

ヒト細胞を用いた医療製品のための CPCのあり方

独) 医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部

ヒト幹細胞応用開発室

古江-楠田美保

懸案事項

1. 無菌性
2. 交差汚染
3. 設置場所
4. 機器類のレイアウトとメンテナンス
5. 作業者の育成
6. 細胞培養操作のリスクマネジメント
7. 細胞培養操作の検証の必要性

治療用多能性幹細胞の品質について 海外との意見交換

- 2012年、2013年の海外CPC視察における意見交換
(H23、24年度 厚労省 ヒト幹細胞臨床調査業務調査委員会)
 - UK stem cell bank (英) 古江
 - Sheffield University (英国で最初の臨床用施設、現在は閉鎖)
 - Waisman Biomanufacturing (米、ウィスコンシン) 末盛先生、古江
 - CHA Hospital (韓国) 阿久津先生、末盛先生、古江
 - UTCG Nantes 青井先生
 - I-Stem 青井先生
- International stem cell banking initiative (ISCBI)
 - Clinical banking guidelineの策定 佐藤先生、末盛先生、松山先生、中村先生、古江、

懸案事項

1. 無菌性
2. 交差汚染
3. 設置場所
4. 機器類のレイアウトとメンテナンス
5. 作業者の育成
6. 細胞培養操作のリスクマネジメント
7. 細胞培養操作の検証の必要性

懸案事項その1：無菌性

- 細胞は滅菌できない。（＝完全な無菌は無理）
- コスト面から妥当な検査を選択する必要がある。

(UK stem cell bank, Sheffield)

- 1細胞1ルームにする必要はないだろう。すでにするべき検査を行って、現状において問題となる微生物が検出されていないのに、なぜ部屋を限定する必要があるのか？
- 技術が確立されても、高い経費により国民がその技術に基づく医療を受けられないのであれば意味がない。

では、どれを選択すべきなのか？

それぞれの国の事情によるだろう。

懸案事項

1. 無菌性
2. 交差汚染
3. 設置場所
4. 機器類のレイアウトとメンテナンス
5. 作業者の育成
6. 細胞培養操作のリスクマネジメント
7. 細胞培養操作の検証の必要性

懸案事項その2：交差汚染

- 合理的な作業工程の策定により回避できる。
- 合理的であることを検証をする。

(UK stem cell bank, Sheffield, Cha hospital)

- 適切な作業を行えば、交差汚染は発生しない。
- 研究の現場において起きないことは起きない。

普段、複数の細胞を1つのインキュベーターに入れているが、問題は起きていない。もし起きるとすれば、作業者に問題があり、それはSOPで避けられるだろう。

例) シェフィールド大では、1トレイ1細胞種類として、1つのインキュベーター内に複数ドナー細胞を入れて培養。検証実験を実施し、交差汚染していないという検査結果を提示。

例) CHA病院では、製造工程ごとに部屋を使用。複数ドナーを1つの部屋で使用。インキュベーターは1ドナー2台使用。

懸案事項

1. 無菌性
2. 交差汚染
3. 設置場所
4. 機器類のレイアウトとメンテナンス
5. 作業者の育成
6. 細胞培養操作のリスクマネジメント
7. 細胞培養操作の検証の必要性

懸案事項その3：設置場所

- UK stem cell bank (郊外)
- CHA hospital(病院内)
- Sheffield (病院内)
- Waisman (病院内)

郊外の場合、たとえば牧場が近くにあるような設置場所であるとすると、感染対策、虫対策が課題になる。実際、入り口付近には多数の虫の死骸が見られた。



Waisman center



CHA hospital



UK stem cell bank
(NIBS)



Royal Hallamshire Hospital
(Sheffield)

懸案事項

1. 無菌性
2. 交差汚染
3. 設置場所
4. 機器類のレイアウトとメンテナンス
5. 作業者の育成
6. 細胞培養操作のリスクマネジメント
7. 細胞培養操作の検証の必要性

懸案事項その4： 機器類のレイアウトとメンテナンス

効率よい作業を行うためのレイアウトを決めるのは難しい (Sheffield)。

使うものは、ほぼ決まっているのに、なぜ標準化できない？



Cell processing centre, The University of Sheffield
Royal Hallamshire Hospital

CHA Hospital/Global stem cell clinical trials center



懸案事項

1. 無菌性
2. 交差汚染
3. 設置場所
4. 機器類のレイアウトとメンテナンス
5. 作業者の育成
6. 細胞培養操作のリスクマネジメント
7. 細胞培養操作の検証の必要性

懸案事項その5：作業者の育成

米、英：現状では対策はない。

CHA病院：育成に力を入れている。
高給を支払う。

- 難しい。
- 熟練者なしには成立しない。
- 育成に力を入れる必要がある。

Bundang CHA Hospital

- 幹細胞の開発に対するほとんどの操作は、熟練した技術者が行なっている。同院のグループでは、国内にし、各施設では100名以上の熟練技術者が働いている。
- 毎年、研究者も募集しており、約30%の研究者はグループの大学の卒業生である。待遇は非常によく、中級の研究科学者の年収は少なくとも5万ドル、上級研究者の場合、年収は8万ドルとなる。
- 同院の研究センターでは、1つの製品ごとに、チームを組成して研究を行っている。各チームは、医師、医学博士、教授、研究者、前臨床チームおよびCRM（顧客関係管理）全体から成り、幹細胞製品の最初の段階は、前臨床から臨床に至る幹細胞研究でデザインされています。このシステムにより、失敗を減らし、コストと時間を提言することができる。

シェフィールド大学： 人材確保が一番難しい。このメンバー以外では考えられない。



日本組織培養学会の取り組み

細胞培養士 認定制度

(教育研究システム委員会)

- 1996年 実習の必要性について議論開始
- 2003年 教育研究システム委員会のシンポジウム (実習講演)
- 2005年 実習の立案
- 2007年 第1回 細胞培養基盤技術コース開催
- 2012年 細胞培養士第一号 認定

なぜ、こんなに時間がかかったのか？ = 指導者の標準化が難しい

作業者の育成 < 指導者の育成 < 細胞培養の標準化

目的

深刻なクロスコンタミネーションやマイコプラズマ感染などが報告されている一方、再生医療や薬剤毒性評価に培養細胞の利用が注目されている。安全、高品質で汎用性のある培養細胞を使用して、科学的に安定した結果が産生されるために、培養技術を標準化していくことを目的とする。その一環として、培養実習を行い、細胞培養士を育成する。

各コースの概要

講習は細胞培養基盤技術コースI~IIIを基本コースとする。

全コース終了した後、細胞培養士認定委員会が認定した会員に細胞培養士の認定書を発行する。

〈細胞培養基盤技術コースI〉

- 基本を理解し、細胞株を適切な方法で培養できる。

〈細胞培養基盤技術コースII〉

- 品質管理法を理解し、細胞を用いたアッセイが行える。

〈細胞培養基盤技術コースIII〉

- : 基本的知識を持ち、かつ研究倫理を理解し、自立して培養細胞株を扱うことができる。

通番	開催期間	会場
1	2007.08.30-31	独) 医薬基盤研究所
2	2008.02.04-05	独) 医薬基盤研究所
3	2008.02.07-08	広島大学歯学部
4	2008.07.12-13	広島大学歯学部
5	2008.07.19-20	広島大学歯学部
6	2008.08.28-29	広島大学歯学部
7	2008.10.25-26	栃木県立衛生福祉大学校
8	2009.02.20-21	広島大学歯学部
9	2009.07.04-05	広島大学歯学部
10	2009.08.22-23	広島大学歯学部
11	2009.10.24-25	獨協医科大学
12	2009.11.07-08	獨協医科大学
13	2009.12.05-06	獨協医科大学
14	2010.02.20-21	広島大学歯学部
15	2010.06.19-20	獨協医科大学
16	2010.07.17-18	広島大学歯学部
17	2010.07.30-31	獨協医科大学
18	2010.08.26-27	広島大学歯学部
19	2010.11.20-21	獨協医科大学
20	2010.12.04-05	獨協医科大学
21	2011.02.19-20	京都大学CiRA
22	2011.07.09-10	広島大学歯学部
23	2011.07.23-24	獨協医科大学
24	2011.08.27-28	広島大学歯学部
25	2011.10.22-23	京都大学CiRA
26	2012.02.18-19	獨協医科大学
27	2012.06.23-24	大阪ハイテクノロジー専門学校
28	2012.08.26-27	広島大学歯学部
29	2012.08.28-29	広島大学歯学部
30	2012.11.17-18	京都大学CiRA
31	2012.12.15-16	獨協医科大学
32	2013.2.16-17	獨協医科大学
33	2013.5.11-12	大阪ハイテクノロジー専門学校
34	2013.8.03-04	獨協医科大学
35	2013.8.25-26	広島大学歯学部
36	2013.8.27-28	広島大学歯学部
37	2013.10.26-27	京都大学CiRA
38	2013.12.14-15	獨協医科大学

日本組織培養学会 細胞培養基盤技術コースI 開催状況

〈支援研究機関〉

- 広島大学 大学院医歯薬保健学研究所
- 獨協医科大学 研究支援センター
- 独) 医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部
- 京都大学 iPS細胞研究所
- 長浜バイオ大学
- 大阪ハイテクノロジー専門学校
- 東京バイオテクノロジー専門学校

〈協賛企業〉

大日本住友製薬グループDSファーマバイオメディカル株式会社
コーニングジャパン
株式会社ニコン
マンダム
J-TEC
和光純薬

何を教えているのか？

一人で培養できるようになるヒトを育てることを目的としている。
「培養できる」とはどういうことか、を理解できることが重要。

- ・顕微鏡下に細胞を見て、その細胞の状態が判断できる。
 - ・細胞の分散状況を正しく判断できる。
 - ・培養条件を調べて、正しい培養条件を選べる。
 - ・細胞は生き物であることを認識して対応できる。
(餌のやり方を覚えても、細胞の反応を見て、育てる必要がある。)
- トラブルに対応できる力が必要。

「培養できる」ための、哲学の基本を指導する。
経験で得たノウハウの極意を伝える。

培養実習



細胞培養基盤技術コースI
(広島大学細胞培養実習室にて)



指導者講習会
(日本歯科大学薬理学教室にて)

指導士の標準化が大変。。。。

懸案事項

1. 無菌性
2. 交差汚染
3. 設置場所
4. 機器類のレイアウトとメンテナンス
5. 作業者の育成
6. 細胞培養操作のリスクマネジメント
7. 細胞培養操作の検証の必要性

6. 細胞培養のリスクマネージメント

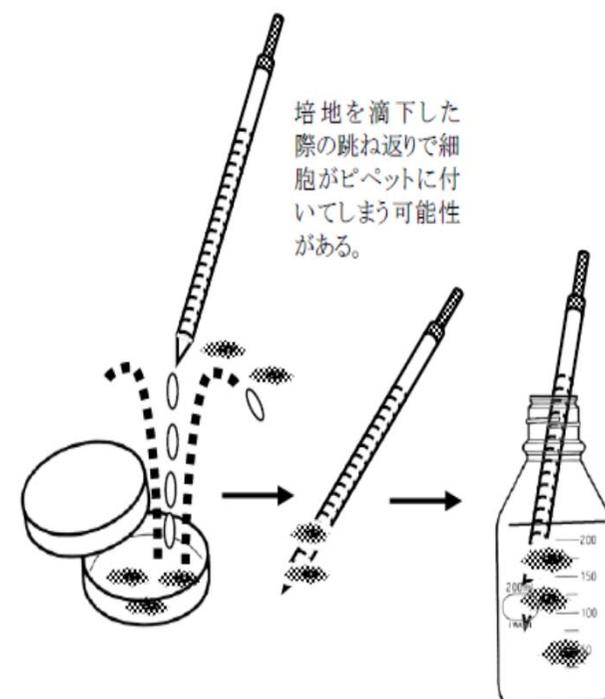
細胞培養における問題：細菌感染、クロスコンタミネーション（細菌、細胞）
細胞生存率、細胞増殖、細胞分化、再現性

- できるだけ失敗しない方法を行う。
- 誰もができる方法を行う。
- 作業の流れをトレーニングする。
- 細胞培養の基礎と意味を理解する。

細胞培養のリスクマネージメントが重要

失敗しない操作

1. 操作の流れを把握する。
2. 実験の準備を十分に行う。
3. 疲れたときに操作をしない。
4. コンタミさせないピペット操作を身につける。
5. 必要なものだけをベンチに置く。
6. 培地やPBSを使用量分に分取する。
7. 培養開始する前に検査を行い、その後も定期的に検査を行う。



無菌操作の場面で

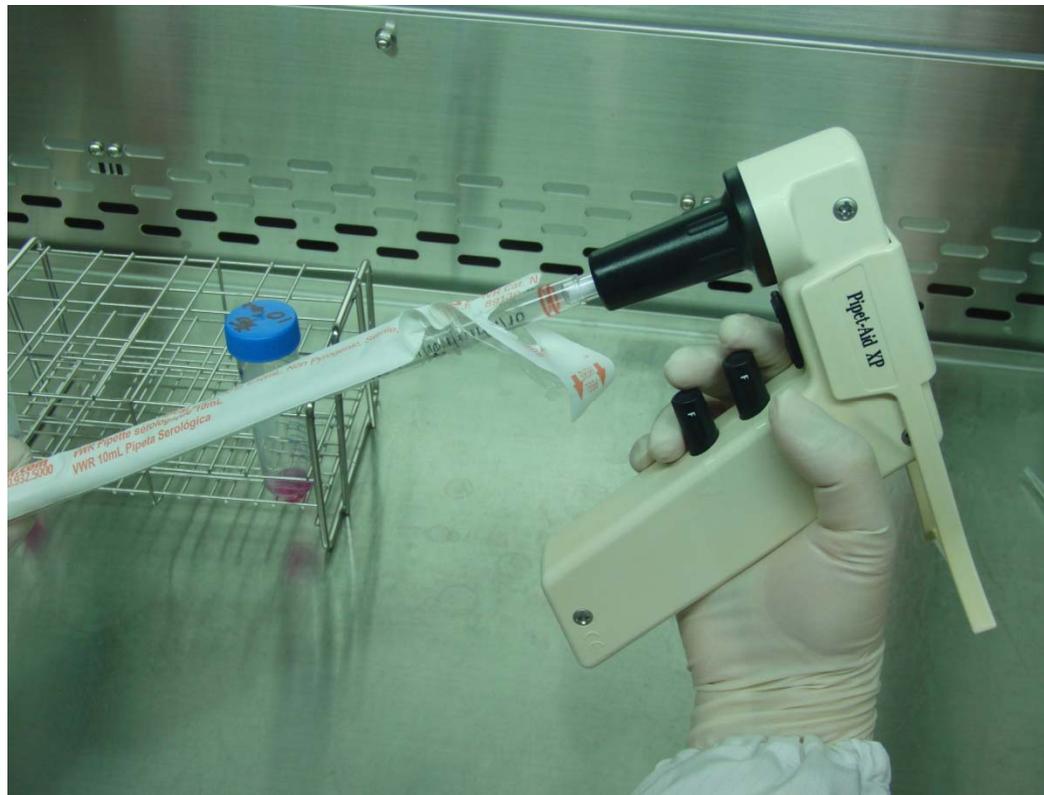
クリーンベンチ(安全キャビネット)の使い方

- ベンチの中央部分しか使用しない。あるいは、手前に物をおく傾向がある。
- クリーンベンチのシャッターを必要以上に開放。



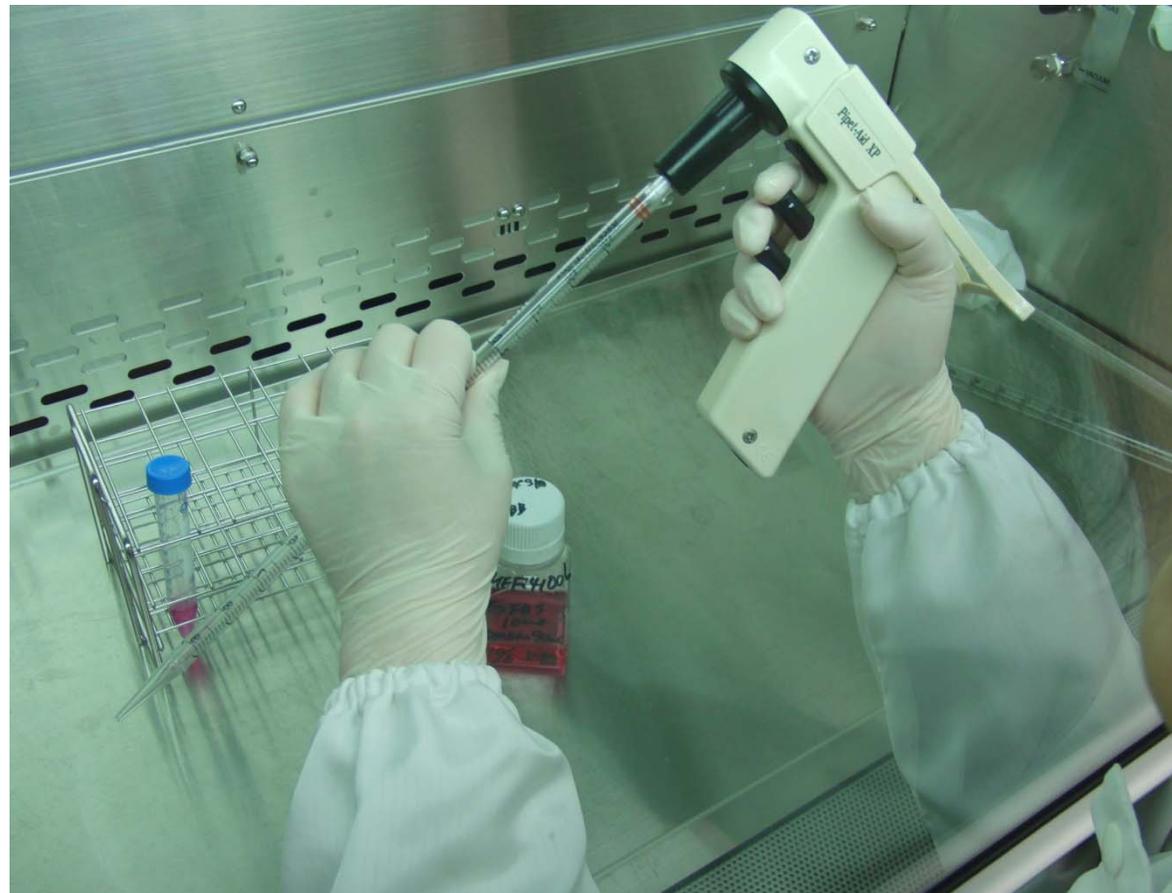
無菌操作の場面で

- 袋を破ってピペットを取り出し、無菌的にピペットを取り出してない。



無菌操作の場面で

- 袋から取り出したピペットの向きを直すため、ピペットの中心部をつかむ。



無菌操作の場面で

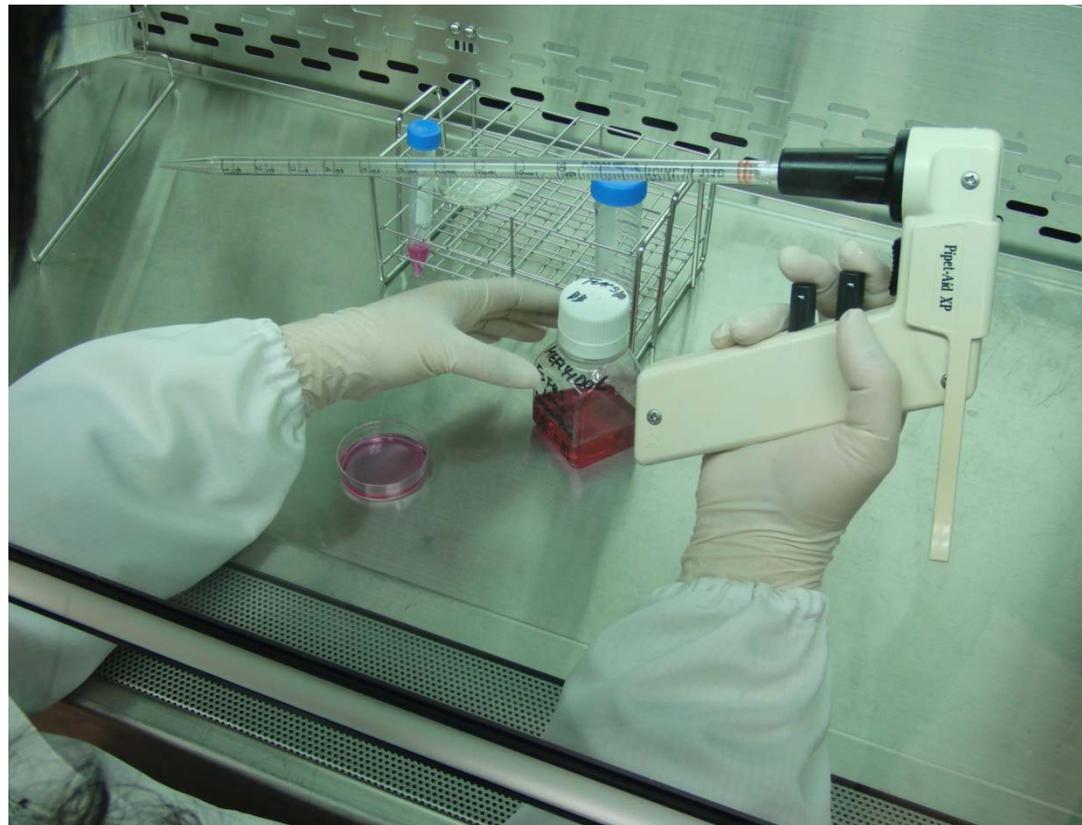
操作の予測と段取りをきちんとしないと情けないことに……

●ピペットコントローラーにピペットを装着した後で培地びんのフタが開いていないことに気がつく。



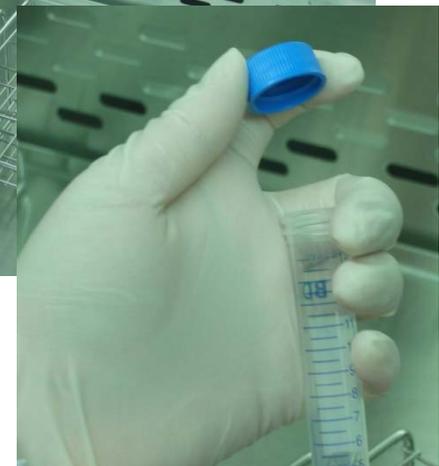
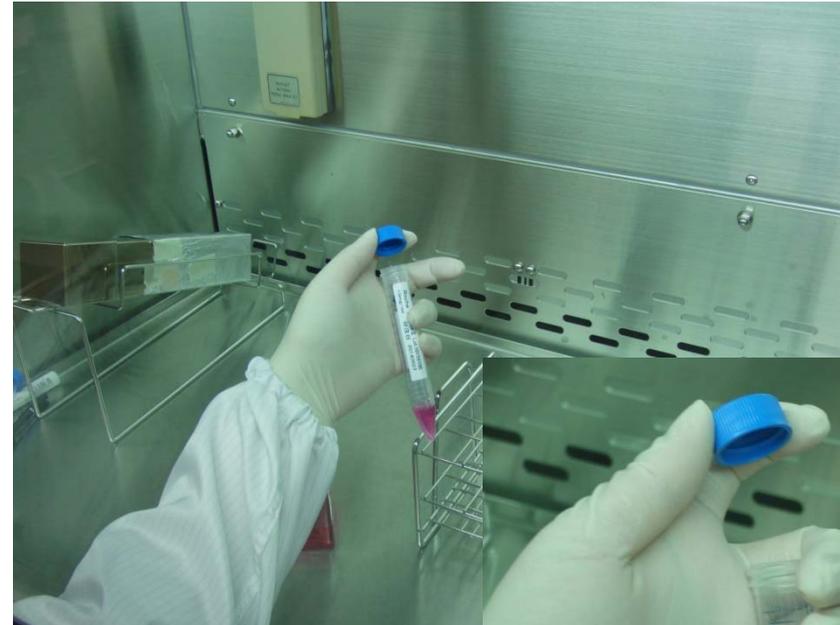
無菌操作の場面で

- 培地びんの開口部やフタを開けたシャーレの上に手をかざす。
- 左にある物を右手で、右にある物を左手で取る。
- ピペットコントローラーにピペットを装着した後で培地びんのフタが開いていないことに気がつく。



無菌操作の場面で

- 片手で開けて、フラスコやチューブのスクリュー部に触れる。
→ 無理して片手で開けるより、蓋を置く方が確実。



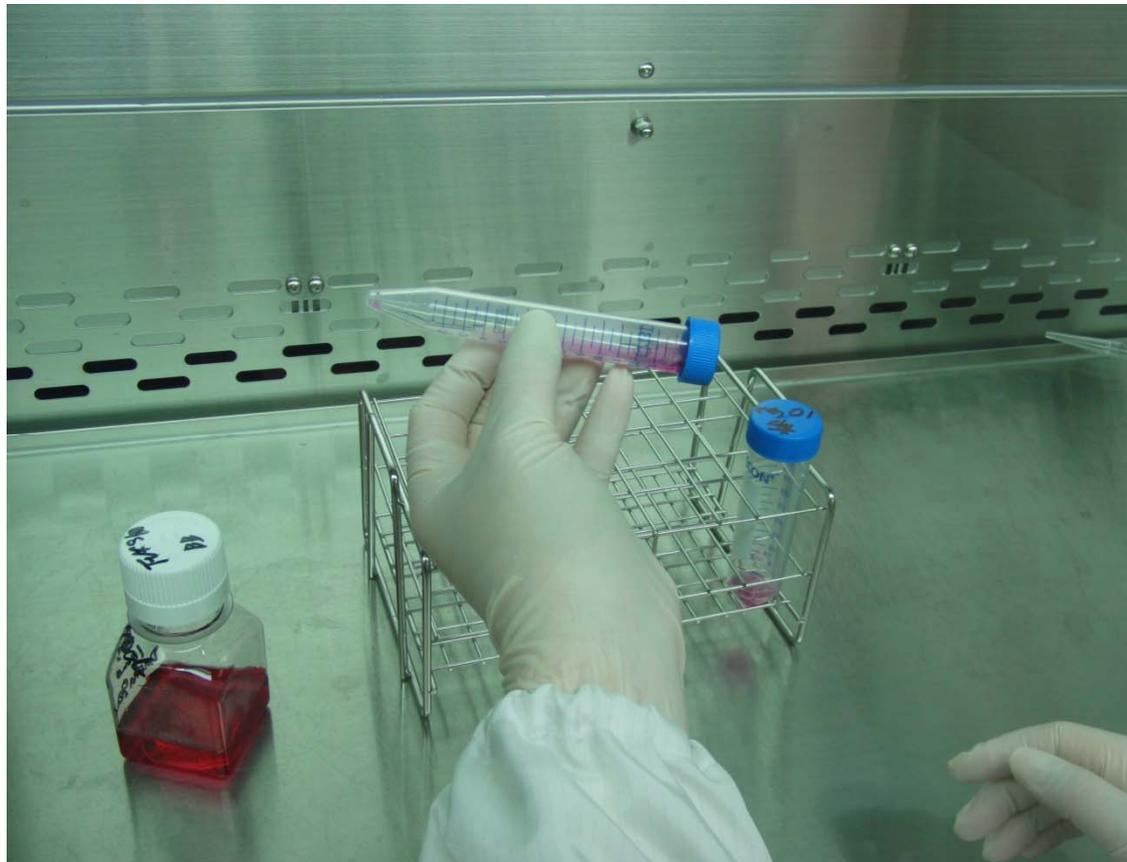
無菌操作の場面で

- 無菌に保持しなければならないサンプルが入ったチューブにディスペンサーの本体を突っ込む。



無菌操作の場面で

- 細胞懸濁液等の転倒混和。



培地に抗生物質は入れない

- 抗生物質を入れると感染した際に発見が遅れる
- 抗生物質に感受性の高い細胞もいる
- 耐性菌が出現する可能性がある
- 初代培養の際には2代目まで
- 抗生物質を入れないと感染するのは、その系になにか問題があるのでは？

国内外の細胞バンクは抗生物質を入れてない。
市販の培養細胞は抗生物質は入っていない。

指導を行っていて感じる課題：対応力

最近は、こんなヒト達が実習に来ます。。。。

- 再生医療関連のベンチャー企業、アカデミアの臨床用細胞部門
- × 作業工程を覚えようとする。
- × お作法を教えてくれると思っている。
- × 細胞の種類が違っていると、どう対処したらいいのか、わからない。
- × 突然のエラーに対応する力がない。
- × 手順書を作製してくるように言っても、作製の必要はないと言う。

レポートの1例

—測定値の意味を理解していないで作業を行っている—

マウスES細胞のDMSOの毒性を評価するため、血球計算盤を用いて測定を行った。DMSO 10%の条件では、ヘモサイトメーターの1視野あたりに6.5個の細胞があり、そのうちトリパンブルーに染まらなかった生細胞は3.5個であった。DMSO 10%による細胞生存率は、 $3.5/6.5$ で、53.9%であった。

DMSO濃度 (%)	0	0.625	1.25	2.5	5	10
全細胞数 ($\times 10^3$ cells)	10	14	12.5	18.5	11	6.5
死細胞数 ($\times 10^3$ cells)	1.0	0.50	0.50	2.5	1.5	3.0
生細胞数 ($\times 10^3$ cells)	9.0	13.5	12	16	9.5	3.5
細胞生存率 (%)	90.0	96.4	96.0	86.5	86.4	53.9

表 11. 血球計算盤を用いて計測した細胞数から算出した各データ

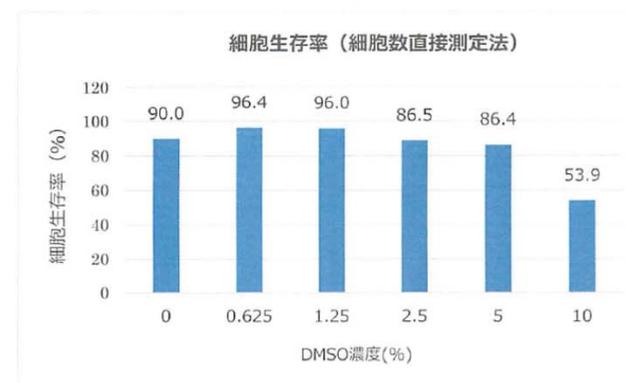


図 7. DMSO の濃度と細胞生存率の関係

- × コントロールの認識がない。
- × 測定値の意味を理解していない。

指導を行っていて感じる課題：理解力

- 測定値の意味が理解できず、グラフを作成できない技術者が
増えているのが、現実のようである。
 - エクセルが使えないらしい（エクセルを信じてる？）
 - グラフ用紙を使ってもらうようにする。
 - 縦軸、横軸をどちらに取ったらよいか、わからない。
 - 単位がわからない。
 - 桁をそろえられない。

理系の教育を受け、少なくとも生物活性の測定値の意味は理解できる必要がある。

→ 基礎教育はだれが行うのか？

懸案事項

1. 無菌性
2. 交差汚染
3. 設置場所
4. 機器類のレイアウトとメンテナンス
5. 作業者の育成
6. 細胞培養操作のリスクマネジメント
7. 細胞培養操作の検証の必要性

(厚労科研費) iPS細胞の品質変動と実用化を目指した培養技術の標準化に関する研究

iPS細胞を用いた研究は再現性が低い

なぜなのか？

培地のロット差
ゲノム不安定性
株間の差

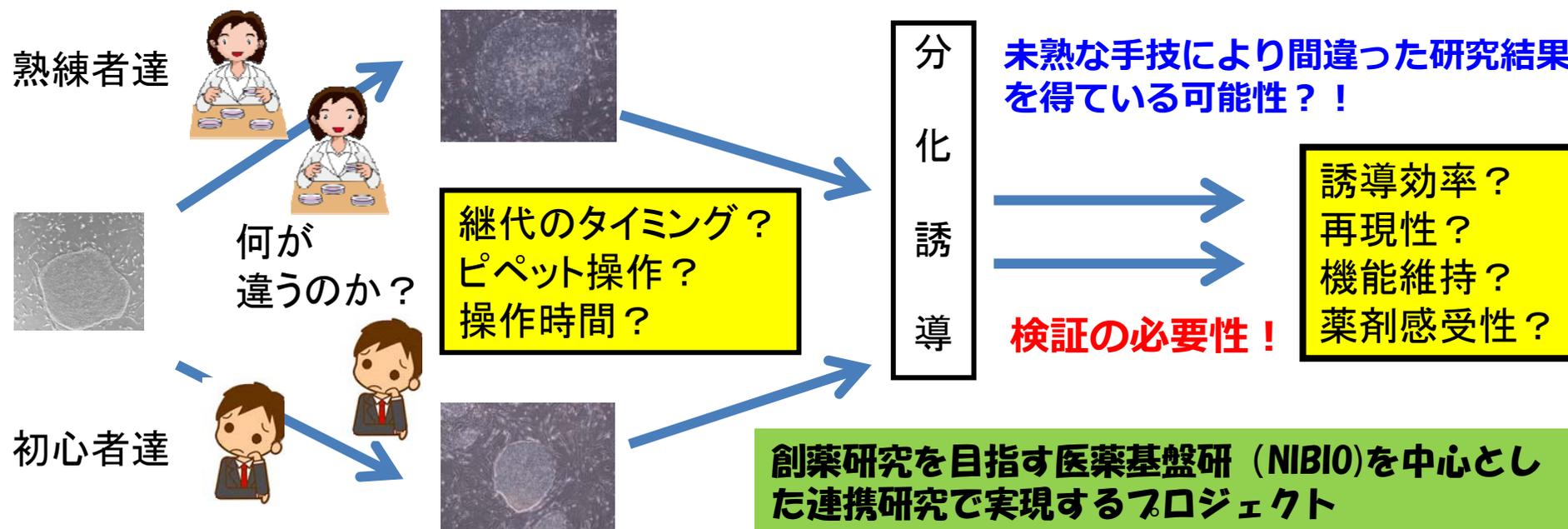


その状態に合わせた
熟練した培養技術が必要

➡ **「熟練した技術による培養技術の標準化が必要」**

標準化プロジェクト (CiRA, NIH, ISCI) もっとも信頼できるスーパー基準を目指している

〈技術が悪いと何が起きるのか？〉 実用化を目指すには先端だけでなく、底上げが必要

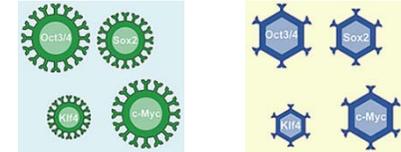
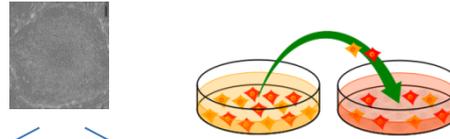


同じ細胞株を培養しても研究室により形質が違う？

培養技術が品質に与える影響を検証

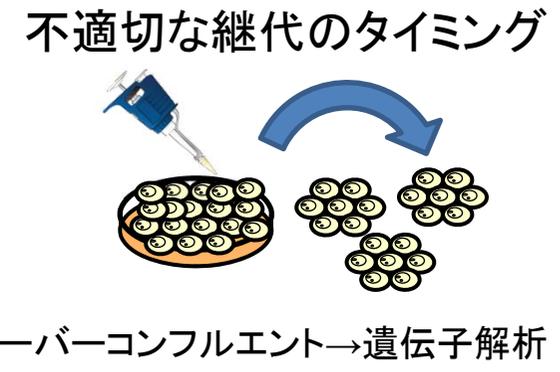
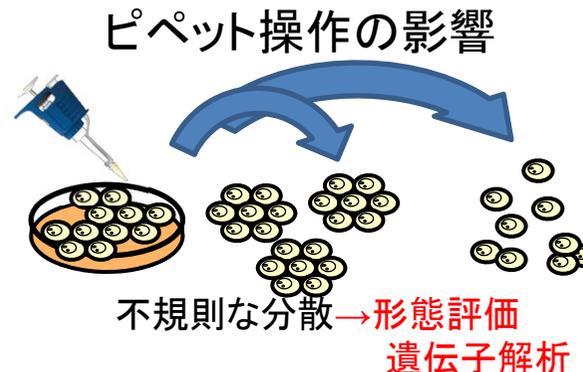
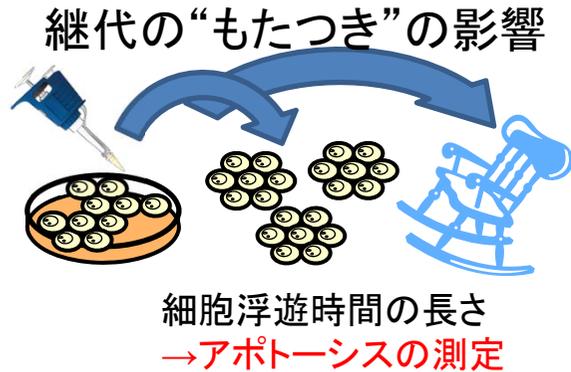
〈① 未分化状態における品質変動の要因の検証〉

iPS細胞の異なる作製方法
(レトロウイルス&センダイウイルス)



レトロウイルス センダイウイルス

熟練者と初心者の手技を模倣した培養



品質変動の評価

未熟な培養技術により、
品質はどれだけ悪化するのか？

絶対的なマーカーはまだ見つかってないため、様々な面から解析が必要

医薬基盤研 ヒト幹応用開発・代謝疾患PJ & 長岡技大 & 産総研 幹細胞センター

懸案事項：まとめ

1. 無菌性は合理性をもって考える必要があるだろう。
2. 交差汚染はSOPで防止できるのでは？
3. 設置場所は考える必要がある。
4. 機器類のレイアウトはブレイクスルーが必要？
5. 作業者の育成のためには、指導士の育成が必要。
6. 細胞培養操作のリスクマネージメントが必要。
7. 細胞培養操作の検証の必要性。