

平成28年度中小企業経営支援等対策費補助金

戦略的基盤技術高度化支援事業

iPS細胞等の3次元大量培養技術の開発

## 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 | 公益財団法人 新産業創造研究機構    |
| 間接補助事業者   | 株式会社ジェイテックコーポレーション  |
|           | 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.....                                               | 4  |
| 1-1-3 研究目標.....                                               | 5  |
| 1-1-3-1 3次元大量培養技術の開発.....                                     | 5  |
| 1-1-3-2 創薬スクリーニング操作の自動化.....                                  | 6  |
| 1-2 研究体制.....                                                 | 7  |
| 1-3 成果概要.....                                                 | 8  |
| 1-3-1 3次元大量培養技術の開発.....                                       | 9  |
| 1-3-2 創薬スクリーニング操作の自動化.....                                    | 9  |
| 1-4 当該研究開発の連絡窓口.....                                          | 10 |
| 第2章 本 論.....                                                  | 11 |
| 2-1 3次元大量培養技術の開発.....                                         | 11 |
| 2-1-1 3次元大量培養用回転培養ベッセルの開発.....                                | 11 |
| 2-1-2 大量培養のためのCFC（Cell Float Control）ソフトウェアの開発.....           | 12 |
| 2-1-3 3次元大量培養装置及び3次元大量培養アルゴリズムの開発.....                        | 13 |
| 2-1-3-1 3次元大量培養装置の開発.....                                     | 13 |
| ・3次元大量培養（浮遊培養）装置「CellPet 3D-L」の改良.....                        | 13 |
| ・iPS細胞用3次元大量培養装置「CellPet 3D-iPS」の開発.....                      | 13 |
| ・iPS細胞用大量培養ベッセル向けの培地交換ユニット「CellPet FT」の改良.....                | 14 |
| 2-1-3-2 3次元大量培養アルゴリズムの開発.....                                 | 15 |
| ・3次元大量培養（浮遊培養）装置「CellPet 3D-L」での3次元大量培養アルゴリズムの開発.....         | 15 |
| ・iPS細胞用3次元大量培養（浮遊培養）装置「CellPet 3D-iPS」での3次元大量培養アルゴリズムの開発..... | 17 |
| 2-2 創薬スクリーニング操作の自動化.....                                      | 19 |
| 2-2-1 3次元組織ピックアップユニットの開発.....                                 | 19 |
| 2-2-2 3次元組織粉碎ユニットの開発.....                                     | 24 |
| 2-2-3 創薬スクリーニング用自動化装置の開発及び性能実験.....                           | 25 |
| 2-2-3-1 創薬スクリーニング用自動化装置の開発.....                               | 25 |
| 2-2-3-2 創薬スクリーニング用自動化装置の評価.....                               | 27 |
| 第3章 全体総括.....                                                 | 29 |
| 3-1 総 括.....                                                  | 29 |
| 3-2 今後に向けて.....                                               | 31 |
| 専 門 用 語.....                                                  | 32 |

注：平成28年5月に株式会社ジェイテックコーポレーション（旧社名；株式会社ジェイテック）に社名変更した。本文には計画時のものもあり、一部旧社名のまま残している。

## 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

製薬業界では現在細胞培養技術を用いた創薬スクリーニングの評価技術は全てディッシュやフラスコ等を用いた静置培養での2次元培養系で実施されてきたが、評価結果等の相関に限界があった。また静置式の3次元培養の大量培養では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壊死などの問題が生じたり、また培養できても30%以上が死細胞（トリパンプルー陽性）になったり、品質上問題があった。さらにフラスコによる撈半式の大量培養法もあるが、開放系でコンタミの問題や培養液の使用量等の問題もあった。

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採取した大型軟骨組織から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。<sup>1)</sup>

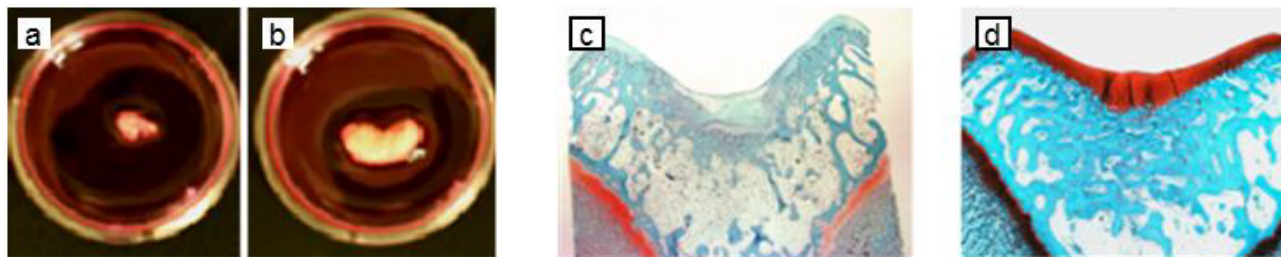


図 1-1-1 ウサギ膝関節への移植の比較（RWV バイオリアクター、静置培養との比較）

(a)はペレット法（静置培養）、(b)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（培養期間は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 倍程度と大きいだけでなく、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。(d)はRWV で構築した軟骨をウサギ膝関節全層欠損モデルに移植し、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。(c)の放置群ではほとんど軟骨は再生されていないが、(d)の移植群では極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。

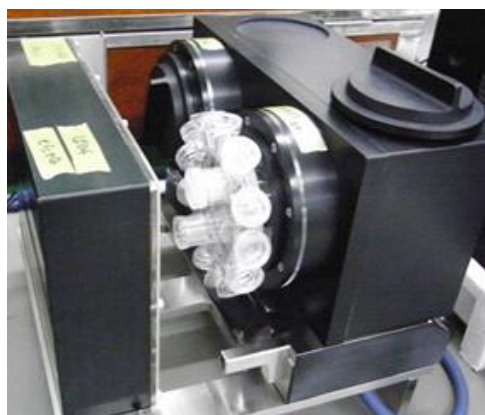
さらにヒト患者由来の骨髄細胞を用いても、RWV 回転培養により、静置培養に比べて有意に優れた軟骨組織を再生できることが分かった。すなわちヒト患者由来骨髄間葉系幹細胞を用いたRWV 軟骨、RWV バイオリアクターで作製した軟骨と湿重量の静置培養との比較をし、RWV 培養の方が静置培養に比べて寸法、重量とも圧倒的に大きな組織を構築することができた。<sup>2)</sup>

- 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)

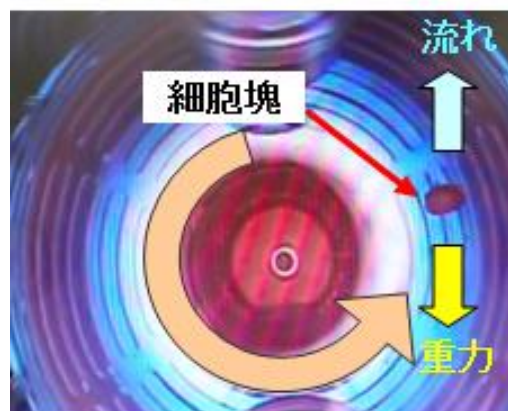
ジェイテックコーポレーションは産業技術総合研究所とRWV バイオリアクターに変わる新しいベッセルを開発し、（特許 5055479 及び特願 2009-138475、PCT/JP2010/059754）このベッセル（図 1-1-2 参照、ガス透過性膜を装備した円筒形）を用いた軟骨再生技術をもとにCPC のような特別な細胞専用培養施設不要のGMP 基準を満たした自動回転培養装置の試作開発に着手し、平成 21 年度補正予算ものづくり中小企業製品開発等支援補助金で産業技術総合研究所の技術協力のもとに形成外科用自動細胞培養装置を完成させ弾性軟骨の再生が可能であることを確認した。そこで産業技術総合研究所（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

関連特許：特許 4499041 号、US10/581911、CA2548910『擬微小重力環境下での骨髄細胞を用いた3次元軟骨組織構築方法』他  
特願 2005-174932 US11/917226、特願 2007-232621、特願 2010-206215 等



(a) 回転培養装置本体



(b) 円形ベッセル

図 1-1-2 回転培養装置および円形ベッセル

#### <最近の研究の動向>

RWV バイオリアクターは、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を作り細胞組織はベッセルの底に沈むことなく、培養液中にふわふわと浮いた状態で徐々に3次元集合体を形成する。

さらに骨髄由来間葉系幹細胞を用いて、3次元軟骨組織の構築に成功しており、実用化に向けてジェイテックとRWV バイオリアクターにかわる独自のベッセルを共同開発し、本システムはガン細胞や肝臓細胞の3次元構築にも威力を発揮することを見出した。

#### <3次元大量培養へのアプローチ>

図 1-1-3 に示すように、RWV による3次元培養によって、がん細胞 (MG63: ヒト骨肉腫由来樹立細胞株) から大型のがん組織が構築できることが分かった。従来開発した 10cc ベッセルを用いて足場材料を用いずに、長径 1.5cm の組織が構築でき、H&E 染色により細胞塊の中まで壊死がおこっていない。

しかし、創薬スクリーニングに用いるには、均質でアッセイに必要な十分な量の細胞塊を同時に作製する必要がある。その条件に適う細胞足場材料として、種々の材料を検討した結果、コラーゲン製スポンジが気孔径、強度、細胞の含浸性の観点から優れており、また、大きさとしては 3mm φ × 3mm が適当であると結論できた。

そこで MG63 を培養液 (DMEM + 10% FBS + antibiotics-antimycotics) で単層培養した後、トリプシンを用いて数十個のこのコラーゲンスポンジを含む同培地に懸濁し、減圧下にてコラーゲンスポンジに細胞を播種した。静置培養した後、RWV バイオリアクターの回転培養ベッセル (図 1-1-4: 250cc 用) に足場材料/ガン細胞コンポジットを新鮮な培養液 (同組成) 中で、回転培養を行った。6 日間培養した後、多数の均質な3次元がん組織モデルを構築することができた (直径 1.5mm 程度の大きさ)。図 1-1-5 に上記方法により得られた組織のトルイジンブルー染色像および Hoechst 染色像を示す。組織中央部まで細胞は壊死せずに均質に近い3次元がん組織を形成していることがわかる。



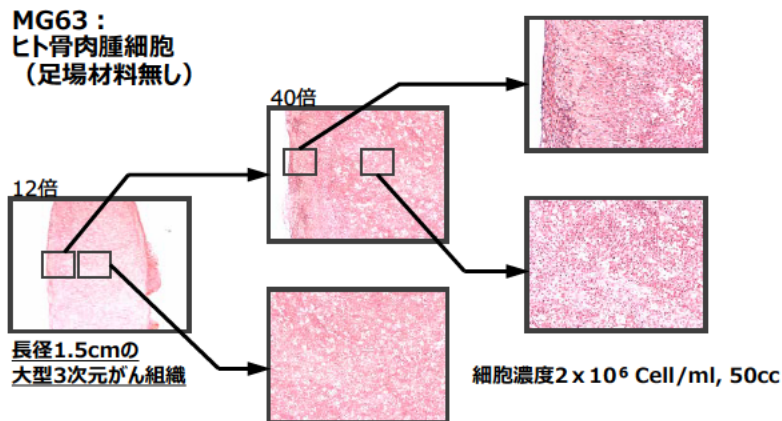


図1-1-3 RWV バイオリアクターを用いて構築したガン組織



図1-1-4 市販回転培養ベッセル (250cc用)

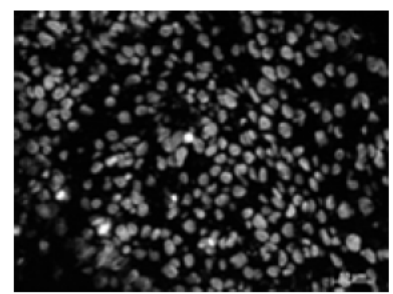
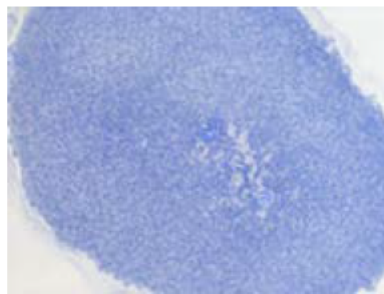
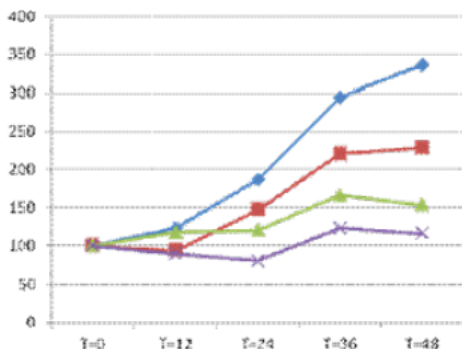
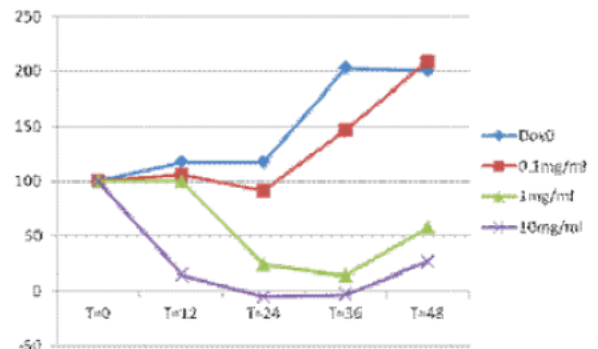


図1-1-5 RWV回転培養により得られたMG63細胞から構築した3次元がん組織のトルイジンブルー染色像 (左図) およびHoechst染色像 (右図)

またこの得られた3次元がん組織モデルを、新鮮な培養液で静置培養を24時間行った後に抗ガン剤(ドキソルビシン)を添加した培地(それぞれ10.0/1.0/0.1/0.0  $\mu\text{g/ml}$ )に置換し、2日間培養した。比較実験のために、MG63を静置培養して2次元がん組織モデルを構築し、同様に抗ガン剤で処理し、12時間おきにDNA量を測定した(図1-1-6参照)。



(a) 静置培養 (2次元培養)



(b) RWVバイオリアクターによる回転培養 (3次元培養)

図1-1-6 MG63ガン組織モデルのドキソルビシン曝露により生じるDNA量の経時的変化

静置培養により得られた2次元がん組織モデルの場合、抗ガン剤曝露によるDNA量の変化は抗ガン剤の濃度依存的であり、抗ガン剤の濃度変化とDNA量との間には、逆比例の関係が見られた。しかし本回転培養により得られた3次元がん組織モデルの場合、抗ガン剤濃度が低濃度(0.0/0.1  $\mu\text{g/ml}$ )の場合、DNA量に与える影響は小さく、抗ガン剤濃度が高濃度(1.0/10.0  $\mu\text{g/ml}$ )の場合、DNA量に与える影響が比較的大きくなることが観察された。

一般に、抗ガン剤の効果は、固形ガンにおいて低いことが臨床的報告により示されている。その理由として、

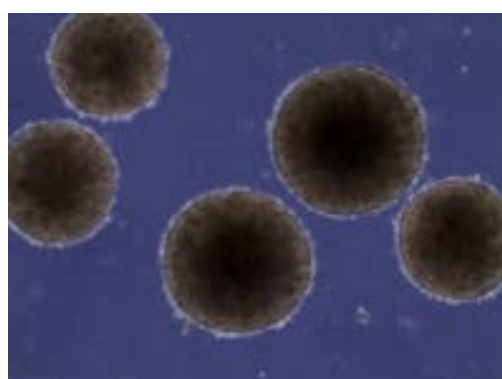
がん細胞が3次元の組織構造を有することにより、当該組織の内部まで抗ガン剤が浸潤しにくいこと、また当該3次元組織によって、抗ガン剤に対する反応性が2次元培養の場合とは異なっていることが挙げられ、上記のとおり3次元培養により得られたがん組織モデルのデータは、2次元培養により得られたがん組織モデルのデータとは明らかに異なっており、この浸潤性の違いや3次元組織の抗ガン剤に対する反応性の変化であると考えられる。

すなわち従来のディッシュを用いた2次元培養では、がん細胞の増殖率は抗ガン剤の投与量に対し濃度依存的（つまり投与量を多くすると増殖率は減少）であるが、RWV回転培養によって得られた2次元組織では、抗ガン剤の投与量に対し、低濃度（0.0/0.1  $\mu\text{g/ml}$ ）ではその影響は小さいが、ある閾値を超えると（1.0/10.0  $\mu\text{g/ml}$ ）、その影響は極めて顕著になる。つまり、2次元がん組織には低濃度で薬効のあった抗ガン剤も、3次元組織では、低濃度では効果は小さく、高濃度にしてはじめて薬効が得られることが現象論的に分かった。

以上の結果より、3次元組織を用いたスクリーニング技術開発はきわめて重要なテーマであることがわかる。また、産業技術総合研究所では肝臓細胞の3次元細胞培養にも成功し、その有効性を示しており、現在注目されている肝毒性の有無を創薬早期に調べる肝臓毒性スクリーニングにも適用可能であることを実証した。

さらに最近iPS細胞を用いた創薬への応用が期待されているが、そのためには大量培養法の開発が必要不可欠である。そこで京都大学の山中伸弥博士の構築したiPS細胞（253G1細胞株）を10mlの回転培養ベッセル中に播種し（ $2 \times 10^5$  cells）、mTeSR1培地で4日間培養することにより700 $\mu\text{m}$ ～1000 $\mu\text{m}$ 程度（およそ100個のスフェロイド、細胞総数 $8 \times 10^5$  cells）の球状スフェロイドを多数培養することに成功した（図1-1-7参照）。また、ALP染色他の試験、フローサイトメータによる未分化マーカーの解析によりiPS細胞の持つべき未分化性が維持されていることを確認した。本手法では、ほぼ均質の大きさのスフェロイドが安定して得られ、完全密閉系で容易に培養液交換や継代ができることが特長で、増殖率はフィーダー細胞を用いた培養に比べて2倍以上の高効率で、コストは3分の1以下であった。また培養後の細胞組織を分化培地で培養すれば、そのまま分化細胞・組織を用いた創薬スクリーニングに適用できるなどの利点がある。

またiPS細胞はデリケートな細胞株が多いために抗生物質を入れずに培養することが重要であるが、従来の大量培養法はいずれも非密封系でコンタミを起こしやすい。一方、本事業の培養手法（[回転培養ベッセル及びそれを用いた自動細胞培養装置] 特許5257960、PCT/JP2010/059754、出願人：ジェイテック、産業技術総合研究所）は密封系で、ベッセル内外気と接触せずに培地交換等を行うことができ、現在類似技術はない。特に現在様々な各種攪拌式による大量培養法について研究されているが、いずれと比べても安全性、安定性は高く、さらに培養効率、培養液コストとも優位であり、コンパクトなシステムが実現可能である。



(a) iPS細胞球状スフェロイドの位相差像



(b) iPS細胞球状スフェロイドのALP染色像

図1-1-7 回転培養により得られたiPS球状スフェロイドの位相差像とALP染色像

### 1-1-2 研究目的

製薬会社等の創薬プロセスでは実験動物を用いた評価の信頼性は低く、従来の2次元細胞培養法にも限界があり、3次元細胞培養の技術開発のニーズが高まっているが、大量で均質な3次元組織細胞の培養技術は現在確立した技術はない。また、ジェイテックコーポレーションと産業技術総合研究所が開発したこの再生医療向け3次元細胞培養装置は1つの細胞塊を大きな3次元組織（3～5cm程度）まで培養するために開発したものであり、同時に大量の3次元組織細胞を培養することはできない。

そこでこれら課題を解決し、iPS 細胞や均質なガン組織、肝臓組織等の 3 次元細胞の大量培養を可能とする独自のベッセルを用いた擬微小重力培養法による 3 次元培養技術を高度化し、大量培養技術を確立する。

### 1-1-3 研究目標

製薬会社等における創薬のプロセスでのスクリーニング作業における 3 次元大量培養及びその評価方法の確立がニーズとしてある。

そこでまず現在のスキヤホールド（足場材料）等を用いた静置式の 3 次元大量培養やフラスコなどを用いた攪拌式の大量培養に比べ十分に大きく、従来にはない高品質な 3 次元組織の大量培養を実現するために、まず大量培養可能な回転培養ベッセルを開発し、また独自の位置制御ソフトウェア CFC（Cell Float Control）をもとに、ストレスなく微小重力下で大量の 3 次元細胞塊を均質に培養するために、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独自の新しい位置決め CFC ソフトウェアを開発する。また本ベッセルをセットし、新しい CFC を組込んだ 3 次元大量培養装置を開発し、大量培養のためのアルゴリズムを開発する。さらに本 3 次元大量培養装置で作製した大量の 3 次元組織細胞を用いた画期的な創薬スクリーニング操作の自動化装置を開発する。

本 3 次元大量培養装置は従来の静置式や攪拌式の大量培養装置に比べて以下の点が優れている。

- ・ ストレスなく微小重力下で細胞培養可能で 100% 正常な培養組織（トリパンプルー陰性）。【高品質】
- ・ 静置培養に比べ湿重量で 3～5 倍の組織を形成可能。【高品質】
- ・ 培養時間が静地培養に比べ 3 分の 1。【高効率】
- ・ iPS 細胞では攪拌式に比べ培地のコストは培養液の交換回数も考慮すると 10 分の 1 以下を実現。【低コスト】
- ・ ベッセルは閉鎖系で攪拌式と比べコンタミの発生がない。【高品質】

#### 1-1-3-1 3 次元大量培養技術の開発

(1) 3 次元大量培養用回転培養ベッセルの開発（株式会社ジェイテックコーポレーション、国立大学法人大阪大学）

直径 1mm～3mm のコラーゲンスポンジなどに細胞を播種したコラーゲン・細胞コンポジットを 300 個以上同時に、高品質な 3 次元組織細胞（正常細胞）を培養可能なスクリーニング用細胞組織を構築できる回転培養ベッセルを試作開発し、その性能を評価する。

(2) 大量培養のための位置制御 CFC ソフトウェアの開発（株式会社 ジェイテックコーポレーション）

同時に 300 個以上の大量の 3 次元組織の細胞塊を浮遊培養するために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）の最適化を図り、さらに従来の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）をもとに新しい大量の細胞群の位置決め制御アルゴリズム（FFMA : Free float by multivariate analysis）を開発し、最適化をはかる。これら研究成果をもとにベッセル内で大量の細胞塊を常に一定領域で浮遊させるためのベッセルの回転角速度及び揺動速度制御による細胞塊位置制御ソフトウェア（CFC）を開発し、本研究開発で試作開発する創薬スクリーニング用大量培養装置に組み込み、動作確認を実施する。（一定領域内での細胞密度分布が常時  $\sigma$  以内を目標とする）

(3) 3 次元大量培養装置の開発及び 3 次元大量培養アルゴリズムの開発（国立研究開発法人産業技術総合研究所、株式会社ジェイテックコーポレーション、国立大学法人大阪大学）

(1)で開発した回転培養ベッセルをセットし、(2)で開発した位置制御ソフトウェア CFC を組込んだ回転、揺動及び傾斜角度機構を有する 3 次元大量培養装置を開発し、3 次元大量培養プロトコルを開発する。

本プロジェクトの最終的な技術的目標は細胞塊の浮遊制御の自動化により、300 個（2～5mm 程度）以上の品質の一定したスクリーニング用 3 次元組織細胞を構築できる大量培養装置を開発する。1 組織の細胞数の偏差が  $\pm 7\%$  以内、品質（肝臓細胞の場合はアルブミン産生など） $\pm 7\%$  以内の組織を目標とし、評価実験を実施する。



### 1-1-3-2 創薬スクリーニング操作の自動化

(1) 3次元組織ピックアップユニットの開発 (株式会社ジェイテックコーポレーション、国立大学法人大阪大学)  
上記1-1-3-1で構築したディッシュ上に多数点在した3次元組織を画像認識により識別し、マイクロピペットの先を細胞組織の中央に位置決めし、吸引によりピックアップし、96ウェルプレートの指定したウェルに播種するピックアップユニットを開発する。位置の制御、吸引力、離脱の機構などを検討し、自動化システムを開発する。

(2) 3次元組織粉碎ユニットの開発 (株式会社ジェイテックコーポレーション、国立大学法人大阪大学)  
細胞のアッセイを行うために3次元の細胞組織を粉碎するためのユニットを開発する。必要十分な時間とパワーにより、組織の温度を過剰に上昇させず、最適なパラメータを決定する。

(3) 創薬スクリーニング用自動装置の開発及び評価実験 (国立研究開発法人産業技術総合研究所、株式会社ジェイテックコーポレーション、国立大学法人大阪大学)

(1)および(2)の一連の操作、および(2)で採取した上清を用いた種々のアッセイ法に評価法対して適応可能なソフトウェアを組み込んだアッセイプレート作成を含む全操作を自動化した創薬スクリーニング自動化装置を開発する。

最終的な技術的目標は1-1-3-1の3次元大量培養装置で大量培養し、さらに(2)と(3)で開発したピックアップユニット及び粉碎ユニットを組み込んだ創薬スクリーニング用自動化装置を用い、手培養との比較を行い、同程度の精度でデータが得られることである。

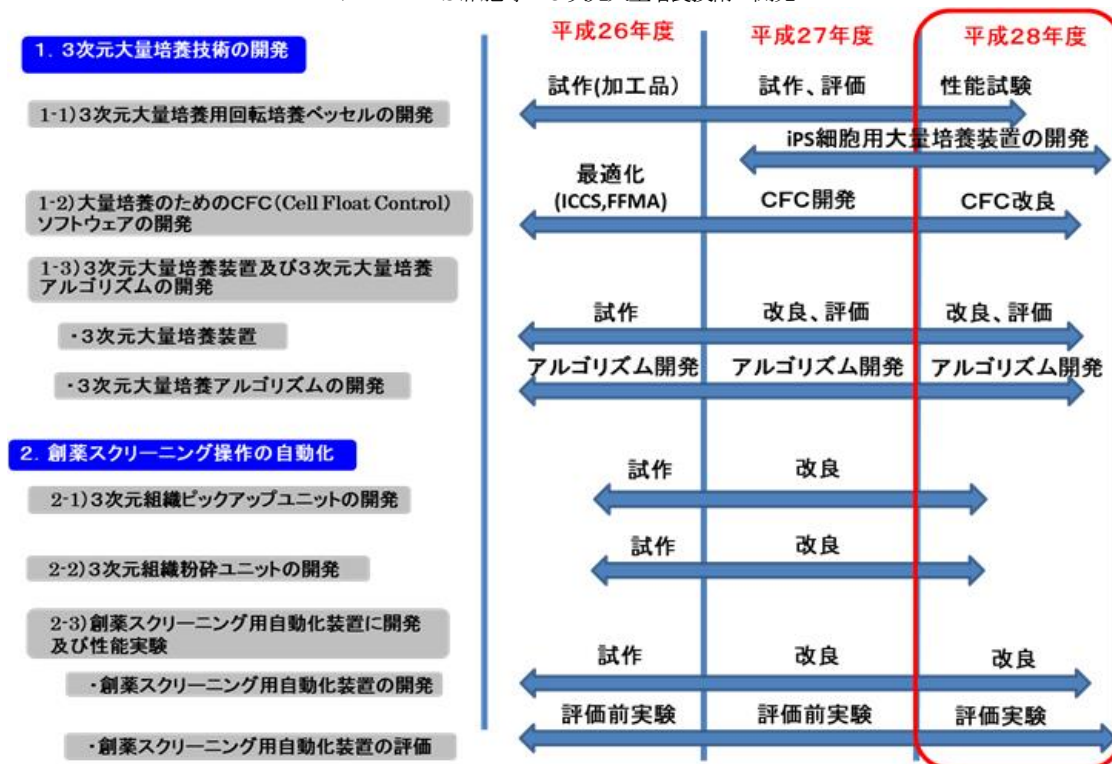
本研究開発では表1-1-1のスケジュールで研究目標の達成を目指す。

本事業も3ヶ年の最終年度を迎え、本年度は評価から実用化の段階に入る。

新たに開発したiPS細胞専用の大量培養システムは、インキュベータに対応した実用的な培養装置と同じく上市レベルの閉鎖系培地交換ユニットの開発を行った。

もう一方のテーマである創薬スクリーニング自動化システムについても、インキュベータ対応の培養装置を開発するとともに、スクリーニング自動化装置を仕上げ、ピックアップユニット・細胞破碎ユニットを完成させて、実際の抗ガン剤スクリーニング実験において手操作との比較実験を行い、その有用性を確認する。

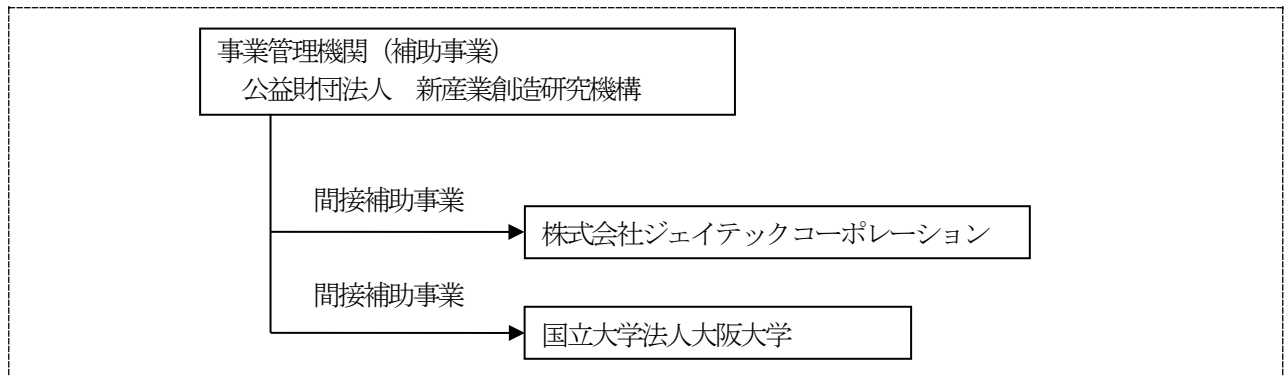
表1-1-1 研究開発スケジュール (3ヶ年)  
＜テーマ：iPS細胞等の3次元大量培養技術の開発＞





## 1-2 研究体制

### 研究組織（全体）



|                                                  |                                                                    |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 総括研究代表者（PL）<br>株式会社ジェイテックコーポレーション<br>代表取締役 津村 尚史 | 副総括研究代表者（SL）<br>国立大学法人 大阪大学大学院<br>工学研究科 精密科学・応用物理学専攻<br>特任教授 植村 寿公 |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|

### (1)管理者および研究員

#### (1-1) 事業管理機関 公益財団法人新産業創造研究機構

##### 管理員（プロジェクト管理）

| 氏 名   | 所属・役職                   |
|-------|-------------------------|
| 小坂 宣之 | 研究所ロボット・AI部研究開発コーディネーター |
| 神田 正巳 | 研究所ロボット・AI部部長           |
| 飯塚 昌弘 | 研究所所長                   |
| 川口 雅弘 | 技 監                     |

#### (1-2) 間接補助事業機関

##### ① 株式会社ジェイテックコーポレーション研究員

| 氏 名   | 所属・役職                  |
|-------|------------------------|
| 津村 尚史 | 代表取締役社長                |
| 桜井 靖久 | ライフサイエンス・機器開発部 部長      |
| 浜島 義和 | ライフサイエンス・機器開発部 部長代理    |
| 小野 貴弘 | ライフサイエンス・機器開発部 次長      |
| 杉坂 剛  | ライフサイエンス・機器開発部 課長      |
| 加藤 正和 | ライフサイエンス・機器開発部 課長      |
| 内田 雄大 | ライフサイエンス・機器開発部 主任      |
| 森田 健一 | 事業戦略室 室長               |
| 増永 竜彦 | 営業本部ライフサイエンスグループ グループ長 |
| 楠本 憲司 | 細胞培養センター チーフ研究員        |
| 上村 葉  | 細胞培養センター 研究員           |

② 国立大学法人大阪大学 研究員

| 氏 名    | 所属・役職                       |
|--------|-----------------------------|
| 紀ノ岡 正博 | 大学院 工学研究科 生命先端工学専攻 教授       |
| 植村 寿公  | 大学院 工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 特任教授 |

(1-3) アドバイザー・委嘱委員

| 氏 名    | 所属・役職                                             |
|--------|---------------------------------------------------|
| 魚谷 信夫  | NPO 法人近畿バイオインダストリー振興会議 理事長・事務局長 (H26,27)          |
| 梅村 勲   | NPO 法人近畿バイオインダストリー振興会議 専務理事 (H28)                 |
| 山本 美穂子 | NPO 法人近畿バイオインダストリー振興会議 (H27)                      |
| 源島 裕一郎 | 第一実業株式会社新事業推進室 ライフサイエンス担当部長                       |
| 上田 雅之  | 株式会社島津製作所 分析計測事業部 営業統括部<br>ライフサイエンス市場担当 シニアマネージャー |

### 1-3 成果概要

本年度の研究開発は、下記の各項目について、表 1-3-1 に記載の研究開発スケジュール通りに、遅滞なく目標を達成することができた。

表 1-3-1 に記載の「1. 3 次元大量培養技術の開発」では、大量培養用ベッセルの改良をさらに進め、培地を確実に封止すると共に、酸素・CO<sub>2</sub>ガス交換膜の選定を行い、実際の細胞を用いた培養評価につなげた。さらに本技術に関しては、インキュベータでの利用を考慮して、電装系を完全密閉にした培養装置の開発も行った。また、前年開発した iPS 細胞培養用の大量培養ベッセルについても、より効率的な培養・継代（フィルトレーション）を実現するべく、シリンドリカル形状の改良を行ったほか、同じくインキュベータでの使用に耐えうる完全密閉型培養装置の開発を行った。

以上、一連の 3 次元培養技術は、昨年同様 再生医療産業化展に出展し、注目を集めることができた。

一方、表 1-3-1 に記載の「2. 創薬スクリーニング操作の自動化」に関しては、ピックアップユニットのプログラムを作成し、細胞塊 1 個ごとの抽出・移送を可能にした。これにより自動インキュベータ、粉碎ユニットとあわせ一連の機能が完成したことから、スクリーニング操作について本装置と手操作との比較を行い、本装置の有効性について評価を行った。

表 1-3-1 平成 28 年度の研究開発スケジュール  
＜テーマ：iPS 細胞等の 3 次元大量培養技術の開発＞

| 項目                    | 内容          | 平成28年 |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    | 平成29年 |    |     | 当初  | 現状 | 進捗 |
|-----------------------|-------------|-------|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|----|----|----|-------|----|-----|-----|----|----|
|                       |             | 4月    | 5月 | 6月 | 7月 | 8月 | 9月 | 10月 | 11月 | 12月 | 1月 | 2月 | 3月 | 予定    | 予定 | 状況  |     |    |    |
| 1. 3次元大量培養技術の開発       |             |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    |     |     |    |    |
| 1-1) 大量培養用回転培養ベッセルの開発 | ガス交換膜選定     |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 7月  | 2月  | 完了 |    |
|                       | 改良・評価       |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 1月  | 2月  | 完了 |    |
|                       | 実用化         |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 3月  | 3月  | 完了 |    |
| 1-2) 大量培養ソフトの開発       | 改良          |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 9月  | 9月  | 完了 |    |
| 1-3) 培養装置・アルゴリズムの開発   | 改良          |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 9月  | 9月  | 完了 |    |
|                       | 評価          |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 11月 | 11月 | 完了 |    |
|                       | 実用化         |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 3月  | 3月  | 完了 |    |
| 1-4) iPS細胞大量培養装置の開発   | 培養評価        |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 9月  | 11月 | 完了 |    |
|                       | 実用化         |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 3月  | 3月  | 完了 |    |
| 2. 創薬スクリーニング操作の自動化    |             |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    |     |     |    |    |
| 2-1) ピックアップユニットの開発    | 検証・改良       |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 11月 | 11月 | 完了 |    |
|                       | 実用化         |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 3月  | 3月  | 完了 |    |
| 2-2) 細胞粉碎ユニットの開発      | 評価          |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 7月  | 7月  | 完了 |    |
|                       | 改良          |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 11月 | 11月 | 完了 |    |
| 2-3) 創薬スクリーニング自動化装置開発 | 装置開発・改良     |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 11月 | 12月 | 完了 |    |
|                       | プロトコル開発・実用化 |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 3月  | 3月  | 完了 |    |
|                       | インキュベータ評価   |       |    |    |    |    |    |     |     |     |    |    |    |       |    | 7月  | 1月  | 完了 |    |

### 1-3-1 3次元大量培養技術の開発

#### (1) 3次元大量培養用回転培養ベッセルの開発

本年度は、昨年度までに開発したベッセルを、さらに実際の細胞培養に供するために、以下の2点の改良を行った。

- ・ 酸素・CO<sub>2</sub>ガス交換膜の選定
- ・ 膜取付け構造の見直し・改造による培地封止方法の改良

これらの改良を施したベッセルで、実際に細胞培養評価を行い、本手法及びベッセルの有効性を確認した。

#### (2) 大量培養のための位置制御 CFC (Cell Float Control) ソフトウェアの開発

本年度は、昨年度までのノウハウ（特徴抽出・位置決め制御等）を統合し、回転培養コントロールソフトウェアとしてとりまとめる作業を行った。

#### (3) 3次元大量培養装置の開発及び3次元大量培養プロトコルの開発

昨年度に開発した3次元大量培養（浮遊培養）装置の機能評価まで実施完了したが、今年度は創薬スクリーニング用の大量の細胞培養の実証を行うために、一般的なサイズのCO<sub>2</sub>インキュベータに設置するための若干の小型化（幅で約400mm以下）と、その高湿度環境内において長時間使用しても機能的かつ電氣的な不具合を防止するための耐高湿度対応の改良を行った。なお、今年度から3次元大量培養（浮遊培養）装置を「CellPet 3D-L」という名前で展示する機械等で発表している。そしてさらに、(1)に記載の3次元大量培養用回転ベッセル、(2)に記載の位置制御CFCを組み込んだ「CellPet 3D-L」を用いてヒト骨肉腫由来樹立細胞株MG63の浮遊培養を行い、当初の技術目標の通り、均質な（直径約3mmと揃っている）300個以上の細胞組織の培養に成功した。

また今年度の深掘りテーマとして、昨年度に開発したiPS細胞用大量培養ベッセル向けにiPS細胞用3次元大量培養装置「CellPet 3D-iPS」の研究開発に取り組んだ。「CellPet 3D-iPS」は同時に2機種の開発を行い、それぞれ搭載・培養できるiPS細胞用大量培養ベッセルの本数が1本と3本という設定になっている。そして「CellPet 3D-iPS」の開発後においては、引き続いて「CellPet 3D-iPS」と昨年度に試作機開発に成功したiPS細胞スフェロイドをフィルタリングにより小片化する機能を有する培養液交換ユニット「CellPet FT」を用いて、3次元培養によるiPS細胞スフェロイドでの増殖培養プロトコルと継代プロトコルの開発をそれぞれ推進した結果、これまで存在しないiPS細胞スフェロイドの状態が増殖と継代を繰り返すことによる維持培養可能な3次元大量培養プロトコルの開発に成功した。

### 1-3-2 創薬スクリーニング操作の自動化

#### (1) 3次元組織ピックアップユニットの開発

昨年度の開発に成功した3次元組織ピックアップユニットにおいて、3次元大量培養装置「CellPet 3D-L」で培養した細胞組織を任意に播いたディッシュから組織を一つずつピックアップしてプレートの穴に移送することを実現させるために、「カメラ撮影」→「画像処理」→「細胞塊の特定」→「ピックアップ」→「プレートへの移送・播種」を一連の動作で行うソフトウェアを開発し、動作評価を行った。

#### (2) 3次元組織粉砕ユニットの開発

昨年度において基本動作を確認した3次元組織粉砕ユニットを改良し、実際に96ウェルプレート内に入れた細胞組織に対して薬剤やバッファー液をアプライし、一定期間CO<sub>2</sub>インキュベータで培養した後に、所定の粉砕動作により粉砕可否の実験を繰り返し行い、最終的に穴形状が角型のウェルプレートを用いることで組織が超音波粉砕機やホモジナイザーと同じレベルに粉砕されることを実証した。

#### (3) 創薬スクリーニング用自動化装置の開発及び評価実験

CO<sub>2</sub>インキュベータ、3次元組織ピックアップユニット、3次元組織粉砕ユニット、遠心分離ユニットを含む創薬スクリーニング用自動化装置のハードウェアについては前年度までに概ね完成させており、本年度は各ユニッ

トまたは装置の動きを最適化させるための調整し、同時に全てを統合して制御・動作させるソフトウェアの開発を中心に推進した。そして本年度の後半では、これら開発成果に基づいた実際のガン細胞株による抗ガン剤の薬効評価テストを行い、当初の技術目標の通り、本装置と現状標準的に実施されているヒト手技培養操作での評価テスト結果は同じであることが示され、本装置の有効性が確認できた。

#### 1-4 当該研究開発の連絡窓口

公益財団法人新産業創造研究機構（担当 中嶋 勝己）  
〒650-0046 神戸市中央区港島中町6丁目1番地  
神戸商工会議所4F  
TEL 078-306-6801  
FAX 078-306-6812



## 第2章 本 論

### 2-1 3次元大量培養技術の開発

直径が $\phi 1\sim 3\text{mm}$ と比較的大型のスクリーニング用細胞組織（コラーゲンスポンジと細胞のコンポジット）を培養する大型細胞培養ベッセルとその培養装置について、本年度は実用化に向けて、すなわち実際の細胞培養の現場で使えるように改良を重ね、細胞培養テストによる評価を行った。

#### 2-1-1 3次元大量培養用回転培養ベッセルの開発

##### (1) ベッセルの概要

創薬スクリーニングに用いる大型細胞培養ベッセルでは、7～10日程度の長期間の培養中において細胞組織が消費する酸素を取り込み、逆に代謝により産生される $\text{CO}_2$ を外部に放散させるためのガス交換膜が必要となる。本年度は、この膜の選定ならびに培地漏れが一切発生しない膜の取付け機構の開発・設計ならびに一部改良にも取り組んだ。

##### (2) 開発・設計

###### ① 酸素・ $\text{CO}_2$ ガス交換膜の選定

ベッセルの中心軸（通気のため気道を有する）に巻くもので、酸素・ $\text{CO}_2$ ガスの透過性や加工性・柔軟性等の物理特性はもとより、培地に常時接液するため、化学的な安定性、液中へ薬剤の溶出のないことや、生物学的に細胞培養の阻害要因がないこと等を勘案、さらに実際の細胞培養テストの結果から、多孔質のPTFE膜を選定した。膜のチューブ加工・供給に関しては、住友ゴム工業株式会社の協力得た。

###### ② 膜取付け部の改良

上記PTFEガス交換膜は比較的強靱でしなやかではあるが、軸との接合部での封止性・密着性に問題があり、培地が漏れる可能性があった。元々の設計思想は、Oリングを使って輪ゴムのように使って軸に密着させるものであったが、この構造自体に無理があり、培地の封止は難しい問題であった。培地が漏れるということは、同じルートを逆にたどって雑菌が入り込む可能性があるということで、コンタミネーションの大きな要因になる。ベッセルを培養に使う上で、膜の取付けは重要なファクターであった。本年度はこの問題に取り組み、結果として以下のような機構で膜を取り付けることで、培地の漏れ問題を解決することができた（図2-1-1参照）。

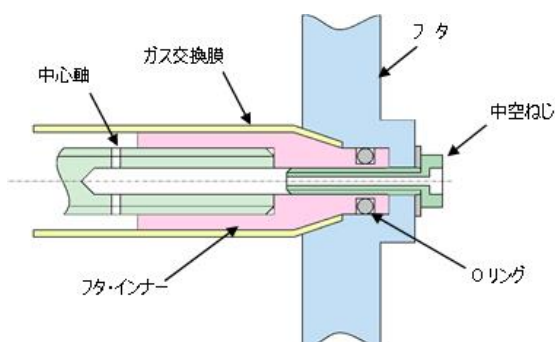


図2-1-1 ガス交換膜取付け機構の概念図



図2-1-2 改良後のスクリーニング細胞用大量培養ベッセル

開発・製作したベッセルを図2-1-2に示す。図2-1-2は、漏れ試験実施時の写真である。

##### (3) 検証、課題

図2-1-2のベッセルを用いて実際にガン細胞株MG63とコラーゲンスポンジのコンポジットを播種し、10日間の培養をしたところ、培養中において目立った変化や異常が認められず、培養自体においては問題がないことを確認した。またカビなどのコンタミネーションもなく、さらに培地の色等の目立った劣化も確認されなかったことから目的としていたガス交換も良好に行われていたものと判断できる。10日間の培養で得られた細胞塊も、旧来の方法で得られるものの大きさや形質等とほぼ同様であった。

## 2-1-2 大量培養のためのCFC（Cell Float Control）ソフトウェアの開発

### (1) 概 要

昨年度までに、大量培養に必要な特徴抽出（ICCS：Image cytometry by color separation）位置決め制御（FFMA：Free float by multivariate analysis）等基本アルゴリズムの最適化は終了しており、大量培養のためのCFC技術もほぼ完成してきたことから、本年度はこれらを統合し、実際に回転培養装置をコントロールして回転培養を行うためのプログラムの作成を行った。

### (2) 回転培養制御プログラム

作成したソフトウェアの画面を図2-1-3に示す。

このソフトウェアでは、設定された時間ごとに図2-1-4に示すフロー図に従って回転数・角度をコントロールすることで細胞群の位置をベッセル中央付近に安定させることを実現させるためのものである。



図2-1-3 回転培養制御プログラム画面例

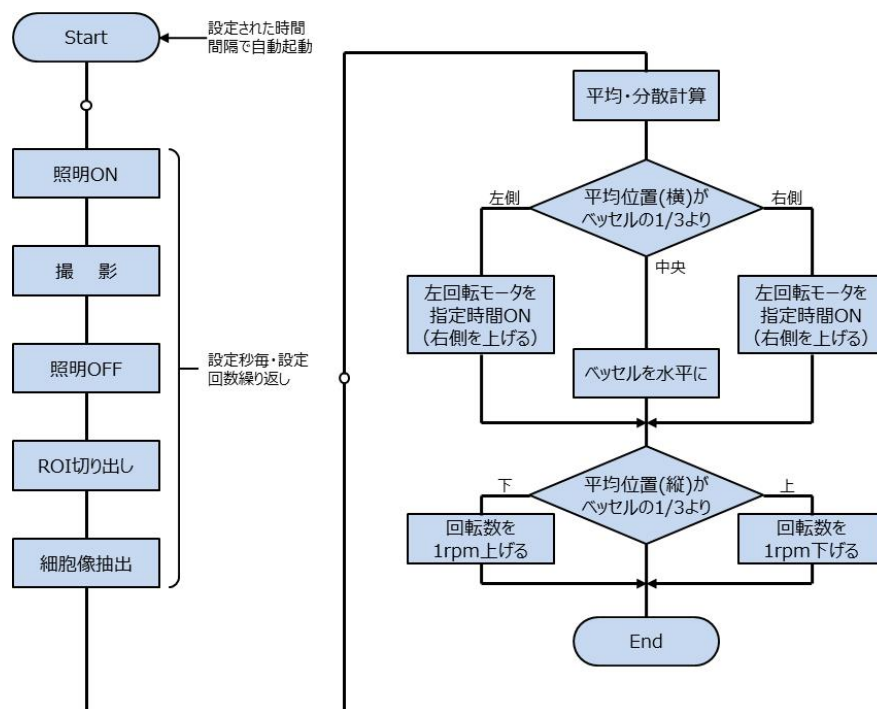


図2-1-4 回転培養制御フロー図

### (3) 課 題

ベッセル開発で触れたように、細胞培養テストで使用するベッセルは中心軸が白色の PTFE 膜になっており、本プログラムを作用させたところ、細胞塊の背景とのコントラストが十分でなく、細胞像切り出しが不十分である。ソフトウェアでは、細胞像の大きさに制限を加え、この問題の軽減を図っているが十分でない。解決には、ベッセル自体の改良を含め、照明環境などハードウェア、ソフトウェアの多面的なアプローチが必要と思われる。いずれにせよ N 数がまだ少ないため、試行錯誤を繰り返しながら改善していく所存である。

## 2-1-3 3次元大量培養装置及び3次元大量培養アルゴリズムの開発

### 2-1-3-1 3次元大量培養装置の開発

#### ・3次元大量培養（浮遊培養）装置「CellPet 3D-L」の改良

#### (1) 概 要

昨年度に開発した3次元大量培養（浮遊培養）装置「CellPet 3D-L」の機能評価まで実施完了したが、今年度は創薬スクリーニング用の大量の細胞培養の実証を行うために、一般的なサイズのCO<sub>2</sub>インキュベータに設置するための若干の小型化（幅で約400mm以下）と、その高温高湿度環境内において長時間使用しても機構的かつ電氣的な不具合を防止するための耐高湿度対応の改良を行った。

#### (2) 開発・設計

昨年度までに開発した3次元大量培養（浮遊培養）装置「CellPet 3D-L」は機能評価用として開発・設計をした。今年度は、実使用に向けた「CellPet 3D-L」の若干の小型化、CO<sub>2</sub>インキュベータ内の高温高湿度環境対応の開発・設計を行った。具体的には加工品材質・形状の再設計、直動ガイドレールやオリエンタルモーター社製ブラシレス DC モーター「BLH015K」等の機構部品の再選定を推進し、一般的なCO<sub>2</sub>インキュベータに設置できるように横幅を約10%程度の短縮（約400mm以下）、高温高湿度環境による結露等による機構的かつ電氣的な不具合を防止するための密封構造、さらにはモーターによる発熱量の低減を実現した（図2-1-5 参照）。

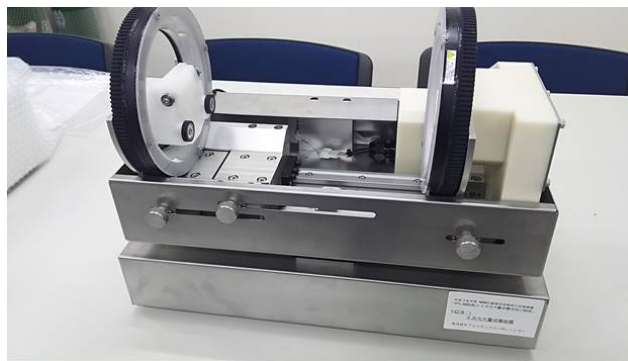


図2-1-5 CellPet 3D-Lの写真

#### (3) 検証・課題

「CellPet 3D-L」を設置・使用するCO<sub>2</sub>インキュベータの庫内温度は37度に制御されているが、この制御は通常庫内に発熱物がないことを前提とされている。万が一、庫内に設置した「CellPet 3D-L」が通常動作で発生・放散する熱によってCO<sub>2</sub>インキュベータの庫内温度制御が不能になる可能性が懸念され、まずはその検証を行った。結果として、低発熱性のブラシレス DC モーターの効果によりCO<sub>2</sub>インキュベータの温度制御が不能には至らず、庫内は37度一定で温度制御がなされていた。庫内の培養環境が一定であることが示されたので、次に通常動作しているCO<sub>2</sub>インキュベータ内での「CellPet 3D-L」の長時間連続動作検証を行ったが、2週間以上の連続動作でも不具合は発生せず、また高温高湿度環境が原因となる金属錆びなどの外観変化も観察されず、このことから3次元大量培養装置として開発に成功したと考えている。

#### ・iPS細胞用3次元大量培養装置「CellPet 3D-iPS」の開発

#### (1) 概 要

今年度の深掘りテーマとして、昨年度に開発した iPS 細胞用大量培養ベッセル向けに iPS 細胞用 3 次元大量培養装置「CellPet 3D-iPS」の研究開発に取り組んだ。「CellPet 3D-iPS」は同時に 2 機種の開発を行い、それぞれ搭載・培養できる iPS 細胞用大量培養ベッセルの本数が 1 本と 3 本という設定にした。

## (2) 開発・設計

iPS 細胞用 3 次元大量培養装置「CellPet 3D-iPS」は、昨年度に開発した iPS 細胞用大量培養ベッセル向けの回転浮遊培養装置である。特長としては装置設置面積当たりの細胞培養数の向上を目指したフットプリント 176mm×176mm のコンパクト設計、また連続運転したとしても恒温槽の庫内 37 度一定の温度制御に影響を与えない低発熱性を実現したところにある。さらには、生物学的な実験では n 数が 3 以上を求められることから「CellPet 3D-iPS」においては 1 台で 1 本の培養ベッセルが搭載・培養できるものとは別に、3 本の培養ベッセルが同期して回転する装置も必要であると判断し、開発した（図 2-1-6 参照）。



図 2-1-6 CellPet 3D-iPS の写真

## (3) 検証・課題

発熱により恒温槽の温度制御が不能にならないために「CellPet 3D-iPS」は「CellPet 3D-L」と同様に低発熱性のブラシレス DC モーターを採用している。実際に「CellPet 3D-iPS」を連続動作させているときであってもアルミニウム製の筐体の効果もあって表面温度が 20 度以下と非常に低く保たれており、このことから複数台を同時に恒温槽内で連続動作したとしても庫内の温度制御に影響がないと考えられる。

### ・iPS 細胞用大量培養ベッセル向けの培地交換ユニット「CellPet FT」の改良

#### (1) 概要

昨年度に開発した培地交換ユニット「CellPet FT」は、主には「CellPet 3D-iPS」で培養した後の iPS 細胞用大量培養ベッセル内の iPS 細胞スフェロイドを閉鎖系のまま分散・小片化（フィルトレーション）する機能を有している。今年度においては使用性向上ならびに実用化に向けた専用コントローラーの開発を推進した。また、フィルトレーションのためのフィルタユニットの改良を行い、培地通過時に細胞がフィルタユニットにほぼ残らないことを確認した。

#### (2) 開発、設計

昨年度に開発した培地交換ユニット「CellPet FT」では、電源や制御信号を送信するための中継 BOX を作成し専用コントローラーしたが、今年度においては使用性向上と実用化に向けた専用コントローラーを開発した。そのコントローラーは「CellPet FT」を動作させるための電源、制御用 CPU、モータードライバー等を搭載しており、作業者とのインターフェースは液晶タッチパネルとなっている。また、卓上での使用を想定し、実験台等に設置しても場所を取らないように省スペース設計とした。

さらには、細胞のフィルトレーションのために使用する金属メッシュやパッキン類が内部に組み込まれているフィルタユニットにおいて、フィルトレーション後での金属メッシュに細胞がほぼ残らないように金属メッシュやパッキン類のサイズの最適化を図った（図 2-1-7 参照）。





図 2-1-7 CellPet FT の写真

### (3) 検証、課題

今年度での検証も、昨年度と同様にして iPS 細胞スフェロイドのフィルトレーションの評価を行ない、昨年度と同様に結果が得られる否かについて確認を行ったが、図 2-1-8 の通りほぼ同じ分散・小片化状態を示し、またその後の「CellPet 3D-iPS」での培養を実施したが、問題なく大きさの揃ったスフェロイドに増殖した。

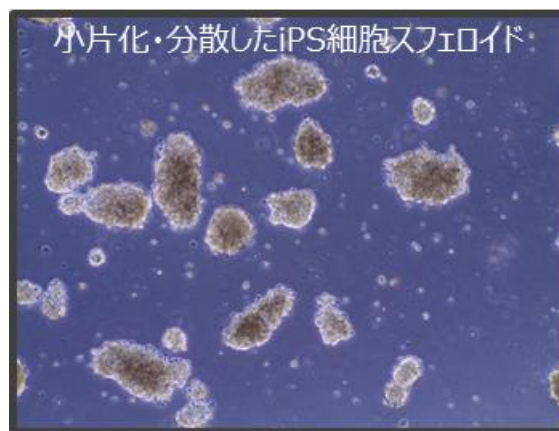


図 2-1-8 「CellPet FT」による分散・小片化した iPS 細胞スフェロイド写真

## 2-1-3-2 3次元大量培養アルゴリズムの開発

### ・3次元大量培養（浮遊培養）装置「CellPet 3D-L」での3次元大量培養アルゴリズムの開発

#### (1) 概要

創薬スクリーニングにおいて、多数の均質な細胞組織塊を作ることが最も重要な課題である。

我々は「CellPet 3D-L」を用いて、細胞としてはガン細胞である「MG63」を選び、足場材料としてオリンパステルモ社製のコラーゲンスポンジ（直径 1～3mm）を用い、300 個以上の均質な組織塊の構築に成功した。

#### (2) 開発

今年度において、創薬スクリーニング用自動化装置を評価するために使用する細胞として、ヒト骨肉腫由来樹立細胞株「MG63」とした。まず評価準備として、オリンパステルモ社製テルダーミスを 3mm φ 生検パンチでく

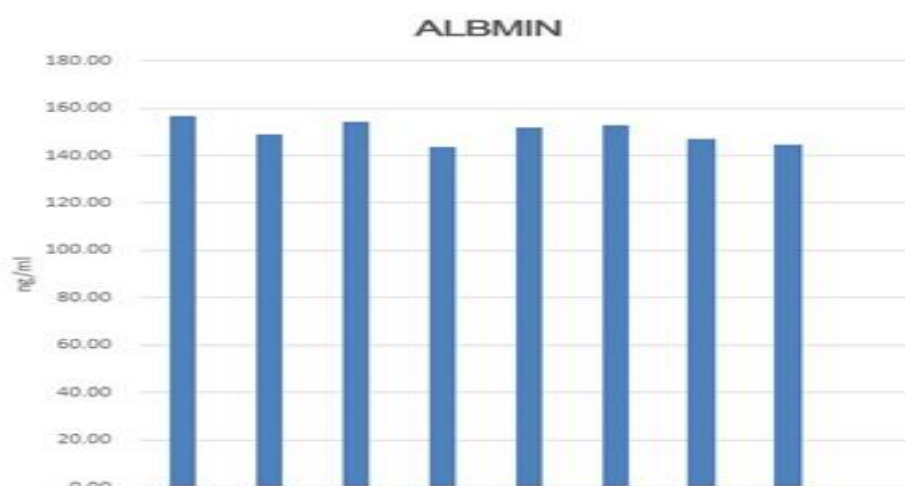


り抜いて作製した 3mmφ コラーゲンスポンジに 100mmHg 減圧下で 10 分間維持することで「MG63」細胞を導入、ガン細胞・コラーゲンスポンジのコンポジットを作成した。そしてそのコンポジットを 3 時間程度の静置培養を行った後、続いて 3 次元大量培養装置「CellPet 3D-L」を用いて DMEM<High Glucose>、10%FBS、抗生剤<Anti-Anti>が主成分の培養液中で 12 日間の浮遊培養を行い、多数の 3 次元ガン組織を作製した。

### (3) 検証、課題

まず先に開発に成功した 3 次元大量培養ベッセルと「CellPet 3D-L」を用いて肝臓細胞（ヒト肝臓ガン由来細胞（HepG2）、ヒト血管内皮細胞（HUVEC）、ヒト間葉系幹細胞の 3 種混合培養系）の大量培養実験を行った。本プロジェクトでの当初の技術目標であった「1 組織での細胞数の偏差（1σ）が±7%以内」ならびに「品質（アルブミン産生など）±7%以内」については、図 2-1-9 の(a)のように目標を達成することができた。

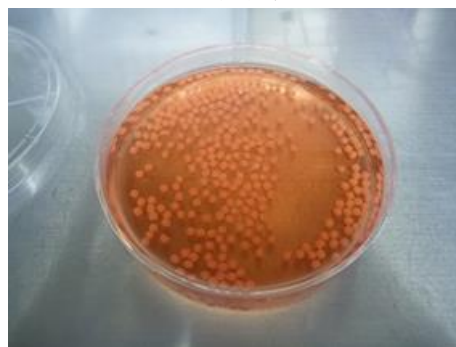
さらに同じように 3 次元大量培養ベッセルと「CellPet 3D-L」を用いて MG63（ヒト骨肉腫樹立細胞株）・コラーゲンスポンジのコンポジットを浮遊培養することにより、12 日後に 300 個以上の細胞塊の大量培養に成功した（図 2-1-9(b)、(c)を参照）。ただし、本検証実験において細胞数や品質を検証するために 30 個の細胞塊をランダムに抽出する方法で評価を実施したが、当初の技術目標を下回る結果となった。これは、以前の 50 個のコラーゲンスポンジによる実験と今回の 300 個のコラーゲンスポンジによる実験では、それぞれのスポンジ容積に対する調整した細胞懸濁液量の割合が異なり、コラーゲンスポンジ内に導入される細胞の絶対数にむらが生じたことが原因であると考えており、今後最適化を図っていく予定としている。



- (a) ヒト肝臓ガン由来細胞（HepG2）、ヒト血管内皮細胞（HUVEC）、ヒト間葉系幹細胞の 3 種類混合培養系を用いて構築した 50 個の 3 次元肝臓細胞組織のうちランダムに抜き出した 8 試料に関して行ったアルブミン産生量測定結果



- (b) 浮遊培養容器内の MG63 とコラーゲンスポンジのコンポジット



- (c) 浮遊培養容器から取り出した 300 個以上の「MG63」の細胞塊

図 2-1-9 MG63・コラーゲンスポンジのコンポジットならびに培養後の「MG63」の細胞塊の写真

## ・iPS細胞用3次元大量培養（浮遊培養）装置「CellPet 3D-iPS」での3次元大量培養アルゴリズムの開発

### (1) 概要

昨年度から今年度かけて開発したiPS細胞用3次元大量培養（浮遊培養）装置「CellPet 3D-iPS」によるスフェロイド化による増殖培養のプロトコルと、培地交換ユニット「CellPet FT」を使用したフィルトレーションによる継代操作のプロトコルを用いて、昨年度開発したiPS細胞用大量培養ベッセルによる増殖培養ならびに継代操作が可能であることを実証した。

### (2) 検証、課題

今年度行った増殖培養ならびに継代操作の検証実験での培養条件においては、基本的には前年度に産業技術総合研究所でプロトコル開発したものと同様のプロトコルを踏襲している。図2-1-10に今年度実施した「CellPet 3D-iPS」「CellPet FT」そしてiPS細胞用大量培養ベッセルによる増殖培養ならびに継代操作の詳細を示す。まず増殖培養からの検証を推進した。開発したiPS細胞用大量培養ベッセルの容量としては10ccならびに50ccを設定したが、いずれの容量での培養ベッセルにおいてもiPS細胞の3次元浮遊培養によるスフェロイド化が確認できた（図2-1-11参照）。また、10ccのベッセルにおいては、3日間の培養期間で約4倍に細胞を増殖できることも確認している。さらに、未分化マーカーSSEA4およびNANOGの発現は、浮遊培養前のiPS細胞と同等であることも確認できた（図2-1-12、図2-1-13参照）。

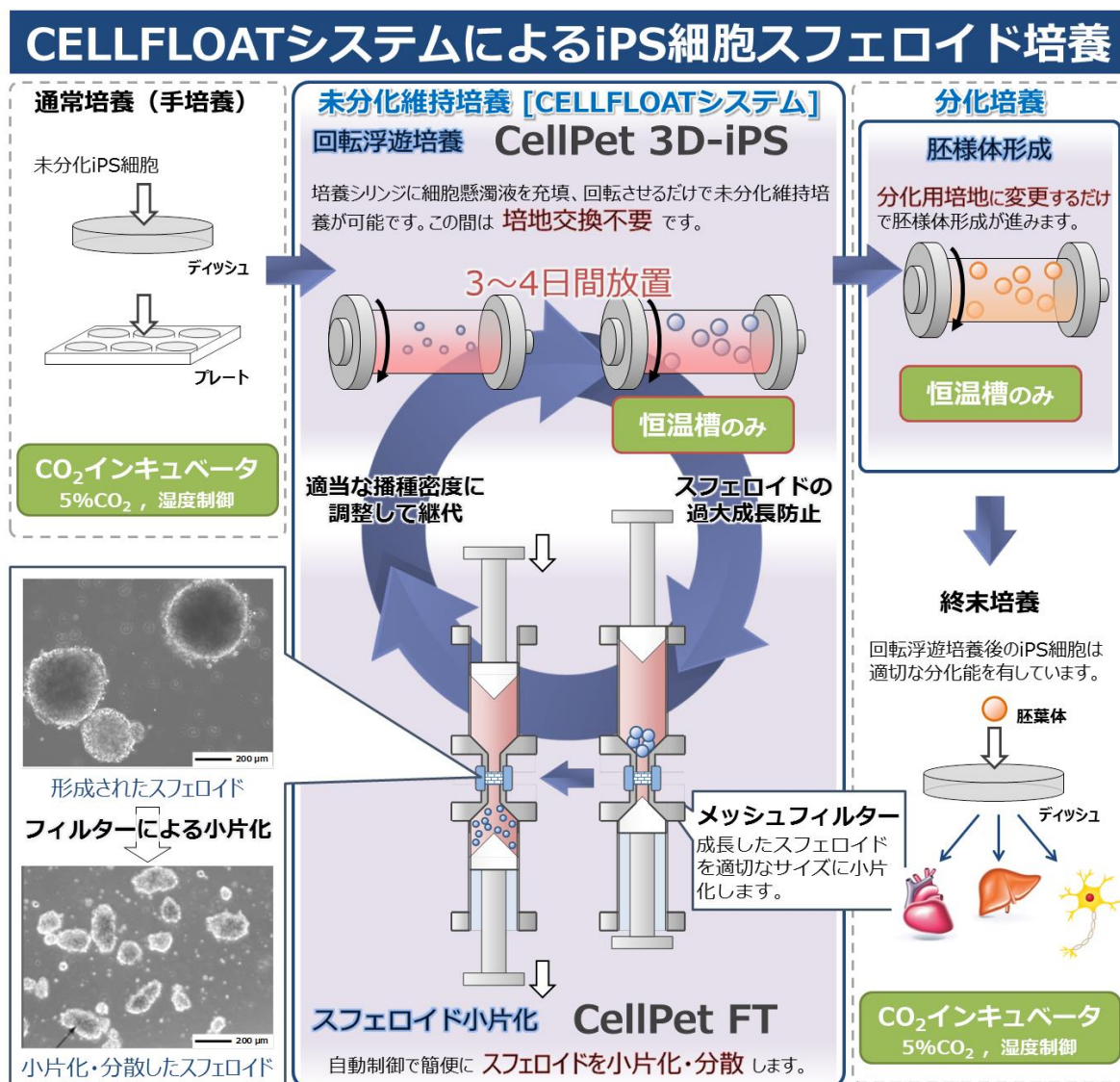


図2-1-10 「CellPet 3D-iPS」「CellPet FT」ならびにiPS細胞用大量培養ベッセルによる増殖培養ならびに継代操作

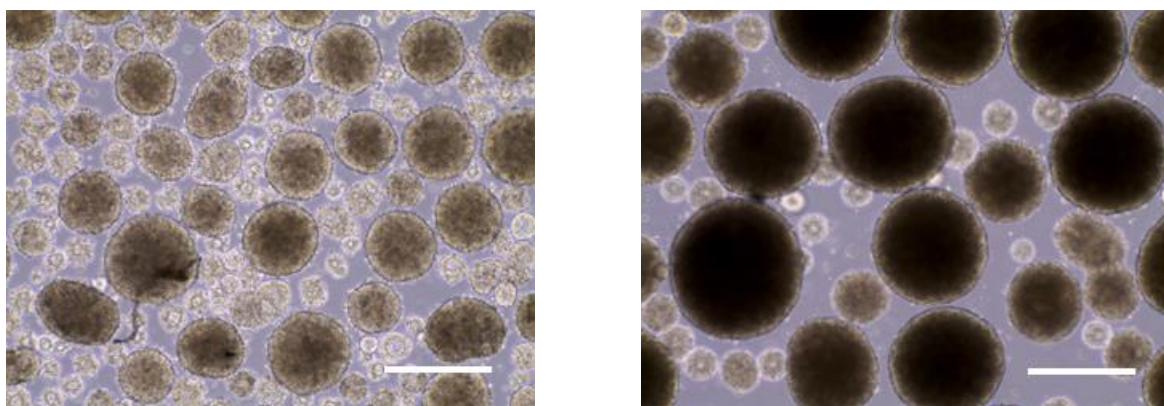
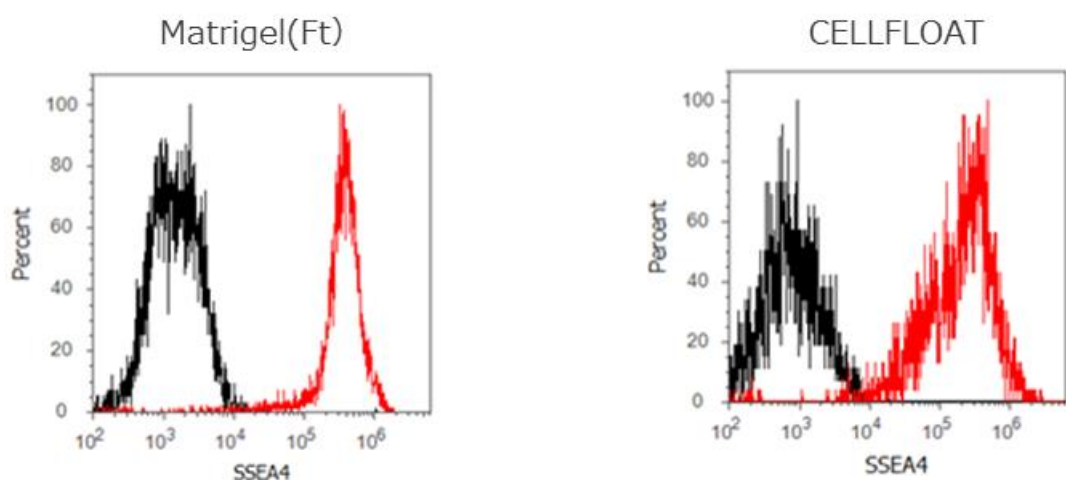


図2-1-11 培養ベッセル容量10ccならびに50ccでのiPS細胞のスフェロイド化(図中のbarは400μm)



Matrigel (Ft) ; マトリゲルで培養後のiPS細胞

CELLFLOAT ; 浮遊培養後のiPS細胞

図2-1-12 未分化マーカーSSEA4およびNANOGの発現量(赤線; SSEA4抗体、黒線; コントロール)

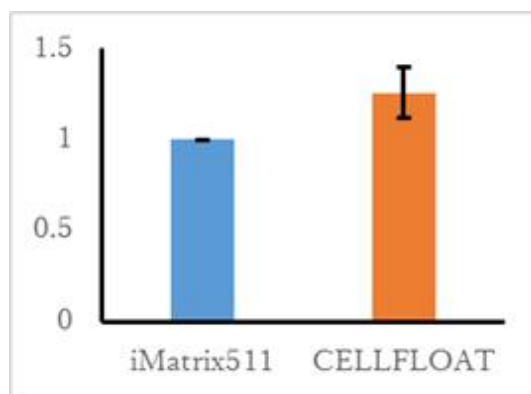


図2-1-13 培養開始3日後のNANOGの遺伝子発現(iMatrix511; 浮遊培養前のiPS細胞、CELLFLOAT; 浮遊培養後のiPS細胞)

次に「CellPet 3D-iPS」ならびにiPS細胞用大量培養ベッセルを用いた浮遊培養によって増殖培養したiPS細胞の球状スフェロイドを培養液交換ユニット「CellPet FT」によって小スフェロイド化した後、再度10ccの大量培養ベッセルによって浮遊培養を3日間行い、球状スフェロイドが形成できることを確認した(図2-1-14)。このように、「CellPet 3D-iPS」「CellPet FT」そしてiPS細胞用大量培養ベッセルによる増殖培養ならびに継代操作が可能なが実証された。



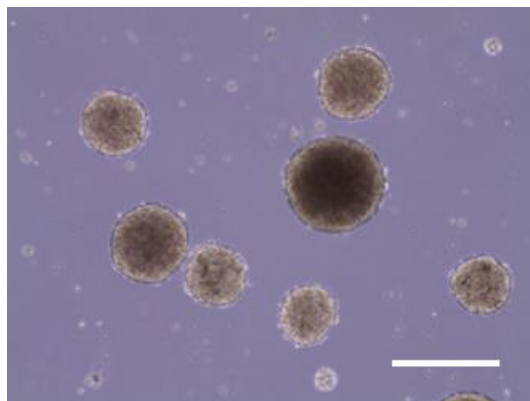


図 2-1-14 継代操作後の球状スフェロイド（図中の bar は 400μm）

その後、図 2-1-14 に示した iPS 細胞の球状スフェロイドを位相差像の観察を行ったが、正常なスフェロイドの状態の細胞を維持していることが分かった。通常、iPS 細胞を維持培養するときはこの増殖培養ならびに継代操作を繰り返すことのために、今年度でのさらなる検証として今回の増殖培養ならびに継代操作を 3 回繰り返した実験を行ったが、正常なスフェロイドの状態の細胞を維持することが分かった。この時のスフェロイドでの未分化マーカー Oct3/4 及び NANOG の発現の評価でも浮遊培養前の iPS 細胞と同等であったことから、今回の「CellPet 3D-iPS」「CellPet FT」そして iPS 細胞用大量培養ベッセルによる増殖培養ならびに継代操作、すなわち新しく開発した培養プロトコルは、iPS 細胞の未分化状態を維持したままの培養が可能であることが示唆された（図 2-1-15 参照）。

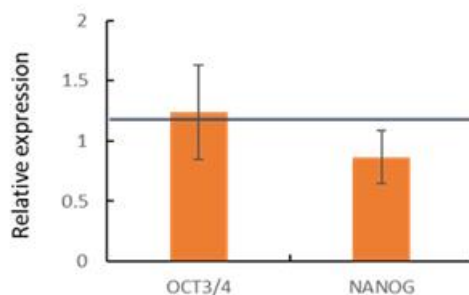


図 2-1-15 浮遊培養を 3 回繰り返した後の未分化マーカー Oct3/4 ならびに NANOG の遺伝子発現の結果（培養場の iPS 細胞での遺伝子発現を 1 とした相対値を示している）

## 2-2 創薬スクリーニング操作の自動化

### 2-2-1 3次元組織ピックアップユニットの開発

#### (1) 概要

本年度は、大量培養装置で培養された細胞塊を実際にディッシュからピックアップし、96 ウェルプレートへ移送・播種する動作シーケンスを決定し、一連の動作を全自動で行うピックアッププログラムの設計・開発、細胞塊を使つての動作検証を行った。

#### (2) 開発、設計

実際の細胞に当たったとき、それまでシミュレーションやモデルで進めていたものとは全く異なる状況に直面し、原理原則に立ち返って基礎的な事が再検討・開発を行った。以下、項目毎に報告する。

##### ① ディッシュの選定

実際に、ディッシュ中に半ば漂っている細胞塊（φ<2mm）をピックアップしようとする、その不安定さ故に細胞塊が定位しない。また、細胞塊は想定以上に固く滑らかであり、ピックアップ針が近づくと逃げてしまう

問題点があった（図 2-2-1 参照）。

針先から細胞が逃げる問題に対し、まず通常の平底のディッシュからディンプル形状（凹凸面）を有するディッシュの採用を検討した。（図 2-2-2 参照）。

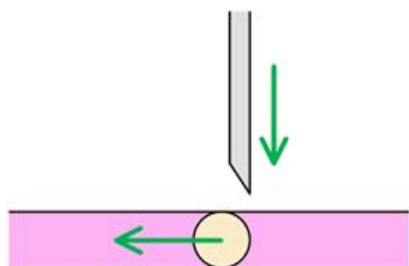


図 2-2-1 ピックアップの問題点の説明図

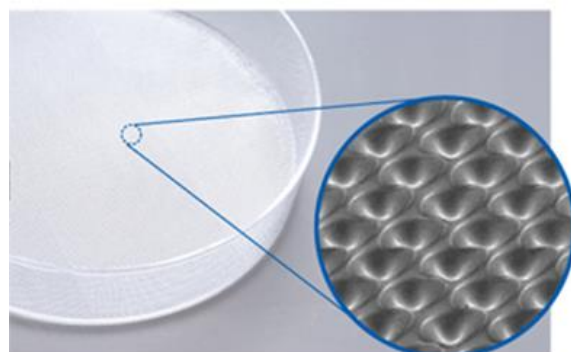


図 2-2-2 ディンプルディッシュ（商品名：EZSPHERE®）  
※AGC テクノグラスの HP より

ディンプルディッシュを採用するに当たり直面する問題として、ディンプルテクスチャが画像処理に与える影響が懸念された。これを確認するため、実際に細胞を蒔いて撮影したのが下図 2-2-3 である。（比較のため、通常のディッシュ画像を図 2-2-4 に併記する。同図の格子はディッシュトレイに印刷されたもの）懸念通り、ディンプルが克明に写り込んでしまっており、全体に暗くなっている。

しかしながら、細胞と背景のコントラストはまだ明確であるため、画像処理の際、下地の平坦化をやや強めにかけた上で、（この処理で全体がぼけるため）二値化後の縮退操作回数を多めにするなどの画像処理上のパラメータを最適化することで細胞像の切り分けは可能であった（図 2-2-5 参照）。

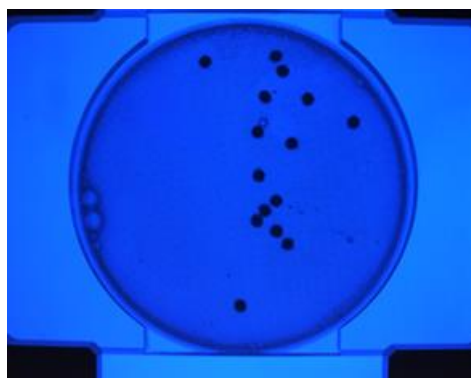


図 2-2-3 ディンプルディッシュ

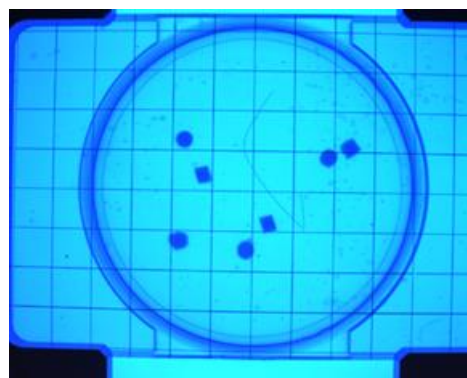


図 2-2-4 従来ディッシュ

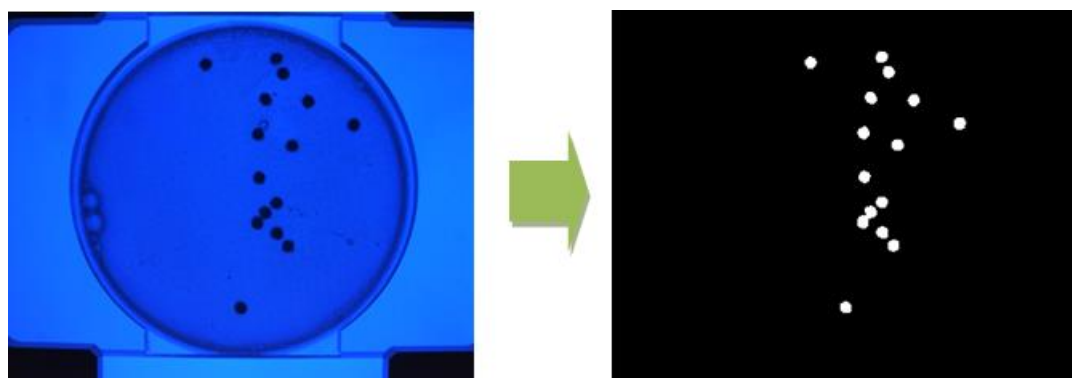


図 2-2-5 ディンプルディッシュに最適化した画像処理結果



## ② ピックアップチップ選定

もう一つの改善として、ピックアップに“針”を使用するのを止め、培地交換・薬液添加に使っているチップを利用することとした。前述したように、“針”では、針先が斜めにカットしてあることもあり、細胞の横上からアプローチする必要があり、針先が下がると細胞が逃げてしまう。これを軽減するために吸いながらアプローチするなどの工夫は施したが、細胞塊表面が滑らかなためか、ほぼ効果はなかった。この点、チップを利用すると、細胞直上からアプローチできるため、逃がすことなく細胞をキャッチできると考えた。また針同様、吸いながらアプローチすることでピックアップの確度をさらに上げるようにした。

①と②の改善を模式的に表すと図2-2-6のようになる。

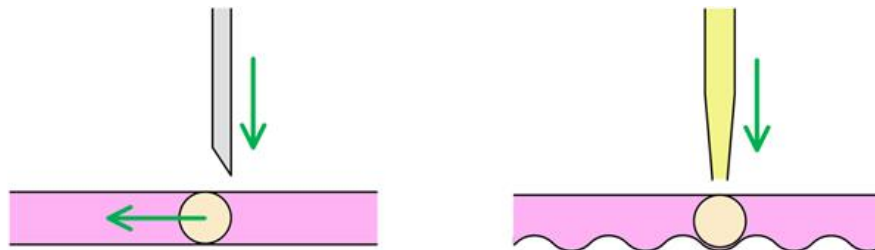


図2-2-6 ピックアップ方式の再検討（左図は図2-2-1を再掲）

## ③ カメラロボット座標変換

画像処理結果をピックアップロボットの動きに繋げるためにはカメラの画像上のx-y座標系とピックアップロボットのX,Y軸座標系に正確な対応を取る必要がある。実際、上記①②の知見からサブミリ単位の正確性が必要と思われる。

このための工夫として、昨年はディッシュトレイに方眼を印刷し、この格子点を利用することで両者の対応を取るキャリブレーション機構の開発を行った。しかし、ディッシュトレイの格子点をピックアップロボットにティーチングする操作を実際に行うと、想定以上に手間がかかり全く実用にならない上、高い精度はとても望めないことが判明した。

この反省の元に、本年度はあらたに次のようなキャリブレーション機構を検討・開発した。

### ③-1 キャリブレーション用LEDチップ

ロボットの位置をカメラで直読できるように、今回、ピックアップ用チップの先端に微小なLEDチップを組み込んだ図2-2-7のようなツールを作成した。

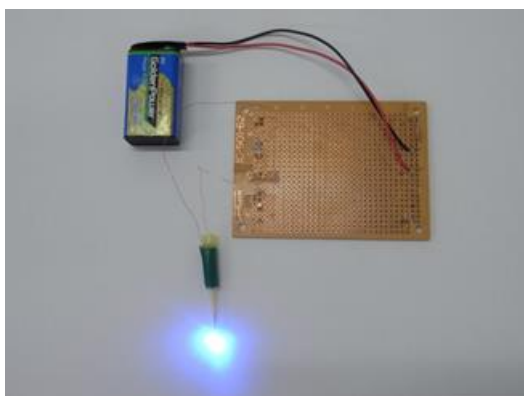


図2-2-7 LEDチップ



図2-2-8 従来ディッシュ

これをピックアップノズルに取付け、ピックアップ領域（カメラ視野内）で点灯させることで、ピックアップチップの先端位置をカメラで簡単に取得することができる。この時のロボット位置はPLCから直読できるため、カメラ座標とロボット座標の対応をとることができる（図2-2-8参照）。

### ③-2 キャリブレーションテーブル作成自動化

さらに、この機構を用いれば、キャリブレーションテーブルを自動的に作成することが可能となる。図 2-2-9 は、ピックアップディッシュ領域内で 10mm 刻みに LED チップを動かした画像を重畳したものである。この画像を処理して、各輝点の重心位置を求めれば一気にカメラ座標とロボット座標の対応表すなわちキャリブレーションテーブルを得ることができる。

キャリブレーションテーブルの作成は、カメラの設定（位置やピントなど）やロボットの調整を変える度に行う必要があり、自動的にできることは極めて重要なことである。

また、本手法はカメラ画像を直接ロボット座標と対応させているため、カメラレンズのディストーションも同時に補正することができる。

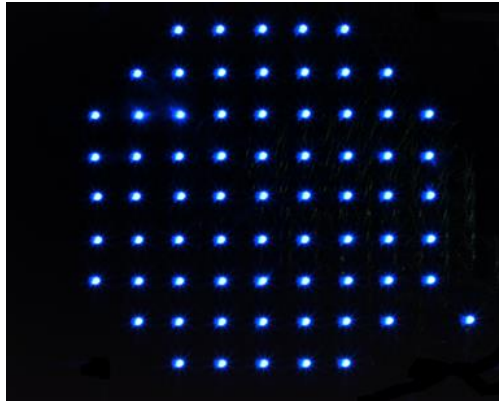


図 2-2-9 キャリブレーション画像

#### ④ ピックアップシーケンス開発

今回開発したピックアップシーケンスをフローにすると図 2-2-10 のようになる。

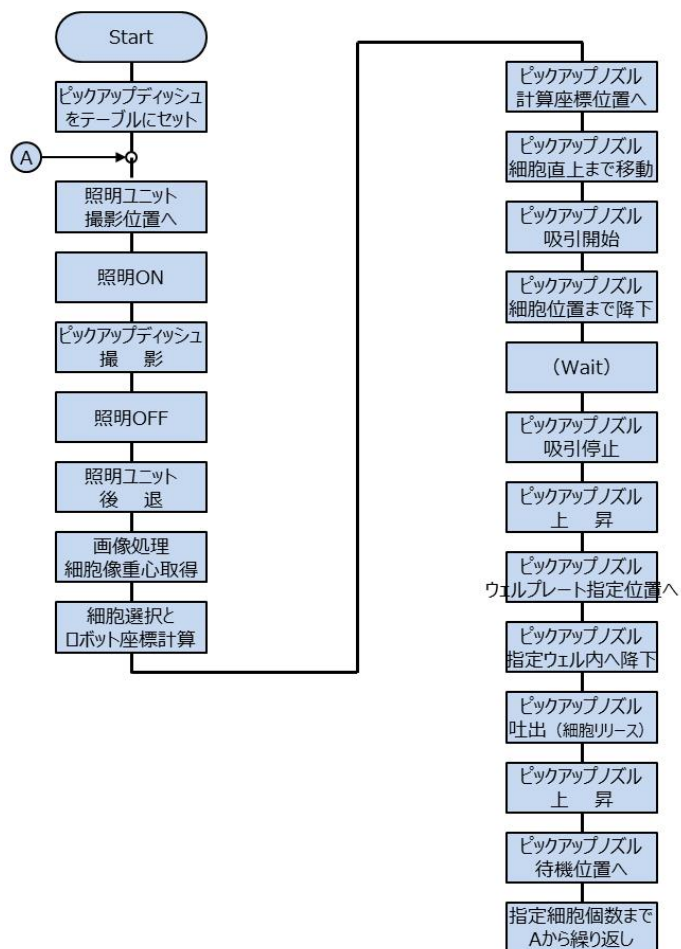


図 2-2-10 ピックアップフロー

#### ⑤ 自動化プログラム開発

上記フローをプログラム化した本年度の成果を図 2-2-11 に示す。

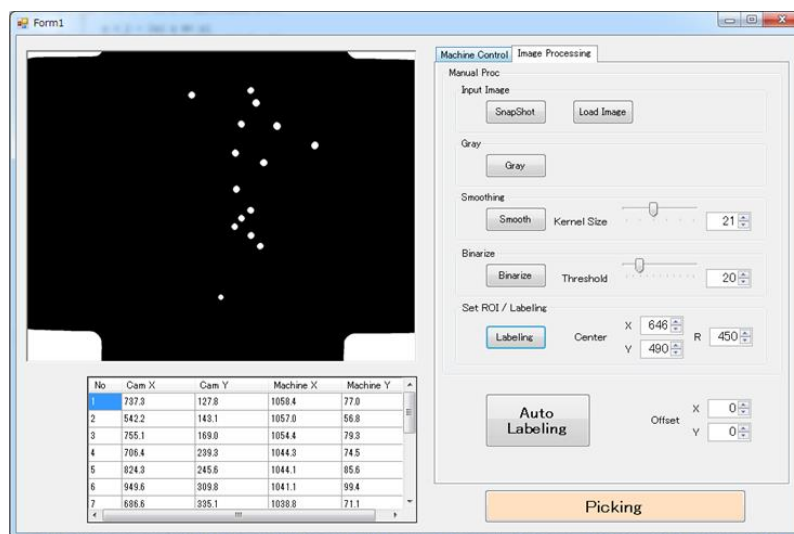


図 2-2-11 ピックアップフロー

### (3) 検証、課題

同プログラムをもって実際の細胞塊をピックアップ・移送するテストを行ったところ、全く問題なく動作し、確実に細胞塊を操作できることが確認した（図 2-2-12 参照）。

今後に残された大きな課題は、1つの細胞をピックアップし移送するサイクルに時間がかかりすぎることである。現状は、動作の確実性を第一に考えた事もあって、1サイクルに数分かかってしまう。これを1プレート分にするると5〜6時間かかることになり実用からはほど遠い。確実性を維持しつつ高速化することが今後の開発の最大の目標である。



図 2-2-12 ピックアップ動作（記録動画からスナップショット）

## 2-2-2 3次元組織粉砕ユニットの開発

### (1) 概要

96 ウェルプレートにピックアップされた細胞に薬剤やバッファーを播種し、一定期間 CO<sub>2</sub> インキュベータで培養した後、細胞組織を粉砕するためのユニットで、粉砕のためのビーズの投入方法（ビーズ径、ディーププレート形状）、粉砕に適した前後動作（モーター回転数、時間）、粉砕動作後のウェル内の細胞及び培養液について確認した。

### (2) 開発、設計

昨年度はディープウェルプレートの3次元粉砕ユニットへのハンドリング、位置決めおよび粉砕動作時の固定、ウェルごとのビーズの投入、飛散防止カバーの自動カバーリング、往復前後動作による粉砕動作を一連動作で行えることを確認できたが、今年度は細胞での実機検証により粉砕動作での問題点の改良を行った。

問題点として V 底丸穴ディーププレートでのビーズの浮き上がり、φ3mm ビーズでの粉砕不足が確認されており、それぞれ丸底（ピラミッド底）角穴ディーププレート、φ5mm ビーズに破砕条件を変更することにより良好な結果が得られた。

装置改良としてはビーズホッパー部のφ5mm ビーズ対応を行った。丸底角穴ディーププレートへの変更により培養液の飛散がなくなったため、飛散防止カバーの動作については今回のプロトコルから削除した（図 2-2-13 参照）。



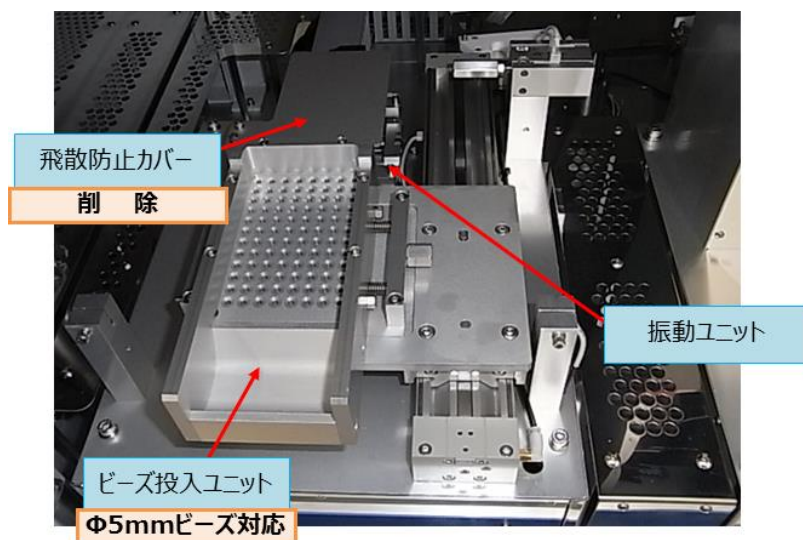


図2-2-13 3次元組織粉碎ユニットの写真

### (3) 検証、課題

96 ウェルプレートにおいて、以前より一般的に使用されていた丸穴平底と今年度新たに準備した角穴V底（ピラミッド底）のディーププレートでの細胞粉碎検証を行ったところ、 $\phi 5\text{mm}$  ビーズを用いて細胞粉碎後のDNAの抽出量から角穴V底のほうが良く粉碎されており、また粉碎時間については5分以上行ってもDNA抽出量に変化がないことから粉碎時間としては5分とした。

## 2-2-3 創薬スクリーニング用自動化装置の開発及び性能実験

創薬スクリーニングの操作プロトコルを決定し、この操作を実現する創薬スクリーニング用自動化装置を製作しており、今年度は改良を行った2-2-1での3次元組織ピックアップユニット、2-2-2での3次元組織粉碎ユニットおよび下記2-2-3-1での改良を行った $\text{CO}_2$ インキュベータや改良を加えたチップ装着部、培地供給ラインを用いて一連の自動培養と手培養の性能比較実験を行い遜色ないことを確認した。

### 2-2-3-1 創薬スクリーニング用自動化装置の開発

#### (1) 概要

昨年度開発した $\text{CO}_2$ インキュベータの性能評価を行い、実際の細胞での培養ができるように装置開発を行った。具体的には結露の発生抑制やコンタミのない雰囲気であることを実現できるよう検証した。

また、大量のチップ消費のため段積みチップケースを使用しているが、剛性が足らずチップ装着時にチップケースの連れ上がるため、対策用のガイド改良を行った。あわせて保冷庫で冷蔵された培地を常温以上にして細胞へ供給するための加温システムを開発した。

#### (2) 開発、設計

$\text{CO}_2$ インキュベータは個別の温調機能を使用し、パラメータ調整を行い、結露の発生しにくい温度分布条件を導き出した。また従来の加湿パットによる加湿方法でなく、透湿防水バックによる加湿方法を用いて更に結露の発生しにくい状態を導き出した（図2-2-14参照）。

チップケースはチップ装着部分に連れ上がり防止用のガイドを設けることで、たとえば仮にチップケースが連れ上がったとしてもガイドに引っかかることでチップケースが元の位置に収まり、正常にチップを装着できる構造へ設計を行った（図2-2-15参照）。

保冷庫で冷蔵された培養液を送液するチューブポンプを開発し、さらに培地を温めて供給できるアルミビーズを用いた加温供給システムを開発した（図2-2-16参照）。これにより保冷庫で冷蔵保管された培地を常温以上で温めて接液しないで供給できることができた。



図2-2-14 CO<sub>2</sub>インキュベーターの写真

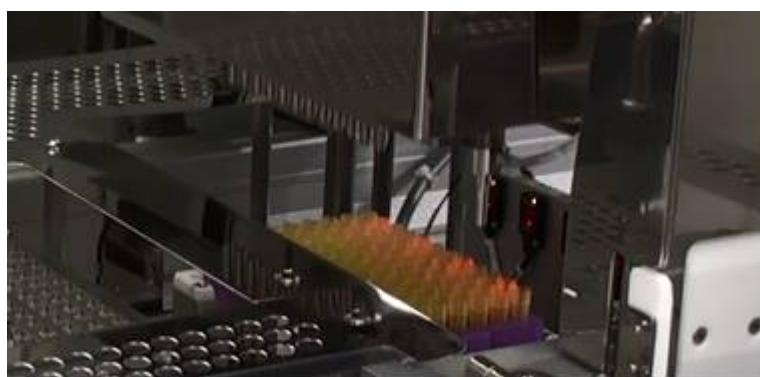


図2-2-15 チップ装着部の写真

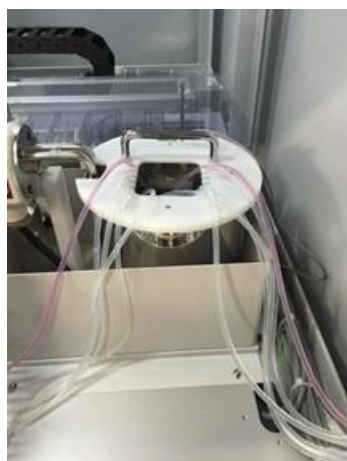


図2-2-16 培地恒温供給システムの写真

### (3) 検証、課題

先に述べたような一連の改良を行った結果、創薬スクリーニング操作に求められる細胞培養を含む操作の自動化が可能であることが示せ、(後述するが) また本装置と手培養との実際の薬剤による薬理評価による性能比較実験で同様の結果が得られることから、創薬スクリーニング用自動化装置として完成したと考えている(図2-2-17参照)。



図2-2-17 創薬スクリーニング用自動化装置の写真

### 2-2-3-2 創薬スクリーニング用自動化装置の評価

#### (1) 概要

今年度は、創薬スクリーニング用自動化装置と手培養で培養した細胞を用いた実際の薬剤による薬理評価により、創薬スクリーニング用自動化装置の評価を実施した。結果として両法で有意な差は確認されなかったことから、本事業で研究開発した創薬スクリーニング用自動化装置の有用性が示された。

#### (2) 評価方法

今年度において、創薬スクリーニング用自動化装置を評価するために使用する細胞として、ヒト骨肉腫由来樹立細胞株「MG63」とした。まず評価準備として、オリンパステルモ社製テルダーミスを3mmφ生検パンチでくり抜いて作製した3mmφコラーゲンスポンジに100mmHg減圧下で10分間維持することで「MG63」細胞を導入、ガン細胞・コラーゲンスポンジのコンポジットを作製した。そしてそのコンポジットを3時間程度の静置培養を行った後、続いて3次元大量培養装置「CellPet 3D-L」を用いてDMEM<High Glucose>、10%FBS、抗生剤<Anti-Anti>が主成分の培養液中で12日間の浮遊培養を行い、多数の3次元ガン組織を作製した。

その後、以下①～⑨に示す創薬スクリーニングのプロトコルに従い、創薬スクリーニング用自動化装置を用いた場合と手培養による操作を用いた場合について同時に検証を開始し、それら評価に有意な差があるか否かを検証することで創薬スクリーニング用自動化装置の性能の評価を行った。具体的な評価内容については以下の通りとした。

- ① 【ピックアップ】ピックアップに関してはマニュアル操作により行い、角穴 96 well deep plate にコンポジット（足場材料）を移した。（n=5）
- ② 【培養】細胞培養に関して、創薬スクリーニング用自動化装置を用いるときは装置内に装備されているCO<sub>2</sub>インキュベータ（5%CO<sub>2</sub>、37度）を、また手培養のときは実験室に設置してある通常のマルチガスインキュベータ（5%CO<sub>2</sub>、37度）で行った。
- ③ 【薬剤投与】薬剤（抗ガン剤等）投与に関して、典型的な抗ガン剤であるドキソルビシン（doxorubicin；商品名アドリアシン、悪性リンパ腫（細胞肉腫・リンパ肉腫・ホジキン病）などの抗ガン剤）を用いた。今回の評価ではドキソルビシンの濃度として0.0/1.0/10.0μg/mlの3種類を投与するが、創薬スクリー

ニング用自動化装置では備えている自動分注装置により、また手培養ではヒトによるピペット操作により分注した。

- ④ 【培養】細胞培養に関して、創薬スクリーニング用自動化装置を用いるときは装置内に装備されているCO<sub>2</sub>インキュベータ（5%CO<sub>2</sub>、37度）を、また手培養のときは実験室に設置してある通常のマルチガスインキュベータ（5%CO<sub>2</sub>、37度）で24時間行った。
- ⑤ 【培養液吸引】培養液吸引に関して、創薬スクリーニング用自動化装置では備えている自動分注装置により、また手培養ではヒトによるピペット操作により分注した。
- ⑥ 【Lysis バッファーを分注】Lysis buffer の分注に関して、創薬スクリーニング用自動化装置では自動分注装置により、また手培養ではヒトによるピペット操作により分注した。
- ⑦ 【細胞粉砕】細胞粉砕に関して、創薬スクリーニング用自動化装置および手培養のいずれも、自動化装置に備えている粉砕装置により行った。
- ⑧ 【遠心分離】遠心分離に関して、創薬スクリーニング用自動化装置および手培養のいずれも、実験室に備えている遠心機により行った。
- ⑨ 【アッセイプレート】アッセイプレート作成に関して、創薬スクリーニング用自動化装置および手培養のいずれも、上澄みをヒトの手培養により採取した。その後、ピコグリーン法を用いてDNA量を評価し、以下の図2-2-18のようにグラフにまとめ、両者を評価した。

図2-2-18が示すように、創薬スクリーニング用自動化装置および手培養による抗ガン剤の効果として有意な差が生じなかったことから、今年度までかけて開発した創薬スクリーニング用自動化装置であっても、これまでの創薬スクリーニングで行われてきた手培養と同様の結果が得られることが示唆され、本事業の技術目標が達成できた。

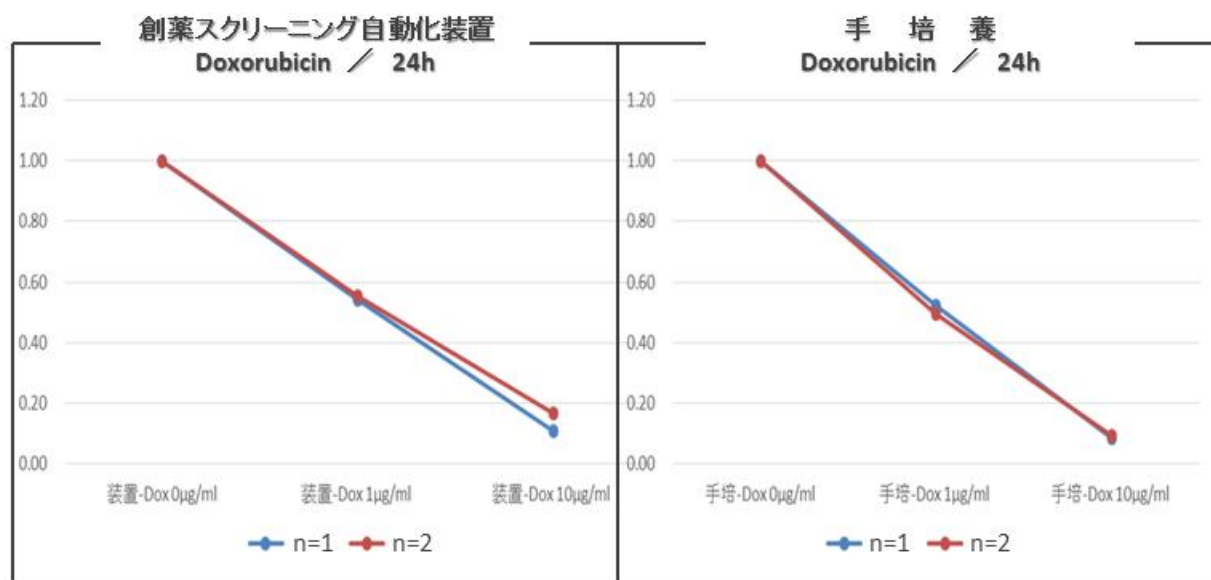


図2-2-18 MG63 とコラーゲンのコンポジットから作製したガン組織への抗ガン剤「ドキソルベシン」投与の効果（創薬スクリーニング用自動化装置と手培養との比較評価）

## 第3章 全体総括

### 3-1 総 括

製薬会社等における創薬のプロセスでのスクリーニング作業において、実験動物を用いた評価は主流であった。しかし、実験動物への薬剤投与による毒性評価では、ヒトと実験動物ではかなり異なる結果が得られることが知られてきており、細胞培養技術を用いた評価に期待が寄せられている。

しかし、通常ペトリディッシュのような2次元培養系で多くの試験が行われてきたが、最近このような2次元培養での実験系に限界があることが多方面で指摘されており、特に創薬でよく用いられるガン細胞の培養においては、本来生体内では3次元的な組織を構築しているガン細胞を生体外で2次元培養したとき、抗ガン剤に対する効能が3次元組織とは異なることが指摘されており、3次元培養による評価方法の確立が急務となっている。またiPS細胞の創薬への適用も研究開発が進められているが、一度に大量でかつ高品質な3次元組織の細胞を培養する技術が確立していないのが現状である。(3次元大量培養及びその評価方法の確立というニーズ)例えば医薬品の開発は莫大な費用と時間を必要とし、前臨床や臨床試験において、予想不可能な肝毒性によって、多くの医薬候補品が開発中止に追い込まれている。そのため、創薬早期における肝毒性スクリーニング系の開発が注目されており、大量の均質な3次元細胞組織が必要不可欠となっている。

そこでジェイテックコーポレーションでは、これまで産業技術総合研究所と共同で開発してきた再生医療向けの大型培養軟骨の高効率形成可能な3次元細胞培養技術からさらに高度化を図り、創薬スクリーニング用途かつ自動化対応可能な3次元細胞塊を培養するための3次元大量培養用回転培養ベッセル（培養器）や均質な大量の3次元組織の細胞塊を培養するために位置制御ソフトウェア（CFC）、特徴抽出（ICCS）、大量細胞群位置決め制御アルゴリズム（FFMA）を開発・組込んだ3次元大量培養（浮遊培養）装置「CellPet 3D-L」を開発し、50個の肝臓細胞の大量培養実験では当初の技術目標を達成したものの、300個のヒト骨肉腫樹立細胞株「MG63」での大量培養では目標が未達成となった。これは、足場材であるコラーゲンスポンジに対する細胞懸濁液量の割合の差異によるスポンジへの細胞導入のムラが原因と考えられ、今後最適化を図る予定とした。

また創薬スクリーニング操作の自動化においては、当初の技術目標とした3次元組織ピックアップならびに3次元組織粉碎ユニットの開発に成功し、それらユニットを含む創薬スクリーニング用自動化装置において、3次元大量培養用回転ベッセルと「CellPet 3D-L」により培養された均質なガン細胞株「MG63」を用いた抗ガン剤との反応評価を実施し、本自動化装置とこれまで標準的なスクリーニングで行われてきた手培養との反応評価で有意な差が確認されなかったことから、当初の目標の通り創薬スクリーニング用自動化装置がスクリーニング工程に適用可能であることを実証した。

さらに3次元大量培養用の取組みにおいて、深掘り開発の位置づけでiPS細胞をスフェロイド化で細胞培養ならびに継代作業を行う技術開発を推進し、iPS細胞用大量培養ベッセルならびに装置「CellPet 3D-iPS」、そしてスフェロイド培養されたiPS細胞を分散・小片化（フィルトレーション）のための培地交換ユニット「CellPet FT」を開発し、それらによってiPS細胞スフェロイドのままでの3継代の維持培養に成功し、独自のiPS細胞スフェロイドのままで増殖培養する新たな技術開発の成果につながった。

図3-1-1に本高度化支援事業における研究開発成果を示す。



### 3次元大量培養用アルゴリズムの開発 (培養プロトコル等の開発)

#### 3次元大量培養用ベッセルの開発

成果



#### 3次元大量培養装置の開発

<要素技術>

位置制御ソフトウェア

: CFC (Cell Float Control)

特長抽出

: ICCS (Image cytometry by color separation)

大量細胞群位置決め制御アルゴリズム

: FFMA (Free float by multivariate analysis)



成果

成果



ヒト骨肉腫由来樹立  
細胞株「MG63」の  
大量培養

### 創薬スクリーニング用自動化装置の開発

#### 3次元組織ピックアップユニットの開発

(創薬スクリーニング用自動化装置に組み込み)



成果

#### 3次元組織粉碎ユニットの開発

(創薬スクリーニング用自動化装置に組み込み)



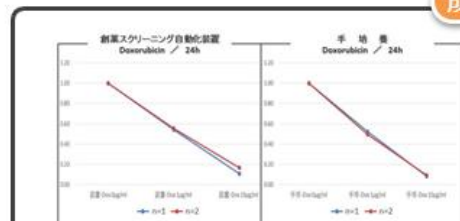
成果

成果



創薬スクリーニング用  
自動化装置

成果



抗ガン剤による評価結果

### iPS細胞用大量培養技術の開発 (深掘り)

新しいiPS細胞スフェロイドでの維持培養の提案

成果



iPS細胞用大量培養ベッセルと  
iPS細胞用大量培養装置  
「CellPet 3D-iPS」

成果

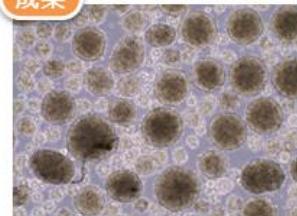


成果



培地交換ユニット  
「CellPet FT」

成果



培養後の  
iPS細胞スフェロイド

図3-1-1 本高度化支援事業における研究開発成果の概要

### 32 今後に向けて

創薬分野向けに3次元大量細胞培養や創薬スクリーニング自動化に関する研究開発の事業を推進してきたが、3次元大量細胞培養装置については本事業終了後から2年間を目途に、また創薬スクリーニング用自動化装置（アッセイシステム）については本事業終了後からさらに継続する形で、パイロットユーザーとなる製薬メーカー（または川下にあたる製造業者）との協業ならびに本研究開発の成果を実用化レベルまで改良・改善を進めることを計画する＜追加研究＞。また、事業終了後2年以内には当該製品についてテスト的な販売～本格販売へ進めるとともに、その後の拡販を目指して製品のコストダウンについても計画、実施する。

また、本事業の深掘りテーマとして進めたiPS細胞の3次元大量培養技術において、3次元培養装置「CellPet 3D-iPS」と培地交換ユニット「CellPet FT」による独自の画期的なiPS細胞の増殖培養技術は、創薬分野だけでなく再生医療の分野からもその可能性を期待されており、当初予定に無かった平成29年度早々にそれら装置・ユニットの上市、拡販に向けた事業活動を行い、当該分野への貢献を図る。それとともに、創薬または再生医療分野の川下ユーザーとの共同研究を模索し、現状抱えている現場課題の解決手段として適用可能となる独自の増殖培養技術の改善・改良を進める。

## 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、弾性繊維を多く含み、硝子軟骨に比べ、弾力がある。