

1. 研究課題名：正常ヒト細胞を用いた組織モデルの作製と評価
2. 研究機関：倉敷紡績株式会社 技術研究所（yamamoto@lab.kurabo.co.jp）
3. 研究者：山本良平
4. 研究協力者：元野満（倉敷紡績株式会社・技術研究所）
Mitch Klausner(MatTek Co., Ashland, MA)
Gary D. Shipley, Ann K. Shipley (Cascade Biologics, Inc., Portland, OR)
妹尾久雄（名古屋大学・環境医学研究所）
5. 研究期間：平成9年～11年

6. 要約

我々は正常ヒト細胞の分離および培養法を検討してきた（1、2、3）。その結果、表1に示す細胞の培地および培養法を開発することができた。これら正常細胞は、基礎研究および薬理・毒性試験において使われるが、通常の単層培養ではモデルとしての限界があると言わざるをえない。そこで、より生体に近似したモデルとして、表皮モデルおよび血管モデルについて検討を行った。

表皮モデルは、表皮角化細胞の重層モデルを用いた。このモデルは、*in vivo* の表皮構造が再現されており、表皮特異的な分化マーカーの存在も確認されている。このモデルが、化学的な刺激に対して *in vivo* と同じ反応を示すかどうかを調べた。皮膚刺激試験におけるスコアが分かっている化粧品について、本モデルを用いて試験した。その結果、化粧品による本モデルの細胞生存率低下は *in vivo* の結果とよく一致した。しかし、本モデルでは高濃度のエタノールを含む試料で過剰に反応する傾向が見られ、溶媒に対するバリアー機能が実際の表皮より低いことが示唆された。

血管モデルは、フィルター上に血管内皮細胞を単層に培養したものをを用いた。このモデルでは、物質および細胞の透過性について評価した。その結果、本モデルはFITCデキストランおよび血球細胞の透過を阻止し、IL-8 によって血球細胞が血管内皮細胞層を遊走することが確認できた。

7. 研究目的

正常ヒト細胞（表皮角化細胞および血管内皮細胞）で作られた組織モデルの機能を評価することにより、その有用性を確認する。同時に、*in vivo* との相違を明らかにし今後の開発の基礎データとする。

8. 材料および方法

8-1. 表皮モデル

用いた表皮モデルは、特殊メンブレン上に培養された正常ヒト表皮角化細胞で、多層化した細胞より構成され、上層の細胞は分化（ケラチン化）している。我々の共同研究者が開発したものであり、既に倉敷紡績(株)よりEP-100の商品名で販売されている。表皮特異分化マーカーである pro-filaggrin、K1/K10 cytokeratin involucrin などの存在が確認されて

いる。また、構造的にもラメラリポド層、デスモソーム、トノフィラメント束、ケラトヒアリン顆粒の存在が確認されている（図1）。

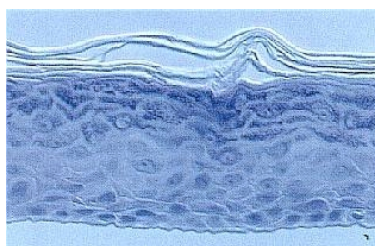


図1 表皮モデルの構造

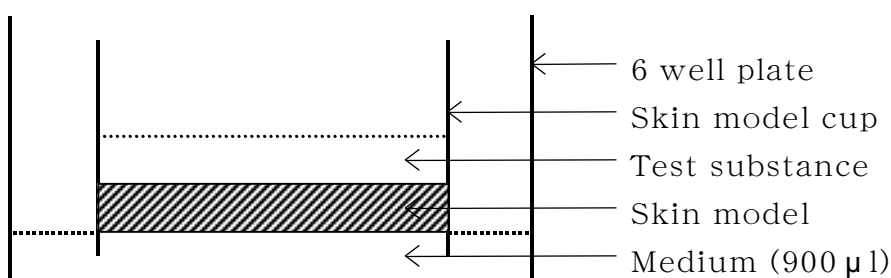


図2 表皮モデルのデバイス

実際のモデルは図2に示すデバイスの形態になっており、各カップごとに別々に取り扱うことができる。

表1 組織からの分離法および培養法が確立された正常ヒト細胞

細胞名	由来	基礎培地
表皮角化細胞	皮膚	改変MCDB151
メラニン細胞	皮膚	改変MCDB151
繊維芽細胞	皮膚	改変MCDB102
さい帯静脈血管内皮細胞	血管	改変MCDB131
大動脈血管内皮細胞	血管	改変MCDB131
肺動脈血管内皮細胞	血管	改変MCDB131
微小血管内皮細胞	血管	改変MCDB131
大動脈血管平滑筋細胞	血管	改変MCDB131
肺動脈血管平滑筋細胞	血管	改変MCDB131
冠状動脈血管平滑筋細胞	血管	改変MCDB131
角膜上皮細胞	角膜	改変MCDB151

血管内皮細胞用と血管平滑筋細胞用の改変MCDB131は成分が異なる。
 角膜上皮細胞用と他の細胞用の改変MCDB151は成分が異なる。

8-2. 血管モデル

メンブレン・デバイス（商品名インターセル：孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ 、商品名ケモタキセル：孔径 $3\ \mu\text{m}$ いずれも倉敷紡績製）（図3）を接着因子でコーティングし、これに血管内皮細胞を播種・接着させて24ウェルのプレートで培養した。なお、インターセルではⅠ型コラーゲン、ケモタキセルではⅠ型コラーゲンにファイブロネクチンを加えたものを接着因子として用いた。細胞としてはさい帯静脈内皮細胞（HUV EC）および微小血管内皮細胞（HMVEC）を用いた。

8-3. 表皮モデルによる化粧品の刺激性試験

図2. の表皮モデルデバイスに $100\ \text{mg}$ または $100\ \mu\text{l}$ のサンプルを乗せ、 37°C で24時間、炭酸ガスインキュベーター中に置いた。その後、MTT法により生細胞数を測定した。ネガティブ・コントロールとして蒸留水を用い、サンプルにおける細胞生存率（%）をMTT%として細胞障害性の指標とした（4）。

8-4. 血管モデルによる透過性試験および細胞遊走試験

FITC - デキストラン（分子量 $70,000$ ）をインターセルを用いた血管モデルのカップに入れ、 37°C 、15分静置した後、細胞層を透過したFITC - デキストランの量を蛍光強度によって測定した。

一方、細胞の遊走試験は、ケモタキセルを用いたモデルで行った。ヒト新鮮血から分離したPolymorphnuclear cell（PMN）をカップ内に入れ、1時間置いた後、血管内皮細胞層を通過した細胞数をカウントした。

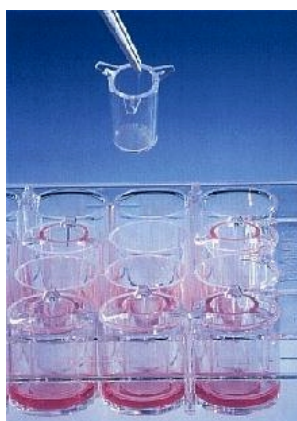


図3 ケモタキセル

9. 結果

9-1. 表皮モデルによる化粧品の刺激性試験

化粧品18種についての、表皮モデルによるMTT%値およびウサギを用いた皮膚刺激性試験の結果（Drainage法）を図4に示す。図4の18種の化粧品についての $\text{Log}(\text{MTT}\%)$ 値とMDS値の相関係数は -0.67 であった。

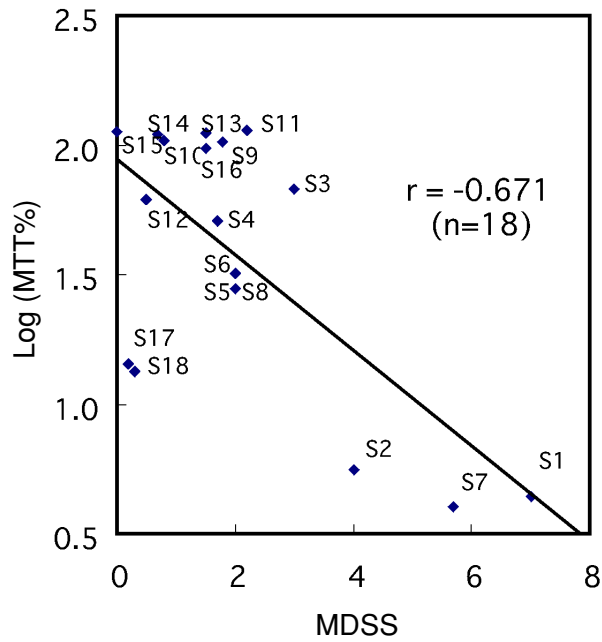


図4 化粧品についてのMTT%値とドレイズスコア（MDSS）

S17とS18の化粧品において表皮モデルでの障害性が高く出た。そこで、この2つのサンプルの組成について調べたところ高濃度のエタノールを含むことが分かった。エタノールはウサギでの皮膚刺激性試験では大きな障害を示さないが、表皮モデルでは細胞障害性を持っている。このことがS17およびS18の結果に影響しているものと予想された（図5）。この2種の化粧品を除くと、相関係数は-0.87になった。

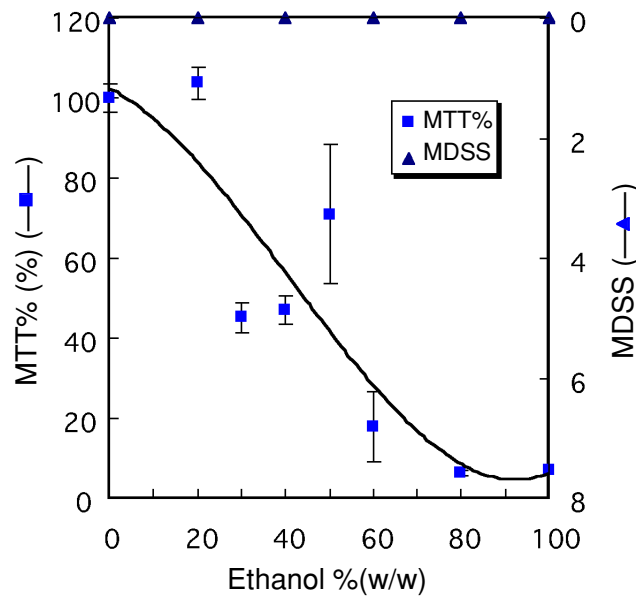


図5 表皮モデルとウサギ皮膚に対するエタノールの影響

9-2. 血管モデルによる透過性試験

インターセルにHUVECを接着させた血管モデルを用いてFITC-デキストランの透過性試験を行った。その結果、透過量は5%で十分なバリアー性が認められ、細胞が均一かつ隙間なくメンブレン上に接着していることが確認できた。

ついで、ケモタキセルとHMVECを用いたモデルで血球細胞の遊走について調べた。図6に示すように、細胞を播種していないメンブレンのみの場合に比べ、血管内皮細胞を含むモデルではPMNの遊走阻止が認められ、IL-8によって遊走が促進されるという結果が得られた。

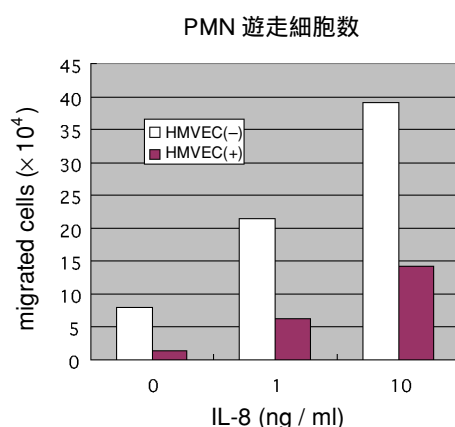


図6 血管モデルにおけるPMNの遊走

10. 考察

表皮モデルは薬物の皮膚透過性試験や皮膚刺激性試験の代替法に使用するという目的で開発されたものである。今回の結果より、表皮モデルによる試験は、動物を用いた皮膚刺激性試験の結果をある程度予測できることが示唆された。しかし、一方で、表皮モデルはエタノールに対する感受性が実際の表皮より高いという結果も得られ、今後、このような *in vivo* との違いを明確にして行く必要があると思われる。この違いを明かにすることは、表皮モデルによるデータを的確に解釈する上で必要であるばかりでなく、より生体組織に近いモデルを開発する上で重要である。

血管モデルは今回はじめて作製し評価したものである。今回の結果より、このモデルは血管モデルとして応用できる可能性が示されたが、以下の点について更に確認が必要である。まず、今回は内皮細胞によるメンブレンの被覆を重点に検討したが、メンブレンのコーティングに用いる接着因子の種類と量を詳細に検討する必要がある。コーティングは細胞の遊走および物質の透過、さらに血管内皮細胞の機能に大きく影響すると予想される。また、モデルに用いる血管内皮細胞の由来についても検討する必要がある。我々のデータでは大動脈と肺動脈の内皮細胞では各種因子にたいする応答が異なっている。当然、これは血管モデルの機能に影響するであろう。さらに、最終的には血管平滑筋細胞とのコカルチャーによって、より生体に近い状態を再現することも必要と思われる。

11. 今後の展開

表皮モデルについては、さらに多種の物質について *in vivo* 皮膚刺激性試験と比較し、実用性の確認を行っていく。なお、平成11年度は、このモデルを用いた繊維製品の安全性評価法の標準化を検討しているところである。

血管モデルは、機能を多面的に調べ、より生体に近いモデルとして改良したい。一方、現在、今回開発したモデルを医学部、製薬会社の研究者に提供し、種々の研究に使用可能かどうかを評価中である。

12. 参考文献

- (1) H. Yanase, H. Torishima and R. Yamamoto: The effect of calcium and magnesium ions on the proliferation of normal human epidermal melanocytes. *Pigment Cell Res.* **10**, 150-152 (1997).
- (2) 元野 満、田中雅教、山本良平：正常ヒト気管支上皮細胞用培地の検討．*組織培養工学* **24**, 30-32 (1998).
- (3) 元野 満、山本良平、Ann K. Shipley, Gary D. Shipley：培地組成の制御による血管平滑筋細胞の分化．*組織培養工学* **24**, 167-169 (1998).
- (4) M. Genno, R. Yamamoto, H. Kojima, H. Konishi and M. Klausner: Evaluation of a new alternative to primary Draize skin irritation testing using EpiDerm skin model. *AATEX* **5**, 195-200 (1998).

13. 研究業績

13 - 1 . 原著論文

- (1) M. Genno, R. Yamamoto, H. Kojima, H. Konishi and M. Klausner: Evaluation of a new alternative to primary Draize skin irritation testing using EpiDerm skin model. *AATEX* **5**, 195-200 (1998).

13 - 2 . 総説など

- (1) 山本良平：綿とバイオテクノロジー：環境保全と安全性評価へのアプローチ．*繊維と工業* **55**, 26-29 (1999).

13 - 3 . 国際学会発表 なし

13 - 4 . 国内学会発表

- (1) 山本良平：綿とバイオテクノロジー：環境保全と安全性評価へのアプローチ、第26回繊維加工シンポジウム、平成10年5月22日、大阪府立大学．
- (2) 山本良平：綿のエコフレンドリー・プロセッシング、繊維学会関東支部講演会、平成10年10月23日、大妻女子大学．

13 - 5 . 新聞など なし

13 - 6 . 特許 なし

14 .

(1) Development and evaluation of tissue models using normal human cells.

(2) Technical Research Laboratory, Kurabo Industries Ltd.

(3) Ryohei Yamamoto

(4) Michiru Genno (Technical Research Laboratory, Kurabo Industries Ltd.)

Mitch Klausner (MatTek Co., Ashland, MA)

Gary D. Shipley, Ann K. Shipley (Cascade Biologics Inc., Portland, OR)

Hisao Seo (Institute of Environmental Medicine, Nagoya University)

(5) 1997 – 1999

(6) Abstract

We developed the culture system of normal human cells and studied their biochemical characters. In this study, we prepared and studied two tissue models, that is, the skin model using normal human keratinocytes and the vascular model using normal human vascular endothelial cells.

The skin model, developed by the collaborator, is the multilayer model of skin. This model has a structure similar to the epidermis and expresses the markers of differentiation of keratinocytes. The responsibility of this model to chemical irritation was studied to compare with true epidermis. Eighteen cosmetics were applied to the model and the damage was compared to their Draize's skin irritation scores. The results obtained by the skin model was correlated well to the Draize's scores. However the skin model was more sensitive to ethanol than epidermis. This means that the ability of the model as the barrier for organic solvents is relatively low compared with true epidermis.

The monolayer culture of vascular endothelial cells on a membrane filter was used as the vascular model. The permeability of FITC-dextran and polymorphnuclear cells was studied. FITC-dextran and polymorphnuclear cells (PMN) were blocked to permeate through the endothelial cell layer. IL-8 accelerated the permeability of PMN. Our vascular model will be able to be used as in vitro model of vasculer, although we should evaluated more in detail.