

C321

RWV バイオリアクターのための
自動回転制御システムの開発

(筑波大) ○ (学) 平井まどか*・(産総研) 植村壽公

*E-mail: M.hirai@aist.go.jp TEL:029-861-3006

1. 背景と目的

骨髄由来間葉系幹細胞は、特定の分化誘導因子を加えることにより、骨、軟骨、神経、心筋等に分化することが可能である。中でも軟骨組織は無血管組織であるため自己再生能に乏しく、間葉系幹細胞からの組織構築が期待されている。しかし細胞培養において、単層培養や攪拌培養のような一般的に用いられる 2 次元や 3 次元培養法では、脱分化や壊死等が起こってしまう可能性も少なくない。そこで本研究の先行研究は、擬微小重力環境を模倣した Rotating Wall Vessel(RWV)バイオリアクターを用いて幹細胞より、移植に有効な軟骨組織を得ることに成功した。RWV はガス交換膜を裏側に備えた円柱状のベセルが水平方向に回転させてその回転数を制御することにより、浮力と重力が釣り合い、ベセル内の組織が浮遊して良好な 3 次元組織を構築していく。

現在、再生医療の現場において、ヒト細胞を培養できる CPC (Cell Processing Center) が必要不可欠な施設であり、人が細胞を取り扱うので取り扱いのないように一人の患者につき 1 部屋の細胞培養室を占有し、患者にかかる経済的負担は大きすぎる。人より正確に細胞培養プロセスを行える制御装置が開発されたら、大掛かりな施設を必要とせず、人為的ミスを防ぐことができ、より身近な再生医療が期待できる。このような臨床応用の観点から、RWV バイオリアクターのための自動回転制御システムの構築を目指す。

2. 実験操作

1) 自動回転制御装置の開発

装置の概要は CCD カメラでベセル内の培養組織を認識し、コンピュータに伝達し計算して、回転速度を制御するシステムである。このシステムにおいて任意に指定した設定範囲と実際の培養組織の位置を相対的に判断し、設定されたアルゴリズムにより回転速度が制御される。従来、培養液と培養組織の色相は類似したもので、コンピュータが培養組織のみを認識することは困難であった。そこで、培養液と培養組織のコントラストを高くするために、ベセル裏側から青色光を当て培養液を青色に見せ、前面から白色光を照射することにより培養組織を赤色に見せた。この手法と、彩度、明度、色相の 3 つのパラメータを調節することによって、コンピュータが培養組織のみを認識することが可能となった。

ベセルの中心を、X 軸および Y 軸の交点すなわち(0,0)として、縦軸を Y 軸、横軸を X 軸としてベセル内の組織の位置情報を表した。任意に指定した設定範囲や培養組織の位置を示すには中心点の獲得が重要であるため、培地交換時などにベセルの位置がずれる可能性を考慮して、中心点は培養組織の位置情報を収集する前に毎度作成する工夫をした。中心点の取得には緑色蛍光マーカーを使用して培養組織と同様の手法でコンピュータに認識させた。このマーカーをベセルの外縁に貼って、回転することにより中心点を獲得する。この中心点と培養組織、任意に指定した設定範囲の位置情報を計算して、設定されたアルゴリズムにより、OK/SLOW/FAST 判断が下され、回転速度が制御される。



図1 自動回転制御システム(左) RWV バイオリアクター(右)

2) 培養における装置の有効性の確認

a) 単層培養

14 日令メスのウサギの大腿骨および脛骨より、骨髄由来間葉系幹細胞を得、DMEM 培地で 2 週間単層培養を行った。

b) RWV バイオリアクターを用いた 3 次元培養

トリプシン処理により、単層培養で得られたシート状組織をはがし、種々の分化誘導因子を加えた DMEM 培地を用いて RWV で 2 週間回転培養を行った。

回転培養はまず、細胞を播種して 30 分静置後、安定に浮遊する位置で回転数を固定した。その後、回転数を一定に固定したサンプルをコントロールサンプルとし、回転数を自動制御した装置で培養したサンプルをオートサンプルとして、2 週間培養を行った。

c) 切片作成・染色および顕微鏡観察

パラホルムアルデヒド処理後、パラフィンで包埋し 3.5 μm の厚さで切片を作成した。切片乾燥後、それぞれヘマトキシリン・エオシン染色、トルイジンブルー染色、アルシアンブルー染色、サフラニン O 染色を行った。

3. 結果と考察

コントロール、オートサンプルともに長径 10 mm を超える組織が観察された。また、染色結果より軟骨組織への分化が認められた。組織は大きさのみならず、分化状態も良好であることが示唆された。

コントロールサンプルとオートサンプル間に大きさ、分化状態などの点で大きな差異はあまり見られなかったが、組織の形にはわずかな違いが見られた。オートサンプルは丸く角があまりないのに対し、コントロールサンプルは凹凸があったり歪であったりした。

これらの結果より、自動回転培養制御システムは、的確な判断を下し、良好に作動していると考えられる。

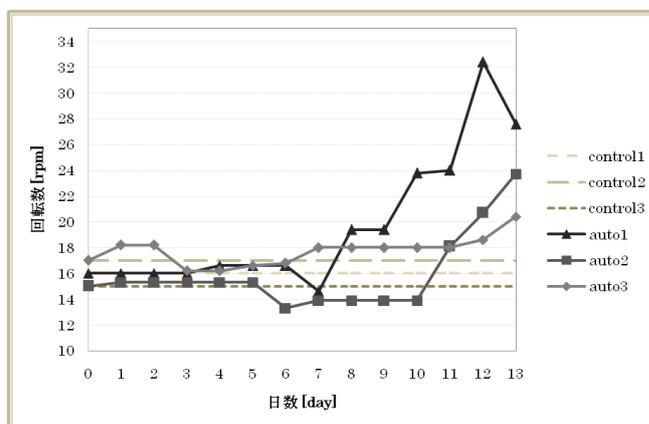


図2 回転培養 2 週間における回転数の推移