

Mini Review

再生医療を目指した間葉系幹細胞自動培養装置「ゆりかご」の開発

坂井将典^{1,*}、桂 由紀¹⁾、吉橋久男¹⁾、原真依子¹⁾、山縣敏彦²⁾、
加藤幸夫^{1,3)}、辻紘一郎¹⁾

¹⁾株式会社ツーセル

²⁾株式会社丸菱バイオエンジニア

³⁾広島大学大学院医歯薬学総合研究科

Development of useful automatic cell culture system 'YURIKAGO' for regenerative therapy

We accomplished the following three very important break-through 1) we established technology for Superproliferation of MSC and developed Automatic cell culture system, 2) we conducted pre-clinical tests in animal experiments designed for dental applications and 3) we participated and supported clinical research into actual treatment of periodontal disease.

We developed Automatic Cell Culture system for mesenchymal stem cells(MSC) 'YURIKAGO' in 2007. The system has various characteristics 1) size is smaller than other system, 2) weight is lighter than other systems, 3) culture program is all automatic (culture, passage and harvest) and 4) we can proliferate MSC for the vast numbers required for treatment with having kept retention of multilineage differentiation potential. The key to this system is original MSC proliferation technology obtained by TWO CELLS that utilize basic Fibroblast Growth Factor(bFGF) that takes a few MSC and produces the vast numbers required for treatment. It is a wish that an intractable disease can be treated using our system and MSC.

Rec.1/6/2009, Acc.5/11/2009, pp329-332

Masanori Sakai^{1,*}, Yuki Katsura¹⁾, Hisao Yoshihashi¹⁾, Maiko Hara¹⁾,
Toshihiko Yamagata²⁾, Yukio Kato^{1,3)}, and Koichiro Tsuji¹⁾

¹⁾TWO CELLS Co., Ltd.

²⁾B.E.MARUBISHI Co., Ltd.

³⁾Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

*連絡先:

坂井将典, 株式会社ツーセル, 〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3 広島大学霞総合研究棟 306

TEL/FAX: 082-257-5749

Key words regenerative therapy, mesenchymal stem cell, automatic cell culture system,
basic fibroblast growth factor

はじめに

現在、多能性幹細胞 induced Pluripotent Stem (iPS) 細胞をはじめとする幹細胞を用いた再生医療が注目を集めており、難病を抱える患者は、再生医療により難治性疾患の治療が可能となることを渴望している。難治性疾患として、肝硬変、糖尿病、歯周病、変形性関節症や脊髄損傷が挙げられるが、その根本的治療方法は、今日まで確立できていない。

難治性疾患の治療を目指し、幹細胞を用いた研究が全世界で行われているが、その中でも、患者自身の体（組織）から採取・分離が可能な間葉系幹細胞 Mesenchymal Stem Cell (MSC) は、骨・軟骨・脂肪等への分化能が知られており、Embryonic Stem (ES) 細胞のような倫理的な問題がなく、また、iPS細胞のような遺伝子導入や特別な処理が不要なため、最も再生医療の事業化に近い細胞であると考えられている。

そこで我々は、難治性疾患の治療を可能とする治療法を開発するため、細胞を用いた再生医療にどのような課題があるかを検討した。その結果、細胞治療にはさまざまなハードルがあることがわかってきた。例えば、薬剤による治療に比べ、対象が生き物（細胞）であることから品質管理や品質保証が難しく、細胞のデリバリーにも課題がある。細胞治療には、細胞の規格や品質管理による保証が求められるが、その品質管理が非常に難しく、どの企業、病院も細胞治療の事業化・普及に悪戦苦闘しているところである。我々は、細胞を用いた再生医療の事業化・普及のため、細胞培養技術の確立と効率化が基本であると考え、10年間の開発経緯を経て、培養の自動化に取り組み、3年前に商品化に成功した。すなわち、幹細胞培養の工程を閉鎖環境下で一定に管理し、安定して供給できるシステムを開発したのである。

通常、細胞の培養は、細胞培養の経験者がクリーンな培養室に設置してある安全キャビネット内で時間をかけて行わなければならないため、作業員や作業スペース等の要因により、しばしば細胞の性質にばらつきが生じてしまう。その結果、治療効果にばらつきが生まれる可能性があり、最悪の場合は、治療を途中で中断しなければならない。また、作業を管理する人間が必要となるため、一検体の培養にかかる人件費も非常に高額となってしまう。その上、培養中にはさまざまな疾患を抱えた患者由来の検体を扱う可能性があるため、作業員が検体由来の感染症に感染する危険性が生じてしまうのが現状である。そのため、可能な限り作業員が細胞に触れない作業工程であることが望ましい。

このような課題を解決するため、日本国内では、弊社の幹細胞自動培養装置「ゆりかご」を含め、川崎プラントシステムズ社、高木産業社、メディネット社等がさまざまな用途の自動培養装置を開発しており、再生医療の事業化を推進している。対象となる細胞や培養方法等は異なるが、品質管

理、安全性の確保、コスト削減といった共通の目的を持っている。

自動培養装置開発の経緯

開発の始まりは、広島大学大学院医歯薬学総合研究科の加藤教授らの発明と、MSCの培養方法など再生医療に有用な特許群の集積である。試験管内で骨髄・骨膜、口腔組織由来のMSCを骨分化能を維持したまま超増幅させる技術を開発し、動物実験における歯周病モデル（イヌ）、関節症モデル（ウサギ）で、欠損した歯、関節の再生、修復に成功した。この成果を基に、再生医療の推進のため、JST プレベンチャー制度によりバイオベンチャー企業株式会社ツーセルを立ち上げ、自動培養装置等の研究開発がスタートした。

近年、いろいろな業界において、業務の簡素化、簡略化は必須であり、その一環としての機械化はコスト面、安全性の確保の面、品質管理面で重要な意味を持つ。細胞培養の一連の作業を自動化（機械化）することにより、人件費の削減、作業員の作業中の事故（ウイルス感染）の危険性を減少させ、また、細胞の治療効果の一定化、製品としての管理を可能とする。現在までに、数社の企業が再生医療の事業化を試みているが、細胞の品質管理をどのように行うか、治療効果の評価、保証をどのように行うかが事業化成功の鍵である。細胞は、培養環境や手技に大きく左右されて、その性質が容易に変化してしまうことから、非常にデリケートな扱いが要求される。そのため、だれが培養するかで細胞を移植した後の治療効果にまで、影響が及んでしまう。

また、コストの面で患者の負担は大きく、普及が進むような金額で治療ができるようになるためには、まだまだ時間がかかってしまうことが問題である。

再生医療は、現在一般的に行われている対症療法と違い、予防医療や根治療法を可能にする治療法である。患者自身の細胞を移植するため、免疫的な拒絶がなく、効果的な治療を行うことが可能である。また、MSCには免疫寛容の作用があると言われており、他家（同種間）での移植も多く研究者により検討されており、事業化が進んでいる。

自動培養装置の構成と性能

我々が開発した、間葉系幹細胞自動培養装置「ゆりかご」（図1a,b）は、以下の特徴を備えている。

- ・ 1検体（培養細胞）1インキュベーター方式
- ・ 検体に触れる箇所のディスポーザブル化
- ・ 未分化なMSCを大量に培養することが可能
- ・ 細胞、骨髄液播種以降の培地交換、継代、回収を自動化
- ・ 培養工程、培養時の異常を記録保存

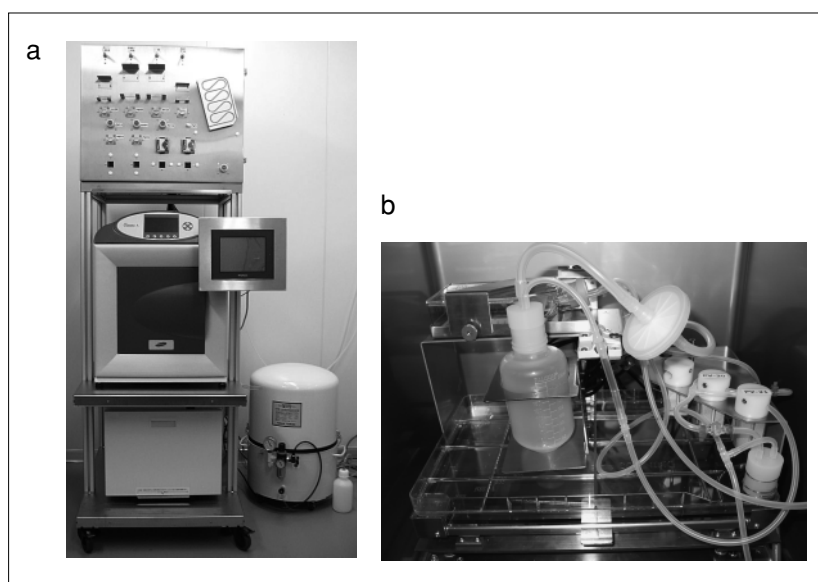


図1 a,b 間葉系幹細胞自動培養装置「ゆりかご」

すなわち、検体同士の相互感染を防止するため、1つの装置で培養するのは1検体のみである。また、検体や培養試薬が触れる経路をディスポーザブル化している。細胞、骨髓液播種以降の培地交換や、継代、回収作業を自動で行い、MSCを取得することが可能である。

また、「ゆりかご」は線維芽細胞増殖因子 basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) を用いたMSCの超増幅法を採用しており、未分化なMSCを通常の培養方法に比べ、1,000～10,000倍多く増殖させることが可能となっている。腸骨由来骨髓液を用いて、 1×10^7 個以上の細胞を得ることが可能である。

また、さまざまな培養環境に適応できるよう、スリム化・コンパクト化に努め、現在の装置を完成させている。非常にコンパクトな装置であるため、設置場所での組立をほとんど必要とせず、簡単に設置を完了することができる。また、作業者に負担を与えないことを念頭に置き、シンプルなシステムを追求している。多機能を持たせることは便利であるが、人為ミスを生むため、極力必要なシステムのみに終始した構成となっている。

「ゆりかご」を含む数社の自動培養装置は、サイズや用途等さまざまな点が異なっており、それぞれの特徴を生かすことにより、再生医療への応用が可能となる(表1)。

「ゆりかご」の性能を確認するため、腸骨由来骨髓液、ヒト凍結骨髓単核細胞を用いて、培養を行った(表2)。得られた細胞は無菌性を担保するため、5種類の項目に関して菌感染否定試験を行った。好気性菌、嫌気性菌、糸状性真菌およびマイコプラズマについて、陰性であることを確認した。また、エンドトキシンについても検出限界値以下であることを確認した。

表1 各社の自動培養装置について

メーカー	対象細胞		特徴
ツールセル	骨髓由来間葉系幹細胞	単検体用	未分化細胞の大量培養
川崎プラントシステムズ	接着系細胞	複数検体用	クリーンロボットによる複数検体の培養
高木産業	軟骨細胞	単検体用	圧力培養
メディネット	リンパ球	多検体用	複数検体培養、乾熱滅菌

表2 培養成績

サンプル名	age	sex	由来	播種濃度 (単核細胞数) cells/cm ² (ml)	培養日数 Day	収穫細胞数 cells(継代数)
R52	34	male	腸骨骨髓	$1 \times 10^5(0.28)$	29	$3.4 \times 10^7(P2)$
R69	65	female	腸骨骨髓	$1 \times 10^5(0.19)$	30	$1.7 \times 10^7(P2)$
070702B	26	male	腸骨骨髓凍結単核細胞	$1 \times 10^5(0.3)$	27	$2.3 \times 10^7(P2)$
3095A	34	female	腸骨骨髓凍結単核細胞	$1 \times 10^5(0.3)$	25	$2.8 \times 10^7(P2)$

まとめと今後の展開

以上のことから、我々は当初3台の試作と試運転を繰り返して、小型化や汚染防止のための改良を行い、培養液等の計量方法をはじめとするさまざまなプロセスを自動化し、間葉系幹細胞用の自動培養装置「ゆりかご」を完成させた。

今後は、我々の持つ「ゆりかご」と、再生医療の実現に必要なと考えられる無血清培地、細胞の品質管理システム等を複合的に活用し、幹細胞を用いた再生医療の重要性、有効性、安全性を証明していきたいと考えている。

文 献

- 1) 平成 18 年度科学技術調査研究助成「産学官連携によるイノベーション創出の成功要因に関する調査研究」報告書. 平成 20 年 3 月, 社団法人新技術協会.
- 2) Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y: Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun*, 288(2): 413-419, 2001.
- 3) Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Igarashi A, Oda R, Nishimura M, Saito M, Nakagawa K, Yamanaka K, Miyazaki K, Shimizu M, Tsuji K, Nakamura K, Kato Y: Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *JBMR*, 20(3): 399-409, 2005.
- 4) Ishii M, Koike C, Igarashi A, Yamanaka K, Pan H, Higashi Y, Kawaguchi H, Sugiyama M, Kamata N, Iwata T, Matsubara T, Nakamura K, Kurihara H, Tsuji K, Kato Y: Molecular Markers Distinguish Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 332(1): 297-303, 2005.
- 5) Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, Hiraoka H, Oda R, Nishimura M, Nakamura K, Kato Y: A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun*, 313(3): 503-508, 2004.
- 6) <http://www.khi.co.jp/mechamd/catalog.pdf>
- 7) http://www.purpose.co.jp/a_saisei/kaatu_sys.html
- 8) http://yakkei.jp/news/lfx-yakkei_news_detail-id-4.htm