

平成28年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「幹細胞を簡便、安全に分取し、高機能化増幅する革新的器具の開発」

研究開発成果等報告書

平成29年 3月

担当局 関東経済産業局
補助事業者 公益財団法人千葉県産業振興センター

目 次

第 1 章 研究開発の概要

1-1	研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-2	研究体制	3
1-3	成果概要	6
1-4	当該研究開発の連絡窓口	7

第2章 本論

[サブテーマ 1]	幹細胞を分取する分離膜の高度化課題への対応	8
[サブテーマ 2]	分取・精製・培養機能の統合による低コスト化課題への対応	11
[サブテーマ 3]	幹細胞の高機能、高品質化課題への対応	14
最終章	全体総括	19

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

1-1-1 研究開発の背景・目的

再生医療の発展に伴い、歯髄・脂肪・骨髄などの幹細胞は、様々な用途での応用が期待され、多くの研究機関で、その実用化研究が進められている。実用化のための重要テーマの一つとして、高機能、高品質の幹細胞（高い遊走能、増殖能、抗アポトーシス作用、抗炎症作用などが有意に優れ、血管新生・神経栄養因子などの trophic 因子を高発現している幹細胞）を簡便に、低コストで分取できる手段の提供が強く要望されている。

従来の幹細胞分取法である、遠心分離法や、不織布からなる分離カラム法では、高機能幹細胞を選択的に分取する機能は無い。また、高機能幹細胞を得ることが可能であるフローサイトメトリーやボイデンチャンバーによる分取法は、分取機能しか有していない。これら全ての従来法では、分取から精製、増幅、培養までの過程をひとつの機器で行うことが出来ないため、分取から精製、増幅までには培養操作の都度、細胞ロスと汚染・感染のリスク、細胞の活性などに影響がある。このため自動培養装置やアイソレーター等高額な設備投資が必要になり、幹細胞分取から培養までの手間と高コスト化が問題となり、再生医療研究の効率的な推進に対して大きなハードルとなっている。

本開発ではこれらの問題点を鑑み、幹細胞の遊走能と開孔率を飛躍的に高めた新規分離膜とを組み合せ、「高機能、高品質な歯髄及びその他幹細胞」を高効率で分取・精製でき、培養による増殖機能も同時に備えた安価な器具開発を行った。

1-1-2 研究概要

本開発では、細胞を分離膜上に置いて、膜の下側に細胞の遊走能を刺激する因子を添加して濃度勾配を作製し、遊走能の高い幹細胞が膜下面に遊走することを利用する分取法を基盤技術としている。

当技術を基に開発を行うにあたり、将来的な医療用途への展開も踏まえて、「分取効率を向上させ、短時間で幹細胞分取を行う」「閉鎖系で一貫して分取・培養・増殖を行う」「高機能幹細胞を分取する」ことをテーマとして、試作開発を行った。

1-1-3 目標

本研究開発のサブテーマの課題を3つ設定し、各テーマの技術目標値を以下に設定した。

サブテーマ1. 幹細胞を分取する分離膜の高度化課題への対応

1-1. 歯髄幹細胞分離膜の設計・試作

開孔率が従来品の4倍程度の開孔率20%の孔径8 μ mの膜の実現による分取速度の高速化

1-2. 分離膜の細胞付着性の抑制

分離膜の孔径変化に影響無く、特殊親水化修飾技術を応用して細胞の膜付着率20%以下の達成

サブテーマ2. 分取・精製・培養機能の統合による低コスト化課題への対応

2-1. 歯髄幹細胞用容器の設計・試作

汚染や感染を防止する、閉鎖培養系、酸素濃度やpHなどの最適条件を適用できる容器の開発

2-2. 細胞剥離技術の開発（表面の修飾技術の確立）

トリプシン酵素消化を使用しないで細胞剥離する技術を確立して、細胞機能と構造を維持させたまま剥離し、生存率70%以上の達成

サブテーマ 3. 幹細胞の高機能、高品質化課題への対応

3-1. 分取幹細胞が高機能であることの検証

遊走因子の種類・濃度/処理時間の最適値を検討し、高機能幹細胞分取効率極大化。

3-2. 分取幹細胞の品質及び安全性確保

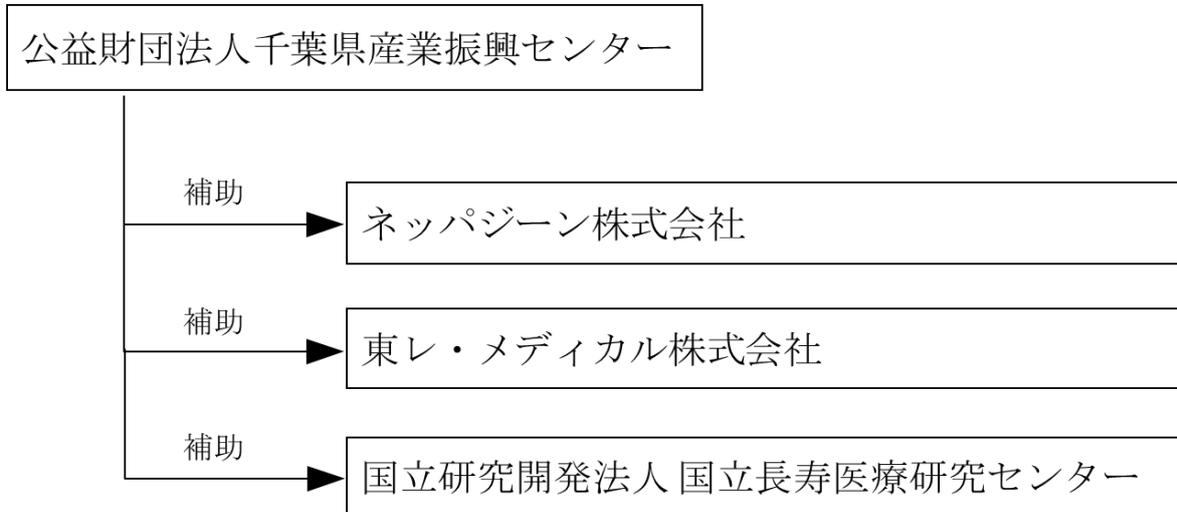
細菌やウイルスなどの感染、染色体・核型異常の検査、がん化の検査などを実施して、安全かつ高品質の安定した膜分取幹細胞を得られることを確認

3-3. 他の組織由来幹細胞への展開

骨髄、脂肪など他の細胞源から得られる幹細胞系のデータ取得

1-2 研究体制
(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)

1-2-1 研究組織 (全体)



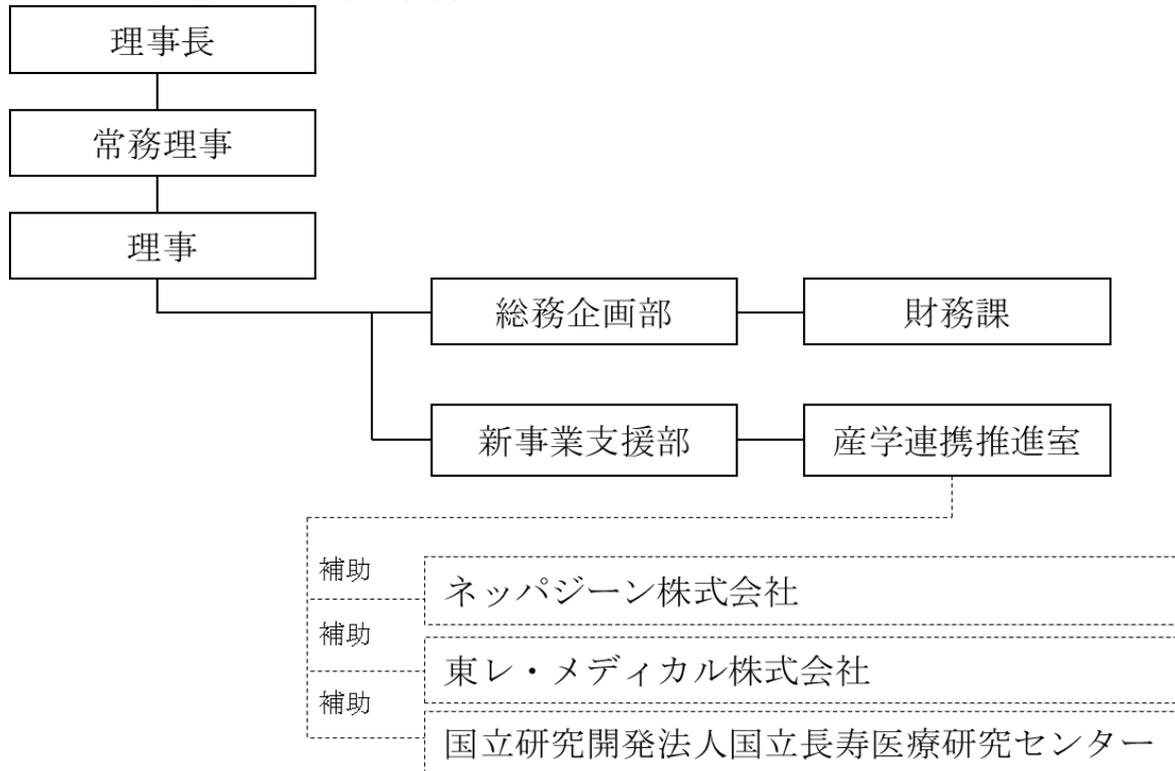
研究代表者(PL)
ネッパジーン株式会社
商品企画開発部マネージャー
鈴木 孝尚

副総括研究代表者(SL)
東レ・メディカル株式会社
医療用具事業部門 新事業推進室
主幹
島垣 昌明

1-2-2 管理体制

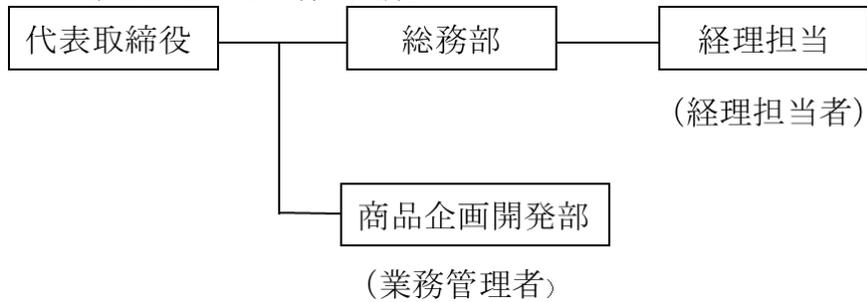
【事業管理機関（補助事業者）】

公益財団法人千葉県産業振興センター

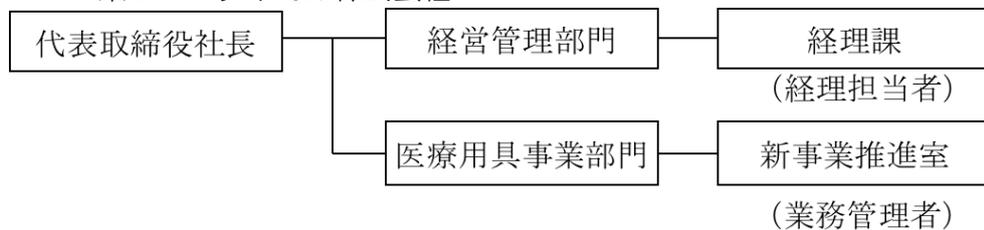


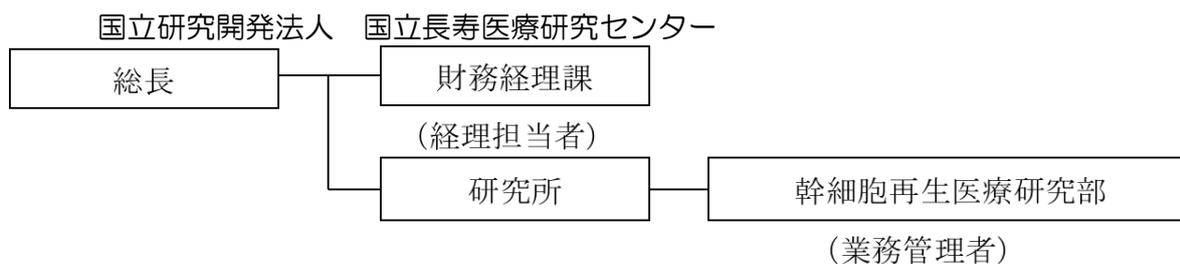
【間接補助事業者】

ネッパジーン 株式会社



東レ・メディカル株式会社





1-2-3 参画研究者

ネッパジーン 株式会社

氏名	所属・役職	実施内容 (サブテーマ)
鈴木 孝尚	商品企画開発部・マネージャー	1,2,3
栗原 欣也	商品企画開発部	1,2,3
渥美 優介	商品企画開発部	1,2,3
中本 和希	商品企画開発部	1,2,3

東レ・メディカル株式会社

氏名	所属・役職	実施内容 (サブテーマ)
金澤 哲也	医療用具事業部門 新事業推進室・室長	1,2,3
島垣 昌明	医療用具事業部門 新事業推進室・主幹	1,2,3
武重 英之	医療用具事業部門 新事業推進室・主席部員	1,2,3

国立研究開発法人 国立長寿医療研究センター

氏名	所属・役職	実施内容 (サブテーマ)
中島 美砂子	研究所 幹細胞再生医療研究部・部長	3
庵原 耕一郎	研究所 幹細胞再生医療研究部・室長	3
廣川 順子	研究所 幹細胞再生医療研究部・研究補助員	3

アドバイザー

所属	実施内容
国立大学法人 東京医科歯科大学	歯髄幹細胞に関するアドバイス
国立大学法人 名古屋大学	脂肪幹細胞に関するアドバイス
国立大学法人 名古屋大学	骨髄幹細胞に関するアドバイス
株式会社新日本科学	安全性評価に関するアドバイス

1-3 成果概要

サブテーマ 1. 幹細胞を分取する分離膜の高度化課題への対応

1-1. 歯髄幹細胞分離膜の設計・試作

- 細胞を分離する膜の開孔率を向上させるため、新規分離膜金型を開発し、開孔率 20%、孔径 8 μm の膜を完成した。
- 更に、金型や製膜方法の改良によりバリを減少させ、孔の周りの土手の高さ（平坦性）が大幅に改善した品質の良い膜を完成した。
- 製作効率向上のための第一試作金型より 4 倍の面積の大判金型を作製した。
- 他の幹細胞系対応のため、開孔率 20%孔径 5 μm の試作品も完成した。

1-2. 分離膜の細胞付着性の抑制

- 膜への細胞接着性を低減させる表面修飾を検討し、接着率 20%以下を達成した。また、膜への表面修飾が、遊走因子 G-CSF の効果である細胞の運動性向上に影響を与えないことを確認した。
- 量産化プロセス、製造委託先の選定はほぼ完了した。

サブテーマ 2. 分取・精製・培養機能の統合による低コスト化課題への対応

2-1. 歯髄幹細胞用容器の設計・試作

- 膜分取で想定される数の細胞を用いて、設計培養面積で正常かつ目標以上に増幅することを確認でき、設計が正しいことを実証した。
- 酸素濃度や pH などの最適条件を適用でき、汚染や感染を防止し、クリーンベンチやインキュベーターでの培養も可能な閉鎖培養系容器が完成した。
- 開発容器の密閉性については播種時と回収時以外は 100%密閉性を維持できる設計を完成させ、当初目標以上の成果を得た。

2-2. 細胞剥離技術の開発（表面の修飾技術の確立）

- 酵素トリプシン消化を使用しないで細胞剥離する技術、温度応答性ポリマー修飾を確立した。細胞機能と ECM 構造を維持させたまま剥離し、目標の生存率 70%以上である生存率 90%以上を達成した。
- 培養面での細胞増殖を向上させるため、プラズマ処理法を検討した結果、既存品培養シャーレと比較して遜色ない増殖効果を確認した。

サブテーマ 3. 幹細胞の高機能、高品質化課題への対応

3-1. 分取幹細胞が高機能であることの検証

高機能幹細胞分取効率極大化のための遊走因子の種類・濃度・処理時間の最適化の検討。

- 細胞数、G-CSF 濃度、膜分取時間の最適化を検討した結果、従来膜と比較して分取時間を 1/2 に短縮できることを見出した。
- G-CSF の作用を受けた細胞は、運動が活発化し、移動距離が増加することが示唆され、G-CSF が細胞運動性を活性化する因子であることが示された。
- 新規開発膜により、血管誘導・神経栄養因子などの mRNA 発現にすぐれ、老化マーカーを発現していない未分化な細胞が分取できることを確認した。
- FCM 解析の評価法を修正改良し、PCR で各種マーカーを比較し、分取された幹細胞の高機能性を示す新たな幹細胞表面マーカー（CD105, G-CSFR, CD271）の目標陽性基準値（各 95%, 20%, 5%）を設定し、クリアすることを確認した。

3-2. 分取幹細胞の品質及び安全性確保

- 開発容器上で培養した歯髄膜分取細胞について、染色体・核型異常検査と感染性検査（無菌検査、エンドトキシン定量試験、マイコプラズマ否定試験、ウイルス否定試験）を自主検査および外注で実施した結果、安全かつ品質が安定していることを確認した。
- がん化検査は「理化学機器に於いては検査の必要はなく、ユーザーが必要に応じて検査す

るべきである」とアドバイザーの助言を頂いたため、考慮の上検討不要と判断した。

3-3. 他の組織由来幹細胞への展開

- 論文や学会から蓄積した情報を基に、他の幹細胞の一般的な前処理法や細胞数などの新たな情報を得て、他の幹細胞を用いる際のプロトコルの原案を作成した。
- 歯髄幹細胞容器の膜分取・培養データを基準に、様々な組織（骨髄幹細胞・脂肪幹細胞・歯根膜細胞）から採取した細胞を膜分取し、データを取得した。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

ネッパジーン株式会社

商品企画開発部 マネージャー

鈴木 孝尚

TEL : 047-306-7222

FAX : 047-306-7333

e-mail : suzuki@nepagene.jp

第2章 本論

[サブテーマ 1] 幹細胞を分取する分離膜の高度化課題への対応

【1-1】 歯髄幹細胞分離膜の設計・試作

<平成26年度>

研究目標

- ・膜の開孔率は、従来市販品で5%程度でしかなかったものを20%程度まで高める。
- ・孔径は、直径8 μm とする。(以上は、2年目に完了する)

研究成果

- ・インプリンティング技術を応用した新規成膜法を検討した。開孔率20% 孔径8 μm の金型を完成した(図1)。
- ・金型と膜がアンカー効果によって強く付着しているため、膜の破損を防ぎながら剥がす手法を種々検討し、試作品を作成した。

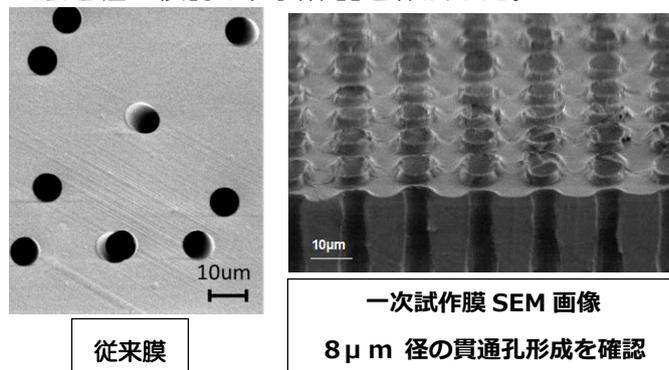


図1. 孔径8 μm の従来膜と新規開発膜の比較

<平成27年度>

研究目標

- ・歯髄幹細胞分離膜の設計・試作
- ・歯髄幹細胞用膜の改良試作(膜開孔率20%の孔径8 μm)
- ・他の幹細胞分離膜の設計・試作

研究成果

- ・分離膜貫通孔及び断面の凹凸を減少させる製膜方法の改良検討を行い、離型剤を使うことで表面凹凸を0.5~1.5 μm 程度に大幅に減少させる(図2)ことに成功した(膜開孔率20%、孔径8 μm)。
- ・他の幹細胞用分離膜の設計・試作に関してはより小孔径の分離膜の設計・試作を開始した。
- ・昨年度試作した金型を基に成形プロセスを改良し、36mm角の大面积化金型の作製を開始した。

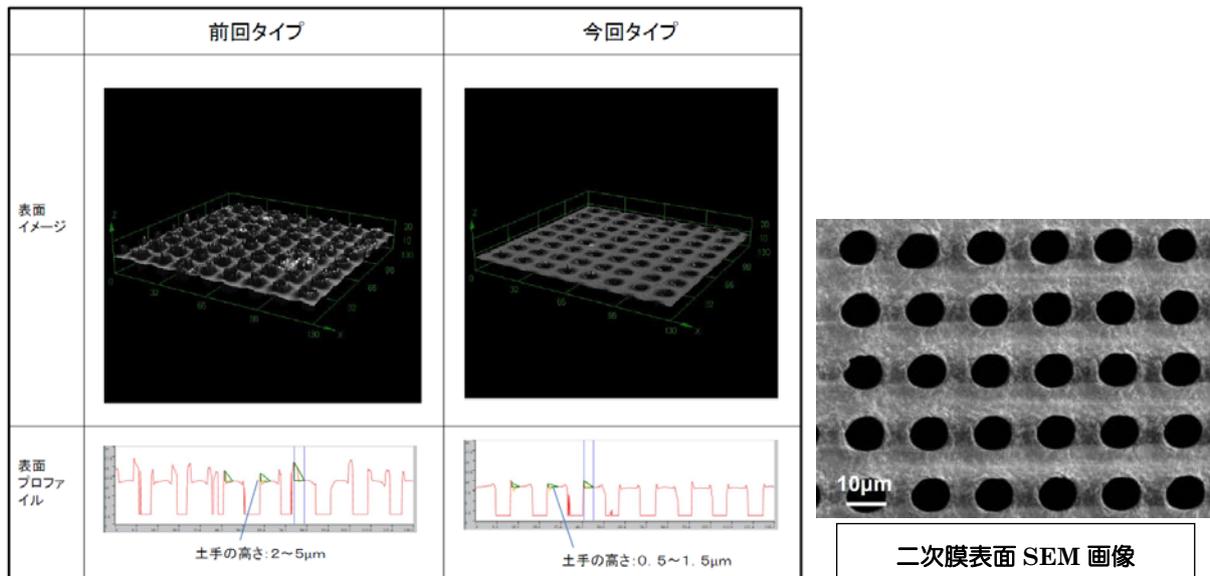


図2. 新規開発膜の表面凹凸の改良

<平成28年度>

研究目標

- ・再現性良く高機能幹細胞が高効率に得られる事を確認する
- ・他の幹細胞分離膜の設計・試作
- ・試験的提供により販売準備
- ・量産化プロセスの検討
- ・分離膜離型剤の除去（追加検討項目）

研究成果

- ・前回膜と比較して土手の高さ（平坦性）を0- 0.2 μ mに大幅に改善した、品質の良い膜を得た（図3）。また、50mm角の金型で従来より4倍の面積の成膜を実現し、他の幹細胞、評価サンプル提供を見越した量産試作に対応した。
- ・他の幹細胞系対応のため、孔径5 μ m、開孔率20%の試作分離膜を作成した（図4）。さらに、孔径3 μ mの分離膜の試作検討を開始した。
- ・IADR-PBRG 2016 と、第16回日本再生医療学会総会にて、試作品を参考展示した。また、幹細胞を扱う研究者を対象にアンケート調査を行い、ニーズのあるターゲットを明確にし、販売に向けた準備を行った。
- ・離型剤処理、各種表面処理量産化プロセスを検討し、今後、製造委託先選定を完了させ、量産化へ移行する為の準備を行った。
- ・離型剤を除去した膜で分取効率や細胞増殖性に影響が出ないことを確認した。

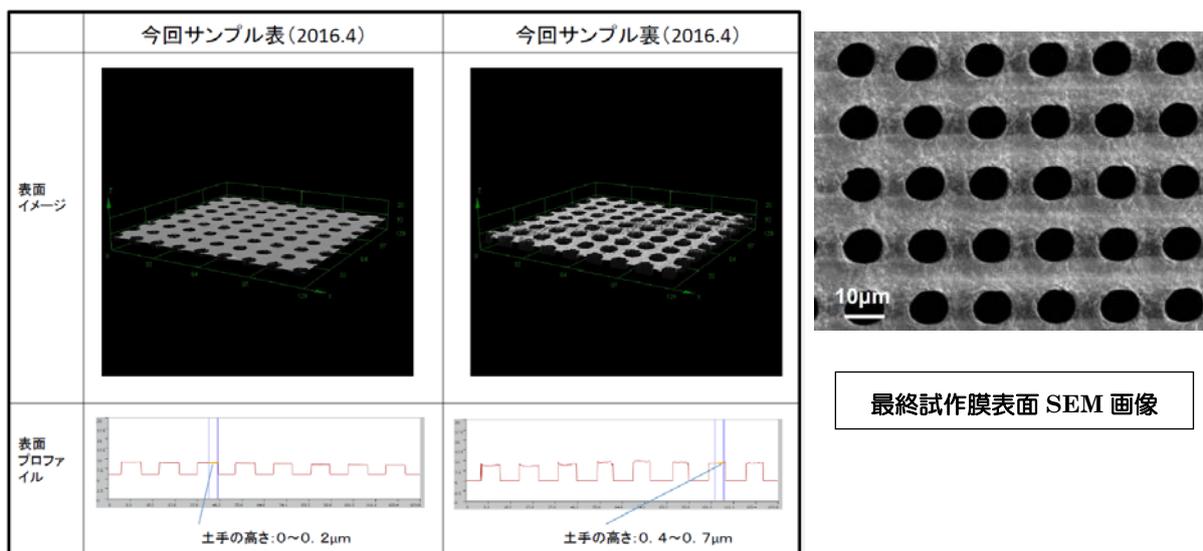
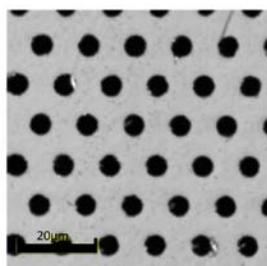


図3. 新規開発膜の50mm角金型による試作品（表面凹凸観察およびSEM写真）



直径 $5.2\mu\text{m}$

図4. 孔径 $5\mu\text{m}$ 新規膜のSEM写真

【1-2】分離膜の細胞付着性の抑制

<平成26年度>

研究目標

- ・細胞付着抑制表面修飾技術の検討を行い、結果を【1-1】へ反映する

研究成果

- ・人工透析膜や血液浄化カラム表面などに用いる特殊親水化修飾技術を応用し、安全性が高く細胞付着性を抑制する表面処理技術を検討した。各種膜材料と表面処理方法の組み合わせについて検討し評価した結果、開孔率5%の膜及び開孔率20%の膜両者とも、膜裏面への細胞付着の抑制を確認した。

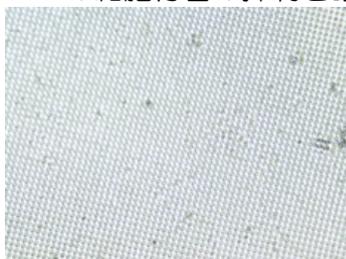


図5. 開孔率20%分離膜表面光学顕微鏡写真（細胞付着なし）

<平成27年度>

研究目標

- ・膜裏面への細胞付着率20%以下の達成
- ・細胞増殖への影響を確認

研究成果

- 人工透析膜や血液浄化カラム表面などに用いる特殊親水化修飾技術を応用した細胞付着性の抑制方法の最適化を実施した。
- 分取後に得られた細胞数と分離膜の裏に接着した細胞数を比較した結果は、細胞付着率 0%となり、細胞付着率 20%以下の目標を達成した。
- 付着抑制処理を行った表面凹凸改良膜（開孔率 20%・孔径 8 μ m）を用いた分取実験では、細胞の増殖性に対しても影響ないことを確認した。付着抑制処理を行っても、問題なく細胞は増殖した（図6）。

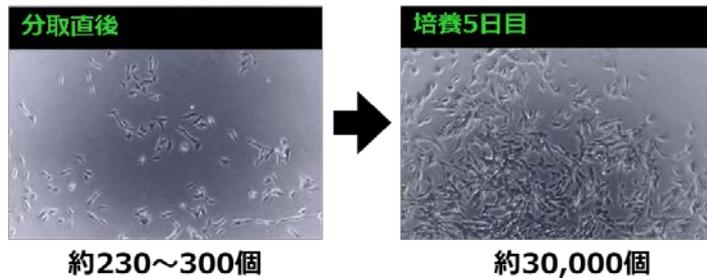


図6. 付着抑制処理を行った表面凹凸改良膜での細胞増殖

<平成28年度>

研究目標

- 他の幹細胞系での付着抑制効果及び細胞増殖性の確認
- 量産化プロセスの検討
- 膜分取状態のタイムラプス撮影による、膜素材・膜厚・開口率・付着抑制処理の効果についての詳細検証（追加検討項目）

研究成果

- 開発目標である、膜ウラ面への付着抑制効果及び細胞増殖性の確認は既に達成済。実用化までに更に分取効率を向上させる表面処理条件を検討した。
- 量産化プロセス、製造委託先の選定はほぼ完了し、目標を達成した。
- 分離膜への付着抑制処理の有無は、細胞の運動性に影響を与えない事を確認した。

[サブテーマ2] 分取・精製・培養機能の統合による低コスト化課題への対応

【2-1】 歯髄幹細胞用容器の設計・試作

<平成26年度>

研究目標

- 歯髄幹細胞を安全に分取培養できる容器の設計及び1年目プロトタイプ器の試作と評価

研究成果

- 汚染や感染を防止し、酸素濃度や pH などの最適条件を適用できる閉鎖培養系容器の設計を行い、プロトタイプ容器の試作を実施した。容器の容量、材料の検討及びそれを反映した1年目のプロトタイプ容器の試作を完了した。
- 拡大培養と培養後の移植必要細胞数の回収に向けた改良タイプ設計のため、培地組成、酸素濃度、培養プレート面の修飾など最適条件を検討した。

<平成27年度>

研究目標

- 歯髄幹細胞用容器の改良タイプ試作
- 他の幹細胞系に使うことが可能な、分取細胞用容器の検討

研究成果

- ・ 歯髄幹細胞用容器の改良タイプ試作では、①分離膜下面に発生する気泡の除去、②蓋を開閉しなくても培地交換・細胞継代が可能なコンタミネーションリスクを軽減した構造設計、③操作性が向上できる構造設計、を優先課題とし、昨年度の金型を改良し、第二次試作容器を完成させた（図7）。

改良点は

- ①部分脱着性の改善、②破損性の改善、③コンタミリスクの改善、④操作性の向上、⑤分離膜の泡かみ問題の改善、⑥密閉系のまま培地交換が可能な構造の実現、⑦容器のコンパクト化である。

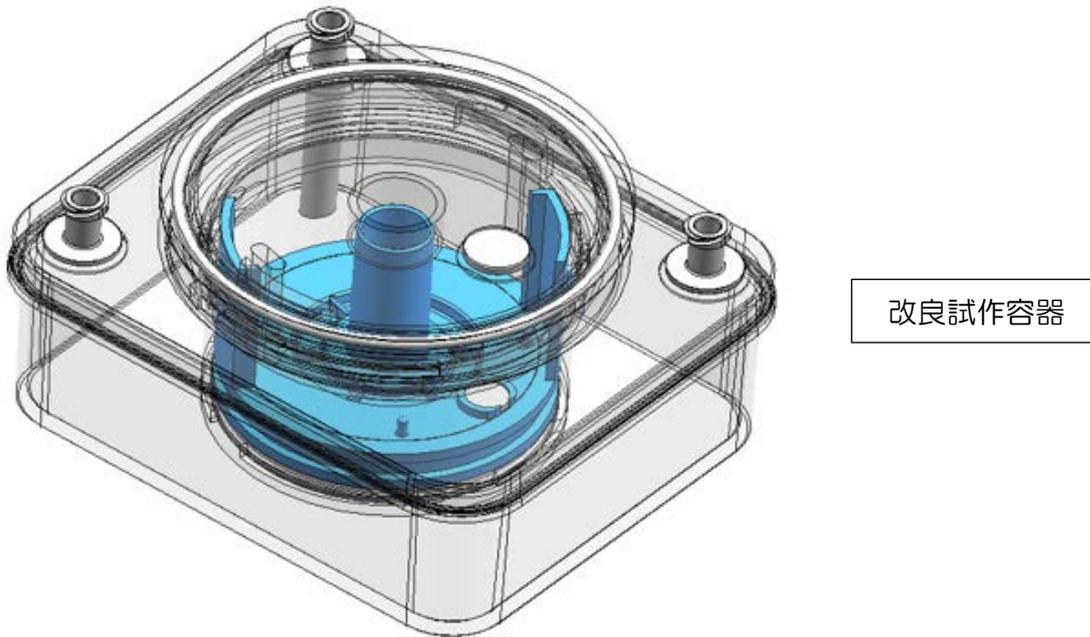


図7. 二次試作容器の概形

<平成28年度>

研究目標

- ・ 幹細胞の一次培養時は10倍程度、二次培養時は5倍程度の増幅を実現
- ・ 他の幹細胞系で使うことが可能な分取細胞用容器の設計を開始
- ・ 分取細胞用容器の試験的提供による販売準備の開始
- ・ 量産化プロセス検討

研究成果

- ・ 膜分取で想定される数の細胞を用いて、設計培養面積で正常かつ目標以上に増幅することを確認でき、設計が正しいことを実証した。更に、操作プロトコルの原案確認、細胞特性評価を行った。
- ・ IADR-PBRG 2016 と、第16回日本再生医療学会総会にて、幹細胞を扱う研究者を対象に、試作品を参考展示した。アンケート調査を行い、ニーズのあるターゲットを明確にし、販売に向けた準備を行った。
- ・ 設計密度で播種した場合の細胞増殖性は問題ないことを確認した（図8）。
- ・ 来年度の実用化に向けて量産化プロセス検討も順調に進捗しており、量産化へ移行する目途を立てた。



図8. 設計培養密度で播種した場合の細胞増殖性の確認

【2-2】細胞剥離技術の開発（表面の修飾技術の確立）

<平成26年度>

研究目標

- ・トリプシンを使用しない細胞剥離法の検討（2年目に、目標生存率：70%以上を完了する）

研究成果

- ・市販品の培養皿表面を温度応答性ポリマーで修飾し、幹細胞の剥離性を評価した結果、80%の剥離性が得られた（図9）。

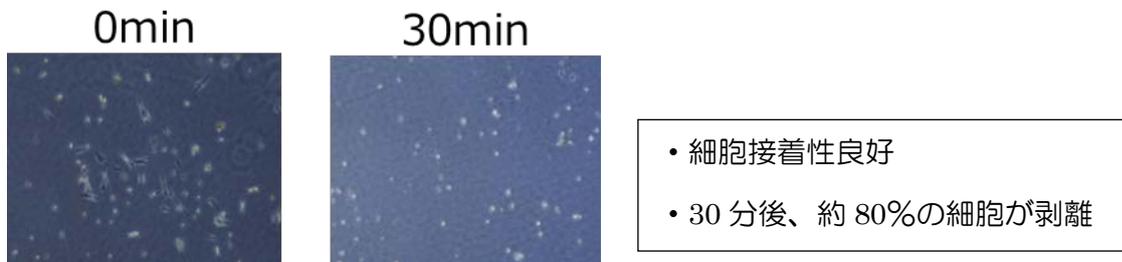


図9. 温度応答性ポリマー修飾による細胞剥離性確認

<平成27年度>

研究目標

- ・トリプシンを使用しない細胞剥離法の確立（目標細胞生存率：70%以上）

研究成果

- ・開発プレートを用いて、表面修飾ポリマー濃度および結合条件を調整し、細胞の接着・剥離率の検討を実施した。結果、トリプシン消化酵素を用いなくて細胞を剥離することができたが、ばらつきが大きく剥離技術の最適条件の確立には至らなかった。ただし、剥離した細胞の生存率は70%以上であり、生存率の目標は達成した（図10）。

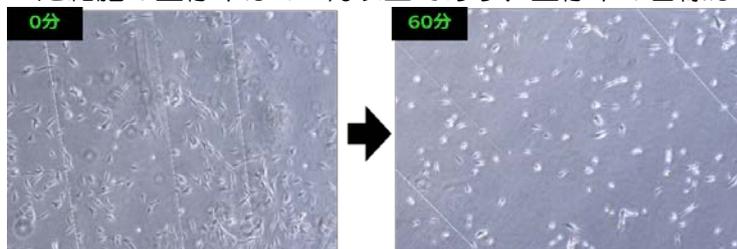


図10. 開発培養プレートでの細胞剥離性

<平成28年度>

研究目標

- ・再現性良く幹細胞のバイアビリティに影響を与えず、分離増殖操作が行えることを確認する。（生存率70%以上）

研究成果

- プラズマ処理法を検討した結果、経年変化が少なく、既存品培養器と比較して遜色ない増殖効果が得られる条件を発見した（図11）。更に、コストダウンを目指し、修飾条件や量産化プロセス検討を実施した。
- 開発容器への電子線照射による温度応答性ポリマー修飾により、一定の細胞接着・剥離を実現し、剥離した細胞の生存率 90%以上を確認した。目標細胞生存率 70%以上を達成した（図12）。
- ヒトの歯髄幹細胞を用いるとイヌと異なり細胞種の違いで剥離性が低下することが判明した。細胞腫に適した接着・剥離性の向上と生存率の維持を可能とするため、表面修飾条件の更なる検討を行い修飾ポリマー重合度の制御等の検討の結果、改良の目処が立った。

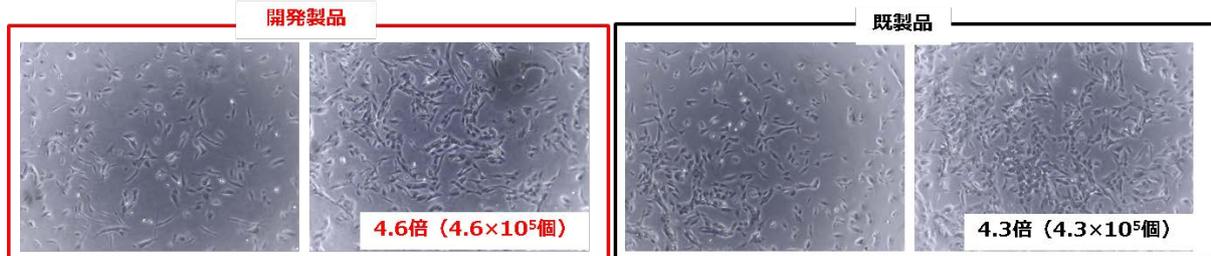


図11. プラズマ処理プレートと既存品での細胞増殖比較

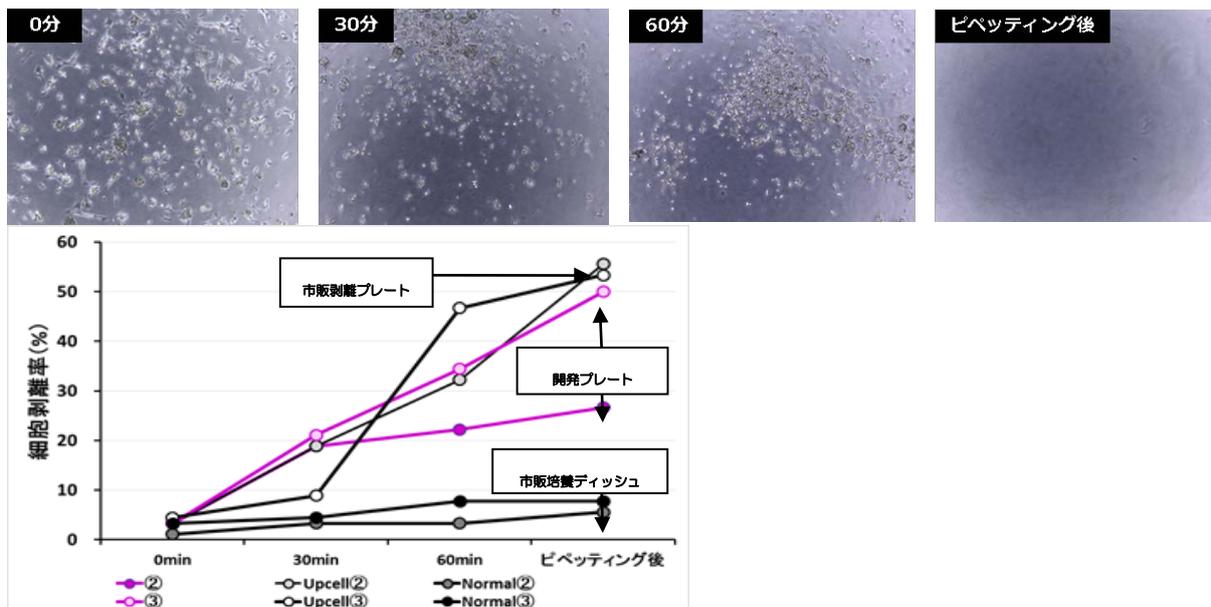


図12. 温度応答性ポリマー修飾プレートでの細胞剥離性評価

[サブテーマ3] 幹細胞の高機能、高品質化課題への対応

【3-1】分取幹細胞が高機能であることの検証

<平成26年度>

研究目標

- 遊走因子使用条件の検討
- 高機能幹細胞分取効率極大化検討（2年目にCD105陽性率95%以上）

研究成果

- 幹細胞表面マーカーとしてCD105、CXCR4、G-CSFRを選定し、陽性率の目標値設定（各95%, 10%, 30%以上）を完了した。

- ・幹細胞が高機能（高い遊走能・増殖能・血管誘導因子・神経栄養因子発現など）であることの評価方法を検討した。

<平成27年度>

研究目標

- ・幹細胞表面マーカー発現率で、分離細胞では目標値を越えることを確認（CD105、CXCR4、G-CSFR）
- ・遊走因子の種類・濃度/処理時間の最適値設定

研究成果

- ・幹細胞表面マーカー発現率を測定することによって、膜の素材、厚み、開孔率の相違による分取効率を検討した結果、それぞれが分取効率に影響を及ぼす因子であることを確認した。
- ・開孔率 20%の表面平坦性を改善した改良膜は、従来の開孔率 5%膜と比較して、分取時間を 1/2 に短縮できることを確認した。（図13）
- ・開孔率 20% 改良膜で得られた細胞は平均値として CD105 陽性率が 95%、CXCR4 陽性率が 20%であり、目標値である CD105 で 95%以上を達成した。（図14）
- ・遊走因子の種類・濃度・処理時間の検討を行い、条件の最適化をほぼ達成した。

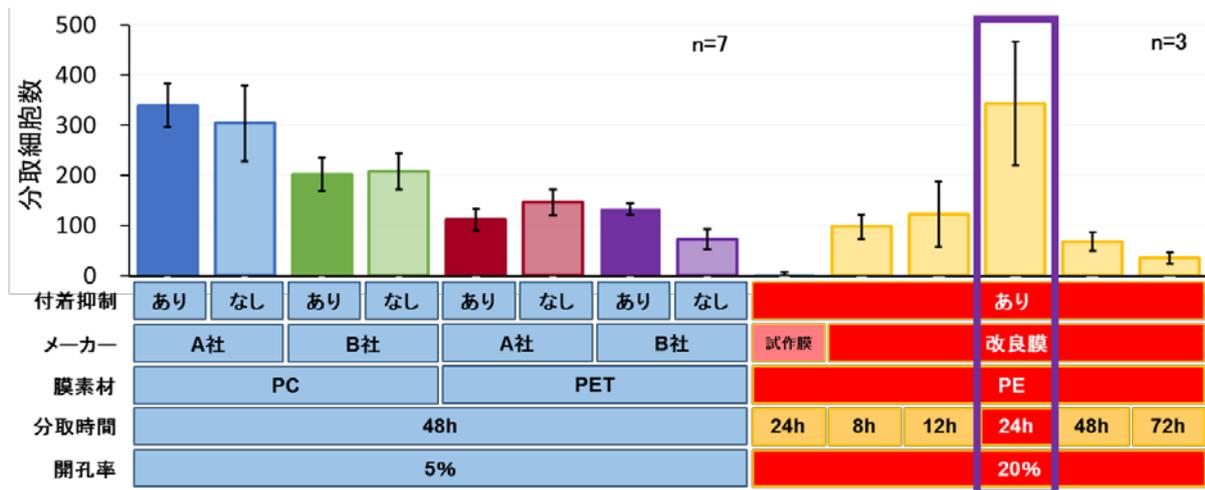


図13. 膜の素材、開孔率の相違による分取効率の検討

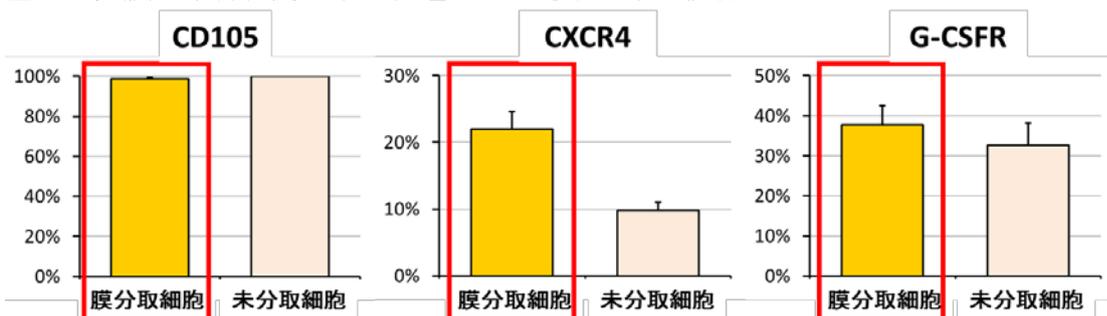


図14. 改良膜で分取した幹細胞表面マーカーの陽性率

<平成28年度>

研究目標

- ・更なる高機能幹細胞分取効率極大化要因の検討
- ・歯髄細胞への遊走因子の効果をタイムラプス撮影で確認（追加検討項目）
- ・膜素材・膜厚・開口率・付着抑制処理の効果を、膜分取状態のタイムラプス撮影により検証（追加検討項目）

- ・分取培養した幹細胞が高機能であること（高い遊走能・増殖能・血管誘導因子・神経栄養因子発現など）の確認

研究成果

- ・播種細胞数、G-CSF 濃度、膜分取時間の検討を行った結果、それぞれにおいて最適条件を確認した。
- ・さらなる高機能幹細胞分取効率向上を目指し、誰がやっても安定的な結果を得られるプロトコル原案を作成するため、分取前に予め G-CSF に反応させてから分取を行うなど、前処理法と従来法を比較して、G-CSF が細胞運動性を活性化する因子であることを確認した。
- ・新規開発膜により血管誘導・神経栄養因子などの mRNA 発現にすぐれた細胞及び老化マーカーを発現していない未分化な細胞が分取できることを確認した（表1）。
- ・FCM 解析の評価法を修正して、PCR で各種マーカーを比較し、分取された幹細胞の高機能性を示す新たな幹細胞表面マーカー（CD105, G-CSFR, CD271）の目標陽性基準値（各 95%, 20%, 5%）を設定し、膜分取した細胞の陽性率が基準値をクリアすることを確認した。（図 15）

表1. 分取幹細胞の特徴（新規開発膜、従来膜、コロニー法での比較）

新規開発膜（開孔率20%・孔径8μm）vs 市販膜（膜開孔率5%・孔径8μm）

	膜分取細胞数 2×10 ⁴ 、 100ng/mlで 分取した場合	遊走能 遊走細胞 数比	幹細胞 マーカー	血管誘導・神経栄養因子mRNA発現比							老化マーカー (4代目時点)		
				CXCR4	GM-CSF	MMP3	VEGF	BDNF	NT3	GDNF	NGF	P16	IL-1β
新規開発PE膜 膜分取細胞	150	10.2	1.9	0.3	1.3	4.2	3.5	3.6	1.1	0.3	0.3	0.7	1.0
市販PC膜 膜分取細胞	93	2.1	0.2	0.3	1.3	1.4	1.6	0.9	2.2	0.9	0.7	0.6	2.0
コロニー形成 膜分取細胞		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

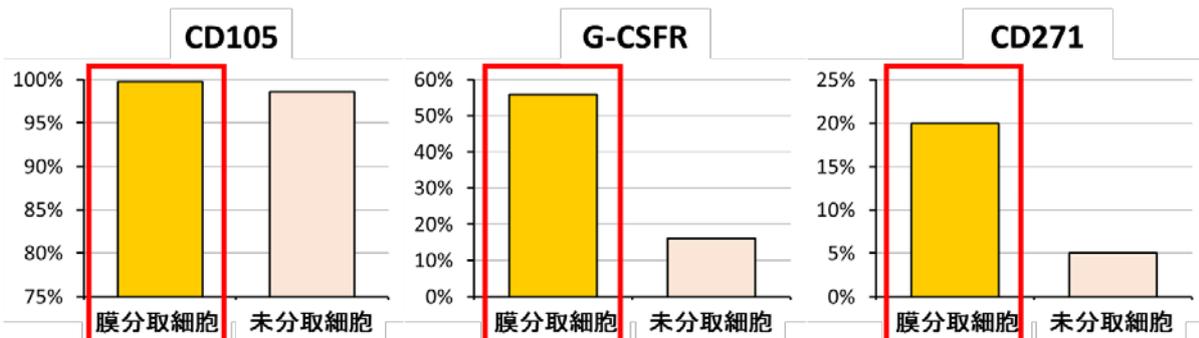


図15. FCM 評価法を修正後の新たな幹細胞表面マーカー陽性率基準値と解析結果

【3-2】分取幹細胞の品質及び安全性確保

<平成26年度>

研究目標

- ・感染検査、染色体・核型異常検査、がん化の検査方法などを検討

研究成果

- ・感染がなく高品質で安定した膜分取幹細胞を確認する方法を確立した。
- ・染色体・核型異常検査、がん化の試験法を検討した。
- ・がん化試験法として、膜分取法により分取された歯髄幹細胞を各種免疫不全マウスの精巣や皮下に移植する方法を検討した。

<平成27年度>

研究目標

- ・感染検査と染色体・核型異常検査、がん化の検査の実施

研究成果

- ・膜分取された幹細胞の品質及び安全性の評価を、感染検査及び染色体・核型異常検査は第三者機関に評価依頼して、染色体・核型異常検査は実際にはダピ（DAPI）染色法で評価、感染性検査は好気性菌・嫌気性菌・真菌検査、エンドトキシン検査は比色法、ウイルス検査はPCRによる遺伝子検査を行った。
- ・がん化検査は「理化学機器に於いては検査の必要はなく、ユーザーが必要に応じて検査するべきである」とアドバイザーの助言を頂いたため、考慮の上検討不要と判断した。

<平成28年度>

研究目標

- ・安全にかつ高品質の安定した歯髄幹細胞を得られることを確認

研究成果

- ・染色体異常・核型異常検査と感染性検査（無菌検査、エンドトキシン定量試験、マイコプラズマ否定試験、ウイルス否定試験）により、開発容器上で培養した歯髄膜分取細胞は安全かつ品質が安定していることを確認した。さらに、昨年度に選定した外注先にて別の評価法を用いて染色体異常・核型異常検査と感染性検査を実施した。染色体・核型異常検査は、n数が少なく安全性を確認できなかったが、自主的に遺伝子検査を実施した。
- ・自主的な遺伝子検査として、PCR解析により開発容器で分離培養した細胞のがん抑制遺伝子発現量を検討した結果、通常のディッシュ培養と比べてほとんど変化無いことを確認した（図16）。これにより培養した歯髄細胞の安全性が確保できていることを確認した。

開発容器の遺伝子的安定性の検討

開発容器 vs 通常Dish培養 PCR解析

G+G+	老化マーカー
	P16
開発容器	1.1
通常Dish	1.0

発現量がほとんど変わらないため、開発容器培養により、遺伝子的安定性は損なわれていないと考えられる。

図16. 開発容器で分取培養した細胞の遺伝子的安定性

【3-3】他の組織由来幹細胞への展開

<平成26年度>

計画により平成27年度より実施

<平成27年度>

研究目標

- ・骨髄、脂肪など他の細胞源由来幹細胞での検討

研究成果

- ・各組織の安定した入手および最適な培養技術に関する最新情報をアドバイザー、論文、学会より入手し蓄積した。
- ・イヌ・ブタの歯髄・骨髄・脂肪由来幹細胞を用いた比較実験に於いて、歯髄と同様な分取方法（遊走因子・評価方法）が、骨髄・脂肪にも適応できることを確認した。

<平成28年度>

研究目標

- 骨髄、脂肪など他の細胞源由来幹細胞系の開発容器使用データ取得

研究成果

- 昨年度論文・学会より蓄積した情報を基に、アドバイザーから他の幹細胞の一般的な前処理法や細胞数などの新たな情報を得て、他の幹細胞のプロトコルの原案を確認した。
- 歯髄幹細胞容器の膜分取・培養データを基準に、様々な組織（骨髄幹細胞・脂肪幹細胞・歯根膜細胞）から採取した細胞を膜分取しデータを取得した。

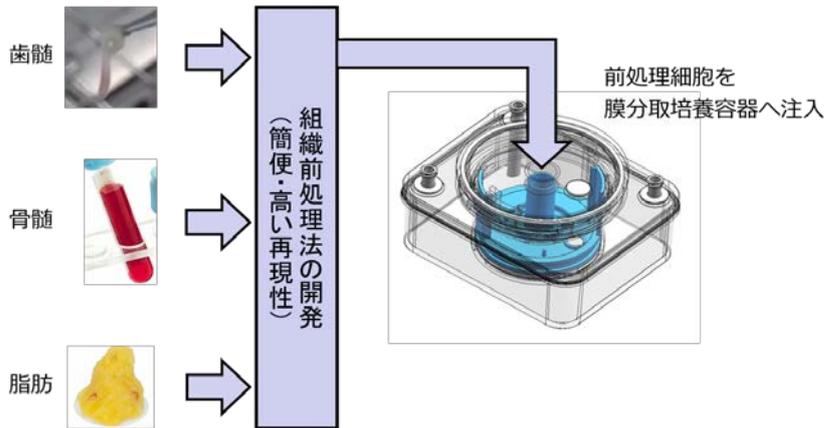


図17. 歯髄・骨髄・脂肪由来幹細胞を用いた膜分取の模式図

最終章 全体総括

本研究開発では、今後の再生医療の発展に伴い、高機能、高品質の幹細胞を簡便に、低コストで分取できる手段の提供を目的とし、歯髄幹細胞分取培養容器としての開発を行った。歯髄・脂肪・骨髄など由来の幹細胞は、様々な用途での応用が期待され、多くの研究機関で、その実用化研究が進められている。従来の幹細胞分取法では、汚染・感染のリスクや高額な設備が必要など様々な問題により、再生医療研究の効率的な推進に対して大きなハードルとなっていた。これらの問題点を鑑み、「高機能、高品質な歯髄及びその他幹細胞」を高効率で分取・精製でき、培養による増殖機能も同時に備えた安価な器具開発を行った。

従来の細胞分離膜が開孔率 5%程度に対し、インプリンティング技術を応用した開孔率 20% 孔径 $8\mu\text{m}$ の新規膜を開発した。また、幹細胞が小型であることに則して孔径 $5\mu\text{m}$ の分離膜の作製にも成功した。この分離膜へ、細胞増殖に影響しない細胞付着抑制処理を施し、膜裏面への細胞付着率を抑制できることから、高速（従来膜比 1/2 の短時間化）で効率良く幹細胞を分離できることを確認した。

新開発分離膜を組み込み、歯髄幹細胞を安全に分取培養できる容器の設計を行い、汚染や感染を防止し、酸素濃度や pH などの最適条件を適用できる閉鎖系培養容器の設計を行った。さらに、細胞の機能性や形態を変化させないため、容器内第一次培養においてトリプシンを使用しない細胞剥離技術を用いたプレートを開発した。最終年度には、幹細胞の一次培養時は 10 倍程度、二次培養時はさらに 5 倍程度（合わせて 50 倍程度）の増幅が見込める完全閉鎖系培養容器の設計を完成した。既存品培養シャーレと比較して遜色ない増殖効果も確認した。

高機能幹細胞が得られることを証明するために、幹細胞表面マーカー CD105, CXCR4, G-CSFR を選定し、目標陽性率の設定（各 95%, 10%, 30% 以上）を行ってきたが、最終年度に FCM 解析の評価法を修正改良して、新たな幹細胞表面マーカー（CD105, G-CSFR, CD271）の目標陽性基準値（各 95%, 20%, 5%）を設定し、クリアすることを確認した。新規開発膜により得られた幹細胞は、血管誘導・神経栄養因子などの mRNA 発現にすぐれた細胞であり、かつ老化マーカーを発現していない未分化な細胞であることを示し、高機能であることを確認した。

一方、染色体・核型異常検査と感染性検査を実施し、開発容器上で分離培養した歯髄膜分取細胞は安全かつ品質が安定していることを確認した。

がん化検査に関しては、アドバイザーの助言に従い、研究用分取培養器具の段階では不要と判断した。

さらに、論文・学会より蓄積した情報を基に、他の幹細胞系への適用を目指して、骨髄・脂肪・歯根膜由来の細胞から採取した細胞を膜分取しデータを取得した。

これらの研究成果は、適宜次項に示す各種発表や特許出願を行った。また商標については、VIVANT-CELL（ヴィヴァンセル）として既に登録を完了した。今後、量産化を実現し、国内販売を 2018 年上半旬、海外販売を 2019 年中に開始することを目標としている。さらに将来の展望として、本開発の医療機器への展開も考慮に入れ、品質保証、安全性のデータを蓄積し販売開始後 3 年程度を目処に医療機器開発の準備を行う予定である。

本研究開発による製品により、より質の高い幹細胞を安価に手に入れることが可能となり、今後の再生医療に関わる基礎研究、さらには臨床における再生医療への貢献が期待される。

1. 複数年の研究開発成果

平成 26 年度

・論文/外部発表等

海外：論文 1 件、総説 1 件、著書 1 件

国内：シンポジウム 1 件、学会 4 件

平成 27 年度

- 特許出願：1 件
- 論文/外部発表等
海外：論文 2 件、講演 1 件
国内：講演 3 件、学会 4 件、報道 1 件

平成 28 年度

- 特許出願：PCT 1 件
- 商標出願/登録査定：VIVANT-CELL ヴィヴァンセル
- 論文/外部発表等
論文 1 報
国際学会発表：ポスター 2 件 講演 2 件
国内学会：講演・セミナー 5 件
- 学会展示：IADR-PBRG2016、第 16 回日本再生医療学会総会 2 件

(2) 事業化展開

製品の名称

商標：VIVANT-CELL ヴィヴァンセル（膜分取培養容器）

<研究用途>

- 全世界を網羅した販売チャネル（国内 400 社以上と海外 8 か国の正規代理店）の活用
- 実証データの周知徹底を行い短期間で高シェア獲得
- 関連学会の活用
- ネット販売の展開
- 海外市場への早期展開（H31 年度）

<将来展開（医療用途）>

- 歯髄バンクや再生歯治療
→品質保証、安全性のデータを蓄積→販売開始後 3 年から医療機器開発の準備