

# 位相シフトレーザー顕微鏡による非侵襲的細胞解析

高木 睦

## 移植用細胞の非侵襲的品質評価の必要性

移植用の細胞を培養するにはセルプロセッシング工学が必要である。このセルプロセッシング工学には細胞設計、培地設計、担体設計を含む従来の“動物細胞大量培養技術”に加えて、分化を含めた不均一な細胞集団を制御するための細胞分離法、三次元培養法などの“移植用細胞の効率的培養技術”が必要である。しかし、培養で得られた細胞や組織を臨床応用し、それが普及する、すなわち再生医療の産業化のためには、培養工程の自動化<sup>2)</sup>とともに、「ヒト由来細胞・組織加工医薬品などの品質及び安全性の確保に関する指針」に沿った品質管理システムの構築が求められている。

製造プロセスの品質管理システムを確立するためには製品の品質評価技術が不可欠である。しかし、再生医療の主流である自家移植では、移植用細胞や組織に対して統計処理可能な抜取り検査は困難である。そのため、自家移植用細胞や組織の品質評価のためには、移植に供しようとする細胞や組織が培養器に入ったままで、かつ移植成績に影響を与えない方法で品質評価する必要がある。すなわち非侵襲的に、非破壊的に短時間での品質評価が必要と考えられる。

しかし、免疫染色法、フローサイトメトリーや移植実験などによる従来の品質評価方法は侵襲的、破壊的で長時間を要するため、細胞および組織の非侵襲的品質評価技術が新たに必要となる。筆者らは、骨髄間葉系幹細胞から軟骨細胞への二次元接着分化培養における細胞形態解析により、分化度の指標としてのアグリカン遺伝子発現度を非侵襲的に推定できることを明らかにした<sup>3)</sup>。しかし二次元接着培養においても細胞には厚みがあり立体形状を有することから、二次元接着培養における三次元的な細胞形態の解析により細胞のさらなる品質評価技術が期待できると考え、接着細胞の三次元的な解析を試みることとした。

## 二次元接着培養での細胞立体形状の非侵襲的定量

位相差顕微鏡をはじめとする通常の顕微鏡では、二次元培養における接着細胞の平面的形状は定量できるが、立体形状の定量はできない。近年、電子部品の計測用に

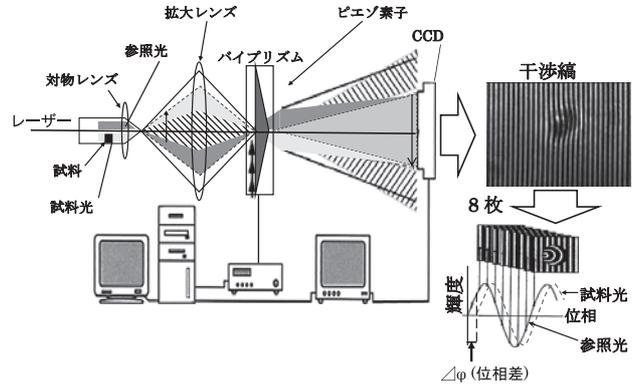


図1. 位相シフトレーザー顕微鏡

開発された位相シフトレーザー顕微鏡 (phase shift laser microscope, PLM: エフケー光学研究所<sup>4)</sup> (図1) では、光軸の片側に置いた観察対象物を透過するレーザー光と光軸の反対側の観察対象物のない部分を透過したレーザー光とで生じる干渉縞画像を8枚取得し、対象物の厚みと屈折率に起因する位相差を視野内の1画素ごとに定量できる。すなわち、対象物の厚みを  $d$ 、対象物の屈折率を  $n_c$ 、媒質の屈折率を  $n_0$  とすると、位相差  $\Delta\Phi$  は次式で表される。ただし  $\lambda$  はレーザーの波長である。

$$\Delta\Phi = (2\pi/\lambda) \times (n_c - n_0) \times d \quad (1)$$

この位相差  $\Delta\Phi$  を視野内の1画素ごとにプロットすると、細胞の位相差分布図が得られる。

浸透圧により細胞の高さが異なることが従来のAFMを用いた研究で明らかになっている<sup>5)</sup>。そこで、2種類の浸透圧で培養したCHO細胞を用いてPLM測定値とAFM測定値を比較した結果、いずれの方法による測定値もほぼ同じ値が得られた。また、いずれの測定でも浸透圧300 mOsm/lで培養した細胞の厚み(最大部分)は400 mOsm/lで培養した細胞より高い傾向を示した<sup>6)</sup> (図2)。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、ヒト骨髄間葉系幹細胞 (MSC) および CHO 細胞をディッシュを用いて接着培養し、グルタルアルデヒドによる固定の後、原子間力顕微鏡 (AFM) によって測定した。一方固定していない細胞についてPLMにより位相差分布を測定し、別途求めた細胞の屈折率データを用いて細胞高さ分布に換算した。さらに、ディッシュ中に用意した浮遊CHO細胞のPLMによ

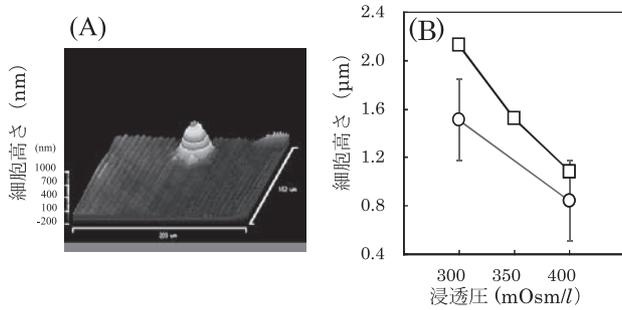


図2. 位相シフトレーザー顕微鏡による細胞高さ測定. (A) 細胞立体図, (B) 位相シフトレーザー顕微鏡 (○) と AFM (□) との測定値比較 ( $n = 10$ , mean  $\pm$  SD).

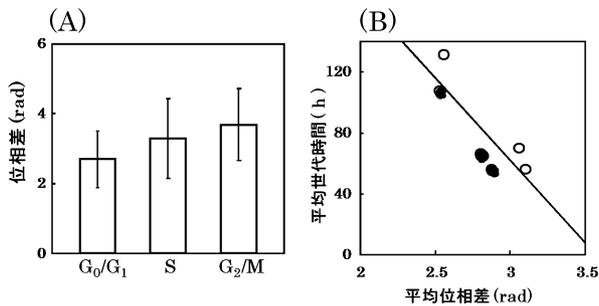


図3. 位相シフトレーザー顕微鏡による細胞周期および増殖速度の推定. (A) 各細胞周期の細胞の位相差, (B) 平均位相差と平均世代時間の関係.

る測定も行った. その結果, HUVEC, MSCおよびCHO細胞ともにPLMで得られた高さやAFMで得られた高さとの間に顕著な差異は認められなかった. また, PLMで測定した浮遊CHO細胞の高さは同一細胞の直径に近い値を示した.

このようにPLMでは細胞を固定することなく, 培養中に30秒程度の短時間で細胞の立体形状を非侵襲的に定量できることから, 移植用細胞の品質評価に利用できる可能性が示された.

### 二次元培養での細胞の細胞周期および増殖速度の非侵襲的推定

CHO細胞およびヒトMSCを37°C, 5%CO<sub>2</sub>雰囲気下で二次元同調または非同調培養した. BrdUとDAPIで染色し各細胞の細胞周期を決定すると共に, PLMで各細胞の位相差を定量した. その結果, 同調培養, 非同調培養ともに, G<sub>2</sub>/M期細胞の位相差は他の周期の細胞の位相

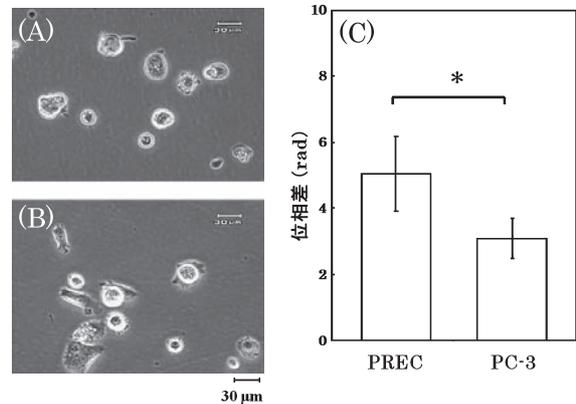


図4. 位相シフトレーザー顕微鏡による正常細胞とがん細胞の識別. (A) 正常ヒト前立腺上皮細胞 (PREC) の形態, (B) ヒト前立腺上皮がん細胞 (PC-3) の形態, (C) PREC細胞とPC-3細胞の位相差の比較.

差に比べて有意に高かった. また, 平均位相差と平均世代時間の間には明確な負の相関が認められた. 以上から, MSCの細胞周期および増殖速度をPLMを用いて非侵襲的に推定できることが示された (図3)<sup>7,8)</sup>.

### 二次元培養での正常細胞とがん細胞の非侵襲的識別

二次元培養した正常ヒト前立腺上皮細胞 (PREC) およびヒト前立腺上皮がん細胞 (PC-3) の細胞形態に差異は認められなかったが, PLMで測定したPC-3の位相差はPRECの位相差に比べて明らかに小さかった (図4). 同様にヒト肝がん細胞株 (Hep3B, HLF, Huh-7, PLC) の位相差はヒト凍結肝細胞の位相差に比べて顕著に小さかった. このように, がん細胞と正常細胞はPLMによる位相差測定により識別可能と考えられた. 実際に, PREC細胞にPC-3細胞が10%混入した細胞集団の位相差測定によりPC-3細胞の混入が検出できた<sup>9)</sup>.

### 文 献

- 1) 高木 睦: セルプロセッシング工学—抗体医薬から再生医療まで—, コロナ社 (2007).
- 2) Nakajima, K. *et al.*: *Inflam. Regen.*, **29**, 131 (2009).
- 3) Takagi, M. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **30**, 1189 (2008).
- 4) Endo, J. *et al.*: *Appl. Opt.*, **41**, 1308 (2002).
- 5) Takagi, M. *et al.*: *Cytotechnology*, **32**, 171 (2000).
- 6) Takagi, M. *et al.*: *J. Biomed. Opt.*, **12**, 54010 (2007).
- 7) Ito, S. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **31**, 39 (2009).
- 8) Tokumitsu, A. *et al.*: *Cytotechnology*, **59**, 161 (2009).
- 9) Tokumitsu, A. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 499 (2010).