

**4Bp13 iPS細胞培養手技標準化のためのコロニー形態評価法**

○城戸 理紗子<sup>1</sup>, 松本 恵<sup>2</sup>, 佐々木 寛人<sup>2</sup>, 蟹江 慧<sup>1,2</sup>, 清田 泰次郎<sup>3</sup>,  
本多 裕之<sup>2</sup>, 古江 美保<sup>4</sup>, 加藤 竜司<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・創薬科学, <sup>2</sup>名大院・工・生物機能, <sup>3</sup>株式会社ニコン,  
<sup>4</sup>医薬基盤研究所)  
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

【目的】iPS細胞(人工多能性幹細胞)は、体細胞から作られる多能性幹細胞として近年多くの注目を集めている。iPS細胞の培養行程は、「良いiPS細胞」の管理維持をするために、高い培養スキルが必要とされる。我々は、画像中からiPS細胞コロニーを認識するアルゴリズムと、コロニーの形態の数量化解析技術を開発している。再現性が高く安定した研究成果を得るには、生物学的な細胞の品質管理と共に、毎日の培養行程においてリアルタイムなモニタリングが重要である。現在、iPS細胞を自動培養しようとする試みが数多くなされているが、リアルタイムモニタリングのためのソフトウェアの開発はまだあまり進んでいない。我々は、人の感覚や手技を工業化する生物工学の観点から、iPS培養の熟練培養者の「手技」と「判断」との相関性を解析し、その客観的なデータの解析から手技の標準化を行う研究を進めている。【方法および結果】iPS細胞(201B7株)をいくつかの作為的な品質劣化培養条件下において経時的な位相差画像取得を行い、画像中のiPSコロニーを画像処理によって認識した後、形態特徴量の数値変換と特徴量の多変量解析を行うことで、細胞品質条件とコロニー形態が、どれだけ連動するのかを定量評価する手法を開発した。評価対象のiPS細胞品質として継代培養における細胞品質の劣化等を非侵襲でどのように解析・分析できるかを検討した。

**iPS colony morphology informatics for standardization of iPS cell culture**

○Risako Joto<sup>1</sup>, Megumi Matsumoto<sup>2</sup>, Hiroto Sasaki<sup>2</sup>, Kei Kanie<sup>1,2</sup>,  
Yasujiro Kiyota<sup>1</sup>, Hiroyuki Honda<sup>2</sup>, Miho Furue<sup>4</sup>, Ryuji Kato<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Basic. Med. Sch., Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Dept. Biotech.,  
Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., <sup>3</sup>Nikon Corporation, <sup>4</sup>NIBIO)

**Key words** iPS cells, colony morphology, cell culture standardization

**4Bp15 霊長類ES/iPS細胞用緩慢凍結保存液の開発**

○今松 伸介<sup>1</sup>, 安成 皓<sup>2</sup>, 馬場 憲三<sup>3</sup>, 岡崎 宏悟<sup>1</sup>, 田川 陽一<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>リンフォテック, <sup>2</sup>東工大院・生命理工, <sup>3</sup>日本ジェネティクス)  
ytagawa@bio.titech.ac.jp

【背景】霊長類ES/iPS細胞を、腫瘍細胞株等で使用される一般的な緩慢凍結法で凍結保存すると、解凍後のコロニー生着率が極端に低くなるため、国内では、簡易ガラス化法による凍結保存が広く用いられている。しかしながら、簡易ガラス化法は、(1)操作に熟練が必要(2)それでも低コロニー生着率(3)液体空素中で凍結細胞の輸送が必要等の問題点をもつ。そこで我々は、緩慢凍結法により霊長類ES/iPS細胞を保存し、ドライアイスでも十分に輸送可能な保存液の開発を試みた。

【方法】開発品を用いて霊長類ES細胞を緩慢凍結法により凍結した。コントロールとして、一つに既存のガラス化凍結保存液で簡易ガラス化法、もう一つに10%DMSO/霊長類ES/iPS細胞用培地で緩慢凍結法により凍結した。凍結サンプルは液体空素中で3日以上保存し、その後、各々の最適条件により解凍・播種し、6日間培養し、コロニー生着率・アルカリフォスファターゼ活性を比較した。

【結果および考察】開発品は、既存のガラス化凍結保存と比較し約2倍、10%DMSOを含む培地と比較し約4倍コロニー生着率が高いことが示された。現在、ドライアイスを用いて、凍結細胞の輸送が可能か否かの検証を行っている。本開発品は熟練を要する簡易ガラス化法凍結保存液と異なり、緩慢凍結法により誰でも容易に霊長類ES/iPS細胞を凍結・解凍できる。さらに、本開発品は、異種成分を含まないゼノフリー凍結保存液であるため、今後、ヒトES/iPS細胞を用いた再生医療に対応できると考えている。

**Improved cryopreservation of primate ES/iPS cells using a new freezing medium**

○Shinsuke Imamatsu<sup>1</sup>, Sungho Ahn<sup>2</sup>, Kenzo Bamba<sup>3</sup>, Hirosato Okazaki<sup>1</sup>,  
You-ichi Tagawa<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>LYMPHOTEC, <sup>2</sup>Dept. Life Sci., Tokyo Institute of Technology, <sup>3</sup>Nippon Genetics)

**Key words** ES/iPS cells, cryopreservation

**4Bp14 細胞評価安定化のための培養技術支援流体解析**

○蟹江 慧<sup>1</sup>, 佐々木 寛人<sup>2</sup>, 本多 裕之<sup>2</sup>, 加藤 竜司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・創薬科学, <sup>2</sup>名大院・工・生物機能)  
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

【目的】ヒト細胞は再生医療や創薬開発において広く使用されているが、その培養は感覚的かつ不安定であり、培養手技によって品質が変化することが知られる。再生医療の実現や患者由来細胞を用いた創薬スクリーニング等の実現には細胞培養の高度な自動化・工業化を行う技術が必要不可欠である。細胞播種の不均一さは細胞品質にバラツキを与えてしまう他、ハイコンテントスクリーニングの結果に影響を与えることが知られ、培養自動化には最適化が必要である。我々は細胞培養の自動化およびリアルタイム評価機能の向上のため、より多くの細胞サンプルが均等な増殖・変化し、品質を維持することができるよう細胞の播種方法について検討した。具体的には細胞の粒径や攪拌速度・方向、培養容器のサイズ・形状などの細胞播種性能に関連したパラメータの最適化を目指した。【方法】培地中の細胞と流体挙動のシミュレーションに粒子法理論に基づく流体解析ソフトウェア Particle Worksを導入し、細胞形状・容器形状と攪拌パラメータとの関係性を解析したのでこれを報告する。

**Fluid simulation for supporting automation of cell culture assessment**

○Kei Kanie<sup>1</sup>, Hiroto Sasaki<sup>2</sup>, Hiroyuki Honda<sup>2</sup>, Ryuji Kato<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Basic Med. Sci., Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Dept. Biotech.,  
Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

**Key words** Cell screening, Regenerative medicine, Cell seeding, Simulation

**4Bp16 高エネルギー線を用いた育種による増殖制御可能な動物細胞株の創出**

○千田 泰史<sup>1</sup>, 河村 拓郎<sup>1</sup>, 高城 啓一<sup>2</sup>, 寺田 聡<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>福井大院・工, <sup>2</sup>若狭エネ研)  
terada@u-fukui.ac.jp

【目的】タンパク質医薬品生産に利用されている動物細胞の生産能力は低く、莫大なコストを要する。その理由の一つは、細胞が無限増殖能を有するために必要な細胞レベルに到達した後も増殖が過剰に続き、この過剰な増殖にともなう急速な培養環境の悪化が生産性を著しく損ねている。そこで、必要な細胞数まで増殖できた時点で、それ以上の増殖を抑制することで、有用物質の生産性を改善できると期待される。我々は高エネルギー線照射による変異導入を利用し、自己増殖制御可能な工業用動物細胞株の取得を目指した。

【方法】組換え抗体が導入されたチャイニーズハムスター卵巣細胞をモデルとし、コロニー形成法を用いて高エネルギー線に対する放射線感受性を調べ、生存率から照射線量を決定した。次に、高エネルギー線を照射された細胞に対し、コンフルエントまで増殖させてからヒドロキシウレアと5-フルオロウラシルで処理して増殖が持続している細胞を選択的に死滅させ、増殖制御株のスクリーニングを行った。その後、得られたクローンについて増殖能と組換え抗体の生産能を評価した。

【結果と考察】照射とそれに続くスクリーニングにより6つの株が樹立された。そのうちミュータント1は細胞が高密度に増殖した後に増殖が自発的に停止し、かつ組み換えタンパク質の生産能力を高く維持しており、その比生産速度は親株の2倍であった。この方法で現行の生産株に変異を導入することで、生産性に優れた株を樹立できると考えられる。

**Establishment of mammalian cell line suitable for industrial production of recombinant protein using mutation induced by high energy beam radiation.**

○Yasuhiro Chida<sup>1</sup>, Takuro Kawamura<sup>1</sup>, Keiichi Takagi<sup>2</sup>, Satoshi Terada<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., <sup>2</sup>The Wakasa Wan Energy Research Center)

**Key words** mutation, proliferation, CHO, high energy beam