

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った。

(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

平成 24 年度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。平成 25 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平成 24 年度に策定した。平成 25 年度には、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； mTeSR1 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

2007 年の 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 ~ 2 μ g) 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 Panel (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 1 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、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、同じ手法を用いて、対象株について異なる継代数で複数回、解析した。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譲る。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(図3)。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、今後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2)。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。

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ィールは、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3)。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4)。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測定において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。このヒト多能性幹細胞の未分化マーカーの解析の詳細については、分担研究者・川寄の項に譲る。

また、下記図 5 のように、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したところ、高い相関性が得られた。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。一方、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ることから、作業効率がよい。また、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。

このように、平成 24 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、平成 25 年度に実際に Tic を含む複数株のヒト ES/iPS 株を用いて比較解析をおこなった。ヒト ES 細胞株 H9 については、培養、固定、フローサイトメトリー解析、イメージングサイトメトリー解析すべての工程を医薬基盤研究所において行った。その結果、高い相関性が得られることが確認された(図 5)。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。(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幹細胞のマーカータ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 (図 5 下図)。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。

→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

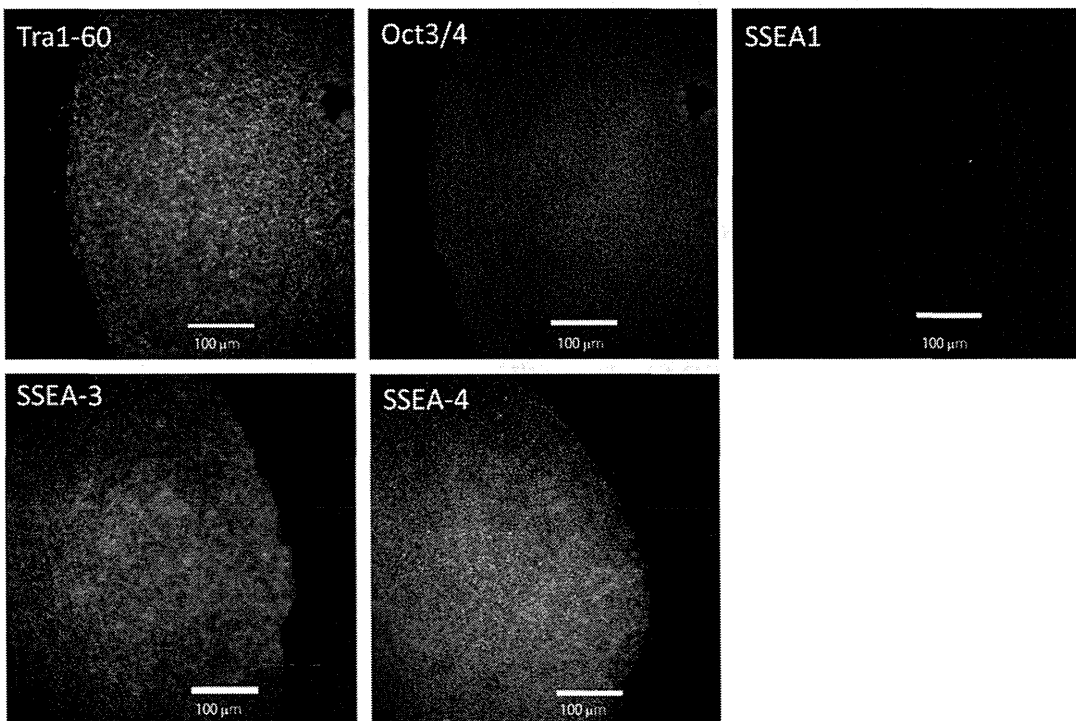
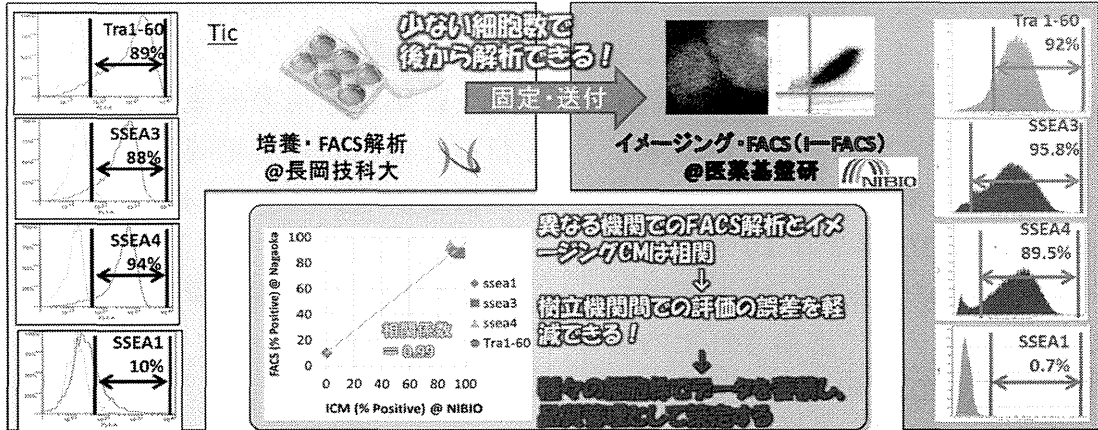
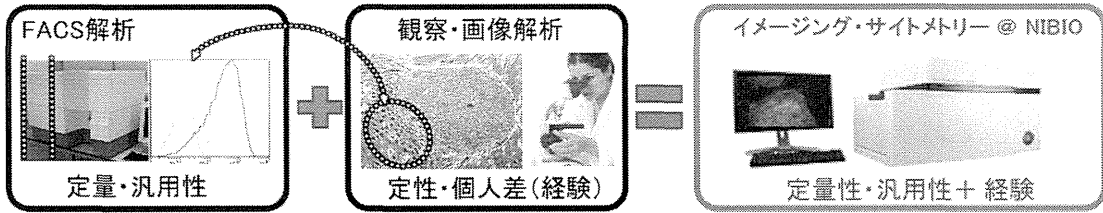


図5 イメージングサイトメトリー解析
イメージアナライザーによる未分化マーカータンパクの解析

2. 細胞登録システムの基礎設計案についての検討

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)。

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、海外の細胞バンクのサイトを収集し、ヒト幹細胞応用開発室のホームページに掲載した (次頁表)。

http://www.nibio.go.jp/baiyou/myweb1_025.htm

国	バンク機関名 URL
米国	Wisconsin International Stem Cell (WISC) Bank http://www.wicell.org/
米国	Harvard Stem Cell Institute http://www.hsci.harvard.edu/
米国	Massachusetts Human Stem Cell Bank http://umassmed.edu/MHSCB/index.aspx
英国	UK Stem Cell Bank http://www.ukstemcellbank.org.uk
シンガポール	Singapore Stem cell Consortium http://www.sccc.a-star.edu.sg/stemCellBank.php
オーストラリア	Australian Stem Cell Centre http://www.stemcellcentre.edu.au/
オーストラリア	Australian Stem Cell Bank http://www.ascb.com.au
台湾	Taiwan Stem Cell Bank http://www.tscb.bcrf.firdi.org.tw//index.do
スペイン	National Stem Cell Bank?Banco?Nacional de Lineas Celulares (BNLC) http://www.isciii.es/htdocs/terapia/terapia_bancocelular.jsp (アクセスエラー)
フランス	Agence de la Biomedicine National Registry for hESC http://www.agence-biomedecine.fr/
ドイツ	Charite Cell Bank-Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies n/a
イスラエル	Tel Aviv Sourasky Medical Center Cell Bank n/a
インド	National Centre for Cell Science?Cell Repository http://www.nccs.res.in
韓国	Korean Stem Cell Bank http://kscb.co.kr/eng

海外ヒト幹細胞分譲機関リスト

(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)

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

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 (図 6 参考資料)。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 (図 6 参考資料) は、2005 年にすでに公表されている。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 6 参考資料)。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、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発表している(図7,8,9)。これら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7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る、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8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10、11)、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・ウィ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 11、12)。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、品質管理においても有効に利用できる(研究論文④)

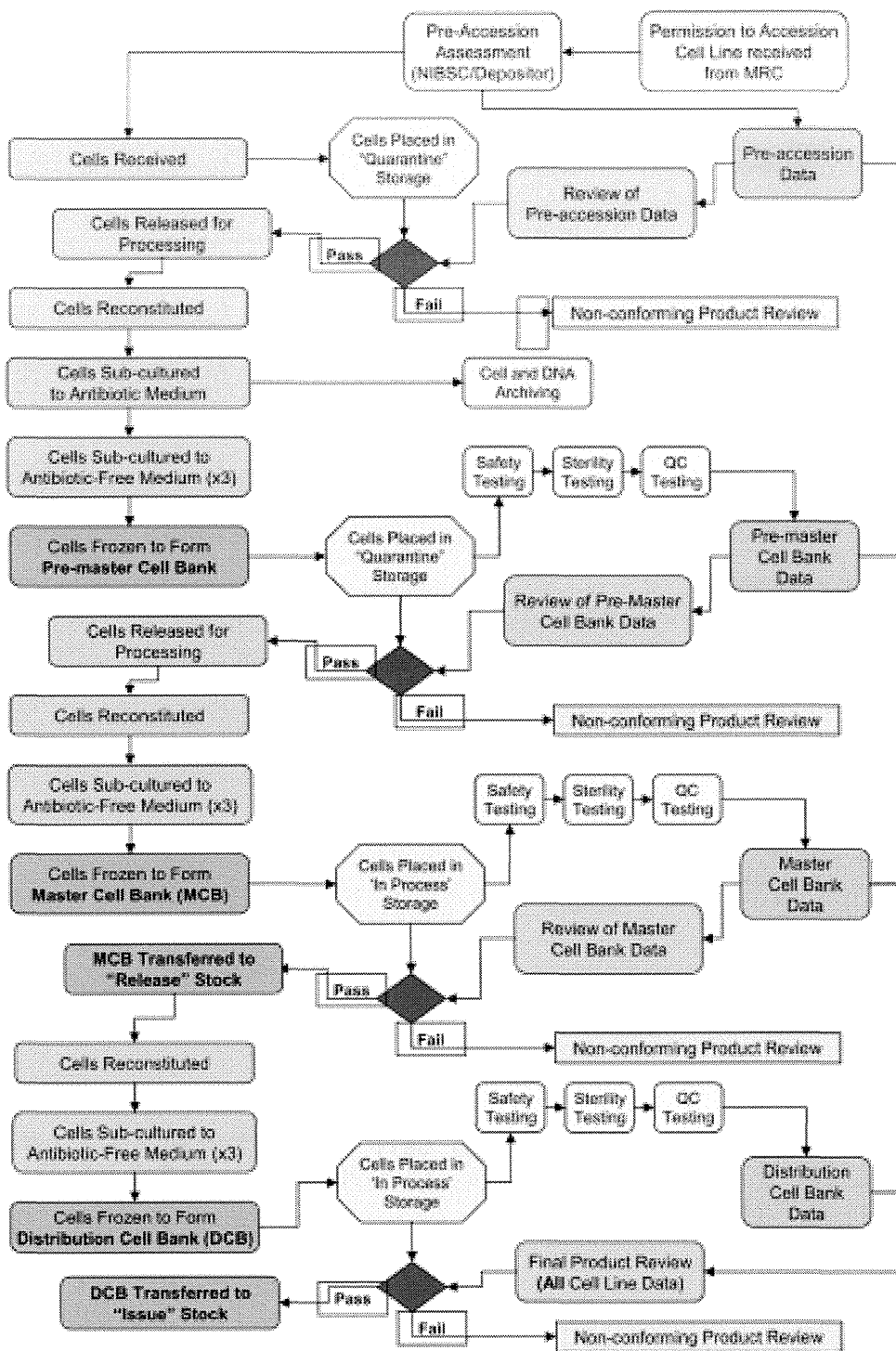


図 6. 参考資料 UK Stem Cell Bank におけるヒト ES 細胞の資源化工程表 (Advanced Drug Delivery Reviews 57 (2005) 1981- 1988 図 3 より転載)

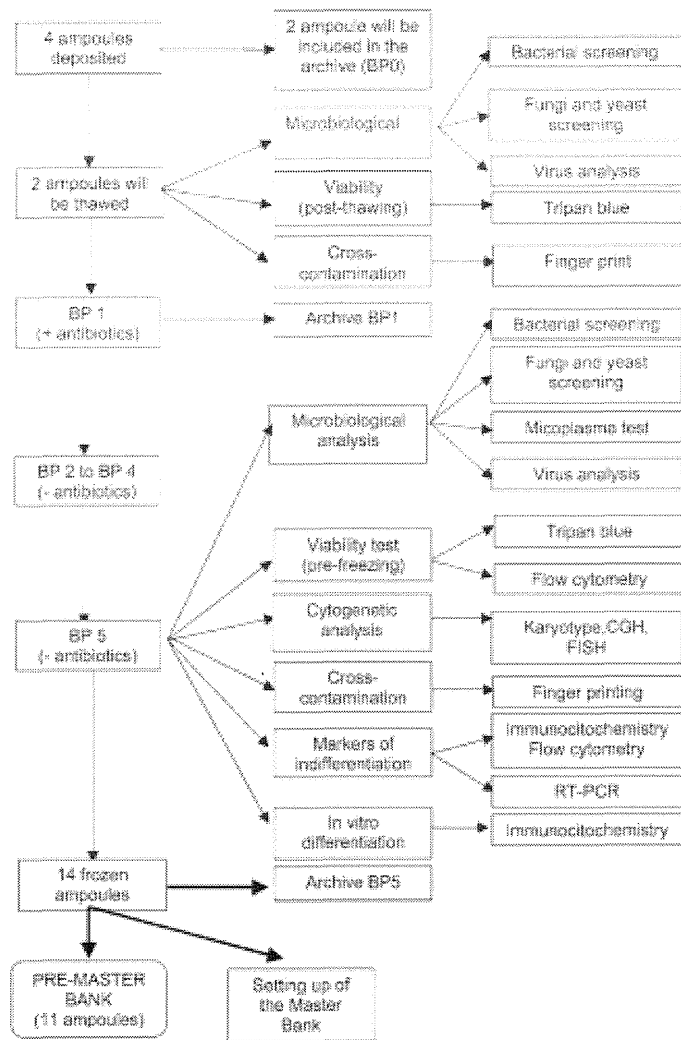


Fig. 2. Setting up a premaster bank. (Modified version of UK stem cell bank flowchart; 11.)

図7. 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)

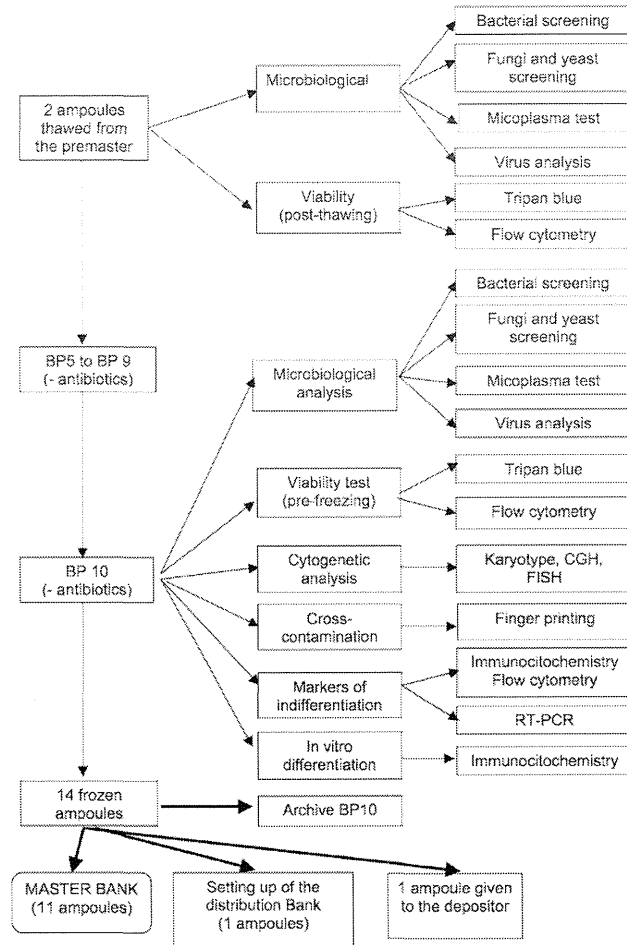


Fig. 3. Setting up a master bank. (Modified version of UK stem cell bank flowchart; 11.)

図 8. 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)

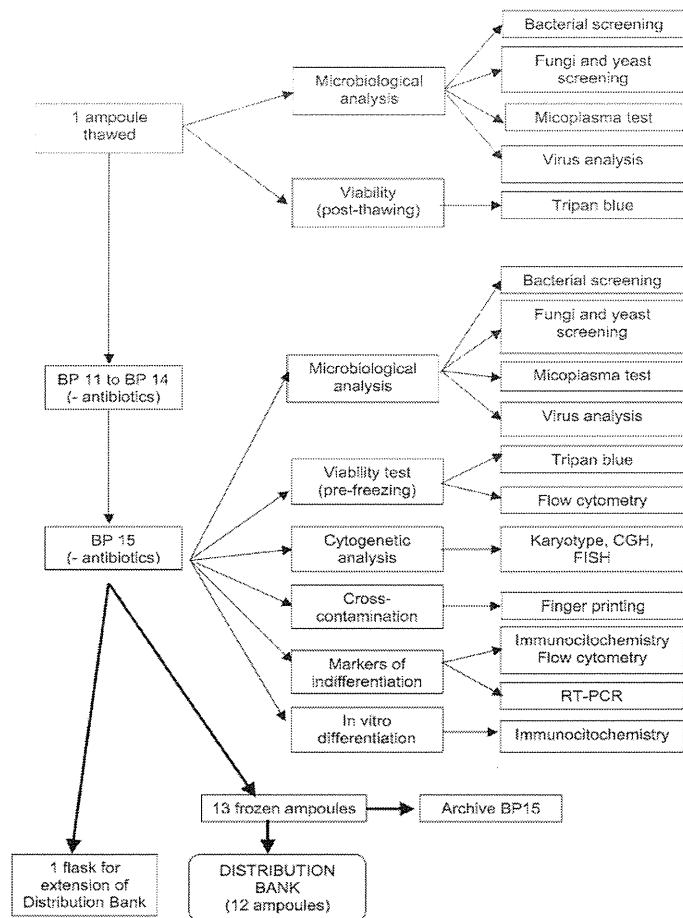


Fig. 4. Setting up a distribution bank. (Modified version of UK stem cell bank flowchart: 11.)

図 9. 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)

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
・Allprep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⇒ PCR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
・GGH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1 mL懸濁液にし、Trypan blue 50 μL中に懸濁液50 μL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PCRアレイ
・分化性	EBを作成し、2週間培養後アレイ
・GGH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-1-60、Oct3/4、Nanog
・倍加速度 Tic < <H9	6 well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 12. NIBIO ヒト iPS 細胞資源化における検査

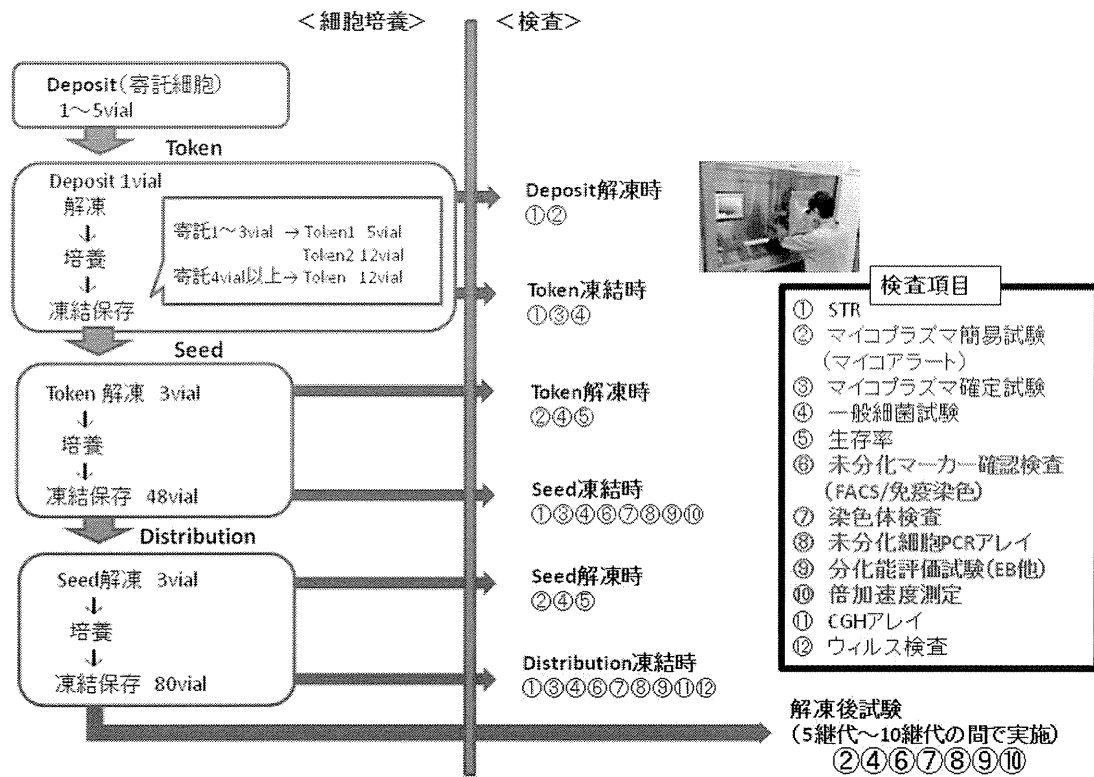


図 13. 改訂ヒト iPS 細胞資源化工程表：トークン、シード、分譲用バイアル作成

(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

平成 23 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、平成 24 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。平成 25 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 13 に示すような最終版の作業工程表に改訂した。平成 24 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

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 の資源化にあたり、平成 24 年度には、上記 (i) で策定した作業工程表をもとに、UTA-SF2-2 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、平成 25 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った。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。

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。