

大規模な細胞解析を想定した高速コロニーカウンター開発・製品化

研究代表者： 安田 仲宏（附属国際原子力工学研究所・教授）

共同研究者： 泉 佳伸（附属国際原子力工学研究所・教授）、松尾 陽一郎（附属国際原子力工学研究所・特命助教）、沖 昌也（大学院工学研究科・准教授）

概 要	
	大量の細胞培養皿の連続高速撮像を実現し、コロニー計数を細胞培養皿あたり1秒程度で行う装置を製品化することを目的とした研究を推進した。 細胞の生存率を測定する手法として、培養により細胞が形成するコロニーをカウントし、増殖能を調べる方法がある。これまでの手法では、大量の細胞培養皿の測定は想定されておらず、放射線の細胞影響計測など稀な事象を迅速に測定できる技術が存在しない。 これを解決するため、ベルトコンベアとラインセンサの導入により、細胞培養皿の搬送中に顕微鏡画像を取得する装置の開発、および画像解析による測定を行うソフトウェア開発を行った。現在、装置の有効性と汎用性を検証しており、この後に装置とソフトウェアを融合させて高速コロニーカウンターとして来夏頃に製品化の予定をしている。
関連キーワード	細胞、計数、コロニーカウンター、自動化、大量処理

研究の背景および目的

細胞の生存率を測定する手法として、培養により細胞が形成するコロニーをカウントし、増殖能を調べる方法がある。これまでの手法では、大量の細胞培養皿の測定は想定されておらず、放射線による細胞影響計測など稀にしか起こらない事象を測定できる技術が存在しない。

本研究では、ベルトコンベアとラインセンサの導入により、細胞培養皿の搬送中に画像を取得、画像解析による計数を瞬時に行うことで、コロニー計数の迅速化と高精度化を目指した。

ヒトリソースが実験研究で利用できるようになりつつある現状、再生医療などで工学分野と生物学分野の融合が進みつつある現状に鑑み、申請

者らは、細胞の解析を高速・自動で大量にこなすことにより「低線量領域における放射線影響」のシグナルを検出できる「細胞解析工場」を提案したいと考えている。これは、照射後あるいは暴露環境にある細胞を自動的に播種・継代・培養などし、最終的に細胞の終状態（アポトーシス頻度や突然変異、それに続く細胞の生死（増殖能）など照射後の細胞が辿る末路）の分岐比を精密に決定する手法提案で、当該分野に革新的進展をもたらす可能性を有する。また、本手法は、毒性試験など医学・薬学・生物学のスクリーニングにも応用可能であり、将来、福井大学の武器として発展させられるものと考えている。

研究の内容および成果

【装置開発】

ベルトコンベアとラインセンサの導入により、細胞培養皿の搬送中に顕微鏡分解能で画像を取得する手法の最適化を行った。ラインセンサにより顕微鏡分解能で撮像可能であることは、以前に製品化した「株式会社セイコープレジジョン社製広領域高速取得顕微鏡 HSP-1000（関連特許4件）」で実証している。ここで得られたノウハウは、測定対象およびカメラが撮像分解能の範囲で位置安定性を保っていることであり、動作の高速性を維持しつつ、画像に「ブレ」が出ないようにする必要があった。当初の案（図1）では、線光源が照らす部分を同じ側からラインセンサカメラにより画像化するものであった。

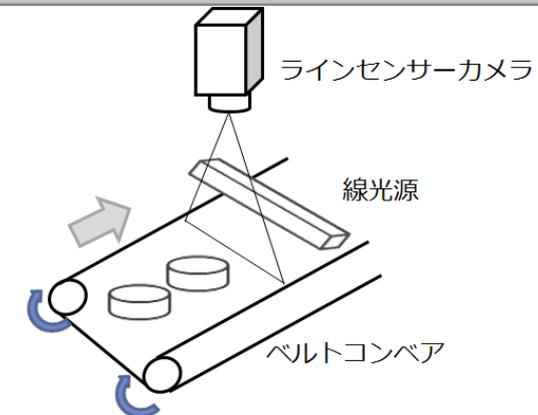


図1 装置概念図。

装置に求める仕様を以下のように定めた。

- 1) 測定対象物 : 最大φ70mm
- 2) 移動ピッチ : 14μmピッチ
- 3) カメラ素子 : 5000画素 7μm素子
- 4) 視野 : 70mm
- 5) 視野分解能 : 14μm/画素
- 6) 移動速度 : 35mm/秒
- 7) サイクルタイム : 2秒/個

これは、例えばφ70mm シャーレ（細胞培養皿）の場合、得られる画像サイズが5000×5000ピクセルに相当し、それが2秒で画像化されることを意味する（φ35mm シャーレの場合、サイズは1/4。1秒で画像になる）。ちなみに、2012年時点での一般的な市販パソコンディスプレイの最大ピクセル数は、2560×1600（WQXGA）であるため、画面に表示しきれないほどの拡大率（顕微鏡倍率で10x程度）になる。また、1ピクセルが7μmの素子を使用しているため、必要に応じ20x相当とすることも可能である。

しかしながら、この撮像系では駆動部分とカメラ・光源の取り付け位置の関係で、画像がブレてしまい装置に要求した画像分解能と速度が得られなかった。このため、図2に示すように、光学系とカメラをベルトコンベア下部に固定し、上部から光源で照らす構造とした。

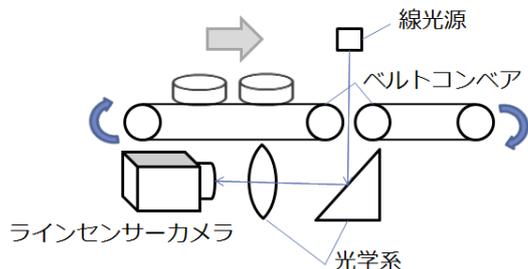


図2 改良した装置概念図。

透過照明としたことも撮像速度の点で有利に働き（高速に動作させようとすると対象物をより明るく証明する必要がある）、上記の仕様を満たす装置が完成した。

上記の装置で撮像されたφ70mm シャーレ上のCHO細胞のコロニー画像を図3に示す。

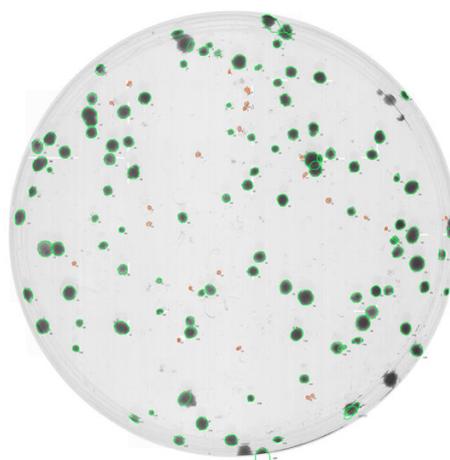


図3 φ70mm シャーレ上のCHO細胞のコロニー画像。

【解析ソフトウェア開発】

以前に開発・製品化した、放射線飛跡の自動検出アルゴリズム（関連特許3件）を細胞培養皿画像からのコロニー抽出に活用した。図3では、得られた画像の濃淡から対象を楕円として抽出し、個々のコロニーが抽出できている様子も示している。特徴量として、コロニーの位置、大きさ、濃淡、円形度などの情報を抽出しエクセル形式などでデータを書き出すことができる。

今後の課題としては、

- ・シャーレの壁に成長したコロニーは、基本的にコロニー画像として不完全なため計数できない。これを回避するためのシャーレ改良の必要。
- ・ユーザーにより扱う細胞や染色など諸条件が異なるため、製品化のためには汎用性を検証する必要がある。
- ・検証の後、撮像と解析を連動させて、撮像とともに結果が得られるようなシステムとする必要があるため、多様な種類の細胞・染色法で試行を繰り返しており、来夏頃に製品化の予定である。

また、今後、生物・医療の分野で活躍される研究者や地元企業（例えば、東洋紡バイオロジクス（株）など）と連携し、「低線量領域における放射線影響」のシグナルを検出する「細胞解析工場」実現につなげていきたい。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

なし（特許検討中のため）

「特記事項」

平成25年3月11日 福井新聞3面「低線量被ばく細胞を自動分析可能に 福井大・安田教授が装置開発」

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科学研究費助成事業・基盤研究C（一般）・H25～H27・低線量放射線領域での細胞影響解析の全自動化を目指した高速コロニーカウンタの開発・代表・申請中