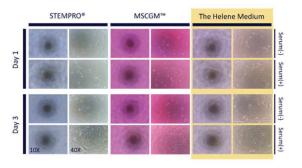
安全で純粋な幹細胞培養技術と培地

Cambridge International Stem Cell Symposium

19th - 21st September 2018

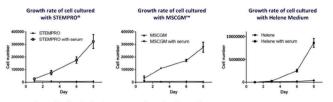
The "Helene Medium": specialized stem cell culture medium Yang CF, Saito M, Shirakawa K, Matsuoka T

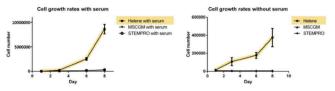
The stem cell culture requires many different conditions from normal or cancer cell culture, such as serum concentration, culture methods, and most of all, the culture medium. In our clinic in Japan, we provide stem cell treatments to our patients. We need more efficient and safer stem cell culture; thus, we have developed a specialized stem cell culture medium for primary stem cell culture. The 'Helene Medium' is designed speciality for stem cell growth, with better growth rate, stable cell growth, less chance of the restriction. We grow the stem cells in our medium and two other commercial mediums, examine the growth rate, cell morphology and paste 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.



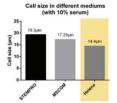
No significant difference is observed in ether cases on Day 1. Whereas on Day 3, Helene Medium outstands the commercial mediums in terms of better cell growth, more stable morphology under both serum-free and serum-containing condition







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、3つの培地の中で最も小さな細胞サイズを観察できることです。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 がある。

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: O18084)

ご依頼者:楊 晴棻 様 ご所属:STEMCELL株式会社

所在地:〒107-0062 東京都港区青山 5-10-2 第二九曜ビル 2F

TEL: 03-6433-5769

试验焓休

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		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	検体 1	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 イネティックー比濁法 オプショ ン:反応干渉因子試験)	Q18084-04	檢体 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 イネティックー比濁法)	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	除性	

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、第三方試薬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、第三方試薬会社タカラバイオ株式会社へ提供しました。

以上

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

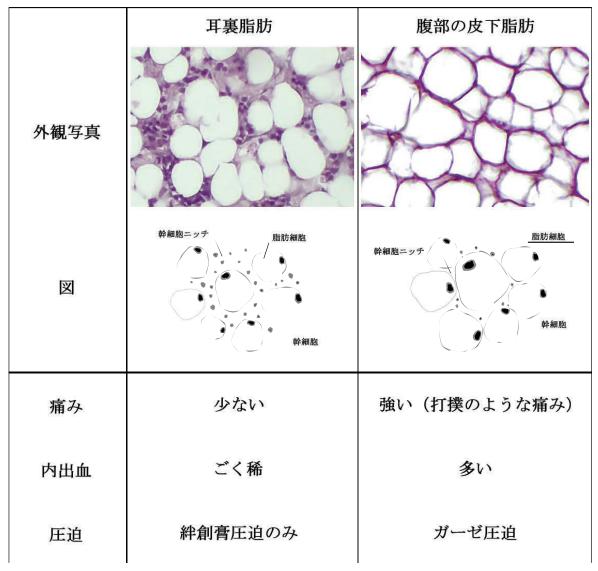
採取部位による脂肪の違い

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。





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

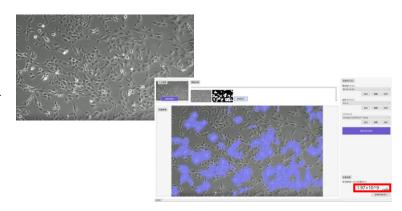
▶ ステップ1- Thermo Fisher Countess II FL セルカウンター

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%タイパンブ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て細胞数、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、62の臨床試験が解析対象として選ばれています。 これらの臨床試験のうち7件以上において、5億個以上、場合によっては $10\sim20$ 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	Cell	Dose	
Xiao	2017	China	BMSC	$(4.9 \pm 1.7) \times 10^8$ cells	5億個幹細胞
Bartunek	2013	Belgium	BMSC	600 -1200 × 10 ⁶ cells	6-12億個幹細胞
Teraa	2015	The Netherlands	BMSC	144-500 × 10 ⁶ cells	1.4-5億個幹細胞
Lublin	2014	USA	Placenta-Derived MSc	600×10 ⁶ cells	6億個幹細胞
Hess	2017	USA	BMSC	1200 × 10 ⁶ cells	12億個幹細胞
Xie	2007	China	BMSC	20.56-58.87 × 10 ⁸ cells	20億-58億個幹細胞
Xiao	2012	China	BMSC	1-10×10 ⁹ cells	10億-100億個幹細胞

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。

