平成 21 年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「機能性を有する細胞培養器具の開発」

研究開発成果等報告書

平成 22 年　3 月

委託者　関東経済産業局

委託先　株式会社バイオ光学研究所

目次

第1章 研究開発の概要 ・・・ 3

1－1 研究開発の背景・研究目的及び目標 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3

1－2 研究体制 ・・ 5

1－3 成果概要 ・・ 6

1－4 当該研究開発の連絡窓口 ・・・ 6

第2章 本論 -1 ヒーター回路設計・ITO センサーユニットの研究開発 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7

第 3 章 本論 -2 ヒーター回路ユニットの複合一体化製法の開発 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13

第 4 章 本論 -3 新規の細胞外基質 ECM 足場材ｺｰﾄの検証・開発及び培養環境温度への適合性研究 ・・・・ 17

第 5 章 全体総括・・・ 32

5-1. 研究開発の成果・・ 32

5-2. 研究開発後の課題・事業展開今後の課題 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32

研究開発成果報告書

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

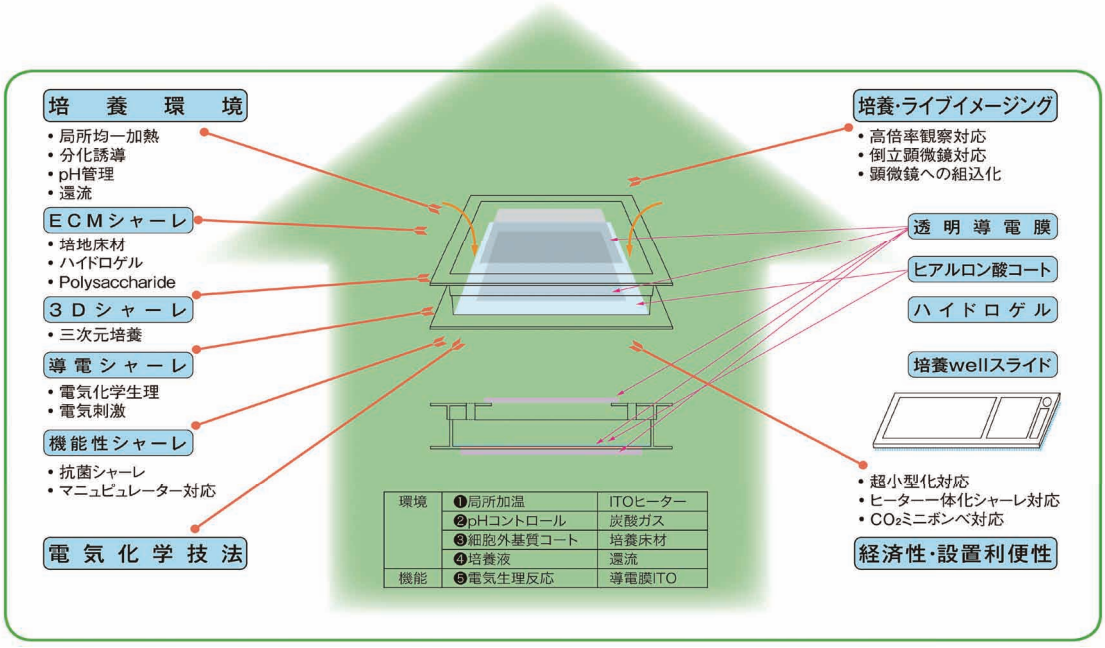
【背景】 再生医療で鍵を握る万能細胞の増殖は一筋縄では行かず、様々なアプローチが為されており、高機能化が求められている。細胞培養の増殖過程のチェックには光学顕微鏡観察が必須であり、さらに温度という培養環境の整備は当然の事として専用加温装置が普及している。一方細胞増殖及び回収技術要請、三次元培養対応となる培養器具の高機能化も進んでおり、高機能化培養器も市販化されて来ている。本研究は細胞増殖が難しい培養環境要因の一つである温度環境の精度を向上させる事と、その他の要因として pH、細胞外基質からなる培養担体を組み合わせる事で細胞の住まいとなる細胞培養器具の開発である。

【目的】 細胞培養容器・器具の高度化対応させる為にこれ迄の半導体薄膜加工等の技術知見を基に高機能化させるものである。先ず半導体薄膜でなじみのある ITO 透明導電膜をヒーターとして機能させる目的で、培養容器にヒーターを一体内蔵させるシャーレ・スライドの製品開発を行う。即ち、細胞培養容器に透明導電膜材料の各特性である、電気、光学、物性並びに形体を発揮できる様に形成を行って、最適な細胞の住まいを可能とする高機能なシャーレ及びスライドを研究開発するものである。これは顕微鏡による高倍率観察に対応するプラスチック製のデイスポーサブル培養容器である。呼称は CellHome。

万能細胞等の培養増殖過程を倒立顕微鏡下等で高倍率観察するには、従来の製法による樹脂の容器ではその肉厚の為、屈折率が影響し高倍率での観察が出来なかった為に、容器の皿部と蓋部へは、顕微鏡観察用のカバーガラス相当の厚み凡そ 150 μ 前後とする、低屈折率、高透過率の性能を満足させる石英又はホウケイ酸ガラスもしくは光学性能を有する樹脂製のものを一体化させる事で対応するものである。更に市場要求は、単に薄肉化にとどまらず培養環境を最適化する機能が付加された培養器が求められており、その透明材料プレートに ITO 透明導電膜の薄膜加工を行い次に均一なヒーターとして機能させる為に導電回路形成を為したこのプレートを、培養容器の底面と蓋面に一体化加工を行い、培養環境の要件である温度の正確な制御を可能とする培養容器である。

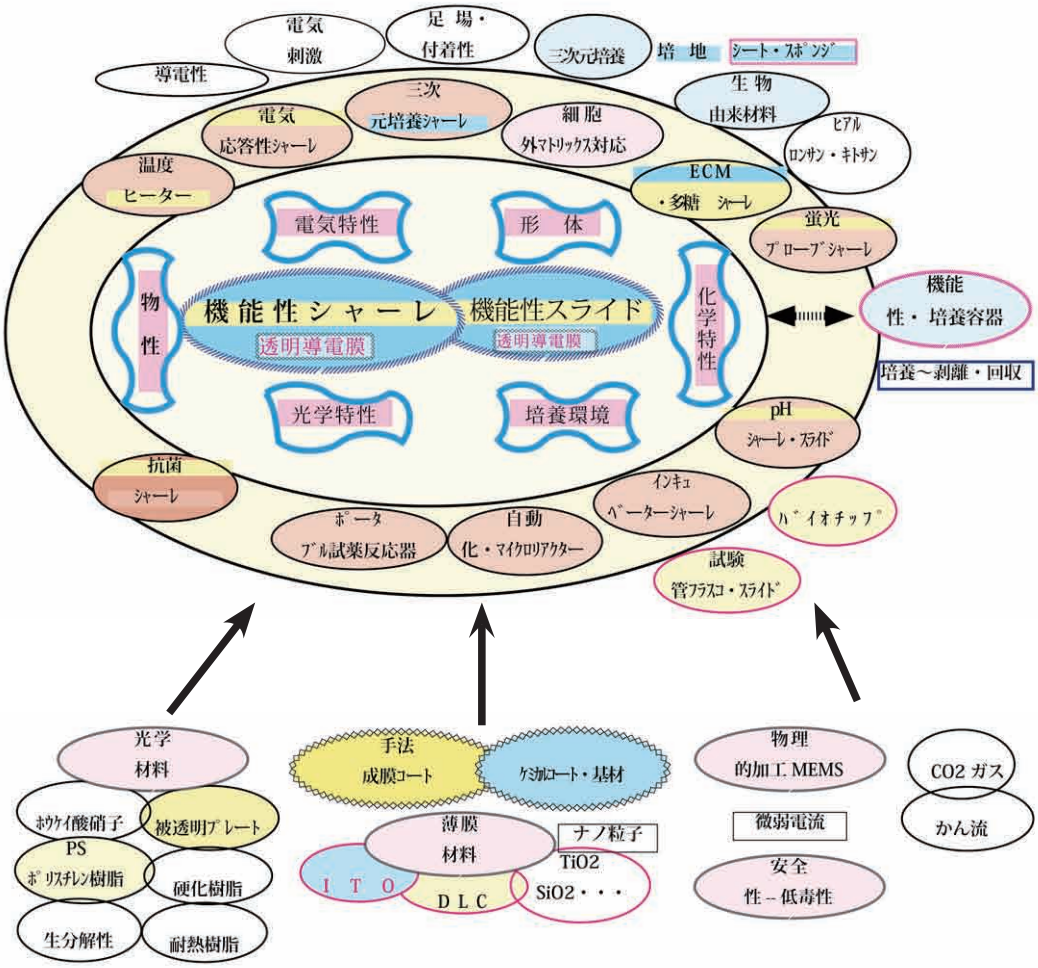
研究の目標は、透明な発熱部及びセンサー部となる機能回路ユニットの製作を行い、更にその透明プレート材（厚み 150 μ ）を培養容器筐体（厚み 1mm）に複合成形加工を行って製品化するものである。

以下（図 1）に開発製品のイメージ図を記す。



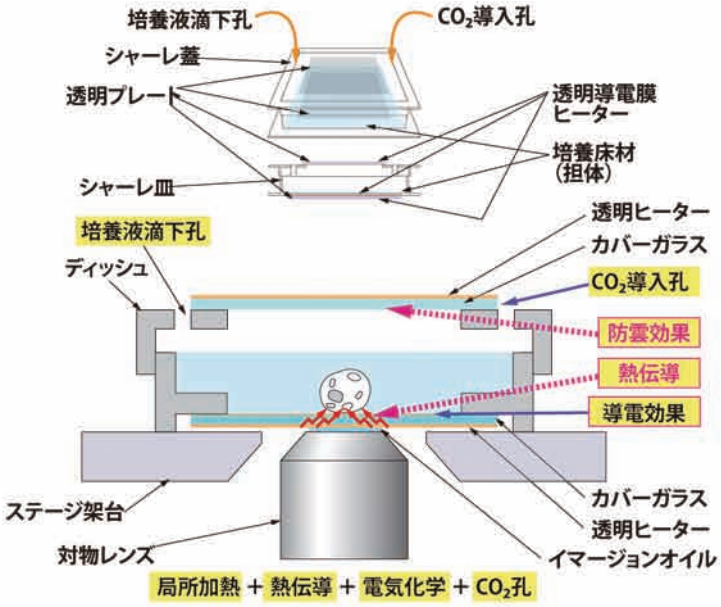
【図 1】開発製品のイメージ

機能培養容器の取組課題とその製法開発アプローチを（図 2）に記す。



【図 2】機能培養容器の取組課題とそのアプローチ

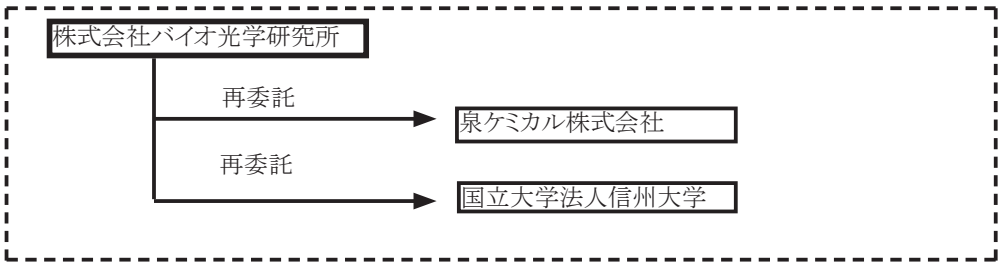
機能性培養容器の技術課題とその特長を（図 3）に記す。



【図 3】開発する新技術

1－2 研究体制

(1) 研究組織（全体）



統括研究代表者（PL）	副統括研究代表者（SL）
株式会社バイオ光学研究所	泉ケミカル株式会社
代表取締役　磯野邦夫	代表取締役　山口孝志

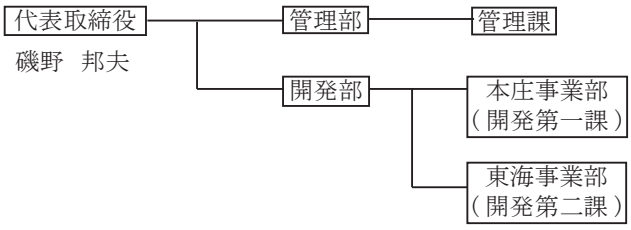
(2) 協力者

氏名	所属・役職
鈴木　淳史	国立大学法人横浜国立大学　環境情報研究院　教授
永井　達哉	MRC ポリサッカライド株式会社　取締役
四方田 和雄	日商精密光学株式会社　代表取締役
榎本　博康	財団法人東京都中小企業振興公社　マネージャー

(3) 管理体制

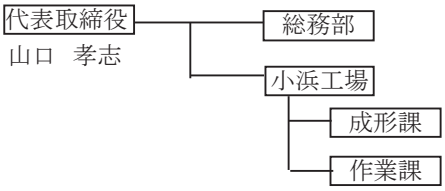
①事業管理者

［株式会社バイオ光学研究所］

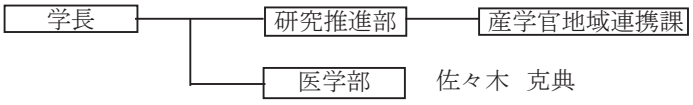


②再委託先

［泉ケミカル株式会社］



［国立大学法人信州大学］



1－3 成果概要

委託事業としての研究成果としては、実施計画書に記載した各内容項目に対して以下のような研究成果が得られた。

① ヒーター回路設計・ITO センサーユニットの研究開発

万能細胞等の培養増殖過程を倒立顕微鏡下で高倍率観察するには、従来の製法による樹脂の容器ではその肉厚の為、屈折率が影響し高倍率での観察が出来なかった為に、容器の皿部と蓋部は顕微鏡観察用のカバーガラス相当の厚み凡そ 150 μ 前後とし、低屈折率、高透過率の性能を満足させるホウケイ酸ガラス製のものを一体化させる事で対応する容器設計から始めた。透明ガラスプレートに ITO 透明導電膜の薄膜加工を行い、次に均一なヒーターとして機能させる為に特殊に研究開発した設計に依る導電回路形成を為した。発熱を均一化と ITO センサーを機能させる設計指針を得ることが出来た。

② ヒーター回路ユニットの複合一体化製法の開発

上記の透明ガラスプレートを、培養容器の底面と蓋面に一体化加工を行う複合化製法としてインサート成形法により、開発を行った。試作金型を製作して超薄肉材のインサート射出成形により、インサート材料の機械的強度と素材の対応・研究を併せ実施して試作品を製作した。目標とする形状及び容器性能が得られた。但し安定した量産化と樹脂の密着性等の再検討も必要で有るが金型構造の設計対応指針は得られた。

インサート部材の密着性及び、複合化成型方法に関する研究開発に就いても、金型構造の他、成形条件並びに最終工程での品質対策を施す等の改良実験を実施した。

③ 新規の細胞外基質 ECM 足場材コートの検証・開発及び培養環境温度への適合性研究

上記機能性培養器が細胞の住まいとする他の補充条件である、細胞外基質対応足場材コートの研究・開発と、培養環境温度への適合性課題の対応を実施した。ECM としてはヒアルロン酸 Na-100 が有効である事が確認できた。適合性評価としては、万能細胞に適切な培養環境が得られる事を確認出来た。

④ 実験結果に基づくフィードバック分析・検証

信州大学に於いて培養環境・温度、付着性・ECM コート組合せ実験を基に、製品システムの不具合情報も入手でき、今後の製品最適化への対応を目指す事ができる。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

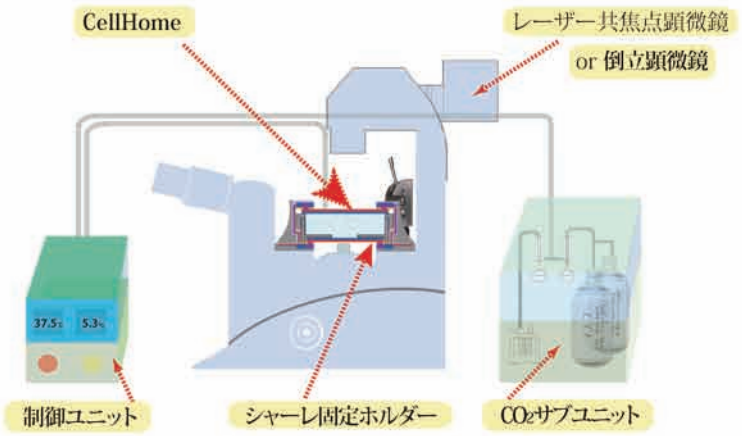
株式会社バイオ光学研究所（担当：磯野）
〒 121-0815 東京都足立区島根 4-7-15
TEL & FAX：03-3859-6221
Mail ：info@bioopt.co.jp

第2章　本論 -1 ヒーター回路設計・ITO センサーユニットの研究開発

2-1 ヒーター回路設計・ITO センサーユニットの研究開発

本研究に係るものは、顕微鏡観察が可能となる透明導電膜を抵抗体用として基板に成膜し、薄膜材料である酸化スズと酸化インジウムからなる半導体セラミックスである ITO 材料をスパッタ、蒸着法等の気相成長法で成膜を行うものである。更にその抵抗回路は通常電極間を電気が流れて行く事により発熱現象を生じるが、その発熱パターンに渦巻き現象 を介在させヒーター部全体を均一化させる為に、回路を設けて電気の流れを制御させる設計を行い、電極間を対向する位置に設けスリット構造からなるその回路を設ける。

今回の開発に拘わる機能性シャーレ（CellHome）のシステムに就いては、❶ CellHome 機能性培養器、❷機能性シャーレホルダー、❸制御ユニット、❹ CO2 サブユニットより構成される。
参照（ 図 4 機能作用システムの概要図 ）。



【図 4】機能作用システムの概要図

2-1 -1 薄膜 --- 透明導電膜

ヒーターとセンサーに用いる透明導電膜は可視光域で透明であり、かつ導電性がある薄膜である。現在では透明電極として、各種のディスプレー電子機器などにはかかせない材料となっている。

2-1 -2 回路設計検討

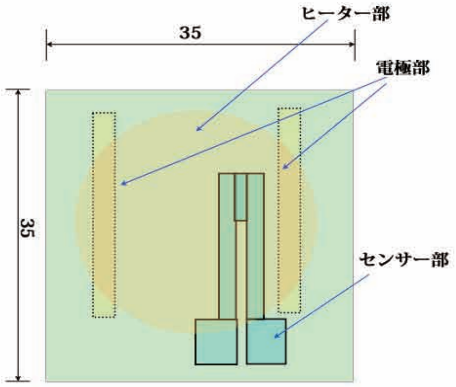
本研究は、培養環境の精度を改善する為に機能性を有する細胞培養容器とするものである。透明導電膜からなるヒーター部を培養容器の底面に取付けて、その容器底部の局所部を任意な温度で直接的に熱伝導を行わせ、その温度を制御し、且つ簡易及び安価な形態で提供できるものを開発するものである。その目的の一つは、測温及び監視とする温度センサーをヒーター発熱部の近傍又は同一パターン上に設けて、培養試料部の温度を正確に制御する事である。二つ目は、顕微鏡観察時において支障をきたさない様に培養容器の蓋部に防曇機能を設けたトップ透明プレートを設ける事である。方法としては培養容器本体に透明導電膜の成膜を行い、次いで適切に機能化させる為にヒーター部又はセンサー部において最適なパターン加工を行い導電回路形成の開発を行うものである。　一方で、温度制御を行う為にはセンサーは必須であり、特に透明な薄膜センサーは光学顕微鏡観察向けには期待がされている。高価な装置を用いて作るフォトリソグラフィ法を用いず、より安価で簡便な手法での製造も待たれている。レーザー加工法を用いて ITO 薄膜を温度センサー化するとともに、成膜時に多層膜手法を用いて試作を行う事を調査研究した。

ヒーターとして機能するのは、印加する電圧制御によりヒーター端子間の抵抗値に電力負荷が加わり電流値の変動が生じる事を利用するものである。ヒーター温度を設定するには、印加する電流と電圧の比例関係に於いて設定され、その時の電流値と比例関係にある発熱温度との相関関係を利用するものである。予めその所定温度を得る必要な電圧を印加し、この時センサーにより電流を計測検出し、温度に換算して、電圧を調整する事で温度制御を行う。この端子間の抵抗値を測定する事から、上記関係を用いて温度センサーとして利用するものである。

【本研究の要素部品】

技術目標として、発熱均一高精細回路ユニットを一体化させる樹脂容器であり、高度化目標は、成形による劣化を防止する技術、高精細な回路成形を可能にする高精細プラスチック成形加工技術、異質樹脂の複合化成形技術に対応するものを開発する。

その主要な構成要素部品である透明ヒーター / センサーを（図5）の構造となる設計を行った。



【図 5】透明ヒーター / センサーの構造

【ヒーター / センサー部】

基盤材料 --- ホウケイ酸ガラス (屈折率 : Nd 1.5231

熱膨張係数 : α （20 ～ 300℃）=7.2・10-6 K-1

ガラス転移点（Tg）: 557℃)

サイズ ----35 x 35 x 0.145 mm

機能 ------- 温度加熱範囲 (常温～ + 15℃)

制御 ------- ヒーター部に近接するセンサー部を検知して
制御を可能とさせるもの。

2-1 -3 ヒーター薄膜の実験及びその条件

顕微鏡観察が可能となる透明導電膜を抵抗体用として基板に成膜する。基板に発熱体となる透明導電膜を凡そ 5000A 以下の膜厚で成膜を行う。成膜厚さとしては一般に低抵抗回路（30 Ω /sq）の場合は厚膜を行い、高抵抗回路（1K Ω /sq）の場合は薄膜を形成する。本研究に用いた成膜方法は下記の通り実施した。

【成膜装置】 株式会社シンクロン製 真空蒸着装置
BMC-1400

【成膜条件】 基盤指示加熱温度 250°
蒸発 電子ビームによる蒸発
真空度 10-3Pa 以下で成膜

参照（図 6）成膜装置

【図 6】成膜装置

【成膜課題と対応】

1) 成膜用ターゲット材は INSn の合金を使用する為、成膜加工時の基盤温度設定に留意する必要が有る。

2) 光学特性として高透過率を必要とする為、 ITO 膜に吸収が少ない成膜とする。

3) 電気特性 (抵抗値) が重要であり、ITO 膜厚制御に留意し、機械的膜厚計にて制御する。

2-1 -4 ヒーター / センサー薄膜の実験結果

上記条件で試作性膜を実施し、成膜の膜厚は、膜厚計を用いて実施。

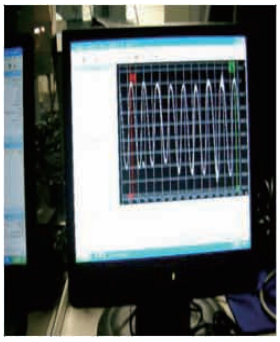
全面膜厚目標値 400 Å

測定値 416 Å

【表面形状測定器】Veeco 社製
Dektak 6M

参照（図 7,8）Dektak 6M

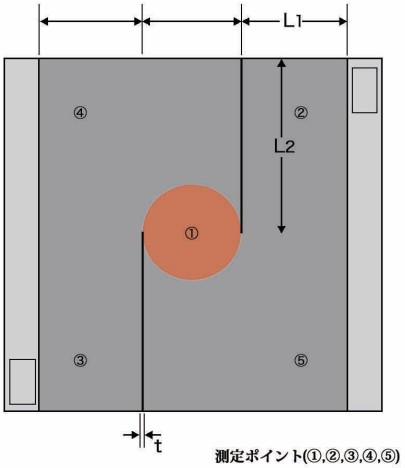
【図 7】Dektak 6M
資料測定部



【図 8】Dektak 6M
解析モニター部

2-1 -5 ヒーター薄膜回路作製の実験

ヒーターの発熱の仕組みは、印加電圧、透明ヒーター部分の面積、電極間距離等の設計を最適化して行う必要がある。ヒーターとして均一に発熱させる為に、その透明導電膜の両端上下にスリット状パターンを加工し、その両端対角の位置に電極形成をし導通させる回路がこれまでの知見より得ている。図 9 に示す様にスリット位置（L1）はヒーター面積の 1/3 のところを目処に、巾（t）は凡そ 1mm 以下とする。有効発熱エリアを広くする時は回路長さ（L2）を大きく採るパターン設計を行う。図に示した様に電極間を対向する位置に設け、その回路となるスリット構造をレーザーにてトリミング加工を行う。下記設計においてヒーター回路（n 分割数）と所要トリミング数を得る。



【図 9】回路設計

【ヒーター回路設計】

（図 5）となる設計に就いては、簡易計測ソフトを構築し、シュミレーションを行い、以下のフローからなる設計・試作を実施した。

目標：発熱温度 、常温 ～ 15℃上昇。

①ヒーター設計に必要となる設計緒言を得る。

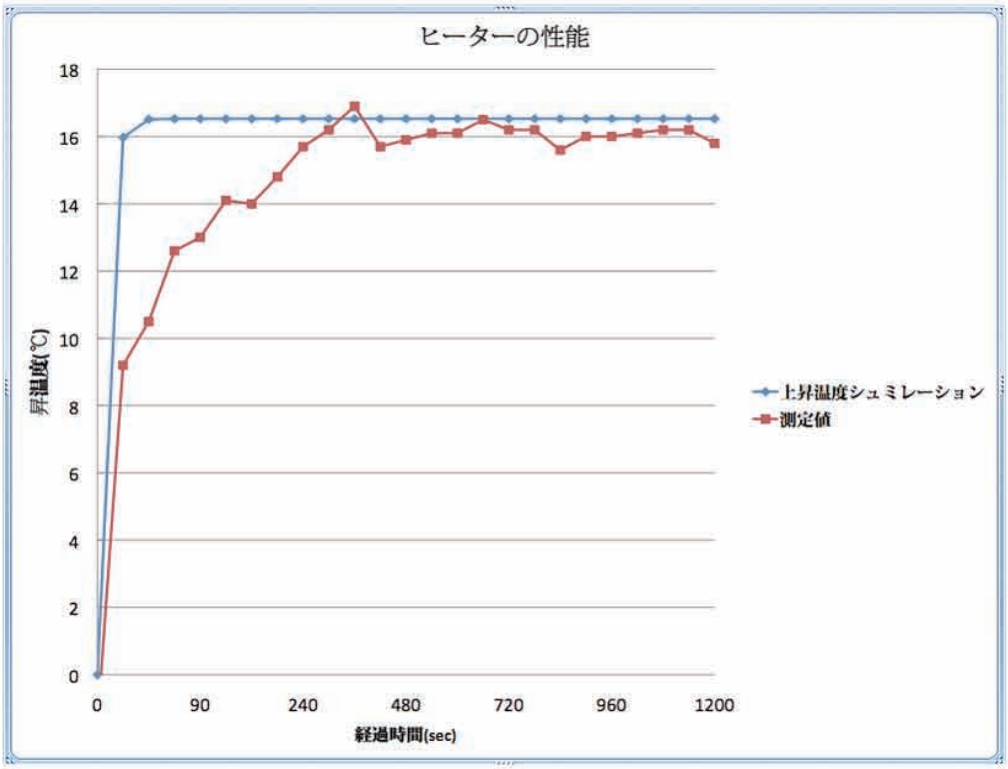
②ヒーターの能力（概算 W 数）は必要熱計算にて算出を行う。

③ヒーターの能力（目標 W 電力）を定め、ITO 薄膜のシート抵抗値の算定を行う。

④上昇温度温度シュミレーションより抵抗値電圧を入力し測定値との比較を行う。

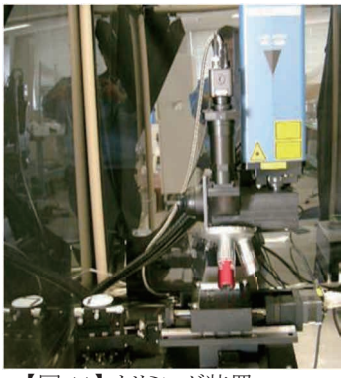
⑤前に記載した薄膜製造、Lot 間のシー抵抗値のバラつきが予測されるので補正を行えるようにする。
シュミレーション値に基づき必要電圧の変更にて対応実施。

⑥（図 10）ヒーター性能シュミレーション、測定グラフ。



【図 10】ヒーター性能シュミレーション測定

以下に用いた小型レーザー装置を記す。



【図 11】トリミング装置

【トリミング装置】 HOYA 株式会社製 レーザーマイクロカッター
LR-3100FSUV

【性能】 パルス励起 Q スイッチ Nd:YAG レーザー

波長 (nm)	532	1064
エネルギー (mJ/puluse)	4	5
バルス幅 (nsec)	8 ～	6

参照 （図 11）トリミング装置。

2-1 -6 センサー薄膜回路作製の実験

【設計目標】ヒーター温度が常温より +18℃上昇時に於いて、 センサー部の抵抗値変化率が初期値より 10% 以上変化する事を目標とする。

【方法】 センサー部に於ける 端子間抵抗値を測定する。

端子間抵抗値の予測達成レベル ① 1K Ω
② 10K Ω
③ 20K Ω

【試作】 試作は次の 2 方式で進めて実施する。

1) 現状のヒーター膜面にトリミング加工にて抵抗値を定める。

2) ヒーター膜の上に絶縁層を設け、 その上にセンサー膜を成膜を実施。 次いでトリミング加工し抵抗値を定める。

薄膜 ITO を制御可能となる抵抗値は、これ迄の知見から下限 8 Ω / □～ 150 Ω / □である。成膜時の膜厚コントロールでは、150 Ω / □以上となる膜厚は 150Å 以下になり、製造が困難となり膜厚の再現性が得られなくなるので、 厚膜成膜を行い、トリミング加工にて 電極回路長を形成する事で 抵抗値を形成する。トリミング方法は、（図 11）に依る。

本試作では、シート抵抗 20 ～ 35 Ω / □、電極の長さ 20mm x 幅 1mm の想定であると（表 1）の予測ができる。

Ω/□	幅 (Cm)	長さ(Cm)	端子間抵抗 Ω
20	0.1	3.6	720
30	0.1	3.6	1080
35	0.1	3.6	1260
25	0.1	3.6	900

【表 1】

1kΩレベルの端子間抵抗設定は、ヒータ面に幅 1mm x 長さ 20mm の電極回路を 2 本製作する事で可能となる。 参照 （図 5）透明ヒーター / センサーの構造。

【絶縁膜を設けた積層法】

センサー部は簡易マスク治具を使って、トリミング加工と同様な回路を形成する。

【絶縁膜】 膜種； SiO2

【成膜条件】 基盤指示加熱温度； 250° 蒸発； 電子ビームによる蒸発
真空度； 10-3Pa 以下で成膜

【センサー膜】 膜種； ITO

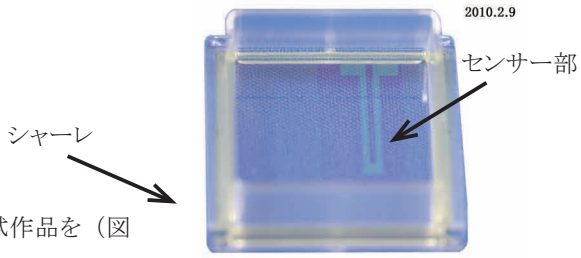
【成膜条件】 基盤指示加熱温度； 250° 蒸発； 電子ビームによる蒸発
真空度； 10-3Pa 以下で成膜

【成膜法】

ヒーター部　に全面に ITO 膜　　膜厚 400 Å

絶縁膜部　　3570 Å

センサー部　　400 Å



【図 12】試作品

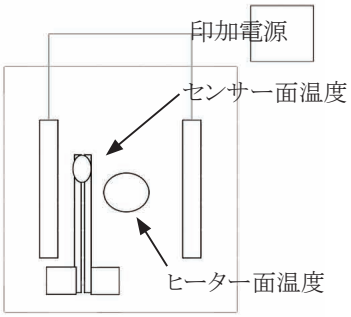
【試作品】

上記の製法に依り培養容器へアッセンブリーした試作品を（図 12）の写真に記す。

2-1 -7　ヒーター / センサー基盤の実験結果及び考察

【測定方法】

ヒーター / センサー基盤の測定は、(図 13) の要領で実施した。



【図 13】測定方法

一方電気特性 (抵抗測定) と温度計測を実施した。

【計測装置】 抵抗測定器　　株式会社アドバンテスト製

デジタルマルチテスター　R6552

参照（図 14）

温度計測は、サーミスタ温度計、高精度標準温度計　ETI 社製 RF-100。

【図 14】抵抗測定器

【実験結果】

測定条件を踏まえた結果、（表 2）が得られた。

測定条件

電圧　DC-5V

電流　0.12A

電力　0.6W

端子間抵抗 Ω	ヒーター面温度 ℃	センサー部温度 ℃	通電時間 分
879	24	23.9	0
883	30	32.4	1
887	33	35	2
893	33.4	35.8	3
927	35.4	38.1	5
921	36.9	38.3	7
919	37.5	38.2	9
925	37.7	38.9	11
939	38.1	39	15
60	14.1	15.1	
6%			

抵抗値変化量

抵抗値変化率

【表 2】

【考察】

ヒーター温度の発熱性は良好で有った。センサー部の抵抗値変化量は Max 6% である。この変化量では、制御するには少ないので、回路設計を改善検討していく必要があると思われる。次に解決法を述べる。

2-1 -8 ヒーター / センサー基盤の精度改善

今回の設計に於いてセンサー部の端子間抵抗値が低い為、変化量が少ないと推測されるので、その抵抗値を 10K Ω以上となる設計を行って改善を行った。

【改善点】電極回路長は、抵抗長を長くする事でシート抵抗値を高くする。

幅 1mm、総回路長 108mm。

（表 3）はその設計予測値とするものである。

シート抵抗		検出器端子抵抗	
30	Ω/□	3240	Ω
50	Ω/□	5400	Ω
70	Ω/□	7560	Ω
80	Ω/□	8640	Ω
100	Ω/□	10800	Ω
120	Ω/□	12960	Ω

【表 3】設計予測値

【実験結果】

結果（表 4）が得られた。センサー部の変化率が 10%以上ある為、センサー機能として期待できる。

	端子間抵抗			センサー温度		端子間抵抗			センサー温度	
	13.82	k	Ω	24.5	℃	21.5	k	Ω	24.5	℃
	13.94	k	Ω	24.9	℃	22.06	k	Ω	28.3	℃
	15	k	Ω	30.2	℃	22.3	k	Ω	30	℃
	15.16	k	Ω	31.2	℃	22.4	k	Ω	30.2	℃
	15.2	k	Ω	32.2	℃	22.71	k	Ω	31.8	℃
	15.2	k	Ω	34	℃	22.99	k	Ω	32.4	℃
	15.91	k	Ω	40.2	℃	25.1	k	Ω	37.5	℃
抵抗値変化量	2.09		Ω	15.7	℃	3.6	Ω		13	℃
抵抗値変化率	13%					14%				

【表 4】

【考察】

局所制御を行うヒーターと、温度制御可能となるセンサーとからなるユニットの設計・製造の指針が得られたので、本ユニットを用いて小型培養器に組込、一体化させる事とした。

その報告は、本論 2 章で行う。

第 3 章　本論 -2　ヒーター回路ユニットの複合一体化製法の開発

1. はじめに

再委託研究テーマである、機能シャーレ (呼称 CellHome) は、約 35mm サイズの透明ボトムトップディッシュに、細胞培養環境制御機能を有したものである。シャーレ底面には、透明導電膜によるヒーター及びセンサー回路を有した構造からなる。

プラスチック成形加工による培養容器に就いて留意事項は、安全性 (清浄度)、高機能化という課題及び要請が有り、以下の指針に基づき対応して望んだ。その高度化目標として、

イ．高精細な回路成形を可能にする高精細プラスチック成形加工技術

ウ．異質樹脂の複合化成形技術　に対応して実施。

具体的には、以下の項目に依り推進した。

①インサ－ト射出成形の加圧対応 (超薄肉材のインサート)。

②インサート材料の機械的強度と素材の対応・研究。

③安全性 (清浄性) に対しては、成形環境のクリーン度対応と、成形物の細胞適合性をテストピース等で事前対応。

2. 成形目標と製法

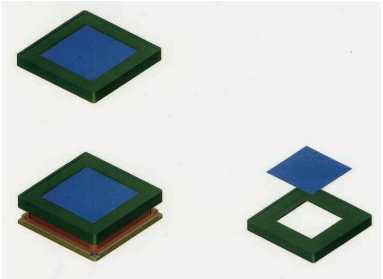
複合一体化製法開発・製作を目指し、インサート材 (厚 150 μ) を筐体部厚 (1mm) にインサート成形とし一体化させる。

項目	仕様	特記事項
シャーレ形状	四角形	スタッキングが出来ること
構成部品	蓋と底の 2 部品で構成。 いずれもガラスインサート。	CO2 の取り入れ小穴付き。
本体使用材質	ポリスチレン	
インサートガラス （導電膜付）	厚み 150μm カット寸法：35＊35±0.1mm	
使用成型機（ｲﾝｻｰﾄ用）	縦型成型機	

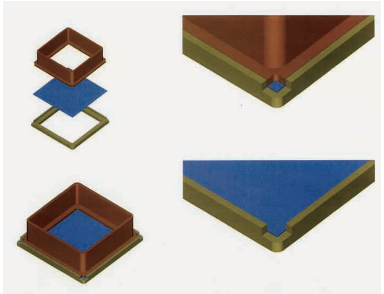
3. 一体化製法の試作

①基本設計・金型設計

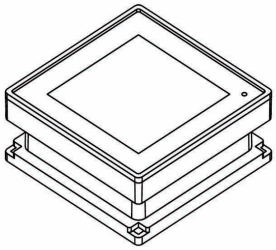
株式会社バイオ光学研究所の基本構想図に基づき、インサート成型法の検討の実施。3Dで検証し設計を実施。【図 1】蓋部、【図 2】底部、【図 3】セット図。



【図 1】蓋部



【図 2】底部



【図 3】セット

②製法

成型時の薄肉ガラスの割れ対策のため、枠パーツを作り、2 重成型を行うが、大きい方のパーツを先に成型し、そこにガラスをセットし、インサート成型する。ポイントは（収縮の応力を少なくするため）ガラスの膨張係数を考慮して、紙 1 枚大きめに製作を心がけた。

③成型材料の選定と、樹脂圧力は【表 1】に記す。

ポリスチレンの収縮率（%）	０．４～０．７
材料メーカー	ＰＳＪポリスチレン
材料グレード	SGP１D
金型内の樹脂圧力（kgf/cm2）	２００～３００

【表 1】

④金型（射出成型）の構成は【表 2】に記す。

型名	内容	サイズ	重量	鋼材
Ⅰ型（1 次成型型）	蓋と底のｾｯﾄ取	200＊200＊210	70Kg	NAK80
Ⅱ型（２次成型型）	蓋と底のｾｯﾄ取、穴なし蓋	300＊250＊240	130Kg	NAK80

【表 2】

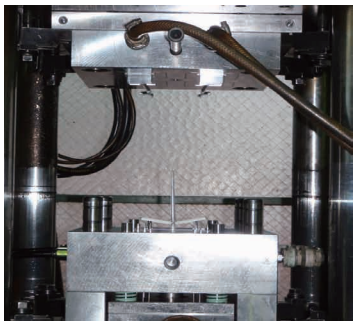
⑤成形機

実験に使用した成型機は、薄肉成形に適した縦型射出成形機を用いた。【表 3】に記す。

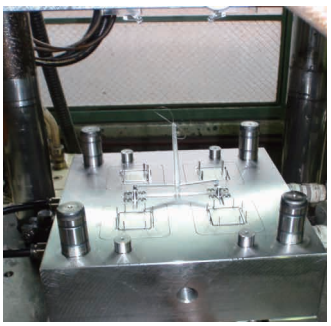
【図 4】金型、【図 5】金型にセットした状況である。

使用金型	メーカー	仕様	備考
Ⅰ型（1 次成型型）	東芝	３０ｔ	横型 INJ
Ⅱ型（２次成型型）※インサート型	菱屋精工 VSR70	７０ｔ	縦型 INJ　油圧式

【表 3】



【図 4】金型



【図 5】金型にセット

⑥ガラスインサート成型条件

次の条件で実施、【表 4】。

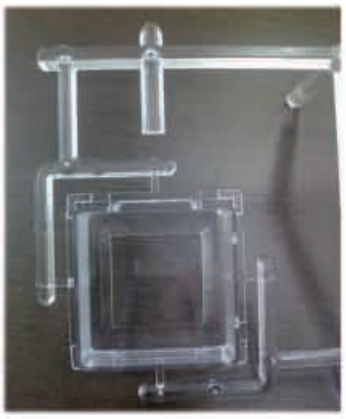
	蓋	底
ノズル温度（℃）	２４０	２４０
金型温度（℃）	６０	６０
射出成型圧力（Mpa）	４０	３３
射出速度（mm/ｓ）	３５	３５
充填量（cm3）	１４	２０．２

【表 4】

4. 試作実験

①試作実験経緯

型修正と試作の繰返しにより、ガラスが割れる事なく成形が出来る事を確認した。



【図 6】試作製品

②試作による考察と問題点

＜試作による考察＞

成型した後に、異種材料成形の難しさである、樹脂枠の収縮によりガラスが撓んだり割れたりするという成形の難しさを経験した。成形法として2次成型でガラス周囲を囲いこむのではなく、点止めする形であれば、薄肉材料であるガラスが割れないことが判り、成形の安定性の今後の設計指針を得る事ができた。

5. 複合化成形の見直しと試作

本開発に用いたインサート成型手法、試作金型、又ガラスインサートを手作業として実施したが、今後事業化するには、設備の自動化投資が避けられない。そこで、小規模生産に適した複合化成形を併せて実施した。

①試作検証結果による、対案製法案。

現行の1次成型品にガラスをセットし、新たなカバー成型品（第Ⅲ型）で嵌め込んで圧接させる方法が考えられた。

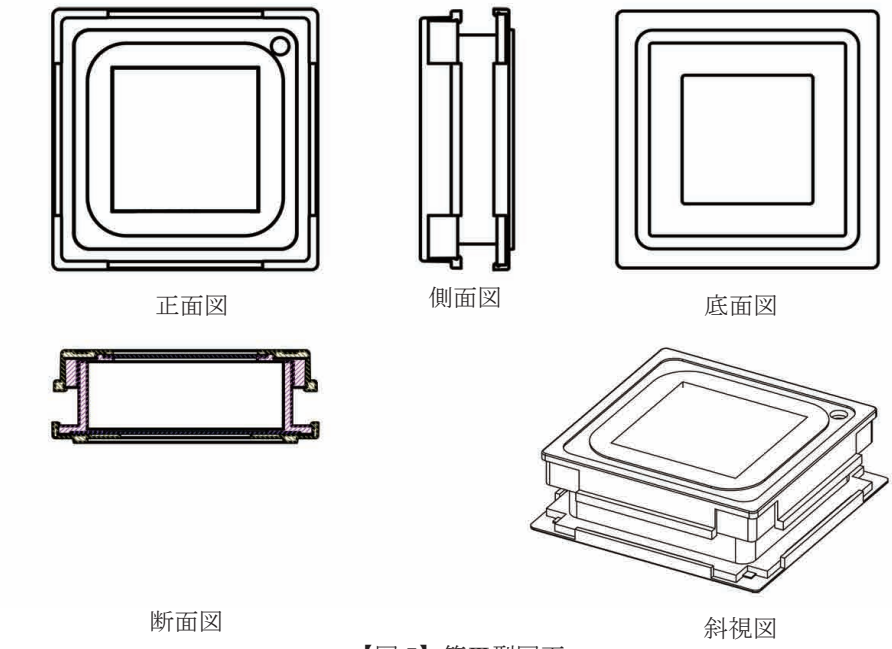
② 金型

Ⅲ型（３次成型型）	蓋と底のｶﾊﾞｰｾｯﾄ取	200＊200＊200	50Kg	NAK80

③試作結果

ガラスの割れは無くなり、成型現場でガラスを型へ手作業でインサートする苦労も軽減でき、量産への移行の一方式となる事が確かめられた。

④ 第Ⅲ型製作に伴うシャーレ最終図面



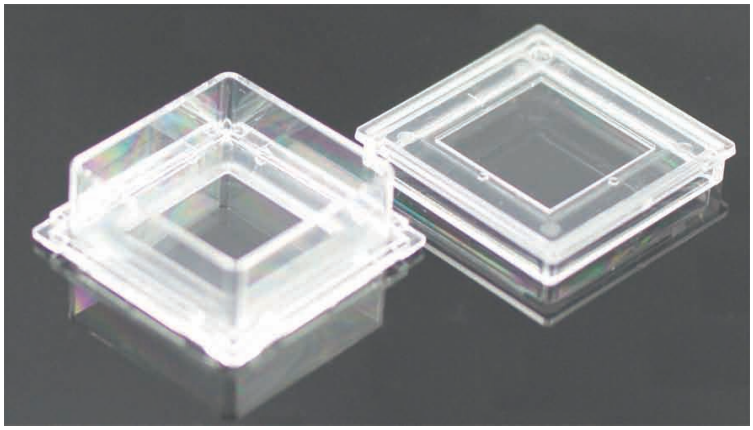
【図 7】第Ⅲ型図面

6. 製品評価と成果

本プロジェクトの性格も有り、短納期対応としては実際の実施による実験で検証する方法しかなく、度重なる金型の修正・調整・改造、そして試作となった。

本格的な量産化への移行は今後の課題となる。複合材としての一体化成形に於ける、その金型構造・構成、成型法に就いての目標は達成された。安定した成型品とする成形率を高める改善と、金型及び自動機設備等のイニシャルコストが事業化の為の課題がある。これらの課題の克服も行い、今回補足対案で試作した製法も、少量生産が可能となり、早い時期での事業化が可能となると思われる。

最終試作品は【図 8】に示す。



【図 8】

第 4 章　本論 -3　新規の細胞外基質 ECM 足場材コートの検証・開発及び培養環境温度への適合性研究

1. はじめに

上記プロジェクトにおいて信州大学における委託開発項目はこのプロジェクトで新規に開発される機能性シャーレ（CellHome）について、培養に適した新規の細胞外基質（ECM）足場コートの研究・開発および CellHome で提供される培養環境への万能細胞の適合性・有効性の検証を行うことである。

2. 細胞外基質対応足場材コートの研究・開発

一般的なプラスチックシャーレ（プレート）は、細胞の接着性が弱く、日常の細胞培養ではゼラチンを塗布するかあるいは目的によりコラゲーンなどの細胞外マトリックスが塗布された高価なプレート使うことが多い。一方、今回作成する機能性シャーレ（CellHome）は透明性を確保し、熱効率を確保するために、底面を極めて薄いガラスにし、その両面或いは下面を透明電導膜であるITO薄膜で覆い、サーモヒーターとして機能させるものである。

これまでの経験から材質により細胞の接着が極端に変化することがわかっており、特にガラスでは、ゼラチンなどを塗布しても、細胞は接着しにくく、例え接着してもその後の伸展や増殖が抑えられ、形状は変化する。そこで CellHome を一般的な使用に耐えられるようにするため、使用前に特別な処置をほどこさずとも細胞がスムースに接着し、手軽に使えるようにすることが必要だと考えた。さらに市場展開を期待する場合、廉価なマトリックス基材を使用する必要がある。

我々はこのプロジェクトを再生医療への応用を念頭に置いて展開することを計画したため、CellHome を再生医療の有力な担い手であるヒトES細胞の培養開発に応用することにした。ES細胞の培養は通常の細胞培養と異なり、いくつか特異な面がある。その一つがフィーダー細胞（マウスの幼弱な間葉系細胞でES細胞の未分化性を制御している）との共培養である。この細胞の接着、伸展の良し悪しが、培養の優劣を決定する。

そこで、我々が最初に行ったのは、さまざまな基材とフィーダー細胞との接着程度の検証であった。これにより、フィーダー細胞やES細胞の培養に適した使いやすい細胞外マトリックスをスクリーニングし、CellHome に応用しようと考えた。

1-(2)　ベースをPVAにした13種類の細胞外マトリックスとフィーダー細胞、ES細胞の接着の検証

【スクリーングした基材】

3 cmプレートに表 1 で示すような細胞外マトリックスを塗布した（これらはあらかじめ横浜国大の鈴木淳史により作成されたものである）。親水性が極めて強く温水に溶解する合成樹脂、PVAを基本基材として、その中にキトサン、ヒアルロン酸、ヒト可溶性羊膜を 0.1 － 0.5%の割合で混合した。コートバイオは、通常の PVA キャストゲルを作る際にシャーレに流し込んだ後に、1ml 純水に溶かしたヒト可溶化羊膜1mg 溶液を流し込んで表面に拡散させたもの；mix bio は、通常の PVA キャストゲルを作る際に使用する PVA 溶液にヒト可溶化羊膜1mg ／1ml 純水を混ぜて、キャストしたもの（かき混ぜた時に泡が入ると厚くなるため、静置して泡が表面に集まった時に上澄みを流し、後に残ったものである）。また、－Kはクラレ製の PVA、－キシは岸田化学製である。【表 1】に記す。

C-0.1	キトサン 0.1wt%含有
C-0.2	キトサン 0.2wt%含有
C-0.5	キトサン 0.5wt%含有
H-0.1-キシ	ヒアルロン酸ナトリウム 0.1wt%含有
H-0.2-キシ	ヒアルロン酸ナトリウム 0.2wt%含有
H-0.5-キシ	ヒアルロン酸ナトリウム 0.5wt%含有
H-0.1-K	ヒアルロン酸ナトリウム 0.1wt%含有
H-0.2-K	ヒアルロン酸ナトリウム 0.2wt%含有
H-0.5-K	ヒアルロン酸ナトリウム 0.5wt%含有
PVA コートバイオ	ヒト可溶化羊膜 1 mg／ 1 ml 純水
PVAmix bio	ヒト可溶化羊膜 1 mg／ 1 ml 純水、上澄み（泡）除去
PVAmix bio 上澄み	ヒト可溶化羊膜 1 mg／ 1 ml 純水の上澄み（泡）
PVApure	何も含まない PVA キャストゲル

【表 1】

【図 1】作成されたプレート (PVApure は2枚ある、1枚のみ使用)

今回は1－2mmほどの厚みのあるものを作成し検討した（図 1)。滅菌はガンマー線照射（平均 30 kGy）により行った。

特に、この実施では CellHome(予備試作品) にヒアルロン酸を主体とした基材の使用を考えていたため、ヒアルロン酸を含んだ基材と細胞との関係について注意を払った。

【使用した細胞】

ヒトES細胞（京都株 1　khES 1）：パッセージ 50　培養 4 日目のコロニー

フィーダー細胞（MEF）：凍結されたものを解凍後直接使用。

1-(1)-1 実施 1

①【ES細胞の場合】

あらかじめ作成したES細胞コロニーを京都再生研の中辻らが開発した剥離液を用いて剥離した。フィーダー細胞を除去するため、剥離したコロニーをES培地でゼラチン塗布プレートに 1 時間静置した。この時間ではフィーダー細胞のみ接着し、ES細胞は接着しない。1時間後、培地を遠心し、浮遊しているES細胞を沈殿させた。これらの細胞を 0.1%トリプシンで 5 分処理した後、ROCK阻害剤含ES培地で、反応を止め、細胞を分散させた。再び遠心した後、ROCK阻害剤含ES培地で希釈し、1枚のプレートにつき、104 個を播腫し、2 日間静置した。100 個単位まではコロニー数を測定、以上は +3 とすることにした。しかしES細胞はどのような基材に対してもフィーダー細胞があらかじめ播種されていなければ極めて接着が悪いことが知られている。接着しない場合は次の実施を行う。

②【フィーダー細胞の場合】

どのプレートにもES細胞が接着せず、コロニーの形成がなかった場合、プレートを再び洗浄し、フィーダー細胞を播腫することにした。

③実施結果

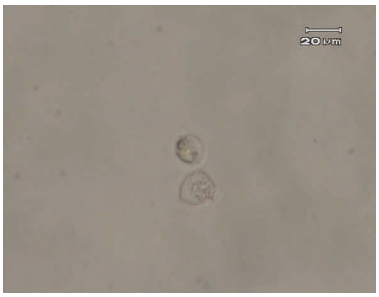
【表 2】で示されるように、ヒトES細胞が明確に接着したプレートはなく、浮遊しているのが大半であった。その中で、プレートに固定されているよう見えたのがヒアルロン酸を含んだ基材であった。しかし、その場合、PVA の製品自体に関係しているようで、岸田化学製（キ）のものだけであった。3日ほど観察を続けたが、基材に固定されたと思われるものでも、結局伸展しなかった。

細胞が数個塊を作っていることが多く、増殖しているようにも見え、単純にお互いが接着してできたとは思えなかった（図 2a)。それ以外は集塊を作ることもなく、個々に存在することが多かった（図 2b)。

プレートの種類	C－0.1	C－0.2	C－0.5	H－0.1キ	H－0.2キ	H－0.5キ	H－0.1K	H－0.2K	H－0.5K	PVAコートバイオ	PVA mixbio	PVA mixbio上澄	PVA pure
接着の有無、程度	－	－	－	＋－	＋－	＋－	－	－	－	－	－	＋－	－
伸展				－	－	－						－	

【表 2】

【図 2a】】H-0.5 キ（ヒアルロン酸を含む）



【図 2b】b. Mixbio 上澄

④結論

PVA を基本基材にした13種類の基材はES細胞の接着を促すことはできなかった。しかしヒアルロン酸では、細胞がなじむ或いは言葉を変えれば親和性がよいという点でほかのものと少し異なる挙動を示した。

1-(1)-2 実施 2

ES細胞がほとんど接着しなかったために、フィーダー細胞の接着について検討した。上記で使用したプレートの培地をPBS洗い流し、通常 6 cmプレートに播種する量の半分をそれぞれのプレートに入れた。

① 実施結果

フィーダー細胞の場合は、表3に見られるように、基材により反応は異なった。×は作成したゲルが操作の過程でたわみ観察が困難なプレートである。（表 3)。

(1) 伸展の仕方がよいもの：H－ 0.1，0.2 K；MixBio、

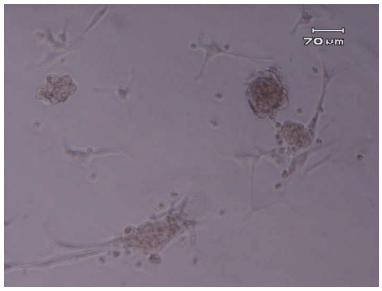
(2) 細胞塊を作るもの：H－ 0.5；C－ 0.5；MixBio上澄み、

(3) 接着しないもの：PVA pure; PVA バイオコート

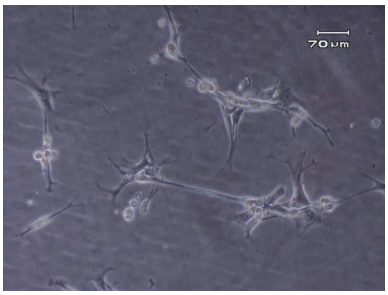
ヒアルロン酸基材への細胞接着は安定感があった。（図 3）。H－ 0.5 キはよく接着していたが、部分的に細胞の塊が見られ、我々が通常みる細胞の伸展の仕方と趣を異にした（図 3a）。それと比較すればH -0.2 Kは細胞一個一個が伸展しており、正常状態に近い（ 図 3b)。

プレートの種類	C－0.1	C－0.2	C－0.5	H－0.1キ	H－0.2キ	H－0.5キ	H－0.1K	H－0.2K	H－0.5K	PVA コートバイオ	PVA mixbio	PVA mixbio 上澄	PVA pure
接着の有無	×	×	+	×	×	++	+	+	×	－	+	＋	－

【表 3】



【図 3a】H-0.5 キ



【図 3b】H-0.2K

② 結論

フィーダー細胞の接着にはヒアルロン酸が有効である。量は 0.2%ほどで十分であるが、ベースになる基材の影響も受けると考えられる。この実施で用いたゲルは厚みがあり、透明度が落ちる懸念があったが、いずれも観察に耐えた。したがって、PVA－ヒアルロン酸基材をコートしたプレートは使用できる。

しかし、これらの実験を通じて、PVAをベースにしなくとも、ヒアルロン酸単独で細胞は接着する可能性が示唆された。今回PVAを用いた理由は将来、ゲルごと他の場所に細胞を移すことを考えて行ったものであり、それを考慮しなければ、ヒアルロン酸単独の方がはるかにやりやすい。このことを確認するために、次にPVAを用いずヒアルロン酸を中心とした細胞接着及び増殖の検討を行った。

1-(2)　ベースをヒアルロン酸にした4種類の細胞外マトリックスとフィーダー細胞、ES細胞の接着の検証

1-(1) の実施に於いて、ヒアルロン酸が細胞接着に有効であることを見出したので、次にヒアルロン酸をベースにして、①分子量の異なるもの（36 万、120 万）、②グリセリン、ポリペプチドの混在による接着、増殖の増強、③基材の固定化、④基材の透明性の確保について検討することにした。これらの結果から、新たな細胞コート剤が開発されることを期待した。

【スクリーニングした基材】

① 0.1% HA（ヒアルロン酸）/0.06% グリセリン水溶液

② 0.1% HA 030/0.1% 低分子ポリペプチド水溶液

③ 0.1%HA100/0.06% グリセリン水溶液

④ 0.1% HA 100/0.1% 低分子ポリペプチド水溶液

これらの水溶液 5.1 gを 3 cmプレートに入れて風乾した。計算上 0.6 g /cm2 コートされ、厚みは①と③が 8 μm、②と④が 10 μmになる。これらは通常の 3 cmプラスチックプレートに塗布した。各々 5 枚づつ準備した。

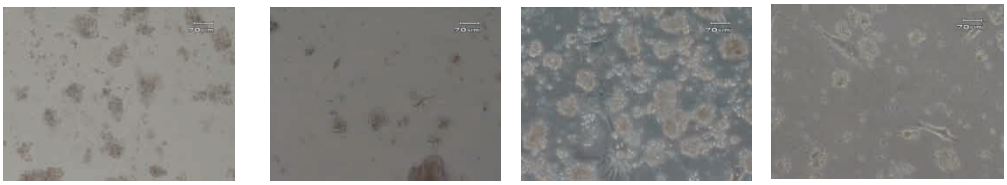
今回のプロジェクトでは段階を踏んで検討する時間が限られていたため、結果が明確になる前に、接着の検証を行う必要があった。そこで製作途中の未完成な機能性シャーレ（CellHome 試作品）にあえて①と②を塗布した。2 枚準備した。

1-(2)- 1 実施 1

最初に ES 細胞の接着を見た。もし接着しなければ、PBS で洗浄しフィーダー細胞を接着させることにした。使用した細胞の種類、実施方法は 2-（1）に同じである。

①実施結果

①、②、③、④のいずれにも接着しなかった。②、③、④に残存したフィーダー細胞の接着が見られた（図 4）。①には接着しなかった。



【図 4】a HA030 ＋グリセリン　HA030 ＋低分子ポリペプチド　HA100 ＋グリセリン　HA100 ＋低分子ポリペプチド

② 結論

ヒアルロン酸を主体とした基材にヒトES細胞は直接接着することはない。しかし、フィーダー細胞は接着する。

1-(2)-2 実施 2

フィーダー細胞に焦点を当て、繰り返し検討した。実施方法は上記に同じである。4種類の基材に対するフィーダー細胞の接着に関する検証。

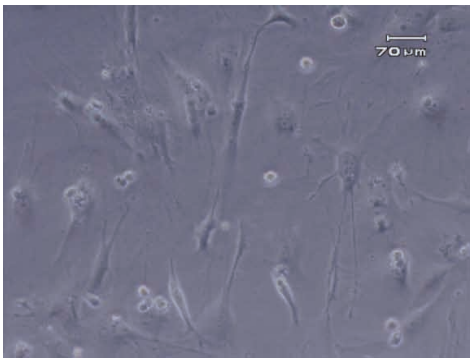
① 実施結果

実施 1 において、①にはフィーダー細胞は接着しなかった。実施 2 ではその後 3 回繰り返し、接着することは認めたが、その量はほかの条件の基材に比較すれば少量であった（表 4）。また、伸展がやや貧弱であった。

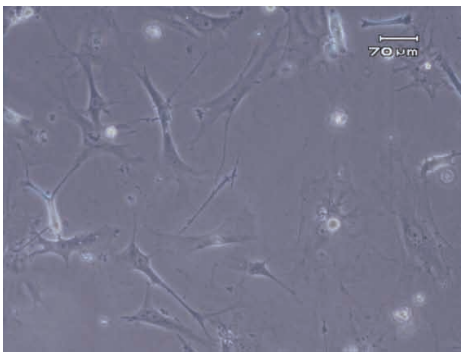
基材の種類	細胞接着数/ 0.5mm²(3 枚のデッシュの平均)
1. HA030/グリセリン	7
2. HA030/低分子ポリペプチド	16
3. HA100/グリセリン	24
4. HA100/低分子ポリペプチド	20

【表 4】

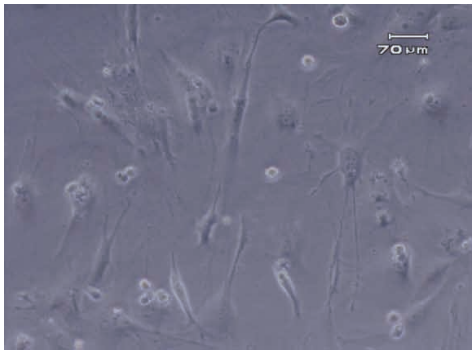
フィーダ細胞は②、③、④には接着したが、もっともよかったのは③で量、伸展いずれも優れていた（図 5)。しかし、末端まで繊細に伸展しているのはポリペプチドを加えた基材であり、通常実施しているものに遜色なかった。



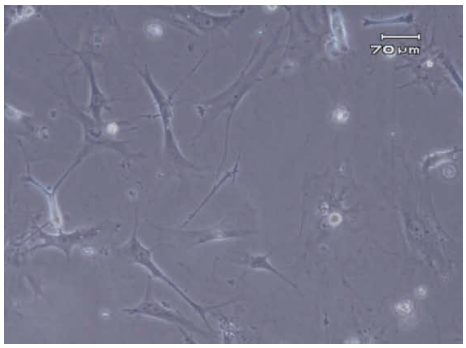
【図 5a】① HA100(グリセリン)



【図 5b】② HA100（低分子ポリペプチド）



【図 5c】③ HA100(グリセリン)



【図 5】④ HA100（低分子ポリペプチド）

② 結論

HA 100 の高分子素材が適切、HA 030 はかなり悪い。ポリペプチドを加えることでHA 030 の接着の悪さをある程度回復させることができるが、あえて商品化するだけの価値はない。

HA 100 で比較した場合、グリセリンの方がよくつくように見えるが、細胞の伸展の仕方を比較してみると、ポリペプチドの方が、突起が細く、末端まで伸びていた。

1-(2)-3 実施 3

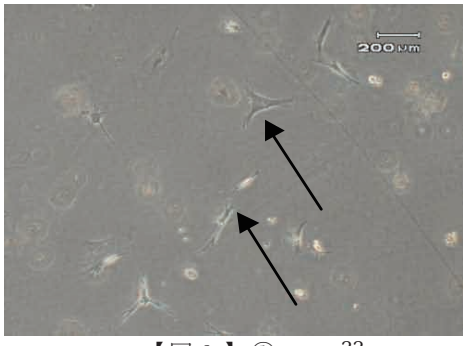
ここではフィーダー細胞が接着したプレートにヒト ES 細胞が接着し、増殖するかを調べた。ヒト ES 細胞の播種の方法は上記で記載した通りである。その際、株による違いがないことを確認するために、ヒトES細胞株をさらに一株追加した（京都株3 khES3)。それぞれプレート 2 枚を用いて行い、再現性をとった。いずれも播種した後4日目に比較した。

① 実施結果

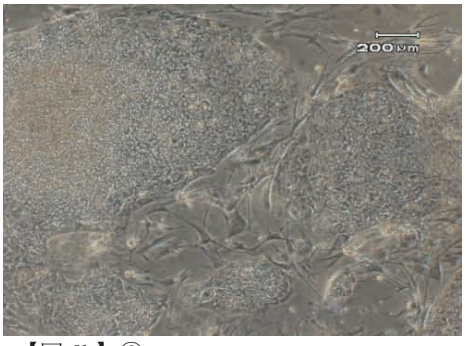
京都株 1 の所見（図 6)

① HA030（グリセリン）

フィーダー細胞はわずかに存在しているが（矢印)、伸展が貧弱で、この条件ではヒト EES 細胞は接着しなかった（図 6a)。ポリペプチドを加えると、この欠陥は是正された (図 6b)。

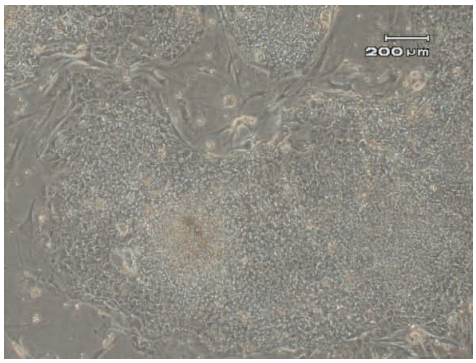


【図 6a】①

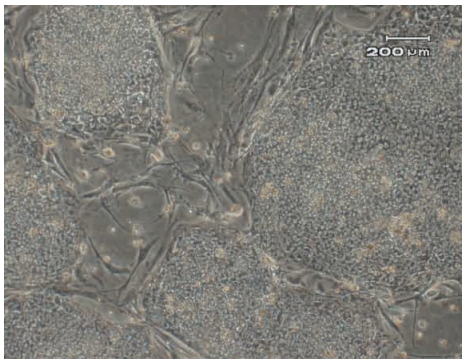


【図 6b】②

しかし、ヒトES細胞の接着は高分子のヒアルロン酸を使用するだけで、劇的に変化し増強した（図6c）。ポリペプチドを加えると、コロニーの数や、周囲への広がりにおいてさらに好ましい方に改善されるように見えるが（図6d）、その差は決定的ではない。

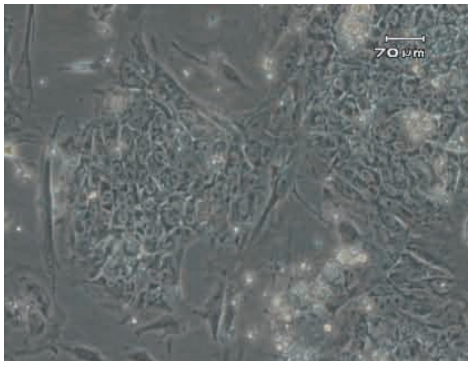


【図6c】①

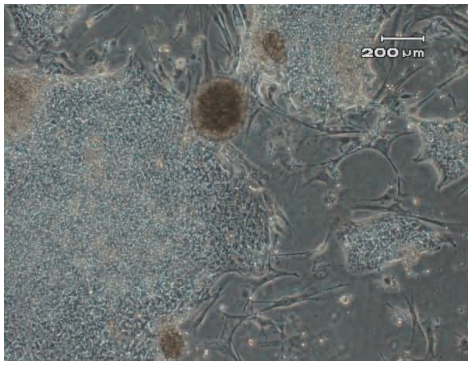


【図6d】②

この株を用いて、播種後2日目と4日目を比較し、増殖の傾向を確認した。例として④の変化を示すが、②、③いずれも同じである。2日目のコロニーでは、個々の細胞を確認できるが（図7a）、4日目にはコロニーの大きさが、直径で比較すると5−6倍、全体が緻密になり、一個一個の細胞を識別するのが困難になる（図7b）。



【図7a】④2日目

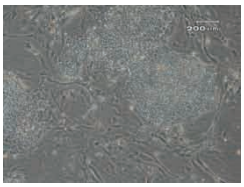


【図7b】④4日目

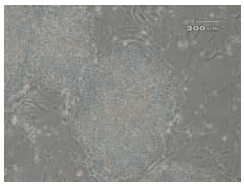
京都株3の所見（図8）

傾向は京都株1と同じであり、これらの基材に対する細胞株間の差はなかった。

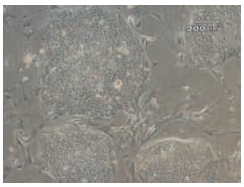
【図8a】①



【図8b】②



【図8c】③



【図8b】④

②結論

各基材に対するフィーダー細胞接着後のヒトES細胞の接着は、HA030の①の場合、フィーダー細胞が少量存在しているのにも関わらず、ほとんどみられなかった。フィーダー細胞の伸展や接着数からみて、HA030はフィーダー細胞にフィーダー細胞としての役割を発揮させていないことが示唆される。それ以外の基材ではヒトES細胞の接着、増殖は確保された。

以上より、新規のシャーレコート剤として

0.1%HA100/0.06%グリセリン水溶液

0.1%HA 100/0.1%低分子ポリペプチド水溶液

が適切であり、商品化する価値があると判断する。

価格を考慮するならば、0.1%HA100/0.06%グリセリン水溶液がよい。

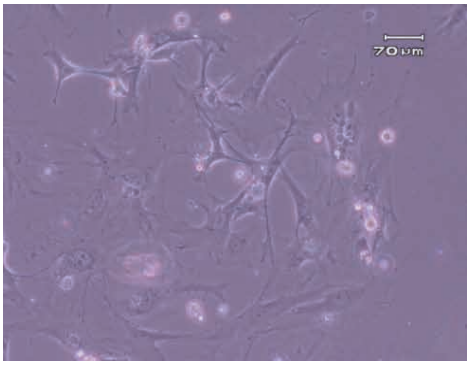
1-(3) 2種類の基材を塗布した機能性シャーレ（CellHome）に対するフィーダー細胞、ES 細胞接着の検証

1-(3)-1 実施

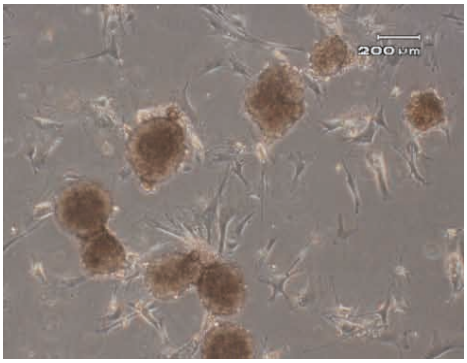
もし、1-(2) の結果がわかっていれば、CellHome には③、④をコートしたであろう。しかし、時間が限られていたため、結果が不明な段階で、①、②を選択し機能性シャーレ（CellHome）に塗布し、細胞を播種した。

① 実施結果

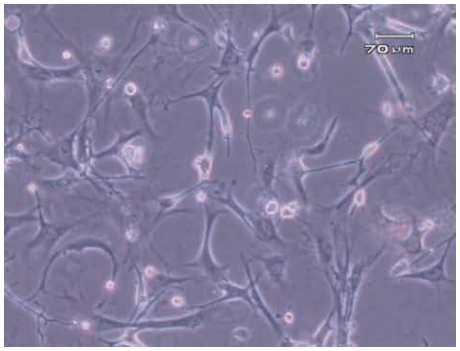
当然のことながら、①にはフィーダー細胞はつくが、その伸展性は悪く、ヒトES 細胞（京都株 1）は接着しなかった（図 9a,b）。②にはフィーダー細胞、ES 細胞いずれも接着し、伸展或いは増殖した（図 9c,d)。このことから、CellHome の底面（ガラス面）にもヒアルロン酸は固定され、この場合は低分子ポリペプチドが存在することにより細胞接着が促されることが明確になった。



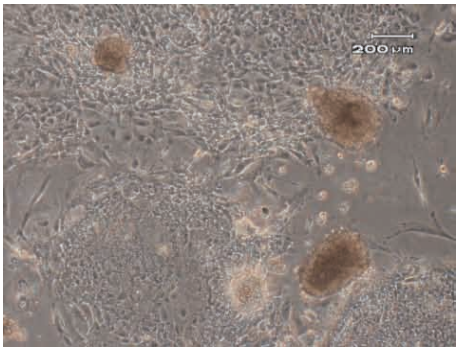
【図 9a】① HA 030（グリセリン）フィーダー細胞



【図 9b】ES 細胞播種、コロニー形成しない



【図 9c】② HA030（ポリペプチド）フィーダ細胞



【図 9d】ES 細胞は接着し増殖する

② 結論

今後、繰り返し実施し、再現性を確認する必要はあるが、CellHome には 0.1% HA 100/0.1% 低分子ポリペプチド水溶液を塗布しておけば、確実に細胞は接着する。

機能性シャーレ（CellHome）に使用する細胞外基質（ECM）対応コートはヒアルロン酸 Na、HA100 が適切である

信州大学に委託された培養に適した新規の細胞外基質（ECM）足場コートの研究・開発について、すべて実施され、結論が得られた。少なくとも今回のプロジェクトに直結する項目において残された課題はない。

2. 機能性シャーレ（CellHome）が提供する培養環境への万能細胞の適合性及び有効性の検証

細胞を培養するためには、培養環境として、一定の温度（37℃）、CO2 濃度（3 ～ 5%）、適切な湿度が求められる。これを実現するため、インキュベータが開発され、現在の細胞培養技術が確立された。しかし、インキュベータはいずれもある程度の容積を有し、高圧 CO2 ボンベを必要とするため、管理は必ずしも容易ではない。同じ性能を有しながら、手軽に扱えて、顕微鏡に簡単にセットでき、輸送にも対応できるような小回りの効く装置が作成されれば、研究への応用が増し、新たな展開と市場が期待できる。

もし、シャーレを制限された範囲内の温度で、直接、温めることができれば、余計なものを一切省いた究極のインキュベータ作成の第一歩になりうる。一方、シャーレは顕微鏡下で観察されるべき宿命を持つ容器であり、絶対不可欠な要件が透明性である。このような要求を満たすものとして浮上してきたのが新素材、ITO 薄膜である。このプロジェクトでは、シャーレの底面に薄いガラスをはり、それを ITO 薄膜で覆い、直接、培地と細胞を温める新規のインキュベータを開発をしようとした。

このような環境の中でまずクリアしなければならない問題は、① ITO 薄膜で覆われたガラスに細胞は接着するか、②培地と細胞を直接温めた場合、細胞はその環境に耐えられるか、③二酸化炭素の供給を極めて小さな容器（シャーレ）に正確に供給できるかである。

信州大学が明らかにしなければならないのは③が行われているという条件で①と②を検討することである。

①ついては、1. で記載したように HA100 を主体としたコート剤を塗布することにより解決できることが示された。しかし、2. を実施するに当たって、1. の結果を待って行うことは、限られた時間の中で不可能と判断した。実際 1. の結果を得たのは、完成した機能性シャーレ（CellHome）を受け取り、試験を開始する直前であった。しかも、2. を実施する期間は2週間前後しかなかった。したがってあらかじめ日常使用している塗布剤の有効性を確認しておき、最悪、その塗布剤で検証しようとした我々の判断は正しかったと考える。

2-(1) 実施 1

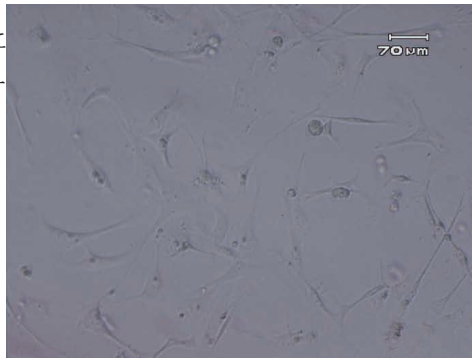
最初に我々がこれまで使ってきたゼラチン、クロム混合材で細胞の接着を試すことにした。この塗布剤は、ヒアルロン酸よりは落ちるかもしれないが、ガラスにもある程度対応できることがわかっていたので、これ使用できるならば、CellHome の細胞環境に関する実施の準備をあらかじめ行うことができ、新規に開発したコート剤を使用できなくとも 2. を実施できるからである。

機能性シャーレの試作品数個（4枚）で試した。0.5%ゼラチン、0.05% Cr(SO4)2
の 3 mlを機能性シャーレの透明電導膜塗布ガラスに塗布し、4℃で 1 日静置した。

次にフィーダー細胞であるMEFを播種した。6 cmプレートに通常蒔く量と 2 倍量のそれぞれ 2 枚づつを準備した。

① 実施結果

4 枚のうち 3 枚は培地が洩れ、受け皿として用意したシャーレに培養液が貯留した。1 枚は一部もれていた。しかし、フィーダー細胞は程よく接着し、伸展も良好だった（図 10）。



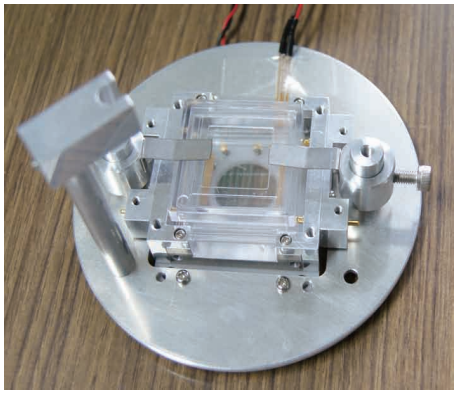
【図 10】 試作品 CellHome へのフィーダー細胞の接着

② 結論

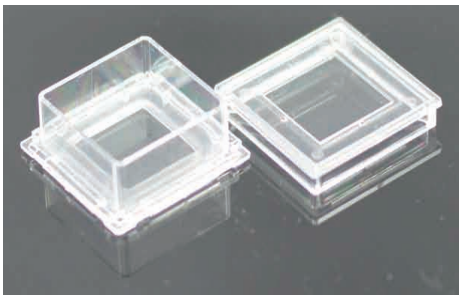
ゼラチン、クロムコートで CellHome の細胞環境を検証することは暫定的に可能である。しかし、クロムを含んでいることから、実際に市場に出す時は、ヒアルロン酸でコートすべきである。漏れの問題は、すぐにフィードバックし、速やかに解決された

2-(2) 実施 2

完成された機能性シャーレ (CellHome) の 2 枚を用いて（図 11)、対象実験を行った。すなわち、CellHome が通常のインキュベータを使う一般の培養方法において、ES 細胞の重要な性質である増殖性、未分化性を確実に保つことを免疫染色法、RT-PCR 法で確認した。
実施1で行った方法で、ゼラチン、クロムでコートし、フィーダー細胞を用意した。次にヒトES細胞を播種した。量、操作は 1. で説明した通りである。使用したヒトES細胞は京都株1である。3日間培養したもので検証した。



【図 11a】ホルダーに固定された機能性シャーレ（CellHome）



【図 11b】CellHome

免疫染色法は次のようなやり方で行った。プレート上に培養した細胞を PBS で 1 ～ 2 回ほど洗浄した。4% PFA で 30 分間固定した。0.1M (PBS) で洗浄した。5 分× 3 回；0.1% Triton を入れ 60 分処理した。この処理により細胞膜に穴をあけ、抗体との反応性を高まる。次に 0.02M PBS で洗浄し（5 分× 3 回)、ブロッキング溶液をいれた。抗体の非特異的な結合を防ぐためである。60 分程度反応させた。ブロッキング溶液を吸い、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体 (Oct3/4、pHH3) をいれて反応させた。そのまま 4℃で一晩放置した。次に抗体液を吸い、0.02M PBS で洗浄した（20 分× 3 回)。ブロッキング溶液で希釈した二次抗体 (goat anti mouse IgG Alexa488/ goat anti rabbit Alexa 568) をいれて 60 分反応させた。抗体液を吸い、0.02M PBS で洗浄した（10 分× 3 回)。ZEISS Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) で観察した。

遺伝子発現（RT-PCR) は次のようにして調べた。
RNA 抽出：TRIZOL 試薬をピペットマンでディッシュへ添加した。ピペッティングを数回行い、細胞を懸濁した。RNase-free のエッペンチューブへ移した。常温、5 分、静置させた。TRIZOL 1ml に対して、0.2ml のクロロホルムを加え、30 秒間、ボルテックスを行った。常温、3 分、静置させた。13000rpm、15 分、4℃ 遠心した。上清を新しいチューブへ移した。TRIZOL1ml に対して、0.2ml のクロロホルムを加え、30 秒間、ボルテックスを行った。常温、10 分 静置させた。13000rpm、10 分、4℃遠心した。ペレットを吸わないように、イソプロピルアルコールで静かに吸出し、TRIZOL と等量の 75% エタノールを加えた。5 秒間、ボルテックスを行った。14,8000rpm、10 分、4℃遠心した。エタノールをピペットで静かに吸出し、air-dry で 10 ～ 30 分ほどペレット(RNA)を乾燥させた。

ペレットを 50ul の RNase-free 水に懸濁した。1ul のサンプルを 49ul の TE Buffer もしくは RNase-free 水に懸濁し、OD260/280 を測定した。CellHome で培養したヒト ES 細胞の未分化維持を確認するため、PCR 法を行った。primer には未分化細胞の指標となる Oct-4、Rex-1 を用いた。今回の RCR 法には、TaKaRa の Ex Taq を使用した。

【PCR 反応液の調製】

下記に示す PCR 反応液を氷上で調製した。

［1 反応あたり］(total 20ul)

試薬	使用量
TaKaRa Ex Taq	0.1ul
10 × Ex Taq Buffer	2ul
dNTP Mixture	0.5ul
Template cDNA	1ul
Primer 3’	0.4ul
Primer 5’	0.4ul
RNase Free dH_2O	up to 20ul

試薬分注後の反応チューブは、即氷上に置いた。サーマルサイクラーに反応チューブをセットし、即スタートさせた。

PCR 反応：ポリメラーゼ連鎖反応を行った。94℃、5 分 (熱変性準備)、94℃、30 秒 (熱変性：DNA の 2 本鎖を 1 本鎖にする)、60℃、30 秒 (1 本鎖になった DNA とプライマーをアニーリングさせる)、72℃、30 秒 (DNA ポリメラーゼ活性により、DNA を合成させる)

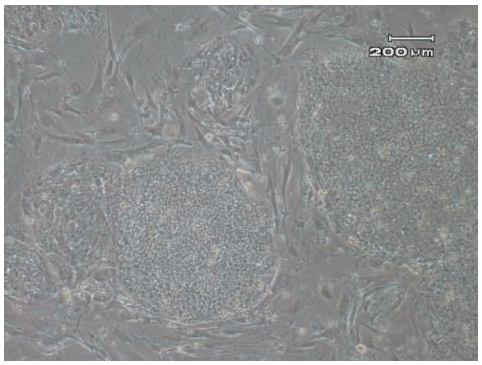
＊上記 3 ステップを 30 サイクル繰り返した。72℃、10 分　4℃。使用した主な未分化 primer は以下の通りである。

Oct-4　5’-cttgctgcagaagtgggtggaggaa-3’ 5’-ctgcagtgtcggtttcgggca-3’　169bp

Rex-1　5’-ggcggaaatagaacctgtca-3’　 5’-cttccaggatgggttgagaa-3’　152bp

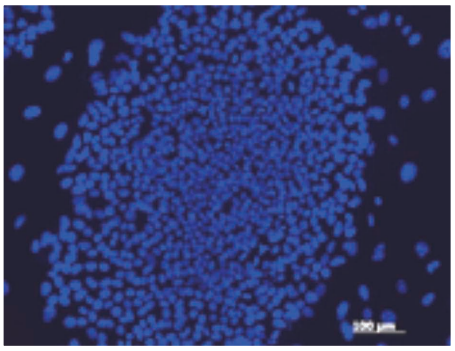
① 実施結果

（図 12）は3日めの ES コロニーであり、通常のインキュベータにおいて CellHome プレートでも問題なく増殖していることがわかった。

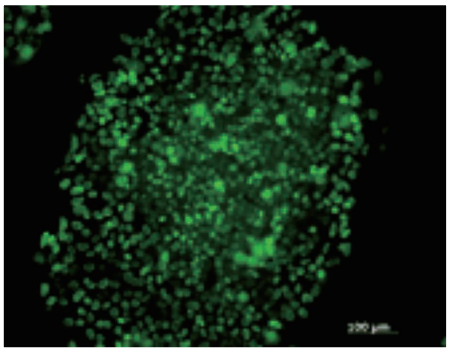


【図 12】対照　通常のインキュベータ内で CellHome に形成された ES 細胞コロニー

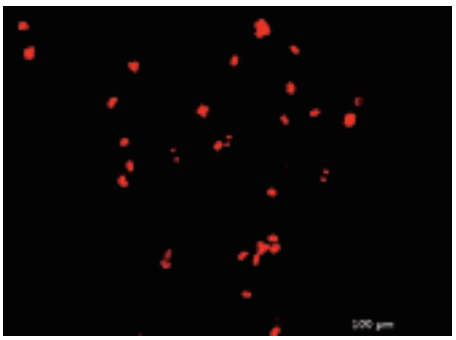
次にこれらの細胞の増殖性（p HH3 マーカー）、未分化性（Oct3/4 マーカー）を見るために、それぞれのマーカーの有無を免疫組織化学法で検証した。図 13 で示すように、通常のヒトES細胞培養と同様に、ITO 膜で培養ガラスを覆ったシャーレにおいても Oct3/4 の発現から未分化を維持し、pHH3 の発現から増殖性を示す細胞を確認することができた。



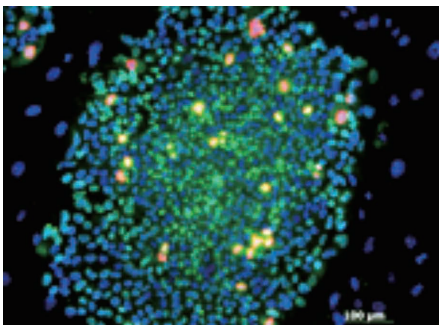
【図 13a】核を DAPI で染色



【図 13b】Oct3/4（未分化マーカー）で染色

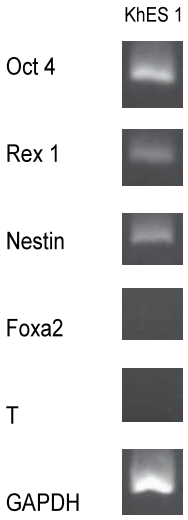


【図 13c】p HH3（増殖マーカー）で染色



【図 13d】a,b,c を同時に示したもの

RT-PCR でも、免疫染色でみられたように、未分化マーカである Oct4, Rex1 のバンドが強く発現しており（図 14）、免疫染色の所見と一致した。



【図 14】RT-PCR　Oct4,Rex1（未分化マーカー）、Nestin（外胚葉マーカー、未分化な状態でもでる場合が多い）、GAPDH　標準指標

② 結論

機能性シャーレ（CellHome）でも、通常のインキュベータで培養した場合、ES 細胞の性質（未分化性、増殖性）は失われない。

2-(3) 実施 3

最後に CellHome 自身の細胞環境によるヒト ES 細胞培養の有効性について検証した。機種システムの詳細については他の項目のところで説明されるので、ここでは、必要最小限にとどめる（図 15)。ホルダーに固定されたむきだしの CellHome には、温度制御可能なヒータ回路（赤い線)、二酸化炭素を供給するチューブが直接固定されている。右のコントロールボックスで温度制御、二酸化炭素の濃度を制御した。設定温度を 32.8℃（その設定温度で実際の培養液の温度は 37℃、予備実験で確認した)、二酸化炭素 3 ～ 4%とした。その後、しばらく機械の作動性をチックし、チューブなどの接続部の小さな不具合などを調整した。温度センサーにおいては 0.2 ～ 0.3 の幅、二酸化炭素濃度の検知については 0.2 前後と微少な幅で制御が可能であった。この程度の幅であれば、細胞へのダメージはほとんどないと考えられた。問題は細胞が接着した部位を直接温めることが、細胞にどのような影響を与えるか予想できないことであり、世界で誰も経験したことがない。もし、その状態で細胞が生存できるならば、余計なものがそぎ落とされた、もっともシンプルな低コストのインキュベータが世に出ることになる。

【図 15a】コントローラー図

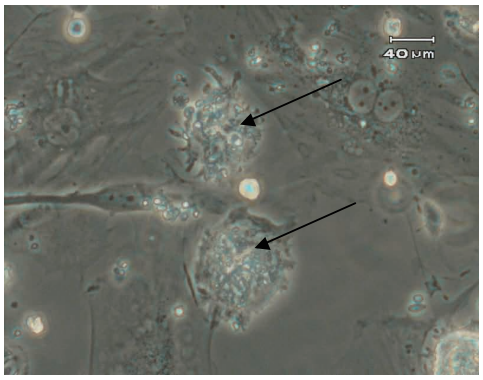
【図 15b】ホルダーに固定された CellHome

前処置：3枚の完成した CellHome にゼラチン、クロムを塗布し、フィーダー細胞を播種した。

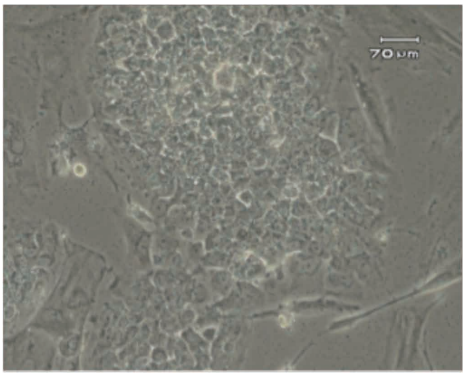
ES 細胞播種：最初の 1 枚にこれまでと同じ ES 細胞の量を播種し、ホルダーにセットし、上記で述べた条件を組み込んで開始した。

① 結果

培地量が適切でなかったため、最初の 1 枚は途中で乾燥し、データをとることができなかった。2 枚目では、培地量を増やした。5 時間後に観察した段階で、ES 細胞が接着していることを確認した（図 16a)。夜間は、トラブルが発生した場合、対応できないと考え、一端通常のインキュベータに戻し、翌日再びセットし、12 時間観察することにした。翌日、セットし経過を見たが、何度か観察を繰り返すうちに、培養液が蓋周囲よりあふれ、それが原因となってコンタミ（細菌感染）を起こし、ES 細胞の大半は剥離してしまった。しかし、総計 17 時間観察した結果、CellHome の環境の中で ES 細胞は接着することだけでなく、さらに増殖することがわかった(図 16b)。



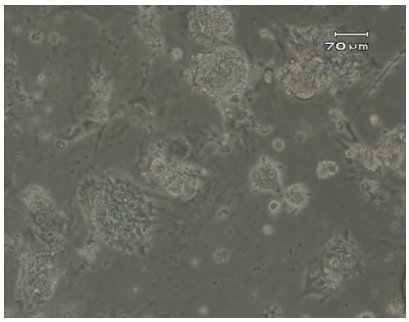
【図 16a】 CellHome 環境で生存し接着し増殖を開始した最初の ES 細胞コロニー（5 時間）



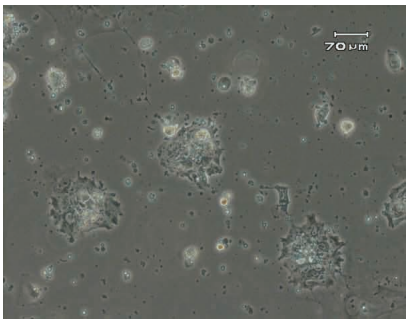
【図 16b】 CellHome 環境で総計 17 時間後の ES 細胞コロニー。増殖している。

最後の 1 枚で次の検証を行った。CellHome の環境を 12 時間連続してみることにした。観察ポイントを 5 時間と 12 時間の 2 点とした。数時間で細胞が接着することを再確認し（5 時間）、12 時間後に 5 時間目より、細胞が増殖していることを確認するためである。これらが証明されれば、CellHome が再生医療の有力な担い手の一つである ES 細胞培養に応用できることが明確になる。コントロールとして、通常のインキュベータ内で、通常のプラスチックシャーレで培養した細胞と比較した。

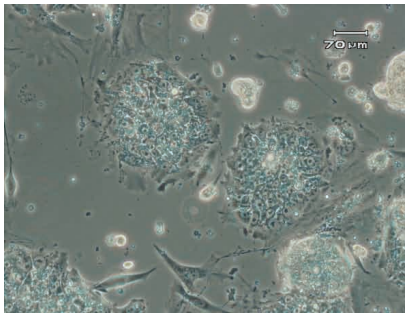
5 時間めでは、2 枚めのプレートと同じように、確実に細胞は接着した。コントロールと比較して決して見劣りしない（図 17a,b）。12 時間後、5 時間と比較し、コロニーは径で約 2 倍に増殖し（面積では 4 倍）、コントロールの増殖割合とほぼ同じであった（表 5）。



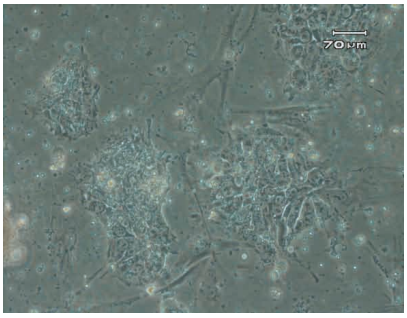
【図 17a】CellHome 環境で 5 時間



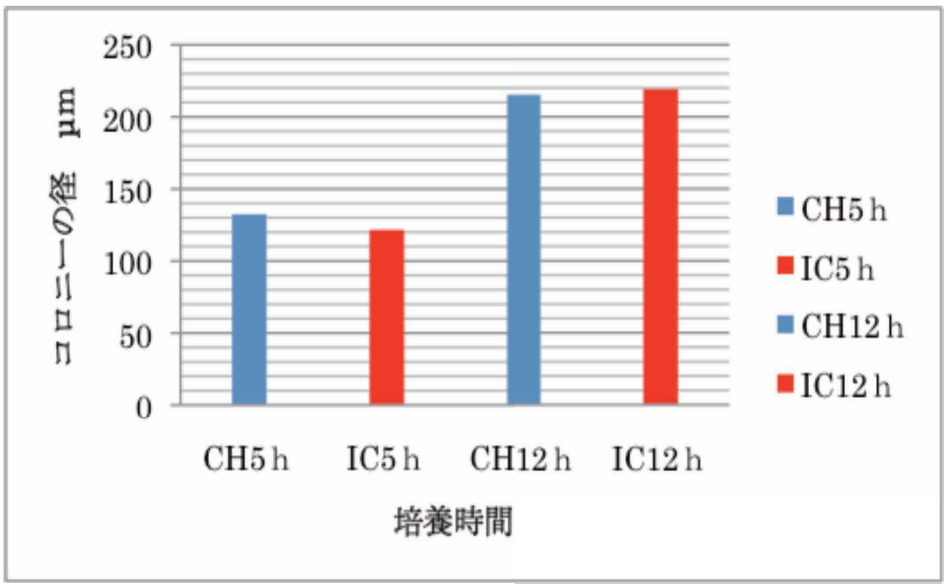
【図 17b】通常のインキュベータ環境で 5 時間



【図 17c】CellHome 環境で 12 時間

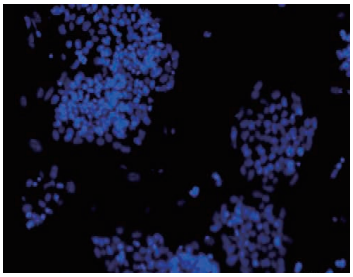


【図 17d】通常のインキュベータ環境で 12 時間

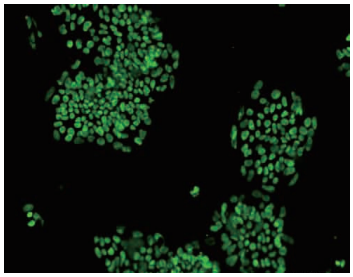


【表 5】 CH:CellHome ; IC: 通常の incubator

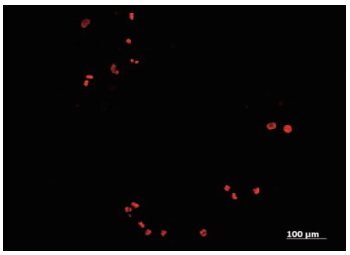
さらに、免疫染色により、未分化能、増殖能は CellHome 培養環境の中で維持されていることがわかった（図18）。



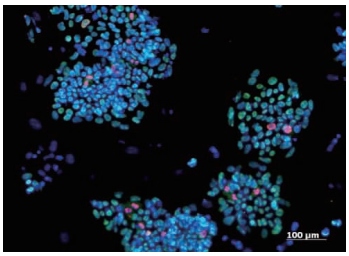
【図 18a】核を DAPI で染色



【図 18b】Oct3/4（未分化マーカー）で染色



【図 18c】p HH3（増殖マーカー）で染色



【図 18d】a,b,c を同時に示したもの

② 結論

以上の結果から、CellHome の培養環境は、十分万能細胞培養に耐えうることが証明できた。また、底面がガラスであったために、蛍光顕微鏡により通常のプラスチックシャーレに比較して極めて鮮明に細胞を観察できた。

> 機能性シャーレ CellHome は万能細胞に適切な培養環境を与える

信州大学に委託された細胞培養における CellHome 環境適正の検証（細胞接着、生存、増殖）について、すべて実施され、結論が得られた。少なくとも今回のプロジェクトに直結する項目において残された課題はない。

今後の課題として、実施期間が短期間であったために繰り返し試行することができなかった。そのため、問題抽出が十分に行うことができず、製品作成に反映できなかった。培地の漏れを指摘し、即座に改良されたのが唯一である。

3. CellHome の市場性と展開について

最後に今回のプロジェクトの意義と CellHome のライフサイエンスにおける位置づけを明確にしてみたい。

途中で触れたように、細胞を直接温めることは、これまで誰も経験したことがなかった。当初、直接に負荷される熱により、細胞ははがれ培養はできないのではないかと推測し、危惧した。しかし、実際、直接熱をかけても生存し、通常のインキュベータと同じように増殖することが明らかになった。これが実現できた大きな理由は ITO を用いた温度制御が極めて優れていたためである。この範囲が 2℃を超えれば、細胞は死滅したであろう。この ITO センサーによる正確な制御は画期的であり、余計なものをすべてカットした究極のインキュベータを作成できることが明確になった。その結果コスト削減を極限まで追求できる。

しかしこれだけではない。ITO 薄膜で細胞培養できることは、いくらでもその面積を広げることが可能であり、かつ薄いが故に何層にも重ねることができることを意味する。すなわち細胞を大量に培養できる。CellHome ではなく Cell Farm として新しい価値が付加されたのである。大量培養技術は細胞供給のための必須の技術である。

一般にはタンクなどで浮遊させ、回転しながら行うが、細菌や酵母ならいざ知らず、哺乳類の細胞は、特にヒト ES 細胞では、このようなデリカシーに欠けた培養ではままならないことが多い。この問題を ITO 薄膜は簡単にクリアしてしまった。

さらに、ITO 薄膜は温度にのみ有効なのではない。ITO 薄膜の基本的なコンセプトは電子制御である。薄膜をコンピュータで管理することにより、例えば、局所的な細胞の剥離や細胞の化学反応などをキーボードでコントロールできるようになる。ITO 薄膜はコンピュータ制御可能な Cell Farm を実現する。細胞治療が日常の医療として位置づけられるようになれば、この機種は大きな市場を獲得することが期待できよう。

今回のプロジェクトはライフサイエンスにおける ITO 薄膜のすこぶる大きな可能性実現のためのささやかな、しかし輝く一歩を踏み出したものといえる。

第 5 章　全体総括

5-1. 研究開発の成果

再生医療で鍵を握る万能細胞の研究等に向けた高機能培養器具の研究開発を行った。培養環境の必須条件である温度制御が可能となる小型培養器を完成させ、細胞への直接加温増殖等の可能性の研究を行い、培養培養実験まで確認することができた。

細胞の住まいとなり、透明導電膜材料の各特性である、電気、光学、物性形体の特性を発揮させる高機能シャーレ & スライドである CellHome(製品呼称) は、その共同研究者である信州大学からも細胞培養のみならず細胞治療と云った再生医療向けの培養器具の扉を開いたとの認識を得る研究となった。

機能性細胞培養器としては以下の研究開発成果が得られた。

①ヒーター回路設計・ITO センサーユニットの研究開発

透明ガラスプレートに ITO 透明導電膜の薄膜加工を行い、次に均一なヒーターとして機能させる為に特殊に研究開発した設計に依る導電回路形成を為した。発熱の均一化と ITO センサーを機能させる設計指針を得ることが出来た。特に透明ヒーターを製造できる設計指針を得たものは大きい。

② ヒーター回路ユニットの複合一体化製法の開発

上記の透明ガラスプレートを、培養容器の底面と蓋面に一体化加工を行う複合化製法としてインサート成形法により開発を行い、試作品を製作し、目標とする形状及び容器性能が得られた。

③ 新規の細胞外基質 ECM 足場材コートの検証・開発及び培養環境温度への適合性研究

ECM としてはヒアルロン酸 Na-100 が有効である事が確認できた。適合性評価としては、万能細胞に適切な培養環境が得られる事を確認出来た。

④　実験結果に基づくフィードバック分析・検証

信州大学に於いて培養環境・温度、付着性・ECM コート組合せ実験を実施検証と、製品システムの不具合情報も入手でき、培養環境に適合化させる製品最適化の対応と設計・製造指針が得られた。

5-2. 研究開発後の課題・事業展開今後の課題

ものづくり研究開発として、限られた研究期間の中で、繰り返された数々の実験・試作を踏まえて得られた考案並びにデータの絶えざる再解釈をする事がいかに大事で有ると云う事が認識させられた。

研究期間中に出来なかった品質管理に係る事項及び、安定した量産化と樹脂の密着性試験等の再検討も必要で有る。生産設備のイニシャルコスト及び量産に向けた金型投資など事業化の課題は有る。しかし、これらの課題は、新技術・新製品として市場に投入する事により、新たな市場を開拓できると予測される。今回の共同研究開発体制を敷く事で関係各機関、会社の相互理解も得られ、参加共同会社の協力の下、より早い事業化の準備を進める。