

細胞シートヒト臨床応用にむけた製造施設 および管理体制の構築

高木 亮

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所



当研究室において開発された温度応答性培養皿によって、培養した細胞に低温処理を行なうだけで、移植可能な人工組織の作成が可能となった。これまでに、角膜輪部および自己口腔粘膜をもちいて作製された培養上皮細胞シートが角膜上皮細胞の幹細胞疲弊症の治療に応用され、新しい再生医療の一分野、細胞シート工学として、近年注目を集めている。

現在、再生医療の為の細胞培養工程は、薬の製造・品質基準である **GMP (Good Manufacturing Practice)** 省令に準拠して行なわれなければならない。当研究所においても細胞シートによる再生医療を目指すにあたり、**GMP** に準拠した細胞調製施設、セル・プロセッシング・センター (**CPC**)の運営の立ち上げを行なった。本報告書において、この **CPC** の施設 (ハード) の概要を述べると共に、その施設管理機構 (ソフト) について、合わせて概説する。

1. 緒言：近年ティッシュエンジニアリングの発展に伴い、失われてしまった組織そのものを再生しようという、いわゆる再生医療が注目を集めている。この新しい医療概念を支える重要な礎となったティッシュエンジニアリングは主に、細胞を成長因子等の可溶性因子、そしてその細胞の足場となる高分子素材 (スキャフォールド) とを組み合わせた移植グラフトを用いて組織再生を促すという手法であるといえる。しかしながら、上記手法を用いて構築される組織は、その構造上、間質に富む組織に限定される恐れがある。そしてそれは、主に細胞から成り立つ多くの組織の再生を、どのようにエンジニアリングするかという新しい問題にたどり着ききっかけであったとも考えられる。

そのような中、当研究室において開発された温度応答性表面による細胞培養器材の開発は、上皮組織や筋組織のような細胞に富む組織構築を目指した再生医療において、有用かつ新しい組織工学の一手法であると考えられる。この温度応答性培養表面による細胞シートは、温度を下げるだけで、シート状に培養した細胞を回収する事によって作製できる。これは、トリプシンやディスパーゼといったタンパク質分解酵素を用いる必要がないため、非侵襲的に細胞間接着を保持した状態の細胞として回収することができる。既に上皮組織において、Green らの開発した **3T3** フィーダーレイヤー法によって培養人工皮膚に応用されてきた。そのような中、東北大学の西田幸二教授らとの共同研究により、温度応答性培養器材

による培養上皮細胞シートを用いた角膜上皮組織再生の臨床応用に成功している。これは、熱・化学腐蝕やスティーブンス・ジョンソン症候群といった上皮幹細胞疲弊症によって失われた視力を、自己角膜輪部あるいは自己口腔粘膜由来の培養上皮細胞シートによって回復したというものである。当研究室においても、表層性食道癌への内視鏡的粘膜切除術および内視鏡的粘膜下層切開剥離術による、術後の人工潰瘍面の創傷治癒促進を目的として、移植可能な口腔粘膜上皮細胞由来細胞シートの作成の為に検討実験を行っており、大木らによってイヌのモデルにおいて良好な結果を得る事に成功した。さらに、村上らの研究において、温度応答性セルカルチャーインサートを用いる事で、3T3 フィーダーレイヤーを用いず、さらには自己血清を用いる事で、重層化したヒト口腔粘膜上皮細胞シートの作製に成功した。これらの結果から、内視鏡下にて行なわれた表層性食道癌切除後の人工潰瘍面の創傷治癒の促進に培養自己口腔粘膜上皮細胞シートの応用に用いる事が可能であると判断し、臨床研究に乗り出す事にした。

2. 製品標準書および標準作業手順書 (SOP) の作成：現在、培養した細胞を実際の臨床に用いるには、薬の製造・品質基準である GMP (Good Manufacturing Practice) 基準に準拠して調製されなければならない。そこで、株式会社セルシード品質保証部／開発推進室／文書・資材管理室の協力のもとに、「自己培養口腔粘膜上皮細胞シート製品標準書」の作成を行なった。この製品標準書により、口腔粘膜組織採取工程、口腔粘膜上皮細胞シート作製

工程、品質検査工程、原材料／試薬等の管理、等の明確な記述がなされた。次に、製品標準書に示された作業工程が、当研究室ハイテクリサーチセンターによるセル・プロセッシング・センター(CPC)にて運営が可能であるかどうか考慮した上で、SOP および製造指図・製造記録書の作成を行なった。

3. 製造施設設計 (ハードウェア面)：今回の対象とする、ヒト培養口腔粘膜上皮細胞シート作製施設は、取り扱う原材料の特性上、バイオハザードの面において対策を考慮しなければならない。さらにいえば、最終製品 (培養口腔粘膜上皮細胞シート) が、被験者に移植される事を考慮して、無菌的製造施設である事が求められる。そうした事をふまえ、CPC は差圧管理、清浄度ゾーニング区分管理、作業員および原材料・最終製品の導線を考慮した設計がなされている。また、施設内に流れる空気は、高清浄度を維持する為に、大気を HEPA (High efficiency particulate air) フィルターによって濾過して給気される。Figure 1 は、ゾーニングされた各部屋の室圧および清浄度、空気の流れ、この CPC における、作業員、原材料・最終製品の理想的と考えられる動線を示した。採取組織からの細胞調製、培養、出荷判定等の一連の製造工程は細胞操作室にて行なわれるが、操作室の室圧が $\pm 0\text{pa}$ であるのに対し、この部屋の作業員の入り口にあたる前室-3 は $+30\text{pa}$ 、出口にあたる後室-2 は -15pa 、副室-2 は $+15\text{pa}$ となっている。これは、空気の流れが示すように、細胞操作室内の空気は、外部に漏らさない設計となっている。これは、原材料のバイオハザード面を

考慮して設計されて差圧管理がなされていることを示す。また、ゾーニングされた清浄度は、細胞操作室内の安全キャビネット内のクラス 100 (100 微小粒子数/ft²)を最高清浄度として、作業者がそこにたどり着くまでに、非管理区域からクラス 100,000、10,000 へと清浄度が上がっている事が見てとれる。

4. 製造施設の管理概要(ソフトウェア面): これまでに示した CPC は、製造施設性能の点からいえば今回のヒト培養口腔粘膜上皮細胞シートの作製に十分対応しうるものであると考えられる。しかしながら、当施設の本来の性能を維持する為に、製造施設の管理方法(ソフトウェア)についても考えなければならない。そこでまず、当施設において、清浄度維持の指標として空気中微粒子の監視を行っている (Figure2 A)。このモニタリングシステムによって、Figure2 B の示すように、過去の入室記録からその時の室内空気中微粒子量の変動について確認をすることができ、その部屋の清浄度基準を満たしていたかどうかをトレースする事ができる。また、CPC に持ち込むものについては、高圧蒸気滅菌をかけるよう規定し、前室-1 にオートクレーブを設置し、パスボックスを通じて管理区域内に搬入する事ができる (Figure2 C, D)。前室-2 (Figure2 E) は、作業者の付着物由来の汚染防止の為に一次ガウニングを行なう部屋とし、この奥で作業を行なう場合、例えば材料保管室においては一次ガウニングされていなければならない (Figure2 G)。クラス 10,000 の管理区域である、細胞操作室 (Figure2 F) に入室するには、前室-3 において二次ガウニングを行なわ

なければならない (Figure2 H)。こうした過程を経て、細胞操作室まで入室し、実際の細胞培養操作を行なうが、持ち込んだ検体はバイオハザード対応にて扱われる。従って、製造工程において使われた器具、ガウニング類は、Figure2 I に示すように、細胞操作室の出口にあたる後室-2 において高圧蒸気滅菌を行なうと規定した。これらの規定以外にも、製造施設管理について、例えば試薬の調製法や細胞調製/培養工程、施設清掃からガウニング類のクリーニングにいたるまで、すべて SOP に明記されている (Table 1)。また、ここに示された手順書を基に、製造指図・製造記録書を作製した。Figure3 A の示す、細胞操作室内の実際の製造作業工程は、作業者 (写真左) と、製造指図および記録者 (写真右) が示されている。この時つけられた記録書 (Figure3 B, C) は、作業を行った日付、実施作業、逸脱の有無、記録者のサインが示されている。これにより、実際に行なわれる作業が手順書に則って行なわれ、その時の記録が残せるような仕組みとなっており、最終製品のトレーザビリティ、製品保証を担保するように構築されている。

5. 結語: 今回、表層性食道癌への内視鏡的粘膜切除術および内視鏡的粘膜下層切開剥離術による、術後の人工潰瘍面の創傷治癒促進を目的とした培養口腔粘膜上皮細胞シート製造のための設備 (ハードウェア) および管理機構 (ソフトウェア) の構築を行なった。これらは、GMP 基準での製造・品質基準を満足すべく行ってきたが、原材料ともいべき被験者由来口腔粘膜組織自体が、または最終製品

自体の有効性等において、品質の不確かさを
含むものである為、完全に **GMP** に対応させ
る事が不可能な点が幾つかある。そのような
問題を抱える中、今回我々は再生医療の為の
GMP に準拠したハード・ソフトの構築および
提案を行なった。これらの事が、今後の再生
医療の為の組織工学的手法による製造工程の
モデルの一つになりうるものである事を期待
する。

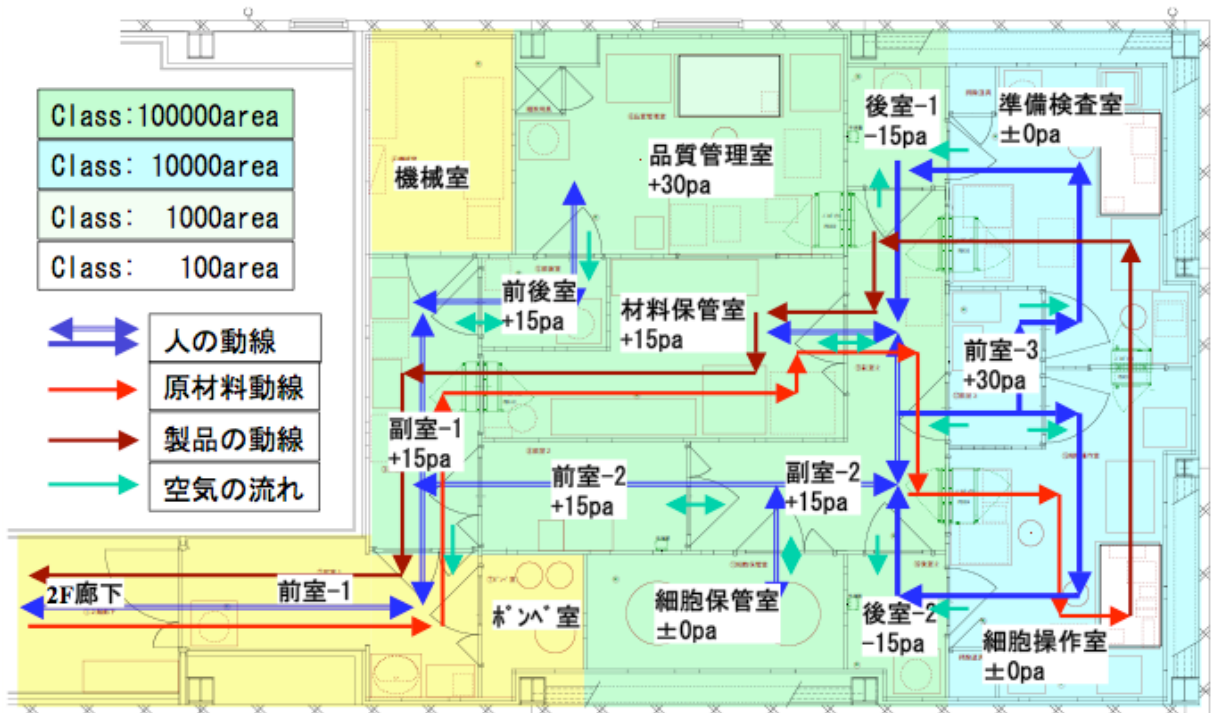


Figure 1 CPCの施設概要

CPC内のゾーニングされた各部屋の名称、室圧および清浄度、空気の流れ、作業者および原材料・最終製品の理想的と考えられる動線を示す。

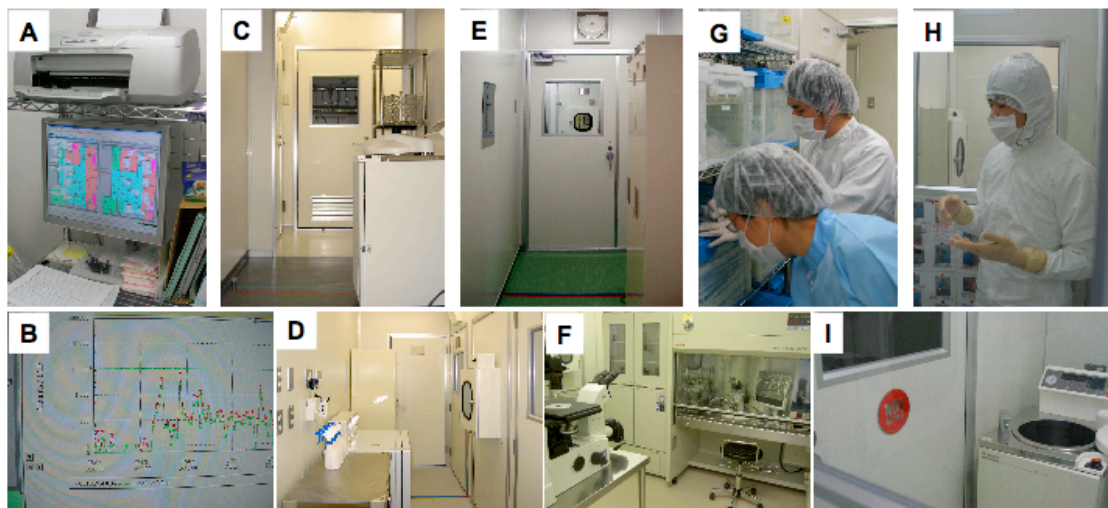


Figure 2 CPC施設内の写真

AおよびB: CPCモニタリングシステム. C: 前室-1. D: 副室-1. E: 前室-2. F: 細胞操作室.
G: 材料保管室で作業する一次ガウニングされた作業者. H: 前室-3において二次ガウニングを行なった作業者. I: 後室-2のオートクレーブ.

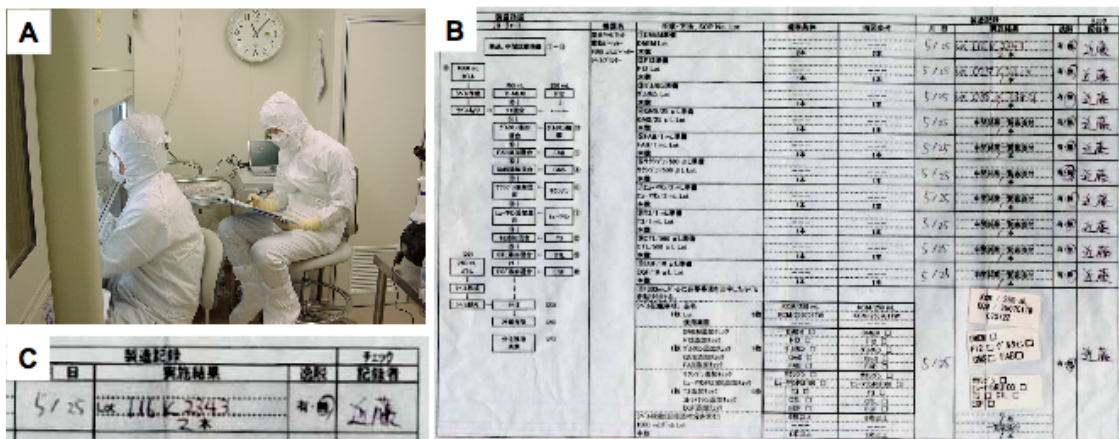


Figure 3 CPC施設内における製造工程作業.

A: 細胞操作室内での作業工程の様子. 写真左: 作業者. 写真右: 製造作業指図および記録者. BおよびC: 実際に使用された製造指図・製造記録書.

作業標準書番号	作業標準書名
E001	DMEM(-)の調製・分注手順
E002	DMEM(PS)の調製手順
E003	ファンギン調製・分注手順書
E004	ユジシ・硫酸ストロブトマイシ調製・分注手順書
E005	カカシ調製・分注手順書
E006	EGF溶液調製・滅菌分注手順書
E007	T3調製・分注手順書
E008	コレトキシ調製・滅菌分注手順書
E009	ヒューマリン分注手順書
E010	インジン分注手順書
E011	デイスパーゼ溶液調製・滅菌分注手順書
E012	トリプシンの融解・分注手順書
E013	トリプソリン分注手順書
E014	クイオグー分注手順書
E015	KCM調製・分注手順書(コレトキシ添加)
E016	KCM+5%血清調製手順書(HS)
E017	自己血清作製手順書(非働化なし)
E118	凍結保存液の調製手順書
E119	PVDFメンブレンの作製手順書
E101	口腔粘膜組織採取手順書
E102	口腔粘膜組織の消毒手順書
E103	口腔粘膜上皮細胞の単離手順書
E104	口腔粘膜上皮細胞の播種手順書
E105	口腔粘膜上皮細胞の細胞数測定手順書
E106	口腔粘膜上皮細胞の培養手順書
E107	培養口腔粘膜上皮細胞シートの移送手順書
E108	培養口腔粘膜上皮細胞シートの剥離手順書
E201	委託試験用検体取扱手順書(SRL)
E202	培養口腔粘膜上皮細胞シートの細胞数及び生存率測定試験手順書
E203	培養上清pH測定試験手順書
E204	培養口腔粘膜上皮細胞シート外観確認手順書
E205	培養口腔粘膜上皮細胞シート固定手順書
E206	培養口腔粘膜上皮細胞シート剥離試験手順書
E207	培養口腔粘膜上皮細胞シート純度測定試験手順書
E208	培養口腔粘膜上皮細胞シートの参考品凍結手順書
001	冷凍冷蔵庫使用手順書
002	冷蔵庫使用手順書
003	-30℃冷凍庫使用手順書
004	炭酸ガス培養装置の使用手順書
005	安全キャビネットの使用手順書
006	オートクレーブ使用手順書
007	乾燥機使用手順書
008	倒立位相差顕微鏡の使用手順書
009	スターラー使用手順書
010	電動ビクター使用手順書
011	マイクロビクター使用手順書
012	ラベルリッター使用手順書
013	遠心機使用手順書
014	サーモプレート使用手順書
015	輸送容器の使用手順書
101	CPC準備室から前室1、ボンベ室、副室1、機械室への入退室手順書
102	副室1から副室2、細胞保管室、材料保管室への入退室手順書
103	副室2から前室3、細胞操作室への入退室手順書
104	CPC入室前手洗い、手指消毒手順書
105	資材搬入手順書
106	製造指図・製造記録書滅菌手順書
107	表示ラベル滅菌手順書
108	EOG滅菌提出手順書(女子医大付属病院設備使用)
109	作業着クリーニング依頼手順書
110	CPC清掃手順書
111	CPC環境モニタリング使用手順書
112	CPC環境菌(浮遊、付着菌)測定手順書
113	CPC定期点検実施手順書
114	CPC受電設備点検立ち会い手順書
115	CPCサンクション依頼手順書

Table 1 作成された標準作業手順書(SOP)一覧