

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-295822

(P2005-295822A)

(43) 公開日 平成17年10月27日(2005. 10. 27)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 5/06

F I

C 1 2 N 5/00

E

テーマコード (参考)

4 B O 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2004-113018 (P2004-113018)

(22) 出願日 平成16年4月7日(2004. 4. 7)

(71) 出願人 000000376

オリンパス株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(74) 代理人 100118913

弁理士 上田 邦生

(74) 代理人 100112737

弁理士 藤田 考晴

(72) 発明者 林 孔華

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オ

リンパス株式会社内

Fターム(参考) 4B065 AA93X AC20 BA24 BA30 BC01

BD22 CA44

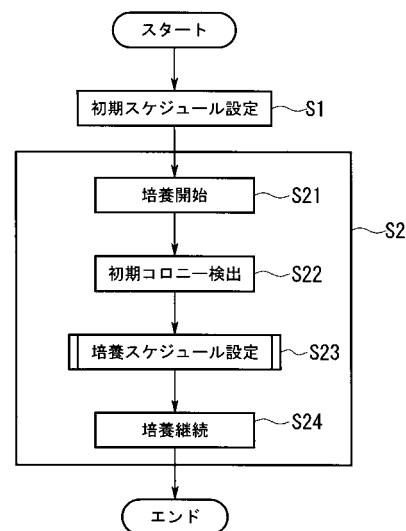
(54) 【発明の名称】 培養スケジュール設定方法及び細胞培養方法

(57) 【要約】

【課題】 骨髓液の培養開始後早期に骨髓液の品質の良否を判定でき、無駄な培養工程を行うことを防止し、効率よく細胞を培養する。

【解決手段】 培養容器内に骨髓液を播種して培養する際の培養スケジュールを設定する方法であって、培養開始直後の所定期間内に、複数の幹細胞の塊からなる初期コロニーを検出し（ステップS22）、培養容器内において検出された初期コロニー数に基づいて、培養を継続するか否かの判断を行う培養スケジュール設定方法を提供する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

培養容器内に骨髓液を播種して培養する際の培養スケジュールを設定する方法であって、
培養開始直後の所定期間内に、複数の幹細胞の塊からなる初期コロニーを検出し、
培養容器内において検出された初期コロニーの数に基づいて、培養を継続するか否かの判断を行う培養スケジュール設定方法。

【請求項 2】

前記所定期間が 3 日以内である請求項 1 に記載の培養スケジュール設定方法。

【請求項 3】

前記初期コロニーが、培養容器内の骨髓液に光を照射し、骨髓液を透過した光を検出することにより検出される請求項 1 または請求項 2 に記載の培養スケジュール設定方法。

【請求項 4】

前記初期コロニーの検出前に、培養容器内の骨髓液を溶血処理する請求項 1 または請求項 2 に記載の培養スケジュール設定方法。

【請求項 5】

検出された初期コロニーの数が所定のしきい値より少ないときに、培養中止を判断する請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載の培養スケジュール設定方法。

【請求項 6】

検出された初期コロニーの数が所定のしきい値以上のときに、培養継続を判断する請求項 1 から請求項 5 のいずれかに記載の培養スケジュール設定方法。

【請求項 7】

骨髓液提供者の年齢によって前記しきい値を補正する請求項 5 または請求項 6 に記載の培養スケジュール設定方法。

【請求項 8】

請求項 1 から請求項 7 のいずれかに記載の培養スケジュール設定方法により設定された培養スケジュールに基づいて細胞を培養する細胞培養方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、培養スケジュール設定方法および細胞培養方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、いわゆる再生医療において、術後の生体組織における欠損部の修復速度を高めるために、患者から採取した骨髓液等から間葉系幹細胞を取り出して、βリン酸三カルシウム（β-TCP）やハイドロキシアパタイト（HAP）等の生体組織補填材とともに培養することにより、培養骨に代表される生体組織補填体を製造することが提案されている。生体組織補填体は、移植時に、すでに生体組織補填材を足場にして増殖した多くの間葉系幹細胞を含んでいるので、手術後に体内で細胞を増殖させる方法と比較すると、自家組織に置換されるまでの日数を大幅に短縮することができる（例えば、非特許文献 1 参照。）

【0003】

生体組織補填体を製造するには、一般に、まず、患者の骨髓液を培養容器内で一次培養して内部に含まれている間葉系幹細胞を必要細胞数まで増加させる。この過程において、成長した間葉系幹細胞は、少なくとも 1 回以上、培養容器から剥がされて、さらに大きな培養容器に移し替えられる。そして、最終的に必要細胞数まで増加したところで、再度、培養容器から剥離させられ、生体組織補填材に付着させられて、二次培養が行われる。これにより、生体組織補填体が製造される（例えば、非特許文献 2 参照。）。

【非特許文献 1】植村他 2 名，「生分解性 β-TCP 多孔材料を用いた骨におけるティッシュエンジニアリングー生体内で強度を増す新しい材料オスフェリオンー」，メディカル

10

20

30

40

50

朝日、朝日新聞社、2001年10月1日、第30巻、第10号、p. 46-49

【非特許文献2】吉川、「骨髓間葉系細胞による培養真皮、培養骨—骨髓間葉系細胞による再生医療—」、バイオインダストリー、株式会社シーエムシー出版、2001年、第18巻、第7号、p. 46-53

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

従来、骨髓液を培養して必要細胞数まで増殖させる一次培養工程において、実際にその骨髓液内に含有されている間葉系幹細胞が必要細胞数まで増殖するか否かについては、培養容器内に形成される間葉系幹細胞のコロニーを目視にて観察し、その大きさを測ることによって判断するのが一般的であった。この場合、コロニーの目視による判断には、一次培養工程がある程度進行する必要がある、少なくとも1週間以上の培養期間が必要であった。

10

【0005】

しかしながら、間葉系幹細胞が必要細胞数まで増殖するか否か、すなわち、骨髓液の品質の良否が、培養開始から1週間経過しなければ判断できないのでは、仮に1週間経過後に必要な細胞数まで増殖しないと判断される場合には、それまでの培養工程が無駄になるという不都合がある。また、必要細胞数まで増殖する時期が予測できれば、細胞の培養スケジュールを設定でき、また、最終的な手術日を決定できるので便利である。

【0006】

20

この発明は上述した事情に鑑みてなされたものであって、骨髓液の培養開始後早期に骨髓液の品質の良否を判定でき、無駄な培養工程を行うことを防止し、効率よく細胞を培養できる培養スケジュール設定方法および細胞培養方法を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記目的を達成するために、本発明は、以下の手段を提供する。

本発明は、培養容器内に骨髓液を播種して培養する際の培養スケジュールを設定する方法であって、培養開始直後の所定期間内に、複数の幹細胞の塊からなる初期コロニーを検出し、培養容器内において検出された初期コロニーの数に基づいて培養を継続するか否かを判断する培養スケジュール設定方法を提供する。

30

【0008】

発明者は、培養開始直後の所定期間内に形成される微細なコロニー（以下、初期コロニーともいう。）の数が、その骨髓液内に含まれる幹細胞の増殖能と相関しているという知見を得た。この初期コロニーは、幹細胞数50個程度、数100 μ m程度の大きさを有するため目視で観察することはできないが、顕微鏡観察により検出することができる。そこで、培養開始直後の所定期間内に初期コロニーを検出して、その数を計数することにより、幹細胞の増殖能を判断でき、精度よく培養スケジュールを設定することが可能となる。

【0009】

その結果、例えば、幹細胞の増殖能が極めて低いことが判明した場合には、それ以上の培養工程継続を中止して、培養作業の無駄を省くことができ、また、骨髓液の再採取等の次善の策を講じることができる。また、幹細胞の増殖能が低い、必要細胞数まで達することができる程度の増殖能を有すると判断できる場合には、それに合わせた培養スケジュールを設定し、適正な培養を行うことができる。さらには、移植日の設定や変更等を行うことが可能となる。

40

【0010】

上記発明においては、前記培養開始直後の所定期間が3日以内であることが好ましい。

培養開始後2～3日程度で初期コロニーが形成されることが判明した。このため、この期間に初期コロニーの検出、計数を行うことで、極めて早期に幹細胞の増殖能を判定することができる。

【0011】

50

また、上記発明においては、前記初期コロニーの検出が、培養容器内の骨髓液に光を照射し、骨髓液を透過した光を検出することにより行われることとしてもよい。培養開始直後は、培養容器内の骨髓液に光を照射しても、幹細胞が赤血球等に覆われているために透過する光が少ない。しかしながら、所定の期間、例えば2～3日経過して初期コロニーが形成されると、該初期コロニーが盛り上がり、それを覆っている赤血球等にひびが入る。このため、照射された光がひびを透過するようになり、この光を観察することによって、初期コロニーを簡易に検出することが可能となる。

【0012】

また、上記発明においては、前記初期コロニーの検出前に、培養容器内の骨髓液を溶血処理することとしてもよい。

10

溶血処理により、赤血球の血球成分が除去されるので、初期コロニーの顕微鏡観察が容易になる。

【0013】

また、上記発明においては、検出された初期コロニーの数が所定のしきい値より少ないときに、培養中止を判断することとしてもよい。培養中止を判断することにより、それ以上の無駄な培養作業が不要となり、コストおよび時間の無駄の発生を防止することができる。

さらに、上記発明においては、検出された初期コロニーの数が所定のしきい値以上のときに、培養継続を判断することとしてもよい。

【0014】

20

また、上記発明においては、骨髓液提供者の年齢によって前記しきい値を補正することが好ましい。幹細胞の増殖能は、年齢とともに変化するため、一律に同一のしきい値を設定したのでは、実情に沿わない場合があるからである。例えば、一般には、骨髓液提供者の年齢が高まるにつれて細胞増殖能は低下していくことになる。したがって、年齢とともにしきい値を上げ、培養中止または培養継続を判断することにより、培養作業の無駄を省くことができる。

【0015】

また、本発明は、上記培養スケジュール設定方法により設定された培養スケジュールに基づいて細胞を培養する細胞培養方法を提供する。

この発明によれば、細胞の増殖能に基づいて設定された培養スケジュールに沿って細胞を培養するので、効率的に培養することができ、また、最終的に製品として出荷可能な時期あるいは移植手術が可能となる時期を精度よく予測することが可能となる。

30

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、骨髓液の培養開始後早期に骨髓液の品質の良否を判定でき、無駄な培養工程を行うことを防止して、細胞を効率よく培養することができるという効果を奏する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

この発明の一実施形態に係る培養スケジュール設定方法および細胞培養方法について図1～図5を参照して以下に説明する。

40

本実施形態に細胞培養方法は、図1に示されるように、培養開始前に暫定的に設定する初期スケジュール設定ステップS1と、該初期スケジュール設定ステップS1において設定された暫定的なスケジュールに従って細胞の培養を開始する培養ステップS2とを含んでいる。また、本実施形態に係る培養スケジュール設定方法は、培養を開始した後に行われる初期コロニー検出ステップS22と培養スケジュール設定ステップS23とを含んでいる。

【0018】

初期スケジュール設定ステップS1は、骨髓液提供者の年齢や生活習慣等の種々のファクターを考慮して、培地の交換時期や培養容器の切替時期等、さらには移植手術予定日等

50

の培養スケジュールを設定する。

そして、骨髓液提供者から提供された骨髓液を所定の培地と混合して細胞懸濁液を製造し、製造された細胞懸濁液を所定の培養容器内に投入して、前記暫定的な培養スケジュールに基づいて細胞の培養が開始される（ステップ S 2 1）。

【0019】

ここで、使用される培地は、例えば、MEM (Minimal Essential Medium: 最小必須培地)、FBS (Fetal Bovine Serum: ウシ胎児血清)、抗生剤を 84 : 15 : 1 の配合比率で混合したものである。なお、この配合比率は任意であり、また、ウシ胎児血清に代えてヒト血清を用いてもよい。

また、培養条件は、温度 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 100%、 CO_2 濃度 5% である。

10

【0020】

次に、初期コロニー検出ステップ S 2 2 について説明する。

初期コロニー検出ステップ S 2 2 は、培養開始直後の所定期間、例えば、2～3 日以内に行われるステップであり、培養容器内に静置された状態で形成される 50 個以上の幹細胞の塊からなる初期コロニーを検出する。初期コロニーは、数 $100\ \mu\text{m}$ 程度の塊であり、目視では観察できないので、以下の方法により検出する。

【0021】

すなわち、倒立顕微鏡を用いて培養容器内の細胞懸濁液の上方から光を照射し、培養容器の下方に対物レンズを配置して観察する。骨髓液と培地とを混合してなる細胞懸濁液には、赤血球等の血球成分も多く含まれているため、培養初期においては赤血球が全面を膜状に覆っていて上方からの光が通過できない状態になっている。この場合に、初期コロニーが形成されると、該初期コロニーの部分において表面を覆っている赤血球等からなる層 (layer) が盛り上がり、その層 (layer) に亀裂が生じるため、上方からの光が通過できるようになる。

20

【0022】

そこで、倒立顕微鏡によって培養容器を全面にわたって走査し、光が漏れている箇所を探すことにより、初期コロニーが検出されることになる。そして、検出された初期コロニーの数を計数して初期コロニー数 C を求めることにより、初期コロニー検出ステップ S 2 2 が終了する。

【0023】

次に、培養スケジュール設定ステップ S 2 3 について説明する。

初期コロニー数 C と幹細胞の増殖能とは図 2 に示される関係がある。図 2 は、幹細胞が継代可能な細胞世代数と、初期コロニー数との関係を示している。これによれば、初期コロニー数が多いほど細胞世代数が多く、幹細胞の増殖能が高いということがわかる。

また、図 3 に、骨髓液提供者の年齢と細胞増殖速度との関係を示す。この図 3 によれば、細胞提供者の年齢が 40 歳を超えて高くなるほど、細胞増殖速度が低下していくことがわかる。

30

【0024】

そこで、培養スケジュール設定ステップ S 2 3 においては、上記事実を考慮して、図 4 に示されるように、まず、その後の培養を継続するか中止するかの判断を行う（ステップ S 2 3 1）。

40

すなわち、原則としては、初期コロニー検出ステップ S 2 2 において検出された初期コロニー数 C が所定のしきい値 X より大きいかな否かによって培養を継続するか否かを判断する。初期コロニー数 C がしきい値 X より小さい場合には、細胞増殖能が低いと判断できるため、培養を中止することにより、その後の培養作業の無駄を省くことができる。

【0025】

また、しきい値 X の設定に際しては、骨髓液提供者の年齢 A を考慮している。すなわち、図 5 に示されるように、骨髓液提供者の年齢 A および上記初期コロニー検出ステップ S 2 2 において計数された初期コロニー数 C が入力され（ステップ S 2 3 1 1）、骨髓液提供者の年齢 A が 40 歳より高いかな否かが判断される（ステップ S 2 3 1 2）。

50

【0026】

ステップS2312において骨髓液提供者の年齢Aが40歳を超える場合には、骨髓液提供者の年齢Aに応じて、しきい値Xを補正する年齢係数Bが算出される（ステップS2313）。年齢係数Bは、例えば、 $B = (10 / (A - 20) + 1 / 2)$ であり、年齢Aが高くなるにしたがって小さくなる係数である。そして、この年齢計数Bを用いてしきい値Xが算出される（ステップS2314）。しきい値Xは、基準となるしきい値 X_0 を年齢係数Bで除した値である。

一方、骨髓液提供者の年齢Aが40歳以下の場合には、ステップS2312において、しきい値Xを基準となるしきい値 X_0 自体とする設定がなされる（ステップS2315）。

10

【0027】

次いで、上記により設定されたしきい値Xと初期コロニー数Cとが比較される（ステップS2316）。初期コロニー数Cが少ない場合であっても、骨髓液提供者の年齢Aが40歳以下の場合には、十分な細胞増殖能が期待できるので、年齢係数Bを考慮することなくしきい値Xを基準となるしきい値 X_0 に保ち、比較的少ない初期コロニー数Cの場合にも培養継続の判断が可能となる（ステップS2316）。

一方、初期コロニー数Cが多い場合であっても、骨髓液提供者の年齢Aが40歳を超える場合には、細胞増殖能が低く、培養中止の判断をした方がよい場合がある。したがって、しきい値Xを高くして、初期コロニー数Cが十分ではない場合には培養の中止を判断する（ステップS2317）。

20

【0028】

また、培養スケジュール設定ステップS23においては、初期コロニー数Cがしきい値Xに対して大きい場合には、培養を継続する判断が行われ（ステップS231）、さらに、初期コロニー数Cおよび骨髓提供者の年齢Aによって定まる細胞増殖速度に応じて、その後の1次培養終了までの時間、2次培養に要する時間、手術日までに要する時間を予測し再設定する（ステップS232）。

そして、このように設定された培養スケジュールに基づいて、その後の培養を継続する（ステップS24）ことにより、細胞が培養されることになる。

【0029】

本実施形態に係る培養スケジュール設定方法および細胞培養方法によれば、初期コロニー数Cに基づいて培養スケジュールを設定するので、培養開始直後3日以内という、極めて早期に培養を継続するか否かを判断でき、培養を中止する場合には、その後の培養作業を行わずに済むので、時間およびコストの無駄を省くことができる。

30

【0030】

また、培養開始直後に検出される初期コロニー数Cによってその後の培養スケジュールを設定できるので、細胞増殖能の高い細胞に対しては、必要細胞数まで迅速に増殖させて移植手術までに要する時間を短縮することができる。また、細胞増殖能の低い細胞に対しては、必要細胞数に達するまでに要する時間が長いことが予想されるので、十分な培養期間を確保して、細胞を確実に増殖させることができる。

【0031】

なお、本発明に係る培養スケジュール設定方法および細胞培養方法は、上記実施形態に限定されるものではない。

40

例えば、上記実施形態においては、初期コロニー検出ステップS22において、培養容器の全面にわたって走査することとしたが、培養容器が大きい場合には、全面にわたる走査に時間がかかることが考えられる。この場合には、培養容器内部を複数の領域に区画して、その領域のいくつかを選択的に走査することにより、領域毎の初期コロニー数を求め、該領域毎の初期コロニー数に基づいて全体の初期コロニー数Cを推定することにしてもよい。

【0032】

また、骨髓液を培養する培養容器の他に、サンプル用の小さい培養容器を用いて同条件

50

で培養する場合には、このサンプル用の培養容器に対して全面にわたる走査を行うことにしてもよい。

【0033】

また、赤血球の膜に生ずる亀裂の検出は、顕微鏡を扱う観察者が、接眼レンズを通して、あるいは、撮影されモニタに表示された画像を通して行ってもよいが、撮影された画像を処理して亀裂発生部を検出することとすれば、自動的に検出することができる。また、画像処理により亀裂発生部を直接検出する場合の他、亀裂発生により漏れる光が増大することを利用して、対物レンズ側で検出される光の総光量を取得することにより、その総光量に基づいて、初期コロニー数を推定することにしてもよい。

【0034】

また、培養開始前に、細胞懸濁液に塩化アンモニウム等の溶血剤を添加して攪拌する溶血処理を施すことにより、赤血球を除去してもよい。このようにすることで、初期コロニーの形状を顕微鏡により直接観察することができる。

また、上記実施形態においては、培養スケジュールの設定ステップにおいて、培養の継続か否かの判断や、各培養工程や移植手術の時間的なスケジュールについて再設定することとしたが、これに加えて、添加する成長因子や栄養剤等の量や種類を変更することにしてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】この発明の一実施形態に係る培養スケジュール設定方法を示すフローチャートである。

【図2】初期コロニー数と細胞世代数との関係を示すグラフである。

【図3】骨髓液提供者の年齢と細胞増殖速度との関係を示すグラフである。

【図4】図1の培養スケジュール設定方法における培養スケジュール設定ステップを示すフローチャートである。

【図5】図4の培養スケジュール設定ステップにおける培養継続判断ステップを説明するフローチャートである。

【符号の説明】

【0036】

A 骨髓液提供者の年齢

C 初期コロニー数

S22 初期コロニー検出ステップ

S23 培養スケジュール設定ステップ

S2315 培養中止判断ステップ

S24 培養継続判断ステップ

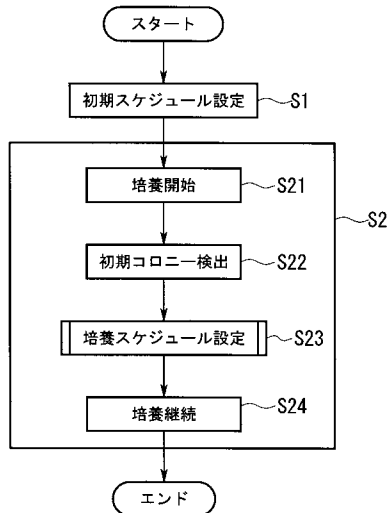
X しきい値

10

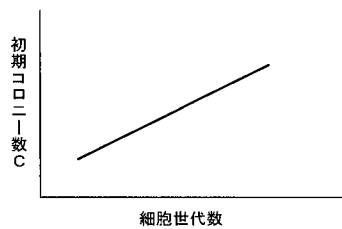
20

30

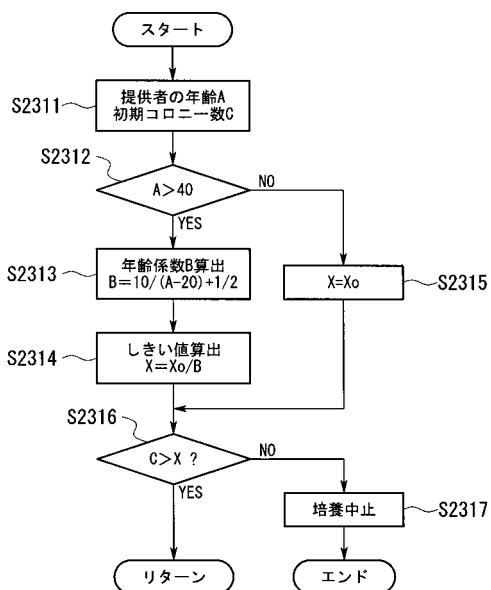
【図 1】



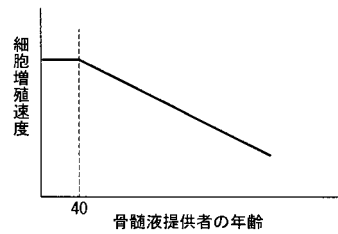
【図 2】



【図 5】



【図 3】



【図 4】

