

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業  
（再生医療関係研究分野））

「iPS細胞等の安定供給と臨床利用のための基盤整備」

総括研究報告書

研究代表者 西田幸二 大阪大学医学部眼科学教室 教授

**【研究要旨】**

ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針において、移植を受ける被験者等が感染症を発症した場合等の原因究明のために、採取したヒト幹細胞又はヒト分化細胞の一部等の適当な試料について、適切な期間保存しなければならないと定められている。しかしながら、移植した細胞の保管や情報管理を各臨床施設に任せただけの場合、不確実な保管や情報の損失の可能性が危惧され、再生医療の発展の障壁となりうる。本研究では確実な保管・情報管理を達成するための基盤整備として、移植された体性幹細胞を統合的に管理・保存するシステムを構築することとする。

今後再生医療が日本で発展することを想定すると、これらの再生医療用材料を確実に保管するための保管施設は必須のインフラと言える。しかしながら各大学や臨床施設毎に保管設備を設置するというのは、施設の運営予算や施設の設備などを考慮すると現実的とは言えない。設備、予算的に余裕のある、ある程度限られた範囲の施設において質の高い管理を行うというのはいずれの解決法であると言える。

本研究では、本研究の実施に必要な設備の整備として、1、体性幹細胞ならびに iPS 細胞等の細胞凍結保存装置細胞ストックルームの整備、2、細胞保存のためのセキュリティシステムの整備、3、細胞運搬における安全でセキュリティの高いシステムの構築を行うこととする。また本研究がクリアすべき倫理的事項について議論を行い、現在までに行っている臨床研究と密接な連携を行うことでより質の高い、臨床に根差した研究を実施する。

また研究分担者が臨床研究で用いる体性幹細胞ならびに iPS 細胞から特定の組織細胞に分化誘導させたものについては、次年度に運用開始する予定のクライオライブラリで実際に保存していくことを予定しており、今年度は臨床研究の推進ならびに iPS 細胞からの誘導法の確立や最適化について行った。

**A. 研究目的**

ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針において、移植を受ける被験者等が感染症を発症した場合等の原因究明のために、採取したヒト幹細胞又はヒト分化細胞の一部等の適当な試料について、適切な期間保存しなければならないと定められている。しかしながら液体窒素保管庫における出納

管理は通常人の手で行っており、human error による管理ミスが発生が危惧される。human error を減らすための対策としては、高額なコンピュータ管理の液体窒素保管庫を専任のオペレータにより管理運営することなどが考えられるが、初期設備投資や年間の人件費、ランニングコストなどを考慮すると全国の各大学に設置することは現実

的に難しい。そこで本研究ではコンピュータ管理の液体窒素保管庫を専任のオペレータとともに大阪大学に設置して、全国から再生医療に使用した体性幹細胞ならびにiPS細胞を受け入れ、厳密に管理することとする。本研究により再生医療の品質管理や追跡に関する体制が整備できれば今後の再生医療の発展に大きく寄与するものと考えられる。

## B. 研究方法

研究代表者の西田は、体性幹細胞ならびにiPS細胞等の確実な保管を実現するための基盤整備としてクライオライブラリの運用開始に向けた様々の検討を、特に以下の1~3の点について検討した。

### 1. 体性幹細胞ならびにiPS細胞等の細胞凍結保存装置細胞ストックルームの整備

体性幹細胞ならびにiPS細胞等貯蔵をおこなうために、平成24年度に当機関内に電子錠を備えた専用のストックルームの設置、コンピュータと連動した自動入出庫管理システムを実現する細胞凍結保管庫(クライオライブラリ)の設置および、既存の液体窒素タンクとの配管整備を行い、クライオライブラリに液体窒素が自動注入される環境を構築した。また作業者の安全確保のための環境整備を行った。

保管庫そのものは細胞バンクなどで使用されているものと同じの機器であり信頼性は高いと言えるが、ある程度の時間をかけて設置機器固有の問題がないかどうかを検証する必要がある。また配管や液体窒素の自動注入機能についても問題がないかどうかの検証が必要である。さらに試験運転を試験サンプルで行い、問題が生じないことを確認する。これらを平成26年上半期中に終える予定である。

### 2. 細胞保存のためのセキュリティシステムの整備

細胞保管と取り出しに関しては、ハードおよびソフト両面で確実性の向上を目指す。具体的には平成25年度下半期に2人のオペレータを本研究の専従研究員として配し、保管庫のオペレーションと細胞管理および細胞付帯情報管理ソフト運用の際の最適化を徹底的に図る。

### 3. 細胞運搬における安全でセキュリティの高いシステムの構築

全国の体性幹細胞ならびにiPS細胞の保管が本研究の目的であるが、確実な運搬システムの構築は確実な保管システムの構築とともに本研究達成のための重要な要素である。運搬には液体窒素を吸収する担体が保管容器内部に仕込まれているドライシッパーと呼ばれる専用の液体窒素保管容器を用いる。ドライシッパーはたとえ転倒しても液体窒素がこぼれる心配はなく、運搬業者に対して安全性を担保できる。また容器の大きさのある程度以上のものにすれば最大で2週間程度の保管が可能であり、たとえ自然災害等で細胞の到着が遅れたとしてもほとんどのケースで問題が発生しないと言える。また細胞の由来元の個人情報の漏洩防止策として、細胞保存チューブにはバーコードシールを貼り、バーコード情報と個人をリンクする対応表は鍵のかかる保管庫で保管することとする。これらのシステム構築を平成25年度中に完成させる。

### 4. 体性幹細胞を用いた臨床研究の推進ならびにiPS細胞からの誘導法の確立や最適化

研究分担者が臨床研究で用いる体性幹細胞ならびにiPS細胞から特定の組織細胞に分化誘導させたものについては、次年度に運用開始する予定のクライオライブラ

リで実際に保存していくことを予定しており、今年度は臨床研究の推進ならびにiPS細胞からの誘導法の確立や最適化について行った。

### C. 研究結果

平成24年度に設置したクライオライブラリについては平成25年11月より液体窒素の充填を開始し、配管漏れや液体窒素タンクの漏れがないことを確認した。またストックルームにおいて酸素濃度不足が生じる危険性を排除し作業者の安全確保を図るために、酸素濃度計とそれに連動したパトランプを設置した。また業者立会のもと、正常動作することを確認した。さらにランダムに振り分けた100個のストック部位(ケーンとケーン内の部位をランダムに設定)について、クライオライブラリへの入庫と出庫作業を行い、すべての作業でハードおよびソフトの両面でエラーが発生しないことを確認した。またワケンビーツ社製の検体管理システムであるSample Conductor Proをクライオライブラリのシステムに連動させ、より高機能のサンプル管理が可能となったほか、液体窒素にて冷凍中のクライオチューブにもラベルを貼ることが可能で、運用の幅を広げることが可能となった。

またクライオライブラリで使用可能なクライオチューブについても検討し、機械のトラブルが発生しないように、基本的には固有のチューブのみを用いることに決定した。そのため、運用面ではあらかじめサンプル送付予定の施設にチューブを送ることとした。

また購入したドライシッパーの機器固有の問題の可能性をみるため、液体窒素をマニュアル通りにしみこませた後の温度変化を記録した。結果、メーカーの公表よ

りはやや短かったものの、10日間にわたって-190以下の低温維持が可能であった。

また送られてきたサンプルをバーコードリーダーで読み取らせる際に、デスク脇にて簡便に低温維持ができるように、ステンレス容器にアルミビーズを敷き詰めたものを作成した。周りに液体窒素を加えると、12分程度でアルミビーズの温度は-100に達した。アルミビーズはクラッシュアイスのようにクライオチューブを刺すことが可能で、安全でかつクロスコンタミネーションがないため本研究で有用であると考えられた。

またドライシッパーで3日間保管し、その後8日間クライオライブラリで保管した後に細胞を融解、培養したことによる影響を調べた。その結果、これらの操作による細胞生存率は90%前後と良好で、また細胞形態、細胞増殖能、コロニー形成能、遺伝子発現には影響は見られなかった。以上のことから、ドライシッパーによる輸送とクライオライブラリでの保管による細胞への影響はないものと考えられた。

研究分担者の澤は体性幹細胞、iPS細胞等を用いる臨床研究実施のための基盤技術についての検討を行い、研究分担者の吉川はiPS細胞からの骨・軟骨系細胞への培養技術を最適化するための基盤整備を行った。また研究分担者の森は幹細胞のストック実施と管理についての検討を行い、研究分担者の大園は小児科領域におけるヒトiPS細胞をもちいた再生医療を実現化するための技術基盤の確立についての検討を行った。また研究分担者の吉峰は慢性期完全脊髄損傷に対する自家嗅粘膜移植の臨床効果についての検討を行い、一定の効果を得た。また研究分担者の玉井は遺伝性皮膚難病に対する骨髄間葉系幹細胞の臨床利用について検討し、研究分担者の斎藤

は体性幹細胞、iPS 細胞等を用いる臨床研究支援技術の開発を行った。また研究分担者の高島は幹細胞等の確実な保管および機能解析を実現するための基盤整備について検討を行った。これら研究で将来的に用いられる体性幹細胞については次年度の下半期から運用を予定しているクライオライブラリにて保管する予定である。さらに将来的には分担研究者が検討しているような iPS 細胞から分化誘導した組織細胞についても同様にクライオライブラリで保管していく予定としている。

#### **D. 考按**

国内で行われる再生医療治療のサンプルを保管するシステムとして、最低限のハードおよびソフトのシステムとしては今回の検討で確認できた。しかし人が介在するポイントは随所にあると考えられ、human error による管理ミスの可能性を完全に払拭できたとは言えない。来年度上半期中に、human error をゼロにするためのルール作り(SOP の作成)と、臨床データを管理する REDCap ベースのデータベースの構築を行う予定で、来年度下半期には現在大阪大学で行っている臨床研究で用いている体性幹細胞の受け入れを手始めに、日本全国のサンプル受け入れを開始する予定である。また将来的には iPS 細胞から分化誘導した組織細胞に対しても対応する予定である。

#### **E. 結論**

我々が構築した細胞輸送システムとクライオライブラリによる保管システムは問題なく動作しており、今後国内で行われた再生医療サンプルを確実に保管・管理するのに適したシステムであると言える。

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表**

##### 1. 論文発表

巻末研究成果一覧表参照

##### 2. 学会発表

各分担者の項を参照

#### **H. 知的所有権の取得状況**

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案特許

なし

##### 3. その他

なし