

結果が大きく異なる事が起こる。幹細胞を資源としてあつかうバンク運営においては、このような研究所・研究者による違いを無くし、誰もが同じ結果が得られるような品質管理のための基準の策定が非常に重要となる[4]。

ヒトES/iPS細胞の未分化性維持の状態を日常的に管理する手法として一般的に使用される方法が2つある。一つは単純に顕微鏡を用いて形態を観察することで、もう一つは未分化マーカーを免疫蛍光染色してFACS（フローサイトメトリー）で陽性細胞の割合を算出する事である（図1）。

細胞の形態を位相差顕微鏡で観察することは、細胞の品質管理の上で非常に基礎的、かつ重要な方法である[4]。実際、顕微鏡下で細胞を観察しながら、未分化な形態をして

いる細胞のみを選別したり、分化により形態が変化した細胞を除去する事は日常的に行われている。ヒトES/iPS細胞は未分化性を維持するのに不適切な操作をすると、数日内に細胞が分化してその形態が変化する。そのため、細胞の形態を観察することによりその状態を日常的に把握することは非常に重要となる。固定操作などをせずに細胞を生きたまま、手軽に検査できるという利点がある。更に、熟練の培養技術者になると、様々な定量的試験では検知できないレベルの微妙な変化を見てとる事ができるようになる。一方、定性的で、技術者の経験や技能に大きく左右される点が欠点である。



図1：FACS解析と顕微鏡観察とI-FACS解析

SSEA4 抗体および抗 TRA-1-60 抗体) を 20 μ l 加えた。これらの一次抗体を加えた 15 ml チューブはアルミ箔で遮光し、4°C で一晩静置した。一次抗体を除去するため、チューブに PBS を 4ml 加え、600 \times g、3 分間遠心して上清を除いた。抗 SSEA1 抗体、抗 SSEA3 抗体、抗 SSEA4 抗体および抗 TRA-1-60 抗体を反応させたチューブには 10 mg/ml BSA-PBS で 1/250 に希釈した Alexa Fluor 488 標識二次抗体を 20 μ l 加えた。さらに、各チューブに Anti-Feeder PE 抗体を 4 μ l 加えた。抗体を加えた 15 ml チューブはアルミ箔で遮光し、4°C で 30 分間静置した。二次抗体を除去するため、チューブに PBS を 4ml 加え、600 \times g、3 分間遠心して上清を除いた。各チューブに 1 mg/ml BSA-PBS を 500 μ l 加えた。その後、JSAN セルソーター (ベイバイオサイエンス株式会社、Hyogo、Japan) を用いて、フローサイトメトリー解析を行った。

データ解析

FACS 解析データと I-FACS 解析データの比較をするため、バイオインフォマティクスの分野をはじめ、

数物系、工学などの幅広い分野で使われている統計解析用のオープンリソースのフリーソフトの R を使用した (<http://www.r-project.org/>)。

倫理面の配慮

ヒト iPS 細胞は、JCRB 細胞バンク (医薬基盤研究所) より所定の手続きを経て入手した。文部科学省からの通知 (平成 20 年 2 月 21 日付 19 文科振第 852 号) にある禁止事項 (着床前のヒト胚へのヒト iPS 細胞の導入、ヒト iPS 細胞から除核卵への核移植などにより個体を発生させる研究、ヒトへのヒト iPS 細胞の移植、ヒト iPS 細胞を導入した着床前の動物胚からの個体産生、生殖細胞の作製) は行わない。

全研究は、法令及び、長岡技術科学大学の内規を遵守し、所定の手続きと審査を経た上で、専用の実験室内で行う。更に、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、研究を推進した。

C. 研究結果

本研究では、様々な施設で培養している細胞の品質評価法を定める事が目的である。具体的には図 2 に示すよう、細胞を 10 cm 培養皿と 6 ウェルプレートに分け、10 cm 培養皿は FACS 解析機、6 ウェルプレートは固定・送付して I-FACS で解析する。こうすることにより、正しく解析が行えるかどうかテストし、作業手順を確立する。

固定ヒト iPS 細胞の送付

初めに、長岡技術科学大学(以下、培養施設)においてヒト iPS 細胞を培養し、それを医薬基盤研(以下、検査施設)で検査をするため、送付方法を検討した。

図 3 に示すよう、ヒト iPS 細胞を培養している 6 ウェルプレートを PBS+/+ で満たした。その上から空気が入らないように：1) プレートの蓋をする：2) パラフィルムで中蓋をし、その上からプレートの蓋をする、の 2 つの方法を試みた。その結果、1) 直接蓋をした場合は気泡が混入してしまったが、2) パラフィルムで中蓋として液面を覆ってから蓋をした場合は気泡が混入しなかった。こうしてパラフィルムの中

蓋を使用して密閉した培養容器を更にパラフィルムで包み、液が漏れないようにしてから宅配便(冷蔵)で送付した結果、培養容器内に空気が混入することが無く、細胞も剥がれることなく、培養施設(新潟県長岡市)から診断施設(大阪府茨木市)へと 10 回以上に送付に成功しており、失敗は 1 度も無かった。従って、パラフィルムを用いた細胞の送付法が適していることが分かった。

以上の実験に基づき、下記の様に固定・送付の操作手順を定めた。

ヒト iPS 細胞の固定・送付操作手順

- ① ヒト iPS 細胞を培養している 6 ウェルプレートから培地を除き、カルシウム、マグネシウム入りのリン酸緩衝溶液(PBS+/+)で 2 回洗浄
- ② PBS+/+ を除き、カルシウム、マグネシウム入りの 4% ホルマリン溶液を各ウェルに 500 μ l 加えて室温で 20 分間静置
- ③ 4% ホルマリン溶液を除き、再度 PBS+/+ で 2 回洗浄
- ④ ウェルを PBS+/+ で満たし、気泡が残らないように容器全体をパ

ラフィルムで覆い、その上からプレート
の蓋で押さえ、更に蓋をパ
ラフィルムで固定 (図 2)

⑤ 6 ウェルプレートは緩衝材で覆
い、ダンボールに詰めて梱包

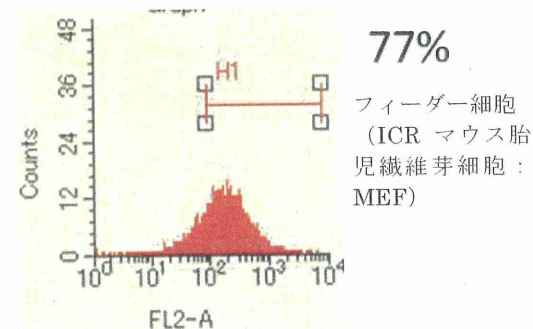
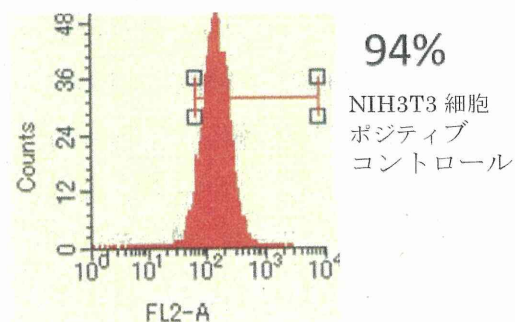
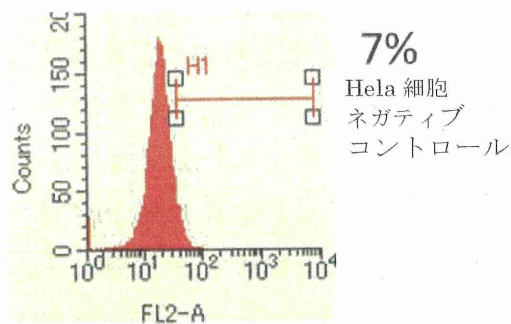
⑥ 宅配便を利用し、冷蔵 (4 度) で
送付

フィーダー細胞の除去

最初に検討したのは、ヒト ES/
iPS 細胞と共培養しているフィーダ
ー細胞の影響を取り除く事である。
一般的なヒト ES/iPS 細胞の培養に
於いて使用されるフィーダー細胞
は未分化マーカーを発現していな
いため、これが混入すると、未分化
細胞の陽性率が見かけ上低下する
という問題がある。

このフィーダーの混入問題を解
決するため、当初は散乱光を用いて
分離することを検討した。フィーダ
ー細胞とヒト iPS 細胞は大きさや
内部構造が違うため、前方散乱光
(FSC) や側方散乱光 (SSC) の値
が異なり、無染色で両者を区別でき
ると期待された。

固定しない生のヒト iPS 細胞と
フィーダー細胞を FACS 解析した
結果、FSC と SSC を基準に分離で



Anti-Feeder-PE

図 4: 抗 Feeder 細胞抗体のテスト。
ネガティブコントロールのヒト子宮頸
癌由来の細胞株の HeLa 細胞での陽性率
は 7%、ポジティブコントロールのマウ
ス繊維芽細胞株 NIH3T3 での陽性率は
94%、ヒト PS 細胞用のフィーダーと
して用いた ICR マウス胎児由来の繊維芽
細胞 MEF の陽性率は 77%。

きたが、固定細胞では分離が難しかった。更に、長岡技科大と医薬基盤研にある装置の違いから定量的な判断基準を設けることが困難である事が解った。以上の事から、FACSの散乱光 (FSC, SSC) を基準にフィーダー細胞を分離して解析することは断念した。そこで、最近販売されたマウス繊維芽細胞に特異的な抗原を認識する抗体、抗 Feeder 抗体を試してみた。その結果、高効率 (77%) でフィーダー細胞を区別することに成功した (図 4)。以上の結果より、フィーダー細胞とヒト PS 細胞の区別には、抗 Feeder 抗体は感度、使い良さ、定量性共に申し分ないことが明らかとなった。

FACS 解析と I-FACS 解析

ヒト PS 細胞の未分化性を FACS と I-FACS で検査するため、細胞表面糖タンパクの未分化マーカーとして広く使われている Stage specific Embryonic Antigen 3 (SSEA3)、SSEA4、Tra 1-60 の 3 種類の未分化マーカーを用いた。また、初期分化マーカーとして SSEA1 を用いた。培養施設では同じ細胞を 10cm 培養皿、6 ウェルプレートで培養し、10cm 培養皿の方は FACS 解析を行い、6 ウェルプレートは固定・透過

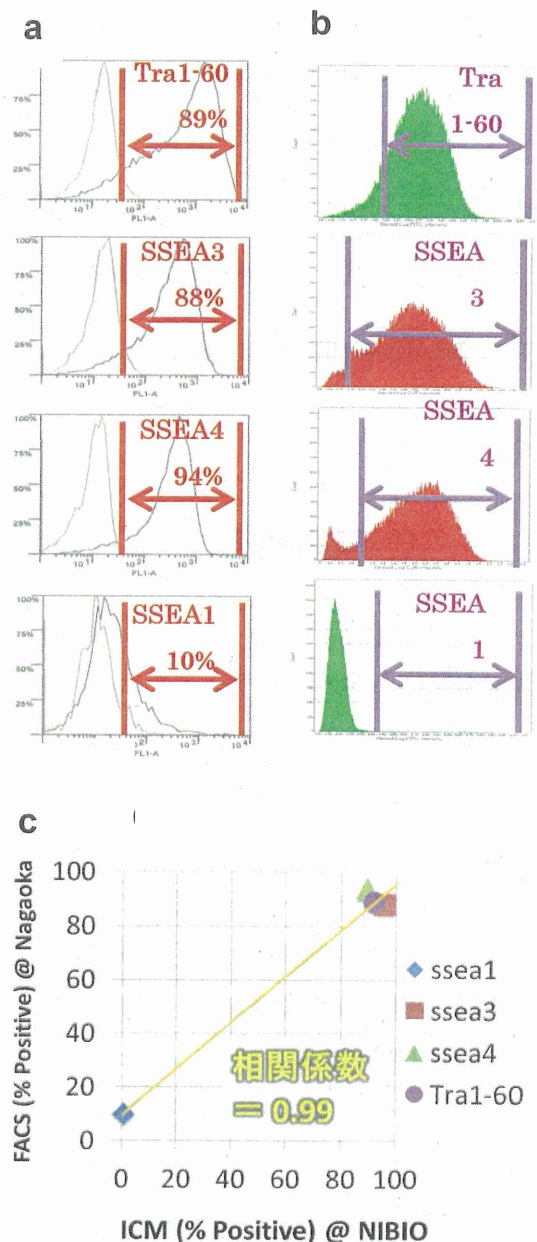


図 5: 培養施設 (長岡技術科学大学) での FACS 解析結果と、検査施設 (医薬基盤研) に於ける I-FACS 解析結果の比較。培養施設に於いて培養したヒト iPS 細胞を FACS 解析した結果 (a) と、その姉妹培養した細胞を固定して検査施設に送付して I-FACS で解析した結果 (b) と、両者の比較 (c)。

した後に診断施設に上記の方法で送付し I-FACS 解析を行った(図 5)。

培養施設に於いて行った FACS 解析の結果より、未分化マーカーの 3 種類が全て 88%以上陽性であったのに対し、初期分化マーカーの発現が 10%以下であったことから、適切に未分化維持ができていないこと示唆された。また、姉妹培養した 6well プレートを検査施設へと送り I-FACS を行った結果、FACS 解析と同様に、未分化マーカーが 89%以上陽性であったのに対し、初期分化マーカーの陽性率は 1%以下であった。

FACS 解析と I-FACS 解析の結果を比較するため、ピアソンの相関係数を算出したところ 0.99 となり、非常に強い相関がある事が明らかとなった。以上の結果より、異なる機関で培養・送付しても途中で細胞状態が変化せず、適切に診断が行われることが明らかとなった(図 5)。

D. 考察

本研究では、幹細胞バンクに於いて、様々な施設におけるヒト ES/iPS 細胞の状態を、統一的・定量的に検査・管理することを目標とし、細胞の送付方法、解析方法を確立する事

を行った。異なる施設で培養した細胞を送付し、FACS 解析と I-FACS 解析した比較したところ、非常に強い相関が得られたことから、作成したプロトコルが適切である事が示唆された。

細胞の送付方法

細胞を送付するには大きく分けて 4 つある。細胞を生きたまま送付する、接着したまま固定・透過などをしてから送付する、細胞を剥がして分散してから送付する、ライセート等を送付するである。本研究では、I-FACS を用いて細胞の形態も観察する事を主軸にしているため、後者の 2 つの様に細胞を回収すると形態が失われて解析ができなくなる。そこで、生きたままか、固定・透過してからかのどちらかになる。

当初は、生きたままの細胞を送ることも考慮した。細胞を受けとった医薬基盤研で生きたままの細胞の状態を顕微鏡観察し、統一的な方法で固定、染色し、診断できれば確実だ。しかし、ヒト ES/iPS 細胞は生きたまま他の施設へ送付することはレギュレーション違反である。また、送付が可能な細胞でも、発送や受け取りのタイミング、輸送途中の

温度管理、細胞の増殖状況などを考慮した場合、輸送途中で細胞の状況が大きく変化する可能性が高い。以上の理由から生きたまま送付する案は却下した。

そこで本研究では細胞培養施設で細胞が培養皿に接着した状態で固定して送付する手法を用いた。一般の宅配便業者を利用したり、特殊な設備を用いない等、どの施設でも使用できる事を念頭にプロトコルを策定した。特に、培養皿の中に気泡が混入すると、輸送途中で細胞を傷つけるため、これを抑える工夫を行った結果、パラフィルムを内蓋として活用することで解決できた。パラフィルムは生命系の研究をするほとんど全てのラボで使われているため、本プロトコルは非常に汎用性が高く、確実な方法である。

フィーダー細胞の除去

今回、細胞の状態を定量的に解析するため、フィーダー細胞の影響を取り除く事を検討した。一般的なヒト ES/iPS 細胞の培養に於いて使用されるフィーダー細胞が混入し、見かけ上、未分化細胞の陽性率が低下する。

最初は無染色の方法を試みた。フ

ィーダー細胞とヒト ES/iPS 細胞は大きさや内部構造が異なるため、前方散乱光 (FSC) や側方散乱光 (SSC) の値が異なり、無染色で両者を区別することは可能だ。しかし、生細胞では区別が難しかったこと、更には統一的な数値基準が策定し難いため、使用を断念した。

次に抗 Feeder 抗体を使用して染色し、FACS 解析したところ、十分な検出感度が得られる事が解った。この抗体は PE 標識されているので、青色の励起光を用いて赤色蛍光で観察することができるため、青色の励起光を用いて緑蛍光で観察する一般的な抗体染色で頻繁に使う色素と干渉しない点も良い。また顕微鏡観察にも使えるため、I-FACS での利用も可能である。以上のより、フィーダー細胞とヒト ES/iPS 細胞の区別には、抗 feeder 抗体は感度、使い良さ、定量性共に申し分ないことが明らかとなった。

FACS と I-FACS の比較

FACS と I-FACS 解析した結果、同じような傾向のデータが採れた。ただし、染色方法や操作の仕方や、閾値の選び方などにより解析結果は変わる。実際、今回の解析結果の個

別の解析値を見ると、FACS 解析と I-FACS 解析の間に 10%近い違いがある事が解る。しかし、複数のマーカーを用い、複合的に診断することにより、細かい違いがキャンセルされ、結果として両者の解析結果の間に、0.99 という非常に強い相関がある事が明らかとなった。以上の事から我々の作成したプロトコルが適切に働いていることが示唆される。

E. 結論

本研究では、異なる施設（長岡技術科学大学と医薬基盤研究所）間で細胞を送付し、更に一般に普及している FACS 解析と、これまでに本研究課題で代表者らが構築した I-FACS 解析との比較を行った結果、非常に高い相関が得られた。従って、遠隔地での細胞培養施設に於いて、一般的な試薬・設備・方法で細胞を固定・送付し、医薬基盤研でそれを解析することにより、細胞状態を的確に診断できる事が示された。今後は、このプロトコルを更に改良し、かつ多数の細胞株を用いて多面的に検証することにより、ヒト PS 細胞を少量の試料・低コストで測定できる品質管理法を策定する。

F. 参考文献

1. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
2. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
3. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
4. 古江-楠田, 美保., 日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化: その 2 分化能の評価. 組織培養研究, 2009. **28**(2/3/4): p. 129-133.
5. Hayashi, Y., et al., *Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or Cultured under Feeder- and*

*Serum-Free Defined
Conditions.* PLoS One, 2010.
5(11): p. e14099.

6. Suemori, H., et al., *Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(3): p. 926-32.
7. Fukawatase, Y., et al. *Characterization of newly established induced pluripotent stem cells from human embryonal lung fibroblast, MRC-5.* in *Ann. Meeting. of the Biochemistry (81st) and Molecular biology (31st).* 2008. Japan.
8. Watanabe, K., et al., *A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells.* Nat Biotechnol, 2007. **25**(6): p. 681-6.

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 大沼清、藤木彩加、小池怜、林洋平、伊藤弓弦、小沼泰子、セン徳川、道上達男、古江-楠田美保、浅島誠、“ヒト ES・iPS 細胞の無酵素培養” 日本再生医療学会 2013 年 横浜 O-55-3 口演「ES/iPS 培養法 2」
- 2) Ryosuke Yoshimitsu, Koji Hattori, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, Kiyoshi Ohnuma, Serum- and feeder-free culture condition for human iPS cells on microchamber array chip, Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay (The university of tokyo, Tokyo) Dec 10, 2012, Poster
- 3) Ryotaro Yamada, Koji Hattori, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, Kiyoshi Ohnuma, Patterning for human iPS cells by adsorption mixture of proteins on plasma-patterned PDMS surface, Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay (The

university of tokyo, Tokyo) Dec 10, 2012, Poster

4) Shougo Nakamura, Atushi Maruyama, Yuichi Wakamoto, Shin-ichi Sakai, Bayar Hexig, Toshihiro Akaike, Kiyoshi Ohnuma, Perfusion device to observe of single ES cells, Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay (The university of tokyo, Tokyo) Dec 10, 2012, Poster

5) Atsushi Maruyama, Yuichi Wakamoto, Shogo Nakamura, Tatsuo Michiue, Shin-ichi Sakai, Bayar Hexig, Toshihiro Akaike, Kiyoshi Ohnuma, Single-cell-based analysis of differentiation of mouse ES cells (マウス ES 細胞分化の単 1 細胞解析), 第 50 回 日本物理学会年会 (名古屋大学、愛知県)、2012 年 9 月 22 日、口頭発表

6) Ryosuke Yoshimitsu, Koji Hattori, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, Kiyoshi Ohnuma, ECMcoating on polydimethylsiloxane for hiPSCs

culture (hiPSCs 細胞培養のための polydimethylsiloxane への細胞外基質コート)、第 50 回 日本物理学会年会 (名古屋大学、愛知県)、2012 年 9 月 22 日、ポスター

7) Ryotaro Yamada, Koji Hattori, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, Kiyoshi Ohnuma, Patterning for human iPS cells by adsorption mixture of proteins on PDMS surface (PDMS 基盤表面上でのタンパク質混合物の吸着による hiPS 細胞のパターニング)、第 50 回 日本物理学会年会 (名古屋大学、愛知県)、2012 年 9 月 22 日、ポスター

8) Shougo Nakamura, Atushi Maruyama, Yuichi Wakamoto, Shin-ichi Sakai, Bayar Hexig, Toshihiro Akaike, Kiyoshi Ohnuma, Perfusion device to observe of single ES cells、第 50 回 日本物理学会年会 (名古屋大学、愛知県)、2012 年 9 月 22 日、ポスター

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
柳原佳奈、古江-楠田美保	第二章 2の6 幹細胞技術：標準化に向けて	一般財団法人日本規格協会	幹細胞技術の標準化—再生医療への期待	一般財団法人日本規格協会	日本	2012	143-154

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kinehara M, et al.	Protain Kinase C Regulates Human Pluripotent Stem Cell Self-Renewal.	PloS One	8	1-13	2013
Shofuda T, et al.	Human Decidua-Derived Mesenchymal Cells are a Promising Source for the Generation and Cell Banking of Human Induced Pluripotent Stem Cells.	Cell Medicine.		DOI: http://dx.doi.org/10.3727/215517911X658918	2012
Kawabe K, et al.	A novel antibody for human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells recognizes a type of keratan sulfate lacking oversulfated structures.	Glycobiology.	3	322-36	2013
Takayama K, et al.	3D Spheroid Culture of hESC/hPSC-derived Hepatocyte-like Cells for Drug Toxicity Testing.	Biomaterials.	2013 Feb;34(7)	1781-9	2013
Takayama K, et al.	Generation of Metabolically Functioning Hepatocytes from Human Pluripotent Stem Cells by FOXA2 and HNF1 α Transduction.	J. Hepatol.	57	628-636	2012
Nagamoto Y, et al.	The Promotion of Hepatic Maturation of Human Pluripotent Stem Cells in 3D Co-culture using Type I Collagen and Swiss 3T3 Cell Sheets.	Biomaterials.	33	4526-4534	2012
Takayama K, et al.	Efficient Generation of Functional Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells by HNF4 α Transduction.	Mol. Ther.	20	127-137	2012

VI. 研究成果の刊行物・別刷

2.6 幹細胞の実用化のための培養技術の標準化における課題

2.6.1 培養技術の標準化の必要性

2.6.1.1 はじめに

胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞などの多能性幹細胞は細胞治療へ応用が期待されている。一方、分化細胞を原材料とする製剤やワクチン作成、薬効・毒性評価などスクリーニングツールとしての利用など創薬分野にも広く期待されている。実用化には、細胞の品質を確保し、安定的に大量供給できることが重要である。ヒト ES/iPS 細胞株は株間により細胞特性が異なり¹⁾、細胞そのものを標準化するのは難しい。一方、培地や足場材料などの培養環境や培養記録を整備することでヒト ES/iPS 細胞培養技術を標準化し、安定的に細胞を供給することは可能だろう。本節では、ヒト ES/iPS 細胞の実用化に向けた培養技術の標準化と体制作りについて概説する。

2.6.1.2 培養技術の標準化の必要性

ヒト ES/iPS 細胞は株間の差も大きいですが、癌細胞や体細胞などと比べて、デリケートで高品質を維持することは大変難しいため、培養技術の差による品質の違いも大きい^{2),3)}。ISCI (International Stem Cell Initiative) プロジェクトでは、日本を含めた世界 11 か国の研究者らが共同でヒト ES 細胞株の特徴を比較し、ヒト ES 細胞研究の標準化が進められている¹⁾。2011 年には、19 か国 38 研究室からヒト ES 細胞 125 株とヒト iPS 細胞 11 株を集めて比較分析を実施し、ゲノムの変化などについての発表がなされた⁴⁾。これまでもヒト ES 細胞^{5),6)}、およびヒト iPS 細胞^{7),8)} のゲノム不安定性が報告されている。倍加速度が速い異常クローンが出現した場合、5 継代でほとんどの細胞集団が入れ替わる可能性が予測されており、比較的小さな (25 cm² 前後まで) 培養器で培養することが望ましいとされている⁹⁾。筆者らも、京都大学や独立

行政法人国立成育医療研究センターなどと連携を持ち、各種ヒト ES/iPS 細胞株の比較解析を行っている。ヒト ES/iPS 細胞の品質は培地やフィーダー細胞のロット、継代や培地交換のタイミングによっても簡単に変化する¹⁰⁾。培養技術の標準化が実用化に向けて重要である。

2.6.2 培養液

2.6.2.1 培養液の問題点

ヒト ES/iPS 細胞は、一般的に不活性化したマウス胎児組織由来線維芽細胞をフィーダー細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast, MEF) として使用し、ウシ血清、あるいは代替血清 (KnockoutTM-Serum Replacement, KSR) と線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2)¹¹⁾ を添加した培地を用いて培養されている。フィーダー細胞と KSR を用いた培養法は多くのヒト ES/iPS 細胞株において安定した培養が可能であるが、KSR は組成が公開されておらず、動物由来成分を含むためロット差がある。さらに、培養維持した細胞には動物由来成分であるシアル酸・N-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc) が確認される¹²⁾。病原体をできるだけ排除し、安定した品質を得るためには、未知の成分を含まず、精製された成分からなる無血清培養が望ましい。近年、ヒト幹細胞における培養液の重要性がようやく理解され、し烈な無血清培地開発競争が生じている。

2.6.2.2 defined medium

(1) 無血清培養とは

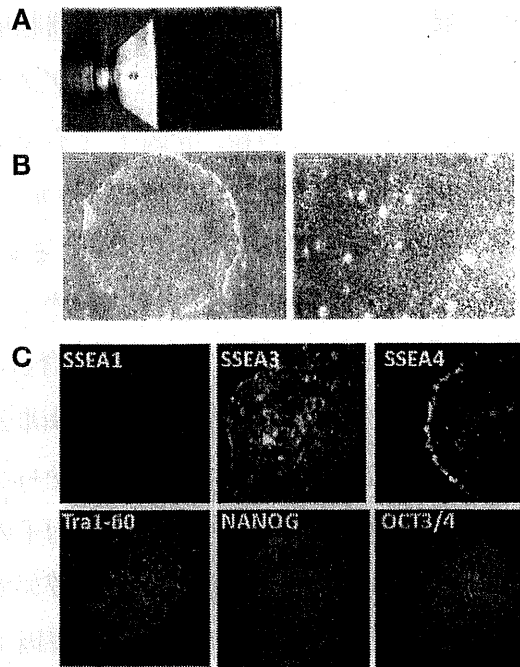
無血清培養とは、既知の成分よりなる培地を用いた chemically defined serum-free culture¹³⁾ であり、単に血清を除いた基礎培地のみによる培養ではない。血清には細胞増殖因子、分化促進因子、接着因子やホルモンだけでなく、未知の因子やプリオンやウイルスなどの病原体を含んでいる可能性がある。1975年に、ゴードン・H・サトウ (Gordon H. Sato) 博士^{14), 15)} が血清の役割とは、それに含まれるホルモン、増殖因子、接着因子などが細胞の増殖を促進することであり、これらの因子を基礎培地に加えることにより血清を

代替できることを提言した。1979年に、神経細胞培養用としてN2サプリメント（インシュリン、トランスフェリン、プロゲステロン、セレンウム、プトレッシン）¹⁶⁾が開発された。その後、5因子（インシュリン、トランスフェリン、エタノールアミン、2-メルカプトエタノール、セレン酸）あるいは6因子（5因子+オレイン酸）に改良された^{17),18)}。その結果、神経細胞だけでなく様々な細胞の無血清培養が可能となった^{19)~24)}。一方、1993年にプライス（P.J. Price）博士らによって、インシュリンを含む20因子から構成されているB27サプリメント²⁵⁾が開発されたが、濃度は非公開である。昨今、市販培地の組成が非公開の場合が多いが、既知の組成からなる培地に既知の因子を添加することにより、細胞の増殖や分化に必要な因子の要求性を正確に解析することが可能となるのであり、組成公開が必要不可欠である。

無血清培養においては、その細胞に必要な接着因子を添加する必要がある。また、栄養因子が最少必要量であるため、確実な培地交換が必要である。微量の毒性物質などへの感受性も高いため、精製度の高い試薬を必要とする。継代によるダメージも大きい。そのため無血清培養には様々なノウハウが必要である。

(2) ヒト ES/iPS 細胞用無血清培地

市販品を含めて20例近く報告されているが、既知の組成からなる培地は3グループからの報告のみである。トムソン（James A. Thomson）博士らのグループにより開発されたmTeSRTM 1²⁶⁾、TeSRTM 2と新たに2011年に開発されたE8培地²⁷⁾、また、StemPro[®]、筆者らが開発したhESF9培地^{28),29)}、さらに動物由来成分不含培地に改良したhESF-FX（図2.6.1）である。筆者らのhESFシリーズは、必要最低限な組成からなるため、添加因子の影響が高感度に解析でき、分化因子にも従順なため分化誘導にも使用できる。しかし、これらの培地を用いても、現状ではすべての細胞株を誰でもが簡単に培養できるわけではない。その主な原因は、ヒトES/iPS細胞の未分化維持や分化におけるメカニズムが十分に解明されていないことによる。FGF-2だけでな



A: 継代4代目のアルカリフォスファターゼ染色
 B: 継代20代目のコロニー形態(左)と強拡大(右)
 C: 未分化マーカー抗体を用いた免疫染色像

図 2.6.1 動物由来成分不含 hESF-FX 培地による
 ヒト iPS 細胞(JCRB 1331, Tic)の培養

く、トランスフォーミング増殖因子- β (Transforming Growth Factor- β , TGF- β) ファミリーや Wnt, インシュリン増殖因子などの様々な因子が関与していることが明らかとなっているが、これらのリガンドによる細胞内シグナルがすべて未分化維持に関与しているのではなく、分化にも関与し、相互に影響を与えているためメカニズム解明を難しくしている^{28), 30)~35)}。ISCI プロジェクトにおいて、5施設が8条件の培養条件を検討した。開発者は培養可能であるにもかかわらず、2条件のみが培養可能であった (Consortium, 2010 #4387)。それでもすべての株ではなかった。その培地・株ごとのノウハウの蓄積が必要だと考えられる。現状では培養維持には、mTeSRTM 1 が広く使用されている。一方、添加因子などの解析や分化誘導には hESF9 が向いている。ヒト幹細胞培養の標準化は、培養条件を一つに決めるのではなく、その目

的にあった、ロット差のない培地を適正に使用することが必要である。

2.6.3 足場材料

2.6.3.1 足場材料の問題点

未分化状態を保持するための足場として、一般的にはMEFやマトリジェルが使われている。マトリジェルはマウス肉腫由来で様々なマトリックス、増殖因子や未知の因子が含まれており、効能確認をロットごとに行う必要がある。安定した培養を行うという観点からできるだけ精製された因子を使用するのが望ましい。しかし、培地との組合せにより細胞内シグナルへ影響を与えることが予測され、それに合わせて分散法も考慮する必要がある。

2.6.3.2 非哺乳動物由来因子

医療・創薬応用に向けて、培養から人畜共通感染症の危険性を取り除く必要がある。哺乳類由来因子は極力使用せず、その代替因子の使用が望ましい。近年、リコンビナントタンパク質の開発も進んでいるが、一方、海洋系因子などが培養細胞に有効であることが徐々に見出されてきている。マリンスキャフォールド上ではヒト骨膜細胞シートや初代骨芽細胞は骨活性が向上することや、テラピアのウロコを用いた培養基材では角膜細胞の増殖が促進するなどが報告されている^{36),37)}。また、筆者らはクラゲ由来コラーゲンが間葉系幹細胞に対して有効であることを見出している³⁸⁾。現在、このクラゲ由来コラーゲンをヒトES/iPS細胞の培養技術へ応用を試みている。

2.6.4 継代法

ヒトES/iPS細胞の培養において継代がもっとも難しいと言われる。品質管理の上では継代時に単一細胞へ分散させて正確な細胞数を把握することが望ましい。しかし、ほとんどの細胞が単一では生存できない。ROCKインヒビターを使用すれば生存できるが³⁹⁾、継続的な使用により異常クローンの増殖を促進する可能性も否定できない。米英では安定性を選択し、機械的、あるいは

はエチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) やコラゲナーゼなどによりコロニーを 50~100 個ぐらいの細胞集団にして継代が行われている^{39), 40)}。操作者による差も大きく、改良がもっとも必要な事項であると考えられる。

2.6.5 品質検証

2.6.5.1 培養記録

ヒト ES/iPS 細胞の培養技術を標準化するためには、忠実に培養操作を記録することが重要である。経験的な事例であるが、品質に問題が出た場合 3 代継代後に影響が出ることが多い。詳細に記録された培養記録から、品質低下に与えた影響を同定できることも多い。筆者らはこれらの点を踏まえた培養記録用紙を作成した (表 2.6.1)¹⁰⁾。現在、他の研究室などに記録用紙の試用をお願いしている。共通の記録用紙を使用することで、培養技術に関して共通のプラットフォームで意見交換することができ、培養技術の標準化につながると期待される。

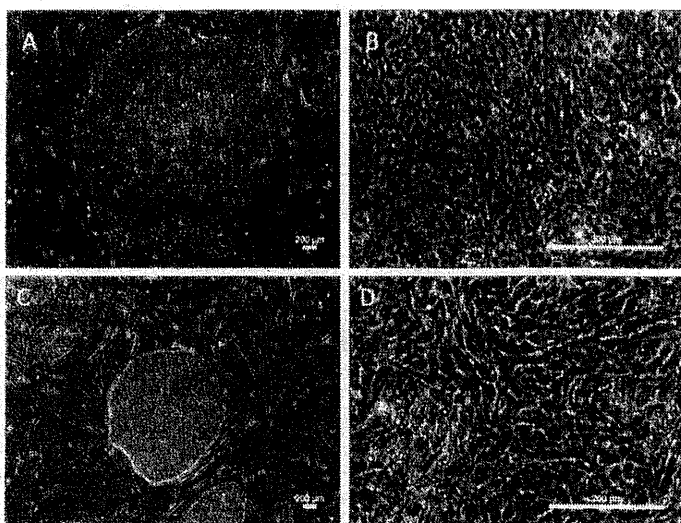
(1) 位相差顕微鏡像

現在までに多能性の根拠となる絶対的なマーカーは発見されておらず、いくつかの解析方法を用いて未分化性や多能性を同定する必要がある。その中で、形態は重要な評価基準の一つである⁴⁰⁾。未分化な ES/iPS 細胞は、細胞質がほとんどなく、丸い核を持った細胞がコンパクトに集合したコロニーを形成し、細胞間境が明瞭でない特徴的な様相を呈する。遺伝子解析などを行っていなくても、細胞の写真により異常を予測できる場合もある。コロニーの形態がわかるように弱拡大と、細胞質や核の状態がわかるように強拡大の画像を取得しておくことが重要である (図 2.6.2)。

表 2.6.1 培養記録用紙

[Tiss.Cult.Res Commun. 30:145-157 (2011) 図1より転載]

細胞継代 作業チェックシート												
日時		Executioner :						プロジェクト名:				
細胞名	MMT-MEF	GF-1	B6	IGR	SNL					EC(2102EP)	NTERA2	
	HESC	KHES-1	KHES-3	H1	H9	HES3	HES4					
	hiPSC	201B7	201B2									
	Tic	Squeaky	Dotcom	Toe	Lollipop	UTA-1	UTASF2-2	IPS(Foreskin)-1				
Passage No	P-()	前回継代日	月 日	今回の継代日は	予定通り	予定より早い	予定より遅い					
細胞の状態	未分化コロニーがほとんど	分化した細胞がやや多い	分化した細胞が多い	熟していないコロニーが多い	よくわからぬコロニーが変	コンフルエント	サブコンフルエント	細胞が予定より少ない	細胞がほとんど死んでいる	分化したコロニーが少しだけ		
写真機器	なし	x40 ()	x100 ()	x200 ()	ファイル格納場所							
medium	遠心機		37°C 湯浴		CO2インキュベーター							
	京大培地	Lot: Kse		EB (-2M)	Lot: EB(-)	mTeSR	Lot:					Variance
	成育培地	Lot: Slp		EB+2ME	Lot: EB(+)	DMEM+FBS	Lot: EG					
	HESF8	Lot: EB		Condition Med	Lot: GMO	FGF-2	Lot:					
	HESF6	Lot: EB		Condition Med	Lot: CMB	activin	Lot:					
	HESF-FX	Lot: FX		Condition Med	Lot: CMI	PDGF	Lot:					
HESF-Diff	Lot: Edif		PBS	Lot:	ROCK inhibitor	Lot:						
必要量	培地	ml	37°C 湯浴	分								
用事添加因子	FGF-2	10ng/ul	x()microL	最終濃度	ng/ml			x()microL	最終濃度	g/ml		
	Activin A	10ng/ml	x()microL	最終濃度	ng/ml			x()microL	最終濃度	g/ml		
	PDGF	10ng/ml	x()microL	最終濃度	ng/ml			x()microL	最終濃度	g/ml		
	Rock inhibitor		x()microL	最終濃度	ng/ml			x()microL	最終濃度	g/ml		
分散液	Dispase	Lot: D		CTK	Lot: CTK							Variance
	High Trypsin/EDTA	Lot: TE(H)		アキュターゼ	Lot:							
	Low Trypsin/EDTA	Lot: TE(L)										
	Media Trypsin/EDTA	Lot: TE(M)										
	STEMPRO®EZPassage™ Tool											
	ピックアップ											
必要量		ml										
分散枚数	25cm フラスコ	75cm フラスコ	60mm Dish	90mm Dish								Variance
	6well plate	12well plate	24well plate									
洗浄/培地交換	1回目PBS	ml/each	1回目培地	ml/each								Variance
	2回目PBS	ml/each	2回目培地	ml/each								
剥離液処理		ml/each										Variance
処理時間	室温	~1分	~2分	~7分	~10分							
	37°C	~1分	~2分	~7分	~10分							
処理後の様相	コロニーの周囲のみがカール	コロニーが半分程度剥がれた	コロニーがほとんど浮き上がった	ほとんど変化ない								
分散	剥離剤吸引除去		x()									
	Wash with Medium		ml/each	x()								
	Wash with PBS		ml/each	x()								
	pipetting		x()			酵素液で変化がなかったためスクレーパーした X()						
	scraper		x()									
回収	チューブに回収	直接次の培養器に播種										Variance
遠心速度	200rpm (10G)	300rpm (20G)	700rpm (90G)	1000rpm (190G)	1200rpm (270G)							
遠心時間	1min	2min	3min	5min								
調製	上清を除去											
	Wash培地添加		ml/each	pipetting	x()							
	繰り返し	x()										
細胞数計測	細胞浮遊液	ml	pipetting	x()								Variance
	ヘモサイトメーター	()micro	mix with trypanblue	()microL	()cells/ml							
	コールターカウンター	()mL		()cells/ml								
	GEカウンター	()microL		()cells/ml								
容器と枚数	細胞浮遊液	ml/each	※分散密度									
	25cm フラスコ	x()	75cm フラスコ	x()	60mm Dish	x()	90mm Dish	x()				x()
	6well plate	x()	12well plate	x()	24well plate	x()						x()
インキュベーター	No. :											
				CO2濃度 :	%							



- A: ヒト ES 細胞 KhES-1 (京都大学再生医科学研究所より分配) の未分化性の良い状態の弱拡大写真
 B: A の強拡大写真
 C: A の培養時とは異なるロットのフィーダー細胞を用いて未分化性があまり高くない状態の弱拡大写真
 D: C の強拡大写真

図 2.6.2 ヒト ES 細胞の位相差顕微鏡像¹⁰⁾

[*Tiss. Cult. Res. Commun.* 30:145-157 (2011), p.147 図 2 より転載]¹⁰⁾

2.6.6 実用化に向けた体制作り

移植あるいは細胞製剤用ヒト ES/iPS 細胞の培養には、医薬品 Good Manufacturing Practice (GMP) レベルが求められると言われる。しかし、細胞を完全に滅菌することは不可能であり、医薬品と同じ品質管理を行うことは不可能であることから、新しい考え方による基準作りが求められている。基準がなければ、管理されてない細胞が民間で利用されレシピエントの生命を危うくする可能性もある。未知の分野であり、どう管理をするべきなのか予測できないジレンマがある。少なくとも培養液や培養工程は明らかにして、多くの研究者により多角的に検討されるべきであると考え。様々な問題を克服して高品質の細胞を安定して供給するためには、細胞培養を技術としてだけでなく、体系的な細胞培養学として確立していく必要があるのではないだろうか。