

セルプロセッシング工学へのダボハゼ的展開



研究室紹介

高木 睦*

"Dabohaze"-like expansion to cell processing engineering

Key Words : Mammalian cell culture, noninvasive discrimination, microscope, phase shift, fermentation

はじめに

大阪大学工学研究科の田口研（田口久治教授、吉田敏臣助教授）で醗酵工学を学んだあと、その当時、儲かりそうならどんな事業にも進出する「ダボハゼ経営」で有名な宮崎輝が社長だった旭化成工業に入社した。入社して2年間は微生物培養プロセスの研究に従事していたが、『脳梗塞と心筋梗塞を対象疾患とし大型新薬化が期待される血栓溶解剤（tissue plasminogen activator; t-PA）の開発を始めるので、とりえず動物細胞培養のパイロットを作れ』と命じられた。「技術があるから」ではなく「儲かりそうだから」で、しかも動物細胞を見たこともなかった新米への指示である。これぞダボハゼではないか。無事に工場稼働、薬価収載まで見届けさせてもらい、大阪大学生物工学国際交流センター吉田研（吉田敏臣教授）での10年を経て、北大の現在の研究室に落ち着いて12年になる。この22年の間、今度は私なりに、動物細胞の培養工学（セルプロセッシング工学と呼んでいる）の分野でダボハゼ的展開を実践してきた。ただし、「儲かりそうだから」ではなく「役に立ちそうだから」ではあるが。

セルプロセッシング工学とは

アミノ酸、抗生物質など微生物由来の有用物質の工業生産を目的として、培地設計、通気攪拌培養槽

設計、培養プロセスの数式モデル化と計測制御などプロセス工学的研究が1960年代から盛んに行われその成果は『培養工学』として集大成された。¹⁾ また、1980年代になり上述のtPAのほかインターフェロン、インターロイキン、抗体など動物細胞由来のタンパク質医薬品の有用性が認められ、これらの工業生産を目的とし、マイクロキャリア培養、中空糸膜培養器、ラジアルフロー型リアクター、細胞に損傷を与えない新規な通気・攪拌方法、培地交換のための細胞分離技術など動物細胞大量培養技術が、私たちも含めて世界中で盛んに研究され、『動物細胞培養工学』が形成された。²⁾ その技術は1990年代に入りハイブリッド型人工臓器の開発にも応用された。

一方、1990年代後半から、種々の幹細胞とその分化・増殖の制御に関わる多くの基礎的知見が種々急速に報告され、それらに基づく再生医療の実現が社会的にも要請されてきた。しかし、再生医療にかかわる細胞培養のプロセスは、従来のタンパク質が目的生産物である『動物細胞培養工学』とは異なり細胞そのものが生産物であり、細胞の分化や三次元化などによる細胞加工すなわち“セルプロセッシング”に重点がある。すなわち再生医療の実現にはこれら基礎的知見以外に、セルプロセッシングを安価に、安定に、安全に、大量に実行するための工学（『セルプロセッシング工学』）が不可欠と考えた。そこで、従来の『培養工学』と対比して『セルプロセッシング工学』の課題を私たちは抽出した。^{3,4)} (図1) 当研究室は、これまでこれらの項目の大部分に“ダボハゼ的”に取り組んできたが、本稿ではこれらのうち「非侵襲的細胞品質評価」を紹介する。

非侵襲的細胞品質評価の必要性

再生医療においては、製品である細胞の移植前の



* Mutsumi TAKAGI

1956年11月生

大阪大学 大学院博士前期課程 工学研究科 醗酵工学専攻修了 (1981年)

現在、北海道大学 大学院工学研究院

応用化学部門 生物工学講座 細胞培養

工学研究室 教授 博士(工学) 1994 大

阪大学 動物細胞培養工学

TEL : 011-706-6567

FAX : 011-706-6567

E-mail : takagi-m@eng.hokudai.ac.jp

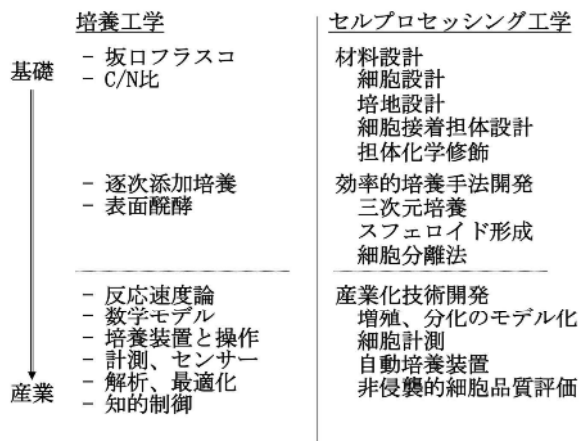


図1 セルプロセッシング工学の諸課題

時点での品質評価技術が不可欠である。しかも、移植に供しようとする細胞や組織が培養器に入ったままで、かつ移植成績に影響を与えない非侵襲的な方法で短時間に品質評価する必要がある。細胞や組織の品質の中でも、移植に際して特に重要なのは細胞の分化度、増殖活性、ガン化の有無、未分化iPS細胞の残存有無などと考えられる。ヒトを対象とした臨床研究以前の基礎研究段階では、染色後の顕微鏡下での計数、フローサイトメトリーや免疫不全動物への移植実験により評価される。しかし、細胞染色を伴う評価法は侵襲的である。また実験動物へ細胞を移植して新たな組織形成や細胞の生着を調べる方法は、細胞に対して破壊的な測定であるだけでなく、診断結果を得るまでに移植後数週間から数ヶ月を要する。このように従来の品質評価方法は侵襲的、破壊的で長時間を要するため、移植用細胞や組織の品質評価には適用しにくい。したがって、細胞および組織の非侵襲的品質評価技術が新たに必要となる。

本研究室ではこれらのうち、培養上清の分析による分化度の推定、細胞形態解析による分化度の推定、および位相シフトレーザー顕微鏡の利用による細胞周期や増殖活性の推定、ガン化細胞の有無の診断、未分化iPS細胞の残存有無の診断などを研究し、報告してきた。本稿では、「位相シフトレーザー顕微鏡の利用によるガン化細胞の有無の診断」について紹介する。

位相シフトレーザー顕微鏡による細胞透過光の位相差定量

プラスチック容器の底面に接着培養中の動物細胞

の立体形状(厚み)を非侵襲的に測定できる方法はなかった。位相シフトレーザー顕微鏡(Phase Shift Laser Microscope, PLM、エフケー光学研究所)⁵⁾では、光軸の片側に置いた観察対象物(細胞)を透過するレーザー光と光軸の反対側の観察対象物(細胞)のない部分(媒質、培養液)を透過したレーザー光との間で生じる干渉縞画像を8枚取得し、対象物(細胞)の厚みと屈折率に起因する位相差を視野内の1画素毎に定量できる。すなわち、対象物(細胞)の厚みを d 、対象物(細胞)の屈折率を n_c 、媒質(培養液)の屈折率を n_0 とすると、位相差 $\Delta\Phi$ は次式で表される。ただし、 λ はレーザー光の波長である。

$$\Delta\Phi = (2\pi/\lambda) \times (n_c - n_0) \times d$$

この位相差 $\Delta\Phi$ から d を求め視野内の1画素ごとにプロットすると、細胞の立体形状が得られる。屈折率は異なるが生理的浸透圧を有する2種類の液でそれぞれ培養液を置換し、それぞれ位相差測定を行うことにより、細胞の屈折率と高さ(厚み)をそれぞれ求めることも可能である。⁶⁾

ガン細胞と正常細胞との位相差分析による非侵襲的高精度識別

正常ヒト前立腺上皮細胞(PREC)およびヒト前立腺ガン細胞株(PC-3)、ヒト正常凍結肝細胞(HCH)および肝ガン細胞株(Hep3B、HLF)、ヒト骨髄間葉系幹細胞(MSC)およびヒト骨肉腫細胞(HuO-3N1)を35 ϕ ディッシュにて接着培養後、PLM(測定波長532 nm、エフケー光学研究所)により細胞内全個所の位相差を定量した。

正常細胞およびガン細胞の細胞内位相差分布の鳥瞰図は、それぞれ台地状、三角錐状だった。(図2)すなわち、1細胞内で最大位相差を与える点を含む細胞接着面上の直線における位相差プロファイルを細胞内最大位相差と接着面長さで正規化してから調べたところ、ガン細胞、正常細胞各々が三角形様、台形様だった。ガン細胞、正常細胞各々について上記直線上での典型的な位相差プロファイルを測定データをもとにして設定し、未知細胞の細胞内位相差プロファイルがこれらのいずれに近いかを示すパラメーター(Cancer Index)を計算した。その結果、上皮様細胞、線維芽様細胞(長軸方向)ともに、ガ

位相差($\Delta\phi$)の細胞内分布 (前立腺上皮細胞)

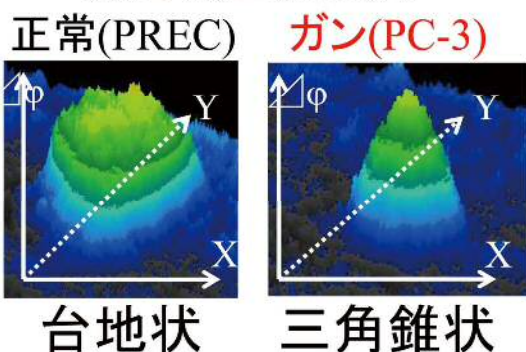


図2 位相差の細胞内分布測定による
ガン細胞の高精度識別

ン細胞、正常細胞 (各 $n = 10$) は各々すべてが正および負の値となった。⁷⁾ すなわち、接着培養されているガン細胞と正常細胞とを、位相差解析により非侵襲的に高精度で識別できる可能性が示された。

おわりに

医薬品の売り上げトップ10品目のうち約半数が動物細胞培養により生産されている。再生医療にお

いても、改正薬事法などにみられるように法規制も現状に即して進化しつつある。さらに、患者自身の細胞を用いて治療する自家システム (多品種少量生産) だけでなく、同一ロットの細胞を多くの患者の治療に供する他家 (同種) システム (大量生産) の開発も始まっている。このように、動物細胞培養工学、セルプロセッシング工学のニーズは変化し続けて行く。我々はこれに対して今後もダボハゼ的に取り組んで行きたいと考えている。

参考文献

- (1) 吉田敏臣：培養工学、コロナ社 (1998).
- (2) 高木 睦：生物工学会誌、80、70-77 (2002).
- (3) 高木 睦：再生医療、2(4)、17-22 (2003).
- (4) 高木 睦：セルプロセッシング工学、コロナ社 (2007).
- (5) J. Endo *et al.*, Appl Opt, 41(7), 1308 (2002).
- (6) M. Takagi *et al.*, J Biomed Opt, 12(5), 54010-1-5 (2007).
- (7) M. Takagi *et al.*, Cytotechnology, 67(4), 733-739 (2015).

