

胚性幹細胞(ES細胞)を利用した 安全性評価研究

住友化学(株)

生物環境科学研究所

堀江 宣行
樋口 敏浩
川村 聡
斎藤 幸一
鈴木 紀之

Safety Evaluation Study Using Embryonic Stem (ES) Cells

Sumitomo Chemical Co., Ltd.

Environmental Health Science Laboratory

Nobuyuki HORIE

Hashihiro HIGUCHI

Satoshi KAWAMURA

Koichi SAITO

Noriyuki SUZUKI

Embryonic stem (ES) cells are pluripotent stem cells that have the capacity for self-renewal and multilineage differentiation, and they have recently started to be used in the safety evaluation of chemicals. The novel *in vitro* embryotoxicity test (EST) that utilized the differentiation ability of mouse ES cells into cardiomyocytes was established in Germany. We could obtain results which were equal to the validation study performed in Europe and will apply the test system to a preliminary assessment of new chemicals. In addition, we have participated in one of the national projects to improve this test system to make it much simpler and more precise.

胚性幹細胞 (ES細胞) について

1. ES細胞とは？

哺乳動物の個体発生は、精子と卵子が受精した受精卵から始まる。胚性幹細胞 (Embryonic stem cell ; 以下、ES細胞) とは、この個体発生において受精卵から分化した胚盤胞 (Blastocyst) の中から将来胎児になる組織 (内部細胞塊 ; Inner cell mass) を採取し、シャーレの上で培養して樹立される細胞株である (Fig. 1)。1981年にマウス¹⁾で初めて樹立され、当初は主に遺伝子組換え動物を作出するツールとして利用されてきたが、1998年にヒト²⁾で樹立に成功してから、分化誘導技術の進展と共に再生医療への応用が期待されるようになり、研究の著しい進展がみられるようになった。

ES細胞は未分化状態で無限に増殖することができる「自己複製能」と、体を構成する全ての細胞に分化することができる「多分化能」という2つの性質を併せ持つ多能性幹細胞である (Fig. 2)。現在では、再生医療への応用が最も注目を浴びている分野であ

るが、基礎的な発生生物学分野の研究や分化細胞を利用した薬理学的研究、そして本稿で紹介する分化過程を利用した発生毒性研究など、幅広い研究分野に利用されている。

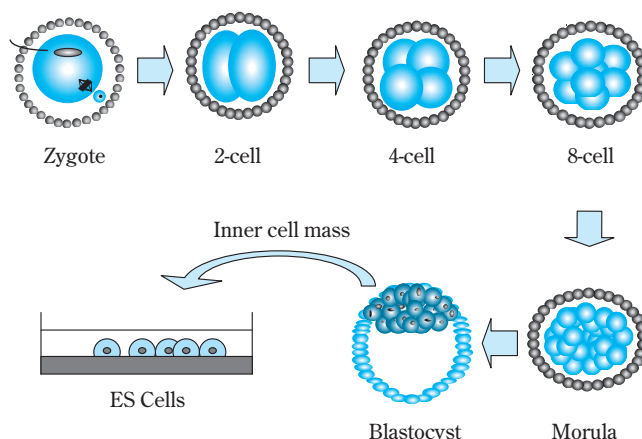


Fig. 1 Generation of the ES cell line

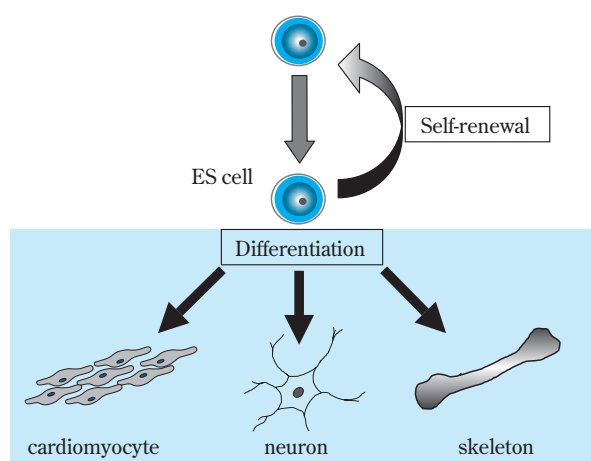


Fig. 2 Pluripotency of ES cells

2. マウスES細胞の有用性

これまでに多数の動物種でES細胞株の樹立が報告されているが、最も汎用されているのはマウスES細胞である。その理由として、①基礎的研究用ツールとして古くから利用され培養方法が確立されている、②既に商業ベースで細胞株が普及し容易に入手できる、③遺伝子組換えマウスの作出に必須である点などが挙げられる。ES細胞は一旦分化してしまつて元の未分化な状態には戻れないため、培養時には未分化状態を維持することに最も注意を払わなければならない。マウスのES細胞では未分化を維持するメカニズムがほぼ解明されており、培養液にLIF (leukemia inhibitory factor ; 白血病阻害因子) と呼ばれる因子を添加することにより、未分化状態を効率良く保つことができる。一方、サルやヒトのES細胞ではそのメカニズムに未だ不明な点が多く、現状では単に外部から因子を加えるだけでは未分化状態を維持できず、他の支持細胞との共培養により未分化が維持されている。

マウスES細胞の創出が最も貢献した技術として、遺伝子組換えマウスへの利用が挙げられる。例えば、

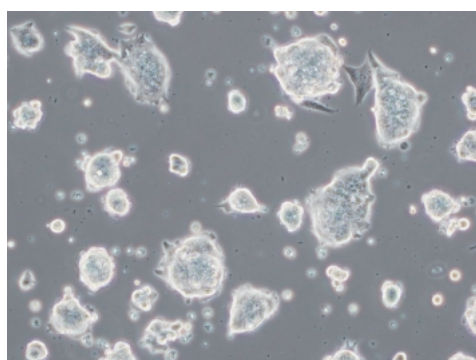


Fig. 3 Undifferentiated mouse ES cells

機能未知の遺伝子を欠失させた組換えES細胞をマウス胚に戻すことによりノックアウトマウスを作り出すことができる。マウスは小型でありながら生体内の生理学的変化や行動学的変化など一動物から得られる情報が多く、未知遺伝子の機能解析に適した動物種であると考えられる。

ES細胞を再生医療分野で実用化するにはサルやヒトの細胞を用いた研究が必要であるが、上述のようにマウスES細胞の有用性から現在でも基盤技術はマウスで開発され、見出された知見をヒトを含めた霊長類に应用する手法は世界的なスタンダードになっている。(Fig. 3 : 未分化時のマウスES細胞。)

In vitro毒性試験の現状

1. 安全性評価におけるin vitro試験法の現状

医薬品、農薬、化粧品、工業製品など身の回りには多様な化学物質が存在するが、これらのヒトに対する安全性を評価するためには、現状では実験動物を用いた多くの毒性試験を必要とする。評価項目は多岐にわたり、発がん性、刺激性、感作性、生殖性など実に様々な影響が調べられ、安全な使用が見極められたものが製品として世に出される。こうした動物実験に対し動物細胞や微生物などを用いた、いわゆるin vitro試験法というものがある。動物実験の代替化としてin vitro試験法の確立が望まれるのは言うまでもないが、短期間に少量の化合物で評価できる試験法は開発期間の短縮や効率化に大きく貢献する。その他、in vitro試験系のメリットとして、ヒト由来の細胞を用いることによりヒトへの予測性が向上すること、また、特定の組織や細胞に絞った評価が可能であるため、毒性メカニズムの解明に役立つと考えられる。

欧米では代替試験法の開発を目指した研究が精力的に進められており、公的な推進機関として欧州では1991年にECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods)、米国では1993年にICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) がそれぞれ設置され、各種毒性試験の代替法の開発、バリデーションおよび科学的評価を行っている。これまでに主として化粧品の原料などが対象となる3つの試験系(皮膚腐食性、光毒性、経皮吸収性)について、細胞を用いた代替法が開発され、OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) のテストガイドラインとしても承認済みである (Table 1)。一方、日本国内においても2005年に代替法研究の評価機関としてJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) が設立されている。

Table 1 Evaluations of alternative (non-animal) test by OECD

Toxicity studies	OECD Test Guidelines (<i>In vitro</i>)
Skin Corrosion	No.430
	<i>In vitro</i> Transcutaneous Electrical Resistance
	No.431
	Human Skin Model Test
Phototoxicity	No.435
	<i>In vitro</i> Membrane Barrier Method for Skin Corrosion
Skin Absorption	No.432
	<i>In vitro</i> 3T3 NRU Test
Eye Irritation/Corrosion	No.428
	<i>In vitro</i> Method
Eye Irritation/Corrosion	— (unacceptable)
Acute Toxicity	— (unacceptable)
Repeated Dose Toxicity	— (unacceptable)
Carcinogenicity	— (unacceptable)
Teratology	— (unacceptable)
Reproductive Toxicity	— (unacceptable)

2. 生殖発生毒性試験における *in vitro* 試験法の現状

安全性評価の中で生殖発生毒性試験が対象として
いる項目は、配偶子（精子、卵子）の形成および生殖機能（受胎、妊娠維持、分娩、哺育）ならびに次世代の発生および成長といった世代を越えた幅広いものである。1961年に発生したアザラシ肢症などを主徴としたサリドマイド禍をきっかけに、世界各国で化合物の登録申請の際に生殖発生毒性試験の重要性が認識されるようになった。特に、次世代（胎児）の形態的な異常を検出する催奇形性試験は生殖発生

毒性試験の中で最も重要視されている。胎児は子宮の中で胎盤を介して母体と密接に関わっており、個体発生は母体の代謝や生理学的変動に影響されるため、単純な *in vitro* 系で評価するには限界がある。しかしながら評価項目としての重要性から、*in vitro* 試験系を開発初期の段階でスクリーニングレベルで利用することができれば、開発の効率化を図る上で非常に有効であるため、古くから様々な手法が考案されてきた（Table 2）。

哺乳類の細胞や組織などを用いた試験系の中では、マウスES細胞を用いた試験系（EST：Embryonic Stem cell Test）、ラット胎児の肢芽を用いる小塊培養法（Micromass culture）およびラットの初期胚を用いた全胚培養法（Whole embryo culture）については、欧州で検証試験が実施されている³⁾。哺乳類以外では鳥類（ニワトリ）や両生類（カエル）、さらには無脊椎動物の昆虫（ショウジョウバエ）や扁形動物（ヒドラ）など非常に下等な動物を用いた検討がなされている。高等な哺乳動物の予測に下等動物が用いられている理由は、個体発生の初期過程には生物共通のメカニズムが多く存在すること、世代交代の早い動物種では短期間に世代を越えた観察が可能であるためである。

マウスES細胞を用いた *in vitro* 催奇形性試験 (EST) について

1. ESTの有用性

マウスES細胞を用いた *in vitro* 催奇形性試験（以下、

Table 2 *In vitro* embryonic toxicity studies

1. Mammals

	Study	Material	Index	Reference	
Cells	Cell Lines	MOT Assay	Ascitic mouse ovarian tumour cells	Inhibition of cell attachment to lectin-coated surfaces	Braun et al., 1982
		HEPM Assay	Human embryonic palatal mesenchyme cells	Cell proliferation	Pratt et al., 1985
		Gap junction	Chinese hamster ovary cells	Inhibition of gap junction	Trosko et al., 1982
		Embryonic Stem cell test	Mouse embryonic stem cells Mouse fibroblast cells	Cardiomyocyte differentiation Cell proliferation	Spielmann et al., 1997
	Primary Cultures	Micromass culture	Rat embryo (limb bud)	Cartilage differentiation Cell proliferation	Flint et al., 1984
Organs	Palate culture	Mouse embryo (palate)	Fusion of secondary palate	Shiota et al., 1990	
	Limb bud culture	Mouse embryo (limb bud)	Cartilage differentiation Morphology	Freedman et al., 1982	
Whole embryo culture	Whole embryo culture	Rat embryo	Morphogenetic differentiation	Schmid et al., 1985	

2. Non-mammals (1970s – 1980s)

(1) Vertebrates

Fish, Avian or Frog embryo

(2) Invertebrates

Drosophila, Hydra, Sea urchin

EST) はES細胞が持つ分化能に着目したもので、ドイツ連邦リスク評価研究所 (BfR) のDr.H.Spielmannら⁴⁾によって考案された。従来の試験系が実験材料に動物胚や胎児組織を必要としたのに対し、ESTは培養細胞のみで実施できる代替試験法である。従って、必要な時に凍結保存した細胞を解凍して速やかに実験を開始できるメリットがある。

従来の試験系にはないもう一つの特徴として、異なる性質を持つ2種類の細胞を用いることである。前述の通り、胎児は母体と密接な関係にあるため、母体の生理状態が悪化すれば個体発生に必要な栄養の供給が不足するため正常に発生することができない。従って、母体への影響と胎児への影響の双方を *in vitro* 系で予測することができれば、より精度の高い試験系となる。ESTでは、未熟な細胞であるES細胞を動物実験における「胎児」、分化した細胞 (繊維芽細胞) を動物実験における「母動物」と仮定している。両細胞で増殖に対する影響を比較することにより、母体と胎児の感受性の差を見極めようとしている。

2. プロトコール概要

実験に用いる2種類の細胞株はマウス由来のES細胞株 (D3) およびマウス胎児由来の繊維芽細胞株 (Balb/c 3T3株) である。本試験系の指標は、①ES細胞の心筋細胞への分化に対する影響、②ES細胞の増殖に対する影響、③繊維芽細胞の増殖に対する影響の3つである。試験操作の概要を以下に示す。

(1) 心筋細胞への分化 (Fig. 4)

未分化なES細胞を酵素処理により単一細胞にした後、ハンギングドロップと呼ばれる培養法でシャーレの蓋の内面で懸滴培養する (一滴あたり約750個の細胞を含む)。これにより各細胞はシャーレ壁面に接することなく重力により徐々に一ヶ所に集まり、3日後には胚様体 (embryoid body) と呼ばれる3胚葉 (内胚葉、中胚葉、内胚葉) に分化した凝集塊を形成す

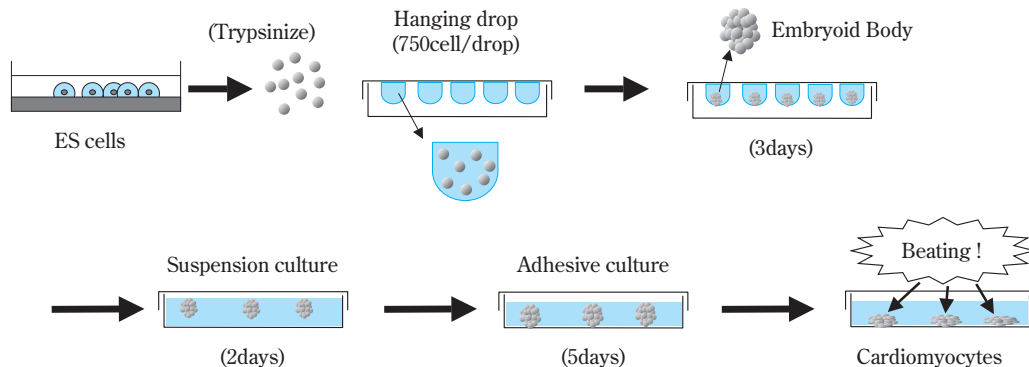


Fig. 4 Differentiation into cardiomyocyte

る。この胚様体をさらに2日間、非接着系のシャーレの中で浮遊培養した後、細胞塊を接着系のシャーレに移行する。ハンギングドロップ開始から10日後に、収縮を繰り返す心筋細胞を顕微鏡下で確認する。

(2) 細胞増殖 (Fig. 5)

未分化ES細胞あるいは繊維芽細胞を酵素処理により単一化した後、約500個の細胞を少量の培地内で培養する。培養開始から10日後までに2回の液交換を経て、最終日に細胞内の還元酵素を利用して、培地内の生細胞数を算出する。

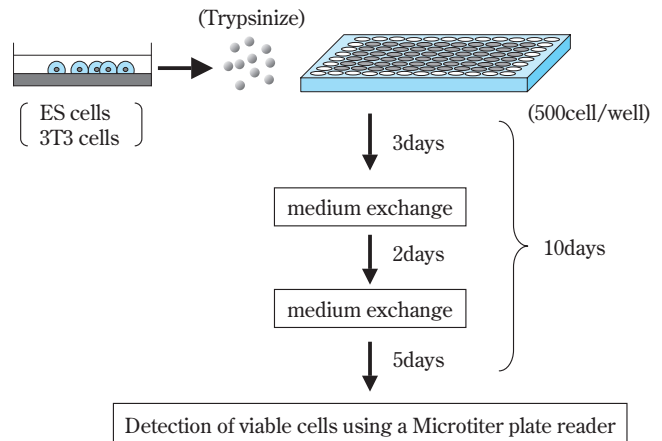


Fig. 5 Cytotoxicity Assay (ES and 3T3 cells)

(3) 化合物を用いた実験

心筋分化、細胞増殖ともに実験開始から全期間で供試化合物を添加する。化合物の濃度は複数設定し、各実験で対照群に比べて50%阻害される化合物濃度、ID50 (心筋分化) およびIC50 (ESおよび繊維芽細胞の増殖) を求める。50%の阻害とは、心筋分化では細胞収縮が認められる細胞塊の数が対照群の半数になる化合物濃度であり、細胞増殖では対照群の生細胞

Function I	$5.92 \times \log(\text{IC50 } 3\text{T3}) + 3.50 \times \log(\text{IC50 } \text{D3}) - 5.31 \times \left(\frac{\text{IC50 } 3\text{T3} - \text{ID50}}{\text{IC50 } 3\text{T3}} \right)$	-15.7
Function II	$3.65 \times \log(\text{IC50 } 3\text{T3}) + 2.39 \times \log(\text{IC50 } \text{D3}) - 2.03 \times \left(\frac{\text{IC50 } 3\text{T3} - \text{ID50}}{\text{IC50 } 3\text{T3}} \right)$	-6.85
Function III	$-0.125 \times \log(\text{IC50 } 3\text{T3}) - 1.92 \times \log(\text{IC50 } \text{D3}) + 1.50 \times \left(\frac{\text{IC50 } 3\text{T3} - \text{ID50}}{\text{IC50 } 3\text{T3}} \right)$	-2.67

IC50 : 50% cytotoxic concentration, ID50 : 50% differentiation concentration
3T3 : mouse fibroblast cell line, D3 : mouse embryonic stem cell line

Non- embryotoxic	Function I > Function II, Function III
Weakly embryotoxic	Function II > Function I, Function III
Strong embryotoxic	Function III > Function I, Function II

Fig. 6 Prediction model of the EST

胞数の半数になる化合物濃度である。得られた3つの値を予測式 (Fig. 6) に代入し、発生毒性の有無を3つのグレード (発生毒性なし、発生毒性あり (弱)、発生毒性 (強)) にクラス分けする。

3. 試験精度

前述の通り、ES細胞を用いた試験系 (EST)、小塊培養法および全胚培養法については検証試験が実施されている。これらの検証は1996 ~ 2000年にECVAMが母体となり欧州各国の製薬企業や公的機関等が参画して、同時期に一つのプロジェクトとして実施された。検証に使われた化合物は前述の3つのグレードから各々6 ~ 7化合物が選ばれ、計20化合物で実施された。検証の結果、検出感度の面ではESTは動物を全く使わない方法であるにも関わらず、従来法と同等の検出感度を持つことが示された。検証結果で得られた *in vivo* 動物実験との一致率は70 ~ 80%前後で、個別には発生毒性が「弱い」および「強い」に分類された化合物は84%および83%であったのに対し、発生毒性のない化合物は68%でやや低い傾向が認められた (Fig. 7)。

	<i>in vivo</i> (animal study)	<i>in vitro</i> (EST)		
		Non-embryotoxic	Weakly embryotoxic	Strong embryotoxic
ECVAM	Non-embryotoxic	68%	32%	0%
	Weakly embryotoxic	16%	84%	0%
	Strong embryotoxic	10%	6%	83%
Sumitomo	Non-embryotoxic	50%	50%	0%
	Weakly embryotoxic	17%	83%	0%
	Strong embryotoxic	0%	0%	100%

in vivo = *in vitro*

Fig. 7 The validation results in ECVAM & Sumitomo-chemical

4. ESTの評価

検証試験の結果を受けて、ECVAMの諮問機関であるESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) によって代替試験法として承認されたものの、ESTはよりグローバルなOECDのガイドライン化には至っていない。2003年に開かれたECVAMのワークショップにおいていくつかの課題が指摘されている⁵⁾。すなわち、精度を高めるための予測式の改良、検証試験に供した化合物の多くが医薬品であったため、一般化学物質の検証も実施すべき点、検証に用いた催奇形性物質の多くが強い細胞毒性を有しており、他のメカニズムをもつ催奇形性物質の検証を実施すべき点、代謝も入れた系を構築すべき点、神経や骨など心筋以外の細胞への分化誘導系も試すべきである点といった課題が挙げられている。

5. ESTに関する当社の取り組み状況

ESTを社内に導入後、欧州の検証試験で使用された市販化合物を用いて社内で検証試験を実施した。供試化合物は欧州の検証試験では20種類であったが、社内ではその中から市販されている17種類を用いて実施した。その結果、*in vivo* 動物実験との一致率は発生毒性のない物質で50%、発生毒性が「弱い」および「強い」物質で83および100%となり、欧州の検証試験と同様な結果が得られた (Fig. 7)。現在、より広範な作用をもつ化合物の検出感度を確認するため、催奇形性データが既知の市販化合物 (医薬、農薬、一般化学物質) を用いた追加実験を行い、ESTの検出感度や特徴を確認中である。

国家プロジェクトへの参画

発生毒性の *in vitro* 検出系については、ESTの社内検討に加えて、国家プロジェクトに参画してマウスES細胞を用いて簡便で高精度な試験系の確立に取り組んでいる。

1. 国家プロジェクトの概要

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (以下、NEDO) が平成18年度から5年間の予定で、「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」プロジェクトを開始した。本プロジェクトでは高コストおよび長期間を要する毒性試験の中から3つの分野 (催奇形性、免疫毒性、発がん性) を選択し、培養細胞を用いて短期間で効率的に毒性を検出する試験系の確立を目指している。

2. 計画概要

本プロジェクトの基本コンセプトは「簡便」および「高精度」である。本計画ではESTと同様にES細胞を心筋細胞に分化させるが、ESTでは顕微鏡を用いて分化の有無を確認していたところを、本プロジェクトではES細胞にルシフェラーゼ遺伝子というホタルの発光酵素遺伝子を導入することにより、その発光の強さを指標として分化の「有無」に加えて「程度」までを自動化したシステムで検出する。さらに、共同研究者である(独)産業技術総合研究所および東洋紡績株式会社の独自技術である多色ルシフェラーゼレポーターを用いて増殖と分化に関わる複数の遺伝子を細胞内で同時に発光させる技術も導入し、より簡便な試験系の確立を目指す。また、分化マーカー遺伝子の選抜にあたっては、分化過程で変動する遺伝子をDNAチップで網羅的に解析することにより、これまで知られていなかった鋭敏な新規マーカーを発見できる可能性がある。さらに、当社ではマウスES細胞を心筋細胞、神経細胞および骨芽細胞などに分化させる技術を既に持っており、心筋だけでなく多種類の細胞に分化させることにより、精度の高い検出系が構築できることが期待される。

今後の展望

各種毒性試験の中で発生毒性試験が初めてES細胞を導入して*in vitro*試験(EST)を確立した。ESTは欧州で検証試験が実施され、20化合物の限られた数の検討であるが70~80%前後の確率で*in vivo*動物実験の結果を予測することができた。しかしながら、現状の方法ではいくつかの課題が出され、それらに対し2004年から開始したReProTectプロジェクト⁶⁾の中で検討が進められている。現在、OECDガイドラインに組み入れられている*in vitro*試験法は生体内の局所的な影響を評価するものばかりであり、全身的な影響を評価する反復投与試験や生殖発生毒性試験については承認されたものはない。しかし、本稿で紹介したESTは細胞の分化過程を体外環境で再現し、さらに未熟なES細胞を成熟した別の細胞と増殖性を比較しており、理論的には動物を用いた*in vivo*の評価系をモデル化している。使用場面は限られるが、化合物のスクリーニングや毒性メカニズム解明など、

有効なツールになり得ると考えている。

社内においては、国家プロジェクトも活用しながらES細胞を利用した高精度な試験系の確立を目指している。確立後は社内化合物のスクリーニング系に適用し、候補化合物の早期選抜に役立てたいと考えている。一方、発生毒性以外の分野に関しても、ES細胞の特徴を生かして特定の分化細胞を大量に調製し、各種細胞への影響を検出する系が確立できる。ハイスループット(high-throughput)による大規模なアッセイ系への応用や、毒性メカニズムの解明などに活用できると考えられる。将来的には霊長類の細胞を導入することにより、ヒトへの予測性を向上させる評価系の構築も視野に入れて取り組んでいる。

謝辞

EST(Embryonic stem cell test)の社内導入にあたり、ドイツ連邦リスク評価研究所(BfR)のDr. H. Spielmannおよび同研究所の動物実験代替法センター(ZEBET)のDr. A. SeilerおよびDr. K. Hayessに技術的な面でサポートして頂いたことに深謝致します。

引用文献

- 1) M. J. Evans and M. H. Kaufman, *Nature*, 292, 154 (1981).
- 2) J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V.S. Marshall, and J. M. Jones, *Science*, 282 (6), 1145 (1998).
- 3) E. Genschow, H. Spielmann, G. Scholz, A. Seiler, N. Brown, A. Piersma, M. Brady, N. Clemann, H. Huuskonen, F. Paillard, S. Bremer, and K. Becker, *ATLA*, 30, 151 (2002).
- 4) H. Spielmann, I. Pohl, B. Doring, M. Liebsch, and F. Moldenhauer, *In vitro Toxicology*, 10 (1), 119 (1997).
- 5) S. Bremer, and T. Hartung, *Current Pharmaceutical Design*, 10, 2733 (2004).
- 6) L. Hareng, C. Pellizzer, S. Bremer, M. Schwarz, and T. Hartung, *Reproductive Toxicology*, 20, 441 (2005).

PROFILE



堀江 宣行
Nobuyuki HORIE

住友化学株式会社
生物環境科学研究所
主任研究員



齋藤 幸一
Koichi SAITO

住友化学株式会社
生物環境科学研究所
主席研究員 工学博士



樋口 敏浩
Hashihiro HIGUCHI

住友化学株式会社
生物環境科学研究所
主席研究員 農学博士



鈴木 紀之
Noriyuki SUZUKI

住友化学株式会社
生物環境科学研究所
主任研究員 医学博士



川村 聡
Satoshi KAWAMURA

住友化学株式会社
生物環境科学研究所
研究グループマネージャー
薬学博士