

2017年度 生物工学賞 受賞



構造体形成を伴う動植物細胞の培養と 利用に関する生物工学研究

田谷 正仁



Bioengineering studies on cultivation and application of plant and animal cells propagating with cellular constructs

Masahito Taya (*Division of Chemical Engineering, Department of Materials Engineering Science, Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 1-3 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka 560-8531*) *Seibutsu-kogaku* **96**: 2-11, 2018.

1. はじめに

この度、図らずも2017年度生物工学賞受賞の荣誉に浴し、私のこれまでの研究を総括する良い機会を与えていただいた。貴重な会誌の頁を使って甚だ恐縮ではあるが、端緒として、私の研究活動における経緯のようなものに少し触れさせていただきたい。

学生時代も含め40年余りの研究内容を振り返ると、初期の頃の主な研究対象はセルロース分解性のルーメン細菌などであった¹⁾。微量の酸素混入も嫌う偏性嫌気性細菌を取り扱うことから、ジャー・ファーメンター培養などは色々な工夫を凝らす必要があった。また、培養液相はセルロース粉末を含む不均一系を形成するため、培養中の細胞濃度をリアルタイムで正確に把握することも不可能であった。爾来、培養が一筋縄では行かなさそうな対象細胞を好んで研究の題材とした。今回の受賞対象となった植物細胞や動物細胞を取り扱った研究は1987年ころから始めたものであるが、懸濁培養系とは程遠い不均一な状態を形成するだけでなく、時に不均質な細胞集団（あるいは細胞組織体）を形成する培養系として特徴づけることができる。いずれの場合も、筆者らが研究を始めた当初は、生物工学的な観点からの研究はほとんどなされておらず、手探り状態で研究を開始した。

私の研究への取組み方に影響を及ぼしたものに講義がある。私は1988年に大阪大学基礎工学部化学工学科に講師として着任した。以来、学部学生の主要科目として

「物理化学」「反応工学」「生物化学工学」を担当させていただいた（後者の2科目は現在も担当）。職務である講義担当に「させていただいた」という物言いは奇異に感じられるかもしれないが、私自身、担当した講義を通じて大変多くのことを学ばせていただいた。物理化学の講義では、現象を抽象的にとらえモデル化して表現することの面白さを学んだ。余談だが、単位を気にする習性がついたのもこの講義のお蔭である。講義の冒頭、よく次のような雑談をした。

○摂氏温度 t [°C] を絶対温度 T [K] に変換する式を $T = t + 273$ と書くのは間違い。なぜなら、たとえば、27°C と 273 は足し合わせることができないので、 $T/K = t/°C + 273$ と単位を除いた式で書くのが正しい。

○cells/cm³ は慣用単位として認めているが、SI 単位には正しくない。接頭語は原則として最初の単位に一回だけ付ける (kg は例外)。また、個数を表す唯一の SI 単位は mol である。たとえば、大阪府の人口は 14.6 amol (アトモル)。

○ dX/dt の表記は不可。SI のルールでは物理量を表す記号は斜体とするが、数学の演算子記号は斜体としないので、 dX/dt の表記が正しい。

などなど……。

反応工学の講義を通じて二つの視点の重要性を学んだ。すなわち、(1) 反応解析：実験で得られたデータがどのような現象に基づいているのか、その因果関係を整理し、それを記述する理論を構築する。(2) 反応器

設計：目的とする生成物を必要量生産するための装置とその操作方法を論理的に決定する。大阪大学基礎工学部の創設理念は「科学と技術の融合による科学技術の根本的開発、それにより人類の真の文化を創造する」である。生物化学工学では、この精神を講義に反映したいと試行錯誤しているうちに、前段部分からBioscienceとBioengineeringのバランス感覚、後段部分からは成果の社会へのアウトプット意識が養われた。

以下の項では、構造体形成を伴って生育する動植物細胞に関する研究を紹介させていただく。いずれの場合においても全体を貫く研究方針は、基礎としての「増殖過程のモデル化とそれに基づく特性評価」→開発研究としての「バイオリクター・培養操作の設計と培養システム開発」→展開研究としての「培養細胞・組織利用の要素技術開発」である。

2. 植物毛状根

2.1 毛状根の増殖過程のモデル化とそれに基づく特性評価 土壌細菌 *Agrobacterium rhizogenes* のもつ Ri プラスミドが植物細胞の染色体に組み込まれると、植物細胞は不定根に分化した状態で無限の増殖能を獲得するとともに、代謝産物などの生産能が高い、いわゆる毛状根と呼ばれる組織体に誘導される。また、毛状根は条件を整えればカルスに脱分化し植物体にも分化できることから、有望な植物培養の素材の一つである (図 1A)。

このような根の状態で生育する毛状根について、培養特性を定量的に把握するため、まず毛状根の増殖過程を記述する「分枝増殖モデル」を提案した (図 1B)²⁾。モデル化にあたり以下の仮定を設けた。

- (1) 増殖は一次的で、先端部に仮想した生長点 (growing point : GP, 長さ : L_G) でのみ起こる。
- (2) 生長点は長さ L_B 伸びた時点で2分裂する。
- (3) 分裂した生長点は、その後それぞれ独立した生長点として増殖する。
- (4) せん断応力などの物理的ストレスは、生長点の減衰を引き起こす。

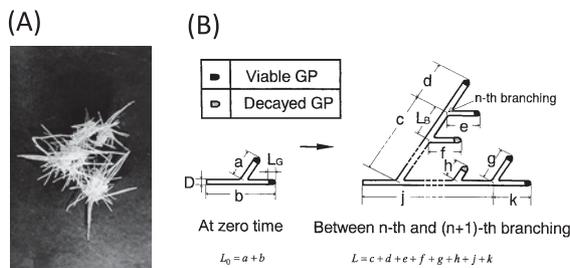


図 1. (A) カルスに脱分化後再び発根する毛状根 (セイヨウワサビ). (B) 毛状根の分枝増殖モデル概念図

(5) 毛状根を、直径 D 、長さ L の円柱と見なす。

(6) 培地中のアンモニウムイオンなどは、高濃度では増殖阻害を引き起こす。

N 個の各生長点に対し等速増殖を適用し、毛状根全体の伸長速度を次式で表示する。

$$dL/dt = \mu L_G \cdot N \quad (1)$$

生長点の減衰速度を次式で与える。

$$dN/dt = -K_d \cdot N \quad (2)$$

ここで、 K_d は生長点の減衰速度定数である。

生長点の比伸長速度 μ を基質 (炭素源) 濃度 S の関数として Monod 式を適用し、阻害物質の阻害効果を非拮抗阻害型で表す。

$$\mu = \mu_{\max} \cdot S / (K_S + S) \quad (3)$$

$$\mu = \mu'_{\max} \cdot S / \{ (K_S + S) (1 + I/K_I) \} \quad (4)$$

ここで、 K_S は飽和定数、 K_I は阻害定数、 I は阻害物質濃度である。 μ_{\max} 、 μ'_{\max} は、それぞれ式 3、式 4 で定義される生長点の最大比伸長速度である。

乾燥細胞重量 X は、基質濃度に対する細胞収率 $Y_{X/S}$ を用いて次式で関係づけられ、

$$X = Y_{X/S} \cdot S \quad (5)$$

また、仮定 (5) より次式により求められる。

$$X \cdot V = \rho \pi (1 - W_C) L D^2 / 4 \quad (6)$$

V は培養液体積、 ρ 、 W_C はそれぞれ、毛状根の密度および水分含量である。

種々の毛状根および種々の培養系におけるモデルパラメータは表 1 のようにまとめられる²⁾。種々の培養装置において、毛状根が受ける物理的ストレスの評価として、式 2 で与えられる K_d による比較が有効である。ニンジン毛状根を用いて試験したりアクターの中では、毛状根をメッシュ状の支持体にアンカリングし、底部の攪拌翼で酸素を富化した培養液を循環するタイプのタービンポンプ型³⁾でもっとも小さな $K_d = 2.4 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ が得られた。これより、毛状根に対してはこのタイプのバイオリクターを組み入れた培養システムならびに培養操作が適していると判断した。

式 4 に基づき培地中の阻害物質の効果を定量的に評価できる⁴⁾。パックブン毛状根、セイヨウワサビ毛状根について、アンモニウムイオンの阻害効果を評価したところ、それぞれ、 $K_I = 1.1, 2.3 \text{ kg/m}^3$ と求められ、パックブン毛状根は、セイヨウワサビ毛状根に比べアンモニウムイオンからより強く阻害を受けることが分かった。

表1. 分枝増殖モデルにより決定された種々の毛状根に対するパラメーター値

	バックブン	ニンジン	セイヨウワサビ	ハブソウ
μ_{\max} [h ⁻¹]	0.47	0.43	0.43	0.40
μ'_{\max} [h ⁻¹]	0.63	—	0.50	—
K_S [kg/m ³]	4.1	4.5	4.4	4.5
K_I [kg/m ³]	1.1	—	2.3	—
k_d [10 ⁻³ h ⁻¹]	三角フラスコ	4.6	4.6	4.6
	タービンポンプ型	—	2.4	—
	エアリフト型	—	5.3	—
	回転ドラム型	—	6.0	—

計算に用いた他の変数： $D=1.0$ mm, $L_B=1.5$ cm, $L_G=0.5$ mm, $V=1.0$ m³, $W_C=0.85$, $Y_{X/S}=0.32$, $\rho=1.01$ kg/m³

2.2 バイオリクター・培養操作の設計と培養システム開発

毛状根用のバイオリクターとして、毛状根を担体に支持し培養液を循環させるタイプのものが有望であることは先に示した通りである。しかし、根組織の状態が培養されることから培養槽内から均一な細胞懸濁液を採取することは不可能である。培養中における細胞量は、もっとも基本的かつ重要な状態変数である。そこで毛状根量の汎用性の高い計測方法を開発することを目的として、培地の電導度に着目した⁵⁾。図2は、ニンジン、セイヨウワサビおよびハブソウから誘導した毛状根培養において、培地電導度の低下と細胞増殖量の関係を示したものである。いずれの毛状根に対しても良い直接関係が認められ、次式で表すことができた。

$$\Delta X = \kappa \cdot \Delta C \quad (7)$$

ここで、 ΔX = 増殖した乾燥細胞重量、 ΔC = 培地電導度の減少値、 κ = 比例定数である。

図2で示すような標準線をあらかじめ用意しておけば、電導度測定による細胞量の評価は、培養系内に導入した流通型の電導度セルによりインライン測定が可能である。筆者らはオートクレーブ可能な電導度セルとして、一對の白金板とガラス管から成るフローセルタイプの電導度セルを自作した。白金表面は、塩化白金酸中での電気分解により白金黒で被覆する。また、セル定数はKCl溶液を用いて定期的に検定する⁶⁾。電導度測定に依れば、細胞量だけでなく、培地中のカリウムイオン、アンモニウムイオン、硝酸イオンなどの主要無機塩濃度を推算することも可能である⁷⁾。

毛状根の増殖モデルの項でも述べたように、1本の毛状根組織に着目すると、先端部の生長点は活発な細胞分裂を担っている一方、先端から離れ基部に向かうに従って細胞齢が増し成熟細胞となっていく。すなわち、細胞の活力度や代謝物含有量が位置によって異なる不均質な構

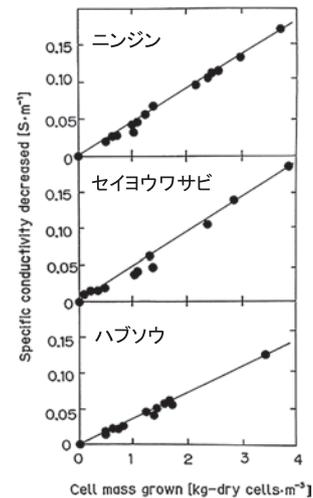


図2. 種々の毛状根培養における細胞増殖量と培地電導度の減少値の関係

造体を形成する。レッドビート毛状根の継代培養を継続している過程で、振とうを停止し溶存酸素 (DO) 濃度を低下させると、生長点に大きなダメージを与えることなく、基部の成熟細胞から色素が培地中に漏出する現象を見いだした (図3A, B)⁸⁾。この現象に基づいて、DOのON/OFF操作により色素を漏出し、漏出色素を吸着カラムで回収するバイオリクターシステムを構築した (図4)。レッドビート毛状根では、DOのON/OFF操作を実施しつつ20日以上にわたって培養を継続するとともに、色素の回収もオンラインで可能であることを実証した (図3C)⁹⁾。この培養システムはセイヨウアカネなど他の色素生産毛状根でも有効であった¹⁰⁾。さらに、毛状根をカラム型培養槽で培養し外部からDO調整培地を循環するシステムでは、毛状根による酸素吸収によりカラム内でDO分布が自発的に形成され色素の漏出・回収が可能であった¹¹⁾。

2.3 培養細胞・組織利用の要素技術開発 毛状根

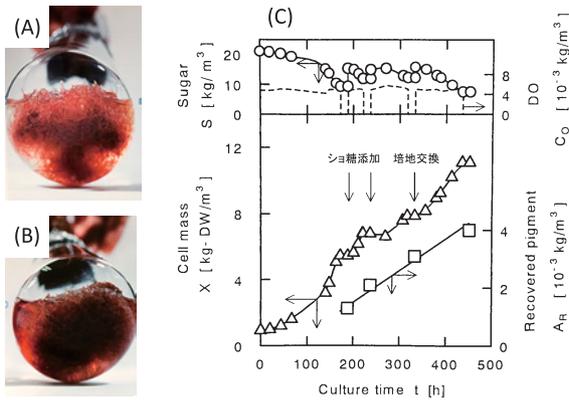


図3. (A) 振とう培養中の毛状根 (レッドビート). (B) 振とう停止後数時間静置した毛状根 (レッドビート). (C) 色素の漏出・回収操作を伴う毛状根 (レッドビート) のバイオリアクター培養.

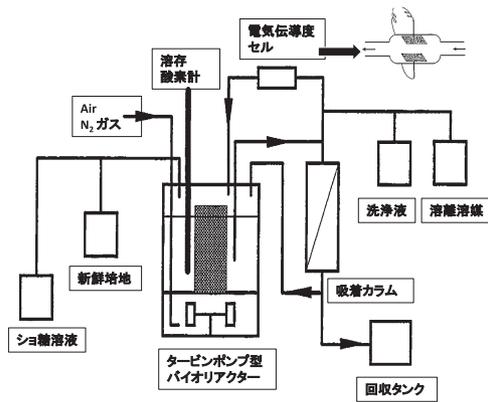


図4. 毛状根用バイオリアクターシステムの概略図

は通常は植物ホルモン無添加の培地中で活発な増殖を示すが、オーキシンやサイトカイニンの添加により、発根や分枝の促進や分化・脱分化などの形態変化が誘発される¹²⁻¹⁴。そこで、セイヨウワサビ毛状根から誘導された脱分化細胞塊を人工胚と見立てて、大量繁殖技術としての人工種子を提案した(図5)。栄養分を含むアルギン酸ゲルに細胞塊を包埋しさらにその外側をパラフィンコートで被覆する。これにより、内部ゲル相からの水分や栄養分の漏出を防止し、外部からの雑菌の侵入を完全に遮断できる。さらに、パラフィン被膜による酸素供給の制限により細胞の呼吸活性が低下し一種の休眠状態に導くことが可能である。このように調製されたセイヨウワサビ由来の人工種子は、室温で2か月保存の後も再生能を保持し、パラフィンコートにクラックを入れて酸素を供給し光を照射することで植物体へと再生された^{15,16}。

一方、バックブーン毛状根の培養において、光照射のもと培地中の炭素源濃度を徐々に低下させていくと、根の形態を保持したまま光合成能を獲得した光独立栄養毛状根が誘導された¹⁷⁻²¹。いわば、根と葉の機能を併せもち、

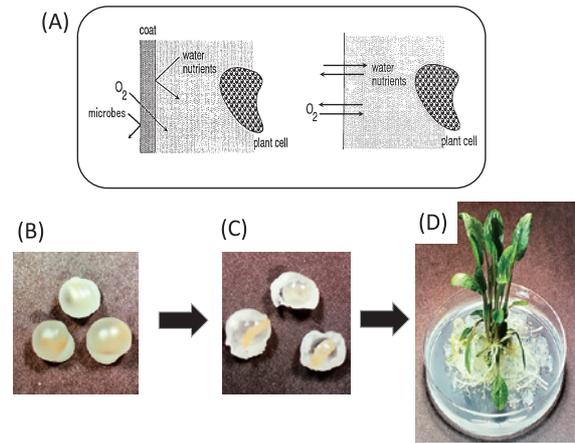


図5. (A) 毛状根細胞塊を用いた人工種子概念図 (左図: 保存中, 右図: 発根・発芽開始). (B) パラフィンコートで被覆された人工種子. (C) 約60日間保存後パラフィンコートにクラックを入れた人工種子. (D) 人工種子から発芽・再生した植物体 (セイヨウワサビ).

伸長は先端で行われ先端から基部に向かってクロロフィル含有量が増加する不均質構造を示した。この光独立栄養毛状根に対し、作用機序の異なる薬剤の応答を試験したところ、先端の伸長応答やクロロフィルの合成・分解応答が異なることが示された(表2, 図6)²²⁻²⁴。このことは、毛状根の伸長速度およびクロロフィル変化速度を測定することによって、植物に対する薬剤の毒性に関する類別評価が可能であることを示すものであり、実際に野外水の毒性評価へ適用することも可能であった²³。

3. 足場依存性動物 (ヒト) 細胞

3.1 足場依存性細胞の増殖過程のモデル化とそれに基づく特性評価 再生医療分野などで対象となる細胞の多くは足場依存性であると同時に、*in vitro*培養を実施すると、培養の進行に伴って分化・脱分化や老化などの生理的変化が生じ、不均質な細胞集団を形成することが多い。また、培養は非懸濁状態で推移し、気相、液相、固相 (細胞または足場基材) の3相系から成る不均一系を形成する場合がほとんどである。このような培養プロセスに対しては、従来の増殖速度論や培養装置・操作の設計手法だけでは対応しきれず、新たな発想に基づく増殖モデルや培養法の導入が必要である。

足場依存性細胞の単層培養過程をみると、図7に示すように播種後の細胞は、培養面に付着するために必要な時間である接着期、接着した細胞が分裂開始可能な安定した状態になるための誘導期、個々の細胞の分裂が周期的に行われる対数増殖期、コロニー形成した細胞群が増殖を停止し単層シート状の組織を形成する静止期の四つのフェーズに分類できる。このような培養面上での増殖プロセスを表現するため、筆者らは、培養面を格子状に

表2. 光独立栄養毛状根（パックブン）の各種薬剤に対する応答

	伸展応答指標, EC ₅₀ [mmol/m ³]	クロロフィル蓄積 応答指標, β [%]	クロロフィル分解 応答指標, γ [%]
DCMU	0.45	0	98.4
パラコート	0.37	93.6	282
2,4-D	0.40	93.8	86.5
野外水	—	105	217

DCMU : 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
 2,4-D : 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
 EC₅₀ : 薬剤非存在下での生長点の伸長速度を50%低下させる薬剤濃度

$$\beta = \frac{\text{薬剤存在下でのクロロフィル蓄積速度}}{\text{薬剤非存在下でのクロロフィル蓄積速度}} \times 100$$

$$\gamma = \frac{\text{薬剤存在下でのクロロフィル分解速度}}{\text{薬剤非存在下でのクロロフィル分解速度}} \times 100$$

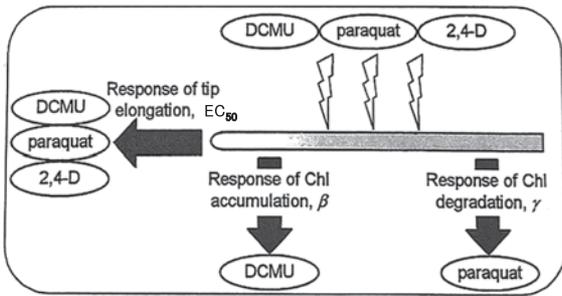


図6. 光独立栄養毛状根（パックブン）による各種薬剤応答の類別評価

区画化したグリッドで記述しその中を娘細胞が順次占有していく「細胞配置モデル」を提案した²⁵⁾。ここで、モデル化に際し以下の仮定を設定した。

- (1) 播種細胞群は播種前の操作である酵素処理などの損傷により一部が死滅し、細胞生存率 α_s によって生存細胞と死滅細胞に分けられる。
- (2) 播種された個々の生存細胞に対し、非同期的な接着時間 t_a を与える（接着期）。
- (3) 生存細胞は培養面の任意の位置に配置される。
- (4) 培養面に接着した細胞に対し、誘導時間 t_L を与える（誘導期）。
- (5) 十分な栄養源が供給されている培養条件下を仮定し、個々の細胞の分裂は世代時間 t_g ごとに繰り返される（対数増殖期）。
- (6) 培養容器内の培養面を二次元のグリッドで分割し、播種された細胞はそのグリッド上に配置される。
- (7) 分裂により生じた娘細胞が配置可能なスペースは母細胞の近接8グリッドとし、一定の確率 Pr に従って各グリッドに配置される（図7、下図参照）。
- (8) 母細胞の近接グリッドに娘細胞を配置させるための

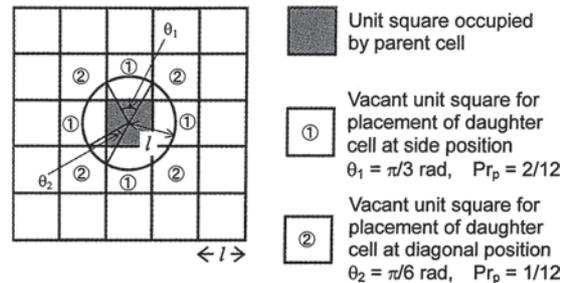
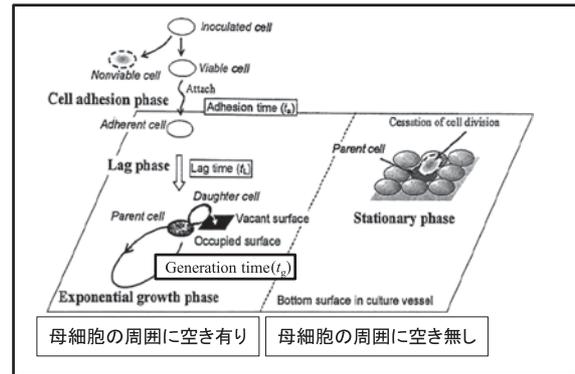


図7. 足場依存性細胞の接着・増殖過程と細胞配置モデルの概念図

空きスペースがない場合は、接触阻害現象が生じ細胞分裂が停止する（静止期）。

成人由来角化細胞を対象として、種々の細胞播種濃度 X_0 で培養した際の接着細胞濃度 X_a の経時変化を図8に示す。いずれの細胞播種濃度においても、接着期、誘導期、対数増殖期および静止期が認められ、グラフ中の実線で示すように、細胞の増殖経過を上記細胞配置モデルを用いてコンピューター上で再現したところ、実験値をほぼフォローすることができた。

さらに、分離ソースの異なる細胞の増殖特性を比較するために、新生児由来の角化細胞を用いて種々の播種密

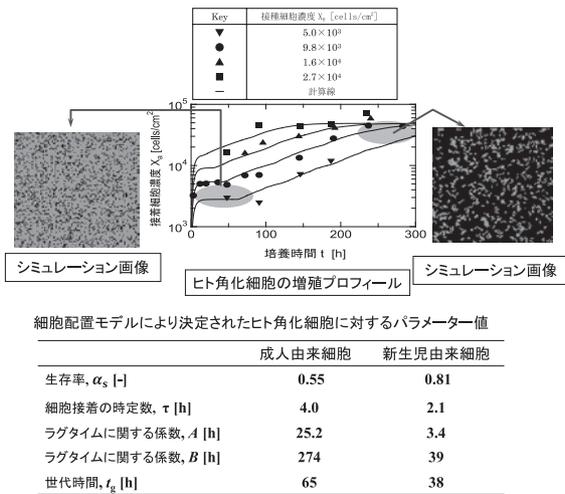


図8. 細胞配置モデルによるヒト角化細胞の増殖シミュレーションとそれにより決定されたパラメーター値

度で同様の培養を行った。上記の細胞モデルを新生児由来の細胞培養に適用し、 X_0 を変数とした次式で整理して生存率に関するパラメーター α_s や誘導時間に関するパラメーター A , B , 世代時間 t_g を求めた。

$$X_a = X_0 \alpha_s \{1 - \exp(-t/\tau)\} \quad (8)$$

$$t_L = -A \ln(X_0/X_0^*) + B \quad (9)$$

ここで、 τ は細胞接着に関する時定数であり、 $X_0^* = 1 \text{ cell/cm}^2$ である。

図8中の表は、得られたパラメーターについて、成人由来と新生児由来の角化細胞の値を比較したものである。生存率（接着に有効な細胞の割合）は新生児が非常に高く、また、誘導時間に関するパラメーター A および B はいずれも新生児由来の細胞で小さく、これより成人由来の細胞の誘導時間は播種濃度に影響されやすく、また新生児由来の細胞の誘導時間は試験した条件では短いことが分かった。さらに、新生児由来の細胞の世代時間も成人由来の細胞の約半分であった。予想通り、新生児由来の細胞ポピュレーションは活力の高い細胞を多く含み、播種後の新しい環境にただちに順応し、播種直後から分裂可能な状態へ入り旺盛に生育できることを定量的に理解することが可能であった²⁶⁾。

なお、提案したモデルの接着に関与するパラメーターは、細胞と培養面との相互作用の効果を含むことから、培養面の評価ツールとしても有効である²⁷⁾。

上述の平面培養での細胞配置モデルを基に、三次元的な培養場での細胞挙動の再現へと拡張することも可能であった²⁸⁻³⁰⁾。コラーゲンゲル内での軟骨組織培養を対象とし、コラーゲンゲルをキューブ状に区画化し、各単位キューブ内に一つの細胞を配置し、酸素に関し拡散によ

る供給と細胞による消費を考慮することで、ゲル空間内の細胞分布や細胞集塊の形成を表現した。本モデルでの細胞の増殖や挙動解析は、実際の組織片の観察結果と良好に一致し、ゲル表層からのDOの濃度分布に伴って、細胞密度やゲル内集塊サイズ分布が、ゲル深さ方向に沿って減少する培養組織の不均一性を表現できた。これより、三次元組織培養におけるスケジューリングやシードとして必要な細胞量の算定だけではなく、組織の品質評価としても有効なツールとなることが示された。

3.2 バイオリクター・培養操作の設計と培養システム開発 培養容器内における細胞の量や質に関する情報を得ることは、どのような培養系においても重要である。しかし、足場依存性細胞の培養細胞の一部をサンプリングし、細胞の量や状態を直接分析することはきわめて困難である。また、微生物培養における場合以上に、雑菌汚染のリスクを避ける必要があると同時に、培養系へのセンサー類の挿入なども極力避けることが望ましい。このような制約条件を満たし、非侵襲かつ非破壊のセンシングツールとして、筆者らは、培養容器底面から取得した細胞画像に着目し、画像データに基づいて培養中の細胞挙動をモニタリングする手法を開発した。画像取得システムの構築に際し、容器の振動を抑え高感度なCCDカメラを敷設した独自の観察装置を作製した³¹⁻³⁴⁾。培養容器底面からの細胞画像取得は、迅速かつ簡便で有効な細胞挙動の追尾手段となりうる。

培養面上で増殖する足場依存性細胞は細胞分裂だけでなく、移動、伸展、回転、離脱などさまざまな挙動を示す。したがって、足場依存性細胞の画像解析手法は大きく二つに分けられる。一つは特定の時間における静止画像の解析である。これから得られる情報は、細胞の数、密度、面積、円形度などの静的な状態変数である。もう一つは個々の細胞の挙動を継続的に追尾するもので、動的評価が可能となる。動的評価では、移動速度、分裂速度、回転速度など、よりダイナミックなパラメーターが得られ、細胞集団における不均質性に関する情報なども得ることができる。

移植用表皮シートの原料である角化細胞は、ドナー年齢や採取部位に大きく依存して有限の分裂回数をもつ。その結果、継代を重ねると細胞分裂回数の増加に伴い比増殖速度が低下し寿命に達する。これは、目的の細胞数を確保するうえで障害になる。継代培養時における培養面の画像を取得し、画像解析により細胞稠密度(confluent degree)ならびに平均細胞面積を算出した(静的評価)。図9に解析手順を示す。この解析手法により継代培養時における細胞寿命の評価を行うため、図10Aに示すように、寿命に達した最大の分裂回数 N_{df} からの残り分裂

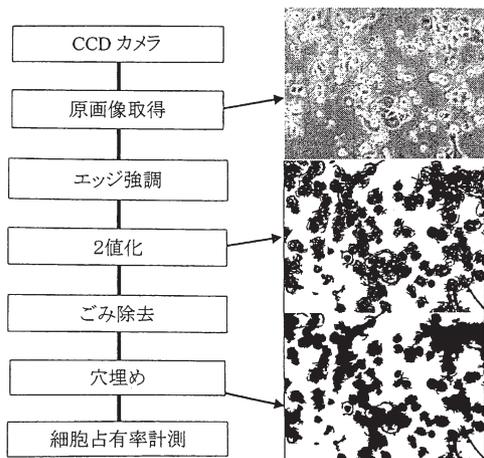


図9. 培養面上から取得された細胞画像の解析手順

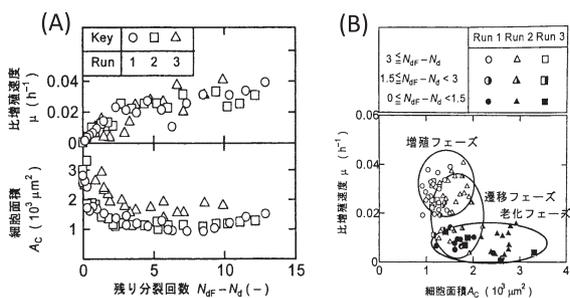


図10. ヒト角化細胞の培養経過と細胞寿命評価. (A) 残り分裂回数と細胞面積, 比増殖速度の関係. (B) 細胞面積と比増殖速度の相関による細胞寿命の類別評価.

回数 ($N_{df}-N_d$) により細胞面積 A_c および比増殖速度 μ を整理すると, 由来の異なる細胞においてもほぼ同一の経過を辿ることが分かった. さらに, 細胞面積と比増殖速度の相関を示すマップで整理したところ, データ点は細胞の分離ソースによらず, 活発に増殖を行う増殖フェーズ, ほぼ分裂が停止し寿命に至る老化フェーズおよびそれらの中間領域である遷移フェーズに分類することができた (図10B). 得られたデータマップは細胞寿命の類別評価の指標として利用可能である³¹⁾.

ヒト上皮細胞の挙動観察 (動的評価) を行ったところ, 2個の細胞が接した状態になると回転運動を始めることが認められた³⁵⁻³⁷⁾. この細胞の回転運動に着目し, 個々の細胞画像重心間を結ぶ直線の傾きを算出し, 重心間の直線が Δt 時間に回転する角度 $\Delta\theta$ より, 2個の細胞の回転速度 ($|\omega| = |\Delta\theta/\Delta t|$) を計測した. それぞれの2細胞は, 波状に回転速度を変化させながら回転を続け, その間不規則に回転方向を変化させることが確認された. 多数の細胞ペアについて測定した回転速度の頻度分布を求めたところ幅広い分布が示され, 個々の細胞はさまざまな状態で存在し, 培養中の細胞ポピュレーションは不均質であることが示唆された.

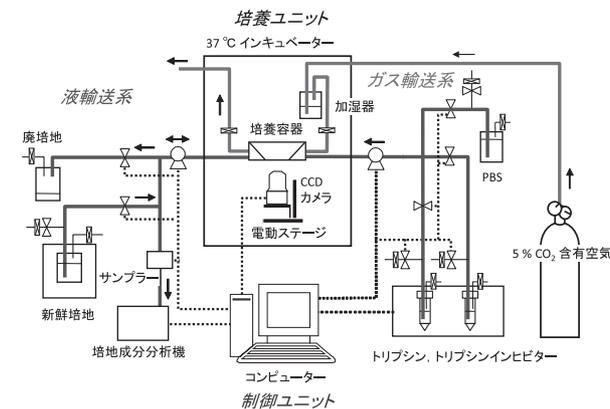


図11. 足場依存性細胞用バイオリクターシステムの概略図

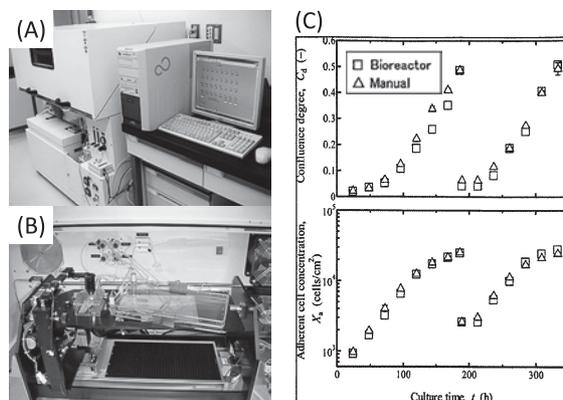


図12. (A), (B) 足場依存性細胞用バイオリクターシステムの外観とその内部. (C) バイオリクターによる筋芽細胞の継代培養経過.

以上, 培養中の非侵襲な細胞挙動の評価を可能とするハード, ソフト両面からの結果に基づき, これらを組み込んだ足場依存性細胞の継代操作を伴うバイオリクターシステムを開発した (図11, 図12A, B). 本システムは, 培養ユニット, 貯蔵ユニット, 制御ユニットからなり, ポンプによる送液や電磁バルブによる流路の切り替えにより, 培地交換, 継代操作, 細胞回収, 培地成分分析が可能である. 培養ユニットには二つの異なるサイズの培養面を有する培養容器を採用した. さらに, 容器下部にメカニカルステージとCCDカメラを設置することで, 自動的な画像取得が可能である. 貯蔵ユニットは, 新鮮培地, 緩衝溶液, 酵素溶液, 消毒液など培養中に必要な溶液が保存されている. 制御ユニットでは, 操作のリモート制御が可能で, さらに, 上記で述べた画像解析ツールによる細胞密度や細胞稠密度の測定, 培養液の自動サンプリング装置と培地分析装置を接続した培地分析システムを併設することで, 細胞増殖経過の把握を可能とした. ヒト上皮細胞や筋芽細胞について, 培地交換や継代操作を自動的に行う培養が可能であることを実

証した(図12C)^{38,39}。なお、細胞配置モデルに基づくシミュレーターによる増殖経過の予測および操作時間の事前決定が可能であり、予測値は、培養時における画像解析からの実測値とも良好な一致を示した。さらに、グルコース消費量測定による細胞数の推定値も、増殖結果を的確に示すことができた。以上、本培養システムでは、ハードとソフトを統合することで、オンラインで細胞状態を観察しながら、培養操作を計画的に行うことが可能である。

3.3 培養細胞・組織利用の要素技術開発 ティッシュ・エンジニアリングの主要課題の一つに細胞培養担体の開発があげられる。二次元培養では、細胞の接着、増殖、分化などを制御するためのスキヤホールドとして、三次元培養では、組織構造体を形成するための立体的支持体として重要な役割を果たす。細胞培養担体を再生医療、ドラッグデリバリー、創薬などの分野に適用する場合、生体に対する無毒性が必要不可欠な性質となる。このような観点から、再生医療分野ではコラーゲンやゼラチンなどの天然高分子ヒドロゲルが用いられることが多い^{40,41}。ヒドロゲルは一般に高い含水率を有し生体との親和性の高い材料であるが、汎用性の高い材料の設計手法が開発されれば、その有用性をさらに向上させることができる。

筆者らのグループでは、天然高分子にフェノール性水酸基を導入することで、セイヨウワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP) が触媒する架橋反応によるヒドロゲル材料の作製を行った⁴²。調製法の概要を図13に示す。この方法は原料となる天然高分子の選択幅が広く、アルギン酸、カルボキシメチルセルロース (CMC)、アミロペクチンなどの多糖類に適用できるだけでなく、タンパク質やペプチドにも適用可能であることから、培養担体への細胞増殖因子の導入も可能である。

フェノール性水酸基導入ヒドロゲルは、培養面から培

養後の細胞や組織の回収を容易にする材料として有望である。アミロペクチン誘導体ポリマーからHRP架橋反応によりシート状ゲルを合成し、このゲルを塗布した培養面上でヒト上皮細胞を培養し、培養終了時に体液 (アミラーゼを含む唾液や血清) でゲルを加水分解することで培養細胞が回収できることを示した^{43,44}。このことは、患者自身の体液が利用できる可能性を示唆するものであり、医療応用に有用な材料とすることができる。さらに、たとえばCMC誘導体をベースとするヒドロゲルを利用すれば、動物細胞にダメージを与えないセルラーゼで処理することで、細胞間連結タンパク質などを分解することなく培養細胞を回収することも可能である。

同心円筒二重ノズル型デバイスを用いて、フェノール性水酸基導入ポリマーから中空カプセルやファイバー構造を作製することも可能である。中空カプセル作製では、まず、対象とする細胞を内包する形で、中空構造の鋳型となるゲルビーズを作製する(手順1)。次に、このゲルビーズを手順1で使用したゲル材料と異なる材料からなるゲルビーズに包埋する(手順2)。手順1のゲルビーズを細胞に損傷を与えない方法で分解可能な材料で作製しておけば、内部のゲルビーズが占有していた部分が中空となるマイクロカプセルを得ることができる(手順3)。その後、培養を行うことで、中空部分でスフェロイドが形成される(手順4)。最後に、カプセル皮膜を細胞の生存に影響を与えない方法で分解することにより、スフェロイドのみを回収することができる(手順5)。先に述べたように細胞にダメージを与えずに分解できる材料としてCMC誘導体のゲルや動物細胞の培養温度37°Cで溶解するゼラチンゲルが有効である。また、手順5で分解されるカプセル皮膜材料としては、アルギン酸リアーゼにより分解可能なアルギン酸誘導体ゲルなどを用いている。スフェロイドのサイズは、中空空間の鋳型ゲルビーズのサイズで規定され、そのサイズの制御は同心円筒二重ノズル型デバイスにおける流量調節により容易に行える。中空部分の直径を約200 μmとした中空マイクロカプセルを用いてHeLa細胞を培養したところ、形成したスフェロイド内の細胞が抗がん剤に対して高い耐性を有することやそれを導いたと考えられる多剤耐性遺伝子MDR1の発現上昇を確認している⁴⁵。この中空マイクロカプセル作製法では、大量のスフェロイドを作製可能であり、また作製したカプセルを液体窒素中で保存できることから、薬剤開発時のスクリーニングなどへの利用が期待される。また、内部でスフェロイドを形成させた後にカプセル皮膜ゲル上に他の細胞層を形成させ、その後カプセル皮膜を分解することで、異種細胞層で覆われたスフェロイド組織なども作製可能である(図14)⁴⁶。

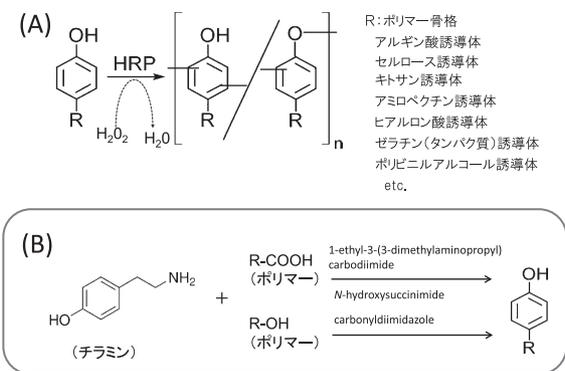


図13. (A) セイヨウワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP) を用いたヒドロゲルの合成スキーム。 (B) 種々のポリマーへのフェノール性水酸基の導入反応。

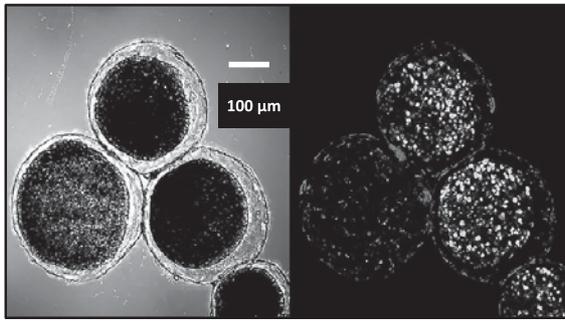


図14. ヒドロゲル中空内で増殖したHela細胞により形成されたスフェロイド(左図)および異種細胞(血管内皮細胞)で被覆したスフェロイド(右図).

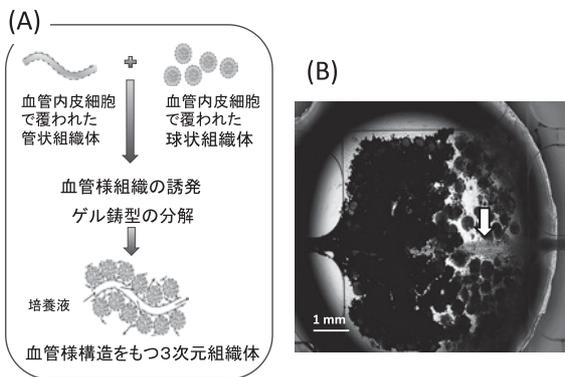


図15. (A) 血管様ネットワークを有する三次元組織体の作製手順。(B) 作製した三次元構造体(白矢印:血管様の液流路の一部).

異種の細胞からなる複雑な三次元構造をもつ組織を生体外で再現するため、先に述べたヒドロゲル作製法を展開し、チューブ状ゲルや球状ゲルの作製とそれらを統合した三次元細胞組織体の構築を行った(図15)^{47,48)}。チューブ状組織体および球状組織体表面を血管内皮細胞でラッピングし、鋳型としてのゲルを分解後、血管新生用培地で培養することで、内皮細胞の増殖と遊走が活発に起こり、チューブ状組織(動脈や静脈との見立て)とその周囲の球状組織体の間に毛細血管様の管路がつながったネットワーク構造が形成できることを確認した。さらに、これら血管様構造の内部に微粒子を含む流体(赤血球を含む血液との見立て)を流通させることができることも示された⁴⁸⁾。このような栄養源供給媒体としての培養液の輸送を可能とする血管様ネットワークを有する三次元組織体の生体外での構築は、実験動物の代替モデルなどへの適用も期待され、再生医療や創薬分野における新たな展開が期待される。

4. おわりに

生物化学工学関連のテキストでは、細胞濃度が記号 X で表されていることが多い。そして、細胞の増殖速度は、

細胞濃度の1次反応として X と比例定数(μ :比増殖速度)の積で表される。

$$dX/dt = \mu X \quad (10)$$

X の単位は kg/m^3 , cells/cm^3 などである。すなわち暗黙の了解として、細胞ポピュレーションは均質であり、個々の細胞の個性は考慮していない。したがって、細胞が分裂し娘細胞を生み出すまでの時間である世代時間(generation time)とマスとしての細胞量(細胞数)が2倍になる時間の倍加時間(doubling time)はほぼ同義語として用いられてきた。また、多くの理論・方法論は均一懸濁培養系を中心に構築されてきた。物理化学的な表現を借りれば「理想系」を仮定した理論体系とすることができる。

私は、上記のような増殖モデルや培養システムでは対処しきれない培養対象物に興味をいただき、30年余りにわたって研究を行ってきた。本稿で述べた植物毛状根然り、足場依存性動物(ヒト)細胞然りである。対象とする細胞は異なるものの、基本的な考え方は、(1)抽象化された(細胞の種類などに依らない)モデルを構築して細胞増殖過程を記述し、モデルパラメーターを策定して、細胞種による増殖ポテンシャルの差異や培養環境の影響などを定量的に把握すること、(2)細胞の存在形態や繁殖特性を考慮した培養場ならびに培養操作の設計手法を開発すること、(3)細胞やその機能のユニークな利用法を提案しそのために必要な要素技術を開発すること、である。不均一系を形成する要因としての固相、液相、気相の3相の他に光がある。光強度分布が生じる反応系や培養系、さらには光照射による細胞機能の誘発や利用に関しても、不均一系生物工学研究の一環として取り組んできた^{49,50)}。

以上、「不均一性/不均質性」をキーワードに筆者らの研究を縷々書き連ねたが、生物工学分野の発展の一助になれば幸いである。

謝 辞

ここに紹介した研究は、多くの恩師、現・旧の研究室スタッフ、学内外の共同研究者の皆様のご指導やご協力なしでは到底なし得なかったものばかりです。心から感謝申し上げる次第です。特に、私の学生時代からの恩師である故・清水祥一先生(名古屋大学)と小林猛先生(名古屋大学)には教育研究における気構えを、Dr. J. E. Prenosil(スイス連邦工科大学)には研究の節目節目で新たな世界をご教授いただきました。さらに、研究室のスタッフとして、私とは異なるバックグラウンドを存分に生かして研究を推進していただいた紀ノ岡正博博士(現大阪大学教授)、西岡求博士(現大阪府立大学工業高等専門学校准教授)、尾島由紘博士(現大阪市立大学講師)、境

慎司博士（現大阪大学教授）、清水一憲博士（現名古屋大学准教授）、劉揚博士、中畑雅樹博士にお礼申し上げます。本研究の内容は「comrades in science and engineering games」として昼夜を問わず共に戦い続けてくれた卒業生・在学生諸氏の奮闘努力の賜物です。記して謝意を表すともに、紙面の関係で全ての内容を網羅できなかつたことをお詫び申し上げます。

文 献

- 1) 田谷正仁：醗酵工学, **65**, 249–263 (1987).
- 2) Taya, M., Kino-oka, M., Tone, S., and Kobayashi, T.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **22**, 698–700 (1989).
- 3) Kondo, O., Honda, H., Taya, M., and Kobayashi, T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 291–294 (1989).
- 4) 紀ノ岡正博, 田谷正仁, 東稔節治: 化学工学論文集, **17**, 1012–1018 (1991).
- 5) Taya, M., Yoyama, A., Kondo, O., Kobayashi, T., and Matsui, C.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **22**, 84–89 (1989).
- 6) 田谷正仁, 東稔節治, Jiri E. Prenosil: 植物組織培養, **6**, 179–181 (1989).
- 7) Kino-oka, M., Taya, M., and Tone, T.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **24**, 381–384 (1991).
- 8) Taya, M., Mine, K., Kino-oka, M., Tone, S., and Ichi, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 31–36 (1992).
- 9) Kino-oka, M., Hongo, Y., Taya, M., and Tone, S.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **25**, 490–495 (1992).
- 10) Kino-oka, M., Mine, K., Taya, M., Tone, S., and Ichi, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 103–106 (1994).
- 11) Kino-oka, M., Taya, M., and Tone, S.: *Plant Tissue Culture Lett.*, **12**, 201–204 (1995).
- 12) Repunte, V. P., Kino-oka, M., Taya, M., and Tone, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 271–275 (1993).
- 13) Repunte, V. P., Shimamura, S., Taya, M., and Tone, S.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **27**, 523–528 (1994).
- 14) Repunte, V. P., Shimamura, S., Taya, M., and Tone, S.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **28**, 847–850 (1995).
- 15) Repunte, V. P., Taya, M., and Tone, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 83–86 (1995).
- 16) Repunte, V. P., Taya, M., and Tone, S.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **29**, 874–880 (1996).
- 17) Taya, M., Sato, H., Kino-oka, M., and Tone, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 42–48 (1994).
- 18) Kino-oka, M., Nagatome, H., Taya, M., and Tone, S.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **29**, 1050–1054 (1996).
- 19) Nagatome, H., Tsutsumi, M., Kino-oka, M., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 151–156 (2000).
- 20) Ninomiya, K., Nagatome, H., Kino-oka, M., and Taya, M.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **34**, 1396–1401 (2001).
- 21) Ninomiya, K., Tsushima, Y., Kino-oka, M., and Taya, M.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **36**, 725–729 (2003).
- 22) Ninomiya, K., Oogami, Y., Kino-oka, M., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 505–508 (2002).
- 23) Ninomiya, K., Oogami, Y., Kino-oka, M., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 264–270 (2003).
- 24) Ninomiya, K., Tsushima, Y., Kino-oka, M., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 98–101 (2003).
- 25) Kino-oka, M., Umegaki, R., Taya, M., Tone, S., and Prenosil, J. E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 285–287 (2000).
- 26) Kobayashi, T. Ed.: Recent Progress of Biochemical and Biomedical Engineering in Japan II (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology), **91**, 135–169, Springer (2004).
- 27) Yashiki, S., Umegaki, R., Kino-oka, M., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 385–388 (2001).
- 28) 屋敷思乃, 原 由之, 紀ノ岡正博, 田谷正仁: 化学工学論文集, **30**, 515–521 (2004).
- 29) Kino-oka, M., Maeda, Y., Yamamoto, T., Sugawara, K., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 197–207 (2005).
- 30) Kino-oka, M., Maeda, Y., Ota, Y., Yashiki, S., Sugawara, K., Yamamoto, T., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 67–76 (2005).
- 31) Umegaki, R., Murai, K., Kino-oka, M., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 231–236 (2002).
- 32) Hirai, H., Umegaki, R., Kino-oka, M., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 351–356 (2002).
- 33) Umegaki, R., Kino-oka, M., and Taya, M.: *Biochem. Eng. J.*, **17**, 49–55 (2004).
- 34) Hata, N., Hirai, H., Kino-oka, M., and Taya, M.: *Biochem. Eng. J.*, **20**, 197–202 (2004).
- 35) Kino-oka, M., Agatahama, Y., Hata, N., and Taya, M.: *Biochem. Eng. J.*, **19**, 109–117 (2004).
- 36) Kino-oka, M., Agatahama, Y., Haga, Y., Inoie, M., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 119–122 (2005).
- 37) Hata, N., Agatahama, Y., Kino-oka, M., and Taya, M.: *Cytotechnology*, **47**, 127–131 (2005).
- 38) Kino-oka, M., Ogawa, N., Murai, K., Manabe, M., and Taya, M.: *Biochem. Eng. J.*, **32**, 49–55 (2006).
- 39) Kino-oka, M., Chowdhury, S. R., Muneyuki, Y., Manabe, M., Saito, A., Sawa, Y., and Taya, M.: *Tissue Eng. Part C*, **15**, 717–728 (2009).
- 40) Khoshfetrat, A. B., Kino-oka, M., Takezawa, Y., Sato, Y., Yamamoto, T., Sugawara, K., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 547–553 (2008).
- 41) Khoshfetrat, A. B., Kino-oka, M., Takezawa, Y., Yamamoto, T., Sugawara, K., and Taya, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **102**, 294–302 (2009).
- 42) 中野義夫 監修: ゲルテクノロジーハンドブック—機能設計・評価・シミュレーションから製造プロセス・製品化まで—, 720–727, エヌ・ティー・エス (2014).
- 43) Sakai, S., Liu, Y., Matsuyama, T., Kawakami, K., and Taya, M.: *J. Mater. Chem.*, **22**, 1944–1949 (2012).
- 44) Sakai, S., Liu, Y., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 462–465 (2013).
- 45) Sakai, S., Inamoto, K., Liu, Y., Tanaka, S., Arii, S., and Taya, M.: *Cancer Sci.*, **103**, 549–554 (2012).
- 46) Sakai, S., Inagaki, H., Inamoto, K., and Taya, M.: *Biomaterials*, **33**, 6721–6727 (2012).
- 47) Sakai, S., Liu, Y., Mah, E. J., and Taya, M.: *Biofabrication*, **5**, 015012 (8 pages) (2013).
- 48) Liu, Y., Sakai, S., and Taya, M.: *Heliyon*, **2**, e00067 (17 pages) (2016).
- 49) 田谷正仁: バイオサイエンスとインダストリー, **54**, 712–714 (1996).
- 50) 田谷正仁: 生物工学, **88**, 11–17 (2010).