

再生医療・組織工学に用いる細胞の製造

*1大阪大学大学院工学研究科未来医療システムデザイン共同研究講座,

*2大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻生物プロセスシステム工学領域,

*3大阪大学大学院工学研究科テクノアリーナ細胞製造コトづくり拠点

齋藤 充弘*1, 紀ノ岡 正博*2, 3

Atsuhiko SAITO, Masahiro KINO-OKA

1. はじめに

再生医療とは、失われた器官・臓器を再生することを目的とした治療であり、これまでの医療概念を根底から変革する「根治治療」への道を拓くことが期待されている。再生医療では、従来の医療とは異なり、細胞を体外で増幅・分化させ、必要ならば、立体的構造を有する組織化を経て、得られた培養細胞・組織を患者疾患部へ移植し、治癒させることが多い。さらに、近年の胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞をはじめとする幹細胞の研究開発の進展がその可能性を一層高めており、再生医療における新たな培養技術の開発が活発になされている。本稿では、再生医療に用いる細胞と、その細胞または組織の作製に関する考え方、培養工学の観点からみた特徴を解説する。

2. 細胞培養の特徴¹⁾

培養工程において、滅菌することができない原料である細胞・組織を利用するため、無菌環境の維持が重要となり (無菌環境下における非滅菌原料の利用)、さらに、すべての工程でクロスコンタミネーション (交叉汚染) などのヒューマンエラーは許されない (エラーの低減)。培養容器内では、培養面に接着して増殖する足場依存性細胞の場合、多くは静置培養で、通気操作も表面通気であり、培養容器内では、気・液・固各相が存在する不均一系となる (3相の存在)。培養中は、接着、馴化、分裂、分化などの細胞イベントが存在する (個別時系列イベントの存在)。細胞

分裂を繰り返すと、細胞は遊走しながらコロニーを形成するため、容器内局所にて細胞密度の上昇が起こり、細胞同士で囲まれると、分裂を停止する (接触阻害)。その結果、容器内に散在したコロニー内では、その中心と周辺部では細胞の増殖能が異なり (空間的不均一性)、細胞が培養面のほぼ全面を覆ったとき (コンフルエント状態)、培養面から細胞を酵素処理などにより剥離して再懸濁し、新たな培養容器に再播種する継代操作が必要となる。その際、1回の培養において、適度な播種密度と到達密度が要求され、増幅には多回の継代培養が不可欠となる (多回の回分操作と継代操作の必須性)。よって、小型培養容器から大型培養容器まで段階的に変化させるマルチスケールでの培養工程が必要である。

細胞挙動は、患者ごとや採取部位ごと、継代培養を経るごとに異なる特性 (細胞集団的不均一性) を有する。また、患部の大きさや状態は患者ごとで変わるために、個別の要求量に対応した生産スケジュールを立てる必要がある (生産スケールの変動)。したがって、培養状態の把握は不可欠で、情報取得方法について種々検討されているが、培養細胞の希少性により、サンプリングなどの侵襲的な手法によるモニタリングは避ける必要があり、非侵襲的で、経時的に取得可能な細胞観察が有望な手段であると考えられている (非侵襲的モニタリング手法の利用)。

3. 細胞製造の考え方²⁾

自家 (患者自身から採取した細胞を由来とする) や同種 [提供者 (ドナー) から採取した細胞を由来とする] の細胞 (原料) を用いた移植材 (生産物) の生産において、細胞を増幅させる継代培養や構造・機能を付与する組織培養は、主要な工程の1つである。図1に示すように、自家培養移植、もしくは同種培養移植を前提とした細胞・組織の培養で

■ 著者連絡先

大阪大学大学院工学研究科未来医療システムデザイン共同研究講座

(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

E-mail: saito@bio.eng.osaka-u.ac.jp

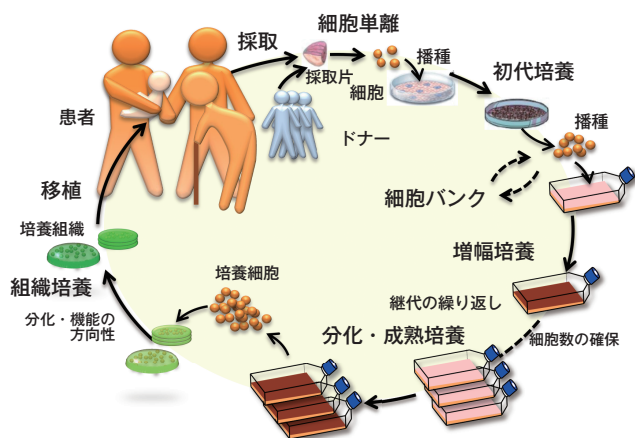


図1 細胞製造の流れ

は、それぞれ、患者もしくは提供者から必要最小量の細胞または組織片を病院にて採取し、これらを原料として細胞培養加工施設 (cell processing facility, CPF) へ搬送される。CPFでの製造においては、採取片から、細胞単離、増幅、分化誘導、形成加工を含めた培養を上工程 (上流工程) に、分離・精製、分注、凍結、梱包を下工程 (下流工程) に分けられ、製品としての培養細胞または組織を得る。その後、製品は病院へ搬送され、移植に使用される。主な培養工程は、体内に存在した細胞を容器内で順化するための初代培養、細胞増幅による十分な細胞数を確保するための継代培養、立体構造・分化機能の付与を目的とした組織培養が挙げられる。さらに、再生医療では、細胞採取からCPFまでの細胞搬送や出荷後から病院までの細胞搬送、さらには、病院内での院内調製などを含む工程 (ここでは、「外工程 (外流工程)」とする) の役割が今後重要になると考えられ、一貫した工程の技術構築が不可欠となる。

医薬品などの製品に対する製造概念として、「製造における種々の変動を考慮する際の製造設計の容易性」を意味する「製造性」(manufacturability, 製造可能性) が挙げられ、この概念に基づき製造プロセスの構築がなされている。細胞加工物の製造の安定性を目指すうえでは、図1に示すように、細胞を含む生産物の不確定要素が多い (評価があいまいであることが多い) ため、細胞製造固有の変動を考慮する必要がある、固有の概念構築が要求される。そこで、「細胞を用いた製造における種々の変動を考慮する際の製造設計の容易性」を細胞製造性 (cell manufacturability) と定義し、細胞を用いた製造のための工程 (プロセス: 加工、反応、形成などを含む)、入力 (細胞、原材料、資材など)、出力 (細胞加工物など) からなる系 (システム) と外界 (環境) において、出力の安定化、高効率化、低コスト化などを考

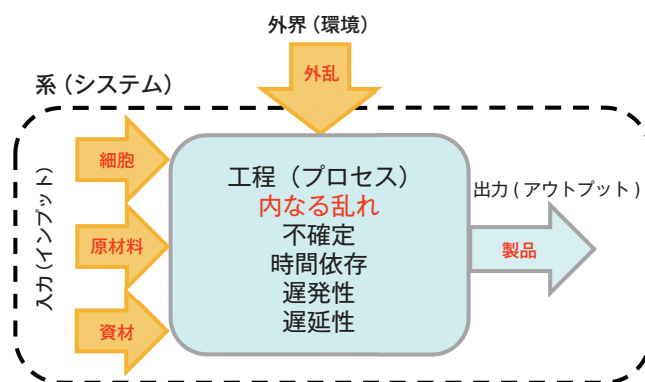


図2 細胞製造性における工程の安定化

慮し、製造の最適化を行うことが重要となる (図2)。

細胞製造性の観点から、工程の安定性を損なう変動として、①外界から系に対する外乱 (extrinsic error, 無菌環境など) 由来の変動、②入力に対する細胞・原材料・資材由来の変動、③工程の内なる乱れ (intrinsic disorder, 操作など) 由来の変動 (細胞製造固有の変動)、④実用化に向けた変動 (スケールアップなどの開発時から実生産までの入力および工程の柔軟性による変動) が挙げられる。その際、原料であり製品である細胞は、不確定要素が多く、細胞自ら、細胞イベントを引き起こし逐次に状態が変化し (時間依存性)、シグナル開始から表現型を提示するまでに時間がかかること (時間遅発性) などの特徴を有し、目的細胞が得られたかの判定は、細胞イベントの実時間でなく、検出してから時間となる (時間遅延性)。よって、細胞特性および工程の連続性により内なる乱れが増大・累積し、不安定性が増大して、得られる細胞群が不均質かつロット間に変動が発生しやすくなると考えられる。

4. ヒト細胞加工製品製造におけるQuality by Design (QbD) アプローチ

医薬品および生物製剤の開発分野では、国際的な市場を視野に原料調達や治験を推し進めている。各国の規制当局もこの国際化の流れを受け、医薬品の製造工程・製品規格の国際化の観点から医薬品査察協定及び医薬品査察共同スキーム (Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme, PIC/S) への加盟を推進しており、本邦も2014年に加盟し、国際協調を重視することとなった。医薬品や生物製剤では医薬品規制調和国際会議 (ICH) Q8~Q10をベースにした製造の管理戦略にて、Quality by Testing (QbT, 出荷製品の品質保証) を出荷ごとに最終製品の破壊検査で品質を確認する開発方法からQbD (事前の目標設定に始まり、製品および工程

の理解並びに工程管理に重点を置いた、立証された科学および品質リスクマネジメントに基づく体系的な開発手法)への推奨が示され、産業化に必須である工程改善(自動化、スケールアップなど)の際に、再現性の高い製品製造を行うことが要求されている。

医薬品の製造における考え方を、再生医療等製品(特に、ヒト細胞加工製品)へ適用すべく、本邦では、厚生労働省の発出した「再生医療等製品の製造販売承認申請に際し留意すべき事項について(薬食機参発0812第5号)」に、製造承認や一部変更承認の手続きに対するポイントが紹介されており、製品品質に影響を及ぼす重要プロセスパラメータ(CPP)の提示およびその範囲の取得に対する重要性が記載されている。しかし、ヒト細胞加工製品の製造に展開する場合、出発原料である細胞や原料となる生物由来原材料の品質が不均一・不安定であること、製品である細胞の品質特性が不明確で、同等性・同質性の証明が困難であること、手作業を主体とした工程自体に変動があること、工程中に細胞が内なる乱れを有すること(培養中に自発的に特性変化を引き起こす)などから、工程のプロセスバリデーションの実施が困難で、従来の医薬品に対するQbD手順での工程設計が達成できていない。その結果、未だQbTでの製造が主となっている場合が多く、承認後の工程改善で、一部変更承認を試みるが非臨床・臨床を伴う製品の同等性/同質性証明が必要となる。製造企業は、同種のヒト細胞加工製品の生産コスト低減を目指すものの、開発コストの増加がハードルとなる。

再生医療等製品の製造にQbDの手法が適応された例としては、脊髄性筋萎縮症に対する遺伝子治療用ウイルスベクター製品「ゾルゲンスマ点滴静注」〔ノバルティスファーマ(株)〕³⁾や、再発または難治性CD19陽性のB細胞性急性リンパ芽球性白血病に対する遺伝子導入自己由来細胞加工製品「キムリア点滴静注」〔ノバルティスファーマ(株)〕の遺伝子導入用ウイルスベクターの製造⁴⁾や、再発または難治性の大型細胞型B細胞リンパ腫等に対する遺伝子導入自己由来細胞加工製品「イエスカクタ点滴静注」〔第一三共(株)〕⁵⁾がある。

5. おわりに

再生医療の発展に伴って、治療に用いる細胞の培養技術が改めて重要視されることとなり、様々な道具が生み出されてきた。しかし、細胞レベル(μm)、コロニー・集塊レベル(mm)、組織・臓器(cm)、人体レベル(m)のマルチスケールに対する道具については、依然不足している。また、2006年におけるマウスiPS細胞の創出以来、幹細胞研究が一層活性化され、現在では、その多様な分化能により、これまで増殖が困難であった細胞種の幹細胞からの大量分化が見込まれる。この技術は、これまで増殖能が低いために培養不可能であった、心筋細胞、膵島細胞、網膜色素上皮細胞、肝細胞などの大量調製を可能とし、これらの細胞由来の組織化を伴った再生医療への展開が期待されている。その中で、種々のレベルでの道具構築は、幹細胞研究の進歩とともに、より一層必要とされ、再生医療を支援する産業の発展の一端を担うと思われる。

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) 紀ノ岡正博：再生医療におけるコトづくりと細胞製造性に基づくプロセス構築. 化学工学 **81**: 140-3, 2017
- 2) 紀ノ岡正博：細胞治療・再生医療における継代培養. 動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術. 技術情報協会 13-9, 2014
- 3) ゾルゲンスマ点滴静注 審査報告書. 独立行政法人医薬品医療機器総合機構. 令和2年2月7日. https://www.pmda.go.jp/regenerative_medicines/2020/R20200407001/300242000_30200FZX00001000_A100_2.pdf Accessed 2 Sep 2021
- 4) キムリア点滴静注 審査報告書. 独立行政法人医薬品医療機器総合機構. 平成31年2月4日. https://www.pmda.go.jp/regenerative_medicines/2019/R20190423001/300242000_23100FZX00002000_A100_1.pdf.pdf Accessed 2 Sep 2021
- 5) イエスカクタ点滴静注 審査報告書. 独立行政法人医薬品医療機器総合機構. 令和2年11月17日. https://www.pmda.go.jp/regenerative_medicines/2021/R20210129001/430574000_30300FZX00001000_A100_2.pdf Accessed 2 Sep 2021