平成２７年度

再生医療の産業化に向けた評価基盤技術事業

（再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発）

事業報告書

事　業　名	再生医療の産業化に向けた評価基盤技術事業 （再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発）
研究開発課題名	低侵襲移植を特徴とした自家培養軟骨
研究開発担当者 所属 役職 氏名	オリンパスRMS　株式会社 代表取締役　社長　森山　剛

目次

1．事業の目的

軟骨組織は自己再生能が低く外傷等による軟骨欠損症に対する根本的治療法がない。軟骨欠損症は長い年月をかけて変形性膝関節症に移行し、人工関節置換術や介護が必要なロコモシンドローム（運動器障害）となることが問題である。軟骨欠損症の治療として、2013 年に J-TEC 社のジャックが日本発の培養軟骨製品として市販された。しかし、既存の培養軟骨製品の多くは、骨膜の採取･縫合による移植部分の保定が必要で、大きな手術侵襲を伴うという短所があった。

本事業で対象となる培養軟骨製品は手術時に軟骨細胞をハイドロゲルと混合して注入する製品である。軟骨細胞をハイドロゲルと注入することで、これまでの製品で実施されている骨膜の採取･縫合を不要とした。さらに、関節鏡視下の移植が可能で、外科的な切開が小さく、患者への侵襲性が極めて低いため、患者の疼痛の低減や手術時間の短縮が図れる。これらの点は既存の国内外の他社製品にはない本製品独自の長所である。

本事業では、これまで薬事戦略相談時に得られた PMDA からの指摘事項および助言を踏まえ、当該製品を事業化するために今後重要になると思われる評価手法、具体的には製造の効率化や臨床評価の課題について、下記の２つの大課題を設定し、５つのテーマを実施する。

【１】軟骨細胞の有効性を担保する評価手法の確立

＜項目１＞ 変形性関節症患者由来軟骨細胞と正常軟骨細胞の同等性の評価手法の開発

＜項目２＞ 光学的に軟骨再生を評価する手法の開発

＜項目３＞ MRI による軟骨再生評価条件の標準化

【２】軟骨細胞の培養および試験の効率化

＜項目４＞ 非侵襲イメージングを活用した工程管理手法の開発

＜項目５＞ 再生医療等製品に適合されるマイコプラズマ否定試験手法の開発

上記５テーマに挙げられた評価手法は、当該製品のみならず、他の培養軟骨製品、更には他の再生医療等製品に広く資するものと考える。

2. 実施内容及び結果

【１】軟骨細胞の有効性を担保する評価手法の確立

＜項目１＞ 変形性関節症患者由来軟骨細胞と正常軟骨細胞の同等性の評価手法の開発

・本年度は、OA と非 OA 細胞の同等性を評価する少数の軟骨細胞評価マーカーを「同等性アッセイ」として抽出・構築し、治験時に実施する特性解析方法を確立・検証した。

・弘前大学、大阪大学との共同研究で実施した、平成２６年度の先行事業(平成２６年度「再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業(再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発)」(軟骨欠損症、低侵襲移植を特徴とした自家培養軟骨)）の成果を元に、OA 軟骨および非 OA 軟骨の類似点・相違点を代表する遺伝子発現量・表面マーカー・基質量などから少数のマーカーを抽出し下記のような同等性アッセイを構築した。項目の抽出方法は、生物学的な意義の観点、統計学的な観点、少数の細胞で実施するフィージビリティを考慮して行った。

【同等性アッセイ】

遺伝子発現：COL1,2、AGCN、SOX9、IL-6,8、MMP1,3

表面マーカー：CD90、CD105

基質産生能：GAG、COL1/COL2 比

・上記同等性アッセイが、OA 軟骨および非 OA 軟骨の類似点・相違点を代表しているかどうかの検証を、弘前大学・大阪大学との共同研究で実施した。その結果、平成２６年度の先行研究で示された通り、炎症系の因子に関しては OA 軟骨と非 OA 軟骨を比較すると OA 軟骨で高い発現を認めたが、増殖特性、細胞表面マーカーや軟骨の再分化に関する遺伝子発現、さらに軟骨細胞への再分化能については大きな相違はないということが確認された。また治験時の特性解析で実施するために上記同等性アッセイをオリンパス RMS 社内で構築し、同一検体を用いて、弘前大学と大阪大学で分析を行い、同様に分析が可能であることを確認した。

＜項目２＞ 光学的に軟骨再生を評価する手法の開発

・平成２６年度の先行事業では、オリンパス㈱より提供された特殊光分析装置及びラマンプローブによって、軟骨再生や軟骨変性の評価の可能性が示唆された。

・本年度は、再生軟骨や変性軟骨を実験的に (ex vivo モデル) 作製し、硝子軟骨、線維軟骨、混合(Mixed) といった軟骨の再生状態の違いや軟骨変性の状態をラマンスペクトルを用いた特殊光分析によって定量的に分析できる可能性が示された。

・ウサギ膝軟骨正常部位をラマン顕微鏡によりラマン信号をイメージ分析し、組織像と比較し、硝子軟骨に特徴的な基質であるⅡ型コラーゲン、線維軟骨を構成するⅠ型コラーゲン、正常軟骨の主たる構成基質であるプロテオグリカン(GAG)の判別が可能であることが示された。

・ウサギの滑車溝に全層軟骨欠損を作製し、培養軟骨を用いないマイクロフラクチャーという手技で、線維性軟骨を中心とする未熟な再生軟骨を誘導し、組織学的スコアとラマンスペクトルとの対応について評価した。軟骨再生の指標である ICRS スコアと、ラマンスペクトル分析から得られたⅠ型・Ⅱ

型コラーゲン・硫酸化 GAG の総タンパク質量に対する相対量との間に高い相関性が見られた。
・ブタの大腿骨内側顆に全層軟骨欠損を作製し、ブタ自家培養軟骨細胞移植群と自然修復群との比較を行った（2 週、4 週、8 週）。ラマンスペクトルを主成分解析し、その特徴量と、軟骨の状態：「半月板（線維軟骨）、自然修復群（間質性組織、線維軟骨が多い）、細胞移植群（線維軟骨から硝子軟骨へ成熟）、正常軟骨(硝子軟骨)　」に相関が見られた。
・ヒトの OA 患者由来軟骨摘出組織のラマンスペクトルから算出された硫酸化 GAG の相対量と、生化学分析にて定量した GAG 量は相関傾向にあった。また、コラーゲン分子構造に対応する特徴量と組織学的スコアとの対応が見られた。

＜項目３＞ MRI による軟骨再生評価条件の標準化

・治験時において MOCART スコアを中心とする MRI を用いた治験の軟骨再生の副次的評価指標を適切に評価するために、イメージング CRO を活用し、撮像条件及び評価方法の標準化を行った。
・治験候補施設の膝軟骨 MRI 撮像条件の調査を行い、多くの施設は 3T MRI を所有し、3D や T2 マッピングなどのアドバンスなイメージングを活用していることが分かった。また各施設で使用している機材、撮像シーケンスやパラメータはそれぞれ異なっていることが判明した。
・医学専門家との討議の結果、副次的評価指標に用いている軟骨再生の評価として国際的に用いられている MOCART に加え、軟骨再生による治療機序に関わる軟骨欠損の充填量、痛みなどの臨床評価と相関の高いのう胞や骨棘など軟骨下骨の障害、および軟骨の質と関連する指標である T2 マッピングの測定を行い、補足的情報として記録することとし、「MRI 画像評価手順書」を作成した。
・上記に基づいて、医学専門家、放射線医、イメージング CRO の３者で撮像条件の整合を行った。MOCART および軟骨再生の量、軟骨下骨の状態、軟骨の質を判別するために、必要十分な６つの撮像シーケンスを選択し、全ての施設でメーカー・機種が異なっても共通のパラメータで実施可能なように、1.5T と 3T MRI 両方に対応したパラメータを設定し、「MRI 撮像実施手順書」を作成した。

【２】軟骨細胞の培養および試験の効率化

＜項目４＞ 非侵襲イメージングを活用した工程管理手法の開発

・平成２６年度の先行事業において、オリンパス㈱より提供された非侵襲イメージング装置による培養中の細胞数測定の可能性が示された。本年度は細胞数測定の精度を実際の製造現場で活用できるレベルに向上する検討を行った。細胞の増殖・製造段階に応じて細胞検出パラメータの最適化を行うことで、ばらつきの圧縮を行うことができた。最適化した細胞検出パラメータを用いて、15 検体のヒト軟骨細胞を培養して回収できた細胞数と本非侵襲イメージング装置での測定の差異を検討し、当初の目標である±20%の正確度から大きく外れず測定が可能であった。また、細胞密度を経時的にモニタリングできることから、継代のタイミングの予測が容易で工程内管理手法としても活用できる可能性が示唆された。
・また、ヒト軟骨細胞を用いて第１継代（初代培養：P1)、第２継代(P2)、第３継代(P3)と増殖曲線を作成し、各点で細胞を回収して計測した真値と比較した。結果、本非侵襲イメージング装置で増殖曲線を作成することができ、真値と比較しても統計学的な有意差は認めなかった。これにより、治験時の

細胞の特性解析の一環として、非侵襲イメージングを用いた細胞の増殖特性の計測が可能であることが示された。

・平成２６年度の先行事業において、画像解析により抽出された、細胞の形態学的特徴量により、表面マーカー等での区別が困難な滑膜細胞および軟骨細胞が分離可能であることが示唆された。本年度の検討ではk-means法、主成分解析、およびロジスティック回帰分析で、滑膜細胞と軟骨細胞が分離できることが確認でき、更に特定の画像特徴量を分離軸とすることにより、滑膜細胞および軟骨細胞を分離できることが示された。

・非侵襲イメージング装置によりStaphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicansをモデル菌として、軟骨細胞画像中からのコンタミ検出のフィージビリティを検討した。その結果、通常の細胞観察で用いられるx10～x20の対物倍率の顕微鏡画像を画像処理することによって、$1x10^6$CFU/ml以上の濃度での夾雑微生物検出の可能性があることが確認できた。

<u>＜項目５＞ 再生医療等製品に適合されるマイコプラズマ否定試験手法の開発</u>

・細胞･組織加工製品のマイコプラズマ否定試験を日本薬局方（局方）に適合させるためには約１ヶ月の期間が必要で、移植前に試験結果が判明しないという課題がある。本年度は、医薬品の承認に使用実績のあるRoche Diagnostics社製MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Kitを用いて、第十七改正日本薬局方改正案に従って、検討を実施し、PCR法による当該製品のマイコプラズマ否定試験法の確立を行った。

・最初に検体がMycoTOOLキットの反応に阻害しないことを確認した。次に、マイコプラズマを接種した最終製品にてPCR法によるマイコプラズマ否定試験を6回繰り返して行い、キットの特異性、検出感度を検討した。第十七改正日本薬局方で指定される7種類のマイコプラズマ菌種に対して、いずれも5 CFU/検体が検出できることを確認した。

3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容

【１】軟骨細胞の有効性を担保する評価手法の確立
＜項目１＞ 変形性関節症患者由来軟骨細胞と正常軟骨細胞の同等性の評価手法の開発

1. 課題

自己由来軟骨細胞製品の開発においては、一般に複数の対象疾患での適応を想定するため、治験前に各対象疾患由来の軟骨組織を原材料とした非臨床試験（製法、品質特性、安全性等）が要求されている。しかしながら倫理的な観点からは、これら非臨床試験に使用できる組織は医療機関で廃棄されるものであり、特に健常者由来の正常軟骨組織を入手することは困難である。現状、我々が入手できる軟骨組織は、人工関節置換術の際に膝関節軟骨組織を切除･破棄する変形性関節症（以下、OA）患者由来軟骨組織のみである。このようなOA患者由来軟骨組織から分離した軟骨細胞で確立した製造工程に基づいて実施される品質評価法および安全性試験は、正常な軟骨組織由来のものと同等であるかを治験で再検討するよう審査の際には求められている（２０１２年６月５日、独立行政法人医薬品医療機器総合機構審査報告書（ジャック）　p14)。当社の培養軟骨においても、PMDAより下記の相談結果を得ている。

> 【PMDA相談結果：薬事戦略相談　対面助言記録】
> 「これまでに製造した本品の原材料である軟骨組織と、治験品の原材料である軟骨組織は、（中略）由来の異なる患者あるいは被験者の病態が異なるため、品質特性が異なる可能性があると考える。本品の最終的な規格設定に関しては、品質の特性解析の試験成績と臨床上の安全性および有効性の試験成績を踏まえて検討する必要があることから、（中略）治験品を用いて可能な限り幅広く解析を実施し、情報収集する必要がある。」

そこで、平成２６年度「再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業（再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発)」（軟骨欠損症、低侵襲移植を特徴とした自家培養軟骨）の先行事業では、培養した軟骨細胞の細胞表面マーカーの経時変化、特徴的な遺伝子発現パターン、３次元培養アッセイによる培養軟骨細胞の軟骨形成能という複数の解析方法により、OA患者由来軟骨組織（以下、OA軟骨）と外傷等患者由来の軟骨組織（以下、非OA軟骨）から培養した軟骨細胞の品質特性上の相違点を明確にし、外挿可能な評価項目や基準値等について考察した。結果、炎症系の因子に関してはOA軟骨と非OA軟骨を比較するとOA軟骨で高い発現を認めたが、増殖特性、細胞表面マーカーや軟骨の再分化に関する遺伝子発現、さらに軟骨細胞への再分化能については大きな相違はなかった。本結果から、培養軟骨の製造工程や品質管理項目、出荷試験の有効性に関わる規格等の検討においては、非OA軟骨細胞においても、OA軟骨細胞で確立された製造法や規格が外挿できる可能性が示唆されたと考えた。一方で、治験で入手可能な細胞は治験製品製造時の余剰細胞であり、細胞数が極めて限定されるため、平成２６年度先行事業で得た成果を活用してOA軟骨および非OA軟骨の類似点・相違点を代表する遺伝子などの少数のマーカーを抽出し、同等性アッセイを確立した。また、先行事業では分析を共同研究先で行っていたことから、治験での実施に向け当社にて同等性アッセイ法を確立し、共同研究先との検証を行った。

2. 実施事項

2-1. 概要

平成 26 年度での先行事業の結果から、OA 軟骨および非 OA 軟骨の類似点・相違点を代表するマーカーを、遺伝子発現、表面マーカー、基質産生量から抽出した。項目の抽出方法は、生物学的な意義の観点、統計学的な観点、少数の細胞で実施するフィージビリティを考慮して行った。さらに、細胞の増殖特性など、同時に実施する他の特性解析も組み込んで、治験時に入手可能な少数の細胞で実施可能な同等性アッセイとして確立した。上記の同等性アッセイが、OA 軟骨と非 OA 軟骨を用いて、細胞表面マーカーの経時変化、軟骨細胞の特徴的な遺伝子発現パターン、３次元培養アッセイによる培養軟骨細胞の軟骨形成能、を反映していることを検証した。なお、先行事業では分析を共同研究先（弘前大学、大阪大学）で行っていたことから、当社にて同等性アッセイ法で用いる分析法の確立を行い、共同研究先との検証も行った。

2-2. 具体的な実施内容と結果

2-2-1. 同等性アッセイ項目の抽出

平成 26 年度での先行事業の OA 軟骨および非 OA 軟骨の類似点・相違点を表１－１にまとめる。

表１－１．OA 軟骨および非 OA 軟骨の類似点・相違点のまとめ

項目	検討手法		類似点	相違点
増殖特性	単層培養	細胞数測定	・培養日数 ・回収細胞数	－
遺伝子発現	単層培養	PCR 法	・軟骨再生・分化関連遺伝子※1	・炎症系サイトカイン（P1）※2 ⇒OA 軟骨＞非 OA 軟骨 ・軟骨分解酵素（P1）※3 ⇒OA 軟骨＞非 OA 軟骨
	三次元培養（再分化）		・軟骨再生・分化関連遺伝子※1	－
	三次元培養（加圧）		・軟骨再生・分化関連遺伝子※1	・炎症系サイトカイン（P1）※2 ⇒OA 軟骨＞非 OA 軟骨 ・軟骨分解酵素（P1） ⇒OA 軟骨＞非 OA 軟骨※3
表面マーカー	単層培養	FCM 法	・間葉系幹細胞のマーカー※4	－
基質産生量	三次元培養	生化学分析	・コラーゲン ・グリコサミノグリカン	－
		組織学的検査	・ヒト抗Ｉ型コラーゲン ・ヒト抗Ⅱ型コラーゲン ・サフラニンＯ	－

※1 Collagen Type Ⅰ、Collagen Type Ⅱ、Aggrecan、SOX9

※2 IL-6、IL-8

※3 MMP1、MMP3

※4 CD90、CD105

表１－１の結果から OA 軟骨および非 OA 軟骨の類似点・相違点を代表するマーカーを、増殖特性、遺伝子発現、表面マーカー、基質産生量から抽出した。治験では治験製品の製造及び出荷と同時並行して余剰細胞を用いて図１－１に示す同等アッセイを含んだ特性解析を行う。

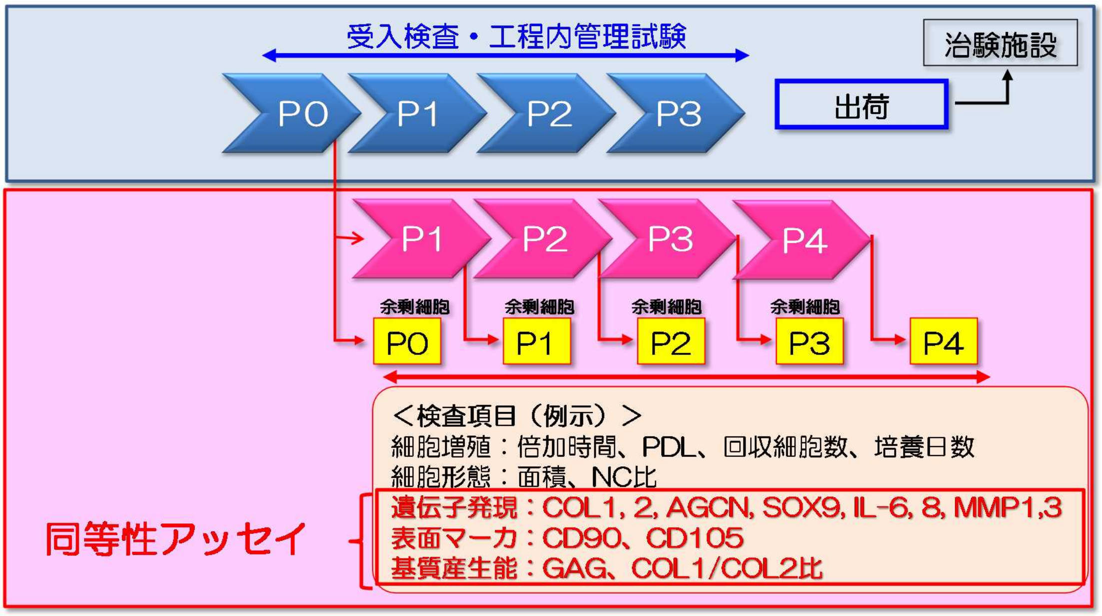


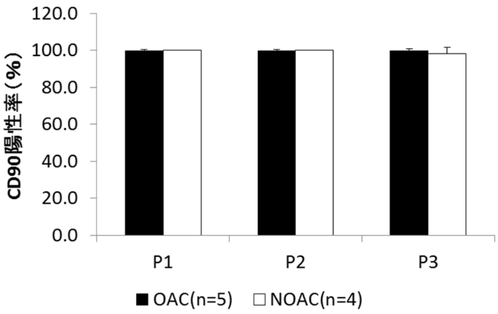
図１－１．治験時の特性解析（同等性アッセイを含む）

2-2-2．細胞表面マーカーの検証（弘前大学）

OA 軟骨（5 ドナー）と非 OA 軟骨（4 ドナー）から調製した各 Passage の細胞について、フローサイトメーターを用いて細胞表面マーカーの変化について検証した。細胞表面マーカーは、同等性アッセイで抽出した CD90 と CD105 を選択し、OA 軟骨と非 OA 軟骨の類似マーカーとして検証した。また、細胞集団の確認を目的として昨年度の先行事業でも分析した間葉系幹細胞の表面マーカーについても検討した。細胞表面マーカーは、CD11b、CD19、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105、CD166、HLA-DR について検討を行った。

結果、両群共に CD90（＋）はほぼ 100%、CD105（＋）は個体差があるものの 50%～80%であった。また、細胞は CD11b(–)、CD19 (–)、CD34 (–)、CD44 (＋)、CD45 (–)、CD73 (＋)、CD166 (–)、HLA-DR (–) で先行事業と同じ細胞集団であることが確認できた（図１－２）。

以上より、同等性アッセイとして抽出した CD90 と CD105 が OA 軟骨と非 OA 軟骨の類似マーカーであることが検証できた。また、同等性アッセイでは CD90 と CD105 に加えて、CD11b などの陰性マーカーも組み入れることで細胞集団の確認も行う予定とした。



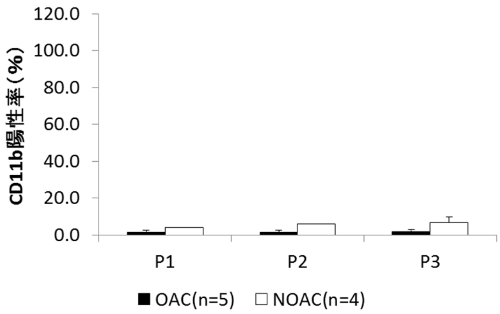


図１－２．細胞表面マーカーの継代に対する変化
左がCD90、右がCD11b

（OAC:OA由来軟骨細胞、NOAC：非OA由来軟骨細胞）

2-2-3. 特徴的な遺伝子発現パターンの検証

2-2-3-1. 単層培養及びペレット培養における軟骨関連遺伝子の発現パターン（弘前大学）

OA 軟骨（7 ドナー）と非 OA 軟骨（7 ドナー）から調製した各 Passage の細胞から mRNA を回収し、同等性アッセイとして抽出した軟骨の脱分化や再分化に関する遺伝子（COL1A1、COL2A1、SOX9、AGCN）の発現量をリアルタイム PCR 法で分析し、両群共に継代に伴い脱分化するかを検証した。さらに、P4 の細胞を用いて 3 次元ペレット培養を約 3 週間行い、細胞から mRNA を回収し、上記と同様の遺伝子について発現量を PCR 法で分析し、両群共に同程度の再分化能を有しているかを検証した。なお、ペレット培養には軟骨分化因子が添加された市販の培地を用いた。遺伝子発現量の解析は P1 の発現量を基準としたΔΔCT 法を用いた。

結果、単層培養では両群共に COL1A1 は継代により増加傾向、COL2A1 と SOX9 は継代により減少傾向を示し、脱分化していることを示唆する結果であった。三次元ペレット培養では三次元培養を行うことで両群共に軟骨細胞分化因子である、COL2A1、SOX9、AGCN 等が上昇傾向を示し、軟骨細胞への再分化能については同等の結果であった（図１－３）。

以上より、同等性アッセイとして抽出した軟骨細胞の脱分化や再分化に関する遺伝子(COL1A1、COL2A1、SOX9、AGCN) が OA 軟骨と非 OA 軟骨の類似性を代表するマーカーであることが検証できた。

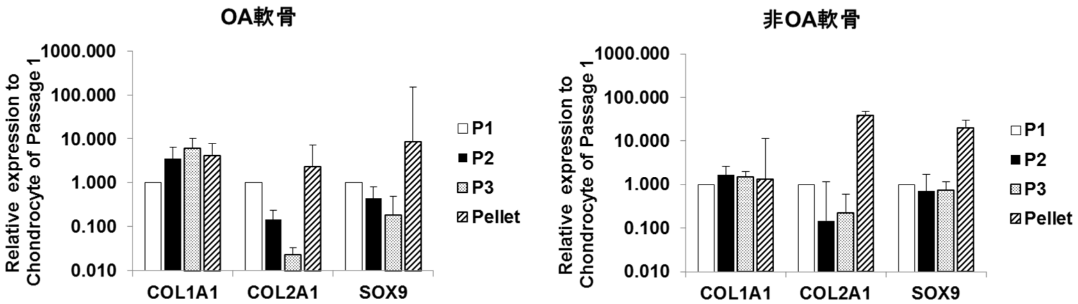


図１－３．OA 軟骨と非 OA 軟骨の軟骨関連遺伝子発現パターン
左が OA 軟骨、右が非 OA 軟骨

2-2-3-2. 単層培養及び三次元加圧培養における特徴遺伝子の発現パターン（大阪大学）

2-2-3-2-1. 単層培養

OA 軟骨（8 ドナー）と非 OA 軟骨（5 ドナー）から調製した各 Passage の細胞から mRNA を回収し、同等性アッセイとして抽出した炎症系遺伝子（IL-6、IL-8)、軟骨分解酵素遺伝子（MMP-1、MMP-3）の発現量をリアルタイム PCR で分析し、これらの遺伝子は P1 で OA 軟骨が非 OA 軟骨に比較して高発現で、P3 ではその差が収束するかを検証した。

結果、OA 軟骨は非 OA 軟骨と比較して、基質分解酵素である MMP-1 と MMP-3、軟骨分化因子である SOX9、軟骨の特徴的基質である COL2A1 は、P1 で高い発現量傾向を示したが、P3 ではその差は収束していた。一方で、炎症系遺伝子である IL-6 と IL-8 につては個体差が大きく OA 軟骨と非 OA 軟骨で発現量に差を認めなかった。(図１－４)。

以上より、同等性アッセイとして抽出した軟骨分解酵素遺伝子（MMP-1、MMP-3）は OA 軟骨由来細胞と非 OA 軟骨由来細胞の相違を代表するマーカーであることが検証できた。一方で、相違を代表するマーカ

ーとして抽出した炎症系遺伝子（L-6、IL-8）については、本年度の検討で OA 軟骨由来細胞と非 OA 軟骨由来細胞との相違は検証出来なかった。本遺伝子は個体差が大きいことから解析対象数を追加して検討し、同等性アッセイに組み入れるかを検討することとした。

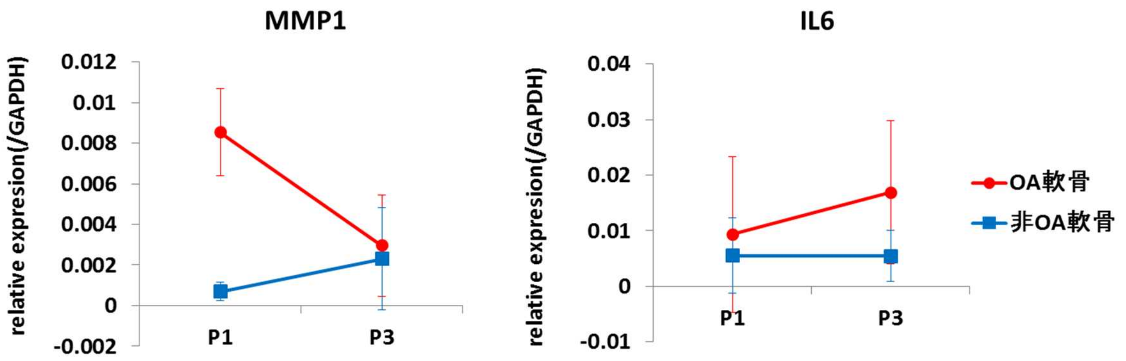


図１－４．単層培養における MMP1 と IL6 の遺伝子発現量

2-2-3-2-2. 三次元加圧培養

OA 軟骨（5 ドナー）と非 OA 軟骨（6 ドナー）から調製した細胞を大阪大学が開発した三次元加圧培養装置で圧縮負荷をかけ、同等性アッセイとして抽出した炎症系遺伝子（IL-6、IL-8）と軟骨分解酵素遺伝子（MMP-1、MMP-3）の発現量をリアルタイム PCR で分析し、これらの遺伝子は三次元加圧培養装置で加圧することで OA 軟骨が非 OA 軟骨に比較して高発現であるかを検証した。培養条件は平成２６年度の先行事業の成果を元に設定した。具体的な手法は、軟骨細胞をコラーゲンスポンジに播種し、3 日間培養した後、三次元加圧培養装置で 0kPa、20kPa、40kPa の加圧（0.5 Hz）を行い、静置培養 12 時間後にコラーゲンスポンジから RNA を回収し、PCR で遺伝子発現量を解析した。

結果、炎症系遺伝子である IL-6 と IL-8、基質分解酵素遺伝子である MMP-1 と MMP-3 は加圧により OA 軟骨が非 OA 軟骨に比べて高い発現傾向を示した（図１－５）。

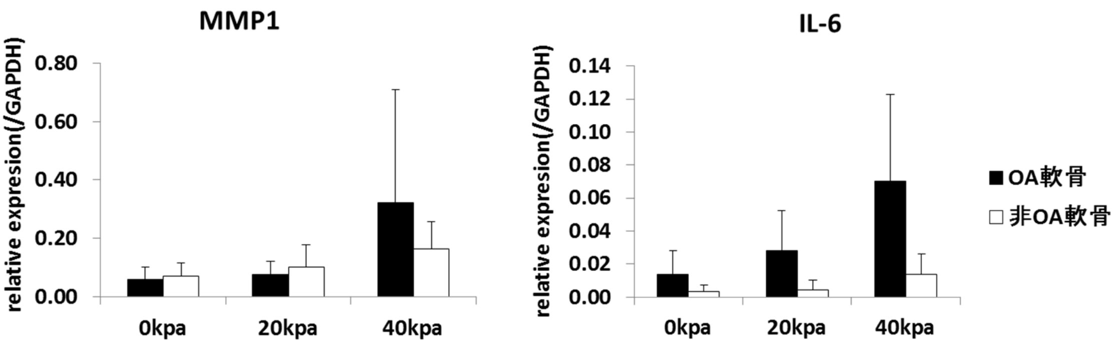


図１－５．三次元加圧培養による MMP1 と IL-6 の遺伝子発現パターンの変化

2-2-4. オリンパス RMS 社における分析法の確立

2-2-4-1. 同等性アッセイで用いる分析法の確立

平成 26 年度での先行事業では分析を共同研究先（弘前大学、大阪大学）で行っていたことから、本年度は治験での実施に向けて、当社で同等性アッセイ法の確立を行った。具体的にはリアルタイム PCR 法と FCM 法を導入し、確立した。また、リアルタイム PCR 法に比較して少量の細胞数で遺伝子発現量の分析が可能なデジタル PCR 法も導入し、確立した。治験における特性解析の一部である「同等性アッセイ」として、これら手法を用いて行う準備が完了した。

2-2-4-2. 施設間の検証

当社で確立したリアルタイム PCR 法及び FCM 法について、同一検体を用いてこれまで分析を行ってきた共同研究先（弘前大学、大阪大学）と同様に分析可能かを評価した。リアルタイム PCR 法については 3 ドナーの OA 軟骨を用いて弘前大学とは 6 つ、大阪大学とは 5 つの遺伝子について発現量を比較検討した。FCM 法については 2 ドナーの OA 軟骨と非 OA 軟骨を用いて 2 つの表面マーカーについて検討した。

結果、リアルタイム PCR 法では分析した全ての遺伝子の発現量について両施設間に統計学的な有意差を認めなかった（図１－６）。FCM 法については 2 ドナーでの検討であったので統計学的な手法を用いて検討はできなかったものの陽性率の発現傾向は同様であった（図１－７）。

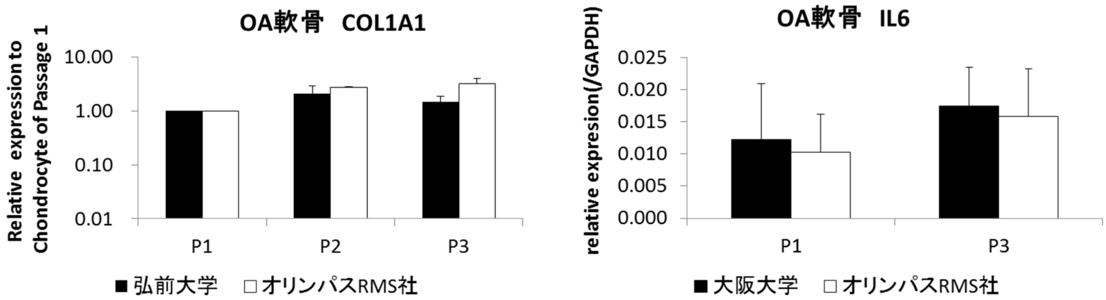


図１－６．同一検体を用いた両施設間の検討（リアルタイム PCR 法）

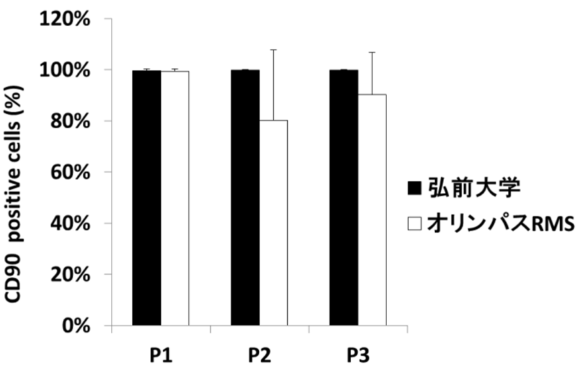


図１－７．同一検体を用いた両施設間の検討（FCM 法）

＜項目２＞ 光学的に軟骨再生を評価する手法の開発

1. 課題

薬食発第 0208003 号（平成 20 年２月８日発行）「ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」第７章　臨床試験　において、臨床試験では適切なエンドポイントを設定して実施する必要があると記載されている。

現在培養軟骨の再生状態を評価する非侵襲的な評価手法として主に MRI が用いられている。培養軟骨では、再生された軟骨が、生理学的に正しい軟骨（Ⅱ型コラーゲンを中心とする硝子軟骨）か将来的に変形性関節症へとつながる線維軟骨（I 型コラーゲンを中心とする）であるかが長期間に渡る有効性を予測するために重要である。しかし、MRI ではこのような再生軟骨の質的な評価を行うことが難しい。正確に判定する方法は、免疫染色による組織学的評価が主な方法であるが、そのためにはバイオプシーが必要であり、侵襲が大きく、臨床現場では実施が困難である。

平成２６年度の先行事業ではオリンパス㈱より提供された試作低侵襲特殊光分析装置および細径のプローブ（図２－１）を用い、ブタ膝軟骨（硝子軟骨モデル）およびブタ半月板（線維軟骨モデル）について、ラマンスペクトルにもとづく光学的判別が出来ることが判明した。さらに、本ラマンプローブを用いて、摘出されたヒト変形性関節症(OA)の軟骨組織の組織変性度に対応したラマンスペクトルの特徴的な変化が検出され、試作低侵襲特殊光分析装置および細径のラマンプローブを用いた硝子軟骨と線維軟骨の光学的判別の可能性およびヒト軟骨組織のラマンスペクトルの測定のフィージビリティが確認できた。しかし、一般的には培養軟骨は硝子軟骨と線維軟骨が混合されたような Mixed と呼ばれる形で再生されることが多く、再生軟骨の質の診断を行う必要があり、本年度は特殊光分析によってどのように分析可能かを検討した。

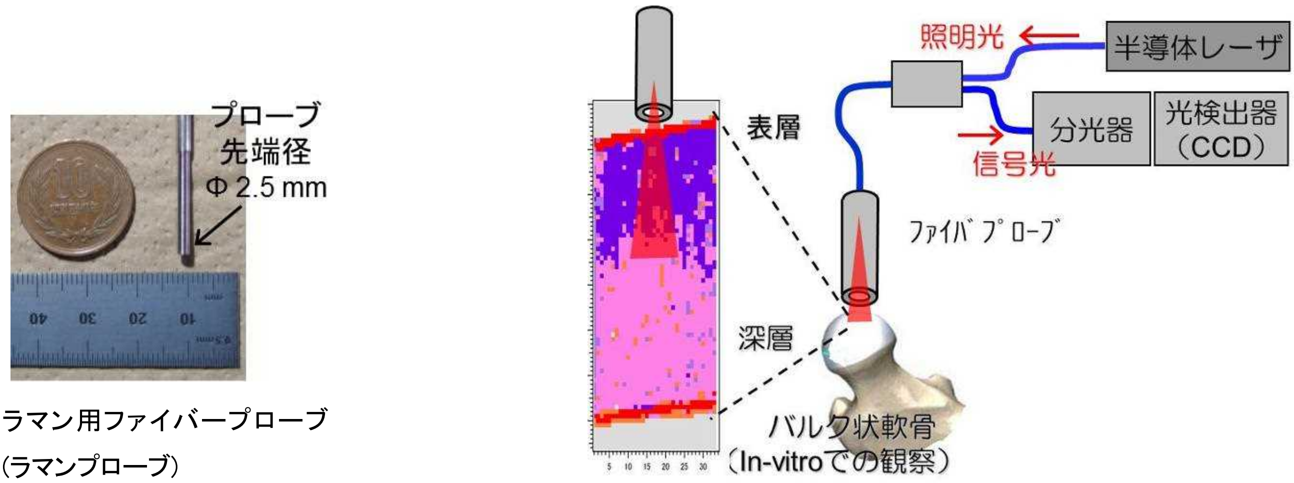


図２－１．オリンパス㈱より提供された低侵襲特殊光分析装置の構成

2. 実施事項

2-1. 概要

本年度は、再生軟骨等を実験的に（ex vivo モデル）作製し、硝子軟骨、線維軟骨、Mixed、変性軟骨を特殊光分析によってどのように分析可能か検討した。また、ヒト OA 軟骨組織を用いて特殊光分析結果と組織像や生化学分析の定量データとの比較を行い、ヒト組織の特殊光分析の精度向上についても検討

した。

2-2. 具体的な実施内容と結果

2-2-1. 再生軟骨 ex vivo モデルの作製と、硝子軟骨、線維軟骨、Mixed　の特殊光分析

硝子軟骨、線維軟骨、Mixed、変性軟骨などの様々な質の軟骨を作製し、特殊光分析で解析することを目的として表２－１に示す動物モデルを ex vivo で作製した。なお、測定に用いる低侵襲特殊光分析装置および細径のプローブは約 1mm 以下の軟骨を分析すると軟骨下骨のシグナルがノイズとなり分析精度が低下することが判明しており、軟骨が 1mm 以下のウサギでは顕微鏡タイプの装置で特殊光分析を行った。

表２－１．ラマンスペクトルの分析に用いた動物モデルの一覧

	動物モデル①	動物モデル②	動物モデル③
動物種	ウサギ	ウサギ	ブタ
動物モデル	軟骨再生	軟骨変性	軟骨再生
モデル作製方法	滑車溝に全層軟骨欠損を作製し、マイクロフラクチャーで骨髄由来細胞を誘導。	下肢膝内側半月板を部分切除。	大腿骨内側顆に全層軟骨欠損を作製し、ブタ自家培養軟骨細胞を移植。
特殊光分析	顕微鏡	顕微鏡	低侵襲特殊光分析装置
評価手法	組織像	組織像	組織像、生化学分析

2-2-1-1. 動物モデル①：ウサギ再生軟骨

６匹のウサギの下肢滑車溝に直径３mm、深さ３mm 程度の全層軟骨欠損を作製し、マイクロフラクチャーという手技で、軟骨再生を促した。モデル作製後は 2W（3 匹）と 5W（3 匹）後に剖検して膝を摘出した。摘出した膝はホルマリンで固定し、HE 染色、マッソントリクローム染色、サフラニンO染色、抗ウサギⅡ型コラーゲン染色、の組織学標本を作製した。特殊光分析は未染色の組織学標本を用いて顕微鏡タイプの装置で分析を行った。

まず、ウサギ膝骨軟骨組織の正常部位についてラマン信号をイメージ分析した。結果、Ⅰ型コラーゲン、Ⅱ型コラーゲン、プロテオグリカン(GAG)の判別が可能であり、特異性は高いと思われた。(図２－２)。

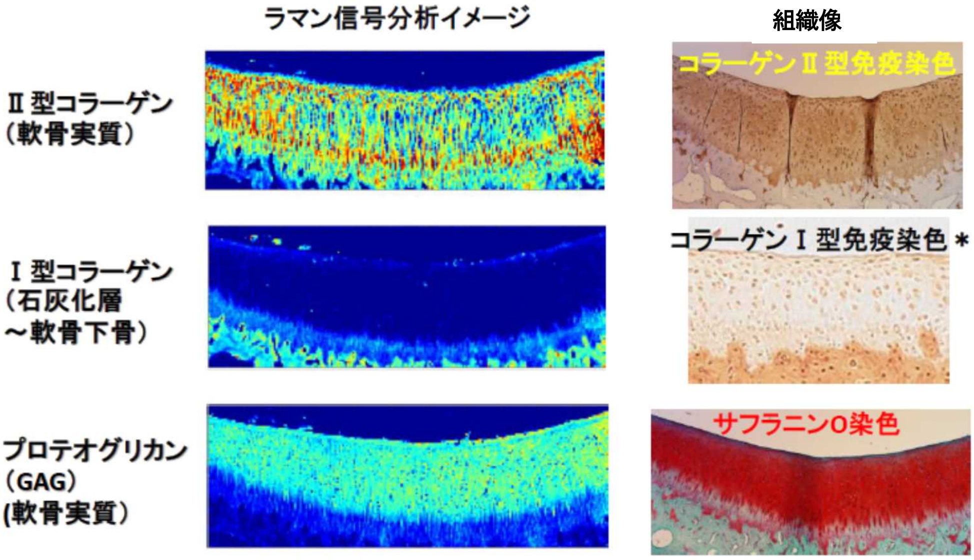


図２－２．ウサギ膝関節の骨軟骨標本のラマン信号と組織像

＊印：写真のみ Rani S et.al, J Bone Joint Surg Am, 2000 Feb; 82 (2): 151 -60 より引用

次にウサギの再生軟骨の組織学的スコアとラマンスペクトルとの対応について評価した。組織学的スコアは軟骨再生の指標である ICRS Score を選択し、非該当の１項目を評価項目から除外して 18 点を満点として評価した。組織学的所見では処置 2W 後は線維性軟骨、5W 後は軟骨様組織に修復されているが GAG と抗ウサギⅡ型コラーゲンの染色性は正常に比較して低下していた（図２－３）。ラマンスペクトルについては、全タンパク量、硫酸化 GAG、コラーゲン総量、Ⅰ型・Ⅱ型コラーゲン量に対応する特徴量を抽出し、（１）全タンパク量に対する硫酸化 GAG の相対量、（２）全タンパク量に対するコラーゲン相対量、（３）Ⅰ型・Ⅱ型コラーゲンの相対量、を指標とした。結果、硫酸化 GAG の相対量について ICRS Score と相関性の高い変化を見せた（図２―４）。全タンパク量に対するコラーゲン相対量についても同様の傾向であった。Ⅰ型・Ⅱ型コラーゲンの相対量については修復過程の処置 2W 後ではⅡ型コラーゲン相対量が低下し、Ⅰ型コラーゲンが上昇、修復が進んだ処置 5W 後では逆にⅡ型コラーゲン相対量が上昇し、Ⅰ型コラーゲンが低下し、軟骨再生の過程を確認することが出来た（図２－５）。

以上の結果から、Ⅰ型・Ⅱ型コラーゲン、GAG の組成差から硝子軟骨、Mixed 軟骨、線維軟骨を識別できる可能性が示唆された。

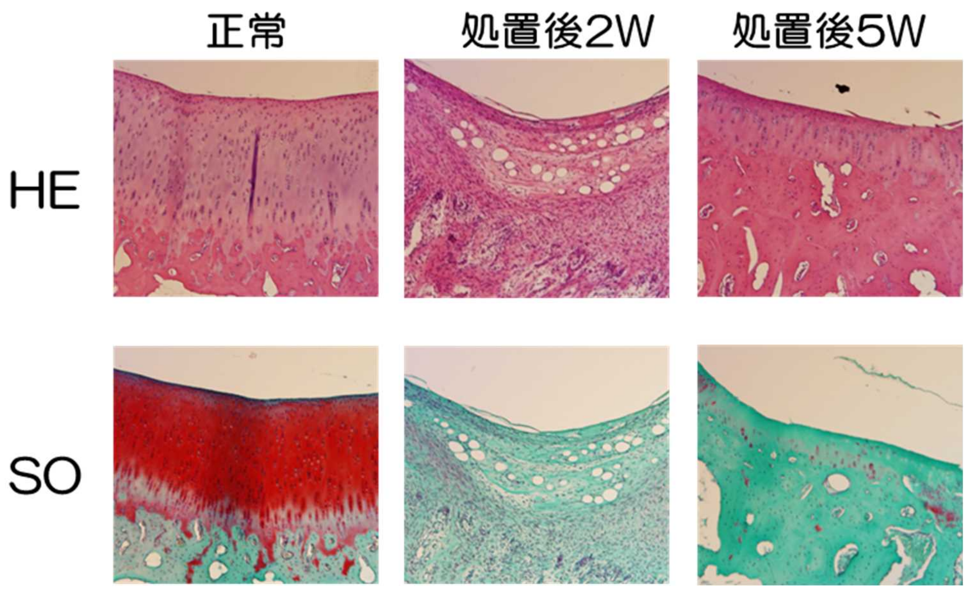


図２－３．ウサギ再生軟骨の組織像（HE 染色とサフラニン０染色）

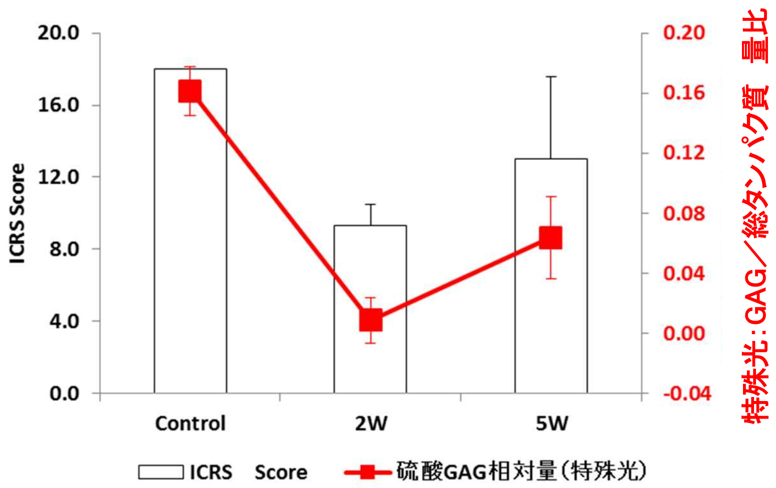


図２－４．ICRS Score とラマンスペクトルから算出した硫酸 GAG 相対量の変化

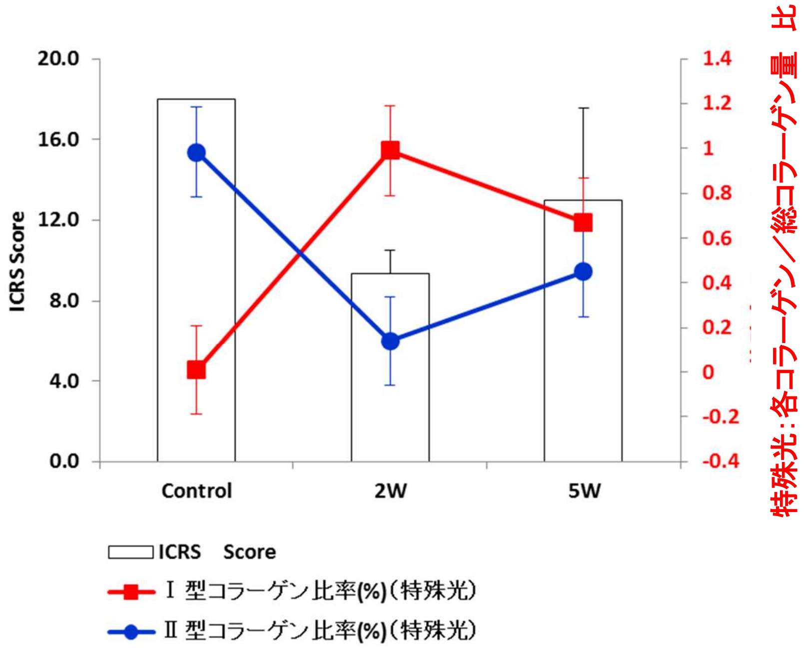


図２－５．ICRS Score とラマンスペクトルから算出したⅠ型・Ⅱ型コラーゲンの相対量の変化

2-2-1-2. 動物モデル②：ブタ再生軟骨

14 頭のブタの大腿骨内側顆に全層軟骨欠損を作製し、自然修復群はモデル作製後 4W（3 頭）と 8W（3 頭）後に剖検した。細胞移植群はブタ自家培養軟骨細胞を移植し、移植後 2W(2 頭)、4W（3 頭）と 8W（3 頭）後に剖検した。なお、ブタ自家培養軟骨細胞は移植の約 1 ヶ月前に反対肢の膝から軟骨組織を採取して作製した。剖検時には骨軟骨の状態で組織を摘出し、低侵襲特殊光分析装置および細径のプローブで欠損層部分のラマンスペクトルを分析した。その後、欠損層部分を二等分して組織学的評価と生化学分析を行った。組織学的評価用の組織はホルマリンで固定し、HE 染色、サフラニンO染色、抗ブタⅠ型コラーゲン染色、抗ブタⅡ型コラーゲン染色の組織学標本を作製した。生化学分析用の組織は前処理を行い、コラーゲン量、硫酸化 GAG 量、Ⅰ型・Ⅱ型コラーゲン含量比を分析した。組織学的スコアは軟骨再生の指標である ICRS Score を選択した。ラマンスペクトルについては再生軟骨のラマンスペクトルの特徴の違いを定量的に評価するために、各サンプルのスペクトルデータを用いて主成分分析によるスコアリングを実施した。なお、主成分分析については GAG およびコラーゲンに対応する成分を主成分①とした。

結果、主成分①では主成分スコアと軟骨の状態が相関していた（図２－６）。本主成分は GAG 量およびⅠ型・Ⅱ型コラーゲン割合の変化を反映すると考えられ、各群の生化学分析にて定量した GAG 量とも相関していた（図２－７）。なお、生化学分析として分析したⅠ型・Ⅱ型コラーゲン比とは相関していなかった。

以上の検討により、主成分①で GAG 量を評価できる可能性が示唆された。

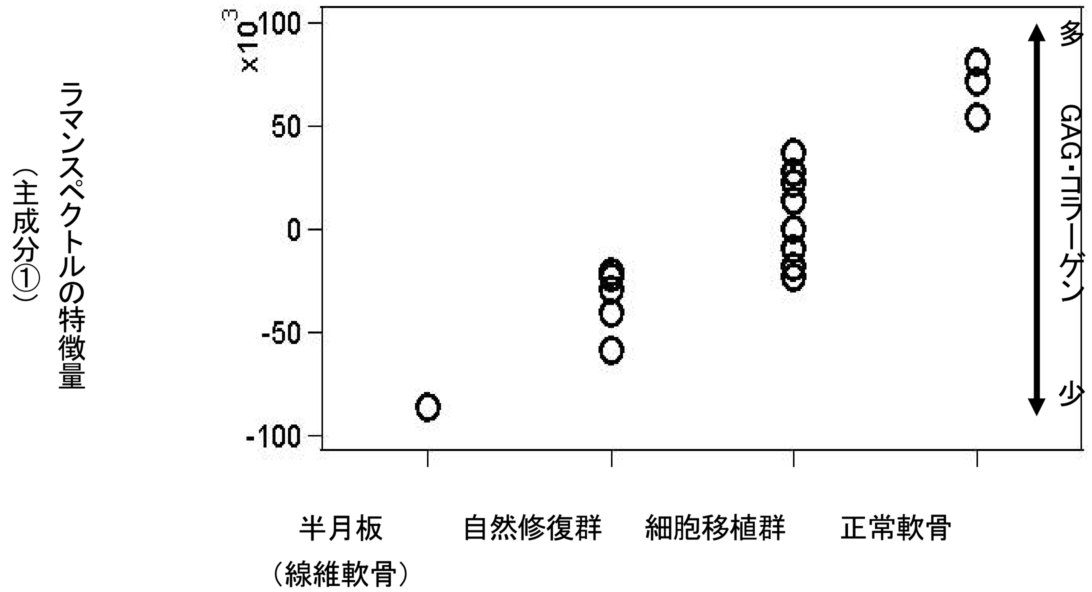


図２－６．主成分①の解析の結果

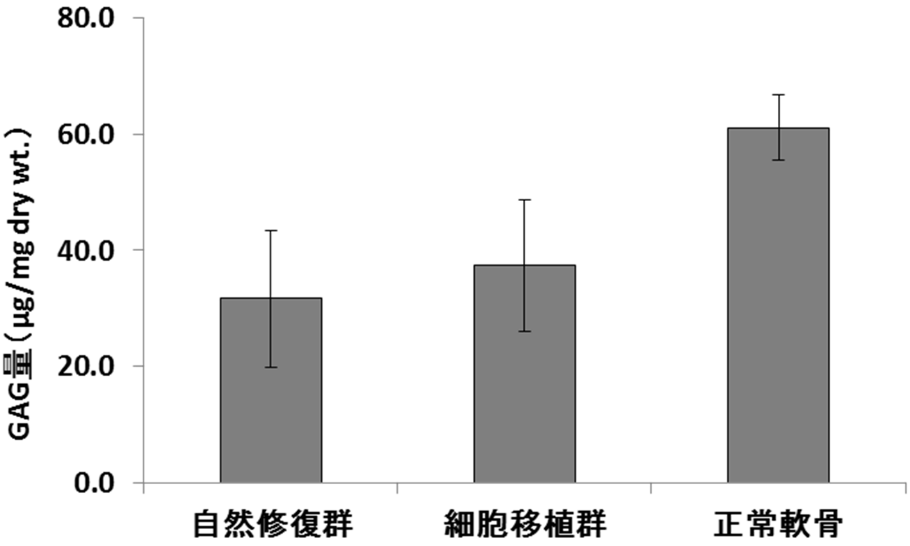


図２－７．各試験群の GAG 量

2-2-2. OA 患者由来軟骨組織を用いた、ヒト軟骨サンプルの特殊光分析

人工関節置換術の際に破棄された膝関節軟骨組織をインフォームドコンセントの下に 3 ドナー入手し、正常部、変性部など状態が異なる 7 サンプルに対し、低侵襲特殊光分析装置および細径プローブで計測を行った（図２－８）。計測後は計測部分をサンプリングし、二等分して組織学的評価と生化学分析を行った。組織学的評価用の組織はホルマリンで固定し、HE 染色、サフラニンＯ染色、抗ヒトＩ型コラーゲン染色、抗ヒトⅡ型コラーゲン染色の組織学的標本を作製した。対象とした 7 サンプルは組織学的には

正常または軽度OAで、組織の状態としては計画よりも狭い範囲であった。生化学分析用の組織は、前処理を行い、コラーゲン量、硫酸化GAG量、Ⅰ型・Ⅱ型コラーゲン含量比を分析した。組織学的スコアは軟骨の変性度評価に用いられるModified Mankin Scoreで評価した。ラマンスペクトルについては、全タンパク量、硫酸化 GAG、コラーゲン総量、Ⅰ型・Ⅱ型コラーゲン量に対応する特徴量を抽出し、（１）全タンパク量に対する硫酸化GAGの相対量に関わる特徴量、（２）全タンパク量に対するコラーゲン相対量、（３）コラーゲン分子構造に鋭敏なマーカーであるアミドⅢバンド比、を指標とした。

結果、低侵襲特殊光分析装置および細径プローブで算出した硫酸化GAGの相対量に関わる特徴量と生化学分析にて定量したGAG量は相関傾向にあった（図２―９）。一方で、コラーゲン相対量と生化学分析で分析したⅠ型・Ⅱ型コラーゲン量については、相関傾向はなかった。アミドⅢバンド比については、組織学的スコアと対応していた（図２－１０）。

以上の検討により、GAG 量やコラーゲン変性度からヒト軟骨組織の質的な評価を行える可能性が示唆された。

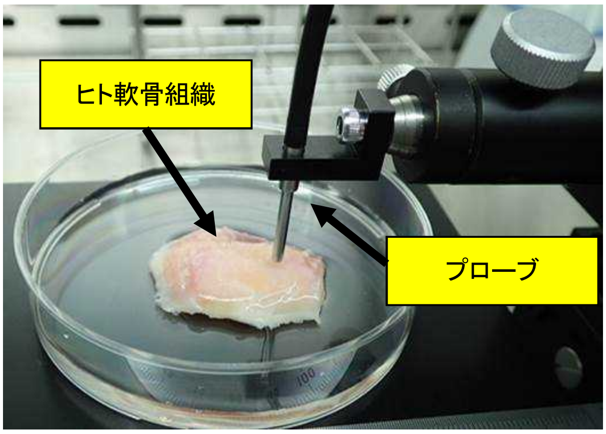


図２－８．低侵襲特殊光分析装置でヒト軟骨組織を計測する様子
左：プローブ設定時の様子、右；計測時の様子

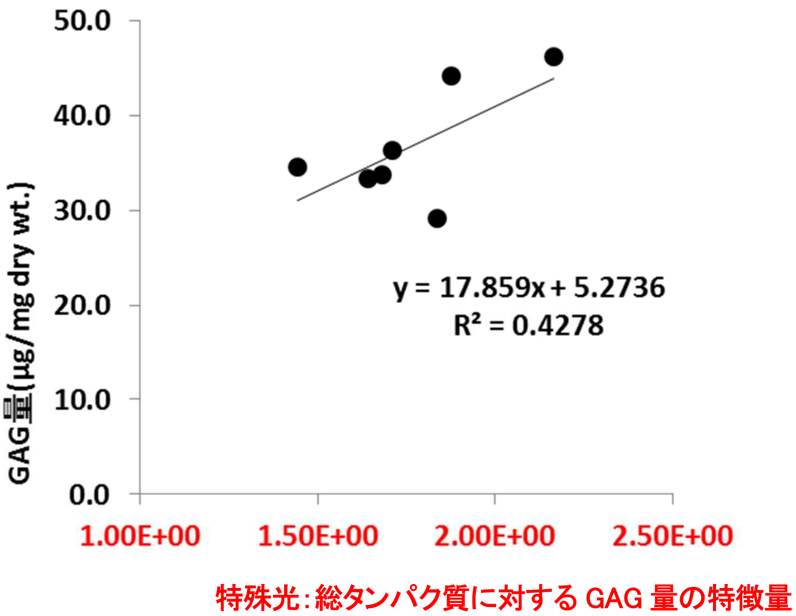


図２－９．ラマンスペクトルより算出した硫酸化GAGの相対量とGAG量

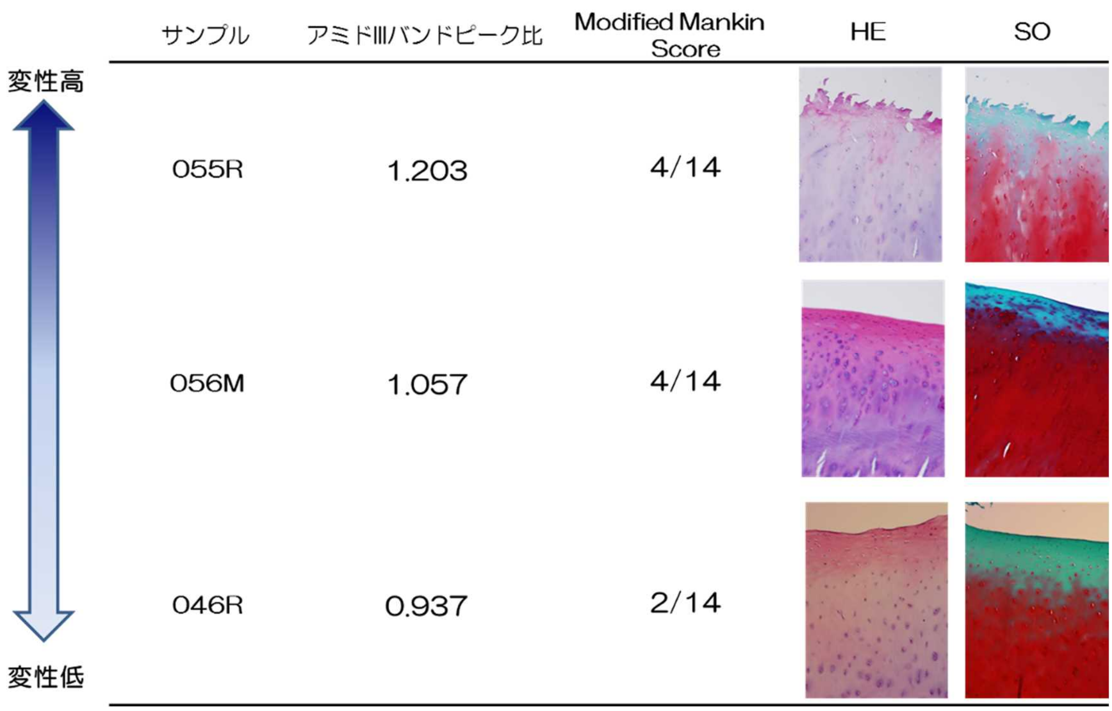


図２－１０．アミドⅢバンド比と組織学的スコアおよび組織像

＜項目３＞ MRI による軟骨再生評価条件の標準化

１．課題

当該製品の治験における副次エンドポイント（評価項目）として、MRI を用いた軟骨欠損評価の国際スコア（MOCART）（表３－１）による軟骨再生の構造的評価がある。本治験では主要エンドポイントとして、疼痛や関節の可動範囲や患者の QOL など主観的臨床評価が用いられているが、培養軟骨の長期的なゴールとして、軟骨の再生により人工膝関節が必要な変形性関節症の進行を予防することが挙げられており、軟骨再生の構造的評価は重要な副次的エンドポイントである。

表３－１．MOCART による軟骨再生の構造的評価

①軟骨欠損の治療の程度	0～20 ポイント(5: 50%以下、10:50%以上、15:過形成、20：完全)
②境界領域の統合状態	0～15 ポイント(5:境界が視認できる、10：不十分、15：完全)
③修復組織の表面	0～10 ポイント(5:損傷がある、10：完全)
④修復組織の構造	0～5 ポイント　(0:不均一、5:均一)
⑤修復組織の信号強度	0～30 ポイント(下記２項目の加算)
T2 強調画像	0～15 ポイント(0:著しい高強度、5:中等、15：正常部位と等強度)
脂肪抑制 T1 強調画像	0～15 ポイント(0:著しい低強度、5:中等、15：正常部位と等強度)
⑥軟骨薄板	0～5 ポイント　(0:不完全、5:完全)
⑦軟骨下骨	0～5 ポイント　(0:不完全、5:完全)
⑧滲出	0～5 ポイント　(0:有、5:無)

各施設での MRI のメーカー、機種、磁力、撮影条件、撮影体位は様々であり、統一して評価を行うことは容易ではない。

㈱ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング社の培養軟骨ジャックの審査報告書（p.51）において、「MRI 画像については、撮像条件が臨床試験計画時に事前に十分に検討されておらず、症例毎に異なっており、必ずしも軟骨を検出するのに適した画像が得られたとは言い難いことを考慮すると、適切な撮像条件下では、軟骨修復像が得られた可能性は否定できないものの、機構は、本臨床試験で得られた画像所見からは、本品による軟骨の再生を裏付けるデータは示されていないと考える。」と MRI の撮像条件の不適切さにより MRI 画像より軟骨の再生が証明できなかった可能性に言及している。

当該製品についての機 P982 医療機器治験相談(平成 26 年 8 月 18 日)においても「MRI 検査での撮影方法や条件等をあらかじめ規定し、同一条件下での評価が可能になるような方策を講じること」との助言を得ている。

２．実施事項

2-1. 概要

本課題の解決のために、各施設の異なった MRI を用いて相互に解釈可能にするための、各施設保有の機種に対応した、撮影条件、撮影体位等の条件の整合を行う。具体的には、治験候補施設の協力の元、使用する機種、撮像シーケンス、パラメータのアンケートを実施した。また MOCART に加えて収集する再

生軟骨の量や質に関わる補足的な情報を決定した。これらの項目を評価するのに必要十分な撮像シーケンスを選択し、全ての施設でメーカー・機種が異なっても共通のパラメータで実施可能なように、パラメータを設定した。本課題は、抗がん剤の MRI 等での治験画像評価で実績のある、イメージング CRO を活用して実施した。

2-2. 具体的な実施内容と結果

2-2-1. 各施設の膝軟骨 MRI 撮像条件の調査

論文等の情報に基づき、シーケンスシート　（MRI の撮像シーケンス、パラメータ、使用コイル、体位などの条件を記すアンケートシート）を作成し、治験各候補施設に配布した。10 施設より回答が得られた。今回の調査施設では、高磁場の 3T MRI と 1.5T MRI を両方所有する施設が多かったが、２施設は 1.5T MRI のみ所有であった。3T MRI を持っている施設では、3D や T2 マッピングなどアドバンスな評価もルーチンで実施しているところも多かった。また軟骨は、断層方向：矢状断撮像（サジタル）、冠状断層像（コロナル）、横断面（アキシャル）、シーケンスは、プロトン強調、T1 強調、T2 強調、T2＊強調で各施設様々なシーケンス・パラメータでまんべんなく撮像されており、最大公約数的なシーケンス・パラメータを選ぶことはできなかった。

2-2-2. 評価手順の決定

医学専門家との討議の結果、軟骨再生の評価として国際的に用いられている副次評価指標である MOCART に加え、軟骨再生による治療機序を示す軟骨欠損の充填量および痛みなどの臨床評価と相関の高いのう胞や骨棘など軟骨下骨の障害についても補足的情報として記録することとした。表３－２に MOCART に加え評価・記録する内容を示す。

表３－２．追加の評価・記録項目

<table>
<tr><td colspan="5">【欠損修復度詳細スコア】</td><td></td></tr>
<tr><td></td><td colspan="4">---</td><td>連続確信度(%)</td></tr>
<tr><td></td><td colspan="4">0　　　　　　　　　100 (%)　　　　　　　　　200(%)</td><td>長さ(%)</td></tr>
<tr><td colspan="6"></td></tr>
<tr><td colspan="5">【軟骨下骨の障害　複数項目選択可】</td><td rowspan="5"></td></tr>
<tr><td rowspan="8"></td><td>□</td><td colspan="3">肉芽組織</td></tr>
<tr><td>□</td><td colspan="3">嚢胞</td></tr>
<tr><td>□</td><td colspan="3">硬化</td></tr>
<tr><td>□</td><td colspan="3">軟骨骨棘(軟骨修復エリア内の骨棘)</td></tr>
<tr><td rowspan="4">□</td><td rowspan="4">骨髄浮腫</td><td>□</td><td>小さい(1cm未満)</td><td></td></tr>
<tr><td>□</td><td>中等度(2cm未満)</td><td></td></tr>
<tr><td>□</td><td>大きい(4cm未満)</td><td></td></tr>
<tr><td>□</td><td>広範囲</td><td></td></tr>
</table>

また、多くの施設が 3T MRI を所有しており、複数の施設がルーチンで T2 マッピングの測定を行っていること、また 1.5T MRI でも T2 マッピングの測定が可能であることが確認できたため、軟骨の質と関連する指標として T2 マッピングの測定を行い、補足情報として取得することとした。T2 マッピングの測定方法は、正常部および欠損部（再生部）の関心領域（ROI）を設定し、T2 マッピング専用のソフトウエアを用いて、それぞれの平均値の T2 値を取得する。このソフトウエアは、MRI 装置から撮像されたマルチ TE の複数の MRI 画像のシリーズを用いて、T2 値を単項の指数関数的減衰によってカーブフィッテングして画像に T2 値を再マッピングすることができ、組織内の関心領域（ROI）を設定することによって、定量値による数値解析結果として T2 数値ヒストグラムおよび ROI の平均と標準偏差を得ることができる。

上記に基づいて「画像評価手順書」を作成した。

2-2-3. 撮像条件の決定

上記 2-2-1、 2-2-2 に基づいて、医学専門家、放射線医、イメージング CRO の３者で、撮像条件の整合を行った。MOCART および軟骨再生の量、軟骨下骨の状態、軟骨の質を判別するために、必要十分な撮像シーケンスを選択し、全ての施設で実施可能なパラメータを設定した。結果をまとめたものを表３－３に示す。

表３－３．整合された撮像シーケンスのまとめ

撮像条件の説明	パルスシーケンス	脂肪抑制	スライス厚(mm)	スライス間隔(gap)	FOV(有効視野)(mm)	TR	TE	取得ボクセルサイズ(mm)	再構成ボクセルサイズ(mm)
①プロトン信号強調もしくは中間信号脂肪抑制矢状断撮像	高速スピンエコー法	有	2.5 (3T) 2.5-3.0 (1.5T)	スライス厚の20%以内	150	2000以上	27-37	0.5以下x 0.7以下 x 2.5-3.0	0.5以下x 0.6以下 x 2.5-3.0
②プロトン信号強調または中間信号(非脂肪抑制)冠状断撮像	高速スピンエコー法	無	2.5 (3T) 2.5-3.0 (1.5T)	スライス厚の20%以内	150	2000以上	27-37	0.5以下x 0.7以下 x 2.5-3.0	0.5以下x 0.6以下 x 2.5-3.0
③デュアルエコー(プロトン信号強調または中間信号+T2)法による矢状断撮像	高速スピンエコー法	無	2.5 (3T) 2.5-3.0 (1.5T)	スライス厚の20%以内	150	2000以上	35以下 (T2強調は80以上)	0.5以下x 0.7以下 x 2.5-3.0	0.5以下x 0.6以下 x 2.5-3.0
④T1強調矢状断撮像	高速スピンエコー法	無	2.5 (3T) 2.5-3.0 (1.5T)	スライス厚の20%以内	150	500-700	18以下	0.5以下x 0.7以下 x 2.5-3.0	0.5以下x 0.6以下 x 2.5-3.0
⑤膝関節軟骨撮影用3次元矢状断撮像	注1)	有	3以下(slice sapcing 1.5以下)	注2)	注2)			注2)	注2)
⑥-A:T2マッピング (3T MRI装置用)	T2値測定用マルチエコー法	無	3.0	0.3-0.7mm	150-180	治験実施施設のMRIの推奨値	マルチエコーのエコー時間の最短時間18以下	0.6以下x 0.7以下 x 3.0(FOV150mmの場合)	0.5以下x 0.6以下 x 3.0 (FOV150mmの場
⑥-B:T2マッピング (1. 5T MRI装置用)	T2値測定用マルチエコー法	無	4.0	0.3-0.7mm	150-180	治験実施施設のMRIの推奨値	マルチエコーのエコー時間の最短時間18以下	実施医療機関で撮像時間内に収まるよう設定	実施医療機関で撮像時間内に収まるよう設定

注１：MOCART 原法にあわせて脂肪抑制による T1 強調 3D スポイルドグラジェントエコー法（3D-SPGR/FLASH）の使用を原則とする。但し、実施医療機関の状況に応じ、治験担当医が適正と判断した場合、実施医療機関のシーケンスを使用することも可。

注２：スライス間隔(gap)、FOV、取得ボクセルサイズ、再構成ボクセルサイズおよび信号対雑音比の調整は、実施医療機関で最適な撮像時間内に収まるように設定する

表３－３に整合されたシーケンスによって、1.5T MRI を用いても適切な撮像が行えることを、ブタ培養軟骨移植モデルの摘出膝の MRI 画像を撮像し検証を行った。図３－１に 1.5T MRI で、プロトン信号強調または中間信号（非脂肪抑制）冠状断撮像を示す。ブタはヒトに対して軟骨が薄く確認しにくいが、撮像が成功し、軟骨が適切に描出できていることが確認できた。
これらに基づいて、「撮像実施手順書」を作成した。

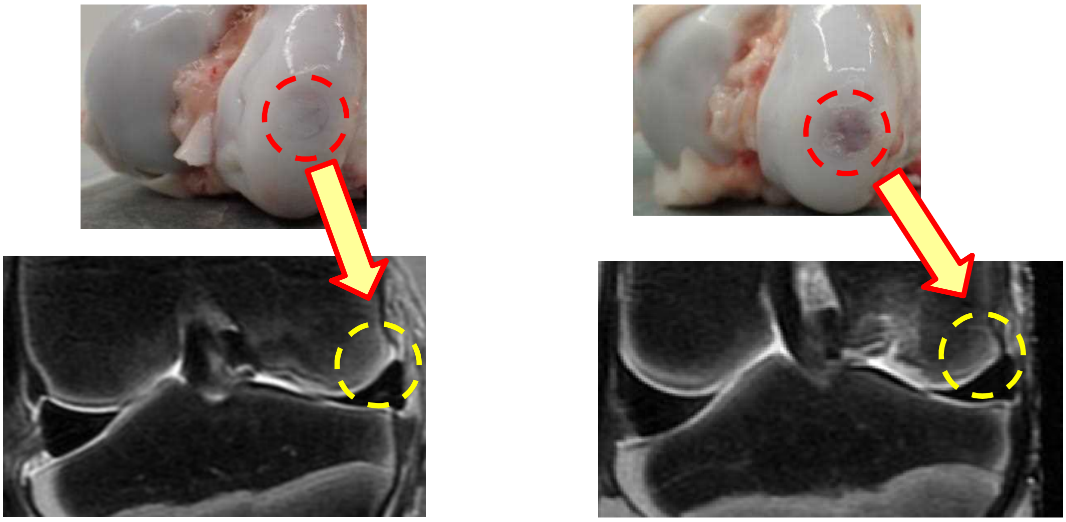


図３－１．1.5T MRI でのブタ培養軟骨移植モデルの摘出膝のプロトン信号強調または中間信号（非脂肪抑制）冠状断撮像

2-2-4. 撮像から評価の実施手順

各施設で手順書に従って、MRI 撮像を行い、個人情報をマスキングしたうえで、イメージング CRO に提出する。イメージング CRO では、画質のチェック及び整合性の確認を実施したうえで、マスキングソフトウエアを用い、不必要な情報を全て削除し、GCP に対応したサーバーに画像を保存する。画像データから、個人情報、不必要な情報や、手技を特定するようなデータを削除し、データをイメージング CRO に送付し、データサーバーにアップする。

第３者画像判定委員会を招集し、イメージング CRO より提供された MRI 画像及び T2 マッピング情報を用い、「画像評価手順書」に基づいて読影・判定を行う。

詳細手順を示す「画像判定委員会に関する標準業務手順書」を作成した。

【２】軟骨細胞の培養および試験の効率化
＜項目４＞　非侵襲イメージングを活用した工程管理手法の開発

1. 課題

薬食発第 0208003 号（平成 20 年２月８日発行）「ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」『第２章　製造方法　第２　製造工程』で示されるように、培養工程では、培養条件や収率等を明確にする必要がある。また、『第３章　最終製品の品質管理』に示されるように、目的の細胞・組織であることを確認する“確認試験”、目的以外の細胞の混入の純度を測定する“純度試験”を行う必要がある。

培養工程の管理に細胞増殖速度と細胞コンフルエント程度は重要な因子である。細胞の増殖速度は、培養の成否を早い段階で判断したり、十分な細胞数を確保したりと、患者への移植日の決定などに重要である。これまで増殖速度は、数日おきに行われる培地交換時で作業者が目視で顕微鏡観察した結果を基に判断され、定量的に測定ができなかった。また細胞コンフルエント程度は細胞継代のタイミングを決める際の重要な判断指標である。また継代のタイミングは顕微鏡で細胞状態を観察し、コンフルエント前の同じ状態で継代することが一定の品質を保つために必要とされているが、この手法は作業者の熟達に依存し、ばらつきも大きいことが問題となっている。

2. 実施事項

2-1. 概要

細胞観察、培地交換、継代、細胞回収などの際に、顕微鏡等による目視により、細胞の量、増殖能、形態学的な特性、コンタミの有無を確認し、工程管理および工程中の品質管理を実施している。これを非侵襲的なイメージング技術を活用し、半自動による定量的な評価を行うことで、工程管理を省力化・迅速化し、コスト低減につなげる。従来の顕微鏡による定量システムは、自動培養システムとの統合や、専用の顕微鏡・観察ステーションが必要であった。オリンパス(株)で開発された、試作非侵襲イメージング装置は、軟骨を含む複数の細胞で、細胞数の計測、コンフルエンシーの計測が可能である。本システムを用い、自動化の方向ではなく、通常の培地交換・継代などの手作業を妨げずに実施できるようにすることで、工程管理を大幅に省力化・迅速化する。

平成２６年度の先行事業において、オリンパス（株）より提供された非侵襲イメージング装置を、製造工程中で使用し、細胞数及びコンフルエンシーの測定および細胞画像の取得を行った。本イメージング装置を用いた細胞数測定では、セルカウンターによる細胞数の計測値に対し、ばらつきがあった。対策の一つとして、細胞の増殖・製造段階に応じて細胞検出パラメータの最適化を行うことで、ばらつきの圧縮に効果があることが示された。本非侵襲イメージング装置を用いた軟骨細胞の製造工程における細胞数測定のフィージビリティは確認できたと考えられた。本年度は細胞数測定の精度を実際の製造現場で活用できるレベルに向上する検討、製造シミュレーションにおける非侵襲イメージング装置を用いた製造管理、非侵襲イメージング装置を用いた細胞の特性解析、について検討を行った。

2-2. 具体的な実施内容と結果

2-2-1. 細胞数測定の精度を実際の製造現場で活用できるレベルに向上する検討

平成２６年度の先行事業における細胞検出パラメータ最適化による精度向上の検討をベースに、細胞

数測定の精度を実際の製造現場で活用できるレベルに向上する検討を行った。

先行事業における細胞検出パラメータを用いて細胞数測定を行うと図４－１(右)に示すような初代細胞や播種直後の伸展性の低い軟骨細胞では真値に対する正確度が低下することが判明した。オリンパス㈱より細胞検出パラメータの最適化を行ったソフトウエアの提供を受け、評価を行った。真値はヒト軟骨細胞をDAPIで蛍光染色して算出した（図４－２）。

100検体のヒト軟骨細胞を用いて細胞検出パラメータの最適化前と最適化後で測定した結果、真値に対する正確度を比較すると最適化前は168.0±146.9%に対して最適化後は94.3±15.9%と正確度が向上した（図４－３）。

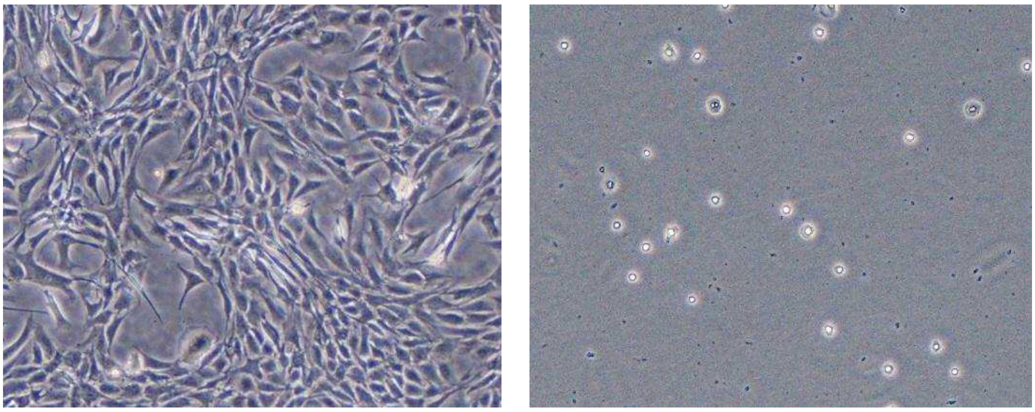


図４－１．ヒト軟骨細胞の顕微鏡画像
左：通常の軟骨細胞、右：初代細胞や播種直後の伸展性の低い軟骨細胞

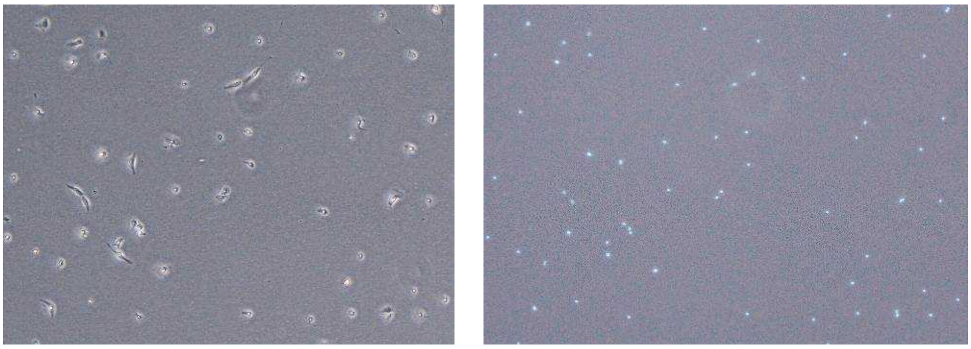


図４－２．真値の算出方法
左：位相差顕微鏡画像、右：DAPI染色画像（真値）

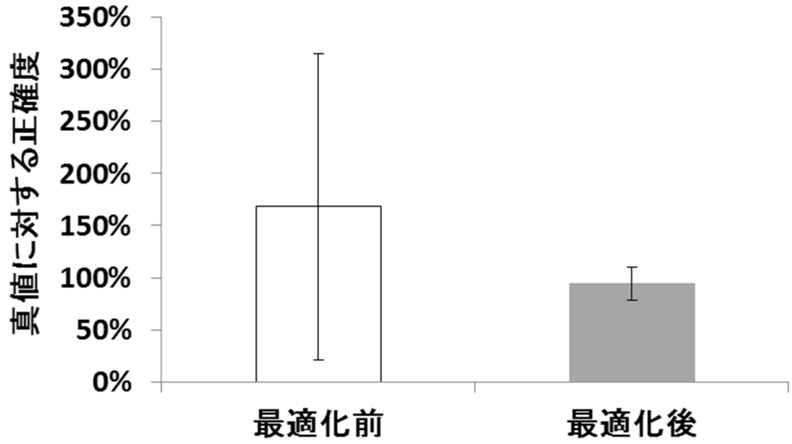


図４－３．細胞検出パラメータの最適化前後の比較

最適化した細胞検出パラメータを用いて 3 ドナーのヒト軟骨細胞、P1、P2、P3 及びそれぞれの低密度、中密度、高密度における精度の評価を行った。結果、真値に対する正確度が 80.0%～120.0%以内に収まり実際の製造現場で活用できるレベルに向上したと考えられた（表４－１）。

表４－１．各条件での真値に対する正確度

	P1	P2	P3
低密度	93.4±13.4%（71）	103.3±8.3%（18）	98.0±3.9%（11）
中密度	101.7±5.3%（8）	107.0±13.0%（5）	110.9±7.5%（6）
高密度	84.5±13.0%（37）	98.3±6.5%（22）	102.1±5.8%（26）

数値は平均値±標準偏差
カッコ内はｎ数

2-2-2. 製造シミュレーションにおける非侵襲イメージング装置を用いた製造管理

製造シミュレーションにおいて、現在の SOP による製造管理と平行して、本非侵襲イメージング装置を用いた製造管理の可能性について検討した。

具体的には P3 の 15 検体のヒト軟骨細胞を培養して本非侵襲イメージング装置を用いて継代のタイミングを確認し、トリプシンにて回収できた細胞数と本非侵襲イメージング装置での測定の差異を検討した。トリプシンにて回収できた細胞数はセルカウンターで測定した。結果、当初の±20%の正確度で測定するという目標に対して大きく外れることなく、実現できた。また、継代のタイミングについては、作業者による判断のバラツキが少なく、細胞密度を経時的にモニタリングできることから、予測が容易で工程内管理手法としても活用できる可能性が示唆された。

2-2-3. 非侵襲イメージング装置を用いた細胞の特性解析

細胞の増殖特性（PDL、DT）は播種直後や対数増殖期の細胞数が必要で一般的には細胞を回収して侵襲的に行う（図４－４）。一方で治験時等に得られるヒト細胞は貴重で侵襲的には解析ができない。そこで、本非侵襲イメージング装置を用いて非侵襲的に解析ができないかを検討した。

具体的には 3 ドナーのヒト軟骨細胞を用いて P1、P3、P3 と増殖曲線を作成し、真値はヒト軟骨細胞を DAPI で蛍光染色したものから得たものを真値として比較した。結果、本非侵襲イメージング装置で増殖曲線を作成することができ、真値と比較しても統計学的な有意差は認めなかった（図４－５）。

以上により、非侵襲イメージング装置を用いて、治験時に細胞の特性解析の一環として、細胞の増殖特性を計測することが可能であることが示された。

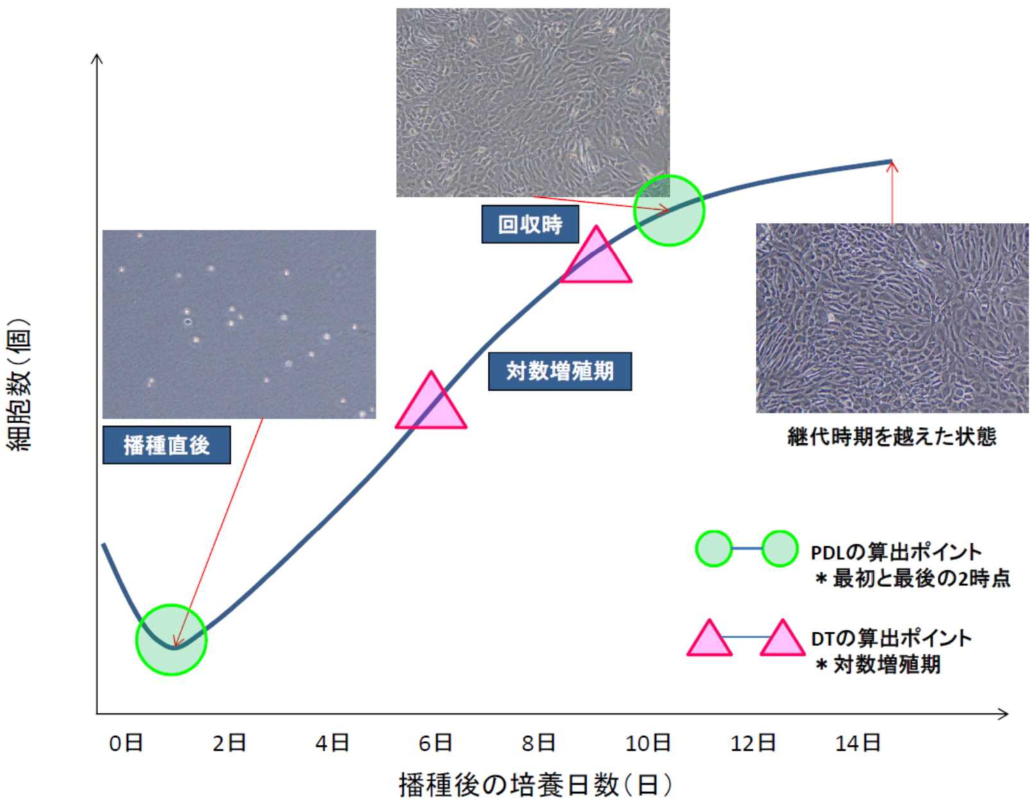


図４－４．PDL と DT のデータ取得方法

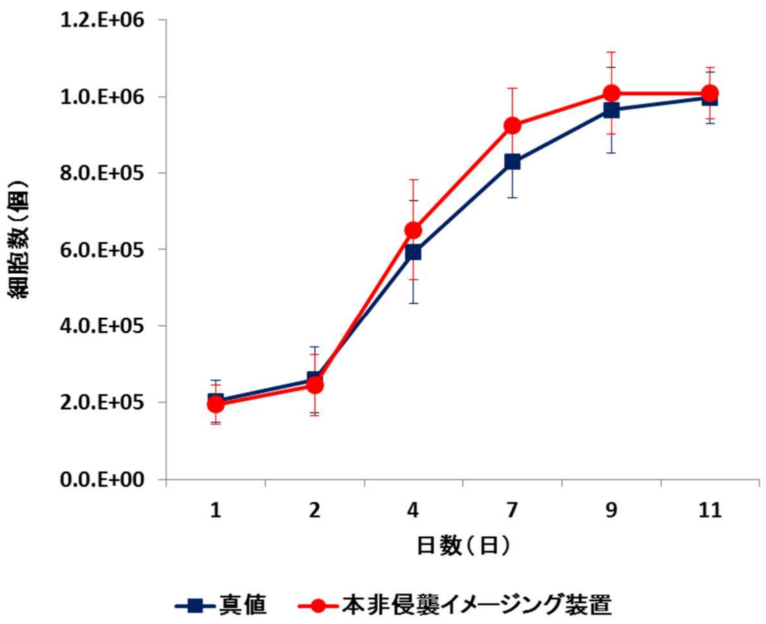


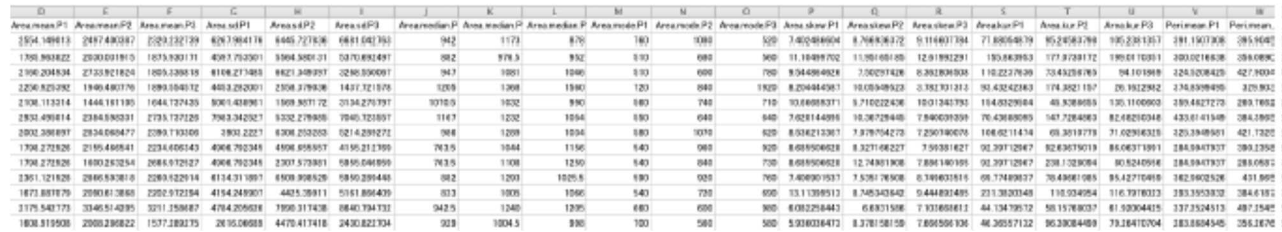
図４－５．P2 のヒト軟骨細胞の増殖曲線

<u>2-2-4. 細胞の形態学的特徴の抽出と特性解析結果との対応</u>

<u>2-2-4-1. 細胞の形態学的特徴量の抽出</u>

細胞の形態学的特徴量の抽出は、H26 年度の先行事業で開発された方法を使用した。製造工程に沿って細胞画像を取得し、画像処理によって細胞の形態学的特徴量を抽出した。具体的には、原画像より、バックグラウンド減算処理の後、自動２値化を行い、細胞の２値化画像を得る（図４－６）。このようにして得られた細胞の２値化画像に対し、細胞面積、細胞周長、楕円近似の長軸、楕円近似の短軸、楕円近似の角度、扁平度、真円度、凹凸度等の特徴量を得た。各継代(P1, P2, P3)のそれぞれの特徴量の平均・標準偏差・最頻値等の統計量を取得した。このようにして、各細胞ロットにつき計 180 種類の特徴量を抽出した（図４－７）。

図４－６．原画像(左)より、バックグラウンド減算処理(中)、細胞の２値化画像処理結果(右)の例



D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W
Area.mean.P1	Area.mean.P2	Area.mean.P3	Area.sd.P1	Area.sd.P2	Area.sd.P3	Area.median.P	Area.median.P	Area.median.P	Area.mode.P1	Area.mode.P2	Area.mode.P3	Area.skew.P1	Area.skew.P2	Area.skew.P3	Area.kur.P1	Area.kur.P2	Area.kur.P3	Peri.mean.P1	Peri.mean.
2554.149613	2497.430387	2320.232739	6267.984176	6445.727636	6681.042763	942	1173	878	160	1080	520	7.402488604	8.766836372	9.116407784	71.88064879	95.24583799	105.2381357	391.1507308	385.9045
1769.993822	2030.031915	1875.930171	4597.753501	5564.580131	5370.892497	882	978.5	952	510	680	960	11.10499702	11.99166185	12.61992291	155.863953	177.9739172	199.0110351	300.0216638	356.089C
2190.204834	2733.921824	1805.239818	8106.277483	8821.349097	3298.590097	947	1081	1046	510	600	780	9.544864928	7.00297426	8.392806938	110.2237639	73.45256765	94.101988	224.5208425	427.9004
2250.825292	1946.480776	1899.564612	4453.282001	2558.379936	1437.721576	1209	1368	1590	120	840	1920	8.204444587	10.05949523	3.782731313	93.43242363	174.3821157	26.1922982	374.8399495	329.932
2108.113314	1444.161195	1644.727435	5001.438961	1569.957172	3134.270797	1010.5	1032	990	580	740	710	10.68608371	5.710222436	10.01343793	154.8329984	45.9388655	135.1100803	359.4627273	289.7652
2832.495814	2384.598331	2735.737226	7983.342927	5332.276995	7845.723557	1167	1232	1054	550	640	640	7.628144895	10.36729445	7.940030359	76.43668065	147.7284863	82.68210348	433.6141548	384.3892
2802.386897	2834.068477	2380.713306	3902.2227	6306.253283	5214.291272	988	1289	1034	580	1070	620	8.536213367	7.979704273	7.250740076	106.6211474	65.3819779	71.02906325	325.3948981	421.7322
1708.272826	2195.446841	2234.606143	4906.792345	4596.658557	4195.212759	763.5	1044	1156	540	960	920	8.685506628	8.327168227	7.59381627	92.39712967	82.63679019	86.06371991	284.9947937	390.2358
1708.272826	1680.263254	2686.972127	4906.792345	2307.573861	5895.046859	763.5	1108	1250	540	840	730	8.685506628	12.74981908	7.886140165	92.39712967	238.1329084	80.5240956	284.9947937	288.0587
2361.121828	2866.593818	2269.522914	6134.311897	6509.998529	5850.289446	882	1203	1025.5	590	920	760	7.406901537	7.535176508	8.349631515	65.77489837	78.40681085	95.42710458	362.9602526	431.865
1673.881879	2080.613868	2202.972184	4154.249901	4425.35911	5161.866409	833	1005	1066	540	720	690	13.11399513	8.745343642	9.444893485	231.3820348	116.934954	116.7378033	283.3953832	384.6187
3175.540773	3346.514295	3211.259887	4784.205628	7990.317438	8840.794732	942.5	1240	1295	660	600	980	6.082258443	6.6831586	7.103868613	44.13479572	58.15768037	61.92004425	337.2524513	487.2545
1808.319508	2008.286822	1577.289275	2616.06685	4470.417418	2430.822704	928	1004.5	898	100	560	580	5.938036473	8.378158159	7.866566106	46.36557132	95.38084489	79.28410704	283.8604545	356.2676

図４－７．抽出された細胞ロット毎の特徴量の例（一部）

2-2-4-2. 滑膜細胞および軟骨細胞の分類軸の検討及び評価

平成 26 年度に報告した「細胞の形態学的特徴量の画像解析と、特性解析の結果との対応関係の数値解析」（以下「H26 年度　画像解析」とする）において、滑膜細胞および軟骨細胞の分離可能性が示唆された。従来までは滑膜細胞および軟骨細胞の分類は生化学的手法でも容易ではなかったが、細胞形態による区別を達成するために、新規に取得された滑膜細胞の画像データと併せ、滑膜細胞および軟骨細胞を分類し得る評価軸の検討および評価を行った。

滑膜細胞：8 細胞株、軟骨細胞：29 細胞株を用い、継代 P1 における画像解析を実施した。相互に相関する特徴を選抜し、面積、長軸、扁平度、凹凸度に関わる 7 特徴量にて分類軸の評価を行った。

教師無し学習である、k-means 法、主成分分解析、教師有り学習としてロジスティック回帰で、滑膜細胞と軟骨細胞が分離できることが確認できた。特にロジスティック回帰により分類軸を評価した結果、特定の特徴量により分離可能であることが確認された。図４－８に特定の画像特徴量による軟骨細胞及び滑膜細胞の分離結果を示す。白枠が軟骨細胞、黒が滑膜細胞を示す。画像特徴量＝73.493 を分離軸として、滑膜細胞および軟骨細胞を完全に分離できている。

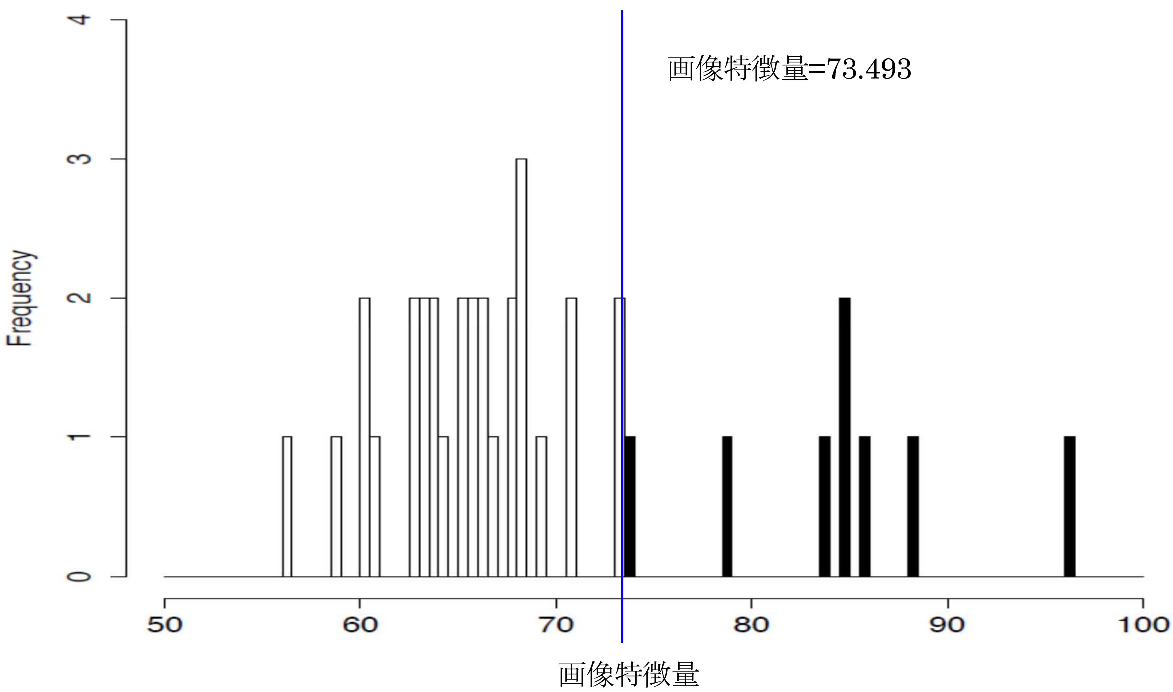


図４－８．画像特徴量による軟骨細胞及び滑膜細胞の分離

2-2-4-3. 「H26 年度 画像解析」により得られたモデル式の検証

「H26 年度 画像解析」では細胞画像解析によって下記の特性解析結果を予想できるモデル式がたてられた。

【表面マーカー】

・継代 P1 における HLA-DR、CD19、CD11b

【遺伝子発現量】

・継代 P1 における COL10A1 発現量、MMP13 発現量

・継代 P2 における COL1A1 発現量

・継代 P3 における COL10A1 発現量

・ACAN 発現量、ADAMTS5 発現量、IL8 発現量

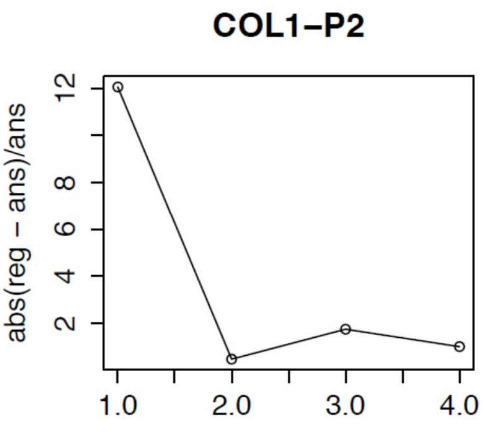
【モデル式の例】

COL1A1 の遺伝子発現量= -1.016872e+01 - 5.001172e-04* AA + 1.809203e-03* AM
-1.057067e-01* MM + 9.068739e-01* MS + 4.436185e+00* RS
($p = 0.04353$, $R2 = 0.763$)
（AA, AM, MM, MS, RS は継代 P2 の細胞画像特徴量を示す）

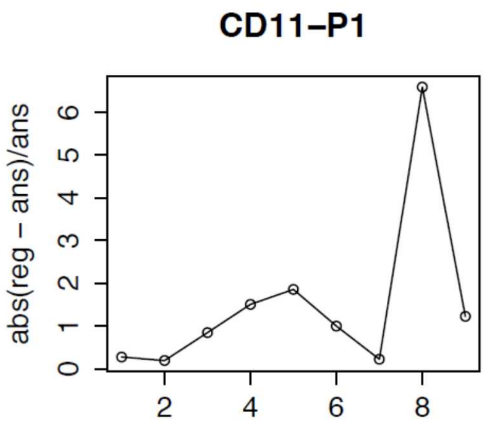
H27 年度に取得された新たな画像および、遺伝子発現及び表面マーカーの情報を用い、「H26 年度 画像解析」により得られたモデル式の当てはまりの程度を下記の式で評価した。予想値と計測値に差が無ければ、値は 0 を取り、差があれば値は大きくなる。

当てはまりの程度＝| モデル式による予想値 - 実際の計測値 | / 実際の計測値

図４－９に COL1A1 の P2 における遺伝子発現の例、表面マーカーCD11 の P1 における例を示す。横軸に細胞ロット、縦軸に当てはまりの程度を示す。ADAMTS5 の発現量を除き、多くの細胞株における誤差は、計測値の 3 倍程度に収まったが、一部、予想式と計測値の差が 6-12 倍程度の大きな誤差を示す細胞株が存在した。



COL1A1 の P2 における遺伝子発現



表面マーカーCD11 の P1 における例

図４－９. モデル式との当てはまりの程度（横軸：細胞ロット、縦軸：当てはまりの程度）

2-2-4-4. 夾雑微生物の抽出

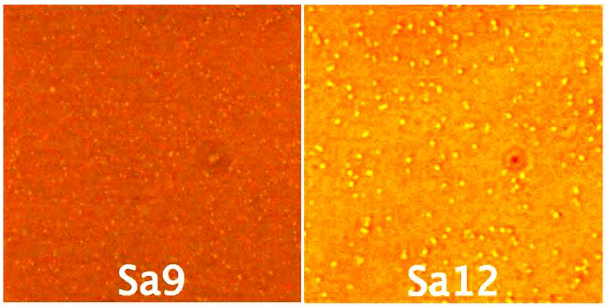
平成２６年度の先行事業に引き続き、非侵襲イメージング装置によるコンタミの検出のフィージビリティを検討した。培地交換・継代時に得られる顕微鏡画像を用いて、夾雑微生物の抽出のフィージビリティ検討を行った。

モデルとして、第十六改正日本薬局方4.06無菌試験法で使用される下記3菌種を選択した(表４－２)。

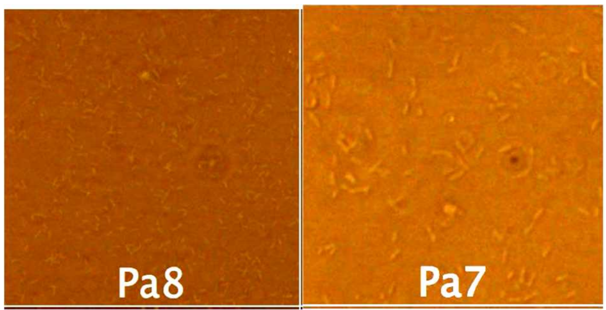
表４－２．検討に用いられた菌種

微生物	菌株名	使用菌種
細菌	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (*Staphylococcus aureus*)	NBRC13276
	Pseudomonas aeruginosa	NBRC13275
真菌	*Candida albicans*	NBRC1594

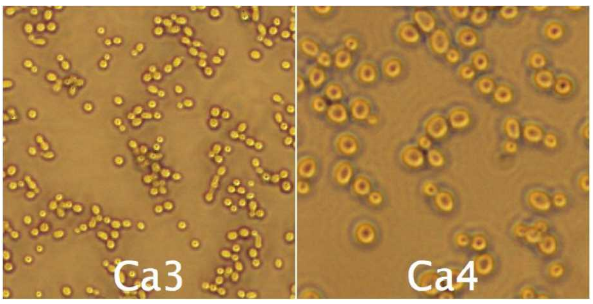
菌液を培養し、軟骨細胞培地に、1x10^{5} CFU、1x10^{6} CFU、1x10^{7} CFU/ml になるように調製して T25 フラスコに接種し、５分および 30 分静置したものを培養中の細胞観察に使用する x4、x10、x20 の対物を用い位相差で顕微鏡撮像した（図４－１０）。



Staphylococcus aureus (x10, x20)



Pseudomonas aeruginosa (x10, x20)



Candida albicans (x10, x20)

図４－１０．モデル菌の播種画像の例

夾雑微生物のコンタミネーションをシミュレートするため、軟骨細胞画像と菌種画像を人工的に合成した（図４－１１）。

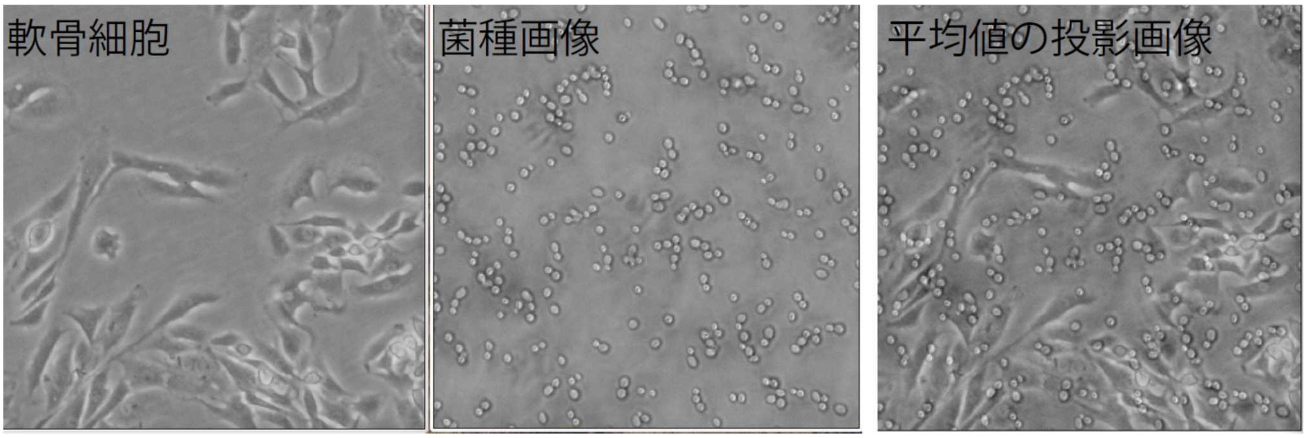


図４－１１．合成された軟骨細胞画像と夾雑微生物画像

複数の軟骨細胞の画像から、コンフルエンスに近い画像を代表的な画像として使用し、軟骨細胞との合成画像の中から、夾雑微生物を抽出するアルゴリズムを検討し、ノイズ低減処理の後、輝度ピークを探索する方法を採用した。

本法を用い、１画像中の False positive の値を 10 に抑えるように、検出パラメータを設定した場合の Accuracy を検証した。つまり、夾雑微生物の混入が未知の画像に対し、10 点以上が選ばれた場合、「夾雑微生物の混入が予想される」と判定する。一方で、値 10 未満の場合は「夾雑微生物の混入が検出できない。あるいは、10 個体未満の混入」と判定される。判定の可否と、菌種画像から抽出された菌の位置を基準（正しく検出できている）として、軟骨細胞との合成画像での検出結果と比較し、精度の評価を行った。

表４－３．菌種と合成画像からの検出結果

	菌種	菌濃度 (CFU/ml)	判定	倍率	精度
細菌	*Staphylococcus aureus*	$1x10^7$	○	X10	0.345
		$1x10^6$	○	X10	0.457
		$1x10^7$	○	X20	0.079
		$1x10^6$	○	X20	0.211
	Pseudomonas aeruginosa	$1x10^7$	○	X10	0.067
		$1x10^6$	○	X10	0.081
		$1x10^7$	○	X20	0.021
		$1x10^6$	○	X20	0.133
真菌	*Candida albicans*	$1x10^7$	○	X4	0.629
		$1x10^6$	○	X4	0.975
		$1x10^7$	○	X10	0.381
		$1x10^7$	○	X10	0.025
		$1x10^7$	○	X10	0.982
		$1x10^7$	○	X10	0.046
		$1x10^5$	○	X10	0.833

上記の結果から、*Staphylococcus aureus* と、*Pseudomonas aeruginosa* では、x10 または x20 の対物で撮像した画像を用いて、培地中 $1x10^{6}$ CFU/ml 以上の濃度で夾雑微生物が検出可能であった(表４－３)。また *Candida albicans* では、x4 または x10 の対物で撮像した画像を用いて、$1x10^{5}$ CFU/ml 以上の濃度で夾雑微生物の存在が検出可能であった。しかし、精度に関しては、0.02～0.97 と大きくばらつくことが分かった。

上記より、x10～x20 の対物倍率の顕微鏡画像を画像処理することによって、$1x10^{6}$CFU/ml 以上の濃度での夾雑微生物検出の可能性があることが確認できた。

<u>＜項目５＞ 再生医療等製品に適合されるマイコプラズマ否定試験手法の開発</u>

1．課題

薬食発第 0208003 号「ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」『第３章　最終製品の品質管理』で最終製品に対し、適切なマイコプラズマ否定試験の実施が求められている。

一方、再生医療等製品にマイコプラズマ否定試験（培養法）を日本薬局方に定める培養法に適合させる場合、結果が得られるまでに１ヶ月程度の期間が必要で、移植前に試験結果が判明しないという課題がある。

上記課題を解決するために、マイコプラズマを迅速に検出できる方法を確立する必要がある。第 17 改正日本薬局方では、マイコプラズマ検出のための核酸増幅法(NAT)が適切にバリデーションされれば、培養法の代替法として用いることが可能とされる。そこで、我々はこれまでに医薬品の製造承認に使用実績のある MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Kit（Roche Diagnostics 社）を用いて、第 17 改正日本薬局方に従って、培養軟骨製品に適する迅速なマイコプラズマ否定試験法を確立することを目的として検証を行った。

第 17 改正日本薬局方では、市販キットを NAT(核酸増幅試験）による試験の一部又は全部に用いる場合は、キットの製造業者により添付されたフルバリデーションデータがあれば、使用者のバリデーションの代替として用いることが可能であり、使用者が再度フルバリデーションを行う必要はない。しかし使用者は、キットの性能（特異性、検出感度等）について、使用目的に十分かなっていること、使用者の試験系でも目的とした性能が得られることを確認する試験を必ず実施し、データを提示すべき、とされている。MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Kit については、製造先である Roche Diagnostics 社にてキットのフルバリデーションが実施されている。そこで、今回は、本キットが我々の培養軟骨製品の試験系に適用される際、そのキットの性能（特異性、検出感度）が十分に担保されているかどうかを確認するために、①培養軟骨製品の試験系で使用する検体が与えるキットの性能への影響、②培養軟骨製品の試験系におけるキットの特異性・検出感度について検討した。

２．培養軟骨製品の試験系で使用する検体のキットの性能への影響に関する検討

培養軟骨製品の製造の重要な工程において、マイコプラズマ否定試験を実施することを想定し、試験系で使用する検体は最終製品、中間製品、患者さんからの軟骨組織を病院から運搬する組織保存溶液が考えられる。従って、検体によって、溶媒や細胞数が異なる。MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Kit が推奨する検体の細胞数は 10^5 個以下である。そこで、培養軟骨の細胞数がキットの性能に影響するかを確認するために、実際の検体量とその 1.5 倍の検体量（最終製品では検体量：200μL と 300μL、中間製品では検体量：20μL と 30μL）がそのキットの性能に影響するかどうかを検討した。

2-1. 試験方法

2-1-1. マイコプラズマ菌株

本試験に使用するマイコプラズマ菌株について、平成 26 年度の先行事業での検討結果から、検出感度の低い株 *Acholeplasma laidlawii*（以下、*A. laidlawii*）、と検出感度の高い株 *Mycoplasma orale*（以下、*M. orale*）を選択した。

2-1-2. 検体

被検物質１（最終製品検体）、被検物質２（中間製品検体）、被検物質３（組織保存溶液）、対照物質（日本薬局方精製水）、陽性対照（対照物質にマイコプラズマを接種したもの）、陰性対照（対照物質にマイコプラズマを接種せず、Carrier DNA を加えたもの）を用いた。細胞数及び検体溶媒量の影響を調べるために、被検物質１～3 について、実際検査に使用する検体量とその 1.5 倍量である検体量の 2 種類を用意し、検討した。詳細は下表５－１に示した。

表５－１．本試験の検体の詳細

被験物質及び対照物質（PW）	被験物質1		被験物質2		被験物質3		対照物質（PW）	
							陽性対照	陰性対照
採取量	200µL	300µL	20µL	30µL	200µL	300µL	900µL	1mL
マイコプラズマ（約10^2CFU/mL）	100µL							未接種
PW	700µL	600µL	880µL	870µL	700µL	600µL		
Carrier DNA	8µL		80µL					

2－1－3. 実施方法

実施方法の概要は下記図５－１に示した。各検体に 10CFU *A. laidlawii* または *M. orale* の菌液を個々に接種し、日本薬局方精製水と Carrier DNA を加えて、最終的に 1000μL に調製した。その後、キットのマニュアルに従って、DNA を抽出し、PCR 反応を行った。得られた PCR 産物について、電気泳動を行い、バンド有無を確認し、マイコプラズマ陰性か陽性を判定した。

１検体につき、2 回に分けて DNA を抽出し、得られた DNA について PCR 反応を 2 回ずつ行った。従って、最終的に１検体につき、PCR 反応を 4 回行った。

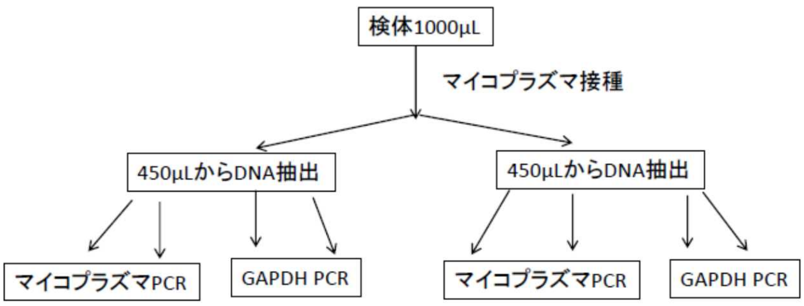


図５－１．検体のキットの性能への影響に関する試験概要

2-2. 試験成立条件

サンプル、陽性対照、陰性対照、PCR Positive Control、PCR Negative Control において表５－２の試験成立条件の結果が得られたとき、試験成立とした。

表５－２．試験成立条件

	項目	判定基準
Mycoplasma PCR	陽性対照	4レーンのうち、1レーン以上で450bpのバンドを認める
	陰性対照	バンドを認めない
	PCR Positive Control	4レーンのうち、2レーン以上で350bpのバンドを認める
	PCR Negative Control	バンドを認めない
GAPDH PCR	サンプル	2レーンのうち、1レーン以上で150bpのバンドを認める
	陽性対照	
	陰性対照	
	PCR Negative Control	バンドを認めない

2-3. 判定方法

2-2.試験成立条件を満たした場合、表５－３の判定基準に従い、各サンプルでの結果を判定した。

表５－３．判定基準

	項目	判定基準	結果
Mycoplasma PCR	サンプル	4レーンのうち、いずれのレーンにも、450bpのバンドを認めない	陰性
Mycoplasma PCR	サンプル	4レーンのうち、1レーン以上で450bpのバンドを認める	陽性

2-4. 結果

2-1-2 に示した検体種類と量による MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Kit（以下、キット）の性能への影響を調べた結果を表５－４に示した。いずれの被験物質存在下でも *A. laidlawii* 及び *M. orale* が検出され、各検体はキットの性能に影響しないことが確認された。その結果から、最終製品を被験物質とした場合、細胞数 9×10^{6} 個までならば、本キットの測定に適用可能なことが示された。

表５－４．各検体の PCR 反応結果

被験物質の採取量	被験物質1		被験物質2		被験物質3	
	200μL	300μL	20μL	30μL	200μL	300μL
被験物質の採取量あたりの細胞数	6×10^{6} cells	9×10^{6} cells	4×10^{5} cells	6×10^{5} cells		
接種菌量	10CFU					
Carrier DNA添加量	8μL		80μL			
A. laidlawii バンド	＋	＋	＋	＋	＋	＋
*M. orale*バンド	＋	＋	＋	＋	＋	＋

３．培養軟骨製品の試験系におけるキットの特異性、検出感度、

本検討は第 17 改正日本薬局方に指定された 7 菌種に対して、培養軟骨製品の試験系で使用する検体を用いた場合、どのぐらいの感度でこれらの菌株を特異的に検出できるか検討することを目的とした。また、２．の検討で培養軟骨製品の試験系で使用する検体がキットの性能へ影響しないことから、本検討では、培養軟骨最終製品 200μL を検体として用いた。

3-1. 試験方法

3-1-1. マイコプラズマ菌株

第 17 改正日本薬局方に指定された 7 菌種を使用した。詳細は表５－５に示した。

表５－５．試験に使用した菌種

菌種名	使用菌種
Acholeplasma laidlawii（以下、*A.laidlawii*）	NBRC14400
Mycoplasma orale（以下、*M.orale*）	NBRC14477
Mycoplasma arginini（以下、*M. arginini*）	ATCC23838
Mycoplasma pneumoniae（以下、*M. pneumoniae*）	NBRC14401
Mycoplasma fermentans（以下、*M. fermentans*）	NBRC14854
Mycoplasma salivarium（以下、*M. salivarium*）	NBRC14478
Mycoplasma hyorhinis（以下、*M. hyorhinis*）	NBRC14858

3－1－2. 検体

最終製品を検体として用いた。最終製品の調製制限により、1 回の調製で 1 菌種用の最終製品量しか用意できないため、各菌種用の最終製品の調製日（ロット）が異なる。ロットに応じて被験物質を被験物質 1、2、3、4、5、6、7 と定義した。第 17 改正日本薬局方のマイコプラズマ否定試験案には、核酸増幅法（NAT）を A 法（培養法）の代替法として用いる場合、NAT は上記のマイコプラズマ 7 種全てについて 10CFU/mL を検出可能なことを示す必要がある、と記載されている。そこで今回は被験物質に対して各菌株につきそれぞれマイコプラズマ 10CFU と 5CFU を接種し、検出感度を検討した。

また、試験の繰り返し数は、最終製品の製造能力、試験実施施設の処理能力、及び統計的に処理必要な N 数を考慮し、6 回測定とした。詳細は表５－６に示した。

表５－６．被験物質及び対照物質（PW）における測定数

	被験物質及び対照物質（PW）の採取量	被験物質		対照物質（PW）		被験物質1
				陽性対照	陰性対照1	陰性対照2
		200μL		900μL	1mL	200μL
	接種菌量	5CFU	10CFU	10CFU	未接種	未接種
被験物質1	*A. laidlawii*	6測定	6測定	1測定	1測定	1測定
被験物質2	*M. orale*	6測定	6測定	1測定	1測定	
被験物質3	*M. arginini*	6測定	6測定	1測定	1測定	
被験物質4	*M. pneumoniae*	6測定	6測定	1測定	1測定	
被験物質5	*M. fermentans*	6測定	6測定	1測定	1測定	
被験物質6	*M. salivarium*	6測定	6測定	1測定	1測定	
被験物質7	*M. hyorhinis*	6測定	6測定	1測定	1測定	

3－1－3. 実施方法

2-1-3. 実施方法に準じた。

3-2. 試験成立条件

2-2. 試験成立条件に準じた。

3-3. 判定方法

2-3. 判定方法に準じた。

3-4. 結果

下記の表に示したように、培養軟骨最終製品を検体として用いた場合、第 17 改正日本薬局方で指定されている 7 菌種のマイコプラズマ（*A. aidlawii*、*M. orale*、*M. arginini*、*M. pneumoniae*、*M. ermentans*、*M. salivarium*、*M. hyorhinis*）を本キットにより 5CFU/200μL の検出感度で検出できることを確認した（表５－７）。

表５－７. 各菌株における検出感度

接種菌量	5CFU	10CFU
	陽性数/測定数	陽性数/測定数
A. laidlawii	6/6	6/6
M. orale	6/6	6/6
M. arginini	6/6	6/6
M. pneumoniae	6/6	6/6
M. fermentans	6/6	6/6
M. salivarium	6/6	6/6
M. hyorhinis	6/6	6/6

４. 結論

MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Kit（Roche Diagnostics 社）を用いて、培養軟骨製品に適する迅速なマイコプラズマ否定試験法を確立できた。第 17 改正日本薬局方の要求要件を満たした方法で、5CFU/検体の検出感度でマイコプラズマを検出できた。

4. まとめ

１．軟骨細胞の有効性を担保する品質管理手法の確立

(1) 変形性関節症患者由来軟骨細胞と正常軟骨細胞の同等性の評価手法の開発

本年度の成果により、OA と非 OA 細胞の同等性を評価する軟骨細胞評価マーカーを「同等性アッセイ」として抽出し、治験時に実施する特性解析方法として治験時に得られる少数の余剰細胞で実施できる形で確立でき、弘前大学、大阪大学の共同研究において、検証することができた。

これまでの炎症系の因子に関しては、OA 軟骨と非 OA 軟骨を比較すると OA 軟骨で高い発現を認めたが、増殖特性、細胞表面マーカーや軟骨の再分化に関する遺伝子発現、さらに軟骨細胞への再分化能については大きな相違はないという肩由来の非 OA 軟骨を用いた分析結果について、今後治験で入手可能な非 OA 患者の膝関節由来の正常軟骨の一部を用いて、膝 OA 軟骨や肩の非 OA 軟骨との相違を明らかにして、外挿可能な評価項目や基準値等について考察したいと考える。

(2) 光学的に軟骨再生を評価する手法の開発

本年度は、ウサギやブタといった動物モデルを用い再生軟骨や変性軟骨を実験的に (ex vivo モデル) 作製し、硝子軟骨、線維軟骨、Mixed といった軟骨の再生状態の違いや軟骨変性の状態が特殊光分析によってどのように分析可能か検討を行った。その結果、ラマンスペクトル分析によりⅠ型コラーゲン、Ⅱ型コラーゲン、プロテオグリカン(GAG)の判別が可能で、ラマンスペクトル分析から得られたⅠ型・Ⅱ型コラーゲン・硫酸化 GAG の総タンパク質量に対する相対量にと軟骨再生の指標に相関があり、マイクロフラクチャーによる線維軟骨を中心とする未熟な軟骨と、培養軟骨の差を検出できることが示された。また、ヒト OA 患者由来軟骨摘出組織においても、ラマンスペクトル分析から、硫酸化 GAG の量に関わる情報を得、コラーゲン分子構造の変性を検出することで、軟骨の変性についての定量的な分析の可能性が示された。

本年度は摘出サンプルの評価を行っているが、将来本手法が関節鏡下で実施できるようになれば、現在バイオプシーおよび組織学的にしか評価できない軟骨の構成成分などの再生軟骨の質について、軟骨を傷つけることなく定量的な評価が行えるようになるものと期待され、将来の新しい培養軟骨の開発にも寄与するものと考えられる。

(3) MRI による軟骨再生評価条件の標準化

治験時において MOCART スコアを中心とする MRI を用いた軟骨再生の副次的評価指標を適切に評価するために、イメージング CRO を活用し、撮像条件及び評価方法の標準化を行い、「MRI 画像評価手順書」および「MRI 撮像実施手順書」を作成した。

今回最初に治験候補施設の保有 MRI や膝軟骨 MRI 撮像条件の調査を行った結果、各施設の撮像シーケンスやパラメータはそれぞれ異なっており、最大公約数的なものがないことが分かり、軟骨再生の評価に必要な評価項目を満たすことと、各施設で保有している 1.5T /3T MRI で共通に撮像・評価可能な条件という観点で標準化を行った。培養軟骨の評価においては、国際的に MOCART が用いられており、近年では T2 マッピングなど「軟骨の質」を評価する手法についても注目が集まっている。その点で、今回の撮像条件・評価条件は、本製品固有というよりは、培養軟骨の評価に一般的なものであり、今後開発される培養軟骨の臨床評価においても参考となると考えられる。

２．軟骨細胞の培養および試験の効率化

(4) 非侵襲イメージングを活用した工程管理手法の開発

本年度は、細胞数測定の精度を実際の製造現場で活用できるレベルに向上させることができた。実際の製造シミュレーションによって、ヒト軟骨細胞を培養して回収できた細胞数と本非侵襲イメージング装置での測定の差異を検討し、当初の目標である±20%の正確度から大きく外れず測定が可能となり、実用的なレベルに達したと考えられた。本非侵襲イメージングは個人の判断差の激しい継代のタイミングの判断などを定量的に行うことができるため実際の製造現場で有用と考えられる。2015/12 に本非侵襲イメージング装置提供元であるオリンパス㈱より、本検討で利用しているものと同じアルゴリズムを用いた細胞密度計測ソフトウエア「CKX-CCSW」が発売され、研究現場・製造現場で利用できる環境が整ってきていると考えられる。

また、細胞数の計測以外にも、細胞の形態学的特徴量の解析により、滑膜細胞および軟骨細胞が特定の画像特徴量により分離できる可能性が示されるなど、非侵襲イメージングによる品質・工程管理の可能性が広がったと考えられる。

(5) 再生医療等製品に適合されるマイコプラズマ否定試験手法の開発

本年度は、医薬品の承認に使用実績のある Roche Diagnostics 社製 MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Kit を用いて、第十七改正日本薬局方改正案に従って検討を実施し、PCR 法による当該製品のマイコプラズマ否定試験法の確立を行った。その結果、第十七改正日本薬局方で指定される 7 種類のマイコプラズマ菌種に対して、いずれも 5 CFU/検体が検出できることを確認した。本課題は、多くの細胞製品に共通の課題であり、他の再生医療等製品の特性に応じて本検討を実施することにより、同様に適用できると考える。今後、実際の製造の中で行われる品質管理プロセスでの検証を行うことによって、製造販売段階において本手法による迅速なマイコプラズマ試験が活用されることが期待される。