

平成27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)

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)
研究開発課題名	密封培養システムにおける上皮シートの品質評価法の確立
研究開発担当者 所属 役職 氏名	国立大学法人東京大学 医学部附属病院 角膜移植部 准教授 山上聡

## 目次

1. 事業の目的	P. 3
2. 実施内容及び結果	P. 5
3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容	P. 6
4. まとめ	P. 16

## 1. 事業の目的

### 1. はじめに

再生医療等製品の製造業の許可を得るための必要な製造所の構造設備について以下の省令により定められている。

- ①再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令（平成 26 年 8 月 6 日厚生労働省令第 93 号）
- ②薬局等構造設備規則(昭和 36 年 2 月 1 日厚生省令第 2 号[改正 平成 27 年 4 月 1 日号外厚生労働省令第 80 号〔第一七次改正〕])
- ③医薬品、医薬部外品、化粧品及び再生医療等製品の品質管理の基準に関する省令（平成 16 年 9 月 22 日厚生労働省令第 136 号）（平成 26 年 8 月 12 日薬食発 0812 第 11 号にて通知）

これら製造所の構造設備は外部からの汚染リスクを低減させるために、清浄度が管理された空間であり、構築と維持に多額のコストが必要である。

一方、再生医療は他人の組織・細胞を使用した多くの製品は拒絶反応を起こす。移植・投与された再生医療等製品による拒絶反応を回避する最も簡便な手法は、患者由来の組織・細胞を原料に再生医療等製品を製造し、拒絶反応を起こさせないことである。

即ち、拒絶反応を回避するために患者自身の組織・細胞を原料にした再生医療等製品は、その患者にしか使用できない個別化医療である。個別化医療である自己組織・細胞由来再生医療の製造は大量生産によるコストの低減が不可能である。現行の省令が定める構造設備は大量生産が前提であり個別化医療の様な小スケールロットの生産には対応していない。現行の構造設備の構築や維持に必要なコストを回収するには、極めて高額な再生医療等製品の製品化が必要である。そのため必要なコストを回収することは困難であり、事業化リスクを大きくしている。実用化しても高額治療費により必要な患者が再生医療による治療を受けられず、治療費を国が補助した上で普及すれば医療費の国民負担が重くなり、実用化が困難である。

再生医療を実用化し、普及させるには、再生医療等製品の開発と製造に係る安全性を維持、又は向上させた上で、コストを低減し、事業化リスクを低減し、実用化した際の患者・国民負担を許容できる範囲にまとめなければならない。

更に、省令で規定された清浄度環境には作業員が立ち入り、製造作業を行わなければならない。安全性や品質が保証された再生医療等製品の製造にあたる作業員には熟練した製造技術や品質管理の能力が求められるほか、清浄度管理された環境についても精通している必要がある。製造における安全性、品質保証や清浄度管理は煩雑であり、労力の負担が大きく、安全性を保证するための作業がミスを引き起こし、安全性を損ないかねない。そのため現行より安全性や品質保証をより確実に行ったうえで労力を低減化させることが望ましい。

我々は、再生医療等製品の製造業の許可を得るための必要な製造所の構造設備よりも安全でコストが安価な「密封培養システム」を開発した。密封培養システムは開発時点で以下の特徴と利点をもつ。

1. 本体はガス透過性の樹脂バッグで構成された消耗品タイプの密封培養システムであり非常に安価である。
2. 製造開始前に無菌環境を保証できる。
3. 全行程にわたり密封環境で製造できるため、一度構築した無菌環境を保持できる。
4. 密封環境であるため、汚染原因である外部環境の影響を受けない。
5. 作業者が高度に清浄度管理された環境に立ち入る必要がなく、労力の負担軽減が可能である。

密封培養システムは外部汚染リスクを完全に排除できるため、原理的には必要な製造所の構造設備の大幅な省略が可能である。

しかしながら、本研究で実施される全行程が密封（閉鎖/気密）環境で行われる密封培養システムは新しい概念であり、再生医療等製品の製造を規定する省令では想定されていない。そのため、規制上の要求事項は不明である。

今回、角膜上皮幹細胞疲弊症による失明を克服する手段である粘膜上皮シートを用いた角膜上皮再生医療の開発を気密環境で行い、それらの評価項目を元にPMDAと薬事戦略相談を複数回実施し、全行程が密封環境で行われる再生医療等製品の製造工程について幅広い議論を行い、記録として保存すべき項目については対面助言を実施し、気密環境中で再生医療等製品を製造する為に必要な評価項目の洗い出しを行った。その上で消耗品型の密封培養システムを用いた再生医療等製品の低コスト化について、既存の構造設備で製造される開放系培養法と比較、評価を行った。

その上で規制当局の要求事項の明確化と実用化に向けて解決すべき問題点の抽出と考察に取り組んだので報告する。

## 2. 実施内容及び結果

### ① 既存法の評価手法と製造工程における問題点を解決する別手法の提案

製造工程の問題点は汚染源である人が作業するため汚染リスクを完全に排除できない清浄環境の状況である。機械化も一つの解決策であるが、機械化は汎用性の確保に問題があり、また高価でありコスト削減に課題がある。そこで、我々が開発をした消耗品型の密封培養システムを用いた全行程密封環境での製造工程を提案する。これにより、従来求められていた細胞加工施設の厳格な清浄基準が必要でなくなり、安全性の確保に必要であった外部汚染リスクに対する評価項目が必要でなくなる可能性がある。これにより大幅な安全性向上とコスト削減が見込めるため、本提案が有望と考えられる。

評価すべき項目として、既存法の開放系培養では、ガス交換が容易であったが消耗品型の密封培養システムでは不明である。そのため、既存の開放系培養との密封環境で製造された粘膜上皮シートの品質同等性の比較を行う。

品質・治療効果の同等性評価は幹細胞密度が重要と考えられるが、幹細胞密度を計測する手法はない。また一般的には幹細胞の特異的マーカーを探索し、免疫染色法で計測する手法が考えられるが、この方法は破壊的検査法であるため、患者へ移植する再生医療等製品に直接実施することは困難である。そのため幹細胞密度と相関すると考えられる細胞の増殖能を評価した。

このほか、十分な細胞の増殖の結果得られることが期待される粘膜上皮シートの重層化や、開放系培養でも得られている幹細胞の特性能力保持の指標となる未分化マーカーの発現の評価を行った。

密封培養システムでは、製造工程における新規の新鮮培地の投入はリスクである。そのため、培養液は予め密封培養システムに封入される。使用直前に調整するものでなく、粘膜上皮シートの製造中、培養液は37℃の条件で保存されることになるため、培養液の効果の同等性試験も併せて評価する。同様に粘膜上皮シートのキャリアである培養基材についても、予め滅菌と保存により期待された性能を発揮し得るか評価した。また、製造工程中の非破壊検査法としてどのような手法が可能か検討した。

### ② 密封培養システム試作品製造（～平成27年12月）

消耗品型密封培養系を用いた再生医療等製品の要求事項の明確化や、同等性評価により新たな機能が必要、又は不要になることが想定されるため、随時、消耗品型密封培養システムの試作品改良と製造を行った。

### ③ 報告書取りまとめ

製造に必要な清浄環境の初期投資コストなど製造コストを低減する方策を提案、報告するために、消耗品型密封培養系を用いた再生医療等製品の承認審査、適合性評価等に当たってPMDAの見解を相談記録として公式に入手し、同等性評価の試験結果や現行の制度について考察した。

### 3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容

#### 3-1. 密封培養システム試作品製造

目的：

1. 粘膜上皮が培養可能であり外部環境と隔離された気密環境を構築すること
2. 気密環境を保持して培養液と廃液の交換が可能なこと
3. 組織／細胞の注入時の外部汚染リスクを最小限にすること
4. 滅菌が可能なこと

上記目的を達成するために以下の工作を行い、気密環境を構築した。

1. 培養と外部環境との隔離を達成するために、ガス透過性の樹脂からなるバッグを用いて気密環境を構築した。
2. 気密環境を保持して、培養液・廃液を交換可能にするために、バッグに培養液供給チューブと廃液チューブを付属させ、それぞれにガス透過性バッグを付与し、培養液・廃液バッグとした。
3. 製造者の意図したタイミングで培養液等の交換が可能ないように、廃液チューブにクレンメを付与した。
4. 廃液の逆流と、培養液と廃液の接触を防止するため、空封を使用することとし、廃液チューブに点滴筒を付与した。
5. バッグに組織／細胞を注入する際に、汚染リスクが最小になるよう医療用ゴム栓を付与した。
6. バッグ中に移植キャリア等を密封し、電子線滅菌照射による滅菌を検証した。

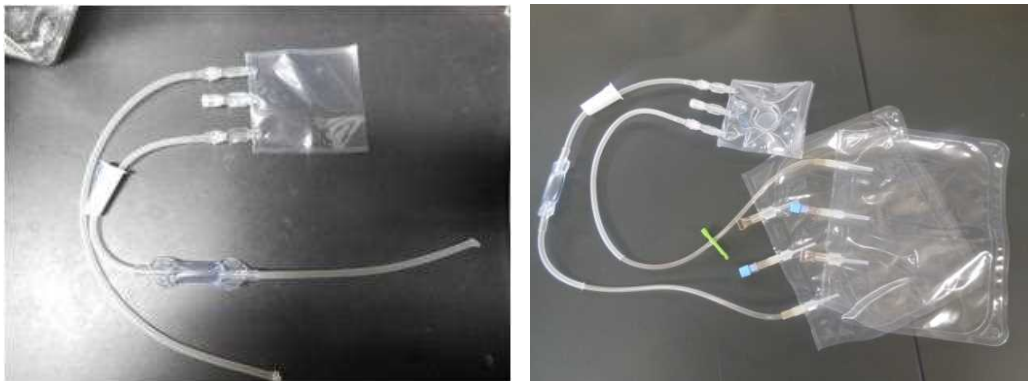


図1. 試作品外観

左図の本体部分は、組織／細胞注入用のゴム栓が備わる。培養液供給チューブと廃液チューブが備わっており、培養液・廃液用バッグとの連結が可能である。廃液チューブには、廃液と隔離するために点滴筒を設置した。また流量の調節が可能なようクレンメを設置した。右図は本体に移植用キャリアである羊膜を封入し、培養液・廃液バッグを連結し、構築した密封培養システム。

またガス透過性については以下の通りである。

構成		本品
O <sub>2</sub> 透過性	cm <sup>3</sup> /(m <sup>2</sup> ・24h・atm)	2140
CO <sub>2</sub> 透過性	cm <sup>3</sup> /(m <sup>2</sup> ・24h・atm)	304

本密封培養システムの製造コストは約6千円であった。量産により更にコストの低減が可能になると考えられる。

参考に、従来の細胞加工施設（400m<sup>2</sup>）を建設した場合のコストについて、記載する。本システムの実用化で、下記に記すコストを削減することが可能である。

- ・見積額：2.8億円（建築内装、電気設備、空調衛生設備込み）
- ・バリデーション費用：室内に設置してある機器一点（クリーンベンチやインキュベータなど）につき、13万～30万円
- ・室内サニテーション：30万円/部屋

実際の稼働には施設ダクト改修工事など3000万円超の様々な追加工事が必要で、コスト全体を明らかにすることは難しい。

また製造に必要な機器類は5部屋からなる細胞加工施設の中で、2億1千万円程度のコストが必要であった。

### 3-2. 密封培養システムによる低価格粘膜上皮シートの評価

本密封培養システムを用いて、粘膜上皮シートが作成可能か評価を行った。

#### 1. 密封培養システムの安全性評価



図2. 電子線滅菌

構築した密封培養システムは、15kGy相当の電子滅菌により、滅菌が可能である。

15 kGy相当の電子線滅菌を行った上で、滅菌フィルターを介して培養バッグに培養液を充填した。充填した培養液を使って、密封培養システムの漏出試験・無菌試験が可能であり、気密環境の完全性を再生医療等製品の製造前に保証が出来る。



図3. 無菌充填とリーク試験・無菌試験

ペリスタポンプを用いて、培養バッグに付属したニードレスコネクタを通じて培養液を充填できる。充填した培養液をシステム全体に還流させ、数日間安置後に、予め雑菌などの汚染が無いか事前に無菌性の確認が可能であった。また、液体の培養液の漏出を確認することで、システム全体の気密性の完全性について確認をすることが出来る。

組織／細胞の注入時の外部汚染リスクを最小限にするために、医療用ゴム栓を採用した。ゴム栓は既に医薬品の密封に使用されており、注射液等の安全な調整や採取に使用されてきた実績がある。ゴム栓部より、医療機関内で組織／細胞の汚染リスクを低減した注入が可能であると考えられる。また、同種ゴム栓を付与した大型のバッグを試作し、18Gによる注射針で刺突した後、気密を維持しているか試験を行った。

まず、注射針を刺突し、空気を注入しバッグを膨満させ、内部の空気が排出されるかを検査し、気密系が保たれているか確認したが、ゴム栓部からの空気の流出は認められなかった。またこの状態で水中に漬けて、気泡の発生やバッグ中への水の漏出などを確認したが、それら外部環境との接続は認められず、組織／細胞注入に際して刺突されるゴム栓部が外部環境からの隔絶に十分な効果を発揮できることを確認した。





図4. ゴム栓の安全性試験

医療機関内における組織／細胞注入による汚染リスクを低減させるために、医療用ゴム栓を使用した。ゴム栓は医薬品の密封の実績がある。下段は空気で膨満させた試験用バッグ。風船のように膨らみ、内部の空気の漏出は認められない。水中に漬けても気泡の発生は認められなかった。

次にゴム栓部のコアリング発生リスクについて、連続コアリング試験により評価した。評価方法は、ゴム栓部へ15G, 16G, 18Gの針を用いて、コアリング発生まで連続して突き刺し、何回目の連続刺突でコアリングが発生するかを、発生時に浮遊してくるゴム片を視認することで行った。結果について示す通り、15Gでは8回目、16Gでは、10回目、18Gでは20回目でコアリングが発生し、単回使用が前提の本システムではコアリングによる気密環境破綻のリスクは極めて低いと考えられる。

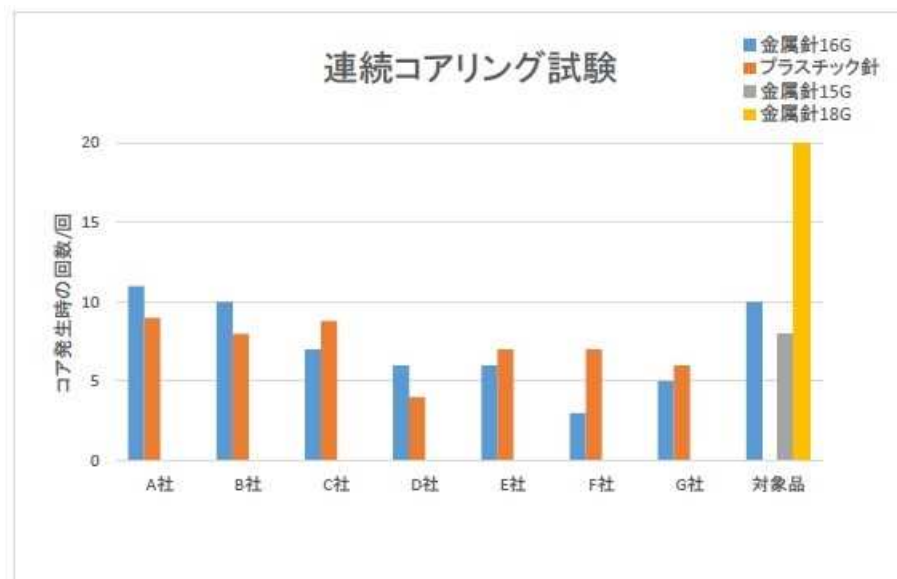


図5. ゴム栓の安全性試験 連続コアリング試験結果

## 2. 密封培養システムによる低価格粘膜上皮シートの製造

本システムを用いて、再生医療安全性確保法施行以前に角膜上皮幹細胞疲弊症の治療に用いられていた羊膜上培養結膜上皮シート（眼粘膜上皮シート）の作成を行い、品質・安全性について評価した。

材料：

米国アイバンクより提供された研究用ヒト角膜

密封培養システム

工程	原材料	製品名、メーカー； 品番等	品質
組織採取 (組織採取用 培地)	培地	D-MEM/Ham's F-12(L-グルタミン, フェノールレッド, HEPES, ピルビン酸ナトリウム含有) 和光純薬; 042-30555	供給元規格
	抗生剤	抗生物質-抗真菌剤溶液(100×)(安定化) SIGMA-ALDRICH; A5955	供給元規格
羊膜処理	生理食塩水	大塚生食注 大塚製薬; 14900AMZ00188	医薬品
	羊膜	ヒト由来羊膜 (研究用に提供されたもの)	自主規格

培養液	培地	D-MEM/Ham's F-12(L-グルタミン, フェノールレッド, HEPES, ピルビン酸ナトリウム含有) 和光純薬; 042-30555	供給元規格
	B-27 Supplement	B-27 Supplement (50X) Thermo Fisher Scientific; 17504-044	供給元規格
	抗生剤	抗生物質-抗真菌剤溶液(100×)(安定化) SIGMA-ALDRICH; A5955	供給元規格
	KGF	ケラチノサイト成長因子、ヒト、組換え体、動物由来物フリー 和光純薬; 116-00811	供給元規格
コート剤	無水エタノール	エタノール(99.5) 和光純薬; 057-00456	供給元規格
	p-HEME	Poly(2-hydroxyethylmethacrylate) -BioReagent, powder, suitable for cell culture	供給元規格

原材料・製造用物質に使用する、患者以外のヒト又は動物から得られたものに係る名称、本質及び性状並びに成分及びその含有量

原材料	製品名、メーカー、品番等	備考
羊膜	ヒト由来羊膜 (先進医療等の研究用に提供されたもの)	15kG 電子線滅菌を施す
B-27 Supplement	B-27 Supplement Thermo Fisher Scientific; 17504-044	動物由来原料含有

原材料・製造用物質に使用する、微生物から得られたものに係る名称、本質及び性状並びに成分及びその含有量

原材料	製品名、メーカー、品番等	備考
KGF	ケラチノサイト成長因子、ヒト、組換え体、動物 由来物フリー 和光純薬； 116-00811	組換えKGF Animal  Origin Free (製造工程含む)

最終製品の試験について以下の項目を設定し実施した。

	内容	方法	評価項目	規定値
品質	外観の確認試験	目視確認	1. 微生物の発生がない	
		顕微鏡観察	1. 微生物の発生がない 2. 細胞がコンフルエントに達していること 3. 細胞増殖の停止・退縮がないこと 4. 上皮様細胞であること	細胞被覆率 100% 上皮様以外の異形細胞含有率 0%
			重層化している	単層でないこと
	特性評価	免疫染色法	粘膜上皮細胞に特異的なケラチンマーカートの発現がある	CK4、CK13 等の発現
		組織染色法	重層化している	単層でないこと
安全性	無菌試験	培養法	細菌、真菌の定性	不検出
	マイコプラズマ試験	培養法	マイコプラズマ	不検出
	エンドトキシン試験	比濁時間分析法	エンドトキシン	1181EU/mL 以下

方法：

構築した密封培養システムに封入した羊膜上に、研究用輸入角膜から採取した結膜細胞を 18G の注射針を用いて、1ml シリンジを用いて、注入した。

密封培養システムを下図のように、培養液を充填した培養液バッグを上段に、本体を中段に、廃液バッグを下段に設置し、クレンメを緩め、増殖因子が含まれる培養液を本体部にセットした羊膜が浸る程度に流入させ、一晩放置した。一晩放置後、結膜細胞が羊膜上に接着していることを確認後、クレンメを開放し本体内に培養液を満たした。培地交換は一日一回、クレンメを弛緩させることで行い、羊膜上の細胞が培養面積に対して被覆率が 100% になるまで培養し、確認後、約一週間まで培地交換を実施した。



図6. 密封培養システムで培養中の結膜細胞

図のように、培養液を充填したバッグを上段に置き、培地交換の際は、クレンメを緩めて行う。培地交換は重力を用いるのでポンプなど使用しない。作業者はクレンメを緩めて、閉じるだけの負担が軽い労力で済む。  
培養中の観察は通常の顕微鏡観察で行った。

結果：

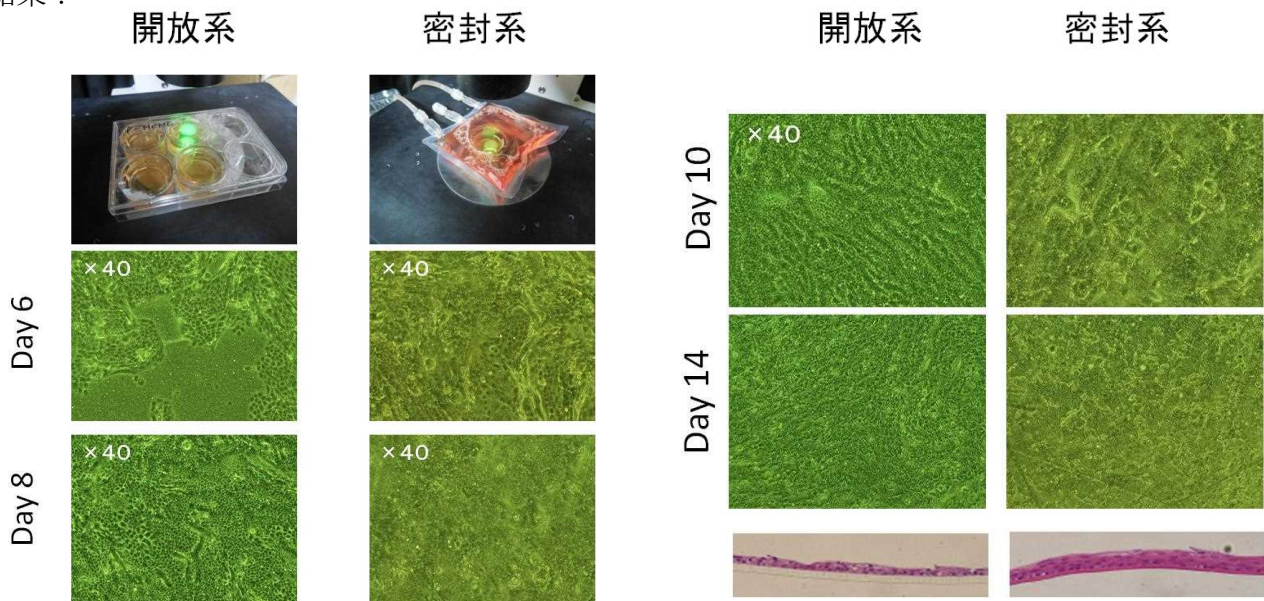


図7. 密封培養システムと開放系培養の比較

結膜細胞を10万個注入し、開放系と比較検討した。両者とも培養開始後8日目で被覆率100%に達した。2週間の培養後、ホルマリン固定し、重層化について検討したところ、開放系より密封系のほうが重層化度合いは高かった。開放系では朝・夕に培地交換を10ml行っているが、密封系では容積が大きく培地劣化が遅延するため一日一回の培地交換を行った。培養液劣化の影響を受けないため開放系より優れた結果が得られたと考えられる。

その結果、開放系と比較して密封系では増殖の遅延などは見られず、印象としてむしろ開放系より良く増殖した。また重層化の程度も優れており、酸素濃度の差などが考えられるが、密封系の容量は大きく、培地劣化の影響をより受けにくいためと推察される。

また、結膜線維芽細胞様の細胞の出現は確認されなかった。

結膜上皮マーカーはサイトケラチン4、13が用いられる。また未分化マーカーとしてサイトケラチン15が指標と出来るので、これらの蛋白質が発現しているか、免疫染色を行い、確認した。

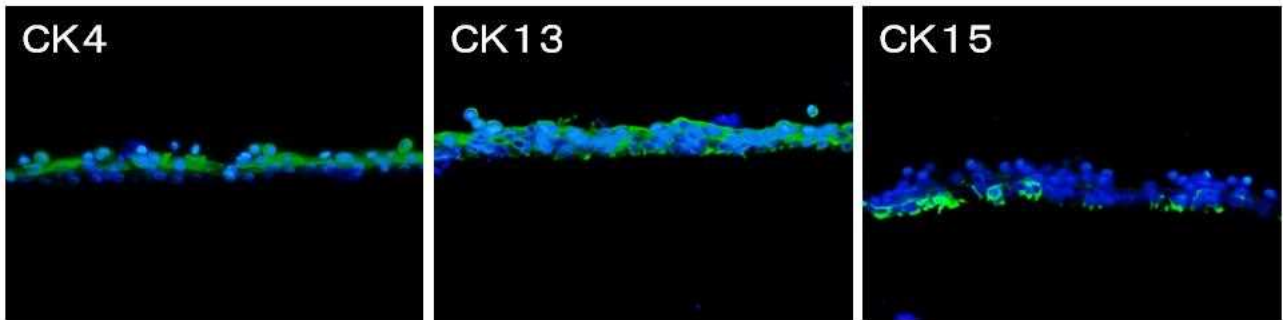
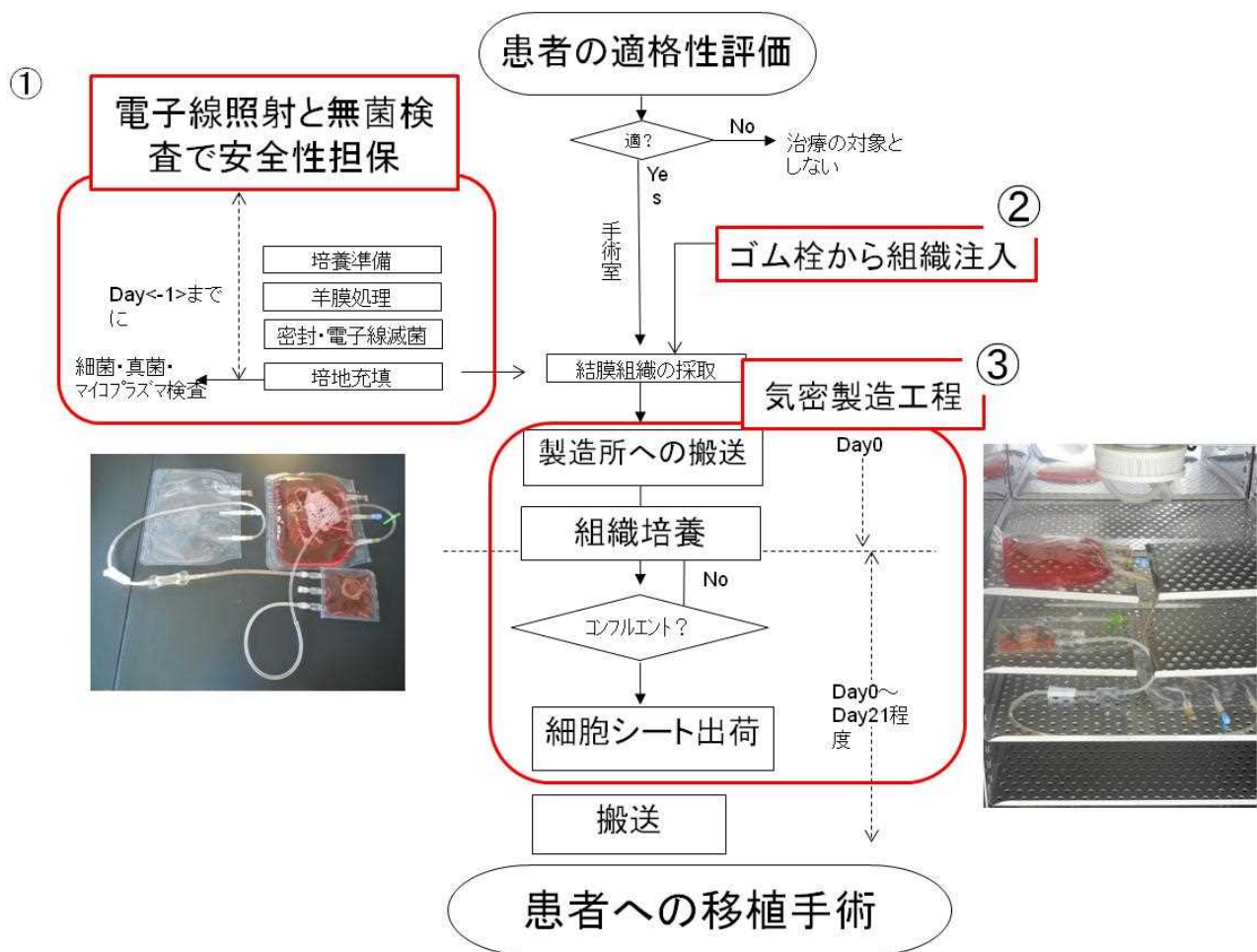


図8. 密封培養システムで製造されたサイトケラチン発現パターン  
 結膜上皮細胞マーカーである、サイトケラチン4、13陽性であり、正常な結膜上皮細胞が形成されている。また未分化マーカーであるサイトケラチン15が発現していることから、細胞供給能をもった結膜上皮シートと判断される。

上記結果から、外部環境と隔離された密封培養システム中で、角膜上皮幹細胞疲弊症に対して臨床実績がある結膜上皮シートの製造が可能であった。

製造指図書をまとめると下記のようなになる。



### 3. 対面助言での議論

#### 消耗品型密封培養系を用いた再生医療等製品の要求事項の明確化

研究開発の到達点として、消耗品型密封培養系を用いた再生医療等製品の要求事項を明確化するために、本研究事業期間中に独立行政法人 医薬品医療機器総合機構（以下PMDA）に対して2回の薬事戦略相談事前面談と1回の薬事戦略相談（対面助言）を行った。

対面助言を実施する前に議事録として記載すべき論点を整理するための事前面談を3回実施した。

対象の被験物は「羊膜上培養結膜上皮シート（眼粘膜上皮シート）」である。

#### 質問事項は

1. 生物由来原料基準の適性について
  2. 気密環境で再生医療等製品を製造する作業所がクリーンルームでないことの可否
  3. 製造物の品質評価を観察に限定することの可否
  4. その他、気密環境での製造を可能にするために必要な事項について
- の4項目について実施した。

対面助言に先立ち、事前面談では気密環境における再生医療等製品の製造・実施に留まらず、治験を実施するために必要な項目全てに渡って、必要な情報が求められ、幅広い議論が行われた。

#### 4. まとめ

以上の結果により、密封培養システムを構築し、気密環境で角膜上皮幹細胞疲弊症の治療に用いられる結膜上皮シートの製造が可能であった。

密封培養システムは外部環境から隔絶されており、予め滅菌、無菌検査を施すことができる。作業者が立ち入る必要がなく、既存の細胞加工施設と比較して、圧倒的な低コストであり、患者自身の組織／細胞を使った再生医療の実用化に有益な手段となり得る。

一方で、省令で規定された再生医療等製品の構造設備には、気密環境での製造について全く想定されていない。また新しい概念であるため、研究者や規制当局、治療を施す医療側と治療を受ける患者間で最終的に安全性が高く、品質が保証された再生医療等製品の実用化に向けて積極的な議論を進めることが重要と考えられる。