

氏名	小 ^コ 林 ^{バヤシ} 豊 ^{トヨ} 茂 ^{シゲ}
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	甲第540号
学位授与の日付	平成24年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(医学研究科専攻, 博士課程修了者)
学位論文題目	Transplant of rabbit corneal epithelial cell sheets cultured with automated cell culture system using cell-cartridges (セルカートリッジ型自動培養装置で作製したウサギ角膜上皮細胞シートの移植について)
主論文公表誌	Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 投稿予定
論文審査委員	(主査) 教授 岡野 光夫 (副査) 教授 清水 達也, 堀 貞夫

論文内容の要旨

〔目的〕

現在, ヒト臨床に使用する細胞シートの作製は, CPC (cell processing center) と呼ばれるクリーンルーム内において, 医薬品の製造管理および品質管理に関する国際基準である GMP (good manufacturing practice) を厳格に満たしながら人手で細胞培養作業を実施することでなされている。しかし今後は, 細胞シートが広く普及していくにつれて, 現状もしくはそれ以上の品質管理を有し, より低コストで大量に細胞シートを製造可能な生産技術が求められてくる。そこで, 細胞シートの産業化に向け, 製造プロセスを機械化し, 細胞シートを自動で作製して病院へ出荷するティッシュエンジニアリングファクトリー (TEF) を実現することが重要になっていくと示唆される。これまで私は, 自動培養装置を設置した TEF の全体システムを規定することを目的として, 細胞培養工程からその必要条件を精査した結果, その設置場所の清浄度保持の観点から, 装置内部を閉鎖構造とし, 可能な限り小型化した自動培養装置が望ましいと結論付けた。そこで, 汚染リスクを最小とする閉鎖系培養容器を特徴とした小型自動培養装置を設計, 試作した。

本研究では, TEF 内で臨床適用可能な細胞シートを製造する自動培養技術の開発を目的とし, これまでに試作した自動培養装置で作製した細胞シートの品質について, 動物移植により検証した。

〔実験方法〕

評価のために, 対象となる細胞として日本白色家兎 (ウサギ) の角膜上皮輪部細胞を播種密度 2×10^4 cells/cm² にて培養容器へ播種した。培養容器は温度応答性培養表面を有した自動培養装置用の閉鎖系培養容器を使用した。播種後, 2週間の細胞培養で, 角膜上皮細胞シートを作製した。移植実験のため, 培養容器を2次包装し, 定温輸送容器内に入れ, 公共交通機関を使用して, 6時間持ちで, 手術室まで搬送した。移動時間内の外気と輸送容器内温度をそれぞれ1点ずつ観測した。搬送前, 搬送後の細胞の状態は位相差顕微鏡で撮像した。移植用に使用するウサギは, 移植日から1週間前に上皮組織を排除し, 角膜疲弊症モデルを作製した。搬送した角膜上皮細胞シートを20℃下で20分放置後, シートとして回収し, それを病変モデルのウサギ角膜へ移植した。シート回収時に, シートの一部で切片像を作製し, ヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色, 免疫染色 (p63, CK3) から組織学的評価を行った。移植時に, フルオレセイン染色により細胞シートのバリア機能を確認した。移植後1週間で, ウサギ角膜組織の切片像を作製し, H-E 染色, 免疫染色 (p63, CK3) から組織学的評価を行った。

〔結果〕

自動培養装置で作製した角膜上皮細胞シートは, その搬送時に外気は変動したが, 定温輸送容器内の温度は36.2℃で一定していた。搬送前後の位相差顕微鏡像から, 搬送により細胞シートの破れ等は観察されず, 培養面に細胞が生着していた。さらに, 低温処理で細胞シートとして回収した際, 3層程度の厚みがあることが切片のH-

E染色像から観察され、免疫染色像から基底層の存在が観察された。移植時のフルオレセイン染色により、細胞シートはバリア機能を有していることがわかった。移植後1週間で、角膜上皮部に血管はなく、バリア機能を有した。さらにその組織切片像から、移植した細胞シートが、3層の重層化を有し、基底層を有しながら生着していることが確認できた。

〔考察〕

TEF内でヒト臨床適用可能な再生組織を、GMPに準拠して製造する自動培養技術の開発を目的として試作した自動培養装置で、動物移植可能な品質を有した細胞シートを自動培養装置で作製可能であることを示した。さらに、定温輸送容器を使用することで、移植可能な細胞シートの品質を保持したまま、搬送可能であることを示した。このことから、TEF内の自動培養装置で製造した細胞シートを病院へ輸送し、移植する一連の工程が可能となり、細胞シートの産業化を促進する方向性を示した。

〔結論〕

自動培養した細胞シートが動物移植可能な品質を有し、汚染リスクを最小とする閉鎖系培養容器を特徴とした小型自動培養装置を開発した。さらに、TEF内での自動培養、輸送、移植といった一連のフローを実現するシステムを開発した。

本研究開発の一部はNEDOの成果である。

論文審査の要旨

ヒト臨床に使用することのできる細胞シートは、CPC (cell processing center) 内でGMP (good manufacturing practice) に従った手作業で作製されている。今後、多くの患者を救済していくためには、細胞シートを自動製造するためのティッシュエンジニアリングファクトリー (tissue engineering factory : TEF) という新概念とその実現が重要である。申請者はTEFでコアとなる細胞シート自動製造技術と移植技術の開発を行った。動物角膜輪部細胞を装置へ投入し、2週間の自動培養で、角膜上皮シートの作製を可能とした。その後、細胞シートを装置から手術室まで約6時間で搬送し、細胞シートの構造と機能を損なうことがない定温輸送システムを開発し、角膜上皮移植ができることを確認した。

本研究で開発された装置によって達成された自動培養技術は、今後のTEFの実現と細胞シート製造の効率化を可能にする基盤技術となる。すなわち、細胞培養や細胞シート作製のバイオ技術とロボット技術の融合により自動培養シート作製装置の開発を成功させ、再生医療の新しい局面を作った研究は博士論文に相応しいものと判定した。

氏名	板垣裕子
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	甲第541号
学位授与の日付	平成24年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(医学研究科専攻, 博士課程修了者)
学位論文題目	Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice (メチオニン・コリン欠乏(MCD)食誘導性非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)モデルマウスにおける肝病態の進展に伴う形態学的・機能的変化に関する研究)
主論文公表誌	Hepatology Research 投稿中
論文審査委員	(主査) 教授 江崎 太一 (副査) 教授 小田 秀明, 立元 敬子