

多様化する再生医療等製品 ～評価方法の開発～

技術開発センター 岩田 美紀・寺井 織枝・北中 淳史

再生医療等製品の開発は、リスクとベネフィット（安全性と有効性）のバランスを考慮した上で、開発期間の短縮とコスト削減が望まれている。我が国では、新規医療産業分野の構築を重要課題と位置づけ、関連する各種の規制も急ピッチで整備されつつある。安全かつ既存治療よりも有効性の高い効能効果を実現し、複雑な培養工程を含む製造方法を安定したものにすることは、製品を評価する分析手法も適切であることが求められる。また製造に使用する器材・資材、最終製品（細胞）の輸送方法、包装など周辺分野の技術革新も進められているが、これらの開発にも目的にあった評価手法の選択が重要となる。用いる評価手法は既存技術が主であるが、各技術と対象となる細胞の特性を熟知し、最適な手法を選択しながら評価法を構築する「創造性」が求められる。本稿では様々な再生医療等製品に必要となる評価技術について当社での開発事例を紹介する。

1 再生医療とは

「再生医療」とは、爬虫類や両性類における手足や尾の再生、また我々にも備わっている髪の毛や爪、皮膚の再生など、生体の細胞が本来持つ再生能力を引出した細胞や再構築した組織を患者さんの体内に導入し、病気や障害から回復させる医療である。重い疾病や事故によって機能が失われた組織や臓器を健康な臓器に取り換えて機能を回復させる「臓器移植」による治療は古くから実施されている。移植のための臓器は第三者からの提供を待たねばならないが、必要とする患者さんの数に対して圧倒的に不足している。また、重篤な免疫拒絶反応を回避するために、臓器のマッチングが重要であること、移植後も複数の免疫抑制剤を使用する必要があるため合併症のリスクが高いこと等、課題が多い。この課題の克服と、より有効性の高い医療の確立のために、バイオテクノロジーによって治療用の細胞・組織を創造する研究が世界中で行われている。

「再生医療等製品」とは、ヒト又は動物の細胞に培養等の加工を

施したものであって、身体の構造・機能の再建・修復・形成や疾病の治療・予防を目的として使用するもの（細胞製品）、又は遺伝子治療を目的としてヒトの細胞に導入して使用するもの、と定義されている。¹⁾ 古くから、体性幹細胞を用いた医療や、ES細胞（胚性幹細胞）の研究は行われていたが、2012年の京都大学・山中伸弥教授のノーベル生理学・医学賞受賞後、すでに組織や器官に分化した細胞をリプログラミングした人工多能性幹細胞であるiPS細胞を用いた再生医療への期待が一気に高まった（図1、表1）。そして他家移植治療として、他者の細胞から樹立したiPS細胞による細胞医薬品の開発が望まれ、再生医療等製品の薬事申請に関わる規制も整備されつつある。

品質試験項目については、平成28年6月に公表された「再生医療等製品（ヒト細胞加工製品）の品質、非臨床安全性試験及び臨床試験の実施に関する技術的ガイダンス」²⁾にて具体的に記載されている。細胞製品は適応疾患や部位、処方量に合わせて目的の細胞を適切な細胞数まで培養したものであるが、最近では懸濁

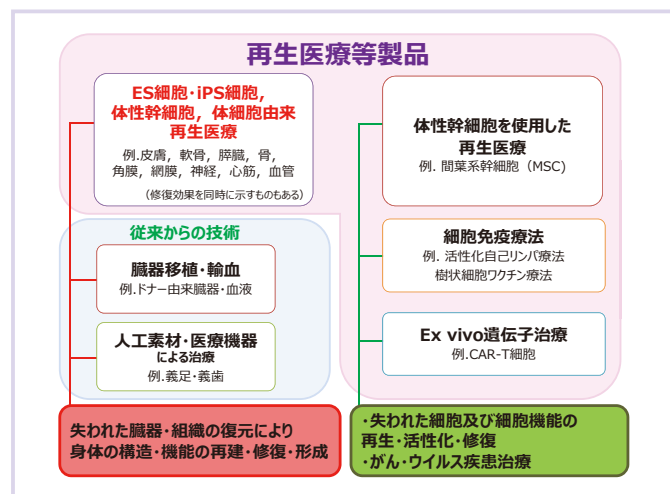


図1 再生医療 治療手法と製品の分類

表1 再生医療に使用される原料細胞

	ES細胞 (胚性幹細胞)	臍帯血幹細胞	体性幹細胞 組織幹細胞	iPS細胞 (人工 多能性幹細胞)
由来	受精胚に存在 受精後約6～7 日目の胚の中 にある。内部細胞 塊という細胞を 培養	出生時にへその 緒から採取して 凍結保存	組織の再生や修復 のために生体内に 存在	体細胞に特定の 遺伝子を導入し 初期化
多能性	○	×	×	○
特徴①	自己複製能、 多能性がある。	免疫系が未熟な ため移植の際の 拒絶反応が起き にくい。	自己複製能を持ち 特定の系列にのみ 分化可能な細胞 (血球系、神経系、 肝臓、胆管系など)	自己複製能、 多能性がある。
特徴②	他家	自家 (出生時に凍結保存)	自家 近年は他家も	他家

自家移植：患者さん本人の細胞を処理し、本人に戻す形態の治療法。細胞処理に手間と時間がかかるため、費用が高額化する等、実用化に当たっての課題がある。
他家移植：健康な第三者から採取した細胞を大量培養し使用することから、多くの患者さんを治療でき、量産化によるコスト削減効果も期待される。

表2 細胞製品の品質試験項目と分析技術例

評価項目	試験項目	分析技術
含量	細胞数, 細胞生存率等	細胞計測
		FACS
確認試験	性状, 細胞表現型, 分化能, 細胞種等, バリア機能測定	観察・細胞免疫染色
		PCR法
		FACS
		経上皮/内皮電気抵抗値(TER)測定
純度試験	細胞表現型, 異常増殖等	観察・免疫染色
		PCR法
		FACS
製造工程由来不純物	製造工程由来物質 (血清由来アルブミン, 抗生物質等)	LC/MS・GC/MS・ICP-MS・ELISA・PCR法
目的外生理活性不純物	生理活性物質等	LC/MS, GC/MS, ELISA メンブレンアレイなど
安全性	染色体異常, 未分化細胞の混入, 軟寒天コロニー形成能, ウイルス, マイコプラズマ, エンドトキシン, 無菌 等	核型解析 (G-band, Q-band)
		PCR法
		微生物関連試験 JP17 準拠
		迅速無菌試験
力価試験 効能試験	タンパク質発現, 生理活性物質の分泌能, 分化能, 細胞表現型, 細胞増殖能 等	ELISA, 細胞アッセイ等

細胞を点滴や注射によって体内へ導入するものだけでなく、スフェロイドである細胞塊やシート状に培養したもの、異なる細胞を秩序よく配置した立体構造をもつ組織製品も開発されている。また、原材料となる細胞（原料細胞）の種類や製造工程が多様化しているだけでなく、安定した品質を確保するために培養後の形状加工や、臨床現場までの輸送や保管時間を考慮した保存液の使用も検討されている。実際に細胞製品の非臨床試験、臨床試験、臨床研究を行う際には、ガイドラインに示された項目からその細胞・組織の特性にあった項目を選び、品質を評価する試験を設定しなければならない。当社では、GMP体制の下、これらの評価試験を実施していると同時に（表2）、さまざまな分析技術を駆使して多様化する製品に適した評価試験の検討と開発を行っている。

2 開発事例の紹介

2.1 細胞数（生細胞率）、スフェロイド数の計測及び顕微鏡観察

原材料として細胞を導入する際や、製品の品質管理の場面で細胞数・生細胞率の算出は必須となる。トリパンプルーと血球計算盤を用いた細胞数・生細胞率の評価の他、自動セルカウンターであるセルアナライザー NC-3000™ (ChemoMetec A/S) を使用した評価を実施している。あわせて、その形態が重要となる分化細胞の評価・計測には蛍光顕微鏡による観察を行い、径が100 μmを超えるようなスフェロイドの評価については粒度分布計を用いた評価法の開発に取り組んでいる。

(1) 間葉系幹細胞の形態解析

間葉系幹細胞 (MSC : Mesenchymal stem cell) を播種 48 時間後に蛍光顕微鏡を用いて撮像し、ソフトウェアにより細胞画像を認識させて形態解析を実施した (図 2 ①)。プロットから MSC は周囲長に対して面積が小さいこと (図 2 ②)、円形度の中央値は 0.25 (図 2 ③) となったことから MSC は細長い、あるいは突起を多くもつ複雑な形状をしていることが示された。このような数値を用いて細胞の形態を評価することが可能である。

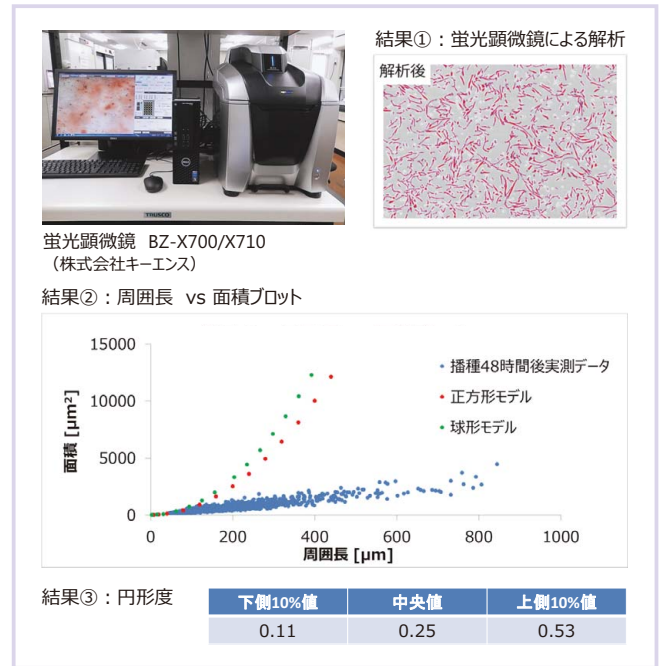


図2 蛍光顕微鏡と細胞観察および計測結果



図3 レーザー回折式粒度分布計 HELOS-KF-M (Sympatec GmbH)

(2) レーザー回折式粒度分布計による凝集体粒子数の測定

細胞培養で一般に使用される血球計算盤やセルカウンターなどの細胞数計数手法は、導入可能な粒子サイズに制限があり、スフェロイドの粒子径、粒子数の測定には向かない。一方、従来工業分野や環境科学分野で粒子径及び粒子数の計測機器として活用されてきた粒度分布計、レーザー回折式粒度分布計 (HELOS-KF, (Sympatec GmbH)) (図 3) は、非常に広い測定レンジを持ち (0.1 ~ 8750 μm)、液中に懸濁した粒子の測定が可能である。従来の細胞数計数手法では可能な細胞の生死の判定と、細胞残渣と細胞の区別は難しいという欠点はあるが、細胞製品としてのスフェロイドは一般的に 200 ~ 500 μm であり、粒子径及び粒子数の計測に有効利用できると考えられる。

2.2 遺伝子発現解析

目的の細胞であるかの確認および目的外細胞の残存否定のために実施される遺伝子発現解析の主要な手法としては、一般的にはリアルタイム PCR 法 (定量 PCR 法) が選択されるが、本法は、検出下限が比較的高い、相対定量である、作業が煩雑であるという



図4 ドロップレットデジタルPCRシステム
QX200™ AutoDG™ Droplet Digital™ PCR System
(バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社)

欠点がある。一方、ドロップレットデジタルPCR法（ddPCR法、図4）は絶対定量が可能であり、検量線や相対評価に使用する基準の遺伝子を同時に評価する必要がないため、定量PCR法と比較して同時に多検体の結果を得ることができる。ddPCR法はドロップレットオイルで形成した微小なドロップレットにサンプルを限界希釈し、その中でPCRを実施する。陽性、陰性として判定した結果を用いて濃度を算出するために、PCR効率（プライミング効率）の影響が小さいこと、感度が高いことも利点である。

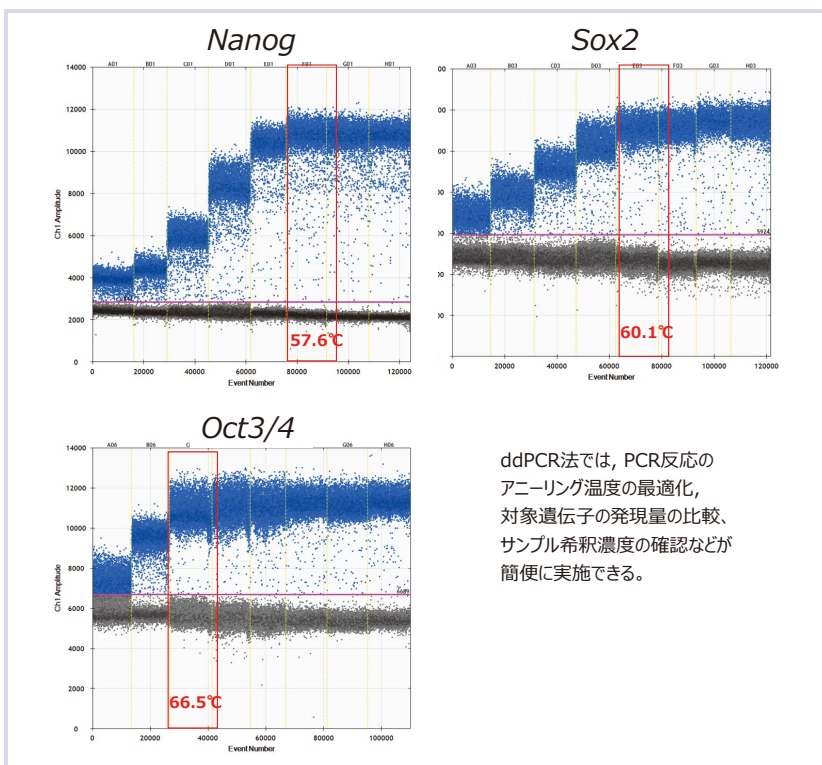


図5 ddPCR法 iPS細胞未分化マーカー発現解析結果

(1) ddPCR法を用いた遺伝子発現解析

iPS細胞の未分化マーカーを用いた発現解析試験は、細胞製品における未分化細胞の残存否定やiPS細胞ストックの品質評価を目的に実施される。当社はddPCR法を用いた、iPS細胞の*Nanog*、*Sox2*、*Oct3/4*を定量する分析法の確立を目的として、アニーリング温度、検体希釈量を確認するための検討を実施した。この結果、この濃度のサンプルにおけるアニーリング温度は、非特異的な反応がより少ないと考えられる*Nanog* 57.6°C、*Sox2* 60.1°C、*Oct3/4* 66.5°C付近が適当であることが示唆された（図5）。ddPCR法は定量PCR試験設計のためのHouse Keeping遺伝子の発現量の確認、特性解析としての複数のターゲット遺伝子による発現解析、汚染検査や目的外細胞を検出する用途に有用と考えられる。

2.3 細胞製品の製造工程由来不純物分析

細胞製品の製造工程で使用する培養培地や保存液に含まれる成分のうち、有効成分である細胞と一緒に施術時に体内に入ってしまう物質で、残留量の管理が必要と考えられるものは、製造工程由来不純物として分析対象となる（図6）。一般的には微量元素（セレン、亜鉛）、低分子化合物（ROCKインヒビター（ROCK：Rho-associated protein kinase）、ジメチルスルホキシド（DMSO））、高分子化合物（ウシ血清アルブミン（BSA：Bovine Serum Albumin）やサイトカイン（成長因子他）、多糖類）、核酸（プラスミドDNAを含む）があげられる。特に公表データや一般毒性試験の結果に基づいて安全性の面でのリスクが否定できない成分については、最終製品中の残存量を厳格に評価する必要がある。また、これらの成分の分析には、ターゲットに応じた機器・分析法の選択、マトリクスが細胞など有機物を豊富に含有するためその干渉を低減する処理の検討が必要となる。

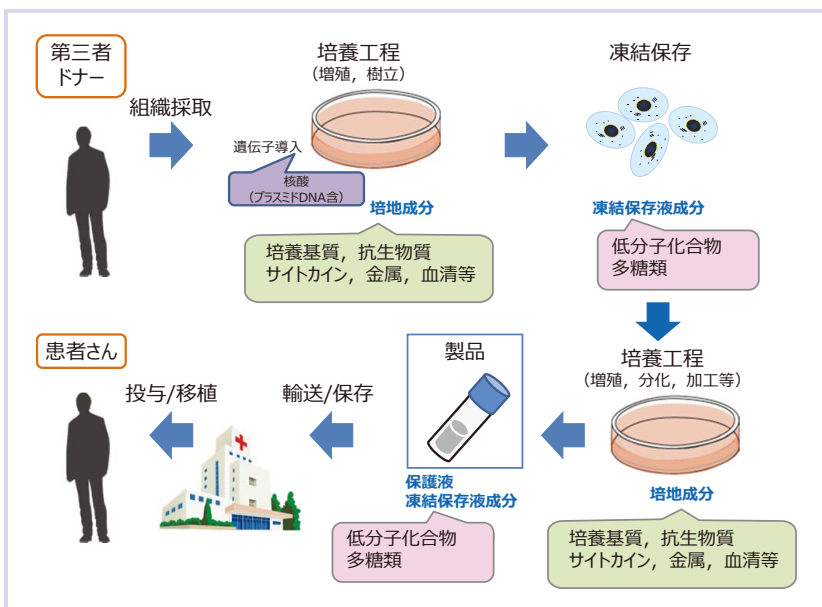


図6 細胞製品の製造フローと製造工程由来不純物

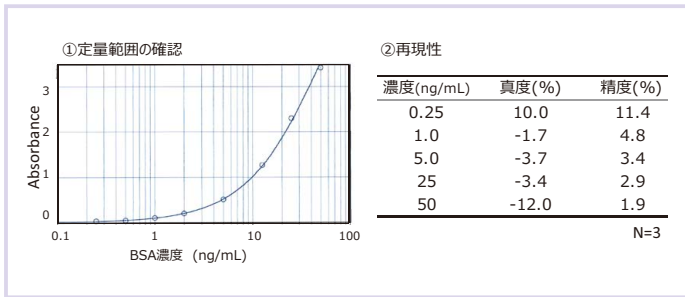


図7 ELISAによるBSA定量法 検討結果

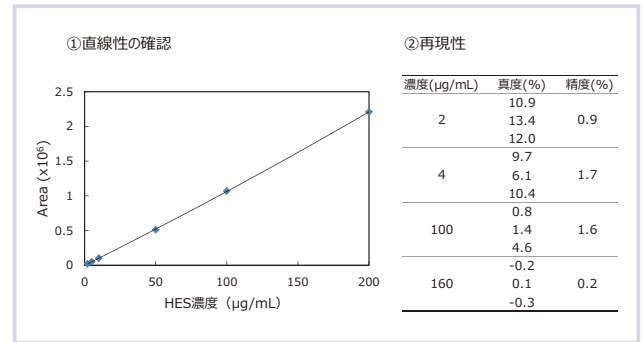


図8 LC-CADによるHES定量法 検討結果

(1) ウシ血清アルブミン (BSA) の分析

培養のための足場材料や培地には様々なタンパク質が用いられる。特に異種由来のタンパク質を製造工程で使用している場合はその残存量を評価し管理する必要が生じる。今回、細胞培養で汎用的に用いられているウシ胎仔血清 (FBS) の主成分であるBSAについて、MSC凍結ストック中の残存量をELISAにて定量した。市販のBSA ELISAキットを用いて、抗体反応時間、希釈率などを検討した結果、0.25～50 ng/mL (タンパク質抽出液中2～400 ng/mL相当) を定量範囲とする、良好な再現性のある分析法を確立した (図7)。

(2) 保存液中の高分子化合物の分析

細胞保存液には細胞凍結保存時の凍害防止や、輸送中の物理的・化学的からの保護の目的で高分子化合物 (多糖類) を含有するものが多い。これらは臨床現場で細胞製品を使用する際に場合によっては成分の残存量の定量、除去が必要ならばその除去効率の評価が求められる。今回は細胞保存液として使用されることもある凍害保護液に含まれる多糖類、ヒドロキシエチルスターチ (HES) を分析し、保存液中の多糖が洗浄操作においてどの程度除去されるのかを評価した。測定にはHPLCに荷電化粒子検出器 (CAD: Charged Aerosol Detector) を接続した装置を使用した。CADはUV吸収がない、繰り返し構造である高分子ポリマーの分析に有用である。2～200 μg/mLの範囲で良好な直線性と再現性を示す分析法を確立し (図8)、HES含有細胞懸濁液に対して洗浄液添加、遠心操作、上清回収を3回繰り返して得た回収液を評価したところ、除去率はほぼ100%であった。

(3) 保存液中の低分子化合物 (DMSO) の分析

細胞保存液には細胞凍結保存時の凍害防止のために低分子のDMSOが5～10% (v/v) の濃度で含まれることが多い。DMSOは濃度によっては細胞毒性を示し、残存量の確認や除去が必要な場合がある。当社では、GC-MSを用いてDMSOの定量法を検討した。細胞の洗浄や移植直前の保存液として一般的に使用されるHBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) は糖や塩類を多く含むためGC-MS分析において障害となる。前処理方法を検討することで、0.5～50 μg/mLの範囲で直線性が確認でき、良好な再現性を有する分析法を確立した (図9)。

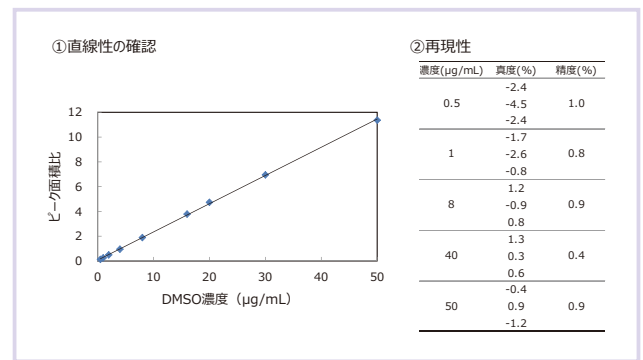


図9 GC-MSによるDMSO定量法 検討結果

3 おわりに

再生医療等製品を、難病、希少疾患の患者さんや治療手段が限られている疾患の患者さんへ、新しい医療として速やかに届けるために、その開発における評価法、分析法の構築の部分を担当する当社の責務は重要であると考えている。今後も様々なニーズに応えると同時に、新規の技術に関しては国際標準法とされる分析法の確立にも貢献できるよう、技術開発を進めていきたい。

文献

- 再生医療等製品の安全性の確保等に関する法律 (平成二十五年法律第八十五号), available from < <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10800000-Iseikyoku/0000030847.pdf> >, (accessed 2018-05-24) .
- 独立行政法人医薬品医療機器総合機構: 再生医療等製品 (ヒト細胞加工製品) の品質、非臨床安全性試験及び臨床試験の実施に関する技術的ガイダンス (2016.6.14), available from < <https://www.pmda.go.jp/files/000212850.pdf> >, (accessed 2018-04-23) .



岩田 美紀
(いわた みき)
技術開発センター



寺井 織枝
(てらい おりえ)
技術開発センター



北中 淳史
(きたなか あつし)
技術開発センター