

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：37112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870787

研究課題名(和文) Cell Processing Robotを用いた細胞凝集塊形成特性の解明

研究課題名(英文) Clarification of spheroid-formation characteristics using cell-processing robot

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究グループでは、細胞のみで骨軟骨再生のための3次元細胞構造体を作製する技術確立している。細胞構造体作製における本手法の特色は、スフェロイド培養した細胞凝集塊を用いることである。しかし、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。そこで本研究では、Cell-Processing Robotを用いて細胞凝集塊形成の特性を解明することを目的とした。研究の結果、円形度の高い細胞凝集塊を得るための細胞数の範囲が存在することと、細胞凝集塊形成システムを用いることで、技術技能員よりも細胞を傷つけずに細胞凝集塊の作製が可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This research group has established technology to produce three-dimensional cell constructs for osteochondral regeneration by using only cells and not using supports, such as scaffolds. A special feature of this method for producing a cell construct is that it uses cultured spheroids. However, if spheroids with identical shapes cannot be obtained, it is impossible to construct the intended cell construct. Thus, this study was conducted to clarify characteristics of spheroid formation using a cell-processing robot. Research results confirmed that it was possible to specify the range of optimum cell counts capable of forming highly circular spheroids. Additionally, it was possible to produce spheroids without damaging the cells than a technician using the spheroid-formation robot to incorporate the motions of a technician.

研究分野：医用生体工学

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

機能しなくなった組織や臓器に対する治療法として、再生医療への期待が高まっている。ES細胞やiPS細胞など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ティッシュエンジニアリングを用いて、失った組織や臓器の再生を目指した3次元組織工学による治療開発も活発化している。細胞・成長因子/遺伝子・Scaffold(細胞培養の足場となる担体)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されている。本研究グループにおいても、細胞を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Scaffoldを使用せずに、再生医療用3次元細胞構造体を作製することに成功している。3次元細胞構造体は細胞凝集塊の品質と再現性が重要になるが、細胞凝集塊を作製する際の適切な細胞数は決まっておらず、熟練した技術技能員の経験に基づいて作製しているのが現状である。さらに、体調や長時間の作業などによる影響で、細胞凝集塊にばらつきが生じる可能性がある。これに関し、再現性のある3次元細胞構造体の作製を実現するため、ロボティクス技術を応用して作製過程を自動化させるシステムの開発を行ってきた経緯がある(Shimoto et al., 2012; Shimoto et al., 2013)。そこで、開発してきたCell Processing Robotに専門の技術技能員のモーションを組み込んで細胞凝集塊を作製し、細胞凝集塊の形成特性を解明することにより、目的の大きさを有す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

最適な細胞凝集塊の生成を行い、再現性のある3次元構造体の作製のため、細胞凝集塊の形成特性について解明することを目的とした。専門の技術技能員が作製した細胞凝集塊について定量評価を行うとともに、Cell Processing Robotを応用したシステムを開発し、再現性のある細胞凝集塊の作製を実現させ、形状の解析を通じて細胞凝集塊の形成特性について考察した。

3. 研究の方法

(1) 細胞凝集塊の適切な細胞数の特定

第1に、専門の技術技能員による肉眼的評価や、円形度などの形状の定量的評価を踏まえながら、適切な細胞数を特定した。

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で構成されている。細胞凝集塊は特殊な96穴ウェルプレートに細胞懸濁液を播種して作製され、CO₂インキュベータ内で培養される。1つのウェルに1つの細胞凝集塊が作製されるため、プレート1枚に対して96個の細胞

凝集塊を得ることができる。細胞凝集塊撮影の際、CO₂インキュベータからプレートを取り出し、手探りで細胞凝集塊を探し出すのは時間が掛かるため、細胞にダメージを与えるだけでなく、コンタミネーションのリスクも増大する。そのため、XYスライダを取り付け、プレートのスムーズな移動を実現するとともに、数百μmの細胞凝集塊を短時間で探索できるようにした。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、撮影時にピントを合わせられるようにした。画像取得時では、プレートにおける各スフェロイドのアドレスの取得とスフェロイド撮影を同時に行えるようなソフトウェアにし、プレートが外気に触れる時間を短縮した。

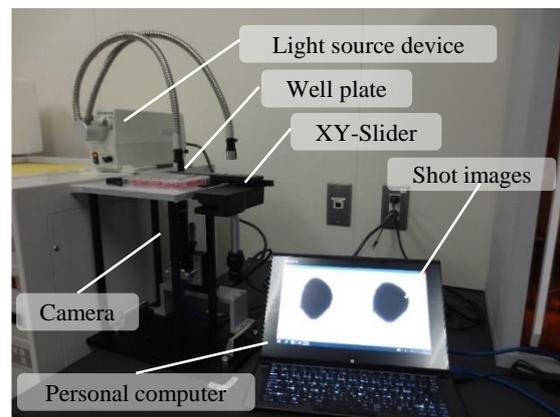


図1 細胞凝集塊形態評価システム

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、定量評価するために、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した。まず、キャプチャした画像に対して2値化処理を行った。細胞凝集塊の大きさやウェル内のメディウムなどの影響により、得られる画像の輝度はそれぞれで異なる。したがって、単純に閾値を決めた2値化ではなく、クラス間分散とクラス内分散の比で求まる分離度が、最大となるように閾値を設定する判別分析法を用いた。次に、2値化をすると本来は連続している部分が切断されたり孤立点が現れたりするため、境界線を滑らかにし、孤立点を除去するためにモフォロジー処理を行った。最後に、画像上の細胞凝集塊のピクセル情報から、面積、直径および円形度を算出するようにした。

②細胞凝集塊の形態評価

細胞は正常ウサギ間葉系幹細胞を用いた。継代はカルチャーディッシュを用いた。細胞培養は専門の技術技能員が行った。細胞はディッシュ内でコンフルエントすると接触阻害を起こし増殖を止めてしまう。そのため、コンフルエントする前に継代を行いながら培養を進めた。細胞凝集塊は専用の96穴ウェルプレートに細胞懸濁液を分注することで作製した。必要細胞数に達するまで通常培養を行い、細胞の数を調整し、1×8ピペット

を用いて専用のウェルプレートに播種してスフェロイド培養を行った。開発した細胞凝集塊形態評価システムを用いて、細胞凝集塊の形態の定量評価を行った。培養した細胞凝集塊の様子は播種してから24時間毎に5日間観察し、培地交換も24時間毎に行った。

(2) Cell Processing Robot を応用した細胞凝集塊形成システムの開発

第2に、再現性のある細胞凝集塊の作製を実現させるために、細胞凝集塊形成システムの開発を行った。装置に用いた部材は、オートクレーバブルもしくはエタノール消毒可能な素材とした。スカラロボット第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。作製した専用の治具に入れられた細胞懸濁液内の細胞を均一にする際には、スカラロボット第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、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、技術技能員が分注するよりも時間がかからないようにした。通常培養で用意した細胞懸濁液の細胞数を入力し、スフェロイドの大きさをリストから選択することで、スフェロイド作製に必要な細胞と培養液を別の容器で調節し、スフェロイド培養用の細胞懸濁液を作製するようにした。装置のモーションは、専門の知識や技術をもった技術技能員のモーションを参考にした。

(3) 細胞凝集塊形成システムを用いた細胞凝集塊の作製と形成特性の考察

最後に、細胞凝集塊形成システムを用いて細胞凝集塊を作製し、形状の解析と技術技能員が作製する細胞凝集塊との比較から、細胞凝集塊の形成特性について考察した。

4. 研究成果

(1) 細胞凝集塊の肉眼的評価と定量的評価

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μmの細胞を96穴ウェルプレートから目測で探し出す作業に、多くの時間が掛かっていた。しかし、開発した細胞凝集塊形態評価システムを用いた撮影では、プレート1枚に対し10分以内で撮影することができた。

①細胞凝集塊の肉眼的評価

肉眼的所見において、細胞数によって細胞凝集塊の大きさや形状が異なることが確認された。さらに、時間経過に伴い凝集していくことが確認された。細胞数が 6×10^4

cell/well や 7×10^4 cell/well の細胞凝集塊は、歪な形状をしていることが確認された。

②細胞凝集塊の定量的評価

技術技能員が作製した細胞凝集塊について、撮影した細胞凝集塊の画像に対して画像処理を行い、細胞凝集塊の直径および円形度について算出した。円形度は時間経過に伴い、高くなっており、3日目から安定することが確認された。細胞凝集塊の面積と直径は、時間経過に伴い測定した5日間は単調減少しているが、3日目で変化量が小さくなることが確認された(図2)。

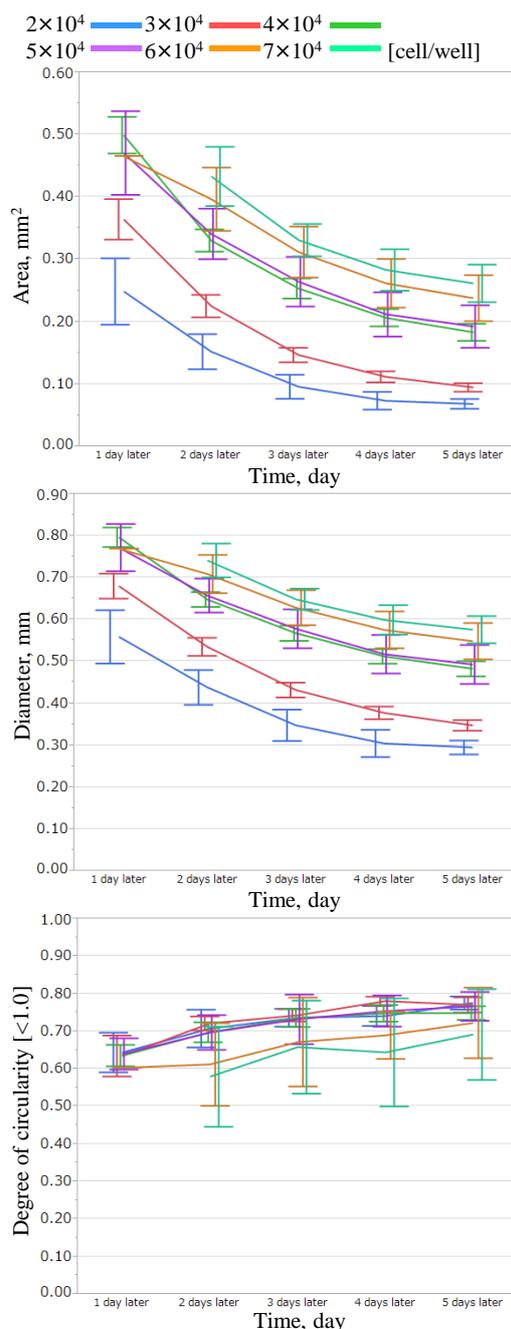


図2 経時変化に対する細胞凝集塊の変化

スフェロイド培養3日目が安定すると考えられたことから、3日目の円形度に対する直径について再プロットして考察した(図3)。

細胞の数が多くなるにつれ直径は大きくなり、円形度はばらつきが大きくなった。6×10⁴cell/well と 7×10⁴cell/well の細胞凝集塊については、特にばらつきが大きく、円形度が低いスフェロイドも認められた。これは、一定以上の細胞数では、凝集していかない可能性を示唆していると考えられた。本実験では、細胞数は4×10⁴ cell/well までが有効であると考えられた。

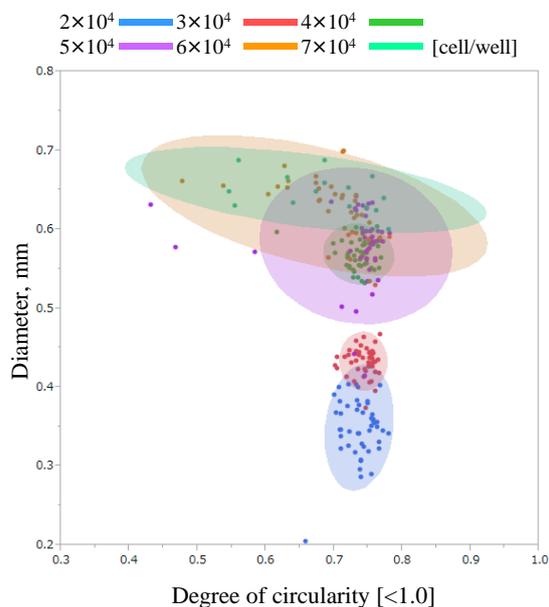


図3 細胞凝集塊の円形度と直径の関係

(2) 細胞凝集塊形成システムを用いた細胞凝集塊の作製と形成特性の考察

①細胞凝集塊形成システムを用いた細胞凝集塊の作製

細胞凝集塊形成システムのモーションは、技術技能員が作製する細胞凝集塊と同様の細胞凝集塊を得るために、技術技能員が行っているピペッティングによる細胞凝集塊の剥離、細胞懸濁液の攪拌および細胞を傷つけないような細胞播種のモーションを組込んだ。使用するピペットは、技術技能員は1×8チャンネルに対し、細胞凝集塊形成システムは2×2チャンネルだったが、細胞懸濁液の分注時間に差がないことを確認した。細胞凝集塊形成システムで作製した細胞凝集塊は、肉眼的ではあるが歪でない細胞凝集塊の作製を確認できた。播種してから5日間の経過観察をしたところ、時間の経過に伴い直径が小さくなり、細胞が活発に凝集していることが確認された。

②細胞凝集塊の形成特性

細胞凝集塊の円形度において、技術技能員が作製した細胞凝集塊と比較し、細胞凝集塊形成システムが作製した細胞凝集塊の方が有意に高い値を示した。技術技能員の経験により、細胞はダメージを受けると活発度が低下する。したがって、細胞凝集塊形成システムによるピペッティング動作、攪拌動作および細胞懸濁液を分注する際に気泡を発生さ

せないように、チップの先端を各ウェルの側面にあてて排出した動作などにより、細胞にダメージを与えずに細胞凝集塊を作製できたためだと考えられる。

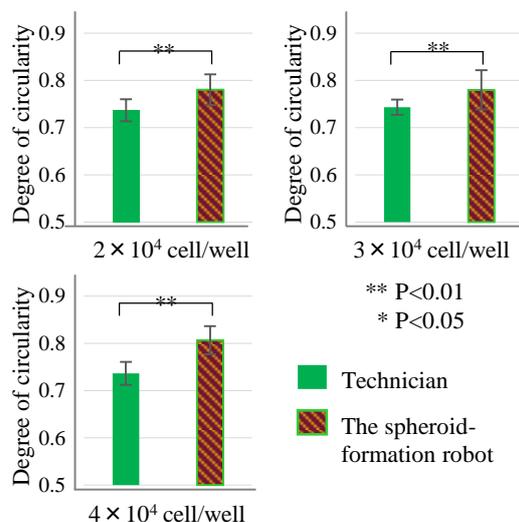


図4 技術技能員と細胞凝集塊形成システムが作製した細胞凝集塊の円形度の比較

以上のことから、円形度の高い細胞凝集塊を得るための細胞数の範囲が存在すること、細胞凝集塊形成システムを用いることで、技術技能員よりも細胞を傷つけずに細胞凝集塊の作製が可能であることが明らかとなった。今後、作製できる大きさの範囲で、細胞凝集塊の直径を任意に指定することで、細胞凝集塊の大きさを調整できるようにする計画である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計6件)

- ① 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, 2016年6月10日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ② 藤川眞麗恵, 下戸健, 石川篤, 日垣秀彦, 中山功一再生医療用細胞構造体のためのスフェロイド形成システムの開発, 日本機械学会学生会第47回卒業研究発表講演会, 2016年3月4日, 鹿児島工業高等専門学校(鹿児島県霧島市)
- ③ Fujikawa M, Shimoto T, Ishikawa A, Higaki H, Akieda S, Nakayama K, Matsuda S, Miura H, Iwamoto Y, Bio Rapid Prototyping Project: Influence of Passage Culture of Spheroids for Cells Construct, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (AP Biomech 2015), 2015年9月18日, Hokkaido University (Sapporo, Japan)
- ④ 下戸健, 松本友美, 山崎勇弥, 藤川眞麗恵, 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スフェロイド形成ロボットの開発, 日本機械学会 2015 年度年次大会, 2015 年 9 月 15 日, 北海道大学 (北海道札幌市)

- ⑤ Shimoto T, Ikebe S, Ishikawa A, Higaki H, Akieda S, Nakayama K, Shuichi Matsuda S, Miura H, Iwamoto Y, Bio rapid prototyping project: Evaluation of spheroid formation for cells construct, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering (WC2015), 2015 年 6 月 8 日, Tronto, (Canada)
- ⑥ 山崎勇弥, 藤川真麗恵, 松本友美, 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 2015, 2015 年 5 月 17 日, みやこめっせ, (京都府京都市)

[その他]

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

6. 研究組織

(1) 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