

細胞増殖評価のための培養工程シミュレーションシステムの開発

Culture process simulation for cell proliferation

○木内裕紀 (電機大) 野口展士 (電機大) 幡多徳彦 (電機大) 荒船龍彦 (電機大)
野中一洋 (McGowan Inst. Univ. Pittsburgh) 福井康裕 (電機大) 舟久保昭夫 (電機大)

Hiroki KIUCHI, Hiroo NOGUCHI, Norihiko HATA, Tatsuhiko ARAFUNE,

Yasuhiro FUKUI, Akio FUNAKUBO, Tokyo Denki University

Kazuhiro NONAKA, McGowan institute, University of Pittsburgh

Abstract: In fabrication cell tissue by using a large amount of cultured autologous, cell culture process is difficult to evaluate of culture time required and quality of cell. This research aimed at the development of a simulation system that was able to forecast the cell culture process. Two kind of simulation system, include the system with cell proliferation (concentration, doubling time) and the system with cell behavior (migration, shape, roundness) were developed for cell culture process evaluation. For a comparison purpose, mouse vascular endothelial cells (UV♀2, RCB1994) inoculated at 1.8×10^4 , 1.5×10^4 , 1.0×10^4 cells/cm² was captured every 10 minutes for 96 hours. Cell concentration in the captured cell images was measured by using image processing. The relation actual measured value and simulation value was shown highly correlation. In conclusion, it was suggest that developed simulation system was able to forecast the cell culture process.

Key Words: Cell proliferation, Cell culture process, Simulation

1. 諸言

現在、再生医療における自家培養は患者から直接採取した細胞を用いる。採取した細胞を使用可能な組織とする培養工程において、培養面が特異的で複雑な足場構造を有する場合の観察や評価、または培養面上における細胞挙動の可視化を評価することが困難である。そのため、細胞組織の構築工程を把握し、シミュレーションすることのできるシステムの開発が求められている。

本研究では、細胞の増殖を定量化によって、細胞数の経時変化を予測・算出する方法と、細胞の経時的な移動や成長を考慮し、細胞数の経時変化を予測・算出する方法でのシミュレーションを作成した。そして、それぞれを実際の培養工程と比較・検討することを目的とした。

2. 実験方法

2-1. シミュレーション作成条件

細胞の継時的な観察を模擬するため、観察視野を模擬した2次元配列のサイズを指定した。その配列内に細胞を模擬したデータを挿入し、データのある配列を1プロットとし、これをシミュレーションにおける細胞と定義した。

シミュレーションを作成するうえで細胞の移動と増殖に着目し、これを模擬する方法を2通り作成した。

一つは継時的な細胞密度の変化に着目し、これを時間の変化により算出できる式を求めることで、培養工程中における継時的な細胞増殖を模擬した¹⁾。また細胞の移動を模擬するため算出された細胞数分のプロットを配列内にランダムに行うことにより移動を模擬した。

またもう一つは移動に着目し、1プロットの周囲においてまだデータの存在していないプロットを検索し、条件にあうプロットに対してデータの移動を行うことで細胞の移動の模擬を行った。増殖に関しては、1プロットに対して細胞の形状を模擬するデータを与え、そのデータを変化させた。一定の値になった時にそのプロットの周囲においてデータの無いプロットを検索し、条件にあうプロットに対して新しいデータを与えることで、細胞増殖を模擬した。

作成したそれぞれの方法は、共通して移動・増殖計算が終了したのち、配列内のプロット数を計測し、細胞数の計測を模擬した。移動・増殖計算からプロット数の計測までを1ループとし、この1ループを実際の1時間と仮定することで継時的な細胞増殖を模擬した。

2-2. 培養実験

マウス血管内皮腫様細胞(UV♀2)を 1.8×10^4 , 1.5×10^4 , 1.0×10^4 cells/cm² のそれぞれ異なる濃度で細胞培養用シャーレφ60mm(住友ベークライト社製)に播種した。培養条件をTable1として示した。

そしてTable1に示した条件において培養した細胞にCMOSカメラ付位相差顕微鏡を用い10分間隔で96時間のタイムラプス撮影を行った。撮影した細胞画像は、画像処理を用いた細胞数を計測するツールを用いて細胞数を計測し、視野内における細胞密度を測定した。測定した結果を用いてシミュレーションに用いる細胞の増殖曲線を作製した。また実際の培養工程における継時的な細胞密度の変化とシミュレーション結果による細胞密度の変化とを比較検討を行った。

Table 1 Culture conditions

	Mouse vascular endothelial cell line (UV♀2, RCB1994)
Cell line	Mouse vascular endothelial cell line (UV♀2, RCB1994)
Culture vessel	60mm dish for tissue culture
Temperature	37 °C
Aeration	5% CO ₂ in air
Inoculate conc.	1.8×10^4 cells / cm ² 1.5×10^4 cells / cm ² 1.0×10^4 cells / cm ²
Medium	Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum

3. 結果および考察

観察を行った異なる細胞密度毎の細胞増殖曲線を Fig. 1 として示した。また播種濃度 1.0×10^4 cells/cm² に着目し、この増殖曲線に対して継時的な細胞の倍加時間 (T_d) を算出した。その結果を Fig. 2 として示した。Fig. 2 の結果から細胞増殖は倍加時間に着目することにより算出することが示唆された。この倍加時間を基に時間ごとの細胞密度を算出するシミュレーションの作成を行った。

作成したシミュレーションの検討を行うために、撮影した実際の培養工程を動画にし、シミュレーションの結果となる動画と比較を行った。比較した結果、実際の培養工程に近似したシミュレーション結果を確認することができた。

作成したシミュレーションに対して定量的な評価を行うために、実際の培養工程中における細胞密度の変化の測定を行いシミュレーションにより求めた細胞密度の変化との比較を行った。結果を Fig. 3 として示した。シミュレーションの結果はどちらも高い相関を有することが確認できた。

また移動・増殖を模擬したシミュレーションに関して、初期播種濃度を变化させた時の実測値との比較を行った。結果を Fig. 4 として示した。結果としてシミュレーションと実測値の間に初期播種濃度が変化しても高い相関を有することができた。

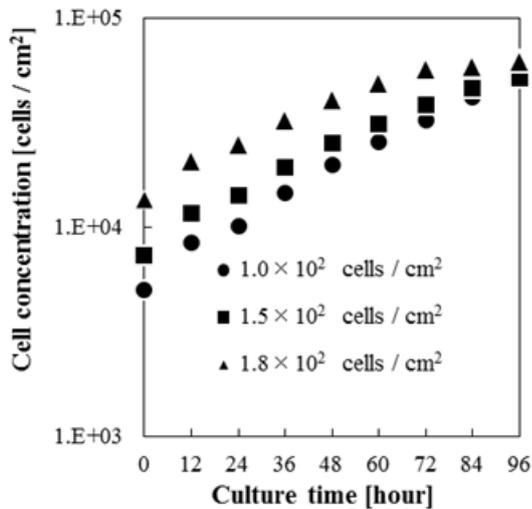


Fig. 1 Cell Growth Curve

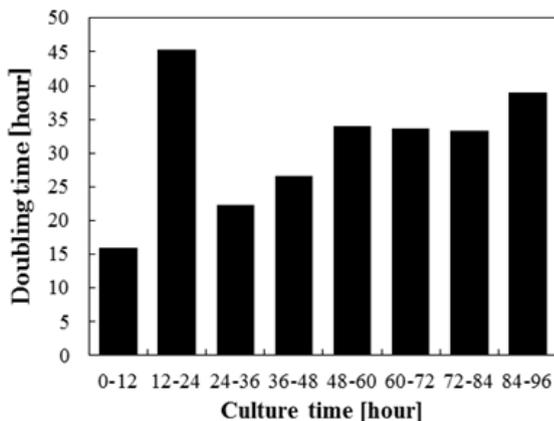


Fig.2 Change of doubling time
($X_0 = 1.0 \times 10^4$ cells/cm²)

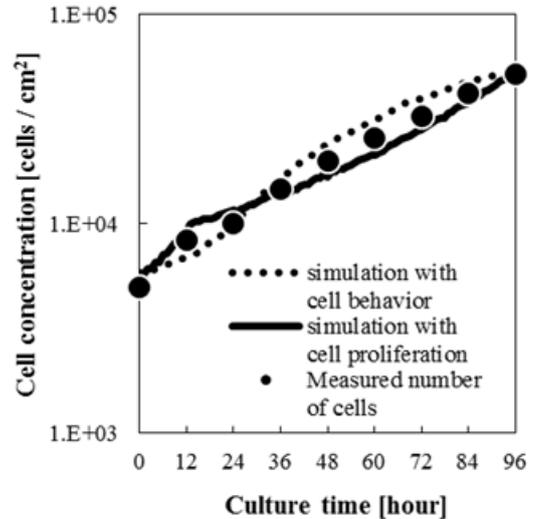


Fig.3 Comparison of cell count
($X_0 = 1.0 \times 10^4$ cells/cm²)

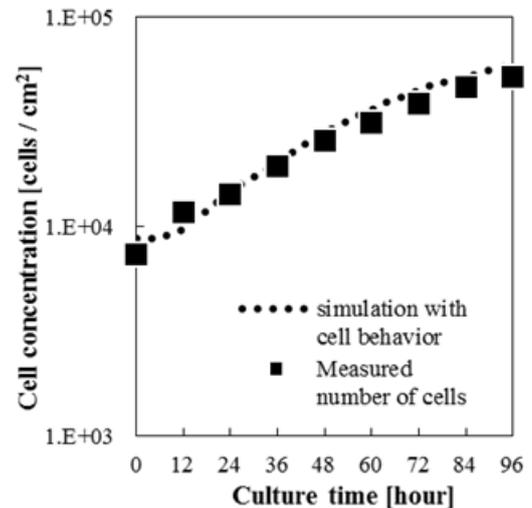


Fig.4 Comparison of cell count

4. 結言

本研究では実際の培養工程を模擬できるシステムの開発を行い、実際の培養工程を解析した結果と比較することでシミュレーションの検討を行った。

結果から実際の培養工程に対して高い相関を持つシミュレーションを作成することができた。このことから足場構造が特異的であり、また複雑な構造をした場合による細胞の組織形成のシミュレーションを作成することが示唆された。

5. 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。

6. 参考文献

1) 浦栢信吾, 大野翔太, 紀ノ岡正博, 田谷正仁: 移植用組織生産における細胞挙動シミュレーション、ケミカルエンジニアリング Vol155(11):pp.814-818,2010