

201106017A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

ヒト ES/iPS 細胞の実用化における
幹細胞バンクの基盤整備についての研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 古江美保

平成 24(2012)年 5 月

目次

I. 総括研究報告

ヒト ES/iPS 細胞の実用化における幹細胞バンクの基盤整備についての研究

古江 美保 1

II. 分担研究報告

1. ヒト ES/iPS 細胞遺伝子発現プロファイルのバイオインフォマティクス解析

水口 賢司 29

2. iPS 細胞を認識する新規抗体を用いた評価技術の策定

川崎 敏祐 41

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 50

IV. 研究成果の刊行物・別刷 51

I. 総括研究報告
厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
（総括）研究報告書

ヒト ES/iPS 細胞の実用化における幹細胞バンクの基盤整備についての研究

研究代表者：古江 美保

（独立行政法人医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部ヒト幹細胞応用開発室 研究リーダー）

研究要旨：ヒト ES/iPS 細胞の実用化においては、プレマスターバンク、マスターバンク、ワーキングセルバンクを設置することが望ましい。バンク設置と運営を円滑に行うためには、作業工程などのフローを事前に構築しておく必要がある。一般細胞バンクにおける品質管理、ならびに臨床用細胞プロセッシングにおける作業工程などについてはすでに策定されており、本研究では、これらに加えるべきヒト幹細胞のデータベースの基盤設計、品質管理に必要な技術の策定を行い、ヒト幹細胞バンク運営の基盤システムを設計することを目的とする。

研究分担者

水口賢司：独立行政法人医薬基盤研究所 バイオインフォマティクスプロジェクト プロジェクトリーダー
川寄敏祐：立命館大学総合理工学研究機構生化学・糖鎖生物学 客員教授

A. 研究目的

ヒト ES/iPS 細胞などのヒト幹細胞は、再生医療のソース、ワクチン作製や生物製剤原料として、国内外で、その応用への期待が高まっている。その実用化においては、セルバンクを設置し、樹立機関や分化誘導機関と連携することが理想的である。バンク運営には、技術とノウハウの蓄積が必要であり、

ヒト ES/iPS 細胞のバンク設置と運営を円滑に行うためにはには、作業工程などのフローを事前に構築しておく必要がある。一般細胞バンクにおける品質管理、ならびに細胞治療を目的とした細胞プロセッシングにおける品質管理などについては、すでに策定されている。本研究では、これらに加えるべき、臨床に資するヒト幹細胞に必要な品質評価とその維持など品質管理に必要な技術の策定を行って、ヒト幹細胞バンク運営の基盤システムを設計することを目的とする。

具体的には、

- ① 資源化工程表作成、② 効率的な遺伝子発現の評価法の検討、③ 効率

的な細胞表面マーカーの評価法、④細胞登録システムの基盤設計などに関して研究を実施し、ヒト幹細胞バンク運営の基盤システムを設計する。これにより、再生医療など臨床に資するヒト幹細胞の資源化における品質管理の基盤が整備され、バンクの設置と運営を円滑に行うことが可能となり、ヒト幹細胞の再生医療などへの実用化が促進される。

B. 研究方法

ヒトES細胞、iPS細胞は従来の細胞と同様の資源化工程を使うことができない。ヒトES/iPS細胞は、その細胞増殖の速度が遅く、分化能もあることから分化細胞を取り除きながら細胞を増殖させ、また、幹細胞ならではの特性検査も必要となる。一方、継代とともにゲノムが不安定なることが知られており、限られた継代数内に資源化することが望ましい。効率良く細胞を増殖させ、特性検査、品質検査を行って、保存を行うために、作業工程表を作成するとともに、評価法についても効率よく行う必要がある。そこで次の項目について研究を行った。

① 資源化工程表作成

ヒトES/iPS細胞の資源化工程において、適切なタイミングで検査を行い、凍結保存を行う必要がある。また、株

間の差も大きいと、様々な工程が予測され、細胞株によって臨機応変に対応できるよう工程を策定する必要がある。海外の幹細胞バンクからヒトES細胞についての資源化工程表などが発表されており、これらの資料を集めて調査するとともに、実際に資源化を行い、株間の差を考えた工程表の作成を行う。

② 効率的な遺伝子発現の評価法の検討

国際ヒト幹細胞バンキングイニシヤティブ(ISCBI)や海外におけるヒト幹細胞バンクでは、品質評価法についてバンク間での連携が必要であることが提唱されており、その資料を調査した。それらの資料をもとに、国際幹細胞イニシヤティブで使用された未分化ならびに早期分化マーカー遺伝子群のプライマーペアがすでに固定化されたマルチウェルプレートにcDNAを入れて解析を行うRT² Profiler PCR Arrayシステムを用いて、遺伝子の発現プロファイルの解析を行った。解析対象は、正常染色体を有するES/iPS細胞株群、染色体異常クローン群、胚性がん(EC)細胞株群とした。解析結果は、分担研究者である水口賢治によりバイオインフォマティクスの手法を用いた解析を行った。

③ 効率的な細胞表面マーカーの評価法

近年、細胞表面マーカープロファイル解析については、免疫染色法による解析が注目されていることから、IN Cell Analyzer 2000（現有）によるイメージングサイトメトリー解析と FACS を比較する。従来使用されている糖鎖認識抗体 SSEA3、SSEA4、tra-1-60、tra-1-81 は EC 細胞を免疫原として得られたものであり、必ずしも iPS 細胞/ES 細胞に特異的な成分を認識するものではない。分担研究者である川崎 敏祐とともに開発した EC と ES/iPS 細胞を判別できる抗体なども含めて、評価方法を検討した。

④ 細胞登録システムの基盤設計

研究目的にあった細胞を検索するためには、それに必要な細胞情報がデータベース化され、適切な検索システムが必要不可欠である。しかし、現状では、細胞名のリストがあるだけである。そこで、研究用のヒト幹細胞を対象として、細胞登録とデータ登録のための基盤設計を行うために、海外での実態について調査した。

（倫理面への配慮）

本研究についてヒト試料を用いてゲノム解析を用う研究を実施する場合には「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に、その他の研究は「臨床研究に関する倫理指針」に従っ

て行うほか、研究機関等で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行する。また、ヒト ES 細胞使用研究に関しては「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に従って行うほか、各研究機関等で定められた規定を遵守して研究を遂行する。あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については研究開始前に所定の手続きを行う。

将来有用な医療に繋がる可能性を秘めたヒト幹細胞研究が、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て有効性及び安全性を確保できるよう厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従い、研究を推進する。JCRB 細胞バンクならびに難病バンク運営にかかる倫理問題について従来より研究・政策提言を行っている難病疾患資源研究部・増井徹部長と連携し、研究推進のあり方、情報公開における問題等に関する検討も行う。「ヒト ES 細胞の品質管理に関する研究」（医薬基盤研究所）については文部科学大臣確認済みである。

C. 研究結果

① 資源化工程表作成

海外の幹細胞バンクからヒト ES 細胞についての資源化工程表などが発

表されており、これらの資料を集めて調査した。英国においては、独立行政法人 Health Protection Agency (HPA、健康保護局)のセンターである National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC、国立生物学的製剤研究所)に UK Stem Cell Bank が設置されている。HPA は 2003 年設立され、2005 年に英国放射防護庁 (NRPB : National Radiological Protection Board) と合併し、独立行政組織 (NDPB : Non-departmental Public Body) となって、関連機関と直接連携協力して業務を遂行していたが、2009 年に NIBSC と合併し、NIBSC が中核的機能を担っている。このような研究所に UK Stem Cell Bank が設置されたことは、英国における幹細胞の位置づけを示しており、英国においては厚生省がヒト幹細胞の研究を標準化し、創薬や医療への応用を目指している。

UK Stem Cell Bank の部長である Glyn Stacy 博士は、各国の幹細胞バンクにおける資源化に際する評価基準を標準化するため、国際ヒト幹細胞バンキングイニシャティブ (ISCBI) プロジェクトを設置して、国際連携を推進している。ISCBI では、ヒト多能性幹細胞の各国で相互に研究利用して医療創薬への応用を促進する目的で、品質の確保されたヒト幹細胞の安定的な供給を行うにあたっての研究用幹細胞バンキングガイドラインを発

表した (参考資料 1)。さらに、ISCBI ではヒト幹細胞のワクチンや再生医療などへの応用のための臨床用幹細胞バンキングガイドラインも作成中である。これについて、ISCBI の会議に参加するとともに厚生労働省医政局研究開発振興課再生医療研究推進室など関係機関より品質管理関連資料を収集し、ドラフトについての検討を行い、ISCBI に日本における臨床用細胞の品質管理に関する情報提供ならびにバンキングガイドラインの改定案の提出を行った。

ISCBI のバンキングガイドラインの基盤となる UK Stem Cell Bank における臨床用ヒト幹細胞の作業工程表 (参考資料 2) は、2005 年にすでに発表されている。ヒト ES 細胞の解凍率は一般細胞に比べて高くなく、樹立者から受け取った細胞を解凍・培養できないことも多い。そのため、培養を行うことができなかつた場合なども記載されている (図 1)。このようなフローチャートを作成することは、実際に現場で作業を行う際には大変有用である。欧州においてカトリック文化圏であるにもかかわらず、早くからヒト ES 細胞の研究を推進してきたスペインは、早くからヒト幹細胞バンクの設置に動いてきた。いくつかの幹細胞バンクがあるが、その中でもアンダルシア幹細胞バンクはスペインで 2004 年に設置された。2006 年に UK Stem Cell Bank の資源化工程表を参

考として改良した工程表を公表している（図2、図3、参考資料3）。この作業工程表は実際に資源化を行う際には大変有用であった。図2は樹立者より提供されたアンプルのプレマスターバンクを作成する際の作業工程表である。JCRB細胞バンクにおいてはトークンと称している樹立者から供与されたアンプルのバックアップとしての保存工程である。できるだけ少ない継代数でバックアップを作成する必要があるが、検査も同時に行う必要があり、この作業工程は慎重に行う必要がある。JCRB細胞バンクにおいては、樹立機関からの提供は1アンプルとしているが、4アンプルの提供により効率的に品質検査を行うことが可能となる。しかし、1アンプルは細菌検査やマイコプラズマ検査の目的であり、培養上清で検査が可能であり、貴重な細胞の資源化の場合には、培養上清の提供がより有用であると考えられる。

マスターバンク作成の際には、プレマスターバンクを解凍することになるが、解凍率を測定する際にも、ヒト幹細胞ならではの問題がある。ヒトES/iPS細胞はシングルセルにすると細胞死に至るため、凍結する際に細胞数を正確に測定することができない。実際には一部を採取して別途トリプシンなどによりシングルセルにして細胞数を測定することになる。しかし、解凍時に生存率を測定するためには

シングルセルにせねばならず、一方それでは播種できず、本質的な解凍率を知ることはできない。図3に Spain Stem Cell Bankにおけるマスターバンク作成工程表を転載した。1アンプルを培養せずに検査のみに利用している。一方、分譲用バンク作成の際にはマスターバンク作成用のフラスコをそのまま凍結の工程を経ずに培養を継続している。しかし、これでは凍結したマスターバンクを解凍した場合の分譲用バンクと品質が異なる可能性がでてくる。

これらの工程表を参考にして、JCRB細胞バンクにおけるヒトiPS細胞資源化工程表を作成して（図5、6）、実際に資源化を行う際に使用した。樹立者からの寄託分1アンプルのバックアップとして5アンプルのトークンを作成し、うち3アンプルを保存し、2アンプルをシード作成に用いることとした。トークン作成時にはSTRによる細胞同一検査のみを行った。本来は樹立機関より5アンプル提供されることとすれば、うち2アンプル解凍時に、細胞生存率、細菌検査、真菌・酵母・ウイルスなどの汚染検査、STR検査を行うこととする。解凍後の細胞増殖動態が不明の場合が多く、まずは1:2にスプリットを行い、慎重に細胞増殖を行った。寄託者からのアンプルのバックアップとしてシード作成過程でトークンを作成する。シード作成時には、汚染検査、生存率検査、染

色体検査、未分化マーカー遺伝子発現検査、未分化表面マーカー検査、in vitro 分化能検査、倍加速度検査を行った(図7)。シード解凍時も3アンプル解凍を行い、うち1アンプルは解凍後生存率検査を行うとともに、汚染検査に使用した。また、2アンプルは培養を行った。これによりロット内の解凍後生存率に差がないことが確認できた。細胞増殖させる際に、UK Stem Cell Bankなどの海外の幹細胞バンクでは、6ウェルプレートを使用している。そこで、当所も6ウェルプレートを使用した。UK Stem Cell Bankでは1ウェルあたり5アンプルを作成しているが、それでは解凍後のコロニー数が少なくなり、セレクションが起きる可能性があり、当所では2アンプルから3アンプルまでとした。6ウェルプレートを用いることにより、効率的に作業を行うことが可能となることは明らかとなった。また、分譲用アンプルを作成後、品質保証試験を行って、ユーザーが問題なく使用できるかどうか検査を行った。資源化開始時は不安定な形質であった株であっても、分譲用アンプル解凍後の検査では、培養法における注意点などがわかっているならば、トラブルなく培養できる。樹立機関による培養法の指示だけではなく、第三者である細胞バンクにおける客観的な培養法の確認は重要であることが示唆された。

また、培養の状態を把握するために

培養記録表を作成した。この記録表策定に当たっては、京都大学再生医科学研究所末盛准教授や京都大学 iPS 細胞研究所の青井教授らにも情報提供を行って、意見交換を行い、作成した。細胞名、継代数はもとより、使用する培地の名前、培地の量、添加する増殖因子の濃度や添加容量、あるいは作業工程などを詳細に明記してチェックすることにより、培養時に技術者が注意点を確認しながら作業できるように作成した。このフォームを他研究施設にも提供し、多施設で共用することにより、同じプラットフォームで培養法について検討できる(図8)。また、品質についても有効に利用できる(研究論文④)。

② 効率的な遺伝子発現の評価法の検討

2007年にISCIの報告によれば、未分化なヒトES細胞に発現している遺伝子は、NANOG、POU5F1(OCT4)、TDGF1、DNMT3B、GABRB3やGDF3であった。このプロジェクトで使われた幹細胞遺伝子PCRアレイはキアゲン社から市販されており、資源化の際に使用して、その検査に必要な細胞量などを計算した。具体的には、RNA(必要RNA量1pg~2μg)を抽出し、High Capacity RNA-to-cDNA Kit(ABI社、品番:4387406)を用いて逆転写し、PCRア

レイにアプライする。PCR アレイ解析には TaqMan Array Human Stem Cell Pluripotency Card (ABI 社、品番 4385344) を使用し、AB7900HT リアルタイム PCR システムで測定し、ヒト幹細胞関連マーカー遺伝子の発現を測定した (研究論文④)。解析対象は図9の表に示すようにヒト ES、iPS、間葉系幹細胞や癌細胞などを用いて解析を行った。さらにバイオインフォマティクス解析を行った結果については、分担研究者水口の項にゆずるが、これまでの解析方法では株間の差はほとんど確認できなかつた。しかし、水口らによる解析により、他の細胞株との比較解析も可能であり、幹細胞バンクにおける品質管理として有用であることが示唆された。問題点としては、コントロール株の設定であった。ISCI などにおいてコントロール株としてはヒト ES 細胞 H9 株と EC 細胞株である 2012EP 細胞が使用されている。H9 細胞は培養しやすい安定した細胞株であるが、使用する MEF によって未分化マーカーの発現は揺れる。また、2012EP 細胞は EC 細胞であるが、ヒト ES 細胞よりも不安定であり、コントロール株として使用することが難しいことが明らかとなった。MEF や培地などのロットにより変化しない株をコントロールとするか、あるいは、ロット差のできるだけ少ない培養条件下における細胞をコントロールとするか、これからの

課題であると思われる。

また、この幹細胞遺伝子 PCR アレイは *in vitro* 分化能評価にも使用可能であった (図10)。ヒト ES 細胞は、受精卵の内部細胞塊由来であることから、成体組織を構成するすべての細胞に分化するとされる。ヒト ES と同様の分化能を持つ iPS 細胞も多くの細胞に分化するとされる。その分化能は免疫不全マウスに移植しテラトーマ形成により確認される。しかし、マウス ES 細胞とは異なり、ヒト ES/iPS 細胞のテラトーマ形成試験の際には、精巣や腎皮膜下などへの移植が必要で技術を要する。また、分化にも時間がかかるため、必ずしも適確に分化能を評価できず、国際的に問題となっている。一方、再生医療や創薬などへの応用を目指す場合、通常は *in vitro* で分化させる。*in vitro* での分化能を評価する場合、ES/iPS 細胞を凝集させて胚様体 (Embryoid body; EB) を作成させて分化誘導し、10 日間から3ヶ月程度培養を行って分化マーカー遺伝子の発現を解析する。細胞はあらゆる細胞に分化する可能性があることから、分化マーカーの選択が難しい。幹細胞遺伝子 PCR アレイには早期分化マーカーも含まれており、EB を1週間以上1ヶ月以内であればその分化を評価することが可能であり、未分化状態と分化状態の遺伝子を比較解析できる。

③ 効率的な細胞表面マーカーの評価法

幹細胞関連遺伝子発現は、それほど大きく変化することは少ないが、細胞表面抗原発現プロファイルは、ヒト ES/iPS 細胞を培養しているその培地やフィーダーのロットにより変化することも多い (図 1 1)。位相差顕微鏡像を見て普段の状態とは異なると思われるような場合には、フローサイトメトリーを行って確認すると、SSEA-1 陽性細胞が増加していたり、SSEA-3 陽性細胞が低下していたりする。しかし、実際に FACS をするためには細胞数が必要であり、解析もその当日前後に行う必要がある。一方、免疫染色の場合には、検査の必要性があると考えられた時点で固定を行い、数日間時間の猶予があり、作業工程を調整することが可能である。実際に免疫染色の結果をイメージアナライザーにより画像を取得して解析を行うことによりフローサイトメトリーと同様の解析結果が得ることが可能であった (図 1 2)。その際の作業として、抗体 2 種による二重染色を行うのは効率的ではあるが、実際にはバックが高くなるなどのトラブルも多い。バックグラウンドが高くなるとイメージアナライザーによる解析においてロット差が大きくなってしまう。そのため、基本的にはすべてシングルで染色を行う工程として設定した。免疫染色の

場合には、6 ウェルプレート 2 枚に播種し、6 抗体による染色を行う。また、フローサイトメトリーと免疫染色はほぼ同じ抗体を用いることが可能であるが、いくつかの二次抗体でフローサイトメトリーでバックグラウンドに影響を与えることが明らかとなったため、免疫染色とフローサイトメトリーと全く同じ抗体を使用することはできなかった。

④ 細胞バンクにおける細胞登録システムの基盤設計

ヒト ES/iPS 細胞の株数は急ピッチで増加しており、既に数千株にも及ぶ。ところが、ヒト ES/iPS 細胞株の命名法について整備されておらず、混乱が生じている。細胞株の命名は細胞登録においては重要な案件である。2010 年の国際幹細胞学会 (ISSCR: International Society for Stem Cell Research、2010 年 7 月 15 日開催)、及び ISCI (2010 年 9 月 15 日開催) のワークショップで議論された内容に準拠して、2011 年 4 月に米国マサチューセッツ医科大学ヒト幹細胞バンクの International stem cell registry (ISCR) が代表として米国、英国、オーストラリア、中国などの幹細胞バンクや幹細胞研究者らが提案する「ヒト ES/iPS 細胞株の命名法および細胞登録に関する統一規定の案」が米国科学誌 Cell Stem Cell 2011 年

4月8日号に掲載された。これに対し、京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) 山中伸也所長らの意見と米国細胞バンク American Type Culture Collection (ATCC) Brian Pollok 所長らの意見が同誌の6月3日号に掲載された。両者とも ISCR の提案に大筋で同意した上で、幹細胞研究の将来展望をもとに想定される問題を提起し、改善案を提示した。しかし、これらの改善案においても命名法は解決されていないことから、京都大学 再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センター 細胞

プロセッシング研究領域、京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センター 霊長類胚性幹細胞研究領域、京都大学 iPS 細胞研究所 規制科学研究部門、理化学研究所バイオリソースセンター 細胞材料開発室の研究者らと連携して、命名法についての提案を行った (研究論文⑤)。

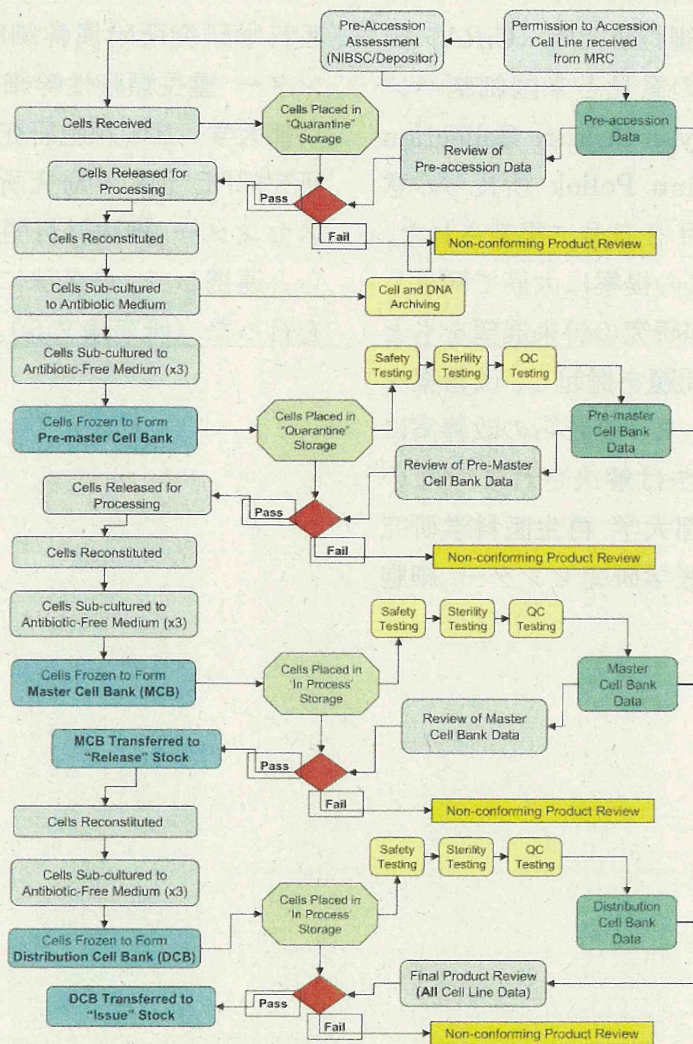


Fig. 3. Overview of the receipt, quarantine, processing, storage and issue of stem cell lines.

図1. 参考資料 UK Stem Cell Bank におけるヒト ES 細胞の資源化工程表
 (Advanced Drug Delivery Reviews 57 (2005) 1981- 1988 図3 予定転載)

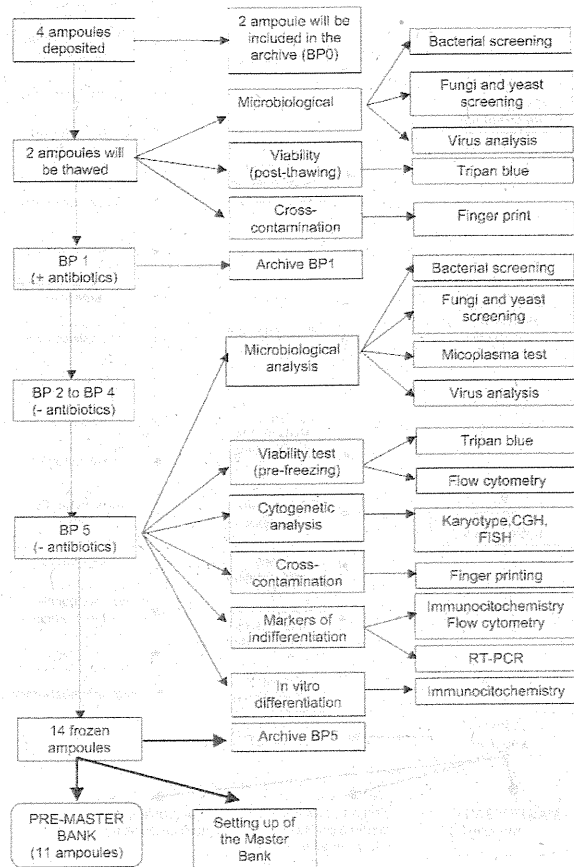


Fig. 2. Setting up a premaster bank. (Modified version of UK stem cell bank flowchart: 11.)

図2. 参考資料 アンダルシア Stem Cell Bank におけるプレマスターバンク
作成工程表 (Stem Cell Reviews 6: 117-126 (2006) 図2より転載)

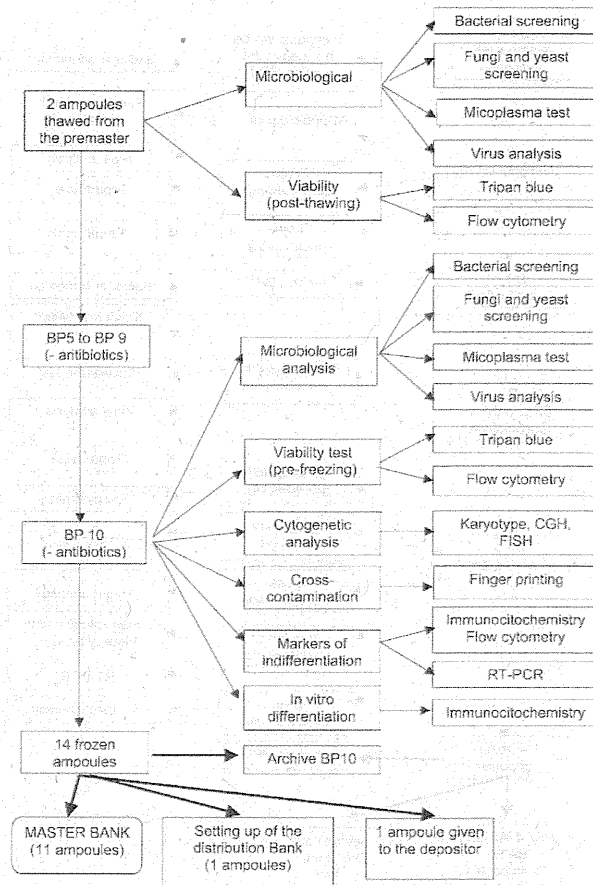


Fig. 3. Setting up a master bank. (Modified version of UK stem cell bank flowchart: 11.)

図3. 参考資料 アンダルシア Stem Cell Bank におけるマスターバンク作成工程表 (Stem Cell Reviews 6: 117-126 (2006) 図3より転載)

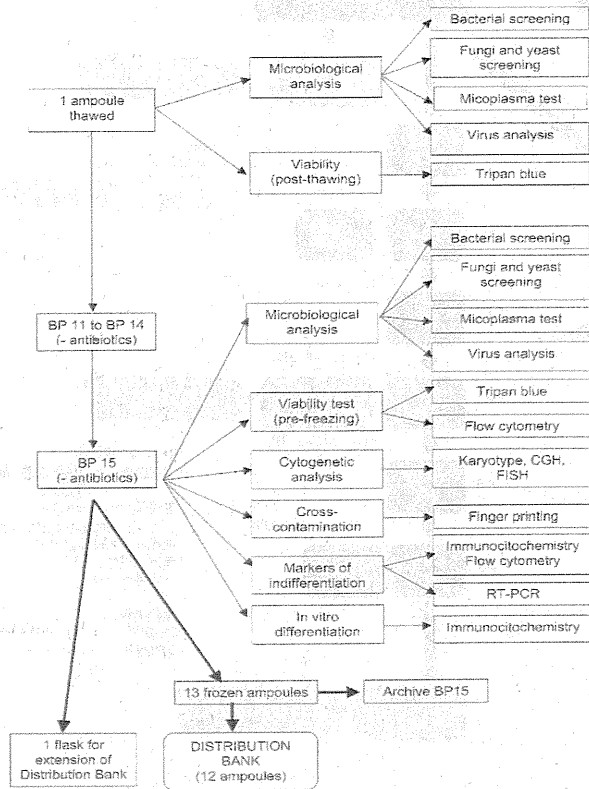


Fig. 4. Setting up a distribution bank. (Modified version of UK stem cell bank flowchart: 11.)

図4. 参考資料 アンダルシア Stem Cell Bank における分譲バンク作成工程表 (Stem Cell Reviews 6: 117-126 (2006) 図2より転載)

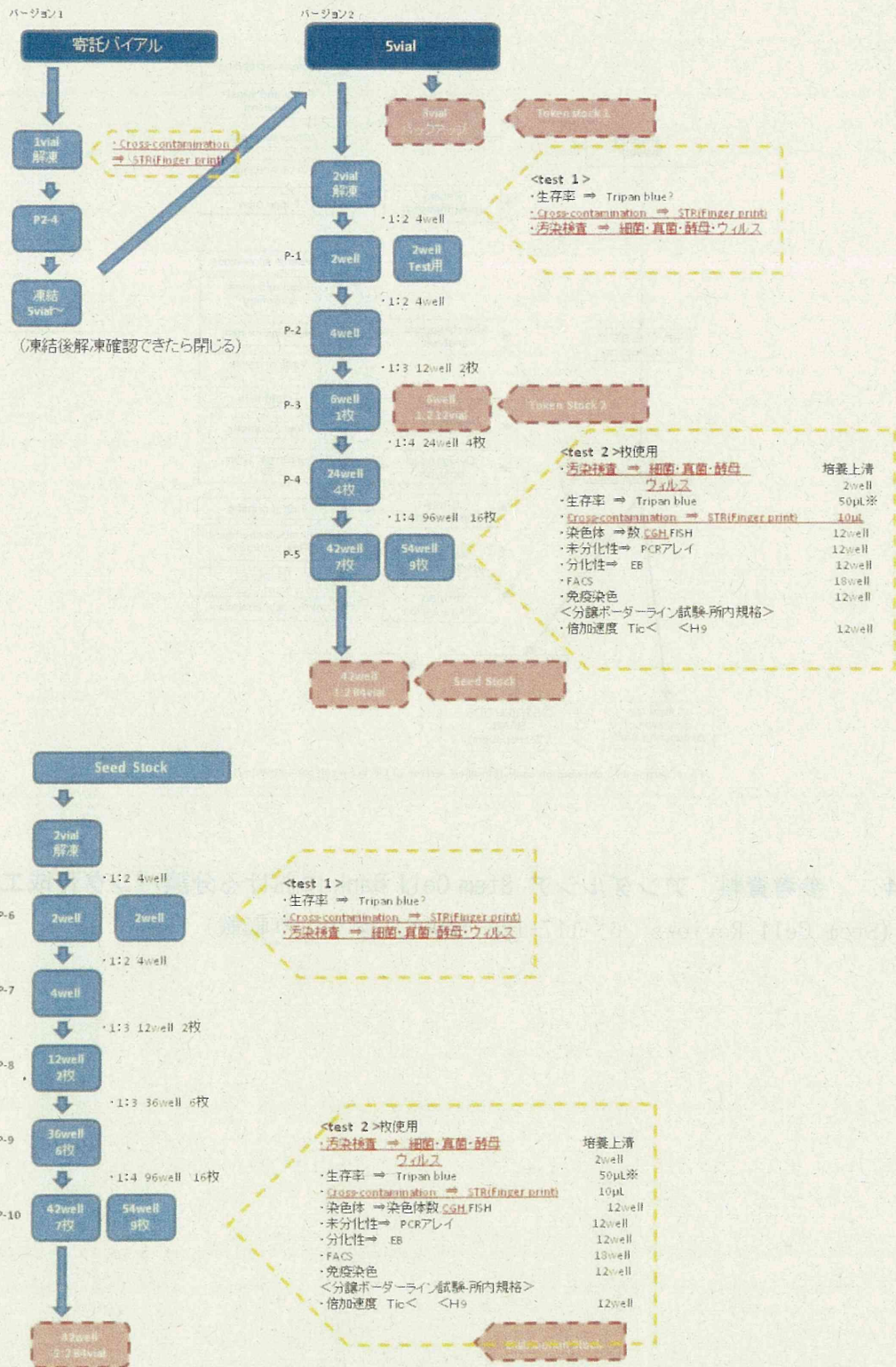


図5. NIBIO ヒト iPS 細胞資源化工程表：トークン、シード、分譲用アンプル作成

品質保証試験



図6. NIBIO ヒト iPS 細胞資源化工程表：分譲用アンプル解凍後検査工程

バージョン1

検査内容	サンプル提出タイミング
・Cross-contamination ⇒ STR(Finger print)	解凍時
・Alkprep培養上清→test 0.5へ	解凍後5-6週間目以降

バージョン2

検査内容	サンプル提出タイミング
------	-------------

Test 1

・生存率 ⇒ Trypan blue	解凍時
・Cross-contamination ⇒ STR(Finger print)	解凍時
・汚染検査 ⇒ 細菌・真菌・酵母・ウイルス	解凍後1-2週間

Test 2

・生存率 ⇒ Trypan blue	解凍時
・Cross-contamination ⇒ STR(Finger print)	解凍時
・汚染検査 ⇒ 細菌・真菌・酵母・ウイルス	解凍後1-2週間
・染色体	解凍後5-6週間以降
・未分化性⇒ PQRアレイ	解凍後5-6週間
・分化性⇒ EB 2wのみ	解凍後7-8週間以降
・QGHアレイ	解凍後5-6週間
・FACS	解凍後5-6週間
・免疫染色	解凍後5-6週間
・倍加速度 Tic < < H9	解凍後5-6週間以降

検査内容	検査方法
・生存率 ⇒ Trypan blue	解凍直心後1mL懸濁液にし、Trypan blue50 μ L中に懸濁液50 μ L分注。ヘモサイトメータにて検査
・Cross-contamination ⇒ STR(Finger print)	播種後、チューブに残った懸濁液をサンプリングに使用
・汚染検査 ⇒ 細菌・真菌・酵母・ウイルス	New med, used medを継代のタイミングでサンプリングし、検査。ウイルスは継代のタイミングでサンプリング
・染色体	数FISH
・未分化性	イニシヤチブのPQRアレイ
・分化性	EBを作成し、2週間培養後アレイ
・QGHアレイ	依頼方法確認の必要
・FACS	検討中
・免疫染色	SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-1-60, Oct3/4, Nanog
・倍加速度 Tic < < H9	6wellプレート2枚を用いてn=2測定。播種後2日目から7日目までコールタカカウンターで細胞数を計測する。その際、MEFを取り込まないようEDTAで剥離後行う。

図7. NIBIO ヒト iPS 細胞資源化における検査

Day		Executioner		Photo <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無	
Cell name <input type="checkbox"/> MEF(CF1) <input type="checkbox"/> MEF(B6) <input type="checkbox"/> MEF(ICR) <input type="checkbox"/> 2102Ep <input type="checkbox"/> KhES-1 <input type="checkbox"/> KhES-3 <input type="checkbox"/> H9 <input type="checkbox"/> HES3 <input type="checkbox"/> 201B7 <input type="checkbox"/> Tic <input checked="" type="checkbox"/> Souseaky <input type="checkbox"/> Toe <input type="checkbox"/> Dotoom <input type="checkbox"/> 201B2#2 <input type="checkbox"/> 201B2#4 <input type="checkbox"/> UTA1 <input type="checkbox"/> UTA1-SF2-2 <input type="checkbox"/> iPS(Foreskin) <input type="checkbox"/>					
Passage No. P → P 細胞の状態 <input type="checkbox"/> 良い <input type="checkbox"/> 適切 <input type="checkbox"/> 悪い <input type="checkbox"/>					
Medium <input type="checkbox"/> 京大 (Lot: KES) <input type="checkbox"/> 成育医療センター (Lot: Sip) <input type="checkbox"/> mTeSR (Lot:) <input type="checkbox"/> hESF8 (Lot: E8) <input type="checkbox"/> hESF-FX (Lot: FX) <input type="checkbox"/> DMEM+FBS (Lot: EC) <input type="checkbox"/> hESF6 (Lot: E6) <input type="checkbox"/> hESF-Dif (Lot: EDif) <input type="checkbox"/> EB用+2Me (Lot: EB(+)) <input type="checkbox"/> EB用+2Me (Lot: EB(-)) <input type="checkbox"/> Condition Med B (Lot: CMS) <input type="checkbox"/> Condition Med C (Lot: CMC) <input type="checkbox"/> Condition Med K (Lot: CMK) <input type="checkbox"/> (Lot:)					
準備				凍結用溶液 <input type="checkbox"/> 10% DMSO <input type="checkbox"/> mFraSR <input type="checkbox"/>	
細胞剥離				Variance ※ロックインヒビター使用の有無など	
<input type="checkbox"/> Dispass (Lot: D) <input type="checkbox"/> High Trypsin-EDTA (Lot: TE(H)) <input type="checkbox"/> CTX (Lot: CTX) <input type="checkbox"/> Low Trypsin-EDTA (Lot: TE(L)) <input type="checkbox"/> Media Trypsin-EDTA (Lot: TE(M)) <input type="checkbox"/> (Lot:) ※メカニカル <input type="checkbox"/> pick up <input type="checkbox"/> STEMPRO®EZPassage™ Tool <input type="checkbox"/>					
分散					
枚数: _____ 枚 洗浄 PBS _____ mL 回数: _____ 回 PBS必要量: _____ mL 細胞剥離 細胞剥離剤 _____ mL/枚(or well) 必要量: _____ mL 希釈濃度: _____ 希釈日: _____ 処理時間: _____ min at 37°C incubator 剥離剤の効き <input type="checkbox"/> 強い <input type="checkbox"/> 適切 <input type="checkbox"/> 弱い コメント: _____ 剥離剤吸引除去 wash用Medを加え wash _____ 回 wash用Med: _____ mL 必要量: _____ mL <input type="checkbox"/> ピペッティング <input type="checkbox"/> スクレーブ コメント: _____ チューブに回収後、遠心する。遠心速度: <input type="checkbox"/> 200 rpm <input type="checkbox"/> 300 rpm <input type="checkbox"/> 700 rpm <input type="checkbox"/> 1000 rpm <input type="checkbox"/> 1200 rpm <input type="checkbox"/> rpm 遠心時間: _____ min ※wash,遠心回数: <input type="checkbox"/> 1回 <input type="checkbox"/> 2回 <input type="checkbox"/> 3回 <input type="checkbox"/> 回 上清を除去する。				Variance	
目的					
Seed / Passage					
細胞懸濁液調製 継代前枚数: _____ 枚 継代後枚数: _____ 枚 seed密度: _____ 懸濁用培地: _____ mL/1 flask or well 必要量: _____ mL FGF-2濃度: <input type="checkbox"/> 4ng/mL <input type="checkbox"/> 5ng/mL <input type="checkbox"/> 10ng/mL FGF-2必要量: _____ μL ng/mL x _____ mL / 10ng/mL(stock) 上記Medから _____ mL取り、細胞ペレットに加え、軽くほぐす。 細胞懸濁液を元のMedに加え、懸濁し、細胞懸濁液を作製する。 細胞懸濁液を新しいフラスコ/プレートへ _____ mLずつ播種する。 incubate Incubator No. _____ CO2濃度 _____ % コメント: _____				Variance <input type="checkbox"/> Activin <input type="checkbox"/> PDGF <input type="checkbox"/> ()	
Freeze					
凍結枚数: _____ 枚 凍結密度: _____ 凍結本数: _____ vial (Lot: #) 1vialあたりの量: _____ uL/vial 凍結溶液必要量: _____ mL Med必要量: _____ mL (DMSO必要量: _____ mL) (DMSO終濃度: _____ %) FGF-2濃度: <input type="checkbox"/> 4ng/mL <input type="checkbox"/> 5ng/mL <input type="checkbox"/> 10ng/mL FGF-2必要量: _____ μL ng/mL x _____ mL / 10ng/mL(stock)				Variance <input type="checkbox"/> Activin <input type="checkbox"/> PDGF <input type="checkbox"/> ()	
凍結用Med					
凍結溶液を加えて、懸濁し、vialに文注する。 vialを4°Cに冷やしたバイセルに入れ、-80°Cへ入れる。) 15分以内で行う。 翌日、液体窒素タンクへ移動させる。					

図 8. NIBIO ヒト ES/iPS 細胞の培養記録表

細胞種	細胞株	JCRB細胞番号	樹立者/寄託機関/作製方法
EC	2102Ep.cl.2A6		Prof. Andrews, The University of Sheffield, UK
	NCR-G3	JCRB1168	
ES	H9	NSCB (USA)	Prof. Thomson, The University of Wisconsin-Madison
	khES-1 khES-3		Prof. Nakatsuji, Kyoto University, JAPAN
iPS	201B7 201B2 201B2 subclone		Prof. Yamanaka, CiRA, Kyoto University, JAPAN
	Tic Dotcom Squeaky Toe Lollipop	JCRB1331 JCRB1327 JCRB1329 JCRB1338 JCRB1336	Dr. Umezawa, et al., National Center for Child Health and Development, JAPAN. These cell lines are derived from human fetus lung cells (MRC-5), infected with recombinant retroviruses expressing the four factors (Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc).
	iDMC-03 iDMC-13		Dr. Kanemura, et al., Osaka National Hospital, National Hospital Organization, JAPAN. These cell lines are derived from human decidua-derived mesenchymal cells.
Neuroblastoma	NB(TU)1-10 SCCH-26 GOTO TGW	JCRB0154 JCRB0106 JCRB0612 JCRB0618	神経芽細胞腫
PNET	TASK1	JCRB0139	Primitive Neuroectodermal cell 原始神経外胚性腫瘍
MSC	UE7T-13	JCRB1154	Mesenchymal stem cells 間葉系幹細胞

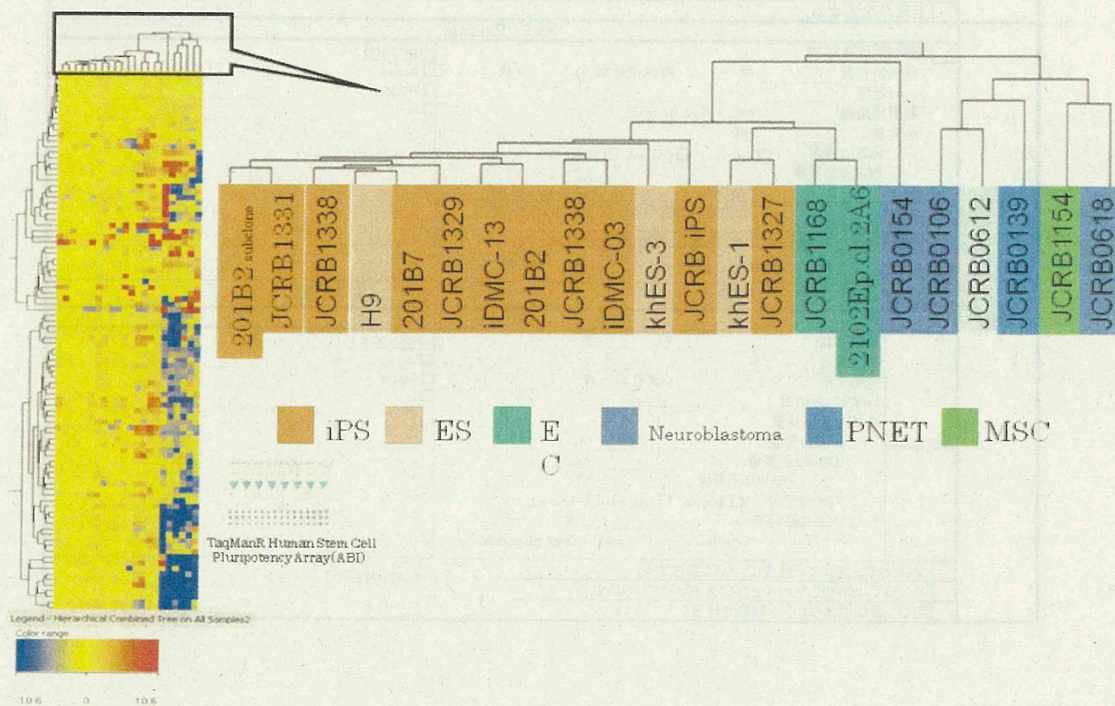


図9. 遺伝子プロフィール解析