

# 培養細胞を用いた新規の環境評価・医療システムの開発

## Development of New Devices for Environmental and Clinical Applications Using Cultured Mammalian Cells

酒 井 康 行\*・迫 田 章 義\*\*・鈴 木 基 之\*\*\*  
Yasuyuki SAKAI, Akiyoshi SAKODA and Motoyuki SUZUKI

### 1. はじめに

ヒトを含む哺乳類の動物細胞は、生理学的意義のある生体機能を発揮する最小単位であるため、環境評価や新たな医療システムへの利用が期待されている。当研究室では、これらの利用に関して、以下のような研究を進めている。

### 2. 環境評価のための新規バイオアッセイ開発とその利用 (Fig. 1)

培養ヒト細胞短期毒性試験は、ヒト急性致死血中濃度との相関が高いことから、変異原生試験や内分泌攪乱性試験と共に、環境評価・管理への適用が期待されている。

そこでまず、ヒト細胞を用いながらも現場で使用可能な簡便デバイスを開発した<sup>1)</sup>。高感度安定検出が可能であるヒト肝ガン細胞 (Hep G2) の低密度リポタンパク質 (LDL) 活性阻害を指標とした、多孔質担体を用いることで細胞を高密度固定化し、それをマイクロピペットのチップ内に充填する使い捨て型のデバイスとした。各種化学物質や実際の環境水に適用したところ、従来2日間かかっていた急性毒性レベルの毒性を約2時間で検出可能であった。

次に、バイオアッセイデータと化学分析結果、本邦で構築が進められているバイオアッセイデータベース<sup>2)</sup>を利用して、環境水中の特定化学物質の総括毒性への寄与を定量化する試みを行った<sup>3,4)</sup>。これは、費用対効果が最も高い対策を選定するために役立つ<sup>5)</sup>。単成分物質の用量作用曲線はロジスティックモデルで、それらの複合的な毒性はその積 (両者の作用は相加的) で、それぞれ良好に記述することができた。興味深いことに、2種の化学物質の組合せより、環境水に一種類の化学物質を添加した場合の方が、予測と実測とがより高い相関性を示した。これは、環境水

中が毒性発現メカニズムの異なる多くの物質を含んでおり、ある化合物がそれに添加されたとしても、その物質の毒性発現機構が、総括の毒性に対して拮抗的・相乗的といった特殊な相互作用を及ぼす可能性が低いことを示している。従って、特定の毒性物質 (群) の除去による総括毒性の低減を評価する場合には、その影響は相加的であると予測することは妥当であると判断した。

さらに、毒性低減の視点からの水処理プロセス改善に応えるために、処理プロセスでの総括毒性の低減と処理操作条件を簡便に記述することを試みている。例えば排水のオゾン処理においては、原水中化学物質・酸化によりプロセス内で初期に生じる中間生成物・処理後期に生じ強い毒性を示すアルデヒド類の三者の消長に着目し、上述の複合毒性記述手法を用いて、総括の毒性変化をおおよそ記述することができた<sup>6,7)</sup>。今後、他の処理プロセスについても同様の手法で数値モデル化し、種々の処理操作条件での毒性削減を簡便に予測することが可能となろう。

### 3. 人体システムの応答再現を目指した新規実験システムの開発 (Fig. 2)

環境評価・管理のためのバイオアッセイは、簡便性・迅速性を最重要視しているため、階層構造を持ったシステムとしての人体の複雑な環境応答を記述再現することは困難である。従ってこれらの手法は、例えば動物実験代替といった目的のためのより高度な人体応答の評価のためには、全く不十分である。この目的のためには、動物実験以外には、生理学的薬物動力学モデルによる数値シミュレーションが専ら用いられているが、未解明の臓器間相互作用を予測することは原理的に不可能である。

そこで、より高度な人体応答の評価のために、複数のバイオアッセイ手法を生理学的な構造で配置・結合する新規実験システムの開発を進めている。具体的には、小腸や肺から摂取された環境汚染物質が肝臓で代謝を受け、それ以外の臓器に毒性を発現するという主要なプロセスの再現を

\*東京大学生産技術研究所 人間・社会大部門  
\*\*東京大学生産技術研究所 物質・生命大部門  
\*\*\*国際連合大学

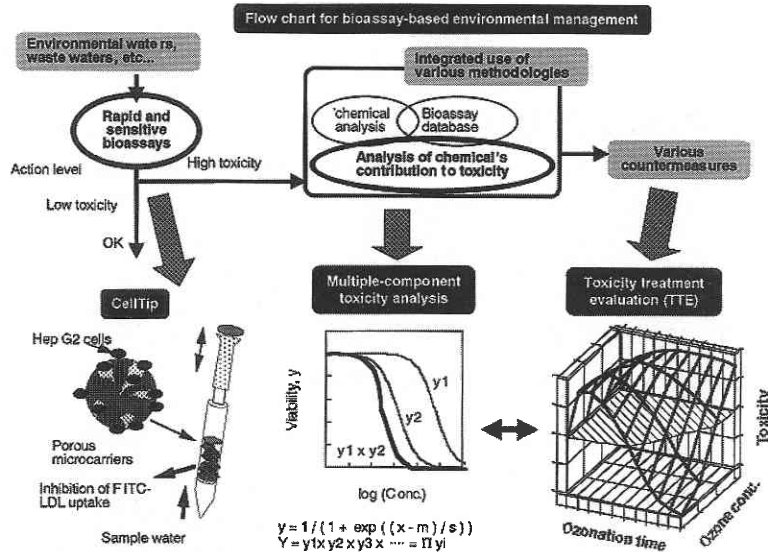


Fig. 1 バイオアッセイを利用する新たな環境管理と、開発した要素技術・方法論. 上半分に、バイオアッセイによる環境評価に基づいて、具体的な対策を執るまでの流れを示す. 下半分に、その中で必要とされる迅速簡便バイオアッセイ・多成分毒性解析法・水処理プロセスによる毒性低減評価予測法、などの要素技術・方法論を示す.

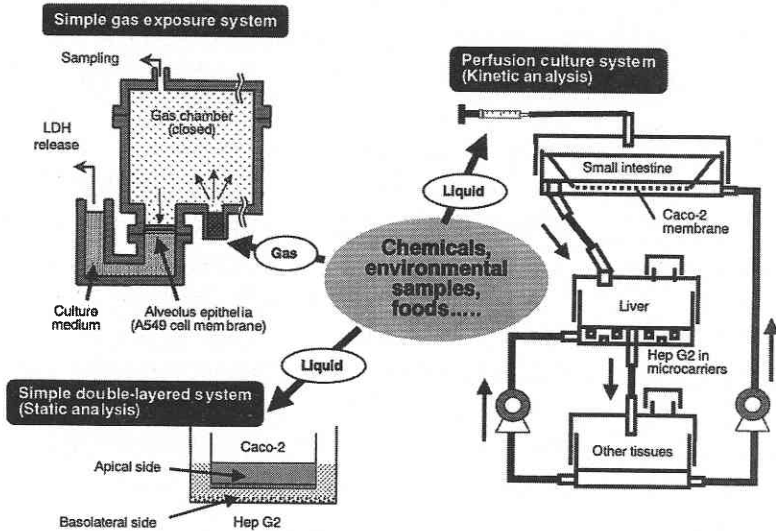


Fig. 2 経口・経吸的に摂取された化学物質影響評価のための培養細胞利用型の実験システム.

まずは目指し、種々の培養システムを研究している。

まず、簡便型として市販の膜型培養器を用いて、小腸吸収とその後の毒性発現を同時に評価可能な新規試験系を開発した<sup>8)</sup>。小腸モデルにヒト大腸ガン由来細胞 (Caco-2) を用い、肝臓モデルにヒト肝ガン由来の Hep G2 細胞を用いた。この系では、毒性発現における消化管吸収率の補正を行うことができ、人体致死毒性の予測性の向上が確かめられた。ある種の化学物質では、人体で指摘されているような小腸での代謝と極性輸送に起因すると見られる複雑な毒性発現が再現され、現在、詳細な検討を進めている<sup>9)</sup>。

この簡便型では市販の培養器を用いているため、人体に比較して細胞密度が著しく低いものとなっている。またその小ささゆえ、速度論的な評価には適さない。さらに、厳密に生理学的な回路で各細胞集団が接続されているわけで

はない。そこで、同様の細胞を用い、生理学的な回路を持つ灌流システムの開発をも進めている<sup>10)</sup>。高密度培養を行うことで、細胞密度を人体の 1/10 程度にまで高めることができ、より定量的な記述予測に近づくことができる。ただし、数多くのシナリオを簡便に評価することは不可能であるので、上記の簡便型システムと共に各々の利点を活かしつつ相補的に利用していくべきであろう。

以上では、経口的な摂取を前提としたが、経吸的な評価のため、別途、簡便なガス暴露装置を開発した<sup>11)</sup>。ここでは、肺気道や肺胞の *in vivo* での大気への暴露を模倣するため、気液界面培養を用いた。すなわち、培養液中で膜上に細胞を培養した後に、上面の培養液のみを取り除き *in vivo* と同じく気体に半ば直接接触させるものである。環境中で問題となっている種々のガスを暴露すると、明らか

に液相存在下と比較して毒性が高くなった。また、興味深いことに、肺気道細胞（ここではヒト気管支ガン由来 Calu-3）では、気液界面培養で多層化が進み、*in vivo* 様の厚い上皮構造を形成するが、肺胞細胞（ヒト肺胞ガン由来 A 549）では全く重層化が進まず、肺胞細胞は気道細胞と比較して暴露に対して著しく感受性が高かった。先に使用した肝細胞（Hep G2）と、肺由来のこれらの細胞の感度比較も行ったが、全ての物質について肺胞細胞が最も弱いことが確認され、短時間暴露での経吸気影響においては、肺を標的臓器として重視すべきと考えている。

以上のように、人体組織の各特徴を再現しうるバイオアッセイ手法を、階層的な人体システムの構造に沿って適切に組合せ利用することで、生理学的薬物動力学シミュレーションと相補的に働くような全く新たな実験システム体系を構築することができる。これらは、進歩の著しい多遺伝子発現同時解析技術などと合わせて用いることで、応答に関わるメカニズムの解明に役立つと考えている。

#### 4. 新たな医療システムとしてのバイオ人工臓器や再構築型組織の開発 (Fig. 3)

人体を構成している細胞・組織のうち代謝を司るものの代替を展望した場合、その最小構成単位である細胞を用いるのは妥当である。特に肝臓については、500 種程度の機能を保持しており、物理化学的な単位操作で代替することは全く不可能であることから、細胞を利用するバイオハイブリッド型のシステムが研究されている。

そこで、本学大学院医科学研究科・肝胆膵外科学専攻の成瀬勝俊助手・幕内雅敏教授らと共同で、ブタ肝細胞の高密度培養バイオリクターを利用する一時的肝機能代替システムの開発を進めている。要となるバイオリクターについては、物質交換性に優れたポリエステル不織布を用い

る充填槽型<sup>11)</sup>、ミニ肝臓とも言うべき高密度肝細胞凝集体を利用する浮遊灌流培養型<sup>12)</sup>、などの開発を行ってきており、現在、肝疾患モデルイヌ・サルを用いる詳細な性能評価を進めている。しかしながら、異種動物細胞を用いる治療では、例えばブタの場合には染色体内在性のレトロウイルスが種を越えて人類に蔓延する可能性が否定できないことなどから、わが国の厚生労働省は慎重な姿勢を取り続けており、本邦での臨床応用の目処は立っていない。

このような一時的な機能代替を目指す従来の人工臓器開発と異なり、ここ数年、永続的に働くほぼ完全な生体臓器の再構築を目指した、いわゆる生体組織工学の研究が盛んとなっている。これは具体的には、ヒト組織・臓器の幹細胞・前駆細胞を、生分解性のポリマー担体で培養し、生体に戻して欠損機能を回復しようとするもので、皮膚や軟骨に関してはほぼ成功している。これはこれらの組織の幹細胞の *in vitro* 増殖分化制御が比較的容易であること、これらの組織がもともと二次元的であり、移植直後の物質交換があまり問題とならないこと、などが挙げられる。

一方で、肺や肝臓・腎臓といった複雑な機能または構造を持つ重要な臓器については、いまだ方法論が確立していない。複雑ではあるが高度に組織化された内部微細構造を持つ生分解樹脂テンプレートをどのように製作するかといった工学的課題解決と、これらの臓器の幹・前駆細胞の増殖分化を如何に *in vitro* で制御するかといった極めて生物学的な知見の蓄積、などが必要条件である。

そこで、前者に関しては、CREST 研究員・宮田房枝氏（本学大学院工学系研究科・化学システム専攻）、同じく CREAST 研究員の古川克子博士（本学大学院工学系研究科・機械工学専攻）の協力を得て、高機能生分解ポリマーの開発と評価に着手している。また本所白樫了助教授と共にこれらの新規ポリマーを用いた各種微細加工・造型技術

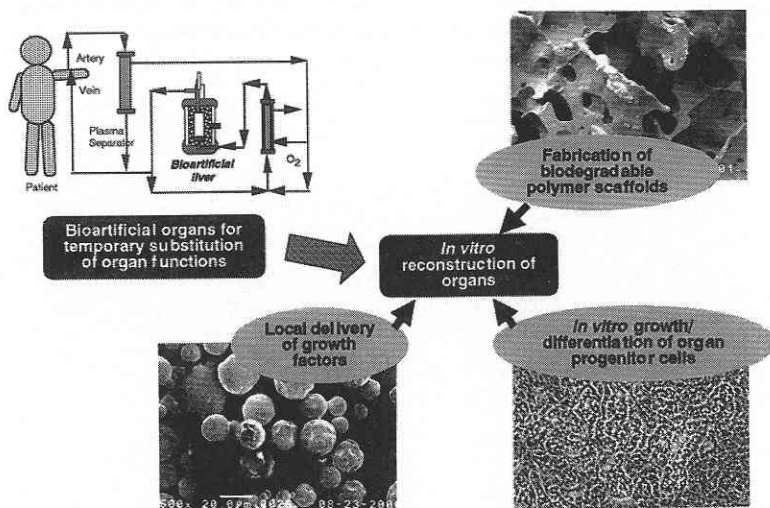


Fig. 3 開発したバイオ人工肝システムと肝組織再構築を目指した個別研究。左上は血漿分離を介してバイオリクターと物質交換させる人工肝臓システムを示す。写真は、肝組織再構築を目指した、各個研究を示す。上から時計回りに、乳酸系ポリマーを粒子溶出・ガス発泡法で多孔質化した担体の内部構造、増殖因子の存在下で培養され一部肝組織様の構造を形成しているマウス胎児肝細胞、内部に複数の増殖因子をもつ生分解性徐放マイクロカプセル、をそれぞれ示す。

の適用可能性に関する研究を開始している。

一方で後者に関しては、当面のターゲットを肝組織再構築に当て、本学分子細胞生物学研究所の宮島篤教授らのグループの協力のもと、まずはマウスの胎児肝細胞を細胞ソースとして、最近研究を開始した。これは、成熟肝細胞は *in vitro* でほとんど増殖しないが、胎児肝細胞は活発な増殖能を持ち、適当な条件下で培養を継続することで、分化機能を獲得し始めると共に、*in vivo* の肝細胞索に酷似した組織を形成し得るためである。これに必要な因子を例えば生分解性ポリマーマイクロカプセルを用いて局所高濃度供給したり<sup>13)</sup>、上述の微細構造テンプレートをを用いることで、高度な肝組織の *in vitro* 形成可能性を追求している。

### 謝 辞

紹介した研究は、文中で述べた方々以外に、以下の方々の寄与が大であることを付記する。毒性検出チップと複合毒性の記述・予測については、前・博士課程学生・庄司良氏（現在、東京工業高等専門学校・物質工学科）、処理プロセスにおける毒性削減過程の記述・予測については、現・博士課程・金範洙さんと本所の藤井隆夫技術官、複合培養システム開発に関しては、前・修士課程の新井友教氏（現・東京三菱製薬）、同じく大磯輝将氏（現・国立国会図書館）、現・修士課程の富田賢吾さんと福田理さん、ポリマー合成・担体作製・評価に関しては、現・研究実習生の小佐々淳一さん（明治大学理工学部）、本所の野村剛志技術官、マウス胎児肝細胞培養については、現・博士研究員の姜金蘭氏（吉林大学・生物工程研究所）と、それぞれ行っている。以上、まとめてお礼申し上げる。

(2001年2月22日受理)

### 参 考 文 献

- 1) Development of a rapid and sensitive bioassay device using human cells immobilized in macroporous microcarriers for the on-site evaluation of environmental waters: R. Shoji, Y. Sakai, A. Sakoda and M. Suzuki: *Appl. Microb. Biotechnol.*, **54**, 432-438 (2000).
- 2) H. Utsumi, O. Nakasugi, T. Nishimura, A. Sakoda, R. Oguri, and R. Higuchi: Development of bioassays to evaluate human and ecological impacts of pollutants: Proc. Asian Waterqual. '99 (7th IAWQ Asia-Pacific Regional Conference), pp. 275-280, Taipei (1999).
- 3) バイオアッセイで評価した化学物質及び環境水の複合的な毒性の定量的記述: 庄司良, 迫田章義, 酒井康行, 内海英雄, 鈴木基之: 水環境学会誌, **23**, 487-494 (2000).
- 4) Formulating bioassay data of chemicals and environmental water; Shoji R., Sakoda A., Sakai Y., Utsumi H. and Suzuki M.: *Water Sci. Technol.*, in press.
- 5) 環境中化学物質の新たな管理体系をめざして: 酒井康行, 庄司良, 金範洙, 迫田章義, 鈴木基之: 生産研究, 印刷中.
- 6) DDVPのオゾン処理における細胞毒性変化の解析と予測: 鈴木基之, 金範洙, 藤井隆夫, 酒井康行, 迫田章義: 水環境学会誌, 印刷中.
- 7) 埋地地浸出水のオゾン処理における細胞毒性変化の解析と予測: 金範洙, 迫田章義, 藤井隆夫, 酒井康行, 鈴木基之: 水環境学会誌, 印刷中.
- 8) Development of a simple double-layered cell culture system using Caco-2 and TIG-1 cells as a new cytotoxicity test, Y. Sakai, T. Arai, A. Sakoda and M. Suzuki, *AATEx*, in press.
- 9) 小腸上皮・肝細胞複合培養系での Benzo [a] pyrene の吸収・代謝・毒性発現の評価: 鈴木基之, 福田理, 酒井康行, 迫田章義: 日本動物実験代替法学会, P-21 市川, 2000.11.
- 10) 複合動物細胞培養: 酒井康行: 動物細胞工学ハンドブック, 動物細胞工学会編, 朝倉書店 (東京) pp.216-217 (2000).
- 11) Efficacy of non-woven fabric bioreactor immobilized with porcine hepatocytes for ex vivo xenogeneic perfusion treatment of liver failure in dogs: K. Naruse, Y. Sakai, G. Lei, Y., Y. Sakamoto, T. Kobayashi, C. Puliatti, G. Aronica, F. Leone, S. Qiang, S.-G. Ming, Z. Li, S.-J. Chang, M. Suzuki and M. Makuuchi: *Artif. Organs*, in press.
- 12) A new bioartificial liver using porcine hepatocyte spheroids in high-cell-density suspension perfusion culture: *in vitro* performance in synthesized culture medium and 100% human plasma: Y. Sakai, K. Naruse, I. Nagashima, T. Muto and M. Suzuki: *Cell Transplant.*, **8**, 531-541 (1999).
- 13) *In vitro* organization of biohybrid rat liver tissue incorporating growth-factor- and hormone-releasing biodegradable-polymer microcapsules: Y. Sakai, K. Furukawa, T. Ushida, T. Tateishi, and M. Suzuki: *Cell Transplant.*, in press.