

**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**

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

研究代表者 古江-楠田 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。実際に実用化を目指して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バンクにおけるデータベースの基盤設計、幹細胞としての品質管理に必要な技術の策定など、ヒト幹細胞バンク運営の基盤システムの基礎設計について研究を行った。

協力研究者

菅 - 岸本 三佳： 難病・疾患資源
研究部 ヒト幹細胞応用開発室
特任研究員

大沼清：長岡技術科学大学 生物機能
工学専攻 准教授

分担研究者

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

A. 研究目的

これまで培養細胞を産業利用する際においては、細菌などの微生物の利用と同様に、樹立機関から提供された資源をストックするプレマスターバンク、さらに種としてのマスターバンク、実際に使用するワーキングバンクを作成して使用することが望ましい

とされ、培養細胞が資源化されてきた。しかし、ヒト胚性幹（ES）細胞や人工多能性幹（iPS）細胞などの多能性幹細胞を実用化する上においては、従来の細胞とは異なり、培養過程において形質が変化しやすく、実用化を目指してバンク設置と運営を円滑に行うためには、これら細胞の特性検査などを含めた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。そこで、実用に資するヒト幹細胞バンクに必要なデータベースの基盤設計、品質管理に必要な基盤技術の策定を行い、実用ヒト幹細胞バンクの基盤システムを設計について研究することを目的とする。

ヒト ES/iPS 細胞などヒト幹細胞を再生医療のソース、ワクチン作製や生物製剤原料、創薬研究ツールとして実用化するために、プレマスターバンク、統合的に管理するマスターバンク、実用のためのワーキングセルバンクの設置が望まれ、共用の基盤システムを構築しておく必要がある。一般細胞のバンクは独立行政法人 医薬基盤研究所の生物資源として JCRB 細胞バンクが設置されており、微生物検査、ウィルス検査、細胞同定検査（CGH アレイ検査）など基本的な検査項目についての作業工程は策定されている。また、臨床用細胞プロセッシングの作業工程については、医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理規則に準じた工程が臨床研究を行っている各機関にて策定されている。しかし、ヒト多能性幹細胞は従来の細胞とは異なる

る形質をもつため、ヒト幹細胞特有の品質管理が必要となる。また、一番の問題点は、ヒト多能性幹細胞はゲノムが不安定であり（文献 1、2）長期に継代を行う事よりゲノムが変異してしまう可能性があることが報告されている。そのため、ヒト多能性幹細胞を治療に用いるためには、できるだけ短時間で資源化を行った細胞を使うべきであるとの見解がでていいる。海外では、国際幹細胞バンキングイニシャティブ（ISCT）が臨床用ヒト幹細胞バンクのためのガイドラインを作成中である（文献 4、5）。国内事情を鑑みたヒト幹細胞バンクの基盤設計が急務である。

具体的には、下記の 3 つの観点から研究を推進する。

効率的な品質管理を行うための基盤技術の策定

細胞登録システムの基礎設計案の作成

臨床応用などに資するヒト幹細胞の品質維持技術の策定

遺伝子発現の解析の方法については、水口が分担し、また、細胞品質評価のうち、表面抗原プロフィール解析については、大沼が分担した。

B. 研究方法

1. 未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性解析

(i) 遺伝子解析

未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性を明らかにするため、遺伝子発現プロフィール解析を行った。その検査方法については、H23 年度に策定を行った国際幹細胞イニシヤティブ (ISCI) にて用いられた Stem Cell PCR アレイを用いた方法を用いて行った。

これまで、厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell Bank) に登録されたヒト iPS 細胞 JCRB1331 Tic、JCRB1327 Dotocom、JCRB1437 iPS-TIG-114-4f1、コントロールとして京都大学 iPS 細胞研究所より供与されたヒト iPS 細胞 201B7、京都大学ヒト ES 細胞 KhES-1(京都大学より分与)、ウィスコンシン大学ヒト ES 細胞 H9(Wicell

Bank より分譲)を検査対象としてきた。国際幹細胞イニシヤティブによる解析にも用いられた Pluripotency 遺伝子 PCR アレイを用いて解析し、データの蓄積を行ってきた。

今年度には、3 株のヒト iPS 細胞株 ; JCRB1341 iPS-TIG120-3f7、JCRB1363 iPS-TIG120-4f1 及び NIHS0693 UTA-SF2-2 (以上 JCRB Cell Bank) 2 株のヒト ES 細胞株 ; KhES-4 及び KhES-5 (京都大学より分与)を追加し、同様の手法で遺伝子発現プロフィール解析を行い、昨年度までに蓄積したデータと合わせて、遺伝子発現プロフィールの細胞株間の相違や個々の細胞株の特性を示す遺伝子等について検討した。

細胞番号	細胞名	樹立者	寄託機関	性状	ドナー情報	作成方法	使用培地	分譲条件	分譲受付開始
NIHS0693	UTA-SF2-2	浅島誠	東京大学	ヒトES細胞様	46才, 女性, 皮膚線維芽細胞	Human OCT3/4、Human SOX2、Human KLF4、Human c-MYCをVSV-Gレトロウイルスベクターを用いて導入後、ヒトES細胞様コロニーを無フィーダー培養したもの	hESF9a	国内の大学・公的研究機関・企業	分譲準備中

【遺伝子プロフィール解析を行った厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell Bank) に登録されたヒト iPS 細胞 NIHS0693 UTA-SF2-2 の細胞情報】

http://cellbank.nibio.go.jp/cellinfo/ips/u-tokyo_ipslist/

【遺伝子プロファイル解析を行った厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell Bank) に登録されたヒト iPS 細胞 JCRB1341 iPS-TIG120-4f3 の細胞情報】

http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search_res_det.cgi?RNO=JCRB1341

細胞番号(JCRB)	JCRB1341	細胞名	iPS-TIG120-3f7
生物種(日本語)	ヒト	組織名(日本語)	ヒトiPS
コメント(日本語)	ヒトiPS細胞, TIG120由来	プロフィール	Human iPS cell line which was generated from adult human skin fibroblast cell line (JCRB0542: TIG-120).
別名		動物名	human
系統名		学名・属名	Homo
種名	sapiens	性別	F
年齢・月齢	6	細胞識別情報	available
(癌) 原発組織名		病歴情報	
転移の有無 (Y/N)	No	(癌) 転移組織名	
遺伝的性質	Transgene: Human OCT3/4, SOX2, and KLF4 (in pMXs retroviral vectors)	細胞寿命	infinite
クライスPDL		形態	human ES-like
一般性状		細胞分類	transformed
細胞樹立者名	Yamanaka, S.	細胞寄託者	Yamanaka, S.
分譲時制限	1) Academic research purpose only. 2) Conclude a MTA with Kyoto Univ..	コメント	
入手年	2009	培養培地	Primate ES cells medium (ReproCELL) supplemented 4 ng/mL bFGF.
継代方法	Cells are treated with the solution consisted by 0.25% Trypsin, 0.1 mg/mL collagenase IV, 1mM CaCl ₂ , and 20% KSR.	継代時細胞数	
人種		炭酸ガス濃度	5%
登録状況	registered	採取組織名	skin
ウイルス検査	tested	検出ウイルス	GAPDH(+), CMV(-), EBV(-), HHV6(-), HHV7(-), BKV(-), JCV(-), ADV(-), HBV(-), parvoB19(-), HTLV1(-), HTLV2(-), HIV1(-), HIV2(-), HPV18(-)[- /negative, + /positive, nt /not tested, GAPDH is positive control]
組織型			

【遺伝子プロフィール解析を行った厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell Bank) に登録されたヒト iPS 細胞 JCRB1363 iPS-TIG120-4f1 の細胞情報】

http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search_res_det.cgi?RNO=JCRB1363

細胞番号(JCRB)	JCRB1363	細胞名	iPS-TIG120-4f1
生物種(日本語)	ヒト	組織名(日本語)	ヒトiPS
コメント(日本語)	ヒトiPS細胞, TIG120由来	プロフィール	Human iPS cell line which was generated from adult human skin fibroblast cell line (JCRB0542: TIG-120).
別名		動物名	human
系統名		学名・属名	Homo
種名	sapiens	性別	F
年齢・月齢	6	細胞識別情報	available
(癌) 原発組織名		病歴情報	
転移の有無 (Y/N)	No	(癌) 転移組織名	
遺伝的性質	Transgene: Human OCT3/4, SOX2, KLF4, and c-MYC (in pMXs retroviral vectors).	細胞寿命	infinite
カインPDL		形態	human ES-like
一般性状		細胞分類	transformed
細胞樹立者名	Yamanaka, S.	細胞寄託者	Yamanaka, S.
分譲時制限	1) Academic research purpose only. 2) Conclude a MTA with Kyoto Univ..	コメント	
入手年	2009	培養培地	Primate ES cells medium (ReproCELL) supplemented 4 ng/mL bFGF.
継代方法	Cells are treated with the solution consisted by 0.25% Trypsin, 0.1 mg/mL collagenase IV, 1mM CaCl ₂ , and 20% KSR.	継代時細胞数	
人種		炭酸ガス濃度	5%
登録状況	registered	採取組織名	skin
ウイルス検査	tested	検出ウイルス	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), HHV7(-), BKV(-), JCV(-), ADV(-), parvoB19(-), HBV(-), HTLV1(-), HTLV2(-), HIV1(-), HIV2(-), HPV18(-) [-/negative, +/positive, nt/not tested]
組織型			

アレイに含まれる遺伝子のリストは表 1 に示した。

アレイ名	Stem cell PCR array (幹細胞の同定、分化、増殖に関する 84 遺伝子の発現プロファイルを解析する)
アレイ遺伝子	BRIX, CD9, COMMD3, CRABP2, EBAF, FGF5, FOXD3, GABRB3, GAL, GBX2, GDF3, GRB7, IFITM1, IFITM2, IL6ST, IMP2, KIT, LEFTB, LIFR, LIN28, Nanog, NODAL, NR5A2, NR6A1, PODXL, POU5F1, PTEN, REST, SEMA3A, SFRP2, SOX2, TDGF1, TERT, TFCP2L1, UTF1, Xist, ZFP42, FGF4, NOG, CDX2, CGB, EOMES, KRT1, GCM1, DDX4, SYCP3, COL1A1, COL2A1, RUNX2, HBB, HBZ, ACTC, NPPA, DES, MYF5, MYOD1, T, WT1, CD34, CDH5, FLT1, PECAM1, GCG, IAPP, INS, IPF1, PAX4, SST, TAT, AFP, FN1, FOXA2, GATA4, LAMA1, LAMB1, LAMC1, PTF1A, SERPINA1, SOX17, GFAP, HLXB9, ISL1, NES, NEUROD1, OLIG2, PAX6, SYP, TH
コントロール遺伝子	ACTB, 18S, CTNNB1, DNMT3B, EEF1A1, GAPDH

(ii) 未分化マーカータンパクのプロフィール解析

ヒト多能性幹細胞のマーカータンパクの発現について2つの手法を用いて解析を行い、その結果を比較した。手法1として、コーニング社製25cm²プラスチックフラスコを用いて培養後、細胞を分散し、Tra-1-60、SSEA-3、SSEA-4、SSEA-1などの抗体と反応させて免疫染色を行い、フローサイトメトリーによる解析を行った。手法2として、同じロットの細胞をBD社製6ウェルプレートにて培養した細胞を4%パラホルムアルデヒドにて室温で固定し、免疫染色を行ってイメージアナライザーにてプロフィール解析を行った。手法1、手法2による解析結果の比較を行った。

2. 細胞登録システムの基礎設計案についての検討

海外のヒト幹細胞の分譲を行っている機関における細胞登録情報の収集を行った。また、細胞培養記録および各種検査結果記録を継続して記載し、データ化について検討を行った。

3. 臨床応用などに資するヒト幹細胞の品質維持技術の策定

(i) フィーダーを用いたヒトES/iPS細胞の培養に関する作業工程表ならびに作業手順書の作成

昨年度までにフィーダーを用いたヒトES/iPS細胞の解凍・培地交換、継代、凍結について必要な準備、作業などのリストアップを行い、解凍・培地交換、継代、凍結について作業手順書を作成した。データベースとして応用できるようにエクセルにて作成した。今年度は実際にこれらの手順書に従って細胞の解凍・培地交換、継代、凍結を行い、改善すべき点について検討し、手順書の改定を行った。

(ii) フィーダーを用いないヒトES/iPS細胞の培養に関する品質管理法ならびに作業手順書の作成

フィーダー細胞を用いない無血清培地を用いて培養を行う場合、その品質管理も従来の培養法を用いる場合とは異なってくる。東京大学浅島研究室にて無フィーダー・無血清にて樹立され寄託されたヒトiPS細胞UTA-SF2-2の資源化に備えて、hESF9a培地を用いた培養工程における品質管理方法をこれまでに策定した。今年度は策定した品質管理方法に従いヒトiPS細胞UTA-SF2-2の資源化を行った。また、解凍・培地交換、継代、

凍結について作業工程表および作業手順書を作成した。

近年、次々と無血清培地が開発されていることから、どの培養条件にも対応できるような品質維持培養技術を策定する必要がある。そこで、これまでに報告されている既知の組成よりなるフィーダー細胞を用いない市販の培地； m TeSR1 培地、TeSR2 培地、TeSR-E8 培地、申請者が開発した既知組成よりなる hESF9a 培地、動物由来成分不含 hESF-FX 培地を用いて、複数の培養技術者がヒト ES/iPS 細胞を 5 継代にわたって培養を行い、評価や検査を行って、品質管理法を検討した。

倫理面の配慮

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した。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した。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っている。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。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っている。「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. 未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性解析

ヒト ES/iPS 細胞の培養過程におけるヒト幹細胞の未分化マーカーや早期分化マーカーなどの遺伝子群の発現の安定性を確認するために、Pluripotency PCR アレイを用いて、対象株について異なる継代数で複数回、解析した。それらの結果については、分担研究者・水口らとともに、バイオインフォマティク解析を行ったので、詳細については水口の項に譲る。

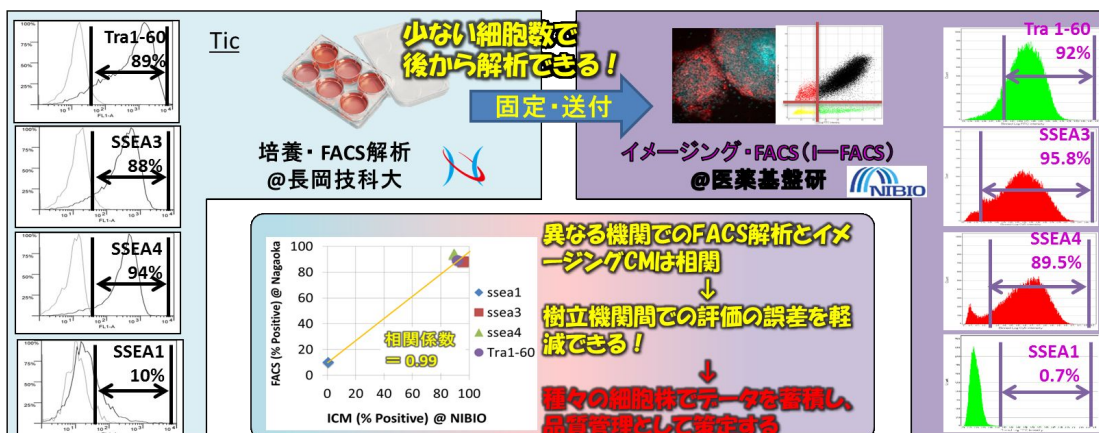
また、ヒト多能性幹細胞の未分化マーカータンパクの解析について

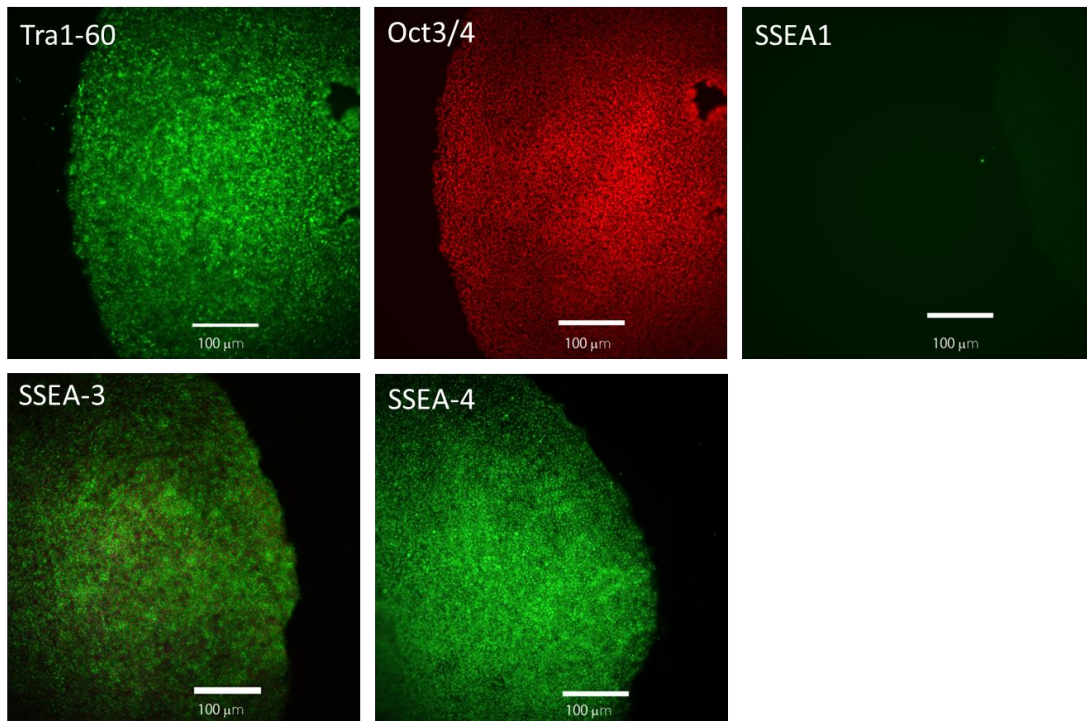
は、分担研究者・大沼の項に譲るが、昨年度にヒト iPS 細胞 Tic を用い、長岡技術科学大学にて培養を行った細胞を固定し、独) 医薬基盤研究所に送付後、免疫染色を行ってイメージアナライザーにより解析を行って、長岡技術科学大学にて行ったフローサイトメトリーでの解析結果と比較するという工程を作成し、実際に比較解析をおこなったところ、高い相関性が得られることが確認された(下図)。フローサイトメトリーによる解析を行うためには、細胞数が必要であり、また、解析を行うタイミングも限定されるのに対し、細胞をプレートで培養後固定して免疫染色を行って解析を行う場合は、少ない細胞数で解析でき、また、固定後は随時解析を行うこと

ができ、輸送を行った後に解析を行うこともできることから、品質評価法として有用であることが示された。今年度はヒト iPS 細胞 Tic を用いて策定したこの品質評価工程に従いヒト ES 細胞 H9、ヒト iPS 細胞 201B7 及び 253G1 について解析を行い、イメージアナライザーによる解析結果がフローサイトメトリーでの解析結果と高い相関があることを確認した。(結果の詳細については大沼の項を参照されたい。)

イメージアナライザーによる未分化マーカータンパクの解析がヒト幹細胞の品質評価法として特に有用であり、結果の信頼性も高く、汎用性もあることが示された。そこで、これまで用いてきたヒト多能性

→少ない細胞数で低コスト、検査時設定の自由度向上、遠隔地の細胞状態を診断可能





幹細胞のマーカートンパク発現解析のための画像解析プロトコルの改良についても検討した。具体的には、これまではフィーダー細胞を用いてヒト幹細胞の培養を行った場合に、フィーダー細胞を特異的に染色できる抗体を用いてフィーダー細胞を解析対象から除いていたが、このような抗体染色をしなくともフィーダー細胞とヒト幹細胞の細胞面積や核の大きさの差異等を利用してヒト幹細胞のみを画像認識させるというプロトコルへと改良した。この改良版のプロトコルを用い、ヒト iPS 細胞 UTA-SF2-2 の品質評価を行った（上図）。この改良版のプロトコルは、より汎用性が高く、フィーダー細胞を用いない培養にも応用できるものであることが示

された。今後当バンクでも標準の評価方法として活用していく。

2. 細胞登録システムの基礎設計案についての検討

ヒト幹細胞応用開発室にて資源化を行った細胞の細胞培養記録および各種検査結果記録は、JCRB 細胞バンクへの情報提供を行い、JCRB 細胞バンクにおいても情報の管理がなされている。それらの情報は JCRB 細胞バンクのホームページ

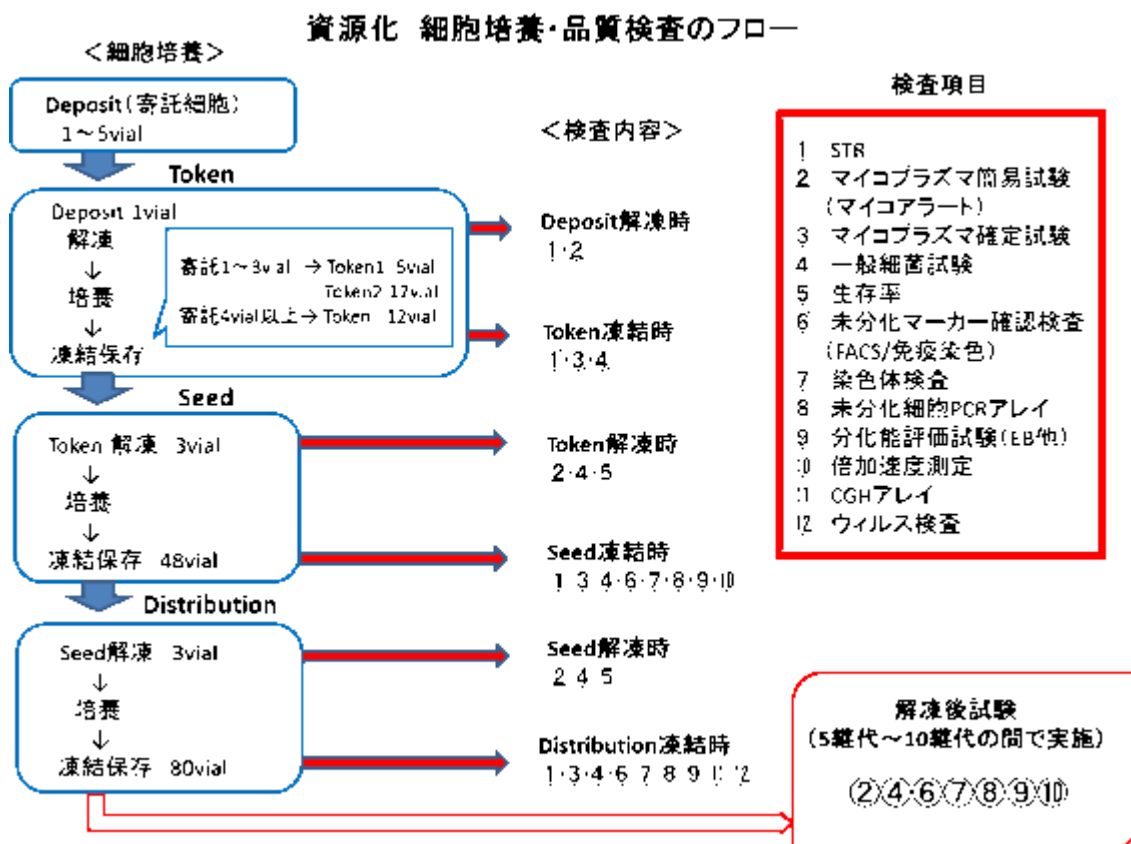
<http://cellbank.nibio.go.jp/>に掲載されている。また、資源化を行った細胞について、厚生労働省「ヒト幹細胞情報化事業」に情報提供を行い、その情報は <http://www.skip.med.keio.ac.jp/>

へ記載されている。また、収集した海外の細胞バンクのサイトの情報は、ヒト幹細胞応用開発室のホームページ

http://www.nibio.go.jp/baiyou/myweb1_025.htm に掲載している。H25年度は、海外の細胞バンクにおけるヒトES/iPS細胞の収集状況および細胞登録状況について調査を行うとともに、ヒト幹細胞情報化事業と連携して、細胞登録システムの基礎

設計案についての検討を行った。新たに収集した情報についても更新・掲載の準備を進めている。

【厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク(JCRB Cell Bank)におけるヒトiPS細胞の細胞培養及び品質検査のフロー】



3. 臨床応用などに資するヒト幹細胞の品質維持技術の策定

(i) フィーダーを用いたヒト ES/iPS 細胞の培養に関する作業工程表ならびに作業手順書の作成

H23 年度に英国の UK Stem Cell Bank やスペインアンダルシア Stem Cell Bank などにおける分譲バンク作成工程表を参考にして、資源化工程表を策定した。その工程表を元に実際に資源化を行ったところ、それぞれの株間の特性の差により、工程表に沿って作業が行えない事例があった。そこで、H24 年度には、特性の異なるさまざまな株に対応できるよう、また、できるだけ短い継代数で資源化できるよう作業工程を改訂した。今年度は改訂した工程表に従い、ヒト iPS 細胞 Tic ならびに Skipper の資源化を行い、詳細に検討を重ね、図に示すような最終版の作業工程表に改訂した。H24 年度に作成した作業手順書についても同様に改訂を行い、JCRB 細胞バンクからの iPS 細胞の分譲時に添付する取り扱い説明書として提供を行った。

(ii) フィーダーを用いないヒト ES/iPS 細胞の培養に関する品質管理ならびに作業手順書の作成

昨年度までに策定した作業工程表をもとに、UTA-SF2-2 (東京大学浅島研究室にて無フィーダー・無血

清にて樹立され寄託されたヒト iPS 細胞株)の資源化を行い、ウシファイブロネクチンならびに hESF9a 培地を用いた培養工程に実際に応用できた。さらに、今年度に (i) で策定した最終版の作業工程表がフィーダーを用いない培養工程にも汎用できることを確認した。一方、作業手順書は別途作成する必要がある。ウシファイブロネクチンならびに hESF9a 培地を用いた培養における解凍、継代、培地交換、凍結の作業手順書を作成し、細胞分譲時の添付資料として JCRB 細胞バンクに提供した。(表)

また、MEF (CF-1) や SNL などのフィーダー細胞を用いて樹立、培養されたヒト ES 細胞・iPS 細胞を市販の TeSR-E8 培地、申請者が開発した既知組成よりなる hESF9a 培地、動物由来成分不含 hESF-FX 培地を用いて 5 継代以上培養し、評価や検査を行い、無フィーダー・無血清培養に馴化させて使用できることを確認した。

[解凍 作業手順書]

Day:		Executioner:	
Cell name:			
Passage no:	P	P	
準備試薬リスト		Variance	
Medium	培地Lot:	Variance	
	量:whah用: ml 播種用: ml		
	FGF-2濃度: <input type="checkbox"/> 4ng/ml <input type="checkbox"/> 5ng/ml <input type="checkbox"/> 10ng/mL		
	FGF-2量: <input type="text"/> μL in <input type="text"/> mlMedium		
Defrost		Variance	
開始時間:	Vial 本	Photo - / +	
	Med 分注し、37° 恒温水槽で加温		
	加温したwash培地をクリーンベンチに入れる		
	N2タンクから液体窒素容器にストックのvialを取り出す		
	Vialをアルコールで拭いた後、クリーンベンチに入れる		
	加温したwash用Medを先太トランスファーピペットで約600ulほど入れ込む		
	穏やかにピペッティングで融解させ半融解したら素早くwash培地に回収する		
	遠心 rpm 分間		
	上清除去		
	細胞数: 多い やや多い 適切 やや少ない 少ない		
	軽く弾いて細胞ペレットをほぐす		
	終了時間:		播種用の培地を ml細胞ペレットに加える
			フラスコorプレートへ mlずつ()播種する
	顕微鏡で細胞の様子を見る		
	細胞状態: 良い 適切 悪い コロニーの大きさ: 大きい 適切 小さい		

[培地交換 作業手順書]

培地交換 作業チェックシート										
日時					Executioner : 上田					
細胞情報	細胞名	インキュベーターNo.	資10%	前回作業者: 上田		プロジェクト名:				
		MMT-MEF: CF-1 B6	ICR SNL	EC(2102EP) NTERA2						
		hESC: KhES-1 KhES-3	H1 H9	HES3 HES4						
		hiPSC: 201B7 201B2	Tic Squeaky	Dotcom Toe		Lollipop UTA-1		ITASF2-2 PS(Foreskin)-1		
Passage No	P-(27+10+11+5+5)		前回継代日:	4月 14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	よくわからないが変	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て	細胞多すぎた
写真	なし	x40 ()	x100 ()	x200 ()	ファイル格納場所					
機器	37°C湯浴			CO2インキュベーター						
マテリアルチェック	培地	京大培地 Lot: KS	EB (-2Me) Lot: EB(-)	mTeSR Lot:	Variance					
		成育培地 Lot: Sip	EB+2ME Lot: EB(+)	DMEW+FB5 Lot: EC						
		hESF8 Lot: E8130419/22(ESF-)	Condition Med Lot: CMC	FGF-2 Lot:	ESF(-) 4/18作					
		hESF6 Lot: E6	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	135ml							
	用事添加	FGF-2	10ug/ml x(135)microL	最終濃度:	10 ng/mL	x()microL	最終濃度:	g/mL		
		Activin A	10ug/ml x(27)microL	最終濃度:	2ng/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			
必要量	mL		37°C湯浴	分						
対象	5cmフラスコ	6枚	75cm フラスコ	60mm Dish	90mm Dish	Variance				
	24well plate	24well	12well plate	24well plate						
	培地吸引	全量吸引	5mL残し	mL残し	2mL残して	mL残して		吸引せず		
培地添加	4.6	mL/each								
	インキュベーターNo.	資10%								

[継代 作業手順書]

細胞継代 作業チェックシート										
細胞情報	日時	Executioner : 上田						プロジェクト名: Distribution		
	細胞名	MMT-MEF: CF-1 B6	IGR	SNL	H1	H9	HES3	HES4	EC(2102EP) NTERA2	
		hESC: KhES-1 KhES-3	H1	H9	HES3	HES4				
		hiPSC: 201B7 201B2	Dotcom	Toe	Lollipop	UTA-1	UTASF2-2	IPS(Foreskin)-1		
Passage No	P-(27+10+11+2)	前回継代日:	解凍 1月15日	予定通り	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	分化した細胞が多い	細胞がやや多	細胞が多い	よくわからぬが変	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	コロニーが少	
写真	あり	x50 ()	x100 ()	x200 ()	ファイル格納場所	(研究業務)共有>50 写真 維持用細胞				
機器	遠心機	37°C湯浴			CO2インキュベーター No.					
medium	京大培地	Lot. KES	EB(-2Me)	Lot. EB(-)	mTeSR	Lot.	Variance			
	成育培地	Lot. Sip	EB+2ME	Lot. EB(+)	DMEM+FBS	Lot. EC				
	hESF8	Lot. E8 130121/130123	Condition Med	Lot. CMO	FGF-2	Lot. D2222				
	hESF6	Lot. E6	Condition Med	Lot. CMB	activin	Lot. BNV321201E				
	hESF-FX	Lot. FX	Condition Med	Lot. CMI	PDGF	Lot.				
	hESF-Dif	Lot. Edif	PBS	Lot.	ROCK inhibitor	Lot.				
必要量	培地	88 mL	37°C湯浴	10 min						
用事添加因子	FGF-2	10ng/ul	x(8)microL	最終濃度:	10 ng/ml	x()microL	最終濃度:	g/ml		
	Activin A	10ng/ml	x(17.6)microL	最終濃度:	2 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)	アキュテラーゼ	Lot.						
	Low Trypsin/EDTA	Lot. TE(L)								
	Media Trypsin/EDTA	Lot. TE(M)								
	STEMPRO [®] EZ Passage [™] Tool									
必要量	ml									
分散	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	2回目PBS	ml/each	1回目培地	ml/each	2回目培地	ml/each	Variance
	剥離液処理	ml/each								Variance
	処理時間	室温	~1分	~2分	~7分	~10分	ピックアップ: ①→3コロニー			
		37°C	~1分	~2分	~7分	~10分	②→10コロニーぐらい			
	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	継代				
	分散	剥離剤吸引除去	x(1)	(1:5) Ezpassageとスクレーパー						
		Wash with Medium	10 ml/each	x(1)	(1:10) 2ml播種x1					
		Wash with PBS	ml/each	x()	(1:15) 1ml播種x3					
	pipetting	x()	(1:20) 670ul播種x3							
	scraper	x()	(1:20) 500ul播種x3							
回収	チューブに回収	直接次の培養器に播種				Variance	ピックアップ			
遠心速度	200rpm (10G)	300rpm (20G)	700rpm (90G)	1000rpm (190G)	1200rpm (270G)	顕微鏡で先細でピックアップ				
遠心時間	1min	2min	3min	5min	培養液全量回収後、300rpm 1min遠					
	上清を除去	上清吸引除去 播種用培地6mlで								
	Wash培地添加	10 ml/each	pipetting	x()	浮遊させて 1枚に播種					
	繰り返し	x()	①② それぞれ1枚ずつ							
調製	細胞浮遊液	10 ml	pipetting	x(2)	Variance					
	ヘモサイトメーター	()microL	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	7 ~ 8 ml/each	※分散密度		1 : 5 ~ 1 : 20					
	25cmフラスコ	x(12)	75cmフラスコ	x()	60mm Dish	x()	90mm Dish	x()	x()	
	6well plate	x()	12well plate	x()	24well plate	x()	x()	x()	x()	
インキュベ	No. :	資源下	CO2濃度 :	10%						

[凍結 作業手順書]

細胞凍結 作業チェックシート											
細胞情報	日時	Executioner :					プロジェクト名:				
	細胞名	MMT-MEF:	CF-1	B6	ICR	SNL	EC(2102EP) NTERA2				
		hESC:	KhES-1	KhES-3	H1	H9	HES3	HES4			
		hiPSC:	201B7	201B2	Dotcom	Toe	Lollipop	UTA-1	UTASF2-2	iPS(Foreskin)-1	
	P-()	前回	月	日							
細胞の状態	本日の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	コロニーが多い	よくわからないが要	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		
写真	なし	x40 ()	x100 ()	x200 ()	ファイル格納場所						
機器	遠心機	37℃湯浴			CO2インキュベーター						
マテリアルチェック	medium	成大培地	Lot: Kcs	EB (-2Mo)	Lot: EB(-)	mToSR	Lot:	Variance			
		成育培地	Lot: Slp	EB+2ME	Lot: EB(+)	DMEM+FBS	Lot: EC				
		hESF8	Lot: F8	Condition Med	Lot: CMC	FGF-7	Lot:				
		hESF6	Lot: E6	Condition Med	Lot: CMB	activn	Lot:				
		hESF-FX	Lot: FX	Condition Med	Lot: CMI	PDGF	Lot:				
		hESF-Dif	Lot: Eoif	PBS	Lot:	ROCK inhibitor	Lot:				
	必要量	培地	ml	37℃湯浴	分						
	用事添加因子	FGF-2	10ng/ul	x()microL	最終濃度:	ng/ml	DMSO	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				
Dispase		Lot: D	GTK	Lot: GTK	Variance						
分散液	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)									
	STEMPROBEZPassage™ Tool										
	ピックアップ										
必要量	ml										
分散	分散枚数	25cm プラスコ	75cm プラスコ	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℃	~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	半分程度剥がれた	コロニーがほとんど浮き上がった	コロニーがほとんど変化しない						
		剥離剤吸引除去	x()								
	分散	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のでスクレーパーした 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	遠心速度	200rpm (10G)	300rpm (20G)	700rpm (90G)	1000rpm (190G)	1200rpm (270G)					
	遠心時間	1min	2min	3min	5min						
	上清を除去										
凍結	調製	10%DMSO 培地	ml	pipetting	x()	Variance					
	細胞数計測	ヘモサイトメーター	()microL	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							
	10%DMSO 培地	ml/each	※凍結密度:	:							

D. 考察

1. 未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性解析

国内外で多くのヒト iPS 細胞が樹立され、再生医療のソース、ワクチン作製や生物製剤原料、創薬研究ツールとして実用化が期待されている。実用化に際しては、プレマスタバーク、統合的に管理するマスタバーク、実用のためのワーキングセルバンクの設置が望まれ、共用の基盤システムを構築しておく必要がある。しかしながら、ヒト ES 細胞とほぼ同じ特性を持つヒト iPS 細胞においても、絶対的なマーカーはなく、また、多分化能を持つがゆえに、未分化状態は不安定である。これまで細胞バンクにおいて資源化されてきた培養細胞は、多くが癌細胞である。細胞増殖速度も速く、解凍後の生存率も高い。しかし、ヒト iPS 細胞は癌細胞とは異なり、細胞倍加時間は遅く、解凍後の生存率も低い。また、培養過程において細胞形質が変化しやすく、実用化を目指してバンク設置と運営を円滑に行うためには、幹細胞特性検査などを含めた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。そこで、実用に資するヒト幹細胞バンクに必要なデータベースの基盤設計、品質管理に必要な基盤技術の策定を行い、実用ヒト幹細胞バンクの基盤システムを設計について研究を行っている。また、多様な形質をもつヒト iPS 細胞の標準化は、細胞自体を標準化するのではなく、品質評価を標準化することが先決であると考えられ、研

究を進めている。

未分化マーカーや分化マーカーなど 84 遺伝子を集めた PCR アレイを用いて遺伝子プロファイルの解析を行うためのプロトコルを策定し、その方法を用いて各細胞株の未分化状態の品質管理を行うため、異なる継代数の細胞から RNA を抽出して Stem Cell PCR アレイ解析を行い、継代による未分化状態の変化を確認した。詳細については、分担研究者・水口の項にゆずるが、継代数が異なることにより発現が変動する遺伝子と、ほとんど変動しない遺伝子があることが明らかとなった。また、細胞株によって発現量が大きく異なる遺伝子が複数存在することが明らかとなった。これらの遺伝子の特徴を理解し、ヒト ES/iPS 細胞の遺伝子発現プロファイル解析を行っていくことが重要である。

ヒト iPS 細胞における未分化マーカータンパク発現のプロファイル解析は、フローサイトメトリーを用いて行われるが、機器やその操作方法、また、解析操作により、しばしば結果が異なる。詳細については、分担研究者・大沼の項にゆずるが、フローサイトメトリーによる解析のためには、多くの細胞数が必要であり、解析のタイミングも制限される。本研究で、イメージアナライザーによって、フローサイトメトリーと同等の解析を行うことが可能であることが明らかとなった。イメージアナライザーによる解析の場合、プレートに播種された細胞を固定して 4 で保存し、数週間の期間、保存することが可能である。凍結保存する細胞と同じロットの細胞を評価しようとする際、

フローサイトメトリーによる解析の場合には、凍結と同日に行う必要があるが、免疫染色の場合には後日解析が可能であり、細胞バンクにおける実務効率が向上する。さらに、今回、分担研究者・大沼が培養を行ったものを固定後、医薬基盤研究所に送付し、同所にて免疫染色を行って解析を行うことが可能であることを示した。この二施設間でのやりとりは、複数株について複数回行い、いずれも良好な結果が得られた。従って、イメージアナライザーを用いた解析は、特定の機関による評価を可能とし、今後、活用されるべきものと考えられる。

2. 細胞登録システムの基礎設計案についての検討

国内外で、ヒト iPS 細胞が多数樹立され、細胞情報を登録する動きが活発化してきている。H23 年度、H24 年度と比較しても、疾患特異的 iPS 細胞株や遺伝子操作で作成した亜株（例：GFP 発現細胞や特定の遺伝子を欠失した細胞）を含む細胞株など大幅に増加しており、樹立方法や培養条件などもバラエティーに富むものになっている。このような状況に対応可能な細胞登録システムの構築が必要である。

昨今、新しいリプログラム法や維持培養条件が次々と開発されており、論文には詳細に記載されていない場合も多い。幹細胞バンクなどにおいて資源化する際には、このようなリプログラム法や維持培養条件をトレースできるようにすることが重要である。今後は細胞バンクと樹立機関との情報交換を推進し、互換性の

あるデータベースを構築しておく必要がある。このことは、海外の細胞登録機関へ情報提供して研究を推進するためにも必須である。

3. 臨床応用などに資するヒト幹細胞の品質維持技術の策定

ヒト ES/iPS 細胞の培養は、従来研究ツールとして使われてきた癌細胞に比べて、培養が難しく、ちょっとしたピペット操作、培地交換のタイミング、継代時の操作時間などによりその後の品質に影響を与える。従って、小さな作業も含めて作業手順書を作成することが品質維持につながると考えられる。本研究では、細胞培養工程表、品質評価工程表ならびに、各培養工程の作業手順書を策定した。この作業手順書には、詳細な作業手順が記載され、どのような培養技術・手順をもってすれば良好に細胞を培養できるかという品質維持技術についても具体的にわかりやすく示している。今後は、この培養手順書を含む本研究成果を活用し、様々な施設において様々な培養技術者がヒト ES/iPS 細胞を安定に培養できるよう情報提供に努めていきたい。

無フィーダーで、既知の組成からなる無血清培養条件を用いる方が、従来のフィーダー細胞と KSR を用いた培養に比べて、ロット差なく培養維持できるものの、高度な培養の技術も必要であり、些細な操作が品質に影響を与える。今後、さらに安定した培養条件が開発されるとともに、それら培養条件に特有の品質維持技術を作業手順書に記載することによ

り、より安定して培養を行うことが可能となり臨床応用などに資する細胞の資源化が効率化されると考えられる。

E. 結論

ヒト iPS 細胞としての幹細胞特性検査などを効率的に行うためには、様々な工程を考える必要がある。海外のヒト幹細胞バンクにおいて、複数機関から資源化工程についての研究論文が発表されているが、このような研究が重要であることを再認識した。本研究で策定した資源化のための培養・品質評価工程表は、実際に日本で樹立された複数のヒト iPS 細胞株を資源化することが可能であったことから、汎用性のあるものを確立することができたと言える。しかし、ヒト iPS 細胞は樹立方法や培養方法、細胞そのものの特性など株間の差が大きく、また、今後さらにバラエティーに富んだ樹立方法、培養方法が確立されていくことから、実際に資源化を行った際に作業工程表に合わなくなることも予想される。本研究を基盤にして、樹立機関との意見交換を推進できることを願う。

F . 健康危険情報

特筆すべき事項はなし。

G. 研究発表

1 . 論文発表

1. Watanabe H, Takayama K, Inamura M, Tachibana M, Mimura N, Tashiro K, Nagamoto Y, Sakurai F, Kawabata K, Furue MK, Mizuguchi H. HHEX Promotes Hepatic-Lineage Specification Through the Negative Regulation of Eomesodermin. PLoS One, 2014 Mar 20; 9(3).

2. Kinehara M, Kawamura S, Mimura S, Suga M, Hamada A, Wakabayashi M, Nikawa H, Furue K.M. Protein Kinase C-induced Early Growth Response Protein-1 Binding to SNAIL Promoter in Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells and Development 2014 Jan 11.

3. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Inamura M, Ohashi K, Okuno H, Yamaguchi T, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Okano T, Furue MK, Mizuguchi H. CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGFβ receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision. Development. 2014. 141(1):91-100.

書籍

4. 菅 三佳、古江 楠田 美保、GMP に準拠した細胞プロセッシングにおける無血清培地組成の考え方 . 実験医学別冊「ESiPS 細胞実験スタン

ダード」(2014) in press

5. 福田隆之、古江 - 楠田美保 *In vitro* 毒性・動態評価の最前線 第6章 ヒト iPS 細胞の供給と標準化 p81-87 シーエムシー出版 (2013)

6. 川寄敏祐、川寄伸子、中尾広美、松本正悟、古江 - 楠田美保、豊田英尚実験医学増刊：第三の生命鎖糖鎖の機能と疾患 (Vol.31 No.10) 第1章 作動原理と疾患、生命現象とのかかわり 新規 iPS/ES マーカー抗体とその応用 p129-133 羊土社 (2013)

その他

7. 古江 - 楠田美保 HUMAN SCIENCE (Vol.24 No.3) TOPIC : ヒト iPS 細胞研究の海外動向 p24-27 公益財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団 (2013)

2. 学会発表

【国際学会】

一般講演

1. Risako Jouto, Megumi Matsumoto, Hiroto Sasaki, Kei Kanie, Yasujiro Kiyota, Hiroyuki Honda, Miho Kusuda-Furue, Ryuji Kato.

Morphology-based PSC culture protocol evaluation. 5th Annual Symposium of Stem Cell Society Singapore(SCSS) 2013.11.18-19 Singapore(Biopolis)

2. Mika Suga, Hiroaki Kii, Takayuki Uozumi, Yasujiro Kiyota, Miho K Furue. A noninvasive method for counting human pluripotent stem cell numbers by live cell imaging. STEM CELLS IN TRANSLATION(ISSCR) 2013.9.15-18 Florence, Italy

3, Megumi Matsumoto, Hiroto Sasaki, Risako Joto, Mika Suga, Masaki Kinehara, Kana Yanagihara, Yasujiro Kiyota, Kei Kanie, Hiroyuki Honda, Miho Kusuda-Furue, Ryuji Kato. Image-based irregular iPS colony detection for intelligent automated cell culture. ISSCR 11th 2013.06.12-15 Boston, USA

4. Masaki Kinehara, Suguru Kawamura, Daiki Tateyama, Mika Suga, Hiroko Matsumura, Sumiyo Mimura, Mitsuhi Hirata, Kana Yanagihara, Miho K. Furue. Protein kinase C regulates human pluripotent stem cell self-renewal. ISSCR 11th 2013.06.12-15 Boston, USA

【国内学会】
(一般演題)

1. 岡田光加、城戸理紗子、佐々木寛人、蟹江慧、菅三佳、柳原佳奈、福田隆之、清田泰次郎、古江美保、加藤竜司 細胞画像解析による iPS 細胞リアルタイム評価法 化学工学会 第 79 年会 2014 年 3 月 19 日 岐阜 (岐阜大学柳戸キャンパス)
2. 岡村美菜子、柳原佳奈、劉有容、加藤竜司、古江 - 楠田美保 ヒト多能性幹細胞株の内胚葉分化指向性を予測するための評価法の開発 第 13 回日本再生医療学会 2014 年 3 月 3 日 京都 (国立京都国際会館)
3. 古江 - 楠田美保 in vitro 毒性評価系構築におけるヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞の可能性 第 26 回 動物実験代替法学会 2013 年 12 月 19 ~ 21 日 京都 (京都テルサホール)
4. Miho K Furue Standardization of culture conditions for human pluripotent stem cells toward clinical application 第 40 回日本低温医学会 2013 年 11 月 28 日 愛知 (名古屋大学 野依記念学術交流館)
5. 三村純代、菅三佳、二川浩樹、古江 - 楠田美保 ヒト多能性幹細胞の単層無血清培養下における神経分化誘導法の開発 日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念学術大会・

総会 2013 年 11 月 23-24 日 東京 (日本歯科大学 生命歯学部 九段ホール)

6. 岡村美菜子、柳原佳奈、Shandar Ahmad、劉有容、平田みつひ、水口賢司、二川浩樹、古江 - 楠田美保 ヒト多能性幹細胞から内胚葉分化誘導効率に優れた細胞株の選択方法 日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念学術大会・総会 2013 年 11 月 23-24 日 東京
7. 城戸理紗子、松本恵、佐々木寛人、蟹江慧、本多裕之、清田泰次郎、古江美保、加藤竜司 iPS 細胞の創薬応用にむけた画像評価法 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2013 年 11 月 10 日 三重 (鈴鹿医療科学大学 白子キャンパス)
8. 古江 - 楠田美保 臨床用ヒト ES/iPS 細胞の培養に使える原材料についての考え方 第 14 回医薬品等ウイルス安全性研究会 2013 年 9 月 28 日 東京 (北里大学薬学部コンベンションホール)
9. 城戸理紗子、松本恵、佐々木寛人、蟹江慧、清田泰次郎、本多裕之、古江美保、加藤竜司 iPS 細胞培養手技標準化のための形態評価モデル 化学工学会 第 45 回秋季大会 2013 年 9 月 16-18 日 岡山 (岡山大学 津島キャンパス)

10.松本尚悟、中尾広美、野中元裕、川端健二、古江 - 楠田美保、滝島佑人、豊田英尚、川寄伸子、川寄敏祐
ヒト iPS/ES マーカーとしての新規糖鎖認識抗体 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11-13 日 神奈川 (パシフィコ横浜)

11.古江 - 楠田美保 ヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞の可能性 第三回レギュラトリーサイエンス学会学術大会 2013 年 9 月 6~7 日 東京 (一橋大学 一橋講堂)

12.Miho Furue-Kusuda, Takeki Tsutsui, Ken Kataoka Professional training for cell culture “Programs for beginners to experts” 日本組織培養学会 第 86 回大会 2013 年 5 月 30~31 日 茨城 (独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター)

13.Kana Yanagihara, Yujung Liu, Ken Fukumoto, Hirotomo Banko, Keiichi Takagi, Masanori Hatashima, Satoshi Terada, Miho K. Furue. Ion beam modification of Jellyfish collagen-derived biomaterial as a scaffold for culturing human pluripotent stem cells. 日本組織培養学会 第 86 回大会 2013 年 5 月 30-31 日 茨城 (産業技術総合研究所 つくばセンター中央第一)

14. Minako Okamura, Kana

Yanagihara, Shandar Ahmad, Yujung Liu, Mituhi Hirata, Hiroki Nikawa, Kenji Mizuguti, Miho K. Furue. Prediction of hepatocytic differentiation tendency of human pluripotent stem cells. 日本組織培養学会 第 86 回大会 2013 年 5 月 30-31 日 茨城 (産業技術総合研究所つくばセンター中央第一)

(シンポジウム・ワークショップ等)

15. 古江 - 楠田美保 再生医療に求められる細胞培養 第 1 回 再生医療資格認定セミナー 2014 年 3 月 3 日 京都 (国立京都国際会館)

16. 城戸理紗子、松本恵、佐々木寛人、蟹江慧、本多裕之、清田泰次郎、古江美保、加藤竜司 画像情報処理を用いた iPS 細胞品質管理 予防早期医療センター第四回ワークショップ 2014 年 1 月 29 日 愛知 (名古屋大学 野依学術記念交流会館)

17. 古江 - 楠田美保 Q quality stability of human stem cells in cell banking 再生医療イノベーションシンポジウム 2014 年 1 月 14~15 日 大阪 (大阪大学中之島センター)

18. 古江 - 楠田美保 セミナー ヒト多能性幹細胞について 大阪ハイテクノロジー専門学校 2013 年

12月12日 大阪

19. 大沼清、藤木彩香、太刀川彩保子、林洋平、伊藤弓弦、小沼泰子、セン徳川、道上達男、楠田 - 古江美保、浅島誠 ヒト ES-iPS 細胞の無酵素培養 細胞アッセイ研究会シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来 2013年11月25日東京(東京大学生産技術研究所コンベンションホール)

20. 城戸理紗子、松本恵、蟹江慧、佐々木寛人、本多裕之、清田泰次郎、古江美保、加藤竜司 画像情報処理を用いた iPS 細胞培養プロトコルの定量化 細胞アッセイ研究会シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来 2013年11月25日東京(東京大学生産技術研究所コンベンションホール)

21. 古江 - 楠田美保 ヒト多能性幹細胞の特性とその応用の可能性 長浜バイオ大学セミナー 2013年10月30日 滋賀(長浜バイオ大学)

22. 古江 美保 再生医療に利用する細胞の品質評価の重要性 日本分析化学会第62年会 特別シンポジウム講演 2013年9月10~12日大阪(近畿大学 東大阪キャンパス)

23. 古江 - 楠田美保 再生医療に求められる細胞培養 第1回 再生医

療資格認定セミナー2014年3月3日 京都(国立京都国際会館)

24. 古江 - 楠田美保 Quality stability of human stem cells in cell banking 再生医療イノベーションシンポジウム 2014年1月14-15日大阪(大阪大学中之島センター)

25. 古江 - 楠田美保 セミナー ヒト多能性幹細胞について 大阪ハイテクノロジー専門学校 2013年12月12日 大阪

26. 古江 - 楠田美保 ヒト多能性幹細胞の特性とその応用の可能性 長浜バイオ大学セミナー2013年10月30日 滋賀(長浜バイオ大学)

27. Miho Furue-Kusuda, Takeki Tsutsui, Ken Kataoka Professional training for cell culture “Programs for beginners to experts” 日本組織培養学会 第86回大会 2013年5月30-31日 茨城(独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター)