

- 4-3 西迫 貴志 東京大学大学院工学系研究科/(株)科学技術振興機構 特任研究員
 鳥居 徹 東京大学大学院工学系研究科 助教授
- 4-4 大島 栄次 東京工業大学名誉教授
- 4-5 芹生 章典 (株)産業技術総合研究所コンパクト化学プロセス研究センター 非常勤研究員
 葉 淑英 (株)産業技術総合研究所コンパクト化学プロセス研究センター 非常勤研究員
- 4-6 宮村 和宏 (株)堀場製作所開発センターMEMSライフサイエンスプロジェクト 主任
 馬渡 和真 (財)神奈川科学技術アカデミー光科学重点研究室マイクロ化学グループ 研究員
- 4-7 古川 影政 (株)マイクロリアクターシステム 代表取締役社長
- 4-8 河村 義裕 カシオ計算機(株)要素技術統轄部第三技術開発部 リーダー
 五十嵐 哲 工学院大学工学部環境化学工学科 教授
- 4-9 北野 延明 日立電線(株)技術開発本部アドバンス技術研究所
 フォト・エレクトロニクス技術研究センタ 研究員
- 4-10 松崎 覚 太盛工業(株)設計開発部
 西薮 和明 大阪府立工業高等専門学校総合工学システム学科 助教授
 田中 茂雄 太盛工業(株) 代表取締役社長
- 4-11 和田 芳弘 (株)イーピーテック プロジェクトマネージャー
 小林 功 (株)食品総合研究所 客員研究員
 中嶋 光敏 (株)食品総合研究所食品工学部 部長
 筑波大学大学院生命環境科学研究科 客員教授
- 4-12 榛原 均 大日本スクリーン製造(株)技術開発センター
 開発管理統轄部開発企画部 担当課長
- 4-13 渡慶次 学 マイクロ化学技研(株) 代表取締役社長
- 4-14 関 実 大阪府立大学大学院工学研究科 教授
- 4-15 大政 健史 大阪大学大学院工学研究科 助教授
 (株)産業技術総合研究所セルエンジニアリング部門 客員研究員
- 4-16 中西 博昭 (株)島津製作所基盤技術研究所 主任研究員
- 4-17 下出 浩治 旭化成(株)研究開発本部 主幹研究員
- 4-18 久保 英明 花王(株)加工・プロセス開発研究所第1研究室 グループリーダー/主任研究員
- 4-19 佐藤 忠久 富士写真フイルム(株)R & D統括本部先進コア技術研究所 研究主幹
- 5 草壁 克己 福岡女子大学人間環境学部 教授

マイクロリアクタを用いた 薬物代謝評価系の構築

大阪大学大学院工学研究科 助教授 大政 健史
(独)産業技術総合研究所セルエンジニアリング部門 客員研究員

1 はじめに

マイクロリアクタとは、マイクロ・ナノレベルでの加工技術を用いて作成される反応場を利用して、さまざまな化学・生物反応を実現するマイクロスケールでのリアクタと定義される。マイクロリアクタと呼ばれる場合には、マイクロスケールの回分反応ではなく、通常マイクロチャンネルを利用して連続的に反応する系を指す場合が多い。本稿では、マイクロリアクタを生体反応の1つである薬物代謝の評価系に利用する試みについて、その可能性・課題について紹介する。

2 生体での薬物代謝と肝臓・腎臓

薬物代謝とは、生体内において行われる酵素反応による化合物（タンパク質も含む）の化学構造の変化に他ならない。すなわち、「生体内反応」そのものである。これらの反応を担っているのは細胞内に存在する酵素であるが、酵素反応の反応場としては、マイクロレベルでの構造体：細胞、組織などが用いられている。すなわち、生体内では生きたマイクロバイオリアクタが生体反応を担っているといっても過言ではない。

大政 健史 (おおまさ たけし)

平成4年、大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了。博士（工学）。同年、同学助手。現在、同学大学院工学研究科助教授。専門は、生物化学工学、動物細胞工学。主な著書に、『動物細胞工学ハンドブック』（朝倉書店）、『バイオミメティック組織デバイス』（三恵社）。日本生物工学会照井賞受賞。

生体内における薬物代謝反応場として、最もよく知られているのが、肝臓である。肝臓は人体の化学工場と呼ばれるように、数百以上の非常に多数の化学反応にかかわっている臓器である。これまで知られている肝臓の機能を表1に示す。

表1 肝臓の機能

(1) 代謝機能

糖質代謝、脂質代謝、アミノ酸・タンパク代謝、ビタミン・ホルモンの代謝

(2) 解毒機能

薬物代謝酵素系 (P-450 など) による薬物の酸化、水酸化、グルクロン酸抱合、アルコールの代謝、アンモニアの代謝など

(3) 排泄機能

胆汁分泌、胆汁酸生成分泌、コレステロール、リン脂質、ビリルビンなどの分泌、解毒された薬物などの胆汁中への分泌

(4) 循環調節作用

肝臓は、生体内最大の臓器 (成人で約 1.5 kg) であり、約 50 万の肝小葉と呼ばれる構造体からなっている。1 つの肝小葉には 50 万個の肝細胞があり、これらの細胞が放射状に配置され、効率よく血液と接することにより、その機能を発揮できるようになっている。肝臓の最小単位である肝小葉の構造を以下の図1に示す。

肝小葉は、実際の代謝を担う肝実質細胞と間質細胞、クッパー細胞などからなる。生体内に吸収された薬物は、肝動脈を通過して毛細血管を通じて肝実質細胞に供給され、代謝される。内径 10 μm 程度の毛細血管だと、血流量は 10^{-7}ml/分 程度となり、まさにマイクロチャネルと同様に、層流条件下での反応が実現されている²⁾。さて、上記表1に示した非常に多種類の肝臓の機能のうち、近年最も注目されているのは解毒代謝、特に薬物代謝である³⁾。

さて、実際の薬物代謝は肝実質細胞中で第I相反応 (Phase I) と第II相反応 (Phase II) の主として2つのステップを経て代謝される。第I相反応は、体内に吸収された薬物が酸化、還元、加水分解を受ける。このステップでは主として極性化反応が起こり、水酸基・カルボキシル基・アミノ基などの比較的小さな極性基が生成、導入され、薬物に極性官能基が付与される。第II相反応は抱合反応である。この反応によって、第I相にて極性官能基が付与された薬物にグルクロン酸、硫酸、グルタチオンなど第一相反応よりも大きな置換基が導入される。この結果、尿中などを経てより生体外に排出されやすくなる³⁾。I、II相反応の模式図を図2に示す。

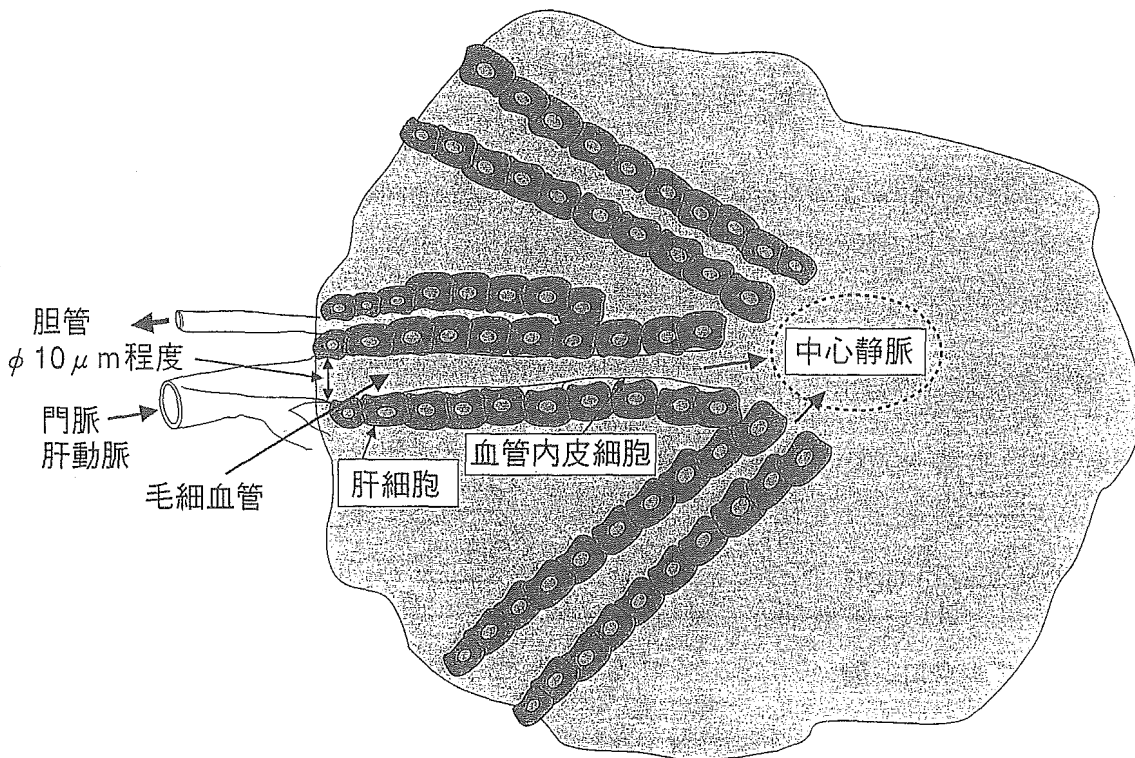


図1 肝小葉の構造 (模式図)¹⁾ (文献1) を改変)

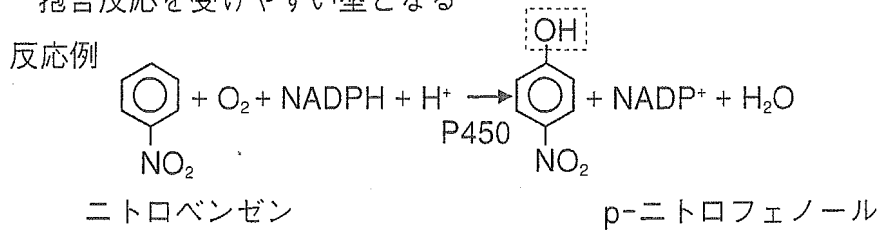
ヒトにおいては、第I相反応の薬物代謝の約80%を担っているのが肝ミクロソームに存在する膜酵素チトクロームP450である⁴⁾。P450は肝臓のみならず、腎、肺、小腸などにも少量ではあるが分布する。近年、ヒトゲノム計画の完了に伴ってP450に関する遺伝子多型 (Genetic polymorphism) が知られるようになってきた。この遺伝子多型は現在、薬物動態の個人差の主要因として、注目されている³⁾。またP450は基質特異性が低いという特徴があり、P450の分子種であるP450 3Aの場合、臨床で使用されている医薬品のおよそ半分を代謝することができる⁵⁾。さらに、P450 3A4はP450全体の約30%の発現量を占めていることが知られている (図3)⁴⁾。

また、第II相反応においては、UDPグルクロン酸転移酵素や、硫酸転移酵素、グルタチオン転移酵素などが第II相の抱合反応を担っている。近年では、これらの第II相反応を担う酵素群にも遺伝子多型が報告され⁶⁾、I相反応のP450の多様性のみならず、II相反応の多様性も含めて、ヒトにおける薬物代謝の多様性、個人差を担っている。また、近年では第III相反応として、これらの薬物の取り込みと排出を担う薬物トランスポータにも注目が集まっている³⁾。

さて、肝臓にて代謝された薬物はそのまま血流に沿って腎臓へと運搬される。腎臓の機能としては体内の老廃物排泄が一般的には知られているが、実際の生体内で

第I相反応（酸化・還元・加水分解などの反応）

OH基・NH₂基・COOH基などが生成され、極性を生じるとともに抱合反応を受けやすい型となる



第II相反応（抱合反応）

抱合反応により極性がさらに増大し、より排泄されやすい型となる

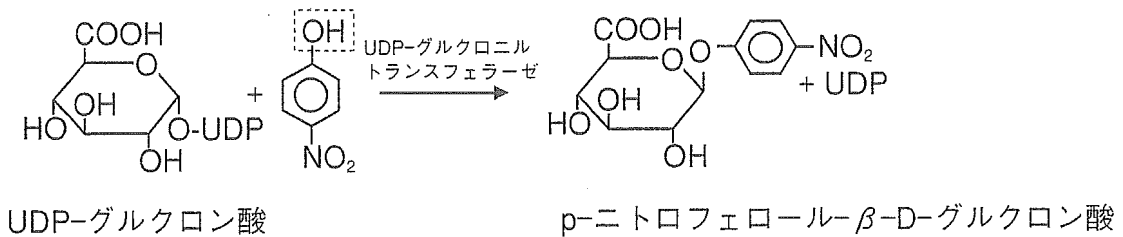


図2 肝臓における薬物代謝反応

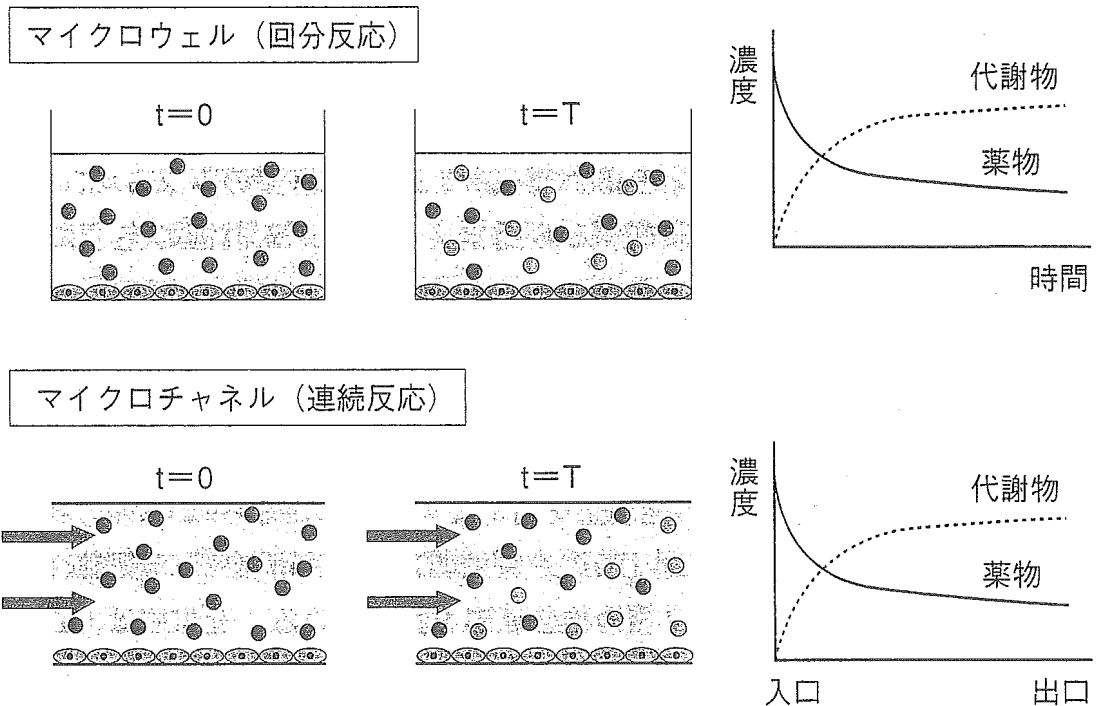


図3 マイクロウェルとマイクロチャネルにおける反応の違い

の役割からは、体液性状を一定に維持するために、ろ過、再吸収、および分泌を行っている臓器と位置づけられる。体内に入った薬物は、通常適当な時間後にその

ままの構造で排泄されるか、肝臓で代謝され、極性構造に変化した後に排泄される。その主な経路は腎臓である。腎臓における薬物代謝は以下のような道筋をたどる^{7),8)}。まず、糸球体において血清成分がろ過され、分子量1~2万以下のものがほぼ全て尿細管に移行する。次に、腎尿細管において比較的極性の高い酸性および塩基性の薬は尿細管において発達している分泌機構によって血漿中から尿細管中に排泄される。特にアニオン分泌機構においては関与するトランスポータは同じと考えられており、有機アニオン薬物間では拮抗阻害が起こり、薬物相互作用の原因となる。これら糸球体および尿細管において排泄された薬は再び尿細管で吸収される。尿細管における再吸収は細胞膜を通る受動輸送なので脂溶性の高い薬ほど再吸収され排出されることはない。

3

薬物代謝をシミュレートするためには -マクロからとマイクロからのアプローチ-

ヒト生体内薬物代謝の解明は、医薬品の開発においては、避けては通れない必須の検討項目であり、化合物自身の構造に基づく予測、解析、酵素、肝ミクロソーム、細胞株、初代細胞から動物実験までありとあらゆる手段によって *in vitro* の実験からヒトにおける *in vivo* での代謝を予測する手法が開発されている⁹⁾。これらのアプローチは、構成要素を要素分解して、マイクロレベルでの反応から予測する手法と、ミニスケールでの動物で得られたデータをヒトに外挿して推定する手法がある。

3.1 マクロからのアプローチ：動物実験系、バイオ人工臓器

薬物のヒト体内における動態を予測するためには、アロメトリーと呼ばれる個体の大きさ（体重や表面積など）と臓器の構造および機能との相関性を用いた経験則を利用して、予測をする手法が主として用いられている^{10),11)}。本手法は実際の医薬品開発の現場においては常套手段として利用され、近年では、ヒト初代肝臓細胞を移植可能なマウスを構築し、これを用いて薬物代謝を予測しようとする試みがある。一方、動物実験自体について、できるだけ回避しようとする方向性もあり、近未来的には、細胞を用いて再構築したバイオ人工肝やバイオ人工腎によって薬物代謝を予測する手段についても検討されている。

バイオ人工臓器は従来の機械的装置のみからなる人工臓器ではなくて、より実際の生体に近い生体由来の材料（細胞、酵素など）を用いて、これと人工物を組み合わせることにより構築した臓器である。人工肝臓の場合は、生体由来の初代肝実質

細胞や、細胞株を用いて、これを高密度可能なリアクタと組み合わせることにより、薬物やアンモニアの代謝を行わせることが可能となる^{12)~14)}。一方、バイオ人工腎臓は、従来のろ過機能のみをシミュレートしている血液透析とは異なり、腎由来細胞と透析装置を組み合わせることにより、腎機能を再現しようとする試みである¹⁵⁾。さらには、肝臓と腎臓の細胞を組み合わせることにより、これらの臓器による薬物代謝を再現する試みもある¹⁶⁾。

3.2 ミクロからのアプローチ：肝ミクロソーム、初代肝細胞、肝由来細胞株の利用

一方、これに対してヒトでの代謝予測を、薬物代謝を担っている酵素、細胞に要素分解することにより行う手法もさまざまに用いられている。具体的にはP450を多量に含むヒト肝ミクロソーム画分やヒト初代肝細胞、肝由来細胞株を用いることにより、生成される代謝物の構造決定、代謝経路の解明、さらには代謝経路に関与する酵素系の解明、細胞における酵素誘導、薬物相互作用、基質阻害活性などの検討である。現在、これらの評価系を用いた新薬候補化合物の絞り込みのためのハイスループットアッセイ系は、できるだけ多数のサンプルの評価を同時にこなすために、回分反応を用いて行われている。ところが、しばしば、これらの評価を行う際には、回分反応であるがゆえに、代謝反応の直線性が保たれていない範囲での測定や、広い基質濃度範囲での代謝活性検証が行われていない場合がある¹¹⁾。また、反応に伴って基質濃度が減少し、反応速度も低下する。そこで、基質濃度を一定に保って、かつそのレベルを自由自在に制御可能で、かつ、ステップ応答的に基質を切り替えられるため、多種の薬物に対する切り替え応答についても評価可能なマイクロリアクタを用いた薬物代謝評価系の構築を試みた(図3)。

4 マイクロリアクタを用いた薬物代謝評価系構築の試み

マイクロリアクタを用いた薬物代謝評価系を構築するにあたり、下記のような個々の構成要素を設定し、開発を行った。具体的には、本システムの開発項目としてセンサとしての細胞の選定・構築、そしてそれを用いた応答、精度の検証、さらにはマイクロリアクタを用いて血管での流れを模倣した評価システムを構築し、最終的にはこれを用いた薬物代謝評価系を構築する。本稿では、センサとしての細胞設定と測定環境設定の例について具体例を紹介する(図4)^{17)~20)}。

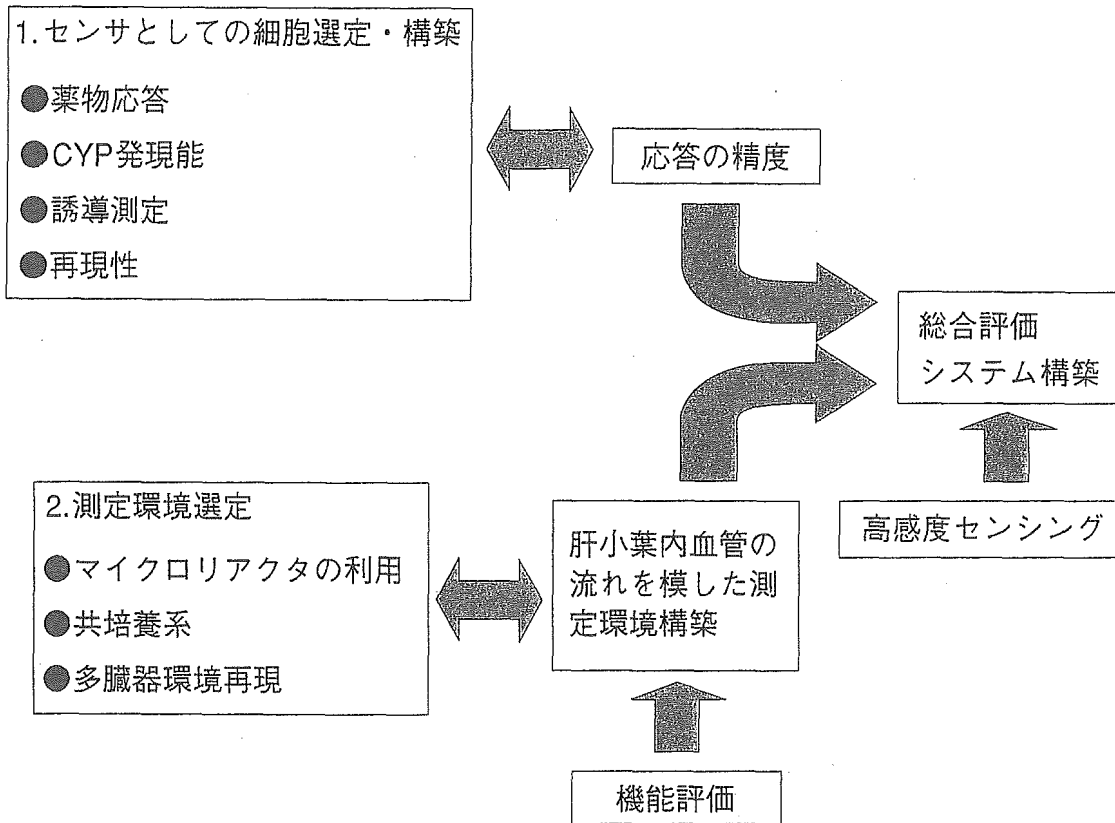


図4 マイクロリアクタを用いた薬物代謝系構築要素

4.1 センサとしての細胞選定・構築

薬物代謝を評価するためにはセンサとしての細胞の選定・構築が欠かせない。代謝評価に用いる細胞としては、ヒト初代肝細胞もしくはヒト肝由来細胞株が候補として挙げられる。初代肝細胞は、ヒトと同様の薬物代謝酵素を保持しているが、その活性は、生体より単離後、急速に低下していく。また、凍結保存をすることにより、生残率が極端に低下し、生理活性の再現よい測定には、細胞の維持管理に非常な労力を要する。また、初代細胞であるがゆえに、得られた生体由来のロット差が大きく、実験の再現性が難しい点や、入手自体も困難、さらに細胞は増殖しないため手に入れた細胞を増やして利用することができないなど、実験自体の困難さも存在する。一方、ヒト肝由来細胞株は、肝由来機能は失っているかもしくは低下しているものの、活性のばらつきは少なく、無限増殖能を持つため、品質管理や再現性、コストの面で扱いやすい。また、薬物誘導についてはその活性が極端に低下している。そこで、本研究では「要素分解」して評価することを主眼とした細胞株を構築し、センサとして用いることとした。構築した細胞のコンセプトは、CYPプロモータ配列を用いることにより、代謝物が細胞に取り込まれて薬物代謝酵素の誘導が起

こる。そして反応自体は発現したP450の構造遺伝子によって代謝物が生成され、誘導自体はレポータ遺伝子によって経時的に測定可能な系である。宿主動物細胞として、ヒト由来HepG2 (RCB0459) 株を用いた。本細胞はhuman hepatocellular carcinoma由来であり、増殖形態はepithelial-likeである。現在、P450を誘導する配列は、いくつか知られている。ここでは具体例として、最もよく知られているER6配列を用いた。本配列に、pregnane X receptorに外来誘導物質が結合したのちに、レセプター誘導物質複合体が核内に移動し、これとretinoid X receptorとが結合してプロモータ領域に結合することにより、P4503A4の発現誘導が開始される。本プロモータ配列の下流にCYP構造遺伝子と、レポータ遺伝子としてGFP遺伝子を導入することにより、薬物代謝に利用できるプラスミドを構築した。本プラスミドはP450プロモータの下流にCYP3A4構造遺伝子とGFPを、IRES配列を介在させて結合することにより、1つの3A4プロモータ制御下にて2つの構造遺伝子を発現することが可能である。

また、構築した細胞へのトランスフェクションおよび細胞の評価はTransfection arrayシステムを用いて行った。本システムは、産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリング研究センターにて開発されたシステムであり、スライドガラス上にスポッティングしたベクターの上に細胞を播種することによって行う固相系トランスフェクションの手法により、細胞により効率的かつ簡便にトランスフェクションを行うことができる^{21), 22)}。また、得られた細胞の接着したスライドガラスを蛍光顕微鏡で観察することにより、細胞の応答を簡便に検出することが可能である。ここでは、3A4特異的誘導薬剤としてdexamethasoneおよびclotrimazoleを添加した場合の写真为例として示す(図5)。誘導薬剤添加後、3日目に得られた誘導結果である。

4.2 測定環境設定

さて、センサとしての細胞を用いて測定系を構築するためには、細胞の測定環境の整備が欠かせない。筆者らは、図6に示す幅深さ400 μm 、幅4,000 μm のマイクロチャンネル型リアクタ(容積100 μl 、 μ -SlideI)を用いて薬物代謝実験を行っている。実験に用いた細胞は、CYP3A4を恒常的に発現しているGS-3A4-HepG2細胞株を用いた^{23), 24)}。用いたマイクロチャンネル型リアクタおよび、35 mmディッシュを用いた代謝実験との比較を下記の図に示す。ここでは、CYP3A4特異的な基質であるVIVID CYP3A4 Red substrateを用いた。これは、代謝されることにより蛍光を発するため、少量の系でも代謝活性が測定可能である。マイクロチャンネル型リアクタを用いる場合と35 mmディッシュを用いた場合とで同様な代謝活性測定系が構築で

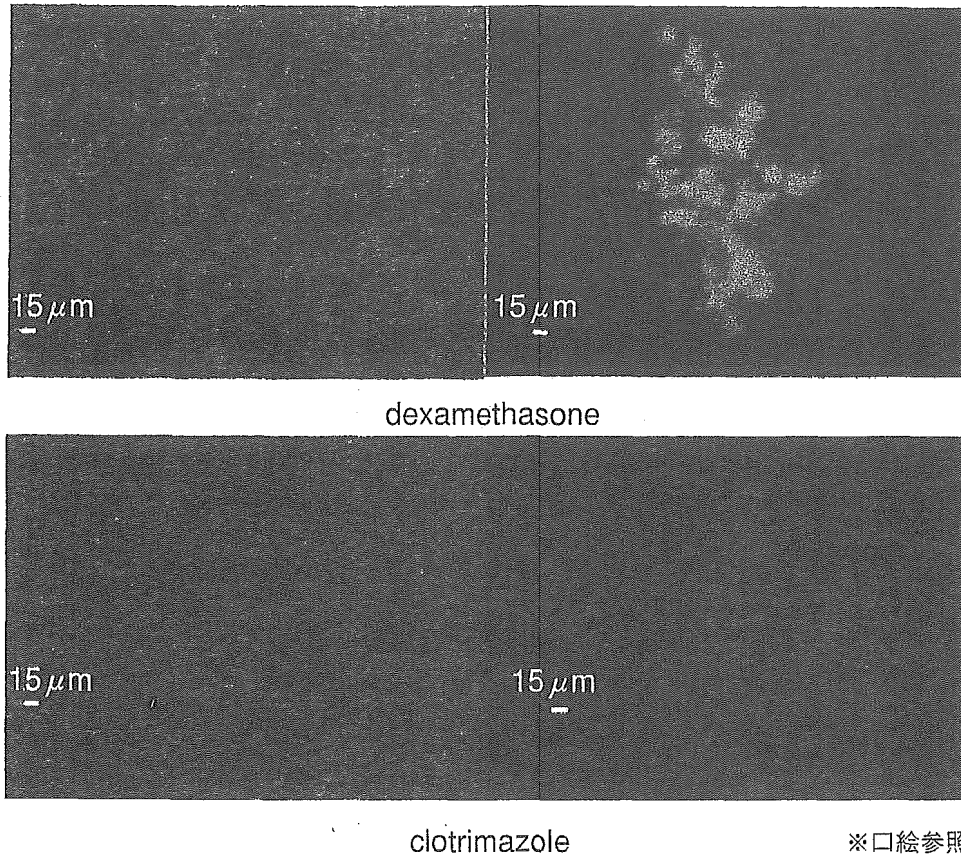


図5 p3A4cp-d2EGFPの誘導実験結果 (day 3)
 (左図：位相差顕微鏡、右図：蛍光画像)

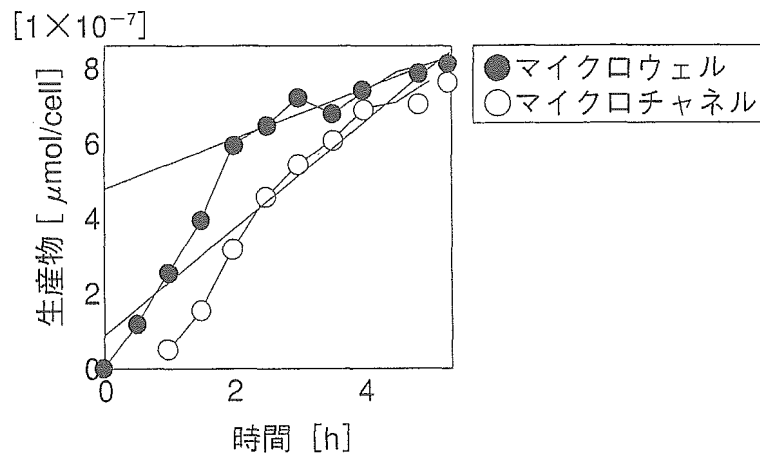
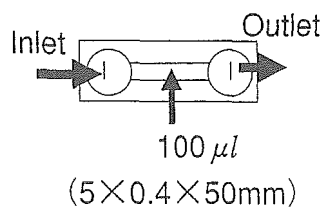
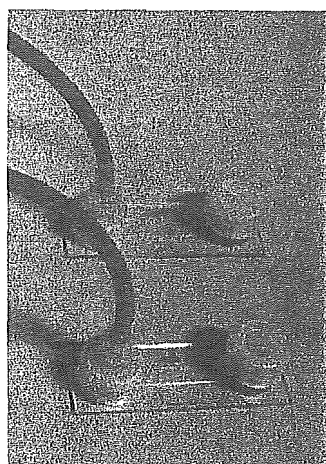


図6 用いたマイクロチャネル型リアクタおよびマイクロウェルとの反応生成比較

きていることが示されている。

5 おわりに

マイクロチャンネル型リアクタを用いて薬物代謝評価システムを構築するためには、センサとして用いる細胞自身の改良のみならず、より広範囲な基質について検証できる高感度な分析システムとの組み合わせが必須である。さらには、マイクロチャンネル型リアクタによって得られたデータが、はたして、従来のマイクロウェルを用いた回分反応系に比較して、より精度よくヒト代謝を検証（予測、模倣）できるかを実証する必要がある。マイクロチャンネル型リアクタによる評価系は、本質的にハイスループットで多数のデータを取得する目的には適していない。マイクロリアクタと多種類の細胞を組み合わせ毒性試験に用いたり^{25), 26)}、肝-腎細胞と組み合わせ薬物代謝評価を行う系を構築するなど、マイクロウェル型では得られないデータの取得を目指した今後の開発が望まれる。

謝 辞

本稿に紹介した内容は、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物化学工学研究室および(独)産業技術総合研究所セルエンジニアリング部門にて行われたものである。同研究室大竹久夫教授、橋本忠明氏（現：鐘淵化学工業(株)、大西真亮氏、林哲司氏、同部門三宅正人先生、吉川智啓博士（現：(株)サイトパスファインダー）の各先生方に御礼申し上げます。

引用文献

- 1) T.Oinonen, and, KO.Lindros : *Biochem J.*, **329**, pp.17-35(1998).
- 2) 山越憲一, 戸川達男著：生体用センサと計測装置, コロナ社, pp.58-103(2000).
- 3) 加藤隆一・鎌滝哲也編：薬物代謝学第二版, 東京化学同人(2000).
- 4) N.P.E. Vermeulen, : *Cytochromes P450 metabolic and toxicological aspects* (Ioannides C. (ed.)), CRC press, pp.29-53(1996).
- 5) G.R.Wilkinson, : *The pharmacological basis of therapeutics* (Hardman, J.G.; Limbird, L.E. (eds.)), McGraw-Hill, pp.3-30(2000).
- 6) 島田美樹, 山添康：遺伝子医学, **5**, pp.22-26(2001).
- 7) 田中千香子, 加藤隆一編：new薬理学改訂第3版, 南光堂(1996).
- 8) 吉田文武, 酒井清孝：化学工学と人工臓器第2版, 共立出版(1997).

- 9) 堀江透：創薬サイエンスのすすめ（堀江透，石川智久編）共立出版，pp.85-106(2002).
- 10) 小川浩太郎：薬物動態研究ガイド-創薬から臨床へ-（佐藤哲男他編），エル・アイ・シー，pp.121-140(2003).
- 11) 杉山雄一編：医薬品開発における薬物動態研究，じほう(1998).
- 12) 大政健史：日本生物工学会誌，83，pp.117-122(2005).
- 13) S.Enosawa et al： *Transplantation Proceedings*, 33, pp.1945-1947(2001).
- 14) S.Enosawa et al： *Cell transplantation*, 10, pp.429-433(2001).
- 15) HD.Humes et al： *Nat Biotechnol.*, 17, pp.451-455(1999)
- 16) M.Endo et al： *Journal of Artificial Organs.*, 4, pp.336-341(2001).
- 17) 大政健史，大竹久夫：特願2004-046675号(2004).
- 18) 大政健史他：第11回HAB研究機構学術年会，O-2，要旨集p.46(2004).
- 19) 大西真亮他：化学工学会第69年会，Q205，要旨集，p.719(2004).
- 20) T.Omasa et al：7th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 2005, ANI-O3 (APBIOChEC'05), Abstract, p.86(2005).
- 21) T.Yoshikawa et al： *J. Controlled Release*, 96, pp.227-232(2004).
- 22) K.Kato et al： *Biotechniques.*, 37, pp.444-448(2004).
- 23) 大政健史他：特願2002-81344号(2002).
- 24) T.Omasa et al： *Biotechnology Progress*, 21, pp.161-167(2005).
- 25) TH. Park, ML.Shuler, *Biotechnol Progress.*, 19, pp.243-253(2003).
- 26) R.Khamsi： *Nature*, 435, pp.12-13(2005).

マイクロリアクタテクノロジー

～限りない可能性と課題～

発行日 ————— 2005年7月13日 初版第一刷発行

発行者 ————— 吉田 隆

発行所 ————— 株式会社 エヌ・ティー・エス
〒113-8755 東京都文京区湯島2-16-16
TEL. 03 (3814) 9150 (編集企画部)
03 (3814) 9151 (営業部)
<http://www.nts-book.co.jp/>

企画・編集 ————— 有限会社 ブッカーズ

印刷・製本 ————— 三報社印刷 株式会社

©2005 吉田潤一, 北森武彦, 菊谷善国, 長谷部伸治, 富樫盛典, 三宅亮, 中嶋光敏, 岡本秀穂, 吉塚和治, 山口佳子, 前田英明, 小林重太, 森雄一朗, 小林修, 福山高英, 佐藤正明, 柳日馨, 菅誠治, 前一廣, 青木宣明, 中村浩之, 山本貴富喜, 藤井輝夫, 宮崎真佐也, 西迫貴志, 鳥居徹, 大島榮次, 芹生章典, 葉淑英, 宮村和宏, 馬渡和真, 古川影政, 河村義裕, 五十嵐哲, 北野延明, 松崎覚, 西籙和明, 和田芳弘, 小林功, 榛原均, 渡慶次学, 関実, 大政健史, 中西博昭, 下出浩治, 久保英明, 佐藤忠久, 草壁克己.

落丁・乱丁本はお取り替えいたします。無断複写・転写を禁じます。
定価はケースに表示してあります。

ISBN4-86043-090-5

予防医学 事典

松島綱治
酒井敏行
石川 昌
稻寺秀邦
……[編集]……

朝倉書店

182 細胞大量培養

細胞を治療の手段として用いる細胞療法や再生医療においては、治療に利用する細胞の大量培養法が近年重要な工学的問題となっている。大量培養の手段は、バイオ医薬品生産において工業的にさまざまな技術が確立され、現在、確立された手法が、ティッシュエンジニアリング関連のさまざまな細胞培養分野に応用されている。本項では、細胞大量培養に必要な原理と工学的手法について解説する。

1. 生体外細胞培養法の開発と培地の発展

細胞を生体外にて培養する技術は20世紀初めにHarrisonによって行われたオタマジヤクシの細胞培養実験にまでさかのぼることができる¹⁾。当時の培地は、生体から取り出した成分（血清など）を用いる培養法が主流であった。20世紀半ばになると、Eagleの開発したMEM (minimum essential medium)²⁾に代表されるように、血清のアミノ酸組成をもとにして、血清を補うために種々のアミノ酸、ビタミンを含む合成培地が開発され、生体外培養法はほぼ確立された。さらなる発展は、1980年代になってさかんに開発された無血清培地である。Sato

らは、血清のおもな役割を「成長因子」の供給にあると仮定し、血清のかわりにいくつかの細胞成長因子を用いた無血清培養法を確立した³⁾。現在さかんに用いられている細胞培養用無血清培地は、Satoの考え方にに基づき、糖、アミノ酸、ビタミンからなる基本培地に成長因子、ホルモン、分化増殖因子類などを添加して構築されている。

2. 大量細胞培養における培養方法

現在、最も大きなスケールで動物細胞大量培養を行っているのは、少品種多量生産が求められているバイオ医薬品生産プロセスの分野である。現在用いられている高度細胞培養技術も、このプロセス開発のために発展してきた。

現在、工業スケールでは、細胞濃度 1×10^6 個/ml以上のレベルで、5,000 lから最大10,000 l程度のスケールで細胞培養を行うプラントが存在する。このような大量培養法として用いられるのは、微生物と同様に、深部培養と呼ばれる溶液（培地）中に細胞を分散させた状態にて、通気攪拌により酸素を供給して培養する手法である。培養液中には細胞の炭素源（エネルギー源）となるグルコースは100 g/l以上のレベルにて溶解することが可能であるが、酸素は数mg/lのレベルでしか溶解しない。

一方、生体内代謝においてTCAサイクルを経て1モルのグルコースを完全酸化するには、6モルの酸素を必要とする。すなわち、深部培養における律速因子は、水に対する溶解度の低い酸素の供給である。動物細胞を深部培養にて培養する場合、通気により細胞がダメージを受けやすいため、小規

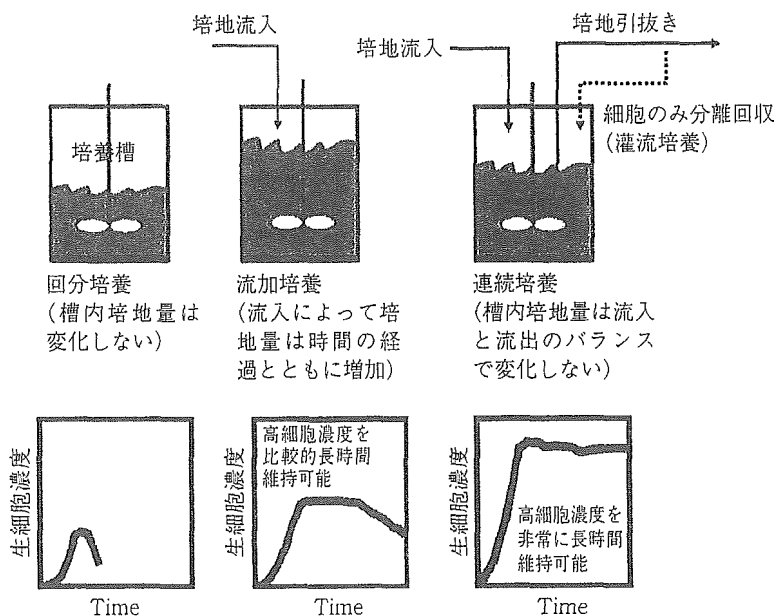


図 細胞培養における培養操作

模スケール（数リットル程度）では上面通気や酸素のみを選択的に通過させることのできる膜もしくはチューブを用いた通気法が用いられる。しかし、数百～1,000 lレベルの大規模攪拌培養においては、これらの通気法では酸素供給が不十分である。近年、通気時における細胞へのダメージに関するメカニズムの研究が進み、これらのダメージは、気泡が空気層に移動し、はじける過程で発生することが明らかにされた。特に、非イオン性ポリマー界面活性剤 Pluronic F68 がこれらのダメージを軽減するのに非常に有効であり、これを用いた直接通気培養が大規模攪拌培養の場合には用いられている。

細胞培養における培養操作は、最初に目的の培地を入れて培養を行う回分培養、培地を適宜流入させる流加培養、培地を流入させながら、同時に引き抜く連続培養の3種類に分類できる(図)。このうち、工業的な細胞大量培養に主として用いられているのは流加培養と連続培養法(特に細胞を維持したまま培地のみを引き抜く灌流培養法)である。回分培養の場合には、細胞の増殖とともに培地中の栄養源が減少し、乳酸、アンモニアなどの有害代謝産物が蓄積する。生体内ではこれら有害代謝産物はすみやかに除去されるが、回分培養法では、これら有害代謝産物の蓄積により細胞濃度がある一定値に達した後には死滅する。

流加培養法では、培地を流加することにより栄養源の供給、有害代謝産物の希釈を行い、培養時間(特に増殖期)を延長させ、高細胞濃度を達成することができる。一方、上記のような問題点を解決するためには、連続培養法(特に灌流培養法)も適している。連続培養法は、流加培養法と比較して高生産性が得られるため、より小規模の設備で、大量培養と同様の生産性を上げることが可能となる。また、生産された生産物が不安定な場合にも、生産物を直ちに回収できる連続培養が適している。

動物細胞は、その細胞自身の増殖の特性から器壁への接着を増殖に必要とする接着依存性の細胞と非接着性の細胞に大別できる。したがって、培養方法もこれら細胞の性質に基づいた方法が用いられている。具体的には、非接着性の細胞は溶液中での浮遊攪拌培養が可能であり、一方、接着依存性の細胞では、接着担体を必要とし、担体を用いた培養法が行われている。接着依存性の細胞を培養する際には、いかにすぐれたかつ安価な担体を用いるかが培養の鍵となる。

大量生産が可能な接着担体の例として、マイクロ

キャリアがあげられる。これは、数mm程度の小さなビーズをキャリアとして用い、ビーズの表面に細胞を接着させて増殖させることにより、見かけ上、接着性細胞を浮遊細胞のように取り扱って培養を行うことが可能となる。また、キャリアの濃度を上昇させることにより培地当りの細胞濃度を上昇させることも可能となる。近年では、通常の粒状のキャリアではなく、多孔質のマイクロキャリアを用いることにより接着面積を増大させ、培地中の細胞濃度をさらに上昇させることが可能になっている。マイクロキャリア以外では、不織布などの単位体積当りの接着面積が大きい担体がより有効である。さらに特殊な例として、少量生産システムを並列に並べることで大量生産を実現した、多数の数lスケールのローラーボトルを並列に利用し、全自動で細胞接種、培地交換を行うシステムがある。本手法は、組換えCHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞を用いたエリスロポエチン生産に用いられている。同様のシステムで、多数のT-フラスコを並列に並べて積み上げたシステムもある。

また、近年開発された、使い捨てプラスチックバッグを用い、これを振とうさせることにより細胞を最大500 lスケールまで培養するシステムもある。小規模から中規模スケールでは、ホロファイバー培養と呼ばれる栄養源を透過するが、細胞は透過しない中空糸を用いた培養法も利用されている。本方法は多数束ねた中空糸の表面に細胞を接着させ、血管を模した中空糸の内面から栄養源を供給する手法である。近年での細胞療法や再生医療の発展を受け、いわゆる多品種の細胞、もしくは、ほぼ同じ性質ではあるが、個々に異なる細胞を少量生産する多品種少量生産の手法も求められ、いくつか応用されている。

すなわち、個々の患者由来の個々に異なる多種類の少量の細胞をもとに、数mlから数百ml程度の少量スケールの生産システムを大量に並列にて操作することにより、多品種の細胞を同じ品質で少量生産する。多品種少量生産においては、より操作の簡便なかつ使い捨て可能で、しかも個々の品質を管理・制御できる全自動培養システムが必要である。また、個々の品種(患者)によって得られる細胞の増殖や各種培養パラメーターが変動すると考えられ、これについても厳密に制御するシステムが必要である。現在、画像解析などを用いることにより個別のプロセスに対して品質管理を行う手法が開発されつつあるが、工業的レベルでの個々のプロセスの管理・

制御・標準化は今後の課題として残されている。

参考文献

- 1) Harrison RG: Observations on the living developing nerve fiber. *Proc Soc Exp Biol Med* 4: 140-143, 1907.
- 2) Eagle H: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130: 432-437, 1959.
- 3) Hayashi I, Sato GH: Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature* 259: 132-134, 1976.

183 医用工学

1. 生体工学と医療・福祉工学の関係

医用工学分野における研究課題は多種多様である。図1は、医用工学分野の研究課題のうち、工学の方法論を適用して確立しうる課題を大きく「医療」と「福祉」およびそれらの「支援」の3つに大別し、さらにそれらを細かく分類して整理したものである。このような多くの研究課題を、学問分野として見なおすと図2に示すように4つの学問分野が関係している。

2. 検査・診断機器の現状と傾向

検査・診断機器は、

(1) センサを生体に接続して物理化学量を測る生体現象測定記録装置

(2) 長時間にわたって患者をモニターする医用監視装置

(3) 試料の分析を中心とする検体検査装置

(4) 体外から無侵襲で体内の状態を診断する医用画像検査装置

(5) 管腔器から体内を診断する内視鏡装置および医用テレビジョン

に分類される。

生体の内部構造を非破壊的に、あるいは無侵襲的に観測する手法を、その原理に基づいて以下のように二大別することができる。第1の方法は、外部から照射した特定の波長をもつが、組織を透過する際に微細構造によって吸収されるエネルギー量を測定し、その吸収量から微細構造を同定する。

この方法を原理とする測定手法には、① X線透視、② X線CT、③ マイクロ波CT、④ インピーダンスCT、⑤ 超音波イメージング、⑥ 光CT、⑦ 近赤外線酸素モニターがある。

一般に、これらの手法は、X線などの線源と検出器を直線上に対向させ、特定の波長のエネルギーをビーム状に放射し、物質内部を透過した後のエネルギー量を測定する。この測定を、対象の周囲で180°回転させながら行い、その取得データからコンピュータを用いて断層像を再編成する。このなか

生物工学ハンドブック

日本生物工学会 編

コロナ社

執筆者一覽 (五十音順)

- | | | | |
|---------|-----------------------------------|--------|--|
| 青柳 秀紀 | 〔筑波大学〕 I編7.3.5 | 大島 正弘 | 〔農業・生物系特定産業技術研究機構〕
II編5.2.1 |
| 秋田 修 | 〔酒類総合研究所〕 II編1.1.3〔1〕 | 大竹 久夫 | 〔大阪大学〕 II編4.3.2 |
| 朝日 知 | 〔武田薬品工業株式会社〕 II編3.1.5 | 太田 元規 | 〔東京工業大学〕 I編3.2.3〔3〕 |
| 跡見 晴幸 | 〔京都大学〕 II編4.5.3 | 大場 利治 | 〔タカラバイオ株式会社〕 I編4.3.3 |
| 阿部 貴志 | 〔国立遺伝学研究所〕
I編2.5.4〔4〕(d) | 大政 健史 | 〔大阪大学〕 I編1.4, 4.2.6 |
| 天野 仁 | 〔天野エンザイム株式会社〕
II編1.1.5〔2〕 | 大村 直也 | 〔電力中央研究所〕 II編4.4.2 |
| 荒巻 功 | 〔酒類総合研究所〕 II編1.1.2 | 岡田 光正 | 〔広島大学〕 II編4.3.4 |
| 飯島 信司 | 〔名古屋大学〕 I編編2.5.4〔4〕(a) | 尾形 智夫 | 〔アサヒビール株式会社〕 II編1.3.2 |
| 五十嵐 泰夫 | 〔東京大学〕 II編4 | 岡本 晋 | 〔食品総合研究所〕 I編6.1.4 |
| 池道 彦 | 〔大阪大学〕 I編2.5.4〔3〕(b) | 岡本 正宏 | 〔九州大学〕 I編5.6 |
| 池村 淑道 | 〔総合研究大学院大学〕
I編2.5.4〔4〕(d) | 奥村 一 | 〔株式会社ミツカングループ本社〕
I編2.1.1〔6〕 |
| 石井 哲 | 〔雪印乳業株式会社〕 II編2.13 | 小原 仁実 | 〔トヨタ自動車株式会社〕
I編1.1.4 |
| 石崎 文彬 | 〔新世紀発酵研究所〕
I編1.1.1, 1.1.2 | 蔭山 文次 | 〔千里ライフサイエンス振興財団〕
II編5.1.5 |
| 磯貝 泰弘 | 〔理化学研究所〕 I編3.2.3〔3〕 | 梶山 直樹 | 〔キッコーマン株式会社〕
I編3.3〔4〕 |
| 磯部 公安 | 〔岩手大学〕 II編2.9 | 柏木 豊 | 〔食品総合研究所〕 II編1.5 |
| 五十部 誠一郎 | 〔食品総合研究所〕 I編9.6 | 片倉 啓雄 | 〔大阪大学〕 II編5.4 |
| 井上 弘一 | 〔埼玉大学〕 I編2.5.4〔2〕(c) | 加藤 晃 | 〔奈良先端科学技術大学院大学〕
I編4.3.5 |
| 今中 忠行 | 〔京都大学〕 II編4.5.3 | 加藤 滋雄 | 〔神戸大学〕
I編4.3.9, 8, 8.1~8.2.1, 8.2.3 |
| 岩崎 雄吾 | 〔名古屋大学〕 I編3.2.1〔1〕 | 加藤 純一 | 〔広島大学〕 I編2.2.1, 2.2.2 |
| 上園 幸史 | 〔東京大学〕 I編2.5.4〔5〕(a) | 加藤 博章 | 〔京都大学〕 I編4.1.5 |
| 上田 宏 | 〔東京大学〕 I編3.3〔5〕,〔6〕 | 門多 真理子 | 〔武蔵野大学〕 I編2.1.1〔5〕 |
| 上野 嘉之 | 〔鹿島技術研究所〕 II編4.1.4 | 金谷 重彦 | 〔奈良先端科学技術大学院大学〕
I編2.5.4〔4〕(d) |
| 上原 秀章 | 〔ヤエガキ醗酵技研株式会社〕
II編2.8.1, 2.8.2 | 金子 嘉信 | 〔大阪大学〕
I編2.1.2〔1〕, 4.3.7〔3〕 |
| 植本 弘明 | 〔電力中央研究所〕 II編4.1.6 | 神谷 典穂 | 〔九州大学〕
I編3.2.2〔6〕,〔7〕 |
| 宇佐美 昭次 | 〔元早稲田大学〕 II編2.1 | 川口 秀夫 | 〔地球環境産業技術研究機構〕
II編4.2.2 |
| 牛木 辰男 | 〔新潟大学〕 I編4.4.1 | 川崎 寿 | 〔東京電機大学〕 I編6.1.3 |
| 内山 進 | 〔大阪大学〕 I編4.1.2 | 川崎 浩子 | 〔大阪大学〕 I編1.2.1, 1.2.2 |
| 遠藤 銀朗 | 〔東北学院大学〕 II編4.3.5 | | |
| 近江戸 伸子 | 〔神戸大学〕 I編4.2.2 | | |
| 大嶋 寛 | 〔大阪市立大学〕
I編8.3.1, 8.6.1, 8.6.2 | | |

引用・参考文献

- 1) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T.: Efficient transformation of rice, (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA, *Plant J.*, **6**, 271-282 (1994).
- 2) 伊藤紀美子: 細胞工学別冊 モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ編, (島本 功, 岡田清孝監修), pp. 82-88, 秀潤社 (2001).
- 3) 島田多喜子: 細胞工学別冊 モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ編, (島本 功, 岡田清孝監修), pp. 89-92, 秀潤社 (2001).
- 4) Heifetz, P. B.: Genetic engineering of the chloroplast, *Biochimie*, **82**, 655-666 (2000).
- 5) Daniell, H., Khan, M. S. and Allison, L.: Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology, *Trends Plant Sci.*, **7**, 84-91 (2002).
- 6) Koziel, M. G., Carozzi, N. B. and Desai, N.: Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events, *Plant Mol. Biol.*, **32**, 393-405 (1996).
- 7) Mengiste, T. and Paszkowski, J.: Prospects for the precise engineering of plant genomes by homologous recombination, *Biol. Chem.*, **380**, 749-758 (1999).
- 8) Ebinuma, H., Sugita, K., Matsunaga, E. and Yamakado, M.: Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2117-2121 (1997).
- 9) Endo, S., Sugita, K., Sakai, M., Tanaka, H. and Ebinuma, H.: Single-step transformation for generating marker-free transgenic rice using the *ipt*-type MAT vector system, *Plant J.*, **30**, 115-122 (2002).
- 10) Joersbo, M.: Advances in the selection of transgenic plants using nonantibiotic marker genes, *Physiol. Plant*, **111**, 269-272 (2001).
- 11) Cheng, Z., Lu, B. R., Baldwin, B. S., Sameshima, K. and Chen, J.: Comparative studies of genetic diversity in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) varieties based on analysis of agronomic and RAPD data, *Hereditas*, **136**, 231-239 (2002).
- 12) Rafalski, A.: Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**, 94-100 (2002).
- 13) 武田和義, 小原雄治, 小原英雄: オオムギ遺伝子の一塩基多型 (SNP) 大量検出に成功, 科学技術振興事業団報, 第209号 [http://ume.tokyo.jst.go.jp/pr/report/report209/] (2004年12月現在)
- 14) Holtorf, H., Guitton, M. C. and Reski, R.: Plant functional genomics, *Naturwissenschaften*, **89**, 235-249 (2002).
- 15) The Arabidopsis Genome Initiative: Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature*, **408**, 796-815 (2000).
- 16) Yu, J., et al.: A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*), *Science*, **296**, 79-92 (2002).
- 17) Goff, S. A., et al.: A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*), *Science*, **296**, 92-100 (2002).
- 18) Yuan, Q., Ouyang, S., Liu, J., Suh, B., Cheung, F., Sultana, R., Lee, D., Quackenbush, J. and Buell, C. R.: The TIGR rice genome annotation resource: annotating the rice genome and creating resources for plant biologists, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 229-233 (2003).
- 19) Maloof, J. N.: QTL for plant growth and morphology, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**, 85-90 (2003).
- 20) Schaefer, D. G.: A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**, 477-501 (2002).
- 21) Terada, R., Urawa, H., Inagaki, Y., Tsugane, K. and Iida, S.: Efficient gene targeting by homologous recombination in rice, *Nature Biotechnol.*, **20**, 1030-1034 (2002).
- 22) 常脇恒一郎編: 植物遺伝学実験法 (遺伝学実験講座4), 共立出版 (1982).
- 23) 平井 泰, 酒井 昭: ビーズガラス化法により超低温保存した植物の生育, 北海道立農試集報, **80**, 55-64 (2001).
- 24) 柿本辰男: 細胞工学別冊モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ編, (島本 功, 岡田清孝監修), pp. 135-142, 秀潤社 (2001).
- 25) 長峰 司, 白田和人, 國廣泰史: 細胞工学別冊 モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ編, (島本 功, 岡田清孝監修), pp. 234-239, 秀潤社 (2001).
- 26) 中村保一, 田畑哲之: 細胞工学別冊 モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ編, (島本 功, 岡田清孝監修), pp. 244-248, 秀潤社 (2001).

1.4 動物資源

1.4.1 宿主としての動物資源

生物工学の究極の目標は人類への貢献と位置づけてよいだろう。その際には資源としてのヒトを含む動物、そして動物由来の細胞を用いた研究・応用が欠かせない。宿主としての動物資源は動物個体そのものを利用する場合と、動物個体、組織、器官から得られた細胞