

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 細胞画像情報解析を用いた培養機械化における品質管理デザインスペースの理解  
(英語) Study of quality design space in culture mechanization using cell image analysis

研究開発実施期間: 令和2年7月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 加藤 竜司  
(英語) Ryuji Kato

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立大学法人東海国立大学機構・名古屋大学大学院創薬科学研究科・准教授  
(英語) Tokai National Higher Education and Research System, Nagoya University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor

## II 研究開発の概要

(研究開発の成果およびその意義等)

本研究の目標は、再生医療等製品としての細胞製造における品質管理技術の発展を目指し、「培養作業の機械化」の影響について検証し、①細胞画像評価によるデザインスペースのマップ化、②細胞画像解析による培養自動化工程モニタリング法の開発の2つの側面から技術開発を行うものである。

具体的には、①細胞画像評価によるデザインスペースのマップ化とは、画像撮影だけを用いた細胞状態の簡易定量化解析であり、従来の方法ではコストが高すぎて検証が不可能であった広い条件空間を効率的に探索するための手法としての細胞画像応用方法の開発である。②細胞画像解析による培養自動化工程モニタリング法の開発とは、筆者が研究開発を進めてきている細胞画像解析と AI モデル化技術の融合による、非破壊・迅速・効率的培養環境評価技術の新規アルゴリズムの開発である。各年度において、(1)細胞画像解析によるデザインスペースマッピング法の開発、(2)作業機械化における品質変動計測、(3)作業機械化における品質変動計測の3つのテーマを並行して進め、目標達成を目指した。

R2 年度の研究開発では、名古屋大学では網羅的な培養と細胞画像解析の技術開発を、大阪大学では名古屋大学が開発する解析技術の汎用性の確認と実現性向上を担当し、特に振動ストレスに着目して研究開発を推進した。結果として、名古屋大学では、最も効果が現れるパラメータレンジの決定に成功し、目標培養条件の機械化および高品質画像データ(約 2000 枚×約 80 条件)や各種マーカーなどのデータ蓄積を完了した。また、高精度解析のため、新規に細胞数カウント・コロニー認識・近傍コロニー影響数値化の新画像処理アルゴリズムと形態マッピング技術を開発した。解析の結果、振動ストレスにおいては容器に伝わる加速度と振動数の積算量であるエネルギー量に比例して細胞増殖率や未分化能の細胞品質の劣化が生じることが初めて定量的に発見された。さらにこのわずかな品質劣化を高精度かつロバストに検出するアンサンブル MT 法の開発に至り、目標である振動による異常品質サンプルの予測精度 90%以上・予測安定性 3 倍以上の向上を実現し、培養プロセスにおける振動制御のためのデザインスペースを画像情報のみからマッピングできることまでを確認した。また、大阪大学との連携では振動ストレス検証実験系を通じて、同様にエネルギー量に比例して iPS 細胞の品質劣化に影響を与えることを確認すると共に、名古屋大学が提供する画像解析などの培養プロセスモニタリングデータを用いた場合における各操作の Criticality の決定方法の考え方、および Process Parameter・Quality Attribute など概念・用語の整理を実現した。本研究を通じて得られた iPS 細胞培養におけるデザインスペースの決定法および画像解析技術の導入の有無については、ISO TC276 WG4 で提案中の細胞製造マネジメントシステム (ISO/PWI 20406) 草案へと反映を行い、各国への Consultation へと興じ標準化を進めた。

R3 年度の研究では、(1)細胞画像解析によるデザインスペースマッピング法の開発において、振動、攪拌、ピペッティング、分注のデザインスペース検証のデータ(100+20 条件)の蓄積を完了し、デザインスペースマッピングをより正確に評価するための新規画像解析アルゴリズムの構築および、画像解析を用いたデザインスペースマッピングが可能であることを確認した。特に振動という物理的因子が iPS 細胞培養に及ぼす品質劣化度合いを記述する定量数式を導き出すことにも成功した。また、iPS 細胞の逸脱判定アルゴリズムの開発にも成功し、逸脱判定率 8 割を達成した。(2)作業機械化(各操作)における品質変動計測では、振動、攪拌、ピペッティング、分注について振動試験機、ロボット分注機や攪拌装置、加速度計測器などのカスタマイズ、チューニング、キャリブレーションに成功し、計画していた実験データに加えて次年度分のデータまでを前倒しで取得した。(3)作業機械化(装置化)における品質変動計測では、阪大設備において名大の指定した振動データの取得を行い、名大での解析・発見を行ったリスク振動の存在を再確認することができた。ただ、装置等が異なる場合には、完全な同一実験としての再現は難しく、画像評価の検証までは実現できなかったが、名大では実現できなかったより装置の大型化におけるリスク振動が現れる部分・箇所を複数発見するに至り、名大解析から見出されたデザインスペースのリスク領域を装置設計へと活かせる可能性が示唆された。標準化への稼働としては、予定していた ISO TC276 からの細胞製造文書の作成活動を積極的に行ったが、2021 年 10 月に米国からの猛烈な反対によって提案を取り下げる事態を迎えてしまい、まず国内・アジア圏での細胞製造

標準化を加速するため JIS 化へと舵を切った。

R4 年度は、培養機械化の「分注」「培地交換」の影響について昨年度に検証した条件から掘り下げた検証を行った。名古屋大学では、これらの実験系の全体設計を実施し、近大が最適化した実験データ取得方法でデータを蓄積し、近畿大学と共にこれらデータの分析を実施することで、iPS 細胞に対して「影響が生じ得る条件」であってかつ「品質判定が難しい領域」までをデザインスペースとして可視化する技術開発と、機械化の際に重要な制御項目となる CPP の探索を実施した。この結果、分注・培地交換の両方において共通して、細胞品質への影響を大きく与える CPP に「時間」があることを突き止めた。機械化によって時間制御は容易になることが期待できるが、特に人的作業のどこで時差が生まれ、優先して時差の制御を進めるべきかを検証するため、新たに人的作業の動画数値化にも取り組んだ。結果として、分注・培地交換・ピペッティングなどで共通する「作業単位」の特定と、人の作業ではどこで CPP にブレや不安定性が生じるかの理解と、機械化においてどう制御すべきか、という定量的ルールを見出すに至った。また、昨年度開発していたアンサンブル逸脱評価技術が、これら実験で発生する逸脱条件を高精度に判別できることも確認し、これまで開発してきた画像解析技術のロバスト性の確認までを行うことができた。さらに、阪大と連携することで、見出された分注 CPP の影響について議論・検証し、大型製造施設への実装性や高度装置での CPP 制御の方策や課題、標準化への解説の在り様を明確することにも成功した。

以上の結果より、本研究開発では「振動」「攪拌」「ピペッティング」「分注」という細胞培養自動化において必須の基盤操作を分注機などで自動化することによる効果と問題の両方を、網羅的な半機械化実験の設計技術と、細胞画像情報解析技術の融合によって定量的に解析・理解することに成功したと言える。実際には、「攪拌」のみ再現性の高い実験が難しかったために深い検証を断念したが、「振動」「ピペッティング」「分注」の3つの人的操作におけるデザインスペースが、画像解析による「iPS 細胞形態・増殖に対する変化」の定量的検出によって極めて効率的に実践可能なことが明らかとなった。従来、デザインスペースの検証や理解は非常に重要であることが細胞製造現場では知られているが、細胞培養におけるパラメータがあまりにも多様であるため単純な実験計画法などの統計的手法では対応が困難であることがプロセス開発の大きなハードルとなっている。この課題解決において、我々はロボット分注機の導入が極めて有効であることを解明した。実際の研究においては、ロボット分注機や独自デバイスを用いた半機械化は装置のカスタマイズ・チューニング・キャリブレーションが極めて重要であり、研究開発当初は、条件を設定しようにもこれを実験値として安定再現できないなどの多くのハードルに見舞われた。特に、半機械化が実現できた場合でも、これらを安定に既存の分子細胞学的手法で破壊的に評価することはほぼ不可能であった。なぜならば半機械化実験によって条件を拡大した場合でも、準備する細胞状態を短時間でラグなく評価することができないためである。この点で、細胞画像解析は画像撮影という極めて簡易な作業によってハイコンテンツな情報を経時的に取得することが可能であり、さらに今回の解析からもその経時的な情報が逸脱評価に必須であることが明らかであった。これらの解析を通じて我々は、振動では2つの振動を構成する物理パラメータの方程式として iPS 細胞へのストレスの度合いを表現できることを初めて発見した。これは単純に、ストレスの結果論的な影響を画像解析で検出できたということに留まらず、細胞に振動的な物理的なストレスが影響を与えるという初めての生物現象の理解という意義とも評価できる。また、分注・ピペッティングという操作のパラメータ検証において、想定とは異なりシェアストレスそのものの影響よりも、時間因子が最も細胞品質に影響を与えるパラメータであることが定量的に解明された。実際には、この時間の因子の制御は、まだ全細胞培養作業が機械化しない状態では、一部の操作を半機械化しただけでは安定化することが困難であることが想定された。このため、我々はさらにこの検証を深めるため、人の細胞培養作業において「どの作業」「どのタイミング」で時間の制御がバラつくのかを作業動画の解析方法を新たに開発することで検証した。この結果、分注・ピペッティングにおいて人の作業で制御すべき特定の作業と工程があることを定量的に解明するに至った。これは、細胞培養の機械化を進める中で、優先すべき Critical Process Parameter(CPP)を特定したことであり、従来感覚的にしか理解されていなかった

た細胞培養機械化の重要性と効果を明確に示す新しい発見的意義であると考えられる。これらの発見は、従来の統計的な実験と分子生物学的な抜き取り検査では発見することは不可能だと考えられ、目標であった「細胞画像解析を用いたデザインスペースの可視化とデータ化」によって初めて効果的に検証・発見できた意義だと評価できる。事実、振動データを含めたデザインスペースデータは、細胞製造工程の自動化を目指す企業や、自動培養装置開発の企業からリクエストを受け、社会実装が進行中である。

我々は、これまで様々な細胞品質評価に用いてきた「細胞形態情報解析」技術を用いて、本研究開発でられた大量の画像・品質データの解析を進め、より安定して細胞品質の逸脱を検出するための解析アルゴリズムの開発としてアンサンブル学習と逸脱判定モデルの有効性をすべての品質逸脱問題について確認した。従来、AIモデルを用いた細胞品質判定技術の多くは、単純な機械学習原理の導入であるため、大規模かつ多様性を持った教師データが取得されなければ安定した判定精度を得ることは困難である。我々が今回の検証を進めてみて強く実感できたことは、細胞製造のデザインスペース探索時のデータは非常に偏っており、計画の規模が小さい場合には現象の本質が反映されない、ということであった。そこで我々は定常データだけを学習しながら、アンサンブル学習のような弱学習器を組み合わせることで、細胞製造現場に即した安定的な逸脱モデルの構築が可能であることを定量的に示すに至った。このような現場に即した iPS 細胞画像品質判定モデルの提唱はこれまでに行われた例は極めて少なく、多くの細胞製造現場に実装可能な AI モデルとして社会実装性の高い成果であると言える。事実、これらの新規アルゴリズムは、特許としての新規性の獲得が難しいノウハウ的な扱いの解析技術であるが、著作物として細胞画像解析ベンチャーなどへのライセンス提供が進むと共に、細胞製造企業からリクエストを受け、社会実装が進行中である。

さらに、本研究開発では名古屋大・大阪大学と連携することで、別施設・別装置において「半機械化」を進めるための重要ポイントや標準化手法のための考え方の整理を進めた。実際、施設・装置が全く異なる場合、まずパラメータそのものの理解を共有するためには、概念・用語を丁寧に整理・標準化することが重要であることが明確化された。用語の統一は標準化において定石ではあるが、Process Parameter(PP)や Quality Attribute(QA)の議論においても非常に重要であり、特に機械化においては「工程」を細かく「作業」「操作」などに分解し、人的作業の流れの中で「どこが機械化されたのか」を明確化しなければ、デザインスペースの設計や理解に繋がらないことが分かった。このように、特定の人間の作業を機械化した状態であっても、そもそもの機械化思想が「作業のどの部分を、どのように機械化しようとしたのか」をスキームとして理解しなければ、実験の再現や、パラメータの理解が根本的に難しいということが明確となった。このような概念・用語の統一方法や、機械化原理を分解して共通性を理解するか、というコンセプトは、標準化文書としての重要なヒントであった。即ち、本研究開発で見いだされたこれらの標準化文書のヒントは、ISO・JISの両方の標準化文書草案の記述方針・文書設計にとって重要な発見と指針であり、標準化文書設計に大きく影響を与える意義があった。また、全く同じ実験条件の再現こそできなかったが、名大で見いだされた振動ストレスの2つの物理パラメータ、分注作業における時間パラメータの影響度合いに共通性を見出させたことは、名古屋大学の検証方法から見いだされた CPP や画像解析を用いたデザインスペースの検証方法が、再現性の高いものであったことを示すものであった。また、両施設で画像解析での品質モニタリングの重要性が明確化された結果、細胞培養機械化と細胞画像評価の連動性の重要性が明確化され、細胞培養製造工程の機械化を目指す企業との連携や技術指導が進んだことで、社会実装が進行中である。

最後に、本研究では細胞培養工程の機械化促進のための技術開発を行うと共に、国際標準化に向けた文書作成へとその考え方や施設共有方法の概念を反映させ、ISOとしての標準化文書の提案を進めた。ただ、残念ながら、ISOとしての文書提案と活動は英米との方針の違いから2021年10月に断念せざるを得なくなった。しかし、「データに基づく品質管理の重要性」を記述した文書案は、JIS化文書の草案として着実に活用を進め、2022年中に原案作成委員への説明と招集、および再度のニーズの確認を進め、2023年5月にはJSAからの附番を得るに至った。これは、本研究成果が科学的研究成果としてだけではなく、徹底的な培養定量化

を基盤とした細胞製造管理コンセプトの国際標準化の一步としての意義がある成果であると考えている。事実、本研究を通じ、細胞培養工程の開発にはデザインスペースの定量化が必須であり、そのための具体的技術として細胞画像解析技術が極めて有効であることが示された。即ち、細胞画像解析研究を通じて得た研究成果とノウハウが、国際標準化文書の基盤となる JIS 文書へと貢献した意義があったと評価できる。さらに、今回の研究を通じて得たデザインスペース研究データは、単純に公開データとするよりも、JIS 文書に参照されるデータや文書として時期を合わせて社会的に公開することが有効だと考えられたため、現在論文発表および和文参考書の執筆を JIS 化の文書開発と連動して進めている。

以上より、本研究成果は、iPS 細胞の安定な製造工程開発の新しいコンセプトおよび技術開発を実現しただけでなく、国際標準化に続く重要な概念整理と文書草案の構築に貢献できた成果だと言える。

(Achievements in English)

This research aims to develop quality control technology for cell production in regenerative medicine. It focuses on two aspects: (1) mapping the design space through cell image evaluation and (2) developing a method for automated culture process monitoring using cell image analysis.

The study successfully quantitatively analyzed and understood the effects and challenges of automating essential operations for cell culture, such as "vibration," "agitation," "pipetting," and "dispensing," by combining semi-mechanized experiment design technology and cell image information analysis. The findings demonstrate the efficient implementation of design space for human manipulations through quantitative detection of changes in iPS cell morphology and proliferation using image analysis. The introduction of a robotic pipetting machine proved highly effective in overcoming the diverse parameters and challenges in cell culture. The study also revealed that cell image analysis provides essential time-dependent information for evaluating deviations. It discovered a biological phenomenon where iPS cells experience oscillatory physical stress and identified critical process parameters that should be controlled in dispensing and pipetting, highlighting the importance of mechanizing cell culture. The research data, including vibration data, is in high demand from companies involved in automating cell manufacturing processes, facilitating social implementation. By analyzing a large amount of image and quality data using cell morphology information analysis, the study confirmed the effectiveness of ensemble learning and deviation judgment models in detecting quality deviations more reliably. It demonstrated the possibility of constructing stable deviation models suited to the cell production site by combining weak learners like ensemble learning with steady-state data. This AI model for iPS cell image quality judgment is highly applicable in various cell manufacturing sites.

In our research collaboration with Nagoya University and Osaka University, we focused on promoting "semi-mechanization" in various facilities and equipment and developing a standardized approach. We emphasized the importance of organizing and standardizing concepts and terminology, especially in mechanization, to ensure a shared understanding of the parameters. Breaking down the process into detailed work and operation is essential for clarifying mechanized aspects of human work. These insights influenced the description policy and document design of ISO and JIS draft standards. We identified similarities in vibration stress parameters and the impact of time in the dispensing process. The design space validation method using Critical Process Parameters (CPP) and image analysis proved highly reproducible.

This study aimed to promote mechanization of cell culture processes and contribute to international standardization efforts. While the ISO document proposal was withdrawn in ISO, the draft JIS document emphasizing data-based quality control has been utilized. Obtaining an approval number from JSA in May 2023 marks progress in achieving international standardization of cell production management. The research highlighted the importance of quantifying the design space and the effectiveness of cell image analysis. The findings and expertise in cell image analysis contributed to the development of JIS documents. Research data on the design space is being released as referenced material, and publications and Japanese reference books are being written alongside the development of JIS documents.

Based on the above, the results of this study can be considered as achievements that not only realized a new concept and technological development for stable manufacturing processes of iPS cells but also contributed to the essential conceptual organization and document drafting for international standardization.