

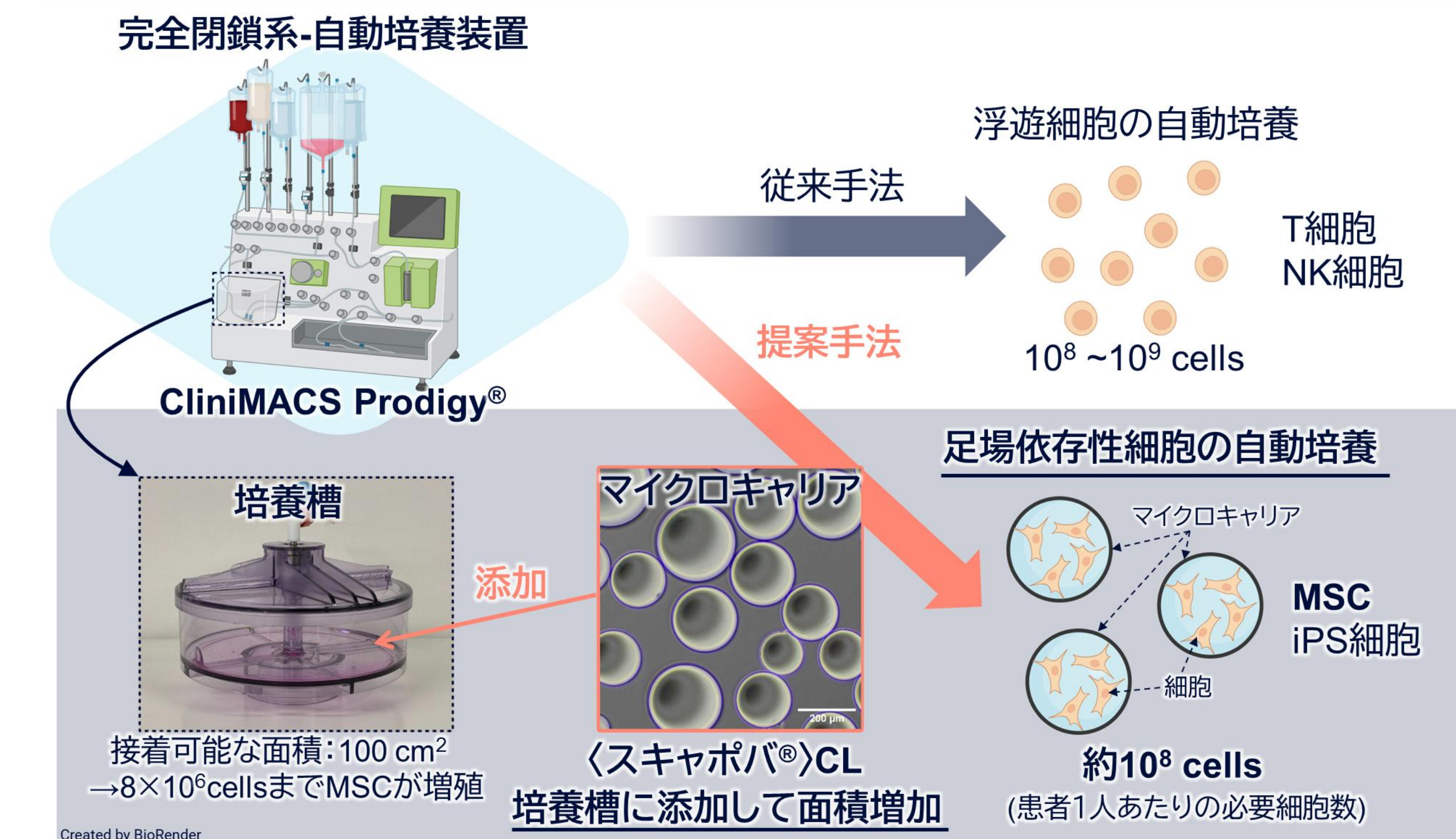
〈スキャポバ®〉CLとCliniMACS Prodigy®を使った 間葉系間質細胞の自動培養システムの開発

kuraray

田中龍一郎¹, 比嘉光², 荒木基², 板垣亮¹, 三輪達明¹, 狩野有花¹, 藤田明士¹, 小林悟朗¹

¹株式会社クラレ, ²ミルテニーバイオテク株式会社

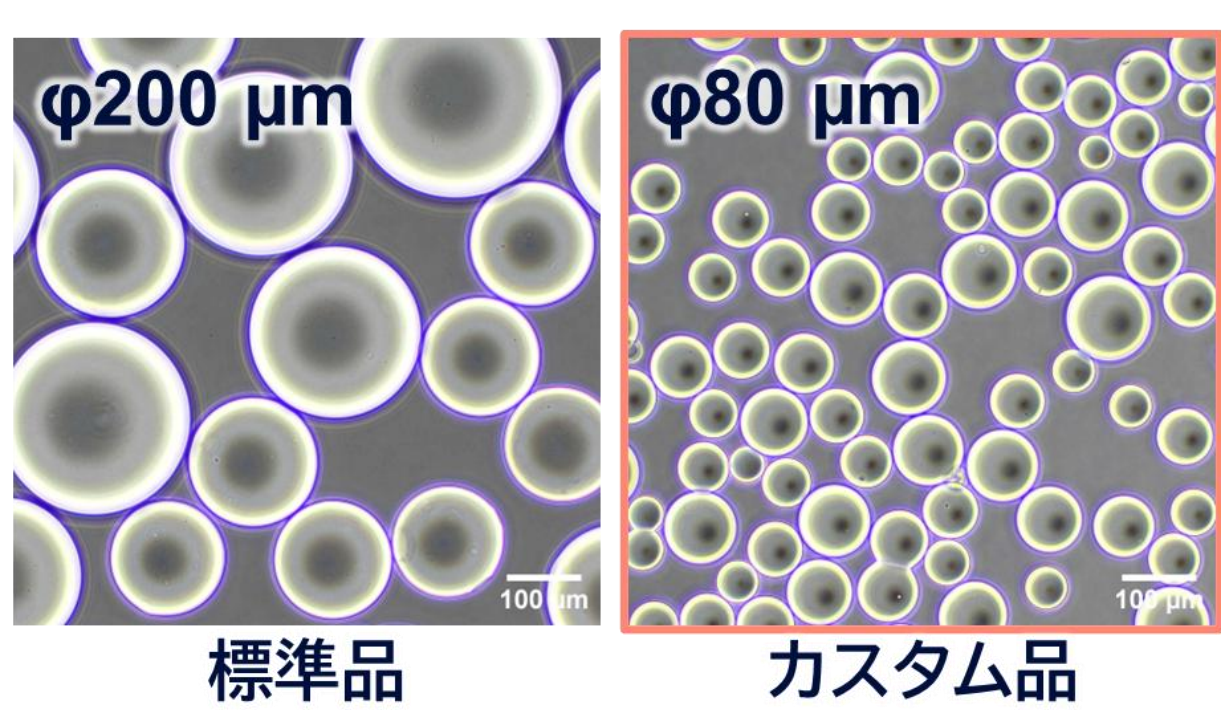
1 Introduction



- 背景
近年, 間葉系間質細胞(Mesenchymal stromal cell, MSC)を用いた細胞治療法の研究開発が進んでいる⁽¹⁾。しかし, 細胞培養を手作業で行うと安全性の担保やスケールアップ, 人件費などに課題が生じる。そのため, 自動培養による効率的かつ安全なMSCの製造方法が求められている。
- 先行技術
ミルテニーバイオテク社が開発した自動培養装置CliniMACS Prodigy®は閉鎖系での無菌操作や各工程の自動化が可能である。
- 課題
培養槽内の底面積は限られており(100 cm²), 細胞治療に使う十分な数のMSCを得ることは難しい。計算上100 cm²の面積で培養可能なMSCは8×10⁶ cells⁽²⁾であり, 実際は約10⁸ cells必要⁽³⁾。
- 提案手法
クラレ社が開発したマイクロキャリア〈スキャポバ®〉CLと組み合わせることで, 接着可能な面積を増加し, 患者1人あたりの治療に必要な細胞数の培養を可能にする(上図)。
- 研究目的
1人の患者への細胞治療に必要なMSCの自動培養システムを作ることを目指し, 本研究では, CliniMACS Prodigy®内の〈スキャポバ®〉CL上でMSCが増殖可能な培養条件を明らかにすることを目的とした。

2 Materials and methods

2.1 〈スキャポバ®〉CL

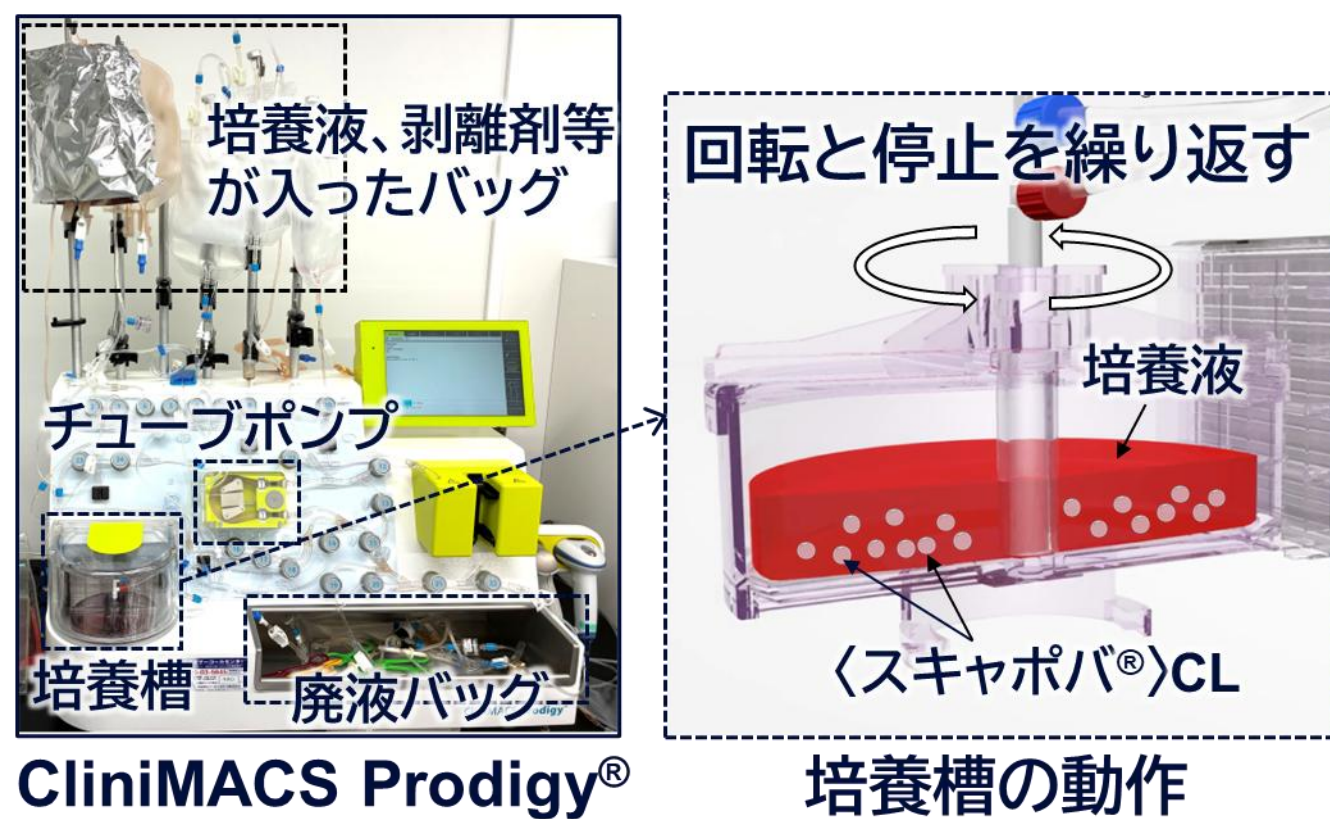


ポリビニルアルコールが原料のマイクロキャリア表面にコラーゲン分子 (Collagen, CL) を結合⁽⁴⁾

- 特徴
- ✓ GMP規格を参考にした規定・基準の品質管理
 - ✓ 壊れづらく, 異物混入リスクが低い
 - ✓ 増殖性に優れている

弾性、粒径をカスタマイズ可能であり, 本研究では細い流路 (Min.: φ300 μm) への流動性向上のため CliniMACS Prodigy® 専用小粒径 (φ80 μm) のカスタム品を作製 (左図)。

2.2 CliniMACS Prodigy®



細胞製造・加工を自動化する完全閉鎖系の培養プラットフォーム

- ✓ 完全閉鎖系かつ統合された自動システムにより, 手作業の工程を削減し, 作業効率を向上
- ✓ 細胞の洗浄, 分離, 活性化, 遺伝子導入, 回収, 製剤化, 充填までの全工程を1つのプラットフォームで完結
- ✓ 0.1~0.5 Lの培養スケールで患者1人の治療に必要な細胞を製造可能

通常は浮遊細胞(T細胞等)を培養するが, 本研究では〈スキャポバ®〉CLを投入し, 足場依存性細胞を培養

2.3 培養方法

CliniMACS Prodigy®では, 培養槽を一定間隔で回転(spin-up)と停止(spin-down)を繰り返す攪拌培養を行う。本研究では, “〈スキャポバ®〉CLの標準品と標準の攪拌方法 (Active shaker 1)を用いた条件”, “〈スキャポバ®〉CLのカスタム品と細胞へのダメージ削減のため改良した方法を用いた条件”を比較した。

攪拌方法		〈スキャポバ®〉CL
標準条件	回転(3秒)と停止(27秒)を繰り返す	標準品 (φ200 μm)
改良条件	3時間毎に回転(3秒間)と停止(27秒)を行う	カスタム品 (φ80 μm)

使用した細胞や培養液, および播種細胞数や〈スキャポバ®〉CLの添加量等の培養条件を下記の表に示す。

Materials		Culture conditions	
Cells	Human Adipose-Derived Stem Cells (Lonza, PT-5006, P4)	Number of cells seeded	7.5×10 ⁶ cells
Medium	ADSC-1 (Kohjin Bio) +1% P/S	Microcarrier addition amount	Total surface area: 1500 cm ²
Dissociation reagent	TrypLE™ Express (Gibco)	Medium volume	150 mL (D0) → 225 mL (D1)
Tubing set	TS520 (Miltenyi Biotec)	Environmental conditions	37°C, 5% CO ₂

標準条件、改良条件で合計4日間の自動培養を行った後, TrypLEを用いて〈スキャポバ®〉CLから細胞を剥離し, 分離バッグを用いて細胞を回収した。増殖能や回収した細胞の品質評価を行った。

3 Results and discussion

3.1 サンプルング機能



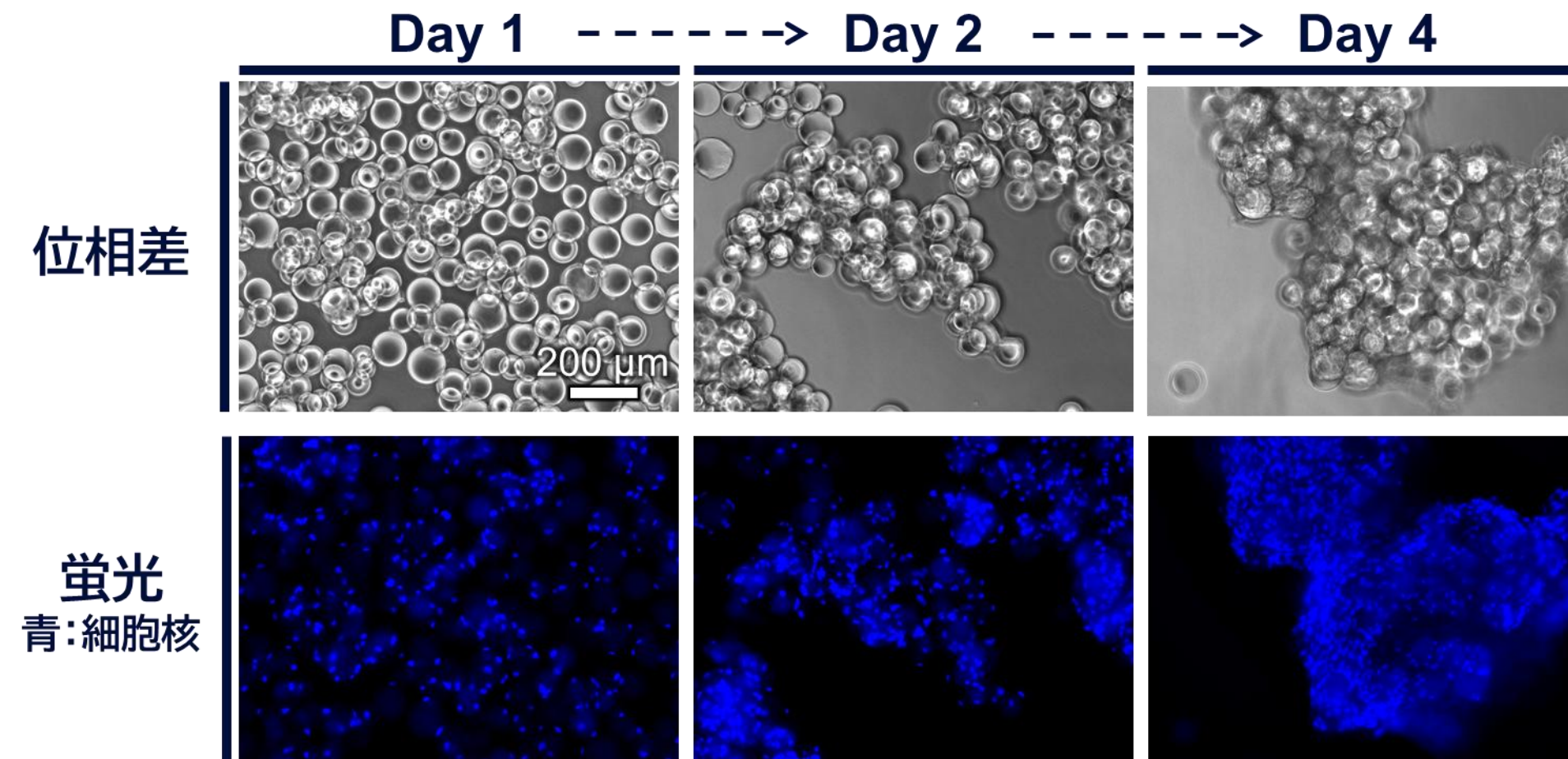
CliniMACS Prodigy®のサンプルング機能により, 閉鎖系を維持したまま自動培養中の品質チェックが可能

- ✓ φ200 μmの〈スキャポバ®〉CLは流路に詰まり, サンプルングできない
- ✓ φ80 μmの〈スキャポバ®〉CLはサンプルング可能

→ 自動培養中の培地成分や細胞の状態が確認可能に

3.2 サンプルングされた〈スキャポバ®〉CLとMSC

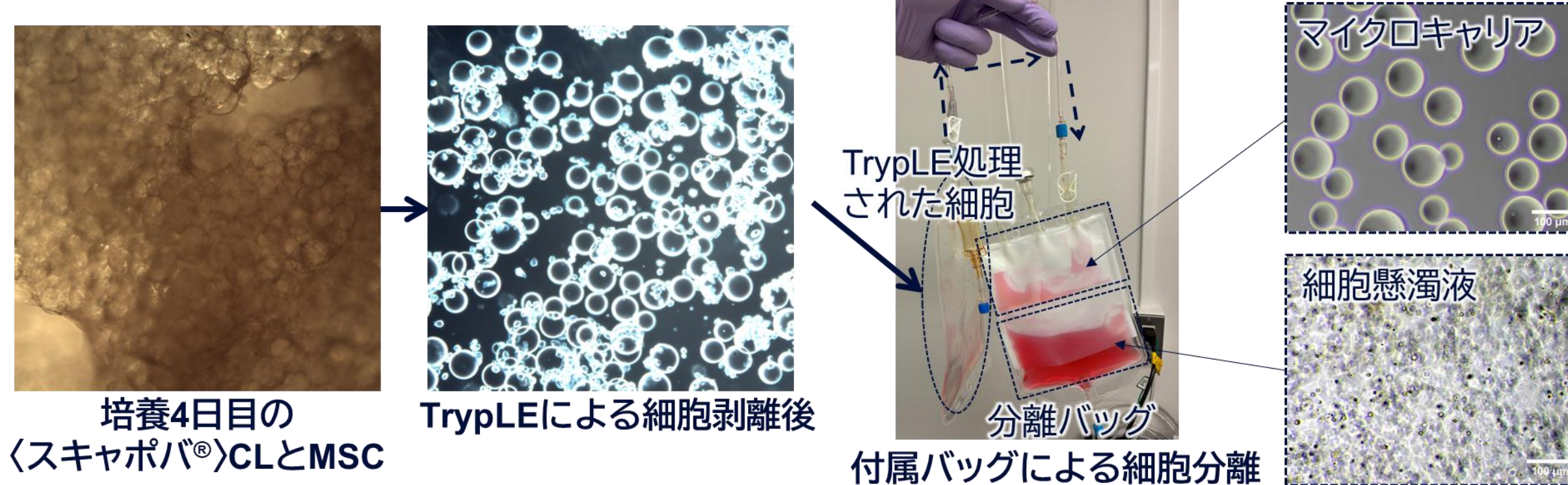
サンプルングによって回収できた〈スキャポバ®〉CL(φ80 μm)を観察 (細胞核をHoechstで染色)



✓ 〈スキャポバ®〉CL上でMSCが増殖する様子を確認

3.3 細胞剥離、分離工程

培養4日目に細胞回収を開始。CliniMACS Prodigy®内でPBS洗浄後, TrypLEで細胞を剥離。懸濁液を付属のフィルター付きバッグに通し, 細胞と〈スキャポバ®〉CLを分離。

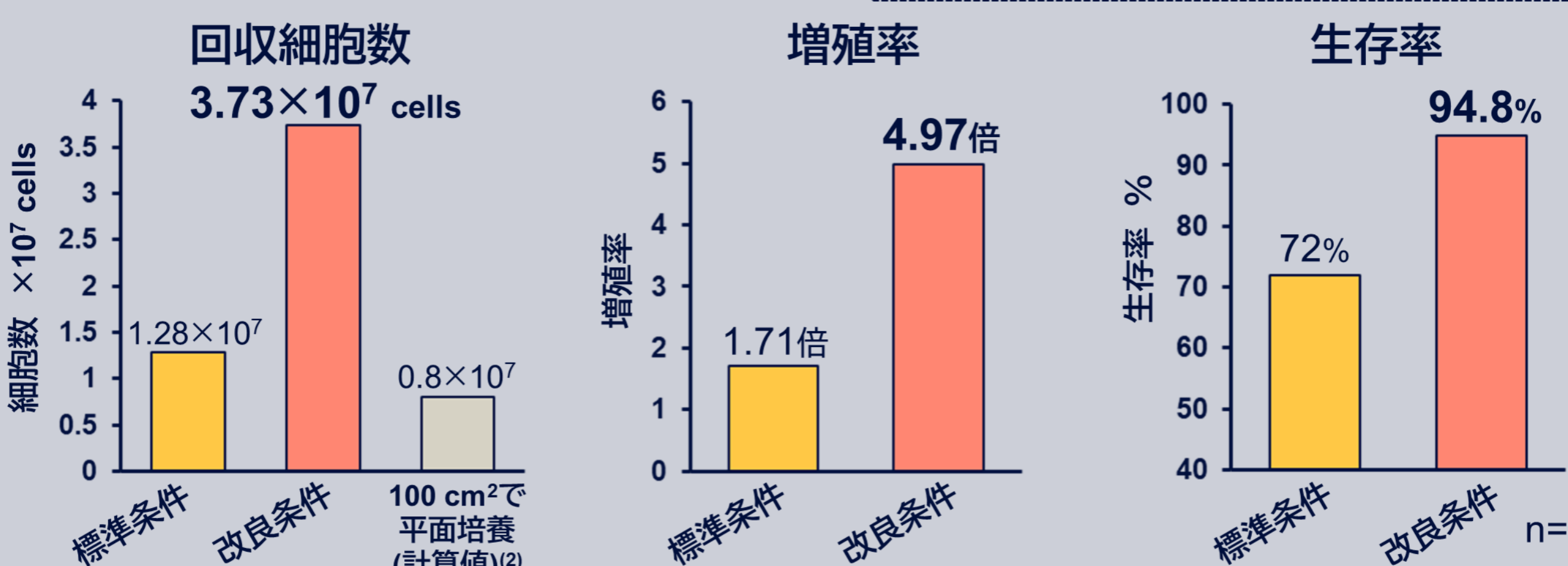


- ✓ CliniMACS Prodigy®内でMSCが剥離していることを確認
- ✓ チュービングセット付属の分離バッグでMSCと〈スキャポバ®〉CLの分離に成功

3.4 自動培養後の細胞収量

培養4日目に回収した細胞数, 増殖率, 生存率を評価

“標準条件” 攪拌: 30 s毎, 粒径: φ200 μm
“改良条件” 攪拌: 3 h毎, 粒径: φ80 μm



- ✓ 改良条件で生存率を維持しながら細胞増殖した
- ✓ 標準条件では増殖, 生存率ともに良好ではなかった

CliniMACS Prodigy®と〈スキャポバ®〉CLを用いてMSCの自動培養に成功

→標準の攪拌条件は浮遊細胞に最適化されたものであるため〈スキャポバ®〉CLには適していない? 攪拌中の様子を観察した結果, 〈スキャポバ®〉CLはほとんど浮遊せず, 底面を引きずられているような挙動を示していた。過去研究⁽⁵⁾での流体解析によって, 回転時は底で外向きに流れた動きを受けて, 壁に沿って上向きの流れが生じることが明らかにされているが, 〈スキャポバ®〉CLを浮遊させるには不十分である可能性。結果として, 固定床培養に近い改良条件では〈スキャポバ®〉CLが引きずられることで生じる細胞へのダメージを抑制され, 増殖率, 生存率が改善されたと考えられる。

3.5 自動培養後の細胞の品質評価

国際幹細胞学会治療学会が提唱するヒト間葉系間質細胞の定義を基に培養後の細胞を評価⁽⁶⁾

表面マーカーの評価		骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨芽細胞への分化誘導		
MSC Markers	Percent positive cells	Alizarin Red	OilRed	Alcian Blue
CD73	99.8%			
CD90	99.9%			
CD105	91.7%			
CD45, CD34, CD11b, CD19 HLA-DR	1.8%	骨芽細胞	脂肪細胞	軟骨芽細胞

n=1 ✓ 自動培養後の細胞がMSCの特徴を有していることを確認

4 Conclusion

- ✓ 小粒径の〈スキャポバ®〉CL(φ80 μm)を用いることで, 自動培養中のサンプルングに成功
- ✓ 〈スキャポバ®〉CL表面に細胞が接着し, かつ増殖していることを確認
- ✓ 最適化された攪拌条件により自動培養でMSCを3.7×10⁷ cells回収することに成功

- 展望
- 培養条件のさらなる最適化により10⁸ cells以上回収可能なプロセス開発が必要
 - 増殖能だけでなく表現型・分化能・ポテンシーの維持を同時に満たすプロセス設計を行うことで再現性の高い閉鎖系自動培養システムとしての確立が期待される。

References:

- (1) Signal Transduction and Targeted Therapy 10.1 (2025): 262. (2) Frontiers in medicine 5 (2018): 178. (3) Cell stem cell 22.6 (2018): 824-833. (4) Journal of bioscience and bioengineering 136.5 (2023): 407-414. (5) Chemical Engineering Science 281 (2023): 119175. (6) Cytotherapy 8.4 (2006): 315-317.



〈スキャポバ®〉



CliniMACS Prodigy®