

事後評価報告書

- 開発実施企業 : 株式会社アイカムス・ラボ
- 代表研究者 : 国立研究開発法人産業技術総合研究所 生命工学領域細胞分子工学研究部門 首席研究員 夏目徹
- 開発課題名 : マルチウェルでの培養液交換及び非破壊細胞評価を可能とする SMART-Cell-Culture-System

1. 開発の目的

ライフサイエンスの発展とともに、再生医療技術分野を代表例として、細胞を培養する機会が増えている。その中でもiPS細胞からの分化誘導や細胞シートの形成、オルガノイドの培養においては、定期的な培地交換作業が必須である。細胞を新鮮な培地へ移動させる、細胞を避けて培養液を吸引し交換する、という作業を顕微鏡視野下で行うことも多く、細胞は環境変化ストレスを大きく受ける。また、このストレスの度合いも作業者の技能による差が大きく、培養結果が安定しないという問題があった。

そこで本開発では、市販の細胞培養用マルチウェルプレートにおいて、培養液を非常に緩やかに、細胞近傍でも層流状態を維持したまま常時灌流させる培養液交換方式(以下、「かけ流し」と言う。)を実現するとともに、画像や培養液中成分を用いて非破壊での細胞評価をしながら、安定した細胞培養を行うシステムの実用化を目指した。

2. 開発の概要

細胞培養用プレートに培養用の穴(ウェル)を複数備えたマルチウェルプレートにおいて、「かけ流し」を行おうとすると、それぞれのウェルに培養液を出し入れするチューブが必要となり、多数のチューブを培養器の蓋の上で引き回すことになる。本開発では、ウェルの蓋となるシリコンゴム板を二層構造にし、層間に流路を立体的に作りこむことで、煩雑な配管作業をなくした。

また、培養液の灌流には、ウェル毎に送液チューブを分離することでコンタミネーションを防止し、流量を均一にそろえる必要があった。そこで、ウェル毎に並列に置かれた流路をローラで押しつぶしながら液体を送り出す、多流路平板ポンプシステムを開発し、「かけ流し」を実現した。

併せて、市販のタイムラプスイメージング顕微鏡が容易に設置できる治具と、細胞の増殖や成熟などの状態を培養液中の化学成分から計測できる電気化学インピーダンス・スペクトル計測(EIS計測)用電極を開発してシステムに組み込んだ。

なお、本開発では、マルチウェル対応として6、12、24ウェルの3種類プレートへの対応を目標としていたが、新型コロナウイルス感染症流行の影響を受け、外注先での製造が間に合わず24ウェルプレートの還流アタッチメントなど、一部が未完となった。

本開発では、装置機能について定量的目標を設定し、実際に細胞を培養して結果を確認した。

最初に、「かけ流し」が実現されていることを確認した。「かけ流し」は、培養容器内に流入した新鮮な培養液が古い培養液と混ざらずに押し出され、常時灌流されることが特徴である。この機能の実現には、培養セル内を攪拌しない適切な流速を保つ必要があるため、流量のばらつきを表す流量誤差 $\pm 2\%$ 以下を目標とした。

本開発では、内部に流路を持つシリコンゴム板の製造に射出成型を用いた。試作段階でアルミニウムの金型を使用したところ、加工精度に問題があり流量誤差は6%と目標を達成できなかった。しかしながら細胞を用いた試験では、 $\pm 10\%$ の流量誤差でも培養結果に有意な差は見いだされず、現状でも細胞培養に問題がないことが分かった。

次に、細胞の短期培養による機能の評価を行った。培養液の交換によるストレス影響を調べるため指標としてよく使われるヒト胎児腎臓由来癌細胞(HEK293T)を用いた結果、培養開始

から4日後の時点で95%以上の細胞の生存を確認した。さらに、二週間の長期培養では、再生医療の使用頻度の高いヒト網膜色素細胞(RPE)に対して、同様の培養を行い、分化および細胞の成熟度を確認した。セル内細胞のタイムラプス撮影を行い観察したところ、RPE細胞の成熟に伴う形態変化が確認され、リアルタイムPCRによる遺伝子発現計測では、RPE細胞の成熟度マーカーであるBEST1が静置培養の10倍以上発現していることが確認できた。これらの結果から、短期および長期の培養において、本システムを利用した培養条件は、手動での培地交換方式に比べ、細胞のストレスが少なく、増殖が促進されていることが確認された。

3. 総合所見

本開発では、代表研究者の提唱する「かけ流し」の灌流培養をシステムとして完成させたことにより、ライフサイエンスの研究で欠かせない培養作業の省力化を図ると同時に再現性を高め、細胞へのストレスを低減させることで、成熟、分化、増殖の面で優れた細胞培養を実現することに成功した。

より具体的には、「かけ流し」の灌流培養をマルチウェルに対応できる小型培養装置に取り入れ、低ストレス培養を実現し、短期、長期の培養評価においても「かけ流し」による効果を実証した。また、タイムラプス撮影した画像と排出される培養液のEIS計測によって、細胞の成熟に伴う形態変化を捉え、静置培養より細胞の成熟度が高い事の確認に成功している。以上から24ウェルへの対応や流量精度の目標は未達ではあるものの、6、12ウェルにおいて、低ストレス培養の効果と培養状況をモニタリングする機能が確認された。

また、本開発成果が、細胞培養を必要とする研究者へ提供されることで、再生医療等への貢献が期待できる。再生医療に係る研究者による試作機評価の試みも既に進んでいることから、今後、製品としての完成度を高め、早期に製品化されることを期待したい。

以上のとおり、本開発結果は、目標は一部未達のところがあるものの、未達成の要因・対策が適切に検討され、将来的に達成する可能性が高く、事業化に至る可能性がある、と評価する。

以上