## 令和元年度 戦略的基盤技術高度化•連携支援事業 戦略的基盤技術高度化支援事業

「iPS 細胞等幹細胞の高効率な継代作業を実現した 3 次元大量継代培養 自動化技術の実用化開発」

研究開発成果等報告書

令和2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

### 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
1-1-1 研究開発の背景	3
1-1-2 研究開発の目的	5
1-1-3 研究開発の目標	5
1-2 研究体制	6
1-3 成果概要	6
1-4 当該研究開発の連絡窓口	7
第2章 本 論	7
2-1 細胞継代培養「JiSS」での大量培養に向けたプロトコル構築構築	7
2-1-1 大量培養に向けた培養ベッセルの開発および性能評価	7
2-1-2 細胞小片化・分散技術の最適化および性能評価	13
2-1-3 細胞継代培養技術「JiSS」による iPS 細胞の大量培養の実証	14
2-2 臨床応用を目指した細胞継代培養技術「JiSS」による自動化システムの構築。	18
2-2-1 滅菌ガス対応の細胞小片化・分散ユニットの開発	18
2-2-2 滅菌ガス対応の低コストアクチュエーターの開発	20
2-2-3 臨床応用可能な「JiSS」による大量細胞継代培養自動化システムの開発	21
最終章 全体総括	23
3-1 総 括	23
3-2 今後に向けて	24

#### 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

現在、多くの再生医療に関する研究の成果により、これまで治療が困難であった疾患であっても治療の可能性が見出せるようになり、再生医療のなかでも技術的に非常に難易度の高いと言われている「他家 iPS 細胞」を用いた治験も開始されつつある。経済産業省の再生医療周辺産業の国内市場規模予測では、2030 年には 5,500 億円にもなることが示されており、再生医療周辺産業は今後の成長が期待される産業と言える。その一方で、再生医療に関連する治療開発に係る膨大なコストや高額な治療費が顕在化した問題として認識されており、コストを意識した治療法の開発が急務となっている。

再生医療の治療や研究で要求される iPS 細胞数は年々増加する傾向にある。再生医 療研究の治療開発に用いられる細胞の要求数量は、最大でも 100 億個(1×1010 個) であるが、さらにその上の 1000 億個(1×10<sup>11</sup> 個)以上の要求も出てきつつある。 近年の大量培養装置開発の進展は目覚ましいものがあり、大容量培養器または培養 バッグによる効率的な大量培養技術(装置化技術)が多く開発され、細胞数だけを見 れば市場の要求を満たしている。しかし、再生医療治療の普及やそれに向けた細胞バ ンキングの実現に向けては技術課題が存在しており、その課題の一つとして、培養過 程で旧態依然とした手作業に依存している工程が多く残っている点が挙げられる。図 1 に iPS 細胞の製造工程の説明を示す。従来技術における細胞製造プロセスにおいて は、特殊培養皿、バイオリアクター、大型バイオリアクターと順次拡大培養をするこ とにより大量の細胞が得られるが、手作業による細胞処理工程が各所に多く残ってお り、細胞製造工程の技術開発の遅れが指摘されるなかで、非効率にも多くの労力(手 作業)をかけて大量培養を行っていることが分かる。手作業による工程は各作業者の 技術や経験や慣れに依存し、細胞品質、品質のバラつき、高コスト化などの問題に繋 がるが、従来技術が抱える問題を解決するための有効かつ画期的な技術や装置はなく、 再生医療分野の発展の妨げとなっている。手作業の工程を低減させ、細胞の品質向 上・製造コスト削減につながる画期的な継代培養技術の確立が急務である。

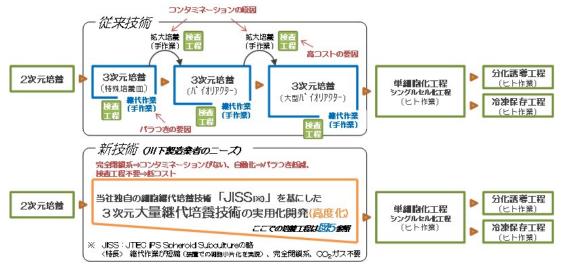
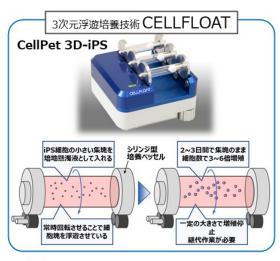
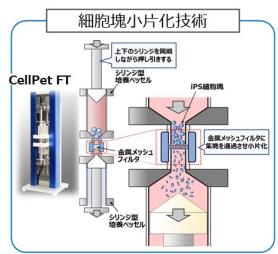


図 1 iPS 細胞の製造工程の説明(従来技術と本研究開発目的である新技術との比較)

ジェイテックコーポレーションは、これまでに、独自の円筒型の培養ベッセル(容 器)を回転させることで細胞を浮遊させながら培養する画期的かつ新しい「3 次元浮 遊培養技術 CELLFLOAT」を見出しており、本培養技術を用いて、大型の軟骨組織 細胞の培養に成功し、湿重量が5倍、培養時間が3分の1でありながら、100%の 正常細胞が得られるという研究成果を得ている。また、iPS 細胞についても、球状ス フェロイドの形態で増殖培養できる事を確認している。その他、メッシュにより物理 的に小片化・分散する「細胞小片化・分散技術」も見出しており、スフェロイド(細 胞塊)の未分化性維持を確認している。ジェイテックコーポレーションは、これら技 術を組み合わせた画期的な細胞継代培養技術「JiSS (JTEC iPS Spheroid Subculture)」の基礎開発を進め、実験室レベルで使用する回転浮遊培養装置 「CellPet 3D-iPS」と細胞小片化・分散装置「CellPet FT」の製品化に成功してい る (図2)。「JiSS」では、培養から継代まで全ての操作をシリンジ型の培養ベッセル だけで行う事ができ、通常の培養皿を用いた手作業による iPS 細胞の継代培養と比べ、 「5 分の 1 L ~ 「10 分の 1 L の継代作業の短縮化を実現している。また、培養と継 代の繰り返しの間も閉鎖系を維持し易く、通常の培養環境に必要な CO2 ガスも一切 不要で、培養後のスフェロイド形状・サイズが均一であるといった従来技術にない特 長を有している (図1、図2、図3)。





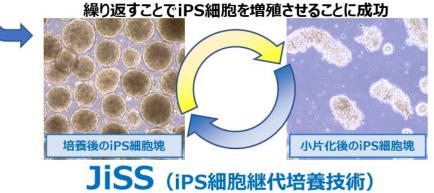


図2 iPS 細胞継代培養「JiSS」の概要



図3 従来法である手作業での培養と「JiSS」による継代時間の比較

しかしながら、現状の「JiSS」には課題が残っており、大量培養を行うためには、大量培養向けのプロトコル開発や培養ベッセルの改良・最適化、装置の改良・最適化を行う必要がある。10ml の培養ベッセルで培養した場合の増殖率は従来技術と比較して遜色ないが、ベッセル容量を50mL 程度にした場合やベッセル形状(直径や軸方向長さ)を変化させた場合に、増殖率の低下が確認されている。これは、培地流れに起因し、細胞が感受する物理学的作用(流れにより細胞表面で発生するせん断応力など)や生物学的作用(細胞自身から発現される成長因子量と細胞密度の依存性など)等によるものと推察している。

#### 1-1-2 研究開発の目的

基幹技術である「JiSS」を大量培養向けに展開し、手作業を介さず、細胞の品質向上・バラつき低減・細胞製造コスト削減につながる大量培養可能な iPS 細胞の継代培養技術の構築および iPS 細胞継代培養自動化システムの構築を目的とする。なお、「JiSS」を実現する発明特許は出願を終えている。

※【特願 2017-004993 (H28/1/19)「大量細胞培養システム及びそれに用いるベッセル間細胞液移送装置並びに回転細胞培養装置」

#### 1-1-3 研究開発の目標

- 細胞継代培養「JiSS」での大量培養に向けたプロトコル(製造法)を構築すること。つまり、川下製造業者が再生医療で使用する細胞シート等を製造するのに必要とする細胞数となる 1.0×10<sup>8</sup>(1 億)個以上の iPS 細胞の継代培養可能な技術を確立し、その iPS 細胞が未分化性を維持すること、かつ心筋細胞への分化能を有することを実証すること。
- 「JiSS」を適用した臨床応用可能な低コストのiPS 細胞継代培養自動化システムを構築し、1.0×10<sup>8</sup>(1 億)個以上の iPS 細胞が継代培養可能であることを実証し、さらに本システムに対し外部からの微生物汚染が無いことを示すこと。

#### 1-2 研究体制

〇研究組織(全体)

#### 事業管理機関-

公益財団法人新産業創造研究機構





研究開発実施機関(補助事業管理機関)

産 株式会社ジェイテックコーポレーション

学 国立大学法人大阪大学 大学院工学研究科

**学** 国立大学法人大阪大学 大学院医学系研究科

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

#### 1-3 成果概要

iPS 細胞は今後再生医療の分野を大きく発展させる可能性を有し、大きな市場を形成することが予想されている。ただし、iPS 細胞の従来の製造工程では手作業が残っており、本研究開発では独自の継代培養技術「JiSS」によるiPS細胞継代培養プロトコル(製造法)の構築と「JiSS」を適用した臨床応用可能な低コストiPS細胞継代培養自動化システムの構築を推進し、以下の成果を得た。

- 「JiSS」で使用する回転浮遊培養(3次元培養)のためのシリンジ型の 25ml、 50ml ガラス製培養ベッセルならびに大量培養に向く 10ml 樹脂製培養ベッセル の開発に成功し、それぞれの最適培養条件を明らかにした。
- 細胞小片化のための金属メッシュフィルタ周辺の構造最適化を進め、小片化した 細胞の回収率の改善に成功した。
- iPS 細胞継代培養「JiSS」により最終的に 1.0×10<sup>8</sup>(1億)個の iPS 細胞が得られることを実証した。また、「JiSS」で得た iPS 細胞が心筋細胞に分化すること、また冷凍保管が可能であること、さらにその心筋細胞シートが拍動することを明らかにした。
- CO<sub>2</sub> インキュベータが不要の回転培養ユニットを開発し、その恒温環境が 37± 0.3℃で制御できることを確認した。
- 臨床応用可能とする「JiSS」を適用した iPS 細胞継代培養自動化システムを構成 するターンテーブル、ジョイントステージ、小片化・分散ユニットを開発し、安 全キャビネットに設置した。
- 臨床応用向けの装置に使用可能な低コストアクチュエーターの開発に成功し、そのアクチュエーターによる培養ベッセル移送ユニットを開発し、安全キャビネッ

トに設置した。

- iPS 細胞継代培養自動化システムを開発し、本システムにより最終的に 1.0× 10<sup>8</sup>(1億)個のiPS 細胞が得られることを実証した。
- 本システムで iPS 細胞を培養したときに使用した培地の微生物検査により、菌やマイコプラズマの外部からの混入は無いことを明らかにした。ただし、樹脂製培養ベッセルの製造法もしくは臨床用の試薬を用いていないことが理由と考えられるエンドトキシンが微量に検出され、技術課題として抽出された。

#### 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:西野公祥)

〒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:078-306-6805 FAX:078-306-6813

#### 第2章 本論

#### 2-1 細胞継代培養「JiSS」での大量培養に向けたプロトコル構築

本研究開発では iPS 細胞継代培養「JiSS」での培養プロトコルを構築し、「JiSS」により  $1.0\times10^8$ (1 億)個の概念実証することを目的とする。そのために、3 つの技術課題として、培養ベッセルの開発と培養プロトコルの検討、生存率・回収率向上に資する細胞小片化技術の最適化、「JiSS」で培養された iPS 細胞の未分化性や分化能評価による特性解析、 $CO_2$  インキュベータ不要の回転培養ユニットの開発に取り組んだ。

#### 2-1-1 大量培養に向けた培養ベッセルの開発および性能評価

○シリンジ型ガラス製培養ベッセルの開発

「JiSS」での回転培養と細胞小片化を一度も外部環境に細胞を暴露させることなく閉鎖系でおこなうための形状をしており、特にシリンジ型であることを特徴としている。また培養する iPS 細胞の数が多いときは培地量も必然的に多く必要となるため、より容量の大きい培養ベッセルを開発する必要がある。そこで、先行研究で開発した10ml ガラス製培養ベッセルの他に25ml と50ml のベッセルを開発した(図4、図5)。なお、これらの容量は10ml のベッセルで約2.0×10<sup>6</sup>(200万)個まで iPS 細胞の増殖が可能であったことから、25ml で約5.0×10<sup>6</sup>(500万)個、50ml で



図4 シリンジ型 25ml ガラス製培養ベッセル



図5 シリンジ型 50ml ガラス製培養ベッセル

約1.0×10<sup>7</sup>(1,000万)個のiPS 細胞が得られることを前提としたものである。また、本研究開発における開発ストラテジを実現するには、「JiSS」の培養プロトコルの検討は先行研究の成果である回転培養装置「CellPet 3D-iPS」を用いることが前提であり、これらベッセルは「CellPet 3D-iPS」に搭載できるサイズとした。

〇シリンジ型ガラス製培養ベッセルにおける培地と成長因子、培養時の回転数、細胞播種方法等の違いによる増殖率への影響

「JiSS」での大量継代培養を実現するために、増殖率の高い培養プロトコルを見い出す必要がある。図6は2-1-1における最適化工程を示したものであり、以下にこの最適化工程における実験条件を振ったときの増殖率の結果を示す。なお、本実験で使用するiPS細胞株は「253G1」とした。

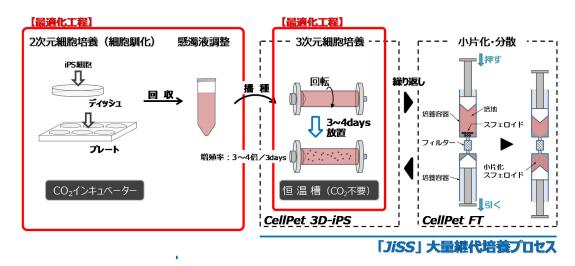


図 6 2-1-1 における最適化工程

#### (培地と成長因子の違いによる増殖率への影響)

これまで従来法である2次元培養(静置培養)向けの様々な培地が開発され、それに適合する成長因子も開発されてきた。本検討においては「JiSS」での3次元培養への適用を確認した。準備した培地はStemFit(AKO2N)、Essential-8、StemMacsの3種類、成長因子としてのロックインヒビターはY-27632、RevitaCell Supplement、Thiazovivinの3種類とした。もちろんこれらは2次元培養では十分良好な培養実績を有している。10ml ガラス製培養ベッセルによる3日間の3次元培養を行ない、培養後のiPS細胞の形態観察を実施した(図7)。図7に示す赤字の「◎」「〇」「△」「×」は順番に「特に良好な増殖」「良好な増殖」「増殖はしたが良好でない」「増殖不良」を示しており、培地とロックインヒビターの組み合わせというよりは、Y-27632を添加したどの培地においても「特に良好な増殖」「良好な増殖」「良好な増殖」「鬼好な増殖」「鬼好な増殖」「鬼好な増殖」「鬼好な増殖」「鬼好な増殖」「鬼好な増殖」「鬼好な増殖」「鬼好な増殖」「鬼好な増殖」「鬼好な増殖」「おいてもいるというよりは、Y-27632を添加したどの培地においても「特に良好な増殖」「鬼好な増殖」「鬼好な増殖」「鬼好な増殖」「鬼好な増殖」「おいてもいるりは、Y-27632を添加したどのおりにおいても、3次元培養において有効な機能を果たさない結果となった。この結果より、「JiSS」で使用する培地とロックインヒビターはStemFitとY-27632にした。

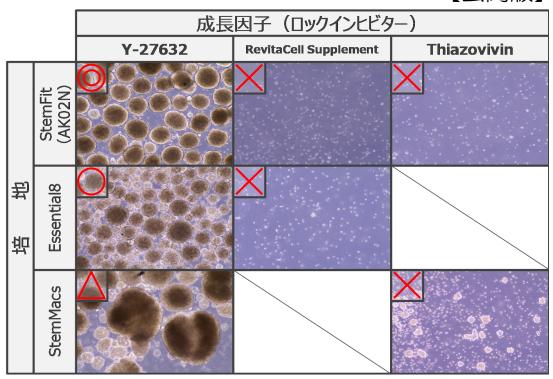


図7 培地と成長因子の違いによる培養結果

#### (培養時の回転数の違いによる増殖率への影響)

「JiSS」による回転浮遊培養はiPS細胞を培地懸濁液として培養ベッセルの中に封入し、ベッセルを常時回転して培養する。そのとき設定する回転数によって培地中のiPS細胞の浮遊状態が変わる。先行研究ではiPS細胞の浮遊状態を保ち、培養、増殖させるため回転数 6rpm(分速 6 回転)を設定していたが、増殖率の最適化はなされていない。そこで本実験では 10ml ガラス製培養ベッセルを用いて 6rpm、8rpm、10rpm の条件で 3 日間培養したときの増殖率を調べたところ、図 8 に示すように

10rpm での増殖率がやや低いものの、どの条件でも概ね同じ増殖率であった。この結果より、「JiSS」では 6rpm の回転数を用いることとした。なお、6rpm よりも遅い回転数のときは iPS 細胞の浮遊が保てず、10rpm より速い回転数のときは iPS 細胞が培地流れに連れ回る状態となり、浮遊状態が異なるため条件設定しなかった。

また 50ml ガラス製培養ベッセルにおいても同様の増殖率の傾向を示すことを見出した(図9)。

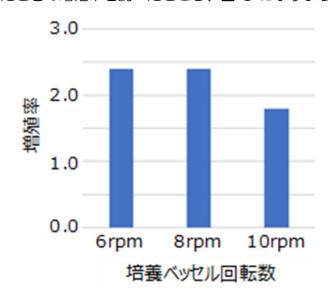


図8 回転数の違いによる増殖率

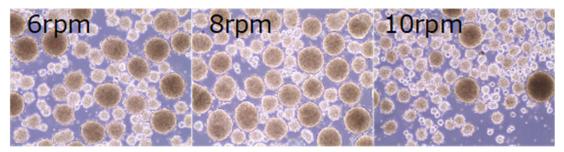


図9 50ml ガラス製培養ベッセルでの回転数の違いによる3日間培養後のiPS 細胞集塊の写真

#### (細胞播種方法の違いによる増殖率への影響)

「JiSS」に使用する iPS 細胞は 2 次元培養で増殖し、使用することになる。ここで、そのときのiPS 細胞の状態が「JiSS」での増殖率や品質に影響することが予想される。これまでの 2 次元培養の方法は京都大学 iPS 細胞研究所のホームページに掲載された方法を使用してきたが、それが「JiSS」にとって最適とは限らない。そこで本実験では「JiSS」に最適となる 2 次元培養の条件検討を実施した。

最初に平底容器に塗布するコーティング剤である Laminin511 (商品名: iMatrix511/マトリクソーム社製)の塗布条件を検討した。メーカー推奨の塗布条件である細胞播種"前日"もしくは"当日"の2つの条件で2次元培養したiPS細胞を用いて3日間の3次元培養したところ、前日コーティングでの増殖率が2.4倍、当日コーティングでの増殖率が4.2倍と有意な差が確認できた。

次にコーティング剤によって容器に接着している iPS 細胞を剥離する条件を検討した。剥離するときに使用するEDTA(エチレンジアミン四酢酸)は細胞のコーティング剤に対する接着力を弱めるために使用するが、例えば濃度 5mM、反応時間 8 分の従来条件で剥離したとき、剥離前に集塊だった iPS 細胞が一つ一つの単細胞にまでバラバラになる傾向があった。3 次元培養は最終的に集塊の形態で培養されるので、単細胞から3次元培養を開始すると増殖率が悪くなることが分かっていたので、剥離条件を従来法より弱め、濃度 0.5mM、反応時間 5 分の剥離条件で小さい集塊のまま剥離することに成功し、3 次元培養したところ従来法よりも増殖率が亢進されることを見い出した(図 10)。

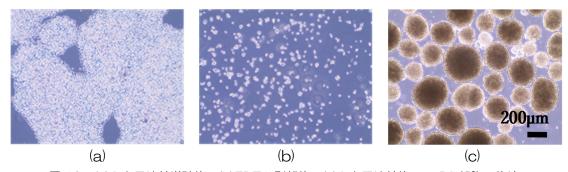


図 10 (a) 2 次元培養増殖後、(b) EDTA 剥離後、(c) 3 次元培養後 の iPS 細胞の集塊

#### (容量の異なる培養ベッセルでの増殖率等の比較)

本実験では、容量の異なる 10ml と 50ml ガラス製培養ベッセルを用いたときの増殖率を比較した。培養条件は先に示した各最適化した条件を適用し、10ml ベッセルに 5.0×10<sup>5</sup>(50万)個の iPS 細胞を、50ml ベッセルに 2.5×10<sup>6</sup>(250万)個の iPS 細胞を播種し、4日間の回転浮遊培養による 3 次元培養を実施した。10ml、

50ml ベッセルともに2日目 (2day) まで増殖し続け、その後4日目 (day4) まではそれほど増殖しないという結果を得た(図11)。つまり培養ベッセルの容量の差による増殖様態は僅かであると考えられる。

またそのときの集塊 サイズと個数の分布を Cell<sup>3</sup>iMeger /SCREEN ホールディングス社製 を使用して測定したと

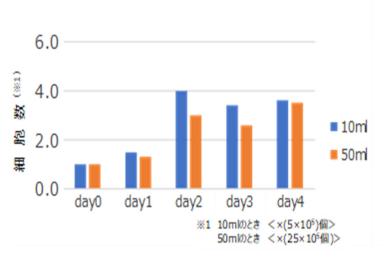


図 11 10ml と 50ml の培養シリンジでの増殖率の経時変化

ころ、10ml の培養ベッセルのほうが僅かながら分布が広く、50ml の培養ベッセル において 3 日目 (3day) でほぼ 150μm の集塊径にそろうことを見い出した (図 12)。

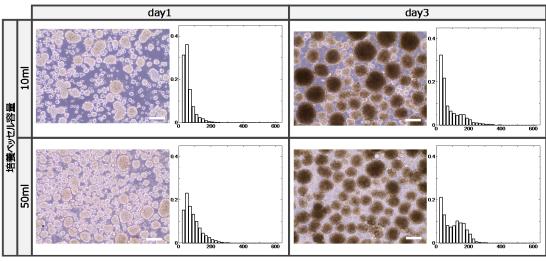


図 12 10ml と 50ml の培養ベッセルでの iPS 細胞の集塊の形態と粒径分布 (bar=100μm)

#### ○シリンジ型樹脂製培養ベッセルの開発

ガラス型樹脂培養ベッセルによる iPS 細胞の 3 次元培養での最適化条件は既報の通りである。ただし、開発した最大容量 50ml ベッセルにおいて 2.5×10°(250万) 個の iPS 細胞を培養したとき増殖率が約 2 倍までしか達せず、最適化によって当初想定していた到達細胞数1.0×10°(1,000万) 個の半分の 5.0×10° 個(500万) 個までしか達しなかった。この原因としてはガラス製培養ベッセルのガス透過性が無く、培地中の



図 13 シリンジ型樹脂製培養ベッセル

酸素不足が考えられる。そこでガス透過性の優れた樹脂材料を用いた 10ml シリンジ型樹脂製ベッセルを開発した (図 13)。

#### 〇シリンジ型樹脂製培養ベッセルによる iPS 細胞培養での増殖率等の評価

10ml のガラス製培養ベッセルと図 13 の樹脂製培養ベッセルによる iPS 細胞の 3 次元培養を実施し、増殖率や使用済みの培地の性状の評価を実施した。5.0×10<sup>5</sup> (50万) 個の iPS 細胞(253G1)を播種し、回転数 6rpm で 3 日間培養した結果、増殖率はガラス製ベッセルでは 2.5 倍であったが、樹脂製ベッセルでは 3.2 倍となった。また、従来の開放系で 2 次元培養するときに使用する平底培養容器を比較対象とし、ガラス製培養ベッセル、樹脂製培養ベッセルでの培養後の培地の pH、溶存 O2 濃度、溶存 CO2 濃度を比較したところ、樹脂製培養ベッセルの培養環境が従来の開放系に近い 2 次元培養環境下とほぼ同じであることが分かった (図 14)。

ガラス製培養ベッセルでは iPS 細胞の初期播種量を 5.0×10<sup>5</sup>(50 万)個よりも増やすと増殖率が劇的に悪化する傾向であった。しかし、その 8 倍量となる 4.0×10<sup>6</sup>(400 万)個の iPS 細胞をガラス製培養ベッセルに播種し、培養したところ、増殖率は低下するが 1.8 倍に増殖することが確認できた。これにより到達細胞数が目標値の7割に留まったが7.2×10<sup>6</sup>(720 万)個となり、達成目標である 1.0×10<sup>8</sup>(1 億)個を得るにはベッセル 14 本で達することになる。

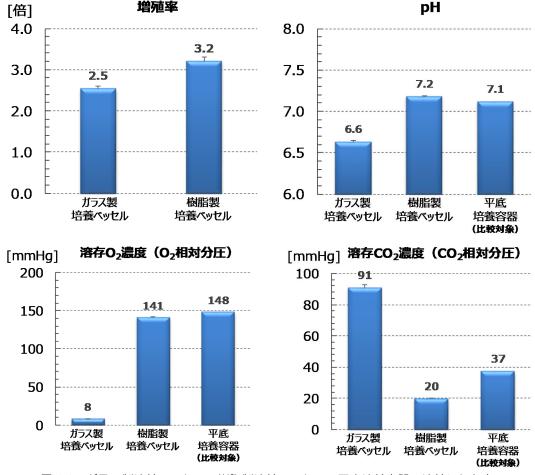
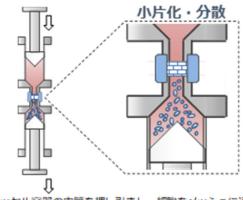


図 14 ガラス製培養ベッセル、樹脂製培養ベッセル、平底培養容器で培養したときの 増殖率、pH、溶存 O2 濃度、溶存 CO2 濃度のデータ

#### 2-1-2 細胞小片化・分散技術の最適化および性能評価

OiPS 細胞の小片化、分散のための金属メッシュフィルタの開発

「JiSS」での細胞小片化・分散の目的は、iPS 細胞の集塊サイズが大きくなることで細胞増殖が停止したiPS 細胞の再増殖を促すため、つまり「継代」と呼ばれる細胞処理を実施するためである。具体的には金属メッシュフィルタにiPS 細胞の集塊を押し付け、細胞がフィルタを通過するときに小片化され、通過後には培地のなかに分散されるという物理技術である(図 15)。



ベッセル容器の内筒を押し引きし、細胞をメッシュに通す

先行研究で開発に成功した、生存

図 15 小片化・分散技術

率が低下しない継代処理に既に使用されている平織の開口サイズ 70µm の金属メッシュフィルタに対し、さらに良質な継代処理を可能にする新しいメッシュフィルタの探索的開発のために、同じ平織の開口サイズ 70µm のフィルタ 4 種類、カレンダー加工平織の開口サイズ 70µm のフィルタ 1 種類を準備し、実際に小片化したときの顕微鏡による細胞の形態観察と、その小片化後の細胞を 3 日間の 3 次元培養したときの増殖率を比較したところ、先行研究品である金属メッシュフィルタが最も良質であった (図 16)。ただし、小片化前後での細胞数をカウントしたところ約 50%に減少することがいずれのフィルタでも確認されており、この実験・検証によって継代培養により大量に iPS 細胞を増殖させる「JiSS」において、大きな技術課題が抽出された。

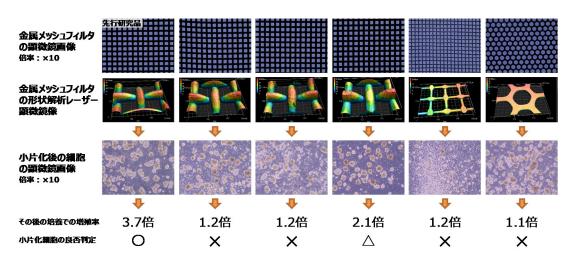


図 16 実験に使用した金属メッシュフィルタの顕微鏡画像、形状解析レーザー顕微鏡像、そして小片化・分散実験の結果

#### 〇細胞小片化・分散技術の回収率改善の取り組み

先の報告において、小片化することで細胞がロスする技術的な課題を示した。そこで小片化後の金属メッシュフィルタを確認したところ、iPS 細胞が小片化されずにフィルタ表面に残っていることが確認された。これは培養ベッセルのシリンジ内筒を押してフィルタに細胞を押し付けているにも関わらず、小片化するだけの圧力が得ら

れていないと考え、結果として圧力を保持するための金属メッシュフィルタのゴム材のパッキンが組み込んだときに大きく変形していることが原因であると分かった。そこで、パッキンのゴム硬度を 50 から 70 に強化したものに換え、小片化の実験をしたところ、回収率が約 50%であったところから 80~94%に改善することが確認できた。

#### 2-1-3 細胞継代培養技術「JiSS」による iPS 細胞の大量培養の実証

O「JiSS」により継代培養した iPS 細胞(253G1)の増殖率、未分化性、染色体解析の評価について

「JiSS」は閉鎖系ベッセルを用いた回転培養(3次元培養)技術 "CELLFLOAT"による細胞培養と細胞小片化技術による継代を交互に繰り返すことで、iPS 細胞を増殖(拡大培養)させる新しい継代培養技術である(図 17)。本検討では、「JiSS」による 50ml のシリンジ型ガラス製培養ベッセルを用いた拡大培養を P8(8世代)まで実施した(図 18)。そこで、各世代の増殖率を初期細胞数に掛け算すると P7(7世代)で達成目標である 1.0×10<sup>8</sup>(1億)個の細胞を得ることを示唆する結果となった。

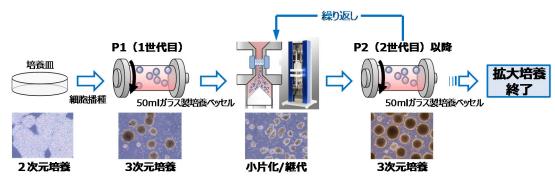


図 17 「JiSS」による 3 次元培養と小片化による継代培養の概略

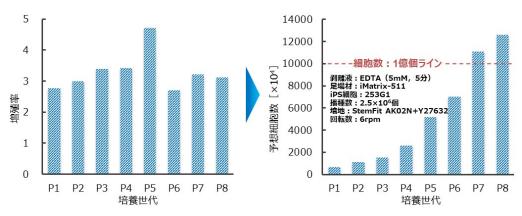


図 18 50ml ガラス製培養ベッセルを用いた「JiSS」での増殖率と予想細胞数

また、各世代の iPS 細胞の未分化性を評価するために RT-PCR による iPS 細胞から抽出した遺伝子マーカー (OCT3/4 と NANOG) の発現を測定したところ、どの世代においても大きく発現状態に変化はなく、未分化性が維持されているものと考えられる (図 19)。

さらに、継代培養において染色体変異の有無を確認するために、2次元培養後と

#### 【公開版】 OCT3/4 NANOG 1.8 1.8 1.6 1.6 Relative expression levels Relative expression levels 1.4 1.4 1.2 1.2 1.0 1.0 0.8 0.8 0.6 0.6 0.4 0.4 0.2 0.2 0.0 0.0 2次元培養 3 **P4** P5 9 P7 培養世代 培養世代

図 19 ガラス製培養ベッセルを用いた「JiSS」による iPS 細胞の遺伝子マーカーの発現比較

「JiSS」の5世代目後のiPS細胞の染色体解析(核型異常解析)を実施したところ、 どちらも正常判定であった。

これら結果から「JiSS」が十分に大量培養の技術であることが示唆され、継代培養した iPS 細胞では未分化性に問題なく、また遺伝子レベルの変異もなく、十分に再生医療等に適応できる可能性があることを示せた。

〇「JiSS」により継代培養した iPS 細胞(253G1)を従来法で分化誘導した心筋細胞の分化能の評価

一般的に iPS 細胞は体細 胞に近い細胞に分化し、使 用される。「JiSS」で培養 した iPS 細胞も従来法と同 様に分化能を有している必 要がある。本検討では 「JiSS」で培養した iPS 細 胞(253G1)を従来法の プロトコルを用いて心筋細 胞に分化することを確認し た。分化能の評価は、ヒト の心筋細胞にはトロポニン が含まれていることを利用 し、分化後の細胞のトロポ 二ン含有状況を蛍光分析法 で確認した。その結果、全 細胞に対するトロポニン含 有細胞の率として 10.0~ 80.0%とバラつきが見られ たが分化能を有しているこ とが示せた(図 20、図 21)。また、トロポニン含 有細胞が80.0%含まれる心

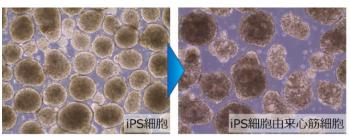


図 20 「JiSS」で継代培養した iPS 細胞と それから分化した心筋細胞

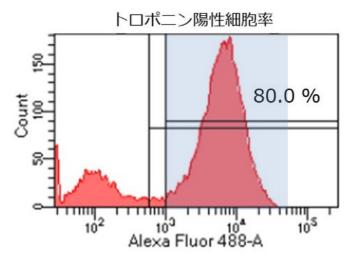


図 21 FACS によるトロポニン陽性細胞測定結果

筋細胞をシート化したところ、モーションアナライザによって一定のリズムで拍動していることが確認できた(図 22)。

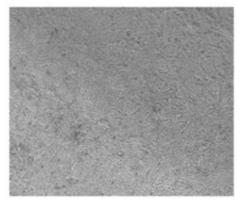


図 22(a) シート化した心筋画像

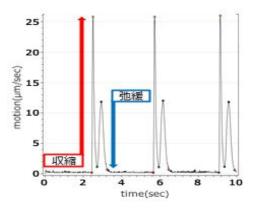


図 22(b) モーションアナライザの拍動波形

〇「JiSS」により継代培養した iPS 細胞(253G1)を従来法で分化誘導した心筋細胞の冷凍保存の評価

「JiSS」により iPS 細胞(253G1)から分化させた心筋細胞の冷凍保存融解後において、生存率が 97%(3.5 $\times$ 10 $^6$ 個)から 79%(1.9 $\times$ 10 $^6$ 個)に低下したものの、生細胞の存在が確認されたことから冷凍保存可能であることを示した。なお、冷凍保存においては、緩徐冷却法を使用した。

#### ○回転培養ユニット(試作)の開発

従来の細胞培養は CO<sub>2</sub> インキュベータの庫内に静置することで実施されてきたが、「JiSS」においては使用される閉鎖系の培養ベッセルが寄与し、培養最適温度 37℃ 環境であれば培養が可能となる。本開発では先行研究で開発した回転浮遊培養装置「CellPet 3D-iPS」をベースに、スペース効率の高い、CO<sub>2</sub> インキュベータが不要となる恒温カバーを備える回転培養ユニット(試作)の開発を推進した (表 1)。

この回転培養ユニットの要件としては、開発したガラス製培養ベッセルが搭載できること、設置場所の融通性に必要となる制御コントローラーを内蔵すること、37±0.5℃の恒温環境が維持できる恒温カバーと温調ヒーターを備えること、スペース効率を考慮して3台までスタックできること、そして最後は本研究課題で開発するiPS細胞継代培養自動化システムに対応できることとした。

特に恒温環境を維持するため、温調ヒーターの加温能力の見直しと取り付け方の検討、微風循環用ファンの設置方法の検討、温調用センサーの配置の検討を繰り返し、培養ベッセルの配置位置で温測し、概ね目標仕様通りの 37±0.5℃であることが確認できた(図23、図24)。

表 1 回転培養フニット (試作) と CellPet 3D-iPS の比較表

表 1 回転培養ユニット(試作)C CellPet 3D-IPS の比較表					
	回転培養ユニット(試作)	CellPet 3D-iPS			
外観写真		COLPLOY			
設置環境	一般実験室 等	CO2インキュベータ庫内			
環境温度	室温(20~28℃)	37±0.5℃			
制御方法	コントローラー内蔵	別体の外部コントローラー			
電源供給	外部電源(専用)	外部コントローラーから供給			
その他	恒温槽付き (37±0.5℃) 恒温槽内に循環ファン装備 ユニットは3台までスタック可				
	継代培養自動化システムに対応				

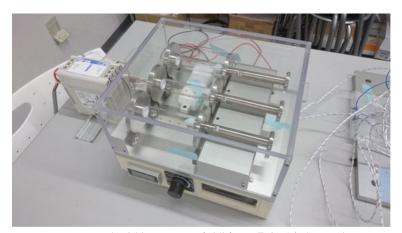
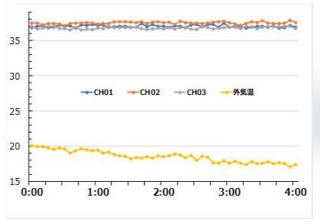


図 23 回転培養ユニット (試作) の温度測定中の写真



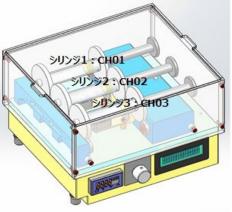


図 24 回転培養ユニット (試作) の温度測定結果

#### ○回転培養ユニット(量産試作)の開発

回転培養ユニット(試作)に続き、実用化に向けて回転培養ユニット(量産試作)の開発を進めた。基本の構造は回転培養ユニット(試作)を踏襲するが、シリンジ型ガラス製培養ベッセルの他に、本研究期間中に新たに開発したシリンジ型樹脂製培養ベッセルに対応させ、本事業最終年度に実施予定のiPS細胞の1×108(1億)個の培養の概念実証実験のときに使用することを目的として開発を推進した(図25)。

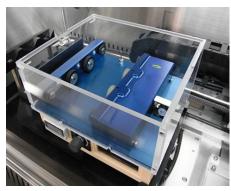
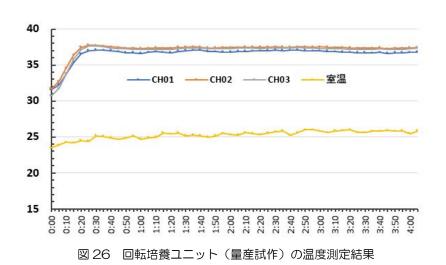


図 25 回転培養ユニット (量産試作)

培養において最も大切な恒温環境の温度補

償について、ユニット(試作)と同様に恒温環境の温度測定を実施し、37℃±0.3℃ (室温 25±5℃)であることを確認した (図 26)。その他、仮に培地漏れが起きたときの 2 次被害対策、別途回転計による培養ベッセルの回転数の校正、100 時間連続運転試験、販売に向けたデザイン反映等を実施し、回転培養ユニット(量産試作)の開発を終えた。



2-2 臨床応用を目指した細胞継代培養技術「JiSS」による自動化システムの構築

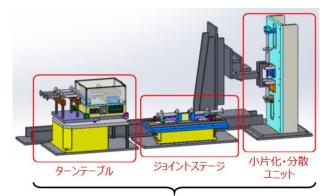
本研究開発では iPS 細胞継代培養「JiSS」の臨床応用を目指す iPS 細胞大量継代培養自動化システムの開発を実施し、本システムにより 1.0×10<sup>8</sup> (1 億) 個の概念実証することを目的とする。そのために、3 つの技術課題として、継代培養自動化システムの開発、低コスト自動化システムに資する低コストアクチュエーターの開発、そして開発した継代培養自動化システムにおいて 1.0×10<sup>8</sup> (1 億) 個の概念実証と微生物評価に取り組んだ。

#### 2-2-1 滅菌ガス対応の細胞小片化・分散ユニットの開発

〇細胞小片化・分散ユニットの開発

「JiSS」は大きく分けて iPS 細胞の 3 次元培養の工程と増殖した iPS 細胞の小片化・分散する工程を交互に実施する継代培養方法である。本開発ではそのうち小片化・分散する工程の自動化ユニットの開発を進めた。本ユニットは培養ベッセルが搭

載されたままの回転培養ユニットが配置されるターンテーブル、小片化のための金属メッシュフィルタが内封されたフィルタホルダーに対し、容量が 10ml を 25ml、50ml のガラス製培養ベッセルまたは10ml 樹脂製培養ベッセルをホルダー両端方向から同時に自動着脱するジョイントステージ、小片化・分散ユニットから構成される(図27)。



細胞小片化・分散ユニット

図 27 細胞小片化・分散ユニットの構成図

これらはシステムとして安全キャビネット内に配置されることから滅菌ガス対応とする必要がある。本開発では、腐食性のある滅菌ガスに対する材質としてステンレス・ABS 樹脂もしくはアルミ合金の表面に耐腐食性塗膜を検討したが、コストやメンテナンス性を考慮した結果、ステンレス・ABS 樹脂を採用している。また電気・信号配線については防水テープ等による滅菌ガスの入り込みを防ぐ処理等も施した。

#### ○ターンテーブルの開発

ターンテーブルにおいては、主に回転培養ユニットの搭載時に微粒を物の持ち込みを防ぐため、より簡便に搭載する構造を、また自動化動作の際には細胞へのダメージを少なくするための高速化に注意を払って

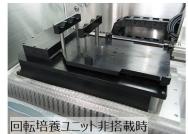


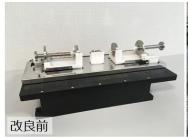


図 28 ターンテーブルの外観写真

設計、開発することに留意した(図 28)。またメンテナンス性を考慮し、安全キャビネットから簡便に着脱できるようにベースプレート構造を採用した。

#### 〇ジョイントステージの開発

ジョイントステージにおいては、主にメッシス防止・高い再現性の実現に注意を払って設計、開発することに留意した。また、開発当初は2つの培養ベッセルと1個のメッシュホルダーの着脱を行



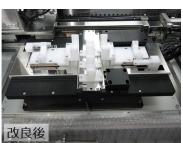


図 29 ジョイントステージの外観写真

う機構となっていたが、自動化システムとしての要件を満たすべく、本着脱を3回連続で実施する機構に改良した(図29)。さらに、開発当初はガラス製培養ベッセルのみに対応していたが、樹脂製培養ベッセルの開発にともない、さらに改良を実施した。

#### 〇小片化・分散ユニットの開発

小片化・分散ユニットにおいては、培養ベッセルとフィルタホルダーがジョイントステージで接続された状態のまま搭載されるので、自動化での搭載時トラブルにつながらないような機構検討を主に注力し、設計を推進した。開発当初、本ユニットは機構的に能動的制御、つまりモーターによる単なる位置制御のみで小片化・分散動作を

実現しようと考えていたが、評価時に動作ミスが 多発し、細胞小片化・分散の再現性が確保できな かった。そこでその原因究明をしたところ、本ユニットに搭載される培養ベッセルのプランジャ (内筒)と本ユニットのプッシャー部およびプラー部との接触部に隙間が生じると、プランジャの押し引きする距離が入力数値通りにならず、小 片化・分散時にベッセル間を移動する培地の定量性に不具合が生じることが原因であると断定し、 急遽追加センサーをプッシャー部およびプラー部に追加する改良を実施した(図30)。その結果、 懸念されていた隙間があっても問題無くプランジャの押し引きされ、ベッセル間を移動する培地が定量的に送液されることも確認できた。

また、ジョイントステージと同様に開発当初は ガラス製培養ベッセルのみに対応していたが、樹 脂製培養ベッセルの開発にともない、さらに改良 を実施した。



図30 小片化・分散ユニット の外観図

#### 2-2-2 滅菌ガス対応の低コストアクチュエーターの開発

医療用や臨床用途の自動化装置のニーズが高まっているなかで、上市されている直動ロボット等のアクチュエーターにおいて滅菌のための腐食性ガスに対応したものは少なく、さらに規格製品



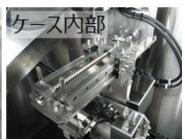
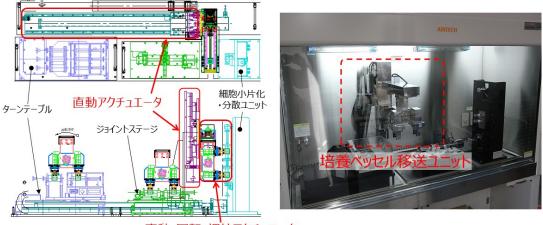


図31 直動の低コストアクチュエーターの写真

のために設計するにあたってサイズ面やコスト面で制限されることが多い。本研究開発の完成目標である iPS 細胞継代培養自動化システムの構成装置の一つで、培養ベッセルを把持し・姿勢を変え、ターンテーブルとジョイントステージと小片化・分散ユニットの間を移載させ、またそれらと同様に安全キャビネット内に設置して使用する培養ベッセル移送ユニットは、規格製品のアクチュエーターでは実現が難しく、滅菌ガス対応の低コストアクチュエーターを開発する必要があった。そこで、本開発において直動、回転、把持する低コストアクチュエーターの開発を進め、最終的には培養ベッセル移送ユニットの開発を実施した(図 31、図 32)。

培養ベッセル移送ユニットの培養ベッセルを把持する機構は、容量の異なる培養ベッセルであっても把持できることを特徴とし、今後の容量の異なる培養ベッセルにも対応できるようにした(図 33)。



直動・回転・把持アクチュエータ

図32 培養ベッセル移送ユニットの図面・写真と各アクチュエーターの場所



図33 把持する機構の概要

### 2-2-3 臨床応用可能な「JiSS」による大量細胞継代培養自動化システムの開発

「JiSS」による  $1\times10^8$ (1億)個の iPS 細胞の継代培養の概念実証は 2-1-3 で 既報した通りである。そこで本開発では、臨床応用に向けた「JiSS」を実現するための iPS 細胞継代培養自動化システムを構築し、10ml 樹脂製培養ベッセルによる  $1\times10^8$ (1億)個の iPS 細胞継代培養の概念実証ならびに培養後の培地の微生物検査によるシステムへの微生物汚染状況を把握することを推進した。

本開発で設計・作製した iPS 細胞継代培養自動化システムは、安全キャビネット内にターンテーブル、ジョイントステージ、小片化・分散ユニット、培養ベッセル移送ユニットを備え、回転培養ユニットから培養後のベッセルを取り出し、培養後の細胞を小片化するシステムである。本システムの特長として、安全キャビネットが寄与し、清浄度が非常に高い状態で培養ベッセルの移載や小片化・分散作業が行われるので細胞の微生物汚染の懸念は非常に少ない(図 34)。

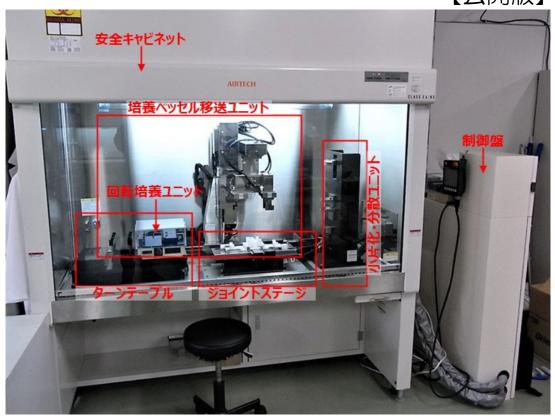


図 34 大阪大学内に設置した iPS 細胞継代培養自動化システムの全景

次に本システムを用いた大量 iPS 細胞継代培養の概念実証するための実験を実施した。実験では、iPS 細胞(253G1)を 1.0×10<sup>6</sup>(100万)個を培地懸濁液として播種、培地は StemFit AKO2N、試薬は 10mM Y-27632、1 回の培養期間を 2 日間としてトータル 6 日間培養(小片化は 2 回)した。その結果、最終的には約 5.93×10<sup>6</sup>(593万)個の iPS 細胞が得られた(図 35)。これは、現実的な数字である 17 本×3 培養分(51 本)の培養ベッセルで培養することにより、目標としている 1.0×10<sup>8</sup>(1 億)個の iPS 細胞を 6 日間という短い期間で得られることを実証したと言える。なお、さらに培養期間を 8 日間に延ばすと、これまでの増殖率通りに増えたとして 10ml 培養ベッセル 1 本あたり 1.0×10<sup>7</sup>(1,000万)個以上の iPS 細胞が得られることが予想され、使用するベッセル数が 10 本×4 培養分(40 本)と削減できる可能性はあるが、実証するに至っていない。これについては、本研究開発後に取り組む課題として考えている。

またこの時の培地の微生物検査では、無菌試験(直接法)、マイコプラズマ否定試験(核酸増幅法)、エンドトキシン試験(リムルス試験法)を実施したが、無菌試験とマイコプラズマ否定試験では陰性であり概ね外部からの微生物混入は無いと判断したが、エンドトキシン試験では培養ベッセルの製造法、または研究用試薬を使用したことが起因し、微量ながら検出したものと推測した。一般的にエンドトキシンは外部からの持ち込みよりも容器等に初期から付着しているケースが多く、将来的には培養ベッセルの製造法の改善により低減可能と考えている(図 36)。

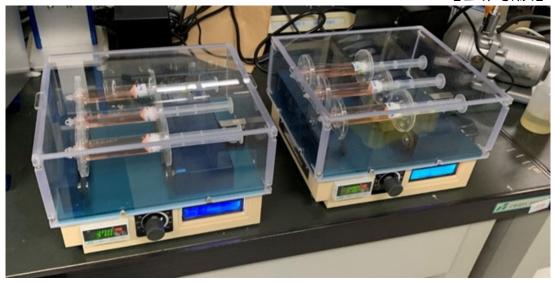


図35 樹脂製培養ベッセルによる大量培養中の回転培養ユニット

試験検査項目	無菌試験 (14日目)	マイコプラズマ否定試験	エンドトキシン試験	グラム染色検査
依頼内容	<ul><li>□ 直接法</li><li>□ バクテアラート法</li><li>□ メンブレンフィルター法</li></ul>	□ nested PCR法 ID real-time PCR法	ロゾムルス試験法	□ B&W法
判定年月日	2019/12/19	20-19/12/6	2019/12/120	20 /
実 施 者				. /
手順書に従って適切に 試験検査を実施した	4	Ŋ	D .	/6
指図記録書・結果記録 書の添付	4	d d	4	/ -
結 果 (試験検体)	陰性 · 陽性	陰性・陽性	39.7/ EU/mL	陰性・陽性
結 果 (比較検体)	陰性 · 陽性	陰性・陽性	<0.01066 EU/mL	陰性・陽性

以上のごとく、各微生物検査の実施状況と結果を報告します。

図36 微生物検査結果

#### 最終章 全体総括

#### 3-1 総 括

iPS 細胞は今後再生医療の分野を大きく発展させる可能性を有し、大きな市場を形成することが予想されている。ただし、iPS 細胞の従来の製造工程では手作業が残っており、細胞処理装置や自動化装置の開発が課題となっていた。

上記に基づき、以下の成果を得た。

- 「JiSS」で使用する回転浮遊培養(3次元培養)のためのシリンジ型の25ml、 50ml ガラス製培養ベッセルならびに大量培養に向く10ml 樹脂製培養ベッセル の開発に成功し、それぞれの最適培養条件を明らかにした。
- 細胞小片化のための金属メッシュフィルタ周辺の構造最適化を進め、小片化した 細胞の回収率の改善に成功した。
- iPS 細胞継代培養「JiSS」により最終的に 1.0×10<sup>8</sup>(1億)個の iPS 細胞が得られることを実証した。また、「JiSS」で得た iPS 細胞が心筋細胞に分化すること、また冷凍保管が可能であること、さらにその心筋細胞シートが拍動することを明らかにした。

- CO<sub>2</sub> インキュベータが不要の回転培養ユニットを開発し、その恒温環境が 37± O.3℃で制御できることを確認した。
- 臨床応用可能とする「JiSS」を適用した iPS 細胞継代培養自動化システムを構成するターンテーブル、ジョイントステージ、小片化・分散ユニットを開発し、安全キャビネットに設置した。
- 臨床応用向けの装置に使用可能な低コストアクチュエーターの開発に成功し、そのアクチュエーターによる培養ベッセル移送ユニットを開発し、安全キャビネットに設置した。
- iPS 細胞継代培養自動化システムを開発し、本システムにより最終的に 1.0× 10<sup>8</sup>(1億)個のiPS 細胞が得られることを実証した。
- 本システムで iPS 細胞を培養したときに使用した培地の微生物検査により、菌やマイコプラズマの外部からの混入は無いことを明らかにした。ただし、樹脂製培養ベッセルの製造法もしくは臨床用の試薬を用いていないことが理由と考えられるエンドトキシンが微量に検出され、技術課題として抽出された。

#### 3-2 今後に向けて

本研究開発において、独自のiPS細胞継代培養「JiSS」の実用化に向けた取り組みを実施し、達成目標であった細胞数 1.0×10<sup>8</sup> (1億) 個の iPS 細胞が得られることを実証したが、更なる高効率な細胞継代培養に資するさらに容量の大きい樹脂製培養ベッセルを開発する課題に着手できなかった。外科的治療用の軟骨等の大型組織において、また内科的治療用のナチュラルキラー(NK) T 細胞においては 10 億個以上の iPS 細胞が必要と言われており、「JiSS」の更なる大量培養や高効率化を必須課題とし、補完研究として取り組みたいと考えている。

本研究開発において開発に成功した、回転培養ユニットならびに iPS 細胞自動継代培養自動化システムについては、翌年度から iPS 細胞ユーザーを中心にパイロットユーザーとなる研究機関等の探索、関係強化を図り、営業販売に使用できるデータ取得を進める予定である。