別添１

令和７年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
（厚生労働科学特別研究事業）

# 特定細胞加工物の攪拌等に関するリスク評価研究
# （課題番号：25CA2051）

# 令和７年度　総括研究報告書

研究代表者　佐藤　陽治

令和８（２０２６）年　５月

別添２

目　　次

I. 総括研究報告書
特定細胞加工物の攪拌等に関するリスク評価研究　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　1
佐藤 陽治

II. 研究成果の刊行について　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　23

別添３

令和７年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
総括研究報告書

特定細胞加工物の攪拌等に関するリスク評価研究（課題番号：25CA2051）

研究代表者　佐藤 陽治　国立医薬品食品衛生研究所 副所長

研究要旨：本研究は、令和7年8月に発生した自己脂肪由来の間葉系幹細胞（MSC）の投与途中における患者死亡事案を受け、医療機関が実施していた物理的操作（解凍後のボルテックスミキサーによる約1分間の強い攪拌）が細胞の品質や安全性に及ぼす急性リスクを科学的に検証したものである。事案の細胞が廃棄されていたため、2種類のヒト脂肪組織由来不死化MSC株および初代培養ヒト脂肪由来MSC（ADSC）を用い、臨床を模した凍結・解凍条件下で5秒または60秒のボルテックス攪拌、および23G注射針のシリンジ通過操作を負荷してシミュレーション実験を行った。検証の結果、不死化株および初代細胞のいずれにおいても、最大負荷条件（60秒攪拌＋針通過）であっても処理直後から室温静置2時間後に至るまで細胞生存率は95%以上の高い水準を維持した。総細胞数、生細胞数、平均細胞直径においても対照群との顕著な乖離は見られず、播種後の画像解析でも細胞の急性破砕や異常な形態変化、巨大な不可逆的凝集塊の形成は一貫して認められなかった。以上の結果から、独自のボルテックス攪拌操作そのものが、直ちに急性肺塞栓症などの致命的な原因となるリスクは低いと結論づけられた。ただし、本研究は形態的・物理的な急性指標の評価にとどまり、機械的ストレスが誘発する組織因子（TF）発現などの分子生物学的変化や血栓形成リスク、被投与者の基礎疾患等の背景因子による影響までは検討しておらず、これらが今後の課題である。

研究分担者

| | | |
|---|---|---|
| 安田　智 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 再生・細胞医療製品部　部長 |
| 三浦　巧 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 再生・細胞医療製品部第一室　室長 |
| 草川　森士 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 再生・細胞医療製品部第二室　主任研究官 |
| 澤田　留美 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 再生・細胞医療製品部第二室　室長 |


## Ａ．研究目的

自由診療における幹細胞を用いた再生医療の多くは、再生医療等安全性確保法において第二種再生医療等提供計画（治療）に該当する。また本提供計画は、第107回再生医療等評価部会資料によると、令和４年度は896件、令和５年度は1,096件、令和６年度は1,257件の定期報告がなされ、年々増加の一途を辿っており、同様の幹細胞を用いた再生医療が他の自由診療クリニックでも提供されている実態がある。今般、自己脂肪由来の間葉系幹細胞（以下 MSC という。）を用いた再生医療を実施した自由診療クリニックにおいて、幹細胞の投与中に被投与者が急変し、急速に心停止に至り死亡する事例が発生した（令和7年8月29日 厚生労働省報道発表資料「再生医療等の安全性の確保等に関する法律に基づく緊急命令について」）。当該診療においては、細胞の凍結保存剤として用いられるジメチルスルホキシド（DMSO）の濃度が10％である投与前最終産物を解凍後、約１分間のボルテックス（振動攪拌、渦巻き攪拌）する処理がなされていたことが判明している。DMSOは細胞膜透過性を高める作用があり、高濃度のDMSOの存在下で解凍後の不安定な幹細胞に強い振動攪拌を与えた場合、幹細胞の安定性に大きな影響を与えることが想定された。そこで、このような振動攪拌処置が特定細胞加工物である幹細胞の安定性に与えた影響及び振動攪拌により破砕されたデオキシリボ核酸等の細胞内容物が凝集塊を生じさせるリスク等について緊急に評価を行うことを目的に本研究は実施された。

## Ｂ．研究方法

### B.1. 実験材料および細胞培養

#### B.1.1 不死化間葉系幹細胞株の選定と維持培養

本研究における物理的ストレスの影響および実験の再現性を評価するため、まずは遺伝子導入により表現型が安定化された2種類のヒト脂肪組織由来不死化MSC株を選定した。

JCRB-1555株: 独立行政法人医薬基盤・健康・栄養研究所JCRB細胞バンクより入手。本細胞株は、ヒト脂肪由来幹細胞にヒトテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）、ヒトパピローマウイルス（HPV）E6遺伝子、およびBmi-1遺伝子を導入し、不死化させたものである。

SCRC-4000株: ATCC（American Type Culture Collection）より入手。本細胞株は、hTERT遺伝子の導入により不死化されたヒト脂肪由来幹細胞である。

各細胞株は、Lonza社のヒト間葉系幹細胞専用培地キットを用い、37℃、5% $CO_2$条件下、加湿インキュベーター内にて対数増殖期を維持するよう継代培養を行った。

#### B.1.2 初代培養ヒト脂肪由来幹細胞の調製

不死化細胞株で得られた知見を検証するため、実際の治療現場で用いられる細胞により近いモデルとして、市販の初代培養ヒト脂肪由来MSC（Primary ADSCs：Adipose-Derived Stem Cells）を使用した。

使用細胞: Lonza社製 Human Adipose-Derived Stem Cells（製品番号：PT-5006, ロット番号：24TL007154）。

本初代細胞は、Lonza社指定の専用低血清培地キットを用いて、製造元の推奨プロトコルに従い拡大培養を行った。なお、初代細胞は不死化細胞株と比較して、培養容器内での増殖時に強い接触阻害を受けやすく、同一の培養面積あたりから回収可能な総細胞数が限定されるという特性が事前に確認された。そのため、後述する凍結サンプルの調製にあたっては、回収操作のタイミングおよび播種密度の厳密な管理を行った。

### B.2. 凍結サンプルの調製と保存

#### B.2.1 凍結保存液（臨床模倣液）の調製

実際の自由診療事案において被投与者に点滴静注される直前の細胞組成および溶媒環境を *in vitro* で可能な限り忠実に再現するため、以下の組成からなる凍結保存液（臨床模倣液）を調製した。

ベース溶媒: 市販の点滴用リンゲル液（生理食塩水ベースの電解質解液）

保護剤・添加剤: 10%（v/v）ジメチルスルホキシド（DMSO）、および 5%（w/v）ヒト血清アルブミン（HSA）

#### B.2.2 高密度細胞凍結バイアルの作成

対数増殖期にある不死化MSC（JCRB-1555、SCRC-4000）および初代培養ADSCを、それぞれトリプシン-EDTA溶液を用いて培養容器から剥離・回収した。遠心分離（400×g（不死化MSC）または300 ×g（ADSC）、5分間）により細胞ペレットを回収後、上記凍結保存液に懸濁し、細胞密度が $3.0\times10^7$ cells/mL（高密度条件）となるよう正確に調整した。

調製した細胞懸濁液を、2.0 mL容量の滅菌済みクライオバイアル（CryoVial）へ充填した。充填液量は以下の通りとした。

不死化MSC群: 1バイアルあたり 1.7 mL（総細胞数：$5.0\times10^7$ cells / vial）

初代培養ADSC群: 初代細胞の総回収量の制限に基づき、1バイアルあたり 1.4 mL ～ 1.7 mL の範囲内で充填（ただし、細胞密度は $3.0\times10^7$ cells/mL に完全に統一）。

バイアル充填後、細胞凍結コンテナ（バイセル, 日本フリーザー）に収容して-80℃の超低温フリーザーにて一次凍結を行った後、液体窒素保存容器内（気相）へ移送し、試験に供するまで厳格に凍結保存した。試験の統計的信頼性を確保するため、各実験条件において独立した3回の試行を行い、1試行あたり同一ロットのバイアルを3本ずつ、計9本のバイアルを各処理群の評価に用いる実験デザインを組んだ。

### B.3. 解凍操作および機械的物理ストレス負荷

#### B.3.1 解凍プロトコル

液体窒素保存容器から凍結バイアルを取り出し、37℃の恒温水槽（ウォーターバス）にて、バイアル内の氷晶がわずかに残留する状態（約1～2分間）まで迅速に融解させた。融解後、バイアル表面を70%エタノールにて消毒し、速やかに以下の物理的ストレス負荷実験へと供した。

#### B.3.2 機械的ストレス処理条件（6試験群の設定）

融解直後の細胞に対して機械的刺激が与える影響、およびそれらの複合作用を検証するため、以下の6つの実験処理群（Conditions 1～6）を設定した。ボルテックス撹拌には、実験室用標準ボルテッ

クスミキサー（MX-S 速度可変タイプ，アズワン：目盛りを低速域と高速域の中間である12時の方向に固定）を使用した。

Condition-1: 即時セルカウント群
（対照群/ Control）
解凍直後のバイアルから細胞液をサンプリングし、機械的操作を一切加えることなく、直ちに後述する測定用希釈液で20倍に希釈してセルカウントに供した。

Condition-2: 23G注射針通過群
Condition-1でサンプリングした後の残液（機械的撹拌なし）に対し、臨床で標準的に用いられる23Gの注射針を装着した5 mL滅菌シリンジを用いて、全量を速やかに吸引および排出させる操作を1回実施した。その後、20倍に希釈して計測した。

Condition-3: 5秒ボルテックス攪拌群
解凍直後のバイアル（蓋を閉じた状態）を、ボルテックスミキサーのヘッドへ直接押し当て、中速にて連続5秒間の振動攪拌（渦巻き攪拌）を負荷した。処理後、速やかに20倍に希釈して計測した。

Condition-4: 5秒ボルテックス＋23G注射針通過群
Condition-3の5秒間ボルテックス処理を施した直後の細胞液に対し、さらに23G針付きシリンジを用いて全量の吸引・排出操作を1回加えた。その後、20倍に希釈して計測した。

Condition-5: 60秒ボルテックス攪拌群
（臨床再現群）
死亡事案の発生した自由診療クリニックの特定操作を正確にシミュレーションするため、解凍直後のバイアルに対し、ボルテックスミキサーで連続60秒間の強い振動攪拌を負荷した。処理後、直ちに20倍に希釈して計測した。

Condition-6: 60秒ボルテックス
＋ 23G注射針通過群（最大複合負荷群）
Condition-5の60秒間ボルテックス処理を完了した直後の細胞液に対し、さらに23G針付きシリンジを用いて全量の吸引・排出操作を1回負荷した。その後、20倍に希釈して計測した。

### B.4. 経時的安定性評価および測定手順

#### B.4.1 静置保存条件と測定タイムポイント

臨床現場における解凍から被投与者への点滴完了までの待機時間および劣化リスクを模倣するため、各機械的ストレス処理を完了した細胞サンプル（20倍希釈前の原液、または20倍希釈後の液）は、すべて室温（約25℃）環境下にて静置保存した。各処理条件において、以下の3つの時点で定量的測定および定性的画像評価を行った。

1）0 時間（処理直後）
2）0.5 時間後（30分経過時）
3）2 時間後（120分経過時）

#### B.4.2 希釈・懸濁液の種類による比較試験

融解後の細胞希釈・懸濁液が細胞生存性に与える影響を比較評価するため、不死化MSC株および初代培養ADSCを用いた試験において、細胞融解後の20倍希釈・懸濁時に、以下の2つの希釈法を用い、データを取得した。

希釈法A: 細胞培養用液体培地（medium）での希釈と懸濁
希釈法B: 臨床用生理食塩水（0.9% NaCl, saline）での希釈と懸濁

### B.5. 評価項目およびデータ解析

#### B.5.1 自動セルカウンターによる定量的パラメータの計測

各タイムポイントにおいて、細胞懸濁液を20倍に希釈した後、一定量をサンプリングして専用カートリッジ内に吸引させた。細胞は、カートリッジ内でアクリジンオレンジおよびDAPIにより自動的に染色され、キャリブレーション済みの高精度自動セルカウンター（ケモメテック社製 NC-202）を用いて測定した。

自動解析ソフトウェアを介して、1サンプルあたりから以下の6つのパラメータを同時に取得・算出した。

1）総細胞数（Total Cell Count）[cells/mL]
2）生細胞数（Viable Cell Count）[cells/mL]
3）死細胞数（Dead Cell Count）[cells/mL]
4）細胞生存率（Viability）[%]
=生細胞数/総細胞数 x100
5）平均細胞直径（Average Cell Diameter）[μm]
6）細胞凝集率（Aggregation Rate）[%]

なお、セルカウンター用カートリッジ内の微小流路閉塞を防ぎ、かつ均一なサンプリングを行うために、サンプルを吸引する直前に、すべての検体に対して「軽いピペッティング操作による均一再

懸濁」を一律に実施した。

### B.5.2 播種後画像解析による細胞形態・分布の評価

定量的セルカウントデータを補完し、物理的刺激に伴う細胞断片（デブリ）の集積や不可逆的な巨大凝集塊の有無を視覚的にマッピングするため、画像解析試験を行った。

各時間点（0、0.5、2時間）で20倍に希釈された細胞懸濁液を、さらに測定用溶媒にて5倍（解凍原液から計100倍）に希釈し、細胞数を揃えた評価用播種液を調製した。これを平底96ウェルマイクロプレートの各ウェルに対し、以下の2つの細胞密度条件下で播種した。

1）低密度条件: 1ウェルあたり 30,000 cells
（液量：100 µL）
2）高密度条件: 1ウェルあたり 60,000 cells
（液量：200 µL）

播種後、細胞を完全に沈降させ、実際の生着・形態変化の初期相を観察するため、プレートを室温下（約25℃）で2時間静置した。静置完了後、細胞形態解析イメージングシステム（SCREENホールディングス社製、Cell$^3$iMager duos 2）を用いて、各ウェル底面の全視野デジタル画像を撮影した。得られた顕微鏡画像に対し、細胞の分散度、破砕片の残渣レベル、および異常な塊状変異（クラスター形成）の有無を判定するマイクロモルフォロジー解析を適用した。

### B.5.3 統計解析

すべての測定値は、独立した3回以上の試行（N=3）から得られたデータに基づき、平均値 ± 標準偏差（Mean ± SD）として表記した。各処理条件（Conditions 1〜6）間、および経時的タイムポイント（0、0.5、2時間）間における統計学的有意差の検定には、一元配置分散分析（One-way ANOVA）に続くTukeyの後多重比較検定、または二元配置分散分析（Two-way ANOVA）を適用した。統計的有意水準は $p < 0.05$ 未満に設定した。

### （倫理面への配慮）

本研究では、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規程における「ヒト生体試料及びそれに準ずる試料で非該当となるケース」のうち「会社、組織が製造、あるいは販売・譲渡しているヒト細胞」のリストに掲載されているヒト細胞（適切な倫理審査を経て採取、販売・譲渡されていることが上記委員会で既に確認されているヒト細胞）が用いられている。従って、上記委員会による審査対象には該当しなかった。

## C．研究結果

### C.1. 不死化間葉系幹細胞株を用いた機械的ストレス負荷試験

### C.1.1 細胞生存率、総細胞数、 生細胞数の推移

2種類のヒト脂肪組織由来不死化間葉系幹細胞株（JCRB-1555株およびSCRC-4000株）に対し、融解直後に種々の物理的刺激（Condition-1：対照群、Condition-2：23G針通過、Condition-3：5秒ボルテックス、Condition-4：5秒ボルテックス＋23G針通過、Condition-5：60秒ボルテックス、Condition-6：60秒ボルテックス＋23G針通過）を負荷し、室温静置下における経時的変化（0時間、0.5時間、2時間）を追跡した。

JCRB-1555株において、物理操作直後（0時間）の細胞生存率は、ボルテックス撹拌を施さない対照群（Condition-1）および23G針通過群（Condition-2）で95%以上の極めて高い水準を示した。実際の事案を模した60秒間の連続ボルテックス撹拌を負荷した群（Condition-5）、およびこれに針通過を組み合わせた最大複合負荷群（Condition-6）においても、生存率はそれぞれ95%以上を維持しており、対照群との間に統計学的な有意差は認められなかった。（Fig. 1A）

室温静置2時間経過時において、全条件で死細胞数の緩やかな増加に伴う生存率の微減が観察されたが、最終時間点（2時間）における生存率は依然として90%以上を担保していた。この経時的な生存率の低下傾向は、60秒ボルテックス撹拌群（Condition-5, 6）に特異的な現象ではなく、撹拌を行わなかった対照群（Condition-1）でも同様の軌跡を描いた。したがって、この生存率の低下は機械的ストレスそのものの直接的影響ではなく、解凍後の時間経過（室温静置環境）に伴う生理的劣化に起因するものと判断された。

また、総細胞数（Total Cell Count）および生細胞数（Viable Cell Count）の推移においても、物理操作の有無や強弱（5秒対60秒）による顕著な減少やばらつきは検出されなかった。激しい機械的剪断力が加わる23G注射針の通過操作を重ねた場合（Condition-4, 6）であっても、細胞数が急激に減少するような現象は観察されず、物理刺激による細胞の急性破砕（バースト）は極めて限定的であることが定量的に立証された。希釈・懸濁液については培地（希釈法A）と生理食塩水（希釈法B）とで顕著な差は認められなかった。培地で希釈した場合（希釈法A）は、2時間で細胞の凝集が増える傾向にあったが、全体から見ればそれでも凝集はわずかであった。（Fig. 1B）

もう一方の細胞株であるSCRC-4000株を用いた検証においても、JCRB-1555株とほぼ完全に同様の結果が得られた。0時間、0.5時間、2時間のすべてのタイムポイントにおいて、60秒ボルテックス撹拌群（Condition-5, 6）の細胞生存率および生細胞数は

対照群と同等であり、激しい物理攪拌が不死化MSCの構造的安定性を直接的に破壊しないことが二つの独立した細胞株によって再現された。(Fig. 3A-3B & 4A-4C)

### C.1.2 平均細胞直径および凝集指標の定量的評価

自動セルカウンターの画像解析機能から得られた平均細胞直径(Average Cell Diameter)は、JCRB-1555株およびSCRC-4000株のいずれにおいても、全実験条件を通じて約16 μmから18 μmの範囲で安定しており、処理条件に依存した直径のシフトや偏りは認められなかった。(Fig. 1B & 3B)

一方、定量的な指標としての細胞凝集率(Aggregation Rate)については、一部のボルテックス処理条件や経過時間点において数値の上昇や微増傾向が記録された。しかしながら、これらの数値の変動は、60秒ボルテックス撹拌(Condition-5)や最大負荷(Condition-6)といった特定の激しい処理群にのみ一貫して現れる性質のものではなく、物理操作の強度や時間変化との間に明確な相関性を見出すことは困難であった。

### C.1.3 播種後画像解析によるマイクロモルフォロジー評価

セルカウント用の20倍希釈サンプルをさらに5倍に希釈し、96ウェルプレート底面へ低密度(30,000 cells/well)および高密度(60,000 cells/well)で播種し、室温下で2時間静置した後の細胞付着・分布状態を顕微鏡画像により解析した。(Fig. 2A-2C & 4A-4C)

画像解析の結果、Condition-1からCondition-6に至るすべてのウェルにおいて、播種密度に応じた均一な細胞の沈降と分散パターンが観察された。60秒間の強いボルテックス撹拌を負荷したサンプル(Condition-5, 6)の画像においても、対照群(Condition-1)と比較して、細胞の急性破砕片(デブリ)の異常な集積や、複数の細胞が不可逆的に絡み合って形成される「巨大な細胞凝集塊(クラスター)」の発生は一貫して認められなかった。すべての処理群において細胞の完全性は良好に保たれており、物理操作に起因する明確なマイクロモルフォロジー学的差異は検出されなかった。

## C.2. 初代培養ヒト脂肪由来幹細胞を用いた機械的ストレス負荷試験

### C.2.1 細胞生存率および細胞数の挙動

臨床実態への近似を目的として実施された初代培養ヒト脂肪由来幹細胞(Primary ADSCs)を用いた試験においても、融解直後の細胞生存率は97%から99%という極めて高い初期値を示した。

5秒および60秒のボルテックス撹拌、ならびに23G注射針のシリンジ通過を負荷した直後(0時間)において、生存率の低下や総細胞数の減少は認められなかった。最大複合負荷条件(Condition-6)であっても、生細胞数は対照群(Condition-1)と有意な差を示さず、初代培養細胞のレベルにおいても、解凍直後の独自のボルテックス撹拌操作が直接的に細胞を即時破砕するリスクは低いことが実証された。(Fig. 5A)

### C.2.2 経過時間およびサンプリング希釈液(培地 vs 生理食塩水)による影響

初代培養ADSCの試験では、物理操作後の静置時間(0時間 → 0.5時間 → 2時間)に伴い、一部の条件において死細胞数の増加が、前述の不死化MSC株よりも明確に観察された。この経時的な生存性の低下は、細胞をサンプリング・希釈する際に用いた溶媒(懸濁液)の種類によって若干の差を示した。(Fig. 5A)

1) 希釈法A: 解凍・処理後の細胞を培地で希釈し室温静置した場合、2時間経過時においても細胞生存率は比較的高い水準を維持した。死細胞数は時間たつにつれて希釈法Bよりも増加する傾向があった。ただし絶対数は低く、生存率に大きく影響を与えるものではなかった。
2) 希釈法B: 解凍・処理後の細胞を、臨床を模した生理食塩水で希釈し室温静置した場合、2時間経過時においても細胞生存率は比較的高い水準を維持した、細胞の劣化は緩やかであった。

なお、この培地希釈下における経時的な生存率の低下は、60秒ボルテックス撹拌群(Condition-5)だけでなく、撹拌を一切行っていない対照群(Condition-1)や23G針通過群(Condition-2)でも同様の振る舞いを示した。これらのデータは、初代細胞の生存性低下を誘発する主たる要因が「解凍直後の物理的撹拌操作の有無や強度」ではないことを示唆している。

### C.2.3 平均細胞直径および細胞種特異的ばらつき

初代培養ADSCの平均細胞直径は、全処理条件において約20 μmから22 μmの範囲で推移した。これは、前述の不死化MSC(約16〜18 μm)と比較して明確に大きな値であり、初代幹細胞株が持つ固有の生理的サイズ特性が反映された結果であった。(Fig. 5B)

この細胞サイズの大きさに起因して、初代細胞はコンフルエント時の接触阻害を受けやすく、同一培養面積からの総回収細胞数が不死化細胞に比して著しく制限された。このため、凍結バイアル作成時の充填液量にわずかなばらつき(1.4〜1.7 mL)が生じたものの、凍結時の最終細胞密度を$3.0\times10^{7}$ cells/mLの一定値に厳格に均一化した結果、処理条件間における生細胞数および総細胞数の初期値(0時間)のばらつきは最小限に抑えられ、物理ストレスの強弱を正確に比較評価することが可能となっ

た。

### C.2.4 凝集評価および播種後形態観察

初代細胞における定量的凝集率のデータにおいても、一部のタイムポイントや条件で数値の上下変動がみられた。しかし、これらの数値は測定直前に一律に執行される「軽いピペッティング操作（サンプルの均一化）」による再分散効果や、流路内の細胞濃度の微細な不均一性を完全に排除できていないため、処理条件ごとの明瞭な操作依存的な傾向として解釈することは困難であり、定性的な指標に留まった。

これを補完する目的で行われた、96ウェルプレート播種2時間後の顕微鏡画像解析においては、低密度（30,000 cells/well）および高密度（60,000 cells/well）のいずれの条件下においても、全6条件を通じて細胞はウェル底面に均一に分布していた。不死化MSCの試験結果と同様に、60秒連続ボルテックス撹拌を施した群（Condition-5, 6）のウェル内において、物理的ダメージを原因とするような細胞破砕片の顕著な残渣や、不可逆的かつ巨大な塊状変異（細胞凝集塊）の形成は一切観察されなかった。これにより、初代培養ADSCの系においても、今回の実験室スケールでの再現実験の範囲内においては、解凍直後のボルテックス撹拌操作が直ちに致命的な巨大凝集塊を直接誘発する可能性（急性リスク）は低いことが視覚的・形態学的にも裏付けられた。（Fig. 6A-6C）

## D．考察

### D.1. 機械的操作が細胞の急性特性に与える影響

本研究は、令和7年8月に発生した自己脂肪由来間葉系幹細胞（MSC）の投与途中に生じた患者死亡事案を端緒とし、臨床現場で独自に行われていた「融解直後のボルテックスミキサーによる約1分間の強い振動撹拌」および「23G注射針のシリンジ通過」という物理的操作が、細胞の品質と安全性に及ぼす影響を *in vitro* 環境下で検証したものである。

2種類のヒト脂肪組織由来不死化MSC株（JCRB-1555、SCRC-4000）および初代培養ヒト脂肪由来幹細胞（ADSC）を用いた一連のシミュレーション実験の結果、最大負荷条件（60秒間の連続ボルテックス撹拌および23G針通過の複合ストレス）を負荷した群においても、処理直後から室温静置2時間後に至るまで、細胞生存率は95%以上の極めて高い水準を維持していた。また、総細胞数および生細胞数、平均細胞直径のいずれの定量的指標においても、撹拌操作を行わない対照群との間に明確な悪影響や有意な乖離は検出されなかった。さらに、プレート播種後のマイクロモルフォロジー観察において、物理ストレスに起因する急激な細胞破砕片（デブリ）の集積や異常な形態変異は一貫して認められなかった。

一般に、凍結融解直後の細胞は細胞膜の透過性や構造的安定性が著しく低下しており、機械的剪断力に対して脆弱であると認識されている。しかし、本実験結果は、1分間程度の中速ボルテックス撹拌や臨床用注射針の通過に伴う流体力学的剪断ストレスそのものは、MSCの細胞膜の完全性を即座に破壊し、細胞の大量破砕（バースト）を誘発する直接的な要因にはなり得ないことを強く示唆している。すなわち、物理的操作そのものがもたらす構造的な急性リスクは、当初の懸念に反して極めて低いと結論づけられる。

### D.2. 経時的安定性を左右する環境因子の同定

一方で、処理後の室温静置時間（0時間 → 0.5時間 → 2時間）に伴う経時的変化においては、一部の条件で死細胞数の増加（生存率の緩やかな低下）が観察された。この現象の挙動は、特に環境ストレスへの感受性が高いと推測される初代培養ADSCにおいて顕著であり、細胞をサンプリング・希釈した際の溶媒（懸濁液）の組成によって明確な差異を示した。

維持培地で希釈した方法（希釈法A）と比較して、臨床での点滴投与を模した生理食塩水で希釈した方法（希釈法B）では、静置2時間後における死細胞数の増加が有意に促進された。重要な点として、この生存性の低下は60秒ボルテックス撹拌群（Condition-5, 6）に特異的なものではなく、撹拌を一切行っていない対照群（Condition-1）や23G針通過群（Condition-2）においても全く同様の軌跡をたどって発生していた。

この事実は、解凍後の幹細胞の生存性を担保する上での主たる支配因子が「解凍直後の物理的操作の有無や強度」ではなく、「解凍・調製後に置かれた懸濁・希釈液の生理環境（栄養成分や浸透圧保護因子の有無）」および「投与されるまでの待機時間の長さ」であることを科学的に実証している。したがって、臨床現場における細胞調製から投与完了までのタイムマネジメント、および最適な調製溶媒の選定は、物理的撹拌の回避以上に安全性を担保する上で重要な管理指標（SOP）となる。

### D.3. 本研究における科学的・技術的限界

本研究は、実際の事案で投与された細胞そのものが廃棄されていたという制約下において、入手可能な限定的情報から *in vitro* の系を構築したものであり、以下の重大な技術的・科学的限界を有している。これらは、本成果を臨床での安全性評価へそのまま一般化・拡大解釈することを制限する因子である。

第一に、「自動セルカウント技術の制約に伴う凝集評価の不確実性」である。本実験における定量的凝集率は、処理条件や時間点によって数値の上下変

動を示したが、明確な操作依存性を見出すことは困難であった。これは、自動セルカウンターの測定機構上、流路閉塞を防ぎ均一な計測を行うために、注入直前にすべてのサンプルに対して「軽いピペッティングによる再懸濁操作」を一律に施さざるを得ないという実験操作上の限界に起因する。仮に、ボルテックス撹拌や注射針通過の直後に、細胞同士や漏出した微量成分が絡み合った「一時的かつ可逆的な細胞凝集」が形成されていたとしても、測定直前のピペッティングによる再分散効果によって消失してしまい、物理刺激がもたらす純粋な初期凝集作用を正確に分離・定量できていない可能性を排除できない。

第二に、「分子生物学的および機能的な質的変化に対する検証の必要性」である。本研究での評価項目は、生存率、細胞数、サイズ、および播種後2時間の肉眼・形態的観察といった「急性かつ物理的な指標」に限定されている。しかし、MSCは物理的ストレスや不適切な微小環境に晒されると、細胞表面において血液凝固・血栓形成のトリガーとなる「組織因子（Tissue Factor：TF/CD142）」の発現プロファイルが急激に上昇することが近年の知見で示されている。TFの発現上昇は、静脈内投与時における遅延型の微小血管塞栓（肺塞栓症等）を誘発する重篤な重要品質特性（CQA）となり得るが、本研究ではこのような細胞の質的変異や生体内凝固活性の評価までは一切検討が行われていない。

第三に、「被投与者の宿主因子（基礎疾患）との相互作用の再現の難しさ」である。本試験は、健康なドナー由来の市販初代細胞や既に確立された細胞株を用いた *in vitro* 評価である。ただし、実際の死亡事案においては、患者が特定の基礎疾患を抱えている等の患者側の背景因子の存在の可能性についても考慮する必要がある。物理ストレスを受けた細胞、あるいはピペッティングで破砕しきれなかった微小な細胞集団が、当該疾患の下にある患者の静脈内に直接投与された際の塞栓誘発リスクや血流力学的応答は、*in vitro* の急性毒性データのみからでは結論づけることができない。したがって、このような場合には病態モデルを用いたさらなる検証が必要である。

## E．結論

本研究は、解凍直後の独自のボルテックス撹拌操作が細胞品質に与える物理的急性リスクを検証した。不死化MSCおよび初代培養幹細胞を用いたシミュレーション実験の結果、最大負荷（60秒撹拌および23G針通過）を与えた条件においても、処理直後から2時間後に至るまで細胞生存率は95%以上の高い水準を維持した。総細胞数や平均直径に顕著な低下はなく、播種後の画像観察でも急性破砕片の集積や巨大凝集塊の形成は認められなかった。したがって、物理的操作そのものが直ちに致命的な急性肺塞栓症などを直接誘発する可能性は低いと結論づけられる。

しかし、本研究にはいくつかの科学的・技術的限界が存在する。第一に、自動セルカウンター測定直前のピペッティング操作により、解凍直後に形成された可能性のある一時的かつ可逆的な細胞凝集塊が再分散され、純粋な初期凝集作用を分離定量できていない可能性がある。第二に、本研究の評価項目は形態的・物理的急性指標に限定されており、機械的ストレスが誘発する組織因子（TF）の発現上昇といった、生体内での遅延型凝固活性や血栓形成リスクなどの質的変化までは検討していない。第三に、患者個体が基礎疾患（宿主因子）を抱えていた場合、その疾患の影響までは再現されていない。

厚生労働省の公開情報（e-再生医療）によれば、令和7年8月の自由診療での患者死亡事案のクリニック以外にも、承認された計画内に「解凍後のボルテックス処理」を明記している医療機関が複数存在することが判明している。今後も再生医療等評価部会や地方厚生局を通じ、「機械的刺激による急激な細胞破砕のリスクは限定的であるものの、自由診療現場における逸脱操作の防止と細胞調製後の適切なタイムマネジメントは徹底すべきである」とする、一貫性のある行政指導や注意喚起通達を行うことは依然として重要である。

## F．健康危険情報　なし

## G．研究発表

1. 論文発表　なし
2. 学会発表　なし

ただし、令和8年2月26日開催の厚生労働省厚生科学審議会再生医療等評価部会において非公開資料「再生医療等の提供途中に発生した急変及び死亡事例に関する行政処分等について」の中にデータを示しつつ研究結果を報告した。

## H．知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得　なし
2. 実用新案登録　なし

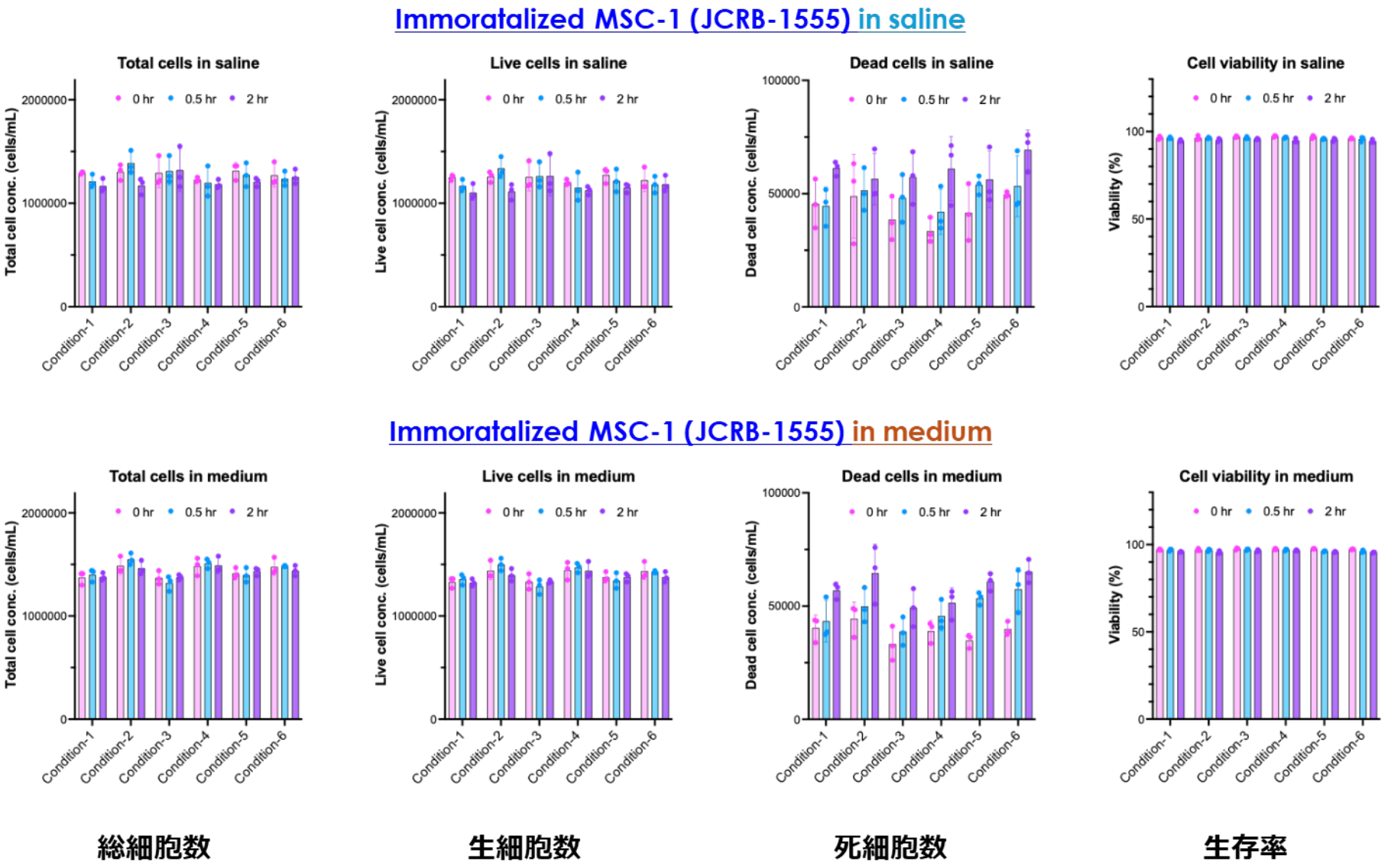



**Fig.1A　JCRB-1555 株の凍結融解および各種物理的刺激後の生存率の時間経過**

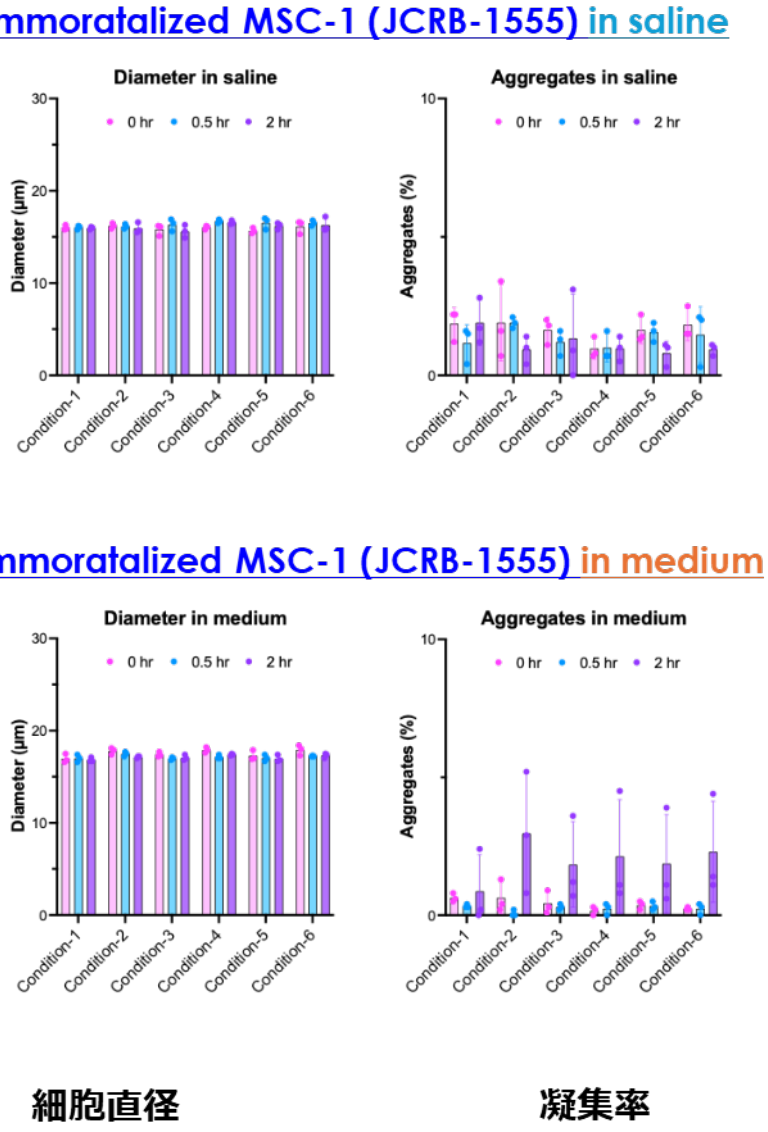



**Fig.1B　JCRB-1555 株の凍結融解および各種物理的刺激後の細胞直径および凝集率の時間経過**

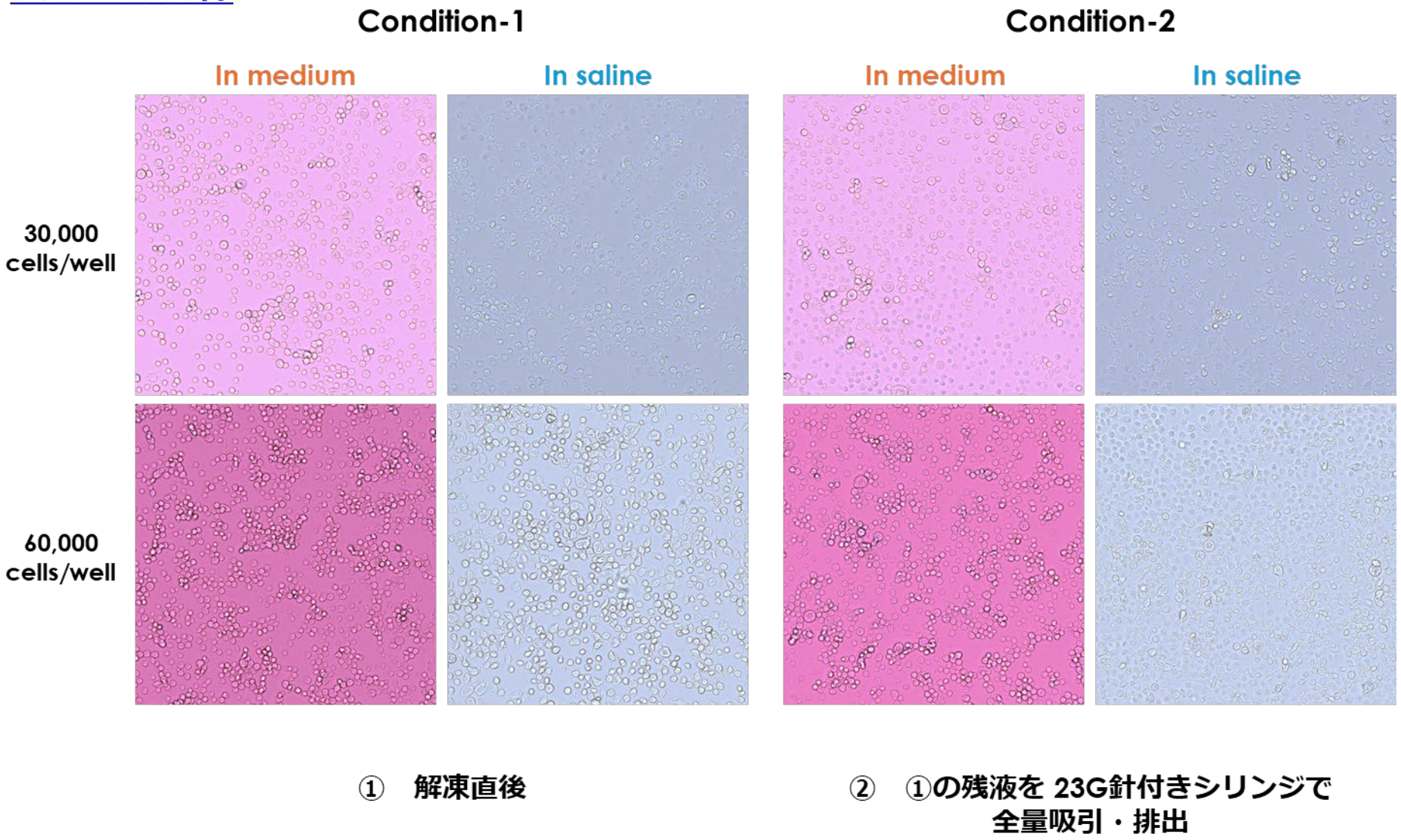



Fig.2A　JCRB-1555 株の凍結融解および各種物理的刺激後 2 時間の時点における細胞形態

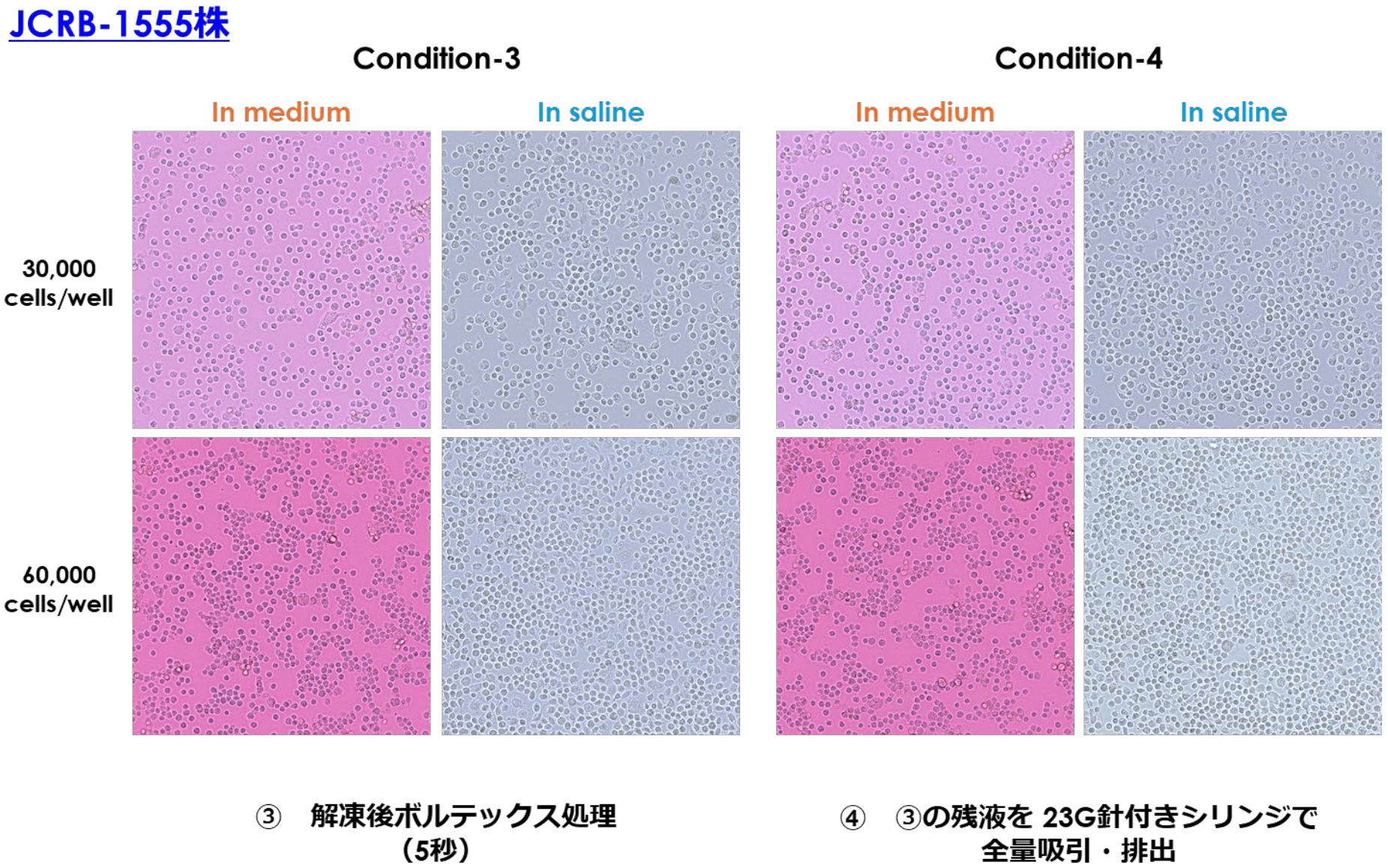



**Fig.2B　JCRB-1555 株の凍結融解および各種物理的刺激後 2 時間の時点における細胞形態**

## JCRB-1555株

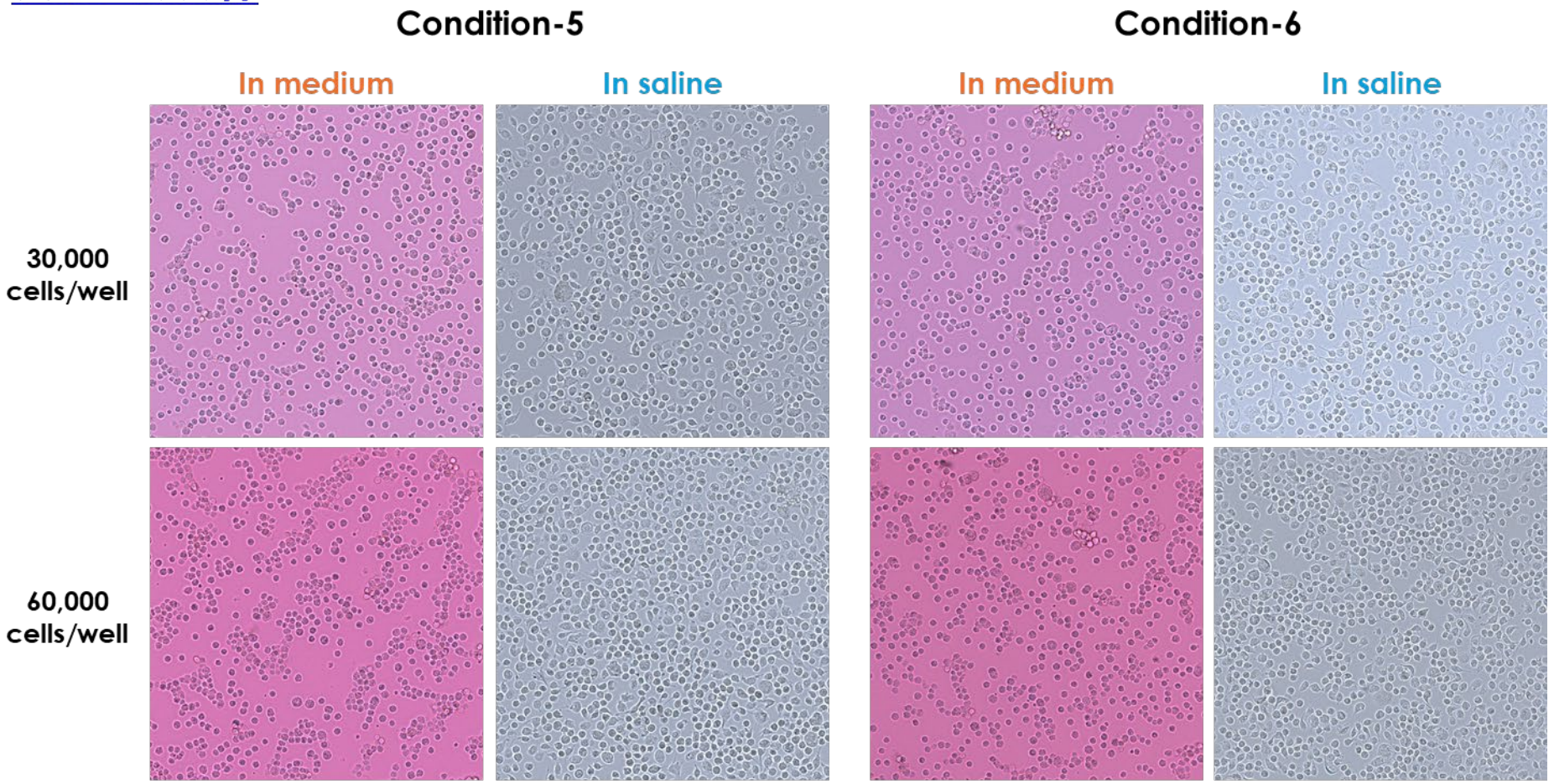



**Fig.2C　JCRB-1555 株の凍結融解および各種物理的刺激後 2 時間の時点における細胞形態**

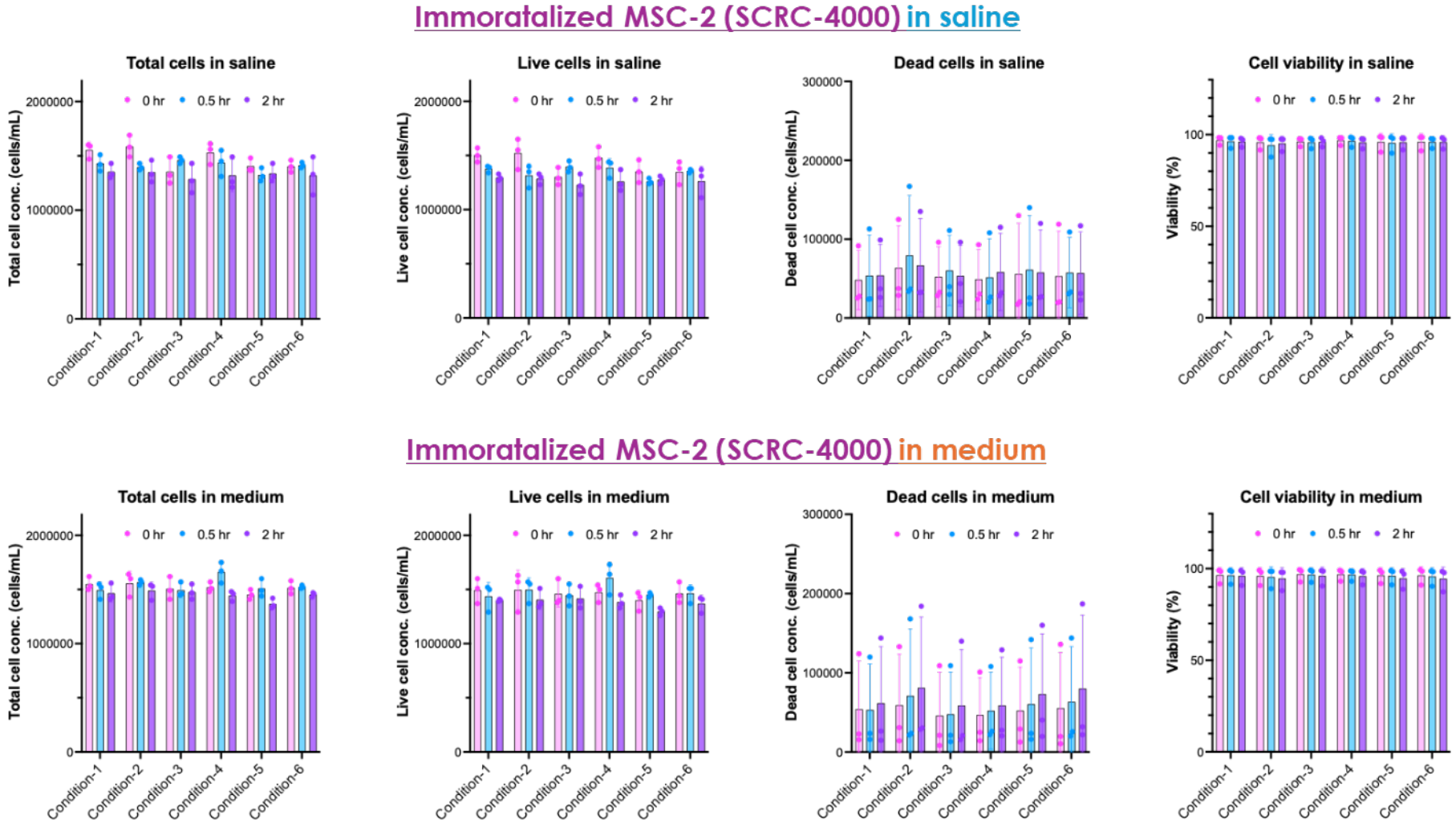



**Fig.3A　SCRC-4000 株の凍結融解および各種物理的刺激後の生存率の時間経過**

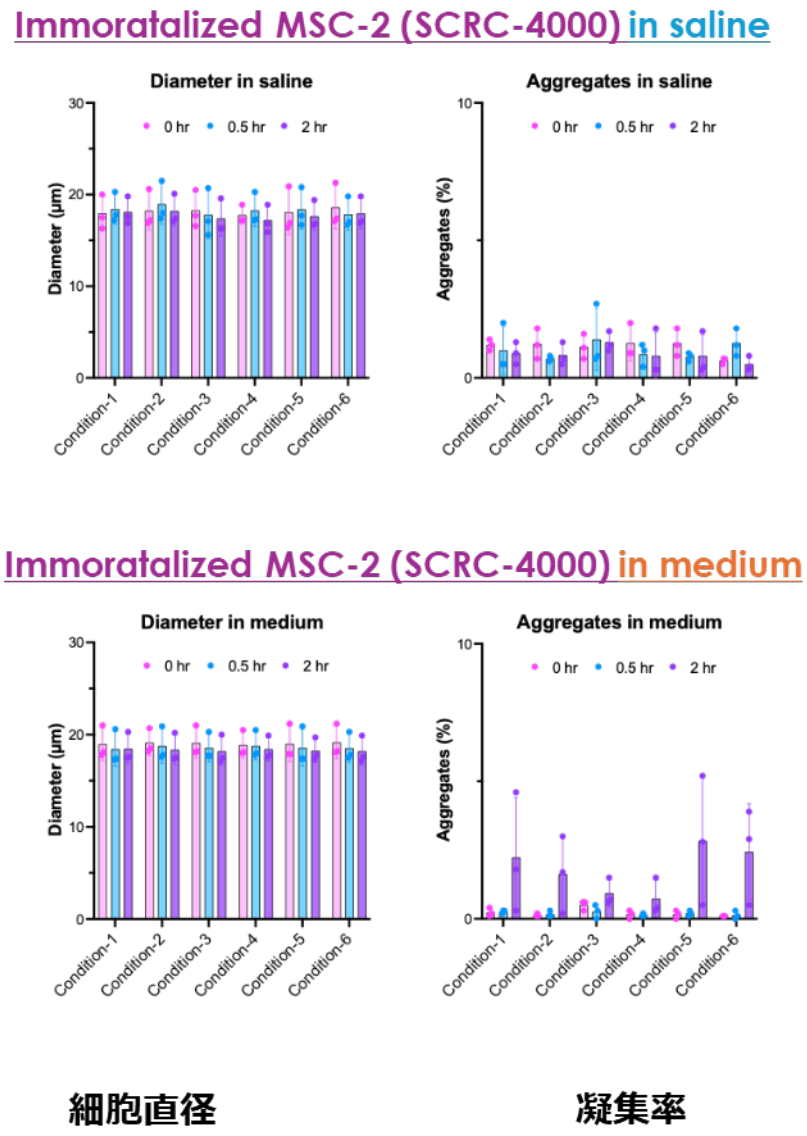



**Fig.3B　SCRC-4000 株の凍結融解および各種物理的刺激後の細胞直径および凝集率の時間経過**

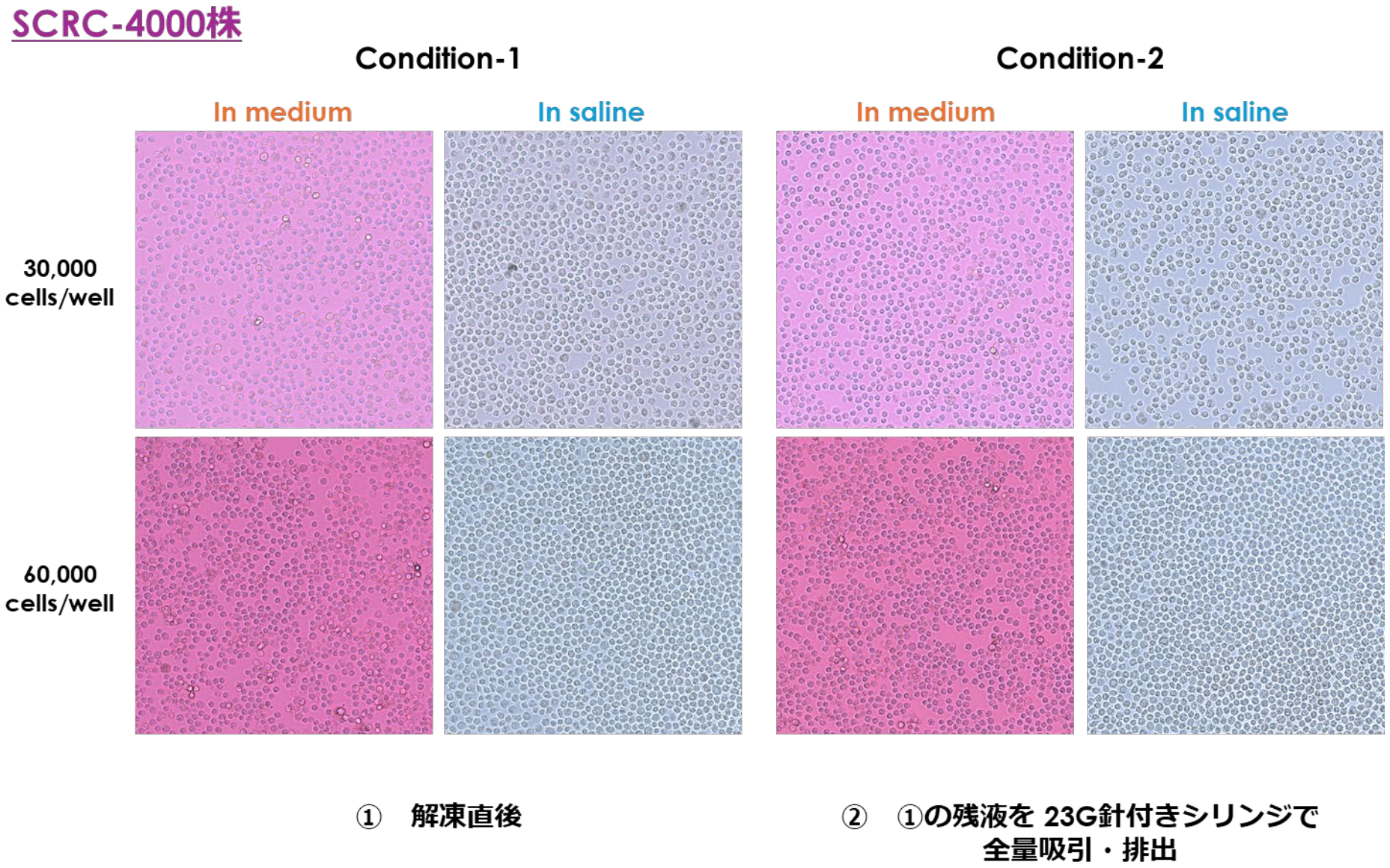



**Fig.4A　SCRC-4000 株の凍結融解および各種物理的刺激後 2 時間の時点における細胞形態**

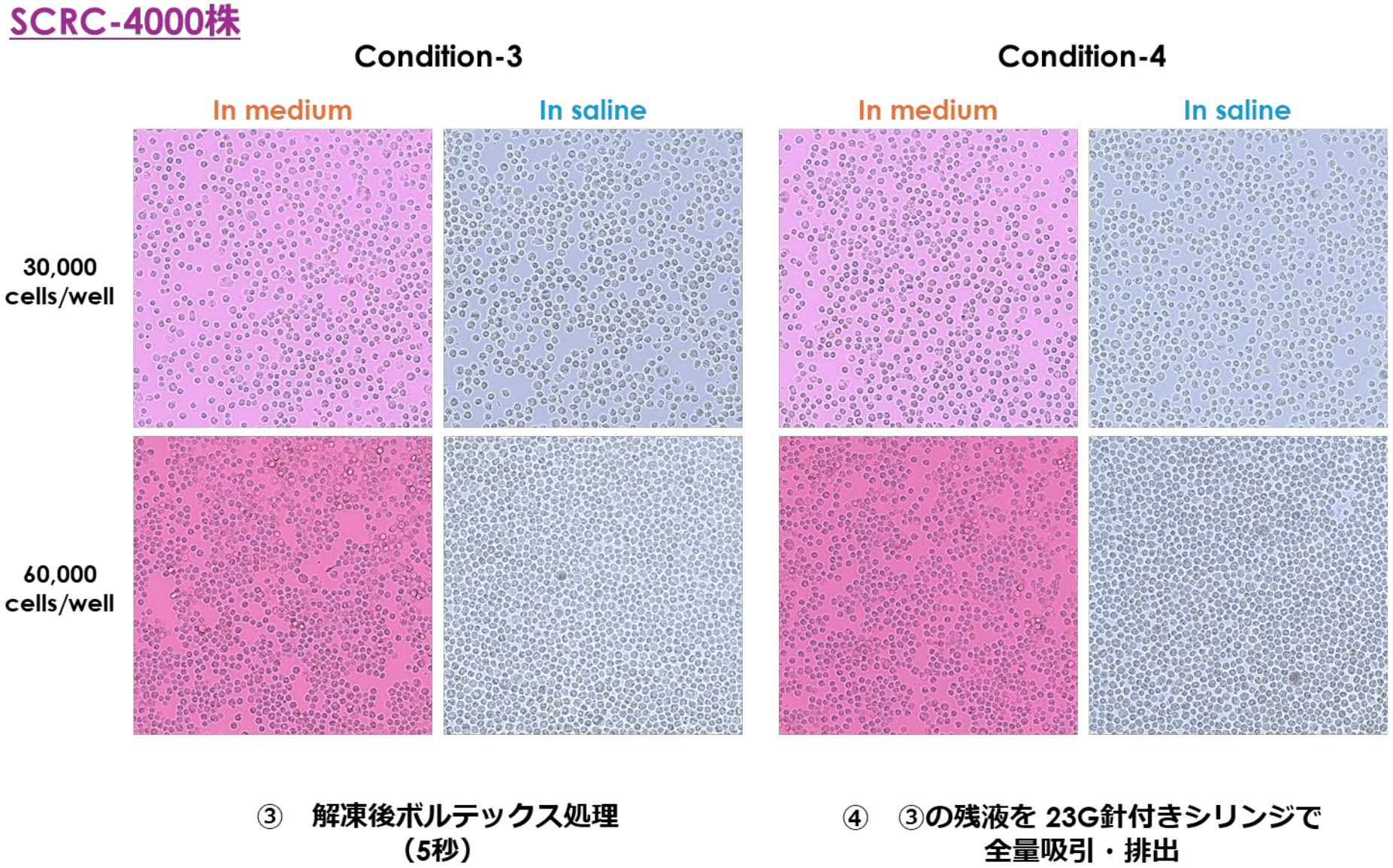



**Fig.4B　SCRC-4000 株の凍結融解および各種物理的刺激後 2 時間の時点における細胞形態**

## SCRC-4000株

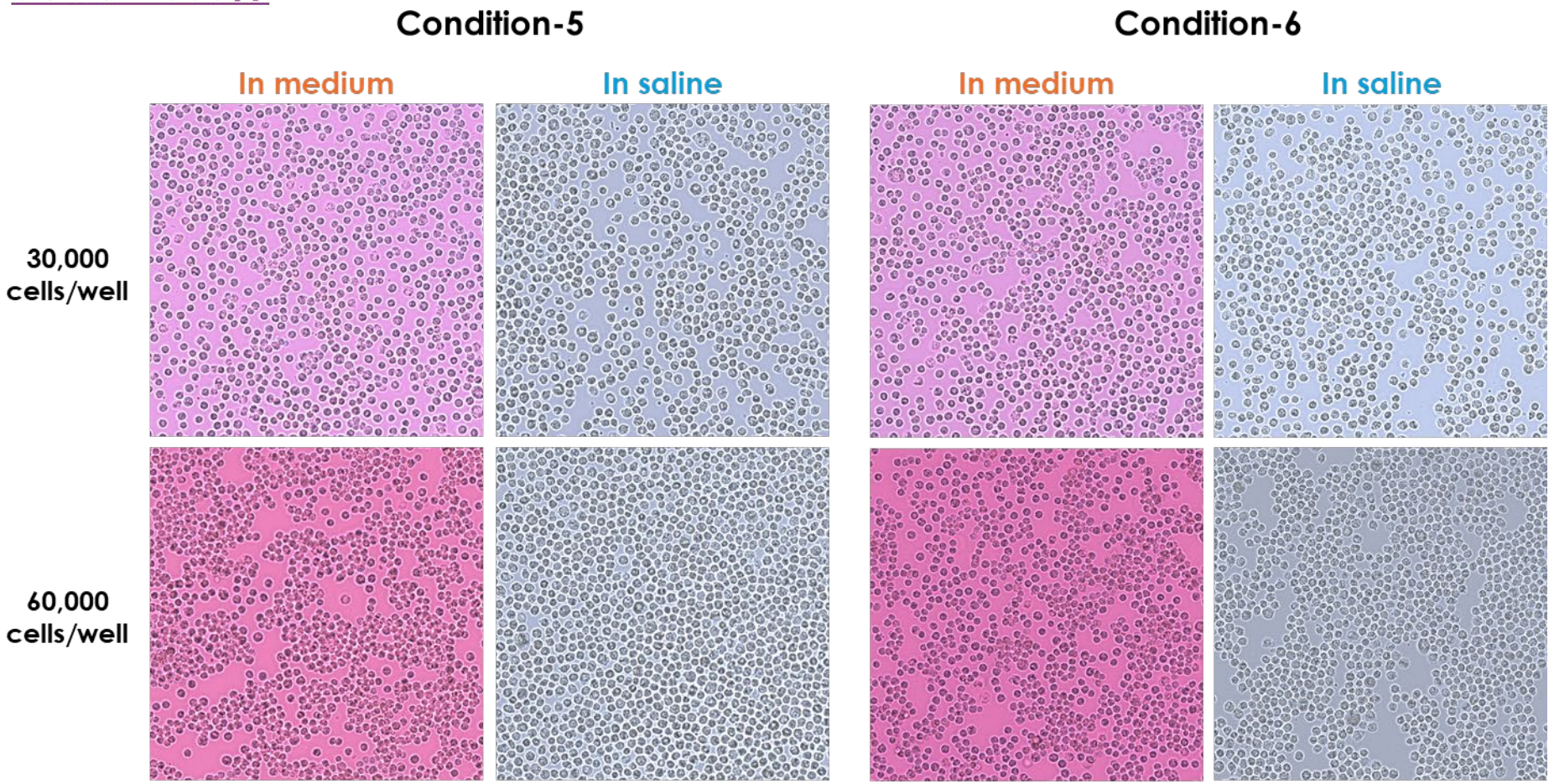



**Fig.4C　SCRC-4000 株の凍結融解および各種物理的刺激後 2 時間の時点における細胞形態**

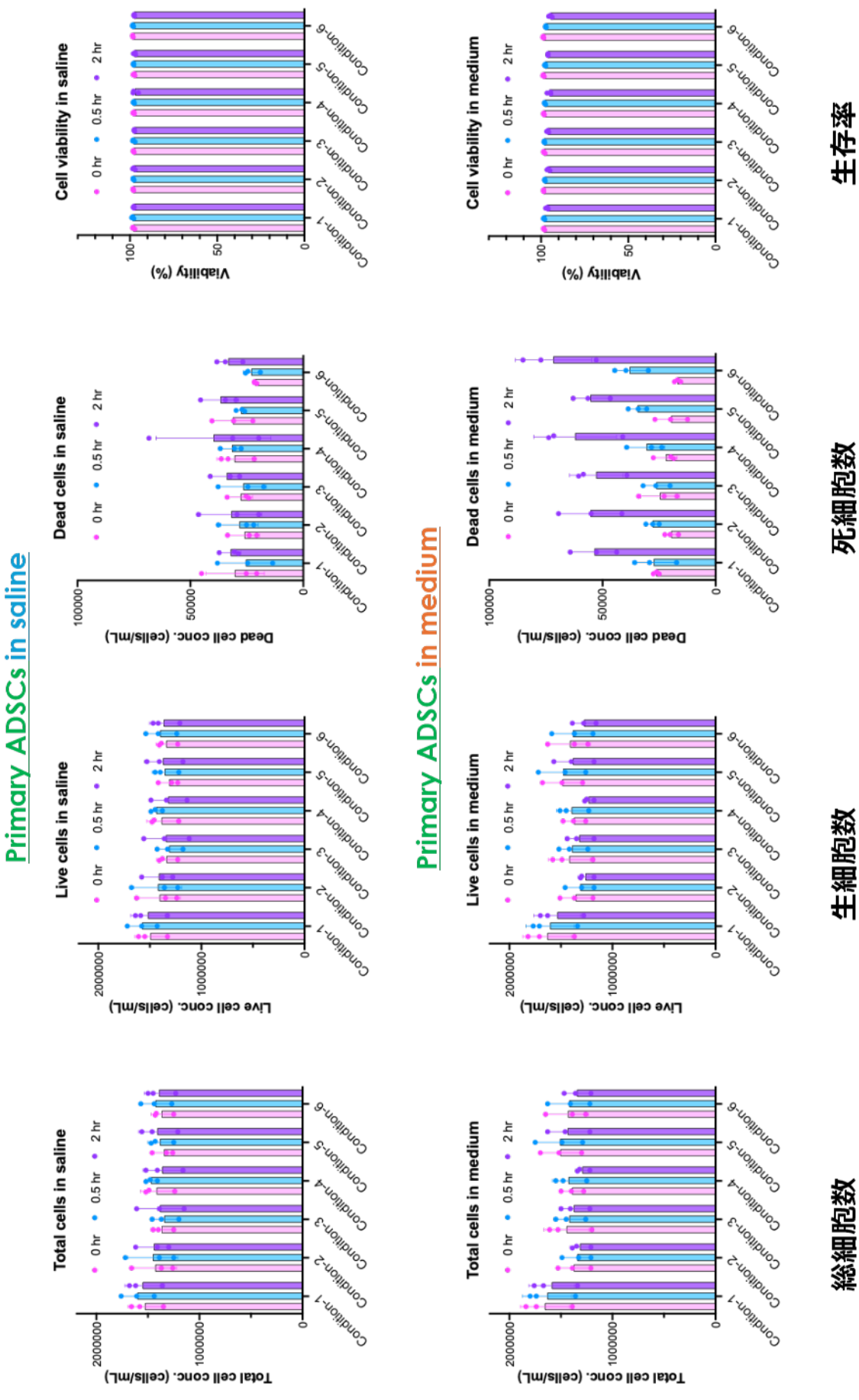



Fig.5A　初代培養ヒト脂肪由来 MSC (ADSC)の凍結融解および各種物理的刺激後の生存率の時間経過

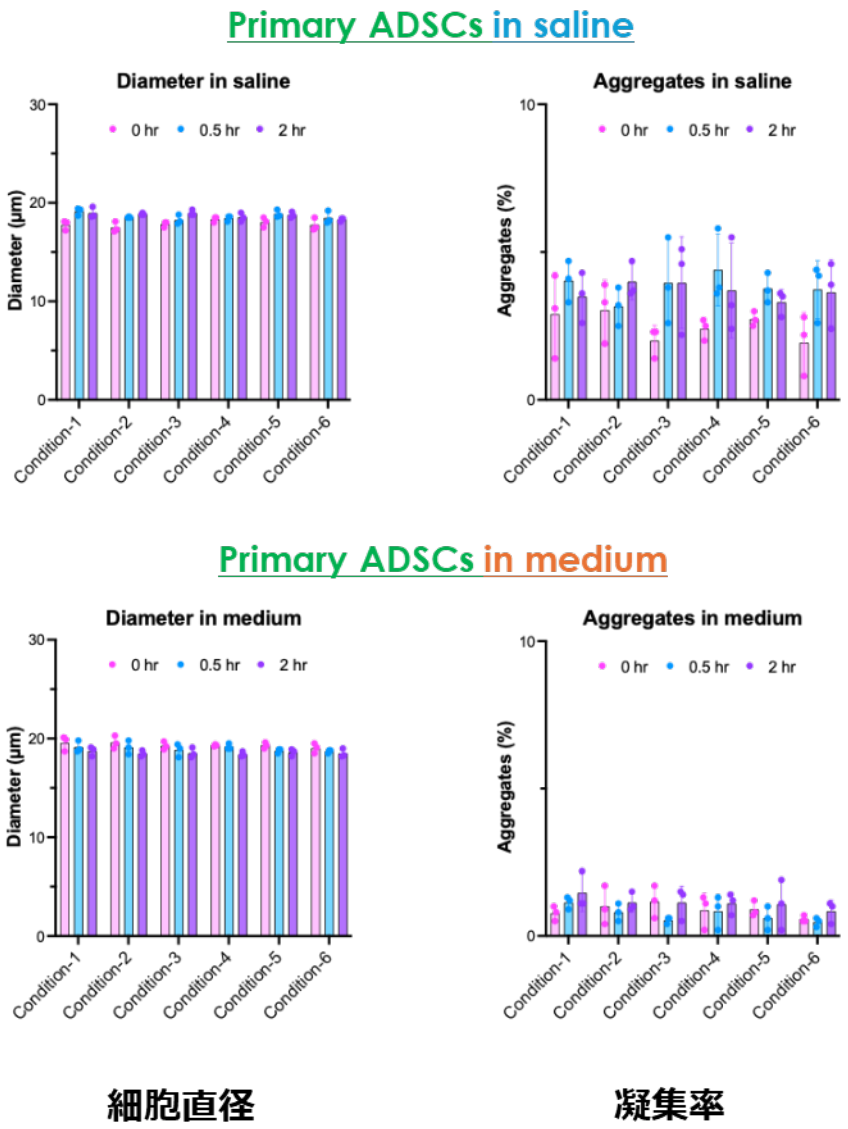



**Fig.5B　初代培養ヒト脂肪由来 MSC (ADSC)の凍結融解および各種物理的刺激後の細胞直径および凝集率の時間経過**

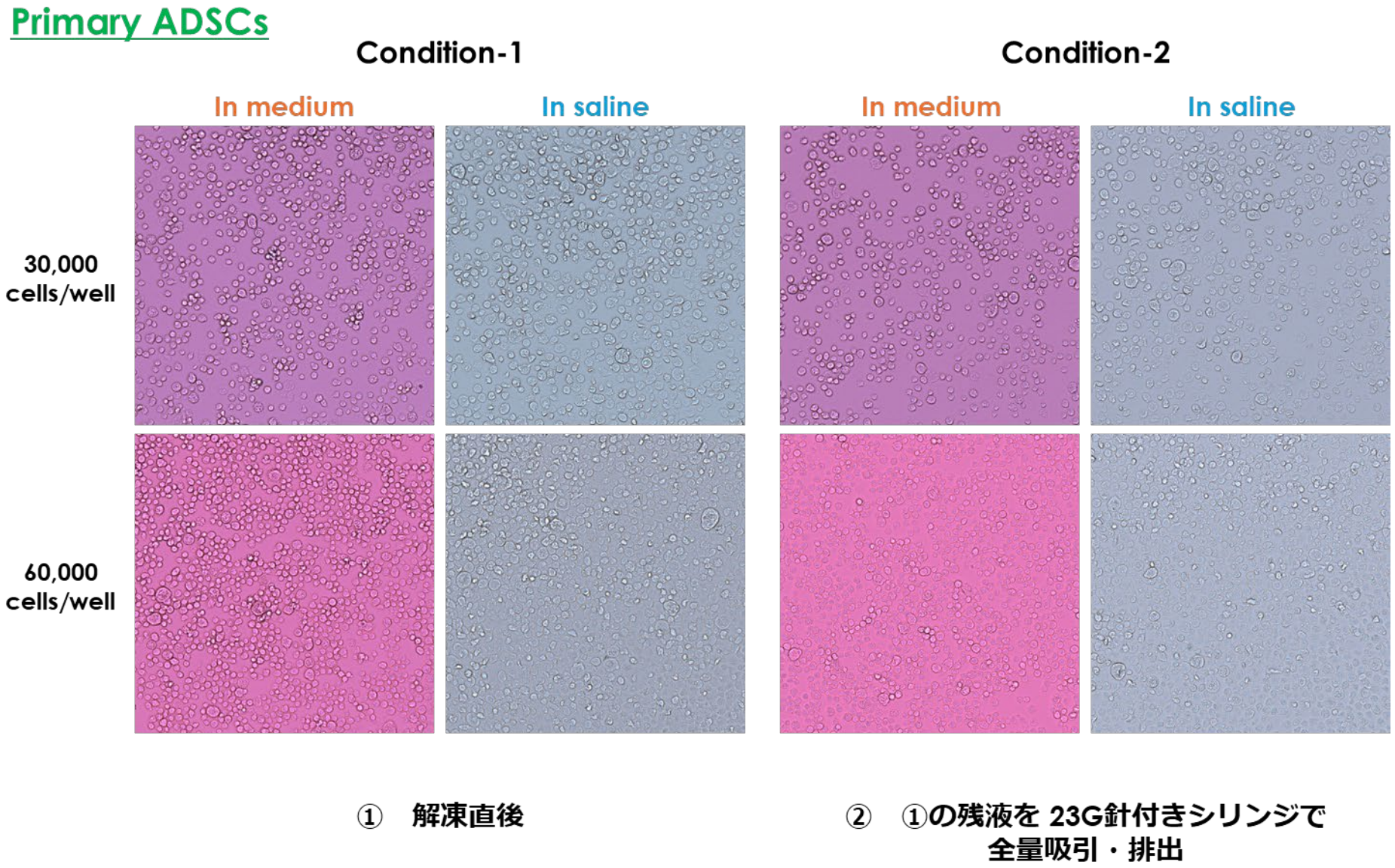





**Fig.6A　初代培養ヒト脂肪由来 MSC (ADSC)の凍結融解および各種物理的刺激後 2 時間の時点における細胞形態**

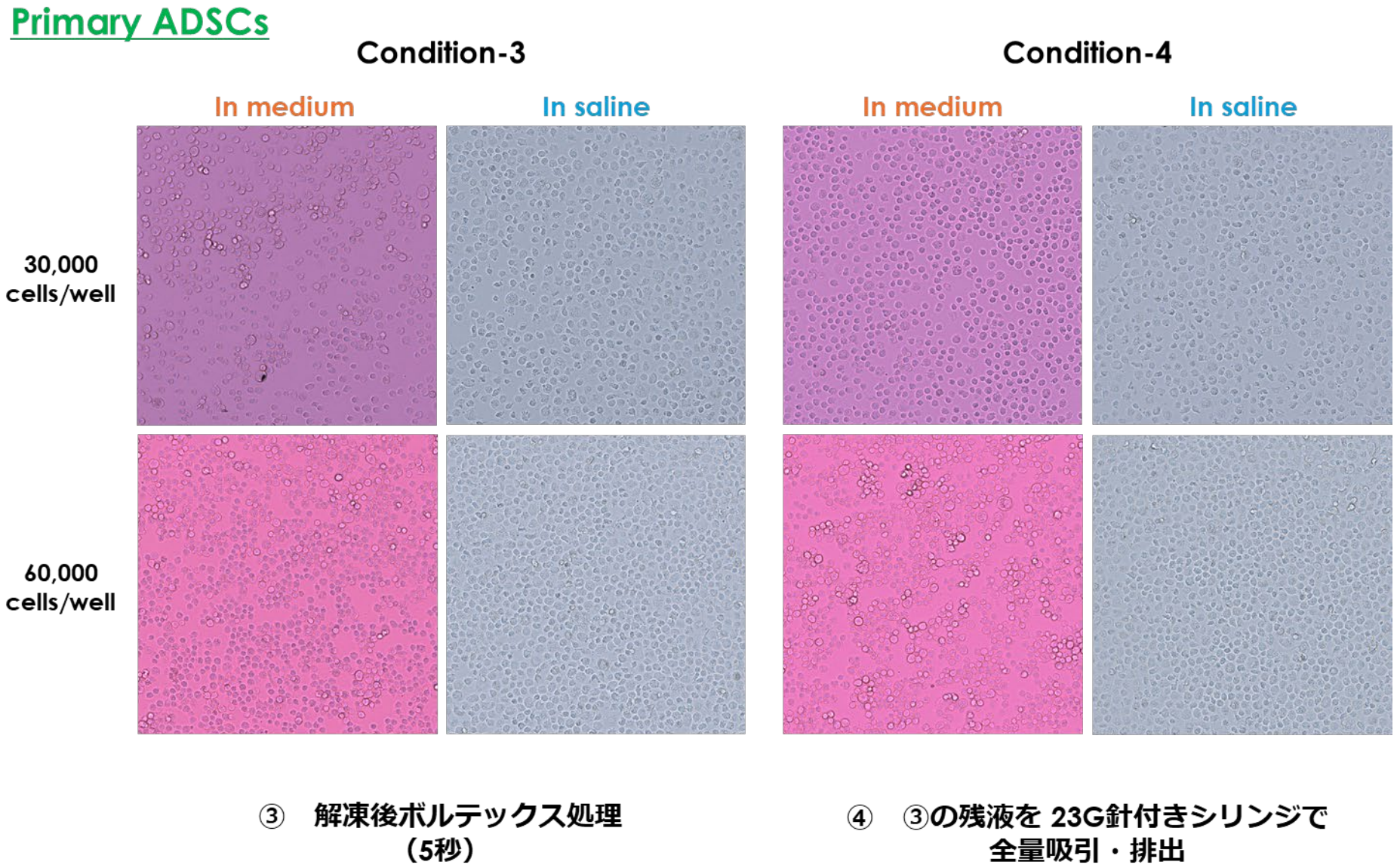



Fig.6B　初代培養ヒト脂肪由来 MSC (ADSC)の凍結融解および各種物理的刺激後 2 時間の時点における細胞形態

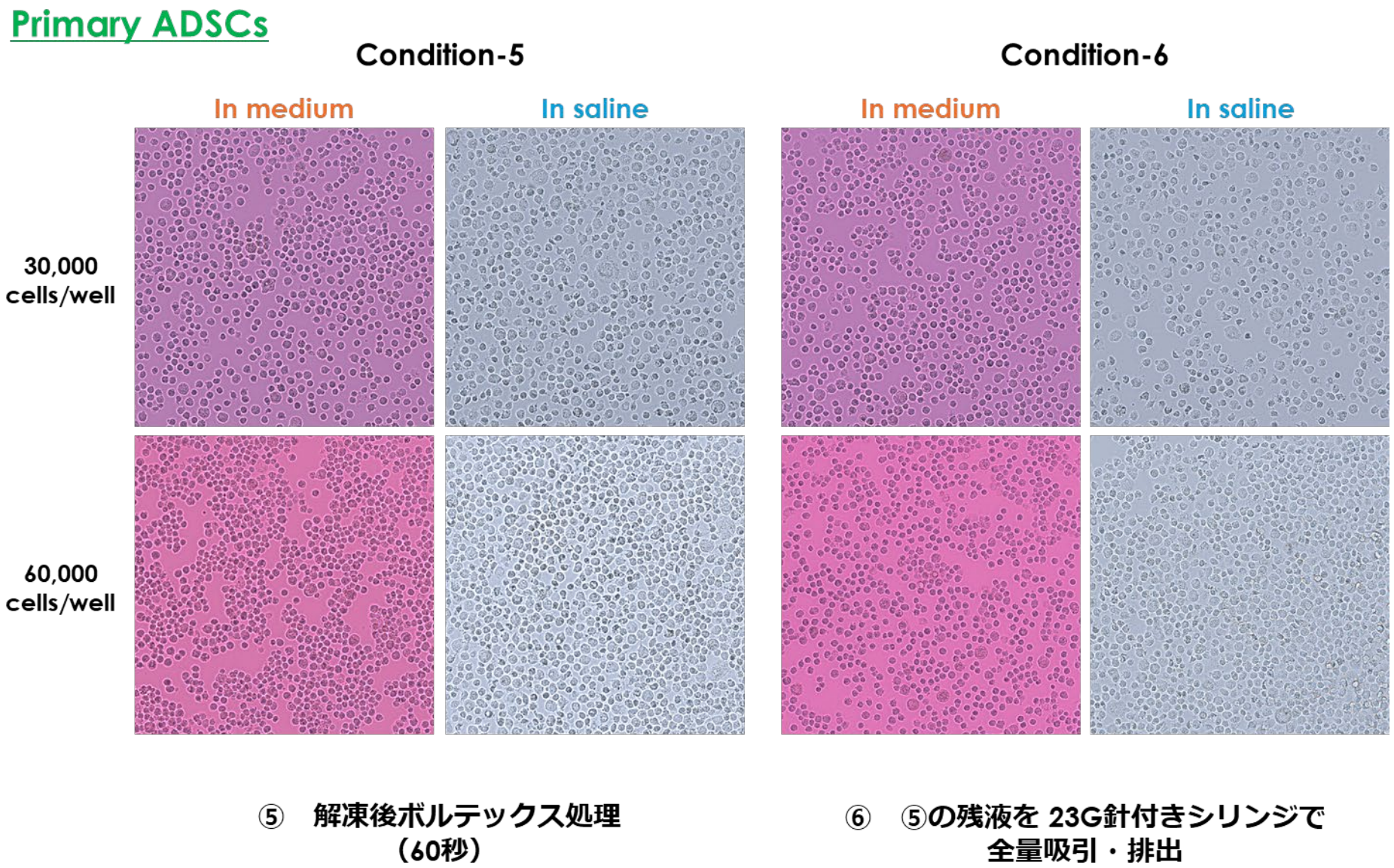



Fig.6C　初代培養ヒト脂肪由来 MSC (ADSC)の凍結融解および各種物理的刺激後 2 時間の時点における細胞形態

別添５

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書　籍　名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | なし | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|---|---|---|---|
| | なし | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

別添６

令和８年３月３０日

厚生労働大臣　殿

機関名　国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　齋藤　嘉朗

次の職員の令和７年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　厚生労働科学特別研究事業

２．研究課題名　特定細胞加工物の攪拌等に関するリスク評価研究

３．研究者名　（所属部署・職名）副所長

（氏名・フリガナ）佐藤　陽治・サトウ　ヨウジ

４．倫理審査の状況

| | 該当性の有無<br>有　無 | 左記で該当がある場合のみ記入（※1） | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 審査済み | 審査した機関 | 未審査（※2） |
| 人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3） | □　☑ | □ | | □ |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | □　☑ | □ | | □ |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | □　☑ | □ | | □ |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　） | □　☑ | □ | | □ |

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|---|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 ☑　未受講 □ |

６．利益相反の管理

| | |
|---|---|
| 当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定 | 有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　　） |
| 当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無 | 有 ☑　無 □（無の場合は委託先機関：　　） |
| 当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無 | 有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　　） |
| 当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無 | 有 □　無 ☑（有の場合はその内容：　　） |

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和８年３月３０日

厚生労働大臣　殿

機関名　国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　齋藤　嘉朗

次の職員の令和７年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　厚生労働科学特別研究事業

２．研究課題名　特定細胞加工物の攪拌等に関するリスク評価研究

３．研究者名　（所属部署・職名）再生・細胞医療製品部　・　部長

（氏名・フリガナ）　安田　智　・　ヤスダ　サトシ

４．倫理審査の状況

| | 該当性の有無<br>有　無 | 左記で該当がある場合のみ記入（※1） | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 審査済み | 審査した機関 | 未審査（※2） |
| 人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3） | □　☑ | □ | | □ |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | □　☑ | □ | | □ |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | □　☑ | □ | | □ |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　） | □　☑ | □ | | □ |

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|---|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 ☑　未受講 □ |

６．利益相反の管理

| | |
|---|---|
| 当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定 | 有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　　） |
| 当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無 | 有 ☑　無 □（無の場合は委託先機関：　　） |
| 当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無 | 有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　　） |
| 当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無 | 有 □　無 ☑（有の場合はその内容：　　） |

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和８年３月３０日

厚生労働大臣　殿

機関名　国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　齋藤　嘉朗

次の職員の令和７年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　厚生労働科学特別研究事業

２．研究課題名　特定細胞加工物の攪拌等に関するリスク評価研究

３．研究者名　（所属部署・職名）再生・細胞医療製品部　・　室長

（氏名・フリガナ）三浦　巧　・ミウラ　タクミ

４．倫理審査の状況

| | 該当性の有無<br>有　無 | 左記で該当がある場合のみ記入（※1） | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 審査済み | 審査した機関 | 未審査（※2） |
| 人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3） | □　☑ | □ | | □ |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | □　☑ | □ | | □ |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | □　☑ | □ | | □ |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　） | □　☑ | □ | | □ |

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|---|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 ☑　未受講 □ |

６．利益相反の管理

| | |
|---|---|
| 当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定 | 有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　　） |
| 当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無 | 有 ☑　無 □（無の場合は委託先機関：　　） |
| 当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無 | 有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　　） |
| 当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無 | 有 □　無 ☑（有の場合はその内容：　　） |

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和８年３月３０日

厚生労働大臣　殿

機関名　国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　齋藤　嘉朗

次の職員の令和７年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　厚生労働科学特別研究事業

２．研究課題名　特定細胞加工物の攪拌等に関するリスク評価研究

３．研究者名　（所属部署・職名）再生・細胞医療製品部　・　主任研究官

（氏名・フリガナ）草川　森士　・　クサカワ　シンジ

４．倫理審査の状況

| | 該当性の有無<br>有　無 | 左記で該当がある場合のみ記入（※1） | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 審査済み | 審査した機関 | 未審査（※2） |
| 人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3） | □　☑ | □ | | □ |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | □　☑ | □ | | □ |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | □　☑ | □ | | □ |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　） | □　☑ | □ | | □ |

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|---|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 ☑　未受講 □ |

６．利益相反の管理

| | |
|---|---|
| 当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定 | 有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　　） |
| 当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無 | 有 ☑　無 □（無の場合は委託先機関：　　） |
| 当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無 | 有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　　） |
| 当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無 | 有 □　無 ☑（有の場合はその内容：　　） |

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和８年３月３０日

厚生労働大臣　殿

機関名　国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　齋藤　嘉朗

次の職員の令和７年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　厚生労働科学特別研究事業

２．研究課題名　特定細胞加工物の攪拌等に関するリスク評価研究

３．研究者名　（所属部署・職名）再生・細胞医療製品部　・　室長

（氏名・フリガナ）澤田　留美　・　サワダ　ルミ

４．倫理審査の状況

| | 該当性の有無<br>有　無 | 左記で該当がある場合のみ記入（※1） | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 審査済み | 審査した機関 | 未審査（※2） |
| 人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3） | □　☑ | □ | | □ |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | □　☑ | □ | | □ |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | □　☑ | □ | | □ |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　） | □　☑ | □ | | □ |

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|---|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 ☑　未受講 □ |

６．利益相反の管理

| | |
|---|---|
| 当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定 | 有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　　） |
| 当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無 | 有 ☑　無 □（無の場合は委託先機関：　　） |
| 当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無 | 有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　　） |
| 当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無 | 有 □　無 ☑（有の場合はその内容：　　） |

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。