

ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞製造における アイソレーター運用法の開発

稲森 雅和・澤田 昌典*

はじめに

ヒト iPS 細胞¹⁾を由来とする再生医療等製品の製造においてはバイオクリーン環境の維持が求められる。また、製造ロットが変わる際には、前のロットで生じたエアロゾルなどが次のロットに持ち込まれないよう、作業員および器具・機器類・設備について適切な清掃・除染・滅菌（チェンジオーバー）を実施する必要がある。再生医療用のアイソレーターは閉鎖システムが特徴で、マウスホールなどの開放口がなく気密性が確保されている。パスボックス、顕微鏡、遠心分離機付きの作業エリア、インキュベーターを備えており、閉鎖空間内で一連の細胞製造工程を実施できるようになっている。また複数のグローブが取り付けられており、複数人で作業できるように設計されている（図1）。このようなアイソレーターを用いることで無菌操作区域を最小限にとどめ、汚染の原因となる作業員を排除することにより高度な無菌環境を維持することが可能となる。さらに厳密なチェンジオーバー手順が得られるため、原料から最終製品まで一貫した無菌操作を達成できる。またアイソレーターを用いたコンパクトな無菌操作ができる設備を活用することで、安全性を維持しつつコスト削減が期待できると報告されている²⁾。

アイソレーターの運用に当たっては、過酸化水素除染による試薬・資材の搬入、グローブを介した操作などアイソレーター特有の作業が要求され、細胞製造に即した

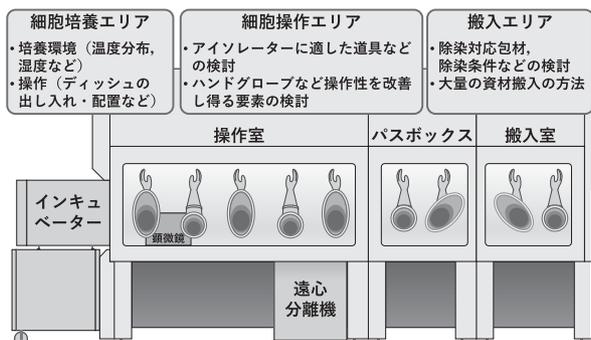


図1. 再生医療用アイソレーターの構成と運用における課題

運用法の確立が必要となる。また、細胞製品の品質は作業員の熟練度に左右されやすく、いかに安定したプロセスを構築できるかが課題となっている（図1）。このような課題に対応するために、2013年度、2014年度において経済産業省「再生医療等産業化促進事業（再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発）」、2015年度において国立研究開発法人日本医療研究開発機構「再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業（再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発）」を通じて、iPS細胞由来の網膜色素上皮細胞（RPE細胞）製造に向けたアイソレーターの基本的な運用法を開発した。また実際の作業工程を評価しアイソレーター運用における課題を抽出し、操作の安定化や効率化を支援する道具などの開発を行うとともに将来のスケールアップに向けた運用についての検討も行った（図2）。

アイソレーター運用法の開発

アイソレーターによる作業は本体に取り付けられたグ

2013年度：過酸化水素の細胞影響評価



2014年度：アイソレーター試験製造の運用評価



2015年度：アイソレーター運用上の課題解決

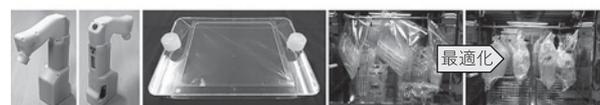


図2. iPS細胞由来RPE細胞製造に向けたアイソレーター運用法開発の流れ

*著者紹介 株式会社ヘリオス 執行役 CMO（Chief Medical Officer）

グローブを介して行われるが、腕の可動範囲や手の感覚など安全キャビネットの操作と勝手が異なる。このため、グローブを介した模擬操作を実施し、基本的なiPS細胞培養法³⁾をアイソレーターで実施するための手順を作成した。加えて、アイソレーター内の作業スペースに合わせて試薬・資材の配置も検討した。また、資材・試薬の搬入においては過酸化水素による除染、あるいは過酢酸を用いた清拭が必要となる。細胞培養で用いられている資材の多くは過酸化水素除染を想定していないパッケージとなっていたため、除染テストを実施しパッケージ内に浸透した過酸化水素を評価した。その結果、約半数の資材については過酸化水素除染が可能と判断され、残りの資材については薬剤による清拭が適当と考えられた。実際の運用においては搬入に要する時間も重要であり、過酸化水素除染は大量資材の一括搬入に適しているものの除染工程に時間を要する。一方で、過酢酸による清拭搬入は作業工数と清拭の技術が必要となるものの、短時間で搬入ができるため、少量の資材搬入に適している。実際の運用においては、1日の作業時間において過酸化水素除染が占める割合が大きかったため、一括搬入が必要な場面あるいは定期除染と同時に資材搬入する場合などは過酸化水素除染を活用し、搬入量が少ない場合は清拭搬入を行うことで作業を省力化した。また、細胞解凍時は迅速搬入が必要であったため、別途清拭搬入法の最適化を検討した。表1に凍結細胞バイアルの搬入の検討例を示す。検討1回目ではグローブを介した清拭操作に手間取ってしまい、細胞生存率に影響を生じた。このため清拭操作の手順を検討し、グローブ操作の練習を行って再検討した結果、検討2回目では生存率を改善することができた。特に過酢酸による清拭は、アイソレーター外、搬入室、パスボックスの3か所で実施したため、清拭方

表1. 凍結細胞搬入の工数と細胞生存率 (iPS細胞)

工程	検討1回目	検討2回目
液体窒素から取り出し	0:00	0:00
アイソレーター搬入室へ移動	3:34	1:09
パスボックスへ移動	7:58	3:38
細胞操作室へ移動	10:24	6:36
細胞に培地添加	12:40	7:45
遠心洗浄後、再懸濁完了	34:26	17:34
播種	55:00	28:40
インキュベーター格納完了	58:23	29:42
細胞生存率	38%	60%

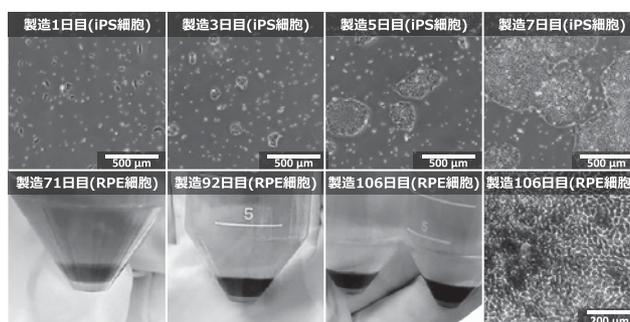


図3. アイソレーターで製造したiPS細胞とRPE細胞

法を迅速化したことで、各エリアでの作業時間短縮につながった。

このように各製造工程について運用検証を行い、最終的にアイソレーター連続運転環境下でiPS細胞解凍から、分化誘導培養、RPE細胞のバイアル充填まで合計100日以上行程を一貫して実施できた。細胞形態観察より解凍後のiPS細胞が十分に増殖し、コロニーを形成していることが確認され、培養環境が良好であることが示唆された。また分化誘導後のRPE細胞は培養経過とともに黒くなり、特徴的な多角形の細胞形態を示した。この他種々のRPE細胞特異的マーカー発現なども評価した結果、安全キャビネットを用いて培養した従来のRPE細胞と同等の品質のRPE細胞が製造できたことを確認した(図3)。一方で、アイソレーター連続運用を通して種々の課題が明らかとなり、課題解決のために道具・運用法などの検討を行った。

アイソレーター運用法の改善

過酸化水素除染による搬入工程の開発 現在市販されている細胞培養関連資材の多くは過酸化水素による除染を想定されておらず、除染によって包材内部へ過酸化水素が浸透することが課題となっていた。このため過酸化水素バリア性を有する新規包材について評価を行い従来品との比較を行った。また、大量資材をまとめて搬入するためのパッケージについて包装形態の検討を行った。

培養ディッシュを従来の包材および新規包材でそれぞれ梱包した資材を用意し、アイソレーター内で過酸化水素除染を行った。除染後すぐに培養ディッシュを取り出して蒸留水を10 mL添加し、37°C、5% CO₂下で24時間インキュベートして蒸留水内の過酸化水素濃度を測定した。従来の包材で梱包したものを過酸化水素除染した場合、多量の過酸化水素が検出された。一方、新規包材A、新規包材Bで梱包された培養容器からはほとんど過

酸化水素が検出されなかった。これは過酸化水素除染を行わず、過酢酸による清拭を行った場合と同等であった（図4）。

操作の安定化のための道具開発 iPS細胞培養や分化誘導培養において、細胞の品質は培養操作の影響を受けやすい。作業員ごとに操作技術レベルが異なると品質のばらつきにつながる懸念される。本開発では培養操作の基本であるピペット操作に着目し、作業メンバーごとのばらつきを評価するとともに操作を安定化するためのピペット器具の開発に取り組んだ。

図5にアイソレーター作業時の培地交換の所要時間を示す。操作手順書の開発者を第1世代とし、第1世代より手順を受け継いだ操作者を第2世代、第2世代より手順を受け継いだ操作者を第3世代として分類し比較評価を行った。電動ピペッターは一般に用いられるものとして、ボタンを押す深さに応じて流速が変化するタイプを使用した。培地交換時の培地吸引、培地吐出に着目して所要時間を評価した結果、平均の所要時間について個人差があることが明らかとなり、技術の継承が難しいことが明らかとなった。また、第1世代の所要時間はばらつ

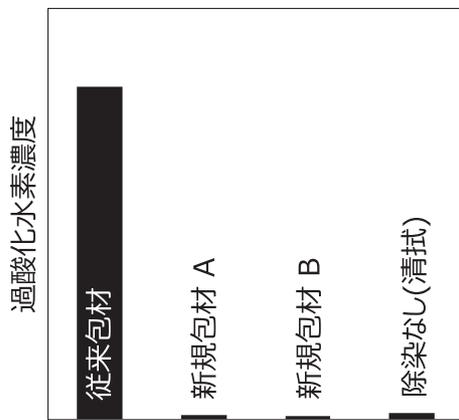


図4. 除染後の資材を用いた溶存過酸化水素の評価

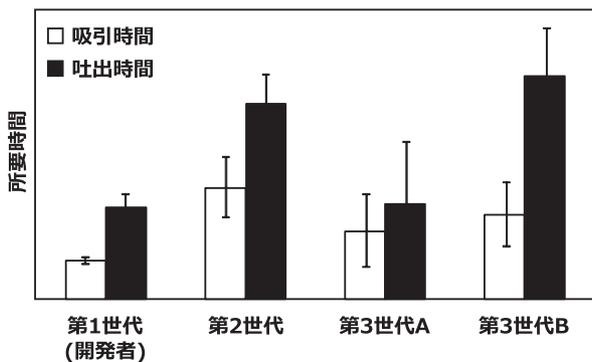


図5. 培地吸引・吐出の所要時間比較

きが少なく、第2世代以降はばらつきが大きくなる傾向が見られ、熟練度を反映していると考えられた。また、この問題を解決するために流速固定の電動ピペッターを開発した（図6）。設定値を変えることで任意の流速で再現よく吸引・吐出することができ、作業員間にばらつきの少ない操作が可能であった。このような道具を活用することで製造安定性の向上が期待される。

ピペット操作に関するもう一つの課題として、ピペット先端からの液だれがあげられる。汚染リスクを抑制するために液だれが起りにくいピペットの開発を行った。液だれが生じる原因について、液体吸引後のピペットは大気圧とピペット内の液柱による圧力、ピペット内の空気圧のバランスによって液体が保持されるが、ピペットを傾けるとバランスが崩れてしまい先端から空気を吸い上げたり、液だれが生じたりするといった問題が起こる。また、手の震えによりピペット先端が振動することも一因となっている。これらの問題を解決するために、丈の短いピペットを開発することでピペットを傾けずに運用できるようにし、また、ピペット先端の振動を評価した。図7にピペット外観の画像を示す。長さの基準としては、遠沈管や培地ボトルとの組合せに対応できる長さを指標とした。図8と図9にピペット先端の振動評価を示す。ピペット先端にマーカーを貼り付けた状態

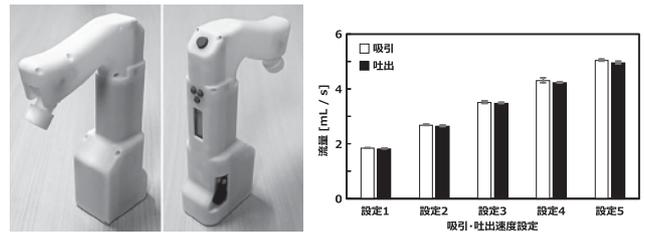


図6. 製造向け流量固定ピペッター. (左) 試作品外観 (右) 流量再現性評価 ($n = 7$).



図7. ショートピペットの開発. (左)従来品ピペット(右)ショートピペット試作品.

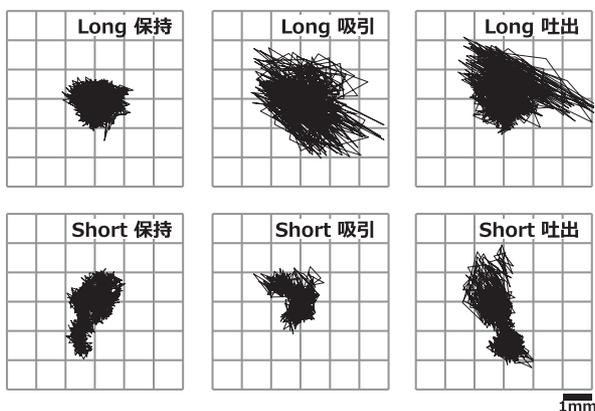


図8. ピペット先端の移動範囲評価. (上段)従来品ピペット(下段)ショートピペット.

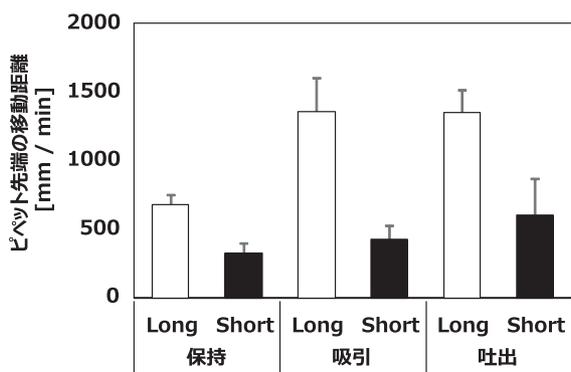


図9. ピペット先端の移動量評価

で模擬操作（保持，吸引，吐出）を行い，マーカーの動きを動画撮影してマーカーの位置を数値化した．その結果ピペットを短くすることで移動量が抑制される傾向が確認できた．

培養スケール拡大に向けた開発

大量資材導入のためのパッケージ最適化 大量の資材を除染搬入するに当たっては，除染不良を起こさないことや，開封後に発生する包材ゴミの抑制などが課題となっている．手作業で実施し得る大量培養スケールを想定し，除染パスボックス内に必要量の資材をそのまま配置した場合，パッケージ数が多くなり，包材同士が接触してしまい除染不良となると考えられた．これらの資材を大型の除染対応包材にまとめてパッケージするとともに不要な多重包装を除いた結果，少ないパッケージ数で搬入・除染できることが確認された(図10)．

大型培養容器の開発 将来の大量製造技術として自動培養システムの開発が期待される中，現状のアイソレーター運用において生産性を高めるためには，ピペッ

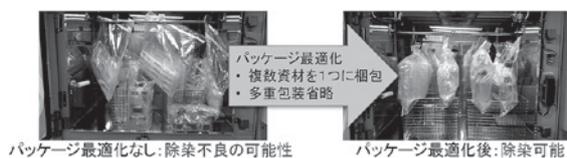


図10. 大量資材のパッケージ最適化検討. (左)最適化なし(右)資材を詰め直して最適化.

培養容器	90mmディッシュ 1枚分	150mmディッシュ 2枚分	1225プラスチック 4枚分	多段容器(1段) 11枚分	多段容器(2段) 22枚分	多段容器(10段) 110枚分
フタ	開放系			閉鎖系		
スクレーパー	セルスクレーパー使用可			使用不可(粉末処理の改良が必要)		
培養・観察	スタック1段(段ごとのばらつき無し)			スタック多段		

図11. 培養面積の異なる代表的な培養容器の特徴

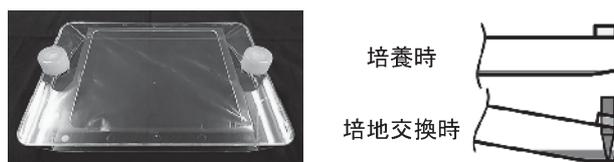


図12.ピールオフ大型培養容器. (左)容器外観, (右)培地交換時の容器側断面の模式図.

トやグローブなど操作に関わる道具に加え，培養スケールを拡大するための道具の活用も重要となる．現在の製造方法をなるべく変えずに製造スケールを拡大するためのアプローチとして大型培養容器の検討を行った．

図11に培養面積の異なる代表的な培養容器の特徴を示す．市販の培養容器は培養面積が大きくなるにつれて閉鎖系となり，多段化することで培養面積が拡大する．iPS細胞の培養においてはスクレーパーを用いた細胞回収が行われており，同等性担保の観点からスクレーパー使用可能な大型培養容器が求められる．また培養容器が大型になるほど液体の流動が大きくなることから培地がこぼれない構造も重要となる．本検討ではこれらの要求を満たすアイソレーター運用に適した大型培養容器の設計・検討を行った．

図12に開発した大型培養容器の外観を示す．培地がこぼれるリスクを回避するために閉鎖系の容器構造を採用した．また，容器上面からピペットがアクセスできるようにし，ピペット先端で細胞を削ることのないよう培養面にスロープを設けた．さらに，細胞回収時にはスクレーパーが使用できるよう容器天面をフィルム貼りすることで開放系にできるようにした．容器のサイズについてはハンドリングを考慮して培養面積を約500 cm²とした．また，容器をしっかり持つことができるよう容器側面を傾斜させる工夫を行った．図13に大型培養容器

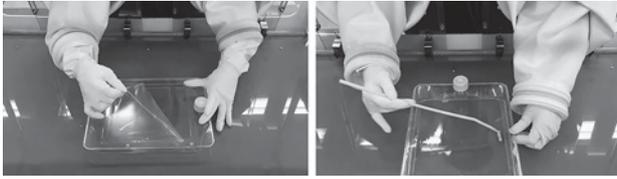


図13. 大型培養容器試作品の模擬操作による評価。(左) フィルムの剥離操作, (右) スクレーパー操作。

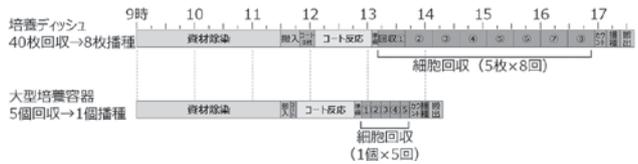


図14. 大型培養容器による作業時間の削減効果の評価

試作品の模擬操作による評価の様子を示す。アイソレーターグローブを装着した状態でフィルムの剥離やスクレーパー操作を問題なく行えることが確認できた。

大型培養容器の適用による大量培養時の工数削減評価

この大型容器を用いることでどれだけ作業を効率化できるかを評価するために、培養ディッシュ40枚の細胞を回収する場合の工数比較を行った(図14)。ディッシュ40枚を酵素処理・細胞回収するために5枚ずつ8グループに分け酵素処理・回収作業を行ったところ、合計3時間45分要した。これに除染、播種作業を加えると1日の作業時間が約9時間に達することが明らかとなった。

次に、大型培養容器5個からの継代操作にかかる時間を模擬操作で確認した。大型培養容器を1個ずつに分け酵素処理・回収作業を評価したところ、ディッシュ40枚の作業と比べて所要時間が約5分の1に短縮した。このことから大型培養容器を用いることで酵素処理・回収操作を迅速化し、1日の作業時間内でより大きなスケールの製造が実施できることが期待された。

おわりに

アイソレーターを用いた細胞製造は運用例が少なく、作業で用いる資材や器具などは安全キャビネットでの作業を想定して作られたものを流用しているのが現状である。アイソレーターは無菌環境を構築しやすい反面、特有の作業性を要求されるため、今後、アイソレーター運用に適した資材や器具、周辺機器の充実が期待される。また、製造安定性を向上するためには作業者の技術に加えて、機械化による再現性の高い操作技術の開発が期待される。

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の課題番号 JP15be0104007 の支援を受けた。

文 献

- 1) 経済産業省：再生医療の実用化・産業化に関する研究会最終報告書 (2013)
- 2) Takahashi, K. *et al.*: *Cell*, **131**, 861 (2007).
- 3) Nakagawa, M. *et al.*: *Sci. Rep.*, **4**, 3594 (2014).