

G. 研究発表

1. 著書

なし

2. 論文発表

- 1) Murai K, Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Igarashi T, Seo N, Murakami T, Kobayashi E, Mochida J. Primary immune system responders to nucleus pulposus cells: evidence for immune response in disc herniation Eur cells materials J. 2010 Jan;19, 13-21.

2.学会発表

- 1) 村井邦彦、鈴木英雄、五十嵐孝、瀬尾憲正、酒井大輔、中井知子、中村嘉彦、持田讓治.椎間板ヘルニアの新治療に向けた基礎的研究—椎間板髄核細胞の特異的免疫特性について. 第23回日本ペインクリニック学会東京地方会 2009年2月、東京.
- 2) 村井邦彦、酒井大輔、中井知子、中村嘉彦、持田讓治. 椎間板ヘルニアの新治療に向けた基礎的研究 - 椎間板髄核細胞の特異的免疫特性について-. 第38回日本脊椎脊髄病学会2009年4月、神戸. 日本脊椎脊髄病学会誌 20s298, 2009.
- 3) 村井邦彦、酒井大輔、中井知子、中村嘉彦、持田讓治. 椎間板ヘルニアにおける免疫機能の関与. 第24回日本整

形外科学会基礎学術集会. 2009年9月、横浜. 日本整形外科学会誌 83; s1212, 2009.

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

## 細胞シートならびに遺伝子改変ブタ精子の 凍結保存に関する研究

研究分担者 長嶋比呂志 明治大学農学部生命科学科発生工学研究室 教授

研究要旨：東海大学医学部整形外科佐藤正人准教授らによって開発された細胞シートによる軟骨再生技術の臨床応用の促進を目的として、細胞シートの凍結保存に取り組んだ。哺乳動物初期胚、胎仔組織および成体卵巣組織等の凍結保存に実績のあるガラス化法を、細胞シートに適用するための条件検討を行った。

ガラス化法は、細胞シートを構成する細胞の生存性を高効率に維持し得えた。しかし、ガラス化あるいは融解時に、脆弱な構造体である細胞シートに亀裂が生じることが避けられなかった。この亀裂の発生を避けるために、組織片ガラス化用デバイスの応用や、新規デバイスの開発についても検討した。

大型実験動物であるブタを用いて細胞シートの移植試験を行う際に、蛍光蛋白のような細胞マーカーを持ったブタの利用が望まれる。そのようなブタの安定供給を可能にするため、分担者らが既に開発した、赤色蛍光蛋白（クサビラオレンジ）遺伝子を持ったブタの精子の凍結保存を行い、さらにそれらの受精能を検証した。凍結精子を用いた人工授精で産仔が得られることが確認され、これによって赤色蛍光蛋白マーカーを持ったブタの研究利用を今後促進することができる。

### A. 研究目的

1. 東海大学医学部整形外科佐藤正人准教授らによって開発された細胞シートによる軟骨再生技術の臨床応用の促進を目的として、細胞シートの凍結保存法を開発することを目的とした。
2. 細胞シートの移植実験を遂行する際に、有力なリサーチツールとなり得る、赤色蛍光蛋白遺伝子導入ブタの精子の凍結保存を目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 細胞シートの凍結保存

マウスおよびブタ胚、ブタ胎仔臓器、マウス卵巣、ヒト卵巣組織片等の凍結保存に実績のある MVC ガラス化法 (Kawayama et

al., 2005) を、細胞シートの凍結保存に適用した。細胞浸透性凍害保護後剤として、平衡液には 7.5% DMSO および 7.5% ethylene glycol を、ガラス化液には 15% DMSO および 15% ethylene glycol を用いた。さらに、細胞非浸透性の凍害保護剤として、ガラス化液に 0.5M sucrose および 10% ポリリジン誘導体（カルボキシル基導入ポリリジン）を加えた。

平衡時間およびガラス化液の浸漬時間の検討に引き続き、その後実際にガラス化を行って、細胞の生存性を評価した。

#### 2. 遺伝子改変ブタ精子の凍結保存

性成熟に達した、クサビラオレンジ遺伝子導入ブタの雄個体から精巣を摘出し、精巣上体精子を還流法により採取した。精子

の凍結保存は Niwa ら(1989)の方法に準じて行った。融解後の精子の活力ならびに生存率(live and dead stain)を検定した。さらに、発情誘起した雌ブタに、卵管内人工授精を行い、凍結精子の受精能を判定した。

### C. 結果

#### 1. ガラス化された細胞シートの生存性

平衡時間を 25 分とし、ガラス化液への浸漬時間(5-20 分)の比較検討の結果、ガラス化状態を達成するための条件が決定された。すなわち、ガラス化液浸漬時間が 5-10 分ではシートに氷晶形成が起こり、20 分では安定的にガラス化状態が得られることが明らかとなった。

この条件を用いて細胞シート(4.2cm<sup>2</sup>タイプ)をガラス化保存し、融解後に細胞を分散して生存率を調べた結果、非凍結試料の細胞生存率と同等であった(93.0% vs 94.0%)。

#### 2. クサビラオレンジ遺伝子導入ブタ精子の凍結保存

##### ① 精子生存性確認試験

凍結融解精子の生存率は 77%であった。また、融解時の精子活力は+++50%であった。

##### ② 受精能試験

凍結融解精子を用いて 7 頭の雌に人工授精を行った結果、2 頭が妊娠・分娩し、合計 12 頭の産仔が得られた。これらのうちの、5 頭には遺伝子伝達が確認された。

### D. 考察

細胞シートを構成する個々の細胞の生存性は、ガラス化保存後も十分に維持されていると考えられる。一方、脆弱な構造体である細胞シートは、液体窒素中や融解後の洗浄過程において極めて破損し易い。適当な支持体を用いてシート面を保護することで、シートの破損はある程度防止できる可能性があるため、適切なデバイスの開発を平行して進める必要がある。

クサビラオレンジ遺伝子導入ブタ精子の凍結後の生存性は高く、卵管内人工授精によって後代産仔を得ることの出来る正常性を保っていると判断される。レシピエント雌への授精適期について検討することで、受胎率は向上するものと考えられる。

### E. 結論

細胞シートのガラス化によって、個々の構成細胞の生存性は高効率に保たれるが、構造体としてのシートの形態を完全に維持するためには、さらなる検討を要する。

凍結精子を用いた赤色蛍光蛋白発現ブタの増殖は実用的レベルであり、今後の研究に利用可能である。

### G. 研究発表

#### 1. 総説

- 1) Matsunari H, Nagashima H. Application of genetically modified and cloned pigs in translational research. *Journal of Reproduction and Development* 2009; 55: 225-230.
- 2) 松成ひとみ、長嶋比呂志. 蛍光マーカー遺伝子を組み込んだ大型動物の医学研

- 究応用. 医学のあゆみ 2009; 230: 147-151.
- 3) 長嶋比呂志. クローン動物とクローニング技術の医学・医療への利用. 日本畜産学会報 2010; 81: 53-64.
2. 論文発表
- 1) Umeyama K, Watanabe M, Saito H, Kurome M, Tohi S, Matsunari H, Miki K, Nagashima H. Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1alpha induces diabetes in transgenic-cloned pigs. *Transgenic Res* 2009; 18: 697-706.
- 2) Tomii R, Kurome M, Wako N, Ochiai T, Matsunari H, Kano K, Nagashima H. Production of cloned pigs by nuclear transfer of preadipocytes following cell cycle synchronization by differentiation induction. *J Reprod Dev* 2009; 55: 121-127.
- 3) Kasai T, Kano H, Umeda Y, Sasaki T, Ikawa N, Nishizawa T, Nagano K, Arito H, Nagashima H, Fukushima H. Two-year inhalation study of carcinogenicity and chronic toxicity of 1,4-dioxane in male rats *Inhalation Toxicology* 2009; 21: 889-897.
- 4) Miyagawa S, Yamamoto A, Matsunami K, Wang D, Takama Y, Ueno T, Okabe M, Nagashima H, Fukuzawa M. Complement regulation in the GalT KO era. *Xenotransplantation* 2009; 17: 11-25.
- 5) Miyagawa S, Takeishi S, Yamamoto A, Ikeda K, Matsunari H, Yamada M, Okabe M, Miyoshi E, Fukuzawa M, Nagashima H. Survey of glycoantigens in cells from alpha1-3galactosyltransferase knockout pig using a lectin microarray. *Xenotransplantation* 2010; 17: 61-70.
- 6) Ogawa B, Ueno S, Nakayama N, Matsunari H, Nakano K, Fujiwara T, Ikezawa Y, Nagashima H. Developmental ability of porcine in vitro matured oocytes at the meiosis II stage after vitrification. *J. Reprod. Dev.* 2010; 56: online 2010/3/24.
- 7) 落合恵子、池田有希、香川則子、桑山正成、長嶋比呂志. 老化促進モデルマウス SAMP1 亜系統の生理・病理学的特徴の解析. 明治大学農学部研究報告 2010 ; 59 : 103-107
2. 学会発表
- 国際学会
- 1) Nagashima H. Recent advances in production of genetically modified pigs for xenotransplantation. International Symposium Xenotransplantation, Berlin, 4-5 Jun, 2009
- 2) Kagawa N, Kuwayama M, Ikeda Y, Nagashima H, Leibo S, Kato O. Recovery of reproductive function and extension of life expectancy in old infertile mice by ovarian transplantation . 25th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Amsterdam, The Netherland. 28 Jun-1 Jul, 2009.
- 3) Miyagawa S, Yamamoto A, Ikeda K, Matsunari H, Nagashima H, Takeishi S, Yamada M, Fukuzawa M. Lectin microarray analyses of endothelial cells and fibroblasts from the  $\alpha$ 1,3 galactosyltransferase knockout pig. The Transplantation Society, IPITA-IXA 2009, Venice, 12-16 Oct, 2009.
- 4) Yokoo T, Nagashima H, Matsunari H, Iwai S, Hosoya T, Kobayashi E. Xeno-metanephros as a biocompetent scaffold for kidney regeneration . The Transplantation Society, IPITA-IXA 2009, Venice, 12-16 Oct, 2009.
- 5) Kagawa N, Kuwayama M, Ikeda Y, Silber S, Nagashima H, Kato O. Function of vitrified human ovarian grafts after xeno-transplantation . 65th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, Atlanta, USA, 17-21 Oct, 2009.
- 国内学会
- 1) 池田有希、松成ひとみ、落合恵子、香川則子、桑山正成、加藤修、長嶋比呂志. Cryotop法を用いたマウス4細胞期

- 胚および胚盤胞の再凍結保存後の生存性：凍結・再凍結保存時期の検討。第 50 回日本哺乳動物卵子学会、東京都、2009 年 5 月 8-9 日
- 2) 池田有希、香川則子、落合恵子、桑山正成、加藤修、長嶋比呂志。若齢時に凍結保存した卵巣の老齢マウスへの自家移植による繁殖能力の回復。第 27 回日本受精着床学会、京都市、2009 年 8 月 6-7 日
- 3) 香川則子、桑山正成、池田有希、落合恵子、長嶋比呂志、加藤修。若齢時に凍結保存した卵巣の自家移植による老齢不妊マウスからの正常産子の作出。第 27 回日本受精着床学会、京都市、2009 年 8 月 6-7 日
- 4) 梅山一大、渡邊將人、松成ひとみ、黒目麻由子、小川武甲、中野和明、藤原主、長嶋比呂志。糖尿病モデル遺伝子改変ブタの生産と病態の特徴について。第 36 回豚の繁殖衛生セミナー、つくば市、2009 年 8 月 27-28 日
- 5) 松成ひとみ、渡邊將人、梅山一大、中野和明、藤原主、小川武甲、池田有希、春山エリカ、塩田明、長嶋比呂志。肝臓特異的赤色蛍光(Kusabira-Orange)発現を示す遺伝子改変ブタの作出。第 102 回日本繁殖生物学会、奈良市、2009 年 9 月 9-12 日
- 6) 梅山一大、渡邊將人、松成ひとみ、黒目麻由子、小川武甲、中野和明、藤原主、三木敬三郎、長嶋比呂志。糖尿病モデルトランスジェニッククローンブタの作出 III. 変異型ヒト HNF-1 $\alpha$ 遺伝子を導入した Dominant-negative 変異体の病態の詳細解析。第 102 回日本繁殖生物学会大会、奈良市、2009 年 9 月 10-12 日
- 7) 香川則子、桑山正成、池田有希、落合恵子、長嶋比呂志、加藤修。若齢時凍結保存卵巣の自家移植による老齢不妊マウスの繁殖能力の回復および寿命の延長。第 102 回日本繁殖生物学会、奈良市、2009 年 9 月 10-12 日
- 8) 中野和明、中山順樹、小川武甲、松成ひとみ、藤原主、斉藤紗恵子、池澤有加、吉岡耕治、星 宏良、長嶋比呂志。抗酸化機能強化培地がブタ体外生産胚の凍結生存性に及ぼす影響。第 102 回日本繁殖生物学会大会、奈良市、2009 年 9 月 10-12 日
- 9) 池田孔佑、山本亜紀、松成ひとみ、中野和明、藤原主、長嶋比呂志、福澤正洋、宮川周士。ブタ CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene の解析。第 45 回日本移植学会総会、東京都、2009 年 9 月 16-18 日
- 10) 山本亜紀、徐 恒傑、武石俊作、山田正雄、三善英知、池田孔佑、松成ひとみ、長嶋比呂志、福澤正洋、宮川周士。レクチンプロット法による  $\alpha$ Gal-knockout ブタの糖鎖抗原の解析。第 45 回日本移植学会総会、東京都、2009 年 9 月 16-18 日
- 11) 香川則子、桑山正成、池田有希、落合恵子、長嶋比呂志、加藤修。妊孕性保存および QOL 向上を目的とした卵巣ガラス化保存・移植技術の有効性。第 54 回日本生殖医学会、金沢市、2009 年 11 月 22-23 日
- 12) 松成ひとみ、池澤有加、渡邊將人、梅山一大、中野和明、藤原 主、竹内靖浩、本田香澄、前原美樹、高柳就子、山田和彦、宮川周士、長嶋比呂志。 $\alpha$ 1,3 ガラクトース転移酵素遺伝子ダブルノックアウトブタの体細胞クローニングにおける Scriptaid の効果。第 13 回日本異種移植研究会、東京都、2010 年 3 月 14 日
- 13) 池田孔佑、山本亜紀、近藤昭宏、松成ひとみ、長嶋比呂志、高間勇一、上野豪久、福澤正洋、宮川周士。ブタ CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene の解析。第 13 回日本異種移植研究会、東京都、2010 年 3 月 14 日
- 14) 松成ひとみ、小林敏寛、渡邊將人、中野和明、藤原主、長屋昌樹、中内啓光、長嶋比呂志。膵臓特異的に緑色蛍光タンパク (Venus) を発現するトランスジェニック (Tg) ブタの作出。第 9 回日本再生医療学会、広島市、2010 年 3 月 18-19 日
- 15) 杉本直美、横尾隆、増田茂夫、花園豊、竹内賢吾、松成ひとみ、長嶋比呂

- 志、土居雅子、小林英司. 胎仔腎臓原基の器官培養を利用した幹細胞スクリーニング—手技の仔細と蛍光画像パターンによる分類—. 第9回日本再生医療学会、広島市、2010年3月18-19日
- 16) 岩井聡美、横尾隆、杉本直美、松成ひとみ、長嶋比呂志、小林英司. 急性腎不全に陥った腎臓への胎児由来組織の移植効果—バイオイメージング・ラットを用いた検討. 第9回日本再生医療学会、広島市、2010年3月18-19日
- 17) 横尾隆、松成ひとみ、岩井聡美、松本啓、長嶋比呂志、小林英司. 異種胎仔組織を用いた再生腎臓誘導法の開発. 第9回日本再生医療学会、広島市、2010年3月18-19日
- 18) 松成ひとみ、中野和明、藤原主、池澤有加、小川武甲、高柳就子、渡邊將人、梅山一大、長嶋比呂志. ブタにおける連続核移植の可能性：第6世代クローンの作出. 日本畜産学会第112回大会、東京都、2010年3月28-30日
- 19) 松成ひとみ、竹内靖浩、保谷美恵、関口溪人、望月寛徳、日高龍路、渡邊將人、梅山一大、高柳就子、中野和明、藤原主、長嶋比呂志. Kusabira-Orange 遺伝子導入トランスジェニッククローン(Tg-C)ブタの繁殖能力および遺伝子伝達. 日本畜産学会第112回大会、東京都、2010年3月28-30日
- 20) 藤原主、松成ひとみ、梅山一大、渡邊將人、中野和明、竹内靖浩、中野貞雄、長嶋比呂志. 自動冷却装置を用いた遺伝子改変ブタ精子の凍結保存. 日本畜産学会第112回大会、東京都、2010年3月28-30日
- 21) 日高龍路、梅山一大、望月寛徳、関口溪人、松成ひとみ、中野和明、藤原主、渡邊將人、長嶋比呂志. 糖尿病発症遺伝子改変ブタの長期飼育に関する研究. 日本畜産学会第112回大会、東京都、2010年3月28-30日
- 市（自治医科大学）、2009年4月8日
- 2) 長嶋比呂志 トランスレショナルリサーチ推進のためのブタの遺伝子改変の現状. バイオ・ナノテクフォーラムイブニングセミナー21. 東京都（東京女子医大）、2009年4月27日
- 3) 長嶋比呂志 Tokyo Pig Center 機構（構想）. 自治医科大学 CDAMTec 内覧会、下野市（東京女子医大）、2009年7月14日
- 4) Hiroshi Nagashima. Recent advances in production of genetically modified pigs in Meiji University, Yunnan Agricultural University, Yunnan, China, 19 Aug, 2009
- 5) 長嶋比呂志 トランスレショナルリサーチに向けたクローンブタ・遺伝子改変ブタの開発. 東京電機大学公開講座 ME 講座 第33回、東京都（東京電機大学）、2009年9月24日
- 6) 長嶋比呂志 クローン動物とクローニング技術の医学・医療への応用. 体細胞クローン技術の取り扱いと利用方向. 平成21年度問題別研究会「体細胞クローン技術の現状と将来展望」東京都、2009年12月14日～15日

招待講演

- 1) 長嶋比呂志 遺伝子改変ブタの再生医療への応用 自治医科大学先端医療技術開発センターシンポジウム、下野

## 製造工程の異なる細胞シートの非侵襲的特性評価に関する基礎的検討

研究分担者 石原 美弥 防衛医科大学校 医用工学講座 准教授  
研究協力者 谷川 待子 防衛医科大学校 医用工学講座 研究員

研究要旨： 本研究では、同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究の1つとして、「製造工程の異なる種々のヒト細胞シートの非侵襲的特性評価」に関する第1年目の研究成果として報告する。移植に用いる細胞シートそのものを非侵襲的に評価することで再生医療のバリデーション実施が可能となる。本研究では、光をモダリティとして選択し、再生医療のバリデーションが可能となるようなシステムを構築することを目的とした。分析手段には分子分光法を採用し、目的を達成できるハイパースペクトル顕微鏡システムの構築をめざした。この結果、生細胞を対象に高分解能で空間情報と波長情報が同時に取得できる、5次元（空間  $(x,y,z)$  軸、時間軸、波長軸の5軸）細胞追跡を可能にするシステムを構築できた。

### A. 研究目的

分子分光法は、分子のエネルギー準位に相当する光の波長の吸収特性や発光特性から、分子構造や定量的成分分析が可能な方法である。

この分子分光分析を可能にするハイパースペクトルセンサ（Hyper Spectral Sensor, 以下、HSS）は、画像情報及びスペクトル（分光）情報を同時に得ることが可能なセンサであり、元々はリモートセンシングの分野で発展してきたセンサである。近年、この特長を生かしたバイオメディカル分野への応用がなされ始めている。HSS データには、スペクトル情報が画像内の全ての画素に対して取り込まれる特徴を持つ。取得した HSS データを画像化するには、任意の波長に対する強度表示を行うことが可能

であり、たとえば赤緑青の3つの波長における光強度を基に画像を作製すれば、可視画像に近い RGB 表示を得ることができる。また、蛍光強度分布を取得したい場合は、その蛍光波長（任意の複数の波長あるいは単数の波長でも可）における光強度を画像化することにより得ることができる。

上記の特長を利用し、リモートセンシング分野では、HSS で取得したスペクトル特性の違いから画像内の特異物体を識別・抽出したり、ある波長での光強度に対応した色表示を行うことにより、特定物体の分布状況を把握できる。この HSS の利用は、バイオメディカル分野すなわち、再生医療のバリデーションに有効に利用できると考えられる。

通常、HSS と比較されるのはマルチスペク

トルセンサ（以下、MSS）である。MSSは数バンドから十数バンドの離散的に分かれた波長で撮像を行うのに対し、HSSは、波長を数十～数百バンドに連続的に分けて撮像を行うものである。つまり、HSSは連続的な多数のバンドでの撮像が可能で、かつ原理的にフィルター切り換えなどが不要で

あるため、波長分解能が高く、連続のスペクトル特性が同時刻で取得できる特長を持つ。つまり、得られるデータが図1のように  $x, y, \lambda$  の3次元データとなる。これにより、連続的なスペクトルで物質の評価・同定が可能であることがわかる。

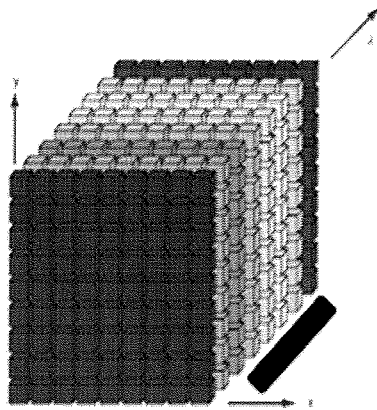


図1 ハイパースペクトルセンサで得られるデータ

HSSの原理としては、一般的に撮像光学系、波長分散素子を用いた分光光学系、及び CCD や FPA などの2次元画像センサ素子から構成される。被写体からの光は撮像光学系（対物レンズ）通過後に線状のスリットを通ることにより1列の光となり、その後波長分散素子にてスリットに対して垂直の方向に分光される。この2次元に広がった光に対して、2次元画像センサの一方のラインで空間軸の光強度情報を、もう一方のラインでスペクトル（波長）軸の光強度情報を取得する。また、HSSと被写体の相対的な位置を、2次元センサの空間軸に対し垂直方向に変化させることにより、もう一方の空間軸の光強度情報を取得する。これにより被写体の2次元画像情報及びス

ペクトル情報が取得できることになり、HSSで取得したデータは直交する2つの空間軸とスペクトル軸を持つ3次元データとなる。ここで、スペクトル情報は、2次元画像センサの1ラインにて取得するため、ほぼ連続的なスペクトル特性を示すデータとなり、その検知波長域は2次元センサの検知波長域に、また波長分解能は検知波長域を画素数で除算した値に相当する。たとえば、1000 nmの波長範囲を500画素のセンサで検知するとき、波長分解能は2 nmとなる。一方、空間分解能は、視野角をセンサの空間軸の画素数で除算した値とHSSと被写体の相対的な位置の変化の割合に依存する。



2次元の画像を得るためには、被写体自身を移動させる方法のほかに、HSSの撮像光学系の前に1次元スキヤニングミラーなどの走査光学系を設置する方法や、HSSを航空機や衛星に搭載して、プラットフォームの進行方向への動きを利用する方法（プッシュブルーム方式）などがある。

波長分散素子としては、プリズム、透過型や反射型のグレーティング、プリズムと透過型グレーティングを組み合わせたもの、音響光学素子などが使用される。その他、HSSデータを取得するための方法として、フレネルレンズ等の回折レンズを用いた焦点位置の波長による違いを利用する方法、干渉フィルターを用いるもの、干渉計を利用するものなどがある。

近年のHSSの発展には、HSSを構成する各要素における性能向上と密接な関係がある。具体的には、2次元画像センサにおける高感度化及び多画素化、MEMS技術の進展による波長分散素子等の光学部品の高性能化、データ解析技術の向上などがHSSの発展に大きく寄与している。これらの進展は、検知波長範囲の拡大にも寄与しており、適用範囲が広がってきている。これらのハイパースペクトルセンサを生物医学分野に適用するためには、微小のものを精細に撮像可能にする必要がある。本研究の目的として、生きた細胞の観察、画像取得やその解析ができる研究用倒立顕微鏡にハイパースペクトルシステムを組み込むようなシステム構築を目的とした。

また、細胞のダイナミックな変化を生きたまま観察する技術が日々進歩を続けている。現在までに生細胞の様々な情報を得る

ことが可能となった。タイムラプスはその1つの手段で、細胞を培養しながら時間的あるいは空間的な変化や波長情報などを連続して観察する手法である。これについても詳細に本項で検討する。

## B. 研究方法

本研究でのHSSは、ラインイメージング方式を採用することにした。これにより、高速にデータの取得が可能で、照明光による細胞への影響を最小限にできるからである。分光光学系に波長分散素子を用いたハイパースペクトルセンサを用い、290～870nmの波長範囲を512バンドで検出することで波長分解能2.9nmを実現した。また、検出系には、EMCCDカメラを採用した。EMCCDカメラは、Electron Multiplier CCD cameraのことで、ノイズに埋もれて画像が記録できないといったCCDの問題を解決すべく開発された増倍型高感度カメラである。増倍型高感度カメラとは、カメラに電子増倍方式を搭載し、信号量を増やすことで感度を高めたカメラである。具体的原理はCCDチップ上に電子を増倍する電子増倍機能を持つ。蓄積時間（露光時間）を増やすことで利用できる光量を増やす冷却CCDとは異なる方式の高感度カメラであるが、ゲインを下げると蓄積型高感度カメラとしての使用も可能となる。ただし、暗電流ノイズの面から、冷却が必須となる。さらに、このEMCCDカメラの特徴として、CCDチップの温度が低いほど電子増倍率が高くなる特性がある。そのため、冷却温度の低いことが重要で、かつ、その冷却温度が安定していることも重要である。

システムを構築する際には、この点について、十分考慮するように配置した。上記の HSS、及び EMCCD を研究用倒立顕微鏡に組み込んだ。つまり、通常の顕微鏡用 CCD は、そのまま残し、検出を切り替える形で HSS 用システムと併用できるようにした。これにより、一般的な顕微鏡画像を取得できるので、複数の研究機関で進める本研究のような体制には資料データ共有に有用と

考えられる。本研究でのタイムラプス実験は測定対象として、単層培養した軟骨細胞と、白色家兎の軟骨細胞を単離して作製した細胞シートを対象にした。また、細胞シートは単層の場合と積層化シートと両方を対象にした。本研究では生きた細胞の観察、画像取得やその解析ができる研究用倒立顕微鏡を使用した。

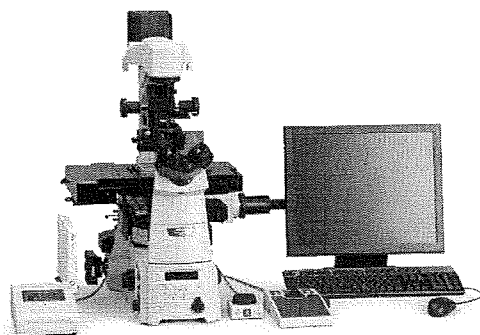


図2 研究用倒立顕微鏡として使用したニコンの「ECLIPSE Ti-E」

タイムラプス観察時に問題となる、長時間観察時のフォーカスずれを自動焦点維持装置を内蔵することにより瞬時に解決し、常に焦点の合った画像が取得できる。画像統合ソフトウェア「NIS-Elements」により、顕微鏡はもちろんカメラ、励起フィルターホイールなど周辺機器を連動させて制御する。Chamlide TC は培養細胞を長期間観察できるインキュベーションシステムである。

インキュベーター、加湿器を用い温度、湿度、pH を保ち、培地の蒸発を防ぐことで最適な培養条件を作り出すことができる。インキュベーターを顕微鏡の電動ステージに設置することで、細胞を培養しながら観察ができる。CU-105 コントローラーとガスボンベはポリウレタンチューブで接続し、CU-105 コントローラーの流量計を用いてガス流量を調整できる。



図3 顕微鏡用インキュベーションシステムとしてのChamlide TC システム  
(Live Cell Instrument: 以下 LCI とする)



図4 5%CO<sub>2</sub>ガスボンベ（標準ガス CO<sub>2</sub> 5%, O<sub>2</sub> 20%, N<sub>2</sub> 75% 使用）

細胞を培養する際の最適な pH は 7.2～7.4 である。細胞を培養すると培地中の糖を消費して有機酸を産生する。この有機酸による pH の変動を小さくするためには緩衝液が必要である。培地中には細胞の生育

に影響の少ない炭酸水素ナトリウム (NaHCO<sub>3</sub>) が添加されているものがあり炭酸ガスとの組み合わせで pH の変動を小さくしている。

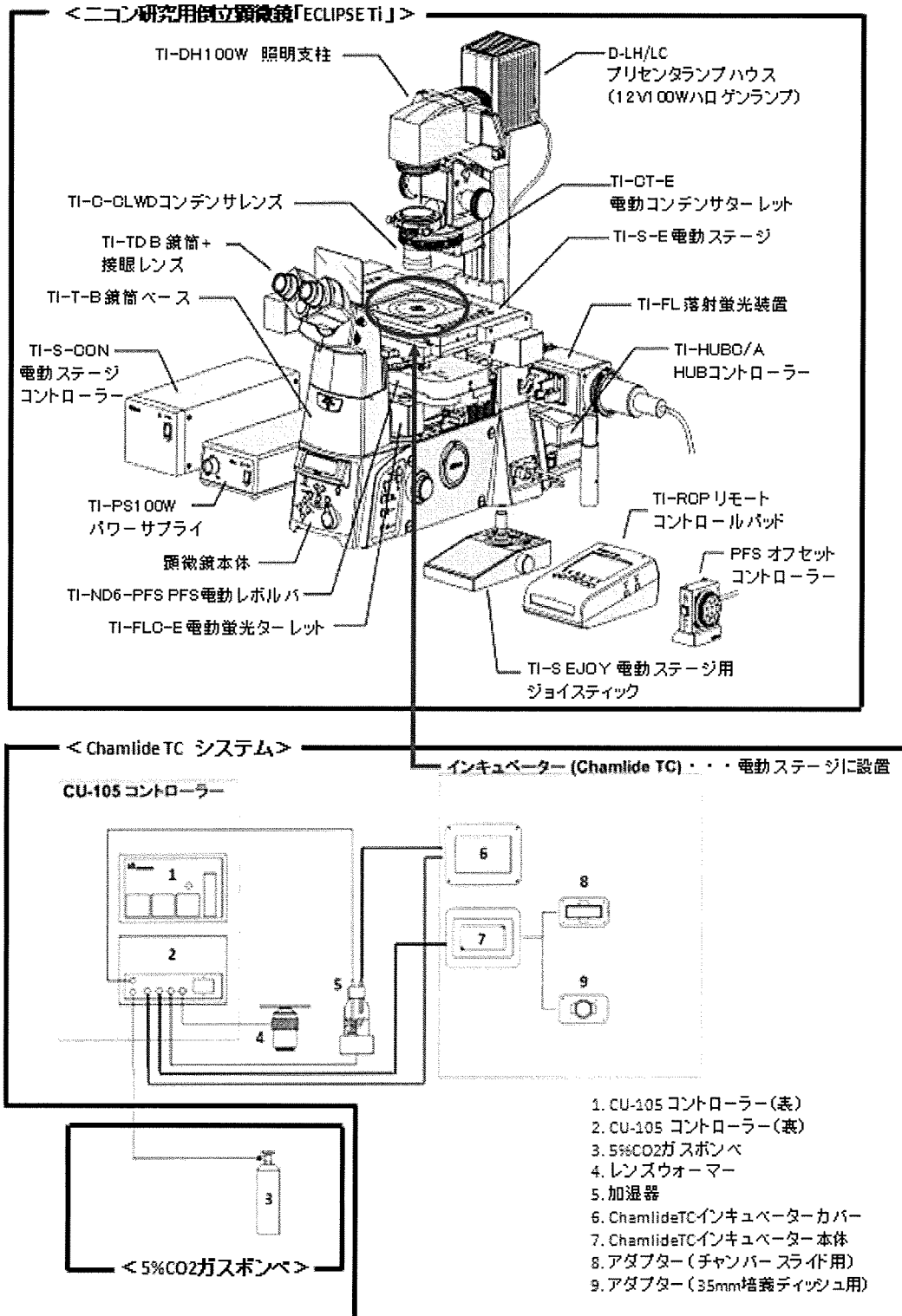


図5 本研究で使用した研究用倒立顕微鏡のシステム全体図と設置方法

### B-1. タイムラプスの取得方法

B-1-1. ライブ像 (①) を見ながら「Camera Settings」(②) を調整する。  
必要に応じて「LUTs」(③) も調整する。

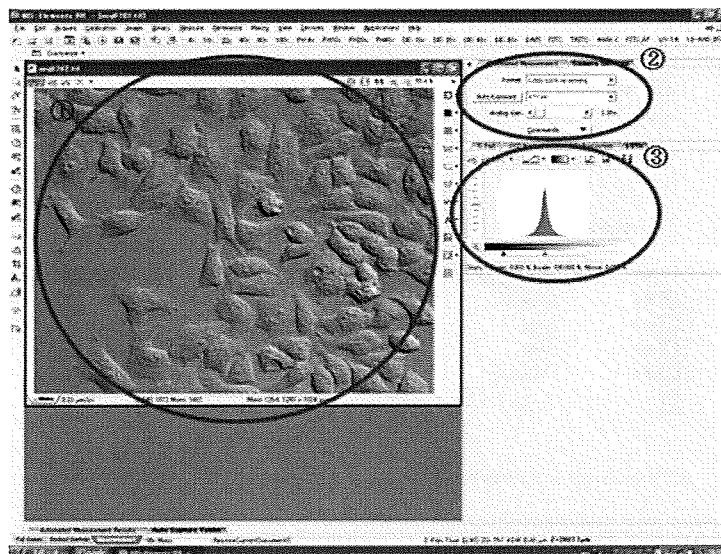


図6 タイムラプス用基準画像取得

B-1-2. 「Acquire」→「Capture Timelapse」→「Capture Automatically」(④) を選択する。

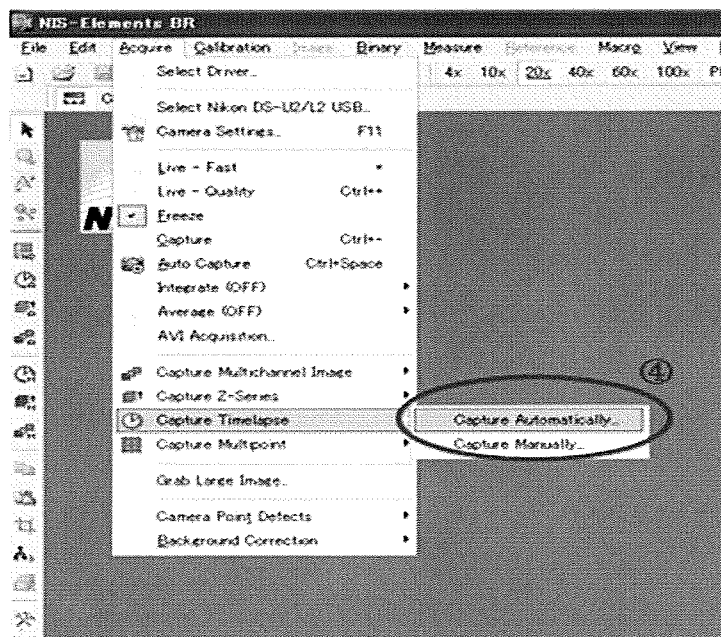


図7 タイムラプスの取得方法選択

B-1-3. 「Interval」 (⑤) , 「Duration」 (⑥) , 「Loops」 (⑦) を設定した後、「Run now」 (⑧) を押すと撮影がスタートする。

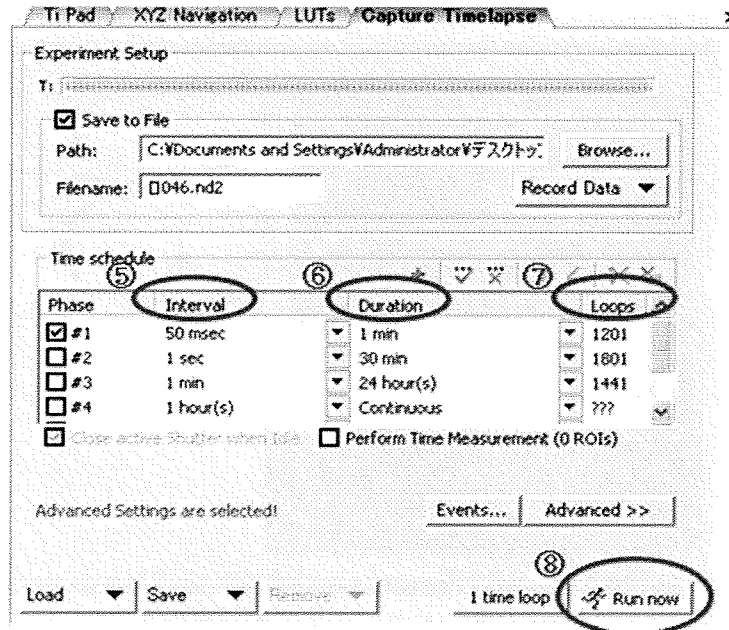


図8 タイムラプスの時間設定

上図の「Time schedule」欄で1回の時間フェーズについて Interval、Duration、Loops を指定するが、これらの設定は相互に関連付けられているのでいずれかの2つの要素を指定すると3つ目のパラメーターは自動的に計算される。

## C. 研究結果

### C-1. ハイパースペクトルシステム

構築したハイパースペクトルタイムラプス顕微鏡システムは、生細胞を対象に高分解能で空間情報と波長情報が同時に取得でき、5次元（空間(x,y,z)軸、時間軸、波長軸の5軸）細胞追跡を可能にするシステムである。システムには培養環境（温度37℃、湿度90%、CO<sub>2</sub>濃度5%）を維持できる培養装置があるため、軟骨細胞シートの培養過程の連続モニターが可能である。

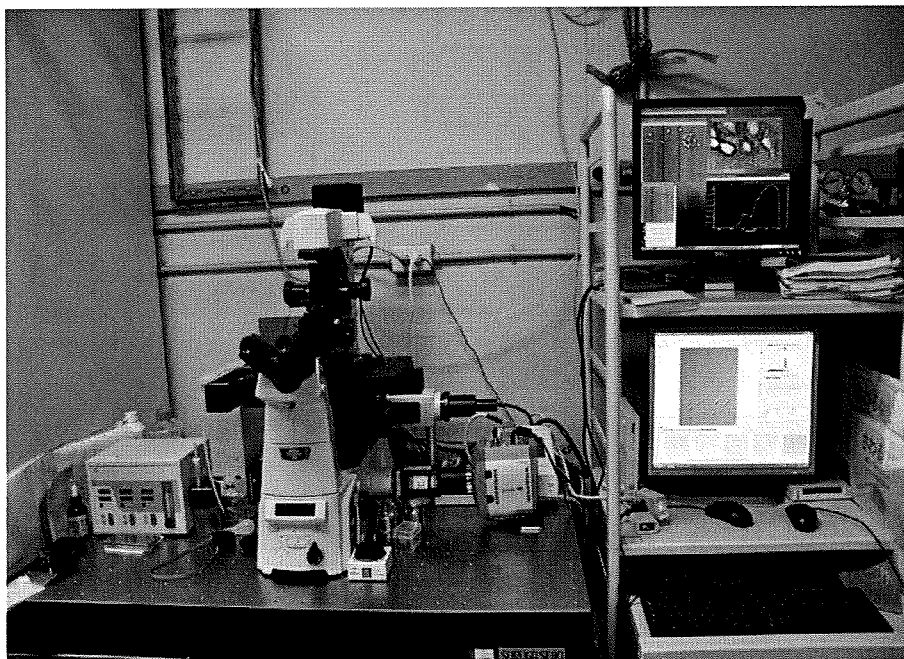


図9-1 構築した HSS 顕微鏡システム



図9-2 構築した HSS 顕微鏡システムの試料部分

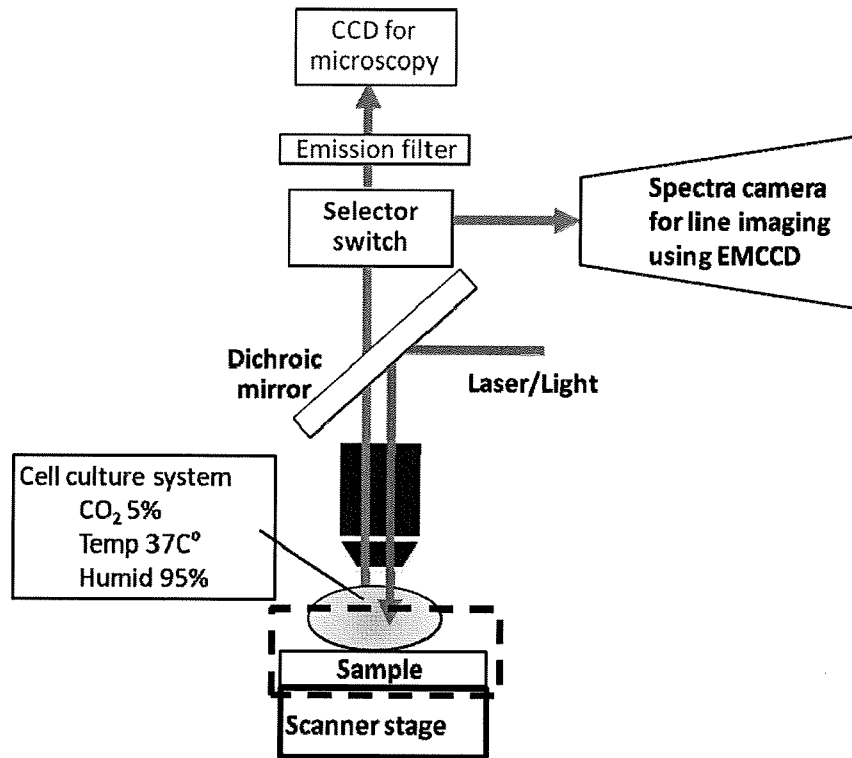


図10 HSS顕微鏡システムの構成図

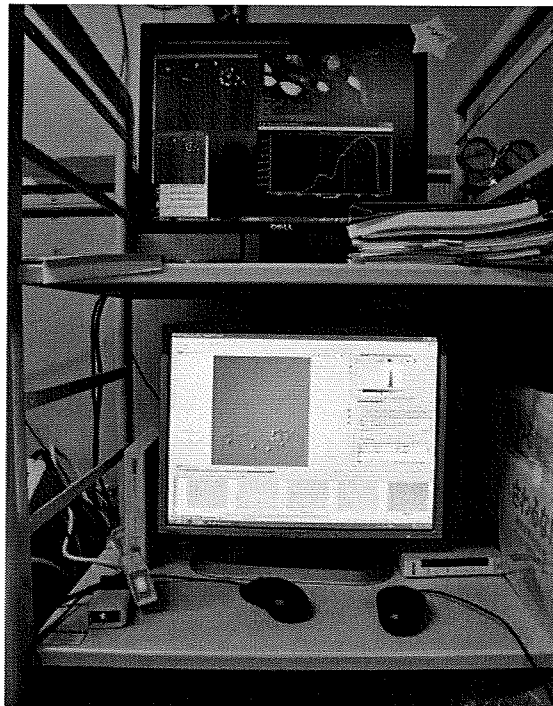


図11 本システムで使用しているモニター  
(上：HSS用モニター 下：一般的な顕微鏡のモニター)



構築したシステムで画素ごとによって細胞の連続したスペクトルが得られた。また、スペクトル加算平均を可能とする手段を考案した。しかし、細胞内小器官や細胞外マ

トリックスの位置情報を確認するためのプロトコルを確認する必要があることがわかった。

C-2. タイムラプス像の例

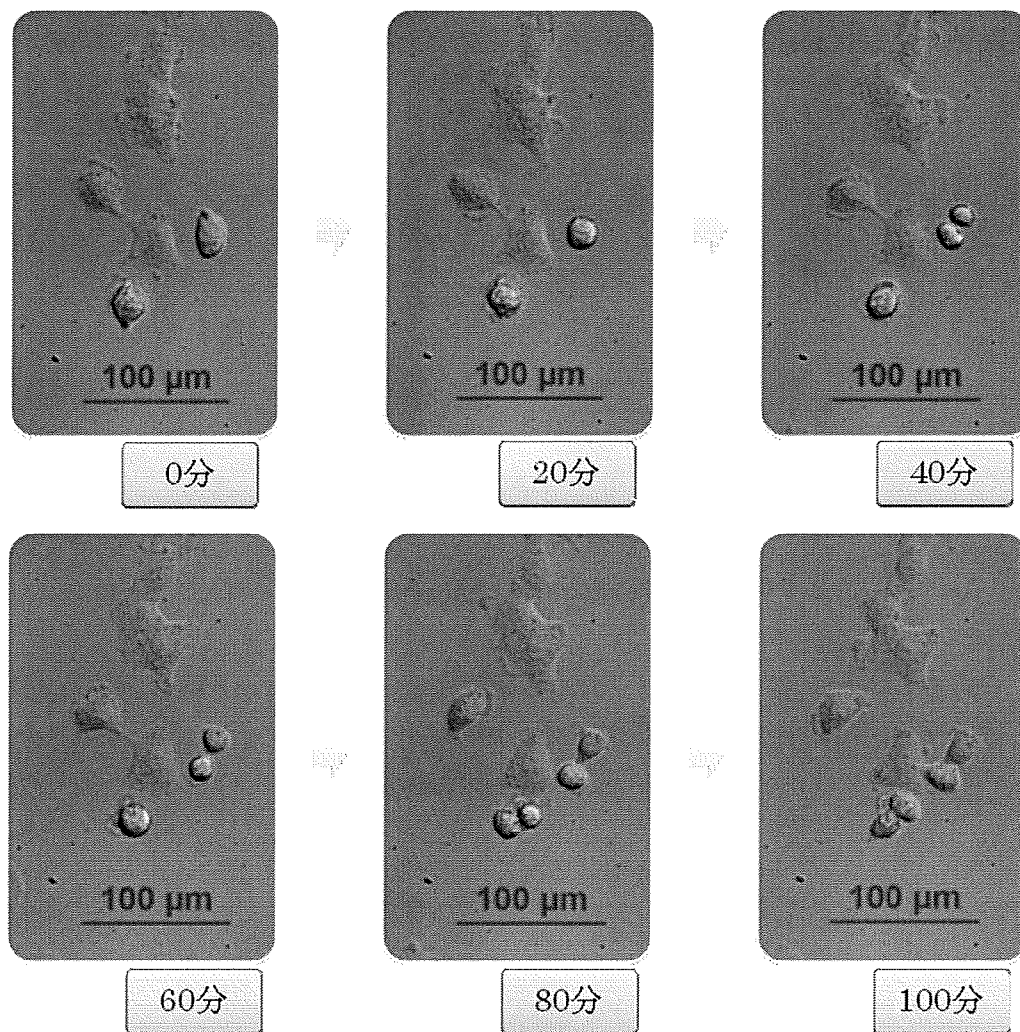


図 1 2 A549（ヒト肺癌）細胞取得結果 DIC 20X の場合

C-3. Z-Series 像の場合

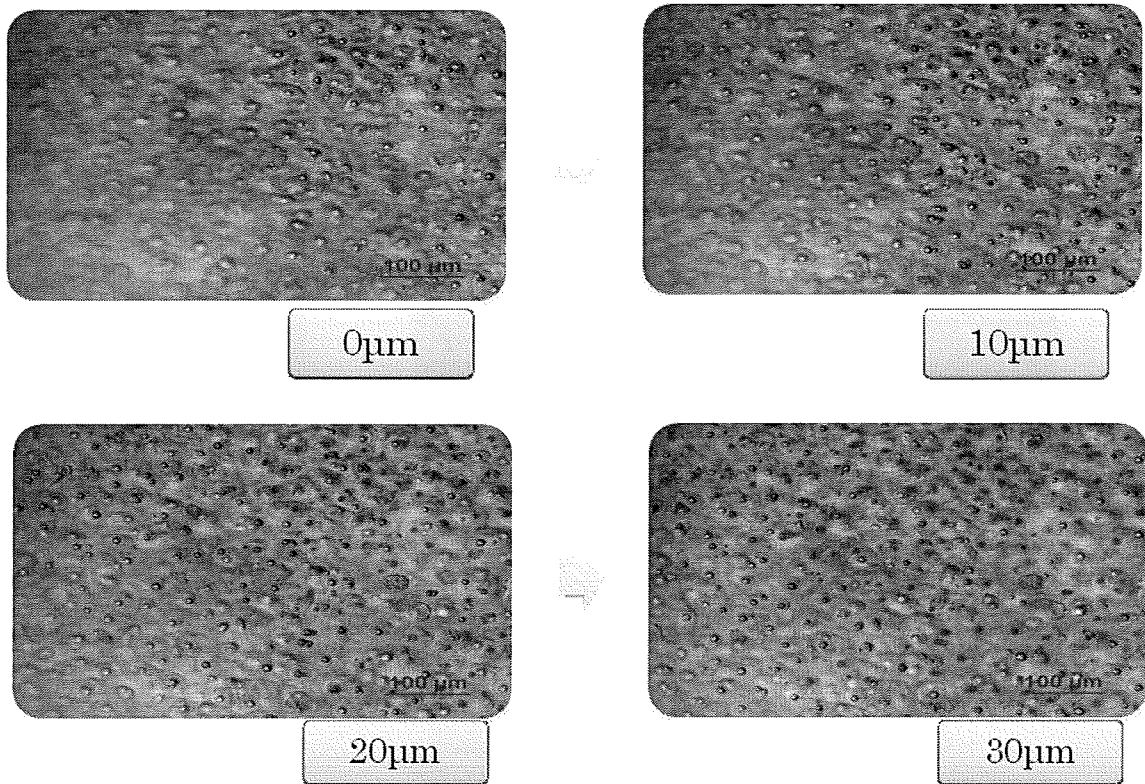


図 1 3 ウサギ軟骨細胞シートの取得結果 DIC 20x の場合

なお本 Z-Series 像では、ライブ像を確認しながら撮影したい Z 範囲 (⑩) を設定し、「Run now」 (⑪) を押すと撮影がスタートする。

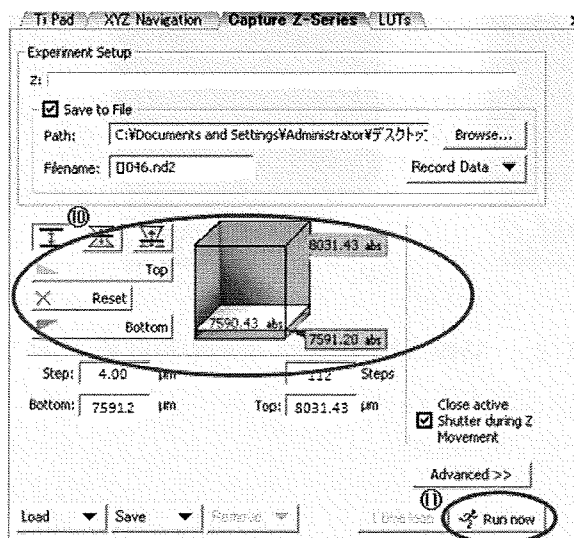


図 1 4 Z 範囲の設定方法

C-4. 多次元像-蛍光-の場合

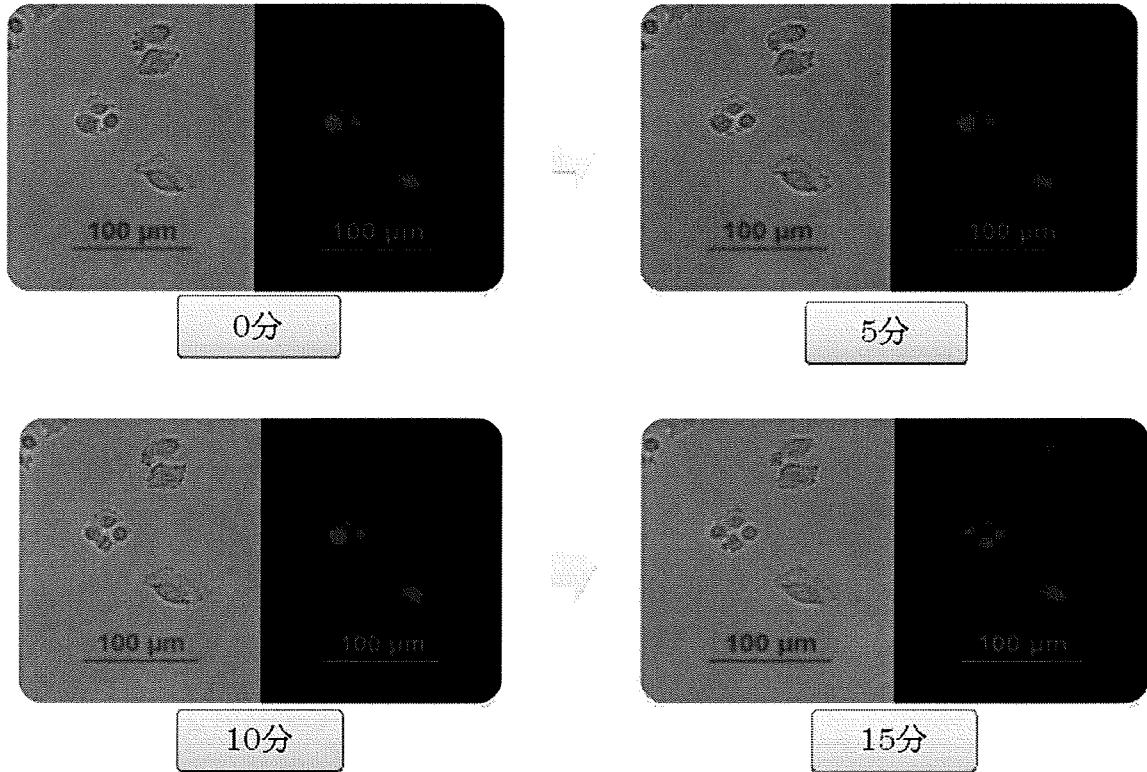


図15 SHIN3dsRed（ヒト卵巣癌 dsRed）Ph 20x の場合

なお多次元像の場合には、取得したい次元に合わせて「Time」(⑬)、「XY Pos」(⑭)「Z Series」(⑮)、「Lambda」(⑯)のチェックボックスをONにし、「Run now」(⑰)を押すと撮影がスタートする。

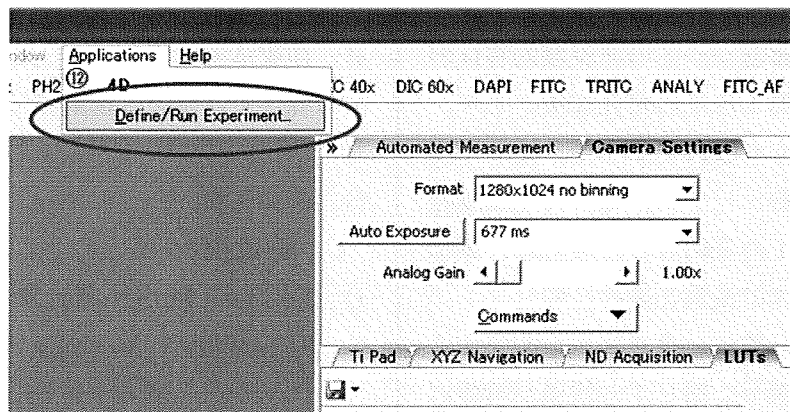


図16 多次元像の設定方法

#### D. 考察

HSS の使用によりフィルターの切り替えによる時間遅れなく精密な動態が把握できるようになった。また、細胞に影響を与えないように、未染色の細胞シートをサンプルにして得られた結果として、画素ごとによって得られる細胞のスペクトルが得られたが、何に起因したスペクトルなのか、現状では判別が難しい。そこで、細胞の何に

由来したスペクトルなのか確認するために、細胞周期をそろえた細胞での測定を実施することにする。そのために、今年度は、まず細胞周期をそろえるプロトコルを確立した。また、タイムラプスデータを取ることで、細胞の時間変化に応じたスペクトルが獲得できるように準備した。また、スペクトルデータベースの構築は必須であり、そのプロトコルは以下のように設定した。

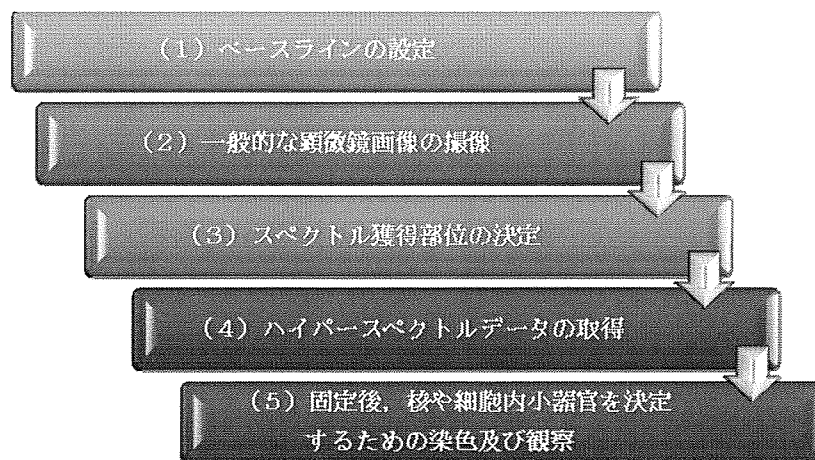


図17 スペクトルデータベース構築のプロトコル

#### E. 結論

同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究の1つとして、「製造工程の異なる種々のヒト細胞シートの非侵襲的特性評価」に関する第1年目の研究成果として、当初の予定通りの進捗であった。第2年度目以降は、細胞シートの、均一性や細胞密度の評価を第1の目的とし、さらに、細胞外マトリックスの産生と維持に関して、フィブロネクチンやインテグリンが関係する接着性、成長因子に関する評価が可能に

なるように、照明条件や取り込み条件の最適化を検討する。

#### F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ishihara M, Sato M, Matsumura K, Toguchida J, Mochida J, Kikuchi M, Development of the hyperspectral