

# 再生医療等製品の品質評価試験 (特性解析・安全性評価試験) への取り組み

大分ラボラトリー 藤井 清治 / 技術開発センター 泉川 健・高橋 昭博

国内における再生医療の臨床応用、再生医療等製品の研究開発推進の機運を受けて、周辺産業の将来市場の拡大への期待が高まっており、有効性と安全性の確保を目的とした法的枠組みの整備も同時に進められている。再生医療等製品の評価試験には、従来、低分子医薬品やバイオ医薬品に用いられてきた手法に加え再生医療等製品に対応した種々の分析手法も求められる。細胞生存率評価試験やフローサイトメーターを用いた細胞純度試験、感染性物質の存在を否定するためのマイコプラズマ否定試験やウイルス否定試験、製品中の不純物や目的外生体活性物質など、当社で実施している評価試験を紹介する。

## 1 はじめに

近年、再生医療周辺産業へ参入する国内外の企業が急増しており、国内における再生医療産業を推進するために種々の施策が行われている。

経済産業省は再生医療の将来市場を以下のように予測しており、2020年に950億円、2030年に1.0兆円、2050年には2.5兆円の市場規模が見込まれている。疾患別で見ると、がん免疫分野の再生医療が最も盛んに実施され、次いで腎臓、神経、血液といった多岐に渡る疾患分野で成長が予測されている(図1)。また、周辺

産業の将来市場についても準じた拡大が期待されている(図2)。国内では2015年9月に再生医療等製品2品目の製造販売が承認された。JCRファーマ株式会社のテムセルHS注は通常承認を、テルモ株式会社のハートシートは医薬品医療機器等法で新たに取り入れられた早期承認制度である条件および期限付き承認を取得した。

このように国内での再生医療等製品の上市が達成されたことで、周辺産業への期待が高まっているが、製品の品質評価は従来の低分子医薬品やバイオ医薬品で用い

られてきた分析手法だけでなく、細胞製品に対応した種々の分析手法も求められる。本稿では、当社がこれまでの医薬品開発の支援業務で培った分析技術と経験を活かして実施している再生医療等製品の品質評価について、各種試験の概要を紹介する。

## 2 特性解析試験

製品の構成要素である細胞について各種指標を解析することにより、目的とする細胞固有の特性を管理項目として設定しておく必要がある。ここでは特性解析試験の一例を紹介する。

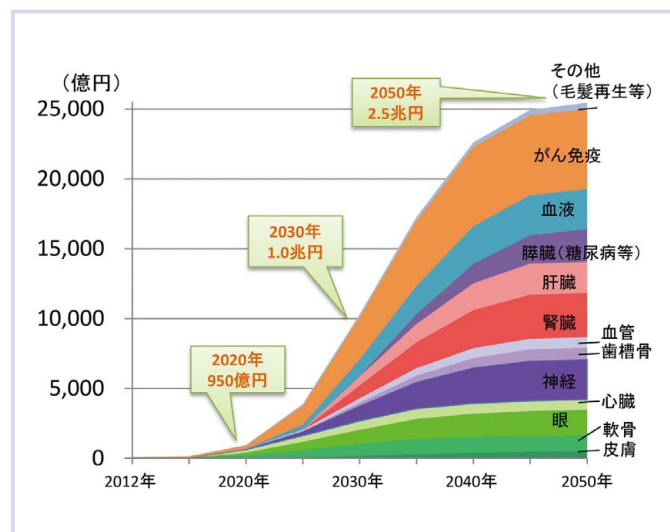


図1 再生医療の将来市場予測 (国内)<sup>1)</sup>

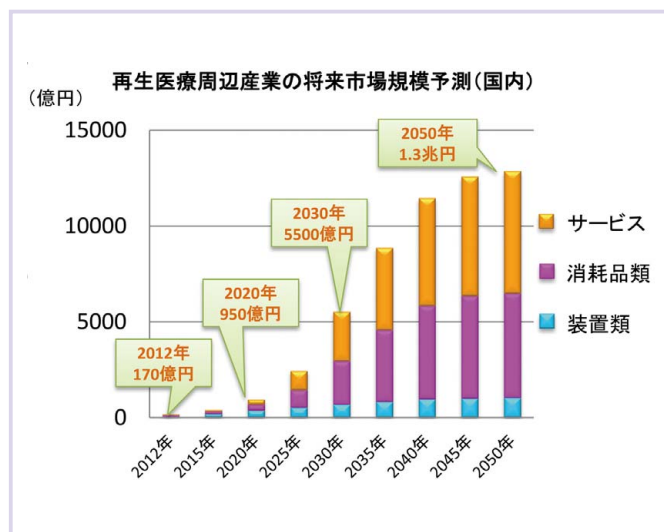


図2 周辺産業の市場規模 (国内)<sup>1)</sup>

## 2.1 生細胞数・細胞生存率評価試験

最終製品中には生細胞および死細胞が含まれる。生細胞は、生理活性物質を分泌するなど製品の有効性を左右する可能性があるため、最終製品中の生細胞数は重要な管理項目である。また、死細胞は、製品や人体へ影響を及ぼす可能性があるため、最終製品の細胞生存率も重要な管理項目である。

評価方法は、一般的にトリパンブルーで死細胞を染色後、血球計算盤を用いて人が目視で生細胞および死細胞を計数するが、人為的なエラーが発生する可能性がある。そのため当社では、客観的に評価可能な自動細胞計数装置を利用している。

## 2.2 細胞純度試験

目的細胞の純度は最終製品の有効性を左右する可能性が高い。一方、最終製品中に未分化細胞、異常増殖細胞、形質転換細胞のような目的外細胞が混入している場合、製品や人体へ影響を及ぼす可能性がある。したがって、最終製品の細胞純度を規格として組み入れることが重要である。当社では、目的細胞の表面抗原に対する蛍光標識抗体を反応させ、フローサイトメーターを用いる評価を実施している。

ヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (AdMSC) の細胞表面抗原である CD73 および CD90、細胞表面抗原でない CD45 の表面抗原解析をフローサイトメトリー法で実施した例を図 3 に示す。(A) に示すように、抗体未標識の細胞集団をネガティブセル (97.7%) およびポジティブセル (2.3%) として領域を定めた。蛍光標識抗体として抗 CD45 抗体を添加した細胞集団はネガティブセル領域に 97.3% 分布した (B)。この結果から AdMSC の

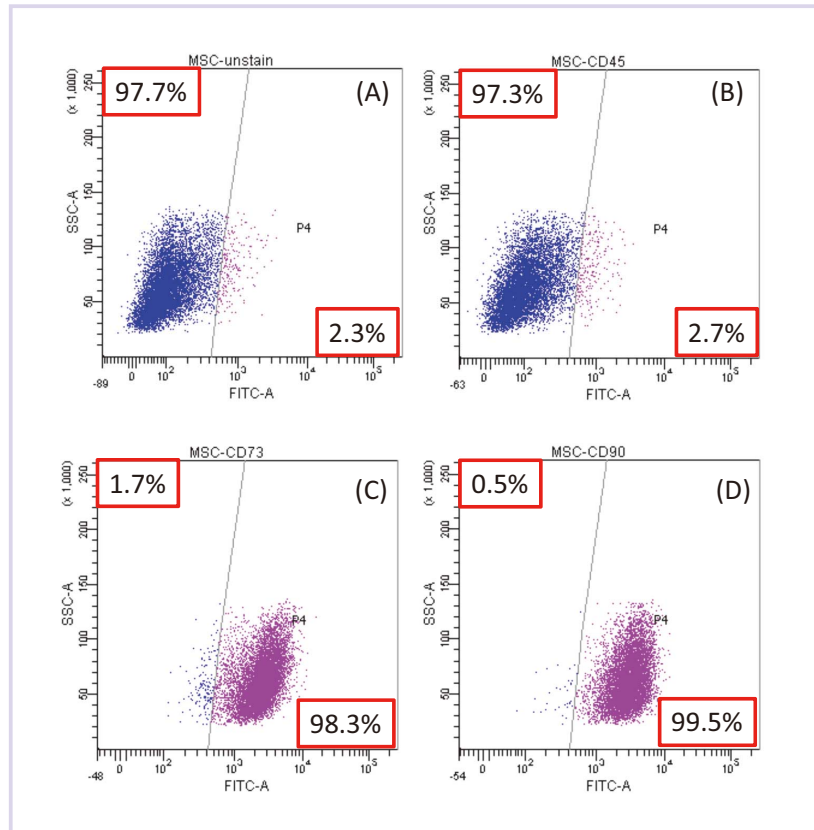


図3 フローサイトメトリー法による細胞表面抗原の測定  
(A) 抗体未添加の細胞集団  
(B) FITC標識抗CD45抗体と反応させた細胞集団  
(C) FITC標識抗CD73抗体と反応させた細胞集団  
(D) FITC標識抗CD90抗体と反応させた細胞集団

細胞表面には CD45 が発現していないことが示唆された。一方、抗 CD73 抗体を添加した細胞集団および抗 CD90 抗体を添加した細胞集団はそれぞれポジティブセル領域が 98.3% および 99.5% を示した (C および D)。

## 3 安全性評価試験

製品の投与による細菌感染、ウイルス感染あるいはエンドトキシンによる発熱の惹起を未然に防止するため、無菌試験（一般細菌および真菌の否定）、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験およびウイルス否定試験等を実施し安全性を評価する必要がある。ここでは各試験の概要を紹介する。

### 3.1 無菌試験

再生医療等製品は生きた細胞を用いていることから、注射剤等の製造で用いられる最終滅菌が適用できない。そのため製造においては一貫した無菌操作による工程を経て最終製品が製造される。無菌性保証のためには、最終製品の他、工程管理における無菌試験が求められている。

無菌試験法は日米欧の薬局方で国際調和された試験法であり、試験環境については高度な清浄度環境が要求され、従来の無菌試験室での実施から高度な清浄度環境を実現できるアイソレータシステムでの実施に移行が進んでいる。こうした状況に対応するため当社では、アイソレータシステムによる無菌施設を導入し、工程管理および最終製品の安全性評価を目的とし

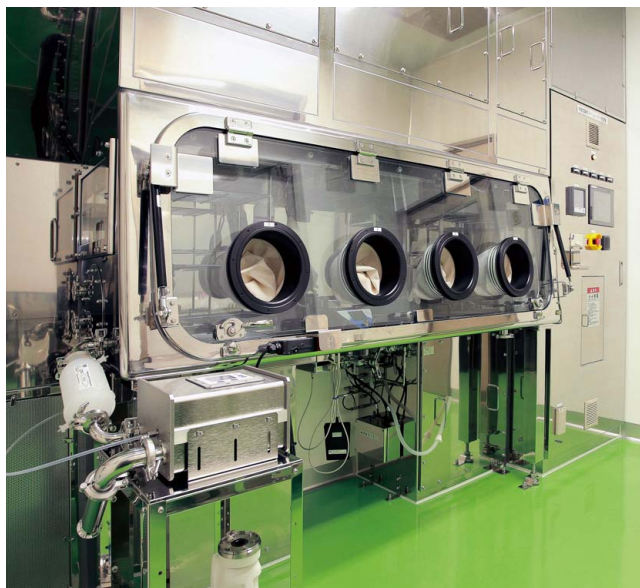


図4 無菌試験用アインレータシステム

た再生医療等製品の無菌試験を実施している（図4）。

### 3.2 マイコプラズマ否定試験

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、安全性の観点から製品への混入を防止する必要がある。また、培養細胞がマイコプラズマ感染すること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、再生医療等製品の製造においてはマイコプラズマ汚染の防止が必須と考えられる。マイコプラズマ汚染は培養液の濁りとして検出されない特徴があり、一般細菌などと比べて感染の発見が遅れる恐れがあることから、原料や中間製品についても十分な管理を行う必要がある。

マイコプラズマ否定試験法は日本薬局

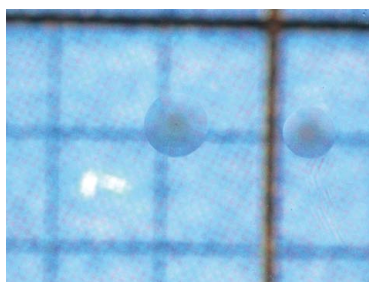


図5 A法観察例（マイコプラズマコロニー）

方 参考情報「バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験」にA. 培養法、B. 指標細胞を用いたDNA染色法、C. 核酸増幅法（NAT）の3つの手法が規定されている（図5および図6）。A法およびB法は増殖可能なマイコプラズマを検出できる反面、培養に時間を要する欠点がある。一方、C法は迅速に検出できる反面、増殖不能なマイコプラズマを検出する欠点がある。こうした各手法の特性を踏まえ、目的に応じた手法を選定する必要がある。当社では、従来のA. 培養法、B. 指標細胞を用いたDNA染色法に加え、第17改正日本薬局方に準拠したC. 核酸増幅法（NAT）に対応している。

### 3.3 エンドトキシン試験

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、血中に入った場合、微量でも強い発熱を引き起こす。一旦、製品に混入したエンドトキシンは除去や不活化が困難であることから、最終製品のみでなく原料や工程管理におけるエンドトキシ

ンの管理が必要である。

エンドトキシン試験はライセート試薬の酵素反応を利用した検出法である。試料に含まれる成分によっては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起こす場合がある。再生医療等製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が現れる可能性が高い。当社では、反応干渉作用を受けにくいライセート試薬の選定や試料溶液の希釈倍率の検証などを事前に検討して試験条件を設定している。

### 3.4 ウイルス否定試験

再生医療等製品は生体試料を原材料とするため、製造工程におけるウイルス混入の可能性を考慮する必要がある。厚生労働省の指針<sup>2)</sup>では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）、成人T細胞白血病ウイルス（HTLV）、パルボウイルスB19（B19V）の存在の有無を特定し、核酸増幅法などによりウイルスの混在を否定することが要求されている。また、必要に応じてサイトメガロウイルス（CMV）、エプスタイン・バール・ウイルス（EBV）、ウエストナイルウイルス（WNV）などのウイルス否定も実施する必要がある。当社では、核酸増幅法（NAT）によりウイルス特異的なプライマー・プローブを用いたウイルス検出を実施している。

図7にAdMSCのウイルスチェックを実施した例を示す。ポジティブコントロールでは各ウイルス由来の核酸増幅が認められたが（A）、AdMSC由来のサンプルでは内因性コントロールであるβ-アクチンを除き、各ウイルス由来の核酸増幅は認められず（B）、AdMSC中の各ウイルス量は検出下限未満の結果であった。

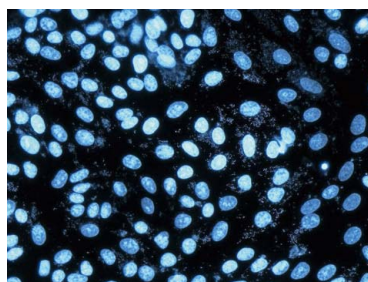


図6 B法観察例（DNA蛍光染色像）



### 3.5 製造工程由来不純物試験

製品となる細胞には、原材料(細胞)や製造工程にて使用される資材や試薬等(例えば、培地成分等)に由来し、最終製品中に残留物として存在する可能性のあるものがある。品質および安全性の面より好ましくない物質(例えば、抗生物質やウシ胎児血清由来アルブミン等)については、当該物質の除去に関するプロセス評価よりその存在を否定するか、あるいは適切な試験を設定することで存在許容量を規定することが重要となる<sup>3-6)</sup>。当社では、抗生物質等の低分子化合物に関しては液体クロマトグラフィー/質量分析法を、またウシ胎児血清由来アルブミン等のタンパク質成分に関してはELISA法を用いて最終製品中の存在量を評価している。

### 3.6 細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験

再生医療等製品は、主にヒト由来の細胞・

組織より得た生きた細胞を用いており、それらより産生される生理活性物質がシグナル伝達の促進・抑制を介し相互に作用し合うことで、その治療効果(目的作用)を発揮する。一方、人体に対して有害な作用(目的外作用)を生じさせることもある。現在、細胞加工医薬品等の品質管理項目の一つとして、生理活性物質を作用機序とする最終製品に関しては、目的外の生理活性物質が安全性に影響を及ぼす可能性がある場合、出荷規格として許容量限度試験を設けることが重要となる<sup>3-6)</sup>。当社では、細胞より産生される炎症関連物質や増殖因子(例えば、サイトカイン)、その他成長因子等の生理活性物質に関してELISA法やメンブレン抗体アレイ法等を用いて評価している。

## 4 おわりに

当社では、再生医療等製品の特性解析、安全性評価に関する各種試験を、従来の低

分子医薬品やバイオ医薬品と同様、GLP/GMP体制下で実施している。今後は、さらに再生医療等製品の開発の活発化が予測されることから、品質評価に求められるより広いニーズに応え、分析技術の面から再生医療の普及に貢献したいと考えている。

## 文献

- 1) 経済産業省 再生医療の実用化・産業に関する研究会 再生医療の実用化・産業化に関する報告書(平成25年2月)
- 2) 「再生医療等の安全性確保に関する法律」, 「再生医療等の安全性確保に関する法律施行令」及び「再生医療等の安全性確保に関する法律施行規則」の取扱いについて 平成26年10月31日 医政研発1031第1号
- 3) 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 平成24年9月7日薬食発0907第2号
- 4) 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 平成24年9月7日薬食発0907第3号
- 5) 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 平成24年9月7日薬食発0907第4号
- 6) 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 平成24年9月7日薬食発0907第5号

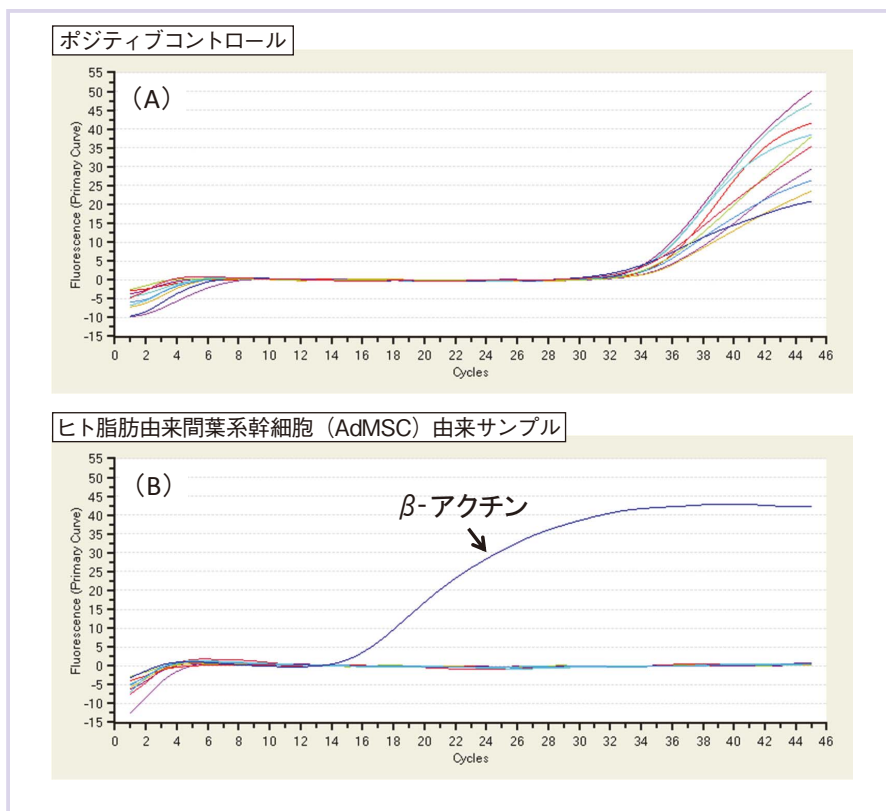


図7 リアルタイムPCR法によるウイルス由来核酸の検出



藤井 清治  
(ふじい せいじ)  
大分ラボラトリー



泉川 健  
(いずかわ たけし)  
技術開発センター



高橋 昭博  
(たかはし あきひろ)  
技術開発センター