

Wet *in-vivo* シミュレーターとしての multi-organ-on-a-chip (MOC) への期待

金森 敏幸*・杉浦 慎治

細胞治療や再生医療への一般の人々の関心は高く、巨額の国費が投じられて研究開発されている。細胞治療や再生医療の普及と関連する製品群による産業創出には、まだ相応の年月を要すると思われるが、一連の研究開発がもたらした副次的な果実として、ヒト細胞に関する理解が深まったことと、ヒト細胞を扱うためのさまざまな周辺技術が生み出されたことがあげられる。昨今は、それらの水平展開に注目が集まっている。

そのうちもっとも期待されているのが、創薬プロセスへの応用である。山中伸弥先生はヒトiPS細胞の実用化の道筋として、再生医療の前に創薬応用があると述べられているが、一方、横浜市立大学の谷口英樹先生は、まずは再生医療（ヒトiPS細胞由来の臓器特異的細胞の移植治療）があって、創薬応用はその後、と明言されている¹⁾。現在、細胞治療や再生医療が対象としている疾患の多くは、治療法が存在しない難治性疾患であって、不完全な臓器/組織特異的細胞であっても、患者様の救命やQOL向上の観点から臨床応用を目指さざるを得ない事情がある。一方、一般医薬品は、投与されることによって患者様が健常に復帰できることを前提にしており、その効果と安全性はきわめて高い水準で担保されなくてはならない。したがって、医薬品候補化合物の効果や安全性の評価にヒト細胞を用いる場合、その健全性や機能は健常人の*in vivo*と同様である必要がある。

〇〇細胞（幹細胞）から△△細胞が作製できた（△△は臓器や組織の名称）、というニュースを頻繁に耳にする。一方で、創薬プロセスでもっとも重要な対象臓器である肝臓の細胞でさえ、日常的に用いられている幹細胞由来の製品は未だ存在しない。

細胞アッセイにおける課題

細胞を用いて医薬品候補化合物の薬効や安全性を評価する技術を細胞アッセイ (cell-based assay) と呼ぶ。現在でも細胞アッセイは用いられているものの、マルチウェルプレート上でヒト細胞を培養し、そこに化合物を添加して細胞の反応を調べる方法が主流である。この方法では、細胞単位での反応を調べることはできるかもしれないが、全身性の現象、たとえば複数の臓器や組織間の反応は評価できない。そのため、臨床治験を実施する

ためには、何種類かのほ乳類を用いた全身性の試験が必要となるが、遠藤章先生のスタチン実用化でよく知られているように、しばしば種差が問題となる。また、食品添加物や農薬、あるいは化粧品などは、人体への影響を極力小さくしなければならないが、一般的にはヒトによる評価は実施できない。

したがって、次世代の細胞アッセイ技術では、1) 臓器/組織特異的機能を*in vitro*で誘導する、2) *in vivo*の臓器/組織間相互作用を*in vitro*で再現する、の2点を達成する必要がある。

Organ-on-a-chip

送液技術 上述の1)を達成するためには、遺伝子操作や培地成分を検討する研究が一般的である。しかしながら、肝小葉の微細構造と、既存の細胞アッセイで用いられるディッシュや平底フラスコで培養されている細胞の状態とを比較すると一目瞭然だが、細胞が置かれている環境がまったく異なる。20年ほど前にMEMS (micro electro mechanical systems) の応用先としてμTAS (micro-total analysis systems) が注目され、その流れの中でMEMSを用いた培養環境の制御に関する研究が始まった。マイクロプロセスを応用してヒト細胞にチップ（切手程度からマルチウェルプレート程度の大きさ）上で臓器/組織特異的機能を誘導する技術は、organ-on-a-chip (以下、OOC) と呼ばれている²⁾。OOCに関連する研究論文もここ10年で急激に増加していて、培養環境の精密制御によって、ありとあらゆる臓器や組織の機能が発現できると期待されている。

個々の詳しい研究の内容、すなわち、どうやって*in vivo*機能を誘導するかなどについては、既報の総説²⁾を参照いただくとして、ここではOOCを製品化する際の課題点を述べたい。

自動化された、いわゆるパイプライン・テクノロジーが浸透している創薬プロセスでOOCを実用化するためには、高いユーザビリティが必須である。また、既存の細胞アッセイ技術ほどではないにしろ、ある程度のスループットは必要である。それらを満たすために克服すべき技術課題は多数あるが、その中でもっとも困難なのは外部との接続である。チップで用いる液の種類ごと

* 著者紹介 産業技術総合研究所創薬基盤研究部門 (研究グループ長) E-mail: t.kanamori@aist.go.jp

にチップへの供給経路を変えなければならない場合、その数だけポンプとチップへの接続が必要である。これは、細胞チップのみならず、 μ TASのチップを実用化する場合に共通の課題である。

この課題を解決するため、たとえば、東京大学の木村らはチップ上へのロータリーポンプの組み込みを³⁾、筆者らは圧力による液駆動⁴⁾を検討している。

チップ製造技術 細胞を取り扱う場合、顕微鏡による観察が必須であり、チップを作製する材料は光学的透明性を有する必要がある。また、そういった材料で、数～数百 μ mの構造を許容される公差内で作製する加工技術も必須である。一般的には、二つのプレートの片面に微細構造を作り込み、貼り合わせてチップとするプロセスが用いられるが、その場合には、液漏れがないように(チップ外だけではなく、微細構造間でも)接合する技術も重要となる。OOCに関連する論文は、*Lab on a Chip*などの学術誌で無数に発表されているし、 μ TASの国際学会であるInternational Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciencesの昨年の大会(MicroTAS 2016)では発表演題の1/4程度が細胞に関するものとなっている。それらの研究において、チップは、Harvard大学のWhitesidesが開発したソフトリソグラフィ⁵⁾を用いてpolydimethylsiloxane (PDMS)から作製されるか、あるいは、ガラスや透明性プラスチック(glassy polymer)の平板をマイクロミリングによって加工して得ている場合がほとんどである。これらのチップ作製法は、設計から作製までのサイクルが短く(数日からたかだか1週間)、研究には非常に適しているが、マイクロミリングにしろ、ソフトリソグラフィにしろ、生産性に限界があるので、製品の製造技術としては不適である。

プラスチック製品は、一般的には射出成形法によって製造される。鯛焼きを作るのと本質的には同じで、微細構造を刻み込んだ金型に溶融させたポリマーを流し込んで所定の構造を有するプラスチック製品を得る。プラスチック製品(あるいは部品、部材)ごとに金型が必要となるが、金型は高価であり、製品の数で償却せざるを得ない。しかしながら、OOCの研究・開発プロセスは、上述の通りきわめて流動的かつ柔軟に行われているため、開発から製品化への橋渡しが困難である(いったん作ってしまった金型は、原則変更はできない)。

また、ソフトリソグラフィと射出成型を組み合わせた方法で、シリコン系ポリマーでチップを数百個作る技術もある⁶⁾。しかしながら、シリコン系ポリマー(PDMSもその一種)は自由体積が高いため、低分子化合物を吸着(sorption, 固体状のポリマーへの吸収)する。吸着は疎水性化合物で顕著であるが、経口投与の医薬品

のほとんどは疎水性であるため、その水溶液をシリコン系ポリマーで作製したチップに流通すると、濃度が著しく減少する場合がある。したがって、細胞アッセイチップの材料として、シリコン系ポリマーは不適である。

いずれにしても、マイクロプロセスでヒト細胞によって臓器/組織機能を誘導できる、という仮説のもとで開発されたOOCの機能を検証するためには、創薬現場などで評価する必要があるが、そのためにはある程度の個数(一般的には数十個から数千個)を製品レベルの品質で作製する必要がある。コストや製造までに要する日数などが現実的な製造技術の確立が必要不可欠である。

OOC製品 以上のような事情により、OOCの製品は世界中でもそれほど多くはない。現在OOC製品を販売している海外の企業を表1にまとめた。すべてベンチャー(多くが大学からのスピンアウト)であり、関連する学会や展示会で筆者らが製品を確認した企業もあるが、単にインターネット検索や諸処の情報に基づくものもある。また、これらのうちほとんどの企業はmulti-organ-on-a-chip (MOC)を主な製品としているが、それについては次項で述べる。国内では、北九州市立大学の中澤浩二の技術を基にSTEMバイオメソッドから販売されているマイクロスフェアアレイと、筑波大学の長崎幸夫の技術によるCell-Able(東洋合成工業で製品化され、住友ベークライトから販売されている)があるが、どちらもディッシュ底面で細胞に自発的にスフェロイドを形成させるものである。

マイクロスフェアアレイとCell-Ableは静置培養であるし、筆者らが知る限り表の中でもっとも使われているMimetasのチップは、マルチウェルプレートの底に微細構造を作り込み、毛細管現象によって細胞を適切な空間配列で播種するもので、上で述べた液のハンドリングの問題は、通常のピペット操作で解決している。

Multi-organ-on-a-chip (MOC)

Wet in-vivoシミュレーターとしてのMOC 薬学で必修科目となっているpharmacokineticsは、BischoffとDedrickの一連の研究をルーツとしているが、Bischoffは筆者らと同じ化学工学(Chemical Engineering)を専門としている(Dedrickは彼の学生)。Bischoffは反応工学(Chemical Kinetics)やプロセス工学で多くの業績を残し、優れた教科書⁷⁻⁹⁾を記している。1960年代、化学産業は目覚ましい発展を遂げたが、それを支えたのは化学工学であり、この時代、化学工学もまた学問として大きく飛躍した。そんな流れの中で、生体を臓器/組織をユニットオペレーションとする化学プラントと見なし、生体内の現象を化学工学で取り扱おうという多くの研究が、主に米国を中心としてなされた¹⁰⁾。Bischoffによる

表1. OOC, MOC 製品を販売している海外の企業の一覧

| 企業名 | HPのURL | 設立国 | 設立年 | 概要 |
|------------------------|---|------|------|---|
| Micronit | http://www.micronit.com/ | オランダ | 1999 | Lab-on-a-ChipとMEMSに基づく製品開発 |
| Kirkstall | http://www.kirkstall.com/ | 米国 | 2006 | U. Pisaのスピンアウトベンチャー Quasi Vivo® (MOC製品) Lonzaが販売 |
| Hesperos | http://www.hesperosinc.com/services/ | 米国 | 2016 | Human-on-a-chipの提唱者のM.L. Shuler (Cornel U.) のスピンアウトベンチャー |
| Inspheero | https://www.insphero.com | スイス | 2009 | 細胞ベンダー |
| Nortis | https://www.nortisbio.com/ | 米国 | 2012 | U. Washingtonのスピンアウトベンチャー Microfluidic chip |
| Mimetas | http://mimetas.com/ | オランダ | 2013 | OrganoPlate® (96穴または384穴のマルチウェルプレート の底面に細工) |
| Emulate | https://emulatebio.com/ | 米国 | 2013 | D. Ingber (Wyss Institute)のスピンアウトベンチャー |
| cNBio Innovations | http://cn-bio.com/ | 英国 | ? | DARPAのHuman-on-a-Chipのプロジェクト (PL: MIT のL. Griffith)のスピンアウトベンチャー |
| TissUse | https://www.tissuse.com/en/ | ドイツ | ? | U. Marx (Technische Universität Berlin)のスピンア ウトベンチャー Multi-Organ-Chip (2臓器または4臓器) |
| Tara Biosystems | http://tarabiosystems.com/ | 米国 | ? | スピンアウトベンチャーらしいが詳細は不明 心臓系が専門 (具体的な製品は不明) |
| AxoSim Technologies | http://axosim.com/ | 米国 | ? | Tulane U.のスピンアウトベンチャー Nerve-On-A-Chip (詳細不明) |

pharmacokineticsの創出は、ある意味必然であった。

シミュレーションを専門とする方は痛感されていると思うが、結果の妥当性をいかに担保するかが常に問題となる。シミュレーションの真骨頂は、未知な、あるいは実験が困難な現象の予想であるが、合った合わないだけに固執し、回帰的手法で得たシミュレーションが報告されることもあり、実験ベースの研究者の不信感を招くことが多々ある。

特に生体现象のシミュレーションは、ヒトについては通常は検証することが困難であるため、臨床現場などに受け入れてもらうのに苦労する。Cornel大学のShulerは、専門はやはりChemical Engineeringであるが、この問題を克服するためにphysiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelを提案し¹¹⁾、さらにそれを検証するツールとしてcell culture analog (CCA) systemの有用性を示した¹²⁾。当初はバイオリアクターを用いていたが、チップ上に培養チャンバーを設け、さらには複数の臓器の機能を結合した系を発表した^{13,14)}。Shuler自身は μ CCAと呼んでいるが、これがMOCの最初の報告である。ちなみに、チップを斜めにすることによる水頭圧によってチップ内に液を流しており¹⁴⁾、OOCの製品化のところでも述べたとおり、コストやユーザビリティの面から、こういったシンプルな方法(ある意味ローテク)は注目

に値する。

MOCへの期待と技術上の問題点 MOCは、いわゆる“化学物質評価のジレンマ”(ヒト細胞培養系では全身性の現象を再現できず、動物実験では種差の問題がある)を克服できると期待されている。また、欧州では実験動物の使用が困難になりつつあり、まずは化粧品の開発から規制が始まっているが、追ってそれ以外の化学物質へと規制が広まっていくと考えられる。我が国でも、県によっては、医療用途の製品開発も含め、大型動物の使用が難しくなっていて、動物実験の廃止は世界の潮流であると思われる。

医薬品開発においてMOCに求める機能は、臨床治験をどれだけ予測できるかどうか、である。個々の臓器/組織の機能(すなわち、OOCとしての機能)が*in vivo*を反映していることが大前提となるが、どんな臓器/組織をどのように結合して構成するか、も重要である。

MOCが大きな注目を集めたのは、5年前、米国のDARPA (Defense Advanced Research Projects Agency)がNIHとともにMOCを開発する目的で、3,700万ドルのプロジェクトをスタートさせたことである¹⁵⁾。そこでは、「少なくとも10臓器をチップ上に実装し、複雑な生体内の生理機能を反映すること」が求められている。DARPAが資金提供元であることから推察できるよう

に、その真の目的は化学兵器や生物学兵器に対する兵士の安全性確保であり、当該プロジェクトが開始された当時は、MOCはhuman-on-a-chipと呼ばれていた。

しかし、最近ではNIHやFDAも創薬応用を重要視しており、NIHのNCATS (National Center for Advancing Translational Sciences) を司令塔として、“Tissue Chip for Drug Screening”を国家レベルで推進している。また、世界経済フォーラムの“the top 10 emerging technologies of 2016”¹⁶⁾にもorgans-on-a-chipが選ばれており、今後当該技術に関する世界中の研究開発がますます加熱すると思われる。

MOCの実用化に関してすぐにでも克服すべき技術上の問題点として筆者らが考えているのは、1) 有用性の検証、2) 製造方法の確立、の2点である。OOCのところでも述べたが、大部分の企業はOOCのみならず、MOCの製品化も視野に入れている。しかしながら、医薬品開発の現場でルーチン的に用いられている製品は、筆者らが知る限りでは、未だ存在していない。それは、この二つの問題のために、ビジネスモデルが立てられないことが要因である。MOCのみならず、OOCでさえも、大手企業が本腰を入れて参画しないのも、同じ理由である。

1) については、勿論human-on-a-chipが開発できればwet *in-vivo* シミュレーターとしてさまざまな用途が期待できるが、何をもってしてhumanとするのかは、おそらく誰にも、どのようにしても決定できないであろうから、現実的には具体的な*in vivo*現象を仮定し、その現象に主に関わる臓器/組織を選び、*in vivo*を模倣してチップ上に実装することになる。その場合、OOCでの培養上清を逐次添加する方法(ディッシュを用いる場合のコンデショニングメディウム法と同様)とどこが違うのかが説明しにくい。したがって、培養液は単回通過ではなく、循環させる必要があるが、そういった機構をどのように作り込むのか、と、結果をどう解析するのか、が重要となる。さらには、OOCのところでも述べたが、ユーザビリティとコスト、適切なスループットへの配慮も、実用化には必須である。

次世代型細胞チップの臨床応用

21世紀はバイオの時代と言われているそうだが、バイオサイエンスの応用先としてもっとも期待されるのが臨床現場である。アカデミアの研究成果を産業へ応用する際、ありがちなのが理化学機器としての製品化であるが、あえて誤解を恐れずに書けば、理化学機器の市場規模は小さい。医薬品開発に用いられるとしても、同様であろう。大手企業がバイオに進出するのに二の足を踏むのは、産業規模(予想される売上高)が小さいためである。

臨床現場、特に臨床検査に普及するとなるとその市場規模は格段に大きくなるが、医療製品は、我が国では珍しく、輸入超過の分野である(つまり、海外の企業の戦略勝ち)。MOCはPOC (point of care)、ベッドサイド診断、personalized medicineなどときわめて相性が良い。我が国が強みとするヒトiPS細胞に関する技術を使って、患者様の体細胞からその患者様が患っている疾患のモデル細胞を作製し、それに最適な治療法(投薬だけではない、後述)をベッドサイドで選択する(しかもそれら一連の操作は「使い捨ての」チップ上で)、というのは、筆者らの妄想であろうか?

最後に、2014年11月にBostonで開かれたFAST (Functional Analysis & Screening Technologies Congress)で聴講したWake Forest UniversityのProf. Verbridgeによる研究発表を紹介したい。米国人に多いgliomaの治療で用いられるirreversible electroporationについて、マイクロチップ内で患者様のgliomaと複数の細胞を培養して、治療条件を検討している¹⁷⁾、ということであった。OOCやMOCの臨床現場への応用についても、我が国は一步遅れているのでは、と危惧する。

文 献

- 1) 第22回HAB研究機構学術年会招待講演I, 2015年6月26日, 東京.
- 2) Bhatia, S. N and Ingber, D. E.: *Nat. Biotechnol.*, **32**, 760 (2014).
- 3) Kimura, H. *et al.*: *Lab Chip*, **8**, 741 (2008).
- 4) Hattori, K. *et al.*: *J. Lab. Autom.*, **18**, 437 (2013).
- 5) Xia, Y. N and Whitesides, G. M.: *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **28**, 153 (1998).
- 6) (一例として) 株式会社メイホー: <http://www.meiho-j.co.jp/index.html> (2017/06/05)
- 7) Bischoff, K. B.: *Chemical Reaction Engineering*, ACS (1972).
- 8) Froment G. F. and Bischoff, K. B.: *Chemical Reactor Analysis and Design*, Wiley (1979)
- 9) Bischoff, K. B. and Himmelblau, D. M.: *Fundamentals of Process Analysis and Simulation*, AIChE (1967).
- 10) Cooney, D. O.: *Biomedical Engineering Principles*, Taylor & Francis (1976).
- 11) Quick, D. and Shuler, M.: *Biotechnol. Prog.*, **14**, 540 (1999).
- 12) Sweeney, L. *et al.*: *Toxicol. In Vitro*, **9**, 307 (1995).
- 13) Sin, A. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **20**, 338 (2004).
- 14) Sung, J. H., *et al.*: *Lab Chip*, **10**, 446 (2010).
- 15) Wyss Institute: <https://wyss.harvard.edu/wyss-institute-to-receive-up-to-37-million-from-darpa-to-integrate-multiple-organ-on-chip-systems-to-mimic-the-whole-human-body/> (2017/06/05)
- 16) 世界経済フォーラム: <https://www.weforum.org/agenda/2016/06/top-10-emerging-technologies-2016/> (2017/06/05)
- 17) Morgan, J. P. *et al.*: *Nat. Protoc.*, **8**, 1820 (2013).