

コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを用いた組織構築とその化学物質の動態・毒性評価への応用

竹澤 俊明

筆者は、2004年に世界に先駆けて、従来のハイドロゲルをガラス化した後に再水和して得られる安定した状態にあるゲルを「ビトリゲル (vitrigel)」と命名し、高密度コラーゲン線維網の新素材「コラーゲンビトリゲル膜」を作製する基盤技術を開発した¹⁾。その後、再生医療、創薬、動物実験代替法、化粧品および食品の分野への応用、さらには実用化を目指して多くの共同研究を展開することで、コラーゲンビトリゲル膜を利用した技術と製品を開発し拡充してきた²⁻⁸⁾。この一連のイノベーションの特徴は、筆者への取材をもとに平成27年度知的財産管理技能士会研究会の研究報告書「イノベーションの要因と知的財産」に掲載された⁹⁾。なお、「ビトリゲル[®]」は農研機構の登録商標 (第5602094号) である。

本稿では、医薬品や化成品の開発に有用な培養システムを創出する視点から、「コラーゲンビトリゲル膜チャンバー」を用いて組織を構築する利点と、その利点を活用して開発してきた化学物質の動態・毒性評価法について紹介する。なお、コラーゲンビトリゲル膜チャンバーは、「ad-MEDビトリゲル[®]」という商品名で関東化学(株)より販売されている。

なぜコラーゲンビトリゲル膜を用いるのか？

コラーゲンビトリゲル膜は、透明性および力学的強度に優れていることから、細胞培養担体として有用である。また、コラーゲンビトリゲル膜は、生体内の結合組織に匹敵する高密度コラーゲン線維網でできているので、培養細胞から組織を構築する足場材料として良好に機能するのみならず、培養液に含有させた化学物質の細隙通路としても良好に機能する。特に、この二つの機能がきわめて重要であるため、コラーゲンビトリゲル膜を用いる。以下、詳細に説明する。

生体内器官の基本構造は、細胞外マトリックスが上皮細胞、間充織細胞および内皮細胞に接着の足場を提供して細胞極性を制御することで、各細胞を適所に配置していると解釈できる。また、細胞外マトリックスを構成するコラーゲンやエラスチンなどの高密度線維網には間質液が浸潤しており、細胞外マトリックスは間質液成分の往来を制御する細隙通路としての役割も果たしている。

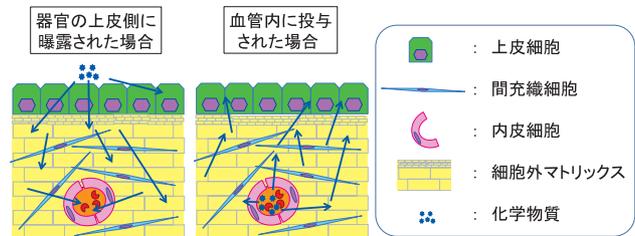


図1. 生体内器官における化学物質の動態

そのため、皮膚や角膜や消化管あるいは肺胞のような器官の上皮側から曝露された化学物質は、上皮組織のバリアを上皮細胞の先端面側 (apical) から基底面側 (basal) へと突き進み、細胞外マトリックスを経て内皮組織のバリアを内皮細胞の基底面側から先端面側へと突き進むことで血液 (角膜の場合は房水を経てから血液) 中に浸入した後、全身へ巡ることになる。一方、血管内に投与された薬剤としての化学物質は、内皮組織のバリアを内皮細胞の先端面側から基底面側へと突き進み細胞外マトリックスを経て、たとえば上皮のがん組織へと浸透していくことになる (図1)。

したがって、生体内器官における化学物質の移行経路を反映した培養システムを創出するためには、上述の細胞外マトリックスの機能を代替することを考慮して組織を構築する必要がある。培養システムでは、コラーゲンビトリゲル膜を構成している高密度コラーゲン線維網の「線維」は、培養細胞に接着の足場を提供して細胞極性を誘導できることが分かってきた。また、高密度コラーゲン線維網の「網」は、培養液が浸潤して培養液成分の往来を制御する細隙通路として機能することが分かってきた。さらに、コラーゲンビトリゲル膜は、任意の厚さに調製できる。これらのことから、生体内器官の細胞外マトリックスの主要な機能は、コラーゲンビトリゲル膜でほぼ代替できると考えている。

なぜチャンバーにするのか？

コラーゲンビトリゲル膜の表側と裏側の培養環境が、互いに混入し合わないよう独立させるために、チャンバーにする。その結果、チャンバーの内側と外側に異なっ

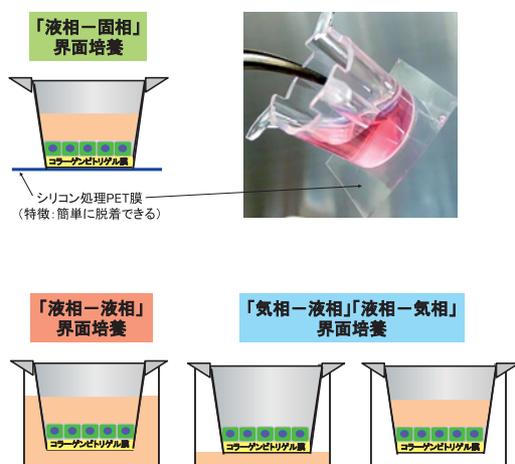


図2. コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを用いた4通りの界面培養システム。写真は、シリコン処理PET膜を付着した「ad-MEDビトリゲル®」による「液相-固相」界面培養システムをピンセットで摘まみ上げた様子。

た培養環境の設定が可能となり、チャンバー内に細胞を播種した場合は4通りの界面培養システムを構築できる(図2)。また、チャンバーにすることで、化学物質の動態や毒性を評価するアッセイシステムを容易に構築できる。特に、コラーゲンビトリゲル膜上では上皮細胞や内皮細胞のバリアを容易に形成できるので、化学物質を曝露する前後のチャンバーの内側と外側の変化を解析するアッセイシステムは有用な試験法となる。

なお、細胞培養用に市販されている多孔質ポリエチレンテレフタレート(PET)膜チャンバーと比較した場合、コラーゲンビトリゲル膜チャンバーは、膜を介した異種細胞の培養、および凍結切片の作製による免疫染色を簡単に達成できる。

眼刺激性試験法の開発⁶⁾

コラーゲンビトリゲル膜(厚さ15~20 μm)チャンバー内にヒト角膜上皮由来の細胞株であるHCE-T細胞を播種して「液相-液相」の界面で2日間培養した後、チャンバー内の培養液を除去した「気相-液相」の界面で4日間培養することで、ヒトの角膜上皮およびボーマン膜と組織学的に類似し、かつバリア機能も有するヒト角膜上皮の培養モデルを構築することに成功した。このヒト角膜上皮の培養モデルを用いて、化学物質の眼刺激性の有無を評価する新しい眼刺激性試験法「Vitrigel-EIT (Eye Irritancy Test) 法」を開発した。具体的には、チャンバーの内側と外側に電極を挿入して培養液に混和した2.5 (w/v) %被験物質を培養モデルに曝露した後、3分間にわたり経上皮電気抵抗 (transepithelial electrical

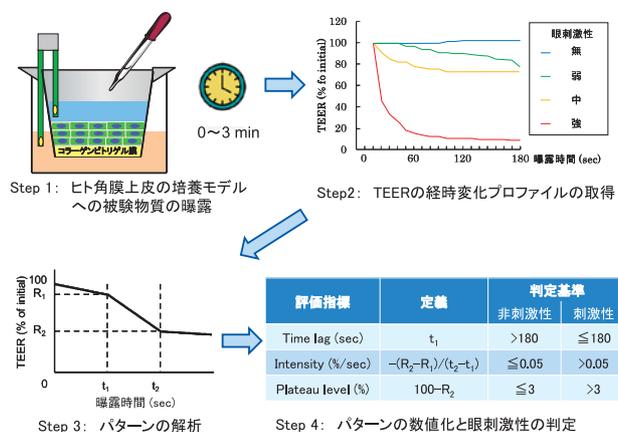


図3. 眼刺激性試験法「Vitrigel-EIT法」の概要

resistance; TEER) 値を計測して経時変化プロファイルを得る。Vitrigel-EIT法は、そのパターンを評価する3つの指標とその判定基準より眼刺激性の有無を判定する迅速で簡便な試験法である(図3)。Vitrigel-EIT法で30種類の化学物質について眼刺激性の有無を解析した結果、従来の動物実験に基づくGHS (Globally Harmonized System of classification and labeling of chemicals: 化学品の分類および表示に関する世界調和システム) 分類との比較では、偽陰性率0% (0/18), 偽陽性率25% (3/12), および一致度90% (27/30) と高い相関が得られた¹⁰⁾。

その後、予測性能を評価するため、118種類の化学物質を用いて解析した結果、GHS分類との比較では、偽陰性率9.9% (7/71), 偽陽性率34.0% (16/47), および一致度80.5% (95/118) となり、偽陰性率が高かった。そこで、偽陰性を示した7つの化学物質について調べたところ、5物質は被験物質溶液の水素イオン濃度が5以下の明らかに刺激性を示す物質であることが分かった。そこで、被験物質溶液の水素イオン濃度が5以下の9物質を除去した109種類の化学物質に対して予測性能を評価したところ、偽陰性率3.2% (2/63), 偽陽性率32.6% (15/46), および一致度84.4% (92/109) となり、Vitrigel-EIT法の予測性能は向上することが分かった。また、偽陽性を示した化学物質は、免疫組織学的な解析では弱い眼刺激性を有していることが実証された¹¹⁾。

また、このVitrigel-EIT法の国際的な公定法「OECDテストガイドライン」への登録を目指して、動物実験代替国際協力組織の協力を得て日本動物実験代替法評価センターの小島肇先生を委員長とする国際的なバリデーション実行委員会を組織し、参加3施設および統計学者の協力も得てバリデーション研究を実施した(2012-2014年度)。その結果、技術譲渡性、施設内再現性、施

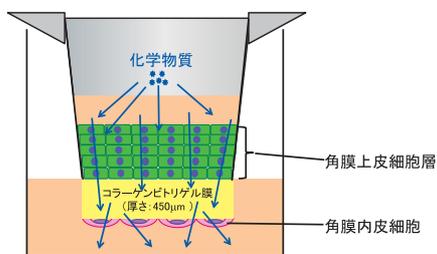


図4. 厚さ約450 μmのコラーゲンビトリゲル膜を介した角膜上皮-内皮モデルにおける化学物質の動態。

設問再現性および予測性に優れていることが実証された。このような背景からバリデーション報告書を作成し、2016年度には Vitrigel-EIT 法の OECD への申請を完了した。

角膜透過性試験法の開発⁶⁾

ヒトのポーマン膜および角膜実質のコラーゲン線維網を代替するために、それぞれ厚さ15–20 μmおよび約450 μmのコラーゲンビトリゲル膜のチャンバーを作製した。これら2種類のチャンバーに、ヒト角膜上皮由来の細胞株である HCE-T 細胞のみを培養した角膜上皮モデル、およびコラーゲンビトリゲル膜を介してウシ角膜内皮由来の細胞株である BCE C/D-1b 細胞を共培養した角膜上皮-内皮モデルを構築した。モデル薬剤としての蛍光標識デキストランFD4 (分子量4000, 分子半径1.4 nm) をチャンバーの内側の角膜上皮細胞層の上に添加した後、各モデルを透過してチャンバーの外側へ流出してきた薬剤の蛍光強度を経時的に測定することで透過係数を算出した(図4)。その結果、透過係数は角膜上皮モデルより角膜上皮-内皮モデルの方が小さくなり、特に、厚さ約450 μmのコラーゲンビトリゲル膜を介した角膜上皮-内皮モデルではウサギ摘出角膜と同等の透過係数を示すことが明らかとなった(投稿中)。以上の結果から、ヒトの無細胞性角膜実質に相当する厚さ約450 μmのコラーゲンビトリゲル膜を介した角膜上皮-内皮モデルは、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。

肝代謝排泄試験法の開発⁶⁾

コラーゲンビトリゲル膜(厚さ15~20 μm)チャンバー内にヒト肝がん細胞株である HepG2 細胞を播種して「液相-固相」の界面で2日間培養した後、コラーゲンビトリゲル膜の下面を気相として「液相-気相」の界面で1日間培養した(図5A)。このように3日間培養した HepG2 細胞では、アルブミン産生や尿素合成はヒト初代

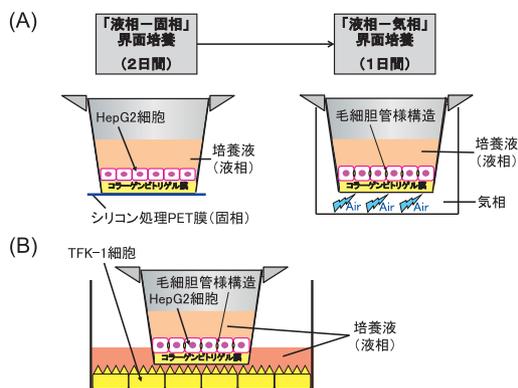


図5. HepG2細胞の肝機能を迅速に賦活化して、細胞間に毛細胆管様構造を形成させる培養法 (A)。毛細胆管様構造に蓄積された肝代謝物の排泄動態を解析するために考案したHepG2細胞とTFK-1細胞との共培養システム (B)。

凍結肝細胞のレベル、また、CYP3A4活性は平均的なヒト初代凍結肝細胞の活性に匹敵すると考えられている分化型HepaRG細胞の約1/2のレベルに達して、肝機能が賦活化されていることが分かった。さらに、このHepG2細胞の培養液にモデル薬物として fluorescein diacetate を添加した結果、その代謝物である fluorescein が細胞間の毛細胆管様構造へ蓄積した¹²⁾。

次に、生体内では毛細胆管内に蓄積された代謝物は胆汁とともに胆管内、すなわち胆管上皮細胞の先端側面に排泄されることに着眼した。そこで、HepG2細胞間の毛細胆管様構造に fluorescein が蓄積された状態のコラーゲンビトリゲル膜チャンバーを、ヒト肝外胆管がん細胞株である TFK-1 細胞を単層培養した培養皿内に移し入れて共培養した(図5B)。そして、fluorescein がコラーゲンビトリゲル膜チャンバーの内側と外側 (TFK-1細胞側) に排泄される量を経時的に解析した。その結果、HepG2細胞からの fluorescein の排泄量、および TFK-1細胞側への fluorescein の排泄割合が向上されることが分かった(投稿準備中)。このことは、共培養システムがヒト肝における薬物代謝物の胆汁中排泄物の外挿に使える可能性があることを示唆する。今後、薬物のヒト型肝代謝排泄物を解析する培養ツールとしての有用性を検証する研究へ発展することが期待された。

おわりに

本稿では、化学物質の毒性評価法として眼刺激性試験法、また動態評価法として角膜透過性試験法および肝代謝排泄試験法を紹介した。いずれの試験法においても、冒頭で述べたコラーゲンビトリゲル膜とチャンバーの特徴が活かされていることが、読者に理解していただけた

なら誠に幸いである。なお、筆者が四半世紀以上にわたり一貫して行ってきた「細胞の足場」に関する研究と、その社会実装を目指した戦略については、「組織や器官を作り出す“職人肌”の科学者」として紹介された取材記事を参照していただければ誠に幸いである¹³⁾。

本稿で紹介した試験法の開発に関する研究は、農林水産省受託プロジェクト研究費「医薬品作物、医療用素材等の開発(2011～2014年度, 課題番号6000)」¹⁴⁻¹⁵⁾、および国立研究開発法人日本医療研究開発機構「創薬基盤推進研究事業(2014～2016年度, 課題番号15ak0101029h1702)」の支援を受けた。また、眼刺激性試験法および角膜透過性試験法の開発は山口宏之君、および肝代謝排泄試験法の開発は押方歩さんが、私の研究室で担当した研究である。ここに記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) Takezawa, T. *et al.*: *Cell Transplant.*, **13**, 463 (2004).
- 2) 竹澤俊明ら：薬学雑誌, **128**, 51 (2008).
- 3) 竹澤俊明ら：薬学雑誌, **130**, 565 (2010).
- 4) 竹澤俊明：生物工程学, **91**, 214 (2013).
- 5) 竹澤俊明：日経バイオテク, **788**, 38 (2014).
- 6) 竹澤俊明：薬剤学, **75**, 344 (2015).
- 7) 竹澤俊明：日本白内障学会誌, **28**, 43 (2016).
- 8) http://www.naro.affrc.go.jp/archive/nias/org/DivAnimal/ImmuneCellBiology/page05_takezawa.html (2017/6/8)
- 9) 宮澤 亘：IPマネジメントレビュー20号別冊, p. 17, 知的財産教育協会 (2016).
- 10) Yamaguchi, H. *et al.*: *Toxicol. Sci.*, **135**, 347 (2013).
- 11) Yamaguchi, H. *et al.*: *J. Appl. Toxicol.*, **36**, 1025 (2016).
- 12) Oshikata-Miyazaki, A. *et al.*: *Cytotechnology*, **68**, 1801 (2016).
- 13) 藤川良子：Nature ダイジェスト, **10**, 22 (2013).
- 14) <http://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2039017856.pdf> (2017/6/8)
- 15) <http://www.naro.affrc.go.jp/archive/nias/press/2016/20160328/vitrigel.pdf> (2017/6/8)