

細胞画像インフォマティクスによる細胞品質評価法

加藤 竜司*・本多 裕之

「細胞の品質」は、長らく多くの研究者にとって触れてはいけないう不可侵領域であったと言える。昨日の細胞と、今日の細胞はどれほど違うのか？ 今回購入した細胞は、前回購入した細胞と同じなのか？ この答えを本気で探そうとすると誰もがうんざりし、研究は一步も進まなくなってしまう。しかし、20世紀初頭から続く「感覚的に品質が維持される細胞培養」のままでいいのだろうか？ このような「感覚」を「工業的実学」として技術的に昇華させることこそ、生物工学の得意なことではないのだろうか？ 筆者らはここに、次世代の細胞計測・評価技術の必要性を感じるものである。

細胞品質管理へのニーズの高まり

細胞という不安定な対象に対する品質管理のニーズは、細胞を用いた産業の発展とともに急増しつつある。

細胞の品質管理が特に強く求められる分野に再生医療がある。再生医療は患者の自己細胞を生体外で人工的に培養し、疾患の修復・治療に用いる歴史的にも新しい医療技術である。近年では、世界的にも多くの先端医療機関において治療用細胞を調製する施設が整備され、再生医療は多くの患者に提供され始めている。

再生医療は、医療としてさまざまな安全性基準を満たさなくてはならない。このような「安全性を担保する技術がなければどんな最新医療であっても治療に使えない」という現実が医学系研究者に浸透したことにより、いままでの細胞培養がいかに適当だったのか、ということが強く認識されつつある。現在国内では、従来の医薬品（化合物など）とは安定性が大きく異なる「細胞から成る医薬品」をいかに安全に生産管理できるか、という指針が産官学が丸一となって作られつつある。すなわち、今や「不安定な細胞であっても品質評価ができなければいけない」という時代であると言える。しかし、未だ経験に基づく細胞培養技術に支えられた再生医療分野では、まだ産業化の成功例がなく、細胞品質の計測・評価技術には大きな期待が寄せられている。

筆者らは、このような細胞を扱う産業化技術の一つとして、培養中の細胞画像を用いたインフォマティクス解析（多変量・統計解析）の有用性を提唱している。

細胞画像情報を用いた細胞品質評価の試み

細胞の品質を非破壊的に推察するための情報として、培養中の細胞の形が重要であることは経験的によく知ら

れており、細胞培養の手順書や教科書にも多くの記載が見られる。このため、経験的に用いられてきた細胞の形の情報から細胞品質が推定できれば、従来必要とされる細胞評価のための高コストで手間のかかる生化学的なアッセイを大幅に軽減できる可能性がある。

学術的には、核の形と癌転移の関連、細胞形と神経細胞分化度の関連、角化細胞の増殖度と形態の数式化など、細胞形態と細胞活性との関連性の解析は複数報告されている。高木らは、細胞の多角形度というパラメータや、位相差シフトレーザー顕微鏡などの非侵襲計測技術で測定された細胞の厚みの情報が、間葉系幹細胞の骨分化の度合いとの関係があることを先駆的に明示している¹⁾。紀ノ岡らは、細胞の二次元・三次元における静的・動的な変数を導入し、画像観察によって軟骨細胞などさまざまな細胞の品質評価を実証することで、産業応用のための自動培養システムへの道のりを明示している²⁾。

しかし、これまでの細胞画像での品質評価法の多くでは、(a) 正確な画像処理のため染色が必要となること、(b) 検証する形態指標の特定が恣意的であること、(c) 他群分類を行えていないこと、などの課題が残されていた。

非染色画像のための細胞情報処理

一般的に、画像処理のために染色が必要とされる最大の原因は、非染色の細胞画像（明視野や位相差）の画像処理が非常に難解であることに起因する。蛍光などで染色した細胞画像は、S/N比が高いだけでなく画像内の教師値を明確に特定できる。人間は、瞬時に画像全体を総合的に評価したり、想像力を働かせることによって、非染色の画像であってもどれが細胞であるかを判別している。しかし、画像処理アルゴリズムで画像中の細胞を判別するためには、「このピクセルは細胞である」「このピクセルはノイズである」という明確な答えが必要とされる。通常、非染色細胞培養画像は、感覚的にしか画像中の物体を規定できないため、画像処理だけの専門家では処理アルゴリズムを開発することができない。

筆者らは、観察画像の撮像品質を機器的に安定化することで撮影ノイズを減らし、細胞培養技術者としてさまざまな条件の画像を自前で準備・教師データ化しながら処理アルゴリズムを構築するによって、複数の細胞種（fibroblast, keratinocyte, epithelial cell, smooth muscle cell, myoblast, mesenchymal stem cell, chondrocyte, neural cell, sarcoma, melanocyte, induced pluripotent cell,

* 著者紹介 名古屋大学大学院工学研究科化学生物工学専攻（助教） E-mail: kato-r@nubio.nagoya-u.ac.jp

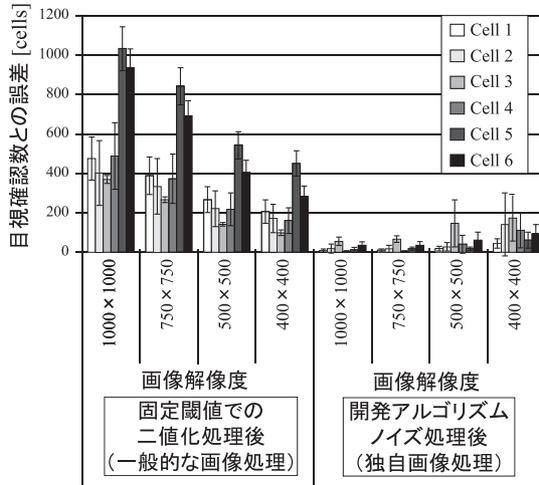


図1. 開発位相画像処理アルゴリズムの有効性

embryonic stem cell) にユニバーサルに適応できる画像処理アルゴリズムを構築することに成功している (図1).

細胞形態解析へのインフォマティクスの導入

細胞品質に相関する有効かつ安定な形態指標を発見することは、品質評価モデルの頑強性に直結する。研究者が恣意的に選んだ形態指標 (例: 長細さ) が細胞品質と相関を示すことは、研究者の感覚が優れていれば可能で

あり、多くの場合有効である。

しかし、産業化技術としての高い実用性を保証するためには「他の指標だともっといいのではないか?」、「なぜその指標がいいのか?」という可能性を追求する必要がある。すなわち、網羅的かつ客観的なパラメータ候補の探索の必要性である。これは、遺伝子解析が「研究者の注目する1~2遺伝子で説明しようとする」ものであったものが、「ゲノム上の全遺伝子をマイクロアレイ解析しなければ現象を理解できない」という形に変化したことと同様である。人間が思いつくだけで説明できる生命現象は非常に少ないのである。

このような網羅的な探索や、多数の変量 (パラメータ) の解釈には、生物統計や多変量解析というインフォマティクスの考え方の導入が重要となってくる。

細胞増殖率予測モデル

図2Aは、臨床患者10人 (29歳~72歳) から得た初代ヒト線維芽の継時的な位相差顕微鏡画像 (420枚) を用いて、14日後の細胞増殖率を予測する線形モデルの予測精度を示している。筆者らは、取得した画像中の全細胞に対して、23種類の形態指標の統計量 (平均、標準偏差) とその継時変化量 (全184項目) を説明変数として算出し、目的変数として14日後に実験的にカウントした細胞増殖率を予測する multiple regression analysis (MRA) を行った。

結果、MRAの最適モデル構築には、(a) 楕円形度の標

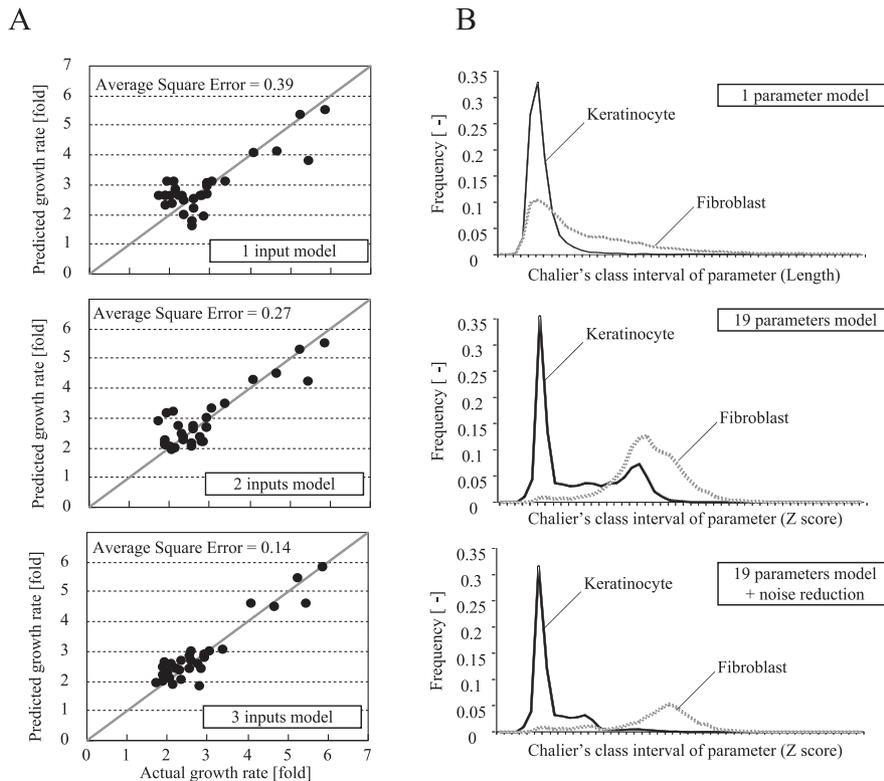


図2. 形態指標の網羅探索と組み合わせの効果. (A) 細胞増殖率予測モデル, (B) 混在異種細胞判別モデル.

準偏差の播種1日目→3日目の変化量, (b) 播種1日目の細胞数, (c) 播種3日目の内接円の大きさの標準偏差, という3変数が最適であることがわかった. 図2Aが示すように, 変数は単独より複数組み合わせの方が予測精度が向上することが明らかとなった. すなわち, 研究者が恣意的に当てた一つの指標よりも, 網羅探索して見つける「指標の組み合わせ」の方が品質予測には重要であることがわかる.

混在異種細胞判別モデル 図2Bは, 人工皮膚シートの品質管理モデルの一例として, 治療用の角化細胞中に混入してしまった線維芽細胞の割合を, 画像情報のみから予測する異種細胞判別モデルの例を示す.

筆者らは正常ヒト角化細胞に正常線維芽細胞を数パーセント混在させた共培養条件において, BioStation CT (ニコン) を用いて数百枚の位相差顕微鏡画像を取得した. 特に形に変化の現れた培養後開始後16時間目の角化細胞100%の画像と線維芽細胞100%の画像中から各々1800個(約30画像ずつ)の19種類の形態指標を説明変数として算出し, 目的変数として細胞の種類を分類できるかを判別分析にて検証した.

その結果, 形態指標のヒストグラムとして描画すると, 人間が2つの細胞を見分ける最大の形態特徴と考えられた「細胞の長さ」だけでは, 1つ1つの細胞を明確に分類することが不可能なことがわかった(図2B). これは, 細胞は増殖前・中・後などさまざまな状態のヘテロな集団であるため, 別な種類の細胞であっても同じ形をしている集団が常に存在してしまうためである. これに対して, 19指標を多変量として全投入した判別式を用いたモデルでは, Z Score (各サンプルデータの判別式との距離) によって両細胞のヒストグラムは明確に判別でき, 両細胞に誤認識される分画をノイズ除去すると, さらに明確に2群を判別できるようになることがわかった. すなわち, 形態指標を用いた品質評価では, 複合的なインフォマティクス解析が重要であることがわかる.

細胞品質分類モデル 図3は, 人為的に継代を連続的に繰り返した初代正常ヒト線維芽細胞の継時的位相差顕微鏡画像を用いて, 各細胞の品質(継代数ごとのダメージ度合い)を多群分類した結果を示す.

細胞の品質は, 多くの場合「1つの数字では表せない」複合的な状態を指すことが多い. つまりマーカーとして測定できる品質もあれば, さまざまなマーカー変化の複合点から総合的にしか評価できない品質もある. このため, 細胞品質の定性評価=状態のカテゴリ分類法は, 非常に利用範囲が広いと考えられる.

筆者らは初代ヒト正常線維芽細胞を強制的に連続継代し, 継代ごとの継時的画像(525枚)の画像中から, 15種類の形態指標の画像中の統計量(平均, 標準偏差)とその継時の変化量を説明変数として算出し, 目的変数と

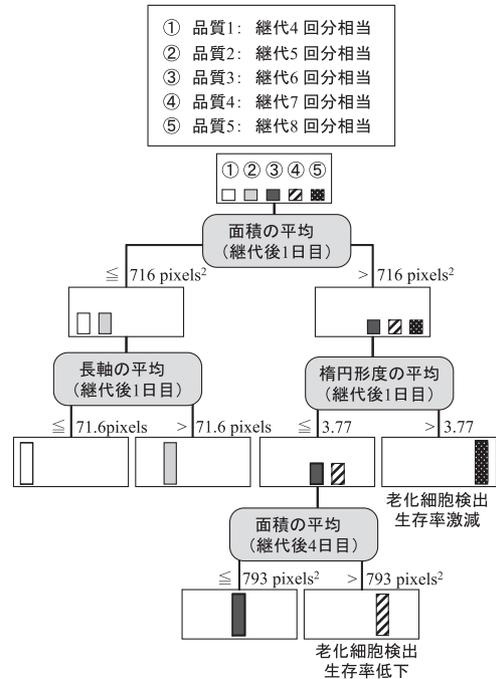


図3. 細胞品質の多群分類CARTモデル

して細胞の継代数(ダメージレベル)を予測する分類モデル CART (classification and regression trees) 解析の有効性を検証した.

結果, 各継代の細胞画像は形態的な差を持って明確にカテゴリー分類でき, 継代数が近ければ近縁に分類されることがわかった. また, 各分類には複数の形態指標を有効に組み合わせることが重要であることもわかった. 同時に測定した生細胞率, 老化細胞数, 細胞骨格量, テロメア活性などを総合的に評価すると, 継代7~8に相当する形態的特徴を持つ細胞は研究などに用いるべきではないことがわかった. すなわち, 「そろそろ継代数が増えてきた」という感覚ではなく, 各状態を画像だけで診断できる可能性が示唆された.

細胞の品質管理のための計測・評価技術の進歩は, 細胞関連科学の産業化には必要不可欠である. 本研究部会がより多くの生物工学研究者の研究推進の拠り所となることを祈念したい.

ここで紹介した研究は, 株式会社ニコンとの共同研究および, NEDO若手 Grant 09C46036a によって支援されたものである. また研究を遂行した研究室のメンバー(山本若菜, 名倉良英, 向山和博, 小島健児, 三輪明日香)に深く感謝したい.

文 献

1) Tokumitsu, A. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 499 (2010).
 2) Kino-oka, M. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 544 (2009).