

平成21年6月11日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700409
 研究課題名（和文）
 培養した細胞組織の品質および安全性評価のための非侵襲的評価システムの開発
 研究課題名（英文）
 The basic study of quality and safety evaluation method for cultured cell and tissue.
 研究代表者
 矢口 俊之（YAGUCHI TOSHIYUKI）
 東京電機大学・理工学部・助手
 研究者番号：70385483

研究成果の概要：

細胞培養において非侵襲であり、かつ実現性の高い方法として、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を提案する。細胞培養環境下において顕微画像を取得し、細胞の形態や移動度、遊走性、分裂頻度などを総合的に解析することにより、細胞の状態、増殖能、細胞分化・変性、さらには細胞機能発現、細胞周期、意図した細胞組織構築までにかかる時間予測など、将来的には様々なデータを得ると同時に、シミュレーションを可能とすることを目的とした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	240,000	1,940,000

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・組織工学

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

従来から用いられてきた各種細胞評価技術としては、細胞計数測定や増殖能評価、病理評価でも広く用いられている様々な色素を用いた染色評価、蛍光色素を用いた蛍光観察、そして近年では遺伝子解析による細胞機能発現、分子、タンパクレベルでの評価など、評価技術も多様になり、より詳細な評価が行

えるようになった。しかし、これらほとんどの評価方法は、培養細胞を高侵襲的に評価するものであり、評価対象は廃棄せざるをえない。細胞の培養に影響を与えない評価としては、培養液の成分を解析することが考えられるが、それにより現在得られるデータはごく僅かである。これらの学術的背景から、細胞培養時において、非侵襲的に細胞の状態を把握し、さらに増殖度や細胞変性の推定までを行える学術的理論とその評価方法の開発が

望まれている。

(2) 社会的背景

近年、再生医療が社会へ大きなインパクトを与えている。超高齢化と同時に少子化による新たな社会構造は、求める医療の質をも変えた。延命のみを目的とした医療は一定の役割を終え、QOL 向上、ひいては高齢者が社会を支えるため、患者の完全な社会復帰までも視野に入れた再生医療が求められている。その一方で、臨床への距離は遠いのが現状でありその理由の一つとして、再生医療の特殊性が挙げられる。細胞はこれまでの医薬品とも医療機器とも一線を画す特徴を備えており、従来のような医薬品、医療機器であれば、その生産、管理体制を整えることにより品質は一定に保たれ、安全性も保証された。しかし、生きた細胞からなる組織を管理、検査し品質を保証するためのガイドラインとその評価手法は未だ存在しない（(社) 関西経済連合会、産業・科学技術委員会『【提言】再生医療に係わる研究成果の早期実現を目指して』より）。細胞培養状況の把握と管理、細胞組織の機能発現、変性、ガン化等、いかなる手法により、いかなる要素を計測、解析すれば、どのような状態が把握できるのかという、評価に関する研究は非常に遅れており、特に培養を妨げないで実施可能な非侵襲的評価技術に関してはほとんど存在しない。

(3) 国内外の研究動向及び位置づけ

国内においては、医薬品や医療機器の審査機関である(独) 医薬品医療機器総合機構にも細胞組織における評価基準やその方法は規定されておらず、研究においてもほとんど成されていない。国外では、米国 FDA が個々の審査において柔軟に対応しているが、スタンダードたる評価基準・方法は存在せず、また研究においても成されていない。これらの現状により、特に日本国内で細胞組織を産業化する活動を大きく妨げているという指摘が産業界よりなされており、本申請課題が一助となると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞組織を用いた再生医療において、未整備な品質管理・安全性保証に関する定量的かつ非侵襲的な新規評価方法を

提案する。生きた細胞を扱う再生医療では、生産や品質評価に関連するガイドラインも未整備であり、臨床応用への大きな問題となっている。また、細胞組織培養技術が急速に発達した一方で、その評価方法に関してはほとんど研究が行われていない。具体的な研究目的として、非侵襲的な多次元顕微画像撮影システムの構築とその多次元画像合成処理による細胞識別技術の確立、またその多次元画像解析による細胞状態の評価と推定に関する理論導出を目的とする。

3. 研究の方法

細胞とその培地となる Scaffold はどちらも透明であり、屈折率の点において光学的に近似しており、1 台の CMOS カメラでは細胞の認識率が低くなる。さらに、微視的には三次元である Scaffold は乱反射を生じ、さらに観察を困難とする。また、三次元 Scaffold の内部に生着した細胞状態に関しては既存の観察システムでは撮影不可能である。また現有装置に装備された CMOS カメラの解像度は高いものとは言えず、詳細な形態観察には不適である。

以上の問題点を解決するため新規設計による非侵襲的観察・撮影システムを構築する。その中心となるのは超高解像度 CMOS カメラを備えた光学実体顕微鏡である。撮影した画像に対して画像処理、解析を行うことにより、これまでに得られなかった情報取得を目的とした。

4. 研究成果

作製した Scaffold 上での培養実験においては、CMOS カメラによる経時的観察と、詳細な逐次画像処理による細胞の状態に関する定量的評価について基礎的な検討を行った。その成果として、細胞の移動軌跡、輪郭等を半自動検出し、移動速度、直進性、細胞形態（長径等）を定量的に算出するソフトウェアを作成した（図 1）。

さらに、足場の構造（繊維径）と細胞挙動の間に、関連性があることを定量的に明らかにした。これらの結果をまとめ、査読付き論文一編を発表した。

今後、この検討手法を基に、各種細胞の挙動をデータベース化することにより、細胞に

対する細胞足場構造を最適化する際に有用な手法となると考えられる。また、画像解析により得られた基礎的な細胞挙動データベースを解析ソフトウェアとリンクさせ、細胞培養状態の非侵襲予測シミュレータとしての機能を実装してゆく。将来的には細胞組織工学および再生医療分野に対して腫瘍化等の定量的リスク評価ツールとして発展させてゆく。

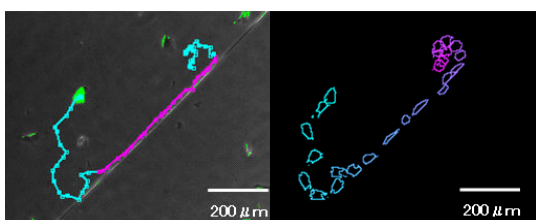


図1 移動軌跡(左)と細胞輪郭(右)

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矢口俊之, 野中一洋, 舟久保昭夫, 福井康裕: 繊維性基材の構造が細胞の移動距離に与える影響, ライフサポート学会論文誌, ライフサポート, Vol.20, No.4, 3-8, 2008 (査読有)
- ②野中一洋, 矢口俊之, 福井康裕, 舟久保昭夫: 線維性 Scaffold 構造における細胞増殖能の検討, ライフサポート学会論文誌, 掲載決定, 2009 (査読有)

[学会発表] (計11件)

- ①矢口俊之, 舟久保昭夫, 野中一洋, 住倉博仁, 大越隆文, 福井康裕: 繊維性 Scaffold における画像処理を用いた細胞実験評価方法に関する研究, 第7回日本再生医療学会総会, 日本再生医療学会総会 プログラム・抄録 P-216, 3月13~14日, 2008, 名古屋国際会議場
- ②T. Yaguchi, A. Funakubo, K.Nonaka, Y. Makino, H. Sumikura, Y. Fukui: Study on structure of small-caliber vascular graft which oriented to promote endothelialization, ASAIO J Articles and Abstracts, P10A, Vol.54 No.2, 19~21 June 2008 San Francisco, USA
- ③T. Yaguchi, A. Funakubo, K.Nonaka, Y. Makino, H. Sumikura, Y. Fukui:

Optimization of NANO-Micro fibrous Scaffold based on the structure for artificial organs., ASAIO J Articles and Abstracts, P10A, Vol.54 No.2, 19~21 June 2008 San Francisco, USA

④矢口俊之, 野中一洋, 野口展士, 住倉博仁, 大越隆文, 福井康裕, 舟久保昭夫: 足場構造が細胞挙動へ与える影響の解析に関する研究, 第6回生活支援工学系学会連合大会, 生活支援工学系学会連合大会 講演予稿集 1B3-2, 9月17~19日, 2008, 山口大学工学部

⑤矢口俊之, 舟久保昭夫, 野中一洋, 相原達也, 大越隆文, 住倉博仁, 野一色泰晴, 福井康裕: 細胞足場の形状が細胞の挙動へ与える影響とその評価方法に関する研究, 第47回日本生体医工学会大会, 日本生体医工学会誌生体医工学 Vol.46 PS3-7-10, 5月8~10日, 2008, 神戸国際会議場

⑥T. Yaguchi, A. Funakubo, K. Nonaka, Y. Makino, H. Sumikura, Y. Fukui: THE BASIC STUDY OF EVALUATION OF SCAFFOLD INFLUENCE CELL BEHAVIOR TO APPLICATION FOR ARTIFICIAL HYBRID ORGANS, 2007 Joint Congress of "the 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs" and "the 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs", Vol.36 No.2, S-44, 28~31 October 2007, Osaka, Japan

⑦K. Nonaka, T. Yaguchi, A. Funakubo, Y. Makino, T. Aihara, H. Sumikura, Y. Fukui: IN VITRO EVALUATION OF FIBROUS SCAFFOLD USING AN ELECTROSPINNING TECHNIQUE, 2007 Joint Congress of "the 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs" and "the 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs", Vol.36 No.2, S-44, 28~31 October 2007, Osaka, Japan

⑧T. Aihara, T. Yaguchi, A. Funakubo, T. Okoshi, K. Nonaka, H. Sumikura, Y. Fukui: FABRICATION AND EVALUATION OF SMALL-DIAMETER GRAFTS WITH ELECTROSPINNING METHOD, 2007 Joint Congress of "the 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial

Organs" and "the 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs", Vol.36 No.2, S-22, 28~31 October 2007, Osaka, Japan

⑨K Nonaka, T. Yaguchi, A Funakubo, H Sumikura, Y Fukui:CELL AFFINITY EVALUATION AND CONTROL OF NANO-MICRO FIBROUS SCAFFOLD STRUCTURE, ASAIO JOURNAL Volume 53 Number2 8A, 7~9 June 2007, Chicago, USA

⑩矢口俊之、舟久保昭夫、牧野雄太、野中一洋、住倉博仁、福井康裕：Scaffold 形状と細胞挙動の関連性評価とその方法に関する研究, 第 29 回日本バイオマテリアル学会大会, 第 29 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, P.186, 11 月 26~27 日(2007), 大阪

⑪野中一洋、矢口俊之、内田祐也、舟久保昭夫、相原達也、牧野雄太、住倉博仁、福井康裕：エレクトロスピンニングによる繊維性 Scaffold の構築と in vitro 評価, 第 10 回日本組織工学会, 第 10 回日本組織工学会プログラム抄録集, P.69, 11 月 8~9 日(2007), 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢口 俊之 (YAGUCHI TOSHIYUKI)
東京電機大学・理工学部・助手
研究者番号：70385483

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし