

# 再生医療等製品の品質評価技術

株式会社住化分析センター

経営推進本部 技術開発センター

岩 田 美 紀

テクニカルソリューション本部 大分ラボラトリー

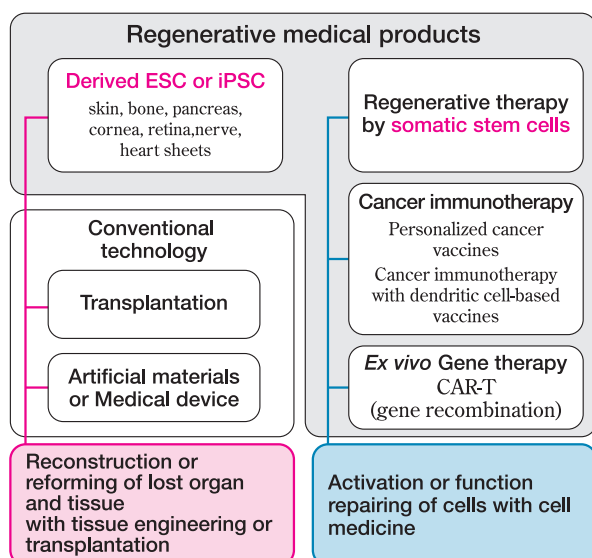
藤 井 清 治



## はじめに

医薬品開発の主流は、低分子化合物からバイオ医薬品へとパラダイムシフトが起きている。バイオ医薬品の代表的なものは抗体医薬品であるが、近年は組織の再生や細胞を用いたがん治療といった「再生医療」が注目されている。再生医療とは、生体の細胞が持つ再生能力を引き出した細胞（多能性幹細胞）から作り出した、分化細胞や組織を用いた新しい医療である。従来から行われてきた臓器移植はドナーの不足、移植後の免疫抑制剤使用に由来する合併症リスクなどの課題も多く、これに代わる医療としても期待されている。一方、「再生医療等製品」とは、「ヒトまたは動物の細胞に培養等の加工を施したものであり、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）、または遺伝子治

療を目的としてヒトの細胞に導入して使用するもの」と政令で定義されている（Fig. 1）<sup>1)</sup>。株式会社住化分析センターは再生医療等製品の承認申請に必要な品質試験を中心に、開発と製造に必要な評価を、製薬企業およびアカデミアからの受託試験として実施している。品質試験の項目については、「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」<sup>2)</sup>にて具体的に記されている。しかし、立体構造を持つ組織製品や、最終製品で保存液を使用するなど細胞製品も多様化しており、実際の非臨床/臨床試験のための検体の品質評価には、ガイドラインの項目から特性や製造方法にあった評価試験を設定しなければならない。当社ではさまざまな分析技術を応用して製品ごとに最適化するための検討や開発を行い、ほとんどの項目をGMP（Good Manufacturing Practice）体制で実施している（Table 1）。本稿ではその技術について当社での実施事例を紹介する。



**Fig. 1** Regenerative therapy: Classification of treatments and products

## 細胞数（生細胞率）、顕微鏡観察およびスフェロイドの粒度分布の計測

原材料の細胞および細胞製品の品質管理で細胞数・生細胞率の算出は必須となる。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（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。分化細胞の評価・計測には蛍光顕微鏡（BZ-X710（株式会社キーエンス））（Fig. 2(a））による形態観察を行い、数値で細胞形態を評価することも可能である。Fig. 2(b)および(c)に、間葉系幹細胞（MSC: Mesenchymal stem cell）の形態解析結果を示す。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、レーザー回折式粒度分布測定装置（SALD-2300（株式会社島津製作所））を用いた評価法の開発にも取り組んでいる。

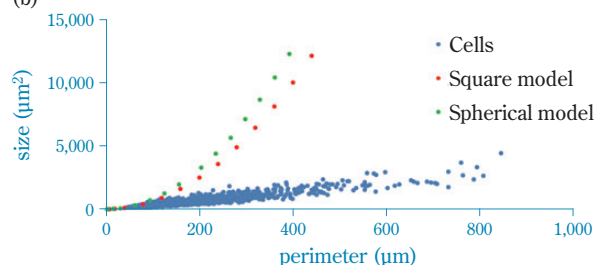
**Table 1** Specifications for Regenerative Medicine

| Evaluations                                                | Test items                                                                                              | Methods                                                                                                       |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Contents                                                   | Cell number and cell viability                                                                          | Cell counting, FACS<br>Cell observation                                                                       |
| Identification                                             | Biochemical markers, immunological markers                                                              | FACS, PCR<br>Cell observation, immunocytochemistry<br>Transepithelial endothelial electrical resistance (TER) |
| Purity                                                     | Undifferentiated cells, cells exhibiting abnormal growth, transformed cells, contaminating cells        | Cell observation, immunocytochemistry<br>PCR FACS                                                             |
| Process-related impurities                                 | Targets:<br>BSA from serum, DMSO, chemicals, antibiotics, metal ions, plasmid vector                    | LC/MS, GC/MS, ICP-MS, ELISA, PCR                                                                              |
| Cell-derived undesirable physiologically active substances | Cytokines                                                                                               | LC/MS, GC/MS<br>ELISA, Membrane array                                                                         |
| Sterility tests<br>Safety                                  | Karyotype,<br>Tumorigenicity,<br>Sterility test,<br>Mycoplasma test,<br>Endotoxin test,<br>Virus test   | Karyotype (G-band, Q-band)<br>PCR<br>JP17 Microbiological evaluation<br>Rapid microbiological evaluation      |
| Efficiency                                                 | Protein Expression, Phenotype<br>Secretion of a specific physiologically-active substance from the cell | ELISA, Cell based assay                                                                                       |

(a)



(b)



(c)

| D-Values*   | D10   | D50: median | D90   |
|-------------|-------|-------------|-------|
| Circularity | 0.113 | 0.235       | 0.534 |

\*D-values (D10, 50 and 90) indicates the particle sizes which the cumulative number of cells is 10%, 50% and 90% respectively.

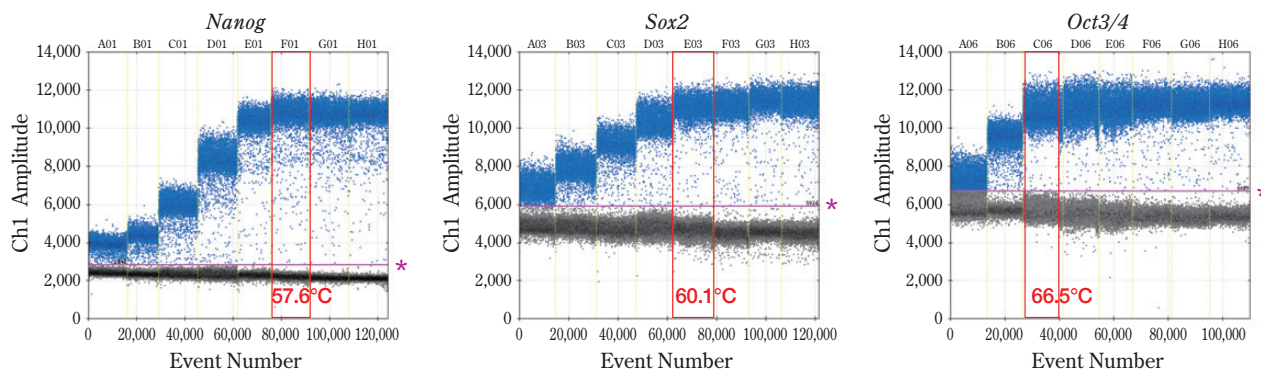
**Fig. 2** Microscope for cell observation and size distribution of mature cells

(a) BZ-X710 KEYENCE The microscopy in our laboratories is managed under GMP Regulation. (b) Cell size distributions (c) Circularity

### 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析の主要な手法としてはリアルタイムPCR法（定量PCR法）が用いられるが、本法には検出下限が比較的高く、相対定量であり、作業も煩雑であるという欠点がある。一方、当社が導入しているドロッ

プレットデジタルPCR法（ddPCR法）は、絶対定量が可能であり（検量線や相対評価対象のための評価マーカー不要）、定量PCR法と比較して短時間で多検体の結果が出ることや、PCR効率（プライミング効率）の影響が小さいことなどの利点がある。このddPCR法は、



**Fig. 3** ddPCR: Expression analysis of pluripotency markers  
Blue dots: Positive droplets, Black dots: Negative droplets, \* Threshold line

PCR反応のアニーリング温度の検討も容易であり、*Nanog*、*Sox2*、*Oct3/4*といった対象遺伝子の発現量の比較も簡便に実施できる (Fig. 3)。

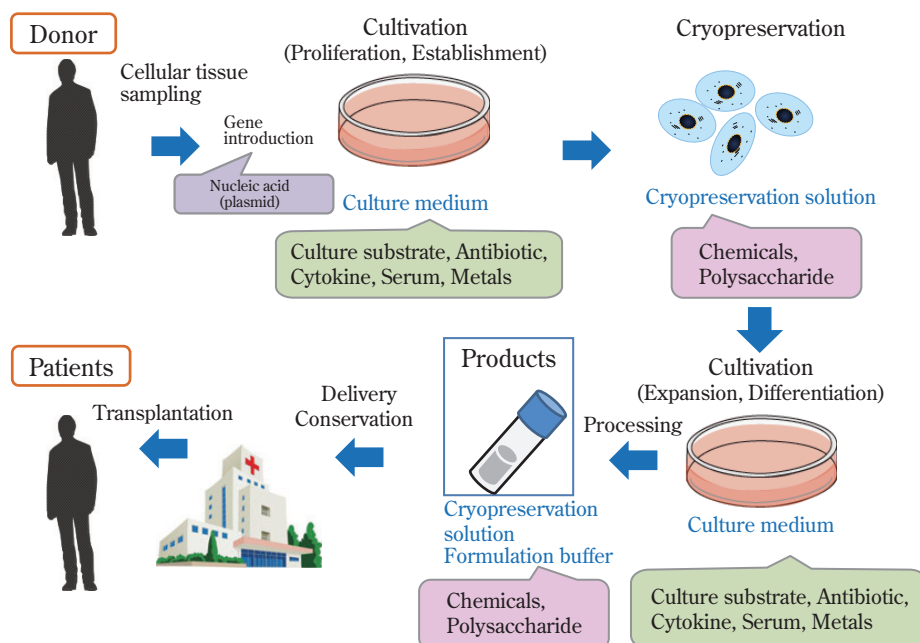
#### 細胞製品の製造工程由来不純物分析

細胞製品の製造工程での培養培地や保存液成分は完全に取り除くことができないため、一部は製造工程由来不純物として分析対象となる (Fig. 4)。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、残存量を厳格に評価する必要があり、対象物質に応じた機器・分

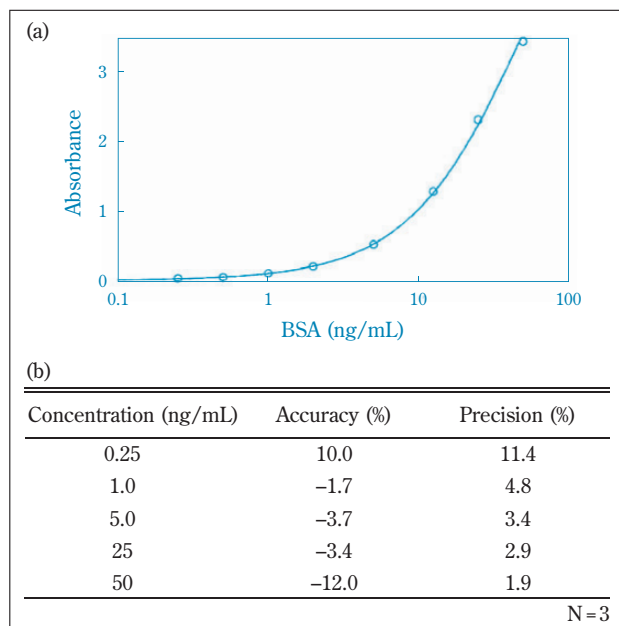
析法の選択、マトリクスの干渉を低減する処理の検討が必要となる。以下に実施例を示す。

#### 1. ウシ血清アルブミン (BSA) の分析

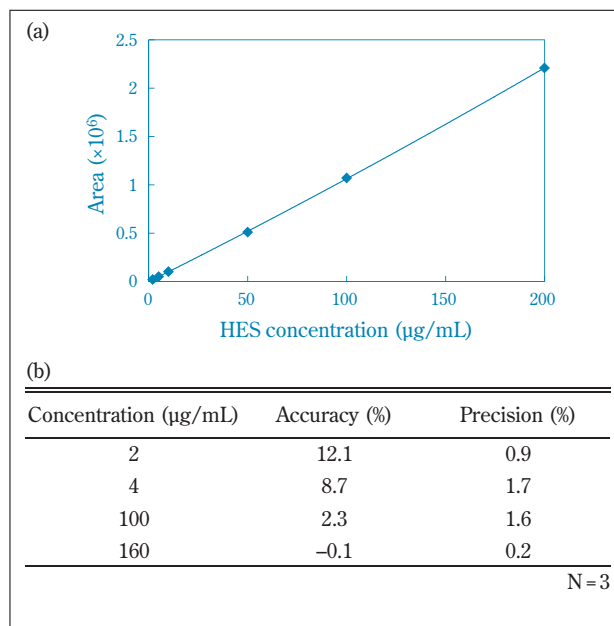
培養で用いる培地に異種由来のタンパク質を使用している場合は、その残存量評価と管理が特に重要となる。汎用的に用いられているウシ胎仔血清 (FBS) の主成分であるBSAについて、MSC凍結ストック中の残存量をELISAにて定量するために分析法を検討した。その結果、0.25~50 ng/mL (タンパク質抽出液中2~400 ng/mL 相当) を定量範囲とする良好な再現性の



**Fig. 4** Impurities in manufacturing process of regenerative medical product



**Fig. 5** Validation of ELISA assay for the determination of BSA  
(a) Calibration curve (b) Repeatability



**Fig. 6** Validation of LC-CAD method for the determination of HES  
(a) Calibration curve (b) Repeatability

**Table 2** Microbiological testing

| Testing item         | Testing method                             | Note                                                                                                                        |
|----------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sterility test       | Membrane filtration method                 | Apply to filterable samples ( <i>e.g.</i> , Culture supernatant, Lower concentrations of the cell suspension, <i>etc.</i> ) |
|                      | Direct inoculation method                  | Apply to the sample impossible to filter ( <i>e.g.</i> , Higher concentrations of the cell suspension, <i>etc.</i> )        |
| Endotoxin test       | Gel-clot technique                         | Limit test                                                                                                                  |
|                      | Turbidimetric method                       | Quantitative test                                                                                                           |
|                      | Chromogenic technique                      |                                                                                                                             |
| Mycoplasma test      | A Culture method                           | Culture method using Liquid and agar media                                                                                  |
|                      | B Indicator cell culture method            | Culture method using Vero cells                                                                                             |
|                      | C Nucleic-acid amplification testing (NAT) | Rapid method to replace the culture method                                                                                  |
|                      | Endpoint technique, Realtime PCR technique |                                                                                                                             |
| Rapid sterility test | Membrane filtration method                 | Apply to filterable samples ( <i>e.g.</i> , Culture supernatant, Lower concentrations of the cell suspension, <i>etc.</i> ) |
|                      | Surface-spread method                      | Apply to the sample impossible to filter ( <i>e.g.</i> , Higher concentrations of the cell suspension, <i>etc.</i> )        |

ある分析法を確立できた (Fig. 5)。

## 2. 保存液中の高分子化合物の分析

細胞保存液には凍結時の凍害防止、輸送中の物理的  
刺激からの保護の目的で高分子化合物（多糖類）を含  
有するものが多く、この成分の残存量の定量、洗浄作

業後の除去効率の評価が求められる。細胞保存液に含  
まれる多糖類ヒドロキシエチルスターチ（HES）を対  
象としてHPLCに荷電化粒子検出器（CAD: Charged  
Aerosol Detector）を接続した装置を用いて分析法を検  
討した。その結果、2～200  $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線  
性と再現性を示す分析法を確立できた (Fig. 6)。UV吸



収がなく、くりかえし構造である高分子ポリマーを分析対象とする場合、CADを用いた分析は有用である。

## 再生医療等製品の無菌性保証としての微生物学的評価

当社では、表に示す微生物学的評価試験<sup>3), 4)</sup>を実施している (Table 2)。ここでは、再生医療等製品などで注目されるマイコプラズマ否定試験と無菌試験迅速測定について紹介する。

### 1. マイコプラズマ否定試験

マイコプラズマ否定試験法は日本薬局方 (JP) 参考情報<sup>5)</sup>に記載されており、培養法 (A法) および DNA 染色法 (B法) は増殖可能なマイコプラズマを検出できる利点があるが、培養に要する日数が6~28日間と長期間であるため、試験の迅速性から核酸増幅法 (C法)

が第一選択として考えられる。特にC法はA法およびB法と比較して多検体処理も可能なことから、より有利な測定法である。当社ではJPで陽性対象として要求される7菌種すべての凍結ストックを保有し常時利用可能としている。

### 2. 無菌試験迅速測定法の確立

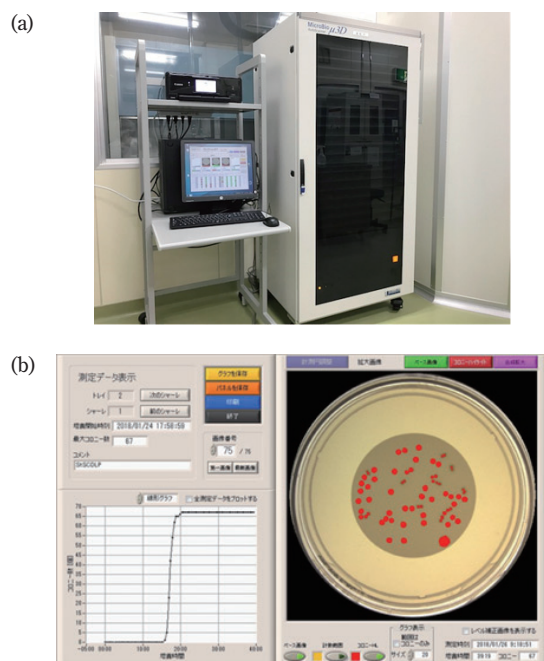
無菌試験迅速測定法はJPの記載にもあるようにさまざまな手法が一般に用いられているが、当社では寒天培地を利用したマイクロコロニー法を導入し試験法を確立した。マイクロコロニー法は従来法と同じ培養手法であるものの、増殖可能な微生物を特異的かつ網羅的に検出でき、コロニー形成初期の微小コロニー (マイクロコロニー) を高感度CCDで早期に検出することにより、従来の目視判定よりも迅速に検出することができる (Fig. 7(a), (b))。

### おわりに

再生医療等製品を、効果的かつ安全な新しい医薬品として速やかに社会に届けるために、評価法、分析法の構築は重要であり、当社は技術力で、この新規医療の創製に大きく貢献している。今後も新規の技術を取り入れるなど多様なニーズに応え、分析法の国際的標準化も視野に入れて、技術開発を進めていきたい。

### 引用文献

- 1) “再生医療等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)” <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10800000-Iseikyoku/0000030847.pdf> (参照 2019/3/22)。
- 2) 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 (平成28年6月14日)” <https://www.pmda.go.jp/files/000212850.pdf> (参照 2019/3/22)。
- 3) 藤井 清治 ほか, SCAS NEWS, **2016-II**, 9 (2016)。
- 4) 藤井 清治, SCAS NEWS, **2018-II**, 3 (2018)。
- 5) 厚生労働省, “第十七改正日本薬局方 参考情報”, [https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/JP17\\_SANKOU.pdf](https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/JP17_SANKOU.pdf) (参照2019/3/22)。



**Fig. 7** Rapid sterility test using microbiological test system based on Time-lapse Shadow Image

(a) MicroBio µ3D Becton, Dickinson and Company Rapid sterility testing is performed using the apparatus based on the Micro-colony method. (b) Report of Rapid sterility test analysis detects colonies and generates growth curves.