軟骨再生医療のための GMP 対応自動回転培養システムの構築

GMP Grade Automatic Rotating Cell Culture System for Cartilage Regeneration

○植村寿公 (産総研)、大藪淑美 (産総研)、

岡田浩巳 (株ジェイテック)、津村尚史 (株ジェイテック)、

青木那知 (茨城工技センター)、植松弘之 (ツジ電子株)

Toshimasa UEMURA(AIST), Yoshimi OHYABU(AIST), Hiromi OKADA(JTEC CORP.),

Takashi TSUMURA (JTEC CORP.), Kunitomo AOKI(Ind. Tech Inst. Ibaraki),

Hiroyuki Uematsu(Tsujii Electronics CO Ltd.)

An RWV(rotating wall vessel) bioreactor is known as a useful tool for three dimensional culture. Our group reported the rapid regeneration of three dimensional large cartilaginous tissue from rabbit and human bone marrow cells using the bioreactor. This system is quite useful, however, the present system needs manual operation of controlling rotation speed changing with the mass increase of the growing tissue. The medium exchange procedure is quite complex. Thus we developed a GMP grade automatic RWV culture system including functions of automatic rotation control and medium exchange, consisting an RWV bioreactor, two illumination systems, a CCD camera, and an automatic medium exchange unit. The detailed results using the automatic system will be reported.

Key Words: RWV bioreactor, Automatic culture

1. 緒言

最近、われわれはRWV(rotating wall vessel)バイオリアクターを用いて、ウサギ骨髄細胞からの軟骨再生、移植、ヒト骨髄細胞を用いた軟骨再生実験を行い極めて良好な成績を得ることに成功し、臨床応用への可能性を示した(前講演参照)。RWV回転培養の有効性が高いにもかかわらず、操作性の複雑さが大きな障壁であり、実験室レベルでの培養、臨床で用いるケースを想定した場合も、培養システムの自動化が必須である。まず、回転速度の調整であるが、ベッセル内で成長する3次元組織は、細胞の増殖、マトリックスタンパク質の産生により時々刻々その重量が増加する。それにつらうように培養液の流れ、すなわち回転速度を調整する必要がある。通常回転速度をマニュアルで調整する必要がある、大きな人的労力が必要となる。臨床応用を想定した場合、ヒト臨床サンプルを扱う専用施設であるCPC(Cell Processing Center)を用いると、施設の維持費が大きく患者への負担が大きくなること、限られた施設でしか治療を受けることができないことが大きな問題である。そのため、CPCを使わないGMP基準を満たした培養システムを構築する必要がある。ヒトの手による細胞播種、培養液交換、組織採取を自動化できる装置をGMPレベルで現在開発している。

2. RWVバイオリアクターのための自動回転制御システム

RWVベッセルの回転制御は通常目視でベッセル内の組織を認識し、その位置により回転速度をマニュアルで調整している。この操作を自動化するために、RWVベッセル内の組織を、CCDカメラにより画像取り込みし、画像認識により位置情報を取り込み、回転数を増加、または減少させるフィードバックをかける。それにより、組織が沈降せず、ふわふわと浮いている状況を実現し、3次元組織構築が自動制御できるシステムを開発する必要がある。この解決策として2種類の照明系を用いたシステムを考案した。

Fig.1 Two Illumination System for Visualization of Tissue

一般に細胞培養液はピンク系の色がついており、培養液中の細胞組織は識別が極めて難しい。さらに、ベッセル上の培養液交換用コックや、細胞取り出し口を認識せず、細胞のみを明確に認識するために、青色(寒色系)の光をベッセルの背面から照らし、ベッセルの前方から白色光(暖色系)を照らす2照明系を考案した。CCDカメラで捕えたRGB画像はそのコントラストを制御することに

より、マスク像として組織のみを可視化できる。組織の位置は数値化し、その位置によって、回転速度のフィードバック制御を行う。本システムを用いてウサギ骨髄細胞から自動回転制御によって培養試験を行ったところ手培養と同様の結果を得ることができた。

3. 臨床応用のための GMP 対応自動回転培養システムの開発

RWVバイオリアクターを用いた臨床応用には、回転制御のほかいくつかのハードルがある。患者の経済的負担を考えると、CPCを使わずにクリーン環境での培養を可能にし、自動回転制御機構の他に、複雑な培養液交換の自動機構、品質管理などの機能を搭載したGMP対応自動回転培養システムの開発が必要であり現在開発中である(1号機、Fig. 2 外観写真参照)。

Fig.2 GMP grade Automatic Rotation Culture System

上部のヘパフィルターを通したエアが装置内を循環する機構になっており、内部には、中央にRWVベッセルを装着できるバイオリアクターを装備したCO₂インキュベータが設置され、その上下に2台の保冷库を装備し、下の保冷库には、新しい培養液の入ったシリンジが、上には古い培養液を回収するための空シリンジが保管されている。運転時には、自動回転制御システムを用いて回転培養を行う。培養液交換時には、回転を止め、インキュベータのドアを自動的に開き、ベッセルがインキュベータの外のクリーンな作業空間に出る仕組みが備わっている。作業空間にはロボアーム2機が装備され、2つの保冷库から、新しい培養液の入ったシリンジ、古い培養液を回収するためのシリンジをつかみ、ベッセルの上下からシリンジを差しこみ、ベッセル内の培養液の交換を行う。作業が終了すると、シリンジは取り外され、元の保冷库に回収され、ベッセルはインキュベータに戻り、再び回転培養を開始する。このような仕組みの元に自動培養を行うことができる。