

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月28日現在

機関番号：37112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21551

研究課題名(和文)細胞凝集塊形成システムの開発研究

研究課題名(英文)Research and development of spheroid-formation system

研究代表者

下戸 健(Shimoto, Takeshi)

福岡工業大学・情報工学部・准教授

研究者番号：40412457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究グループでは、スフェロイド培養して作製された細胞凝集塊同士は融合するという特性を利用して、独自の技術で細胞構造体の作製に成功している。細胞凝集塊の作製過程は作業者に依存しており、変動要因が多く存在するため、これらを最小限に抑えることが求められている。そこで本研究では、細胞凝集塊作製過程を自動化させる細胞凝集塊形成システムの開発を行うことを目的とした。研究の結果、開発した細胞凝集塊形成システムを用いることで、任意の大きさの細胞凝集塊を作製できるようになった。さらに、作業者が作製した細胞凝集塊と比較し、細胞凝集塊の円形度は有意に高く、細胞にダメージが与えることなく作製できていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作業者の専門的な知識や技術に依存せず、コンタミネーションが発生しないクリーン環境下で、目的の大きさを有した細胞凝集塊を生成できるようになった。このことにより、作業者の変動要因を抑えることができ、作業者によって細胞凝集塊の生成に生じていた差をなくすことができると考えられる。本研究グループでは、任意の位置に配置する方法も構築しており、複雑な形状を有する細胞構造体を作製することができる。開発した細胞凝集塊形成システムを用いることで、任意の大きさの細胞凝集塊を作製できるため、複雑な再生医療用3次元構造体の作製に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have successfully formed cell constructs for regenerative medicine without using any scaffolds by taking advantage of the spheroid fusion characteristics. Spheroids have only been formed by a limited number of engineers; as such, there may be some variance in the formed spheroids due to an engineer's physical conditions or due to the long procedural duration. Therefore, it is essential to limit these variation factors. To overcome the above mentioned situations, we developed a spheroid formation system, aimed at automating the process of forming cell constructs. As a result of the research, it became possible to create spheroids of any size by using the developed spheroid formation system. Additionally, the degrees of circularity of spheroids created by the spheroid formation system was significantly higher than that of spheroids created by the cell culturing engineers, and it was thought that the spheroid formation system could be created without damaging cells.

研究分野：細胞凝集塊形成システムの開発研究

キーワード：再生医学 医用ロボット 細胞凝集塊 細胞構造体

## 1. 研究開始当初の背景

事故や病気で失われた組織や臓器に対する治療法として、病状の進行を抑える薬の投与や重症患者に対して行う臓器移植などがある。しかし、臓器移植はドナー不足や拒絶反応による患者へのリスクが大きいため、安全性を考慮した治療法の確立が課題となっている。これに対し、再生医療推進法の公布を起点として薬事改正法や再生医療新法が成立し、再生医療が国策の重点項目として位置づけられている。ES 細胞や iPS 細胞などの細胞ソースの開発が注目を浴びている一方で、工学的アプローチによる Tissue Engineering を用いた細胞構造体の形成開発が活発化している。細胞・成長因子/遺伝子・Scaffold の 3 つの組み合わせにより、体外で立体構造体を形成する試みがすでになされており、細胞シートを積層することにより構造体を作製する技術や、任意の位置に細胞を播種しながら積層化させるバイオプリンティング技術が報告されている。さらに、細胞ファイバーを用いた構築や細胞折り紙による構築といったプロトコルが考案され、複雑な細胞構造体の作製が試みられている。これに対し本研究グループでは、細胞凝集塊同士は融合するという特性を利用して、独自の技術で Scaffold を使用せずに、再生医療用細胞構造体を作製することに成功している。細胞凝集塊を任意の位置に配置する方法も確立しており、それを実現できるシステムも開発している。この技術により、複雑な形状を有し複数の種類の細胞を組み合わせた細胞構造体の作製が期待されている。

細胞凝集塊を任意の位置に配置する場合、同一形状の細胞凝集塊を得ることができなければ、想定した細胞構造体に構築することができない。したがって、細胞構造体を作製する上で、細胞凝集塊の品質が重要であり、作製する細胞凝集塊の形状に再現性を持たせることが必要である。一方で、細胞凝集塊の作製過程は細胞培養に関する知識や技術が備わった熟練した作業者が手技で行う。したがって、作業者個々の技術に依存しており、培養操作時間、培養操作時の細胞へのダメージ、培養操作の正確性（再現性）および作業者のコンディションなど、多くの変動要因が存在する。したがって、これらを最小限に抑えることが求められている。これに対し本研究では、細胞凝集塊作製過程の自動化を行っており、細胞凝集塊作製のための細胞懸濁液の分注および細胞凝集塊の回収が可能なシステムの開発を行ってきた(Shimoto et al., *J. Robot. Mechatron.*, 2012)。さらに、細胞構造体の形状を定量評価するためのシステムを開発し、細胞凝集塊の円形度に対する直径、時間経過に対する細胞凝集塊の直径の変化から、最適な細胞数の範囲の特定を行っている。以上のことから、開発してきたシステムに、細胞数を調整して播種できるような機能を組み込み、細胞凝集塊の形成特性のデータベースを基にスフェロイド培養させることで、目的の大きさを有し、再現性のある細胞凝集塊の作製が可能となると考えた。

## 2. 研究の目的

目的の大きさを有し、再現性のある細胞凝集塊を作製するため、細胞凝集塊作製過程を自動化させる細胞凝集塊形成システムの開発を行うことを目的とした。これに付随して、細胞凝集塊の形態を評価できるシステムの開発も行った。作業者が作製した細胞凝集塊と開発したシステムが作製した細胞凝集塊を比較することで、開発したシステムの有効性について考察した。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞凝集塊形態評価システムの開発

細胞凝集塊を定量評価するために開発した細胞凝集塊形態評価システム(図 1)は、作製した細胞凝集塊を撮影するためのシステムと、撮影した画像を処理するシステムに分かれている。細胞凝集塊は 96 ウェルプレートに一定数の細胞を播種して作製されるため、1 つのウェルに 1 つの細胞凝集塊が作製される。大型の細胞構造体の作製となると、大量の 96 ウェルプレートが必要となり、全てのプレートに対して顕微鏡で確認しながら手探りで細胞凝集塊を探し出して撮影し、得られた画像を解析するのは、作業者に膨大な負担が掛かる。そのため、撮影と解析を自動化させた。2 台のスライダを直交に組み合わせたものに、96 ウェルプレートに対して垂直方向にカメラとライトを取り付け、カメラを X 軸と Y 軸方向それぞれのウェルまで位置合わせできるようにした。2 台のスライダは分解能 20  $\mu\text{m}$ 、走り平行度 30  $\mu\text{m}$ 、繰り返し位置決め精度  $\pm 20 \mu\text{m}$  であり、各ウェルの細胞凝集塊全体が撮影できるように、微調整することができる。XY スライダが制御する面に対して法線方向に Z ステージを設け、カメラを取付けることにより、手動で撮影時にピントを合わせられるようにした。細胞凝集塊は細胞が凝集してため球状になる。そのため、形状を観察するためには最低 2 方向からの撮影が必要である。しかし、96 ウェルプレートを横から撮影する場合、各ウェルは底が球状になっていることと各ウェルの細胞凝集塊にピントを合わせられないことから、底方向からの 1 方向撮影とした。細胞を撮影するカメラの映像出力有効画素数は 2592  $\times$  1944 pixel、画素サイズは 2.2  $\times$  2.2  $\mu\text{m}$ 、感光度は 1.4V/lux-sec である。画像取得時では、96 ウェルプレートにおける各細胞凝集塊のアドレスの取得と細胞凝集塊撮影を同時に行えるようなソフトウェアにした。顕微鏡等での観察では、カメラが固定されているため、プレートを動かして観察する。その場合、培養液や細胞凝集塊が動くため、安定するまで待つ必要がある。これに対し、本システムはカメラを動かさずにし

ており、細胞凝集塊に外力を与えずに観察および解析することができる。細胞凝集塊形態評価システムで撮影した細胞凝集塊の画像に対して定量評価を行うために、画像処理により細胞凝集塊の直径、面積および円形度を算出できるようにソフトウェアを開発した。

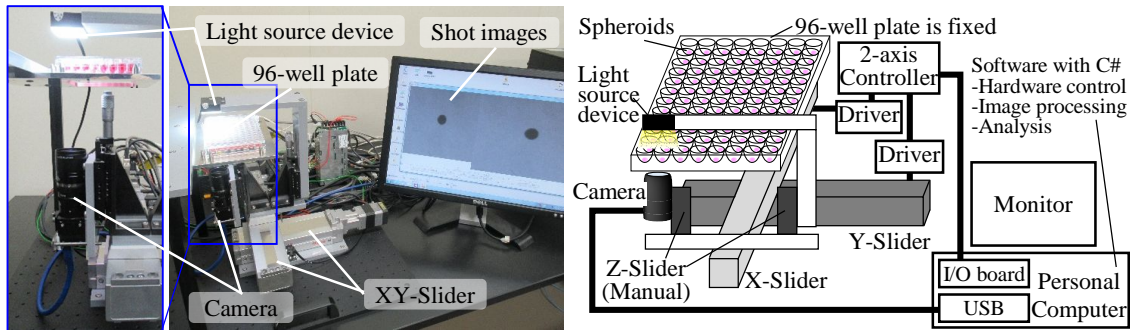


図1 細胞凝集塊形態評価システムの概観図と概要図

## (2) 細胞凝集塊形成システムの開発

目的の大きさを有し、再現性のある細胞凝集塊を作製するための細胞凝集塊形成システムを図2に示す。システムに用いた部材は、オートクレーブもしくはエタノール消毒可能な素材とした。スカラーロボット第4関節先端に2×2チャンネルのチップ着脱可能ピペットを取り付け、滅菌済みのチップを装着して細胞を扱うようにした。装置全体はクリーンベンチ内に設置し、非稼働時は紫外線滅菌を行えるようにした。プレートはスタッカーから自動で搬入と搬出するようにした。作業者が培養を行う場合、1×8チャンネルのピペットを使用して、一定数の細胞が入った細胞懸濁液を細胞凝集塊作製の96ウェルプレートに播種していく。その際に、リザーバーで細胞懸濁液を入念にピペティングし細胞分布を均一化してから96ウェルプレートに分注する。これにより、96ウェルプレートの各ウェルに1つ細胞凝集塊が作製され、大きさは播種する細胞数で調整することができる。細胞凝集塊形成システムでは、作業効率を向上させるために、2×2チャンネルのピペットを使用し、それに合わせて再利用できる専用のリザーバーを作製した。用意した細胞懸濁液の細胞数を入力し、作製したい細胞凝集塊の細胞数を入力することで、自動で細胞懸濁液の調整を行い、細胞凝集塊作製の専用の96ウェルプレートに播種するようにした(図3)。細胞凝集塊形成システムのモーションは、専門の知識や技術を備えた熟練の作業者のモーション、特に培養液内の細胞の均一化、攪拌、培養液のコン

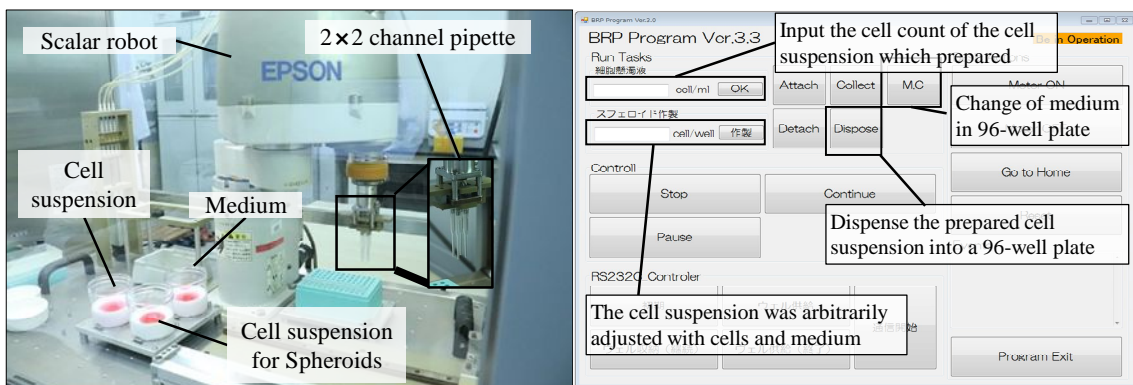


図2 細胞凝集塊形成システムの概観図とソフトウェア画面

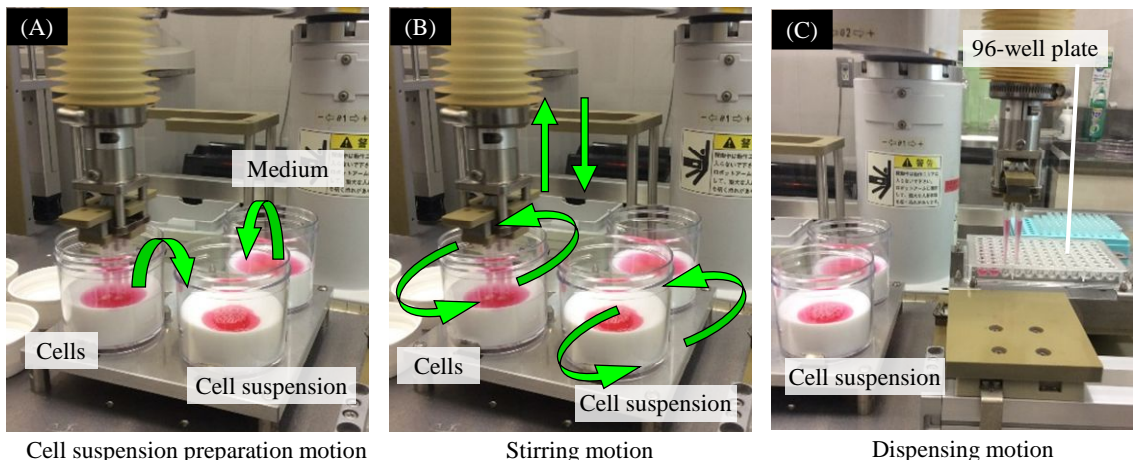


図3 細胞凝集塊形成システムのモーション



ロール、気泡混入の防止および所要時間といった、ピペティング技術を参考にした。作製した専用のリザーバー内の細胞懸濁液内の細胞分布を均一にする際には、スカラーロボット第4関節の回転と、電動シリンダーによる吸引・排出により攪拌を行った。96ウェルプレートに分注する際は、細胞懸濁液が飛散しないようにし、さらに気泡も発生しないようにした。細胞が外気に触れる時間が長ければ長いほど、コンタミネーションのリスクや死滅の可能性が上がるため、細胞懸濁液の分注時間は、作業者が分注するよりも時間が掛からないようにした。

### (3) 目的に応じた細胞凝集塊の作製実験と評価

細胞は正常ウサギ間葉系幹細胞 (Rabbit Mechanical Stem Cell, rMSC) を用い、細胞凝集塊培養に必要な細胞数に達するまで通常培養を行った。培養液は DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, gibco) に Penicillin-Streptomycin Solution を 1%, Fetal bovine serum を 10% 添加したものを使用した。スフェロイド培養のための分注は作業者と開発した細胞凝集塊形成システムで行った。本研究における作業者は、細胞培養の基本を理解し、細胞株を適切な方法で培養できるとともに、24 ヶ月以上の細胞培養の経験を有している者である。細胞数は本研究の細胞構造体作製において使用頻度の高い、 $2 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$  および  $4 \times 10^4$  cell/well とし、継代数は 7 とした。1枚の 96 ウェルプレートの全てのウェルに調整された細胞懸濁液を分注し、同じ細胞数の細胞凝集塊を 96 個作製するようにした。細胞を分注してから 24 時間毎に 5 日間撮影を行い、撮影された画像から細胞凝集塊の直径および円形度を計測した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞凝集塊形態評価システムによる細胞凝集塊の形態評価

開発した細胞凝集塊形態評価システムは 96 ウェルプレートの交換作業は必要であるが、自動で全ての細胞凝集塊を撮影し解析することができる。さらに、さらなる画像処理プログラムも組込むこともできる。インキュベータから取り出された 96 ウェルプレートの培養液の pH は経時的に単調増加しており、短時間で迅速な作業が要求される。細胞凝集塊の撮影において、従来の方法では顕微鏡による撮影で数百  $\mu\text{m}$  の細胞を 96 ウェルプレートから目測で探し出すことや、大量のプレートに対する作業に多くの負担が掛かっていた。しかし、開発したシステムを用いた撮影では、96 ウェルプレート 1 枚に対し 10 分以内で撮影することができ、自動で撮影および解析することができた。機能を拡張させ細胞凝集塊の形態特性の情報に寄与するために、シェードカラー処理による細胞の分布や細胞凝集塊内部の動きの解析等を検討している (図 4)。

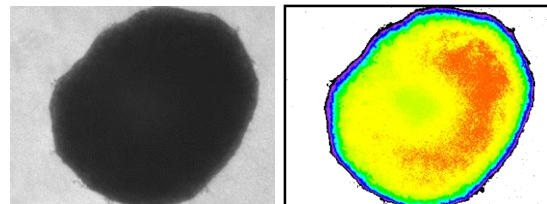


図4 シェードカラー処理を応用した細胞濃度分布の視覚化

### (2) 細胞凝集塊形成システムによる細胞凝集塊の作製と考察

作業者と細胞凝集塊形成システムが作製した細胞凝集塊について、時間経過による直径の変化を図 5 に示す。細胞凝集塊形成システムで作製した細胞凝集塊は、作業者が作製した細胞凝集塊と同じように時間の経過に伴う凝集が確認された。しかし、 $2 \times 10^4$  cell/well の細胞凝集塊の直径の大きさにばらつきが確認された。細胞凝集塊形成システムは作業効率を向上させるために、スカラーロボット第 4 関節先端に  $2 \times 2$  チャンネルのピペットを取り付けている。これに合わせて、円筒の容器底にテーパ形状の治具を設置している。したがって、 $1 \times 8$  チャンネルの

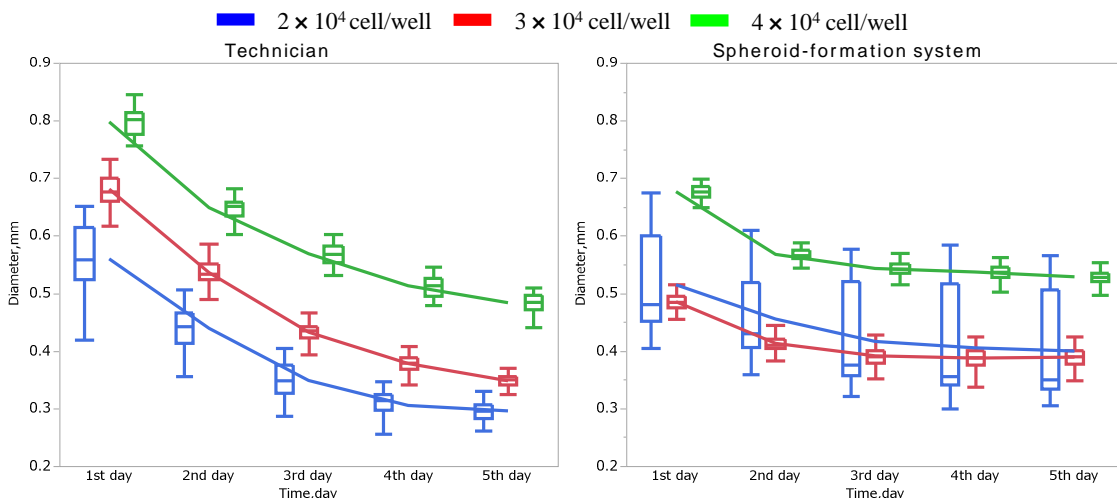


図5 作業者と細胞凝集塊形成システムが作製した細胞凝集塊の直径5日間の変化

ピペットを使用している作業者のモーションとは異なっている．そのため，システム専用リザーバーでは細胞懸濁液内の細胞が一箇所に沈殿し，攪拌が不十分だったために，分注する際の細胞数に差が生じたと考えられる．

細胞凝集塊の細胞数を変更しても同じモーションで細胞凝集塊を作製していたため，細胞数に応じて，細胞凝集塊形成システムのモーションを変更するようにシステムを改善した．改善したモーションの中で， $2 \times 10^4$  cell/well の細胞凝集塊の直径の大きさのばらつきが最も大きかった結果と最も小さかった結果を図 6 に示す．作業者が作製した細胞凝集塊よりも直径のばらつきは認められず，細胞凝集塊形成システムで作製した細胞凝集塊の方が，再現性が高いことが示唆された．

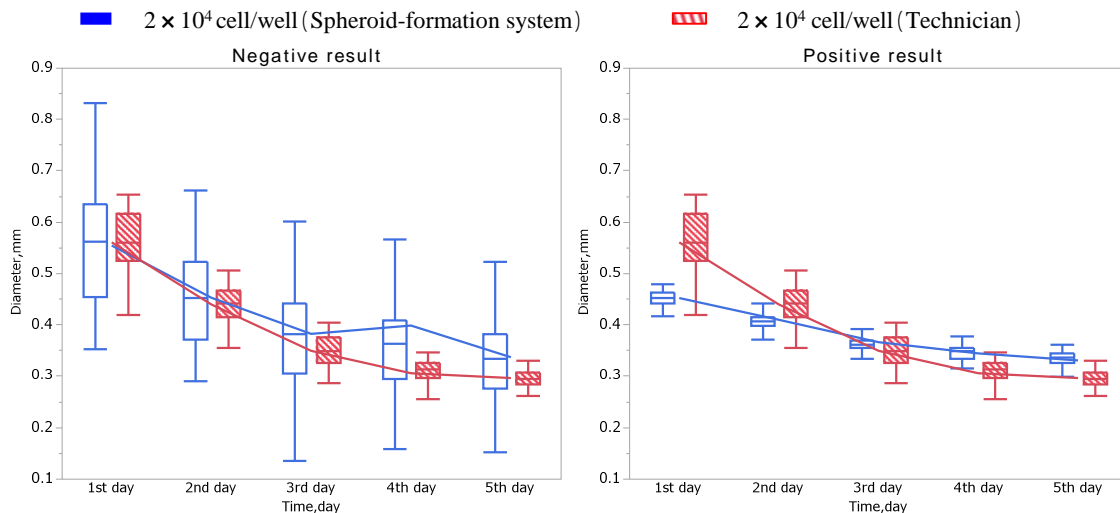


図6 細胞凝集塊形成システムのモーション変更前後の細胞凝集塊の直径5日間の変化

人が行う作業に存在する変動要因を抑えるためと再現性のある細胞凝集塊を得るために，熟練した作業者の動作を参考とした細胞凝集塊形成システムの開発を行った．細胞数に応じたモーションにすることで，作業者が作製するよりも再現性のある細胞凝集塊を作製することができた．細胞凝集塊の円形度においては，作業者よりも高い円形度の細胞凝集塊を作製することができており，細胞凝集塊の作製過程の自動化は単に人に代わる作業ではなく，細胞にダメージを与えないためにも有効であると考えられる．今後は，異なる細胞を指定した比率で混合できるようにし，目的や用途に合わせて細胞凝集塊の大きさを調節できるようにする計画である．

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Shimoto T, Xiu-Ying Zhang, Akieda S, Ishikawa A, Higaki H, Nakayama K, Analysis of cell spheroid morphological character using the spheroid morphology evaluation system, Journal of Robotics and Mechatronics, 査読有, Vol.30, No.5, 2018, 819-826.

下戸健, 石川篤, 日垣秀彦, 再生医療用 cell processing ロボットを用いたスフェロイド作製過程の自動化, 臨床バイオメカニクス, 査読有, 39 巻, 2018, 305-311.

### 〔学会発表〕(計 10 件)

多田隈誠二, 渡部俊樹, 下戸健, 石川篤, 日垣秀彦, 中山功一, シュードカラー処理によるスフェロイド形成特性の可視化, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会, 2019.

渡部俊樹, 手嶋千尋, 下戸健, 石川篤, 日垣秀彦, 中山功一, 自動スフェロイド培養システムによるスフェロイド作製時のピペッティングモーションの最適化の検討, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会, 2019.

渡部俊樹, 下戸健, 石川篤, 日垣秀彦, 中山功一, 自動スフェロイド培養システムのピペッティングモーションの検討, 日本機械学会学生会第 50 回卒業研究発表講演会, 2019.

渡部俊樹, 下戸健, 中山功一, 石川篤, 日垣秀彦, 自動スフェロイド培養装置によるスフェロイドサイズの調整, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会, 2018.

平尾泰誠, 安部壮亮, 下戸健, 中山功一, 石川篤, 日垣秀彦, 画像濃度分布の視覚化によるスフェロイド形態特性の評価の検討, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会, 2018.

下戸健, 藤川眞麗恵, 宮本知佳, 秋枝静香, 中山功一, 石川篤, 日垣秀彦, 再生医療用 cell processing ロボットを用いたスフェロイド作製過程の自動化, 第 44 回日本臨床バイオメカ

ニクス学会，2017.

原遼太郎，川内賢一，藤川眞麗恵，下戸健，秋枝静香，中山功一，石川篤，日垣秀彦，スフェロイド形態評価システムの開発，日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会，2017.

藤川眞麗恵，下戸健，秋枝静香，宮崎雄大，中山功一，石川篤，日垣秀彦，スフェロイド形成ロボットを用いたスフェロイドの作製，第16回日本再生医療学会総会，2017.

Fujikawa M, Hayata T, Shimoto T, Akieda S, Zhang XY, Nakayama K, Ishikawa A, Higaki H, Development of spheroid-formation system for cells construct, The 16th International Conference on Biomedical Engineering (ICBME2016) (国際学会)，2016.

藤川眞麗恵，早田孝明，下戸健，秋枝静香，宮崎雄大，中山功一，石川篤，日垣秀彦，再生医療用細胞構造体のための自動スフェロイド培養装置の開発，日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会，2016.

〔その他〕

ホームページ等

下戸研究室ホームページ

<http://www.fit.ac.jp/~simoto/index.html>

福岡工業大学研究者情報

<https://www.fit.ac.jp/research/search/profile/id/184>