

2S-Dp04 細胞培養画像解析による非侵襲細胞評価

○備瀬 竜馬, 佐波 晶, 前田 賀隆
(大日本印刷)
bise-r@ut-vision.org

新薬開発及びバイオ分野の研究における新薬開発及び細胞品質評価において、細胞挙動は重要な解析対象の一つである。例えば、抑制剤によるガン細胞に対する運動抑制効果の検証や毒性スクリーニングにおいて、細胞の移動スピードや細胞分裂数、細胞形状等の解析は重要である。また、再生医療において、リソースとなる患者や培養法によって細胞の品質が変わることが知られており、細胞の形態や動きも細胞品質と関係すると考えられている。

我々は、細胞の挙動や見た目の違いを数値指標化することで、定量的に細胞の状態を管理することを目指した取り組みを進めている。例えば、細胞の挙動指標として、細胞移動スピードや細胞分裂数等がある。これらの指標を自動的に得るために、タイムラプス画像において、各フレームで個々の細胞を特定し、それらがフレーム間対応付けを得るトラッキング手法の開発を行っている。我々は、既存の手法では課題があったコンフルエント培養における非侵襲画像細胞トラッキング手法の開発を行った。その結果の一例として、網膜色素上皮細胞(RPE)の挙動解析結果を紹介する。

また、iPS細胞のようにコロニーを作成し、個々の細胞の識別が困難な細胞では、細胞集団を評価する指標として、テクニカの違いに着目し、テクニカ解析技術を用いた判別技術の開発を進めている。一例として、iPS細胞の品質の一種として未分化能に着目し、iPS細胞の未分化・脱未分化領域をテクニカ特徴量を用いて識別した結果を紹介する。

これらの技術の一つの活用形態として、培養状態のリモート観察・解析が挙げられる。採取した画像データにアクセスできる環境であれば、解析の現場が細胞培養の現場と同一である必要はない。このような特徴を有する細胞画像解析技術は、再生医療の分野でも培養の品質管理に適用できる可能性がある。まだ技術的な課題はあるが、細胞培養の状態がCPC外から常時観察可能で、かつ培養の状態をデータとして解析、表示(通知)、蓄積できるシステムがあれば、細胞製品作製の省力化と品質の向上につながると思われる。

Cell image analysis for non-invasive cell behavior assay

○Ryoma Bise, Sho Sanami, Yoshitaka Maeda
(Dai Nippon Printing, Co., Ltd.)

Key words Bio image informatics, cell behavior assay

2S-Dp05 細胞透過光の位相差定量による細胞品質の非侵襲的測定

○高木 睦
(北大院・工)
takagi-m@eng.hokudai.ac.jp

細胞がプラスチック製培養器の底面に接着して培養されているままの状態で、かつ細胞活性などに影響を与えない非侵襲的な方法で短時間に細胞の品質を評価する手法の中で、細胞を透過する光の位相差定量に基づく細胞評価方法を紹介する。

＜細胞透過光位相差と立体形状の非侵襲的定量＞

位相シフトレーザー顕微鏡(Phase Shift Laser Microscope, PLM、エフケー光学研究所)(1)では、光軸の片側に置いた観察対象物を透過するレーザー光と光軸の反対側の観察対象物のない部分(媒質)を透過したレーザー光との間で生じる干渉縞画像を解析し、対象物の厚みと屈折率に起因する位相差を視野内の1画素毎に定量できる。すなわち、対象物の厚みをd、対象物の屈折率を n_c 、媒質の屈折率を n_0 とすると、位相差 $\Delta\Phi$ は次式で表される。ただし、 λ はレーザー光の波長である。

$$\Delta\Phi = (2\pi/\lambda) \times (n_c - n_0) \times d$$

屈折率は異なるが生理的浸透圧を有する2種類の液でそれぞれ培養液を置換し、それぞれ位相差定量を行うことにより、細胞の屈折率と高さ(厚さ)も測定できる。(2)

＜細胞周期の推定＞

CHO細胞および間葉系幹細胞(MSC)を培養し、BrdUとDAPIで染色し各細胞の細胞周期を決定すると共に、PLMで各細胞の位相差を定量した。その結果、G2/M期(分裂期)の細胞の位相差は他の周期(間期)の細胞の位相差に比べて有意に高かった。(3,4)

＜正常細胞とガン細胞の識別＞

2次元培養したヒト前立腺上皮ガン細胞(PC-3)の位相差(細胞内の最大位相差)は正常ヒト前立腺上皮細胞(PREC)の位相差に比べて明らかに小さかった。同様にヒト肝ガン細胞株の位相差はヒト凍結肝細胞の位相差に比べて明らかに小さかった。(5) PC-3はPRECに比べて細胞骨格(アクチン)密度が低く、細胞が低くなるため位相差が小さくなくなると考えられた。(6)

PREC、PC-3の位相差をそれぞれPLMを用いてタイムラプス定量した結果、いずれの細胞も分裂期に一時的に位相差が高くなることが確かめられ、10時間程度の間隔で数回位相差を定量すればPRECとPC-3を高精度で識別できる可能性が考えられた。(7)

一方、細胞内における位相差分布のパターンを解析することにより、上皮様のガン細胞(PC-3、ヒト肝がん細胞株)と正常細胞(PREC、ヒト凍結肝細胞)とだけでなく、線維芽様のガン細胞株(骨肉腫HuO-3N1細胞)と正常細胞(骨髄間葉系幹細胞)とについても互いに高精度で識別できる可能性が示された。(8)

参考文献

- 1) J. Endo *et al.*, Appl Opt, 41(7), 1308 (2002).
- 2) M. Takagi *et al.*, J Biomed Opt, 12(5), 54010-1-5 (2007).
- 3) S. Ito *et al.*, Biotechnol. Letters, 31, 39 (2009).
- 4) A. Tokumitsu *et al.*, Cytotechnol., 59(3), 161 (2009).
- 5) A. Tokumitsu *et al.*, J. Biosci. Bioeng., 109(5), 499 (2010).
- 6) M. Takagi *et al.*, J. Biosci. Bioeng., 115(3), 310 (2013).
- 7) M. Takagi *et al.*, J. Biosci. Bioeng., 114(5), 556 (2012).
- 8) M. Takagi *et al.*, Cytotechnol., 10.1007/s10616-015-9865-x (2015).

Noninvasive measurement of cell quality by determination of phase shift of transmitted laser light

○Mutsumi Takagi
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words cell quality, noninvasive, mammalian cell, phase shift