

■ 技術講座

メーカーの取り組むべきヒト幹細胞由来培養上清液の製造規格について

佐俣 文平

(WAARM Journal, 2023; 5: 48-51)

1. はじめに

セルプロジャパン株式会社は2019年に設立されたバイオベンチャーである。設立当初から再生医療事業及びその周辺事業をターゲットとして様々なプロダクトを開発してきており、ヒト幹細胞由来培養上清液もその一つである。近年、ヒト幹細胞由来培養上清液やエクソソームといったワードを見聞きする機会が増えてきた。このような細胞由来成分には数千種類にも及ぶ成分が豊富に含まれている。また、これら細胞由来成分は出発材料として用いる細胞の種類によってもその中身が異なることが分かってきている。このようなヒト幹細胞由来培養上清液（以下、上清液と言う）を細胞実験や動物試験に供することで細胞増殖活性や免疫調節作用など多岐に渡る効果が期待でき、現在では臨床応用に向けた準備も進められている。このように将来への期待が膨らむ一方で、生物由来原料である上清液の製造規格設定の難しさも課題として見えてきた。出発材料となる組織には提供者（ドナー）が存在するため、事前の同意書取得やドナースクリーニングの実施、細胞培養時の製造規格や製造後の品質検査規格の設定などを設定する必要がある。このような課題をひとつずつ解決していくことで上清液の安全性・信頼性が高まっていき、将来的には創薬開発などの開発促進につながっていくものと考えられる。そこで今回はメーカー視点で上清液製造規格をどのように設定しているのかを紹介する。

2. 上清液の市場動向

上清液とは細胞を培養する過程で得られる上澄み液を意味しており、そこには細胞由来成分として種々のサイトカインやエクソソームなどが含まれている。上清液の歴史は古く、1950年頃から組織培

養時の上澄み液に細胞増殖作用があることで注目を集めてきた。例えば、グリア細胞を培養することでGDNF（Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor）という成分が上清液中に分泌されることが分かっている。GDNFにはドパミン神経細胞に対する細胞死抑制作用があり、パーキンソン病患者に対する臨床試験では一定の有効性が確認されている¹⁾。この他にも、上清液中にはFGF2やEGF、HGFなど数千種類ものサイトカインやエクソソームが含まれている。

第5回全国美容医療実態調査の報告書によると美容外科または美容皮膚科における年間のPRP以外の注射による再生治療（上清液など）の件数は63,104件と報告されている。前年の同機関調査と比べると19,172件の増加となっており高い市場急成性が分かる。また、上清液は幹細胞コスメとして化粧品配合原料としても利用されている。表示名称としては30件程の原料名が登録されており、〇〇順化培養液や△△順化培養液エキスとして利用されている。このようにサイトカインやエクソソームを豊富に含む上清液は様々な分野での利用可能性を秘めている。

3. 上清液製造時の検査内容について

幹細胞コスメなどの人気の一方で、上清液が生物由来原料に該当するという事実を知らないユーザーも多い。上清液などの細胞（生物）を利用して製造される原料では、組織提供者であるドナーのスクリーニングや細胞培養工程における検査、最終製品に対して行われる検査や出荷判定などの工程毎の検査規格を設けることが望ましい。実際に、セルプロジャパン社では生物由来原料基準や再生医療等の安全性の確保法等における法律などを参考にして独自の検査体制を確立してきたのでその一部を紹介する。

①ドナースクリーニング

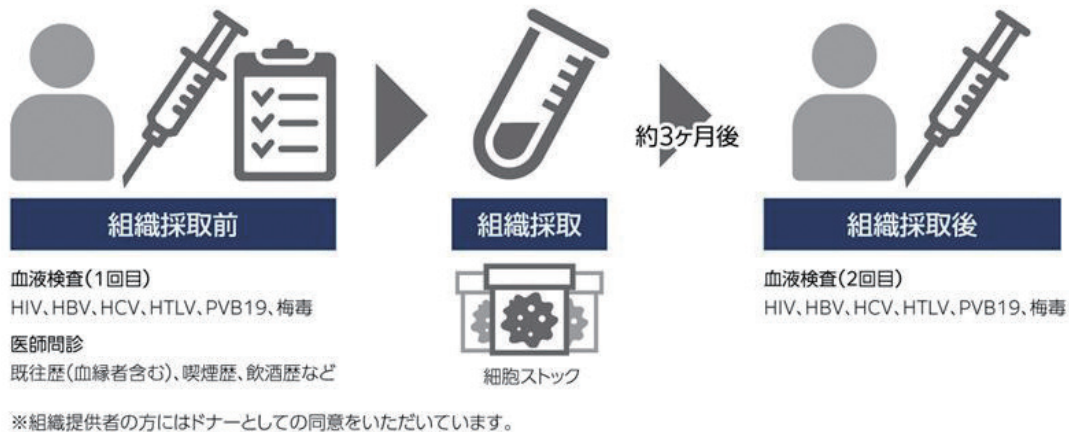
ドナースクリーニングの目的は、組織提供者への問診や検査等を通してドナーとしての適格性判断をすることである。製造においては源流となる組織提供者のスクリーニングを徹底して実施することが極めて重要である。具体的には組織提供者から同意承諾を得た後に、医師問診により既往歴（血縁者含む）や喫煙歴、飲酒歴などを確認して、組織提供者としての適格性を総合的に判断している。適格性ありと判断された場合には血液検査によってウイルス感染の有無（HIV、HBV、HCV、HTLV、PVB19、梅毒）を確認している。これらすべての検査で問題がないと判断された場合にのみ組織提供をいただく。さらに組織提供後3ヶ月程経過した時点で2回目の血液検査を実施している。これはウインドウピリオド期間を勘案した評価であり、1回目の検査での偽陰性（ウイルス感染初期による見落とし等）リスク

を取り除くためである。

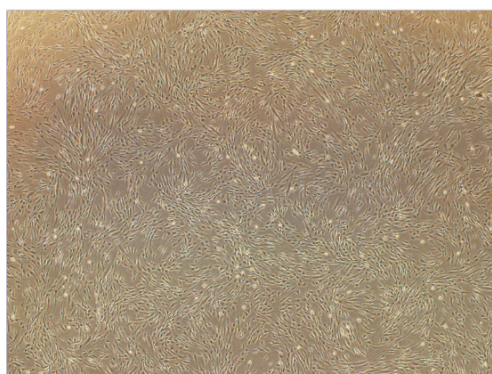
②細胞培養工程検査

細胞培養工程では細胞の生育状態とマーカー発現が重要となる。製造毎のロット間差を小さくするためには継代数や培養日数も固定することが望ましい。セルプロジヤパン社では、上清液中のサイトカイン分泌量の変化を組織ごと（脂肪・臍帯・羊膜など）、培養条件ごと（培養日数・継代数など）に分析している。このような基礎データを参考にして諸条件を決定しているので、製造時のロット間差を最小限に抑えるためのポイントをつかんでいる。特に、細胞の形態観察はほぼ毎日行っている。例えば、いつもより細胞の増殖効率が悪い、老化症状が亢進している、細胞断片が増えている、などの培養操作上のトラブルが生じた場合は、製造規格と当てはめることで、さらには不測の事態では製造責任者の判断

ドナースクリーニング

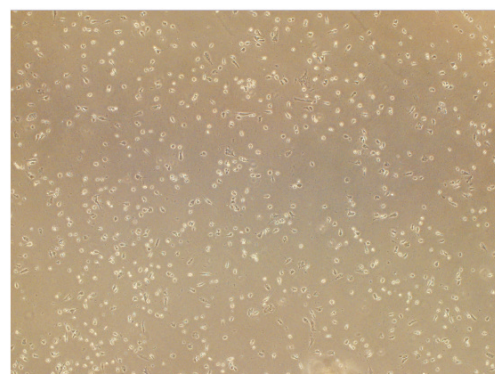


培養工程検査



良好な生育状態

細胞が密集して増殖している状態。ディッシュ底面の隙間はわずかでセミコンフルエントに近い状態。剥がれて浮遊している細胞が少ない状態。



増殖不良な状態

数日間培養を続けても増殖が乏しく、接着細胞の数が少ない状態。多数の細胞が剥がれて浮遊している状態。

により迅速に判断を下すフローが確立されている。また外観上では捉えきれない変化をマーカー発現により客観的に評価することも重要である。ヒト間葉系幹細胞では CD29 や CD90 などの特徴的なマーカーの発現パターンがあることから、定期的に増殖後のマーカー発現を確認することが望ましい。

③最終検査

細胞培養の最終工程では、培養細胞と上清液のそれぞれに対して検査を実施する。両者を扱う理由は、検査内容によって被験物質に対する検出感度が異なるためである。セルプロジャパン社ではより高感度で評価を行える検査規格を採用している。培養細胞に対する検査としては、ウイルス検査 (HIV, HBV, HCV, HTLV, PVB19, CMV, EB, WNV, SARS-CoV-2) やマイコプラズマ検査 (*Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma pirum*, *Mycoplasma synoviae*, *Spiroplasma citri*) 等を実施している。上清液に対する検査としては、無菌検査 (真菌, 細菌) やエンドトキシン検査等を実施している。特徴的なのが、昨今のコロナ禍の影響を受けて培養細胞に対して SARS-CoV-2 の検査を実施していることである。これは培養士が無症状感染者だった場合を想定して培養細胞に対しての感染リスクの勘案、さらには細胞感染後のウイルス増幅のリスクの勘案

といった「万が一のリスク」を想定した対応であり、その時の状況に合わせて独自の検査規格をアップデートしている。これらの検査をすべてパスすることによって初めて製造完了となる。

④出荷前検査

製造完了後の原料は -80℃ のディープフリーザーで保管している。発送の際は凍結チューブ 1 本ずつに対して目視で外観 (キズの有無や液量等) や記載情報ミスがないかどうかをチェックしている。輸送時は低温度帯を保つために適量のドライアイスと同封して出荷を行う。ドライアイスは梱包の仕方によって温度保持能力や昇華速度が変化するので注意が必要である。セルプロジャパン社ではドライアイスを様々な形で梱包を行い、温度ロガー同封の上で試験輸送を繰り返してきた。その中で低温度帯を保持できる発送方法を決定した背景がある。これらの検査をダブルチェックで実施することで出荷前検査が完了となる。

4. 培養上清液を取り巻く環境と今後について

培養上清液やエクソソームの製造に関するルールは整っていない。現時点では原料としての取り扱いの観点から、毒物および劇物取締法 (毒劇法) や化学物質排出把握管理促進法 (化管法)、労働安全衛生法 (安衛法)、GHS ルールの適用が中心となる。

最終検査

検査 ①	ウイルス検査 製造後の細胞に対して、ウイルス感染が生じていないことを確認します。	ウイルス検査項目 〔HBV, HCV, HIV, HTLV, PVB19, CMV, EB, WNV〕	▶ 陰性
検査 ②	新型コロナウイルス検査 製造後の細胞に対して、コロナウイルス感染が生じていないことを確認します。 <small>※本検査はコロナウイルスの蔓延状況により予告なく終了することがございます。</small>	ウイルス検査項目 (SARS-CoV-2)	▶ 陰性
検査 ③	マイコプラズマ否定試験 細胞を培養する工程で、マイコプラズマ汚染が生じていないことを確認します。	検査項目 (マイコプラズマ)	▶ 陰性
検査 ④	微生物(無菌)検査 培養上清中に、真菌及び細菌が混入していないことを確認します。	各種菌の増殖	▶ 陰性 (いずれも菌の増殖が無い)
検査 ⑤	エンドトキシン検査 培養上清中に、基準値以上のエンドトキシンが含まれていないことを確認します。	培養上清に含まれる エンドトキシン濃度	▶ 0.5EU/ml 以下



これらは人体や環境への安全性を確保するために、危険性や有害性のリスクがある場合には予め表示等を行うことで認識できるようにすることを意図している。近年では化粧品配合原料としても利用されていることから生物由来原料基準への対応が必要である。一方で、培養上清液のような新しい原料に関しては既存ルールだけでは十分に対応できないケースも想定される。このような状況のなかで、メーカーとしては既存の法律やルールを十分に理解した上で「どういった点で問題（矛盾）が起り得るのか、そしてどのように対応することで問題点をカバーすることができるのか」を念頭に置いて、その合理性と社会への発信という一連工程に率先して取り組むスタンスが重要だと考える。

例えば、細胞培養に利用する培地でも牛胎児血清（FBS）を利用するかどうかでも判断基準が異なるだろう。一般的には血清を利用することで良好な細胞増殖が認められるが、動物由来因子の利用によるアレルギー反応や狂牛病（BSE）プリオン伝播のリスクが指摘されている。このような場合に、筆者はリスクの経路と現実性の2つを考えるようにしている。狂牛病は1980年代にイギリスを中心に流行した感染症である。現在のBSE発生頭数は世界規模で見ても年間数頭程度であり、またBSEリスクを無視できるBSE洗浄国も存在する。また異常型プリオンタンパク質（PrPsc）が培養細胞に感染するためにはどのような培養条件が必要であるのかなどを学術論文から調べられる。最低でもこのような知識を持った上でFBSの利用可否を判断する必要があると考えている。

一方で、上清液を取り巻く環境も着実に前進して

いる。2022年10月には、培養上清液の安全性審査組織として一般社団法人日本臨床培養上清研究会が設立された。当研究会では臨床での培養上清の品質、信頼性、効率性の向上を目的としている。実際にセルプロジャパン社においても上清液の製造体制に関する情報開示を行ない、2023年1月に最高ランクであるA評価をいただいている。このように第三者機関におけるメーカーの評価体制は非常に重要な一歩であり、メーカーの考える安全性と第三者視点での評価が相まって、今後のルール作りの土台が整っていくものと考えられる。

5. 終わりに

今回は上清液の安全性に関してメーカーの立場から製造規格の考え方について説明した。筆者は再生医療研究者という側面も有しており、これまでに上清液開発における培養方法検討や二次原材料選定などにも取り組んできた。このような経験を経ることで上清液という新原料に対する安全性の在り方を多角的に考察してきた背景がある。今回はその一部をメーカーの製造規格として説明した。製造ではどのようなリスクを想定して、具体的にどのような対策を講じるのが重要となる。セルプロジャパン社の例を基にこれまでにどのように課題解決に取り組んできたのかを参考にいただければ幸いである。

参考文献

1) Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P. Nat Med. 9:589-95 (2003).