

分担研究報告書

三次元ヒト培養表皮モデル *LabCyte* EPI-MODEL を用いた 皮膚一次刺激性評価に関する研究

分担研究者 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所
協力研究者 新井晶子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

【背景と目的】 化学物質のヒト皮膚への刺激性を予測する試験法として、ウサギやモルモットを使用した皮膚一次刺激性試験が行われている。ウサギ等の皮膚表面に被験物質を塗布し、紅斑および浮腫を指標として被験物質の刺激性を評価する方法は、ドレイズ試験法と呼ばれ、OECD テストガイドライン 404 にも認証されている。しかしながら、多くの動物を犠牲にしなければいけないことから、ドレイズ試験を代替するための、ヒト由来の材料を使用した *in vitro* の皮膚一次刺激性評価法が必要であると考えられた。そこで開発されたのが、再構築されたヒト表皮モデルである。EPISKIN というヒト表皮モデルを使用する試験法（Post Incubation : PI 法）は、ドレイズ試験との一致率が高いことが実証されており、唯一、国際的な評価を得ている。わが国においても、いくつかのヒト表皮モデルが販売されているが、それらを用いた皮膚一次刺激性の評価方法は確立されていない。そこで、本研究では、EPISKIN で定められた PI 法のプロトコルに準拠して、国産のヒト表皮モデルを用いた皮膚一次刺激性試験を試みた。

【方法】 国産のヒト表皮モデルとしては、取り扱いや価格を考慮した上で、*LabCyte* EPI-MODEL を選択した。EPISKIN を使用する PI 法で用いられた 48 種類の被験物質のなかから、入手可能であった 45 種類の被験物質について、*LabCyte* EPI-MODEL を使用した PI 法を試みた。皮膚刺激性の指標としては、細胞毒性試験およびサイトカイン測定試験を行い、EPISKIN の結果と比較した。また、*LabCyte* EPI-MODEL に最適な PI 法のプロトコルについても検討した。

【結果】 *LabCyte* EPI-MODEL を用いた場合、既存の PI 法のプロトコルでは、陽性一致率は高いものの、陰性一致率は非常に低いことが明らかとなった。そこで、*LabCyte* EPI-MODEL に適した PI 法のプロトコルについて検討した結果、後培養時間を従来よりも短縮することで、陰性一致率を高めることが可能であった。

【結論】 EPISKIN を用いた PI 法の評価結果が、全ての皮膚モデルで再現可能とは限らない。そのため、各モデルに適したプロトコルの検討が必要である。*LabCyte* EPI-MODEL の場合、後培養時間を短縮した方が *in vivo* データとの一致率が高いと考察された。

A. 研究目的

皮膚一次刺激性を予測する方法には、ウサギを使用したドレイズ試験法がある(1)。ドレイズ試験法は、OECD のテストガイドラインにも定められており(2)、現在まで、医薬品、医薬部外品およびそれらの原材料等の安全性を評価する方法として、最も多く利用されてきた試験法といえる。しかしながら、動物愛護法の改定に伴い、わが国においても動物実験の削減が重要課題となっている。また、ウサギとヒトとでは動物種が異なるため、ヒトにお

いては刺激陽性物質であっても、ドレイズ試験では偽陰性と判定されてしまう危険性も考えられる。そのため、動物実験を介さない、かつヒト由来の試験材料を用いた *in vitro* の安全性評価方法の確立が求められるようになった。

そこで考え出されたのが、正常ヒト上皮角化細胞に由来する三次元ヒト培養表皮モデル（ヒト表皮モデル）である。現在までに、いくつかのヒト表皮モデルが開発され、*in vivo* に類似した特性が示されてきたが、皮膚一次

刺激性を評価できる試験法は、確立されていなかった。しかしながら、SkinEthic社（フランス）が製造するEPISKINというヒト表皮モデルを使用した評価法が、2005年に提案され、その信頼性が国際的に評価された(3)。これを受け、本研究では、国産のヒト表皮モデルを使用し、EPISKINによる評価法の再現性を検討することにした。

B. 研究方法

B.1. EPISKINを用いたPI法_{15min-42hour}の概要

三次元ヒト培養表皮モデルを使用した皮膚一次刺激性評価方法のなかで、唯一、国際的な承認が得られているものは、EPISKINを用いたPost Incubation (PI)法である。PI法とは、表皮モデルの表面に被験物質を15分間暴露し、丁寧に洗浄した後、42時間の後培養を行うものである（以後、PI法_{15min-42hour}と記述する）。評価指標には、細胞毒性試験およびサイトカイン測定試験を行うとされている。PI法についてのプレバリデーション報告は2005年に発表され(4)、2006年から2007年にかけてバリデーションが実施された。その結果、ドレイズ試験との一致率が良好であることが証明され、2007年にECVAM（欧州代替法センター）の顧問会議であるESACにより、皮膚一次刺激性を評価する*in vitro*試験法として承認された(4)。一方、わが国においてEPISKINを使用した安全性評価試験を行うためには、いくつかの障害がある。第一に、24ウェルタイプ1キットあたり約23万円（輸送費含む）と、非常に高額であること。第二に、国内に製造元がなく、フランスより空輸されてくるため、モデルへのストレスが懸念されること。第三に、現在のところ、輸出時の制限により海外への供給が安定していないことがある。そのため、安価で安定供給が可能な国産モデルEPISKINに代わる表皮モデルの選択と、それを用いたPI法_{15min-42hour}の再現性について検討することにした。

B.2. LabCyte EPI-MODELの特性

EPISKINに代わる表皮モデルとして、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングが製造、販売をするLabCyte EPI-MODELを選択した。当モデルは、正常ヒト角化細胞をフィーダー細胞とともにフィルターメンブレン上に播種し、培養液中に含まれる分化誘導因子およびエアリフト培養によって、分化お

よび重層化させたヒト表皮モデルである。特性の異なる層構造をとり、ヒト表皮組織における、基底層、有棘層、顆粒層、角質層の病理学的所見に類似している（図1-a）。また、ヒト表皮組織に特異的な分化マーカーであるサイトケラチン-14の発現も確認されている（図1-b）。以上より、LabCyte EPI-MODELは表皮組織様に分化したヒト由来の試験材料といえる。また、これらの特性は、EPISKINとも類似していることから、LabCyte EPI-MODELはEPISKINに代わる表皮モデルとして利用可能ではないかと考えられた。

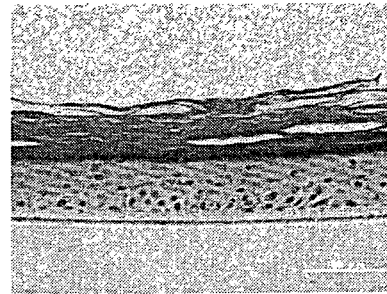


図1-a

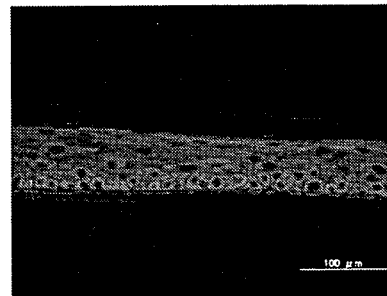


図1-b

図1-a; LabCyte EPI-MODELのパラフィン切片のヘマトキシリン・エオジン染色像。基底細胞から上層にいくにつれて扁平な形態へと変化している。最上層の濃いピンク色の部分が角質層である。図1-b; LabCyte EPI-MODELのパラフィン切片のサイトケラチン-14を用いた免疫組織化学染色像（サイトケラチン-14:緑、DAPI:青）。

B.3. 細胞毒性試験およびサイトカイン測定試験

細胞毒性試験には、MTTアッセイを用いた。MTTアッセイは、細胞内のミトコンドリアにおける酵素活性を測定することで、コントロールに対するサンプルの細胞生存率を求める手法である。酵素活性の測定には、MTT（3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide）が細胞内に取り込まれ、ミトコンドリア内の脱水素酵素によってホルマザンに置換される反応を利用して

る。ホルマザンは青色の非水溶性の結晶で、有機溶媒（イソプロパノール等）によって抽出することができ、570nm の波長において吸光度を測定することができる。本研究においては、後培養ののちに、MTT アッセイを行った。その際、蒸留水のみを処理したもの（コントロール）の吸光度を、100%生存率とした。また、サイトカイン測定試験には、インターロイキン（IL）-1 α アッセイを用いた。IL-1 α は、免疫応答のトリガーであり、刺激応答とも深く関与していることが報告されている(5)。さらに、皮膚一次刺激性の検出に IL-1 α アッセイが有用であることも知られている(6)。試験プロトコルとしては、後培養後のアッセイ培地を採取し、IL-1 α の ELISA 測定キット（JIMRO, Japan）を使用して、アッセイ培地中に分泌された IL-1 α の濃度を測定するものである。MTT アッセイと同様に、蒸留水のみを処理したもの（コントロール）の IL-1 α 濃度を基準値とした。

B. 4. 刺激の評価方法

本研究において行われた試験方法および判定方法は、前述の ECVAM プレバリデーション報告を参考にしている(4)。本研究の開始が2006年であったため、2007年に行われたバリデーション報告を参考にすることはできなかった(7)。しかしながら、バリデーションは、プレバリデーション報告に準じて実施されたことを言及しておく。

PI 法_{15min-42hour}では、二段階の評価を行うことになっている(図2)。一次評価は、細胞毒性試験の結果から、細胞生存率が50%以下であれば「刺激性あり」とみなされる。反対に、細胞生存率が50%以上の場合は、二次評価へと進む。二次評価では、サイトカイン測定試験の結果から判定される。細胞生存率が50%以上であっても、IL-1 α の濃度が、コントロールの値に対して5倍以上であれば「刺激性あり」とみなされる。したがって、「刺激性なし」と判定されるのは、細胞毒性試験において細胞生存率が50%以上であり、かつ、サイトカイン測定試験において IL-1 α の濃度がコントロールの値の5倍以下の場合である。

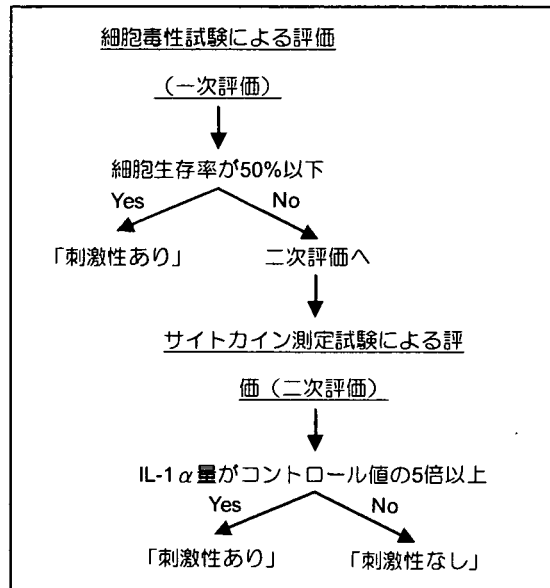


図2；刺激性評価のフローチャート

C. 研究結果

C. 1. EPISKIN を用いた PI 法_{15min-42hour} の再現性

EPISKIN を用いた PI 法_{15min-42hour}のプレバリデーション報告によると、48種類の化学物質（既にドレイズ試験で刺激性が評価されたもの）について皮膚一次刺激性評価を行い、ドレイズ試験との一致率を求めている。その結果、刺激陽性物質を予測できる確率（以下、陽性一致率と記す）は95%、刺激陰性物質を予測できる確率（以下、陰性一致率と記す）は78.6%であった。この結果は、*in vitro*の皮膚一次刺激性評価法としては、非常に高い一致率をマークしたと評価されている(4)。

本研究を始めるにあたり、上記のプレバリデーション結果の再現性を、確認する必要があった。そのため、プレバリデーションで評価された48物質の中から、無作為に14物質（刺激陽性物質7種類、刺激陰性物質7種類）を選択し、EPISKINを用いてPI法_{15min-42hour}を行った。その結果、刺激陽性物質および刺激陰性物質、いずれにおいても100%の確率で再現性を認めることができ、EPISKINを用いたPI法_{15min-42hour}は信頼性のある評価法であると考えられた。

C. 2. LabCyte EPI-MODEL を用いた PI 法^{15min-42hour}の有用性

LabCyte EPI-MODEL を使用しても、PI 法^{15min-42hour}を行えば、EPISKIN と同様の結果を得ることが可能か検討した。プレバリデーションで評価された 48 物質の中から、入手可能であった 45 物質（刺激陽性物質 19 種類、刺激陰性物質 26 種類）について、PI 法を用いた皮膚一次刺激性評価を行った。その結果、陽性一致率は 95% となり、EPISKIN の結果と等しいことが明らかとなった。しかしながら、陰性一致率は 42.3% と低いことから、LabCyte EPI-MODEL に PI 法^{15min-42hour}を応用することは表 1 に示すように、不可能なことが示された（付録 1 を参照のこと）。したがって、LabCyte EPI-MODEL に最適な試験プロトコルが必要であると考えられた。

表 1 ; LabCyte EPI-MODEL を用いた PI 法^{15min-42hour}の結果

	陽性一致率 (%)	陰性一致率 (%)
LabCyte EPI-MODEL	95	42.3
EPISKIN	95	78.6

C. 3. LabCyte EPI-MODEL に最適な試験プロトコルの検討

被験物質の暴露時間あるいは後培養時間を変更して、PI 法^{15min-42hour}の改変を行った。まず、無作為に 11 種類の被験物質を選択した（陽性物質 5 種類、および、誤判定をしてしまった陰性物質 6 種類、詳細は付録 2 を参照のこと）。暴露時間を従来の 15 分から 1、3 および 5 分に変更したところ、3 分以上の暴露では、陰性一致率が急激に減少することが明らかとなった（表 2-a）。続いて、後培養時間を 42 時間から 1、6 および 12 時間に変更したところ、後培養を 6 時間以上行くと、陰性一致率が減少することが示された（表 2-b）。したがって、両一致率が最も高くなるのは、後培養時間を 1 時間へと短縮した場合であることが明らかとなった（このプロトコルを PI 法^{15min-1hour}とする）。

表 2-a ; 後培養時間は 42 時間とし暴露時間を変更した場合の一致率。

	陽性一致率 (%)	陰性一致率 (%)
1min	60	66.7
3min	100	33.3
5min	100	16.7

表 2-b ; 暴露時間は 15 分とし後培養時間を変更した場合の一致率。

	陽性一致率 (%)	陰性一致率 (%)
1h	60	83.3
6h	100	0
12h	100	0

C. 4. PI 法^{15min-1hour}による 45 化学物質の評価結果

PI 法^{15min-1hour}を用いて、45 化学物質の皮膚一次刺激性を再評価した。その結果、陰性一致率を 46.2% から 76.9% に高めることができた。一方、陽性一致率は 73.7% となり、EPISKIN を用いる PI 法^{15min-42hour}に比べると、低い結果となった（表 3、全被験物質についての詳細な結果は、付録 3 を参照のこと）。

表 3 ; 各モデルに最適な PI 法を用いた評価結果

	陽性一致率 (%)	陰性一致率 (%)
LabCyte EPI-MODEL (PI 法 ^{15min-1hour})	73.7	76.9
EPISKIN (PI 法 ^{15min-42hour})	95	78.6

D. 考察

EPISKIN 用いた PI 法_{15min-42hour} のプレバリデーション報告に従い、*LabCyte* EPI-MODEL を用いて化学物質の皮膚一次刺激性評価を行ったところ、陽性一致率は 95%と高い結果となった。この結果は、PI 法_{15min-42hour} のプレバリデーション報告とも一致しており、*in vitro* の安全性評価試験法としては有用であると判断される(付録 1 に、PI 法_{15min-42hour} を用いた際の、両モデルにおける評価結果を列挙した)。興味深いことに、どちらのモデルを使用した場合も、メチルパルミテートを偽陰性と誤判定している。そこで、メチルパルミテートの物性を調べたところ、他の被験物質と比較して融点が高いことがわかった。SIGMA-ALDRICH の MSDS によると、メチルパルミテートの融点は 37 度となっており、室温条件化での暴露では、固化してしまうものと予測される。そのため、刺激性の検出が不可能なのではないだろうか。また、*in vivo* で刺激性がみられるのは、ウサギの体温が高く、メチルパルミテートが液体の状態を維持できるからではないかと考えられる。したがって、今後、融点の低い物質の評価には、高温条件下での暴露あるいは洗浄といった注意が必要ではないかと考えられる。

しかしながら、*LabCyte* EPI-MODEL を用いた PI 法_{15min-42hour} では、EPISKIN を用いた場合に比べ、陰性一致率が低い結果となった。このことから、全ての皮膚モデルに PI 法_{15min-42hour} が適応できるわけではないことが明らかとなった。また、ラボサイトは EPISKIN よりも、刺激に対して弱いモデルではないかと予測された。そのため、PI 法_{15min-42hour} の改変を行う際には、EPISKIN の場合よりもマイルドな細胞毒性を与えるために、暴露時間の短縮および、後培養時間の短縮を試みた。その結果、後培養時間を 42 時間から 1 時間に短縮する方法が、*LabCyte* EPI-MODEL には適していることが明らかになった。また、暴露 1 時間後でもサイトカイン量に有意な差がみられたことから、少なくとも、*LabCyte* EPI-MODEL においては、刺激に対する応答は 1 時間以内に起こり始めていると考えられる。また、暴露 1 時間後において、細胞毒性試験では検出することのできない弱い刺激でさえ、サイトカイン測定試験では評価が可能であった。このことは、皮膚が刺激を受けると、サイトカインの産生にともなって細胞死が誘導されるというこれまでの報告と合致している。

最後に、*in vitro* の試験系を開発する目的は、動物実験数を削減するためだけではない。皮膚一次刺激にともなう細胞および分子レベルの変化を追うためにも、作用機構の解明を行う必要があると考えられる。今後は、これらの利点を生かして、刺激応答機構の詳細を明らかにしていくことも、*in vitro* 試験法に課せられた使命であると考えている。

E. 結論

LabCyte EPI-MODEL を用いて PI 法_{15min-42hour} を行った、EPISKIN と同様の一致率を得ることはできなかった。そこで、*LabCyte* EPI-MODEL に最適な試験プロトコルを検討したところ、PI 法_{15min-1hour} であることを明らかとした。しかしながら、一致率は EPISKIN を下回る結果となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1) 論文発表

なし

G-2) 学会発表

第 6 回 国際動物実験代替法学会 ポスターセッション (2007 年 8 月、於東京)
皮膚基礎研究クラスターフォーラム 第 2 回教育セミナー (2007 年 7 月、於東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 添付資料

資料 1 実験結果

参考文献

- 1) Draize, J.H., Woodard, G. and Calvery, H.O. (1994) Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 82, 377-390.
- 2) Organization for Economic Cooperation and Development. (2002) OECD Guidelines for Testing of Chemicals; Test Guideline 404, Acute Dermal Irritation/Corrosion.
- 3) ECVAM statement
- 4) Cotovio, J., Grandidier, M., Portes, P.,

- Roguet, R. and Rubinstenn, G. (2005) The in vitro acute skin irritation of chemicals: Optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, *Alternatives To Laboratory Animals*, 33, 329-349.
- 5) Gunasekar, PG., Rogers, JV., Kabbur, MB., Garrett, CM., Brinkley, WW. and McDougal JN. (2003) Molecular and histological responses in rat skin exposed to m-xylene, 17, 2, 92-94.
- 6) Ponec, M. and Kempenaar, J. (1995) Use of human skin recombinants as an in vitro model for testing the irritation potential of cutaneous irritants, *Skin pharmacology*, 8, 1-2, 49-59.
- 7) European Centre for the Validation of Alternative Method. (2007) Performance standards for applying human skin models to in vitro skin irritation testing, Final draft performance standards version.

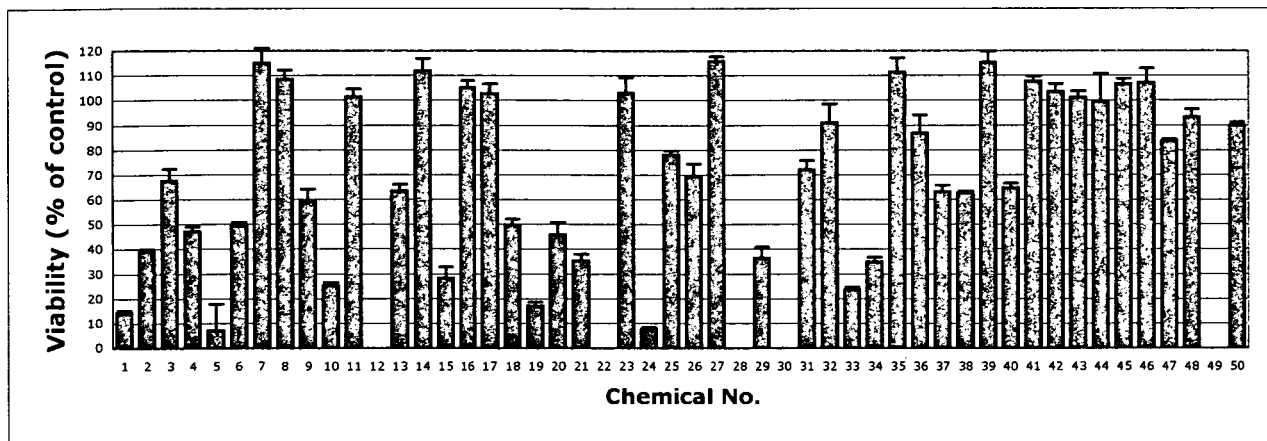
No.	Chemical name	CAS No.	Chemical type	<i>In vitro</i> classification by		Final <i>in vivo</i> classification for the study
				LabCyte EPI-MODEL	EPISKIN	
1	SLS 20% (aq.)	151-21-3	Soaps/surfactant	I	I	I
2	SLS 50% (aq)	151-21-3	Soaps/surfactant	I	I	I
3	Tetrachloroethylene	127-18-4	Chlorinated	I	I	I
4	1,1,1 trichloroethane	71-55-6	Chlorinated	I	I	I
5	Potassium hydroxide 5%	1310-58-3	Alkali	I	I	I
6	Heptanal	111-71-7	Aldehyde	I	I	I
7	Lilestralis/lilial	80-54-6	Aldehyde	I	I	I
8	Methyl palmitate	112-39-0	Ester	NI	NI	I
9	1-Bromopentane	110-53-2	Brominated	I	I	I
10	Alpha terpineol	98-55-5	Alcohol	I	I	I
11	dl-Citronellol	106-22-9	Alcohol	I	I	I
12 ^a	Tallow polypropylene polyamine	68911-79-5	Amine	I	I	I
13	1-Bromohexane	111-25-1	Brominated	I	I	I
14	Methyl laurate	111-82-0	Ester	I	I	I
15	Cinnamaldehyde	104-55-2	Aldehyde	I	I	I
16	Linalyl acetate	115-95-7	Ester	I	I	I
17	d-Limonene	5989-27-5	Miscellaneous	I	I	I
18	Eugenol	97-53-0	Phenolic derivative	I	I	I
19	10-Undecenoic acid	112-38-9	Organic acid	I	I	I
20	Linalool	78-70-6	Alcohol	I	I	I
21	Dimethyl disulphide	624-92-0	Sulphur containing	I	I	NI
22 ^a	Soap from 20/80 coconut oil/tallow	ND ^b	Soaps/surfactant	ND ^b	NI	NI
23	Methyl stearate	112-61-8	Ester	NI	NI	NI
24	Benzyl alcohol	100-51-6	Alcohol	I	NI	NI
25	Cis-Cyclooctene	931-87-3	Hydrocarbon	I	I	NI
26	2-ethoxy ethyl methacrylate	2370-63-0	Acrylate/methacrylate	I	NI	NI
27	Benzyl benzoate	120-51-4	Ester	NI	NI	NI
28	2-Methyl-4-Pphenyl-2-butanol	130-05-9	Alcohol	I	I	NI
29	Benzyl acetate	140-11-4	Ester	I	I	NI
30	Isopropyl palmitate	142-91-6	Ester	NI	NI	NI
31	2,4-Xylidine	95-68-1	Amine	I	I	NI
32	Sodium metasilicate (10%)	6834-92-0	Alkali	I	NI	NI
33	Isopropyl myristate	110-27-0	Ester	I	NI	NI
34	Hydroxycitronellal	107-75-5	Aldehyde	I	NI	NI
35	n-Butyl propionate	590-01-2	Ester	I	NI	NI
36	Sodium bisulphite	7775-14-6	Inorganic	I	NI	NI
37	1,6 Dibromohexane	629-03-8	Brominated derivative	I	I	NI
38	Isopropanol	67-63-0	Alcohol	I	NI	NI
39	Benzyl salicylate	118-58-1	Ester	I	NI	NI
40	Lauric acid	143-07-7	Fatty acid	NI	NI	NI
41	Dipropylene glycol	25265-71-8	Alcohol	NI	NI	NI
42	Sodium bicarbonate	144-55-8	Alkali	NI	NI	NI
43	3,3-Dithiodipropionic acid	1119-62-6	Sulphur containing	NI	NI	NI
44	4,4-Methylene-bis (2,6-di-butyl)phen	118-82-1	Phenolic	NI	NI	NI
45	4-Amino-1,2,4-triazole	584-13-4	Miscellaneous	NI	NI	NI
46	3-Chloronitrobenzene	121-73-3	Halogenated aromatic	NI	NI	NI
47 ^a	Polyether siloxane	ND ^b	Siloxane derivative	ND ^b	NI	NI
48	Erucamide	112-84-5	Amide	NI	NI	NI

^aChemicals not available; ^bND=not detected

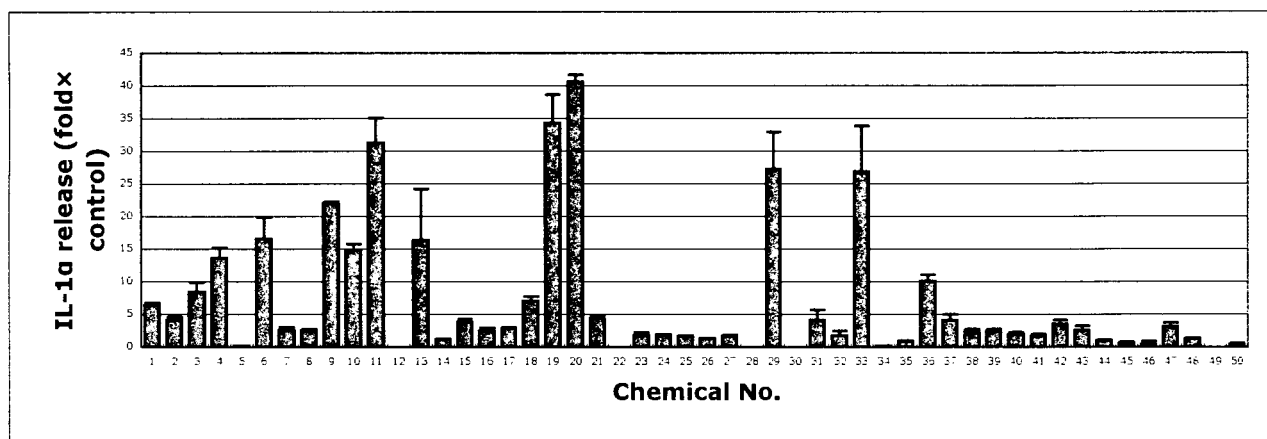
I=irritant, NI=non irritant

No.	Chemical name	Final <i>in vivo</i> classification for the study ^d	<i>in vitro</i> classification (PI法 _{15min-42hour})
9	1-Bromopentane	I	I
13	1-Bromohexane	I	I
14	Methyl laurate	I	I
16	Linalyl acetate	I	I
20	Linalool	I	I
24	Benzyl alcohol	NI	I
25	<i>Cis</i> -Cyclooctene	NI	I
26	2-ethoxy ethyl methacrylate	NI	I
29	Benzyl acetate	NI	I
35	n-Butyl propionate	NI	I
38	Isopropanol	NI	I

a) MTT assay



b) IL-1 α assay



aIL-1 α release. The results are expressed as fold increase relative to control ($5.6 \pm 1.1 \text{ pg/ml}$).

Parameter %	MTT	IL-1 α	MTT + IL-1 α
Sensitivity	52.6 (10/19)	57.9(11/19)	73.7 (14/19)
Specificity	80.8 (21/26)	88.5 (23/26)	76.9 (20/26)
Accuracy	68.9 (31/45)	75.6 (34/45)	75.6 (34/45)
Positive predictivity	66.7 (10/15)	78.6 (11/14)	70 (14/20)
Negative predictivity	70 (21/30)	74.2 (23/31)	80 (20/25)
False negative	30 (9/30)	25.8 (8/31)	20 (5/25)
False positive	33.3 (5/15)	21.4 (3/14)	30(6/20)

分担研究報告書

眼刺激性試験代替法の開発

分担研究者 山本 直樹（藤田保健衛生大学 共同利用研究施設 講師）

研究要旨：本研究では、化粧品や医薬部外品・医薬品等の安全性評価のために用いられている試験法の中で重要な位置付けを占める眼（角膜）の局所毒性に着目し、代替法の開発が十分でない眼刺激性試験・感作性試験の代替法を開発し、本邦からの発信による新規眼刺激性試験代替法としての細胞を構築することを目指した。

A. 研究目的

眼刺激性試験については、既に化粧品原料10%濃度配合以下における細胞毒性試験を用いたガイダンスが作成されている。そこで、本研究における適用範囲は、化粧品原料の原体および化学物質全般に対応するものであり、さらに従来の眼刺激試験法における問題点を再検討し、これらの問題点を解決できる新しい眼刺激性試験代替法の開発と評価を行うことを目的とする。具体的には、白ウサギの結膜内に被検物質を投与し、結膜の発赤、浮腫・分泌物、虹彩の変化、角膜の混濁度などを指標とし、肉眼で判定してスコア化を行う『Draize試験』に変わる代替法として、以下の2つの評価基準モデルの検討を行う。

第1の検討は、強度刺激性物質を同定するために欧州で限定的に認められているウシ角膜組織を用いた不透明性および透過性アッセイ試験（Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay : BCOP）の問題点

と日本国内でも実施可能な試験法についての検討である。具体的な問題点として、BSE問題の発生以降、日本国内においてウシの眼球組織は研究機関でも入手することが禁止されていることから、日本国内でのBCOP試験を実施することは不可能である。そこで、ブタ角膜組織での代用が可能かどうかを検討する。さらに常時新鮮で、品質が統一された角膜組織を様々な機関・企業で入手・維持し、代替法として実現化するために克服しなくてはならない課題などを検討する。

第2の検討として、正常ヒト角膜上皮細胞を宿主細胞として、クローン化遺伝子の発現と消失を細胞の培養環境を変化させることによって、クローン細胞にも正常細胞と同等な細胞にも可逆的に変化させることができるスタート&ストップのコントロールが可能なベクターの構築、および研究分担者が独自に開発した生細胞の状態での細胞質内標的タンパク質による細胞のソーティングを実施し、従来の眼刺激性試験代

替法における課題を克服することができる
新規の眼刺激性試験代替法の確立を目指す。

B. 研究方法

B-1. ブタ角膜組織を用いた試験法の開発

ブタ角膜組織を用いた検討では、食肉処理場から入手したブタ眼球組織を用いて検討した。検討用ブタ角膜組織片の作製方法は、ブタ眼球赤道部を手術用メスを用いて5mmの幅で切開し、眼科手術用尖刀にて眼軸に平行に角結膜接合部近縁まで切開した後、角膜に沿って円形に切開を続け、ごく僅かな角結膜組織を含む角膜組織片を作製した。次に角膜組織片の中心部を6mmの生検パンチで打ち抜き、検討用のブタ角膜組織片とした。この新鮮状態のまま様々な被検薬剤を用いて評価するというのが理想であるが、角膜組織片の作成にはある程度の技術が必要であること、様々な施設で多くの検討を行うには現実的ではないこと、一律の品質での角膜組織の管理・維持が難しいことなどの観点から、ブタ角膜組織片の保存法を検討する必要がある。そこで、まず平成19年度では、皮膚組織の被検物質浸透性試験などで用いられているブタ皮膚組織と同様に凍結保存法による保存法の検討、および標準物質(無刺激:10% Tween-20, MAS25:10% SLS, MAS50:Triton X-100)曝露によるフルオレセイン浸透性について検討した。フルオレセインの浸透性評価には、BCOPの試験法に準じて標準物質を一定時間ブタ角膜組織上に添加した後、さらにフルオレセインを添加して一定時間角膜組織と反応・洗浄した後フルオレセインの濃度を分光光度計で測定した。

B-2. 正常ヒト角膜上皮由来細胞を用いた新規試験法の開発

K12株由来大腸菌(XL1-Blue)に組み込まれたpBluescript II KS (-) Vector (2.9kbp)に導入されているpBS-SVT:SV40 Large T Ag (財ヒューマンサイエンス振興財団 ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入, 約2.5kbp)を抽出し、SV40 Large T Ag遺伝子の5'末端領域の配列をSequencer (3730 XL DNA Analyzer, ABI)を用いて調査した。次にSV40 Large T Ag遺伝子(約2.5 kbp)をPCRで増幅した後、遺伝子発現と消失を制御できるベクターDNAのマルチクローニングサイトを制限酵素(EcoR I/BamH I)で処理し、PCRで増幅させたSV40 Large T Ag遺伝子を挿入・ligationさせた。この挿入した遺伝子を含む領域の塩基配列を確認するため、Sequencerを用いて片鎖解析による塩基配列のシーケンスを行った。

B-3. 新規試験法で使用する宿主細胞の培養条件の検討と正常細胞へのトランスフェクション法の開発

遺伝子導入細胞(宿主細胞)には、正常ヒト角膜上皮細胞(HCEC2, KURABOより購入)を用いた。本試験系確立の過程における一般的な手法では、複数回の継代培養、複数種類の細胞選択過程、および2段階のベクター導入ステップが必要である。しかし、HCEC2細胞は、無血清で培養することが可能ではあるが、継代培養が3継代までしかできないため、従来の培養方法や遺伝子導入作業では、目的とする細胞構築の完了まで維持することができない。そこで研究分担者の山本は、従来よりも少ないステップの細胞実験と短期間で効率的なベクター導入方法を確立することで、これらの問題を解決できると判断し、従来法とは異なる新しいトランスフェクション手法の開発を検討した。

(倫理面への配慮)

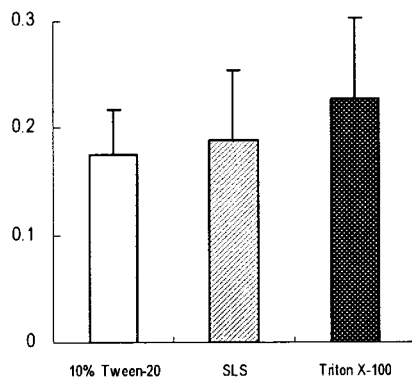
本研究に使用する宿主細胞のヒト正常角膜上皮細胞は、市販されている細胞を購入して研究に用いているため、特別な倫理面への配慮は必要ないと考えている。

C. 研究結果

C-1. ブタ角膜組織を用いた試験法の開発に関する結果と今後の展開

凍結ブタ角膜組織片での評価では、BCOPと同様にフルオレセインを用いた浸透性を評価した。結果として、標準物質の無刺激とMAS25、およびMAS50の間での違いは検出されたが、無刺激でのフルオレセインの浸透性が予想よりも高かったため、ベース値が高いものとなっており、有意差を出すことは出来なかった (Table 1.)。

Table 1.

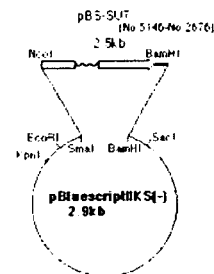


この原因として、凍結処理によりブタ角膜の角膜上皮細胞のバリア機能が著しく破綻するためであると推察した。そこで現在、ヒト角膜の移植片を一定期間冷蔵で保存することができる角膜保存溶液での検討を開始している。

C-2. 正常ヒト角膜上皮由来細胞を用いた新規試験法の開発に関する結果

正常ヒト角膜上皮細胞を用いた新規の眼刺激性試験代替法用細胞の構築は、非常に特殊な技術と時間を要するものである。まず、計算上での成功率が0.01%といわれる目的遺伝子の切り出し、および約2.5kbpの特異的領域の一括での増幅について、数百回にわたる実験を行い、目的遺伝子の増幅に成功した。詳細には、まず培養したK12株由来大腸菌 (XL1-Blue) からpBS-SVT:SV40 Large T Ag / pBluescript II KS (-) Vectorを抽出 (Figure 1.) し、SV40 Large T Ag遺伝子の5'末端領域の配列について、Sequencer (3730 XL DNA Analyzer, ABI) を用いて調査したところ、SV40 Large T Ag遺伝子の5'末端領域の配列を確認した。

Figure 1.



このSV40 Large T Ag遺伝子 (約2.5 kbp) についてPCRによる増幅に成功した。次に遺伝子発現と消失を制御できるベクター DNAのマルチクローニングサイトを制限酵素 (EcoR I / BamH I) で酵素処理し、PCRで増幅させたSV40 Large T Ag遺伝子を挿入・ligationさせた。この挿入遺伝子を含む領域の塩基配列を確認するため、Sequencerを用いて片鎖解析を行ったところ、挿入遺伝子の塩基配列が確認されたことから、目的遺伝子が導入されたベクターの構築に成功したといえる。次にベクターの大腸菌への選択的組み込み、および選択的大腸菌の増幅に成功した。現在、この増幅されたベクターの正常ヒト角膜上皮細胞へのトランスフェクション、および2ステ

ップセレクションを実施するための予備検討を実施している状況である。

C-3. ホスト細胞の培養条件の検討と正常細胞へのトランスフェクション法の開発に関する結果

ホスト細胞の動物血清非依存的培養条件を検討し、薬剤による細胞選択の実現性について評価した。現段階での結果は、培養条件としてはまだ完璧なものとはいえないため、継続的な培養条件の改良を実施している。特にトランスフェクション前の予備培養実験において、薬剤選択による耐性細胞を選択する必要があるが、通常の実験方法で用いられる濃度(400 μ g/ml)での薬剤選択が困難であることが判明した。以前の眼刺激性試験代替法に関する厚生科学研究においても、無血清で培養するウサギ角膜由来初代培養細胞を用いた市販キット(Corne Pack[®])によるバリデーションが検討された。この結果を従来法と比較したところ、アニオン系界面活性剤は比較的良好な相関結果を得ることができたが、全体的には相関性は低かったと報告されている。研究分担者の山本は、無血清での細胞培養環境では薬剤に対する過剰な細胞反応が起こっているのではないかと推察した。一方、同時期に検討された血清を用いた細胞によるバリデーションでは従来法との相関性が良かったという結果を踏まえて、血清を加えて培養することで、細胞の薬剤に対する反応性が変化するのではないかと予想した。試験的に5%の割合で血清を加えて培養すると、無血清の培養条件でHCEC2を培養した際に観察された敷石状の細胞形態を維持することができず、紡錘状の形態に変化してしまった。

D. 考察

本年度は研究初年度であるため、様々な予備実験などを厳密に実施した。また、最も時間と技術を要するポイントは着実に解決しており、来年度以降の継続研究において、日本で開発した新規の眼刺激性試験代替評価法で使用する角膜組織片や細胞を構築できる見込みが十分にある

ブタ角膜組織を用いた検討では、標準物質の無刺激とMAS25、およびMAS50の間での違いは検出されたが、無刺激でのフルオレセインの浸透性が予想よりも高かったため、ベース値が高いものとなっており、有意差を出すことは出来なかったという結果から、角膜の保存法には凍結保存は不適であると判断し、現在、ヒト角膜の移植片を冷蔵保存できる保存溶液での検討を行っている。角膜保存溶液を用いることで、角膜上皮細胞を生存させた状態で保存・維持することができると予想しており、この保存角膜組織を用いた評価試験法には、BCOPで用いられているような試験法ではなく、新鮮角膜組織を用いた際に適用されている生細胞での試験方法(CV法など)による評価の可能性を検討する。

Corne Pack[®]と同時期に検討されていたウシ血清を含む培養細胞による結果と従来法との相関性が良かったこと、ウサギ角膜上皮細胞株(SIRC)を用いた場合は、ウシ血清を用いなくても従来法との良好な相関性が得られたという結果などを総合的に考慮し、新規の試験法で使用する細胞の培養条件の確立に向けてのポイントについて以下のように考案した。

1. ウシ血清を用いることで薬剤に対する反応結果と従来法との相関性が向上する可能性がある。
2. 血清を用いた場合、常にlotの検討問題などが付き纏う。

これらを考慮すると、ウシ血清などの成分を培地に添加した方が従来法との相関性

を向上させることができるが、血清を使用する際に問題となるlotに関する問題を排除するため、ウシ血清に代わる様々な人工血清代替品を用いた細胞培養条件を今後検討する。また、HCEC2に血清を加えて培養した場合の細胞形態の変化を出来る限り少なくできるかどうか検討する必要がある。さらに無血清培養でのHCEC2における角膜上皮細胞マーカーの発現についても調査する必要がある、培養条件を変更しても角膜上皮細胞マーカーの発現が維持できるような培養条件を模索する必要もある。

なお、本研究の遂行過程において、新しい角膜上皮幹細胞の候補マーカーを発見した。そこで、この新マーカーを用いたホスト細胞の選択試験も平行して実施しており、最良の新規眼刺激性試験代替法で使用できる細胞の選択を行っていく。

この新規細胞の構築において、複数のクローンを作成する予定であり、遺伝子導入・クローン化が完成した場合、直ちに従来の試験法での結果と比較するために様々な物質の細胞毒性試験等を実施していき、従来法との相関性が最も高いクローンを最終的に選択していく。

E. 結論

ブタ角膜組織片での課題を克服すること、および本邦からの発信による新規眼刺激性試験代替法としての細胞を構築することで、従来の眼刺激性試験代替評価法での問題点をほぼ解決できることから、次年度以降の継続研究を鋭意実施し続けていく必要がある。さらに2009年問題に間に合うかどうかは定かではないが、可及的速やかに様々な物質でのバリデーション試験に移行するとともに、強刺激物質などに対する付属評価法の検討、および角膜三次元培養モデルで検討できる細胞の構築も同時平行で検討していく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
Yamamoto N., Kojima H., Tanikawa A., Horiguchi M. Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
今のところ、新規特許出願については未定である。
本科研費交付前に申請・取得しているが、本研究の遂行には欠かせない特許は以下のとおりである。
 - ・ 標本作製に関する特許:『難浸透性組織迅速固定液(特許番号:3723204)』山本直樹ほか. 2005.
 - ・ 新規幹細胞マーカーについての特許出願状況:『網膜幹細胞の分離方法および網膜幹細胞(出願番号:特願2006-279917)』山本直樹ほか. 2006.
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

分担研究報告書

「バリデーショndataの統計解析」(平成19年度研究) 報告

分担研究者：大森崇

研究要旨

[背景と目的] わが国で実施された Draize 眼刺激性試験の代替法を開発するためにバリデーショ研究では、細胞毒性試験の毒性の指標である IC50 が Draize 眼刺激性試験の刺激性の指標である Maximum Averaged Score (MAS) と良好な関係があること見出された。そして、細胞毒性試験法を含めた眼刺激性評価のガイダンスが提案されている。この提案では、未知の被験物質を評価する際に、3 つの同時陽性対照物質の実験を行い、相対的な刺激のカテゴリーを決めることとしている。しかし、Draize 眼刺激性試験の代替法という観点から、MAS の値がどの程度であるのかを予測することができればより定量的な評価を行うことが可能になるであろう。本研究では、未知の被験物質とともに 3 つの同時陽性対照物質の実験が行われる細胞毒性試験を想定し、IC50 から MAS を予測する方法を提案する。

[方法] ここで提案する方法は、対数 IC50 と MAS との間に直線的な関係があることを前提とする。事前情報としてバリデーショ研究の結果から直線のパラメータを求める。次に、未知の被験物質を評価する施設での 3 つの同時陽性対照物質により直線を更新し、更新した直線より MAS を予測するというものである。

[結果] 報告されている SIRC-CVS 法のバリデーショ研究のデータを用いて、MAS の予測を行った。バリデーショ研究で 27 物質を実験した施設のデータを用いて直線を求め、同じバリデーショ研究に参加した他の施設のデータを用いて、直線の更新を行った。この施設の陽性対照ではない 5 物質について、MAS の予測値を求め、実測値との乖離を調べた。その結果、MAS の予測値と実測値の差の絶対値は 0.9 から 14.4 の間であった。

[結論] 5 物質の検討では、予測結果はガイダンスで提示されている刺激のカテゴリーの範囲を超えることはなかった。よって、この方法は定量的な方法として利用可能であると思われる。しかしながら、理論的な課題と方法論のさらなる評価が必要である。これらは次年度以降の課題である。

A. 研究目的

化粧品の開発において、Draize (1944) により提案されたウサギを用いた眼刺激性試験 (Draize 試験) が長い間使用されてきた。この試験法の代替法を開発するために、1990 年代に、わが国では

いくつかの候補となる試験法のバリデーショ研究が行われた (Ohno ら (1999))。その結果、いくつかの細胞毒性試験の毒性の指標である IC50 の対数変換した値と Draize 眼刺激性試験のスコアである Maximum Averaged Score (MAS) との間に

はよい直線的な対応関係があることがわかった。この結果に基づき、Ohno (2004) は代替法を用いた眼刺激性を判定する評価スキームを提案している。この提案では、細胞毒性試験を主とした代替法により被験物質の評価を行う場合には、被験物質とともに同時に3つの陽性対照物質(Tween 20、SLS、Triton X-100)の実験を行い、これらの陽性対照物質での測定値と被験物質の測定値との相対的な関係で刺激の強さ(4つのカテゴリー)を把握するとしている。

この判定では、刺激のカテゴリーがわかるだけであるが、具体的にドレイズ眼刺激性試験で評価した場合に、そのスコアがどの程度であるのかは明確にはならない。さらに、このスキームに従い判定を行う施設では実験ごとに陽性対照の背景データが蓄積されるであろうが、そのようなデータは用いられないことになる。そこで、この研究では Ohno のスキームに示されるような実験を行った場合を想定し、細胞毒性試験の毒性の指標である IC50 を用い、ドレイズ眼刺激性試験の刺激性のスコアである MAS を予測する方法を構築することを目的とする。その際に、バリデーション研究で得られた2つの試験法の対応の良さや、過去の背景データを盛り込むことも考慮する。

B. 研究方法

B.1. IC50 を用いた MAS の予測方法の概要

IC50 の値から MAS の値を予測するために、関数関係を想定する必要がある。過去のバリデーション研究により、いくつかの細胞毒性試験は対数 IC50 をとった場合、MAS と良好な直線的な関係があることがわかっているため、ここでは関数として直線を用いることを前提にする。その際、切片と傾きの値は、施設によって異なるであろうから、施設ごとに決める必要があるであろう。大野の評価スキームでは3つの MAS の値がわかってい

る陽性対照物質が同時対照として実験が行われることになるので、これらのデータを用いて直線の切片と傾きを推定することが考えられる。しかし、わずか3点で得られる切片と傾きの2つのパラメータは不安定であろう。そこで、既存に得られている情報を用いることにする。少なくとも過去のバリデーション研究で、多くの物質に関して良好な直線関係が得られているので、これを利用することにする。前述したように、細胞毒性試験を用いて未知の被験物質を評価する施設は、バリデーション研究で実験を行った施設とは異なるので、未知の被験物質について実験を行う施設は、その施設の同時陽性対照物質のデータを用いて、バリデーション研究で得られた過去の情報を更新することにする。そして、更新された直線の IC50 の値を用いて MAS の値を予測することとする。

B.2. バリデーション研究からの直線の推定

ある施設が、バリデーション研究に参加して、ある細胞毒性試験について、MAS がわかっている n_0 物質の実験を行ったとする。第 i 物質の $\log(\text{IC50})$ を y_{oi} 、MAS を x_{oi} とする。これらの間に以下の直線関係

$$y_{oi} = a_0 + b_0 x_{oi} + \text{誤差}_{oi}$$

が成立しているとする。ここで、 a_0 は切片、 b_0 は傾きをあらわすパラメータである。誤差 oi は、 y_{oi} を直線関係 $a_0 + b_0 x_{oi}$ では説明しきれない乖離を示している。個々の物質に関してこの誤差は、平均が 0 で等しい分散を持ち、独立であると仮定する。パラメータを推定する際に、広く用いられる方法は最小二乗法を用いることにし、 a_0 と b_0 の推定値にハットをつけてあらわすことにすると、それぞれ

$$\hat{a}_0 = \bar{y}_0 - \bar{x}_0 \cdot s_{0xy} / s_{0x}^2, \quad (1)$$

$$\hat{b}_0 = s_{0xy} / s_{0x}^2 \quad (2)$$

として、得ることができる。ここで、

$$\bar{y}_0 = \sum_i y_{0i} / n_0,$$

$$\bar{x}_0 = \sum_i x_{0i} / n_0,$$

$$s_{0xy} = \sum_i (y_{0i} - \bar{y}_0) \cdot (x_{0i} - \bar{x}_0) / n_0,$$

$$s_{0x}^2 = \sum_i (x_{0i} - \bar{x}_0)^2 / n_0$$

である。

B.3. 陽性対照を用いた直線の更新

新たな施設で、この細胞毒性試験を用いて未知の物質を評価することを考える。このときに、同時に得られた 3 つの陽性対照物質の $\log(\text{IC50})$ を y_{ij} 、MAS を x_{ij} する ($j=1, 2, 3$)。ここでも、直線関係

$$y_{ij} = a_1 + b_1 x_{ij} + \text{誤差}_{ij}$$

を想定することにする。添え字を 1 としているのは、この施設がバリデーション研究を行った施設ではないことを意味している。つまり、直線関係は持つが、他の施設がバリデーション研究で得た傾きと切片とは異なっているということである。陽性対照の 3 物質のデータでこの直線の傾きと切片を求めるとすると、先の議論と同様に、

$$\hat{a}_1 = \bar{y}_1 - \bar{x}_1 \cdot s_{1xy} / s_{1x}^2, \quad (3)$$

$$\hat{b}_1 = s_{1xy} / s_{1x}^2 \quad (4)$$

として、得ることができる。ここで、

$$\bar{y}_1 = \sum_j y_{1j} / n_1,$$

$$\bar{x}_1 = \sum_j x_{1j} / n_1,$$

$$s_{1xy} = \sum_j (y_{1j} - \bar{y}_1) \cdot (x_{1j} - \bar{x}_1) / n_1,$$

$$s_{1x}^2 = \sum_j (x_{1j} - \bar{x}_1)^2 / n_1,$$

$$n_1 = 3$$

となる。しかし、3 物質で推定した直線は不安定であろうから、バリデーション研究で得られたデータを用いることを考えることにする。この方法の詳細はベイズ統計学の理論により構成することが可能である。構成される切片と傾きをそれぞれ \hat{a}^* 、 \hat{b}^* とすると、これらは \hat{a}_0 、 \hat{b}_0 、 \hat{a}_1 、 \hat{b}_1 の関数になるが、複雑であるため、ここでは得られる結果のみを示すことにすると、

$$\begin{aligned} \hat{a}^* = c \cdot & \left[\left(\sum_i x_{0i}^2 + \sum_j x_{1j}^2 \right) \cdot (n_0 \bar{y}_0 + n_1 \bar{y}_1) \right. \\ & \left. - (n_0 \bar{y}_0 + n_1 \bar{y}_1) \cdot \left\{ n_0 \cdot (\bar{x}_0 \bar{y}_0 + s_{0xy}) \right. \right. \\ & \left. \left. + n_1 \cdot (\bar{x}_1 \bar{y}_1 + s_{1xy}) \right\} \right], \quad (5) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \hat{b}^* = c \cdot & \left[- (n_0 \bar{x}_0 + n_1 \bar{x}_1) \cdot (n_0 \bar{y}_0 + n_1 \bar{y}_1) \right. \\ & \left. + (n_0 + n_1) \cdot \left\{ n_0 \cdot (\bar{x}_0 \bar{y}_0 + s_{0xy}) \right. \right. \\ & \left. \left. + n_1 \cdot (\bar{x}_1 \bar{y}_1 + s_{1xy}) \right\} \right] \quad (6) \end{aligned}$$

となる。ただし、

$$c = 1 / \left\{ (n_0 + n_1) \cdot \left(\sum_i x_{0i}^2 + \sum_j x_{1j}^2 \right) - (n_0 \bar{x}_0 + n_1 \bar{x}_1)^2 \right\}$$

である。

B.4. 未知の被験物質の MAS の予測

上記の \hat{a}^* と \hat{b}^* によって定まる直線は、

$$\log(\text{IC50}) = \hat{a}^* + \hat{b}^* \cdot \text{MAS} \quad (7)$$

となる。そこで、これを MAS について解くと、

$$\text{MAS} = (\log(\text{IC50}) - \hat{a}^*) / \hat{b}^* \quad (8)$$

となる。つまり、バリデーション研究のような事前情報と同時陽性対照を用いて、未知の被験物質における IC50 の値から MAS を予測できることになる。

上記の説明では、(1)、(2)式はバリデーション研究の結果を前提としたが、実験を行う施設での過

去の背景データの陽性対照がある場合には、バリデーション研究の結果だけでなく、背景データも含めたデータセットによってこれらの値を計算してもよいであろう。

また、 n_0 は過去のデータの数として式を修正したが、必ずしもそのような数としなくてもよいであろう。 n_0 の数が大きすぎると、同時陽性対照物質は 3 ($=n_1$) であるので、陽性対照物質の効果は小さくなってしまい、極端な場合には直線の構成にほとんど影響を与えなくなってしまう。このような場合には、陽性対照物質を同じ実験で得ている意味をなさなくなってしまうことになる。

B.5. 適用事例における提案法の評価

本研究では、上記の方法を具体的な数値により確かめることを行うことにした。細胞毒性試験として、Tani ら (1999) による SIRC-CVS 法を用いることにした。この報告では、被験物質の 10% 溶液での MAS と $\log(\text{IC50})$ の値がよい直線性を示すことが報告されている。この研究は多施設で実施されたバリデーション研究であり、2 施設が多く物質を評価している。そのほかに 5 施設が陽性対照となる 3 物質を含む 10 物質の実験を実施している。そこで、35 物質を評価した 1 施設のデータを用いて、直線を構成し、その施設とは異なる任意に選んだある 1 施設の陽性対照物質を用いて、上記の方法を用いてその施設の 5 物質 (7 物質中 2 物質が MAS が 0 であるため) を予測した場合に、どの程度予測が可能であるかを調べることにした。

本研究の検討では、MAS が 0 となる物質に関しては、 IC50 値が測定限界を超えている場合があるので、MAS が 0 の値は用いないことにした。この場合の被験物質数は 27 となる (Tani ら (1999) の報告では被験物質 S2 - 8 の MAS が ND であったが、Ohno ら (1999) では 10% 溶液の値が記載されていたため、この値を採用した)。

C. 研究結果

C.1. バリデーション研究からの事前情報の抽出

図 1 はバリデーション研究で 27 物質の実験を行ったある施設の $\log(\text{IC50})$ の値と対応する MAS の値から推定した回帰直線である。

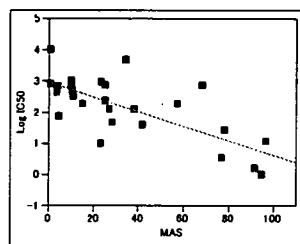


図 1 ある施設の $\log(\text{IC50})$ と MAS

この回帰直線は

$$\log(\text{IC50}) = 2.974 - 0.023 \cdot \text{MAS}$$

であり、寄与率 r^2 は 0.52 とまずまずのあてはまりを示している。

C.2. 特定の施設における直線の更新

上記の施設とは別の施設で得られた陽性対照物質の値を表 1 に示す。

表 1 ある施設の陽性対照のデータ

	MAS	IC50	$\log(\text{IC50})$
Tween 20	0.7	1228	3.09
SLS	15	198	2.30
Triton X-100	41.3	51	1.71

表 1 のデータを用いて、(5)、(6) より得られる切片と傾きにより更新される直線は

$$\log(\text{IC50}) = 2.959 - 0.024 \cdot \text{MAS}$$

と更新された。

C.3. 施設間差の指標の検討

表 1 の施設が実験した他の 5 物質に関して (8) により予測した結果を表 2 に示す。

表2 MASの予測結果

IC50	MASの 予測値	実際の MAS	差
574	8.5	3.3	5.2
495	11.2	10.3	0.9
235	24.9	26.7	-1.8
773	3.0	10.0	-7.0
29	63.6	78.0	-14.4

MASの予測値と実測値の差の絶対値は0.9から14.4の間であった。特にMASの値が大きな場合には予測値と実測値の乖離は許容されるかもしれないが、IC50が773の値では、予測値が実測値より小さくなってしまっている。MASの値が10点と3点では刺激の評価が変わるおそれがあるので、このような誤りはなくすような改善を施す必要があるかもしれない。ただし、このIC50の値773は、同時陽性対照物質のTween20の1228(MASは0.7)より小さく、SLSの198(MASは15)よりは大きいので、Ohno(2004)の示す判定基準に矛盾しない範囲である。

D. 考察

本研究では、刺激のカテゴリーを決めるというOhno(2004)の提案を拡張し、MASを予測するという方法を提案した。細胞毒性試験を用いた定量的な毒性の評価という観点からは、陽性対照と被験物質のIC50を用いれば可能であるかもしれない。しかし、ここで開発の対象になっているのはDraize眼刺激性試験の代替法である。その際に、Draize眼刺激性試験の評価指標であるMASに換算したときに値がどの程度になるかが重要であると考えるのが本研究の視点である。現に、Ohno(2003)に提案したガイダンスにも、注釈として3つの陽性対照物質のMASの値がどの程度であるのかが記載されている。

本報告では、MASの予測方法の方法論を提示し、

その適用事例を示したが、この研究ではまだ検討の余地が残っている。まず、予測値のばらつきの評価である。これは方法論に関係しており、方法論をさらに発展させた上で検討する予定である。方法論については後述する。次に、この方法の利用できるパッケージの開発である。日本で実施されたバリデーション研究では、ここで例にとりあげたSIRC-CVS以外に、SIRC-NRU、HeLa-MTT、CHL-CVSといった他の細胞毒性試験が評価された。これらの結果はいずれも良好な直線関係を示しており、本稿で示した方法が適用できる。現時点では、これらを適用するような解析パッケージが作成できていない。この開発は次年度以降の課題とする。また、このような研究を行う際に、対象となる試験法のデータが重要である。ここではDraize眼刺激性試験の結果がそれにあたるが、バリデーション研究で用いられたデータが公開されるようになるべきであろう。予測法の開発というだけでなく、代替法の開発という点からもデータの公開が重要であるので、筆者は現在過去に行われたバリデーション研究のDraize試験のデータを公開できるように準備を進めている。これも次年度以降に報告をしていく予定である。

ここで用いた予測の方法は、ベイズ統計学での回帰分析によって構成している。具体的には自然共役事前分布を用いた事後分布の平均により回帰パラメータを推定している。本来、ベイズ統計学の回帰分析でこの問題を捉えた場合、事後平均というよりも、予測分布を構成して、それに基づき議論を行うべきであろう。幸いなことに、回帰モデルは比較的単純であるので、この場合の予測分布は3つのパラメータを持つt分布となることが知られている。本研究での方法論もこれを利用することができるであろう。しかし、一般に行われるのはxを与えてyを予測することであるが、今の問題は、yを与えてxを予測することになるので、

逆推定を行わなくてはならない。この点について方法論の発展を行い、完成させることが理論的な面での課題である。これが完成した上で広く研究報告を行うこととしたい。いずれにしても、初年度である本年度は、MASの予測値を得るための方法が利用できそうであることがわかったことであるので、理論的な発展とその評価を今後も継続することにする。

EUの化粧品指令第7次改正によれば、化粧品開発のために動物を用いた眼刺激性試験が実施できる猶予期間は2009年3月までである。それまでの間に適切な代替法の開発が期待されており、現にいくつかの代替法が専門機関により評価されている(Eskesら(2005))。新たな試験法の開発はもちろん必要であるが、過去に開発された試験方法を見直し、その使用方法について検討されることも重要ではないだろうか。

E. 結論

日本で実施されたバリデーション研究の結果を用いて、細胞毒性試験のIC50の値からMASを予測する方法を提案した。具体的な実例を用いた適用結果は、提案されたガイダンスの刺激のカテゴリ内という範囲では利用可能であると思われる。細胞毒性試験の利用範囲、理論的な課題や方法論のさらなる評価が次年度以降の課題である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

参考文献

- Draize, J. H., Woodard, G. and Calvery, H. O. (1944). Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics*, **82**, 377-390.
- Eskes, C., Bessou, S., Bruner, L., Curren, R., Harbell, J., Jones, P., Kreiling, R., Liebsch, M., McNamee, P., Pape, W., Prinsen, M. K., Seidle, T., Vanparys, P., Worth, A. and Zuang, V. (2005). Eye irritation. *ATLA* **33**, Suppl. 1, 47-81.
- Ohno, Y., Kaneko, T., Inoue, T., Morikawa, Y., Yoshida, T., Fujii, A., Masuda, M., Ohno, T., Hayashi, M., Momma, J., Uchiyama, T., Chiba, K., Ikeda, N., Imanish, Y., Itakagaki, H., Kakishima, H., Kasai, Y., Kurishita, A., Ohkoshi, K., Okumura, H., Saijyo, K., Sakamoto, K., Suzuki, T., Takano, K., Tatsumi, H., Tani, N., Usami, M. and Watanabe, R. (1999). Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicology in Vitro*, **13**, 73-98.
- Ohno, Y. (2004). The validation and regulatory acceptance of alternative methods in Japan. *ATLA* **32** Suppl. 1, 643-655.
- Tani, N., Kinoshita, S., Okamoto, Y., Kotani, M., Itagaki, H., Murakami, N., Sugiura, S., Usami, M., Kato, K., Kojima, K., Ohno, T., Saijo, K., Kato, M., Hayashi, M. and Ohno, Y. (1999). Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (8)