

## 繊維性 Scaffold における個別細胞および集団細胞の挙動解析に関する研究

### Study on Behavior Analysis of Individual Cell and Cell Population on Fibrous Scaffold

○野中一洋(東京電機大), 野口展士(東京電機大院), 橋浦匠(東京電機大院), 古関洵也(東京電機大院), 幡多徳彦(東京電機大フロンティア共同研究センター), 矢口俊之(蔚山科学技術大), 福井康裕(東京電機大), 舟久保昭夫(東京電機大)

Kazuhiro NONAKA, Hiroo NOGUCHI, Takumi HASHIURA, Junya KOSEKI, Yasuhiro FUKUI and Akio FUNAKUBO,  
Graduate School of Tokyo Denki University

Norihiko HATA, Frontier Research and Development Center Tokyo Denki University

Toshiyuki YAGUCHI, Ulsan National Institute of Science and Technology

**Key words:** Scaffold, Cell Population Behavior, Analysis System, Particle Image Velocimetry

#### 1. 緒言

再生医療における自家細胞培養は、患者自身の細胞を原材料として用いることから、様々な感染症や免疫拒絶等の問題を解決することが可能であり、各患者に応じたテーラーメイド医療が実現し得ると考えられている。その一方で、生きた細胞から成る組織の生産工程を管理するためのシステム、定量的な計測に基づいた細胞組織の品質評価法や安全性評価法、治療の成否を評価する方法が未だ確立されていないのが現状である。一般的な培養組織の作製法のほとんどは熟練した操作者による手作業によるものであり、その操作基準は操作者の経験に大きく依存している。培養細胞および組織の生産工程の特徴として、患者ごとにあるいは採取部位ごとに細胞の活性や寿命が変化する。つまり、採取した原料である細胞は不均質な特性を有していることが挙げられる<sup>1)</sup>。また評価のために原料である細胞を消費することは、生産原理および原料の希少性から避ける必要がある。これらのことから、不均質な細胞から組織を安定的に生産するためには培養面における細胞挙動変化についての経時的な観察が必要であり、培養状況を常時モニタリングし、細胞組織の診断および変性を定量的、かつ非侵襲的に検出するシステム構築が望まれる。

一方で、個々の細胞は培養面となる足場(Scaffold)の構造によって接着性および増殖性等の運動形態が大きく変化すると報告がなされている<sup>2,3)</sup>。しかし、従来の評価法は培養過程における細胞の状況を計測したのではなく、また細胞を侵襲的に評価していることから、評価対象は廃棄せざるをえないといった問題がある。そこで我々は、これらの問題を解決すべく、細胞外マトリックスを模倣したナノ・マイクロスケールの繊維から成る Scaffold において、個々の細胞を追跡するシステムを構築し、細胞の移動速度、形態変化等の細胞挙動を定量的に評価することを可能とした。その結果、繊維径によって、個々の細胞の挙動が異なることを確認した<sup>4)</sup>。この結果をさらに発展させ、再生医療分野へ応用させるためには、個々に存在する細胞を解析すると同時に、群として運動する組織の挙動の規則性を抽出する必要がある。本研究では、組織再生に重要な線維芽細胞を用い、細胞から組織に至る培養中の集団細胞(細胞群)に着目し、異なる培養面における細胞群の運動形態を非侵襲的、かつ定量的に評価を行うことを目的とした。

細胞群挙動の評価手法として、流れの可視化技術の一つである粒子画像流速測定法(Particle Image Velocimetry: PIV)を用い、異なる培養面における細胞群の移動推移や細胞群内における個別細胞の挙動解析を行い、細胞群挙動の規則性の抽出を行ったので報告する。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 培養面となる Scaffold の構築

異なる培養面の評価として、繊維性の Scaffold を用いた。Scaffold の作製方法として、簡便にナノからマイクロスケールの繊維を紡糸することができ、高い再現性および均一性を有するエレクトロスピンニング法(Electrospinning, E.S 法)を用いた<sup>5)</sup>。また Scaffold を構築するための材料として、医療用材料として数多く用いられ、高耐久性および柔軟性を有するペレット状のセグメント化ポリウレタン (Segmented Polyurethane: SPU Mn=80,000 Mw= 160,000, NKY-26, UBE Industries, LTD)<sup>6)</sup>を用い、テトラヒドロフラン(Tetrahydrofuran: THF bp.65°C, 和光純薬工業株式会社)と N,N-ジメチルホルムアミド(N,N- dimethylformamide: DMF bp.153°C, 和光純薬工業株式会社)の混合溶媒を用いて SPU を溶解し、高分子溶液を調合した。

次に E.S 法にて、ナノスケールの繊維 (0.76±0.50μm, n-Scaffold) とマイクロスケールの繊維 (5.22±0.58μm, μ-Scaffold) を備えた 2 種類の繊維性 Scaffold をプレパラート (Microscope Cover Glass 22CIR-1D, Fisher Scientific, φ22mm) 上にそれぞれ構築した。また、比較するための Control として未処理のガラスプレパラートを用いた。Fig.1 に培養面の顕微鏡画像を示す。さらに Scaffold 構造を定量化するため、Scaffold の繊維面積率と繊維配向角の測定を行った。繊維面積率は、倒立顕微鏡により 4 倍レンズで撮影した Scaffold 画像から全体の画像を一定の閾値で二値化する固定閾値処理を施し、繊維部を抽出することで算出した。また繊維配向角は、顕微鏡画像から個々の繊維がフレームの Y 軸に対して何度で交差しているか、フレームの右上を 0°, 右下を 180°とし、全繊維の交差角を測定することで算出した。

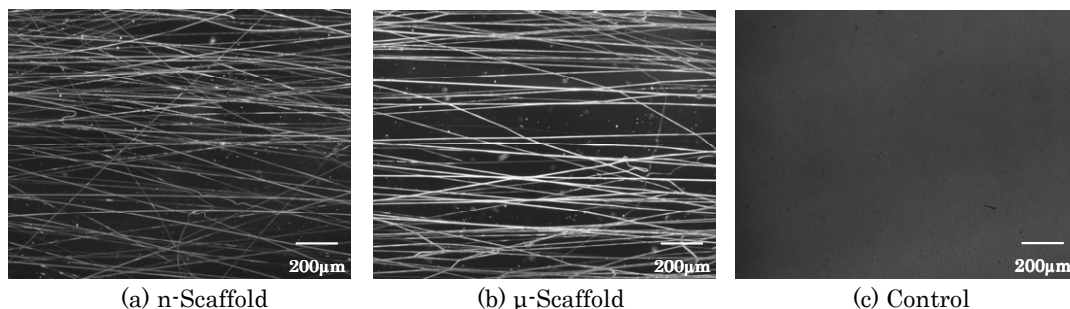


Fig.1 Microscope image of the scaffolds on the glass prepared slide.

## 2.2 細胞培養および細胞群挙動観察

作製した Scaffold(n-Scaffold,  $\mu$ -Scaffold, Control)をリン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH=7.4)で洗浄し、紫外線にて 24h 滅菌した後、*in vitro* 条件下による細胞群挙動観察を行った。実験にはマウス由来の線維芽細胞(NIH3T3)を用い、n-Scaffold,  $\mu$ -Scaffold および Control の 3 種類の培養面とした。培養液にはウシ胎児由来の血清 10%(FBS, Gibco 1017, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA)を含んだ Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)を用いた。

初めに n-Scaffold,  $\mu$ -Scaffold および Control のプレパラートをシャーレ(Falcon 353002, Becton, Dickinson and Company)表面に接着した。次にプレパラート中心上に蒸気滅菌済みガラス製四角筒(寸法 5mm×5mm, 厚さ 1mm)を組織培養用コラーゲンゲル (Cellmatrix Type I-A, 新田ゼラチン株式会社)で一時的に固定した<sup>7)</sup>。このガラス製四角筒内に NIH3T3 細胞を  $2.0 \times 10^4$  cells 播種し、温度 37°C, 湿度 100%, CO<sub>2</sub> 濃度 5.0% 一定に保ったインキュベータ内で培養を行った。培養 24h 後、四角筒内の細胞がコンフルエントになったのを確認した後、四角筒を取り外した。また、未接着のまま浮遊している細胞を PBS により、入念に洗浄および除去を行い、シャーレ内に培養液 2.0ml を注入し、小型インキュベータを搭載した倒立顕微鏡に設置した。

これらの工程を行うことにより、初期の細胞群の移動開始地点をプレパラート内 5mm×5mm の四角形部分に限定することができ、細胞群の挙動を明確に観察、計測することが可能となる。本実験では細胞群の辺縁部を測定開始地点とし、顕微鏡像を CMOS カメラによって、10 分間隔で 7 日間撮影を行った。

## 2.3 PIV による細胞群挙動の可視化および定量化

細胞群の増殖過程における細胞群の速度ベクトル解析を行うため、撮影した画像に対し、PIV の原理を応用した 2 次元流体解析ソフトウェア DIPP-FLOW (株式会社ディテクト社)を用いて細胞の進行方向(横軸方向)における細胞の移動推移および移動速度を算出した。

本解析手法は、参照領域における 2 時刻間の画像間での局所的な濃度パターンの類似性を検出することで、そのピーク位置から移動量・移動方向を求めることが可能である。初めに基準となる画像(時刻  $t$ )内に任意の格子計測範囲の輝度を測定した。次に比較の画像(時刻  $t+\Delta t$ )において格子計測範囲の輝度の類似度が最大になるような範囲の位置を検出し、格子計測範囲の移動量を決定した。これを粒子の平均移動量とすることで速度ベクトルを算出した。最後に PIV で求めた各格子計測範囲におけるベクトルの X 軸成分を抽出し、X 軸方向の各要素の平均を求めることにより、培養日数における細胞群の移動推移、細胞群内の個別細胞全体の平均移動速度を算出した。Table 1 に細胞移動量の解析条件を示す。

Table 1 Analysis condition of cell displacement using PIV

	Numerical value	
	X axis	Y axis
Reference frame size (pixel)	21	21
Mesh spacing (pixel)	19	19
Calculation mark of the vector	33	26
Processing range	639	511

## 3. 結果

### 3.1 Scaffold の繊維面積率および繊維配向性結果

Fig.2 に各 Scaffold の繊維配向分布を示す。また Table 2 に作製した Scaffold(n-Scaffold,  $\mu$ -Scaffold)の繊維径、繊維配向角および繊維面積率を示す。Fig.2 はフレーム内において、個々の繊維が Y 軸と交差する角度を示している。繊維配向分布図を見ると n-Scaffold,  $\mu$ -Scaffold と同じ角度付近でピークを示していることが確認された。また Table 2 より、平均繊維配向角は n-Scaffold が 88.87°,  $\mu$ -Scaffold が 95.37°となり、n-Scaffold,  $\mu$ -Scaffold とともに繊維が同方向に配列していることが確認された。またフレーム内における n-Scaffold の繊維面積率は 26.01%,  $\mu$ -Scaffold の繊維面積率は 27.24%となり、その誤差は 4.7%であった。繊維配向性および繊維面積率に差異は確認されなかったことから、繊維径の違いによる Scaffold 上での細胞群挙動に関して、定量的な評価が行うことを可能と判断した。

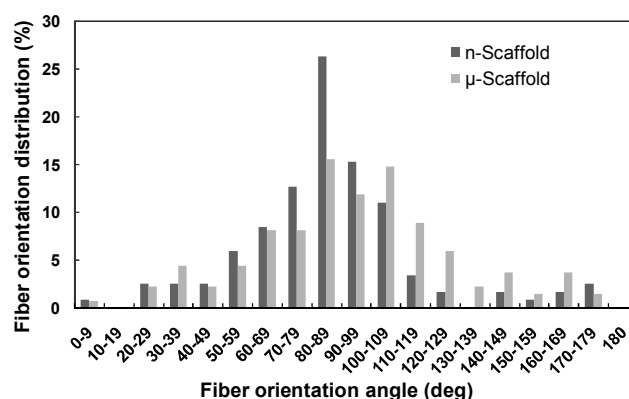


Fig. 2 Distribution chart of aligned electrospun fibers

Table 2 Fiber structure of n-Scaffold and  $\mu$ -Scaffold

	n-Scaffold	$\mu$ -Scaffold
Fiber diameter ( $\mu$ m)	0.76 $\pm$ 0.12	5.79 $\pm$ 0.46
Fiber area ratio (%)	26.01	27.24
Fiber orientation angle (deg)	88.87	95.37

### 3.2 細胞群挙動の可視化および細胞群挙動解析結果

Fig.3 に測定開始 5 日後の各培養面における細胞群の顕微鏡画像と 2 次元流体解析により算出した細胞群の移動方向と移動速度を表す速度ベクトル図を示す。Fig.4 に測定日数における細胞群の移動推移を示し、Fig.5 に測定開始 1 日後および 7 日後における細胞群内の個別細胞の平均移動速度を示す。

Fig.3 の 2 次元流体解析結果から、時間毎による細胞群における個別細胞の移動方向をベクトル化させることにより、ベクトルが多方向に表示されていることが確認された。Fig.4 において X 軸はフレームの実寸値であり、Y 軸は X 座標上における細胞群の運動割合を示している。細胞群の運動割合の推移結果より、時間経過に伴い細胞群の移動分布が変化していることが確認でき、細胞群における個別細胞が活発に運動している位置を抽出することが可能となった。またコンフルエント状態である測定開始 7 日後においても、移動分布が確認されたことから、コンフルエント状態においても細胞群が運動していることが確認された。Fig.5 より、測定 1 日後および 7 日後の個別細胞全体の平均移動速度は全ての培養面において約 30 $\mu$ m/h

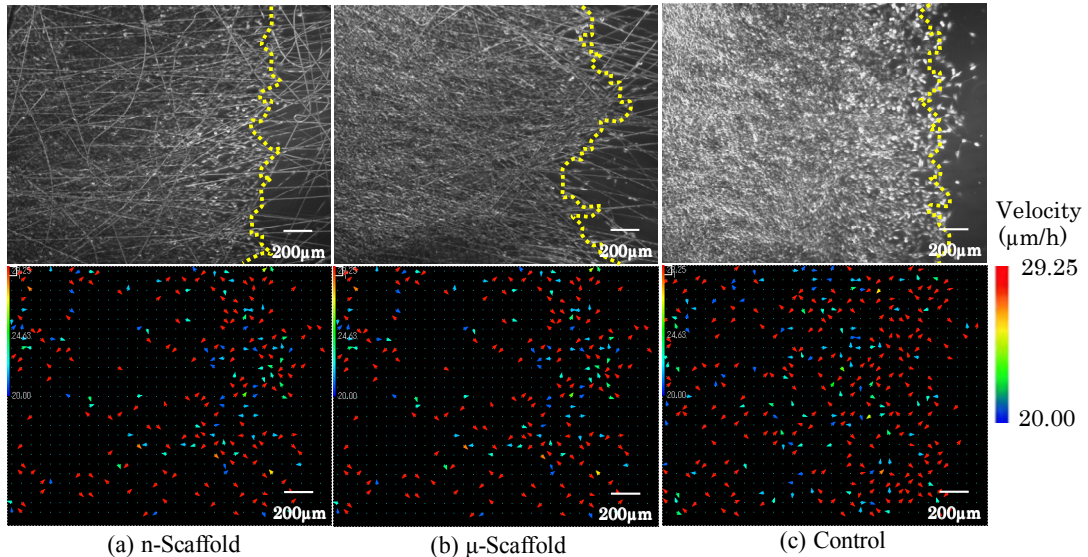


Fig. 3 Velocity vector diagram of cell population cultured for 5 days on culture surfaces

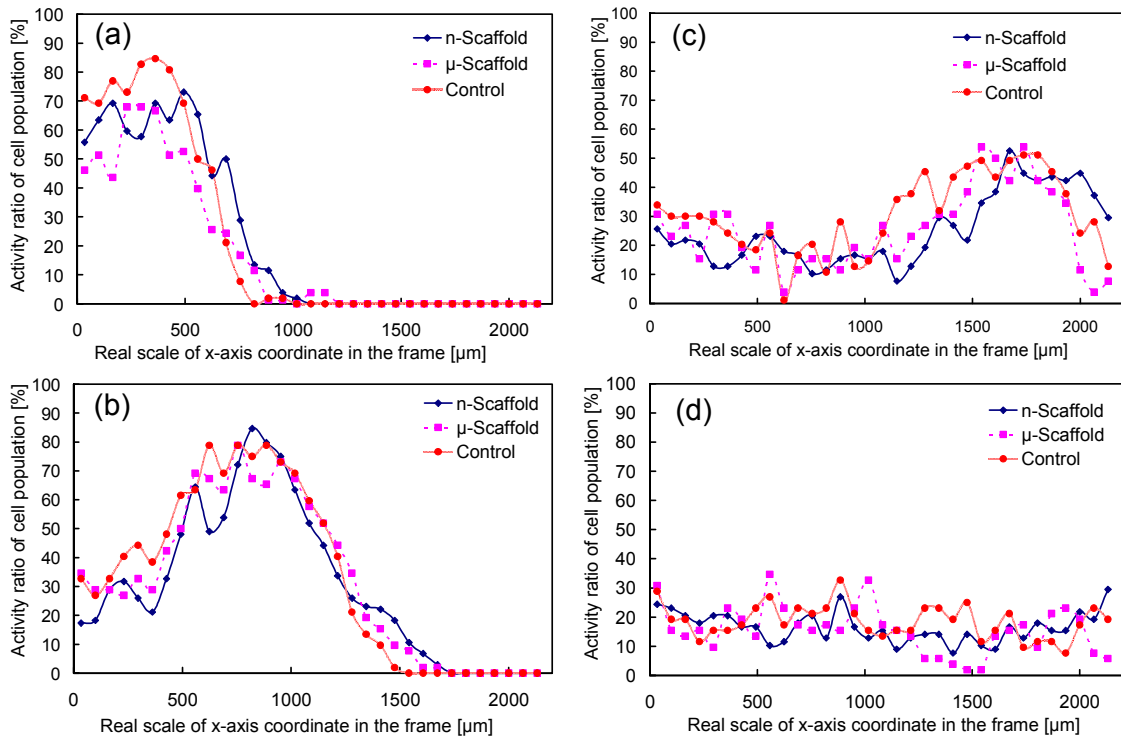


Fig.4 Transition of transfer rate in measurement (a) 1day, (b) 3days, (c) 5days, (d) 7days. (n=3)

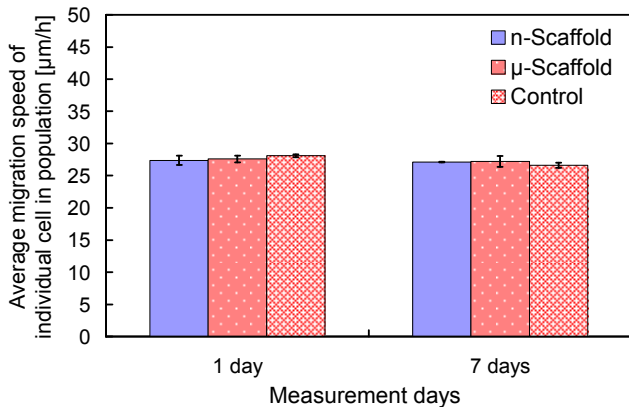


Fig.5 Average migration speed of individual cell in cell population for 7 days. Error bars show standard deviations. (n=3)

であり、7日間速度変化は現れなかった。そして細胞群内の個別細胞の平均移動速度は繊維径  $0.76 \pm 0.12 \sim 5.79 \pm 0.46 \mu\text{m}$  の範囲内において同程度であることが確認された。

#### 4. 考察

自家細胞培養によるテーラーメイド医療は患者自身の細胞を原材料として用いるため、患者から採取される細胞は希少であり、また患者間の個人差により、構築される組織の時間や培養条件が大きく異なる<sup>1)</sup>。従って効率的、かつ安定した組織再生を得るためには、培養面に対して細胞群の増殖過程を常時モニタリングし、細胞群における個別細胞の移動速度、移動方向および細胞分布等の様々な要素を定量的に計測することが求められる。また、生体組織はナノ・マイクロスケールの繊維により構成され、組織を維持しており、繊維径の違いによって細胞の接着性および伸展

性が変化する<sup>8)</sup>。そのため、繊維径の違いによる細胞群の挙動を非侵襲的、かつ定量的にリアルタイムで解析することが必要である。本研究では、異なる培養面に対する細胞群挙動を非侵襲的に定量化するため、流れの可視化技術の一つである PIV を用い、細胞群挙動の培養工程の計測および細胞群挙動の規則性の抽出を行った。

初めに PIV を用いた細胞群内の個別細胞の挙動解析に関して述べる。解析結果より、時間毎における細胞群挙動をベクトル化することで、細胞群の移動推移や細胞群における個別細胞の移動方向、移動速度等の様々な挙動を可視化および計測することが可能であった。そして移動および増殖過程の可視化により、細胞群内において中心部では細胞の運動が低下し、辺縁の細胞が培養面上を活発に移動している様子が確認された。PIV を応用した本システムにより、細胞群内の個別細胞の挙動を定量的、かつ非侵襲的に評価することが可能となった。従来の研究において個々の細胞に着目し、その運動形態をリアルタイムで計測することで細胞診断を行うことが可能であると既に報告がなされている<sup>9)</sup>。しかし、生体組織は細胞同士が複雑に結合し、様々な情報(シグナル伝達)を交換し合うことで機能および形態を維持している。そのため、個々の細胞に着目するだけでなく、細胞から組織に至る培養中の細胞群にも着目する必要がある。本研究により、提案した細胞群挙動解析システムは細胞群内の個別細胞を判別し、ミクロ的に個別細胞の速度ベクトルを導出すると同時に、マクロ的に細胞群としても移動推移を抽出することも可能とした。この新たな知見は細胞群の運動形態評価のみならず、今後の再生医療分野における治療方針の策定において重要な情報となると考えられる。また細胞組織のガン化兆候の早期検出や確率推定、細胞組織の安全性を評価する指標となる可能性もあり、安定した細胞組織を生産するための評価技術としても有用性があるものと考えられる。

次に培養面の違いによる細胞群内の個別細胞挙動の比較に関して述べる。時間の経過による細胞群の移動分布の推移は繊維径や繊維密度に関係なく、3種類の培養面とも同程度の数値を示した。また細胞群における個別細胞の移動速度は全ての培養面および7日間の測定期間において速度変化は現れず、その移動速度は約30 $\mu\text{m}/\text{h}$ で移動していることが確認された。この結果より、今回得られた Scaffold に対する細胞群の移動速度結果では、繊維径 0.76 $\pm$ 0.12 $\sim$ 5.79 $\pm$ 0.46 $\mu\text{m}$  の範囲内において細胞群の挙動は同程度であることが確認された。繊維径によって運動変化および速度変化が現れなかった要因として、以下のようなことが考えられる。

細胞の特性としてナノ・マイクロスケールの微細な繊維に沿って活発に分裂・増殖を繰り返すコンタクトガイダンスと呼ばれる本能的性質を備えている<sup>10)</sup>。しかし、細胞が集団で存在する細胞群の場合、分裂した全ての細胞は繊維に対して直線的に進むだけでなく、他の細胞とネットワークを築くために細胞間コミュニケーションを図っていると推測される。従って、細胞群内の個別細胞は繊維に接触すると同時に、周辺の細胞と連携しあいながら移動および増殖を行っていると考えられる。このことから、繊維径の違いに関わらず、細胞群の移動推移および個別細胞の移動速度が同程度であり、細胞群の移動速度は Scaffold を構成する繊維径に依存しないと示唆された。

今回の実験では繊維径の違いのみに関して言及したが、本実験において使用したガラスプレパレート表面は繊維密度が非常に小さく、ガラス上に接着している細胞は繊維に接着している細胞よりも多く存在している。そのため、ガラス上の細胞の影響が大きく作用している可能性が高く、変化が現れなかった可能性も考えられる。従って、より厳密な評価を行うためには、全ての細胞が繊

維に接着するのに十分な繊維密度、かつ等間隔に繊維が配向した Scaffold を用いて評価を行う必要があると示唆された。また今回の実験では検討を行っていないが、生体の細胞外マトリクスと同等の数ナノスケールの繊維径や数十マイクロスケールの繊維径、繊維密度変化等を新たなパラメータとして加えることで、細胞群内における個別細胞の移動および増殖の促進、抑制を制御させることも可能性として考えられるため、今後十分に検討する必要がある。

## 5. 結論

本研究では、細胞群挙動を非侵襲的に定量化するため、新たなリアルタイム解析システムを考案し、検討を行った。PIV を用いた流体解析を細胞群の挙動解析に応用することにより、細胞群内における個別の細胞挙動を可視化および定量化することが可能となった。この機能により、異なる培養面における細胞群の非侵襲的な計測やその規則性を抽出することに成功した。今後、効率良く、かつ迅速な細胞増殖を誘導する Scaffold 構造を解明すべく、さらに詳細かつ広範な条件に対し、検討を行っていく。

## 謝辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金(萌芽研究 課題番号 15650100, 萌芽研究 課題番号 18650127, 若手研究(B), 課題番号 19700409), および東京電機大学フロンティア共同研究センター(私立大学戦略的研究基盤形成支援事業)の研究費補助金を受けて行われた。

## 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) Kwon IK, Kidoaki S, Matsuda T: Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials* 2005; 26: 3929-3939.
- 3) Xu CY, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S: Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials*. 2004; 25(5):877-886.
- 4) 舟久保昭夫, 矢口俊之, 福井康裕: 再生医療への応用を目指した人工 Scaffold における細胞運動の画像解析.(社)精密工学会 画像応用技術専門委員会研究会報告, 2008; 22(5): 10-14.
- 5) Kidoaki S, Kwon IK, Matsuda T: Mesoscopic spatial designs of nano- and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. *Biomaterials*. 2005; 26: 37-46.
- 6) Yaguchi T, Funakubo A, Okoshi T, Noishiki Y, Fukui Y: Fabrication of small-diameter polyurethane vascular grafts with microporous structure. *J Artif Organs* 2002; 5: 117-122.
- 7) 矢口俊之, 野中一洋, 舟久保昭夫, 福井康裕: 繊維性基材の構造が細胞の移動距離に与える影響. *ライフサポート* 2008; 20(4): 3-8.
- 8) Tian F, Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Khademhosseini A, Yokoyama Y, Estrada GG, Kobayashi H: Quantitative analysis of cell adhesion on aligned micro- and nanofibers. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 84(2): 291-299.
- 9) 丹生智史, 松田武久, 岡隆宏: 血管内膜形成の材料依存性—in vitro における細胞行動からの検討—。人工臓器, 1991; 20(2): 438-444.
- 10) 野一色泰晴: 超極細繊維の医用材料への応用. *人工臓器* 1988; 17: 1586-1592.