

ビトリゲルの開発とその再生医療，創薬，動物実験代替法，化粧品および食品の分野での実用化構想

竹澤 俊明

筆者は細胞の足場（生体内：細胞外マトリックス，生体外：培養担体）に着眼した研究を一貫して行い，生体内細胞環境の再現に有用な3次元培養モデルを構築する6つの基盤技術【① ヘテロスフェロイドの培養技術，② 培養液の通液培養技術，③ 器官工学の培養技術，④ 切片利用の培養技術，⑤ ビトリゲル利用の培養技術，⑥ シルク利用の培養技術】を独自の発想で開発してきた¹⁾。ビトリゲル利用の培養技術の開発は，今から20年ほど前に参加した若手研究者の会で「ゆで卵の自身のガラス化（vitrification）技術：乾燥により自由水のみならず結合水も徐々に除去することで，強度と透明性に優れたガラス様の物性に変換する技術²⁾」を聴講し感銘を受けたことに端を発する。当時，コラーゲンを利用した3次元培養を行っていたので，ワクワクしながら，このガラス化技術を従来の柔らかく取扱い難いコラーゲンゲルに応用して再水和した。その結果，丈夫で取扱い易いコラーゲンハイドロゲル薄膜（後に「コラーゲンビトリゲル薄膜」と命名）に変換することに成功した³⁾。本稿では，このような経緯で始まったビトリゲルの研究開発とその実用化に向けた展開について概説する。

ビトリゲルとは

コラーゲン以外の成分のゲルでもハイドロゲルであれば，ガラス化した後に再水和することで，ゲルを安定した新しい物性状態に変換できた。そこで，このガラス化工程を経て作製した新しい物性状態のゲルに対する新しい学術用語をビトリゲル（vitrigel）と定義した⁴⁾。

第1世代コラーゲンビトリゲルの開発

当初開発した支持体付のコラーゲンビトリゲルは，あらかじめ環状ナイロン膜を挿入した直径35 mmの培養皿内に，0.5%酸可溶性ウシ由来I型ネィティブコラーゲンとウシ血清含有の細胞培養液を等量混合した0.25%コラーゲンゾルを2 ml注入して37°Cでゲル化した後，低温で乾燥して十分にガラス化し，さらに再水和することで作製できる厚さ15–20ミクロンの透明な薄膜であり，そのコラーゲン線維の密度は25–33%に達する。この支持体付コラーゲンビトリゲル薄膜は，当時，共同研

究していた旭テクノグラス株式会社が製品化した。生体内の結合組織に匹敵する高密度のコラーゲン線維で形成されるコラーゲンビトリゲル薄膜は，透明性のみならず強度や高分子タンパク質の透過性にも優れており，また，両面に異種細胞を培養してパラクライン相互作用を誘発できる3次元培養担体，あるいはサイトカインを徐放する担体としても活用できる（図1）⁴⁻⁶⁾。このような背景から，支持体付コラーゲンビトリゲル薄膜を利用した再生医療，創薬あるいは動物実験代替法の分野での基礎研究が発展した^{7,8)}。しかし，実用化を指向した応用研究の視点からは，まず以下の2つの課題を克服する必要があった。第一はコラーゲンビトリゲル薄膜が薄すぎることにより起因しており，具体的には支持体がないと捻れて絡まり，さらに，移植時には支持体の部分でしか良好に縫合できなかったことから，より取扱い性に優れたコラーゲンビトリゲル厚膜を開発する必要があった。第二はコラーゲンビトリゲル薄膜の表側と裏側を完全に隔離して使用することが困難であることに起因しており，生体膜を装着するような二相性容器を使用しないと表面に注いだ細胞懸濁液などの液体が裏面にまわる可能性があったため，コラーゲンビトリゲル膜を貼り付けたチャンバーを開発する必要があった。

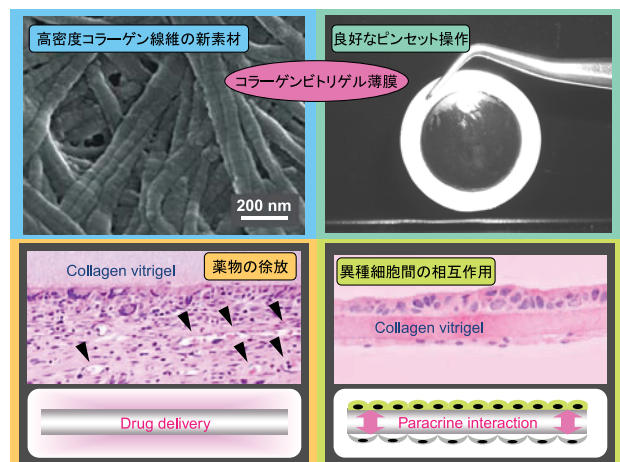


図1. 第1世代コラーゲンビトリゲル薄膜の特徴

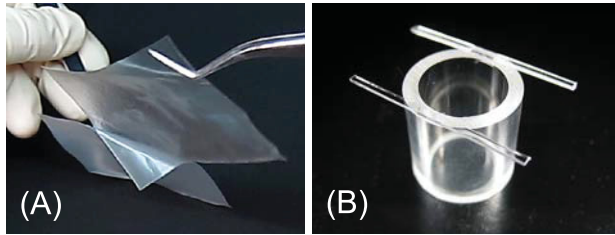


図2. 第2世代コラーゲンビトリゲル膜の使用例。(A)パラフィルムより脱着して取扱えるコラーゲンビトリゲル膜の乾燥体、(B) コラーゲンビトリゲル膜チャンバー。

第2世代コラーゲンビトリゲルの開発

上述の課題を克服するために、第1世代のコラーゲンビトリゲル薄膜の作製工程で多大な時間を要していたガラス化工程におけるコラーゲンゲル内自由水の除去方法を、使用する容器の構造と材質を変更することで改良した。その結果、厚さ数十ミクロンから1ミリ程度までのコラーゲンビトリゲル膜を短期間で作製することに成功した。同時に、厚さにかかわらず切断加工などの取扱い性に優れたコラーゲンビトリゲル膜の乾燥体を容易に脱着できるパラフィルムなどに吸着した状態で効率的に量産する技術も開発した(図2A)。コラーゲンビトリゲル膜は、厚さが約百ミクロンで支持体がなくても捻れ絡まることがなくなり、数百ミクロンに達すると捻れることもなく、それ自体を「無細胞性結合組織プレート」として取扱うことが可能となり、そのようなコラーゲンビトリゲル厚膜の乾燥体は皮膚欠損部に直接縫合して移植できた。また、コラーゲンビトリゲル膜の乾燥体は薄膜でも厚膜でもプラスチック円筒の片側に糊で良好に貼り付けできるので、チャンバーとして使用できた(図2B)⁹⁾。

アグリ・ヘルス実用化研究促進プロジェクト

上述の第2世代コラーゲンビトリゲルについては、2011年度に採択された農林水産省アグリ・ヘルス実用化研究促進プロジェクトの研究課題「牛等の動物由来の原料を用いた医療用新素材の開発(略称:ビトリゲル)」において、2012年度は、農業生物資源研究所を中核機関として全9共同研究機関【小野薬品工業株式会社, 株式会社エコ&ヘルスラボ, 株式会社ダイセル, 関東化学株式会社, 国立医薬品食品衛生研究所, 佐賀大学医学部, 東京大学医学部, 福島県立医科大学医学部, および祐徳薬品工業株式会社(五十音順)】とコンソーシアムを結成して研究を展開している。具体的には、再生医療に有用な「アテロコラーゲンビトリゲル膜」の開発と、創薬や動物実験代替法の研究に有用な「コラーゲンビトリゲル

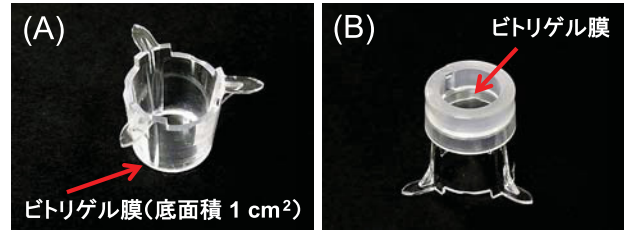


図3. 製品化予定のコラーゲンビトリゲル膜チャンバー。(A) 1室型チャンバー、(B) 2室型チャンバー。

膜チャンバー」の開発に取り組むとともに、前者の治験へ向けた承認申請を目標とした再生医療技術の開発では、人工皮膚、人工角膜および人工気管の開発、また後者のプレバリデーションの実施を目標とした動物実験代替システムの開発では、皮膚感作性試験法および眼刺激性試験法の開発を推進している¹⁰⁾。2014年度までには、生化学・分子生物学的なバイオアッセイのみならず経上皮電気抵抗の測定や凍結切片の免疫染色も容易に行える「コラーゲンビトリゲル膜チャンバー」で、特に細胞培養時の操作性に優れた1室型チャンバーと両面培養用の2室型チャンバーを関東化学株式会社が製品化する予定である(図3)。

再生医療の分野での実用化に向けた研究

従来のコラーゲンビトリゲル膜は原料にウシ由来ネイティブコラーゲンとウシ血清含有の培養液を使用していたので、コラーゲン素材を抗原性の少ないアテロコラーゲンに変更するとともに、ハードルの高い反芻動物基準を考慮しなくてもよい原料に変更する必要があった。そこで、ブタ由来アテロコラーゲンとウシ血清を含まない溶媒より、従来のウシ由来ネイティブコラーゲンビトリゲル膜と同等の強度や透明性を有するブタ由来アテロコラーゲンビトリゲル膜を作製する方法を開発した。

創薬および動物実験代替法の分野での実用化に向けた研究

ヒトにおける化学物質のADMET(吸収・分布・代謝・排泄・毒性)は、動物実験の結果からは必ずしも外挿できない。これは、同じ化学物質に対してであっても、ヒトの細胞と動物の細胞では、その応答性に種差が生じることがあるためである。それにも関わらず創薬をはじめ化学物質に関連した製品の開発研究では、動物実験が行われ続けるのは何故だろうか? 科学的な理由と行政的な理由があると考えられる。科学的な視点では、ヒトに対する化学物質の影響を予測する「ヒト細胞を用いたADMET評価システム」は、化学物質の全身に対する作



用はもとより特定の器官に対する作用であっても十分に評価できるレベルまで開発されてきた培養技術が少ないことに起因している。このような科学的な背景もあり、本邦では薬事法の規定に基づいて、医薬品や医療機器の安全性に関する非臨床試験を実施する基準に関して厚生労働省の省令があると考えられる。一方、欧州では、動物実験を行って開発した化粧品の販売は輸入品も含めて2009年より原則禁止されている。この背景としては、ヒト細胞より作製できる培養皮膚モデルを用いた腐食性試験法など培養細胞を利用した *in vitro* 試験法の開発が著しく進展してOECDガイドラインとして2004年より登録され始めたことがある。つまり、まだまだ限られた試験法ではあるが、動物実験を代替できる *in vitro* 試験法として細胞培養技術が活用される時代に突入しているといえる。動物実験代替の目的は、科学研究や教育、化粧品・医薬品や工業製品の生産などに用いる動物実験について、「動物の苦痛の軽減 (Refinement)」および「使用動物数の削減 (Reduction)」のみならず「代替法による置き換え (Replacement)」も含めた3Rを目指すことである。以上の背景から、ヒト細胞を用いて生体内の細胞応答を反映できる培養技術の開発、あるいは従来法に比べて使用する動物数を削減できるような試験法の開発を推進する必要がある。具体的には、化学物質の特定の器官に対する作用、ひいては化学物質の全身に対する作用を解析できるシステムを構築可能とする培養技術確立していくことが重要な課題となる。現在、化学物質のヒト各器官における影響を予測するためのコラーゲンビトリゲル膜チャンバーを用いた培養技術、また化学物質の全身に対する影響を予測するための組織切片を用いた培養技術¹¹⁾の開発を進めているが、本稿では前者についての開発状況を紹介する。

各器官の最小ユニットを上皮・間充織・内皮と捕らえると、化学物質の動態は皮膚や角膜や消化管のように上皮側から間充織・内皮側へ移行する経路と、血管内に投

与された薬剤のように内皮側から間充織・上皮側へ移行する経路になることに着眼した(図4)。現在、化学物質が最初に暴露される上皮細胞あるいは内皮細胞のみで構成される「組織シート」モデルと、上皮細胞、間充織細胞あるいは内皮細胞のうち2種類以上の細胞で構成される「器官様プレート」モデルをコラーゲンビトリゲル膜チャンバー内に構築して、ADMETを予測する一連の培養システムを開発している。この培養技術を用いて、眼刺激性試験法、角膜透過性試験法、皮膚感作性試験法、血管透過性試験法、肝代謝試験法、および腸吸収試験法などを開発しているが、本稿では前二者について概説する。

動物実験代替法分野では眼刺激性試験法としての実用化を指向して、コラーゲンビトリゲル膜チャンバー内にヒト角膜上皮細胞株 (HCE-T細胞) を三次元培養することで構築したヒト角膜上皮シート型培養モデルに、30種類の被験物質を曝露して3分以内に変動する経上皮電気抵抗値のプロファイルを解析した。このプロファイルを評価する3つの指標とその判定基準を設定することで、従来の動物実験に基づくGHS分類と高い相関性(感度100%、特異度75%、一致度90%)が得られる眼刺激性試験法の開発に成功した。今後、本試験法をOECDガイドライン化を目指したプレバリデーションへ展開するために、Vitrigel-EIT (eye irritancy test) 法と命名した。

創薬分野では角膜透過性試験法としての実用化を指向して、ヒトの角膜実質と同等の厚さ約450ミクロンのコラーゲンビトリゲル膜チャンバー内にHCE-T細胞を三次元培養してヒト角膜上皮・無細胞実質様プレート型培養モデルを構築し、薬剤透過性試験への応用を検討している。このモデルを用いて上皮バリア機能を傷害する塩化ベンザルコニウム (BAK) を曝露する前後で蛍光標識デキストラン (FD-4) の透過係数を測定したところ、曝露していないモデルでは 1.1×10^{-6} cm/sec、0.05% BAKを曝露したモデルでは 3.3×10^{-6} cm/secとなり、BAKの曝露により角膜透過性が亢進することが分かった。今後、この培養モデルの点眼薬成分などの薬剤透過性試験への応用が期待された。

ゼラチンビトリゲルの開発

上述してきたコラーゲンビトリゲルは高価であるため、汎用品への応用は難しいという欠点があった。一方、通常のゼラチンのゲルは生体温度37°Cまで加温すると徐々に溶解するという欠点をもつが、ゼラチンはコラーゲンに比べ安価という利点がある。特に、食用の粗抽出ゼラチンは安価である。そこで、生体温度37°Cで利用できるゼラチンビトリゲル膜の開発を目指した。具体的には、食用のマグロ原皮由来粗抽出ゼラチン溶液を4°C

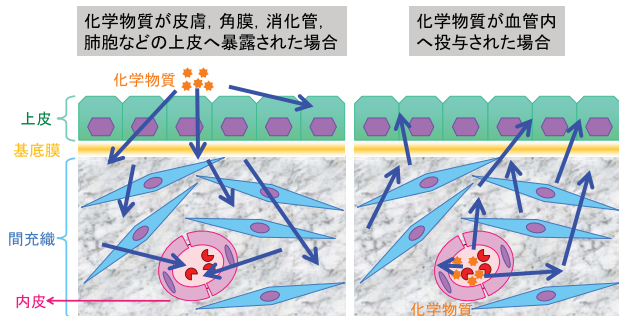


図4. 各器官に於ける化学物質の動態

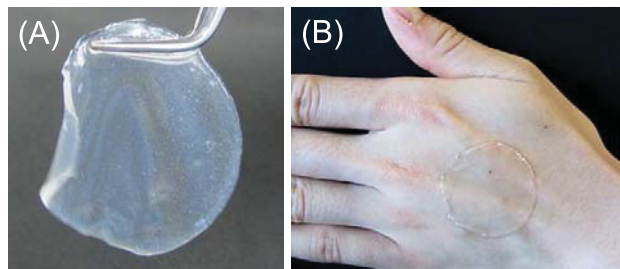


図5. ゼラチンビトリゲル膜。(A) 37°Cに加熱した状態。(B) 皮膚の表面に吸着した状態。

でゲル化した後、ゼラチンゲルを低温で乾燥してガラス化した。その後、種々の条件で紫外線を照射（非照射から1,600 mJ/cm²の積算照射量まで）してから4°Cで再水和することでゼラチンビトリゲル膜を作製し、徐々に加熱して形状安定性を評価した。その結果、紫外線非照射のゼラチンビトリゲル膜は4°Cでも脆く37°Cに加熱すると溶解したが、1600 mJ/cm²の積算照射量で紫外線を照射したゼラチンビトリゲル膜は37°Cに加熱しても安定した形状のまま溶解しなかった(図5A)。興味深いことに、上述の粗抽出ゼラチン溶液に混在している不溶性残渣を除去したゼラチン溶液から作製したゼラチンビトリゲル膜は紫外線を照射した場合でも37°Cで溶解した。

化粧品および食品の分野での実用化に向けた研究

上述のゼラチンビトリゲル膜の乾燥体は使用直前に化粧品成分を含有する水溶液に浸すことで、皮膚の表面に容易に吸着するパッチになるので(図5B)、その効果をより長く楽しむことができる。具体的には、「美白」「アンチエイジング」「うるおい」「ヒーリング」あるいは「リフレッシュ」などの効果をもたらす成分を含有させた皮膚用パッチとしての実用化が期待できる。

また、上述のゼラチンビトリゲル膜は煮沸しても溶解しなかったことから、新しい食品素材としても実用化が期待できる。

おわりに

本稿では、コラーゲンビトリゲルの開発とその再生医療、創薬および動物実験代替法の分野での実用化構想と、ゼラチンビトリゲルの開発とその化粧品および食品分野での実用化構想について概説した。しかし、最終的な実用化は個々の分野のエキスパートと協力しなければ達成できない。それゆえ、ここで紹介した研究開発および実用化構想に興味を抱かれた読者に協力して頂けるような機会に恵まれれば、誠に幸いである。

文 献

- 1) 竹澤俊明ら：薬学雑誌, **128**, 51 (2008).
- 2) Takushi, E. *et al.*: *Nature*, **345**, 298 (1990).
- 3) 特許3081130.
- 4) Takezawa, T. *et al.*: *Cell Transplant.*, **13**, 463 (2004).
- 5) Takezawa, T. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **131**, 76 (2007).
- 6) Takezawa, T. *et al.*: *Cells Tissues Organs*, **185**, 237 (2007).
- 7) 竹澤俊明ら：薬学雑誌, **130**, 565 (2010).
- 8) <http://www.nias.affrc.go.jp/event/vitrigelsympo/index.html>
- 9) 竹澤俊明：先端バイオマテリアルハンドブック, p. 277, 株式会社エヌ・ティー・エス (2012).
<http://www.nias.affrc.go.jp/org/DivAnimal/ImmuneCellBiology/page05.html>
- 10) <http://www.nias.affrc.go.jp/researchactivities/13takezawa/>
- 11) Takezawa, T.: *Methodological Advances in the Culture, Manipulation and Utilization of Embryonic Stem Cells for Basic and Practical Applications (InTech)*, Chapter 26, p. 473 (2011).
<http://www.intechopen.com/books/>