

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 1 頁	

1. 目的

凍結細胞チューブ運搬に使用する凍結保存試料搬送用容器（以下ドライシッパー）の準備に関する手順を記す。

2. 適応範囲

大阪大学内及び他施設から大阪大学医学部眼科学教室への凍結細胞を搬送する全ての工程に適応する。

3. 責任体制

本手順書は iPS スtock 事業分担者が作成し、責任者が承認する。

大阪大学内及び他施設から大阪大学医学部眼科学教室への凍結細胞の受取とクライオライブラリー内へ入庫及び出庫作業は、クライオライブラリーに関する十分な知識及び技術を有する研究者が担当する。

4. 遵守事項

クライオライブラリー取扱説明書（ダイジェスト版）

5. 作業手順

5-1 サンプル受入前登録

5-1-1 サンプル送付を希望する施設の担当者にエントリーシートを E メールで送付する。
（添付 1）

5-1-2 返信された記入済のエントリーシートをもとに、仮登録を行う。

5-1-3 仮登録は、大阪大学で作成した登録記録に情報を入力する。

5-2 凍結チューブの送付

5-2-1 エントリーシートで指定された必要本数の凍結チューブを郵送する。

5-2-2 郵送した日付は、登録記録に入力する。

※ドライアイス梱包にてサンプルが輸送される場合は、以下 5-3～5-5 の作業は不要。

5-3 凍結保存試料搬送容器

5-3-1 エントリーシートで指定された相手先のサンプル輸送日に合わせて搬送容器を準備する。

5-3-2 準備開始は火曜日のみとする。

5-3-3 大陽日酸株式会社が販売する CXR シリーズ（米国 Taylor-Wharton 社製）CXR100 を使用する。

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 2 頁	

5-4 ドライシッパーの事前準備（本作業は共同研究棟 1 階クライオライブラリー室で行うこととする。作業中は換気に十分注意し、作業は 2 人で行うこと）

5-4-1 液体窒素充填（1 日前）；火曜日

5-4-1.1 充填前にドライシッパーの空重量を測定する。（キャニスターも容器内へ入れておく）

5-4-1.2 容器内部のネックチューブ下端まで液体窒素を充填する。

5-4-1.3 ネックチューブコアを装着し、30 分間放置する。

5-4-1.4 ネックチューブコアを外し、容器内部の吸着材に液体窒素がすべて吸着されていることを確認し、ネックチューブコア下端まで液体窒素を充填する。

5-4-1.5 ネックチューブコアを装着し、1 時間放置する。

5-4-1.6 ネックチューブコアを外し、容器内部の吸着材に液体窒素がすべて吸着されていることを確認し、ネックチューブコア下端まで液体窒素を充填する。

5-4-1.7 ネックチューブコアを装着し、5 時間放置する。

5-4-1.8 ネックチューブコアを外し、吸着して減量した分の液体窒素をネックチューブコア下端まで充填し、ネックチューブコアを装着して 24 時間放置する。

5-4-2 ドライシッパー準備（2 日目）；水曜日

5-4-2.1 ネックチューブコアを外し、容器の底に残っている液体窒素を廃棄する。

5-4-2.2 容器を台秤に乗せ、重量を測定する。空容器の重量に対して、約 3.0kg 増加していることを確認して、充填完了とする。

5-4-2.3 クライオスリーブを装着したケーンをドライシッパー内に設置する。

5-5 ドライシッパーの輸送準備

5-5-1 大阪大学施設内での凍結細胞輸送

5-5-1.1 大阪大学の各部署の細胞保存の担当者と連絡を取り、入庫の日程を調整する。

5-5-1.2 日程調整後、その日に合わせてドライシッパーを準備する。

5-5-1.3 保存日または前日に、ドライシッパーを各部署の細胞保存の担当者まで持っていく。

5-5-2 他施設（大阪大学の外部）での凍結細胞輸送

5-5-2.1 輸送はクロネコヤマト便で、着払いにて行うこととする。
（全国の発送日程；添付 3）

5-5-2.2 クロネコヤマトからの集荷は水曜日 17 時とする。

5-5-2.3 輸送する日の 15 時までにクロネコヤマトに集荷の電話をする。

5-5-2.4 ドライシッパーに南京錠をつけ、容器を専用のハードケースに入れる。

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 3 頁	

5-5-2.5 輸送前チェックシートを同封し（添付 2）、しっかりとフック錠をかける。フック錠のタブにはテープを貼り付け、輸送途中でタブがあがらないようにする。

5-5-2.6 集荷用（着払い）用紙に必要事項を記入する。

5-5-2.7 集荷は、眼科研究室（臨床研究棟 4 階）とする。

5-6 クライオライブラリーへの凍結細胞の輸送

5-6-1 大阪大学施設内の部署からクライオライブラリーまでの凍結細胞輸送

5-6-1.1 凍結細胞の輸送は、大阪大学が準備し事前に輸送したドライシッパーを用いて行う。

5-6-1.2 輸送の際にチェックシートを記入の上、ドライシッパーを収める専用のハードケース内に同封してもらう。

5-6-1.3 大阪大学内の部署の担当者とクライオライブラリー担当者と受取の日時を事前に連絡をして取り決める。

5-6-1.4 指定の日時に、クライオライブラリー部屋（共同研究棟 L 階）にドライシッパーを持ち込む。

5-6-2 他施設から大阪大学への凍結細胞の輸送（ドライシッパー使用の場合）

5-6-2.1 他施設からの輸送は月曜日か火曜日か水曜日の 3 日に限定して行う。

5-6-2.2 凍結細胞の輸送は、大阪大学が準備し事前に輸送したドライシッパーを用いて行う。

5-6-2.3 輸送の際にチェックシートを記入の上、ドライシッパーを収める専用のハードケース内に同封してもらう。

5-6-2.4 発送する同じ週の木曜日着指定で大阪大学の眼科研究室（臨床研究棟 4 階）に輸送する。

5-6-3 他施設から大阪大学への凍結細胞の輸送（ドライアイス使用の場合）

5-6-3.1 緊急での輸送が必要な場合、ドライアイスで凍結細胞を梱包して大阪大学へ輸送する。

5-6-3.2 発泡スチロール容器にドライアイスを 5kg 程度砕いて入れる。（ドライアイスの量は、容器の大きさや輸送日数によって調整する）

5-6-3.3 凍結細胞アンプルをドライアイスの底、または真中に埋めるように梱包する。ドライアイスの上には置かないこと。

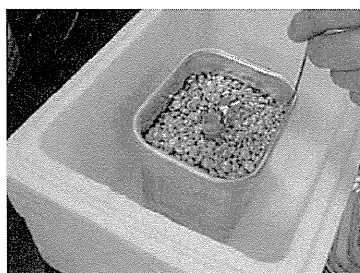
5-6-3.4 発泡スチロール容器を封じ、冷凍便などを利用して大阪大学の眼科研究室（臨床研究棟 4 階）に輸送する。輸送の際は到着日と時間を指定し、事前に大阪大学の担当者へ連絡をしておく。

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 4 頁	

5-7 凍結細胞の受入

5-7-1 凍結細胞受入の準備（本作業は、クライオライブラリー室内で行う）

- 5-7-1.1 アルミビーズをアルミ容器に入れ、受け入れの 1 日前から-80℃冷凍庫に入れておく。
- 5-7-1.2 -80℃冷凍庫からアルミビーズ入り容器を取り出し、発砲スチロール容器の中へ入れる。
- 5-7-1.3 アルミビーズ入り容器にフタをした状態で、発砲スチロール容器の中へ液体窒素を注ぐ（アルミ容器の中央程度の高さまで注ぐ）。



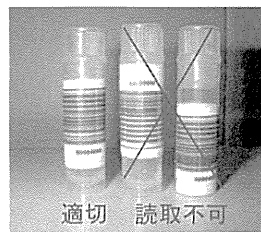
（イメージ図）

- 5-7-1.4 アルミビーズが十分に冷えるまで、15 分程待つ。液体窒素が減ってきたら追加する。
- 5-7-1.5 クライオライブラリーの電源を ON にし、照明を ON にする。

5-7-2 仮登録（詳細は「検体管理ソフトウェア SampleConductorPro for CryoLibrary 簡易マニュアル」参照）

- 5-7-2.1 PC を起動し、ラベルプリンターBMP51 の電源を ON にする。
- 5-7-2.2 「SampleConductorPro」を立ち上げる。
- 5-7-2.3 サンプル登録ボタンをクリックし、サンプル登録を行う。
- 5-7-2.4 ラベル印刷を行いたいサンプルを選択し、右クリックして「ラベルを印刷」を選択する。
- 5-7-2.5 「印刷」ボタンをクリックし、ラベル印字を実行する。
- 5-7-2.6 ドライシッパー、あるいはドライアイスで梱包された凍結細胞を取り出し、アンプルの破損や融解がないかをすばやく確認する。
- 5-7-2.7 発行されたラベルを間違えないように該当チューブ側面に巻きつけて貼る（ラベルは出来るだけチューブの上側に貼ること。右下がりに貼ると貼りやすい。最低 2mm オーバーラップさせること）。
ラベルを貼ったチューブは十分に冷えたアルミビーズの中へ深く差しておく。

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 5 頁	



ラベルを上下逆に貼ったり、下側に貼り付けてバーコードがカップに被ると読み取りができないため適切な位置に貼ること。

5-7-2.8 クライオライブラリーに収納したいサンプルを選択し、右クリックして「クライオライブラリー予約」を選択し、クライオライブラリー登録用ワークリストの登録を完了する。

5-7-2.9 ワークリスト管理画面タブを開き、希望のリストを選択して「ワークリスト印刷」を選択すると、レシートプリンタから登録用ワークリストが印刷される（印刷初回は印刷ボタンをクリックしてもすぐに印刷されないため、印刷ボタンを何度もクリックせずに待つこと）。

5-7-3 サンプル入庫予約（詳細は「クライオライブラリー取扱説明書（ダイジェスト版）」参照）

5-7-3.1 PC の電源を入れ、クライオライブラリーソフトウェアを立ち上げる。

5-7-3.2 メイン画面から「新規入庫命令予約」を選択し、作業コードを入力して作業確認を選択する。

5-7-3.3 新規入庫命令の予約画面が開いたら、バーコードリーダーを使用して印刷したワークリストの作業コードを読み取り、「サンプル名」と「ロット No.」の項目に入力する。

ケーンと段を指定してサンプル入庫を行いたい場合は、予約画面の「新規指定入庫」を選択する（5-7.3.6 項へ進む）

5-7-3.4 アンプル数をワークリストの登録サンプル数と同数を入力する。

5-7-3.5 「空検索」ボタンをクリックして空きケーン情報を取得し、「命令確定」ボタンをクリックする。

5-7-3.6 アンプル ID 項目にカーソルを移動し、ワークリストのバーコードを 1 つずつ読み取ってデータを登録し「アンプル登録」をクリックする。

「新規指定入庫」を選択した場合は、入庫したいケーンと段も入力して「アンプル登録」をクリックする。

5-7-3.7 すべてのサンプルを登録し終わったら、「予約登録」ボタンをクリックする。すぐにクライオライブラリーへの収納を実行する場合は「予約実行」をクリックする。（「予約実行」を選択した場合は 5-7.4.2 項へ進む）

5-7-4 サンプル入庫（詳細は「クライオライブラリー取扱説明書（ダイジェスト版）」参照）

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 6 頁	

- 5-7-4.1 メイン画面から「予約命令の実行開始」を選択し、作業者コードを入力して作業者確認を選択する。
- 5-7-4.2 実行 JOB の選択ウィンドウから JOB を選択する。
- 5-7-4.3 「実行開始」ボタンをクリックし、「実行を操作してください」の表示が出たら、サンプルをアルミビーズの中に入れたままクライオライブラリー本体前まで持参する。
- 5-7-4.4 本体液晶パネルの点滅している「実行」ボタンを押す。ロボットが動作し指定されたケーンをパスボックス位置まで移動する。
- 5-7-4.5 ロボットの動きが停止することを確認し、液晶パネルに「作業可能」と表示されたら、パスボックスの扉を開けてサンプルを所定のケーン位置へセットする。
- 5-7-4.6 パスボックスの扉を閉め、液晶パネルの「完了」ボタンを押してから「実行」ボタンを押す。
収納数分だけ、5-7-4.5 と 5-7-4.6 の作業を繰り返す。
- 5-7-4.7 ロボットが目的ケーンを凍結保存容器に入庫する。元の位置にケーンが入庫されたことを確認する。
- 5-7-4.8 一連の操作が正常終了することを確認する。

5-8 サンプルの出庫

5-8-1 出庫の準備（必要時）

- 5-8-1.1 アルミビーズをアルミ容器に入れ、出庫の 1 日前から -80℃冷凍庫に入れておく。
- 5-8-1.2 -80℃冷凍庫からアルミビーズ入り容器を取出し、発砲スチロール容器の中へ入れる。
- 5-8-1.3 アルミビーズ入り容器にフタをした状態で、発砲スチロール容器の中へ液体窒素を注ぐ（アルミ容器の中央程度の高さまで注ぐ）。
- 5-8-1.4 アルミビーズが十分に冷えるまで、15 分程待つ。液体窒素が減ってきたら追加する。

5-8-2 サンプル出庫予約（詳細は「クライオライブラリー取扱説明書（ダイジェスト版）」参照）

- 5-8-2.1 クライオライブラリーの電源を ON にし、照明を ON にする。
- 5-8-2.2 PC の電源を入れ、クライオライブラリーソフトウェアを立ち上げる。
- 5-8-2.3 メイン画面から「出庫命令の予約」を選択し、作業者コードを入力して作業者確認を選択する。

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 7 頁	

- 5-8-2.4 出庫命令の予約画面が開いたらアンプル ID 項目にカーソルを移動し、ワークリストから出庫したいサンプルのバーコードを読み取ってアンプル ID を入力する
- 5-8-2.5 表示された情報が出庫したいサンプルと一致することを確認し、「出庫登録」ボタンをクリックする。出庫したいサンプルが複数ある場合は、5-8.2.3 と 5-8.2.4 の作業を出庫数分繰り返す。
- 5-8-2.6 すべてのサンプルを登録し終わったら、「予約登録」ボタンをクリックする。すぐに出庫を実行する場合は「予約実行」をクリックする。（「予約実行」を選択した場合は 5-8-3.2 項へ進む）

5-8-3 サンプル出庫（詳細は「クライオライブラリー取扱説明書（ダイジェスト版）」参照）

- 5-8-3.1 メイン画面から「予約命令の実行開始」を選択し、作業コードを入力して作業確認を選択する。
- 5-8-3.2 実行 JOB の選択ウィンドウから JOB を選択する。
- 5-8-3.3 「実行開始」ボタンをクリックし、「実行を操作してください」の表示が出たら、クライオライブラリー本体前まで移動する。
- 5-8-3.4 本体液晶パネルの点滅している「実行」ボタンを押す。ロボットが動作し目的ケーンをパスボックス位置まで移動する。
- 5-8-3.5 ロボットの動きが停止することを確認し、液晶パネルに「作業可能」と表示されたら、パスボックスの扉を開けてサンプルを所定のケーン位置から取り出す。
- 5-8-3.6 パスボックスの扉を閉め、液晶パネルの「完了」ボタンを押してから「実行」ボタンを押す。
出庫数分だけ、5-7.3.5 と 5-7.3.6 の作業を繰り返す。
- 5-8-3.7 ロボットが目的ケーンを凍結保存容器に入庫する。元の位置にケーンが入庫されたことを確認する。
- 5-8-3.8 一連の操作が正常終了することを確認する。

5-9 クライオライブラリーと検体ソフトウェア SampleConductorPro とのデータ同期

① 起動時自動同期

SampleConductorPro が起動した際に、自動的にクライオライブラリーデータベースに接続し、更新済データを同期する。

② 手動処理

SampleConductorPro ソフトウェアのボトムエリアにある「クライオライブラリー同期」ボタンをクリックすると、手動でクライオライブラリーデータベースのデータを同期する。

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 8 頁	

6. 緊急時の対応

停電など緊急時の対応については「クライオライブラリー緊急時対応マニュアル」を参照。

緊急時パターン

- 〈1〉 ケーンを掴んでいる時にピッキングマシンが止まった時
- 〈2〉 ケーンを掴んでいる時にピッキングマシンが止まり、ピッキングマシンが邪魔でケーンが戻せない場合
- 〈3〉 アンプルが装置内に落下した場合

また、その他の異常時の対応については、「クライオライブラリー取扱説明書（ダイジェスト版）」の「6.異常時の対処（P.11）」を参照。

・電磁弁稼働異常による、クライオライブラリーへの液体窒素供給エラー時の対応

- 1) 液面監視装置のリセットボタンを押す。画面に何も表示されていない場合は、画面をタッチして表示させる。
- 2) クライオライブラリー本体側のレベルマスターのスイッチを一旦 OFF にし、ON に戻す。
- 3) 自動供給が開始されたことを確認する。（供給が開始するまで 10 分ほどかかる）

対応できない異常については「緊急連絡体制表」の該当場所に連絡する。

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 9 頁	

添付書類

- 1) エントリーシート
- 2) 輸送前チェックシート
- 3) クロネコヤマト宅急便の全国配送日程図
- 4) 仮登録から細胞保存までのフローチャート

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 10 頁	

再生医療治療に用いる体性幹細胞・iPS細胞ストック登録申請書(仮)									
申請日	年 月 日								
機関名				部署名					
住 所					TEL				
担当者				E-mail					
登録サンプルに関する情報				発送予定日	年 月 日				
手術日	年 月 日					阪大記入欄			
匿名化番号 または識別ID				サンプル本数	本	サンプルID			
						号機 使用ケーンNo.	-		
手術日	年 月 日					阪大記入欄			
匿名化番号 または識別ID				サンプル本数	本	サンプルID			
						号機 使用ケーンNo.	-		
手術日	年 月 日					阪大記入欄			
匿名化番号 または識別ID				サンプル本数	本	サンプルID			
						号機 使用ケーンNo.	-		
* ドライシッパーの低温保持限界があるため、大阪大学に木曜日到着必須となっております。よって、同週の月、火、水曜日のいずれの日程かで発送完了をお願い致します。									
保存サンプル専用チューブについて									
受取希望日	年 月 日			希望本数	本	☐ 同製品を貴施設で準備します。			
** クライオライブラリーでのサンプル保存に使用する凍結チューブは、CORNING 2mL internal threaded PP cryogenic vial (cat# 430488) のみを使用し、その他のチューブでの凍結保存登録は受付不可とする。原則、大阪大学より希望本数を事前に郵送致します。									
ドライシッパー(輸送用液体窒素保管容器)の発送について									
受取希望日	年 月 日(金曜日)まで			☐ 特に指定しません。					
*** 大阪大学からのドライシッパーの発送は毎週水曜のみで翌日(木曜日)または翌々日(金曜日)に到着予定です。									
その他特記事項									
本状の送付先 : 本状を添付の上、以下の3人の担当者全員宛に電子メールで申請をお願い致します。									
大阪大学大学院医学系研究科眼科学 〒565-0871 吹田市山田丘2-2 TEL: 06-6210-8388 FAX: 06-6210-8387									
川崎 諭	E-mail: skawasaki@ophthal.med.osaka-u.ac.jp								
本田 愛	E-mail: yuki.kobayashi@ophthal.med.osaka-u.ac.jp								
小林 由紀	E-mail: ai.honda@ophthal.med.osaka-u.ac.jp								
大阪大学記入欄						受領日: 年 月 日			
保存担当者				備 考					
登録・入庫	年 月 日								
受取状況	凍結サンプル ☐ 異常なし ☐ 異常あり								

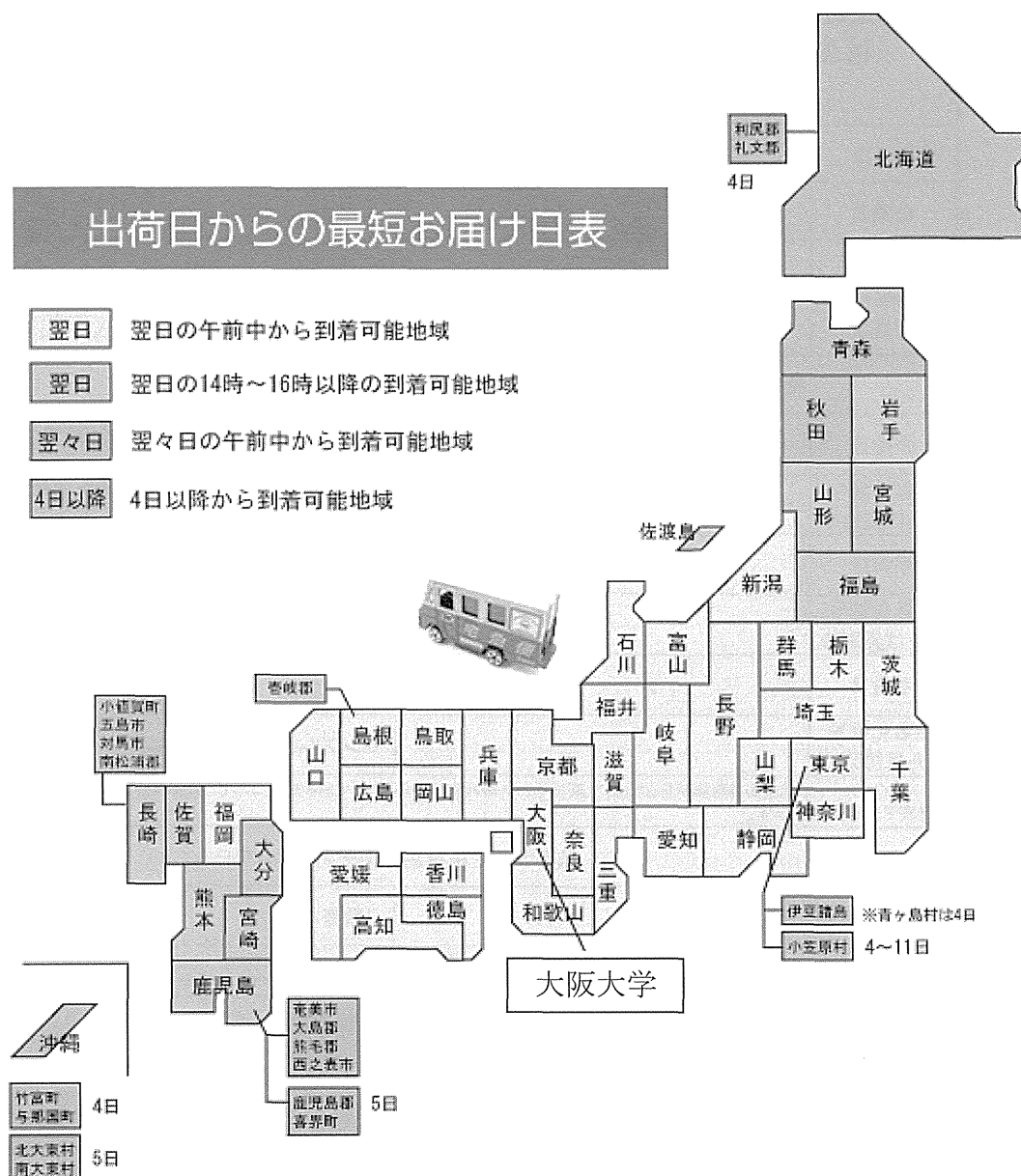
出荷日からの最短お届け日表

翌日 翌日の午前中から到着可能地域

翌日 翌日の14時～16時以降の到着可能地域

翌々日 翌々日の午前中から到着可能地域

4日以降 4日以降から到着可能地域



	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 12 頁	

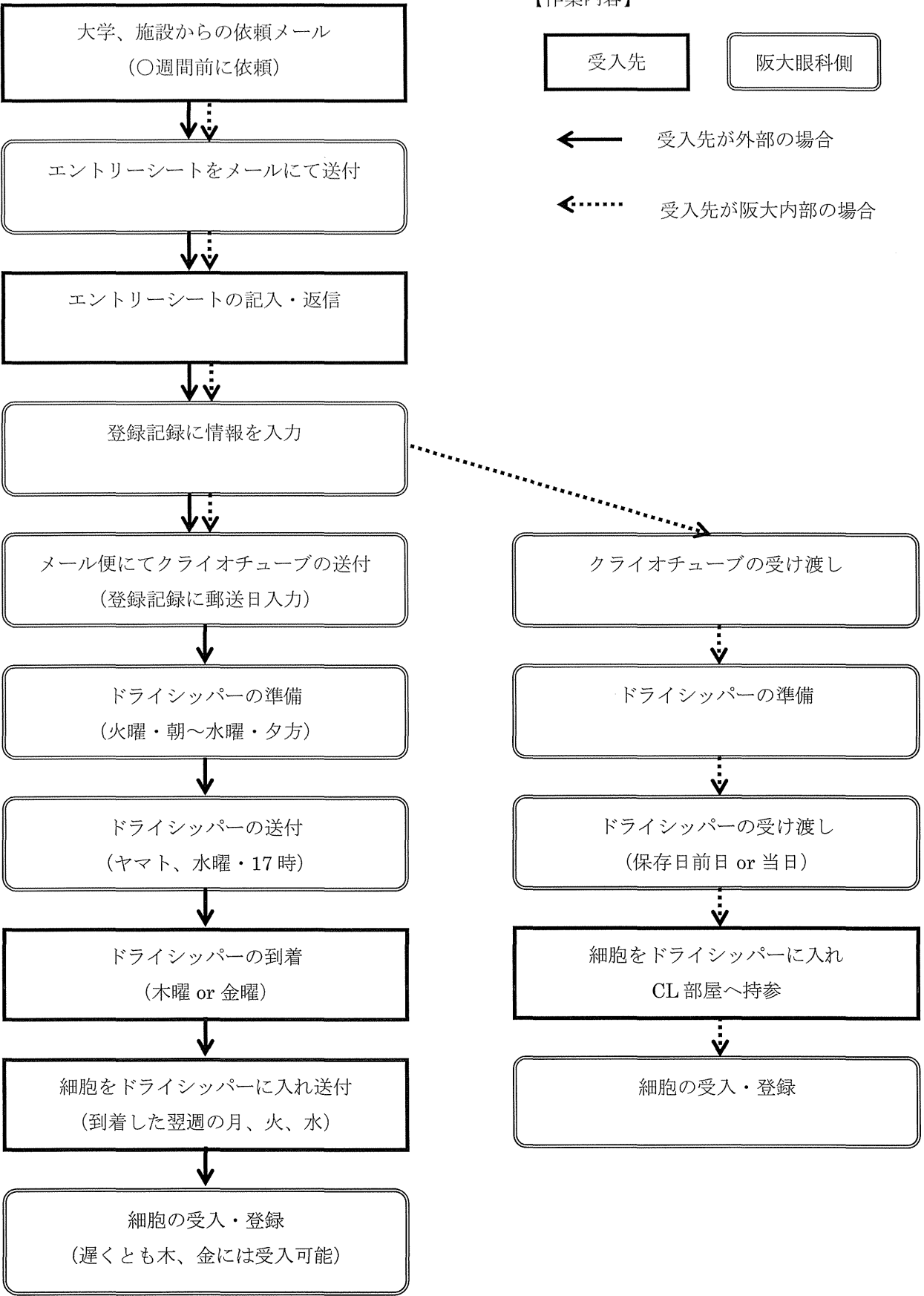
輸送前チェックシート

確認者名：_____

	チェック内容	チェック欄
1	チューブは指定のチューブを使用していますか？ (CORNING 2mL internal threaded PP cryogenic vial (cat# 430488))	
2	申請書に記入した匿名化番号（あるいは識別 ID）と、凍結チューブに記入した内容は一致していますか？	
3	申請書に記入したサンプル本数と一致していますか？	
4	ドライシッパーに鍵はかけましたか？	
5	大阪大学に金曜日までに届きますか？	
6	送り状の内容に間違いはありませんか？	

各項目を確認の上、チェック欄にチェックを入れてください。
すべて確認が終わりましたら、チェックシートをハードケース内に同封して下さい。

クライオライブラリー細胞受入の流れ



細胞運搬クールドラ

【クールドラの流れ】

(大阪大学作業)



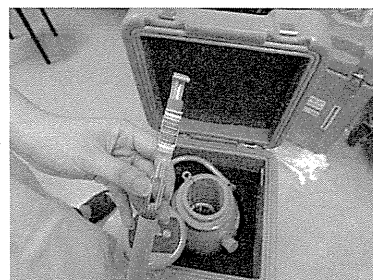
ドライシッパーに液体窒素を充填し、使用準備を行う。(準備には2日かかる)



準備終了後、ドライシッパーを保護ケースに入れて各大学へ送る。また、事前に -150°C で凍結保存しておいた 293T 細胞バイアル 1 本も、ドライアイスにて梱包して送る。



(輸送先作業)



ドライシッパーが到着したら、細胞バイアルを取り出してドライシッパーへ移動する。また、作業記録シートに必要事項を記入する。細胞バイアルが入ったドライシッパーは室温で置いておく。

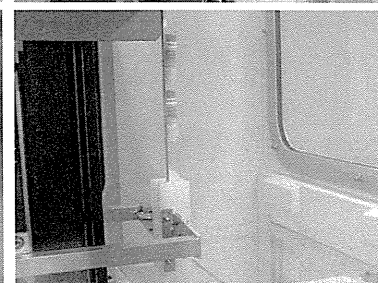
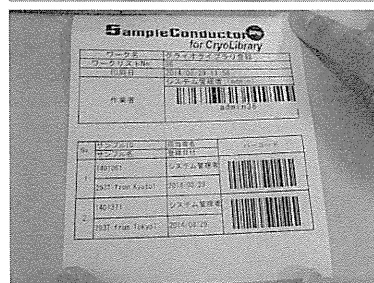
(大阪大学作業)

翌日



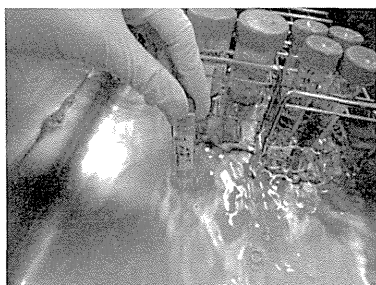
保護ケース内に記入済みの作業記録シートを入れ、ドライシッパーを大阪大学へ送り返す。

翌日



各大学よりドライシッパーが到着したら細胞バイアルを取り出し、クライオライブラリーに入庫登録をして入庫する。

4日後



位相差顕微鏡にて
細胞を観察する。

クライオライブラリーより細胞を出庫し、解凍して生細胞率を測定後、T75 フラスコに播種する。コントロールとして、 -150°C で保存しておいた細胞も同様に解凍、播種する。

【各ドライシッパーの輸送前後の重量】

ドライシッパー① 京都府立医科大学

ドライシッパー② 東京大学

液体窒素充填後

ドライシッパー① 7.74 kg

ドライシッパー② 7.62 kg



返送後（液体窒素充填終了から3日経過）

ドライシッパー① 7.12 kg (-0.62 kg)

ドライシッパー② 7.00 kg (-0.62 kg)

→ 温度測定したところ、両方とも -193°C 以下だった。

【ヒト胎児腎細胞 HEK293T 生細胞率測定】

解凍した細胞を回収して遠心し、培地 1ml で懸濁してトリパンプルーを加え、血球計算板にて4ヶ所カウント。

サンプル	Control	京都府立医科大学	東京大学
生細胞数	96	81	77
死細胞数	1	3	2
生細胞率	99.0%	96.4%	97.5%

→ コントロールと比較して生細胞率に大差なし。

【293T 細胞形状(位相差)】

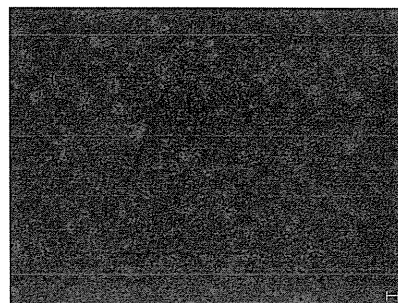
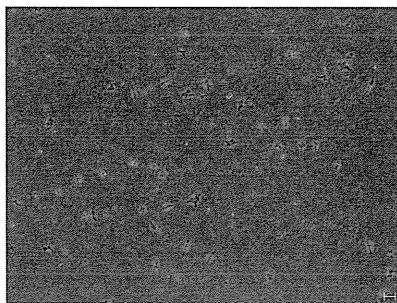
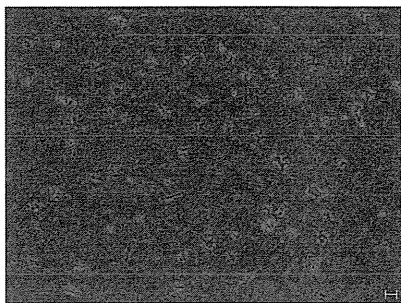
Day1

Control

京都府立医科大学

東京大学

×5



×10



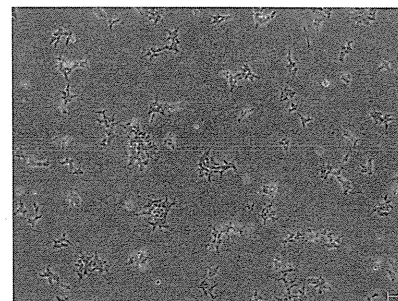
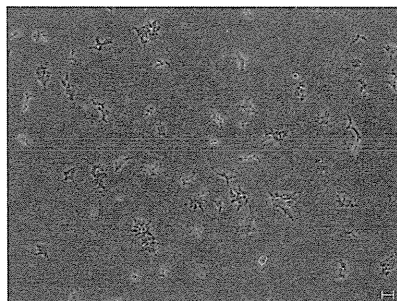
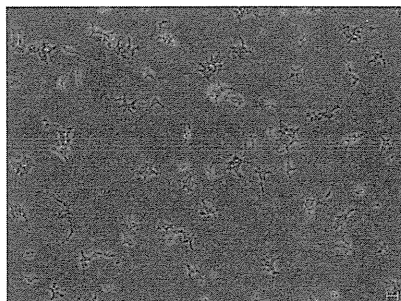
Day2

Control

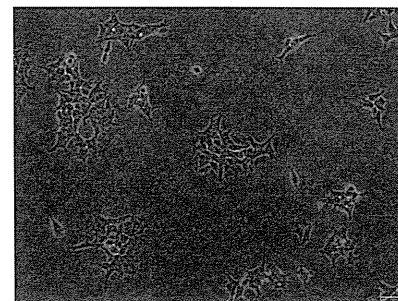
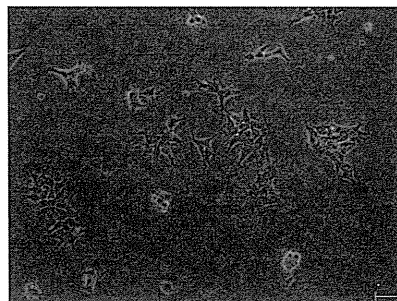
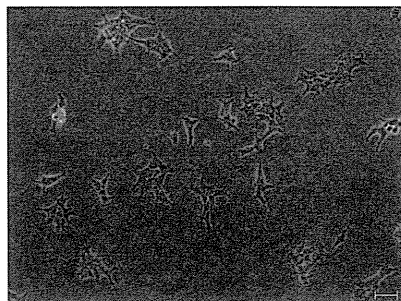
京都府立医科大学

東京大学

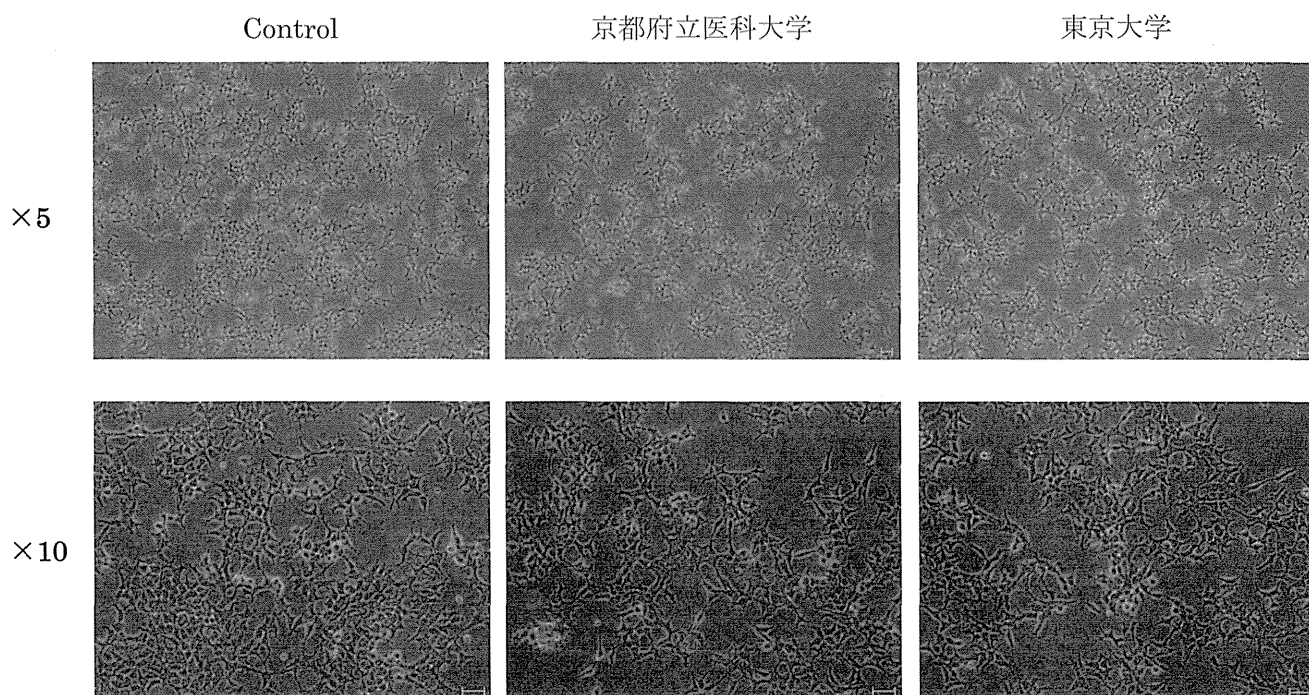
×5



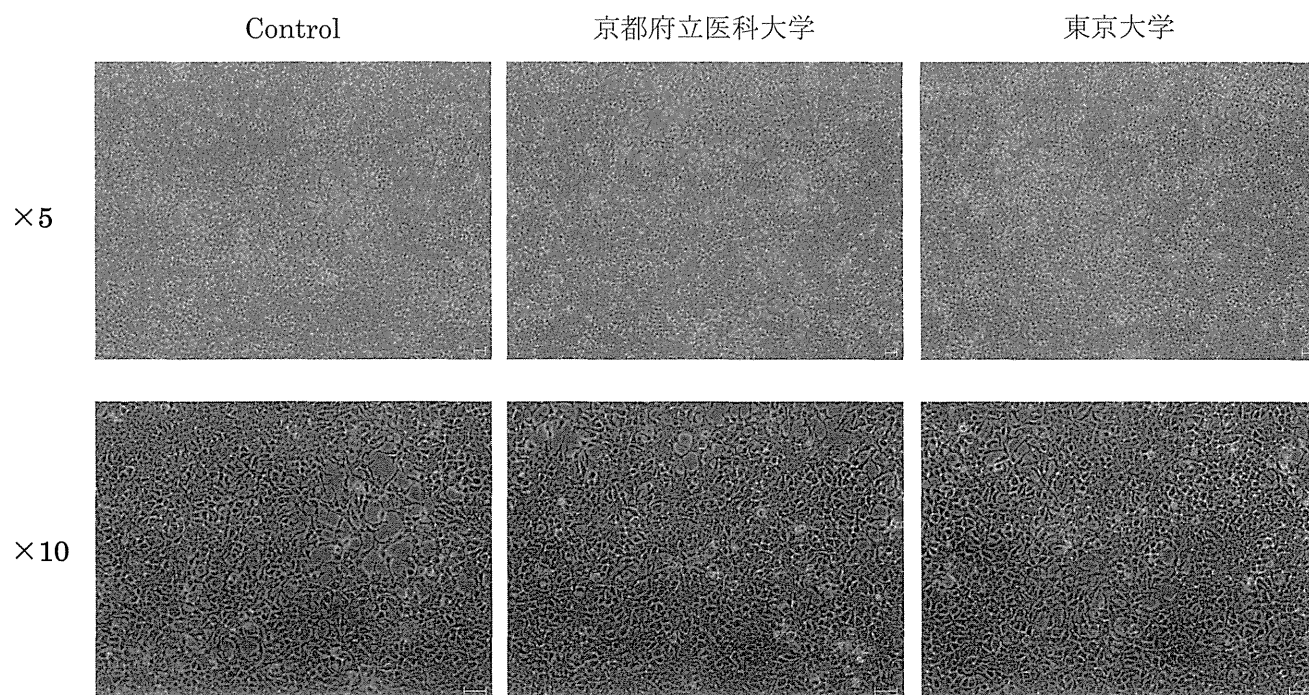
×10



Day3



Day5



→ コントロールと比較して細胞形状に大差なし。

京都府立医科大学

細胞運搬コールドラン作業記録シート

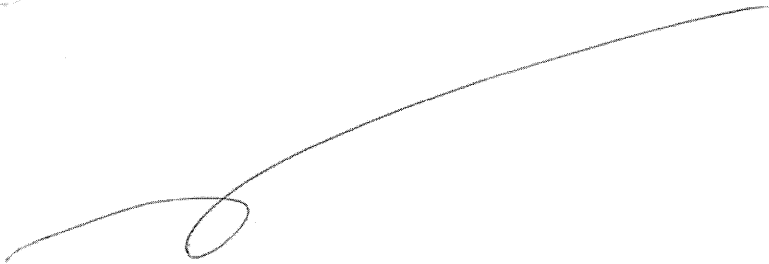
京都府立医科大学 医学部 生理学教室
記録者名： 谷宮克彦

下記の各項目を順に確認の上、チェック&記入欄にチェック(✓)、もしくは記入をして下さい。すべて確認が終わりましたら、シートをハードケース内に同封して下さい。
よろしくお願いいたします。

	チェック内容	チェック&記入欄
1	ドライシッパー内部、外部に異常はありませんか？	シッパー外蓋のタブのフックが 90° 回っていました。
2	細胞サンプルに異常はありませんか？（溶けているなど）	✓
3	細胞をドライシッパーへ入れた時間	8/27/13 : 25
4	ドライシッパーのフタはきちんと閉まっていますか？	✓
5	返送用の送り状の内容に間違いはありませんか？	✓

(その他、何かお気づきの点がありましたらご記入ください)

1: フックが 180° 回っていました。シッパーのフタは開いていませんでした。
到着時にこの状態でした。



細胞運搬コールドラン作業記録シート

記録者名：柳沢 誠一

下記の各項目を順に確認の上、チェック&記入欄にチェック(✓)、もしくは記入をして下さい。すべて確認が終わりましたら、シートをハードケース内に同封して下さい。
よろしくお願いいたします。

	チェック内容	チェック&記入欄
1	ドライシッパー内部、外部に異常はありませんか？	○
2	細胞サンプルに異常はありませんか？（溶けているなど）	○
3	細胞をドライシッパーへ入れた時間	10 : 55
4	ドライシッパーのフタはきちんと閉まっていますか？	○
5	返送用の送り状の内容に間違いはありませんか？	○

(その他、何かお気づきの点がありましたらご記入ください)

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」

分担研究報告書

「体性幹細胞、iPS 細胞等を用いる臨床研究支援技術開発」

研究分担者	澤 芳樹	大阪大学 心臓血管外科学教室	教授
研究分担者	齋藤 充弘	大阪大学 未来細胞医療学共同研究講座	特任准教授
研究協力者	宮川 繁	大阪大学 心臓血管外科学	特任准教授

【研究要旨】

iPS 細胞由来心筋細胞シートの移植による再生治療は新たな治療法として期待されており、高純度の心筋細胞を得られる分化誘導法の研究が進んでいる。一方、心臓組織では心筋細胞の割合は半分以下とされていることから、心筋細胞シートの形態形成や機能において、心筋細胞純度を検討した結果、至適な iPS 細胞由来心筋細胞の細胞シートにおいて、電気生理学的機能、細胞シート構造、液性因子の産生に優れており、iPS 細胞由来心筋組織移植による再生治療においてより優れた再生効果をもつ可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は、50 例近い心臓移植と 200 例を超える補助人工心臓治療を経験する国内有数の重症心不全治療の拠点である。しかし、多数の重症心不全患者を目の前に置換型治療の限界と再生型治療の必要性を痛感し、自己骨格筋由来の筋芽細胞シートによる心筋再生治療法を開発することにより補助人工心臓離脱成功例を世界で初めて報告した。さらに 20 例以上の臨床例の経験から細胞シート移植技術を確立した。しかし筋芽細胞シートの機序は HGF 等によるパラクリン効果で、残存心筋細胞が少ない症例に対して有効性は低い。重症心不全例に対しては心筋と電氣的に結合し直接心機能を向上しうる心筋細胞の大量補充が根治的治療につながると思われ、その細胞源として iPS 細胞が最も期待されているが、我々はすでにヒト iPS 由来心筋細胞の高率分化誘導大量培養法を開発している。一方、Connexin43 や収縮タンパク発現など心筋細胞源の能力を最大限に生かす細胞移植技術は重要であり、我々は不全心に対するヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートによる心機能向上の POC を大動物実験で既に得ている。

iPS 細胞由来心筋細胞の臨床応用を見据えた場合、心臓組織では心筋細胞の割合は半分以下とされており、心筋細胞シートの形態形成や機能において適切な心筋細胞純度が存在する事が推測される。そこで、in vitro において、心筋細胞シートの最適な心筋細胞と非心筋細胞の比率を電気生理学的組織学的に検討した。

B. 研究方法

これまで確立した iPS 細胞から心筋細胞