

細胞培養自動化に必要な操作キャリブレーターと サンプリングデバイス

久保 寛嗣*・牧野 穂高

1. はじめに

iPS細胞をはじめとするさまざまな細胞を用い、従来の薬や外科的手術では治療が困難であったさまざまな疾患や失われた機能を回復させる再生医療がいよいよ現実のものとなりつつある。それに伴い、産業界でも治療に用いる細胞の将来の需要の拡大に対応すべく、細胞を高品質、安定かつ大量に生産する手法をエンジニアリング的な側面から確立し、臨床用途の細胞製造で使用できるシステムを構築することが喫緊の課題となっている。昨今では、その課題を解決すべく、将来の大量製造を可能にする自動培養システムなどの開発が盛んに行われている。しかし、自動培養装置のみを開発しただけで、それが即臨床で使用できる培養装置とはならない。基本的に培養操作は、人手にて行われる場合は培養皿などに細胞を播種し、培地交換作業や継代作業などが行われており、自動培養装置ではその培養操作を再現して培養を行う方式を採用している装置も多い。しかし、設計した培養装置が人の操作をどこまで再現できているのか、実装した培養動作が設計意図通りに動いているか、などを定量的に判断する手法は存在していなかった。また、培養空間がアイソレーター内で行われるような密閉空間にて完結されるようなシステムの場合、継代時に必要な細胞のカウントを行う際にもパスボックス経由で試験用のサンプルの取得を行わなければならないなど、培養操作の機械化のみならず、培養工程全体をスムーズにつないでいくために必要な周辺の機器の準備、システムの評価手法の確立などを丁寧に行っていく必要がある。本稿では、細胞製造システムを構築する際に自動培養システムや人の培養操作の動きを評価するためのシステムとアイソレーター型培養装置から簡便かつ無菌空間をブレイクすることなくサンプルを取得するためのシステムについて報告する。

2. 動作の定量化手法の必要性

スポーツ、職人の匠の技などの身体的技能は日々の反復訓練によって体得される動作である。これらの動作を自分が体得していたとしても、自分が持っている感覚的

な動きを他人に伝えることは、難しいという事を多くの人が経験したことがあるであろう。近年、スポーツなどにおけるトレーニングは熟練者と初心者の動作の違いを定量的に評価したさまざまなデータを数値化、分析し、それらの分析データに基づいて最適な指導を行うようになってきた^{1,2)}。しかし、再生医療分野に目を向けると、細胞培養操作技術の習得のために若手培養技術者は、熟練培養技術者の経験に基づく定性的な操作技術の伝承と日々の反復操作による訓練により、細胞培養操作技術を習得しているというのが実情である。

3. 細胞培養手技定量化評価装置の役割

高品質な再生医療製品を患者に提供することは移植後のQOLに大きく関わってくる。ゆえに、再生医療等製品として細胞を生産する場合の品質確保の重要性は議論を待たない。名古屋大学の加藤准教授らはこれまでの分子生物学的な細胞評価と、経験的な細胞観察による細胞の品質管理に対して、非染色の細胞画像の情報から定量的に細胞の品質を評価する研究を行っており³⁾、このような研究によって、近い将来、一定の品質を保った再生医療等製品を患者に提供できるようになるであろう。一方で、実際の細胞を加工する工程のほとんどが手作業で操作されているのが現状であり、作業者の培養操作の熟練度によって最終的な製品の品質がばらついてしまうという一面を持つ。特に、外的刺激に弱いような細胞にとっては、培養作業行程中の操作により生じる力学的なストレスは培養成績を左右する大きな要因となり得る。そのため、細胞培養操作において、播種分注・懸濁液吸引吐出などの動きは細胞に対するダメージを極力小さくする必要があり、目的の細胞を高品質な状態で獲得するには、高度な教育訓練、培養経験を有した熟練の培養操作技術が必要となる。しかし、この匠の技は定量化されておらず、前述の通り、若手培養技術者は熟練培養技術者の経験に基づく定性的な操作技術の伝承および日々の反復操作の訓練を積むことにより、細胞培養操作技術を習得しているのが実情である。

そこで、筆者らはこれまでの経験に基づく定性的な培養操作技術の伝承を、培養手技定量化装置を用いて、培

*著者紹介 日本光電工業株式会社荻野記念研究所 E-mail: Hirotsugu_Kubo@mb2.nkc.co.jp

養操作者の操作を数値化し、フィードバックすることにより、若手培養技術者の一回一回の訓練において、培養操作技術を効率よく習得するための評価システムの開発を行った。将来的には熟練培養技術者の操作技術を数値化することで、その数値化したデータを自動培養装置の動作仕様設計に反映させ、さらに、自動培養装置の設計後に装置が動作仕様設計通りに動作しているかのバリデーション、自動培養装置の年次点検にも用いることができるシステムを目指している（図1）。

4. 細胞培養手技の定量評価

前述の装置を用いた細胞培養手技の定量評価システムの基本性能を評価するにあたり、まず一連の培養操作を細分化し、各操作を単純化させた。また、培養操作開始前のセンサの向きを統一するように注意した。今回紹介する細胞培養手技の定量評価の一例は、細胞懸濁液を培養皿に播種後、細胞を培養皿に均一に播種するために行う均一化操作を対象とした。被験者は細胞培養の経験のある5名で実験を行った。被験者5名の均一化操作の手法は、図2a、図2bの均一化操作模式図に示すように大きく分

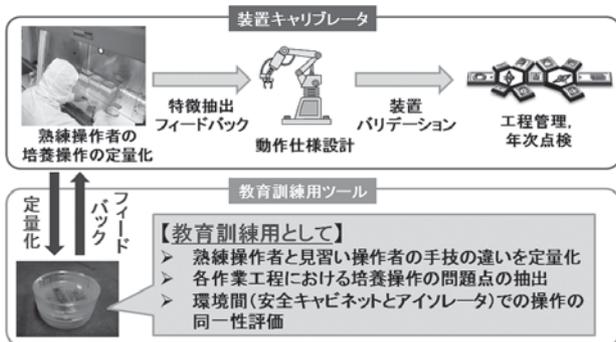


図1. 培養手技定量化装置の概念図

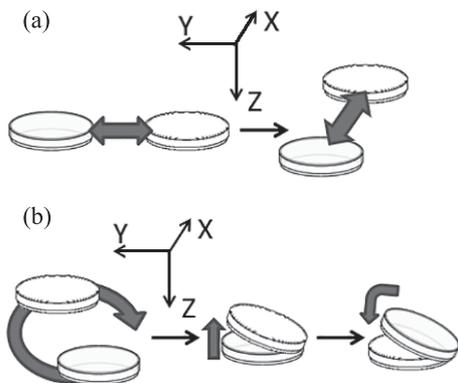


図2. 均一化操作模式図。(a) 被験者A, B, C, Dの均一化動作。(b) 被験者Eの均一化動作。

けて2種類の動作を設定した。図3は被験者5名の実際の均一化操作のX, Y, Z軸の加速度データである。手法①は、培養皿を最初に数回Y軸方向に往復並進運動した後、X軸方向に往復並進運動しており、この動きを加速度というパラメータを用いることにより数値化した。手法②は、培養皿を最初にXY平面上で回転させた後、少しだけ培養皿を傾け、静置させる動きである。加速度データを見ると、回転させている時はX, Y軸ともに加速度が発生しており、培養皿を傾けた時には重力加速度の影響により、Y, Z軸の加速度が変化していることが分かる。このように、本装置で加速度という指標を用いることにより、2種類の均一化操作の手法の違いを定量的に評価することが可能となった。さらに、手法①の被験者データのみ注目して評価を実施した。手法①において、X, Y軸の往復並進運動時のピーク加速度に注目し、各被験者のX, Y軸のピーク加速度を比較したデータを図4に示す。図4を見ると、ピーク加速度の平均値がX, Y軸ともに被験者Dがもっとも低値であることが分かる。また、被験者A, C, DはX軸とY軸のピーク加速度の平均値はおおよそ同じ値であるのに対し、被験者BはX軸とY軸のピーク加速度の平均値に差がある

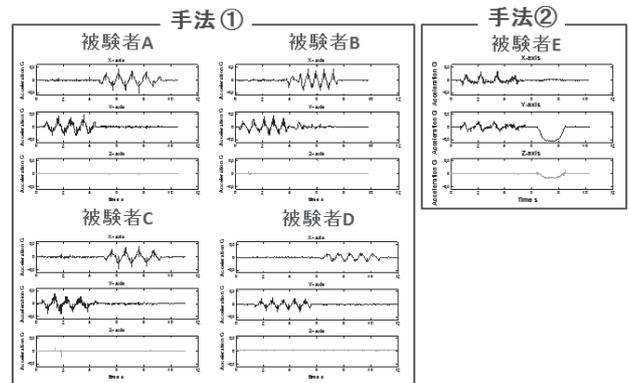


図3. 均一化操作の加速度データ

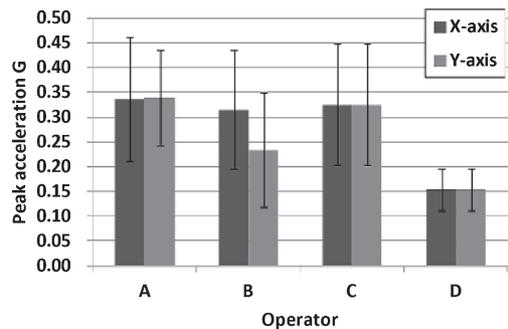


図4. 同一均一化操作手法における各被験者のピーク加速度の比較

ことが分かる。つまり、被験者B以外はX軸もY軸もほぼ同じような往復並進運動をしているのに対して、被験者BはX軸とY軸で動きが異なることを表している。このように、同一手法の均一化操作であっても操作者による操作の違いがあることを定量的に示すことができた。今回示したような操作の違いが、上手に均一化操作できる人と播きムラのできる人の操作の違いを評価する手段の第一歩になると考えられる。

今後は本キャリアレーターを用い、対象動作の範囲を拡大して、熟練培養技術者と若手培養技術者の手技の違いを定量的に評価していく。品質の高い細胞加工製品を安定して患者に提供するために、培養手技により発生する加速度、衝撃などが最終製品である細胞の増殖、品質に与える影響を解析し、細胞にとって良い培養操作・悪い培養操作とは何かを定量的に解明していく。本手法を応用することで、将来的には培養操作の標準手法の策定にも寄与できると考えている。

5. 自動培養システムに必要な周辺機器

自動培養システムにアイソレーターのような空間密閉型の培養システムを採用した場合、高度な無菌環境を保持しつつ、培養行程を実施することができるメリットがある反面、アイソレーター空間内に資材を搬出入する際のパスボックスを利用した資材の搬出入は、出入の度にパスボックス内の除染を行わなければならない、相応の時間を費やす必要があった。この工程を自動培養の工程に適用することを考えた場合、培養期間中には、継代や培地交換のタイミングで、培養装置の内部にある細胞懸濁液、もしくは上清成分をサンプリングして細胞数のカウント、培地成分の分析を行う必要があり、その度にパスボックス経由でサンプリング用のサンプルを外部空間に出すとすると、出入の度にパスボックス内の除染を行わなければならない、検査に必要な迅速性が著しく阻害される。そこで筆者らは、検査に迅速性が要求される培養期間中の細胞カウントや培地上清成分の成分分析時には、パスボックスを経由せずに内部の無菌空間を担保しつつ、かつ迅速に測定用のサンプルを外部空間に導出することを可能とするシステムを考案した。

6. 自動培養装置に用いる無菌サンプリングシステム

前述の通り、アイソレーターは高度な無菌空間を担保し、人の空間介入による汚染リスクをなくすことができ、工業的な細胞製造システムの設計にとっては非常に有益なシステムである。他方、培養期間中に一般的に行われている継代時の細胞数カウントや各種の生化学的な

分析をアイソレーターシステムの中で行うためには、アイソレーター内でサンプリング、分析、結果取得までを完結させる、もしくはパスボックス経由で除染工程を経由して外部空間にサンプルを移送する必要がある。前者は、除染対応の分析用機器を開発せねばならず、かつ常時アイソレーター内の空間がある一定の体積で占有されることになり、空間の有効利用の観点でデメリットも多い。後者のパスボックス経由でのサンプル液の導出は、除染対応の密閉容器にサンプル液を入れ、かつパスボックス内の除染に要する時間を確保しなければならない、特に継代時における迅速な細胞数把握を行いたいというユーザー要求に対して十分な仕様であるとは言えない側面がある。

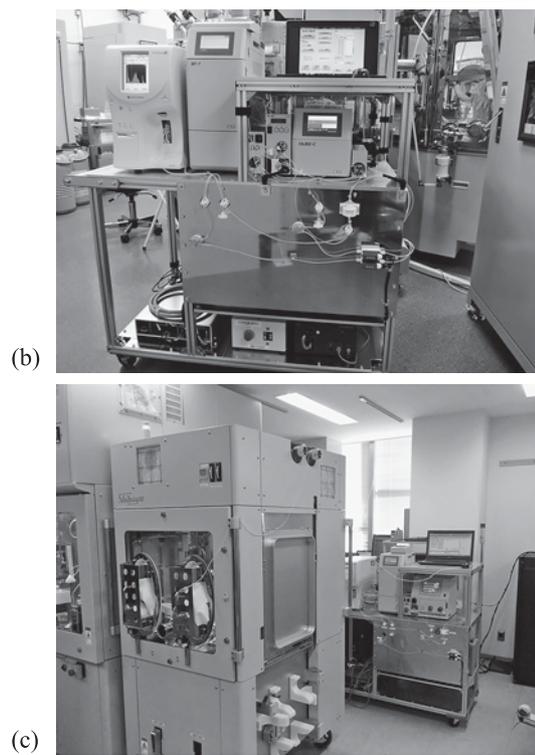
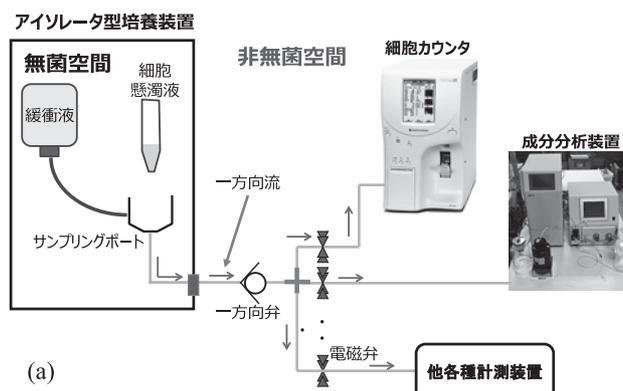


図5. (a)多連式無菌維持接続サンプリングシステム概略図、(b)本体システム、(c)集中研設置の様子（後ろ側）。

そこで筆者らはアイソレーター内からダイレクトにサンプル取得用の導出路を設け、無菌空間の維持のために一方向の定常流を流すことにより、無菌性を維持し、かつ迅速に計測用のサンプルを外部空間に導出するシステムを考案した。本システムはサンプリングシステム本体装置、緩衝液、送液チューブ、細胞カウンタ、成分分析装置、その他各種計測装置より構成される（図5a, 図5b）。非計測時（定常時）はアイソレーター内部より緩衝液を微量流しておき、計測時にはアイソレーター内に設置されたサンプルカップに試料を吐出し、試料吐出後は自動的に計測を行い、各計測装置の測定パラメータ（例：細胞数、グルコース濃度、乳酸濃度など）を表示する。計測後は自動洗浄の後、定常状態に戻る機構を有する。

外部空間とつながるサンプルチューブ内は装置稼働中にアイソレーター内からの一方向流で満たされていることにより、外部からの汚染物質の侵入を阻止し、かつサンプルを安全に外部に導出する仕組みである。本システムを用い、一方向流による空間内の無菌性維持試験を行った結果、7日間の運用試験期間を経た後にも、空間内の無菌性を維持していることが確認された⁴⁾。現在、大阪大学にて設置検証が行われている培養システム本体と結合し、運用試験を実施している（図5c）。2019年度までに細胞培養工程の一貫製造試験を実施する予定である。

本システムでは一方向流を用いた無菌性維持という概念を採用し、パスボックスを経由しないサンプル導出法を提案した。これにより、安全、迅速かつ低コストでのサンプル計測法として確立することを目指している。今後、本システムを用いたさまざまな状況下において検証を重ねていくことにより、最終的には規制に対応できる無菌サンプリングシステムとしてシステムアップしていく予定である。

7. 謝 辞

本稿をまとめるにあたり、多大なご指導を頂きました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻紀ノ岡正博教授、水谷学特任講師、福守一浩特任助教、名古屋大学大学院創薬科学研究科加藤竜司准教授、蟹江慧助教に厚く御礼申し上げます。本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）の再生医療実用化研究事業である“再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システムの開発/ヒト多能性幹細胞由来の再生医療製品製造システムの開発（網膜色素上皮・肝細胞）”の助成を受けた開発の成果です。

文 献

- 1) 木村聡貴ら：通信ソサイエティマガジン, **37**, 23 (2016).
- 2) 相馬りか：科学技術動向, **148**, 23 (2015).
- 3) 加藤竜司ら：生物工学, **92**, 495 (2014).
- 4) 牧野穂高ら：第16回日本再生医療学会総会要旨集, p. 452 (2017).