

培養工程における細胞増殖の定量化およびポテンシャル評価に関する研究

Study on quantification of cell growth the evaluation of cellular potential in cell culture process

○野口展士(電機大) 幡多徳彦(電機大フ) 野中一洋(McGowan Inst. Univ. Pittsburgh)

福井康裕(電機大) 舟久保昭夫(電機大)

Hiroo NOGUCHI, Yasuhiro Fukui, Akio Funakubo, Tokyo Denki University
Norihiko HATA, Frontier Research and Development Center, Tokyo Denki University
Kazuhiro NONAKA, McGowan institute, University of Pittsburgh

Abstract: An evaluation system for the management of cell culture process is required to noninvasively evaluate the cellular growth potential in the cell culture process. In this study, evaluation method was developed with measuring the cell behavior of observed individual cells at elapse time. The passage culture of HPASMC cells was shown that the ratio of individual cells with fast migration decreased with increased of culture passage. Cells in an early culture passage indicated the ratio with large projected area and the average projected area increased over time. Moreover, for quantification of cells growth potential, the cells migration flux was formulated as evaluation index, cells behavior were analyzed. The migration flux of individual cells decreased with decreased residual number of cell divisions. In conclusions, it was suggested that migration flux can be evaluated cellular potential to measure migration rate and projected area in cell culture process.

Key Words: Cell culture process, Passage culture, Cell behavior, Migration flux

1. 諸言

再生医療に用いる細胞組織の生産では、細胞組織の管理、品質評価のための培養プロセス評価技術が重要である。培養細胞は個々に異なる性質を有しており、運動機能についても異なる^{1,3)}。またこれらの性質は、培養の経過とともに変化し、用いる細胞により運動機能や寿命は細胞組織の形成プロセスでの細胞挙動において変化する^{1,3)}。そのため、組織形成プロセスにおける細胞挙動の評価は、非侵襲かつ定量的な評価手法と評価指標について検討する必要がある¹⁾。

本研究では、細胞から組織に至る培養中の細胞集団に着目し、培養工程での細胞挙動変化に基づいて定量化を行い、実計測に基づく細胞寿命の細胞増殖能評価と評価指標の策定を目的とした。

2. 実験方法

2-1. 培養条件

実験にはヒト肺静脈血管平滑筋細胞(HPASMC, 倉敷紡績株式会社, 4C1278)を用い、組織培養用12well plate(住友ベークライト株式会社)に 0.25×10^4 cells/cm²の濃度で接種した。同時に残りのHPASMC細胞は継代毎に凍結保存を行った。接種されたHPASMC細胞は温度37℃、5%CO₂の培養環境下において7日間培養を行った。この培養は、細胞増殖能が失われるまで継代培養を行った。

2-2. 細胞挙動観察

HPASMC細胞の培養工程を評価するため、リアルタイム培養細胞観察システム(CCM-1.4XYZ/CO₂, アステック社)を用い、温度37℃、5%CO₂の培養環境下において10間隔で7日間のタイムラプス撮影を行った。リアルタイム培養細胞観察システムにより取得した細胞画像において、撮影開始から12時間ごとに細胞画像内における細胞数を計測し、細胞密度を算出した($n=6$)。

培養細胞を非侵襲で評価するため、得られた細胞画像から二値化処理により細胞を検出した。次に細胞増殖による細胞挙動の影響を避けるため撮影開始24時間後における細胞画像から個別細胞の移動速度、細胞投影面積を算出した。また継代培養ごとに同様な観察を行い、継代培養における細胞挙動の定量評価および評価指標の策定を行った。また、策定した評価指標を評価するため、継代4, 6, 7, 8回で凍結したものを用いて同様の培養実験を行った。

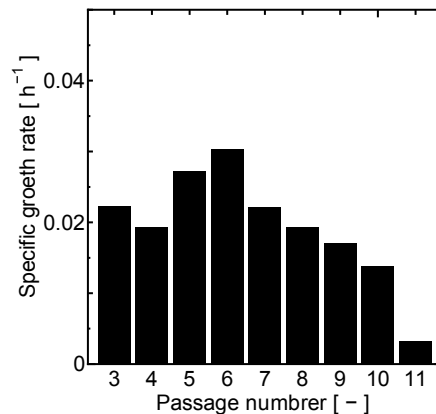


Fig. 1 Specific growth rate in each passage culture

3. 結果および考察

各継代培養における細胞増殖能について評価するため、細胞密度を計測し、各継代培養における比増殖速度を算出した。Fig. 1に各継代培養において増殖比増殖速度の最大値を示した。継代数の増加に伴い、比増殖速度は減少し増殖能が低下した。この結果より、継代11回目までを対象とし、各継代培養における細胞の移動速度および細胞投影面積を算出した。

Fig. 2に各継代培養における移動速度、Fig. 3に72 μm/hour以上の速度を示した細胞割合を示した。継代回数の増加によって平均移動速度は有意な傾向は確認されなかった。しかし、個別細胞の移動は、72 μm/hour以上の移動をする細胞割合が減少する傾向が確認された。Fig. 4に各継代培養における細胞投影面積、Fig. 5に30 μm²以上の面積を示した細胞面積割合を示した。この結果より平均細胞投影面積は継代回数に伴って増加し、また30 μm²以上の細胞割合も増加する傾向が確認された。

以上の結果から細胞寿命に対して細胞の移動速度は低下し、また投影面積は大きくなる傾向が示唆された。そこで細胞寿命を評価するため、(1)式を用いて残り分裂回数(N_{rd})を算出²⁾し、細胞挙動に基づく細胞寿命の新規評価指標として(2)式を用いて単位面積あたりの移動量を移動流束(I_a)として算出した。

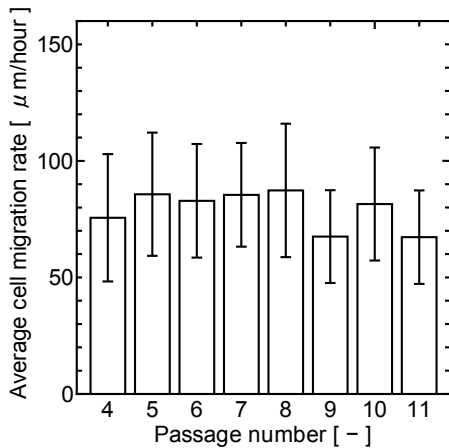


Fig.2 Average cell migration rate in each passage culture

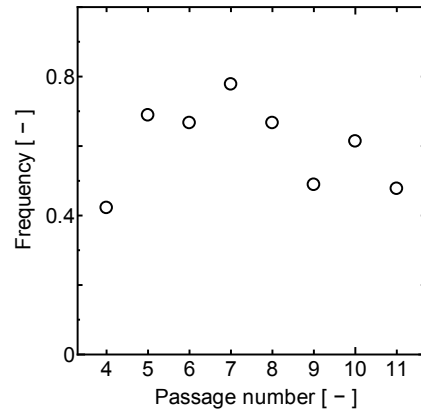


Fig.3 Frequency of cell at a migration rate over 72 μm/hour in each passage culture

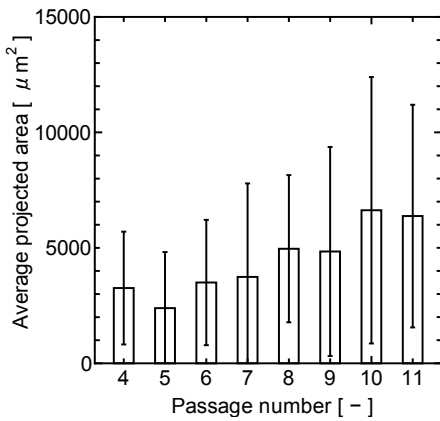


Fig.4 Average cell projective area in each passage culture

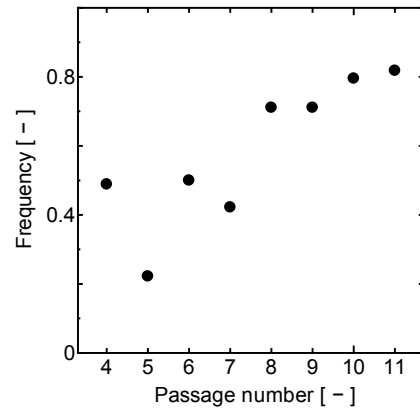


Fig.5 Frequency of cell at a projective area over 30 μm² in each passage culture

$$N_{Rd} = N_{Fd} - N_d \quad \dots\dots(1)$$

$$V_a = \frac{R}{A} \quad \dots\dots(2)$$

ここで、 N_{Rd} : 残り寿命[-], N_{Fd} : 最終累積細胞分裂回数[-] (= 28.36 [-]), N_d : 累積分裂回数[-], V_a : 移動流束 [$\mu\text{m}\cdot\text{hour}^{-1}$], V : 平均移動速度 [$\mu\text{m}/\text{hour}$], A : 平均投影面積 [μm^2]である。

残り寿命に対する移動流束を示した結果、移動流束は残り寿命の減少に対し指数的に減少することが確認され、高い相関を得た [Fig.6]. 評価指標について検討するため、継代4, 6, 7, 8回で凍結した細胞を用いて同様の培養実験を行った. この培養実験において累積分裂回数を算出し、またこれらの培養実験での最終分裂回数は、継代数4では34.0, 継代数6では21.8, 継代数7では18.4, 継代数8では10.4を示した. さらに、撮影開始24時間後の細胞画像に対し移動速度、投影面積を算出し、(2)式によって移動流束を算出後、得られた相関式を基にそれぞれの継代数での残り細胞寿命を算出した [Fig.6]. この結果より、継代数4で凍結された細胞は相関しないことが確認された. 初期の培養においては小さい面積を持つ細胞が多く、継代数4において継代操作中にセレクションがかかったことが考えられ、高い初期の細胞においては移動流束が飽和することが考えられる. この結果より凍結された細胞においても、移動流束はほぼ同等の相関が得られ、増殖能の減衰期にある細胞は、細胞寿命を評価することが可能であると示された.

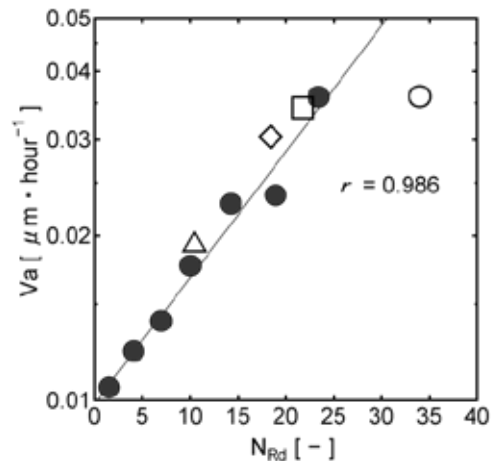


Fig.6 Migration flux for cell growth potential in each passage culture (●), migration flux of frozen cells at passage number 4 (○), passage number 6 (□), passage number 7 (◇), passage number 8 (△).

5. 結言

本研究では、細胞集団挙動を非侵襲的に定量化するため、細胞から組織に至る培養中の細胞集団に着目し、培養プロセスにおける個別細胞の寿命評価について検討を行った。

- 継代回数の増加に伴い、個別細胞の移動は、速い移動をする細胞割合が減少し、また細胞投影面積は増加し、また大きい細胞割合も増加する傾向が確認された。
- 新たに評価指標として移動流束を策定することで、残り細胞寿命の減少に対し、対数に対し直線的に減少することが示され、細胞寿命の定量評価が可能であることが示された。

以上より、細胞培養プロセスの評価ツール、細胞組織形成プロセスのシミュレーションシステム開発へ応用が可能ではないかと示唆された。

6. 謝辞

本研究の一部は平成 20～24 年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (S0801023) の研究費、および本研究の一部は平成 21～23 年度独立行政法人科学技術振興機構の産学イノベーション加速事業【戦略的イノベーション創出推進】の研究費によって支援されました。

7. 参考文献

- 1) 紀ノ岡正博, 田谷正仁:組織培養における細胞評価”, 最近の化学工学 56—先端医療における化学工学(化学工学会関東支部編),pp.79-97, 化学工業社, 東京, 2004.
- 2) 田畑泰彦, 岡野光夫 編集:ティッシュエンジニアリング 2006. 日本組織工学会 監修 日本医学館 2006: 189-194.
- 3) 野口展士, 幡多徳彦, 野中一洋, 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, 日本生体医工学会 Vol50(1):pp.149-154, 2012
- 4) R.Umegaki, K.Murai, M.Kino-oka, M.Taya : Correlation of Cellular Life Span with Growth Parameters Observed in Successive Cultures of Humean Keratinocytes, Journal of Bioscience and Bioengineering Vol.94, No.3, pp.231-236, 2002