

培養動物細胞の形態及び機能の制御に関する研究の現状と課題

The Current Status and Related Issues of Studies on Control of Morphology and Functional Expressions
of Cultured Mammalian Cells

酒 井 康 行*・鈴 木 基 之*

Yasuyuki SAKAI and Motoyuki SUZUKI

動物細胞を大量高密度で培養し、その物質生産能や特異機能を利用する試みがなされている。本報では、物質生産にしばしば用いられる付着性動物細胞の増殖の前提となる固体表面への付着伸展現象とその工業的レベルでの制御、また、ハイブリッド型人工肝臓などへの利用が期待されている初代培養肝細胞における固体表面と各種マトリックス物質による細胞形態と機能の制御について、その現状と課題を概説する。

1. はじめに

動物細胞を大量高密度に培養し、生理活性物質などの生産能や由来臓器の特異機能など、さまざまな有用な用途に利用しようとする試みがなされ始めている。

物質生産の場としては、在来、遺伝子導入発現と大量培養が動物細胞と比較して簡単なことから、大腸菌などが用いられてきた。しかし、生産物に糖鎖が結合されないことや、その高次構造が異なることなどの問題点がある。生体中で働く生理活性物質のほとんどが糖質などを含んだ複合タンパクであり、これらの付加が活性発現または生体内での安定性に必要不可欠であるとの例も多く見つかっているため、天然型またはそれに近い物質を生産することのできる動物細胞の大量培養の必要性は、これからも増し続けるであろう。

動物細胞は、その培養系での性質から、浮遊性と接着依存性に大別できる。前者は、体内でもともと浮遊状態で生存していたものを由来としたもの、および培養にもなっている程度ガン化し、浮遊状態でも生育可能となったものなどがある。ほとんどの臓器の細胞は、生体外で培養した場合は、固体表面に付着・伸展した後に増殖するという、いわゆる接着依存性を示す。

物質生産の面からは、比較的容易に培養可能である浮遊性細胞がまず利用された。この代表例は、モノクローナル抗体の生産に用いられているハイブリドーマである。またリンフォカインなど有用な免疫関連物質も、浮遊性細胞によって生産される。しかし、その他の多くの生理活性物質は、接着依存性動物細胞で生産される。

浮遊性動物細胞の大量培養は、菌体の培養技術の延長である程度確立されてきたが、接着依存性動物細胞の場合は、固体表面への付着伸展が増殖の前提となること、

また、表面に密に増殖した細胞は一般に増殖を停止することなどの性質があるため、大量培養技術については、決定的なものが提出されるには至っていない。しかし、いずれにせよ、固体表面への細胞付着とその後の劇的な形態変化である表面への伸展、そして増殖といった現象を理解し制御することは、接着依存性動物細胞の大量培養にとって重要な課題である。本報では、接着依存性細胞の付着伸展現象に関して、主として工業的利用面から整理し、今後の課題を明らかとした(2.)。

細胞と固体表面の接触付着そしてその後の伸展増殖といった在来からの研究課題に加え、近年では、固体表面の特性が、細胞外マトリックス物質の固体表面への吸着現象を介して、さらに高度な細胞の組織化といった現象に与える影響についての研究が開始され始めている。この例は、応用面としては、単なる物質生産ではなく、臓器細胞の持つ機能の利用といった面で見られる。その中でも、人体の化学工場とも言うべき肝臓を構成している細胞は、多種多様な特異機能を保持したまま培養可能であるため、劇症肝炎時の一時的肝機能代替装置としてのハイブリッド形人工肝臓への応用が期待されている。

近年、この初代培養肝細胞が、さまざまな物質で被覆した固体表面上で次第に凝集、生体と類似な構造を部分的に再現しているスフェロイドと呼ばれる細胞凝集体を形成し、高機能を長期にわたり発現することが報告されてきた。この凝集体形成においては、肝細胞から分泌されたマトリックス物質の固体表面への吸着が、重要な役割を果たしていると考えられている。そこで本報では、凝集体の形成と維持における固体表面特性の影響に関する既往の知見を整理し、ハイブリッド型人工肝臓への利用における問題点と今後の課題を明らかにした。(3.)

*東京大学生産技術研究所 第4部

2. 固体表面特性による細胞の付着伸展の制御

2-1. 固体表面への細胞付着に関わる因子

接着依存性動物細胞の固体表面への付着伸展現象に関与していると思われる因子を、その生物学的特異性の有無に着目してまとめたものが、図1である。

動物細胞は通常、動物血清を5~10%添加した培養液中で培養されるため、さまざまな血清タンパクが、培養固体表面には吸着されている。また、動物細胞自身が分泌したタンパクも同様に吸着される。これらのタンパク質の中には、細胞側リセプターと特異的相互作用を持つものがいくつか含まれている。代表的なものとしては、ファイブロネクチン、ヴィトロネクチン、ラミニンなどである。固体表面上にこれらの特異的付着伸展タンパクが吸着し、それを細胞側のリセプターが認識、細胞付着が起こる。ファイブロネクチンの Arg-Gly-Asp (RGD) 配列が、インテグリンと呼ばれる細胞リセプターに認識されること¹⁾はその代表例である。その他の特異的付着伸展促進タンパクに関しても、分子レベルでの作用解析が進んでおり、それぞれ細胞側リセプターに認識される部位が存在する^{2),3)}。

細胞が付着した後、能動的に伸展するためには、このような特異的付着伸展因子が必要不可欠である。ヒト正常線維芽細胞や初代培養肝細胞は、これらのタンパク質を合成する能力を保持しているが、多くの樹立細胞株は、合成能が低いために、最速の伸展のためには外からの供給が必要である⁴⁾。たとえば、代表的な線維芽細胞株であるハムスター腎由来の BHKc21 は、最速の伸展を行うために、最低15ng/cm²の表面吸着ファイブロネクチンを必要とする⁵⁾。また、正常線維芽細胞⁶⁾や初代培養肝細胞⁷⁾など十分な合成能を保持している細胞でも、その合成には付着伸展過程に必要な時間と比較して、十分に長い時間がかかるため、特に無血清培養では、何等かの手段でこれらの付着伸展因子を添加する。

一方、血清由来のタンパクの中には、細胞と特異的相互作用を全く持たないものが、多量に含まれている。こ

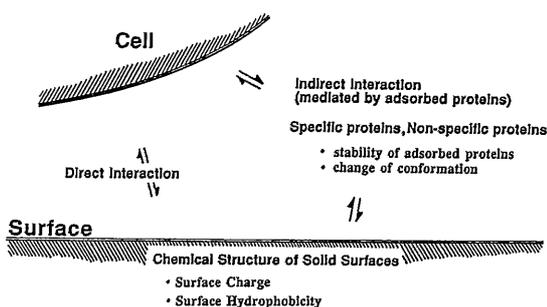


図1 細胞の付着伸展現象に関わるさまざまな因子 (特異性の有無によって分類)

のような非特異的タンパクは通常、細胞の付着を妨げる働きをする。特にアルブミンに関しては、その効果が大きい。血清中の補体成分を不活性化するためにしばしば行われる56℃30分の非働化処理は、付着伸展因子を失活させると同時に、アルブミンの細胞付着阻害効果を大きくすると考えられる⁸⁾。

本来の固体表面の性質は、血清由来や分泌されたタンパクの吸着ならびにその後の安定化に寄与する一方で、細胞表層と直接に結合を形成する。細胞付着実験においては、血清を添加しているものもしばしば見受けられる。これでは吸着タンパクの影響と固体表面の影響を区別できないこととなり、その結果の解釈に当たっては注意を払う必要がある⁹⁾。合成培地での短時間の実験においては、細胞分泌タンパクの影響も無視できる。

このような細胞と固体表面の非特異的相互作用において重要であるとされているパラメーターには、表面電荷や疎水性親水性のバランス¹⁰⁾等があり、それぞれ、静電的相互作用とファンデルワールス力に関連している。

細胞表層には、リン脂質2重層の膜に突き出た糖タンパクのシアル酸残基や各種プロテオグリカンなどのため、全体的に見ると生理 pH では、マイナスに荷電している¹¹⁾。静電的な結合だけを考慮すると、マイナス荷電表面に細胞は付着できないこととなるが、実際は、強くマイナスに帯電しているガラス表面などに細胞は強固に付着する。これについては、確かに全体的には細胞表層はマイナスに荷電しているものの、その分布は一応ではなく¹¹⁾、少量ながら正電荷も存在し、ある強さ以上の電荷が表面上に存在すれば、マイナス表面であっても付着できる¹²⁾と説明されている。この時、培地中の2価イオンが架橋すると考えられている¹³⁾が、詳細は定かでない。また、細胞表面の microvilli や filopodia は、両表面間の静電的バリアーを破る働きをしていると考えられている。以上のように、表面電荷については、必ずしもプラス電荷は必要とされず、ある一定以上の電荷密度が必要であると一般には考えられている¹³⁾。

一方、さまざまな固体表面上で、表面の接触角に対する付着率を測定すると、70°付近に極大値を持つ上に凸の曲線となること示されている。これは、水媒体中における接着仕事の計算結果とおおむね一致していることより、主として、ファンデルワールス力が、支配しているものと考えられている¹⁴⁾。Horbettらも親水性疎水性の2種類のコポリマーの比率を代えて一連の表面を調製、細胞付着への影響を測定し、同様な結果を得ている¹⁵⁾。

以上述べた2つのパラメーター・機構のほかには、疎水的相互作用と水素結合が細胞付着に関与していると考えられる¹⁶⁾。特に疎水的相互作用は、液相からのタンパク質の固体表面への吸着現象において強い作用を持つこ

とが示されており¹⁷⁾, 細胞付着にも局所的には関与していると考えられる。

2-2. 工業プロセスにおける細胞付着伸展現象の解明

2-1. においては, 関与が確かめられているさまざまな機構について, 並立的に解説した。しかし, 細胞付着現象は動的なプロセスであり, それぞれのステップで関与する機構には, 違いがあると考えられる。

この一連の現象は, 大きく付着段階と伸展段階とに分けられるが, まず後者では, 固体表面上に吸着された特異的付着伸展タンパクの存在量が決定的である。吸着量に対するある一定時間後の細胞伸展率は, 容量作用曲線で示され, 伸展に必要な最低吸着量が存在する⁵⁾。また, その吸着量以上のタンパクが存在していれば, 固体表面の特性は, 伸展現象に全く影響を与えないと考えられている。もちろん, 付着伸展タンパクを含む各種のタンパク質の固体表面への吸着については, 表面特性によってタンパク質のコンフォメーションが変化することは確かめられているが^{17), 18)}, それは細胞伸展とその後の増殖にはあまり影響しないようである^{19)~21)}。もっとも, これは, 天然の付着伸展因子の場合であって, たとえば, ファイブロンネクチンの特異的に認識される RGD ペプチドをアルブミンに導入した場合の付着伸展挙動については, 固体表面からの導入部位への鎖の長さが影響するとの報告もあり²²⁾, いまだ詳細は不明である。以上, 伸展およびその後の増殖という生物的過程においては, 固体表面-細胞間の直接の相互作用の影響は, 非常に小さいと考えられる。

一方, 細胞の初期付着過程については, ファイブロンネクチンなどの特異的付着伸展因子の影響は, その後の伸展・増殖における場合と比較して, それほど大きくないと考えられる^{19), 20)}。よって, 相対的には固体表面自体の特性が, 大きな影響を持つ過程であるといえる。

細胞の初期付着過程については, 2-1. で述べたように, いくつかの因子の寄与の有無については判明しているが, その寄与の大小に関しては定量的評価が難しいため, 統一的な見解が共有されるには至っていない¹⁶⁾。そこで, 実用的な側面から, 付着に関わる因子の評価をする試みがなされている。すなわち, さまざまな因子のうち実際の大量培養法において, 問題となるものの影響を定量的に評価しようとするアプローチである。

工業レベルでの接着依存性動物細胞の大量培養で最も有望な方法のひとつに, マイクロキャリア法があげられる。これは, 150~200 μm 程度のビーズに細胞を付着伸展増殖させ, スピナーフラスコなどで疑似浮遊培養するものである。マイクロキャリアへ細胞播種法は現在, ①連続攪拌法, ②間欠攪拌法, ③ディッシュ内付着, の3つがある^{23), 24)}。細胞を均一に付着させるためには, ①が望ましいが, 付着速度が②に比較して遅くなる。③

は大量培養には不向きである。以上の中で, 付着が著しく遅いいくつかの細胞を除いては, 実際には連続攪拌法が用いられている。

マイクロキャリアへの連続攪拌法における細胞付着過程を模式化したものを図2に示す。播種細胞に対する付着細胞の割合(付着率)は, 非付着細胞率が推進力となる1次不可逆反応モデルで記述できることが示唆されている^{25), 29), 30)}。この時の細胞付着速度定数は, 液流れによる剪断応力・細胞-固体表面間の接触時間・同接触確率・固体表面への細胞の付着力などの関数であると考えられる²⁶⁾。固体表面自体の特性およびそれが吸着された血清タンパクを介して及ぼす影響は, 細胞のマイクロキャリアへの付着力に影響を与え, 付着速度定数に反映されていると考えられているが, 定量的解析がなされるには至っていない。

実験室レベルでの培養においては, ディッシュ底面と細胞は培養している間常に接触しているが, 連続攪拌によるマイクロキャリアへの細胞播種では, 細胞とマイクロキャリアは非常に短い接触時間しか持ち得ない。実際のマイクロキャリアへの細胞付着速度定数の測定で明らかになったことは, 血清中には各種の付着伸展促進因子が含まれているにもかかわらず, 血清の添加は, 速度定数を一般に低下させる効果を持つということである^{26), 27)}。この現象は, 接触・付着過程と, その後の伸展増殖過程では, その主要な機構が異なっているということの傍証となる。

マイクロキャリア法で実際に表面特性をさまざまに変えた数多くの実験を行い, 付着速度定数を測定することは容易ではない。そこで, 在来の細胞付着実験と比較して, きわめて短い時間における細胞の接触・付着現象を解明しようとする試みがなされた²⁹⁾。まず, アルブミン等の付着阻害タンパクだけでなくファイブロンネクチンなどの付着伸展タンパクでもある吸着量以下では, 細

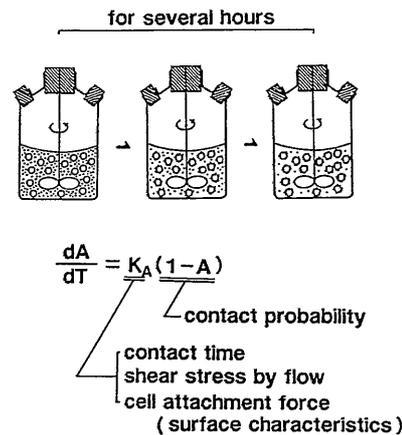


図2 マイクロキャリア培養における細胞播種

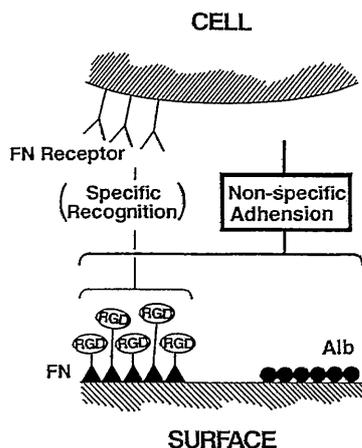


図3 接触直後の細胞付着現象のモデル

胞付着を完成するために一定の時間を要することが判明した。また、接触直後から良好な細胞付着が得られる固体表面をあらかじめファイブロンクチンで被覆しておく、少量の場合は、かえって細胞の接触直後の付着を阻害することが判明した。これらの結果から、特異的付着伸張因子は確かに伸張増殖過程においては決定的な役割を果たすが、工業レベルにおいて重要となる接触・付着現象に関しては、必ずしもそうではなく、むしろさまざまな非特異的付着機構が重要な役割を演じていることが示唆された。この関係をモデル化したものが図3である。この段階では、たとえ特異的付着伸張タンパクであっても、非特異的相互作用が決定的で、その因子としては、タンパク吸着表面の疎水性親水性バランスへの依存性より、荷電状態への依存性の方がはるかに大きかった。このモデルの傍証としては、タンパクで被覆しない各種固体表面への付着が非常に速いという報告や³⁰⁾、培地のpHとタンパクの等電点の相対的大小を代えて、細胞付着速度への影響をみた場合、用いたタンパクの等電点より低い培地pHであれば、どのタンパクに対しても細胞は速く付着すること³¹⁾などがあげられる。

3. 固体表面特性と液性因子による細胞形態および機能発現の制御

3-1. 機能発現とマトリックス物質

コラゲナーゼ灌流法³²⁾によって、状態の良好な肝実質細胞が動物から得られるようになってからは、通常の樹立細胞の培養に用いられる手法が、基本的には、初代培養肝細胞の培養においても用いられてきた。すなわち血清やコラーゲン等で被覆したディッシュ上での培養である。この条件下で細胞は単層状の細胞層を形成し、ラットの場合で1週間程度培養可能である。

その後、主として生体外での肝細胞の増殖についてと、

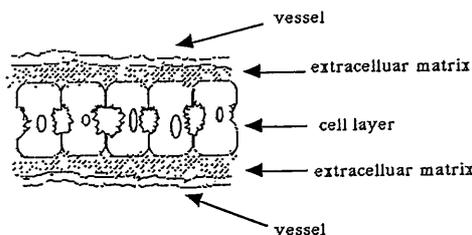


図4 生体内での肝細胞周囲環境

採取した細胞の長期生存および長期の機能維持についての大きく2つの研究が行われてきた。増殖に関する前者の研究は、肝細胞増殖因子の発見³³⁾以後、その遺伝子レベルでの解析や動物細胞での大量生産といった発展を遂げつつある。一方、生存および機能維持に関する研究も近年、著しい発展を遂げている。ここでは、後者について主に述べる。

機能維持と長期生存に関しては、培地成分の改善と、細胞マトリックス物質および培養システムの改善に関する研究に大別される。後者は、生体内での細胞周囲環境を模倣する方向で研究されてきた。生体内での肝細胞周囲環境の模式図を図4に示す。

培地に関しては、肝臓の機能発現が多様なホルモンによって厳密に制御されていることに注目し、各種ホルモンや微量金属類を添加することによって、一定の到達をみている。EnatらによるこのHormonally Defined Medium³⁴⁾は、数多くの研究において用いられている。

一方、細胞マトリックスの培養系での利用は、古くはコラーゲン被覆表面の利用、生体内と同じくゲル化させたコラーゲンの利用などであるが、これではラット肝細胞の場合、1～2週間の維持が限界³⁵⁾であった。一般には、細胞が生体内でとっている立方体の形態と著しく異なる過度に伸展した形態になることが、この方法の限界を決定していると考えられている。

コラーゲンを培養基質として用い、その幾何的な配置を生体内の構造に近付けることによって、機能を維持しようとする試みがなされてきた。はじめに試みられたのは、ゲルを底面から剝離させ、培地中に浮遊させることである(浮遊コラーゲンゲル培養法)³⁶⁾。これによって、背面からも栄養素や酸素などが供給されると共に、浮遊させたゲル細胞層は次第に収縮し、細胞が生体内に近い立方体状の形態をとる。これによって、細胞維持が改善されたが、過度のゲル収縮のため、3週間が限度であった。ゲル収縮を防ぐために、膜を用いて同様の培養を試みた例があるが、十分な改善は得られなかった^{37), 38)}。

一方、生体内で細胞層がゲルにはさまれていることを模倣し、底面付着サンドイッチコラーゲンゲル培養法が試みられた^{39)~41)}。この方法により、血漿タンパク合成

能のレベルと維持期間が約1カ月へと飛躍的に向上した。さらに、膜上でこのサンドイッチコラーゲンゲル培養を行うことにより、維持期間は底面付着サンドイッチコラーゲンゲル培養法と同等であったが、血漿タンパク合成能レベルが著しく向上した⁴²⁾。よって、ゲル層の幾何的配置の機能維持における影響は、培地中に浮遊させる効果よりも、細胞層をゲルでサンドイッチ状に包括する効果の方が、相対的に大きいことが判明した。膜上サンドイッチゲル培養により、ゲル層の幾何的配置に関しては、ほぼ完全に生体内の細胞周囲環境を模倣できたと考えられる。

生体マトリックスの成分を模倣し、Biomatrix と呼ばれる肝ホモジネートから抽出した不溶性物質上で、肝細胞を単層培養することによって、それが半年にわたって生存することが報告された⁴³⁾。この Biomatrix の成分としては、通常用いられてきた Type I コラーゲンの他、Type III, IV コラーゲン、ファイブロンネクチン、ラミニン、各種プロテオグリカンなどが含まれている。この Biomatrix は、肝小葉内間質物質と肝小葉間質物質との混合物である⁴⁴⁾。

小出らは、この Biomatrix から、生体内において肝細胞が直接接触している肝小葉内間質物質のみを精製し、これをさらに、コラーゲン分画、糖タンパク分画、プロテオグリカン分画にわけ、それぞれの細胞生存における影響を個別に検討した^{45), 46)}。その結果、コラーゲン分画では、単層状となったが、プロテオグリカン分画では、細胞が次第に凝集し、100 μm 程度の凝集体となって培地中に浮遊、機能は単層培養に比べて長期にわたり維持された。糖タンパク分画では、両者の中間的傾向を示した。このような凝集体 (スフェロイド) は、poly-(2 Hydroxy methylmethacrylate) 被覆表面上の播種された胎児ラット肝細胞についても報告されている⁴⁷⁾。この場合も、肝特異酵素や血清タンパク合成能が約1カ月に渡り維持された。その後小出らは、通常の培養用

ディッシュとは異なるさまざまな表面上で、同様な凝集体が形成され、機能を長期に維持することを報告した⁴⁸⁾。ポリリジン被覆表面上で形成されたスフェロイドの写真を図5に示す⁴⁹⁾。胎児ラットの凝集体形成で用いられた高度な親水表面 (通常ほとんど細胞を付着し得ない) を例外として、これら細胞凝集を促進する表面は、陽性荷電または疎水性に富んだものに大別できる。

これらの凝集体中で肝細胞は、単層培養の場合と異なり、生体内と同様な立方体の形をとっていることが示されている。ただ、類洞や胆管など物質移動のための経路が完全には形成されず、完璧な組織化とはいえない。このため、大き過ぎる凝集体は次第に内部壊死を起こす。また小さすぎると容易に崩壊する傾向にあるため、培養条件下では、適当な大きさ (60~100 μm) の凝集体を利用するのが適当であると考えられている⁵⁰⁾。

これらの細胞凝集体 (スフェロイド) の単層培養に比べた場合の優位性は、その後さまざまな肝特異機能の発現・維持を測定することにより確立されつつある⁵¹⁾。

肝小葉内細胞間基質プロテオグリカン分画被覆表面上のものと同様な細胞凝集体が、陽性荷電表面や疎水性表面で形成される理由は、肝細胞から分泌されたプロテオグリカンが、その強い陰性電荷と疎水性のために、まずこれらの表面に選択的に吸着されることにより、同様な細胞凝集が起こると考えられている⁴⁸⁾。すなわち、これら人工表面では、まず細胞が初期に伸展してから凝集するのに対し、プロテオグリカン分画被覆表面上では、初期の伸展度は相対的に小さく、より速く浮遊する傾向にあること⁴⁸⁾からも間接的に説明される。

一方、精製された各種プロテオグリカンを単独で被覆した表面上に肝細胞を播種し、凝集を見たところ、デルマタン硫酸が最も効果的であったとの報告がある⁵²⁾。他のプロテオグリカンも若干の効果を持つ。一般に、肝に最も多く含まれているプロテオグリカンは、ヘパラン硫酸であるが、凝集を促進する効果は、デルマタン硫酸に比べて小さかった。ヘパリン、カラゲナン、デキストラン硫酸など高度に硫酸化された多糖を培地中に添加しても、同様な細胞凝集が誘起され、高レベルの機能発現が長期にわたり見られた⁵³⁾。しかし、どの単独のプロテオグリカンでも、Biomatrix プロテオグリカン上で見られた様な、顕著な細胞凝集体の形成および浮遊化はみられなかったことより、球状の凝集体形成にはさまざまな種類のプロテオグリカンの作用が総合されて起こるものであると考えられる。このことから、凝集体を能率よく形成させるためには、精製したプロテオグリカンを用いるよりも、むしろ、肝細胞由来のプロテオグリカンの分泌能を高める、または、分泌されたプロテオグリカンの吸着性を高めた表面を用いる方が、有利である。

プロテオグリカン以外のマトリックス物質で、細胞機

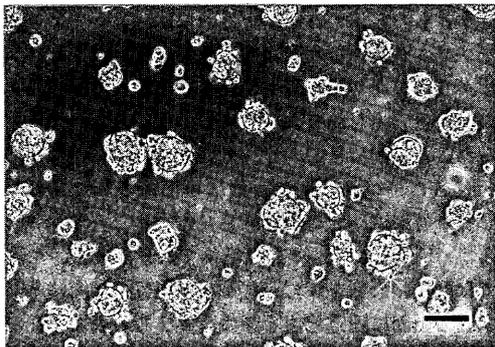


図5 ポリリジン被覆表面上で形成された肝細胞凝集体 (スフェロイド)
(バーは100 μm)

能の長期維持に効果を持つと思われるものとしては、ラミニンがあげられる。Bissel らは、EHS 肉腫から精製されたラミニンやプロテオグリカンを多量に含むコラーゲンゲルを調製し、その上で肝細胞を単層培養することにより、血清タンパク合成能を約 1 カ月に渡り維持した⁵⁴⁾。

肝臓を構成している他の細胞である非実質細胞と肝実質細胞を混合培養すると、細胞が 2 カ月以上にわたって維持される⁵⁵⁾。この効果は、幼若ラット肝臓から株化された上皮細胞との混合培養で最も大きい。特に、他の肝特異機能と比較して著しく困難であった解毒系酵素群であるチトクローム P-450 の維持が、この混合培養系では、10 日以上にわたって維持される⁵⁶⁾。以上の細胞機能および生存の維持における非実質細胞の効果は、これらの細胞が分泌するさまざまなマトリックス物質の影響に帰着されると考えられている。

以上、生体内肝細胞の周囲環境を模倣する方向で成果をあげてきた研究を概説した。在来の単層培養は、伸展のみを促進するコラーゲンだけを用いてきたために、機能維持には限界があったと考えられる。よって、さまざまなマトリックス物質がコラーゲンを骨格とするゲル層にある割合で適当に配置され、それが肝細胞を取り囲み細胞が生体内と同様な立方体状の形態をとり、長期に機能を発現すると考えられている。

3-2. ハイブリッド型人工肝臓における凝集体の利用

ブタ初代培養肝細胞を利用した単層培養/積層型ハイブリッド型人工肝臓モジュールは、すでに試作されているが⁵⁷⁾、このモジュールを、ヒトの肝細胞の 30% を収容するものにそのままスケールアップすると、装置容積が約 40L となるため、高密度化が望まれている。そこで、それ自体が高密度かつ高機能である細胞凝集体を利用し、適切なモジュールを行えば、既存モジュールの性能および装置容積を大幅に改善できると考えられる。

細胞凝集体を人工肝臓モジュールに利用する場合は、単一細胞を固定化した後に凝集を起しスフェロイドを形成させる方法と、大量形成した後に固定化を行う方法とが考えられる。

前者では、多孔質担体内表面を細胞凝集を促進する物質であらかじめ被覆しておく例⁵⁸⁾や、そもそも多孔質担体自体が凝集を促進させるという性質を利用した例⁵⁹⁾などがある。また最近では、内部の流動性を高めたゲルに単一細胞を高密度包括することにより、ゲルビーズ内部で細胞凝集を起こさせる試みなども行われている⁶⁰⁾。

一方、浮遊凝集体を大量形成後、固定化した例としては、アルギン酸カルシウムゲルビーズに包括し、液噴流培養層で懸濁培養するもの⁶¹⁾や、ホローファイバーモジュール内にビーズを充填培養するもの⁶²⁾などがある。

このタイプのモジュール製作においては、単一細胞から凝集体形成を行わせるための装置が必要となるが、最終的に製作されたモジュール内の細胞密度を、単一細胞状態で固定化する方法に比べて、より高めることが可能であると考えられる。また、実際の臨床応用を考えると、細胞を凍結し大量に保存しておく技術の確立が不可欠である。肝細胞の凍結保存に関する研究例はきわめて少ないが、融解後の生存率や機能発現がきわめて悪い点が、樹立細胞株の場合と異なる。しかし、コラーゲンコートマイクロキャリアへ付着伸展させた肝細胞は比較的凍結保存に耐えるという報告⁶³⁾や、凝集体の方が単一細胞より低温での保存に耐えるとの報告もある⁶⁴⁾。これらの研究例は、マトリックス物質を共存させたり細胞をある程度まで組織化したりすることが、凍結保存に対する耐性を向上させうる可能性を示唆しており、将来は、単一細胞を凝集体にして大量凍結保存し、必要な時に融解してモジュール化するという体制が確立される可能性が高い。よって、凝集体を大量形成後、固定化するモジュール製作が、将来主流となると考えられる。

3-3. 固体表面への吸着マトリックス物質による凝集体の形態および機能発現の制御

凝集体の大量形成を目的として、細胞凝集を促進する物質であらかじめ被覆しておいた平板上、浮遊状態の凝集体を選択的に形成させる条件が、正電荷を持つ人工ポリマー上で設定されてきた。まず凝集体を形成させるためには、一定量以上の吸着量が必要であることが明らかにされた⁴⁹⁾。この吸着量以下では、細胞は凝集するが、平板上に強固に付着伸展した多層状の凝集体 (Multicellular Island) にとどまる。また、各種ホルモンの添加の有無および添加濃度によっても同様な形態変化が起こることが報告されている^{65), 66)}。このような形態変化は、細胞によって合成分泌された各種マトリックス物質の表面への吸着性によって決定されていると考えられる。ホルモンなどの液性因子は、細胞が合成するマトリックス物質の種類および量を介して、この形態変化に関与するものと思われる。定性的には、コラーゲンやファイブロンネクチンなど細胞伸展を促進する因子と、プロテオグリカンなど細胞凝集を促進する因子の固体表面上への吸着量の相対的な大小によって、このような現象が見られると説明できる。

Spheroid は、コラーゲン表面に再播種された場合、伸展して単層状態へとその形態を変化することが示されている^{46), 47)}。そこで、浮遊凝集体を大量形成後、全体としては凝集体形態を保ち、しかも多孔質担体内に一部伸展状態で強固に固定化する際の、望ましい表面特性が、細胞伸展促進因子と細胞凝集を促進する因子の相対的関連の下で半定量的に検討されている⁶⁶⁾。この結果、細胞形態と機能発現は、これらの因子の相反する効果を忠

実に反映することが示された。また、多量の細胞凝集を促進する因子に、少量の付着伸展因子を共存させた表面上で細胞の再付着率・細胞形態細胞形態・機能発現ともに最も良好な結果を与えた。

4. 今後の課題

以上述べてきたように、工業的な物質生産における接着依存性動物細胞の付着伸展増殖の制御、初代培養肝細胞を利用したハイブリッド型人工肝臓の製作における細胞凝集体の形成と機能発現のいずれにおいても、固体表面などの細胞周囲環境が、重要な役割を果たしている。

固体表面の非特異的特性が、細胞の付着伸展や増殖といった現象に与える影響については、伸展増殖過程については、生物学的特異性が決定的であることは、ほぼ共通の認識となっている。ごく初期の接触・付着過程においては、非特異的機構が重要な役割を果たしていることは明らかになりつつあるが、そこで何が重要な因子であるのかについては、定性的にはある程度の知見が蓄積されているものの、定量化やその先のモデル化には程遠いのが現状である。さらに、工業レベルでの動物細胞の利用においては、流れの存在下での接触・付着現象を解明する必要がある。いくつかのモデルが提示されているが²⁸⁾、⁶⁷⁾、実際の培養槽内での現象を説明するには至っていない。今後、さらなる検討が必要であろう。

また、付着伸展・増殖だけでなく、その後の分化機能の発現まで制御するモデル系として、また応用面の重要性からも、初代培養肝細胞の研究は重要な位置を占め続けるであろう。初代培養肝細胞においては一般に、増殖と分化機能維持は相反すると考えられている。これは、単層培養しかも低密度であればあるほど増殖活性が高い⁶⁸⁾、⁶⁹⁾という報告、また凝集体の形成に伴って増殖能は低下し、分化機能発現レベルが上昇すること⁴⁵⁾、⁴⁸⁾、⁴⁹⁾、などから明らかである。生体外で、肝細胞を増殖相から分化相へ、または分化相から増殖相へという変換が可能となること、すなわち、増殖と分化機能発現を生体外で制御できれば、応用面としては、少数の細胞から、高性能なハイブリッド型人工肝臓をはじめとする有用な装置を製作することが可能となる。

代表的形態として、増殖相については単層培養を、分化相については凝集体があげて考えると、凝集体から単層培養への移行は、付着伸展促進タンパクで被覆した表面上に再播種することで実現される。一方、肝細胞ではないが、単層培養からの凝集体形成が、最近試みられており⁷⁰⁾、この方向の移行も近い将来、さらに簡便な方法で可能となると考えられる。

これらの形態制御技術を利用する場合にも、固体表面の非特異的特性が、プロテオグリカンなどの巨大糖-タンパク複合体やタンパクの吸着性に及ぼす影響、ホルモ

ンなどの液成因子がマトリックス物質の合成分泌へ与える影響、の両者を総合的に最適化することが重要である。

(1992年7月21日受理)

参 考 文 献

- 1) Pierschbacher, M.D. and Ruoslahti, E., *Nature*, **309**, 30 (1984)
- 2) Rouslahti, E. and Pierschbacher, M.D., *Science*, **238**, 491 (1987)
- 3) Iwamoto, Y. et al., *Science*, **238**, 1132 (1987)
- 4) Pena, S.D. and Hughes, R.C., *Nature*, **276**, 80 (1978)
- 5) Hughes, R. C., et al., *Exp. Cell Res.*, **121**, 307 (1979)
- 6) Pena, S.D.J. and Hughes, R.C., *Cell Biol. Int. Repts.*, **2**, 339 (1978)
- 7) Gjessing, R. and Seglen, P.O., *Exp. Cell Res.*, **129**, 239 (1980)
- 8) Grinell, F., *Exp. Cell Res.*, **97**, 265 (1976)
- 9) 長岡, 繊維と工業, **43**, 497 (1987)
- 10) Horbett, T.A., et al., *J. Coll. Interf. Sci.*, **104**, 28 (1985)
- 11) Borysenko, J.Z., et al., *Exp. Cell Res.*, **118**, 215 (1979)
- 12) Hirtenstein, M., *Develop. Bio. Stand.*, **46**, 109 (1980)
- 13) Gardner, J.L. and Manna, M.H., *Exp. Cell Res.*, **137**, 169 (1982)
- 14) Ikada, Y., et al., in "Polymer as Biomaterials", ed. by Schalaby, A.S., et al., Plenum Pub. Corp. (1984) pp. 135
- 15) Horbett, T.A., et al., *J. Coll. Interf. Sci.*, **104**, 28 (1985)
- 16) Spier, R.E., in "Animal Cell Bioreactors", ed. by Ho, C.S., Butterworth-Heinemann (1991) pp. 3
- 17) Andrade, J.D., "Principles of protein adsorption", in Protein Adsorption, Andrade, J.D., Plenum Press, New York (1985), pp. 1
- 18) Bohnert, J.L., et al., *J. Coll. Interf. Sci.*, **111**, 363 (1986)
- 19) Horbett, T.A. and Schway, M.B., *J. Biomed. Mat. Res.*, **22**, 763 (1988)
- 20) Chinn, J.A. et al., *J. Coll. Interf. Sci.*, **127**, 67 (1989)
- 21) 鈴木, 酒井, *生産研究*, **41**, 175 (1989)
- 22) Danilov, Y.N. and Juliano, R.L., *Exp. Cell Res.*, **182**, 186 (1989)
- 23) "Microcarrier Cell Culture" ed. by Pharmacia Fine Chemicals, Sweden (1989)
- 24) 美王ら, 第3回次世代産業基盤技術シンポジウム—バイオテクノロジー—予稿集, 日本産業技術振興協会・バイオテクノロジー開発技術研究組合編 (1987) pp. 183
- 25) Levine, D.W., et al., *Biotech. Bioeng.*, **21**, 821 (1979)
- 26) Himes, V.B., et al., *Biotech. Bioeng.*, **29**, 1155 (1987)
- 27) Tao, T.-Y., et al., *Biotech. Bioeng.*, **32**, 1037 (1988)
- 28) Mege, J.L. et al., *Cell Biophys.*, **8**, 141 (1986)
- 29) Suzuki, M. and Sakai, Y., *Proc. of JAAC '91*, in press
- 30) Takeichi, M. *Exp. Cell Res.*, et al., **68**, 88 (1971)
- 31) Takeichi, M. *Exp. Cell Res.*, et al., **74**, 51 (1972)
- 32) Seglen, P.O., *Methods Cell Biol.*, **13**, 29 (1976)
- 33) Nakamura, T., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1450 (1984)
- 34) Enat, R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1411 (1984)
- 35) Guguen-Guillouzo, C.B. et al., *Exp. Cell Res.*, **143**, 47 (1983)

- 36) Michalopoulos, G. and Pitot, H.C., *Exp. Cell Res.*, **94**, 70 (1975)
- 37) Savage, C.R., et al., *Exp. Cell Res.*, **114**, 307 (1978)
- 38) Silica, A.E., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 283 (1979)
- 39) Dunn, J.C.Y., et al., *FESEB J*, **3**, 174 (1989)
- 40) Dunn, J.C.Y., et al., *Biotech. Prog.*, **7**, 237 (1991)
- 41) Jaegwan, L., et al., *Biotech. Bioeng.*, **40**, 298 (1992)
- 42) 鈴木ら, 化学工学会米沢大会予稿集, pp. 32 (1991)
- 43) Rojkind, M., et al., *J. Cell Biol.*, **87**, 255 (1980)
- 44) 田辺ら, *人工臓器*, **14**, 220 (1985)
- 45) Koide, N. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 385 (1989)
- 46) 真治ら, *人工臓器*, **17**, 179 (1988)
- 47) Landry, J. et al., *J. Cell Biol.*, **101**, 914 (1985)
- 48) Koide, N. et al., *Exp. Cell Res.*, **186**, 227 (1990)
- 49) Sakai, Y. and Suzuki, M., *Biotech Tech*, **5**, 299 (1991)
- 50) 飯島ら, 化学工学会第24回秋季大会研究発表講演要旨集, pp. 330 (1991)
- 51) Sakai, Y. and Suzuki, M., in *Animal Cell Culture and Production of Biologicals*, ed. by Sasaki, R., et al., Kluwer Acad Pub, Dordrecht (1991) pp. 127
- 52) Shinji, T., et al., *Cell Struc. Func.*, **13**, 179 (1988)
- 53) Fujita, M., et al., *Int. Symp. Growth and Funct. in Primary Cult. of Hepatocytes*, Kyoto, Japan (1985)
- 54) Bissel, D.M. et al., *J. Clin. Invest.*, **79**, 801 (1987)
- 55) Guguen-Guillouzo, C., et al., *Exp. Cell Res.*, **143**, 47 (1983)
- 56) Guillouzo, A., et al., *Biomed. Pharmacol.*, **34**, 2991 (1985)
- 57) 濱田ら, *人工臓器*, **19**, 852 (1990)
- 58) 佐藤ら, *人工臓器*, **20**, 145 (1991)
- 59) 松下ら, 化学工学会第24回秋季大会発表講演要旨集, pp. 328 (1991)
- 60) 伊藤ら, 第8回初代培養肝細胞研究会抄録, pp. 22 (1992)
- 61) 高島ら, *人工臓器*, **20**, 139 (1991)
- 62) Miura, Y., et al., *Biochemical Engineering for 2001*, ed. by Furusaki, S., et al. (1992) pp. 617
- 63) Moscioni, A.D., et al., *Gastroenterol.*, **96**, 1546 (1989)
- 64) 武井, 未発表データ (1991)
- 65) 鈴木, 酒井, *化学工学論文集*, **17**, 667 (1991)
- 66) 酒井, 鈴木, *人工臓器*, **21**, 1065 (1992)
- 67) Hammer, D.A. and Lauffenburger, D.A., *Biophys. J.*, **52**, 475 (1987)
- 68) Nakamura, T. et al., *J. Biochem.*, **94**, 1029 (1983)
- 69) Nakamura, T., et al., in *Isolated and Cultured Hepatocytes*, ed. by Guillouzo, A., et al., Jhon Libbey Eurotext Limtd, London (1986) pp. 187
- 70) Takezawa, T. et al., *Bio/Technol.*, **8**, 854 (1990)