

移植を前提とした培養組織生産に向けた生物化学工学的アプローチ

大阪大学大学院基礎工学研究科化学工学領域 紀ノ岡正博

E-mail: kino-oka@cheng.es.osaka-u.ac.jp

Web: http://www.cheng.es.osaka-u.ac.jp/tayalabo/

はじめに

組織工学における基礎研究は、図1に示すように、細胞増殖および分化のための培養環境の調整(細胞, 足場, シグナル伝達因子の調和)を目指してきた。実践研究として、組織工学の飛躍的な進展により、ヒトの皮膚、軟骨等の細胞を分離・培養し、*in vitro*で組織の再構築を行った後、患者の患部に移植する再生医療技術が開発されてきた。組織工学製品の創出を望む現在では、基礎および実践研究を橋渡しする工学的な展開研究も重要となってきた。特に、培養工学的観点から鑑みると、現状の培養組織作製は、洞察力に長けた熟練オペレータの手作業によるもので、産業規模での生産には不向きとなっている。細胞培養に対するハード・ソフト両面からの自動化システムに対する開発は、観察および予測する能力を含む洞察力を模擬することを意味し、手工業的に生産している組織製品の高品質かつ計画的生産を可能にすると考えられる。ここでは、培養組織の生産における特徴および、角化細胞を用いた表皮シート形成での研究成果を中心に紹介する。特に、培養操作の自動化を目指した要素技術として、培養経過からの情報取得・処理法(細胞診断技術)、情報を利用した培養予測(予測・規格化技術)、予測に基づく操作・装置の工夫(操作・装置設計)の各項目について示す。

1. 培養組織の生産

自家培養移植(患者自身の細胞を用いた移植)もしくは、他家培養移植(ドナーの細胞を用いた移植)を前提とした培養組織の生産では、図1に示すように、患者もしくはドナーから組織片を最小必要量で採取し、目的とする細胞を分離する。得られた細胞を小型の培養容器に播種し、初代培養を行う。培養面への接着を伴う足場依存性細胞は容器内において単層状態で増殖する。細胞が培養面をほぼ全面を覆ったとき、接触阻害により細胞分裂が停止するため、酵素処理により培養面から細胞を剥離して再懸濁し、他の複数の培養容器に再播種する(増幅培養)。細胞は再び培養面に接着し単層状態で増殖するが、この一連の増幅(継代)培養においては、細胞寿命や脱分化などの細胞の質が変化するため継代の限界が存在する。また、細胞数を十分に確保した後、三次元的な機能化(組織)培養を行う。機能化培養においては、コーゲンスポンジなどのスキャフォード(足場)の中に細胞を包埋し、自己組織化(分化)を誘導し、組織再構築をさせる。目的の培養組織に応じて力学的、生理的な機能を得た後、患者の患部に移植を施して治療を目指す。

従来の化学プロセス(コモンケミカル産業)は、図2に示すように、反応工程を伴うスケールアップと生成物の精製工程を伴う単位操作から成り立つ。さらに、ファインケミカルや薬品などの製造工程では、反応工程の前に、原料の選別工程を設けることで、反応における選択性を高めることが一般的である。一方、組織工学製品の製造工程では、原料は患者自身もしくはドナー由来の細胞で、生成物自身が直接製品となるために精製工程を経ることができず、製品の品質向上を伴った反応(培養)工程とする必要がある。さらに、プロセスの特徴としては、(1) 患者ごとに(あるいは採取部位ごとに)細胞の活性や寿命が変化したり、採取した細胞集団(原料)も不均一であることを許容せざるを得ない。(2) 培養容器内では、気・液・固各相も不均一である。(3) 多回の回分操作のため、途中で細胞の剥離、接着、伸展増殖、立体化などの操作を含み、これらは細胞の状態を把握しながら実施される。(4) 個々の患者に対応した生産スケジュールを立てる必要がある。(5) 全ての工程でクロスコンタミネーションなどのヒューマンエラーは許されない。これらは、微生物培養とは多くの点で異なったテーラーメイド的な生産プロセスであり、培養中の定量的評価に基づく情報(指標パラメータ)による安定したプロセス設計が望まれる。

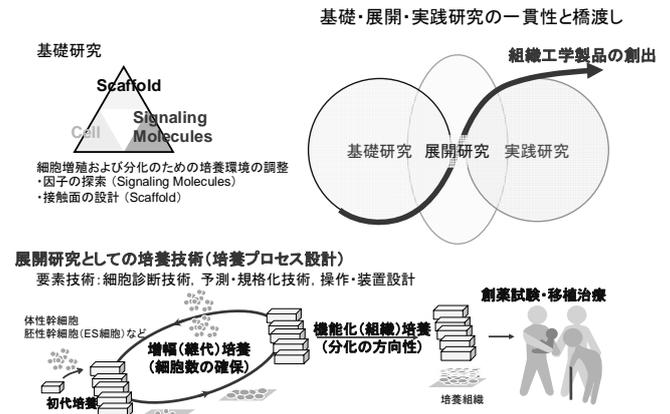


図1 組織工学製品の創出

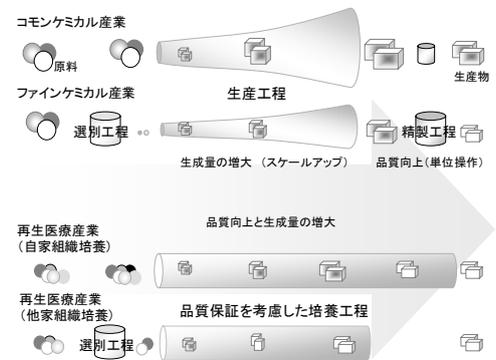


図2 生産工程の比較

プロセス設計・開発は、主に以下の手順で行われる。(1) **細胞診断**(細胞特性の工学的解釈):細胞に対する最適な培養操作を可能とするため、生物的要因(細胞集団の不均一性など)を利用可能なプロセスパラメータで整理する。(2)**予測・規格化技術**(計算機を用いた仮想培養):細胞の状態を特徴づける細胞内因子に基づいて個々の細胞特性を考慮し、培養中の細胞数変化、組織構造変化を表現する数学的モデルを構築する。その際、細胞の接着、伸展増殖から分化・組織化まで培養プロセス全般にわたる速度論を確立する。(3)**操作・装置設計**(培養指針の策定およびプロセスの効率化・自動化):基礎的知見をもとにバイオリアクターを設計し、培養過程のモニタリングツールや組織内での細胞分布シミュレーターを具備させることで、細胞の動態を常時監視するだけでなく、人為操作の極力少ない培養システムを構築する。さらに、一連の培養を自動的に行う生産プロセスを構築するため、細胞状態量変化のオンライン測定とコンピュータ援用技術を統合することにより、培地交換、分化誘導時期、培養停止等、培養スケジュールの最適化を図る。

2. 細胞診断技術

実生産における多くの培養は、比較的少量(100cm³まで)で行われ、複数株での培養が要求されるため、いわば少量多品種での生産様式がとられる。その結果、培養容器としては、小型、単純でかつディスプレイサブルなものが多い。しかし、どのような単純な培養容器の培養においても、細胞を取り巻く環境を厳密に制御しつつモニタリングを行うことが必要となり、非襲撃かつ非破壊のセンシングツールの開発が望まれている。

観察手法は図3に示すように、静的評価を可能とするエンドポイント観察と動的評価を実現する継時変化(タイムラプス)観察に大別でき、それぞれ、操作性、得られたデータの質の特徴を有する。研究や生産の現場では、日々熟練オペレータが、細胞形態を顕微鏡下で静的観察し、培養環境の状況把握に努めている。そこで、我々は、細胞面積に注目し、画像処理技術を用いた細胞観察による細胞モニタリング法を開発した。特に、本手法では、コンフルエントの程度(培養面に対する細胞の占める割合)を自動的に算出することにより、細胞数を把握することができる。さらに、細胞挙動を個々の細胞に対して動的観察できる細胞評価システムを構築し、外部刺激に対する細胞面積変化、回転運動などを検討し、非襲撃的な評価手法の確立した。これらの挙動パラメータは、培養容器底面から画像撮影によって測定することができ、培養系に対して非破壊かつ無侵襲な測定である。よって、表皮シート生産工程における培養特性を評価する有効な指標(プロセスパラメータ)として利用可能で、現場で作業するオペレータに対する支援情報を提供できると考えられる。

3. 予測・規格化技術

培養が2次元培養か3次元培養か、位置的分布を考慮するのか(集中定数系か分布定数系)、分布定数系の際には確率論か決定論か、といった項目について、検討した上で、モデル構築を行う必要がある。近年、不均質かつ不均一である培養特性を示す足場依存性細胞の増殖に対する速度論的展開としては、細胞個々の挙動を表現した、確率論モデルを採用し、自己組織化過程を表現することが多い。特に、コンピュータ上でグリッドを作成し、そこに細胞を確率論的に配置する数理モデル(セルオートマトン)を用いることで、培養容器内における細胞の局所的な相互作用によって作られるパターンを表現し、細胞接着力や隣接細胞による分化制御などの相互作用の解明に利用されてきた。

我々は、図4に示すような、細胞接種による単層培養の開始から、培養面を集密した状態で被覆する細胞数を得るまでの細胞増殖過程を特徴づけた細胞配置型モデルを提案した。本モデルでは、細胞播種後の細胞接着、伸展、分裂および接触障害に関するプロセスパラメータを設定することで、培養中の細胞増殖を表現することを可能とした。提示したパラメータは、上述の細胞診断技術にて得られることから、継代ならびに培地交換などの培養操作のスケジューリングを可能とした。さらに、パラメータ値を用いた培養成績の比較評価が可能となり、品質評価への適用も示唆した。

4. 操作・装置設計

図5にバイオリアクター設計の方向性を示す。我々は、これまで、培養操作の自動化を目指し、単層の大量培養をバイオリアクターにて実施した。本バイオリアクターは、静置型バイオリアクターで、複数の電磁バルブおよびポンプをコンピュ

エンドポイント	観察手法	継時変化
一般的装置(顕微鏡) 簡易な操作 汎用性がある		複雑な装置で煩雑操作 特殊な用途
静的 (Static) 貧弱な把握 乏しい情報		動的 (Dynamic) 詳細な解析 高次な情報
平衡論	解析手法	速度論
実生産プロセスへの利用		研究への利用

図3 観察手法の比較

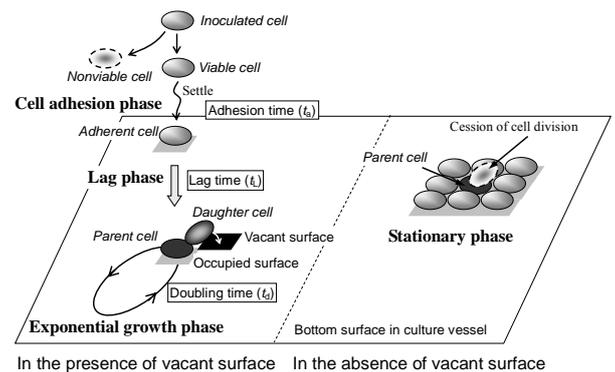


図4 細胞配置型モデル

ータで制御し、培養時の細胞播種、培地交換を自動的に行うことができる。また、CCDカメラや培地分析装置を付設することにより、細胞の形態変化や増殖を観察することや培地成分の濃度変化および収率が測定できる。このような種々の計測システムの装着により、これまで、定性的であった培養中の環境変化、細胞形態などを定量的に評価し、培養の経過に合わせ培地交換頻度等を設定し、適切な培養操作を実現できた。さらに、本リアクターによる大量培養においても、従来法のフラスコでの培養と同様の増殖を示し、培養中のヒューマンエラーの抑制や培養操作の省力化が可能であることが示された。

さらに、表皮シート生産に対して手作業による操作が介在しない継代培養システムの開発を目指し、遠心分離操作を含まない操作手法を確立した。本操作を伴うバイオリアクターを設計し、これまでの細胞診断技術および予測・規格化技術の知見を統合し、自動継代を伴うリアクターシステムの構築を行った。培養容器は、一次および二次培養を可能とした上下異なる培養面積をもつ容器を作製した。継代培養操作に基づき、一次培養の終了時、細胞剥離処理後、培養容器を上下反転させ、より大きな面積を持つ培養面にて二次培養を継続した。培養計画に基づき、培養前に得られた細胞特性パラメータを用いた細胞濃度の推算結果と実験結果はほぼ同一となり、本リアクターシステムの有効性が示された。

おわりに

現在、患者へ適用する表皮シートは、細胞特性および患者の要求量に合わせたテーラーメイドの生産であり、再現性を得ることが困難であるため、培養熟練者による煩雑な操作、および経験的な指標によって培養が行われている。本研究で提示した細胞特性の定量化およびプロセス設計により、生産者側では効率的かつ培養状況の自動判定および自動操作へ展開可能が可能であると考えられる。また、細胞培養システムは、他の足場依存性細胞に対する培養にも適用でき、汎用性の高い技術であると思われる。

一方、プロセスの入口側(原料)と出口(製品)側の両端での変動を許容する組織工学製品の生産では、新たな技術体系を構築する必要がある。ここからは、現在のところ具体的事例に乏しく概念のみであるが、製造における品質評価基準について考えると、図6に示すように、変動がほとんどない製品(金属製品、化学製品など)の場合には、単一の価値判断で評価可能となり(シングルスタンダード)、変動が多少認められる製品(発酵製品など)でも、独立した複数の評価基準(マルチスタンダード)で十分なことが多かった。組織工学製品においては、角化細胞や軟骨細胞などのmono-potencyである体性幹細胞(増殖能を有する分化細胞も含む)を用いた場合は、患者ごとに固有な価値判断が存在することから、マルチスタンダードとなるであろう。しかし、間葉系幹細胞などの多能性細胞(pluri-potency)は、それぞれの分化に対する方向性や成熟の程度が多様となり、種々の目的に応じた価値判断の相互関係を有機的に調和させた基準作り(ハーモスタンダード)が将来必要になるであろう。このような基準に基づき、培養組織製品の品質安定性や治療効果の向上、さらには医療機関における治療方針、手術日等の治療計画の策定が可能となるであろう。

参考文献

1. 紀ノ岡正博, 田谷正仁: “再生医療のための細胞培養システムの開発”, BME (日本エム・イー学会雑誌), 16(2), 10-17 (2002).
2. 紀ノ岡正博, 田谷正仁: “ティッシュエンジニアリングにおけるモデリングとその利用”, バイオプロセスエンジニアリング(清水浩編), p.89-99, シーエムシー出版, 東京 (2002).
3. 紀ノ岡正博, 田谷正仁: “ものづくりから見た再生医療—培養組織の生産—”, バイオサイエンスとバイオインダストリー, 61(8), pp.554-555 (2003).
4. 紀ノ岡正博: “移植を前提としたヒト培養組織に生産に関する生物化学工学的研究”, 生物工学会誌, 82(3), 95-100 (2004).
5. Masahiro Kino-oka and Masahito Taya: “Development of Culture Techniques of Keratinocytes for Skin Graft Production”, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology (Recent Progress of Biochemical and Biomedical Engineering in Japan II) (Ed. by T. Kobayashi), Vol.91, pp.135-169, Springer-Verlag, Berlin (2004).

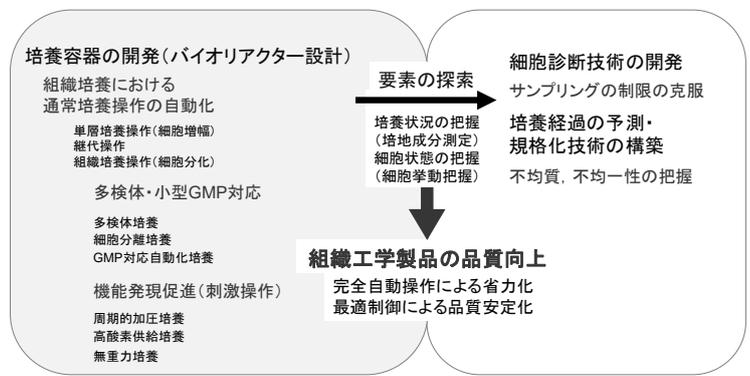


図5 品質向上を目指した装置設計

規格化(細胞評価基準)の変移

Single standard から Multi-standard
そして Hamo-standardへ

Single standard 単入力-単出力
画一化された基準 単解析

対象A ----- 基準A
対象B ----- 基準B
対象C ----- 基準C

無細胞による反応

Multi-standard 多入力-多出力
多様化された基準 独立解析

対象A ----- 基準A
対象B ----- 基準B
対象C ----- 基準C

分化細胞, 体性幹細胞 分化細胞
(採取部位, 患者)

mono-potency

Harmo-standard 複入力-複出力:
調和的に規格化された基準 従属解析

対象A ----- 基準A
対象B ----- 基準B
対象C ----- 基準C

多能性細胞 分化細胞
(間葉系幹細胞, 胚性幹細胞)

pluri-potency

図6 組織工学製品の規格化