

コラーゲンビトリゲル膜と培養細胞を用いた角膜モデルの構築と 化学物質の眼刺激性試験および角膜透過性試験への応用に関する研究

Research on the fabrication of in vitro cornea models using collagen vitrigel membranes
and their application for eye irritation test and corneal permeability test of chemicals

氏名 山口 宏之

氏名 Hiroyuki Yamaguchi

【緒言】

現代の生活において、化学物質は医薬品や化粧品、シャンプーなどの日用化学品、農薬など様々な用途で利用されている。これらの化学物質は、ヒトに対する効能や安全性をあらかじめ評価することが法令で定められている。従来、これらの評価は動物実験によって行われることが多かった。しかし、動物実験は実験動物に苦痛を与えるため倫理的な批判があるのみならず、化学物質に対する応答性がヒトと異なる。そのため、動物実験により得られた結果は必ずしもヒトに対する影響を反映しないことが課題となる。このような背景から、培養細胞を用いてヒトの器官の構造や機能の再現をめざした培養モデルの構築と、当該培養モデルを用いた試験法の開発が試みられている。培養モデルを構築するための細胞の足場となる素材には、細胞の接着や増殖、分化などを制御して生体内に類似した構造および機能を発現させることのみならず、生体内の細胞外マトリクスが担っている化学物質の移動媒体としての役割を果たすことも求められる。しかし、従来より使用されてきたプラスチック製の足場材料は、この役割を十分に果たせない。本研究では、生体内の結合組織に匹敵する高密度のコラーゲン線維より構成されるコラーゲンビトリゲル膜（以下、CVM）を培養細胞の足場として用いるために、新しい細胞培養容器「CVM チャンバー」を作製した。この CVM チャンバーを角膜上皮細胞および角膜内皮細胞の足場に利用することで、ヒト角膜の上皮、実質および内皮の構造と機能の一部を反映した培養モデルを構築した。さらに、角膜上皮モデルに化学物質を曝露した後の経上皮電気抵抗値の経時変化を指標とした眼刺激性試験法、および角膜モデルの上皮側より添加した化学物質の内皮側への透過性を評価する角膜透過性試験法を開発した。

1. CVM チャンバーの作製

CVM は、従来のコラーゲンハイドロゲルをガラス化してから再水和することで作製される透明な薄膜である。CVM の特徴は、透明であること、ピンセットで取り扱える強度を有していること、および高分子タンパク質の透過性にも優れていることである。そのため、CVM の表面に培養した細胞は、顕微鏡を用いて形態を明瞭に観察できるのみならず、CVM を反転して裏面に異種細胞を培養することでパラクライン相互作用を誘導できる。本研究では、CVM の表面に培養した上皮（あるいは内皮）細胞の経上皮（あるいは内皮）電気抵抗（transepithelial / transendothelial electrical resistance; TEER）値を測定するため、および CVM の表面から裏面への化学物質の透過性を評価するために、CVM 乾燥体をプラスチックの円筒の底面に接着した新しい培養容器「CVM チャンバー」を作製した（図 1a）。その後、この培養容器は関東化学(株)より「ad-MED ビトリゲル」として製品化された（図 1b）。

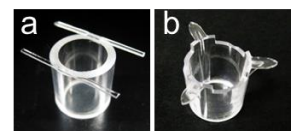


図 1 CVM チャンバー
試作品 (a)、製品 (b)

2. CVM チャンバーを用いた角膜モデルの構築

2-1. 角膜上皮モデルの構築

先行研究では市販の多孔質 PET 膜セルカルチャーインサートの PET 膜上に CVM を調製して、CVM 上でヒト角膜上皮由来の株化細胞（HCE-T 細胞；理研バイオリソース研究センター、RBC#2280）を培養することでヒト角膜上皮モデルを作製した¹⁾。しかし、ヒト角膜上皮と同等の約 6 層の細胞層から成るヒト角膜上皮モデルの形成には、9 日間の培養（コンフルエントまで増殖する 2 日間の液相培養と多層化増殖する 7 日間の気相-液相界面培養）が必要であった。また、PET 膜は凍結切片を用いた免疫組織学的解析に適さないという課題があった。本研究では、下面からも培養液が良好に浸透できる CVM チャンバー内に HCE-T 細胞を 6 日間培養（コンフルエントまで増殖する 2 日間の液相培養と多層化増殖する 4 日間の気相-液相界面培養）することで、約 6 層の細胞層から成るヒト角膜上皮モデルを構築する技術を開発した。この角膜上皮モデルの凍結切片は容易に作製できるため、免疫染色によりヒト角膜上皮に特徴的なタンパク質が発現されていることも確認できた（図 2）。また、細胞層の多層化に伴い TEER 値が上昇し、上皮バリア機能の形成が確認された。

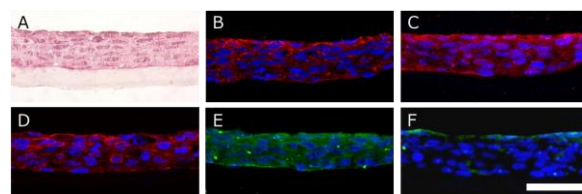


図 2 ヒト角膜上皮モデル断面の HE 染色像 (A)、および、ZO-1 (B)、Occludin (C)、Connexin-43 (D)、Cytokeratin 3 (E)、MUC1 (F) に対する免疫染色像。スケールバーは 50 μm を示す。

2-2. ヒト角膜の上皮、実質および内皮の構造を反映した培養モデルの構築

ヒトのボーマン膜を代替するために厚さ約 20 μm の CVM を有する CMV チャンバー（以下、ボーマン膜モデル）、またヒト角膜実質を代替する無細胞性角膜実質として厚さ約 450 μm の CVM を有する CMV チャンバー（以下、無細胞性角膜実質モデル）を作製した。さらに、CVM チャンバーの底面に専用のリングを装着することで、CVM の表裏面に異種細胞を播種する技術を開発した。この培養技術を用いて、角膜上皮細胞（HCE-T 細胞）と角膜内皮細胞（ウシ角膜内皮由来細胞株（BCD C/D-1b；ATCC）をクローニングして得た内皮細胞様形態を示す細胞）を共培養することで、角膜上皮-ボーマン膜-内皮モデルおよび角膜上皮-無細胞性実質-内皮モデルを構築した。また、HCE-T 細胞のみを培養して、角膜上皮-ボーマン膜モデルおよび角膜上皮-無細胞性実質モデルを構築した。組織学的解析により、角膜上皮-ボーマン膜-内皮モデルおよび角膜上皮-無細胞性実質-内皮モデルは、約 6 層の上皮細胞層と単層の内皮細胞層が厚さ約 20 μm および約 450 μm の CVM を介して構築されていること、また、角膜上皮-ボーマン膜モデルおよび角膜上皮-無細胞性実質モデルは、約 6 層の上皮細胞層が厚さ約 20 μm および約 450 μm の CVM 上に構築されていることが確認された。

3. 眼刺激性試験法の開発

従来、化粧品などに使われる化学物質の眼刺激性は、ウサギの眼に被験物質を滴下した際の障害の程度と回復に要する期間を指標とした動物実験（ドレイズ試験）により評価されてきた。一方、近年は食用のウシやニワトリから摘出した角膜や眼球、培養細胞、あるいは培養細胞を用いて構築した角膜モデルを使った試験法が開発されている。しかし、弱刺激性あるいは無刺激性の化学物質を正確に識別する方法は確立されていない。この理由は、既存の試験法では組織傷害の程度あるいは培養細胞の生存率を眼刺激性の評価指標としているためと考えられる。先行研究では、角膜が眼刺激性物質に曝露された直後に、組織障害や細胞死より先立って惹起される角膜上皮バリア機能の変化に着目した。そこで、多孔質 PET 膜セルカルチャーインサートを用いて作製したヒト角膜上皮モデルに眼刺激性の強さが異なる 4 種類の被験物質を曝露し、上皮バリア機能の変化を評価するために TEER 値の経時変化を測定した。その結果、被験物質の眼刺激性の強さと TEER 値の変化のパターンとの間に関連性があること、および、化学物質の曝露による TEER 値の変化は数分以内には終点に達することが明らかとなった¹⁾。

本研究では、化粧品原料として用いられる化学物質より、GHS（The Globally Harmonized System of

Classification and Labelling of Chemicals) 分類による眼刺激性の全区分から物性の異なる物質が適宜含まれるように 30 種類の被験物質を選択した。各被験物質を TEER 値の測定を妨害しない 2.5w/v% の濃度で培養液に溶解または懸濁して (以下、被験物質調製液)、CVM チャンバー内に構築したヒト角膜上皮モデルに曝露し、曝露直後から 10 秒毎に 3 分間 TEER 値の変化を記録した。その結果、TEER 値の変化は 4 つのパターンに分類できることが分かった (図 3)。そこで、このパターンを識別する指標として、①曝露直後から TEER 値が低下し始めるまでの時間差「Time lag」、②TEER 値の低下速度「Intensity」、および③TEER 値の終点低下率「Plateau level」を設定した。次に、3 種類の評価指標を表現した数式から算出される指標値を用いて各被験物質の眼刺激性の有無を判定できるような基準を設定することで、被験物質の眼刺激性を評価する試験法を考案した。30 種類の被験物質を解析した結果、GHS 分類に対して感度 100%、特異度 75% および一致度 90% と高い相関が得られた。この結果は、被験物質の眼刺激性を高感度に判定できることを示唆するため、本試験法を Vitrigel-Eye Irritancy Test (EIT) 法と命名した²⁾。

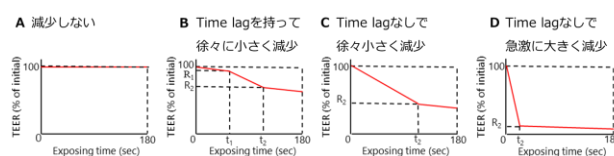


図 3 化学物質をヒト角膜上皮モデルに曝露した際の TEER 値の経時変化のパターン

次に、Vitrigel-EIT 法の実用性を検証するために、被験物質を 118 種類に増やして試験を実施した。その結果、GHS 分類に対する感度、特異度、一致度はそれぞれ 90%、66%、81% となり感度が低かった。また、眼刺激性であっても酸性の被験物質は、TEER 値を上昇させて偽陰性となることが分かった。なお、酸性物質が TEER 値を上昇させる現象は、生体内の上皮組織でも惹起されることが報告されていた。そこで、被験物質から「被験物質調製液が pH5 以下となる物質」を除いた 109 物質について、感度、特異度、一致度を再解析した結果、各々 97%、67%、84% に改善された。さらに、被験物質調製液を 3 分間曝露したヒト角膜上皮モデルについて、タイトジャンクション関連タンパク質の ZO-1、およびヒト角膜上皮の表面に形成されるムチン層の構成成分である膜結合型ムチン MUC1 に対する免疫組織染色を実施した。その結果、GHS 分類の眼刺激性物質のみならず、非刺激性物質のうち Vitrigel-EIT 法で刺激性と判定された物質でも ZO-1 と MUC1 が消失していた。興味深いことに動物実験では、これらの偽陽性物質には短時間で消失する眼刺激性が認められることが報告されている。これらの知見は、Vitrigel-EIT 法に免疫組織学的解析を組み合わせることで、眼刺激性が高感度に検出できることを示唆する³⁾。

次いで、Vitrigel-EIT 法を国際的な公定法である OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) テストガイドラインに登録することを目指して、ICATM (International Cooperation on Alternative Test Methods) の協力を得て結成された国際的な VMT (Validation Management Team) のもと、日本動物実験代替法評価センターの主導で国内 3 施設の協力を得て本試験法のバリデーション研究を実施した⁴⁾。Vitrigel-EIT 法は、VMT が作成したバリデーション報告書に基づいて OECD へ申請された後、審査を経て 2019 年にテストガイドライン No.494 として登録された (OECD/TG494)。

2019 年に登録された TG494 では、被験物質調製液が pH5 以下となる物質および固体物質が適用範囲から除外されていた。固体物質に関しては、ヒト角膜上皮モデルに被験物質調製液を曝露させる時間に相当する 3 分以内に被験物質が培養液から相分離 (浮遊または沈降) する物質で偽陰性または偽陽性反応が生じやすい傾向が認められた⁴⁾。そこで、pH5 以下となる被験物質調製液、および混合後 3 分以内に吸光度が 0.1 (濁度変化として 20.6% に相当) を超えて変動する被験物質調製液を除外する予試験を開発した。158 種類の被験物質 (液体 94、固体 64) について予試験を実施した結果、酸性となる 12 種類および相分離しやすい 39 種類の計 51 種類の被験物質調製液が除外された。予試験を通過した 107 物質 (液体 65、固体 42) の Vitrigel-EIT 法による眼刺激性の判定結果を、GHS 分類による眼刺激性分類と比較した場合の感度、特異度および一致率は、96%、67% および 81% であった。一方、2019 年登録の TG494 では、158 物質より被験物質調製液が pH5 以下となる物質および固体物質を除外するため、適用範囲とな

る 89 物質（液体 89、固体 0）について Vitrigel-EIT 法により眼刺激性を判定した。その結果を GHS 分類による眼刺激性分類と比較した場合の感度、特異度および一致率は 95%、67%および 80%であった。これらの結果から、予試験を利用することで適用可能な物質数が増加するだけでなく予測性も向上することが示唆された⁵⁾。この予試験を用いた Vitrigel-EIT 法は 2021 年に改訂 TG494 として登録された⁶⁾。

4. 角膜透過性試験法の開発

緑内障治療薬のような後眼部に作用する点眼薬は主に角膜を經由して作用部位に到達することから、後眼部作用性点眼薬の開発では角膜透過性の評価が重要となる。従来はウサギなどの実験動物に点眼して種々の解析が行われていた。本研究では、実験動物の代わりに角膜モデルを用いた化学物質の角膜透過性試験の有効性を検証した。被験物質として、点眼薬に用いられる薬剤の分子半径に対応した cyanocobalamin（ストークス半径 8.5 Å）、fluorescein isothiocyanate dextran (FD) -4（同 14 Å）、FD-10（同 23 Å）、FD-20（同 33 Å）、および FD-40（同 45 Å）を選択した。CVM チャンバーに構築したボーマン膜モデル、無細胞性角膜実質モデル、角膜上皮-ボーマン膜モデル、角膜上皮-無細胞性実質モデル、角膜上皮-ボーマン膜-内皮モデルおよび角膜上皮-無細胞性実質-内皮モデルを用いて、各被験物質の透過速度を測定して透過係数（ P_{app} ）を算出した。その結果、無細胞性角膜実質モデルは分子半径が大きくなるほど P_{app} が減少した。また、6 種類の角膜モデルの P_{app} の比較より、上皮細胞層、無細胞性実質および内皮細胞層はいずれも物質透過性に寄与するが、上皮細胞層の寄与が最も大きいことが分かった。さらに、角膜上皮-無細胞性実質-内皮モデルの P_{app} と摘出ウサギ角膜の P_{app} （文献値）との間には有意差が認められなかった。このことから、CVM チャンバーを用いて構築した角膜モデルは、化学物質の角膜透過性の予測に有効であることが示唆された⁷⁾。

【総括】

本研究では、CVM チャンバーを用いて角膜由来の細胞を培養することで、ヒト角膜の上皮、実質および内皮の構造とバリア機能を反映した培養モデルを構築した。また、ヒト角膜上皮モデルに化学物質を曝露した直後の上皮バリア機能の変化を指標として、化学物質の眼刺激性を高感度に出検する Vitrigel-EIT 法を開発した。さらに、ヒト角膜実質を厚さ約 450 μm の CVM で代替して構築した角膜上皮-無細胞性実質-内皮モデルは、化学物質の角膜透過性の予測に有効であることが示唆された。なお、Vitrigel-EIT 法は国際的な公定法である OECD/TG494 として登録され、安全性試験受託会社や化粧品メーカー等で原料や製品の試験に利用されている。

本研究で着目した上皮（内皮）バリア機能は、角膜のみならず皮膚や消化管、呼吸器、血管などの上皮（内皮）にも発現しており、医薬品などの化学物質の体内動態に大きな役割を果たしている。今後、これらの器官についても CVM チャンバーを用いた上皮（内皮）バリア機能を有するモデルが構築され、新たな医薬品や化粧品などの開発に貢献することが期待される。

【引用文献】

- 1) Takezawa T, Nishikawa K, Wang PC. Toxicol In Vitro. 2011 Sep;25(6):1237-41.
- 2) Yamaguchi H, Kojima H, Takezawa T. Toxicol Sci. 2013 Oct;135(2):347-55.
- 3) Yamaguchi H, Kojima H, Takezawa T. J Appl Toxicol. 2016 Aug;36(8):1025-37.
- 4) Kojima H, Yamaguchi H, Sozu T, Kleinstreuer N, Chae-Hyung L, Chen W, Watanabe M, Fukuda T, Yamashita K, Takezawa T. Altern Lab Anim. 2019 Jul-Sep;47(3-4):140-157.
- 5) Yamaguchi H, Kojima H, Takezawa. Nano Biomedicine. in submission.
- 6) OECD (2021), Test Guideline No. 494. <https://doi.org/10.1787/9f20068a-en>.
- 7) Yamaguchi H, Takezawa T. Drug Metab Dispos. 2018 Nov;46(11):1684-1691.