

Mini Review

再生医療ビジネスにおけるバイオプロセッサの役割

渡辺節雄

高木産業株式会社 メディカル推進室

The roles of the Bio-Processor in regenerative medicine

Cell-based therapy is of increasing interest in regenerative medicine. A major component for the therapy includes a three-dimensional cell construct that is engineered with differentiated cells and a cell carrier. In order to produce the cell construct, cell culture technology has been developed covering regulatory requirement for clinical applications. In general, the cell construct is built with high cell density and substantial amount of extracellular matrix to replace degenerative or defect tissue. Thus, the construct needs to promote cell proliferation and matrix production. We have developed a novel hydrostatic pressure/perfusion culture processor, Bio-processor, to fulfill those requirements. The Bio-processor is composed of an independent closed culture unit and a mechanical control unit. It allows for the application of hydrostatic pressure, replenishment of medium, and control of gases in the culture medium. Those specificities are unique and useful to incubate a cell construct. In addition, it has various modes to incubate cells automatically and safely and to record a culture process for quality assurance. The hydrostatic pressure and low oxygen concentration increased cell proliferation and matrix accumulation in a construct by articular chondrocytes. Based on this evidence, the Bio-processor has been used for the treatment of articular cartilage regeneration in the knee at a biotech venture. The Bio-processor can be explored for research and development as well as cell processing business in regenerative medicine.

Rec.1/8/2009, Acc.2/16/2009, pp270-273

Setsuo Watanabe

Medical Technology & Business Development, Takagi Industrial Co., Ltd.

連絡先：

渡辺節雄，高木産業株式会社メディカル推進室，静岡県富士宮市上井出字見返 3508 番地

TEL: 0544-54-3011, FAX: 0544-54-3014, e-mail: wata0472@purpose.co.jp

Key words regeneration medicine, physical stimuli, pressure/perfusion culture, cell construct, closed culture system

細胞を用いる再生医療と細胞培養装置

現在，再生医療は，研究レベルから実際の治療のレベルに至るまで幅広く研究開発されている．細胞を培養して目的

の細胞や組織に作り上げていく過程では，温度やガス濃度を一定に保つ CO₂ インキュベーターや，さらに細胞を効率よく増殖させ，あるいは細胞代謝物質を効率よく生産させ

るためにバイオリアクターが利用され、最近では、せん断応力、灌流、引張り応力、静水圧、圧縮応力など細胞に物理的な作用を与える装置も利用されている。また、加圧装置を使った加圧パターンの違いによる軟骨細胞培養の効果についての報告などもある²⁾。その他、培養手順を自動で行う自動培養装置も利用されつつある。例えば、作業者を細胞培養空間から隔離する閉鎖型ヒト細胞培養システム³⁾、あるいはクリーンな環境の閉鎖系培養空間でクリーンロボットにより自動運転する細胞自動培養装置や培地などの交換を閉鎖的かつ自動的にハンドリングする幹細胞自動培養装置などがある⁴⁾。ただし、バイオリアクターや物理的作用を与える装置は自動化がなされておらず、自動培養装置は物理刺激について配慮がされていないのが現状である。再生医療で治療しようとする組織は多岐に亘っており、培養装置に望まれる要求事項も多種多様である。本稿では、我々が開発し、実際の再生医療の現場で使用されている培養装置を紹介しながら、再生医療全般に共通する問題に焦点を当てて、培養に係わる装置のあるべき姿について論ずる。

新生組織の培養とその問題点

通常の平面培養では、細胞を継代することによって細胞の機能が維持されず変化してしまうという問題がある。細胞によっては、スキャフォールド等を用いて三次元の細胞構成体（以下「構成体」と記す）を形成して培養すると、本来の機能を維持することができる場合もある。こうしてできた移植用の新生組織（以下「新生組織」と記す）を損傷あるいは欠損した組織と置き換えようとした場合、新生組織は豊富な細胞と細胞外基質を持ち、本来の組織に融合して同等の機能を発揮することが望まれる。ところが、新生組織には多くの細胞が密集することは可能であるが、その内部では細胞が壊死してしまうということもある。そもそも、*in vitro*での培養時の構成体には血管がなく、さらに増殖や細胞外マトリクスの増加によって栄養分が内部に届きにくくなるという問題がある。また、生体の組織内の酸素濃度は、大気中の酸素濃度より低い、大半の細胞培養は、本来の酸素濃度で培養されていないという問題がある。一方、医療に利用するための細胞培養はGMP管理下で遂行されなければならないというガイドラインに沿わなければならない。

新生組織培養の問題点の解決策

構成体を培養する上での問題点解決の手段として、細胞の存在する生体内の生理条件、特に物理刺激を再現して培養しようとするコンセプトがある。その物理刺激の代表例としては、圧力とガス濃度が考えられるので、その二点について論ずる。

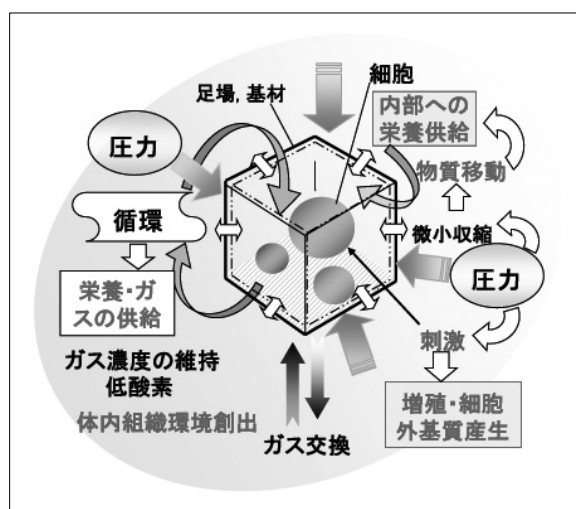


図1 加圧循環の作用・効果の概念図

1) 圧力の作用

圧力の高低を問わなければ、体内のあらゆる臓器や組織、細胞は圧力を受けている。そこで培養時にも圧力を加えるなら、本来の細胞・組織に、より近い新生組織が得られるのではないかと期待される。歩行や荷重によって圧力を受ける軟骨細胞では、静水圧による刺激によって細胞が応答するという報告がある⁵⁾。圧力を構成体に加えると、構成体は歪むことなく圧力に応じて僅かな膨張収縮をする。この膨張収縮が栄養分や老廃物などを少しずつ移動させる推進力となり、栄養物が構成体内を移動することにより内部にまで供給され、老廃物も移動して構成体外に滲出し、高密度培養を可能にすると考えられる。例えば線維芽細胞の培養において、圧力を加えることによって、構成体内部まで細胞が密集し、なおかつ、細胞外基質も概ね均一に産生されるという報告がある⁶⁾。圧力の直接作用を検証した報告はあまりないが、今後、その重要性について解明されることが期待される。

2) ガス濃度の最適化

生体の組織内の酸素濃度も組織によって異なり、概して大気中の酸素濃度より低い。しかし、低酸素濃度で培養を試みた例はまだ少ない。今後、組織に応じたガス濃度で構成体を培養して再生医療用組織の開発をすべきである。そのためには、酸素や炭酸ガス濃度が最適に保たれた新鮮な培養液を供給する必要がある（図1）。幹細胞培養などでは、低酸素が当たり前のように行われるが、今後、酸素濃度にも配慮した研究が期待される。

治療用新生組織の製造に要求される技術

治療に用いる新生組織を製造する場合には、培養装置に

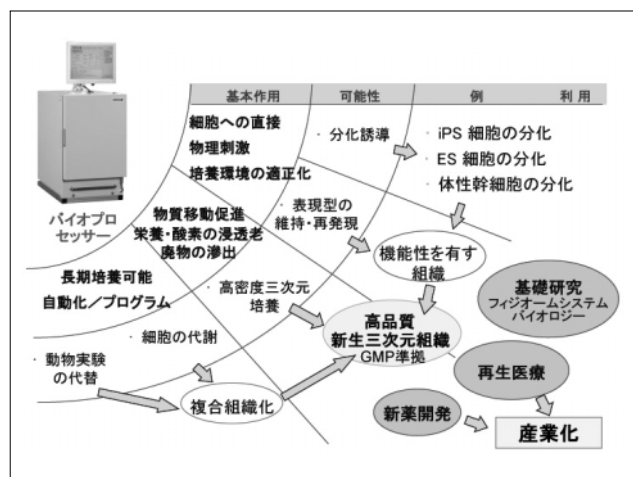


図3 バイオプロセッサの作用・用途・可能性

たという報告がある⁸⁾。培養された新生組織は、関節軟骨様を呈しており、関節軟骨特有のⅡ型コラーゲンや硫酸化グリコサミノグリカンなどの蓄積が見られる。製造された新生組織は、品質チェックされた後、臨床サイトに送られ、患者に移植されている。現在、培養チャンバーは、直径 50mm 厚さ 5mm 程度の大きさの構成体を収容可能となっており、関節軟骨の再生には、充分な大きさである。今後、軟骨以外の構成体を培養したい場合、圧力を考慮に入れて、さらに大きな培養チャンバーを設計することも可能である。

2) バイオプロセッサの可能性と役割

運用例として、軟骨の再生を取り上げたが、バイオプロセッサのコンセプトから見て、これだけにとどまらず、様々な可能性が考えられる。圧力の刺激作用の面では、高い圧力環境にある組織、例えば関節軟骨、骨、歯、などに応用の可能性がある。一方、物質移動の作用の面から言えば、広く種々の三次元組織の培養に期待がかかる。また、胚様体を分化過程で形成する ES 細胞、iPS 細胞などへの応用も期待される。この他、三次元組織を長期培養できることから、新生組織の代謝機能を計測するなどして、創薬の開発でも応用が期待される (図3)。さらに、培養に係わる他の装置、例えば細胞分離装置、あるいはマニピュレーター、画像処理装置などと連携させ、さらなる自動化を推し進めるとい

可能性もあるだろう。このようなバイオプロセッサが種々の細胞・組織の再生に用いられ、再生医療の事業において重要な役割を果たし、再生医療に貢献することを期待するものである。

文 献

- 1) Schulz RM, Bader A: Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur Biophys J*, 36(4-5): 539-568, 2007.
- 2) Smith RL, Rusk SF, Ellison BE, Wessells P, Tsuchiya K, Carter DR, Caler WE, Sandell LJ, Schurman DJ: In Vitro Stimulation of Articular Chondrocyte mRNA and Extracellular Matrix Synthesis by Hydrostatic Pressure. *J Orthop Res*, 14(1): 53-60, 1996.
- 3) 金村米博, 森英樹, 兼松大介, 山崎麻美: ヒト神経幹細胞の大量培養・品質評価技術の開発. *生物工学*, 83(9): 427-429, 2005.
- 4) 中嶋勝己, 土井利尚, 王子修: 再生医療用細胞培養の自動化技術. *生物工学*, 85(10): 432-434, 2007.
- 5) Mizuno S: A novel method for assessing effects of hydrostatic fluid pressure on intracellular calcium: a study with bovine articular chondrocytes, *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(2): C329-C377, 2005.
- 6) Mizuno S, Watanabe S, Takagi T: Hydrostatic fluid pressure promotes cellularity and proliferation of human dermal fibroblasts in a three-dimensional collagen gel/sponge. *Biochem Engineering J*, 20(2-3): 203-208, 2004.
- 7) Watanabe S, Inagaki S, Kinouchi I, Takai H, Masuda Y, Mizuno S: Hydrostatic pressure/perfusion culture system designed and validated for engineering tissue. *J Biosci Bioeng*, 100(1): 105-111, 2005.
- 8) Kusanagi A, Mascarenhas AC, Blahut EB, Johnson JM, Murata T, Mizuno S: HYDROSTATIC PRESSURE WITH LOW OXYGEN STIMULATES EXTRACELLULAR MATRIX ACCUMULATION BY HUMAN ARTICULAR CHONDROCYTES IN A 3-D COLLAGEN GEL/SPONGE, 51st Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Washington DC, 2005.