

IgE 抗体価を調べる受託検査を請け負っている企業では、真菌アレルギーについては10種についての成績を提供している。ただし、その際の抗原は、培養上清を材料としており、不純物を含んでいる。同企業では、診断率の向上のため、オプションとして組換え真菌アレルゲンを作製、検査を行っている。ただし、その数は3菌種8タンパク質に留まっている。登録されている真菌アレルゲンは100種に近い。組換えタンパク質を作製し、抗体を供給できれば、大きな販売市場があるだけでなく、真菌アレルゲンの比較や交差性等、学術的にも大きく貢献できる可能性が示唆された。

5 組換えマラセチアアレルゲンの作製

組換え真菌アレルゲン作製にかかる作業量や技術的困難さを測るため、酵母アレルゲンの1種 Mala f 2 アレルゲンの組換えタンパク質作製を試みた。同アレルゲン遺伝子は塩基配列が公開されており、人工遺伝子の合成、プラスミド挿入、大腸菌の形質転換、組換えタンパク質の発現まで、約1週間で終了した。1Lの大腸菌培養から、精製標品を得るのは3日で終了し、塩基配列の登録さえあれば、短期日で組換え真菌アレルゲンが調製できることが明らかになった。

D 結論

セレウス菌に対する網羅的抗体作製技術を利用しての検査薬開発には、今後も時間がかかることが予想された。セレウス菌嘔吐毒素の強い疎水性は、抗原抗体反応を障害する大きな要因となっており、遺伝子工学的手法でモノクローナル抗体を改変しても抗体の

反応性の向上は見られず、ウサギ IgG 抗体、およびニワトリ IgY ポリクローナル抗体を用いて検査薬を開発するほうが、有効性が高いことが示された。市販されている嘔吐毒素産生性セレウス菌を検査するイムノクロマトキットの妥当性を検証したが、有効だと判ぜられた。一方、真菌アレルゲンを検査薬開発の対象とした場合、産業的にも学術的にも、大きな貢献の可能性が認められた。とくに、組換え真菌アレルゲン作製は、短期間で作業が完成でき、試薬開発を短期間かつ効率よく展開できるものと予想された。

E 文献

- 1) Simon-Nobbe, B., Denk, U., Pöll, V., Rid, R., Breitenvach, M. (2008) The spectrum of fungal allergy, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 145:58-86.
- 2) Allergen Nomenclature Homepage; IUIS Allergen Nomenclature Sub-committee; <http://www.allergen.org/index.php>

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
研究代表者 絵野沢 伸

研究要旨 創薬研究の基盤を形成するため、手術摘出検体からのヒト初代肝細胞の研究利用方法の拡大と、幹細胞分化肝細胞の創薬研究への応用可能性を検討した。ヒト初代肝細胞に関する研究では、手術摘出ヒト肝組織を凍結保存後に生細胞を分離する技術の開発、細胞アレイ (Cell-able) を利用した Feeder-free ヒト肝細胞長期培養の確立、接着性の低い凍結ヒト肝細胞の細胞アレイ (Cell-able) 上培養の検討、手術摘出肝組織の大型薄切標本によりマクロからミクロまでの連続的な観察が可能となる系 (全肝 thin slice法) の確立を行った。ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化誘導研究では、肝細胞分化における培養条件の最適化 (途中継代及び3次元培養)、分化誘導を規定する可能性のある肝臓発生初期過程の non-coding RNA 候補のスクリーニング系立ち上げを行った。

研究分担者

- | | |
|------------------|-------|
| (1) 国立がん研究センター | 落谷孝広 |
| (2) 名古屋市立大学 | 松永民秀 |
| (3) 東京医科大学 | 土田明彦 |
| (4) 株式会社アビー | 大和田哲男 |
| (5) 田辺三菱製薬株式会社 | 山田泰弘 |
| (6) 東洋合成工業株式会社 | 池谷武志 |
| (7) 株式会社トランスパレント | 城村友子 |

A. 研究目的

創薬研究に必須のヒト由来初代肝細胞・組織の保存と長期培養技術を、国立成育医療研究センターの手術摘出肝組織および市販凍結人肝細胞を用い、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 CAS 凍結法を発展させる。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ヒト肝細胞向けに改良する。一方、初代肝細胞に代わり発展性が期待される幹細胞からの肝細胞様細胞分化誘導法を開発・改良し、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めざす。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法をめざす。

B. 研究方法

1) 手術摘出肝組織からの肝実質細胞採取効率化 (絵野沢)

雄性 SD ラット (200~300g) を用い、エンフルラン麻酔下で開腹の後、門脈から灌流液、コラゲ

ナーゼ液を流し、肝細胞を分離した。肝実質細胞の生細胞率、生細胞数はトリパンプルー排除法により計測した。温阻血は門脈カニューレションの後に肝門部の門脈、肝動脈を結紮することによった。灌流液は、Ca²⁺、Mg²⁺ free-Hanks 液、生理的食塩水、クエン酸加ユーロコリンズ液を用いた。

2) 人組織・細胞の凍結における CAS 装置の評価 (大和田、絵野沢)

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。それぞれを丈夫なビニール袋 (フリーザー用のジッパー付袋) に入れブライン CAS 槽、-30℃低温槽、-80℃超低温槽で凍結した。その後、液体窒素中で 3~15 日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プルー排除法によった。

3) 三次元培養ならびに混合培養の創薬研究上の価値評価 (池谷、城村、絵野沢)

凍結ヒト肝細胞は Xenotech (lot HC2-6, HC5-7), IVT (lot TSF, GHA) を使用した。培養は三次元培養用細胞アレイ、Cell-able を用いた。

Cell-able の使用に際してフィーダー細胞を使用する場合は、肝実質細胞播種の 48 時間前に牛

大動脈内皮細胞株 HH (JCRB0099)、マウス 3T3 細胞 (CCL92 および CCL163)、サル網膜上皮細胞 (CRL1780) を 1 穴当たり 8×10^3 細胞播種した。その後、肝実質細胞は 1 穴当たり生細胞として 2×10^4 細胞播種した。培地は RM101 (トランスパレント社) を用いた。培養は 14 日間行い、Day3、7、14 に CYP 活性 (テストステロン 6β 水酸化、フェナセチン脱エチル化) ならびに抱合活性 (グルクロン酸抱合) を測定した。代謝産物の測定は微量高速液体クロマトグラフィー (UPLC) を用いた。誘導実験では培養途中の Day 4 から 7 まで、Day 11 から 14 まで、それぞれリファンピシンあるいはオメプラゾールを添加し培養後、CYP 活性を調べた。

4) 接着性の低い凍結ヒト肝細胞の細胞アレイ (Cell-able) 上培養の検討 (山田)

プレート接着型凍結ヒト肝細胞 (Lot 808 817、XenoTech LLO、浮遊型凍結ヒト肝細胞 (Lot HCF-8、HC2-6、同) を 96 穴タイプ Cell-able で培養した。フィーダー細胞 (マウス 3T3) ならびに肝細胞の培養は前項と同様の方法で行った。同時にフィーダー細胞のない (feeder-free) 条件下での肝細胞培養も行った。対照は通常のコラーゲンコート 96 穴プレートで培養した。培地は RM-101 (トランスパレント) を用いた。CYP 活性測定にはプローブ基質として Phenacetin、Bupropion、Diclofenac、(S)-Mephenytoin、Bufuralol、Midazolam を用いた。薬物代謝酵素誘導にはオメプラゾール (OMP) とリファンピシン (RIF) を用いた。CYP 活性は高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて、上清中の基質代謝物を定量することにより求めた。

5) 手術摘出肝組織における微小転移の診断に向けた標本作製法の開発 (土田)

手術で切除した肝組織を細切することなくホルマリンに浸け、アルコールで脱水した (部分切除程度は数日、葉切除は 4 週間程度)。3.5%の寒天溶液を沸騰させた後、適温まで冷却し、肝組織をプラスチック容器に移し、寒天溶液を流し込んだ。冷蔵庫に一昼夜保管し十分に硬化させた後、プラスチック容器から取り出し、位置決めのための穴を開け、市販のミートスライサーを用い、0.5~1mm 厚で均等にスライスした。

6) ヒト iPS 細胞の肝細胞への効率的な分化誘導法の検討 (松永、山田)

ヒト iPS 細胞は国立成育医療研究センターの梅澤博士によって樹立された 2 株 (Windy および Fetch) を用いた。フィーダー細胞 (マウス 3T3-swiss、ヒト大動脈内皮 (HAEC)) 上で培養し

た同 iPS 細胞を、0.5% FBS、activin、GlutaMax を含む RPMI で 3 日間、次いで KnockOut Serum Replacement (KSR)、activin A、GlutaMax を含む RPMI で 2 日間培養することで内胚葉へ分化させた。Y-27632 を添加し 60 分間反応させた後、Accutase にて剥離し、GFR Matrigel でコーティングした細胞培養用プレートに播種した。播種 24 時間後に Y-27632 を含まない培地に交換後、KSR、GlutaMax、non-essential amino acid、 β -mercaptoethanol、dimethylsulfoxide (DMSO) を含む KnockOut Dulbecco's modified Eagle's medium で肝芽細胞に分化させた。三次元培養を行う群では Y-27632 を添加し 60 分間反応させた後、Collagenase Type IV で剥離し、Accutase で分散させた後、トランスパレント社の三次元培養システム、Cell-able (24 well type) に播種した。24 時間後に Y-27632 を含まない培地に交換した。共培養を行う群ではプレートにあらかじめ HAEC またはマウス 3T3-swiss 細胞を播種した。肝細胞への成熟は hepatocyte growth factor (HGF)、oncostatin M (OSM)、dexamethasone (DEX) を含む初代肝細胞培養用無血清培地もしくはトランスパレント社の RM-101 培地で培養し、その後 HGF、OSM、DEX を含まない初代肝細胞培養用無血清培地もしくは RM-101 培地で培養することによった。薬物応答性を調べるためには、分化処置が終了する 48 時間前より CYP 誘導剤の DEX、omeprazole、phenobarbital、rifampicin を加えた。CYP 活性は mRNA 量ならびに酵素活性で調べた。酵素活性測定において代謝物の定量は田辺三菱製薬にて山田博士が行った。

7) 肝細胞の分化誘導技術の効率化 (落谷)

すでに開発した HIFC 分化誘導方法を改良してヒト iPS 細胞からの肝細胞分化及び成熟化促進を計った。本年度は分化誘導の過程を大幅に効率化する目的で、従来の増殖因子による分化誘導効率を促進する因子を検索する事に重点をおき、特に初年度の成果で見いだされた肝臓の分化成熟に関与する microRNA148a に焦点を絞り、マウス幼若肝細胞の成熟化促進の有無を様々なパラメーターから検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験およびヒト由来検体利用実験については各研究機関においてそれぞれ研究計画申請を行い、許可を受けて行った。

C. 研究結果

1) 手術摘出肝組織からの肝実質細胞採取効率化 (絵野沢)

温阻血後の肝細胞分離で、生細胞率の低下は見

られなかったが、生細胞数は著しく低下した（対照 2.29 ± 0.56 vs 温阻血群 0.29 ± 0.07 、それぞれ $\times 10^8$ 、以下同）。温阻血肝をクエン酸加ユーロコリンズ液で灌流すると生細胞数は 1.41 ± 0.50 に増加した。一方、ヘパリン加生理的食塩水は無効であった。酵素灌流法では微小循環を含めた脈管系が正常に保たれている必要がある。温阻血を経た肝組織の場合、微小血栓の形成が酵素消化を阻害する可能性がある。実際、マクロ的には良好に灌流がなされていても、十分な酵素処理がなされず肝組織が崩れない、あるいは崩れても集塊状を呈し培養に適さない場合がある。末梢循環の回復効果がある灌流液としてクエン酸加ユーロコリンズ液が優れることがわかった。

2) 人組織・細胞の凍結における CAS 装置の評価（大和田、絵野沢）

凍結方法、解凍方法を改良することによって肝組織が割れることなく常温に戻すことが可能となった。コラゲナーゼによる組織消化率は $59.9 \pm 16.6\%$ ($n=32$) で、生細胞率は $42.1 \pm 14.9\%$ ($n=32$)、最高で 80.2% に達した。生細胞数は $6.72 \pm 9.84 \times 10^6$ 個、 $0.90 \pm 1.07 \times 10^6$ 個/g 消化肝重量であった。分離細胞のアンモニア除去能は、調べた 8 例のうち 3 例で検出できた。凍結保存用溶液に DMSO を入れない場合も組織消化はなされたが、懸濁液中に細胞の形態を保つものがほとんどなかった。凍結方法別では、有意な差はなかったが、A 群で Power Setting 3 とした場合に、生細胞率が $50.4 \pm 15.3\%$ ($n=9$) と最も高かった。また一部の細胞は培養が可能であった。

3) 三次元培養ならびに混合培養の創薬研究上の価値評価（池谷、城村、絵野沢）

凍結肝細胞 4 ロットを用いてフィーダーなしの状態と従来のように HH 細胞をフィーダー細胞として用いた場合の CYP 活性の比較をした。テストステロン 6β 水酸化活性、テストステロングルクロン酸抱合、フェナセチン脱エチル化のほぼすべての場合でフィーダーなしの状態の方が高い活性を示した。CYP 誘導能も同じくフィーダーなしの場合の方が絶対値として高かった。すなわち従来のフィーダー細胞使用下でなくとも高い活性を維持することがわかった。この理由のひとつとして、トランスパレント社がヒト肝細胞用に開発した新規培地、RM-101 の使用が挙げられる。本培地は複数の使用者からも高い評価を得ているので、今後、Cell-able とともにヒト肝細胞培養系の一翼を担うものと期待される。

各種フィーダー細胞との共培養の場合、CYP 活性は、ほぼすべての凍結ヒト肝細胞ロットにおいて牛大動脈内皮由来細胞 HH よりマウス線維芽細胞

3T3 の方の維持と誘導に優れることがわかった。牛由来細胞は家畜牛の防疫対策のため、米国には輸出ができない。一方、マウス 3T3 細胞は米国の細胞バンク、ATCC から譲渡を受けられる。今回の結果は Cell-able を米国で販売する際に極めて有用なものである。

4) 接着性の低い凍結ヒト肝細胞の細胞アレイ（Cell-able）上培養の検討（山田）

プレートへの接着率が高い（70%以上）あるいは低い（69%以下）凍結ヒト肝細胞と 3T3 Swiss albino マウス線維芽細胞との三次元共培養において、二次元培養および肝細胞単独の三次元培養より高い薬物代謝酵素活性が長期間に亘って維持できた。典型的な誘導剤（OMP、RIF）に対する CYP 誘導能の維持は、接着率が高い細胞において、三次元共培養が他の培養よりも長期間に亘って維持できた。従って、凍結ヒト肝細胞と 3T3 細胞との三次元共培養は、CYP 活性やその誘導能を長期間の培養期間に亘って維持させるために有用な培養法であることが判明した。

5) 手術摘出肝組織における微小転移の診断に向けた標本作製法の開発（土田）

手術摘出肝組織をほぼそのままのサイズで $0.5 \sim 1\text{mm}$ 厚の標本として処理することが可能となった（全肝 thin slice 法）。本年度は 5 症例に本法を用いて標本を作成し、すべて良好な標本が得られた。肝臓の転移巣は数 mm 以下のものまで、はっきりと肉眼で視認できた。大腸癌肝転移では、肝臓の微小病変の質的診断が重要であり、治療方針を大きく左右する。近年、大腸癌肝転移に対する化学療法は急速に進歩しており、かつてないほどの効果を挙げている。従来より、切除できる転移巣は切除した方が予後がよいが、の改善がみられることは広く知られているが、化学療法が効果する場合は、手術のタイミングの判断に迷うことも少なくない。一方、画像診断上微小転移を見極めることも、治療方針を決定する上で極めて重要となる。今回開発した全肝 thin slice 法は、組織を切り取ることなく、きれいな薄切標本を作成でき、今後、画像診断と病理診断を対比することが可能となった。手術摘出肝組織の研究利用でしばしば問題となる正常性の確認に役立つものと考えられた。

6) ヒト iPS 細胞の肝細胞への効率的な分化誘導法の検討（松永、山田）

予備検討として、細胞の回収・播種操作における細胞剥離酵素の影響を調べた。肝細胞マーカー遺伝子発現に特に顕著な影響を及ぼすことはなかったが、Collagenase Type IV を使用した場合

に CYP3A の高い遺伝子発現が認められた。

三次元培養あるいは HAEC との共培養に際し、継代を行うと肝細胞マーカーの albumin や tyrosine aminotransferase あるいは核内受容体 pregnane X receptor (PXR) の mRNA 発現が、対照として行った当研究室にて確立した分化誘導法と比べて減少した。一方、薬物代謝酵素 CYP1A2、CYP3A4 及び UGT1A1 の mRNA 発現は同等かやや高い傾向が認められた。また CYP3A4 においては DEX 及び rifampicin による誘導が認められ、特に三次元培養においてその効果が大きかった。

分化した肝細胞様細胞において CYP1A、2B、2D、3A、UGT、SULT の薬物代謝酵素活性が認められた。途中継代することで CYP3A と SULT 活性は減少したが CYP1A、2B、2D の代謝活性は上昇した。

マウス 3T3-swiss 細胞あるいは HAEC を用いて共培養では、いずれの群においても肝細胞マーカーや薬物代謝酵素の発現に大きな差は認められなかった。iPS 細胞株の Windy および Fetch で、Windyの方が今回調べた mRNA の発現が高い傾向を示した。

7) 肝細胞の分化誘導技術の効率化 (落谷)

マウスの肝芽細胞は oncostatin M 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。microRNA148a は肝芽細胞では発現が強く抑制されているが、肝機能の獲得、あるいは成熟化に伴って、顕著に発現が上昇した。未成熟の幼若肝細胞に導入したところ、成熟肝細胞マーカーである microRNA122、アルブミン、トランスサイレチンなどの遺伝子が発現上昇した。従って、microRNA148a は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。さらに、HIFC によって ES 細胞から誘導された未成熟肝細胞様細胞にこの同 microRNA を導入した結果、やはり肝細胞の成熟を促進する予備的データを得る事が出来た。

D. 考察

薬物の体内動態 (吸収・分布・代謝・排泄) において著しい動物種差が存在することは周知の事実である。したがって、創薬研究において医薬品候補薬物の薬物動態 (DMPK) を評価する場合、ヒト肝臓試料 (スライス、細胞およびミクロソームなどの細胞画分など) を用いた試験の実施が必須である。これらの試料の中でもヒト肝細胞は、in vivo に最も近い状態での薬物代謝機能を in vitro の試験で評価可能なことから、非常に有用なツールの一つであると考えられている。しかしながら、日本の製薬企業の研究所では、倫理的な観点から主に海外の企業で調製されて市販されている凍結ヒト肝細胞を使用しているが、DMPK を

正しく評価できる品質の優れた凍結ヒト肝細胞を常時安定的に入手するのは困難な状況である。また、ヒトの薬物代謝機能は遺伝子多型や薬歴 (酵素阻害および誘導) などの環境に由来する活性の変動 (個体差) が非常に大きいため、医薬品候補化合物の DMPK を評価する際には複数個体由来のヒト肝臓試料の使用が一般的に推奨されており、この事実がヒト肝細胞を創薬研究に活用することへの大きな障害 (ボトルネック) になる場合がある。この障害を回避するために、我々は本プロジェクト (KHD1023、平成 22~24 年度) において、創薬研究への代替細胞の一つのツールとして、ヒトの人工多能性幹細胞 (Induced pluripotent stem cells、iPS 細胞) から分化誘導した肝細胞様細胞の活用の可能性について検討中である。

本研究事業の重要な一課題として、国立成育医療研究センターで行われる生体肝移植時の手術摘出肝組織から肝実質細胞を得て研究を行っている。今までに通算 157 検体の提供を受けているが (本研究事業開始前の分を含む)、いわゆる動物実験におけるほど細胞の回収率は高くなかった。その原因は手術時の温阻血によると推察してはいたが、実験的に検証したのは今回が初めてである。実際、10 分間の温阻血を経た肝組織の場合、通常の灌流液 (Ca^{2+} 、 Mg^{2+} free-Hanks 液) では回収率が 16%にまで低下した。手術時の温阻血時間は概ね 40 分であるため、さらに厳しい条件になっていると予想される。しかしながら、カルシウムキレーターであるクエン酸を加えた溶液で、細胞回収率が 60%にまで上昇した。コラゲナーゼ灌流法が血管系を利用していることから、クエン酸含有液が微小循環を復元していることが考えられた。現在、この成果をもとに、手術摘出肝組織からの肝細胞分離にもクエン酸加溶液の灌流による脱血処置を行い、好成績を得ている。また、手術当日にどうしても肝細胞分離ができない場合には、今回開発した組織凍結法を応用している。

我々は、これまでの政策創薬研究事業の分担研究において、株式会社トランスパレントの基板パターン細胞アレー (Cell-able) を用いてヒト肝細胞を三次元培養することによって、高い薬物代謝酵素活性とその誘導能が長期間に亘って維持されることを報告した。今年度は、三種類の培養法 (①ヒト肝細胞のみの従来型プレート二次元培養、②ヒト肝細胞単独の三次元培養、および③ヒト肝細胞と 3T3 Swiss albino マウス線維芽細胞との三次元共培養) について比較検討した。また、市販されている凍結ヒト肝細胞には、培養プレートへの接着率が高い『プレート接着型細胞 (接着率約 70%以上)』と低い『浮遊型細胞 (約 69%以下)』が存在している。一般的に Cytochrome P450(CYP)

の誘導試験などのような長期間培養が必要な実験にはプレート接着型凍結ヒト肝細胞が使用され、代謝クリアランス実験などの短期間培養（24時間以内）で実施される実験には浮遊型凍結ヒト肝細胞が使用されている。前者の細胞は後者の細胞と比較して非常に高価（3～4倍）であり、その在庫量やドナーの種類も少ないのが現状である。また、プレート接着型凍結ヒト肝細胞であっても必ずしも良好なCYP誘導能を維持した細胞であるとは限らず、CYP誘導評価に適した細胞を入手することが困難な場合もあり、創薬研究において支障をきたすこともある。一方、後者の細胞は安価であり、その在庫量もドナーの種類も豊富である。もし、後者の細胞を三次元培養することによって、長期間の培養が可能となり、薬物代謝酵素誘導試験などに使用することが可能であるならば、研究費の削減および創薬スピードの向上にもつながると思われる。そこで、Cell-ableを用いて後者の細胞を三次元培養することによって、薬物代謝酵素活性とその酵素誘導能を長期間に亘って維持することが可能かどうかについても検討した。

この他、Cell-ableの使用に関し、フィーダー細胞は従来の牛大動脈内皮由来HH細胞よりもマウス3T3細胞の方が優れること、フィーダーなしの条件でも新しい培地、RM-101使用であれば、長期に渡りヒト肝細胞のCYP活性維持ならびに誘導能検出が可能であることがわかった。

iPS細胞から分化誘導した肝細胞様細胞を創薬研究に活用するためには、薬物代謝酵素機能（活性とその誘導能）の発現プロファイルについて明らかにして評価しておくことが必要である。また、インタクトな肝細胞とほぼ同等の高い酵素活性と適切な酵素誘導能の発現が必要であり、それらの発現をある程度の期間に亘って維持させたままの状態を培養させる必要もある。しかし、残念なことに現時点までに調製されたこの分化肝細胞様細胞の薬物代謝酵素活性の発現とその誘導能は極めて低く、創薬研究に活用できる薬物代謝機能プロファイルを有していないと判断されており、創薬研究に活用させるためには、もう少し良好な薬物代謝酵素機能を有する肝細胞様細胞への分化が望まれている。なお、一般的に使用されている肝細胞の二次元（単層）培養法では、培養開始直後から活性は急激に低下し、培養期間中の活性はかなり低いことが周知の事実である。したがって、iPS細胞から肝細胞様細胞へ分化させる際に二次元培養で実施したのでは、生成される分化肝細胞様細胞の薬物代謝酵素活性は極めて低く、創薬研究に活用できるような高い薬物代謝酵素活性を発現させることは不可能であると思われる。そこで、我々は肝細胞の薬物代謝酵素機能などが長期間維持されることが報告されてい

る三次元培養法をiPS細胞から肝細胞様細胞へ分化誘導する際に適用するために、凍結ヒト肝細胞での機能維持に関するバリデーションデータを詳細に検討した。

E. 結論

官民共同研究として、トランスパレント社開発の新規三次元培養基板、Cell-ableを中心に据え、手術摘出ヒト肝組織からの肝実質細胞の供給と保存、輸入凍結ヒト肝細胞の低接着ロットの培養実験への使用を検討し、従来の方法に改良を加えた。また、新しい肝細胞ソースとしてiPS細胞から肝細胞様細胞の分化誘導を行うプロトコルを開発した。分化肝細胞をCell-ableにて培養する系についても条件検討を行った。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Enosawa S, Yamazaki T, Kohsaka H, Tokiwa T. Repopulation of human origin hepatocyte progenitor-like cell line, THLE-5b, in the Scid mouse liver under p21-mediated cell growth arresting conditions. Cell Transplant in press
- 2) 松野直徒、小原弘道、平野俊彦、武藤 眞、許 懐哲、絵野沢 伸、水沼 博. 臨床応用を目指した肝移植用持続灌流保存装置の開発と温阻血障害肝を用いた研究. Organ Biology 18(1); 87-91, 2011
- 3) 浅野武秀監修、剣持 敬、福寫教偉、絵野沢 伸 編. 移植のための臓器摘出と保存. 丸善出版 ISBN 978-4-621-06494-8 C3047 平成24年3月5日発行
- 4) Furuichihi K, Shintani H, Sakai Y, Ochiya T, Matsushima K, Kaneko S, Wada T. Effects of adipose-derived mesenchymal cells on ischemia-reperfusion injury in kidney. Clin Exp Nephrol in press
- 5) Ishikawa T, Hagiwara K, Ochiya T. Generation and hepatic differentiation of human iPS cells. Methods Mol Biol 826; 103-114, 2012
- 6) 粕谷和彦、永川裕一、鈴木芳明、土田明彦、青木達哉、杉本勝俊、糸井隆夫、斉藤和博、永井 毅、島津元秀. 肝微小転移の画像診断、治療診断、病理診断. 臨床外科 66(10); 1297-1305, 2011

- 7) 大和田哲男. CAS 機能技術の食品食材から医学医療への応用開発. *Organ Biology* 18(1); 71-78, 2011

2. 学会発表

- 1) Enosawa S, Takahashi Y, Jomura T, Ozeki E, Ikeya T. Functional evaluation of 3D-culture of human hepatocytes on Cell-able under newly optimized condition. 17th North American Regional ISSX Meeting, International Society of Study for Xenobiotics (ISSX), Atlanta, USA, 16 - 20, October, 2011
- 2) 絵野沢 伸. 福田晃也、阪本靖介、重田孝信、中澤温子、笠原群生. 肝細胞移植 EBM 化に向けた取り組み. 第 47 回日本移植学会総会 仙台 平成 23 年 10 月 4-6 日
- 3) Enosawa S, Takahashi Y, Jomura T, Ozeki E, Ikeya T. Human hepatocyte 3D culture on Cell-able using newly optimized medium and its functional evaluation. 26th JSSX Annual Meeting, Hiroshima, 16 ? 18, November, 2011 (絵野沢 伸、高橋由里子、城村友子、小関恵美子、池谷武志. 新規培地を用いた Cell-able によるヒト肝細胞 3 次元培養の最適化と機能評価. 日本薬物動態学会第 26 回年会 広島 平成 23 年 11 月 16-18 日)
- 4) 絵野沢 伸、齋藤 亮. 凍結肝組織からの肝細胞分離. 第 38 回日本臓器保存生物医学会学術集会 仙台 平成 23 年 11 月 25-26 日
- 5) 絵野沢 伸. 肝細胞移植治療 標準化に向けた取り組み. 再生医療におけるヒト組織・細胞の利用. バイオジャパン 2011 主催者セミナー 平成 23 年 10 月 6 日 東京
- 6) 落谷孝広. 分泌型 microRNA の生物学的意義と疾患診断への応用. 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 平成 23 年 5 月 13~14 日 広島
- 7) 落谷孝広. 幹細胞の創薬利用の将来: 分化誘導と肝細胞培養法. 15th 薬物動態談話会

セミナー 平成 23 年 8 月 24~26 日 大阪

- 8) 落谷孝広. 間葉系幹細胞による再生医療実現に向けて. 第 18 回日本門脈圧亢進症学会 平成 23 年 9 月 15~16 日 福岡
- 9) 近藤祐樹、岩尾岳洋、三森佳代、吉橋幸美、大森 栄、松永民秀. ヒト人工多能性幹細胞からの肝細胞への効率的な分化方法の検討. 第 57 回日本薬学会東海支部総会・大会 平成 23 年 7 月 9 日 名古屋
- 10) 粕谷和彦、永川裕一、松土尊映、遠藤光史、許文聰、鈴木芳明、土田明彦、青木達哉. 化学療法後の転移性肝癌の CT、MRI 画像と肝マクロ所見、組織所見との対比. 第 23 回日本肝胆膵外科学会学術集会 平成 23 年 6 月 8~10 日 東京
- 11) 粕谷和彦、松土尊映、菊池 哲、許文聰、遠藤光史、永川裕一、鈴木芳明、土田明彦、島津元秀、青木達哉. 肝微小転移の治療的診断法の試み. 第 73 回日本臨床外科学会総会 平成 23 年 11 月 17~19 日 東京
- 12) Oowada N. Wonderful cooling method for foods; Cells Alive System. Luncheon Session I, The 4th International Hypothermia Symposium, September 15 to 17, 2011, Tokyo
- 13) 高橋由里子、城村友子、小関恵美子、池谷武志. 細胞非接着性表面処理による 3 次元培養基板を用いたヒト初代肝細胞機能評価. 日本組織培養学会第 84 回大会 平成 23 年 5 月 27, 28 日 東京 (奨励賞受賞)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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 薬理部
研究者 小島 肇
研究期間 平成 22 年 4 月～平成 24 年 3 月

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、ヒューマンサイエンス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、角化細胞およ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) 試薬営業本部
糸 博之
- (8) 日本メナード化粧品(株) 総合研究所
水谷 宏

協力研究者

- (1) ヒューマンサイエンス研究資源バンク
吉田東歩
- (2) マルホ株式会社 向山洋平

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、コスト低減およ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研究機関が行っているが、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ことを目指した。さらに、国内での普及を促すためには、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。そこで、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、細胞およ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・確立することを目指した。

B. 研究方法

B-1) 組織・細胞の供給

B-1-1) 正常皮膚組織の安定的確保

正常皮膚組織を供給できる施設を調査、選定し、福井済生会病院からの提供を決めた。本病院にて倫理面等の環境整備をした後、ヒューマンサイエンス研究資源バンク(以下HSバンク)に登録した。

B-1-2) 日本人に由来する臍帯血管内皮細胞(HUVEC)の安定的確保

HSバンクへの臍帯提供を前提とし、埼玉医科大学にて倫理面等の環境整備をした後、HSバンクに登録した。

B-1-3) 角化細胞および血管内皮細胞の収集

角化細胞について、(株)ケーエーシーを通じて、BIOPREDIC社、Lonza社、クラボウ社、タカラバイオ社から白人由来の皮膚組織入手し、単離・作製した。

日本人由来の細胞は、HSバンクを通じて、福井済生会病院から皮膚組織を入手し、同様に単

離・作製した。

血管内皮細胞については、HSバンクを通じて、埼玉医科大学病院から臍帯組織を入手し、単離・作製した。

B-2) 細胞を用いた検討

B-2-1) 角化細胞を用いた人種差検討

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をそれぞれ 3 ロット使用し、細胞の形態を顕微鏡観察した。細胞数の測定は、染色法により行った。

角化細胞を 70% からコンフルエントになるまで培養した後、RT-PCR 法により、角化関連タンパク質である involucrin, keratin10, hyaluronan synthase 3 (HAS3)、filaggrin、serine palmitoyltransferase (SPT) および、炎症性サイトカインである interleukin-1 α (IL-1 α) の遺伝子発現を解析した。

B-2-2) 3次元培養表皮モデルを用いた人種差検討

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を使用した。提供された角化細胞の増殖能について、単層培養法により検討した。凍結角化細胞(継代数 0: P0)、あるいは単層培養/継代により増殖させた角化細胞(継代数 1,2: P1, P2)を 24 ウェル培養プレート上に設置したセルカルチャーインサート内に播種した。培養開始 1 日目に気液界面での培養し、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、培養後の表皮組織は、組織評価に供した。

培養後の 3 次元培養表皮組織の病理標本作製後、ヘマトキシリンおよ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。また、各種表面マーカーの特異的抗体を用いて免疫組織染色を行った。

また、培養上清中に産生される生理活性因子 interleukin-1 α (IL-1 α)、IL-1 β 、vascular endothelial growth factor (VEGF)、transforming growth factor beta1 (TGF- β 1)、TGF- β 2、tumor necrosis factor (TNF α)、insulin-like growth factor-1 (IGF-1)、IL-8、keratinocyte growth factor (KGF)、platelet-derived growth factor (PDGF)、prostaglandin E2 (PG-E2) を測定した。

B-2-3) 3次元培養血管内皮モデルの構築

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、チャンバー内に正常ヒト微小血管内皮細胞(HMVEC)および正常ヒトさい帯静脈血管内皮細胞株(HUVEC)のみを培養して作製する組織シート型培養モデルと、チャンバー内に HMVEC あるいは HUVEC を培養した後にコラーゲンビトリゲル薄膜の裏面に HDF を共培養して作製す

る器官様プレート型培養モデルを構築した。

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 あるいは HUVEC の組織シート型培養モデルと HDF を共培養した器官様プレート型培養モデルについて、バリア機能の構築を経時的に定量解析するために、TEER 値を測定した。また、タイト結合関連タンパクである ZO-1 について、抗体染色により発現を解析した。Hoechst33342 による核染色を施した後、蛍光顕微鏡により観察した。

B-3) 調査と情報収集

B-3-1) インフォームドコンセント

国内で流通しているヒト由来の生体試料(海外製品)6社(BioChain社、ILSBio社、PrecisionMed社、USBiomax社、Provitro社、Cybrdi社)のインフォームドコンセント関係の書類を集め、内容を確認、比較検討した。

B-3-2) 倫理問題の改善と確認

雑誌、書籍、インターネット上および米国での独自の情報収集から、問題の本質を論考し明らかにした。

(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および血管内皮細胞株を HS 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、同委員会の審査およ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) 正常皮膚組織の安定的確保

福井県済生会病院から HS バンク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、HS 財団の倫理委員会での承認も得られ、日本人の正常皮膚組織供給施設の確保はされた。

同時に研究分担者の各施設内での倫理委員会の承認も得られ、皮膚組織の調達ルートが確保できた。結果として、皮膚組織譲渡は 8 例となった。

C-1-2) 日本人に由来する HUVEC の安定的確保

HS バンクへの臍帯提供を前提とする、より厳密な倫理審査が埼玉医科大学倫理委員会、HS 財団倫理委員会の承認を経て、臍帯が譲渡可能リストに記載された。

最終的には、コージンバイオから HS バンクに提出された臍帯の譲渡申請に対し、HS 財団倫理委員会が承認した。埼玉医科大学産科婦人科では、手術予定妊婦から条件に適合する 4 例を抽出し、匿名化処理を行った上で、HS バンク 4 例の臍帯を提供した。

C-1-3) 角化細胞および血管内皮細胞の収集

角化細胞については、白人種由来の女性胸部皮膚組織 3 個体分を入手し、3 ロット分を実験用として作製した。しかし、BIOPREDIC 社の皮膚組織は、輸送培地を湿らせた紙片に挟まれており、日本国内に細胞採取の目的で輸入された経験はないことにより、単離後接着する細胞は少なかった。結果的には、輸入した白人女性胸部皮膚細胞を用いた。

日本人由来の細胞は、皮膚組織 8 個体分を入手し、5 ロット作製した。最初の 1 検体目は、皮膚片が小さい（表皮部分約 4mm）ため、細胞が回収できなかった。予め皮下組織を培養し、そこへ単離した角化細胞を共培養することで回収が可能になった。2 検体目と 3 検体目は、酵母のコンタミネーションが見られた。そのため、抗真菌剤の培地への添加に加え、皮膚の消毒にイソジンを使用した。4 検体以降のコンタミネーションは見られていない。

血管内皮細胞について、日本人種由来の臍帯 4 個体分を入手し、3 ロット分を実験用として作製した。始めの 1 ロット分は、細胞の回収が少なかったが、酵素（トリプシン）のメーカーを変えることにより、2 検体目以降は問題なかった。

C-2) 細胞を用いた検討

C-2-1) 角化細胞を用いた人種差検討

日本人および白色人種角化細胞の形態には大きな違いは観察されなかったが、白色人種由来細胞の増殖性に低い傾向が見られた。遺伝子発現解析の結果から、IL-1 α のみで白色人種での発現量が多かった。

C-2-2) 3 次元培養表皮モデルを用いた人種差検討

供給された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た。

もっとも結果のよかった細胞凍結しない P0 の条件においても、日本人組織由来の 2 ロット、白人由来の 1 ロットは全く細胞が増殖せず、3 次元組織を再構成しなかった。白人由来の 1 ロットは 3 次元組織を再構成したものの、2-3 層の非常に薄い組織を再構成するに留まった。細胞間結合様式（tight junction）の検討では、3 次元組織を再構成しなかったロットについては全て陰性となった。

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おいては、再現性を含め検討したものの、全て測定限界以下となった。測定限界以下のとなった理由については、培養細胞の代謝活性が老化によって低下している可能性が考えられた。

C-2-3) 3 次元培養血管内皮モデルの構築

コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー内でコンフルエントまで培養することで、HMVEC は TEER 値が約 25% 上昇するのに対して、HUVEC は TEER 値が約 15% しか上昇しなかった。また、ゼラチンコート処理を施したコラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー内では、TEER 値は HMVEC では約 35%、および HUVEC では約 23% まで上昇した。ゼラチンコート処理を施したコラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー内に HMVEC を培養した後に、コラーゲンビトリゲル薄膜の裏面に HDF を共培養することで、TEER 値は約 80% まで上昇した。

ゼラチンコート処理を施したコラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー内に HUVEC を培養した後に、コラーゲンビトリゲル薄膜の裏面に HDF を共培養することで、TEER 値は約 30% まで上昇した。また、HUVEC の細胞間にはタイト結合に関連する ZO-1 の発現が確認された。しかし、日本人由来および白人由来いずれの細胞株でも TEER 値の変動は認められなかった。

C-3) 調査と情報収集

今回調査した 6 社全てでインフォームドコンセント証明書が発行しているとの情報が得られ、内 5 社の書類を入手した。入手できたインフォームドコンセント関係書類について、①営利企業での使用、②権利放棄についての記載の有無に注目し、確認したところ、4 社について記載が確認された。この 4 社の製品の使用にあたっては営利企業であっても倫理面、権利面において問題なく使用できることが示された。

D. 考察

日本国内におけるヒト正常細胞分譲システム網を確立すること自体の意義とその必要性・重要性については、あまり異論があるとは考えられない。しかし、その目的のために組織を入手すること、さらに組織の提供を受けて得られた細胞を、広く分配することについては、倫理的な問題と、実際のシステム構築上の問題について、さまざまな議論を巻き起こす可能性がある。

角化細胞を得るための皮膚の提供においては、手術後通常廃棄する破片を利用するものであり、HUVEC を得るための臍帯提供についても、通常廃棄する臍帯から比較的容易な手技により HUVEC の回収が可能であるため、これまで実態

として各研究機関と開業医などが、個別に契約し（あるいは口頭で依頼し）、皮膚や臍帯の提供が随時行われていた可能性がかなり高い。そこで、広く一般へ細胞を提供することを前提として、大学病院や一般病院から組織提供を行うことについての倫理的な問題を明確にするため、各倫理委員会に審査を付託し、十分な審議に基づく承認を得ると共に、患者に配布する説明文書や同意書を、適切に作成することができた。

また、今回、本研究への協力を依頼した患者には、担当医の適切な説明により、患者の理解を得て、いずれも快く組織提供に応じて頂くことができた。これには、担当医の誠実で真摯な態度と、HS バンクにより作成されたパンフレットなど適切で有用な資料が奏功したものと考えられる。したがって、今後、組織提供による日本国内におけるヒト正常細胞分譲システム網の確立をめざすためには、より HS 財団による積極的な広報活動と提供者の理解を援助するための適切な資料の作成を行うこと、そして、なによりも、提供者となる患者に直接対応する担当医の熱意が必要条件となる。

一方、このようにして得られた細胞を用いた研究による発生する可能性のある潜在的利益については、組織提供者への説明と同意の段階で、提供者には直接の利益がないことを明確にしている。しかし、今回の組織提供のプロセスにおいては、これに加えて、例えば、提供機関である埼玉医科大学の知財戦略研究推進部門との協議および契約締結が行われ、提供機関との間においても、より明確な潜在的利益に対する対応の方法が確立したと考えられる。この点は、今後、ますます重要な要件となる可能性が高いと思われる。国内研究部門でのヒト由来生体試料の使用にあたっては、現在、各企業・研究組織内で倫理委員会、知的財産部門の承認を必要とするケースがほとんどである為、インフォームドコンセントを証明する書類は必要不可欠となっている。

今後、国内の病院等で採取された組織を、営利企業を含めた各研究機関で使用できるようにする為には、インフォームドコンセント証明書を必要とすることはもちろん、「営利企業での使用」および「権利放棄」についても了承を得られるよう、記載内容を考慮する必要がある。実際、国内で流通している海外からのヒト由来の生体試料は主にアメリカのメーカーから供給されているが、全てインフォームドコンセントの取られた製品である。その内容について調査した所、4社の資料で「営利企業での使用」および「権利放棄」がドナーまたはドナー関係者から了承されていることが確認された。

現状で、日本でのヒト組織の所有権・支配権

に関しては、かなり法技術的な問題がある。その点でも、今後法律家による日本におけるこれらのテーマに関する研究を期待したい。また、いろいろな利用に関して、果たしてインフォームドコンセントだけがすべてを決めるのかなど多くの課題がいまだに残されている現状が明らかとなった。今、患者、医師、研究者の連携・連帯が叫ばれている。そして、その中で研究者が自由に免責された状態で研究を行うことが重要であるという意識が高くなってきているように思われる。しかし、ここで論じたように、オープンエンドの状態を得るためには研究者の責務について今一度考える必要がある。そして、本報告書の主題である企業によるヒト試料等の商業利用を考えると、企業側に問われる倫理的な課題は、今一度整理しなおす必要がある。企業の社会的責任（CSR）の一環としてこの問題を位置づけることも重要であろう。もちろん企業が利用する場合は、治験のように最後まで見通した研究の計画の元に行われるであろう。しかし、それだけでは、治験と異なる研究を支えることはできないことを考えてみる必要がある。特に、医療と近いところで企業が営利を目的にして研究を行うことの重要性が増してきたことを踏まえた「企業によるヒト試料等の利用方針」の素描が必要であろう。

本件について、組織を利用するサイドから見た場合、倫理的な問題も解決されたとはいえない。例えば、ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングでは、日本人の細胞を研究に利用する際の倫理的課題が倫理委員会において、提供者に対するインフォームドコンセントの内容が曖昧であるとの指摘があった。具体的には民間企業への提供の可能性やその際の研究内容に対する記載が十分ではないとのことであり、本研究以外の研究内容では使用すべきでないとの結論となった。さらに、具体的な連結不可能匿名化の方法が不明確であり、実際には連結可能ではないかとの指摘もあった。連結可能であるならば、それを明確にすべきとの判断となった。また、本研究において日本人が必須であるのであれば、HS バンクが入手する組織の由来である「日本人」の定義が曖昧であるとの指摘があった。日本人であることの特定は医療機関にしかできないがその確認項目がなく、結局医療機関にしかゆだねることはできないとのことから、ドナー情報に明記されるよう求められた。本研究は、研究目的が明白であることから、本研究に限定して、上述の条件付で HS バンクからの日本人組織由来の細胞の受け入れが承認された。今後、新たな研究課題でのヒト組織の入手では、インフォームドコンセントの内容や連結可能/不可能の手段等、解決すべき課題は多いと考え

られる。

最後に、HS バンクからの組織の購入値段が高額（約 19 万円）である点、HS バンクから供給された組織にコンタミネーションがあった場合、うまく細胞培養できなかつた場合などの保証がなされておらず、対応策などを今後検討する必要がある。例えば、皮膚の初代培養に於いて、数 mm の皮膚片から細胞を単離することは、一般的に困難と思われており、貴重な試料を無駄にした場合も生じた。また、角化細胞は、ドナーのバックグランド、継代回数や培養条件により、生育状態や分化の状況が変化し、遺伝子発現が変動するため、種差を比較するためには、性別、年齢、採取部位、採取方法や細胞の培養条件などを同一にすることが望ましい。今回の試験結果では、日本人 3 ロット、白人 3 ロットともに、成人女性胸部由来の角化細胞で、年齢も同年代とした。しかし、送付された細胞の状態が良好ではなく、細胞増殖や正常な 3 次元構造を再現しなかつた。送付されてきた細胞の老化が進行していたためと推察した。その原因は、ドナーの年齢によるところも考えられたが、同時に、海外より取り寄せている細胞であることもあり、皮膚を採取してからの時間的な影響も推測された。細胞を用いて種々の試験を行う場合、組織を摘出した後、出来得る限り、短時間での処理が望ましいのは当然であろう。今回の、国内におけるヒト正常細胞の分譲システム網の確立は、このような観点からも、意義があるものと考えられた。

一方、種々のマーカーの内、炎症性サイトカインの IL-1 α のみ、日本人に対して白人細胞は高い傾向があることから、炎症の発現に関して、差異を有する可能性が示唆されたものの、3 次元表皮培養では、細胞表面マーカーの発現量や各種サイトカインの産生量が低く、上皮細胞としての形質を消失していると考えられた。これらの結果からは、人種差を考察できるに十分なものではなく、本検討を今後進めていくためには、組織からの細胞分離方法の課題が重要であると思われる。また、その問題が解決した後、個人差も考慮して十分な試料数を揃えることが必要と考える。

なお、コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバーを利用して、HMVEC および HUVEC のタイト結合に依存したバリア機能を TEER 値の変動で容易に測定できる 3 次元培養モデルを構築する手法がほぼ確立できた。また、異なる人種由来の HUVEC を用いて、炎症性サイトカインや薬剤に対する血管透過性を評価する研究も行うことが可能な段階になったが、研究期間の問題から人種差の詳細な検討までに至らなかつた。

E. 結論

- 1) 日本人の臍帯由来 HUVEC 細胞や角化細胞の分譲システム網を複数の倫理審査委員会での承認を経て確立し、HS バンクに提供することができた。
- 2) 日本でのヒト試料等の所有権・支配権については、試料等を提供する由来者、それを研究利用する研究者および医療関係者が連携・連帯する中で、研究者の免責だけではなく、由来者の保護につながるオープンエンドの状態を得るためには研究者の責務について考える必要がある。
- 3) 民間企業が日本人ヒト組織を利用する際の倫理的な書類の整備が必要である。
- 4) 組織から得られた細胞の状態が良好ではなく、細胞増殖や正常な 3 次元構造を再現しなかつた。組織からの細胞分離方法の課題が明らかになった。
- 5) 上記の理由から、角化細胞を用いて、種々の検討を行ったが、人種差を明らかにするには、個人差も考慮してより多くの試料を用いた検討が必要と判断された。

F. 研究発表（論文）

- 1) Takezawa T, Aoki S, Oshikata A, Okamoto C, Yamaguchi H, Narisawa Y, Toda S. A novel material of high density collagen fibrils: a collagen xerogel membrane and its application to transplantation in vivo and a culture chamber in vitro. in *The Proceedings of 24th European Conference on Biomaterials*, Monduzzi Editore International Proceedings Division, MEDIMOND, Italy, 2012, pp. 181-185.
- 2) 増井徹 ヒトを対象とする研究の倫理：ヘルシンキ宣言の改訂の意味するもの「生命科学・医学と法・生命倫理－生命倫理基本法に向けて－」編集：位田隆一/ドナルド・チャルマーズ、印刷中
- 3) Masui, T. The Integrity of Researchers in Japan: Will Enforcement Replace Responsibility? Promoting Research Integrity in a Global Environment, Tony Mayer and Nicholas Steneck, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2012
- 4) 増井徹訳、「英国国立がん研究所 研究のための試料と情報：利用方針作成のための雛形」、(National Cancer Research Institute, Sample and Data for Research: Template for Access Policy Development, June 2009) 2011 英日対訳版

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

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 薬理部
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、ヒューマンサイエンス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、角化細胞およ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) 試薬営業本部 糸 博之
- (8) 日本メナード化粧品(株)総合研究所 水谷 宏

協力研究者

- (1) ヒューマンサイエンス研究資源バンク 吉田東歩
- (2) マルホ株式会社 向山洋平

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、コスト低減およ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ことを目指した。さらに、国内での普及を促すためには、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。そこで、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、細胞およ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・確立することを目指した。

B. 研究方法

B-1) 組織・細胞の供給

B-1-1) 正常皮膚組織の安定的確保

ヒューマンサイエンス研究資源バンク(以下HSバンク)より国内のヒト組織・細胞の分譲が行われているが、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、福井済生会病院からの提供を決めた。本病院にて倫理面等の環境整備をした後、HSバンクに登録した。

B-1-2) 日本人に由来する臍帯血管内皮細胞(HUVEC)の安定的確保

HSバンクへの臍帯提供を前提とし、埼玉医科大学にて倫理面等の環境整備をした後、HSバンクに登録した。

B-1-3) 角化細胞および血管内皮細胞の収集

角化細胞について、(株)ケーエーシーを通じて、フランス BIOPREDIC 社から白人由来の胸部皮膚組織を入手し、単離・作製した。予備として、Lonza 社、クラボウ社、タカラバイオ社から同様に白人由来胸部皮膚細胞を入手した。

日本人由来の細胞は、HSバンクを通じて、福井済生会病院から胸部皮膚組織を入手し、同様に単離・作製した。

血管内皮細胞については、HSバンクを通じて、埼玉医科大学病院から臍帯組織を入手し、単離・作製した。

B-2) 細胞を用いた検討

B-2-1) 角化細胞を用いた人種差検討

(1) 細胞および培養方法

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をそれぞれ 3 ロット使用した。角化細胞を解凍後、12well プレートにて 37°C、5%CO₂ 条件下で単層培養した。培地はコージンバイオ社製の角化細胞培養用無血清培地を用いた。

(2) 細胞増殖量の測定

角化細胞を 12well プレートにて 1well あたり 1×10⁵ 個播種し、3 日間培養した。その後、細胞の形態を顕微鏡観察した。細胞数の測定は、染色法により行った。すなわち、培養終了後培養液を除き、メタノールを用いて 10 分間細胞を固定した。続いて、0.1%メチレンブルーを加え、1 時間、細胞を染色した。乾燥させた後、0.1N HCl を各 well に 1mL ずつ加えてよく攪拌させ、マイクロプレートリーダーを用いて 650 nm の吸光度を測定した。

(3) 遺伝子発現解析方法

角化細胞を 70%から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 mRNA を回収した。その後、PrimeScript RT MasterMix (TAKARA) および Platinum SYBRGreen qPCR kit (Invitrogen) を用いて、RT-PCR 法により、角化関連タンパク質である involucrin, keratin10, hyaluronan synthase 3 (HAS3)、filaggrin、serine palmitoyltransferase (SPT) および、炎症性サイトカインである interleukin-1 α (IL-1 α) の遺伝子発現を解析した。内部標準遺伝子として β -actin 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 (J1) の遺伝子発現量に対する各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を用いた人種差検討

(1) ヒト角化細胞

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を使用した。

(2) 単層培養による角化細胞の増殖

提供された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、角化細胞をマウス胎児由来線維芽細胞様細胞株 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。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。

(3) 気液界面での角化細胞の 3 次元培養

凍結角化細胞 (継代数 0: P0)、あるいは単層培養/継代により増殖させた角化細胞 (継代数 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%CO₂、37°C 条件下の培養インキュベーター内で培養した。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、培養後の表皮組織は、組織評価に供した。

(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、5 μ m の薄切標本作製後、ヘマトキシリンおよ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。また、各種表面マーカーの特異的抗体を用いて免疫組織染色を行い、人種間の比較検討を試みた。

(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-1 α (IL-1 α)、IL-1 β 、vascular endothelial growth factor (VEGF)、transforming growth factor beta1 (TGF- β 1)、TGF- β 2、tumor necrosis factor (TNF α)、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

(1) コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバーの処理

コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバーは、未処理群、紫外線照射 (800mJ/cm²) 群、およびゼラチンコート (0.1%ブタ由来ゼラチン水溶液の 30 分間吸着) 群を作製した。

(2) ヒト血管内皮細胞およびヒト真皮由来線維芽細胞の培養

クラボウより購入した正常ヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC) および正常ヒトさい帯静脈血管内皮細胞株 (HUVEC) として、日本人由来の J-1 株と J-2 株および白人由来の W-1 株と W-2 株を購入した。これらは同メーカーの培養液で、また、同メーカーより購入した正常ヒト真皮由来線維芽細胞 (HDF) については、10% FBS、20mM HEPES、100units/ml penicillin、および 100ug/ml streptomycin 含有の DMEM にて、37°C、5%CO₂ インキュベータ内で培養した。

(3) 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 HMVEC あるいは HUVEC のみを培養して作製する組織シート型培養モデルと、チャンバー内に HMVEC あるいは HUVEC を培養した後にコラーゲンビトリゲル薄膜の裏面に HDF を共培養して作製する器官様プレート型培養モデルを構築した。

(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 HMVEC あるいは HUVEC の組織シート型培養モデルと HDF を共培養した器官様プレート型培養モデルについて、バリア機能の構築を経時的に定量解析するために、ミリポア社製の 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。

(5) 免疫染色によるバリア機能の評価

タイト結合関連タンパクである ZO-1 について、抗体染色により発現を解析した。Hoechst33342 による核染色を施した後、蛍光顕微鏡により観察した。

B-3) 調査と情報収集

B-3-1) インフォームドコンセント

国内で流通しているヒト由来の生体試料 (海外製品) 6 社 (表 1 参照) のインフォームドコンセント関係の書類を集め、内容を確認、比較検討した。

表 1. 調査メーカー一覧

メーカー名	所在地
BioChain 社	米国 カリフォルニア州
ILSBio 社	米国 メリーランド州
PrecisionMed 社	米国 カリフォルニア州
USBiomax 社	米国 メリーランド州
Provitro 社	ドイツ
Cybrdi 社	米国 メリーランド州

B-3-2) 倫理問題の改善と確認

雑誌、書籍、インターネット上および米国での独自の情報収集から、問題の本質を論考し明らかにした。

(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由来の角化および血管内皮細胞株を HS 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、同委員会の審査およ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) 正常皮膚組織の安定的確保

福井県済生会病院から HS バンク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をクリアし、福井県済生会病院より HS バンクにヒト組織譲渡申請書が提出され、HS 財団の倫理委員会での承認も得られ、日本人の正常皮膚組織供給施設の確保はされた。

同時に研究分担者の各施設内での倫理委員会の承認も得られ、皮膚組織の調達ルートが確保できた。結果として、皮膚組織譲渡は 8 例となった。

C-1-2) 日本人に由来する HUVEC の安定的確保

HS バンクへの臍帯提供を前提とする、より厳密な倫理審査が埼玉医科大学倫理委員会によりなされ、研究の実施が承認された。一方、HS 財団倫理委員会は、「埼玉医科大学からの臍帯組織の提供」について承認し、臍帯が譲渡可能リストに掲載された。

最終的には、コージンバイオから HS バンクに提出された臍帯の譲渡申請に対し、HS 財団倫理委員会において、「研究機関からの譲渡申請」が承認され、埼玉医科大学病院からの臍帯組織提供が実現することになった。埼玉医科大学産

科婦人科では、この譲渡申請に基づき、2012年1月の手術予定妊婦から条件に適合する4例を抽出した。それぞれの個人情報について匿名化処理を行った上で、埼玉医科大学からHSバンクに対して4例の臍帯を提供した。

C-1-3) 角化細胞および血管内皮細胞の収集

角化細胞については、白人種由来の皮膚組織3個体分を入手し、3ロット分を実験用として作製した。しかし、共同研究先（日本メナード化粧品(株)）に送付後、細胞の角化傾向が強いとの指摘があり、さらに市販角化細胞を購入し、3ロット分を作製した。原因は、皮膚組織の送付方法にあると思われる。BIOPREDIC社の皮膚組織は、輸送培地を湿らせた紙片に挟まれており、日本国内に細胞採取の目的で輸入されて経験はないとのことだった。単離後接着する細胞は少なかったが、皮膚片が大きいと、回収量自体は少なくなかった。今後は、培地の中に浸けて輸送する方法に変更することとした(未実施)。日本人由来の細胞は、皮膚組織8個体分を入手し、5ロット作製し、共同研究先（日本メナード化粧品(株)、(株)ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング）に発送した。最初の1検体目は、皮膚片が小さい(表皮部分約4mm)ため、細胞が回収できなかった。原因は、増殖可能な基底膜細胞が操作途中で接着・損失してしまったため、最低限必要な細胞数に満たしていないためとされた。そのため、ピペット、遠心管等をシリコンコートするなどしたが、改善しなかった。最後に予め皮下組織を培養し、そこへ単離した角化細胞を共培養することで回収が可能になった。2検体目と3検体目は、酵母のコンタミネーションが見られた。そのため、抗真菌剤の培地への添加に加え、皮膚の消毒にイソジンを使用した。4検体目以降のコンタミネーションは見られていない。

血管内皮細胞について、日本人種由来の臍帯4個体分を入手し、3ロット分を実験用として作製した。始めの1ロット分は、細胞の回収が少なかったが、酵素(トリプシン)のメーカーを変えることにより、2検体目以降は問題が見られなかった。

C-2) 細胞を用いた検討

C-2-1) 角化細胞を用いた人種差検討

日本人および白色人種角化細胞の形態には大きな違いは観察されなかったが、白色人種由来細胞には増殖性が低い傾向が見られた。遺伝子発現解析の結果から、involucrin、filaggrinのmRNA発現量は同じ人種内でも大きく変動した。keratin10、HAS3およびSPTのmRNA発現量には人種間に差は認められなかった。IL-1 α で

は白色人種での発現量が多かった。

C-2-2) 3次元培養表皮モデルを用いた人種差検討

(1) 単層培養による角化細胞の増殖

白人、あるいは日本人由来の角化細胞を、3T3-J2フィーダー細胞との共培養による単層培養を行い、その増殖能について検討した。日本人由来の角化細胞では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、P1、P2継代前の角化細胞の形態観察において、日本人、白人由来角化細胞の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。供給された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た。

(2) 角化細胞の3次元培養

白人、あるいは日本人由来の角化細胞を、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した。角質層や細胞層は日本人由来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の日本人由来角化細胞、およびP1、P2の白人由来角化細胞は、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。

細胞凍結しないP0の条件で、3次元組織培養の再現性検討を行ったところ、日本人組織由来の2ロット、白人由来の1ロットは全く細胞が増殖せず、3次元組織を再構成しなかった。白人由来の1ロットは3次元組織を再構成したものの、2-3層の非常に薄い組織を再構成するに留まった。細胞間結合様式(tight junction)の検討では、3次元組織を再構成しなかったロットについては全て陰性となった。3次元組織を再構成しない細胞については、凍結保存された時点で、既に老化が進んでおり、細胞増殖能や上皮細胞としての形質を失っていたと考えられた。

(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 α 、IL-1 β 、VEGF、TGF- β 、TGF- β 2、TNF α 、IGF-1、IL-8、KGF、PDGF、PG-E2 の倍地中への産生量について、再現性を含め検討したものの、全て測定限界以下となった。測定限界以下となった理由については、培養細胞の代謝活性が老化によって低下している可能性が考えられた。

C-2-3) 3次元培養血管内皮モデルの構築

(1) HMVEC あるいは HUVEC の組織シート型培養モデルのバリア機能

コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー内でコンフルエントまで培養することで、HMVEC は TEER 値が約 25% 上昇するのに対して、HUVEC は TEER 値が約 15% しか上昇しないことが分かった。また、ゼラチンコート処理を施したコラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー内では、TEER 値は HMVEC では約 35%、および HUVEC では約 23% まで上昇することが分かった。

(2) HDF と共培養した HMVEC の器官様プレート培養モデルのバリア機能

ゼラチンコート処理を施したコラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー内に HMVEC を培養した後に、コラーゲンビトリゲル薄膜の裏面に HDF を共培養することで、TEER 値は約 80% まで上昇することが分かった。

(3) HDF と共培養した HUVEC の器官様プレート培養モデルのバリア機能

ゼラチンコート処理を施したコラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー内に HUVEC を培養した後に、コラーゲンビトリゲル薄膜の裏面に HDF を共培養することで、TEER 値は約 30% まで上昇することが分かった。また、HUVEC の細胞間にはタイト結合に関連する ZO-1 の発現が確認された。しかし、日本人由来の J-1 株と J-2 株および白人由来の W-1 株と W-2 株については、いずれの細胞株でも TEER 値の変動は認められなかった。

C-3) 調査と情報収集

C-3-1) インフォームドコンセント

今回調査した 6 社 (表 1) 全てでインフォームドコンセント証明書が発行しているとの情報が得られ、内 5 社の書類を入手した。内容を確認した所、5 社全てメーカー名でインフォームドコンセントの取られた試料であることを証明する書類を発行していた。内 2 社からは、ドナーやドナー関係者と交わされるインフォームドコンセントの見本を入手することが出来た。

入手できたインフォームドコンセント関係書

類について、①営利企業での使用、②権利放棄についての記載の有無に注目し、確認したところ、4 社について記載が確認された。従ってこの 4 社の製品の使用にあたっては営利企業であっても倫理面、権利面において問題なく使用できることが示された。

C-3-2) 倫理問題の改善と確認

英国バイオバンクは 2007 年に収集を開始し、2010 年 7 月に 50 万人の試料の収集を完了した。日本では、2002 年の文部科学省の科学技術・学術会議の下部委員会の報告書でその言葉が使われ、36 万人のバイオバンク設立が提言された。それを受ける形で、経済振興予算として、30 万人の 47 対象疾患の患者試料を収集するバイオバンクジャパンが設立された。それもすでに 5 年計画の 2 期目の最終年度を迎えようとしており、今後を考える時期になっている。

一般的にバイオバンク自体は、「ヒト試料と情報を体系的に収集、保管、分譲する活動」という定義で広く考えることがよいと言われている。「体系的に」ということが重要であり、収集の目的が重要であるが、場合によっては仮説非依存性の収集という概念も使われる。40 歳から 65 歳の英国国民 50 万人の血清、血漿、血球細胞、尿を収集し、被験者の健康を 20-30 年の追跡研究を計画している英国バイオバンクの場合、「将来どのような目的に使われるかは、現在はわからない」という意味で「仮説非依存性」の収集という言葉が確信を持って使われるようになっている。

このように、将来の利用目的が定めきれなくなった背景には、2 つの理由が存在すると考えている。研究技術の進歩と研究方法の変化である。前者については、例えば 5 年前に実施された DNA 提供の際のインフォームドコンセントでは、現在現実的になりつつある全ゲノムシーケンシスなどを想定した説明が行われてはいないというような事実である。DNA という物質の利用範囲が、研究技術の進歩で変化した。後者については、例えば候補遺伝子解析研究と genome-wide association 研究を比較してみると理解できる。前者がその季節に、その場所で釣れる魚を予想して、釣道具や餌を用意する魚の釣方だとすると、後者はトロール漁法で根こそぎ収穫して、目的の魚を探すようなものである。genome-wide association 研究では方法自体が研究の目標を限定できない形になっている。

このような背景の元、現時点では、研究利用の想定が未知、即ち、前述の通り「仮説非依存性」になるため、インフォームドコンセントの場面で明確な研究利用を説明することができない。従って医療の場で使われていたインフォー

ムドコンセントと異なった内容を持つ説明と同意の形を作る必要がある。ということは、未来の未知の研究に利用されるという不安をヒト試料と情報を提供する由来者に負わせることになる。もちろん、不測の事態が発生する可能性を低くするように研究利用について設計をする。また、一旦試料と情報が提供されれば、その後は由来者の身体への侵襲はない。しかし情報による不利益がその後の課題となる。とはいえ、それらの試料と情報が廃棄と削除されるまでは提供の時点では予想もしなかった研究目的に使われ、思わぬ問題に発展するリスクと負担が由来者には存在する。

現在、ヒト試料を用いた研究については、連帯という言葉が声高に語られている。それは主に、由来者が次の世代と連帯することが求められており、研究に参加することは連帯の一環であるという意味に使われる。また、研究実施を通じて研究者は由来者と連帯するのだということの意味する場合もある。

ところが、ヒト試料と情報を利用する研究の倫理審査を受ける研究者は、承認による免罪符を受けること、免責を受けることを期待している。となると、先に述べた、インフォームドコンセントの段階で由来者が負うリスクと負担に対して、由来者と連帯する研究者の側が負うべきものは何であろうか。研究者が奪うだけの存在であることは許されないだろう。

研究者は提供された試料と情報の研究利用をオープンエンドにしたリスクと負担を負うことで、由来者と対等な立場で研究に関わることが求められている。その内容をどのように考えるかは今後の課題である。医療と研究が接近し、その区別が曖昧になる中で、研究者が負うべきもの、由来者が負うべきもの、研究に関わる医療関係者が負うべきもの、社会が負うべきものについて、真剣に論じ、それぞれの責務を負う時が来た。

D. 考察

日本国内におけるヒト正常細胞分譲システム網を確立すること自体の意義とその必要性・重要性については、あまり異論があるとは考えられない。しかし、その目的のために組織を入手すること、さらに組織の提供を受けて得られた細胞を、広く分配することについては、倫理的問題と、実際のシステム構築上の問題について、さまざまな議論を巻き起こす可能性がある。

角化細胞を得るための皮膚の提供においては、手術後通常廃棄する破片を利用するものであり、HUVECを得るための臍帯提供についても、通常廃棄する臍帯から比較的容易な手技によりHUVECの回収が可能であるため、これまで実態

として各研究機関と開業医などが、個別に契約し（あるいは口頭で依頼し）、皮膚や臍帯の提供が随時行われていた可能性がかなり高い。そこで、広く一般へ細胞を提供することを前提として、大学病院や一般病院から組織提供を行うことについての倫理的問題を明確にするため、各倫理委員会に審査を付託し、十分な審議に基づく承認を得ると共に、患者に配布する説明文書や同意書を、適切に作成することができた。

また、今回、本研究への協力を依頼した患者には、担当医の適切な説明により、患者の理解を得て、いずれも快く組織提供に応じて頂くことができた。これには、担当医の誠実で真摯な態度と、HSバンクにより作成されたパンフレットなど適切で有用な資料が奏功したものと考えられる。したがって、今後、組織提供による日本国内におけるヒト正常細胞分譲システム網の確立をめざすためには、よりHS財団による積極的な広報活動と提供者の理解を援助するための適切な資料の作成を行うこと、そして、なによりも、提供者となる患者に直接対応する担当医の熱意が必要条件となる。

一方、このようにして得られた細胞を用いた研究による発生する可能性のある潜在的利益については、組織提供者への説明と同意の段階で、提供者には直接の利益がないことを明確にしている。しかし、今回の組織提供のプロセスにおいては、これに加えて、例えば、提供機関である埼玉医科大学の知財戦略研究推進部門との協議および契約締結が行われ、提供機関との間においても、より明確な潜在的利益に対する対応の方法が確立したと考えられる。この点は、今後、ますます重要な要件となる可能性が高いと思われる。国内研究部門でのヒト由来生体試料の使用にあたっては、現在、各企業・研究組織内で倫理委員会、知的財産部門の承認を必要とするケースがほとんどである為、インフォームドコンセントを証明する書類は必要不可欠となっている。

今後、国内の病院等で採取された組織を、営利企業を含めた各研究機関で使用できるようにする為には、インフォームドコンセント証明書が必要とすることはもちろん、「営利企業での使用」および「権利放棄」についても了承を得られるよう、記載内容を考慮する必要がある。実際、国内で流通している海外からのヒト由来の生体試料は主にアメリカのメーカーから供給されているが、全てインフォームドコンセントの取られた製品である。その内容について調査した所、4社の資料で「営利企業での使用」および「権利放棄」がドナーまたはドナー関係者から了承されていることが確認された。

現状で、日本でのヒト組織の所有権・支配権

に関しては、かなり法技術的な問題がある。その点でも、今後法律家による日本におけるこれらのテーマに関する研究を期待したい。また、いろいろな利用に関して、果たしてインフォームドコンセントだけがすべてを決めるのかなど多くの課題がいまだに残されている現状が明らかとなった。今、患者、医師、研究者の連携・連帯が叫ばれている。そして、その中で研究者が自由に免責された状態で研究を行うことが重要であるという意識が高くなってきているように思われる。しかし、ここで論じたように、オープンエンドの状態を得るためには研究者の責務について今一度考える必要がある。そして、本報告書の主題である企業によるヒト試料等の商業利用を考えると、企業側に問われる倫理的な課題は、今一度整理しなおす必要がある。企業の社会的責任（CSR）の一環としてこの問題を位置づけることも重要であろう。もちろん企業が利用する場合は、治験のように最後まで見通した研究の計画の元に行われるであろう。しかし、それだけでは、治験と異なる研究を支えることはできないことを考えてみる必要がある。特に、医療と近いところで企業が営利を目的にして研究を行うことの重要性が増してきたことを踏まえた「企業によるヒト試料等の利用方針」の素描が必要であろう。

本件について、組織を利用するサイドから見た場合、倫理的な問題も解決されたとはいえない。例えば、ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングでは、日本人の細胞を研究に利用する際の倫理的課題が倫理委員会において、提供者に対するインフォームドコンセントの内容が曖昧であるとの指摘があった。具体的には民間企業への提供の可能性やその際の研究内容に対する記載が十分ではないとのことであり、本研究以外の研究内容では使用すべきでないとの結論となった。さらに、具体的な連結不可能匿名化の方法が不明確であり、実際には連結可能ではないかとの指摘もあった。連結可能であるならば、それを明確にすべきとの判断となった。また、本研究において日本人が必須であるのであれば、HSバンクが入手する組織の由来である「日本人」の定義が曖昧であるとの指摘があった。日本人であることの特定は医療機関にしかできないがその確認項目がなく、結局医療機関にしかゆだねることはできないとのことから、ドナー情報に明記されるよう求められた。本研究は、研究目的が明白であることから、本研究に限定して、上述の条件付でHSバンクからの日本人組織由来の細胞の受け入れが承認された。今後、新たな研究課題でのヒト組織の入手では、インフォームドコンセントの内容や連結可能/不可能の手段等、解決すべき課題は多いと考え

られる。

最後に、HSバンクからの組織の購入値段が高額（約19万円）である点、HSバンクから供給された組織にコンタミネーションがあった場合、うまく細胞培養できなかった場合などの保証がなされておらず、対応策などを今後検討する必要がある。例えば、皮膚の初代培養に於いて、数mmの皮膚片から細胞を単離することは、一般的に困難と思われており、貴重な試料を無駄にした場合も生じた。また、角化細胞は、ドナーのバックグランド、継代回数や培養条件により、生育状態や分化の状況が変化し、遺伝子発現が変動するため、種差を比較するためには、性別、年齢、採取部位、採取方法や細胞の培養条件などを同一にすることが望ましい。今回の試験結果では、日本人3ロット、白人3ロットともに、成人女性胸部由来の角化細胞で、年齢も同年代とした。しかし、送付された細胞の状態が良好ではなく、細胞増殖や正常な3次元構造を再現しなかった。送付されてきた細胞の老化が進行していたためと推察した。その原因は、ドナーの年齢によるところも考えられたが、同時に、海外より取り寄せている細胞であることもあり、皮膚を採取してからの時間的な影響も推測された。細胞を用いて種々の試験を行う場合、組織を摘出した後、出来得る限り、短時間での処理が望ましいのは当然であろう。今回の、国内におけるヒト正常細胞の分譲システム網の確立は、このような観点からも、意義があるものと考えられた。

一方、種々のマーカーの内、炎症性サイトカインのIL-1 α のみ、日本人に対して白人細胞は高い傾向があることから、炎症の発現に関して、差異を有する可能性が示唆されたものの、3次元表皮培養では、細胞表面マーカーの発現量や各種サイトカインの産生量が低く、上皮細胞としての形質を消失していると考えられた。これらの結果からは、人種差を考察できるに十分なものではなく、本検討を今後進めていくためには、組織からの細胞分離方法の課題が重要であると思われる。また、その問題が解決した後、個人差も考慮して十分な試料数を揃えることが必要と考える。

なお、コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバーを利用して、HMVECおよびHUVECのタイト結合に依存したバリア機能をTEER値の変動で容易に測定できる3次元培養モデルを構築する手法がほぼ確立できた。また、異なる人種由来のHUVECを用いて、炎症性サイトカインや薬剤に対する血管透過性を評価する研究も行うことが可能な段階になったが、研究期間の問題から人種差の詳細な検討までに至らなかった。