

幹細胞の自動培養システム

中嶋 勝己*・金澤 秀和・櫻井 隆・蓮沼 仁志・佐藤 理

再生医療の実用化のためには、移植に必要な細胞を高品質に、安全に、安価に提供する必要があり、細胞培養の自動化は、そのための重要技術である。筆者らは、これまで、産業界の自動化で培った技術—ロボット技術、画像処理技術、プラント技術などを応用し、細胞自動培養システムの開発を実施してきた。その結果、研究用のiPS細胞や再生医療用の幹細胞の培養の自動培養を実現し、市場に製品として提供している。本稿では、最新の自動培養システムを紹介する。

細胞自動培養システム開発のコンセプト

細胞自動培養システムを再生医療に使用する細胞の自動培養用と位置づけ、開発を開始した。再生医療を行う事業者は、まず、人の手による手培養で開発を実施し、承認を取る。最初は培養量が少ないため、手培養で事業を続け、培養量が増大した段階で、規模拡大とコストダウンのため、培養を自動化する。そのためには、承認を受けた細胞の製造法の変更が必要で、承認を得やすくするには手培養に、できるだけ近い形で自動化することが望ましいと考えた。培養の手技を、ロボットを中心とした技術で自動化し、顕微鏡で見て判断していた技術を画像処理技術で自動化し、プラント技術で全体をまとめるコンセプトで開発を行った。

研究用細胞の自動培養システム

オートカルチャー® オートカルチャー®とは、非臨床用途でのヒトiPS細胞を含む接着系細胞を対象とした自動培養システムで、人の手による細胞培養で確立されたプロトコルを容易に自動化できる汎用性の高さが特徴である。図1にシステムの外観を示す。装置の基本構成は、通常の培養でクリーンベンチに相当する「操作部」を中心とし、インキュベータ、冷蔵庫、常温での消耗品の保管庫（常温保管庫と呼ぶ）、遠心分離機、クリーンロボットからなる。オプションとして細胞観察装置があり、装置の外から観察画像を取得・自動保存を行うことができ、画像処理による細胞回収や継代時期の判断を支援する機能もある。これらのすべてが、2.2～3.7 m × 1.4 m × 2.1 mの装置内部に格納されている。装置内部はクラス100（Fed-std209E）に対応しており、使用者



図1. 非臨床用細胞自動培養システム

の指定でエタノール噴霧やUV照射によって内部の除染を行うことができる。

搬入口 細胞やディッシュ、チューブなどの消耗品、培地、剥離用溶液などの試薬は、常温保管庫を兼ねた搬入口から供給する。クリーンロボットによって直ちに、細胞はインキュベータに、冷蔵保管が必要な培地、剥離用溶液などは冷蔵庫にと、適切な場所に格納される。消耗品や培地の量はプログラムによって適切に管理され、ヒューマンエラーを防ぐ仕組みになっている。

操作部 図2に操作部を示す。操作部内に、ピペット操作を行う簡易アーム（ピペッタ）とディッシュの蓋を開閉する簡易アーム、遠心管や薬液ボトルの蓋を開閉するキャッパーがある。ピペッタで使用するチップ（10 ml）は、本システム専用のもので、操作部右側のチップスタンドにチップを用意し、必要に応じて自動でチップ交換を行う。回転ステージでは、クリーンロボットがインキュベータから出してきたディッシュ5枚の作業を同時並行的に行うことができる。ここには、ディッシュから液体をチップで吸引する場合に、ディッシュを傾ける機構や、継代時に使用するタッピング機構などが組み込まれている。廃液口は、培地交換で不要となった培養上清や継代時に洗浄に使用したPBSなど、液体の廃棄物を捨てる口で、必要なときに自動で開口する。廃液は装置前方下部に設置された廃液ボトルに集められる。

細胞観察装置 細胞観察装置を使用することで、

*著者紹介 川崎重工工業株式会社マーケティング本部（室長） E-mail: nakasima_katsumi@khi.co.jp



図2. 操作部

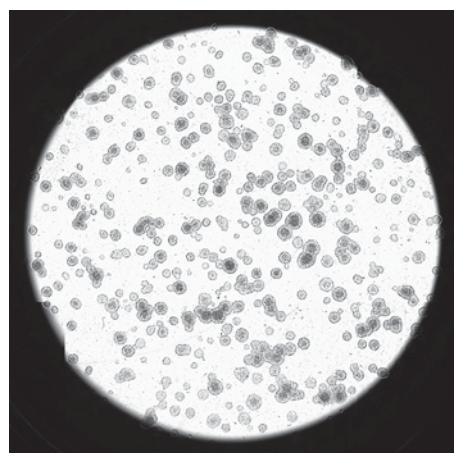


図4. 6 cm ディッシュ1枚の画像の合成例

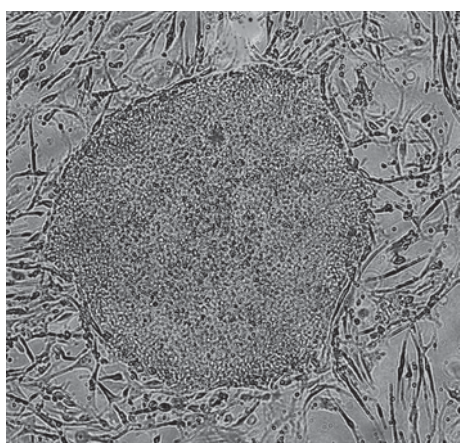


図3. iPS細胞のコロニーの観察例

ディッシュを装置外に出さずに、細胞観察が可能となる。通常は、位相差顕微鏡で、細胞を観察した場合と同様な画像を見ることができる。図3にiPS細胞のコロニーを観察した例を示す。iPS細胞のコロニーひとつひとつの画像だけではなく、複数の画像からディッシュ1枚分の画像を合成することで、ディッシュ全体のコロニー分布を観察することも可能である。図4に5枚の画像から6 cmディッシュ1枚の画像を合成した例を示す。倍率の異なる2個のレンズは切り替え式なので、両方の画像を使用者に提供することができる。

種々の培養法への対応 ヒトiPS細胞培養ではさまざまな継代方法が使用されているが、使用する継代方法に合わせて使用者がオートカルチャー®を設定することができるようになってきている。代表的な接着系細胞10種とヒトiPS細胞1種に対応した、継代の作業行程がデジタル化されたパラメータが、あらかじめプログラムされており、各パラメータを使用者が変更することで、さまざまな培養プロトコルに対応可能である¹⁾。

ヒトiPS細胞の自動培養 現在プログラムされているヒトiPS細胞の培養パラメータは、マウス胎児由来繊維芽(MEF)細胞をフィーダー細胞として使用するスタンダードな培養プロトコルに対応している。このヒトiPS細胞培養パラメータは、国立成育医療研究センターで樹立されたヒト胎児肺細胞株MRC-5由来のヒトiPS細胞(Tic, JCRB1331)を用いて調整されている。このiPS細胞株のようにフィーダー細胞を使用する培養方法では、iPS細胞を継代する1日前にフィーダー細胞をディッシュに播種し、当日に装置の搬入口より供給する方法、あるいは、フィーダー細胞を細胞懸濁液で供給することで装置自身が播種を行う方法のいずれかを選ぶことができる。国立成育医療研究センターで行われた連続培養試験においては、3か月間の試験期間を通じて良好な培養状態を保つことが確認されている。

使用者は、はじめにこのパラメータを用いて使用するiPS細胞を培養し、問題のあるパラメータを調整することで最適化を図ることができる。たとえば、剥離用溶液の作用が強い場合、あるいは、使用するiPS細胞が剥がれやすい場合には、「剥離時間」のパラメータを短く設定する。また、播種時の細胞集団を希望のサイズにするためには、「細胞再懸濁時ピペッティング回数」のパラメータを調整し、何通りかの設定を同時に行い、培養結果を比較することで、最適なパラメータを選ぶことができる。自動培養により、継代する細胞集団のサイズや分散が一定となり、また継代間隔も一定になるため、継代の直前のコロニーの大きさは、人の手による培養よりも均一になる。そのため、最適な播種密度(継代倍率)を決めてしまえば、ヒューマンエラーもなく安定した培養が継続できる。

医療用細胞の自動培養システム

GMP準拠 現在の薬事法では、再生医療に使用される細胞は医薬品、または、医療機器として承認を受ける。それゆえ、細胞を培養する自動培養装置は、医療機器ではなく、医薬品、または、医療機器の製造装置になると考えられる。製造装置として重要なのはGMPに適合することである。培養した細胞を臨床使用することを目指すために、GMPに適合した製造装置とすべく、細胞自動培養システムの開発を実施してきた。

自動培養装置にとってのGMP適合で重要なのは、汚染防止と間違いの防止である。しかし、GMPに対応できても、ユーザーにとってデメリットとなれば、使う価値はなくなる。ユーザーにとってのメリットを生むよう、以下の設計目標を設定した。

- (1) GMP対応
 - ①汚染を起こさないこと
 - ②間違いを起こさないこと
- (2) 事業者にとってのメリットの提供
 - ③同時培養する検体数の増加
 - ④同時培養する細胞数の増加
 - ⑤無人化
 - ⑥設置施設の簡素化
 - ⑦多種の細胞への対応
 - ⑧手培養から自動培養への移行の容易さ

ここでは、代表例を紹介する。

設置施設の簡素化 本装置の基本的な考え方は、ヒト細胞培養加工装置についての設計ガイドラインに示された筐体密閉型培養装置である。設置施設が簡素化できれば、事業者にとって、イニシャルコスト、および、ランニングコストの低下につながる。設置施設の簡素化のためには、設置場所に要求される清浄度を下げられることが重要である。そこで、除染付パスボックスを装備することにした。自動培養装置の内部を安全キャビネットと考え、Cell Processing Center (CPC) 内で安全キャビネットは、カテゴリーBのクリーン空間に設置する必要がある。パスボックスに自動除染機能を設けることで、自動培養装置は除染付パスボックスを装備したアイソレータと同等となり、設置場所は、カテゴリーC以下にすることが可能となる。

培養する検体数の増加 複数の患者由来の検体に対応するため、並列的に培養する培養系を増やす。この場合、交差汚染への対応が必要となる。筐体密閉型培養装置で、培養容器が解放される操作空間を複数の患者由来の細胞が共通に使用する空間とし、培養系の交替（チェ

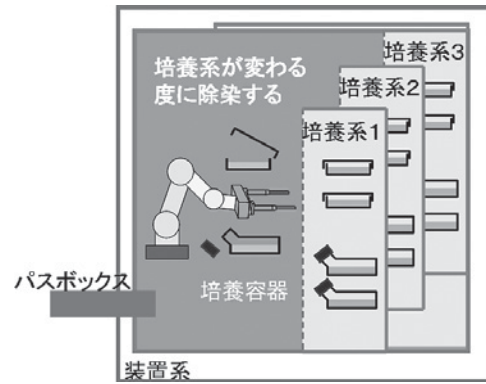


図5. チェンジオーバー時の除染の考え方

ンジオーバー) 時に除染を行うこととした。図5に、考え方を示す。ヒト細胞培養加工装置についての設計ガイドライン²⁾内にある図に一部変更を加えたものである。この除染技術も、除染付パスボックスと同じ技術である。

汚染を起こさないこと 除染は過酸化水素蒸気による滅菌レベルの自動除染であり、パスボックスと培養操作部に設けた。培養操作部とは、ロボットが動き、培地交換や継代などを実施する場所で、CPCにおける安全キャビネット内に相当する。培養操作部に自動除染機能を設けることで、培養対象が入れ替わるチェンジオーバー時の除染が自動化できる。一つの装置内で、複数の患者由来の細胞を培養したとしても、1人の培養操作終了後に自動除染を行えば、次に別の患者の細胞を取り扱うことが可能になると考えられる。これにより、多患者の細胞を同時に自動培養することが可能となる。

除染については、過酸化水素滅菌用の指標菌を使い、滅菌できているかを確認した。過酸化水素蒸気の流れを考え、除染対象場所内で、蒸気の届きにくいと思われる箇所を中心に指標菌を貼りつけた。その後、自動除染のルーチンを実施し、除染完了後に指標菌を培養し、滅菌確認を実施した。除染完了は、過酸化水素濃度で判定している。図6に試作機の培養操作部における除染確認試験での指標菌貼付場所を、図7に除染完了後の滅菌確認の結果を示す。

通常の細胞培養施設においては、カテゴリーAのクリーン空間は安全キャビネット内のみである。インキュベータ、遠心分離機、顕微鏡、などは、安全キャビネット外のカテゴリーBの空間に設置されている。容器を開放するのは安全キャビネット内のみとはいえ、容器外部は汚染する可能性があるため、安全キャビネットに戻すとき、除染が必要となり、毎回、汚染を起こすリスクがある。本システムでは、アイソレータと同様に、インキュ

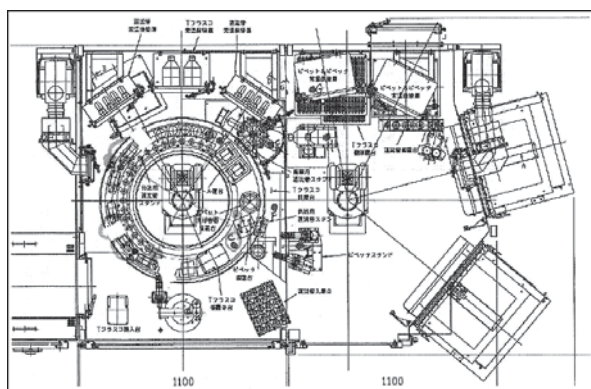


図6. 試作機の培養操作部における除染確認試験での指標菌貼付場所



図7. 除染完了後の滅菌確認の結果

ベータ，遠心分離機，顕微鏡，なども，カテゴリーBの密閉筐体内にあり，汚染のリスクは低減されている。

手培養から自動培養への移行の容易さ 再生医療のための培養技術は，まず，手培養で確立される．現状，多くの場合は，まず，手培養で認証を受ける．その結果，手培養に近い方法で自動化できれば，培養結果の同等性の確認が容易となり，すでに認証を受けたものを変更申請するとしても，容易になると考えられる．それゆえ，本細胞自動培養システムの開発においては，手培養の手法に近い形で，自動化することを目指した．筐体密閉型とし，筐体内で容器を開放する方式を選択した理由がここにあり，手培養での手法に近い形で自動化できるからである．

培養容器はフラスコとディッシュの使用が可能である．フラスコや遠心用のチューブのネジ式のキャップは，開閉を行うキャッパーの除染が不完全になることを懸念し，ワンタッチ式のキャップに交換した．図8にワンタッチキャップを付けたフラスコとチューブを示す．

多種の細胞への対応 臨床用の細胞自動培養装置の試作機は，大阪大学内に設置され，軟骨再生を目的とし，骨髓液から間葉系幹細胞を自動培養する実証試験を実施した．本研究の責任者は広島大学の脇谷教授で，教授の



図8. ワンタッチキャップを付けたフラスコとチューブ

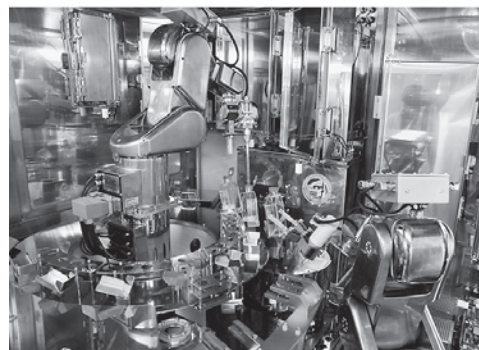


図9. 臨床用細胞自動培養装置の試作機（外観と内部）

手培養でのプロトコルを自動培養装置に実装した．装置内に入れられた骨髓液は，初代培養で，遠心分離によって，凝固防止用のヘパリンの成分を除去後，フラスコに播種される．数回の培地交換の後，継代を行い，さらに数回の培地交換の後，約3週間で，必要量の間葉系幹細胞が得られる．装置内には顕微鏡観察に相当する機能があり，フラスコを装置外に出すことなく，観察が可能である．また，無菌検査のための培養上清や継代時の懸濁液サンプルを出庫することもできる．図9に臨床用細胞自動培養装置の試作機を示す．ドナーから得た骨髓液を自動培養する実証試験を実施し，実現性を確認した．

他の細胞への応用について，紹介する．一つは，温度応答性培養皿を使った角膜再生である．大阪大学の西田

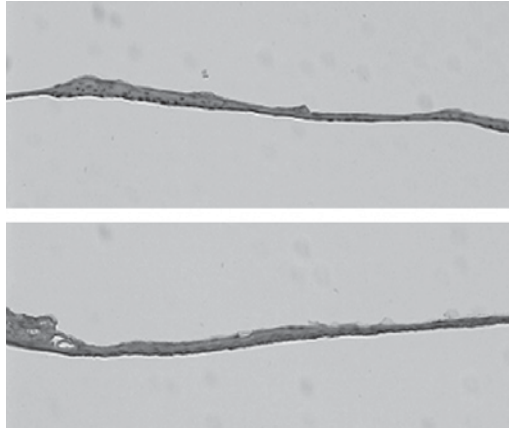


図10. 培養した細胞シートの断面
(上：手培養，下：自動培養)

教授のご指導による方法で、患者の口腔内皮の細胞を温度応答性培養皿に播種し、自動培養した。培養した細胞シートを確認いただいたところ、臨床で使用されている手培養での細胞シートと、同等のものが培養できていると評価をいただいた。なお、患者の口腔内皮の組織から、細胞を分離する作業は手作業であるが、この工程も自動培養装置をアイソレータとして使用し、自動化できる。それゆえ、CPCを持たないユーザーでも角膜再生が可能となる。図10に培養した細胞シートの断面を示す。

他の一つは、心筋再生であり、大阪大学の澤教授にご指導をいただいた。心筋再生は、患者の大腿部の筋芽細胞を採取し、大量に培養し、細胞シートを作る。課題は大量培養の部分であり、手培養では、外形がT175フラスコで、内部が3層になったフラスコ（T500相当）を40個使用する。回収に要する時間を短縮するため、手培養の細胞回収は、複数の担当者による人海戦術で行なわれる。自動培養装置で行う場合、処理時間を短くするため、1度の処理量を増大させ、内部が10層のフラスコ（T1720相当）を使うことにした。フラスコの所要数は12個となる。10層のフラスコを扱う場合、内部の液体の排出は、単に傾けるのではなく、途中で方向を変えながら液体を排出する必要がある。図11に示すように、ロボットは、1度、教示した動きを毎回、再現するため、10層のフラスコの扱いが可能となり、筋芽細胞の大量培養の道が開けた。

同時培養する細胞数の増加 図9に示した試作機はインキュベータを2台しか装備していない。これは、ロボットの手が届く範囲にインキュベータを2台しか配置できなかったことによる。それゆえ、同時培養数の増加のためには、インキュベータ台数を増やす必要があった。

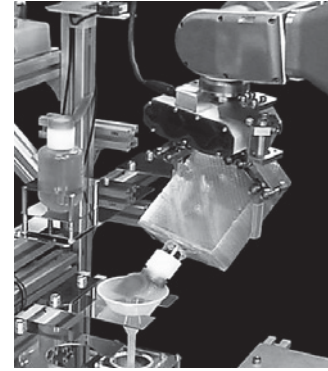


図11. ロボットを使った10層のフラスコのハンドリング



図12. 改良試作機

そこで、改良試作機として、ロボットに走行軸を持たせ、インキュベータの増加に対応可能とした。図12に改良試作機を示す。この写真はインキュベータ4台装備のものであるが、走行軸の長さを延長することで、インキュベータの追加が可能である。

無人化 本システムは装置外との出入りが発生する入出庫を除くと、作業は無人で可能である。通常、管理者が行う判断のみを人間が行い、作業と作業の確認は機械が行うという考え方である。

作業はスケジュールに基づいて行われる。図13にスケジュール画面を示す。開始日時と作業内容を指定することで、指定した日時に作業が開始される。作業は、スケジュール設定後でも変更、追加、削除が可能で、作業履歴の記録も行われる。

管理技術 間違いは人が介在することで起こる。入庫時、間違いを起こしやすいのは、入庫すべき物品の個数の間違いと、置く場所の間違いである。本システムでは、筐体内に監視カメラを設け、図14に示すように、カメラの画像を画像処理し、正しい場所に正しい個数の入庫物品があるかを確認している。

図8で紹介したフラスコとチューブには、キャップに



図13. スケジュール画面

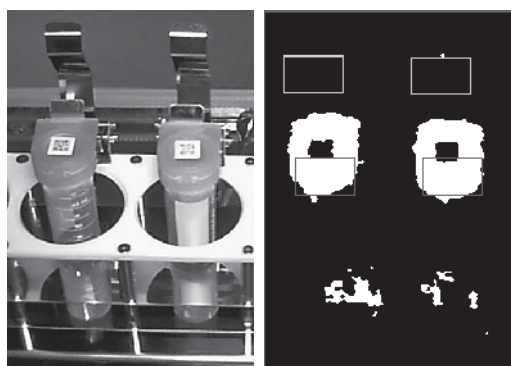


図14. 画像処理技術を使った入庫物品の確認

2次元バーコードが貼付されている。これは、作業者が入庫ミスを犯した場合に対応したもので、ロボットは作業を行う前に、バーコードリーダーでフラスコやチューブを選び、照合作業を行う。

タイでの実証試験 NEDOの国際実証事業の支援を得て、2013年8月、バンコク市内のチュラロンコン大学に医療用細胞の自動培養システムの試作機を設置した。本事業は、日本の医療分野の先端技術の海外展開のために、東南アジアでの実証を支援するものであり、NEDOとタイ商務省の間でMemorandum of Understanding (MOU) を締結の上、進められた。9月にはタイ王女を迎えて開所式が行われ、タイ側の研究者による使用が開始された。現在、すでに自動培養システムはタイ側に譲渡され、自動培養した細胞を使った臨床研究が、タイの大学で始まろうとしている。

培養実績 表1に示したのは、本システムを使った培養実績である。タイでの臨床研究では、ドナーから採取した骨髄液をT500のフラスコで培養し、間葉系幹細胞を使った関節軟骨の再生治療を行う。それに先立ち、輸入の骨髄液を使用し、手培養と自動培養の比較を行っ

表1. 手培養と自動培養の比較

年齢	性別	培養手法	回収生細胞数	生細胞率 (%)	CD44/CD105 二重陽性率 (%)
34	男	手培養	2.7×10^7	89	96.1
		自動培養	3.0×10^7	93	96.0
20	男	手培養	3.0×10^7	96	98.3
		自動培養	3.3×10^7	94	97.1
27	男	手培養	7.0×10^6	94	89.0
		自動培養	7.7×10^6	92	86.1

た、表1に3人のドナーから採取した骨髄液を使った手培養と自動培養の比較を示す。T500 フラスコ2個ずつの培養結果である。回収された生細胞数、生細胞率、CD44とCD105の二重陽性率において、自動培養は手培養と差異のない結果が得られた。

まとめ

細胞自動培養システムの開発に取り組み、約10年となる。研究用細胞の自動培養システムは、すでに上市し、研究機関でiPS細胞を中心とした研究用細胞の培養に使っていただいている。医療用細胞の自動培養システムは実証試験中であり、自動培養した細胞を使った臨床実施も近いと期待される。これまでに開発した技術が、将来の再生医療の普及に役立つことを期待したい。

謝 辞

研究用細胞の自動培養システムの開発は独立行政法人 科学技術振興機構、iPS細胞の自動培養技術と医療用細胞の自動培養システムの開発は独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構の支援をいただいた。研究用細胞の自動培養システムの開発は独立行政法人産業技術総合研究所（以下、産総研）の植村上級主任研究員、独立行政法人成育医療研究センター（以下、成育研）の小野寺室長、稲木研究員、iPS細胞の自動培養技術の開発では成育研の阿久津室長、産総研の浅島センター長、伊藤チーム長に、医療用細胞の自動培養システムの開発では広島大学の脇谷教授と東京大学の田原教授、大阪大学の澤教授、西田教授、紀ノ岡教授にご指導をいただいた。ここに深く謝意を表す。

文 献

- 1) 中嶋勝己, 小沼泰子: ヒトiPS細胞自動培養装置の開発とその応用, 技術情報協会, 《最新》動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術, p. 364 (2014).
- 2) ヒト細胞培養加工装置の設計ガイドライン [改訂] http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/healthcare/report_iryuu_fukushi.html (2010).