

安全で純粋な幹細胞培養技術と培地

Cambridge International Stem Cell Symposium

19th - 21st September 2018

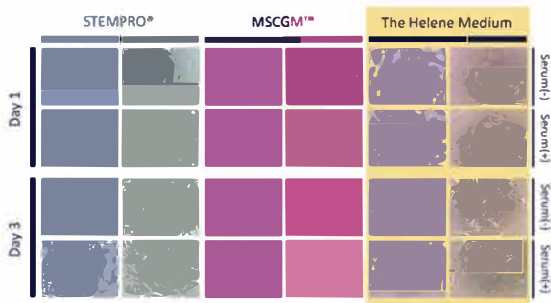
206 The "Helene Medium": specialized stem cell culture medium

Yang CF, Saito M, Shirakawa K, Matsuo T

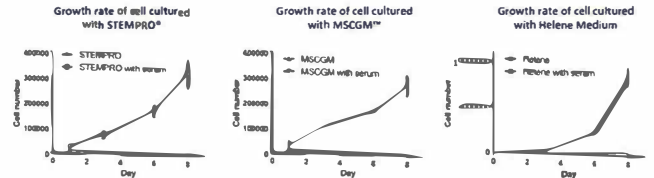
STEMCELL Co Ltd, Japan

Keywords: cell culture, transplantation

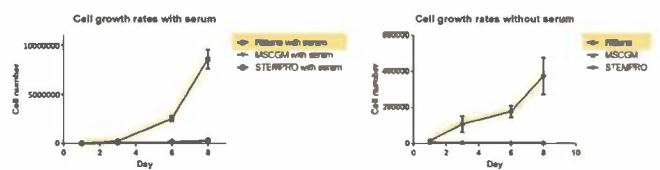
The stem cell culture requires many different conditions from normal or cancer cell culture, such as serum concentration, culture methods, and most of all, the culture medium. In our clinic in Japan, we provide stem cell treatments to our patients. We need more efficient and safer stem cell culture; thus, we have developed a specialized stem cell culture medium for primary stem cell culture. The "Helene Medium" is designed specially for stem cell growth, with better growth rate, stable cell growth, less chance of differentiation. We grow the stem cells in our medium and two other commercial mediums, examine the growth rate, cell morphology and passage number to evaluate the cell quality. Besides, serum usage in stem cell culture might lead to cell differentiation. We also test the different concentrations and types of serum. Stem cells could grow easily in Helene Medium but other cell types such as fibroblast cells, are difficult to grow. In our research, we have found that compared with other commercial mediums, stem cells cultured by our medium grow faster and with more stable cell morphology. Also, the expression of clusters of differentiation (CD) shows that stem cells are able to keep their potency during cell culture.



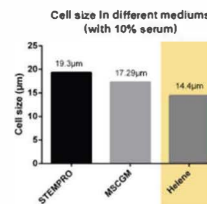
No significant difference is observed in either cases on Day 1. Whereas on Day 3, Helene Medium outstands the commercial mediums in terms of better cell growth, more stable morphology under both serum-free and serum-containing condition.



Stem cells cultured without serum grows slower than those with serum.



Yet in either cases, number of cells cultured in Helene medium exceeded that in the two commercial medium, showing that cells in Helene exhibits better growth rate.



Size of stem cells is considered as one of the validations for differentiation tendency, as stem cells are smaller than its differentiation product, fibroblasts (10-15 µm). From the result (left), only stem cells cultured within Helene medium demonstrates stem cells' character of smallness.



2018年、ケンブリッジ国際幹細胞シンポジウムにて、自作の動物用無血清培地（HELENE Medium）の成果を発表しました。1点目は、HELENE Mediumでは他の市販の培地よりも多くの細胞を同じ期間で培養できること、2点目は、HELENE Mediumで培養した間葉系幹細胞の大きさが最も小さいことである。幹細胞が小さいほど、線維芽細胞に分化しにくいという学術的な根拠があります。

以上の2点を総合して、耳の後ろから採取した脂肪組織には、MSCが含まれていることが確認されました。採取した脂肪の量は、大腿部や腹部と比較すると少ないですが、当社独自のラボ技術とHELENE Mediumにより、1ヶ月で最大22.5億個のMSCを培養することが可能です。

試験報告書一覧

2019年03月19日
タカラバイオ株式会社
品質管理部
田辺 雅茂

ご依頼いただいた下記試験検体に対する品質試験の試験報告書一覧を示します。
(受託ロット：Q18084)

ご依頼者：梅 晴菜 様
ご所属：STEMCELL 株式会社
所在地：〒107-0062 東京都港区青山 5-10-2 第二丸ビル2F
TEL：03-6433-5769

試験検体

検体 1：Lot No. QC_AL_1
検体 2：Lot No. QC_AL_2

検体 3：Lot No. QC_AL_3
検体 4：Lot No. QC_AL_4

試験名	試験番号	使用検体	結果
無菌試験（日本薬局方 直接法 オプション：手法の適合性試験）	Q18084-01	検体 1	手法は適切ではなかった
無菌試験（日本薬局方 直接法）	Q18084-02		判定しない
マイコプラズマ否定試験（日本薬局方参考情報 PCR 法（7菌種の阻害確認あり））	Q18084-03		PBSで2倍希釈したものを供試したとき、マイコプラズマ7菌種の阻害はなく、陰性であった
エンドトキシン試験（日本薬局方 カイネティック-比濁法 オプション：反応干渉因子試験）	Q18084-04	検体 2	希釈倍率 10 倍、50 倍、100 倍のいずれにおいても、反応干渉因子はなかった
エンドトキシン試験（日本薬局方 カイネティック-比濁法）	Q18084-05		1.0 EU/mL 未満（希釈倍率：10 倍）
細胞生存率試験	Q18084-06	検体 4	生存率：65.2%
ヒトウイルス否定試験（リアルタイム RT-PCR 法（GMP 試験））	Q18084-07	検体 3	陰性

以上

当院が患者様にご提供する幹細胞の品質を保証するため、当品質証明書と同様のプロセスで製造した幹細胞サンプル試験を外部委託しました。試験はGMP(Good Manufacturing Practice)、再生医療GLP(Good Laboratory Practice)に準拠し、さらに独自デザイン実験3つを含む検査です。同等の検査を自社ラボにて実施後細胞提供をしており、第三方試験会社に公正的に患者様に提供する幹細胞品質を検証した結果もここに記します。

サンプル提供者三名の脂肪組織を当院ラボにて培養したものを送検しました。サンプルは耳の後ろから採取した組織で特殊技術と専用の酵素で組織を分離・分解します。単体の細胞にしたものを1カ月間の培養期間を設け、規定数に達したものをMACSで分離し、セルカウンターで細胞数を確認した後、第三方試験会社タカラバイオ株式会社へ提供しました。

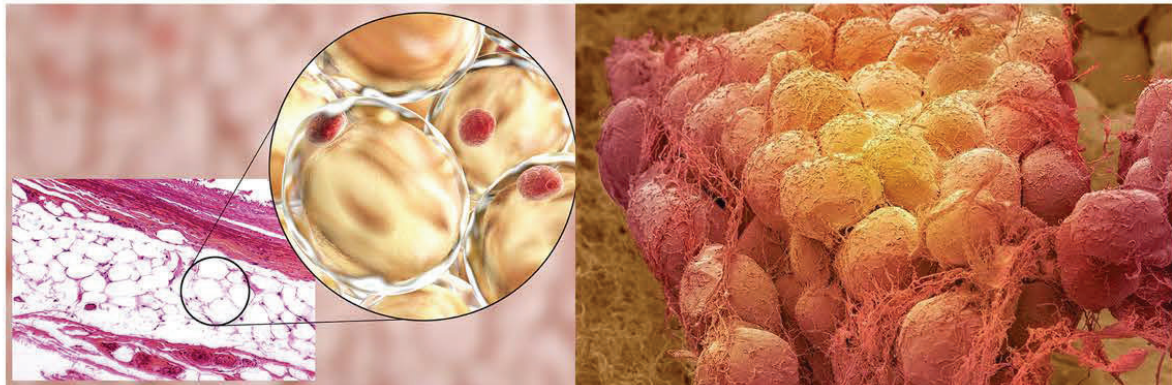
試験目的	試験名	使用検体	結果
感染、汚染	無菌試験（GMP準拠、日本薬局方）	QC_AL_1	陰性
	マイコプラズマ否定試験（GMP準拠、日本薬局方）	QC_AL_1	陰性
	エンドトキシン試験（GMP準拠、日本薬局方）	QC_AL_2	検出精度以下
	ヒトウイルス否定試験（GMP準拠）	QC_AL_4	陰性
腫瘍化	軟寒天コロニー形成試験（再生医療GLP）	QC_AL_4	陰性
幹細胞分化能	FCM試験（CD45- CD105+）	QC_AC_5	CD45- 99.3% CD105+ 92.6%
	脂肪細胞分化誘導試験	QC_AC_5	脂肪滴の染色が確認された

採取部位による脂肪の違い

上は脂肪組織のイメージ図ですが、豆のように丸い物体が脂肪組織です。幹細胞は幹細胞ニッチと呼ばれる繊維状の網のような部分に潜んでいます。

つまり、幹細胞は脂肪滴には存在せず周辺の繊維状の場所に存在しています。

それでは、耳裏脂肪と腹部脂肪の違いについてまとめます。



	耳裏脂肪	腹部の皮下脂肪
外観写真		
図		
痛み	少ない	強い（打撲のような痛み）
内出血	ごく稀	多い
圧迫	絆創膏圧迫のみ	ガーゼ圧迫

脂肪由来幹細胞は、黄色い脂肪滴にいるわけではなく、間質と呼ばれる脂肪滴周辺（＝幹細胞ニッチ）に潜んでいます。

腹部脂肪にも耳裏脂肪にも幹細胞が存在していますが、「脂肪滴が少なく間質が多い脂肪」の方が、幹細胞の率は多いのです。

ヘレネでは、患者様の痛み負担の少ない耳裏脂肪を主に採取しています。

ただ腹部脂肪の方がよいという方には腹部脂肪吸引でも採取可能です。

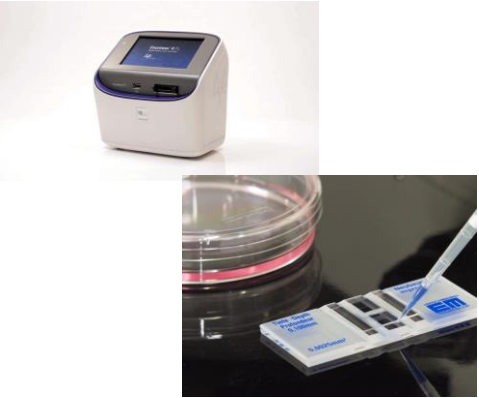
ヘレネで幹細胞の数の精密な確認方法

HELENE Cell Centerで培養した幹細胞は、お客様に投与提供する前に幹細胞の数と生存率を確認するために、少なくとも2段階で測定されます。結果はラボで承認と印刷されます。科学的かつ責任がある方法ですべての顧客に提供いたします。

二重確認 + 高精度計算

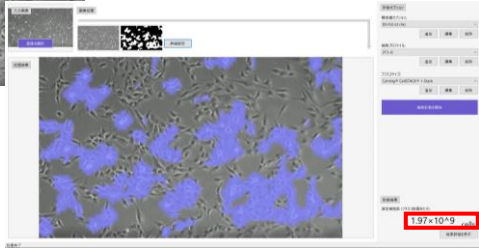
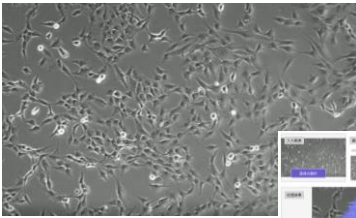
▶ ステップ1- Thermo Fisher Countess II FL セルカウンター

細胞サンプルを得た後、生細胞と死細胞の区別によく使われる生体染色剤、0.4% タイバンプルー溶液を加えて染色を行う。染色方法は色素排除試験で、染色液は死細胞には浸透するが、生細胞の細胞膜に阻まれることを利用して、生存率算出のための区別を行うものである。従来は染色したサンプルを顕微鏡で観察し、手作業でカウントしていましたが、自動化セルを用いて透視反応を自動認識し、解析を完了させます。手動でカウントする場合、ピント合わせを手動で行うだけでなく、サンプル間の明視野光量も調整する必要があります。Countess II FL自動セルカウンターは、照明とフォーカスを自動的に調整し、使用時に最適な画質を得ることができます。



▶ ステップ2-二重確認-特許取得済みのAI画像細胞活動認識技術

Countess II FLで量を測定した後、当社の細胞センターでは、細胞サンプルをスライドに載せ、ZEISS Axio Vert.A1顕微鏡で細胞画像を取得します。HELENEが独自に開発した画像読み取り用AIプログラムを用いて、共焦点レベルで細胞骨格を観察し、顕微鏡の焦点距離と細胞種（MSC）と細胞培養フラスコの断面積を組み合わせ、細胞数、細胞生存率を算出する。この2つのステップで、計算精度は100%に近く、他では真似のできない職人的なプロセスを実現しており、HELENEブランドの治療用グレードの幹細胞は、お客様のニーズに正確に合わせ、常に最適化されていることを保証しています。



▶ 品質保証書提示

HELENEクリニックでは、治療のたびに幹細胞証明書を提供し、品質と透明性に責任をもっていることを表明しています。

▶ 幹細胞治療の投与数量

2021年の論文【The safety of MSC therapy over the past 15 years: a meta-analysis】によると、国際的に有名な雑誌「Lancet」に掲載された臨床試験の抜粋を含む62件の研究が解析対象として選ばれています。これらの臨床試験において、5億個以上、場合によっては10億個ものMSCが投与され、俗説を払拭し、世界的研究機関に並ぶHELENEクリニックの技術力を確認することができました。

Author	Year	Location	Dose	
Hess	2017	USA	1200×10^6 cells	12億個幹細胞
Bartunek	2013	Belgium	$600 - 1200 \times 10^6$ cells	6-12億個幹細胞

多くの臨床データから、特定の疾患に対して低用量の細胞を投与した症例を見つけることができないことから、場合によっては低用量のMSCが有効でない可能性さえあることが示唆された。 近い将来、科学的データや研究の更新に伴い、関連する臨床試験の結果をよりよく比較するために、MSC治療プロトコル、治療対象、供給源、培養プロトコル、投与量の違いなどを継続的に改善し、標準化する必要があります。これに先立ち、HELENE Clinicは、患者の年齢、体調、疾患に応じて異なる細胞およびエキソソーム量の再注入プログラムを展開し、完全な安全性の下で最高の幹細胞治療を保証するために、治療方法を改善し続けます。

MACCE (Major Adverse Cardiac and Cerebrovascular Events) 低減を目的とする自己細胞由来幹細胞の投与				
文章番号	施設	バージョン	発行日	Page
	HELENE	第2.0版	2020年1月6日	下記記載
No	項目及び内容			
1. 特定細胞加工物を使用する再生医療等に関する事項				
(f)	再生医療等の名称	MACCE (Major Adverse Cardiac and Cerebrovascular Events) 低減を目的とする自己細胞由来幹細胞の投与		
(g)	再生医療等提供機関	名称) 医療法人社団 HELENE 表参道へレネクリニック 所在地) 東京都港区南青山5-9-15 青山 OHMOTO ビル3F 連絡先) 03 (3400) 2277		
(g)	再生医療等提供計画の実施責任者又は再生医療等を行う医師／歯科医師	医療法人社団 HELENE 表参道へレネクリニック		
(g)	再生医療等の概要	皮下脂肪より採取した脂肪細胞には、間葉系幹細胞が存在し、それを継代培養することで、豊富な成長因子を分泌する細胞及びその幹細胞、幹細胞エクソソームを増殖することが可能である。動脈硬化を主因とする心血管病変に対して、これらを移植することで症状改善を図り、MACCE 発生率の低減をめざす。		
(g)	内容	皮下脂肪より採取した脂肪細胞には、間葉系幹細胞が存在し、それを継代培養することで、豊富な成長因子を分泌する細胞及びその幹細胞、幹細胞エクソソームを増殖することが可能である。動脈硬化を主因とする心血管病変に対して、これらを移植することで症状改善を図り、MACCE 発生率の低減をめざす。		
	適応疾患等	動脈硬化性心血管病変		
	期待される効果/効果	現在行われている標準治療として血管内治療や外科的手技は効果的であるが侵襲的であり患者負担は大きく、内科的治療も脂質管理が主でありすでに血管硬化したものを改善させる効果は限定的である。本再生医療では、幹細胞投与により血管再生も期待され、より本質的な血管治療であると考えられる。		
	用法・用量又は使用法	皮下に幹細胞 10^6 cells (20ml) を注射用生理食塩水に懸濁させたものを、静注の際は100~200ml 生理食塩水に、経口投与時は同量希釈細胞と幹細胞エクソソームを混注し静脈内投与する。術後投与から4週間以上経過すれば、再度注入することも可能である。		
	安全性及び妥当性	i) 効力又は性能の範囲に関する情報		

[引用] The safety of MSC therapy over the past 15 years: a meta-analysis. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02609-x>