

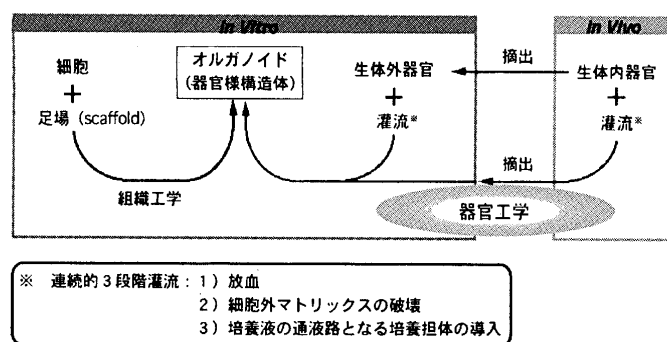


図2. 器官工学の概念

第三の方法は、ラット肝臓に対して連続的3段階灌流を施すことで、大多数の肝細胞を分離することなく、肝臓のオルガノイドを再構築する新しい器官工学の方法である。⁵⁾ この方法は、細胞とその足場 (scaffold) から再構築組織を作製する従来の組織工学の概念とは異なり、臓器を培養バージョンに改変して再構築組織を作製するので、器官工学の新しい概念として確立した (図2)。具体的には、肝臓の門脈より、1) 血液を臓器より除去するための平衡塩溶液、2) 臓器構成細胞の足場 (細胞外マトリックス) を破壊するためのコラゲナーゼ/ディスパーゼ溶液、3) 多細胞性構造を再構成するための細胞の足場 (培養担体) としてのI型コラーゲン含有培養液を用いて、連続的な3段階の灌流操作を施した。肝臓の再構築オルガノイドは、灌流した肝臓をラットより摘出した後、導入したコラーゲンを完全にゲル化させるために37°Cで2時間培養することで作製した。3週間培養した後の再構築オルガノイドにおいても、肝細胞はアルブミンを発現しており TUNEL 陰性であることから、肝実質細胞が健康な状態で維持されていることが明らかとなった。さらに、連続的3段階灌流の3段階目の操作で、線維芽細胞を懸濁した培養液を用いることで、線維芽細胞を肝臓の再構築オルガノイドに導入することにも成功した。この方

- 1) 3次元の多細胞性構築体を誘導できること
- +
- 2) 培養液の通液路ネットワークを有すること
- +
- 3) 細胞の分化状態 (細胞譜系) を制御できること

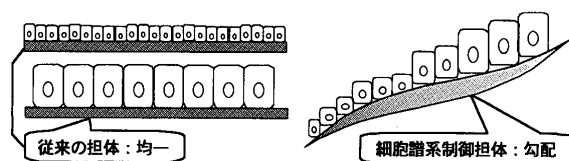


図3. 多機能性培養担体の条件

法は、肝臓のみならず血管網が豊富で複雑な構造の他の器官 (たとえば腎臓や脾臓など) のオルガノイド形成への応用も考えられるので、新しい「器官工学」の概念として更なる発展が期待できた。

今後より確実に、動物の成熟臓器や幼胚の組織を、培養細胞より再生もしくは発生できるような培養技術確立していくためには、*in vitro* で高次構造の組織を再構築するための多機能性培養担体を開発する必要がある。理想的な多機能性培養担体の条件は、1) 多種類の細胞 (幹細胞、間葉系細胞、上皮系細胞など) の自己組織化により三次元の多細胞性再構築体を誘導できること、2) 培養液の通液路ネットワークを有すること、3) 細胞の分化状態 (細胞譜系) を制御できること (生体内組織における細胞の場所的および時間的情報を反映していること) であると考えている (図3)。

文 献

- 1) Takezawa, T. *et al.*: *Bio/Technol.*, **8**, 854 (1990).
- 2) Takezawa, T. *et al.*: *J. Cell Sci.*, **101**, 495 (1992).
- 3) Takezawa, T. *et al.*: *Exp. Cell Res.*, **208**, 430 (1993).
- 4) Takezawa, T. *et al.*: *Tissue Eng.*, **3**, 329 (1997).
- 5) Takezawa, T. *et al.*: *Tissue Eng.*, **6**, 641 (2000).

組織モジュール構築法と実用化

石川 陽一*・青田とも子

細胞を三次元に高密度化し組織モジュールを構築することによって細胞の機能発現やその維持が可能になる。組織モジュールは 1. 再生医療 2. 物質生産 3. 安全性評価 4. 薬理評価 5. 抗ウイルス剤の開発 6. 動物実験の代替などに有効に利用されるが、その目的に適合するようなモジュールの構築のためには生化学、材料、

遺伝子やタンパクなどからだけでなく生物工学やハードウェアからのアプローチも必要である。

細胞モジュール構築の条件

細胞が高密度に集積するとすべての細胞に栄養と酸素を供給することが難しくなる。生体では毛細血管などそ

* 著者紹介 (代表) エイブル株式会社 (取締役社長) 〒162-0812 東京都新宿区西五軒町6-10
TEL. 03-3260-0415 FAX. 03-3260-0407 E-mail: ishikawa@biott.co.jp

の機能を果たす機構があるが、リアクター内で同様な構造を構築することはできないので、細胞が増殖できる環境を作り出していく必要がある。我々は栄養と酸素を細胞全体に供給することを目標にいくつかのリアクターを開発してきたので紹介する。

従来のリアクターの欠点

従来固定床型のリアクターおよびホローファイバー型リアクターが使われている。固定床型リアクターでは培養液は圧力損失が少ない部分に流れて環境がよい部分に細胞が増殖するが、いったん増殖すると増殖した細胞が培養液の流れを阻止してしまい、他の流れやすい場所へ培養液が流れて増殖した細胞が壊死してしまう。またリアクター内に発生するガスが流れを阻害することもあり、これらの問題を解決する必要がある。血管を模倣した姿として中空系を利用したホローファイバー型リアクターがある。しかし中空系の寸法は毛細血管のように細くはできないため中空系と中空系の隙間が大きく空いてしまい、中空系が撓みやすいので均一に配置しにくいこともあって中空系の間で細胞の環境が悪くなってしまう。また播種した細胞はその重力で沈んでしまうので細胞を均一に播種することが難しいこと、培養液の入口と出口では培養環境が異なるため細胞密度に偏りができてしまうことなどの欠点があり、 $2 \times 10(E+7)/\text{ml}$ 程度が最高密度である。

ラジアルフロー型バイオリアクター

上記の問題の解決のためキリンビール(株)がラジアルフロー型バイオリアクターを開発し当社が技術供与を受けて製造販売をしている。その構造を図1に示す。二重円筒になった網を垂直に置き、網に囲まれたドーナツ状部分に多孔質担体を最密に充填し、外周から中心に向かって逆ラジアル方向に培養液を流す。中心ほど酸素と栄養が枯渇するがその分流速が速くなり、供給量が増える。中心で圧力損失が生ずるので培養液が全体を流れやすい形状となっている。細胞は担体と担体の間に多く増殖し、細胞が詰まっても担体の多孔質部分が流路を形成しているので培養液の均一な流れが確保できる。リアクター出口の溶存酸素を維持するように剪断力が許す範囲で流速を制御する。肝細胞の場合、細胞が高密度化してしまうと供給時の酸素濃度を純酸素で高めても流路を13 mm以上にすると酸素が枯渇してしまう。細胞密度は $10(E+8)/\text{ml}$ 担体以上と高密度化しうるが、培養中に細胞をサンプリングできないこと、細胞量が多くなるので

制御が難しくなり装置が高価になることなどの欠点があり、現在これらの課題の解決に取り組んでいる。国立感染症研究所ウィルス2部では慈恵医大(現杏林大)永森らと共にこのリアクターにヒト株化肝細胞を増殖させ、ここにC型肝炎ウィルス(HCV)の遺伝子を導入することによって、HCVを大量に複製しうることを示した。今後抗ウィルス剤の開発などへの利用が期待される。

干満培養装置

コラーゲンコートしたガーゼにラット株化肝細胞RLC16を播種し、ロール状に巻いて96穴プレートに入れ、培養液を供給、除去を繰り返すことによって気相から酸素を供給する干満培養法を検討した。培養液を満たす「満」時間を長くするとガーゼの表面に単層状に増殖するが、満の後すぐ培養液を除去して気相から酸素供給を行うことによって局部的ではあるが細胞が $300 \mu\text{m}$ の

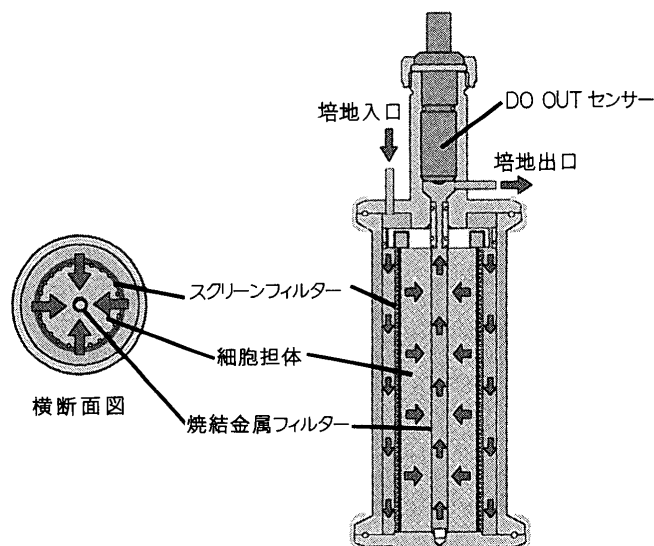


図1. ラジアルフロー型バイオリアクターの構造

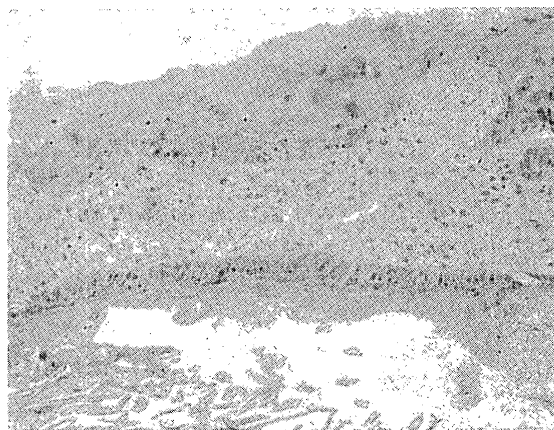


図2. ヒト皮膚線維芽細胞と角化細胞の傾斜培養装置を用いた共培養

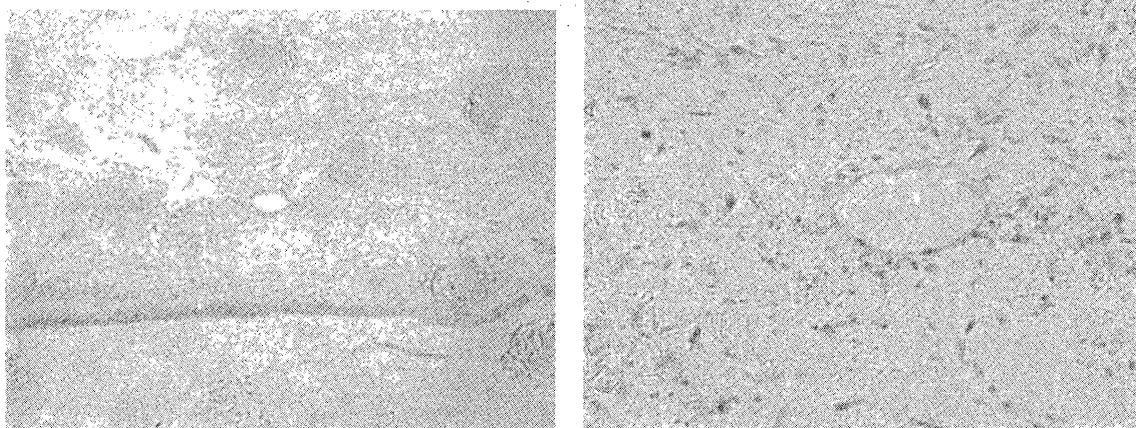


図3. ヒト皮膚線維芽細胞とヒト臍帯静脈血管内皮細胞の傾斜培養装置を用いた共培養（右図は左図の拡大図）

厚さに積層し高密度化した。

遠心培養法

多孔質担体を円盤状に形成し水平に回転させることによって遠心力で中心から外周へ放射状に培養液を供給する遠心培養法で、皮膚線維芽細胞およびラット肝臓星細胞を培養した。線維芽細胞は担体表面で厚さ方向に300 μm の厚さに増殖した。回転数を高くすると流速が速くなって剪断力がかかり、細胞が損傷するので直径60 mm程度の円盤では回転数が30～50 rpm程度に制限されてしまう。

傾斜培養法

遠心培養法では流速が外周ほど高くなり、均一にはならないので解析が難しい。そこで傾斜板にコラーゲンコートしたガーゼを置き上端を傾斜板から垂らして貯槽中の培養液に浸漬した。培養液は毛細管現象でガーゼを

上昇し、傾斜板に沿って流下する。下に溜まった培養液はポンプで再び貯槽に戻す。間欠的に傾斜方向を変えることによって細胞の均一化を図った。皮膚線維芽細胞をコラーゲングルに混ぜてガーゼに播種し、その上に角化細胞を播種して共培養したところ角化細胞が同じ方向に配向して線維芽細胞を取り囲む皮膚様組織を構築した（図2）。また線維芽細胞とヒト臍帯血管内皮細胞を共培養したところ三次元に構築した線維芽細胞の中に多くの血管様管空が形成された（図3）。静置培養では上記の組織様構造は構築されなかった。

おわりに

組織モジュールは目的に適合する細胞種、形状、大きさ、機能などを備える必要があるが、まだ細胞モジュールを構築、維持するための技術が確立していない。ハードウェアを含めた今後の共同研究などによる進展を期待する。

ティッシュエンジニアリングの産業化と課題

森 由紀夫

再生医療に関する日本の基礎的な培養技術、臨床応用実績は、欧米諸国に対して十分な競争力を有しているものの、「製品化」、「産業化」に関しては欧米に後れをとっているのが現状である。このような中で、国家的な支援の動きとして、発生・再生科学総合研究センター（理化学研究所）、先端医療センター（先端医療振興財団）、ティッシュエンジニアリング研究センター（産業技術総合研究所）などの研究開発拠点の設立や、再生医療分野

のミレニアムプロジェクトなど急速に研究開発体制が整いつつある。

しかし一方で、脳死患者からの臓器移植、再生医療技術の進歩に関して、「倫理」、「インフォームドコンセント」などのキーワードが重要視され、技術優先では社会に受け入れられないことも考えねばならない。

これらの状況の中で、ティッシュエンジニアリングを日本における医薬品、医療用具に続く新たな医療関連産

* 著者紹介 (株) ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング 研究開発部（生産技術マネージャー）

〒443-0022 愛知県蒲郡市三谷北通6-209-1 TEL. 0533-66-2020 FAX. 0533-66-2018 E-mail: morimori@jpte.co.jp