解 説

Agrochemistry and Biology Series

細胞成長の動的計測

松岡 英 明

東京農工大学工学部

(平成4年11月20日受理)

Analysis of Dynamic Growth Process of Cell

Hideaki MATSUOKA

*Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology,
Nakamachi, Koganei, Tokyo 184, Japan*

はじめに

細胞の成長過程を定量的に計測することは、細胞の生理学的研究においても、また細胞を使ったバイオアッセイにおいても基本的かつ重要な課題である。一口に成長過程といっても細胞の形や色などの外観上の変化から、細胞内の特定の化学物質の量の変化のように直接は目に見えないものの変化などさまざまな場合が考えられる。また、生物個体や組織の中での細胞を観察するのか、単離した細胞を測るのか、によっても異なった測定原理が要求されるであろうし、細胞の種類や細胞周期などの違いによっても測定法が異なってくる。しかし、いずれの場合も結局一個の細胞の状態をリアルタイムで精確にとらえ、それを適当な指標で定量化するということに帰着する。

「記録」と「リアルタイム解析」の違い

細胞の状態を精確にとらえようとする場合、時間分解能（いかに速い変化までとらえられるか）と、空間分解能（いかに微細な動きや形をとらえられるか）が議論の対象となる。そして、これを考える上で、単に「記録」するだけなのか、「リアルタイム解析」をしなければならないのかで状況が異なってくる。時間分解能の場合、「記録」するだけならば非常に速い変化をとらえることができる。写真の連続撮影を考えると、シャッターを押してからフィルムが1コマ分巻きとられ、次の撮影の準備ができるまでの時間が時間分解能に相当する。シャッターを開閉する代わりに、シャッターは開いたままで

高速でフィルムを巻きとりながらストロボを点滅させれば、より速い変化が記録できる。さらに光源としてパルスレーザを用いればいっそう短い時間間隔で撮影ができる。現在 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ 秒程度の間隔で連続記録が可能になっている¹⁾。

これに対して「リアルタイム解析」の場合は、写真にとるだけでは済まない。フィルムの代わりに CCD やフォトトランジスタアレイなど、二次元で光を検出し、その光強度分布を電気信号に変換できる素子を用いなければならないが、この変換に要する時間が問題になる。この時間は、一画面をどれだけ小さな画素に分けるかによっても異なるが、最近では一画面全体を 400×400 に分けた場合、 0.6×10^{-3} 秒でできるようになっている²⁾。しかし、上述の「記録」するだけの場合に比べれば桁違いに遅い。得られた画像情報について、さらに複雑な計算をし、「解析」することによって初めて有用な情報を導きだすことが必要になるが、この段階でさらに長時間を要し、何秒のオーダーになることもある。結局、最終的にはこの「解析」がどれくらいの時間でできるかによって時間分解能がきまってしまう。いうまでもなく、「記録」しておいたものを後でゆっくり「解析」するのであれば、多少時間がかかっても問題にはならないが、それでは「リアルタイム」にならない。

一方、空間分解能については、光学顕微鏡で観察されるマイクロメーターのオーダーから最近では STM（走査型トンネル顕微鏡）や AFM（原子間力顕微鏡）の導入によってナノメーターのオーダーの空間分解能に迫っている。そして、STM で一画面の情報を処理する時間

は、例えばグラファイトの構造を1枚とるのに 12.5×10^{-8} 秒であるという³⁾。しかし、問題になるのはやはり、次の「解析」であることに変わりはない。すなわち、いったん、二次元の光情報としての画像情報が電気信号に変換されてしまえば、後の計算処理に要する時間は元の画像がマイクロメートルオーダーかナノメートルオーダーかには直接関係がない。もっぱら「解析」の内容に依存する。

ところで、なぜ「リアルタイム」が必要か? 「記録」だけして、後で十分時間をかけて「解析」すればよいのではないか、と考える人も多いと思う。「リアルタイム解析」が必要な場合とは、例えば、細胞の状態を観察しながら薬剤を作用させ、もし少しでも薬剤の影響がみられたら直ちに薬剤を除去して、その後の回復状態を見てみようという場合を考えれば明らかであろう。すなわち薬剤の効果を迅速に、かつ高感度に検知できる可能性があるばかりでなく、薬剤の残留効果や細胞の回復活性も推定できる。さらに同一細胞を1回のアッセイで死滅させるのではなく、繰り返し使用することも可能であろう。これ以外にも「リアルタイム」であることのメリットはいろいろ考えられる。

以下においては、その具体例として、先端成長する糸状菌の成長過程をリアルタイム解析し、抗真菌剤の影響を調べるバイオアッセイへの応用などを図るシステムについて紹介する。

真菌の成長過程

一例として *Aspergillus niger* の成長過程を説明する。図1に示すように、胞子を寒天培地の上において 28°C 前後で培養すると、約6時間で発芽し、菌糸を伸ばす。菌糸は分岐しながら伸びて24時間後には直径3~4mm程度のコロニーを形成する。胞子を液体培地の中で懸濁培養しても同様の菌糸の成長は起こる。栄養条件が悪くなると、分岐した菌糸の一部に胞子が形成される。巨視的に見ればコロニー形成の有無を観察すること、微視的に見れば菌糸一本一本の先端の伸長速度を測定することが真菌の成長過程を測定することになる。巨視的でも微視的でも、単にタイムスケールが違っただけ

図1 真菌の成長していく様子

で、連続測定をするという点では同じである。しかし、人間の目で観察するには成長速度が速すぎるか、あるいは逆に遅すぎる場合は、どうしても人間に代わる自動計測システムの導入が必要になる。そこで、特に菌糸一本の成長過程に着目し、その成長速度を顕微鏡視野の下で自動追跡するシステムを開発することにした。この場合は、目で観測するには遅すぎる場合である。

画像処理の基本スキーム

一般に物体の動きを自動追跡する画像処理は次のようにして行なわれている。TVカメラを通してモニターに映し出された画像は色と明暗の二次元画像情報である。色情報は適当なフィルターを通せば明暗の情報に変換される。この明暗の二次元画像情報がCCDやフォトダイオードアレイによって画素(ピクセル)単位の情報に変換される。この段階では各画素ごとにはアナログ量であるが、本来連続的な二次元情報が画素の面積単位で仕切られ、デジタル化されたことになる(図2)。

次に各画素ごとの光強度をADコンバーターによって、これもデジタル量に変換する。通常、画素ごとに独立にダイナミックレンジを調節できるわけではないから、画面全体で最も明るい画素と最も暗い画素の明暗の差を何段階で表わすかによって明暗の分解精度が決まる。ここで、しばしば二値化処理をする。これは適当な明度(これを閾値とよぶ)を境にして、それより明るい部分と暗い部分に分けることであり、単に形の変化や物の移動を追跡する場合に、これ以後のプログラムを簡単にするために行なう処理である。二値化処理は画像処理全体の中できわめて重要な部分でノウハウを必要とするものである。例えば、対象物を特別に光らせたり色を着けたりすることによって、明暗のコントラストを強調できればそれほど問題はないが、まったく対象に手を加えずにTVカメラを通して得られる画像をそのまま扱う場合は難しい。対象物も背景も一樣な明度になっていないため、対象物の一部と背景の一部が一つながりの模様になってしまったり、また最初は一応区別されていた対象物が、時間とともに全体の明度が変化することによって、閾値を修正しなければ背景との区別がつかなくなっ

図2 二次元画像のデジタル化

てしまったりする。また、顕微鏡を通して観察している場合には、焦点がずれたときの明暗パターンの変化が顕著である。したがって明暗閾値の自動修正や自動焦点などの機能が必要になってくる。

二値化処理によって得られる対象物の形は画素単位で描かれるので、拡大してみると輪郭はギザギザになっている。したがって画素が小さいほど、輪郭はなめらかになる。すなわち一画面を構成する画素数が多いほど、対象物の形や動きの軌跡がなめらかな線で描かれる。しかし、いずれにしても画素単位では原理的に不連続の点をつなぐことになる。そこで更に精度を上げる場合には実際の輪郭や軌跡を推定する計算プログラムを組み込む必要がある。それによって画素単位以下の精度にまで解析精度を上げることができる。

菌糸成長自動追跡システムの開発

図3に開発したシステムの構成を示す。*A. niger* 菌糸一本の先端を顕微鏡で観察すると図のように見える。この画像をコンピュータに取り込み、上に述べたスキームに従って処理していく。この場合、画面全体を解析するのでは時間がかかりすぎるので、四角の枠で囲んだ先端部分だけについて解析する。伸長方向は枠内の直線で示されている。菌糸は $7\sim 8\ \mu\text{m}$ の太さがあるが、菌糸先端の輪郭を適当な関数で近似して先端位置の座標を算出する。一定時間 (10~20 秒) ごとに先端位置を求め、移動した距離から速度を計算して表示、記録する。菌糸

図3 真菌活性自動評価システム

(1) 反応セル, (2) CCD カメラ, (3) 顕微鏡, (4) コンピュータディスプレイ, (5) コンピューター, (6) TV モニター, (7) ビデオテープレコーダー, (8) オートステージ, (9) 菌糸。

先端位置がTV画面からはずれる場合には顕微鏡ステージが自動的に移動して菌糸の位置が修正されるようになっている。こうして原理的には何時間でも連続的に菌糸の成長を追跡することができる。

抗真菌剤の活性評価への適用

本システムを利用して、amphotericin B (AMPH) を始めとする種々の抗真菌剤の活性評価を行なった^{4,5)}。図4に示す反応セル内に調製したポテト・デキストロース・アガー (PDA) 培地 (0.5~1.0 mm 厚) 上に 2.5×10^5 個の *A. niger* の胞子を植菌し、28°C で24時間培養した。これを上述のシステムの顕微鏡ステージにセットし、コロニー外縁部の適当な菌糸を選び、その先端部

図4 液相反応セル

(1) ディスペンサー, (2) 送液ライン, (3) 排液ライン, (4) 顕微鏡対物レンズ, (5) ガラスプレート, (6) ポテト・デキストロース・アガー培地, (7) 菌糸。

図5 AMPH に対する MIC の評価

AMPH 濃度: ① 0, ② 0.5, ③ 1.0, ④ 2.0, ⑤ 4.0 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)。

分に焦点を合わせた。先端成長速度を測定しながら、反応セル内に生理食塩水、あるいは抗真菌剤を含む生理食塩水を移送した。図5に AMPH の場合の応答を示す。はじめ約 $4 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ の速度で伸長していた菌糸に AMPH $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ を含む生理食塩水を移送して反応させると、図5②に示すように伸長速度が低下し、約30分後に伸長が停止した。その後、セル内を AMPH を含まない生理食塩水で置換すると、15分ほどして再び菌糸が伸長し始めた。なお、一連の操作で、抗真菌剤を反応させている間を Exposure、反応前を Pre-Exposure、反応後フラッシングしている間を Post-Exposure と呼ぶことにしている。AMPH を $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ の濃度で与えたときは、Exposure の間にいったんは菌糸の伸長が停止したが、Post-Exposure の間に再び伸長し始めたことから、菌が死んだわけではなく、単に成長が抑制されていただけであることがわかる。しかし、濃度を上げて $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ で与えた場合は Post-Exposure での伸長がみられなかったことから菌が死んだものと判断された。このような作用をおのおの、静菌作用、殺菌作用と区別している。ただ殺菌作用といっても、Post-Exposure の期間が、1時間では伸長がみられなくても、1日、2日、…と長くなったときにやがて伸長してくる場合もあり、その意味では Post-Exposure の時間を規定した上での判定が必要となる。Post-Exposure が1時間の場合の AMPH の最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) は図5より $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ となる。同様にして調べた抗真菌剤の MIC の例を表1に示す。一方、菌糸集団を対象とする従来法の中から、液体培地中での菌体重量増加速度を調べる方法、およびコロニー径増加速度を測定する方法を選び、これらの方法によって得られた MIC も併せて

表1に示す。いずれの場合も本システムで単一菌糸で測定した MIC のほうが小さい値を示す傾向にあった。

動的計測の意義

TV 画面上で目を凝らして菌糸の先端を見ていると、徐々に伸びていく様子がわかる。しかし、それ以上詳しく、速度が速くなったり遅くなったりしているかどうかの判断は難しい。しかし、これを本システムで連続測定すると図5に示すように伸長速度が変動していることがわかる。こうした現象の解析は本システムによって時時刻々追跡することによって初めて可能になる。一例として本システムによって花粉管の伸長速度の振動現象がとらえられている⁶⁾。

一方、抗真菌剤を反応させた場合の応答に目を転じると、薬剤を与えたことによって、必ずしもただちに応答が現われるわけではなく、若干の時間遅れがあってから応答が現われる場合がある。また、応答が現われ始めてから Exposure の間に定常な伸長速度（停止する場合も含めて）に落ち着くまでの途中経過も薬剤の種類によって異なるパターンとなる。これらの違いは薬剤が菌糸に作用して伸長速度を変化させるまでの過程が、薬剤の種類によって異なることを示唆している。換言すれば、その応答パターンから作用機序が推察されるかもしれない。

以上のような点が、動的計測によって得られる新たな情報の例であるが、動的計測のもっとも重要な点は、やはり次の点に集約されよう。すなわち薬剤の影響がわずかに現われた段階でただちに評価ができるようになる点である。もう少しわかりやすくいえば、薬剤の効果を調べるのに細胞が完全に死んだかどうか確認するまで待って行なうのではなく、薬剤の効果の徴候がわずかに認められた時点でただちに判断できるようにするという点である。それによって薬剤活性の評価がきわめて迅速にできるだけでなく、同時に薬剤をすみやかに除去、洗浄することによって細胞を元の状態にもどせば、同じ細胞で引き続き他の条件での活性評価が行なえる。このようにして、同一の細胞をくり返し使用できるようにすることが細胞を用いるセンサーシステムを構成する上できわめて重要な点である。

細胞研究の新しい手段として

細胞単位で、薬剤との反応を繰り返し行なわせ、またその応答を迅速に定量化できるならば、細胞研究を進める上でも有用と思われる。例えば、細胞は薬剤に限らず、一般にさまざまなストレスに対して、一定の範囲内

表1 抗真菌剤の MIC 比較

抗真菌剤	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	菌体乾燥重量測定法	コロニー径増加速度法	本システムによる単一菌糸伸長速度法
Amphotericin B	12.5	50	1.0
Nystatin	12.5	50	2.0
Miconazole	3.12	6.25	2.5
Ketoconazole	100	100	15
Tolnaftate	1.56	1.56	1.5
Cyclopyroxolamine	25	25	20

で馴れの現象を示す。これは、ストレス抵抗性分子が細胞内で酵素反応によって生成されるからか、あるいはそのような酵素あるいはストレス依存性タンパク自体が生成されることによってはじめて現われる現象なのか、いずれにしてもその馴れの状態がどのような条件で、どの程度持続するものかについては、多くの関心がよせられている。このような問題を調べる場合、細胞応答を時時刻々解析する方法はきわめて有力な方法と考えられ、本システムはまさにそれを可能にするものである。

おわりに

近年、コンピュータ関連技術の進展はめざましく、さまざまな分野に普及している。バイオアッセイにおいても例外ではない。従来から熟練者の経験と勘に頼っていた部分が、自動化されボタン一つで瞬時に結果を出すことができるようになった例も少なくない。こうした状況の下で、細胞の挙動をリアルタイムで精確に自動解析するシステムの開発が進められた。その発想はけっして著者らが初めてというわけではない。むしろ、古くから、多数の研究・技術者が考え、さまざまな形で実現してきたことと思われる。本稿で紹介したシステムは、特に先

端成長する真菌に焦点を合わせて開発されたもので、すでに十分精度の高いシステムであると考えている。今後は、周辺技術の進展を見ながら、さらに機能の拡張、精度の向上をめざし、細胞の動的挙動のリアルタイム解析、新しい細胞現象の発見等に活用したいと考えている。

引用文献

- 1) 宝谷紘一, 木下一彦編: 限界を越える生物顕微鏡—見えないものを見る, 学会出版センター, 東京, 1991
- 2) T. Iijima, M. Ichikawa & G. Matsumoto: *Neurosci. Res.* (Suppl.) **16**, S158 (1991)
- 3) A. Bryant, D. P. E. Smith & C. F. Quate: *Appl. Phys. Lett.* **48**, 832 (1986)
- 4) S. Yamada, J. Cao, O. Sumita, K. Kurasawa, H. Kurata, K. Oh & H. Matsuoka: *Mycopathologia* **118**, 65 (1992)
- 5) K. Oh, H. Matsuoka, O. Sumita, K. Takatori & H. Kurata: *Mycopathologia* **118**, 71 (1992)
- 6) 根本泰行, 土屋暢子, 本間知夫, 松岡英明: '92 電気化学秋季大会講演要旨集, 2F04 (1992)