



Title	塑性流体を応用したヒト人工多能性幹細胞集塊の懸濁培養系設計に関する研究
Author(s)	山本, 陸
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/88010
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (山本 陸)	
論文題名	塑性流体を応用したヒト人工多能性幹細胞集塊の懸濁培養系設計に関する研究
論文内容の要旨 ヒト人工多能性幹細胞（ヒトiPS細胞）を再生医療や創薬スクリーニングなど種々の分野に活用する試みがなされ、多量の細胞を用意する増幅プロセスの構築が急務となっている。しかしながら、大量のヒトiPS細胞を培養するための培養装置の開発は十分とはいえず、10^2 L以上の規模での培養を達成可能な培養装置の設計が要求されている。そこで本研究では、ヒトiPS細胞の大量培養を達成するための装置設計に対するスケールアップの方法論を構築し、これに基づく培養系の設計を行った。 第1章では、ヒト幹細胞の培養装置設計を達成するための考え方の構築を行った。細胞製造に用いられるヒト幹細胞の装置設計では、生物学的観点からみた細胞培養系に対する要求と、工学的観点からみた装置・操作による細胞培養系への供給の間に、従来の細胞培養では考慮の必要がなかった隔たりが存在する。これは既存の装置・操作などの仕組みでは、ヒト幹細胞培養への適用に限界が生じることを意味している。そこで新たな装置設計への考え方を提案した。培養装置の設計では、まず使用する細胞の選択を行わなければならない（細胞の設計）。特に細胞製造に用いられるヒト幹細胞は、細胞そのものを製品とするために、製造要求に合わせた細胞の設計が難しい。そのため使用する細胞の培養系への要求に基づく設計が必要とされる。ヒト幹細胞の多くは、その増殖に接着を必要とする。ヒトiPS細胞の場合、不十分な接着は細胞死を招く一方で、過度な接着による凝集は細胞の増殖を阻害する。そのため、増殖挙動を考慮した培養系の設計が求められる（細胞挙動の設計）。また、様々な環境因子に対する細胞特性を速度論的に評価したとき、ヒト幹細胞は、微生物や抗体医薬品の製造に用いられる動物細胞などと異なる特性を示す。ヒトiPS細胞は、これらの細胞と比較し、せん断応力に対する耐性が低い。また老廃物の比生成速度が高い一方で、それらに対する耐性が低い。そのため、培養系の設計では、これらを満たす環境を設計する必要がある（環境の設計）。既存の装置タイプやその操作はヒト幹細胞培養に適しておらず、このように、ヒト幹細胞の大量培養プロセスの構築に向け、培養系の設計（細胞の設計・細胞挙動の設計・環境の設計）という考え方に基づいた装置の設計が必要とされる。 第2章では、塑性流体の流動特性を利用することで、ヒトiPS細胞集塊の懸濁培養系の構築を行った。塑性流体とは、降伏応力未満の応力では固相のようにふるまい、一方で降伏応力以上の応力を加えると流動が生じる流体である。塑性流体を用いることで、細胞集塊の浮遊状態を維持することが可能であることが知られている。本流体中に気泡導入を行った結果、3.0×10^{-2} vvm以上の通気条件では、細胞集塊を模した粒子の沈降が確認されたのに対し、2.0×10^{-2} vvm以下の通気条件では、粒子の浮遊状態が維持され、その流動は、気泡周囲の局所的な範囲に限られることが確認された。このとき、気泡の上昇速度は抑制され、ガスホールドアップはニュートン流体中に気泡導入を行った場合と比較し、高い値を示した。これらの現象は、気泡の通過する時間間隔が0.14 s以上の条件において確認され、塑性流体のチキソトロピー回復時間に依存していることが示唆された。ベンチスケール培養装置を用い、本流体を利用した培養系でヒトiPS細胞を培養したとき、細胞集塊の分散維持が確認された条件では、通気速度の増加に伴いみかけの比増殖速度は増加し、既存の翼攪拌型培養装置と同程度の値を示した。一方で、細胞集塊の沈降が確認された条件では、細胞集塊の凝集によるみかけの比増殖速度の低下が示唆された。また、この系において、通気速度あたりのガスホールドアップは向上し、効率的な酸素供給が可能となることが示唆された。 本研究では、ヒトiPS細胞の大量培養装置設計に必要なスケールアップの方法論を提案し、これに基づき、塑性流体を利用することで、ベンチスケールまでの培養系の構築した。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (山 本 陸)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	大政 健史
	副 査	教授	本田 孝祐
論文審査の結果の要旨 本論文では、ヒト人工多能性幹細胞（ヒトiPS細胞）の活用における細胞調製の問題点を示し、そのための増幅プロセスの構築の重要性を示している。その際、必要な大量のヒトiPS細胞を培養するための培養装置の開発について言及し、特に、装置設計に対するスケールアップの方法論を構築の考え方、並びにそのための要素技術の構築を示している。 第1章では、細胞製造に用いられるヒト幹細胞の装置設計では、生物学的観点からみた細胞培養系に対する要求と、工学的観点からみた装置・操作による細胞培養系への供給の間に、従来の細胞培養では考慮の必要がなかった隔たりが存在していることを指摘し、ヒト幹細胞培養への適用に限界が生じることを示している。ヒトiPS細胞の場合、不十分な接着は細胞死を招く一方で、過度な接着による凝集は細胞の増殖を阻害するため、増殖挙動を考慮した培養系の設計が求められると示している。さらに、ヒトiPS細胞は、他の細胞と比較し、せん断応力に対する耐性が低く、老廃物の比生成速度が高い一方で、それらに対する耐性が低いことを述べている。よって、培養系の設計では、これらを満たす環境も設計する必要があることを示している。 第2章では、塑性流体の流動特性を利用することで、ヒトiPS細胞集塊の懸濁培養系の構築を行っている。塑性流体は、降伏応力未満の応力では固相のようにふるまい、一方で降伏応力以上の応力を加えると流動が生じる流体で、細胞集塊の浮遊状態を維持することが可能であることが知られている。そこで、本流体を用いた懸濁培養系における酸素供給方法を開発している。特に、気泡導入を行った結果、細胞集塊を模した粒子の沈降が確認されたのは、3.0×10^{-2} vvm 以上の通気条件で、その流動は、気泡周囲の局所的な範囲に限られることが確認されている。さらに、その際、気泡の上昇速度は抑制され、ガスホールドアップはニュートン流体中に気泡導入を行った場合と比較し、高い値を示し、気泡の通過する時間間隔が0.14 s以上の条件において安定供給ができることを示している。この知見から、ベンチスケール培養装置を用い培養を行ったところ、既存の翼攪拌型培養装置と同程度の比増殖速度で、ヒトiPS細胞が増殖可能であることを示している。 第3章では、総括として、ヒトiPS細胞の大量培養装置設計に必要なスケールアップの方法論を提案し、この方法論に基づき、塑性流体を利用することで、ベンチスケールまでの培養系の構築できたことを述べている。 以上より、本論文は、将来、スケールアップ並びに周辺技術の最適化を行うことで、ヒトiPS細胞の大量培養装置の設計が期待される有望な方法論構築を示したものである。 よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。			