

平成25年度 再生医療等産業化促進事業
(加齢黄斑変性、同種 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞)
報告書

平成26年3月

委託元 経済産業省

委託先 株式会社ヘリオス

目次

1. 事業の概要	2
2. 事業の詳細	
(1) 培養液に溶け込む残留過酸化水素の測定	2
(2) 気相の残留過酸化水素濃度と溶存濃度	3
(3) 培地での過酸化水素の分解	3
(4) 溶解した過酸化水素の周囲への影響	3
(5) 過酸化水素暴露による細胞への影響	4
(6) 画像解析による細胞の品質評価	4
(7) 免疫染色を用いた網膜色素上皮細胞の純度評価	6
(8) 網膜色素上皮細胞の成熟度評価（形状・色調の判定）	6
3. 有識者会議の概要	6
4. まとめと今後の課題	7

1. 事業の内容

長期細胞培養が求められる iPS 細胞由来製品製造においては、原料由来微生物の封じ込めとバイオクリーン環境維持の両立に加え、クロスコンタミネーション対策としてチェンジオーバーが求められており、製造コスト面からもアイソレータを用いたコンパクトな無菌操作ができる設備の活用が図られている。

アイソレータを iPS 細胞由来製品製造に活用するためには、製造過程における除染後に残留する消毒剤・除染剤の量を測定する必要がある。本事業において、当該消毒剤・除染剤の培地への溶け込み量や残留濃度を定量するとともに、想定される作業時間における iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞への影響を検討した。また本事業では、通常培養時の iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の品質管理法として、観察装置で撮影した細胞画像データから画像解析ソフトによる評価手法を開発した。

さらにアイソレータの除染方法や除染接続装置の規格化・標準化の提言を行っていくことで、アイソレータ本体や様々な周辺装置の相互開発や新規参入を容易とし、より良い製造設備の開発および日本の再生医療産業拡大にも繋がると考えられ、本事業において議論を行った。

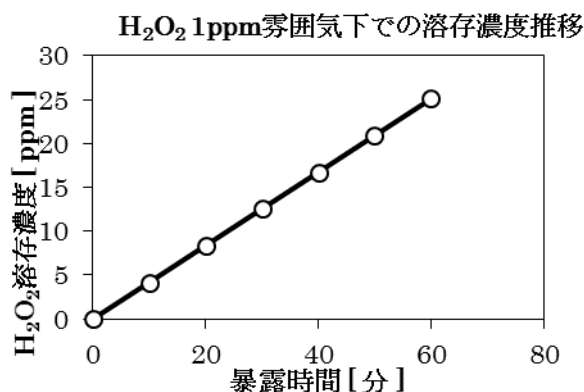
本事業の最終的な目的は、同種 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の治療法開発とともに、無菌製造および大量生産可能な自動培養装置の開発を行い、安定した生産体制を構築することである。

2. 事業の詳細

(1) 培養液に溶け込む残留過酸化水素の測定

iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の製造過程において、除染後アイソレータ内に残留する過酸化水素の細胞への影響についての検証として、培養液や蒸留水に溶け込む過酸化水素の濃度を計測し、各製造工程で溶解する残留過酸化水素量の検討をした。

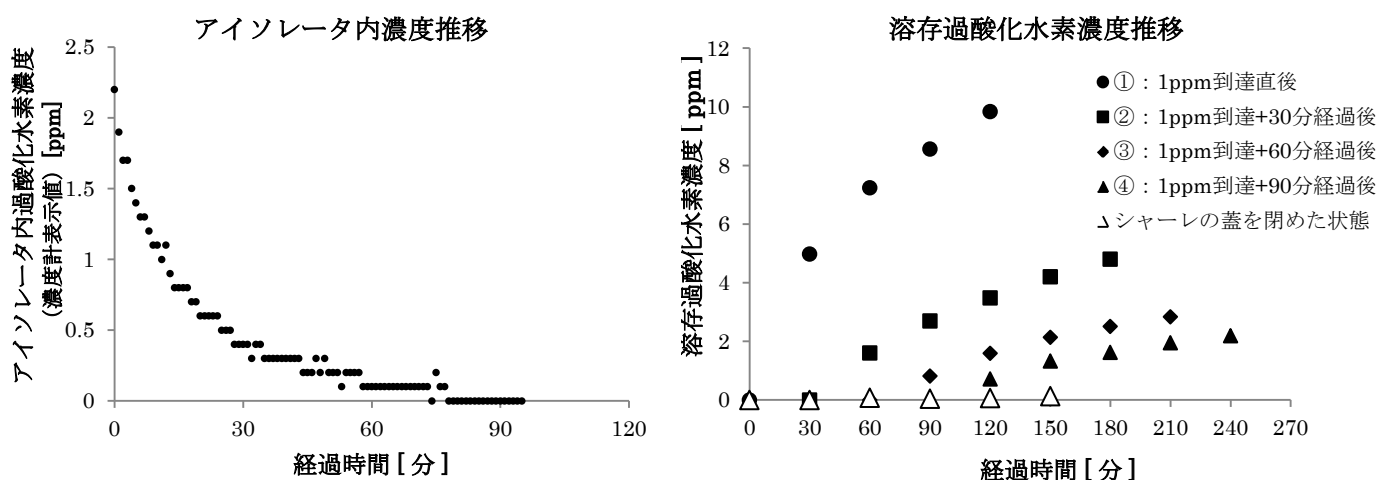
その結果、アイソレータ内部の気相の過酸化水素濃度を 1ppm とした場合、ディッシュの蓋の開放時間に比例し、溶存濃度が高くなる傾向が見られた。気相の濃度が 1ppm であっても、60 分暴露すると蒸留水の溶存過酸化水素濃度が 25ppm 程度まで上昇した。



(2) 気相の残留過酸化水素濃度と溶存濃度

細胞操作の開始時における、気相の過酸化水素濃度とディッシュ内の蒸留水への溶存濃度の関係を調査した。

除染後にエアレーションを行い、アイソレータ内の過酸化水素濃度が 1 ppm になった時点から一定時間経過後にディッシュ内の蒸留水中溶存濃度を測定した。その結果、気相の過酸化水素濃度を 1ppm で持続することに比べ、溶存濃度を低く抑えることができた。ディッシュの蓋をした場合、過酸化水素の溶け込みはほとんど確認されなかった。



気相中の過酸化水素が低い濃度であっても、溶け込む量は非常に大きな値となるため、アイソレータ内での操作中に注意が必要であるという重要なデータとなった。しかしながら、蓋をすると間口が狭いのでそれほど多く溶け込むことはないと考えられた。

(3) 培地での過酸化水素の分解

培地での過酸化水素濃度を計測しているうちに、時間の経過にともない過酸化水素濃度が低下していく現象が確認された。そこで iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の製造過程で使用する培地に一定量の過酸化水素を加え、過酸化水素濃度の経時的変化を調査した。

その結果、培地中の過酸化水素濃度の減衰は培地の種類によって異なっており、培地によって細胞に与える影響が異なることが示唆された。また過酸化水素により培地の組成が変化し細胞の培養に影響を与える可能性も考えられた。

(4) 溶解した過酸化水素の周囲への影響

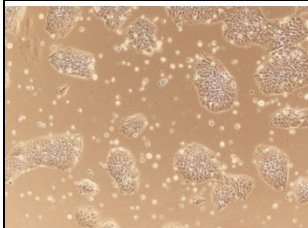
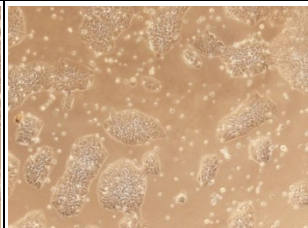

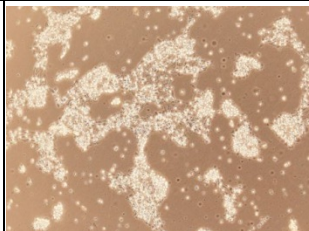
インキュベータ内でディッシュ培地に溶存した過酸化水素が、他のディッシュの培地に影響を与えるか確認した。結果的に過酸化水素が溶存したディッシュが、同一インキュベ

一タ内に設置された他のディッシュの培地に影響することは無かった。

(5) 過酸化水素暴露による細胞への影響

iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の製造過程において、除染後、アイソレータ内に残留する過酸化水素が培地中に溶け込むことを想定し、細胞への影響を検討した。過酸化水素の単回暴露及び培養期間中、長期暴露による細胞への影響を検討した。

MSC においては、過酸化水素濃度 50 ppm から用量反応的に生存率の低下が認められた。細胞観察においても 50 ppm で細胞密度の低下が認められ、100 ppm 以上においては、明らかな細胞の剥離、委縮が認められた。iPS 細胞においては、過酸化水素 1 ppm では細胞生存率の低下は認められなかったものの、20 ppm では検出限界付近の低値を示した。細胞観察においても 1 ppm では明らかな細胞形態の変化、密度低下は認められず、20 ppm でほとんどの細胞の剥離、委縮が観察できた。

iPS 細胞 (×100)			
0 ppm	1 ppm	20 ppm	50 ppm
			

iPS 細胞に対する過酸化水素の影響をより詳細に確認するため、1～50 ppm の濃度範囲で再度評価した。その結果、4 ppm から細胞生存率の低下傾向が認められ、8 ppm から明らかな細胞生存率の低下が認められた。

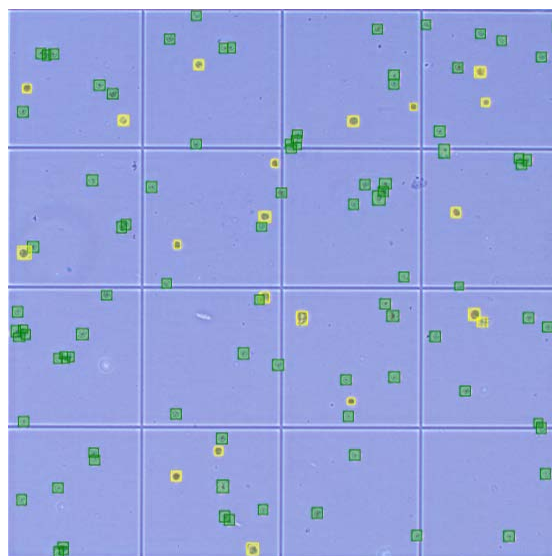
また iPS 細胞について 7 日間の長期暴露試験を実施したところ、H₂O₂ を培地中に添加しなかった非暴露検体に比し、培地中 H₂O₂ 濃度 0.5 ppm 暴露検体では約 84.3%、1.0 ppm 暴露検体では約 2.3% の生細胞を確認した。2.0 ppm 暴露検体では、細胞は死滅した。よって iPS 細胞の増殖を阻害するため、微量であっても H₂O₂ が培養環境中に存在することは望ましくないと考えられた。

今後は分化誘導した網膜色素上皮細胞についても同様の試験を行い過酸化水素の影響を確認する予定である。

(6) 画像解析による細胞の品質評価

従来の目視による細胞数計測や細胞状態判定などの評価手法では、作業者による判定のバラツキや作業漏れ、評価結果が残らないなどの課題がある。さらに、網膜色素上皮細胞は色素を有するため、従来のトリパンブルー染色による生細胞数計測では色素細胞と染色

細胞との判別が難しく、バラツキが生じやすい。これらの課題を解決するため、細胞画像解析ソフトを用いることにより観察装置で撮影した細胞画像データから計測や判定を行なう定量的・安定的な評価手法への代替可能性について検討した。製造工程終了時点のiPS細胞由来網膜色素上皮細胞の細胞画像データ1セット（4画像）を元に、細胞の生死判定を行なう画像解析アルゴリズムを作成し、他の画像データ3セット（12画像）に適用した結果を目視による評価結果と比較した。その結果、画像データセット1において、開発した画像解析アルゴリズムによる判定結果は目視判定結果と90%以上が合致した。またこのアルゴリズムを同様に他の画像データに適用した結果、目視判定結果に対して94%以上（平均95%）の正解率が得られた。ただ、割合としては大きくはないが、画像解析アルゴリズムの誤検出や誤判定があり、また目視判定の判定基準が曖昧な点や判定漏れなどもあった。よって細胞の生死判定のアルゴリズムとしては、ほぼ実用的なレベルのものができたと思われるが、目視判定の場合に見ている網膜色素上皮細胞自体の色（茶色）や細胞境界のハロ（光輪）などの網膜色素上皮細胞特有の判断が入っておらず、アルゴリズムの堅牢性という点では改良の余地があると考えられた。（※緑色は生細胞、黄色は死細胞）



Case	目視判定	解析判定	正誤結果 (誤判定理由)	データセット2 (計 1263 個)	データセット3 (計 1185 個)	データセット4 (計 542 個)
1	生細胞	生細胞	(正解)	1171 個 (92.72%)	1122 個 (94.68%)	457 個 (84.32%)
2	死細胞	死細胞	(正解)	21 個 (1.66%)	20 個 (1.69%)	55 個 (10.15%)
(正解小計)				1192 個 (94.38%)	1142 個 (96.37%)	512 個 (94.46%)
3	死細胞	生細胞	判定間違い	13 個 (1.03%)	9 個 (0.76%)	7 個 (1.29%)
4	生細胞	死細胞	判定間違い	2 個 (0.16%)	3 個 (0.25%)	1 個 (0.18%)
5	-	認識失敗	細胞単位の 分割間違い	27 個 (2.14%)	21 個 (1.77%)	19 個 (3.51%)
6	容器の 傷など	生細胞	細胞認識間違い	16 個 (1.27%)	4 個 (0.34%)	2 個 (0.37%)
7	容器の 傷など	死細胞	細胞認識間違い	12 個 (0.95%)	5 個 (0.42%)	0 個 (0.00%)
8	生細胞	未検出	細胞認識漏れ	0 個 (0.00%)	0 個 (0.00%)	0 個 (0.00%)
9	死細胞	未検出	細胞認識漏れ	1 個 (0.08%)	1 個 (0.08%)	1 個 (0.18%)
(誤判定小計)				71 個 (5.62%)	43 個 (3.63%)	30 個 (5.54%)

(7) 免疫染色を用いた網膜色素上皮細胞の純度評価

細胞品質評価のひとつとして網膜色素上皮細胞の純度について、免疫染色を行なった細胞の蛍光発現を目視で判定して数えているが、判定基準の曖昧さや作業者によるばらつきがあり、他にも根拠となるデータが残らないなどの課題があった。

そこで網膜色素上皮細胞の細胞画像データ 1 セットをもとに細胞の蛍光発現を判定する画像解析アルゴリズムを作成し、他の画像データに適用した結果を目視による評価結果と比較したところ、細胞のカウント数では 5% 程度の誤差が出たものの、純度判定の誤差は最大でも 1.5% であった。よって誤差的には純度評価のアルゴリズムとしては実用的なレベルにあるものが得られたと考える。今後はアルゴリズムの堅牢性を確保するため、目視判定で行っている核染色 (DAPI) の画像解析の結果を追加する必要がある。

(8) 網膜色素上皮細胞の成熟度評価 (形状・色調の判定)

網膜色素上皮細胞の成熟度について、細胞の形状や色調等を目視で判定しているが、判定基準の曖昧さによって作業者によるばらつきがあり、他にも根拠となるデータが残らない、定量的な評価が出来ないなどの課題があった。

そこで細胞画像データ 4 セットをもとに、細胞の「敷石状の形状」「茶色くなる色調」を定量化する画像解析アルゴリズムを作成した。その結果「敷石状」「茶色」を画像から抽出することで定性的な判断を定量化することができたが、ソフトを開発するには、コントロールとなりうる目視での判断を定量化する必要があると考えられた。また細胞の境界を認識していないため、敷石状態がフォーカス位置によって濃淡が反転した場合の反転結果が不十分であり、アルゴリズムの堅牢性を確保するためには改良が必要であると考えられた。

3. 有識者会議の開催

2014 年 3 月 6 日に有識者会議を開催、中川誠人先生 (京都大学 CiRA)、廣瀬志弘先生 (産業技術総合研究所) および各研究関連担当者に本年度成果を報告し、以下の総括を頂いた。

- ① 気相の残留過酸化水素濃度とディッシュ液相への過酸化水素溶存濃度の関係において、気相中の過酸化水素濃度が低濃度であっても、培養容器を開放した状態では、液相中に溶け込む過酸化水素量は非常に高い値となった。一方、容器蓋を閉じた状態では、ほとんど溶け込まないことが確認された。作業環境中の過酸化水素の液相への溶け込みは、気相に接する溶液の表面積および物質拡散の自由度に依存しており、今回のデータは、アイソレータ内操作を検討する上で重要なデータと考えられる。今後は実製造を検討する中で、さらなるデータの蓄積をしていくことが必要である。
- ② 本報告において過酸化水素が iPS 細胞の増殖を阻害することが示されたが、実際にアイソレータを使用した iPS 細胞樹立 (テストラン) において、細胞劣化および増

殖阻害は認めていない。今後、実製造における検証を行う必要がある。

- ③ 網膜色素上皮細胞の画像解析アルゴリズムを用いた純度や細胞計数方法については、生体由来 RPE 細胞を用いて評価基準の設定および精度評価が必要である。

4. まとめと今後の課題

①過酸化水素の液相への溶け込みと iPS 細胞の培養への影響について

アイソレータのエアレーションを約 90 分間継続し、気相中の過酸化水素濃度を下げること、液相への溶け込み量を抑えることができるとともに、容器に蓋をして気相対流を防ぐことにより過酸化水素の溶け込みを防ぐことができた。しかしながら、十分換気した後も操作中の容器蓋解放時には、アイソレータ内の器材に浸潤した過酸化水素の放出によって暴露するといった課題も挙げられた。

また、培地に溶存した過酸化水素の分解速度は培地の種類により異なることを見出した。この結果から、過酸化水素暴露環境下での細胞培養において、細胞への過酸化水素の影響が、培地成分により緩和する可能性がある一方で、培地組成の変動が細胞の維持・分化などに与える影響も無視できない問題であり、過酸化水素分解に関与する成分の解明が課題となった。

加えて、培地中に溶存した過酸化水素は、微量であっても iPS 細胞の増殖に影響を与えることが確認された。

アイソレータ内の培養操作において、除染後に残存する気相中の過酸化水素量、作業開始までのエアレーション時間、容器蓋開放時間、容器形態（気相対流の有無）、培地組成などが、過酸化水素が細胞の増殖、生存に与える影響に関与することを見出した。これらの結果を踏まえ、実際のアイソレータで用いた細胞製品の製造における、除染、細胞操作の標準的な手順を構築することが今後の最重要課題である。

②細胞の画像解析について

細胞画像解析ソフトの開発については、それぞれのアルゴリズムの開発によって、これまで目視で行っていた定性的評価方法を簡便かつ定量的な方法に置き換える可能性がでてきた。今後は網膜色素上皮細胞特有の要素を判断できる、きめ細かいアルゴリズムを加えることで、より多様で堅牢性の高いソフトウェアに構築することが必要である。

以上