

表2. Scaffoldの評価基準

材料面
1) 物性: レオロジー特性, 生分解性, 可滅菌性
2) 漏出物: モノマー, 重合開始剤, 内分泌攪乱化学物質
3) LPS
生体との相互作用
1) 細胞応答
2) 炎症反応
3) 免疫応答
4) 細胞活性化

観点から生分解性と可滅菌性についても評価をしなければならない。材料からの漏出物（モノマー・重合開始剤など）については、次に述べる生体との相互作用を引き起こすため慎重に調べる必要がある。特に、内分泌攪乱化学物質あるいは同様の作用を示すものが出て来ないかについては過敏にならざるを得ないであろう。見過ごされがちであるが、LPS (lipopolysaccharides) についても使用前に調べる必要がある。LPS が体内に入ると全身性炎症症状、多臓器障害、多臓器不全を引き起こし、最悪の場合死に至る。材料の滅菌だけではLPSを除去できないので、LPS は今後の scaffold 開発において大きな問題となると考えられる。

生体との相互作用では、やはり、有害な細胞応答を引き起こさないこと（アポトーシス誘導、ストレスタンパク質の発現などで評価可能）、炎症反応、不要な免疫応答を引き起こさないことが重要となってくる。炎症反応や

免疫応答は血液中のサイトカインを調べることで評価できると考えている。また、負の事象だけではなく、細胞の活性化・機能亢進などのプラスの効果がもたらされるような scaffold の開発を心がけたいとも考えている。

まとめにかえて

ここにあげた事項すべてを行ってれば、開発などできないとの意見もあるかと思われるが、生体に使用するには、かなりの規制がかけられるのは覚悟しなければならず、この規制をクリアして初めて再生医工学用 scaffold と呼べるのではないかと思う。このような再生医工学用 scaffold を作り出すためには、最初に、先にあげた基準をほぼクリアするつもりで研究に取り組まなければならないであろう。

そして、このためには研究機関・企業・医療機関の密接な連携、行政のバックアップもまた必要ではなかろうか。これは個人でできるものではなく、日本生物工学会などの組織に期待したい。

文 献

- 1) Vacanti, C. A. *et al.*: *Plast. Reconstr. Surg.*, **88**, 753 (1991).
- 2) Langer, R. and Vacanti, J. P.: *Science*, **260**, 920 (1993).
- 3) Sodian, R. *et al.*: *Ann. Thorac. Surg.*, **70**, 140 (2000).
- 4) 筏 義人編: 再生医工学, 化学同人(2001).
- 5) 中林宣男ら: バイオマテリアル, コロナ社(1999).
- 6) 上田 実編: ティッシュ・エンジニアリング, 名古屋大学出版会 (1999).
- 7) Ito, Y. *et al.*: *Bioconj. Chem.*, **9**, 277 (1998).
- 8) Kawase, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 433 (1999).
- 9) Kawase, M. *et al.*: *Artif. Org.*, **24**, 18 (2000).
- 10) Kawase, M. *et al.*: *J. Biomed. Mater. Res.*, **54**, 519 (2001).

三次元培養による骨髓前駆細胞の増幅

高木 睦^{1*}・相馬 俊裕²・吉田 敏臣¹

造血幹細胞や造血前駆細胞の自己複製と分化・増殖が骨髓中で行われ (Fig. 1), 分化した成熟血球は血液中へ定期的に供給されているが、骨髓中にある接着性の造血支持細胞（ストローマ細胞）と造血細胞との接触などにより産生される種々のサイトカインがこの造血プロセスを調節していると考えられている。しかし、放射線や化学療法を受けたがん患者や白血病患者ではこのしくみに問題があるため、救命のために造血細胞移植として骨髓移

植が行われているが、組織抗原が適合するドナーの数が少ない、ドナーの負担が大きいなどの問題がある。一方、骨髓液に比べて採取が容易な臍帯血造血細胞の移植が解決策として期待されているが、骨髓液に比べて含まれる造血前駆細胞数が少ないため、移植後の造血回復、特に好中球や血小板の増加が遅れる例が多いという問題がある。

これに対して、体外での造血幹細胞や造血前駆細胞の

* 著者紹介 (代表) 大阪大学生物工学国際交流センター (助教授) 〒565-0871 吹田市山田丘2-1

TEL. 06-6879-7456 FAX. 06-6879-7454 E-mail: takagi@icb.osaka-u.ac.jp

¹大阪大学生物工学国際交流センター, ²大阪大学医学部分子病態内科学血液研究室

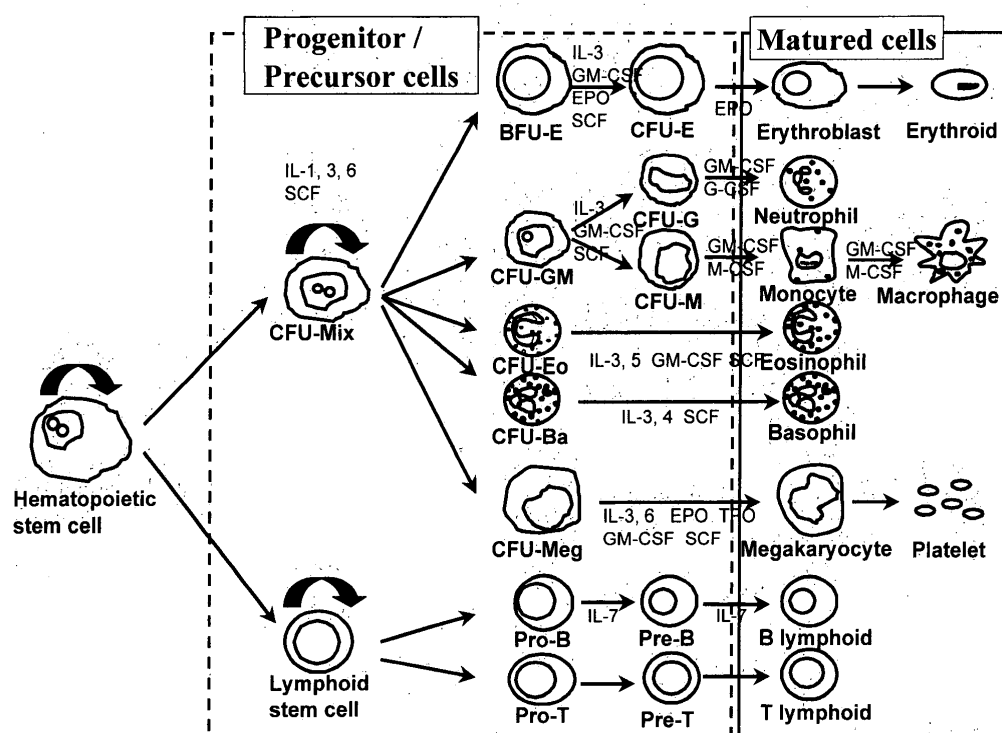


Fig. 1. Proliferation and differentiation of hematopoietic cells.

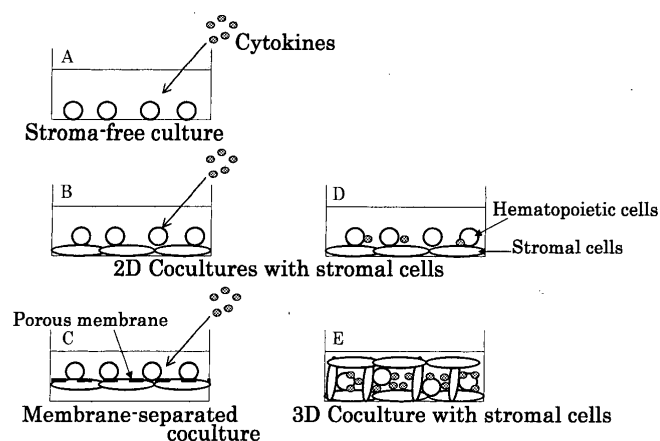


Fig. 2. Various types of hematopoietic cell cultures.

ストローマ細胞接着に適した多孔性担体

マウスストローマ細胞株 (SR-4987) を種々の多孔性担体を用いて培養した結果、セルロース製多孔性ビーズ (CPB, 孔径 100 μm , 旭化成) 上で増殖した細胞の多くが球状であったのに対して、セルロース製多孔性キューブ (MC, 孔径 500 μm , バイオマテリアル社) やポリエステル不織布 Fibracell (FC, NBS 社) 上では細胞が伸展して接着し、特に FC を用いた場合には細胞が繊維芽状に伸展して高密度で接着することが SEM で観察された (Fig. 3).⁴⁾

また、マウス (Balb/c) 初代骨髓細胞に含まれる初代ストローマ細胞と造血細胞との三次元共培養をこれらの担体を用いて行った結果、初代ストローマ細胞も FC 上で良好に接着・伸展することが確認できたとともに、他の担体の場合には造血前駆細胞が培養とともに減少し消失したが、FC を用いた場合にのみ造血細胞に占める前駆細胞の割合が培養中高く維持されることがわかった。⁵⁾ また、ディッシュ底面上で行う二次元共培養では 4 週間目以降造血細胞の 97% が顆粒球に占められたが、FC を用いた三次元共培養ではマクロファージが 45% を占めた他、赤血球も約 5% 残存しており、FC を用いた三次元共培養が造血細胞系統の多様性の点でも骨髓環境をより再現していると考えられた。⁵⁾

増幅培養が試みられているが、ほとんどすべての例で高価なサイトカイン添加を必要とするのが現状である (Fig. 2A, B, C).^{1,2)} また古典的な造血細胞培養法である Dexter 培養法 (Fig. 2D) では、ディッシュ底面上に二次元的に形成されたストローマ細胞層の上で造血細胞との共培養を行うが、幹細胞や前駆細胞のような未分化な造血細胞の増幅はほとんど見られず、分化の方向も偏っている。³⁾ そこで、骨髓構造を模倣してストローマ細胞を三次元的に接着培養し、造血細胞と共培養すれば、サイトカイン無添加でも、細胞がサイトカインを効率的に産生して造血前駆細胞の増幅が可能になるのではないかと考え、三次元共培養系の確立を試みた。

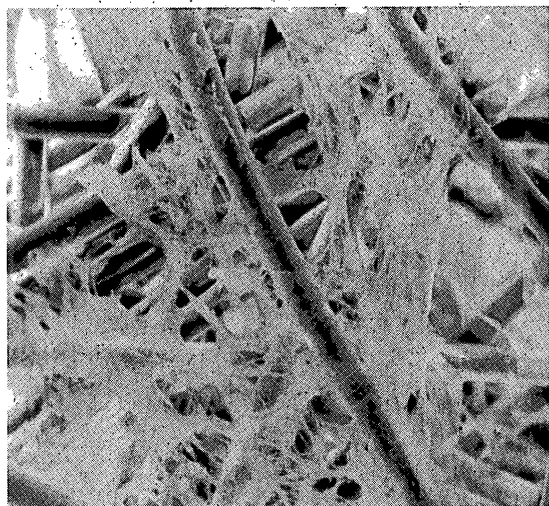


Fig. 3. Spatial development of stromal cells in nonwoven fabric.

三次元共培養による造血前駆細胞増幅

ウェル内にFCを置き、マウスストローマ細胞株ST2を接種し増殖させた後に、接着細胞を除いたマウス骨髓造血細胞を接種し、FCS, HS, ハイドロコーチゾンを含むがサイトカインを添加しないMcCoy's5A培地を用いて3週間三次元共培養した (Fig. 4). その結果、ディッシュ底面に接着したST2細胞の上に造血細胞を接種した二次元共培養では最も未分化な前駆細胞である CFU-Mix 数は培養開始時に比べてまったく増加しなかったが、三次元共培養では3週間で約5倍に増加した (Table 1).⁶⁾

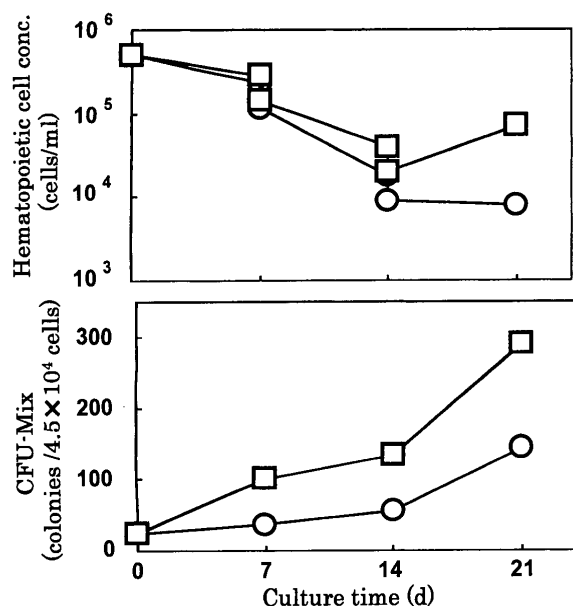


Fig. 4. Comparison of cocultures of murine hematopoietic cells with stromal cells in two and three dimensions. Primary murine hematopoietic cells were cultivated together with pre-attached ST2 stromal cells in 2-D (○) and 3-D with nonwoven fabric (□) culture systems.

Table 1. CFU output from hematopoietic cell cultures in 2-D and 3-D culture systems.

Culture system	CFU-Mix number (colonies/well)				
	Input	Output			
		7 d	14 d	21 d	Total
2-D	267	184	22	26	232
3-D	267	651	119	464	1234

また、C57BL/6-Ly5.1マウス由来の骨髓造血細胞を用いて共培養し1週間後に回収した造血細胞と、培養していない新鮮なC57BL/6-Ly5.2マウス骨髓造血細胞とを同数混合し、放射線照射 (8.5 Gy) により造血系を破壊したLy5.2マウスに移植した (Fig. 5). 移植6ヶ月後の末梢血中に占めるLy5.1血液細胞の割合は、二次元共培養由来のLy5.1細胞を用いた場合が平均で7%だったのに対し、三次元共培養由来のLy5.1細胞を用いた場合は約25%と、培養していない新鮮なLy5.1細胞を用いた場合の約33%と同等であった (Table 2).⁶⁾ これは、二次元共培養では造血幹細胞が顕著に減少するが、三次元共培養では造血細胞に占める造血幹細胞の割合がほぼ維持されることを示している。

おわりに

以上のようにポリエステル不織布を用いたストローマ細胞と造血細胞との三次元共培養では、他の担体を用いた三次元共培養やディッシュ底面上での二次元共培養と

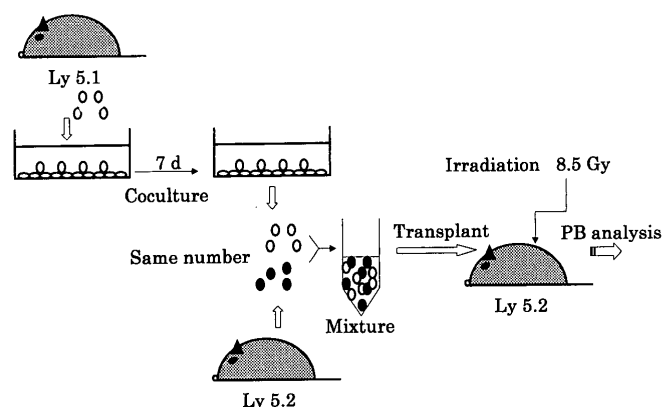


Fig. 5. Assay protocol of stem cell content by transplantation. Hematopoietic cells from a C57BL/6-Ly 5.1 mouse were cultured for 7 d. The mixture of equal amounts of the hematopoietic cells harvested from the 2-D or 3-D culture and hematopoietic cells freshly prepared from the C57BL/6-Ly 5.2 mouse was injected into the tail vein of sublethally irradiated C57BL/6-Ly 5.2 mice. Peripheral blood cells were obtained from tail vein monthly after the transplantation and analyzed using a flowcytometer.

Table 2. Engraftment of cultured hematopoietic cells in irradiated mice.

Transplanted Ly 5.1 cells	Percentage of Ly 5.1 cells among peripheral blood cells (%)					
	1 month	2 months	3 months	4 months	5 months	6 months
Fresh	28.1 ± 6.6	33.2 ± 6.6	30.7 ± 3.8	31.4 ± 1.9	33.8 ± 2.4	33.9 ± 2.5
2-D cultured	3.3 ± 2.4	5.4 ± 3.9	5.7 ± 4.1	6.4 ± 4.2	6.7 ± 4.7	7.4 ± 5.3
3-D cultured	23.9 ± 5.5	28.5 ± 4.2	26.6 ± 4.7	25.7 ± 5.7	25.6 ± 5.7	25.1 ± 8.1

The percentage of Ly 5.1 cells among peripheral blood cells was determined using a flowcytometer. Average values of 5 mice ± SD are shown.

は異なり、造血細胞の分化系統が多様化する、サイトカインを添加しなくても造血前駆細胞を増幅できる、造血細胞中の造血幹細胞の割合がほとんど低下しない、などの優れた特徴を示した。しかし、ストローマ細胞の形態がその機能に影響を与えていることは推測できるが、具体的にどのような機能がどのくらい変化しているかなど作用機作の詳細は不明であり今後の研究課題として残っている。特に、サイトカイン無添加での造血前駆細胞の増幅はその成績の向上およびヒト細胞系への応用により

臨床応用の可能性があり、再生医療への生物工学の貢献という観点からも研究の発展が期待される。

文 献

- 1) Piacibello, W. *et al.*: *Blood*, **93**, 3736 (1999).
- 2) Yamaguchi, M. *et al.*: *Exp. Hematol.*, **29**, 174 (2001).
- 3) Takagi, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 200 (1999).
- 4) Takagi, M. *et al.*: *Cytotechnology*, **31**, 225 (1999).
- 5) Tomimori, Y. *et al.*: *Cytotechnology*, **34**, 121 (2000).
- 6) Sasaki, T. *et al.*: *Cytotherapy*, (2002) in press.

器官工学の新しいアプローチ

竹澤 俊明

組織培養技術が誕生してから、かれこれ100年になる。組織培養技術は、当初は器官培養や組織片培養が発達したが、1960年代以降は培養器具や培養液などの試薬が充実かつ普及して細胞培養が主流となった。その後、動物細胞の培養技術は急速に発展し70年代から80年代になると、動物の組織から分離した細胞を、プラスチック上で培養するのではなくコラーゲンやマトリゲル（再構成基底膜）上で培養することで、さらには平面上で二次元培養するのではなくコラーゲングル内などで三次元培養することで、生体内細胞の機能や形態を再現しようとする培養技術の開発が始まった。90年代以降には、このような研究がさらに発展して組織工学の学際領域が誕生した（図1）。そして、培養細胞とその足場（scaffold）から組織を再構築する組織工学の基盤技術はこの10年間で著しく進歩して、軟骨、皮膚、血管、膀胱などの比較的単純な構造の臓器については、すでに基本的な再構築方法が確立されている。しかし、血管網が豊富でさまざまな分化状態や異なった機能の細胞から構成されている肝臓や腎臓などの複雑な構造の臓器については、決定的な

再構築方法は確立されてない。⁵⁾

著者は、細胞の足場（生体内→細胞外マトリックス、生体外→培養担体）を人為的に「つくる」「こわす」「なくす」「かえる」など操作した際に生じる細胞挙動に興味を持ち、以下の三つの組織再生技術を創出してきた。

第一の方法は、温度感受性ポリマーを利用したスフェロイド（多細胞性球状凝集塊）の形成法である。¹⁻³⁾ 培養

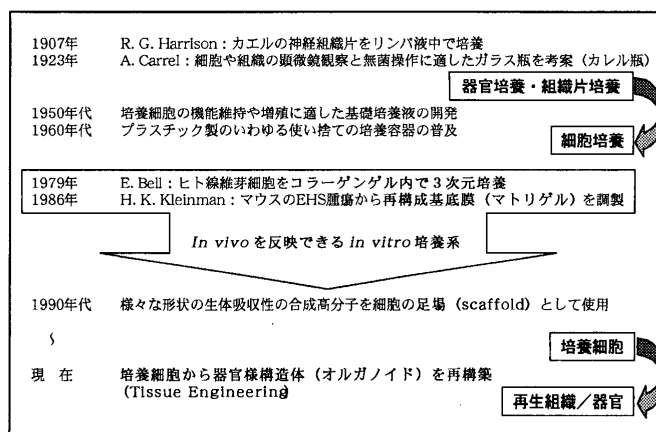


図1. 組織培養の歴史