

0-09-5

iPS細胞の自動培養装置の性能評価と 活用可能性の探索事例

JSRM2022 (2022.3.17)

公益財団法人京都大学iPS細胞研究財団 (iPS財団)

吉田 信介、塚原 正義



公益財団法人

京都大学iPS細胞研究財団

iPS細胞の自動培養装置の性能評価と 活用可能性の探索事例

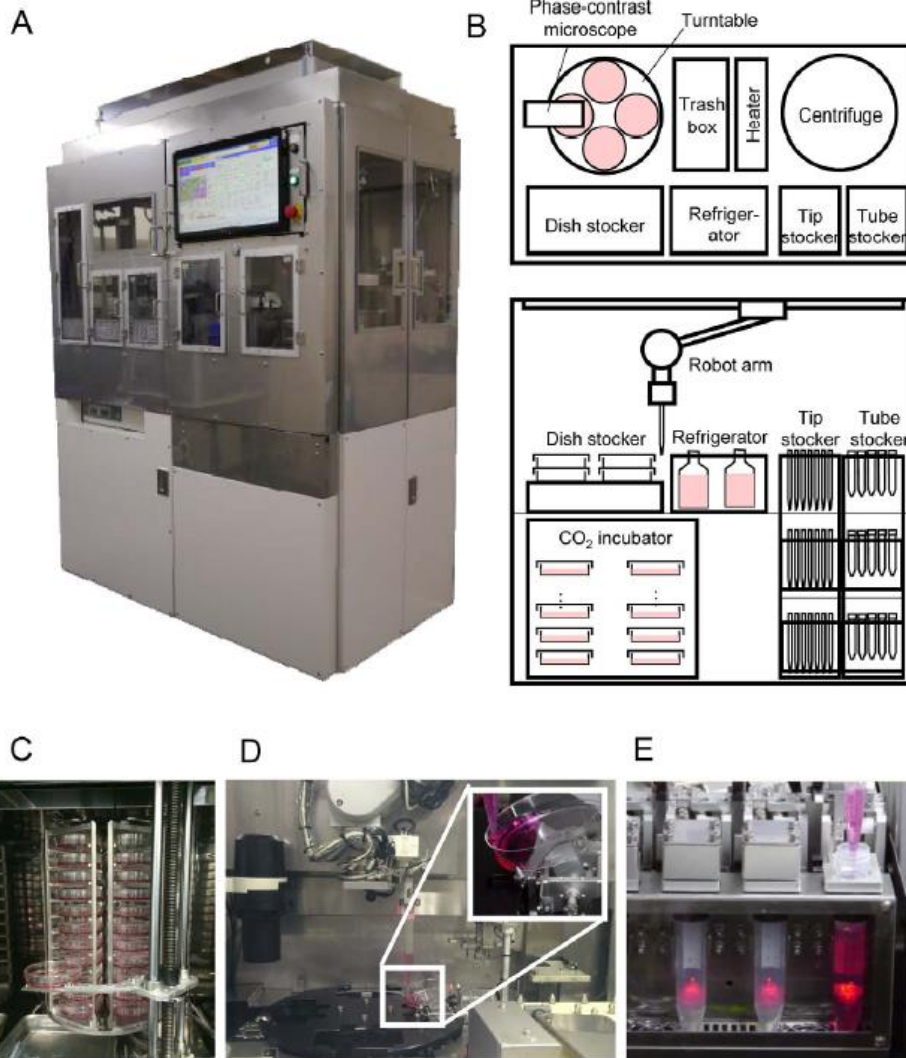
公益財団法人京都大学iPS細胞研究財団
吉田 信介

筆頭演者は、過去1年間（1月～12月）において、
本演題の発表に関して、開示すべきCOIはありません。

パナソニック社製の自動培養装置の使用例

- 取得データから判明したこと
- 継代安定性試験への利用可能性の検討

パナソニック社製自動培養装置



Long-term maintenance of human induced pluripotent stem cells by automated cell culture system

Shuhei Konagaya¹, Takeshi Ando², Toshiaki Yamauchi², Hirofumi Suemori³ & Hiroo Iwata^{3,*}

Pluripotent stem cells, such as embryonic stem cells and induced pluripotent stem (iPS) cells, are regarded as new sources for cell replacement therapy. These cells can unlimitedly expand under undifferentiated conditions and be differentiated into multiple cell types. Automated culture systems enable the large-scale production of cells. In addition to reducing the time and effort of researchers, an automated culture system improves the reproducibility of cell cultures. In the present study, we newly designed a fully automated cell culture system for human iPS maintenance. Using an automated culture system, hiPS cells maintained their undifferentiated state for 60 days. Automatically prepared hiPS cells had a potency of differentiation into three germ layer cells including dopaminergic neurons and pancreatic cells.

SCIENTIFIC REPORTS | 5:16647 | DOI: 10.1038/srep16647

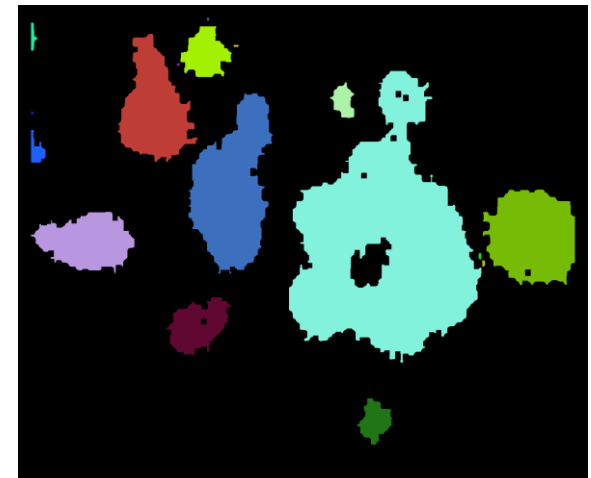
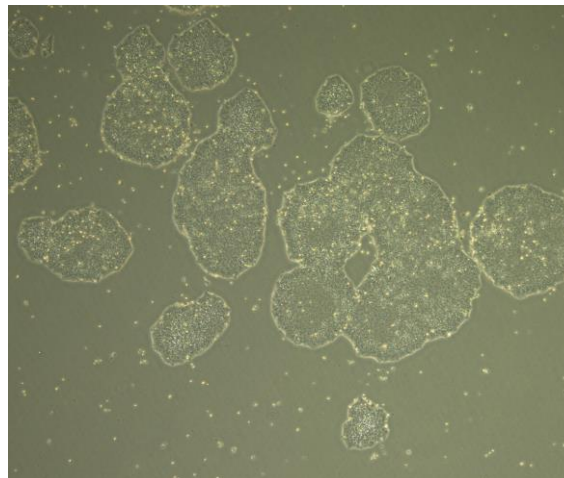
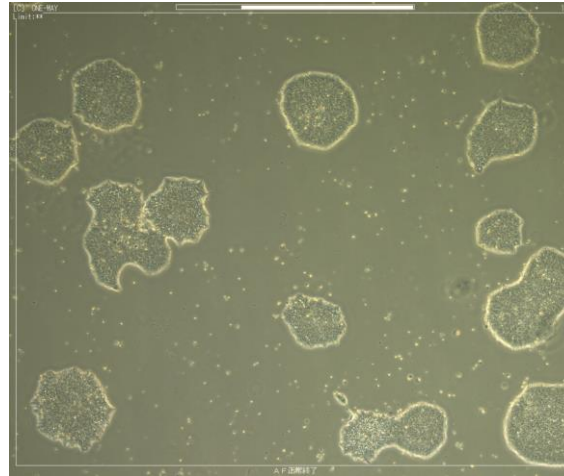
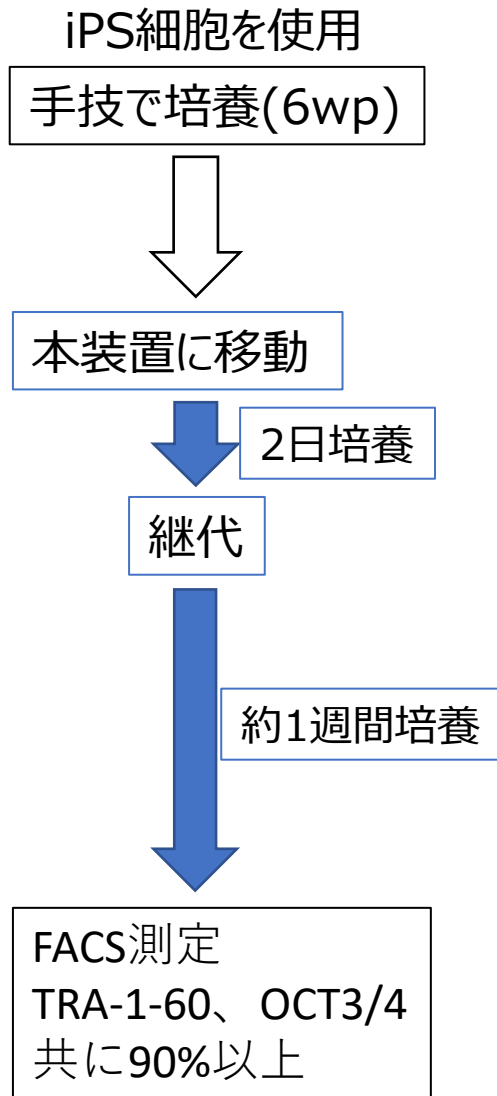
2013年 パナソニック社／京大再生研共同研究
2015年 論文化：多能性幹細胞を60日間培養
⇒ 三胚葉系への分化を確認
2017年 製品化：8月販売開始



本発表：製品ではないプロトタイプ品を使用
→カスタマイズ、試験培養実施
(多能性幹細胞を100日以上培養)

Figure 1. Automated culture system of hiPS cells. (A) Outside view of automated culture system. (B) Module layout of automated culture system. (C–E) Photographs of cell culture modules. (C) CO₂ incubator, (D) Turntable and robotic arm, (E) Heater.

培養およびコロニー認識例(6wp)

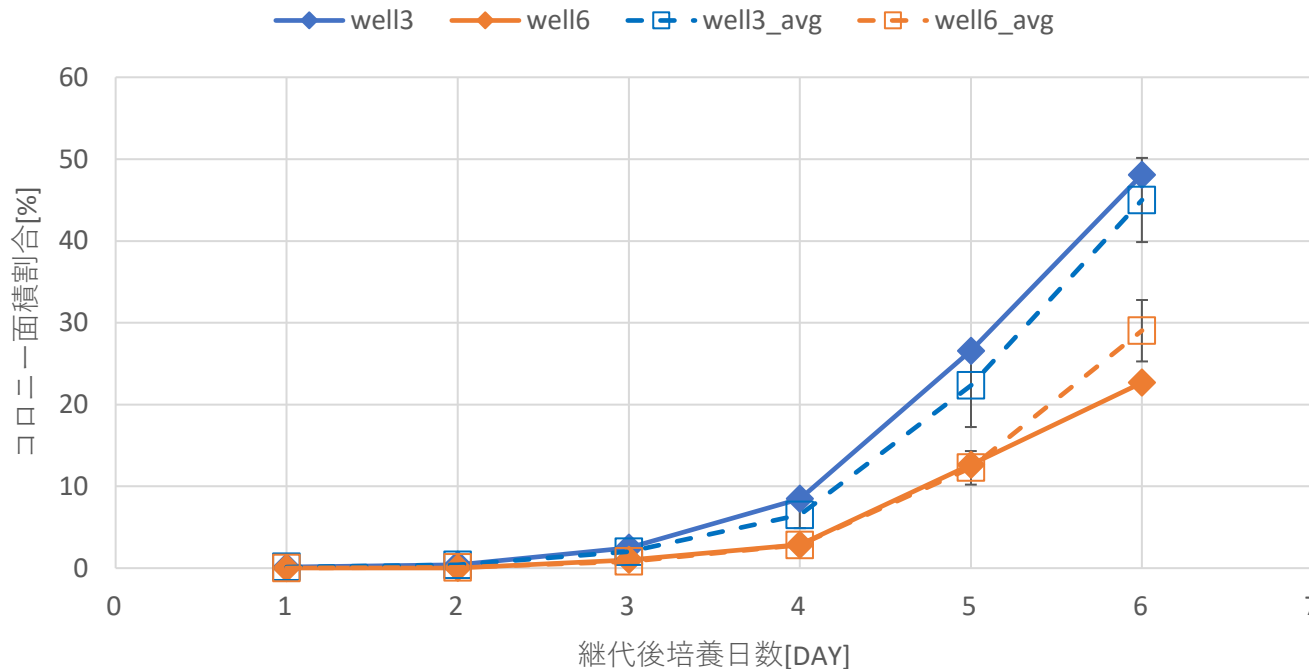


自動装置

コロニー認識

コロニー面積経時変化例(6wp)

継代後コロニー増殖曲線（例）



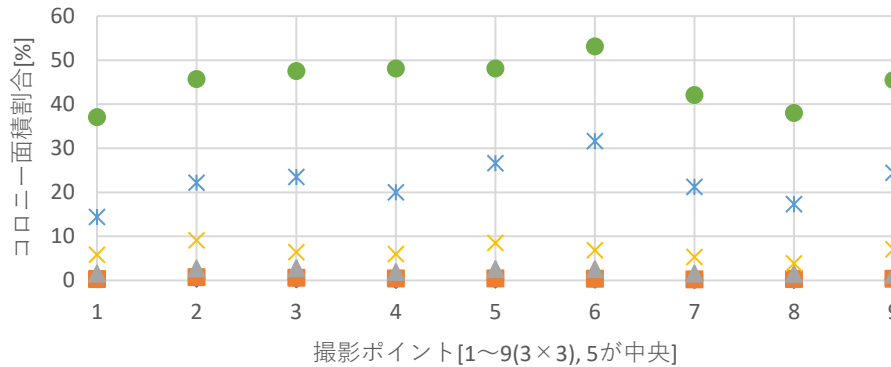
撮影ポイント
1 2 3
6 5 4
7 8 9

- well3の面積 > well6の面積という傾向が見られた
- 中央位置一点(5)で撮影した画像からの、コロニー面積割合推定値は、九点(1～9)の撮影画像からの平均値±標準偏差（×2）以内に収まった。

コロニー面積測定例(6wp内分布)

WELL内空間分布(WELL3)

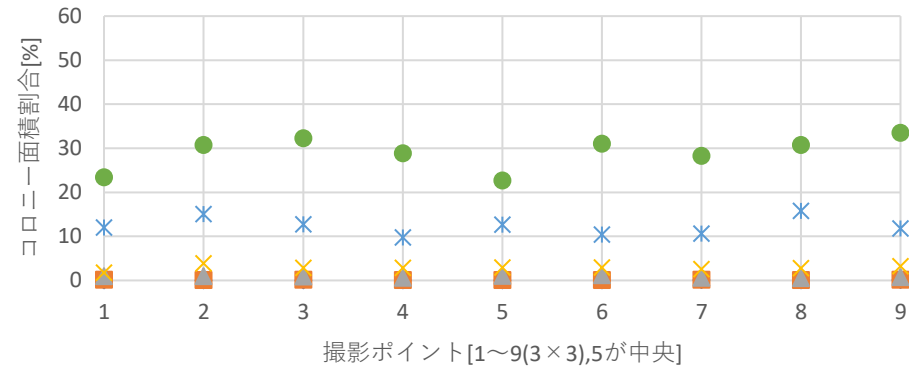
◆ day1 ■ day2 ▲ day3 × day4 * day5 ● day6



撮影ポイント
1 2 3
6 5 4
7 8 9

WELL内空間分布(WELL6)

◆ day1 ■ day2 ▲ day3 × day4 * day5 ● day6

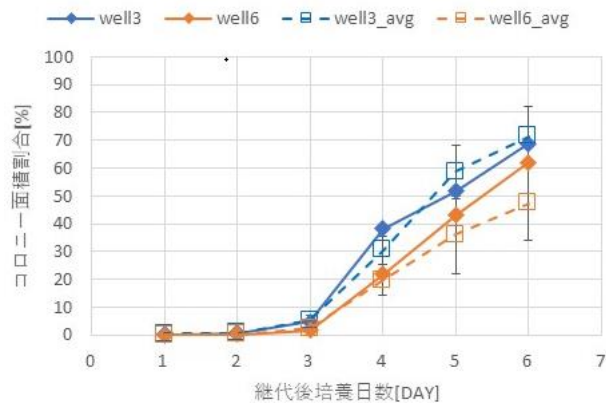


- day4以降の9点のばらつき（標準偏差）は20%程度であった
- 空間分布の明確な傾向は、現時点では見出だせなかった
- well3とwell6でのコロニー面積の差の原因は確定していない
【考えられる可能性】
 - 分注量のばらつき
 - プレートコーティング後の振盪回数
 - インキュベータ外での培地交換タイミング
 - etc

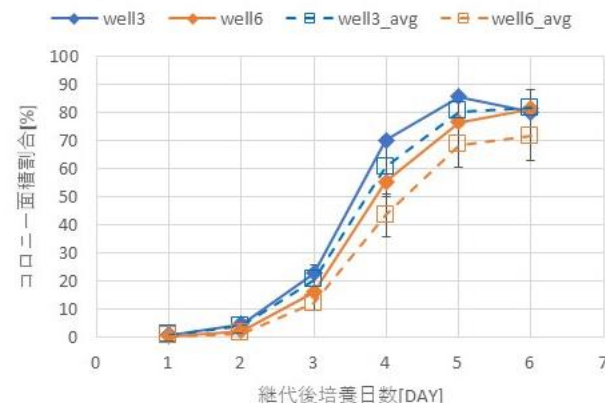
} ロボットアームの
動作速度に起因

他の測定例（同一の傾向）

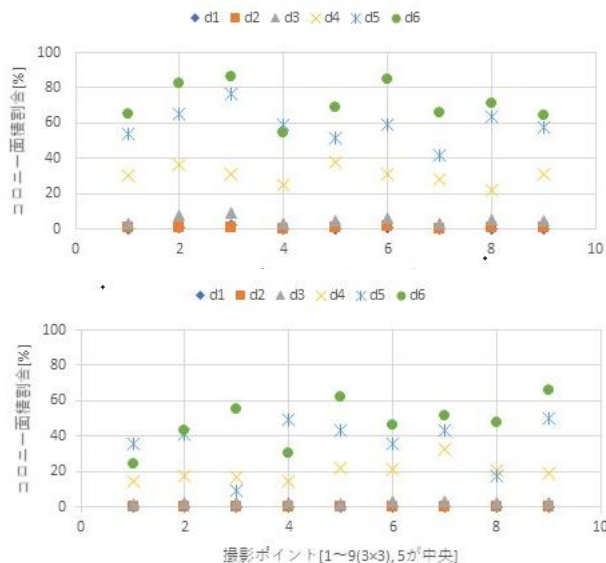
継代後コロニー増殖曲線（例）
Pass(StemFit+Y)



継代後コロニー増殖曲線（例）
Pass(PBS)



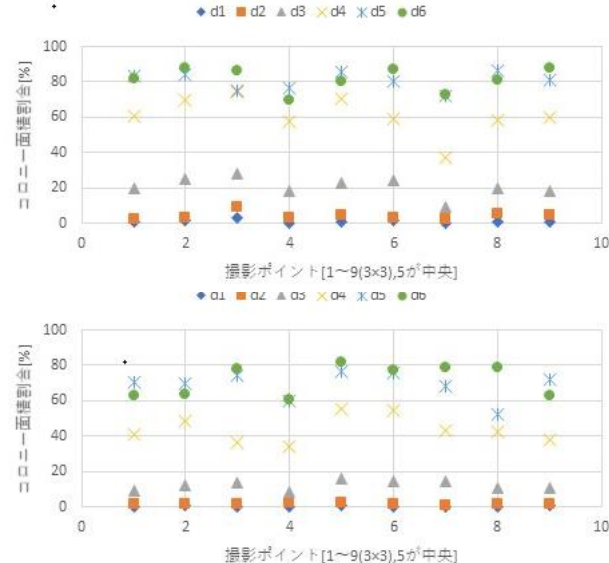
Well内空間内分布(well3(上),6(下))



撮影ポイント

1 2 3
6 5 4
7 8 9

Well内空間内分布(well3(上),6(下))



本装置（自動装置）の特徴

	長所	短所
精度	再現性の良さ	系統誤差の存在
時間	時間制限無し（昼夜作業可）	作業時間がかかる
手作業との比較	手作業に近い⇒培養経験者から見て、工程のイメージがわかりやすい	手動では簡単にできる変更でも手間がかかることがある
その他	・人が制御できないパラメータを、容易に変更できる（例. 流速） ・簡単な作業に向いている（例. <u>長期継代安定性試験</u>）	・資材の節約 ・交叉汚染のリスク低減 ・冗長性のある作業実施 上記は両立しない

元々の開発目的は、ラボでの土日作業の自動化

継代安定性試験への利用

→求めるべき重要品質特性（CQA）は？

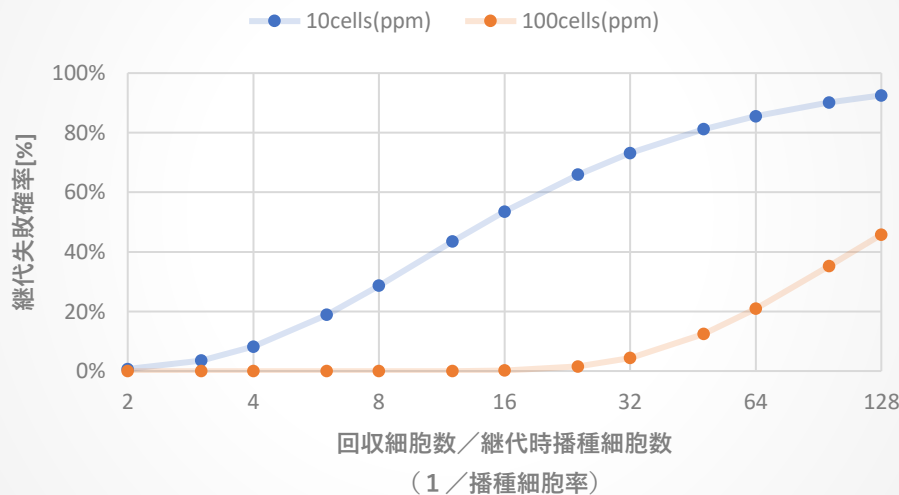
多能性幹細胞のCQA：増殖、分化、安全性など

- ・増殖・・・○（下限(well6)でも問題なければOK）
- ・分化・・・？（保存特性、プロセス依存性も含めて）
- ・安全性・・・問題となりうる細胞の存在の検出可否
⇒継代時播種量（割合）の誤差が、検出能に
与える影響を検討する

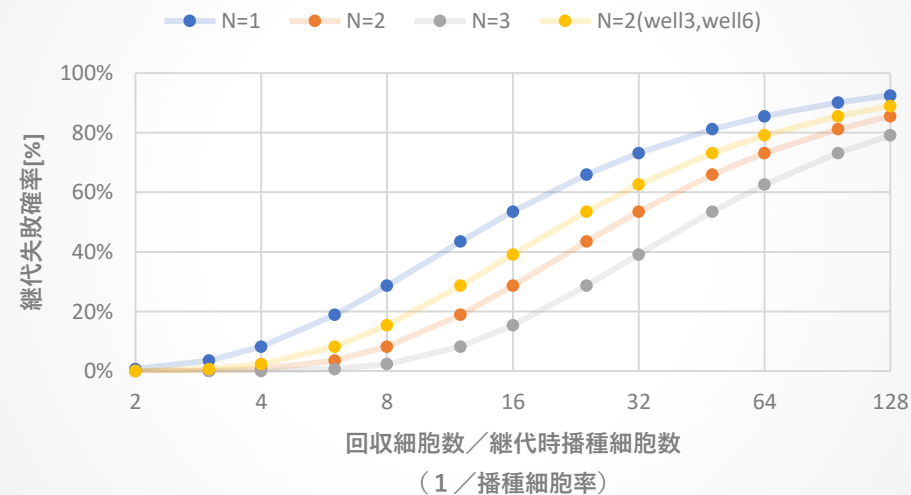
継代時サンプリングに関する検討

正常細胞群中に存在する逸脱細胞が、持ち越されない確率
逸脱細胞：ゲノム変異、残存プラスミドなど→偽陰性のリスク
(培養中のセレクション効果 (生着率大、増殖優位など) は考慮せず)
ポアソン分布で近似

逸脱細胞を継代し損ねる確率



逸脱細胞を継代し損ねる確率(10ppm)



1/10レベルの播種における、50%程度の播種量の誤差の影響

- ・100cells(ppm)レベルの細胞を取り逃がす確率には影響なし
- ・10cells(ppm)レベルの細胞を取り逃がすリスクは約20%増加する
- ・N=2(well3, 6)1/6播種で、10%未満のリスク

- ・パナソニック社製の自動培養装置（プロトタイプ）を使用し、データ取得した（100日間連続培養実施した）
- ・複数ポイントで画像撮影し播きむらがないことを確認した（コロニー面積は $\pm 20\%$ 程度に収まっていた）
- ・well間の増殖（コロニー面積）の差： $\sim 50\%$ 程度の系統誤差が見られた
- ・繰り返し作業に向く本装置の用途の一つとして継代安定性試験を想定し、上記系統誤差の影響を検討した
6wpのwell3,6を使用し、1/6量播種を繰り返すことで、1回あたりの10cellの逸脱細胞を検出し損ねる確率は約10%未満に抑えられる概算結果が得られた

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
安達 泰治

パナソニックプロダクションエンジニアリング株式会社
奥村 幸司
久保 泰康
柴田 徳啓
津守 基夢

公益財団法人京都大学iPS細胞研究財団
研究開発センター
梅景 雅史
上田 杏菜
大野 モニカ
久保田 千晶
細胞調製施設(FiT) 品質部
吉岡 貴世

(敬称略)