

平成２８年度－平成２９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	再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発 「パーキンソン病に対する機能再生療法に用いる iPS 細胞由来神経細胞製剤の開発」
研究開発代表者 所属 役職 氏名	大日本住友製薬株式会社 取締役執行役員 木村 徹

目次

1. 事業の目的	2
2. 実施内容及び結果	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	10
4. まとめ	42

1. 事業の目的

パーキンソン病（PD）は、運動障害をきたす神経変性疾患として最も患者数が多く、要介護率も高いため社会的損失の最も大きな疾患の一つとなっている。黒質ドパミン神経細胞の変性・脱落が主因のため薬物療法には限界があり、再生医療への期待が高い。しかし、これまで胎児細胞や ES 細胞等を原材料としての検討がなされてきているが、実用化にあたっては倫理面や安定供給、不純細胞の混入リスクといった課題が指摘されている。こうした中、大日本住友製薬株式会社（研究開発代表者、DSP）、京都大学 iPS 細胞研究所（研究開発分担者 1、京大）、及び株式会社日立製作所（研究開発分担者 2、日立）は、本委託事業の研究開発成果や京大が実施中の再生医療実現拠点ネットワークプログラム拠点 A の成果等を発展させ、医薬品医療機器等法に基づいた、「非自己 iPS 細胞由来のドパミン神経前駆細胞を用いたパーキンソン病治療」の事業化を目指している。

本製品は、ヒト iPS 細胞を出発材料とし、神経細胞に親和性の高い合成基質上での「高密度培養」と中脳 floor plate のマーカータンパク質である CORIN の発現量を指標にした「セルソーティング」技術を組み合わせることで、高品質なドパミン神経前駆細胞（以下本製品と記載）製造を可能としたことが最大の特徴である。本製品の iPS 細胞からの分化誘導法の概略を図 1 に示した。

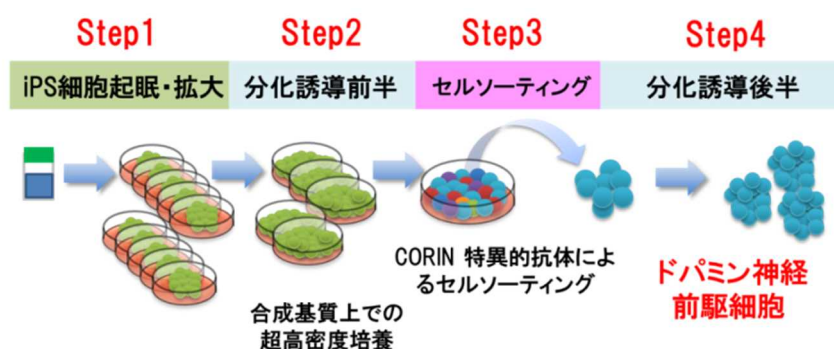


図1 本製品の製造プロセス

- Step1 (iPS 細胞の起眠・拡大): iPS 細胞を起眠し、フィーダーフリー培養にて大量調製
- Step2 (分化誘導前半): iPS 細胞を再播種し、合成基質上への接着状態で高密度培養にて分化誘導
- Step3 (セルソーティング): 表面抗原 CORIN の発現を指標にセルソーターで陽性細胞を回収、濃縮
- Step4 (分化誘導後半): 分取細胞を浮遊状態で細胞塊として培養
- 出荷

本製品の製造方法検討と品質管理戦略及びげっ歯類やサルを用いた薬効薬理試験、非臨床安全性試験はほぼ終了しており、随時 PMDA との相談を重ね医師主導治験の準備中である。使用する iPS 細胞に関しては、京都大学 iPS 細胞研究所にて作製された HLA ホモ接合体健康者由来 iPS 細胞ストックを原材料とし、GMP に準拠したセルバンクを作製済みである。以上のように、原材料、分化誘導方法やセルソーターによる細胞の分離方法についての基本プロトコールは既に確立済みであるが、現在の手作業を中心とした製法のままでは大量生産ならびに最終製品の長期保管ができず、製造コストが高額になることが予想できる。承認取得後の安定供給を考えると、PD の対象患者数から予想される生産規模において、品

質の安定化や製造コストの低減を可能とする工業的な大量製造法(新製法)を各種規制や GMP 等に対応した製造プロセスとして確立する事が必須である。

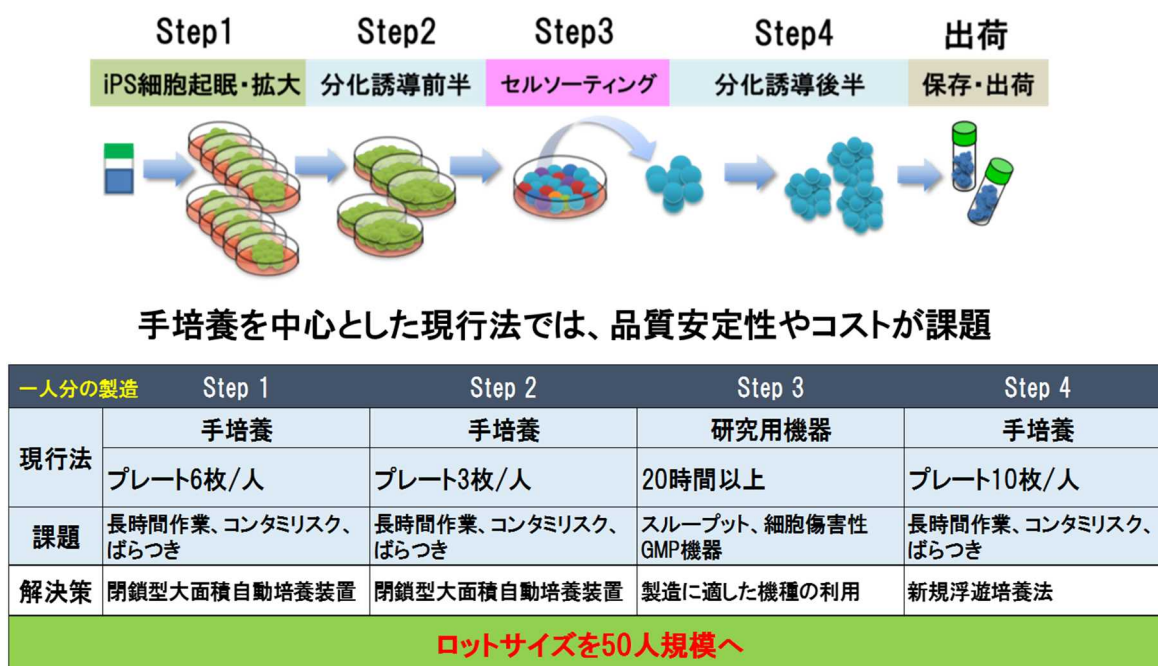


図2 本製品の現行プロセスと商用生産上の課題

現在の手培養による製造法では、図2のStep1~Step4の各工程を研究用器材にて少数の熟練した作業者によるCPC内手作業として実施する。この方法でも、数例規模の治験用サンプルを製造する際には高い品質を担保可能であり問題は無い。しかし、仮にこの製造法をそのままスケールアップし、長期間にわたって繰り返し生産する市販後のGMP製造では生産効率やリスク管理の点から課題をはらむこととなる。すなわち、煩雑な作業を伴う手培養による繰り返し製造のための労務コスト、作業者への負担、作業者間差によるロット内及びロット間差、長時間作業による細胞へのダメージや汚染リスクの増加等である。従って、工業化製法においては上記を克服すべく、各製造Stepの合理化とGMP等の規制への対応の両立が不可欠である。具体的な目標としては、品質を損なわずにロットサイズを50人規模とし、自動化によるコストダウン及び品質安定化、製品の凍結による長期保存を実現させ、GMP製造プロセスとして完成させたいと考えており、図2に示すような各Stepの改良を実施している。改良を生産設備に実装する際には、現行法との同等性評価手法の開発及び基準値の設定、さらには各種変更に伴うリスク評価のための特性解析などの基礎データの取得が必要となる。

このような背景の下、平成27年度の本事業では、産業化の核となる課題設定として、自動培養プロセスやセルソーターの要件検討、凍結した神経細胞塊の評価手法の開発などに取り組んできた。続いて平成28~29年度の本事業では、平成27年度の事業を発展させ、産業化の完成を狙った課題設定として、前述の各Stepの改良に対応させ、以下の6つの具体的な研究開発項目を設定した。それぞれの研究開発項目について同等性評価指標を明確化し、バンク由来iPS細胞や研究用iPS細胞を用いて現行法及び新製法にてデータを採取し、新製法での同等性を担保することが可能な同等性評価手法の開発、導入妥当性の検証を目指して研究を進めた(図3)。

具体的には、Step1, 2における大規模培養技術として自動培養装置の導入を検討し、また Step3 では、細胞選別用抗体の具体的な製造管理法及びリスク評価手法を開発するとともに工業用ハイスループットセルソーターの導入検討を進め、本格的な GMP 対応に取り組んだ。Step4 については、培養方法の選択を進め、候補となる新規培養方法を選定した。最後に本製品の出荷時の凍結保存方法の検証も進め、凍結保存細胞の非臨床有効性・安全性評価を実施した。さらに、これらの一連の検討において取得したデータ及び京大にてこれまでに取得済みの膨大な非臨床データを活用し、Step ごとに同等性評価手法を開発し、製造プロセスへの導入妥当性の検証及びそのリスクアセスメントを実施した。

本研究成果は、iPS 細胞による再生医療の製造における本質的な課題を解決するための先行事例となると期待している。

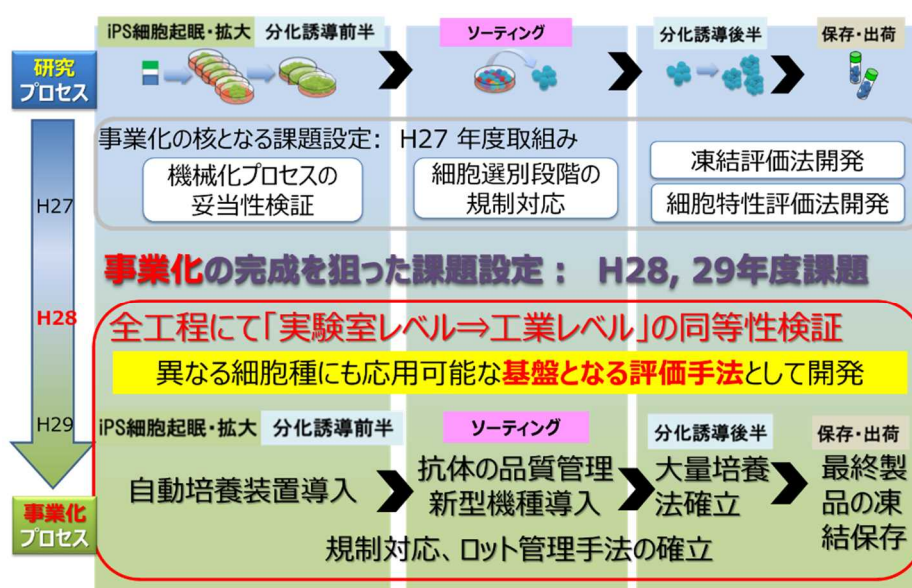


図3 本事業におけるの取り組み概要

研究開発項目① セルソーティング用抗体の品質評価手法の開発、残存リスク評価の理論構築

実施者：DSP

研究開発項目② 改良型セルソーター導入における同等性評価手法の開発、妥当性検証

実施者：DSP

研究開発項目③ 新規浮遊培養法における同等性評価手法の開発、妥当性評価

実施者：DSP

研究開発項目④ 閉鎖型自動培養装置導入における同等性評価手法の開発、妥当性検証

実施者：日立

研究開発項目⑤ 凍結プロセス導入時の非臨床有効性・安全性評価および非凍結細胞との同等性評価手法の開発

実施者：京大

研究開発項目⑥ 製造毎のばらつきを把握する評価手法の開発およびロット管理手法の戦略構築

実施者：京大

2. 実施内容及び結果

本研究開発事業では、これまでに述べた製造に関する諸問題を解決し、低コストで再現性の良い GMP 製造に相応しい生産体制を確立するために、同等性評価手法の開発及び導入妥当性の検証、各種変更に伴うリスク評価のための基礎データの取得を目的として、下記の内容を計画、実施した。

【研究開発項目①】 セルソーティング用抗体の品質評価手法の開発、残存リスク評価の理論構築

・実施内容

本製品の製造における重要工程として、標識抗体を用いたセルソーティングプロセスがある。抗体産生細胞は樹立済みであり、これまでの基礎研究により実用性は十分に検証済である。しかし、長期間にわたる使用についての具体的な管理体制や規制対応、標識抗体製造毎の品質評価法についての検証は不十分であった。そこで、再生医療等製品の原材料として長期間にわたって使用するために、標識抗体の GMP での製造管理、ウイルス安全性管理体制の構築、生物由来原料基準等の各種規制対応を実施した。また、標識抗体の物理化学的・生化学的特性を把握し、抗体製造毎の品質評価法や日常管理基準値の設定も実施した。さらに、セルソーティング後の製品に残存する抗体の影響に関しては、ヒトにおけるリスク管理について理論構築を行った。

・方法および結果

PMDA への対面助言実施により課題を明確化し、この中で最も重要な課題であるウイルス安全性管理体制について ICH-Q5A に準拠してウイルス試験や抗体製造工程中のウイルスクリアランス試験を実施し具体的な抗体製造管理体制へ反映させた。これにより本製品の製造原料として生物由来原料基準に適合した標識抗体を製造した。さらに、平成 27 年度の本事業にて開発した物理化学的・生化学的評価法を応用し、ELISA 法による抗体の品質評価法を完成させ、未標識抗体の品質評価試験として決定し、これにより長期保存安定性を確認した。また、標識抗体の性能評価法としてセルベースアッセイ法及び ELISA 法を新たに確立し、保存温度等の日常管理基準を設定した。さらに、最終製品中に残存する抗体量を実測する評価手法を開発し、ワーストケースを想定した実測データに基づくリスク管理理論を構築した。

【研究開発項目②】 改良型セルソーター導入における同等性評価手法の開発、妥当性検証

本製品の製造における Step3 のセルソーティングによる細胞分取は必須のプロセスである一方、研究用の現行機種ではスループット及び GMP 対応に課題がある。研究用機種では jet in air 方式と呼ばれる機構が主流で、これは細胞を含む液滴を形成し蛍光強度を指標に選り分ける方式である。この方式では、分取精度と分取速度がトレードオフの関係となり、装置を複数台並べる以外これ以上の高速化は原理上不可能である。また、セルソーティングが開放環境で実施される上、細胞が触れる流路のディスポーザブル化が困難であるため GMP 製造においては無菌性の担保に多大な労力が必要である。従って、スループット及び無菌性等規制対応面で最も優れたセルソーターとして閉鎖型の並列マイクロ流路型セルソーターを選定(平成 27 年度の本事業にて実施)、導入することとした。本事業ではまず、再生医療等製品の製造におけるセルソーターへの要求を整理して評価指標の選定を実施した。さらに、新規セルソーターを用いてこれら評価指標についてデータを取得するとともに、iPS 細胞から本製品を作製した。作製したドパミン神経前駆細胞に対する品質項目解析や特性解析データ等、同等性に関して評価す

べき指標についてデータを採取し、同等性評価手法を開発した。また、生産機としての使用に向けて GMP 対応を進めた。

・方法および結果

再生医療等製品の製造に用いるセルソーターの要件としての指標は、これまでの研究用機種での実績値を参考とし、GMP 対応の可否、生産性や細胞品質を選定した。これらの指標に対して、細胞での評価が必要なものについて抗原強制発現細胞や iPS 細胞から分化させたドパミン神経前駆細胞を用いてデータを採取した。純度や次工程の Step4 における細胞塊形成能は研究用機種と同等以上であった。次に、細胞品質の同等性評価指標として目的細胞及び非目的細胞のマーカー発現についてのデータを取得し、既存機種と同等であることを確認した。また、生産性については新規セルソーターが大幅に良好な成績を示した。これらのデータにより新規セルソーターの同等性評価手法を開発して導入妥当性を検証し、製法変更によるリスクは「無し」と判断した。さらに、セルソーターを GMP 製造に使用するための課題をリストアップし、必要となる文書の整備手順を明確化して文書を作成した。

【研究開発項目③】 新規浮遊培養法における同等性評価手法の開発、妥当性評価

・実施内容

本製品製造における Step4 では、セルソーターによって分取された細胞を凝集させ、細胞塊として浮遊培養する。Step1~Step3 の各プロセスにおいてロットサイズを向上させるべくスケールアップ検討を進めていることから、大量の細胞塊を処理可能な GMP 製造に適した Step4 の新規浮遊培養法の構築を進めた。現行の製造法との比較解析に用いる同等性評価指標を明確化し、大量の浮遊培養が可能なリアクターあるいは特殊な形状のマルチウエルプレート等で浮遊培養を実施してデータを採取し、最適な培養法を選定した。さらに、選定した培養法については、均一性や細胞塊形成不良など同等性評価時に想定される課題を洗い出し、これらがリスクにならないことを示す検討を実施した。これらの結果を基に、新規浮遊培養法の同等性評価手法を開発し、製造プロセスへの導入妥当性を検証した。

・方法および結果

iPS 細胞から現行のセルソーターで分取した CORIN 陽性細胞を用いて、3 種類のリアクター、スリットウエルタイプの 96 穴プレート(再生医療実現拠点ネットワークプログラム技術開発個別課題(川崎重工、住友化学、住友ベークライト、大日本住友製薬)で開発)にて Step4 の培養を行い、細胞塊の形状解析や GMP 製造管理の観点から有望な培養法を絞り込み、スリットウエルプレートを選定した。次に、スリットウエルプレートで培養した細胞塊の画像解析による詳細な形状解析、免疫染色による目的細胞マーカー発現、神経突起伸長能を評価指標としてデータを取得したところ、いずれの指標も従来法と同等以上であり、一部の指標ではばらつきの低減が示唆される結果となった。本スリットウエルプレートでは、プレートの端一か所から培地を交換する。従って、培地交換時のウエル間の均一性や細胞塊の移動が潜在的リスクとして考えられたが、各ウエルに培地が均一に浸透して培地交換できること、培地交換時の細胞塊移動が起らないことも確認した。これらのデータにより新規浮遊培養法の同等性評価手法を開発して導入妥当性を検証し、製法変更によるリスクは「無し」と判断した。

【研究開発項目④】 閉鎖型自動培養装置導入における同等性評価手法の開発、妥当性検証

・実施内容

再生医療等製品を安全・安定的に製造し、かつコストダウンするためには、無菌性を維持できる閉鎖系の自動培養装置の導入は極めて有効であると考えられる。本製品製造における Step1,2 の工程を、実験用器材を用いた手培養から、大面積培養容器を用いた閉鎖系の自動培養へと変更することを検討した。またここでは、大面積の培養容器を複数枚同時に培養し、商用製造を想定しロットサイズの劇的な拡大を達成することを目指した。そこで、本製品の製造工程における Step1,2 について、閉鎖型大面積培養容器及び流路を用いた自動培養装置の適用を検討した。一方で、装置導入は、細胞製造において大きなプロセス変更である。手培養である現行法からの変更点を網羅的に抽出し、その許容範囲評価を実施した。また、本事業と並行して開発してきた閉鎖型自動培養装置の試作機を完成させ、実機を用いて Step1,2 の培養を行い、手培養によって得られた細胞と種々の指標により比較し、同等性評価手法を開発して自動培養装置導入の妥当性を評価した。

・方法及び結果

自動培養への移行に際し、変更となりうる種々の培養パラメーターについて、培養実験により細胞への影響を検討し許容範囲を設定した。設定した許容範囲を自動培養に反映するとともに自動培養装置でのフルスケール、すなわち 10 容器の並列培養により工業化製法を想定したスケールでの Step1,2 の自動培養試験を実施した。Step1 終了時の iPS 細胞、Step2 終了時の分化細胞それぞれに対して同等性に関して評価すべき評価指標として細胞形状、増殖倍率、フローサイトメトリー等によるマーカー染色等とし、手培養及び自動培養時のデータを採取した。また、自動培養にて得た細胞については、その後の製造工程を既存法の手培養にて進め最終製品を製造した。最終製品の評価は、本製品に対して既に設定済みの品質試験や特性解析などに準じて実施した。さらに、Step1～4 の各培養段階にて網羅的遺伝子発現解析を実施して遺伝子発現プロファイルを比較し、細胞の品質が手培養と同等であることを確認した。これらの結果を基に、手培養との同等性評価手法を開発して自動培養装置の導入妥当性を検証し、製造プロセスへの導入リスクが無いことを示した。

【研究開発項目⑤】 凍結プロセス導入時の非臨床有効性・安全性評価および非凍結細胞との同等性評価手法の開発

・実施内容

医師主導治験において本製品は、37℃で生細胞の培養状態で出荷され、その日のうちに患者に投与される予定である。しかしながら、国内外に広く治療法の普及を目指す承認後の製造において培養状態で出荷することは、製造施設や製造スケジュールの管理、出荷数変動による製造コスト変動、培養環境の長時間維持等解決困難な課題が多い。さらに最も重要な品質面では、培養終了後すぐに投与するというやり方では汚染検査等の一部試験の結果が投与後に判明することになり患者へのリスク要因となる上、各医療施設での細胞移植までの手順の標準化が難しく、効果にも影響する懸念がある。従って、合理化された工業化製法にて製造された本製品は、出荷前に全ての試験を終えたものを凍結保存し、必要に応じて供給することが理想である。そこで、本製品の凍結保存方法の開発を進めるとともに、凍結保存した本製品を用いて *in vitro* から *in vivo* にわたって詳細に細胞品質の評価指標を明確化し、これら指標に

対して比較解析した。さらに、パーキンソンモデルラットへの移植実験を実施し、有効性評価及び造腫瘍性などの安全性評価を実施した。これらの結果を基に、凍結保存された本製品と非凍結品の同等性評価手法を開発し、製造プロセスへの導入妥当性を検証した。

・方法及び結果

種々の iPS 細胞を用いて実製造を模して本製品を作製し、凍結保存実施後に種々の評価指標にて非凍結細胞と比較した。評価指標としては、凍結融解後の細胞生存率、細胞回収率、本製品に対して既に設定済みの品質試験や種々の特性解析、網羅的遺伝子発現解析による遺伝子プロファイル取得、等を設定し、データを採取した。凍結融解において融解後に生存できた細胞は、その後の数週間の *in vitro* での成熟過程において非凍結細胞と同様に成熟し、ドパミン神経として十分に機能することを細胞レベルで確認した。また、凍結融解後の細胞をパーキンソン病モデルラットに移植して有効性試験及び安全性試験を実施した。移植脳に対する免疫組織化学的な評価として、ヒト特異的マーカー、有効性マーカーや増殖性細胞のマーカーを指標に非凍結細胞と比較した。凍結細胞は、脳内においても非凍結細胞と同様に生着して成熟し、有効性試験で期待される薬効を示すことを確認した。これらの結果から、凍結細胞と非凍結細胞の同等性を評価する手法を開発し、プロセス導入の妥当性検証及びリスク評価を実施し、リスクを軽微とした。

【研究開発項目⑥】製造毎のばらつきを把握する評価手法の開発およびロット管理手法の戦略構築

・実施内容

iPS 細胞を分化させて製造する再生医療等製品は、経時的に細胞の性質を変化させて製造することから、培養過程で生じるロット間のばらつきがある。一般に GMP 製造においては、ばらつきを出来る限り低減し、均質な細胞集団が再現よくかつ大規模に製造できる方策が検討される。そこで、品質への影響が許容できるばらつき範囲を把握可能な評価手法の開発を行い、これを用いた実生産時における基準幅の設定を実施した。さらに、これまで取得した多くの非臨床データを参考として、本事業で確立を目指す各プロセス変更についてリスクアセスメントを実施して同等性検証ストラテジーの構築を行った。同等性検証ストラテジーについては、PMDA への相談を行った。

・方法及び結果

現行の製造法にて本製品を複数ロット製造し、既に設定済みの品質試験や特性解析、網羅的遺伝子発現解析による遺伝子発現プロファイル取得、等を実施した。これにより本製品の既存の製造法には高い頑健性があることを確認した。次に、製造した本製品に対して、細胞集団ごとの微小な品質差をもとらえることが可能な（平成 27 年に原型を構築済）網羅的遺伝子発現解析を種々のロット、分化誘導タイミングで実施してデータを採取した。採取したデータにより、遺伝子発現プロファイルによるばらつき評価手法を開発した。次に、開発したこの評価手法を用いて、培養期間、セルバンクのバイアル間の差異及びセルソーティングのタイミング等品質に影響を及ぼす可能性のあるパラメーターを変更した時の影響を評価し、品質変化の許容範囲を設定した。また、これまでの非臨床研究で蓄積してきたデータを集約して活用することで、本事業で実施した各研究開発項目での考察を深め、スケールアップや凍結保存プロセス等の変更についてリスクアセスメントを実施し、非臨床データのみでの同等性証明が達成でき

る戦略を立案した。PMDA への事前面談の結果、本事業で実施した各種検討の有効活用により、非臨床データのみでの同等性検証への可能性を拓いた。

3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容

研究開発項目① セルソーティング用抗体の品質評価手法の開発、残存リスク評価の理論構築

【緒言】

本事業製品の製造工程として、抗体を用いたセルソーティングプロセスがある。セルソーティングプロセスは、目的細胞の純度向上、非目的細胞の除去を可能とするため、本製品に限らず次世代の再生医療等製品の製造法には有用な技術である。一方で、製造現場においては GMP 製造に用いるセルソーター本体及び選別に用いる抗体そのものの取り扱いに等ついで方向性は定まっていなかったことが課題である。従って、本事業では、今後の参考とすべく研究開発項目①、②にてこれらの課題の解決を目指した検討を実施した。研究開発項目①では、抗体そのものの取り扱いに対して、特に必要な規制対応についての検討を進めた。

本製品の製造にて用いられるモノクローナル抗体は、抗体遺伝子の配列を導入した遺伝子組み換え細胞で発現させ、精製した後、蛍光物質でラベルして使用する。抗体産生細胞や使用する蛍光標識物質は選定済みであり、これまでの基礎的な検討により品質や実用性は十分に検証されていたが、長期間にわたる使用についての具体的な管理体制や規制対応、抗体製造毎の品質評価法についての検証は不十分であった。平成 27 年度の本事業では、抗体製造管理手法やウイルス安全性に関する対応の原案を立案した。また、抗体の物理化学的特性を元にした品質評価手法や抗原/抗体反応に基づく品質評価手法の開発に向けデータを蓄積した。平成 28～29 年度にはこれらの検討を応用し、標識抗体の GMP での製造管理、ウイルス安全性管理体制の構築、生物由来原料基準等の各種規制対応を実施し完成させた。また、標識抗体の物理化学的・生化学的特性を把握し、抗体製造毎の品質評価法や日常管理基準値の設定も実施した。さらに、セルソーティング後の製品に残存する抗体の影響に関しては、ヒトにおけるリスク管理について理論構築を行った。

【研究開発内容】

抗体の品質評価手法の開発

抗体の製造管理戦略及びウイルス安全性評価について、PMDA 薬事戦略相談対面助言を実施し、規制上必要な対応について確定させた。特に議論となったポイントは、セルバンク製造に使用した生物由来原料（レトロウイルスベクター）のウイルス安全性であったことから、セルバンクのウイルス安全性評価は ICH-Q5A に準拠して実施した。一方で、工程のウイルスクリアランス評価については、ウイルスの不活化/除去を目的とした 2 工程のみ実施すること、評価に使用するウイルスは低 pH 処理工程では X-MuLV の 1 種、ウイルス除去フィルターろ過工程では X-MuLV 及び MMV の 2 種とすることで了承された。最終的に確定した抗体製造フローとウイルス安全性評価の概略を図 1 に示した。

再生医療等製品の製造に使用する標識抗体の製造



図1 PE 標識抗体製造フローと規制対応
(EPC: 製造用の培養が終了した後の細胞)

セルバンク及び EPC のウイルス試験結果を表 1 に、工程のウイルスクリアランス試験結果を表 2 に示した。PE 標識抗 CORIN 抗体の生物由来原料であるセルバンクには外来性ウイルスの混入を認めず、かつ、EPC に迷入因子を認めないことを確認した。また、PE 標識抗 CORIN 抗体製造工程が十分なウイルスクリアランス能力を有することを確認した。

表 1 セルバンク、EPC 及び未加工バルクのウイルス試験結果

試験対象	ウイルス試験実施項目	試験結果
セルバンク	レトロウイルス及び内在性ウイルス試験	
	・ Mus dunni 細胞との共培養試験	陰性
	・ 延長 XC-プラークアッセイ	陰性
	・ 電子顕微鏡観察	内在性レトロウイルス様粒子以外のウイルス様粒子を認めない
	非内在性ウイルス又は外来性ウイルス試験	
	・ レトロベクター構成体試験(PCR)	陰性
	・ 抗体産生試験(マウス及びハムスター)	陰性
	・ in vivo 試験	陰性
	・ in vitro 試験	陰性
	・ in vitro 試験(ウシ/ブタ由来ウイルス)	陰性
	・ PCR による特異的ウイルス試験	
	(1)レトロベクター作成時の原材料を考慮して選択したウイルス	陰性
	(2)環境からの混入の可能性のあるウイルス	陰性

EPC	レトロウイルス及び内在性ウイルス試験 ・ Mus dunni 細胞との共培養試験 ・ 電子顕微鏡観察	陰性 内在性レトロウイルス様粒子以外 のウイルス様粒子を認めない
	非内在性ウイルス又は外来性ウイルス試験 ・ <i>in vivo</i> 試験 ・ <i>in vitro</i> 試験	陰性 陰性

表 2 工程のウイルスクリアランス試験結果

工程		ウイルスクリアランス 指数 (Log ₁₀)	
		X-MuLV	MMV
低 pH 処理工程	1 回目	4.87	
	2 回目	5.24	
ウイルス除去膜ろ過工程	1 回目	≥4.48	≥4.73
	2 回目	≥4.78	≥4.86
総ウイルスクリアランス指数*		≥9.35	≥4.73

*：各工程 2 回実施したうちの低い方のウイルスクリアランス指数を用いて算出

以上に示したウイルス安全性評価に加えて、セルバンク作製用原材料のウイルス試験結果に問題がないこと、並びにセルバンクの無菌試験及びマイコプラズマ試験を実施し、セルバンクに微生物の汚染がないことを確認した。以上の結果及び、PE 標識抗 CORIN 抗体の製造毎に表 3 に示す試験を実施し、PE 標識抗 CORIN 抗体に感染性物質の混入がないことを確認することにより、PE 標識抗 CORIN 抗体の生物由来原料基準への適合が確認できると考えた。

表 3 標識抗体の製造毎に実施する感染性物質に関する試験

検体	試験項目
未加工バルク	・ <i>in vitro</i> 試験 ・ 逆転写酵素活性 ・ 生菌数試験 ・ マイコプラズマ否定試験
抗 CORIN 抗体	・ 生菌数試験 ・ エンドトキシン試験
PE 標識抗 CORIN 抗体	・ 無菌試験 ・ エンドトキシン試験

上記に示した内容により PE 標識抗 CORIN 抗体の生物由来原料基準への適合が確認できるとする方針について薬事戦略相談対面助言を実施し、受入れ可能との回答を得た。

標識前抗体の品質管理手法の開発

次に、標識前抗体の品質管理として、抗体医薬品を参考に抗体の物理化学的特性を踏まえて開発した評価手法により前事業から継続してデータを取得している。平成 27 年に製造した抗体の出荷試験及び

安定性試験の結果を表 4 に示した。出荷試験の結果から、この標識前抗体は製造用原料として十分な品質を有していることが示された。また、安定性試験の結果から 24 箇月の保存期間中にいずれの試験項目においても経時的な変化は認められておらず、-60℃以下の保存では少なくとも 24 箇月は物理化学的に安定であることが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、今後の標識前抗体製造時においても今回開発したこれらの評価を実施し、標識前抗体の物理化学的特性を評価することとした。

表 4 標識前抗体の物理化学的特性を踏まえた試験項目と安定性試験結果

目的	試験項目		試験開始時 (出荷試験)	<-60℃, 6 箇月保存	<-60℃, 12 箇月保存	<-60℃, 24 箇月保存
示性値	性状		無色澄明の液 で、 異物を認めない	無色澄明の液 で、 異物を認めない	無色澄明の液 で、 異物を認めない	無色澄明の液 で、 異物を認めない
	pH		6.4	6.5	6.5	6.5
	浸透圧		297 mmol/kg	(保存中に変化しないため、出荷時のみ実施)		
含量	濃度(吸光度測定)		4.86 mg/mL	5.0 mg/mL	5.1 mg/mL	5.0 mg/mL
確認	キャピラリー 等電点 電気泳動	酸性+6.66*	57.22%	62.59%	65.07%	61.83%
		6.82	21.32 %	17.39 %	17.12 %	17.30 %
		6.87	9.77 %	8.77 %	8.49 %	9.26 %
		6.92	6.65 %	6.61 %	5.65 %	6.98 %
		塩基性	5.01 %	4.64 %	3.67 %	4.64 %
純度/ 不純物	SEC HPLC	主ピーク	94.6 %	97 %	96 %	97 %
		高分子量	3.3 %	(主ピーク量で変化が推定可能であるため、 出荷時のみ数値を報告)		
		低分子量	2.1 %			
	非還元 SDS-PAGE		結果報告	91% intact IgG	85% intact IgG	89% intact IgG
	還元 SDS-PAGE		96 % 重鎖+ 軽鎖	96% 重鎖+ 軽鎖	96% 重鎖+ 軽鎖	95% 重鎖+ 軽鎖
	宿主細胞タンパク質		22.567 ng/mg	(これらの不純物は、保存中に混入することはないため、出荷時のみ実施)		
	宿主細胞 DNA		< 9 fg/μL			
	プロテイン A		0.140 ng/mg			
微生物 管理	エンドトキシン		< 0.1 EU/mL	(冷凍保存のため、出荷時のみ実施)		
	生菌数	総好気性微生物 数	< 1 CFU/mL			
		総真菌数	< 1 CFU/mL			

*：酸性ピークと pI6.66 のピークはほとんど分離していないため、合算値を報告

抗体医薬をはじめとするバイオ医薬品においては、物理化学的評価に加え、目的物質が意図する生物活性を有することを確認することが必要である。このため、力価試験法として ELISA 法を構築することとし、合成抗原ペプチドを用いた ELISA 法の原型を構築し、実用的な抗体濃度範囲で良好な反応曲線が得られることを確認した。本事業では、合成抗原ペプチドに複数の修飾を加えて安定性を高めると共に洗浄工程等を工夫し、100ng/mL～10000ng/mL の濃度域で良好な反応曲線を描く条件を見出し(図 2)、標識前抗体製造における力価試験として確立した。

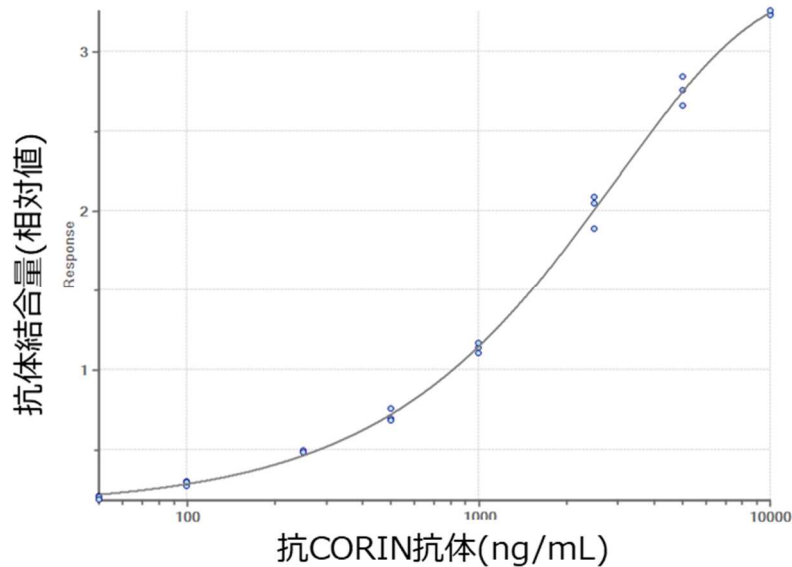


図2 ELISAによる標識前抗体の反応曲線

PE 標識 CORIN 抗体 (標識抗体) の品質評価手法を開発

本製品の GMP 製造において、標識抗体の保管方法や日常的な品質試験と管理基準値を設定しなければならない。そこで、抗原強制発現 293 細胞を用いた FACS によるセルベースアッセイ法及び上記標識前抗体での方法を応用した ELISA 法を確立し、標識抗体の温度安定性を評価した。

抗原強制発現 293 細胞を用いた FACS によるセルベースアッセイにつき、標識抗体を反応させた細胞を測定することで試験間のばらつきについて検討を行った(図 3)。N=8 のデータをプロットし、図示した。横軸は標識抗体濃度(ng/mL)、縦軸はフローサイトメトリー上の蛍光強度を示しており、エラーバーは平均値の標準偏差を示している。この結果、一定のばらつきは存在するものの、各回共に線形回帰直線に対する決定係数は 0.99 以上と高く、測定した範囲内での定量性に問題は無いと考えられた。そこで、標識抗体のロット更新時の管理法としては、標準標識抗体もしくは前回ロットの標識抗体と同時に染色を行い、想定濃度域(10-100ng/mL 程度)で同等の蛍光強度が得られること、かつ線形性を有すること、とすることが妥当であると考察した。

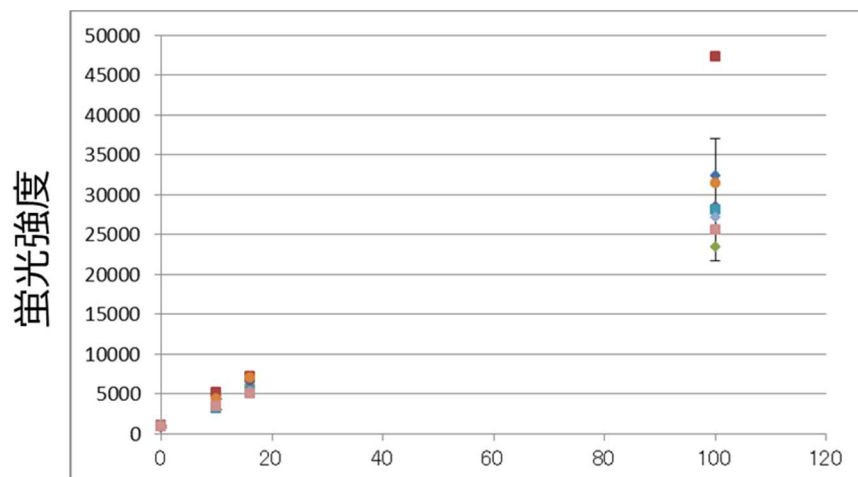


図3 繰り返し実験(n=8)によるばらつきの検討

次に、本事業内で確立した標識抗体の ELISA 法を用いて、4℃及び-60℃(ディープフリーザーのワーストケースを想定)以下で 12 か月保存した PE 標識抗体の品質評価を実施した。セルベースアッセイの結果を図 4 に、ELISA の結果を図 5 に示した。いずれの方法でも 4℃保存品は-60℃以下保存品に比較すると活性が低下しており、4℃での長期間の保存では-60℃以下保存よりも不安定であることが明らかになった。本結果から、標識抗体の保存温度は-60℃以下と設定した。

4℃保存品の抗体結合量は、-60℃以下保存品と比較して、セルベースアッセイでは約 20%低下しているのに対し、ELISA 法では約 50%低下していると見積もられた。ELISA に使用している抗原ペプチドは細胞表面の抗原に比べて抗体との affinity が低いと考えられ、細胞表面の抗原には結合できるがペプチド抗原には結合できない程度に緩やかに結合活性が低下した抗体は ELISA 法でのみ検出できるためと考えられた。この点から考えると、ELISA 法はセルベースアッセイよりも 品質の変化をより早期に検出できる可能性がある。

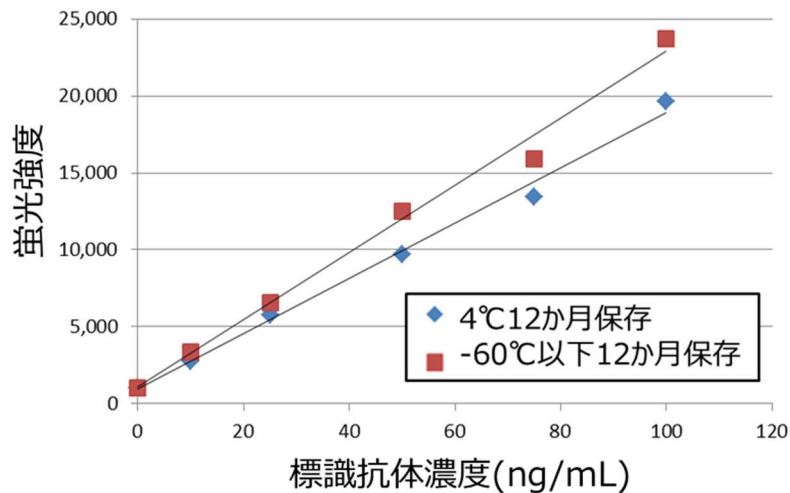


図4 セルベースアッセイによる標識抗体の温度安定性評価

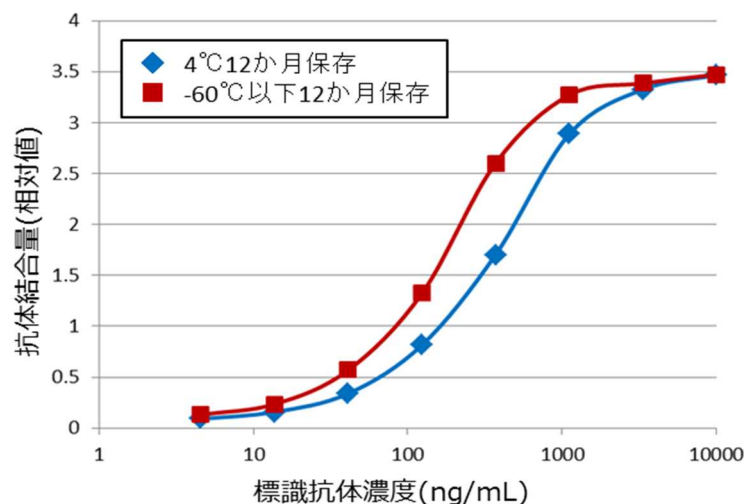


図5 ELISA 法による標識抗体の温度安定性評価

以上のように、標識抗体の品質評価手法としてセルベースアッセイ法と ELISA 法を開発した。温度安定性の評価において両試験法ともに標識抗体の劣化を識別可能であることを確認し、また、評価結果に基づき、保存温度を-60℃以下に決定した。今後、標識抗体の力価の日常的な評価は、セルベースアッセイよりも簡便で品質の変化をより早期に検出できる可能性のある ELISA 法で実施し、標識抗体のロット更新時には、本製品の実際の製造プロセスにより近い試験系であるセルベースアッセイでも評価を実施する方針である。

残存抗体に対するリスク評価の理論構築

薬事戦略相談事前面談において、PMDA から最終製品中に残存する抗体のリスク評価が必要であるという指摘を受けた。そこで、本課題において、最終製品に持ち込まれる可能性のある抗体量を見積もり、抗体医薬品における不純物の管理基準などから本製品中の残存抗体についてヒトにおける安全性担保の理論構築を行った。

Step3 の時点で、染色前及び染色後の抗体溶液中の抗体濃度を蛍光プレートリーダーにて定量し、差分によって算出される、細胞に結合しなかった上清中の抗体量をもとに、最終製品に残存する可能性のある最大の抗体量を見積もることを試みた。測定方法の概略を図 6 に示した。図 6 の②と③の差が細胞に結合した抗体量となることから、これにより、Step4 や最終製品の洗浄工程における抗体の希釈や分解を無視した、最終製品にて患者の体内に持ち込まれるワーストケースの抗体量を見積もることが出来る。検討の結果、細胞の染色前と染色後の蛍光数値は検量線の直線性のよい範囲内に収まること、また細胞の染色後には染色前と比較して有意な蛍光の減弱が認められたことから、本試験系は成立していると考えられた。

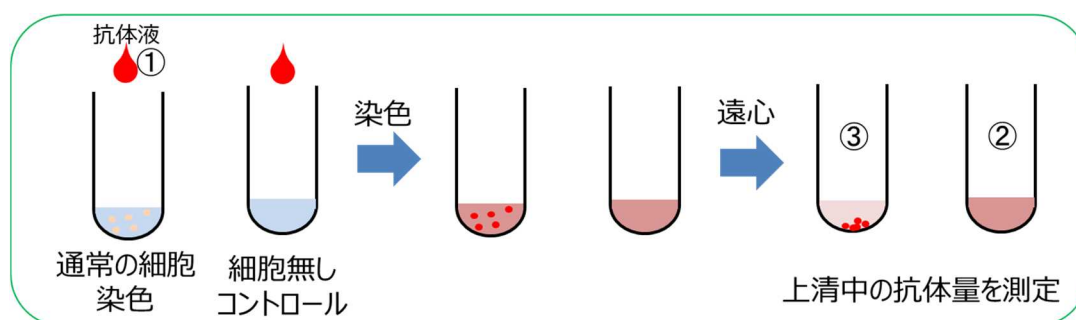


図 6 残存抗体量の測定方法の概略

本試験系により 7 ロットを評価し、細胞に結合する抗体量を見積もった。この値をセルソーティング時の細胞の CORIN の発現量（CORIN 陽性率）に対してプロットしたところ、相関係数は約 0.9 と正の相関を示し、評価系の妥当性を確認することができた(図 7)。

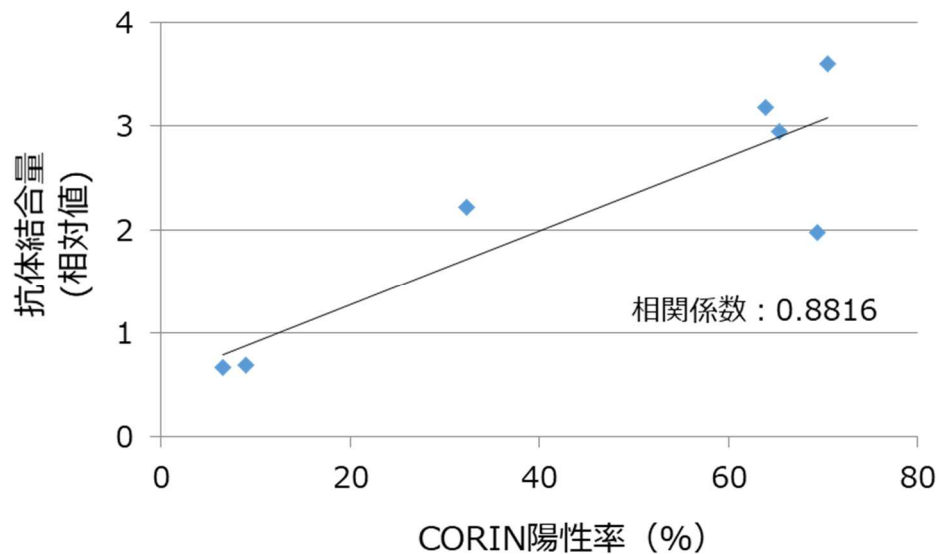


図 7 抗体結合量と CORIN 陽性率の相関性

以上の結果をもとに、最終製品に残存する可能性のある抗体量の最大量見積りを行った。その結果、
1 投与量のドパミン神経前駆細胞に残存する可能性のある抗体量は、本製品の製造工程中に使用する他の異種タンパク質の残存推定量と比べても低い値であると推定された。

【小括】

PMDA への対面助言実施によりウイルス安全性管理体制について必要な対応を確定し、具体的な標識抗体製造管理体制へ反映させて生物由来原料基準に適合した標識抗体を製造した。さらに、ELISA 法による標識前抗体の品質評価法を完成させ、未標識抗体の品質評価試験として採用した。また、標識抗体の性能評価法としてセルベースアッセイ法及び ELISA 法を確立し、保存温度並びに日常的及びロット更新時の管理方針を決定した。これらに加え、最終製品中の残存抗体に関して、ワーストケースを想定した実測データに基づくリスク管理の理論を構築し、PMDA から受け入れ可能との回答を得た。

研究開発項目②改良型セルソーター導入における同等性評価手法の開発、妥当性検証

【緒言】

現在研究用途にて広く使用される jet in air 方式と呼ばれる機構のセルソーターでは、溶媒と細胞の層流を保ったままで細く高速のストリームを形成させて上から下に流し、この途中で振動を与えることで液滴を形成させる。液滴 1 個中に 1 個の細胞が入るように設計されており、液滴形成の直前で細胞由来の蛍光シグナルが測定される。細胞が蛍光抗体でラベルされていれば蛍光シグナルを元に液滴形成時に同時に荷電され、落下時に電磁的に目的液滴(細胞)が選り分けられる。セルソーティングは本製品の製法の中でも必須のプロセスである一方で、分取精度と分取速度がトレードオフの関係にあることから高速化に限界があり、生産規模を上げるには複数台の並列設置しか採りえる方策が無く大きなボトルネックとなっている。また、機種ごとに異なっているが一般に溶媒の流速が速くシェアストレスを惹起するとともに、回収時に細胞が培地表面に激しく衝突する。そのためダメージに弱い細胞では細胞生存率の低下やこれによる品質のばらつきが懸念される。さらに、通常は開放環境でセルソーティングが行われるため、GMP 上の無菌環境の担保も難しい。従って、これらの課題を根本的に解消した、完全閉鎖型かつ細胞へのダメージの少ないハイスループットセルソーターを導入することが改良製法には必須である。

平成 27 年度の本事業において、世界中の既存セルソーターを網羅的に調査し、本製品の製造に有望なセルソーターを選定した。平成 28～29 年度の本事業ではまず、再生医療等製品の製造におけるセルソーターへの要求を整理して評価指標の選定を実施した。さらに、新規セルソーターを用いてこれら評価指標についてデータを取得するとともに、iPS 細胞から作製したドパミン神経前駆細胞に対する品質項目解析や特性解析データ等、同等性に関して評価すべき指標についてもデータを採取し、同等性評価手法を開発した。また、生産機としての使用に向けて GMP 対応を進めた。

【研究開発内容】

再生医療等製品製造における Cytonome 社 Gigasort の有用性について

既存の研究用機種を利用した現行のセルソーティングプロセス(Step3)は、患者一人当たり数百万個の細胞を移植しなければならない本製品の製造にはスループットが不十分であり、現行のプロセスのまま GMP での大量生産を実施することは製造コストや規制面からも難しい。加えて、既存機種は、高速化に限界があるのにもかかわらず GMP での使用には必要以上にハイスペックで複雑な機構を持ち、CPC 内に複数設置し手順書を整備するには製造所の管理業務に多大なエネルギーを必要とすると思われる。また、徹底した無菌管理を達成するため、全ての流路と分取部分の完全ディスプレイ化が必要となり、これに合わせた設計変更や消耗品の高コスト化などが課題となる。既存機種ではこれらの課題に対する根本的な解決策を示すことは難しいため、本製品の将来の商用製造においてハイスループット処理が可能で、高い無菌環境での作業及び CPC 設置機器としての GMP 対応が可能な機種として、コンセプト段階より細胞医薬品を指向して開発された米国 Cytonome 社の Gigasort という機種に着目し、本機種を製法に組み入れることとした。本事業においては、新規セルソーターに求められる評価指標を明確化するとともに既存機種及び新規セルソーターにて作製した iPS 細胞由来細胞の評価を進め、新規セルソーター導入時の同等性評価手法開発を目指した。

Cytonome 社の Gigasort は、24 チャンネルのマイクロ流路がスライドグラス様のチップ内に並列に配置され、それぞれのチャンネルに分取部を持つ完全閉鎖系のセルソーターで、サンプルボトル、シー

スポトル、分取ボトル、廃液ボトルがチップに閉鎖的に接続されているものである。細胞が触れる可能性のある流路部分は、完全にディスプレイ仕様となっている。チップは常にシース液で満たされており、目的細胞が分取部に到達した瞬間に、横の空間からわずかな空気圧が付与され、目的細胞の進行方向が分取方向に曲げられるという原理である。その後速やかに空気圧が戻り、元の層流が再形成される(図 1)。

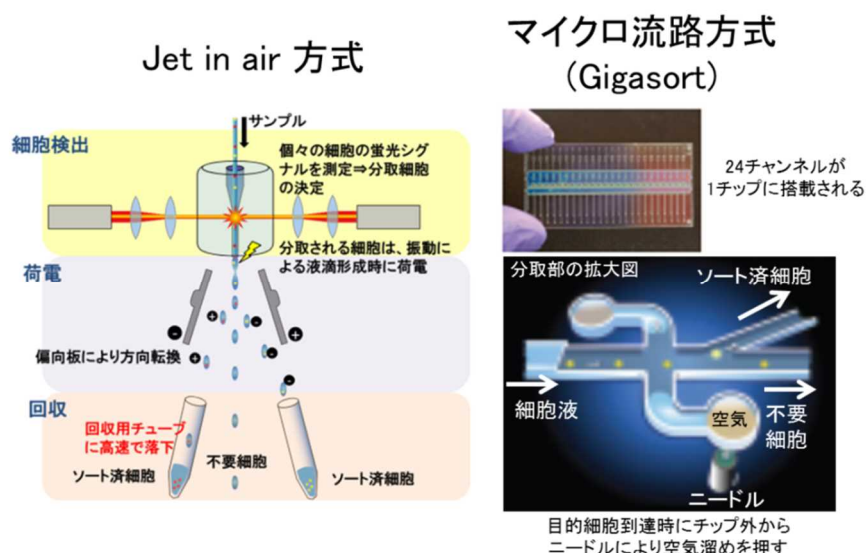


図1 Jet in air 方式とマイクロ流路方式の Gigasort の分取機構の比較

カタログ値では、チャンネルごとに最大 2000 細胞/sec の処理速度を持っており、全チャンネルでは最大 48000 細胞/sec のスループットとなる。実際には、ドパミン神経前駆細胞の製造時には 20000 細胞/sec 前後のスループットになると見積もっているが、jet in air タイプの物と比べると処理速度は圧倒的に早い。さらに、Gigasort では比較的広い流路内を細胞が移動することから、jet in air タイプで見られるノズル通過時のシェアストレス、液滴の形成、荷電、回収ボトルへの高速衝突が無い機構であるため、細胞へのダメージの低減が期待できる。また、流路系がシンプルで閉鎖系であるため、セルソーティング中の細胞のロスを少なくすることも可能である。これらの相乗効果により、本機種を最適化することで本製品の製造ボトルネックを解消し、生産性を著しく高めることが出来ると期待している。

また、本機種では GMP 製造の観点からのメリットも多い。例えば、従来のセルソーターでは機器の精度管理に標準蛍光ビーズが使用されるが、本機種においては不要である。さらに、流路が閉鎖系で完全ディスプレイであるため、CPC 内のグレード C エリアでの運用を視野に入れることができる点が大きなメリットである。以上より、現存するセルソーターの中では再生医療製品の製造には最も適した機種であると考えられる。

新規セルソーターの導入における同等性評価手法の開発

初めに、新規セルソーターを導入するにあたって既存機種との比較にて評価すべき指標を洗い出した。指標としては、ソーティング機構、無菌保証、GMP 製造すなわち SOP 対応可能かどうか、GMP 機器

としての対応が可能かどうか、などが主なポイントである。また、生産性の指標としては機器そのものの処理速度及び収率、品質の指標としては分取した細胞の純度及び最終製品の品質規格等があげられる(表 1)。

表 1 新規機種に期待されるスペック

	項目	既存機種	工業的生産に必要なスペック
機構	カテゴリー	Jet in air / 研究用途	マイクロ流路/工業用
	無菌保証	困難 (開放)	可能 (閉鎖)
GMP	製造安定性	熟練が必要	SOPにより安定生産
	機器対応	困難	可能
生産性	分取速度	3-5K 細胞 / sec	10-20K / sec
	収率	~10 %	10%以上
品質	再解析純度	90 %	90%
	品質	規格値をクリア	規格値をクリア

次に、これらの指標についての検討を進めることとした。本製品におけるセルソーター使用の位置づけは、中間体における有効成分の濃縮及び非目的細胞の排除である。従って、本製品の品質に直結する重要なパラメーターは純度である。そこで、新規セルソーターGigasortでの純度解析を実施した。材料としては、抗原強制発現 293 細胞及び研究用 iPS 細胞から分化誘導した中間体を用いた。強制発現 293 細胞では、CORIN 陽性細胞/非陽性細胞のシグナルの分離が大きい、iPS 細胞由来の中間体では、分化度の異なる細胞が同時に存在することから通常シグナルの分離は不明瞭である。プロファイルの異なるこれら二種類の細胞での検討の結果、いずれにおいても、再解析後の CORIN 陽性率は 90%以上であった(図 2)。

次に、同様のサンプルを用い、新規セルソーターでの予備的な検討として速度、純度、機器収率の関係を測定して整理した。各パラメーターに関して、純度は回収画分内の CORIN 陽性率、機器収率は元サンプルに対する非回収画分内の目的細胞の減少率と定義した。Jet in air タイプのセルソーターであれば、「速度」と「純度」には逆の相関が認められることが知られている。Gigasortにおいて、分取速度を 12000~24000cells/sec まで変化させたところ、機器収率は速度の上昇に伴って低下したが、純度は維持できることが示された(図 2)。

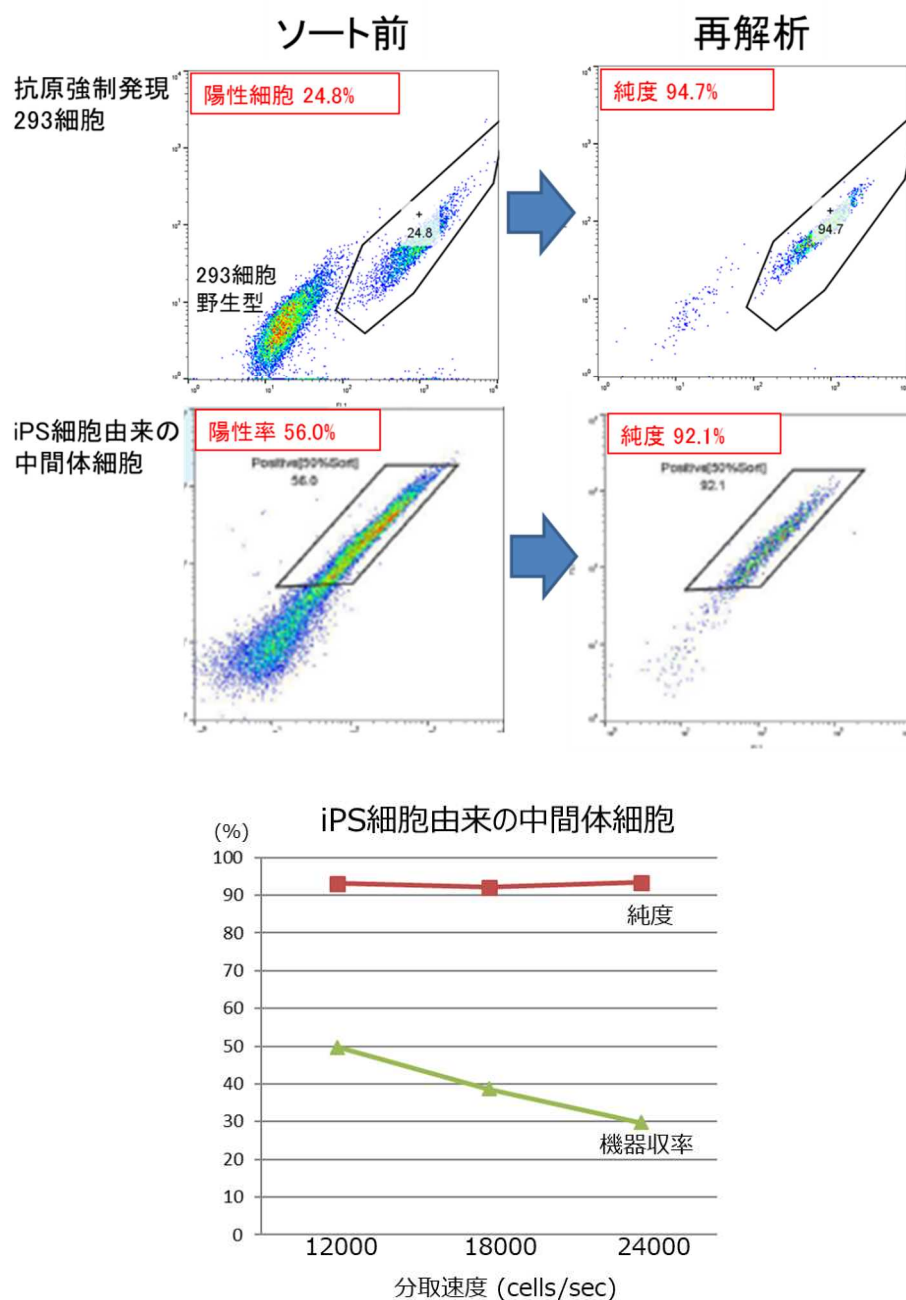


図2 Gigasort による分取細胞の純度解析及び純度と機器収率の相関

次に未固定細胞を用いて Gigasort の分取速度を 18000 cells/sec に固定した状態で複数回のセルソーティングを行い、収率に関するパラメーターについて既存機種との詳細な比較を行った。既存機種ではそれぞれに最適な分取速度でセルソーティングを実施した。セルソーティングに引き続いて Step4 の培養を実施してドパミン神経細胞塊を形成させた。この結果、既存機種に比べて処理速度で 7 倍、分取画面の遠心濃縮などの実験内ロスを経機収率に乗じた、Step3 全体としての収率で 1.2 倍向上していた。また、ドパミン神経細胞塊形成後 24 時間の時点での細胞塊を詳細に顕微鏡観察したところ、Gigasort でセルソーティングした場合も、既存機種と同様の細胞塊が良好に形成された(図 3)。また、独立して施行した複数の実験で同様の結果が得られた。

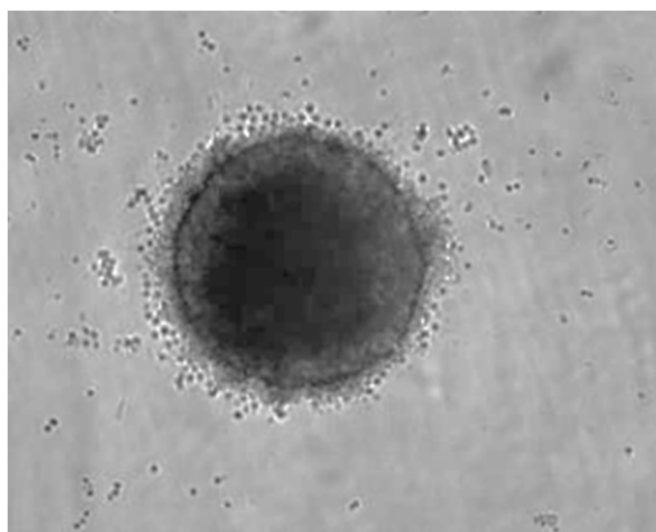


図3 セルソーティング後播種直後の細胞塊形成

以上の収率に関する比較を表2にまとめた。今後更なるパラメーターの微調整を実施する予定であるが、既存のセルソーターに比べて処理能力の点で少なくとも8倍以上の向上が期待でき、全工程の収率としては大幅な改善が見込まれる。

表2 生産性に関連が深い指標における機種間比較

	試行数	細胞処理量 (cells/hr)	スピード 比較	収率 比較	トータル 比較 (検討中)	品質 評価
BD社 Aria	5	1.4 E7	1.0	1.0	1.0	○
BD社 Influx	2	3.2 E7	2.3	0.6	1.4	○
BD社 Jazz	6	2.5 E7	1.8	0.6	1.1	○
Gigasort	12	9.8 E7	6.9	1.2	8.3	○

次に、新規セルソーター導入時の同等性評価手法開発に最も重要となる最終製品の品質に関する指標について検討を実施した。最終製品を免疫染色にて評価し、有効性マーカーFoxA2, Nurr1, TH, 安全性マーカーPax6, Sox1, Ki67の陽性細胞率を測定し比較した。その結果、これらのマーカーの陽性細胞率は既存機種にて得られた最終製品と同等レベルの発現を示しており、細胞の品質は同等となることを示した(図4)。

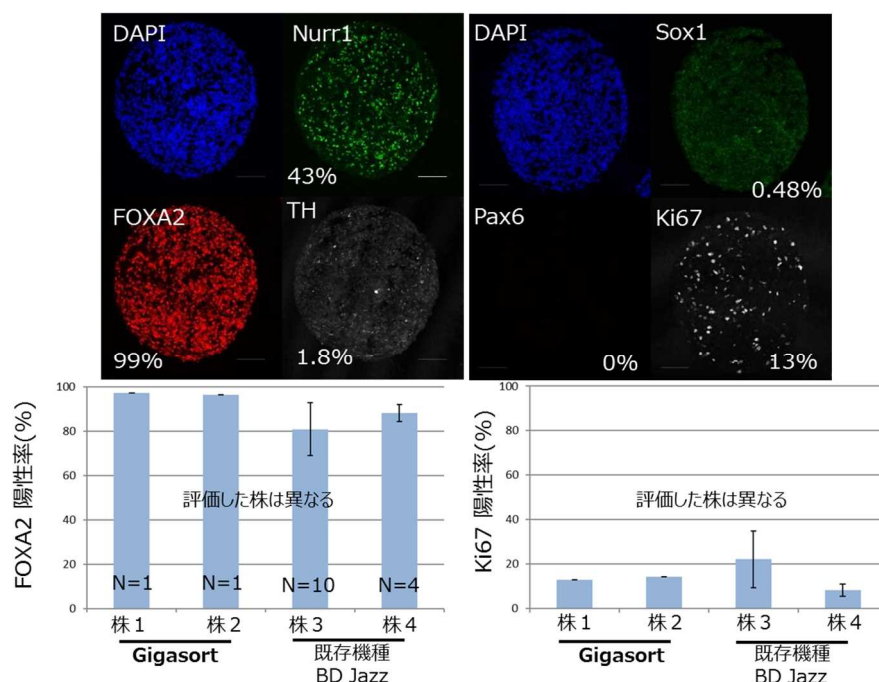


図4 各種品質評価マーカーの免疫染色結果

新規セルソーターの導入における GMP 対応

セルソーターは、患者に直接触れるものではないため、医療機器の範疇には入らず治験の実施や承認申請の必要性は無いと考えられるが、ヒトへの投与を前提とした再生医療等製品の製造工程中で使用するため、GMP 上の対応を行った。

GMP 機器として導入するにあたって必要となるのが各種仕様書、製作図・配置図、アラームリストをはじめとした文書の整備である。Gigasort 本体の GMP 対応に必要と考えられた文書は総数で 80 以上となったため、文書リストを作成し、メーカーとやり取りしながら進捗、バージョンを管理した。また GMP では、Gigasort 本体に生じる何らかの不具合による製品への影響を考慮したリスクアセスメントを実施する必要がある。そのため製品の品質に大きな影響を与えうるクリティカルパラメーターをあらかじめ抽出しておき、それに基づいたリスクアセスメントを行い、アラームリストとして整備した。さらに、CPC 内への設置に備え、各種バリデーションプロトコルを整備した。

GMP 機器の CPC 内への導入ステップとしては、リスクアセスメント、ユーザー要求仕様書(URS)の作成、設計時適格性評価(DQ), 工場受入試験(FAT), 設置時適格性評価(IQ), 運転時適格性評価(OQ)と進められる。それぞれの段階において、抽出したクリティカルパラメーターを参考に製品品質に影響しないことを確認できるバリデーションプロトコルを作成し試験の実施を完了する必要がある。

消耗品については、特に無菌性の担保を考慮した設計、仕様を検討した。すなわち、細胞調製施設での強力な滅菌操作に耐える材質であることの確認、無菌性保証法の検討、滅菌バリデーション、消耗品組み立てメーカーの監査などを実施した。以上に示した通り、GMP 機器の導入は一般研究機器の導入とは大きく異なるプロセスが必要となる。膨大な量の文書の整備にかかる手間はもちろんであるが、ユーザー固有の要素やメーカーの知的財産などといった機密事項を多く共有した上で各種仕様を決定し文書化していくには、ユーザーとメーカーの信頼関係と緊密な連携が不可欠であり最も重要なことである。

【小括】

既存機種との比較について、これまでに得られている情報を表 3 に整理した。生産性に関しては Gigasort が著しく優れること、細胞の品質は既存機種と同等であることを確認した。加えて、新規セルソーターの導入における評価指標として表 3 の項目についていずれも同等以上であることが確認できたことから、これらの項目を同等性評価手法として開発して Gigasort の導入妥当性を検証し、導入による品質へのリスクは無しと結論付けた。

また、再生医療等製品の GMP 製造機器に必須となる各種課題や必要文書の洗い出し、及びこれらへの対応手順を明確化し対応し、当社 CPC 施設への GMP 対応機種の導入に繋げた。

表 3 既存機種(BD 製 Jazz)と新機種(Gigasort)の比較表

		既存機種	Gigasort	同等性/優位性
機構	カテゴリー	Jet in air / 研究用途	マイクロ流路 / 工業用	-
	無菌保証	困難（開放）	可能（閉鎖）	○
GMP	製造安定性	熟練が必要	SOPにより 安定生産	○
	GMP機器対応	困難	可能	◎
生産性	分取速度	3-5K 細胞/sec	18K 細胞/ sec	◎
	収率	5-10%	10%	○
	細胞塊形成能	○	○	○
品質	再解析純度	>90%	>90%	○
	最終製品品質	規格値をクリア	規格値をクリア	○

研究開発項目③新規浮遊培養法における同等性評価手法の開発、妥当性評価

【緒言】

本製品製造における Step4 では、セルソーターによって分取された細胞を一定数播種して凝集させ、ドパミン神経前駆細胞の細胞塊として成熟させる。細胞塊の形成は分取細胞播種後数日内には完了し、その後成熟する。現行の手培養では、研究用途の一般的な 96 ウエルプレートを用いて、1 ウエルに 1 つの細胞塊を培養する。患者一人当たりに必要な細胞塊は数百個単位であり、ロット毎に求められる品質試験や汚染検査の実施を考えるとさらに多くの細胞塊を準備する必要がある。また、枚数が増えると、培地交換時あるいは回収時の手間及び長時間の作業が必要となり細胞の品質低下や汚染リスクが上昇するなどの問題がある。開発初期のように小規模に製造する段階では、手培養であっても十分に高品質な製品が製造可能であるためこのような問題は顕在化しないが、GMP 製造段階では品質面、コスト面での大きな課題である。Step1~Step3 の各プロセスにおいてロットサイズを向上させるべくスケールアップ検討を進めていることから、大量の細胞塊を処理可能な GMP 製造に適した Step4 の新規浮遊培養法の構築を進めた。そこで、Step4 における新規浮遊培養法として、①スリットウエルプレートで一カ所からの培地交換(再生医療実現拠点ネットワークプログラム技術開発個別課題で開発)により時間短縮と汚染リスクの低減を目指す②リアクタにより閉鎖環境で大量培養し、培地交換や回収を容易とし大幅な省力化と均質化を目指す、の 2 つのアプローチを検討した。さらに、選定した培養法については、均一性や細胞塊形成不良など同等性評価時に想定される課題を洗い出し、これらがリスクにならないことを示した。これらの結果を基に、新規浮遊培養法の同等性評価手法を開発し、製造プロセスへの導入妥当性を検証した。

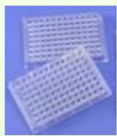
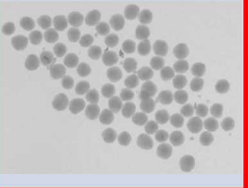
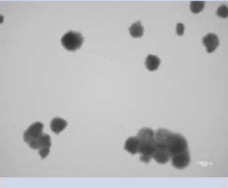
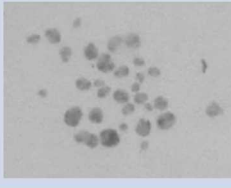
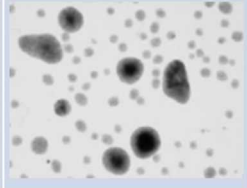
【研究開発内容】

本製品製造における Step4 は、現行では手培養にて実施しているが、本事業で検討中のスケールアップが成功した場合、例えば 1 ロット 50 人分とした場合であれば 1 回の製造で数万個の細胞塊の培養が必要となり、作業量から考えるだけでも従来法での手培養は非現実的である。そこで本事業では、Step4 の新規浮遊培養法として、2 つのアプローチを検討した。

新規浮遊培養法の絞り込み

現行の手培養による Step1~2 の培養と研究用セルソーターで調製した細胞で、スリットウエルプレート及び種々のリアクタでの培養により Step4 の浮遊培養を実施した結果を表 1 にまとめた。評価指標として、培養過程で細胞塊の形状に変化が認められるかどうかを観察し、対象となる培養方法を絞り込んだ。尚、リアクタ培養においては、96 ウエルプレートであらかじめ細胞塊を作製し、リアクタに投入して一定期間培養を継続した。

表1 種々の培養器材での浮遊培養結果比較

				
	スリットウェルプレート	スピナーフラスコ	バイオリアクタ 1	バイオリアクタ 2
メーカー	住友ベークライト	コーニング	エイブル	メルク
培養原理	現行法同様	回転	回転	マリン型
細胞塊形状				

現行の 96 ウェルと同じ形状の培養器材であるスリットウェルプレート(住ベ社製 MS-9096S)は、培養スケールは現行と同等であり培養法変更のインパクトは最も小さい(表 1 左)。浮遊培養の期間中、目視で観察する限りでは播種時点からの細胞塊の形成能や細胞塊形状に差は認められなかった。本プレートは、ウェルのスリット構造により一カ所での培地交換が可能となるため、96 ウェルプレートと比較すると作業時間やコンタミネーションリスクが激減すると予想される。

エイブル社製バイオリアクタ 1 は、回転翼の形状に特徴があり、細胞塊へのダメージが少ないと見込んでいたが、培養期間終了後には細胞塊の欠けや崩壊が認められた。メルク社バイオリアクタ 2 はスクリー形状の回転翼を持つ物であり、せんだん力が最も高いと想定していたが、予想通り細胞塊崩壊や融合等が顕著に認められた。コーニング社製スピナーフラスコでも同様の結果であった。これらのリアクタは、培養終了後の形態解析には至らず、以降の工業的製法に応用できる見込みが薄いと考えられるため、検討を中断した。

スリットウェルプレートによる培養

GMP 製造で使用する新規浮遊培養法としては、スリットウェルプレートを選定することとした。このスリットウェルプレートは、AMED の「再生医療実現拠点ネットワーク技術開発個別課題」で開発された細胞培養容器である。特徴は、前述のとおり 96 個のウェルそれぞれの上部に培地が出入りできる細い開口部(スリット構造)を設けた三次元培養プレートであり、プレートのコーナー部分から培地を添加または吸引するだけで、各ウェルに細胞塊が入ったままの状態ですべてのウェルの培地を一度に交換する事が可能である(図 1)。

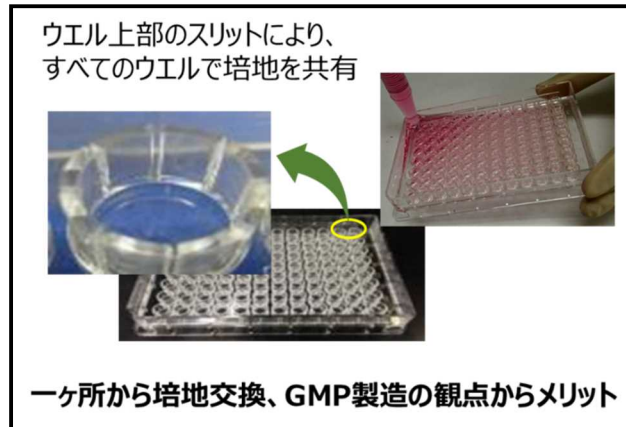


図1 スリットウエルプレートの構造と特徴

このため、培地交換時間の短縮やウエル間のばらつき減少及びこれらに起因する品質安定性の向上、汚染リスクの回避が期待できる。そこで、本スリットウエルプレートで培養した細胞塊の性状を解析し、現行の 96 ウエルプレートで培養した細胞との同等性評価手法の開発に取り組んだ。

細胞塊の神経突起伸長能評価を実施した結果、従来法と同等の結果であった(図 2)。また、スリットウエルプレートでは標準偏差が小さく、CV 値が 0.54 倍に低下し(n=6)、ウエル間のばらつきが低減することが明らかとなった。以上の結果より、スリットウエルプレートを用いることで機能的なばらつきが抑えられ、細胞塊の品質安定性が向上したと言える。

さらに、細胞塊を構成する細胞の性質を、常法である免疫染色法により解析した。ドパミン神経前駆細胞マーカーの FoxA2 陽性率を指標に従来法とスリットウエルプレートで比較した結果、FoxA2 陽性率はそれぞれ 91 %と 93%と十分な成績を示しており、最終製品の品質が同等であることを確認した。

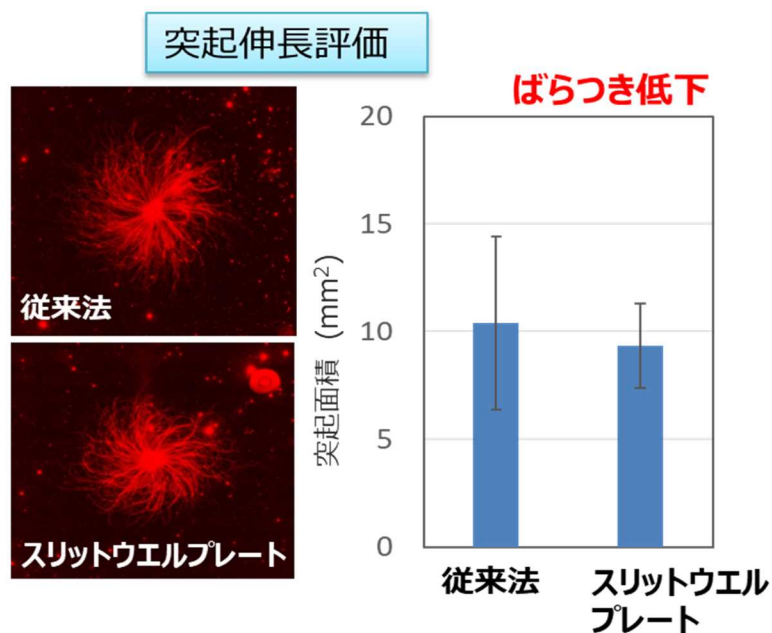


図 2 細胞塊の突起伸長評価における従来法とスリットウエルの比較

以上の結果から、スリットウェルプレートにて従来法と同等以上の品質安定性を持つ細胞塊が安定的に培養できることが示された。

スリットウェルプレートでは培地の入れ替えが一か所で行われるため、ウェルごとの培地交換時の置換効率及びスリットを介した細胞塊の移動が潜在的なリスクと考えられる。そこで、培地添加の際にすべてのウェルに均一に速やかに培地が浸透するかどうかを検証した(図 3)。蛍光標識物質を含む培地を使用して培地交換操作を行い、A1 ウェルのコーナーから添加した直後に、各ウェルの蛍光強度をプレートリーダーで測定した。各ウェルの蛍光強度の変動計数 (CV 値) は 6%と低く、培地は添加後すぐに各ウェルに均一に浸透すると言える。

培地交換時における評価指標

培地浸透：蛍光標識物質により検証

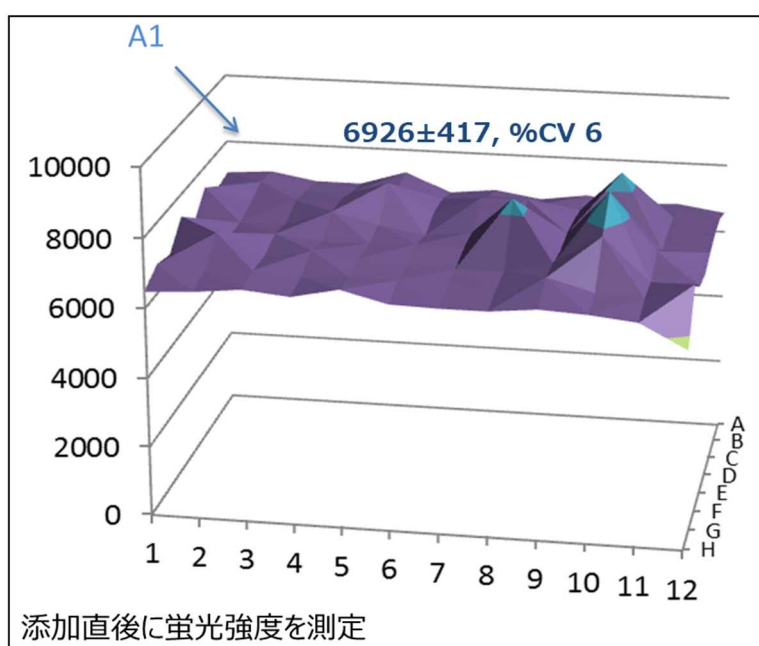


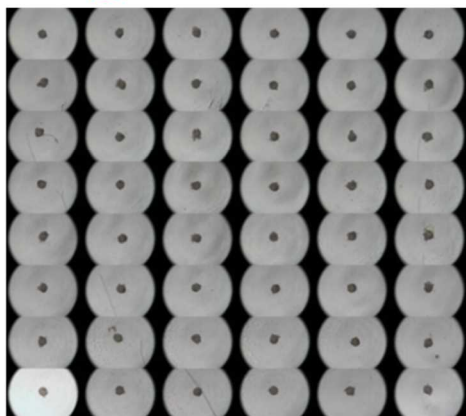
図 3 培地交換時の培地浸透評価

次に、ウェルのスリットを介した細胞塊の移動可能性を検証した(図 4)。培地交換前後で、細胞塊移動の有無を目視と位相差顕微鏡画像で確認した結果、細胞塊の移動は認められなかった。以上の結果から、スリットウェルプレート導入による潜在的なリスクは無視できると言える。

取得した一連のデータを組み合わせ、新規浮遊培養法の同等性評価手法として開発した。開発した評価手法により新規浮遊培養法の妥当性を検証したところ、導入によるリスクは無いと結論付けられた。

細胞塊移動の有無

交換前



交換後

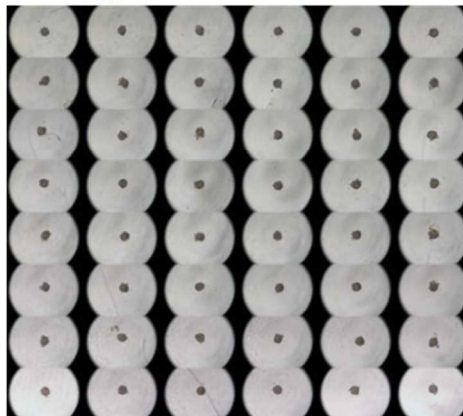


図4 培地交換時の細胞塊移動の有無

【小括】

スリットウェルプレートやリアクタを用いて作製した細胞塊の形状解析により、新規培養法として有望な培養法を絞り込んだ。選定したスリットウェルプレートを用いた新規培養方法にて製造を繰り返し、種々の指標にてデータを採取した。採取したデータを基に、従来法との同等性評価手法を開発し、プロセスへの導入妥当性の検証を行ったところ、変更によるリスクは「無し」と判断できた。

研究開発項目④ 閉鎖型自動培養装置導入における同等性評価手法の開発、妥当性検証

【緒言】

iPS 細胞由来のドパミン神経前駆細胞の製造工程を工業化するために、現在熟練した作業者の手作業で行われている培養作業を、より低コストで安定に製造できるよう自動化する必要がある。日立では、スケールアップによるコストダウンを目指して大量の細胞を培養できる自動培養装置を開発してきた。この装置の特徴は閉鎖型の大面積培養容器および流路を用いる点で、外部からの菌の混入を防ぎ安全な培養が可能である。また、これらの容器および流路は単回使用のため、ロット間交叉がなく、またチェンジオーバーにかかる時間も容器および流路の設置にかかる時間だけで済むため、ダウンタイムが少なく生産性の向上が望める。

この自動培養装置を本製品の製造工程の Step1, 2 への導入を検討している。閉鎖型培養容器及び流路を用いる装置による培養は、現行法の手技培養と培養条件が異なる点があるため、変更点を抽出し、種々のパラメーターの許容範囲を検証してきた。設定したパラメーターにおける培養条件で商用スケールでの自動培養を実施可能であることを示し、さらに製造された細胞について種々の評価指標に対してデータを取得して同等性評価手法を開発し、導入妥当性を検証した。

【研究開発内容】

自動培養装置導入に伴う変更点の検討

自動培養への移行に際し、変更となりうる培養パラメーターについて、基礎的な培養実験により許容範囲を確認し、培養への影響を検討した。自動培養装置では大面積培養容器を複数用いるため、容器内あるいは容器間で温度や pH を維持するための CO₂ ガス濃度がばらつく可能性がある。これを検証するため、6well plate を用いた既存の手技培養にて種々の培養温度、CO₂ ガス濃度で Step1, 2 の培養を行い細胞の品質評価を行った。また、細胞播種前のマトリックスコーティング条件、及び播種翌日の培地交換の際の培地の残存についても Step1 の培養で評価した。また、装置培養特有のパラメーターとして、閉鎖系培養時に培養容器へ pH 維持ガス(CO₂ ガス濃度 5 %混合空気)を送る送気速度、培地交換等の際の送液速度を変更し Step1 の培養を自動装置で行った。これらの検討時の細胞での評価指標については、Step1 は細胞の増殖倍率、未分化マーカーの発現量評価、Step2 については中間体の指標である CORIN 陽性率の評価を行い、培養条件の違いによる影響を調べ、表 1 にまとめた。設定した許容範囲に対し、自動培養で採用する培養条件も示した。これらの培養条件は自動培養装置において許容範囲内に設定できることから、自動培養が、本製品の品質に影響を及ぼさないための必要条件を満たすと考えられる。自動培養導入後のスケールアップにおける品質の同等性については、実機を用いたフルスケールでの検証が必要になる。

表 1 自動培養への移行における変更点についての検証結果

評価項目	許容範囲	自動培養条件	培養への影響
1. 温度	36.0 ~ 38.5 °C	37 ± 0.5 °C	無
2. CO ₂ 濃度	4.0 ~ 6.5%	4.3 ~ 4.7%	無
3. 送気速度	10 ~ 100 cm ³ /min.	50 ~ 100 cm ³ /min.	無
4. 送液速度	15 ~ 75 ml/min.	75 ml/min.	無

5. ラミニンコーティング液	濃度 : 3.2 $\mu\text{g/ml}$	濃度 : 3.2 $\mu\text{g/ml}$	無
	液量 : 1.5 ~ 3.0 ml (6well plate の 1well 当たり)	液量 : 1.5 ml (6well plate の 1well 当たり)	
6. Rock 阻害剤の残存	$\leq 30 \%$	5 %	無

フルスケールでの自動培養の実施および最終製品の品質評価

・フルスケール自動培養

上述の自動培養条件にて、自動培養装置のフルスケールすなわち 10 容器を用いた並列培養を Step1 について行った。フルスケールの自動培養では手技培養で用いられる 6well plate の約 90 枚分の培養が一度に行える。このときの iPS 細胞の 7 日間の増殖倍率と未分化マーカー陽性率を図 1 に示した。

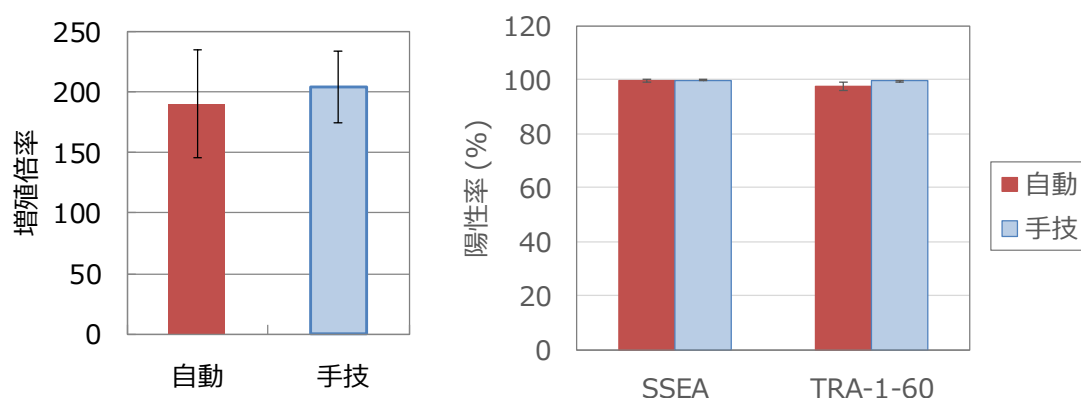


図 1 自動培養と手技培養の iPS 細胞の増殖倍率 (左) と未分化マーカーの陽性率 (右)

図 1 の左は容器ごとの増殖倍率の平均値と、標準偏差をエラーバーとして示したものである。自動培養は N=10、手技は N=3 で、手技培養では自動培養と同じ大面積容器 (培養面積 500cm^2) を用いている。増殖倍率の平均値、ばらつきにおいて、自動培養の結果は手技培養とおおむね同程度である。図 1 の右に示す未分化マーカー (SSEA および TRA-1-60) の陽性率については、自動培養と手技培養は同じく 100 % に近く、未分化状態を維持していた。

・最終製品の品質評価

本製品の製造工程のうち、Step1、Step2 を閉鎖型自動培養装置で連続して行い、その後の工程を従来法で培養を進めて最終製品を製造し、種々の指標によってその品質を評価した。図 2 には手技及び自動培養での中間体 CORIN 陽性率の測定結果を示した。CORIN 陽性率は手技で 44.6 %、自動培養は容器 1 で 50.7 % であり、自動培養したものは手技と同等であった。また、容器 2 では 48.8 % であり、容器間の差もなく並列での自動培養が可能であることが示された。

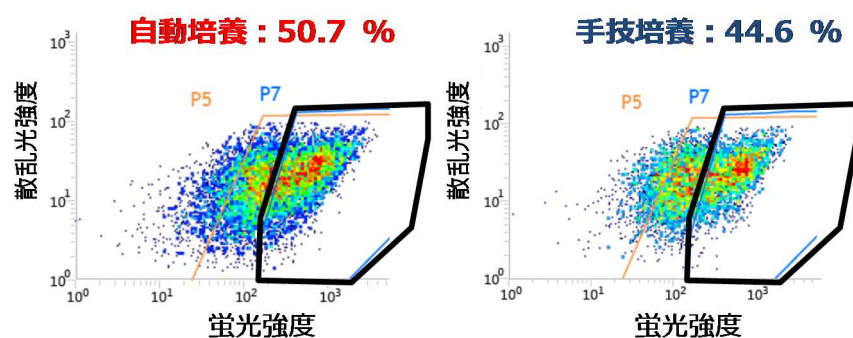


図2 自動培養および手技培養で Step2 を行った細胞の CORIN 陽性率

・網羅的遺伝子発現解析

自動培養にて得た中間体細胞を従来法にて最終製品まで分化誘導し、Step1, 3, 4 終了時の細胞の遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイによって網羅的に解析した。取得した遺伝子発現プロファイルを、主成分分析によって解析し、図3に結果を示した。凡例に示される手培養、自動培養は、Step1、Step2 を各々手培養、自動培養で行ったもので、その後の工程は共に従来法にて実施した。

図3に示すように、プロットは工程ごとに3つのグループに明確に分けられた。iPS細胞、中間体及び最終製品の何れの遺伝子発現においても、Step1、Step2 を自動培養で行ったものと手技培養したものとの間には差が認められず、これらは同等な細胞であると言える。

取得した一連のデータを組み合わせ、手技培養と自動培養装置の同等性評価手法として開発した。開発した評価手法により自動培養装置導入の妥当性を検証したところ、導入によるリスクは無いと結論付けられた。

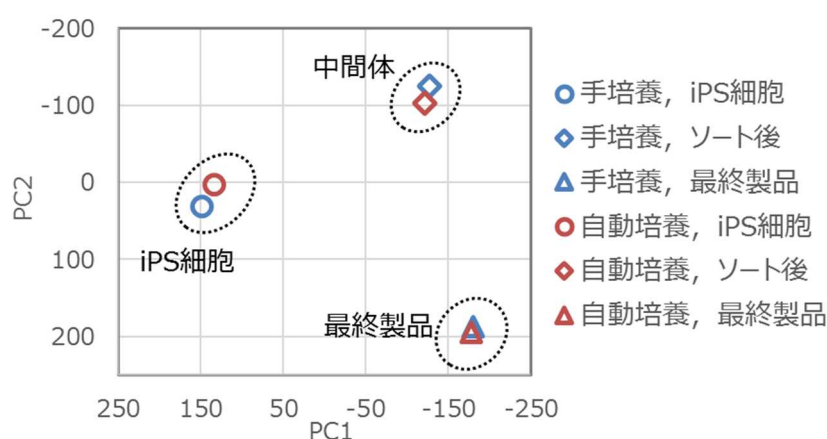


図3 自動培養及び手技培養で Step1, 2 を行った細胞の遺伝子発現プロファイル

【小括】

閉鎖型自動培養装置の導入において、従来法の手技培養から変更となる点を抽出しその許容範囲を明らかにした。許容範囲に従って装置を稼働させ、実機を用いた商用スケールでの自動培養を行った。10

容器を用いた並列培養により大量自動培養が可能であることを示し、同等性評価手法を開発して製造プロセスへの導入妥当性を検証した。

研究開発項目⑤ 凍結プロセス導入時の非臨床有効性・安全性評価および非凍結細胞との同等性評価手法の開発

【緒言】

本製品の初期臨床開発では、37℃で生細胞として出荷され、その日のうちに患者に投与される。初期の探索的段階であれば生細胞出荷の製造スケジュール管理は可能である。しかしながら、承認後の供給体制に目を向けると、国内外に広く治療法の普及を目指す商用製造段階にて生細胞で出荷する場合、種々のスケジュール管理が複雑化し、製造毎にロットサイズが変動し製造コストが安定しない等の課題がある。また、汚染検査等の一部試験の結果が投与後にしか判明せず、患者へのリスク要因ともなる。従って、本製品の承認形態としては、出荷前に全ての試験を終え、“off the shelf”での安定供給が出来るような形態が理想である。さらに、グローバルを含めて広い地域での事業展開を考えた場合、生細胞のまま輸送するためにはCPC 外での培養環境の長時間維持、GMP や GDP に準拠した輸送機器の開発や専用輸送業者の準備等が地域ごとに必要となり、現実的でない。品質面においても、医療施設の構造や作業者が異なり細胞移植手術までの手順の標準化が難しく、効果のばらつきが発生する懸念がある。従って、本製品の製造工程に凍結保存プロセスを導入することを検討している。凍結保存プロセスが導入できれば、本事業での研究開発項目②、③、④で達成されるロットサイズ拡大と相乗効果を引き起こし、さらなるコストダウン、安定した供給が達成できる。

本製品は、ダメージに弱い神経細胞が三次元に凝集した形状をとっているため凍結保存そのものが難しく困難であった。しかしながら、平成 27 年度の本事業において、凍結保存細胞の動物への移植後の挙動を推定可能な高感度 *in vitro* 評価手法を開発した。平成 28～29 年度の本事業では、この手法を活用して最終的な凍結方法を決定し、凍結保存した本製品について種々の *in vitro* / *in vivo* 評価を実施することで凍結細胞と非凍結細胞の同等性評価手法を開発して、凍結プロセス導入妥当性の理論を構築した。

【研究開発内容】

本製品の製造プロセスへの凍結保存法導入に向けて、下記のプロセスにて研究開発を進めた。平成 27 年度の本事業にて開発した、凍結感受性を適切に評価可能でかつ *in vivo* 移植結果と相関性のある評価手法を用いて神経細胞塊の凍結保存方法を改良した。ここでは、凍結保存の際に使用する凍結液や凍結プログラムの選定を行った。次に、凍結保存方法を決定し、各種評価指標に対して非凍結細胞との比較解析を行い、本製品の製造プロセスへの導入に向けた同等性評価手法の開発及び妥当性検証を行った。



図1 凍結保存プロセス導入に向けた検討

In vitro における非凍結細胞との比較指標

臨床用 iPS 細胞と同等の製法にて製造された研究用細胞、あるいはドナーが異なるが樹立法が同一の iPS 細胞株等複数の細胞を用いて、最終製品の凍結保存を実施した。凍結保存した細胞は、実臨床での

想定運用方法を参考に、37℃にて融解することとした。また、一部の *in vitro* 解析では、融解後に後数週間継続して培養を続けて細胞を成熟させ、種々の指標によって非凍結細胞と比較した。選定した凍結方法で凍結した iPS 細胞由来ドパミン神経前駆細胞では、凍結融解後に存在する細胞数を直にカウントすることにより算出した生存細胞数は約 50%であった(図 2)。この結果より、本製品の製造プロセスへ凍結保存工程を導入し同等性を検証する際に重要なことは、凍結融解後に生存した細胞が神経としての機能をどれだけ保持しているかどうか、という点であると言える。

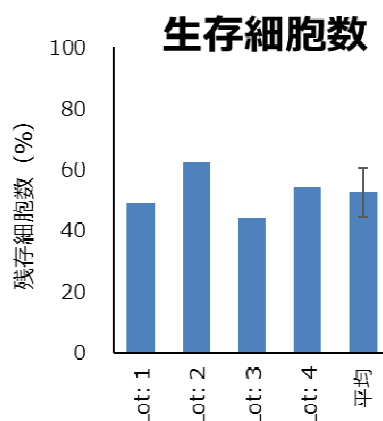


図 2 複数ロットにて測定した凍結融解後の生存細胞数（非凍結細胞に対する相対値）

従い、種々の指標にて *in vitro* での解析を進めることとした。表 1 に、本事業で比較解析を実施した評価指標とその結果をまとめた。評価指標としては、本製品の重要品質特性に着目し、出来るだけ多面的に設定することとした。すなわち、マーカー染色・qPCR など有効性や安全性の品質規格及び特性解析に用いられるような分子レベルの指標、力価に関連する生存率／生存細胞数等の指標、電気生理学的解析やドパミン放出能といった細胞レベルの高次機能の評価指標等を設定し、幅広く比較検討を進めた。さらに、品質のわずかな変動を評価可能な網羅的遺伝子発現プロファイルの比較も同時に実施した。また、*in vivo* においては、有効性評価としての行動評価に加え、移植脳の標本を用いて細胞の生着率やドパミン神経への成熟を示す免疫組織化学解析も併せて実施した。安全性評価としては、凍結保存プロセス導入による目的外細胞の増加の有無の検証、異所性の生着や造腫瘍性リスクの増加についても評価した。

表 1 凍結プロセス導入における同等性評価手法開発に向けた各種評価指標での比較解析結果

	目的	評価指標			評価指標の特徴	
		項目	方法	比較解析結果		
in vitro	力価	生存率/生存細胞数	膜透過性 /生存細胞数	生存細胞数：約50%	生存細胞数評価は 既存の評価法より高感度	
	有効性	ドパミン神経系マーカー	qPCR /免疫染色	非凍結細胞と同等	規格・特性解析など	
	安全性	未分化・未成熟細胞・目的外細胞マーカー				
	細胞機能	活動電位				パッチクランプ
		ドパミン放出				LC/MS/MS
	細胞特性	網羅的遺伝子解析			マイクロアレイ	細胞特性の全体像把握に有用
in vivo	有効性	行動評価	PDモデルラット	高次評価		
		生着率	免疫染色			
		ドパミン神経系マーカー				
	安全性	目的外細胞、 造腫瘍性、異所性生着	免疫染色、PCR		安全性の懸念なし	

In vitro での比較解析結果

凍結保存した細胞を融解し、ドパミン神経系のマーカーや目的外細胞の存在について免疫染色や qPCR 等で検討したが、いずれも非凍結細胞との差は全く認められなかった。次に、融解後に成熟用培地で細胞を成熟させ、細胞あたりのドパミン放出量を算出した。凍結の有無にかかわらず、融解後の細胞からドパミンが放出されていることを確認した。さらに、成熟培養後の細胞において、凍結細胞からも活動電位が確認された。これらの結果は、本製品が凍結融解後にドパミン神経細胞として機能的に成熟可能であり、また治療効果に必要な神経活性を維持していることを示している。

平成 27 年度の本事業の成果として、細胞集団の特性を把握するためにはマイクロアレイなどの網羅的遺伝子発現解析が有用であることを示し、評価手法として開発した。そこで、4 ロットの本製品にてマイクロアレイ解析を実施し、凍結融解後の種々のタイムポイントで非凍結細胞と比較した。この結果、凍結融解プロセスを導入しても細胞は特性を変化させることなく、非凍結細胞と同じ方向性でさらなる分化・成熟を進めていた。

In vivo 有効性・安全性評価

研究用 iPS 細胞及びセルバンク由来 iPS 細胞よりそれぞれドパミン神経前駆細胞を調製し、パーキンソン病モデルラットに凍結細胞を移植し、有効性試験としてメタンフェタミン誘導回転運動試験を実施した。メタンフェタミンの投与により生体のドパミン神経から強制的にドパミンを放出させた際、黒質ドパミン神経を片側性に脱落させたパーキンソン病モデルラットでは、左右のドパミン放出量の不均衡から一定方向に回転運動する。本製品の移植によりドパミン神経が生着した場合、左右の不均衡が解消され回転数が減少する。この結果、本試験にて移植後 20 週の時点で凍結細胞にて行動の完全な改善が認められた(図 3)。コントロールは、パーキンソンモデル動物への生理食塩水投与群である。また、行動解析終了後の組織学的解析においても、生着細胞に占めるドパミン神経細胞の割合は非凍結細胞と凍結細胞で同等であり、これは凍結融解細胞であっても脳内で十分に成熟、機能発揮したからであると考

えられる。一方で、造腫瘍性の増加や異所性の分布など安全性に係る評価指標では、問題となりえる現象は認められなかった。

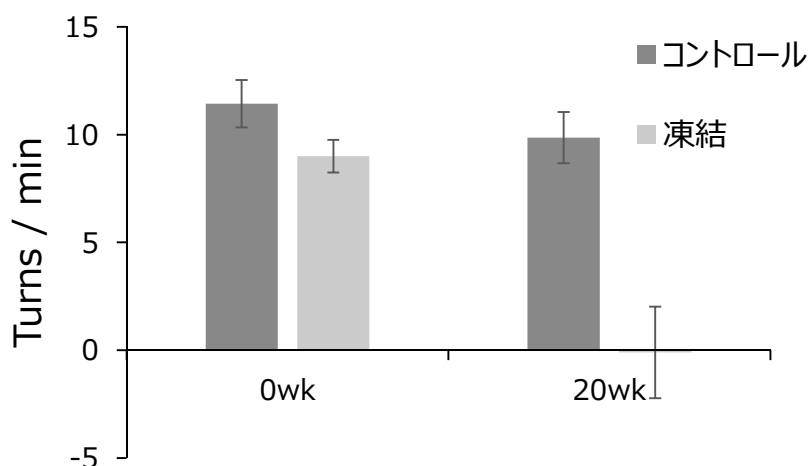


図3 パーキンソン病モデルラットに対する凍結細胞の移植によるメタンフェタミン誘導回転運動改善

非凍結細胞との同等性評価手法の開発

本事業では、平成27年度から3年間に渡り *in vitro*、*in vivo* の評価指標について多数のデータを取得してきた。これらの評価指標は、本製品の重要品質特性を網羅するものであると考えており、細胞の力価、有効性、安全性、細胞機能の評価することが可能である。従って、これらの指標にて取得したデータを組み合わせることで、凍結細胞と非凍結細胞の同等性評価手法として開発できる。開発した評価手法により凍結プロセス導入の妥当性を検証したところ、凍結保存プロセスの導入によるリスクは軽微なものであり、細胞数を補って力価をそろえることで、有効性、安全性の同等性が十分に担保可能であると結論付けられた。

【小括】

凍結細胞は融解後に非凍結細胞と同様にドパミン神経として機能することを分子レベル及び細胞レベルで実証した。また、パーキンソン病モデルラットへの移植実験により、非凍結細胞と同様に生着・成熟し有効性及び安全性に差が認められないことを示した。これらにより、凍結保存プロセス導入における同等性評価手法として開発し、導入妥当性を検証した。

研究開発項目⑥ 製造毎のばらつきを把握する評価手法の開発およびロット管理手法の戦略構築

【緒言】

本製品の製造工程として想定しているロットサイズとパーキンソン病の対象患者数から考えると、一度に大量に製造し、一定期間保管しながら供給するという既存医薬品のようなスタイルは取りづらく、ロットの異なる製品を日常的に繰り返して小規模に製造する形式になると予想できる。一般的に、iPS細胞を原料とした再生医療等製品特有の課題として、iPS細胞株間の個性に起因する品質の差や、作業手順の管理では防ぎきれない細胞培養の揺らぎ等があげられる。本製品は、非自己 iPS 細胞による他家移植であるため、バンク細胞を準備した後の細胞の株間差、ロット間差は無視できるが、培養過程のばらつき低減、すなわち品質の安定化は GMP 製造においては大きな課題がある。特に分化誘導工程では経時的に細胞の性質を変化させることから、培養過程で生じるロット間のばらつきはバイオ医薬品などと比較してより大きなものになる懸念がある。従い、GMP 製造においては、そのばらつきを出来る限り低減し、均質な細胞集団が再現よくかつ大規模に製造できる方策を注意深く検討しなければならない。一方で、これまでの経験から推測すると、本製品には有効性や安全性に影響しない範囲のばらつき許容幅が存在していることも示唆されている。従って重要なことは、製造毎に想定されるばらつきの程度を把握する評価手法を開発し、ロット間のばらつきを有効性や安全性に影響しない許容基準幅に内包させるような培養法を構築することである。

本項目では、現行の製造法で実製造を模して試行し、ばらつきの評価手法開発と許容基準幅を設定する。本課題にて設定を目指す同等性適合基準は、今後必要となるロット管理の方法論構築や種々の製法改良に対する数値的な根拠としての活用が期待できる。

【研究開発内容】

iPS 細胞を分化させて製造する再生医療等製品は、経時的に細胞の性質を変化させて製造することから、大きな課題として、培養過程で生じるロット間のばらつきがある。そこで本課題では、まず品質への影響が許容できる揺らぎ範囲の把握及び実生産時における基準幅の設定に取り組んだ。具体的には、種々の iPS 細胞を用いて同一の製法で製造した最終製品に対する *in vitro* 品質評価項目や特性解析を実施し、また細胞集団の品質の差異を鋭敏にとらえることが可能な網羅的遺伝子発現解析を実施し、細胞のばらつきを把握する評価手法を開発した。

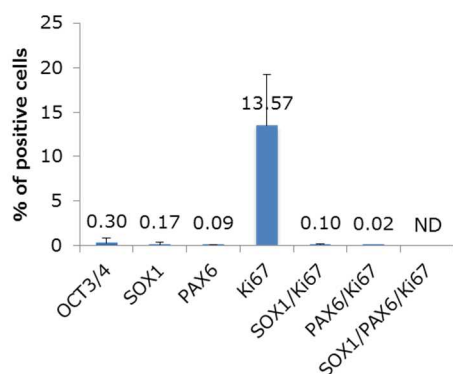
現行製法の頑健性及びロット間差について

現時点の製法の頑健性を検証するため、臨床株と同様に製造された研究用 iPS 細胞株を用いて 4 回の手培養による本製品の模擬製造を行い、最終製品における品質評価試験結果についてロット間差を検討した(図 1)。最終製品に対し、有効性マーカーとして神経マーカー Tuj1、ドパミン神経系のマーカーとして FoxA2 を用いてフローサイトメトリーにより陽性細胞の純度を検討した。また、安全性の指標として未分化細胞のマーカー Oct3/4、初期神経マーカー Sox1 及び Pax6、増殖性細胞の指標として Ki67 を選定して解析を実施した。さらに、未分化 iPS 細胞の残存否定については、LIN28 及び POU5F1 をマーカーとして qRT-PCR による解析を実施した。いずれのマーカーにおいても、当研究室でこれまで確認した結果とほぼ同様の結果が期待通り再現された。Ki67 はロット間で比較的バラつきが大きかったものの、その他のマーカーでは比較的バラつきが小さかった。Ki67 陽性細胞の比率は、これまで当研究

室で得られている他株由来データの範囲内に収まることから、ばらつきは一定の範囲内で変動しており結果には整合性があると考えられた。また、最も重要な未分化 iPS 細胞の残存に関しても、ロットごとの変動範囲が小さかったことから、本製品の製造プロセスは頑健性が高いと予想できる。

• フローサイトメトリー n=4

安全性マーカー



• qPCR n=4

有効性マーカー

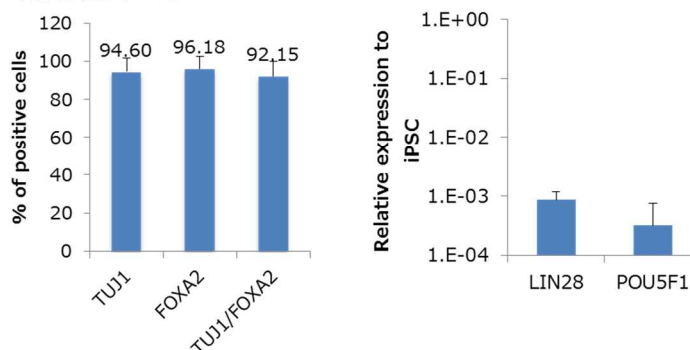


図1 最終製品の品質評価試験結果

次に、この頑健性の高い製造プロセスにおけるロット間のばらつきについて、iPS 細胞にて検討を実施した。本製品は Step3 のセルソーティング以降に成熟培養した後に出荷される。本製品は、セルソーティングによって中脳腹側領域の狭い範囲の細胞を高純度を含む細胞集団に濃縮され均一化されるが、セルソーティング後 Step4 での成熟速度に差があった場合、最終製品ではロット間差を生じる可能性が考えられる。一方で、これまでの解析経験より、培養終了時において図1で示したような *in vitro* 基準をクリアしていれば有効性や安全性の品質に問題が生じることは無いことが判明しており、基準をクリアした最終製品は培養過程で生じるバラツキの範囲にあるものとして許容できると言える。平成27年度の本事業における予備的な検討にて、細胞集団の特性変化や揺らぎを把握するためには、網羅的遺伝子発現解析（遺伝子発現プロファイル）が特に高感度で有用であることを示した。そこで今回、複数ロットの遺伝子発現プロファイルについて、どれだけの差を示すか検討した。すなわち本解析では、中間体及び最終製品を中心とし培養期間中に多くのタイムポイントでサンプリングした細胞を参照データとして、それらに対して複数のロット由来最終製品の相対的な位置関係を明らかにすべく主成分分析にて解析した。予想通り、原材料 iPS 細胞と day12 の中間体は全く異なるプロット位置に属し、PC2 軸がドパミン神経前駆細胞としての成熟度合いを示していた。そこで、解析した数万の遺伝子の中の約 15% を占める PC2 遺伝子群の発現に着目し、品質の変化の有無を捉えることとした。図2では、PC2 の値について各ロットのプロットの中から最小値と最大値を点線で結び最終製品の品質として許容できる範囲を設定した。この点線範囲内が最終製品におけるロット毎のばらつきであると言える。言い換えれば、このばらつき内に含まれるサンプリングポイントは同一品質特性を持っていると考えて差支えが無いと考えられる。

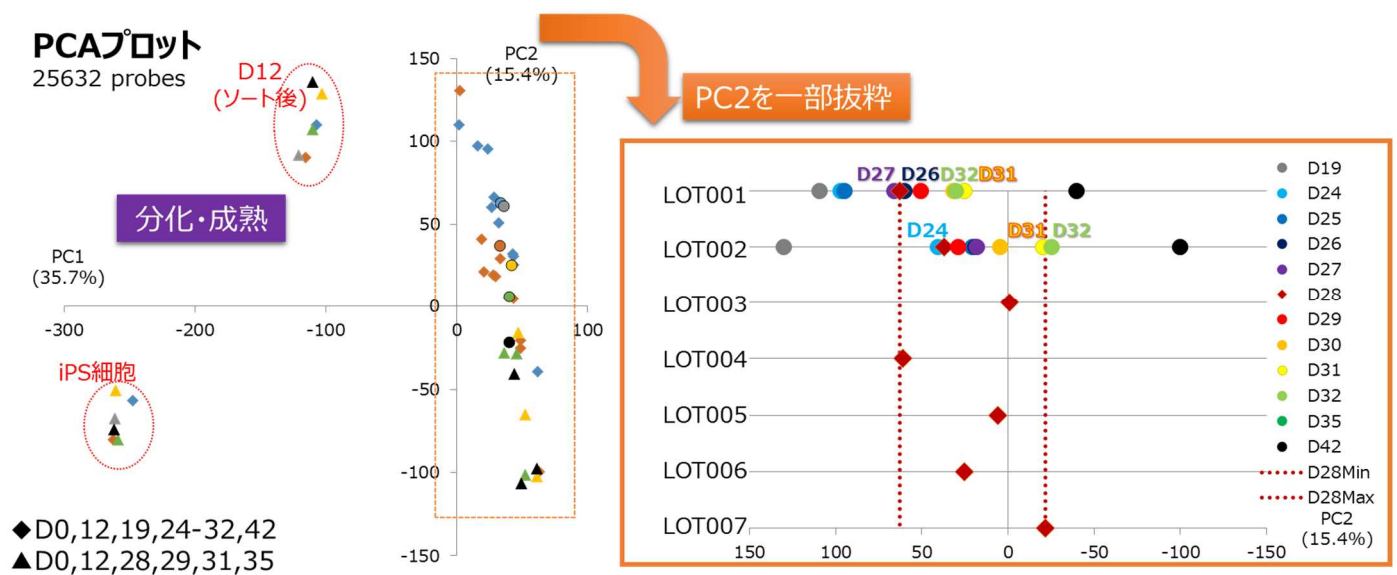


図2 複数ロットの網羅的遺伝子解析結果 (主成分分析)

次に、セルバンク由来 iPS 細胞から作製した本製品についても同様の網羅的遺伝子発現解析を実施し、重要パラメーターとして、異なるバイアル、ソーティングタイミングの追加(d12 に加え d13)についてどの程度の違いをもたらすものかについて検討した。この結果、異なるバイアル由来製品及び1 継代程度の違いがあってもほぼ同じ場所にプロットされた。また、PC2 軸の指標において差の大きかった2 サンプルはバイアル違いの同一培養条件であった(図3)。

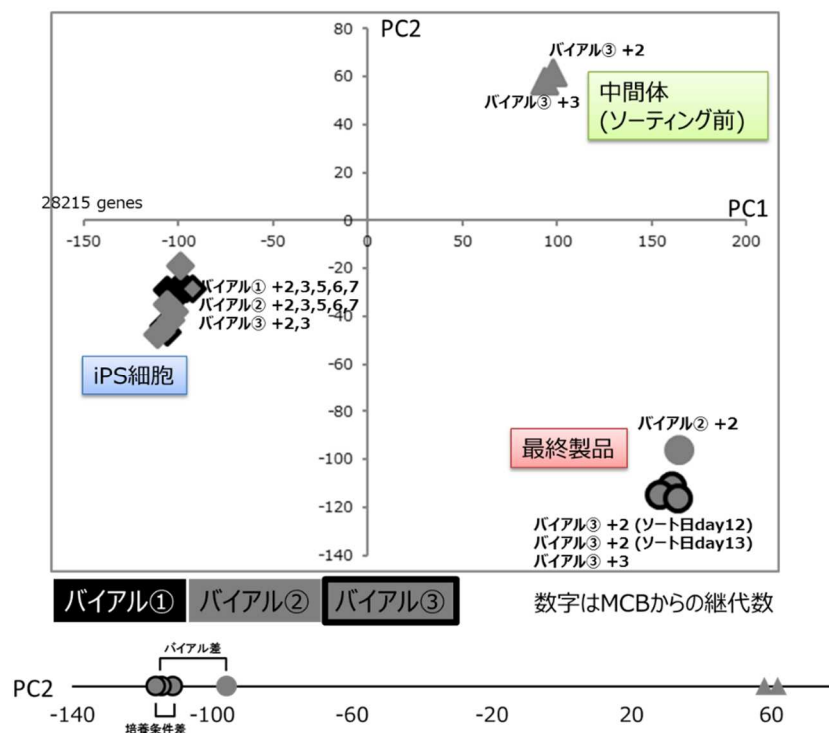


図3 MCB のバイアル間の遺伝子発現の違い

以上の検討結果を基に製造毎のばらつきを把握する評価手法を開発し、培養条件の重要パラメーター設定の論拠とした。

工業化製法の同等性検証に向けた検討

非臨床研究で蓄積してきたデータを網羅的に集約して活用して表1に示した種々の製法変更についてリスクアセスメントを実施し、非臨床データのみでの同等性証明が達成できるストラテジーを立案することとした。すなわち、各種非臨床試験用に製造したサンプルから取得した工程管理試験、品質規格試験及び特性解析試験の結果を集約して、この平均値やばらつきなどから各試験項目における許容幅すなわち同等性適合基準を設定した。設定した同等性適合基準を参照値とし、各課題①～⑤にて開発した同等性評価手法と妥当性検証結果を合わせて考察し、変更リスクアセスメントを実施した(表1)。この結果、品質への影響は無し、又は軽微であった。従って今後も、当事業内で開発した同等性評価手法（の指標の一部）を用いて実生産施設由来サンプルの品質評価実績を蓄積する方針とした。

表1 プロセスの変更が品質に与える影響のリスクアセスメント

Step	工程	現行法	改良法	変更内容	品質影響 リスク評価
1	iPS細胞拡大	研究用器材 (開放) 手培養	大面積プレート (閉鎖) 完全自動化	培養方法変更 ・自動化 ・閉鎖系	無し
2	分化誘導前半				
3	ソーティング	Jet in air 方式	マイクロ流路 方式	機種変更 ・分取機構 ・GMP対応	無し
4	分化誘導後半	96穴プレート	スリット型 96穴プレート	培養方法変更 ・簡略化	無し
5	保存	工程なし	凍結保存	新工程追加	軽微

【小括】

iPS細胞を用いて現行製法の再現性、頑健性を確認するとともに多数の製造を実施し、製造毎の細胞のばらつき評価手法を開発した。また、これにより培養条件の重要パラメーターを決定した。非臨床試験用サンプルのデータを集積し、最終製品におけるばらつきの許容幅（同等性適合基準）を設定した。さらに、研究開発項目①～⑤における各プロセス変更についてリスクアセスメントを実施し、同等性検証ストラテジーを立案した。

4. まとめ

iPS 細胞等を原材料とした再生医療等製品を事業として確立するためには、「種々の規制要求に対応した上で、再現性のある GMP に準拠した製造プロセス構築」が不可欠であることは周知の事実である。しかしながら現時点では、未だ研究用器材や研究用試薬が中心的に用いられ、実験室レベルでの高度な手作業の単純移行による産業化、ロットサイズ拡大が中心である。このような形態をとる限り、産業化においては生産性やコスト、品質の安定性に課題が残り、いわゆる「ダーウィンの海」は超えられない。本製品においても、現在の手培養による製造法の単純移行によるスケールアップは適わず、長期間にわたって繰り返し生産する市販後の GMP 製造における生産効率向上やリスク管理の点から、改善を進めている。そこで我々は、iPS 細胞を用いた再生医療等製品の工業的製造法の確立、CPC への実装及び事業化先駆的事例とすべく、Step1、2 では閉鎖型大面積自動培養装置の導入、Step3 ではセルソーティングにおける抗体の規制対応及び工業用セルソーターの導入、Step4 では新規浮遊培養法の導入、最終製品の凍結保存法の開発、をそれぞれ進め、これらの製造プロセス導入の妥当性検証に必要となる同等性評価手法の開発及び基準値の設定に取り組んだ。

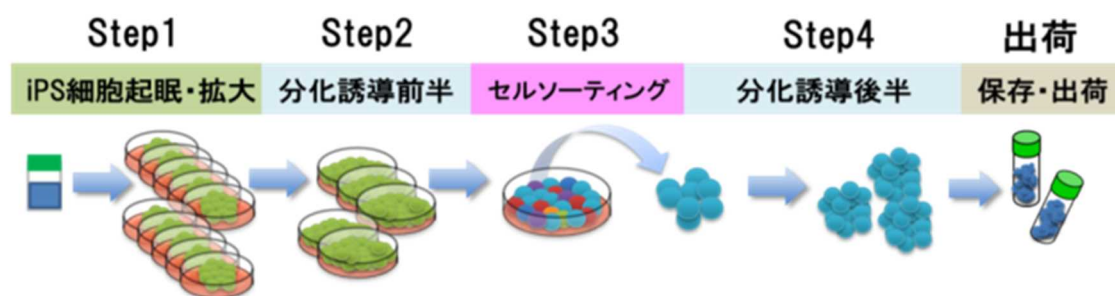


図1 本製品の製造プロセス

Step1、Step2

iPS 細胞由来の再生医療等製品を GMP で工業的に生産するためには、自動培養装置の導入は必須の課題である。自動培養装置を導入することで、現在熟練した作業者の手作業で行われている培養作業を、より低コストで安定に製造できるとともにロット内外のばらつきの低減が期待できる。自動培養の方法としては、送液システムを備えた装置本体と閉鎖系のディスポーザブル容器・流路を用いた方法が望ましいと考えられる。これは、CPC などの製造施設における装置設置場所の空調管理等のハード面での労力が激減することに加え、単回使用の閉鎖型容器であればロット間交叉がなく、またチェンジオーバーにかかる時間が容器・流路の設置にかかる時間のみとなり、ダウンタイムを少なく抑えられるからである。本事業では、製造プロセスに日立製自動培養装置を導入することを検討し、これにより培養した細胞について種々の指標でデータを取得し、同等性評価手法を開発した。これにより、大量自動培養装置での、商用スケールの細胞培養が可能であることを示した。自動培養装置における評価指標としては、最終製品までの製造工程全体を対象として選定することで、原料細胞のわずかな違いがその後の細胞加工に与える影響も見逃さずに評価した。また、自動培養への移行に伴う培養条件の変更に関する基礎的な培養条件の評価及び許容範囲の設定も実施した。これらの一連の研究開発プロセスは、異なる

プロトコールにて他細胞種を製造するような別製品における自動培養装置の導入にも汎用的であり、後続事業者が研究開発方針を設定する際の参考情報として非常に有用な知見であると言える。

Step3

再生医療等製品の製造におけるセルソーティングプロセスは、本製品のような単一細胞の製造における目的細胞の純度向上、非目的細胞の除去といった目的のみならず、次世代の再生医療等製品で想定される複数種類の細胞により構成される生体組織の作製技術にも応用可能な汎用性の高い技術基盤である。将来性の高い技術であるにも関わらず、GMP 製造に用いるセルソーター本体及び選別に用いる抗体そのものの取り扱いに等つての方向性は定まっていなかった。本事業において、抗体の製造管理や規制対応を進めた。また、研究段階で用いられるセルソーターとの同等性評価手法を開発することで、新規セルソーターの製造プロセスへの導入可能性を示した。

Step4

製造工程を工業レベルにスケールアップすると、必ず品質安定性が低下する。分化誘導に係る自動化などのプロセス開発研究は世界中で精力的に進められているが、iPS 細胞からの各種分化細胞への分化誘導方法開発がアカデミア主体であることを考えると、必然的に手作業による製造工程が主流となっている。従って、再生医療等製品のスケールアップによる品質安定性の低下の主因は、作業時間の長時間化や作業者の違い等であると考えられる。そこで、現行法をより省力化し、簡潔なプロセスへ進化させることが重要である。本工程では、品質安定性の向上を主眼に置いた新規浮遊培養法について検討を行い、現行法との同等性評価手法を開発することで、スリットプレートの導入可能性を示した。ここでの検討プロセスは、より複雑な組織培養すなわちオルガノイド培養などを利用した再生医療等製品の研究開発の参考となる。

保存法

本製品は、iPS 細胞由来の初の立体組織(細胞塊)製品であり、ダメージに弱い神経細胞が三次元に凝集した形状をとっているため凍結保存そのものが難しく困難であった。しかしながら、本事業、前事業の三年間にわたって研究開発を進める中、三次元構造を持つ神経細胞塊に特異的で *in vivo* でのデータと相関の高い高感度評価手法の開発、これを用いた最適凍結法を完成させた。さらに、凍結細胞と非凍結細胞の同等性評価手法を開発して、凍結プロセス導入妥当性の理論を構築した。本事業で評価した同等性検証手順は、神経細胞について分子レベルから高次細胞機能レベル、さらには移植後の動物脳内での挙動解析までを含む網羅的なものである。従って、凍結細胞の評価手法として、神経一般に汎用的に使用できるものと期待できる。

本事業では、工程毎に製造プロセスを合理化し、製造方法変更に係る同等性の検証に必要な各種指標の選定とデータ取得を行い、同等性評価手法を開発した。またこれにより、GMP での製造プロセスとしての導入妥当性を検証した。既存法との同等性検証ストラテジーを整理すると、新たな製造工程への移行を成功させるためには、対象とする製品の重要品質特性 (Critical Quality Attributes:品質規格や特性解析など) 及び重要工程パラメーター(Critical Process Parameters:)の把握が不可欠であった、と言える。本事業においては、CQA や CPP の観点から評価指標を設計し、また予測される工程変動のインパクトを踏まえて多岐にわたるデータを取得し検証した(図 2)。設定した評価手法は将来の製造所での製造時ベリフィケーションにも活用できる有意義なものであり、データの信頼性が担保された製造所間の製造デ

ータ比較を継続的に実施することで、ヒトへの投与なく非臨床データのみでの同等性証明を達成する道筋を拓いた。再生医療等製品は、品目ごとに原材料、製造法や品質特性が大きく異なっている。その研究開発においては、たとえ製法の軽微な変更であっても既存の低分子化合物のような画一的な評価が適用できるわけではなく、開発者側及び規制当局どちらの視点からもその適否判断が難しい場面が多々存在する。従い、設計した評価指標の妥当性・網羅性及び取得したデータについてはタイムリーに相談を重ね、規制当局への入念な製品特性の説明とそれに基づいた見解を順次検討に盛り込むサイクルを確立することが必須である。

一方で、我々が取り組んだ種々の製法改良では、ハード面からの根本的改良による新たな工程への置き換えを目指した。この場合、対応するソフト面においても研究用の段階から工業的段階への脱皮を図る必要がある。すなわち、装置本体のみならず、使用する試薬や操作に用いる器材全てに対して GMP における使用を見越し、必要な規格設定、規制上必要となる追加の試験といった対応が必要となることも忘れてはならない重要なポイントである。

以上のように、本事業にて我々が先駆けて実証してきた工業的生産法への移行とその同等性検証手法は、再生医療等製品の初期研究開発における本質的な課題の解決事例であり、今後の参考となる取り組み例になったと考えている。

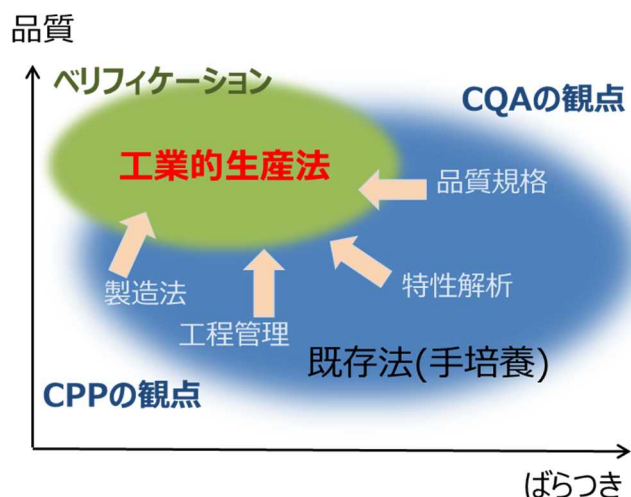


図2 工業的生産法確立に向けた同等性検証ストラテジー