

7. 総括

動物実験の3Rs (Replacement, Refinement, Replacement) の普及を受け^{1,2)}、欧米では化粧品規制や REACH に対応するため、動物実験代替法の利用が推奨されている。よって、欧米では安全性評価における経皮吸収試験や皮膚透過性は *in vitro* 試験が中心である³⁾。

本検討会においては各種、*in vitro* 試験法についての長短所を議論してきたが、いずれの試験も適用限界を理解し、実施する上での問題点を考慮しながら実施する必要がある。但し、適用限界を理解した上で、ガイドラインやガイダンスに準拠した正しい試験で行った *in vitro* 試験から *in vivo* の結果を推定することが可能であると思われる。正しい方法というのは皮膚の選定、レセプター相の選定、皮膚代謝の有無、試験物質の物性等を十分に考慮することである。

本検討会で評価した3試験法はいずれも公知で、欧米では一般的に用いられている試験法であることを鑑みると、適用限界を十分に理解した上で評価すれば、化学物質のリスク評価および効能評価の一つの評価系として十分に活用できる。

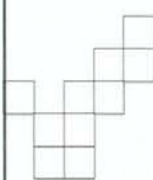
1)動物の愛護及び管理に関する法律

http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend_law2/law.pdf

2)実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準

http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law_series/nt_h180428_88.html

3)Commission Staff Working Documents (2004) Time Tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC); EN, SEC82004, 1210



**医薬部外品の申請に
おける資料のあり方
検討会**

平成21年2月

厚生労働省の方々への質問事項

- あり方検討会の報告書はどのような形で成果が公表されるのか？
製工連や関連する研究者(大学の先生方や医師へ)の貢献を多様に
書いて欲しい。
- あり方検討会に参加する委員の交通費を十分に賄える予算を検討し
て欲しい。
製工連は手弁当である。
この不況下では、今後、手弁当での参加を継続することは困難な場合
も予想される。
- ICCRに向け、もっと製工連と厚生労働省は話し合うべきである。
EUではCOLIPAとEU委員会、米国ではPCPC (IBCTFA)とFDAが、
ICCRに臨むにあたって自国の産業にとって不利な状況避けるべく事前
協議を綿密に行っていると聞いている。
- 製工連と製薬は、代替法の評価と活用に関して良く話し合うべきであ
る。
厚生労働省はその仲介に積極的になるべきと思う。

分科会を通しての留意事項

- あり方検討会 分科会は
「代替法の第三者評価を行う委員会ではない。代替法を取り入
れて安全性評価をどう担保するかを検討する委員会」

「扱うべき代替法はOECDで認められているか、バリデーション
が終了し、第三者評価も済んでいるものである」

「時間の関係で、第三者評価は並行して実施する場合あり」
「代替法を用いて医薬部外品を扱う場合の長短所をまとめる」

混乱した事項

分科会議論

- 試験法の第三者評価と安全性の行政的な受け入れ
評価の区別がつかない
- 医薬部外品の定義や存続に関する疑問
- 業界内でコンセンサスが取れていない
- 代替法以外のことを受け入れない姿勢
- 9項目に拘らない姿勢の否定

報告書

- これまでに検討していないことの記載
- 調査報告であり、その後どうするのかの方向性が未
記載
- マイナー意見が未記載

分科会の全体的な方向性

- 代替法がある場合、その利用が第一優先
- スキームまたはフローチャートの作成

検討された代替法

- 皮膚刺激性 EPISKIN
- 眼刺激性 牛摘出角膜試験、鶏摘出眼球
試験、SIRC、MATREX
- 感受性 LLNA
- 光関連毒性 3T3-NRU
- 皮膚透過性 in vitro
- 遺伝毒性 in vivoの有無

皮膚刺激性分科会 会議開催経緯

第1回会議: 2007/10/4
 新方針検討委員会発足の背景と分科会の目的・役割説明、動物実験代替法の現状と将来に関する説明、分科会の進め方
 第2回会議: 2007/12/15
 皮膚刺激性データベース作成における必要項目の確認
 第3回会議: 2008/3/1
 検討方針の変更に関する説明 → 皮膚一次刺激性代替としてのEPISKIN
 分科会の検討方針確認 → 皮膚刺激性評価法の評価項目の検討が必要
 第4回会議: 2008/4/20
 分科会の検討方針再確認、EPISKINの説明
 第5回会議: 2008/7/3
 繊維製品の皮膚一次刺激性試験方法としての培養皮膚モデル法の説明
 JIS L 1918「繊維製品の皮膚一次刺激性試験方法—培養ヒト皮膚モデル」
 第6回会議: 2008/10/9
 皮膚刺激性試験代替法第三者評価会議との合同
 ESAC 皮膚刺激性in-VITRO試験の妥当性に関する声明書の解説
 第7回会議: 2008/12/10
 代替法学会発表内容の確認、中間報告書の内容について、他の代替法の進捗確認、来年度の予定

皮膚刺激性分科会の来年度の方向性

- 1) 各種試験法の対応性の検討
 R38非表示(ウサギ4時間閉塞貼付で未満)と判断される被験試料について、ウサギおよびヒト24時間閉塞貼付試験との対応性を文献情報により評価。
- 2) ヒトパッチ試験の実施手順の改善可能性の検討
 1)の結果から、Reconstructed Human Epidermis (RHE)を用いた評価をもとに、ヒトパッチテストを実施するための手順を検討(スキーム化)。

眼刺激性分科会 会議開催経緯

開催日	概要
第1回 平成18年10月15日	<ul style="list-style-type: none"> ■ 医薬部外品の安全性評価と動物実験代替法を用いた安全性評価の確立 ■ 代替法の現状と将来について
第2回 平成19年12月12日	<ul style="list-style-type: none"> ■ 眼刺激性試験代替法開発のこれまでの流れ ■ 眼刺激性試験及び代替法開発の基礎研究
第3回 平成20年2月13日	<ul style="list-style-type: none"> ■ ヒト角膜障害や痛みについて ■ 代替法の国際動向概要
第4回 平成20年4月30日	<ul style="list-style-type: none"> ■ ウサギの角質について ■ Drazen試験の解説
第5回 平成20年7月2日	<ul style="list-style-type: none"> ■ 欧米の状況と今後の予定 ■ 厚生科学研究ガイダンス案
第6回 平成20年9月17日	<ul style="list-style-type: none"> ■ 試験法の第三者評価委員会眼刺激性試験との合同開催 ■ BCOP及びVICEの検討
第7回 平成20年10月15日	<ul style="list-style-type: none"> ■ 韓国を用いた眼刺激性評価の検討 ■ あり方検討委員会の今後の内容について
第8回 平成21年1月21日	<ul style="list-style-type: none"> ■ 代替法学会発表内容の確認、中間報告書の内容について、他の代替法の進捗確認、来年度の予定

眼刺激性分科会の来年度の議論

- ① BCOP及びVICEについてさらに検討。
- ② 細胞毒性試験(三次元培養真皮モデル試験を含む)について検討。
- ③ 国内外で開発・評価が進められている代替法について、最新動向の継続調査。
- ④ 代替法を組み込んだ評価スキームの検討。

感作性分科会の会議報告

染毛剤、香料や防腐剤の皮膚感作性の有無の判定にLLNAが有用。

ただし、LLNAにおいては、①マウスの系統により反応性が異なる(CBAマウスでの評価が重要)。②適切な溶媒を用いないと、感作性の有無だけでなく、その強さのランク分類にも影響する。

感作性分科会の来年度の方向性

1. 国内外のpeer reviewの推移を見極める
 - 水溶液や混合物の評価は難しい
 - Stand Aloneとして、感作強度の判別難しい
 - スクリーニングとしての one dose LLNA
 - LLNA-DAおよびLLNA-BrdUの利用
2. LLNAで陽性の場合の対処を具体的に示す

光関連毒性分科会の会議報告

3T3NRUは、比較的簡便かつ安価、広く普及しやすい試験法であり、光毒性の有無を判定する試験法として利用可能。本試験法で光毒性が陰性と判定された場合には、原則としてそれ以上の確認は必要ない。しかしながら、本試験法にはいくつかの短所も指摘されており、従来の動物を用いた光毒性試験法に完全に置き換わるものではない。従って、まず本試験法を第一選択肢とし、本試験法の適用が困難であった場合、またその他の理由で必要と判断された場合には、動物試験を含む適正なその他の試験法での確認が必要となる。また、本試験法にて光毒性が疑われた場合にも、他の試験法で確認することが出来る。

光関連毒性分科会の来年度議論内容

- 光毒性試験の省略を判断する基準について、可視光領域での吸収を確認する必要性
- 医薬品毒性試験(光毒性、光感作性)との関係
- 酵母光生育阻害試験法や、近年EUを中心に報告されている3次元皮膚モデルを使用した試験法の検討

皮膚透過性・経皮吸収性分科会報告

In vivo/In vitro相関性

正しい方法で行ったin vitro試験から
in vivoの結果を推定することができる

正しい方法

皮膚の選定	レセプター相の選定	皮膚代謝がある場合	試験物質の物性
-------	-----------	-----------	---------

遺伝毒性分科会の会議経緯

In vitro 小検試験の日本での受け入れ

ICHガイドラインが改訂され、評価項目に組み入れられる

今後、技術的な面で障害はなくなる見通し

2009年3月以降のEUでの動物実験禁止

部外品申請においても、代替法のみで問題ないことを示せば、動物実験を要求しない運用も可能

動物実験に頼らずに適切な評価が可能か?

遺伝毒性分科会の来年度議論

遺伝子突然変異および染色体異常の有無の確認を目的とした微生物および哺乳類の培養細胞を用いるin vitro試験が求められる。ただし、これらの試験で遺伝毒性が疑われた場合には、各々の目的に応じ動物の個体を用いるin vivo試験の提出が求められる。

in vitro試験陽性の場合の対処法は?

in vivo試験を実施できないのであれば、一現時点では対応策なし、COLIPA待ち

EU規制を想定した場合の1年後の申請資料(予想)

- 皮膚刺激性 代替法 (EPISKIN + α)
- 連続皮膚刺激性 動物実験を継続
- 感作性 LLNA (非RL法、rLLNAも可?)
- パッチテスト
- 眼刺激性 代替法 (BCOP、ICE + α)
- 光毒性 代替法
- 光感作性 動物実験を継続
- 急性毒性 動物実験を継続 (Limit法)
- 遺伝毒性 2種のin vitro

いずれも陰性の場合には、追加の動物実験不要
陽性の場合には、動物実験等を用いたリスク評価が必要

急性毒性試験

- 細胞毒性試験の利用に関する第三者評価開始の予定
 欧米のデータを参照
- 急性毒性分科会を並行して開始？

皮膚感作性試験

日本独自のガイドラインのため、案なし
光感作性物質の多くは3T3-NRU陽性？

連続皮膚刺激性試験

継続？不要？皮膚刺激性分科会で議論？

EU規制を想定した場合のpositive list収載品の追加申請資料(予想)

- 遺伝毒性 in vivo
- 皮膚透過性試験 in vitro
- 亜慢性毒性試験
- 生殖毒性
- 癌原性
 試験実施の際には3Rsを意識した立案(第三者委員会の許可が必要)

業界の方々へのお願い

- 代替法の問題でなく、安全性評価の問題であるとの認識を統一
- 分科会代表者に任せきりでなく、適度な業界内で意思疎通
- 業界としての方向性の明確化

分担研究報告書

三次元ヒト培養表皮モデルを用いた 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

研究要旨

【背景と目的】

EPISKIN, SkinEthics および EpiDerm という再構築されたヒト表皮モデルを使用して、被験物質処理後、後培養する試験法（Post Incubation: PI 法）が *in vitro* 皮膚一次刺激性試験として、欧州にて認証を得ている。わが国においても、いくつかのヒト表皮および皮膚モデルが販売されているが、それらを用いたバリデーション研究や専門家による第三者評価は終了していない。そこで、昨年の本研究では、EPISKIN で定められた PI 法とは異なる最適なプロトコルを検討した。本年は他の国内で入手可能な表皮および皮膚モデルにおける結果を求め、EPISKIN の PI 法を用いて比較検証した。

【方法】 ヒト表皮モデルとしては、LabCyte EPI-MODEL, EPISKIN, EpiDerm を用いた。ヒト皮膚モデルとしては、Vitrolife-Skin および TESTSKIN を用いた。EPISKIN のバリデーション研究で用いられた 48 種類の被験物質のなかから、無作為に選んだ 14 種類の被験物質をすべてのモデルに供した。皮膚刺激性の指標としては、MTT アッセイにおける細胞毒性試験を行った。

【結果】 得られた結果はモデル毎に異なり、14 物質中すべてのモデルで同じ判定結果が得られた物質はなかった。

【結論】 EPISKIN を用いた PI 法のプロトコルが、全ての皮膚モデルで再現可能とは限らないことが明らかになった。そのため、各モデルに適したプロトコルにおけるバリデーション研究が必要であることが明らかになった。

協力研究者

新井晶子（元国立医薬品食品衛生研究所薬理部）

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、医薬部外品および化学物質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。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、ウサギとヒトとは動物種が異なるため、疑陽性や疑陰性が生じる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。

そこで開発されたのが、再構築されたヒト表

皮モデル(ヒト表皮モデル)である。欧州にて、EPISKIN, SkinEthics および EpiDerm というヒト表皮モデルを使用して、被験物質処理後、後培養する試験法（Post Incubation: PI 法）とドレイズ試験との一致率が高いことが報告された(3)。さらに、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 EPISKIN が承認された(4)。2008年には同様に ESAC でヒト表皮モデル SkinEthics および EpiDerm を用いた MTT アッセイも認証された(5)。

一方、わが国においては、安価で安定供給が可能ないくつかのヒト表皮または皮膚モデル（表皮層の下に真皮層を併せ持つモデル）が販売されている。しかし、それらを用いたそれらを用いたバリデーション研究や専門家による第三者評価は終了していない。そこで、昨年度の本研究では、EPISKIN で定められた PI 法とは異なる最適なプロトコルを検討した。本年

度は国内で入手できるヒト表皮および皮膚モデルにおける結果を EPISKIN の PI 法で求め、比較検証した。

B. 研究方法

B. 1. 試験に用いたヒト表皮および皮膚モデル

日本国内で入手可能なヒト表皮モデルまたはヒト皮膚モデルを用いた。

ヒト表皮モデルとしては、SKinEthic 社より EPISKIN、倉敷紡績株式会社から EpiDerm、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングから LabCyte EPI-MODEL を購入した。

ヒト皮膚モデルとしては、グンゼ株式会社から Vitrolife-Skin および東洋紡株式会社から TESTSKIN を購入した。

実験は、モデル到着日またはその翌日から開始した。実験開始までの間、モデルはそれぞれに決められた温度状態で保管した。

B. 2. 被験物質

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 (3)。

この 48 物質の中から、日本国内で入手可能な 45 物質を用い (Table 1-1)、LabCyte を用い、バリデーション研究を実施した。さらに、モデル間の検討のためには、Table 1-2 に示すように、無作為に選んだ 14 物質 (刺激陽性物質 7 種類、刺激陰性物質 7 種類) を選択した。

B. 3. EPISKIN を用いた PI 法_{15min-42hour} の概要

ヒト表皮モデル EPISKIN を使用して、被験物質を処理後、後培養する試験法 (PI 法) のドレイズ試験との一致率が高いことが実証されている。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 IL-1 α 測定試験を行うとされている。

なお、LabCyte のみを用いて、昨年度検討した後培養時間を 1 時間に短縮した改定 PI 法_{15min-1hour} の検証も実施した。

B. 4. 細胞毒性試験

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いる。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。

B. 5. 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 (3)。

PI 法_{15min-42hour} では、二段階の評価を行うことになっているが、一次評価の MTT アッセイの細胞毒性のみで評価した。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、「刺激性なし」と判定した。

C. 研究結果

C. 1. LabCyte を用いた PI 法_{15min-42hour} および改良 PI 法_{15min-1hour} の比較

LabCyte を用いて PI 法_{15min-42hour} および昨年度検討した PI 法_{15min-1hour} の比較検証を 45 物質を用いて実施した。その結果、Table 2 に示すように、後処理時間を短くすることにより、陽性と判断される物質が減り、陰性と判断される物質が増えた。Specificity (特異度) が 65.4% から 80.8% に増し、逆に Sensitivity (感度) が 84.2% から 57.9% まで減った。これらの結果を合わせると、Accuracy (一致度) に大きな差はない (後短時間で 71.1%、長時間で 73.3%) と考えられた。よって、PI 法_{15min-42hour} を以後他のモデルの処理に用いることとした。

C. 2. 他のモデルを用いた PI 法_{15min-42hour} の検討

無作為に選んだ 14 物質を用いて、種々のモデルを用いて PI 法_{15min-42hour} を行うことにより、EPISKIN と同様の結果を得ることが可能か検討した。EPISKIN の結果は文献値を元にした

が、実験者により、測定値が大きくバラツクことを考慮して、EPISKIN についても実験を行った。その結果、Table3 に示すように、EPISKIN の結果は、1 物質のみずれたが、ほぼ文献値通りであった。しかし、得られた結果はモデル間で異なり、14 物質中 No. 1 のみしか同じ結果が得られなかった。他物質において、モデル間で同じ判定結果が得られた物質はなかった。他のモデルの結果はいずれも EPISKIN の一致度に及ばなかった。したがって、15 分処理、42 時間の後培養という処理方法は、EPISKIN に適した方法であり、モデル毎に最適な試験プロトコルが必要であると考えられた。

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、無作為に選んだ 14 物質を用い、日本で市販されている培養表皮および皮膚モデルを用いて細胞毒性を比較検証した。

その結果、EPIKIN と同程度の予測性を示すモデルは存在しなかった。これは各モデルに適したプロトコルが必要であることを示している。現在、*in vitro* 皮膚刺激性試験の OECD ガイドライン候補モデルとして検討されている EpiDerm および SkinEthics においても、EPISKIN performance standard に基づいた 20 物質を用い同様の検討がなされた結果として、それぞれ 60 分間および 43 分間の処理時間を選択している (5)。日本の他のモデルにおいても、EPISKIN performance standard をもとに処理時間の検討を行い (6)、モデル毎に適切な処理時間を求める必要がある。その結果を受け、バリデーション研究を実施し、適切な予測率が得られるまで、EPISKIN、EpiDerm および SkinEthics 以外のモデルを皮膚刺激性試験の代替法として使うべきではないと考える。

E. 結論

EPISKIN を用いた PI 法のプロトコルが、全ての皮膚モデルで再現可能とは限らないことが明らかになった。そのため、各モデルに適したプロトコルにおけるバリデーション研究が必要であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小島肇夫: *in vivo* 経皮吸収試験法、最新・経皮吸収剤～開発と基礎から申請のポイントまで～、株式会社情報機構、東京、pp. 95-103 (2008)
- 2) 小島肇夫: *in vitro* 経皮吸収試験法、最新・経皮吸収剤～開発と基礎から申請のポイントまで～、株式会社情報機構、東京、pp. 104-113 (2008)
- 3) 小島肇夫: 安全性評価と動物実験代替法の現状、薬学雑誌、128 (5) 747-752. (2008)
- 4) 小島肇夫: 動物実験の 3Rs における国内外の動向、ファルマシア、44 (9)、857-861 (2008)
- 5) 小島肇夫: REACH 対応に必要な動物実験代替法の現状、コスメティックステージ、2 (5)、1-4 (2008)
- 6) 小島肇夫: 動物実験代替法に関する 2008 年の国際動向、Fragrance Journal、2009-1、65-69 (2009)
- 7) 小島肇夫: 動物実験代替法の現状と展望、J. Environ Dermatol Cutan Allergol. 3 (1)、1-6 (2009)
- 8) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I., Yuasa, A.: Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 58 11-26 (2008)
- 9) Arai, S., Yamamoto, N., Kato, M., and Kojima, H.: An *in vitro* evaluation methods to test ocular irritation using a human corneal epithelium model. *Altern. Animal Test. Experiment*, 13 (2), 83-90 (2008)
- 10) 小島肇夫: 動物実験の 3Rs における国内外の動向、城西大学生命科学研究センター報告第7号、p37-50 (2009)

2. 学会発表

- 1) Kojima, H. : Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (May, 2008)
- 2) 小島肇夫: REACH 対応と動物実験代替法, 第128回FJセミナー, 東京(2008)
- 3) Kojima, H. : Japanese Collaboration on Alternative to Animal Toxicology Testing, World Congress on in Vitro Biology, Tucson (2008)
- 4) Kojima, H. : JaCVAM Update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, Bethesda, (June, 2008)
- 5) 小島肇、武吉正博、大森崇、寒水孝司、有馬和範、出原賢治、金澤由基子、牧栄二、中桐直人、五十嵐良明、田中正志、吉村功、湯浅敦子: LLNA-BrdU 法の施設間バリデーション研究, 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, 東京(2008)
- 6) 小島肇、武吉正博、出原賢治: 非 RI 法による皮膚感作性試験代替法(LLNA法)のバリデーション研究—試験法概要—, 第15回日本免疫毒性学会学術大会, 東京(2008)
- 7) 出原賢治、小島肇、武吉正博: 非 RI 法による LLNA 法の比較, 第38回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 大阪(2008)
- 8) Kojima, H. : Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Brussels (November, 2008)
- 9) Kojima, H. : International Current of 3Rs International Symposium on the 3Rs Promotion in Asia, Saitama (2008)
- 10) 小島肇: 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会報告, 日本動物実験代替法学会第21回大会, 埼玉(2008)
- 11) 杉山真理子、河合敬一、小島肇、寒水孝司、辰見寿、夏秋優、森福義: 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 皮膚刺激性分科会からの報告, 日本動物実験代替法学会第21回大会, 埼玉(2008)
- 12) 金澤由基子、横関博雄、中田土起文、坂口斉、大野泰雄、小島肇: 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 感作性試験分科会からの報告, 日本動物実験代替法学会第21回大会, 埼玉(2008)
- 13) 瀬戸 洋一、萩野 滋延、畠 賢一郎、森田 正道、平野 耕治、金子 豊蔵、小島肇: 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 眼刺激性分科会からの報告, 日本動物実験代替法学会第21回大会, 埼玉(2008)
- 14) 藤井まき子、小島肇、杉林堅次、上月裕一、桑原裕史: 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 皮膚透過・経皮吸収試験分科会からの報告, 日本動物実験代替法学会第21回大会, 埼玉(2008)
- 15) 笠松俊夫、江幡真也、林 真、能美建彦、本間正充、小島肇: 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 遺伝毒性分科会からの報告, 日本動物実験代替法学会第21回大会, 埼玉(2008)
- 16) 武吉正博、小島肇、大森崇、寒水孝司、有馬和範、出原賢治、金澤由基子、牧栄二、中桐直人、五十嵐良明、田中正志、吉村功、湯浅敦子: LLNA-BrdU 法の施設間バリデーション研究, 日本動物実験代替法学会第21回大会, 埼玉(2008)
- 17) 小島肇、安藤洋子、山口能宏、小坂忠司、鈴木民恵、湯浅敦子、渡邊幸彦、篠田伸介、出原賢治、吉村 功、宮岡悦良、石山賢也、加藤雅一、大森 崇: 培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究 予備試験結果, 日本動物実験代替法学会第21回大会, 埼玉(2008)
- 18) 小島肇: in vitro 遺伝毒性試験—光と影—, 第37回日本環境変異原学会, 沖縄(2008)
- 19) 小島肇: 毒性試験における培養細胞の利用, 安全性評価研究会2008年冬のセミナー, 東京(2008)
- 20) 小島肇: 動物実験適正化のグローバルな動き—代替法の動きを中心に—, 日本制約工業協会医薬品評価委員会 第102回基礎研究部会総会, 京都(2009)
- 21) Kojima, H. : Current aspects of LLNA-DA and LLNA-BrdU as alternatives for skin sensitizer classification in Japan, 2009 Winter Conference of Korean Society of Alternatives to Animal Experiments, Seoul (February, 2009)
- 22) Kojima, H. : Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra

(March, 2009)

- 23) R Tice, F Deal, P Ceger, D Allen, J Gordon, J DeLange, S Bremer, M Nakamura, H Kojima, A Ono, W Stokes : Establishing a Historical Database for a Multi-phased International Validation Study of a Stably-Transfected Estrogen Receptor (ER) Transcriptional Activation (TA) Test Method. 48th Annual SOT meeting, Baltimore (2008)
- 24) J Strickland, M Paris, D Allen, R Tice, H Kojima, P Prieto, M Wind, W Stokes : ICCVAM/NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Acute Systemic Toxicity Evaluations. 48th Annual SOT meeting, Baltimore (2008)

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし

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) 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.
- 4) European Centre for the Validation of Alternative Method (2007) STATEMENT ON THE SCIENTIFIC VALIDITY OF IN-VITRO TESTS FOR SKIN IRRITATION TESTING
- 5) European Centre for the Validation of Alternative Method (2008) STATEMENT ON THE SCIENTIFIC VALIDITY OF IN-VITRO TESTS FOR SKIN IRRITATION TESTING
- 6) 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.

Table 1-1: Test chemicals for optimised protocol

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

^aChemicals not available; ^bND=not detected; ^cS=solid, L=liquid; ^dclassification after analysis and review of *in vivo* data suggested by Ingrid Gerner

I=irritant, NI=non irritant

Table 1-2: Test chemicals used

No.	Chemical name	CAS No.	Chemical type	Physical state	Supplier	Final <i>in vivo</i> classification for the study	EPISKIN classification (protocol: 15min/42h)
7	Lilestralis/lilial	80-54-6	Aldehyde	Liquid	Wako		
9	1-Bromopentane	110-53-2	Brominated	Liquid	Acros organics	I	I
13	1-Bromohexane	111-25-1	Brominated	Liquid	Wako	I	I
14	Methyl laurate	111-82-0	Ester	Liquid	Wako	I	I
16	Linalyl acetate	115-95-7	Ester	Liquid	Wako	I	I
17	d-Limonene	5989-27-5	Miscellaneous	Liquid	Sigma-Aldrich	I	I
20	Linalool	78-70-6	Alcohol	Liquid	Wako	I	I
24	Benzyl alcohol	100-51-6	Alcohol	Liquid	Acros organics	NI	NI
25	<i>Cis</i> -Cyclooctene	931-87-3	Hydrocarbon	Liquid	Aldrich	NI	I
29	Benzyl acetate	140-11-4	Ester	Liquid	Acros organics	NI	I
32	Sodium metasilicate (10%)	6834-92-0	Alkali	Liquid	Kanto chemical	NI	NI
34	Hydroxycitronellal	107-75-5	Aldehyde	Liquid	Wako	NI	NI
35	n-Butyl propionate	590-01-2	Ester	Liquid	Acros organics	NI	NI
37	1,6 Dibromohexane	629-03-8	Brominated derivative	Liquid	Acros organics	NI	I

Table2 Diference of post-incubation using LabCyte

Chemical No.	Chemical name	15min+1h15min+42h	
1	SLS 20% (aq.)	I	I
2	SLS 50% (aq)	I	I
3	Tetrachloroethylene	NI	I
4	1,1,1 trichloroethane	I	I
5	Potassium hydroxide 5%	I	I
6	Heptanal	I	I
7	Lilestralis/lilial	NI	I
8	Methyl palmitate	NI	NI
9	1-Bromopentane	NI	I
10	Alpha terpineol	I	I
11	dl-Citronellol	I	I
13	1-Bromohexane	NI	I
14	Methyl laurate	NI	I
15	Cinnamaldehyde	I	I
16	Linalyl acetate	NI	NI
17	d-Limonene	NI	NI
18	Eugenol	I	I
19	10-Undecenoic acid	I	I
20	Linalool	I	I
21	Dimethyl disulphide	I	I
23	Methyl stearate	NI	NI
24	Benzyl alcohol	I	I
25	Cis -Cyclooctene	NI	NI
26	2-ethoxy ethyl methacrylate	NI	NI
27	Benzyl benzoate	NI	NI
28	2-Methyl-4-Pphenyl-2-butanol	I	I
29	Benzyl acetate	NI	I
30	Isopropyl palmitate	NI	NI
31	2,4-Xylidine	I	I
32	Sodium metasilicate (10%)	I	I
33	Isopropyl myristate	NI	NI
34	Hydroxycitronellal	NI	I
35	n-Butyl propionate	NI	I
36	Sodium bisulphite	NI	NI
37	1,6 Dibromohexane	NI	I
38	Isopropanol	NI	NI
39	Benzyl salicylate	NI	NI
40	Lauric acid	NI	NI
41	Dipropylene glycol	NI	NI
42	Sodium bicarbonate	NI	NI
43	3,3-Dithiodipropionic acid	NI	NI
44	4,4-Methylene-bis (2,6-di-butyl)phenol	NI	NI
45	4-Amino-1,2,4-triazole	NI	NI
46	3-Chloronitrobenzene	NI	NI
48	Erucamide	NI	NI
	Specificity(%)	80.8	65.4
	Sensitivity(%)	57.9	84.2
	Accracy(%)	71.1	73.3

$$\text{Specificity} = \text{CN} / (\text{CN} + \text{FP})$$

$$\text{Sensitivity} = \text{CP} / (\text{CP} + \text{FN})$$

$$\text{Accuracy} = (\text{CP} + \text{CN}) / (\text{CP} + \text{CN} + \text{FN} + \text{FP})$$

not matched

Table3. Comparison with the cytotoxicity among LabCyte, EPISLIN, EpiDerm, VitroLife-skin and LSE-high

Chemical No.	Chemical name	in vivo classification	LabCyte	EPISKIN		EpiDerm	VitroLife-Skin	LSE-high
				文献値	再現性			
1	Lilestralis/lilial	I	I	I	I	I	I	I
2	1-Bromopentane	I	I	I	I	NI	I	NI
3	1-Bromohexane	I	I	I	I	NI	I	NI
4	Methyl laurate	I	I	I	I	NI	NI	NI
5	Linalyl acetate	I	NI	I	I	NI	NI	I
6	d-Limonene	I	NI	I	I	NI	I	NI
7	Linalool	I	I	I	I	I	I	I
8	Benzyl alcohol	NI	I	NI	NI	I	I	NI
9	Cis-Cyclooctene	NI	NI	I	I	I	I	I
10	Benzyl acetate	NI	I	I	I	NI	NI	NI
11	Sodium metasilicate (10%)	NI	I	NI	NI	I	I	I
12	Hydroxycitronellal	NI	I	NI	NI	I	I	I
13	n-Butyl propionate	NI	I	NI	I	NI	NI	NI
14	1,6 Dibromohexane	NI	I	I	I	I	NI	I
	Specificity(%)		14.3	57.1	42.9	28.6	42.9	42.9
	Sensitivity(%)		71.4	100	100	28.6	71.4	42.9
	Accuracy(%)		42.8	78.6	71.4	28.6	57.1	42.9

Treatment: 15min + 42h post incubation
 Endpoint: MTT assay
 Specificity = CN/(CN+FP)
 Sensitivity = CP/(CP+FN)
 Accuracy = (CP+CN)/(CP+CN;FN+FP)

分担研究報告書

『分子生物学的・組織化学的手法を用いた新規眼刺激性試験・眼毒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）

協力研究者 山下 宏美、住友 万里子、田島 香里、大野 亜由美、
綾木 雅彦、山田 治基、谷口 孝喜、加藤 雅一、畠 賢一郎、
堀口 正之、平野 耕治

研究要旨

【背景と目的】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、新規の眼刺激性試験・眼毒性試験代替法を開発する。

【材料と方法】新規の眼刺激性試験・眼毒性試験代替法の開発・検討を行うため、2種類のヒト角膜上皮細胞株（HCEC2、EHXV）と1種類の不死化ヒト角膜上皮細胞株（HCE-T）を用いた。眼刺激性試験・眼毒性試験代替法で使用する細胞は、安定性・再現性が確保された細胞であることが必要である。そこで、ヒト角膜上皮細胞の特性を保持したまま、増殖させることができる遺伝子（SV40、hTERT）の発現ベクターの作成、および作成したベクターの角膜上皮細胞への遺伝子導入として、リポフェクション法とエレクトロポレーション法による検討を行い、新規角膜上皮不死化細胞株の作成を試みた。一方、ウイルスベクターを用いてSV40が導入された不死化ヒト角膜上皮細胞株（HCE-T細胞）のクローニングを行い、角膜上皮細胞としての細胞特性の維持について検討した。

【結果】SV40とhTERTの発現ベクターを構築し、全シーケンスの解析を完了した。リポフェクション法とエレクトロポレーション法による角膜上皮細胞株への遺伝子導入・不死化細胞株の樹立は、平成20年度の研究段階においては、まだ成功していない。クローニングしたHCE-T細胞株は、継代を行ってもKeratin-3とIntegrin- β 1を発現し続ける細胞であった。

【展開】来年度は、構築したベクターを正常角膜上皮細胞へ導入できる方法の更なる検討を継続する。一方、クローニングしたHCE-T細胞を用いた研究では、三次元培養角膜モデルの構築を検討する。

A. 研究目的

現在の眼刺激性試験のガイドラインは、ウサギの眼結膜嚢に被験物質を暴露させた後の角膜、虹彩および結膜に対する刺激性について細隙灯顕微鏡などを用いて肉眼的に判定する方法（ウサギを用いた *in vivo* 眼刺激性試験法：Draize法）である。このDraize法は、被験物質の刺激性を検出する感度としては非常に優れているが、試験施設間での再現性に乏しく、動物に激しい苦痛とストレスを与えることが社会的に問題となり、昨今、試験目的のために動物を使用しない代替法の開発が進められている。

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も、重要な位置付けを占める眼（角膜）の局所毒性に着目し、継代培養しても角膜上皮細胞の特性を保持した細胞株による新規の眼刺激性試験・毒性試験代替法を開発することを目的とする。

B. 材料・方法・結果

B-1. 供試細胞

研究に使用した細胞は、入手することが可能であった2種類のヒト正常角膜上皮細胞株（HCEC-2：KURABO、EHXV：J-TEC）とSV40によって不死化されたヒト角膜上皮細胞株（HCE-T：Riken BRC）の3種類を用いた。

B-1-1. HCEC-2 (KURABO)

ヒト角膜上皮から分離・培養し、2次培養後に凍結保存された正常ヒト角膜上皮細胞（HCEC-2, lot NO. KC-4009, KURABO）を用いて、

KURABOのプロトコールに基づき無血清培地（EpiLife™+HCGS）にて培養した細胞（3次培養細胞）を用いた。

B-1-2. EHXV (J-TEC)

ヒト角膜上皮から分離した正常ヒト角膜上皮細胞（EHXV）を本研究の遂行のためだけに特別に株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング（J-TEC）より供与して頂いた。本細胞は、3T3-J2細胞をフィーダー細胞として、アッセイ培地（J-TEC）で培養した細胞を用いた。

B-1-3. HCE-T (Riken BRC)

ヒト角膜上皮から分離・培養した正常ヒト角膜上皮細胞をSV40-adenovirus組換えベクターにより不死化したヒト角膜上皮細胞株である。64kDケラチン産生能があり、ウイルス粒子は産生せず、コレラトキシン不含で培養した細胞株（HCE-T, RCB2280, Riken BRC）である。医療法人出田会出田眼科病院の佐々木香る先生から承諾を得て、RIKEN Bio Resource Center (RIKEN BRC)より分与・購入した細胞を用いた。

B-2. 発現ベクターの構築

ヒトの正常角膜上皮を用いた眼刺激性試験・毒性試験代替法の開発において、まず、使用する細胞特性などを安定して供給できるようにしなければならない。しかし、ヒト角膜上皮細胞は、初代培養が難しく、さらに継代・維持することができない細胞として知られている。そこで、細胞特性を維持させることを目的とし、2種類の不死化遺伝子（SV40 Large T Ag遺伝子：SV40、Telomerase Reverse Transcriptase：hTERT）を2種類の

ベクター（定常的に発現するベクター：Stable Vector、発現コントロールベクター：Control Vector）に組み込み、計4種類のVectorを構築した。

SV40 Large T Ag遺伝子 (Simian virus: SV40)は、サルを宿主とするポリオマウイルスであり、アカゲザルの腎臓の細胞から分離された。不死化遺伝子SV40-T抗原は、細胞周期を制御する働きを持つ癌抑制遺伝子p53の働きを阻害し、結果として細胞の増殖を促す作用を持つと考えられている。

本研究で使用したSV40は、K12株由来大腸菌 (XL1-Blue) に組み込まれたpBluescript II KS (-) Vector (3.0 kbp) に導入されたpBS-SVT: SV40 Large T AgをJCRB Gene Bank (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; Resource ID: VG042) より購入した。SV40 Large T Ag遺伝子の5'末端領域の配列はSequencer (3730 XL DNA Analyzer, ABI) を用いて解析した。次にSV40 Large T Ag遺伝子 (約2.5 kbp) をPCRで増幅した後、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、およびSV40 Large T Ag遺伝子の発現を確認するためのPrimer & Probeの作製のため、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。

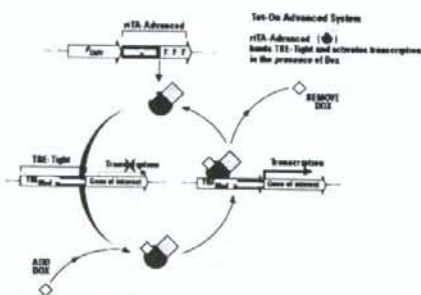
Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT)は、テロメア長さを維持することができる細胞のリボ核タンパク質の逆転写酵素である。テロメアとは、真核生物の染色体の末端にある反復

DNA領域であり、染色体末端を複製・保護する機能を有している。原核生物の染色体は環状であるため、複製が終結するという事はおこらないが、真核生物の通常のラギング鎖DNAが複製される際には、細胞分裂時にテロメアが短くなり、細胞がテロメア依存的に老化すると考えられている。テロメラーゼは、自身のRNA部分を鋳型として直鎖状の染色体の3'末端にTTAGGG反復配列を付加することによってテロメア長を維持することができる。これはヒトの癌細胞によくみられるパスウェイであり、テロメアのホメオスタシス (恒常性) を保っている。テロメア長が細胞の増殖能を制御して細胞が無限に分裂するには、テロメアの維持が不可欠であると考えられている。

本研究で使用したhTERTは、The Global Bioresource Center of the American Type Culture Collection (ATCC) からcDNAを購入した。hTERTを含むプラスミドDNAを抽出・精製した後、EcoR Iで消化し、hTERTを含む約3.4kbp断片を回収し、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hTERT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 (3730 XL DNA Analyzer, ABI) 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。

発現コントロールベクターシステムは、Tet-Onシステム ((Clontech Lab., Inc. Cat. No. 631018) を使用した。テトラサイクリン遺伝子発現誘導系は、大腸菌テトラサイクリン耐性オペロンの転写調節に働くTet リプレ

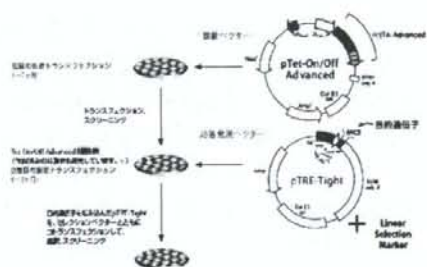
ッサー (TetRタンパク質) とTetオペレーター配列 (tetO配列-Tetオペロン上流のDNA配列) の特性を利用し、真核生物での転写制御システムとして開発された。TetリプレッサーはtetR遺伝子産物でテトラサイクリン非存在時にのみtetO配列に結合し、テトラサイクリンがTetリプレッサーに直接結合するとtetO配列に結合できなくなる。本システムでは、ヘルペスウイルス由来のVP16転写活性化ドメインをTetRと融合し転写活性化因子(r)tTAとして働かせ、培地中のテトラサイクリンの濃度を調節することにより、TREプロモーター (tetO配列が7回連続したTet応答配列をもつCMV最小プロモーター) の下流に組み込んだ目的の遺伝子の発現レベルを定量的に調節することができる。発現の調節は厳格かつ可逆的でリーク (非誘導時の発現) はほとんど見られない。また目的遺伝子の発現調節は誘導後、速やかに行なわれることが知られている。



(Tet-On Advanced Systemマニュアルより引用)

Tet-On Advanced Inducible Gene Expression Systemでは、まず第1段階として、pTet-On Advanced Vector (調整ベクター) を導入させ、次に pTRE-Tight Vector (目的遺伝子を組み込んだ応答発現ベクター) を導入させるという、2段階の遺伝子導入ステ

ップを必要とする。



(Tet-On Gene Expression Systemマニュアルより引用)

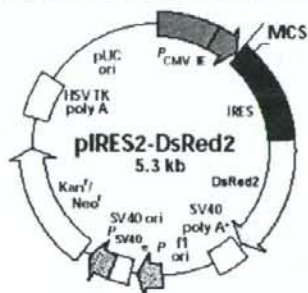
B-2-1. Stable SV40 Large T Ag 遺伝子 - pIRES2-DsRed Vector (S-SV40)

SV40 Large T Ag gene Plasmid DNAをEcoR I消化し、SV40遺伝子を含む約2.5kbp断片を回収した。

精製した断片を pIRES2-DsRed Express Vector DNA (Clontech Lab., Inc. Cat. No. 632463) の Multiple Cloning Site (MCS : EcoR I サイト) に挿入した (図-1)。Pcmvプロモーターに対して正方向に挿入されたクローンを選択し、挿入遺伝子の塩基配列を確認した。

S-SV40 が挿入された pIRES2-DsRed-Express Vector を大腸菌に形質転換し、液体培養した。培養菌体より Plasmid Mega Kit (QIAGEN)を用いて Plasmid DNAを抽出、精製した。

図-1 pIRES2-DsRedのVector Map



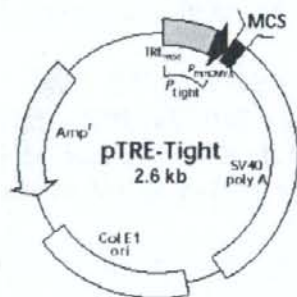
B-2-2. Control SV40 Large T Ag 遺伝子 - pTRE-Tight Vector (C-SV40)

SV40 Large T Ag gene Plasmid DNA を EcoR I 消化し、SV40 遺伝子を含む約 2.5 kbp 断片を回収した。

精製した断片を pTRE-Tight Vector DNA (Clontech Lab., Inc. Cat. No. 631059) の MCS (EcoR I サイト) に挿入した (図-2)。PminCMV プロモーターに対して正方向に挿入されたクローンを選択し、挿入遺伝子の塩基配列を確認した。

C-SV40 が挿入された pTRE-Tight Vector を大腸菌に形質転換し、液体培養した。培養菌体より Plasmid DNA を抽出、精製した。

図-2 pIRES2-DsRed の Vector Map



B-2-3. Stable telomerase reverse transcriptase-pIRES2-DsRed Vector (S-hTERT)

hTERT Plasmid DNA を EcoR I 消化し、hTERT 遺伝子を含む約 3.4 kbp 断片を回収した。

精製した断片を pIRES2-DsRed Express Vector DNA の MCS (EcoR I サイト) に挿入した。Pcmv プロモーターに対して正方向に挿入されたクローンを選択し、挿入遺伝子の塩基配列を確認した。

S-hTERT が挿入された pIRES2-DsRed-Express Vector を大腸菌に形質転換し、液体培養した。培養菌体より Plasmid DNA を抽出、精製した。

B-2-4. Control telomerase reverse transcriptase - pTRE-Tight Vector (C-hTERT)

hTERT Plasmid DNA を EcoR I 消化し、hTERT 遺伝子を含む約 3.4 kbp 断片を回収した。

精製した断片を pTRE-Tight Vector DNA の MCS (EcoR I サイト) に挿入した。PminCMV プロモーターに対して正方向に挿入されたクローンを選択し、挿入遺伝子の塩基配列を確認した。

C-hTERT が挿入された pTRE-Tight Vector を大腸菌に形質転換し、液体培養した。培養菌体より Plasmid DNA を抽出、精製した。

B-3. 細胞への遺伝子導入

細胞への遺伝子導入方法は、リポフェクション法 (8 試薬 × 4 条件) とエレクトロポレーション法で検討した。

リポフェクション法で使用した試薬は、Lipofectin Reagent (Invitrogen)、Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen)、FuGENE® (Roche)、TurboFect™ in vitro Transfection Reagent (Fermentas)、Nano Juice™ Transfection Kit (TAKARA Bio)、TransIT® Transfection Reagent (TAKARA Bio)、GenJet™ Transfection Reagent (SignaGen Lab)、および Cellfect™ Transfection Kit (GE Healthcare Life Sciences) の 8 種類を用いた。DNA と各試薬との混合条件は、1:1、

1:2, 1:3, 1:4の4条件を検討した。

エレクトロポレーション法は、Gene Pulser Xcell (BIO-RAD) を使用した。10⁶ cell/mlの細胞に対して2 mmのキュベットを使用し、条件はExponential wave、またはSquare waveを用いて、電圧は75~200 V、Pulse lengthは10 or 20 msec、パルス数は1回、または2回とした。

なお、平成20年度の研究においては、まずS-SV40とS-hTERTの遺伝子導入を検討した。ベクターにDsRedが組み込まれているため、導入された細胞は、倒立蛍光顕微鏡で観察することにより、GFPベクターと比較すると若干暗いが蛍光を判別することができる。

B-4. HCE-TのCloningと細胞特性

HCE-T細胞をFACS Vantage SE (BD) を用いて、Integrin β 1でのセルソーティングを行い、Cloningを行った。また角膜上皮細胞の特異的マーカーの1つであるKeratin-3の発現が継代培養によって変化しないかどうかを検討した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用したヒト正常角膜上皮細胞は、市販されている細胞を購入、または研究用で使用している細胞を分譲して頂き、本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

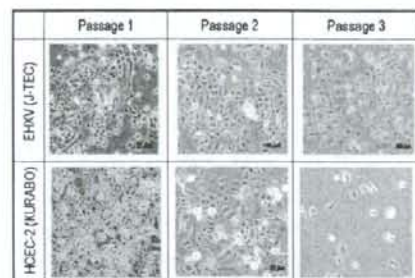
C-1. 角膜上皮細胞株の継代と遺伝子導入

HCEC-2 (KURABO) と EHXV (J-TEC) の2種類のヒト正常角膜上皮細胞の継代培養と遺伝子導入実験を

行った。

C-1-1. HCEC-2とEHXVの継代培養

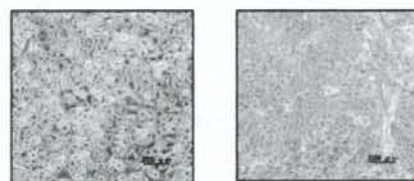
無血清培地 (EpiLife-KG2 : EpiLife™+HCGS) を用いて、Non-CoatのディッシュでFeeder細胞の無い培養条件で細胞の継代培養実験を行った。



HCEC-2は3継代目で殆どの細胞が増殖しなくなった。EHXVは3継代目で細胞の膨化が顕著となり、4継代目で細胞が殆ど増殖しなくなった。

C-1-2. HCEC-2への遺伝子導入

購入後1継代目の細胞を無血清培地 (EpiLife-KG2 : EpiLife™+HCGS) と3%血清を含む培地 (M-stars C) で培養した。



無血清で培養

3%血清で培養

次に継代した細胞が60%程度のサブコンフルエントになった状態で、Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen) と FuGENE® (Roche) を用いてS-SV40とS-hTERTの遺伝子導入を検討した。

無血清培地で培養した細胞は、導入