

培養中の幹細胞品質評価： 画像を用いた評価技術とその貢献

加藤 竜司^{1*}・清田泰次郎²・備瀬 竜馬³

幹細胞科学の進歩は、ライフサイエンスに大きなパラダイムシフトをもたらしつつある。胚性幹細胞と体性幹細胞が切り開いてきた細胞応用の可能性や夢は、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell: iPS細胞）の提唱によって、現実のものとして我々の生活や科学に大きく引き寄せられたと言える。

事実、この10年の間に、再生医療や組織工学では幹細胞を利用することは定石となり、どんなラボからでも幹細胞の成果が生まれる土壌が育ちつつある。また、種差や病態モデルの限界が一つのボトルネックであった創薬分野においても、幹細胞がもたらす可能性は非常に大きく、製薬企業などの幹細胞分野への進出が進んでいる。そして、幹細胞培養技術の発展は、「限られた種類や数の中から仕方なく選ぶしかない製品」であった細胞を、「好きな種類を好きなだけ入手できる製品」へと近づけつつある。これは細胞の科学史においても、産業革命に近い劇的な変化と言えるのではないだろうか。この細胞に対するニーズの高まりに応えるには、本特集における「細胞を生産する工学技術」のさらなる発展は重要である。

幹細胞製品の品質

幹細胞を医療用・研究用の「製品」として大量生産しようとするとき、最終産物（幹細胞そのもの、またはこれを分化させた目的細胞）の品質管理は非常に重要である。

医療応用を想定するとき、細胞の品質は患者の安全性に直結するばかりか、治療効果の確実性や安定性をも大きく左右する。また、研究応用であっても、細胞の品質は実験・検証の成功や再現性に大きく起因する。

しかし現在、細胞の品質を規定する基準はまだ少なく、特に有効性に関する基準はきわめて少ない¹⁾。さらに未知なことがまだ多い幹細胞では、品質管理は基準・コンセプト・方法ともに発展途上である。

一方で、多くの幹細胞はラボレベルでは世界中で作製され、優れた研究成果に結びついている。このため、幹細胞の品質評価のヒントは、「今、どうやって細胞がメンテナンスされているのか」にあり、その技術化が重要だと言える。では、幹細胞培養を行うラボでは、どのよ

うに細胞品質のメンテナンスをしているのだろうか。答えは、分子生物学的な細胞評価と、経験的な細胞観察との併用である。このとき、明確な評価用マーカーがまだ数少ない幹細胞を維持培養する際、「毎日の顕微鏡観察」が世界共通の重要なスキルであることは、注目すべき事実だと言える。日々の細胞形態観察は、分化マーカーの標識化に勝る評価法だ、という声すら少なくないのである。

このため、近年実用化に向けて進む幹細胞培養技術では、観察（目利き）技術の自動化が品質管理の一つの方法として注目されている。本項では、国内で進む幹細胞の自動培養技術に採用されつつある細胞画像を用いた評価技術（＝目利きの自動化技術）について解説し、その技術と可能性についてまとめてみたい。

画像を用いた細胞の評価技術

「細胞の目利き」という視覚情報を用いた細胞評価スキルは、大きく3つの行動「目を向ける＝撮影」「見極める＝認識」「判断する＝評価」という工学技術の組合せであると捉えることができ、その要素技術の流れと連動性を理解することが重要だと言える（図1）。

1) 細胞に目を向ける（撮影） 細胞観察という作業

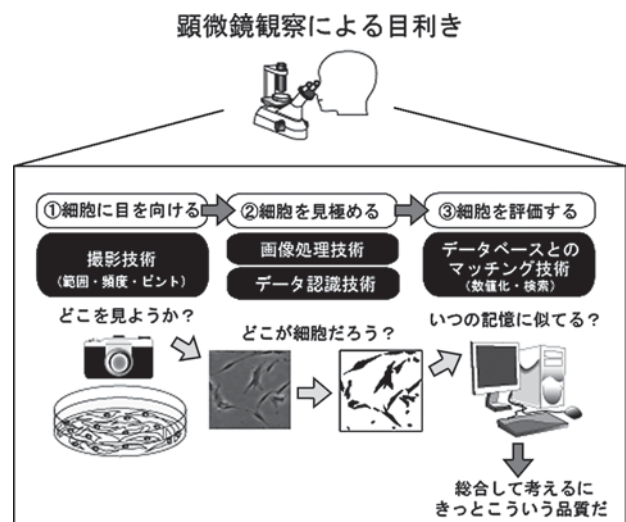


図1. 細胞の目利きの技術的解釈

*著者紹介 ¹名古屋大学大学院創薬科学研究科 (准教授) E-mail: kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp
²株式会社ニコン MS事業部 ³大日本印刷株式会社 ABセンター開発本部開発第5部

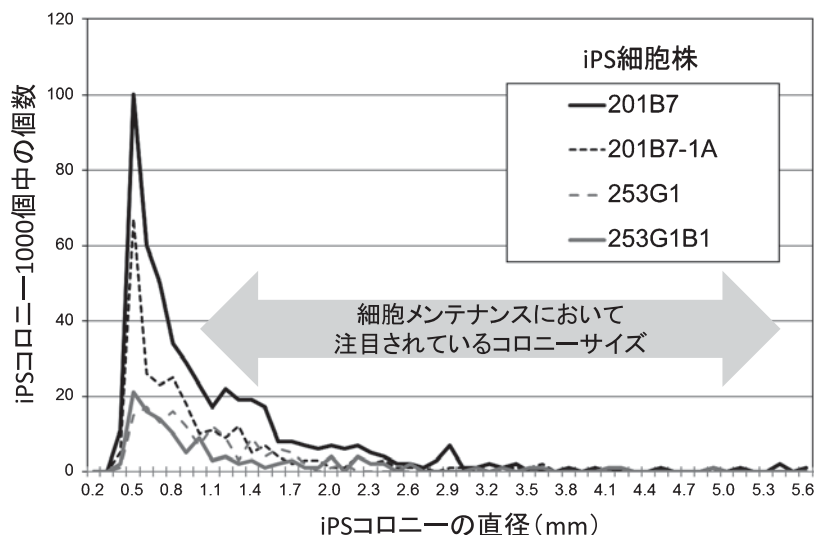


図2. iPS細胞コロニーのサイズ分布解析の例

は、顕微鏡の中の細胞に「目を向ける」ことからスタートする。工学的に考えると、これは「頻度（顕微鏡を覗く）」と「範囲（目を動かして見渡す）」および「ピント（焦点を合わせる）」という3つの動作設定を最適化した「撮影」である。

撮影の「頻度」と「範囲」の設定を、オートメーション装置の強みである「網羅性」でカバーする試みは、蛍光染色された細胞のハイコンテンツアナリシス (high content analysis: HCA) 研究で数多くの成功が報告されている。すべての視野と高頻度な画像撮影を行うHCAにおいて、画像情報は人智を遙かに超えている。そして、人間では記憶も処理もできないような膨大な細胞の情報を（時には1細胞レベルまで）解析することで、新しい発見が可能なことを数多くの研究が証明している²⁾。

同様なコンセプトのもと、大量の画像取得による「ライブセルイメージング」を可能にする装置が、細胞染色しない顕微鏡観察法でも出現しつつある。国内では、株式会社ニコンのBioStationシリーズ、コアフロント社のセルウォッチャー、株式会社ASTECのCCM-MULTI、PanasonicのMCOKシリーズ、SONYのCell Motion Imaging System、国外ではEssen BioScience社のIncuCyte、Cytemate Technologies BVのCytemateなど、従来の「細胞撮影」を、スナップショットからムービーへと進化させようとする装置が多く登場している。これは、従来の「ベストショットばかりを探す細胞撮影」というコンセプトを大きく変えるものであり、人が見落としていた深夜のイベント、培養容器内の包括的な変化、動画再生して初めてわかる細やかな細胞の挙動など、多

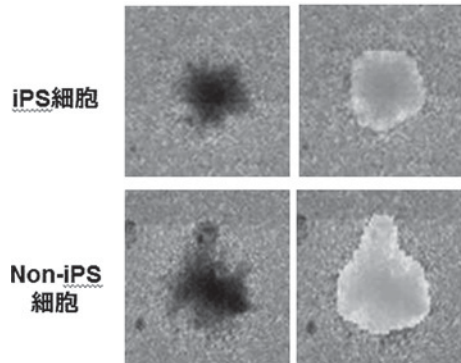
くの発見をもたらすパワーを持っている。

ただし、本来追求すべき撮影が前述の3つの動作設定を組み合わせ最適化されていることを忘れてはならない。そして特に重要なのは「ピント」である。蛍光染色した細胞画像を量産する場合と比べ、非染色な細胞の細胞画像は後述する画像処理が難しい。このため、「撮影した画像を後でどうするのか」を考えることなしにムービーを量産しても、「結局後で雰囲気しかわからないにもかかわらず、保管や管理が大変な情報」となってしまうリスクが高い。このため、オートフォーカスは、大量に撮影した画像を後で活用するためにきわめて重要な機能である。「細胞研究者が見たい細胞の様子」をいかに全画像で再現できるかによって、装置が人を超えられるかは大きく左右されてしまう。

筆者らは、株式会社ニコンの細胞培養観察装置BioStation CTを用いて、位相差顕微鏡で網羅的に撮影した細胞画像が、細胞品質の評価技術として有効であることを示してきている^{3,4)}。この装置は、最大30枚のプレートをストックを有するインキュベータと位相差顕微鏡、そして自動搬送システムから構成され、閉鎖された安定な撮影空間とオートフォーカス機能によって、人の「目を向ける」作業に近い網羅的な撮影を可能としている。さらに、スケジューリング機能による多サンプルの並列撮影は、人力を超える効率的な情報収集を可能にしている。細胞ごとにバラツキの多いサンプルの評価において、この「撮影の安定性」と「多検体評価」は、網羅性とともにより重要なものである。筆者らは本撮影システムを用いて、iPS細胞の培養を観察した結果、培養容器

画像解析ソフトウェア CL-Quant

(1) iPS細胞画像の数値化例



(2) iPS細胞コロニー認識例

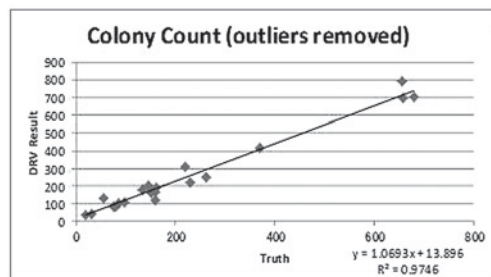
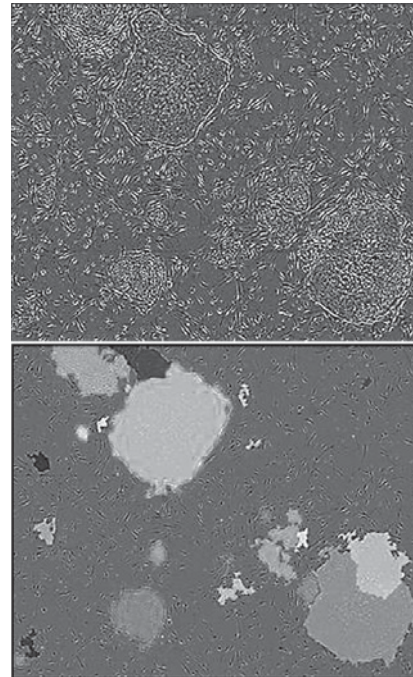


図3. iPS細胞の自動認識・解析例

の中には、通常細胞メンテナンスの対象となることが多いコロニーの他に、「見おとしてしまうほど小さいコロニー」がその数百倍もあることを突き止めることなどに成功している(図2)。これは、撮影技術によって、人間の観察以上の情報を細胞評価のために取得することができる可能性を示唆するものである。

2) 細胞を見極める(認識) 細胞を観察する(見る)ことは、実は前述の「目を向ける」行動とともに、「細胞を見極める」能力によって瞬時に達成されている。

細胞培養を行っている人間であれば、いとも簡単に、目の前にある視覚情報の中から、「これは細胞」「これは背景」「これはゴミ」という見極めを行うことができる。しかし、当たり前ではあるが、同じ視覚情報があっても「一回も細胞を扱ったことがない人間」には、この行動はできない。目の前にあるたくさんの粒々や線を細胞として認識できないのである。すなわち、「見極める」という行動は、「見極める行動」よりもさらに経験に支配されている。しかし厄介なことに、経験の多くは文字や数字として記述することが難しい。このため、細胞を見極める能力を、技術的達成目標として数式化・定義化することが難しいのである。このため、その技術は研究例が少なく、ゴールデンスタンダードはまだない。

工学的に考えると、「見極める」という行動は、「細胞を見つける」技術と、「細胞だと判断する」技術に分解できる。これは「画像処理技術」と「データ認識技術」に相当する。

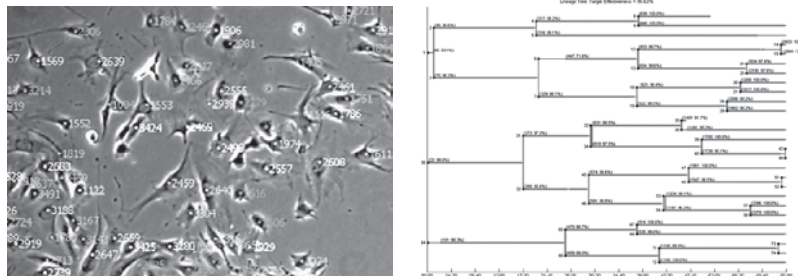
これまで多くの細胞画像の研究では、画像というシグナル情報の塊を扱うとき、シグナル・ノイズ比の高い蛍光染色画像や、二次元的特徴量や色素的特徴量の多い染色画像が用いられてきた。これらの画像は、画像処理技術的に「細胞を認識(=細胞と思われる画像中のエリアを定義)」することが容易なのである。しかし、医療用・研究用に製品として提供する細胞は、染色することが望ましくない。このため、新しい画像処理技術が求められているが、世界的にも、非染色の細胞画像において細胞を見極めるための画像処理技術は、まだ発展途上である。

筆者らは、ソフトマッチングと呼ばれる画像中の細胞の「画像テクスチャ情報(=輝度分布などの多次元情報)」を機械学習させる画像処理アルゴリズムを搭載した細胞画像解析ソフトウェアCL-Quantの開発を進め、「細胞を見つける」と「細胞だと判断する」という両方の作業を実装するに至っている(図3)。

また、備瀬らはカーネギーメロン大学の金出らとの共同開発によって、このような細胞を見極める画像処理技

1細胞トラッキング技術

(1) 1細胞トラッキングを応用した細胞系譜図



(2) iPS由来網膜色素上皮細胞の細胞移動度評価

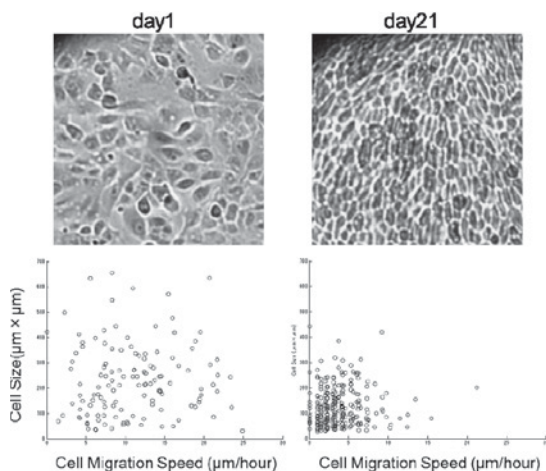


図4. 細胞トラッキング解析技術とその応用例

術を「1細胞ごとの細胞トラッキング」と「細胞系譜図の作成」という機能まで進化させている(図4)^{5,6)}。この技術は、培養細胞のタイムラプス画像から「個々の細胞がどこに移動したのか」「いつどの細胞が分裂したか」「いつどの細胞が細胞死を起こしたか」などの詳細プロフィールを評価結果として得ることができる。このようなトラッキングアルゴリズムは、JSTの戦略的イノベーション創出推進プログラム「網膜細胞移植医療に用いるヒトiPS細胞から移植細胞への分化誘導に係わる工程および品質管理技術の開発」の中で、現在もっともiPS細胞の臨床応用へと近いiPS由来網膜色素上皮(Retinal Pigment Epithelium: RPE)細胞の解析へと応用され、個別にトラッキングした細胞の遊走速度がRPE細胞の成熟マーカーの一つであるZO-1の染色結果と相関することを確認している(図4)。

このような1細胞レベルでの画像評価は、人が把握しきれない数の細胞の挙動を把握することで「細胞集団」という不均一かつ相互作用しあう集団の深い理解につな

がる可能性を示している。

3) 細胞を判断する(評価) 細胞培養者は、細胞を見た(目を向け、認識した)後、その細胞が今どんな状態か、また今後どうなるかを判断する。この総合行動が細胞の目利き(=品質評価)である。

まず、細胞培養の熟練者の頭の中には、膨大な量の「成功例」と「失敗例」が経験として蓄積されている。そして、日々の観察で得られた細胞の「見た目」という情報を元に、過去の「おなじような見た目」を思い起こすのである。また、単に見た目を思い起こすだけではなく、「そのときの事例(成功・失敗)」という紐付いた記憶までも呼び起こし、「あのときはこうだったから、今回もきっとこうである」という品質の推定を行っている。これは、技術的には「データベースとのマッチング情報処理技術」である。

画像のデータ化や情報処理は、実はたくさんの分野ですでに身の回りの技術として実用化されている。個人情報を守る指紋認証、高速道路での車のナンバープレート

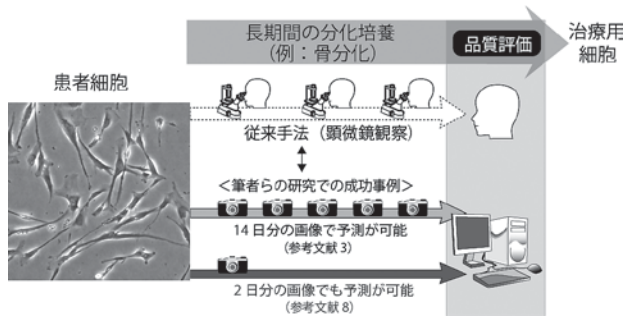


図5. 画像情報解析を用いた細胞品質予測のイメージ図

の解説，工場ライン上での痛んだ果物や欠陥製品の高速選別，デジタルカメラの笑顔認識，衛生画像からの物体特定，など実用例は数限りない。しかし，特に非染色な培養細胞においてこのような「画像のデータ化」を実現している例は非常に少ない。筆者らは，その理由は画像中の細胞が多様すぎるという生物学的な難しさ，非染色細胞に良い特徴量が少ないという画像的な難しさ，そして，上述の二つの技術との融合が難しいという実現プロセスの難しさに起因していると考察している。このため，筆者らは「撮影」「認識」「評価」の各技術の連動性を踏まえた開発を行うことで，2014年よりNEDO「再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システムの開発」に挑戦している。

筆者らは，これまで2011～2013NEDO「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発/ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」プロジェクトや共同研究を通じ，細胞画像の「数量データ化」を利用した「情報解析による品質判別・予測」に成功している(図5)。ヒト間葉系幹細胞では，培養開始後たった4日間の位相差顕微鏡による取得画像をデータとして活用するだけで，培養1か月後の骨，軟骨，脂肪への分化の度合いを定量的に予測できることを実証している⁴⁾。また，ヒトiPS細胞の未分化状態培養を観察した画像からは，未分化状態を維持したコロニーと，この状態を逸脱してしまったコロニーとの分類アルゴリズムを開発している⁷⁾。これらどちらの成功事例も，画像中の細胞の形を「多数の形のパラメータ」へと変換したデータと，「実験的に評価した実際の

品質データ」とをセットとして機械学習を行うという手法を用いている。

これはすなわち，細胞画像を効果的に数量的なデータとして変換・処理することができれば，身の回りにある画像処理技術の成功例のように，膨大なビッグデータの強みを活かして「人間には不可能な評価」を行うことさえも可能であることを示唆している。

結 言

細胞画像を用いた細胞評価は，幹細胞のサイエンスを切り開いてきた先陣の知恵と経験を活用し，目的とする細胞の計画的な生産という新しい産業へとつなげる挑戦である。本項を通じて，その技術コンセプトとその有効性，そしてその可能性をより多くの方々に共感して頂ければ幸いである。

謝 辞

本稿における成果の一部は，NEDO若手 Grant 09C46036a (2009～2013)，JST 戦略的イノベーション創出推進プログラム (2010～2013)，NEDO「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発/ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」(2011～2013)，NEDO「再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システムの開発」(2014)，科研費挑戦的萌芽 23650286 (2011～2013)，26630427 (2014)，野口遵研究助成金 (2014) の支援のもとで遂行した。この場を借りて感謝申し上げる。また，研究を支えて下さった名古屋大学大学院創薬科学研究科細胞分子情報学分野のみなさま，工学研究科本多研究室のみなさま，医薬基盤研究所の古江美保先生，木根原匡希様，柳原佳奈様，菅三佳様には深く御礼申し上げたい。

文 献

- 1) 畠賢一郎：生物工学，**88**，654 (2010)。
- 2) Carpenter, A. E. *et al.*: *Genome Biol.*, **7**, R100 (2006)。
- 3) Matsuoka, F. *et al.*: *PLoS One*, DOI:10.1371/journal.pone.0055082 (2013)。
- 4) Sasaki, H. *et al.*: *PLoS One*, DOI:10.1371/journal.pone.0093952 (2014)。
- 5) Bise, R. *et al.*: IEEE ISBI, (2011)。
- 6) 園井理恵ら：化学工学会第44回秋季大会要旨集 (2012)。
- 7) Matsumoto, M. *et al.*: *Proceedings of ISSCR* (2013)。
- 8) Matsuoka, F. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, DOI:10.1002/bit.25189 (2014)。