

【表】 風量(換気回数)・室圧による操作室清浄度

圧力(Pa) 処理風量(m <sup>3</sup> /min)	30	40 (仕様値)	50	換気回数 (回/H)
13	11	6	20	31
	8	5	15	
	4.2	2	6.4	
16(仕様値)	16	5	35	39
	12	5	28	
	5.2	3.6	14.2	
19	25	10	29	46
	18	9	24	
	8.4	5.2	13.2	
28		6		68
		5		
		1.8		

※上段:最大粒子濃度、中段:上限値(UCL)計算値、下段:全平均粒子濃度を示す(単位 個/cft)

※測定条件は非作業時、BHC 停止とする。

以下、計算法を示す。

- 1) 全平均粒子濃度 M を求める (例)。

$$M = \frac{(a+b+c+d+e)}{\text{測定場所数}L}$$

測定場所数 L

5

全平均粒子濃度 M

少数第2位を四捨五入

- 2) UCL を求める。SD: 標準偏差

$$UCL = M + t_{0.95} \times (SD / \sqrt{L})$$

UCL 係数 T

2.1

UCL

95%信頼の上限値(UCL)に対するスチューデント t 分布

測定点の数(L)	2	3	4	5 ↓	6	7-9	>9
t <sub>0.95</sub>	6.3	2.9	2.4	2.1	2.0	1.9	適用外

- 3) 換気回数(回/H) = 風量(m<sup>3</sup>/min) × 60(min) / 部屋内容積(m<sup>3</sup>)

## 【グラフ】 着衣室 清浄度回復性能試験

### 1. 測定前条件

着衣室に1名入室し、ガウニングを想定した屈伸運動を20秒程度行い、その直後に退出し、測定を開始した。

### 2. 測定条件

条件①: 薄型ファンフィルターユニット(ACP) 停止

条件②: 薄型ファンフィルターユニット(ACP) 運転

ACP 運転時 6.5m<sup>3</sup>/min、天井吹出 3m<sup>3</sup>/min と合わせ循環回数 124 回/H

着衣室の総風量 = 6.5(ACP) + 3(FFU) = 9.5m<sup>3</sup>/min

換気回数 = 9.5 m<sup>3</sup>/min ÷ 4.6 m<sup>3</sup>(部屋内容積) × 60sec = 124 回/H

ACP 停止時、天井吹出 3m<sup>3</sup>/min、循環回数 39 回/H

対象粒径: 0.5 μm 以上粒子

吸引量 1cft/min 測定時間 10sec

測定インターバル 10sec

(10sec 当たりの吸引量 0.166cft)

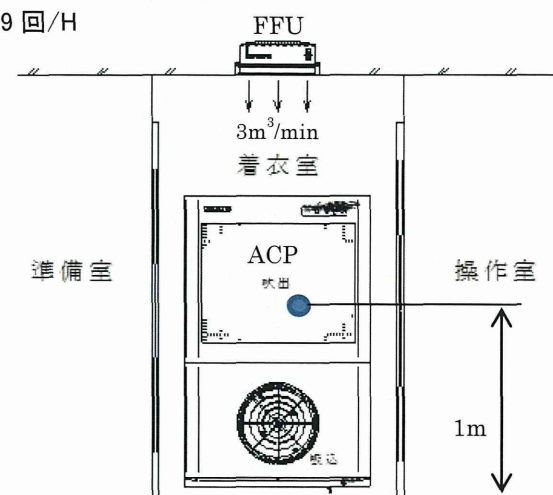
### 3. 測定位置

着衣室中央部 測定高さ床より+1m

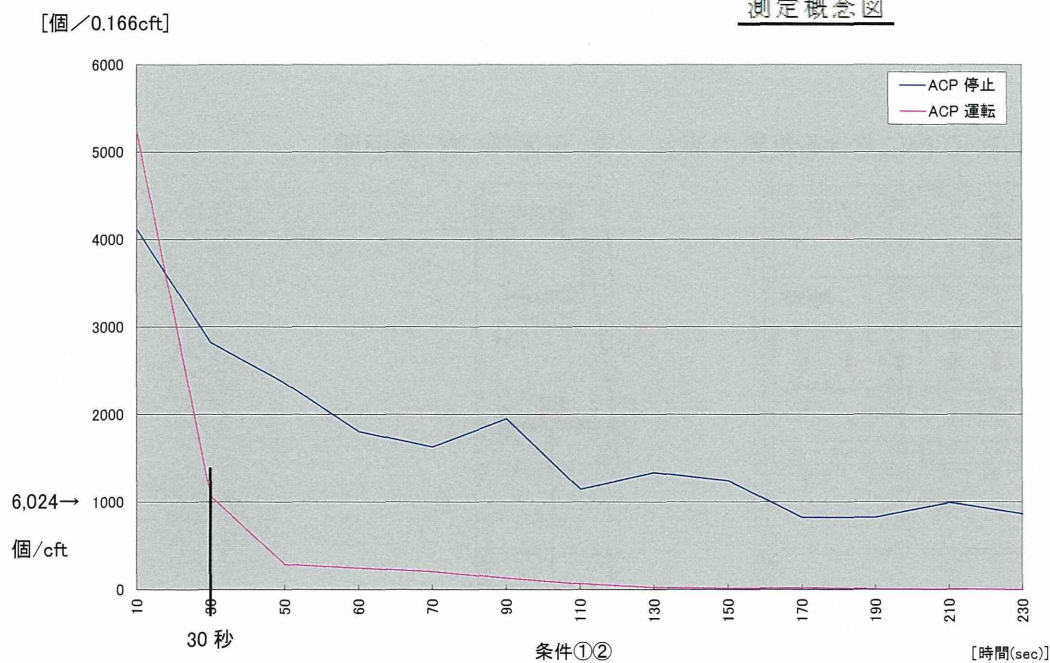
### 4. 測定器

メーカー: HACH、型式: A2400LL

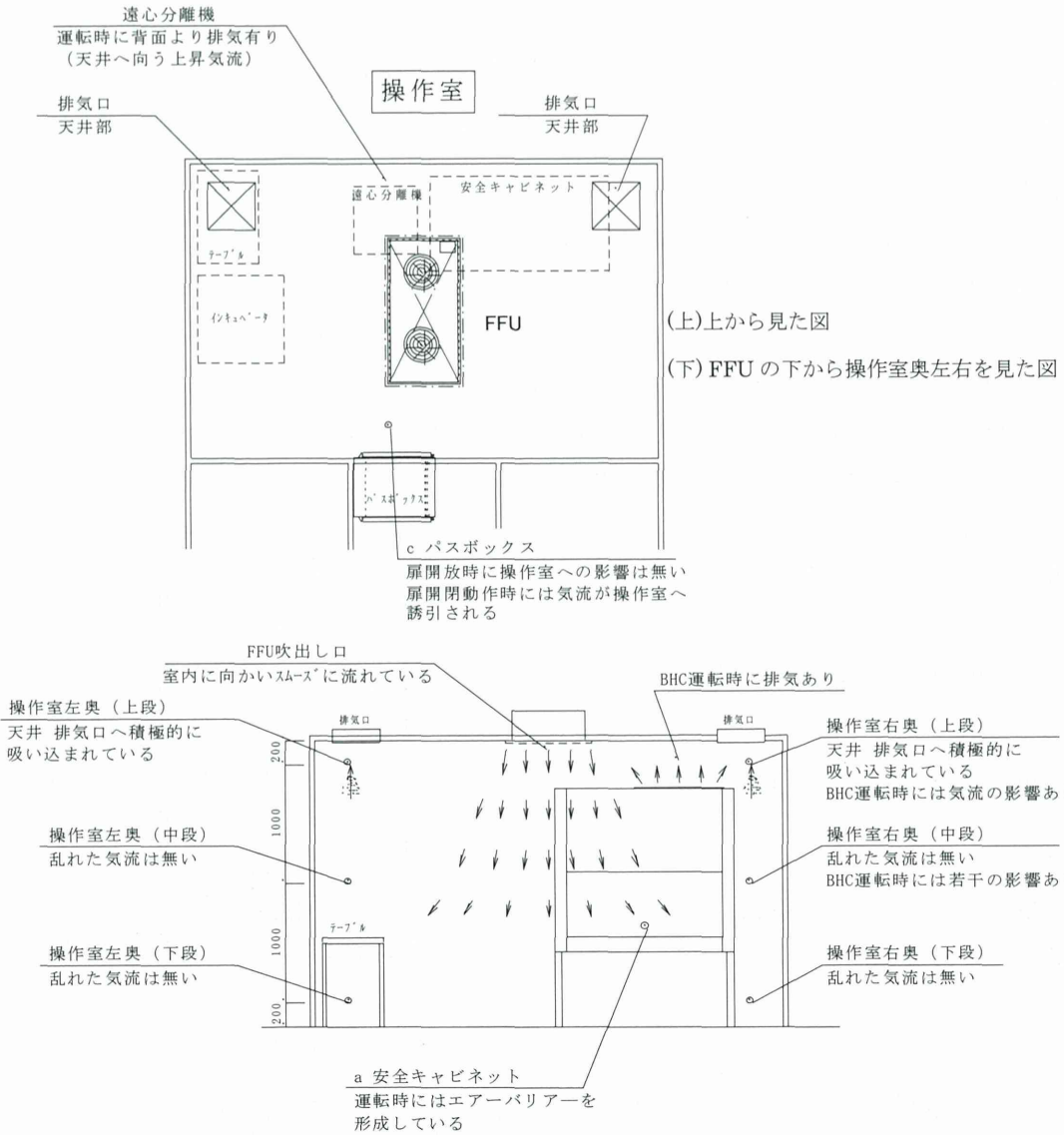
製造番号: 080101003



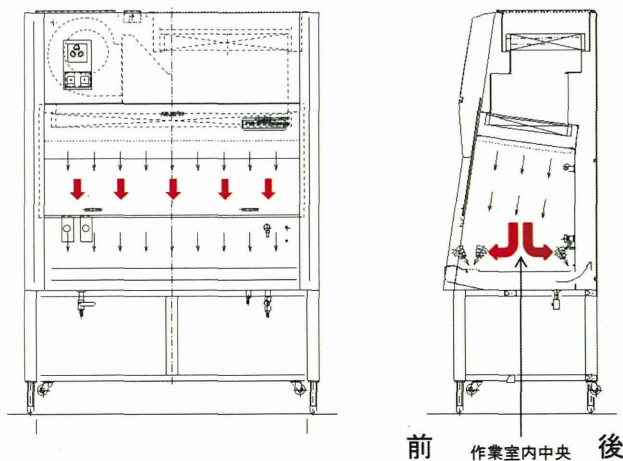
測定概念図



【図1】風速測定位置(FFU 取付位置)と排気口、操作室における気流の流れ(推定)



【図2】BHC内における気流の流れ(左:正面図、右:側面図)



平成 26 年度 厚生労働科学研究「特定細胞加工物・再生医療等製品の品質確保に関する研究」

【紀ノ岡班】第 1 回再生医療等製品の無菌操作法ガイドライン作成班会議(仮)

## 議事内容

開催日：平成 27 年 2 月 9 日（月）10 時～12 時

開催場所：東京都千代田区霞が関 3-3-2 新霞が関ビル  
独立行政法人医薬品医療機器総合機構  
14 階 第 24/25 会議室

出席者(36 名)：主催者（大学関係者：4 名、公的機関関係者：9 名）  
外部有識者（大学関係者：2 名、企業関係者 21 名(18 社)）

## 議事議題

- 1) ガイドラインの趣旨・説明
- 2) 活動スケジュール
- 3) 検討の分担

## 配布資料

- 1) 名簿（非公開）
- 2) 座席表（非公開）
- 3) 活動スケジュール（資料 1） . . . 添付
- 4) 再生医療等製品の無菌製造法指針(項だて案)（資料 2） . . . 添付
- 5) 再生医療等製品の無菌製造法指針作成における考慮点（資料 3） . . . 添付
- 6) 再生医療等製品における最終製品の場合分け(資料 4 ) . . . 添付  
当日説明のために使用。後日配布。
- 7) 無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針（参考 1） . . . 添付

## 議論の流れ

厚生科研「特定細胞加工物/再生医療等製品の品質確保に関する研究」(H26-28)

### 再生医療等製品の無菌操作法ガイドラインの作成班会議

趣旨説明	再生医療等製品の無菌操作法のガイドライン	第1回 H27.2	
項目の確認	「無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針」を参考に比較修正, 新規項目	第1回 H27.2	
項目ごとの対応	主担当の決定	試験確認による項目提案	第1回 H27.2
	担当ごとの対応・確認, 対比表作成 文書作成・確認・修正確認	試験確認による項目追記	第2-4回 H27.4,8,12
全体対応	確認, 修正, パブコメ(H28.4), 修正, 公表(H28.7)	第5, 6回 H28.2,4	

## 再生医療等製品の無菌製造法に関する指針（項立て案）

再生：再生医療等製品の無菌製造

無菌操作法：無菌操作法による無菌医薬品の製造指針

無菌操作法による無菌医薬品の製造指針	再生医療等製品の無菌製造法指針（作成方針）	作成担当者
1. 序論	“再生” に特化した記載にする	
2. 用語の定義又は説明	“再生” に関係した用語の定義を加える	
3. 品質システム 3.1 品質システム一般要求事項 3.2 日常管理要件 3.3 バリデーション	▶ “無菌操作法” を参考に、“再生” に関連した事項を加える。	
4. 職員 4.2 職員の教育訓練 4.2 職員の健康管理 4.3 職員の監督	▶ “無菌操作法” を参考に、“再生” に関連した事項を加える。	
5. 職員による汚染防止 5.1 更衣要件 5.2 無菌作業要件	▶ “無菌操作法” を参考に、“再生” に関連した事項を加える。グレードD環境に設置したアイソレータ作業者に対する要件を具体的に提示する。	
6. 構造設備 6.1 構造設備の設計上の要点	▶ “無菌操作法” を参考に、“再生” に関連した事項を加える。構造設備を、クリーンルームとアイソレータに分けて記載した方が良いかもしれない。	

<p>7. 無菌医薬品に係る製品の作業所</p> <p>7.2 清浄度レベルによる作業所の分類</p> <p>7.2 空調システム</p> <p>7.3 HEPA フィルターの完全性</p>	<p>➤ “構造設備”と“無菌医薬品に係る製品の作業所”を纏めた方が良いかもしれない。</p> <p>差圧管理(封じ込め)は項目として必要か？</p> <p>HEPA 排気は？(封じ込めと独立給排気は別観点？)</p> <p>上給気下排気、上給気上排気を記載考慮するか？</p> <p>※バイオセーフティではなく、デフォルトとして。</p>	
<p>8. 無菌医薬品に係る製品の作業所の清浄化及び消毒</p> <p>8.2 消毒剤及び洗浄剤</p> <p>8.2 消毒手順のバリデーション</p> <p>8.3 清浄化及び消毒の実効性のモニタリング</p>	<p>➤ “無菌操作法”並びに日局参考情報“消毒法及び除染法”を参考に整理の必要性あり。</p>	
<p>9. 原料並びに容器及び栓の管理</p> <p>9.1 原料(原薬、添加剤)の管理</p> <p>9.2 容器及び栓の管理</p> <p>9.3 ヒト組織由来原料(プライマリー)の管理</p>	<p>➤ “無菌操作法”を参考に、“再生”に関連した事項を加える。“培地”及び“動物由来原料基準に抵触する試薬類”が重要な原料になりうるので、これらの管理法についても記載する。</p> <p>原料の消毒(除染)手順についてのバリデーション等は指針に含まれないのでしょうか？</p> <p>除染しきれない(内在性)原料を扱う手順の指針は無菌操作法と同一視で議論できると考えてよろしいでしょうか？</p>	

<p>10. 無菌中間製品の保管及び輸送の管理</p> <p>10.1 一般要件</p> <p>10.2 保管及び輸送のための容器</p> <p>10.3 容器への投入, 容器からの取出し作業</p> <p>10.4 保管及び輸送の条件</p>	<p>▶ “無菌操作法”を参考に、“再生”に関連した事項を加える。</p> <p>無菌中間製品は、凍結された状態が前提でしょうか？ 温度により場合分けを行なうべきなのか？ (温度により菌が増殖するリスク考慮必要か？ → 無菌だから必要ない？)</p> <p>中間製品の無菌性をどのように確認、担保するのか？</p>	
<p>11. 環境モニタリング</p> <p>11.2 一般要求事項</p> <p>11.2 日常管理要求事項</p> <p>11.3 環境モニタリング判定基準例</p>	<p>▶ クリーンルーム (安全キャビネット) 及びアイソレータ (RABS) における環境モニタリングの在り方について具体的に記載する。</p>	
<p>12. 製造設備及びユーティリティの適格性評価</p> <p>12.1 一般要件</p> <p>12.3 維持管理</p> <p>12.3 校正</p> <p>12.4 変更管理</p>	<p>必要なら、“無菌操作法”を引用する記載にする</p> <p>作業者のスキルが絡むものの適格性評価 (OQ、PQ) はどのように考慮するのか？</p> <p>例えば、安全キャビネット。作業者の人数 (ギャラリーが多いとリスクが増す) 等で個別に評価するのか、上限条件のようなものを設定するのか...など。</p>	
<p>13. 滅菌工程</p> <p>13.2 一般要件</p>	<p>必要なら、“無菌操作法”を引用する記載にする</p> <p>▶ 滅菌済み製品 (デスポーザル製品) の選択要件に</p>	



13.2 高圧蒸気滅菌 13.3 乾熱滅菌 13.4 電子線, $\gamma$ 線滅菌 13.5 その他の滅菌法	ついて記載する	
14. 無菌製造設備の定置清浄化(CIP) 14.1 CIP 対応の設計要点 14.2 洗浄剤の選定 14.3 CIP 工程パラメータ 14.5 日常管理 14.5 保守・管理 14.6 職員の教育訓練	必要なら、“無菌操作法”を引用する記載にする	
15. 無菌製造設備の定置蒸気滅菌(SIP) 15.1 一般要件 15.2 装置設計の要点 15.3 日常管理 15.4 保守・管理 15.5 職員の教育訓練	必要なら、“無菌操作法”を引用する記載にする	
16. 無菌充てん工程 16.2 一般要件 16.2 液体充てん工程 16.3 粉末充てん工程	必要なら、“無菌操作法”を引用する記載にする。ただし、最終製品化と輸送容器については、記載する必要があるかもしれない。	
17. ろ過滅菌工程 17.1 液体ろ過滅菌工程	▶ 培地や試薬のろ過滅菌については記載する必要がある。	

17.2 空気その他ガス		
18. 凍結乾燥工程 18.1 一般要件 18.3 バリデーション 18.3 凍結乾燥装置の洗浄及び滅菌 18.4 日常管理と維持管理事項	必要なら、“無菌操作法”を引用する記載にする	
19. アイソレータ／バリアシステム／ブローフィルシール 19.1 アイソレータシステム 19.1.1 一般要件 19.1.2 アイソレータシステムの設計 19.1.3 空調システム 19.1.4 除染 19.1.5 教育訓練 19.1.6 日常管理  19.2 アクセス制限バリアシステム (RABS) 19.2.1 一般要件 19.2.2 教育訓練  19.3 ブローフィルシール 19.3.1 ブローフィルシールの範囲及び対象工程 19.3.3 容器の成型及び製品充てんの工程のフロー及びその環境	<p>▶ アイソレータと RABS の使用要件については、詳細に記載する。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 除染方法</li> <li>・ リーク試験</li> <li>・ 微粒子計測計の規格</li> <li>・ 風速</li> <li>・ 各種インターフェースに対する要件</li> <li>・</li> </ul>	

<p>19.3.3 プラスチック容器の無菌性保証</p> <p>19.3.4 ブローフィルシール工程の重要管理項目</p>		
<p>20. プロセスシミュレーション</p> <p>20.1 概要と範囲</p> <p>20.2 実施要領</p> <p>20.3 プロセスシミュレーションの留意事項</p> <p>20.4 培養及び観察</p> <p>20.5 プロセスシミュレーションの許容基準</p> <p>20.6 アイソレータシステムを採用している製造ラインのプロセスシミュレーション</p>	<p>➤ ロットを構成しない“再生”のプロセスシミュレーションについては、以下のことについて詳細に記載する。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・使用培地、培養条件</li> <li>・初期評価、定期評価</li> <li>・シミュレートする範囲</li> <li>・サロゲート</li> </ul> <p>評価する検体は、引き抜き試験か全量試験かについて、モデル例（分類）で示すのか？ （全量の場合、同時に A6 の複数の試験は難しいと考えます。全て最終加工物で評価するのか？）</p>	
<p>A1. 細胞培養／発酵により製造する原薬</p> <p>A1.1 一般要件</p> <p>A1.2 細胞培養又は発酵</p> <p>A1.3 ハーベスト、分離及び精製</p>	<p>➤ 細胞培養については詳細かつ具体的に記載する。本項は、参考情報から本体に移動。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞培養、ハーベスト、誘導、分離及び精製</li> <li>・MCB 及び WCB の確立</li> </ul>	
<p>A2. 製薬用水</p> <p>A2.1 製薬用水設備の基本設計の留意点</p> <p>A2.2 製薬用水のバリデーション</p>	<p>➤ 製薬用水を自家製造する際には、“無菌操作法”を引用する記載にするが、培地調製や試薬調製等に使用する製薬用水を購入して使用する場合は</p>	

<p>A2.3 製薬用水の日常管理</p> <p>A2.4 製薬用水設備に係る職員の教育訓練</p> <p>A2.5 製薬用設備の維持管理</p> <p>A2.6 変更管理</p> <p>A2.7 逸脱管理</p>	<p>要件は記載する</p>	
<p>A3. 無菌医薬品製造所の防虫管理</p> <p>A3.1 一般要件</p> <p>A3.2 昆虫類管理プログラム</p> <p>A3.3 防虫対策</p>	<p>必要なら、“無菌操作法”を引用する記載にする</p>	
<p>A4. バイオセーフティ及びバイオセキュリティ対策</p> <p>A4.1 バイオセーフティレベル</p> <p>A4.2 バイオセキュリティ対策</p> <p>A4.3 微生物等安全管理区域(管理区域)</p> <p>A4.4 BSL1施設に対する一般要件</p> <p>A4.5 BSL2施設に対する一般要件</p> <p>A4.6 BSL3施設に対する一般要件</p> <p>A4.7 緊急時の対策</p> <p>A4.8 教育訓練</p>	<p>▶ 感染症法の対象疾患に感染している患者検体を取り扱う際のバイオセーフティを中心に詳細かつ具体的に記載する。本項は、参考情報から本体に移動。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・構造設備要件</li> <li>・廃棄物、廃水物の管理</li> <li>・感染症法の対象疾患を表形式で提示する</li> </ul>	
<p>A5. ケミカルハザード対策</p> <p>A5.1 原則</p> <p>A5.2 リスクマネジメントプロセス</p> <p>A5.3 教育訓練</p>	<p>必要なら、“無菌操作法”を引用する記載にする</p>	
<p>A6. 試験検査</p>	<p>▶ 代替微生物試験法を含め、詳細かつ具体的に記載</p>	

<p>A6.1 エンドトキシン  A6.2 不溶性微粒子  A6.3 容器完全性  A6.4 外観検査</p>	<p>する。本項は、参考情報から本体に移動。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・無菌試験</li> <li>・マイコプラズマ否定試験</li> <li>・エンドトキシン試験</li> <li>・外来性ウイルス否定試験が必要かどうか？</li> </ul> <p>それぞれにおいて、どのようなもの（細胞、培地上清）が検体として適切なのかまで言及するか？</p>	
---	--	--

最終製品の保管および輸送の条件は不要という認識？

再生医療等製品の無菌製造法に関する指針作成における考慮点  
(佐々木)

【使用語】

無菌操作法指針	GCTP、構造設備規則（再生医療等製品）	コメント
無菌操作区域、直接支援区域、その他の支援区域、清浄区域、作業室	無菌操作区域、清浄度管理区域、作業管理区域、作業室	使用語の統一は不要であるが、各区域の理解に誤りのないように
バリデーショ	バリデーショ	バリデーショ又はベリフィケーショ
	品質リスクマネジメント、回収処理、管理単位、ドナー、外部試験検査機関等、生物由来原料基準、参考品及び保存品の保管管理、原料及び資材の供給者管理、	ベリフィケーショの言及が必要か？ GCTP で使用している言葉の概念をどこまで盛り込むべきか？
バイオセーフティ対策	職員の感染防止措置	同一要件か？
一方向気流装置	層流装置	

【要議論点】

《病原性を持つ微生物等による職員の感染防止措置に関する構造設備》

・構造設備規則の逐条解説（16）で「病原性を持つ微生物を取り扱う区域」には、病原性を持つ微生物等が混入しているおそれのある物を取り扱う区域であって封じ込めを行わなければ製品等の汚染又は交叉汚染のおそれがある場所も含むとある。BSL 3 該当病原体を使用する場合は、P3 施設が必要であるが、BSL 2 の肝炎ウイルス（B 型、C 型）を取り扱う構造設備を封じ込めにする必要があるかどうか。

《アイソレータに対する要件》

・一般無菌医薬品製造用アイソレータは、One-way 方式で、全て滅菌された原料、資材が搬入され、マウスホールを通して外部に搬送される。再生医療用アイソレータは、Working cell の消毒、プロセッシング後の使用器材、必要に応じて製品が搬入口に戻る。それ故、作業員が直接介在できない高度な清浄装置であり、一般無菌医薬品製造用アイソレータとは異なるので、過度な要件を課さないこと。

・USP<1116>要件やこれまでの実績データからみても、アイソレータ使用の場合、環境モニタリングは微粒子測定を主とし、微生物のモニタリングは従にしてよい。環境モニタリングの記載ぶりを考えること。

#### 《使用培地の性能試験》

・種々の培地が、製造用、環境モニタリング、無菌試験、出荷試験等に使用される。製造用（細胞培養用）培地の性能試験は必須であるが、その他の市販培地については、製造所が品質システム（ISO 9001 等）を有し、適切な COA を提出し、使用者までの輸送システムに問題ないなら、受け入れロットごとの培地性能試験を省略できるようにしなければ再生医療等製造所では対応ができない。必要に応じては、培地製造者もしくは販売代理店と Quality agreement を締結させることでもよい。

#### 《出荷時試験：無菌試験》

・出荷時製品の培養液、洗浄液等について MF 法でろ過し、可能な限り、迅速無菌試験法を採用すること。迅速無菌試験法としては、米国 FDA の評価研究で好成績を得た、ノバルティス社が開発し、かつ PMDA でも承認されている Shaedler Blood Agar を用いた方法が推奨される。出荷時製品の培養液、洗浄液等が使えるなら、製品そのものを試験に供する必要はない。

#### 《出荷時試験：マイコプラズマ試験》

・マスターセルバンクやワーキングセルバンク確立の場合には、培養法や DNA 染色法での確認も必要ではあるが、製品出荷時においては PCR 法のみでよい。マイコプラズマの多くは細胞表面に付着し、表面で増殖後、上清に移行する。Late phase の培養物の場合、細胞破片に付着したマイコプラズマが上清に存在するので、上清を遠心処理し、沈渣から DNA を抽出し、日局参考情報に記載されている改正「マイコプラズマ否定試験法」で PCR を行う。

#### 《出荷時試験：エンドトキシン試験》

- ・特に問題なく実施可能

#### 《プロセスシミュレーション：培地充填試験》

- ・無菌性検証手段として、何らかのプロセスシミュレーションが必要ではあるが、サロゲートの選択、実施回数（初期評価、定期評価）、実施容器数、シミュレート範囲等、難しい問題である。

#### 《重要な原料及び資材の供給者管理》

- ・製造元の監査は難しいので、基本は Quality agreement 締結で十分と考えられるが、agreement の具体的内容を例示した方がよいのでは。

#### 《生物由来原料基準への準拠》

- ・特殊な試薬や原料の中には、生物由来原料基準への適合の難しいものもある。規制当局との個別協議内容か？

#### 《外部試験検査機関》

- ・GMP上の製造所に相当するのか？ 例えば、環境モニタリングの培地の培養と観察を委託する場合、当該機関はGMP適合機関でなければならないのか？

#### 《原料や資材の受入れ管理試験》

- ・原料（培地や試薬類を含む）の受入れ試験として、バイオバーデンやエンドトキシン試験実施は必須か？

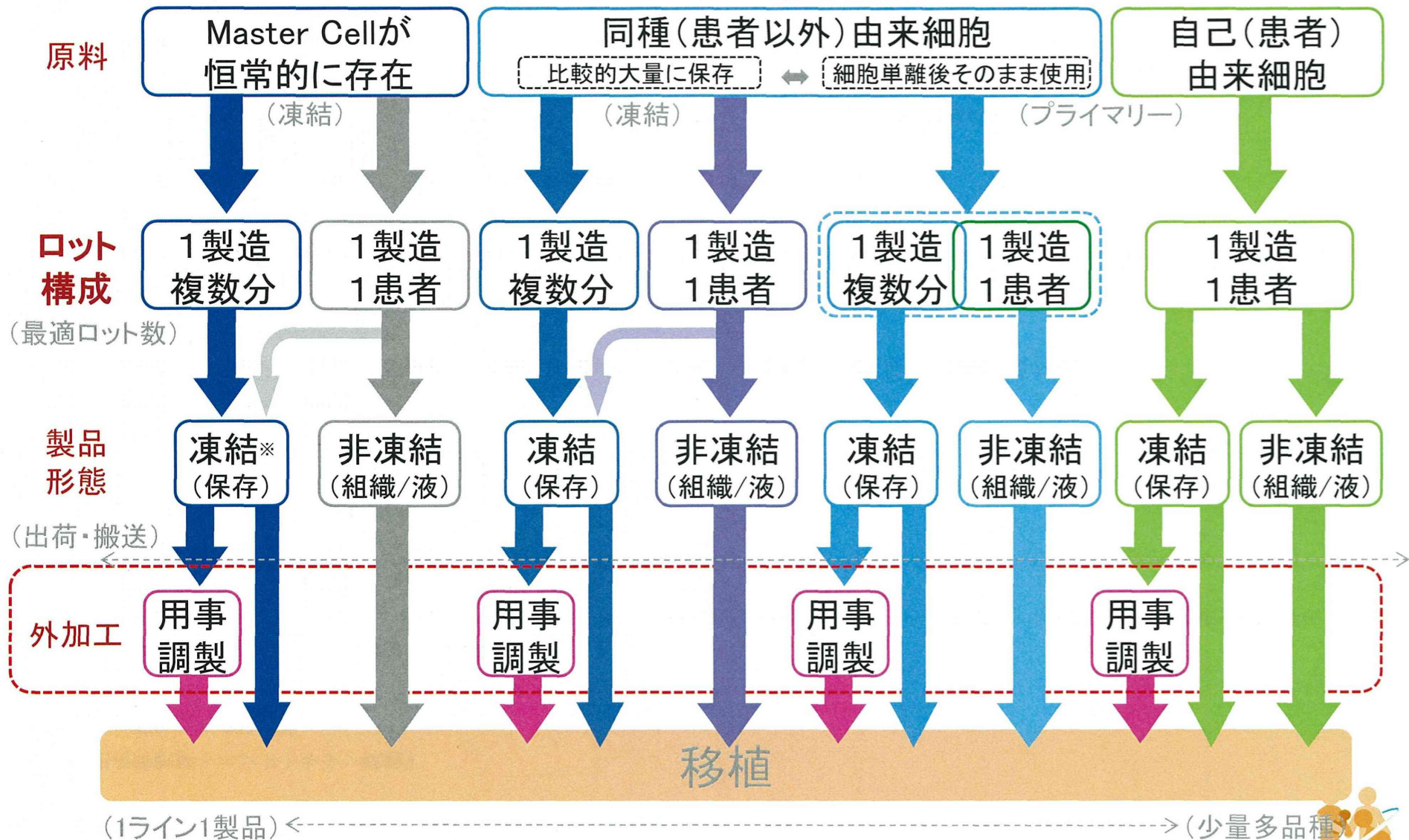
#### 《市販滅菌器材》

- ・一般無菌医薬品の製造には、SAL $<10^{-6}$ で滅菌した器材の使用が求められている。市販プラスチック製品の中には、滅菌水準の分からないものもある。どうすべきか？



# 再生医療等製品における最終製品の場合分け

(ロットの分類)



※ 凍結は、あくまでも現時点での選択で、長期間保存が可能な意



厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）

委託業務成果報告

特定細胞加工物／再生医療等製品の品質確保に関する研究

細胞加工物等の不均質性、運搬・輸送時の脆弱性、実生産における変動要因等を勘案した

製品・原資材の規格及び試験検査のあり方に関する研究

担当責任者 佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所再生・細胞医療製品部・部長

担当協力者 三浦 巧 国立医薬品食品衛生研究所再生・細胞医療製品部第1室・室長

研究要旨

【目的】近年、再生医療に関わる研究が飛躍的に進み、特定細胞加工物／再生医療等製品（以下、細胞加工物等という）を用いた臨床研究・臨床試験が、多くの医療機関で進められようとしている。特に iPS 細胞等を用いた再生医療は日本を初めとして世界で注目を集めているところである。その一方で、安全面での課題も多く存在している。iPS 細胞による再生医療実用化に向けた課題の一つとしては、発がんリスクを低下させる技術が求められ、安全性を担保した製造技術開発が進められているが、細胞加工物等の安全性を評価する方法は未だ確立していないのが現状である。そこで本研究では、細胞加工物等の品質に関し、それら製造工程における変動要因を考慮するとともに、品質評価試験方法を開発することを目指す。【方法】細胞加工物等は、大量培養、分化誘導（加工）、保存（凍結・解凍）等の多岐に渡るプロセスを経て製造・加工されるため、細胞加工物等の品質に影響を与えると想定される変動要因は無限に存在すると考えられる。そのため、今年度では、モデルケースとして、製造工程の上流に位置する iPS 細胞（原材料）の培養維持期におけるゲノム不安定性を指標にし、その評価手法の検討を行った。具体的には、培養の各工程（継代、凍結融解）における細胞のゲノムを各段階において回収し、全エクソン解析、CGH マイクロアレイ解析、ビーズアレイ解析（SNP ジェノタイプング）を行った。【結果】フィーダーフリー培養環境下で培養された iPS 細胞を約 4 ヶ月間培養し、3 継代ごと（0、3、6、9、12、15 継代）のゲノムを回収した。また、iPS 細胞の凍結前後におけるゲノムについても同様に回収を行った。これらゲノムについては、品質、量ともに全エクソン解析、CGH マイクロアレイ解析、ビーズアレイ解析に供する条件を満たしていた。現在、イルミナ社シーケンサーで解析を行うためのライブラリー作製が終了した段階である。【結論】現在解析が進行中であるため、次年度以降、シーケンサーによる解析が完了後には、他のゲノム評価方法との比較検討を行い、簡便性、再現可能性、信頼性などについて総合的に評価することで、ゲノム不安定性を指標にした場合の標準的な方法論を提案する予定である。

A. 研究目的

新たな治療方法をもたらす可能性のあ

る再生医療は、機能不全となった細胞や組織を再生させ、これまで有効な治療法

のなかった疾患が治療できるようになると考えられており、世界的にも高い期待が寄せられている。細胞ソースとしては、患者自身の細胞のほかES細胞、最近開発されたiPS細胞（人工多能性幹細胞）が有望視されている。しかし実際は、承認を得て治療に成功している例は世界的にも少なく、現在我が国では、重症熱傷のための自家培養表皮、膝関節軟骨治療のための自家培養軟骨の2品目が薬事法の承認を得て上市されているのみである。一方、欧米をはじめとする世界各国においても、再生医療製品の研究開発が進められており、実用化に向けた競争が激化している。中でも、再生医療に用いる細胞として特に期待が高いのは、多能性幹細胞であるES細胞およびiPS細胞であり、2010年に、ES細胞を用いた臨床試験が、アメリカの企業ジェロン社およびアドバンスト・セル・テクノロジー（ACT）社ですでに実施されている。また、昨年9月、iPS細胞から網膜の細胞を作り、目の難病患者の網膜を再生させる臨床研究で、世界で初めてiPS細胞を用いた網膜移植も本国で実施された。しかし、細胞加工物等は未知・未経験な要素が多く、本格的な実用化に至るために検討すべき課題はまだ数多い。細胞加工物等は、非常に複雑な構造と「生きている」というこれまでの医薬品にない性質を持っており、新たな特性解析技術や品質管理法の開発、あるいは安全性確保のための適切な評価技術の開発が望まれている。

以上のような現状から、細胞加工物等の品質をコントロールすることは、生物薬品よりも更に困難であることが容易に

想像できる。なぜなら、細胞加工物等に関しては、意図した機能・薬効以外の品質特性（品質を評価する項目）を「漏れなく」把握する事が非常に困難であるからである。その理由は、上述のように、細胞加工物等が非常に複雑な構造と「生きている」というこれまでの医薬品にない性質をもつことによる。つまり細胞加工物等は、製品（細胞・組織）の「ばらつき」の所在が極めて不明確であり、潜在する「ばらつき」よる思わぬハザードが出現する危険性がある。この問題を解決する方法として、近年、基礎研究の分野でも広く使われているハイスループットのアッセイ系（所謂”Omics”）を利用して、細胞加工物等の品質特性を網羅的に探索する方法が考えられる。

これまでに、我々はhMSCを例にして、製品の「ばらつき」の所在（品質特性となりうる生理機能）をトランスクリプトーム解析によって網羅的に同定する方法の検討を行い、細胞加工物等の品質のばらつきの所在、即ち品質特性の候補を同定するツールとしてOmics解析が有用であること、およびその際にはサンプル以外に由来する誤差を慎重に吟味することが重要であることを見出し、その技術的問題点と解決法を報告した。本分担研究では、細胞加工物等の品質が製造過程での何らかの要因によって影響を受けることを想定し、その一つのモデルケースとして、製造工程の上流に位置するiPS細胞（原材料）の培養維持期におけるゲノム不安定性を指標にし、現在、Omics解析として最も注目されている次世代シーケンサーなどを用いた評価系を確立する

ことを目的としている。

## B. 研究方法

### B-1 iPS 細胞の培養

ヒト人工多能性幹細胞 (hiPS 細胞) は理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。購入した細胞株は 454E2 であった。hiPS 細胞の培養は、mTeSR1 (STEMCELL Technologies 社) の基礎培地 400mL に、専用のサプリメント (5X Supplement) 100mL を加え、0.1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む培地を調製し、マトリゲル (Corning 社) でコートされたディッシュを使用し、炭酸ガス濃度 5%、温度 37°C の条件下のもと培養を行った。細胞の継代は、細胞を D-PBS (-) で 2 回洗浄後、Dissociation Solution for human ES/iPS Cells 溶液 (ReproCELL 社) を添加し、37°C、炭酸ガスインキュベーターで 5 分程度加温し、hiPS 細胞のコロニーの周辺が剥がれかけた状態を確認後、D-PBS (-) で 3 回洗浄後、STEMPRO EZPassage (Life Technologies 社) を用いて hiPS 細胞のコロニーを剪断し、セルスクレーパーにて細胞を細胞塊が細かくなならないように剥離し、遊離した細胞を回収した。マトリゲルコートディッシュ上に、適切な希釈割合で細胞塊を播種し、37°C、5% 炭酸ガスインキュベーターで一晩培養を行い、翌々日から毎日 1 回、mTeSR1 で培地交換を行った。継代によるゲノム変異への影響を観察するために、0、3、6、9、12、15 継代目 (約 4 ヶ月間の培養) の hiPS 細胞を上述の方法で回収し、ゲノム抽出操作まで凍結状態で保存した。また、凍結融解がゲノム不安定性へ与える影響について

も観察を行うために、ガラス化凍結法により hiPS 細胞の凍結を行った。液体窒素を発泡スチロールの容器に入れ、クリーンベンチの近くに準備した。クライオバイアルを凍結する本数準備し、細胞がサブコンフルエントの状態になるまで培養し、上述の方法にて細胞を回収した (60mm ディッシュでサブコンフルエントの細胞の場合、1~2 本のバイアルを準備)。このとき、複数本凍結する場合は、細胞ペレットを氷冷しておき、一本ずつ以下の操作を行った。StemCell Keep (Bio Verde 社) を 200 $\mu$ L 加え、良くピペッティングし、ふたをしてなるべく早く (1 分以内が目安) バイアルごと液体窒素に浸漬し、液体窒素タンクで保存した。解凍操作は、37°C で暖めた培地を準備し、9mL の培地を入れた本数分の遠心管を用意し、凍結バイアルのふたをあげ、素早く 1mL の温めておいた mTeSR1 培地を添加し、ピペッティングして溶解した。9mL の培地の入った遠心管に全量を移し、遠心して洗浄を行い、マトリゲルコートディッシュ上に播種し、培養を上述の方法にて実施した。この時、10 $\mu$ M Y-27632 (和光純薬工業) を培地に添加した。以上の凍結融解時で得られた細胞を回収し、その後のゲノム抽出に供した。

### B-2 iPS 細胞からのゲノム抽出

iPS 細胞からのゲノム抽出は、NucleoSpin Tissue (MACHERY-NAGEL 社) を用いて行った。hiPS 細胞を回収し、Buffer T1 200  $\mu$ l に懸濁し、Proteinase K 溶液 25  $\mu$ l、Buffer B3 200  $\mu$ l を加え、70°C で 10~15 分間インキュベートした。96~100%エタノール 210  $\mu$ l を添加し、よく混