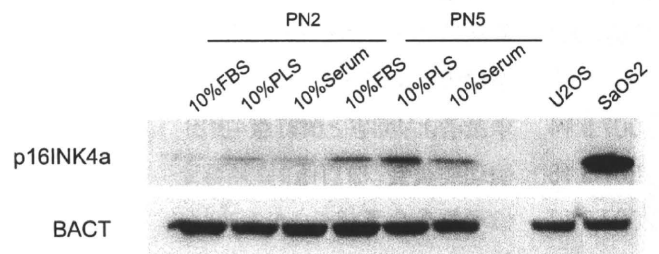
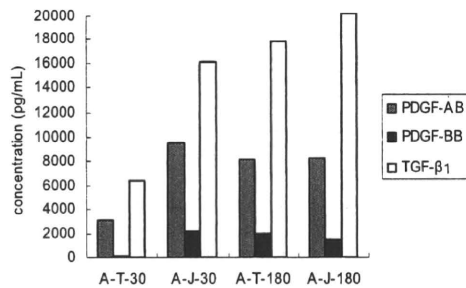
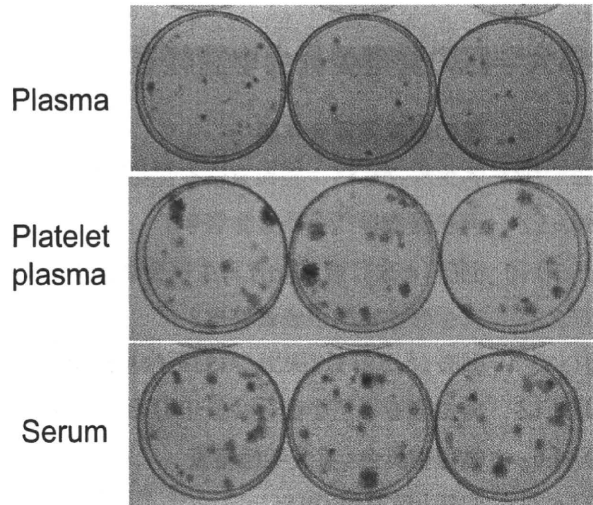
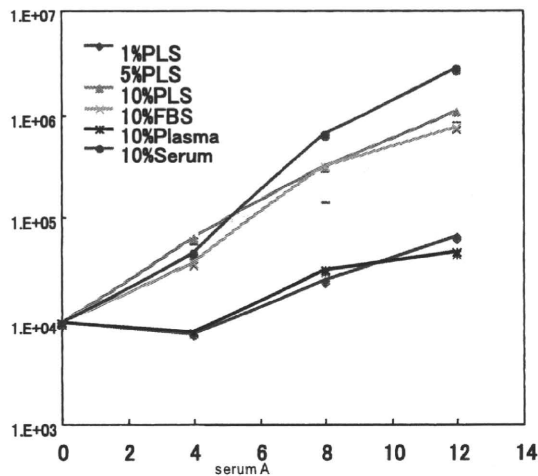
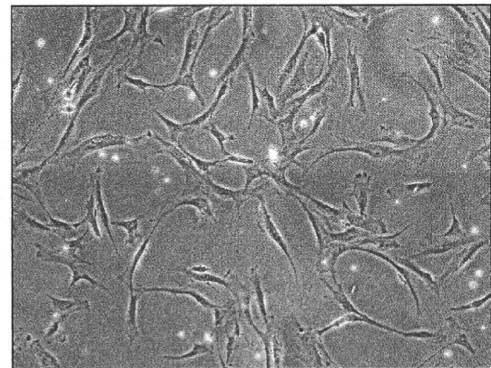


# 血清に含まれる血小板由来の増殖因子が必要

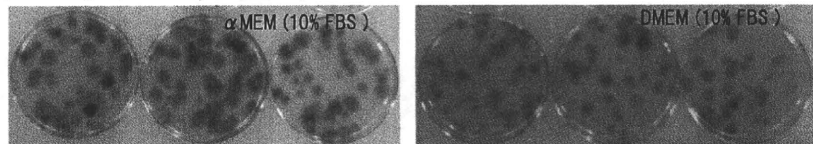


# 細胞調製→知識に基づいた培養技術が必要



## ・培養液

α-MEM glutamax (Invitrogen) FDAよりcGMPグレード認可



## ・細胞解離液

TrypLE Select (Invitrogen)

組み換えプロテアーゼ(動物成分フリー) FDAよりcGMPグレード認可

エンドキシン擬陽性→添加回収試験

## ・細胞凍結保存液

CP-1

細胞生存率 90%

## ・抗生剤

ペニシリン、ストレプトマイシン(Invitrogen) FDAよりcGMPグレード認可

# 臨床試験申請

## 京都大学医の倫理会およびヒト幹細胞を用いた臨床研究指針

### 京都大学医の倫理委員会申請経過

- 2006.7.19 医の倫理委員会申請
- 2006.7.20 再生医療専門小委員会審査開始
- 2006.9.22 再生医療専門小委員会答申1
- 2006.10.10 回答1と改訂版1提出/再生医療専門小委員会再審査
- 2007.2.27 再生医療専門小委員答申2
- 2007.3.5 回答2と改訂版2提出/再生医療専門小委員会再審査
- 2007.3.12 再生医療専門小委員会答申3/\*小委員会承認
- 2007.4.6 倫理委員会 実質審議審査
- 2007.4.21 回答と改訂版3提出
- 2007.4.23 倫理委員会通常書類審査
- 2007.5.9 申請者へ改訂を求める
- 2007.5.14 申請者より回答と改訂版4提出
- 2007.5.15 倫理委員会 改訂版4書類審査
- 2007.5.17 倫理委員会承認

### ヒト幹細胞指針申請経過

- 2007.6.1 厚生労働大臣への意見聴取申請
- 2007.10.22 厚生科学審議会承認
- 2007.10.25 大臣答申
- 2007.10.29 審査委員会からの通知
- 2007.11.7 実施承認

厚生労働省発医政第1026007号  
平成19年10月25日

京都大学医学部附属病院  
病院長 内山 卓 殿

厚生労働大臣 幹 派 要



ヒト幹細胞臨床研究実施計画について

平成19年6月1日付で申請のあった下記の臨床研究については、実施して差し支えない。  
なお、臨床研究の中止、終了などに伴う厚生労働大臣への報告については、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成18年厚生労働省告示第425号)の定めるところによるほか、定期的に中間報告書を提出するようお願いする。

記

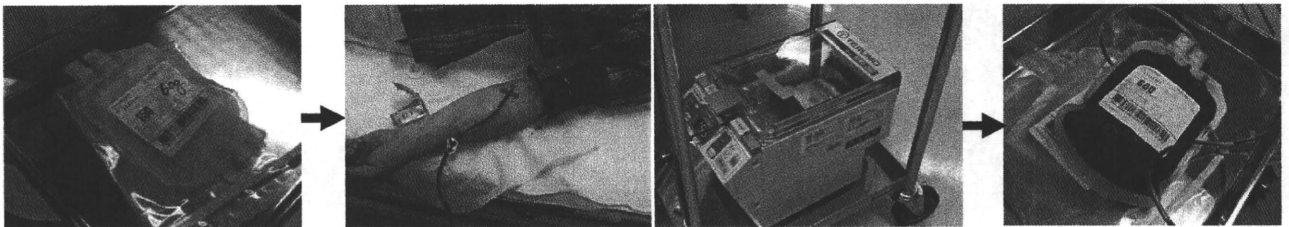
題 名 月状骨腫瘍性壊死患者に対する骨髄間葉系幹細胞を用いた骨再生治療の検討

地 活 責 任 者 中 村 孝 志 (京都大学大学院医学系研究科整形外科教授)

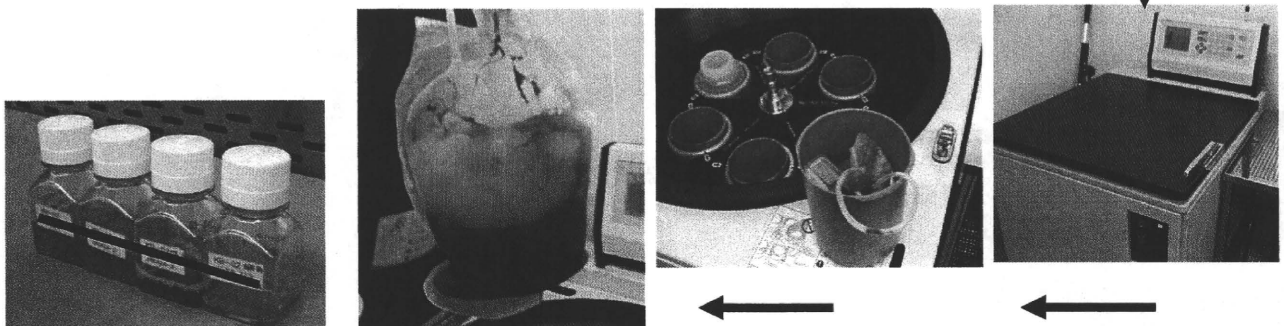
→国内初のヒト幹指針に遵守した臨床試験

## 培養用の自己血清調製 400mL×2回 人工腎臓部、輸血細胞治療部

### 血液採取

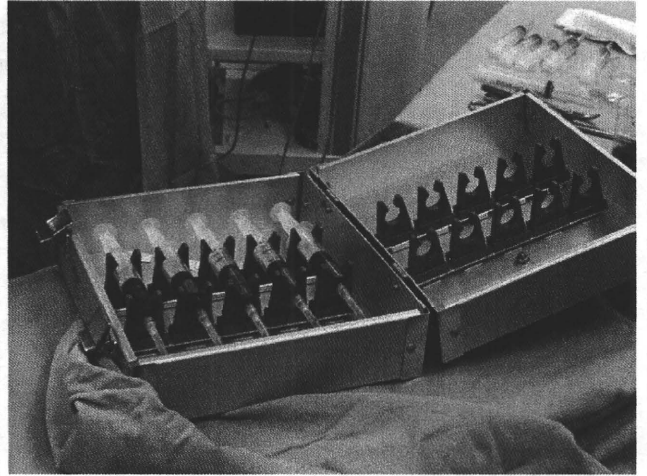


### 血清調製

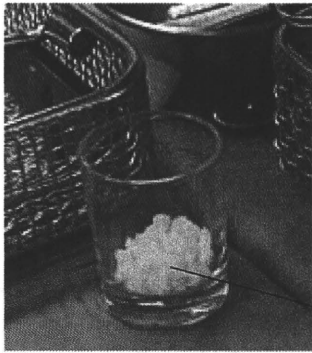




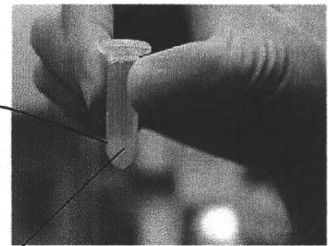
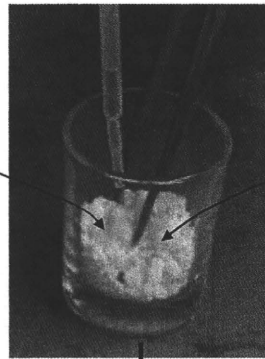
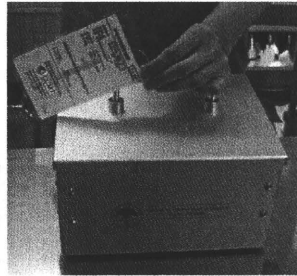
# 骨髓穿刺＊結構痛い！ →麻酔医による無痛麻酔



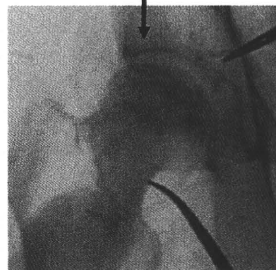
## 細胞搬送 →移植



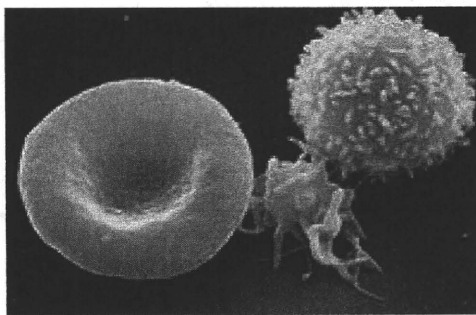
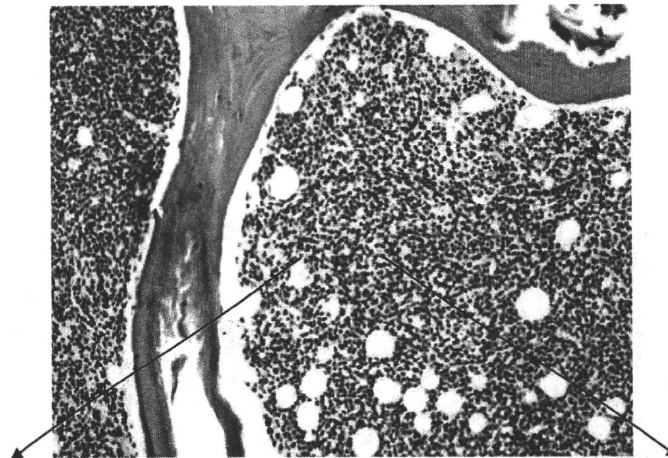
人工骨(Osferion)



チューブに入った間葉系幹細胞

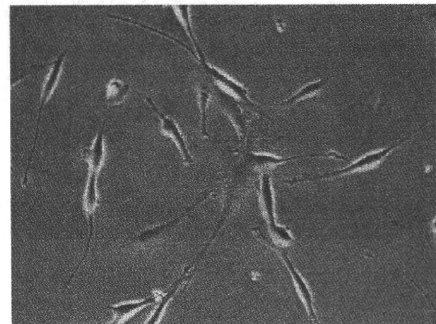


# 骨髓からMSCを分離する



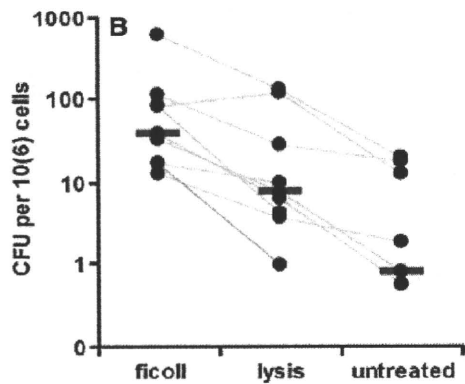
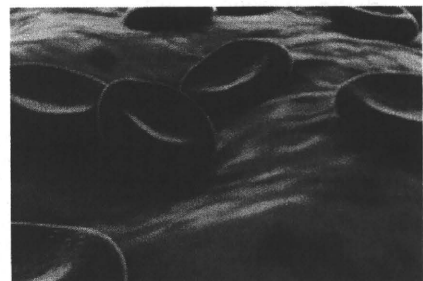
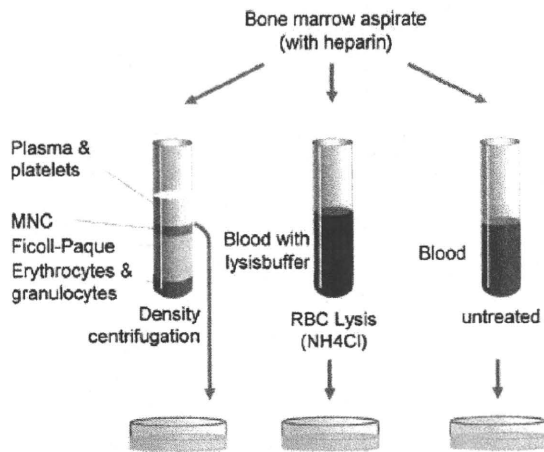
RBC

Platelet WBC



Bone marrow stromal cell

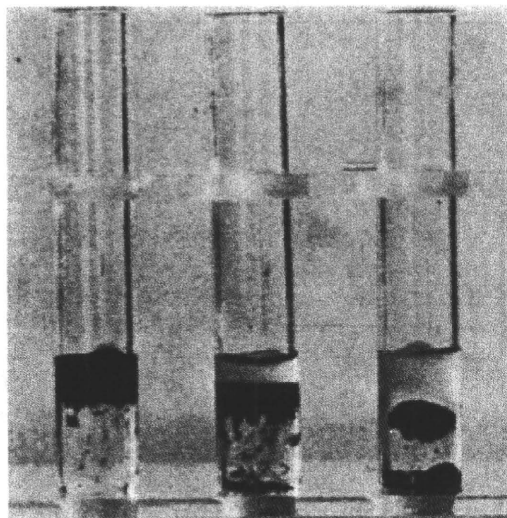
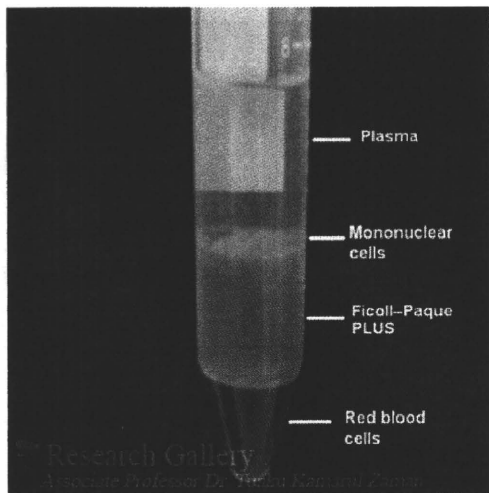
## MSCの初期培養でRBCは除いた方がよい



Horn P (2008) Cytotherapy



# 密度勾配遠心法



NATURE November 21, 1964 VOL. 204  
ARNE BØYUM

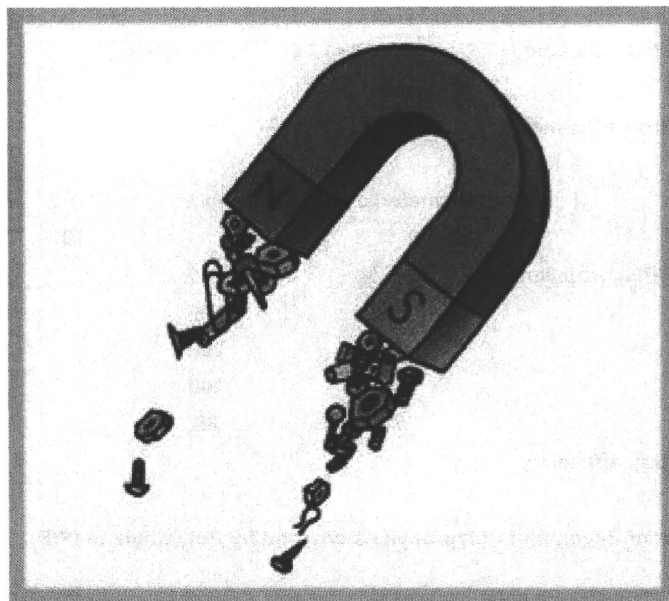
Norwegian Defence Research Establishment,  
Division for Toxicology, Kjeller, Norway.

## Stokes' Law

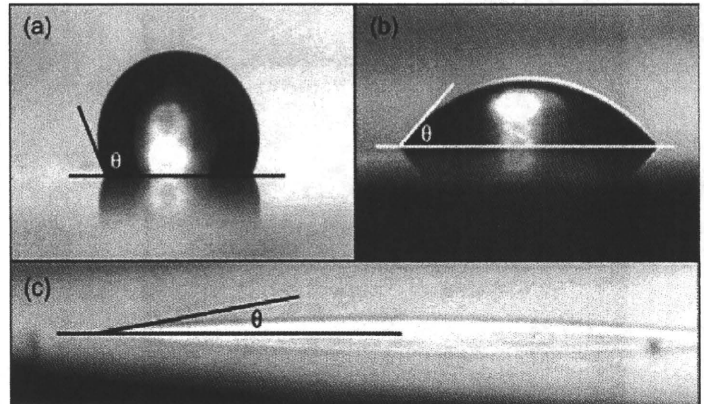
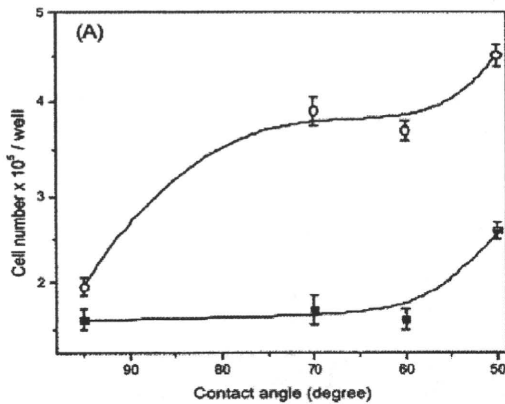
$$V = \frac{2}{9} \frac{r^2 (p - p_1) g}{n}$$

r:球体の半径 p:球体の比重 p<sub>1</sub>:液体の比重 g:重力 n:液体の粘度

# くっつけて分離する



# Bone marrow stromal cellは親水性の高い素材に付着する



## Adhesion Behavior of Human Bone Marrow Stromal Cells on Differentially Wettable Polymer Surfaces

MOON SUK KIM, Ph.D.,<sup>1</sup> YU NA SHIN, M.Eng.,<sup>1,2</sup> MI HEE CHO, M.Eng.,<sup>1</sup>  
 SOON HEE KIM, M.Eng.,<sup>2</sup> SUN KYUNG KIM, M.Eng.,<sup>1,2</sup> YOUNG HO CHO, M.Eng.,<sup>1,2</sup>  
 CH. SON KHANG, Ph.D.,<sup>2</sup> H. WOO LEE, M.D.,<sup>3</sup> and HAI BANG LEE, Ph.D.<sup>1</sup>

TISSUE ENGINEERING  
 Volume 13, Number 8, 2007

### 200 materials (1st screening)

- Microscopic analysis
- Diameter of fiber ( $\geq 10 \mu\text{m}$ )
- Weight ( $\geq 50 \text{g/m}^2$ )
- Biosafety
- Availability

## 200種類以上の素材からフィルター素材をスクリーニング

### 40 materials (2nd screening)

- CFU assay (N=2) : collection efficiency

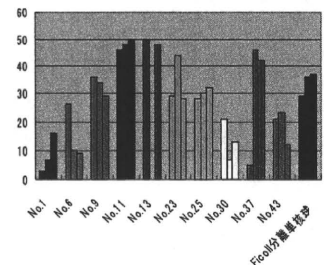
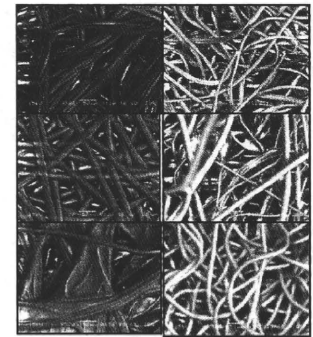
### 10 materials (3rd screening)

- CFU assay (N=3): collection efficiency

### 6 materials (4th screening)

	Diameter( $\mu\text{m}$ )	Weight( $\text{g/m}^3$ )
1. PET / Polyethylene		3-13
2. Rayon / Polyethylene / Polypropylene	6-24	110
3. Rayon / Polyethylene	5-25	95
4. Polyester	7-29	250
5. Polyester	6-22	200
6. Polyester	7-15	85

73

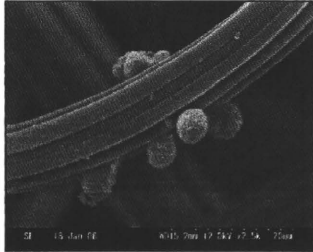


### Non-woven fabric compound of Rayon and Polypropylene covered by Polyethylene (P/P)

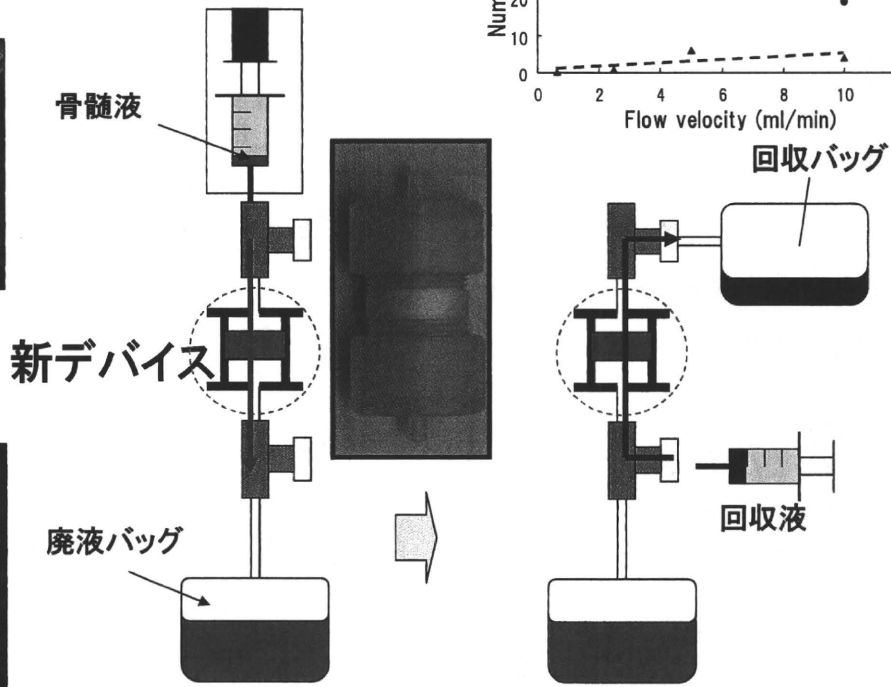
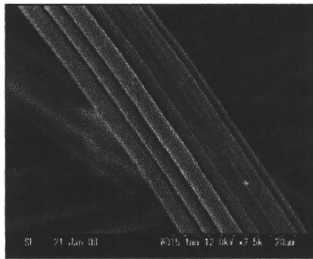
- Rayon > P/P
- Diameter=5-25  $\mu\text{m}$
- Weight=95 $\text{g/m}^2$
- Mesh-opening=5-50  $\mu\text{m}$
- Thickness=500  $\mu\text{m}$

# 新しいコンセプトによる間葉系幹細胞分離デバイス

骨髓液を注入

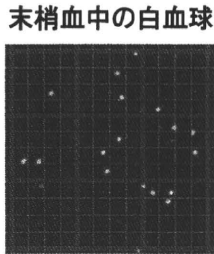
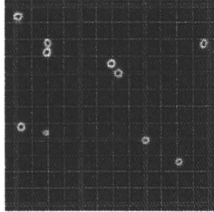


回収液による逆流により回収

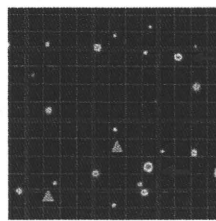


## デバイスによる間葉系幹細胞の選択性

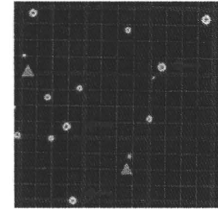
培養した間葉系幹細胞



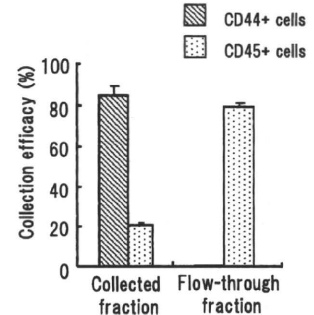
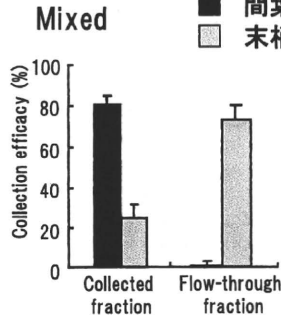
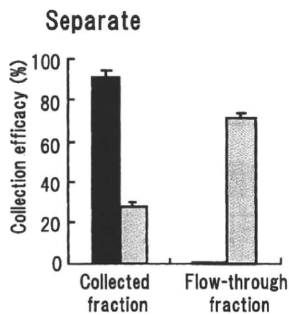
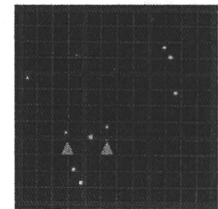
間葉系幹細胞と白血球を混合



回収されたfraction

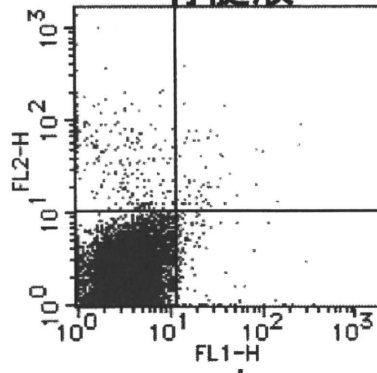


廃棄されたfraction



CD106+/STRO-1+

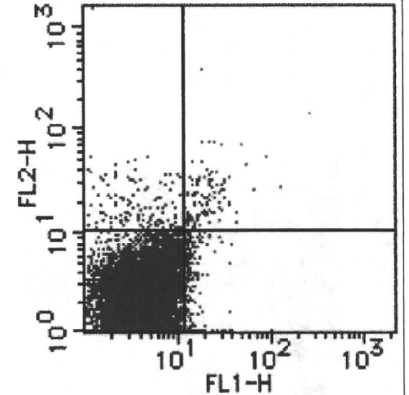
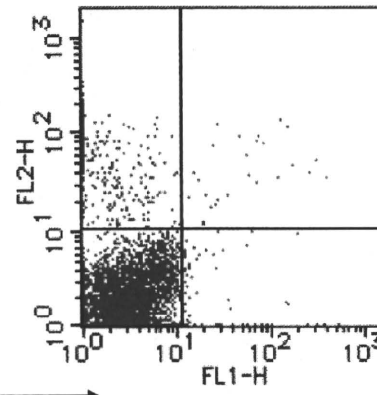
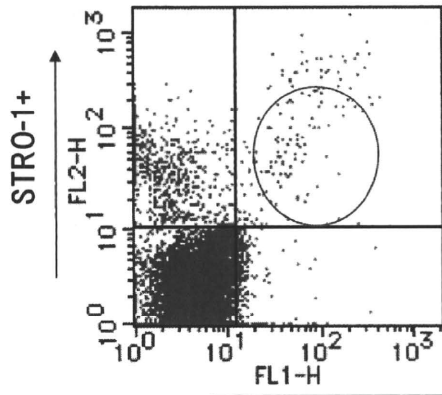
骨髓液



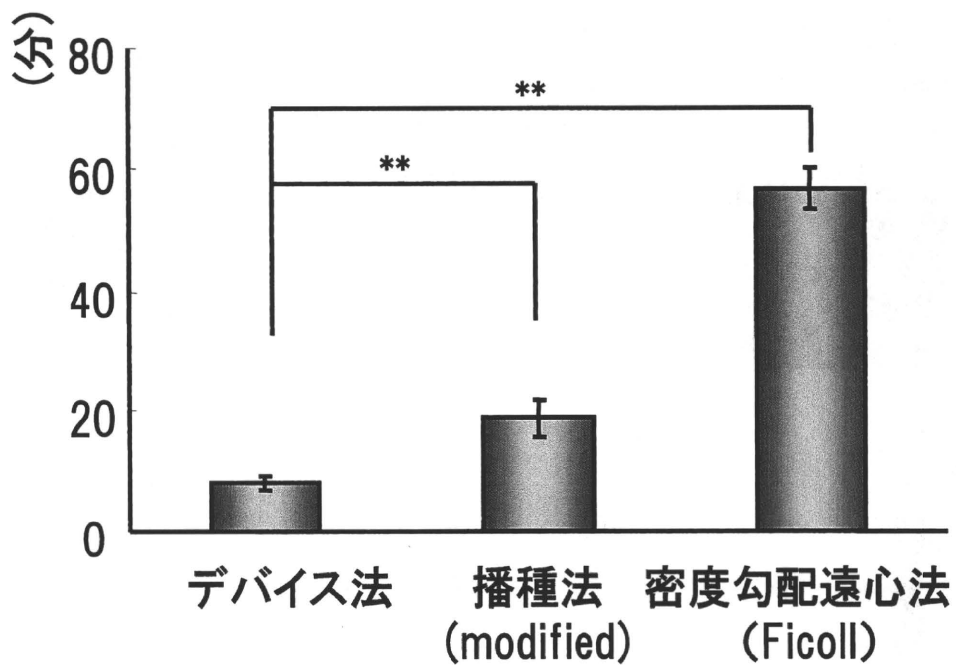
デバイス法

播種法  
(modified)

密度勾配遠心法  
(Ficoll)



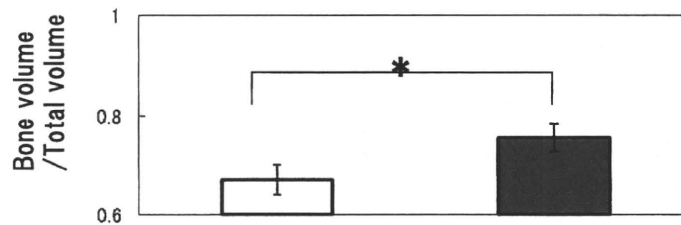
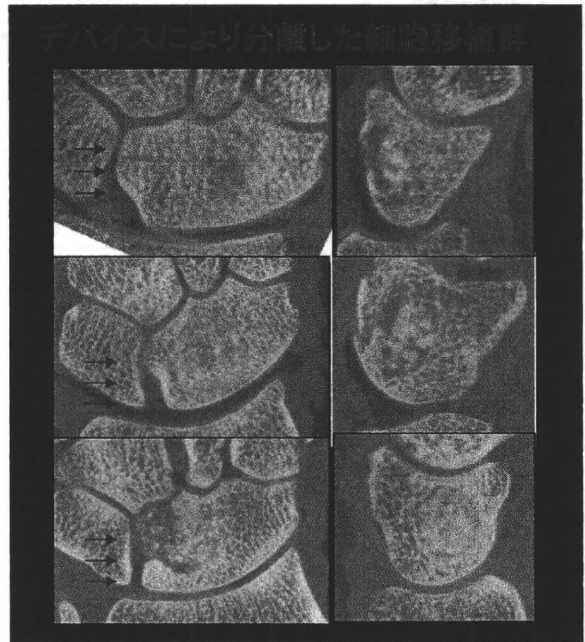
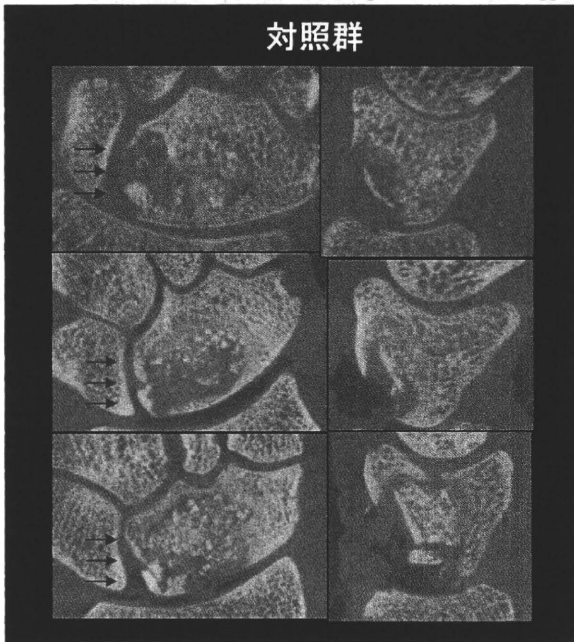
### 従来法との比較一分離時間



\*\*; p<0.001



# 治療実験結果 —移植1か月後のマイクロCT結果—

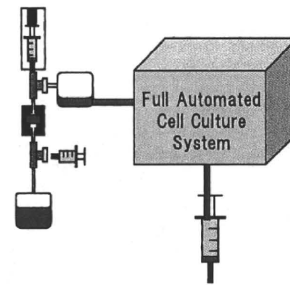


\* $p < 0.01$

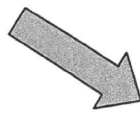
## 将来展望

### デバイス法のアドバンテージ

- 短時間処理
- 簡便
- 効率が一定→標準化
- 閉鎖系回路のため安全
- 遠心処理を要しない

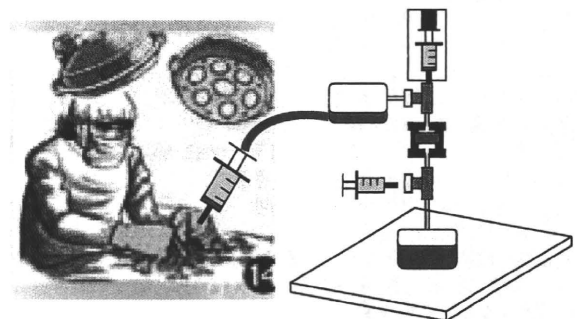
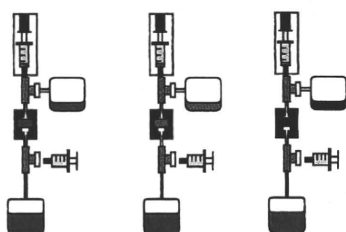


自動培養装置の開発



### 選択性フィルターを用いた他の細胞分離

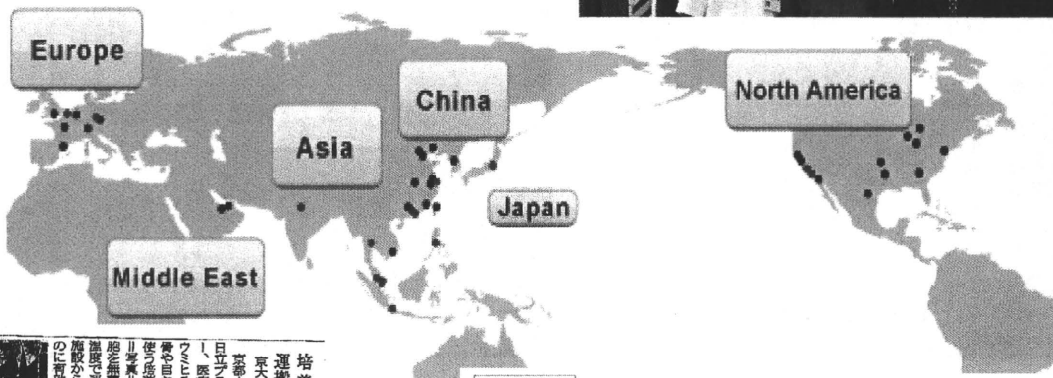
Use of specific antibodies  
Change of fiber materials or diameter etc.



手術台上での間葉系幹細胞分離・移植

# 細胞搬送システム構築(定温、水平維持、無菌性,耐気圧保証) →Cellular Logistics構築

Inner Case × Outer Case  
Buffer material

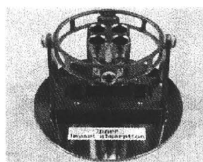
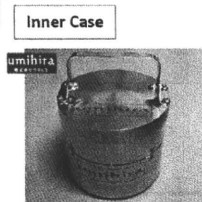


培養細胞の  
運搬容器開発  
京都大学大学院  
工学研究科  
生物工学専攻  
細胞工学研究室  
京都大学  
京都府  
宇治市  
宇治  
〒627-8565  
TEL: 0774-381-6111  
FAX: 0774-381-6112  
E-mail: kumura@bio.kyoto-u.ac.jp

培養細胞の運搬容器の開発は、細胞の生存率を高めることが最大の課題です。従来の容器では、温度変動や振動によるダメージが避けられず、細胞の死滅率が高かった。本研究では、温度変動を抑え、振動を吸収する構造を開発し、細胞の生存率を大幅に向上させた。この容器は、医療機関や研究機関での細胞搬送に広く利用されている。

培養細胞の運搬容器の開発は、細胞の生存率を高めることが最大の課題です。従来の容器では、温度変動や振動によるダメージが避けられず、細胞の死滅率が高かった。本研究では、温度変動を抑え、振動を吸収する構造を開発し、細胞の生存率を大幅に向上させた。この容器は、医療機関や研究機関での細胞搬送に広く利用されている。

培養細胞の運搬容器の開発は、細胞の生存率を高めることが最大の課題です。従来の容器では、温度変動や振動によるダメージが避けられず、細胞の死滅率が高かった。本研究では、温度変動を抑え、振動を吸収する構造を開発し、細胞の生存率を大幅に向上させた。この容器は、医療機関や研究機関での細胞搬送に広く利用されている。



HITACHI Cell Medical Container

Buffer Material (Refrigerant)

Outer Case

日本経済新聞掲載(2009年12月21日)

## 謝辞



京都大学医学部附属病院整形外科  
 京都大学再生医科学研究所  
 京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター  
 京都大学医学部附属病院探索医療センター  
 京都大学医学部附属病院中央手術部  
 京都大学医学部附属病院日帰り手術部  
 京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部  
 京都大学医学部附属病院人工腎臓部  
 京都大学医学部附属病院リハビリテーション部  
 京都大学医学部附属病院中央検査部  
 京都大学医学部附属病院放射線部  
 京都大学医学部附属病院材料部  
 京都大学医学部附属病院南2階病棟  
 京都大学大学院人間健康科学系専攻  
 独立モニタリング委員会  
 京都博愛会病院  
 株式会社カネカ  
 株式会社JMS



京都大学医学部附属病院負担患者経費  
 厚生労働省科学研究費  
 文部科学省科学研究費  
 橋渡し研究支援プログラム  
 新エネルギー産業技術研究開発機構プロジェクト

<b>細胞育成学実践論</b>				区 分			
				所 属		職 名	氏 名
				医療検査展開学講座		教 授	高桑徹也
				医療検査展開学講座		准教授	伊吹謙太郎
単 位 数	2単位	授業形態	講義	理学療法学講座	准教授	青山朋樹	
時 間 数	30時間	対象回生	1,2回生	人間健康科学系専攻	教務補佐	上田路子	
開 講 期	後期	選択	選択	輸血細胞治療部 iPS細胞研究所	主任技師 教授	笠井泰成 木村貴文	

#### 授業概要と学習目標

細胞治療とは、ヒトの細胞を輸注、移植することによって行う治療法の総称であり、従来から行われている輸血治療を原型とし、造血器幹細胞移植、細胞移入免疫療法、遺伝子治療、再生医療などがこれに含まれます。細胞治療の今後の発展性を考えると、「細胞育成」という役割を持つ人材が必要不可欠で、これは臨床検査技術学を主体とした領域となると考えられます。求められる能力は、単に細胞が培養できるというだけでなく、1.細胞治療の基礎知識、理解、2.細胞治療センター(CPC)の運営管理の考え方の理解と実践、3.安全な細胞の育成、調製法の理解と実践、さらには、4.細胞治療研究に必要な基礎技術の修得、5.細胞治療研究の実際と多岐にわたります。当コースでは、細胞治療における品質管理、培養法の実習、細胞治療を背後で支える細胞治療センターの紹介、見学、実際の運営法等について学びます。

#### 授業計画と内容

1. 品質管理法実践論 1 グラム染色による細菌感染否定試験
2. 品質管理法実践論 2 マイコプラズマ否定試験
3. 品質管理法実践論 3 エンドトキシン測定
4. 品質管理法実践論 4 セルプロセッシングセンターにおけるモニタリング
5. 細胞培養法実践論 1 無菌培養手技
6. 細胞培養法実践論 2 細胞数カウント、増殖曲線作成
7. 細胞培養法実践論 3 細胞数カウント、増殖曲線作成
8. 細胞培養法実践論 4 Cell sorting
9. 細胞調整室運営実践論 セルプロセッシングセンター見学

(2コマ連続で行う回があります)

成 績 評 価	レポート、出席
教 科 書	無し
参 考 書 等	適宜テキストを配布します。
学生へのメッセージ	細胞治療の最先端とそれを支える細胞治療センター、細胞育成士の役割という主題で、配当いたします。 検査技術科学コースを含め、すべてのコースの学生の聴講を歓迎致します。 細胞育成学を受講していなくても受講可能ですが 実習的要素も行いますので、受講希望者は事前に担当教官と連絡を取ってください。

主担当教員連絡先

高桑徹也 (内 3956/3931)

## 細胞育成学実践論

### 1. 目的

再生医療を展開する人材には 1.細胞治療の基礎知識の理解、2. 細胞調製施設(Cell Processing Center: CPC)の運営管理の考え方の理解と実践、3.安全な細胞の育成、調製法の理解と実践、4.細胞治療研究に必要な基礎技術の修得、5.細胞治療研究の実際と多岐にわたる能力が求められる。本カリキュラムでは GMP に準拠した細胞製造、品質管理、セルプロセッシングセンター管理の実際を学習することを目的とする。

### 2. 日程

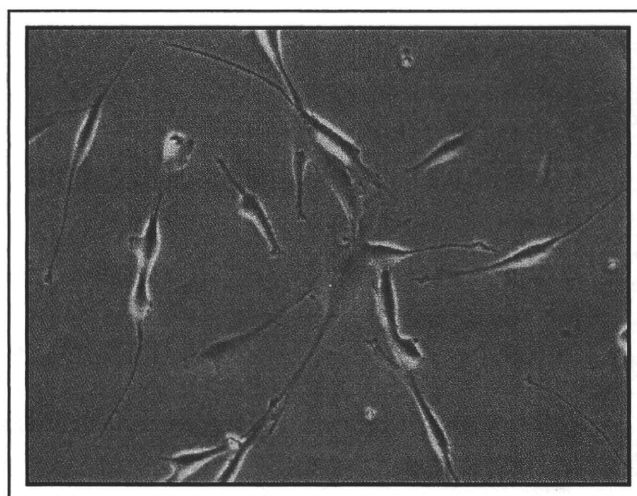
集中講義 3日間 平成 23 年 2 月 14, 16, 18 日 (月、水、金)

### 3. スタッフ

人間健康科系専攻	教授	高桑徹也 (単位認定責任者)
	准教授	伊吹謙太郎
	准教授	青山朋樹
	教務補佐	上田路子
分子細胞治療センター	主任技師	笠井泰成
iPS 細胞研究所	教授	木村貴文
	テクニカルスタッフ	谷 美穂

### 4. スケジュール

次ページ



[2月14日：第一日]

9：00－9：10

オリエンテーション（実施場所：人間健康科学系専攻 実習室）

オリエンテーション：高桑徹也

実習説明：青山朋樹

9：10－9：40

講演Ⅰ：細胞培養とは？（実施場所：人間健康科学系専攻 実習室）

人間健康科学系専攻：上田路子

9：40－10：30

講演Ⅱ：滅菌、消毒とは？（実施場所：人間健康科学系専攻 実習室）

分子細胞治療センター：笠井泰成

10：30－10：40

〈休憩〉

10：40－11：30（実施場所：人間健康科学系専攻 培養室）

実習Ⅰ：バイオハザードキャビネット、CO2インキュベーターの構造

分子細胞治療センター：笠井泰成

実習Ⅱ：ロット管理

人間健康科学系専攻：上田路子

11：30－12：30

〈休憩〉

12：30－17：00

無菌性培養実習（実施場所：人間健康科学系専攻 実習室および培養室）

講演Ⅲ：無菌培養について（実施場所：人間健康科学系専攻 実習室）

iPS細胞研究所：谷 美穂

無菌性細胞製造実習Ⅰ（実施場所：人間健康科学系専攻 培養室）

・ 培養液調製

- ・ 付着細胞剥離
- ・ 細胞数カウント
- ・ 細胞播種

〈休憩〉は適宜

担当：伊吹謙太郎、青山朋樹、上田路子、谷 美穂

レポート作成

[2月16日：第二日目]

9:00-12:00

無菌性細胞製造実習Ⅱ（実施場所：人間健康科学系専攻 培養室）

- ・ 細胞観察
- ・ 付着細胞剥離
- ・ 細胞数カウント

〈休憩〉は適宜

担当：伊吹謙太郎、青山朋樹、上田路子、谷 美穂

12:00-13:00

〈休憩〉

13:00-16:00

品質管理Ⅰ（実施場所：分子細胞治療センター）

- ・ エンドトキシン測定オリエンテーション
- ・ エンドトキシン測定実践Ⅰ

〈休憩〉は適宜

担当：笠井泰成

16:00-17:00

CPC管理Ⅰ（実施場所：分子細胞治療センター）

- ・ CPC管理

担当：笠井泰成

レポート作成



[2月18日：第三日]

9：00－12：00

無菌性細胞製造Ⅲ（実施場所：人間健康科学系専攻 培養室）

- ・ 細胞観察
- ・ 付着細胞剥離
- ・ 細胞数カウント
- ・ 倍加時間算定

〈休憩〉は適宜

担当：伊吹謙太郎、青山朋樹、上田路子

12：00－13：00

〈休憩〉

13：00－15：00

品質管理Ⅱ（実施場所：分子細胞治療センター）

- ・ エンドトキシン測定実践Ⅱ

〈休憩〉は適宜

担当：笠井泰成

15：00－16：00

CPC管理Ⅱ（実施場所：iPS研究所 FiT）

- ・ CPC管理

担当：木村貴文、谷美穂

16：00－17：00

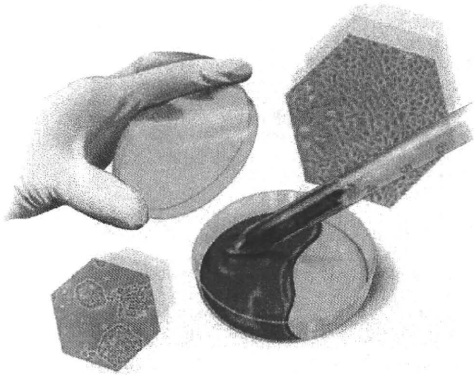
総括（実施場所：人間健康科学系専攻 実習室）

レポート提出、実習結果評価：青山朋樹、笠井泰成

実習総括：高桑徹也

# 細胞培養とは？

参考 細胞培養入門ノート(羊土社)  
細胞培養なるほどQ&A(羊土社)  
バイオ実験イラストレイテッド(秀潤社)



上田路子

2011年 2月 14日

京都大学大学院医学研究科  
人間健康科学系専攻

## 細胞培養とは

体の中から組織や細胞を取り出して、  
培養容器の中で、細胞を生かし続けたり  
増殖させたりすること。

狭義 1つ1つばらばらにした細胞の培養

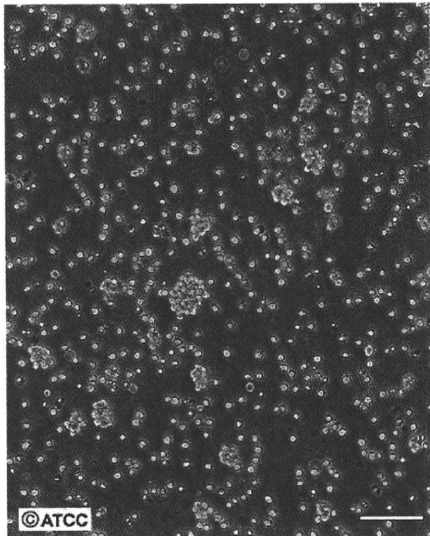
広義 組織培養や器官培養も含めて総称

## 細胞の種類(増殖形態で分類)

浮遊培養系細胞  
主に血液由来細胞

接着培養系細胞  
主に組織由来の細胞  
繊維芽細胞・上皮様細胞など

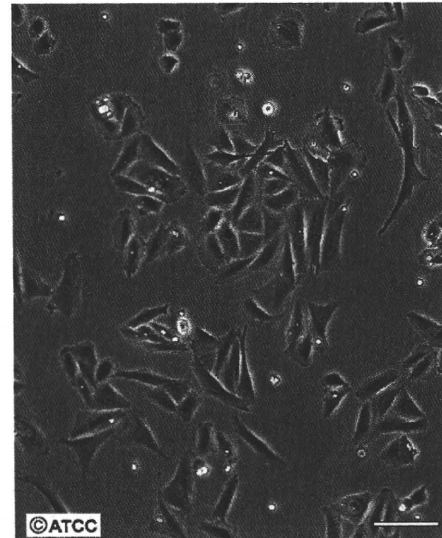
Jurkat  
(ヒト急性リンパ芽球白血病由来)



©ATCC  
Low Density

Scale Bar = 100µm

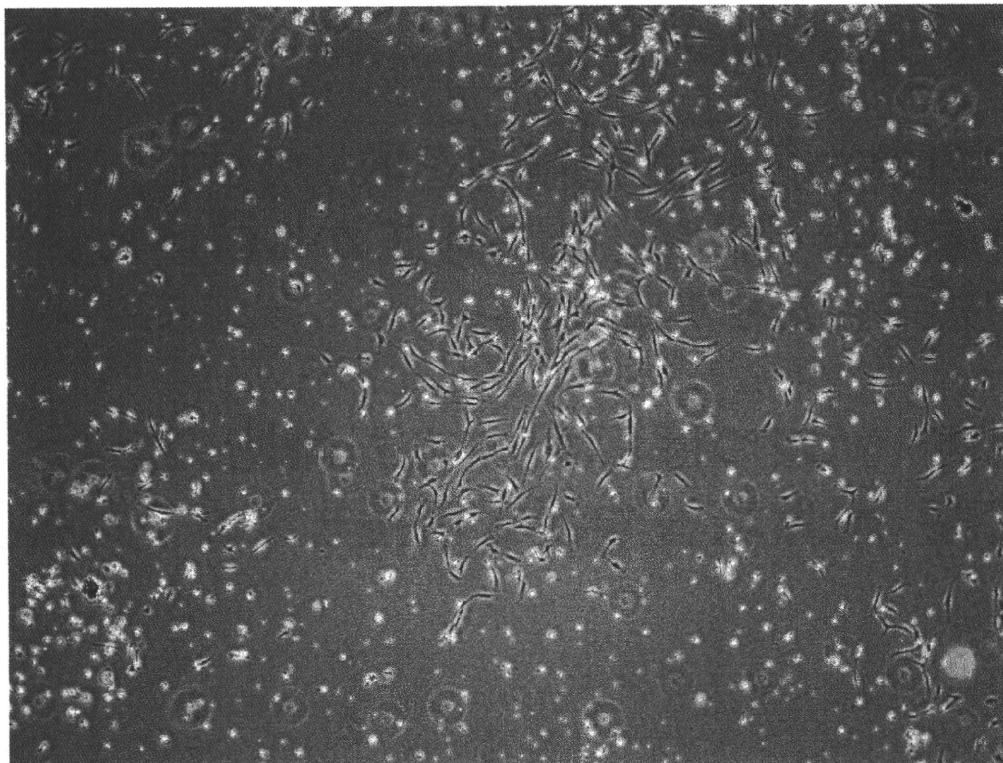
Saos-2  
(ヒト骨肉腫由来)



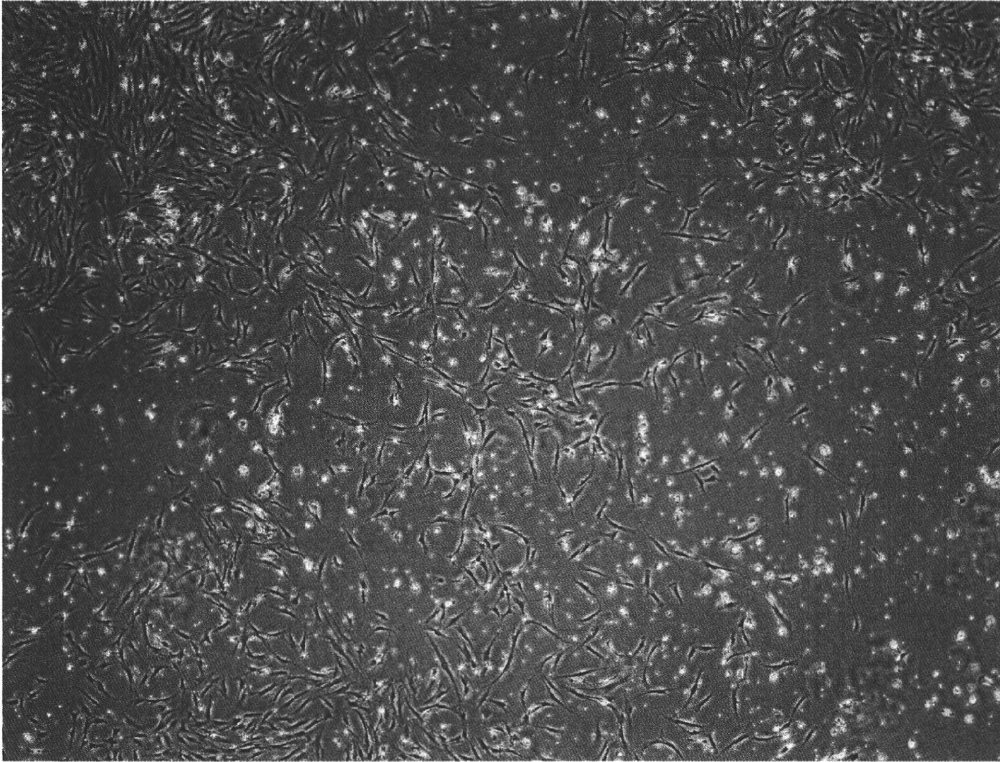
©ATCC  
Low Density

Scale Bar = 100µm

## 骨髄間葉系幹細胞 培養 5日目



骨髓間葉系幹細胞 培養 7日目



骨髓間葉系幹細胞 培養 10日目

