

## ヒト幹細胞馴化培養液の販売について

弊社は多くの皆様からお問い合わせを頂いておりますヒト幹細胞馴化培養液の製造と販売を開始いたしました。

幹細胞馴化培養液はこれまで化粧品原料として使用されてきましたが、近年、細胞を用いない再生医療の可能性を開く新しい素材として注目され、多くの論文が発表されています。

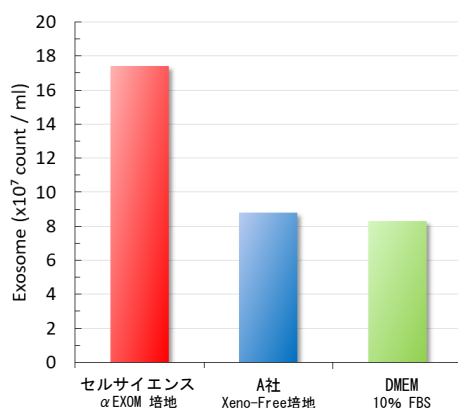
幹細胞馴化培養液には多様なサイトカインや高分子成分が含まれていることが知られ、それらが皮膚の再生や血管新生、創傷治癒促進などを担っていると考えられておりました。

最近、幹細胞馴化培養液の中に幹細胞が分泌する細胞外小胞（EV：エクソソーム）が多量に含まれていることが発見され、幹細胞の分泌するエクソソームの生理作用に熱い視線が向けられています。

弊社はすでにヒト幹細胞培養用の、異種動物成分を含まない“幹細胞培養液”を販売しておりますが、この培養液と動物成分を含まない細胞分散酵素や無血清細胞凍結保存液を用いて、乳歯歯髄や臍帯のウォートンゼリー(Wharton's Jelly)から、「ゼノフリー幹細胞」の分離培養と凍結保存技術を確立しました。

この度、ゼノフリー無血清培養した幹細胞を使い、東京医科大学、落谷教授のご指導により、他社培養液での生産量を2～4倍上回る濃度の幹細胞エクソソームを含む幹細胞馴化培養液の製造が可能になったことから、再生医療研究用試薬、製品開発原料、臨床治験材料等として「ゼノフリー/無血清幹細胞馴化培養液」の提供を開始いたしました。

\* 幹細胞馴化培養液製造用に開発した完全合成培養液「 $\alpha$ EXOM」と他社の培養液で製造した馴化培養液に含まれるエクソソームの含有量の比較試験を行いました。下の図に示した様に、「 $\alpha$ EXOM」培養液で製造した馴化培養液は他社培養液と比較し、多量のエクソソームを含有します。



試験方法：ゼノフリー幹細胞培養液「 $\alpha$ MSCM+PL」で臍帯幹細胞を細胞培養フラスコ3本に、12,000個/cm<sup>2</sup>の細胞密度で植え込み、翌日フラスコ表面の50～60%に細胞が増殖したことを確認して培養液を除去、PBSで細胞を洗浄後、3種類の試験培養液（ $\alpha$ EXOM培地、A社 Xeno-free培地、10%FBS DMEM培地）を加え37°Cで培養した。培養3日後、馴化培養液を回収して培養液中に含まれる、粒子サイズ50～200nmのCD63陽性エクソソームの数をJVCKENWOOD社の「ExoCounter」で測定しました。

## 馴化培養液製造用の「ゼノフリー幹細胞」

馴化培養液を製造するための幹細胞は、インフォームドコンセントを実施して同意の上でご提供頂いた乳歯や臍帯から、ゼノフリー培養法で分離培養した、異種動物成分で汚染されていない日本人の「ゼノフリー幹細胞」です。

馴化培養液の製造には、以下の「安全性試験」と「適合性試験」を実施して原料細胞としての規格に適合した細胞のみを使用しています。

**細胞の安全性試験：** 健康な小児の乳歯や正常分娩で誕生した新生児臍帯から分離した幹細胞は、「ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」に基づき、リアルタイム PCR 法でのウイルス否定試験 (HIV1, HIV2, HBV, HCV, HTLV, PVB19) と第 17 改正日本薬局方に基づいた PCR 法による 7 種類のマイコプラズマ否定試験と無菌性試験 (一般細菌、嫌気性菌、真菌) を実施して安全性を担保しています。

**細胞の適合性試験：** 採取した細胞の適合性確認には以下の検査を実施しています。

- ・フローサイトメトリー法で細胞表面マーカーを解析し、幹細胞の特徴である「CD90, CD73, CD105 が陽性、且つ CD45, CD34, CD11d, CD79a, HLA-DR 陰性」の細胞率が 90% 以上である事を確認済み。
- ・自社培養プロトコールに準拠して細胞を培養し培養液中に分泌されるサイトカイン (VEGF, IGF-1, EGF, GDF-11 等) の種類と含有量を免疫化学的測定 (ELISA 法) で分析。
- ・培養液中に分泌される、CD63 陽性エクソソーム量を測定。

以上の安全性試験と適合性試験を確認した細胞を血清や異種動物成分を含まない凍結保護剤を用いてマイナス 160°C 以下の液体窒素で凍結保存しております。

## 馴化培養液製造方法概要

「ゼノフリー/無血清幹細胞馴化培養液」の製造は、幹細胞の継代・拡大培養から馴化培養液の回収までを再生医療用の細胞加工施設に適合したクリーンルーム内で実施し、馴化培養液の精製・滅菌・小分け分注などの製品化は GMP グレードに準拠した ISO クラス 5~クラス 7 のクリーンエリア内で実施されます。

### 1, 幹細胞の継代・拡大培養

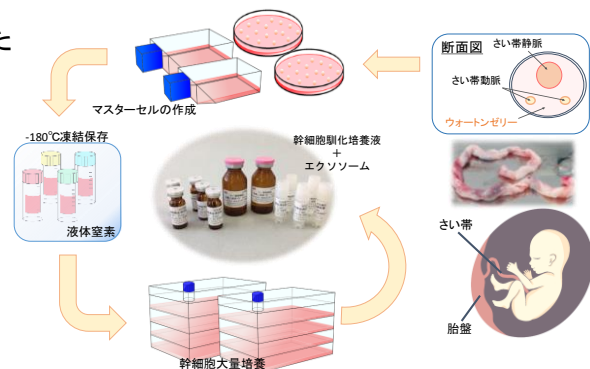
ゼノフリー幹細胞培養液「 $\alpha$ MSCM+PL」とアニマルフリー細胞分散酵素を用いて継代培養を繰り返し、馴化培養液の製造に必要な細胞数まで増やします。

### 2, 馴化培養液の回収

細胞が培養容器表面の 50~60% に到達した時、培養液を吸引除去し細胞を等張塩類溶液で洗浄し、動物成分を含まない自社開発した馴化培養液製造用の完全合成培地に置換して数日培養後、馴化培養液を回収します。

### 3, 精製、滅菌、小分け分注

回収した馴化培養液は、高速遠心分離、精密限外ろ過によって精製され、ろ過滅菌法で除菌して様々な無菌容器に小分け分注されます。



#### 4. 品質管理

品質管理は製造工程内と製品化後に実施されます。検査項目は、濁度、pH、浸透圧、蛋白質濃度、エンドトキシン検査、無菌性試験等を日本薬局方に準じて実施。さらに、50～150nmのCD63陽性エクソソームの量をエクソカウンターで測定します。

### 馴化培養液の製造工程内検査項目と品質規格

馴化培養液製造のための細胞の品質管理、培養工程の管理、回収した馴化培養液の品質に関連する様々な検査項目及び品質規格は「安全性試験及び品質検査方法一覧表」及び「幹細胞馴化培養液の品質規格」のとおりです。

安全性試験及び品質検査方法一覧表

検査項目	方 法
外観（濁り）	目視にて確認
pH	日本薬局方 2.54 pH 測定法に準拠
浸透圧	日本薬局方 2.47 浸透圧測定法（オスモル濃度測定法）に準拠
エンドトキシン含量	日本薬局方 4.01 エンドトキシン試験法に準拠した比色法
無菌性試験	日本薬局方 4.06 に準拠した 5.1.直接法または5.2.フィルター法 検査対象：一般細菌、嫌気性菌、真菌類
ウイルス否定試験 （原料細胞のロットごと または製造工程内に実施 する）	すべての幹細胞に対して適用する。（社内試験） 検査対象：HIV-1,HIV-2,PVB19,HCV,HBV,HTLV,特異的プライマーと蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR 法による核酸増幅試験（NAT）。
マイコプラズマ否定試験 （原料細胞のロットごと または製造工程内に実施 する）	すべての幹細胞に対して適用する。（社内試験） 検査対象：M.arginini、M.fermentans、M.hyorhinis、 M.pneumoniae、M.orale、M.salivarium、 Acholeplasma laidlawii マイコプラズマ特異的プライマーと蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR 法による核酸増幅試験（NAT）。
蛋白質定量試験	日本薬局方準拠、ビシンニン法（BCA法）
純度確認試験	SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDSPAGE）による高分子成分の有無を確認する。
サイトカイン類含量 （原料細胞のロットごと に実施する）	E L I S A 法による免疫化学的測定（社内試験） VEGF,IGF-1,HGF,GDF-11 等
線維芽細胞培養試験	ヒト線維芽細胞 TIG-1 の無血清培養による増殖促進試験。 検査試料を添加した無血清培養液で4～6日培養し、トリパンブルー染色法で細胞数を測定する。（社内試験）

## 幹細胞馴化培養液の品質規格

検査項目及び方法		UCSCM31、UCSCM32、 DPSCM11、DPSCM12
濁り（目視）		視認できないこと
pH		pH7~8.5
浸透圧		290±10 (mOsm/Kg H <sub>2</sub> O)
エンドトキシン含量		1.0 EU/ml 以下
蛋白質含量 (BCA 法)		<3 mg/mL
無菌性試験	一般生菌 (直接法)	検出されないこと
	嫌気性菌 (直接法)	検出されないこと
	真菌類 (直接法)	検出されないこと
マイコプラズマ否定試験 (PCR 法)		検出されないこと
ウイルス否定試験 (PCR 法)		検出されないこと

### 製品の形態について

幹細胞馴化培養液の製品形態は以下のとおり、100ml、500ml、1,000ml の角形 PET 瓶入りですが、お客様のご要望によりガラスバイアル瓶やスクリューキャップ付きプラスチックバイアル等への無菌充填品のご提供も致します、ご遠慮なくお問い合わせください。

なお、本製品は冷凍でのご提供になりますが、凍結乾燥品としてご提供出来るよう準備を進めております、提供可能になりましたら改めてウェブサイト上でご案内させていただきます。