

専門職種向け等

A.細胞調製

国立研究開発法人 日本医療研究開発機構
臨床研究・治験推進研究事業

先端医療開発を担う人材養成のための 標準化教育プログラムの策定と
実践研究班



A. 細胞調製

①細胞治療と法律

- 1)再生医療等製品と薬機法及び
特定細胞加工物と再生医療等安全性確保法

再生医療関連法3法とは？



細胞治療に関する法律が施行され、細胞治療・細胞調製に関しても法律とは無関係ではいられない。造血幹細胞移植、再生医療、免疫療法、遺伝子治療等、さまざまな形での細胞治療がある。ここでは、細胞治療のタイプと適応される法律について述べる。詳細は、各法律の説明に委ねる。

再生医療や免疫療法等を含む細胞治療に関しては、平成25年4月に同じく議員立法にて「再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするために施策の総合的な推進に関する法律」が成立し、5月10日公布・施行され、この関連法規が適応されることとなった。これらの関連法規を図2に示す。製造・販売を目的として、医師主導治験を含めた治験を実施する場合には、旧薬事法が改正された「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性確保等に関する法律（医薬品医療機器等法）」により規定され、製造については、「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令（GCTP省令）」によって規程されることとなった。非治験の再生医療は、従来は「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」下で実施されていた。「再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成25年第85号）」施行後は、これに含まれ、同指針は廃止となっている。

再生医療等安全性確保法のポイントは、

- (1) リスクに応じた再生医療安全確保法の手続きが必要です。第一種、第二種、第三種に分けられ、それぞれに必要な手続きがあります。
- (2) 第一種と第二種は特定認定再生医療等委員会の意見を聴き、第三種は認定再生医療等委員会の意見を聴くことが必要です。
- (3) 細胞加工施設の基準が明確に示されました。
- (4) 特定細胞加工物の製造は許可制（医療機関の場合は届け出制）になり、細胞加工の外部委託が可能になりました。
- (5) 特定細胞加工物の適正な提供のための措置（インフォームド・コンセントや疾病報告、定期報告など）が示されています。

再生医療推進法の成立に伴い、再生医療を実施するための基本的枠組み、ルールを示した法律である。本法における再生医療等提供行為の規制は、二つの柱から成り立っている。一つは、再生医療等の提供行為に、「再生医療等提供基準」の遵守義務を課したこと、もう一つは事前の手続きとして、基準適合性の関し「再生医療等委員会」の意見を聴く手続きと研究計画の厚生労働大臣への提出を義務づけたことである。

再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするために施策の総合的な推進に関する法律 平成25年月10日公布・施行

1) 目的と理念

- ・ (目的) 第一条 その研究開発及び提供並びに普及の促進に関し、基本理念を定め、国、医師等、研究者及び事業者の責務を明らかにするとともに、再生医療の研究開発から実用化までの施策の総合的な推進を図り、もって国民が受ける医療の質及び保健衛生の向上に寄与することを目的とする。
- ・ (基本理念) 第二条 一 治療等に際して、最先端の科学的知見等を生かした再生医療を世界に先駆けて利用する機会が国民に提供されるように施策を進めるべきこと。
- ・ 四 世界に先駆けて、我が国で再生医療を実用化することを通じ、国際的な医療の質及び保健衛生の向上並びに研究開発の一層の促進に寄与すること。

再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするために施策 の総合的な推進に関する法律 平成25年月10日公布・施行

2) 責務と助成

- ・ (医師等及び研究者の責務)

第四条 医師その他の医療関係者 (第十四条第一項において「医師等」という。) 及び研究者は、国が実施する再生医療の迅速かつ安全な研究開発及び提供並びに普及の促進に関する施策に協力するよう努めなければならない。

- ・ (再生医療に用いる細胞の培養等の加工を行う事業者の責務)

第五条 再生医療に用いる細胞の培養等の加工を行う事業者は、国が実施する再生医療の迅速かつ安全な研究開発及び提供並びに普及の促進に関する施策に協力するよう努めなければならない。

- ・ (先進的な再生医療の研究開発の促進)

第八条 国は、先進的な再生医療の研究開発を促進するため、大学等で行われる先進的な研究開発に対する助成、研究開発の環境の整備等の必要な支援を行うものとする。

再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするために施策 の総合的な推進に関する法律 平成25年月10日公布・施行

3) 環境と体制の整備

1. 再生医療を行う環境の整備
2. 臨床研究環境の整備→薬機法改正
3. 再生医療製品の審査体制の整備

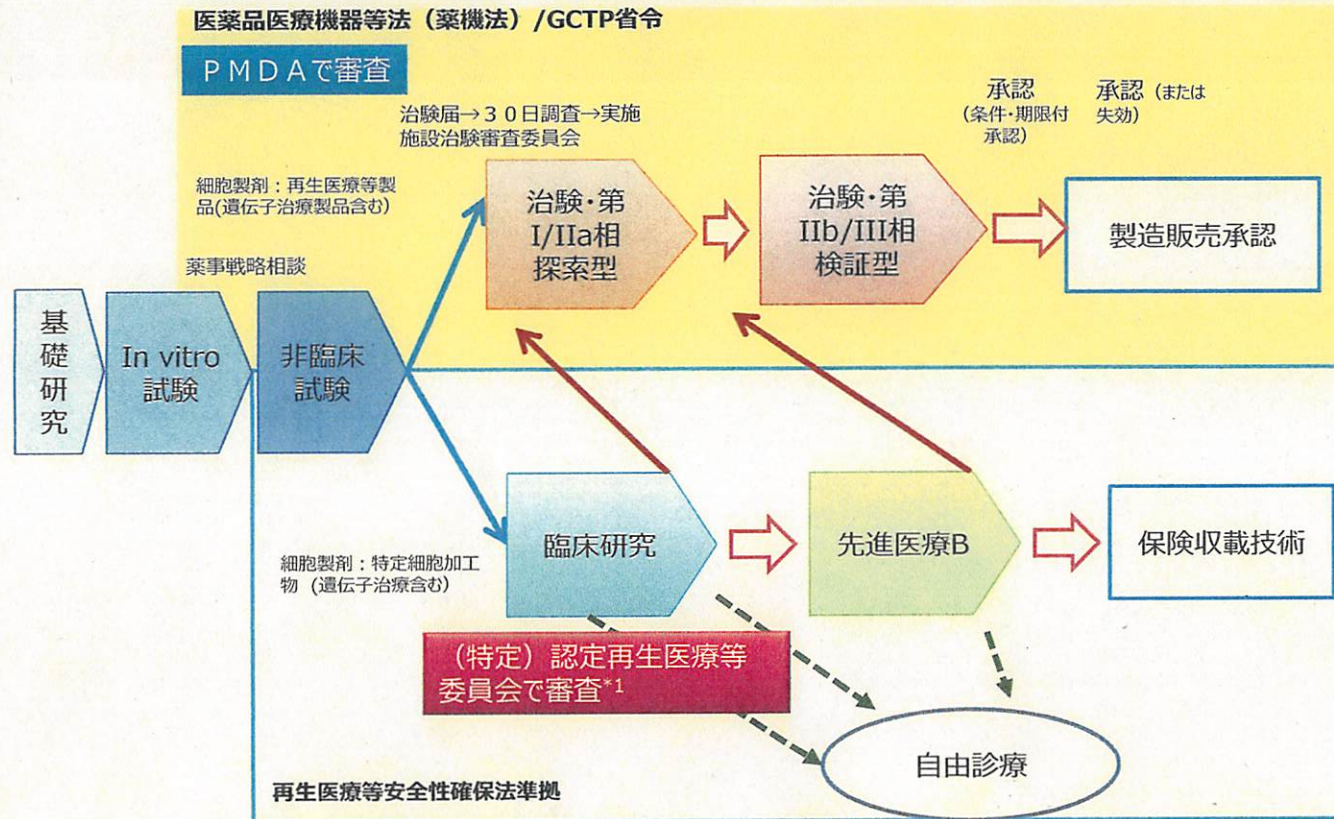
4) 人材の確保等

第十三条 国は、再生医療に関する専門的知識を有する人材の確保、養成及び資質の向上に必要な施策を講ずるものとする。

5) 安全面及び倫理面の配慮等

- ・第十四条 、、医師等、研究者及び事業者による活動の確保に留意しつつ、再生医療の特性に鑑み、安全性を確保するとともに生命倫理に対する配慮をしなければならない。

細胞製剤の開発トラックからみた規制等



*1第1～2種は特定認定、第3種は認定再生医療等委員会。第1種→厚生科学審議会→厚生労働大臣→90日間提供制限後に提供開始。第2～3種は、厚生労働大臣へ提出後提供開始。

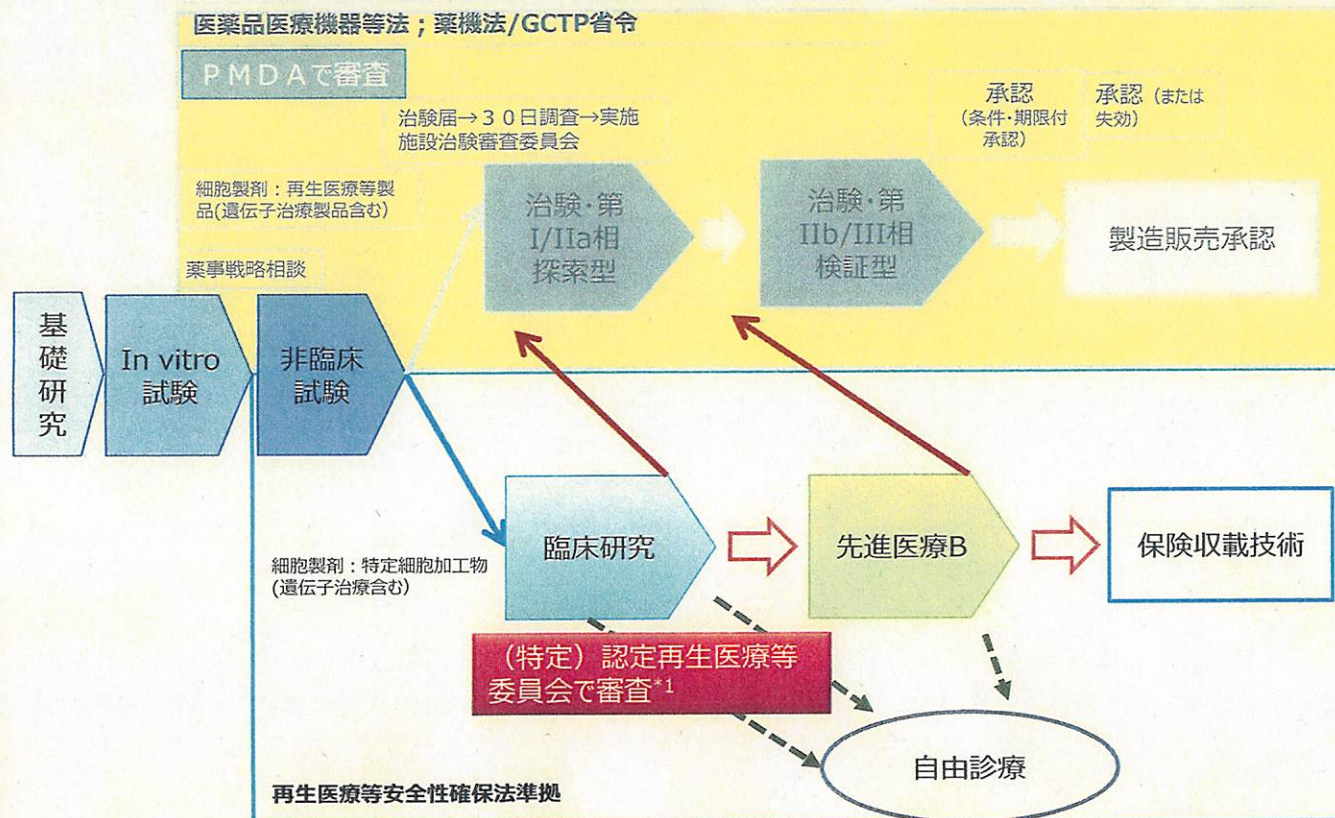
細胞治療認定管理師制度テキストより抜粋



A. 細胞調製

②特性細胞加工物の製造

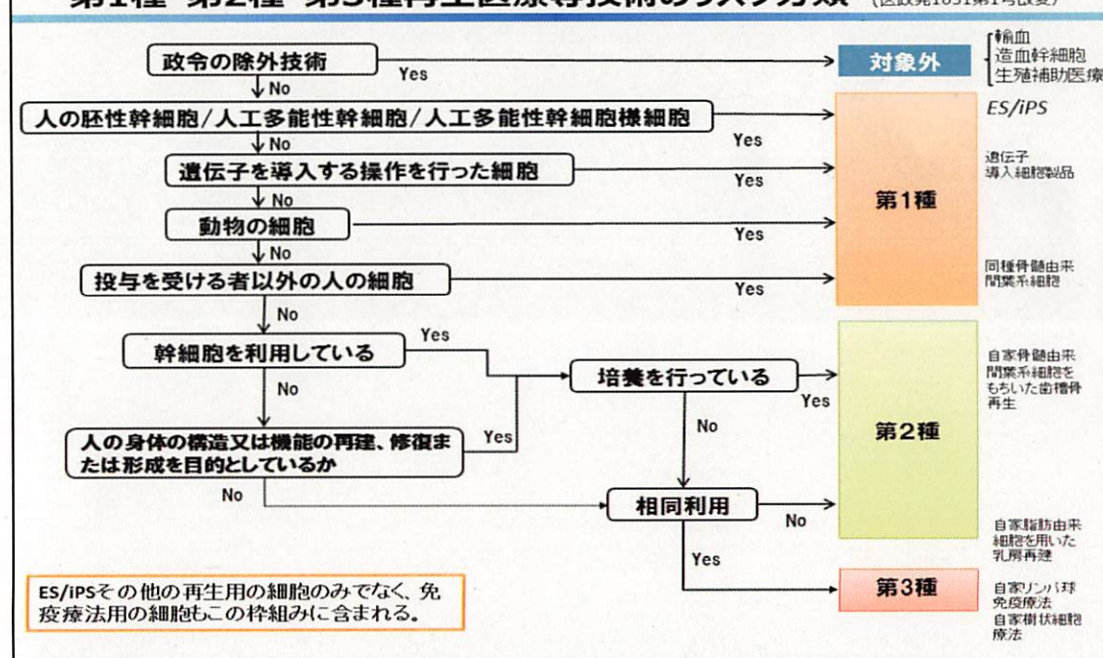
細胞製剤の開発トラックからみた規制等



*1第1～2種は特定認定、第3種は認定再生医療等委員会。第1種→厚生科学審議会→厚生労働大臣→90日間提供制限後に提供開始。第2～3種は、厚生労働大臣へ提出後提供開始。

細胞治療認定管理師制度テキストより抜粋

第1種・第2種・第3種再生医療等技術のリスク分類 (医政発1031第1号改定)



再生医療等について、人の生命及び健康に与える影響の程度に応じ、第1種から第3種に3分類されています。①輸血、②造血幹細胞移植(遺伝子を導入した造血幹細胞またはiPS細胞等から作製された造血幹細胞を用いるものを除く。)、③生殖補助医療:人の精子又は未受精卵に培養その他の加工を施したものをを用いる医療技術の3項目である。

(1) 第一種再生医療等技術

第一種再生医療等技術とは、ES細胞、iPS細胞や、皮膚の繊維芽細胞からiPS細胞を経ずに直接作成された神経幹細胞(iPS様細胞)などを用いた技術や、生体外(ex vivo)に取り出した細胞に遺伝子を導入し、それを体内に投与する技術が挙げられる。悪性腫瘍に対するリンパ球活性化療法のうち、リンパ球に遺伝子を導入したキメラ抗原受容体(CAR)発現T細胞などが相当する。また、動物の細胞を含む細胞を投与する場合や、同種細胞を培養や加工した細胞を投与する場合も第1種に相当する。In vivoでの遺伝子治療は引き続き厚生労働省遺伝子治療臨床研究審査委員会が担う事になる。

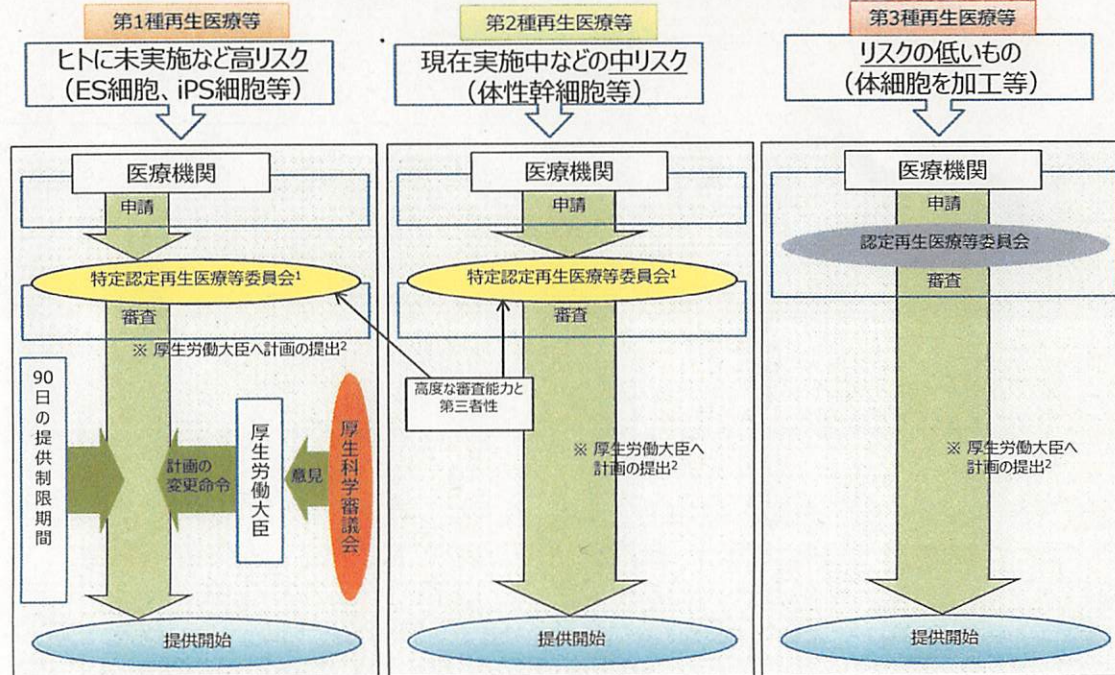
(2) 第二種再生医療等技術

幹細胞を用いた場合は、「培養を行なう技術」または、「培養は行わない」場合も「相同利用ではない」技術は第二種となる。「培養を行わない」とは、幹細胞を分離し、培養することなく短期間で体内に投与する場合をさし、「相同利用」は、採取した細胞が、治療を行おうとする部位の細胞と同様の機能を持つ細胞の投与方法をいう。例えば、腹部から脂肪細胞を採取し、脂肪組織由来幹細胞を分離して、乳がん術後の乳房再建目的で投与する場合は相同利用にあたるが、脂肪組織由来幹細胞を糖尿病治療目的で経静脈的に投与することは相同利用に当たらない。

(3) 第三種再生医療等技術

第一種および第二種再生医療等技術に該当しない場合、第三種となると記載されています。免疫担当細胞を用いたがん免疫療法が、「身体の構造又は機能の再建、修復又は形成を目的」ではなく、「相同利用」の技術に相当する。培養したリンパ球等を静脈内投与ではなく、皮下や腹腔内投与の場合も「相同利用」にあたり、第三種再生医療等技術に相当する。

リスクに応じた再生医療等提供の手続き



(注1)「認定再生医療等委員会」とは、再生医療等技術や法律の専門家等からなる合議制委員会であり、一定の手続きにより厚生労働大臣の認定を受けたものをいう。「特定認定再生医療等委員会」は、認定再生医療等委員会のうち、特に高度な審査能力、第三者性を有するもの。

(注2) 厚生労働大臣への提供計画の提出の義務を課す。提供計画を提出せずに再生医療等を提供した場合は、罰則が適用される。 **1-2.再生医療等安全性確保法**

(1) 第三種再生医療等技術

第三種再生医療等技術を提供する際には、①あらかじめ再生医療等提供計画を厚生労働大臣に提出すること、②再生医療等提供計画を提出する前にあらかじめ「認定再生医療等委員会」の意見を聴くこと、③認定再生医療等委員会は厚生労働大臣の認定を受けなければならない。基本手続きとして、厚生労働大臣への届け出に加えて、認定再生医療等委員会の意見聴取が要件である。

(2) 第二種再生医療等技術

第二種再生医療等技術については、基準適合性の判断を「特定認定再生医療等委員会」が担う。認定再生医療等委員会の構成員と比較して、より専門性の高い組織になっている。それ以外の要件は第三種と変わりはない。

(3) 第一種再生医療等技術

基準適合性の判断を「特定認定再生医療等委員会」が担うのに加え、厚生労働大臣のチェックを受ける二重審査となっている。第一種再生医療等技術を提供する期間の管理者が、再生医療等計画書を提出してから90日間の提供制限期間が設けられている。厚生労働大臣には、90日間の間に、提供基準に適合しないことを理由に計画変更等の命令を発する権限が与えられている。この場合は、厚生科学審議会の意見を聴くことになっており、実際の判断は厚生科学審議会が担うことになる。第一種は許可制、その他は届出制と考えられる。認定再生医療等委員会も特定認定再生医療委員会の役割は、基準適合性のチェックであるが、意見陳述であり計画の審査承認ではないことに留意すべきである。また、委員会は倫理的・科学的妥当性の判断をも求められているのかは明確にされておらず、これらは当該施設の倫理委員会が担うことになるのかもしれない。

特定細胞加工物の製造に関する記録の保存 (法第45条)

記録事項

- ・ 特定細胞加工物に関する事項
- ・ 特定細胞加工物の提供医療機関に関する事項
- ・ 原料となる細胞に関する事項
- ・ 輸送に関する事項（方法及び輸送業者）等

保存期間

- ・ 指定再生医療等製品の原料と類似の原料からなる特定細胞加工物に係る記録は30年間
- ・ それ以外は10年間
(再生医療等製品も同様)

※ 特定細胞加工物製造事業者が作成した特定細胞加工物標準書、衛生管理基準書、製造管理基準書、品質管理基準書等の文書等についても同様の期間保存しなければならない

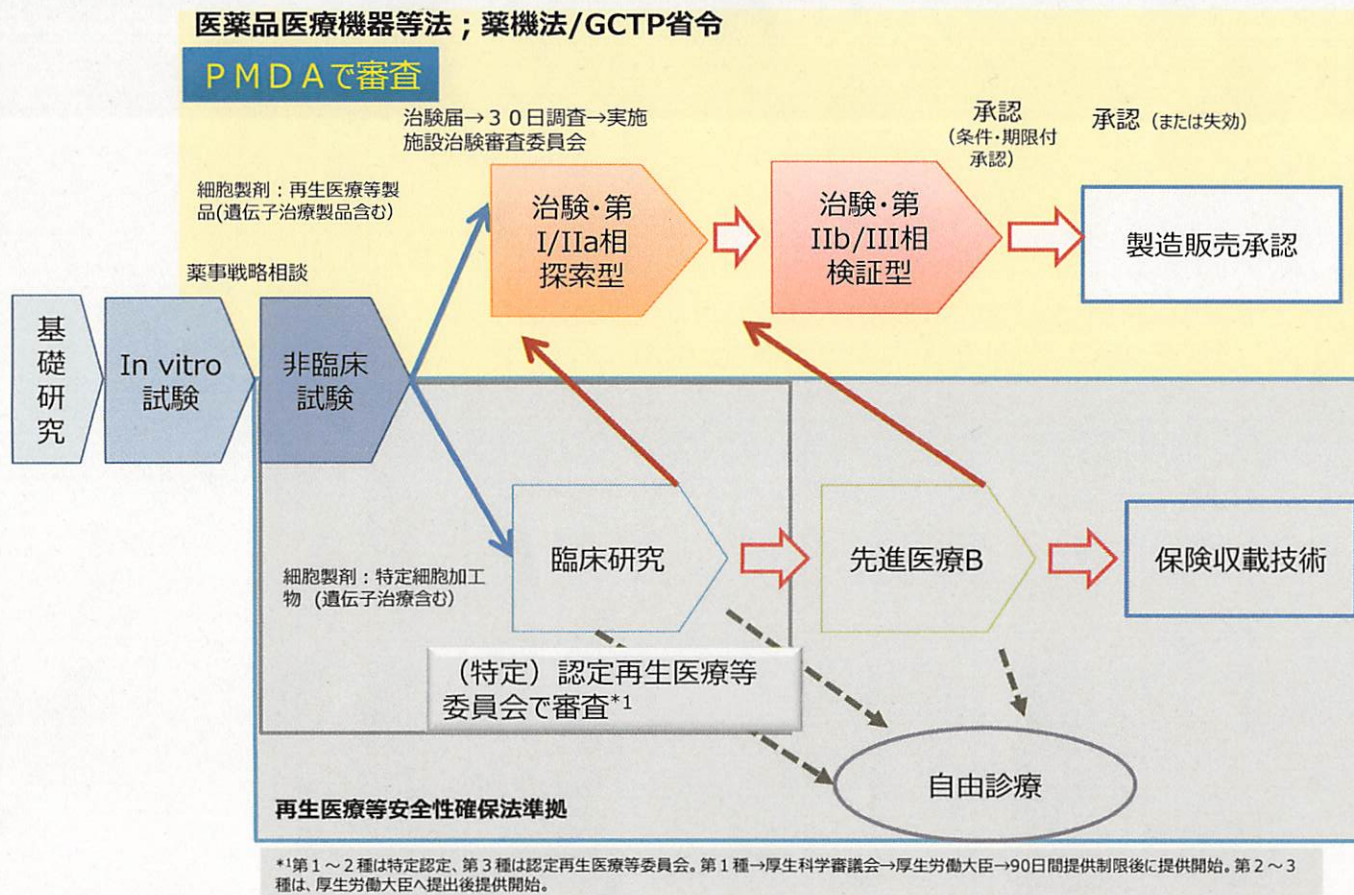
1-2.再生医療等安全性確保法



A. 細胞調製

③再生医療等製品の製造

細胞製剤の開発トラックからみた規制等



細胞治療認定管理師制度テキストより抜粋

再生医療等製品とは？

再生医療等製品は、以下に掲げる製品であって、政令で定めるものをいいます。

- (1) 人又は動物の細胞に培養等の加工を施したものであって、
 - イ 身体の構造・機能の再建・修復・形成するもの
 - ロ 疾病の治療・予防を目的として使用するもの
- (2) 遺伝子治療を目的として、人の細胞に導入して使用するもの

治験→医師主導治験か、企業治験か？

医師主導治験は、医師が自ら責任者となって行うものであるが、製造を医療機関で自ら製造したり、企業に製造を委託することができる。

製造→市販 販売は、販売業の許可が必要であり、国立大学法人では販売はできない。従って、医師主導治験が進んだ段階、あるいは早期から企業の協力が必要である。

再生医療等製品の製造管理および品質管理の基準に関する省令

(平成26年厚生労働省令第93号)

= GCTP (Good Genes Cells Tissue Practice) 省令

医薬品は、GMP 再生医療等製品はGCTP

市販用の製造管理、品質管理を適切に実施するための運用方法の枠組みを示したもの

- 第1条 趣旨
- 第2条 定義
- 第3条 適用の範囲
- 第4条 品質リスクマネジメント
- 第5条 製造部門及び品質部門
- 第6条 製造管理者
- 第7条 職員
- 第8条 製品標準書
- 第9条 手順書
- 第10条 構造設備
- 第11条 製造管理
- 第12条 品質管理
- 第13条 製造所からの出荷の管理
- 第14条 バリデーション又はバリフィケーション
- 第15条 製品の品質の照査
- 第16条 変更の管理
- 第17条 逸脱の管理
- 第18条 品質等に関する情報及び品質不良等の処理
- 第19条 回収処理
- 第20条 自己点検
- 第21条 教育訓練
- 第22条 文書及び記録の管理
- 第23条 記録の保管の特例

赤：GCTPで新たに規定された事項

紫：再生医療等の製品の特性を踏まえた事項が考慮

再生医療等製品の製造管理および品質管理の基準に関する省令は、Good Genes Cells Tissue Practice 略してGCTP省令と呼ばれます。その構成は第1条から23条からなり、いわゆる医薬品GMPと異なる点は、品質リスクマネジメント、バリフィケーション、製品の品質の照査が加えられたことです。

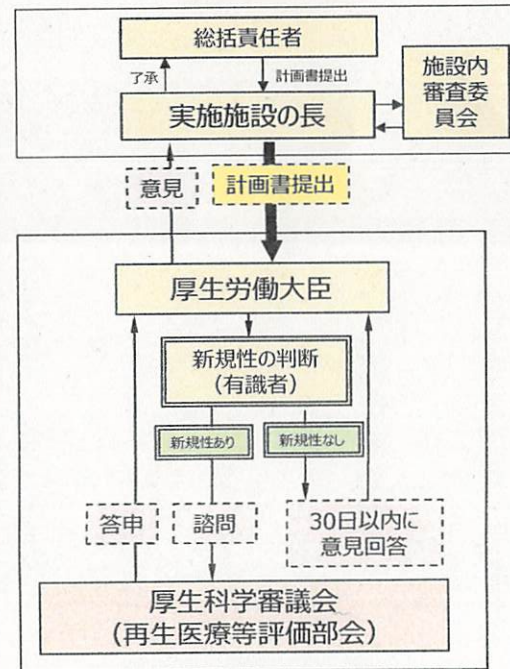


A. 細胞調製

④遺伝子細胞治療関連法規

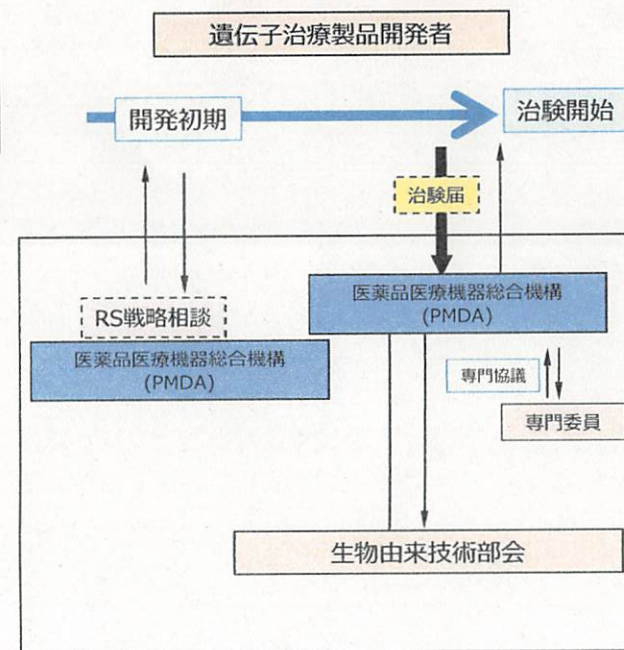
遺伝子細胞治療関連法規と審査体制

臨床研究



遺伝子治療等臨床研究に関する指針

薬機法上の治験



遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針

細胞治療認定管理師制度テキスト 山口照英より抜粋

昨年より遺伝子すなわち、治療学会も遺伝子細胞治療学会に名称変更されましたが、ほかの細胞治療用と同様に臨床研究と薬機法に則った申請パターンとなっています。臨床研究として患者への投与を行い、当該遺伝子治療の有効性や安全性を評価するものと、薬機法に従って、遺伝子治療製品としての開発を目指すものです。前者において、患者に直接ウイルスベクター等を投与するin vivo遺伝子治療の場合には、専門委員により新規性の判断が行われた後に、再生医療等評価部会にかけられる。一方、ウイルスベクターやプラスミドにより体外で遺伝子改変された細胞を患者に投与するex vivo遺伝子治療の場合には、再生医療等安全性確保法第Ⅰ種として、特定認定再生医療等委員会にかけられる。その後の申請は、第Ⅰ種と同様です。薬機法での申請の場合には、PMDAとのレギュラトリーサイエンス戦略相談を受けた後に治験届が提出され、治験が開始します。

A. 細胞調製

⑤細胞調製に関する施設基準 —CPCと運用について—

1. 細胞調製の施設と届出・許可について
2. 清浄度
3. 室圧、空調
4. クリーンベンチと安全キャビネット
5. 動線と服装
6. 清掃、廃棄処理、防虫、防鼠対策等

細胞を調製するには、無菌性、粉じんのコントロールされた環境である細胞調製室、クリーンルームが必要です。ここでは、施設基準と実際の運用について、私どもの経験も踏まえて考えてみましょう。

細胞調製の施設と届出・許可について

	再生医療等安全性確保法 (特定細胞加工物)	薬機法 (再生医療等製品)
構造設備	構造設備基準法第42条に基づく基準 (省令) 院外：許可 (PMDA調査) 海外：認定 (PMDA調査) 院内等：届出	薬局等構造設備規則 第14条及び第15条 (PMDA調査)
製造管理・品質管理等	製造および品質管理基準法第44条に基づく基準 (省令) * 場合により厚生労働大臣又は PMDAによる立入検査又は質問	GCTP省令 (PMDA調査)

・法第42条、第44条ともに、再生医療等技術のリスク分類、特定細胞加工物の製造場所が院内か院外かに関わらず、同じ基準が適用される。・細胞培養加工施設の許可、認定又は届出にあたり必要になるのは法第42条への適合。

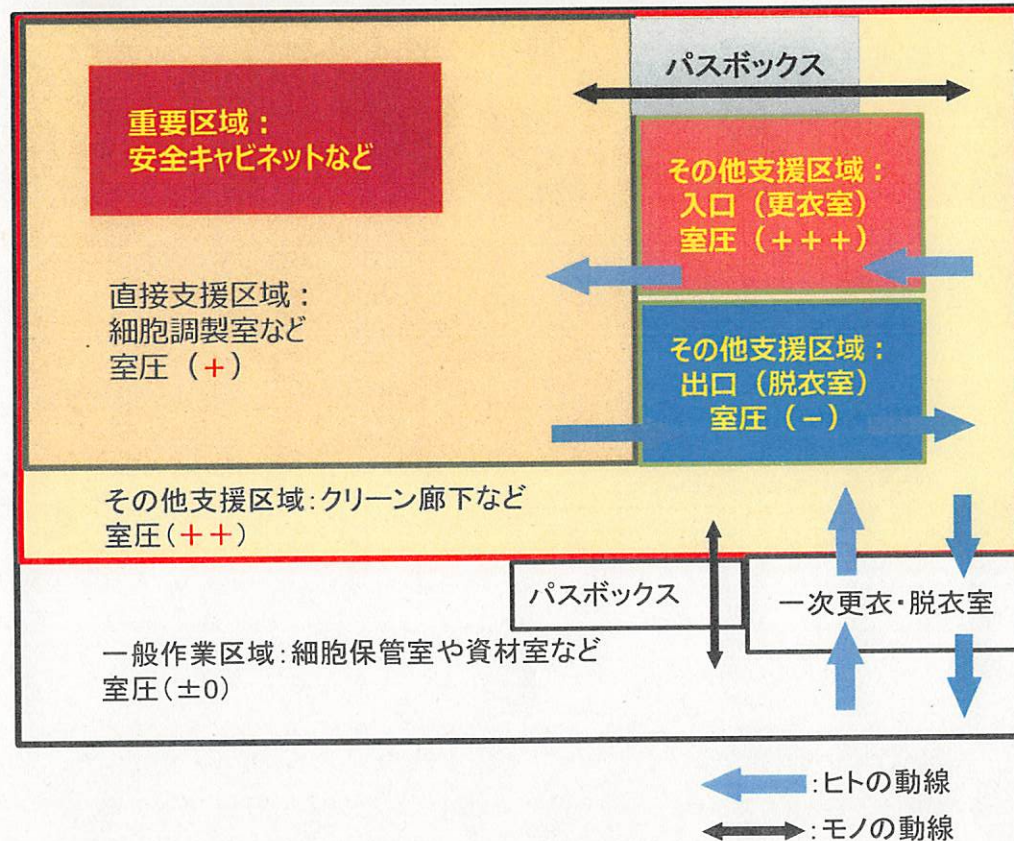
⑤細胞調製に関する施設基準

1-2.再生医療等安全性確保法

細胞治療用の細胞調製を行う施設が届出・許可性になりました。病院区域に細胞調製施設がある場合には、該当する厚生局に届け出ます。構造設備基準法第42条への適合が求められます。もし、病院外での扱いの場合には、PMDAの立入検査の後に許可されます。薬機法に準じて市販される場合には、各局等構造設備規則第14条、15条が適応されます。

細胞調製施設 室圧と動線

細胞調製施設の設計と動線の概念



⑤細胞調製に関する施設基準

細胞調製施設の設計の概念図を示します。

内側に行くほど清浄度が高くなるように設計されており、近年は、封じ込めを目的として、直接支援区域を比較的平圧に維持するために入口である更衣室を陽圧に、出口である脱衣室を陰圧にする仕組みが一般的になってきています。

出入口入り口にある意味エアロックの役割を持たせ、直接支援区域を外部から切り離す、平圧封じ込め状態が可能になる。

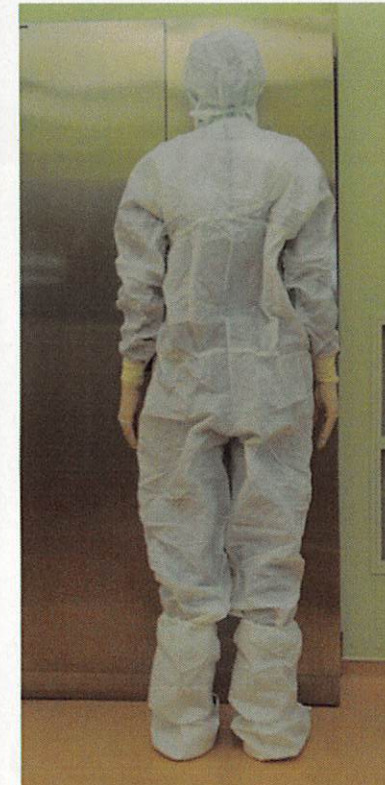
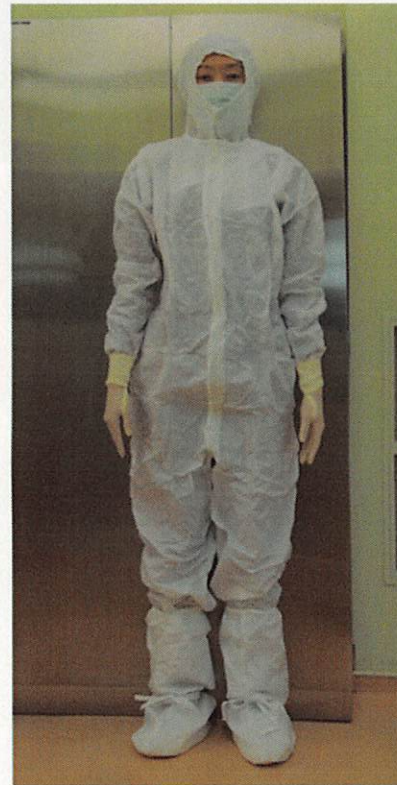
ヒトの動線は基本的に一方通行になるよう、入り口と出口を別に設計することが求められます。モノの動線は、ヒトとは別ルートで、パスボックスを利用して搬入・排出します。

直接支援区域に入れる物品は消毒用アルコールを用いて表面を消毒してから、パスボックス経由で搬入します。

搬出については、パスボックスを2段にするなど搬入と別ルートが望ましいが、スペースなどの関係で難しい場合は製剤や製品に影響の無いよう最終段階で搬出します。

クリーンルームでの服装

服装	
一般作業区域	白衣や作業着
その他 支援区域	専用白衣、 専用サンダル
直接支援区域	①マスク ②キャップ ③無塵衣(クリーン スーツ) ④専用靴 ⑤シューズカバー ⑥グローブ



服装については、清浄度に合わせて選択が必要です。

細胞調製施設の直接支援区域(以下 クリーンルームと言いますが)へ入室する場合は、①マスク、②キャップ、③無塵衣(クリーンスーツ) ④専用靴 ⑤シューズカバー⑥ノンパウダークローブを装着します。

クリーンエリアでの汚染源はヒトであることを認識し、直接支援区域および重要区域では、人体から発生する粉塵を極力抑える様心がけましょう。

清浄度と無菌性

空気の清浄度 (ISOクラス 分類)	場所および作業内容	最大許容微粒子数/m ³		作業時の 空中浮遊菌数 (CFU/m ³)
		非作業時	作業時	
		0.5μm以上 (コ/m ³)		
グレード A (ISO 5)	重要区域： 安全キャビネットやクリーンベンチ	3,530 (=100/Ft ³)	3,520 (=100/Ft ³)	< 1
グレード B (ISO 7)	直接支援区域： 細胞調製室など 重要区域が設置されている 部屋	3,530	352,000	≤ 10
グレード C (ISO 8)	その他支援区域： 入口（更衣室）、出口 （脱衣室）など 細胞調製室以外の部屋	353,000	3,520,000	≤100
グレード D	一般作業区域： 細胞保存室や資材室など	3,530,000	作業形態による	作業形態による

EU-GMP Annex1 改訂版規格表 (01 March 2009)

⑤細胞調製に関する施設基準

さて、実際には、どのくらい清浄なところで、細胞調製すればよいのでしょうか？ 個々の要件は、薬局など構造設備規則 平成27年4月1日厚生労働省令第80号第4節 再生医療等製品の製造業 の製造所の構造設備に記載されています。

細胞調製に関する施設については清浄度による区域分けをしています。

開放系で直接、検体や細胞を扱うグレードAの重要区域。無菌操作が可能な区域です。

重要区域が設置されているグレードBの直接支援区域。ここまでがクリーンルーム内となり、粒子測定や浮遊菌検査などにより厳密な微生物管理が必要な区域である。

クリーンルームの入口や出口、クリーン廊下などのグレードCのその他支援区域。および、一般作業区域においては作業形態により、環境管理を行う。

この清浄度基準はEU-GMPの規格であり、グレードAは、0.5μmの粒子が作業時、非作業時ともに3530/立法M以下であることが求められます。ここはいわゆるクリーンベンチや安全キャビネット内ですが、私ども経験では、粒子は常に0です。また、差表示の空中浮遊菌数は、表に記載されている通り、で、グレードAでは、菌が<1cfu/立法であることが求められます。これも通常は菌陰性、0です。測定点の数、頻度については、薬局方に準じる必要があります。

なお、これらの基準を外れた場合には、どのように対応するか？ については、予め施設内で決めておく必要があります。

清浄度と無菌性

環境測定

浮遊微粒子測定

計測機器の一例)

<浮遊微粒子測定>

計測機器：パーティクルカウンター



無菌性

空中浮遊菌測定

落下菌測定

表面付着菌測定

<空中浮遊菌測定>

計測機器：エアースAMPLER



パーティクルカウンターやエアサンプラーを用いて、1cf=28.3Lの空気を吸い込み測定を行う。
測定場所・サンプリング数については面積や形状に合わせて設定する。

⑤細胞調製に関する施設基準

細胞調製施設の環境測定の項目は浮遊微粒子測定と無菌検査からなります。左の写真は、実際にパーティクルカウンターを用いて、空中の粉じん量を測定するために、セットしているところです。1cfの空気を吸い込み、0.5 μ mの粒子数を測定する。ちょっとしたヒトの動きでも粉塵が発生する可能性がありますので、測定には注意が必要です。

無菌検査には、空中浮遊菌測定、落下菌測定、表面付着菌測定などがあります。右は、空中浮遊菌測定をエアースAMPLERを用いて、寒天平板に1cfの空気を吹き付けている写真です。中の寒天培地の培養を行い、微生物の数を計測する。エアースAMPLERを用いずに、落下菌検査でも菌検査が可能です。落下菌検査は、寒天平板を水平に置き、一定時間ふたを開け、落下菌を収集し、培養を行い微生物の数を計測するものです。付着菌測定は、小型の寒天培地を直接検査場所に押し当て表面付着菌を採取し、培養を行い微生物の数を計測する。当院では、スタンプアガー(KBM SCD-LP)というものをを用いて、付着菌を確認しています。

これらの検査は、検査場所の環境や使用用途に合わせて、組み合わせて行うことが望ましい。

測定場所や測定箇所数については測定エリアの面積や形状に合わせて、それぞれ設定することが重要です。

クリーンベンチと安全キャビネット

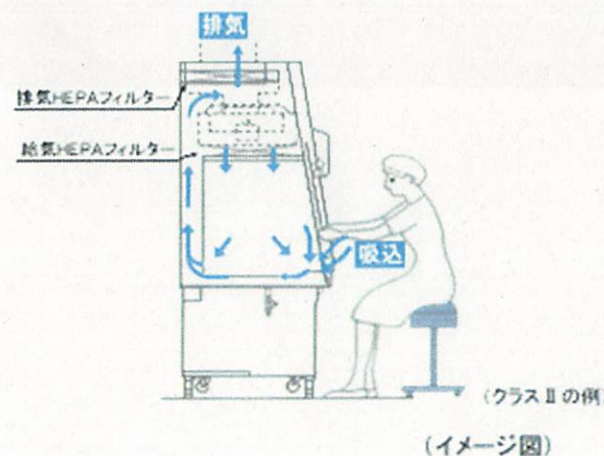
バイオハザード対策用キャビネットとクリーンベンチの違い

一般的なクリーンベンチ



検体を清浄空間で扱うことが第一目的。

バイオハザード対策用キャビネット



作業者の安全性を図るのが第一目的。
かつ検体を清浄空間で扱う。

© 株式会社 日立産機システム

<http://www.hitachi-ies.co.jp/products/cleanair/class.htm> より

⑤細胞調製に関する施設基準

クリーンベンチは環境微生物の混入を防ぎながら、清浄空間で検体や細胞を扱うことを目的としている。上部からHEPAフィルターを通した空気が、作業者に向かって外へ流れ出すようになっており、作業スペースは陽圧になっている。バイオハザードキャビネットは作業者の安全性を図るのを第1目的として、かつ清浄空間を作り出しています。すなわち、前面から外部の空気を吸い込み、HEPAフィルターを介して清浄な空気が出てきて、循環します。機器ないは、周囲より圧力が低い空間となります。

清掃、廃棄処理、防虫、防鼠対策等

清掃

場所	作業内容
重要区域	クリーンベンチ内は 消毒用エタノールでの清拭 または過酢酸を用いた消毒(燻蒸)
直接支援区域	床や壁面は 粘着ローラーでホコリ除去後、 消毒薬を用いて清拭
その他支援区域	床は粘着ローラーでホコリ除去 (環境管理を行っているところは 消毒薬を用いて清拭)
一般作業区域	掃除機やモップを用いて清掃

UV ランプ

※再生医療等製品の製造業に関しては、薬局等構造設備規則 第14条第15条を参照のこと。

⑤細胞調製に関する施設基準

廃棄物

- ・ 一般廃棄物と医療廃棄物に分別。
- ・ 作業終了ごとに外部に搬出し、
- ・ 適切に廃棄する

防虫・防鼠対策

防虫

- ・ 施設内光源の遮光
- ・ 段ボール箱の持ち込み制限
- ・ 定期的検査

防鼠

- ・ 直接支援区域およびその他支援区域の外部からの切り離し
- ・ 床面から切り離れた搬入経路を設ける

清掃は、クリーンルームの管理の中で最も重要な作業の一つです。

日常清掃として、重要区域は作業終了ごとに消毒用アルコールで清拭を行います。

定期清掃は期日を決めて、直接支援区域やその他支援区域の床や壁のごみを除去し、消毒する。

床面の清掃はホコリを立てないように、粘着ローラーを用いて大きなホコリを除去し、

不織布部分(マイクロファイバークロスモップ)に消毒薬をしみこませて清拭する。

清浄度の高いエリアから低いエリアへと順に清拭を行うことが重要である。壁面に関しては消毒用のアルコールなどで清拭する。

廃棄物は一般廃棄物と医療廃棄物に分別し、作業終了ごとに外部に搬出する。その後、施設の基準にしたがい適切に廃棄しましょう

防虫対策は昆虫を誘因する光源を可能な限り外部と遮蔽し、昆虫の侵入を防止します。

また、昆虫や虫卵のキャリアになる可能性の高い段ボール箱の持ち込みは、制限します。

防鼠対策は直接支援区域およびその他支援区域が、外部と直接接しないような構造が必要です。

外部と遮断することでネズミの侵入を予防します。

また、資材の搬入は、パスボックスを使用して、床面から切り離れた搬入経路を設けるとよいでしょう。

清掃、廃棄処理、防虫、防鼠対策等

清掃風景

きれいに、整理整頓

粘着ローラー



薬液で清拭



(消毒液)

- ①エタノール、
- ②グルコン酸クロルヘキシジン（ヒビテン®）
- ②塩化ベンザルコニウム（オスバン®）等

このスライドは実際の清掃風景です。清掃は、清浄度の高い方から低い方に順次清掃します。

A. 細胞調製

⑥機器校正

- 校正と保守点検
- 校正・保守点検において重要な要素
量、重さ、温度、時間

校正と保守点検

校正とは

国家標準で定められた標準器や標準試料を用いて、測定器が示す値と真の値の関係を求めること。

対象とする校正に用いた機器の校正経路を記載したトレーサビリティ体系図（チャート）を確認する必要がある。

保守点検とは

仕様に沿った性能が得られているか、校正された機器などを使用して検査、確認すること。

・導入時点検

据付時適格性確認（IQ）

稼働性能適格性確認（OQ）

・定期点検

使用時点検

日常点検

年次点検

✦ 校正および保守点検はあらかじめ計画を立てて実施する。
実施内容及び結果については文書にて記録を残しておく

⑥機器校正

適正な状態を保った機器で細胞調製を行うことは必須である。

いつでも適切な機器を使用できるように、定期的に校正および保守点検などの保守管理を行い、記録を残しておくことが重要である。

校正とは、国家標準で定められた標準器や標準試料を用いて、測定器が示す値と真の値の関係を求めることである。対象とする校正に用いた機器の校正経路を記載した書類であるトレーサビリティ体系図（チャート）が作成された一連の検査のことを言います。

保守点検とは、仕様に沿った性能が得られているか、校正された機器などを使用して検査、確認することである。

細胞調製における主な保守管理対象機器と項目

校正	項目
分銅	重量
温度計	温度
天秤	重量
ピペット	容量
クリーンベンチ	風速 フィルター性能 清浄度
パーティクルカウンター	風量 カウント数
エアースンプラー	風量

保守点検	項目
CO ₂ インキュベーター	温度 CO ₂ 濃度
冷凍庫	温度
冷蔵庫	温度
遠心機	回転数
ドライシッパー	保持日数
タイマー	時間
モニタリング装置	表示確認

©機器校正

どのような機器が校正、点検の対象となるのでしょうか？

主な保守点検の対象となる機器は表のとおりである。

重要な要素は、重さ、量、温度です。これらのもとになる機器、例えば校正分銅や温度計の校正は、トレーサビリティを
保証できる専門の業者に依頼します。

校正された温度計で、他の温度計を校正します。

これらあらかじめ「校正された」分銅を用いて、電子天秤を点検します。電子天秤と温度計が校正できたら、 μ ピペット
の点検します。また温度計が校正できれば、CO₂インキュベータなどの恒温槽の点検ができます。

といった具合に、いもづる式に校正、点検をしていきます。

重さ：電子天秤

✦ 電子天秤は、校正された分銅を用いて定期点検をしましょう。

<<電子天秤の定期点検 例>>
島津製作所 電子天びんELシリーズ

・準備するもの

①校正する天秤、②JCSS分銅など（銅）、③記録用紙

・方法

- 1.電源を入れ、室温25℃前後の
- 2.メニューで測定条件を選択する。
- 3.繰り返し性を測定する。
- 4.秤量近くの校正された分銅を皿
Xi：載せたときに表示が安定した値
Yi：降ろしたときに表示が安定した値
- 5.それぞれの標準偏差 σ_x, σ_y を算出する。
6. σ_x, σ_y 共に電子天びんの仕様値以内とする。
- 7.偏置誤差を測定する。
- 8.秤量の約1/4の分銅を右図1.0gの位置に置く。
- 9.皿の中央での値（X1）と、その位置での値（X2, X3, X4, X5）を測定する。

電子天秤 校正・保守点検 記録書
Electronic balance proofreading and maintenance check record

実施年月日 Date of execution	(西暦) 年 月 日	実施者 Executor	
温度 Temperature	℃	湿度 Humidity	%

対象機器 管理番号 Object equipment control number	D
メーカー、型番、製造番号 Maker and serial number and manufacturing number	
実施前 モード・条件設定 Mode and condition setting before execution	
設置場所 Place to set	
備考 Note	

校正 Proofreading

使用分銅 Used weight	g	管理番号 Control number	D
使用分銅 Used weight	g	管理番号 Control number	D
備考 Note			

定期点検 Regular check

使用分銅 Used weight	g	管理番号 Control number	D
Xi	g	Yi	g
Xi	g	Yi	g
Xi	g	Yi	g
Xi	g	Yi	g
ok		ok	
判定 Judgment	合格・不合格 Conformity and Nonconformity		

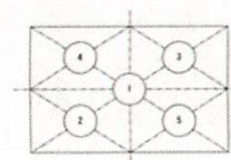
使用分銅 Used weight	g	管理番号 Control number	D
偏置誤差 Bias error	X1	X2	X3
判定 Judgment	合格・不合格 Conformity and Nonconformity		

承認(施設長)	審査(製造責任者)
印	印
年 月 日	年 月 日

校正分銅



角型皿の場合



丸型皿の場合

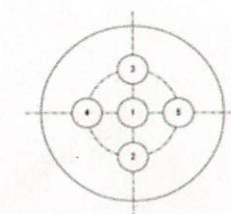


図1 偏置誤差測定位置

これは、校正分銅を用いて、電子天秤の定期点検の図です。

温度：温度計・恒温槽

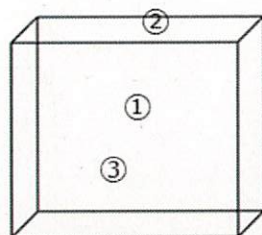
温度モニターが必要な機器

- CO₂インキュベータ
- 冷蔵庫
- 冷凍庫
- 気相式窒素タンク



- ①校正のとれた測温抵抗体および電子記録計で図に示す箇所の温度を測定する。
- ②中の温度が設定温度により平行状態になってから測定を開始すること。CO₂インキュベータは中を空にする。冷蔵庫、冷凍庫は、実際には、現状に即した対応とする。

①中央、②天板中央、③底面中央



恒温水槽保守点検記録書
Thermostatic bath maintenance check record

実施年月日 Date	年 月 日	実施者氏名 Member	印 Sign
④ 室温 Room temperature	℃		

計量機器 管理番号 control number	⑤
メーカー・型式・製造番号 Model, model number, and manufacturing number	
設定温度 Set temperature	℃
備考 Note	

使用温度計または熱電対 Thermometer		D	
測定温度 Temperature	① 熱電対付点 Heat part	℃	通過 Pass・不通過 Suspect
	② 中央部 Center part	℃	通過 Pass・不通過 Suspect
	③ 熱電対付点 heat facing part	℃	通過 Pass・不通過 Suspect
	平均	℃	通過 Pass・不通過 Suspect

※ 通過 誤差が±1.0℃以内 不通過 誤差が±1.0℃より大きい

※ Pass: error is within ±1.0°C Suspect: error is larger than ±1.0°C

承認(ディレクター) Approved (Director of Laboratory)	審査(製造管理者) Review (Manufacturing Manager)
印	印
Sign	Sign
年 月 日(Date)	年 月 日(Date)

恒温槽の点検の例です。

クリーンルームに必須なもの：パーティクルカウンターとエアースンプラー

＜空中浮遊菌測定＞
計測機器：エアースンプラー



医学部研究部 衛生

校正成績

1.00181.00
エアージン
100000
1.52
REVO
400穴
10000
01/10/1月1
22.3°C
101.7bar

項目	1	2
流量 [L/min]	100.0	100.0
流量 [m³/h]	6.0	6.0
流量偏差 [%]	-1.4	-1.2

注：流量、気圧、湿度は校正時の環境条件に基づきます。

判定：合格

（）裏面

校正証明書

校正機 東京大学 医学部研究部
品名 ハンドヘルドパーティクルカウンター
型式 K2-120
製造番号 100000
校正日 2017年10月1日

本証明書は、当社の校正装置を用いて校正を行い、校正済みの状態にある機器、計測結果は、計測結果の信頼性を保証しています。
この校正は、当社の校正装置を用いて行われ、計測結果は、計測結果の信頼性を保証しています。
NIST (アメリカ合衆国標準技術研究所) のトレーサビリティが確保されています。

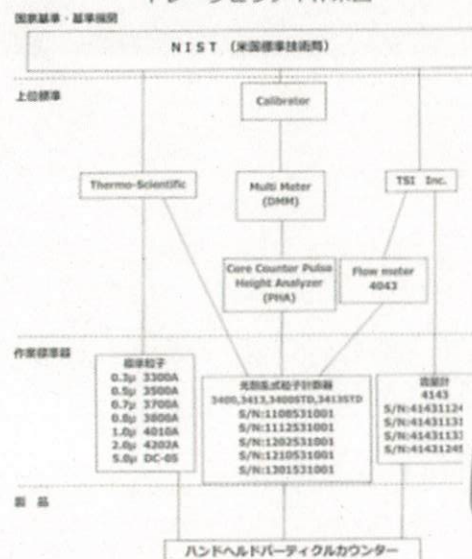
校正用標準器

品名	型式	管理番号	校正有効期限
光散乱式粒子計数機	3411-STD	1000000001	2017.2.28
流量計	4143	4143112000	2017.6.7
標準粒子	1000A	44001	2018.3.30
標準粒子	1000A	44002	2018.3.31

株式会社 ハンディ・エレクトロニクス
〒169-0075 東京都新宿区高田馬場 1-29-9 TGC&SF
TEL: 03-6255-0900
FAX: 03-6255-0905

MERCK

トレーサビリティ体系図



校正機により、使用できるものとします。
各標準器の管理番号を記載します。



株式会社 ハンディ・エレクトロニクス
〒169-0075 東京都新宿区高田馬場 1-29-9 TGC&SF
TEL: 03-6255-0900
FAX: 03-6255-0905



HGPC 2+

株式会社
ハンディ・エレクトロニクス

パーティクルカウンターとエアースンプラーは、クリーンルームの清浄度の維持に欠かせないものです。残念ながら、自分たちでは校正できませんので、業者に依頼します。このような、校正証明書とトレーサビリティ体系図を発行してくれます。こうした校正費用を予算として算出しておく必要があります。

A. 細胞調製

⑦細胞調製の基本と試験

- 細胞数測定
- ピペット、注射器の使用方法、試薬や細胞の希釈方法
- 培養
- 細胞凍結と凍結管理と解凍
- ラベル

細胞数の測定

細胞数の測定は、細胞治療において最も基本かつ重要な検査である。

表 1. 細胞数測定とその対象

染色液	生細胞率測定	対象および特徴	検体例
チュルク液	不可	赤血球が多く含まれている検体、培養細胞全般。但し、死細胞との区別はできない。	新鮮骨髄液、末梢血培養細胞
トリパンブルー	可	赤血球の少ない検体、(凍結解凍) 細胞。赤血球と生細胞の区別がつけにくい。	(凍結解凍) 培養細胞
アクリジンオレンジ/プロピジウムイオタイド (AO/PI)	可	赤血球の多い検体、(凍結解凍) 培養細胞。細胞の区別が明瞭である。蛍光顕微鏡が必要。	(凍結解凍) 培養細胞
アクリジンオレンジ/エチジウムブロマイド (AO/EB)	可	赤血球の多い検体、(凍結解凍) 培養細胞。細胞の区別が明瞭である。蛍光顕微鏡が必要。但し、EBは危険有害化学物質であり、廃棄規制がある。	(凍結解凍) 培養細胞
自動細胞数測定装置	可	各社、それぞれ特徴がある。トリパンブルー染色が一般的であるが、AO/PI染色法での測定可能機器もある。	(凍結解凍) 培養細胞
自動血球分析装置	不可	総白血球数 (または有核細胞数) を測定。機種によっては分画も可能であるが、基本的には、血液、造血幹細胞を対象としているため、それ以外の測定の場合は、事前検討が必要。 培養細胞は、リンパ球でも細胞サイズが異なるため、正確な測定は困難である。	非凍結血液細胞

細胞数の測定は、細胞治療において最も基本かつ重要な検査である。細胞処理調製過程、凍結解凍した細胞の生存率、凍結するときの細胞数、輸注(移植)時の細胞数や機器の品質管理用や回収率を計算する際のデータとして使われる。細胞濃度や輸注する細胞数が実際と異なっていると、見かけ上の増殖が良くなったり、悪くなったりして品質評価に影響を及ぼす。最終的には、患者さんへの輸注細胞数が指定した値より多すぎたり、少なすぎたりすることで、副作用が多く出たり、効果が足りなかったりする危険性もある。

培養した血液・免疫細胞(リンパ球、NK細胞や樹状細胞など)や培養した間葉系細胞等の体細胞等は、血球計算盤を基本とした顕鏡による細胞数のカウントが基本となる。すなわち、細胞分離後クリーンルーム内または品質管理(検査)室で細胞数を測定したり、解凍後に生細胞率を測定したりする場合には色素により細胞を染色し目視で算定する方法が用いられる。染色した細胞液を血球計算盤とカバーガラス上にできた高さ0.1mmの部分に注いで顕微鏡で数を数える。染色方法は、表1に示すとおり細胞の状態によっていくつか使い分ける必要がある。Trypan Blue染色法(トリパンブルー法)は、トリパンブルー色素が生細胞には取り込まれないが死細胞では取り込まれることを利用して、生細胞と死細胞を見分けるときに役立つ。生細胞は光って見えるが、死細胞は青色に染まる。ただし赤血球にも取り込まれないため赤血球が多い検体では白血球との判別がつかない場合がある。一方、Turk's solution染色法(チュルク法)は骨髄液や末梢血など赤血球が多くて白血球との見分けがつかない新鮮な検体の場合に用いる。チュルク液を入れると赤血球が溶血するが、どの白血球も濃紺に染まって見えるので死細胞との区別はつかない。死細胞も含み、かつ赤血球も多い場合にはAcridine Orange/Ethidium Bromide染色(エチジウム・ブロマイド/アクリジン・オレンジ)エチジウム・ブロマイド/アクリジン・オレンジ染色法やアクリジン・オレンジ/PI染色が有用である。臍帯血解凍時の生細胞率測定等で用いられることが多いが、蛍光顕微鏡を必要とする。血球計算盤(Hemocytometer)にはビルケルチュルク(Burker-Turk)や改良ノイバウエル(Improved Neubauer)が一般的に用いられる。ニュートンリングを作るように計算盤にカバーガラスをスライドさせてかぶせると深さが0.1mmになる。ディスポーザブル検査キットも市販されていて便利である。

近年は、血球計算盤を顕鏡する原理を模した様々な自動細胞数測定装置が市販されている。フローサイトメリーを用いる場合には、CD45陽性細胞分画およびCD34陽性細胞その他目的とした細胞分画における7AAD陰性細胞数との割合が生細胞率となる。市販されている専用の機器(Countess®, Life technologies, USA)等で測定することも可能である。市販の自動細胞数測定装置については、機器付属の手順書を参照されたい。今後、トレーサビリティ、測定者誤差を少なくするという点で導入が進められている。

細胞数の測定

血球計算盤

主な検体	長所	短所
末梢血、骨髓液、臍帯血 解凍検査検体	- 目的細胞により染色液や計算盤、顕微鏡の種類を変えて対応可能 - 生細胞率測定可能 - 必要検体量が少ない	測定者間誤差あり

図1. 血球計算盤



機器例) ディスポーザブル血球計算板
C-Chip® (NanoEnTek社製): ノイバウエル改良型
ビルゲルチュルク型、フックスローゼンタル型
などがある

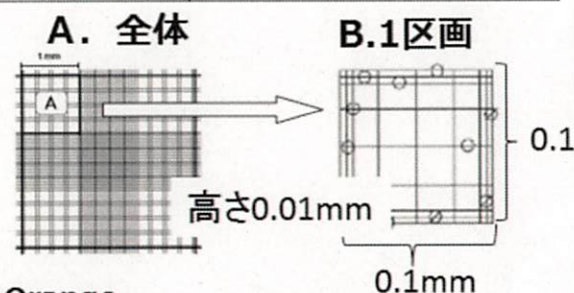


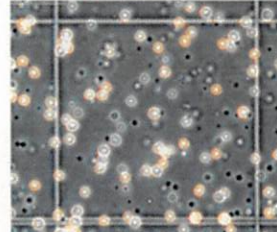
図2. 実際の顕微鏡写真

A. チュルク染色



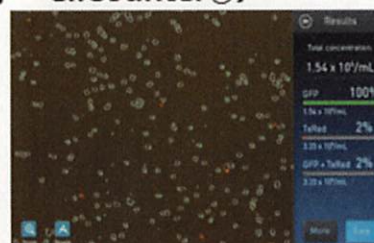
Blue: All nucleated cells

B. トリパンプルー染色



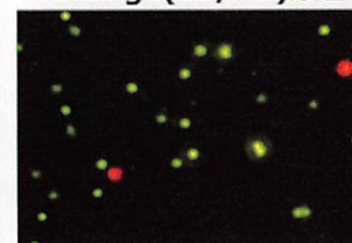
Blue: dead, Bright: Alive

C. Acridine Orange / Propidium Iodine (AO/PI) 染色 (by ellCounter®)



RED: Dead, Green: Alive

D. Ethidium Bromide/Acridine Orange (EB/AO) 染色



RED: Dead, Green: Alive

細胞数の測定

自動測定装置

	主な検体	長所	短所
自動細胞数測定装置	(凍結解凍) 培養細胞	- 目視も可能。データ保存可能。 - 作業者間のばらつきが減少する。 - 必要検体量は研究計算板と同じ。	細胞の凝集等がある場合には、不正確となる。接した2細胞→1細胞と読むなど、鑑別できているか、事前検討必要。
自動血球計算機	末梢血 (骨髓液、臍帯血、解凍血液検体も測定可能機種がある) 末梢血を基本としているため、その他は正確に測定できるか事前検討が必要。	- 多項目同時測定可(WBC分画など) - 作業者間のばらつきが減少する。	- 機器が高価 - バリデーションが必要 - 必要検体量が多い

測定結果例) トリパンブルー染色

機器例)

Countess®II
(Thermo Fisher社製)

蛍光色素も
測定可能



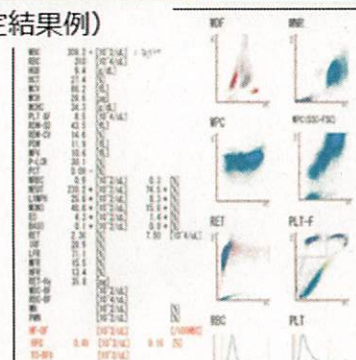
機器例)

Sysmex XN-1000
(Sysmex社製)

NRBCやHPC、体液
modeでの
測定も可能



測定結果例)



⑦細胞調製の基本-細胞数測定-

細胞数測定・特性解析

フローサイトメトリー

	主な検体	長所	短所
フローサイトメーター	あらゆる細胞	- 抗体の組み合わせにより目的細胞を選べる。(CD73, CD105, など) - 特定の細胞の生細胞率も計算可能	- 機器が高価 - バリデーションが必要 - Gatingにより測定者誤差あり

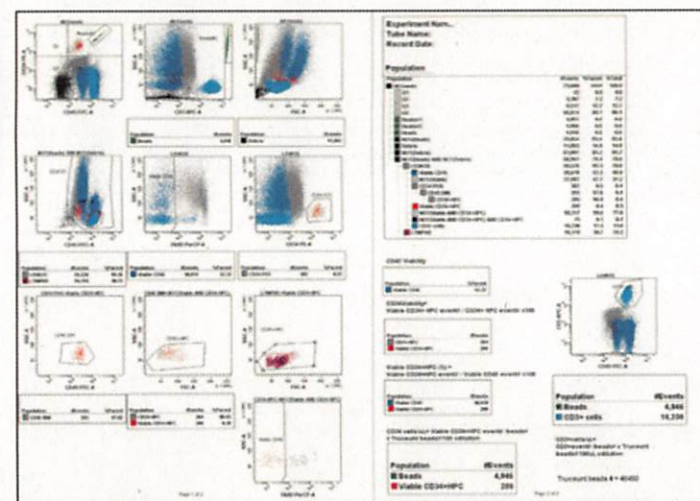
機器例)

BD FACSCanto™ II
(BD社製)



目的とする分画が何%あるか？
純度は？

測定結果例) CD45^{dull}+CD34⁺における生細胞率の算出
(対象とする細胞集団をゲートし、7AAD染色陽性細胞 (= 死細胞) を区別することで、viabilityが算出できる)



⑦細胞調製の基本-細胞数測定-

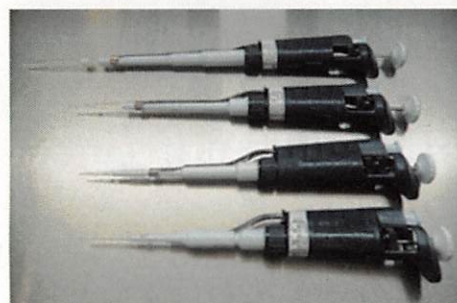
ピペット、注射器の使用方法、試薬や細胞の希釈方法

- ① 正確な細胞濃度の調製や試薬の添加には、正確なピペット、注射器の使い方にかかっている。
- ② 扱う量によって、どのサイズのピペットや注射器を用いるか決める。モデルごとに容量範囲が決まっているため、容量範囲外の量を採ると不正確となる。

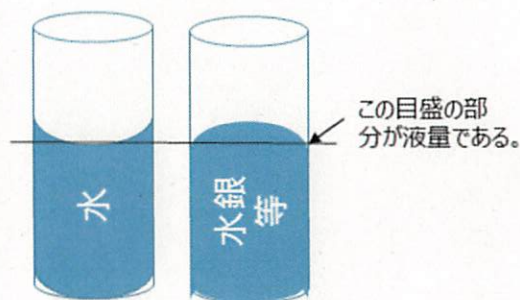
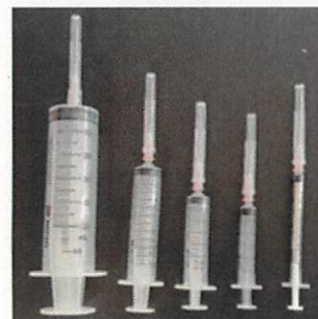
ピペット



マイクロピペット



注射器



- ① マイクロピペットはP2からP1000が一般的に使用される。
- ② フィルター付きチップが望ましいが、チップとピペッターとのサイズが合致していない場合は、量が不正確となったり、吸引しすぎて、フィルターに詰まったり、内筒が汚染されたりする場合がある。
- ③ 自分で校正できるのは、概ねP200までであり、P10, P2は業者に校正依頼する。

- ① シリンジは1度使用したら、再使用しない。
- ② 内筒を触った部分まで、液を吸引しない。
- ③ 細胞採取の時には、18G以上で採取することが望ましい。(細い針を使うと、細胞が壊れたり、赤血球がある場合には、溶血する)

細胞数の希釈方法

Q1. 初期細胞が、 $8.0 \times 10^6/\text{ml}$ 5mLある。これを、1フラスコ当たり7mL、濃度 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ になるように調整して培養開始したい。何フラスコ分できるか？

A. $8.0 \times 10^6 / 1.0 \times 10^6 = 8$ 倍希釈
 $5\text{mL} \times 8 = 40\text{mL} \rightarrow 5\text{mL}$ に35mLの培養液を加えて、40mLとする。 $40\text{mL} \div 7 = 5.7$ フラスコ $\rightarrow$ 5フラスコ培養できる。

Q2. 培養後、回収・洗浄した細胞が $15 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度で、70mLであった。最終濃度 $5 \times 10^6/\text{ml}$ になるように調整して凍結したい。凍害保護液は20%DMSO溶液であり、等量細胞懸濁液を混合して10%DMSO溶液として凍結したい。どのように希釈するか？

A. 最後に等量混合するため、2倍濃度の細胞懸濁液とする必要がある。
従って、 $15 \times 10^6 / 10 \times 10^6 = 1.5$ 倍 $\rightarrow$ 1.5倍希釈する。
 $70\text{mL} \times 1.5 = 105\text{mL}$ $105\text{mL} - 70\text{mL} = 35\text{mL}$
70mLに、35mLの溶液を加え、さらに20%DMSO溶液を105mL ゆっくり添加混合すると、最終 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 210mLとなる。

細胞数の希釈方法

培養において細胞数 $8.0 \times 10^4/\text{ml}$ を1mlのBufferに、 $1.0 \times 10^4/\text{ml}$ になるように調整して培養する。

$$1/8 = 0.125(\text{ml})$$

$\therefore 1\text{ml} = 1000 \mu\text{l}$ なので

$$0.125(\text{ml}) \times 1,000 = 125 \mu\text{l} \text{ となり}$$

培養液 875 μl に細胞を、125 μl 採取して加える。

試薬の希釈方法

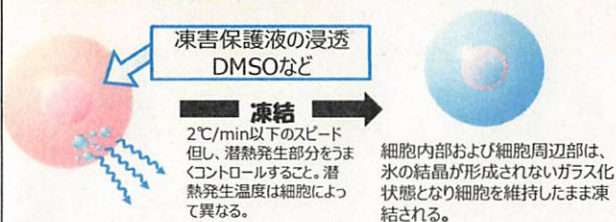
Q2. サイトカインAのストック濃度は $10\mu\text{g}/\text{mL}$ である。
細胞懸濁液（培養液）が、 10mL である。
この溶液の最終濃度を $10\text{ng}/\text{mL}$ に調製するには、 10mL に対して、
何 μL 試薬を加えるか？

$10\text{ng}/\text{mL} \times 10\text{mL} = 100\text{ng}$ 必要である。
ストック液は、 $10\mu\text{g}/\text{mL} = 10\text{ng}/\mu\text{L}$ なので
 $100\text{ng} \div 10\text{ng}/\mu\text{L}$ は、 $10\mu\text{L}$ となる。

サイトカインAを $10\mu\text{L}$ 10mL の細胞懸濁液に添加する。

細胞凍結と管理と解凍

1. 細胞凍結と凍害保護液



凍害保護液を使用しない、急速凍結を行った場合...



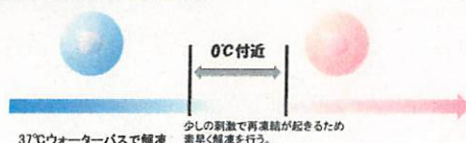
凍結機器：

- ①-80°C超低温冷凍庫(簡易凍結)
- ②プログラムフリーザー(潜熱発生部分の管理が可能、大量の場合でも温度管理しながら凍結が可能である)

凍害保護液

- ①細胞内凍害保護液；DMSO, Glycerol, Ethylene Glycol, Propylene Glycol
- ②細胞外凍害保護液；Glucose, Sucrose, Trehalose, HES(Hydroxy ethylstarch), Albumin, Dextran, 等

2. 細胞の解凍と安定性



(1-1) 凍害保護液と緩慢凍結法

DMSOを加えた溶液は、凍害保護物質が細胞内部に浸透する。緩慢に凍結される過程で、細胞外の溶液中の水分が徐々に結晶化し、細胞内との浸透圧差により細胞内が徐々に脱水される。細胞内および細胞周辺部は十分に濃縮され氷の結晶が形成されない状態＝ガラス化状態となり細胞を維持したまま凍結される。

(1-2) 保護液と緩慢凍結の必要性

保護液を使用せず、急速に温度を下げた場合では液中の水分が鋭利な氷晶を細胞内外作り、細胞構造を破壊するため細胞死が起こる。

(2) 凍結管理

プログラムフリーザーや市販の凍結容器に入れ-80°Cまで凍結を行う。細胞は低温下でも代謝が進むため、-20°C~-80°C程度では長く保管することができない。

液体窒素中のような超低温下で保管することで細胞の代謝を遅くし長期保管が可能となる。

(3-1) 細胞の解凍

細胞は37°Cウォーターバス等で急速解凍を行う。温度が0°C付近になると少しの刺激で再凍結が起きてしまう。

再凍結によって出来た氷は膨張し形も鋭敏であるため細胞を破壊する。チューブの温度を急速に温度を上げ、素早く解凍を行う必要がある。

(3-2) 安定性

解凍後細胞はDMSOにさらされた状態である。DMSOは濃度が高くなると細胞毒性を呈し、遺伝子発現に影響を与える場合もある。

凍結による細胞へのダメージもあるので、解凍後は素早く洗浄操作を行うのが好ましい。

細胞凍結と管理と解凍

保管容器

機器	温度	利点	欠点
液相式窒素タンク	極低温(-196℃)	- 長期保管可能 - バッグ保存に適す	- 液中での汚染の可能性がある - チューブ保存には不向き - 液体窒素補充必要
気相式窒素タンク	-150~-195℃(機種により性能が異なる)	- 長期保管可能 - チューブ保存可能	- 液相に比べて開閉時温度不安定の可能性あり - 液体窒素補充必要
超低温冷凍庫	-80℃、-135℃、-150℃	- 容易 - チューブ保存可能	停電・故障対策必要



搬送容器の一例 (Cryoshipper)



-195℃5日間保管可能
(定期点検は欠かせない！)

窒素タンクを用いる場合の注意：

- ① 蓋は開けっ放しにしない。(酸欠)
- ② 作業時は酸素濃度計を必ず所持し、タンクの中は覗き込まない。(酸欠)
- ③ 安全のため、専用グローブや保護メガネを身に付けて作業する。(凍傷)

品質・安全性→長期安定性試験へ

ラベル

再生医療等製品の臨床試験の実施の基準に関する省令
(H27年7月21日 厚生労働省第129号)

治験依頼者

第24条 治験依頼者は、治験製品の容器または被包に次に掲げる事項（拡大治験を実施する場合にあっては、第1号及び第2号に掲げる事項に限る）を邦文で記載。

- ① 治験用である旨
- ② **治験依頼者の氏名および住所**（当該者が本邦にない住所を有しない場合は、その氏名・住所、治験国内管理人の氏名・住所）
- ③ 構成細胞、導入遺伝子または識別記号
- ④ 製造番号または製造記号
- ⑤ 貯蔵方法、有効期間等を定める必要があるものについては、その内容

2. 添付する文書、その治験製品またはその容器若しくは被包（内袋含む）には、次の事項を記載。

- ① 予定される販売名
- ② 予定される効能、効果または性能
- ③ 予定される用法、用量または使用方法

治験用：IMSUT-CORD
治験依頼者：〇〇製薬会社・
東京都港区六本木〇〇
構成細胞：ヒト（同種）臍帯由来間葉系細胞
製造番号：110054222
保存方法：-150℃以下（DMSO添加）
有効期限：2027年1月10日

医師主導治験

第35条 自ら治験を実施する者は、治験製品の容器または被包に次に掲げる事項（拡大治験を実施する場合にあっては、第1号及び第2号に掲げる事項に限る）を邦文で記載。

- ① 治験用である旨
- ② **自ら治験を実施する者の氏名および職名並びに住所**
- ③ 構成細胞、導入遺伝子または識別記号
- ④ 製造番号または製造記号
- ⑤ 貯蔵方法、有効期間等を定める必要があるものについては、その内容

2. 添付する文書、その治験製品またはその容器若しくは被包（内袋含む）には、次の事項を記載。

- ① 予定される販売名
- ② 予定される効能、効果または性能
- ③ 予定される用法、用量または使用方法

治験用：IMSUT-CORD
治験調整医師：医科研太郎・教授・
東京都港区白金台4-6-1
構成細胞：ヒト（同種）臍帯由来間葉系細胞
製造番号：110054222
保存方法：-150℃以下（DMSO添加）
有効期限：2027年1月10日

再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令（平成二十六年八月六日厚生労働省令第九十三号）
「第十二条2項五 検体の混同及び交叉汚染を防止するために、検体を適切な識別表示により区分すること。」



- ・凍結細胞の場合には、長期保管に耐える材質。
- ・保管中に剥がれないように、粘着力や貼るプラスチックとの相性などについて事前検討が必要である。
- ・文字が消えないこと。
- ・製造番号は唯一であること。

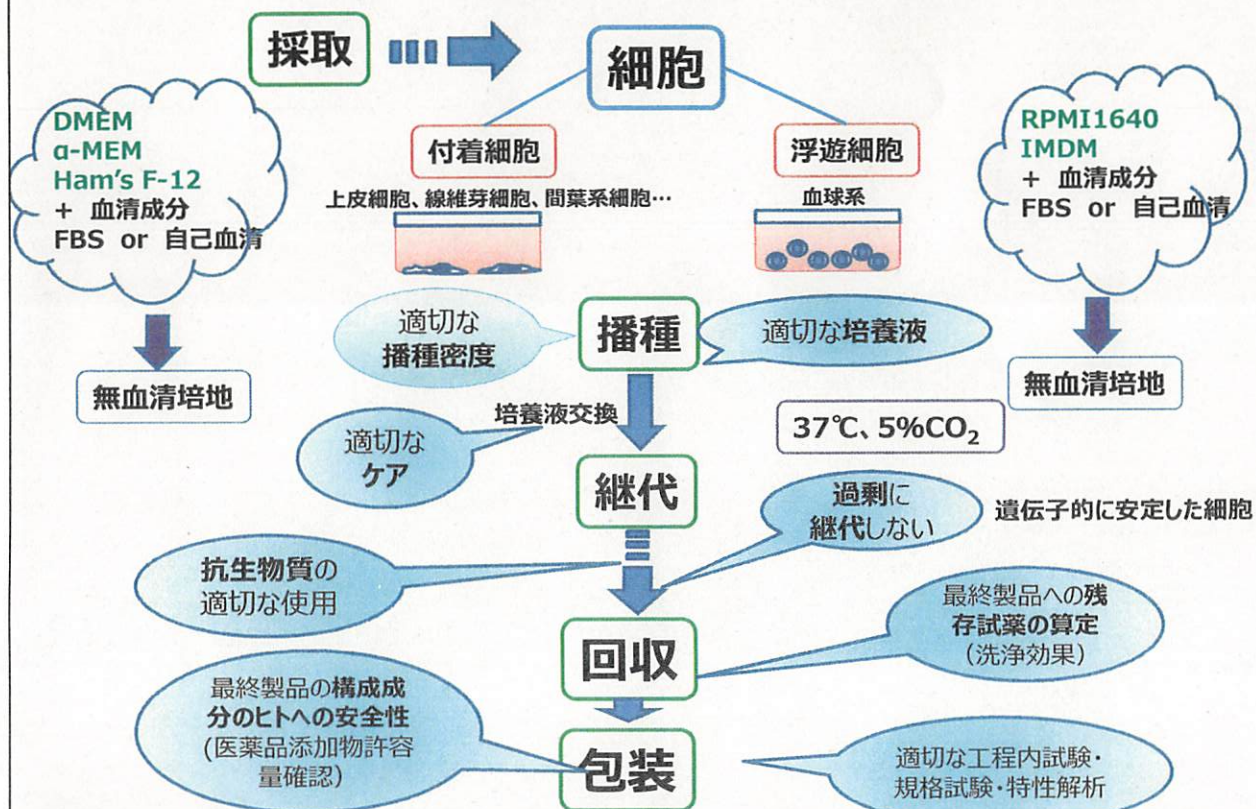
ラベルは検体の識別を確実にを行うために重要である。

再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令（平成二十六年八月六日厚生労働省令第九十三号）

「第十二条2項五 検体の混同及び交叉汚染を防止するために、検体を適切な識別表示により区分すること。」

また、再生医療等製品の臨床試験の実施の基準に関する省令（H27年7月21日 厚生労働省第129号）には、治験依頼者がいる場合と医師主導治験の場合が示されている。

培養



細胞調製の基本 培養

細胞には、培養器に接着して増殖する付着細胞と、培養液中に浮遊し増殖する浮遊細胞がある。

扱う細胞に合わせて、適切な培養器材、培養液を選択する。培養液は実験では牛胎児血清(FBS)を10%前後添加したものが用いられることが多いが、異種タンパクとなるため細胞治療用には無血清培地が望ましい。用途に合わせた無血清培地が各社で開発されているが、ウシ血清由来のアルブミンが添加されている場合もあり使用する上で注意が必要である。

培養では細胞の播種密度が重要で、低すぎると細胞の増殖が悪くなる。播種する際、付着細胞では培養器の単位面積当たりの細胞数を、浮遊細胞では細胞濃度を、扱う細胞に合わせて決めておく必要がある。

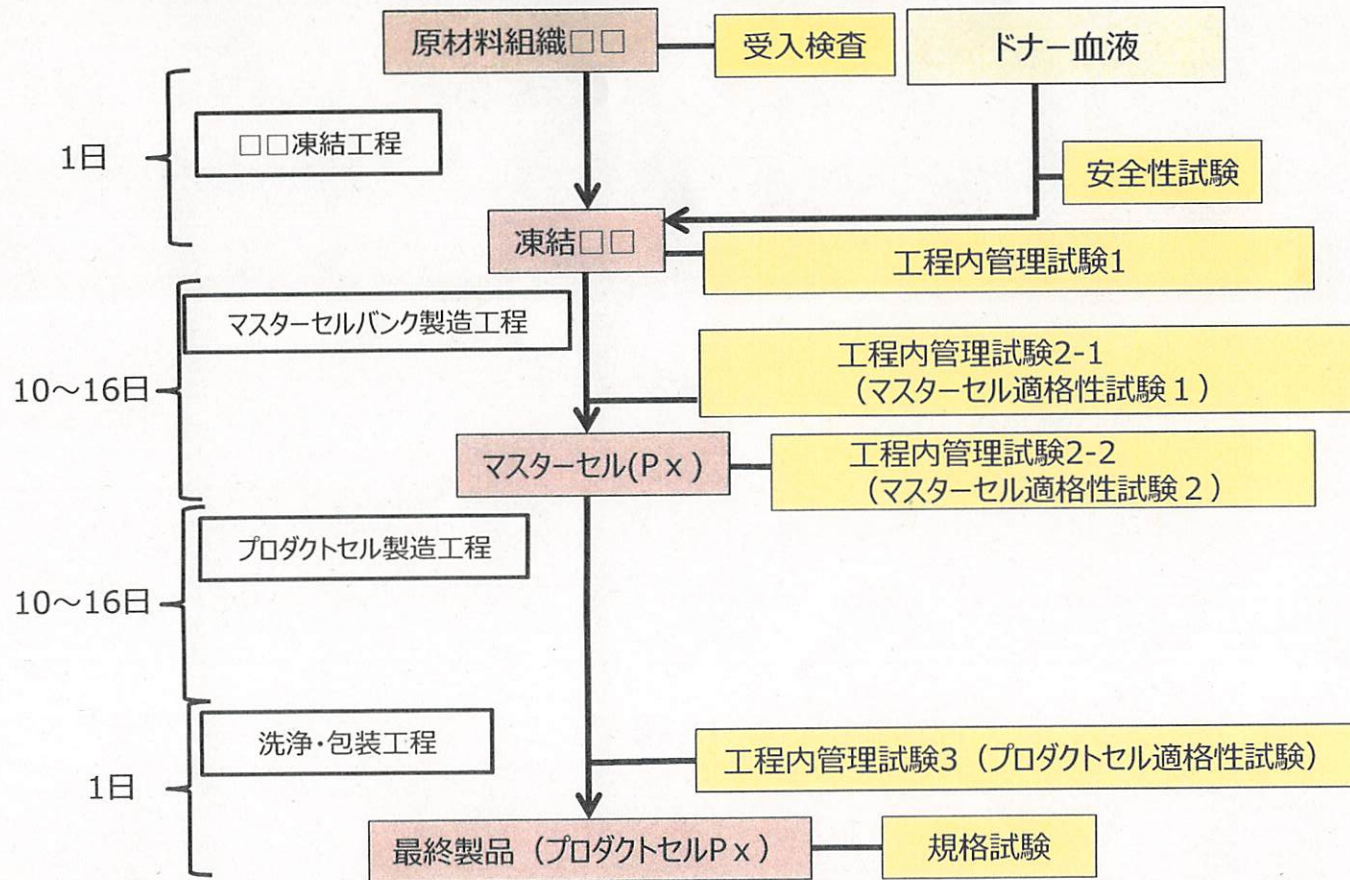
播種した細胞は、通常37°C、炭酸ガス濃度5%の条件下で培養される。

細胞が増殖し培養器の面を覆いつくした状態のことコンフルエントとよび、コンフルエントになる前に継代を行う。継代前に、培養液中の栄養や成長因子・サイトカインの枯渇が考えられる場合は途中で培養液を交換する必要がある。

継代を行う場合は、浮遊細胞ではピペッティングしながら細胞を集め、付着細胞ではトリプシンなどの酵素を用いて細胞を剥離して集める。遠心分離後、古い培養液を除去し、新しい培養液で細胞を懸濁し、新しい培養器に播種し直す。

継代培養において遺伝子複製の絶対的安定性を示す細胞はない。遺伝的不安定性を最小限にするために培養期間、継代回数は制限が必要である。

製造方法の概略のフローチャート例



工程内管理試験2-1.(マスターセル適格性試験の一例)

検査材料	検査項目	検査方法
培養細胞	細胞形態	鏡検
初回培地交換時の培養上清	無菌検査	Bact/Alert
回収細胞	細胞数測定	トリパンプルー染色法
	生細胞率	トリパンプルー染色法
	マイコプラズマ否定試験	2段PCR法
		マイコアラートキット検査
		マイコプラズマ培養法
回収前の培養上清	エンドトキシン検査 (TR検証室にて実施)	比色法

48

工程内管理試験、この場合には、マスターセル適格性試験の一例を示す。

工程内管理試験2-2.(マスターセル適格性試験の一例)

凍結保存したマスターセルを解凍して検査	検査項目	検査方法	適合基準
	細胞形態	鏡検	紡錘状・付着性
	生細胞数測定	トリパンプルー染色法	$\bigcirc \times 10^6 \text{ cells / tube}$
	生細胞率	トリパンプルー染色法	$\bigcirc\%$ 以上
	ウイルス試験	透過型電子顕微鏡試験(TEM)	陰性
		In vitro ウイルス試験： Vero、MRC-5、HeLa細胞などを指標細胞とし、細胞変性、血球吸着反応(HAD)血球凝集反応(HA)	陰性
		In vivo ウイルス試験： モルモット、成熟マウス、哺乳マウス、発育鶏卵への接種	陰性
		レトロウイルス否定試験 感染性レトロウイルス試験 逆転写酵素活性試験	陰性
		NAT試験：HIV1, HIV2, HTLV1/II, HCV, HBV, Parvo B19, EBV, CMV, WN, HSV1, HSV2, VZV, HHV6, HHV7, HHV8, ADV, JCV, BKVなど	全て陰性
	増殖倍率	継代培養 トリパンプルー染色法	$P \times$ から $P \times$ まで $\bigcirc$ 倍以上
	表面形質	フローサイトメトリー	細胞特異的マーカー 陽性細胞 $\bigcirc\%$ 以上 (純度)
	染色体検査	G-Band分染法	異常なし
	足場形成試験	軟寒天コロニー試験	コロニー形成しないこと
	細胞機能解析	In vitro 免疫抑制試験	抑制効果があること

大量の同種細胞を製造する場合には、一旦凍結保存したマスターセルを一部解凍して、安全性、品質に関して検査します。またウイルス試験に関して、既知のウイルス以外に、unknown ウイルス否定試験も求められます。マスターセルとともに、CAL細胞(in vitro細胞齢の上限まで培養された細胞)について、適切な外来性、内在性ウイルスの存在の有無について試験を実施して、評価する必要があると、第十四改正日本薬局方第一追補、日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件に記載されています。その他、このマスター細胞を増幅した時に、目的とする細胞になりえるかを判断するために、解凍後の増幅倍率や、表面形質、染色体、足場形成試験や、その細胞製品の特性を含んだ機能解析試験を実施します。

ウイルス・マイコプラズマ・エンドキシン試験

	ウイルス試験	マイコプラズマ否定試験	エンドキシン試験
対象	- HBV、HCV、HIV、HTLV、 - 必要に応じてパルボウイルスB19、サイトメガロウイルス、EBウイルス、ウエストナイルウイルス - 再生医療等製品では、Unknown virusの否定を求められる。	真性細菌の一属の原核生物であり、200種以上が存在する。	グラム陰性菌の細胞壁外膜を構成するリポ多糖
混入した場合の影響	- 患者への感染 - 細胞の遺伝子変化	細胞代謝への影響、遺伝子発現変化、サイトカインの誘導等免疫反応の異常	発熱、致死性ショック、補体の活性化、白血球の活性化等
検査方法	①抗原・抗体検査 ②NAT試験 ③ウイルス否定試験(in vitro, in vivo, 電顕, retrovirus 否定試験)	①培養法、 ②指標細胞を用いたDNA染色法、 ③核酸増幅法	①ゲル化法、 ②比濁法、 ③比色法
備考	- 生物由来原料基準 ヒト由来原料総則ヒト細胞組織原料基準 (3) ウに基いて、ウィンドウピリオドを勘案したドナーの再検査を求められる。 - 第十七改正日本薬局方参考情報「日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件」及び「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のウイルス 安全性について」(平成 12 年 2 月 22 日付け医薬審第 329 号) (ICH-Q5A)	- 試験環境や操作及び器具に起因する汚染を防止すると共に、病原性のあるマイコプラズマ感染から作業従事者を防護する措置を取ることが重要である。 - 第十七改正日本薬局方に準じる	- エンドキシン活性の不安定性や、試験操作や器具に存在し得る汚染物質の影響への対策を講じた上で予備実験として、検証戦の信頼性確認試験、反応干渉因子試験を行い、精度と有効性を保証しなければならない。 - 第16改正日本薬局方

ウイルス、マイコプラズマ、エンドキシン試験の概略をします。

ウイルス試験は対象のウイルスに対して核酸増幅法キット製品を使って検査するのが一般的です。他家の細胞を樹立する場合にはこれらのウイルスを有さないドナーを選定することは当然ですが、ウィンドウピリオドの可能性や培養中におけるクロスコンタミネーションの危険性もあるので、樹立した細胞を用いてウイルスの存在を否定することが必要です。

マイコプラズマは真性細菌の一属の原核生物であり、現在までに200種以上の存在が確認されています。再生医療製品の調整の過程では、医療者や培養担当者の口腔からの感染と材料提供者に内在するものの感染とが生じ得ます。マイコプラズマは培養細胞の代表的な汚染微生物ですが、培養期間中は細胞障害性を示すことが少なく、気づくことは困難です。日本薬局方ではバイオ医薬品や治療用細胞製剤について品質管理試験としてマイコプラズマ否定試験を実施し、マイコプラズマの存在を否定すべきとしています。

エンドキシンはグラム陰性菌の細胞壁外膜を構成するリポ多糖で、生理活性的な作用として発熱、致死性ショック、補体の活性化、白血球の活性化などがあります。完全失活には乾熱滅菌が必要なため、注射液や医療器具をはじめ、失活処置が不可能な細胞製剤の出荷判定時点において、最終製品のエンドキシン値が規格値未満であることの証明が必要です。3種類の試験方法のうち、JPIにおいて疑義や係争が生じた場合ゲル化法によって最終判定を行う旨記載のあることからゲル化法が多く用いられています。また、エンドキシン活性の不安定性や、試験操作や器具に存在し得る汚染物質の影響といった問題に対策を講じた上で予備試験を行い、試験精度を保障しなければなりません。さらに、反応干渉因子試験により測定対象試料の調製方法を決めておく必要があります。

無菌試験

製造・調製される医薬品の微生物（一般細菌ならびに真菌）の有無を評価

中間産物 及び
最終製品由来の検体（ロットごと）における無菌性を判定

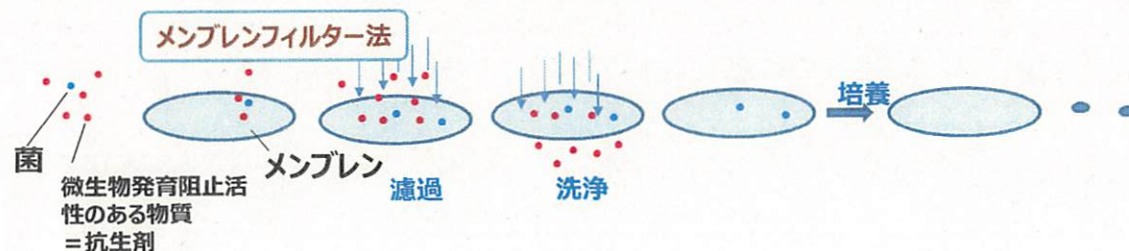
無菌試験用培地

液状チオグリコール酸（LTG）培地（30～35℃）
ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト（SCD）培地（20～25℃）
など

肉眼で培養した菌の増殖を確認

観察…3～5日後、7～9日後、14日後以降 判定

培地
器材
洗浄液
希釈液
...



無菌試験とは、ご存知の通り、検体中の一般細菌ならびに真菌の有無を確認するものです。液状チオグリコール酸(LTG)培地、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト(SCD)培地などの培地に検体を接種し培地の濁りで菌の増殖を確認します。

バイオ医薬品や細胞製剤は基本的に生体材料が使用されるため、材料に本来存在している微生物の可能性が完全に払拭できない。また、製造工程の無菌性の保証のために

中間産物及び最終製品由来の検体をロットごとに製造環境と同等な無菌環境下で実施する必要があります。

通常は、培地に直接検体を接種する直接法を用いますが、もし培地中に構成物質など、微生物発育阻止活性をもった添加物が入っている場合には、メンブレンフィルター法という方法で、添加物を除去してから菌検出を行います。

事前に検体中の微生物発育阻止活性の有無を確認し、正しい試験方法を選択することが大切です。また、培地のロットごとに、細胞を調製する環境下で検出される菌を用い性能試験を行うことが望ましいといわれています。

従来の無菌試験では、結果が出るまでに日数を要し、最終製品の無菌試験結果が投与後になってしまうことがある。そのため、なるべく早く結果が出るよう、フィルター上に補足した菌を短時間培養し形成された微小のコロニーを蛍光染色し、蛍光顕微鏡下で検出・カウントするマイクロコロニー法や、フィルター上に補足した菌を非培養で蛍光染色し、検出する機器も開発されている。今後、さらに迅速・簡便・高精度・高スペクトラム検出を可能とする試験方法が開発されることが期待されています。

非臨床試験

一般毒性試験

NOGマウス(ヌードラット*)を用いた単回または反復静脈内投与による一般毒性および造腫瘍試験

生命維持に関わる重要な器官および組織に対する影響評価 (= **安全性薬理試験**)
(一般毒性評価に係る重要な試験の中でサテライトを置いて実施; 中枢・呼吸器・心血管系)

造腫瘍性試験

・*in vitro*での評価

①核型分析試験 (最終製品を使用、G-bang法)

②足場非依存性増殖能試験

・*in vivo*での評価

①一般毒性試験の病理組織学的検査結果を用いて評価することも可能。

*投与経路や投与量によっては、最適な動物を選択する。

↑
いきなり、本試験は無理

①投与液(細胞)の**均一性安定性試験**

②**MTD/MFD用量設定試験が必要**

再生医療等安全性確保法の下での臨床試験では、必ずしも一般毒性試験(安全性薬理試験)は求められず、研究者による非臨床試験結果にて臨床試験実施されるが、再生医療等製品では、GLP施設での一般毒性、造腫瘍性試験が求められる。

再生医療等製品、特定細胞加工物において、非臨床試験の実施が必要です。ここでは、再生医療等製品における非臨床試験を示しています。

一般毒性試験は、NOGマウス(ヌードラット*)を用いた単回または反復静脈内投与による一般毒性および造腫瘍試験、生命維持に関わる重要な器官および組織に対する影響評価(= **安全性薬理試験**)

(一般毒性評価に係る重要な試験の中でサテライトを置いて実施; 中枢・呼吸器・心血管系)を行います。また造腫瘍性試験のうち、*in vitro*での評価は、①核型分析試験(最終製品を使用、G-bang法)

②足場非依存性増殖能試験、*in vivo*での評価は、①一般毒性試験の病理組織学的検査結果を用いて評価することも可能です。

GLP施設での試験は、非常に1000万円を超す、高額になります。投与量は、予め投与液の①投与液(細胞)の**均一性安定性試験**、

②**MTD/MFD用量設定試験を実施してから決定します。観察期間は、投与回数が、単回か複数回かによっても異なります。**

なお、再生医療等製品では、GLP施設での一般毒性、造腫瘍性試験が求められます。再生医療等安全性確保法の下での臨床試験では、必ずしも一般毒性試験(安全性薬理試験)は求められず、研究者による非臨床試験結果にて臨床試験実施されているのが現状です。

造腫瘍性試験

品質・安全性試験、造腫瘍性試験

製品中の細胞が異常に増殖して腫瘍形成する恐れがあるか？

最終製品

中間製品

「目的外細胞として造腫瘍性細胞が含まれるか」

In vivo試験
核型分析 (G-Band)
細胞増殖特性評価
軟寒天コロニー形成試験

「どのくらいES/ iPS細胞が残存しているのか」

In vivo試験
qRT-PCR
フローサイトメトリー
直接培養法

「投与細胞が生着する微小環境で腫瘍を形成するか」

In vivo試験

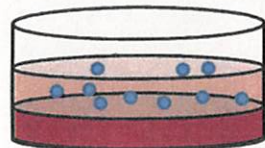
試験方法の能力と限界を踏まえ、個別の製品で示すべき目的に合うかどうかで取捨選択

核型分析 (G-band)

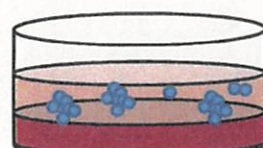


染色体異常が培養過程で継続して観察されるか
染色体異常→腫瘍？

軟寒天コロニー形成試験

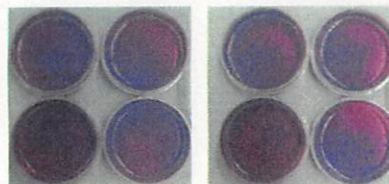


3~4週間培養



マスター細胞

Hela細胞



造腫瘍性試験は、製品中の細胞が異常に増殖して腫瘍形成をしないことの評価を行うため試験である。

対象とする細胞により試験項目は多少異なる。iPSなどの遺伝子導入された細胞では最終製品に造腫瘍性細胞が含まれていたり、未分化な細胞が残存している可能性が高いため

造腫瘍性を否定する根拠となる品質試験項目は必然的に多くなる。

核型分析は分裂中期の細胞を低張処理、固定、染色して染色体数の数的異常、構造的異常を調べる。問題のある異常なのか、無視できる異常なのかの判断は容易ではない。

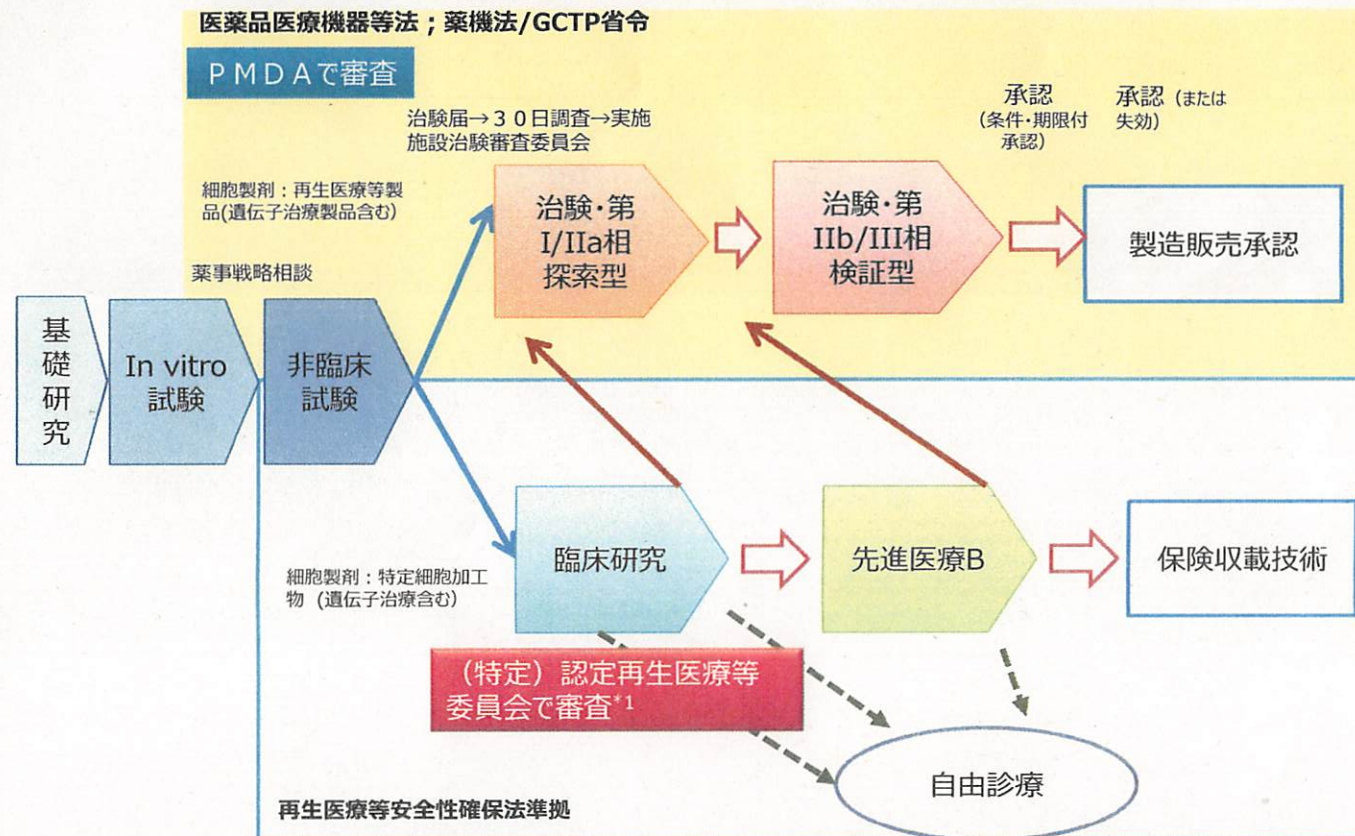
判断の一つのポイントは、それらの異常が培養過程で継続して観察されるかどうかである。

細胞増殖特性評価は、細胞を4週間またはそれ以上に渡って継代し、細胞の異常増殖が認められるかどうかを確認するものである。

軟寒天コロニー形成法は、アガロース上に被検細胞を播き、足場非依存性にコロニーを形成し増殖する能力があるかを確認する方法である。

これらいずれの方法にも検出限界があることを理解し、慎重に結果の判断をする必要がある。

細胞製剤の開発トラックからみた規制等



^{*1}第1～2種は特定認定、第3種は認定再生医療等委員会。第1種→厚生科学審議会→厚生労働大臣→90日間提供制限後に提供開始。第2～3種は、厚生労働大臣へ提出後提供開始。

細胞治療認定管理師制度テキストより抜粋