

# 生体機能の医療および環境評価への利用

Utilization of biological functions in clinical medicine and environmental risk assessment

酒 井 康 行\*・迫 田 章 義\*・鈴 木 基 之\*

Yasuyuki SAKAI, Akiyoshi SAKODA and Motoyuki SUZUKI

近年、細胞などの生体組織の新たな利用が模索されている。本稿では、医療福祉分野においては、バイオ人工臓器のうちブタ肝細胞細胞利用型のバイオ人工肝臓について、また環境影響評価への利用においては、ヒト細胞を利用した新たな手法について、筆者らの研究を踏まえて、今後の研究の方向性について議論する。

## 1. はじめに

今世紀後半に始まったバイオテクノロジーの長足の進歩は、応用面として当初は生理活性物質などの比較的高価な医薬品の大量生産が最大の目的であったが、これらの技術についてはすでに完成の域に達している。それらにかわり近年では、細胞などの生体組織それ自体の新たな利用が模索されている。たとえば医療福祉分野においては、各種細胞治療・バイオ人工臓器・生体組織再構築などが研究されており、一部ではヒト臨床応用も開始されている。環境中化学物質の人体影響については、近年の社会的関心の高まりと共に、現行の基準体系についてもさまざまな疑問が投げ掛けられている。それに答える形で、培養細胞などの生体組織の応答によって環境からの人体影響を包括的に評価しようとする新たな試みが始まっている。

本稿では、前者の利用についてはバイオ人工臓器に注目し、特にその実現が期待されている異種細胞利用型バイオ人工肝臓について、筆者らの研究成果を踏まえその将来を展望する。また後者については、主として水環境からの人体影響評価に注目し、筆者らの研究室で試みている予備的な検討から、今後の研究の方向性について議論する。

## 2. 医療への利用——バイオ人工臓器を例として

### 2.1 バイオ人工肝臓の開発研究

細胞は外界から取り入れたほとんどの物質について第1義的な代謝を行う重要な臓器で、判明しているだけで500種以上の酵素反応を行っている。このような多くの反応を完全に物理化学的な単位操作の組み合わせで置き換えるこ

\*東京大学生産技術研究所 第4部

とは将来にもわたってほぼ不可能と考えられるため、細胞利用型のバイオ人工肝臓実現への期待は必然である。当面の適用は、肝移植待ち患者の延命または劇症肝炎患者の一時的な肝機能代替であり、10-20%の患者肝機能を最低数時間程度維持するシステムの開発が目標となろう。移植待ち患者については、この治療をドナー肝臓が現れるまで繰り返すことになり、劇症肝炎患者の場合には、最もクリティカルな場面で数時間から数日使用し、患者肝の再生を待つことになる。

Kamlotらのグループによりすでにヒト臨床応用が試みられている<sup>1)</sup>。ブタ正常肝細胞を利用した彼らのシステムは移植までの橋渡しとしてはかなり有効と思われるが(最終的には肝移植で救命されている)、わが国で当面想定されている劇症肝炎患者への適用例では救命率が著しく低い。固定化細胞数はヒト全肝の3%程度で、システム全体として実際に患者肝の何パーセントの機能を維持しているのか不明である。このためわが国の研究グループは、特に本邦での適用に関しては非常に慎重な見方をしており、まずは動物実験まででの十分な評価の積み重ねが必要であるとする意見が強い<sup>2)</sup>。

### 2.2 筆者らのアプローチ<sup>3,4)</sup>

そこで我々は、ブタ灌流実験を当面の目標として、生物化学工学の一つの到達点であるラジアルフロー多孔質担体充填型バイオリクターにブタ全肝の10%の細胞を固定化してその性能をまず*in vitro*で評価した。その結果、臨床サイドから要求される装置容積内にこのような多量の肝細胞を非常に高密度で固定化すると、細胞当たりの機能が数分の1以下に低下することが明らかとなった。充填槽型モジュールは物質生産を目的とした増殖性の高い株細胞

では非常に有効であることが示されているが、ほとんど *in vitro* で増殖しない正常肝細胞への直接的な利用には困難が伴うことが判明した。

次に、上記モジュールを2本使用したシステムによる肝不全ブタ延命実験での評価を行った。*in vitro* の評価では十分な結果は得られなかったものの、わずか1時間の灌流で非治療群または細胞無しシステム灌流群に対して2倍程度の延命効果が得られた。既往の研究例では動物が死亡するまで灌流を続けて同程度の延命であるので、本システムは既往のシステム以上の治療効果を持つと考えられた。

さらに、高機能化の一つの試みとして、培養系自体の改善を検討した。肝細胞が生体外で一定程度再組織化した結果、直径200-500  $\mu\text{m}$  程度の凝集体(肝細胞スフェロイド)をつくり、従来の培養法と比較して高機能を長期にわたり発現することが報告されている。そこで臨床に必要な多量のブタ肝細胞スフェロイドを迅速に形成させる手法を開発し、形成させたモジュールを高密度で浮遊培養させる新たなモジュールを開発した。本モジュールは12時間というやや短い時間ではあるが、上記の充填槽型モジュールで観察されたようなスケールアップに伴う細胞当たりの機能低下がほとんど見られなかったことから、固定化された細胞の比率をそのまま機能代替の比率と考えることが可能である。当面の臨床応用の焦点はたとえ短時間でも最大の機能を発揮することがまずは求められるので、本モジュールはその要求を十分に満たすと考えられた。

ヒト臨床応用に想定されるシステム全体像を図1に示す。現在まで開発したモジュールはブタの2%程度の細胞を固定化するので、当面の肝不全ブタ灌流では2倍程度、ヒト臨床応用のためには5倍程度のスケールアップが必要である。未だその詳細は明らかではないが異種組織との接触を許容限度内に抑えるために、ブタ細胞固定側回路とヒト側回路には分画分子量10万程度の限外ろ過膜が必要とされよう。採取された患者血漿はブタスフェロイドと十分な物質交換をした後、血球と合わされ患者に戻される。この免疫隔離膜は当然物質交換速度を低下させることになる

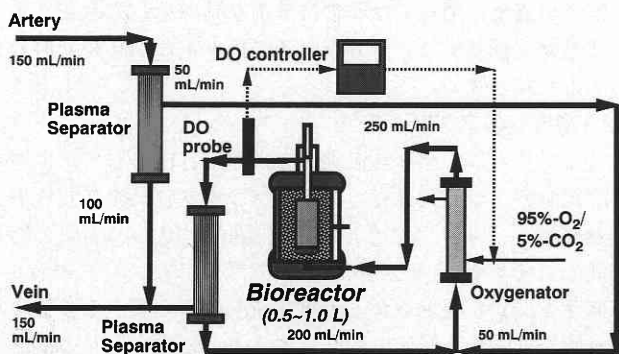


図1 ブタ肝細胞組織体浮遊灌流培養型バイオリアクターを利用した実用規模人工肝臓システム

ので、当面の動物実験においては、人工肝と患者とを一つのシステムとして考えた上で、人工肝側の操作条件を最適化する必要がある。

### 2.3 今後の展望

モジュール設計に関しては工学サイドからここ数年でほとんどのものが出そろったので、今後は医学サイドの動物実験を中心としたその評価がしばらくの重要課題となろう。そこでの問題点をシステム全体の設計・操作条件等の最適化に活かすことになろう。

我々が最終的に開発したモジュールにおいては、ほぼ現状の技術限界である細胞固定化密度が細胞の機能を損なうことなく実現されているが、それでも  $10^8 \text{ cells/cm}^3$  以上である正常組織のそれに比較して1桁低い。近年、足場としての生物分解性ポリマーや組織の幹細胞(ステムセル)の増幅技術を用いて、最終的に完全なヒト組織・臓器を構築しようとする生物組織工学(Tissue Engineering)が提唱されている<sup>5)</sup>。将来的には、患者の正常部組織片からオリジナル臓器と全く同じものを *in vitro* で完全に再構築することが目標となり、移植ドナーの不足といった問題も原理的に解消される。現在、最も進んでいるのは皮膚組織であり、一片の皮膚から時間さえかければ望みの大きさの患者オリジナル移植用皮膚を製作できるまでになっている<sup>6)</sup>。これは皮膚組織の幹細胞の *in vitro* 増殖が、比較的簡単にコントロールできることによる。やや異なるが骨髄については、少数の幹細胞の高い骨髄再建能から臨床学的に意義のある治療として広く行われつつある。

これと比較すると大多数の他の組織では、未だに基礎的な研究が必要な段階である。肝組織を例にとると、比較的分化の進んだ幹細胞の単離培養が可能となつてはいるものの、*in vitro* でその増殖を十分にコントロールすることはまだ不可能で、まして臨床に必要な大きさの正常組織を構築するのはまだ夢の段階である。肝組織でのもう一つの問題は、高い物質交換速度を実現する毛細血管組織(肝類同)の再構築である。前節で述べた肝細胞組織体(スフェロイド)にはこれが部分的にしか形成されないため、そのままでは酸素の拡散消費で決まる直径300-400  $\mu\text{m}$  以上の組織化にはあまり意味がない。血管新生の研究自体はしばらくは基礎的な段階にとどまることが予想される。次善の策として、スフェロイドや生分解性ポリマー上に培養した小組織を移植し、生体本来の力を借りて正常組織にしようという考えがある。ラットなどの小動物では見事に周囲からの血管新生が進み自己組織化されるが、肝臓の場合には、ヒトはラットの約1,000倍程度細胞を保持するので、ヒトにおける臨床学的意味は低いと思われる。そこで、やはり血管の配備されたある大きさまでの組織を *in vitro* で製作し、患者の循環系とつなぐというアプローチが不可避であろう。

### 3. 環境評価への利用

#### 3.1 培養肝細胞の亜急性毒性評価への利用

肝臓は毒性物質が体内に取り込まれた後に最初に遭遇する臓器で、チトクローム P450 という解毒酵素群によって、大抵の毒物は無毒化されるが、一部の毒物は酵素反応によって初めて強い毒性を発現するようになる。いずれにせよ、肝臓における毒物の代謝は小腸からの毒物吸収と並んでその後の蓄積毒性発現過程に重大な影響を及ぼす。ほぼ20年前に肝細胞の安定した初代培養が可能となってからは、これを利用した *in vitro* の毒性試験が徐々に用いられるようになってきた。しかしながら、広く用いられてきたディッシュ内二次元培養では、特にチトクローム P450 酵素群の維持が極めて不安定（最大数日間）であるという重大な欠点を持っており、亜急性毒性相当期間（約1カ月）の試験は不可能であった。

そこで我々は肝臓細胞が生体内で置かれている幾何的構造をまねたサンドイッチゲル培養法<sup>7)</sup>を、さらに改善する膜上サンドイッチゲル培養法<sup>8)</sup>を考案し、前者と比較して物質交換を有利にすることにより、特に各種機能発現レベルが著しく高められることを示した。チトクローム P-450 についても誘導も含めて1カ月程度は維持されることも示した<sup>9)</sup>。さらにこの系を利用して、有機塩素化合物や農薬類の長期毒性発現過程を追った。その結果、細胞を急性死させるような高い濃度を除いて、負荷濃度の時間積分値によって毒性発現過程がある程度記述できることを示した<sup>10)</sup>。これは亜急性毒性をより短い時間である程度予想可能であることを示唆している。

#### 3.2 ヒト細胞を用いた迅速簡便評価への利用

亜急性毒性評価とならんで、急性毒性の評価も重要であり、前者と比較してより短時間での評価が可能であることから、より広く利用される可能性が高い。ここでは発がん物質・抗がん物質のスクリーニング系として開発されてきた短期細胞増殖試験のうちで、比較的操作が簡便であるマイクロプレート/Acid Phosphatase 法<sup>11)</sup>と培養が簡単なヒト肝ガン由来細胞株を用いた手法で、予備的な水質評価を行うと共に、本手法の有効性・限界性・今後の課題などを明らかにすることを目的とした。

水道原水ともなる多摩川上流から下流までの数地点で採取した河川水から培地を調製し、超純水から調製した培地と6日後の増殖を比較した。その結果、特に夏季において上流域ではまったく毒性は検出されなかったが、中流から下流にかけては、優位な細胞毒性が検出された<sup>12)</sup>。また夏季中流域（関戸橋付近）について数時間毎に1週間の連続測定を行ったところ、全く阻害が見られない水質からほぼ増殖がみられない水質までほぼ日周的な変動が観察された。概して深夜から明け方にかけて毒性が最大となった。

この最大毒性は、対称化合物を仲介として単純に評価すると、ヒト血中致死濃度の1/10程度と無視しえないものであった。またこの最大毒性を持つサンプルを希釈していくと単一化合物の容量作用関係と比較して非常に広い濃度範囲で徐々に毒性が変化することが観察された<sup>13)</sup>。

以上の予備的な検討より、今後の具体的な研究課題は、以下の2点に集約される。まず第1に、非常に激しい毒性変動が見られたことから、測定結果を日常的な水質管理に利用するためには、遅くとも数時間以内に測定結果が得られるような、より迅速なバイオアッセイシステムの開発が不可欠であるということである。この概念を図2に示す。すなわち、例えば上水処理プロセスにおいては、各単位操作毎に処理水を迅速評価しその後のプロセスの操作条件に活かすといった利用である。迅速簡便性と共に、ヒトへの毒性を評価するためには、種々の化合物の影響がすでに検討されてある程度その意義が確立されている急性細胞毒性程度の感度を最低限持つ必要もある。このためのひとつの手法として我々は、酸素の次に消費量の大きな低密度リポタンパク質の取り込み活性に着目した手法を提案している<sup>14)</sup>。第2の課題は、無視しえない毒性が観測されたことに関する。この多摩川中流域の河川水は、幸いにして現状では水道原水には使用されていない。しかしながら、水消費量の増大と汚染の進行から、近い将来（または他の地域においてはすでに）これらの原水から水道水を供給する必要性が生じる可能性は十分に想定される。そのため、高度浄水処理をも含めた現行の上水処理プロセスにおける毒性低減効果を、プロセス操作条件との関連においてバイオアッセイで評価しておく必要があると思われる<sup>15)</sup>。これらの結果に基づき、場合によってはより高度な処理操作を模索する必要も生じよう。

#### 3.3 今後の展望

現行の各種環境基準濃度は、個別化合物について動物実験で得られた投与毒性発現データとその化合物の特性（特殊毒性（発ガン性、生殖毒性、催奇毒性など）を持つか、それらを持たない一般化合物（非発ガン物質）か？）に、

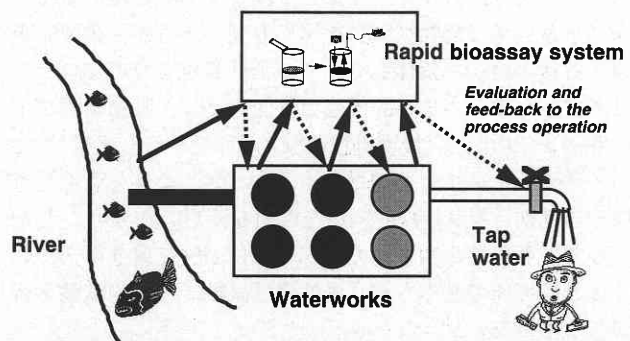


図2 水環境管理における細胞利用簡便迅速バイオアッセイシステム

想定される人体摂取過程と安全率などを加味して決定されている。要するに一種のバイオアッセイによるデータが基礎となっている。実際の評価は物理化学的分析によって個々の規制対象毒物の環境中濃度を測定し、環境管理に活かされている。

これに対して、上述した細胞利用型バイオアッセイは、個別毒物の影響決定ではなく、環境試料の包括的な毒性評価を目指している。その意味では現行基準では考慮されていない複合的な毒性発現や未知の毒物の影響をも包含することから、社会的要請にも答えかつより合理的であると言える。しかしながら、実際に広く認められかつ使用されるには、より一層の研究が必要である。まず、種々のバリデーションプログラムが国内外で行われているが、現在までの成果として、医薬品などを用いた場合のヒト急性致死血中濃度と哺乳類細胞を用いた短期増殖試験・膜障害試験などで観測される細胞毒性にはある程度の相関が得られている<sup>16, 17, 18)</sup>。現実の環境からの影響としては微量濃度多種の物質摂取に伴う亜急性から慢性の毒性が問題であると考えられており、これらを検知可能な新たな手法の確立も必要であろう。一つのバイオアッセイですべての影響を評価することは不可能であることから、現実的には対象とする毒性に合わせた個々のバイオアッセイをうまく組み合わせて使用することになる。このためには、現在環境中での存在が問題となっている化合物に関して、提案されている各種バイオアッセイ手法によるデータの蓄積が必要である。

バイオアッセイを日常の環境管理に導入する上での技術的な課題は、たとえば水環境管理においては、上述したように、ヒトへの影響に言及できるだけの感度を維持しその毒性学的意味を明確にしながらも、大幅な迅速簡便化を実現することであろう。また得られたデータに基づいて、ヒト健康影響リスクを合理的かつ科学的に評価する手法の開発も望まれる。これなくしては、バイオアッセイを環境管理に導入するという社会的な合意は得られないであろう。

さらに一歩進んで、基準値の決定に、簡便なバイオアッセイが使用できるかという点に関しては、当面は困難であるといえよう。バイオアッセイではヒト細胞を用いることができる点では動物試験に比べて有利であるが、代謝・吸収・蓄積といった個体レベルでの毒性発現までのプロセスは考慮されない。また評価期間に関しては、動物実験がその寿命までの試験（慢性毒性試験）が可能なのに比較して、バイオアッセイでは将来的にも3.1の例のような亜急性毒性相当期間（1カ月程度）が技術的な限界となる。したがって、亜急性毒性までの一部の個体試験を置き換えていくことは可能であろうが、慢性毒性試験では動物試験を行わざるを得ない。

以上、環境管理のためのバイオアッセイには、一方で簡便化を極力追及しながらも、動物個体試験で反映されてい

る毒物吸収・代謝・標的臓器への蓄積による毒性発現プロセスを定量的に評価できる新たなバイオアッセイシステムの開発も求められよう。この概念を図3に示す。これは模擬人体ともいべきシステムで、毒物発現プロセスの再現のみに焦点を合わせた小型人体である。これは、別方面からの社会的要請である動物実験代替の有効な手段となると思われる。具体的にはヒト細胞からなる臓器シミュレータを循環系で結合するものになる。亜急性毒性までの動物実験で得られるのと同じ質の実験データを、種差を考慮することなく得るのが目標となる。

以上まとめると、現行の環境基準体系が背景としている学問的レベルにまでバイオアッセイのそれを高めるにはかなりの時間を要すると考えられ、すべてが確立されるのを待っているいつまでたってもバイオアッセイは具体的な環境管理に導入されないことになる。一方で、バイオアッセイは現代社会からの要請に答える簡便な手法として有望であることは間違いなく、上述した各点にある程度答えられた段階で、可能な手法から順次現行の管理体系に加えて行くことが妥当であると考えている。

#### 4. お わ り に

生体機能が近未来の人類福祉に役立つと思われかつ筆者らが主にかかわってきた2つの大きな領域について、今後の方向を展望した。現代科学の類にもれずバイオ分野においてもその最先端での研究発展はめざましいが、非常に細分化の傾向にあることも多くの識者の指摘する通りである。だからこそ、真に有益な成果をうまく再構成してある社会的要請に答えるという工学的アプローチも、バイオ分野の特殊性から規定・提起される課題に最大限の配慮をするという前提のもとで、十分に有効かつ必要であると考えている。

#### 謝 辞

バイオ人工肝臓の開発は、東京大学医学部第一外科の武藤徹一郎教授・長島郁雄講師（現帝京大学医学部）・成瀬

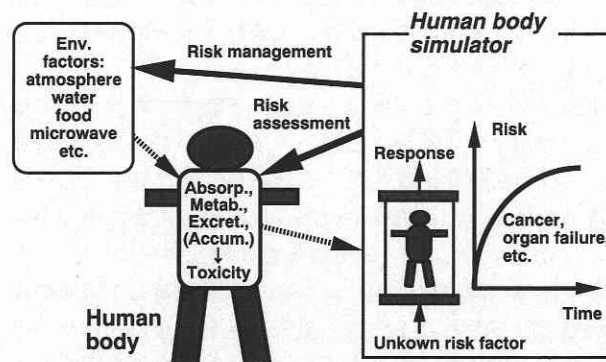


図3 環境リスク管理のための人体シミュレータ

勝俊医師との共同研究である。環境評価への利用に関する研究は、当時大学院博士課程の学生であった市川和洋氏（現九州大学薬学部助手）および大学院博士課程在籍中の庄司良氏の成果である。以上、心より感謝申し上げます。

(1998年5月21日受理)

#### 参 考 文 献

- 1) Kamlot *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 382-391 (1996).
- 2) 酒井, *人工臓器*, **26**, 967-968 (1997).
- 3) 酒井ら, *日本臨床*, **55**, 2451-2457 (1997).
- 4) 成瀬ら, *肝臓病学の最前線 1997 (肝臓増刊号)*, pp. 319-323 (1997).
- 5) 岩田, *生体組織工学*, 産業図書 (1995).
- 6) 紀ノ岡, *生物工学会誌*, **76**, 173 (1998).
- 7) Dunn *et al.*, *FASB J.*, **3**, 174-177 (1989).
- 8) Suzuki *et al.*, *Cytotechnol.*, **11**, 771-780 (1993).
- 9) Sakai *et al.*, *Cytotechnol.*, **21**, 243-252 (1996).
- 10) Ichikawa *et al.*, *Biotechnol. Techniques*, **10**, 99-102 (1996).
- 10) 酒井, *バイオアッセイ—水環境のリスク管理—*, 鈴木・内海編, 講談社 (1998).
- 12) 酒井ら, *生産研究*, **47**, 216-219 (1995).
- 13) Shoji *et al.*, *submitted to Water Res.*
- 14) 鈴木ら, *水環境学会誌*, **20**, 746-751 (1997).
- 15) 鈴木ら, *生産研究*, **50**, 131-134 (1998).
- 16) Wang *et al.*, *AATEX*, **2**, 115-126 (1993).
- 17) Clemedson *et al.*, *ATLA*, **24**, 251-271 (1996).
- 18) Clemedson *et al.*, *ATLA*, **24**, 273-311 (1996).