特 集

特集：再生医療の産業化に向けて

自動初代培養装置が開く再生医療

久 保 寛 嗣*

1. はじめに

細胞シート工学はその技術が発明されて以来^{1, 2)}、さまざまな細胞に対して適用され、現在では角膜を初めとする臨床レベルでの治療に応用されるなど、再生医療による医療の発展を推し進める非常に強力な技術としての地位を確立しつつある³⁾。現在、細胞シート製造工程は医師、研究者などが熟練の技術を駆使し、さらに臨床で利用されるヒト細胞を使用した細胞シート製造であればCPC (Cell Processing Center) などのクリーン度、清潔度を高度に管理された製造施設の中で目的の細胞シートを作り出している。今後、細胞シート工学を利用した再生医療が益々普及するにつれ、現在の手作業による細胞シート作製では製造が需要に対して追いつかなくなり、安定した細胞シート製造を自動化するシステムが必要となってくるこ

は必須であると考えられる。

現在、われわれは東京女子医科大学岡野教授を中心研究者とする最先端研究開発支援プログラム（以下、Firstプログラム）⁴⁾の組織ファクトリの開発グループに参画し、骨格筋組織から移植に必要な積層化筋芽細胞シートを製造する工程をモデルケースとして、骨格筋組織からの筋芽細胞単離、拡大培養、細胞シート作製、細胞シート積層化までの工程を自動化する研究開発プロジェクトを推進させている（図1）。自動化に際しては、今まで培養技術者が持っていた匠の技をいかに機械で代替させるかということはもちろんであるが、機械による製造工程を経て生産されてきた細胞が安心して使用できる品質を有していることを客観的に示さなければならない。細胞の品質管理をどのように定量化かつシステムチェックにおこなっていかかが非常に重要になる。

図1 組織ファクトリ概念図¹⁴⁾

* 日本光電工業株式会社 荻野記念研究所
河田町研究室

手作業にて培養がおこなわれていた場合は、培養実施者の顕微鏡での視覚的観察により、培地の交換、継代タイミングなどのケアを適切におこない、最終的な培養細胞の品質を維持してきた。この定性的な評価（ノウハウ）を基に培養がおこなわれるため、熟練の培養技術者と新人の技術者での培養成績の差が激しく、それにより細胞の品質が大きく左右されてきた。機械による自動培養ではその熟練技術者の目を持つことはできないため、培養技術者の経験の裏に隠れている技術を定量化し、それら定性的評価に代替しうる新しい細胞の品質管理システムが必要である。

本報では、本プロジェクトでの取り組みとして、細胞シート製造の初めの工程である細胞単離・初代培養システムの構築と、培養細胞の品質管理を目的とした培養細胞の品質を一定に保ち、かつ細胞が培養されてきた環境のトレーサビリティを確保することのできる培養状態のモニタリングシステムの研究開発について紹介する。

2. 細胞シート工学による再生医療的治療

東京女子医科大学岡野教授らの開発した細胞シート工学は培養皿上の表面温度を変化させるだけで、培養皿表面を親水性、疎水性を相互に変化させることができ、その性質を利用して、細胞の接着、剥離を制御できることが大きな特徴である。細胞を剥離する際、酵素などを使用せずに済むため、細胞間結合構造をそのまま維持してシート状に回収することができる⁵⁾。

現在、その技術を用いてさまざまな細胞が細胞シートとして回収することに成功した例が報告され^{6,7)}、従来の細胞懸濁液を直接疾患部位注入法では細胞損失の問題で広く普及が進まなかった細胞治療法が注目されるようになってきた。これまでに動物細胞での前臨床的な臨床基礎技術の確立を進め^{8~10)}、現在では、ヒト組織由来の骨格筋、角膜、歯根膜、食道粘膜などの細胞シートを作製し、疾患部位に移植する臨床応用が進んできており¹¹⁾、細胞シートを用いた治療は今後再生医療学的な細胞治療の大きな柱になると予測される。

3. 細胞シート製造の流れ

細胞シート作製において、その製造工程は大きくわけて次の5段階の工程にわけられる。すなわち、① 患者からの組織採取工程、② 細胞単離・初代培養工程、③ 細胞継代・大量増幅培養工程、④ 細胞シート作製・積層化工程、⑤ 患者への移植である。ヒト臨床に用いる場合は、現在は患者に対し細胞シート移植治療をおこなう計画を立て、医師がこの5工程のすべてに関わり、個々の患者の治療計画に乗っ取り移植のための細胞シート作製がなされ、最終的に患者に移植されることになる。

しかし、今後このような再生医療学的治療法が普及し、細胞シートの需要が増大してくると、現在のように製造工程のすべてに医師が関わり、移植をおこなう医師すべてが細胞シート製造の技術を習得しなければ、治療ができない状態では、広く一般に浸透する治療法としては不十分である。細胞シート製造は細胞培養を専門におこなう別の組織体に任せ、医師は患者の治療計画と組織採取、シート移植に集中できる体制を作ることが必須である。

4. 手作業での細胞シート作製から自動化によるファクトリでの大量・高品質生産へ

現在、細胞培養をおこなう施設において通常の細胞単離・初代培養工程をおこなう際には、熟練の細胞培養技術者が細胞培養室にてクリーンベンチ、安全キャビネットなどの設備を利用し培養をおこなっている。培養技術者は生物、化学、医療系の大学、専門学校などの教育機関にて無菌操作、培地交換法など細胞培養に必要な基本的技術を習得するための教育訓練を受けて通常作業に従事している。細胞培養行為は培養技術者の所作の節々に教科書には明文化されていない熟練の技が隠れており、往々にしてその技を入れるか否かにより、培養細胞の品質に多大な影響が現れるという側面を有していた。細胞の増殖、活性度合いが培養する人に依存する所以である。細胞シートの品質のばらつきは、安定した細胞シートを生産する上での

大きな障害となり、人的工数の増大は製造コストの上昇を招き、医療費の抑制が叫ばれる昨今の医療社会事情に合致しない。

そこで求められるのは、安心・安全・安価な細胞シートを大量生産させる細胞シート自動システムの開発である、この自動製造システムの開発を成功させることが、医師単位によりおこなわれている再生医療学的治療を産業として確立し、広く一般に普及させるための核となると思われる。

前述した細胞シート製造工程のうち、患者からの組織採取と、患者への細胞シート移植は医師以外では関与できないため、自動化の対象となるのは組織を受け取ってからの細胞単離・初代培養から細胞シート積層化までの工程である。医師が摘出した組織を自動製造システムに投入するだけで、移植用の積層化された細胞シートを製造するシステムを開発することができれば、先に問題となっていた人的工数を大幅に減らすことができ、さらに人的技術差による品質のばらつきも抑えることができる。

これにより現在製薬と医療との間での分業体制が確立している創薬と医療行為が、再生医療の分野でもシート製造と医療行為の分業体制を確立することができ、再生医療的治療法の確立に大きく寄与するものと思われる。さらに、開発された細胞培養システムは安心・安全・安定した細胞シート作製に大いに寄与し、再生医療産業化に対する確実なステップアップとなる。

5. 細胞単離・初代培養工程

現在、筆者らが開発を進めているのは自動化工程の中の最初の工程である細胞単離・初代培養工程の自動化である。筋芽細胞シート作製を例とした場合、現在、手作業での細胞単離・初代培養工程は以下のような手順となる。

① 患者より骨格筋組織を採取する。② 組織から脂肪、線維組織を取り除く（トリミング）。③ コラゲナーゼなどの細胞間接着タンパクを分解する酵素を用いることで細胞間の結合組織を溶解し、組織から細胞を単離する。④ 回収した細胞を遠心分離、洗浄動作をおこない、細胞懸濁液を得る。⑤ 回収した細胞懸濁液を培

養皿上に播種する。⑥ 播種後、コンフルエントになるまで初代培養をおこなう。ただし、筋芽細胞の場合は、コンフルエントになると、隣接する筋芽細胞同士が細胞融合をおこし、多核化した筋管を形成するため、分化を押さえるためにサブコンフルエントになった状態で、次工程である継代・大量培養工程に受け渡される。

1) 細胞単離

筋芽細胞を取得するための骨格筋は、筋原線維とそれを覆う筋膜、細胞間を埋める結合組織から構成される。筋芽細胞は、胎生期に筋芽細胞から分化し、筋管形成を経て筋原線維として分化が終了するが、一部の筋芽細胞は分化せず、そのまま筋衛星細胞として休止状態に入る。成熟した筋原線維の周りには、この分化を休止した状態の筋衛星細胞が存在し、これらは組織の損傷時などに休止より目覚め、活性化し筋芽細胞として分化を始め新たな筋原線維として構築される。細胞単離処理はまさにこの眠っている筋原線維中の筋衛星細胞（筋芽細胞）を、コラゲナーゼ、トリプシンなどの細胞間接着を溶解する処理を施すことにより、生きたまま回収する操作である。この筋芽細胞をいかに活きの良い状態で効率よく回収するかが重要な技術開発要素となる。また、回収された細胞懸濁液の中には、線維芽細胞、筋芽細胞が含まれ、次工程での大量培養工程に受け渡しする時の境界条件として、筋芽細胞の収率を上げることも求められる。初代培養時には、採取する組織の性質により、細胞の純度、増殖度合、細胞組成が大きく左右される。この最初の細胞の性質のばらつき、特に筋芽細胞と線維芽細胞の含有比率をある程度一定にすることは安定した細胞シートの品質を保つのに非常に重要である。今回われわれが解決しなければならない大きな課題の1つとして、この筋芽細胞、線維芽細胞も構成比率を制御する方法を確立することが挙げられている。

本プロジェクトでは細胞単離システムの開発をおこない、ターゲットを筋芽細胞にした細胞単離技術を獲得するための検討をおこなった。

2) 自動培養システム

近年機械化、省力化の波は細胞培養の世界に

も波及しつつあり、自動培養装置としては自動継代培養装置や、細胞破碎装置などいくつかの自動化アイテムが近年世の中に出現しつつある。しかしながら、組織からの細胞単離、細胞懸濁液作製までの一連の工程を自動化させた例は世界でもあまり報告されていない。その理由はいくつか考えられるが、主に考えられる原因としては、細胞種ごとに細胞単離する手法が異なること、最初の入力である組織の品質が患者個人に大きく依存し、一定の細胞数を得るためには培養期間、ミンスサイズの最適化など、細かな調整が必要であるなど、さまざまな理由が挙げられる。さらに自動化実現のためには、滅菌処理した培地、培養皿、ピペットチップなどの培養機材の搬入を滅菌状態を維持したまま確実に作業空間に搬入する方法を確立すること、培養空間自体の滅菌方法を確立すること、でき上がった細胞懸濁液の次工程への供出法を確立することなどがあり、その個々に対して確実な回答を用意しつつ開発作業を進めなければならない。

細胞単離・初代培養工程を自動化することにより、① 熟練の細胞培養技術者がいなくても初代培養に必要な細胞が取得可能となり、② 培養工程に人の手が介在しないことによるコンタミリスクの低減することができる。さらに、③ 培養作業に要する人的工数の大幅な削減を実現することができるなどのメリットがある。

今回、Firstプログラム内で筆者らの研究グループは、細胞単離・初代培養工程自動化のための機能試作機を開発した(図2)。本システムは、細胞単離装置を中心として、人の手作業

をなるべく忠実に再現させることのできる6軸のロボットアームを採用し、遠心管、ピペットチップ、細胞単離用の容器、培養皿をチャックの交換なしに把持、搬送できるハンドチャックを独自開発した。これらを用いることで、人間の手の動きを再現しアームを中心として、遠心分離、培地、洗浄液などの試薬供給モジュール、細胞懸濁液作製のための懸濁モジュール、そして外部に出すための遠沈管をキャップするためのキャップユニットの配置をおこない、細胞単離、遠心分離、細胞洗浄、細胞懸濁の各工程を有機的につなげることのできる自動細胞単離・初代培養システムを開発した。本装置を用い、まずラット、豚の動物組織を用い、筋芽細胞の培養試験をおこなったところ、大腿部骨格筋組織より筋芽細胞を生きたまま回収し、初代培養をおこなうことに成功した。

6. 品質管理のためのモニタリングシステム

通常、細胞培養をおこなう作業者は細胞懸濁液播種の後、細胞がコンフルエントに到達するまで、毎日観察をおこない、細胞の様子を確認し、必要に応じて培地交換をおこなう。培養状態を把握する判断材料となるのは培養期間中においては顕微鏡観察などの視覚的な情報を主とし、培養技術者の熟練した経験によりその増殖・活性度合いを判断している。さらに、より詳細な細胞培養状態を把握しようとする、サンプリング用の培養皿を用意し、固定後蛍光抗体などで標識した細胞を観察することで目的の機能を発現しているか否かを判定しているのが実情である。紀ノ岡らの研究グループは連続

図2 細胞単離・初代培養システム機能試作機

的な培養中の細胞増殖過程を詳細に把握するためにさまざまな培地成分分析をおこない¹²⁾、培養中の細胞挙動の定量化をおこなっている。本プロジェクトでも同様に、初代培養にて回収した細胞をそのまま細胞シート作製のための細胞として次工程に渡す必要があるため、サンプリングによるロス、コンタミリスクを回避しつつ、細胞の増殖および分化度合いを生かしたまま評価・判断する指標を獲得することが必要となる。また、筋芽細胞に於いてはコンフルエントになり、隣接し合う細胞が接触しだすと、筋芽細胞は増殖を止め、細胞融合を起こし、多核化した筋管形成を起こす。次工程に渡すためには筋管形成を起こす前の筋芽細胞の状態を受け渡さねばならないため、このコンフルエントに到達するまでの時間を注意深く観察する必要がある。現在は、顕微鏡観察により、サブコンフルエント状態で継代培養をおこない、細胞間の距離を離す工程をおこなっているが、無菌が維持された自動化装置の庫内空間中では安易に観察のために培養皿を外に出すことはできない。

特に組織から目的の細胞を単離してくる初代培養工程においては、単離時の酵素処理や組織ミンス処理時の物理的な力により、細胞がダメージを受けた状態にある。人間でいえば患者が手術直後のICUにいる時期に相当する。この際に、その細胞が今どのような状態にあるのか、細胞の代謝の状態、培地の状態を常に監視し、なにか不測の事態が起きれば即アラームを鳴らし、いち早く管理者に知らせることのできる培養状態モニタリングシステムを構築すること

は、高品質で安定した細胞シートを生産する上で不可欠である。

さらに本プロジェクトが目指す、安心・安全・安価な自動細胞シート製造装置では、元となる細胞がどのような状態で取得され、どのような条件で培養期間をすごし、移植の直前までどのような状態が保たれていることを記録として残し、品質を保証する必要がある。実際に患者の治療に使用しようと意図して作製した細胞シートの品質が不明のままでは移植術者も患者も培養者も安心して手術をおこなうことは不可能であることは自明である。

1) 非侵襲モニタリングシステム

今回、Firstプロジェクトにて細胞の代謝の状態を非侵襲で計測するモデルとして、図3のような培養状態モニタリングシステムを開発する。本システムは培養状態を24時間連続的に監視し、計測パラメータに不測の事態が発生した場合、即管理者に通知が届く仕組みを備える。これにより、従来の顕微鏡観察による視覚情報に加え、細胞の代謝、活性、増殖度合いを把握することのできる指標としてのモニタリングパラメータを確立し、細胞治療を基軸とした再生医療においてもトレーサビリティのとれた品質保証システムを構築し、安定した品質の細胞シートを生み出す生産システムを構築する。

一例として、光学的なアプローチによる非接触型のpH計測システムを開発した(図4)。細胞培養においては培養期間中のpHの管理は最も大切な指標の1つであるが、連続、かつ非侵襲培養溶液液に含まれるフェノールレッドの

図3 培養モニタリングシステム

図4 着脱式非接触 pH 計測ユニットと専用培養容器

吸光度を計測することで、従来の電極法による接触型の pH 測定装置と同等の性能を非接触にて計測することに成功した¹³⁾。本システムでは培地中に含まれるフェノールレッドの吸光度の変化量により培養中の pH の変化量を計測することができ、同時に連続的温度計測、ID 管理をおこなうことができ、今後、グルコース、 pO_2 、乳酸、アンモニアなどの細胞代謝による産生物質を計測することができれば、培養期間中の細胞の状態を詳細に把握することが可能となる。

7. おわりに

細胞シート工学の発展により、従来の薬を使用した治療行為と同様に細胞そのものを治療デバイスとして利用することができる世界が現実のものとなりつつある。今後、広く普及が進み、再生医療的な治療が身近なものとなると、細胞シートの需要は一気に増大し、安定した品質の細胞シートを大量に生産しなければならない時期がそう遠くない将来に訪れるであろう。その時までには、現在の培養技術者の職人芸に頼った細胞培養技術を吸収し、発展させ、大量、高

品質、安定生産できる細胞シート製造ファクトリを創生し、新しい産業として育成しておかなければならない。

謝 辞

本報をまとめるにあたり、多大なご指導を頂きました岡野光夫教授、清水達也教授（東京女子医科大学）、紀ノ岡正博教授（大阪大学）、研究推進時に多くの有益なコメントを頂きました水谷学様、田中理枝様（独立行政法人科学技術振興機構 FIRST 岡野プロジェクト支援室）に厚く御礼申し上げます。

本研究は、総合科学技術会議により制度設計された最先端研究開発支援プログラムにより、日本学術振興会を通して助成されたものです。

文 献

- 1) Yamada, N.; Okano, T.; Sakai, H. et al. Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol Chem Rapid Commun.* 1990, 11, p. 571-576.
- 2) Okano, T.; Yamada, N.; Okuhara. et al.

- Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials*. 1995, 16, p. 297-303.
- 3) Nishida, K.; Yamato, M.; Hayashida, Y. et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *The New England journal of medicine*. 2004, 351, p. 1,187-1,196.
 - 4) 最先端研究開発支援プログラム－再生医療産業化に向けたシステムインテグレーション.
<http://twins.twmu.ac.jp/first/index.html>
 - 5) Kikuchi, A.; Okuhara, M.; Karikusa, F. et al. Two-dimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly (N-isopropylacrylamide) -grafted surfaces. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 1998, Vol. 9, No. 12, p. 1,331-1,348.
 - 6) Shimizu, T.; Yamato, M.; Kikuchi, A. et al. Two-dimensional manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile amplitude. *Tissue Engineering*. 2001, 7, p. 141-151.
 - 7) Kanzaki, M.; Yamato, M.; Hatakeyama, H. et al. Tissue engineered epithelial cell sheets for the creation of a bioartificial trachea. *Tissue engineering*. 2006, 12, p. 1,275-1,283.
 - 8) Ohki, T.; Yamato, M.; Murakami, D. et al. Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut*. 2006, Dec, Vol. 55, No. 12, p. 1,704-1,710. Epub. 2006, May, 18.
 - 9) Memon, I.A.; Sawa, Y.; Fukushima, N. et al. Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2005, 130, p. 1,333-1,341.
 - 10) Nishida, K.; Yamato, M.; Hayashida, Y. et al. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation*. 2004, Feb, 15, Vol. 77, No. 3, p. 379-385.
 - 11) Ohki, T.; Yamamoto, M.; Ota. et al. Application of cell sheet technology for esophageal endoscopic submucosal dissection. *Tech Gastrointest Endosc*. 2011, Vol. 13, No. 1, p. 105-109.
 - 12) Medical Innovation of 21st Century “Challenge for the State of the Art Medical System Driven by Nanobiotechnology. 抄録集. Development of a New Cell Isolation System from Tissue for Regenerative Medicine. Shioyama, T.; Kubo, H.; Takeda, S. et al.
 - 13) 紀岡正博, 田谷正仁, “第24章 培地成分測定に基づく細胞培養モニタリング”, “細胞培養・再生医療のための培養システム”. シーエムシー出版, 東京, 2010, 1, 28, p. 214-224.
 - 14) M. Oura.; H. Kubo.; T. Okano. et al. Development of Cell Culture Monitoring System and Novel Non-Contact pH Measurement. *IEEE EMBS*, Vol. 2, No. 6, P. 22-25.
 - 15) 組織ファクトリープロジェクト概要.
<http://twins.twmu.ac.jp/first/soshiki.html>