

再生医療に向けた細胞シートの自動培養装置と輸送技術

Automated Cell Culture Equipment and Transportation Technology for Cell Sheet-based Tissue Engineering and Regenerative Medicine

中嶋 亮太

Nakajima Ryota

千田 直子

Senda Naoko

野崎 貴之

Nozaki Takayuki

小林 豊茂

Kobayashi Toyoshige

武田 志津

Takeda Shizu

再生医療は、機能不全または欠損を起こした細胞・組織・臓器の根本的回復を実現する革新的な医療であり、従来は治療困難であった疾患に対して新たな治療法を拓（ひら）く医療として社会的な期待が大きい。再生医療においては、医療技術のほかに細胞生物学的ならびに理工学的な技術の融合が必要であり、普及のためには、これらの分野に対する幅広い技術力が要求される。この潮流の中で、日立は細胞・組織加工品の低コスト生産と安定的供給を可能とする自動培養技術や、生産拠点から各医療機関へ品質を保持した状態で細胞を輸送可能とする技術の研究開発を推進している。これらの研究開発は、日立の展開する細胞処理施設事業や医療関連事業と連携して再生医療の普及に貢献していく。

1. はじめに

再生医療は、体外で培養された細胞やティッシュエンジニアリングにより作製した組織を、機能不全または欠損を起こした細胞・組織・臓器に移植することにより、患者の根本治療を図る革新的な医療である。既存の治療法では回復困難な多くの患者が、その実用化を待望するとともに、新たな医療産業としての成長が期待されている。iPS (Induced Pluripotent Stem) 細胞作製の功績によって京都大学の山中伸弥教授がノーベル賞を受賞したことに象徴されるように、再生医療分野における日本の研究レベルは世界のトップクラスにあるが、実用化については今後の加速が望まれている。

再生医療の実用化を促進するために、制度的な改革と同時に技術面での課題の解決が進められている。再生医療用の細胞・組織加工品は、細胞培養を中心とする細胞プロセッシング工程を経て製造される。現状では、細胞プロセッシング工程は、ほとんどが手作業で行われており、生産性の限界やヒトの作業による環境微生物などの汚染リスクが課題である。一方、医薬品産業の拡大・発展に、製造や品質管

理の自動化や流通システムの発達が大きな役割を果たしたことを考えると、今後の再生医療の発展と普及のためには、細胞培養の自動化や細胞・組織加工品の輸送システムなどのインフラストラクチャの整備が緊急の重要課題となっている。日立は、これまでに再生医療分野で、細胞処理施設 (CPC: Cell Processing Center) の事業を展開するとともに、インフラ構築のうえで重要な基盤技術となる自動培養装置と細胞輸送技術の開発にほかに先駆けて取り組んできた^{1)~4)}。

ここでは、これらの基盤技術の研究開発状況について述べる。

2. 日立の自動培養技術

細胞培養工程の自動化は、多大な労力を要する一連の操作の省力化や、プロセスの記録・管理の自動化、作業者を介した汚染リスクの低減に大きく寄与するものである。日立はこれまでに独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の「組織再生移植に向けたナノバイオインターフェイス技術の開発」、文部科学省の先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム「再生医療本格化のための最先端技術融合拠点 (CSTEC: Cell Sheet Tissue Engineering Center)」などの国家プロジェクトへ参画しており、東京女子医科大学の岡野光夫副学長の研究グループとのオープンイノベーションにより、再生医療向けの自動培養装置を開発している^{5)~9)}。日立の自動培養技術は、高い治療効果が実証されている東京女子医科大学の温度応答性高分子 [PIPAAm: poly (N-isopropylacrylamide)] を利用した細胞シート培養技術¹⁰⁾ を応用していることと、外部環境からの菌の混入を回避可能な完全閉鎖系の培養容器・流路系を特長としている。

2.1 細胞シート培養容器の開発

閉鎖系培養装置を設計するうえでは、専用の培養容器開発が最重要となる。例えば、食道再生用の上皮系細胞シートの作製にはセルカルチャーインサート（以下、インサートと記す。）と呼ばれる、孔径 $0.4\ \mu\text{m}$ の多孔膜を有する容器を用いた2層培養方式が採用されている¹¹⁾。そこで、2層構造でガス交換が可能な閉鎖系培養容器を実現するために、枠体に多孔膜とガス透過膜を設けるカートリッジ方式の細胞培養容器（以下、セルカートリッジと記す。）を開発した。

開発した培養容器の模式図と外観を図1に示す。多孔膜材質とガス透過性を考慮して、射出成形枠体および膜材質はすべてポリカーボネートとし、超音波溶着装置を用いてセルカートリッジを構築した。培養液の注入と排出は、容器外枠の4隅に設けたチューブ接続ポートから可能である^{12), 13)} [図1 (b) 参照]。セルカートリッジの上層で移植対象の上皮系細胞を培養し、下層には必要に応じてフィーダ細胞を培養する。温度応答性高分子を多孔膜表面に被覆することで、 32°C 以下の温度処理によって細胞シートを非侵襲で回収可能である [図1 (c) ~ (e) 参照]。

培養対象となる重層扁平上皮組織の重層化には、酸素が重要な役割を果たしていることが知られていることから、ウサギ角膜輪部上皮細胞を用いて、セルカートリッジへのガス透過性と細胞重層化の関係を調べた。その結果、細胞

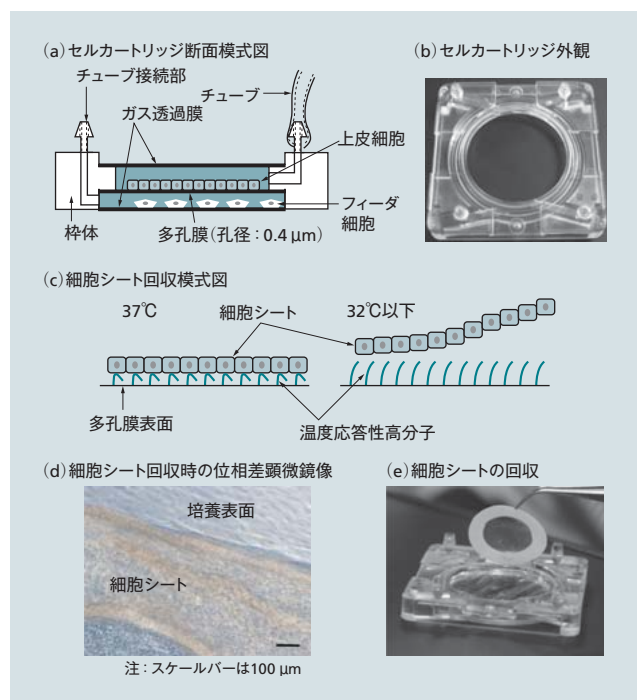


図1 | 閉鎖系培養容器（セルカートリッジ）

ガス透過膜と多孔膜を有する閉鎖系2層構造が特長である。多孔膜表面には温度応答性高分子を被覆しており、低温処理により細胞シートを非侵襲で回収可能である。

はセルカートリッジの上層側ガス透過膜の厚みに依存せずに増殖し、密集状態となったが、培養液中の酸素分圧と細胞シートに含有する細胞数は、ガス透過膜の厚さが $25\ \mu\text{m}$ のときに最大値を示した [図2 (a), (b) 参照]。また、ガ

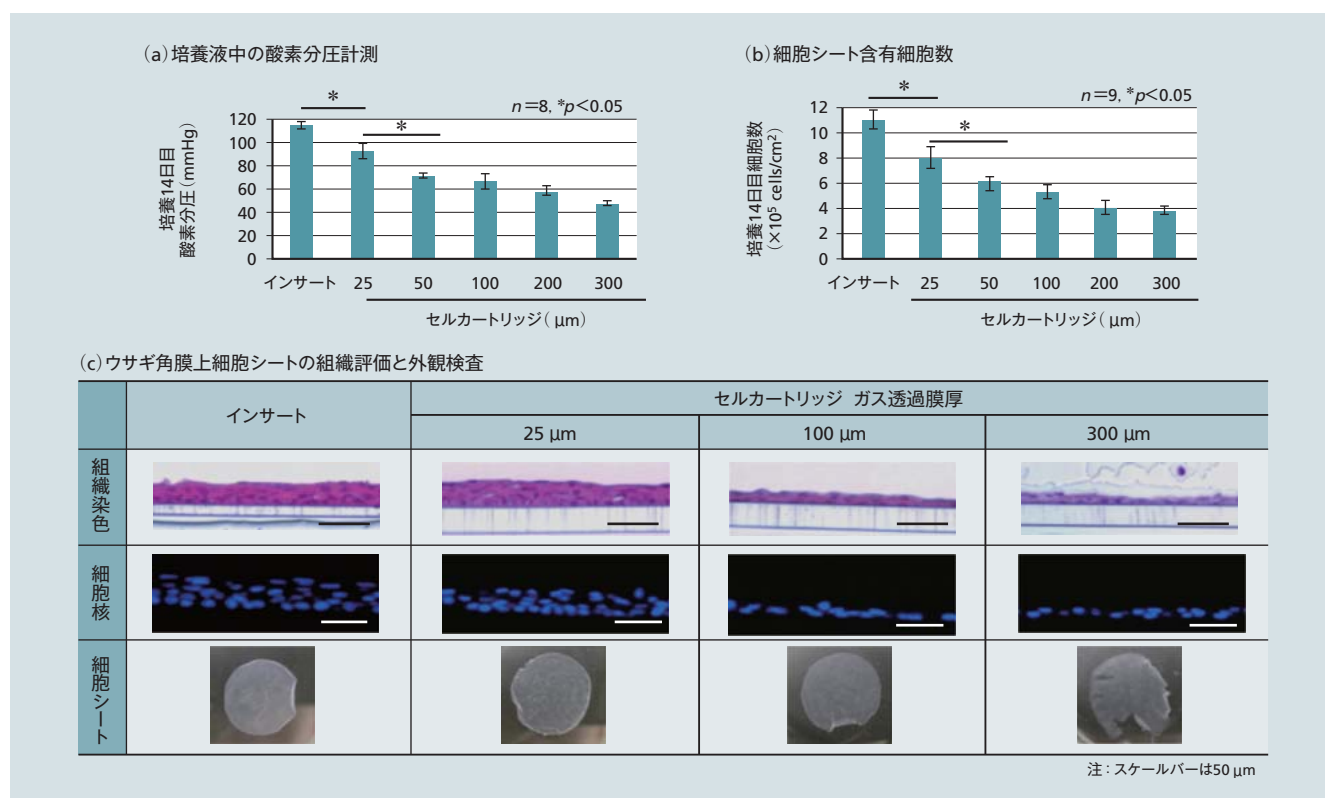


図2 | セルカートリッジへのガス透過性と細胞シート重層化の関係

セルカートリッジ内での細胞シート重層化はガス透過量に依存することを示し、ガス透過膜の仕様を決定した。

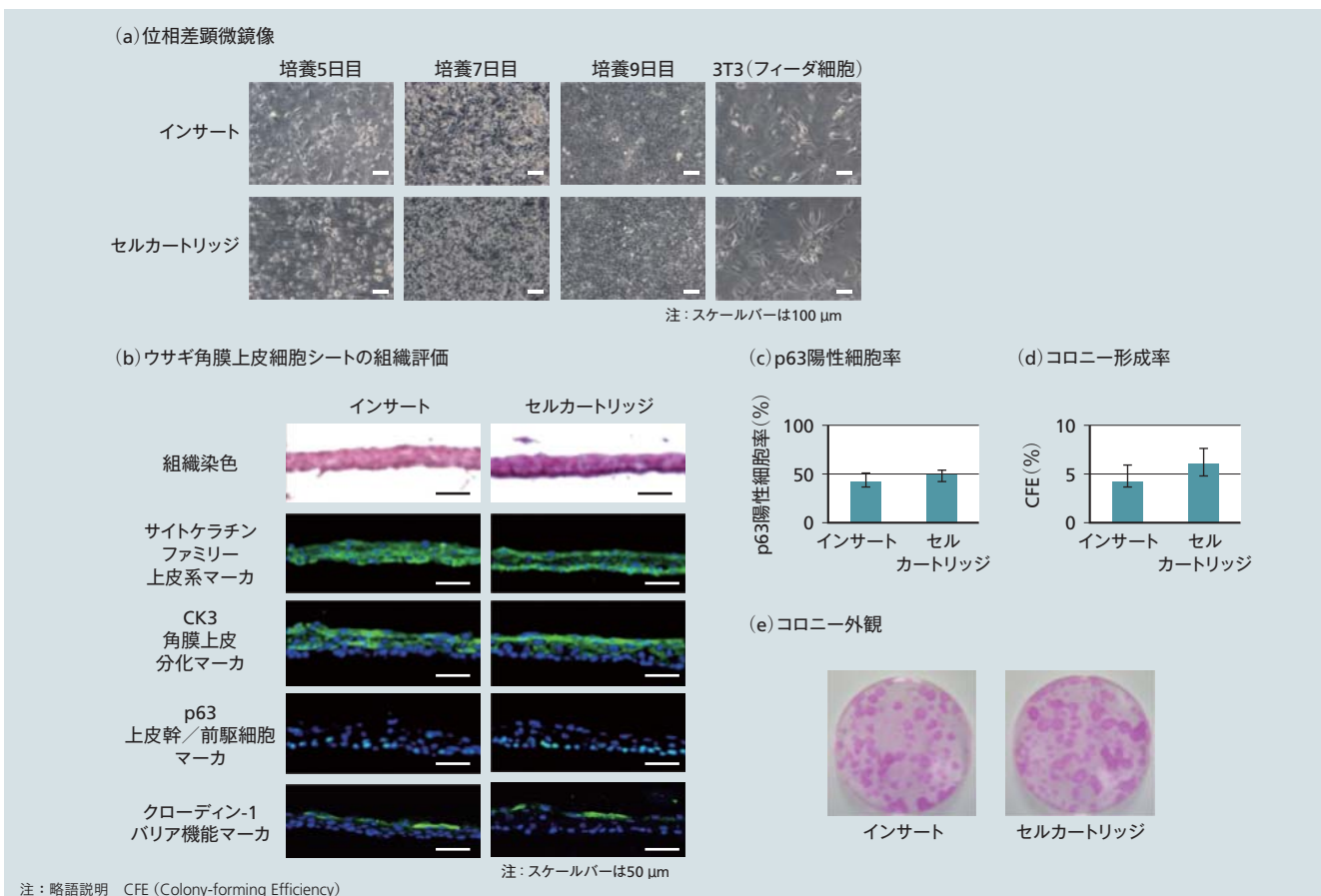


図3 | セルカートリッジで培養した角膜上皮細胞シートの評価

セルカートリッジで培養したウサギ角膜上皮細胞シートで、細胞の重層化と角膜上皮分化マーカー、上皮幹/前駆細胞マーカー、バリア機能マーカーの発現を確認し、手技で用いられている培養容器で作製した組織と同品質であることを実証した。

ス透過膜の厚み依存的にそれらが減少することを確認した。組織染色の結果、ガス透過膜の厚み依存的に重層化が進行することが明らかとなった [図2 (c) 参照]。以上の結果により、セルカートリッジに用いるガス透過膜の仕様を決定した^{12), 13)}。

次に、多孔膜表面へ温度応答性高分子 (PIPAAm) を処理したうえで細胞シートを作製し、品質をインサート培養で得たものと比較評価した。PIPAAm処理は東京女子医科大学発のベンチャー企業である株式会社セルシードとの連携により条件検討した。培養9日目に上皮特有の敷石形状態を示し [図3 (a) 参照]、培養14日目に細胞シートを回収し組織評価を実施した [図3 (b) ~ (d) 参照]。その結果、セルカートリッジで作製したウサギ角膜上皮細胞シートは、インサート培養で得たものと同等の品質を有することが分かった。すなわち、細胞シートの組織染色像を観察した結果、3層~6層に重層化した細胞が見られ、基底層以外での角膜上皮分化マーカーCK3の発現、基底層での上皮幹/前駆細胞マーカーp63の発現、表層でのバリア機能関連マーカークローディン-1の発現が認められた [図3 (b) 参照]。また、p63陽性細胞率はインサートで42.7 $\pm$ 8.0%，セルカートリッジで47.6 $\pm$ 4.6%であり同等であった [図3 (c)

参照]。さらに、細胞シート内の幹細胞含有率を反映するコロニー形成率は、インサートで4.3 $\pm$ 1.7%，セルカートリッジで6.5 $\pm$ 1.9%であり同等であった^{12), 14)} [図3 (d), (e) 参照]。

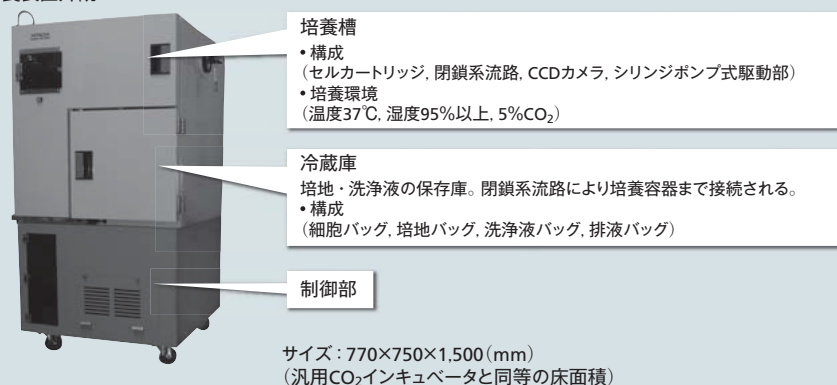
同様の結果はヒト口腔粘膜上皮細胞を用いた場合でも得られており、このように作製した細胞シートは、ヌードラット皮下へ生着することも動物移植実験で確認した¹⁵⁾。以上の結果から、開発したセルカートリッジで移植に適した重層扁平上皮細胞シートが作製可能であると結論づけた。

2.2 細胞シート自動培養装置の開発

再生医療用の自動培養装置は、医薬品の製造に関わる設備と工程管理、品質管理に関する規則 (GMP: Good Manufacturing Practice) に準拠して設計することが望ましいとされる¹⁶⁾。GMPでは、汚染および品質劣化の防止と人為的ミスの最小化、高度な品質を保証するシステムを満足することが重要である。すなわち、細胞培養中における無菌性の担保と患者サンプル間の交差汚染防止、厳密な動作記録が可能な装置として設計しなければならない。

このような設計指針の下で完全閉鎖系を実現するために、ポンプや切換弁を含む駆動部から流路とセルカート

(a)自動培養装置外観



(b)ヒト口腔粘膜上皮細胞シートの組織評価

	組織染色	p63 上皮幹／前駆細胞マーカー	CK13 口腔粘膜上皮分化マーカー
インサート (手作業)			
自動培養			

注: スケールバーは50 μm

注: 略語説明 CCD (Charge Coupled Device)

図4 | 自動培養装置とヒト口腔粘膜上皮細胞シートの評価

自動培養したヒト口腔粘膜上皮細胞シートで、細胞の重層化と上皮幹／前駆細胞マーカー、口腔粘膜上皮分化マーカーの発現を確認し、手技で培養した組織と同品質であることを実証した。

リッジを容易に着脱できるようモジュール構造を設計した。モジュール構造では、流路とセルカートリッジを患者由来の細胞培養ごとに交換できるように確実な交差汚染防止が可能である。さらに、装置内の温度・湿度などの記録をリアルタイムで計測できるように各種センサーを配置した設計とした。

試作した自動培養装置の外観を図4(a)に示す。装置サイズは汎用のCO₂インキュベータと同等の設置床面積(約0.6 m²)であり、現行のCPC内に設置可能な小型である。この試作機は培養槽と冷蔵庫ならびに制御部から構成されており、培養槽内には、閉鎖系流路と駆動部、細胞増殖状況を確認するためのCCD (Charge Coupled Device) カメラが内蔵される。冷蔵庫には培地バッグと流路洗浄液バッグ、排液バッグを収納する[図4(a)参照]。自動培養する際には、培養スケジュールの設定、閉鎖系流路の駆動部への設置、および閉鎖系流路に連結する細胞バッグへの細胞の注入を行う。各種培養プロトコルに対応するために、培養スケジュールはユーザーがソフトウェア上で容易に設定可能である。

この試作機を用いて、ヒト口腔粘膜上皮細胞シートを自

動培養した結果を図4(b)に示す。細胞シートの組織染色像を観察した結果、細胞の重層化が認められ、基底層での上皮幹／前駆細胞マーカーp63の発現、基底層以外での口腔粘膜上皮分化マーカーCK13の発現が確認された。これらの結果から、セルカートリッジを用いて自動培養した細胞シートは、手作業で培養したものと同等の品質を有することが実証された。

2.3 今後の展開

これまでの開発経験を基に、現在、同時培養枚数を向上させた自動培養装置を開発中であり、東京女子医科大学との連携の下、自動培養装置を用いて作製した細胞シートによる食道再生医療の臨床研究をめざしている。さらに、日立は東京女子医科大学が推進する内閣府最先端研究開発支援プログラム[FIRST (Funding Program for World-Leading Innovative R&D on Science and Technology) プログラム]において、心筋再生に向けた大量継代培養装置を開発している。今後も、再生医療の普及に向けて、安全で有効な高品質の細胞を低コストで供給可能とする自動製造システムの開発へ発展させたい。

3. 細胞シート輸送技術の開発

再生医療を産業化するにあたり、製造した再生組織を製造拠点から各地の医療機関へ輸送する技術が求められている。輸送手段は輸送距離に応じ、車両、鉄道、航空機などから選択されるが、いずれの場合も輸送後の再生組織は輸送前と同じく、細胞生存率、活性、形態などの品質に関わる性質を維持している必要がある。このため輸送技術には輸送時の環境変化要素を制御する工夫が必須となり、特に温度や圧力を製造時と同様に一定に保持することや、CPCにおける清浄性を輸送行程中においても保持可能であることが重要となる。

3.1 細胞輸送容器の開発

日立製作所中央研究所は株式会社日立物流と共同で、温度および圧力を制御可能な細胞輸送容器を開発した。この細胞輸送容器は、培養容器収納部と蓄熱剤および断熱材から成り、サイズは直径30 cm、高さ27.5 cmである〔図5 (a) 参照〕。内部には真空断熱材を内壁に沿って配置しており、熱放出を抑制することが可能である。その内側には、再生組織の入った培養容器を収納する培養容器収納部と、熱分布を一様化するための金属板に囲まれた蓄熱材を設置した^{17)~20)}〔図5 (b) 参照〕。培養容器収納部の外観を図5 (c) に示す。蓄熱材には、パラフィン的一种で融点が36.4°Cであるn-エイコサン(化学式 $C_{20}H_{42}$ ・融解熱247 kJ/kg)を用いた。この蓄熱材は輸送前に37°Cの恒温機で予熱しておく、輸送時は36.4°Cに保たれるため、細胞輸送容器の内部を約36°Cの一定温度に維持できる。この細胞輸送容器を用いて空輸する場合は、培養容器を気密容器に収容することにより、空輸時の圧力変化を回避することが可

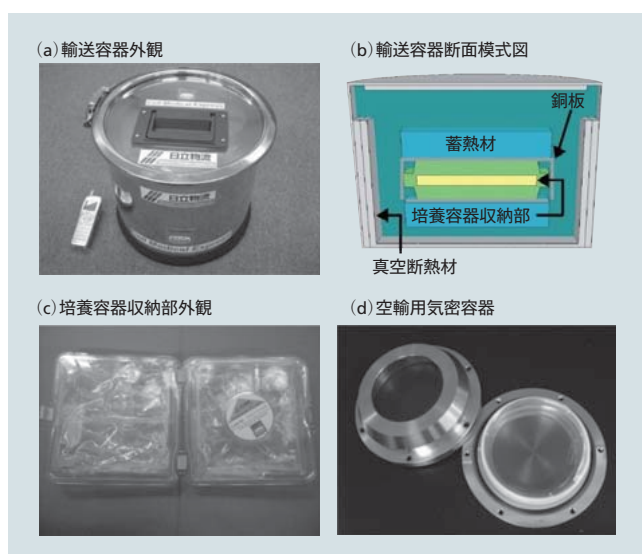


図5 | 細胞輸送容器

蓄熱材に融点36.4°Cのn-エイコサンを使用していることが特長である。最長38時間を約36°C一定で輸送可能である。

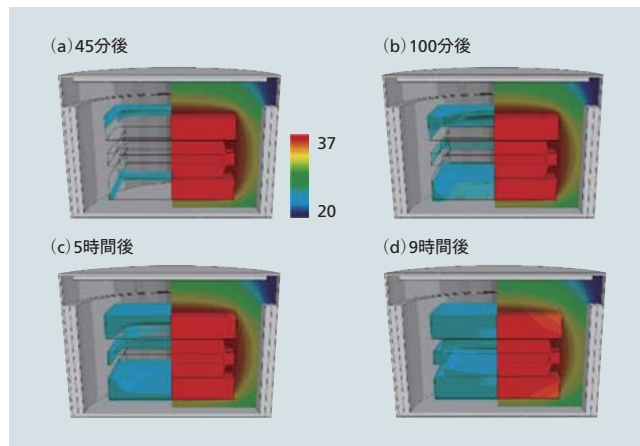


図6 | 細胞輸送容器内の熱分布解析

細胞輸送容器内の熱分布が約36°Cで一定し得ることを可視的に示した。

能である。この気密容器は、熱伝導性の高いステンレス製の上蓋(ぶた)と台から構成され、上蓋には透明窓を設けて内部の状況を視認可能な構造である²¹⁾〔図5 (d) 参照〕。

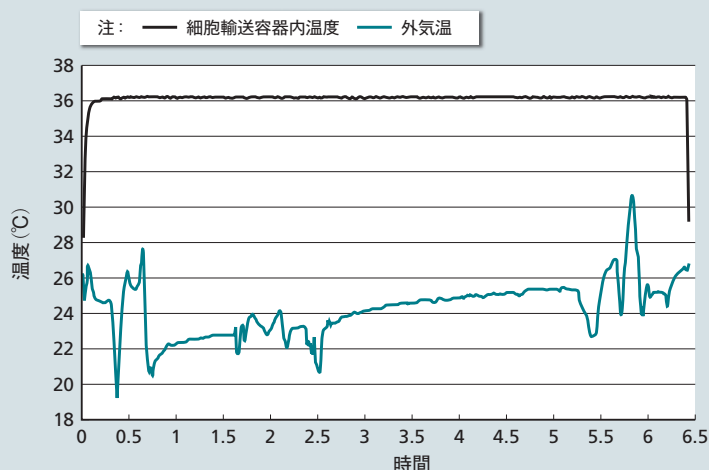
細胞輸送容器内部の熱分布は、熱流解析プログラムと実測によって評価した。シミュレーションによる熱分布解析結果を図6に示す。容器断面図の左側は蓄熱材固化の程度を示しており、右側は熱分布を示している。外気曝(ばく)露時間の経過とともに蓄熱材の固化が進むが、9時間経過後も培養容器周辺の温度は約36°Cに維持されることが想定された〔図6 (a) ~ (d) 参照〕。最終的に、16°C~24°Cの外気下では37.9±3.7時間にわたり約36°Cに維持可能であることを確認した。

3.2 細胞輸送検証

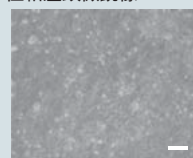
この細胞輸送容器を用いた再生組織の車両と鉄道による陸路輸送実験結果を以下に示す。温度応答性培養表面を有するセルカートリッジで培養したウサギ角膜上皮細胞シートを、鉄道乗車時間3.5時間を含む計6.5時間輸送した。輸送結果は走行中の細胞輸送容器の内部と外部温度の測定、および輸送後の再生組織の状態によって評価した。輸送経路で外気温度20°C~30°Cという温度変化の中、輸送容器内の温度は輸送全経路で約36°Cに維持されており、温度幅は0.1°Cと極めて小さかった〔図7 (a) 参照〕。輸送後の細胞を位相差顕微鏡で観察したところ、敷石状形態を確認した〔図7 (b) 参照〕。輸送後に、培養容器から細胞シートを回収し、角膜上皮欠損モデルウサギへの移植実験に供した。その結果、移植前は角膜の実質層が露出した状態であったが、移植後角膜上皮層が再生され、角膜の透明性が回復した¹⁸⁾〔図7 (c) 参照〕。

次に、この細胞輸送容器を用いた再生組織の空輸実験結果を示す。温度応答性培養表面を有する35 mm培養皿で作製したウサギ角膜上皮細胞シートを、空輸経路4時間を

(a) ウサギ角膜上皮細胞シート輸送時の温度変化



(b) 輸送後の位相差顕微鏡像



注：スケールバーは100 μm

(c) 輸送後細胞シートの移植

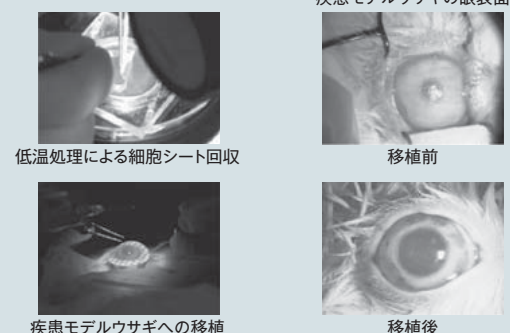


図7 | 角膜上皮細胞シートの陸路輸送と輸送後組織の評価

陸路輸送後のウサギ角膜上皮細胞シートを用いて、疾患モデルウサギへの移植実験に成功した。

含む計9時間輸送した。空輸経路では気圧が800 hPa前後まで低下したが[図8(a) 参照]、輸送終了後の培養容器収納部を観察すると培養液の漏えいなどは見られなかった[図8(b) 参照]。細胞シートの外観と位相差顕微鏡像は輸送前後で差異はなく、生細胞率は95%以上であった²¹⁾[図8(c) 参照]。以上の結果から、この細胞輸送容器は温度、圧力を維持した細胞輸送に有効であると結論づけた。

3.3 今後の展開

細胞シートを輸送するために、温度および圧力を保持し、空輸対応可能な細胞輸送容器を開発したが、さらに、

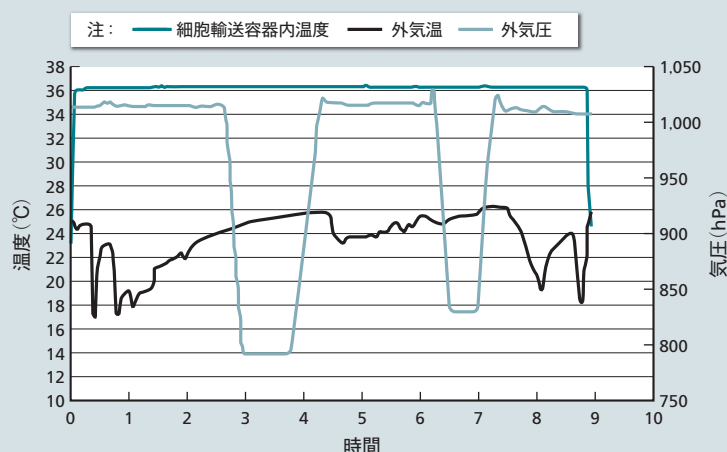
再生医療のニーズに対応するため、CPC内の清浄性を保持可能な状態で輸送が可能な細胞輸送容器を開発している^{22), 23)}。これにより、医療用途に対応する品質を保持した細胞を製造施設から遠隔の医療機関まで輸送することが可能となり、再生医療の普及に貢献できる。

4. おわりに

ここでは、再生医療の産業化を実現するうえで基盤技術となる、当研究チームの自動培養装置と輸送技術の研究開発状況について述べた。

2013年4月に再生医療推進法が可決、成立したほか、

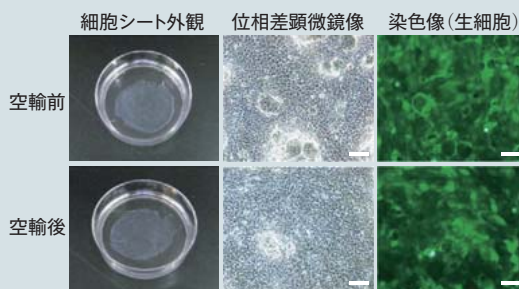
(a) ウサギ角膜上皮細胞シート空輸時の温度・圧力変化



(b) 培養容器収納部外観



(c) 空輸した細胞シートの評価



注：スケールバーは50 μm

図8 | 角膜上皮細胞シートの空輸と空輸後の組織評価

空輸時、細胞輸送容器の外気圧は変化したが、培養容器収納部からの培養液の漏えいは見られなかった。空輸後のウサギ角膜上皮細胞シートは空輸前の組織の品質を保持可能であることを実証した。



図9 | 東京女子医科大学と日立の連携

東京女子医科大学先端生命医科学研究所内日立ラボでの岡野光夫副学長、大和雅之教授とのディスカッション風景。

薬事法の改正案と規制法案も提出される予定であり、再生医療の実用化がますます加速されると思われる。今後も、細胞製造の自動化や輸送システムの構築により、再生医療の普及に貢献したいと考えている。

ここで紹介した内容の一部は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の「組織再生移植に向けたナノバイオインターフェイス技術の開発」、文部科学省先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム「再生医療本格化のための最先端技術融合拠点（CSTEC）」、内閣府先端医療開発特区（通称「スーパー特区」）「細胞シートによる再生医療実現プロジェクト」での成果であり、東京女子医科大学の岡野光夫副学長、大和雅之教授らの研究グループ、ならびに大阪大学医学部の西田幸二教授の研究グループとの共同研究成果である。この研究開発にあたり、ご指導、ご支援いただいた関係各位に感謝申し上げる。

参考文献

- 1) 高橋，外：セルプロセッシング施設およびバイオセーフティ施設への取り組み，日立評論，89，5，430～435（2007.5）
- 2) S. Takeda：Hitachi Group's Approach to Regenerative Medicine, ISCP-AP（2010）
- 3) 武田：社会インフラとしての再生医療，再生医療産業化戦略シンポジウム，経済産業省（2011）
- 4) 武田，外：細胞プロセッシングを活用した再生医療への取り組み，日立評論，93，3，320～323（2011.3）
- 5) T. Kobayashi, et al.：Development of a mass culturing system with multi-cartridges method, TERMIS-AP（2007）
- 6) T. Kobayashi, et al.：Development of automatic culturing systems for auto-grafting and allo-grafting using cell-cartridges, 2nd Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society TERMIS-WC（2009）
- 7) 齊藤：再生医療用細胞シートの自動培養装置開発，細胞シート2009 シンポジウム（2009）
- 8) 小林：角膜上皮シート用自動培養装置，細胞治療・再生医療のための培養システム，第20章，181～188，シーエムシー出版（2010）
- 9) 小林：自動培養装置が拓く再生医療の未来，医療機器学，第81巻，第6号，446～451（2011）
- 10) Y. Kumashiro, et al.：Cell attachment-detachment control on temperature-responsive thin surfaces for novel tissue engineering, Ann Biomed Eng.，38（6）：1977-1988（2010）
- 11) T. Ohki, et al.：Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets, Gastroenterology, 143, 582-588（2012）

- 12) R. Nakajima, et al.：Development of closed cell culture vessels of automated culture system for regenerative medicine, Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society Annual Conference of North America（TERMIS-NA）（2011）
- 13) R. Nakajima, et al.：A novel closed cell culture device for fabrication of corneal epithelial cell sheets, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, In press, DOI: 10. 1002/term.1639（2012）
- 14) R. Nakajima, et al.：Fabrication of transplantable corneal epithelial and oral mucosal epithelial cell sheets using a novel temperature-responsive closed culture device, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, In press, DOI: 10. 1002/term.1728（2013）
- 15) 千田，外：自動培養装置用閉鎖系培養容器におけるヒト口腔粘膜上皮細胞シートの作製，第35回 日本分子生物学会年会，（2012）
- 16) 経済産業省：再生医療分野（ヒト細胞培養加工装置）についての設計ガイドライン〔改訂〕開発ガイドライン 2009（2010）
- 17) T. Nozaki, et al.：Evaluation of Transported Tissues Fabricated on Temperature-Responsive Culture Dishes Using a Portable Container under Fixed Temperature, TERMIS-NA（2007）
- 18) T. Nozaki, et al.：Evaluation of an Automatic Culture System and a Cell Transport Method with Temperature-responsive Cell Cartridges, TERMIS-AP（2007）
- 19) T. Nozaki, et al.：Transportation of transplantable cell sheets fabricated with temperature-responsive culture surfaces for regenerative medicine, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2, 190-195（2008）
- 20) 野崎，外：施設間輸送の技術開発の現状と輸送事業の展望，幹細胞医療の実用化技術と産業展望，第6章，シーエムシー出版（2013）
- 21) T. Nozaki, et al.：Evaluation of Airtransported Cell Sheets Fabricated with Temperature-Responsive Culture Surfaces Using a Portable Homothermal Container and Sealing Apparatus, TERMIS-NA（2008）
- 22) T. Nozaki, et al.：Transportation of Transplantable Cell Sheets for Regenerative Medicine Treatment, The 24th International Congress of the Transplantation Society（2012）
- 23) Y. Oie, et al.：Cell transport system for clinical trial using cultured human oral mucosal epithelial cell sheets, International Society for Stem Cell Research（ISSCR）10th Annual Meeting（2012）

執筆者紹介



中島 亮太

2005年日立製作所入社，中央研究所 基礎研究部 所属
現在，再生医療の研究開発に従事
日本再生医療学会会員，日本動物細胞工学会会員，国際組織工学・再生医療学会会員，国際細胞治療学会会員



千田 直子

2010年日立製作所入社，中央研究所 基礎研究部 所属
現在，再生医療の研究開発に従事
博士（理学）
日本分子生物学会会員，日本表面科学学会会員



野崎 貴之

2002年日立製作所入社，中央研究所 基礎研究部 所属
現在，再生医療の研究開発に従事
博士（医学）
日本再生医療学会会員，国際組織工学・再生医療学会会員



小林 豊茂

2003年日立製作所入社，中央研究所 基礎研究部 所属
現在，再生医療の研究開発に従事
博士（医学）
日本再生医療学会会員，国際組織工学・再生医療学会会員



武田 志津

2001年日立製作所入社，中央研究所 基礎研究部 所属
現在，再生医療の研究開発に従事
薬学博士
日本再生医療学会会員，日本分子生物学会会員，国際組織工学・再生医療学会会員