

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10395

研究課題名(和文)再生医療製造現場における衛生管理の実証的評価

研究課題名(英文)The empirical evaluation of hygienic management in the manufacturing facilities of regenerative medicine

研究代表者

江副 幸子 (Sachiko, Ezoe)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：90379173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：安全キャビネットやインキュベータ内でいくつかの除染剤の残留やその細胞への影響について検討した。低濃度二酸化塩素の持続暴露については、間葉系幹細胞、iPS細胞ともに培養液中への溶解蓄積も考慮し、0.05ppmvでの細胞への安全性と除染効果について確認した。一方、作業員への安全性のため、肺胞上皮細胞 in vitro モデルを用いて細胞への影響を検討し、安全に利用できる条件の検討を行った。過酢酸製剤の間葉系幹細胞への影響についても検討した。過酢酸製剤は、液中では過酸化水素と酢酸に分解されるが、通常の安全キャビネットの除染後、速やかに分解され、30分で細胞増殖に対する影響がほぼ認められなくなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、再生医療のための細胞製品の製造の場において必要な衛生管理について科学的データを蓄積しそのデータを社会に発信することにより、再生医療細胞製品の製造における標準化を目的とする。科学的根拠に基づき実証データを蓄積し、その手法を確立する事は再生医療の製造現場の衛生環境保持において有用であると考え。さらに環境モニタリングについてもどの場所でどの頻度で実施すべきかについて現在明らかでないデータはなく、細胞製剤の製造環境における適切なモニタリングについて理論的、実証的な検証が必要であり、また、それらのデータが環境モニタリングの省力化につながり再生医療がそれを待つ患者にとって身近なものとなる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the impact of some decontaminants on cells in facilities in the manufacturing site of regenerative medicine, such as safety cabinet and CO2 incubator. We confirmed the safety and decontamination effectiveness of continuous exposure to low-dose ClO2 for mesenchymal stem cells and iPS cells. Furthermore, to ensure the safety for operators, we used a 3D model of the organ to investigate the impact of ClO2 on alveolar epithelial cells, and considered the conditions under which operators can work safely.

We also investigated the effects of peracetic acid-based products on mesenchymal stem cells. In solution, peracetic acid decomposes into acetic acid and hydrogen peroxide. After decontamination of safety cabinet in a standard manner, peracetic acid rapidly decomposed and little to no impact on cell proliferation was observed even immediately after decontamination.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 衛生管理 二酸化塩素 過酢酸 間葉系幹細胞 iPS細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療は、医療に大きな可能性をもたらすことが期待されている。細胞製剤の製造においては、原料となるヒト由来の細胞の不均一性、原料および最終製品である細胞を滅菌することができないという性質などから、製造工程でのより厳密な衛生管理が必要となる。一方、原料、製品とも、大量にストックし必要に応じてどこにでも輸送するということが困難である場合が多く、必要に応じてその都度人の手によって小規模の製造を行っている現状の中で、製造のコストを下げることが極めて重要である。細胞製材の製造における衛生管理に何が必要で、どの部分を削減できるかについて実証的根拠に基づいた検討を行い、標準化を目指すことが喫緊の課題である。

### 2. 研究の目的

本研究は、再生医療のための細胞製品製造の現場において必要な衛生管理について科学的データを蓄積するとともに再生医療細胞製品の製造における衛生管理の標準化を目指す研究である。細胞調製施設(CPC)での空間除染においては、細胞への毒性や環境資材への残留などを考慮しなければならない。また、低濃度二酸化塩素による持続的空間除染の細胞への影響について検討する事、各種除染剤の影響についても比較検討する事を目的として研究を開始した。

### 3. 研究の方法

#### 1) 低濃度二酸化塩素による持続的空間除染の細胞への影響について

CO<sub>2</sub> インキュベータ内の二酸化塩素濃度を 0.03ppmV、0.05ppmV、0.1ppmV に設定し、その中で間葉系幹細胞及び iPS 細胞を継代培養し、細胞増殖、細胞死、細胞老化、未分化性維持について検討した。

#### 2) ヒト気道上皮細胞株への持続的二酸化塩素暴露の影響

1)と同様にCO<sub>2</sub> インキュベータ内の二酸化塩素濃度を一定に設定し、3D培養気道上皮のモデル、MucilAir™を用いて細胞への直接の影響を検討した。細胞形態、電圧計測(TEER)及びROSの蓄積を評価した。また、酸化による影響を消評価するためビルビン酸添加による影響も検討した。

#### 3) 各種除染剤の培養液内滴下による細胞の生存、増殖への影響

過酸化水素および過酢酸製剤による除染の細胞への影響を検討した。1)の結果から間葉系幹細胞においてより酸化ストレスによる感受性が高いことが示されたため、間葉系幹細胞での実細胞増殖への影響を検討した。

### 4. 研究成果

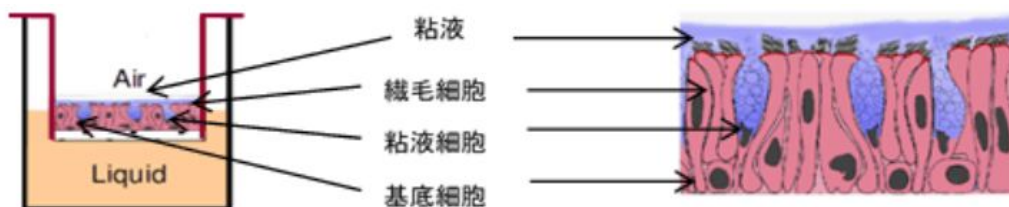
#### 1) 低濃度二酸化塩素による持続的空間除染の細胞への影響について

CO<sub>2</sub> インキュベータ内の二酸化塩素濃度を 0.03ppmV、0.05ppmV、0.1ppmV に設定し、その中で間葉系幹細胞の増殖を検討したところ、0.1ppmV では蚊尿系幹細胞に senescence が誘導され、増殖が止まった。一方、0.05ppmV では非暴露の場合と同様に細胞増殖を認めた。さらに iPS 細胞に対する二酸化塩素の持続暴露の影響について検討した。二酸化塩素 0.1ppmV 及び 0.05ppmV 環境における iPS 細胞の長期培養における品質評価を行った。iPS 細胞においては、0.05ppmV、0.1ppmV 共に細胞増殖、細胞死、細胞老化、未分化性維持の何れにおいても影響を受けず、酸化ストレスに対する影響が受けにくいことが示された。これらの結果について論文投稿し、Regenerative Therapy(査読英文雑誌)に掲載された。さらに iPS 細胞の分化への影響について検討した。それぞれの分化誘導メディウムでの培養の後、外胚葉系の分化マーカー、PAX6、NESTIN、中胚葉系、BRACHYURY、CD56、内胚葉系、SOX17、FOXA2 の発現を調べた結果、暴露群と非暴露群に差が無く、二酸化塩素 0.5ppmV に暴露された iPS 細胞においては、三胚葉系

への分化マーカーの発現に影響はない事がしめされた。

### 2) ヒト気道上皮細胞株への持続的二酸化塩素暴露の影響

再生医療製造現場における作業員への影響については、これまで 0.1ppmV の安全性が確認されているが、3D 培養気道上皮のモデル、MucilAir™ を用いて細胞への直接の影響を検討した。



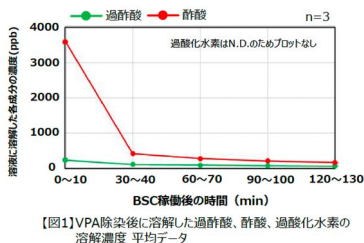
このモデルでは、外気中の二酸化塩素が気道上皮組織に及ぼす影響を直接調べることができるが、基底膜側の細胞培養液中に溶け込んだ二酸化塩素の影響を大きく受ける。実際には 1.0ppmV の環境の中では培養液中の二酸化塩素濃度が 3.0ppmV に上昇することが示された。1.0ppmV の二酸化塩素の環境下では 8 週間培養を続けた場合、細胞の形態の変化と TEER (電気抵抗) の減少、ROS の蓄積を認め、酸化ストレスによる senescence、細胞間接着の阻害が認められた。一方、このような過剰なストレスの条件下においても 2mM のピルビン酸追加により細胞形態の変化、TEER の減少、ROS の蓄積はすべて解消された。生体内では一カ所に吸収した二酸化塩素が蓄積して残っている訳ではないが、臥位環境から受けたストレスも生体内、細胞内外の酸化ストレス応答機構により処理されていることが示された。

### 3) 各種除染剤の培養液内滴下による細胞の生存、増殖への影響

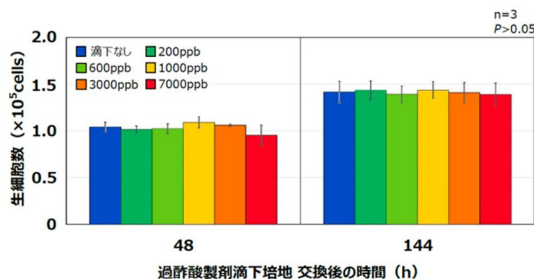
また、二酸化塩素以外の除染剤の細胞への影響について検討した。申請者らはすでに、安全キャビネットが置かれた CPC の培養調整室内を過酸化水素で除染した場合、除染後 30 時間経過しても安全キャビネット内での細胞の操作により細胞増殖への影響を認めることを発表した (Regen Ther. 2018)。本研究において過酢酸製剤について検討した。過酢酸は水中で一部過酸化水素と酢酸に分解される。過酢酸で安全キャビネット内を除染した場合、最初の 10 分以内に過酸化水素はほとんど検出されなくなった。一方過酢酸、酢酸の残存について検討した結果、除染後 30~40 分の間に酢酸の濃度は急速に低下し、過酢酸は最初から低値ではあるが緩徐に低下することがわかった。

次にヒトさい帯由来の間葉系幹細胞を用いて増殖への影響を検討した。培養直後の酢酸濃度における滴下培養実験での細胞増殖への影響は認めなかった事から過酢酸による環境除染では、30~40 分作業を待機することは望ましいが、この結果からは直後より細胞への影響は少ないことが示された。

以上の結果から、新たに細胞培養の設備を整備する際、滴下実験により細胞毒性を予測した上で除染方法を構築する事が可能であると考え、システムの構築を進めている。



【図1】VPA除染後に溶解した過酢酸、酢酸、過酸化水素の溶解濃度 平均データ



【図2】過酢酸製剤滴下培地による生細胞数の平均データ エラーバーは標準偏差を示す

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okawa Ryoma, Sogawa Koushirou, Shiozaki Motoko, Yachiku Kenji, Miura Takanori, Shibata Takashi, Ezo Sachiko	4. 巻 21
2. 論文標題 The effects of continuous exposure to low-dose chlorine dioxide gas on the characteristics of induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 250 ~ 257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2022.07.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋香菜、辻本和子、茂田誠、山中貴裕、佐野義哉、池田卓司、中村浩章、筒井正造、小川祐樹、水谷学、紀ノ岡正博、江副幸子
2. 発表標題 除染後の環境が細胞増殖に及ぼす影響 過酢酸製剤Vol.2
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋香菜、千原莉里、中村浩章、筒井正造、小川祐樹、水谷学、紀ノ岡正博、江副幸子
2. 発表標題 除染後の環境が細胞増殖に及ぼす影響、過酢酸製剤Ver.
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宇野友貴、江副幸子、伊藤恒夫、大須賀俊裕、岡崎利彦、高野忠夫、高見太郎、千葉俊明、紀ノ岡正博
2. 発表標題 ヒト細胞化工に資する人材育成制度と教育コンテンツの活用
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茂田誠、樋口皇太郎、池田卓司、高橋香菜、辻本和子、紀ノ岡正博、江副幸子
2. 発表標題 取り扱い細胞への環境からの汚染影響スクリーニング方法の提案 ~ 過酢酸製剤を用いたBSC除染への実施例 ~
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 辻本和子、高橋香菜、茂田誠、山中貴裕、池田卓司、紀ノ岡正博、江副幸子
2. 発表標題 過酢酸製剤によるBSC除染後の環境が培養細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高橋香菜、辻本和子、茂田誠、山中貴裕、池田卓司、紀ノ岡正博、江副幸子
2. 発表標題 除染後の環境が細胞増殖に及ぼす影響 ~ 過酢酸製剤Ver.3 ~
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	名井 陽  (Myoi Akira)  (10263261)	大阪大学・医学部附属病院・教授   (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	紀ノ岡 正博  (Kinooka Masahiro)  (40234314)	大阪大学・大学院工学研究科・教授    (14401)	
研究分担者	大川 竜麻  (Ookawa Ryoma)  (40838520)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員（常勤）    (14401)	
研究分担者	塩崎 元子  (Shiozaki Motoko)  (50598828)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）    (14401)	
研究分担者	岡本 美奈  (Mina Okamoto)  (50457008)	大阪大学・医学部附属病院・助教    (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関