



kju:

SCAS NEWS

2025 - I

(通巻60号)

テーマ

未来医療の実現に 貢献する分析技術

提言 P.1

再生医療の発展と未来への期待

大阪大学大学院 岡田 潔 先生

未来へ繋ぐ P.3

重症心不全の新規治療法の開発

～iPS細胞を用いた橋渡し研究と臨床応用～

大阪大学大学院 / 大阪大学医学部附属病院

笹井 雅夫 先生

河村 拓史 先生

宮川 繁 先生

FRONTIER REPORT P.11

- 細胞医薬品の微生物学的安全性評価

規制&標準化の潮流 P.15

- 中国のDMF登録制度の最新情報

SCAS NOW P.17

- syFISH(systematic FISH)解析
～バイオ医薬品の生産に用いられる細胞基材の
単クローン性の評価～
- 血中循環腫瘍細胞(CTC)のバイオマーカー
としての活用の新展開
～検体の長期保存によるCTC中DNA・RNA解析の
利用拡大に向けて～
- 中分子医薬品(核酸およびペプチド)の
バイオアナリシスにおけるLC-MS/MS
(Triple Quad™7500)の有用性

TOPICS P.22

- 日本分析化学会 2024年度有功賞受賞

PICKUP! TOPICS 巻末

- 品質感受性診断「品感コンシェルジュ®」サービス
開始のお知らせ
- 日本粉体工業技術協会
第38回粉体工業功績者賞受賞



再生医療の発展と 未来への期待

大阪大学大学院医学系研究科・医学部附属病院
産学連携・クロスイノベーションイニシアティブ 特任教授

おかだ きよし
岡田 潔

再生医療は細胞等を用いて、失われた臓器の機能を再建、再生を目指す医療であり、これまで治療困難であった疾病や外傷を治療できる可能性があることから、この20年大きな注目と期待を受けてきた分野である。2012年に京都大学iPS細胞研究所の山中伸弥教授がノーベル生理学・医学賞を受賞されてから、研究、開発は一層盛んとなり、未来の医療の一分野となった。そして新たな産業としての期待も受けて、法整備も行われ、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」（再生医療安確法）が2014年より新たに施行された。同年、改正薬事法である「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」（医薬品医用機器等法；薬機法）の中に、新たに「再生医療等製品」のカテゴリーが設けられることとなった。2014年以前には、株式会社ジャパン・ティッシュエンジニアリングが製造販売する自家培養表皮「ジェイス®」と自家培養軟骨「ジャック®」の2製品が医療機器として承認されているのみであったが、法整備の後押しもあってか、2024年3月31日までに20製品が承認されるに至り、ちょうど10年間で製品数が10倍になっており、現在も新規に承認される製品が増えてきている状況にある。

整形外科医である私が、再生医療の分野に触れるようになったのは、大学院に進学し、神経再生の基礎研究に関わるようになってからであった。幸いにして、大学院の過程を無事修了した後に、大阪大学医学部附属病院未来医療センターへ配属となり、軟骨再生や心臓再生、角膜再生の臨床研究に関わるようになり、再生医療開発進展の一助となることが私の業務の一つとなった。その後、2011年より厚生労働省、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）へ出向し、再生医療の規制の考え方に触れる機会を得ることができ、ちょうど、法改正のタイミングにその議論に加わることができたことで、再生医療開発に関して規制する側が重視するポイントを理解できるようになった。

上記経験を踏まえて、再生医療開発の要となってくるのが分析化学の力だと私は考えている。基礎研究から、非臨床試験、そして臨床試験に進み、実用化への道筋をたどるためには、その作用機序の解明からProof of Conceptを得ることも重要だが、特性や安全性の確認のためには、細胞に含まれるタンパク質の解析や、製造工程に含まれる不純物の同定や定量も必須になってくる。我々アカデミアは分子生物学的な研究を日々進めているが、例えば製造工程で発生する不純物の網羅的解析や、特殊な手段が必要な物質の解析などを1教室で実施していくことは困難である。上記のような事例では、特に産学連携が重要と考えており、分析を得意とする企業の力が、再生医療開発の大きな助けとなっている。

一方、私が2016年から取り組んでいる事業に「再生医療ナショナルコンソーシアム」と呼ばれるものがある。これは日本医療研究開発機構から委託された事業として、一般社団法人日本再生医療学会が中心となって行われる組織体で、再生医療研究の支援や、人材育成、データベースの開発、産学連携や社学連携の推進、そして再生医療の国際展開を支援する仕組みである。1期目（2016年～2020年）、2期目（2021年～2023年）、3期目（2024年～現在）と事業は進展してきており、これまで支援やアドバイスを実施した研究はアカデミア、企業のを両方含め100件を超えている。また、この事業の中で、テキストブック「再生医療～創る、行う、支える～」を発刊し、E-Learningシステムも構築している。この活動を通じて、アカデミア、企業が一体となった再生医療の発展を支援していきたいと考えており、再生医療に関与する企業の参画がより進むことを期待している。

加えて、私が再生医療における企業とアカデミアの連携の場として、検討に参加しているのが未来医療国際拠点、Nakanoshima Grossである。大阪市内の中之島4丁目に建設されたこの拠点は、未来医療の中でも再生医療の実践、創造、共有をアカデミアと企業のコラボレーションで実施し、新規のイノベーションとビジネスを生み出す場としてその役割を果たすことが期待されている。建物はR&DセンターとMEDセンターの2棟から構成され、R&Dセンターには様々な企業とのリエゾンオフィスやインキュベートルボ、コミュニティカフェやカンファレンスセンターがある。MEDセンターには病院や診療所が入居しており、免疫拒絶のない自家iPS細胞を用いた再生医療を推進するmy iPSプロジェクトが実施されることも公表されている。R&Dセンター側では様々なシーズ開発や新たな事業のインキュベーションが行われ、そうして開発されたシーズは、MEDセンター側で臨床におけるProof of Conceptが確認されていくことになり、研究開発から臨床応用までを一つ屋根の下で一貫して実施して行くことが可能となる。さらには、PMDA 関西支部がNakanoshima Grossに移転することもすでに公表されており、規制側への相談までも同じ場所で受けることができるということになる。つまりここには、様々な企業や研究者、医療者が集まり、再生医療を推進するための新たな需要と供給を生み出す場になると考えている。この新たな需要と供給の中で、細胞、遺伝子、細胞外小胞やタンパク質から化学物質まで、様々な解析を正確に行う力が、再生医療の未来を解き明かしていってくれることを期待するものである。

略 歴	2002年	佐賀医科大学医学部卒業
	2002年	国立大阪医療センター整形外科 研修医
	2004年	済生会泉尾病院整形外科 医員
	2005年	関西労災病院整形外科 レジデント
	2006年	大阪大学大学院医学系研究科入学
	2010年	同学博士課程修了。大阪大学医学部附属病院未来医療センター 医員
	2011年	大阪大学大学院医学系研究科 助教
	2011年	厚生労働省医政局研究開発振興課 ヒト幹細胞臨床研究対策専門官
	2012年	福島県原子力災害現地対策本部医療班長
	2012年	厚生労働省医政局研究開発振興課課長補佐（高度医療専門官併任）
	2012年	独立行政法人医薬品医療機器総合機構再生医療製品等審査部 特任職員（常勤）
	2013年	同機構医療機器審査第二部併任
	2013年	大阪大学医学部附属病院未来医療開発部 特任講師
	2015年	大阪大学医学部附属病院未来医療開発部 講師
	2017年	大阪大学医学部附属病院未来医療開発部未来医療センター 副センター長
	2019年	大阪大学大学院医学系研究科 産学連携・クロスイノベーションイニシアティブ 特任准教授
	2023年	大阪大学大学院医学系研究科 産学連携・クロスイノベーションイニシアティブ 特任教授

研究分野 末梢神経再生、規制科学、臨床研究倫理

所属学会・資格
日本再生医療学会常務理事
日本レギュラトリーサイエンス学会理事
Asian Cellular Therapy Organization, Committee Member
日本再生医療学会再生医療認定医
日本整形外科学会整形外科専門医
日本整形外科学会認定リウマチ医
日本手外科学会手外科専門医

受賞歴
2019年 第1回日本オープンイノベーション大賞 日本学術会議会長賞
2019年 日本再生医療学会The Johnson & Johnson Innovation Award



重症心不全の新規治療法の開発 ～ iPS 細胞を用いた橋渡し研究と臨床応用～

執筆者所属：

- 1 大阪大学大学院医学系研究科最先端再生医療学共同研究講座
- 2 大阪大学医学部附属病院未来医療開発部
- 3 大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科学講座

執筆者氏名：

笹井 雅夫^{1,2}, 河村 拓史³, 宮川 繁^{2,3}



再生医療は、有効な治療法のない疾患に対して新たな治療法となりうることが期待されている。大阪大学では様々な領域で再生医療につながる技術開発が進められており、基礎研究、橋渡し研究を経て臨床応用された技術が多く存在している。大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科では、重症心不全の新規治療法の開発として、虚血性心筋症患者を対象とし、他人の細胞を移植（同種移植）する、ヒト（同種）人工多能性幹細胞（induced Pluripotent Stem Cells：iPSC）由来心筋細胞を用いた医師主導治験を実施している。本稿では、iPSC 由来心筋細胞を用いた再生医療等技術の基礎検討段階から、橋渡し研究を経て臨床試験にステージアップする時の留意点を含め、本研究開発の進捗を紹介したい。

1 はじめに （日本におけるアカデミア医療開発について）

2015 年、日本における医療分野の研究開発の中核的な役割を担う機関として、日本医療研究開発機構（AMED）が設立された。その理念は「医療分野の研究成果を一刻も早く実用化し、患者さんやご家族の元にお届けすること」と

掲げられており、アカデミアもその理念に賛同して、日々新たな治療法の開発に取り組んでいる。大阪大学では、AMED 設立以前より産官学連携による様々な支援を受けながら大学での基礎研究を効率的・効果的に実用化するべく、開発の「死の谷」を超えるための「橋渡し」を行う橋渡し研究(Translational research:TR)を推進してきた(図1)。

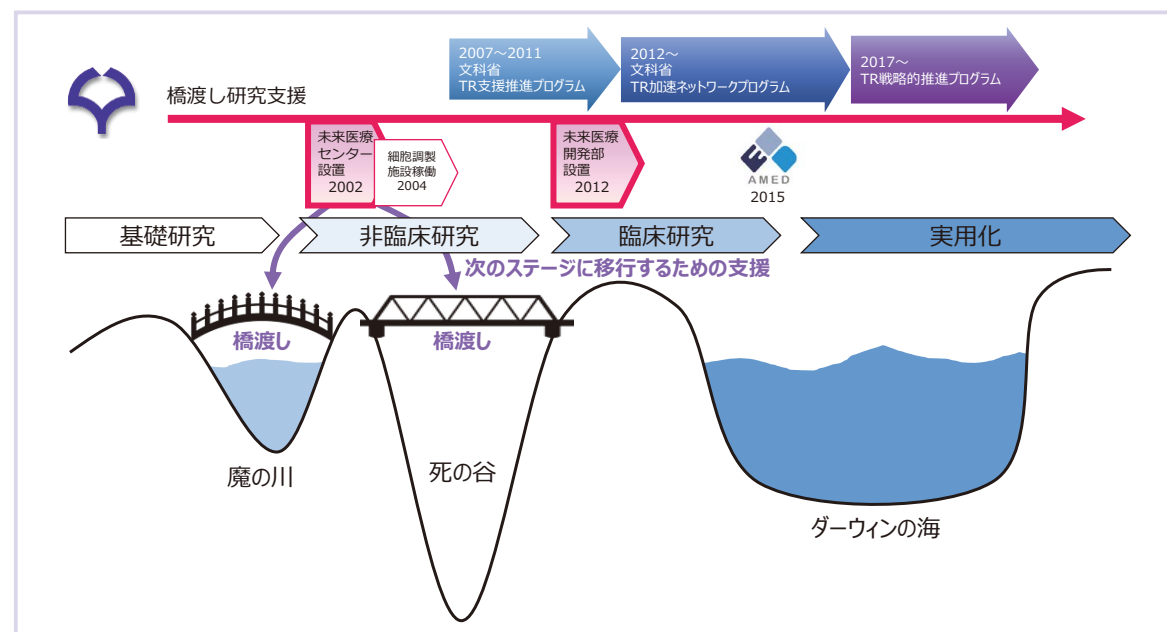


図1 製品開発のステージと橋渡し研究の位置付け

2 心不全に対する新規治療法の開発背景

心不全は、動脈硬化による虚血性心筋症、心筋の遺伝的、環境的因子による機能低下が主因となる拡張型心筋症などの原因により生じる。治療方法については、発症予防、進行抑制などを目的とした薬物療法、形態的異常に対する外科的治療介入などが考慮されるが、あらゆる既存の治療方法を行っても心不全の進行を来す重症心不全に対しては、補助人工心臓、心臓移植などの心機能の代替療法が考慮される。心臓移植は、我が国ではドナー不足により5年以上の待機期間が必要な状況¹⁾となっており、その間植込み型左室補助人工心臓(LVAD)による治療も検討される。しかしながら、長期間のLVAD治療により、感染、脳血管合併症などの発生が課題となっており、これらを解決する新たな治療方法の開発が急務となっている。

心不全患者に対する心機能改善を目標とした再生医療において、細胞移植はこれまでに数多くの基礎研究が行われ、臨床研究へと進んでいる。最初に報告された心不全への細胞移植治療は、フランスで行われた患者自身の下腿から骨格筋を採取し、得られた筋芽細胞を開胸下で心筋組織に注射で移植する臨床研究(The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) Trial)である。残念ながら本臨床研究では、心不全患者に

対する有効性を示すに至らず、致死性不整脈が発生する可能性が報告された²⁾。その後、細胞種（骨髄間葉系幹細胞³⁾、胚性幹細胞（ES細胞）由来心筋細胞⁴⁾）や移植細胞の形状（細胞シート）の検討が進められてきたが、残念ながら、臨床において心不全に対する有効性を示し、普及する治療法として定着したものは現時点で存在していない。心不全領域の製品開発は厳しい状況にあるが、大阪大学心臓血管外科では、iPSCを新たな細胞源として、iPSC由来心筋細胞をシート状にした「iPS心筋細胞シート」を用いて虚血性心筋症患者に対する安全性および有効性を評価する医師主導の治験を実施する等、新規治療法の開発を進めている。

3 重症心不全に対するヒト（同種）iPS心筋細胞シートの基礎的検討

iPSCは2007年に京都大学の山中伸弥教授らによって発表され⁵⁾、その後、2012年に山中教授はノーベル医学生理学賞を受賞している⁶⁾。大阪大学心臓血管外科では、2007年の発表後に山中教授と共同研究を開始し、2012年に「ヒトiPS心筋細胞シート」を虚血性心筋症モデル動物に移植し、心機能が改善することを世界で初めて報告した(図2)⁷⁾。その後、心筋細胞移植後にレシピエント

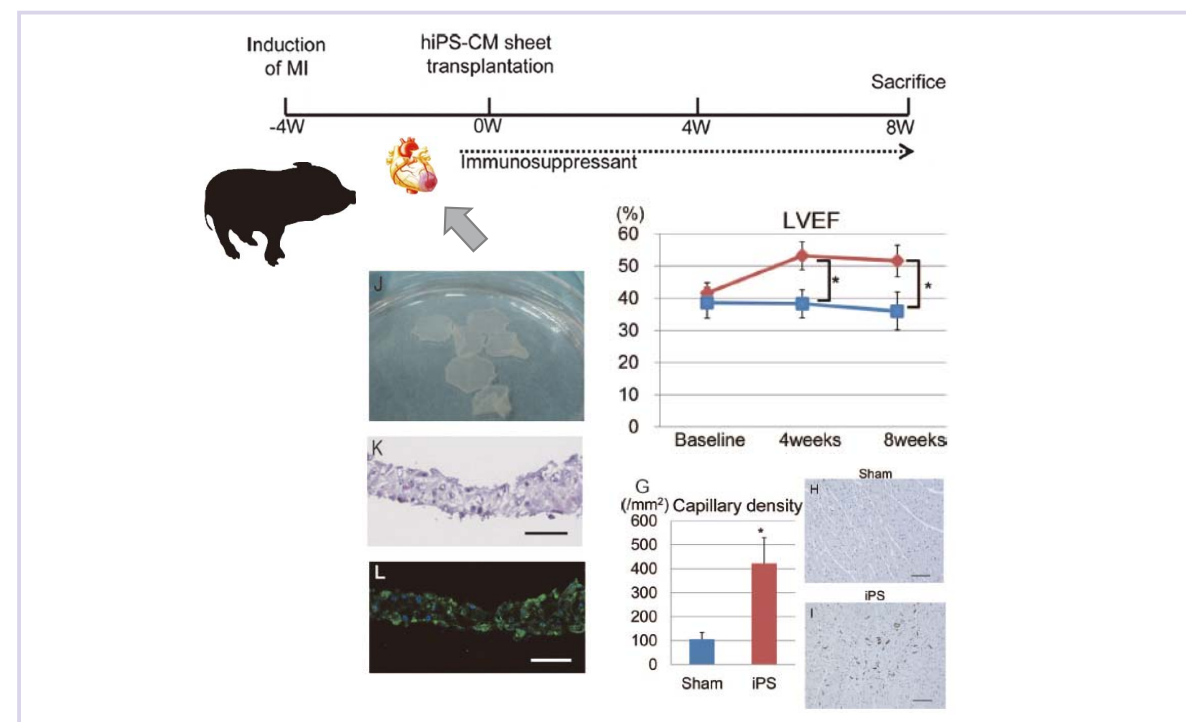


図2 虚血性心筋症モデル動物に対し、iPS心筋細胞シート（hiPS-CM）を移植することで心機能を改善⁷⁾

- ・上：実験プロトコル（MI: Myocardial Infarction）
- ・左写真：J: hiPS-CMの概観、K: ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色像、L: 心筋トロポニンT（緑）染色像
- ・右上グラフ：左室駆出率（LVEF: Left Ventricle Ejection Fraction）の推移（赤：iPSC移植群、青：シャムオペ群（コントロール群））
- ・右下グラフおよび写真：毛細血管密度（Capillary density）（赤：iPSC移植群、青：シャムオペ群（コントロール群））、H, Iはそれぞれ心筋の顕微鏡写真

心臓と同期拍動すること⁸⁾，これまで検討されてきた細胞源よりも iPS 心筋細胞シートは高い有効性が期待できることを示してきた⁹⁾。また，他人の細胞を移植（同種移植）することから，移植後の免疫反応を評価する非臨床試験を，マウス，カニクイザル等を用いて実施し，臨床応用を見据えて想定される状況に対する情報の取得を進めてきた¹⁰⁻¹²⁾（図 3）。

4 臨床研究に移行するための橋渡し研究

非臨床 Proof of Concept（PoC）の取得後，我々は臨床応用を目指し，治験の実施および臨床使用可能な品質を備えた細胞加工製品を提供できる体制を構築する必要があった。具体的には，産官学連携による橋渡し研究支援を

受けて，細胞培養加工施設での製造方法の確立，非臨床安全性試験の実施，治験開始前に必要な規制当局相談（レギュラトリーサイエンス戦略相談（旧薬事戦略相談）），実施医療機関での治験審査等に対応してきた。細胞加工製品（治験製品）の製造は，研究室での製造から，清浄度を高度に管理した細胞培養加工施設での製造へ，単純に作業手順の移管のみでなく，ヒトへの投与のために必要な品質を確保するための品質管理戦略を立てた（表 1）。また，心機能改善につながる作用機序も継続して究明し，iPS 心筋細胞シートが移植後に分泌する液性因子が，心臓の障害部位および正常部位との境界領域の微小環境を改善することで，心機能改善につながることを見出した（図 4）。

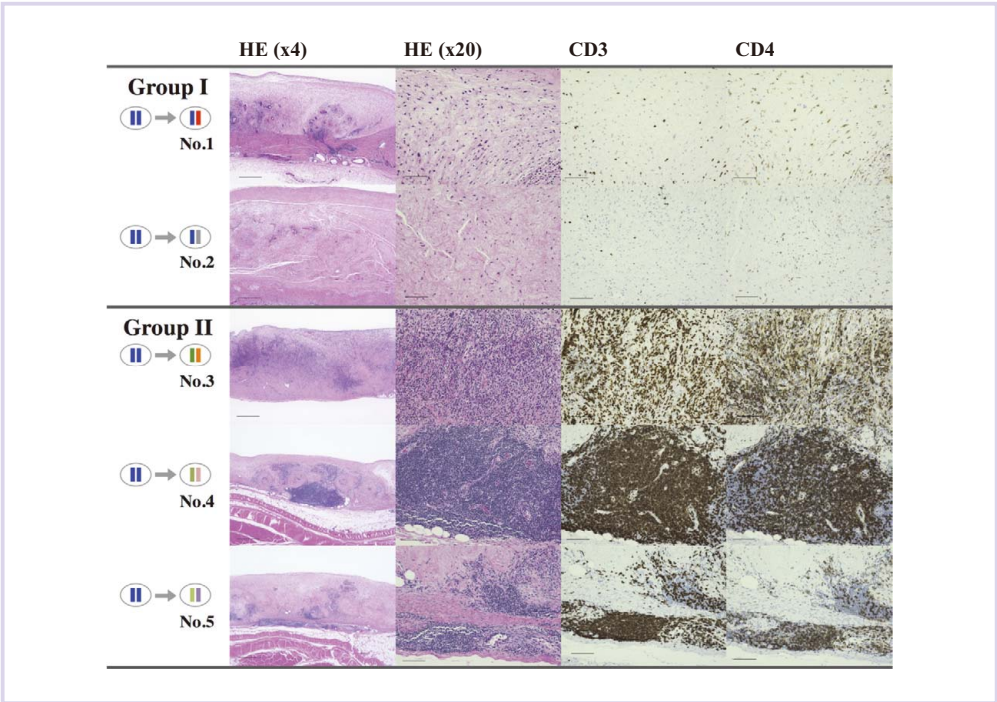


図 3 カニクイザルを用いた iPS 細胞由来心筋細胞の免疫拒絶反応の検討の一例¹¹⁾
・ Group I (No.1, No.2) は，主要組織適合遺伝子複合体（MHC: Major histocompatibility complex）がホモ（1種類）であるカニクイザル iPS 由来心筋細胞を，MHC 型を一致させて移植したときの写真（左から，HE 染色（広角像），HE 染色（拡大像），CD3 陽性細胞免疫染色像，CD4 陽性細胞免疫染色像）。
・ Group II (No.3, No.4, No.5) は，MHC 型の不一致の移植であり，組織中に免疫担当細胞である CD3 陽性細胞や CD4 陽性細胞の浸潤（細胞が血管から組織内に移動する現象で，拒絶反応時は，異物として認識された細胞が攻撃を受ける）が多く認められている。

表 1 細胞加工製品（治験製品）の製造移管について

	基礎研究	→	治験
製造場所	研究室		細胞培養加工施設（清浄度を高度に管理）
製造方法	実験計画書（作業者の経験）	➤ 手順書の整備	手順書に基づく製造
原料	卸売業者から購入	➤ 原料変更により製造条件を変更	卸売業者から購入（開発者自らが品質を確認）
品質管理項目	未確立の場合が多い	➤ 品質管理項目の設定による作業の複雑化	開発者による設定（規制当局と合意）
分析法	未確立の場合が多い		手順書に基づく分析法
記録	実験ノート		手順書に基づく指図記録書

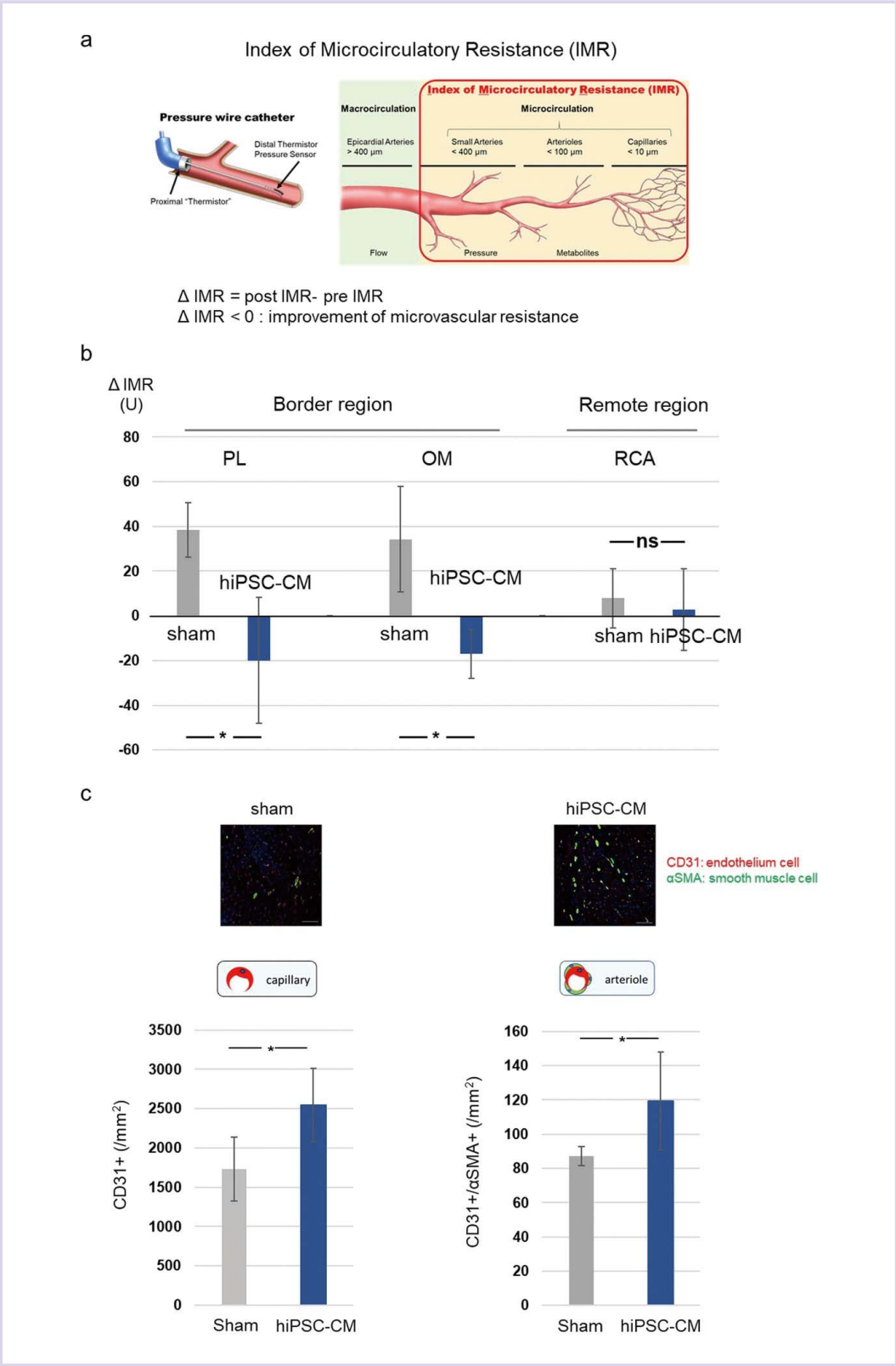


図 4 iPS 心筋細胞シートによる微小環境の改善と血管成熟¹³⁾
a：微小循環抵抗に関する模式図，微小循環抵抗（IMR）が小さくなると微小循環が改善されたと判断できる。
b：IMR が hiPSC-CM の移植により低下した（ Δ IMR が 0 よりも低い値となった）ことから，心筋の微小環境が改善したと評価された。Border region は正常心筋と心筋梗塞部位の境界領域，Remote region は心筋梗塞部位から遠位での評価を示す。
c：心臓組織における内皮細胞（CD31 陽性細胞）と平滑筋細胞（ α SMA 陽性細胞）の蛍光染色像を示す。左図は内皮細胞のみで構成された毛細血管（capillary），右図は内皮細胞と平滑筋細胞で構成された細動脈（arteriole）を示す。下のグラフは単位面積あたりに占める CD31 陽性細胞と，CD31 陽性かつ α SMA 陽性細胞の割合を示す。hiPSC-CM を移植した方が，CD31 陽性かつ α SMA 陽性細胞の割合が多い，つまりの成熟血管の割合が多くなったことを示す。

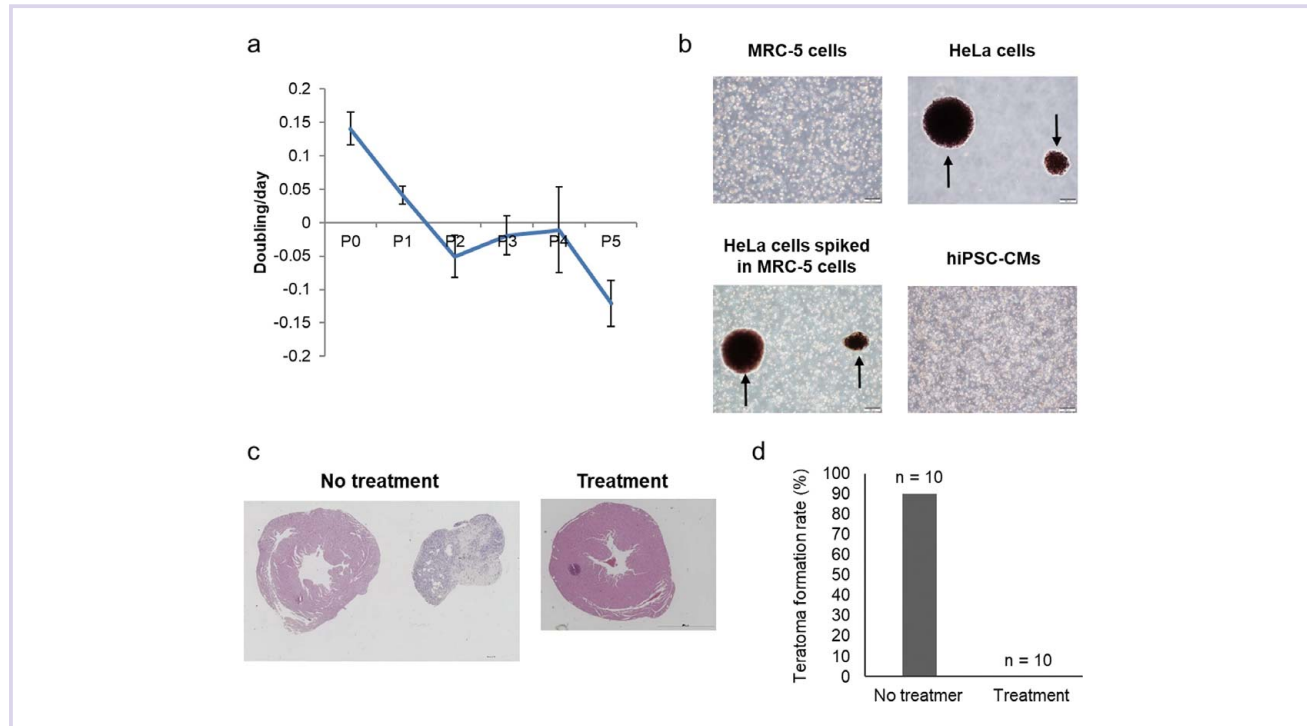


図5 iPS 心筋細胞の細胞増殖特性、足場非依存性増殖評価、造腫瘍性評価¹³⁾

- a: 細胞増殖特性の評価: 継代培養時 (P0~P5) に細胞増殖率を算出し、増殖速度を計測した。その結果、継代を重ねることで増殖速度は低下した (異常な増殖は認めなかった)。
- b: 足場非依存性増殖の評価: 軟寒天上に培養し、足場のない状況での増殖の可否を評価した結果、hiPSC-CMsは軟寒天上 (足場のない環境) では、増殖を示さなかった (MRC-5 cells: 陰性対照, HeLa cells: 陽性対照)。心筋細胞シートの製造中に形質転換が生じて、足場がない状況でも増殖する形質を獲得すると腫瘍形成のリスクがあるものと判断される。
- c: 造腫瘍性の評価: 免疫不全マウス (NOGマウス) の心臓表面にヒト心筋細胞シートを貼付し、腫瘍形成の有無を評価した。No treatmentは、未分化iPSCを除去する工程を行っていないもの (陽性対照) で、Treatmentは未分化iPSCを除去する工程を加えたものの評価である。
- d: 未分化iPSCによる奇形腫形成能の評価: 未分化iPSCを除去する工程を経たもの (Treatment) では、奇形腫形成が認められなかった。

その後、非臨床安全性試験 (図5)、効力を裏付ける試験、特性解析試験 (図6) を実施する等、臨床応用に必要なデータを積み重ねてきた¹³⁾。その間、規制当局との相談を適時に実施し、治験開始までに必要なデータの合意を得つつ、治験プロトコルについても議論を重ね、2019年に初回治験計画届の提出に至った。

5 臨床試験

我々は上述した基礎的検討、橋渡し研究を基に2019年から虚血性心筋症に対するiPS細胞由来心筋細胞移植の医師主導治験 (臨床研究実施計画番号 jRCT2053190081) を開始した (図7)。

第1症例目についてiPS心筋細胞シート移植術が実施され (図8)、その後観察期間を通じて詳細な検討が行われ、安全性の確認と、iPS細胞を移植した左心室での収縮能の改善が観察された (図9: 四次元CTで観察した左室収縮。収縮能が高い領域を赤色で表現している。下図の点線は、iPS細胞由来心筋細胞を移植したこと、治療効果の期待が持てる結果を得られている¹⁴⁾。2024年10月現在、

8症例への移植、移植後1年間の観察期間は全例で終了し、全例に対して長期観察試験を実施している (臨床研究実施計画番号 jRCT2053220055)。

6 細胞加工製品の開発における留意点

細胞加工製品は、その複雑性から、最終製品の規格試験のみで品質を担保することは困難と考えられており、製造場所、製造方法、原材料等の変更があった際の最終製品の同等性評価では、規格試験のみならず、特性解析試験で幅広く評価することが求められる。工程内管理試験成績を用いて一貫性を示すことも手段として採り得るものと言える。そのために、特性解析 (例えば、目的外細胞の特定、液性因子産生能、細胞増殖、遺伝子発現等) をはじめ、試験方法が確立されていること (ものさしが確固としたものであること) は、非常に重要であることは言うまでもなく、開発の初期段階において、試験方法の操作手順を確立し、何をどこまで計測・評価できるのかといった試験方法の性能を確認し、記録を残しておくことは技術移管を円滑に進めるための方策の一つと考えられる。しかしながら、細胞加工製品の品質

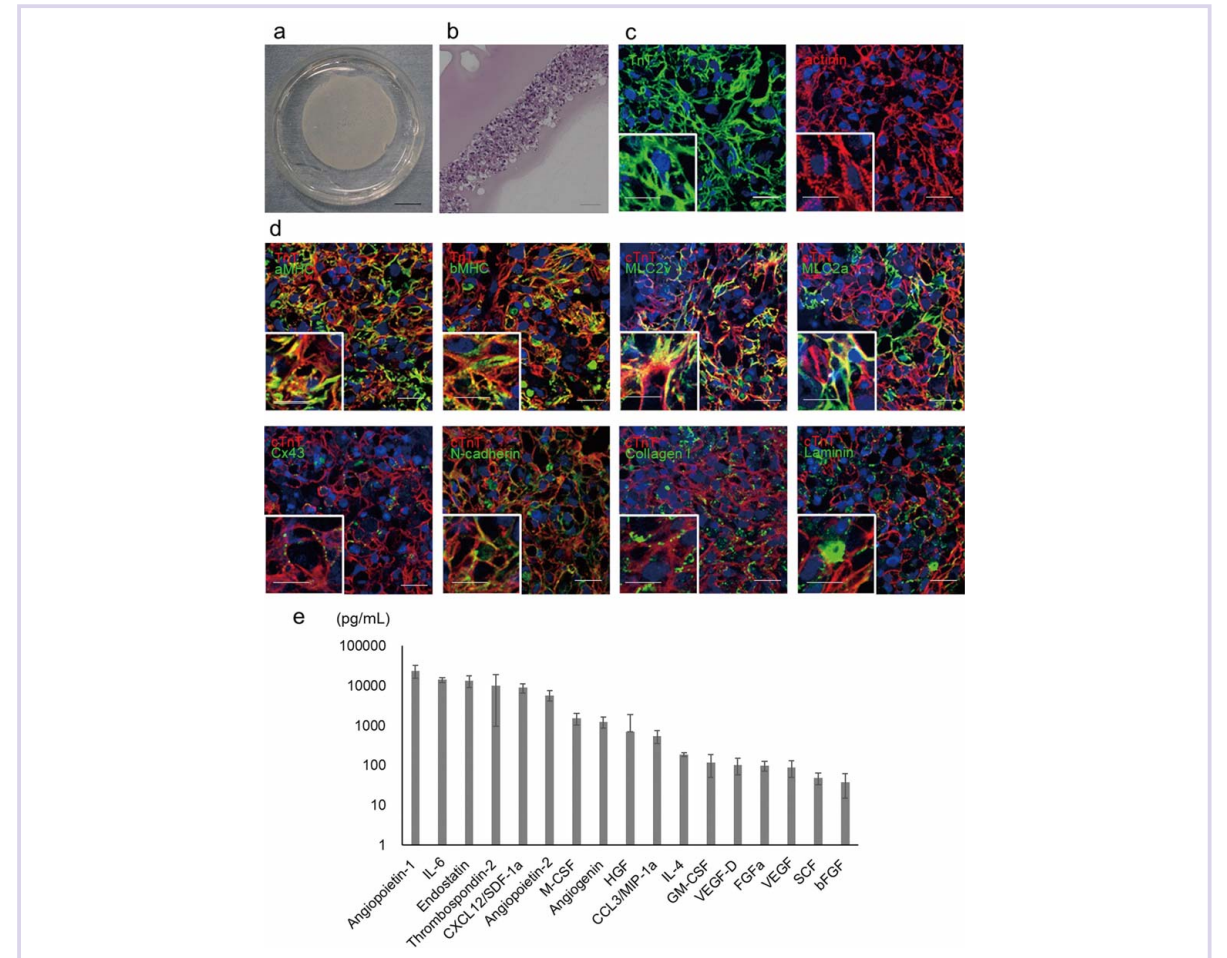


図6 iPS 心筋細胞シートの構造及び液性因子の解析¹³⁾

- a-d: a: iPS 心筋細胞シートの概観, b: HE 染色像, c: 心筋トロポニン (緑), アクチニン (赤) の蛍光染色像, d: 心筋トロポニン (赤) を共通として、左上から、aMHC, bMHC, MLC2v, MLC2a, Cx43, N-cadherin, Collagen I, Laminin の共染色像、染色像を重ね合わせて重なる黄色で示されることになる。
- e: iPS 心筋細胞シートから産生される液性因子の種類および量が示されている。血管新生 (VEGF)、血管成熟 (Angiopoietin-1, 2)、幹細胞誘因 (CXCL12/SDF-1a) といった心機能の改善に寄与すると考えられる液性因子が安定的に産生されている。

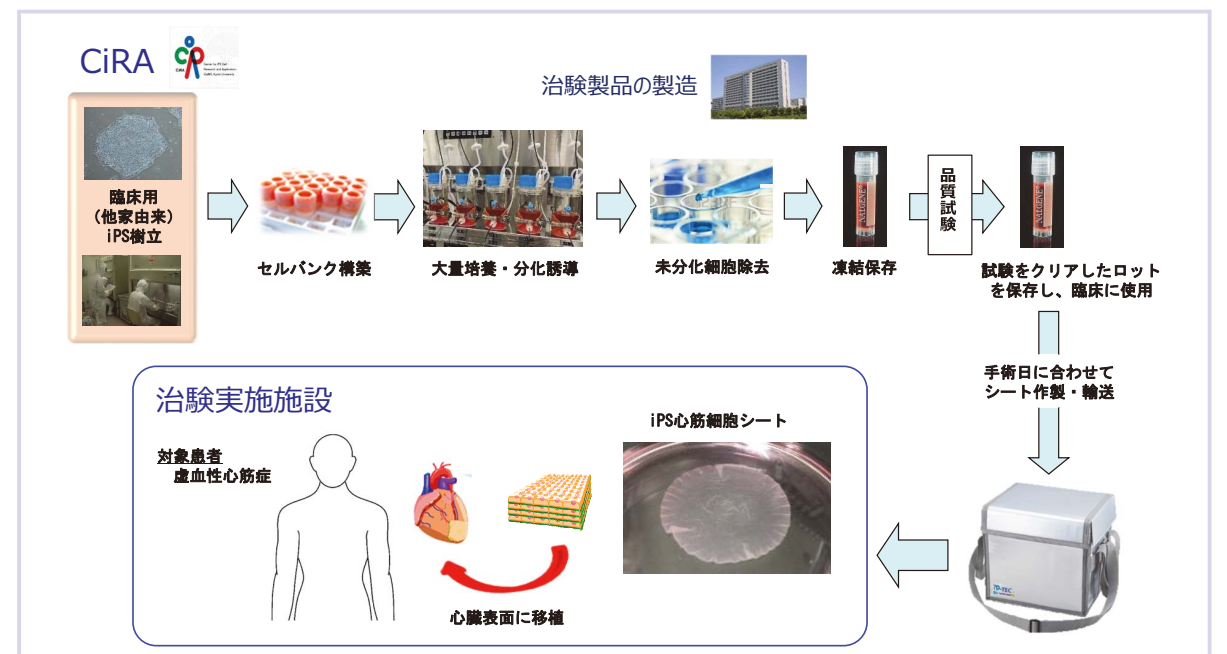


図7 医師主導治験における治験製品の製造および提供スキーム

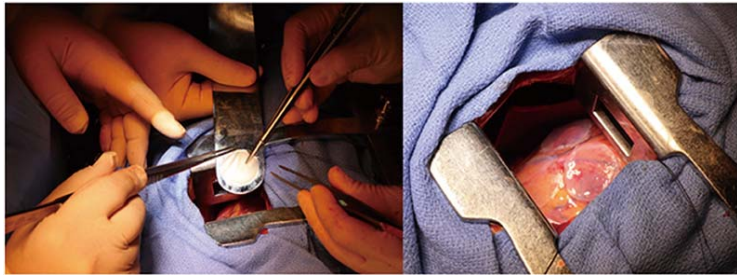


図8 虚血性心筋症に対するiPS細胞由来心筋細胞シート移植¹⁴⁾
左の写真：心臓表面に1枚目のiPS心筋細胞シートを貼付する直前
右の写真：iPS心筋細胞シートを3枚貼付した後の写真

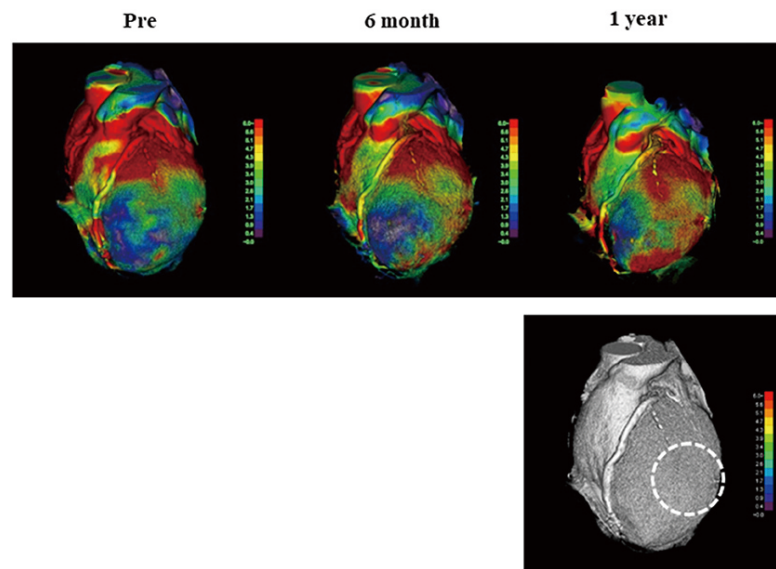


図9 iPS細胞由来心筋細胞移植後の左室収縮能の改善¹⁴⁾
4D CTの解析結果：iPS心筋細胞シートを移植する前(Pre)、移植6か月後(6 month)、移植1年後(1 year)での解析結果を示す。右下の白丸点線部位がiPS心筋細胞シートを移植した箇所を示す。時間経過に応じて寒色から暖色となった箇所が多くなり、動きの悪かった部分が、良く動くようになったことを示す。

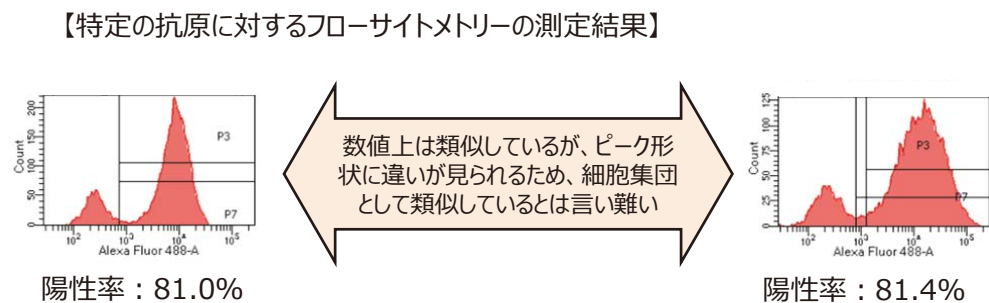


図10 特定の抗原に対するフローサイトメトリーの測定結果の一例

試験に用いられる試験方法の多くは標準品がなく、一つの測定結果のみでは解釈が難しくなる場合が多い(図10)。そのため、様々な側面から品質を評価する手法の開発も製品開発と併行する必要がある、特に非破壊で細胞の特性を評価できる試験系の開発が望ましいと考えられる。

7 おわりに

大阪大学では、現在の治療法では救命できない患者に対して、臨床現場で使用される想定を常にとって新規治療法の開発を行なってきた。特に再生医療に関しては、実際に手術により細胞移植を行うことができる外科学講座(学)として、新規治療法の制度設計を行う政府や地方公共団体等(官)、最終的に臨床現場に製品を届ける企業(産)と連携し一貫した開発を行うことで、一定の成果を挙げることができたと考えている。

今後、新規治療法が真に普及する医療として受け入れられるためには、さらなる開発を続けるとともに、得られた知見を基礎研究の手法で検討する、いわゆるリバース・トランスレーショナル・リサーチにも注力し、常に科学的根拠に基づいた医療を行なっていくことが重要と考えられる。

謝辞

本稿で提示した研究開発は、文部科学省、厚生労働省、AMEDから手厚い支援を受けて、多くの共同研究者の協力のもとに進められたものであり、医師主導治験は、大阪大学医学部附属病院をはじめ、治験実施機関である国立循環器病研究センター、順天堂大学医学部附属順天堂医院、九州大学病院、東京女子医科大学病院の各施設の担当者、スタッフの多大な支援を得て達成されたものである。この場を借りて深く御礼申し上げる。

文献

- 1) 日本心臓移植研究会: 移植, **58** (3), 209 (2023) .
- 2) Philippe Menasché, Ottavio Alfieri, Stefan Janssens, William McKenna, Hermann Reichenspurner, Ludovic Trinquart, Jean-Thomas Vilquin, Jean-Pierre Marolleau, Barbara Seymour, BS, Jérôme Larghero, Stephen Lake, Gilles Chatellier, Scott Solomon, Michel Desnos, Albert A. Hagège: *Circulation*, **117** (9), 1189 (2008) .
- 3) Amit N Patel, Timothy D Henry, Arshed A Quyyumi, Gary L Schaer, R David Anderson, Catalin Toma, Cara East, Ann E Remmers, James Goodrich, Akshay S Desai, David Recker, Anthony DeMaria: *Lancet*, **387** (10036), 2412 (2016) .
- 4) Philippe Menasché, Valérie Vanneaux, Albert Hagège, Alain Bel, Bernard Cholley, Alexandre Parouchev, Isabelle Cacciapuoti, Reem Al-Daccak, Nadine Benhamouda, Hélène Blons, Onnik Agbulut, Lucie Tosca, Jean-Hugues Trouvin, Jean-Roch Fabreguettes, Valérie Bellamy, Dominique Charron, Eric Tartour, Gérard Tachdjian, Michel Desnos, Jérôme Larghero: *Journal of the American College of Cardiology*, **71** (4), 429 (2018) .
- 5) Kazutoshi Takahashi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, Shinya Yamanaka: *Cell*, **131** (5), 861 (2007) .

著者略歴

【笹井雅夫】(写真左)
2007年3月 名古屋市立大学薬学部 卒業
2009年3月 名古屋市立大学大学院薬学研究科博士前期課程 修了
2009年4月 大阪大学医学部附属病院 特任研究員(常勤)
2011年10月 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 生物系審査第二部 審査専門員
2012年10月 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 再生医療製品等審査部 審査専門員
2014年8月 厚生労働省 近畿厚生局 再生医療等推進専門官
2017年4月 大阪大学大学院医学系研究科 特任講師(常勤)現職
〈研究領域〉
レギュラトリーサイエンス、再生医療

【河村拓史】(写真中)
2005年3月 大阪大学医学部医学科 卒業
2005年4月 国家公務員共済組合連合会 大手前病院 初期臨床研修医
2007年4月 大阪警察病院 外科 シニアレジデント
2008年4月 大阪警察病院 心臓血管外科 シニアレジデント
2010年4月 大阪大学医学部附属病院 心臓血管外科 医員
2011年4月 大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科博士課程
ドイツ マックス・プランク心臓研究所 ポスドク研究員
2015年9月 ドイツ ケルクホッフクリニック心臓外科 客員医師
2016年4月 大阪大学医学部附属病院 心臓血管外科 助教 現職
〈研究領域〉
心臓血管外科

- 6) The Nobel Foundation: "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012, Shinya Yamanaka Facts" <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2012/yamanaka/facts/>>, (accessed 2024.10.9) .
- 7) Masashi Kawamura, Shigeru Miyagawa, Kenji Miki, Atsuhiko Saito, Satsuki Fukushima, Takahiro Higuchi, Takuji Kawamura, Toru Kuratani, Takashi Daimon, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, Yoshiki Sawa: *Circulation*, **126** (11 Suppl 1), S29 (2012) .
- 8) Takahiro Higuchi, Shigeru Miyagawa, James T. Pearson, Satsuki Fukushima, Atsuhiko Saito, Hirotsugu Tsuchimochi, Takashi Sonobe, Yutaka Fujii, Naoto Yagi, Alberto Astolfo, Mikiyasu Shirai, Yoshiki Sawa: *Cell transplantation*, Published online January 1 (2015) .
- 9) Masaru Ishida, Shigeru Miyagawa, Atsuhiko Saito, Satsuki Fukushima, Akima Harada, Emiko Ito, Fumiya Ohashi, Tadashi Watabe, Jun Hatazawa, Katsuhisa Matsuura, Yoshiki Sawa: *Transplantation*, **103** (2), 291 (2019) .
- 10) Ai Kawamura, Shigeru Miyagawa, Satsuki Fukushima, Takuji Kawamura, Noriyuki Kashiwama, Emiko Ito, Tadashi Watabe, Shigeo Masuda, Koichi Toda, Jun Hatazawa, Eiichi Morii, Yoshiki Sawa: *Scientific reports*, **14** (6), 19464 (2016) .
- 11) Takuji Kawamura, Shigeru Miyagawa, Satsuki Fukushima, Akira Maeda, Noriyuki Kashiwama, Ai Kawamura, Kenji Miki, Keisuke Okita, Yoshinori Yoshida, Takashi Shiina, Kazumasa Ogasawara, Shuji Miyagawa, Koichi Toda, Hiroomi Okuyama, Yoshiki Sawa: *Stem Cell Reports*, **6** (3), 312 (2016) .
- 12) Noriyuki Kashiwama, Shigeru Miyagawa, Satsuki Fukushima, Takuji Kawamura, Ai Kawamura, Shohei Yoshida, Seiko Eiraku, Akima Harada, Keiko Matsunaga, Tadashi Watabe, Koichi Toda, Jun Hatazawa, Yoshiki Sawa: *Transplantation*, **103** (8), 1582 (2019) .
- 13) Shigeru Miyagawa, Takuji Kawamura, Emiko Ito, Maki Takeda, Hiroko Iseoka, Junya Yokoyama, Akima Harada, Noriko Mochizuki-Oda, Yukiko Imanishi-Ochi, Junjun Li, Masao Sasai, Fumiyo Kitaoka, Masaki Nomura, Naoki Amano, Tomoko Takahashi, Hiromi Dohi, Eiichi Morii, Yoshiki Sawa: *Stem Cell Research & Therapy*, **15** (1), 73 (2024) .
- 14) Shigeru Miyagawa, Satoshi Kainuma, Takuji Kawamura, Kota Suzuki, Yoshito Ito, Hiroko Iseoka, Emiko Ito, Maki Takeda, Masao Sasai, Noriko Mochizuki-Oda, Tomomi Shimamoto, Yukako Nitta, Hiromi Dohi, Tadashi Watabe, Yasushi Sakata, Koichi Toda, Yoshiki Sawa: *Front Cardiovasc Med*, 9:950829, (2022) .

【宮川繁】(写真右)
1996年3月 大阪大学医学部医学科 卒業
1994年4月 大阪大学医学部附属病院 心臓血管外科 医員
1995年6月 大手前病院 外科 医員
1997年6月 大阪労災病院 心臓血管外科
1998年6月 大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科 博士課程
2002年4月 大阪大学医学部附属病院 未来医療センター 研究員
2004年4月 桜橋渡辺病院心臓血管外科
2006年3月 大阪大学医学系研究科心臓血管外科 非常勤講師
2006年11月 ドイツ・ケルクホッフクリニック心臓外科
2009年1月 大阪大学医学系研究科 心臓血管外科 助教
2009年6月 大阪大学医学部附属病院院内 講師
2012年7月 大阪大学医学部医学系研究科 心臓血管外科 講師
2014年4月 大阪大学医学系研究科 免疫再生制御学講座 特任准教授
2016年8月 大阪大学医学系研究科 先進幹細胞治療学共同研究講座 特任教授
2018年4月 大阪大学医学系研究科 最先端再生医療学共同研究講座 特任教授
2021年7月 大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科 教授
〈受賞歴〉
2001年 日本人工臓器学会オリジナル賞受賞
2002年 日本心臓病学会 young investigator award受賞
2003年 日本人工臓器学会 JSAO-Grant受賞
2004年 アメリカ人工臓器学会(ASAIO) Medforte Innovation Award受賞
2015年 第9回上原財団特定研究助成金
2016年 産官学連携功労者表彰 厚生労働大臣賞
2019年 第18回日本再生医療学会 功績賞
2022年 日本人工臓器学会論文賞(広領域)
〈研究領域〉
心臓血管外科

細胞医薬品の微生物学的安全性評価

大分ラボラトリー 藤井 清治 / 大阪ラボラトリー 西岡 由紀

細胞医薬品は生きた細胞等を用いるため、製造において最終滅菌法やろ過滅菌法にて製品を無菌化することができない。したがって、製造工程において製品に対する微生物汚染のリスクを低減させることが必要であり、製品の安全性を評価するために各種の微生物学的安全性試験が重要となる。当社は他社に先駆けて製薬会社や医療機関等からの委託を受け、細胞医薬品の微生物学的安全性試験を数多く実施してきた¹⁾。特に製造から投与までの期間が短いものは、早期に結果が求められることが多いため、当社は微生物迅速試験法の開発を行い、安全性評価に活用してきた。本稿では、当社で実施している無菌試験、微生物迅速試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、ウイルス否定試験について紹介する。

1 はじめに

細胞医薬品は、生きた細胞等を患者に移植することによる疾患治療法として利用される医薬品であり、従来の疾患治療法と比較して優れた治療効果を発揮することが期待されている。一方で、細胞医薬品は主に生きた細胞等を用いるため、製造工程において最終滅菌法や、ろ過滅菌法による無菌化工程を適用することができないという課題がある。細胞医薬品の無菌性を保証するためには第一に、製造における環境、原料および工程資材、操作方法等に関するリスク管理として工程管理を行い、製品に対する微生物汚染のリスクを低減させることが必要である。そのうえで、製品の安全性を評価するため、各種の微生物学的安全性試験が求められる。

微生物学的安全性試験は、原則として最終製品を試験検体に用いることが求められている。一方、最終製品はその試験結果を得た後に患者に投与できることが望ましい。しかしながら、試験期間に制約があることから日本薬局方に従った試験を適用できないケースがある。その場合、「再生医療等製品（ヒト細胞加工製品）の品質、非臨床試験及び臨床試験の実施に関する技術的ガイダンスについて²⁾」には、日本薬局方に厳格に従った試験方法を採用するのではなく、科学的に合理的な試験方法の採用が可能であると記載されており、品質管理試験の信頼性担保を前提として微生物迅速試験法を採用できる。

最近では、再生医療等安全性確保法の下で実施されている細胞外小胞等を用いた治療について、日本再生医療学会から「細胞外小胞等の臨床応用に関するガイダンス」が発表されている。その中では、細胞を含め原料等からのウイルス・細菌・真菌のような感染因子の混入の管理が重要と指摘されている³⁾。

以下に、当社で実施している微生物学的安全性評価試験の目的と概要を紹介する。

2 無菌試験

無菌試験とは、日本薬局方に規定された試験条件、例えば培地の種類、試験検体量、培養温度、培養期間に従って培養を行い、目視観察の結果、菌の増殖が認められない場合に、陰性と判定する試験法である。

しかしながら、日本薬局方 無菌試験法は、最終製品の製造量の10%あるいは最大20～40本といった限られた数量を使用する抜き取り試験であることから、製品の無菌性が完全に担保されるわけではない。より高い無菌性を保証するためには、無菌操作による一貫した製造工程を経て製造されることが重要であり、製造工程のバリフィケーションに加え、工程管理などでも無菌性の確認が求められている。

無菌試験法は、日米欧の薬局方で調和済みの試験法であり、2種の培地を使用することにより、好気性細菌、真菌、嫌気性細菌を網羅的に検出する手法である。微生物の増殖による培地の濁り等を目視により検出する方法であるため、14日間以上の培養期間が必須であり、細胞医薬品の出荷までに試験結果が得られないケースがある。万一、無菌試験で陽性と判定された場合、即座に報告し、製薬会社や医療機関等にて適切な対応がとられることになる。こうした事情を踏まえ、当該無菌試験法に加え、微生物迅速試験法の導入が規制当局から推奨されている。詳細は次項にて紹介する。

無菌試験を実施するにあたって重要な点は試験環境の管理である。無菌試験法の第1項「微生物汚染に対する予防措置」において、作業区域の適切な環境モニタリングと適切な汚染防止措置の実施が要求されている。

当社では清浄度グレードAで管理された無菌試験用アイソレータシステム（図1）の中で、閉鎖系のろ過器ユニット用いて検体溶液をろ過処理する「メンブランフィルター法」および検体溶液を培地に直接添加する「直接法」を実施しており、試験環境



図1 無菌試験用アイソレータシステム（追加導入した2号機）

および試験作業者に由来する微生物のコンタミネーションのリスク低減を図っている。2020年9月には無菌試験用アイソレータシステム2号機（図1）を追加導入することにより、定期点検やメンテナンスに伴って生じていた試験停止期間が解消され、お客様の要望される時期に試験を実施することが可能となった。また、試験作業者には無菌試験の操作技術の習得に加えて、微生物学的な知識教育も行っており、微生物に対する十分な知識を有する有資格者が試験に従事している。

3 微生物迅速試験法

製造から患者への投与までの期間が短い細胞医薬品の場合、迅速に微生物の混入の有無を確認しなければならない。複数の測定原理による微生物迅速試験法があるなか、当社では培養手法と高感度CCDを組み合わせた「マイクロバイオμ3D™」（図2）を用いたマイクロコロニー法と、培養手法と炭酸ガス検知を組み合わせた「バクテアラート™」を用いたガス測定法の試験を導入し受託してきた。

前者のマイクロコロニー法は、試験着手から3日以内に結果が判明する（図3）。この手法では、メンブランフィルター法を適用することにより、中間工程品（培養上清）など比較的多くの試験検体量（数mL～数百mL）を確保できる場合に、用いる検体量を増やすことで、検出感度を向上させることができる。後者のガス測定法は、細胞医薬品の微生物迅速試験法として広く使用されている手法で、試験着手から7日以内に結果が判明する。

いずれの方法も試験過程に培養工程があることから、万一、菌の検出が認められた場合にも、菌を単離して菌種の同定を行うことにより（当社では外部試験機関を利用）、菌の混入経路の



図2 無菌試験迅速測定装置（マイクロバイオμ3D™）

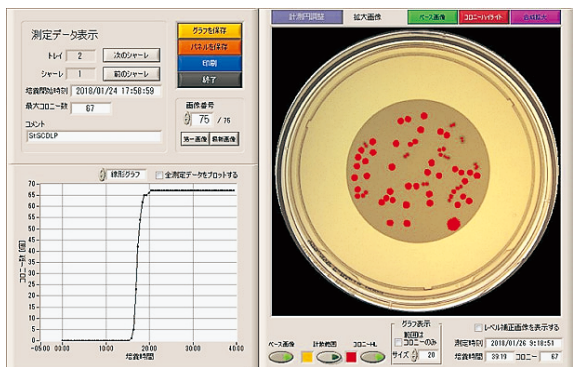


図3 測定モニター画面

調査や投与後の患者への対応方法などの情報を提供することができる。

以上のとおり、微生物迅速試験法は細胞医薬品の無菌性評価において、その迅速性と応用範囲の広さから今後大いに活用されるものとする。当社では報告までに必要な期間、各手法の原理や特徴に応じて、より適切な試験法でGMPおよび信頼性基準の規制に対応した試験が可能である。現在、さらなる試験期間短縮に向けて、新たな手法を準備中である。

4 エンドトキシン試験

細胞医薬品の品質管理項目の一つとして、エンドトキシン試験が求められる。エンドトキシンはグラム陰性桿菌に由来する発熱性物質であり、誤って一定量以上のエンドトキシンが混在する医薬品が投与され患者の血中に入った場合、強い発熱を引き起こす。いったん、製品に混入したエンドトキシンは完全な除去や不活化が困難であることから、最終製品の試験だけでなく、原料や製造用水を対象とした工程管理でのエンドトキシン試験が必要である。

エンドトキシン試験法は、無菌試験法と同様に日米欧の薬局方で調和済みの試験法である。測定手法にはゲル化法並びに



図4 エンドトキシン測定装置

光学法（比濁法および比色法）（図4）の3法があり、当社では、いずれの手法を用いることも可能である。

エンドトキシンの検出は、ライセート試薬の酵素反応を利用することから、試験検体に含まれる成分によっては試薬の反応経路に影響を及ぼし、結果として偽陰性や偽陽性などの反応

干渉作用を引き起こす場合がある。また、細胞医薬品では培養液や細胞保存液等に含まれる種々の成分により反応干渉作用を示すことがある。従って、当社では、試験法設定に際し、試験検体のロット間差も考慮して条件設定を行っている。

5 マイコプラズマ否定試験

細胞医薬品の品質管理項目として、マイコプラズマ否定試験が求められる。マイコプラズマは一部の菌種に病原性が確認されており、患者への健康被害防止の観点から、製品への混入を防止する必要がある。加えて、培養細胞のマイコプラズマ感染により細胞の増殖や特性に影響を与える可能性があることから、細胞医薬品の製造においてはマイコプラズマ汚染の防止が必須である。マイコプラズマ汚染は細胞培養液の濁りとして検出されない特徴があり、一般細菌と比べて汚染の発見が遅れる恐れがあることから、最終製品だけでなく、原材料や中間製品での管理を十分に行う必要がある。

マイコプラズマ否定試験法は、A. 培養法、B. 指標細胞を用いた DNA 染色法、および C. 核酸増幅法（NAT）の3つの手法が日本薬局方に記載されている（A. ～ C. は日本薬局方の試験項目名称に含まれる表記である）。特に、C. NAT は測定の迅速性と高い検出感度に特徴があり、A. 培養法および B. 指標細胞を用いた DNA 染色法の代替法でもあることから、マイコプラズマ否定試験の第一選択として採用される。しかしながら、薬局方で厳格なメソッドバリデーションが要求されており、試験法設定においては、試料マトリクス下での試験菌 7 菌種の添加回収試験などが必要である。

一方、A. 培養法は液体培地および寒天培地を用い、マイコプラズマのコロニーを検出する方法であり、増殖可能なマイコプラズマを特異的に検出できる利点があるが、培養に要する日数が28日以上と長期間であるため、迅速性に欠ける。また、B. 指標細胞を用いた DNA 染色法も培養手法を用い、VERO 細胞に試験検体を接種して最長6日間培養して蛍光染色を行い、

VERO 細胞の核を取り巻くマイコプラズマ由来の微小な核外蛍光斑点の有無を確認する試験法であり、やや迅速性に欠ける。

なお、マイコプラズマ否定試験法は日米欧3局で調和されていないことから、各薬局方に応じて試験法を設定する必要があるが、当社では上述の A. 培養法および C. NAT について、日米欧それぞれの薬局方に従って実施可能である。

6 ウイルス否定試験（核酸増幅法（NAT））

細胞医薬品の原材料であるヒト細胞や、ヒト・動物由来の製造関連物質はウイルスに汚染されている可能性がある。また、製造工程中にウイルスが混入するリスクもある。一方、原材料となる細胞や製品は生きた細胞を含むことから、バイオ医薬品のように製造工程中でウイルスの不活化／除去を厳密に行うことは困難である。したがって、微生物学的評価として、原材料、中間製品および最終製品でウイルス否定試験を実施し、ウイルスに汚染されていないことを確認することが必要となる。再生医療等製品では、厚生労働省の「品質及び安全性の確保に関する指針」^{4) ～ 9)} において、自己由来細胞については、B 型肝炎ウイルス（HBV）、C 型肝炎ウイルス（HCV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）および成人 T 細胞白血病ウイルス（HTLV）に留意することとなっている。さらに、同種由来細胞については、上記4種類のウイルスおよびパルボウイルス B19 に加えて、必要に応じてサイトメガロウイルス（CMV）、EB ウイルス（EBV）およびウエストナイルウイルス（WNV）の混入が否定されることが求められている。また、改訂版の検討が進められている ICH ガイドライン Q5A（R2）には、推奨されるウイルス検出および同定法として、Molecular Methods が追加され、ウイルス否定試験として NAT が用いられるケースが増えてくると考えられる¹⁰⁾。

当社ではウイルス否定試験として、リアルタイム PCR（図5）を用いた NAT を実施している。測定には Virus Test KitTM（タカラバイオ株式会社）または VirFinderTM（島津ダイアグノスティクス株式会社）を用い、試験法設定の際は、試験検体ごとに核酸抽出液に Kit 付属のポジティブコントロール（各ウイルスの核酸配列）を添加してバリデーション（特異性および検出限界）を実施し試験法の妥当性を検証している（図6）。



図5 リアルタイムPCR (Thermo Fisher Scientific QuantStudio 7 Flex)

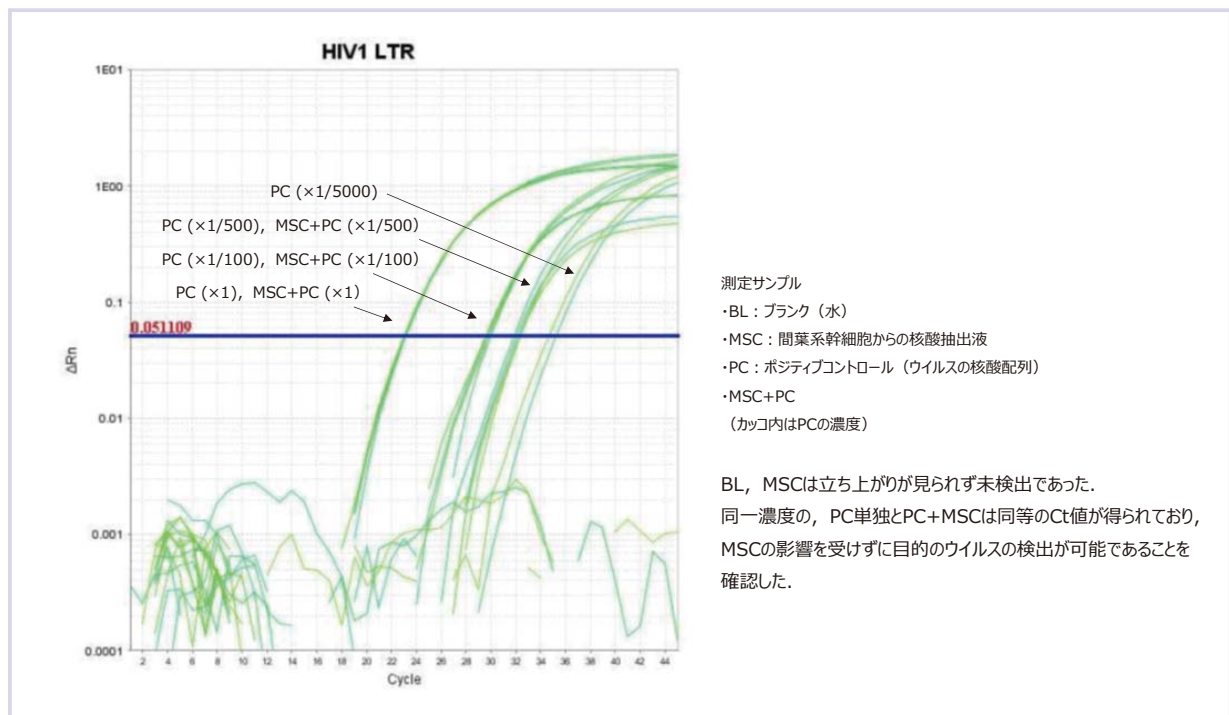


図6 測定チャート

7 おわりに

当社は細胞・組織加工製品をはじめとする細胞医薬品について、他社に先駆けて2014年から品質評価サービスを提供してきた。細胞医薬品の微生物学的試験の特徴として、試験法設定や品質試験の際、陽性対照に生菌を用いる必要がある。製造施設内での試験実施は、生菌を持ち込むため、製品への生菌混入リスクが懸念される。このような背景から、外部試験機関への委託を希望されるケースも多く、（当社は）これまでに40社以上のお客様より950件以上の試験をご依頼いただいている。

また、細胞医薬品は安定性などの理由による品質管理の時間的制限がある。当社はこれに対応するため、微生物迅速試験法などの技術開発についても積極的に進めてきた。現在もこうしたご要望にお応えするため、より試験期間の短い新たな手法の微生物迅速試験の提供に向け準備を進めている。

再生医療を待ち望む患者のため、今後さらに技術を磨き続け、品質の高い評価サービスを提供することにより、再生医療の発展に貢献していきたい。

文 献

- 1) 藤井清治：SCAS NEWS 2018-II、**48**、3（2018）。
- 2) 厚生労働省：平成28年6月14日 薬機発第0614043号，“再生医療等製品（ヒト細胞加工製品）の品質、非臨床試験及び臨床試験の実施に関する技術的ガイダンスについて”（2016）。
- 3) 一般社団法人日本再生医療学会：“細胞外小胞等の臨床応用に関するガイダンス（第1版）（令和6年4月30日）”（2024）。
- 4) 厚生労働省：平成20年2月8日 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”（2008）。
- 5) 厚生労働省：平成20年9月12日 薬食発第0912006号，“ヒト（同種）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”（2008）。
- 6) 厚生労働省：平成24年9月7日 薬食発0907第2号，“ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について”（2012）。
- 7) 厚生労働省：平成24年9月7日 薬食発0907第3号，“ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について”（2012）。
- 8) 厚生労働省：平成24年9月7日 薬食発0907第4号，“ヒト（自己）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について”（2012）。
- 9) 厚生労働省：平成24年9月7日 薬食発0907第5号，“ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について”（2012）。
- 10) 医薬品規制調和国際会議：“ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品等のウイルス安全性評価 ICH Q5A（R2）（ドラフト版 承認日2022年9月29日）”（2024）。

藤井 清治
（ふじい せいじ）
大分ラボラトリー西岡 由紀
（にしおか ゆき）
大阪ラボラトリー

中国の DMF 登録制度の最新情報

健康・安全事業部 中谷 圭吾 / 医薬事業部 中津 道子

1 はじめに

中国の医薬品等のドラッグマスターファイル（DMF）制度は、2015 年以降、欧米の制度を参考に急速に整備され、毎年新しい通知が多数発出されています。電子化の基盤整備も進んでおり、最新の仕様に合っていないと登録時に思わぬ時間を要することになるため、注意が必要です。

当社は、現地委託先と連携し、最新の中国の薬事規制に基づいた DMF の作成、登録を遂行する体制を整えております。本稿では刻々と変化する中国の薬事規制の最新情報と、当社のこれまでの実績から資料作成のポイント等を紹介します。

2 背景

DMF とは、原材料（原薬（有効成分）、添加剤、包装材料など）メーカーの機密情報を守るための制度です。製剤を構成する各原材料の供給メーカーはあらかじめ医薬メーカーに情報開示する必要はありません。一方、医薬品メーカーは当局に登録された情報を用いて円滑に申請を行うことができます。米国、欧州、日本で先行して確立されたこの DMF 制度は中国にも取り入れられましたが、中国特有の規制要件もあり、原材料メーカーの DMF 登録が進まないことが、中国での医薬品の承認申請を行ううえで課題になっています。

3 さらなる改革が進む中国 DMF 制度

中国国務院は、医薬品医療機器の審査承認制度改革の一環として、それまで個別に実施していた添加剤や包装材料の審査を医薬品の審査と同時に実施する政令を 2015 年（第 44 号）¹⁾ に発表し、これを深化させるための措置を 2017 年（第 42 号）²⁾ に発表しました。中国 DMF の登録対象範囲および審査手順については 2016 年に発行された 134 号公告³⁾ で示され、2017 年 12 月 1 日より新制度での DMF の受付が開始されました⁴⁾。また、これらを実行するため、2017 年 146 号公告⁵⁾ で DMF の登録申請書、2019 年第 56 号公告⁶⁾ で包装材料および添加剤の登録資料要件が示されました。原薬については 2016 年第 80 号⁷⁾ に登録資料要件が示されています。また、改訂された医薬品管理法⁸⁾ が 2019 年 12 月 1 日に、医薬品登録管理規則⁹⁾ が 2020 年 7 月 1 日に施行され、原薬、添加剤、包装材料も明確にこれらの法律下に置かれました。図 1 に中国 DMF 制度の変遷をまとめました。2023 年 1 月 1 日からは電子申請による受付が開始^{10) 11)}、2024 年 3 月 1 日から義務化¹²⁾、電子申請要件の見直し¹²⁾ や電子申請ソフトのアップデート¹³⁾ を経て、7 月 1 日からはネットワーク経由でも提出できるようになり¹⁴⁾、先行する日米欧と同水準の DMF 制度に近づいています。

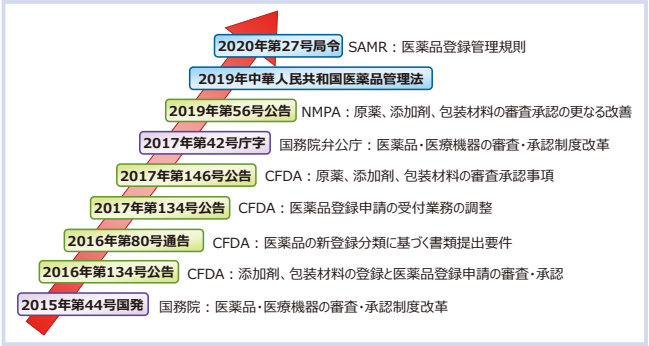


図1 中国DMF制度の変遷

4 中国独自の DMF の分類、構成

中国 DMF に登録する原薬、添加剤、包装材料は、その種類により分類されており、どれに分類されるかにより、要求される資料が変わってきます。原薬では新薬／ジェネリック、国内外での上市状況（表 1）¹⁵⁾、添加剤では上市医薬品に既に使用されている場合は国内外の薬局方への収載状況（表 2）⁶⁾、包装材料では国内外の上市医薬品への使用実績やリスク（表 3）⁶⁾ により分類されます。

表 1 化学医薬品の登録分類

分類	内容
第 1 類	革新的新薬
第 2 類	改良型新薬
第 3 類	海外上市済みで国内未上市の先発医薬品のジェネリック医薬品
第 4 類	国内上市済み先発医薬品のジェネリック医薬品
第 5 類	海外上市済み医薬品の国内上市を申請する場合
5.1	海外上市済み先発医薬品及び改良医薬品の国内上市
5.2	海外上市済みジェネリック医薬品の国内上市

出典：国家药监局关于发布化学药品注册分类及申报资料要求的通告(2020 年第 44 号)を日本語翻訳

表 2 医薬品添加剤の登録分類

分類	内容
国内外の上市医薬品で、既に使用されており、かつ	
2.1	中国薬局方 /USP/EP/BP/JP のいずれにも収載されていない添加剤
2.2	USP/EP/BP/JP のいずれかに収載されているが、中国国内の上市医薬品には使用されていない添加剤
2.3	USP/EP/BP/JP のいずれかに収載されているが、中国薬局方には収載されていない添加剤
2.4	中国薬局方に既に収載されている添加剤

出典：国家药监局关于进一步完善药品关联审评审批和监管工作有关事宜的公告(2019 年第 56 号)の「附件 2 药包材登记资料要求（试行）」の一部を日本語翻訳

表 3 医薬品包装材料の登録分類

分類	内容
1	国内外の上市医薬品に使用したことがない医薬品包装材料（例えば、新素材、新構造）
2	国内外の上市医薬品に既に使用されているが、投与経路を変更し、リスクが高まった医薬品包装材料
3	国内外で上市医薬品として使用されていないが、食品包装に使用されたことがあり、食品と直接接触することが証明できる医薬品包装材料（経口剤に限る）
4	同じ投与経路で既に上市医薬品に使用されている医薬品包装材料
4.1	中国での登録証明書のない医薬品包装材料
4.2	中国での登録証明書のある医薬品包装材料

出典：国家药监局关于进一步完善药品关联审评审批和监管工作有关事宜的公告(2019 年第 56 号)の「附件 2 药包材登记资料要求（试行）」の一部を日本語翻訳

医薬品添加剤および包装材料の DMF の構成は、2019 年第 56 号公告⁶⁾の付録に DMF のテンプレートが掲載されています。さらに、当局が提供するソフトを使って項目ごとに電子申請で求められている構成に合わせてファイルを分割する必要があります（表 4）¹³⁾。

表 4 中国 DMF の構成

添加剤	包装材料
申請書情報	申請書情報
目次	目次
1 登録者の基本情報	1 登録者の基本情報
2 添加剤の基本情報	2 医薬品包装材料の基本情報
3 製造情報	3 製造情報
4 特性評価	4 品質管理
5 品質管理	5 ロット検査報告書
6 ロット検査報告書	6 安定性研究
7 安定性研究	7 適合性 / 安全性の研究
8 薬理 / 毒性的学研究	

原薬の DMF の構成は、2016 年第 80 号⁷⁾に記載されていますが、医薬品規制調和国际会議（ICH）M4 のコモンテクニカルドキュメント（CTD）*¹ 第 3 部（3.2.S）とほぼ同じです¹⁶⁾。

5 中国 DMF の資料作成のポイントと最新の規制動向

中国 DMF に必要な情報を表 5 にまとめました。

表 5 DMF に記載する情報

申請書（2019 年第 146 号）	証明書類等、宣誓書等
原薬：CTD 第 3 部（2016 年第 80 号） 添加剤、包装材料（2019 年第 56 号） リスク（カテゴリ）に応じて求められる情報が異なる。 基本情報 製造情報 品質管理（規格、分析法バリデーション、規格の設定根拠） ロット分析結果 安定性試験 特性（構造 / 物理的・化学的性質、不純物、機能特性）* 薬理 / 毒性的試験*、適合性 / 安全性試験**	登録者の履歴事項全部証明書、 製造業許可証 原材料の購入履歴 起源に関する証明書、BSE の感染 リスクがない国の原材料を使用し ていることの公的証明（動物由来原料 を使用する場合） 受委託契約書、委託先への内部監査 報告書（該当する場合） GMP 証明（該当する場合）

*：添加剤特有の項目、**：包装材料特有の項目

原薬については、中国 DMF も日米欧の DMF も CTD 形式で申請できますので、概ね海外の申請資料をそのまま利用できますが、中国では全て中国語に翻訳する必要がある点が大きく異なります。また、各種分析チャートや試験成績書などの PDF の提出が要求されます。添加剤や包装材料については、テンプレート⁶⁾に合わせて表形式にまとめるなど、データを整理し直す必要があります。また、中国薬局方や包装材料に係る国家医薬品包装材料規格（YBB）に収載されている品目については、ギャップ分析を実施し、必要に応じて規格を変更するなど、試験を実施して中国規格にも適合することを確認することが望ましいです。

その他、証明書類等については、公文書の場合は外務省、私文書の場合は公証役場での公証（アポスティューロ）を日本国内で取得する必要があります。なお、中国は 2023 年 11 月にハーグ条約に加盟したことから、中国大使館での認証は不要になっています。

DMF の登録申請資料は CD-ROM に格納して中国の医薬品評価センター（CDE）に郵送またはネットワーク経由で提出しますが、受領後、CDE のバリデーターでの検証に合格する必要があります。不合格になると申請資料は返却され、改めて修正した資料を提出する必要があります。受理までに想定外に時間を要することがあるため、注意が必要です。問題がなければ、5 営業日以内に受理され、CDE のホームページ*²に掲載されます。

DMF の審査は製剤の審査と合わせて実施され（ジェネリック原薬を除く）⁹⁾、審査マニュアル（案）等^{17)～19)}も公開されています。製剤の承認後、原薬の DMF に製剤の品質に影響を与える変更が生じた場合は、2021 年第 15 号通告²⁰⁾に従って変更登録申請を行います。その他の原薬の軽微な変更、医薬品添加剤および包装材料の DMF の変更については、適時に更新し、毎年 1～3 月の間に年次報告書にまとめる必要があります⁶⁾。年次報告書には、前年の変更点の概要（変更がない場合はその旨）と関連する医薬品の情報を記載します。

6 おわりに

中国は世界第 2 位の 14 億超の人口を有していますが、日本をはじめ欧米先進国と同様、人口増加が鈍化し、今後急速に高齢化が加速する見込みです。医療施設の普及が地方にいき渡っていない状況もあり、中国当局は医薬品の審査・承認プロセスの改善に意欲的に取り組んでおり、今後ますます医薬品や原材料メーカーへの影響が大きくなると思われます。当社は国内や米国、欧州の製造販売承認のための薬事申請資料の作成を 10 年以上にわたって支援してまいりました。最近ではその市場の大きさから中国への

*1 医薬品規制調和国际会議（ICH）の M4 にコモンテクニカルドキュメントの作成要領が規定されている<https://www.pmda.go.jp/files/000156304.pdf>（accessed 2024-11-13）.
*2 CDE のホームページ
<https://www.cde.org.cn/main/xxgk/listpage/ba7aed094c29ae31467c0a35463a716e>（accessed 2024-11-13）.

申請を検討されているお客様も増えております。中国の最新の規制動向を把握し、それに合致した申請資料を準備することはとても大切です。当社は、お客様の状況やご要望をきめ細かくヒアリングし、中国向け DMF 資料の作成、中国認定施設での試験の実施、中国語翻訳、DMF 登録代行、規制当局からの照会事項対応から DMF 登録後の維持管理までワンストップで対応いたします。

参考資料

- 1) 国務院：「国务院关于改革药品医疗器械审评审批制度的意见（国发〔2015〕第 44 号）」（医薬品・医療機器の審査承認制度改革に関する意見）（2015）.
- 2) 国務院并公庁：「关于深化审评审批制度改革鼓励药品医疗器械创新的意见（行字〔2017〕第 42 号）」（医薬品・医療機器のイノベーションを促進するための審査承認制度改革の深化に関する意見）（2017）.
- 3) 国家食品药品监督管理局（CFDA）：「总局关于药包材药用辅料与药品关联审评审批有关事项的公告（2016 年第 134 号）」（包装材料および添加剤と医薬品の審査承認事項に関する公告）（2016）.
- 4) 国家食品药品监督管理局（CFDA）：「总局关于调整药品注册受理工作的公告（2017 年第 134 号）」（医薬品登録申請の受付業務の調整に関する公告）（2017）.
- 5) 国家食品药品监督管理局（CFDA）：「总局关于调整原料药、药用辅料和药包材审评审批事项的公告（2017 年第 146 号）」（原薬、医薬品添加剤および包装材料の審査承認事項に関する公告）（2017）.
- 6) 国家医薬品監督管理局（NMPA）：「国家药监局关于进一步完善药品关联审评审批和监管工作有关事宜的公告（2019 年第 56 号）」（原薬、医薬品添加剤および包装材料の審査承認の更なる改善に関する公告）（2019）.
- 7) 国家食品药品监督管理局（CFDA）：「总局关于发布化学药品新注册分类申报资料要求（试行）的通告（2016 年第 80 号）」（化学医薬品の新登録分類に基づく申請資料要件（案）の発行）（2016）.
- 8) 国家医薬品監督管理局（NMPA）：「中华人民共和国药品管理法」（中華人民共和国医薬品管理法）（2019）.
- 9) 国家市場監督管理総局（SAMR）：「药品注册管理办法（2020 年第 27 号）」（医薬品登録管理規則）（2020）.
- 10) 国家医薬品監督管理局（NMPA）：「国家药监局关于实施药品注册申请电子申报的公告（2022 年第 110 号）」（医薬品登録の電子申請の実施に関する公告）（2022）.
- 11) 医薬品評価センター（CDE）：「关于药品注册申请电子申报有关要求的通知（2022.12.2）」（医薬品登録の電子申請要件に関する通知）（2022）.
- 12) 医薬品評価センター（CDE）：「国家药监局药审中心关于更新〈申报资料电子光盘技术要求〉等文件的通告（2023.12.11）」（「CD-ROM で提出する申請資料の技術的要件」等を改訂）（2023）.
- 13) 医薬品評価センター（CDE）：「关于更新电子申报资料制作软件的通知（2024.2.28）」（電子申請資料作成ソフトのアップデートに関する通知）（2024）.
- 14) 医薬品評価センター（CDE）：「关于试行以网络传输方式提交药品注册电子申报资料的通告（2024.7.1）」（医薬品登録申請資料のネットワーク経由での電子申請の試行実施について）（2024）.
- 15) 国家医薬品監督管理局（NMPA）：「化学药品注册分类及申报资料要求（2020 年第 44 号）」（化学医薬品登録分類および申請資料要件）（2020）.
- 16) 国家医薬品監督管理局（NMPA）：「关于发布〈M4：人用药物注册申请通用技术文档（CTD）〉模块一文件及 CTD 中文版的通告（2019 年第 17 号）」（ヒト用医薬品の登録に関するコモンテクニカルドキュメント（CTD）に関する ICH M4 ガイドラインのモジュール 1 文書および ICH M4 ガイドラインの中国語版の発行について）（2019）.
- 17) 医薬品評価センター（CDE）：「《化学药品注册受理审查指南（试行）》的通告（2020 年第 10 号）」（化学医薬品登録受理および審査マニュアル（案））（2020）.
- 18) 医薬品評価センター（CDE）：「关于公开征求《化学原料药受理审查指南（征求意见稿）》意见的通知（2020.4.30）」（化学原薬登録の受理・審査に関するガイドライン（案）に関するパブリックコメントの募集）（2020）.
- 19) 医薬品評価センター（CDE）：「关于公开征求《化学原料药、药用辅料及药包材与药品制剂关联审评审批管理规定（征求意见稿）》意见的通知（2020.4.30）」（原薬、医薬品添加物および包装材料の医薬品関連審査および承認の管理規定（案）に関するパブリックコメントの募集）（2020）.
- 20) 国家医薬品監督管理局（NMPA）：「国家药监局关于发布已上市化学药品变更事项及申报资料要求的通告（2021 年第 15 号）」（上市された化学医薬品の変更登録のための分類および申請資料要件）（2021）.



中谷 圭吾
(なかたに けいご)
健康・安全事業部



中津 道子
(なかつ みちこ)
医薬事業部

syFISH（systematic FISH）解析 ～バイオ医薬品の生産に用いられる細胞基材の単クローン性の評価～

クロモセンター 山内 清司

1 はじめに

バイオ医薬品の製造には動物細胞や微生物に目的遺伝子を導入して樹立された細胞（細胞基材）が用いられます。近年、バイオ医薬品の品質を評価するにあたり、特性変化のリスク低減の観点から細胞基材の単クローン性の確保（単一細胞由来であること）が国内外で求められています。本稿では、細胞基材の単クローン性の評価の事例を中心に、染色体の不均一性を生じる細胞において導入遺伝子の染色体上の位置を特定可能な syFISH 解析技術の独自性および解析力を紹介します。

2 細胞基材の単クローン化の意義と FISH 解析 単独では評価困難な理由

バイオ医薬品生産のための細胞基材として、チャイニーズハムスターの卵母（CHO）細胞のような不死化細胞が用いられています。不死化細胞は、培養を続けることで遺伝子型や表現型などの不均一性が増加するため、バイオ医薬品を安定に生産するためには、細胞基材の不均一性を最小限に抑えることが重要です。細胞基材の樹立では、細胞の特性を均一にするために遺伝子導入後の細胞群に対してシングルセルクローニングを行い、細胞基材の単クローン性を確認します。近年、単クローン性を確認するためのイメージング機器も存在していますが、培養プレートのウェルの端での解像度の低下などにより、単クローン性を十分

に確認できないケースがあります。このような場合、樹立後の細胞基材に対して、規制当局から単クローン性に関する裏付けデータが求められます。

導入遺伝子が細胞のゲノムにランダムに挿入（ランダムインテグレーション）された場合、細胞基材の単クローン性は導入遺伝子の染色体上の位置を指標として評価することが可能です。導入遺伝子の染色体上の位置を可視化する方法として、FISH（蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション）解析があります。クローン化した細胞基材では導入遺伝子の位置は全ての細胞で同じとなり、FISH シグナルのパターンも解析した全ての細胞で同じになることが期待されます。しかし、ここで問題となるのが不均一性の増加です。CHO 細胞では培養期間の増加に伴い、欠失、重複、転座など、染色体レベルにおいても不均一性が増加します¹⁾。これは、たとえクローン化した細胞基材であっても、個々の細胞における染色体の構成は異なっている可能性があることを意味します。FISH 解析単独では染色体の構成を確認することができないため、異なる FISH シグナルのパターンを持つ細胞が認められた場合、以下の 2 つの可能性を区別することができず、単クローン性を評価することが困難です。

①単クローン性が確保されていない。

②単クローン性は確保されているが、染色体の不均一性の増加によって異なる FISH シグナルのパターンが得られた。

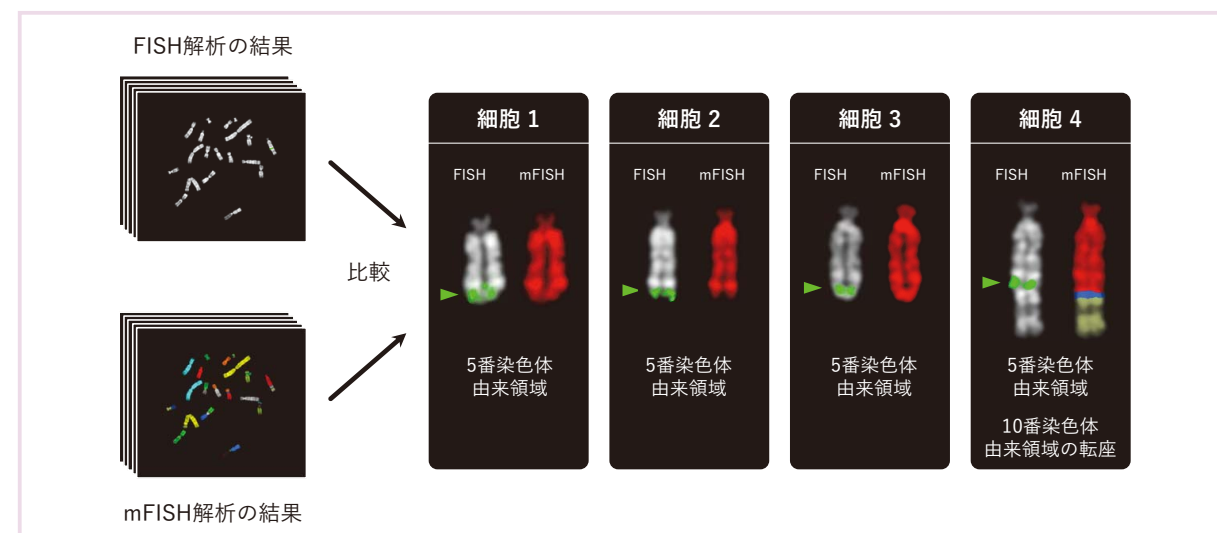


図2 syFISH解析による単クローン性の評価の流れ

3 導入遺伝子の染色体上での位置を特定可能にする syFISH 解析

syFISH 解析は染色体の不均一性に関わらず、導入遺伝子の染色体上の位置を体系的（systematic）に特定することが可能な解析技術であり、米国 FDA の資料²⁾でも紹介された方法です。

syFISH 解析ではスライドガラス上の染色体像に対して以下の 2 種類の FISH 解析を連続的に行います（図 1）。

①導入遺伝子に特異的なプローブを用いた FISH 解析

②各番号の染色体に特異的なプローブを用いたマルチカラー FISH（mFISH）解析

①の FISH 解析で導入遺伝子の染色体上の位置を可視化し、②の mFISH 解析では染色体を番号ごとに異なる蛍光の組み合わせで染色することで、各染色体の構成を明らかにします。同じ染色体像で両者の結果を比較することで、導入遺伝子が位置する染色体の構成がわかり、何番の染色体に由来した領域に位置しているかという情報も同時に得ることができます。

4 syFISH 解析による細胞基材の単クローン性の評価の流れ

当社が実施している syFISH 解析による単クローン性の評価の流れを図 2 に示しました。各細胞の染色体像において、FISH 解析と mFISH 解析の結果を比較し、FISH シグナルの位置を特定します。図 2 の細胞 1、細胞 2 および細胞 3 では、FISH シグナルは同じ構成の染色体上の同じ位置（赤色、5 番染色体由来領域）に存在していることがわかります。

細胞 4 のように、他の細胞と比較して異なる FISH シグナルのパターンを持つ細胞が認められた場合も同様に、mFISH 解析の結果から FISH シグナルの位置が特定可能です。細胞 4 の場合、FISH シグナルは他の細胞と同じく 5 番染色体由来領域（赤色）に存在していることが明らかとなりました。また syFISH 解析

では染色体に生じた構造変化の考察が可能です。細胞 4 では他の細胞と比較して、10 番染色体由来領域（鶯色）の転座が生じたことが推察されます。

このように FISH シグナルが観察された染色体の構成およびその位置を確認し、解析した全ての細胞において FISH シグナルの位置が同じであると判断された場合、細胞基材の単クローン性が確保されていると結論付けることができます³⁾。

5 おわりに

syFISH 解析は、単クローン性の評価技術の一つとして有効な手法であり、当社では本解析を信頼性基準対応試験で実施することが可能です。今後は、当社の豊富な分析ラインナップと組み合わせたサービスを提供し、お客様からの多彩なニーズにお応えし、課題解決に向け最大限に取り組んでまいります。

文 献

- 1) S. Vcelar, V. Jadhav, M. Melcher, N. Auer, A. Hrdina, R. Sagmeister, K. Heffner, A. Puklowski, M. Betenbaugh, T. Wenger, F. Leisch, M. Baumann, N. Borth : *Biotechnol. Bioeng.*, **115**, 165, (2018) .
- 2) R. Rawat : *Informa Life Sciences Annual Cell Line Development and Engineering Conference*, (2016)
- 3) 岸岡康博, 多田稔, 栗林亮佑, 堀内貴之, 高倉知朗, 山野-足立範子, 三崎亮, 石井純, 太田康勝, 大屋智資, 片山和彦, 川原彰人, 小山伸吾, 阪下日登志, 瀧村靖, 森本拓也, 中野歩希, 早水健二, 日向昌司, 村上聖, 内田和久, 大政健史, 石井明子 : *PDA Journal of GMP and Validation in Japan*, **25**, 10, (2023) .



山内 清司
(やまうち せいじ)
クロモセンター

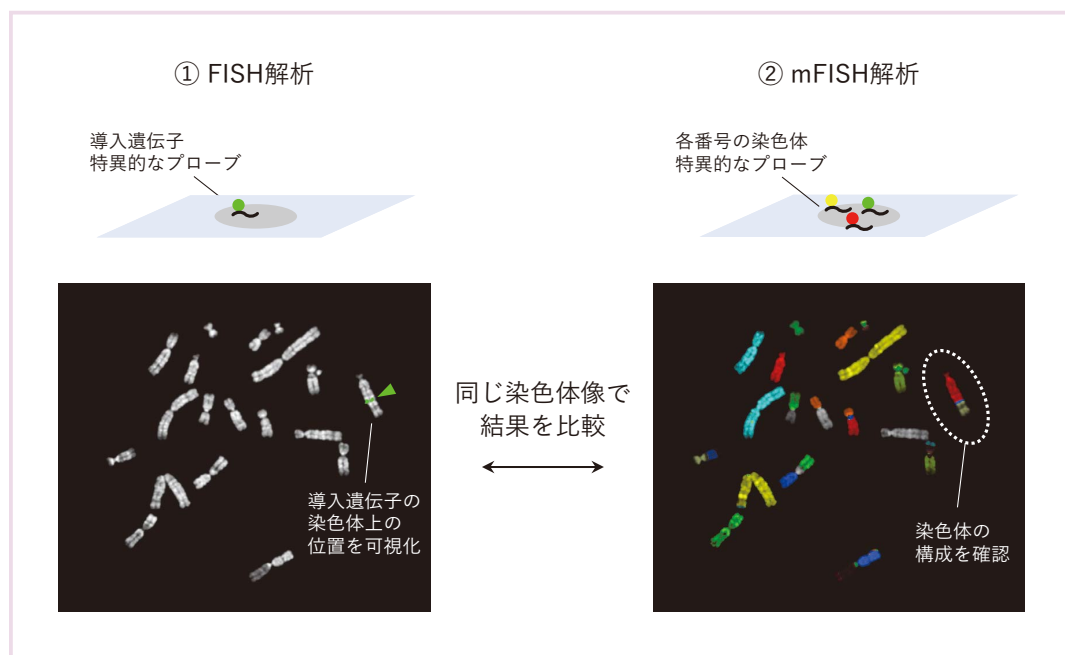


図1 導入遺伝子の染色体上での位置を特定可能にするsyFISH解析の原理

血中循環腫瘍細胞（CTC）の バイオマーカーとしての活用の新展開 ～検体の長期保存によるCTC中DNA・RNA解析の利用拡大に向けて～

大阪ラボラトリー 村田 崇人

1 血中循環腫瘍細胞(CTC)の臨床研究等への活用

がん医療において、血液等の体液からがんの情報を得る液体生検（リキッドバイオプシー）が注目されています。液体生検は、患者の体への負担が少なく、繰り返し採取が可能のため、経時的にがんの性質をモニタリングすることができます。がんは進行や治療の経過によって性質が変化することが知られており、それをモニタリングし把握することにより、適切な治療を選択することができます。液体生検の測定対象の一つである CTC（Circulating Tumor Cells）はがん組織から血液中へ放出され、血流を循環するがん細胞です。CTC 中に含まれる様々ながんの情報（例えばタンパク質や遺伝子変異）をバイオマーカーとして利用することで、患者の層別化や薬効の評価、投与レジメン^{*1}の決定が可能となります¹⁾。

しかしながら、CTC 解析用に採血した血液検体の保存期間は一般に2～3日と言われており、医療現場において採血後速やかに処理を行う必要があります。これが、CTC のバイオマーカーとしての利用を阻む原因のひとつとなっています。そのため、当社は血液中の CTC を保持する目的で、CTC 検体の長期保存方法の検討を行いました。

また、CTC の臨床研究等への活用を促進する目的で、CTC 中の DNA および RNA の解析にも取り組んでおりますので、以下に紹介させていただきます。

2 CTC 検体の長期保存法開発

当社は臨床研究や臨床試験等における CTC のバイオマーカーとしての活用を広げる目的で、検体の保存法に関する種々の検討を行い、採血後の CTC 検体を長期に保存できる方法を見出しました。図 1 に、既知数のがん細胞を添加した血液検体を疑似 CTC 検体として 1 か月保存した後に、がん細胞をセルソーターを用いて回収した結果を示します。長期保存検体からのがん細胞の回収率は 67.4 % で、保存前（採決当日）のそれと大きな差はありませんでした。このことから、保存後の検体においてもがん細胞を回収できることがわかります。現在、さらに長期での保存が可能か検討していますが、これらにより CTC 検体の安定性の問題が解決され、臨床研究等に必要な種々解析に寄与できると考えます。

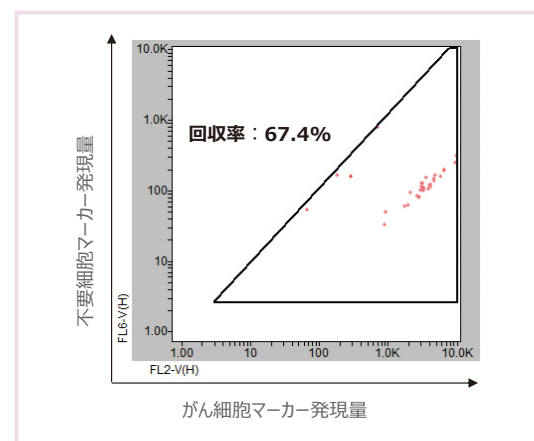


図1 長期保存検体におけるCTC検出プロット例
血液 4 mL に肺がん由来細胞（PC9）を添加し、1 ヶ月保存した検体における検出プロット例を示します。各点が細胞 1 個を示し、黒線に囲まれた範囲内（不要細胞マーカーの発現量が低く、がん細胞マーカーの発現量が高い領域）の点が CTC として検出された細胞を示します。
回収率 = 検出されたがん細胞数 / 添加細胞数 × 100

3 高純度で回収した微量 CTC 中 DNA および RNA の解析事例

CTC はがん細胞そのものであるため、CTC の遺伝子解析は、他のがん細胞由来物（例えば cfDNA）の解析と比較して情報量が多いなど、数多くの利点があります。当社は、2018 年よりオンチップバイオテクノロジー社と共同で、セルソーター（On-Chip[®] Sort）を用いた CTC 回収法を開発するとともに、次世代シーケンサー（NGS）で DNA 変異解析を行ってきました（図 2）。血液中の CTC は赤血球や白血球などの血液細胞全体の 5000 万分の 1 未満と微量しか存在しませんが、本手法を用いることにより、高純度に CTC を回収し、DNA 変異解析を行うことができます。さらに当社では、CTC の変異解析を全ゲノム増幅なしで行う方法を開発しました。増幅工程を省くことにより増幅時の PCR エラーを抑え、CTC 中の変異解析を正確に行うことができます。

これまでのがん解析はゲノム解析が主流でしたが、最近ではトランスクリプトーム^{*2}情報を統合した解析も盛んに行われています。当社では、CTC 中 RNA の解析に対応した CTC 回収法を新たに開発しました。前項と同様、血液に既知数のがん細胞を疑似 CTC として添加した試料からがん細胞を回収し、得られた

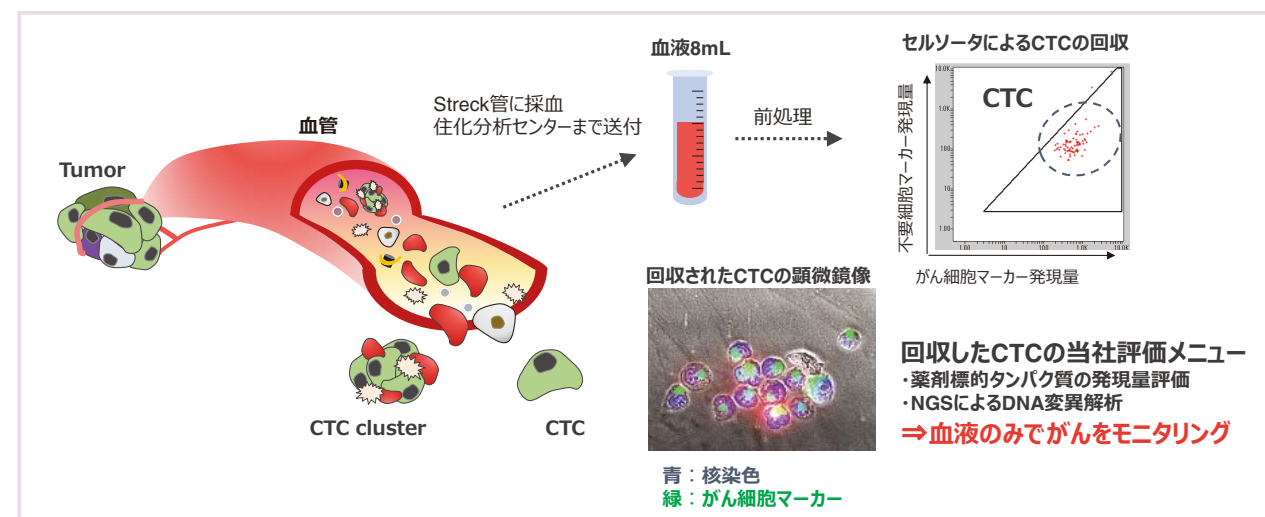


図2 当社CTC回収法の概要

血液 8 mL を前処理後、セルソーターで高純度に回収します。写真は回収後の CTC を蛍光顕微鏡で観察したものです。青色が核、緑色のがん細胞マーカーの蛍光を示し、両方とも色がついているものが CTC です。

試料を q-PCR で解析した結果、抗がん剤の分子標的である EGFR^{*3} の mRNA が検出できました（図 3.a）。また、当社法とすでに市販されている CTC 分離手法（方法 A、B）で得られた試料中の白血球マーカーの mRNA を比較したところ、当社法は他法と比較して高い Ct 値^{*4}を示しました（図 3.b）。この結果から、当社法では白血球等の夾雑細胞の影響を低く抑えることができ、正確な発現量解析が可能となりました。

4 総括と展望

これまで臨床研究等における液体生検は、DNA 変異解析が主な解析法であり、ctDNA が主な解析対象でした。近年では、ゲノム以外の情報を臨床へと活用する試みも広がっており、CTC 中の RNA を解析し、免疫チェックポイント阻害剤^{*5}の薬効評価マーカーとして利用している例も報告されています^{2) 3)}。CTC 検体の長期保存法の開発と、セルソーターを用いた CTC 回収

および CTC 中 DNA・RNA 解析により、バイオマーカーとしての CTC の活用が広がることで、がんの性質に応じた適切な治療がますます発展すると期待されます。

文 献

- Antoine Vasseur, Nicolas Kiavue, François-Clément Bidard, Jean-Yves Pierga, Luc Cabel: *Molecular Oncology*, **15** (6) , 1647 (2021) .
- Xin Hong, Ryan J Sullivan, Mark Kalinich, Tanya Todorova Kwan, Anita Giobbie-Hurder, Shiwei Pan, Joseph A LiCausi, John D Milner, Linda T Nieman, Ben S Wittner, Uyen Ho, Tianqi Chen, Ravi Kapur, Donald P Lawrence, Keith T Flaherty, Lecia V Sequist, Sridhar Ramaswamy, David T Miyamoto, Michael Lawrence, Mehmet Toner, Kurt J Isselbacher, Shyamala Maheswaran, Daniel A Haber: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **115** (10) , 2467 (2018) .
- Yosuke Murata, Takuto Nosaka, Yu Akazawa, Tomoko Tanaka, Kazuto Takahashi, Tatsushi Naito, Hidetaka Matsuda, Masahiro Ohtani, Yasunari Nakamoto: *Cancers*, **16** (13) , 2410 (2024) .

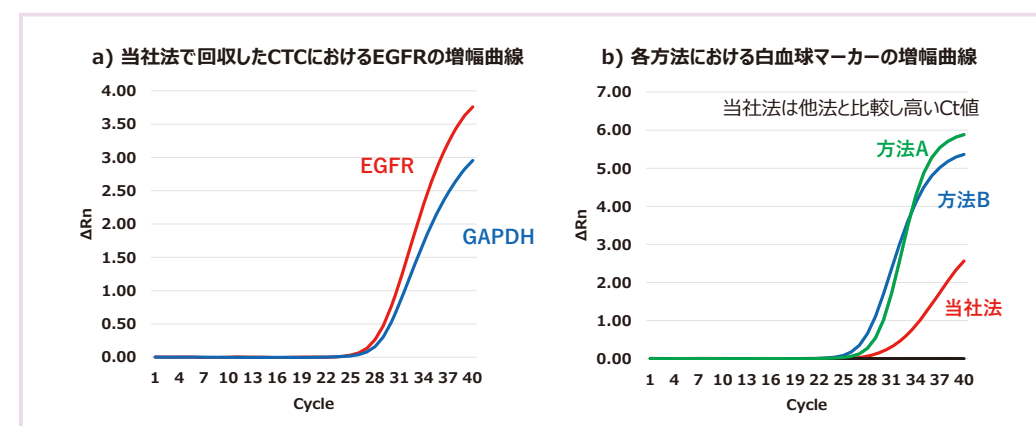


図3 分取したCTCのq-PCRによるmRNA解析結果

- 血液 8 mL に 20 個の肺がん由来細胞（PC9）をスパイク後、細胞表面抗原等を蛍光染色し、当社法でがん細胞を回収しました。PCR 試料の調製は、Single Cell-to-CT[™] qRT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いました。EGFR（肺がん細胞の分子標的）および GAPDH（内在性コントロール）の mRNA のプライマー / プローブとして TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific) を使用し、q-PCR を実施、測定は QuantStudio[®] 5 (Thermo Fisher Scientific) を使用しました。
- 各方法で推奨される血液量（5～8 mL）に 20 個のがん細胞（PC9）をスパイクし、当社法並びに市販の CTC 分離キット（方法 A：MACS[®], B：Adna test）でがん細胞を回収しました。CD45（白血球のマーカー）の mRNA のプライマー / プローブとして TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific) を使用し、a) と同様の方法で q-PCR を実施しました。当社法は他法と比較して高い Ct 値を示し、夾雑細胞が少なく高純度に CTC を回収できました。



村田 崇人
(むらた あかと)
大阪ラボラトリー

*1 投与レジメン：抗がん剤や支持療法薬剤の投与量、期間、方法などを示した治療計画。
*2 トランスクリプトーム：細胞や組織中に存在する全ての転写物の総体。細胞や組織の機能についての情報が得られる。
*3 EGFR：上皮成長因子（EGF）の受容体。細胞の成長や増殖に関わるタンパク質で、多くのがんにおいて異常が見つかっている。抗がん剤の分子標的として広く知られている。
*4 Ct値：PCRにおいてシグナルが閾値と交差する点におけるサイクル数。Ct値が低いほどサンプル中の核酸（mRNA）の量が多いことを示す。
*5 免疫チェックポイント阻害剤：がん細胞に対する免疫応答を活性化し、がんを攻撃する薬剤。

中分子医薬品（核酸およびペプチド）のバイオアナリシスにおけるLC-MS/MS (Triple Quad™7500) の有用性

大阪ラボラトリー 浜田 梨沙

1 はじめに

バイオアナリシスとは、医薬品の非臨床および臨床試験において得られた生体試料中の薬物や代謝物などの濃度分析のことです。医薬品の生体内濃度はその薬効や安全性を評価する上で重要な指標であるため、それを高感度でかつ正確に定量することが求められます。液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いるバイオアナリシスは、従来の低分子医薬品のみならず、近年注目が集まる中分子医薬品でも活用されています。本稿では、この中分子医薬品における LC-MS/MS 分析をご紹介します。

2 中分子医薬品のバイオアナリシスの課題

低分子（細胞内標的が狙える、化学合成可能）と高分子（標的への高い特異性／強い親和性）の長所を兼ね備えた中分子医薬品として核酸およびペプチドが挙げられますが、いずれのバイオアナリシスにも LC-MS/MS が有用なツールとして期待されています。

LC-MS/MS の基本原理は、イオン化させた分析対象（プリカーサーイオン）を分解して得られる特定のプロダクトイオンを検出することです。比較的分子量大きい中分子では、プリカーサーイオンが複数発生するうえに、そこから多数のプロダクトイオンが発生することから、検出する特定イオン量が低下することが一般的です。また、分析対象が装置配管へ吸着する場合もあります。これらが中分子医薬品の LC-MS/MS による高感度分析を妨げる要因となっています。

3 事例紹介

当社が導入した LC-MS/MS は、低吸着仕様 LC : Nexera™XS inert（島津製作所）および高感度 MS/MS : Triple Quad™7500（SCIEX）からなり、中分子医薬品の高感度分析に有用です。当該装置を使用して環状ペプチドおよびアンチセンス核酸を分析した事例を紹介します。

①ラット血漿中の環状ペプチド Cyclorasin9A5 の高感度分析

ペプチドは実験器具や装置配管への吸着が懸念されます。また、環状ペプチドは一般的な直鎖状ペプチドより特定のプロダクトイオンが発生しにくい特徴があります。そのため、吸着低減を目的とした前処理方法や、特定イオンの生成量を上げるために MS/MS 条件を最適化しました。その結果、ラット血漿 50 μ L を除タンパク処理後、逆相クロマトグラフィーで分析することで、Cyclorasin9A5 の検量線は、1 ~ 1000 ng/mL の範囲で直線性を示し、国際的なガイドライン

ICH-M10 の基準を満たしました。なお、同社の一つ下位機種 (Triple Quad™6500) と比較すると Signal to Noise 比で約 4 倍の高感度化に成功しています (図 1)。

②ラット肝臓中のアンチセンス核酸 Mipomersen および代謝物 12 種の一斉分析

核酸医薬品は代謝により鎖長の異なる核酸となり、鎖長の違いにより金属への吸着性や分析カラムへの保持能など物性が異なってき

ます。これら物性の異なる核酸（代謝物含む）を一斉に分析できる条件を設定しました。その結果、ラット肝臓ライセート 50 μ L を塩基性条件下で固相抽出後、イオンペア試薬含有の移動相を使用した逆相クロマトグラフィーにより分析したところ、各成分のピークは相互に分離し、機器への吸着も抑えられ、良好なピーク形状を得ることができました (図 2)。また、全 13 成分ともに検量線の直線性は 0.1 ~ 50 μ g/g の範囲で国際的なガイドライン ICH-M10 の基準を満たしました。

このように、低吸着仕様 LC と高感度 MS/MS を組み合わせることにより、ペプチドおよび核酸の高感度分析を可能にしました。なお、本結果は、当社が参画する日本医療研究開発機構 (AMED) の「4 種の新規モダリティ医薬品を対象とする薬物動態評価のための生体試料中濃度等分析法の開発と標準化に関する研究」のもとで取得したものです。

4 おわりに

Triple Quad™7500 の導入により、これまで難しかった中分子医薬品の LC-MS/MS 高感度分析が可能となりました。お客様の研究開発に新たなオプションとしてご活用いただけるものと思います。さらに、高感度分析による生体試料の使用量の削減、分析法確立の迅速化など研究開発の加速化が期待できます。

当社は LC-MS/MS に強みを有しており、さらに向上すべく最新装置の導入や技術開発を進め、新たな価値を提供できるよう努めてまいります。

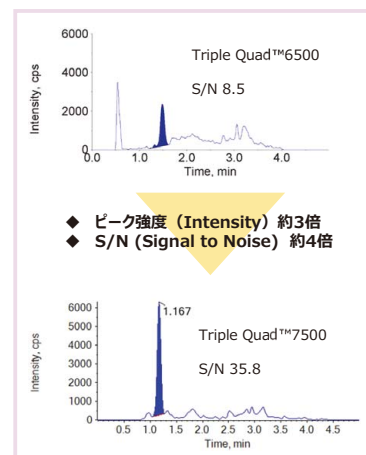


図1 Cyclorasin9A5分析における Triple Quad™ 6500および 7500の感度比較

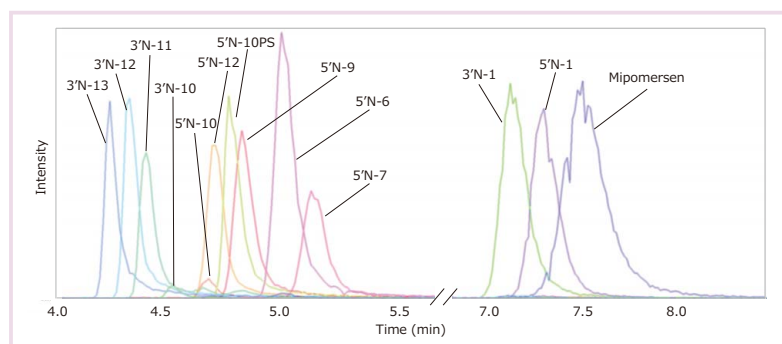


図2 アンチセンス核酸医薬品Mipomersenおよび代謝物12種のクロマトグラム



浜田 梨沙
(はまだ りさ)
大阪ラボラトリー

▶ 日本分析化学会 2024 年度有功賞受賞

当社愛媛ラボラトリーの佐々木康晴、千葉ラボラトリーの秋馬立幸の二名が日本分析化学会「2024 年度有功賞」を受賞しました。いずれも 30 年以上の長きにわたり分析実務に従事し、豊富な経験と知識を活かしてお客様のご要望にお応えしてきた実績を認めていただいたものです。

佐々木は、34 年間、有機・無機、環境分析と幅広い業務に従事してまいりました。また、第一線で活躍するなかで、各手法における試験法の改良・改善を行い、各種の分析プロセスの問題解決を通じて社会に貢献いたしました。

秋馬は、社内外で有機、無機技術を修得し、技術を磨くと共に分析を通じてお客様の製品の品質向上に貢献してまいりました。また、2014 年からは、安全衛生・保安防災・化学品管理等の多岐にわたる支援業務に関わり、当社の品質と安全の維持・向上を支えております。

受賞した二名は、いずれもこれまでに培った分析技術や、長年にわたる経験と広範な知識を活かして後進の育成にも尽力しております。当社は、お客様に信頼されるパートナーを目指し、これからも研鑽してまいります。



愛媛ラボラトリー 佐々木



千葉ラボラトリー 秋馬

主な投稿論文・口頭発表等

2024.5→2024.10

※所属名は投稿・発表当時のものです。

投稿論文

【医薬分野】

核酸医薬品の不純物等の構造解析と品質評価への取り組み
章 宏*1、長野裕夫*2、高橋友章*3 (*1 大阪ラボラトリー、*2 医薬事業部、*3 大分ラボラトリー)
[住友化学 技術誌 2024] (住友化学発行)、P64-68 (2024)
核酸医薬品においては、目的成分とオリゴヌクレオチド不純物の物理的・化学的性質が類似しているため、不純物の構造同定や品質評価法の開発もまた技術的な課題である。本稿では、当社における 2D-LC/MS の分析事例と AMED のプロジェクトで実施した UV 検出と質量分析を組み合わせた分析法により、分離困難な不純物を評価した事例を紹介した。

【マテリアル分野】

半導体製造工程のケミカルコンタミネーション評価 ～固体捕集サンプラーによる気中酸塩基性ガス成分の高感度定量～
堀川玲子 (千葉ラボラトリー)
[JETI] (株日本出版制作センター発行)、72 (6)、P91-96 (2024)
クリーンルーム空気中の分子状汚染物質 (Airborne Molecular Contaminant : AMCs) の定量に使用する、酸と塩基の固体捕集サンプラーについて説明した。ここで紹介する「気中の酸塩基

定量用の固体捕集サンプラー 商品名 BremS® (プレムス®) は、開発してから 10 年以上が経過し、特に海外拠点において利用が進んでいるが、国内においては現在でも従来法の液体捕集サンプラーが主流である。今回は改めて基本に立ち寄り、半導体製造の現場におけるケミカルコンタミネーションの分類、化学的な性質と浄化方法の考え方を解説すると共に、これに応用した捕集サンプラーの原理と特徴、改良した新たな固体サンプラーの性能について説明した。

キラル固定相「SUMICHIRAL®」50 年の歩み

西岡亮太、上重哲郎、三好 彰、梅原一宏 (大阪ラボラトリー)
[LC と LC/MS の知恵] ((公社) 日本分析化学会・液体クロマトグラフィ研究会発行)、2024 年第 1 号 (通巻第 8 号)、P7-17
当社のキラル分離カラム SUMICHIRAL® に関して、その開発の黎明期から現在まで、50 年の歩みを総括した。SUMICHIRAL® は GC カラムからスタートし、HPLC カラムとして Pirke 形、配位子交換形、ホストゲスト形など、年代ごとに新たなコンセプトを取り入れて新製品開発を行ってきた。本稿では、それらの開発経緯、特長、アプリケーションを紹介した。

放熱材料の熱物性評価技術 (熱伝導率、放射率、熱膨張、熱応力)

宇石拓也 (マテリアル事業部)
(書籍) 「次世代パワーデバイスに向けた高耐熱・高放熱材料の開発と熱対策」 (機技術情報協会発行)、第 8 章 第 1 節、P499-509 (2024)
放熱材料の熱物性評価技術に関して紹介した。熱物性評価技術 (熱伝導率、熱膨張率、硬化収縮率、放射率) の測定概要と一般流通材料の測定事例を記載し、当社の特効的な熱マネジメント技術の紹介を行った。

S₈ ガスによる腐食試験および S₈ ガス発生源調査方法

池田創一、大山正幸 (千葉ラボラトリー)
[JETI] (株日本出版制作センター発行)、72 (10)、P27-29 (2024)
腐食性ガスの一種である硫黄 (S₈) ガスは、自動車のエンジンルーム等で使用されるホース等のゴム部材から発生することが知られているが、他の硫黄系ガス (H₂S、SO₂) と比較して銀や銅材料に対して腐食性が高く、信頼性調査のための S₈ ガス腐食試験が重要となる。腐食試験方法と事例、S₈ ガス発生源調査方法について紹介した。

口頭発表等

【医薬分野】

質量分析を用いた薬物動態試験における定量分析
松井誠一 (大阪ラボラトリー)
第 52 回質量分析講習会 (大阪大学)、2024 年 7 月 12 日

GalNAc 修飾 siRNA の逆相イオンベクトロメトリによる分析法検討
○赤嶺隆太*1、章 宏*1、長野裕夫*1、乙丸有香*1、井上貴雄*2、川上純司*3、小比賀 聡*4 (*1 株式会社分析センター、*2 国立医薬品食品衛生研究所、*3 甲南大学 FIRST、*4 大阪大学大学院 薬学研究科)
日本核酸医薬学会第 9 回年会 (仙台国際センター)、2024 年 7 月 17 日

RPIP-LC-MS による 100 mer 化学合成オリゴヌクレオチドの分離研究と構造確認

○章 宏*1、赤嶺隆太*1、長野裕夫*1、乙丸有香*1、井上貴雄*2、川上純司*3、小比賀 聡*4 (*1 株式会社分析センター、*2 国立医薬品食品衛生研究所、*3 甲南大学 FIRST、*4 大阪大学大学院 薬学研究科)
日本核酸医薬学会第 9 回年会 (仙台国際センター)、2024 年 7 月 17 日

医薬品の特性解析および不純物試験における CAD 活用事例の紹介

北中淳史 (大阪ラボラトリー)
サモフィッシャーサイエンティフィック(株)主催 LC-CAD ユーザーミーティング 2024 (サモフィッシャーサイエンティフィック(株) (横浜市)、2024 年 10 月 9 日/イノグレート大阪 (大阪市)、2024 年 10 月 11 日)

逆グラジエント LC-CAD/ オービトラップ MS システムによるノータゲット定性・半定量分析事例のご紹介

山下裕樹 (千葉ラボラトリー)
サモフィッシャーサイエンティフィック(株)主催 LC-CAD ユーザーミーティング 2024 (サモフィッシャーサイエンティフィック(株) (横浜市)、2024 年 10 月 9 日/イノグレート大阪 (大阪市)、2024 年 10 月 11 日)

【マテリアル分野】

高分子・有機材料の劣化評価及び物性評価
大西 翔 (千葉ラボラトリー)
(公社) 精密工学会 成形プラスチック歯車研究専門委員会 第 157 回研究会 (機械振興会館 東京)、2024 年 6 月 14 日

各種製品に混入する異物の特徴と分析技術を活用した処方

大田省吾 (大阪ラボラトリー)
TH 企画セミナーセンター主催セミナー (芝浦サザビル 東京)、2024 年 8 月 7 日

半導体製造環境の気中ケミカル成分の最近の分析技術について

安倍聡彦 (千葉ラボラトリー)
(一社) 日本粉体工業技術協会主催 2024 年度第 1 回クリーン化分科会 (株式会社分析センター 千葉ラボラトリー)、2024 年 9 月 5 日

医薬品製造機器の粒子封じ込め性能評価

長谷部枝 (千葉ラボラトリー)
(一社) 日本粉体工業技術協会主催 2024 年度第 1 回クリーン化分科会 (株式会社分析センター 千葉ラボラトリー)、2024 年 9 月 5 日

spICP-MS を用いたナノパーティクルの粒径・個数分析

藤村知也 (千葉ラボラトリー)
(一社) 日本粉体工業技術協会主催 2024 年度第 1 回クリーン化分科会 (株式会社分析センター 千葉ラボラトリー)、2024 年 9 月 5 日

リチウムイオン電池正極の軟 X 線吸収分析による充放電状態の解析

末谷省吾*1、松永拓也*1、豆崎美夢*2、山田咲樹*2、平井大智*2、下垣部弥*2、村松康司*2 (*1 株式会社分析センター、*2 兵庫県立大学)
第 21 回 Spring-8 産業利用報告会 (科学技術館 東京)、2024 年 9 月 11 日

【健康・安全分野】

美味しさの感性評価 ～感性評価でできること～
松岡康子 (大阪ラボラトリー)
2024 年生医工学学会・年次大会 (愛媛大学)、2024 年 6 月 29 日

土壌中多成分 PFAS 一斉分析法のインターラボラトリーテストに関する報告 その 1

○股 照汰*1、谷保佐知*2、秦 浩司*1、今井志保*3、金子善平*4、天日美薫*5、高沢麻里*6、高原玲華*7、古川 幸*8、内川 綾乃*9、大脇千景*10、秋野裕基*11、木村辰徳*12、山本彩織*13、北原康治*14、久保明日香*15、長谷川 淳*16、三木芳恵*17、野島智也*18、小野純子*19、橋 拓也*20、城代 航*21、岩田敏明*22、若佐奈実*23、醍醐ふみ*24 (*1 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 *2 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 *3 環境管理センター *4 環境総合リサーチ *5 一般財団法人 九州環境管理協会 *6 埼玉環境科学国際センター *7 ジーエルサイエンス(株) *8 株式会社分析センター *9 中外テクノス(株) *10 一般財団法人 東海技術センター *11 株式会社久栄 *12 東北緑化環境保全(株) *13 日鉄テクノロジー(株) *14 株式会社総合科学 *15 株式会社 *16 公益財団法人 ふくおか公衆衛生推進機構 環境科学センター *17 三浦工業(株) 三浦環境科学研究所 *18 ユーロフィン 日本環境(株) *19 大阪府立環境農林水産総合研究所 *20 兵庫環境環境センター *21 アジレント・テクノロジ(株) *22 日本ウォーターズ(株) *23 株式会社津製作所 *24 株式会社テクノリサーチ)
第 3 回環境化学物質合同大会 (JMS アステールプラザ(広島市))、2024 年 7 月 4 日

移動空間の体験価値創出のための感性指標化

佐久間 文、野崎浩寿、山本 悠、大岡佳子 (大阪ラボラトリー)
(公社) 自動車技術会主催 2024 年秋季大会 (仙台国際センター)、2024 年 10 月 23 日

株式会社分析センター主催セミナー

【マテリアル分野】

消防法危険物の危険性
伊藤和寿 (愛媛ラボラトリー)
化学物質による火災・爆発事故防止技術セミナー (株式会社分析センター 東京本社)、2024 年 10 月 24 日

▶ 品質感受性診断「品感コンシェルジュ®」サービス開始のお知らせ

昨今、ものづくりを行う企業を中心に検査での不適切行為などの品質不正が頻発しており、社会問題となっています。

品質不正を防止するには、「性弱説」*1の考え方に立って、組織の従業員一人ひとりの品質への感受性を高め、良好な組織風土を醸成することが重要です。

これまで当社は、感性工学に基づいた「感性価値評価」により、人の感性を数値化・可視化するサービスを行ってきました。その経験とノウハウを発展させ、組織の品質感受性を診断するサービス「品感コンシェルジュ®」の提供を開始しました。

本サービスは、「リスクに直面した際の人の気持ち」と「自職場の組織風土」の2つの評価軸から組織の品質感受性を見る化し、他のサーベイとは異なる

～ サービスご利用・ご活用の流れ ～



視点で品質不正の未然防止の一助となる診断結果をご提供いたします。また、診断結果に応じた改善施策のご提案、研修動画や個別研修もご準備しております。

品感コンシェルジュ®をご活用いただき、皆様の組織の品質感受性の向上および組織風土の改善へのお力添えができましたら幸いです。ぜひお気軽にご相談ください。

*1 人は非常に弱いものであり、状況によって誰でも不適切な行為を行ってしまう可能性があるという考え方

本件に関する
お問い合わせ先

株式会社住化分析センター
健康・安全事業部（東京）TEL 03-5689-1213
健康・安全事業部（大阪）TEL 06-6202-1000
Email : hinkanconciierge@scas.co.jp



▶ 日本粉体工業技術協会 第38回粉体工業功績者賞受賞

当社愛媛ラボラトリーの明比美鈴が一般社団法人日本粉体工業技術協会「第38回粉体工業功績者賞」を受賞いたしました。会員企業である当社を通じて粉体工業の発展に著しく貢献したとお認めいただいたものです。

明比は、当社にて36年の間、無機分析の業務に従事してまいりました。主にお客様の製品の生産管理分析業務において、各種評価試料に応じ粒度分布

測定装置等を用いた機器分析の条件最適化を行い、新たな手法や合理化法を開発・確立しました。このように幅広く第一線で活躍するとともに、若手分析者の育成にも精力的に取り組んでおります。

当社は今後もお客様のご要望に真摯にお応えし、当社分析技術が粉体関連工業の発展、さらには社会に貢献できるよう研鑽してまいります。



SCAS Sumika Chemical Analysis Service

株式会社住化分析センター
〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-6-17 住化不動産横堀ビル



企業情報

<https://www.scas.co.jp/company/>

- 所在地案内
- 会社概要 など
- 会社案内
- 総合カタログ



分析サービス・製品に関するお問合せ

<https://www.scas.co.jp/contact/>

- 各種お問合せフォーム など



SCAS NEWS 2025- I (通巻60号)

発行 2025.2.27

編集担当 情報戦略推進室

✉ メール scasnews@scas.co.jp

はアインシュタインの疑問符です。彼のあくなき好奇心と探求心こそが、宇宙真理発見の原動力だったのかも知れません。

〔無断転載禁止〕