

を考えなくてはならない。その中で、継代後の細胞の増殖を予想することが難しく、細胞数のばらつきの原因になったと考えられる。また、ALP活性にもかなりのばらつきが見られた。

2) 無血清培地により培養された骨髄由来間質細胞 (BMSCs) の評価

次に、新たに開発された動物由来成分を全く含まない無血清培地を用いてBMSCsの初代培養を行ない、細胞の形態と増殖の比較を行なった。(図3)。

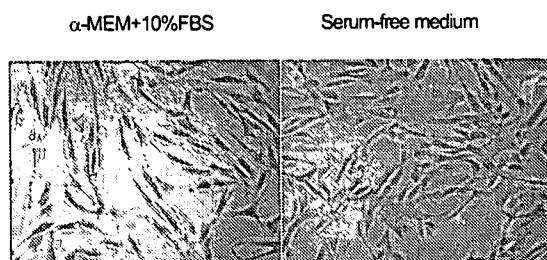


図3. α -MEMとserum-free mediumの比較初代培養 (P0) において、ほぼ同様のコロニー形成と増殖を認めたが、細胞形態には多少の違いを認めた。

図3に示すように、ヒトBMSCsにおいては、無血清培地でも通常の培地である α -MEM+血清と同様のコロニー形成を認め、細胞の増殖もほぼ同様であった。特に、用いた無血清培地は動物由来成分を含まない培地であり、次世代の培地といえる。この培地にて、通常培地と遜色ないコロニー形成と増殖を示したことは、有望な結果であった。

しかしながら、継代後において、細胞の増殖は無血清培地では遅くなり、形態にも明らかな変化を認めた (図4)。

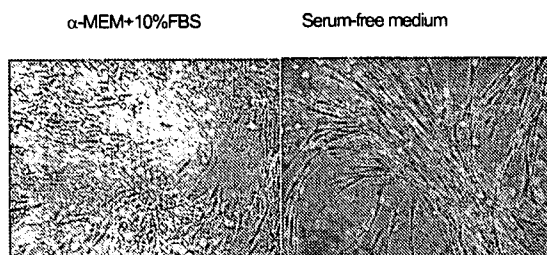


図4. α -MEMとserum-free mediumの比較継代培養 (P1) において、無血清培地では増殖が鈍化し、形態にも明らかな違いを認めるようになった。

無血清培地による培養細胞は、紡錘形であり、培養期間が長くなっても多角形は示さず、石灰化noduleの形成も認めなかった。一方、血清入り培地で培養された細胞は、継代後には徐々に多角形を示し、一部は分化したと思われる細胞が存在した。増殖については、初代培養時は無血清培地、血清入り培地ともほぼ同等であったが、継代後は血清入り培地と比較して、無血清培地における増殖は緩やかであった。

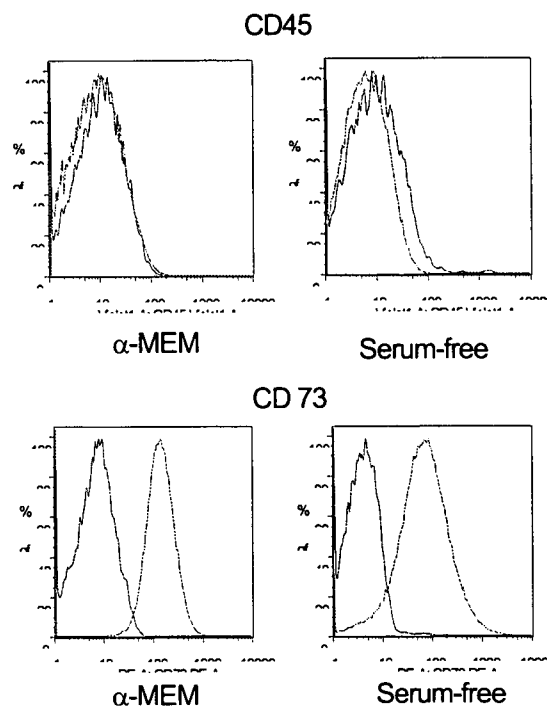


図5. FACS解析。得られた細胞は、 α -MEM、無血清培地とも、CD45(-)、CD73(+), CD105(+)であり、MSC様であった。

異なる培地の評価のためには、初代培養よりそれぞれの培地で培養を行なうことが重要と考えられる。今回学内倫理委員会の承認とボランティアからの採取が可能となったため、同時に異なる培地での培養を行ない、得られた細胞の表面抗原の解析を行なうことが可能であった。得られた細胞は、CD45(-)、CD73(+)で、いわゆる間葉系幹細胞の表面抗原のプロファイルと一致していた (図5)。表面抗原の詳細な検討からは、BMSCsはmixed populationであり、CD105、CD90などの陽性率はサンプルにより異なる。しかしながら血球系のマーカーであるCD34は常に(-)である。しかしながら、今回無血清培地にて培養されたBMSCsでは、一部のCD34陽性細胞が見られた (図6)

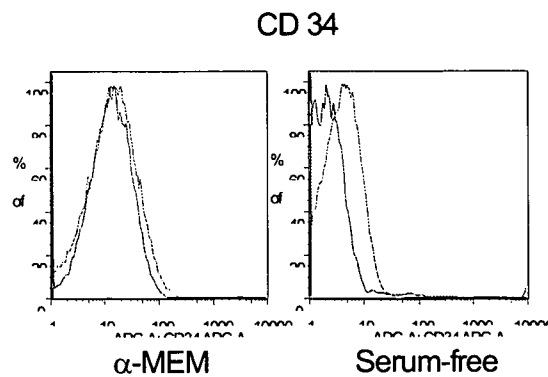


図6. FACS解析。通常BMSCsではCD34陽性分画はないが、無血清培地にて得られた細胞では、一部が陽性であった。

現時点では、培地により異なる細胞分画が選択された

のか、あるいは培地により細胞の表面抗原の発現が変化したのかは明らかではない。いずれにせよ、形態の変化を考えると、無血清培地により培養された細胞と、通常血清入り培地で培養された細胞とでは、質的な変化があることが推測される。

3) 血清がBMSCsの分化に与える影響について

次に、それぞれの血清で培養された細胞のALP活性について検討を行なった。無血清培地では、血清入りの通常培地と比較して、分化誘導前のALP活性が極めて低く、未分化な状態が維持されている可能性が示された。一方、15日間の分化誘導では、ALP活性の上昇が認められなかった(図7)。一方通常血清のデキサメタゾンによる骨分化誘導培地では、分化誘導前と比較して、約1.5%のALP活性の上昇を認めた。また、分化誘導前の状態でも、一定のALP活性を示したことから、培地に含まれる血清成分により、分化誘導前の状態でも一定の分化細胞の存在が示唆された。

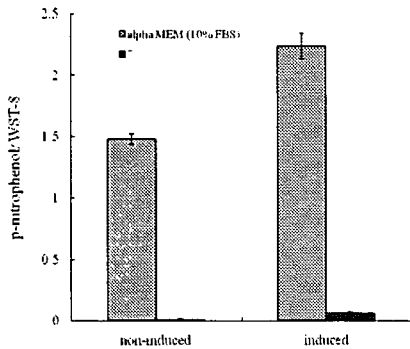


図7. 無血清培地および血清入り通常培地における分化誘導実験。無血清培地(茶)では、血清入り通常培地(α -MEM)(ブルー)と比較して、ALP活性が低く、また分化誘導後の上昇も少ない。

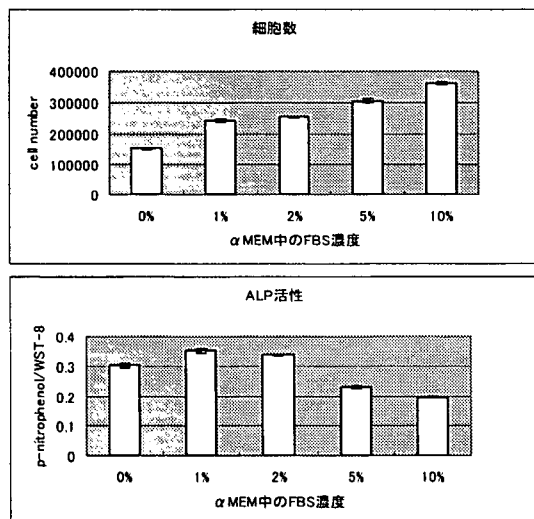


図8. 血清濃度が分化誘導に与える影響。さまざまな血清濃度下で、骨分化誘導培地によるALP活性の上昇を調べた。

ALP活性は1-2%の血清存在下で最大となったが、血清濃度が上昇するにしたがって、ALP活性は低下した。

次に、血清が培養細胞の分化誘導に与える影響について検討を行なった。BMSCsに対して、デキサメタゾンを含む骨分化誘導培地にて7日間分化誘導を行なった。血清濃度が上がるにつれ、細胞増殖は促進されたが、ALP活性は1%~2%の低血清でもっとも上昇した。一方、血清濃度が上がるにつれて、ALP活性は下がる傾向であった(図8)。

次に、BMP-2による分化誘導についても、さまざまな血清濃度にて検討した。血清濃度が2%で最大のALP活性を示したが、5%以上10%でもALP活性に変化はみとめなかった(図9)。

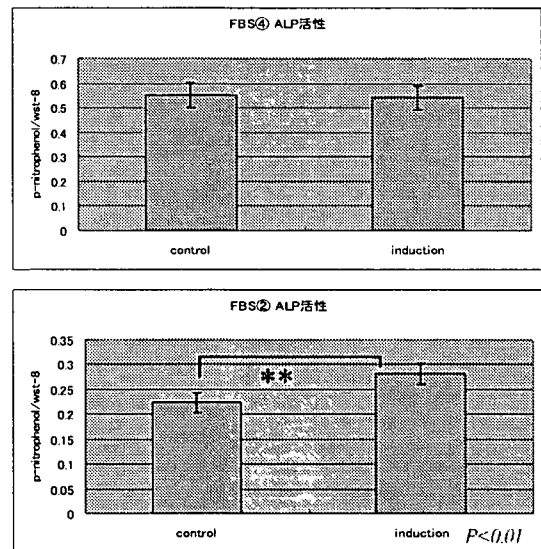


図9. 血清濃度が分化誘導に与える影響。さまざまな血清濃度下で、BMP-2(100ng/ml)による分化誘導を行い、ALP活性の上昇を調べた。ALP活性は2%の血清存在下で最大となったが、それ以上の血清濃度では有意な変化を認めなかった。

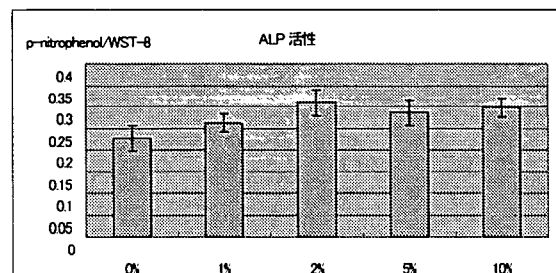


図10. 血清の種類が細胞の分化誘導に与える影響。さまざまな血清により、同一の細胞への同一の分化誘導刺激(BMP-2 100ng/ml)を行なっても、添加する血清により分化誘導の結果が異なる。

以上から、BMP-2による分化誘導は、血清濃度の影響を受けることが示唆されるが、通常使用する血清濃度で

は大きな低血清ほど有効であると考えられるが、その一方で、BMP-2 による分化誘導は、血清の種類による影響を大きく受けることが明らかとなった。

同一患者から培養された細胞をグループ分けし、それぞれに対して異なる血清を用いた培養液で培養し、同一の分化誘導刺激を与えた。その結果、血清により分化誘導の結果には違いがあることが明らかとなった (図 1 0)。特に、BMP-2 など増殖因子を用いた分化誘導では、血清に含まれる成分の違いにより、antagonist の誘導を起こす可能性が示唆された。それを明らかにするために、分化誘導の得られなかった細胞と血清の組み合わせを用いて、BMP-2 の antagonist である noggin と follistatin の発現をリアルタイム PCR にて定量的に測定を行なった (図 1 1)。

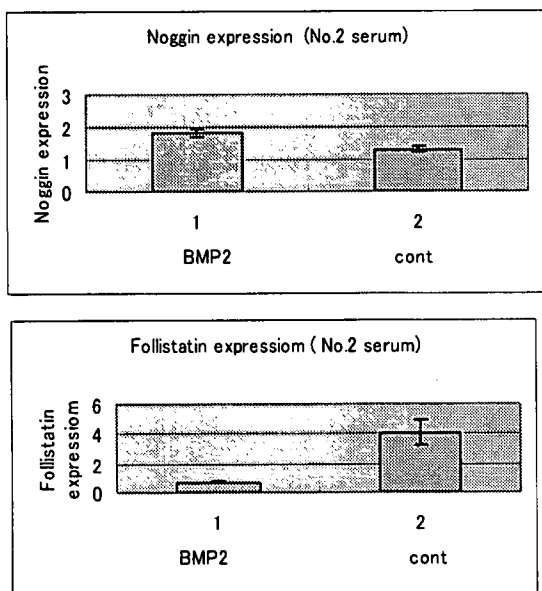


図 1 1. BMP-2 の負荷による noggin と follistatin のメッセージ発現 (定量 PCR による)。

リアルタイム PCR では、BMP-2 の添加により noggin の発現が誘導されるが、follistatin の発現は誘導されなかった。その一方、分化誘導する前の細胞には、すでに noggin、follistatin の発現が認められ、これが BMP-2 に対する反応性に影響している可能性が示唆された。

4) 自動培養システムの開発

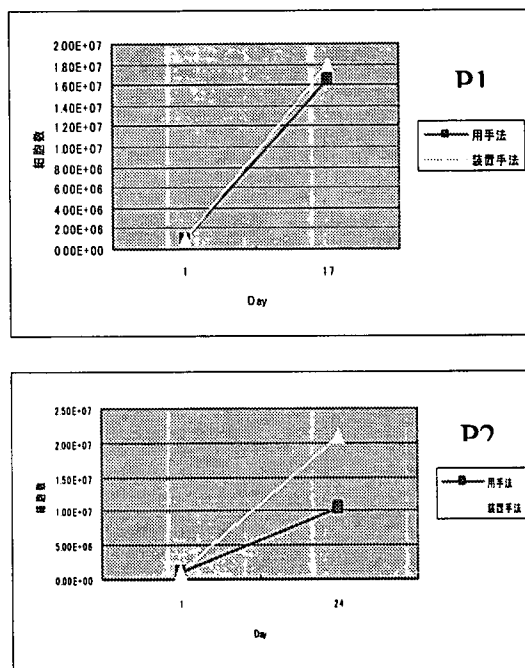
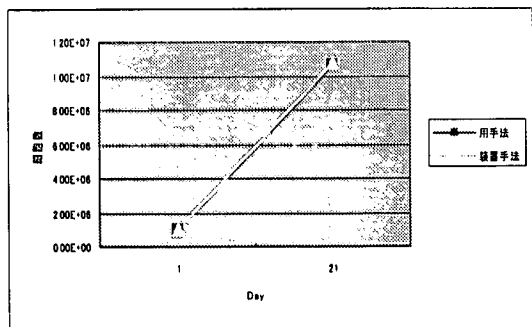


図 1 2. 自動培養装置による細胞増殖と従来法の比較。自動培養装置により、初代培養から P2 まで、手作業による培養操作と同等以上の細胞増殖が得られた。

次に、β版となる自動培養装置を用いて、ヒト由来間葉系幹細胞を用いて、動作確認を行った (図 1 2)。

ヒト細胞を用いて継代操作、および初代培養時の条件の設定を行い、培養操作の初めから細胞回収時まで、人手を要しない細胞培養が可能であることが示された。

D. 考察

自己血清については、ヒト由来線維芽細胞を用いて、実際に FBS との比較や異なる血清濃度の影響について詳細に検討を行った。平成 1 8 年度には、患者由来の間葉系幹細胞を用いて、増殖能、および ALP 活性の比較を行った。臨床研究においては、個々の患者間のばらつきが細胞にあるのか、血清にあるのかは明らかではないが、培養を通じて患者毎に異なる細胞と血清を用いて一定の品質の細胞を培養することの困難さが明らかとなり、今後さらなる検討が必要である。

無血清培地による検討では、新たに開発された無血清培地にて、ボランティアの骨髄由来の間質細胞 (BMSC) は、初代培養から継代培養まで可能であることが示された。細胞の形態には大きな違いが見られるが、細胞の表面抗原はほぼ同じであり、得られた細胞は同一であると考えられた。通常の血清培地で培養された細胞と比較して、無血清培地で培養された細胞は未分化な状態に保たれており、ALP 活性は有意に低い値であった。このことから、無血清培地で培養された細胞に対しては、長期間の培養でも、幹細胞としての性質が維持されているものと考えられた。

一方、分化誘導は添加する血清の影響を大きく受けることが示唆された。通常の骨分化誘導培地では、血清濃度が上昇するとともに、分化誘導されにくくなり、また BMP-2 に対しては、2% から 10% まで ALP 活性に変化はなく、1% 以下では低い ALP 活性であった。以上から、

分化誘導には低血清培地を用いることが有用と考えられた。

BMP-2による分化誘導では、用いる血清により分化誘導の結果が異なることが示された。現在行なわれている骨再生では、自己血清が用いられている。自己血清では感染の危険が少ない代わりに、血清成分が安定していない問題点がある。本研究の結果からは、自己血清を用いた場合の問題として、分化誘導能に違いをもたらす可能性が示唆された。

現在ウシ血清を用いた培養は臨床では用いられなくなっており、代わりに自己血清を用いた培養が主体となっている。これにより感染の可能性を減らすことや、動物由来の蛋白による免疫応答を防ぐことが可能である。しかしながら、骨再生に関しては血清が分化誘導能に影響を与えることが明らかとなった。特に、同じ細胞を用いても、用いる血清により分化誘導の結果が異なることから、安定した分化誘導を得るためには、血清を含まない新たな培地の使用が望ましいと考えられる。

実際に無血清培地で培養した細胞と通常血清入り培地で培養した細胞の比較データは少ないが、今回われわれは健康なボランティアから骨髓液を採取し、同じ骨髓液由来のBMSCを同時に無血清培地と通常培地とで培養し、比較することができた。その結果からは、MSCを含む骨髓間質細胞は、無血清培地でも初代から培養が可能であることが明らかとなった。また、細胞の表面抗原の解析からは、得られる細胞分画はほぼ同一であることが示された。また、無血清培地では培養中に分化傾向を示さず、血清入り培地と比較して、培養細胞の未分化性が保たれる可能性が示唆された。その一方で、培養細胞の形態には差があり、獲られた細胞の質的な差については、まだまださまざまな検証が必要と考えられた。さらに、無血清培地により得られたBMSCsでは分化誘導が得られにくい可能性があり、今後もさまざまな評価を行ない、安全性や有用性についてのデータを蓄積する必要がある。そのような情報の蓄積により安全性や有用性を示した上で、今後は無血清培地による骨再生治療へと移行することが望ましいと考えられる。

自動培養装置を含めた培養操作の自動化は、安全性の確保とともにコスト削減のためにも必要な研究である。特に、安全性確保のための基準では作業による確認作業が多く、ヒューマンエラーやコストの増加につながる可能性がある。今後培養細胞を安定して供給する上で、自動培養装置を用いた培養システムの構築は有用と考えられた。

E. 結論

培養細胞の安全で効率的な供給システムの開発は、再生医療の実用化を進める上で臨床的研究とともに車の両輪をなす重要な課題である。安全な培地、培養方法、評価方法のそれぞれについて、今後も研究を重ねることが重要である。無血清培地への移行の必然性が示されたが、得られた細胞の評価について、さらに慎重な検討が必要と考えられる。安全な培地、培養方法、評価方法のそれ

ぞれについて、今後も研究を重ねることが重要である。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Agata H, Kagami H, Watanabe N, Ueda M. Effect of ischemic culture conditions on the survival and differentiation of porcine dental pulp-derived cells. *Differentiation* in press

Mizuno D, Kagami H*, Mizuno H, Mase J, Usami K & Ueda M. Bone regeneration of dental implant dehiscence defects using cultured periosteum membrane. *Clin. Oral Imp. Res.* in press

Tomomura A, Sumita Y, Ando Y, Iejima D, Kagami H*, Honda MJ, Ueda M. Differential inducibility of human and porcine dental pulp derived cells into odontoblasts. *Connect. Tissue Res.* 48, 229-238, 2007

Iejima D, Sumita Y, Kagami H*, Ando Y, Ueda M. Odontoblast marker gene expression is enhanced by a CC-chemokine family protein MIP-3 α in human mesenchymal stem cells. *Arch. Oral Biol.* 52, 924-931, 2007

Shimizu K, Ito A, Arinobe M, Murase Y, Iwata Y, Narita Y, Kagami H, Ueda M, Honda H. Effective Cell-Seeding Technique Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force onto Decellularized Blood Vessels for Vascular Tissue Engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 472-478, 2007

Agata H, Asahina I*, Yamazaki Y, Uchida M, Shinohara Y, Honda M, Kagami H, Ueda M. Effective bone engineering using periosteum-derived cells. *J. Dent Res.* 86, 79-83, 2007

Hibi H, Yamada Y, Kagami H, Ueda M. Distraction osteogenesis assisted by tissue engineering in an irradiated mandible: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 21: 141-147, 2006.

Mase J, Mizuno H, Okada K, Sakai K, Mizuno D, Usami K, Kagami H, Ueda M. Cryopreservation of cultured periosteum: effect of different cryoprotectants and pre-incubation protocols on cell viability and osteogenic potential. *Cryobiology* 52:182-192, 2006.

Matsunuma H, Kagami H, Narita Y, Hata K-I, Ono Y, Ohshima S, and Ueda M. The potential of bone marrow-derived mononuclear cells for enhancing angiogenesis in ureteral acellular matrix. *Tissue Engineering*

12:509-518, 2006.

Tatebe M, Nakamura R, Kagami H, Okada K, Ueda M.

Differentiation of transplanted mesenchymal stem cells in a large osteochondral defect in rabbit. *Cyototherapy* 7,520-530,2005.

Ito A, Ino K, Hayashida M, Kobayashi T, Matsunuma H, Kagami H, Ueda M, Honda H. Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng* . 11,1553-61,2005.

Ito A, Hibino E, Kobayashi C, Terasaki H, Kagami H, Ueda M, Kobayashi T, Honda H. Construction and delivery of tissue-engineered human retinal pigment epithelial cell sheets, using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng*. 11, 489-96, 2005.

Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, Ueda M. Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol* 68,89-101,2005.

山田陽一、各務秀明、上田 実 幹細胞を応用した歯周組織再生 「再生歯科のテクニックとサイエンスー歯周・審美・インプラントー」 第1編 歯周組織・再生 吉江弘正/宮本泰和編 クインテッセンス出版株式会社、2005

各務秀明、渡辺真紀、外村明子、安藤由典、本田雅規、上田実 歯および歯胚由来細胞を用いた再生医療とその可能性 「再生医療」 4(1):79-83, 2005

2. 学会発表

各務秀明、朝比奈泉、縣 秀樹、本田雅規、山下直秀、東條有伸、長村登紀子、河野美保子、土屋周平、新村優佳、上田実 「自己骨髄由来培養骨芽細胞様細胞を用いた歯槽骨再生法」 先端医療研究開発シンポジウム 2008. 1. 22 東京

各務秀明 体性幹細胞を用いた顎口腔領域の再生医療：歯槽骨再生の臨床研究 東京医科歯科大学シンポジウム 東京医科歯科大学 21 世紀 COE プログラム 「歯と骨の分子破壊と再構築のフロンティア」 第 12 回公開シンポジウム 「インプラント治療の最近の進歩：再生医療との融合」 2008. 1. 20 東京

Hideaki Kagami Safety and efficacy of alveolar bone tissue engineering using bone marrow stromal cells and β -TCP, International Symposium for Musculoskeletal Bioorgan

Center 2007.11.23 Korea

各務秀明、朝比奈 泉、本田雅規、縣 秀樹、山下直秀、東條有伸、長村登紀子、田端美帆、河野美保子、土屋周平、新村優佳、上田実 「自己骨髄由来培養骨芽細胞様細胞を用いた歯槽骨再生法」 橋渡し研究支援推進プログラム 第一回 橋渡し研究カンファレンス 2007. 11. 30 東京

各務 秀明 教育講演 II 「再生医療の未来は？」 第 18 回日本歯科審美学会・第 26 回日本接着歯学会合同大会 2007. 11. 18 福岡

各務秀明、朝比奈泉、本田雅規、縣秀樹、上嶋伸知、上田実 (ワークショップ 2 臨床応用を先導する歯科の再生医療) 口腔領域の再生医療ー顎骨再生臨床研究の現状と今後の可能性についてー 2007. 8. 9 第 28 回日本炎症・再生医学会 東京

各務秀明、朝比奈泉、成田祐司、上田実 (シンポジウム 1 口腔癌の診断と治療) 口腔組織の再生医療ー顎骨再生の臨床研究と血管・神経の再生についてー 2007. 6. 14 第 31 回日本頭頸部癌学会横浜

各務秀明、本田雅規、山田陽一、水野裕和、上田 実 (シンポジウム 2 口腔領域の Stem Cell Biology) 体性幹細胞の分化誘導と口腔組織再生への応用。第 61 回日本口腔科学会総会 2007. 4. 19 神戸

各務秀明 「臨床応用の進む歯科の再生医療」 岩手医科大学歯学会第 32 回総会シンポジウム 2006. 12. 2 岩手

縣 秀樹、朝比奈 泉、山崎 安晴、各務秀明、上田 実 「骨膜由来培養細胞による骨再生能の評価」 第 60 回日本口腔科学会 2006. 5 名古屋

各務秀明 再生療法：21 世紀の展望と展開 「歯科領域における再生療法研究の現状と可能性」 第 5 回日本国際歯科大会 2006.10.14 横浜

縣 秀樹、各務秀明、上田 実 「低酸素・低グルコースが歯髄幹細胞の動態と可塑性に及ぼす影響についてー細胞の脱分化と未文化性の再獲得ー」 平成 19 年度 医学研究所 研究成果発表会 2007. 5.31-6.1 東京

各務秀明 臨床応用のはじまった神経再生医療 第 1 回 「下顎管・下歯槽神経シンポジウムーインプラントと神経損傷ー」 2006. 2.19 東京

各務秀明、上田 実 口腔・顎顔面領域における再生と分化 「口腔・顎顔面領域における組織再生ー唾液腺

と歯周組織の再生―」第 111 回 日本解剖学会総会・
全国学術集会 2006.3.29 神奈川

各務秀明「顎口腔領域の組織再生研究と今後の展望
細胞分化と可塑性―組織再生」体性幹細胞の分化誘導
と再生医療への応用 第 48 回歯科基礎医学会
2006.9.21 横浜

各務秀明、朝比奈 泉、本田雅規、縣 秀樹、上田 実
「歯科の未来を拓く再生医療」体性幹細胞を用いた顎
口腔領域の再生医療 第 6 回日本再生医療学会総会
シンポジウム 4, 2007.3.12 横浜

各務秀明、朝比奈 泉、縣 秀樹
「間葉系幹細胞を用いた歯科再生医療の現状と課題」
第112回日本解剖学会総会・全国学術集会サテライト研
究集会・談話会●歯の発生の会「第5回歯の発生生物
学と再生に関するシンポジウム」シンポジウム,
2007.3.26 神戸

Agata H, Asahina I, **Kagami H**, and Ueda M.
Evaluation of Human Periosteum –Derived Cells for Bone
Regeneration. FRONTIERS OF SKELETAL BIOLOGY
Eleventh and Valedictory Workshop on Cell Biology of
Bone and Cartilage in Health and Disease. No2. 3/2006,
Davos, Switzerland

Iejima D, **Kagami H**, Ando Y, Ueda M. Odontoblast marker
gene expression is enhanced by a CC-chemokine family
protein MIP-3a in human mesenchymal stem cells⁴th ISSCR
Annual Meeting, 6/29-7/1, 2006, Toronto, Canada

Agata H, Asahina I, **Kagami H**, and Ueda M. Evaluation
of Human Periosteum –Derived Cells for Bone
Regeneration: Comparison with Human Bone Marrow
Stromal Cells. 4th ISSCR Annual Meeting, 6/29-7/1, 2006,

Toronto, Canada

Agata H, **Kagami H**, and Ueda M. Combined influence of
anoxia/hypoxia and low glucose on cell physiology and
plasticity of porcine dental pulp stem cells. International
Society for Stem Cell Research 5th Annual Meeting,
Sun-150, June, 2007, Cairns, Queensland, Australia

Hideaki Kagami, Izumi Asahina, Hideki Agata, Masaki
Honda, Naohide Yamashita, Arinobu Tojo, Tokiko
Nagamura-Inoue, Miho Tabata⁵, Shuhei Tsuchiya, Yuka
Shinmura, and Minoru Ueda. Safety and efficacy of bone
regeneration therapy using mesenchymal stem cells at The
Institute of Medical Science Research Hospital: A
preliminary report. International Society for Stem Cell Research
5th Annual Meeting. Sun-150, June, 2007, Cairns, Queensland,
Australia

各務秀明、上田実 臨床応用の進む歯科の再生医療 第
41 回日本界面医学会学術研究会 11/5/2005 神奈川

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

「細胞品質予測モデル」

加藤竜司、山本若菜、本多裕之、他：特許出願番
号 2007-212116

特願 2005-190374 皮膚組織改善剤

特願 2006-008521 自動培養装置

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

画像処理技術を用いた培養細胞の評価法の開発
分担研究者 紀ノ岡正博 大阪大学大学院基礎工学研究科 化学工学領域 准教授

本研究では、再生医療の実用化における細胞の品質管理において重要である「細胞評価技術」の確立を目指して研究を行った。現在の再生医療に用いる細胞の評価は、人の経験に基づいて経時的なポイントにおける細胞を顕微鏡観察により行われているが、このような作業は人の感覚に依存しすぎており安定した品質管理体制とは言えない。培養中の細胞運動は、細胞の一時的画像の評価に比べて細胞を評価するための情報をより多く含んでいると考えられるため、本研究ではこのような動的変化・準動的変化をモニタリングするための細胞観察システムの開発とその情報と細胞品質との解析を行うことにより、非襲撃的細胞評価基準の探索を行った。我々が構築した細胞観察システムを用いたヒト角化細胞の動的観察からは、二つの細胞が接した状態になったときに回転運動をすることが確認され、このような挙動は細胞の培養環境（酸素濃度）を反映して細胞寿命と相互関係を示すことが示された。結果、細胞の動的情報（回転速度）を用いて細胞寿命を予測できる可能性が示唆された。また、細胞の評価は、人の経験に基づいて経時的なポイントにおける細胞を顕微鏡観察により行われているが、このような作業は人の感覚に依存しすぎており安定した品質管理体制とは言えない。これまで、非襲撃的細胞評価基準の探索しており、本年度は、準静的観察を可能とする D-グルコース培養面の設計と細胞形態変化観察に基づく細胞活性の評価を行った。さらに、本培養面の接着・形態変化機構についてのメカニズム解明を行い、本培養面の有効性を証明した。さらに、重層シート等の培養組織製品の品質管理を行う上、培養組織製品の極小部分をサンプリングして質的に観察評価を行う、弱襲撃的評価法が不可欠である。本年度は、乳腺上皮細胞シートを培養組織の製品評価を目指し、基底層安定性についての立体染色評価法を構築した。

A. 研究目的

単層増殖時においては、培養容器底面からの細胞観察は、迅速かつ簡易で最も有効な培養状況の把握手段である。図 1 に示すように、静止画(snapshot)のようにある特定の時間において観察する方法(end-point observation)は、簡易かつ安価で一般的な顕微鏡などの装置で行うことができる（静的評価、static evaluation）。その結果、汎用性が高く、多くの研究や生産の現場で、日々熟練オペレータが、細胞形態を顕微鏡下で観察し、培養環境の状況把握に努めている。しかし、容器内全体での細胞形態の集団的観察となるため、い

わゆる平衡論的な情報のみが取得可能である。一方、培養面への接着を伴う足場依存性細胞において、細胞運動は培養環境を把握する上で重要な評価要素である。個々の細胞の動画(movie)のような経時的観察(time-lapse observation)は、より高質な情報が得られ、速度論的な解析を行うことができるが、装置、操作が煩雑になり汎用性に乏しい（動的評価、dynamic evaluation）。また、培養面の修飾により、細胞の一部を強く培養面に固定することで、細胞の移動は、若干制限されるものの、細胞の退縮が阻止されて伸展のみとなり、移動が時間積分され細胞形態が変化する。そこで、細胞を一時的に培養条件とは異なる状態に曝すことで評価する方法により、動的評価の特徴を兼ね備えた静的観察、“準静的評価”(‘quasi-static evaluation’)を実現した。

これらの 3 種の方法の特徴を活かした非襲撃的細胞評価手法を、メカニズム解明と汎用性の両面から検討を行う。

さらに、立体構造を有する培養組織の場合、組織内の細胞挙動を把握することが困難である。そこで、培養組織の一部を切り出し、染色、弱襲撃的手法にて、立体的に定量的評価することを目指した。

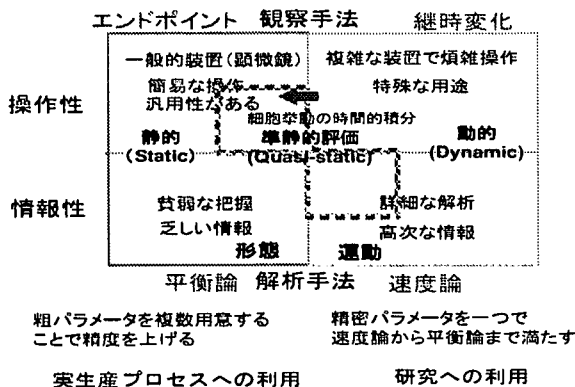


図1 細胞観察手法

B. 研究方法

1) 動的評価におけるデータ取得・取得方法の指針構築

画像観察システムの改良ならびに臨床研究に用いられているヒト細胞（株化されていない細胞）での観察データの取得ならびに解析についての指針を構築することで、データの信頼性を目指した。

既存の細胞観察システムの性能を、ハード（画像取得装置）、ソフト（画像取得プログラミング）の改良により向上させ、より詳細な画像データの取得を目指す。また、動的手法の汎用性を目指し、角化細胞の寿命評価を細胞ペアの回転速度測定により実施した。

2) 準静的評価におけるデータ取得・取得方法の指針構築

D-グルコース提示面上での画像観察手法の改良ならびにヒト細胞での観察データの取得・解析についての指針を構築することで、データの信頼性を目指した。

特に、既存の細胞観察システムの性能を、ハード（画像取得装置）、ソフト（画像取得プログラミング）の改良により向上させ、より詳細な画像データの取得を目指す。また、準静的手法の汎用性を目指し、角化細胞の寿命評価を形態変化（円形度）測定により実施した。

また、D-グルコース提示面の特性解明を目指し、D-グルコース提示面上の培養の際に細胞側のグルコーストランスポーター(GLUT)を介するヒト上皮細胞に対する形態変化のメカニズムについて解明する。

GLUT を介する細胞形態のメカニズムを証明するために、0, 50, 100%D-glucose 提示培養面を用いインスリンを含まない培養条件で培養した細胞にインスリンを添加した際の細胞形態変化の観察を行った。ここで細胞の形態は、円形度 R_c にて評価した。

3) 蛍光免疫染色を伴う立体組織片の定量評価法の構築（図2）

乳腺上皮細胞シートを、TOPRO および抗 ki-67 抗体にて、全核ならびに増殖細胞核を蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて、シート内細胞密度 (X_T)、増殖細胞密度 (X_P) を立体的に算出する手法を開発する。算出には、取得立体画像を、市販の Image Pro Plus にて画像処理を行った。

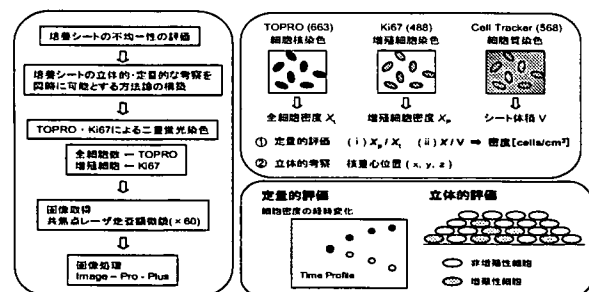


図2 立体組織片の定量解析

C. 研究結果

1) 動的評価におけるデータ取得・取得方法の指針構築

動画評価を実施するための細胞観察システムのハード（照射装置、ステージ）および取得ソフトを改良し、3つのT-フラスコ中の18点を5分毎に画像取得可能なシステムを構築した。本システムによりより詳細なデータ取得可能とした。また、得られたデータの解析方法について、細胞培養の特徴を考慮した方法論を構築した。

フラスコ内で多点観察が可能な細胞観察装置にて、ヒト角化細胞の挙動観察（動的評価）を行い、2個の細胞が接した状態になると回転運動を行うことがわかった。2個の細胞の回転速度を評価した（抽出挙動評価）。回転速度による細胞挙動評価の有効性を確認するため、通常酸素濃度（21%）と極低酸素濃度（0.2%以下）の条件下における角化細胞の継代培養実験を実施した。通常酸素濃度下で培養した場合は、数回の継代培養において累積分裂回数 $PD = 6.8$ で細胞の増殖が停止し寿命に達するのに対し、極低酸素濃度では増殖速度の著しい低下もなく増殖が続き、 $PD = 14.5$ まで達した。このとき、各酸素濃度下で培養したときの細胞挙動を把握するために、回転速度を測定したところ、通常酸素濃度下では累積分裂回数の増加とともに、回転速度が低下したが、極低酸素濃度下での培養では、寿命に伴う回転速度の著しい低下は見られなかった。以上の結果より、回転速度を指標とする運動性評価は、細胞活性評価の一つとして有効であることが示された。さらに、回転運動能力と細胞伸展能力の組み合わせ評価により、角化細胞の継代培養中に、細胞寿命を非襲撃的に評価可能であることを確認した。

2) 準静的評価におけるデータ取得・取得方法の指針構築

準静的評価を実施するためのハードの確認を行ったところ、汎用性の高い位相差顕微鏡でかつ、培養初期24h後に画像取得することで適用可能であることが確認された。また、形態変化評価においても既製品の画像解析ソフト（本試験では、WinRoof、三谷商事を使用）にて細胞輪郭をフリーハンドで描き、円形度を算出することで評価可能であることが確かめられた。なお、本評価機能を備えた、自由配布可能なソフトを作成することで、汎用性を可能とした。

ヒト角化細胞の数回の継代培養において、準静的評価を行い、累積分裂回数に対する細胞形態（円形度）の変化を観察したところ、累積回数の増加に伴い、伸展可能な細胞が減少し、その結果円形度が上昇した。さらに細胞増殖速度の減少と細胞形態変化相関づけるさせることができた。

D-グルコース提示面の特性解明をめざし、抗体を用いたブロック法により細胞接着ならびに形態

変化のメカニズム解明を目指した。特に、GLUT を介する細胞形態のメカニズムを証明するために、0, 100%D-glucose 提示培養面を用いインスリンを含むまたは含まない培養条件で培養した細胞の GLUT の観察を行った。ここで細胞は、不処置処理を施したヒト乳腺上皮細胞を使用することで、実験の安定化を図った。

細胞接着はインスリンの有無とは関係なくほとんど差が確認されず、D-グルコースの提示密度に伴う大きな変化は確認されなかった。また、細胞表面に存在する GLUT を anti-GLUT 抗体を用いブロックした細胞の細胞接着にもほとんど差が確認されなかった。これは、乳腺上皮細胞の場合、細胞接着に integrin が関与していると考えられた。

様々な濃度 (0, 50, 100%) の D-グルコースを結合させた面上で培養した細胞は様々な形態を示すことが確認され、さらに、培地中のインスリンの有無やブロックの有無によって、伸展された細胞の形態から丸く維持された細胞形態まで円形度が変化することがわかった。

さらに、GLUT を介する細胞形態のメカニズムを証明するために、0, 50, 100%D-glucose 提示培養面を用いインスリンを含まない培養条件で培養した乳腺上皮細胞に、インスリンを添加した際の細胞形態変化の動的観察を行った。図 2 に示すように、0%D-glucose 提示培養面では、インシュリン添加前後で細胞の形態変化は無かったが、50%においては、伸展形態から円形形態、100%においては、円形形態から伸展形態へと変化した。これらの応答は、約 30 分であったことから、インシュリン添加による GLUT 4 の提示増加による応答であることが示唆された。

以上より、D-グルコース提示面上の細胞は、接着としては、インテグリンを介した機構、形態変化は、GLUT を介した機構であることが解明された。また、形態変化の程度は、細胞側の GLUT 量と培養面上の D-グルコース提示量との量的バランスにより変化する“Receptor saturation model”に従うことがわかった。

3) 蛍光免疫染色を伴う立体組織片の定量評価法の構築

立体的かつ定量的増殖能の評価を目指し、画像処理技術にて、上皮細胞の重層シートに対する増殖能評価を行った。ここで、基底層核に対する判定高さ Z_T は単層培養時の値を採用した。さらに、培養の経

過に伴い、基底上層の細胞密度が上昇したが、増殖細胞は低下した。さらに、基底層の増殖細胞に比べ基底上層においては、その頻度がより低下していることが分かった。

本手法を、予備的に角化細胞からなる表皮シートへ展開したところ、図 3 に示すように、増殖細胞が基底層に存在することが分かり、基底層安定性への展開が示された。以上より、蛍光免疫染色を伴う立体組織片の定量評価法は、重層の程度ならびに基底層の安定性評価に有効であることが分かった。

D. 考察

培養中の細胞挙動を実際に観察するにあたって、培養系の不均質性および不均一性を考慮した情報取得が必要となる。従来の物質生産などを目的としたセルライン (株化細胞) を用いた細胞培養における評価では、図 3 に示すように、集団細胞を均質として捉え、かつ培養環境も均一状態であると考え、刺激などの変数に対し、単方向へ応答 (“均質応答”) する。その結果、その一部の細胞を観察し培養全体の代表値として、平均値比較 (有意差判定) や単純相関評価を行ってきた。しかし、組織培養のために採取された細胞 (新鮮細胞) では、増殖や分化、細胞年齢などの複数の現象が絡み合って生じる。よって、単方向性応答でも不均質な応答 (“単方不均質応答”) を示し、分散の大きな平均値比較で解釈することとなる。さらに、分化の方向性が複数存在する場合には、多方向を示す応答 (“多方不均質応答”) であると考えられ、個々の単方不均質応答の統合の結果、平均値比較 (有意差判定) や単純相関評価ではデータの差異を見出すことが困難である。一般には、多方不均質応答に対し、蛍光試薬による染色 (標的化) にて有用データを絞って (情報抽出) から解析を行うことで、よりデータの精度を高めている。無染色での細胞評価でも、標的化、情報抽出は不可欠で、従来の有意差判定や単純相関評価のみならず、図 3 に示すように、多重相関評価、抽出挙動評価、on-off 評価などの処方により精度向上を目指す。これらの手法は、精度や操作性の点で特徴があり、用途に応じた選択が必要であることが考えられた。本研究で示した、細胞ペアの回転速度測定による動的細胞評価方法は、寿命予測に有効なパラメータの 1 つであると考えられる。

一方、培養細胞の特性評価を行ううえで、準静的評価手法の構築は、汎用性、オペレータの省力化などの観点から重要となる。その際、細胞を固定する技術は、インテグリンを介した細胞接着機構が多く報告されているが、接着斑形成を伴うために、細胞内のシグナリング変化が引き起こされ細胞特性が変化することが予想されている。

そこで、シグナリング変化を引き起こさないようなイナータな固定が必要となる。よって、細胞固定

● 角化細胞シート

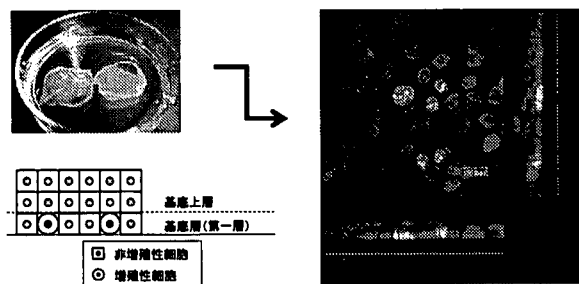


図 3 角化細胞シートにおける基底層安定性評価への展開

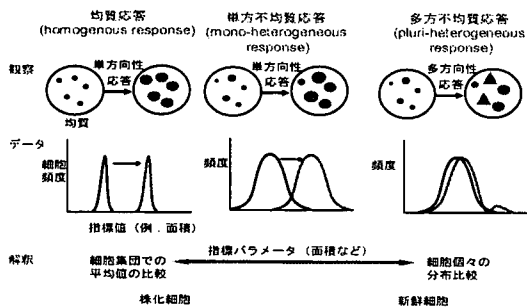


図4 不均質を考慮したデータ取得方法

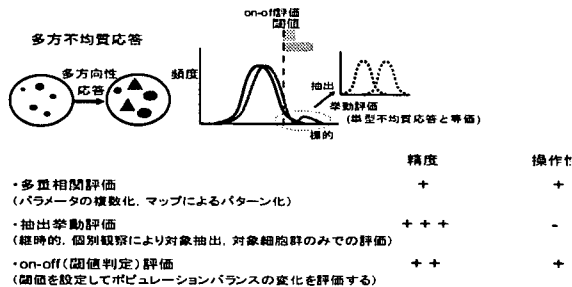


図5 多方向不均質応答におけるデータ解析

法としては、培養面に固定された脂質等を積極的に細胞膜中に挿入し、細胞固定を行う方法、細胞表面に存在するレセプターを標的とした物質を培養表面に固定化し、アフィニティー吸着により固定する方法、培養面に固定されたトランスポートチャンネルを標的とした物質を細胞に取り込ませトランスポーターに補足させることで細胞を固定する方法が挙げられる。被検体細胞の再利用を必須とする培養工程での細胞評価では、適度な細胞固定と細胞構成物質での固定が不可欠となり、トランスポートチャンネルを標的としたシステムが有望視される。

表面にリガンドの1つとしてD-グルコースを提示した面は、本来の細胞特性を利用した形で、細胞構成物質以外の第3物質の導入を伴う、従来の強制的な固定物質の導入固定法（強制細胞固定）とは異なり、細胞の負担が低減される。また、細胞表層のレセプターをターゲットとした細胞固定（親和的吸着による固定）場合に比べ、より強固な細胞固定が可能と考えられ、細胞固定培養面として有用である。

本研究で示したように、培養中の細胞運動の推進力は細胞骨格形成に起因し、累積分裂回数の増加（細胞寿命）と共に骨格形成能力が低下し、その結果、円形度変化が見られなくなったものと考えている。また、培養面提示グルコース密度の変化による細胞形態変化、本年度の細胞表層の提示 GLUT 密度変化による細胞形態変化より、形態変化の程度は、細胞側の GLUT 量と培養面上の D-グルコース提示量との量的バランスにより変化する Receptor saturation model に従うことがわかった。よって、細胞種に応じ適度なグルコース提示は細胞形態

の変化を引き起こし、特に、細胞の移動に伴って伸展させ、細胞移動能力の測定に活用できることが示唆された。

さらに、本研究にて開発された立体組織片の定量評価法は、立体的不均一構造を有する表皮、角膜、口腔粘膜などのシートに対し、増殖能、幹細胞存在率、分化マーカー分布など位置的かつ定量的評価が可能であることが示唆され、将来的には、移植部への生着率（テイク）との相関により、重要な指標となり得ることが示唆される。

E. 結論

画像取得により得られたデータ解析の手法を整理することができ、特に、動的観察での抽出挙動評価を試験し、角化細胞培養における細胞ペアの回転速度計測により細胞寿命を予測することができた。しかし、回転速度計測は動的評価手法によるため、精度は高いが汎用性に欠ける。

そこで、準静的評価の手法構築を目指し、グルコース提示型デンドリマー培養面を用いることにより骨格形成を伴う細胞運動をエンドポイント観察することが可能となった。また、評価後に細胞を回収し、細胞を再利用することができることから、培養組織生産工程において、骨格形成能を評価できる有効なツールとなるものと考えられた。

また、蛍光免疫染色を伴う立体組織片の画像定量評価手法は、上皮シートにおける基底層安定性評価に有効な手法であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

N. Hata, Y. Agatahama, M. Kino-oka, M. Taya: "Relations between Individual Cellular Motions and Proliferative Potentials in Successive Cultures of Human Keratinocytes", *Cytotechnology*, 47(1-3), 127 - 131 (2005)

紀ノ岡正博、田谷正仁: "移植を前提とした組織培養工程における細胞評価"、*医工学治療*, 17(4), 203-206 (2005)

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: "Response of Human Epithelial Cells on Culture Surfaces with Varied Roughnesses Prepared by Immobilizing Dendrimers with/without D-Glucose Display", *J. Biosci. Bioeng.*, 103(2), 192 -199 (2007)

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: "Synergistic Effect of D-glucose and EGF Display on Dynamic Behaviors of Human Epithelial Cells", *J. Biosci. Bioeng.*, 104(5), 428-431(2007).

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: "Glucose Transporter Mediation Responsible

for Morphological Change of Human Epithelial Cells on Glucose-Displayed Surface”, J. Biosci. Bioeng., in press.

2. 学会発表

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: “Design for EGF Stimulation on D-glucose-displayed surface”, TERMIS, Pittsburgh (April.25-27, 2006)..

紀ノ岡正博, 金 美海, 川瀬雅也, 田谷正仁: グルコース提示型培養面を用いた EFG 刺激伝達面の設計, 第 9 回日本細胞工学会, 京都 (2006.9)

金 美海, 紀ノ岡正博, 川瀬雅也, 八木清仁, 田谷正仁: グルコース提示型培養面における細胞伸展機構の解明, 第 58 回日本生物工学会大会, 大阪 (2006.9)

紀ノ岡正博, 金 美海, 川瀬雅也, 八木清仁, 田谷正仁: グルコース提示を介した EGF 刺激伝達面上における上皮シート形成, 第 58 回日本生物工学会大会, 大阪 (2006.9)

鍵田祥吾, 金 美海, 紀ノ岡正博, 田谷正仁: ヒト上皮細胞培養における基底層安定性の評価, 第 72 回化学工学会, 京都(2007,3).

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: “Enhancement of Cell Migration in Culture of Human Epithelial Cells on Surface with EGF and D-glucose Display”, TERMIS –EU, London, UK (September 4-7, 2007).

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: “Stimulated Migration of Human Epithelial Cells on Co-immobilized Surface of D-glucose and EGF”, TERMIS-AP, Tokyo, Japan (December 3-5, 2007)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

情報処理理論を用いた細胞培養の効率化

分担研究者 本多裕之 名古屋大学大学院工学系研究科
バイオテクノロジー講座 生物プロセス工学グループ 教授

研究要旨

本研究では、再生医療における細胞培養という人間の感に頼った作業工程を効率化するため、いかに情報処理理論を導入し効率化できるかを命題として研究を遂行した。

初年度では、ヒト臨床サンプルの培養行程における基礎データを臨床現場において収集し、現場の医師の意見とくみ取りつつ、どのような因子が培養効率化の障壁となっているかを検証・解析した。結果、再生医療のための培養効率化には「人間の感覚のモデル化による自動化の促進」と「作業者の効率的な管理」を平行に進めることによってのみ実用化に貢献できると判断された。そこで、人間の感覚のモデル化のためには Fuzzy Neural Network モデルのプログラム改良を行い、作業者の管理のために作業工程管理のためのソフトウェアを新たに開発した。

次年度では、同じく分担研究者が開発した自動培養装置のインテリジェント化を想定し、治療用細胞の回収量予測モデルを構築し、情報処理理論導入の有効性を示した。具体的には、細胞治療に用いられるヒト線維芽細胞の2週間後の回収率予測モデルを構築した。入力データとしては、様々なファクターを検討したが、非接触で得られる情報である細胞の位相差画像を選択し、細胞認識とノイズ除去のための画像解析手法を開発し、これを数値化して用いた。

最終年度には、同じく分担研究者である紀ノ岡らとの共同によって、よりサンプル数の多いヒト角化細胞の経時的培養データを効果的に画像解析する手法を開発し、画像から得られる情報を用いて細胞の残存ダブリング数予測するモデルの構築を行った。同時に、他の多変量解析の手法とも様々に比較を行い、画像解析を用いた品質管理のための情報解析の基礎を確立した。

結果、本研究を通じて、再生医療実用化の鍵となる培養行程の情報処理理論による効率化の成功例を示し、さらには品質管理まで行えることを示唆することができた。

A. 研究目的

本研究の目的は、再生医療を実用化するために必要である「効率的な培養」を可能にするため、これまで工業的な生産管理に応用されてきている情報処理を用いた支援技術を、医療の臨床現場に密着した形で開発することであった。

近年、再生医療の対象患者はますます増加しており、その適応範囲は致死的な疾患から日常的な疾患まで拡大されつつある。しかし、この新しい医療を享受出来る患者の数は僅かではない。これは治療技術の確立以外に、セルプロセッシングの技術が成熟していないことが一因と考えられる。再生医療のための細胞調製という工程はテーラーメイドであり、通常の大規模生産のストラテジーを応用することは難しい。これは現在、多くの企業が再生医療に興味を示しているにも関わらず実用化が進まない原因の一つでもある。このため、再生医療の治療用細胞の安定供給と安全性維

持のための技術の開発は、より多くの医療施設で、多くの患者に現在の技術を提供するために必須である。

現在、多くの再生医療研究は治療法の開発を目的としており、実用化や産業化に必要な、生産プロセスの効率化に関する基礎研究は非常に少ない。動物細胞の大量培養の研究は、これまでの工学的な物質生産の観点からは多く行われて来たが、細胞そのものを医療用に用いる観点での細胞供給システムの開発は、ほとんど行われていない。結果として、再生医療を提供する施設では、GMP 準拠の設備、熟練技術者の多数雇用など、コストがかかる方法で安全性を担保する以外には方法がないのが現状である。また、幾つかの企業による自動化等の検討は、工業的な生産を目的とした価格や構造となっており、現在再生医療の臨床応用が行われている現場や医師の現状から離れてしまっている。

本研究では、実際の医療と細胞調製を行う臨床現場

からのニーズを反映させ、再生医療生産プロセスの効率化のためのシステム開発と情報処理理論の導入の効果を詳細に検討した。

B. 研究方法

本研究では、情報処理理論を応用した効率的な培養支援システムとして(1)培養装置制御のための細胞回収量予測モデル、(2)培養施設効率化のための作業管理プログラム、(3)培養細胞の品質管理モデル、の3つの情報処理手法を開発した。

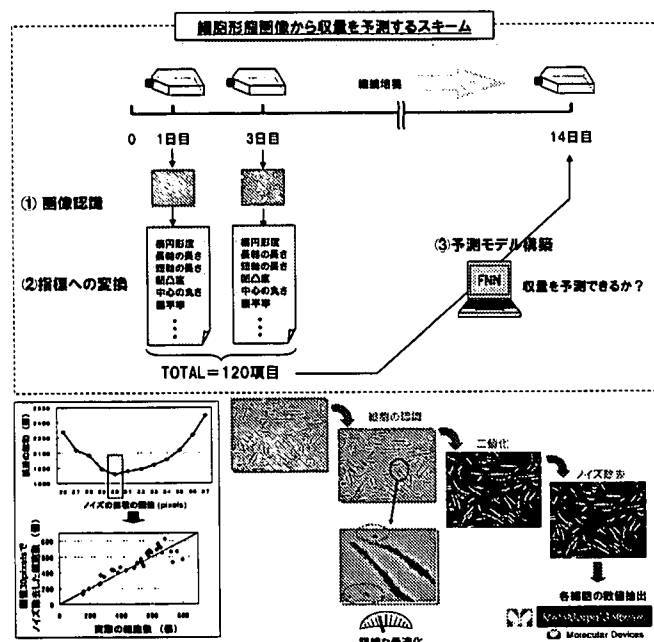
(1)培養装置制御のための細胞回収量予測モデル

臨床研究において同意を得た患者 20 名由来の線維芽細胞を経時的に培養し、毎日位相差画像を取得することで経時的な細胞画像データを大量に取得した。各細胞画像データを画像処理し、細胞の形態特徴量を 120 種類抽出して入力データとし、Fuzzy Neural Network(FNN)を用いてモデル構築を行った。教師値としては、各患者の細胞における実際の増殖率を実験により確認したものをを用いた。

画像解析では、線維芽細胞を認識するための最も良い閾値をランダム抽出した画像を目で確認した教師値と比較することで最適化し、大量の画像処理を短時間でできる独自のワークフローとアルゴリズムを確立した。

また、画像の数値化においては、細胞形態情報の経時的な変化量を導入した。

予測精度や重要特徴量の選択能に関しては、これまで多くの生物情報解析に用いられてきていた重回帰分析(MRA)による変数増加法や、主成分分析(PCA)、CART 法などを検討し、その有用性を比較した。



(2)培養施設効率化のための作業管理システム

ASP形式にてスケジュール管理ソフトウェアを開発し、イントラネットにおいて公開し、作業内容、作業

人員、などすべてを統括した SOP (プロトコル) を DB 化した。データ入力 PC からイントラネットで行い、データ出力として各画面に工程予約状況を表示させた。

(3)培養細胞の品質管理システム

ヒト角化細胞の継代培養(3 個体・5slot)において、細胞の位相差顕微鏡画像を経時的に大量取得した(180 枚×3 視野)。各細胞は、継代限界になるまで継代培養を行い、各培養期間はサブコンプレントになるまでこれを続けて行った(約 3-4 日)。各細胞画像データを画像処理し、細胞形態特徴量を 134 種類抽出し、入力データとして用いて多変量解析を行った。教師値としては、継代限界を迎えた時間から逆算した残存ダブリング数を実験的に計測し、これを用いた。

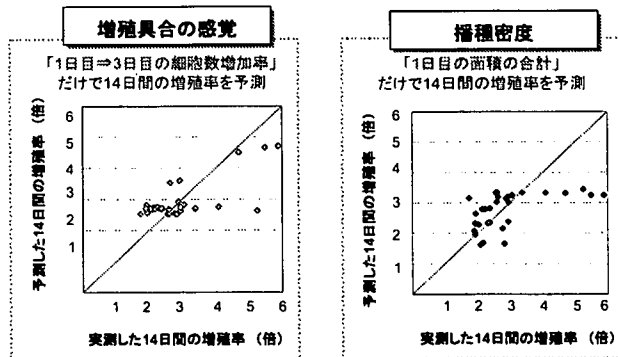
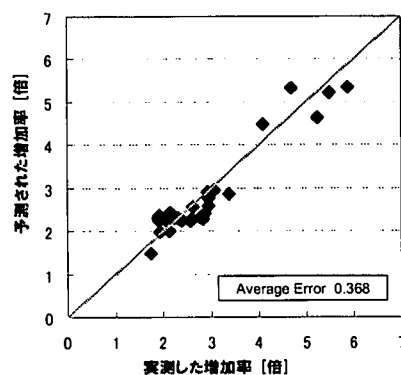
画像解析では、線維芽細胞の認識とは全くことなるアルゴリズムを確立し、角化細胞に合わせたコロニー形成能を評価できる数値化手法を確立し、これを用いた。

また、これまで生物情報に多く用いられてきた重回帰分析(MRA)や、主成分分析(PCA)、CART 法などを検討し、その有用性を比較した。

C. 研究結果

(1)培養装置制御のための細胞回収量予測モデル

細胞回収量予測モデルでは、播種後 1 日目と 3 日目のまだまばらな細胞画像を用いて、14 日後(臨床の治療において患者が来院する時期)において充分量の細胞が回収できるかどうかを連続値で予測した。



結果、多くの細胞の画像解析研究で見られるように、作業員や研究者が恣意的に選んだ指標(増殖具合や播

種密度) という情報よりも、情報処理解析によって無作為に選択された形態指標の組み合わせを用いるモデルの方が非常に精度が高く回収量を予測できることがわかった。

このような回収量予測モデルは、自動培養装置における継代のタイミングを自動的に判断するインテリジェント化のためのソフトウェアとして機能することが期待されるだけでなく、培養を行う作業員にとっても作業をより安心して安定に行うことに貢献すると考えられる。

重回帰分析(MRA)による変数増加法や、主成分分析(PCA)、CART 法との比較を行った結果、予測精度はFNN を用いたモデルが最もよく、かつルールとして形態特徴量の組み合わせを確認できるため、作業員支援の観点からも FNN モデルの有効性が示唆された。

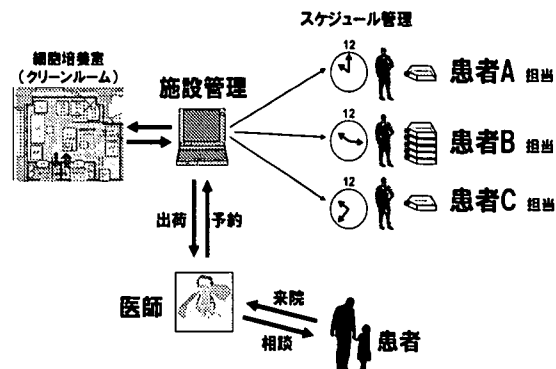
Rule Table		Elliptical. form factor Std.Dev (3day-1day)						
		Small		Big				
		Inner radius Std.Dev (3day)						
Count (3day/1day)	Small	Small	Big	Small	Big			
	Big	3.00	1.45	8.95	4.63	5.09	3.97	9.40

また、本研究から強く示唆されたことは、人間が感覚的に判断している形態情報は非常に重要であるが、恣意的に選んだ単一の変数では個体差のある細胞を安定して認識することは非常に困難であるということである。このため、情報処理理論のような人間のデータ処理能力を補助し、数値化して汎用化する手法の導入が、再生医療での細胞供給には重要であろう。

(2)培養施設効率化のための作業員管理システム

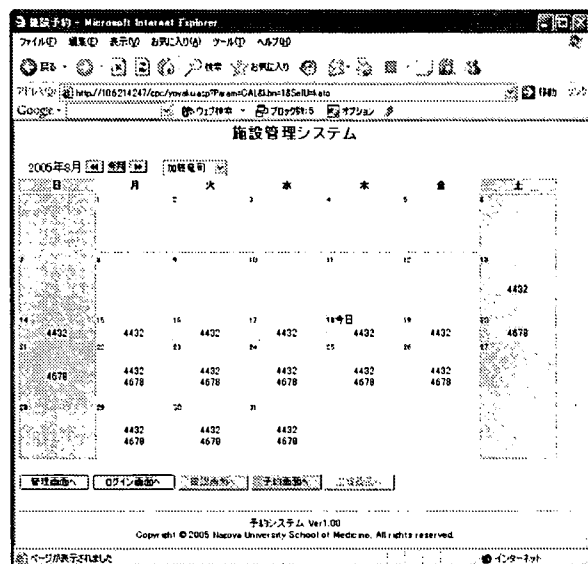
本研究では、培養のための培地成分なども含めて培養にまつわる消耗品を用いた培養の効率化を初期には検討したが、臨床現場のニーズをより詳細に解析した結果、これらを最適化した場合でも培養効率が飛躍的に向上しないことがわかった。すなわち、再生医療の細胞培養工程における最大の律速は、作業員や使用区域の限界であった。このため、培養効率化のためには、実際の細胞調製施設において細胞調製施設1室、作業員3名、医師1名という細胞治療体制を仮定し、各作業員がイントラネットで自分の作業内容を公開・確認し、これを作業責任者・医師が確認できる管理ソフトウェアの開発を行った。

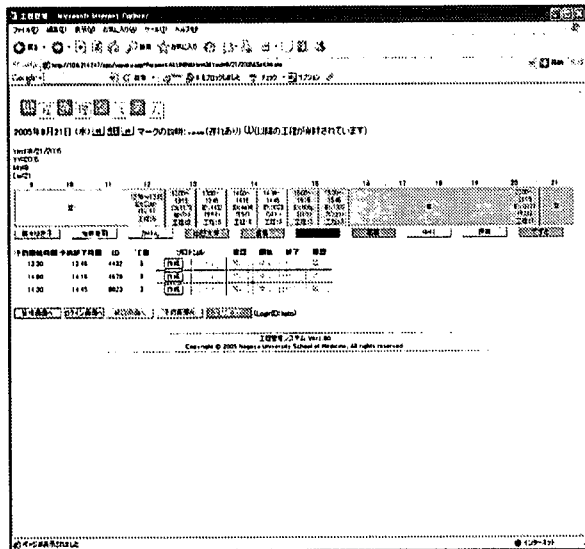
通常、細胞培養の工程管理は、管理者が経験的に行っており、人による自在な判断が必ず必要ではないかと当初は考えられた。しかしながら、細胞調製のプロ



トコルを「重要度」を設けてレベル分けし、日程をずらすことができる工程と日程を Fix すべき工程とを分別して管理することと、最終調整量に応じてプロトコルを3パターンに分けてこれを選び分ける手法を導入することで、ヒト細胞の培養のような個体差の影響を大きく受ける調製工程を効率的に管理できることを確認した。

結果として、人がスケジュール管理し、医師との疎通を頻繁に行わなくてはならなかった調製工程が大幅に簡易化され、作業効率の向上が確認された。さらに、各試薬の使用データおよび、作業員の履歴をバーコードデータ入出力により管理するソフトウェアを導入したことで、記録を確実に残す安全性の高い作業が達成され、作業の効率化が図られた。





本研究で開発したシステムは、株式会社日立プラントテクノロジーによって、CPC 管理システムとして採用され、下記のようなインターフェースを持つソフトウェアとして発売に至った(2007年)。

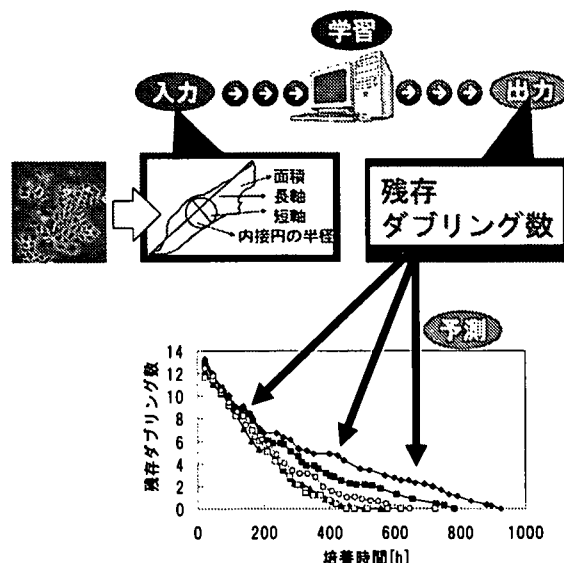
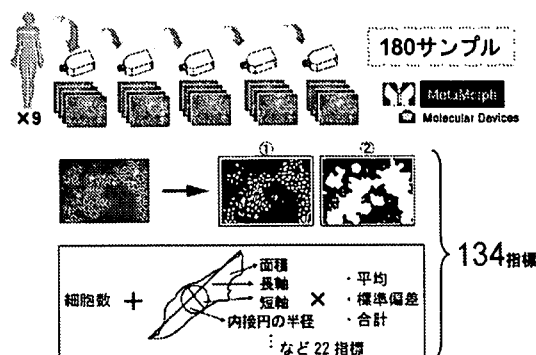


本研究を通じて明らかになったことは、正常細胞の倍化時間には一定の時間が必ず必要になるため、極端な作業効率は培養方法の改良では行うことができず、人的な要因をいかに効率的に動かすかの方が、重要であることであった。再生医療の実用化のためには、このようなインフラの確立が重要であり、再生医療の現場と工学部との密接なやりとりによる最大の成果が、今回のようなコンセプトを生むことに繋がったと考えられる。

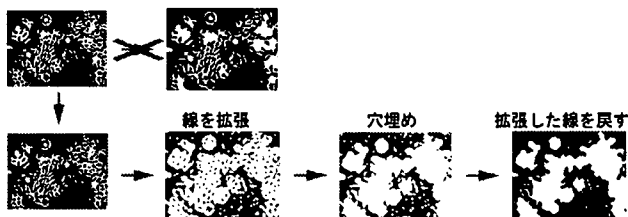
(3)培養細胞の品質管理システム

本研究では、さらに情報処理を用いた画像解析と予測モデルの構築が再生医療の実用化に貢献できないかを考え、品質管理への適応を模索した。

治療用の細胞は安全性とともに、安定した治療効果を保証できるものでなくてはならない。このためには、培養終了後、治療に用いる細胞がどのぐらい活性が残っているのか、その後どれだけ培養できるのかを予測し、高い精度で賞味期限を表示する必要があると考えられた。そこで、我々はもっとも実用化の近い、角化細胞の培養画像によって、細胞の残存ダブリング数(寿命)を予測するモデルの構築を試みた。

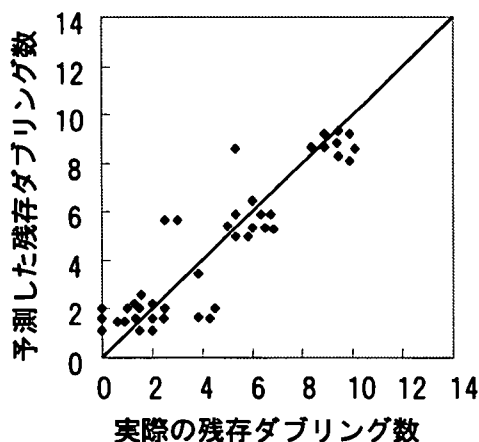


角化細胞は、線維芽細胞とはことなつた増殖形態を持つため、コロニーを形成して増殖する角化細胞に最も最適な画像処理手法を開発し、細胞一個一個の形態特徴量を抽出すると共に、コロニーとしての形態特徴量を予測モデルの構築に用いた。さらに、継代操作によってリセットされてしまう形態情報をより正確に入力として利用するため、継代間の培養中におきた形態の経時的な変化量も予測モデルの入力値として利用した。



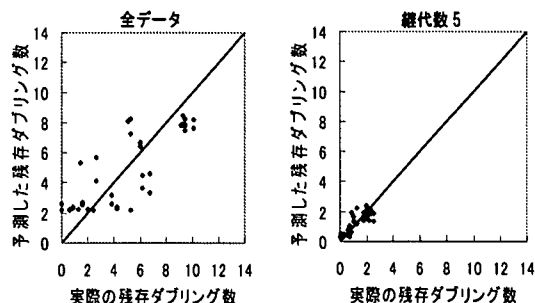
結果、我々は角化細胞の残存ダブリング数を予測するために必要な、重要な形態的特徴の組み合わせを発見し、これを用いて高精度な予測モデルを構築するに至った。選ばれた形態的特徴は、どれも作業者が経験的に感じているものではあるが、定量化できていないものであったため、このようなルール化とモデル化の成功は、これまで経験的かつ曖昧だった品質管理を、より定量的なものにすることができる可能性がある。

Rule Table		1day→2dayの円形度の平均の変化率②			
		small		big	
		small	big	small	big
1day→4dayの合計の変化率①	small	1.61	9.72	5.16	0.06
	big	10.3	12.8	0.13	0.07



かつ、得られた高精度予測モデルは、さらに継代数を2分したモデルと組み合わせて用いることで、より正確な誤差の少ない予測ができることが確認された。こ

れは、継代数が増えるに従って、その形態特徴量と残存ダブリング数の間に直線的な相関が生まれることに起因するが、このような感覚的に理解できていたことを、改めて数式化・モデル化することによって、品質管理はより定量的なものになると考えられる。



本研究を通じて明らかになったことは、各種細胞にカスタマイズした数値化アルゴリズムをきちんと確立すれば、多変量解析手法を用いれば品質のような複雑な活性も十分に予測することができるという事実である。また、継代培養という細胞の形態的特徴をリセットするような培養工程であっても、変化量を取り入れることで、高精度の予測が可能になるという点である。より大量の細胞が治療に必要な場合、臨床の現場では少量の細胞からより多くの細胞を得るために継代培養は必須のプロセスである。このようなプロセスにおいても、FNNは安定した予測精度を与える手法であり、ルールとして表示したものは、培養に携わる人間に安心感を与え、実感を伴いながら品質を予測することができると考えられる。

D. 考察

細胞培養と細胞調製工程は、どちらも人間の調製感覚が重要であるため、多くの場合これらの自動化は困難であると考えられている。しかし、本研究ではこれらの人間の感覚で曖昧に行っている工程や項目を、非線形モデルなどを活用することで、定量的にモデル化し、汎用性を持たせることができることが明らかとなった。

本研究で用いた細胞の多くは、臨床から得られたヒト患者細胞であるため、これらを用いた貴重なモデル化の検討結果は非常に貴重で、より現実の再生医療実用化のための品質管理方法の可能性を強く示すものであると思われる。

E. 結論

本研究からは、「培養の効率化」という課題に対して、情報処理理論が大きく貢献できることが示された。情報処理技術の導入は、これまで人の感や経験に頼り切っていた再生医療の細胞調製という工程の自動化を大いに進めることが考えられ、再生医療の実用化には

非常に大きな影響を持つと考えられる。

貴重な患者由来の細胞を用いる再生医療では、工学的な技術の進歩は非常に重要である。しかしながら、多くの研究では、臨床の現場の声が反映されずに技術だけが一人歩きすることが多い。本研究は、分担研究者の手技・材料・ニーズを交換し、密接なディスカッションを持つことが可能であったため、臨床的にも技術的にも実用化に近い再生医療効率化のための手法を提案するに至ったと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hiro Takahashi, Yasuyuki Murase Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda : New cancer diagnosis method with exhaustive marker gene selection and reliable prediction modeling using boosting and projective adaptive resonance theory with improved reliable index, *Biochemical Engineering Journal*, *Biochemical Engineering Journal*, 33,100-109(2007)

2) Yasuyuki Tomita, Hiroyuki Asano, Hideo Izawa, Mitsuhiro Yokota and Hiroyuki Honda : Classification method for prediction of multifactorial disease development by using interaction between genetic and environmental factors, *IPSI Transactions on Bioinformatics*, 47(SIG 17(TBIO 1)),48-66 (2006).

3) Hiro Takahashi, Takeshi Nemoto, Teruhiko Yoshida, Hiroyuki Honda and Tadashi Hasegawa : Cancer diagnosis marker extraction for soft tissue sarcomas based on gene expression profiling data using the projective adaptive resonance theory (PART) filtering method, *BMC Bioinformatics*, 399(7),2006

4) Hiro Takahashi, Kazuhiko Aoyagi, Yukihiro Nakanishi, Hiroki Sasaki, Teruhiko Yoshida, Hiroyuki Honda : Classification of intramural metastases and lymph node metastases for esophageal cancer from gene expression by using boosting and projective adaptive resonance theory, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(1), 46-52(2006)

5) Hiro Takahashi, Hiroyuki Honda : Lymphoma prognostication from expression profiling using a combination method of boosting and projective adaptive resonance theory, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 39(7), 767-771(2006)

6) Hiro Takahashi, Hiroyuki Honda : Modified signal-to-noise : a new simple and practical gene filtering approach based on the concept of projective

adaptive resonance theory (PART) filtering method, *Bioinformatics*, 22(13), 1662-1664(2006)

7) Hiro Takahashi, Hiroyuki Honda : Prediction of peptide binding to MHC classII molecules using boosted fuzzy classifier with sweep operator method, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2),137-141(2006)

8) Hiro Takahashi and Hiroyuki Honda : A new reliable cancer diagnosis method using boosted fuzzy classifier with SWEEP operator method, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 38(9), 763-773(2005)

9) Hironori Mutoh, Nobuyuki Hamajima, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda : Exhaustive exploring using artificial neural network for identification of SNPs combination related to *Helicobacter pylori* infection susceptibility, *Chemical Bio Informatics Journal*, 5(2), 15-26(2005)

10) Ryuji Kato, Hideo Nakano, Hiroyuki Konishi, Katsuya Kato, Yuchi Koga, Tsuneo Yamane, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda : Novel strategy for protein exploration : High-throughput screening assisted with fuzzy neural network, *Journal of Molecular Biology*, 351, 683-692 (2005)

11) Nobuyuki Hamajima, Hironori Mutoh, Hidetaka Eguchi, and Hiroyuki Honda: Minimal Sizes of Cases with a Susceptible Genotype and Minimal Odds Ratios among Susceptible Individuals in Case-control Studies. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 6, 165-169, (2005)

12) Yasuyuki Goto, Nobuyuki Hamajima, Hiroyuki Honda, Keitaro Matsuo, Kazuhito Yamamoto, Akiko Tamakoshi, Takefumi Ando and Hidemi Goto : Association between *Helicobacter pylori* seropositivity and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1(NQO1)C609T polymorphism observed in outpatients and health checkup examinees, *Gastric Cancer*, 8, 12-17(2005)

13) Hiro Takahashi and Hiroyuki Honda : A new reliable cancer diagnosis method using boosted fuzzy classifier with SWEEP operator method, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 38(9),763-777(2005)

14) Hiro Takahashi, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda: Construction of robust prognostic predictors by using projective adaptive resonance theory as a gene

filtering method, *Bioinformatics*, 21(2), 179-186 (2005)

14) Ryuji Kato, Chiaki Kaga, Mitoshi Kunimatsu, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda : Peptide array based interaction assay of solid-bound peptide and anchorage-dependant cells and its effectiveness in cell-adhesive peptide design, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(6), 485-495(2006)

15) Ryuji Kato, Yukako Okuno, Chiaki Kaga, Mitoshi Kunimatsu, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda : Pentamer peptide from Fas antigen ligand inhibits tumor-growth with solid-bound form found by peptide array, *Journal of Peptide Research*, 66(suppl.1), 146-153(2006)

16) Mina Okochi, Mari Nakanishi, Ryuji Kato, Takeshi Kobayashi, Hiroyuki Honda : High-throughput screening of cell death inducible short peptides from TNF-related apoptosis-inducing ligand sequence, *FEBS Letters*, 580,885-889(2006)

17) Hiro Takahashi, Hiroyuki Honda : Prediction of peptide binding to MHC classII molecules using boosted fuzzy classifier with sweep operator method, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2),137-141(2006)

18) Kazunori Shimizu, Akira Ito, Jong-kook Lee, Tatsuro Yoshida, Keiko Miwa, Hisaaki Ishiguro, Yasushi Numaguchi, Toyoaki Murohara, Itsuo Kodama, Hiroyuki Honda : Construction of multilayered cardiomyocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force, *Biotechnology and Bioengineering*, 96(4),803-809(2007)

19) kousuke Ino, Akira Ito, Hirohito Kumazawa, Hideaki Kagami, Minoru Ueda, Hiroyuki Honda : Incorporating of capillary-lake structures into dermal cell sheets constructed by magnetic force-bases tissue engineering, *Journal of Chemical Engineering Japan*, 40(1), 51-58(2007)

20) Kazunori Shimizu, Akira Ito and Hiroyuki Honda : Enhanced cell-seeding efficiency into 3-D porous scaffolds using magnetic force for tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Appl Biomater* 77B, 265-272(2006)

21) Akira Ito, Eri Hibino, Kazunori Shimizu, Takeshi Kobayashi, Yoichi Yamada, Hideharu Hibi and Minoru

Ueda, Magnetic force-based mesenchymal stem cell expansion using antibody-conjugated magnetoliposomes, *Journal of Biomedical, Materials Reserch: Part B-Applied Biomaterials*, 75(2), 320-327(2005)

22) Akira Ito, Kousuke Ino, Masao Hayashida, Takeshi Kobayashi, Hiroshi Matsumura, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Hiroyuki Honda : A Novel Methodology for Fabrication of Tissue-Engineered Tubular Constructs Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic force, *Tissue Engineering*,11(9/10),1553-1561(2005)

23) Akira Ito, Kousuke Ino, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda : RGD Peptide-conjugated magnetite cationic liposomes facilitate cell growth, cell sheet construction and cell sheet harvesting using magnetic force, *Tissue Engineering*, 26, 6185-6193(2005)

24) Akira Ito, Eri Hibino, Hiroyuki Honda Chiaki Kobayashi, Hiroko Terasaki, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi: Construction and delivery of tissue-engineering human retinal pigment epithelial cell sheets using magnetite nanoparticles and manetic force, *Tissue Engineering*, 11(3/4), 489-496(2005)

25) Akira Ito, Masatake Fujioka, Tatsuro Yoshida, Kazumasa Wakamatsu, Shousuke Ito, Toshiharu Yamashita, Kowichi Jimbow, Hiroyuki Honda : 4-S-Cysteaminyphenol-loaded magnetite cationic liposomes for combination therapy of hyperthermia with chemotherapy against malignant melanoma, *Cancer Science*, 98(3),424-430(2007)

26) Akira Ito, Hiroyuki Honda, Takeshi Kobayashi : Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression, *Cancer Immunol Immunother*, 55(3),320-38(2007)

27) Noriyasu Kawai, Akira Ito, Yoko Nakahara, Hiroyuki Honda, Takeshi Kobayashi, Mitsuru Futakuchi, Tomoyuki Shirai, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri : Complete regression of experimental prostate cancer in nude mice by repeated hyperthermia using magnetite cationic liposomes and a newly developed solenoid containing a ferrite core, *The Prostate*, 66,718-727(2006)

- 28) Akira Ito, Masashige Shinkai, Hiroyuki Honda and Takeshi Kobayashi, : Medical application of functionalized magnetic nanoparticles, Journal of Bioscience and Bioengineering, 100(1), 1-11(2005)
- 29) Kouji Tanaka, Akira Ito, Takeshi Kobayashi, Tatsuyoshi Kawamura, Shinji Shimada, Kazuhiko Matsumoto, Toshiaki Saida and Hiroyuki Honda : Intratumoral injection of immature dendritic cells enhances antitumor effect of hyperthermia using magnetic nanoparticles, International Journal of Cancer, 116, 624-633 (2005)
- 30) Akira Ito, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda : A mechanism of antitumor immunity induced by hyperthermia, Japanese Journal of Hyperthermic Oncology, 21(1), 1-11 (2005)
- 31) Akira Ito, Yoko Nakahara, Masatake Fujioka, Takeshi Kobayashi, K. Takeda, I. Nakashima and Hiroyuki Honda : Complete regression of hereditary melanoma in a mouse model by repeated hyperthermia using magnetite cationic liposomes, Japanese Journal of Hyperthermic Oncology, 2(3), 139-144(2005)
- 32) Kouji Tanaka, Akira Ito, Takeshi Kobayashi, Tatsuyoshi Kawamura, Shinji Shimada, Kazuhiko Matsumoto, Toshiaki Saida and Hiroyuki Honda : Heat-immunotherapy using magnetic nanoparticles and dendritic cells for T-lymphoma, Journal of Bioscience and Bioengineering, 100(1), 112-115(2005)
- 33) Akira Ito, Masatake Fujioka, Kouji Tanaka, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda : Screening of cytokines to enhance vaccine effects of heat shock protein 70-rich tumor cell lysate, Journal of Bioscience and Bioengineering, 100(1), 36-42(2005)
- 34) Noriyasu Kawai, Akira Ito, Yoko Nakahara, Mitsuru Futakuchi, Tomoyuki Shirai, Hiroyuki Honda, Takeshi Kobayashi and Kenjiro Kohri : Anticancer effect of hyperthermia on prostate cancer mediated by magnetite cationic induction in transplanted syngenic rats, The Prostate, 64, 373-381(2005)
- 35) Akira Ito, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda : A mechanism of antitumor immunity induced by hyperthermia, Japanese Journal of Hyperthermic Oncology, 21(1), 1-11 (2005)
- 36) Tomokatsu Hongo, Mariko Kajikawa, Seiichi Isida, Shougo Ozawa, Yasuo Ono, Junichi Sawada, Youichi Ishikawa, Hiroyuki Honda : Gene expression property of high density three-dimensional tissue of Hep G2 formed in Radial flow bioreactor, Journal of Bioscience and Bioengineering, 101(3), 243-250(2006)
- 37) Tomokatsu Hongo, Mariko Kajikawa, Seiichi Ishida, Shougo Ozawa, Yoichi Ishikawa, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda : Three-dimensional high density culture of HepG2 cells in a 5-ml radial-flow bioreactor for construction of artificial liver, Journal of Bioscience and Bioengineering, 99(3), 237-244 (2005)
- 38) 加藤竜司、山本若菜、各務秀明、上田実、本多裕之:「再生医療における細胞品質管理を目指した細胞画像データへの変数解析の有効性」、ソフトウェアバイオロジー、生物工学会出版音(2007) in press
- 39) 各務秀明、加藤竜司:「III. 細胞移植による美容医療を行うにあたって」、再生医療と美容、上田実編集、株式会社南山堂、(2007), p30-39
- 40) 各務秀明、加藤竜司:「第2章: 歯槽骨再生の基礎 ~再生医療をとりまく法的枠組み~」再生医療とインプラント-究極のQOL 向上医療を目指して-, 上田実編, クインテッセンス出版会社, (2007), p80-87
- 41) 加藤竜司, 蛭沢克己, 各務秀明:「第4章: 再生医療の審美へのアプローチ ~繊維芽細胞の細胞特性と培養法~」再生医療とインプラント-究極のQOL 向上医療を目指して -, 上田実編, クインテッセンス出版会社, (2007), p170-180
- 42) 加藤竜司、本多裕之:「第4章 細胞の3D組織化 ~8節 動物実験代替のためのバイオリクターを用いた3次元組織培養~」, 動物実験代替のためのバイオマテリアルデバイス, 酒井康行, 民谷栄一監修, シーエムシー出版, (2007), p219-234
- 2.学会発表
加藤竜司、山本若菜、本多裕之、蛭沢 克己、上田実、各務秀明「再生医療実用化のための画像情報処理による品質管理技術の開発」化学工学会秋季大会、札幌、2007年9月

山本若菜、加藤竜司、蛭沢克己、各務秀明、上田実、本多裕之「再生医療実用化のための画像情報処理による品質管理技術の開発」生物工学会、広島、2007年9月

R. Kato, H. Konishi, K. Kato, Y. Koga, T. Yamane, T. Kobayashi, H. Nakano, H. Honda: Novel Functional Enzyme Exploration by combining SIMPLEX method with Fuzzy Neural Network. Asia Pacific Biochemical Engineering Conference (APBioChEC'05), Jeju, Korea, May, 2005.

R. Kato, Y. Okuno, C. Kaga, M. Kunimatsu, T. Kobayashi, H. Honda: Peptide array based bioinformatic design of cell adhesive matrix design for clinical cell therapy 8th Tissue Engineering Society International (TESI), Shanghai, China, October, 2005.

R. Kato, K. Okada, T. Suzuki, Y. Komori, H. Tachikui, D. Iejima, H. Kagami, M. Ueda: Development of Fully-Automated Cell Culture System Adopted to Adhesive Cells for Clinical Usage, 8th Tissue Engineering Society International (TESI), Shanghai, China, October, 2005.

Ebisawa K, Kagami H, Kato R, Mazlyzam Abdul Latif, Okada K, Kamei Y, Tohnai I, Ueda M. Gingival fibroblasts as a better cell source for cell therapy, 8th Tissue Engineering Society International (TESI), Shanghai, China, October, 2005.

R. Kato, Y. Tomita, M. Okochi, H. Honda. Application of bioinformatic prediction for supporting high-throughput experiments in proteome, The 4th International Forum on Post-Genome Technologies (4th IFPT), HangZhou, China, September, 2006

R. Kato, C. Kaga, Y. Tomita, M. Kunimatsu, H. Honda. Application of bioinformatic prediction for supporting high-throughput experiments in proteome, International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium/4th Engineering Meeting, Yokohama, Japan, November, 2006

R. Kato, C. Kaga, Y. Tomita, M. Okochi, H. Honda. Bioinformatic approach to interpret the flexibility of extra-cellular matrixes, San Diego, Japan, December, 2006

R. Kato, W. Yamamoto, Y. Tomita, M. Nakatochi, Y. Tomita, M. Okochi, H. Honda, H. Kagami, K. Ebisawa, M. Ueda: Development of morphological process-control analysis for the automation of processes in regenerative medicine, Biochemical Engineering XV (Engineering Biology from Biomolecules to Complex Systems), Quebec City, Canada, July, 2007.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

「細胞品質予測モデル」

加藤竜司、山本若菜、本多裕之、他：特許出願番号 2007-212116（発明登録済→特許出願中）

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし