

# 国内製造 ヒト脂肪由来幹細胞順化培養液 ヒト脂肪間質細胞エクソソーム

## Phicello・Phisomeの製造工程から化粧品製造工場での最終製品化まで

### 1 細胞播種

細胞培養器材へ既定密度のヒト脂肪由来幹細胞の懸濁液を播種する。



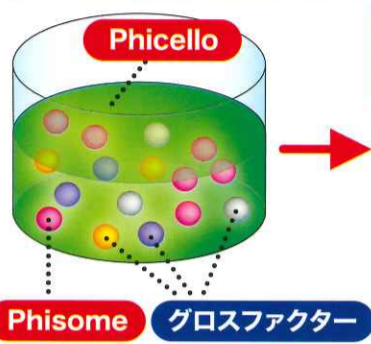
### 2 細胞培養

CO2インキュベータ (CO2濃度を5%に調整した培養器) で5日間培養する。



### 3 上清回収

細胞培養終了後、ヒト脂肪由来幹細胞順化培養液をタンクに集めて無菌フィルターで濾過滅菌する。



### A 粉末化

#### 凍結乾燥

凍結乾燥庫内でヒト脂肪由来幹細胞順化培養液を凍結乾燥する。



### B 単離

上清液に含まれる因子の中からPhisomeを単離する。



### 化粧品製造工場での最終製品化



液体培地の培養評価技術を基に、細胞培養上清やエクソソームを国内で製造し、誕生したヒト脂肪由来幹細胞順化培養液 (INCI名: フコク製) 「Phicello」およびヒト脂肪間質細胞エクソソーム (同) 「Phisome」は、東京大学や金沢医科大学との研究実績を持つフコク社が開発しました。

ヒト毛根細胞順化培養液 研究開発中!

### エクソソームについて

エクソソームは、細胞から分泌される約50-150nm程度の細胞外小胞で、細胞間の情報伝達に重要な役割を担っています。コスメに使用するヒト脂肪間質細胞エクソソーム「Phisome」は、ELISA法を用いたエクソソーム定量分析で、懸濁液1mLあたりの数が、**500億個超/mL**であることも確認済みです。

### 幹細胞とは

幹細胞とは、失われた細胞を再生して補い、組織の機能を回復させる働きを持つ細胞。その培養の際に分泌されるエキスには、グロースファクター (細胞増殖促進因子) やサイトカイン (生理活性物質) など数百種類のタンパク質が含有されており、米国や韓国ではエイジングケア原料として認知されている。なお、ヒト脂肪由来幹細胞順化培養液「Phicello」は、VEGF、HGF、EGF、FGF、PDGF、TGF-βなどの成長因子が検出されている。

### ◆ライフサイエンス事業として20年超の技術を活用

フコク社は、培養容器製造、液体培地製造、細胞培養の全ての製造プロセスを自社で行うため、顧客ニーズの変化へ速やかに対応している。ヒト脂肪由来幹細胞順化培養液「Phicello」とヒト脂肪間質細胞エクソソーム「Phisome」は、次世代技術・新事業開拓の一環として、1996年より手掛ける医療用容器の開発、2009年より手掛ける細胞培養研究や後の液体培地の開発ノウハウを活用して開発された。

### ◆東京大学、金沢医科大学との細胞培養研究

フコク社は、細胞培養においては、東京大学や金沢医科大学との共同研究実績がある。「再生医療学会2019」では、東京大学と共同で「ドーナツ型バッグを用いた旋回培養による均一な大きさの細胞凝集塊形成と大量培養法の確立」を発表。従来容器のディッシュと同社製造のドーナツ型バッグで比較培養した結果、粒子の均一性が向上した。  
また、金沢医科大学「細胞治療プロジェクト」支援で行った研究として、「ドーナツ型バッグを用いた脂肪組織由来幹細胞のスフェロイド形成の検討」を報告。スフェロイドとは、細胞同士が凝集した球状の集合体。従来の細胞培養は、ディッシュやフラスコなどで行う実験的で二次元的な単層培養であるため、細胞治療分野で注目される生体内の三次元的なスフェロイド形成が難しい点に着目。同社のドーナツ型バッグを用いて、スフェロイド形成の検討と、遺伝子発現レベルの網羅的な解析を実施した。その結果、ドーナツ型バッグで培養中の旋回速度を変化させることで、比較的均一なスフェロイド形成を確認したほか、より均一な大きさのスフェロイド作製などを確認。半定量的RT-PCRによるマイクロアレイ解析では、細胞接着、血管新生、組織修復に関する遺伝子の発現向上も確認した。今後、治療への応用として、損傷した組織の血管新生や、組織修復の促進などが期待される可能性がある。

### 安定

#### 製造プロセス：専用液体培地

- 使用する液体培地は、培養上清 (じょうせい) 液の製造専用となります。上清とは、細胞が産生した様々なタンパク質を含む分泌液でGF (グロースファクター) と呼ばれる細胞活性の情報伝達物質が豊富に含まれています。「メイドインジャパン」品質の上清を作るため、化粧品原料として制限された成分を含まずに細胞増殖を最大限に高めたオリジナルの培地を使用。安全を確認した細胞を培養しています。
- 使用する培地には、アミノ酸、糖類、脂質、細胞成長因子などをバランスよく配合し、幹細胞の成長を促します。化粧品原料の規制物質や抗生物質を含んでおらず、化粧品原料基準に適合しています。
- 一般的な細胞培養は、培地にウシ由来の血清 (ウシ胎児血清: FBS) を添加しています。フコクはより安全性を高める為に、血清の代替として、米国の血小板製剤 (米国FDAガイドラインに従った各種病原体の試験実施済み) から作製されたヒト血小板溶解物を使用しています。

#### 製品規格

- VEGF 1,000pg/mL以上
- HGF 1,000pg/mL以上
- pH
- 生菌試験 (細菌・真菌)

順化培養液に含まれる主な成長因子 (実測値: 単位 pg/mL)  
VEGF 3,500 HGF 6,220 EGF 5,900  
TGF-β1 2,700 ヒアルロン酸 681,000  
\*その他、細胞の活性因子を多数含みます。(測定: 株式会社フコク)

#### 培養環境

細胞培養室は、ISO6 (クラス1000) で清浄度管理しています。  
\*ISO6 (クラス1000) ... クリーンルームの清浄度。単位容積あたりの0.5μmの粒子が1000個以下。

\*1982年「第1回ヒト白血球分化抗原に関する国際ワークショップ」(パリ)以降、国際的に統一して分類されるCD (research/cd-antigens/clusters of differentiation) の番号は、ヒト白血球を主としたさまざまな細胞表面に存在する分子 (表面抗原) に結合するモノクローナル抗体群を国際的に統一して分類したもので、ワークショップで決定された順に番号が付く。ヒト脂肪由来幹細胞順化培養液では、CD分類の14 (機能: LPSとLBPの複合体の受容体)、34 (機能: 細胞接着)、73 (機能: ヌクレオチダーゼ)、90 (機能: リンパ球の共刺激と細胞接着)、105 (機能: 血管新生)。

### 安全・安心

#### ウイルス否定試験

培養するヒト脂肪由来幹細胞は、生物由来原料基準の項目を含む下記ウイルスが含まれていないことを確認しています。

- HIV1, 2 (エイズ)
- CMV (サイトメガロウイルス)
- HBV (B型肝炎ウイルス)
- HCV (C型肝炎ウイルス)
- FTA-ABS (梅毒検査)
- EBウイルス (伝染性単核症)
- HTLV-1 (ヒトT細胞白血病ウイルスI型)
- ParvoB19 (ヒトパルボウイルスB19)

#### ヒト脂肪由来幹細胞順化培養液について 幹細胞の安全性と順化培養液製造への適正

・**フローサイトメトリー法**は、個々の細胞が持つ特徴的な因子 (タンパク質、遺伝子など) を検出することで、その細胞の状態や性質を調べる手法です。  
・CD分類より、間葉系幹細胞の特徴として重要とされる5種のタンパク質 (マーカー) を検出することで順化培養液製造に使用する細胞が、幹細胞としての性質を正常に保持した状態であることを確認しています。  
下図は、細胞表面に存在する5種の幹細胞マーカーを調べた結果であり3種の陽性マーカー (赤および緑の波形が離れている図) と2種の陰性マーカー (赤および緑の波形が重なる図) が幹細胞としての特徴を示しています。

