

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
（分担）研究報告書

FACS 解析・バイオインフォマティクス解析

研究分担者 大沼清

長岡技術科学大学・産学融合トップランナー養成センター
特任准教授

研究要旨：ヒト ES・iPS 細胞が様々な研究者により樹立・培養されているが、ヒト ES・iPS 細胞の培養は難しく、施設や担当者により細胞状態が異なるという問題がある。そこで、異なる施設における細胞の状態を、統一的・定量的に検査・管理するため、イメージングサイトメトリー (I-FACS) 解析に着目した。昨年度までの研究で、FACS 解析と I-FACS 解析での結果を比較した結果、非常に強い相関が得られた。今年度に於いては、異なる 3 つの細胞株を用いて複数回の実験を行い、同様の結果が得られた。本研究により、様々な施設で培養している細胞の状態を、幹細胞バンクにおいて統一的に測定できる品質管理法の作業工程が策定できた。今後は多面的に検証し、実用化に向け改訂する。

A. 研究目的

ヒト胚性幹 (ES) 細胞 [1]、誘導多能性幹 (iPS) [2, 3] を再生医療や創薬へ応用・実用化する研究が盛ん

である。特に日本に於いては目覚ましく進んでいる。昨年は、再生医療推進法が成立した。また、網膜色素変性症の治療を目的とした臨床試験が理化学研究所を中心に開始された。ヒト iPS 細胞より網膜の細胞を分化

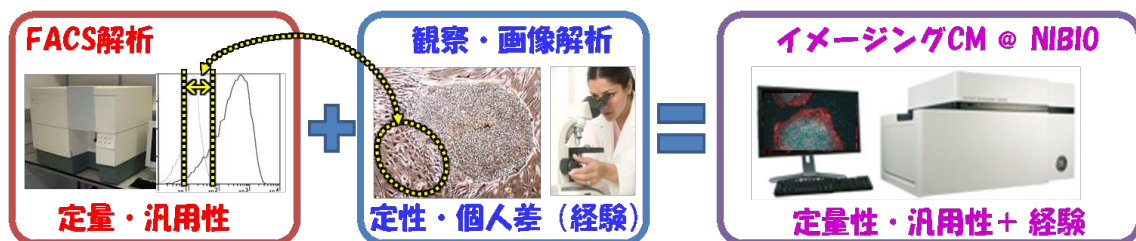


図 1: FACS 解析と顕微鏡観察と I-FACS 解析

誘導し、それをシート状に加工して移植する計画である。更には、日本製薬工業協会（製薬協、東京都中央区、手代木功会長）は昨年（2013年）ヒトiPS細胞を用いた薬剤の安全性評価ツール検証のためのコンソーシアム（ヒトiPS細胞応用安全性評価コンソーシアム）を立ち上げ、約40社が参加している。

このようなヒト幹細胞を用いた実用化の流れの中で、品質の管理が大きな問題となっている[4]。ヒトPS細胞は分化し易いため、同じ研究者が培養していても、1回の継代で状態が大きく変わってしまい、同じ手法で実験をしても得られる結果が大きく異なる事が頻繁に起こる。2014年3月に京都で行われた日本再生医療学会に於いても、細胞の品質管理、標準化などに関して多くの発表があった。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]。

本研究課題では、FACS解析と顕微鏡観察との両方の利点を併せ持つイメージングサイトメトリー（I-FACS）を利用し、遠隔地のヒトiPSユーザーの細胞の培養状態を管理するためのプラットフォームを作る事を目標としている（**図 1**）。I-FACSは顕微鏡観察とFACS解析は相補うような形の解析法で近年注目されている。培養細胞

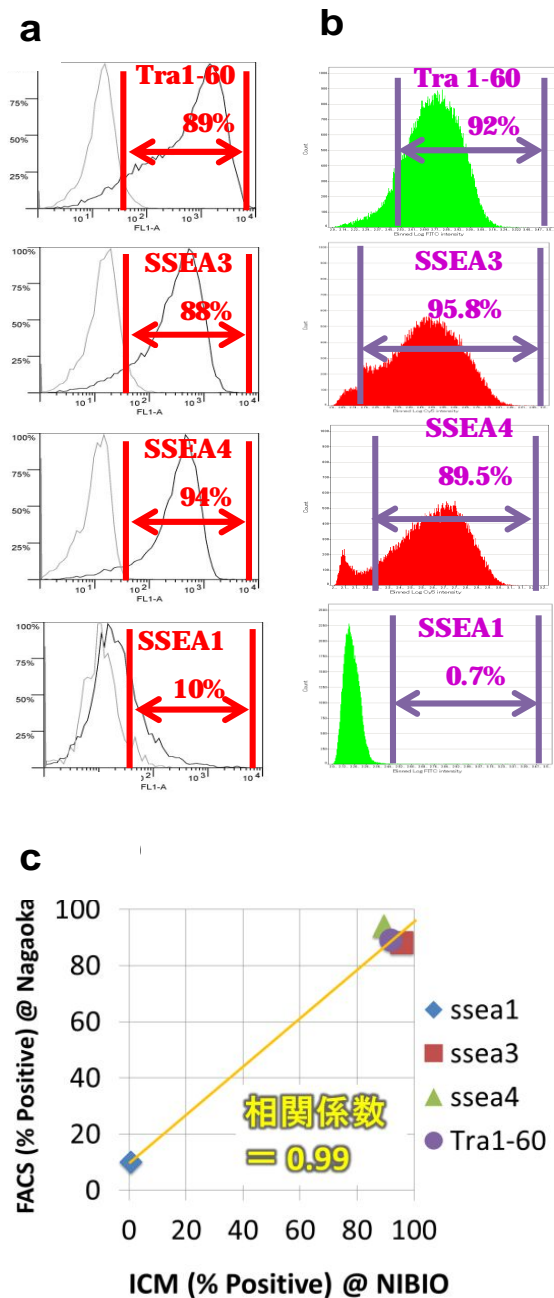


図 2： 昨年度の実験。培養施設（長岡技術科学大学）での FACS 解析結果と、検査施設（医薬基盤研）に於ける I-FACS 解析結果の比較。培養施設に於いて培養したヒト iPS 細胞を FACS 解析した結果（a）と、その姉妹培養した細胞を固定して検査施設に送付して I-FACS で解析した結果（b）と、両者の比較（c）。

を剥がさずに広範囲の写真を自動的に撮り、1個1個の細胞の蛍光量を定量解析する。細胞を剥がさず空間情報を保ったまま解析するため、顕微鏡観察と同じように熟練の技術者が細胞状態を診断できるうえ、FACS解析と同等の定量解析が可能となる。

昨年度は、主に3項目に関して検討した。1)固定ヒトiPS細胞の送付、2)フィーダー細胞の除去、3)上記1)2)の方法を用いて実際にヒトiPS細胞のTic株を培養し、一部を顕微鏡観察とFACS解析し、一部を固定して医薬基盤研へ送付してI-FACSで解析した。両者の結果を比較・解析した結果、強い相関が得られた(図2)。

本年度は、同様の実験を3種の細胞株(ヒトiPS細胞のTic株、201B7株、253G1株)を用い、統計的な解析ができるように実験を繰り返すと共に、データの解析方法、特に閾値の変化による結果の違いに関して検討した。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞の培養

昨年度と同様、ヒト iPS 細胞の培養法は、一般的に行われている培養法に準じた[2, 5, 6]。ヒト iPS 細胞 Tic 株は成育医療センターで樹立され、医薬

基盤研究所・JCRB 細胞バンクを通じて入手した(資源番号: JCRB1331)[7]。ヒト iPS 細胞 201B7 株[2]と 253G1 株[8]は理研 BRC 細胞バンク(つくば、茨城)より、ナショナルバイオリソースプロジェクトを通じて入手した。細胞の培養は以下の通り。D-MEM/F12 に KSR、2-mercaptoethanol、MEM non-essential amino acids、bFGF、Penicillin-Streptomycin を加えた培地(KSR 培地)を用いて、フィーダ細胞(MEF)上で 37℃、5% CO₂ に設定したインキュベータで培養した。継代はまず、培養皿から培地を除き、ヒト iPS 細胞解離液(CTK 溶液[5])を 0.5 ml 加えて、3 分間静置した。その後、ヒト iPS 細胞解離液を除き、KSR 培地を 2 ml 加えてピペティングし、細胞懸濁液を 15 ml チューブに移した。このチューブを 10 × g、1 分間遠心し、上清を除き、KSR 培地を 1 ml 加えた。MEF を培養している培養皿から MEF 培地を除き、KSR 培地に 5 μM ROCK inhibitor[9]を加え、ヒト iPS 細胞懸濁液を 1/6 ~ 1/3 加え、播種した。継代の 2 日後から毎日、培地を交換した。MEF は、D-MEM に 0.9% Penicillin-Streptomycin、9% FBS を加えた培地を用いてインキュベータで培養した。フィーダ細胞は、継代 3 回目の MEF を mitomycin C で 90 分間処理し、0.1%ゼラチンコート培養皿に播種し、調製した。

ヒト iPS 細胞の送付

細胞を送付する際、気泡の混入し、細胞が破壊ないようにするため、昨年度確立した以下の方法を使用した。手短に述べる。hiPS 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 回洗浄した後、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 分間静置して固定した。PBS+/+ で 2 回洗浄した後、各ウェルを PBS+/+ で満たし、気泡が残らないように容器全体をプラスチックパラフィンフィルム (パラフィルム、Pechiney Plastic Packaging Company, Menasha, WI, USA) 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した。6 ウェルプレートは緩衝材で覆い、ダンボールに詰め、宅配便で冷蔵 (4 度) で送付した。

未分化状態でのヒト iPS 細胞のフローサイトメトリ解析方法の検討

FACS 解析の手順も昨年度と同様、以下の通り [6]。培養皿から培地を除き、PBS で 2 回洗浄した。PBS を除き、0.02% EDTA-PBS を 1 ml 加えてインキュベータで 15 分間静置した。1 mg/ml BSA-PBS を加え、ピペッティングして細胞懸濁液を 15 ml チューブに移した。このチューブを 400 \times g、3 分間遠心し、上清を除き、500 μ l の 4%ホルマリンを加えて室温で

20 分間静置した。細胞を固定後、400 \times g、3 分間遠心して上清を除き、 $1 \times 10^7 \sim 3 \times 10^7$ cells/ml になるように 1 mg/ml BSA-PBS で調製した。細胞懸濁液を 20 μ l ずつ 15 ml チューブに移し、10 mg/ml BSA-PBS で 1/50 に希釈した一次抗体 (下記) 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 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。一次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 PE 標識した抗 feeder 抗体 (130-096-094、Milteny Biotec K.K.) を加えた。これは、フィーダー細胞を標識・除去し、ヒト ES・iPS 細胞のみを解析するために加えた。15 ml チューブはアルミ箔で遮光し、4 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、兵庫) を用いて、フローサイトメトリ解析を行った。

ヒト ES/iPS 細胞の未分化マーカーとして以下の 4 抗体を使用した。抗 Stage specific Embryonic Antigen 3 (SSEA3) 抗体 (mouse monoclonal IgM, clone MC-631, R&D, Cat# MAB1434, 1/100)、抗 Stage specific Embryonic

Antigen 4 (SSEA4) 抗体 (mouse monoclonal IgG3, Cat# sc-21704, Santa Cruz Biotechnology, 1/100) 抗 Tra 1-60 抗体 (mouse monoclonal IgM, Cat# sc-21705, Santa Cruz, 1/100)。抗 Oct3/4 抗体(rabbit polyclonal IgG, Cat# sc-9081, SantaCruz1, 1/500)。更に、分化し始めた細胞を確実に検出するために、以下の代表的な初期分化マーカーも一つ使用した。抗 Stage specific Embryonic Antigen 1 (SSEA1) 抗体 (mouse monoclonal IgM, Cat# sc-21702, Santa Cruz, 1/100)

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、マイクロソフトエクセル、及びバイオインフォマティクスの分野をはじめ、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) 及び、理研細胞バンク (理化学研究所) 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 i P S 細胞の導入、ヒト i P S 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 i P S 細胞の移植、ヒト i P S 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) は行わなかった。

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った。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

FACS 解析と I-FACS 解析データの所見

今年度は 3 つの細胞株 (201B7 株、253G1 株、Tic 株) で、それぞれ 3 回以上実験を行った。201B7 株 [2]、253G1 株 [8] は京都大学でレトロウイルスによる遺伝子導入で樹立された株で、前者は 4 遺伝子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC)、後者は 3 遺伝子 (OCT3/4, SOX2, KLF4) を使用している。Tic 株 [7] は成育医療センターに於いてレトロウイルスによる 4 遺伝子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC) を遺伝子導入して樹立された株である。

ヒト PS 細胞の未分化性を FACS と I-FACS で検査するため、ヒト ES・iPS 細胞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 種類に加え、より正確性を期すために転写因子の Oct3/4 も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（長岡技科大）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・透過した後診断施設（医薬基盤研究所）に送付し I-FACS 解析を行い、両者の結果を比較した。

3 株で行った結果を一見して分かる通り、3 つの細胞株でほぼ同様の結果が得られている（図 3）。4 つの未分化マーカー（OCT3/4、SSEA3、SSEA4、TRA-1-60）の値が、横軸（検査施設における I-FACS）と縦軸（培養施設における FACS）の両方が大きい値をとっている（グラフ右上に点が集中している）。それに対し、初期分化マーカーの SSEA1 が横軸・縦軸共に低い値をとっている（グラフ左下に点が集中している）。以上の事から、全ての細胞に於いて、FACS、I-FACS 解析の両方において未分化性が高いことが確認できた。

細かくデータを見ると、FACS、I-FACS データの間で違いも見られた。4 つの未分化マーカーに関しては、横軸の値が全て 80% 以上であるのに対し、縦軸の値は 80% 以下の点が多く、

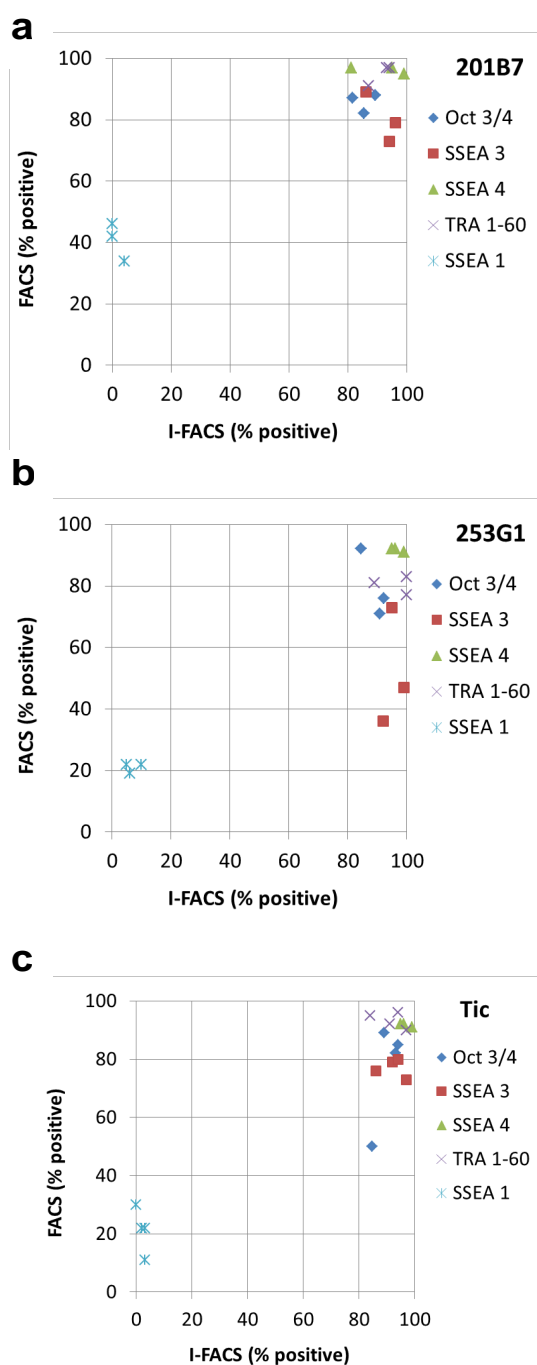


図 3：3 つのヒト iPS 細胞株での、培養施設（長岡技科大）における FACS 解析結果と、検査施設（医薬基盤研）に於ける I-FACS 解析結果の比較。使用した細胞は、京都大学山中研の 201B7 株（a）、253G1 株（b）、及び成育医療センターの Tic 株（c）。縦軸、横軸はそれぞれ FACS 解析、I-FACS 解析した各マーカーの陽性率。SSEA1 は初期分化マーカーでその他は未分化マーカー。

中には 40%を下る点もみられる。また、SSEA1 の結果に於いては、横軸の値が全て 10%以下であるのに対し、縦軸の値はほとんどが 10%以上であり、中には 40%以上の点もみられる。以上のことから、検査機関での I-FACS 結果（縦軸）は培養機関における FACS 結果（縦軸）に比べて、未分化率が安定して高い値を示している事が示唆される。

更に、細胞株間でも違いが観察された。201B7 株（図 3a）は SSEA1 の横軸の値より縦軸の値が高めだったことから、培養機関における FACS 解析では初期分化マーカーの発現率が高く見積もられたことになる。また、253G1 株（図 3b）は SSEA3 の横軸の値より縦軸の値が低めであったことから、培養機関における FACS 解析では未分化マーカーの一つの発現率が低く見積もられたことになる。ただし、これらの細胞は別々の時期に培養し、解析されたため、必ずしも細胞の個性を表しているのではないかもしれない。

総合して示唆されることは、I-FACS の解析結果は安定している事である。

FACS 解析と I-FACS 解析データの相関

FACS 解析と I-FACS 解析の結果を比較するため、図 3 に示したデータを元にピアソンの相関係数を算出した（図 4）。各実験の中で 5 つのマーカー

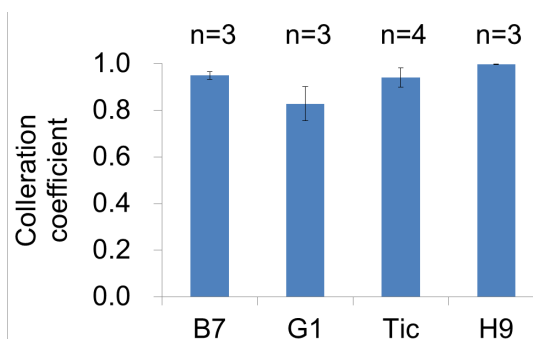


図 4：FACS 解析と I-FACS 解析の相関。4 つの細胞株で行っている。201b7 株（B7）、253G1 株（G1）、Tic 株、それとヒト ES 細胞の H9。H9 に関しては、医薬基盤研内で培養され、更に FACS 解析と I-FACS 解析の両方が行われた。

ーから相関係数を計算し、その値を平均した。その結果、201B7、253G1、Tic の全ての株で相関係数の平均値が 0.8 以上であった。相関係数は、今回のデータの様に、2 つのデータを比較する場合に用いられる指標で、両データが比例関係に近いほど 1 に近くなり、ランダムの場合 0 に近づく。3 つの株で 0.8 以上であったため、強い相関がある（比例関係に近い）と言える。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。

閾値の問題

FACS 解析を実際に行う際に良く問題になるのが、ゲートの取り方である。理想的には、特異的抗体を用いない陰性コントロール（図 5a 青）と、特異的抗体を用いたデータとの蛍光

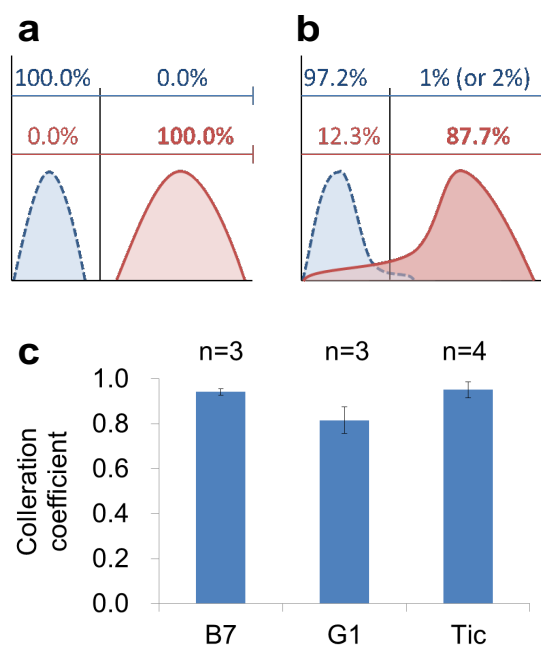


図 5 : FACS のゲート (閾値) の問題。横軸が各細胞のシグナル強度、縦軸が細胞の割合。A : 陰性コントロール (青) と、特異的抗体を使用したデータ (赤) が、完全に分離している場合 (A) と、分離していない場合 (B) の模式図。ポジティブ率はそれぞれの右下部 (100% と 96.4%)。

シグナル (図 5a 赤) が完全に分離する (片方が 100:0、もう片方が 0:100) 条件で測定し、その間に閾値を設ければ良い (図 5a)。しかし、実際には分布のすそ野が広がり、両者が完全に分離できない場合がほとんどである (図 2、図 5b)。そのため、適当な基準を元にポジティブ率を算出する。そのため、閾値をどこに設定するかに任意性があり、結果の値も変わる。特に、別々の装置で測定してその陽性率に偏りが無いかどうか判定する場合、閾値の取り方により結果が逆転することも予想される。

今回は閾値を少し変えてみて、どの

くらい影響が有るかを確かしてみた。具体的には陰性コントロールの陽性率を I-FACS の解析では 1% とし、FACS 解析の時には 1% (図 4) と 2% (図 5c) の両方で比較してみた。その結果、FACS の結果のみ 2% としたときには相関係数が若干減少したもの、ほぼ同様の結果が得られた。

以上の事から、測定する機関に於いて閾値が多少ずれても、大まかな結果は変化しない事が示唆された。

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 PS 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、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。昨年確立した実験プロトコルの元、3 つの細胞株でそれぞれ 3 回以上実験を繰り返した。その結果、どの株でも安定して強い相関が得られたことから、本研究で確立した手法は異なる施設で培養した細胞を同一基準で検査できる事を示唆する。

複数の細胞株で複数回の実験

ヒト多能性幹細胞は安定しない。全ての細胞に分化できる能力を持つが、この能力は細胞の状態の変化し易さ、つまり不安定に繋がる。実際、同じ手法で培養していても培養状態が大きく変化することがある。更に、細胞株

により未分化状態や分化し易さに大きな違いがある。そのため、単一の細胞株だけで調べるのではなく、複数の細胞株を使って調べるのが通例となっている。

昨年度は 1 細胞株のみを用いて実験系を確立し、今年は 3 株で複数回行った。その結果、実験回毎にバラつきが観測され、更に細胞株ごとにも結果が異なった。この結果は細胞の株の違いを反映している可能性と、異なるときに行った実験であるから違う可能性があり、どちらであるかは今回の実験だけでは判断できない。

ただし、複数回行った実験結果はいずれも同じような傾向にあった。FACS の結果と I-FACS の結果が強く相関していたため、このバラつきは実験誤差の範囲内として許容することができる事が示唆される。単一のマーカーを使って診断する事はエラーが出やすいが、今回の様に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、安定した結果が得られると期待できる。

閾値の問題

今回は異なる機械（FACS と I-FACS）を用い、異なる施設（長岡技術科学大学と医薬基盤研究所）に於いて解析を行った。FACS 解析ではどの領域をネガティブとし、どの領域をポジティブと判断するかに任意性がある。解析する細胞や抗体によっては少しの閾値のズレで結果が大きく変わる事もある。今回は閾値を少し変化

させた時に結果が大きく変わらない事から、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、3 つの細胞株で複数回実験して比較した。その結果、どの細胞株でも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。以上の事から、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できたと言える。

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., 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. 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.
6. 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.
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. Nakagawa, M., et al., Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*, 2008. **26**(1): p. 101-106.
9. Watanabe, K., et al., A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2007. **25**(6): p. 681-6.
10. Yamada, R., K. Hattori, S. Tachikawa, M. Tagaya, T. Sasaki, S. Sugiura, T. Kanamori and K. Ohnuma* (2014). "Control of adhesion of human induced pluripotent stem cells to plasma-patterned polydimethylsiloxane coated with vitronectin and γ -globulin." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. (In Press)
11. Katsuto Takakura, Takahiro

Yamamoto, Kensuke Kurihara, Taro Toyota, Kiyoshi Ohnuma, and Tadashi Sugawara*, Spontaneous Transformation from Micelle to Vesicle Associated with Sequential Conversions of Comprising Amphiphiles within Assemblies, Chem Commun

12. Yoshimitsu, R., Hattori, K., Sugiura, S., Kondo, Y., Yamada, R., Tachikawa, S., Satoh, T., Kurisaki, A., Ohnuma, K.*, Asashima, M., Kanamori, T. (2013). Microfluidic perfusion culture of human induced pluripotent stem cells under fully defined culture conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, (2013 Nov 13. Epub ahead of print)
13. K. Hattori, R. Yoshimitsu, S. Sugiura*, A. Maruyama, K. Ohnuma and T. Kanamoria, Masked Plasma Oxidation: Simple Micropatterning of Extracellular Matrix in a Closed Microchamber Array, *RSC Advances*, 3, 17749-17754, (2013)
14. Ohnuma, K., Assays of traditional drugs using human neurons derived from pluripotent stem cells. *Neuroscience Letters*, (2013 Nov 21. E-pub ahead of print)

G . 研究発表

1 . 原著論文

- 1) Yamada R, Hattori K, Tachikawa S,

Tagaya M, Sasaki T, Sugiura S, Kanamori T, Ohnuma K, Control of adhesion of human induced pluripotent stem cells to plasma-patterned polydimethylsiloxane coated with vitronectin and γ -globulin." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. (2014 Mar 18. E-pub ahead of print)

2 . 学会発表

1. 吉満亮介、服部浩二、杉浦慎治、近藤祐樹、山田遼太郎、太刀川彩保子、佐藤琢、栗崎晃、大沼清、浅島誠、金森敏幸、“マイクロチャンバーアレイチップによるヒト iPS 細胞の無血清・無フィーダ培養”、日本再生医療学会（京都国際会館、京都、2014年3月4日-6日）
2. 近藤裕樹、服部浩二、杉浦慎治、佐藤琢、金森敏幸、大沼清、“hiPS 細胞の細胞塊を培養するための灌流培養マイクロチャンバーアレイチップ”、化学とマイクロシステム（兵庫県立先端科学技術支援センター、兵庫、平成12年9月29日～30日）
3. 山田遼太郎、服部浩二、多賀谷基博、佐々木徹、杉浦慎治・金森敏幸、大沼清、“プラズマ処理による、 γ -globulin と Vitronectin を使った無血清/無フィーダ培養でのヒト iPS 細胞パターン作成”細胞アッセイ技術の現状と将来

- (Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay)(Tokyo, 25 Nov 2013)
4. 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 ”、細胞アッセイ技術の現状と将来 (Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay) (Tokyo, 25 Nov 2013)
 5. 近藤裕樹、服部浩二、杉浦慎治、佐藤琢、金森敏幸、大沼清、” hiPS 細胞の細胞塊を培養するための灌流培養マイクロチャンバーアレイチップ ”、細胞アッセイ技術の現状と将来 (Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay) (Tokyo, 25 Nov 2013)
 6. 吉満亮介、服部浩二、杉浦慎治、佐藤琢、栗崎晃・浅島誠、大沼清、金森敏幸、” マイクロチャンバーアレイチップを用いたヒト iPS 細胞培養 ”、細胞アッセイ技術の現状と将来 (Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay) (Tokyo, 25 Nov 2013)
 7. K. Hattori, R. Yoshimitsu, S. Sugiura*, A. Maruyama, K. Ohnuma and T. Kanamori, MASKED PLASMA OXIDATION METHOD AS A SIMPLE MICROPATTERNING OF EXTRACELLULAR MATRIX IN A CLOSED MICROCHAMBER ARRAY, micro TAS 2013 (Messe Freiburg, Freiburg, GERMANY, 27-31 October 2013)
 8. R. Yoshimitsu, K. Hattori, S. Sugiura, Y. Kondo, T. Satoh, A. Kurisaki, M. Asashima, K. Ohnuma*, and T. Kanamori MICROFLUIDIC PERFUSION CULTURE OF HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL IN MICROCHAMBER ARRAY CHIP, micro TAS 2013, (Messe Freiburg, Freiburg, GERMANY, 27-31 October 2013)
 9. Ryotaro Yamada (M2 学生・登壇), Koji Hattori², Motohiro Tagaya³, Toru Sasaki⁴, Shinji Sugiura², Toshiyuki Kanamori², Kiyoshi Ohnuma*, Patterning of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Patterned Plasma Treatment on a PDMS Surface Followed by Composite Protein Adsorption, 24th International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2013) 12 Nov 2013 Nagoya University □頭
 10. Ohnuma K* , Motility Control of Neuronal and Human iPS Cells under Serum- and Feeder-Free Culture Condition, Mini Symposium at The 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC'13) □頭
 11. Ohnuma, K, Fujiki, A, Koike, S, Hayashi, Y, Ito, Y, Onuma, Y, Chan, T, Michiue, T, Furue, M K., Asashima,

M, ENZYME FREE PASSAGE OF
HUMAN PLURIPOTENT STEM
CELLS, International Society for
Stem Cell Research (ISSCR
2013)(Boston, MA, USA, 14 June
2013)