

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月10日現在

機関番号：32657

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22800064

研究課題名（和文）自家細胞培養のための細胞状態変化に対応する培養環境最適化システムに関する研究

研究課題名（英文）Study on optimization system of cell culture environment corresponding to the cell change of state for autologous culture

研究代表者

野中 一洋（NONAKA KAZUHIRO）

東京電機大学・理工学部・助手

研究者番号：50584182

研究成果の概要（和文）：

本研究では細胞組織の運動状態に応じた細胞培養環境最適化システムの開発を行うため、非侵襲的、かつ定量的な細胞組織評価技術を構築し、定量的に解析したデータから、貴重な細胞資源を最も効率的に培養するための条件を選定することを目的としている。構築した解析方法では細胞集団における個々の細胞をリアルタイムで判別し、複数の細胞に対して同時にベクトル解析を行うことが可能となった。結論として、培養環境の刺激応答に基づく画像解析は、細胞の培養状態を計測するうえで重要な評価技術として有用性のあるものと示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, evaluation technique of cell tissue noninvasively and quantitatively was developed to select optimal cell culture environment corresponding to the cell change of state. The developed system results demonstrated the ability to perform vector analysis at the same time for plural numbers of cells and migration of individual cells in the population in real-time. In conclusion, it was suggested that image analysis based on the stimulation response of the culture environment was effective for measurement of cellular state in regenerative medicine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,220,000	366,000	1,586,000
2011年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,230,000	669,000	2,899,000

研究分野：生体医工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：細胞挙動解析，非侵襲的評価，細胞状態予測，培養面設計

1. 研究開始当初の背景

再生医療における自家細胞培養は、患者自身の細胞を原材料として用いるため、未知の感染症や免疫拒絶等の問題を解決でき、日本では特に倫理面からも社会に受け入れられやすいことから、各患者に応じたテーラー

メイド医療が実現し得ると考えられている。その一方で、生きた細胞から成る組織の生産工程を管理するためのシステム、定量的な計測に基づいた細胞組織の品質評価法や安全性評価法、治療の成否を判断する方法が未だ確立されていないのが現状である。

一般的な培養組織の作製法のほとんどは熟練した医師や技術者による手作業によるものであり、その操作基準は操作者の経験に大きく依存している。培養細胞および組織の生産工程の特徴として、患者ごとあるいは採取部位ごとに細胞の活性や寿命が変化する点が挙げられ、採取した原料である細胞は不均質な特性を有している。また評価のために原料である細胞を消費することは、生産原理および原料の希少性から避ける必要がある。これらのことから、不均質な細胞から組織を安定的に生産するためには培養面における細胞挙動変化についての経時的な観察が必要であり、培養状況を常時モニタリングし、培養中の細胞組織の状態診断および変性を定量的、かつ非侵襲的に検出・確率推定を行うシステム構築が望まれる。しかし、これまでの細胞評価法は、培養終了後に細胞組織の品質および安全性を評価する技術であるため、細胞や組織デバイスの破壊を伴う。そのため、既存の評価技術では、細胞・組織医療デバイスの生産段階である培養プロセスを制御可能なパラメータに関する情報が得られないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、機能形態を非侵襲的・非染色的、かつ定量的に評価する方法としてとして、細胞培養過程での詳細な経時的観察および解析による評価方法の構築を目的とした。細胞挙動の評価手法として、流れの可視化技術の一つである粒子画像流速測定法(Particle Image Velocimetry: PIV)を用い、異なる培養面において個々に存在する細胞を解析すると同時に、群として運動する組織の挙動の規則性の抽出を行い、培養時における細胞状態を検討した。

3. 研究の方法

(1) 微細加工技術による培養面設計

本実験では、培養面の評価として、繊維性の Scaffold を用いた。Scaffold を構築するための材料として、医療用材料として数多く用いられ、高耐久性および柔軟性を有するペレット状のセグメント化ポリウレタン(SPU)を用いた。Scaffold の作製方法として、簡便にナノからマイクロスケールの繊維を紡糸することができ、高い再現性および均一性を有するエレクトロスピンニング法により、Scaffold をサブマイクロ～マイクロスケールで構造制御可能な条件を検討した。

(2) 培養面における細胞挙動解析

細胞増殖過程における培養面上の細胞群の速度ベクトル解析を行うため、撮影した画像に対し、PIV の原理を応用した 2 次元流体解析ソフトウェア DIPP-FLOW (株式会社ディ

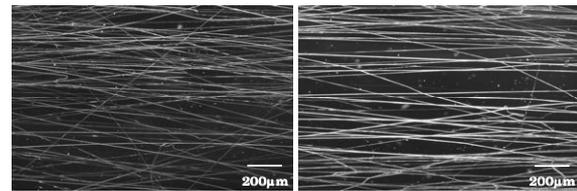
テクト社)を用いて細胞の進行方向(横軸方向)における細胞の移動推移および移動速度を算出した。

本解析手法は、参照領域における 2 時刻間の画像間での局所的な濃度パターンの類似性を検出することで、そのピーク位置から移動量・移動方向を求めることが可能である。初めに基準となる画像(時刻 t)内に任意の格子計測範囲の輝度を測定した。次に比較の画像(時刻 $t+\Delta t$)において格子計測範囲の輝度の類似度が最大になるような範囲の位置を検出し、格子計測範囲の移動量を決定した。これを粒子の平均移動量とすることで速度ベクトルを算出した。最後に PIV で求めた各格子計測範囲におけるベクトルの X 軸成分を抽出し、X 軸方向の各要素の平均を求めることにより、細胞群内の個別細胞の移動量を可視化および定量化し、培養日数における細胞群の移動推移を計測した。

4. 研究成果

(1) 微細加工技術による培養面設計

図 1 に作製したナノファイバー Scaffold ($0.76\pm 0.50\mu\text{m}$, n-Scaffold)およびマイクロファイバー Scaffold ($5.22\pm 0.58\mu\text{m}$, μ -Scaffold)の顕微鏡画像を示した。



(a) n-Scaffold

(b) μ -Scaffold

図 1 ナノファイバー Scaffold およびマイクロファイバー Scaffold の顕微鏡画像

作製した Scaffold の平均繊維配向角は n-Scaffold が 88.87° 、 μ -Scaffold が 95.37° となり、n-Scaffold、 μ -Scaffold とともに繊維が同方向に配列していることが確認された。またフレーム内における n-Scaffold の繊維面積率は 26.01%、 μ -Scaffold の繊維面積率は 27.24% となり、その誤差は 4.7% であった。繊維配向性および繊維面積率に差異は確認されなかったことから、繊維径の違いによる Scaffold 上での細胞群挙動に関して、定量的な評価が行うことが可能となった。

(2) 培養面における細胞挙動解析

図 2 に測定 5 日後での各培養面における細胞群の顕微鏡画像と PIV により算出した細胞群の移動方向と移動速度を表す速度ベクトル図を示した。また図 3 に測定日数における細胞群の移動推移を示した。

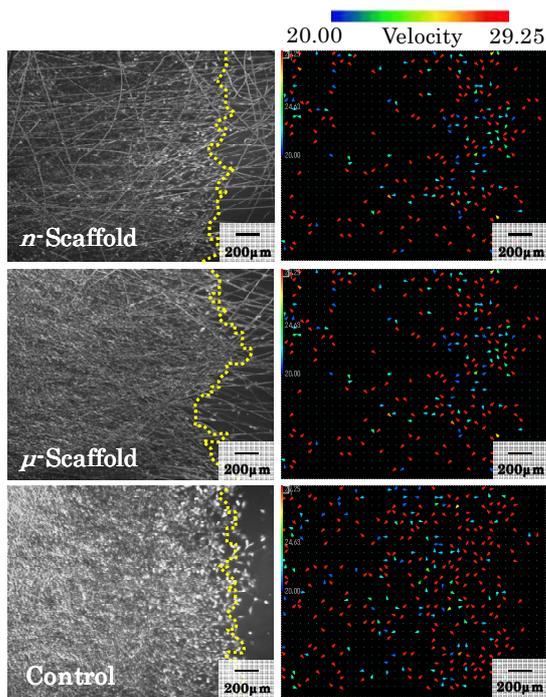


図 2 細胞群の速度ベクトル解析結果 (測定開始 5 日後)

図 2 に示す PIV による解析結果から、細胞群における個別細胞の移動方向をベクトル化させることにより、細胞群内における個別細胞の挙動を可視化および定量化することが可能となった。図 3 に示す細胞群の運動割合の推移結果より、時間経過に伴い細胞群の移動分布が変化していることが確認でき、細胞群における個別細胞が活発に運動している位置を抽出することが可能となった。この機能により、異なる培養面における細胞群の非侵襲的な計測やその規則性を抽出することに成功した。

今後は、画像解析による効率的に培養を行うための最適化な培養条件の策定および培養過程における細胞組織の分化、増殖度・寿命や変性等の測定を行う。さらには個別・集団細胞挙動のデータベースを基にした細胞の組織化過程のシミュレーションモデル構築し、効率的に安全、かつ安定的な自家細胞培養を行うためのシステムの実現を目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 野口展士, 野中一洋, 幡多徳彦, 福井康裕, 舟久保昭夫: 速度ベクトル解析を用いた細胞密度変化における細胞移動評価, 生体医工学, Vol. 50, No. 1: 149-154; 2012 (査読有)

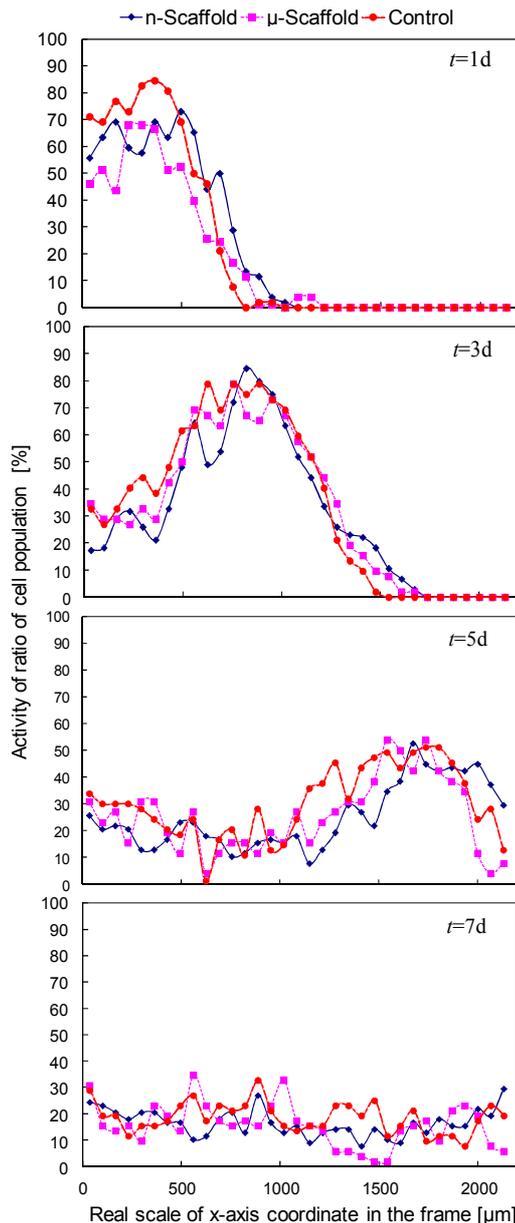


図 3 細胞群の移動割合の推移 ($n=3$)

- ② 野中一洋, 野口展士, 矢口俊之, 幡多徳彦, 福井康裕, 舟久保昭夫: 粒子画像流速測定法を用いた培養面における細胞群の挙動解析, ライフサポート, Vol.22, No.3: 39-45; 2010 (査読有)

[学会発表] (計 21 件)

- ① 野口展士, 幡多徳彦, 野中一洋, 矢口俊之, 福井康裕, 舟久保昭夫: プロセス管理のための継代培養における評価技術に関する研究, 第 49 回日本人工臓器学会大会, 2011.11.25-27, 日本都市センターホテル (東京都)
- ② 野中一洋, 幡多徳彦, 和田知明, 野口展士, 矢口俊之, 大越隆文, 朝倉哲郎, 福井康裕,

- 舟久保昭夫: 血管誘導を目指した二層構造型小口径人工血管の作製と評価, 第 49 回日本人工臓器学会大会, 2011.11.25-27, 日本都市センターホテル (東京都)
- ③ 和田知明, 幡多徳彦, 野中一洋, 野口展士, 福井康裕, 舟久保昭夫: 細胞挙動制御を目的とした繊維性スキャフォールドの構造設計, 第 49 回日本人工臓器学会大会, 2011.11.25-27, 日本都市センターホテル (東京都)
- ④ 松永裕樹, 幡多徳彦, 野中一洋, 福井康裕, 舟久保昭夫: 流体力学的負荷に対する細胞応答評価ツールに関する基礎検討, 生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会 2011, 2011.11.3-5, 芝浦工業大学芝浦キャンパス (東京都)
- ⑤ 野口展士, 幡多徳彦, 野中一洋, 福井康裕, 舟久保昭夫: 多点照明法を用いた培養細胞観察システムの開発に関する研究, 生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会 2011, 2011.11.3-5, 芝浦工業大学芝浦キャンパス (東京都)
- ⑥ 野中一洋, 和田知明, 幡多徳彦, 野口展士, 矢口俊之, 大越隆文, 朝倉哲郎, 福井康裕, 舟久保昭夫: 血管誘導のための人工足場材料の作製と評価, 生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会 2011, 2011.11.3-5, 芝浦工業大学芝浦キャンパス (東京都)
- ⑦ 野口展士, 幡多徳彦, 野中一洋, 福井康裕, 舟久保昭夫: 細胞挙動評価のための新規明視野観察システムの開発, 第 63 回日本生物工学会大会, 2011.9.26-28, 東京農工大学小金井キャンパス (東京都)
- ⑧ 和田知明, 幡多徳彦, 野中一洋, 野口展士, 福井康裕, 舟久保昭夫: 電界制御に基づく繊維性スキャフォールドの構造設計, 第 63 回日本生物工学会大会, 2011.9.26-28, 東京農工大学小金井キャンパス (東京都)
- ⑨ 野中一洋, 幡多徳彦, 和田知明, 矢口俊之, 大越隆文, 朝倉哲郎, 福井康裕, 舟久保昭夫: エレクトロスピンニング法による血管化促進足場材料の開発, 第 63 回日本生物工学会大会, 2011.9.26-28, 東京農工大学小金井キャンパス (東京都)
- ⑩ Hiroo Noguchi, Norihiko Hata, Kazuhiro Nonaka, Toshiyuki Yaguchi, Takafumi Okoshi, Yasuhiro Fukui, Akio Funakubo: Investigation of the Relation Between Cell Migration and Concentration Using PIV Analysis for Tissue Formation Process, ASAIO 57th ANNUAL CONFERENCE, 2011.6.10-12, Washington Hilton (Washington DC, U.S)
- ⑪ Kazuhiro Nonaka, Yasuharu Ohgoe, Tomoaki Wada, Junya Koseki, Norihiko Hata, Hiroo Noguchi, Toshiyuki Yaguchi, Takafumi Okoshi, Yasuhiro Fukui, Akio Funakubo: Analysis of Cell Behavior on Fibrous Scaffolds Coated with Amorphous Hydrogenated Carbon (a-C:H) Film, ASAIO 57th ANNUAL CONFERENCE, 2011.6.10-12, Washington Hilton (Washington DC, U.S)
- ⑫ 野口展士, 幡多徳彦, 野中一洋, 矢口俊之, 福井康裕, 舟久保昭夫: 粒子流速測定法を用いた細胞密度変化における細胞挙動解析に関する研究, 第 50 回日本生体医工学会大会, 2011.4.29-5.1, 東京電機大学神田キャンパス (東京都)
- ⑬ 野中一洋, 高橋佑介, 橋浦匠, 幡多徳彦, 矢口俊之, 大越隆文, 福井康裕, 舟久保昭夫: エレクトロスピンニング法による混紡型・積層型 Scaffold の作製と基礎評価, 第 50 回日本生体医工学会大会, 2011.4.29-5.1, 東京電機大学神田キャンパス (東京都)
- ⑭ 古関洵也, 和田知明, 野中一洋, 大越康晴, 幡多徳彦, 福井康裕, 舟久保昭夫: 培養面における細胞の挙動解析に関する研究, 第 50 回日本生体医工学会大会, 2011.4.29-5.1, 東京電機大学神田キャンパス (東京都)
- ⑮ 幡多徳彦, 橋浦匠, 野口展士, 野中一洋, 福井康裕, 舟久保昭夫: 繊維性 Scaffold を用いた水生二相系による新規組織培養法および評価技術の開発, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011.3.1-2, 京王プラザホテル (東京都)
- ⑯ 野口展士, 幡多徳彦, 橋浦匠, 野中一洋, 矢口俊之, 古関洵也, 福井康裕, 舟久保昭夫: 粒子流速測定法を用いた細胞密度変化における速度ベクトル解析に関する研究, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011.3.1-2, 京王プラザホテル (東京都)
- ⑰ 橋浦匠, 幡多徳彦, 野口展士, 野中一洋, 福井康裕, 舟久保昭夫: 繊維性 Scaffold のみに接触した線維芽細胞挙動の定量解析, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011.3.1-2, 京王プラザホテル (東京都)
- ⑱ 野中一洋, 野口展士, 橋浦匠, 古関洵也, 幡多徳彦, 矢口俊之, 大越隆文, 福井康裕, 舟久保昭夫: 人工臓器表面における培養面設計と細胞挙動解析に関する研究, 第 39 回人工心臓と補助循環懇話会, 2011.2.18-19, 皆生つるや・米子市観光センター (鳥取県)
- ⑲ 野中一洋, 橋浦匠, 幡多徳彦, 野口展士, 古関洵也, 矢口俊之, 大越隆文, 福井康裕, 舟久保昭夫: 繊維性 Scaffold の新規構造制御技術に関する研究, 第 48 回日本人工臓器学会大会, 2010.11.18-20, 仙台国際センター (宮城県)

- ⑳ 橋浦匠, 幡多徳彦, 野中一洋, 野口展士, 大越隆文, 福井康裕, 舟久保昭夫: 繊維性 scaffold 上における足場依存性細胞の増殖機序に関する基礎検討, 第 48 回日本人工臓器学会大会, 2010.11.18-20, 仙台国際センター (宮城県)
- ㉑ 幡多徳彦, 橋浦匠, 三本木慧介, 小林祐介, 野口展士, 野中一洋, 福井康裕, 舟久保昭夫: Perfluorocarbon および繊維性 Scaffold を用いた組織培養の基礎研究, 第 48 回日本人工臓器学会大会, 2010.11.18-20, 仙台国際センター (宮城県)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

- ① 名称: 三次元スキャフォールドの製造装置及び三次元スキャフォールドの製造方法
発明者: 幡多徳彦, 村井正広, 和田知明,
野中一洋, 舟久保昭夫
権利者: 学校法人 東京電機大学
種類: 特許
番号: 2011-270360
出願年月日: 平成 23 年 12 月 9 日
国内外の別: 国内

[その他]

受賞 (計 3 件)

- ① 野中一洋: ライフサポート学会論文賞,
論文名: 粒子画像流速測定法を用いた培養面における細胞群の挙動解析, 受賞日:
2011 (H23) 年 11 月 4 日
- ② 野中一洋: 第 39 回 人工心臓と補助循環懇話会 若手セッション優秀賞, 研究課題名: 人工臓器表面における培養面設計と細胞挙動解析に関する研究, 受賞日:
2011 (H23) 年 2 月 18 日
- ③ 野中一洋: 日本人工臓器学会 Grant-MERA 賞, 個別細胞および集団細胞の挙動解析に基づく組織形成予測システムの開発に関する研究, 受賞日:
2010 (H22) 年 11 月 18 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野中 一洋 (NONAKA KAZUHIRO)
東京電機大学・理工学部・助手
研究者番号: 50584182

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし