



Title	ヒト角化細胞培養における細胞評価パラメータの策定と表皮シート生産プロセスへの適用
Author(s)	梅垣, 良太
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45049
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	梅 垣 良 太
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 18023 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 5 月 13 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 基礎工学研究科化学系専攻
学 位 論 文 名	ヒト角化細胞培養における細胞評価パラメータの策定と表皮シート生産プロセスへの適用
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 田谷 正仁 (副査) 教 授 久保井亮一 教 授 林 紘三郎 助教授 紀ノ岡正博

論 文 内 容 の 要 旨

足場依存性細胞であるヒト角化細胞の培養による表皮シート生産を対象として、細胞増殖の速度論および操作論的解析を実施し、得られた結果に基づいて、生産プロセスの自動化を目指した装置工学的検討を行った。

通常の表皮シート生産工程では、細胞接種に始まり、培地交換および細胞の剥離・回収の操作を繰り返す継代培養によって細胞数を確保した後、細胞群の重層化を経て表皮シート形成を行う。そこで、本研究では、まず、単層培養中の細胞に対して接種後の培養面への接着、培養環境への馴化および細胞分裂の細胞挙動を表現する二次元細胞配置型モデルを提案し、回分培養における細胞量変化の推算と接種細胞密度の最適化を可能とした。

さらに、細胞挙動を表現したパラメータにて、数回の回分操作からなる継代培養中の細胞群の状態を評価し、継代数の増加につれて、細胞の接着能および増殖能が低下することを明らかにした。また、培養中の細胞面積と比増殖速度との相関マップを作成し、細胞寿命の指針となる残り分裂回数について整理したところ、試験した細胞株によらず、細胞状態や寿命の推移が増殖期、停止期および遷移期に分類され、生産工程中における細胞増殖能の把握やそれに基づく培養条件の変更操作に対する有効な指標を与えることを示した。一方、細胞剥離過程において、個々の細胞の面積変化から求められる速度パラメータは、細胞群の増殖能を測定する上で有効であることを示した。

次に、一連の継代培養操作において、自動化や無菌性保持の障害となる遠心分離過程を省略するプロセス設計の基礎的検討を行った。細胞剥離操作時に使用した剥離剤および剥離停止剤の存在下でも、細胞増殖は抑制されるものの、細胞は培養面へ接着することがわかった。そこで、細胞接着後の新鮮培地への切替え時間を変数として、上記の細胞配置型モデルにて最適な細胞生産速度を与える条件を算定して継代培養を実行したところ、通常の培養経過と同等の細胞生産速度が達成された。最後に、培地のカルシウム濃度を変化させることで、重層化培養が可能であることを示した上で、表皮シート生産プロセスにおいて、自動継代操作を可能とするリアクターシステムの開発を行った。上記モデルを重層化培養に適応しうる内容に拡張し、これにより策定された培養計画に基づいてリアクター培養を実行し、本研究で提案した自動生産プロセスの有効性を実証した。

論文審査の結果の要旨

本研究では、まず、ヒト角化細胞の単層培養を対象として、接種後の培養面への細胞接着、培養環境への馴化および細胞分裂などの細胞挙動を表現する二次元細胞配置型モデルを提案し、細胞量変化の算定と接種細胞密度の最適化を可能とした。さらに、細胞挙動を表現するパラメータにて、複数回の回分操作からなる継代培養中の細胞群の状態を評価し、継代数の増加につれて、細胞の接着能および増殖能が低下することを明らかにした。また、培養中の細胞面積と比増殖速度との相関マップを作成し、細胞寿命の指針となる残り分裂回数について整理したところ、試験した細胞株によらず、細胞状態や寿命の推移が増殖期、停止期および遷移期に分類され、生産工程中における細胞増殖能の把握やそれに基づく培養操作に対する有効な判断基準を与えることを示した。

次に、継代培養操作の自動化を想定したプロセス設計に関する基礎的検討を行った。細胞剥離操作時に使用する剥離剤および剥離停止剤の存在下でも、細胞増殖は抑制されるものの、細胞は培養面へ接着することを見出した。そこで、細胞接着後の新鮮培地への切替え時間を変数として、上記の細胞配置型モデルにて最適な細胞生産速度を与える条件を算定して継代培養を実行したところ、通常の培養経過と同等の細胞生産速度が達成された。最後に、培地のカルシウム濃度を変化させることで、重層培養が可能であることを示した上で、表皮シート生産プロセスにおいて、自動継代操作を可能とするリアクターシステムの開発を行った。上記モデルを重層培養経過を表現しうる内容に拡張し、これにより策定された培養計画に基づいてリアクター培養を実行し、本研究で提案した自動生産プロセスの有効性を実証した。

以上のように、本論文は、表皮シート生産プロセスを対象として、増殖速度論、培養操作論ならびに装置論的知見に基づいてプロセス設計論へと展開したものであり、組織培養工学分野への寄与するところが大きい。博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。