

平成23年度戦略的基盤技術高度化支援事業

『再生医療等に用いる大型の軟骨組織を高効率に形成する

細胞培養システムの開発』

研究開発成果等報告書

平成25年4月20日

委託者 近畿経済産業局

委託先 NPO法人 近畿バイオインダストリー振興会議

再委託先 株式会社 ジェイテック

独立行政法人 産業総合研究所

国立大学法人 大阪大学

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	1
1-1-1 研究開発の背景	1
1-1-2 研究目的	2
1-1-3 研究目標	2
1-1-3-1 3次元細胞培養装置の開発課題への対応	2
1-1-3-2 再生医療向け細胞培養システムの開発	4
1-2 研究体制	6
1-3 成果概要	7
1-3-1 3次元細胞培養装置の開発課題への対応	7
1-3-2 再生医療向け細胞培養システムの開発	8
1-3-3 プロジェクトの管理、運営	9
1-4 当該研究開発の連絡窓口	9
第2章 本論	10
2-1 3次元細胞培養装置の開発課題への対応	10
2-1-1 大型ベッセルの開発	10
2-1-2 大型組織培養のためのCFCソフトウェアの開発	11
2-1-3 回転培養ユニットの試作	15
2-1-4 大型ベッセルのためのFMEソフトウェアの開発	16
2-1-5 培養液交換ユニットの試作	17
2-1-6 3次元細胞培養装置の実証実験	18
2-2 再生医療向け細胞培養システムの開発	22
2-2-1 セルプロセッシング・アイソレータ本体部の試作	22
2-2-1-1 セルプロセッシング・アイソレータ本体部	23
2-2-1-2 培養操作ユニット（培養液交換ユニット、遠心分離機）	24
2-2-1-3 細胞観察ユニット	25
2-2-2 専用CO ₂ インキュベータの試作	27
2-2-3 除染の有効性の評価	28
第3章 全体総括	30
3-1 まとめ	30
3-1-1 3次元細胞培養装置の開発課題への対応	30
3-1-2 再生医療向け細胞培養システムの開発	31
3-2 研究開発後の課題	32
3-2-1 残された課題	32
3-2-2 新しい課題	32
3-2-2-1 毒性試験への適用	32
3-2-2-2 ドラッグスクリーニング等創薬研究への適用	32
3-3 事業化展開	33
専門用語	34

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

1-1-1 研究開発の背景

再生医療事業において例えば加齢やスポーツなどによる怪我で生じた「変形性関節症」「離断性骨軟骨炎」「外傷性軟骨欠損症」に対して移植する膝等軟骨の再生への期待は大きいですが、実用的に十分大きな再生軟骨はなく、現状の治療法には限界があり、広範囲の欠損に対する高品質な大型の培養軟骨を効率よく形成可能な3次元細胞培養システムの開発が急務であった。

しかし現在再生医療用として製品化されている自動細胞培養装置は全てディッシュやフラスコ等を用いた静置培養で2次元の細胞しか培養できず、移植には限界がある。また軟骨の組織工学では、従来軟骨細胞あるいは骨髄間葉系細胞を軟骨再生に適した足場材料中で増殖させ、適切な成長因子や力学刺激を加え軟骨基質を持った軟骨組織として再生させることが試みられているが、静置式の3次元培養では移植に必要な十分な大きさに培養することが困難であり、培養液の浸透阻害や攪拌によるストレスなどによる懐死などの問題発生や、また培養できても30%以上が異常組織（サフラニンO染色性のない組織）になるなど、品質上問題があった。

そこで独立行政法人 産業技術総合研究所（ナノシステム研究部門植村主任研究員）ではRWV（rotating wall vessel）バイオリアクターを用いた3次元回転培養法についての開発研究を精力的に行い、（特許 4499041 号、US10/581911、CA2548910 及び特許 4974032、US11/917226）細胞を3次元的に培養するRWVバイオリアクターが、3次元細胞組織の構築に威力を発揮し、再生医療のための3次元組織構築、創薬スクリーニングツールとして有用であることを証明した。図1-1-1はウサギ骨髄細胞から大型軟骨組織をRWVバイオリアクターを用いた3次元培養により構築し、ウサギ膝関節に移植した軟骨再生の実験例である。1）

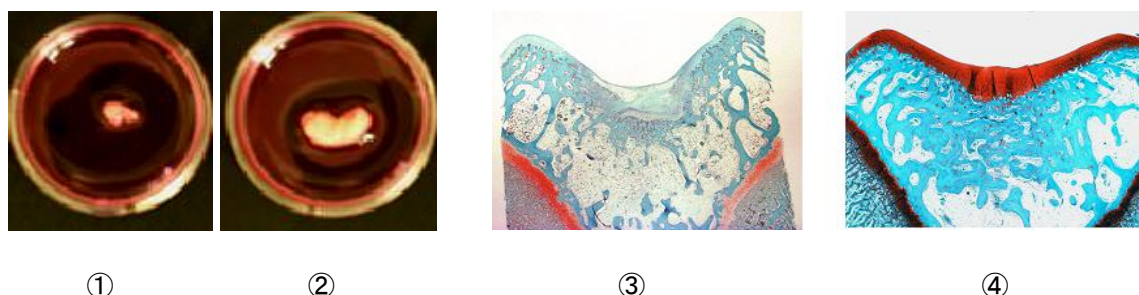


図1-1-1 ウサギ膝関節に移植（RWVバイオリアクター、静置培養との比較）

①はペレット法（静置培養）、②はRWVバイオリアクターによりウサギ骨髄細胞より構築した軟骨様組織（培養4週間）（35mm ディッシュ中）。RWVバイオリアクターにより構築した組織はペレット法に比べて大きさが5倍程度大きいだけでなく、軟骨基質の産生も高く、軟骨の弾力性を有するが、ペレット法による組織は小さく、もろくくずれやすい。④はRWVで構築した軟骨をウサギ膝関節全層欠損モデルにRWV軟骨を移植し、4週後の切片像（コントロールはRWV軟骨を移植しない放置群）を観察した。③の放置群ではほとんど軟骨は再生されていないが、④の移植群では、きわめて良好な軟骨再生が観察された。軟骨部位は軟骨に、軟骨下骨部位は骨に分化誘導されており、良好な骨・軟骨ハイブリッドが形成されている。

さらにヒト患者由来の骨髄細胞を用いても、RWV回転培養により、静置培養に比べて有意に優れた軟骨組織を再生できることが分かった。すなわちヒト患者由来骨髄間葉系幹細胞を用いたRWV軟骨、RWVバイオリアクターで作製した軟骨と湿重量の静置培養との比較をし、RWV培養の方が静置培養に比べて寸法、重量とも圧倒的に大きな組織を構築することができた。2）

1) Repair of large osteochondral defects with cartilage aggregates from bone marrow derived cells using RWV bioreactors, Journal of Orthopaedic Research, 25(10), 1291-1298 (2007)

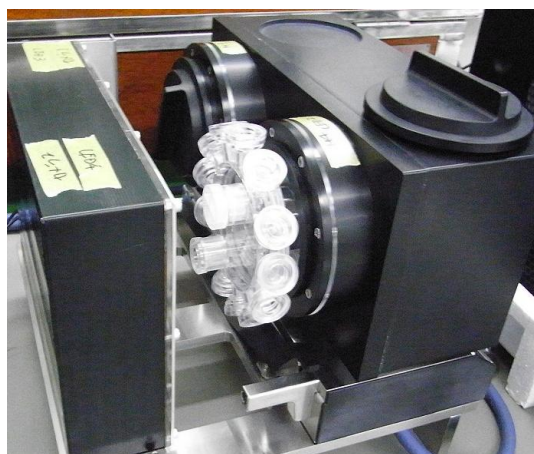
2) “3D structure of hyaline cartilage tissue with adult human bone marrow-derived cells using Rotating Wall Vessel Bioreactor, Journal of Orthopaedic Research 27(4) 517-521 (2009)

また3次元培養のための細胞足場材料の研究開発も盛んであるが、細胞足場材料を使った静地培養では組織できる細胞の大きさに限界があり、3次元培養（回転培養）のための細胞足場材料の研究も進んでいる。

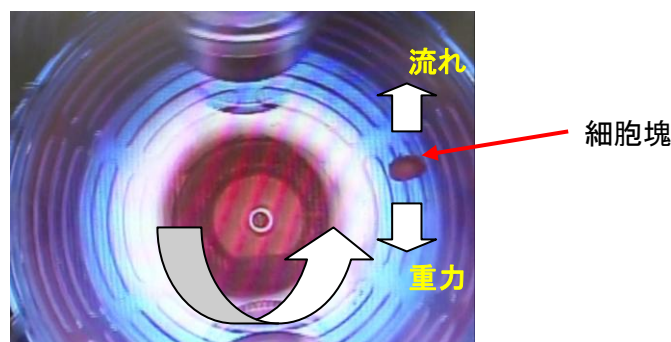
このように回転培養の核となるRWVバイオリアクターは、水平軸方向に回転することにより、

細胞塊が生体内に近い環境、すなわち微小重力下のもと沈降せずフワフワと浮いた状態で培養でき、特に軟骨組織培養に適している。

(株)ジェイテックは産業技術総合研究所とRWVバイオリアクターに変わる新しいベッセルを開発し、(特許 5055479 及び特願 2009-138475、PCT/JP2010/059754) このベッセル(図 1-1-2 参照、ガス透過性膜を装備した円筒形)を用いた軟骨再生技術をもとにCPCのような特別な細胞専用培養施設不要のGMP基準を満たした自動回転培養装置の試作開発に着手し平成21年度補正予算ものづくり中小企業製品開発等支援補助金で産業技術総合研究所の技術協力のもとに形成外科用自動細胞培養装置を完成させ弾性軟骨の再生が可能であることを確認した。そこで産業技術総合研究所(ナノシステム研究部門植村主任研究員ら)は、RWV(rotating wall vessel)バイオリアクターを用いた3次元回転培養法についての研究開発を実施した。



(a)回転培養装置本体



(b)ベッセル

図 1-1-2 回転培養装置及びベッセル

1-1-2 研究目的

患者より採取された間葉系幹細胞を含む骨髓細胞を培養し、分化させて軟骨細胞を得る。次にシャーレ等を使ってある増殖培養により一定の細胞数になるまで2次元培養を実施する。その後移植に有効な大きさになるまで3次元培養を実施し、元の患者の疾患部位に移植する。現在再生医療では患者からの採取後、すべての培養工程のワークエリアを閉鎖系(密封された空間)で実施し、無菌操作を厳密に担保しなければならないとされている。本研究開発では、移植に有効な大型の軟骨組織培養を高効率に形成するために3次元培養工程の中の3次元培養に関する制御ソフトウェアを開発する。

1-1-3 研究目標

従来技術では実現できなかった再生医療に有効な大型培養軟骨を形成するための3次元細胞培養装置を開発するためには、3次元細胞培養に関する制御ソフトウェアの開発が必要不可欠である。

すなわち本研究では小さな細胞から大型培養軟骨まで成長していく細胞塊をストレスなく微小重力下で培養するために、ベッセル内で常に一定領域で浮遊させるための位置制御(CFC: Cell Float Control)ソフトウェア及び大型ベッセル内の古い培養液を残さずに新しい培養液に短時間で置換するための分取分注シリンジ動作制御である培養液交換制御(FME: Flawless Medium Exchange)ソフトウェアを開発し、3次元細胞培養装置(回転培養ユニット、培養液交換ユニット)に組み込むことで従来の静置培養に比べて湿重量で5倍以上、培養時間を1/3に短縮することを目指す。

1-1-3-1 3次元細胞培養装置の開発課題への対応

大型ベッセル、回転培養ユニット及び培養液交換ユニットで構成される本3次元細胞培養装置を試作開発し、細胞培養制御ソフトウェア(CFC及びFME)を組み込み、評価する。

(1) 大型ベッセルの開発(株式会社 ジェイテック)

本3次元細胞培養装置において大型の組織を培養するための大型ベッセルを試作開発する。

このベッセルの外周には培養液交換口が6対及び細胞液注入口/エア抜き口の計7対の口が設

けられており、ここに注射針の付属した培養液/廃液シリンジを刺し込み、培養液を交換する。コンタミ対策として1度使った注入口は2度と使わない。すなわち6回の培養液交換が可能となる。ベッセルは樹脂製（ポリエチレン）で、培養液に接する片側は酸素透過膜である。（特許 5055479 及び特願 2009-138475、PCT/JP/2010/059754）

従来のベッセルは内径φ80mmで容量は50cc程度であり、また細胞取出口の口径から培養できる組織細胞の大きさはせいぜい1cm程度までであり、本研究の目標である3～5cmまでの大型組織を培養するために大型のベッセルを開発する。

また試作した大型ベッセルは密閉テストなどの評価実験を行い、液漏れがないかを確認する。

（2）大型組織培養のためのCFC（Cell Float Control）ソフトウェアの開発（株式会社 ジェイテック）

ベッセル内で細胞塊をストレスなく大型組織になるまで培養するためには、細胞塊をベッセル内で常にフワフワ浮遊した状態である一定領域に保つ必要がある。

もしベッセルの回転が速すぎると細胞塊がベッセルの内壁に衝突し、また遅すぎると底に沈んでしまい細胞塊に衝撃を与え、バラバラに分離してしまう。

本研究開発ではベッセル内の細胞は従来に比べはるかに大きな組織になるまで培養しなければならないが、細胞塊が大きく、重くなるほど常に沈降させずに細胞をベッセルの回転中心付近にリアルタイムに浮遊し続けるように位置制御させることが困難になってくる。

そこで独自の画像処理技術である細胞塊の特徴抽出手法（ICCS：Image Cytometry by Color Separation）及び独自の細胞塊位置決めのための判定ロジック（SRC：Simultaneous optimization of Rotary speed control for Cell float）の最適化をはかり、常に細胞塊を一定領域に浮遊しながら培養を可能とする位置制御を実現するCFC（Cell Float Control）ソフトウェアを開発し試作開発する大型ベッセルに対応した回転培養ユニットに組み込む。

（3）回転培養ユニットの試作（株式会社 ジェイテック、国立大学法人 大阪大学）

大型ベッセルに対応した回転培養ユニットを試作し、上記の独自の画像処理技術である細胞塊の特徴抽出手法（ICCS）及び独自の細胞塊位置決めのための判定ロジック（SRC）の最適化をはかったCFC（Cell Float Control）ソフトウェアを組み込む。

また本回転培養ユニットは通常CO₂インキュベータ内に収納し、耐過酸化水素ガス対応にしなければならない。

尚、本試作開発する回転培養ユニットは、大型ベッセル全域を画像対象としなければならないため、CCDカメラ、レンズ、照明の選定が重要であり、また大型細胞塊及び足場材料など色や濃淡の違う対象物でも色分解して2値化ができるように、照明の光源色の選定確認をする。

さらに回転機構部の空冷化及び低振動タイプのモーター選定による発熱の軽減も考慮する。

（4）大型ベッセルのためのFME（Flawless Medium Exchange）ソフトウェアの開発（株式会社 ジェイテック）

ベッセル内の細胞塊を長期間培養するためには2～5日に一度培養液交換をしなければならない。そこで大容量の大型ベッセルにおいて液漏れによるコンタミ等引き起こし品質に問題が生じない分取分注シリンジのシーケンス動作を検討し、大型ベッセル内の古い培養液をほぼ全量新しい培養液に短時間で置換するためのシリンジ動作の最適化を図った制御（FME：Flawless Medium Exchange）ソフトウェアを開発し、試作開発する大型ベッセル用培養液交換ユニットに組込む。

細胞は一定時間CO₂インキュベータ（培養槽）から出して放置すると死滅してしまう可能性がある。そこでその制限時間の目安である5分以内に培養液交換作業を実施しなければならないが、シリンジ動作が早すぎるとベッセルの酸素透過膜から培養液が漏れてしまう。またベッセル内の古い培養液から新しい培養液に置換するときのシリンジの動作は早くても、遅すぎても培養液を効率よく置換することができないため吸引用シリンジ（古い培養液用）と分注用シリンジ（新しい培養液用）の各動作は同期した最適化動作が必要となる。

(5) 培養液交換ユニットの試作（株式会社 ジェイテック、国立大学法人 大阪大学）

大型ベッセルに対応した培養液交換ユニットを試作し、上記の独自の大型ベッセルのためのFME（Flawless Medium Exchange）ソフトウェアを組み込む。本培養液交換ユニットは耐過酸化水素ガス対応で、通常セルプロセッシング・アイソレータ本体部内に収納する。

本研究で試作開発する培養液交換ユニットでは、細胞のダメージを防ぐために5分以内に培養液交換作業を実施しなければならないが、従来のベッセルよりさらなる大型化に伴い培養液の交換容量がはるかに大きくなる。

そのため大容量の吸引用シリンジ（古い培養液用）と分注用シリンジ（新しい培養液用）の動作制御であるFME（Flawless Medium Exchange）ソフトウェアに対応するために各シリンジ用の各駆動モーターの仕様や内部ギア部分の設計を実施する。

また、過酸化水素ガス滅菌時に加圧する可能性があるため、各シリンジ駆動スライド部のシール部分の耐圧構造を設計しなければならない。

(6) 3次元細胞培養装置の実証実験（独立行政法人 産業技術総合研究所、株式会社 ジェイテック）

研究開発した大型組織培養のためのCFCソフトウェア及び大型ベッセルのためのFMEソフトウェアを組み込んだ3次元細胞培養装置により、実用に資する大型の軟骨細胞組織が形成できることを、インビトロ（生体外での細胞生物学的評価）で生化学的試験、力学的試験、組織化学的試験等を行う。そのための予備試験として、幹細胞である骨髄由来間葉系幹細胞（ヒト由来、およびウサギ由来）、および耳介軟骨膜由来間葉系幹細胞を用い、適切な細胞足場材料の選択、評価、検討を行うことにより、最適な軟骨再生術を確立する。

また従来技術である静置培養と比較し、細胞塊の湿重量が5倍以上の大型培養軟骨の形成を実現し、培養時間を1/3程度に削減することを確認する。

1-1-3-2 再生医療向け細胞培養システムの開発

現在再生医療を臨床応用する場合、通常の医薬品と違い、生きている細胞を使用するために最終滅菌できない。そこで患者からの細胞を採取した後、すべての培養処理工程は高度な無菌管理が必要となる。すなわち培養処理を実施するアイソレータ内のワークエリアを閉鎖系（密封された状態）にし、過酸化水素蒸気を利用して除染することにより、グレードA（クラス100）の無菌操作が厳密に担保されなければならない。

すなわち1患者の細胞操作、培養観察といったすべての細胞処理工程を閉鎖系で実現する必要があり、通常再生医療用の閉鎖系アイソレータ内には培養に必要な遠心分離器や細胞観察用顕微鏡システムを内蔵し、大規模なクリーンルームを必要とすることなく、細胞操作、培養、観察といったすべての細胞処理工程を無菌環境下で行わなければならない。

そこで本研究で開発するソフトウェアを組み込んだ3次元培養装置を再生医療に適用するために本3次元培養装置を内蔵する閉鎖系のセルプロセッシング・アイソレータを開発し、さらに3次元培養の前処理の細胞操作が可能な2次元培養液交換ユニット、遠心分離機、細胞観察システムを開発し、内蔵する。

(1) セルプロセッシング・アイソレータ本体部の試作（株式会社 ジェイテック、国立大学法人 大阪大学）

(1)-1 セルプロセッシング・アイソレータ本体部

3次元細胞培養装置（培養液交換ユニット、回転培養ユニット）を収納する過酸化水素蒸気を利用した除染機能を有したセルプロセッシング・アイソレータ本体部及びその本体部に連結可能な専用CO₂インキュベータを開発する。

再生医療では、本研究で試作開発するセルプロセッシング・アイソレータ内で細胞操作、培養、観察といったすべての細胞処理工程を無菌環境下の閉鎖系で実施しなければならない。すなわち3次元培養の前処理である2次元培養のための細胞操作（培養液交換）もこのアイソレータ内で実施しなければならない。

そこで本研究で試作開発する2次元培養のための細胞操作に必要な各ユニットの操作性や除染の効率を考慮し、レイアウト設計しなければならない。

(1)-2 培養操作ユニット：培養液交換ユニット及び遠心分離機（株式会社 ジェイテック、国立大学法人 大阪大学）

セルプロセッシング・アイソレータ内で細胞操作、培養、観察といったすべての細胞処理工程を無菌環境下の閉鎖系で実施するために3次元培養の前処理である2次元培養のための細胞操作（培養液交換、遠心分離）もこのアイソレータ内で実施しなければならないが、このときの操作は手作業により、コンタミの発生や細胞の成長具合など作業者によって個人差があり、効率面や品質面に問題を生じる可能性がある。

そこで効率よく、品質の安定した2次元細胞操作が可能な前処理用培養液交換ユニットを開発する。この装置もセルプロセッシング・アイソレータ内に蔵し、半自動的なものにする。

すなわち培養液交換は3～5日程度に1回の頻度のため大掛かりな全自動化を図ってもコスト面で採算が合わない、そこでディッシュのインキュベータの取り出しや培養液交換ユニットへのセット作業等は、手作業で実施することを想定し、低コスト化を実現する。

(1)-3 細胞観察ユニット（株式会社 ジェイテック、国立大学法人 大阪大学）

3次元培養の前処理である2次元培養のための細胞操作（培養液交換）では、常にコンタミの発生や細胞の成長具合などを観察しなければならない。そこでアイソレータ内に細胞観察が可能な位相差型の顕微鏡による細胞観察ユニットを開発する。

この顕微鏡ユニットは、細胞が鮮明に観察できるように位相差型にし、ディッシュのセットが容易なように下からの観察が可能なような光学系にする。

(2) 専用CO₂インキュベータの開発（株式会社 ジェイテック、国立大学法人 大阪大学）

本CO₂インキュベータは通常の培養可能な条件を満たすだけでなく、CO₂インキュベータ内部には、回転培養ユニット及び2次元培養時のフラスコを収納し、またセルプロセッシング・アイソレータへの接続が可能で、庫内は耐過酸化水素ガス仕様（材質、密閉性）でなければならない。

よって専用CO₂インキュベータを開発する上での課題は、内部材料がすべて耐過酸化水素ガス仕様（鉄製不可）でなければならないという点で温度及びCO₂ガスセンサ、内部ファンなどの選定が必要である。特に内部ファンはシール部分の除染の構造を検討しなければならない。またセルプロセッシング・アイソレータのシール部分との規格統一を図る必要があり、セルプロセッシング・アイソレータとの接続部の除染時の構造について、除染機能を有する構造を調査し、規格に準拠した設計を実施する。

また内蔵する回転培養ユニットはベッセル培養時の回転速度が上がれば、ユニット筐体の表面温度が培養時の温度（37℃）以上に上昇し、CO₂インキュベータ内の温度が制御不能になる可能性があるため、回転培養ユニット内部の空冷機能を追加するか、あるいはCO₂インキュベータ本体に冷却機能を追加する。

(3) 除染の有効性の評価（株式会社 ジェイテック、国立大学法人 大阪大学）

細胞培養システムの除染の有効性を評価するために除染時にセルプロセッシング・アイソレータ本体部及び専用CO₂インキュベータ内にケミカルインジケータ（CI）を設置し、過酸化水素ガスの到達の有無を確認した。またバイオインジケータ（BI）を各細胞操作箇所に設置し、その結果により除染の有効性を評価する。

本研究開発では表 1-1-1 のスケジュールで研究目標の達成を目指した。

表 1-1-1 研究開発スケジュール

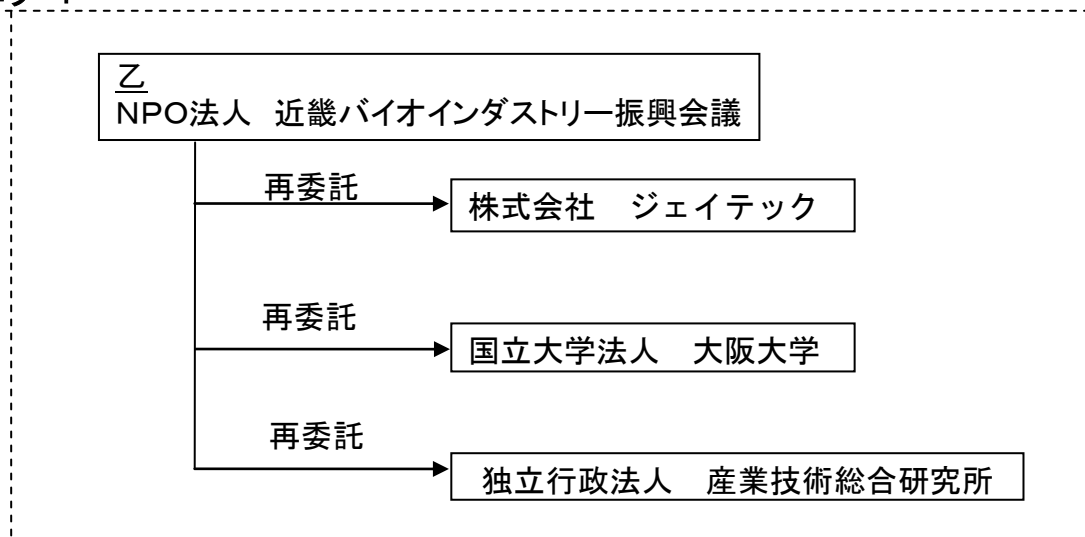
(テーマ：再生医療等に用いる大型の軟骨組織を高効率に形成する細胞培養システムの開発)

実施内容	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月
①3次元細胞培養装置の開発課題への対応												
①-1 大型ベッセルの開発												
①-2 大型組織培養のためのCFCソフトウェアの開発												
①-3 回転培養ユニットの試作												
①-4 大型ベッセルのためのFMEソフトウェアの開発												
①-5 培養液交換ユニットの試作												
①-6 3次元細胞培養装置の実証実験												
②再生医療向け細胞培養システムの開発												
②-1セルプロセッシング・アイソレータの試作												
②-1-1 本体部												
②-1-2 培養操作ユニット												
②-1-3 細胞観察ユニット												
②-2 専用CO ₂ インキュベータの開発												
②-3 除染の有効性の評価												
③プロジェクトの管理・運営												
・委員会の開催	●							●			●	
・報告書作成												→

1-2 研究体制

研究組織（全体）

エラー!



総括研究代表者（PL）
株式会社ジェイテック
代表取締役
津村 尚史

副総括研究代表者（SL）
独立行政法人 産業技術総合研究所
ナノシステム研究部門・部付主任研究員
植村 寿公

1-3 成果概要

本研究開発は下記の各研究項目に対して表1の研究開発スケジュールどおりに遅延なく、それぞれ目標を超える成果を得ることができた。すなわちストレスなく微少重力下で培養するために、小さな細胞から大型培養軟骨まで成長していく細胞塊をベッセル内で常に一定領域で浮遊させるための位置制御（CFC）ソフトウェア及び大型ベッセル内の古い培養液を残さずに新しい培養液に短時間で置換するための培養液交換制御（FME）ソフトウェアを開発し、3次元細胞培養装置（回転培養ユニット、培養液交換ユニット）に組み込み、従来の静置培養に比べて湿重量で5倍以上、培養時間を1/3以上の短縮を実証した。

また3次元細胞培養装置（培養液交換ユニット、回転培養ユニット）を収納する過酸化水素蒸気を利用した除染機能を有したセルプロセッシング・アイソレータ本体部及びその本体部に連結可能な専用CO₂インキュベータを開発し、CO₂インキュベータを含むセルプロセッシング・アイソレータ本体内の除染の有効性を確認した。またさらに品質の安定した2次元細胞操作が可能な前処理用培養液交換ユニットを開発し、すべての培養工程を閉鎖系で実施できる細胞培養システムの目処を立てた。

1-3-1 3次元細胞培養装置の開発課題への対応

(1) 大型ベッセルの開発

従来のベッセルは内径φ80mmで容量は50cc程度であり、また細胞取出口の口径から培養できる組織細胞の大きさはせいぜい1cm程度までであった。そこで本研究の目標である3～5cmまでの大型培養軟骨を培養するために内径はφ80mmのまま厚みを2倍にし、容量を100cc程度にアップしたベッセルの金型を設計し、試作した。

本ベッセルは培養した大型の細胞塊を容易に取り出せるようにベッセル容器を2つに分割できる構造設計をした。

また試作後、密閉テストの評価実験を行い、漏れがないかを確認した。

(2) 大型組織培養のためのCFC（Cell Float Control）ソフトウェアの開発

従来のベッセルと比べ被写界深度の深い大型ベッセルでも、照明条件等の選定及び最適化調整により、細胞塊の特徴抽出手法（ICCS）が可能な、粒子解析による2値化の条件を見出した。また3～5cmまでの大型細胞塊でも細胞塊の位置決めのための判定ロジック（SRC）を見直し、最適化をはかり、細胞が常にある一定領域に浮遊しながら培養可能にした位置制御を実現するCFCソフトウェアを開発し、本研究で試作開発した大型ベッセルに対応した回転培養ユニットに組み込んだ。

(3) 回転培養ユニットの試作

大型ベッセルに対応した回転培養ユニットを試作し、上記の独自の画像処理技術である細胞塊の特徴抽出手法（ICCS）及び独自の細胞塊位置決めのための判定ロジック（SRC）の最適化をはかったCFC（Cell Float Control）ソフトウェアを組み込んだ。

また本回転培養ユニットは通常専用CO₂インキュベータ内に収納し、培養するために、外形寸法を考慮して構造設計を実施した。また過酸化水素ガスに対応するために材料の選定やシールの構造を考慮した。

尚、本試作開発する回転培養ユニットは、大型ベッセル全域を画像対象にし、かつ従来のベッセルに比べて被写界深度が深いため、CCDカメラ及びレンズの選定や、LEDのリング照明の寸法、照射角度、輝度及び光源色の選定など再検討した。また大型細胞塊及び足場材料など色や濃淡の違う対象物でも色分解して2値化ができるように、それぞれに対象物に応じて、照明の光源色の選定確認をした。

さらに回転機構部の空冷化及び低振動タイプのモータを選定し、発熱を軽減した。

(4) 大型ベッセルのためのFME（Flawless Medium Exchange）ソフトウェアの開発

大型ベッセル（容量100cc）において5分以内で液漏れ生じない分取分注シリンジのシーケンス動作を検討し、大型ベッセル内の古い培養液をほぼ全量新しい培養液に短時間で置換するためのシリンジ動作の最適化を図った制御（FME：Flawless Medium Exchange）ソフトウェアを開発した。

(5) 培養液交換ユニットの試作

本研究で試作開発する培養液交換ユニットは、ベッセルの大型化に伴い培養液の交換容量がはるかに大きく、短時間での交換作業が必要になる。

そこで大容量の各シリンジ(吸引用、分注用)動作制御である FME (Flawless Medium Exchange) ソフトウェアに対応するために各シリンジ用の各駆動モーターは高出力、高速/高精度タイプのものを選定し、また内部ギア部分の高倍率(高精度化)設計を実施し、培養液交換ユニットを試作し、上記の独自の大型ベッセルのための FME ソフトウェアを組み込んだ。

また、本培養液交換ユニットはセルプロセッシング・アイソレータ本体部内に収納するため各シリンジ駆動スライド部のシール部分を耐圧構造にし、耐過酸化水素ガス対応の材料を選定した。

(6) 3次元細胞培養装置の実証実験

本研究で開発した大型組織培養のための C F C ソフトウェア及び大型ベッセルのための FME ソフトウェアを組み込んだ 3 次元細胞培養装置を用い、実用に資する大型の軟骨細胞組織が形成できることを確かめた。

まず、RWV 回転培養を行う上で重要な RWV ベッセルの設計を行う上で重要になる酸素透過膜の評価を行い、シリコン製膜などが実用に資することを示した。次に足場材料の検討を行った。予備実験として、多孔性コラーゲンスポンジを足場材料として用いた場合と、足場材料を用いない場合を比較した。G A G (グリコサミノグリカン) 産生量や力学的強度を比較した結果、コラーゲンスポンジを足場材料として用いた方が優位に良質の軟骨組織を再生できることが分かった。次に、認可のとれている 6 種類のコラーゲン系細胞足場材料を検討した結果、臨床応用可能な歯科用コラーゲンスポンジ材料が最適であることを確認した。また、最適な培地の検討も行い、培養条件の最適化を行った。

そのうえで、ヒト由来間葉系幹細胞を用いて 50 cc ベッセルによる 3 次元培養により、静置培養に比べ、湿重量で 8 倍以上、分化の促進効果が 2 倍から 3 倍程度に加速され、合わせて少なくとも 16 倍以上の効果を得ることが確認でき、目標である湿重量 5 倍以上、培養時間(1/3 程度)のあわせて 15 倍を超える高効率化が実現できた。また、100 cc ベッセルにおいて同様の培養が可能であることを確認し、100 cc ベッセルにおいても目標を達成できると目処を立てた。

1-3-2 再生医療向け細胞培養システムの開発

実際の臨床実験に使用できる交差汚染防止対策(過酸化水素ガスによる除染機能)を実装した本 3 次元細胞培養装置を収納できる CO₂ インキュベータ付属の前処理の細胞操作が可能な 2 次元培養液交換ユニット、遠心分離機、細胞観察システムを内蔵したセルプロセッシング・アイソレータを試作開発し、除染の有効性を確認した。

(1) セルプロセッシング・アイソレータ本体部の試作

(1)-1 セルプロセッシング・アイソレータ本体部

3 次元細胞培養装置(培養液交換ユニット、回転培養ユニット)を収納する過酸化水素蒸気を利用した除染機能を有したセルプロセッシング・アイソレータ本体部を開発した。

尚、本体部は専用 CO₂ インキュベータが連結可能であり、特に連結部の除染機能も付属している。また再生医療では、本セルプロセッシング・アイソレータ内で細胞操作、培養、観察といったすべての細胞処理工程を無菌環境下の閉鎖系で実施しなければならないので、本研究で開発する細胞処理工程に必要な 2 次元培養のための細胞操作に必要な機器(培養液交換ユニット、遠心分離機、細胞観察ユニット)の除染効率を考慮したレイアウト設計を実施し、このアイソレータ内に収納した。

(1)-2 培養操作ユニット(培養液交換ユニット及び遠心分離機)

セルプロセッシング・アイソレータ内の限られたスペースの中で、効率よく、品質の安定した 2 次元細胞操作が可能な前処理用培養液交換ユニット及び遠心分離機を開発した。本ユニットは個人差による効率面や品質面の再現性を考慮した半自動的なもので、インキュベータからのディッシュの取り出しや培養液交換ユニットへのセット作業等は、手作業で実施し、低コスト化を実現した。

(1)-3 細胞観察ユニット

細胞のコンタミの発生や細胞の成長具合などを観察するためにアイソレータ内に細胞観察が可能な位相差型の顕微鏡による細胞観察ユニットを開発した。

(2) 専用CO₂インキュベータ

回転培養ユニット及び初期の2次元培養時のフラスコが収納でき、培養可能な専用のCO₂インキュベータを開発した。

庫内は除染時の耐過酸化水素ガス仕様（材質、密閉性）にした。すなわち内部材料がすべて耐過酸化水素ガス仕様（鉄製不可）で温度及びCO₂ガスセンサ、内部ファンなども考慮した。

またセルプロセッシング・アイソレータとの接続部の除染時の構造について、除染機能を有する構造を調査し、設計に反映した。

また内蔵する回転培養ユニットの温度対策として、CO₂インキュベータ本体に冷却機能を追加した。

(3) 除染の有効性の評価

除染の有効性評価はケミカルインジケータ（CI）を用いる事で過酸化水素ガスの到達を確認し、バイオインジケータ（BI）を本アイソレータ庫内及びCO₂インキュベータに設置し、その結果により除染の有効性を評価した。

1-3-3 プロジェクトの管理・運営

下記の日時に関係者と研究開発委員会を開催した。

1. 第一回 2012/3/23 16:00~18:00

（於、大阪市市淀川区宮原3丁目4-30 ニッセイ新大阪ビル）

プロジェクト全体の概要、今年度研究開発について

2. 第二回 2012/10/5 16:00~18:00

（於、大阪市市淀川区宮原3丁目4-30 ニッセイ新大阪ビル）

プロジェクト全体の報告、各機関からの進捗状況報告

3. 第三回 2013/1/16 13:00~17:00

（於、茨木市彩都あさぎ7丁目7-15 彩都バイオインキュベータ ジェイテック開発センター）

プロジェクト進捗状況報告、機械装置見学

1-4 当該研究開発の連絡窓口

株式会社ジェイテック 開発センター

（〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目7番15号 彩都バイオインキュベータ）

代表取締役 津村 尚史

電話 072-643-2292

FAX 072-643-2391

E-mail tsumura@j-tec.co.jp

第2章 本論

2-1 3次元細胞培養装置の開発課題への対応

大型ベッセル、回転培養ユニット及び培養液交換ユニットで構成される本3次元細胞培養装置を試作開発し、実証する。

2-1-1 大型ベッセルの開発

(1) ベッセルの概要

本3次元細胞培養装置で使用する3次元培養を実施する大型ベッセルを試作開発し、密閉テストなどの評価実験を行う。ベッセルの外周には培養液交換口（取入口と取出口）が6対設けられており、ここに培養液交換ユニットにセットされた注射針の付属した培養液/廃液シリンジを刺し込み、培養液を交換する。各交換口はゴム栓で密閉性が確保されているが、コンタミ対策として1度使った注入口は2度と使わない。すなわち6回の培養液交換が可能となる。また、それ以外に細胞液注入口、エア抜き口、細胞取出口が必要である。ベッセルはポリカーボネイト製で、細胞への酸素供給のため培養液に接する片側は酸素透過膜となっている。

(2) 開発、設計

ベッセルの大型化に伴い、内径は $\phi 80\text{ mm}$ のまま、厚みを 20 mm にすることで容量を 1000 cc とし、細胞取り出し方法を細胞取り出し口から全体開閉式取り出しに変更することで大型培養軟骨を容易に取り出すことができるようにした。同時に細胞取り出し口がベッセル正面から削除されることにより回転培養時の画像処理の安定化を向上した。同様に細胞取入口もベッセル外周部に設置することで正面から削除した。

(3) 検証、課題

容量 1000 cc 化、正面取入、取り出し口の外周部への設置、全体開閉式の細胞取り出しへの変更と設計どおり大型ベッセルを製作することができた。

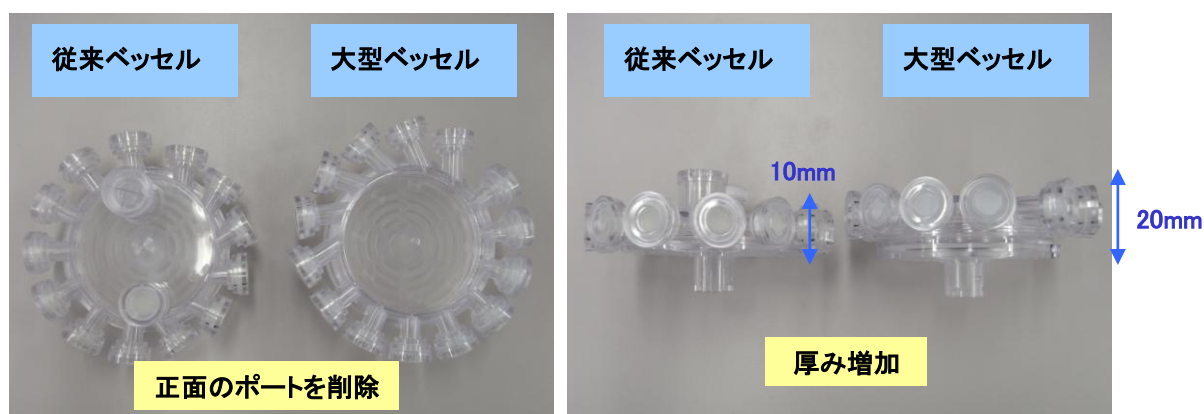


写真 2-1-1 従来ベッセルと大型ベッセルの比較



写真 2-1-2 大型ベッセル培地充填状態（密閉性評価）

2-1-2 大型組織培養のためのCFCソフトウェアの開発

(1) 概要

ベッセル内で細胞塊をストレス無く大型組織になるまで培養するためには、細胞塊をベッセル内で常に浮遊した状態に保つ必要がある。もしベッセルの回転が速すぎると細胞塊がベッセル内壁に衝突し、また遅すぎると底に沈んで細胞塊に衝撃を与えることになり、ばらばらに分離してしまう。本研究開発では、ベッセル内の細胞は従来に比べはるかに大きな組織になるまで培養しなければならないが、細胞塊が大きく重くなるほど常に沈降させずにベッセル内に浮遊し続けるよう位置制御させることが困難になってくる。そこで、今回の研究開発では回転培養装置において開発してきた独自の考え方に基づく細胞塊の特徴抽出手法（ICCS）および、細胞塊位置決めのための判定ロジック（SRC）をさらに進化させ、大型ベッセルを用いたより大きな組織の3次元培養に対応できる新CFC（Cell Float Control）ソフトウェアを開発し、培養ユニットに搭載することに成功した。

(2) 照明・光学系の最適化

一般に画像処理を用いた全てのシステムに共通のもっとも肝要な点はプログラムロジックではなく、いかにして目的とする対象を特徴付けすることが出来るか、というハードウェア、特に照明（照明の形・色・配置）と光学系（カメラ・レンズ）の選択と設計にある。キズや欠点の画像検査が好例であるが、今回の開発に於いても、リアルタイム制御を要求される分、ハードウェアによるところは大変大きい。

(2)-1 照明と照明配置

照明は前面および背面に各色のLED円環照明を実験、検討した結果、図2-1-1のように背面の青色照明だけし、その弊害による弱点を他の工夫で克服することにした。

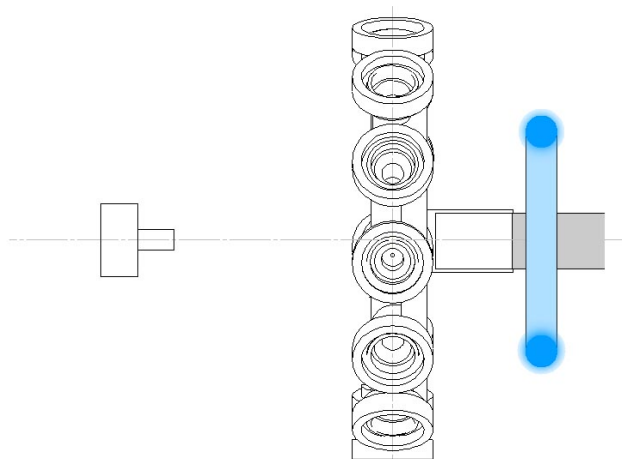


図 2-1-1 回転培養システム照明配置関係（今回の装置）

(2)-2 光学系

回転培養制御に用いるカメラやレンズはスペース上、ノートPCで制御の制約、画質の問題等のより、下記のカメラレンズを選択し、この中から広角で焦点距離の極力短い（ベッセルカメラ間に距離がとれないため）ものを選んだ。

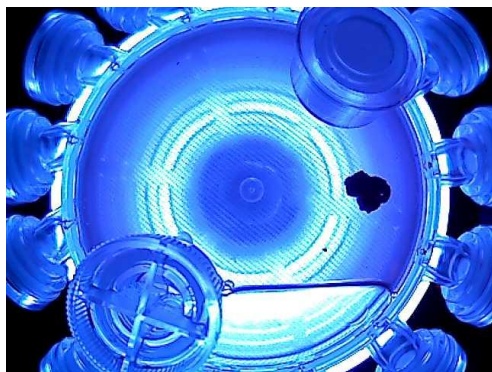
(3) 細胞塊の特徴抽出手法（ICCS）の最適化

前節で示した照明系・光学系の採用により、極めて良質の培養画像を得ることができ、後段の画像処理は飛躍的にシンプルにすることが出来る。

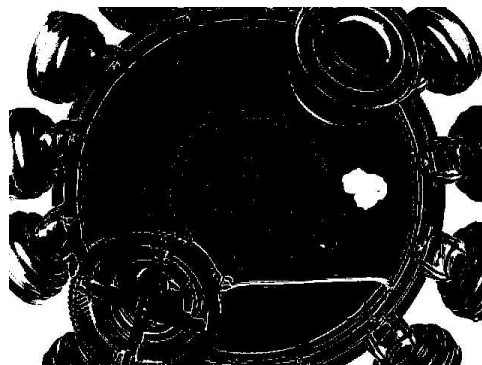
これによって生まれる余力を持って、より多くの特徴量を計算することが出来るようになった。実際、細胞塊が大きくなるにつれ特有の形を形成するような場合があり、また、足場材(スキャホールド)を使って意図的に形を作る場合もあって細胞塊の形や向きあるいはベッセル内での回転運動は3次元培養では大変重要なファクターになってくると思われる。今回の回転培養開発では、形や向きの制御はその目的にないが、将来的な発展を視野に様々な形状特徴量を計算することとした。以下、画像処理の手順を追って各ステップでの詳細を報告する。

(3)-1 2 値化

色や明暗の情報を用いて細胞塊を抜き出す。このためにRGBのカメラ画像情報を人の視覚に近いHCV色空間に変換し、この空間諸量に閾値を課すことで細胞画像を切り分ける。今回は前節の照明・光学系でコントラストの高い画像が得られているため、実質的にはほぼ明度Lだけで切り出すことが出来た。



画像 a 原画像



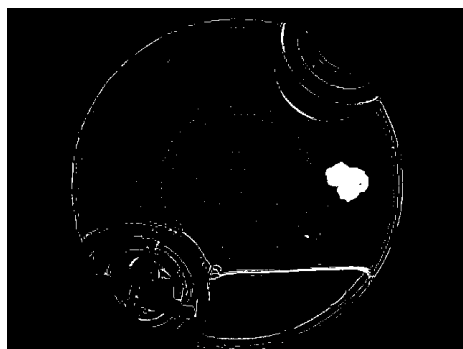
画像 b 二値化画像（反転）

(3)-2 ROI の適用

上図画像に対し、関心領域（ROI）であるベッセル部分の画像を切り出す（画像c）。

(3)-3 収縮・膨張

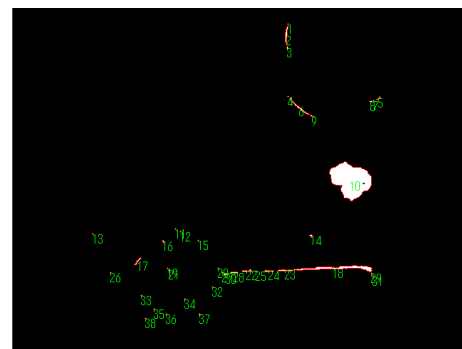
次に画像cには、カメラのノイズやベッセル中で抜けきらなかった泡、細胞投入口の影、場合によっては凝集しきれなかった細胞などに起因する多くの「ゴミ」が含まれている。これらのゴミ画像を後段の処理に送ることは大変な無駄であり、また実際にこれ以降の処理には多数の演算を必要とするため、膨大なCPUの演算ロスを生じてリアルタイム性を阻害する。このため、結果的に若干解像度を犠牲にすることになるが、ここで画像に対し収縮・膨張と呼ばれる処理を施し、小さなゴミを取り除くことにする。適度な収縮・膨張を施した画像dを以下に示す。



画像 c ROI の切り出し



画像 d 収縮・膨張画像



画像 e ラベリング結果

(3)-4 ラベリング処理

画像d中の白い部分が求める細胞塊の候補となる。ここで、ラベリングと呼ばれる手法を用いてこの一つ一つにラベルをつけて識別する。（画像e）ラベリングにはいくつかの手法があり、また、対象の中の穴やさらにその中の島、さらにその中の穴、というようにどの階層までを考慮するかによっても処理が異なる。今回は演算時間の制約もあり、第0階層まででとどめることとした。これは対象の中の穴までは考えないことを意味し、泡が細胞塊と区別できないという弊害もでるが、これは形状特徴量で補うことにする。

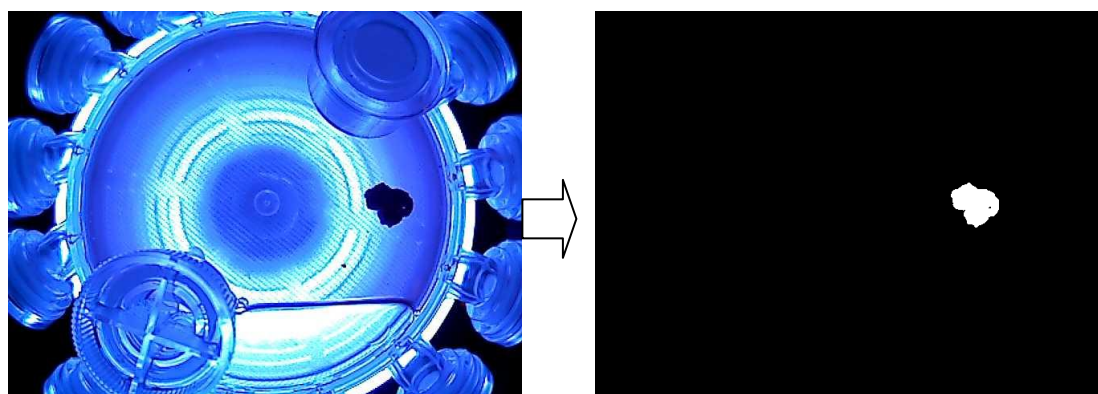
(3)-5 特徴量の計算

ラベリングされた各対象に対し、以下の特徴量を計算する。

- ・面積(穴を考慮しない)
- ・面積(穴や島まで考慮する)
- ・密度
- ・重心座量
- ・包絡矩形
- ・円形度
- ・近似楕円の長軸・短軸
- ・アスペクト比

このうち、密度の値で泡と細胞塊の識別を行い、重心座標で細胞塊の位置を特定する。包絡矩形情報は、以後画像中からこの対象だけを抜き出す際に利用できる。後半の3つの特徴量が形状に関するものである。

面積を第一義に用い密度とアスペクト比に適当な閾値をもうけて細胞画像を切り出した結果が以下の通りである。実際のソフトウェアではこれら3特徴量からスコア付けを行い、上位10までを候補として出力することが出来るようにした。



原画像

細胞塊抽出

(4) 細胞塊位置決め決定ロジック (SRC) の開発

前節の手法 (ICCS) によって得られた細胞塊の位置情報と一定時間において得られる情報の差分情報 (変位 $\div$ 速度) から適切なベッセル回転量を計算し、細胞塊の位置を (ベッセル外の座標系で) 静止した浮遊状態におく手法をここでは SRC (Simultaneous optimization of Rotary speed control for Cell float) と呼ぶ。

SRCの制御フローを図 2-1-2 に示す。ここでX、Yの座標系はベッセルの回転中心を原点に取り、画像右方向をX, また上方向をYとしてベッセル半径を100とした規格化座標であり、Rは同座標系における原点からの距離である。

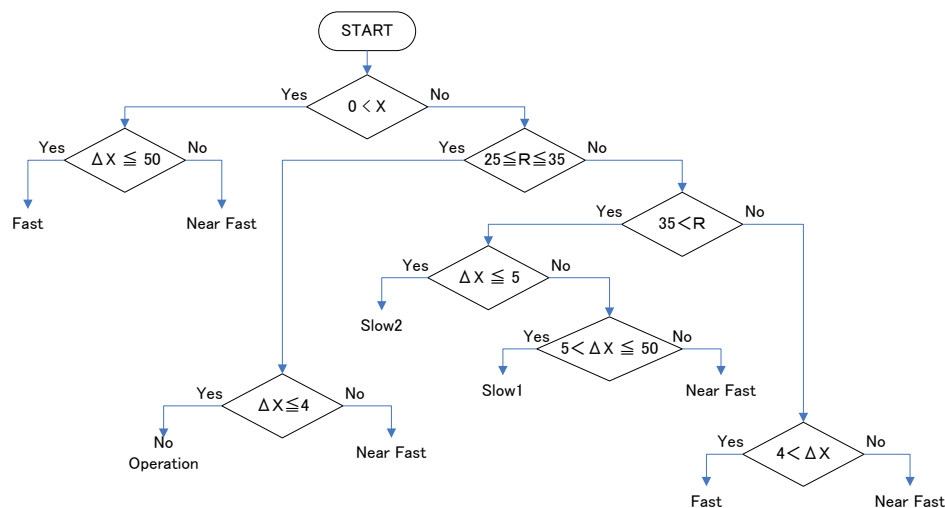


図 2-1-2 SRCフロー

(5) C F C (Cell Float Control) ソフトウェアの開発

また、I C C S、S R Cを組み込んだ操作・制御フローは下図の通り。

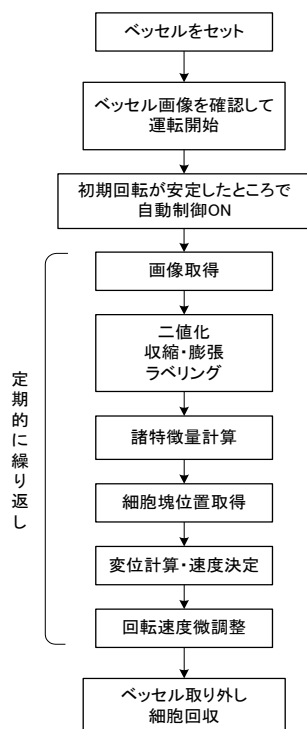


図 2-1-3 回転培養 培養制御フロー

最後に、開発したソフトウェアの外観を図 2-1-4 に示す。

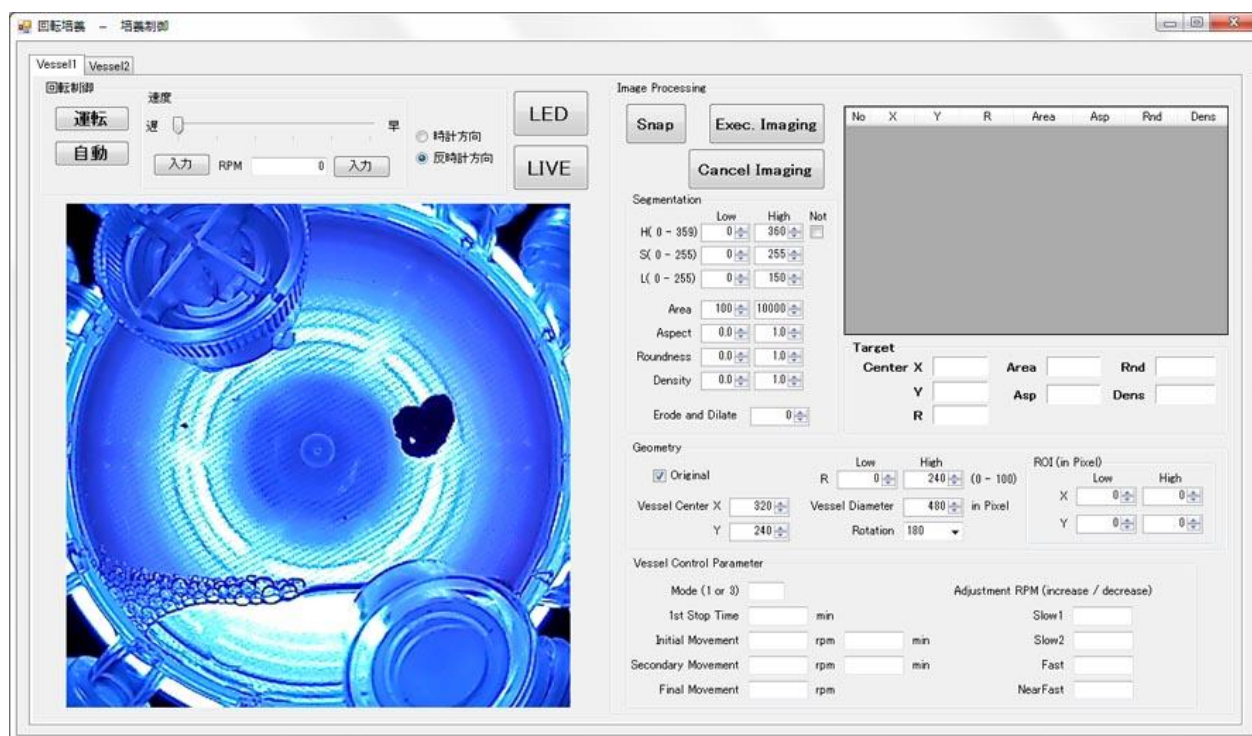


図 2-1-4 回転培養制御ソフトウェア

(6) 評価

本年(2013年)1月に行われた当プロジェクト第3回研究会において、関係者に対しデモンストレーションを行い、良好に浮遊・静止状態を保っていることを確認、一定の評価を得た。また実際に培養操作を行ったところでも良好な状態を維持できることを確認している。より大きな細胞塊で同じように制御できるか、細胞塊がベッセル外壁と干渉した場合や細胞自体が回転を始めた場合にも速やかに元に戻せるかなどが今後の運用を通しての課題である。

2-1-3 回転培養ユニットの試作

(1) 概要

大型ベッセルに対応した回転培養ユニットを試作し、上記の独自の画像処理技術である細胞塊の特徴抽出手法（I C C S）及び独自の細胞塊位置決めのための判定ロジック（S R C）の最適化をはかったC F C（Cell Float Control）ソフトウェアを組み込む。本回転培養ユニットは過酸化水素ガス対応で、C O₂ インキュベータ内に内蔵する。

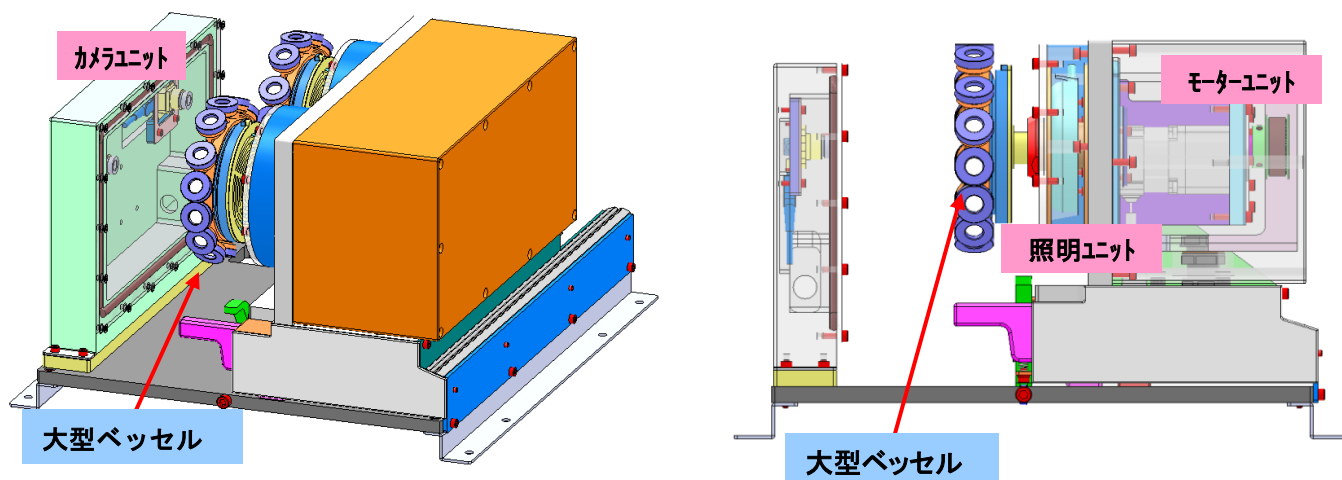


図 2-1-5 回転培養ユニット外観図

(2) 開発、設計

回転培養ユニットはC O₂ インキュベータ内に内蔵され、大型ベッセル内の細胞を培養する。ユニットは、培地交換の際にアイソレータに接続され、アイソレータ内に回転ユニット部分を引き出して大型ベッセルを培養液交換ユニットに着脱する。

そのため、大型ベッセル対応やアイソレータ内への引き出しのための引き出しストロークについて見直す必要があった。また、前記、C F Cソフトに対応したカメラ、照明ユニット設置のための管体についても見直しが必要となる。

全体の軽量化をはかるとともに、インキュベータ内への設置性を考慮した形状への検討を行った。その他の項目としてはベッセル回転用モーターの発熱対策である。これはベッセル回転用モーターの発熱が回転軸を通じてベッセルに伝わり細胞培養に悪影響をおよぼしていた。

そこで、回転用モーターは従来の発熱が懸念されるステッピングモーターから発熱の軽減を考慮したブラシレスモーターに変更した。事前評価により効果が実証されていたが、より発熱を軽減させるためにモーターユニット内の空冷（真空ポンプによる排気）機構を設けた。

さらに回転培養ユニットを内蔵するC O₂ インキュベータにも冷却機能を設けることとで発熱対策を行った。

(3) 検証、課題

カメラ、照明ユニットについては前記のとおり良好な結果を得ることができた。

引き出し量についてはアイソレータグローブを使用してベッセルの取り付け、取り外しが容易にできる位置まで引き出せていることを確認している。

発熱対策についてはブラシレスモーターへの変更と回転軸の断熱部材（ポリカーボネイト製）だけで十分な効果を得ることができており（常温で安定）、モーター内の空冷機構やC O₂ インキュベータの冷却機能は現状使用しなくてもよい状態になっている。

課題としてはカメラ、照明ユニット、モーターケーブルの引き回しがしにくいため、引き回し経路の見直しが必要である。また、空冷機構の要否についても十分確認しておく必要がある。さらには回転培養ユニットのコンパクト化を行えば、インキュベータ、アイソレータ接続部扉も小型化でき、全体としてのコンパクト化が可能となる。

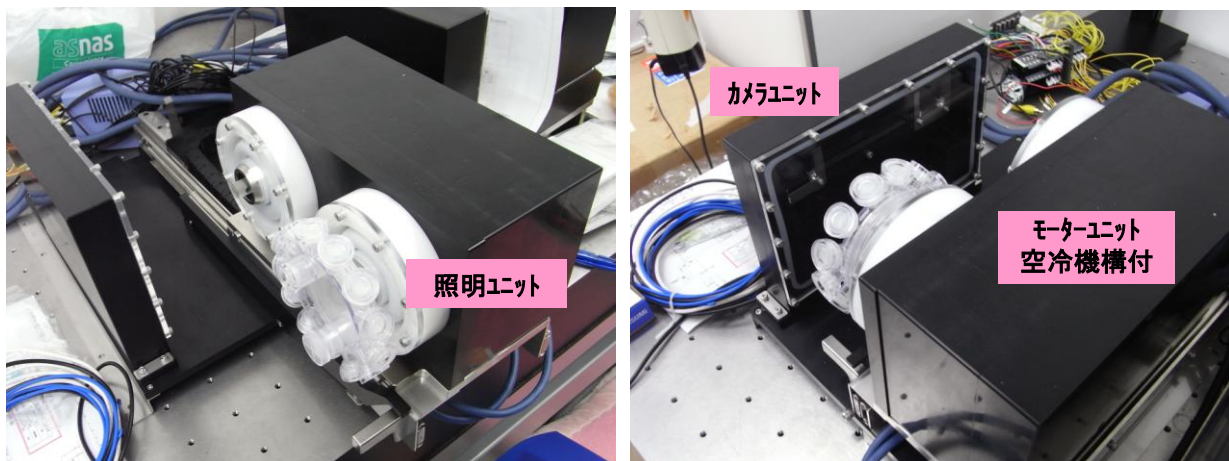


写真 2-1-3 回転培養ユニット

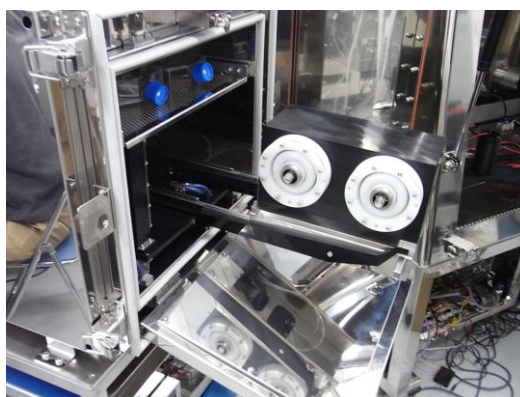


写真 2-1-4 CO₂ インキュベータから引き出した状態

2-1-4 大型ベッセルのためのFMEソフトウェアの開発

(1) 概要

細胞は一定時間CO₂ インキュベータ（培養槽）から出して放置すると死滅してしまう可能性がある。そこでその制限時間の目安である5分以内に培養液交換作業を実現するための下記制御ソフトウェアを開発した。

FME (Flawless Medium Exchange) すなわち培養液交換ユニットの培養液交換制御フローは以下のとおりである。

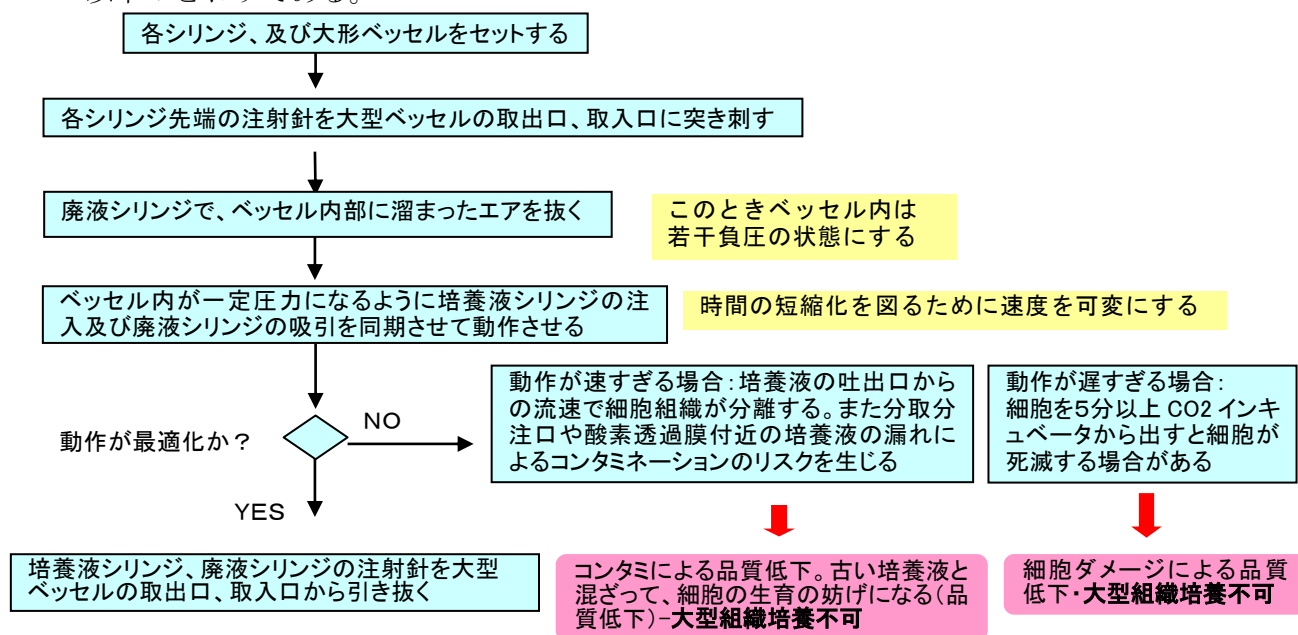


図 2-1-6 培養液交換 制御フロー

(2) 検証、課題

モーターの回転数を変更し、およそ5分、10分、30分を目標に培養液の置換量を検証した結果、培養液の置換率を50%程度とすることで置換時間を5分以内にする事ができた。

ベッセル内から培養液が漏れないようベッセル内をどの程度負圧にする必要が有るかを検証した。培養液交換時に廃液シリンジから動かすことによりベッセル内を負圧にする。培地交換の速度に関係なく、廃液シリンジを5ml 先行させて動かすと最適な置換が実現できた。

今後は5分以内での置換率をあげる方法として培地取入口の口径や方向、取り入れ口と取り出し口の位置関係を含めたベッセル形状の検討や置換率50%での細胞培養の影響について評価が必要である。

2-1-5 培養液交換ユニットの試作

(1) 概要

前記の大型ベッセルに対応した培養液交換ユニットを試作し、独自のFME (Flawless Medium Exchange) ソフトウェアを組み込む。本培養液交換ユニットは過酸化水素ガス対応であり、通常セルプロセッシング・アイソレータ本体部内に収納する。

本培養液交換ユニットは大型ベッセルの培養液交換時に新しい培養液の入ったシリンジと廃液用の空シリンジをセットし、CO₂インキュベータに内蔵された回転培養ユニットから大型ベッセルを取り出してセットすれば、自動的にベッセル内の培養液交換を実施するものである。

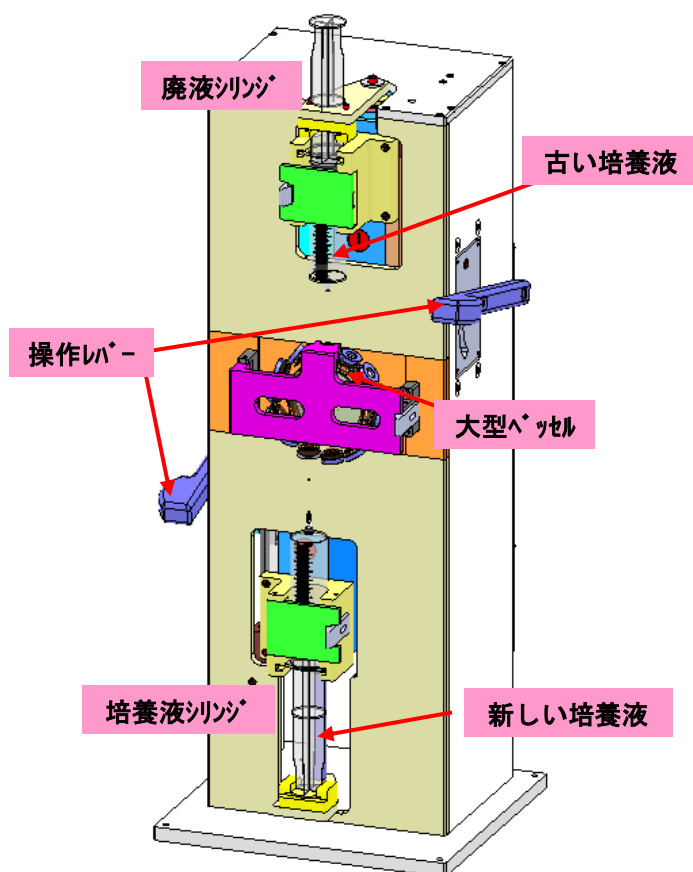


図 2-1-7 培養液交換ユニット外観

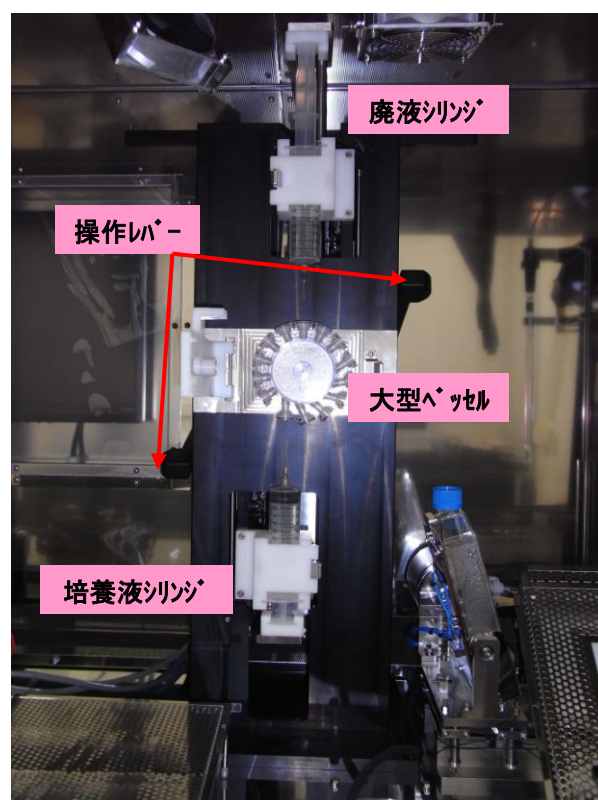


写真 2-1-5 培養液交換ユニット

(2) 開発、設計

培養液交換ユニットはアイソレータ内に設置され、大型ベッセル内の細胞の培地交換を行う。本研究では大型ベッセル化にともない大型ベッセルの取り付け、大容量シリンジ(100ml)への対応を実施するが、細胞のダメージを考慮し従来どおりの5分以内での培地交換作業を目標に実施しなければならない。また、アイソレータ内に設置するため過酸化水素ガス対応である必要があり、各機器のシール性の他に微陽圧雰囲気での耐圧構造にする必要がある。

本研究では、大型ベッセル用ホルダ、大容量シリンジホルダの取り付け位置および形状の設計

を行った。培地交換作業時間については、前記FMEソフトにて検証する。大容量シリンジの駆動のためには従来のモーターより高出力モーターへの変更が必要である。

シール性および耐圧性については従来機から基本設計思想は変わらず、改良部分への形状の変更のみの対応とした。

(3) 検証、課題

大型ベッセル、大容量シリンダへの変更、FMEソフトにより5分以内での培養液交換も前記のとおり問題なく行うことができモーターの選定についても問題ないことの確認ができた。除染評価においても問題なく除染できていることの確認もでき、動作についても問題ない。

また、グローブでの作業も苦もなく行えており、培養液交換ユニットの設置場所、大型ベッセル、大容量シリンジのホルダ部の高さおよび方式についても問題ない結果が得られた。

今後の課題としては回転培養ユニット同様に更なるコンパクト化や除染ガスの滞留を軽減するための構造の単純化等があげられる。

2-1-6 3次元細胞培養装置の実証実験

本研究開発で開発した大型組織培養のためのCFCソフトウェア及び大型ベッセルのためのFMEソフトウェアを組込んだ3次元細胞培養装置により、実用に資する大型の軟骨細胞組織が形成できることを以下の評価実験を実施して確認した。

(1) RWVバイオリアクターベッセルに取り付ける酸素透過膜評価

ウサギ骨髄細胞を用いたRWV培養による軟骨再生の概念図を以下に示す。(図2-1-8、2-1-9)

骨髄間葉系幹細胞の採取と培養

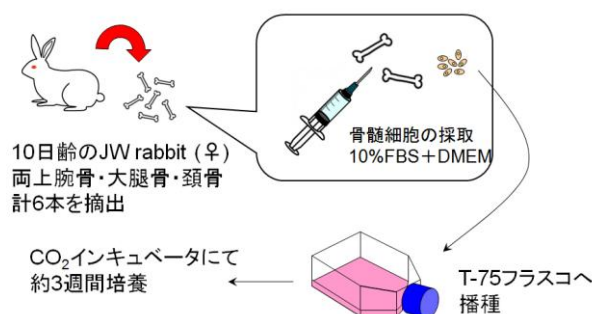


図 2-1-8 骨髄間葉系幹細胞の採取と培養

RWVバイオリアクターを用いた 軟骨分化誘導培養



図 2-1-9 RWVバイオリアクターを用いた
軟骨分化誘導培養

酸素透過膜としてシリコン膜（2種類）、テフロンシート、ナフロン、およびコントロール（シンセコン純製膜）を用いて上記手法で培養した外見的特徴を以下に示す。(図2-1-10、2-1-11)

各RWVバイオリアクターで培養した 細胞塊の外見的特徴①

シリコン0.1mm	シリコン0.2mm	コントロールRWV
・大きさ: 約1.5cm ・表面は硬いが、 軟骨様の弾力あり	・大きさ: 約2.0cm ・表面は硬いが、 軟骨様の弾力あり	・大きさ: 約2.0cm ・表面は硬いが、 軟骨様の弾力あり

図 2-1-10

各RWVバイオリアクターで培養した 細胞塊の外見的特徴②

テフロンシート	ナフロン
・大きさ: 約1.5cm ・表面は硬いが、 軟骨様の弾力あり	・回転培養中は、約2.0cmの 細胞塊が形成されていたが、 培養終了後にリアクターから 取り出すと、バラバラになった。

図 2-1-11

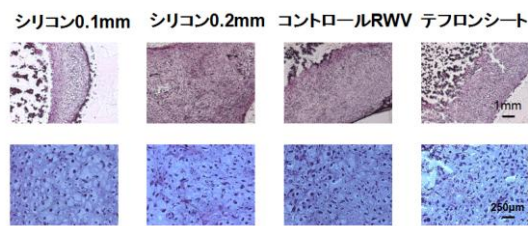
酸素透過膜の違いによるRWV培養細胞塊の外見的特徴①

酸素透過膜の違いによるRWV培養細胞塊の外見的特徴②

また、各細胞塊の組織化学的評価、HE（ヘマトキシリン・エオジン染色、トルイジンブルー染色）結果を以下に示す。(図2-1-12、2-1-13)

各RWVバイオリアクター培養組織の組織学的評価①

・HE染色



各RWVバイオリアクター培養組織の組織学的評価②

・トリジンブルー染色

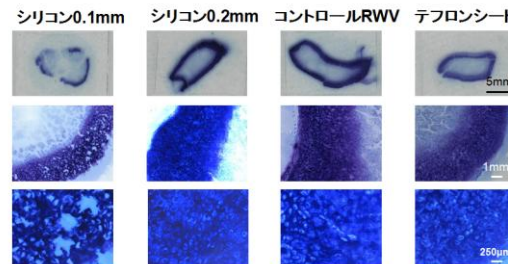


図 2-1-12 酸素透過膜の違いによるRWV培養組織のHE染色像とトリジンブルー染色像

各RWVバイオリアクター培養組織の組織学的評価③

・サフラニン-O染色

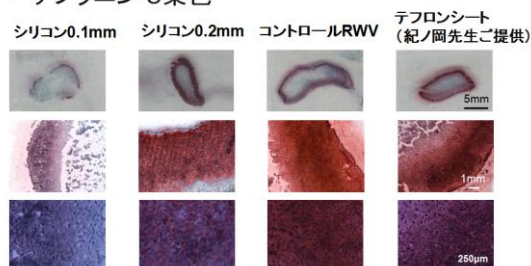


図 2-1-13

酸素透過膜の違いによるRWV培養組織のサフラニン染色像

以上の結果より、シリコン膜を用いたベッセルが有効であることが分かった。

(2) RWV バイオリアクターを用いた培養における細胞足場材料の評価

予備実験として、細胞足場材料としてコラーゲンスポンジを用いた場合と使わない場合を比較した（予備実験では10ccベッセルを用いている）。

実験手法を図 2-1-14 に示す。コラーゲンスポンジを足場材料として用いた場合成形が可能であり、プロテオグリカンなど軟骨基質の産生量が優位に増加すること（図 2-1-15）、力学的強度も早い時点から優位に高い値を示した（図 2-1-16）。

材料(スキャホールド:細胞足場材料)を用いた培養

①コラーゲンスポンジ



図 2-1-14 実験の概念図

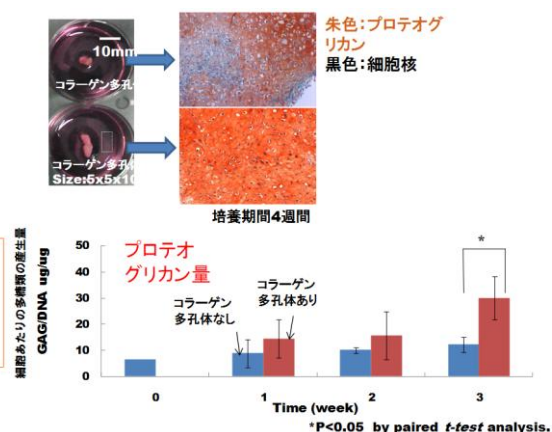
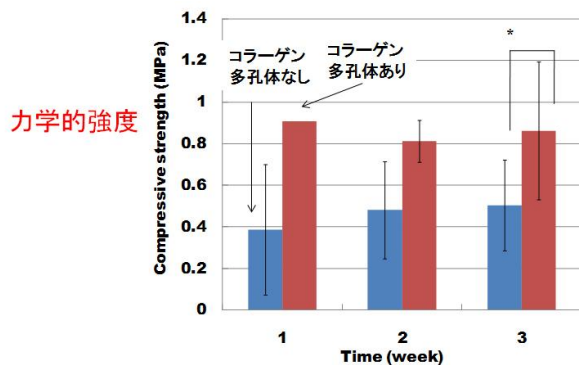


図 2-1-15 コラーゲン足場材料を使った場合とそうでない場合の外見的特徴、サフラニンO染色像、プロテオグリカン量の比較



試験片:
5x5x5mm

図 2-1-16
コラーゲン足場材料を使った場合とそうでない場合の力学的強度

明らかに、多孔性コラーゲンスポンジを用いることにより
良質の軟骨組織が再生できる。

以上より、コラーゲンスポンジを用いた場合、軟骨基質産生の亢進、力学的強度の早期の上昇を得ることができ、多孔性コラーゲンスポンジを用いることにより良質の軟骨組織を再生することができることが示された。

次に、臨床現場で使えるコラーゲンスポンジの検討を行った。対象はすでに臨床現場で用いられている認可されたコラーゲンスポンジである。結果を表 2-1-1 にまとめた。

表 2-1-1 医療機器承認を受けたコラーゲンスポンジの評価結果

医療機器承認を受けたコラーゲンスポンジ(高度管理医療機器)

商品名	販売	形状、特長、用途	評価
ベルナック	グンゼ	シート状人工皮膚	操作性が著しく悪い(台紙に接着している)。回転培養中にはくれてくる。
テルダーミス	オリンパステルモ	シート状 2.5cmx2.5cmx2mm 真皮欠損用グラフト	シート状、操作性良好。軟骨系性能良好。ただし、シート状なのでRWV培養には適さず。
テルプラグ	モリタ	円筒状 コラーゲン使用吸収性局所止血剤(歯科用) 5:8mmφx25mm M:15mmφx25mm	50ccベッセルにはSタイプのテルプラグが適当。細胞播種後、100mmHgで5分、3時間の静置培養後、RWV回転培養。良好な結果を待つ。ある。
インテگران	日本臓器製薬	綿状 コラーゲン使用吸収性局所止血剤	柔らか過ぎる。細胞播種後回転培養中にはぐれて溶けてしまう。
??? 非公開			軟骨組織誘導は可能であるが、RWV回転培養には比重が重く使用できない。

以上の結果より、医療機器承認を受けたコラーゲンスポンジの中で、歯科用材料であるテルプラグが最も適切な細胞足場材料としてのコラーゲンスポンジであると評価できた。

(3) RWV バイオリアクターを用いたヒト骨髄由来間葉系幹細胞の培養における再生軟骨の評価
ヒト患者骨髄由来間葉系幹細胞を用いてRWV培養と静置培養を比較した。外見的比較と湿重量の比較結果を図 2-1-17、2-1-18、2-1-19 に示す。

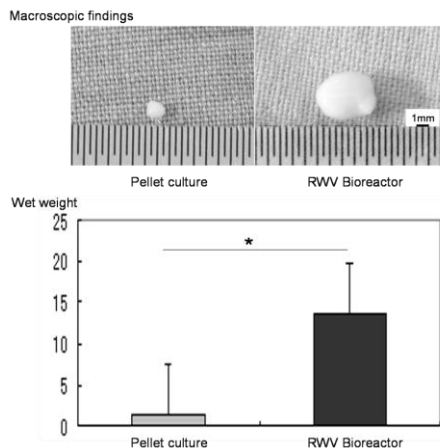


図 2-1-17
静置培養（左）とRWV培養（右）
軟骨組織の外見（上）および湿重量（下）の

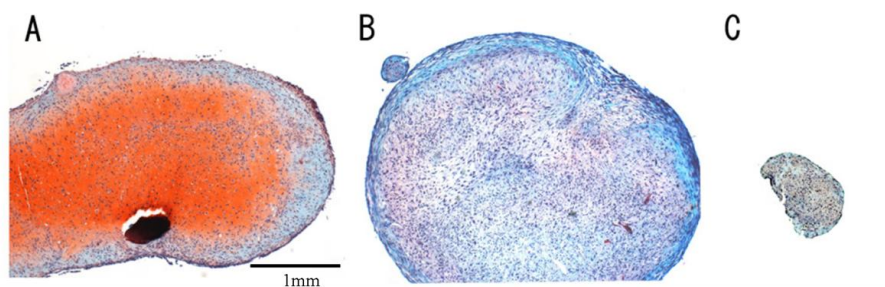


図 2-1-18 静置培養（C）とRWV培養（A、B）の軟骨組織のサフラニンO染色像

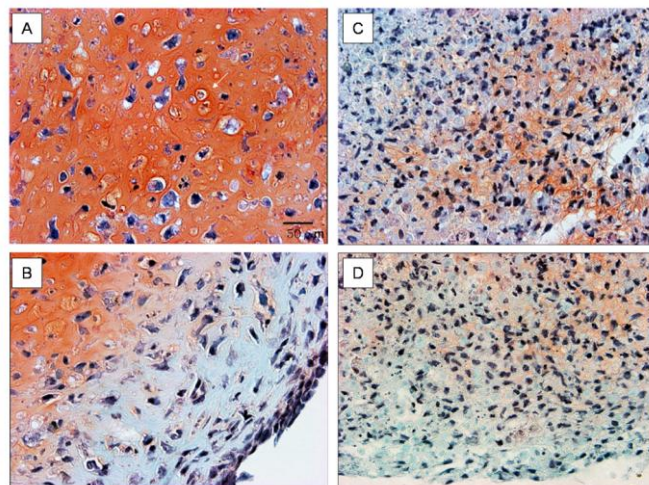


図 2-1-19 RWV培養による軟骨組織のサフラニンO染色像（部分拡大）

以上の結果から、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いたRWV培養による軟骨組織塊は、静置培養に比較して優位に良質の軟骨組織を再生することができ、質重量で8倍以上、分化の速度で2倍以上の優位性を示すことが分かった。

（4）ベッセル及びRWV バイオリアクターを用いた培養における培養液の評価

耳介軟骨膜由来幹細胞を用いた軟骨再生において、以下の培地で検討を行った。50cc ベッセルを用いた回転培養の様子を図 2-1-20 に示す。

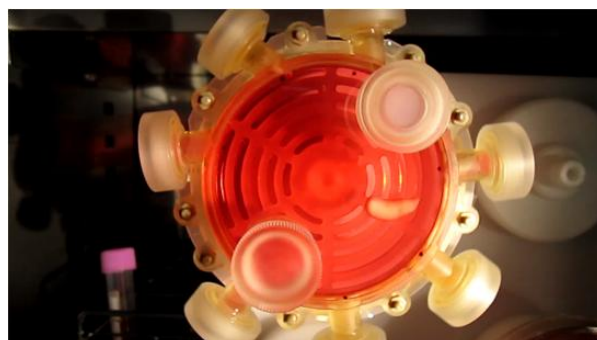


図 2-1-20 耳介軟骨膜由来幹細胞を用いたRWV回転培養（ベッセル）による軟骨再生

RWV培養を開始する前に2次元培養を行い細胞の数を増やす工程がある。そこで用いる培地を4種類検討し、いずれの場合も、静置培養に比べRWV回転培養では、湿重量12倍以上の組織塊を得ることができた。

(5) 大型ベッセル (100cc) を用いた培養評価

また大型ベッセルを用いてコラーゲンスポンジを足場材料として培養テストを実施し、培養可能であることを確認した。(図 2-1-21)



図 2-1-21 100cc 大型ベッセルを用いたRWV回転培養

以上の結果より、大型ベッセルに用いる酸素透過膜の評価を行い、シリコン製膜などが実用に資することを示した(1)。またコラーゲンスポンジを足場材料として用いた方が優位に良質の軟骨組織を再生できることが分かった(2)。さらに、認可のとれている6種類のコラーゲン系細胞足場材料を検討した結果、臨床応用可能な歯科用コラーゲンスポンジ材料が最適であることを確認した。さらに、最適な培地の検討も行い、培養条件の最適化を行った(4)。

以上各種条件の最適化を図った上で、ヒト由来間葉系幹細胞を用いて50ccベッセルを用いて3次元培養し静置培養に比べ、湿重量で8倍以上、分化の促進効果が2倍から3倍程度に加速され、合わせて少なくとも16倍以上の効果を得ることが確認でき、目標である湿重量5倍以上、培養時間(1/3程度)のあわせて15倍を超える高効率化が実現できた。また、100ccベッセルにおいて同様の培養が可能であることを確認し、100ccベッセルにおいても目標を達成できる目処を立てた。(3)～(5)

2-2 再生医療向け細胞培養システムの開発

現在、再生医療を実施するためには、例えば骨髄(間葉系幹細胞)採取後の前処理の2次元培養から3次元培養まですべての細胞操作、培養等を無菌環境下(閉鎖系)で実施しなければならない。そこで全工程を閉鎖系で実現する細胞培養システムを開発する。

本研究では実際の臨床実験に使用できる交差汚染防止対策(過酸化水素ガスによる除染機能)を実装した、本3次元細胞培養装置を収納できるCO₂インキュベータ付属の細胞観察機能を内蔵したセルプロセッシング・アイソレータを試作開発し、除染の有効性を確認する。

除染の有効性評価方法の手順は以下のとおりである。

- ・過酸化水素ガスの到達の確認

(方法) ケミカルインジケータ(CI)を用いる事で確認。

- ・除染の有効性の評価

(方法) バイオインジケータ(BI)を本アイソレータ庫内及びCO₂インキュベータに設置し、その結果により除染の有効性を評価する。

2-2-1 セルプロセッシング・アイソレータ本体部の試作

本研究開発では、セルプロセッシング・アイソレータを試作する。

内部では1患者の細胞操作、培養観察といったすべての細胞処理工程を閉鎖系で実現する必要がある。培養液交換ユニットのほか、細胞培養初期段階のための培養操作ユニット、顕微鏡、遠心分離機が必要であり、試作する上での課題及び対策は以下の点である。

- ・過酸化水素ガスが本体内部に収納するすべてのユニットに到達する。
- ・遠心分離機及び培養操作ユニットを耐過酸化水素ガス仕様の構造にする。

2-2-1-1 セルプロセッシング・アイソレータ本体部

(1) 概要

セルプロセッシング・アイソレータは作業環境および作業者の直接介入から物理的に完全に隔離された無菌操作エリアを有する装置である。

本来、細胞処理工程を行う安全キャビネットはグレードA相当の作業環境に設置しなければならず、クリーンルーム環境の増大化、また、クリーンルームの空調設備、専用着衣などのランニングコスト増大、厳密なチェンジオーバーなどの問題がある。

これらに対してセルプロセッシング・アイソレータはグレードC相当の作業環境に設置でき、それにともないランニングコストも低減でき、また短時間で厳密なチェンジオーバーも可能なセルプロセッシング・アイソレータの主たる装置構成ユニットとしては、操作部（メインチャンバー）、パスボックス、過酸化水素ガス発生装置、HEPAフィルタユニット及び制御ユニットとなる

(2) 開発、設計

①操作部（メインチャンバー）

セルプロセッシング・アイソレータのメインチャンバーである操作部は培養液交換、培養観察をはじめ種々の細胞処理工程を行うための閉鎖系空間であり、耐過酸化水素ガスの材料（SUS、樹脂製）で製作しており、過酸化水素ガスにて除染することで連続多検体対応が可能である。

また本操作部に本研究で開発した、培養液交換ユニット、位相差顕微鏡、遠心分離機を含む培養操作ユニットを設置し細胞処理工程を行う。

②パスボックス

2次元、3次元培養で使用するフラスコ、ベッセル、培養操作で使用する培地、ピペット、遠沈管、コニカルチューブなどのパーツ受け渡しのためのボックスで操作部同様に過酸化水素ガス除染対応の材料で製作しており、各種パーツの除染を行うことができる。

③過酸化水素ガス発生装置

上記、操作部およびパスボックスの除染のための過酸化水素ガスを発生させる装置である。ドライな環境に装置内を調整し過酸化水素溶液をベーパーライザーにて気化させ、過酸化水素ガスとしてHEPAフィルタを通して操作およびパスボックスに供給する。

④HEPAフィルタユニット

過酸化水素ガスを清浄な状態で供給するほか、内部循環により常に操作部をグレードA環境に維持する。HEPAフィルタの目詰まりは差圧計にて管理する。

⑤制御ユニット

除染およびエアレーションの制御、各種インターロック、照明などの制御を行っている。

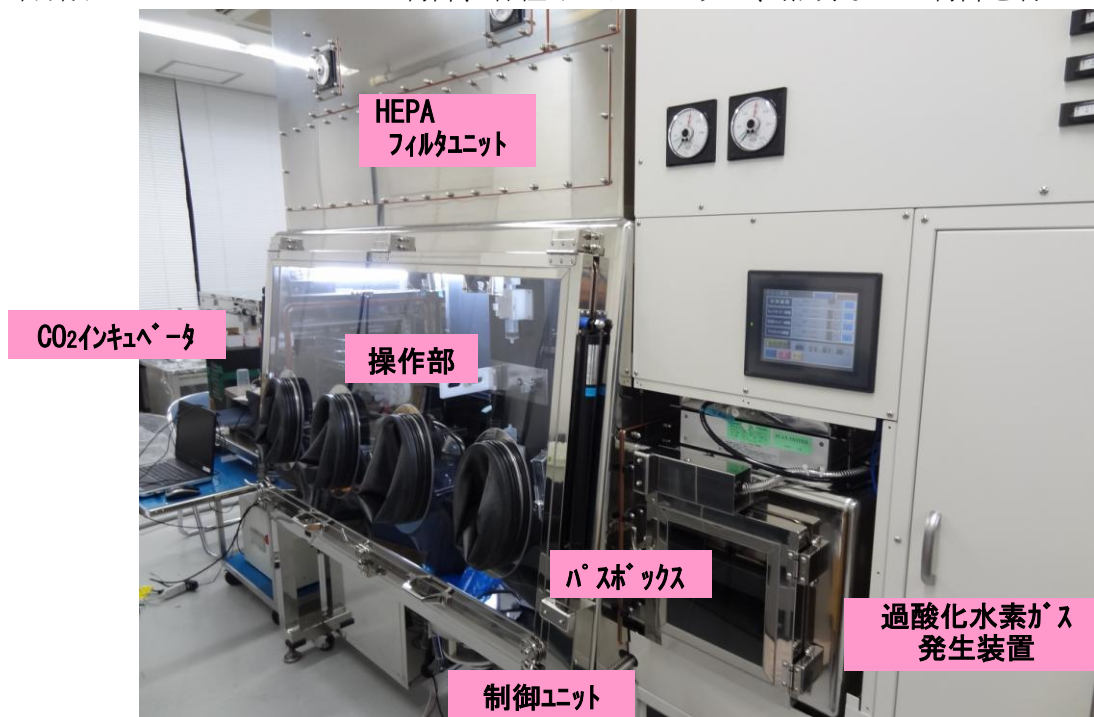


写真 2-2-1 CO₂インキュベータ付セルプロセッシング・アイソレータ

(3) 検証、課題

アイソレータの耐圧試験及び後述するアイソレータ内の除染結果も問題なかった。

今後の課題は除染をいかに効率よく行うことができるか、装置をもっとコンパクトにすることができるかという点である。操作部に設置するものは大きく変更はできないが扉の開閉方向や過酸化水素ガス発生装置部については見直しが可能と思われる。

2-2-1-2 培養操作ユニット（培養液交換ユニット及び遠心分離機）

(1) 概要

回転培養ユニットによる3次元培養の前処理としての2次元培養操作も無菌環境下（閉鎖系）のアイソレータ内で作業行わなければならない。

本培養操作ユニットはT-フラスコを使用しての二次元培養操作を半自動的に行うことができ、個人差による培養状態のバラツキ、ミス防止、グローブ作業の煩わしさを低減することを目的とする。培養は付属のCO₂インキュベータを用いた。

主たる作業の培地交換作業と継代作業を想定して設計した。

また上記のプロトコルを実現させるための培養操作ユニット構成は分取/分注ユニット、搬送ユニット、フラスコセットステージ、ボトルセットステージ、遠心分離機、制御ユニットである。

(2) 開発、設計

①分取/分注ユニット

各種フラスコ、ボトル内の細胞懸濁液、培地、PBS、トリプシンの分取分注を行う。

25 ml ピペットを使用し、シリンダのモーター駆動により分取/分注量を制御でき、ピペット動作は上下動作のみでモーター駆動により行う。

②搬送ユニット

フラスコ、ボトルを分取/分注位置へ搬送し、搬送動作は左右動作のみでモーター駆動により行う。

③フラスコセットステージ

225 ml T-フラスコ、75 ml T-フラスコをセット（アタッチメントを使用して兼用）し、細胞懸濁液、培地、PBS、トリプシンの分取/分注ために所定の角度に倒立させる。

また、フラスコ全面に各種液体が行き渡るよう回転、揺動機構が設けられている。

上記動作についてはすべてモーター駆動により行う。さらに、ステージにはヒーターが設けられており、トリプシンでの反応を行うことができる。

※ただし、フラスコのキャップは手動で着脱する。

④ボトルセットステージ

培地、PBS、廃液用225 ml コニカルチューブ、トリプシン、遠心分離機用50 ml 遠沈管をセットし、搬送ユニットによりそれぞれ分取/分注位置に搬送される。

※ コニカルチューブ、遠沈管のキャップは手動で着脱する。

⑤遠心分離機

50 ml 遠沈管に集められた細胞懸濁液から細胞を分離させる。

ローターは4ホルダ構成で遠沈管の出し入れは手動にて行う。

⑥制御ユニット

上記構成ユニットの動作を制御する。制御はシーケンサで行い、各軸が確実に動作できるようになっており、そのシーケンサを内蔵する制御ユニットはアイソレータ下部に設置し培養液交換ユニットと制御ボックスは兼用している。

アイソレータ操作部内に設置する部分についてはすべて過酸化水素ガス対応の材料を使用して製作し、駆動部については一部を除き装置外に設置するようにした。

また、隔壁部分についても過酸化水素ガス対応の材料を使用し、構成機器の腐食や過酸化水素ガスの外部への流出を防止する。

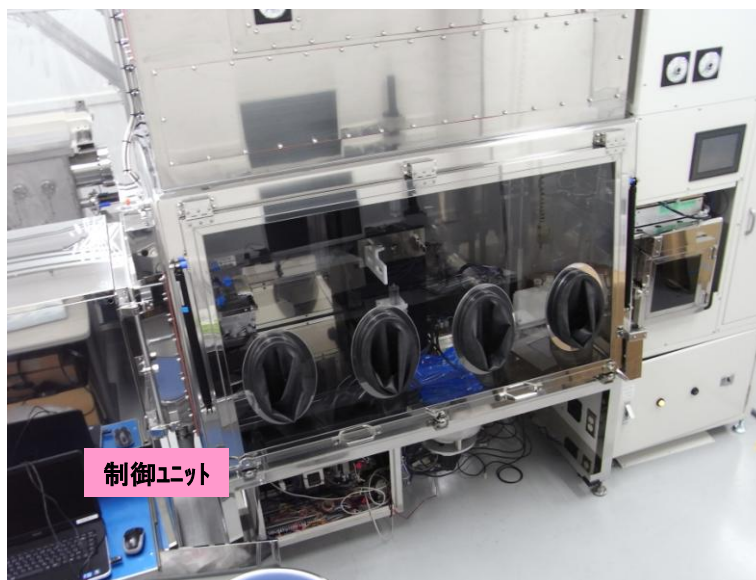


写真 2-2-2 アイソレータ全景

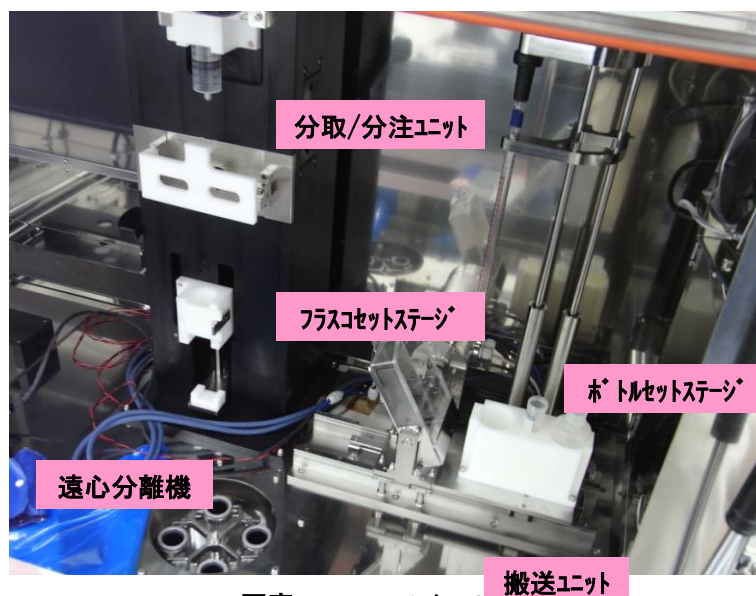


写真 2-2-3 アイソレータ内部

(3) 検証、課題

各軸の簡単な動作は確認済みである。まだ、細かなパラメータ調整の余地があるが、これによりどの程度最適化することができるか、各軸動作をいかに組み合わせてより効率的な一連の作業にすることができるかが今後の課題となる。また、動作指示はグローブにてタッチパネルを操作して行うことになるため、その操作性についても確認していく必要がある。

将来的には培地やPBSなどの温度管理も考慮していく。

2-2-1-3 細胞観察ユニット

(1) 概要

2-2-1-2の培養操作時においてT-フラスコ内の細胞の状況観察やトリプシン処理での細胞剥がし状態の確認などに使用する。

本開発においては観察対象が細胞のため一般的な顕微鏡では細胞を観察することができず、無色透明ではあるが屈折率が異なる部分からなる試料の観察に用いられる位相差顕微鏡を採用する必要があった。

ただし、市販の位相差顕微鏡では装置サイズに見合ったものがなく、また、除染のための過酸化水素ガス対応品である必要があるため、独自に開発することとなった。

(2) 開発、設計

除染が必要なアイソレータ内には駆動部分を配置できないため、対物レンズと焦点合わせ機構はアイソレータ外に配置した。培養操作時における超小型フラスコ内の細胞の状況観察や、トリプシン処理での細胞がディッシュから剥がれたかどうかは、装置奥面に設置した画像用モニターにて確認できるようにした。そのためT-225フラスコの全面が確認できるだけの空間を確保しなければならない。

(3) 検証、課題

超高輝度LED照明、コンデンサーレンズ、対物レンズ(×4)、超小型高精度カメラ(1600×1200)をアイソレータ内に取り付け、対物レンズ用アクチュエータにて対物レンズのピント調整を行い、図2-2-6のような位相差顕微鏡画像を得ることができた。

T-225フラスコ内の細胞の状況観察やトリプシン処理での細胞剥がれ状態の確認には問題ないレベルであり十分使用することができることが確認でき、また照明部分の取り付け再現性についても問題ないことを確認した。

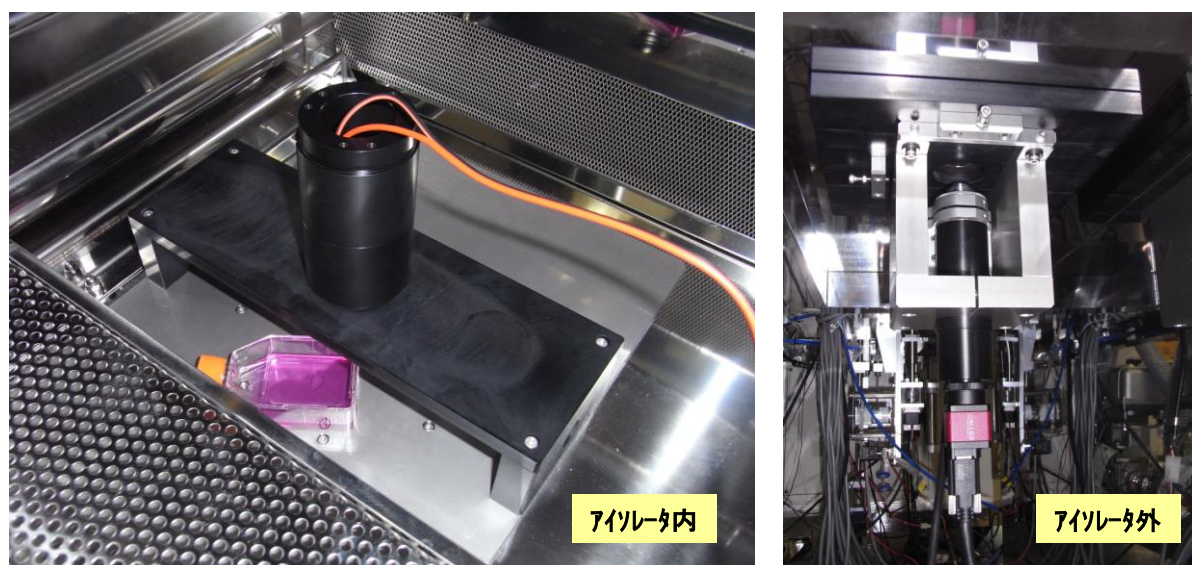


写真 2-2-4 位相差顕微鏡外観

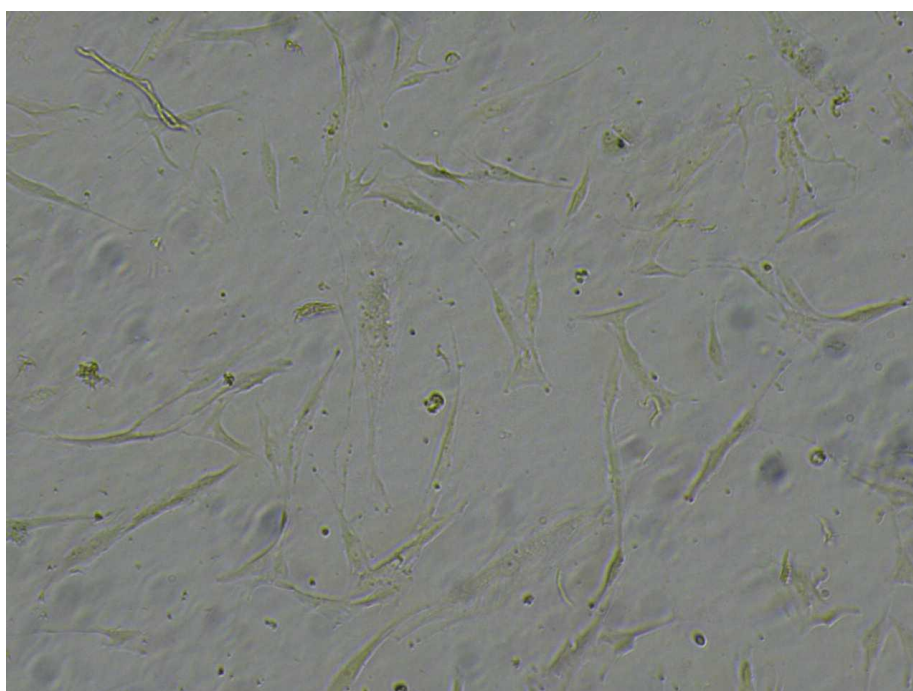


図 2-2-5 位相差顕微鏡画像

2-2-2 専用CO₂インキュベータの試作

(1) 概要

本研究開発では、アイソレータに接続する専用CO₂インキュベータを試作する。
CO₂インキュベータ内では本研究目的である回転培養ユニットによる3次元培養の他に3次元培養の前処理としてのTフラスコを使用しての2次元培養を行える必要がある。

すなわち、CO₂インキュベータ内には3次元培養の回転培養ユニットと2次元培養のTフラスコを内蔵できる構造にしなければならない。当然ながら、アイソレータと同様にCO₂インキュベータ内も無菌環境下（閉鎖系）にしなければならない。従来CO₂インキュベータの機能を持たせつつ、過酸化水素ガスに対応したCO₂インキュベータを製作する必要がある。

(2) 開発、設計概要

CO₂インキュベータ内には、上記のとおり回転培養ユニットとTフラスコを内蔵し、セルプロセッシング・アイソレータへの接続が可能で、過酸化水素ガスに対応（材質、密閉性）していなければならない。

また、通常のCO₂インキュベータとしての機能を満たす必要がある。
主な仕様は下記のとおりである。

表 2-2-1 CO₂インキュベータ主要仕様一覧

外形寸法(架台、キャスト部含まず)	W590×D550×H500mm(内形寸法基準で可)
架台、キャスト部	W500×D500×H700mm(キャスト高さ含む)
内形寸法	W500×D435×H360mm(78L)
右側面扉	内形寸法、アイソレータ側開口に準じる 下開き式
温度制御範囲	37℃固定(室温+7℃～50℃)
温度制御精度	±0.3℃(目標値)
温度分布	±1.0℃(目標値)
加温方式	エアージャケット式
使用温度範囲	20～30℃(周辺温度)
CO ₂ 制御範囲	1.0～20.0%
CO ₂ 精度	±0.2%(目標値)
CO ₂ センサ	熱伝導式(赤外線式でも可)
庫内湿度	90%以上(自然蒸発方式)

(3) 検証、課題

基本的なインキュベータの機能は十分満足しており、筐体についてもステンレス製で、過酸化水素ガス対応の構造となっている。

またTフラスコ対応の部分についても引き出し付きトレイ、背面に確認マドを設け、2次元培養についても対応できる構造となっている。

従来の加湿バットでは交差汚染が懸念されていたが透湿防水袋に滅菌水を入れてパックしたものにすることでこの課題を払拭でき、湿度についても90%程度まで上昇することの確認ができた。

冷却機能については問題なく機能は満足している。

ただし前記したように回転培養ユニットのモーターユニットの発熱問題はモーターの変更で十分効果が得られたため現状使用の必要性はない。

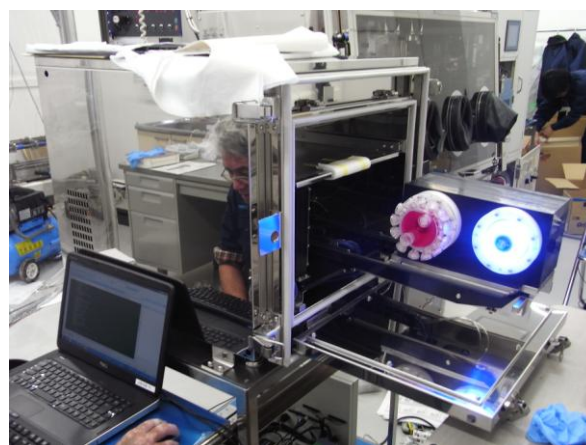


写真 2-2-6 インキュベータ外観

2-2-3 除染の有効性の評価

本研究開発で試作開発したセルプロセッシング・アイソレータの除染の評価を実施した。除染の評価については下記の4パターンについての除染サイクル終了後、検証評価を実施した。

- ・全体除染（本体+パスボックス+接続チャンバー+CO₂インキュベータ）
- ・チェンジオーバー除染（本体+パスボックス+接続チャンバー）
- ・接続チャンバー除染（接続チャンバー単体）
- ・パスボックス除染（パスボックス単体）

過酸化水素ガスによる除染条件および判定基準は下記のとおりである。

（1）除染時間（分）

NO.		除湿工程	除染工程	エアレーション※
1	全体	5～10	90	180
2	チェンジオーバー	5～10	90	180
3	接続チャンバー	5～10	60	60
4	パスボックス	5～10	60	90

※エアレーションは無負荷時に残留濃度が1ppm以下になるまでの時間

表 2-2-2 除染時間

（2）試験片

上記の除染プロセスがきちんと行なわれ、内部にまでその効果を及ぼし、実際除染されたか否かを評価するためにケミカルインジケータ（C I）及びバイオインジケータ（B I）にて確認した。

（3）試験片貼り付け箇所

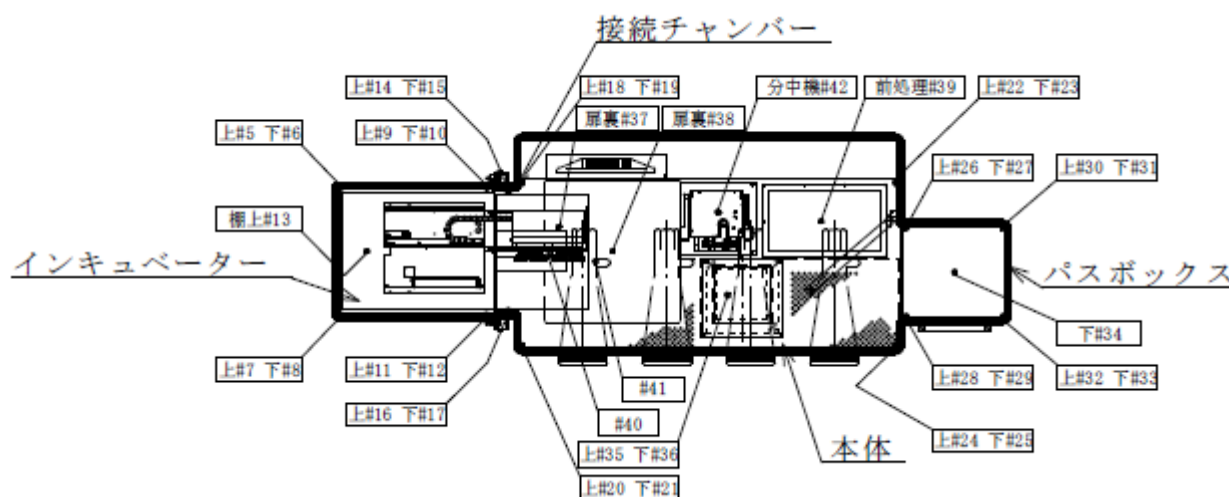


図 2-2-1 全体除染試験片貼り付け箇所

（4）判定方法

ケミカルインジケータが紫色から黄色に変色するとOK、変色しないとNG。
バイオインジケータがピンク色のままだとOK、変色するとNG。

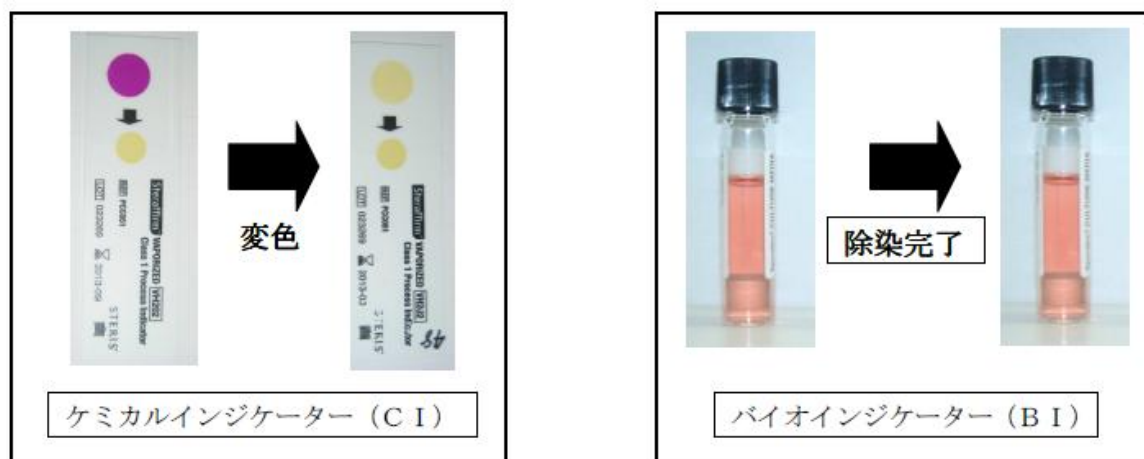


写真 2-2-7 インジケーター合格判定指標

(5) 除染結果

4つの除染パターンすべてにおいてケミカルインジケーターは黄色に変色し、バイオインジケーターはピンク色のままであり、除染の有効性を確認した。

また NO.1の全体除染時の結果よりCO₂ インキュベータ内においても過酸化水素ガスは行き渡り、除染の有効性を確認した。

第3章 全体総括

3-1 まとめ

再生医療において加齢やスポーツなどによる怪我で生じた「変形性関節症」などに対して移植する培養軟骨を対象とした製品は、市販されておらず、現状の治療法には限界があり、これらを解決する大型の培養軟骨への期待は大きい。すなわちディッシュやフラスコ等を用いた静置培養では2次元のシート状の細胞しか培養できず、また軟骨の組織工学では、従来軟骨細胞あるいは骨髄間葉系細胞を軟骨再生に適した足場材料中で増殖させ、適切な成長因子や力学刺激を加え軟骨基質を持った軟骨組織として再生させることが試みられているが、静置式の3次元培養では移植に必要な十分な大きさに培養することは困難であり、培養液の浸透阻害や攪拌によるストレスなどによる懐死などの問題発生や、30%以上が異常組織（サフラニンO染色性のない組織）になるなど品質上大きな問題があった。

そこで㈱ジェイテックは産業技術総合研究所が研究開発したRWVバイオリアクターを用いた3次元回転培養法に変わるベッセル（培養器）を開発し、産業技術総合研究所との共同研究で形成外科用自動細胞培養装置を試作し、100%正常な細胞（サフラニンO染色性100%ポジティブ）を培養し、弾性軟骨の再生が可能であることを確認した。

しかし本装置では5mm程度の比較的小さな組織培養しかできず、変形性関節炎等の移植に対しては高品質でより広範囲の欠損に対する治療には大型の軟骨組織が必要不可欠であり、培養時間の削減も望まれている。そこで大型の軟骨組織を形成するためにはベッセル内で小さな細胞塊から大きな細胞塊にいたるまでベッセルの回転核精度をリアルタイムに制御しなければならない。この課題を解決するために、以下の研究開発を実施した。

3-1-1 3次元細胞培養装置の開発課題への対応

(1) 大型ベッセルの開発（株式会社 ジェイテック）

本研究では大型の細胞を培養するために大型のベッセルのための金型を設計し、試作し、密閉テストにより評価実験を行った。

(2) 大型組織培養のためのCFC（Cell Float Control）ソフトウェアの開発

大型ベッセルによる大型細胞塊に対応した特徴抽出手法（ICCS）及び独自の細胞塊位置決めのための判定ロジック（SRC）の最適化をはかり、小さな細胞から大型の細胞塊まで常に一定領域に浮遊しながら培養可能にした位置制御を実現するCFC（Cell Float Control）ソフトウェアを開発し、本研究で試作開発した大型ベッセル対応の回転培養ユニットに組み込んだ。

(3) 回転培養ユニットの試作

本研究で試作開発した大型ベッセルに対応した耐過酸化水素ガス対応の回転培養ユニットを試作開発し、本研究で開発した大型細胞塊まで位置制御、培養可能なCFCソフトウェアを組み込んだ。

(4) 大型ベッセルのためのFME（Flawless Medium Exchange）ソフトウェアの開発

大型ベッセルに対応した分取分注シリンジのシーケンス動作を検討し、大型ベッセル内の古い培養液をほぼ全量新しい培養液に短時間で置換するためのシリンジ動作の最適化を図った制御（FME：Flawless Medium Exchange）ソフトウェアを開発した。

(5) 培養液交換ユニットの試作（株式会社 ジェイテック、国立大学法人 大阪大学）

大型ベッセルに対応した培養液交換ユニットを試作し、上記の独自の大型ベッセルのためのFME（Flawless Medium Exchange）ソフトウェアを組み込んだ。本培養液交換ユニットはセルプロセッシング・アイソレータ本体部内に収納するために耐過酸化水素ガス仕様を実現した。

(6) 3次元細胞培養装置の実証実験

大型組織培養のためのCFCソフトウェア及び大型ベッセルのためのFMEソフトウェアを組み込んだ3次元細胞培養装置を開発し、実用に資する大型の軟骨細胞組織が形成できることを確かめた。

さらにヒト由来間葉系幹細胞を用いて3次元培養を実施し、静置培養に比べ、湿重量で8倍以上、分化の促進効果が2倍～3倍程度に加速され、合わせて少なくとも16倍以上の効果を得る

ことが確認でき、当初目標の湿重量5倍以上、培養時間1/3程度の1.5倍の高効率化を超える効果を実現できた。

以上のように3次元細胞培養に関する制御ソフトウェアの開発に成功し、再生医療に有効な大型培養軟骨を形成するための3次元細胞培養装置を開発することに成功した。

すなわちストレスなく微少重力下で培養するために、小さな細胞から大型培養軟骨まで成長していく細胞塊をベッセル内で常に一定領域で浮遊させるための位置制御（CFC：Cell Float Control）ソフトウェア及び大型ベッセル内の古い培養液を残さずに新しい培養液に短時間で置換するための分取分注シリンジの動作制御（FME：Flawless Medium Exchange）ソフトウェアを開発し、3次元細胞培養装置（回転培養ユニット、培養液交換ユニット）に組込んだ。

その結果本3次元培養装置により、小さな細胞から大型培養軟骨まで成長していく細胞塊をベッセル内で常に一定領域で浮遊させ、細胞をストレスなく微少重力下で培養することが可能となり、従来の静置培養に比べて目標の湿重量で5倍以上、培養時間も1/3以上の短縮を超える効率化を実現できることを実証した。

さらに再生医療等に用いる大型の軟骨組織を高効率に形成する細胞培養システムを構築するためには以下の研究開発を実施した

3-1-2 再生医療向け細胞培養システムの開発

(1) セルプロセッシング・アイソレータ本体部

3次元細胞培養装置（培養液交換ユニット、回転培養ユニット）を収納する過酸化水素蒸気を利用した除染機能を有したセルプロセッシング・アイソレータ本体部及びその本体部に連結可能な専用CO₂インキュベータを開発した。

(2) 培養操作ユニット（培養液交換ユニット及び遠心分離機）

個人差による効率面や品質面の再現性を考慮した半自動型の2次元細胞操作が可能な前処理用培養液交換ユニット及び遠心分離機を開発し、セルプロセッシング・アイソレータ内に収納した。

(3) 細胞観察ユニット

細胞のコンタミの発生や細胞の成長具合などを観察するためにアイソレータ内に細胞観察が可能な位相差型の顕微鏡による細胞観察ユニットを開発した。

(4) 専用CO₂インキュベータの試作

回転培養ユニット及び初期の2次元培養時のフラスコが収納でき、回転培養ユニットの発熱対策として冷却機能を有した耐過酸化水素ガス仕様の専用CO₂インキュベータを開発した。

(5) 除染の有効性の評価

セルプロセッシング・アイソレータ内の除染の検証は4つの除染パターンすべてにおいてケミカルインジケータ（CI）の変色及びバイオインジケータ（BI）による滅菌より、その有効性を確認した。

このように3次元細胞培養装置（培養液交換ユニット、回転培養ユニット）を収納する過酸化水素蒸気を利用した除染機能を有したセルプロセッシング・アイソレータ本体部及びその本体部に連結可能な専用CO₂インキュベータを開発し、また品質の安定した2次元細胞操作が可能な前処理用培養液交換ユニット等の開発も試み、すべての培養工程を閉鎖系で実施できる機能を有し、再生医療普及の障害となっているCPCのような特別なヒト細胞専用培養施設が不要な低コスト型の細胞培養システムを開発した。

今後は本システムを使って前臨床研究を実施し、システム試験運用を通して改良を実施し、さらに臨床研究、薬事申請へと進めていく予定である。

3-2 研究開発後の課題

3-2-1 残された課題

本研究開発では、各研究項目においてそれぞれ目標を達成することができ、再生医療等に用いる大型の軟骨組織を高効率に形成する細胞培養システムを構築した。

今後は残された認定期間（平成 22 年 11 月 5 日～平成 26 年 3 月 31 日）の中で、本研究開発で構築した細胞培養システムを運用しながら、システムの総合的評価を実施し、有効性・安全性を確認していく。

特に前処理用の培養操作ユニットについては、今後のシステム運用を通じて実際の作業者の意見も広く取り入れ、改良を加えていかなければならないと考えている。

また今後本 3 次元細胞培養システムの臨床実験への適用に向けて以下の課題を実施しなければならない。

（１）非臨床研究の実施

本 3 次元細胞培養システムを用い、大型軟骨組織を再構築させ、組織化学的試験、生化学的試験、力学的試験などの特性解析を行う。

（２）臨床試験に向けた臨床治療プロトコルの作製

セルプロセッシング・アイソレータ内において 3 次元細胞培養システムを用いることにより、臨床応用に向けた医療グレードのスキヤホールドフリーの大型軟骨組織を再構築させる。同時に、臨床治験に向けた GMP 準拠プロトコルの作成を行う。

3-2-2 新しい課題

本研究開発では、各研究項目においてそれぞれ目標を達成し、再生医療に有効な大型培養軟骨を形成するための 3 次元細胞培養装置を開発することに成功した。

しかし、再生医療分野では事業化を進める上では前臨床研究、臨床試験、薬事申請と長期間を要する。そこで対象市場を拡大し、非医療分野での商品展開が急務となっている。そこで毒性試験やドラッグスクリーニング等創薬研究への適用を検討し、技術開発を進めていく予定である。

3-2-2-1 毒性試験への適用

医薬品開発において有害事象に関わる予測は、未だ経験的な手法と判断によるところが大きい。その中でも特に薬剤性肝障害は最も大きな副作用の一つであり、正常動物を用いた毒性試験では再現できないケースが多い。このため、新規医薬品として市販された後でも、販売中止になるケースがあり、その損失は製薬企業にとって莫大なものとなっている。そのため、新規医薬品に関する毒性試験の適切なアッセイ法の開発が望まれている。

我々は、ヒト肝臓の樹立細胞株（Chan Liver Cell）を適切な培養担体に播種し、RWV 回転培養法を用いて、多数の均質な肝臓組織を再生することに成功しつつある。本培養システムの開発により、実験動物を用いた毒性試験の代替法となる肝臓毒性試験法を開発し、医薬品開発現場への導入を目的とした技術開発を進めていく予定である。

3-2-2-2 ドラッグスクリーニング等創薬研究への適用

新規医薬品開発のためのスクリーニングの手法として、培養細胞を用いたアッセイが主流であるが、近年、2 次元的に培養した細胞では必ずしも生体内での薬効や動態を再現しないことが指摘され、3 次元培養を用いたアッセイ法の開発が望まれている。

我々は、ヒト骨肉腫由来細胞株 MG 6 3 を用いて、適切な培養担体に播種し、RWV 回転培養により多数の均質なガン組織を得ることに成功しつつある。薬効（抗癌剤）は 2 次元培養と 3 次元培養で明らかに異なることが分かった。今後、より生体内に近いドラッグスクリーニング法の開発を目的として、適用細胞の拡大やスクリーニングの自動化を行っていく予定である。特に、多数の均質な組織を作るための回転制御システムの開発や、作製したガン組織をマルチプレート（96 穴プレートなど）に分配するための自動ピックアップ装置などの開発を行い、市場の大きい製薬企業への導入を図る予定である。

3-3 事業化展開

本研究では、3次元細胞培養装置（大型ベッセル、回転培養ユニット及び培養液交換ユニット）の開発により、大型の3次元培養の技術的目処を立てた。またセルプロセッシング・アイソレータの除染機能も確認した。今後は残された認定期間中（平成22年11月5日～平成26年3月31日）では、実際の前臨床研究に細胞培養システムを用いて総合評価を実施する予定である。

具体的には横浜市立大学医学部において以下の課題を実施し、本細胞培養システムの総合評価を行っていく予定である。

再生医療事業において例えば耳介軟骨など大型で複雑な弾性軟骨組織の先天性（小耳症など）・後天的（交通外傷による醜形など）形状不全を再建するための有効な医療技術は現在ない、また加齢やスポーツなどによるけがで生じた「変形性関節症」「離断性骨軟骨炎」「外傷性軟骨欠損症」に対して移植する膝軟骨（硝子軟骨）の再生への期待は大きい、実用的に十分大きな再生軟骨はなく、現状の治療法には限界があった。

これは自家軟骨を採取培養し移植する自家軟骨移植法では軟骨細胞の採取量に限界があり、また健康な骨に侵襲を加えるリスクがあること、大型の3次元的な軟骨組織の構築技術（培養法）が確立していない点が課題としてあげられる。以上の問題を解決するには、軟骨再生に有効な幹細胞（または軟骨前駆細胞）の分離培養技術、および大型軟骨を構築するための3次元培養技術の開発であったが、横浜市立大学臓器再生医学および形成外科ではヒト耳介弾性軟骨膜より軟骨前駆細胞を分離同定し、さらにこの軟骨前駆細胞を用いて弾性軟骨を再構築することに成功した（軟骨細胞調整方法：PCT/JP2008/051327）。当大学が分離同定した軟骨前駆細胞は軟骨細胞と比較して高い増殖能を持ち、多分化能を有していることから、軟骨組織を再生する上で極めて有用と考えられた。

そこで平成25年度よりフィジビリティスタディーとして、ヒト耳介から採取した軟骨前駆細胞である軟骨膜細胞（横浜市立大学医学部附属病院 倫理委員会承認済み 平成16年3月29日承認番号3-74）から本3次元細胞培養装置を用いることにより、スキャホールドフリーの大型軟骨組織を再構築させ、組織化学的試験、生化学的試験、力学的試験などの特性解析を行う。

またセルプロセッシング・アイソレータ内において3次元細胞培養システムを用いることにより、臨床応用に向けた医療グレードのスキャホールドフリーの大型軟骨組織を再構築させる。同時に、臨床治験に向けたGMP準拠プロトコルの作成を行う。

専門用語

細胞培養

多細胞生物から細胞を分離し、体外で増殖、維持すること。生体外で培養されている細胞のことを培養細胞と呼ぶ。生体から分離し、最初の植え替えを行うまでを初代培養、既存の培養細胞を新たな培養容器へと移し替えて増殖、維持することを継代培養と呼ぶ。細胞を培養するために用いられる組織間液を模した液体を培地と呼ぶ。

3次元培養

細胞培養は通常、ディッシュやフラスコを用いて、平面空間上に細胞を接着させ増殖、分化させる。しかし、平面空間上で培養した細胞は2次元シート状組織しか形成せず、培養の目的によっては、得られる細胞組織が十分な機能を持たないことがある。再生医療のように、3次的に損傷した組織に移植する組織を生体外で培養するわけであるから、3次元培養による3次元組織が極めて重要である。

RWV 回転培養

RWV (rotating wall vessel) は、ガス交換膜を裏側に備えた円形のベッセルが、回転することで細胞に与える重力を打ち消すような培養液の流れにより細胞、組織はベッセルの底に沈むことなく、培養液中にフワフワと浮いた状態で徐々に三次元集合体を形成する。

細胞足場材料

近年、発展めざましい再生医療においては、足場に細胞を接着させ増殖させることが求められるため、生体内で細胞と接着し、組織構造を保持する細胞外マトリクスの構造を模倣した細胞足場材料の開発が精力的に進められている。

軟骨

軟骨基質の成分によっていくつかの種類に分けられ、それぞれ力学的特性が異なる。

硝子軟骨には、関節面を覆う関節軟骨などが該当し、最も一般的に見られる軟骨である。均質無構造であり、半透明である。**線維軟骨**は、椎間円板、恥骨結合、関節半月および関節円板などに見られる。軟骨基質には、コラーゲンが多く含まれる。固く、強い圧力に耐えることができる。

弾性軟骨には、耳介軟骨や、嚥下時に食物が気管に入らないように蓋をする喉頭蓋の軟骨などが該当する。軟骨基質は、弾性線維を多く含み、硝子軟骨に比べ、弾力がある。

C P C (Cell Processing Center)

再生医療の実現に向けて幹細胞臨床研究などが推進されるよう、臨床利用可能な細胞の調製を行う施設。

GMP (Good Manufacturing Practice)

医薬品適正製造基準。WHO が 1969 年に勧告した医薬品の製造および品質管理に関する基準。日本は 1976 年（昭和 51）より実施

ケミカルインジケーター（化学的インジケーター：C I）

滅菌プロセスがきちんと行なわれ、内部にまでその効果が及び、ほんとの滅菌されたかどうかみるためのもので、滅菌を確認する工程には3つのインジケーターがあります滅菌を確認する工程には3つのインジケーターの一つで、被滅菌物が滅菌工程に曝露されたか否かを区別するため、または被滅菌物の包装内部まで熱あるいはガスなどの滅菌効果が到達したことを確認する。

バイオインジケーター（生理学的インジケーター：B I）

滅菌を確認する工程には3つのインジケーターのうち滅菌効果を確認するため最も信頼性が高い。各滅菌法に対して最も抵抗性を有する細菌芽胞（指標菌）を使用する。