

1C-PM1 再生医療用細胞培養の自動化技術

○土井 利尚, 中嶋 勝己
(川崎重工業)

再生医療の実用化のためには、現在CPCにて手作業で行われている細胞培養を、安全性を担保しながら、より効率的に行う必要があり、自動化技術が必須である。その場合、1 患者分の細胞培養を低価格の自動培養装置で行う考え方と、少し価格が高くなっても、多患者の細胞を培養できるようにする考え方がある。現在、各社で自動培養装置の開発が行われている。(一部は販売開始) 公開情報から各社の装置開発をサーベイし、その考え方の相違を明らかにする。

細胞培養で時間的に支配的なのはインキュベータ内での培養であるので、インキュベータは患者毎に個別に持ち、培地交換や継代は共通の自動化装置で行うことで、装置の経済性が確保され则认为している。多患者細胞を扱う上での心配は交差汚染である。1 患者の細胞を扱った後、その場所を滅菌することで、交差汚染に対する安全性が担保できる。また、自動化には人の判断の自動化も必要である。産業用の視覚装置で培った視覚処理技術を応用し、人の判断の自動化を行う。このような考え方にもとづき、当社が科学技術振興機構の委託開発制度で開発を行っている概要を報告する。

1C-PM2 接着動物細胞の形態解析による非侵襲的分化診断の試み

○高木 睦
(北大院・工・生物機能)

再生医療など移植用の培養プロセスにおける細胞の品質評価および品質モニタリングはこれらの医療の実用化に必須と考えられる。特に自家細胞を用いた培養プロセスでは、非侵襲的、非破壊的かつ短時間でできる細胞の質の評価法が必要であるが、現時点では確立された方法はほとんど見られない。また、幹細胞を用いる培養プロセスにおいて質の評価項目の中でも特に重要と考えられる細胞の分化は、一般に細胞形態の変化を伴う場合が多いと考えられる。そこで、我々は、医療用の培養プロセスのうち大部分を占める2次元培養(平面培養)において細胞形態の変化から分化度を診断する手法の確立を目指し、従来型の位相差顕微鏡から得られる平面的細胞形態画像データを利用した細胞分化度の診断、およびより精度の高い診断を目指した接着動物細胞の立体形状測定法の検討を試みているので紹介する。(1) 細胞形態平面画像データを利用した細胞分化度の診断

分化誘導因子としてTGF- β 3、デキサメタゾン、IGFを添加した10% FCS DMEM培地を用いて、ヒト骨髄間葉系幹細胞(MSCs)から軟骨細胞への分化培養を行った。培養中、位相差顕微鏡にて観察するとともに、リアルタイムRT-PCRによりアグリカンmRNAの発現率(%)を定量し、分化度の指標とした。その結果、分化誘導因子無添加の培養では発現率は非常に低く細胞形態も繊維芽状のままほとんど変化しなかったが、分化誘導因子存在下では経時的に発現率が増大し、細胞形態も多角形様のものが多くなった。顕微鏡画像をもとに種々検討した結果、細胞1個の面積および長径/短径比により特徴づけられる特定の形態の細胞が全細胞に占める割合とアグリカン発現率との間に相関が認められた。したがって、顕微鏡観察画像を用いた細胞形態の解析により軟骨細胞への分化度を非侵襲的・非破壊的に診断できる可能性が示された。さらに、フェムト秒レーザーを利用した、単一接着細胞単位での細胞形態とアグリカン遺伝子発現との対応調査も検討している。

(2) 新規な顕微鏡を用いた接着動物細胞の立体形状測定法の開発
最近開発された位相シフトレーザー顕微鏡(PLM、エフケー光学研究所)では、観察対象物を透過するレーザー光が対象物の厚みと屈折率により生じる位相差を定量的に観察できることから、PLMを使用した非破壊的・非侵襲的な動物細胞の立体形状測定法を検討した。すなわち、浸透圧を調節した培地(300, 400 mOsm/L)を用いて、CHO細胞1-15500株を37°C、5% CO₂ 雰囲気下で4日間静置接着培養した。PLMにより培養器視野内の位相差分布を測定した後、種々の濃度のBSA溶液(生理的浸透圧)を培養液の代わりに加えることにより細胞の屈折率を求め、この屈折率データを用いて細胞の位相差分布を細胞の厚み分布に換算した。その結果、浸透圧300 mOsm/Lで培養した細胞の厚み(最大部分)は400 mOsm/Lで培養した細胞よりも大きかった。これは原子間力顕微鏡(AFM)による測定報告(グルタルアルデヒド固定細胞使用)と同じ傾向であり、両測定法による厚み絶対値もほぼ等しかった。また、PLMによる観察は数分以内に終了できるが、未固定の接着細胞をPLM下に放置しレーザーを照射し続けたところ、調べた範囲内(0~10分)では細胞の形状に変化は認められなかった。

Automatic Cell Processing for Regenerative Medicine

○Toshihisa DOI, Katsumi NAKASHIMA
(Kawasaki Heavy Industries)

Key words automatic cell processing, sterilization, image processing, regenerative medicine

Noninvasive diagnosis of adhesive cell differentiation by means of cell morphology analysis

○Mutsumi TAKAGI
(Div.Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words noninvasive, diagnosis, morphology, microscope