

平成28年度

戦略的基盤技術高度化・連携支援事業

戦略的基盤技術高度化支援事業

「生体内環境近似三次元細胞培養装置の開発」

研究開発成果等報告書

平成29年5月

担当局 近畿経済産業局

補助事業者 一般財団法人大阪科学技術センター

目 次

第1章	研究開発の概要	1
1-1	研究開発の背景・研究目的及び目標	2
1-2	研究体制	3
1-3	成果概要	4
1-4	当該研究開発の連絡窓口	4
第2章	本論	5
2-1	生体内の細胞が血管から受けている培養環境を近似できる輸送ポンプの開発	6
2-2	培養環境を管理するセンサと連動して稼働する培養システムの開発	6
2-3	上記システムを最適化する多孔性培養基材の改良	8
最終章	全体総括	11
3-1	研究開発成果	12
3-2	事業展開	22
3-3	知的財産	23

第 1 章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

【研究開発の背景】

近年、細胞に関する基礎生物医学研究が飛躍的に進歩し、細胞が有する本来の機能を十分に発揮させるためには、細胞を取り巻く環境が非常に重要であることが多くの研究者から報告されている。一般に生体内の細胞は周りの細胞や細胞外基質と三次元的に相互作用しながら組織を形成して特有の機能を発現する。そのため、生体外でも生体内と同じような環境を構築し、生体内と同様の細胞間相互作用を実現する三次元組織体を形成する技術開発が盛んに行われている。

これまでに生体外で細胞を三次元化する技術としては、遠心操作による細胞凝集体の形成や培養液の液滴の中で細胞を凝集させるハンギングドロップ法、低接着性培養プレートの中で細胞を自己凝集させる方法などが開発されている。これらの細胞凝集塊は従来の二次元的な細胞に比べて生体内細胞に近い特性を示しているが、動物実験の細胞移植後の効果が期待外れであったり、創薬開発の毒性評価や薬理効果の試験で十分な結果が得られなかった等の報告も多い。これらの原因は生体外で培養された細胞の成熟度が不十分であるためとの指摘がある。生体内の細胞は互いに接着し、高密度に組織化しているだけでなく、様々な物理的刺激や化学的刺激が負荷され、成熟化している。

このような指摘に対して、細胞の成熟度を上げるために、より生体内に近い環境を模倣するために物理的な刺激や化学的な刺激を与えて細胞を培養する様々な方法が検討されている。例えば培養液を微圧で灌流させ、血管内皮細胞にずり応力やストレッチを与える研究や軟骨組織の再構築のために歩行時にかかる数 MPa の静水圧を負荷する研究や各種の **growth factor** を用いた培養条件の検討が行われている。

また、最近では培養環境の酸素濃度制御についての関心が高く、培養細胞の酸素濃度を生体内細胞の酸素濃度に近似させる研究が増えている。生体内細胞は大気中の酸素濃度（約 21%）に比べて明らかに低い 1~12% の酸素濃度環境（脳：0.5~7%、目：1~5%、肝臓・心臓・腎臓：4~12% 等）に存在し、生体外の培養細胞においても、低酸素環境では増殖が速く、長寿命で低ストレスを実現出来るとの報告がある。

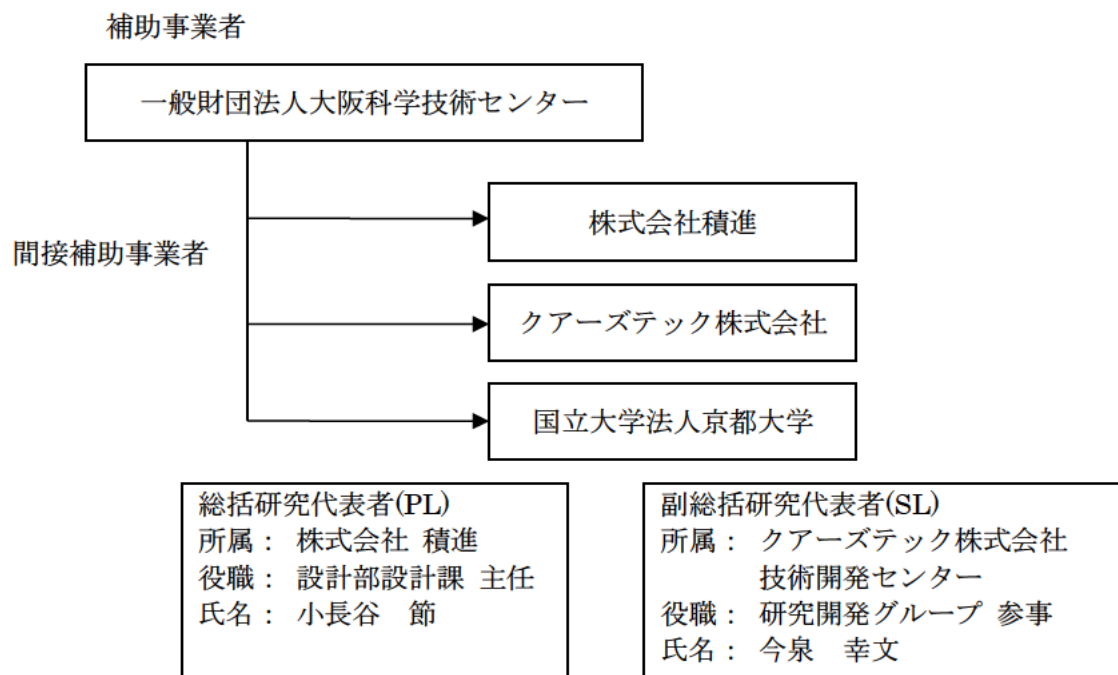
このように生体外で生体内環境を模倣する要求は数多く存在するが、研究者が手軽に再現性良く生体内近似環境で培養実験が出来る培養装置は開発されていない。複数の培養条件を制御し、物理的・化学的刺激を負荷でき、培養環境を生体内近似できる三次元細胞塊の培養装置は非常に有効で、多くの研究者に手軽な実験ツールとして提供したい。

【研究目的及び目標】

三次元化した細胞塊に対して、圧力、溶存酸素、流速、温度等の培養環境を制御し、培養条件が三次元細胞塊の特性に与える影響を検証できる研究者向け小型培養装置を開発する。

これまでの培養装置では十分な制御が行えなかった培養液の圧力を制御し溶存酸素を監視する装置を開発する。また溶存酸素について三次元細胞塊の近接位置で測定することにより酸素濃度を制御し、従来の培養装置では実現出来ていない生体内環境に近似した培養装置の開発を目指す。

1 - 2 研究体制



補助事業者

一般財団法人大阪科学技術センター	
氏名	所属・役職
小島 一哉	常務理事・技術振興部長
川口 満	技術振興部 副部長
森山 昌己	技術振興部 副部長
澤坂 洋	技術振興部 副長
米田 祥子	技術振興部

間接補助事業者

株式会社積進	
氏名	所属・役職
小長谷 節	設計部設計課 主任
糸井 隆顕	設計部設計課

クアーズテック株式会社	
氏名	所属・役職
今泉 幸文	技術開発センター研究開発グループ 参事
橋本 慎也	技術開発センター研究開発グループ

国立大学法人京都大学	
氏名	所属・役職
田畑 泰彦	ウイルス・再生医科学研究所 教授
山本 雅哉	ウイルス・再生医科学研究所 准教授

1－3 成果概要

(株式会社積進)

ヒトをはじめとする動物等の細胞培養において圧力、溶存酸素、流速等の培養環境を制御することができる研究者向け小型の三次元培養装置の開発に取り組み、細胞近傍の圧力・酸素濃度及び流速を制御できる三次元培養装置を開発した。クアーズテック製の培養基材と組み合わせ積進・クアーズテック・京都大学でヒト i P S 細胞や間葉系幹細胞等の培養を行いその効果を実証した。

(クアーズテック株式会社)

大型培養基材（φ 75mm 程度）の作製方法を改良し、培養基材の透水性と耐圧性を改善した。培養基材のシール性向上に関しては、最終的な目標値である高圧 5MPa 加圧時に培養モジュール内に培養基材を固定する O リングとその O リングと接する培養基材外周壁とのシール部から液漏れしない外周壁表面の表面粗さについて確認した。培養基材のウェル形状は客先の要望により U 字形状を優先したため、新規形状は増えていないが、培養基材の細孔径は上記大型培養基材の透水性および耐圧性の向上に伴い種類が増えた。また、積進が開発した培養装置に使用する培養基材（φ 35mm）を作製し、積進と京都大学に提供した。培養装置の評価としてはヒト i P S 細胞や間葉系幹細胞の培養を行い、培養時の細胞塊近傍の溶存酸素濃度を測定し、培養液中の酸素濃度を制御する方法についてアイデアを考案し、その効果を実証した。

1－4 当該研究開発の連絡窓口

〒550-0004 大阪市西区靱本町1丁目 8 番4号
一般財団法人大阪科学技術センター 技術振興部
担当者：川口
Email：m.kawaguchi@ostec.or.jp
T E L：06-6443-5322
F A X：06-6443-5319

第 2 章 本 論

2-1 生体内の細胞が血管から受けている培養環境を近似できる輸送ポンプの開発

i) 補助事業の具体的内容

細胞培養はできる限り生体内に近い環境で培養する必要があるため血圧(15～200mmHg)、血流を近似したものでなければならない。この圧力を制御する為に、シリンジのピストンをスムーズに移動させる機構、細胞に最適な圧力及び流量になるよう制御するためピストンを精密に駆動する機構の小型化及び、モジュール内に設置した圧力センサから得られた信号をもとにシリンジの移動速度と移動量を制御する機構

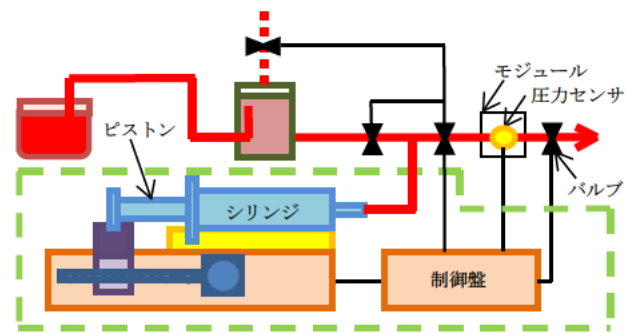


図 2-1-1 ポンプ (イメージ図)

の開発を行った。また血圧以上の圧力を必要とする細胞培養の可能性が有るため 200mmHg 以上のポンプ圧力の検証を行った。また本装置を使用して i P S 細胞 (201B7 株) の培養を行い、細胞凝集体の形成できる培養条件を確立した。

ii) 重点的に実施した事項

シリンジとピストンの抵抗が大きいとピストンのスティックスリップ現象が起こる可能性が有る。シリンジ外筒に対するピストンの直進性を確保し抵抗を減らすため、ピストンの駆動系にリニアプッシュを使用しシリンジ外筒に対しての直進性を確保すると共に摺動抵抗を極小化した。最少移動量を精密に制御できるようにすることで、培養液の吐出量を精密に制御ができるようになる。この吐出量を制御することにより、圧力の制御を行い血圧と同等の 15～200[mmHg]に制御できることを確認した。

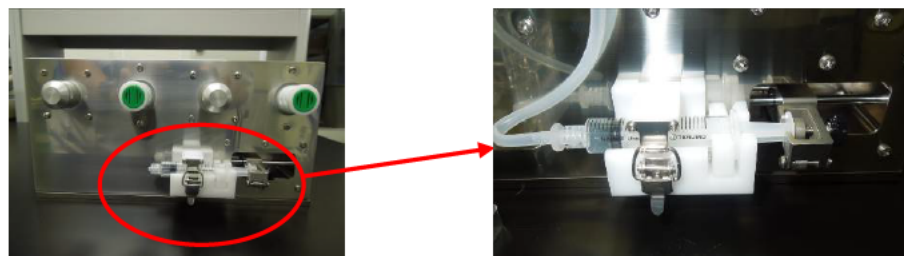


図 2-1-2 シリンジポンプ

研究者によって血圧以上の圧力で評価を行う可能性が有るため、750[mmHg]程度の高圧で圧力制御できるよう制御プログラムに改良を加え高圧域での圧力制御ができることを確認した。

2-2 培養環境を管理するセンサと連動して稼働する培養システムの開発

2-2-1 培養システムの開発 (積進)

i) 補助事業の具体的内容

当初計画では、制御基板を使用しチップにプログラムを書き込むことによりポンプ及びポンプ補助システムを制御する予定にしていたが、基板と同機能を持ったモーターコントローラドライバ等を使用しプログラムの開発の方が条件設定等の自由度が広がるので開発段階ではこちらを使用することとした。

ii) 重点的に実施した事項

圧力センサから取り込んだデータにはノイズを含んでいることが確認できた。センサケーブルへのノイズの混入を防ぐため配線ルートを変更すると共に、センサケーブルへのノイズを除去できる制御プログラムの開発を行い、ノイズによる精度悪化を防ぎ培養液の圧力を $15 \sim 200 \pm 1 \text{ mmHg}$ で制御できることを確認した。これまでに行った市場調査で、研究者が溶存酸素濃度を制御する装置に大変興味を持っていることが分かった。当初装置は溶存酸素を監視するもので制御をするものではなかったため、溶存酸素濃度(5%)を制御するための制御プログラムの開発を行った。



図 2-2-1

2-2-2 培養補助機器の開発（積進）

生体内環境近似三次元細胞培養装置

i) 補助事業の具体的内容

培養液を低温から 37° に上昇させる過程において気泡が生じることが有り、この気泡が培養室に到達すると培養に支障をきたす。この気泡を除去するための調整槽を開発することにより培養モジュールへの気泡の侵入を防ぐ。また培養液の経路に使用するチューブの選定を含め配管経路全体の設計を行い培養液が効率よく送液出来るようにする。

ii) 重点的に実施した事項

モジュールの締め付け方法により偏荷重が加わりクアーズテック製の担体を破損する可能性を否定できない。担体に偏荷重が加わらないモジュール構造、センサ等を設置することによる培養液の流れの変化やインキュベータ内での占有率（小型化）も考慮しながらモジュールの開発を行った。また送液チューブ内の気泡発生を抑制を重点的に行った。気泡発生を抑制する為チューブの評価を行い、滅菌可能（オートクレイブ）で培養液が確認できる透明なチューブの選定を行った。事業化に向けてモジュールの作業性向上の為、モジュール本体の小型化（占有率減少）センサ取付のワンタッチ化等を行った。



図 2-2-2 モジュール

2-2-3 培養システムの生理学的評価（京都大学）

i) 補助事業の具体的内容

細胞培養システムの生理学的評価を行う。

ii) 重点的に実施した事項

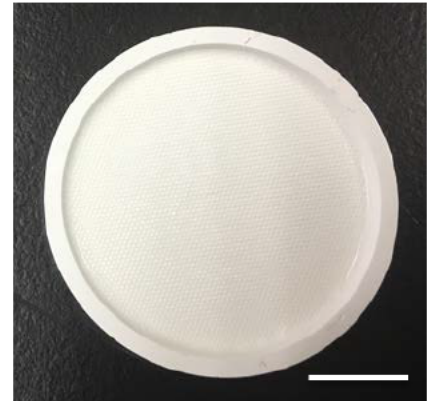
細胞培養実験を以下の手順により行った。

1) 灌流培養

設置した培養装置による細胞培養実験を試みた。培養装置に収容する三次元培養基材として、多孔質のアルミナ製培養基材を使用した（図 2-2-3）。この基材表面には 500 μm 径のくぼみがあり、このくぼみ内で細胞凝集体が形成される。

手順に従い、アルミナ製培養基材を設置し培養装置を組み立てた。組み立て後、培養装置下部に培養液（ α Minimum Essential Medium (α MEM)+10 %仔牛胎児血清+1 %ペニシリンストレプトマイシン溶液）を浸透させた。

培養装置設置後、1 ml の培養液中に懸濁した MC3T3E1（マウス頭蓋骨由来細胞株、 1×10^7 cells）を、培養装置上部から加えて細胞を播種した。播種後 1 日間、培養液を灌流しない状態で 5 日間培養を行った。その後、流速 5 ml/day の条件で灌流培養を行った。コントロールとして、灌流を行わない静置培養を行った。



Scale bar : 1cm

図 2-2-3 アルミナ製培養基材

2) 細胞凝集体の形態観察

培養装置で培養後、ピペッティングにより細胞凝集体を回収した。回収した細胞凝集体の形態はトリパンブルーで染色したのち、倒立型顕微鏡により観察した。

また細胞凝集体中の細胞生存を評価するため、Live/Dead assay を行った。得られた細胞凝集体に Live/Dead assay solution を添加したのち、蛍光顕微鏡により観察した。

2-3 上記システムを最適化する多孔性培養基材の改良

2-3-1 基材の大型化（クアーズテック株式会社）

i) 補助事業の具体的内容

培養基材の大型化は計画当初の目標は直径 70mm の円板形状であったが、顧客要望等もあり最終的に直径 75mm の円板形状となった。昨年度までに大型化の目標を達成した直径 75mm の培養基材には下記のサイズのマイクロウェルが大量に配列されている。

・直径 75mm の大型基材表面に成形されたマイクロウェルのサイズ

①ウェル直径：600 μm 、ウェル深さ：600 μm

②ウェル直径：300 μm 、ウェル深さ：300 μm

③ウェル直径：200 μm 、ウェル深さ：200 μm

*ウェルとは細胞を培養する窪み（培養空間）

*上記サイズは成形型のサイズ

大型培養基材（ ϕ 75mm）の透水性や耐圧性を改良するために、培養基材を構成するセラミックス（アルミナ）粒子の粒子径を変更した。粒子形状については多少の差はあるが、粒子直径の比から作製される多孔体の透水量は約 9 倍を想定した。いずれの粒子についても培養基材の作製方法は技術的ノウハウに関する事項が多数含まれるため記載を控える。また、作製した大型基材 ϕ 75mm と実験用 ϕ 35mm の培養基材を昨年同様に弊社所有の強度試験機を用いて圧縮強度試験を行い、耐圧性を確認した。

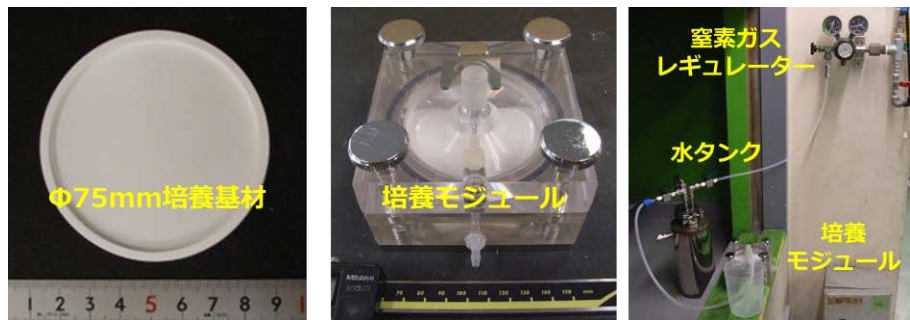


図 2-3-1 強度試験機の外観

ii) 重点的に実施した事項

培養基材の透水量を増加するために、これまで使用してきたアルミナ粒子から変更した結果、発生した製造上の問題点（成形体組成の変更、焼成条件の変更等）について改善を加えた。

また、 $\phi 75\text{mm}$ の大型培養基材の透水量を実測するためには培養モジュールにセットする必要がある、固定（シール）用の O リングが接触する培養基材外周壁の表面を H26 年度に購入した卓上研磨機で研磨し、O リング部からの液漏れを防止した。



$\phi 75\text{mm}$ 培養基材

培養モジュール

透水量の測定風景

図 2-3-2 透水量の測定

2-3-2 基材のシール性向上（クアーズテック株式会社）

i) 補助事業の具体的内容

昨年度までは負荷する圧力が血圧の範囲内である 200mmHg であったため、培養基材と O リング部の液漏れ（リーク性）確認は実際に使用する多孔質の培養基材で実施した。今年度は高圧 5MPa における液漏れを確認するため、下図に示す緻密質のドーナツ状アルミナ円板を高圧容器に収納し、手動ポンプで水压を負荷する方法で実験を行った（実際に使用する多孔質の培養基材に 5MPa の圧力を負荷した場合、確実に培養基材の細孔を通して液が流出するため、緻密質アルミナを用いた）。

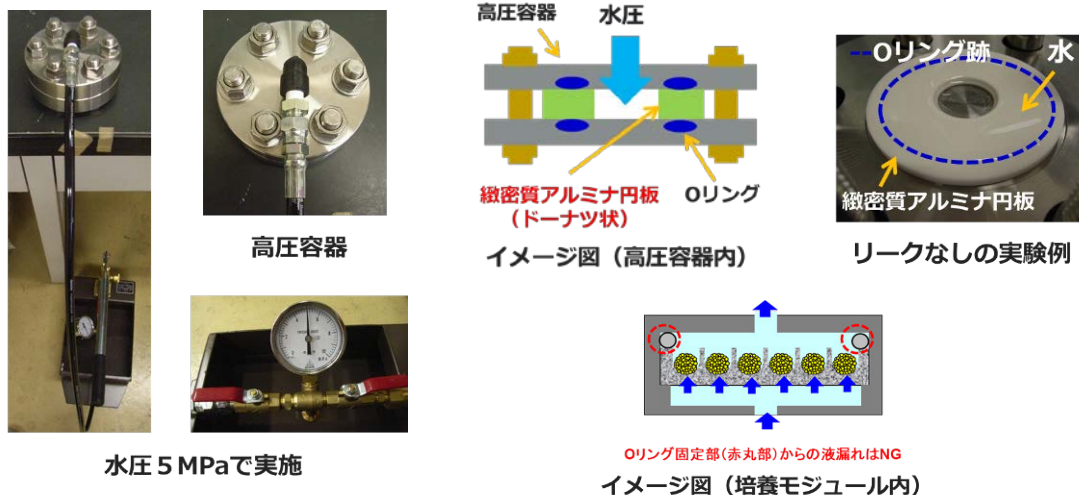
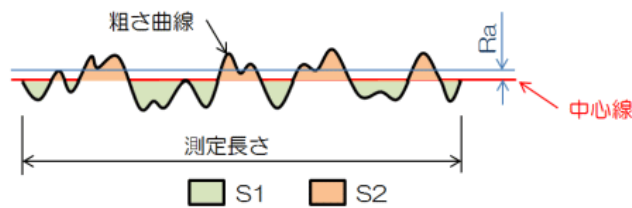


図 2-3-3 水圧リーク試験とイメージ図

ii) 重点的に実施した事項

昨年度までと同様に卓上研磨機を使用し、緻密質アルミナ円板（ドーナツ状）の表面を研磨し、その表面粗さをレーザー顕微鏡で測定した。なお、表面粗さは昨年同様 Ra で検討した。Ra（算術平均粗さ）は山の凹凸を平均にならした値（中心線から上の山の部分の面積の和 S1 と中心線から下の谷の部分の面積の和 S2 は等しくなる）。



表面粗さ(Ra)の定義

(引用先：<http://d-engineer.com/seizu/arasa.html>)

表面粗さ測定機（レーザー顕微鏡）



図 2-3-4 表面粗さ

2-3-3 ウェル形状の多様化（クアーズテック株式会社）

i) 補助事業の具体的内容

本事業期間内（3年間）で可能な限りユーザーの要望を調査したが、市販のマイクロウェル形状も U 字形が定着してきたためか、特に新しい形状やパターンの要望は無かった。

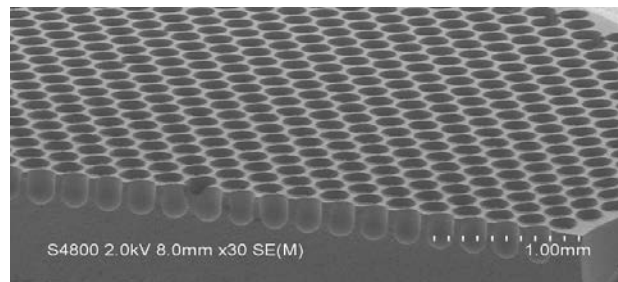


図 2-3-5 U 字形のマイクロウェル（SEM 像）

2-3-4 細孔径、気孔率の改良（クアーズテック株式会社）

i) 補助事業の具体的内容

培養基材の透水量を上げる必要がある場合に備えて、低圧損型の培養基材を開発した。具体的には培養基材を構成するセラミックス（アルミナ）粒子径を変更することで対応した。

ii) 重点的に実施した事項

培養基材を構成するセラミックス（アルミナ）粒子の変更により、iPS 細胞の培養に影響があるか調査した。

また、本培養基材を使用して低酸素状態を維持するための方法を考案し、実際に培養中の酸素濃度を測定し、酸素濃度の制御の可能性について検討した。

最終章 全体総括

3-1 研究開発成果

ポンプの開発

シリンジポンプ及びポンプ補助システムを連動させ、血圧と同等の 15~200mmHg の圧力を制御することができた。また、15~200、100~200mmHg のサイン波連続運転においても想定した圧力の上限下限を往復しており、問題なく制御できている。また、培養液の流量についても 0~10ml/min のコントロールが可能となっている。これらのことにより細胞近傍で所定の圧力付加及び計測ができるようになり、圧力による細胞への影響を監視することが可能になった。

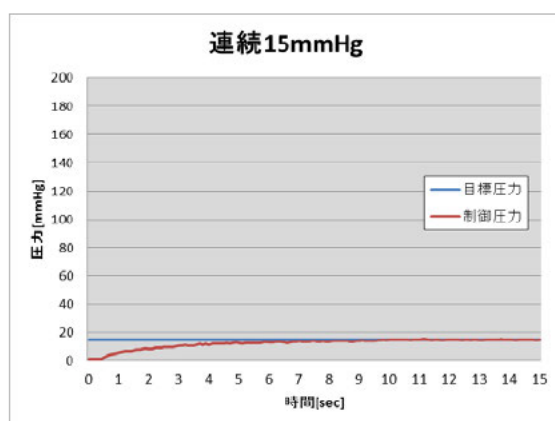


図 3-1-1 連続圧力付加 15mmHg

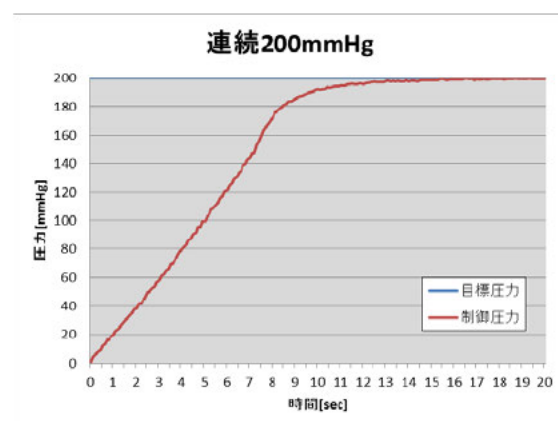


図 3-1-2 連続圧力付加 200mmHg

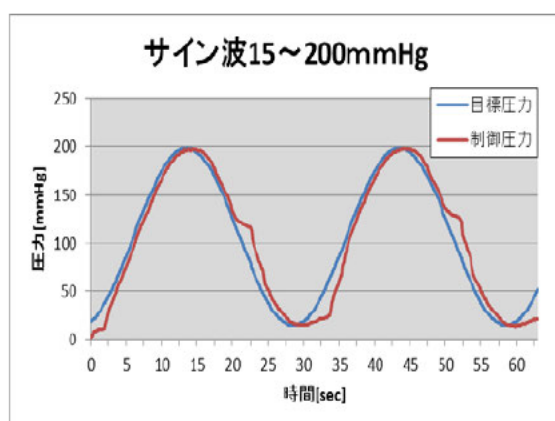


図 3-1-3 サイン波圧力付加 15~200mmHg

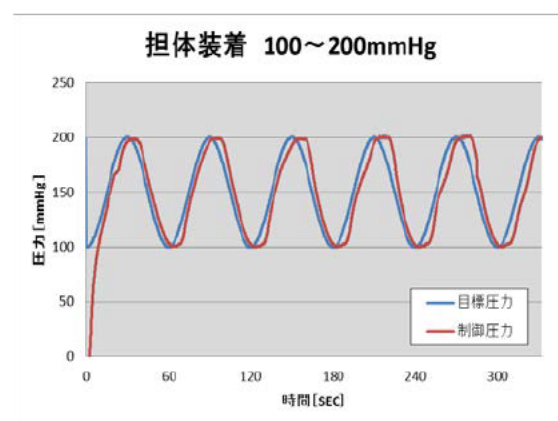


図 3-1-4 担体装着圧力付加 100~200mmHg

血圧より高い圧力に対応できるように、制御プログラムを変更し 700mmHg の圧力まで加圧できるようにした。通常は 200mmHg の血圧範囲内で培養を行うことが考えられるが 700mmHg の高圧をかけることによる細胞評価を行うことが出来るようになり、細胞培養の評価範囲が広がる。

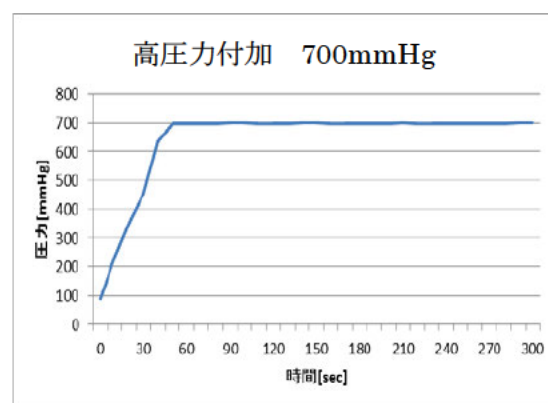


図 3-1-5 高圧力付加 700mmHg

培養システムの開発（積進）

シリンジポンプ及びポンプ補助システムを連動させる培養システムの制御プログラムを開発し、血圧と同等の $15 \sim 200 \pm 1 \text{ mmHg}$ の圧力を制御することができた。圧力センサから送られてきた信号をもとにポンプ等を制御し圧力精度を $\pm 1 \text{ mmHg}$ で圧力のコントロールを行える制御プログラムを開発した。

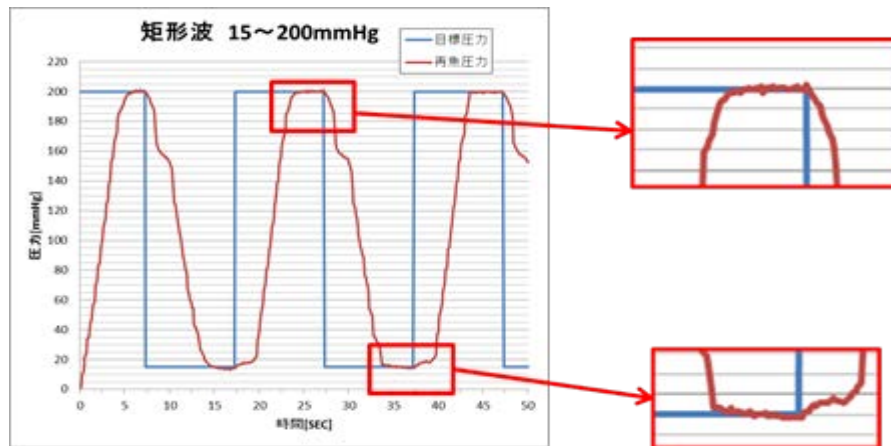


図 3-1-6 ポンプ圧力精度

溶存酸素濃度を制御する為の制御プログラムの開発を行った。担体上部の培地だまりの酸素濃度は細胞の酸素消費により、担体に近づくにつれ低酸素状態になることが実験により確認できた。モジュールの上部培地だまりを攪拌することで酸素濃度が制御できることを確認した。

モジュール内で i P S 細胞 (201B7 株) を 2 日間培地を灌流させない静地培養を行った後、装置を始動させ酸素制御を行った結果、酸素濃度 5% で制御できることを確認した。酸素濃度を制御できることで体内環境に近似した評価が可能になる。

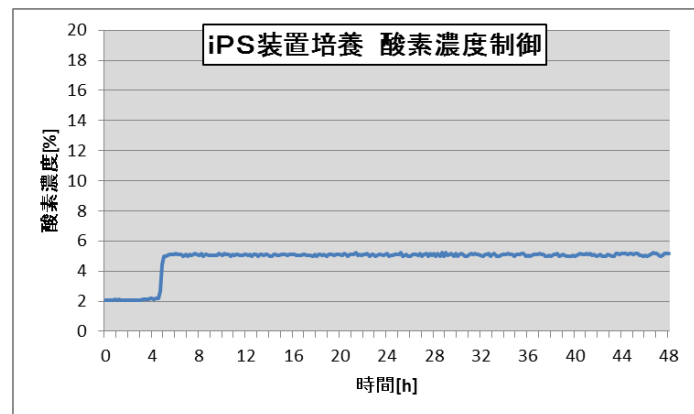
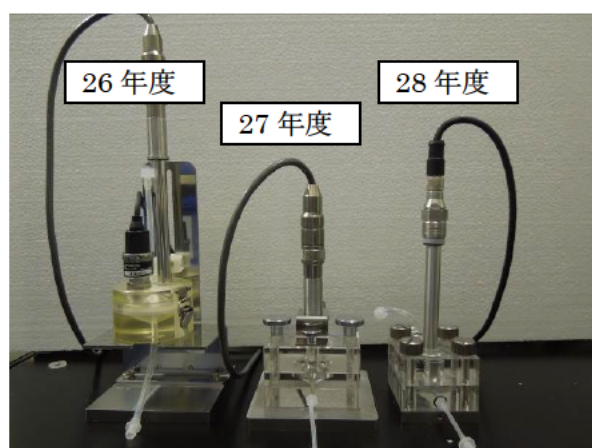


図 3-1-7 溶存酸素濃度制御

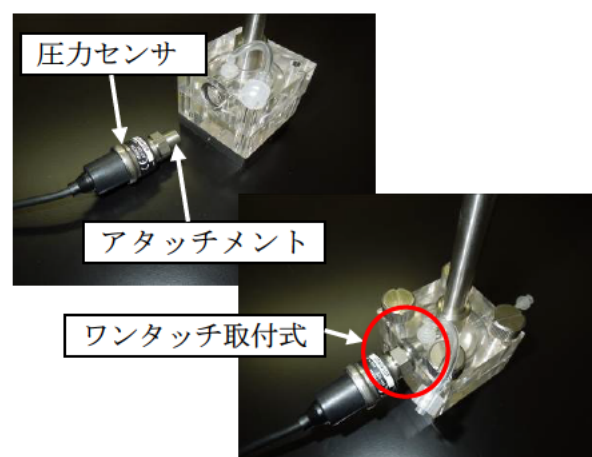
培養補助機器の開発（積進）

当初試作したモジュールはOリングを締め込むためのメネジをモジュール本体の樹脂部分に配置していた。この為オートクレイブ滅菌、水分乾燥用恒温槽、インキュベータ等温度変化が多くある工程で使用していると、ネジ部分に割れが生じることが分かった。このことからOリングを締め込むためのネジをモジュール本体の下部分に配置した金属製の部品に配置することにより、モジュールに割れが発生しない構造へ改良した。

また、溶存酸素センサの高精度化に伴いセンサ全長が 16cm から 21cm と約 30%長くなったが、培養液の流路の変更、培地だまりの形状変更等によりモジュールを含めた全高は 21cm から 24cm と約 14%に抑え作業性の向上を行うと共に、モジュール外形を 100×100mm から 60×60mm と面積比で約 60%小型化しインキュベータ内での占有率を抑えた。作業性が悪いため作業中にモジュール内へのコンタミ侵入が懸念されていたネジ込み固定式の圧力センサを、ネジ部分に装着するアタッチメントを開発しワンタッチ取付式に改良しコンタミ侵入の可能性を低減させた。



新旧モジュール



ワンタッチ取付式圧力センサ

図 3-1-8 モジュール

当初培地を供給する経路に、細胞培養では不可欠なオートクレイブ滅菌ができ、チューブ内の培地が確認できるよう半透明なシリコンチューブを使用していた。シリコンチューブはその特性上非常にガス透過性が良く大気中の酸素、窒素等をチューブ内に取り込むことから経路途中に気泡が多く発生する。この気泡がモジュール内に入ることによって担体下部に気泡が溜り培地供給の妨げになっていた。この気泡を抑制する為、チューブの評価を行い細胞培養装置に使用できるタイゴンチューブを選定した。

		シリコン	タイゴン	Cフレックス	ファーマッド
※1 気体透過性	CO2	20,100	360	---	1,200
	O2	7,950	80	150	200
	N2	2,750	40	---	80
滅菌		オートクレイブ EOG	オートクレイブ EOG	オートクレイブ EOG	オートクレイブ EOG
色		半透明	透明 ※2	白色	ベージュ
気泡の発生		有り	無し	無し	無し

※1 気体透過性 $\left(\frac{\text{CC} \times \text{cm} \times 10^{-10}}{\text{cm}^2 \times \text{sec} \cdot \text{cmHg}} \right)$

※2 タイゴンチューブはオートクレイブ滅菌を行うと白色に変色するが、恒温槽で60℃、2時間乾燥すると透明になる。



図 3-1-9 タイゴンチューブ

<細胞培養>

ヒト i P S 細胞 (201B7) を用いた装置培養の培養条件を確立した。

①モジュール等の経路組立

オートクレイブ等の滅菌を行ったモジュール、チューブ、シリンジ等を手順に従い組立を行う。

②担体へ培養液浸透

モジュールにセットした担体に培養液 (StemFit+1%ペニシリンストレプトマイシン溶液) を培養液供給口から注入し浸透させる。

③細胞懸濁液注入

Rock 阻害剤 (Y27632 : $10 \mu\text{M}$) を添加した 2ml の培養液中に懸濁したヒト i P S 細胞 (201B7 : $5 \times 10^6 \text{cell}$) をモジュール上部開口部より担体に播種する。

④静置培養

37℃ 5%CO₂ のインキュベータで 22~26 時間静置培養する。

⑤培養液交換

22~26 時間後 Y27632 の入っていない培養液に硬軟する。培地交換が早すぎると、培地交換後の生存率が低下し、培地交換が遅すぎると i P S 細胞の形態が変化する傾向になる。

⑥静置培養

培地交換後再び 37℃ 5%CO₂ のインキュベータで 20 時間静置培養する。静置培養の時間が短すぎると、細胞凝集体が形成されない傾向になる。

⑦灌流培養

20 時間の静置培養後、装置を始動させ流速 5ml/day の灌流培養を 2~5 日間行う事により、細胞凝集体が形成される。また、酸素制御機能を使用することで担体上部の培養液を 5~10%の溶存酸素濃度で制御しながら灌流・酸素制御培養を行うことが出来る。上記の培養条件で培養後、細胞凝集体をパラホルムアルデヒドで固定し、オスミウムで染色したものを実態顕微鏡で観察した。図 3-1-11 に培養 4 日後に得られた担体及び細胞凝集体の顕微鏡画像を示す。静地培養と比較して灌流装置培養 (酸素制御無 酸素 5%制御) も担体全面に細胞凝集体が形成されていることが確認できる。細胞凝集体のサイズは直径約 200 μm 程度の球状のものが多くほぼ均一な凝集体が形成されていることが確認できた。

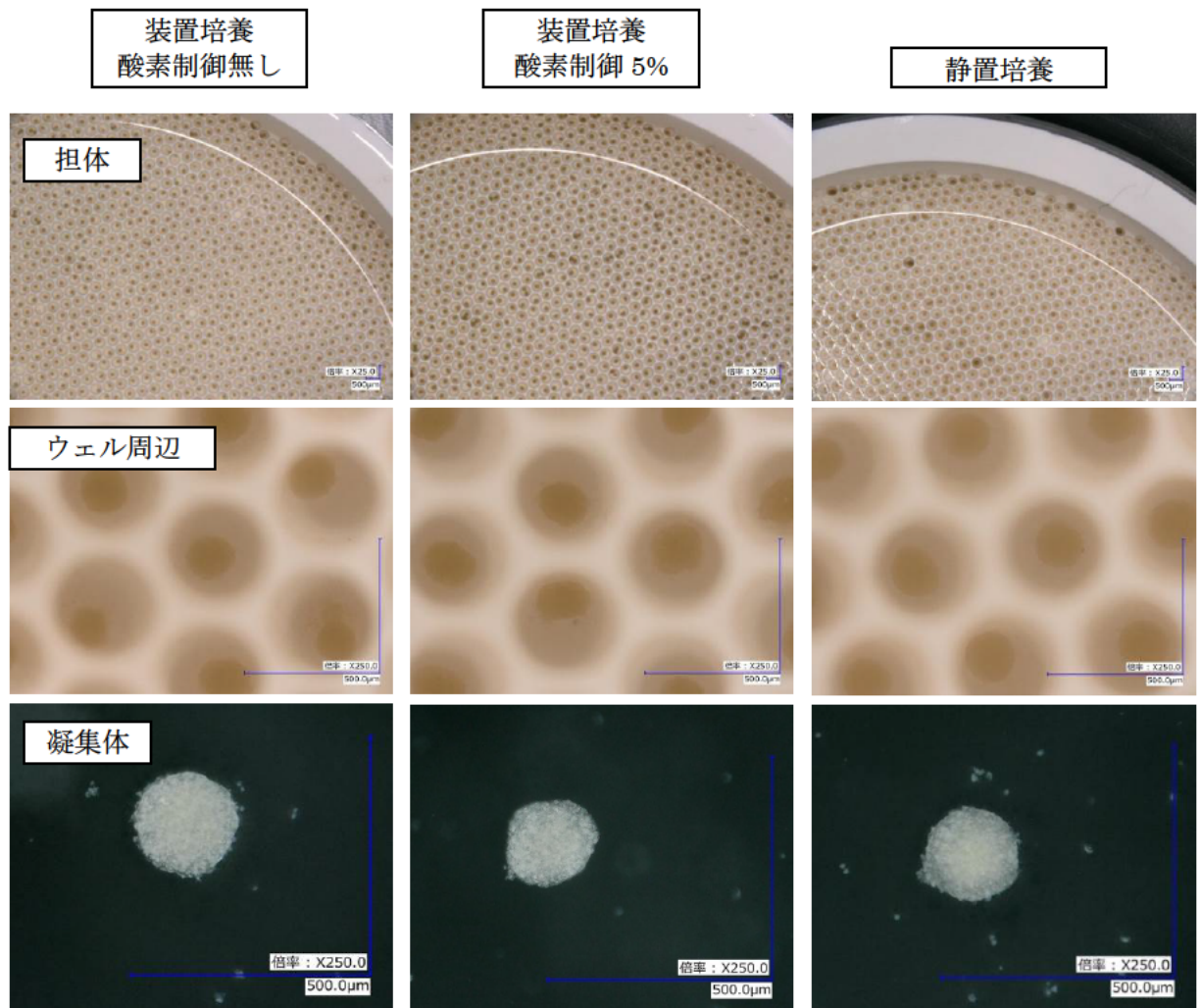


図 3-1-10 装置培養の培養結果（ヒト i P S 細胞の酸素制御の影響）

図 3-1-11 に培養 4 日後に得られた細胞凝集体の未分化検出用マーカー（rBC2LCN）で染色後の顕微鏡画像を示す。2 次元培養にて細胞が未分化であることを確認した後、培養装置で培養を行い形成された細胞凝集体の未分化確認を行った結果、未分化であることが確認できた。本装置で培養することで未分化維持をしながら細胞凝集体を形成できることが確認できた。

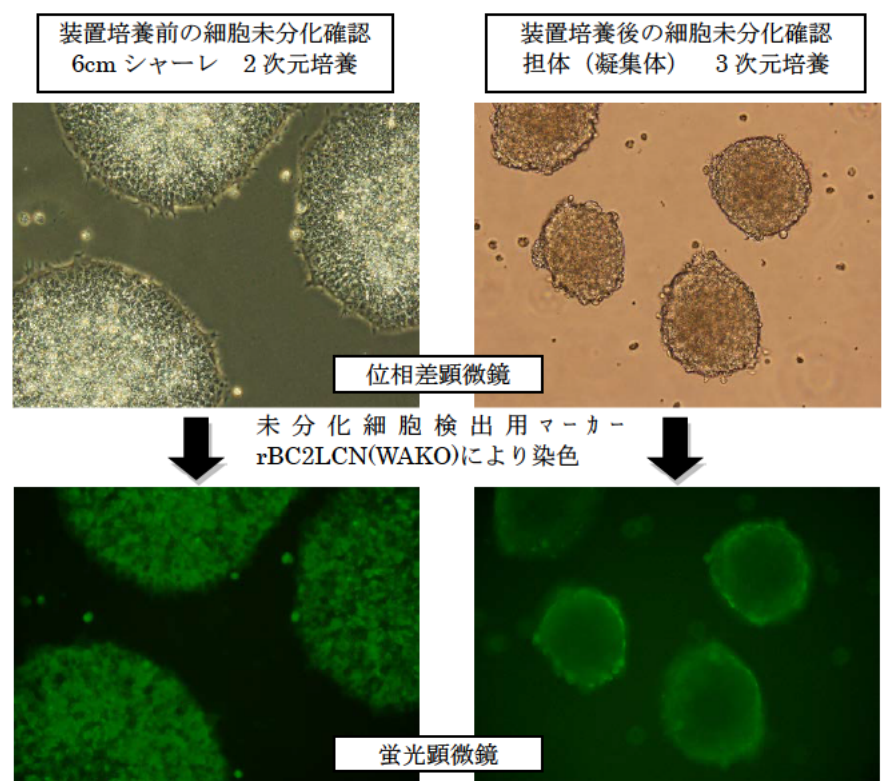


図 3-1-11 未分化維持

培養システムの生理学的評価（京都大学）

図 3-1-12 に培養 5 日後に得られた細胞凝集体のトリパンプルー染色後の顕微鏡画像を示す。静置培養条件と比較して、灌流培養を行うことで細胞凝集体はほぼ球形のものが得られることがわかった。細胞凝集体サイズは灌流培養条件では直径約 200 μm 程度の球形の凝集体が多く、静置培養条件ではサイズ、形に大きなばらつきがあった。拡大画像から灌流培養を行った細胞ではトリパンプルーで染まらず、生存している細胞が確認されたが、静置培養を行った細胞はトリパンプルーで染まり、死んでいることがわかった。

図 3-1-13 に培養 5 日後に得られた細胞凝集体の Live/Dead assay 後の顕微鏡画像を示す。静置培養を行った細胞はアッセイの途中で凝集体がくずれてしまった。さらに細胞が死んでいることがわかった。一方で、灌流培養を行った細胞もアッセイの途中でややくずれてしまい、直径約 100 μm になっていたが、生存している細胞が見られた。

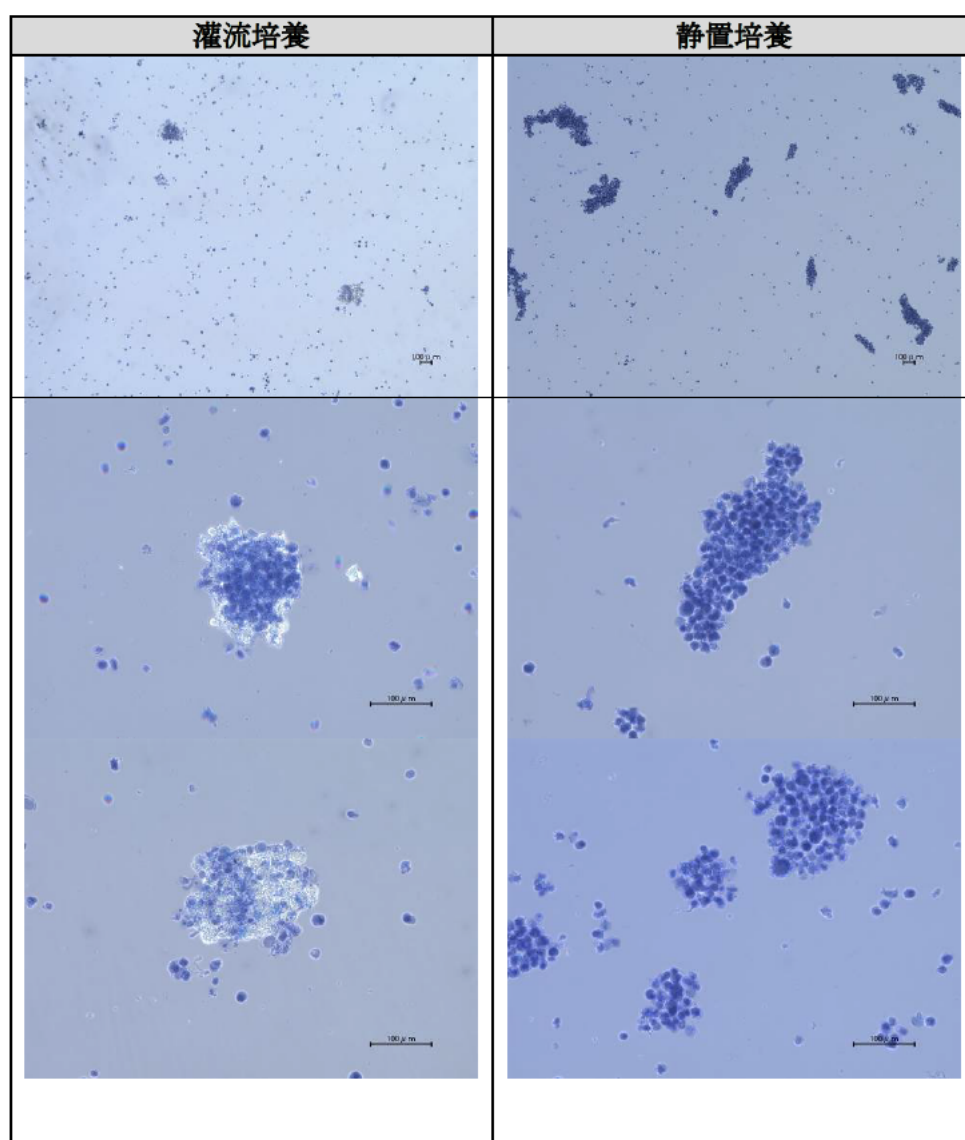
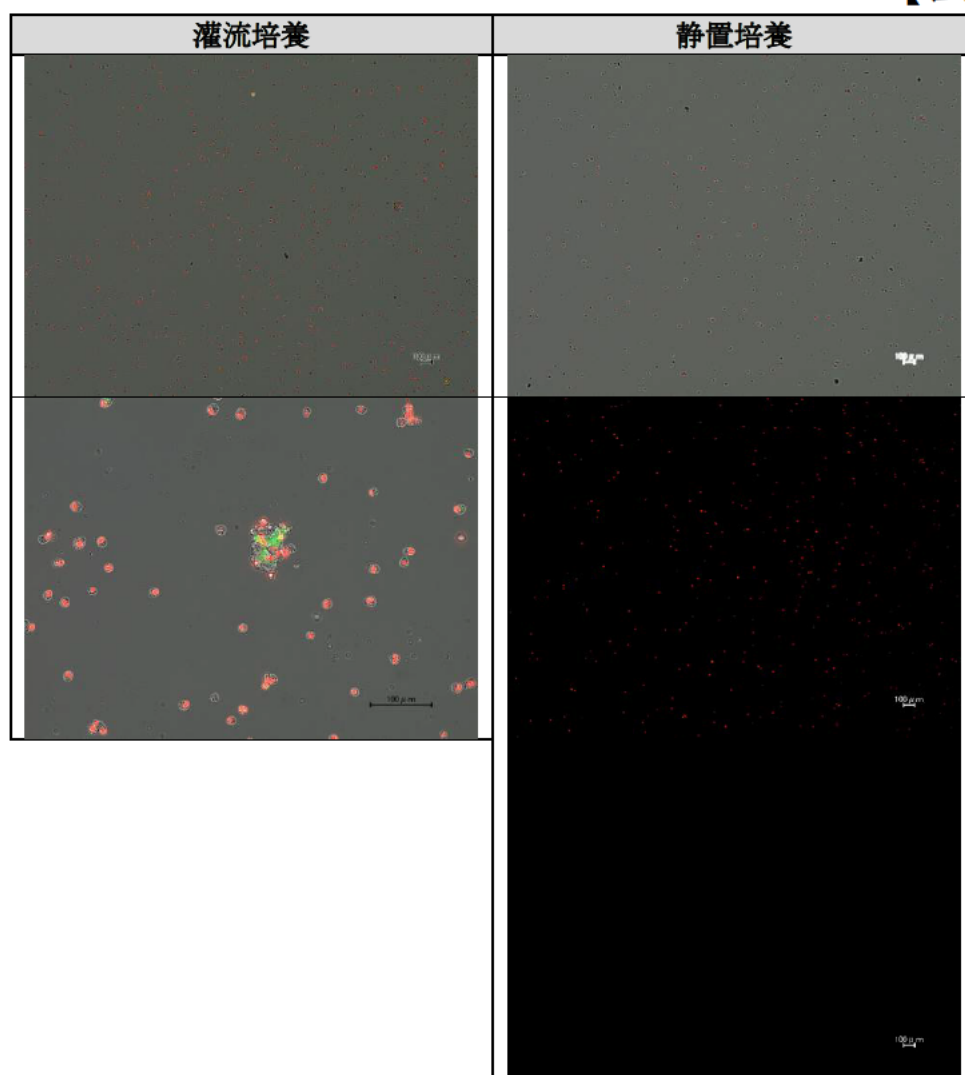


図 3-1-12 培養 5 日後の細胞凝集体像(トリパンプルー染色)

Scale bar : 100 μm



緑: 生細胞、赤: 死細胞

Scale bar : 100 μm

図 3-1-13 培養 5 日後の細胞凝集体 (Live/Dead assay)

アルミナ基材を設置した灌流型の細胞凝集体培養用培養装置により、細胞凝集体の作製と培養を行った。この培養装置により細胞凝集体を灌流培養することで、静置培養状態よりも均一に球形な細胞凝集の作製が可能であった。また細胞の生存についても向上する傾向にあることがわかった。

基材の大型化（クアーズテック株式会社）

作製した $\phi 75\text{mm}$ の培養基材を培養モジュールにセットし、窒素ガスで加圧した SUS 容器から水を圧送し、各圧力における透水量を実測した（二次側圧力は大気開放とした）。従来のアルミナ粒子で作製した $\phi 75\text{mm}$ の培養基材と変更したものを比較すると、透水量は想定していた値（9 倍）と一致した。

また、 $\phi 75\text{mm}$ 培養基材の中心部 20 点と上下左右の端部（各 20 点 $\times$ 4）80 点について測定したマイクロウェル直径の分布を下図に示す。また、従来の粒子径のアルミナ原料で作製した培養基材で測定したマイクロウェル分布と比較した表を示す。原料の違いによるマイクロウェルサイズは多少の差があったが、平均値でも $10\mu\text{m}$ 程度（細胞約 1 個分）であったため、問題ないと判断した。

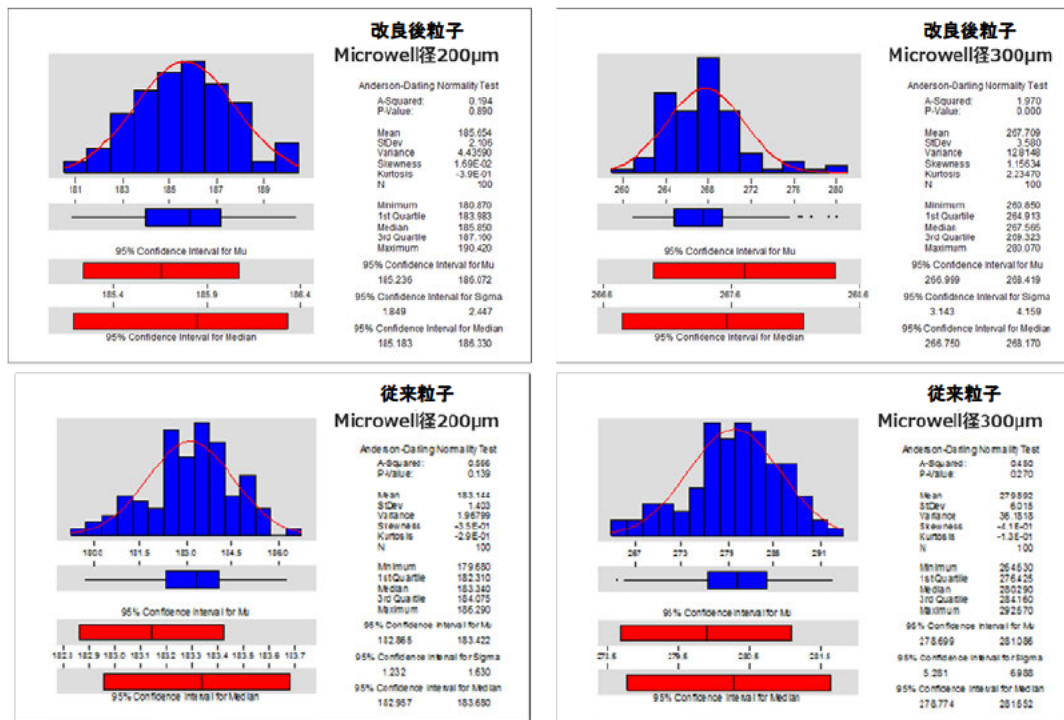


図 3-1-14 マイクロウェル直径の測定値

作製したφ35mmとφ75mmの培養基材で圧縮強度試験を行った。培養基材が圧力を受ける外周壁の面積はφ35mmが約2.1cm²でφ75mmが約7cm²であるため、目標値の5MPaはφ35mmで約1050N、φ75mmで約3500Nとなる。下図に示すようにφ35mm、φ75mmとも目標の試験力でも破損せず、目標値5MPaの耐圧性（圧縮強度）を達成した。

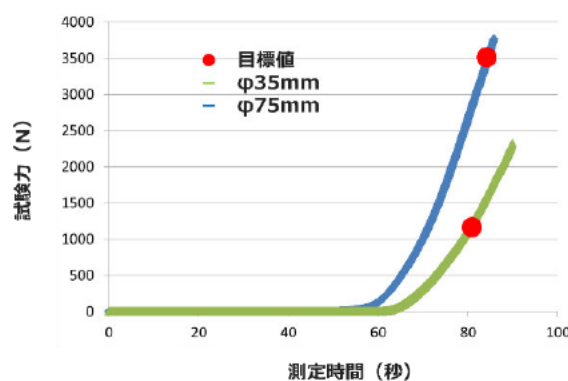


図 3-1-15 培養基材の圧縮試験結果

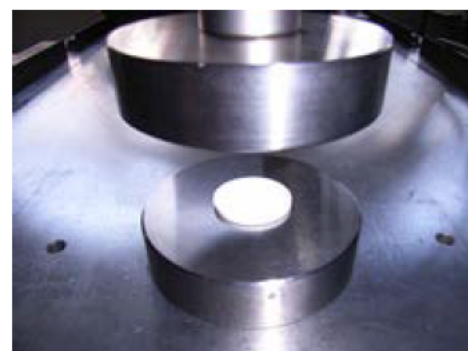


図 3-1-16 圧縮試験の風景(培養基材φ35mm)

基材のシール性向上 (クアーズテック株式会社)

平成26年度に導入した卓上研磨機と弊社所有のディスク盤を用いて右図に示す緻密質アルミナ円板（ドーナツ状）の表面加工（両面）を行った。表面粗さが一定の値以下であれば、5MPaの水圧を負荷しても培養モジュールのOリング部からリークしない結果となった。（数値は技術的ノウハウに関する事項のため記載を控える）



図 3-1-17 緻密質アルミナ

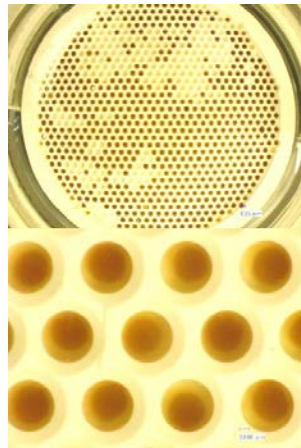
ウェル形状の多様化 (クアーズテック株式会社)

ウェル形状を多様化するため、ユーザーの要望を調査したが、ウェル形状はU字形状の要望

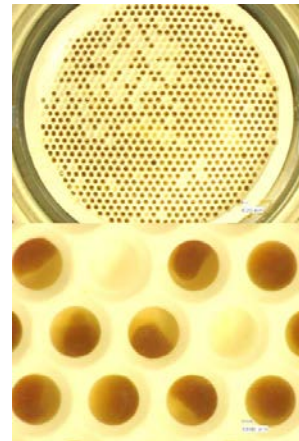
が多く、他形状の要望は無かった。そのため、従来の U 形状品の開発を推進した。

細孔径、気孔率の改良（クアーズテック株式会社）

培養基材を構成するセラミックス（アルミナ）粒子径を変えて作製した多孔質基材にヒト iPS 細胞（253G1）を播種し、5 日間培養後、一部をピペッティング（酵素等是不使用でピペッティングは 1 回）により回収した培養基材を酸化オスミウムで固定した結果を下図に示す。従来粒子と改良粒子で作製した培養基材の結果は細胞塊の回収し易さも含めて、ほとんど同じであった。（現在引続き精査中）。



従来粒子で作成の基材



改良粒子で作成の基材

図 3-1-18 ヒト iPS 細胞（253G1）の培養結果（培養 5 日目：酸化オスミウム処理後）

次に細胞培養中の細胞塊近傍の溶存酸素濃度の測定方法について検討した。溶存酸素の測定風景とイメージ図を下図に示す。実際に細胞塊近傍の溶存酸素濃度を測定した結果、インキュベーター表示の酸素濃度とはかなり異なる濃度であることが分かった。細胞の種類（iPS 細胞や間葉系幹細胞）や細胞の状態によって酸素の消費量は異なるが、下図に示すように細胞塊近傍の酸素濃度は 1~2% 近くまで酸素濃度が低下する状態が幾度も確認された。数時間静置培養を続けて数%程度にまで低下した酸素濃度は培養容器を手動で揺動し、気液界面付近の酸素濃度の高い培養液を撹拌することで上昇した。この結果を基に培養容器の気液界面付近の培養液をペリスタポンプで撹拌した場合の溶存酸素濃度の変化を確認した結果、下図に示すように数%まで低下した細胞塊近傍の酸素濃度がペリスタポンプの培養液循環により上昇することが確認出来た。

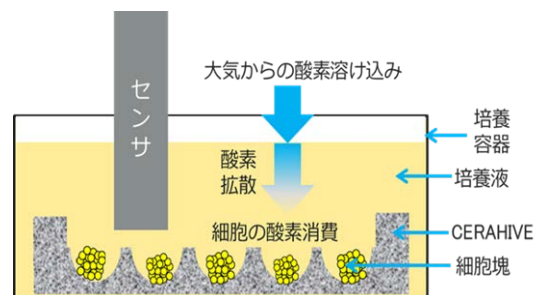


図 3-1-19 溶存酸素の測定風景とイメージ図

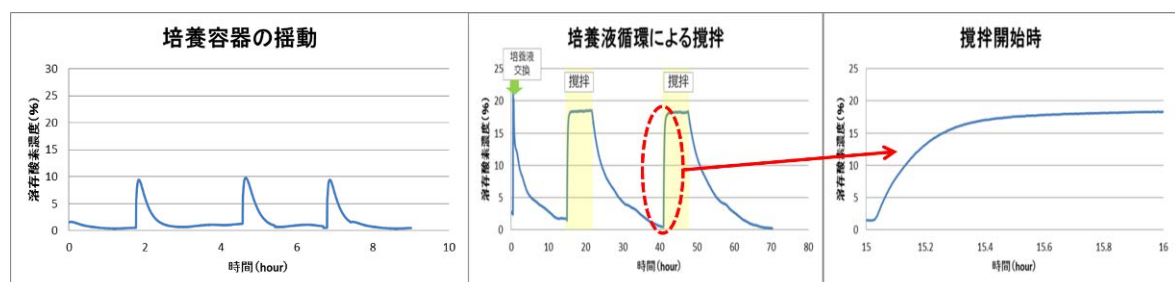


図 3-1-20 ペリスタポンプで培養液循環を行った際の細胞塊近傍の酸素濃度

また、ペリスタポンプの稼働をセンサーと連動させることで、ある程度精密な制御が可能であることが分かった（酸素濃度が 9.5%を下回ったら手動でペリスタポンプを ON にし、10.5%を上回ったら手動で OFF にする操作を繰り返し、溶存酸素濃度 10%±2%を達成した）。

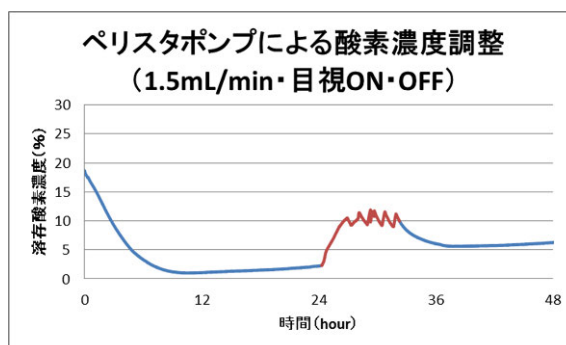


図 3-1-21 酸素センサーとペリスタポンプを連動させた結果

上記の実験結果を基に梯積進殿の培養装置が改良され、プログラムによりペリスタポンプが駆動し、細胞塊近傍の酸素濃度が制御出来るシステムが完成した。下図に示すように溶存酸素濃度は酸素濃度 10%においても 5%においても±0.5%に制御出来た。また、酸素濃度を段階的（5%→10%→15%）に制御することも可能であった。

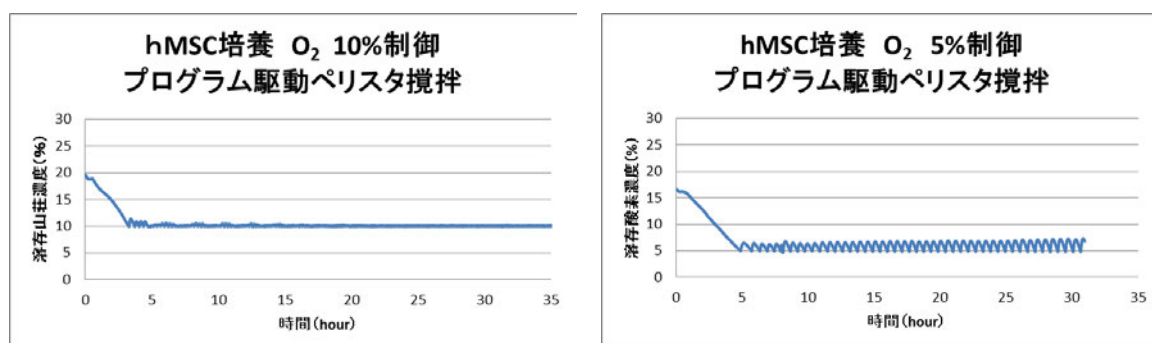


図 3-1-22 ヒト間葉系幹細胞の細胞塊近傍の酸素濃度制御結果

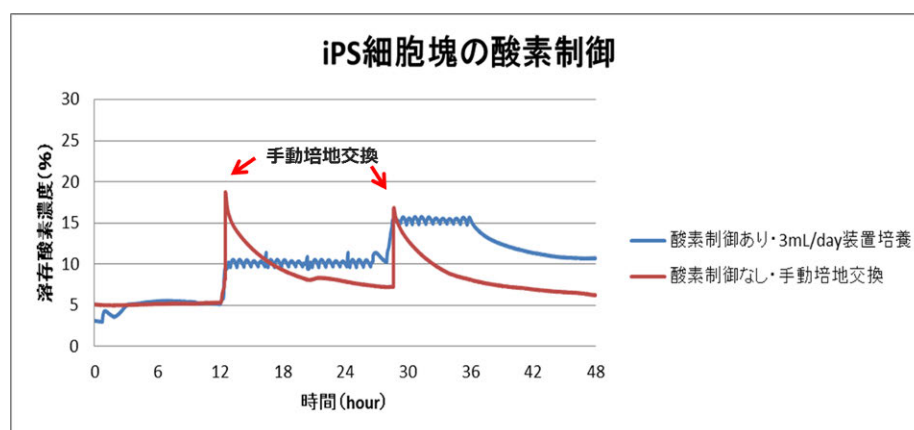


図 3-1-23 ヒト iPS 細胞の細胞塊近傍の酸素濃度制御結果

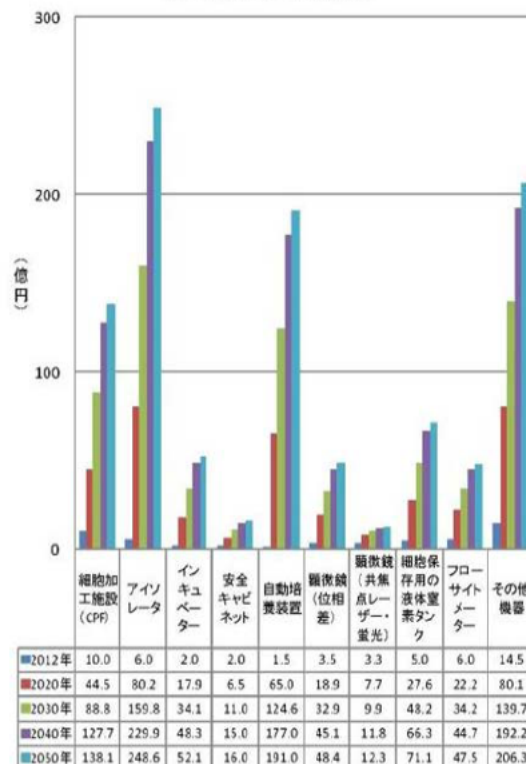
3-2 事業展開

3-2-1 想定している具体的なユーザー、マーケット及び市場規模等に対する効果

2016年3月の日本再生医療学会の発表内容から、再生医療に関しては三次元細胞培養が必須になりつつあり、この流れは当然創薬開発企業にも受け継がれるはずである。こうしたことから、細胞培養に関わる国内1,000の研究室では、三次元培養装置を取り入れたいはずである。また、政府の「成長戦略」には「革新的な研究開発の推進」がアクションプランとして挙げられているが、特にその中でも「再生医療の研究と実用化推進のための研究を集中的かつ継続的に推進する」とされており、「主要施策例」の中でも「再生医療の医療関連産業の市場規模を拡大する」と謳われている。本予測は2012年の市場調査機関のデータを基にしたものであるが、こうした政策的な支援を背景に、更に市場が拡大することが十分に考えられる。

さらに、本事業の中で、大学の研究室に対して需要把握調査を実施した。その中でも三次元培養装置に関しては、ターゲット価格内で収まるのであれば非常に魅力的な機械であり、引き合いも十分に予想されとの報告が寄せられており、上記の予想の裏付けの一つになったと考えている。また、展示会・学会等に出展し、企業の研究者・大学教授等に対してニーズ調査をすることが出来た。大学に比べ、まだ三次元細胞に対しての研究はやや遅れている印象があり、事業化にあたっての当初ターゲットは、大学の研究室を想定していきたい。

【日本】周辺産業:装置類



経済産業省「平成24年度中小企業支援調査
(再生医療の周辺産業に関する調査)」より

3-2-2 事業化見込み (目標となる時期・売上規模)

平成29年度から平成30年度にかけて3次元培養を行っている研究室にサンプル出荷を行い、装置の有効性を確認できる基礎データの収集を行う。装置本体の価格を300万円と推定しているが、細胞培養に関わる国内1,000の研究室のうち本価格で購入が可能な研究室を3%と仮定した場合、平成31年度以降 $1,000 \times 3\% = 30$ 台の販売を見込む。また、予算面で購入が困難な研究室向けにリース販売を実施し、年間50台の契約を見込む。創薬開発企業への販売は5年目の平成33年度から開始する。同じ平成33年度には、日本の10倍といわれる海外市場への販売も開始し、当面は国内と同じ程度の販売台数を見込む。

3-2-3 事業化に至るまでの遂行方法や今後のスケジュール

本事業で開発された細胞培養装置、並びに同装置用モジュールは、生産を株式会社積進とクアーズテック株式会社が担当し、販売をアドバイザーのワケンビーテック株式会社が担当する。また、販売促進活動には、同じくアドバイザーである京都リサーチパーク株式会社の取り組む様々な事業を活用していく。

【公開版】

販売を受け持つワケンビーテック株式会社は、30 年以上の CO2 インキュベータ販売実績を持ち、特に昨今は再生研究機関を対象に年間 100 台以上（国内シェア約 3 割）の納入実績を誇っている。また、同社は独自に管理された培養室を持ち、実証試験を実施できる体制を整えているので、顧客の視点でシステム改良のアドバイスができることも利点と考える。まずは、その既存の顧客を対象にして確実に実績を伸ばし、得られたデータ（エビデンス）を基に、積極的に論文発表をバックアップすることで世界的な認知度を高め、次期バージョンアップ機種（複数のモジュールの取り付け、等）を登場させて事業の継続性と成長を確保する。

もう 1 社のアドバイザーである京都リサーチパーク株式会社は、平成 21 年度より「再生医療サポートプラットフォーム」を立ち上げ、第一線の研究者を招いてのビジネス懇話会（意見交換会）を定期的に実施するなど、再生医療に関わる研究者との幅広いネットワークを構築している。そのルートを活かして販売促進につなげていく。また、同社が中心になって開設した、試作開発品の動画 PR サイト＜リカモ＞も活用していく。さらに、同社が海外のリサーチパーク協会などを通じて構築した世界各国のリサーチパーク（研究団地）とのネットワークを介して、海外の研究機関へも製品を積極的に PR し、海外への販路拡大をサポートしていく。

3－3 知的財産

（1）知的財産権の出願

特願 2015-012832 細胞培養装置

特願 2017-038200 細胞培養モジュール