

再生・細胞医療のための自動細胞培養システムの開発

— 高品質細胞製品を調製するロボットシステム —

脇谷 滋之¹、田原 秀晃²、中嶋 勝己³、蓮沼 仁志³、下平 滋隆⁴、小野寺 雅史⁵、植村 寿公^{6*}

再生・細胞医療技術を生かした基礎研究と臨床応用の間の橋渡し研究の大きな障壁の一つとなっている臨床用細胞調製を飛躍的に容易にすることを目標として研究を行った。川崎重工業が信州大学、産総研に設置し、すでに具体的評価を開始している世界初の細胞培養ロボットシステム (MDX) の技術を基に、建設や運営の困難な専用の細胞調製施設 (Cell Processing Center: CPC) を設置せずとも高品質の細胞試薬を調製できる実用的な培養システム (Robotized - Cell Processing eXpert system: R-CPX) を開発した。この開発を通じた多様な細胞医療の迅速な実現と世界標準品質の確立を目指した。

キーワード: 再生医療、細胞医療、自動細胞培養システム

Development of automatic cell culture system for cell therapy and regenerative medicine

– Robotized system for high quality cell product preparation –

Shigeyuki WAKITANI¹, Hideaki TAHARA², Katsumi NAKASHIMA³, Hitoshi HASUNUMA³,
Shigetaka SHIMODAIRA⁴, Masahumi ONODERA⁵ and Toshimasa UEMURA^{6*}

We carried out R&D in order to dramatically facilitate cell culture for clinical use, the difficulty of which had been a major hurdle in adapting basic research to clinical applications of cell therapy and regenerative medicine. The world's first robotized cell culture system (MDX) was developed by Kawasaki Heavy Industries, Ltd., and the systems were installed in Shinshu University and AIST. Based on the technologies of the MDX system, we developed a novel cell culture system R-CPX (Robotized-Cell Processing eXpert system) which can produce high quality medical cell products. This system does not need to be placed in a CPC (cell processing center), which is expensive to construct and difficult to manage. We aimed to realize rapid progress of various cell therapies and production of medical cell products of global standard quality.

Keywords: Tissue engineering, cell engineering, auto culture system

1 はじめに

1.1 なぜ、今、自動細胞培養装置の開発が必要か？

近年、少子高齢化が進む中、がん、糖尿病、認知症等の成人性疾患等に関して、これまで行われてきた薬剤投与や人工物を用いた代替材料による対処療法には限界があり、新たな医療技術の開発が望まれている。その実現のためには進展著しい医療分野の多様な要素技術や研究成果

を、創薬や、これを支援する解析ツール、診断技術、医療機器等の開発に応用する必要がある。そのためには、迅速な実用化に向け、民間企業と臨床研究機関が一体となって研究開発を行うことが重要である。

従来医療に代わり、次世代医療として期待される再生医療、遺伝子・細胞医療は、細胞の増殖、分化等の能力を利用して、患者自身または提供者の細胞を採取し、生体外

1 武庫川女子大学 健康スポーツ科学部 〒663-8558 西宮市池開町 6-46、2 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 外科・臓器細胞工学分野 〒108-8639 港区白金台 4-6-1、3 川崎重工業株式会社 システム技術開発センター 〒650-8670 神戸市中央区東川崎町 3-1-1、4 信州大学医学部附属病院 先端細胞治療センター 〒390-8621 松本市旭 3-1-1、5 国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部 〒157-8535 世田谷区大蔵 2-10-1、6 産業技術総合研究所 ナノシステム研究部門 〒305-8562 つくば市東 1-1-1 つくば中央第 4

1. School of Health and Sports Sciences, Mukogawa Women's University 6-46 Ikehira-machi, Nishinomiya 663-8558, Japan, 2. Department of Surgery and Bioengineering, Advanced Clinical Research Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo 4-6-1 Shirokane-dai Minato-ku 108-8639, Japan, 3. System Technology Development Center, Kawasaki Heavy Industries, LTD. 3-1-1 Higashikawasaki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-8670, Japan, 4. Center for Advanced Cellular Therapy, Shinshu University Hospital 3-1-1 Asahi, Matsumoto 390-8621, Japan, 5. Department of Human Genetics (Research Institute) National Center for Child Health and Development 2-10-1 Okura, Setagaya-ku 157-8535, Japan, 6. Nanosystem Research Institute, AIST Tsukuba Central 4, 1-1-1 Higashi, Tsukuba 305-8562, Japan * E-mail: t.uemura@aist.go.jp

Original manuscript received January 10, 2012, Revisions received January 24, 2013, Accepted April 15, 2013

で増殖や分化、あるいは遺伝子導入などによる操作を行い、患者の疾患箇所に移植することにより疾患を治癒することを目的とした医療であり、現在急速に普及しつつあり、多くの実績が積み重ねられている。国内では、自家培養表皮組織を用いた皮膚再生医療が実用化（産業化）している。

生体から取り出した細胞の操作技術は、細胞増殖や分化を制御する基礎研究レベルでの技術開発であるが、この臨床応用や産業化を図るためには、基礎研究からの橋渡し研究（Translational Research: TR）が必要である^[1]。患者自身から採取した（自家）細胞、または提供者から採取した（同種）細胞を培養して得られる培養組織を製品として扱い、安全性を担保し、その有効性を顧客である医師や患者に品質保証する必要がある。細胞培養のプロセスでは、細胞を採取する過程や細胞を増やす（増殖）過程での細胞の植え継ぎ（継代）、また分化を誘導する過程等の細胞加工（セルプロセッシング）が必要であり、病院内や企業内に特別に設置された細胞調製施設（Cell Processing Center: CPC）において、熟練した作業者が、複雑な細胞培養操作を行っているのが現状である（図1A）。

CPCでの細胞培養操作では、滅菌できない細胞や組織を扱うことから、無菌環境の維持が重要であり、また、細胞培養の過程において、クロスコンタミネーション（他人の細胞が混ざることによる汚染）やヒューマンエラーは絶対に許されない。このような観点から、CPCは、日本では、治療行為は医師法に従うが、治療に使われる細胞・組織は、薬の製造・品質基準であるGMP（Good Manufacturing Practice: 医薬品の製造にかかわる設備・工程管理・品質管理に関する規則）を満足する必要がある。CPCの満足すべきGMPの3原則は、①汚染および品質劣化の防止、②人為的ミスの最小化、③高度な品質を保証するシステム、

である^{[1][2]}。そのために、(1) 無菌管理・バイオハザード対策・クロスコンタミネーション防止、(2) 取り違え防止、(3) 運営状況の文書化および記録維持等が不可欠である。現在、国内でも多くのCPCが稼動しており再生医療の研究開発が進められているが、以上述べた高いレベルの要件を満たすための維持費用、さまざまな新しい医療技術への対応の必要性からこれまでのCPCを使用した医療システムには限界があり、再生医療や細胞治療の産業化を見据えてさらに改良されたGMP準拠のシステムや機器の開発が切望されている。3原則の②、③は手作業にとって代わる自動培養システムが重要であり、また3原則の①より、維持費のかかるCPCの無菌環境を小型の装置により実現しグローブボックスにより操作が行えるアイソレータシステムの開発が行われている（図1A）。今後、アイソレータを用いた手作業による培養が普及すると考えられる。

この研究開発では、自動培養システムをさらに発展させるべく、アイソレータ内に培養システムを組み込み、種々の用途に対応可能な、CPC不要のR-CPX（Robotized-Cell Processing eXpert system）システムの開発を目的としている。このシステムの開発により、再生医療の普及期においては、中小企業のニーズとしてCPC不要の次世代R-CPXを、中～大企業のニーズとしてより低コストを実現した専用機により、安価で安全な再生医療の普及が実現できるものと期待できる。

1.2 目的、実施体制、研究開発の概要

この研究開発では、再生・細胞医療技術を生かした基礎研究と臨床応用の間の橋渡し研究の大きな障壁の一つとなっている臨床用細胞調製を飛躍的に容易にすることを目標とした。図1Bにこのプロジェクトにおける技術項目とその構成図を示す。川崎重工業株式会社（以下川崎重工

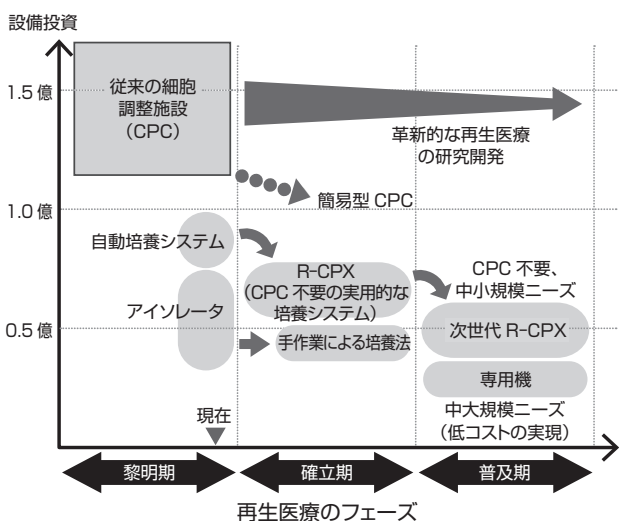


図1A 細胞調製システムのロードマップ

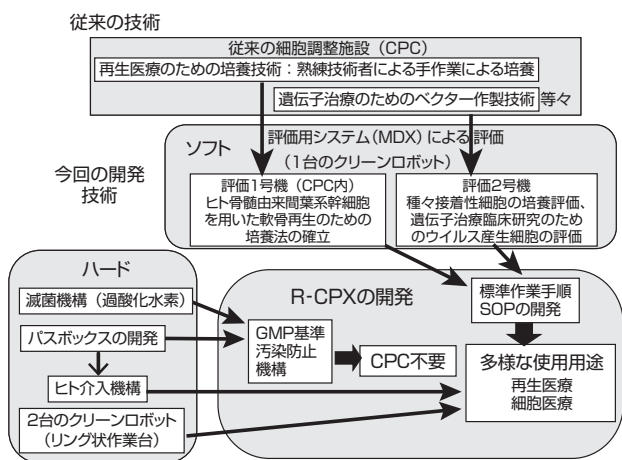


図1B このプロジェクトにおける技術項目と構成図

と略す)は、信州大学、産業技術総合研究所(以下、産総研と略す)に、すでに世界初の細胞培養ロボットシステム(MDX: Medical Device Project X、図2、図3)を設置した。以下、信州大学に設置したシステムを評価1号機、産総研に設置したシステムを評価2号機と略す。信州大学はCPC内で再生医療のための細胞培養技術に、産総研では、創薬開発等に用いるさまざまな細胞の培養に関して多くの経験とノウハウを有している。川崎重工の細胞培養ロボットは、細胞培養を行う熟練した技術者の手作業を、そのままロボット(主にロボットアーム)の動きに置き換えるというコンセプトのもと設計しており、1号機、2号機において、信州大学、産総研の培養技術を導入、そして試験することによって検証を進めた。得られた結果を基に、培養システムR-CPXを開発することを目標として研究を進めた。

再生・細胞医療は、新規性の高い治療法であり、現在も急速な研究開発が進められている分野であるため、その品質基準や機能要求は日々変化している。また、この手法は広範な疾患に応用することのできるものであるため、調製すべき最終産物(細胞)のみならず、その原材料となる細胞や組織も多様なものとなる。よって、現在手作業としてすでに確立されている一つのプロトコルにおける細胞培養関連技術を、単にロボット・システムに移植する努力をするのみでは全く不十分である。そこで、多様な作業の代表的な工程を含む二つの異なる具体的なプロジェクトを選択し、それらを実際に進行させることを軸として開発を進めた。開発する再生・細胞医療プロジェクトとしては、「ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いた軟骨再生のための培養法の確立」(評価1号機)、および、「遺伝子治療臨床治療のためのウイルス産生細胞の評価」(評価2号機)を選択した。これらは、本事業担当者が十分な実績を持つ分野のプロジェクトであるため、これらの臨床試験に用いる細胞

試薬に関して、既存のCPCを用いた手作業用の標準作業工程(Standard Operating Procedures; SOP)を確立した。そして、このSOPに従って実際の試薬を調製し品質検証を行った。これらの研究と並行して、

- (i) 過酸化水素によるR-CPX内の滅菌機構
- (ii) 多様な使用用途に応えるために、すべてをロボット化せず、専用パスボックスを開発することによるヒト介入機構の導入
- (iii) 1台のクリーンロボットでは実現できなかった2台のクリーンロボットによる効率化

を主な技術項目として、CPCを使用することなくR-CPXのみにて円滑に実行できるハードを構築した。特にロボット化部分は現存のMDXを用いて検証実験を行い、将来的には手作業のほとんどが自動化可能となるものを目指した。

以上の目的にそって、以下の5つの研究項目を挙げ、研究開発を行った。

- ① GMP基準R-CPXの開発
- ② R-CPXを用いた再生医療の確立と評価
- ③ R-CPXを用いた遺伝子治療用ベクター産生法の検討
- ④ 標準作業手順SOPの開発
- ⑤ 評価機による培養評価

これらのうち、装置開発の直接関係する①、④、⑤について詳しく述べる。

2 GMP基準R-CPXの開発

2.1 R-CPX設計の基本概念

R-CPXの実現に欠かせない、汚染防止機能や人介入機構を開発し、それに基づきR-CPX全体構成の開発を行った。汚染防止としては、まずP2に対応できるように内部を陽圧/陰圧に制御できる換気機能を試作機を用いて検証し性能を確認した。次に、滅菌機能では比較検討の結果、過酸化水素蒸気による滅菌を採用し、滅菌性能を確認す

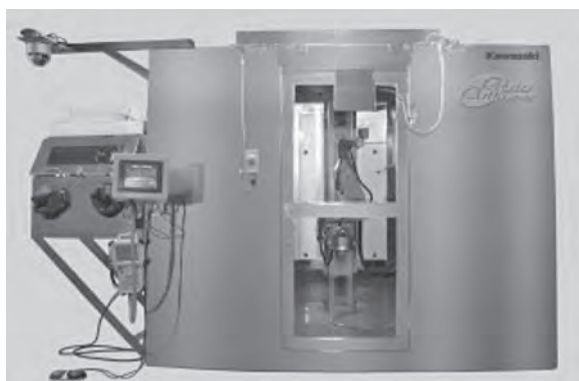


図2 MDX評価1号機(信州大学設置)(再生医療用)



図3 MDX評価2号機(産業技術総合研究所設置)(創薬用)

る各種試験を実施し R-CPX の設計に必要な基本データを
得た。人介入機構では、ロボットとの協調作業となるため
インターロック機構を考案し、また装置内部が陰圧の場合
でも作業操作性が低下しないようにグローブのフィット機構
を考案し、試作機にて検証した。

評価 1 号機、および創薬用に開発され産総研に設置さ
れた評価 2 号機およびこれらの検討結果から、R-CPX の
全体構成を検討し、装置仕様を確定し概略図面を完成さ
せた。ピペットの挿入試験、培養器具の操作性向上試験、
ピペットの脱着試験、など検証が必要なものは試作機によ
る試験を行い、性能を確認した。さらに、過酸化水素蒸
気による滅菌性能やメンテナンス性の向上のために、シ
ンプルな構造とし画像処理による環境認識技術の検証を行
った。

さらに、R-CPX の詳細設計を行い、過酸化水素蒸気の
発生装置は方式を見直した後、試作機を完成した。過酸
化水素によるパスボックスと装置内部の滅菌と、これまで
の試作機 1 号機や 2 号機にはなかった 2 台のクリーンロ
ボットによる培養操作 (図 4) を実現し、性能試験を行い、
確認した。また、評価 1 号機については、信州大学での
培養試験によって確認されたハードウェアの問題点を改良
し、自動培養 SOP の見直しを実施した上、同一ドナーお
よび同一時期で、手培養との並行培養評価を実施した。

2.2 GMP基準の汚染防止法の開発

汚染防止として、求められる機能は以下の 4 項目である。

- (a) 外部から装置内部を汚染しないこと。
- (b) 外部と装置の間出入庫時に装置内部を汚染しない
こと。
- (c) 装置内で異なる検体を扱う場合、交差汚染を起こさ
ないこと。
- (d) 遺伝子治療用の培養等に対応し、装置内部から、外部
を汚染しないこと。

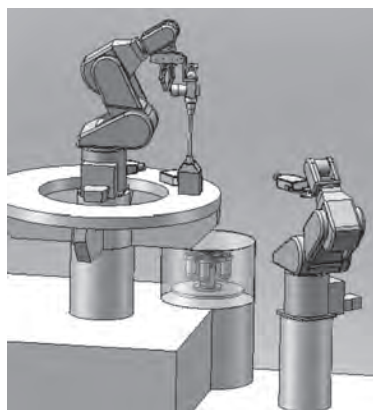


図4 ロボットと回転作業台の配置

この 4 項目の機能を実現するため、R-CPX では、パス
ボックスを含めた装置内の滅菌機能と装置内を陽圧 / 陰圧
両方に制御できる換気機能を持たせた。滅菌機能に関して
は、汚染の可能性がある場所の滅菌ができることが求めら
れる。R-CPX では、内部装備品へのダメージが少なく、
比較的、滅菌時間も短い過酸化水素蒸気滅菌を採用した。
過酸化水素蒸気滅菌は、製薬や医療研究用途のアイソレ
ータ内の滅菌用としても使われており、適切な条件を設定
して使用すれば、十分な滅菌性能を発揮すると考えられる。

過酸化水素蒸気滅菌は、過酸化水素蒸気に触れた対象
表面が滅菌される。それゆえ、蒸気が対象表面に十分に
到達するかどうか課題となる。そのため、複雑な構造物
の内部、狭い隙間は蒸気が十分に到達しないかもしれない
という懸念があるため、対象の構造体はシンプルな構造と
するとともに、隙間やネジ部の存在は避けられないため、
それらの滅菌確認を行った。滅菌工程終了後、バイオイン
ジケータによる滅菌性の確認試験を行ったところ高い滅菌
能を示す結果を得た。

以前の装置 (評価 1 号機、評価 2 号機) にはない R-CPX
の特徴の一つが人介入機構であり、グローブボックスを用
いて行われる (図 5)。このグローブは、ロボットが行う培
養操作の一部を代替することになるので、グローブによる
人介入の作業場所は、ロボットが届く範囲であり、かつ培
養作業を行うロボットの動作範囲内の一部のうち、装置正
面側の人がアクセスしやすい面を割り当てた。また、使用
するグローブは、過酸化水素蒸気に暴露され、かつ、外
部との間に圧力差 (150 Pa ~ 50 Pa 程度) があるため、
材質に限られ作業性が悪い。特に、装置の内部を陰圧に
した場合、そのままでは、グローブが膨らんでしまい、作
業者の手にフィットしない。そこで、作業者の手に密着し、
作業性を向上させる仕組みを考案した。構造としては、図
6 に示すように、作業者の上腕部分にリング状の密着部を



図5 過酸化水素蒸気滅菌対応のグローブ

設置し、密着部にエア供給して密着させ、密着部から先の空間に対してエア吸引を行うことで、グローブを作業者の手に密着できるように設計した。

2.3 R-CPXの基本構成

ここまで検討してきた汚染防止法と人介入機構を装備し、汚染の可能性のある箇所をできるだけ少なく、シンプルにし、手培養にできるだけ近い形で、自動化する機構を検討した。信州大に設置した評価1号機と産総研に設置した評価2号機での作業性を検討比較し、以下のように基本構成を決定した。

- (a) 構造が複雑になる自動機械の使用を減らし、主体を2台のクリーンロボットとし、1台が主に搬送を行うロボット（搬送ロボット）、他方が主に培養操作を行うロボット（作業ロボット）とする。
- (b) ネジ式キャップの開閉にキャッパーを使わずに済むよう、ワンタッチ式キャップを用いる。
- (c) ピペッタは、シリンジポンプとチューブで連結する方式をやめ、作業者が使うピペッタと同様の独立したものとし、ピペッタを作業ごとに交換し、一連の培養作業ごとにピペッタを外部に取り出し滅菌する。
- (d) センサーの多用は機構を複雑化するので、離れた場所からの視覚により代替可能な部分は、TVカメラからの映像をセンサーとして使用し、画像処理して認識する。
- (e) 培養容器は手作業による培養で使用例の多いT型フラスコとする。
- (f) インキュベータや冷蔵庫の扉はシリンダによる開閉式とせず、ロボットが開閉する方式とする。
- (g) 作業ロボットを中心として、リング状に培養操作の作業台を設置し、作業台の回転量を制御できるようにする。この回転作業台が移動することで、設置された培養容器に対する作業ロボットに装着したピペッタで行う培養作業の領域を限定することができる。
- (h) 培地や薬液の容器を遠沈管に共通化し、空になった容器を液体廃棄用容器として用いる。

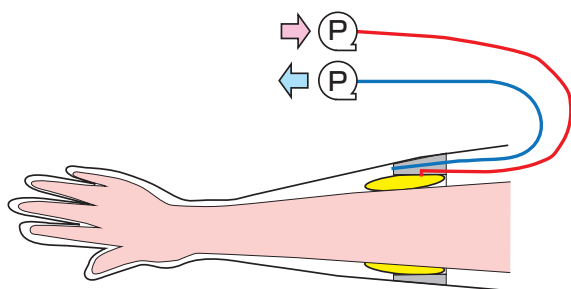


図6 グローブのフィット機構

- (i) 各ロボットの手先には、ハンド機構を設置し、容器の把持だけでなく、作業ロボットに装着するピペッタの操作も行う。
- (j) インキュベータ以外の保管庫（常温保管庫、冷蔵保管庫）は、滅菌しやすさを考慮して奥行きが少ない凹形状とする。

この基本構成のもとに R-CPX システムを構築した。全体図と完成した装置の各主要構成部の写真を図7、図8に示す。

3 標準作業手順SOPの開発

手作業による培養の場合の SOP は標準の手順書であり、ある程度の技量を持った作業者が、その手順書を見て作業すれば、同じ結果が得られる手順書である。それを、自動培養に置き換えた場合4つの部分から構成される。

- (a) 手作業による培養と同じ作業が自動培養でも必要な作業：培地の調製やコラーゲンへの播種等
- (b) 手作業による培養では不要だが自動培養で必要な作業：消耗品のパッキング等
- (c) 自動培養装置の操作する作業：消耗品の入庫、検査用サンプルの出庫等
- (d) 自動培養装置の動作

このうち、重要になるのは、(d) である。自動培養装置による動作は、すべて、作業者が行う動作と同じにはな

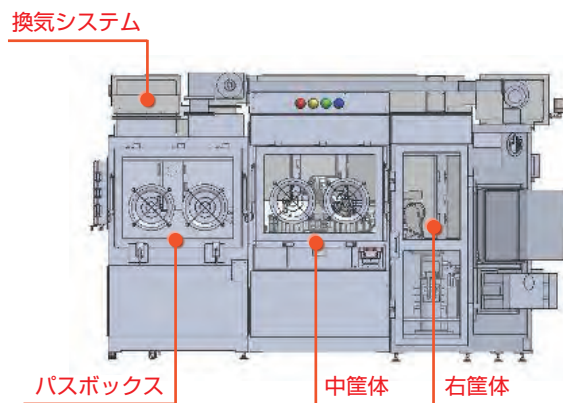


図7 R-CPX全体図（上図）および完成写真（下図）

らない。例えば、初代培養直後の培地交換では、骨髓液中に含まれていた血球成分が残っており、培地交換の前にディッシュを揺動させ、血球成分を上清中にできるだけ浮遊させてから上清廃棄を行う。作業者は揺動の加減を目で見て行うが、装置ではできない。あらかじめ、揺動の方法を決めておく必要がある。そのため、揺動の強度や回数を実験的に比較し、決定した。図9（左）は、当初の揺動条件での培地交換後のディッシュで、赤色を帯びており、血球成分が残っている。揺動条件を修正した結果、目で見て、培地交換後のディッシュに赤色は見られなくなり、図9（中央、右）に示すように、顕微鏡観察においても、血球成分は、ほとんど、見られなくなった。

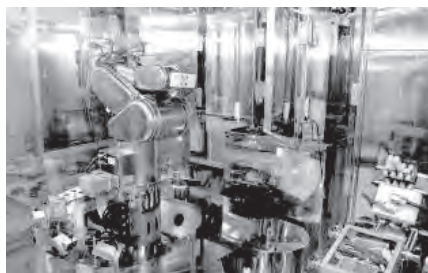
以上の基本概念のもとに、軟骨再生用自動培養 SOP の開発および遺伝子治療用自動培養 SOP の開発を行った。

手作業による培養の SOP は、同一施設でも作業者により手法が異なる、記録が正確に残らない、引き継ぎが難しい、製造物の品質が安定しない、などの問題点がある。

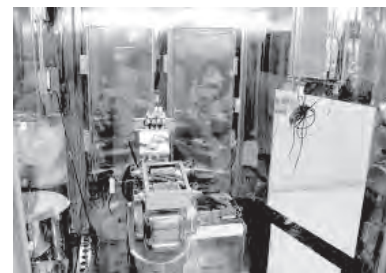
今回、自動培養用の SOP 開発を前提として手作業による培養の SOP を見なおし、曖昧であったり科学的根拠の乏しい点に検討を加えこれらを明確にした。さらに、手作業による培養から自動培養 SOP への変換の考え方を整理し、自動培養 SOP を開発した。手作業による培養のすべてをそのまま自動化できる訳ではないので、その際の考え方も整理した。これらの作業を通じて、手作業による培養の SOP および自動培養 SOP の標準化をどのように実現すれば良いかが明らかとなった。

4 評価機による培養評価

R-CPX の培養対象は、再生医療用の間葉系幹細胞のみではなく、遺伝子治療用のウイルス産生細胞や各種臨床研究用途で使われる多様な細胞が対象となる。間葉系幹細胞の培養評価は、評価1号機で行った。評価2号機では、間葉系幹細胞以外の接着系細胞を対象とした。



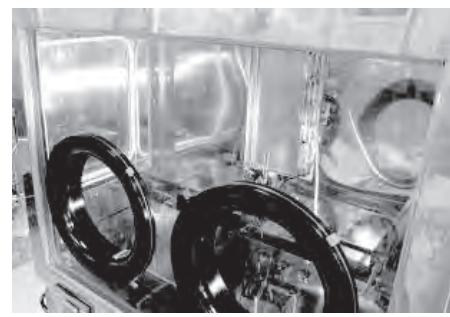
(1) 中筐体内部と作業ロボット



(2) 右筐体内部と搬送ロボット



(3) 中筐体中央部の回転作業台



(4) パスボックス

図8 R-CPXの主要構成部の写真

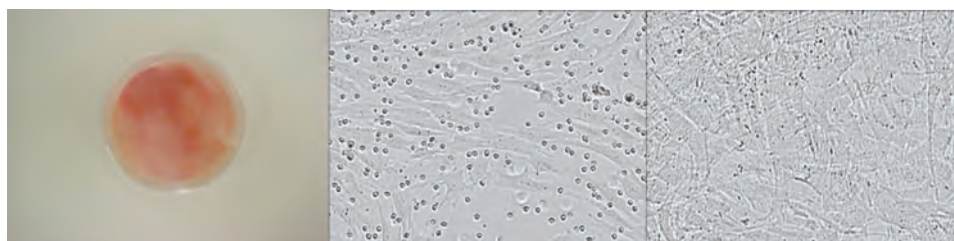


図9 初代培養直後のディッシュ（培地交換後も赤色を帯びる）（左）、揺動方法改良の効果の顕微鏡写真での比較（中央：改良前、右：改良後）

4.1 信州大設置評価1号機の概要

評価1号機は、再生医療用の間葉系幹細胞を培養し、臨床研究に使用する目的で、信州大学附属病院内のCPCに設置した。臨床研究に使用するには、厚生労働省が施行した「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に基づく承認を得る必要があり、臨床研究に使用できるレベルで培養評価を行っている。

評価1号機は、以下のような特長を持つ。

- (a) 骨髓液をスタートとして培養し、軟骨再生に必要な量の間葉系幹細胞を培養し、細胞懸濁液として提供する。
- (b) 装置はクリーン度100,000の管理区域に置かれ、装置内はクリーン度100の無菌空間を維持する。
- (c) 消耗品や細胞の入出庫にはグローブボックスを用い、滅菌梱包を用いることで、内部の汚染を防止する。
- (d) 装置内で、初代培養、培地交換、継代培養、細胞回収、細胞観察が全自動で行える。培養操作の主体はクリーンロボットである。また、検査用のサンプル作成が可能である。
- (e) 培養操作の工程管理はコンピューターで行われ、スケジューリングが自由に行えるだけでなく、すべての動作履歴が記録される。
- (f) 装置内に保管設備を持ち、消耗品は常温保管庫、薬剤は冷蔵庫に保管され、培養操作時に、完全無人で運転が可能である。
- (g) 遠隔監視機能を持ち、CPC内の端末と同じ情報を遠隔から監視できるとともに、装置内の映像も確認可能である。

4.2 評価1号機による細胞培養方法、評価方法の概要

手作業による培養のDry Run（培養した細胞をドナーに移植しない培養）と並行し、同一ドナーの骨髓細胞の培養を自動培養Dry Runとして実施した。培地も、手作業Dry Runで使用するものと同一のもので、ドナーの自己血清から調製したものである。評価は、継代と細胞回収時に、無菌試験およびエンドトキシン、マイコプラズマの品質検査を行うと共に、細胞数および表面抗原の解析を行い、得られた細胞中の間葉系細胞と思われる細胞の割合を求めた。評価は、ドナー由来の骨髓液9 mlに換算した場合、培養期間3週間以内で培養細胞総数が 10^7 個以上、かつ、回収された細胞の内、90%以上間葉系幹細胞のマーカー陽性の細胞が純度80%以上で回収でき、細胞試薬の製品標準とした。

全5回の自動培養Dry Runによって、合格レベルに達する培養が行えるようになった。初代培養時の骨髓上清では、無菌試験陰性（2週間培養）およびエンドトキシン0.1

EU/ml未満であった。自動培養による継代および細胞回収時の品質検査では、無菌試験陰性（2週間培養）およびエンドトキシン0.1 EU/ml未満、マイコプラズマ陰性を確認し、培養工程における病原汚染を認めなかった。また、自動培養SOPおよび装置の改良とともに5回目のDry Runにおいては、製品標準の適格性を示し、純度、特異度ともに高品質な間葉系細胞試薬が作製された。品質保証された間葉系細胞が作製されたことから、自動培養SOPの妥当性が評価された。

4.3 産総研設置評価2号機の概要

評価2号機は、創薬をはじめとする非臨床の研究用途を目的に作られた細胞自動培養装置であり、以下のような特長を持つ。

- (a) 手作業による培養をそのまま自動化
培地交換、継代、細胞回収、細胞観察という手作業で行っていた一連の手法を、そのまま、自動化している。
- (b) 多様な細胞への対応
一般的な培養操作がプログラム化され、継代時の剥離時間、薬液の量や吐出速度等、多くのパラメータをユーザーが決められる。
- (c) 画像認識による培養支援
画像処理装置を装備し、装置内で細胞観察、自動記録も行える。細胞占有率の表示、自動記録が可能。
- (d) 培養スケジューリング機能
毎回の培養操作が自由にスケジューリングできる。
- (e) 細胞品質の安定性 / 均一性
自動操作による培養作業のため、培養性能 / 品質の安定性、均一性が実現できる。
- (f) 汚染防止
装置内はクリーン度100、操作はクリーンロボットが行うので、培養する細胞への汚染が防止できる。アルコール自動噴霧による除染機能を装備し、交差汚染を防ぐ。
- (g) コンパクトなサイズ
装置は幅約3 m、奥行約1 m、高さ約2 mで構成される。

4.4 評価2号機による細胞培養方法、評価方法の概要

R-CPXの培養対象は、再生医療用の間葉系幹細胞のみではなく、遺伝子治療用のウイルス産生細胞や各種臨床研究用途で使われる多様な細胞が対象となる。評価2号機では、間葉系幹細胞以外の細胞を対象とし、できるだけ広範な細胞種をその評価の対象とした。評価方法は接着系細胞を対象に評価し、遺伝子治療用のウイルス産生細胞に関しては、ウイルス同様培養上清中にタンパク成分を分泌するサイトカイン産生細胞をその評価系細胞として用いた。

4.4.1 広範な接着性細胞の培養評価

このシステムでは接着性の細胞を自動培養することが主目的であるが、接着細胞といっても、その接着性は細胞種により大きく異なる。評価した細胞株は、HeLa、NIH3T3など13種類であり、これら培養パラメーターは、手作業による培養によって安定して培養可能な初期細胞数、継代頻度、希釈率をあらかじめ決定し、その結果を基に評価機2号機での微調整を行うことで決定し良好な結果を得た。293 gp/mL2など、細胞接着性が弱い細胞では、PBSや培地の（ピペットからの）吐出速度の検討を行った。図10に吐出速度3、1、0.3、0.1 ml/secにおける細胞剥離状況を示す。至適吐出速度は0.3-1 ml/secであった。また、PC-12のような剥離しにくい細胞の場合、初期設定より剥離時間を長くし、また、タッピング回数を増やすことで剥離率を改善する工夫を行った。このように、細胞の特徴を考慮した培養パラメーター設定により、広範な細胞の自動培養が可能となった。

4.4.2 遺伝子治療臨床研究を想定したウイルス産生細胞の培養評価

遺伝子治療で用いられるレトロウイルスは、P2レベル拡散防止措置を必要とするため、装置を密閉構造とし、かつ、装置外に対し陰圧とすることで内部にウイルスを封じ込めることが必要であるが、評価段階では組み換え体レトロウイルス作業工程とおよそ同一である分泌タンパク質を放出する細胞株を用いた検討で十分で、実際にウイルス上清の回収が可能かどうかを評価した。使用した細胞株はNIH3T3/mL2である。遺伝子導入により、培養上清中にmIL2を放出するようにした細胞である。自動培養による回収性能を評価するために、細胞播種後34時間、58時間、82時間後に培養上清を回収し手作業による培養と比較した。培養上清に含まれるmIL2濃度を定量し、自動培養と手作業による培養で同等な濃度の培養上清を得ることができた。以上行った評価試験結果から、自動培養装置が手作業による培養とおよそ同等の安定した細胞培養が可能であり、細胞に一定の条件を必要とする細胞においても微細な培養パラメーターを設定することで培養可能になった。

5 手作業による培養から自動培養へ

このシステムは、熟練した技術者が手作業で行ってうまくいく作業を、ロボットアームの動作に置き換えるというコンセプトで開発を進めた。熟練した技術者は、その経験により、その一つ一つの作業を、主には培養顕微鏡で観察しながら細胞に対し最適な条件で操作を行う。そこにSOPが存在し、それをもとに機械が行う作業がプログラム化される。しかし、この経験により培われた無意識の操作を機械に無条件に導入するのは困難である。剥がれやすい細胞に対し、ソフトに培地をピペットから吹き付ける、剥がれにくい細胞には、強く培地を吹き付け、ときにはタッピング（たたく動作）を行う。同じ細胞であっても、微妙な条件の違いによって、その接着性、増殖性は微妙に異なってくる。その違いによらず、一つの作業（細胞を剥がす、細胞がはがれずに培地交換をするなど）を完全にこなすには、最適条件よりも強い条件で、しかも問題の生じない条件をSOPとして採用する必要がある。そこにSOPの決定の難しさがある。細胞培養を行うCO₂インキュベータのドアの開閉は、あまり長く開けないように初心者は指導される。熟練した技術者はそれを無意識に行う。無意識を無視してSOPを作ってしまうと、ドアが開いている時間が長すぎて、インキュベータ内のCO₂濃度が変化してしまい、培養に影響が出てしまう。最初それに気づかず、自動培養で手培養より悪い結果が得られ困った時期もあったが、ドアの開閉のタイミングを調整することにより改善された。人による作業のプロトコールには書かれていない無意識の作業を、いかにSOPに反映させるかが、自動化における難しさの一つであった。

6 まとめ

CPC 不要の高品質の細胞試薬を調製できる実用的な培養システム (Robotized-Cell Processing eXpert system: R-CPX) を開発した。R-CPXでは、GMP基準汚染防止機構、2台のクリーンロボットによる作業、種々の使用用途に対応できる柔軟な構造が特徴である。

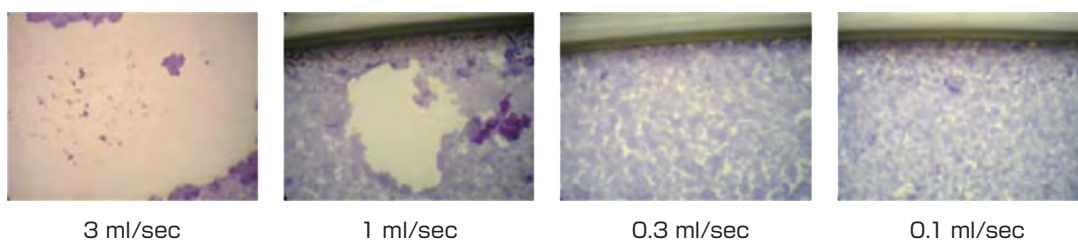


図10 吐出速度と細胞剥離の関係 (293 gp/mL2細胞)

7 今後あるべき研究体制と課題

この開発を通じて、装置開発に限らず、多様な再生・細胞医療の迅速な実現を目指した。この研究分担者が十分な研究実績を持ち、かつ臨床研究が50症例以上と豊富な実績を有する関節軟骨再生医療や、我が国では約40症例の実績を有する骨髄間葉系幹細胞等を用いた顎骨再生を含む歯周組織再生医療、を初期の対象疾患としている。R-CPXシステムにより、この対象疾患に適用できるならば、同じ細胞ソースを利用する脳神経・心筋・脊髄等の「生活習慣病等に由来する難治性疾患」の再生・細胞医療についても探索的臨床試験とその後の事業化に向けての治験の実行を格段に容易とすることができる。

この研究開発は、これまでの研究機関ごと、疾患ごとにバラバラに進められて来たことによる弊害を打破するために、図11に示す「R-CPXシステム開発センター」構想を実現すべく推進した。

この研究開発の推進を通じて、我が国を代表する研究者

とのネットワークが形成されている。また、実用化・事業化のためには、産業界との連携も不可欠である。再生・細胞医療の実現には、細胞調製事業者の役割が大きく、各分野の専門家の人材の厚みが大きく、資金力に富んだ有力企業の参画が不可欠である。この点においても、この研究開発の進展とともに協力体制が構築されて来ている。

また、細胞調製事業者が細胞を調製する上で手作業による培養に頼ったのでは事業化できないのは自明のことであり、各事業者とも自動培養装置の開発を望んでいる。そのためには、装置を構成するさまざまな技術を有する企業コンソーシアムの形成が必要となる。

参考文献

- [1] 紀ノ岡正博: 細胞治療・再生医療における培養システムの役割, *細胞治療・再生医療のための培養システム* (紀ノ岡正博, 酒井康行監修, シーエムシー出版) 3-16 (2010).
- [2] 山本宏: CPCとセルプロセッシング・アイソレータ, *細胞治療・再生医療のための培養システム* (紀ノ岡正博, 酒井康行監修, シーエムシー出版) 265-273 (2010).

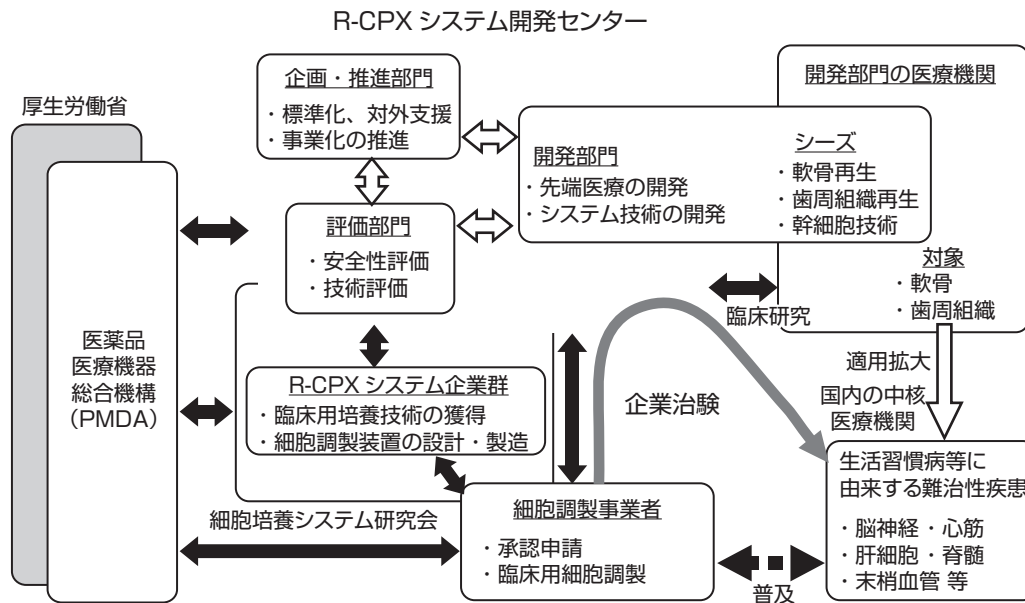


図11 革新的細胞調製システムによる再生・細胞医療を実現するスキーム

執筆者略歴

脇谷 滋之（わきたに しげゆき）

1990年大阪大学大学院医学研究科博士課程修了（医学博士）。同年より、米国ケースウェスタンリザーブ大学研究員、1992年より大阪大学助手、1994年より国立大阪南病院、2001年より信州大学、2006年より大阪市立大学、2011年より武庫川女子大学教授（現職）。骨軟骨再生に関する研究に取り組む。日本整形外科学会会員。このプロジェクトリーダー。この論文では1章、7章を担当した。



田原 秀晃（たはら ひであき）

1983年大阪大学医学部卒業。大阪大学医学部第二外科、大阪府立成人病センター等を経て1991年ピッツバーグ大学医学部外科（Dr. Michael T. Lotze）のResearch Fellowとなる。1992年より同大学外科 Assistant Professorとなり、その後 Pittsburgh Human Gene Therapy Center ベクター部門の部長ならびに分子遺伝生化学科 Assistant Professor も併任。1999年東京大学医科学研究所外科助教授、2000年より東京大学医科学研究所附属病院外科・先端医療研究センター臓器細胞工学分野教授。癌に対する免疫療法と遺伝子細胞治療に関して、基礎的研究および臨床的開発試験を行っている。このプロジェクトのサブリーダー。この論文では3章を担当した。



中嶋 勝己（なかしま かつみ）

1981年京都大学大学院工学研究科修士課程修了。同年、川崎重工業株式会社に入社、技術開発本部にて、ロボットを中心とした自動機械の開発に従事。2009年より、システム技術開発センターMDプロジェクト室長（現職）。自動培養装置の開発に取り組む。日本ロボット学会会員。この論文では、2.1章、2.2章を担当した。



蓮沼 仁志（はすぬま ひとし）

1993年京都大学大学院工学研究科修士課程修了。同年、川崎重工業株式会社に入社、技術開発本部にて、ロボットを中心とした自動機械の開発に従事。2007年より、自動培養装置の開発に取り組む。日本ロボット学会会員。この論文では、2.3章、4.3章を担当した。



下平 滋隆（しもだいら しげたか）

1990年信州大学医学部医学科卒業。1997年信州大学大学院医学研究科修了（医学博士）。2002年、信州大学医学部附属病院輸血部講師。2008年、信州大学医学部附属病院輸血部准教授。2011年、信州大学医学部附属病院先端細胞治療センター長。日本輸血・細胞治療学会認定医、評議員、日本血液学会専門医、指導医。輸血療法、樹状細胞療法に関する研究、自動培養ロボットシステムを用いた再生・細胞治療の開発研究に取り組む。この論文では、4.1章、4.2章を担当した。



小野寺 雅史（おのでら まさふみ）

1986年北海道大学医学部卒。1994年、博士（医学）北海道大学。2001年、筑波大学臨床医学系講師。2009年、国立成育医療センター、研究所・成育遺伝研究部部長、病院・内科系専門診療部免疫科・医長、病院・臨床検査部輸血・組織適合検査室・医長（現職）。小児難治性疾患に対する遺伝子治療臨床研究の実施。日本遺伝子治療学会会員。この論文では、4.4章を担当した。



植村 寿公（うえむら としまさ）

1979年京都大学理学部卒業。1984年大阪大学理学研究科博士後期課程修了（理学博士）。1985年大阪大学理学部職員を経て、1986年通産省工業技術院入所。1989年科学技術庁長期在外研究員（スイス・ETH）。1994年、産業技術融合領域研究所主任研究員。2001年、産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリング研究センター主任研究員、東京医科歯科大学客員教授（2001～2013年）。現在同ナノシステム研究部門上級主任研究員、横浜市立大学先端医科学研究センター客員教授。硬組織における再生医学に関する研究に取り組む。この論文では、4.4章、5章、6章を担当した。



査読者との議論

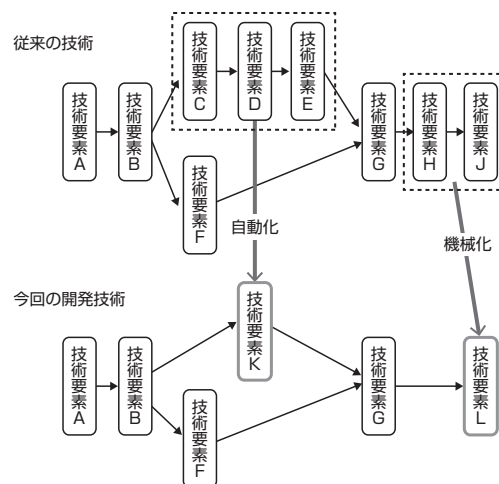
議論1 開発動機、研究目的、技術要素等

質問・コメント（久保 泰：産業技術総合研究所創薬分子プロファイリング研究センター）

細胞調製施設（CPC）がいかに高いレベルでの安全・衛生・品質管理が求められ、その建設から維持運用に至るまでいかに高いコストがかかるか、また確かな熟練技術の要求、今後臨床応用で求められる「量」への対応等、自動培養装置の開発動機や必要性を強く印象づける文章にしてください。さらに、評価2号機に関する実験と結果の記述が詳細過ぎますので内容の絞り込みによる適切な記載をお願いします。

質問・コメント（清水 敏美：産業技術総合研究所）

今回の研究目的は、専用のCPCを設置せずに高品質の細胞試薬を調製できる培養システム（R-CPX）を開発することです。当該分野以外の読者の理解を深めるために、まずどのような技術項目と構成（工程）があり、どこまでが完成しており、今回、自動化、機械化、人介入化等のために、どの技術要素をどのように改変したのかが一目



瞭然で理解できる構成図を作成することを勧めます。さらに、全般にわたって骨子と細部に関する技術が混在しており、読みづらい記述となっています。特に、評価1号機による細胞培養方法、評価方法、評価2号機の接着性細胞の培養評価に関する記述は必要最低限の分量に縮小することを勧めます。

回答（植村 壽公）

このプロジェクトは多方面からの技術開発が統合したプロジェクトであるため、記述に統一性を持たせることが困難であり、全般にわたって読者にとってわかりにくい記述になっていました。まず、1.はじめに、1.1なぜ今、自動培養装置の開発が必要か？、1.2目的、実施体制、研究開発の概要を大幅に書き換えました。また、細胞調製システムの開発ロードマップを参考に、従来技術と今回の開発技術の相関関係を示す技術項目の構成図を図1Bとして追加しました。

議論2 医薬品の製造にかかわる設備、工程管理、品質管理に関する規則GMP

質問・コメント（久保 泰）

GMPに関しては、その承認も含め、いかにこの機器に高い衛生・品質のレベルが求められるかを読者に理解してもらうために解説が必要です。

回答（植村 壽公）

GMPに関して、特にCPCに求められるGMPに関して1章に解説を加えました。

議論3 開発過程での失敗事例や試行錯誤

質問・コメント（久保 泰）

開発過程での失敗事例や試行錯誤、企業や臨床現場からの改善要請の例があれば論文の中で触れてもらうことはSynthesiologyの視野に入っています。あれば論文中に盛り込んでください。

回答（植村 壽公）

苦労話の一つ、新たに5章として、「手作業による培養から自動培

養への飛躍」を設けて記述しました。

議論4 連名著者および各研究機関の貢献

質問・コメント（清水 敏美）

それぞれの技術要素に対する今回、列挙されている各著者および研究機関の役割と貢献を論文中、簡単に紹介してください。

回答（植村 壽公）

連名著者の数は一見多いように見えますが、実際にこのプロジェクトに寄与したメンバーの数はその5倍以上であり、記載した各著者はその中心人物です。このプロジェクトにおいて川崎重工業は企業のミッションとして装置作りを担当し参加しました。他の機関は組織と言うより個人が重要と考えます。各組織の役割やミッションは重要ではなく、他の誰もを持っていない技術を有しているその人の経験、技術が役割であり、ミッションであるとお考えください。著者紹介に各著者の執筆章を記述しましたので、その著者の貢献がプロジェクトのどの部分に相当するかが理解できると思います。

議論5 産総研の技術的貢献と役割、特徴と優位性

質問・コメント（清水 敏美）

このプロジェクトにおける産総研のコア技術の内容と特徴を明確に記述してください。特に、評価1号機と2号機がそれぞれ、信州大学と産総研に設置されています。しかし、それぞれの評価機に対して産総研の技術的な貢献や役割、その特徴と優位性に関して記述をお願いします。

回答（植村 壽公）

産総研の技術的な貢献は一言で言えば、細胞培養に関する経験であると言えます。本自動培養システムは、熟練した技術者が手作業で行う動作と同様の作業を、ロボット、主にロボットアームが行うというコンセプトの元に設計しました。その際に必要であったヒトの動きを、産総研に設置した評価2号機にプログラミングしながら動作確認をすることにより完成に導くことができました。特に、知的財産が関連した訳ではありませんが、とても重要な貢献をしたと考えています。