

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

脳神経細胞残存の無侵襲イメージングおよび定量的指標の構築

分担研究者
国立循環器病センター研究所 放射線医学部 部長
飯田秀博

研究要旨

神経再生医療において、神経細胞の空間的広がりやマクロ的な脳灰白質体積を無侵襲的に定量評価できるようなイメージング手法の妥当性評価を行った。数理的な妥当性を確認した上で、物理的ファントム実験評価、さらに健常マウスの脳脊髄液体積量とその精度評価を行った。またふたつの典型的な臨床MRI撮像画像を対象に、自動化された体積計測プログラムの精度評価を行った。

A. 研究目的

神経再生医療において、神経細胞の空間的広がりやマクロ的な脳灰白質体積を無侵襲的に定量評価できるようなイメージング手法の開発は、技術の客観的評価に貢献し、効率的な研究開発を支援する。本研究では、核医学的手法によって神経細胞の空間的広がりを立体撮像する一方、空間解像度が不十分だった場合に生じる計測誤差（部分容積効果）を高解像度MRI画像を使って補正し、正しい神経細胞残存量を定量評価する手法を確立することである。すでに開発された自動ソフトウェアの精度を評価する目的で、正確かつバイアスをもたない手法としてランダムサンプリングに基づく手法をプログラム化し、これと比較した。

B. 研究方法

ランダムサンプリング理論に基づく体積計測プログラムを開発した（第1図）。プログラム言語はJAVAとして、コンピュータに依存しない仕様とした。最大3つの医用画像を同時に読み込むことが可能で、ランダムに発生させたグリッド点をおおまかに関心領域で囲み、その上で領域内の点数を計測した。スライス厚さを考慮して対象臓器の体積を推定した。

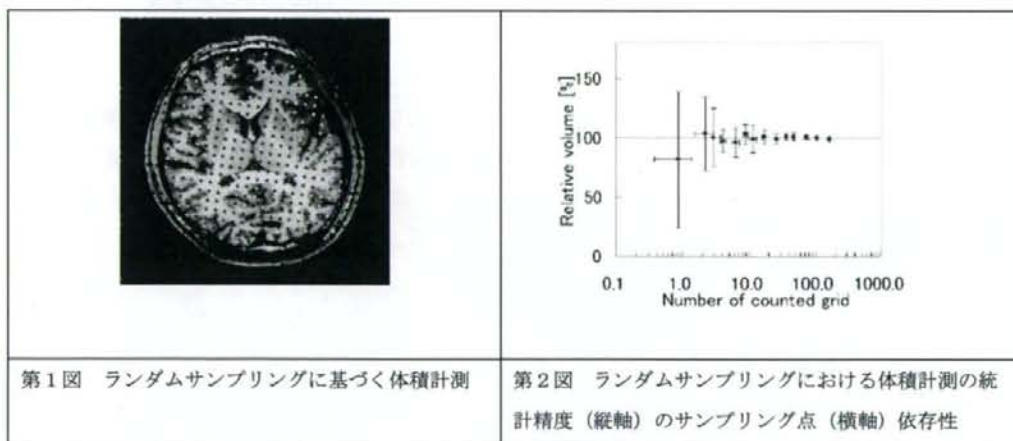
既知の面積を有する幾何学的構造体を対象として仮定し、グリッド点をランダムに発生

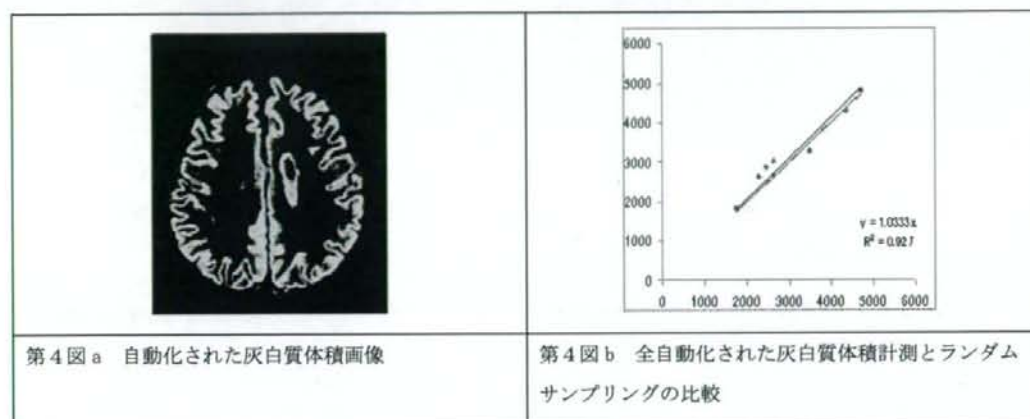
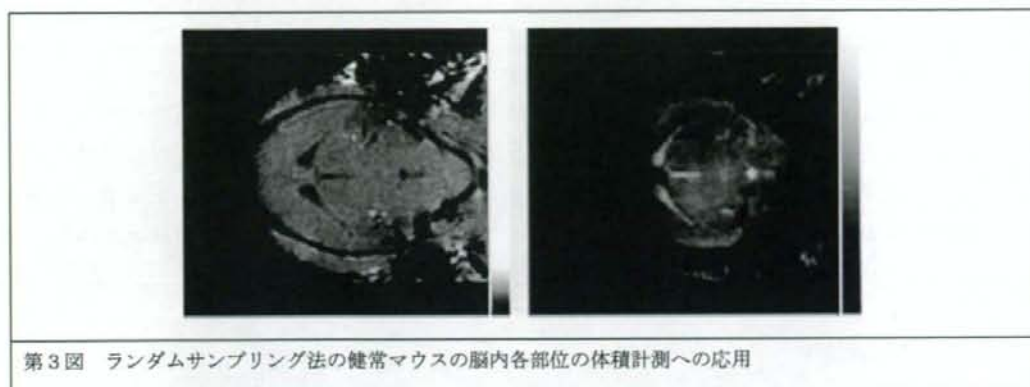
させ面積計測した。各グリッド点間隔に対して複数この計測を行い、精度のグリッド点数依存性を評価した。同様に、小さな構造体をMRI計測し同様にグリッド点数と計測精度との関係を明らかにした。10匹のマウス(第3図)においては脳脊髄液の体積を計測し、個体間統計偏差を求めた。

一方、臨床MRI画像においては、脳中央部スライス領域を対象にして、EUプロジェクトにて共同開発した自動セグメンテーションプログラムの精度を評価した。スライス内に8つの関心領域を設定し、それぞれの領域においてランダムサンプリング法との一致を確認した。

C. 研究結果

第2図に示すとおり、ランダムサンプリング手法においては、グリッド点が少ないと統計的な誤差(バラツキ)が増大する。しかしおよそ20ポイントの計測のみで約5%の再現性で面積計測が行えることが示された。グリッド点の増大は \sqrt{N} よりも急峻に統計精度を上昇させた。同様の結果は立体物理ファントムでも認められた。マウスの脳脊髄液体積は約8%程度の個体差が認められた。臨床画像においても自動セグメンテーション画像とランダムサンプリングによる方法とはよく一致した(第4図)。しかし1.5T装置の方が再現性が高く、3T画像の方がわずかにであった。





D. 考察

ランダムサンプリング法は、専門家の目と判断をもとに正確に、バイアスを持たずに臓器構造体の断面積および体積を計測することが可能である。本研究の基礎的検討で明らかになったことは、およそ20のグリッド点が計測対象に含まれればおよそ5%の統計精度で断面積推定が可能であることである。十分に実用に耐えられる計測手法といえる。このことは物理ファントムで明らかであり、その時のマウスの脳脊髄液体積のばらつき(8%)は計測誤差というよりも個体間のばらつきであることは明らかであった。

さらに、臨床MRI画像においても十分な精度で体積計測できることは、EU多施設研究で開発された全自動化された脳内局所の各構造体の体積計測が、ほぼ問題なく正確に定量評価できることを示唆するものである。取得されたMRI画像は、3T装置の方が鮮明でかつ高いコントラストを示すものである。しかし自動化された体積計測法では、3T画像の方でわずかに再現性が低かった。これは、頭皮周辺領域におけるノイズの影響と個人差の影響が、画像の信号強度分布に反映し、自動化処理ではその区分にばらつきがわずかに生じたためと考えられる。

E. 結論

神経再生医療において、MRIを使った灰白質領域の正確な体積計測は可能である。特にEUが多施設開発した全自動解析プログラムは、十分に高い精度を有しており実用に耐える。当該研究で開発されたランダムサンプリング理論に基づく方法は最も正確で、かつバイアスを有さない方法であるが、この手法との比較によってその正当性が確認された。

F. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iida H, Eberl S, Kim KM, Tamura Y, Ono Y, Nakazawa M, Sohlberg A, Zeniya T, Hayashi T, Watabe H. Absolute quantitation of myocardial blood flow with ^{201}Tl and dynamic SPECT in canine: optimisation and validation of kinetic modelling. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:896-905, 2008
- 2) Sohlberg A, Watabe H, Iida H. Three-dimensional SPECT reconstruction with transmission-dependent scatter correction. *Ann Nucl Med* 22:549-56, 2008
- 3) Yamamoto A, Sato H, Ermi J, Ishida K, Ose T, Kimura A, Fujiwara H, Watabe H, Hayashi T, Iida H. Use of clinical MRI scanner for pre-clinical research on rats. *Radiological Physics and Technology*. 2: :13-21, 2009;
- 4) Yokoyama I, Inoue Y, Kinoshita T, Itoh H, Kanno I, Iida H. Heart and Brain Circulation and CO₂ in Healthy Men. *Acta Physiol (Oxf)*. 193:303-8, 2008
- 5) Kudomi N, Hayashi T, Watabe H, Teramoto N, Piao R, Ose T, Koshino K, Ohta Y, Iida H. A physiological model for recirculation water correction in CMR02 assessment with 15O2 inhalation PET. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* In press, 2008
- 6) Sohlberg A, Watabe H, Iida H. Acceleration of Monte Carlo-based scatter compensation for cardiac SPECT. *Phys. Med. Biol.* 53 :277-285, 2008
- 7) Kudomi, N, Koivuviita, N, Liukko, K, E. Oikonen, V. J. Tolvanen, T. Iida, H, Tertti, R, Metsarinne, K, Iozzo, P, Nuutila, P. Parametric renal blood flow imaging using [(15)O]H₂O and PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* In press, 2008

2. 学会発表 なし

H. 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

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

細胞工学技術による高機能 Scaffold 開発

分担研究者

東京大学大学院バイオエンジニアリング専攻 特任研究員
齋藤敬

研究要旨

細胞へ機能性マーカー等の物質を導入する、また細胞から物質を取り出す技術はバイオの基盤技術として、様々な研究が行われている。しかしながら、単に微小な細胞の操作装置を開発しても、そのような操作が細胞死を誘発するという問題が顕在化している。

我々は細胞死を誘発しにくく、かつ成功率の高い細胞膜穿孔法を発見し、その応用を進めている。この技術はマイクロインジェクション法の一種で、局地的な光酸化反応により化学的に細胞膜を穿孔する。またパッチクランプ法のような細胞膜の吸着を伴わないため、キャピラリーを細胞から外す作業も比較的容易である。

現在までの成果として、微小ガラスキャピラリーによるマイクロインジェクションに穿孔法を応用し、高い生存率や遺伝子導入を達成している。昨年度までの本事業によって、脳循環系の細胞治療に適した細胞標識化ないし細胞改変を行えるよう、医療応用に向けて新たに量産性の高いポリマーによる細胞膜穿孔体を開発、またその運用条件の最適化を容易にする、自動システムを作成した。またこのシステムにより、付着性・浮遊性いずれの細胞集団に対しても、大規模物質導入に有意な成果を得た。本年はこのシステムにより処理された細胞群のデータ解析を再現性よく実施する方法を探索、また細胞治療へ発展させるためベッドサイドで本法を適用出来るよう、装置・ソフトウェアの一層の簡易化・汎用化を進めた。以下、本事業最終年度に際し、事業開始よりの分担部分の総括も含めて報告する。

A. 研究目的

細胞集団への物質導入法は、近年特に重要度を増している。その一例として、京都大学山中グループによる誘導性多能性幹細胞 induced pluripotent stem cell, iPS 細胞[1]を挙げることが出来る。これは受精卵を破壊して作成するため生命倫理上の問題がある胚性幹細胞 embryonic stem cell (ES 細胞)によらない、新たな幹細胞であり、その開発は世界的なニュースとなった。iPS 細胞の作成には、細胞に対し4つの遺伝子の同時導入が必要である。このような遺伝子導入には現在、ウイルスの細胞融合機能・遺伝子挿入機能を利用したウイルスベクターが用いられているが、この方法でも iPS 細胞の作成効率は1%以下、かつ

発ガン性など安全性の面での懸念がある。一方、細胞核への遺伝子挿入を行わない、より安全なプラスミドベクターによって遺伝子導入を行い、iPS細胞を作成した報告もなされたが、この方法は作成効率がウイルスベクターの1%以下と更に低下する[2]。以上の背景から、非生物学的かつ高効率な遺伝子導入法が求められている。

実際的な物質導入法に必要な仕様としては、日常的に実施できる費用で、大量の細胞を、高い確率で処理できることにある。しかしながら現在、非生物学的な遺伝子導入法は、成功率が一般に1%以下と低く、また細胞の性質に強く依存するため、細胞種毎に最適化を行う必要があり汎用性が低いという問題がある。

これに対し我々は、細胞膜に局部的に酸化反応を引き起こすことで、細胞死を誘発しにくい細胞膜穿孔が可能であることを発見し、応用を進めてきた(図1)。一例としてはマイクロインジェクション法に光化学的な細胞膜穿孔法を組みあわせ、任意の細胞に100%近い確率でmRNAの導入と発現に成功している[3]。

この基礎技術を元に、従来にない細胞機能改変を有する Scaffold の開発を目的とした。本事業最初の成果として、剣山状の自己組織化材料である酸化亜鉛ナノロッドを使用、局地酸化反応による細胞集団への物質導入に初めて成功した[4]。また昨年度は新たに量産性に優れた硬質シリコーンゴム(ポリジメチルシロキサン、PDMS)で剣山状の細胞膜穿

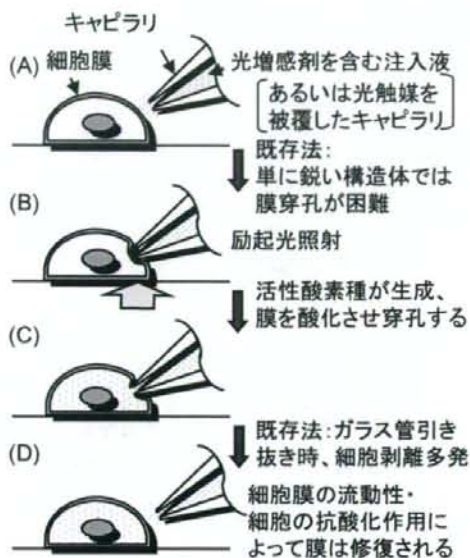


図1 高効率細胞膜穿孔法 基本原理
例: マイクロインジェクション

量産性に優れた以下のPDMS転写穿孔体を開発

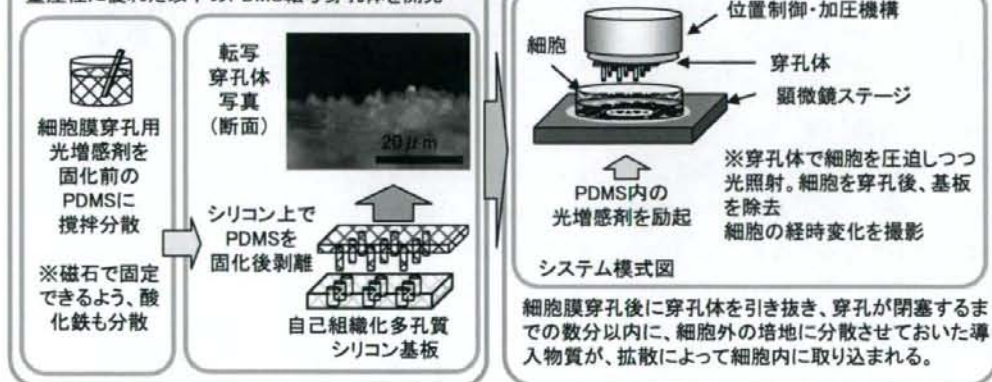


図2 転写穿孔体の作成と運用法

孔体を作成、細胞集団への物質導入に成功した。作成法としては、電解エッチングによる自己組織化多孔質シリコン基板を転写鋳型としたものである。また、PDMS が硬化する前に光増感剤を分散しておくことにより、その表面において細胞膜穿孔機能を持たせることが出来た(図2)。この場合はいかなる光増感剤であっても、PDMS 中に分散可能であれば適用可能であり、医療用光増感剤などへ選択の幅が広がった。

事業最終年度である本年度は、細胞処理量の増加に伴い課題となっていた、細胞群改変効率の定量評価法を確立した。また今後の研究促進のため、様々な研究室で本細胞膜穿孔法を実施出来るよう、簡易・卓上型細胞改変システムを開発した。これは昨年度までの成果に対する研究評価において、医学系研究機関との連携をより深めるよう求められた点への対応も兼ねている。

A-2 高効率細胞膜穿孔法について

この技術は本来、神経インタフェースと呼ばれる、生体-電子機器間の情報媒介をするデバイスのために開発された[5]。具体的な仕様としては、個々の神経細胞を対象に接続可能で、かつ数万~数百万の細胞群に一括して接続しうる集積型細胞内電極が目標である。特徴は細胞膜を一時的かつピンポイントで酸化することにより、化学的に穿孔する点にある。微小な剣山状構造体など、細胞に部分的に接触可能な構造体であれば、酸化触媒能を加えることで膜穿孔体として運用可能という特徴も併せ持つ。当面は細胞への物質導入法として実績を上げており、細胞集団の改変のための剣山状細胞膜穿孔体も開発済みである[4]。これは培養ディッシュの細胞群の上に穿孔体を静置、その上に金属角棒を錘として載せ加圧し、光照射を行い使用するものであるが、手作業ゆえ細胞処理データの量・精度に問題があった。これが自動化システム構築(図3)の動機となった。

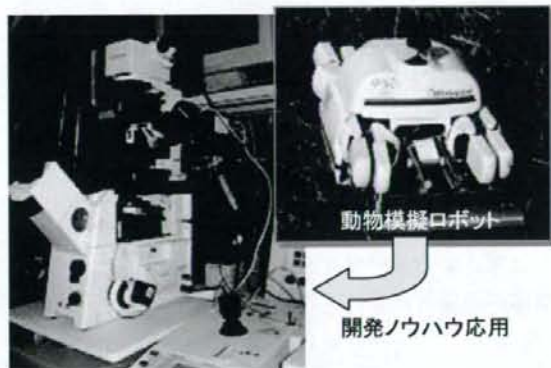
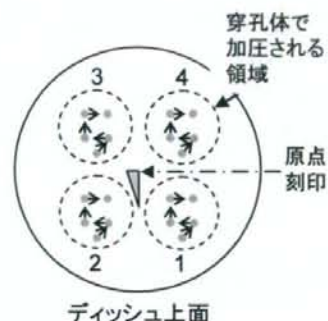


図3 自動化細胞膜穿孔・撮影システム

A-3 動物模擬ロボット”Whitegoat”

同機(図3右)は東京大学の医療工学系の研究室により、2000年に初期型が開発された[6]。開発の際には切削ラピッドプロトタイプング技術を駆使し、様々な素材の小ロット部品試作を内製化するノウハウが蓄積された。この成果が、細胞処理プロセスのロボット化へと繋がっている。機体の主たる開発目的は、神経インタフェースの端末となる「義体」とでも呼べる全身模擬ロボットである。神経インタフェースの開発に際しては、媒介され

た情報やその解釈が適切であるか、例えば生体の腕と、該当する神経情報により操作されたロボットの腕の動きを比較する手法が用いられる。既存の神経インタフェースでは生体側と媒介する情報量の少なさから、腕のみといった部分模擬ロボットでも十分な成果が得られてきた。しかしながら将来の集積型神経インタフェースにおいては、媒介情報量の飛躍的な増大が見込まれるため、全身模擬型が望ましい。特徴としては実験動物や計測装置を搭載し、かつ実験動物並の移動速度や移動の多彩さを実現することを主眼においたため、あえて古典的なリンク機構を主体に脚を構成した点にある。結果的に実用ロボットに求められる運搬・移動性能にも優れ、汎用プラットフォームロボットとして現在も改良を進めている。



手順
 ディッシュ上を1~4の領域に分け、領域順、かつ矢印順に●印位置の細胞を撮影。

各領域に対し、加圧条件は変えず、矢印順に●印位置の細胞に異なる時間で励起光照射し、穿孔。

領域順、かつ矢印順に●印位置の細胞を再度撮影、穿孔前後の像を比較する。

B. 研究方法

B-1 細胞集団への物質導入解析

物質導入システムの適用プロセス例を図4に示す。実験に際しては、一つのディッシュにおいて、4種類の加圧条件下で、それぞれ5種類の光照射時間を試行し、計20カ所の評価地点を作成した。この20カ所において、それぞれ最大6種類の異なる像を連続撮影することが可能となった。穿孔の評価には穿孔作業時のみ、マイクロインジェクションに用いられる膜透過性色素(AlexaFluor594 など)を培地中に加えておき、穿孔後に細胞を洗浄する。穿孔作業後に細胞外にあった色素が細胞内に封じ込められていれば、一時的な細胞膜穿孔とその後の膜閉塞が生じたことになる。

先の剣山状酸化亜鉛を細胞膜穿孔体とした研究においては、細胞内物質導入効率については、全細胞数と染色された細胞数を目視で数え、比率を導出した[4]。一方、量産型のPDMS穿孔体によっては、細胞群が全体的に穿孔され、膜穿孔時間が長期化するにつれ細胞内の蛍光強度が増加する結果となった。この場合、目視計数による比較が不可能であり、ま

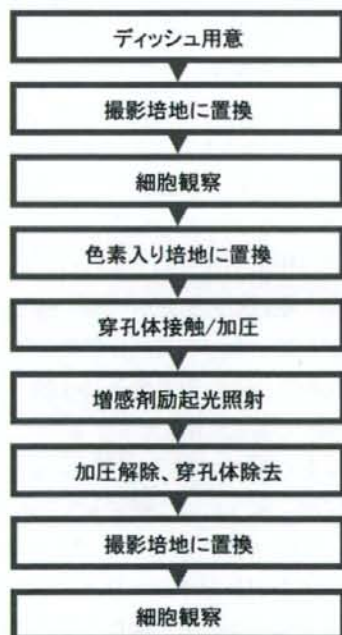


図4 物質導入プロセス適用例(付着性細胞対象の場合)

た今後のハイスループット細胞処理を考慮すると、処理結果の速やかな比較のためには、画像処理を自動で行う必要がある。今回は、効率評価を可能な限り正確に行えるような、画像処理ステップの構築と条件設定を行った。

画像処理については、画像解析ソフトウェア ImageJ (NIH)を使用し、以下のプロセスを基本とした：

二値化像作成コマンド

"filters->maximum->radius 10.0 pixels, threshold 0-250(数値範囲は輪郭の適切な抽出のために後述C-1のように調整), binary, invert, fill hole, invert, dilate(8回繰り返す)"

蛍光像作成コマンド

"image->adjust->brightness, contrast->auto"

なお蛍光像のバックグラウンド画像は、蛍光像を全て合算した上で、コマンド"subtract background->rolling ball radius 50.0 pixels"で処理し作成、これをおのおのの蛍光像から引いて計算した。

評価試験を行う対象として、付着性のラット株化細胞 PC12 を使用した。この細胞は取り扱いが容易で、現在までの細胞膜穿孔実験も含め、様々な分野で標準的に用いられている。細胞膜穿孔体としては、孔径 0.8 μ m、ピッチ 2 μ m、深さ 2 μ m の自己組織化多孔質シリコン基板(カンタム14)を転写鋳型とした PDMS 穿孔体を使用した。PDMS をシリコン基板上で重合硬化する際に、細胞膜酸化用の光増感剤 α -Terthienyl 7.3mM、および穿孔装置への磁気固定のための酸化鉄(III)粒子(PDMS 1.0g あたり 45mg)を分散した。穿孔実験の詳細については、昨年平成 19 年度の本事業報告書の当該分担部を参考にされたい。

実験の結果例を図 5 に示す。透過像、蛍光像の比較により、膜穿孔処理後に通常では細胞膜内に浸入しない蛍光色素が細胞内に認められ、また穿孔体の照射量への依存も認められた。これは従来の光酸化反応による細胞膜穿孔の特徴を満たしている。これらの画像データを元に、画像を 4 分割し領域毎に、積分した蛍光強度を細胞の

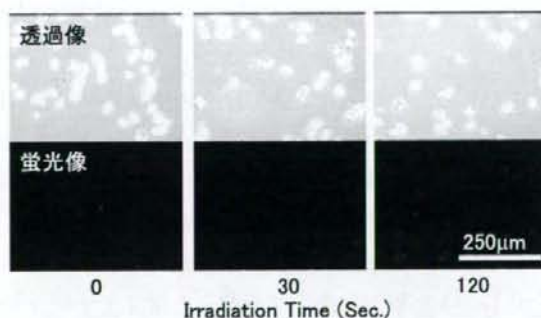


図5 細胞集団への物質導入例
(Rat PC12 cellヘインジェクション用AlexaFluor594導入)

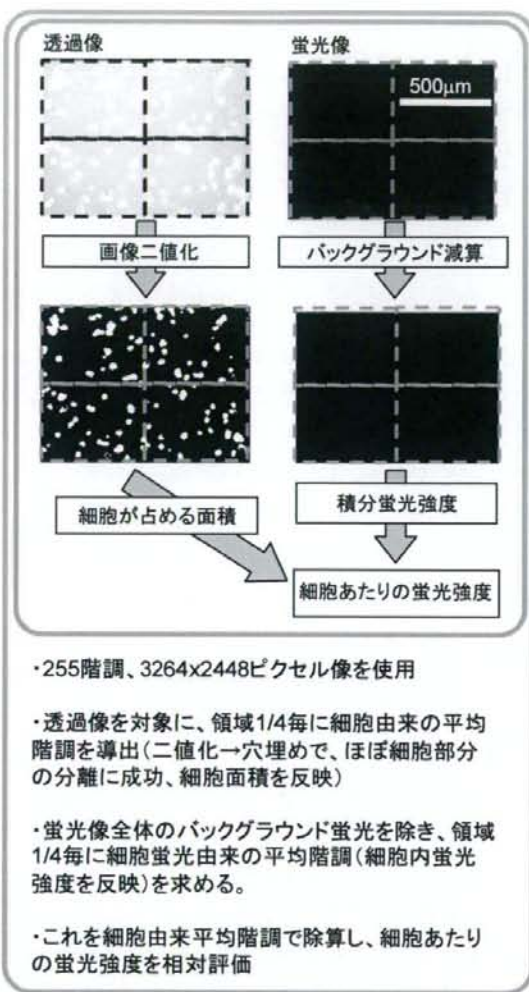
占める面積で除算、得られた細胞あたりの蛍光強度により、細胞内への物質導入効率を比較した(図6)。

B-2 簡易・卓上型細胞膜穿孔システム

B-2-1 オリジナルシステムの構成

高効率細胞膜穿孔法の実施には、①細胞膜穿孔体による細胞加圧強度と、②光増感剤を励起する光照射量の最適化が必要である。加えて、穿孔前後での細胞の変化を追跡可能な、精密なステージ移動機構も必要である。このためには、光源のシャッタ開閉、ディッシュを固定した顕微鏡のステージ移動、蛍光波長の選択などを一定の手順で繰り返す必要がある。従来は一連の作業を手動で行ってきたが、昨年度に研究実装ロボット技術の応用により、細胞膜穿孔法の条件最適化プロセスを大幅に自動化することに成功した。これにより半日を要した実験が一時間以内で終了する等、実験サイクルの大幅な短縮とデータ信頼性の向上に繋がった。この成果は今後の定量解析に大きく貢献することに加え、装置の商業化プロ

トタイプとして産業面での訴求力もある。昨年度に構築したオリジナルシステムを先に図3に示した。中核となる装置は、細胞保温・加湿装置を加えた倒立蛍光顕微鏡(オリンパスIX71)である。これに対し顕微鏡の拡張パーツとして、冷却 CCD カメラ(QICAM)、透過・蛍光照明光路電動シャッタ(シグマ光機)、細胞培養ディッシュを固定する電動ステージ(同)、穿孔体の位置決めと加圧を行う電動マイクロマニピュレータ及び連動マイクロインジェクションポンプ(Eppendorf NI, FemtoJet)についてはそれぞれ既設のシリアル/USBポートを介し、また観測波長を切り替える蛍光ターレット、焦点調節ダイヤルについては本来手動であったため、シリアル制御の追加駆動部品を自作し、全てPCで一括制御した。全体の制御ソフトはグラフィック型言語(National Instruments LabVIEW7.1)で作成、穿孔のための光照射と、その前後の細胞撮影を自動化した。細胞培地など液の交換は手作業で行っ



た。

B-2-2 追加電装/機械系

迅速な試作開発には、基本機構のモジュール化とその組み合わせでのシステム化が望ましい。安価かつ耐久性に優れることも要件である。

このような観点から、追加駆動部にはホビーロボット競技用に市販されているシリアル制御サーボモーター(近藤科学 KRS4013HV)を使用し、LabVIEW7.1により制御ドライバを開発した。同モーターは比較的廉価でありながら 270 度の軸可動範囲を持ち、その範囲を 8000 分割した角度情報を制御側に送信する。更に位置制御をオフにすることで、任意の機器状態における担当サーボモーターの角度情報のみ送信させ、産業用ロボットのような教示作業を実施可能である。

なお顕微鏡の蛍光フィルタターレット等、位置精度の要求される制御箇所においては、駆動部のバックラッシュ対策が重要となる。この場合は本来同じ到達位置であっても、回転方向毎に異なる数値指示を出すことで、支障ない運用が可能であった。

また、システム化に際し独自に必要な部品については、ポリアセタール樹脂からジュラルミンまでの素材を適宜選定し、CAD 製図のデータをホビー用 NC フライス (Roland DG MDX-20, CAM ソフトは付属の Modela Player4, Zacoda スピンドルアクセラレータ装備) によって直接切削して作成した。

B-2-3 簡易・卓上型細胞膜穿孔システムの設計方針

今回の設計に際し、以下の 3 点に注力した。

- ①簡便に運用出来ること：研究ツールとして、市販の倒立蛍光顕微鏡に組み付けて運用する。
 - ②安価であること：様々な機関に貸与可能とするため、動力部品の集約・市販部品の活用により、システムのコストを引き下げる。
 - ③改良の余地があること：最終的には、特定の細胞種毎に最適な穿孔条件が定まると予想されるが、研究段階では様々な条件設定で運用する必要がある。このため、運用ソフトウェアについては、ユーザー自身が設定出来る余地を残した上で簡易化を図った。
- また機構面についても、今回は加圧のみとしたが、培養ディッシュやマイクロプレート等の任意の座標での運用を可能とするため、将来的な電動 XY ステージとの一体化が可能な基礎設計とする。

(倫理面への配慮)

ラット株化細胞を対象とした実験は、特に倫理面に配慮する必要はない。

C. 研究結果

C-1 細胞集団への物質導入解析

細胞輪郭抽出については、透過像における一定の輝度範囲を輪郭線の閾値として処理した。当初は、細胞そのものの輪郭を正確に抽出することを目指した。そのような方針で、同一の穿孔条件でありながら、導入効率にばらつきが認められた。その原因を調査した結果、細胞膜穿孔の結果生ずる、細胞質・細胞内小器官の小胞状の流出部分の判定に問題があることが判明した。細胞膜の穿孔が大きい場合は、流出部の透過像、および流出部に含まれる蛍光が明瞭であったため、当初より細胞あたり蛍光強度に流出部も計上されていた。

一方、穿孔が小さい細胞では細胞内では明瞭な染色が生じていたものの、流出部の輪郭は透過像では不明瞭、かつその部位の蛍光は微弱であった。このため流出部を当該蛍光強度計算から除外した結果になっていた。最終的に細胞あたり蛍光強度の導出時に、細胞の輪郭として全てのケースで流出部を含むよう解析法を改めた。また蛍光像から得られる細胞輪郭と、透過像の細胞輪郭抽出結果が出来るだけ一致するように、抽出の基準となる輝度範囲を変化させた上、実際に両者の細胞像を重ね合わせて最適化を行った(図7)。具体的

には ImageJ コマンドにおいて、"create composite, image->color->merge channels (keep source images)"で蛍光像を赤、抽出像を青にすると、抽出像が細胞より大きければ黒い隙間が表示され、逆であれば紫色の重なり領域が表示されるので、これらの色調を参考に調整可能であった。以上のような検討の結果、本法による細胞処理について、安定したデータ解析に目処が見ついた。実際にラット PC12 細胞を対象とした



図7 細胞輪郭抽出の評価

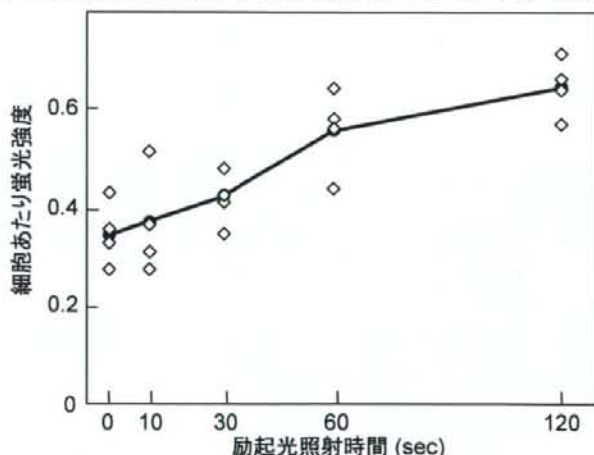


図8 細胞膜穿孔定量解析結果

励起光源: 100W水銀ランプ、
広域紫外励起フィルタ(WU)透過、光強度 0.82 W cm^{-2}
PDMS穿孔体による加圧 70g/cm^2 一回、 140g/cm^2 一回
折れ線グラフは四象限の結果の平均値

最終的な解析結果を図8に示す。今後、様々な細胞で同様のデータを収集し、穿孔法の最適化に努めたい。

C-2 簡易・卓上型細胞膜穿孔システム

昨年度の自動化システムにおいては、穿孔体による細胞の加圧にマイクロインジェクション用加圧ポンプを利用した。しかしながら、費用、スペースの問題から、汎用機については専用の加圧ポンプを用意するのは困難であった。このため、汎用機ではコイルばねによる加圧に変更した。変更に伴い、ばね長を把握しつつ、鉛直方向への直線的な加減圧を行い、更に顕微鏡ステージ上のコンデンサ等と立体的に干渉しない動作機構が必要になった。

このため、顕微鏡ステージ周辺部に動力部を固定、伸びたアームの先端部が、ステージ中央で鉛直動作するように設計を行った。アーム部の機構としては、少ない部品点数で疑似直線軌道を生

成可能なチェビシェフリンク機構を採用した。モーターには量産時の部品の入手性、優れた耐久性、また性能に比較して低コストであることから、先に述べた市販のホビーロボット部品を採用した。適用対象となる顕微鏡については、共同研究先へのヒアリングに基づき、オリンパスIX系、ニコンTe系蛍光顕微鏡のステージへ固定して運用することとした。以上のコンセプトに基づき設計を進め、現在、最終的な生産モデルの製図を終え、量産体制に移行する段階に至った(図9)。

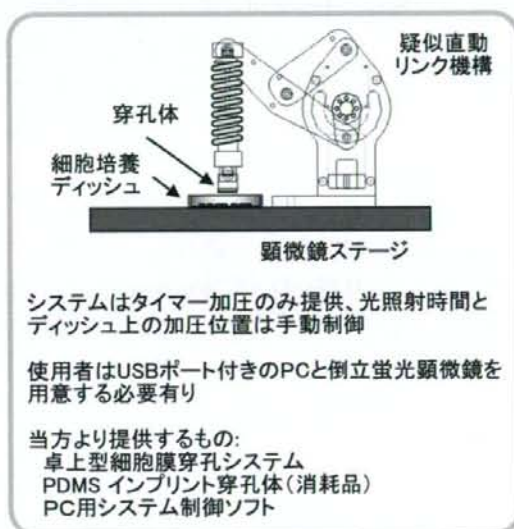


図9 簡易卓上型細胞膜穿孔システム

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、各施設での動物実験委員会の承認を受けるとともに、実験動物の①苦痛の軽減、②数の削減、③代替法の使用に努める。

D. 考察

個々の細胞レベル、かつ細胞集団の改変は、前例の乏しい解析領域である。このような用途ではセルソーターでの解析が一つの解決策である。しかし本細胞膜穿孔法では、今後

の発展性を考慮すると、複数回の物質導入前後での個々の細胞の相互移動や組織構築という、動的な連続解析を行うことが望ましく、細胞を浮遊・滴下して解析するセルソーターでは行えない解析によって、真に重要なデータを得ることが出来る。今回、培養ディッシュ上の細胞輪郭の抽出と細胞内の蛍光強度の対応付けに成功した成果は、今後の細胞膜穿孔プロセスの解析自動化の基礎となる。

また、細胞治療を目的とした細胞処理自動化プロセスについては、本来であれば、バイオとロボット、それぞれの専門家同士が連携し研究開発を行うのが理想である。しかしながら小規模組織や、時間的制約が厳しい条件下では実施不可能なことも多い。今回のシステムは、バイオ研究者が現場のニーズに合わせ、自力で構築したものである。専門家でないにもかかわらず、そのような開発が可能になった背景には、ホビー向け低価格ロボット技術がバイオ操作に十分適用可能な水準に高まる一方、開発言語や CAD/CAM といった専門家向けであったツールが廉価かつ簡便に使用可能になりつつあるという、経済学上の破壊的イノベーションに相当する進捗があると考えている。実際、今回のシステム構築に必要な設備投資は現在およそ 80 万円、またシステム化のためサーボモーター費用は一個 1 万 4 千円である。

このようにシステム化のための要素技術が固まったことから、今後の関連分野発展のため、技術の普及に努めたい。このように迅速かつ廉価に、機械設計や制御の専門家でなくとも、システム構築を行う環境が整ったことで、新しいアイデアの実証を容易に行いうると思われる。特にこの点において想定される波及効果は大きく、一連の技術は今後の教育・研究を加速する基盤になると考えられる。

E. 結論

本事業の分担について総括すると、以下の 4 つの成果を順次発展的に達成することが出来た。

- ① 独自の細胞膜穿孔技術を発展させ、細胞群を一括改変しうる量産可能な細胞膜穿孔体を開発し、浮遊、付着いずれの細胞にも適用可能であるという端緒を付けた。
- ② 穿孔体の運用条件の最適化を大幅に省力化するシステムを構築できた。
- ③ 卓上簡易型穿孔システムをほぼ完成させ、様々な研究機関と共同研究を進める段階に至った。
- ④ 加えて画像解析のノウハウを蓄積し、細胞集団に対する細胞膜穿孔の定量的解析をすすめることが可能となった。

これらの成果によって、研究代表者として文部科学省萌芽的研究費「細胞膜穿孔ナノロッドによる細胞治療システム」平成 19-20 年度、同 特定領域研究「時空間的パターン誘導による細胞群機能改変システム」平成 20-21 年度に採択され、研究の発展に繋がっている。我々は今後、本法を遺伝子等の様々な物質導入法に発展させることで、本法の有用性を更に高めることが出来ると考えており、実際に本事業を含む関連成果を学会等

で発表したところ、既に基礎から応用、また医学系から工学系といった幅広い分野で、共同研究の申込を受けている。今回の量産型卓上細胞膜穿孔システムと、細胞処理データの自動解析によって、本事業の成果を国内外に普及、かつ連携先から得られたデータ群を統合的に相互比較することが可能となり、細胞治療や再生医療の分野でも一挙に研究を発展させようと考えている。

参考文献

- [1] K.Takahashi, S.Yamanaka, *Cell* 126, 663-676 (2006)
- [2] K. Okita et al., *Science* DOI: 10.1126/science.1164270 (2008)
- [3] R.Yano et al., *NeuroReport*, 13, 1263-1266 (2002)
- [4] T.K. Saito et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 391(7), 2513-2519 (2008)
- [5] 齋藤敬, 応用物理, 76, 12, 1384-1387, (2007)
- [6] T.K. Saito et al., *Springer Tracts in Advanced Robotics*, 24, 385-394, (2006)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

“Self-organized ZnO nanorod with photooxidative cell membrane perforation enables large-scale cell manipulation.”

T.K. Saito, M. Seki, H. Tabata,

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391(7), 2008, pp.2513-2519

2. 学会発表

齋藤 敬

「高効率細胞膜穿孔技術と生体模擬ロボット」特定領域「バイオ操作」若手研究者第3回ワークショップ、沖縄、2008.7.12

齋藤 敬、赤木貴則、田口明彦、一木隆範

「ナノインプリント構造体による光化学細胞膜穿孔法」2008年秋季第69回応用物理学会学術講演会、中部大学、2008.9.4

齋藤 敬、一木隆範

「ロボット技術による大規模・高効率細胞膜穿孔システム」第26回日本ロボット学会学術講演会，神戸大学，2008.9.9

T.K. Saito, O. Suekane, T. Akagi, A. Taguchi, T. Ichiki, "Large-Scale High-Performance Cell Membrane Perforation, Assisted by Robotics Technologies", NanoBio-seoul 2008, (Yonsei Biomedical Science and Technology Initiative, Seoul, 2008), Abstract book p.194. Seoul, Korea, 29-30, Oct.2008

Takashi K. Saito, "Bio-Robotics, interdisciplinary fusion for new industries", International Symposium on Emerging Trends in Biotechnology & Management, Biyani Institute of Science & Management, Jaipur, India, 19 Dec.2008, p.12.

"Large-Scale High-Performance Cell Membrane Perforation, with Nanoimprinted Mass Produccible Perforator"

Takashi K. Saito, Osamu Suekane, Takanori Akagi, Akihiko Taguchi, Takanori Ichiki, the 4th annual IEEE-NIH Life Science Systems and Application (LiSSA'09), Accepted, 9 April 2009

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 本年度はなし
2. 実用新案登録 本年度はなし
3. その他 本年度はなし

掲載論文一覧

論文・総説

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Taguchi A, Nakagomi N, Matsuyama T, Kikuchi-Taura A, Yoshikawa H, Kasahara Y, Hirose H, Moriwaki H, Nakagomi T, Soma T, Stern DM, Naritomi H.	Circulating CD34-positive cells have prognostic value for neurologic function in patients with past cerebral infarction.	<i>J. Cereb. Blood Flow Metab.</i>	29	34-38	2009
Maruyama S, Taguchi A, Iwashima S, Ozaki T, Yasuda K, Kikuchi-Taura A, Soma T, Ishii H, Murohara T, Takahashi H, Kasuga H, Kumada Y, Toriyama T, Ito Y, Kawahara H, Yuzawa Y, Matsuo S.	Low circulating CD34-positive cells is associated with poor prognosis in chronic hemodialysis patients.	<i>Kidney International.</i>	74	1603-1609	2008
Taguchi A, Matsuyama T, Nakagomi T, Shimizu Y, Fukunaga R, Tatsumi Y, Yoshikawa H, Kikuchi-Taura A, Soma T, Moriwaki H, Nagatsuka K, Stern D. M, Naritomi H.	Circulating CD34-positive cells provide a marker of vascular risk associated with cognitive impairment. <i>J. Cereb. Blood Flow Metab.</i>	<i>J. Cereb. Blood Flow Metab.</i>	28	445-449	2008
Makino.H Okada.H Sugisawa.T Nagumo.A Miyamoto.Y Kishimoto.I Kikuchi-Taura.A Soma.T Taguchi.A Yoshimasa.Y.	Pioglitazone treatment stimulates circulating CD34-positive cells in type 2 diabetic patients	<i>Diabetes Res Clin Pract.</i>	81	327-330	2008

Yoshihara T, <u>Taguchi A</u> , Matsuyama T, Shimizu Y, Kikuchi-taura A, Soma T, Stern.D.M, Yoshikawa H.	Increase in Circulating CD34-Positive Cells in Patients with Angiographic Evidence of Moyamoya-like Vessels.	<i>J. Cereb. Blood Flow Metab.</i>	28	1086-1089	2008
Okada S, Makino H, Ayako Nagumo A, Sugisawa T, Muneya Fujimoto M, Kishimoto I, Miyamoto Y, Kikuchi-Taura A, Soma T, <u>Taguchi A</u> , Yoshimasa Y.	Circulating CD34-positive cell number is associated with brain natriuretic peptide level in type 2 diabetes patients.	<i>Diabetes Care.</i>	31	157-158	2008
Kudomi N, Hayashi T, Watabe H, Teramoto N, Piao R, Ose T, Koshino K, Ohta Y, <u>Iida H</u> .	A physiological model for recirculation water correction in CMRO2 assessment with $^{15}O_2$ inhalation PET.	<i>Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism</i>	in press		2009
Kudomi, N. Koivuviita, N. Liukko, K. E. Oikonen, V. J. Tolvanen, T. <u>Iida, H</u> , Tertti, R. Metsarinne, K. Iozzo, P. Nuutila, P.	Parametric renal blood flow imaging using $[(15)O]H_2O$ and PET.	<i>Eur J Nucl Med Mol Imaging</i>	in press		2009
Yamamoto A, Sato H, Enmi J, Ishida K, Ose T, Kimura A, Fujiwara H, Watabe H, Hayashi T, <u>Iida H</u> .	Use of clinical MRI scanner for pre-clinical research on rats.	<i>Radiological Physics and Technology.</i>	2	13-21	2009
<u>Iida H</u> , Eberl S, Kim KM, Tamura Y, Ono Y, Nakazawa M, Sohlberg A, Zeniya T, Hayashi T, Watabe H.	Absolute quantitation of myocardial blood flow with ^{201}Tl and dynamic SPECT in canine: optimisation and validation of kinetic modelling.	<i>Eur J Nucl Med Mol Imaging</i>	35	896-905	2008
Sohlberg A, Watabe H, <u>Iida H</u> .	Three-dimensional SPECT reconstruction with transmission dependent scatter correction.	<i>Ann Nucl Med</i>	22	549-556	2008
Yokoyama I, Inoue Y, Kinoshita T, Itoh H, Kanno I, <u>Iida H</u> .	Heart and Brain Circulation and CO2 in Healthy Men.	<i>Acta Physiol (Oxf)</i>	193	303-308	2008
Sohlberg A, Watabe H, <u>Iida H</u> .	Acceleration of Monte Carlo based scatter compensation for cardiac SPECT.	<i>Phys. Med. Biol.</i>	53	277-285	2008