特 集

特集：再生医療の産業化に向けて

自動培養装置が拓く再生医療の未来

小 林 豊 茂*

1. はじめに

近年、患者自身あるいは提供者（ドナー）の少量の細胞から、細胞培養処理で再構築させた再生組織を移植に供する再生医療が注目を集めている。その中で、東京女子医科大学岡野ら¹⁾は、温度応答性培養表面（図1）による組織状の細胞シートの製造方法を開発し²⁾、現在では角膜上皮³⁾、食道上皮⁴⁾などのさまざまな細胞シートで臨床試験を実施し、高い治療成績をあげている。また、国内の産業界では、(株)ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングが再生皮膚の製造販売承認を得て上市し、重度熱傷患者の治療に適用されている。再生医療に対する社会的ニーズが日本ばかりでなく国際的に急速に高まっており、再生医療は今後大きな発展が期待されている。

図1 温度応答性培養表面による細胞シートの回収

- a. 温度応答性培養表面を有した培養容器
b. 採取した角膜上皮細胞シート

しかし、再生組織の製造は、厳格な法規制の下、専門技術者の手作業によりなされるため、少量生産で製造コストが極めて高いこと、また高度な技術を有する専門技術者が不足していることが再生医療の普及に向けて大きな課題となっている。このような状況の下、各国で再生組織の製造プロセスの自動化を実現する自動培養装置の開発が進められている。筆者らはこれまで再生組織の製造プロセス上で最もコストがかかる細胞培養処理を、ロボティクス技術で自動化した自動培養装置を開発し、装置で製造した再生組織の有効性を実証してきた。本稿では、現在の再生医療の課題から自動培養装置が果たす役割と、その将来について紹介する。

2. 再生医療用組織製造の現在と課題

現在、医療用途で移植可能な再生組織の製造プロセスは、細胞処理施設（CPC：Cell Processing Center）内の高度なクリーンルームの中で適正製造基準（GMP：Good Manufacturing Practice）の下、専門技術者の手作業でおこなわれている。細胞採取から移植まで、一般的な再生医療における一連の流れとその製造上の課題を図2に示した。再生組織の製造に使用される細胞は、病院などで医師が採取し、院内・院

図2 再生医療の課題

* 株式会社日立製作所 中央研究所 基礎研究部

外のCPC内へ運ばれる。ここで、細胞周辺の無菌性を厳密に管理しながら、細胞培養処理を手作業でおこない、再生組織を製造する。製造した再生組織は厳密な検査の上で品質保証し、病院に運ばれ、患者の病変部へ移植され治療がなされる。従来の医療用材料では、人体に対して親和性を有する素材のみ使用可能で、その拒絶反応や持続性に課題があったが、再生医療の場合は細胞そのものが医療用材料として使用可能なため、拒絶反応が少なく、細胞分裂による持続性を維持し、さらに機能的な組織に近い形で移植できるため、治療の効果が大きい。

しかし、再生組織の製造には課題があり、大規模施設内で手作業によりなされるため、生産性が低く、その品質の保持に専門技術者の高いスキルが必要である。そのため、人件費（技術教育費含む）、製造コスト（消耗品費含む）や施設運用費（固定費含む）がかさみ、再生組織の単価は高い。将来、安全な再生組織を産業界が安価で、大量かつ迅速に製造し、再生医療が一般的な医療として多くの患者を治療できるようになるには、専門技術者の確保や、製造コストの低減が重要な課題である。産業化の視点から、細胞の採取、培養から治療までの一連の再生組織の製造プロセスを支援し製造効率を向上させる技術開発が求められている^{5,6)}。そこで、製造プロセス内で最も重要な細胞培養処理の効率化を支援するため、さまざまな自動培養装置の研究開発が進んでいる⁷⁾。

3. 自動培養装置による再生医療モデル

再生医療では、対象となる再生組織で細胞培養処理が異なる。大別すると、角膜上皮や口腔粘膜などの少量かつ小型で製造が容易な自家移植組織（自らの細胞から製造し、自らに移植する組織）、心筋組織や皮膚組織などの大型で複雑構造を有し製造が難しい自家移植組織や大量生産可能な他家移植組織（他人の細胞から製造して移植する組織）の製造に関わる細胞培養処理である。対象とする再生組織で細胞培養処理が異なるため、その処理の自動化を目的とした自動培養装置は要求仕様や設置場所が異なる、

そのため、それぞれの自動培養装置による再生医療モデルが存在する。本稿では、自動培養装置による再生医療モデルにおいて、自動培養装置の設置場所の視点から、前述の分類で前者の装置を分散拠点型、後者を集中拠点型と定義し、以下に具体的な内容を示す。

1) 分散拠点型

角膜上皮や口腔粘膜などの少量かつ小型な自家移植組織は、その製造方法が簡潔でまた手術に大規模な設備を要さないため、全国の一般個人病院で製造、移植することが可能である。自動培養装置の設置対象場所を一般個人病院とすると、その病院内部で細胞採取から自動培養装置での再生組織製造、移植までの一連の流れが可能になる。そのため、自動培養装置は小型で少量生産可能とし、装置構成が簡潔で操作が容易なことが求められる。その再生組織を製造する一連の流れと自動培養装置の設置場所の例を図3に示した。自動培養装置による再生組織の製造拠点が分散するため、本再生医療モデル

図3 自動培養装置による再生医療モデル (分散拠点型)

- a. 一連の流れ
- b. 自動培養装置設置場所 (例)

を分散拠点型と定義する。

2) 集中拠点型

心筋組織や皮膚組織などの大型で複雑構造を有する自家移植組織や大量生産可能な他家移植組織は、その製造方法が複雑である点や製造コストを下げるために、設備の充実した細胞工場(CPC含む)内での製造が望まれる。この場合、病院もしくは細胞バンクから運ばれた細胞を細胞工場へ輸送して、その内部の自動培養装置で再生組織を製造し、輸送後に全国の病院で再生組織を移植するといった一連の流れが可能になる。そのため、自動培養装置は大型もしくは複数台で構成され、大量生産もしくは複雑な作業に対して効率的な培養操作が求められる。その再生組織を製造する一連の流れと自動培養装置の設置場所の例を図4に示した。再生組織の製造拠点到自動培養装置が集中するため、本再生医療モデルを集中拠点型と定義する。

図4 自動培養装置による再生医療モデル(集中拠点型)

a. 一連の流れ

b. 自動培養装置設置場所(例)

4. 自動培養装置の開発コンセプト

分散拠点型、集中拠点型の自動培養装置による再生医療モデルを実現するため、これまで筆者らが開発した自動培養装置のコンセプトについて説明する。本装置の全体的な開発コンセプトは図5に示した。本装置では、移植可能な細胞シートが作製可能なことを目的とし、角膜輪部から採取した細胞を対象として、角膜上皮細胞シートの作製を目指した。通常、角膜上皮細胞シートを作製する場合、培養容器としてセルカルチャーインサートを入れた6ウェルプレートを使用する。マイトマイシンで増殖を停止させた3T3細胞(マウス胎仔線維芽細胞)をフィーダー細胞として、セルカルチャーインサートの物質透過膜を介して角膜輪部細胞を共培養する。ここで使用する培養容器は、サイズが大きく、複数のパーツから構成され、さらに開放系のためにロボットでのハンドリングや培養後の輸送が困難である。

図5 自動培養装置の開発コンセプト

そこで、本自動培養装置では、角膜の自動培養に適した形状を有するカートリッジと呼ぶ培養容器を新たに作製し⁸⁾、これを使用して自動培養装置内で一連の培養処理をおこなう構成とした。カートリッジは図5の断面図に示す構造を有し、表1の特徴を有している。自動培養装置に、このカートリッジと角膜輪部細胞と3T3細胞を投入し、2週間の自動細胞培養処理により角膜上皮細胞シートを作製する。本装置でおこなう細胞培養処理は、細胞播種、培地交換、培養、観察で、自動培養装置内部で流体制御による細胞液・培地の注入・排出やマニピ

表1 カートリッジの特徴

- ①閉鎖系構造をもち、ロボットを使用して自動培地交換が可能で、搬送が容易
- ②セルカートリッジ単体での処理が可能で交叉汚染を防止
- ③2層培養構造で角膜上皮シートの培養と回収に最適化したコンパクトな形状
- ④多孔構造を有し、培養面に温度応答性高分子を塗布した物質透過膜
- ⑤細胞を外部から観察が可能
- ⑥ガス透過膜によりガス供給が可能

ュレーターでのカートリッジ搬送、培養室内の環境制御によりなされる。カートリッジを用いた自動細胞培養は手作業の排除を可能にするため、雑菌などによる細胞の汚染リスクをより低減できる。本コンセプトを実現するための自動培養装置は、分散拠点型の自動培養装置の実現を目的に少量生産でデスクトップサイズとした自家移植用小型自動培養装置、集中拠点型の自動培養装置の実現を目的に大量生産可能なため複数カートリッジ同時送液で効率化を図った他家移植用大量培養装置とした。

5. 開発した自動培養装置

前項で示した自動培養装置のコンセプトを基に、東京女子医科大学との共同研究で自家移植用小型自動培養装置^{9,10)}、他家移植用大量培養装置を開発した¹¹⁾。技術的なポイントとして自家移植用小型自動培養装置は移植用、予備用、検査用で最大3枚のカートリッジを単体ごとで細胞培養処理可能として、省スペース化構造とした。また、他家移植用大量培養装置は最大200枚のカートリッジを設置可能とし、9枚のカートリッジからなるカートリッジセット単位で同時処理することで効率化を図った。カートリッジと自家移植用小型自動培養装置の外観を図6に、カートリッジセットと他家移植用大量

培養装置の外観を図7に示した。自家用移植用小型自動培養装置、他家移植用大量培養装置、おのおので目的に応じた自動培養に成功した。自家移植用小型自動培養装置では、装置で製造したウサギ角膜上皮細胞シートが最大3層の重層化を果たし、移植可能なレベルの機能を有したことが実証できた。図8にその細胞シートの切片のヘマトキシリン・エオシン染色像を示した。また、他家移植用大量培養装置では複数カートリッジによる自動培養処理をおこない、3T3細胞の接着、増殖を確認できた。図9にその位相差顕微鏡画像を示した。以上より、再生医療モデルを基にしたコンセプトで開発した自動培養装置で細胞培養処理が可能であることを実証し、今後の見通しを示すことができた。

図6 自家用小型自動培養装置
a. セルカートリッジ
b. 装置外観

図7 他家用大量自動培養装置
a. セルカートリッジセット
b. 装置外観

図8 自家移植用小型自動培養装置で製造した細胞シート
(ヘマトキシリン・エオシン染色、切片像)

図9 他家移植用大量培養装置で培養した3T3細胞の位相差顕微鏡像

6. おわりに

現在の再生医療の課題を解決する手段として、その再生組織ごとの細胞培養工程から自動培養装置を大別し、設置場所からなる要求仕様を満たす自動培養装置をそれぞれ開発し、細胞培養の自動化の有効性を本稿で紹介させて頂いた。

再生医療は人体を構成する細胞そのものを使用することで、これまでに治療が困難であった病気に対して、今後、さらなる新しい治療方法を提供する可能性を秘めている。自動培養技術やその周辺技術を含めた再生組織製造技術が発展することで、これまでは厳格な法規制の下、限られた施設内で再生組織を製造して移植に利用していたが、国内外の場所を問わず低コストで均一の品質をもち、安全な培養組織を製造して利用することが可能になる。さらに、再生組織を製造する際に、専門作業者の教育が必要なくなるため、国内で開発した再生組織製造方法を自動培養装置で世界中に広めて、多くの患者へいち早く最先端医療の提供が可能になる。日本政府も自動培養装置について、設計ガイドライン策定¹²⁾や、大型のプロジェクト^{13, 14)}などでの支援に取り組んでおり、産官学の結びつきで再生組織製造技術の自動化を目指している。

将来的には自動培養装置を中心とし、充実した再生医療インフラのもとで多くの再生組織が

患者へ提供され、再生医療が一般的な医療として普及していくものと期待している。

謝 辞

本研究は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO技術開発機構）基盤技術研究促進事業「組織再生移植に向けたナノバイオインターフェイス技術の開発」の助成による成果の一部である。

文 献

- 1) Kwon, OH.; Kikuchi, A.; Yamato, M. et al. Rapid cell sheet detachment from poly (N-isopropylacrylamid) -grafted porous cell culture membranes. J Biomed Mater Res. 2000, Apr. Vol. 50, No. 1, p. 82-89.
- 2) Yamato, M.; Utsumi, M.; Kushida, A. et al. Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by reducing temperature. Tissue Eng. 2001, Aug, Vol. 7, No. 4, p. 473-780.
- 3) Nishida, K.; Yamato, M.; Hayashida, Y. et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. N Engl J Med. 2004, Sep. 16, Vol. 351, No. 12, p. 1,187-1,196.
- 4) 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.
- 5) Mason, C.; Hoare, M. Regenerative medicine bioprocessing: building a conceptual framework based on early studies. Tissue Eng. 2007, 3, p. 301-311.
 - 6) Archer, R.; Williams, D. J. Why tissue engineering needs process engineering. Nat. Biotechnol. 2005, 23, p. 1,353-1,355.
 - 7) Kino-oka, M.; Taya, M. Recent developments in processing systems for cell and tissue cultures toward therapeutic application. J Biosc Bioeng. 2009, Vol. 108, No. 4, p. 267-276.
 - 8) 水谷 学. BIO INDUSTRY, 2006, Vol. 23, No. 2, p. 14-19.
 - 9) 小林豊茂, 菅 和俊, 野崎貴之ほか. 組織工学のための自動培養装置の開発. 炎症再生. 2005, Vol. 25, No. 4, p. 318.
 - 10) 小林豊茂. 角膜上皮シート用自動培養装置. 細胞治療・再生医療のための培養システム. シーエムシー出版, 2010, p. 181-188.
 - 11) Kobayashi, T.; Kan, K.; Nozaki, T. et al. Development of automatic culturing systems for auto-grafting and allo-grafting using cell-cartridge. Tissue Eng. Regen. Med. 2009, Vol. 6, No. 12, S. 124
 - 12) 平成18年度文部科学省技術振興調整費. “再生医療本格化のための最先端技術融合拠点細胞シートティッシュエンジニアリングセンター”. <http://www.twmu.ac.jp/ABMES/CSSTEC/>
 - 13) 最先端研究開発支援プログラム (FIRST). “再生医療産業化に向けたシステムインテグレーション 臓器ファクトリーの創生”. <http://twins.twmu.ac.jp/first/index.html>
 - 14) 経済産業省. “再生医療分野 (ヒト細胞培養加工装置についての設計ガイドライン [改訂]) 開発ガイドライン 2009”. http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/service/iryoku_fukushi/downloadfiles/201002-9.pdf