

再生医療の実現化に向けた、iPS 細胞自動大量培養装置の開発

Development of iPS Cell Automated Mass-Culture Machine for Regenerative Medicine

坂井 慎一	技術開発本部総合開発センター化学システム開発部 博士（工学）
石井 浩介	技術開発本部総合開発センター化学システム開発部 主査 博士（理学）
福地 泰彦	IHI ASIA PACIFIC PTE. LTD. Research & Development Centre, General Manager
藤田 穰	新潟トランス株式会社 技術・開発室交通技術部 マネージャー
谷口 英樹	横浜市立大学 大学院医学研究科 臓器再生医学 教授 医学博士

iPS 細胞の出現に伴い、再生医療の実現が期待されている。iPS 細胞は手作業で培養させているため、ミスやコンタミネーションが起りやすいという問題がある。また、作業が煩雑なために大量に培養できない。当社では大量培養技術と自動化技術を用いてヒト iPS 細胞の自動培養装置の開発を行い、この課題に取り組んでいる。大量培養に適した培養方式である浮遊培養を基軸に技術開発を行い、新規浮遊培養用リアクターとそれを用いた自動培養試験機の作製を行った。本稿ではこれらの取り組みについて紹介する。

It is expected that the invention of iPS cells will lead to the realization of regenerative medicine. Because iPS cells are cultivated by hand, there are problems involving mistakes, contamination and the inability to culture the cells on a large scale. IHI is developing an iPS cell automated mass-culture machine to solve this problem by applying large-scale culture and automation technologies. We have developed a novel bioreactor for large-scale suspension culture and a test machine including the bioreactor. In this paper, we introduce these efforts.

1. 緒言

当社は、グループ会社である株式会社 UNIGEN で動物細胞によるワクチン原薬製造事業、株式会社 IHI プラントエンジニアリングによる医薬品製造プラント事業を行うなど、医薬分野へ進出をしている。

今後、高齢化社会へ向かうなかで、大きな期待がもたれている再生医療分野に対して、産業機械などで培われた自動化技術やバイオ医薬生産のための培養技術などを用いて自動培養装置の開発を行っている。再生医療の普及に貢献するため、現在人の手で行っている培養操作の時間を低減させ、効率良く品質の良い細胞を大量培養できる技術を目指している。本稿では開発中の自動培養装置の要素技術について述べる。

2. 大量培養・自動培養の必要性

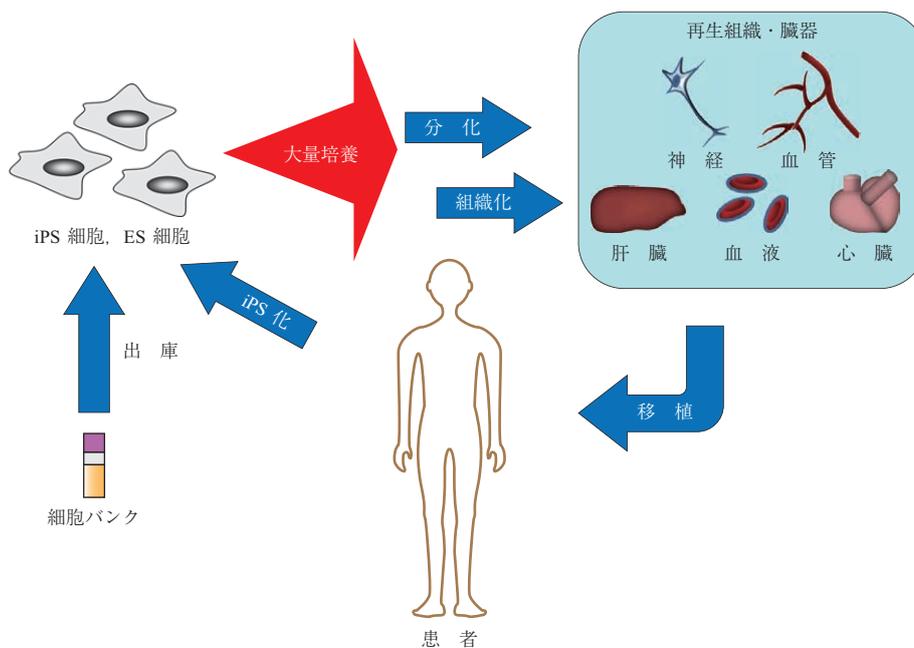
再生医療の工程は iPS 細胞や ES 細胞を培養し、分化させて、組織化し、機能不全な体の一部に再生させる。第 1 図に再生医療の基本的工程を示す。大型の臓器を作製するためにはそれらのソースとなる大量の細胞が必要になる。たとえば、肝臓は 2.50×10^{11} 個、心臓は $7.00 \times$

10^{10} 個、腎臓は 2.60×10^{10} 個の細胞から成り立っており⁽¹⁾、これらの臓器や細胞を作り出すためには、同程度の細胞数が必要になる。第 1 表に臓器を構成する細胞数を示す。

現在、細胞の培養はシャーレを用いて手作業で行われているが、前記の細胞数をシャーレで培養すると数千枚～数万枚以上が必要になる（第 1 表参照）。オペレーターが 1 日に操作できるシャーレが 100 枚程度であることを考慮すると、これだけの枚数のシャーレの維持培養は人の手では不可能である。また、人の手による培養は個人差や技量の差から細胞の品質に差異がでるおそれがある。再生医療の実現化には、大量かつ自動的に培養を行う装置が切望されていた。

3. 現在の培養方法

再生医療のソースとなる iPS 細胞や ES 細胞は付着性のある細胞であり、足場（コラーゲンなどのタンパク質）やほかの細胞に接着しないと生存・増殖できない。現在、再生医療研究の現場ではシャーレの底面を細胞接着マトリックスでコートし、その上で細胞を培養する方法^{(2),(3)}（平面培養）が主な培養方法として行われている。それに



第1図 再生医療の基本的工程
Fig. 1 Basic process of regenerative medicine

第1表 臓器を構成する細胞数
Table 1 Number of cells in body organs

臓器	重量 (g)	細胞数 (セル)	シャーレ換算 ^{*1} (枚)
血液	5 000 ~ 6 000 ml	2.50×10^{13}	2 500 000
肝臓	1 200 ~ 1 400	2.50×10^{11}	25 000
心臓	300 ~ 400	7.00×10^{10}	7 000
腎臓	150	2.60×10^{10}	2 600

(注) *1: $\phi 10$ cm シャーレで 1×10^7 セル培養と仮定した値

対して、細胞を塊の状態ですべて培地中に浮遊させて培養する方式（浮遊培養）も存在する。すでにスピナーフラスコを用いて iPS 細胞を細胞塊のまま攪拌培養した報告がある^{(4), (5)}。

大量培養に適した培養方式を増殖速度・未分化率・大量培養・技術的難易度の観点から比較した。

増殖速度について考えてみると、平面培養では培地中の栄養成分は拡散によって供給されるが、浮遊培養では対流によって栄養成分が供給されるため、増殖速度は浮遊培養の方が良くなると考えられる。

未分化率に関しては、細胞塊の状態ですべて培養する場合には、細胞塊が大きくなるにつれて細胞内部への未分化維持成分や栄養成分が届きにくくなり、細胞塊内部の細胞が分化または死滅してしまう可能性がある。浮遊培養では安定して培養できる細胞塊の径の制限があることが予想され、細胞塊が大きくなり過ぎないようにする技術が必要になる。

大量培養においては、平面培養はより多くの面積が必要になり、直径が大きなシャーレを使用するか枚数を多くする方法しかなく、大量培養への適性は低い。一方、浮遊培養は細胞の懸濁液として培養を行うため、培養容器を大きくすることで大量培養への適応が可能と考える。通常の攪拌培養では $1 \sim 2 \times 10^6$ セル/ml ほどの細胞が培養できる^{(4), (6)}。

浮遊培養は細胞密度の調整や培養する細胞塊径のコントロールなどが必要であることが予想されること、攪拌によって与えられるせん断応力が細胞にダメージを与える場合があるため、詳細な制御を行う必要があり、静置培養よりは技術的難易度が高い。

そのほか、細胞塊の浮遊培養とは別に担体表面に細胞を付着させて浮遊させる培養方法⁽⁷⁾（担体浮遊培養）がある。静置培養の利点と浮遊培養の利点を合わせた培養方式であるが、細胞を担体に安定的に付着させる技術は確立されていない。また、細胞を付着させる担体の径は $200 \mu\text{m}$ ほどであり、せん断応力の影響を受けやすいため、技術的難易度は高い。

以上の各培養方式の特長を第2表に示す。第2表から担体浮遊培養は最も良好な培養が行える可能性が高いが、技術的難易度も同時に高くなっていることが分かる。筆者らは、自動かつ大量に培養できる培養方式として浮遊培養を最初のターゲットとして技術開発を進めることにした。

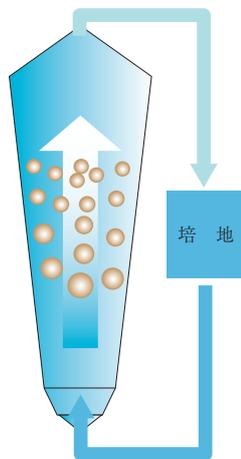
第 2 表 各培養方式の特長
Table 2 Characteristics of incubation methods

培養方式	増殖速度	未分化率	大量培養	技術的難易度
平面培養	△	○	△	低
浮遊培養 (細胞塊)	○	△	◎	中
浮遊培養 (担体付着)	○	○	◎	高

(注) ◎, ○, △: 適正度の評価

4. 浮遊培養のための新規リアクタ

浮遊培養では細胞へのせん断応力を抑えた培養を行うことが重要である。そこで今までに例のない新規培養リアクタを開発している。第 2 図に新規リアクタの概念図を示す。このリアクタは下方から上方へ培地を流し、その上昇流の中で細胞を培養する。リアクタ形状は上に行くほど径が大きくなっているため、上昇流は下部ほど速く、上部ほど遅い。管内を流れる流体は摩擦によって中心部の流速が速く管壁に向かうほど流速は遅くなるが、このリアクタにはそのような管内の流速勾配を緩和した均一な押し出し流れ（プラグフロー）を形成する工夫がされている。第 3



第 2 図 新規リアクタの概念図
Fig. 2 Conceptual diagram of new reactor



第 3 図 新規リアクタ内に形成されるプラグフロー
Fig. 3 Plug flow formed in new reactor

図に新規リアクタ内に形成されるプラグフローを示す。そのためこの流れの中では、細胞塊はその沈降速度が上昇流とつりあった位置に保持され、大きな細胞塊ほど下に小さな細胞塊ほど上に存在することになる。均一なプラグフローを作ることによって、リアクタ内の古い培地と下部から流入する新しい培地は混ざることがなく、培地交換がスムーズにできる。

このようにして細胞を培養すれば細胞にかかる力は軽減され、細胞にダメージを与えずに培養することができると考える。そのほかに、細胞がリアクタ内に保持されるため、培養を行う際に分離機構が必要なく、遠心分離や分離膜などの分離装置がいらないシンプルな培養系が可能になる。

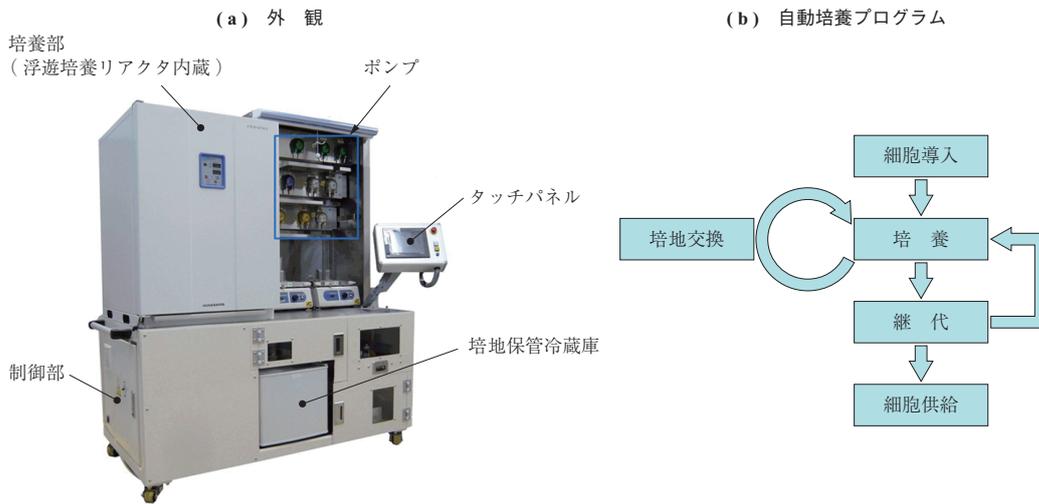
5. 要素試験機の開発

前記で述べたリアクタを内部に設置した自動培養装置の要素試作機を作製した。第 4 図に自動培養要素試験機を示す。この試作機は、① 培養リアクタを内蔵する CO₂ インキュベータ ② 培地などの保存のための冷蔵庫 ③ 制御部 ④ 操作用のタッチパネル ⑤ 培地や薬液を送液する多数のチューブポンプ、から構成され、これらをコントロールすることでさまざまな培養プロセスに対応できるように設計されている。ここで用いる培養槽や配管類は滅菌済みの密閉系を想定しており、滅菌殺菌機能を設けなくても微生物による汚染（コンタミネーション）の可能性を低減できる。最終的には自動で継代培養を行うことを目標としている。この要素試験機の設置面積はたたみ 1 畳ほどあり、現在は小型化を進めている。

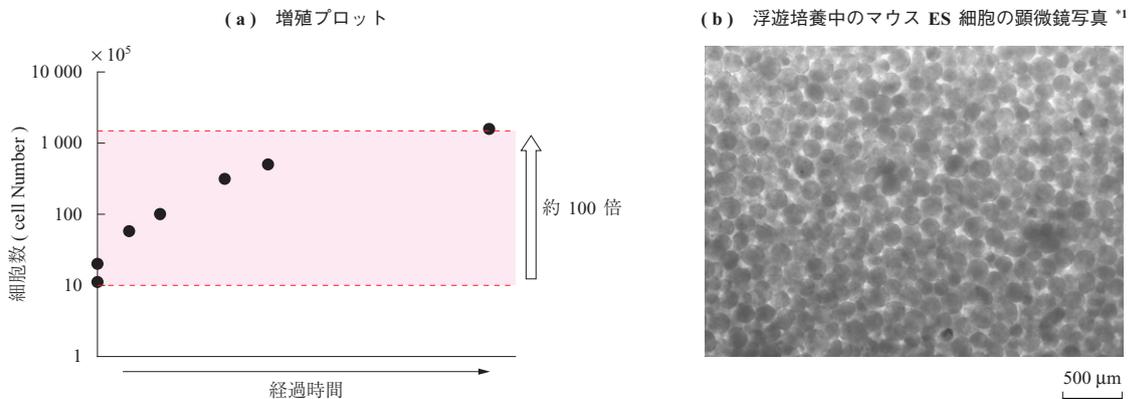
6. マウス ES 細胞の培養試験

ヒト iPS 細胞を用いて培養試験を行う前にマウス ES 細胞で試験した。ヒト iPS 細胞は倫理委員会の設置が必要になるなど、簡単に使用できないためである。加えて、マウス ES 細胞で得られた知見をヒト iPS 細胞での培養試験に活かすためである。

新規リアクタで培養すると 1 日後には細胞塊が形成された。そのまま培養を継続すると、マウス ES 細胞の細胞塊培養で 1×10^4 セル/ml から 1×10^6 セル/ml まで約 100 倍の増殖培養が可能であることが分かった⁽⁸⁾。第 5 図にマウス ES 細胞の培養試験を示す。培養したマウス ES 細胞の未分化性を免疫染色法で調べた結果、未分化性を示すマーカーである Nanog, Oct4, Sox2 が確認でき



第 4 図 自動培養要素試験機
Fig. 4 Test model of automated cell culture machine



(注) *1: マウス ES 細胞が数千個～数万個の塊の状態¹で培養されている。

第 5 図 マウス ES 細胞の培養試験
Fig. 5 Mouse ES cell culture test

た⁽⁸⁾。生物における試験はばらつきが多いので、今後は再現性やほかの手法による未分化性の確認を計画している。また、マウス ES 細胞を用いた浮遊培養は現在も開発中であり、さらに改善をする予定である。

7. ヒト iPS 細胞での培養試験

新規リアクタでマウス ES 細胞の培養が可能であることを確認した後、ヒト iPS 細胞の培養試験に取り組んだ。現在、横浜市立大学谷口英樹教授の指導のもと、ヒト iPS 細胞の培養試験を行っている。

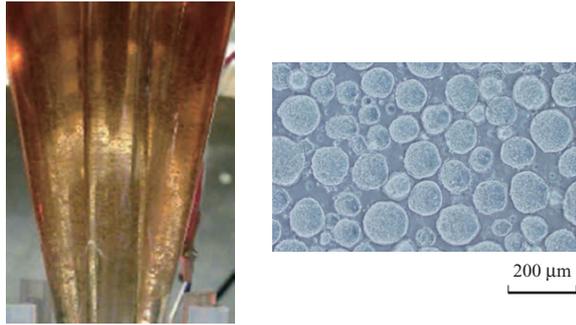
実施に当たり、ヒト iPS 細胞の平面培養での培養手順を参考に培養プログラムを作成して自動培養運転の実施に当たった。

まず、ヒト iPS 細胞をシャーレで培養する際の京都大学が推奨する培養手順⁽⁹⁾について紹介する。ヒト iPS 細

胞はラミニンと呼ばれる足場タンパク質をコートしたシャーレ上に接着して培養するが、iPS 細胞はシャーレから剥離、または細胞間の接着を解離させると容易に死滅する。単細胞へと分散させる際は Rock inhibitor と呼ばれる細胞死を抑制する試薬を添加する。この Rock inhibitor は細胞をシャーレに播種した 1 日後に取り除く。その後、培地交換を 1 日ごとに行い、約 7 日後には再びシャーレから剥離して、希釈してまた新たなシャーレへと播種する。このことを繰り返すのが iPS 細胞のシャーレ上での培養プロトコルである。

以上のプロトコルを当社で開発した要素試験機のポンプコントロールに適応させた培養プログラムを作成した。第 6 図にヒト iPS 細胞の培養試験を示す。このプログラムでヒト iPS 細胞を培養すると第 6 図-(a)に示すように、ヒト iPS 細胞を浮遊培養方式で培養することができた。

(a) 浮遊培養中のリアクタの様子^{*1} (b) 浮遊培養中のヒト iPS 細胞の顕微鏡写真^{*2}



(注) *1: 一つひとつの茶色の粒子が iPS 細胞の塊を示す。
*2: ヒト iPS 細胞が数千個~数万個の塊の状態に培養されている。

第 6 図 ヒト iPS 細胞の培養試験
Fig. 6 Human iPS cell culture test

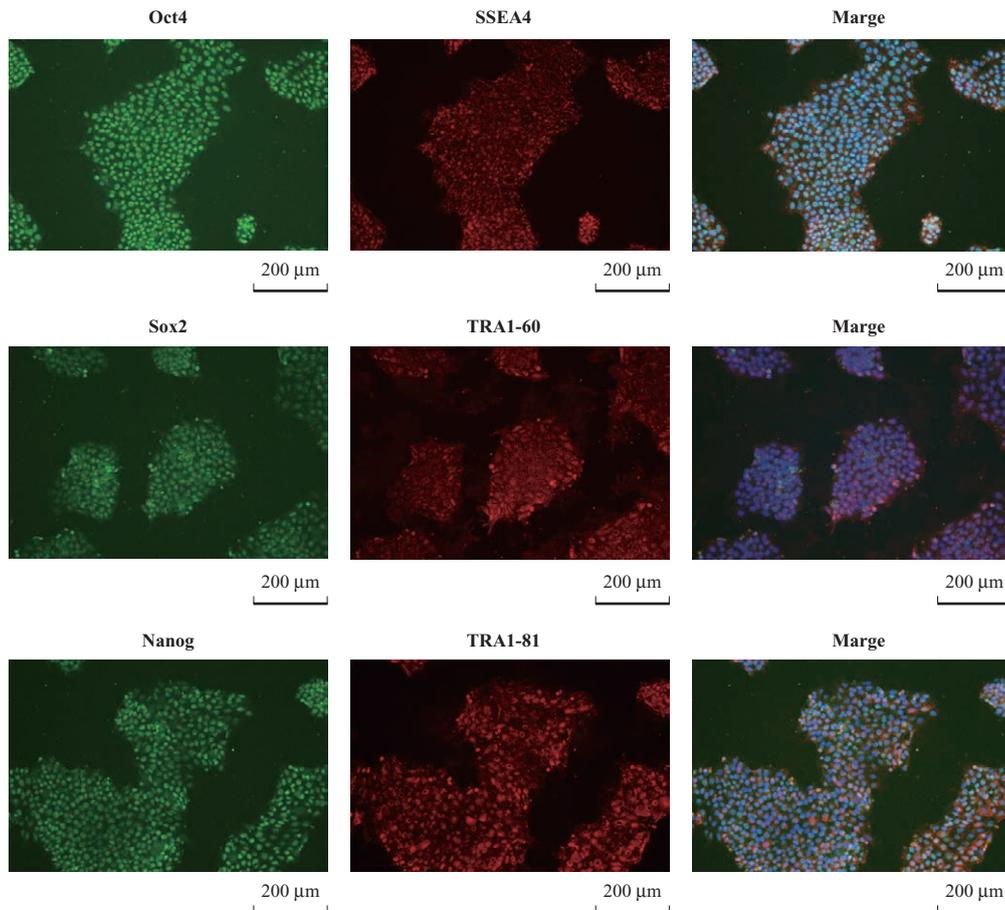
培養液を一部取り出し、顕微鏡で観察すると第 6 図 - (b) に示すように 50 ~ 150 μm の細胞塊の状態になっているのが分かる (ヒト iPS 細胞 1 個は 10 μm くらいの大きさであるが数千個~数万個の細胞が塊となっている)。

培養したヒト iPS 細胞の未分化性を免疫染色法で調べた結果、未分化性を示すマーカーである Nanog, Oct4, Sox2, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81 が確認された (第 7 図)。

現在は培養プログラムの改良などを行い、新規リアクタでのヒト iPS 細胞の浮遊培養のさらなる向上を目指している。

8. 結 言

本稿では iPS 細胞自動大量培養装置の開発について、開発の経緯、コンセプトの策定、新規リアクタと試験機の要素技術、培養試験の結果について述べた。マウス ES 細胞やヒト iPS 細胞での培養試験の結果、培養された細胞は未分化性を維持していることが示唆された。今後は課題をクリアしていき、医療現場や研究所などで使うことのできる自動培養装置の製品開発を目指していく。



(注) 確認方法: ヒト iPS 細胞の未分化性を示すマーカータンパク質を免疫染色法で染色

第 7 図 免疫染色法によるヒト iPS 細胞の未分化性の確認
Fig. 7 Confirmation of iPS cell anaplasticity with immunostaining method

— 謝 辞 —

細胞での試験に当たっては、横浜市立大学の関根圭輔助教に多くの貴重なご助言をいただきました。ここに記して心から謝意を表します。

参 考 文 献

- (1) 賀喜白乙, 赤池敏宏 : ES/iPS 細胞のノンストレスで均質な大量培養システムを目指して 再生医療 Vol. 9 No. 3 2010年 8月 pp. 27 - 35
- (2) T. J. Rowland, D. O. Clegg, et al. : Roles of Integrins in Human Induced Pluripotent Stem Cell Growth on Matrigel and Vitronectin Stem Cells Development Vol. 19 No. 8 (2010. 8) pp. 1 231 - 1 240
- (3) M. Nakagawa, S. Yamanaka, et al. : A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells Scientific Reports4 (2014. 1)
- (4) R. Olmer, R. Zweigerdt, et al. : Suspension Culture of Human Pluripotent Stem Cells in Controlled, Stirred Bioreactors Tissue Engineering Part C Vol. 18 Issue 10 (2012. 9) pp. 772 - 784
- (5) Y. Wang, L. Chengb, et al. : Scalable expansion of human induced pluripotent stem cells in the defined xeno-free E8 medium under adherent and suspension culture conditions Stem Cell Research Vol. 11 Issue 3 (2013. 11) pp. 1 103 - 1 116
- (6) R. Krawetz, D. E. Rancourt, et al. : Large-Scale Expansion of Pluripotent Human Embryonic Stem Cells in Stirred-Suspension Bioreactors Tissue Engineering Part C Vol. 16 No. 4 (2010. 7) pp. 573 - 582
- (7) S. M. Badenes, J. M. S. Cabral, et al. : Scalable Expansion of Human-Induced Pluripotent Stem Cells in Xeno-Free Microcarriers Stem Cells and Good Manufacturing Practices Volume 1 283 of the series Methods in Molecular Biology (2015) pp. 23 - 29
- (8) 石井浩介, 坂井慎一, 初谷智美ほか : 多能性幹細胞大量培養のための新規自動浮遊培養装置 第 14 回日本再生医療学会総会 プログラム・抄録 2015 年 3 月
- (9) 中川誠人 : プロトコル「フィーダーフリーでのヒト iPS 細胞の樹立・維持培養」京都大学 iPS 細胞研究所 CiRA