

画像情報解析を用いたiPS細胞培養における品質管理

加藤 竜司

はじめに

iPS(induced pluripotent stem)細胞という大きなブレークスルーは、細胞培養の有史以来、大きな課題であった体外培養可能な細胞の種類や数の限界を、限りなく取り払うことに成功しつつある。結果、我々はまるでサイエンスフィクションのように、必要とされるさまざまな種類の細胞を(原理的には)、どこでも、いつでも、どれだけでも調製することが可能な時代へと突入したのである。これは、細胞を医薬品や医療機器として用いる再生医療にとって大きな福音であるとともに、細胞を医薬品開発の重要な評価材料として用いる創薬開発においても大きな一歩である。

iPS細胞は、そのきわめて高い増殖能と多分化能から、細胞科学を広く支える根源的材料として、高い可能性を持っている。このため、幅広い応用に向けて、過去に例を見ない大量スケールによる工業生産が求められている。すなわち、「製品としての細胞」という規模および品質での製造が期待されている。このような製品工業化の実現には、常に「新しい工学」が必要とされる。

「生モノを製品として製造する工学」として、生物工学は歴史を刻んで来た。発酵の工業化をはじめとして、これまで多くの生物関連製品の工業化に生物工学という学理の発展は寄与してきた。本特集の監修を務められている大阪大学・紀ノ岡正博教授によって「細胞製造性=Cell Manufacturabilityの体系化」の重要性が提唱されているように、iPS細胞をはじめとする細胞製造の実現は、生物工学にとって新しい学理を開拓するための挑戦的フィールドと言える。本稿では、生物工学的視点に基づき、iPS細胞の細胞製造性実現に向けて、画像情報解析が寄与できる可能性について論じる。

細胞培養における工程の理解と数値化の重要性

細胞を製品として製造しようとする時、その工程は長く複雑であり、ブラックボックスに近い。また、細胞そのものの評価技術自体も、標準となるものはまだほとんどない。このような現状の中での細胞製造は、工学にとって大きなチャレンジである。

そもそも、細胞そのものは生モノであるため、工程は

途中で止められず、時間とともに細胞は変化していく。また、ヘテロな集団としての細胞は常にバラツキや変化を示すため、限られた計測で全貌を把握することは難しい。

このため、細胞では化学物質のように「同じになった(例：構造式が同じ)」と規定できる状態を作ることが難しい。これは、「同じモノが作れた!」と喜ぶことが難しいということでもあり、裏を返せば「同じモノができていない=良い製造だったのか、悪い製造だったのか、自信を持って言えない」という状況に追い込まれることでもある。さらに、細胞という製品品質に、どのような原因がどう影響しているか、その理解はまだ体系化されていない。

このように、確認や理解が難しい細胞の製造工程を管理するには、バイオ医薬品などで導入されているクオリティ・バイ・デザイン(Quality by Design: QbD)というコンセプトが重要ではないかと近年考えられている。これは、製品を「ちゃんと作れたかを確認する」よりも、「いつものように作れていることを毎回示す」ことで品質の管理と保証を行おうというコンセプトである。

このようなQbDを実現しようとするとき、培養工程を徹底的に数値化し、記述・記録・解析することは状況把握のための重要な第一歩である。培養工程の変化を数値的にモニタリングすることは、例え生じている現象のすべてが理解できていないとしても、各工程を記述するデータとなりえる。また、各工程の変動を定量的に分析し、生産物の品質と紐付けることができれば、プロセスを改善するヒントを得られる可能性が高い。

このような理解がこれまであまり進んでこなかった一因には、「培養中に製品のサンプリングや破壊試験ができない」という細胞ならではの難しさがある。筆者らは、このように細胞培養の途中経過を知る一つの手立てとして「培養中の細胞画像情報の解析」が有効であることを提唱してきている(図1, p. 339掲載)¹⁾。画像情報を用いれば、完全非破壊かつ経済的・効率的に状況を「垣間見る」ことができるからである。

顕微鏡などから得られる細胞画像からは、「細胞の形」や「細胞の変化(増殖具合など)」を知ることができる。特に細胞の形は、細胞培養の歴史が実証してきた重要な

モニタリング項目の一つであり、現在も世界中の細胞培養施設で日々の培養を支えるチェック項目でもある。

しかし一方で、これまで細胞の形の評価は「熟練者の経験」によって実現されてきた現実がある。形は定量的に計測・記録されることはなく、「長細い感じ」「ES (embryonic stem) 細胞のような形」のような暗黙知を含む表現が利用されてきていた。結果、その判断基準は数値化されておらず、標準化されていない。事実、どんな教科書や指導者に聞いても、「長さの閾値」「面積の閾値」「集団性の変動係数」などを数字で教えてはくれない。有名な熟練者にお伺いを立てて「良い」と言ったら「良い」などという基準や標準では、工業的に画像を活用することにはリスクがつかまとう。言い換えれば、画像情報をいかに計測・数値化・モデル化するかという点に、生物工学的研究要素がある。

iPS細胞コロニーの画像評価

iPS細胞は、製品としての大量製造を可能とする増殖能を有しているが、同時に培養の方法や手技の影響を受けやすいデリケートな細胞であることが知られる。特に、その培養中に発生する「未分化状態を逸脱してしまった細胞」は、多能性を品質として担保したい幹細胞製品において重大な品質逸脱となりえる。

iPS細胞は、2次元培養環境において通常コロニーを形成して増殖する。そのコロニーの形状（そして形成される様子）は、iPS細胞やES細胞などの多能性を有する細胞にとって、培養した細胞の状態を見極める重要なチェック項目の一つであった²⁾。

iPS細胞などのコロニーにおける「形の異常」とは、コロニーの輪郭の乱れや、コロニー内部の細胞の肥大化や不均質な様相、であると表現されることが多く、未分化マーカーの低下や分化マーカーの増大、または核型異常などと関連していることが知られていた。しかし、大量製造を目的とするiPS細胞の培養工程において、全コロニーの形態チェックを手動で行うには限界がある。

筆者らは、iPS細胞の位相差顕微鏡画像を用いた評価技術を、細胞の大量製造工程における品質管理に活用することを視野に入れ、①細胞品質の診断、②細胞培養工程の見える化、③細胞培養工程の評価、④細胞培養環境の評価、の4つの検証を行ったのでこれを紹介する。

iPS細胞品質の診断

iPS細胞コロニーの顕微鏡画像からは、画像処理的に多種多様な情報を抽出することができる。輝度という情報量を持つピクセルの草原である画像の中から、コロ

ニーが占める場所を特定する画像処理は、「コロニーの認識処理」と呼ばれる。コロニーの場所が特定されたとき、その面積、周囲長、縦横比などの「形態特徴量 (morphological parameters)」を算出することは容易である。すなわち、画像処理を行うと、培養容器内に存在する大量のコロニー集団全体について、人間の記憶力を遙かに超えた「形のプロファイル」を得ることができる。

一方で、写真を撮影したサンプルは生きているため、その後さらに分子生物学的な手法によって生体状態を実験的に評価することができる。コロニー単位、かつ、コロニー内におけるさまざまな局在までを評価するには、ハイコンテンツアナリシスなどで用いられる蛍光プローブ（抗体、レクチン、蛍光分子など）を用いた染色が強力である。蛍光画像の画像処理からは、コロニー集団全体について生物活性の定量データを得ることができる。

形態プロファイルという「見た目」に、免疫染色結果という「答え」を紐付けると、「データセット」が完成し、答えを予測するモデルの構築が可能となる（図2）。コンピュータを用いたモデル構築は、工学的には、多変量・高次元の情報の理解と制御に活用することができ、筆者らの細胞画像評価のコンセプトである³⁾。

しかし、筆者らは画像による品質診断の構築プロセスを詳細に検証することによって、この実現には重要なポイントが複数存在し、これらを徹底的に検証しなければ、「画像による品質診断」という理想のイメージの実現はきわめて難しいことをさまざまな例で報告している。単純に言えば、とにかく画像をモデルに放り込めば良い、というのではなく、画像診断のモデル化においても「プロセスが重要」である、ということである。

注意すべきポイントの一つに、恣意性の介在の問題がある。「画像処理」「モデル化」という言葉には、どこかコンピュータによる客観性が担保されているような響きがあるが、これは大きな間違いである。

多く見られるのが、画像処理を進める際に「理由はないが今回上手くいった」という理由で設定された閾値が複数採用されているケースである。「iPS細胞コロニーを認識した」と記述された解析が、実は勝手に「直径1 mm以上のコロニーだけに絞って数値化している」というようなケースは多々存在する。そのサイズ以下のコロニーは他の細胞に影響を及ぼさないのか、無視してよいのか、そこに根拠がなければ片手落ちである。筆者らは、認識精度の安定する約3細胞以上から構成されるコロニーを定量化し、できる限り広いサイズをカバーした容器内の全貌プロファイルを解析することが重要と考えている³⁾。

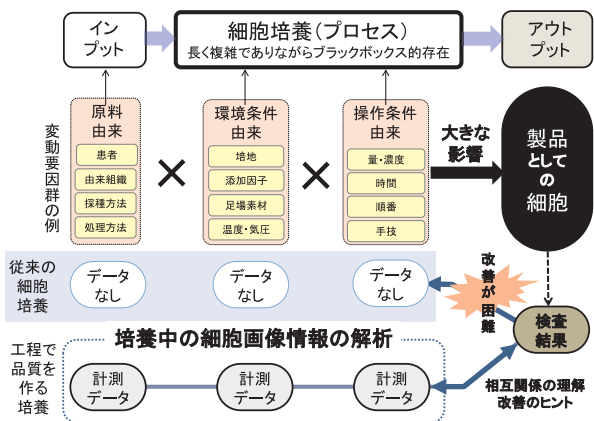


図1. 細胞製造における培養工程理解のための細胞画像情報解析

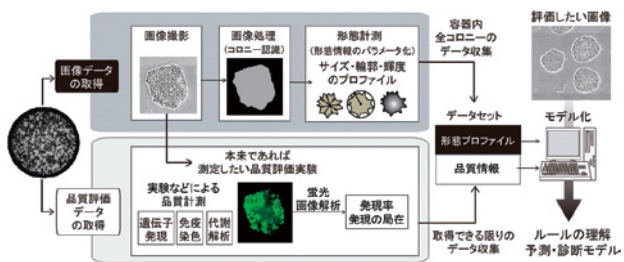


図2. iPS細胞コロニー画像情報解析と品質診断コンセプト

また、画像処理によって形態指標を計測することが客観的作業であるにも関わらず、その後、根拠なしに特定の指標だけを使って結果を分析するようなケースも多く見られる。たとえば、人間の都合で勝手に「4日目のiPS細胞の大きさ」で結果を分析する時には、4日目だけの偶然の結果ではないのか、それ以前・以降ではどうなのか、ということは闇の中である。この点、ライブ観察画像撮影を行えば、各タイムポイントの解析の「ロバスト性」をきちんと評価したうえで結果を考察することができる。また、指標を人間のフィーリングで勝手に選ぶことはきわめて勿体ない解析である。「大きさ」だけで説明できなかったことが、「大きさ」と「明るさ」の組合せでプロットすると明確化するようなことは多々存在する。また、「大きさ」よりも、培養日や実験者の違いの影響が乗りにくい形態指標がある場合も多々存在する。筆者らは、認識したコロニーの形状計測から得られる形態指標（丸さや大きさなどの多次元指標）を可能な限りすべて活用した「Fingerprint」として多変量解析を適応することが重要であることを示してきている。データ駆動型の解析としてコンピュータによるパラメータ選択などの解析を行えば、恣意性を極力排除した「最適な指標の組合せ」を得ることが可能であり、予測性能がロバ

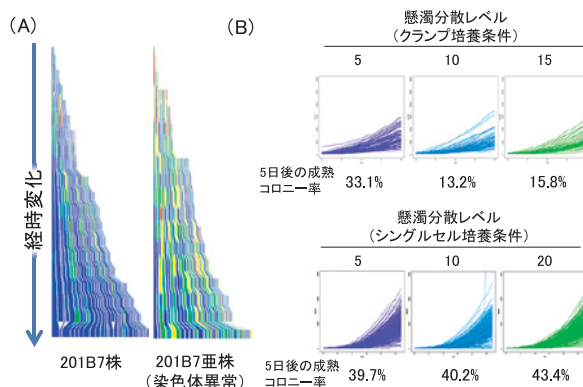


図3. iPS細胞コロニー画像解析事例。(A)コロニー形態の変遷と成長を示すFlow Plot。(B)コロニー集団の増殖曲線と工程の関係

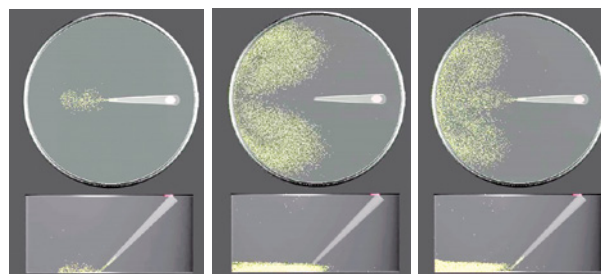


図4. 流体シミュレーションを活用したピペッティング挙動解析の例

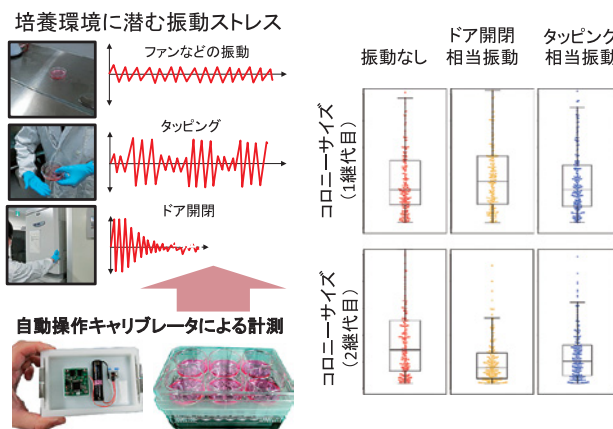


図5. 自動操作キャリアプレートと画像解析を組み合わせた環境因子の解析（コロニーサイズのバラツキ変化のBee swarm plot）

トであることが多い³⁾。このような恣意性に縛られない網羅的な細胞形態情報のモデル化研究の事例として、熊本大学の徳永和明博士・斉藤典子准教授による品質モデリングの研究事例は、特筆すべき画像診断解析の一つである⁴⁾。

もう一つの注意すべきポイントに、データセットのバリエーションの問題がある。モデル化（機械学習など）

を行う時に重要なのは、そのデータの量と質である。特に、筆者らがiPS細胞のモデル化を行う研究を進めた中で難しかったのは、現実問題を反映する集団バリエーションの確保である。iPS細胞に限らず、細胞は「同じ名前と呼ばれていても、集団としてはヘテロである」。どのような形のコロニーが、どのような比率で出現するのかを知らなければ、実際には良いデータセットを作ることとはとても難しい³⁾。例えて言えば、実際の培養容器の中に本当は100タイプのコロニーが存在しているのに、人間がタイプAとタイプBだけを選んで撮影しデータセットを作ったならば、どんなに優れたコンピュータであっても、AとB以外を判別することはできないのである。

実際のiPS細胞培養において、「製造現場で見落としたくないコロニー形状」とは、どのぐらい形状で、どのような頻度で顕れるのであろうか。近年、人工知能など優れた学習能力をもつモデルが出現し、iPS細胞の画像診断などにも用いられるような研究報告が現れつつある。しかし多くの場合、ここで診断のために準備されるiPS細胞の画像は、「培地がまったく異なる」「培養条件が異なる」「株が異なる」などの極端な例が含まれていることが多い。しかし実際に製造現場で出現するのは、「同じ培地で、丁寧にプロトコルに沿ったとしても顕れてしまうような異常」である。筆者らの検証では、培地交換をさぼった差で顕れるコロニーの異常さは、人間には大量に感じるが実際に計測してみると容器内の全コロニーの0.02%以下程度であった⁵⁾。つまり、「製造工程で本当に見分けたい形」を集めてデータセットとしてコンピュータを学習させるには、データ内のバリエーションに対する分析が重要である。

iPS細胞培養工程の見える化

細胞培養の工程を管理しようと考えるとき、画像を用いた評価の強みは、大きく二つある。第一は、バルクとしての平均値の把握ではなく、個々を数値化して集団性を理解できることである(特にiPS細胞はコロニーの平面方向での移動が少ないため、同じコロニーを経時的に連続して評価し続けやすい)。第二は、非破壊であることから、経時的な記録を何度も積み重ねることで結果の信頼性と十分な表現力が得られる点である。

筆者らは、AMEDプロジェクトにおける株式会社ニコンの共同研究において、集団のヘテロ性とその経時変化をモニタリングする手法として、Flow Plot評価法を開発している(図3A, p. 339掲載)。また、画像のトラッキング解析を用いると、培養ストレスに応じた細胞集団

の増殖変化プロファイルを把握することができることを確認している(図3B, p. 339掲載)。このような培養状態の見える化は、長期間にわたって慎重な作業が求められる製造現場において、容器の一部の細胞しか顕微鏡でチェックできていなかった作業者の「状況把握」や「トラブル検出」を手助けする支援技術となる可能性が高い。

iPS細胞培養工程の評価

前項で示したような「見える化」に活用できる細胞画像情報は、「画像の数値的記録」に他ならない。これは、当然ながら各種工程の設計時やトラブルシューティングにおいて、工程の違いや条件の影響を比較検証するための重要な評価データともなり得る。

iPS細胞の継代培養では、大量に培養した細胞を「シングルセル(もしくはこれに近い状態)」にピペッティングなどで懸濁分散し、さらなる拡大培養へと興じる工程が存在する。しかし、ピペッティングという操作はきわめて曖昧な操作であり、同じ回数であっても、人によってチップ先端の位置や、吸引吐出速度が変わると、細胞に生じるストレスは大きく異なり、「何が良いピペッティングなのか」は数値的に明確ではない。このため、このような操作を自動化しようとする場合、現在は人間の動きをそのままロボットに実装するアプローチが採られる。しかし、その人間の操作がベストなものなのか、もっと簡易かつ短時間の自動化で実現できる作業に落とし込めないのかはわからない。

筆者らは、電動ピペットで懸濁回数を揃えた実験を行い、「懸濁レベル」として手技を整理した場合、画像解析からどのような分析評価が行えるかを検証した(図3B)。大量のiPS細胞コロニーについての経時的増殖曲線を画像解析から数値化して分析した結果、一定以上のサイズのコロニーを最大収率で得られる懸濁レベルを特定できることがわかった。

このような「懸濁レベル」という数値は、本データでは特定のピペットでのみ与えられる条件でしかないが、チップの形状のCADデータを用いた流体シミュレーションを活用すると、その懸濁度合いの数値現象をより深く理解することができる。筆者らは、株式会社構造計画研究所との共同研究によって、粒子法を用いた流体シミュレーションソフトParticleworks(プロメテック・ソフトウェア株式会社)を用い、ピペットでの細胞懸濁液の挙動解析によって、汎用的な細胞懸濁分散の定量化が可能であることを報告している(図4, p. 339掲載)。

さらに、画像解析から得られたコロニーの経時的増殖データ(図3, p. 339掲載)を詳細に解析した結果、iPS

細胞201B7株では「播種後5日後に約3 mmへと成長するコロニー」のうち約90%以上は、播種後1日目にすでに一定のサイズを有しているという傾向を把握することができた。経験的には、大きくなりすぎたコロニーは未分化能を欠失しやすく、小さいすぎるコロニーはマーカー発現のパターンが一定サイズ以上のコロニーとは異なることが知られている。筆者らの結果は、このような初期に生まれたサイズの違いが最終収率に影響を及ぼしていることを数値的に明かにしており、「均一なサイズのコロニー」を最大収穫するためには、「培養初期のサイズの均一性が決め手となる」という、大量安定製造のためのヒントを与えてくれたと言える。

iPS細胞培養環境の評価

多くの場合、細胞培養の最適化を目指すときには、培養の制御・影響因子として「培地」「添加因子」「プロトコル」など、従来の細胞科学から得られた知見や培養技術を大きく変化させたポイントのみが注目・検証されることが多い。しかし、細胞製品製造を工業化するような場合では「従来では注意を払っていなかったようなこと」が、隠れた制御・影響因子となることが考えられる。

たとえば、「培養に使う容器の素材や硬さ」「培地の深さと通気環境」「インキュベータで調節するガスの成分」など、培養環境を支える機器や条件が、今後さらに規模や期間が拡大する細胞培養で今のままでよいのか、ということは誰も定量化していない。さらには、インキュベータやクリーンベンチ内でモーターから伝わる振動、容器を搬送するときの液流れ、などの物理的刺激までもが、実は隠れた因子である可能性は、近年のメカノバイオロジー研究からも示唆されるものである。

細胞が培養時に体験するこれら環境からの要因の影響は、培地やプロトコルの影響に比べると、ラボレベルで一過的に培養を行う時には無視できる程度のものである。しかし、工業的な大量培養を実現しようと考えるとき、その蓄積はラボレベルで想像されるものを遙かに超える。自動培養装置において「タッピング10回」とプログラミングすれば、装置は大量のセルバンクを製造するための継代において、これを無慈悲に繰り返す。すなわち、大量培養を実現する製造工程の設計だからこそ、細胞培養環境の定量化はより詳細に、厳密に検証する必要がある。このような影響の検出において、画像を用いた細胞の経時的観察は、わずかな変化を検出できる可能性が高い。

現在筆者らは、日本光電工業株式会社とのAMEDプロジェクトにおける共同開発において、同社の「自動操

作キャリブレーション」を用いた各種振動計測と、画像解析による微細な細胞の応答変化の解析に取り組んでいる。

細胞培養における操作において、細胞を培養容器から乖離するための「タッピング」や、インキュベータの「ドアの開閉」などが生ずる振動は、細胞の培養環境として「何度も繰り返して与えられるストレス」でもある。XYZの3軸加速度センサーが搭載された自動操作キャリブレーションを用いて、これら振動に相当するストレスを計測し、同様の振動を振動試験器により培養容器に長時間与える加速試験を行った。結果、タッピング・ドアの開閉に相当するストレスがどちらも継続的に容器に与えられたとき、継代を繰り返した後のiPS細胞コロニーの増殖能を低下させる可能性があることが示唆された(図5, p. 339掲載)。これは、想定としてあまり懸念されることが少ない機械的なストレスが、細胞品質に徐々に影響を及ぼす一つの例であると言える。

まとめ

細胞の画像から得られるさまざまな情報は、ブラックボックスであった細胞培養工程のより深い理解や、製品品質のモニタリングなどに活用できる可能性が高い。しかし同時に、そこには落とし穴も存在することを本稿では少し指摘した。細胞画像情報解析は、生物工学における新しいデータサイエンス分野であり、本稿が細胞製造用工学技術の発展に寄与するところがあれば幸いである。

謝辞

本稿における成果の一部は、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」、AMED「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」、科研費26630427の支援のもとで遂行されました。画像評価のための光学系・ソフトウェア開発では、株式会社ニコンの清田泰次郎様、魚住孝之様、紀伊宏昭様、和田陽一様に多大なるご協力を賜りました。流体解析では、名古屋大学創薬科学研究科・蟹江慧助教、構造計画研究所・山田剛史様、松岡毅様が中心となって開発が実現されました。細胞への振動影響評価のためのキャリブレーション開発と評価系構築は、名古屋大学創薬科学研究科・蟹江慧助教、酒井徹平氏、杉本礼子氏、日本光電工業株式会社・久保寛嗣様、牧野穂高様のご協力・ご尽力によるものです。この場を借りて深く感謝申し上げます。

文献

- 1) 加藤竜司：生物工学, **96**, 121 (2016).
- 2) Schwartz, S. D. *et al.*: *Lancet*, **379**, 713 (2012).
- 3) Kato, R. *et al.*: *Sci. Rep.*, **6**, 34009 (2016).
- 4) Tokunaga, K. *et al.*: *Sci. Rep.*, **4**, 6996 (2014).
- 5) Nagasaka, R. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 642 (2017).