運用できるようにする事。

- b. ドナーの選定と滑膜の採取、MSC培養およびバンク化に関わる技術開発・評価
- 将来の商用利用のためのマスターセルバンクを構築する際に想定しているドナーの基準に適合する患者に対して、本院の整形外科で実施される膝関節手術で採取された余剰の滑膜組織からMSCを分離し、無血清培地を用いて大量に培養増幅し、バンクとして保存した。すなわちバンク用にストックされるヒト滑膜由来MSCは、GMPレベルで製造され、製造工程管理、ウイルス等の感染因子などの品質管理を徹

底し、トレーサビリティを全て確保し、高い品質を担保した。さらに、2次元コードラベル搭載のバイアルを採用することにより、検体の取り違えを防止している。将来的なGCTP省令に基づいた臨床研究用の細胞の準備も進めており、臨床研究を目指す研究者にとって、非臨床研究の段階から高品質な細胞を供給できるバンキングの存在は、大きな意義があると考えられる。

①-aの結果でも述べたように今回は3例のドナーの細胞を培養した。商用利用のためのマスターセルバンクはgMSC作製における中間製品であるP2の細胞の一部を使用する計画であったため、3例ともそれぞれ作製した100本分のストックのうち、50本を非臨床試験用、残りを将来の商用利用を想定したアカデミアにおける再生医療等の研究に供与した。

この際、バンク化に至るまでの工程のフィージビリティについて検討した。また、将来想定している工程内検査を実施し、細胞の品質に関するデータを蓄積した。

これまでに得られた3株のMSCにおいて、工程毎の試験項目、規格値、試験結果、暫定的な規格に対する合否判断の一覧表（表3）を示す。細胞増殖能など、培養に関する暫定的に設定した規格値に関しては、すべて合格という結果を得た。感染症検査に関して、1株のみ、患者自身の血液検査でサイトメガロウイルスが偽陽性であったが、非臨床試験のため受け入れ、培養を実施した。中間製品、gMSC出荷の時点での感染症検査ではすべて陰性を確認したため、培養操作過程での感染はなかった。

表3 工程内検査及び結果一覧

工程	試験項目	規格値	試験結果 (①~③の3株)	合否
組織採取前	術前検査	HBV, HCV, HIV, HTLV, パルボB19, EBV, サイトメガロウイルス, 梅毒, マイコプラズマ 陰性	① サイトメガロウイルス偽陽性以外は陰性 ② 陰性 ③ 陰性	① 非臨床試験のため受け入れ ② 合格 ③ 合格
	ウインドウピリオド後の検査	HBV, HCV, HIV, HTLV, パルボB19, EBV, サイトメガロウイルス, 梅毒, マイコプラズマ 陰性	① サイトメガロウイルス偽陽性以外は陰性 ② 陰性 ③ 陰性	① 非臨床試験のため受け入れ ② 合格 ③ 合格
製造工程① (組織受入れ)	組織輸送培地の無菌試験及びマイコプラズマ否定試験	無菌試験 陰性 マイコプラズマ試験 陰性	① 陰性 ② 陰性 ③ 陰性 ① 陰性 ② 陰性 ③ 陰性	① 合格 ② 合格 ③ 合格 ① 合格 ② 合格 ③ 合格
	組織輸送培地のエンドトキシン試験	1.0 EU/mL以下	① 1.0 EU/mL以下 ② 1.0 EU/mL以下 ③ 1.0 EU/mL以下	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	細胞数 (P0-P1継代時)	回収細胞数 2×10 ⁴ cells/cm ² 以上	① 3.56×10 ⁴ cells/ cm ² ② 4.90×10 ⁴ cells/ cm ² ③ 3.15×10 ⁴ cells/ cm ²	① 合格 ② 合格 ③ 合格
(滑膜組織からの初代) 製造工程②	生存率 (P0-P1継代時)	70 %以上	① 95.32 % ② 97.82 % ③ 97.25 %	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	細胞数 (P1-P2継代時)	PDL換算2以上/1継代(5日間換算)	① 3.89 ② 3.86 ③ 4.41	① 合格 ② 合格 ③ 合格
(滑膜組織由来MSC) 製造工程③	生存率 (P1-P2継代時)	70 %以上	① 98.38 % ② 98.81 % ③ 98.13 %	① 合格 ② 合格 ③ 合格

	細胞数 (P2-P3継代時)	PDL換算2以上/1継代(5日間換算)	① 3.55 ② 3.85 ③ 3.86	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	生存率 (P2-P3継代時)	70 %以上	① 97.26 % ② 98.06 % ③ 97.08 %	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	細胞数 (P3-凍結保存時)	PDL換算2以上/1継代(5日間換算)	① 3.00 ② 3.09 ③ 3.41	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	生存率 (P3-凍結保存時)	70 %以上	① 97.25 % ② 95.92 % ③ 96.52 %	① 合格 ② 合格 ③ 合格
製造工程 ⌞ (中間製品保存)	細胞純度試験	MSC マーカー (CD13, CD44, CD73, CD90) の発現を確認造血細胞系マーカー (CD11b, CD34, CD45) の発現を認めない	①~③ MSCマーカー陽性 造血細胞マーカー陰性	① 合格 ② 合格 ③ 合格
		脂肪細胞混入否定試験	① 陰性 ② 陰性 ③ 陰性	① 合格 ② 合格 ③ 合格
		骨芽細胞の混入否定試験	① 陰性 ② 陰性 ③ 陰性	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	無菌試験及びマイコプラズマ否定試験	無菌試験 陰性	① 陰性 ② 陰性 ③ 陰性	① 合格 ② 合格 ③ 合格
		マイコプラズマ試験 陰性	① 陰性 ② 陰性 ③ 陰性	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	培地のエンドトキシン試験	1.0 EU/mL以下	① 陰性 ② 陰性 ③ 陰性	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	ウイルス試験	HBV, HCV, HIV, HTLV, パルボ B19, EBV, サイトメガロウイルス	① 陰性 ② 陰性 ③ 陰性	① 陰性 ② 陰性 ③ 陰性

	gMSC軟骨分化能 確認試験	非臨床試験のデータ等を参考 にして今後決定する予定	分化誘導後のGAG値の増 加を確認済	—
製造工程5 (中間製品融解・ 継代培養)	生存率	70 %以上	① 95.15 % ② 96.61 % ③ 97.22 %	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	細胞数 (P4-P5継代時)	PDL換算2以上/1継代(5日間換 算)	① 2.61 ② 2.84 ③ 3.56	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	生存率 (P4-P5継代時)	70 %以上	① 99.20 % ② 98.32 % ③ 98.05 %	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	細胞数 (P5-gMSC 作製 時)	PDL換算2以上/1継代(5日間換 算)	① 3.07 ② 2.62 ③ 2.44	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	生存率 (P5-gMSC 作製 時)	70 %以上	① 97.85 % ② 96.46 % ③ 98.50 %	① 合格 ② 合格 ③ 合格
製造工程6 (gMSCの作)	外観検査	目視による確認で異物、不純 物の混入がないこと	① なし ② なし ③ なし	① 合格 ② 合格 ③ 合格
製造工程7 (gMSCの回収) 出荷前試験	無菌試験及びマイ コプラズマ否定試験	無菌試験 (3日判定) 陰性 (未来医療に依頼)	① 未実施 ② 陰性 ③ 陰性	① — ② 合格 ③ 合格
		マイコプラズマ試験 (NAT法) 陰性	① 陰性 ② 陰性 ③ 陰性	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	培地のエンドト キシン試験	日局法 (比濁法) 1.0 EU/mL以 下	① 1.0 EU/mL 以下 ② 1.0 EU/mL 以下 ③ 1.0 EU/mL 以下	① 合格 ② 合格 ③ 合格
	細胞数	非臨床試験のデータ等を参考 にして今後決定する予定	① 5.08×10^7 cells ② 4.10×10^7 cells ③ 3.93×10^7 cells	—