

## 性セレウス菌の検査法の問題点

### 1) 標準嘔吐毒素

数年前に市販される以前は、検査機関に嘔吐毒素は供給されなかった。現在入手可能な嘔吐毒素は培養液から精製された標品になっている。嘔吐毒素の合成に成功しているという報告があり、その合成物は、1 ng/ml の濃度で、HEp-2 細胞に空胞化を誘導する。現在入手可能な嘔吐毒素は、培養液からの精製後、空胞化を起す最大希釈倍率が測定されている。1 ng/ml の濃度に希釈倍率を補正し、精製品の濃度が算出され、希釈され、1 mg/ml に調整されたとして市販されている。この事実は貴重な情報である。つまり、市販の嘔吐毒素は、実濃度が測定されておらず、標準品になっていない。現在我が国で入手可能な嘔吐毒素が 1 種類であることを考えると、嘔吐毒素が、濃度の面で根本的不適合性をもっていることは深刻に受け止めなければならない。

培養液中から嘔吐毒素を精製し、標準品とするのにはもう一つ問題点がある。嘔吐毒素がイオノフォアであること、カリウムイオンを包有する場合、細胞毒性を発揮すること、アンモニウムイオンをトラップしていると毒性がないことは既に述べた。培養液から精製された嘔吐毒素が、何のイオンをどれくらい包有しているのか、検討されていない。250 mM の KCl を添加したメチルアルコールに嘔吐毒素が溶解されて市販されているが、この標品の、トラップされているイオン種が同定されていない。カリウムイオンへのイオノフォア効果が高い場合、すべての嘔吐毒素がカリウム包有体であることが期待されるが、検定がなされていない。従って、セ

レウス菌嘔吐毒素検査は、基本的根本的欠陥をもっており、標準嘔吐毒素標品の供給は緊急の課題である。

上記の問題を解決するには、嘔吐毒素の化学的合成が望まれる。安定した品質と、正確な濃度の両面を担保するには、培養液からの精製物でなく、化学合成物としての嘔吐毒素が必要である。

嘔吐毒素の化学合成には、すでに論文報告があるが、残念なことにそれらの方法で合成された毒素が市販され、普及されるまでに至っていない。標準嘔吐毒素の供給がされない以上、嘔吐毒素の定量には基本的問題が存在する。

### 2) 免疫学的検査法

嘔吐毒素に対して免疫抗体が作製されていない。抗体による物質同定と定量法の至便さは言及するまでもない。その分、嘔吐毒素に対しての免疫学的検査法が開発されていない事実は、食品のセレウス菌汚染、嘔吐毒素汚染制御の困難さに直結する。正確な嘔吐毒素の濃度測定だけでなく、病的状態を誘発する毒素濃度か否かを判断できるスクリーニング系の検査法も要望される。

### 3) 嘔吐毒素の毒性検査法

便利なげっ歯類実験動物に嘔吐反応がみられないこと、サルやジャコウネズミが普及していないことの 2 点が動物個体で嘔吐毒素の毒性を検査する上で問題となる。

我が国ではブタ精子を使つての嘔吐毒素検査は行われていない。

最も一般に普及している嘔吐毒素検査法は HEp-2 細胞を用いてのバイオアッセイになる。2004 年版食品衛生検査指針に記載されている。細胞培養技術は検査期間に広く

普及し、機械器具の設置導入には大きな問題はない。分離セレウス菌の培養上清の検定には、問題なく利用できる。食品中の嘔吐毒素を検出する場合には、有機溶媒による毒素の抽出と、不純物を取り除くカラム操作が必要である。

一般的な方法ではあるものの、HEp-2細胞アッセイを実際に行ってみると、改良が必要なところが数点ある。HEp-2細胞の細胞質内に誘導される空胞が、訓練を受けた検査員でないと判定しにくい。一部の希釈段階でのみ空胞化が検出され、高濃度の嘔吐毒素が存在するはずなのに、空胞化が誘導されない。嘔吐毒素陽性を示す希釈段階の培養ウェルのなかのすべての細胞が空胞を生じない。空胞が生じるまでに一晩あるいは2日間必要で、迅速性に欠ける。

#### 4) 質量分析器による嘔吐毒素検査法

質量分析計は培養液および食品中の毒素の検査法に應用されている。不純物を取り除く前処理が必要であるが、物質同定の信頼性は非常に高い。最近の質量分析器は定量性も向上している。欠点としては、機器が高価であることだろう。一台数千万円から一億円の価格で、年間の保守契約に数百万円かかる。あまり知られていないことであるが、質量分析器を設置すると作業環境も幾分劣化する。実際に機器を設置すると、真空ポンプおよびチッソ発生装置からの騒音、居住環境よりは極端に低い室温の維持、発生するチッソの排気によるドラフト連続使用などのデメリットがある。

#### 5) 遺伝子検査法

現行のPCRおよび定量PCR法は、分離したセレウス菌株の菌体DNAをテンプレー

トとしており、良好な結果を示す。それらの方法が食品中の嘔吐毒素産生性セレウス菌の検出に直ちに適応できるかというところという訳ではない。食品成分がPCR反応を障害することは周知のことであるが、嘔吐型セレウス菌食中毒が、食品中で産生された嘔吐毒素で起こる事を考えると、遺伝子検査法が食品に適応できないのは、食品産業からの観点からはデメリットが大きい。免疫抗体とともに、核酸を取り扱う技術・知識が普及しているので、「食品中の嘔吐毒素産生性セレウス菌」を検査できる遺伝子検査法の開発が待たれる。

#### 6) 食品中の嘔吐毒素産生性セレウス菌の検査法

セレウス菌分離後に、嘔吐毒素産生性のセレウス菌かどうかを判定する迅速イムノクロマトキットが最近市販された。嘔吐毒素遺伝子（正確には毒素合成酵素遺伝子）保有セレウス菌がもつ、おそらく菌体表面のマーカ一物質に対して抗体を作製し、それをを用いてイムノクロマト法としている。食品中のセレウス菌に対してこの方法が用いられると、食品のセレウス菌汚染把握についてはその制御に貢献するかと考えるが、加熱処理の伴う加工食品の場合、菌体が存在しなくなるので、イムノクロマトが成り立たず、理論的にむづかしい。また、嘔吐毒素のリスクの全貌が不明である以上、食品中から毒素そのものを把握し検査しないと、食品のセレウス菌に対する安全性は担保されない。毒素産生に直結している分子で、免疫抗体が容易に作製され、食品から抽出された後の抗原抗体反応が安定して起こる物質であるならば、毒素そのものの検査に代わる項目として成り立つ可能

性がある。

嘔吐毒素が産生される量が、セレウス菌の増殖と正の相関することが知られているので、毒素産生に直接に関連する遺伝子のコピー数を検出定量すれば、食品中の嘔吐毒素産生性セレウス菌、あるいは嘔吐毒素の有害性へのモニタリングが可能であるという論理も成り立つ。

第2項:セレウス菌に対する網羅的抗体作製

1) セレウス菌のシグナルペプチド保有遺伝子の遺伝子工学的抽出

調製したセレウス菌 cDNA ライブラリーを検査したところ、 $6 \times 10^6$  クローンを得たと計算された。インターロイキン3依存性によって選抜された(増殖して来た) Ba/F3 細胞は41 クローンで、セレウス菌は、SSX 法ではシグナルペプチド保有タンパク質の細胞提示率が非常に不良であることがわかった。真核細胞およびグラム陰性細菌に SSX 法を適応させると、平均的に 200 クローン以上が選抜されるので、SSX 法はセレウス菌のようなグラム陽性菌には十分な効果を発揮できないことが示された。これは、グラム陽性菌がシグナルペプチドを保有するタンパク質群を効率よく細胞外へ輸送する機能を持たない、あるいは、シグナルペプチド中に輸送シグナルとして機能する配列が無いことを推察させる。

確立した 41 クローンがコードする遺伝子の種類は 17 種だった。この 17 タンパク質をコードする遺伝子を持つ Ba/F3 細胞を解析したところ、複数の遺伝子が導入されている細胞、および導入遺伝子の短い細胞集を除いたところ 12 種が選抜された。以後、12 タンパ

ク質をターゲットとして、ハイブリドーマ作製、モノクローナル抗体の作製を試みた。

2) モノクローナル抗体作製

12 種の当該 Ba/F3 細胞でマウスを免疫、細胞融合し、安定した細胞増殖と抗体産生しているクローンを選抜中である。

第3項:抗セレウス菌嘔吐毒素抗体の性状解析

1) マウスモノクローナル抗体

クローンとして3種を検討した。クローン No. 4 および No. 12 は IgG、No.13 は IgM のクラスを示した。各クローンについてマウス腹水から抗体を精製した。ELISA にて各モノクローナル抗体の非特異反応性を検討した。各モノクローナル抗体は、ウェル表面に吸着させた嘔吐毒素に高い吸光値を示している。非特異反応を検証したところ、卵黄レシチン、Triton X-114、Tween-80 に対して、No.4 および No.12 は高い吸光値を示した。一方 No. 13 はブランクと同程度の吸光値を示した(表1)。

2) ニワトリ IgY 抗体

抗セレウリド IgY 抗体の特異性検討

抗セレウリド IgY 抗体は  $1\sim 100 \mu\text{g/mL}$  の濃度範囲で比較的良好な特異性を示した。すなわち、卵黄レシチン、TritonX-144、および Tween 80 について、ブランク値を同定の吸光値だった。(表2)。

抗セレウリド IgY 抗体は、試した難溶性物質との非特異反応が低く、マウスモノクローナル抗体 No. 13 とほぼ同等の S/N 比を示した。

D. 結論

病原性微生物としてセレウス菌を取り上げ、その菌の特徴と産生する毒素について文献検索し、リスクと病原性性状、食品への汚染の程度の把握を中心に情報を収集、現在の動向をまとめた。食品のセレウス菌への汚染は必ず起こると考えておくことが必要である。セレウス菌は下痢毒素と嘔吐毒素を産生する可能性がある。いずれの型の食中毒でも、食品内での菌の増殖を抑制することが重要である。セレウリドは不明の事が多く、免疫抗体も作製されておらず、食品内での変動や修飾化されるかなど、不明な点が多い。食品汚染のリスク管理の上から、その解明は必須のものであろう。

病原性微生物としてセレウス菌を取り上げ、同菌が産生する嘔吐毒素について文献検索し、嘔吐毒素の物性、化学的生物学特性を整理し、毒素検査法に考察、その問題点を議論した。毒素の危害性、リスクの全貌が把握されておらず、そのため、食品のセレウス菌に対する安全性を担保するためには、嘔吐毒素の検出・定量が望まれる。嘔吐毒素の定量法やスクリーニング法の確立に、毒素への免疫抗体の作製が強く望まれる。嘔吐毒素の基礎研究が不足している。一部の食品中での生菌の増殖と嘔吐毒素産生量の成績はあるが、毒素産生後、食品が加熱や加工を受けた場合の嘔吐毒素の挙動などの情報が必要である。嘔吐毒素が取り扱い難い物性を持っているため、嘔吐毒素の産生やその挙動に直接関係する菌由来の物質を食品内で検査し、嘔吐毒素産生性セレウス菌の食品汚染の実態を把握するというアプローチも有効と考える。

SST-REX法をセレウス菌に適応し、同菌の

シグナルシーケンスを持つ分泌性タンパク質ならびに膜タンパク質にたいして、網羅的抗体作製を試みた。12種のタンパク質をターゲットとしてクローンが得られ、順次モノクローナル抗体を作製中である。真核生物の細胞や、グラム陰性細菌ではさらに多くのクローンが得られるのが通常である。SST-REX法はグラム陽性細菌への応用に限界があると判ぜられ、SST-REX法を用いるならば、本研究の標的抗原をセレウス菌以外にも広める事が適切であると推察された。

抗セレウス菌嘔吐毒素抗体の特異性を確認する目的で、セレウリド同様の難溶性物質に対する反応性をELISA法で検討し、マウスモノクローナル抗体の1クローン、およびニワトリ卵黄由来抗セレウリドIgY抗体が非特異反応の少ないことが分かり、嘔吐毒素の免疫学的定量法の開発に用いることができる証左を得た。

#### E. 知的所有権の取得状況

##### 1 特許

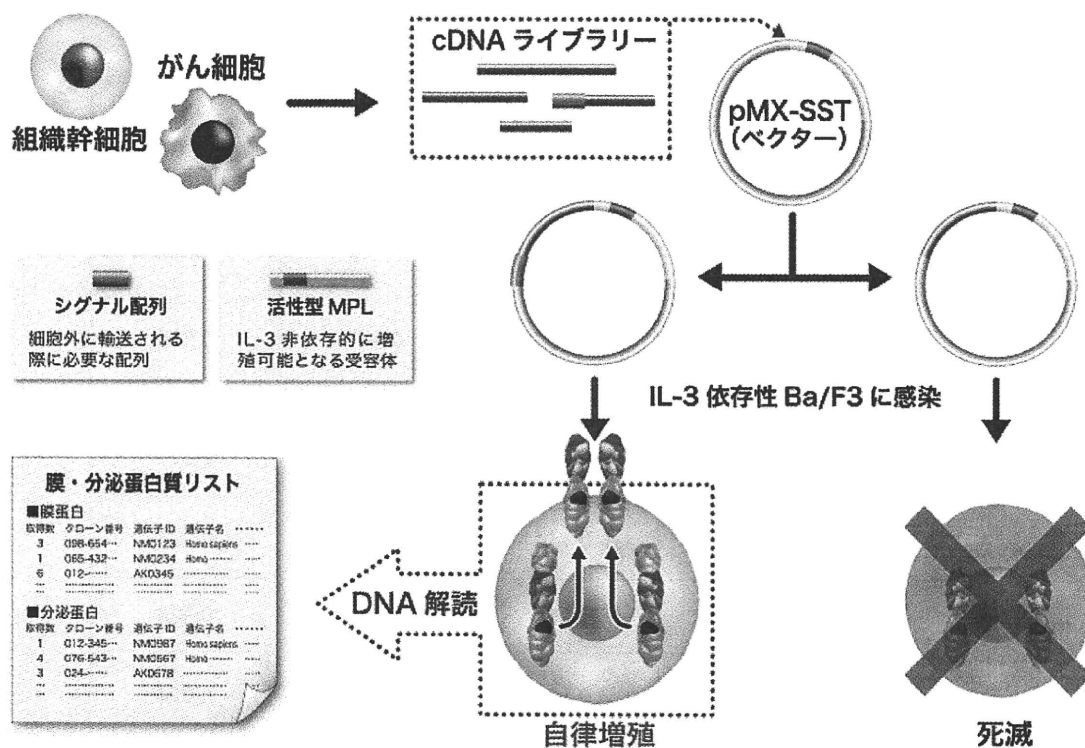
無し。

##### 2 実用新案

無し。

##### 3 その他

無し。



種々の細胞を材料に、レトロウイルスベクター (pMX-SST ベクター) を使用して、膜タンパク質・分泌タンパク質に特化した解析・同定が可能である。

図 1 シグナルシーケンストラップ法 (SST-REX 法)

表1. 各難溶性物質との反応性(OD<sub>450/630</sub>) (n = 2 の生データ)

一次反応 + 二次反応	固相抗原			
	セレウリド	卵黄レシチン	Triton X-114	Tween-80
緩衝液のみ + POD- $\alpha$ -mouse IgG	0.007	0.007	0.007	0.010
①4-11 + POD- $\alpha$ -mouse IgG	0.172	0.175	0.098	0.097
	0.179	0.144	0.162	0.094
②12-9 + POD- $\alpha$ -mouse IgG	0.198	0.118	0.273	0.086
	0.213	0.120	0.169	0.074
緩衝液のみ + POD- $\alpha$ -mouse IgM	0.011	0.009	0.009	0.013
③13-2 + POD- $\alpha$ -mouse IgM	0.075	0.013	0.010	0.013
	0.072	0.012	0.010	0.014

表2 ニワトリ IgY 抗体のセレウス菌嘔吐毒素特異性

IgY 濃度	固相抗原			
	セレウリド	卵黄レシチン	TritonX-114	Tween80
10 mg/mL	5.939	5.946	3.500	2.196
1 mg/mL	5.239	0.821	0.456	0.459
100 $\mu$ g/mL	1.258	0.105	0.086	0.109
10 $\mu$ g/mL	0.150	0.024	0.022	0.023
1 $\mu$ g/mL	0.027	0.012	0.013	0.013
100 ng/mL	0.015	0.012	0.013	0.016
10 ng/mL	0.010	0.011	0.012	0.014
緩衝液	0.011	0.012	0.013	0.018

## 創薬研究における人由来初代細胞および幹細胞の利用 円滑化に向けた研究

所属 国立成育医療研究センター  
臨床研究センター先端医療開発室  
研究者 絵野沢 伸

研究要旨：薬物動態研究の本質的問題として存在する活性の個人差を打ち消すための方法である複数個人に由来する細胞の混合培養の技術的可能性を、50人ならびに3人の混合（プールド）凍結ヒト肝細胞を細胞アレイで培養して検討し、実施可能であることを確認した。フィーダー細胞を用いた三次元培養システム、細胞アレイ（商品名 Cell-able）においてヒト肝細胞を培養する場合のフィーダー細胞として、ヒト羊膜上皮細胞の適性を調べた。アルブミン合成能を肝細胞機能の指標とした場合、他の細胞と比べ遜色のない機能維持が見られた。細胞採取を目的とした肝組織凍結保存の実験系を開発、確立し、解凍肝組織から生きた細胞を分離することができるようになった。ヒト iPS 細胞で、分化誘導後 day 3 もしくは day 4 に PI3K 阻害剤の LY294002 を添加することで、胚体内胚葉で発現する SOX17 及び GSC の mRNA 発現が増加し、胚体内胚葉の効率的な分化に成功した。また、ヒト iPS 細胞からの肝細胞分化誘導を、遺伝子発現の微調整機能を有する non-coding small RNA に求めるため、マウス胎仔肝の分化成熟に関与する microRNA を複数同定した。これらの microRNA はマウス幼若肝細胞の成熟化を明らかに促進した。

### 分担研究者

- |                   |       |
|-------------------|-------|
| (1) 国立がん研究センター研究所 | 落谷孝広  |
| (2) 名古屋市立大学大学院    | 松永民秀  |
| (3) (株) アビー       | 大和田哲男 |
| (4) 田辺三菱製薬 (株)    | 山田泰弘  |
| (5) 東洋合成工業 (株)    | 池谷武志  |
| (6) (株) トランスパレント  | 城村友子  |
| (7) (株) 生物資源応用研究所 | 桜川宣男  |

### A. 研究目的

創薬研究における候補化合物の初期スクリーニングから薬物動態・毒性試験による絞り込みなどの各段階で人由来組織・細胞の使用は必須である。特に新鮮組織から得られる初代細胞は、人本来の機能を有しているため非常に有効な研究材料である。しかしながら、これらの組織・細胞を研究現場で使用するにはいくつかの問題点がある。それは、1) 入手、2) 保存、3) 長期培養、それぞれの困難さである。本研究では、国立成育医療センターの手術摘出肝組織からの肝細胞採取技術効率化、同採取肝細胞および市販凍結人肝細胞を用い、保存と長期培養技術を開発・改良する。保存は食品の冷凍保存の革新的技術である磁界内凍結、CAS 凍結法を発展させる。今までの検討で CAS 凍結によると純水の過冷却曲線に変化が起きることがわかった。そこで、本研究ではこの変化が細胞の凍結に与える効果を検討する。長期培養は、東洋合成工業製作の細胞アレイ基板、Cell Able を用い、トランスパレント社が有する混合培養

プロトコールによる肝細胞の長期機能維持培養法をさらに改良する。今までに、低接着性凍結人肝細胞の培養が可能になり薬物動態研究に使用可能となること<sup>参考文献1</sup>、複数ロットを混合したプールド人肝細胞が個々のロットの薬物代謝活性・誘導能の平均値を示すこと（各ロットの細胞が同程度に接着、培養されていることを示す）<sup>参考文献2</sup>、がわかった。これらの機能維持をさらに長期間安定して続けるための検討を行う。また、新しい接着基質を探索し、フィーダー細胞を使用しない培養法の開発を行う。一方、初代肝細胞に代わり同等かそれ以上の発展性が期待される iPS 細胞からの肝細胞様細胞を分化誘導する方法を開発する。本研究では、通常の再生医療研究で行われる細胞生物学的な肝細胞様分化に留まらず、創薬研究に使用可能な水準の薬物代謝活性、同誘導能、実用に耐えうる細胞数の確保を評価基準として誘導条件を見出す。また、分化細胞を用いた肝がん発症を薬効薬理試験モデルとして検討し、新たな動物実験代替のハイスループットスクリーニング法を目指す。

### B. 研究方法

#### 1) プールド肝細胞の長期培養

50 ドナーをプールドした凍結ヒト肝細胞 (Lot no. 0901227) と浮遊型凍結ヒト肝細胞 (Lot no. 694、713、763) は XenoTech LLC から購入した。培養は三次元培養用細胞アレイ、Cell-able (トランスパレント) を用いた。凍結ヒト肝細胞の解凍ならびに死細胞除去は XenoTech 社のプロトコールによ



た。

Cell-able の使用に際してトランスパレント社のプロトコールに従い、48 時間前に牛大動脈内皮細胞株 HH 細胞を 1 穴当たり  $8 \times 10^3$  細胞播種した。その後、各肝細胞を 1 穴当たり生細胞として  $2 \times 10^4$  細胞播種した。3 ロットを混合する場合は、それぞれのロットについて生細胞が均等に 1/3 づつとなるように調整した。肝細胞播種後 24 時間は肝細胞プレート接着用培地 (KHEM5310、株式会社ケー・エー・シー) を用いた。その後は Williams E 培地 (GIBCO) を基本とし、5%FCS、 $0.1 \mu\text{mol/L}$  デキサメタゾン、 $1 \mu\text{mol/L}$  インシュリン、 $6.25 \mu\text{g/mL}$  トランスフェリン、 $6.25\text{ng/mL}$  セレニウム、 $50 \mu\text{g/mL}$  マトリゲルを含む培地を用いた。

図 1 実験プロトコール

Day-2	フィーダー細胞播種
Day 0	肝細胞播種
Day 1	予備培養
Day 2	予備培養
Day 3	予備培養
Day 4	予備培養
Day 5	予備培養
Day 6	予備培養
Day 7	CYP活性測定(コントロール)
Day 8	予備培養
Day 9	予備培養
Day 10	予備培養
Day 11	(誘導剤暴露開始)
Day 12	(誘導剤暴露24hr)
Day 13	(誘導剤暴露48hr)
Day 14	CYP活性測定(誘導剤暴露72hr)
Day 15	予備培養
Day 16	予備培養
Day 17	予備培養
Day 18	予備培養
Day 19	予備培養
Day 20	予備培養
Day 21	CYP活性測定(誘導剤暴露72hr)
Day 22	予備培養
Day 23	予備培養
Day 24	予備培養
Day 25	(誘導剤暴露開始)
Day 26	(誘導剤暴露24hr)
Day 27	(誘導剤暴露48hr)
Day 28	CYP活性測定(誘導剤暴露72hr)

CYP 活性測定時の反応培地は無血清 Williams E 培地を使用し、山田の基質カクテル法により、CYP 活性ならびに抱合活性を測定した。培養は 28 日間行い、Day7、14、21、28 に CYP 活性ならびに抱合活性を測定した。その途中で Day11 から 14 まで、Day25 から 28 まで、それぞれ 2 回、リファンピシ

ンあるいはオメプラゾールを添加し CYP 誘導能を調べた (図 1 実験プロトコール参照)。対照として解凍当日にも同じ活性測定を行った。

## 2) 新しいフィーダー細胞の検討

細胞アレイ (Cell-able) の使用に際して製造元のトランスパレント社のプロトコールに従い、48 時間前に各種フィーダー細胞を 24 穴プレート 1 穴当たり  $1 \times 10^5$  細胞播種した。フィーダー細胞として、牛大動脈内皮由来細胞株 HH、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF; Neonatal normal human dermal fibroblast)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC; Human umbilical vein endothelial cell)、不死化ヒト羊膜上皮細胞 1 を用いた。対照としてフィーダー細胞を播種しない条件を置いた。肝実質細胞は国立成育医療研究センターにおいて得られる手術摘出検体から分離した。肝細胞は 1 穴当たり生細胞として  $1 \times 10^5$  細胞播種した。

## 3) 細胞採取を目的とした肝組織凍結保存法の検討

家畜ブタ (Large-Yorkshire, Landrace, Duroc 3 系統混合系) 2kg、生後 10 日前後を使用した。吸入麻酔下で腹部切開の後、門脈にカニューレションし、脱血後、全肝を取り出した。取り出した全肝 (120g 前後) に 10% dimethylsulfoxide、10% 牛胎仔血清を含む DMEM 培地を 200mL 灌流し、4 つに分割した。それぞれをビニール袋 (フリーザー用のジッパー付き袋を使用) に入れブライン CAS 槽、 $-30^\circ\text{C}$  低温槽、 $-80^\circ\text{C}$  超低温槽で凍結した。その後、液体窒素容器気相で 48 時間~1 週間保存した後に解凍し、コラゲナーゼ灌流法で肝実質細胞を分離した。組織内温度はデータロガーによって測定した。肝実質細胞の生細胞率はトリパンブルー排除法によった。

## 4) LY294002 による iPS 細胞の内胚葉分化

ヒト iPS 細胞 (#25 : Tic) は、ヒト胎児肺線維芽細胞 MRC-5 に OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC を導入して樹立されたものであり、国立成育医療研究センター研究所梅澤弘明博士より供与された。フィーダー細胞は MEF を使用した。

ヒト iPS 細胞の内胚葉への分化は、ヒト iPS 細胞が培養ディッシュに対し、未分化コロニーの占める割合が約 70% になった状態で開始した。また、分化は 0.5% FBS、100 ng/mL activin A を含む RPMI + GlutaMax medium で 3 日間培養後、2% Knockout Serum Replacement (KSR)、100 ng/mL activin A を含む RPMI + GlutaMax medium で 2 日間培養することで行った。また、LY294002 を dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解したものを最終濃度 1、10、25、50  $\mu\text{M}$  となるように培地に添加した。なお、activin A 処理開始日を day 0 とし、50  $\mu\text{M}$  は day 0 で、その他の濃度は day 1 で添加を開始した。Control は、DMSO が最終濃度 0.1% となるように加えたものを用いた。なお、activin A 処理

開始日を day 0 とし、LY294002 を添加するタイミングを day 2、3、4 と分け、分化を行った。Control としては DMSO が最終濃度 0.1% となるように加えたものを用いた。また bFGF 添加群には、最終濃度 5 ng/mL となるように、培地に bFGF を添加した。

#### 5) 肝細胞の分化誘導技術の効率化

胎生 14.5 日のマウス胎仔肝を摘出後、肝芽細胞を培養し、成熟肝細胞へと分化誘導する過程で、RNA を抽出し、その間に発現変動する microRNA を網羅的に解析した。

#### (倫理面への配慮)

手術摘出検体から得た肝実質細胞については受付番号 385「生体肝移植時に生じる余剰肝等からのヒト肝細胞の分離・保存」および受付番号 396「ヒト肝細胞・組織を用いた創薬研究および肝疾患・病態に関する基礎研究」にて承認済み。それ以外に本研究で用いた市販凍結ヒト肝細胞あるいはヒト由来フィーダー細胞は一般に入手可能なヒト由来試料のため、臨床研究に関する倫理指針でいう「試料」には該当せず、従って本研究は同指針の適応範囲にはならない。動物実験については 2000-001 として申請、審査の後、許可を得た。その他、各分担研究者の所属施設において必要な倫理審査を行った。

### C. 研究結果

#### 1) プールド肝細胞の長期培養

図 2 に 6 種の CYP 活性および 2 種の抱合酵素活性の経日変化を記した。解凍時 (Day0) 活性はすべての場合で 3 ドナープール検体の方が 50 ドナープール検体より高い値を示した。CYP1A2 活性 (A)、CYP2B6 活性 (B)、CYP2C19 活性 (D) は 7 日目以降活性および誘導剤に対する反応性が認められなかった。CYP2C9 活性 (C) は 3 ドナープール検体で検出する活性が持続し、Day14 ではリファンピシンによる活性誘導が見られた。CYP2D6 活性 (E) も 3 ドナープール検体では活性が Day14 まで認められ、さらに CYP3A4/5 活性 (F) は 3 ドナー、50 ドナーそれぞれのプール検体で Day28 まで活性が持続、また Day14 ではリファンピシンによる活性誘導が見られた。薬物代謝第 II 相反応である抱合酵素活性 (UDP グルクロン酸抱合活性 (G)、硫酸抱合活性 (H)) はさらに高い活性が Day28 まで持続した。

#### 2) 新しいフィーダー細胞の検討

3 回の予定手術において、32 歳男性、28 歳男性、39 歳女性の肝組織を得て肝実質細胞を分離することができた。それぞれ生細胞率は 88.2%、86.9%、82.5% であった。これらを 4 種類のフィーダー細胞上ならびにフィーダーのない環境下で 13 日間培養したところ、図 3 に示すようになった。各フィ

ーダー細胞上ならびに無フィーダー細胞培養で大きな相違はなかった。この中で、不死化羊膜細胞との共培養は、ヒト肝実質細胞のアルブミン合成能を比較的高く維持した。不死化羊膜上皮細胞のアルブミン合成能は、 $0.010 \pm 0.001 \mu\text{g}/\text{well}/24\text{hr}$  で、ヒト肝細胞が産生するアルブミンの概ね 1/100 であった。形態観察では、NHDF と不死化ヒト羊膜上皮細胞が肝細胞の生着に優れるようであった。ただし、不死化ヒト羊膜上皮細胞は増殖能が高く、細胞アレイの円形枠内を超えて隣接する細胞集団と交通 (Bridging) することがあった。

#### 3) 細胞採取を目的とした肝組織凍結保存法の検討 最終的に確立した方法を下に記す。

##### <凍結方法>

1. 肝組織に前述の凍結保護剤入り DMEM 培地を血行的に行き渡らせる。
2. その状態で空のビニール袋に入れ、できるだけ空気を出して口のジッパーを閉じる。
3. すでに温度を最低にまで低下させた CAS 凍結槽 ( $-35 \sim -40^{\circ}\text{C}$ ) に 20 分間浸漬して凍結させる。対照としてフリーザー ( $-30^{\circ}\text{C}$ ) または超低温フリーザー ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) に 1 時間放置し凍結させる。
4. 凍結終了後、ただちに液体窒素容器気相に置き凍結保存する。48 時間以上保存した後に、解凍・細胞分離操作を行う。

##### <解凍・細胞分離>

1. 液体窒素液面上 (気相) から室温下に取り出し、そのまま 1 分間放置する。
2. その後、ビニール袋を  $38^{\circ}\text{C}$  温水中で 1 分間加温する。
3. ビニール袋を温水中に保持したまま口を開け、予め  $38^{\circ}\text{C}$  に温めた生理的食塩水 250mL を流し込む。
4. 生理的食塩水が入ったままの状態、 $38^{\circ}\text{C}$  温水中で 7 分間保温する。
5. 解凍された肝組織を取り出し、既報 1 に従いコラゲナーゼ灌流法によって肝細胞を分離する。この時、コラゲナーゼ液に DNase I ( $162.5\text{unit}/\text{mL}$ ) を加える。

この結果、表 1 に示すように高いものでは 64.9% の生細胞率を示し、また生細胞数では  $1 \times 10^7$  細胞を超す例もあった。しかしながら肝組織片重量が 30g 程度であり、新鮮状態で細胞分離を行うと  $10^8 \sim 10^9$  細胞が得られることに比べると回収細胞数はまだまだ少ない。また、これらの値は分離直後であり、培養を開始するとほとんどの肝実質細胞は接着することなく死滅した。

ブタ肝組織を凍結した際の温度変化を図 4A に示した。CAS 凍結槽による温度低下が最も速やかで、 $-80^{\circ}\text{C}$  超低温槽内で同じ温度になるまでの半分以下の時間であった。 $-30^{\circ}\text{C}$  フリーザーでは 1 時間後であっても  $-4^{\circ}\text{C}$  程度であり、組織は凍結していないと考えられた。

解凍プロトコールの検証については図4Bに示す。液体窒素液上(気相)に保存した肝組織を今回のプロトコールによって解凍すると、7分後には解凍が完了していることがわかった。

#### 4) LY294002によるiPS細胞の内胚葉分化

ヒトiPS細胞は、50  $\mu$ MのLY294002添加により細胞死が引き起こされ、mRNAの回収が不可能であった。Day 1での25  $\mu$ M LY294002添加により、内胚葉マーカーであるSOX17、GATA6のmRNA発現が増加した。しかし、胚体内胚葉で発現しているマーカーであるGSCのmRNA発現は減少した。一方、1、10  $\mu$ MのLY294002添加により、分化した細胞の内胚葉マーカーのmRNA発現が、controlであるactivin A単独群と比較して同等、もしくは減少が見られた(図5)。

トiPS細胞は、25  $\mu$ MのLY294002をday 2に添加することで、胚体内胚葉で発現しているマーカーであるSOX17のmRNA発現の増加がみられたが、同じく胚体内胚葉で発現しているマーカーのGSCのmRNA発現は減少傾向が見られた。Day 3もしくはday 4に25  $\mu$ MのLY294002を添加することで、胚体内胚葉で発現しているマーカーのSOX17及びGSCのmRNA発現が増加した。また、day 2以降のLY294002の添加により、分化した細胞のmRNA発現が未分化マーカーや中胚葉マーカーでは変化なし、もしくは増加傾向が見られた。また、ヒトiPS細胞の内胚葉への分化の際、day 0からのbFGF添加により、胚体内胚葉で発現しているマーカーのSOX17及びGSCのmRNA発現の大きな差は認められなかった。

Day 12まで分化させた細胞において、25  $\mu$ M LY294002をday 2に添加した群では、胎児の肝細胞で発現している薬物代謝酵素であるCYP3A7、肝細胞分化初期に発現する $\alpha$ -fetoprotein (AFP)が、controlと比較して減少した。25  $\mu$ M LY294002をday 3に添加した群では、controlと比較してuridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1)、tyrosine aminotransferase (TAT)のmRNA発現が増加したものの、CYP3A7のmRNA発現は減少した。25  $\mu$ M LY294002をday 4に添加した群では、controlと比較してTATのmRNA発現が増加したものの、AFP、forkhead box A2 (FOXA2)、肝細胞マーカーであるalbumin (ALB)のmRNA発現は減少した

#### 5) 肝細胞の分化誘導技術の効率化

マウスの肝芽細胞は0sM等の添加により、10日以内に成熟型の肝細胞へと分化誘導が起きた。この間に124種類のmicroRNAの発現が変動したが、その中で特に本研究で注目したのはmicroRNA148aである。このmicroRNAは肝芽細胞ではその発現が強く抑制されているが、細胞の肝機能の獲得、あるいは成熟化に伴って、顕著にその

発現が上昇した(図6)。

別の解析からこのmicroRNAはヒト間細胞がんでその発現が減少している事が判明している。さらに、予備的な検討から、このmicroRNAを幼若肝細胞へ導入する事により、肝細胞特異的なマーカーが協商した事から、肝細胞の分化あるいは成熟化に有効である事が示唆された。

#### D. 考察

薬物代謝活性には大きな個人差、人種差があると言われている。ヒト肝細胞の場合、複数ドナーの細胞を混合したプールド肝細胞ロットは接着培養ができないことが多い。フィーダー細胞を用いた細胞アレイ培養は接着能が低いロットの長期培養もできるとされ、本来、培養実験に使用できないプールド肝細胞でも培養による薬物動態研究を行える。本研究ではそれが確認された。上市された際には、ごくまれなCYP多型の個人に対して起きる有害事象も問題視される。まれな多型を有する凍結肝細胞は入手困難であるが、幹細胞分化肝細胞様細胞であれば、まれな多型を有するロットの継続的な使用も可能になると考えられる。まれな多型を有するロットだけの実験を組むことは創薬研究の上で現実的ではないが、実際のポピュレーションを再現するプールド細胞が安定的に供給されれば、ヒト集団が示す反応性を培養レベルで再現することも可能となり、より安全な薬剤を効率的に選択できるようになる可能性がある。本研究はそのプラットフォームとして細胞アレイが有効であろうことを示唆するものである。

フィーダー細胞を用いた細胞アレイ培養は肝実質細胞の機能維持に優れ、また低接着性の凍結ヒト肝細胞も培養可能である。今までフィーダー細胞として牛血管内皮由来細胞株IH3が使用されてきたが、ヒト肝細胞の培養にはヒト由来細胞が適すであろうとの考えから、正常ヒト皮膚線維芽細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞、不死化ヒト羊膜上皮細胞のフィーダーとしての特性を調べた。今回は手術摘出肝組織から分離した肝実質細胞を、凍結することなくそのまま播種した。このためか、フィーダー細胞を用いない対照条件でも比較的高いアルブミン合成能を維持した。不死化羊膜上皮細胞をフィーダー細胞に用いると、この対照よりも高いアルブミン産生が見られた。しかしながら、今回の実験では、各値のばらつきが大きく、統計的有意差を示すことはできなかった。これはヒト肝細胞の個人差および分離操作による障害度の差によるものと考えられる。

CAS凍結技術は食品の凍結保存に優れるため、細胞を分離して保存するよりも、組織状態で凍結保存し、解凍後に細胞を分離するプロトコールに適するのではないかと以前より考察されてきた。この考えに基づき卵巣などの組織保存が報告されている。しかしながら、肝組織の場合、凍結解凍処

置によって組織に亀裂が入ることが多く、肝細胞分離の手法であるコラゲナーゼ灌流法ができなくなっていた。今回開発した方法では、解冻を段階的に行い、また温生食を用いることによって解冻時の亀裂発生が抑えられた。また、DNase を添加することにより、破壊された細胞から出た DNA による凝集が阻止され、単離細胞が得られるようになった。解冻組織から分離された細胞にも少なからず生細胞があった。今後の課題としてはこれらの生細胞が培養できるようになることと回収細胞数の増加である。

ヒト iPS 細胞は、50  $\mu$ M LY294002 の添加で細胞死を引き起こした。分化初期の培養条件は、血清の濃度が 0.5% であり、細胞の生存には過酷な環境である。さらに、PI3K 阻害剤である LY294002 は濃度依存的に細胞死を引き起こすことが報告されており、50 $\mu$ M LY294002 の添加では解析不可能であったことから、濃度を低く使用する必要があると思われる。Real-Time RT-PCR の結果より、25  $\mu$ M の LY294002 を day 1 から添加することで、control と比較して SOX17 の mRNA が増加し、GSC の mRNA が減少した。iPS 細胞から内胚葉へ分化を行う際、SOX17 を早期に誘導することで、卵黄嚢を形成する臓側内胚葉 (SOX17+、GSC-) へ、分化開始後あるタイミングで SOX17 を誘導することで、将来肝臓に分化する能力を持つ胚体内胚葉 (SOX17+、GSC+) へ分化することが報告されている。そのため、day 1 に 25  $\mu$ M LY294002 を添加し、分化を行うことで、初期の段階から SOX17 が誘導され、SOX17+、GSC- の臓側内胚葉へ分化する細胞の割合が増加したことが示唆された。LY294002 添加時期の検討では、day 3 もしくは day 4 に LY294002 を添加することで、SOX17、GSC の mRNA 発現が control と比較して増加した。このことから、肝臓へ分化可能な、SOX17+、GSC+ の胚体内胚葉が増加していることが示唆された。しかし、basic fibroblast growth factor (bFGF) の有用性は明らかにならなかった。

SOX17 が増加した day 2、SOX17 及び GSC が増加した day 3、4 に 25  $\mu$ M LY294002 を添加し、day 12 まで分化を行ったところ、control と比較して差がみられないだけでなく、肝芽細胞で発現している AFP などのマーカーが減少している群もあった。LY294002 添加により胚体内胚葉細胞数が増加したことが示唆されたにも関わらず、AFP などのマーカーに差がないか、減少していたことから、LY294002 添加は、ヒト iPS 細胞由来の胚体内胚葉から肝芽細胞、肝細胞への分化効率を上げることがないことが示唆された。肝臓は、胚体内胚葉の一部が近接する心臓中胚葉や横中隔間葉組織からの FGF や bone morphogenetic protein (BMP) のシグナルを受け、肝芽細胞への分化が決定されることで、その発生が開始される。本研究のプロトコルにおいて、内胚葉から肝芽細胞への誘導を行う際、DMSO 単独の処理にて誘導を行っており、FGF や BMP 等の

因子を添加していない。そのため、内胚葉から肝芽細胞、肝細胞へ効率よく分化させるためには、FGF や BMP 等の因子に関してさらに検討する必要がある。

microRNA が肝細胞の分化増殖を制御している可能性については、ある特定のものが効力を発揮していることが *in vitro* の細胞培養実験系から示された。この microRNA は、ヒトの胎児肝臓ではその発現が低いが、成熟した成体の肝臓では数倍に上昇しているデータも獲得した。さらに、予備的なデータとして、この microRNA を未熟型肝細胞へ発現させることで、アルブミン発現や CYP 遺伝子発現を誘導したことから、未分化な stem 細胞からの肝細胞分化を促進する有望な因子である事が判明した。

## E. 結論

薬物動態活性の個人差を打ち消すための方法である複数個人に由来する細胞の混合培養の技術的可能性を、50 人ならびに 3 人の混合 (プールド) 凍結ヒト肝細胞を細胞アレイ培養で検討し、実施可能であることを確認した。

不死化ヒト羊膜上皮細胞は細胞アレイのフィーダー細胞のひとつの候補となることがわかった。

細胞採取を目的とした肝組織凍結の実験系を開発した。凍結し解冻した肝組織から生きた細胞を分離することができるようになった。この肝細胞を培養するには至っていないが、新しい生物資源保存法開発の素地が出来上がった。

ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化には、LY294002 を添加することで SOX17+、GSC+ の胚体内胚葉への効率的な分化に成功した。また、肝芽細胞への分化には day3 の添加が推奨された。

肝細胞の分化誘導や成熟化を制御する microRNA の候補を同定する事に成功した。今後はヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導にこの microRNA が有効かどうかを判定する。

## 【参考文献】

1. Enosawa 他. Application of cell array 3D-culture system for cryopreserved human hepatocytes with low attaching capability. Drug Metab Rev 39:342, 2007
2. Enosawa 他. Successful application of pooled human hepatocytes on 96-well cell array 3D-culture plate for drug-metabolizing enzyme studies in drug discovery. 第 24 回日本薬物動態学会 2009

【謝辞】本研究に対して肝組織をご提供くださいました患者様、ご家族の皆さまに心より感謝いたします。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Miyamoto, Teramoto, Hayashi, Enosawa. Cell Transplant 19;701, 2010
2. ヒト幹細胞の産業応用における法と指針. パイオインダストリー 27;54, 2010
3. 松野直徒、小原弘道、水沼博、武藤真、平野俊彦、絵野沢伸. 臨床における臓器保存方法の最近の進歩 - 持続灌流保存. Organ Biology 17;245, 2010
4. Ochiya T, Yamamoto Y, Banas A. Commitment of stem cells into functional hepatocytes. Differentiation, 79;65, 2010
5. Kawamata M, Ochiya T. Generation of genetically modified rats from embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 107;14223, 2010
6. Chowdhury MM, Katsuda T, Montagne K, Kimura H, Kojima N, Akutsu H, Ochiya T, Fujii T, Sakai Y. Enhanced effects of secreted soluble factor preserve better pluripotent state of embryonic stem cell culture in a membrane-based compartmentalized micro-bioreactor. Biomed Microdevices. 12;1097, 2010
7. 山田泰弘. 創薬段階におけるハイスループット分析技術. 日薬理誌 135;109, 2010

### 2. 学会発表

1. 絵野沢伸、高橋由里子、川口太知、池谷武志. 細胞アレイ、Cell-able 上で形成されたヒト肝細胞スフェロイドのトランスポーター能. 日本組織培養学会第83回大会 岡山 5/20, 21, 2010
2. 高橋由里子、池谷武志、絵野沢伸. 手術摘出肝組織由来新鮮ヒト肝細胞を用いた Cell-able 上スフェロイド培養の肝機能評価. 第17回エイチ・エー・ビー研究機構学術年会 東京 5/21, 22, 2010
3. Enosawa S, Yamada Y, Takatsu H, Suzuki S, Ochiya T. Highly significant CYP activities of hepatocyte-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. The 25th Annual Meeting of the Japan Society for the Study of Xenobiotics (JSSX), 10/7-9, 2010, Omiya 絵野沢伸、山田泰弘、高津久恵、鈴木聡、落谷孝広. ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の肝細胞様細胞への分化 第25回日本

- 薬物動態学会 平成22年10月7-9日 2010年 大宮ソニックシティ (ベストポスター賞受賞)
4. 絵野沢伸、高橋由里子、川口太知、池谷武志. 新規三次元培養基板 Cell-able 上のヒト肝細胞スフェロイドのトランスポーター能. 第37回日本臓器保存生物医学会定期学術集会. 平成22年11月19日~20日 新潟グランドホテル
5. 絵野沢伸. 薬物動態研究における肝細胞スフェロイドの有用性: ラットおよびヒト肝細胞培養の経験から. シンポジウム3 代替法に有用な細胞培養システムへの生物学的アプローチ. 日本動物実験代替法学会第23回大会 平成22年12月3日?5日 北里大学薬学部、東京
6. 落谷孝広. 間葉系幹細胞の生物学的特性の解明と再生医療への応用. 日本医工学治療学会 第26回学術大会 平成22年4月2日~4日 東京
7. 落谷孝広. 肝細胞分化指向性の高いヒト Hepa-iPS 細胞の作製. 第26回日本 DDS 学会学術集会 平成22年6月17日~18日 大阪
8. 落谷孝広. State of the Art of Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cell Therapy. The 4th International Symposium Safety of adipose mesenchymal stem cells and efficacy on spinal cord injury・講演 (2010.6.27-28 京都)
9. 落谷孝広. 脂肪組織に由来する間葉系幹細胞を用いた再生医療の可能性. 第8回長崎障害者支援再生医療研究会 平成22年7月20日~21日 長崎
10. 落谷孝広. 幹細胞による肝臓機能再構築の現状. 日本動物実験代替法学会第23回大会・講演 平成22年12月3日~5日 東京

### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

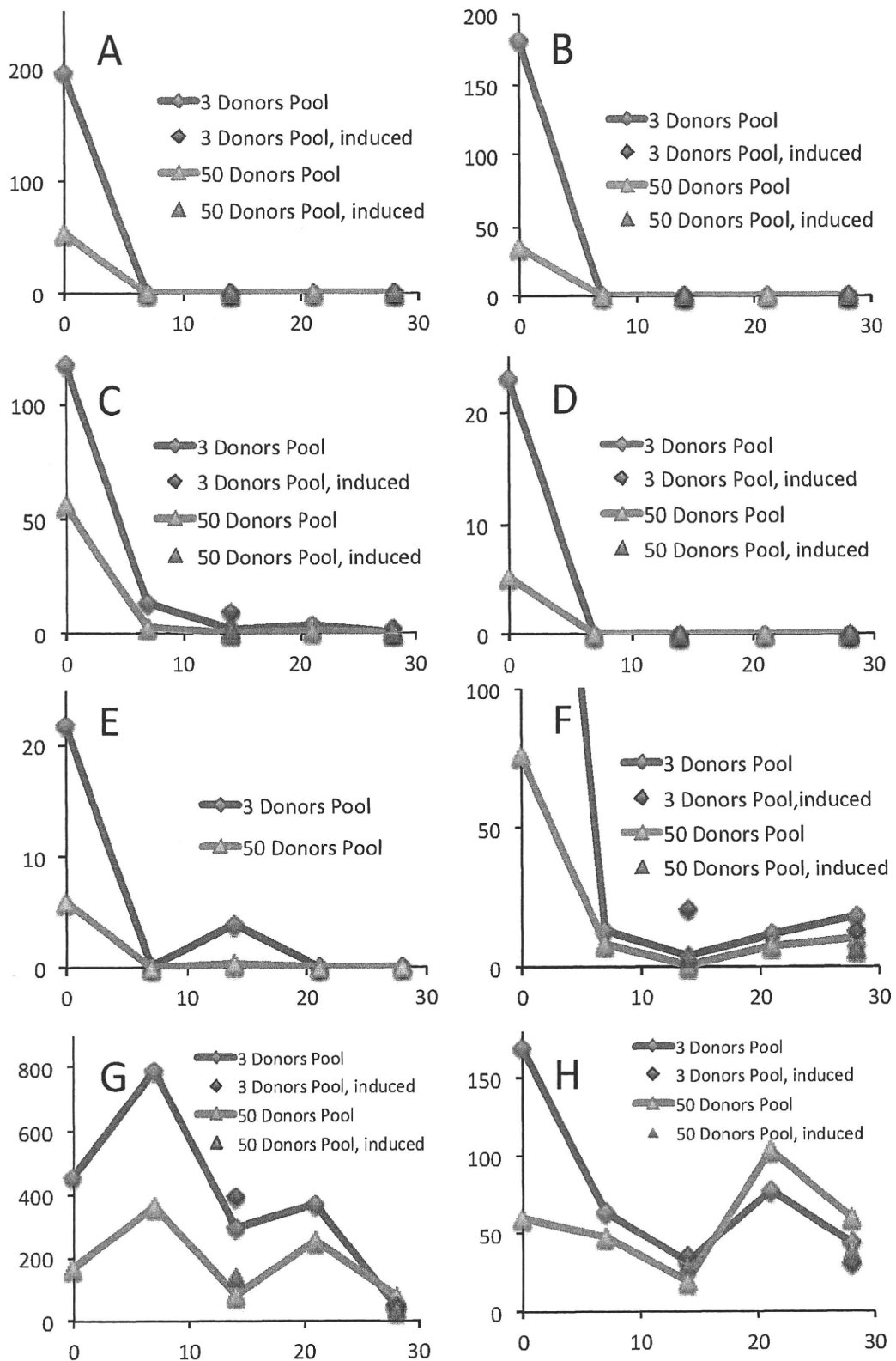


図2 50人ならびに3人に由来するの肝細胞の混合培養(プールド肝細胞培養)における各種薬物代謝酵素活性の経日変化。A; CYP1A2 活性, B; CYP2B6 活性, C; CYP2C9, D; 2C19, E; CYP2D6 活性, F; CYP3A4/5 活性, G; UDP グルクロン酸抱合活性, H; 硫酸抱合活性。

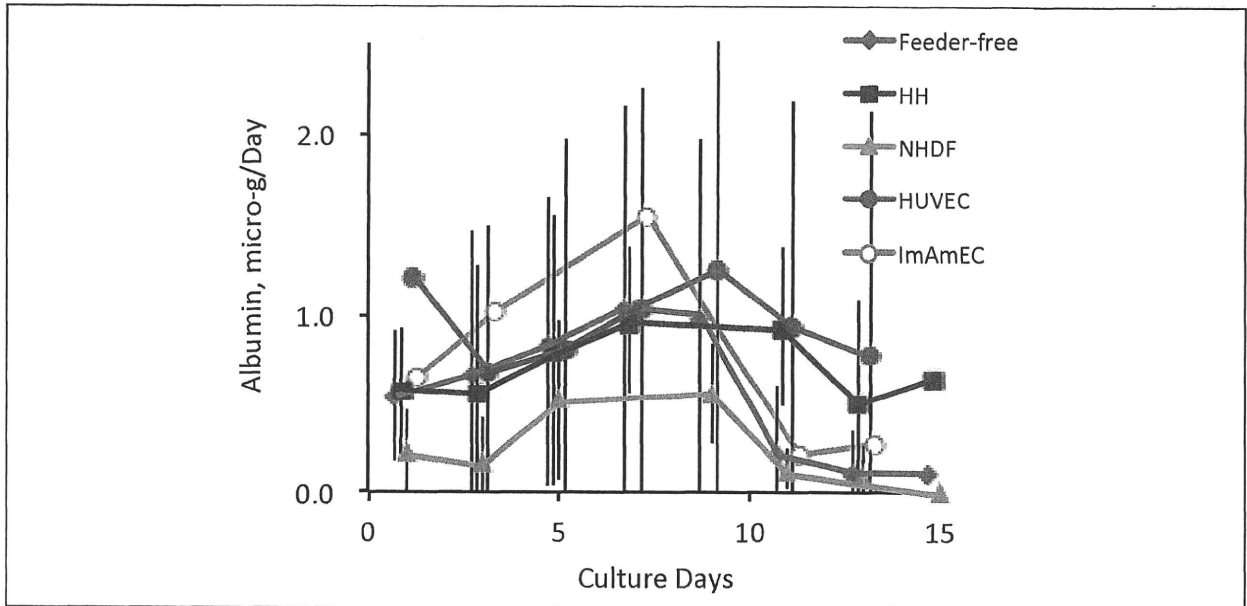


図3 フィーダー細胞の違いによる初代ヒト肝細胞のアルブミン産生能の比較。Feeder-free ; フィーダー細胞なし、HH ; 牛大動脈内皮細胞株 HH、NHDF ; 正常ヒト皮膚線維芽細胞、HUVEC ; ヒト臍帯静脈内皮細胞、ImAmEC ; 不死化ヒト羊膜上皮細胞。培養は細胞アレイ (Cell-able、24 穴タイプ) を用いた。バーは標準偏差。

表1 各試行時の条件ならびに回収された肝実質細胞の生細胞率と生細胞数。CAS の次にある番号は目盛値。

No.	1	2	3	4	5	6	7
組織外保存液量	保存液中に浸漬	少量	なし	なし	なし	なし	なし
保存条件	-80°C	LN2気相	←	←	←	←	←
Dnase添加	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり
温生食による解凍	なし	なし	あり	あり	あり	あり	あり
灌流法	ポンプ	手動	手動	手動	手動	手動	手動
CAS0				44.2% 9.90 × 10 <sup>5</sup>		21.5% 9.50 × 10 <sup>5</sup>	37.1% 6.24 × 10 <sup>6</sup>
CAS3	78.6% 7.00 × 10 <sup>6</sup>	36.9% 1.84 × 10 <sup>6</sup>	64.9% 1.07 × 10 <sup>7</sup>		44.9% 6.48 × 10 <sup>6</sup>	54.4% 5.54 × 10 <sup>6</sup>	31.4% 4.40 × 10 <sup>6</sup>
CAS6			42.6% 2.37 × 10 <sup>6</sup>		37.8% 7.00 × 10 <sup>4</sup>	7.2% 2.10 × 10 <sup>5</sup>	35.3% 1.31 × 10 <sup>7</sup>
-80°C					54.5% 9.00 × 10 <sup>4</sup>		
-30°C			11.7% 3.30 × 10 <sup>5</sup>				

図4 プタ肝組織をCAS槽、-30°C冷凍庫、-80°C超低温槽にて凍結した場合の組織内温度変化(A)と解凍時の組織内温度変化(B)

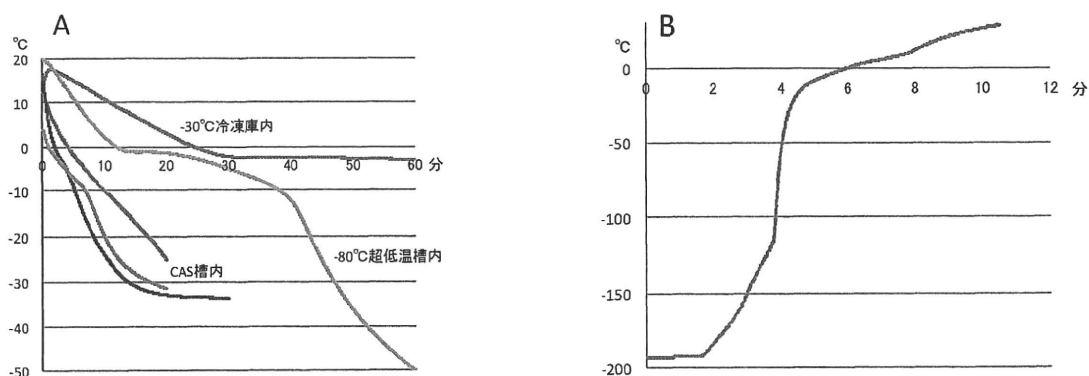


図5 Real time PCRによるヒトiPS細胞の内胚葉マーカーの測定。3回の実験の平均±SD。

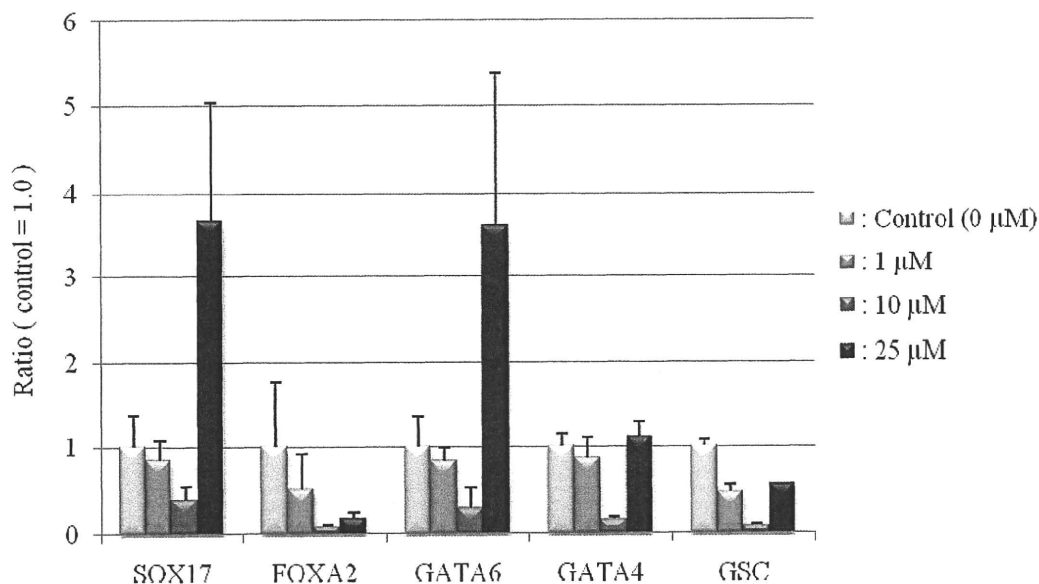
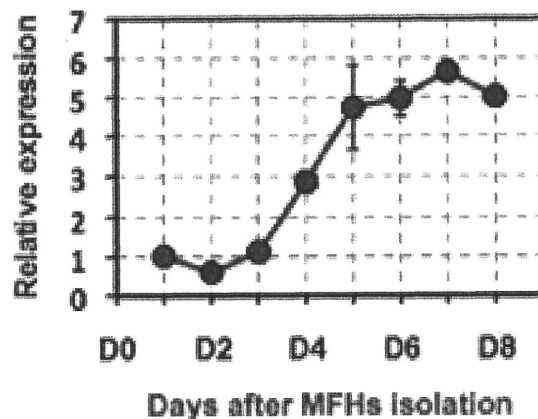


図6 肝細胞の成熟に伴って変動するmicroRNA: 特定のmicroRNAは、肝芽細胞(MFH)の成熟化に従い発現が増大する。





## 国内におけるヒト正常細胞分譲システム網の確立

所属 国立医薬品食品衛生研究所  
研究者 小島 肇

研究要旨：国内におけるヒト正常細胞分譲システム網を確立するため、HS 研究資源バンクを介した供給網の検討を進めるとともに、国内において日本人由来細胞を用いる利点を明確にするため、角化細胞及び血管内皮細胞を用いた人種差の検討を進めた。

### 研究分担者

- (1) 埼玉医科大学産婦人科 石原 理
- (2) (独) 医薬基盤研究所生物資源研究部 増井 徹
- (3) (独) 農業生物資源研究所 竹澤俊明
- (4) 藤田保健衛生大学医学部 赤松浩彦
- (5) コージンバイオ(株)品質保証部 山田進一
- (6) (株)ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング研究開発部 加藤雅一
- (7) 和光純薬工業株式会社試薬開発本部 糸 博之
- (8) 日本メナード化粧品(株)総合研究所 水谷宏

### A. 研究目的

近年、医薬品・化粧品等の開発のために用いる試験においては、動物福祉の社会的な普及に加え、コスト低減及び研究開発の迅速化のため、*in vitro* 研究や動物実験代替法の必要性が増している。その *in vitro* 実験の中核をなすヒトの正常細胞、株細胞、酵素などの製品は、ほとんどは、American Type Culture Collection (ATCC) や Cambrex など欧米から輸入されているものである。しかし、使用する国内の研究者達は、価格が本国の倍以上するものやロットが選べない、入荷までに時間は掛かるなど不利益を被らされている。

また、人に対する効果、副作用は、抗癌剤ハーセプチンなどのように、人種差により異なるものがあり、細胞レベルでも欧米人のものに比べて、日本人の細胞は異なると予想している。そのため、医薬品・化粧品メーカーでは日本人の細胞を使用したいというニーズがあり、その市場は、2001年に4-5億円であり、今日、潜在的にはiPS細胞、ES細胞も含めて1兆円規模と予想している。

一方、国内のヒト組織・細胞の分譲は、ヒュ

ーマンサイエンス (HS) 財団、理化学研究所・細胞銀行、医薬基盤研・細胞銀行、HAB 研究機構が行っているが、その利用は一部の大学研究機関・製薬企業など限定的なものに留まっている。

今回、我々は、HS 財団・研究資源バンクの活動をより活性化し、国内でより簡便で豊富な日本人の細胞材料を提供可能にするとともに、日本人の細胞を用いる利点が明確にならなければいけない。そのために、日本人種と欧米人種の細胞を用いた比較研究から、種差を生化学的・遺伝的な観点から明らかにするとともに、細胞及びそれらを用いた評価方法（測定キット化）を構築し、産官学共同で分譲システムを強化・確立することを検討した。

### B. 研究方法

#### B-1) 組織・細胞の供給

##### B-1-1) 日本人に由来する臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) の安定的確保

HUVEC を国内で入手するために必要な、臍帯を確保することなど、研究遂行のための環境整備について検討し、実際に準備を開始した。

まず、臍帯の具体的な入手手続きについて検討し、埼玉医科大学病院における分娩時に、産婦から臍帯の提供を受ける可能性を追求するために、必要な事項を抽出した。

この検討を経て、1) 政策創薬総合研究事業「国内におけるヒト正常細胞分譲システム網の確立」に対する臍帯組織提供の研究プロトコール、2) 臍帯の提供を要請する患者あての説明書、及び 3) 患者の同意書を作成した。そして、埼玉医科大学病院アイ・アール・ビーへ、平成 22 年 9 月 3 日付けで、これら三点の書類とともに、倫理審査のための申請書を提出した。

##### B-1-2) 正常皮膚組織の安定的確保

財団法人ヒューマンサイエンス振興財団により、

分譲が行われている国内のヒト組織・細胞では、正常皮膚組織に関しては提供されていない。そこで、正常皮膚組織を供給できる施設を調査、選定し、倫理面等の環境整備をした後、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団細胞バンクに登録した。

### B-1-3) 角化細胞及び血管内皮細胞の収集

角化細胞について、白人種の細胞は、Lonza社製の初代培養を購入し、同様にコージンバイオで凍結細胞(30本)に加工した。アジア人種は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクで得られた組織を、コージンバイオで凍結細胞に加工した。これらの角化細胞(白人種、アジア人種)をJ-TEC及びメナードに送った。

血管内皮細胞について、白人種の細胞は角化細胞と同様にLonza社製の初代培養を購入し、コージンバイオで凍結細胞に加工した。アジア人種は、臍帯を埼玉医大から組織バンクに送り、コージンバイオで凍結細胞に加工した。

## B-2) 細胞を用いた検討

### B-2-1) 角化細胞を用いた有効性及び安全性試験に関する人種差検討

#### B-2-1-1) 細胞及び培養方法

角化細胞は、コージンバイオ株式会社から入手した日本人と白色人種由来細胞のそれぞれ1ロットを使用した。凍結保存された角化細胞を解凍した後、6cmシャーレにて単層培養を行った。培地はクラボウHuMedia-KG2を使用した。

#### B-2-1-2) 遺伝子発現解析方法

各角化細胞を50-70%コンフルエントになるまで培養した後、Isogen(日本ジーン)を用いて細胞よりRNAを回収した。その後、SuperScriptIII Platinum SYBRGreen Two-step RT-PCR kit (Invitrogen)を用いて、RT-PCR法により involucrin, filaggrin, keratin10, hyaluronan synthase 3 (HAS3) 及び serine palmitoyltransferase (SPT) の遺伝子発現解析を行った。内部標準遺伝子として GAPDH を用い、ddCt法により、それぞれの遺伝子について、日本人由来角化細胞の遺伝子発現量に対する白人種由来角化細胞の遺伝子発現量の比率を算出した。

## B-2-2) 3次元培養表皮モデルの構築

### B-2-2-1) ヒト表皮細胞

本年度の検討で用いた白人、あるいは日本人のヒト表皮細胞は、分担研究者であるコージンバイオ株式会社から提供された。

### B-2-2-2) 単層培養による表皮角化細胞の増殖

提供された表皮角化細胞の増殖能について、単層培養法により検討した。単層培養では、表

皮幹細胞を維持する目的で、表皮角化細胞をマウス胎児由来線維眼細胞様細胞株 3T3-J2 フィーダー細胞とともに共培養した。3T3-J2細胞は、X線照射により、細胞増殖能を停止させた後、3T3-J2 フィーダー細胞として表皮角化細胞との共培養に供した。培地はアッセイ培地(ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング, 日本)を用いた。培地交換は、2日毎に行った。表皮角化細胞がセミコンフルエントに到達したら、0.05%トリプシンを用いて表皮角化細胞を剥離、回収して、継代単層培養、あるいは気液界面での3次元培養に供した。

### B-2-2-3) 気液界面での表皮角化細胞の3次元培養

凍結表皮角化細胞(継代数 0: P0)、あるいは単層培養/継代により増殖させた表皮角化細胞(掲題数 1, 2: P1, P2)を24ウェル培養プレート(BD biosciences, USA)上に設置したセルカルチャーインサート(BD biosciences, USA)内に播種した。24ウェル培養プレート内(セルカルチャーインサート外面)に、アッセイ培地を添加し、5%CO<sub>2</sub>、37°C条件下の培養インキュベーター内で培養を開始した。培養開始1日目にセルカルチャーインサート内の培養上清を吸引除去し、気液界面での培養条件とした。培地交換は毎日行い、培養上清を生理活性因子産生量測定のため回収した。培養期間は7日から21日間とし、培養後の倍表皮組織は、組織評価に供した。

### B-2-2-4) 組織評価

培養後の3次元培養表皮組織を10%ホルマリンに浸漬し、培養表皮組織を固定した。その後、パラフィンに包埋し、5μmの薄切標本を作製後、ヘマトキシリン及びエオジンによる染色を行い、それぞれの培養表皮組織の構造を顕微鏡視下にて確認した。

### B-2-2-5) 生理活性因子産生量の定量

培養上清中に産生される下記に示す生理活性因子の産生量をELISA kitを用いて測定した。測定した生理活性因子は、interleukin-1alpha (IL-1α), IL-1β, vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor beta1 (TGF-β1), TGF-β2, tumor necrosis factor (TNFα), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IL-8, keratinocyte growth factor (KGF), platelet-derived growth factor (PDGF), prostaglandin E2 (PG-E2)であり、それぞれR&D systems、あるいはinvitrogen社のキットを用いた。

### B-2-3) 3次元培養血管内皮モデルの構築

#### B-2-3-1) コラーゲンビトリゲル薄膜チャンパー

## の作製

4℃で等量の 0.5% I 型コラーゲン水溶液〔CELLGEN I-AC, (株)高研製〕と培養液〔10% 非動化ウシ胎仔血清 (FBS)、20 mM HEPES、100 u/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシンを含有するダルベッコ改変イーグル培養液 (DMEM)〕とを混合して、0.25% I 型コラーゲンのゾルを作製した。この 0.25% I 型コラーゲンのゾルを培養皿の底面に敷いたパラフィルム上に単位面積 (1.0 cm<sup>2</sup>) 当たり 0.2 ml 注入し、これを 37℃ で 2 時間保温して、培養皿内でゲル化させた。培養皿内でゲル化が完了した後、培養皿ごと温度 10℃、湿度 40% の恒温恒湿機内に移し入れて 2 日間維持することで、ゲル内の自由水を乾燥除去した後にガラス化を開始した。PBS で再水和したコラーゲンビトリゲル薄膜をパラフィルムとともに再乾燥することで、再度、自由水を乾燥除去してガラス化を開始した。このようにして、パラフィルムに吸着したコラーゲンビトリゲル薄膜乾燥体を作製した。

次に、プラスチック製円筒 (内径: 11mm, 外径: 15mm, 長さ: 15mm) の片側に接着剤を塗布してコラーゲンビトリゲル薄膜乾燥体に貼り付け、円筒よりはみ出る部分を切断除去するとともに反対側にハンガーとなるプラスチック製スティック 2 本を付着した後、パラフィルムを剥離することで 12 ウェルプレート用のコラーゲンビトリゲル薄膜チャンバーを作製した。

### B-2-3-2) ヒト血管内皮細胞の培養と観察

ヒト血管内皮細胞は、コージンバイオ (株) から提供のあった臍帯より分離した初代培養由来細胞 4 株【日本人由来 J-1 株 (Lot: FOR091111), J-2 株 (Lot: FOR100108), 白人由来 W-1 株 (Lot: FOR100930T), W-2 株 (Lot: FOR101005T)】、及びクラボウより購入した新生児包皮より分離した初代培養由来細胞株【正常ヒト微小血管内皮細胞 HMVEC 株 (Cat: KE-4209)】を、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベータ内で各々のメーカーの培養液で培養した。

また、コージンバイオ (株) から提供のあった細胞 4 株については、ゼラチンコートしたプラスチック培養皿上で培養した細胞を経時的に位相差顕微鏡で形態を観察するとともに増殖性を確認した。

### B-2-3-3) ヒト血管内皮細胞の 3 次元培養

3 次元培養は 12 ウェルプレートの各ウェルにコラーゲンビトリゲル薄膜チャンバーを挿入した後、チャンバー内には播種密度が 6.0x10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> (J-1 株, J-2 株, W-1 株, W-2 株) あるいは 1.0x10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> (HMVEC 株) となるようにヒト血管内皮細胞を懸濁した培養液 0.5ml を注入するとともに、チャンバーの外側には培養液を 1.5 ml ないしは 2.0ml 注入して、37℃、5%

CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養を開始した。培養液は 2~3 日に一度の割合で新鮮な培養液に交換した。

また、J-2 株, W-1 株及び W-2 株については培養 6 日目、HMVEC 株については培養 7 日目にホルマリン固定した後、ヘマトキシリン・エオシン染色して光学顕微鏡でコラーゲンビトリゲル薄膜上の細胞形態を観察した。

### B-2-3-4) TEER 測定によるバリア機能の評価

コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー内に 3 次元培養したヒト血管内皮細胞 5 株のバリア機能の構築を経時的に定量解析するために、ミリボア社製の Millicell-ERS (Electrical Resistance System) を用いて電極をチャンバー内外に挿入することで TEER 値を測定した。

## B-3) 調査と情報収集

### B-3-1) 角化及び血管内皮細胞と培地のセット化による製品化と流通

日本製薬工業協会の 30 社にヒト組織・細胞の利用状況と要望に関するアンケートを配布した。回収されたアンケート結果を項目毎にまとめた。

### B-3-2) 倫理問題の改善と確認

ヒト細胞の利用に関して各方面からの情報を得ると同時に、製薬工業協会の協力の元に、3 人の委員の選出を得て倫理問題に関する委員会を作った。

#### (倫理面への配慮)

細胞については、それぞれ、法の遵守等の原則を遵守、無償提供の原則、利益還元の原則、発明に基づく工業所有権の尊重等点に留意し、臍帯と皮膚の提供者に対して Informed Consent を得たものを供給した。

本報告に係る研究では、製品化されていないヒト初代培養に由来する角化及び血管内皮細胞株を HS 研究資源バンクからコージンバイオ (株) を通して提供を受けるため、ヒト由来試料を用いた研究の実施に関してそれぞれの倫理審査委員会に申請し、同委員会の審査及び承認を得て行った。

## C. 研究結果

### C-1) 組織・細胞の供給

#### C-1-1) 日本人に由来する臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) の安定的確保

本申請については、平成 22 年 9 月 6 日に埼玉医科大学病院アイ・アール・ビーにおいて、慎重な審議が行われ、同年 10 月 15 日付けで、承認 (通知番号 10-039-1) とされた。

#### C-1-2) 正常皮膚組織の安定的確保

福井県済生会病院から財団法人ヒューマンサ

イェンス振興財団への正常皮膚組織の供給に関し、福井県済生会病院の倫理審査委員会は承認した。福井県済生会病院より財団法人ヒューマンサイエンス振興財団細胞バンクにヒト組織譲渡申請書が既に提出されている。

### C-1-3) 角化細胞及び血管内皮細胞の収集

研究に使用する白人種の組織の入手については、米国細胞メーカー (Lonza 社等) から初代培養細胞 (白人種) を購入し、研究用の細胞を製造した。

また、アジア人種 (日本人) の組織の入手について、コージンでも入手先を検討し、臍帯を直原クリニック (大阪)、皮膚をドクターズパクリニック (東京) から入手することとした。

その結果、血管内皮細胞は、2本の日本人臍帯から2ロット分 (約15本/ロット)、白人の初代培養血管内皮細胞から2ロット分 (約15本/ロット) の細胞が得られた。

同様に日本人の皮膚から2ロット分 (約15本/ロット)、白人初代培養細胞から2ロット分 (約15本/ロット) の細胞が得られ、それぞれ分担研究者に3本づつ送付した。

得られた細胞は、細胞数、増殖速度、無菌性、マイコプラズマ否定試験、ウイルス (HBV、HCV、HIV) 否定試験、長期継代培養を実施した。

## C-2) 細胞を用いた検討

### C-2-1) 角化細胞を用いた有効性及び安全性試験に関する人種差検討

白人種由来角化細胞の involucrin, filaggrin 及び HAS3 mRNA 発現量は日本人由来角化細胞よりも多く、keratin10 及び SPT mRNA 発現量は少なかった。

### C-2-2) 3次元培養表皮モデルの構築

#### C-2-2-1) 単層培養による表皮角化細胞の増殖

白人、あるいは日本人由来の表皮角化細胞を、3T3-J2 フィーダー細胞との共培養による単層培養し、その増殖能について検討した。日本人由来の表皮角化細胞では P1, P2 継代時における細胞数がそれぞれの播種細胞数の約 10 倍と十分な細胞増殖を認めた。一方、白人由来の表皮角化細胞は、P1 では約 5 倍の細胞増殖が認められたものの、P2 では約 2 倍程度の細胞増殖に留まった。

一方、日本人、白人由来表皮角化細胞の P1 継代前の細胞形態は、老化したと思われる大型化した細胞が多く出現しており、幹細胞の特徴的な形態である小型円形細胞で構成されるコロニーは培養面の半分程度と少なかった。白人由来表皮角化細胞は、P2 継代前ではほとんど増殖し

ておらず、大型化した老化細胞様細胞が多数出現した。コージンバイオから供給された表皮角化細胞の各ロットは、いずれも老化細胞が含まれており、その中でも白人由来の細胞はより老化細胞が多く含まれていると思われる。

#### C-2-2-2) 表皮角化細胞の3次元培養

白人、あるいは日本人由来の表皮角化細胞を、気液層界面で培養し、3次元表皮組織の再構成を試みた。凍結保存細胞を単層培養せず、そのまま再構成すると、角質層を含むヒト表皮組織に類似した3次元組織構造を再現できた。角質層や細胞層は日本人由来表皮角化細胞を用いた場合が白人由来細胞よりも厚かった。P1の日本人由来表皮角化細胞を用いた場合の3次元組織培養では、脱核していない細胞を含む不全角化を認め、培養21日目には細胞層が消失した。一方、P2の日本人由来表皮角化細胞、及びP1, P2の白人由来表皮角化細胞は、いずれも角質層を全く形成せず、異形状細胞を多数含むヒト表皮組織とは異なるランダムな3次元組織構造を形成した。

#### C-2-2-3) 培養過程における各種サイトカインの産生

3次元培養過程における各種サイトカインの培養上清中への産生について、各 ELISA kit を用いて測定した。IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、VEGF は測定限界以下となり、白人、日本人間の差を確認することができなかった。TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TNF- $\alpha$ 、IGF-1、IL-8、KGF、PDGF、PG-E2 については、現在解析を進めている段階である。

### C-2-3) 3次元培養血管内皮モデルの構築

#### C-2-3-1) コージンバイオ (株) のヒト血管内皮細胞4株の形態と増殖性

日本人由来 J-1 株は肥大化した敷石状形態の細胞が混在して他の3株に比べ増殖が遅く、増殖した紡錘状形態の細胞は培養10日目には凝集して浮遊した。また、日本人由来 J-2 株、白人由来 W-1 株及び W-2 株は良好に増殖したが、いずれの細胞株も敷石状形態の細胞に紡錘状形態の細胞が混在していた。

#### C-2-3-2) コラーゲンビトリゲル薄膜上のヒト血管内皮細胞4株の形態

HMVEC 株はほぼ均一なサイズの敷石状形態の細胞像を呈した。日本人由来 J-2 株は紡錘状形態の細胞像、また、白人由来 W-1 株及び W-2 株は肥大化した敷石状形態の細胞像が混在した不均一な細胞像を呈した。

#### C-2-3-3) ヒト血管内皮細胞のバリア機能

コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー内に3次元培養した HMVEC 株では、培養初期より3日目までに上昇した TEER 値が培養7日目まで維持された。しかし、日本人由来の J-1 株と J-2 株及び白