

第1章 3次元培養技術

1 3次元培養技術の概要

細胞は常に細胞外マトリックス（ECM）と相互作用しており、ECMは細胞遊走やアポトーシス、転写の制御、受容体の発現といった複雑な生物学的機能をコントロールしている。当初、細胞は組織培養用プラスチック容器、あるいはECMに接着した状態で平面上（2次元）に培養されていたが、2次元細胞では細胞とECMの間の複雑なシグナルのやり取りを再現できないため、*in vitro*での実験結果を臨床試験に反映することは不可能であった。一方、3次元環境で培養された幹細胞は、著しく高い分化能を示すことが確認されており、加えて薬物の安全性試験や効能試験を比較的容易に実施できる。3次元培養は、平面に加えて高さ方向（厚み）でも細胞を増殖させる立体的な培養方法である。細胞の接着および増殖を支え、立体的3次元構造を維持するための担体（スキャフォールド：足場）がつくり出す培養環境は生体内の状態に近く、得られた結果も生体内の反応との相関性が高い。そのため3次元培養細胞は、2次元培養細胞に比べ*in vivo*環境に近い状態で細胞を培養できることから、創薬や医療など様々な分野で注目されており、動物実験の代替法としても期待されている。

3次元細胞培養のスキャフォールドは様々な材質・構造の足場の開発が進められており、多孔性軟質ゲルや生体親和性の高い微小孔材料を用いて細胞塊をつくる試みなどが行われ、より生体内の性状に近い細胞が得られている。また、微小重力など培養の環境を制御することで均一性の高い品質の細胞塊をつくる試みも行われており、培養に必須といわれていたタンパク質を用いることなくES細胞（胚性幹細胞）の分化を抑制したとの報告もされている。

そのほかにも、スフェロイド形成に有利な微細構造を有する無機物を用いた足場の開発も進められるなど、3次元培養法は再生医学研究を進める上で、最も注目されている培養方法の1つとなっている。

3次元培養を行う際には、細胞をコンタミネーション（汚染）から防ぐためにクリーンな環境が必要となる。そのためには、室内に浮遊している微生物の管理が重要である。また、空調からの風が直接培養機器に当たらないように設置したり、作業者の移動が少なくて済む動線を考慮することも求められる。

3次元培養ではCO₂インキュベーター、低速遠心機、蒸留装置、試薬保冷库などの培養関連機器が必要になり、培養装置は培養方法により回転培養装置、スターラー、シェーカーホロファイバー、バッグ培養など様々な機器が用いられている。また、培養細胞を保存する容器（機器）や器具は、長期間の保存、特にセルバンクとして細胞の品質管理が必要となる場合には、液体窒素容器が必要となる。一方、一時的な保存の場合は、-80℃の超低温槽でも保存できる。保存容器

には温度だけでなく、クライオチューブの出し入れ時の温度上昇を抑える工夫がなされた器具や、液体窒素がチューブ内へ入らないように考えられた外装フィルムや溶着容器なども上市されている。

そのほか細胞培養においては、生物顕微鏡、倒立顕微鏡、位相差顕微鏡、蛍光顕微鏡などの細胞観察機器、オートクレーブ、乾熱滅菌器、濾過滅菌などの器具滅菌機器、その他ピペット、培養容器、遠心機、保存容器、滅菌フィルターなどの培養器具も必要となる。この中で顕微鏡は、複数人数での観察に適したモニター付きのタイプの顕微鏡や、培養細胞をCO₂インキュベーターから取り出さずに継続的に自動で観察（撮影）できる装置も上市されており、リアルタイム観察・記録・解析が可能となっている。

2 細胞の自己組織化

自己組織化は、自己組織化材料を使用して組織や臓器の再生を促し、組織が自然に形成されるように誘導する方法である。細胞の自己組織化とは、細胞が外部からの明示的な指示なしに、自発的に複雑な構造やパターンを形成する現象のことである。生命の基本的なプロセスの1つとして、胚発生や組織再生、創傷治癒など様々な生物学的プロセスで重要な役割を果たしている。例えば、胚発生の過程では、単一の受精卵が分裂を繰り返して多細胞の胚となり、最終的には複雑な組織や臓器を持つ個体へと成長する。この過程で細胞は互いにシグナルを送り合い、位置情報や化学信号に基づいて適切な形態を形成する。細胞の自己組織化のメカニズムは、細胞の形態や機能を決定するだけでなく、再生医療やバイオエンジニアリングの分野においても応用されており、人工的に組織や臓器を作製する技術が開発されている。

細胞の自己組織化のメカニズムは、人工的に組織や臓器を作製するだけでなく、人工的に作成された組織を利用して、新薬の効果や副作用を検証する研究開発にも使われており、動物実験の削減や、より人間に近い反応を得ることが期待されている。また、自己組織化の原理を応用して、傷の治癒を促進する材料やデバイスの開発が進められている。自己組織化するヒドロゲルを利用して、傷口に適応しやすく、治癒を促進する治療法が研究されている。

一方、自己組織化を利用した疾患のモデルを作成し、病気の進行や治療法の開発に役立てる研究も進んでいる。アルツハイマー病の研究では、自己組織化によって脳組織のモデルを作成し、病気のメカニズムを詳しく調べることができる。また、自己組織化を利用したバイオセンサーの開発も進んでおり、より正確かつ高感度な検出を行うことで、病気の早期発見や環境モニタリングに役立てられている。

3 自己組織化の代表的な技術

3.1 細胞シーディング法 (Cell Seeding)

細胞シーディング法は、自己組織化法の1つであり、特定の場所に細胞を配置し、適切な条件下でそれらが自然に組織や機能的な構造を形成するのを促進する。この方法は、組織工学や再生医療の分野で広く使用されており、人工臓器や組織の作製に役立っている。この技術の利点は、細胞が自ら適切な位置に移動して相互作用することで、自然な組織構造が再現されやすくなることである。これにより、効果的な治療法の開発が期待されている。

3.2 マイクロパターニング (Micropatterning)

マイクロパターニングは、微細なパターンを作成し、そのパターンに従って細胞を配置することで、細胞が自己組織化して組織や構造を形成するのを支援する技術である。例えば、微細な溝や凹凸を表面に作成し、その上に細胞を播種することで細胞が自然に配置され、特定の組織構造を形成する。組織工学や再生医療の分野で広く活用されている技術で、特に複雑な組織や臓器の作製において重要な役割を果たしている。また、細胞の挙動や相互作用を研究するためのプラットフォームとしても利用されている。

3.3 ハイドロゲルスキャフォールド (Hydrogel Scaffold)

ハイドロゲルは、水を内部に含む物質の総称で、あらゆる液体に不溶な3次元構造を持つ高分子物質およびその膨潤体（ゲル）であり、液体が水の場合をハイドロゲルという。具体的には、コンニャク、寒天、ゼリーのようなもので、水溶性の多糖類（糖が結合してできた水溶性の高分子物質）や、ゼラチンなどのタンパク質が異なる分子の間で架橋されて3次元構造を持ち、水不溶化したものである。水溶性の高分子の高分子鎖が架橋され3次元網目構造をとると、水に溶けることができず、その網目構造の内部に多くの水を含んだ膨潤体となる。

ハイドロゲルスキャフォールドは、生体適合性材料で構成された3次元構造を持つスキャフォールドである。細胞はこのスキャフォールドに入り込み、自己組織化して組織を形成する。ハイドロゲルも組織工学や再生医療で広く使用されている。

3.4 オルガノイド培養 (Organoid Culture)

オルガノイドは、幹細胞やプロジェニター細胞が3D環境で自己組織化して形成する、ミニチュア臓器である。脳、腸、肝臓などの臓器モデルが作成されており、疾患研究や薬剤スクリーニングに利用されている。

近年、ヒトの臓器や器官の3次元構造を模倣したオルガノイドの研究が盛んに行われている。ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞が樹立され、これらを種々の細胞系譜に分化させる手法が確立されて以降、オルガノイド研究は世界的に急速な発展を遂げており、ヒトの腸管、肝臓、