

Mini Review

接着性細胞の自動培養装置の開発

中嶋勝己¹⁾, 金澤秀和²⁾, 高木 睦³⁾, 脇谷滋之⁴⁾, 稲木誠⁵⁾

¹⁾川崎重工業株式会社

²⁾カワサキプラントシステムズ株式会社

³⁾北海道大学

⁴⁾大阪市立大学

⁵⁾独立行政法人産業技術総合研究所

Development of the automatic cell processing machine for the adherent cell

The automated cell processing machine for use in regenerative medicine applications consists of a clean robot and associated equipment for culturing cells automatically following protocols identical to those carried out manually. The performance of this device is being evaluated at Shinshu University Hospital. As a first step in assessing its usefulness in practice, we also tested this automatic cell culture machine for drug discovery applications. We found that it could be easily used for the culture of many types of cells because of the similarity of the protocol to manual manipulation.

Rec.10/27/2008, Acc.11/18/2008, pp131-134

Katsumi Nakashima¹⁾, Hidekazu Kanazawa²⁾, Mutsumi Takagi³⁾, Shigeyuki Wakitani⁴⁾, and Makoto Inaki⁵⁾

¹⁾Kawasaki Heavy Industries, Ltd.

²⁾Kawasaki Plant Systems, Ltd.

³⁾Hokkaido University

⁴⁾Osaka City University

⁵⁾National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Key words robot, automatic cell processing, adherent cell, image processing

まえがき

再生医療では幹細胞等のヒト細胞を培養, 増殖し, 患者に移植することが多く行われるが, その場合, 対象とする細胞を汚染することなく培養することが重要である. そのために, 細胞培養はCPC (Cell Processing Center) において, GMP (Good Manufacturing Practice) に準拠し行われているが, CPCは建設費, 維持費ともに高価である上, 培養作業にも汚染防止のため, クリーン着の着用, 間違いの防止等, 大きな負担がかかるとともに人件費も過大なものとなっている. 間違いを起こすことなく, クリーンに作業を行うことは, 半導

体作業等で発展したクリーンロボットを中心とした自動機械の得意とするところである. また, 培養作業の途中には顕微鏡観察等を行い, 継代時期等の判断が必要とされるが, 画像処理の技術を使い解決可能である. そこで, 細胞培養の自動化をロボットや画像処理の技術を適用し, 行うこととした. なお, 細胞培養は再生医療のみならず, 創薬等の分野でも重要な技術であり, まずは再生医療分野以外の分野での実用化を目指した. 表1に示すように, 国内外で再生医療の研究用途や創薬用途の細胞の自動培養装置が, われわれ以外にもいくつか製品化されている. 国内5社は専

表1 種々の開発中の本稿以外の自動培養装置¹⁾

タイプ	培養器	継代	滅菌	検体数 ^{*1}	備考	開発社
A	ディッシュ フラスコ	可	不可		クリーンベンチ	ミツテック
B	密閉容器		乾熱	3		メディアット
B	密閉容器	不可	不可	3		丸菱バイオンジ
B	密閉容器	不可			加圧培養対応	高木産業
B	密閉容器	可	不可	1		Cell Force
B	フラスコ			1 ^{*2}	創薬用	The Automation Partnership

タイプ A：人手作業のうち、作業者がクリーンベンチ内で行う作業（培地交換、継代など）に限定した自動培養装置

タイプ B：作業者がクリーンベンチ内で行う作業（培地交換、継代など）のほか、インキュベータとクリーンベンチとの間の培養器の移動や顕微鏡などの作業も含めた自動培養装置

*1; ドナー数、*2; フラスコ数は～100

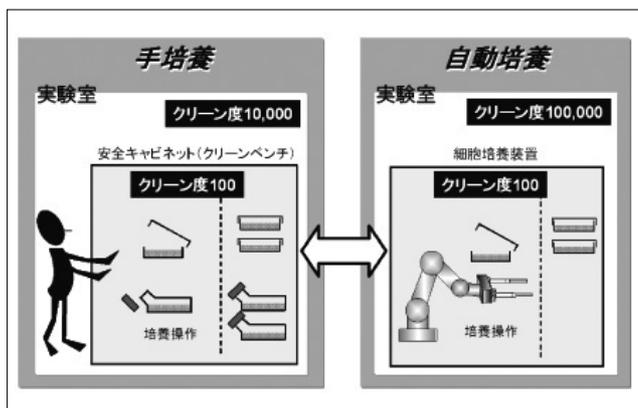


図1 ロボットを使った自動培養装置の概念

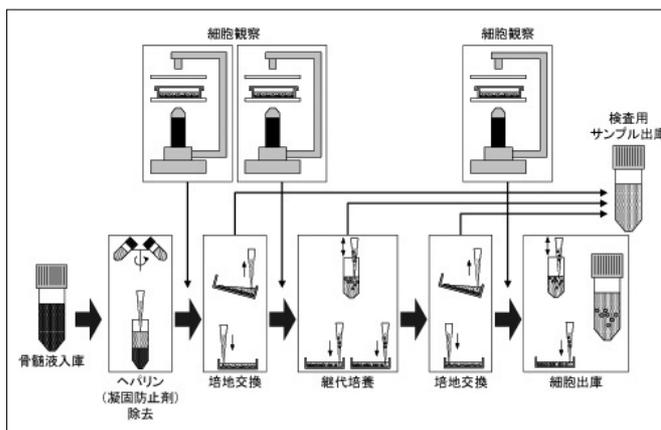


図2 用手法の自動化

用装置であり、培養プロトコルの変更は難しい。The Automation Partnership社は英国企業で、ロボットを使った汎用装置を目指しており、再生医療への適用のための研究開発も行われている²⁾。再生医療はわが国が得意とする医療分野であるので、自動培養装置の開発で、実用化においても世界に先行するものとした。

ロボットを使った自動培養操作

再生医療における細胞培養が自動化される状況を考えると、再生医療が薬事法上、医療として認可され、医療としての実施量が拡大した段階であろう。その場合、認可時点での培養法は用手法であり、自動化においても、その用手法の作業内容の大幅な変更を伴わないことが望ましい。そこで、用手法をできるだけそのままの形で自動化するため、多関節型ロボットを使用することにした。再生医療において、培養時の無菌操作に求められるクリーン度は100（1ft³中に0.5μm以上のパーティクルが100個未満）であるが、使用したロボットのクリーン度は10であり、クリーン度10の空間で

使用しても、クリーン度を悪化させることはない。図1に示すように、用手法では、クリーン度10,000の部屋に置かれた安全キャビネット（内部はクリーン度100）内に、人は手だけを入れ、培養操作を行うが、ロボットはクリーン度100,000の部屋に置かれたクリーン度100以内に維持された筐体内で培養操作を行う。再生医療用の培養装置のガイドラインである「ヒト細胞培養加工装置の設計ガイドライン」³⁾で分類された筐体閉鎖型培養装置の形式を採用しているが、現時点では、全ての項目は満足していない。

培養操作は図2に示すように、ドナーの骨髓液から凝固防止用のヘパリンを除去し、培地に播種する初代培養および継代培養を経て、必要量の細胞が培養された後、細胞を容器から剥がし、細胞懸濁液として出庫する細胞出庫までを自動化の対象とした。培地交換、継代時には培地上清を検査用サンプルとして採取する。また、任意のタイミングで装置外に出すことなく、細胞観察が行える。

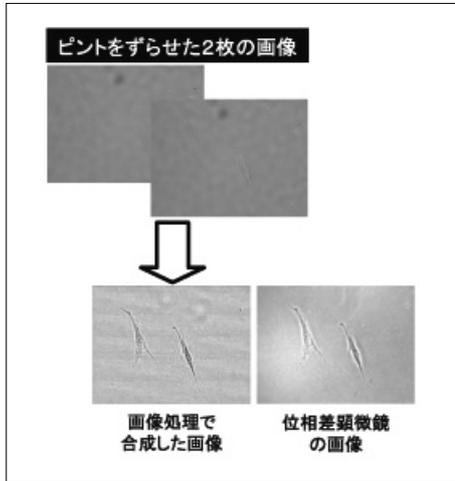


図3 位相情報画像の取得

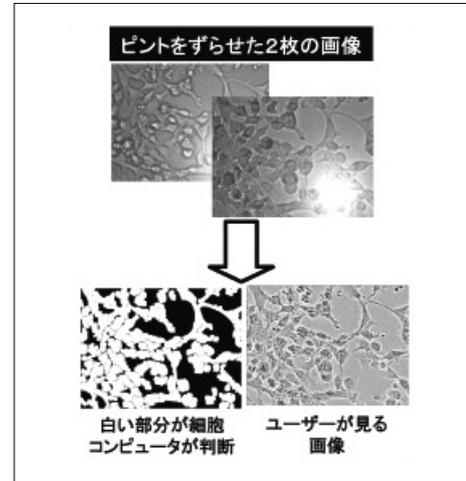


図4 細胞量データの自動取得

画像処理技術を使った細胞観察

細胞は所定の屈折率を持つ位相物体であるが無色透明であるため、通常の光学顕微鏡での観察は困難である。そこで、一般的に位相差顕微鏡を使用して観察することが多い。

しかし、本装置では装置内に位相差顕微鏡を持ち込むことなく、産業用のCCDカメラと高倍率のレンズを組合せたシンプルかつ装置外に設置できる構成（光学顕微鏡と同じ構成）とし、画像処理によって、位相差顕微鏡相当の画像（位相情報画像）を提供する方式を採用した。

図3に、本方式で得られた位相情報画像を示す。合焦点位置から前後にずらした位置で撮像した2枚の画像は、一部のみに焦点が合った画像となるが、その輝度差画像を作成することで、近似的に位相のラプラシアンを表す位相情報画像が得られる。

この原理は、1984年に Streibl らによって提唱された TIE (Transport of Intensity Equation) 法⁴⁾に基づいている。

TIE 法:

$$\frac{2\pi}{\lambda} \frac{\partial}{\partial Z} I_{(xyz)} = -\nabla_{xy} \cdot (I_{(xyz)} \nabla_{xy} \phi_{xyz})$$

λ : 波長 I : 光の強度 ϕ : 光の位相

細胞は位相物体のため光の減衰がないと仮定すると、合焦点位置 Z_0 において $I_{(xyz_0)}$ は一定となる。つまり、

$$\frac{\partial}{\partial Z_0} I_{(xyz_0)} \propto \nabla_{xy}^2 \phi(xyz_0)$$

∇_{xy}^2 : 2次元のラプラシアン

左辺は合焦点位置における光強度の光伝播方向の微分を表しており、合焦点位置前後で撮像した2枚の画像の輝度差

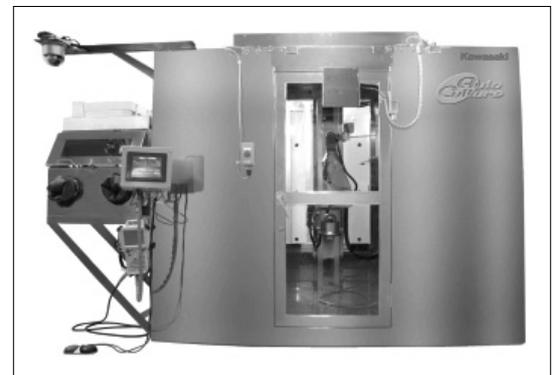


図5 再生医療向けに試作した自動培養装置

に相当する。これが右辺の表す位相のラプラシアンとなる。

また、同様にピント位置をずらした2枚の画像を処理し、細胞形状を検出した画像を図4に示す。細胞が存在する場所を白、ない場所を黒と二値化することで、コントローラが細胞量データを自動取得することを可能とした。今後、継代時期の自動調整や出庫時期調整、さらには細胞分化を含めた細胞の非侵襲的品质検査⁶⁾に使用したい。

実証試験

図5に示す再生医療用の自動細胞培養装置を試作し、信州大学医学部付属病院先端医療センターにあるCPC内に設置し、実証試験を実施している。ドナーから採取した骨髄液と自己血清を使用し培養を行うが、培養した細胞を移植には使用しない非臨床試験である。



図6 創薬向けに開発した自動培養装置

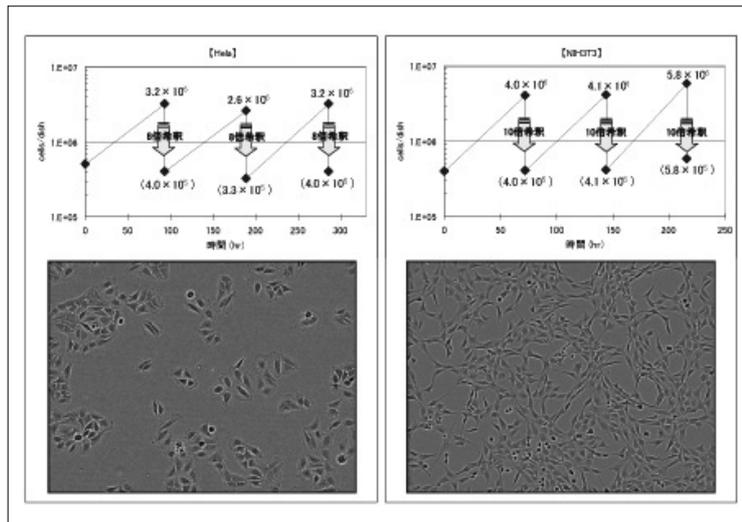


図7 継代培養の結果

自動培養装置の実用化

国内の再生医療は、再生皮膚が認可されたのみであり、自動培養装置を必要とする段階までには時間がかかるとされる。そこで、今回開発した技術を一般の細胞培養用としても実用化することにした。

製薬における薬品開発のプロセスである創薬においては、多数の化合物ライブラリから対象とする疾病に適した化合物を選択する何段階かのスクリーニングのプロセスがあり、化合物を選別するための道具として細胞を使用する。スクリーニングは1次、2次、高次と行われるが、1次は化合物選別にタンパク質を主体に使用し、2次、高次では細胞を主体に使用する。特に高次においては多種類の細胞を必要とする。

図6に示す創薬用に開発した自動培養装置は、用手法をそのまま自動化したので、自動化への移行作業が容易であるという特徴を持つ。培養操作を決めるパラメータがユーザーに公開されており、自由に決めることができる。用手法に近い形で自動化が行われているため、パラメータは用手法、ほぼそのまま決めることができ、高次スクリーニングで必要とされる多種類の細胞の培養自動化が容易に実現可能である。

自動培養装置を産業技術総合研究所に設置し、創薬用に使用される各種細胞を培養する実証試験を実施している。継代培養した細胞のデータと画像(図7)に示されるように、極めて安定した培養が実現できた。この培養時には、画像処理装置で得られた画像を見て継代のタイミングを判断した。

まとめ

再生医療の実用化には細胞自動培養装置が必要である。クリーンロボットを使い、用手法をできるだけそのままの形で自動化した。現在、非臨床の実証試験を実施中である。

自動培養装置の実用化の第一段階として用手法に近い特徴を生かし、多様な細胞への適用が容易に行える創薬向けの培養装置も開発した。実証試験を実施し、安定した培養が実現できた。

謝辞

自動培養装置の開発は独立行政法人科学技術振興機構の委託開発事業で実施したもので、その装置を使用した培養法の開発は独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構の健康安心プログラムで開発を実施中である。これらの開発における関係各位に謝意を表す。

文献

- 1) 高木 陸：セルプロセッシング工学。コロナ社、東京、2007、pp126-129。
- 2) Thomas RJ, Chandra A, Hourd PC, Williams DJ: Cell Culture Automation and Quality Engineering: A Necessary Partnership to Develop Optimized Manufacturing Processes for Cell-Based Therapies. JALA, 13(3): 152-158, 2008.
- 3) http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/service/iryoku_fukushi/index.html
- 4) Streibl N: Phase imaging by the transport equation of intensity. Opt Commun, 49: 6-10, 1984.
- 5) 王子 修, 中村洋一, 金丸孝夫, 土井利尚: 位相物体検出装置及び位相物体検出方法, 特許公開 2007-155982.
- 6) Takagi M, Kitabayashi T, Koizumi S, et al: Correlation between cell morphology and aggrecan gene expression level during differentiation from mesenchymal stem cells to chondrocytes. Biotechnol Lett, 30: 1189-1195, 2008.