

ad-MEDビトリゲル®とその創薬、 化学物質安全性試験への応用

ad-MED vitrigel® for the application
in drug development and alternative method of animal experiments

関東化学株式会社 技術・開発本部 伊勢原研究所 **山口 宏之**

Hiroyuki Yamaguchi

Isehara Research Laboratory, Technology and Development Division, Kanto Chemical Co.,Inc.



キーワード

ビトリゲル®、足場材料、動物実験代替法

1 はじめに

コラーゲンビトリゲル®は国立研究開発法人 農業生物資源研究所(現 農業・食品産業技術総合研究機構)の竹澤らが開発した、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構成された素材であり、ピンセットなどで容易に取り扱える強度を持ち、透明性に優れ、また高分子タンパク質を含む物質透過性に優れるといった特徴がある^{1),2)}。本稿では、このコラーゲンビトリゲル®膜の特徴を生かした細胞培養用インサート「ad-MEDビトリゲル®」およびその関連製品の特長とその応用研究について概説する。

2 コラーゲンビトリゲル®の特徴

水を大量に含むハイドロゲルを温度、湿度をコントロールしながら徐々に乾燥させて、自由水だけでなく結合水も除去した後、再水和すると透明性に優れた物性に変換される。この乾燥工程はガラス化(vitrification)と呼ばれ、このガラス化工程を経て作製したゲルが新しい学術用語「ビトリゲル®(vitrigel®)」と定義されている¹⁾。ビトリゲル®は様々なハイドロゲルから作製できるが、このうちコラーゲンゲルから作製したものをコラーゲンビトリゲル®と呼ぶ。

コラーゲンを原料とした医療器具や細胞培養用担体に用いられる素材は従来から存在するが、それらは透明ではなく白色である。そのため医療器具として用いた場合、患部の観察が難しかった。また、細胞培養用担体として用いた場合は、光学顕微鏡による観察が困難であった。さらに、それらの素材自体の強度が低いため、プラスチック等の裏打ち材や、化学物質による架橋を必要とした。それに対し

て、コラーゲンビトリゲル®は架橋剤等を含まない純粋なコラーゲン線維でありながら、透明であり患部や細胞の観察が容易である。またピンセットでつまみあげたり引っ張ったり、折り曲げたりしても破れない強度を持つ。さらに、任意の形状(膜、糸、管等)に加工でき、乾燥状態で常温保存が可能である。このような性質を生かして、化学物質の動態・毒性の解析に有用な培養モデルの構築、欠損組織を修復する生体適合性素材、細胞移植用担体、ドラッグデリバリーシステム等としての応用が進められている³⁾。

3 ad-MEDビトリゲル®および その関連製品の開発

3.1. ad-MEDビトリゲル®

ad-MEDビトリゲル®はウシ由来I型コラーゲンを原料として作製したコラーゲンビトリゲル®膜を、円筒形の容器の底面に貼りつけた細胞培養用インサートである(図1)。



図1 ad-MEDビトリゲル

インサートとは、培地などを透過する膜を底面に貼りつけたカップ状の容器であり、マルチウェルプレート内に設置した状態で細胞をインサート内に播種して使用する。ad-MEDビトリゲル®で使用しているコラーゲンビトリゲル®膜は、従来のインサートで使われているプラスチック製フィルムや不織布等と比べ細胞が迅速に接着・伸展する。また、膜

の透明性が高く、自家蛍光が低いことから位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡で鮮明な観察像を取得することが可能である。

通常の培養皿で細胞を培養した場合、細胞の下面はプラスチックなどの固相に接触しており、培地の栄養成分や酸素は細胞の上方からのみ供給される。一方、ad-MEDビトリゲル®で培養した場合は、コラーゲンビトリゲル®膜が高分子タンパク質を含む培地の栄養成分や酸素を透過するため、細胞の上方だけでなく、膜を介した下方も培養液と接触（液相-液相）させて、上下両方向から栄養成分等を供給することができる。さらに、ad-MEDビトリゲル®ではインサート内外に入れた培地を保持できることから、インサート内外に異なる組成の培地を入れる、インサート内外のどちらか一方にのみ培地を入れ、もう一方は空気に晒す（気相-液相）といった培養を行うこともできる（図2）。

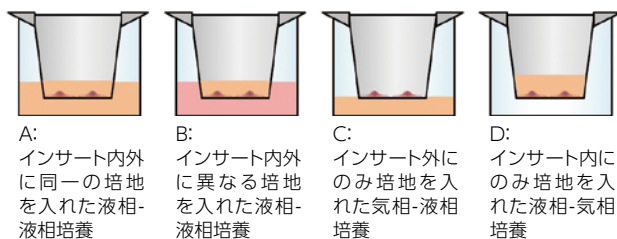


図2 ad-MEDビトリゲルを用いた培養方法

例えば、皮膚や角膜の上皮細胞をad-MEDビトリゲル®内に播種し、インサート外にのみ培地を入れ、細胞の上方を空気に晒した気相-液相界面培養を行うと、生体と同様の多層化した上皮細胞層を形成される。このように、ad-MEDビトリゲル®は天然の組織・器官を再現した高度な培養モデルの構築に適している⁴⁾。

従来のad-MEDビトリゲル®はコラーゲンビトリゲル®膜が培地で膨潤すると、インサート底面に弛みを生じるため、接着性の弱い一部の細胞では、播種した細胞が中心部に偏ってしまう傾向が見られた。最近、弛みを低減した改良品「ad-MEDビトリゲル®2」を開発した。ad-MEDビトリゲル®2では従来品で接着性が弱い細胞も、迅速に接着、伸展し、細胞の偏りが無い均一な細胞層を失敗することなく作

製できる（図3）。

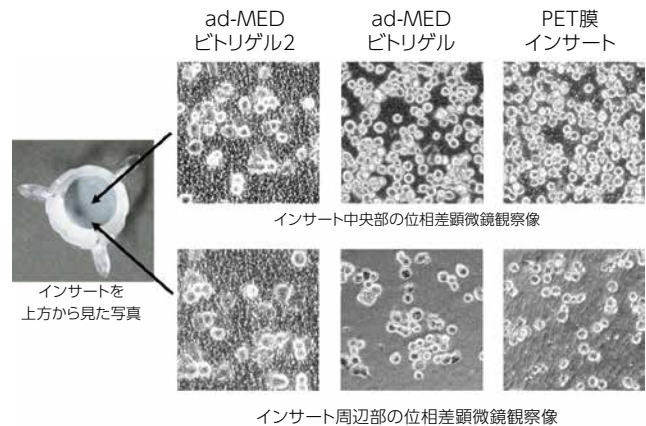


図3 インサート内に播種したHepG2細胞の分布

3.2. オプションリング

生体内では、ある細胞が分泌した物質がその近傍にある別の細胞に作用し、その細胞を活性化する現象（パラクライン効果）が様々な場面でみられる。例えば、皮膚の表皮角化細胞や繊維芽細胞が分泌した神経成長因子（nerve growth factor, NGF）が神経細胞の神経突起伸長を誘導することが知られている⁵⁾。このパラクライン効果を*in vitro*で再現するため、インサート内で2種類の細胞を同時に培養すること（共培養）が行われてきた。しかし、インサートを用いた一般的な共培養では、一方の細胞をインサート内、もう一方の細胞をマルチウェルプレートのウェル底面で培養する。そのため、細胞同士が離れており、パラクライン効果が現われにくい場合がある。そこで、ad-MEDビトリゲル®の底面に細胞を播種するためのリング状の部品「オプションリング」を開発した。ad-MEDビトリゲル®にオプションリングを装着し、リングを装着した側が上方になるようにad-MEDビトリゲル®を設置してリング内に細胞を播種する。そして細胞が接着したらリングを取り外し、ad-MEDビトリゲル®をひっくり返して、マルチウェルプレートに設置し、インサート内部に細胞を播種する（図4）。この操作によってコラーゲンビトリゲル®膜の両面に細胞を播種することが可能になる。一例としてL929細胞が産生するNGF

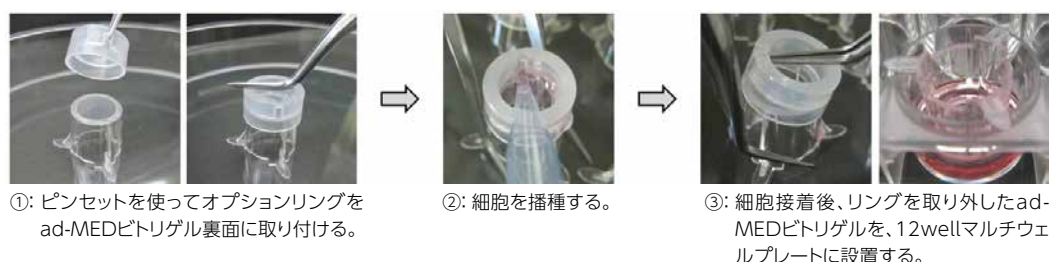


図4 オプションリングの使用手順

でPC-12細胞の神経突起伸長を誘導する実験系を示す。従来法である、インサート内にPC-12細胞、マルチウェルプレートの底面にL929細胞を培養した系(底面培養)と比べ、オプションリングを用いて、ad-MEDビトリゲル®のコラーゲンビトリゲル®膜の一方の面にPC-12細胞、もう一方の面にL929を培養した系(両面培養)の方が、神経突起伸長が促進されることが認められた(図5)。

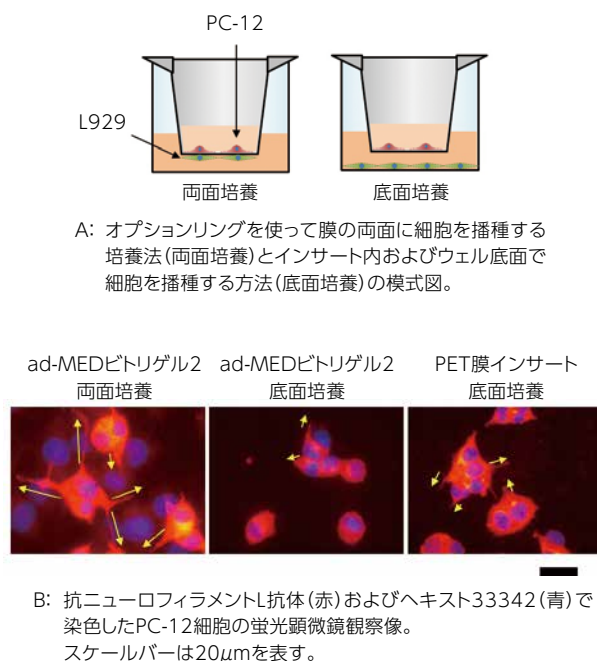


図5 L929細胞とPC-12細胞の共培養

3.3. TEER測定装置

皮膚、角膜、腸、気管、血液等、生体で面を形成している部分では上皮細胞が層状構造を形成し、また、細胞間に密着結合(tight junction)を形成することによって外部から物質の流入を制御している。この仕組みを上皮のバリア機能といい、このバリア機能の評価には経上皮電気抵抗(trans epithelial electrical resistance, TEER)の測定が広く用いられている^{6), 7), 8)}。TEER値は組織毎に異なり、例えば強固なバリア機能を持つ皮膚では $1000\Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上、バリア機能が比較的弱い物質透過性の高い血管内皮では $10 \sim 20\Omega \cdot \text{cm}^2$ である。TEER値の測定は、細胞を培養したインサート内外の培地中に測定用の電極を挿入することで行う。その際、電極の位置がわずかでもずれるとTEER値が変動し正確な値が測定できない。そこでad-MEDビトリゲル®にしっかり固定できる専用の電極と、応答速度の速い抵抗計を組み合わせたTEER測定装置を新たに開発した(図6)。

この電極をad-MEDビトリゲル®組み合わせることで微細なTEER値の変化を正確に測定することが可能である。



図6 TEER測定装置

4

ad-MEDビトリゲル®の創薬・動物実験代替法への応用

医薬品や化粧品の原料として使われる化学物質の効能および安全性は、従来、実験動物にそれらの物質を投与して動物の反応を観察することで試験されてきた。しかし、近年、動物実験に対する倫理的な問題に注目が集まり、また、それらの物質が動物に及ぼす作用が、必ずしもヒトに及ぼすそれと一致しないことが明らかになってきている。それを受けて、EUではいち早く2009年から動物実験を行った原料を使った化粧品の販売を禁止し、動物の代わりに培養細胞や微生物などを使う試験法(動物実験代替法)への置換を進めている⁹⁾。また、国内でも大手化粧品メーカーが原料の試験に動物実験を行わないことを表明しており、また、医薬品メーカーも動物実験の削減と動物実験代替法の導入を進めている。このように、世界的に動物実験を代替法に置き換えていこうという動きがある一方で、現在でも、化粧品の試験に利用できる動物実験代替法は皮膚刺激性試験、光毒性試験、眼刺激性試験など一部の試験に限られており、医薬品・医薬部外品に利用できる試験法はさらに少なく、承認申請を動物実験無しでは行うことができない。このように動物実験代替法の開発が進まない原因として、一つはヒトの体内で化学物質の動態に関する組織や器官を構成する細胞と同等の機能を持つ培養細胞が入手困難であったことが挙げられる。そして二つ目の原因としては、その細胞を適切に配置してその機能を発現させるための足場材料がなかったことである。一つ目の課題である細胞に関して、従来の細胞ソースとしては、無限増殖能を持った単一クローンである株化細胞や、ヒトから採取してきた初代細胞が主に用いられてきた。しかし、前者は不死化していることで、生体内にある正常な細胞とは機能が大きく異なることが問題であった。また、後者は、採取できる細胞数が限られる、細胞の純度が低い場合がある、ドナーの個体間差によって実験再現性が低下するといった問題があった。一つの光明となったのが山中らによるヒトiPS細胞の発見である¹⁰⁾。ヒトiPS細胞を様々な薬剤で処理し分化を促すことで、心筋、肝臓、小腸など様々なヒト由来細胞を誘導することができる。また、患者由来のiPS細胞を用い

ること、疾患特異的な性質をもつ体細胞が得られることから、創薬への応用に関して研究が進められている。一方、二つ目の課題に関しては、生体内において、多くの細胞は単独で機能しているわけではなく、同一種類の細胞が規則的に配列した「組織」や、2種類以上の細胞が複合した「器官」を形成し、近傍に存在する細胞同士が相互作用することで機能を発現している。また、組織や器官において、細胞は一定の方向性（極性）を保って存在している。例えば、生体が外界と接する部分を覆っている上皮細胞は、密着結合 (tight junction)・接着結合 (adherens junction)・接着斑 (desmosome) からなる接着複合体 (apical junction complex) で区別された、頂端側 (apical) と側底側 (basolateral) という極性を持っている。細胞がこの極性に従って、物質の吸収・輸送・代謝・分泌を行うことが、組織・器官の機能を発現させるうえで非常に重要である。この細胞の極性を規定するのは細胞外マトリクス、血液、空気など細胞の周囲環境であると言われている。ad-MEDビトリゲル®を用いて、気相-液相界面培養、液相-液相界面培養など細胞の周囲環境を適切に維持した培養を行うことで、創薬や安全性試験に有用な極性を持った培養モデルを構築できると考えている。その一例として、角膜上皮モデルを用いた眼刺激性試験法、および、肝代謝毒性試験用モデルの構築について説明する。

4.1. 眼刺激性試験法

眼刺激性試験とは、化学物質が眼に付着することによって惹起される傷害の重篤さを評価するための試験法である。従来はウサギの眼に被験物質を滴下し、障害の程度を観察する動物実験（ドレイズ試験）によって行われてきたが、近年の動物実験削減の流れを受け、ウサギの代わりに食肉用のウシやニワトリから摘出した眼球、培養細胞、3次元培養モデルなどを用いた動物実験代替法¹¹が開発されている。しかし、眼刺激性試験は主に化学物質の安全性を確認する目的で使用されるため、偽陰性の少ない高感度な試験法が求められている。

そこで着目したのが角膜上皮のバリア機能である。眼刺激性の化学物質が眼に触れると、最初に上皮バリア機能が破壊され、次いで、化学物質が角膜内部に侵入し、角膜上皮細胞死や角膜実質の浮腫などのより重篤な障害を引き起こす。そのため、上皮バリア機能は化学物質による眼刺激性の早期マーカーとして知られている¹²。そこで、ad-MEDビトリゲル®内で角膜上皮由来の細胞を培養することによって、ウサギの眼の代わりとなる、上皮バリア機能を持つ角膜上皮モデルを構築した。そのモデルに化学物質が触れた際のTEER値の変化を測定することで、化学物質の上皮バリア機能への障害の有無を判定する新しい眼刺激性試験法

〔Vitrigel®-Eye Irritancy Test (EIT) 法〕が開発された^{13, 14}。ad-MEDビトリゲル®内にヒト角膜上皮由来の株化細胞であるHCE-T細胞を播種すると細胞はビトリゲル®膜に速やかに接着する。その後、液相培養を2日間、続いて、インサート内の培養液を取り除き、細胞の上方を空気に晒した状態での培養（気相-液相界面培養）を4日間行う。すると、HCE-T細胞は多層化し、ヒト角膜上皮と同等の約6層の細胞層を形成し、かつ、上皮バリア機能を有したヒト角膜上皮モデルが構築できる（図7）。

0日目 ad-MEDビトリゲルにHCE-T細胞を播種
2日目 気相-液相界面培養
6日目 完成

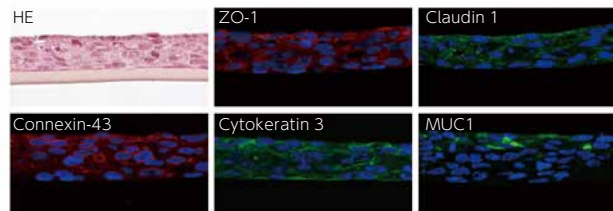
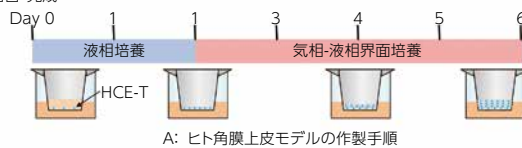


図7 ヒト角膜上皮モデル

このモデルに培養液と混和した化学物質を曝露し、滴下直後から3分間TEER値の経時変化を測定する。このとき、眼刺激性のない物質ではTEER値は3分間全く変化しない。一方、弱い眼刺激性物質では、TEER値は最初変化せず、一定時間経過後に徐々に減少する。そして中程度から強い眼刺激性物質では曝露直後からTEER値が低下し、かつ、眼刺激性が強い物質ほど大きく低下する（図8）。

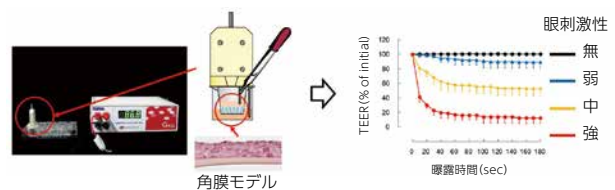


図8 Vitrigel-EIT法の試験手順

このTEER値の変化パターンを、曝露してからTEERが低下し始めるまでの時間差 (Time lag)、低下速度 (Intensity)、終点での低下率 (Plateau level) の3種類のパラメータで数値化し、その数値から化学物質の眼刺激性の有無を判定する。Vitrigel®-EIT法で118種類の化学物質を判定し、その結果を動物実験の結果に基づいた分類

法であるGHS分類と比較したところ、一致度は80.5%、偽陰性率9.9%、偽陽性率34.1%となり、本試験法は偽陰性が少なく、眼刺激性物質と非刺激性物質との判別に適していることが示唆された¹⁴⁾。

Vitrigel®-EIT法を国際的な公定法であるOECDテストガイドラインに登録することを目指して、代替試験法国際協力(ICATM)の協力を得て結成された国際的なバリデーション実行員会のもと、日本動物実験代替法評価センター(JaCVAM)主導で本試験法のバリデーション試験が実施された。国内3施設において、試験法の技術譲渡性、施設内・施設間再現性、および、予測性を試験し、良好な結果が得られている。

4.2. 肝代謝毒性試験

医薬品リード化合物の効能の評価や安全性の確認を行う上で、肝臓における吸収(Absorption)・分布(Distribution)・代謝(Metabolism)・排泄(Excretion)・毒性(Toxicity)のいわゆるADMETを解析することは非常に重要である。しかし、ヒトと動物とではADMETに種差があるため、薬剤をヒトに投与した際、動物実験では予測できない副作用が現われる場合があることが問題となっている。そこで、様々なヒトの肝臓由来細胞を用いた*in vitro*試験法で、ヒトでのADMETを予測する試みが進められている。ここで使われる細胞としては、初代凍結肝細胞、iPS由来肝細胞、および、肝ガン由来の細胞株であるHepG2細胞やHepaRG細胞などがある。これらの細胞にはそれぞれ長所と短所がある。凍結肝細胞は高価であり、ドナーの違いによるロット間差が大きい。iPS由来肝細胞は、ヒト由来の細胞を大量に得られるが、高価であり、また肝臓に特徴的なCYP等の代謝酵素活性が低い。そして、肝ガン由来細胞株は、無限増殖能があり大量の細胞が容易に得られるが、比較的代謝酵素活性が高いHepaRG細胞は高価であり、一方、比較的安価なHepG2細胞は代謝酵素活性が低いことが知られている。このHepG2細胞をシリコン処理PET膜(固相)上においたad-MEDビトリゲル®に播種し2日間培養(液相-固相界面培養)した後、空のマルチウェルプレートに設置し、細胞の上側を培地(液相)、膜を介した下側を空気(気相)に晒した液相-気相界面培養を1日間行うことで、HepG2細胞のアルブミン産生能、尿素合成能、およびCYP3A4活性が向上することが見いだされた(図9)。

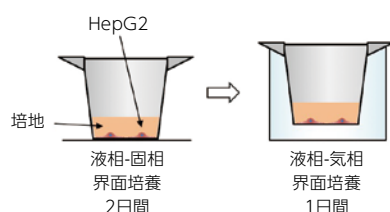


図9 肝代謝毒性試験用モデルの作製手順

また、HepG2細胞の細胞間に毛細胆管用構造を形成している様子が確認された¹⁵⁾。このように、ad-MEDビトリゲル®を用いて、細胞の上下の環境を変えて細胞を培養することで、ヒトにおけるADMEDの解析に有用な培養モデルの開発が期待できる。

5 おわりに

本稿ではビトリゲル®に関する研究開発のうち主にad-MEDビトリゲル®とその応用研究について説明した。それ以外にもビトリゲル®は医療器具、移植用担体など様々な応用が研究されており、今後の用途の拡大が期待できる。本稿で紹介したad-MEDビトリゲル®, Vitrigel®-EIT法、および肝代謝毒性試験用モデル等の研究は、農林水産省「アグリ・ヘルス実用化研究促進プロジェクト(現 医薬品作物、医療用素材等の開発)」の支援を受けた。また、「ビトリゲル®」は国立研究開発法人 農業生物資源研究所(現 農業・食品産業技術総合研究機構)の登録商標である。

参考文献

- 1) T. Takezawa, K. Ozaki, A. Nitani, C. Takabayashi, T. Shimo-Oka, *Cell Transplant* **13**(4), 463-473 (2004).
- 2) T. Takezawa, T. Takeuchi, A. Nitani, Y. Takayama, M. Kino-Oka, M. Taya, S. Enosawa, *J. Biotechnol.* **131**(1), 76-83 (2007).
- 3) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構, 動物由来材料を利用した医薬品原料や医療機器等の開発のてびき, http://www.nias.affrc.go.jp/press/2016/20160328/vitrigel*.pdf(参照2016-5-25).
- 4) 竹澤俊明, *薬剤学* **75**(6), 344-353 (2015).
- 5) R. Levi-Montalcini, *Science* **237**(4819), 1154-1162 (1987).
- 6) C. Kawada, T. Hasegawa, M. Watanabe, Y. Nomura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**(4), 867-869 (2013).
- 7) F. Caloni, C. Cortinovis, F. Pizzo, I. De Angelis, *Front Pharmacol* **111**(3), 1-8 (2012).
- 8) C. Blume, E. J. Swindle, S. Gilles, C. Traidl-Hoffmann, D. E. Davies, *Tissue Barriers* **3**(3), e1062316 (2015).
- 9) "Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (Text with EEA relevance)", European Parliament, Council of the European Union (2009).
- 10) K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, *Cell* **131**(5), 861-872 (2007).
- 11) C. Lotz, F. F. Schmid, A. Rossi, S. Kurdyn, D. Kampik, B. De Wever, H. Walles, F. K. Groeber, *ALTEX* **33**(1), 55-67 (2016).
- 12) M. Meloni, A. Pauly, B. De Servi, B. Le Varlet, C. Baudouin, *Toxicol In Vitro* **24**(1), 276-285 (2010).
- 13) T. Takezawa, K. Nishikawa, P. C. Wang, *Toxicol In Vitro* **25**(6), 1237-1241 (2011).
- 14) H. Yamaguchi, H. Kojima, T. Takezawa, *Toxicol. Sci.* **135**(2), 347-355 (2013).
- 15) H. Yamaguchi, H. Kojima, T. Takezawa, *J. Appl. Toxicol.* doi: 10.1002/jat.3254. (2015). [Epub ahead of print]
- 16) A. Oshikata-Miyazaki, T. Takezawa, *Cytotechnology* doi: 10.1007/s10616-015-9934-1. (2015). [Epub ahead of print]