



第3回 再生医療産学連携バリューチェーンセミナー・ FIRM基準説明会

— 試験検査・検査機器をめぐる諸課題 —

場所：日本橋ライフサイエンスハブ 8階 E会議室
日時：2018年 10月 1日（月） 13:00 – 17:30

主催：一般社団法人 日本再生医療学会

協賛：一般社団法人 再生医療イノベーションフォーラム

第3回 再生医療産学連携バリューチェーンセミナー・ FIRM基準説明会

ー プログラムー

13:00 - 13:05 開会挨拶 : 畠 賢一郎 (JSRM / J-TEC)

13:05 - 13:35 基調講演Ⅰ : 「再生医療の微生物安全性検査」 清水 則夫 (東京医科歯科大学)

13:35 - 14:05 基調講演Ⅱ : 「再生医療における画像情報解析を用いた品質管理の可能性」
加藤 竜司 (名古屋大学)

14:05 - 15:45 FIRM基準説明会 : 「試験検査法／機器のFIRM事例集 (第1集)
～「再生医療等安全性確保法」の下に提供される
細胞等の品質管理～」

<※ 途中 10分間休憩>

15:45 - 16:15 教育講演 : 「再生医療イノベーションを支える知財戦略とは」
永野 志保 (大阪大学)

16:15 - 16:25 休憩

16:25 - 17:25 ディスカッション : 試験検査・検査機器をめぐる諸課題について
畠 賢一郎 (JSRM / J-TEC)、齋藤 充弘 (JSRM / 大阪大学)

17:25 - 17:30 閉会挨拶 : 齋藤 充弘 (JSRM / 大阪大学)

再生医療の微生物安全性検査

東京医科歯科大学 再生医療研究センター

清水 則夫

1

講演内容

再生医療実用化の微生物安全性検査

1. 法律、指針等で求められる微生物等の検査
2. プロセスバリデーションとベリフィケーション
3. 新規検査法の開発 (ウイルス・マイコプラズマ・無菌)
4. 微生物安全性に関わるデータ収集
5. 微生物安全性確保に向けて

2

再生医療実用化への2つのトラック

ヒトや動物細胞に培養などの加工を施したものをを用いた
新しい医療（再生医療や細胞治療）の実用化

製品としての開発トラック

⇒ 医薬品医療機等法に基づく製造販売承認

⇒ 再生医療等製品の製造販売

医療としての開発トラック

⇒ 再生医療安全確保法による届け出・大臣確認

⇒ 医療機関で医療として実施

3

再生医療の問題点

・ 主な科学的課題

再生医療実現拠点ネットワークプログラム
技術開発個別課題 森尾班

1. 微生物安全性

2. 造腫瘍性試験のデザインと解釈 特にES/iPS細胞

)

3. 最終製品を構成する細胞の特性解析

4. 最終製品の免疫原性評価

5. 有効性・安全性のフォローアップ

6. ……

4

再生医療の問題点

微生物安全性の確保

- 原料がヒトの生きた細胞・組織

⇒ ヒトには多くの微生物が持続感染しているため、原料への微生物混入は避けられない

- 最終製品は生きた細胞加工物

⇒ 除去や滅菌により微生物安全性を担保できない

検査による微生物安全性の確保が重要

5

再生医療の安全性確保に関連する主な基準・指針等

文書名	初版／最新版 (平成 26 年 2 月現在)	概略
ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針	平成18年7月3日厚生労働省告示第425号／平成25年10月1日厚生労働省告示第317号	ヒト幹細胞臨床研究が社会の理解を得て適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重し、かつ、科学的知見に基づいた有効性及び安全性を確保するための指針。
生物由来原料基準	平成26年9月26日厚生労働省告示第375号	医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器に使用されるヒトや動物に由来する原料又は材料について、製造に使用される際に講ずべき必要な措置に関する基準を定めることにより、医薬品等の品質、有効性及び安全性を確保することを目的とする。
細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方	平成12年12月26日医薬発第1314号別添1	「生物由来原料基準」と併せてGTPの根幹を形成する。細胞・組織を取り扱う際の基本的要件を示すとともに細胞・組織を利用した製品の品質・安全性、並びに細胞・組織の取扱いに関する科学的及び倫理的妥当性を確保することを目的とする。
ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保について	平成24年9月7日薬食初第0907第2, 3, 4, 5, 6号	ヒト幹細胞を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件を定めたもの。自己体性幹細胞、同種体性幹細胞、自己iPS(株)細胞、同種iPS(株)細胞およびES細胞加工医薬品等に特化した留意事項を示した。
ヒト（自己）iPS(株)細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保について	平成24年9月7日薬食初第0907第2, 3, 4, 5, 6号	ヒト幹細胞を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件を定めたもの。自己体性幹細胞、同種体性幹細胞、自己iPS(株)細胞、同種iPS(株)細胞およびES細胞加工医薬品等に特化した留意事項を示した。
ヒト（同種）iPS(株)細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保について	平成24年9月7日薬食初第0907第2, 3, 4, 5, 6号	ヒト幹細胞を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件を定めたもの。自己体性幹細胞、同種体性幹細胞、自己iPS(株)細胞、同種iPS(株)細胞およびES細胞加工医薬品等に特化した留意事項を示した。
ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保について	平成24年9月7日薬食初第0907第2, 3, 4, 5, 6号	ヒト幹細胞を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件を定めたもの。自己体性幹細胞、同種体性幹細胞、自己iPS(株)細胞、同種iPS(株)細胞およびES細胞加工医薬品等に特化した留意事項を示した。
ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保に関する指針	平成20年2月8日薬食発第0208003号	ヒト細胞・組織を加工した医薬品又は医療機器について品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件について定めたもの。細胞提供者が自己（患者本人）の場合と同種（他人）の場合を区別して整理し、それぞれの注意事項をまとめている。

再生医療の安全性確保に関連する主な基準・指針等

ヒト(同種)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保に関する指針	平成20年9月12日薬食発第0912006号	ヒト細胞・組織を加工した医薬品又は医療機器について品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件について定めたもの。細胞提供者が自己(患者本人)の場合と同種(他人)の場合を区別して整理し、それぞれの注意事項をまとめている。
医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令	平成9年3月26日厚生労働省令第21号/平成20年厚生労働省令第114号	GLP省令。非臨床試験施設の構造設備、標準操作手順書の作成、動物の飼育、プロトコールや最終報告書の作成などを規定。承認申請時に提出する非臨床安全性試験の結果はGLPに従っていることが原則。
医療機器の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令	平成17年3月23日厚生労働省令第37号/平成20年厚生労働省令第115号	GLP省令。非臨床試験施設の構造設備、標準操作手順書の作成、動物の飼育、プロトコールや最終報告書の作成などを規定。承認申請時に提出する非臨床安全性試験の結果はGLPに従っていることが原則。
医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令	平成16年12月24日厚生労働省令第179号	GMP省令。医薬品及び医薬部外品の製造販売承認の要件として、医薬品および医薬部外品の製造所における製造管理・品質管理の基準を定めたもの。
医療機器及び体外診断用医薬品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令	平成16年12月17日厚生労働省令第169号	QMS省令(医薬品のGMP省令に相当)。医療機器及び体外診断用医薬品の製造販売承認の要件として、医療機器及び体外診断用医薬品の製造管理・品質管理の基準を定めたもの。
治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準(治験薬GMP)	平成20年7月9日薬食発第0709002号別添	治験薬GMP。企業から提供を受けた医薬品を治験薬として取り扱う際の製造管理・品質管理の基準。
ヒト(自己)細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方について	平成20年3月27日薬食監麻発0327025号	ヒト自己由来細胞・組織加工製品のGMP。患者本人から直接細胞・組織を採取するという特殊性等を踏まえた製造管理・品質管理の考え方。
医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令	平成9年3月27日厚生省令第28号/平成24年12月28日厚生労働省令第161号	GCP省令。治験を依頼する者、治験を自ら(医師主導治験)実施しようとする者に係る「治験の準備に関する基準」及び「治験の管理に関する基準」、治験を実施する医療機関が行うべき「治験を行う基準」などを定めたもの。
医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令	平成17年3月23日厚生労働省令第36号/平成25年2月8日厚生労働省令第11号	GCP省令。治験を依頼する者、治験を自ら(医師主導治験)実施しようとする者に係る「治験の準備に関する基準」及び「治験の管理に関する基準」、治験を実施する医療機関が行うべき「治験を行う基準」などを定めたもの。

7

再生医療の安全性確保に関連する主な基準・指針等

ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針

ドナーの選択基準

特にB型肝炎(HBV)、C型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、成人T細胞白血病(HTLV)、パルボウイルスB19感染症については、問診及び検査(血清学的試験や核酸増幅法等)により否定すること。

また、サイトメガロウイルス感染、EBウイルス感染及びウエストナイルウイルス感染については必要に応じて検査により否定すること。

次に掲げるものについては既往歴の聴取、問診等を行うとともに、輸血、移植医療を受けた経験の有無等からドナーとしての適格性を判断すること。

梅毒、トレポネマ、クラミジア、淋菌、結核菌等の細菌による感染症

敗血症及びその疑い、悪性腫瘍、重篤な代謝及び内分泌疾患

膠原病及び血液疾患、肝疾患、伝達性海綿状脳症及びその疑い

8

再生医療の安全性確保に関連する主な基準・指針等

ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質 及び安全性の確保に関する指針

最終製品の品質管理

6) 無菌試験及びマイコプラズマ試験

最終製品の無菌性については、あらかじめ試験的検体を用いて

全製造工程を通じて無菌性を確保できることを十分に評価しておく必要がある。

- ・ 最終製品について、患者に適用する前に無菌性を試験により示すこと（一般細菌及び真菌の否定）。
- ・ 適切なマイコプラズマ否定試験を実施すること。
- ・ マイコプラズマ否定試験については、検証された核酸増幅法を用いることもよい。

9

再生医療の安全性確保に関連する主な基準・指針等

ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質 及び安全性の確保に関する指針

最終製品の品質管理

7) エンドトキシン

試料中の夾雑物の影響を考慮して試験を実施すること。

規格値は必ずしも実測値によらず、日本薬局方等で示されている最終製品の1回投与量を基にした安全域を考慮して設定すればよい・・・

エンドトキシン試験法：日本薬局方に一般試験法として収載

10

再生医療の安全性確保に関連する主な基準 指針等

ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質 及び安全性の確保に関する指針

最終製品の品質管理

⑧ ウイルス試験

バンク化されておらず、ウインドウピリオドが否定できず、
HBV、HCV、HIV 等を製造工程中に増殖させる可能性の
ある細胞を用いる際には、中間製品、最終製品等についても
ウイルス等の存在を否定する適切な試験を実施すること。

11

再生医療の安全性確保に関連する主な基準 指針等

再生医療等製品（ヒト細胞加工製品）の品質 非臨床安全性 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 薬機発第0614043号

厚生労働省人官房参事官殿

独立行政法人医薬品医療機器総合機構 理事長

再生医療等製品の取扱いについては、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「平成26年8月12日付け薬食機参発0812第5号厚生労働省大臣官房参事官 医療機器（再生医療等製品審査管理担当）通知」等において示されているところですが、今般、独立行政法人医薬品医療機器総合機構は、再生医療等製品のうち、ヒト細胞加工製品を開発する際の考え方や留意点を記した技術的ガイダンスについて別添として取り纏めましたので、報告します。

12

再生医療等製品の技術的ガイダンス

再生医療等製品においては、設定すべき品質規格や試験、実施すべき特性解析、非臨床安全性試験の試験項目や試験法等が整理されていない

- ・ 製品がヒト由来であるために動物を用いた評価が限定的
- ・ 製品の製造方法、製品の由来（S 細胞、iPS 細胞、体性幹細胞、体細胞 など）が多種多様である

⇒ 再生医療等製品の品質及び非臨床安全性評価においては、製品の特性を把握した上で、柔軟かつ合理的にケース・バイ・ケースでの対応が必要

13

再生医療等製品の技術的ガイダンス

原料及び材料となる細胞 組織のウイルス安全性管理

ヒト（同種）由来製品については、原料又は材料となる細胞 組織についてドナーの適格性が十分であることを確認する必要がある。

生物由来原料基準 第3 ヒト由来製品原料総則

- ・ ヒト細胞組織原料等を採取する際は、問診、検診、検査等により、細菌、真菌、ウイルス等の感染を否定すること
- ・ ウインドウピリオドを勘案した検査または管理がなされていること（ウインドウピリオドを考慮した再検査）

ウインドウピリオド：ウイルスに感染してから検査で検出できるようになるまでの空白期間

14

生物由来原料基準 生原基)

○ 生物由来原料基準 (平成5年厚生労働省告示第210号)

最終改正：生物由来原料基準の一部を改正する件」

平成26年9月26日厚生労働省告示第375号)

→ 医薬品医療機器等法第42条に基づき定める基準

○ 生物由来原料基準の一部を改正する件について」

平成26年10月2日薬食発1002第27号厚生労働省医薬食品局長通知)

→ 平成26年の改正の施行通知

○ 生物由来原料基準の運用について」

平成26年10月2日薬食審査発1002第1号、薬食機参発1002第5号厚生労働省
医薬食品局審査管理課長、厚生労働省大臣官房参事官 医療機器・再生医療
等製品審査管理担当)通知)

→ 生物由来原料基準の運用解釈を示した通知

15

再生医療等製品の技術的ガイダンス

原料及び材料となる細胞・組織のウイルス安全性管理

最終製品における潜在的なウイルス混入リスクを低減化するために、
原料又は材料となる細胞・組織についてはドナーの適格性の確認に加え、セルバンク、中間製品又は最終製品に対し、

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」

平成12年2月22日付け医薬審第329号

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評価」 (CH-Q5A)

を踏まえ、より高いウイルス安全性が確保できるよう管理戦略の構築が重要

16

ICH-Q5A

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評価 医薬審第329号 平成12年2月22日

医薬審第329号 平成12年 2月22日	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評価
各都道府県衛生主管部（局）長 殿 厚生省医薬安全局審査管理課長	目次
「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評価」について	I. 緒言 1 II. ウイルス汚染の可能性 2 A. マスター・セル・バンク（MCB）にウイルスが存在する可能性 2 B. 医薬品製造過程で迷入する可能性 3 III. 細胞株適性試験：ウイルス試験 3 A. マスター・セル・バンク（MCB）、ワーキング・セル・バンク（WCB）又は医薬品製造のために <i>in vitro</i> 細胞層の上限にまで培養された細胞（CAL）におけるウイルス試験 3 1. マスター・セル・バンク 3 2. ワーキング・セル・バンク 3 3. 医薬品製造のために <i>in vitro</i> 細胞層の上限にまで培養された細胞（CAL） 4 B. ウイルス検出及び確認のために推奨される試験 4 1. レトロウイルス試験 4 2. <i>In vitro</i> 試験 5 3. <i>In vivo</i> 試験 5 4. 抗体産生試験 5 C. ウイルスが検出された細胞株の使用について 5 IV. 未加工／未精製バルクにおけるウイルス試験 5 V. ウイルスクリアランス試験と精製バルクにおけるウイルス試験の意義、考え及び実施要領 6 VI. ウイルスクリアランスの工程評価及び工程特性解析 9 A. ウイルスクリアランスの工程評価及び工程特性解析のためのウイルスの選択10 1. 「関連ウイルス」と「モデルウイルス」10 2. その他の留意事項11 B. ウイルスクリアランスの工程評価試験及び工程特性解析試験のデザインと実施要領11 1. 施設とスタッフ11

17

ICH-Q5A

表1. 各細胞レベルで1度は実施すべきウイルス試験

	MCB	WCB ^a	CAL ^b
レトロウイルス及び内在性ウイルス試験			
感染性試験	+	—	+
電子顕微鏡観察 ^c	+ ^c	—	+ ^c
逆転写酵素活性 ^d	+ ^d	—	+ ^d
その他細胞種特異ウイルス試験 ^e	適宜実施 ^e	—	適宜実施 ^e
非内在性ウイルス又は外来性ウイルス試験			
<i>In vitro</i> 試験	+	— ^f	+
<i>In vivo</i> 試験	+	— ^f	+
抗体産生試験 ^g	+ ^g	—	—
その他細胞種特異ウイルス試験 ^h	+ ^h	—	—

18

in vitro 試験

様々な細胞株に検体を接種して、細胞の変化などによりウイルスを検出する

in vivo 試験

実験動物に検体を接種して、病的変化の有無などからウイルスを検出する

抗体産生試験

実験動物に検体を接種して、特異抗体の上昇によりウイルスを検出

細胞種特異ウイルス試験

ヒト由来細胞株、ヒト以外の霊長類由来細胞株あるいはげっ歯類以外の動物由来細胞株である場合は、それぞれの細胞株に適切な試験を適宜実施

19

再生医療等製品の技術的ガイダンス

無菌試験及びマイコプラズマ否定試験について

原則として**最終製品**を試験検体として実施し試験結果を得た後に投与できるような計画とすることが望ましい。

⇒ 最終製品を検査できる迅速検査法の導入が必要

試験方法は **日本薬局方に準じた試験** が望ましいが、科学的に合理的な試験方法を採用することが可能

試験方法を選択する際には、採用する試験結果に影響を与えるリスクを慎重に評価し、必要な**分析法バリデーションを実施**することが重要である。

⇒ 日本薬局方参考情報に準拠したキット（1種類のマイコプラズマを10 CFU/mLの検出感度で検出可能）を使用する場合でも、**自施設で信頼性のある検査結果が得られることを示す必要がある**

20

講演内容

再生医療実用化の微生物安全性検査

1. 法律、指針等で求められる微生物等の検査
2. プロセスバリデーションとベリフィケーション
3. 新規検査法の開発 ウイルス・マイコプラズマ・無菌)
4. 微生物安全性に関わるデータ収集
5. 微生物安全性確保に向けて

21

再生医療等製品の技術的ガイダンス

ベリフィケーション

市販製品の製造管理及び品質管理の運用においては、原則として、プロセスバリデーションの実施が要件とされている。

再生医療等製品での運用には事前に入手可能な検体が制限され、限られた製造経験から製品化が進められる場合や技術的限界からプロセスバリデーションの実施が困難な場合が想定されるため、ベリフィケーションにより品質を確保する手法を規定

22

再生医療等製品の技術的ガイダンス

プロセスバリデーション

製造プロセスの品質に寄与する重要工程パラメータ等の変動要因と品質リスクを特定し、恒常的に品質保証を高いレベルで達成する

⇒ 変動因子が特定したうえで製造管理及び品質管理の方法が期待される効果を与えるか3ロットで検証する（**事前の検証**）

ベリフィケーション

プロセスバリデーションにより事前に検証しておくことが望まれるが、制限された状況で変動要因の理解が十分に進んでいない状況

⇒ 品質リスクマネジメントに基づく品質管理戦略を設定することにより、製品品質を製造毎に確認する（**製造毎の検証**）

23

再生医療等製品（同種）の審査資料

審査報告書

平成27年8月11日 独立行政法人医薬品医療機器総合機構

販売名 テムセルHS注

類 別 ヒト細胞加工製品（ヒト体性幹細胞加工製品）

一般名称 ヒト（同種）骨髓由来間葉系幹細胞

申請者 JCR ファーマ株式会社

申請年月日 平成26年9月26日

申請区分 (1の1)新再生医療等製品

審査担当部 再生医療製品等審査部

24

再生医療等製品（同種）の審査資料

審査結果報告書

類 別] ヒト細胞加工製品 二. ヒト体性幹細胞加工製品
一般名称] ヒト（同種）骨髄由来間葉系幹細胞
販 売 名] テムセルHS注
申 請 者] JCR ファーマ株式会社
申 請 日] 平成26年9月26日

審査結果]

平成27年9月2日の再生医療製品・生物由来技術部会の審議結果は次のとおりであり、この内容で薬事分科会に報告することとされた。

本品目を承認して差し支えない。条件および期限付き承認に該当せず、10年間の再審査指定の対象とすることが適当である。

25

機構による再生医療等製品の審査概略

★品目の概要

テムセルHS注は、健康成人骨髄液から分離した有核細胞を拡大培養して得られるヒト間葉系幹細胞（MSC）を構成細胞とし、医薬品と同様の薬理的作用による治験効果を期待して、点滴で静脈に投与される再生医療等製品

★ ドナースクリーニング(抜粋)

血液検査

全血球検査、血液化学検査、ABO及びRh式血液型、HLA適合

血清学的検査及び核酸増幅検査

HM-1,-2,HCV,HBsAg,HBsAb,HTLV-1,-2,梅毒トレポネーマ 陰性

HM-1,HBV-DNA,HCV-RNA,WNV,シャーガス病（MV,EBV:追加） 陰性

26

機構による再生医療等製品の審査概略

★ ヒト骨髓液以外の生物由来原料等

牛胎児血清

ニュージーランド又はオーストラリア原産、γ線照射 10kGy以上)
外来性ウシウイルス否定試験、エンドトキシン試験、無菌試験、
マイコプラズマ試験

トロプシン

豚膵臓由来、粉末に対する電子線照射 15kGy以上)、γ線照射
15kGy以上)、ブタパルボウイルス否定試験、エンドトキシン試験
、無菌試験、マイコプラズマ否定試験

ヒト血清アルブミン

製造販売承認を受けた医薬品

27

機構による再生医療等製品の審査概略

★ 構成細胞の管理

DCB (Donor Cell Bank) の規格 及び試験方法

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評価」
「CH Q5Aガイドライン 平成12年2月22 日付 医薬
審第329号 厚生省医薬安全局審査管理課長通知)

表 3.6 DCB の規格及び試験方法

試験項目	試験方法
細胞種	■
細胞表面抗原 (1)	フローサイトメトリー ■
細胞表面抗原 (2)	フローサイトメトリー ■
確認試験	■
■細胞分化能	■
■細胞分化能	■
■	■
■	■
■	■
染色体検査	Gバンド分染法 ■ マルチカラー-FISH法 ■
耐寒天コロニー形成試験	■
エンドトキシン	比色法 (日本薬局方)
無菌	直接法
マイコプラズマ	培養法 (日本薬局方参考情報) DNA 染色法 (日本薬局方参考情報)
電子顕微鏡観察	電子顕微鏡観察
in vitro 試験 (Vero, MRC5、Hs68 細胞)	細胞毒性 血球凝集反応 血球吸着反応

ウイルス試験	in vivo 試験	成熟マウス 乳飲みマウス 発育鶏卵 ■ 発育鶏卵 ■
HIV-1		PCR 法
HIV-2		PCR 法
HTLV-1/2		PCR 法
HHV-6		PCR 法
HHV-8		PCR 法
HBV		PCR 法
HCV		PCR 法
B19		PCR 法
CMV		PCR 法
EBV		PCR 法
HPV		PCR 法
細胞濃度		■

28

機構による再生医療等製品の審査概略

製品の規格及び試験方法

試験項目		試験方法
性状		目視
確認試験	細胞表面抗原（1）	フローサイトメトリー
	細胞表面抗原（2）	フローサイトメトリー
純度試験	細胞生存率	
	培地由来成分	
充填容量		重量

不溶性異物	目視
エンドトキシン	比色法（日本薬局方）
無菌	直接法（日本薬局方）
マイコプラズマ	培養法（日本薬局方参考情報）
	DNA 染色法（日本薬局方参考情報）
定量法	

マイコプラズマ試験 DNA染色法からPCR法（日局）変更

29

機構による再生医療等製品の審査概略

外来性感染性物質の安全性について

・ヒト骨髄液におけるドナースクリーニングの再検査について

機構は、本品の原料であるヒト骨髄液の生物由来原料基準への適合状況について、ウインドウピリオドを勘案した再検査が実施されていないことを踏まえ、外来性感染性物質に係る安全性確保に対する考えを説明するように求めた。

申請者は、生物由来原料基準の運用について」に基づき、同等の管理が出来ていることを確認しており、生物由来原料基準への適合状況は問題ないと考えていると回答した。

機構は、ウインドウピリオドを勘案した再検査が実施されていないことから、外来性感染性物質に係る安全性が担保されているとは言い難いと判断した。

しかし、バンクの段階でICH-Q 5Aを踏まえた広範なウイルス等の否定試験が実施されているため、残存するウイルス安全性のリスクは許容可能と判断した。

30

機構による再生医療等製品の審査概略

★ ベリフィケーションの実施について

本品の製造工程について、実生産スケールでプロセス評価が実施されている。

しかし、現時点においては本品の原料である骨髄液の品質特性に由来する製造工程の変動要因が特定されているとは言えない。

- ・ 骨髄液の本品製造に係る品質特性の解析がなされておらず、原料及び製造工程において管理すべき品質が定まっていない
- ・ 骨髄液ドナー毎の品質のばらつきに起因すると考えられるDCBの規格不適合ロットが複数認められていること

したがって、プロセスバリデーションで製造品質が恒常的に得られることが確認できていると判断することは適切ではない。

今後の製造におけるベリフィケーションにより本品の品質確保を行うよう品質における管理戦略を見直すことを求めた。

31

機構による再生医療等製品の審査概略

★ ベリフィケーションの実施について

申請者は以下のように回答した。

現時点では変動要因が特定できていないことから、管理戦略として工程内管理項目並びにドナーセルバンク及び製品の規格を設定し、製造毎にベリフィケーションを実施することにより、目的の製品品質を確保する管理戦略を構築する。

⇒ 機構は、申請者より提示された工程内管理項目、並びにDCB及び製品の規格試験により、骨髄液の品質特性の変動により生じる品質リスクを管理できると判断し、本品目の品質管理戦略を了承した。

32

機構による再生医療等製品の審査概略

ドナーセルバンクの規格及び試験方法（バリフィケーション）抜粋

試験項目	試験方法	ウイルス試験	電子顕微鏡観察
細胞種	■	電子顕微鏡観察	電子顕微鏡観察
細胞表面抗原 (1)	フローサイトメトリー ■	<i>in vitro</i> 試験 (Vero, MRC5, Hs68 細胞)	細胞変性 血球凝集反応 血球吸着反応
細胞表面抗原 (2)	フローサイトメトリー ■		
細胞分化能	■	<i>in vivo</i> 試験	成熟マウス 乳飲みマウス 発育鶏卵 ■ 発育鶏卵 ■
細胞分化能	■		
細胞分化能	■		
細胞分化能	■		
細胞生存率	■	HIV-1	PCR 法
■	■	HIV-2	PCR 法
■	■	HTLV-1/2	PCR 法
■	■	HHV-6	PCR 法
■	■	HHV-8	PCR 法
■	■	HBV	PCR 法
染色体検査	Gバンド分染法 ■ マルチカラー-FISH 法 ■	HCV	PCR 法
秋寒天コロニー形成試験	■	B19	PCR 法
エンドトキシン	比色法 (日本薬局方)	CMV	PCR 法
無菌	直接法	EBV	PCR 法
マイコプラズマ	PCR 法	HPV	PCR 法
		細胞濃度	■

33

機構による再生医療等製品の審査概略

製品の規格及び試験方法（バリフィケーション）

試験項目	試験方法
性状	目視
確認試験	細胞表面抗原 (1) フローサイトメトリー ■
	細胞表面抗原 (2) フローサイトメトリー ■
純度試験	細胞生存率 ■
	培地由来成分 ■
■	■
■	■
■	■
採取容量	採取容量試験 (日本薬局方)
不溶性異物	注射剤の不溶性異物検査法 第1法 (日本薬局方)
エンドトキシン	比色法 (日本薬局方)
無菌	直接法
マイコプラズマ	PCR 法
定量法	■

34

講演内容

再生医療実用化の微生物安全性検査

1. 法律、指針等で求められる微生物等の検査
2. プロセスバリデーションとベリフィケーション
3. 新規検査法の開発 (ウイルス・マイコプラズマ・無菌)
4. 微生物安全性に関わるデータ収集
5. 微生物安全性確保に向けて

35

微生物検査の重要性と安全性確保への対策

再生医療の微生物安全性確保

新しい微生物検査法の開発

1. ウイルス検査法の開発
2. マイコプラズマ検査法の開発
3. 迅速無菌検査法の開発

36

微生物安全性確保への取り組み

ウイルス検査

指針等では HIV, HTLV, HBV, HCV, B19が記載されているが・・・
培養中に混入したウイルスが細胞培養中に増殖する恐れがある

⇒ 大量のウイルスが投与される可能性

同種細胞：未感染のウイルスに感染する可能性

自己細胞：量的な問題 場所の問題 変異ウイルスの問題

- ★ 多種ウイルスの網羅的 迅速 安価な検査系の構築
- ★ ウイルス感染検体の試験培養によるデータ収集
- ★ ウイルススパイク試験によるデータ収集

37

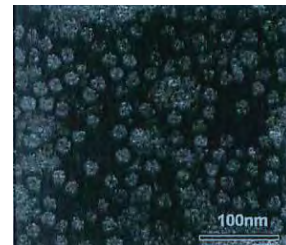
微生物安全性確保への取り組み

バイオ医薬品へのウイルス迷入が判明した最近の事例

経口弱毒生ヒトロタウイルスワクチン (Rotarix) へ PCV-1 が混入

PCV-1: Porcine circovirus type 1

- ・ サークウイルス科サーコウイルス属
- ・ ゲノムは、環状一本鎖DNA ゲノムサイズは1759b
- ・ 直径約17 nm の球状でエンベロープなし
- ・ 哺乳類に感染するウイルスの中で最小
- ・ ブタの感染率 30－60% ブタへの病原性はない
- ・ ヒトへの感染は報告されていない



38

バイオ医薬品へのウイルス迷入が判明した最近の事例

経口弱毒生ヒト rotaウイルスワクチン (Rotarix)へ PCV-1 が混入

事件のあらまし

- 2010年：Victoriaによるが生ワクチンのウイルス多様性の検討過程で GSK社の RotarixよりPCV-1 の全長に相当するDNAを検出
- 2月 9日：GSK社が調査を開始
- 3月 15日：製品、MCB、WCB (Vero細胞)およびウイルスシードより PCV-1 を検出したことをFDAへ報告 感染源はプタ由来トナリシン)
- 3月 22日：FDAよりアナウンス、同日 GSK社もプレスリリース
- 5月 7日：FDAは Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting を開催

Rotarixは迷入判明時にすでに約3千万人の乳幼児に投与されていたが市販後の安全性調査では有害事象の報告は無かった

- 5月 14日：FDA 接種再開を決定
 - ① PCV-1 はヒトに感染しない
 - ② ベネフィットがリスクを上回る

細胞組織加工製品に混入する可能性のあるウイルス (38種)

ウイルス名	病原体	分類
アストロウイルス	AAV	アストロウイルス科アストロウイルス属
ヒトアデノウイルス	HA d V	アデノウイルス科マストアデノウイルス属
ウシアデノウイルス	BA d V	アデノウイルス科マストアデノウイルス属
プタアデノウイルス	PA d V	アデノウイルス科マストアデノウイルス属
マウスアデノウイルス	MA d V	アデノウイルス科マストアデノウイルス属
トロンタノウイルス	TTV	アネロウイルス科
プタ繁殖呼吸器病伝染性ウイルス	PRRSV	アルテリウイルス科アルテリウイルス属
乳産乳牛伝染性ウイルス	LDV	アルテリウイルス科アルテリウイルス属
ラッサウイルス	LASV	アルテリウイルス科アルテリウイルス属
フニンウイルス	JUNV	アルテリウイルス科アルテリウイルス属
サビアウイルス		アルテリウイルス科アルテリウイルス属
ガリトウイルス		アルテリウイルス科アルテリウイルス属
マチュウウイルス		アルテリウイルス科アルテリウイルス属
リンパ性腺癌細胞伝染性ウイルス	LCMV	アルテリウイルス科アルテリウイルス属
インフルエンザウイルス	FLU	オルトミクソウイルス科インフルエンザウイルスA、B属
鳥インフルエンザウイルス		オルトミクソウイルス科インフルエンザウイルスA、B属
ノロウイルス	NoV	カリシウイルス科カリシウイルス属
サッポロウイルス		カリシウイルス科カリシウイルス属
ベシウイルス2117		カリシウイルス科カリシウイルス属
サーズコロナウイルス	SARS-CoV	コロナウイルス科
新型コロナウイルス	HCoV-EMC	コロナウイルス科
伝染性胃腸炎ウイルス	TGEV	コロナウイルス科コロナウイルス属
血球凝集性腸炎ウイルス	HEV	コロナウイルス科コロナウイルス属
プタ呼吸器コロナウイルス	PRCV	コロナウイルス科コロナウイルス属
プタ流行性下痢症ウイルス	PEDV	コロナウイルス科コロナウイルス属
ウシコロナウイルス	BCV	コロナウイルス科コロナウイルス属
マウス肝炎ウイルス	MHV	コロナウイルス科コロナウイルス属
ヒトコロナウイルス229E	HCoV-229E	コロナウイルス科コロナウイルス属
ヒトコロナウイルスOC43	HCoV-OC43	コロナウイルス科コロナウイルス属
ラットコロナウイルス	RCV	コロナウイルス科コロナウイルス属
唾液腺腺炎ウイルス	SDAV	コロナウイルス科コロナウイルス属
トロンウイルス		コロナウイルス科トロンウイルス属
プタローコロナウイルス	PCV	サーコウイルス科サーコウイルス属
東部ウマ脳炎ウイルス	EEE	トガウイルス科アルファウイルス属
西部ウマ脳炎ウイルス	WEE	トガウイルス科アルファウイルス属
ベネズエラウマ脳炎ウイルス	VEE	トガウイルス科アルファウイルス属
チタングニアウイルス	CHIKV	トガウイルス科ベータウイルス属
風疹ウイルス	RUBV	トガウイルス科ベータウイルス属
ヒトパルボウイルス	BPV	パルボウイルス科パルボウイルス属
ウシパルボウイルス	BPV	パルボウイルス科パルボウイルス属
ニバウイルス	NiV	パルボウイルス科パルボウイルス属
ウシRSウイルス	BRSV	パルボウイルス科パルボウイルス属
ヒトRSウイルス	HRSV	パルボウイルス科パルボウイルス属
マウス肺炎ウイルス	PVM	パルボウイルス科パルボウイルス属
ブラジルエンテロウイルス3型	BPEV3	パルボウイルス科パルボウイルス属
センダイウイルス	SeV, HVJ	パルボウイルス科パルボウイルス属
ヒトメタニューモウイルス	HMPV	パルボウイルス科パルボウイルス属
鳥インフルエンザ	PCPV	パルボウイルス科パルボウイルス属
ヘンドラウイルス	HeV	パルボウイルス科パルボウイルス属
麻疹 (はしか) ウイルス	MeV	パルボウイルス科パルボウイルス属
ムンプス (流行性耳下腺炎) ウイルス	MuV	パルボウイルス科パルボウイルス属
パルボウイルスB19型	B19	パルボウイルス科パルボウイルス属
ウシパルボウイルス	BPV	パルボウイルス科パルボウイルス属
プタパルボウイルス	PPV	パルボウイルス科パルボウイルス属
マウス微小ウイルス	MMV, MMV	パルボウイルス科パルボウイルス属
キルヒラットウイルス	KRV	パルボウイルス科パルボウイルス属
トランウイルス		パルボウイルス科パルボウイルス属

ウイルス名	病原体	分類
ヒトロタウイルス	HRV	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトコルナウイルス	HKCV	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトエプスタインバーウイルス	EBV	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトサイトメガロウイルス	CMV	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス1型	HSV-1	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス2型	HSV-2	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス3型	HHV-3	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス4型	HHV-4	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス5型	HHV-5	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス6型	HHV-6	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス7型	HHV-7	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス8型	HHV-8	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス9型	HHV-9	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス10型	HHV-10	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス11型	HHV-11	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス12型	HHV-12	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス13型	HHV-13	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス14型	HHV-14	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス15型	HHV-15	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス16型	HHV-16	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス17型	HHV-17	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス18型	HHV-18	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス19型	HHV-19	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス20型	HHV-20	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス21型	HHV-21	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス22型	HHV-22	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス23型	HHV-23	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス24型	HHV-24	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス25型	HHV-25	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス26型	HHV-26	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス27型	HHV-27	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス28型	HHV-28	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス29型	HHV-29	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス30型	HHV-30	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス31型	HHV-31	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス32型	HHV-32	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス33型	HHV-33	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス34型	HHV-34	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス35型	HHV-35	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス36型	HHV-36	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス37型	HHV-37	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス38型	HHV-38	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属

ウイルス名	病原体	分類
ヒトアデノウイルス	HA d V	アデノウイルス科マストアデノウイルス属
ヒトコルナウイルス	HKCV	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトエプスタインバーウイルス	EBV	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトサイトメガロウイルス	CMV	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス1型	HSV-1	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス2型	HSV-2	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス3型	HHV-3	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス4型	HHV-4	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス5型	HHV-5	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス6型	HHV-6	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス7型	HHV-7	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス8型	HHV-8	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス9型	HHV-9	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス10型	HHV-10	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス11型	HHV-11	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス12型	HHV-12	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス13型	HHV-13	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス14型	HHV-14	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス15型	HHV-15	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス16型	HHV-16	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス17型	HHV-17	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス18型	HHV-18	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス19型	HHV-19	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス20型	HHV-20	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス21型	HHV-21	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス22型	HHV-22	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス23型	HHV-23	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス24型	HHV-24	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス25型	HHV-25	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス26型	HHV-26	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス27型	HHV-27	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス28型	HHV-28	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス29型	HHV-29	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス30型	HHV-30	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス31型	HHV-31	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス32型	HHV-32	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス33型	HHV-33	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス34型	HHV-34	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス35型	HHV-35	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス36型	HHV-36	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス37型	HHV-37	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属
ヒトヘルペスウイルス38型	HHV-38	ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属

生物由来原料に混入している可能性のあるウイルス

由来	ウイルス名		ラットコロナウイルス
ウシ胎児血清	ウシアデノウイルス		唾液腺涙腺炎ウイルス
	ウシRSウイルス		マウス肺炎ウイルス
	ウシバルボウイルス		センダイウイルス
	ウシウイルス性下痢症ウイルス		マウス微小ウイルス
	ウシポリオーマウイルス		キルハムラットウイルス
	狂犬病ウイルス		トーランウイルス
	レオウイルス		マウス脳脊髄炎ウイルス
	ブルータングウイルス		ハンタウイルス
	伝染性出血熱ウイルス		マウス胸腺ウイルス
ブタトリブシン	伝染性胃腸炎ウイルス		マウスサイトメガロウイルス
	血球凝集性脳髄膜炎ウイルス		エクトロメリアウイルス
	ブタサーコウイルス		Kウイルス
	ブタバルボウイルス		ラットポリオーマウイルス
フィーダー細胞	マウスアデノウイルス		マウスロタウイルス
	乳酸脱水素酵素ウイルス		
	リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス		
	マウス肝炎ウイルス		

41

再生医療材料への混入が懸念される

持続感染・血液感染ウイルス

ウイルス名	関連疾患	感染細胞（存在部位）	成人の陽性率（%）	備 考
B型肝炎ウイルス（HBV）	B型肝炎	肝実質細胞（肝臓、血液、体液）	0.0	輸血による感染および母子感染が盛り、若年者の陽性率が低くなりつつある
C型肝炎ウイルス（HCV）	C型肝炎	肝実質細胞（肝臓、血液）	1～1.5	医療行為による新たな感染が激減し、中高年齢が主なウイルスキャリアーである
単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1）	口唇ヘルペス、ヘルペス脳炎	上皮細胞、神経細胞（唾液、血液）	80～100	性器ヘルペスの原因にもなる（主な原因は 2 型）
サイトメガロウイルス（CMV）	先天性サイトメガロウイルス感染症	マクロファージ（血液）	70～95	代表的な日和見感染症の原因ウイルスで、間質性肺炎、膵炎、網膜炎などの原因
水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）	水痘、帯状疱疹	上皮細胞、神経細胞（唾液、血液）	90～95	水痘発症時に体内に潜伏し、加齢などが誘引となり帯状疱疹を発症
EBウイルス（EBV）	伝染性単核症、バーキットリンパ腫、胃がん	B細胞、上皮細胞（唾液、血液）	70～90	T細胞、NK細胞に感染することがある
ヒトヘルペスウイルス 6 型（HHV6）	突発性発疹	T細胞（唾液、血液）	95～100	ほとんどが、乳幼児期に感染し、日和見感染症の原因となる
ヒトT細胞性ウイルス 1 型（HTLV-1）	成人 T 細胞性白血病、HTLV-1 関連脊髄症	T細胞（血液、母乳）	1	九州（特に南部）に多く 5～7%が陽性、一部地域では 50%以上が陽性
ヒト免疫不全ウイルス 1 型（HIV 1）	エイズ、エイズ関連症候群	T細胞、マクロファージ（血液、体液）	僅少	我が国では、感染者、エイズ患者ともに増えつつある
JCウイルス（JCV）	出血性膀胱炎、進行性多巣性白質脳症	尿管上皮細胞（尿、まれに血液）	70 以上	無症状でも時々尿中からウイルスが検出され、ときに末梢血からも検出される
バルボウイルス B19 型（ParvoB19）	りんご病、赤芽球糖	赤芽球（血液）	—	通常は一過性に症状が出た後治癒するが、持続感染患者は希にだが存在する
ウエストナイルウイルス（WNV）	ウエストナイル熱	血液細胞、神経細胞（血液、母乳）	未感染	ウイルスに感染した鳥の血を吸った蚊からヒトに感染する。感染者からの輸血・臓器移植により感染が伝播する可能性がある

DNAウイルス：HBV,HSV1,2,CMV,EBV,VZV,HHV6,7,8,JCV,BKV,PVB19

RNAウイルス：HCV,WNV レトロウイルス：HM12,HTLV1,2

18種を対象として選択)

42

微生物検査の重要性と安全性確保への対策

- ・生体には様々な感染因子（細菌・真菌、マイコプラズマ、原虫、ウイルス）が持続感染しているため、感染因子混入の可能性を否定できない
- ・生きた組織・細胞が原材料となるため、材料の段階で感染因子の滅菌処理を実施できない

⇒ 最終製品の全数検査が望ましい

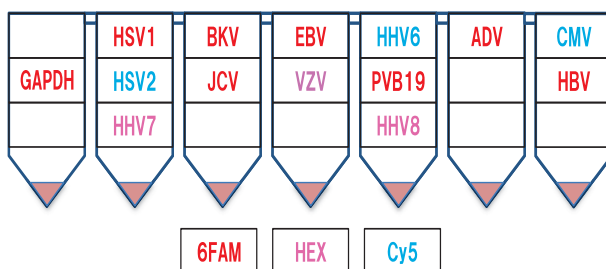
- ・特に重要なウイルスについては、細胞培養への影響やウイルス動態に関するデータを予め収集しておくことが重要

⇒ ウイルススパイク試験やウイルス陽性患者由来の細胞の試験培養

43

マルチプレックスPCR法を用いた網羅的ウイルス検査試薬の開発

日和見ウイルス感染症検査セット14項目（ウイルス13種類）

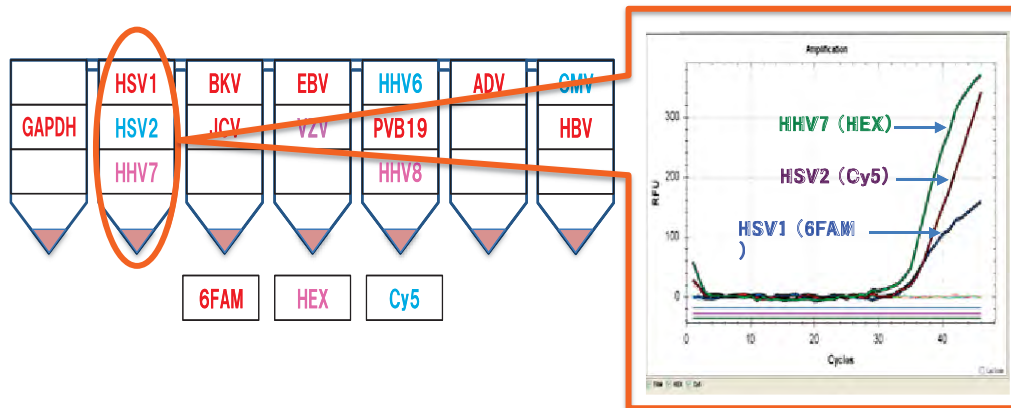


- ・マルチプレックスPCR法により1 wellで1～3項目、7 wellで14項目の検査が可能
- ・3種類の蛍光標識プローブによりウイルス種を区別
- ・PCR反応に必要な全ての試薬（プライマー・プローブ・酵素・バッファー）を固相化
- ・簡便で迅速性に優れる（試薬のセットアップから1時間以内で結果が得られる）
- ・品質は6ヶ月以上安定

44

マルチプレックスPCR法を用いた網羅的ウイルス検査試薬の開発

日和見ウイルス感染症検査セット14項目 (ウイルス13種類)



- マルチプレックスPCR法により1 wellで1～3項目、7 wellで14項目の検査が可能
- 3種類の蛍光標識プローブによりウイルス種を区別
- PCR反応に必要な全ての試薬 (プライマー・プローブ・酵素・バッファー)を固相化
- 簡便で迅速性に優れる 試薬のセットアップから1時間以内で結果が得られる
- 品質は6ヶ月以上安定

45

網羅的ウイルス検査キット

再生医療用

リアルタイムPCRにより迅速・簡便にヒトウイルス試験

Virus Test Kit

HIV, HTLV, HCV, HBV, ParvoB19 / EBV, CMV, WNV

再生医療等に用いられる細胞を調製している、必要に応じてウイルス感染を検査することが再生医療者の指針で定められています。ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV)、ヒト肝炎ウイルス(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、パルボウイルスB19(ParvoB19)、サイトメガロウイルス(CMV)、エボラウイルス(EBO)、マース・エボラウイルス(MEV)。

本製品では、蛍光標識プローブを用いたリアルタイムPCRにより細胞・血液サンプルからこれらのウイルスを検出します。

- 固相化プライマー・プローブ(8連チューブ)で簡単に検出
各ウイルス検出用のプライマー・プローブは、リアルタイムPCR反応用チューブ(0.2mL)に固相化されており、反応液とサンプルからの核酸抽出液を混合してチューブに添加するだけで検出可能な濃度のウイルスを検出できます。

- 「1ステップRT-qPCR」で約90分で検出
従来のリアルタイムPCRを連続して1チューブ内で反応します。コンタミ・クロスコンタミ・作業時間を短縮できます。

※製品2. 東京医科歯科大学産科総合研究所 澤村利夫先生の研究結果に基づき同大学との共同研究により製品しました。

製品名	検数	製品コード	価格(税別)
Virus Test Kit (HIV, HTLV, HCV, HBV, ParvoB19)	12テスト	RR271A	¥120,000
Virus Test Kit (EBV, CMV, WNV)	12テスト	RR272A	¥70,000

<検出フロー>



※反応液は「サンプルからのDNA・RNA抽出」は、NucleoSpin RNA/Kit(製品コード: 740955, 10/50/250)およびProteinase K(製品コード: 740505)等を使用して下さい。

※表示価格すべて税別です。

Takara Clontech

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

日和見感染症用 再生医療に転用可能)

SHIMADZU
Excellence in Science

研究用試薬

日和見感染症 ウイルス検出キット

PCR法により日和見感染症の原因となるウイルスの遺伝子を定量的に検出するための試薬キットです。

特長

- 簡便 PCR法での遺伝子検出により、サンプルの入手から2時間程度でウイルスを検出します。
- 簡便 反応に必要な試薬は、すべてPCR用チューブに固相化されています。高感度試薬調製は必要ありません。DNAサンプル溶液を添加するだけです。
- 同時検出 1回の反応で13種類のウイルスを同時に検出できます。

※本製品は、国立大学法人 東京医科歯科大学 再生医療研究センターの澤村利夫先生が得た基本特許技術を活用して開発しました。澤村利夫先生は、血液・細胞・組織の検査法として先進医療の認定を受けており、その性能が実証されています。(先進医療 No.287「多発性骨髄腫ウイルスPCR法によるウイルス感染の検出」)

※本製品では、反応に必要な酵素も反応管内に固定することで、さらに操作性を改良しました。

分析の流れ



46

固相化試薬を用いた定量系（定量スリッパ）の開発

A, B, C 検量線用 D-G : サンプル測定用 全 well にプライマー・プローブ・酵素を固相化)

	A	B	C	D	E	F	G	H
用途	Positive control	Positive control	Positive control	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Negative control
検査対象	EBV TBP IC	EBV TBP IC	EBV TBP IC	EBV TBP IC	EBV TBP IC	EBV TBP IC	EBV TBP IC	EBV TBP IC
スタンダード	10 ⁵	10 ³	10 ¹					

測定項目

- EBウイルス
- TBP: TATA binding protein gene (細胞DNA量測定用)

単位細胞DNA量当たりの
EBウイルスゲノム量を定量
(EBV copies/μg DNA)

従来型陽性コントロール



EBVやTBP配列と完全一致

新型陽性コントロール



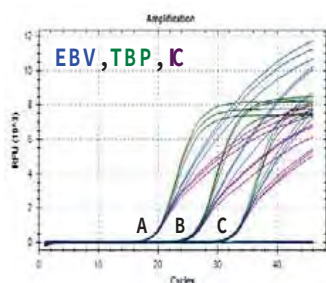
EBVやTBP配列にIC配列を挿入
(IC probe で検出可能)

新規な陽性コントロール核酸を利用した、被検試料中の標的核酸の検出 定量法
2014年10月 国内特許 2015年10月 PCT 本学より出願)

固相化試薬を用いた定量系（定量スリッパ）の開発

スタンダードウェル

A 10⁵, B 10³, C 10¹ Copies/well

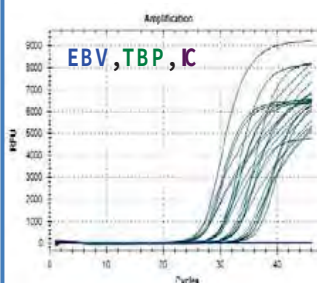


スタンダードDNAにはIC配列が挿入されているので、EBV (青)、TBP (緑)、IC (紫)の増幅曲線がみられる



サンプルウェル

EBV陽性細胞の抽出DNAを段階希釈

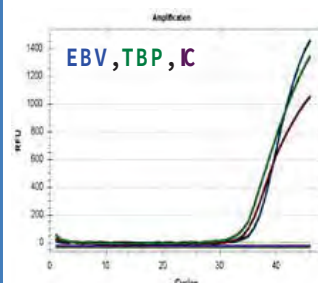


細胞から抽出したDNAにはIC配列が無いので、IC (紫)の増幅曲線は見られない



混入が有った場合

IC配列が挿入されたスタンダードDNAを添加



EBV (青)、TBP (緑)、IC (紫)の増幅曲線がみられる



再生医療の微生物安全性確保

新しい微生物検査法の開発

1. ウイルス検査法の開発

2. マイコプラズマ検査法の開発

3. 迅速無菌検査法の開発

49

微生物安全性確保への取り組み

マイコプラズマ検査

日本薬局方（日局）参考情報準拠した検査が求められる

⇒ 日局17参考情報には核酸増幅法（法）のバリデーション基準が記載され、培養法・DNA染色法の代替として用いることが可能に

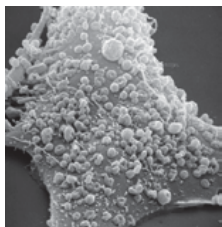
- ・ 検出感度バリデーションの対象菌種7種を指定
- ・ A法（培養法）の代替とする場合：10 CFU/ml の検出感度
- ・ B法（DNA染色法）の代替とする場合：100 CFU/ml の検出感度

50

マイコプラズマ検査の必要性

自然界では宿主特異性を示すが、培養細胞からは血清などの試薬類や培養に携わる作業従事者等が汚染源となり、種を超えて感染する

細胞表面に寄生している
マイコプラズマ



マイコプラズマ汚染によりサイトカインの発現異常や染色体異常などを引き起こす細胞変性を生じず、培養液の混濁も認められない

→ 汚染に気づくことが困難

再生医療の前臨床試験の際に
マイコプラズマ感染したサル之眼



患者に重篤な感染症をもたらす可能性がある

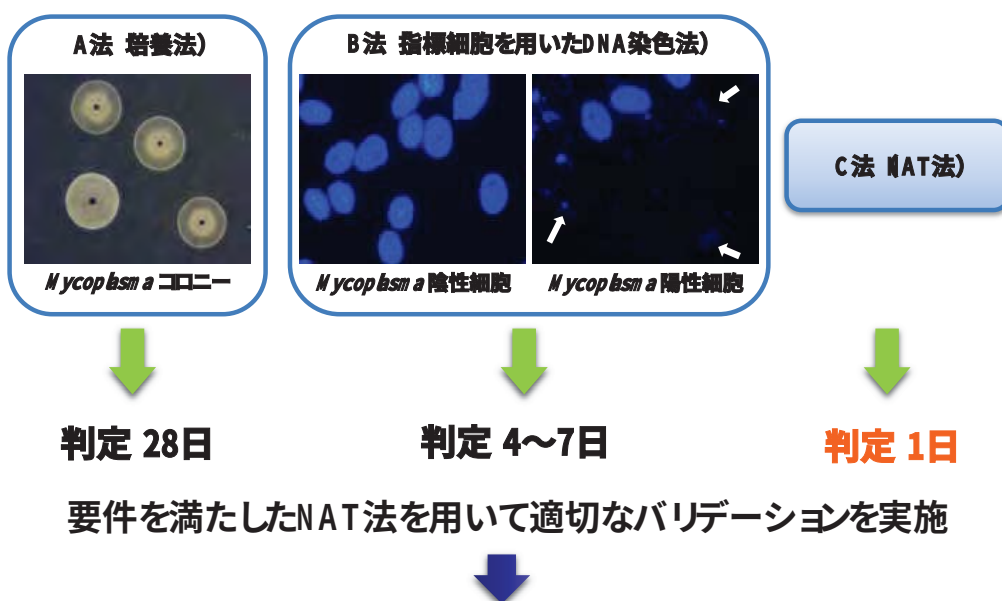
適切なマイコプラズマ否定試験の実施が必要

資料 理化学研究所 杉田直先生より

51

マイコプラズマ否定試験 第十七改正日本薬局方

日局17参考情報には3種類の試験方法が収載されている



NAT法のみで試験可能

52

微生物安全性確保への取り組み

マイコプラズマ検査

日本薬局方（日局）参考情報準拠した検査が求められる

⇒ 日局17参考情報には核酸増幅法（法）のバリデーション基準が記載され、培養法・DNA染色法の代替として用いることが可能に

- ・ 検出感度バリデーションの対象菌種7種を指定
- ・ A法（培養法）の代替とする場合：10 CFU/ml の検出感度
- ・ B法（DNA染色法）の代替とする場合：100 CFU/ml の検出感度

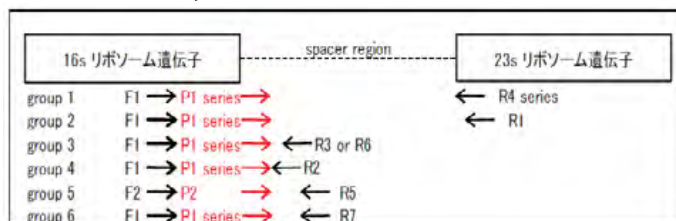
日局17参考情報に準拠したマイコプラズマ検査系の構築

53

マイコプラズマ検出キット（Myco Finder）について



プライマー11種類、プローブ6種類を使用したマルチプレックスPCR



各グループの代表例

Group 1: *M. orale*, Group 2: *M. pneumoniae*, Group 3: *M. gallisepticum*, *U. urealyticum*, Group 4: *A. laidlawii*, Group 5: *S. citri*, Group 6: *M. synoviae*

- ・ 142種類のマイコプラズマを検出可能（*in silico*）
- ・ 高感度 日欧米局方収載9種を含む17種の菌種を10 CFU/ml の感度で検出可能）
- ・ 試薬の固相化により試薬調製が簡易
- ・ 迅速性 試薬調製から検出までの所要時間は1時間程度）

マイコプラズマを検出する方法

2014年 国内特許 2015年 PCT 本学より出願）

2017年2月 PCT出願特許の国内移行が完了、米国譲渡登録通知が発行

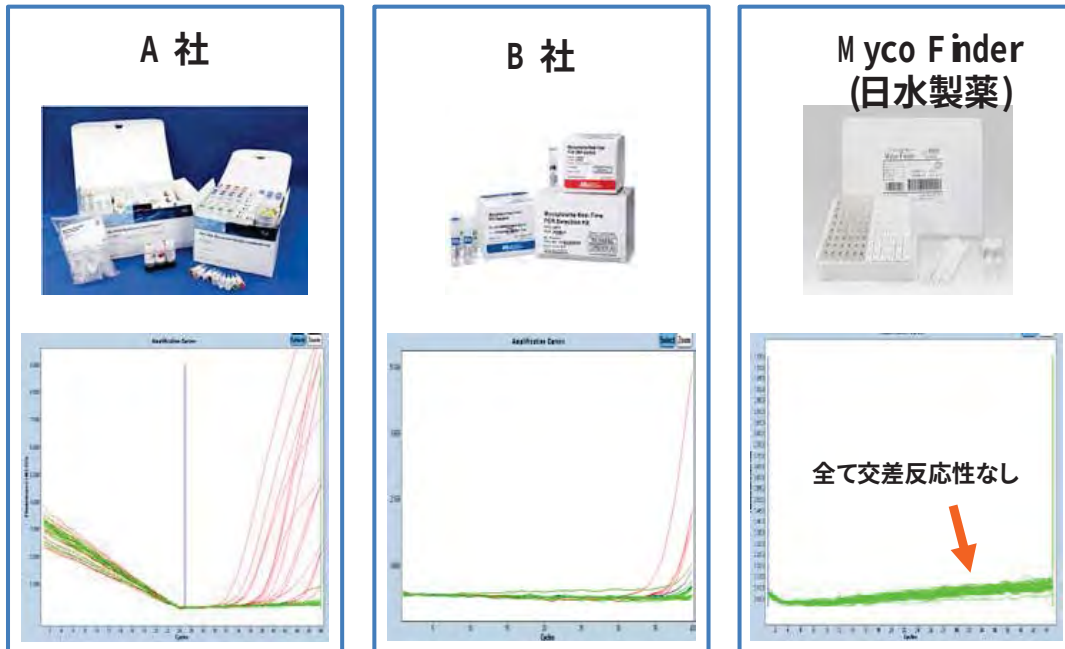
2017年8月 ヨーロッパ公開公報が発行

54

市販キットの特異性 (交差反応性) 比較

特異性 (細菌25種、真菌8種、哺乳動物細胞3種)

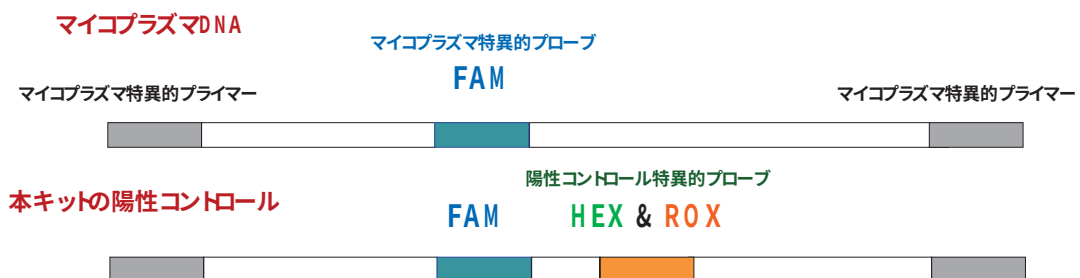
→ 世界的に使われている2社の検査キットに特異性で勝る



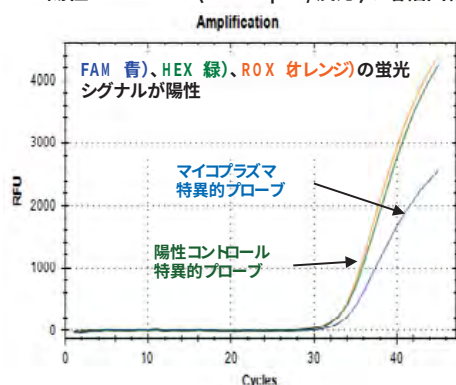
55

マイコプラズマDNA と識別可能な陽性コントロール

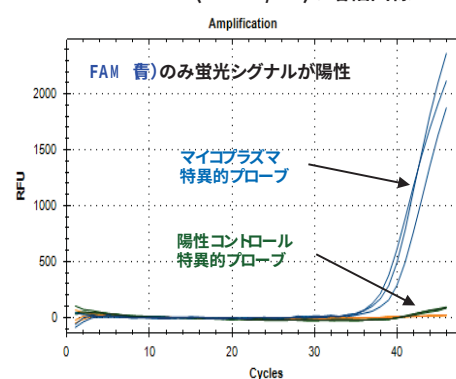
陽性コントロールに特異的配列を挿入し、その配列を検出することで陽性コントロール由来の増幅を判別可能



陽性コントロール (1000 copies/反応) の増幅曲線



M. fermentans (10 CFU/mL) の増幅曲線



56

使用方法 Myco Finder)について

- ① テストストリップBに濃度調整されたDNA抽出サンプルを25 μ L添加
- ② ピペッティングして固相化試薬を溶解した後、テストストリップAに全量を移す
- ③ ピペッティングして固相化試薬を溶解した後、フラットキャップを装着する
- ④ リアルタイムPCR装置で検出



57

NAT法を用いたマイコプラズマ否定試験 第十七改正日本薬局方)

試験前の施設バリデーションの実施が必要

- ・ 市販キットを用いる場合はキットの性能 (特異性、検出感度等) について
使用者の試験系でも目的とした性能が得られることを確認する
- ・ NATによる分析の評価には核酸の抽出から増幅産物の検出までの
全工程が含まれる
- ・ NATのみで否定試験を実施するには7種のマイコプラズマ全てに
おいて10 CFU / mLが95%以上の確率で検出される必要がある
- ・ CFU又はそれに相当するコピー数とが明らかにされたマイコプラズマ
参照品が必要

58

マイコプラズマ参照品の現状

国内調製されたマイコプラズマ参照品（菌種）を公的機関から入手できない

国衛研から基盤研 NITEに委託を検討 → 現状では整備が進んでいない

① 濃度既知の参照品パネルをATCCから入手

➡ 高価（1菌種約10万円）で、解凍後は再利用不可

① 菌株をNBRCやATCCから入手し、各施設で参照品を調製する（2～3週間程度）

➡ 培養・凍結 → CFU値、GC値の測定 → GC/CFU比の評価（100以内）

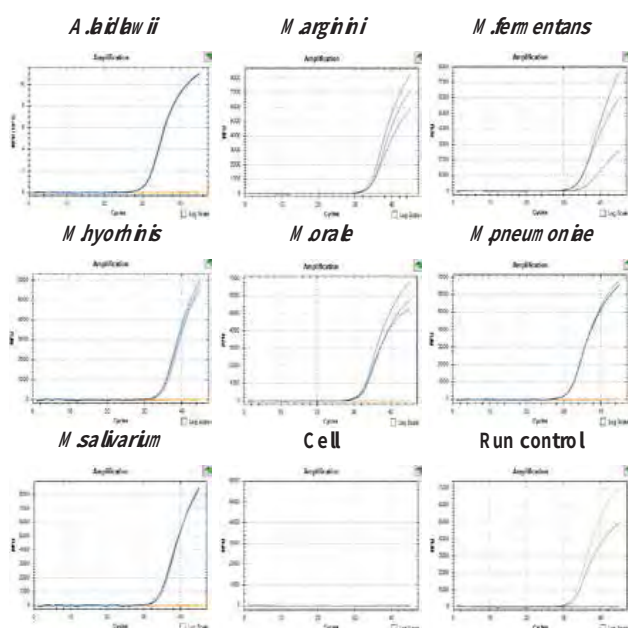
国衛研との共同研究

➡ 国衛研と同等の参照品を作製することが可能に（国内参照品）

59

Myco Finderを用いた施設バリデーションの実施例

滑膜由来幹細胞に対するマイコプラズマ否定試験（再生医療研究センター 軟骨・半月板再生グループ）



Mycoplasma	Positive / Total (10 CFU/mL)
<i>A. laidlawii</i>	3 / 3
<i>M. arginini</i>	3 / 3
<i>M. fermentans</i>	3 / 3
<i>M. hyorhinis</i>	3 / 3
<i>M. orale</i>	3 / 3
<i>M. pneumoniae</i>	3 / 3
<i>M. salivarium</i>	3 / 3
Cell	0 / 1

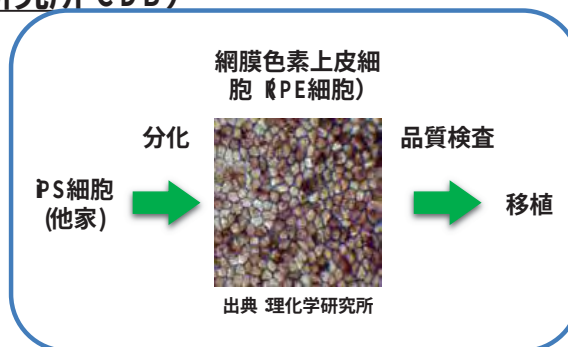
7菌種全てのマイコプラズマにおいて10 CFU/mLが100%検出されたため、NATのみでマイコプラズマ否定試験が実施可能

60

Myco Finderを用いた施設バリデーションの実施例

ヒトPS由来（他家）網膜色素上皮を使用した眼の再生医療（ 理化学研究所 CDB）

臨床研究（2017年3月～）



- ・ マイコプラズマ参照品の提供
- ・ Myco Finderを用いた施設バリデーションの技術指導



移植前のRPE細胞に対し Myco Finderを用いて検査実施

61

微生物検査の重要性と安全性確保への対策

再生医療の微生物安全性確保

新しい微生物検査法の開発

1. ウイルス検査法の開発

2. マイコプラズマ検査法の開発

3. 迅速無菌検査法の開発

62

微生物安全性確保への取り組み

無菌試験

日本薬局方（日局）の一試験法に収載

- ⇒ 試験期間が14日間必要なため、最終製品の検査に不適
- ⇒ 日局17参考情報では迅速無菌試験法の導入を推奨

63

微生物安全性確保への取り組み

無菌試験

日本薬局方（日局）の一試験法に収載

- ⇒ 試験期間が14日間必要なため、最終製品の検査に不適
- ⇒ 日局17参考情報では迅速無菌試験法の導入を推奨

核酸増幅法による迅速無菌試験法を開発

64

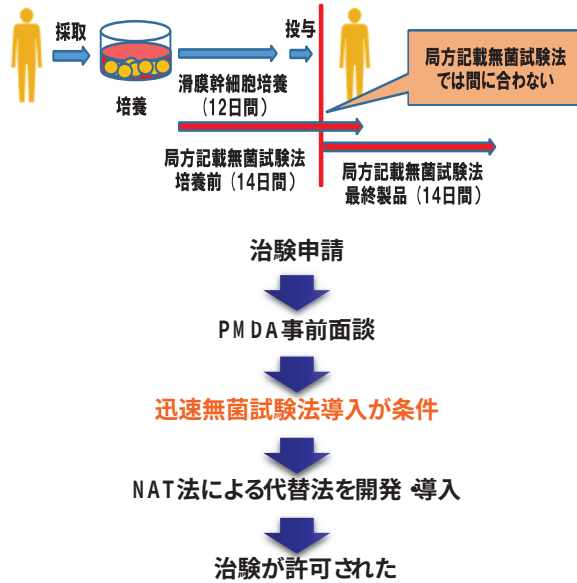
迅速無菌試験法の導入背景

第十七改正日本薬局方参考情報 微生物迅速試験法の今後

- 1) 従来法が使用できない場合に迅速微生物迅速試験法を導入する場合、その妥当性を検証して迅速試験法を用いることが出来る。培養法以外の検出原理を用いた検査法の導入が期待されること。
- 2) 真菌やウイルス等にも応用可能であり、その積極的な活用は関連分野における微生物管理レベルの向上に大きく役立ち、微生物汚染に伴うリスクの低減等に貢献することが期待される。
- 3) 試験方法のバリデーションでは局方6菌種を使用すること。

今後迅速無菌試験代替法が
使用可能になると予想される

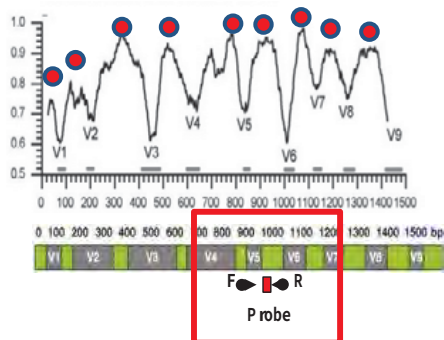
滑膜由来培養幹細胞による半月板再生医療 再生医療研究センター 軟骨 半月板再生グループ



65

NAT法による迅速無菌試験法の構築 (オリゴ設計 網羅性)

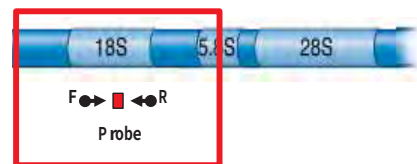
細菌共通16S rRNA遺伝子 定量PCR



検出可能な代表的細菌種

Haemophilus influenzae, *Neisseria meningitidis*,
Staphylococcus aureus, *Moraxella catarrhalis*,
Clostridium perfringens, *Staphylococcus epidermidis*,
Streptococcus pneumoniae, *Mycobacterium tuberculosis*,
Propionibacterium acnes, *Pseudomonas aeruginosa*,
Escherichia coli, *Campylobacter jejuni*,
Bartonella henselae, *Rickettsia japonica*,
Coxiella burnetii etc 合計39種類が検出可能

真菌共通18S rRNA遺伝子 定量PCR



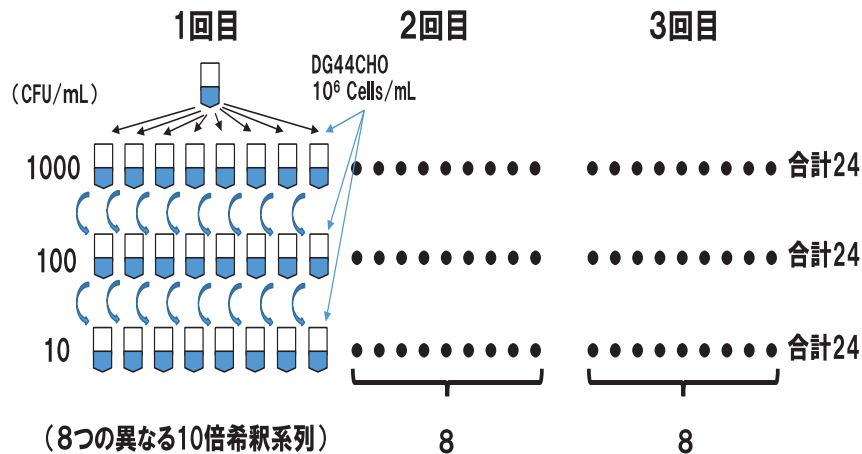
検出可能な真菌類

Aspergillus spp., *Alternaria* spp., *Absidia* spp., *Blastobasis* spp.,
Candida spp., *Chytridiomycota* spp., *Coniophora* spp.,
Coccidioides spp., *Cryptococcus* spp., *Cunninghamella* spp.,
Emicella spp., *Echinophora* spp., *Fusarium* spp.,
Lomentospora spp., *Lichtheimia* spp., *Microsporum* spp.,
Mucor spp., *Naumovozyma* spp., *Orfelia* spp., *Pseudallescheria* spp.,
Paecilomyces spp., *Pneumocystis* spp., *Rhizopus* spp.,
Rhizomucor spp., *Rhodotorula* spp., *Saksenaea* spp., *Trichosporon* spp.,

66

検出感度試験（局方記載の細菌・真菌種類による同等性試験）

マイコプラズマ否定試験 NAT法のバリデーションを参考に評価
無菌試験：培養法による検出感度は100 CFU

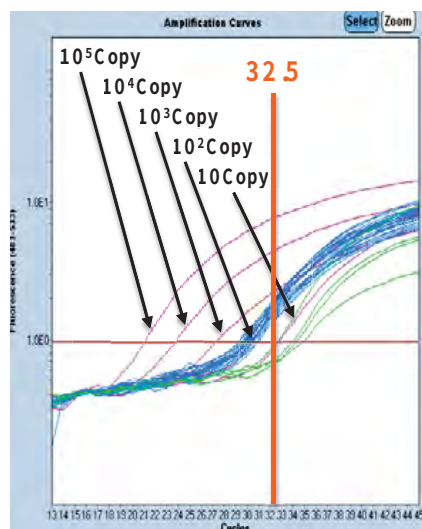


67

検出感度試験 陽性／陰性判定のための基準設定

細菌3菌種 (*B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*) (N=8)

1×10⁶個の細胞 (HO DG44) + 細菌100 CFU



局方収載の細菌4種

C. sporogenes, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*

➡ Cq値 32.5でカットオフ

局方収載の真菌2種

A. brasiliensis, *C. albicans*

➡ Cq値 30でカットオフ

Standard Spike sample 陰性sample

68

検出感度試験（局方記載の細菌・真菌種類による同等性試験）

<i>B. subtilis</i>					<i>P. aeruginosa</i>					<i>A. brasiliensis</i>				
Spike CFU / mL	Run 1	Run 2	Run 3	Total	Spike CFU / mL	Run 1	Run 2	Run 3	Total	Spike CFU / mL	Run 1	Run 2	Run 3	Total
1000	8 / 8	8 / 8	8 / 8	24 / 24	1000	8 / 8	8 / 8	8 / 8	24 / 24	1000	8 / 8	8 / 8	8 / 8	24 / 24
100	8 / 8	8 / 8	8 / 8	24 / 24	100	8 / 8	8 / 8	8 / 8	24 / 24	100	8 / 8	8 / 8	8 / 8	24 / 24
10	3 / 8	1 / 8	1 / 8	5 / 24	10	3 / 8	2 / 8	0 / 8	3 / 24	10	8 / 8	8 / 8	8 / 8	24 / 24

<i>S. aureus</i>					<i>C. sporogenes</i>					<i>C. albicans</i>				
Spike CFU / mL	Run 1	Run 2	Run 3	Total	Spike CFU / mL	Run 1	Run 2	Run 3	Total	Spike CFU / mL	Run 1	Run 2	Run 3	Total
1000	8 / 8	8 / 8	8 / 8	24 / 24	1000	8 / 8	8 / 8	8 / 8	24 / 24	1000	8 / 8	8 / 8	8 / 8	24 / 24
100	8 / 8	8 / 8	8 / 8	24 / 24	100	8 / 8	8 / 8	8 / 8	24 / 24	100	8 / 8	8 / 8	8 / 8	24 / 24
10	5 / 8	2 / 8	5 / 8	12 / 24	10	2 / 8	4 / 8	5 / 8	11 / 24	10	2 / 8	4 / 8	5 / 8	11 / 24

日局17収載の細菌4種および真菌2種のすべてで100 CFU / mLが100%検出された
 ➡ 培養法の検出感度を満たしている

69

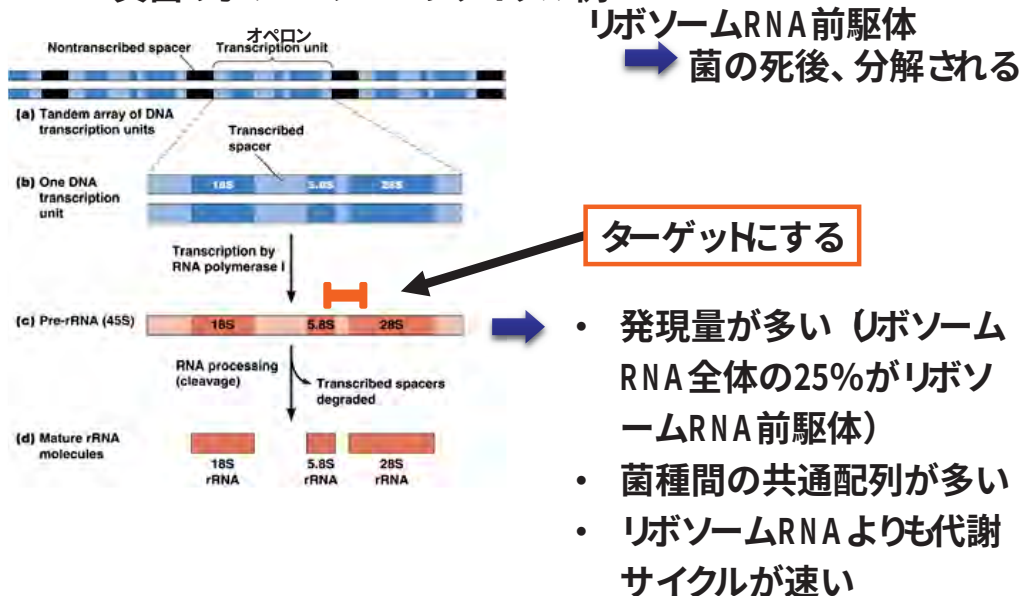
NAT法による迅速無菌試験法のアップグレード

	現在	アップグレード	
核酸	DNA	RNA	・ rRNAはDNAの100～1000倍多く存在する ・ 菌の死後RNAは急速に分解される
対象	一般の細菌・真菌	広範囲の細菌・真菌 マイコプラズマ	期待されること 高感度化 生菌・死菌判定
酵素	➡	低核酸	網羅性の向上 検査の迅速化
プライマー プローブ	➡	高精製 高分子核酸除去	市販品には高濃度の微生物由来の核酸が混入している カットオフ値の設定が容易

70

rRNA・rRNA前駆体を標的とした生菌・死菌判定法の開発

真菌リボソームRNAのサイクル例

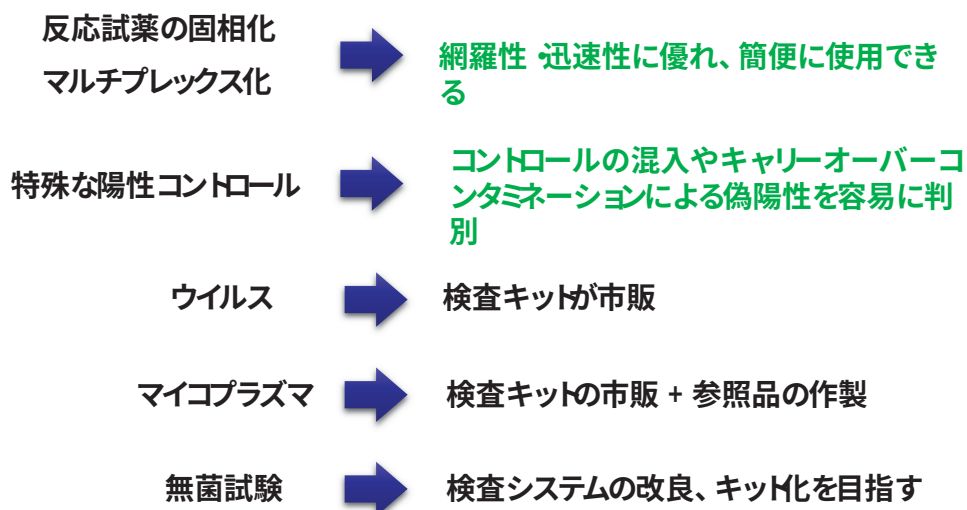


リボソームRNA前駆体を利用した微生物の生死判定方法
2017年 国内特許 2018年 PCT (本学より出願)

71

簡便・迅速な検査系の実用化と統合

リアルタイムPCRを共通プラットフォームとした検査システム



統合型迅速微生物等検査系を開発中

72

講演内容

再生医療実用化の微生物安全性検査

1. 法律、指針等で求められる微生物等の検査
2. プロセスバリデーションとベリフィケーション
3. 新規検査法の開発 (ウイルス・マイコプラズマ・無菌)
4. 微生物安全性に関わるデータ収集
5. 微生物安全性確保に向けて

73

微生物安全性に関わるデータ収集

再生医療用の原料や細胞製剤への 微生物混入に関するデータ収集

ケースバイケース対応を考えるには基礎となるデータが必要

1. 原料や培養細胞に関するデータ収集

(ウイルス陽性検体の積極的な試験培養)

2. スパイク試験によるデータ収集

(ウイルス添加による細胞への影響とウイルス動態解析)

74

微生物安全性に関わるデータ収集

再生医療用の原料や細胞製剤への 微生物混入に関するデータ収集

ケースバイケース対応を考えるには基礎となるデータが必要

1. 原料や培養細胞に関するデータ収集

ウイルス陽性検体の積極的な試験培養)

2. スパイク試験によるデータ収集

ウイルス添加による細胞への影響とウイルス動態解析)

75

微生物安全性に関わるデータ収集

本学 細胞治療センターで実施中の微生物検査

DNAウイルス

HSV -1,-2,VZV ,CMV ,ParvoB19,BKV ,JCV

EBV,HHV -7,HHV -8,HBV

RNAウイルス

HN-1,HN-2,HCV,HTLV-1,HTLV-2

マイコプラズマ

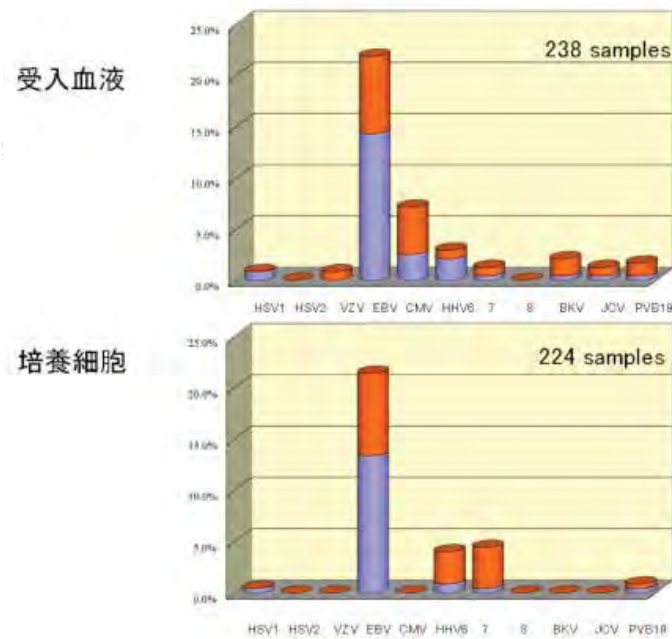
細菌・真菌培養

エンドトキシン

76

微生物安全性に関わるデータ収集（末梢血）

T細胞の活性化培養の前後でのウイルス検出



77

微生物安全性に関わるデータ収集（末梢血）

ウイルス陽性患者T細胞のCD3AT法による試験培養

- HIV-1 キャリア / AIDS患者 ⇒ ウイルス量減少
- HTLV-1 キャリア / ATL患者 ⇒ 感染細胞増幅
- HBV キャリア ⇒ ウイルス量減少
- HCV キャリア ⇒ ウイルス量減少
- PVB19 キャリア ⇒ ウイルス量減少
- CMV感染症患者 ⇒ ウイルス量減少 • 残存
- EBVキャリア ⇒ ウイルス量減少 • 増幅
- HHV6感染症患者（キャリア） ⇒ ウイルス量減少 • 増幅

78

微生物安全性に関わるデータ収集 滑膜幹細胞)

滑膜幹細胞を利用した再生医療の ウイルス・マイコプラズマ検査

対象ウイルス・マイコプラズマ

DNA virus: HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8, CMV, B19, HBV, BKV, JCV

RNA & Retro virus: HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, HCV

マイコプラズマ (欧州薬局方記載の下記9種類を含む142種類が検出可能)

M. orale, M. arginini, M. fermentans, M. hyorhinis, M. pneumoniae, M. synoviae, M. gallisepticum, A. bidlawii, S. citri

対象検体

滑膜 骨髄 (細胞成分、液体成分) 血液 (細胞成分、液体成分)
骨 滑膜由来間葉系幹細胞 (day 14)

79

微生物安全性に関わるデータ収集 滑膜幹細胞)

ウイルス検査

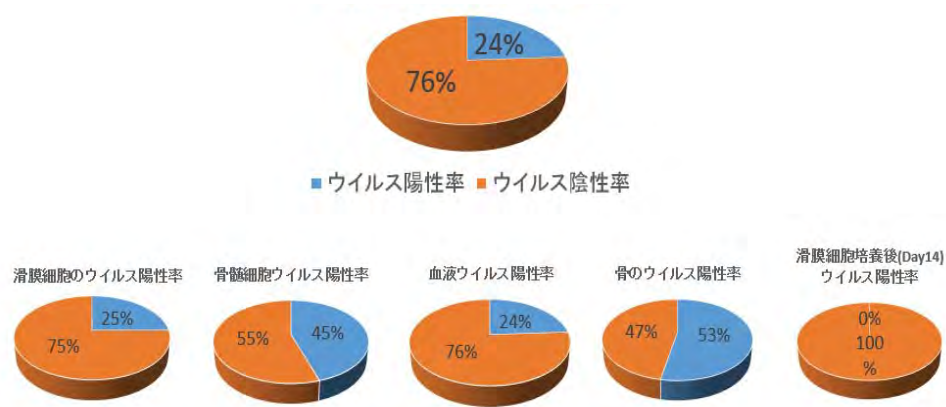
- ・ ウイルス陽性症例数：20 症例中 14 症例
- ・ ウイルス陽性検体数：126 検体中 30 検体

検体 (内訳)	陽性/検体	内訳
滑膜	5/20	EBV (1) parvoB19 (4)
骨髄 (細胞成分)	7/19	parvoB19 (6) HTLV1 (1)
骨髄 (液体成分)	8/19	EBV (1) VZV (1) parvoB19 (6)
血液 (細胞成分)	3/17	EBV (1) parvoB19 (1) HTLV1 (1)
血液 (液体成分)	1/17	parvoB19 (1)
骨	6/15	parvoB19 (6)
滑膜由来間葉系幹細胞 (day 14)	0/19	
Total	30/126	

80

微生物安全性に関わるデータ収集 滑膜幹細胞)

滑膜幹細胞を利用した再生医療のウイルス検査



81

微生物安全性に関わるデータ収集 滑膜幹細胞)

マイコプラズマ検査

- 陽性症例数：20 症例中 0 症例
- 陽性検体数：126 検体中 0 検体

	陽性検体数/検体数
滑膜	0/20
骨髓 (細胞成分)	0/19
骨髓 (液体成分)	0/19
血液 (細胞成分)	0/17
血液 (液体成分)	0/17
骨	0/15
滑膜由来間葉系幹細胞 (day 14)	0/19
Total	0/126

82

微生物安全性に関わるデータ収集

再生医療用の原料や細胞製剤への 微生物混入に関するデータ収集

ケースバイケース対応を考えるには基礎となるデータが必要

1. 原料や培養細胞に関するデータ収集

ウイルス陽性検体の積極的な試験培養)

2. スパイク試験によるデータ収集

ウイルス添加による細胞への影響とウイルス動態解析)

83

微生物安全性に関わるデータ収集

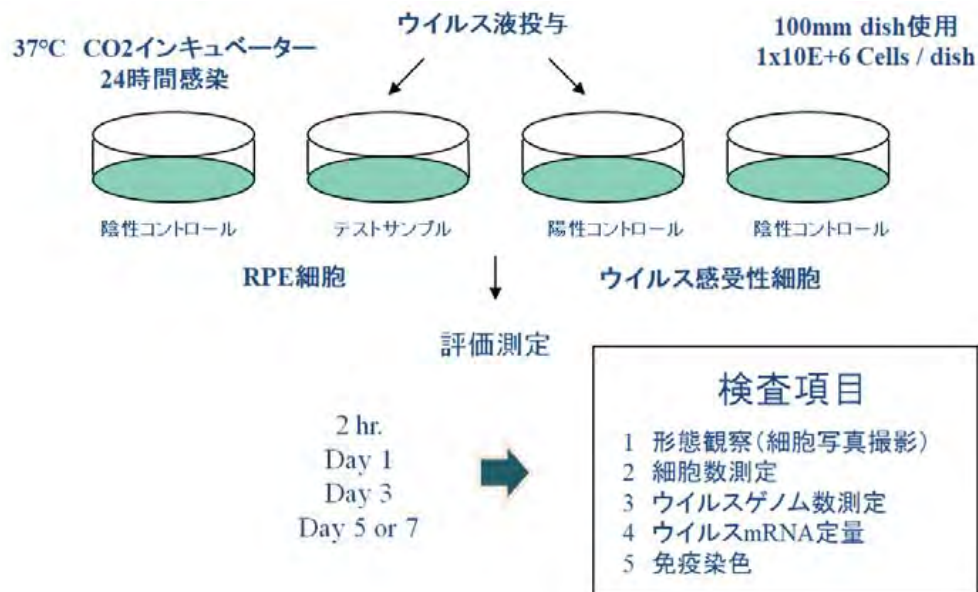
ウイルススパイク試験法の開発

- **対象ウイルス**： ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1)
エプスタイン・バーウイルス (EBV)
ヒトサイトメガロウイルス (CMV)
ヒトパルボウイルスB19型 (PVB19)
単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1)
- **被検細胞**： CD34陽性造血幹細胞 骨髄由来間葉系幹細胞
IPS細胞由来網膜色素上皮細胞 IPS細胞
滑膜由来間葉系幹細胞

84

微生物安全性に関わるデータ収集

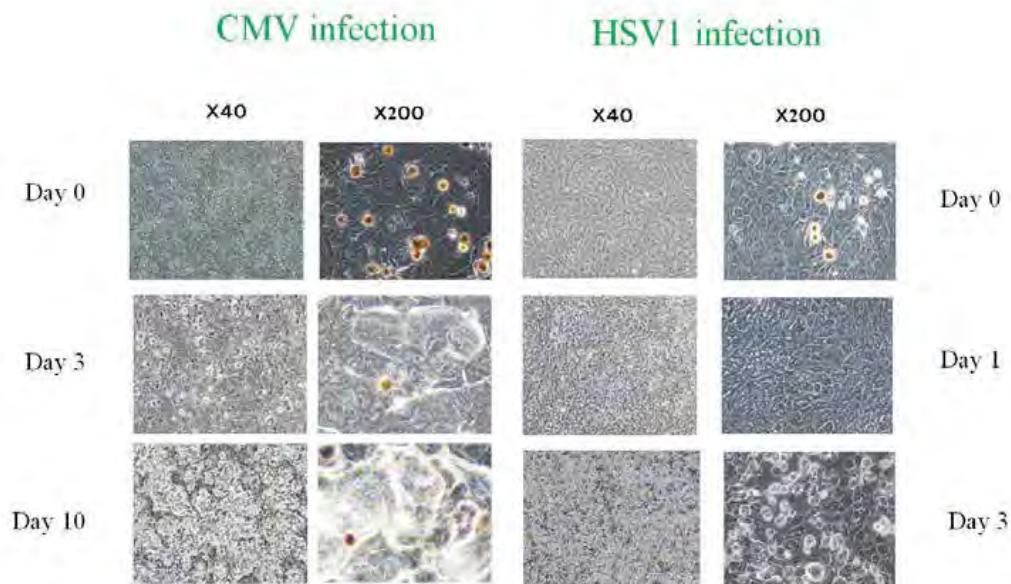
iPS細胞由来網膜色素上皮（RPE）細胞への ウイルススパイク試験



85

iPS細胞由来RPE細胞へのウイルススパイク試験

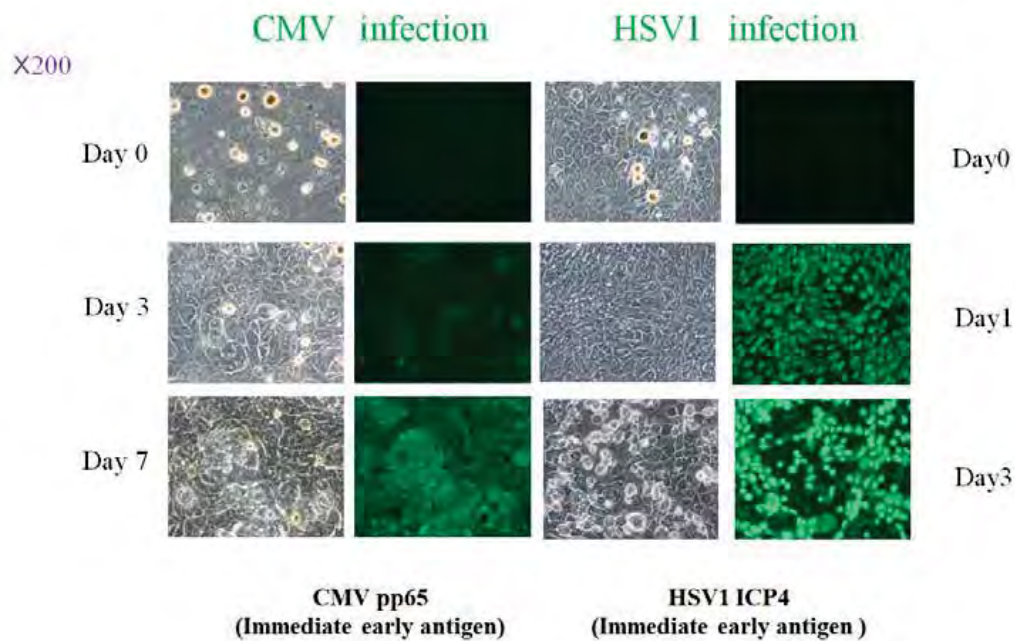
ウイルス感染による細胞の形態変化 (RPE 細胞)



86

iPS細胞由来RPE細胞へのウイルススパイク試験

ウイルスタンパク質発現の検出 (RPE 細胞)



87

iPS細胞由来RPE細胞へのウイルススパイク試験

iPS細胞由来網膜色素上皮細胞を利用した再生医療の安全性確保

【目的】 iPS細胞由来網膜色素上皮 (RPE) 細胞に対するウイルススパイク試験を実施

【結果】 HSV1, CMV ともに感染後ウイルスゲノム量の増加およびウイルス mRNA・タンパク質の発現が確認され、感染細胞は死滅した

88

PS細胞由来網膜色素上皮細胞を利用した再生医療の安全性確保

【目的】 PS細胞由来網膜色素上皮 (RPE)細胞に対するウイルススパイク試験を実施

【結果】 HSV1,CMVともに感染後ウイルスゲノム量の増加およびウイルス mRNA・タンパク質の発現が確認され、感染細胞は死滅した

- 【考察】
1. PS細胞由来RPE細胞はHSV1とCMVに高い感受性を有し、感染後細胞が死滅することが示された
 2. PS細胞ストックを用いる再生医療は同種移植となり免疫抑制剤投与が必要となるため持続感染ウイルスの活性化が懸念される
したがって、移植細胞に親和性がある持続感染ウイルスの感染の可能性を踏まえた治療計画および移植細胞の安全保証検討すべきである
(第14回日本再生医療学会総会で発表)

89

講演内容

再生医療実用化の微生物安全性検査

1. 法律、指針等で求められる微生物等の検査
2. プロセスバリデーションとベリフィケーション
3. 新規検査法の開発 (ウイルス・マイコプラズマ・無菌)
4. 微生物安全性に関わるデータ収集
5. 微生物安全性確保に向けて

再生医療を実施する際に注意すべきウイルス

活性化T細胞

原材料 EBV, HHV6, HHV7, CMV, HTLV1, B19, HCV, HBV

細胞製剤 EBV, HHV6, HHV7, HTLV1

滑膜細胞 原材料 B19, EBV, HTLV1, VZV

PS由来RPE細胞 培養細胞 HSV1, CMV

CD34陽性細胞 培養細胞 B19

PS細胞: 培養細胞 HSV1 (CMVは陰性)
皮膚 末梢血からの汚染?

91

再生医療のウイルス安全性確保

1. 指針に記載のウイルス5種類の検査は必須
(HIV, HTLV, HBV, HCV, B19)
2. 上記5種類以外でも混入や増殖の可能性がある持続感染ウイルスの検査を考慮すべき (ケースバイケースの対応)
3. 同種治療ではウインドウピリオドを勘案したドナーの再検査を考慮すべき
4. 製造ロット毎のベリフィケーションによる安全性確保が重要
5. 免疫抑制剤投与が必要な治療では、患者に持続感染しているウイルスが細胞製剤に感染する可能性を考慮した品質管理・治療戦略を構築すべき

92

再生医療を微生物安全性確保への取り組み

1. 最終製品の検査を目指した迅速検査系の開発と実用化

ウイルス、マイコプラズマ、無菌試験

（4件の特許出願とライセンスアウト：6種類の製品）

2. 微生物汚染に関するデータ取得への協力

正常・感染検体の試験培養と正常細胞へのスパイク試験によるデータ取得

（I-TEC、JCR ファーマ、ヘリオス、リンフォテック など）

3. 微生物検査実施への協力

技術供与や技術指導

（RA、京都府立医大、山口大、タカラバイオ、日水製薬、島津製作所 など）

施設バリデーションへの協力

参照品の作成と供与：理化学研究所、ファーマバイオ、メディネット など）

再生医療における 画像情報解析を用いた 品質管理の可能性



名古屋大学大学院創薬科学研究科
加藤竜司



生モノを製造する難しさ

生モノの製造を実現する工学 = 生物工学

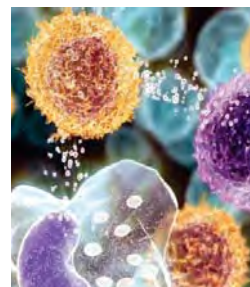
お酒・醤油・酢



パン・お菓子



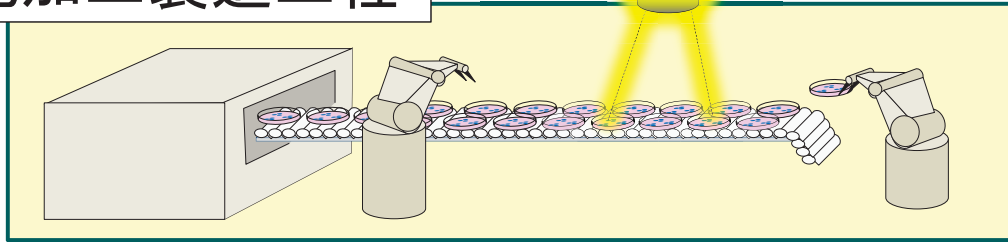
抗体医薬



細胞製品製造工程における画像解析

細胞加工製造工程

非破壊的・定量的な
細胞のモニタリング



細胞製品

安全性

安定性

コスト

医療 産業

★画像解析での品質評価は
意味があるのか？

★画像解析での品質評価は
実際どう使えるのか？

品質工学に当てはめるとき...

・品質は「プロセスで作る」

画像解析は
プロセスを記録しておく、より深く知る
ためには有効かもしれない。

・制御（改善）できなければ 計測する意味は無い

画像解析で得られるデータは
生命的な機構はわからなくても
工程改善の指標となることがある。

生モノ製品の品質

品質



りんご
の
製造・出荷

生産の現実性

生モノ製品の品質管理の難しさ



技術そのものの課題



技術安定性の課題

技術的課題が違う

品質

とにかく最高に美味しい

味はハズレないが
たまには傷が
(逸脱を制御できるか)

味はハズレないが
箱によって傷が
(安定して制御できるか)

たまに甘くない
(活性が制御できるか)

箱によって甘くない
(安定して制御できるか)

美味しい

あいまいな
目標基準は
達成が無理

甘くない (活性少し低い)

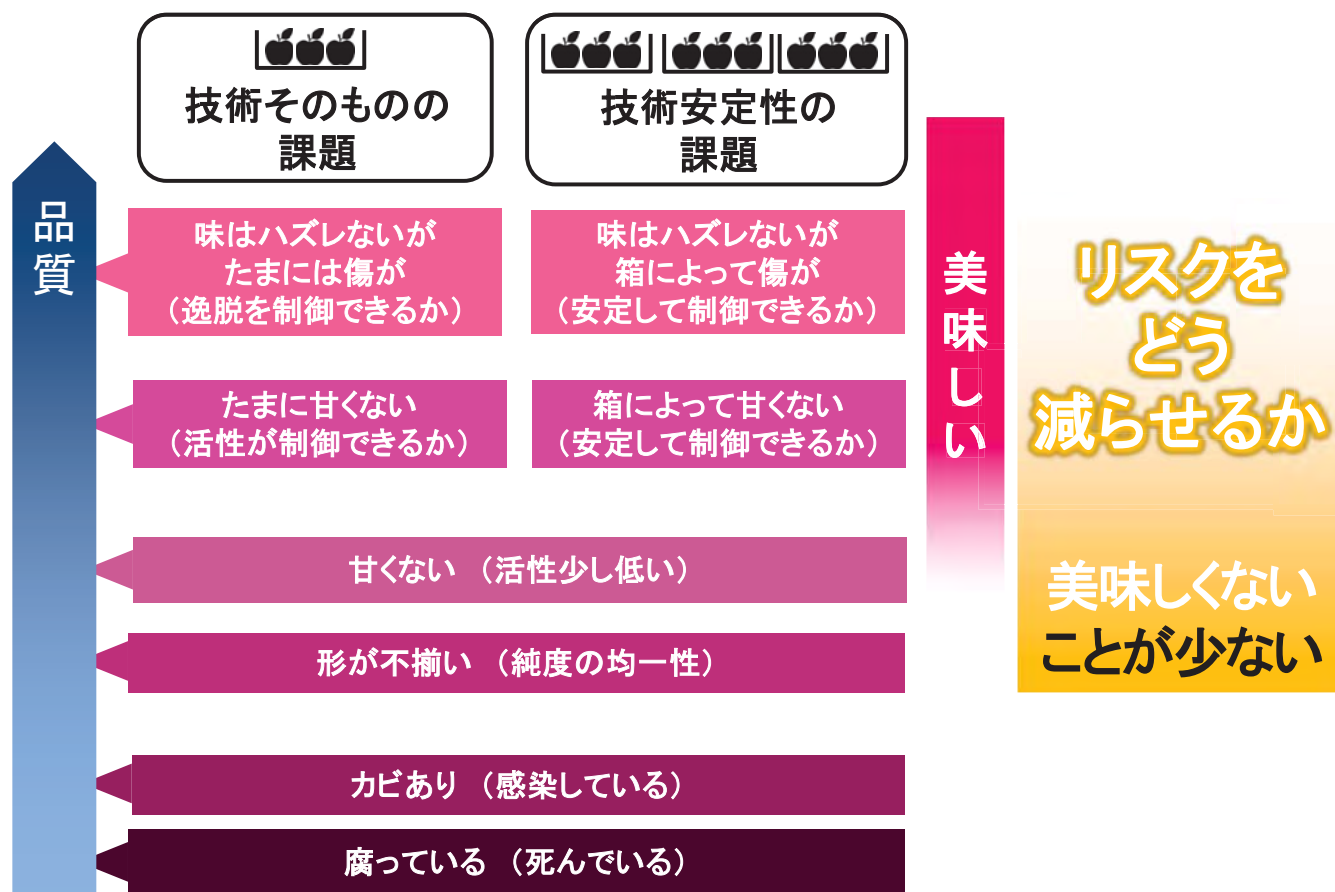
形が不揃い (純度の均一性)

カビあり (感染している)

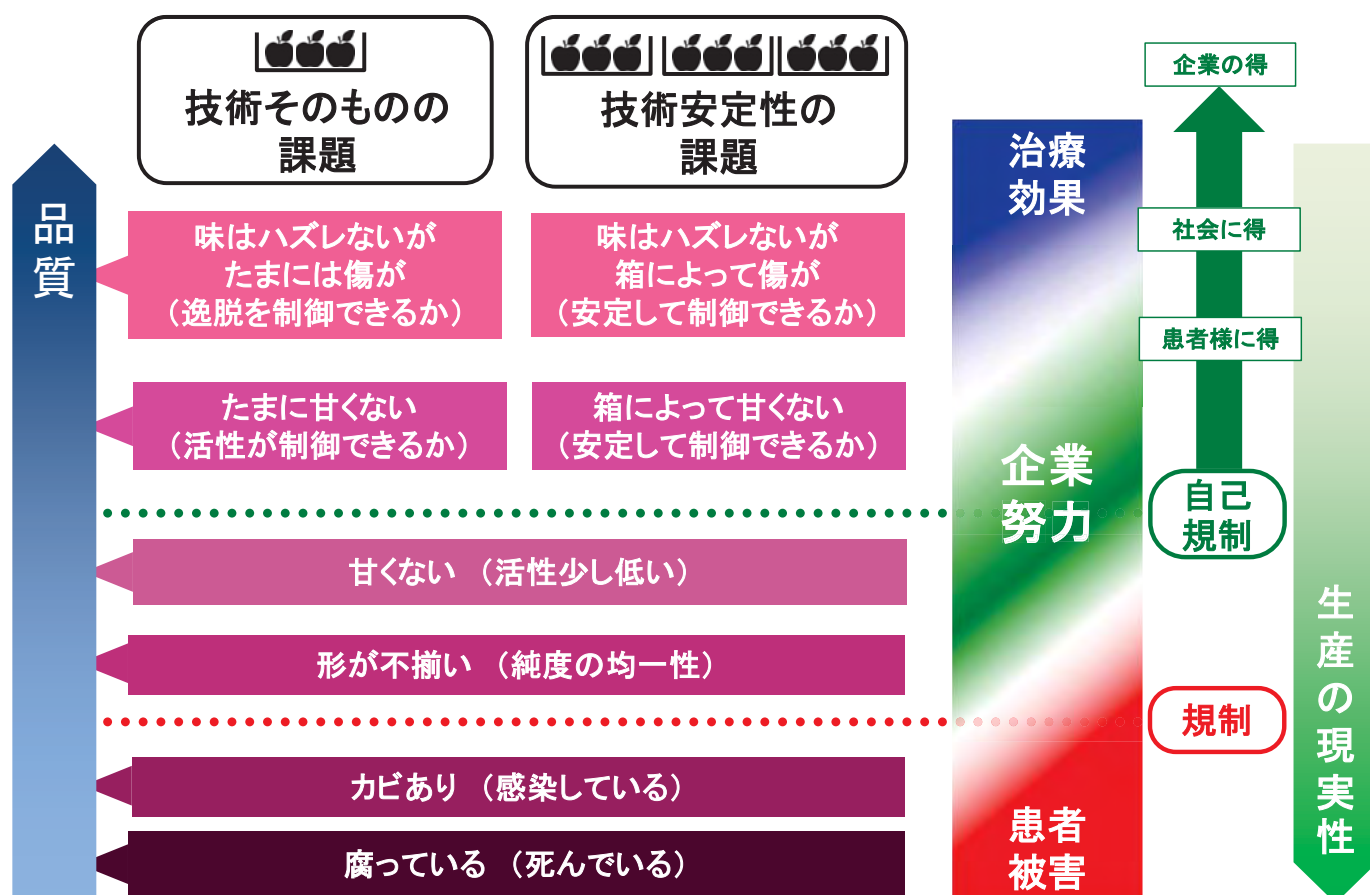
腐っている (死んでいる)

生産の現実性

生モノ製品の品質管理の難しさ

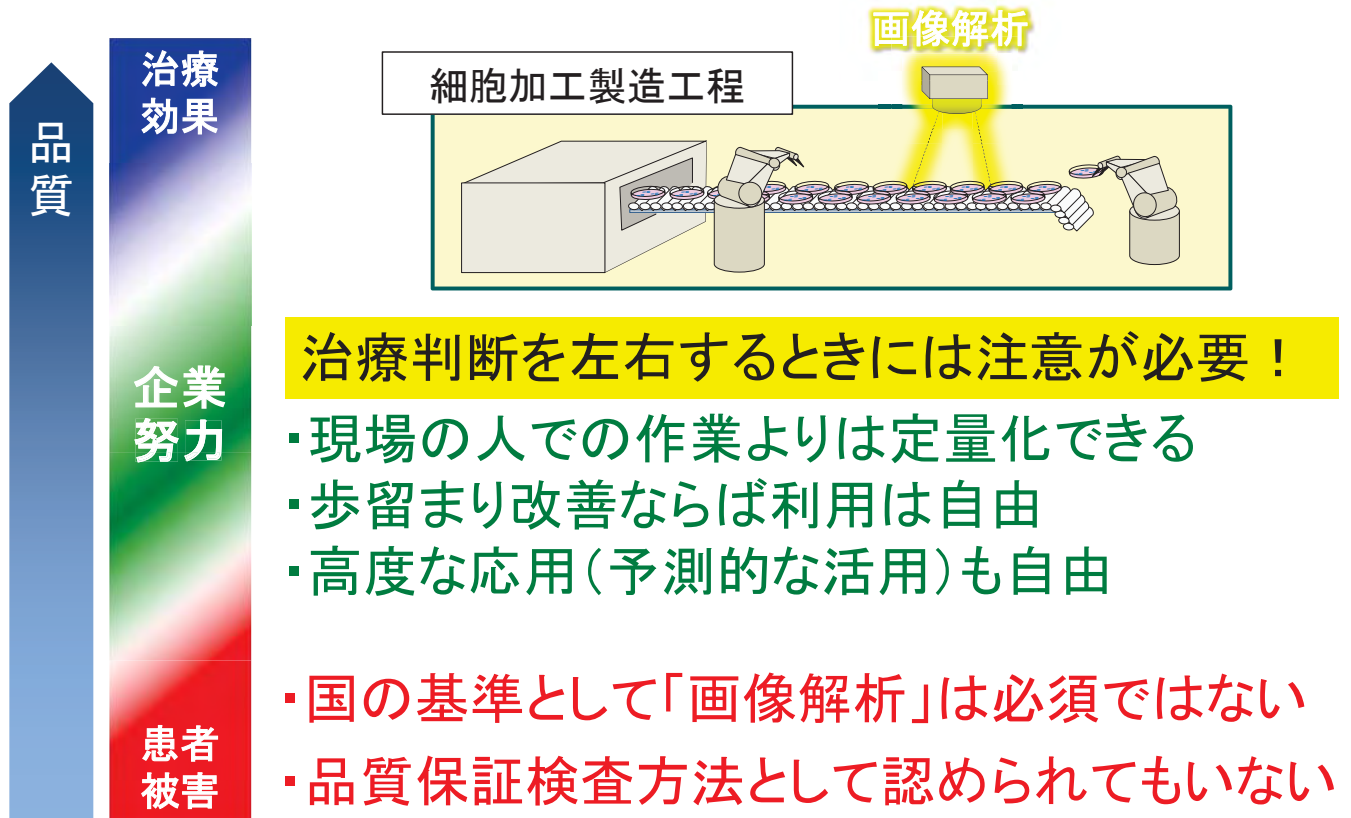


生モノ製品の品質管理の難しさ

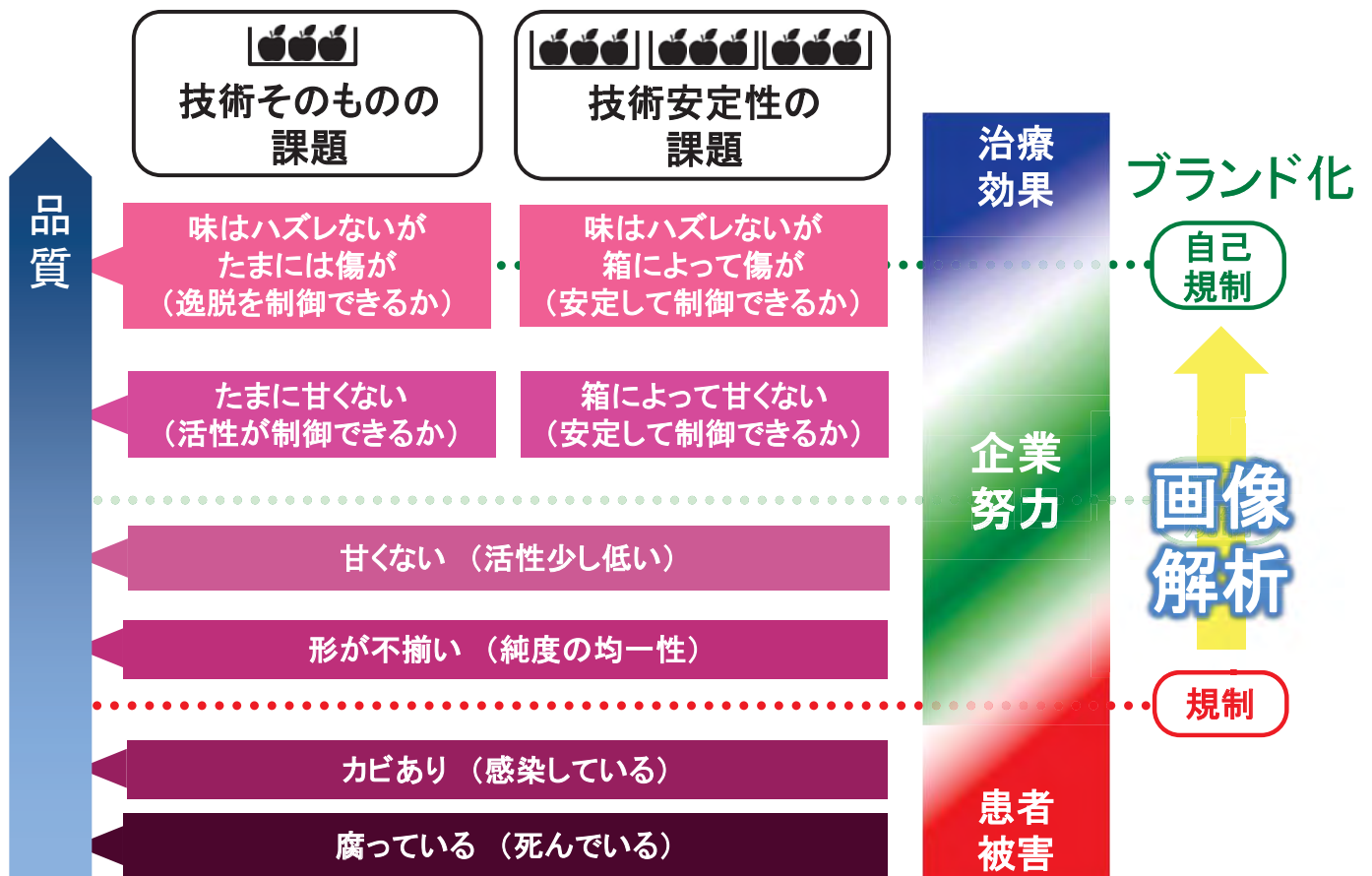


細胞品質管理における画像解析の位置付け

★画像解析での品質評価は意味があるのか？

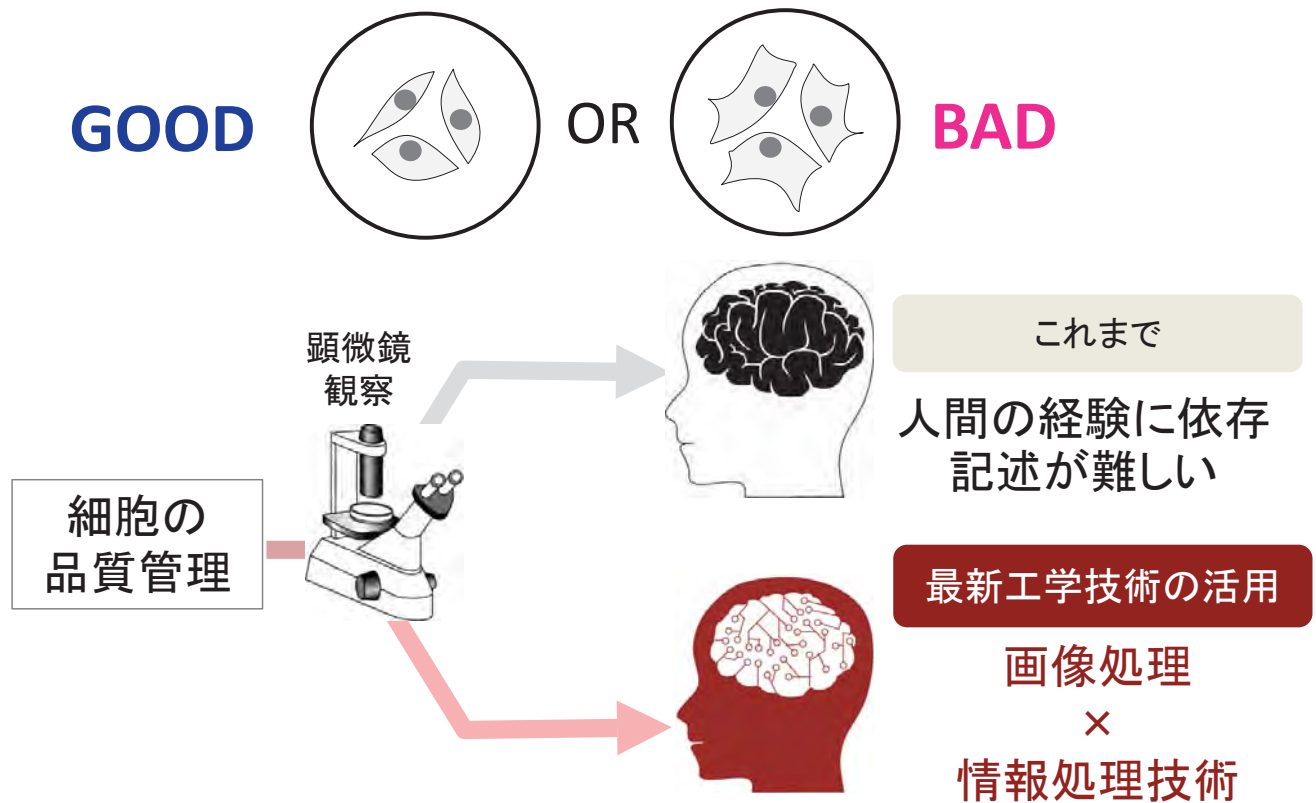


画像解析ができること



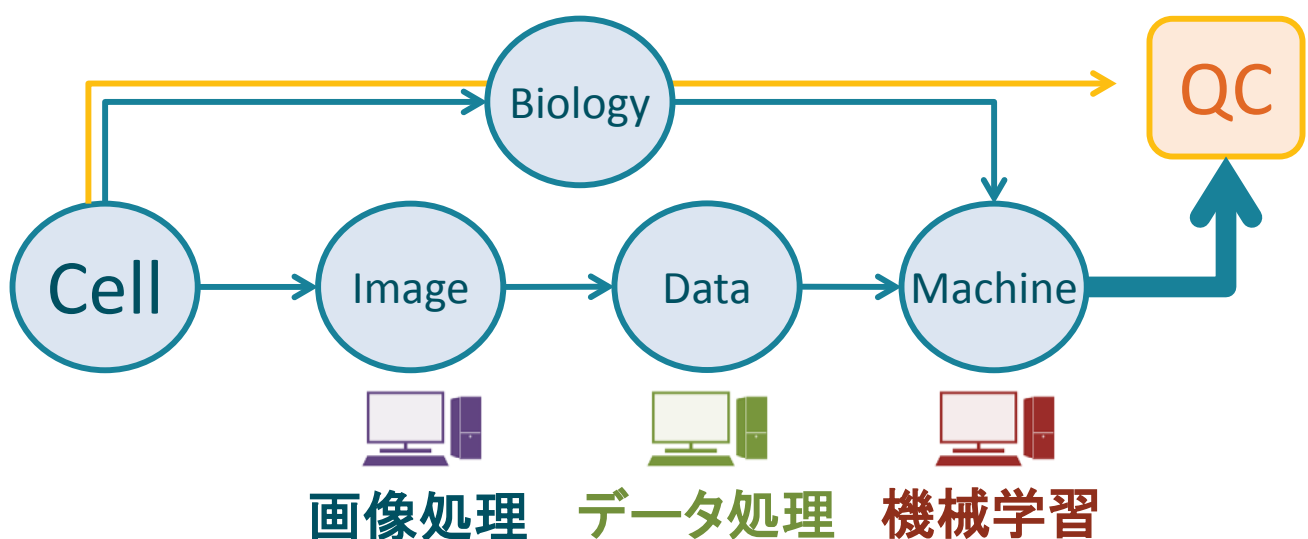
「細胞の形」の品質評価への利用

『細胞の形』の観察 = 重要な品質評価項目の一つ



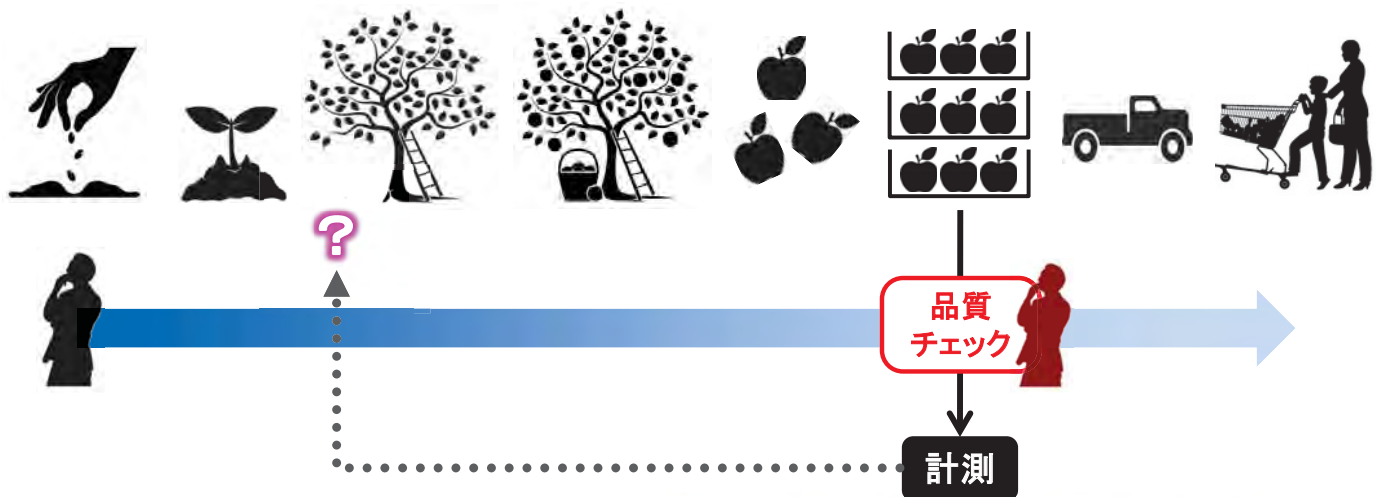
画像解析を用いた品質評価

★画像解析での品質評価はどう使えるのか？



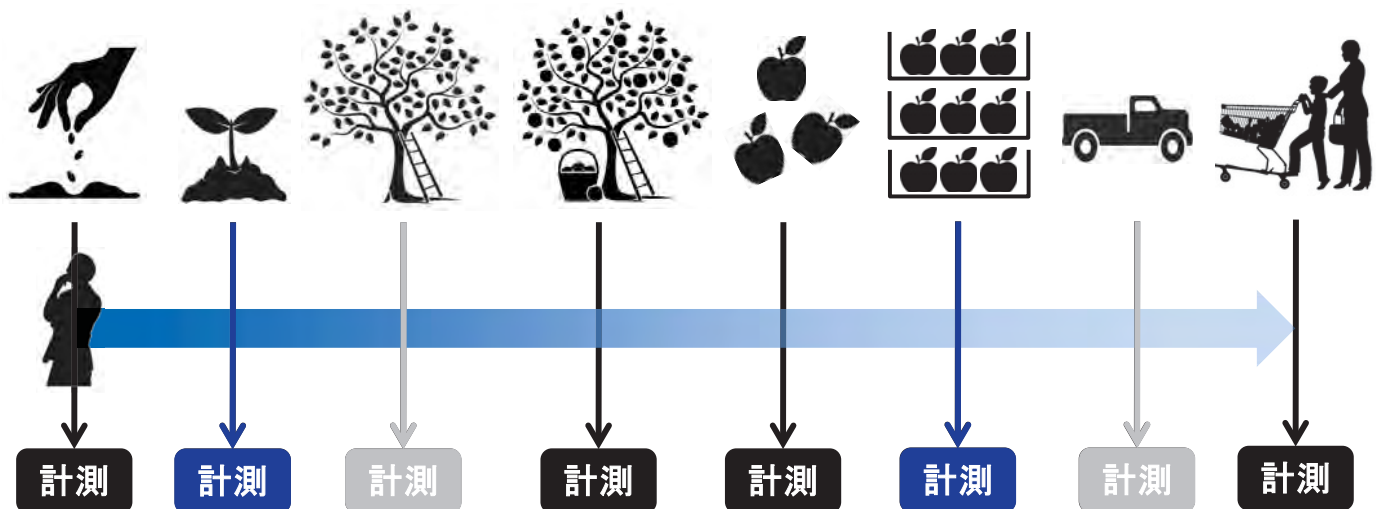
どれかの技術があれば誰でも始められます
技術より、「使い方」が大事

品質管理のための品質計測



どんな高度な計測技術でも
計測しただけでは
不具合は直せない！

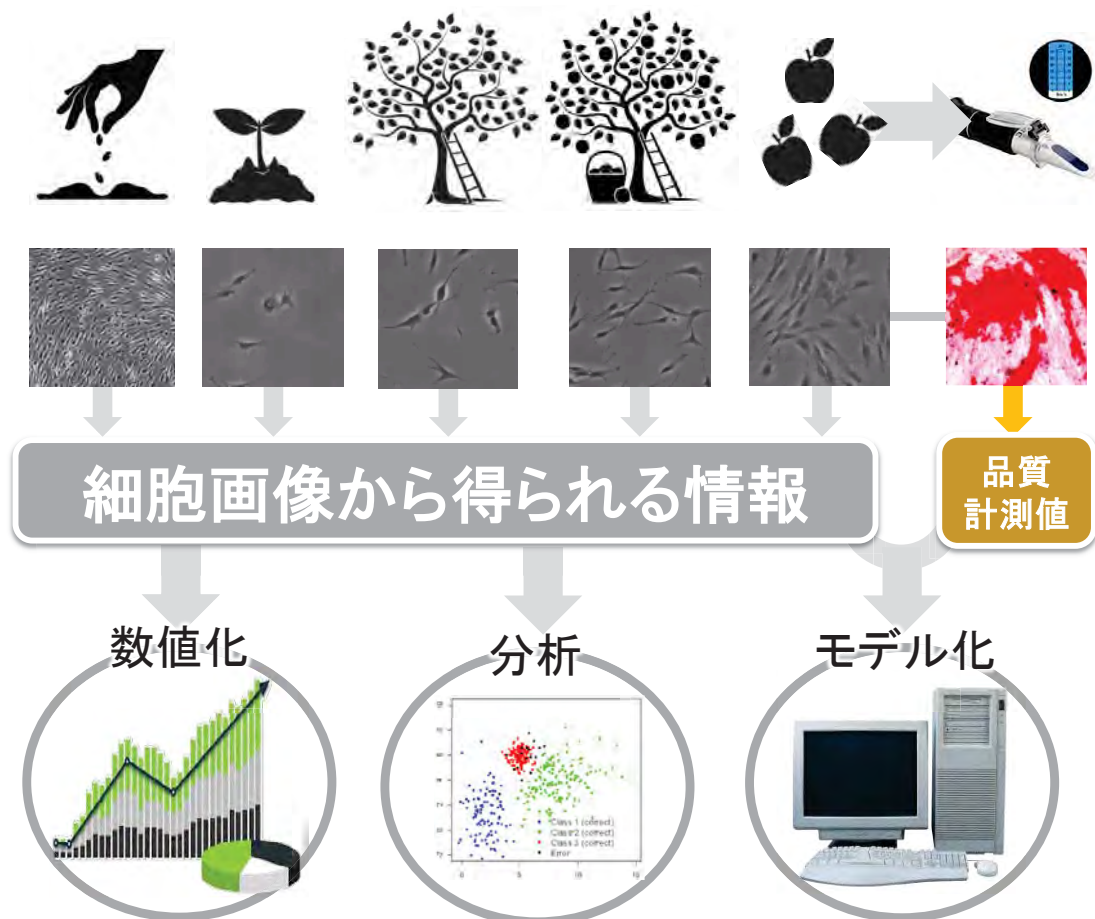
品質管理のための品質計測



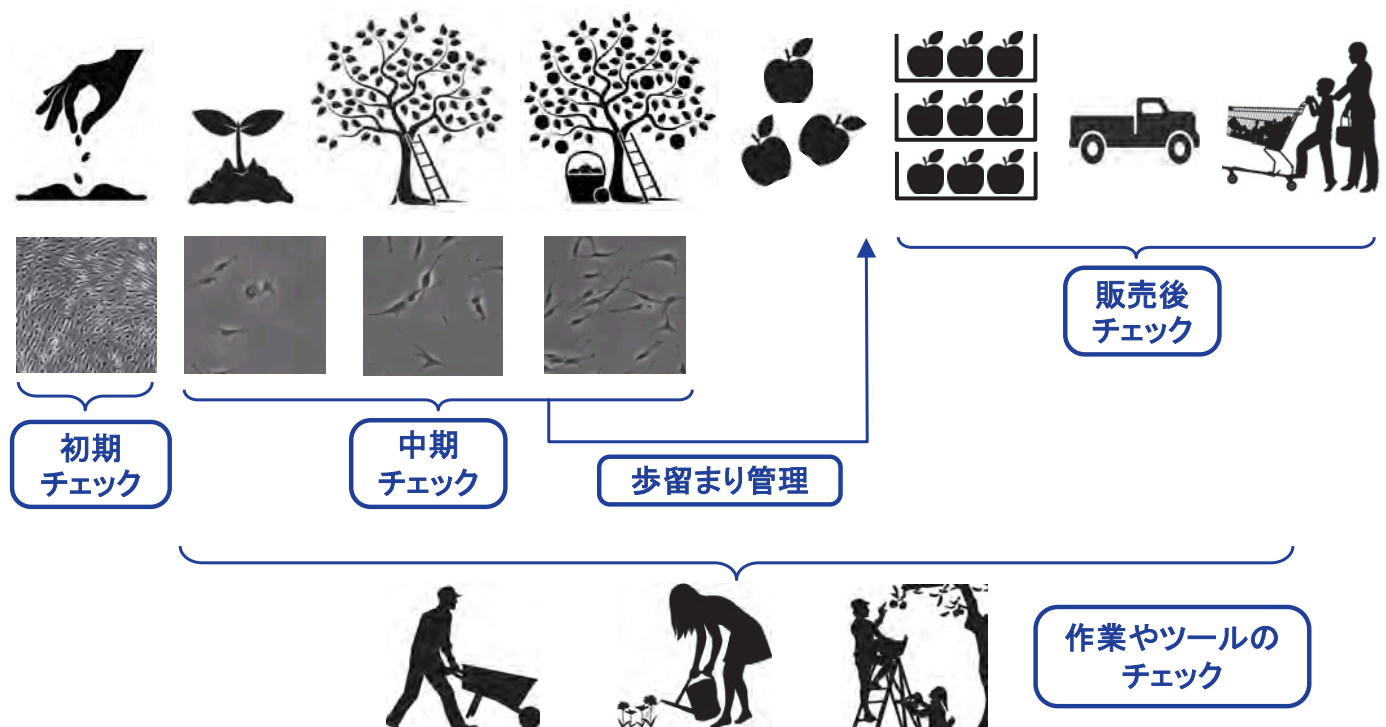
プロセスの理解が進む

- ★大事な工程はどこか
- ★どこと、どこに相関があるのか

画像解析の意義



画像解析による品質管理の可能性

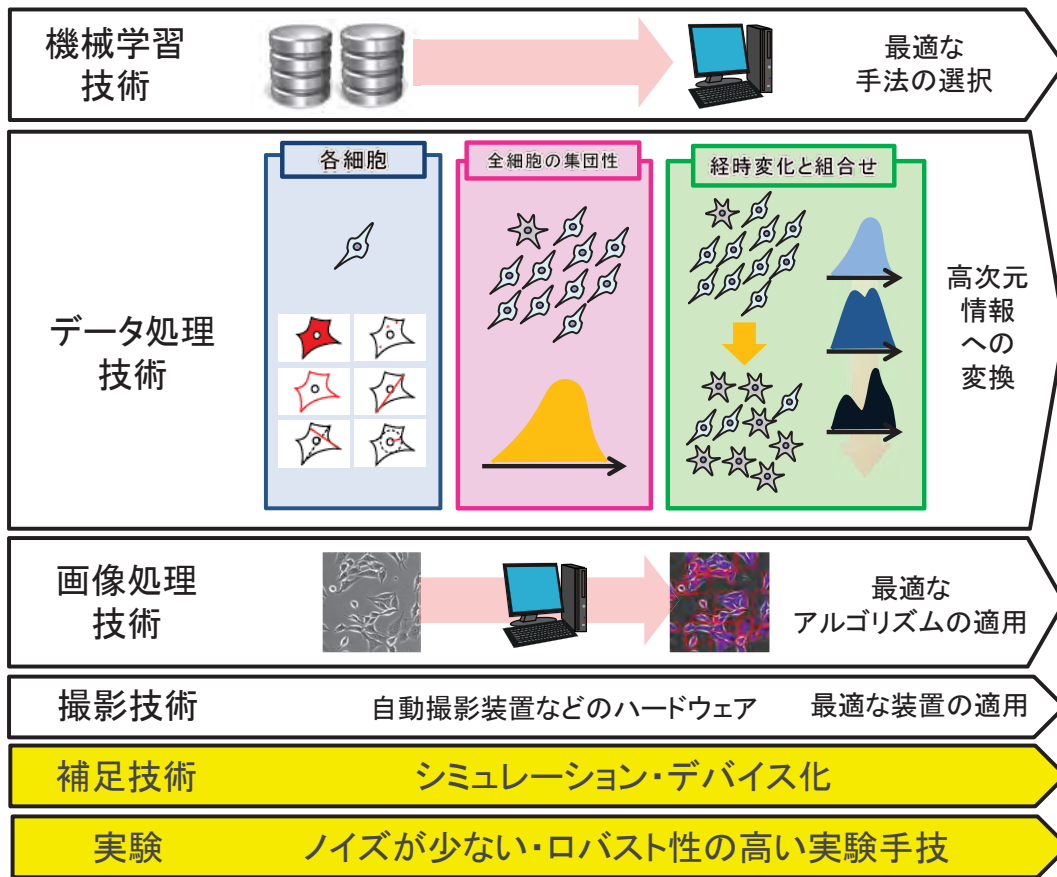


周辺技術の最適化・見直しにも貢献

細胞画像を用いた品質管理に必要なこと

細胞形態情報解析

安定化
要素



高度な品質・状態の予測性能

標準化への取り組み

ISO (International Organization for Standardization)

TC276 WG3, WG4

- Morphology
- Cell Manufacturability

再生医療イノベーションを支える 知財戦略とは

大阪大学 大学院医学系研究科・医学部附属病院

産学連携・加イノベーションイニシアティブ メディカルヘルスケア知財戦略室

永野 志保

アウトライン

自己紹介

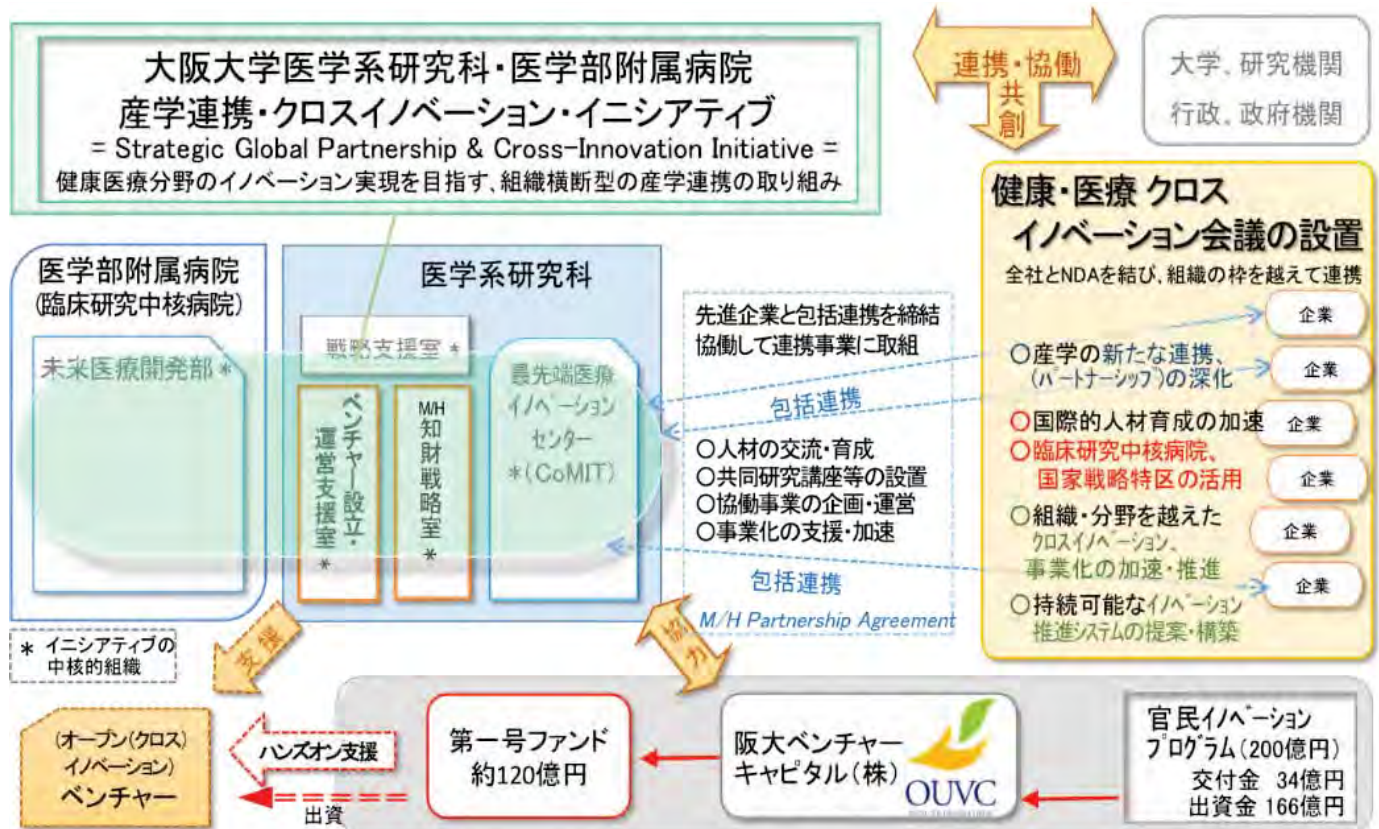
再生医療を取り巻く知財の状況について

再生医療の国際標準化について

今後の課題

クロスイノベーション・イニシアティブについて

大学を起点とした健康医療のクロス(オープン)イノベーションを目指して2015年12月1日に設置。



3

包括連携協定等締結団体・企業

27社(団体) (H30.10.1現在)



4

私の業務（知財戦略室で行っていること）

アカデミア発の研究成果を社会に届けるため、多様な企業・研究機関や学内外の関係組織と連携しつつ、特許化・ライセンス等の知財戦略立案、ベンチャー支援、知財啓発等を実施。

〔これまでの活動（例）〕

1. 先端研究における知財戦略立案

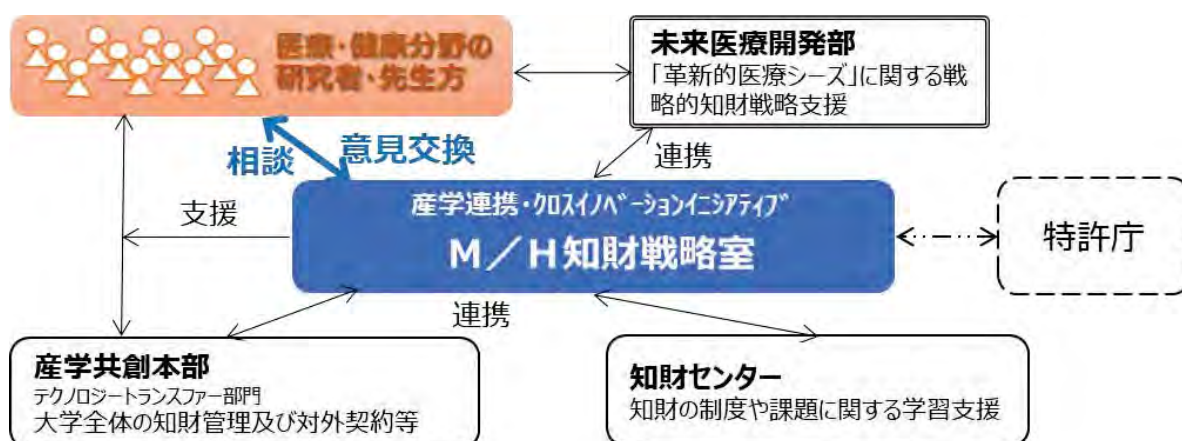
iPS心筋細胞、ゲノム編集、オートファジー等

2. 特許出願戦略等に関するセミナーの実施

「強い特許」を取得するための知識や、最新の特許出願技術動向調査について啓発

3. 知財コンサルタント

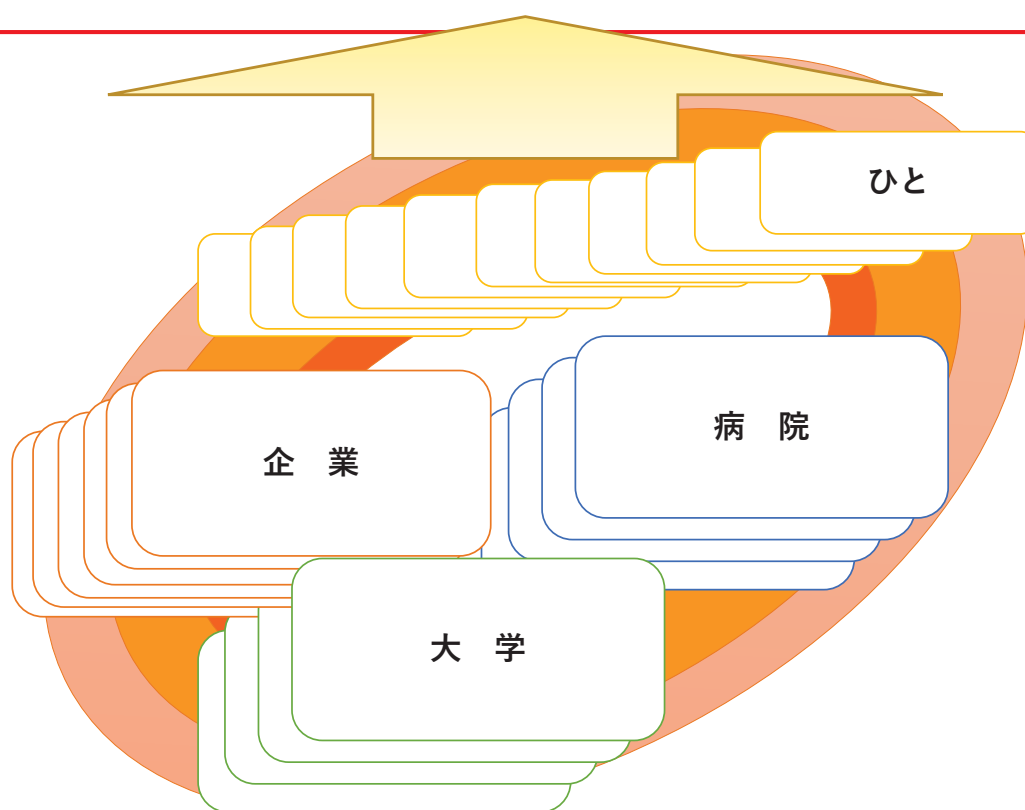
研究者、連携先企業、ベンチャーからの相談対応



5

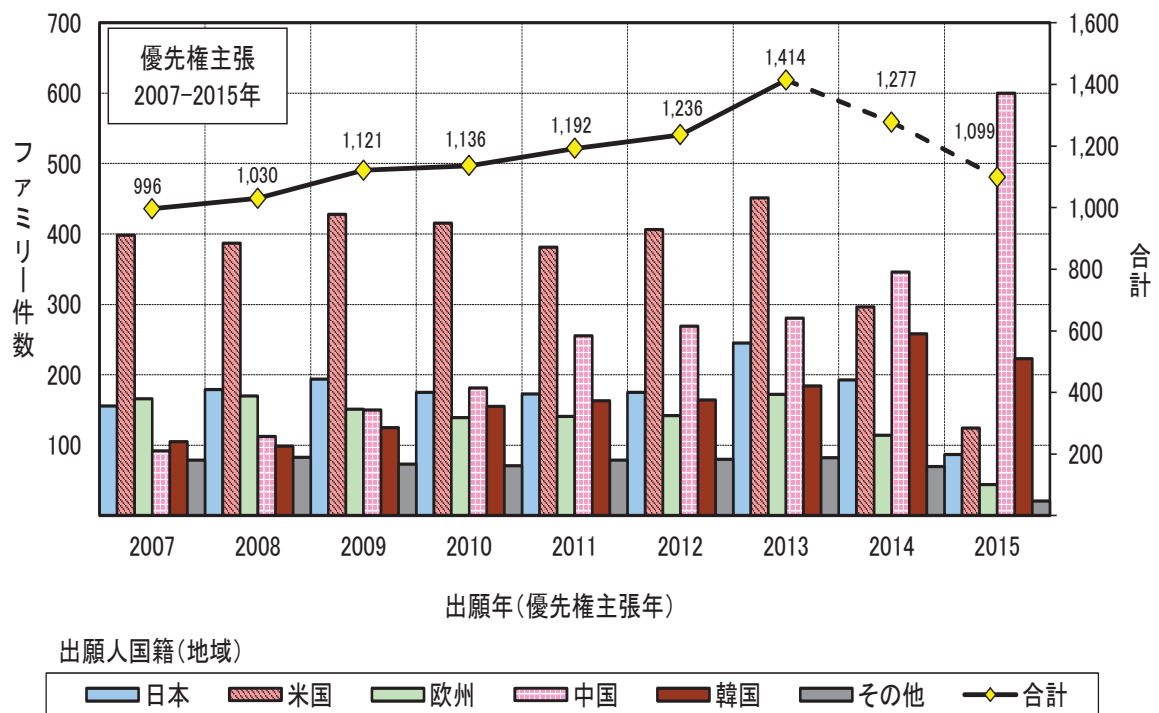
サイエンスエコシステムの実現

サイエンスの発展
健康寿命の増進



6

再生医療の特許出願動向

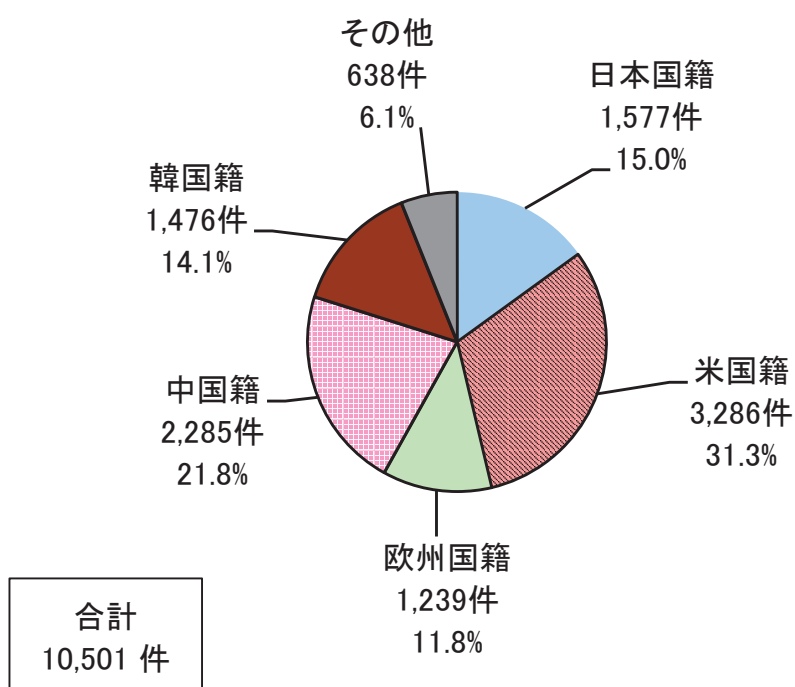


(2007～2015年日米欧中韓への出願)

注：2014年以降はデータベース収録の遅れ、PCT出願の各国移行のずれ等で、全データを反映していない可能性がある。

【出典：平成29年特許出願技術動向調査「ヒト幹細胞関連技術」】 7

国籍別出願シェア

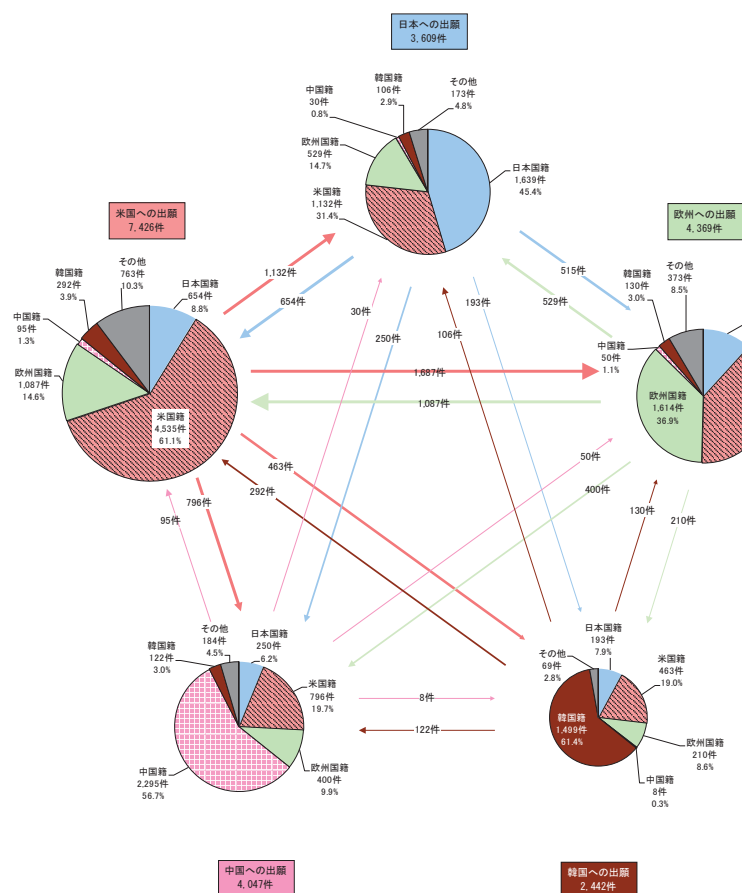


(出願先：日米欧中韓、2007～2015年の出願)

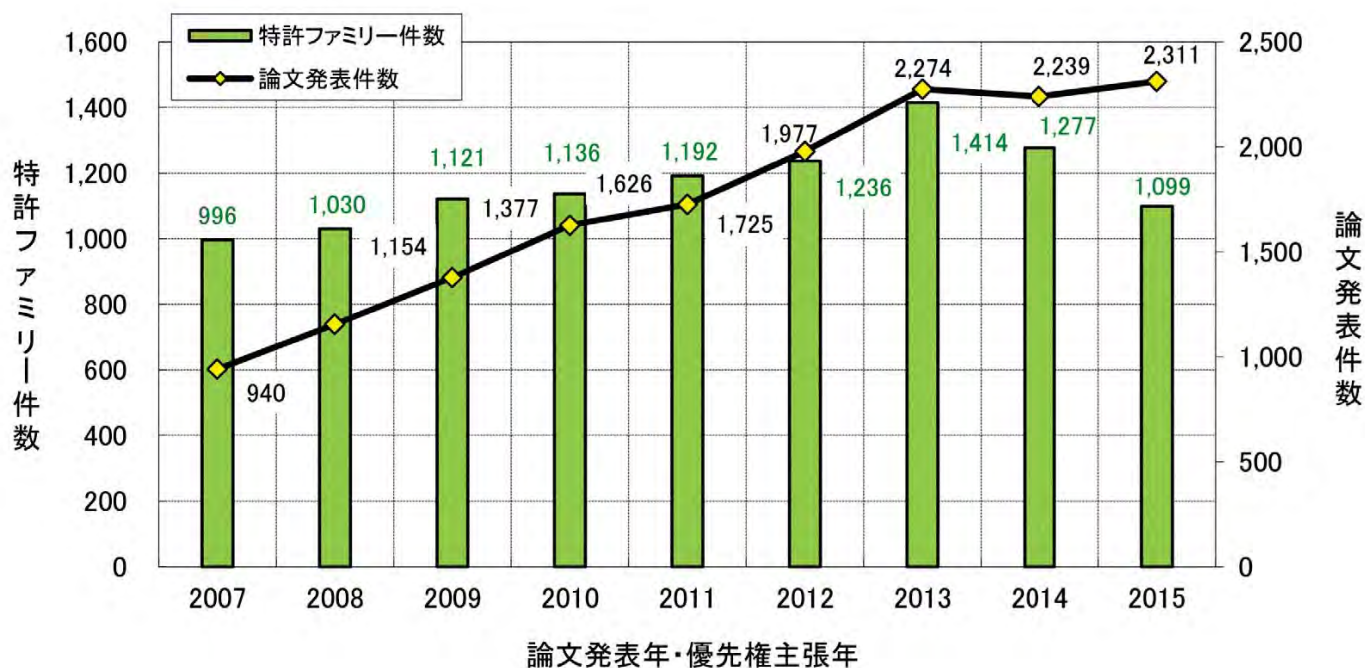
注：2014年以降はデータベース収録の遅れ、PCT出願の各国移行のずれ等で、全データを反映していない可能性がある。

【出典：平成29年特許出願技術動向調査「ヒト幹細胞関連技術」】

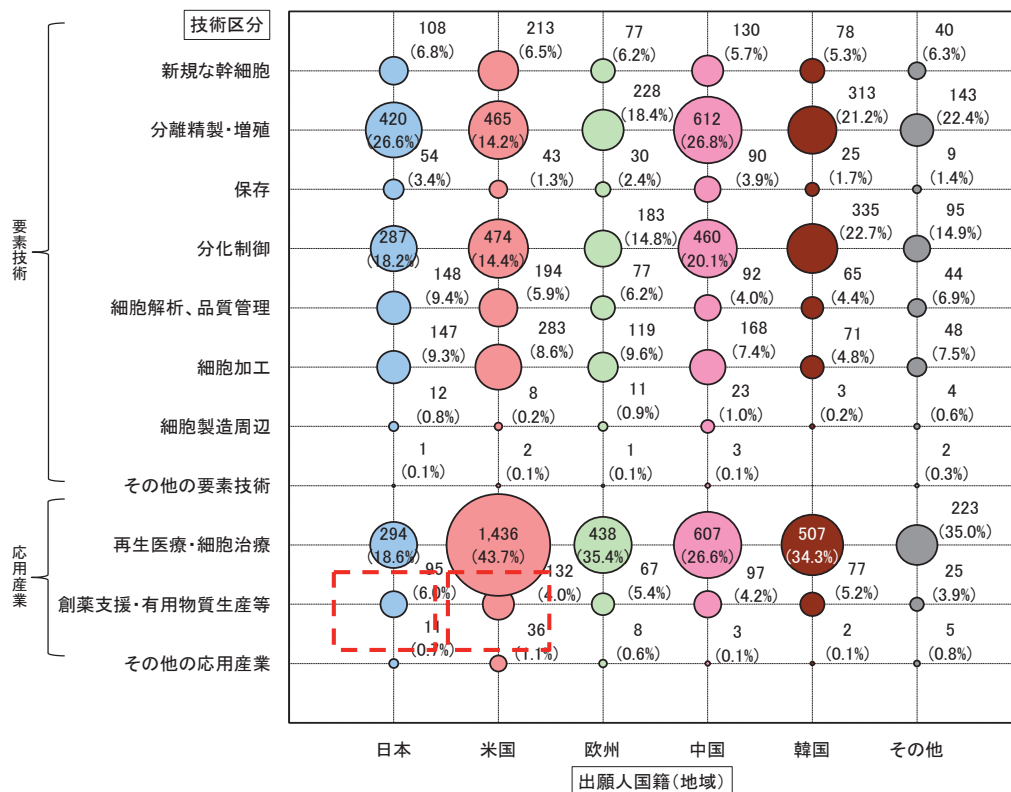
日米欧中韓における出願収支



論文件数と特許件数の推移



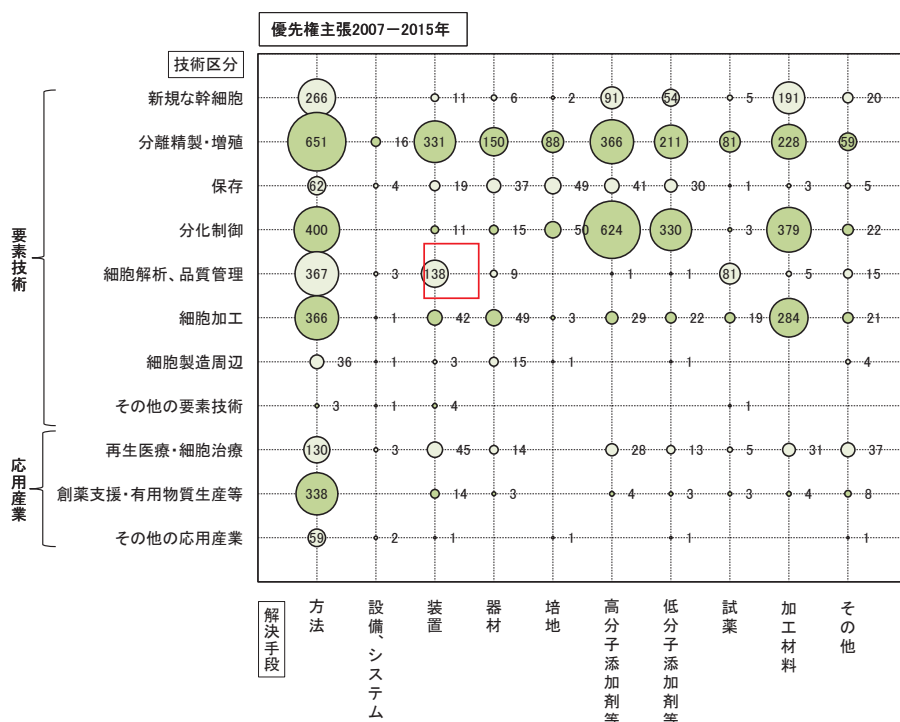
技術別国籍別 特許出願件数



(2007～2015年 日米欧中韓への出願)

【出典：平成29年特許出願技術動向調査「ヒト幹細胞関連技術」】 11

特許出願動向 – 技術区分別 – 解決手段別ファミリー件数 –



(例)
細胞解析・品質管理×装置のプレイヤー
日本出願人について抜粋

出願者1	出願者2
富士フイルム	
ニコン	
浜松ホトニクス	
オリンパス	
日立ハイテクノロジーズ	
コニカミノルタ	
シスメックス	
パナソニック	
SCREENホールディングス	
東芝	
生体分子計測研究所	
川崎重工業	
大日本印刷	
島津製作所	
マイテック	
ニコン	東京大学
ニコン	名古屋大学
浜松ホトニクス	京都大学
大日本印刷	大阪大学
マルコム	東京農工大学
オリンパス	群馬大学
ソーセル	学校法人鶴学園

(2007～2015年 日米欧中韓への出願)

【出典：平成29年特許出願技術動向調査「ヒト幹細胞関連技術」】

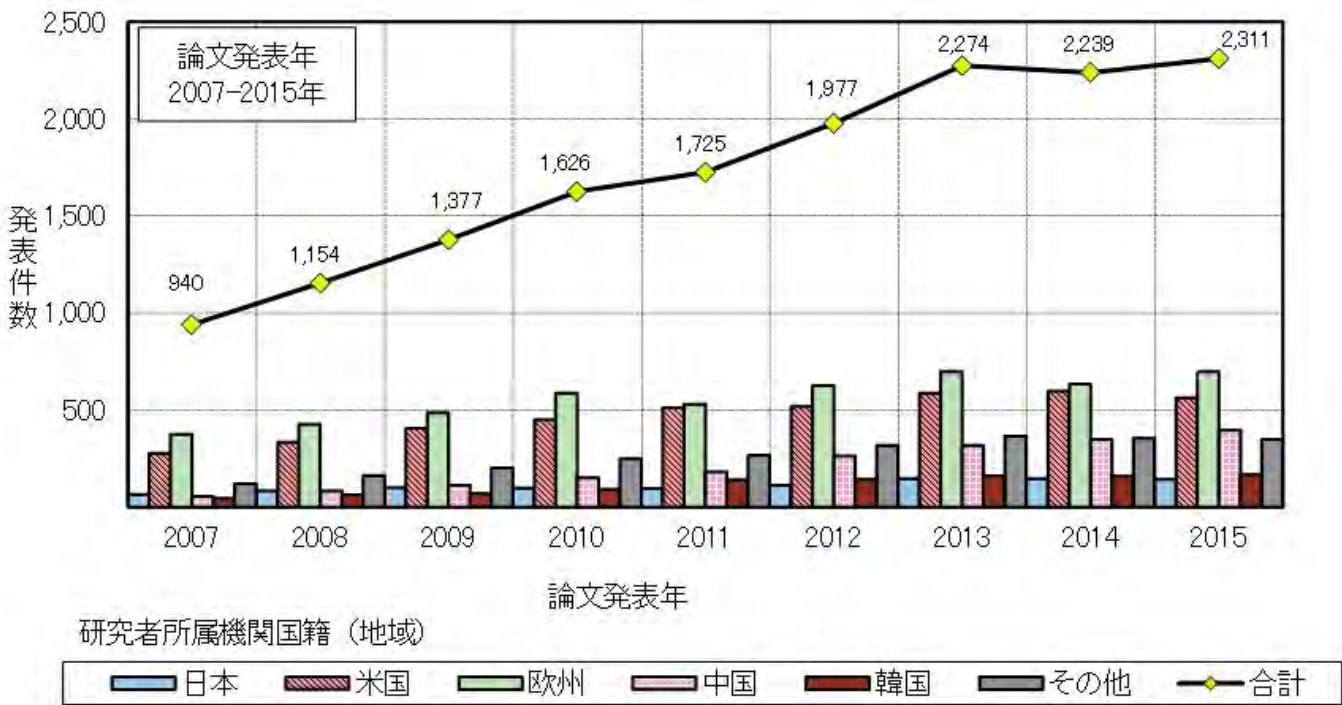
出願先国別出願件数ランキング

日本への出願 (3,609件)			米国への出願 (7,426件)			欧州への出願 (4,369件)		
順位	出願人名称	出願件数	順位	出願人名称	出願件数	順位	出願人名称	出願件数
1	京都大学	119	1	リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・カリフォルニア(米国)	160	1	京都大学	73
2	東京大学	60	2	ボード・オブ・トラステーズ・オブ・ザ・リランド・スタンフォード・ジュニア・ユニバーシティ(米国)	111	2	リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・カリフォルニア(米国)	62
3	日本メナード化粧品	52	3	エージェンシー・フォア・サイエンス・テクノロジー・アンド・リサーチ(A*STAR)(シンガポール)	97	3	エージェンシー・フォア・サイエンス・テクノロジー・アンド・リサーチ(A*STAR)(シンガポール)	59
4	セルジーン(米国)	43	4	京都大学	94	4	セルジーン(米国)	43
5	富士フイルム	39	5	ウイスコンシン・アルムナイ・リサーチ・ファウンデーション(米国)	89	5	ヤンセン・バイオテック(米国)	37

(2007～2015年 日米欧中韓への出願)

【出典：平成29年特許出願技術動向調査「ヒト幹細胞関連技術」】

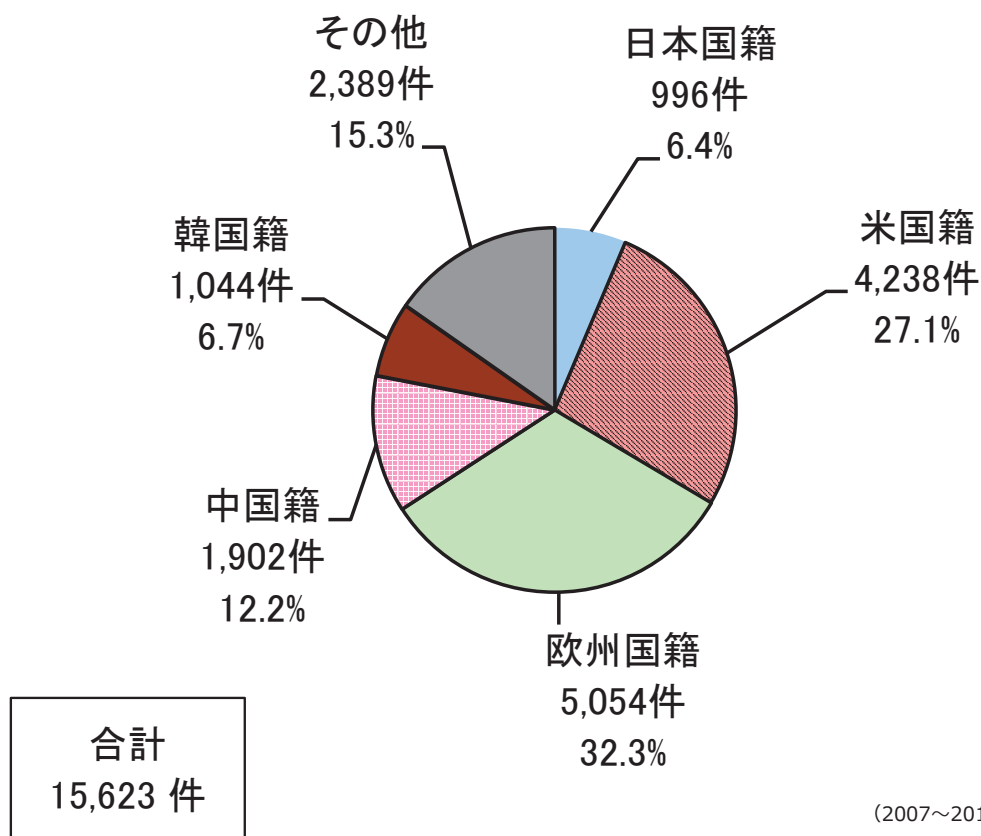
論文件数推移



(2007～2015年 日米欧中韓への出願)

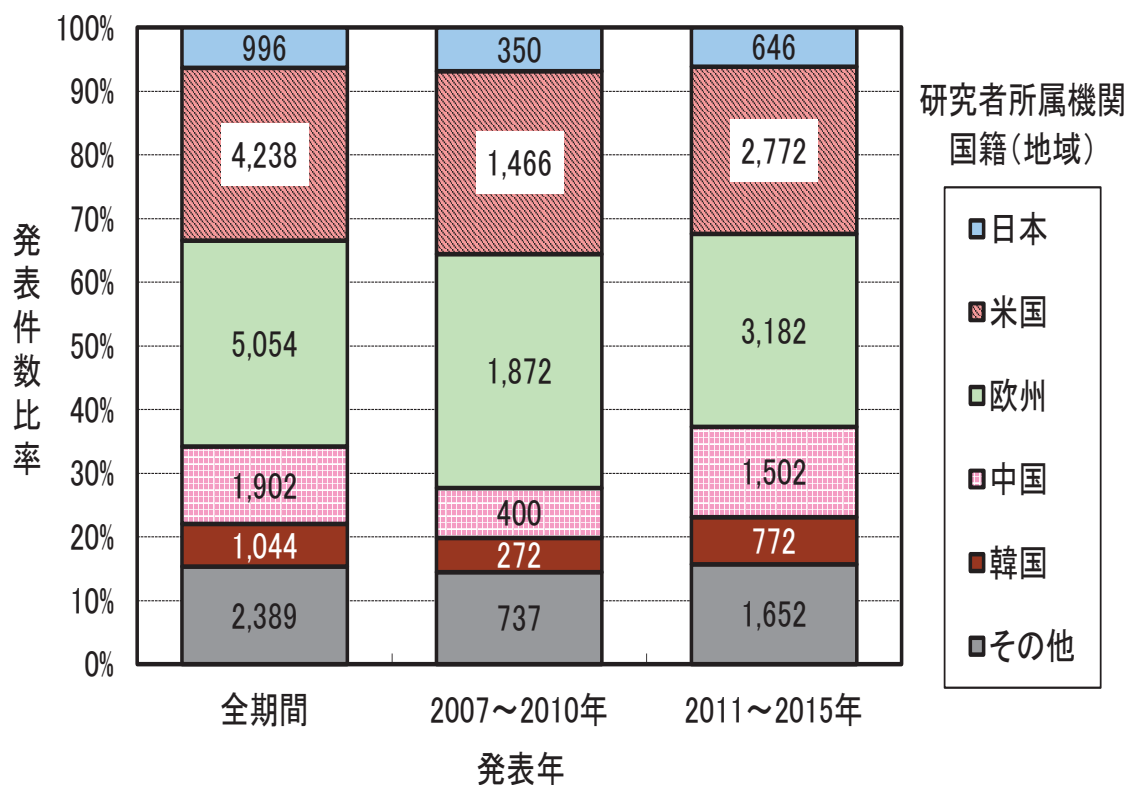
【出典：平成29年特許出願技術動向調査「ヒト幹細胞関連技術」】

国籍別シェア



【出典：平成29年特許出願技術動向調査「ヒト幹細胞関連技術」】 15

国籍別シェアの変遷



【出典：平成29年特許出願技術動向調査「ヒト幹細胞関連技術」】 16

再生医療の特許による技術保護の可能性

製品種別	製品例	特許	担い手
再生医療製品	再生皮膚、軟骨など	製法特許 が主	最終製造者
消耗品	培地、サプリメント、足場材料、培養容器など	組成、物質特許	原材料メーカー
細胞加工施設	セルプロセッシングセンター（CPC）の設計施工、保守、メンテ	ハコモノなのでノウハウが主	CPC設計者、施工業者
評価システム	iPS細胞を使った新薬候補物質の力価、安全性評価	分化細胞の製法特許、検出法の 用途特許	最終製造者 試薬メーカー
細胞培養機器	インキュベーター、自動培養装置	温度、湿度、CO2等の制御、除染などの方法、装置の形状の特許	機器メーカー
細胞評価機器	FACS、画像解析装置	検出方法、装置の形状の特許	機器メーカー、画像解析企業
輸送サービス	製品としての細胞、組織輸送	容器の形状の特許	輸送業者

最終製品

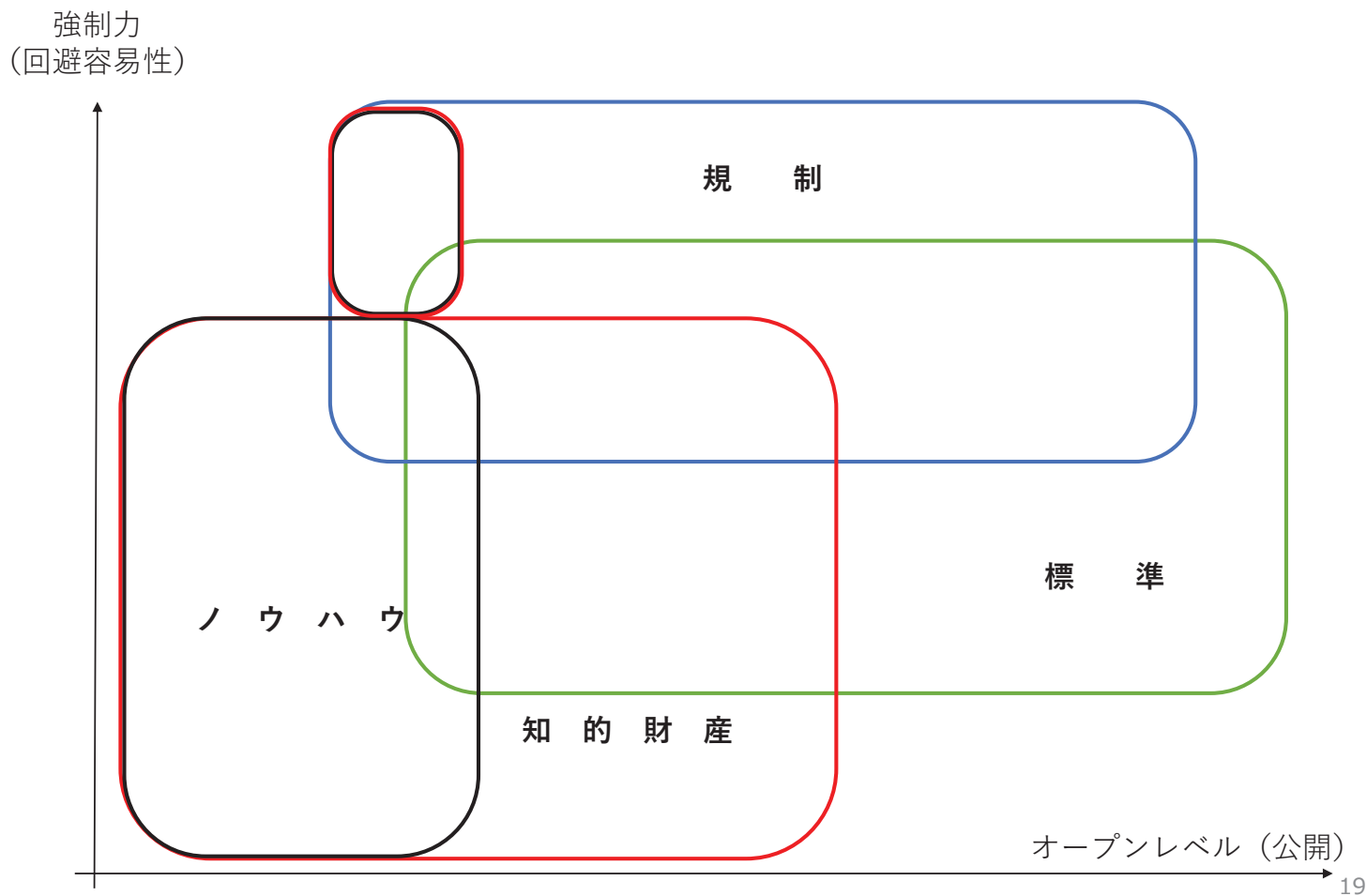
周辺技術、プラットフォーム

17

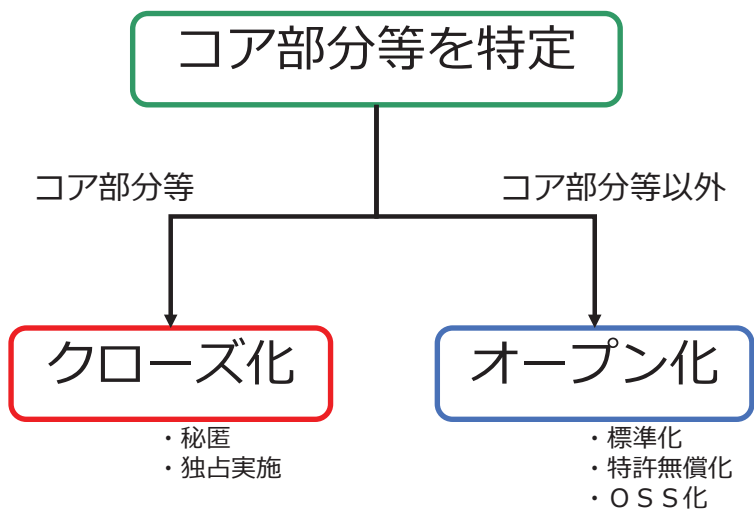
再生医療の特許動向について～小括～

- ✓ 技術開発力と将来の市場性の両面でプレゼンスを増しつつある中国、圧倒的な研究開発力を有する米国、再生医療を重視し積極的な投資を続けるイギリスなど、ヒト幹細胞関連技術分野で世界をリードしようとしている国々の動向は引き続き注視する必要。
- ✓ 開発の早い段階から大学・研究機関と企業との連携を深めることが重要であるが、知的財産の保護及び活用の観点からも、早期の連携が重要。
- ✓ 細胞製剤ごとに、医療の場に供される再生医療製品を安全かつ安価に製造・加工するための製造システムの開発や製造プロセスの一貫したパッケージとしての技術開発や、細胞の品質評価系の開発などを行う出口指向の産学連携プロジェクトが重要な役割を果たすだろう。（第6章「提言」より）
- ✓ 製造技術に関する部分では、権利化のみならず、ノウハウとして秘匿化すべきものも存在するため、両者の使い分けを十分に検討した上で、強固なパテントポートフォリオの構築することが期待される。

特許と規制・標準の関係



知的財産と標準化～そのプロセス～



標準化の意義

- ① 製品の互換性・インターフェースの整合性を確保
- ② 生産効率を向上
- ③ 製品の適切な品質を確保
- ④ 正確な情報の伝達・相互理解の促進

- ⑤ 研究開発による技術の普及
- ⑥ 安全・安心の確保
- ⑦ 環境保護
- ⑧ 企業の産業競争力を強化したり, 競争環境を整備
- ⑨ 貿易の促進

従 来

近 年

標準は、特許の価値を低くするものではない。
むしろ、特許の価値を高めるための標準作成さえ可能。

21

国際標準化の重要性

スポーツで見る国際競争力

近年の各種スポーツのルール改正

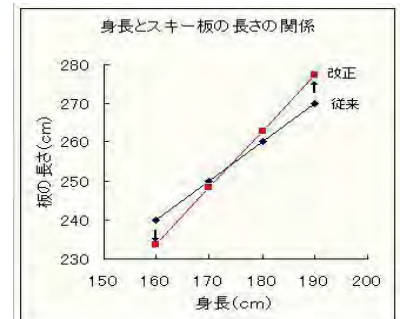
例えば・・・

冬季オリンピックでノルディック複合団体2連覇

→日本人の強いジャンプのポイント比重を下げる改訂

長野オリンピックでジャンプ陣が大活躍

→ 背の低い日本人に不利なスキー板の長さにするルールに改訂



日本が勝ちにくくなった・・・

決まり事（ルール）を決めた側が有利

技術は良くても世界に普及しない
研究成果の出口が閉ざされる

22

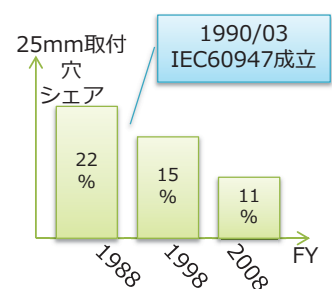
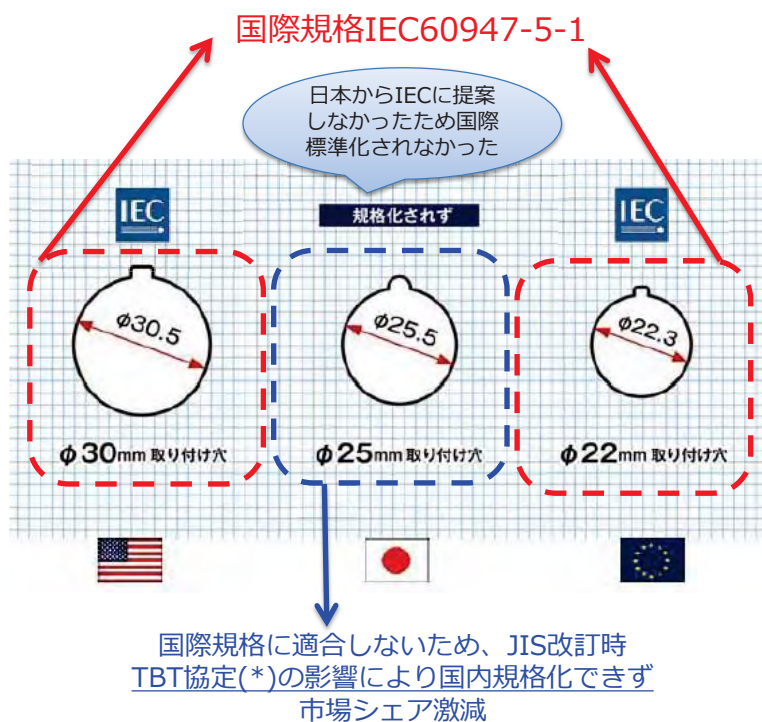
強制規格や適合性評価手続の作成の際、原則として
国際規格(ISO/IEC等)を基礎とすることを義務づけ。

1995年に発効。

23

WTO/TBT協定の影響

～産業機械用押ボタンスイッチ取付穴寸法標準化の事例～



24

再生医療の分野で、

もし、自社が使っている計測器が米国標準の計測方法と異なっていたら？

もし、その標準計測器の仕様が開示されていなかったとしたら？

もし、自国の標準が国際標準化にそぐわず、ガラパゴス化してしまったとしたら・・・？

25

再生医療に関するISO/TC276国際標準

番号	タイトル	ステータス
ISO 20391-1:2018	Biotechnology -- Cell counting -- Part 1: General guidance on cell counting methods	発行済
ISO/DIS 20391-2	Biotechnology -- Cell Counting -- Part 2: Experimental design and statistical analysis to quantify counting method performance	開発中
ISO/PRF 20399-1	Biotechnology -- Ancillary materials present during the production of cellular therapeutic products -- Part 1: General requirements	日本提案
ISO/PRF 20399-2	Biotechnology -- Ancillary materials present during the production of cellular therapeutic products -- Part 2: Best practice guidance for ancillary material suppliers	開発中
ISO/PRF 20399-3	Biotechnology -- Ancillary materials present during the production of cellular therapeutic products -- Part 3: Best practice guidance for ancillary material users	開発中
ISO/AWI 21973	Biotechnology -- General requirements for transportation of cells for therapeutic use	日本提案
ISO/CD 23033	Biotechnology -- Cell Characterization -- General guide for characterization of human cells for therapeutic applications	開発中
ISO/AWITS 23565	Biotechnology -- Bioprocessing -- General requirements and considerations for equipment systems used in manufacturing of cellular therapeutic products	開発中

26

(参考) 再生医療周辺のISO国際標準

TC/SC番号	ISO番号	タイトル	ステータス
TC 150/SC7	ISO/TR 16379:2014	Tissue-engineered medical products -- Evaluation of anisotropic structure of articular cartilage using DT (Diffusion Tensor)-MR Imaging	発行済み
	ISO/DIS 13019	Tissue-engineered medical products -- Quantification of sulfated glycosaminoglycans (sGAG) for evaluation of chondrogenesis	開発中
	ISO/DIS 19090	Tissue-engineered medical products -- Bioactive ceramics -- Cell migration ability test for porous body	開発中
	ISO/WD 21560	General requirements of TEMPs	開発中
TC 194/SC1	ISO 13022:2012	Medical products containing viable human cells -- Application of risk management and requirements for processing practices	発行済み
	ISO 22442-1:2015	Medical devices utilizing animal tissues and their derivatives -- Part 1: Application of risk management	発行済み
	ISO 22442-2:2007	Medical devices utilizing animal tissues and their derivatives -- Part 2: Controls on sourcing, collection and handling	発行済み
	ISO 22442-3:2007	Medical devices utilizing animal tissues and their derivatives -- Part 3: Validation of the elimination and/or inactivation of viruses and transmissible spongiform encephalopathy (TSE) agents	発行済み
	ISO/TR 22442-4:2010	Medical devices utilizing animal tissues and their derivatives -- Part 4: Principles for elimination and/or inactivation of transmissible spongiform encephalopathy (TSE) agents and validation assays for those processes	発行済み
TC 198	ISO 18362:2016	Manufacture of cell-based health care products -- Control of microbial risks during processing	発行済み

27

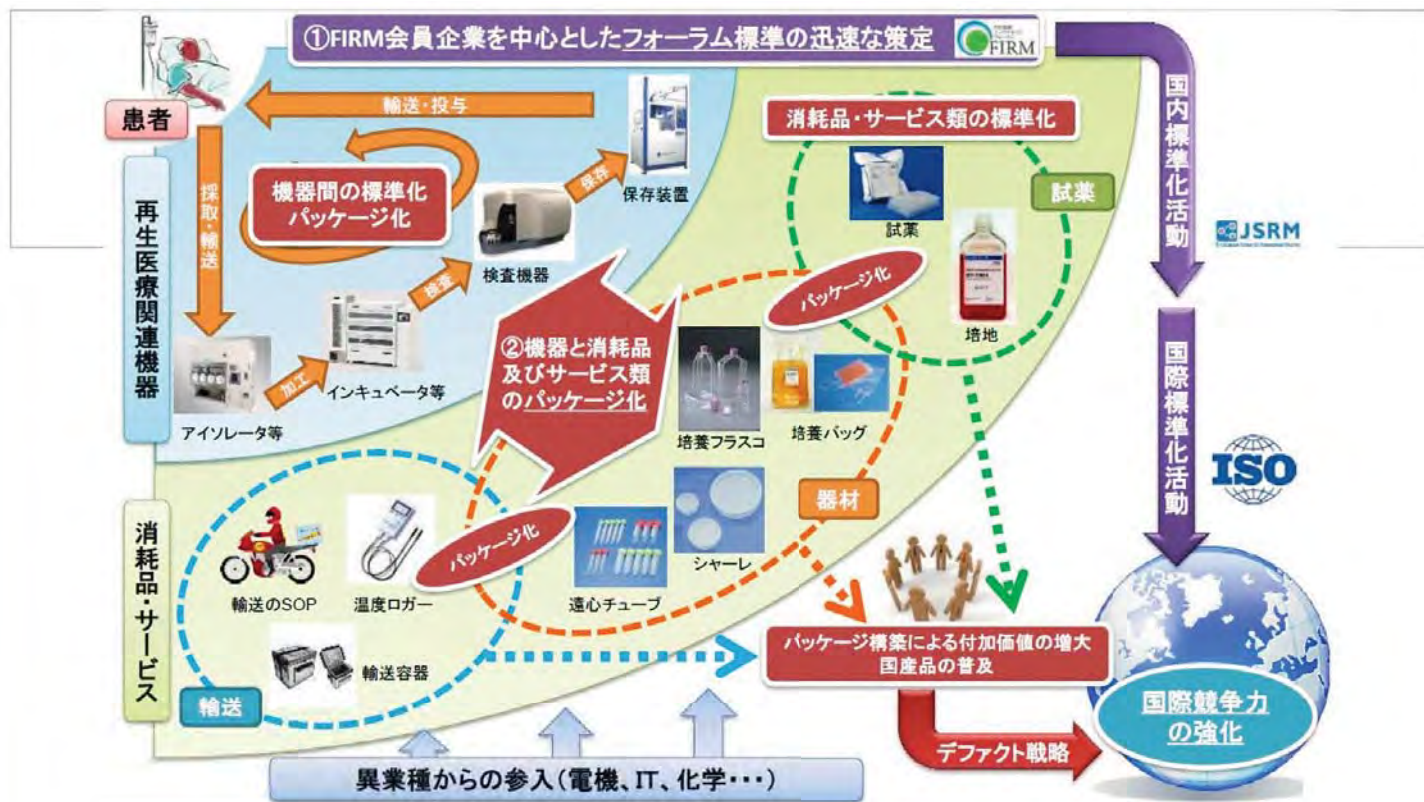
再生医療産業化と標準化の歴史 (米国との対比)

FIRM柳田様よりご提供

(青: 日本、赤: 米国)

年	医学・科学	製品・産業界	政策・制度	国際標準化(ISO)
1981	マウスES細胞作製			
1993	「組織工学」提唱			
1997	クローンヒツジ作成	米、自家軟骨、自家皮膚を上市		
1998	ヒトES細胞作製			
2006	マウスiPS細胞作製			
2007	ヒトiPS細胞作製	日、自家培養皮膚承認	米、組織工学戦略投資計画	ISO/TC 150/SC 7設立
2008				バイオテック/ロジ-TF設立
2009		米、業界団体(ARM)設立		新規TCの設立を勧告
2010			日、新成長戦略、再生医療を成長牽引産業に	
2011		日、業界団体(FIRM)設立 韓、幹細胞製品承認		バイオテック/ロジ-WS開催、 新規TFの骨格を検討
2012	山中教授ノーベル賞受賞	日、自家培養軟骨承認		
2013		FIRMが276日本幹事団体に	日、再生医療推進法施行	ISO/TC 276設立
2014	米FDA-、再生医療標準化WS		日、再生医療安全確保法、 医薬品医療機器法施行	WG3を米国主導で設立 WG4を日本主導で設立
2015	FDA、標準化取組論文	米、ARM標準化ワークショップ	日、AMED設立	276WG会議を日本で開催
2016		米、細胞製造ロードマップ	米、21st C. Cures Act制定	276総会を米国で開催
2017	米FDA-NIST、細胞計数WS	米、SCB発足 米、ロードマップ改訂版	米FDA、標準活用ガイダンス	
2018	再生医療学会、ISCTで標準化セッション	米SCB、標準地形図報告書		米、細胞計数標準を発行 日米英、原材料標準案承認
2019				276総会を日本で開催

「標準化戦略の目指すところ」とは



出典: 経済産業省製造産業局生物化学産業課, 再生医療の制度整備と事業展開 - 法制度の見直しを踏まえた関連産業の育成 -, 平成26年8月.

29

まとめ

- ✓ 米国は、再生医療技術分野において世界のリーダーとなるべく、多大な予算をかけて再生医療研究開発を支援。その上、標準化を今後の再生医療イノベーション推進における重要な要素と位置づけ、世界のルールメイキングも主導しようとしている。
- ✓ このような動きを常にウォッチングし、自らに不利な標準化を策定されないよう、適切なコンタクト先（FIRMの標準化担当者等）に働きかけを行うことが重要。
- ✓ 以上のように、世界の知財動向・標準化動向や、各国の規制状況に目をむけつつ、自らのポジショニングを定め、知財戦略と標準化戦略を連携していくことが、今後ますます重要。

30