

200940003A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と
国際協調に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小島 肇

平成22(2010)年 4月

研究代表者

小島肇(国立医薬品食品衛生研究所 薬理部)

研究分担者

大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所)

松永佳世子(藤田保健衛生大学 医学部 皮膚科)

板垣宏(日本化粧品工業連合会 技術委員会)

山本直樹(藤田保健衛生大学 共同利用研究施設)

大森崇(京都大学大学院 医学研究科)

目 次

I. 総括研究報告	
動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究 小島 肇	1
II. 分担研究報告	
1. 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 山本直樹	11
2. 感作性試験代替法の開発 大野泰雄	57
3. ヒト接触皮膚炎評価の見直し 松永佳世子	65
4. バリデーションデータの統計解析 大森 崇	69
5. 代替法についての国際情勢の調査 板垣 宏	77
6. 動物実験代替法のバリデーションと第三者評価 小島 肇	109
1) 培養表皮モデル 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	115
2) 皮膚刺激性試験代替法の第三者評価	197
3) 酵母生育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた 光毒性試験代替法の専門家による第三者評価	249
4) <i>in vitro</i> 発熱性物質試験の専門家による第三者評価	281
5) 酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる 光毒性試験代替法の行政的な受け入れのための評価	309
6) 眼刺激性試験代替法であるウシ摘出角膜の混濁および透過性試験の 行政的な受け入れのための評価	311
7) ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法の 行政的な受け入れのための評価	315
7. 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 小島 肇	317
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	435
IV. 研究成果の刊行物・別刷	437

総括研究報告書

「動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究」

代表研究者 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

動物実験については欧米を中心に動物愛護団体等からの反対運動が活発に行われており、動物を用いない安全性試験法の開発が迫られている。そこで、本研究では動物実験代替法（以下、代替法と記す）に関する国際情勢を考慮しながら、化粧品や医薬品の安全性評価のために用いられている眼刺激性および感作性試験の代替法の開発を目指した。また、バリデーション研究および専門家による第三者評価（以下、第三者評価と記す）により開発された試験法の行政試験法としての適性を評価した。

代替法の開発として、眼刺激性試験において、新規角膜上皮不死化細胞株の作出を試み、さらに新規眼刺激性試験・毒性試験代替法で使用する角膜上皮細胞の特異的マーカーの検索を行った。その結果、ウイルスベクターを用いることなくSV40の遺伝子導入に成功し、不死化ヒト角膜上皮細胞（HCE-NY）の作出および本細胞を用いた三次元角膜培養モデルを構築に成功した。また、角膜上皮細胞の特異的マーカーであるkeratin-3を新たな眼刺激性評価の指標とできることが明らかになった。

感作性試験代替法の開発においては、ヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞の CD86 および CD54 の発現亢進を指標にした（human Cell Line Activation Test: h-CLAT）について試験法の公定化を目指した活動が行われている。本年度は h-CLAT の信頼性を高めることを目的として、試験条件の背景データを収集した。具体的には、①細胞選択時の対照物質である Ni および SLS の推奨濃度の決定、②細胞継代方法の違いが結果に与える影響、③測定に用いるフローサイトメーターの精度管理に関する基礎的研究を行った。その結果、Ni および SLS の推奨濃度をそれぞれ決定し、プロトコールに記載した。また継代時に細胞を遠心分離するかどうかは結果に大きく影響しないことを明らかにした。さらにフローサイトメーター用の標準ビーズを用いた検討では、3 施設で機器の感度に大きな違いがないことを確認した。

統計学的な解析については、バリデーション研究によって認められた代替法が、未知の被験物質とともに同時に 3 つの程度の陽性対照物質の実験を行うことを想定し、ベイズ統計学の視点から統計的較正法の観点から提案法を導出することにした。また、バリデーションで用いられたドレイズ眼刺激性試験の各個体のデータを入手し、ドレイズ眼刺激性試験の刺激性のスコアである MAS（最大平均評価点）の標準誤差を推定した。その結果、代替法を用いて動物実験のスコア予測を行う際、予測の適性評価には対象となる動物実験のスコアのばらつきも考慮する必要があると結論された。

ヒト接触皮膚炎の見直しについては、化粧品や医薬部外品の皮膚一次刺激のパッチテストについて、日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 皮膚刺激研究グループにて、一次刺激性評価のためのパッチテスト貼布時間の検討がなされた。一次刺激性物質としてパッチテストや動物試験にて刺激性が有るとされている物質および化粧品原料として汎用されている物質を用い、被験者の上背左背部に 48 時間貼布、右背部に 24 時間貼布、両側の上記貼布物質の下部に 4 時間貼布を施行した。判定は皮膚刺激判定用新基準を用いた。すべて同時に評価できるように、貼布時間を調整した。その結果、4 時間貼布では、皮膚刺激反応を惹起することはできなかった。24 時間および 48 時間貼布の皮膚刺激反応には差を認めなかった。皮膚一次刺激性のパッチテストによる評価は、24 時間貼布および 48 時間貼布の何れでも可能であることが明らかになった。

代替法に関する国際動向の調査については、ICATM（代替法試験協力国際会議）が2009年4月27日に調印式を終え、正式に始動したことが挙げられる。2009年9月9日～11日にICCR-3（第3回化粧品規制協力国際会議）が東京で開催され、国際貿易への障壁を最小化しつつ、消費者保護を維持する目的で、化粧品関連の問題について議論された。

日本で開発されたか、あるいは欧米で認証された新規動物実験代替法のバリデーション研究、専門家による第三者評価および第三者評価が終了した試験法の行政的受け入れの評価について検討した。

具体的には、バリデーション研究として、培養表皮モデル 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を行い、良好な結果を得た。

第三者評価については、1) 酵母成育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた光毒性試験代替法、2) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、3) *in vitro* 発熱性試験について適切な評価が実施された。

行政的な受け入れ評価として、JaCVAM 評価会議において、1) 酵母成育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた光毒性試験代替法、2) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、3) 皮膚感作性試験 LLNA-BrdU、4) 牛摘出角膜試験による眼刺激性試験代替法および5) 鶏摘出眼球試験による眼刺激性試験代替法の評価を行い、光毒性試験を除く試験法の行政的な受け入れを推奨することになった。

医薬部外品（薬用化粧品）の安全性評価ガイドラインの中で動物実験代替法をどう使いこなしていくか検討するため、医薬部外品に関係の深い委員の協力のもと、「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（以降、あり方検討会と記す）」を設立した。このあり方検討会の下に、さらに皮膚刺激性、感作性、皮膚透過性・経皮吸収、光関連毒性、遺伝毒性、眼刺激性の6分科会を設立し、検討作業を進めた。

すべての各分科会からの報告を受け、あり方検討会では各分科会の意見に合意し、さらに以下のような提言を行った。

- ①動物福祉や動物実験の3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) は尊重されなければならない。
- ②ただし、医薬部外品の安全性レベルを維持することを前提に、動物実験の要否、代替法の選択を判断すべきである。
- ③代替法はOECD（経済協力開発機構）テストガイドラインや公的な機関でバリデーション研究や第三者評価が実施されたものを用いる。
- ④代替法は、その適用範囲や限界を理解した上で実施されるべきである。

分担研究者

板垣 宏 (日本化粧品工業連合会
技術委員会)

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

大森 崇 (京都大学医学部)

松永佳世子 (藤田保健衛生大学医学部皮膚科)

山本直樹 (藤田保健衛生大学総合医学研究所)

A. 研究目的

動物実験については欧米を中心に動物愛護団体等からの反対運動が活発に行われており、動物を用いない安全性試験法の開発が迫られている。そこで、本研究では動物実験代替法（以下、代替法と記す）に関する国際情勢を考慮しながら、化粧品や医薬品の安全性評価のために用いられている代替法を開発する。また、開発された試験法の行政試験法としての適性を評価するものである。

具体的には

- 1) 化粧品や医薬品の安全性評価のために用いられている眼刺激性および感作性試験の代替法の開発を目指す。
- 2) 代替法に関する国際情報を収集する。
- 3) 臨床医の立場から、
- 4) 日本で開発されたか、あるいは欧米で認証された新規代替法のバリデーション研究、専門家による第三者評価および第三者評価が終了した試験法の行政的受け入れについて検討した。

B. 研究方法

B-1) 試験法の開発

B-1-1) 眼刺激性試験

市販のヒト角膜上皮細胞株 (HCEC-2) と正常角膜輪部組織から分離培養したヒト角膜上皮細胞 (HCE)、および既存の不死化ヒト角膜上皮細胞株 (HCE-T) を用いた。不死化細胞株作出のための遺伝子 (SV40) と細胞増殖・分化に影響する遺伝子 (hTERT) が角膜上皮細胞で働くことができるベクターの構築、および作成したベクターの角膜上皮細胞へのエレクトロポレーション法による遺伝子導入を行い、新規角膜上皮不死化細胞株と細胞分化を試みた。さらに新規眼刺激性試験・毒性試験代替法で使用する角膜上皮細胞の特異的マーカーの検索を行った。

B-1-2) 感作性試験

ヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞の CD86 及び CD54 の発現亢進を指標にした感作性試験代替法 (human Cell Line Activation Test: h-CLAT) が日本において開発され、試験法の公定化を目指した活動が行われている。

B-1-2-1) 防腐剤の検討細胞選択時に用いる Ni、SLS の固定濃度の検討

共同研究に参加している施設の中から、3 施設が本検討に参加した。

Ni に関しては、厚生労働科学研究として以前同一試験濃度で行った 7 施設での結果から、今回評価する固定濃度として 100µg/mL に決定した。SLS に関しては急激に細胞毒性の変化が認められる事から、55、60、65µg/mL の 3 濃度において試験を行いデータを蓄積することとした。これら固定濃度に関して、まず 1 施設で 10 回のデータを取得し、3 施設での評価に適用することができる濃度であるかの予備評価を行った。

その後 3 施設において、細胞を新たに播種し、培養 3~5 週間に 3 回の実験を行い、Ni に関しては CD86、CD54 共に陽性となるかどうか、そして SLS に関しては細胞生存率 < 90 % で CD86、CD54 共に陰性となるかを判断基準とし、評価した。

B-1-2-2) 細胞培養条件の検討

共同研究に参加している施設の中から、5 施設が本検討に参加した。

各施設では、細胞を播種して約一週間培養した後、“遠心分離による方法”および“希釈による方法”の 2 つのラインに分割して継代を行った。“遠心分離による方法”では、細胞培養液及び細胞を培養フラスコより全量回収し、遠心分離により細胞を回収し適切な濃度になるように培養液で希釈し継代した。“希釈による方法”では、細胞培養液及び細胞を培養フラスコより一部回収し、適切な濃度になるように培地で希釈し継代した。

その後、2 つのラインでそれぞれ 8 週間目まで継代し、その間に培養前期の細胞として 3 および 4 週目の細胞について、また培養後期の細胞として 8 週目の細胞について、陽性物質の DNCB (4µg/ml)、及び媒体の DMSO を用いて CD86/CD54 の発現量を比較した。

B-1-2-3) フローサイトメーターの精度管理に関する検討

検討には、フローサイトメーターによる抗原量定量分析システムである、Dako 社製 QIFIKIT® を使用した。QIFIKIT® とは、陰性と陽性 2 種類のピークを検出するためのセットアップビーズと、細胞表面マーカーの発現数を定数化することを従来の使用目的とし、5 段階の蛍光強度の異なるビーズにより検量線を作成し発現数を算出するキャリブレーションビーズの二つのビーズセットからなる製品である。本検討は、本キットの本来の目的である定量化を目的としないが、これらセットアップビーズと、キャリブレーションビーズを用いて、各施設の陰性・陽性ピークのずれの確認や、各施設の値のずれを調整可能かどうか検証することとした。共同研究に参加している施設の中から、3 施設が本検討に参加した。

各施設のフローサイトメーターは同メーカー、同機種であったが、購入年度に違いがある施設もあった。(施設 2) QIFIKIT® は、各施設で同ロット品を購入し使用した。

1) h-CLAT 設定条件の施設間の差を確認するため、各施設でセットアップビーズおよびキャリブレーション

ションピーズにより、陰性・陽性のピークの値を測定した。

2) ピークの値を統一するために、セットアップピーズを使い陰性ピークを統一した条件で、セットアップピーズおよびキャリブレーションピーズにより施設間の感度差の確認をした。

3) セットアップピーズの陰性ピークを統一した条件で、DNCB 処理の THP-1 細胞で 3 施設の値を比較した。DNCB の最大濃度を 7.2µg/mL とし、公比 1.2、8 濃度とポジティブコントロールの濃度である 4µg/mL で試験を実施した。

B-1-3) 統計解析

バリデーション研究によって認められた代替法を用いる実験が、未知の被験物質とともに同時に 3 つの程度の陽性対照物質の実験を行うことを想定する。統計的較正法の観点から提案法を導出することにした。また、バリデーション研究で用いられたドレイズ眼刺激性試験の各個体のデータを入力し、ドレイズ眼刺激性試験の刺激性のスコアである MAS の標準誤差をモデルを用いて推定することにした。

B-1-4) ヒト接触皮膚炎の見直し

被験者はテスト実施部位（背部）に異常所見のない者とした。アトピー素因を有するものも可とした。除外対象者としてはステロイド外用あるいは内服している者、本試験の試験試料にアレルギーを有する者。本試験試料に対して、易被刺激性が既知である者とした。

試験試料は、一次刺激性物質としてパッチテストや動物試験にて刺激性が有るとされている物質及び化粧品原料として汎用されている物質を用いた。アニオン系界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウム (0.5%、0.3%、0.1%水溶液)、保湿剤であるプロピレングリコール (50%、30%水溶液)、脂肪酸石鹸であるラウリン酸ナトリウム (2%、1%水溶液)、油剤であるミリスチン酸イソプロピル (100%)、カチオン界面活性剤である塩化ベンザルコニウム (0.10%、0.05%水溶液)、ノニオン界面活性剤であるポリオキシエチレン (10モル) オレイルエーテル (10%、5%水溶液)、およびこれらの基剤である白色ワセリン、蒸留水、生理食塩水を 100% で貼布した。

貼布部位は上背部傍脊椎部として、左背部に 48 時間貼布、右背部に 24 時間貼布、両側の上記貼布物質の下部に 4 時間貼布を施行した。すべて同時に評価できるように、貼布時間を調整した。判定には新判定基準を用いた。

B-2) 国際情報の収集

情報収集は、過去の本研究による経験から、いくつかのホームページ (SCCS、OECD、ECVAM、ICCVAM、EPAA など) を定期的に検索すると共に EU については同地域の化粧品工業会である欧州化粧品工業会

(COLIPA)、米国については米国化粧品工業会 (Personal Care Products Council ; PCPC、旧称 CTFA : Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association) との連繋を通じて実施した。その他、代替法の承認状況等については、専門学会の会誌やニュースレターも参考とした。

B-3) 新規代替法の評価

日本で新規に開発されたか、あるいは欧米で承認された試験法のバリデーション研究と第三者評価、行政的受入れの評価および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について検討した。

B-3-1) バリデーション研究

バリデーション研究として、培養表皮モデル 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を行った。

第三者評価については、1) 酵母生育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた光毒性試験代替法、2) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、3) *in vitro* 発熱性試験 4) 細胞毒性試験による急性毒性試験代替法、5) 細胞毒性試験による眼刺激性試験代替法について評価した。

行政的な受入れ評価として、JaCVAM 評価会議において、1) 酵母生育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた光毒性試験代替法、2) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、3) 皮膚感作性試験 LLNA-BrdU、4) 牛摘出角膜試験による眼刺激性試験代替法および 5) 鶏摘出眼球試験による眼刺激性試験代替法の評価を行った。

B-3-2) 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

あり方検討会では、その活動方針を明確にし、分科会には以下の課題を課した。

- ① 動物福祉や動物実験の 3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) を尊重する。
- ② 代替法の第三者評価委員会ではない。代替法を取り入れて医薬部外品の安全性評価をどう担保するか、代替法の行政的な受け入れを検討する委員会である。
- ③ 扱うべき代替法は OECD で認められているか、公的な研究機関にてバリデーション研究が終了し、第三者評価も済んでいるものである。
- ④ 時間の関係で、国内外で進行している第三者評価を並行して実施する場合もある。
- ⑤ 代替法を用いる場合の長短所 (限界と適用範囲) をまとめる。
- ⑥ 分担毎に代替法を用いた医薬部外品 (薬用化粧品が対象) の安全性評価のあり方案を作る (必要なら評価フローチャートを作成する)。

以上の課題をもとに、各分科会で議論が進んだ。

C. 研究結果および考察

C-1) 試験法の開発

C-1-1) 眼刺激性試験

C-1-1-1) 角膜輪部組織の免疫染色

角膜輪部組織において、Integrin $\beta 1$ (CD29) やp63などの角膜上皮幹/前駆細胞マーカー陽性の細胞が観察され、それらの細胞はp75NTR陽性であった。p75NTRは、水晶体上皮幹/前駆細胞や網膜幹前駆細胞で発現していることを既に報告しており、角膜上皮幹/前駆細胞においてもp75NTRが発現していることが今回の研究で明らかとなった。

C-1-1-2) HCEC-2とHCEの継代培養と分析

市販されている正常角膜上皮細胞を無血清培地 (EpiLife-KG2 : EpiLife™ +HCGS) と血清含有上皮細胞培養用培地 (M-Stars C) で培養したところ、2 継代目で既に上皮細胞様形態から変化し始め、3 継代目では多くの細胞がディッシュに接着することが出来ず、その後、継代することが出来なかった。平成20年度の研究結果も合わせて考慮すると、市販の正常角膜上皮細胞は、継代維持することが困難であることが明らかとなった。

一方、角膜輪部組織から分離培養したHCEは、4 継代目までは上皮細胞様の多角形の細胞形態を呈しており、6 継代目ぐらいから一部の細胞で紡錘形の形態に変化するものも観察されたが、今回の遺伝子導入実験を行うにあたっては、分量の細胞を継代培養して確保することができた。

2 継代目のHCEでは、p63陽性細胞は78.6 ± 2.4%、Integrin $\beta 1$ 陽性細胞は98.7 ± 0.4%、およびp75NTR陽性細胞は70.2 ± 5.0%であったことから、遺伝子導入実験を行った細胞は、角膜上皮幹/前駆細胞マーカーを発現している細胞であった。

C-1-1-3) HCEへの遺伝子導入

平成20年度までの研究手法において、角膜上皮細胞へ遺伝子を導入することは困難であった。しかし、平成21年度に実施した新しく開発した研究手法を用いることで、世界で初めてウイルスベクターを用いることなく、角膜上皮細胞へ高効率で遺伝子が導入できることを明らかとした。

結果として、SYN-2245-1とSYN-2245-2のいずれかの遺伝子を導入して選択分離した細胞 (HCE-NY) は、現在までに30回以上の継代を行っているが、細胞増殖は衰えることなく、増え続けている。なお、このHCE-NYでは、keratin-3を全ての細胞で発現していることから、角膜上皮細胞としての特性の一部は保持できていた。

C-1-1-4) HCE-Tへの遺伝子導入

SYN-2142-1遺伝子 (hTERT) を導入して選択分離した細胞 (HCE-T hTERT) では、Integrin $\beta 1$ の発現が保持されていた。なお、SYN-2142-1 (hTERT) を導入した細胞は、細胞形態の異常 (癌化) などは起こらなかった。

C-1-1-5) HCE-T hTERTの分化能

最近の研究では、テロメラーゼを細胞に導入しても、その細胞の分化能は維持、あるいは増加することが分かってきたことから、本研究では分化能が減衰してしまったHCE-TにSYN-2142-1遺伝子 (hTERT) を導入することで、分化能が回復するのではないかと考え、本実験を行った。

結果として、角膜上皮細胞の分化能を回復し、細胞の重層化と細胞形態の分化が観察された。

C-1-1-6) keratin-3 mRNAを指標とした被験物質による細胞障害の評価

ヒト不死化角膜上皮細胞株 (HCE-NY) を用いて、Triton X-100を被験物質 (24時間反応) として、角膜上皮細胞特異的マーカーのkeratin-3 mRNAの発現量の変化について、リアルタイムPCR法を用いて検討した。

Triton X-100 (24時間反応) において、従来のNeutral Red法でのIC₅₀ (約50 μ g/ml) よりも遥かに低濃度 (3.1 μ g/ml) において、細胞への障害を検出することができた。

C-1-2) 感作性試験

C-1-2-1) 防腐剤の検討細胞選択時に用いるNi、SLSの固定濃度の検討

Niの100 \cdot g/mlそしてSLSの55 \cdot g/mlを細胞の反応性確認時の固定適用濃度として決定できた。h-CLATの最終プロトコールに記載する予定である。

C-1-2-2) 細胞培養条件の検討

長期間の継代培養を行うことでTHP-1細胞のDNCBに対する反応性やCD86およびCD54の定常発現量に違いが出る可能性が考えられた。一方、遠心分離による方法あるいは希釈による方法の違いが試験結果に影響している可能性も考えられたが、今回の検討では施設間の再現性が得られなかったため明確に結論づけることはできなかった。しかしながら、施設内で継代方法を統一することで試験結果のバラつきを最小限に抑えることは可能であり、細胞培養時にCD54およびCD86の定常発現量を常にモニターすることでh-CLATの高い精度や再現性を得ることができると考えられた。

C-1-2-3) フローサイトメーターの精度管理に関する検討

1) 各施設のh-CLATの設定条件で、セットアップピーズの蛍光量を測定し、現状の施設間差を確認した。施設3のみピーク2と陰性ピークの比率が若干低かったが、3施設ともほぼ同じ値であった。これより、3施設の感度はほぼ同様であることが示唆された。

2) 次に、3施設の陰性ピークを同一設定に揃えることで、陽性ピークのMFI値を揃えることが可能かどうか検証した。陰性ピークを揃えても、陽

性ピークの値はほぼ変化せず 3 施設の値に大きな差は認められなかった。

3) 施設 1 の陰性ピークの条件を統一後(1.78)、DNCB に対する CD86/54 の発現量 (RFI 値) を 3 施設で測定した。全ての施設で CD86/CD54 とともに陽性となったが、RFI 値は各施設で異なっていた。

以上の結果より、h-CLAT の結果のばらつきは、機器によるものではなく、評価される細胞の違いに起因している可能性が高いことが示唆された。

C-1-3) 統計解析

ベイズ統計学の視点から統計的較正法を適用し、提案法を導いた。その結果は、予測値は昨年度導いたものと同じになることを示した。MAS の標準誤差は、MAS が 5 のときは少なくとも 1 程度、10 では少なくとも 2 程度の大きさがあることを考慮すべきであることがわかった。

C-1-4) ヒト接触皮膚炎の見直し

刺激性が認められる成分では、24時間貼付及び 48時間貼布は刺激性が評価可能であったが、4時間貼布では刺激反応の発生は少なかった。48時間貼布・24時間貼布・4時間貼布の 3 群間では刺激反応の出現率に有意差 ($\chi^2 2n \times m$ 検定) が認められた。一方、48時間貼布・24時間貼布の 2 群では、刺激反応の出現率に有意差 ($\chi^2 2n \times m$ 検定) は認められなかった。刺激反応の判定は、48時間貼布・24時間貼布では試料除去後 0 日、1 日が刺激反応のピークとなっており、2 日判定では低減していた。

48時間貼布では補強用の絆創膏 (サージカルテープ) によるカブレの発生が多かった。

「新判定基準」は「本邦基準」より被験物質の刺激性の差を検出し易い結果を得た。

C-2) 国際情勢の調査

ICATM が 2009 年 4 月 27 日に調印式を終え、正式に始動したことが挙げられる。2009 年 9 月 9 日～11 日に ICCR-3 (第 3 回化粧品規制協力国際会議) が東京で開催され、国際貿易への障壁を最小化しつつ、世界的に最高レベルでの消費者保護を維持する目的で、化粧品関連の問題について議論された。

EU においては、ESAC が水溶性物質の眼腐食性と強刺激性並びに水溶性の界面活性剤の無刺激性を確認するための試験法として Cytosensor Microphysiometer を、水溶性物質の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法として Fluorescein Leakage を承認したことが挙げられる。

米国においては、感作性試験代替法について、従来の LLNA から動物数を削減した rLLNA 並びに非 RI-LLNA (LLNA:DA 及び LLNA:BrdU-ELISA) が制限付で感作性、非感作性物質の識別に利用可であると ICCVAM の第三者科学専門家委員会 で結論づけたことが挙げられる。

日本においては、JaCVAM に設定された皮膚刺激

性、皮膚感作性、眼刺激性、急性毒性を評価する第三者委員会の活動が本格稼動したことが挙げられる。この作業に対応する目的で、日本化粧品工業連合会内にタスクフォースが作られた。また、厚生労働科学研究班における「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」活動が進展し、報告会が開催された。

C-3) 新規代替法の評価

C-3-1) バリデーション研究

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を行い、良好な結果を得た。

C-3-2) 第三者評価

1) 酵母成育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた光毒性試験代替法、2) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、3) in vitro 発熱性物質試験評価を行い、適切な評価が実施された。また、4) 細胞毒性試験による急性毒性試験代替法、5) 細胞毒性試験による眼刺激性試験代替法の評価を実施中である。

C-3-3) 行政的な受入れ評価

JaCVAM 評価会議において、1) 酵母成育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた光毒性試験代替法、2) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、3) 皮膚感作性試験として LLNA-BrdU 法、4) 牛摘出角膜試験による眼刺激性試験、5) 鶏摘出眼球試験による眼刺激性試験の評価を行い、光毒性試験を除く試験法の行政的な受け入れを推奨することになった。

C-3-4) 医薬部外品の製造販売承認申請におき 2009 年末までにすべての各分科会からの報告を受け、あり方検討会では各分科会の意見に合意し、さらに以下のような提言を行った。

- ① 動物福祉や動物実験の 3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) は尊重されなければならない。
- ② ただし、医薬部外品の安全性レベルを維持することを前提に、動物実験の要否、代替法の選択を判断すべきである。
- ③ 代替法は OECD テストガイドラインや公的な機関でバリデーション研究や第三者評価が実施されたものを用いる。
- ④ 代替法は、その適用範囲や限界を理解した上で実施されるべきである。

なお、他の利用可能な情報 (物性、既存化学物質からの毒性予測、構造活性相関、他の動物実験結果) を用いて、動物実験および代替法で得られた結果を慎重に評価すべきである。

結果として、現状では使用可能な代替法が少なく、代替法の研究・開発に国や業界などからの積

極的な財政支援の必要性が明らかになった。現在も多くの代替法が評価されているが、これらの中から医薬部外品の安全性評価に用いる公的に認証された代替法の適用範囲と限界を、あり方検討会で今後も審議していくべきであると考えている。

D. 結論

- 1) 新規眼刺激性試験代替法の開発のため、ウイルスベクターを用いることなく SV40 の遺伝子導入に成功し、不死化ヒト角膜上皮細胞 (HCE-NY) を作出することに成功した。HCE-T に hTERT を導入した細胞では、三次元角膜培養モデルを構築することができたことから、分化能 (重層化) を回復することに成功した。角膜上皮細胞の特異的マーカーである keratin-3 を指標にすることで、従来の Neutral Red 法よりも低濃度で細胞への障害を検出することができた。
- 2) 皮膚感作性試験代替法である h-CLAT の信頼性を高めることを目的として、実際に試験を行う際に重要な知見となる試験条件の背景データの収集を行い、h-CLAT のプロトコールが決定された。
- 3) 代替法を用いて動物実験のスコア予測を行う際、予測が適切に行えているかどうかの評価には対象となる動物実験のスコアがどの程度ばらつきも考慮する必要がある。
- 4) 皮膚一次刺激性のバッチテストによる評価は、24 時間貼布及び 48 時間貼布の何れでも可能である。
- 5) ICATM が 2009 年 4 月 27 日に調印式を終え、正式に始動したことが挙げられる。2009 年 9 月 9 日～11 日に ICCR-3 (第 3 回化粧品規制協力国際会議) が東京で開催され、国際貿易への障壁を最小化しつつ、消費者保護を維持する目的で、化粧品関連の問題について議論された。
- 6) 日本で開発されたか、あるいは欧米で認証された新規動物実験代替法のバリデーション研究、専門家による第三者評価および第三者評価が終了した試験法の行政的受け入れの評価について検討した。
バリデーション研究として、培養表皮モデル 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を行い、良好な結果を得た。
第三者評価については、①酵母成育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた光毒性試験代替法、②培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、③in vitro 発熱性試験について適切な評価が実施された。
行政的な受け入れ評価として、JaCVAM 評価会議において、①酵母成育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた光毒性試験代替法、②培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、③皮膚感作性試験 LLNA-BrdU、④牛摘出角膜試

験による眼刺激性試験代替法および⑤鶏摘出眼球試験による眼刺激性試験代替法の評価を行い、光毒性試験を除く試験法の行政的な受け入れを推奨することになった。

7) 医薬部外品 (薬用化粧品) の安全性評価ガイドラインの中で動物実験代替法をどう使いこなしていくか検討するため、医薬部外品に関係の深い委員の協力のもと、「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 (以降、あり方検討会と記す)」を設立した。このあり方検討会の下に、さらに皮膚刺激性、感作性、皮膚透過性・経皮吸収、光関連毒性、遺伝毒性、眼刺激性の 6 分科会を設立し、検討作業を進めた。

すべての各分科会からの報告を受け、あり方検討会では各分科会の意見に合意し、さらに以下のような提言を行った。

- ①動物福祉や動物実験の 3Rs は尊重されなければならない。
- ②ただし、医薬部外品の安全性レベルを維持することを前提に、動物実験の要否、代替法の選択を判断すべきである。
- ③代替法は OECD (経済協力開発機構) テストガイドラインや公的な機関でバリデーション研究や第三者評価が実施されたものを用いる。
- ④代替法は、その適用範囲や限界を理解した上で実施されるべきである。

F. 引用文献

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 小島肇夫：動物実験データなしで新規医薬部外品の申請はどこまで可能か？、BIO INDUSTRY, 26 (8) 42-49 (2009)
- 4) 小島肇夫：皮膚・粘膜毒性、新版 トキシコロジー、日本トキシコロジー学会教育委員会編集、pp. 246-254 (2009)
- 5) 小島肇夫：医薬部外品と化粧品、GLP/非 GLP 試験の具体的実施ポイント、技術情報、東京、pp. 425-433 (2009)
- 6) 小島肇夫：REACH における環境影響試験、フレグランスジャーナル 2009-8、46-51 (2009)
- 7) 小島肇夫、新井晶子、北條麻紀：再構築培養表皮モデルを用いた遺伝毒性の評価、コスメトロジー研究報告、17、57-62 (2009)

- 8) 小島肇：現在の動物実験代替法の状況について、LABIO21、38、17-20 (2009)
- 9) 小島肇：薬用化粧品の承認取得における安全性試験をめぐる問題点、医薬部外品有効成分承認取得のための対策と課題、フレグランスジャーナル社、48-58 (2010)
- 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試験の資料に関するあり方検討会報告、日皮協ジャーナル、32、82-91 (2010)
2. 学会発表
- 1) 小島 肇：バリデーション研究とは何か？&国際動向、JaCVAM第2回ワークショップ、東京 (2009)
- 2) 小島 肇：培養皮膚モデルバリデーション研究、JaCVAM第2回ワークショップ、東京 (2009)
- 3) 小島 肇：動物実験代替法に関する国内外の動向、JALAMシンポジウム
「安全性試験における動物実験代替法－国内外の動向と代替法開発の現状－」、大宮 (2009)
- 4) 小島 肇：動物実験代替法における培養細胞の利用：合同追悼シンポジウム「黒田行昭先生を偲んで」、日本組織培養学会第82回大会、栃木 (2009)
- 5) 小島 肇：バリデーション試験の今後の予定について、コメントアッセイ国際バリデーション試験進捗報告、日本環境変異原学会 MMS研究会 第54回定例会、熱川 (2009)
- 6) 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、第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会、盛岡 (2009)
- 7) 小島 肇：OECD Test Guideline 収載モデルとしての LabCyte EPI-MODL の可能性、皮膚基礎研究クラスターフォーラム、東京 (2009)
- 8) Kojima, H. : 3D comet assay, JaCVAM experience, 5th International Workshop on Genotoxicity Testing, Basel (2009)
- 9) Kojima, H., Yamakage, K., Burlinson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Corvi, R., Uno, Y., Schechtman, L., Tice, R. and Honma, M. : International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 8th International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
- 10) Nakajima, M., Masumori, S., Tanaka, J., Hayashi, M., Uno, Y., Kojima, H. and Tice, R. : An atlas of comet images: JaCVAM initiative International Validation trial for the in vivo comet assay, 8th International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
- 11) Kojima, H. : Validation of innovative methods for safety testing: drawbacks and advantages of Japanese validation studies, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 12) Kojima, H., Matsui, T., Kohara, A., Yoshida, A. and Nakamura, Y. : GCCP initiatives in Japan, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 13) Ono, A., Takeyoshi, M., Bremer, S., Jacob, M., Laws, S., Sozu, T. and Kojima, H. : The International validation study for the ER alpha STTA antagonist assay using HeLa9903, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 14) Allen, D., Deal, F., Ceger, P., Gordon, J., Pazos, P., deLange, L., Bremer, S., Nakamura, M., Kojima, H., Ono, A., Tice, R. and Stokes W. : Testing of coded substances for a multi-phases international validation study of an estrogen receptor (ER) transcriptional activation (TA) assay, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 15) Kojima, H., Iijima, M., Matsunaga, K., Sasa, H., Itagaki, H., Okamoto, Y., Nishiyama, N., Mita I., Washida, J., Masuyama, K., Onodera, H., Masuda, M., Ohno, Y. : Review of an alternative to animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients using Quasi-drug, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 16) Wind, M., Blakey, D., Kojima, H., Kreysa, J. and Stokes, W. : What is the international cooperation on alternative test methods (ICATM) and what is its role?, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 17) Kojima, H. : JaCVAM' s role in the 3Rs and ICATM, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 18) Kojima, H. : Recent progress and future directions at JaCVAM, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 19) Inoue, T., Masuda, M., Akita, M., Kojima, H. and Ohno, Y. : JaCVAM statement on new alternative to animal testing, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 20) Takeyoshi, M., Kojima, H., Omori, T., Sozu, T. and Yoshimura, I. : Validation study for non-radioisotopic local lymph node assay based on BrdU incorporation (LLNA-BrdU), 7th

- World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 21) Kojima, H., Ando Y., Yamaguchi Y., Kosaka T., Suzuki T., Yuasa A., Watanabe Y., Shinoda S., Idehara K., Yoshimura I., Miyaoka E., Ishiyama K., Kato M., Omori T. : Validation of LabCyte EPI-MODEL24, an *In Vitro* Assay for Detecting Skin Irritants, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 22) Yamamoto, N., Hirano, K., Kato, M., Hata, K., Horiguchi, M., Taniguchi, K. and Kojima, H. : Cell surface marker of corneal epithelium stem cells and culture, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 23) Lowther, D., Wind, M., Stokes, W., Barroso, J., Zuang, V., Amcoff, P., Kojima, H., Prinsen, M., Tice, R., Allen, D. and McCall, D. : International acceptance of in vitro alternative ocular safety testing methods: the isolated chicken eye (ICE) test method (Draft OECD TG 438), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 24) Merrill, J., Wind, M., Stokes, W., Barroso, J., Zuang, V., Amcoff, P., Kojima, H., Jacobs, A., McCall, D. Allen D. and Tice, R. : International acceptance of in vitro alternative ocular safety testing methods: bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test method (Draft OECD TG 437), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 25) Hayashi, M., Uno, Y., Honma, M., Schechtman, L., Tice, R., Corvi, R., Morita, T., Asano, N. and Kojima, H. : In vivo Comet Assay: Update on the on-Going international validation study, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 26) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schechtman, L. and Hayashi, M. : International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 27) Kojima, H., Arai S. and Hojo M. : Adequate conditions for performance of comet assay using 3-dimensional human epidermal model, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 28) Stokes, W., Wind, M., Matheson, J., Jacob, A., Casati, S., Kojima, H., Allen, D., Burns, T., Salicru, E., Strickland, J. and Tice, R., Internationally harmonized performance standards (PS) for the murine local lymph node assay (LLNA), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 29) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schechtman, L. and Hayashi, M. : International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 25th ICEM, Florence (2009)
 - 30) Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Schechtman, L., Tice, R., Corvi, R., Morita, T., Asano, N. and Hayashi, M. : In vivo Comet Assay: Update on the on-Going international validation study, 25th ICEM, Florence (2009)
 - 31) 小島 肇 : 動物実験代替法における国内外の動向、日本薬学会関東支部大会、埼玉 (2009)
 - 32) 小島 肇 : In vitro 安全性・機能性評価および作用メカニズム・新規物質探索研究の最前線、第 22 回動物細胞工学シンポジウム、東京 (2009)
 - 33) 小島 肇 : 医薬部外品の承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会、日本産業皮膚衛生協会 秋季研修会、京都 (2009)
 - 34) Kojima, H. : Japanese views in the 3Rs in the 21st century, ZEBET's 20th Anniversary Symposium, Berlin, Germany (2009)
 - 35) Kojima, H. : Organization of JaCVAM and its activity, KoCVAM International Symposium and 6th Congress of KSAAE, Seoul (2009)
 - 36) Kojima, H. : Utilization of an alternative to animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients using Quasi-drug, The 17th ICDS (International Contact Dermatitis Symposium) and the 10th APEODS (Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium), Kyoto (2009)
 - 37) Kojima, H. : Japanese approach to regulatory acceptance of new skin sensitization testings with considerations to animal welfare and 3Rs, The 17th ICDS (International Contact Dermatitis Symposium) and the 10th APEODS (Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium), Kyoto (2009)
 - 38) 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、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 39) 小島 肇、飯島正文、松永佳世子、佐々 齊、板垣 宏、岡本裕子、西山直宏、小野寺博志、見田 活、鷺田 淳、益山光一、増田光輝、大野泰雄：医薬部外品の承認申請における安全性に関わる資料のあり方検討委員会報告、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 40) 小島 肇、井上 達、増田光輝、秋田正治、大野泰雄：動物実験代替法公定化のための JaCVAM 提案書、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 41) 小野 敦、武吉正博、Susanne Bremer, Miriam Jacob, Susan C. Laws, 寒水孝司、小島 肇：HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体転写活性化試験によるアンタゴニスト検出法の国際バリデーション、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 42) 本間正充、山影康次、Burlinson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., 林 真、中嶋圓、鈴木雅也、Corvi, R., 宇野芳文、Schechtman, L., Tice, R., 小島 肇：In vitro アルカリコメットアッセイ国際バリデーション研究、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 43) 小島 肇、笠松俊夫：IWGT 報告 トピックス 3：予測性の高い in vitro 試験の提案、日本環境変異原学会第 38 回大会、清水・静岡 (2009)
- 44) 中嶋圓、小島 肇、宇野芳文、本間正充、林 真：コメットアッセイの国際バリデーション、日本環境変異原学会第 38 回大会、清水・静岡 (2009)
- 45) 小島 肇、北條麻紀、新井晶子：3次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイと細胞毒性の関係、日本環境変異原学会第 38 回大会、清水・静岡 (2009)
- 46) JaCVAM：コメットアッセイ国際バリデーションプロジェクトチーム：インビボコメットアッセイ：JaCVAM 国際バリデーション試験の進捗状況報告、日本環境変異原学会第 38 回大会、清水・静岡 (2009)
- 47) 伊藤正俊、関東裕美、鷺崎久美子、松永佳世子、矢上晶子、中川真美子、加藤則人、河合恵一、滝脇弘嗣、吉村 功、小島 肇：パッチテストによる皮膚一次刺激性評価 (2)、第 39 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、京都 (2009)
- 48) 中村昌文、半田洋士、小野 敦、小島 肇：Lumi-cell ERアッセイ法の国際バリデーション (第二報)、第 12 回環境ホルモン学会研究発表会、東京 (2009)
- 49) 小島 肇、飯島正文、松永佳世子、佐々 齊、板垣 宏、岡本裕子、西山直宏、小野寺博志、見田 活、鷺田 淳、益山光一、増田光輝、大野泰雄：あり方検討会設立の経緯および動物実験代替法の現状、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資料のあり方検討委員会報告、東京 (2009)
- 50) 山本直樹、平野耕治、谷川篤宏、加藤雅一、畠賢一郎、小島 肇、綾木雅彦、堀口正之、谷口孝喜：角膜上皮細胞における組織幹細胞マーカーの検索と初代分離培養法および遺伝子導入法の検討、日本組織培養学会第 82 回大会、栃木 (2009)
- 51) 山本直樹、平野耕治、谷川篤宏、加藤雅一、畠賢一郎、小島 肇、綾木雅彦、堀口正之、谷口孝喜：角膜上皮細胞の組織幹細胞マーカーと初代分離培養法および遺伝子導入法の検討、第 41 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、神戸 (2009)
- 52) 小島 肇：今後の展望、JaCVAM 第 3 回ワークショップ、h-CLAT シンポジウム、東京 (2010)
- 53) Kojima, H., Arai, S. and Hojyo, M.: Adequate conditions for performance of comet assay using 3-dimensional human epidermal model, 49th Annual SOT meeting, Salt Lake City (2010)
- 54) Stokes, W., Wind, M., Blakey, D., Kreysa, J., Kojima, H., Anklam E.: Establishment of the International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM) and Its Role in the Validation and Regulatory Acceptance of Globally Harmonized Safety Assessment Methods, 49th Annual SOT meeting, Salt Lake City (2010)
- 55) Ceger, P., Deal, F., Allen, D., Clark, G., Pazos, P., de Lange, J., Bremer, S., Nakamura, M., Kojima, H., Ono, A., Tice, R., Stokes, W.: Testing of Coded Substances in the NICEATM/ECVAM/JaCVAM LUMI-CELL[®] STTA Multiphase International Validation Study, 49th Annual SOT meeting, Salt Lake City (2010)

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等ゲノム・リサーチ総合研究事業）
動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究

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」

研究分担者 山本 直樹 藤田保健衛生大学

協力研究者 山下 宏美、住友 万里子、田島 香里、大野 亜由美、北條 麻紀、
綾木 雅彦、山田 治基、谷口 孝喜、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・眼毒性試験代替法の開発に必須のヒト角膜上皮由来不死化細胞株を作出する。

【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、市販のヒト角膜上皮細胞株（HCEC-2）と正常角膜輪部組織から分離培養したヒト角膜上皮細胞（HCE）、および既存の不死化ヒト角膜上皮細胞株（HCE-T）を用いた。不死化細胞株作出のための遺伝子（SV40）と細胞増殖・分化に影響する遺伝子（hTERT）が角膜上皮細胞で働くことができるベクターの構築、および作成したベクターの角膜上皮細胞へのエレクトロポレーション法による遺伝子導入を行い、新規角膜上皮不死化細胞株と細胞分化を試みた。さらに新規眼刺激性試験・毒性試験代替法で使用する角膜上皮細胞の特異的マーカーの検索を行った。

【結果】HCEC-2は、継代維持することが困難であった。一方、HCEは継代培養することが可能であり、ウイルスベクターを用いることなくSV40の遺伝子導入に成功し、不死化ヒト角膜上皮細胞（HCE-NY）を作出することに成功した。HCE-TにhTERTを導入した細胞では、三次元角膜培養モデルを構築することができたことから、分化能（重層化）を回復することに成功した。角膜上皮細胞の特異的マーカーであるkeratin-3を指標にすることで、従来のNeutral Red法よりも薄い濃度で細胞への障害を検出することができた。

【展開】HCE-NY、およびHCE-T hTERTのクローニング、分子細胞生物学的な検証などを行い、新しい眼刺激性試験代替法の試験細胞株としての有用性を評価する。

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ヒト角膜上皮由来の細胞株を作成し、新規眼刺激性試験・毒性試験代替法の開発に結びつく細胞株を樹立することを目的とした。

具体的な研究課題は、以下のとおりである。

1. 角膜上皮細胞の安定した分離方法の新規開発。
2. 角膜上皮細胞の継代・維持培養法の新規開発。
3. 角膜上皮細胞への遺伝子導入・選択分離法の新規開発。
4. 新規眼刺激性試験・毒性試験代替法で使用する角膜上皮細胞の特異的マーカーの検索。

B. 材料・方法

B-1. 細胞材料の現状

市販されている正常角膜上皮細胞

は、2継代程度しか維持させることができないと報告されている。また、日本国内のヒト角膜組織から新たに研究目的で細胞を分離培養することが禁止されており、さらにヒト角膜上皮から比較的未分化な角膜上皮細胞を安定して分離・培養する方法が確立されていない。一方、既存の不死化角膜上皮細胞（HCE-T）は、細胞樹立当時は重層化能をもっていたようであるが、度重なる継代の結果、現在では重層化能が減衰（消失）してしまった細胞になっている。さらに樹立時にクローニングがされていないため、ヘテロな細胞集団である。

以上のように、現状で市販・購入できる細胞は様々な課題があり、この状態のままでは安定して供給できないため、眼刺激性試験代替法で使用することはできない。

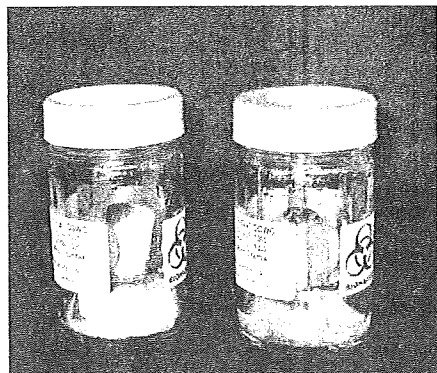
B-2. 供試細胞と供試培地

今回の研究に使用した細胞は、ヒト角膜輪部組織から分離・培養した正常ヒト角膜上皮幹／前駆細胞（HCE）、購入することが可能であったヒト正常角膜上皮細胞株（HCEC-2；KURABO）、およびウイルスベクターを用いてSV40が導入され、分化能が減衰している不死化ヒト角膜上皮細胞株（HCE-T；理化学研究所 筑波研究所 バイオリソースセンター）の3種類を用いた。

培地は、無血清角膜上皮細胞培地（EpiLife™ KG2；KURABO）、血清含有上皮細胞培養用培地（M-Stars C；アルプラスト株式会社）、およびPCT Corneal Epithelium Medium（CnT-20；CELLnTEC Advanced Cell Systems, Bern, Switzerland）を使用して検討した。

B-2-1. HCEの初代分離培養

研究目的での使用として米国アイバンク (Northwest Lions Eye Bank) より眼球を購入し、研究に用いた。

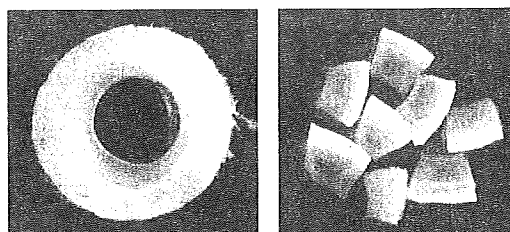


眼球組織から前眼部を摘出し、一部は組織標本作成のために迅速固定液 (SUPER FIX; 倉敷紡績株式会社) を用いて固定し、通常の方法でパラフィン切片標本作製した。作製した標本は、組織形態の観察を行うため、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。さらに角膜上皮幹/前駆細胞マーカーの免疫組織染色として、上皮系幹/前駆細胞マーカーとして知られている Integrin $\beta 1$ (CD29)、角膜上皮幹/前駆細胞マーカーとして知られている p63、および分担研究者の山本が上皮系・間葉系幹細胞マーカーとしての有用性を報告している low-affinity neurotrophin receptor p75 (p75NTR) の各抗体を用いて実施した。

P75NTR の別名は p75 nerve growth factor receptor と呼ばれ、CD ナンバーは 271 (CD271) である。近年、上皮系/間葉系幹細胞マーカーとして注目されており、眼科領域では水晶体上皮幹/前駆細胞、網膜幹/前駆細胞に発現していることを山本が報告した。(Yamamoto N. Med Mol Morphol, 2010 in press.)

摘出した前眼部から水晶体、虹彩、毛様体などの組織を切除した。さらに角膜輪部の周辺組織のみを残し、角膜中心部や眼球結膜も切除した。

次にデスメ膜と一緒に角膜内皮細胞を剥離し、角膜輪部を 8 等分に分割し、コラゲナーゼ (新田ゼラチン) と細胞分散溶液を加えて 37°C で 30 分間酵素処理した。酵素処理終了後、リン酸緩衝液 (PBS) で遠心洗浄を行い、培養した。



CnT-20 を用いて培養した細胞を用いて、発現している細胞マーカーの解析と遺伝子導入実験を行った。細胞マーカーの解析は、角膜組織から分離直後の細胞、2 継代目、および 4 継代目の細胞を用いて、角膜上皮幹/前駆細胞マーカーとして知られている p63、上皮系幹/前駆細胞マーカーとして知られている Integrin $\beta 1$ (CD29)、low-affinity neurotrophin receptor p75 (p75NTR)、nerve growth factor (NGF) の high-receptor である TrkA、および角膜上皮細胞の特異的マーカーの 1 つである keratin-3 の発現について、各種抗体の細胞免疫染色を行い、蛍光顕微鏡、または Flow cytometry にて観察した。

B-2-2. HCEC-2

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、マーカー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)、および血清含有上皮細胞培養用培地(M-Stars C)にて培養した細胞(3次培養細胞)を用いた。

B-2-3. HCE-T

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組換えウイルスベクターを用いて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しなくなったと報告されている。細胞株樹立時にクローニングを行っておらず、さらに複数回にわたる継代培養によって細胞分化能(重層化能)が減衰したと報告されている。培地は理化学研究所バイオリソースセンターの能書に従って培養した。

B-3. 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 ベクター、発現コントロールベクター: Control ベクター)に組み込み、計4種類のベクターを平成20年度の研究で完成させた。

しかし、実際に角膜上皮細胞への導入実験を行ってみたところ、遺伝子は

一時的に組み込まれたものの、安定した目的遺伝子が発現しない、あるいは遺伝子導入マーカーとして組み込んだ蛍光物質を合成する遺伝子の読み込みに何等かの支障が発生し、蛍光が著しく減衰する結果となったため、平成21年度にはSV40と新たな発現ベクターと組み合わせた発現ベクター(SV40 Large T antigen - GFP ベクター: SYN-2245-1)、およびNCBIに登録されたアミノ酸配列(Accession Number: NP_043127、添付資料①)の非翻訳領域を除いて作成したベクター(SV40 Large T antigen ORF - GFP ベクター: SYN-2245-2)を構築することとした。

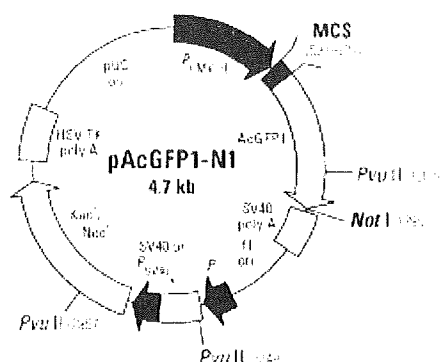
SV40 Large T Ag遺伝子(Simian virus: SV40)は、サルを宿主とするポリオマウイルスであり、アカゲザルの腎臓の細胞から分離された。不死化遺伝子SV40-T抗原は、細胞周期を制御する働きを持つ癌抑制遺伝子p53の働きを阻害し、結果として細胞の増殖を促す作用を持つと考えられている。本研究で使用したSV40は、K12株由来大腸菌(XL1-Blue)に組み込まれたpBluescript II KS(-)ベクター(3.0 kbp)に導入されたpBS-SVT: SV40 Large T Ag(JCRB Gene Bank(財)ヒューマンサイエンス振興財団 ヒューマンサイエンス研究資源バンク; 遺伝子クローン(Resource ID): VG042より購入)を用いた。

B-3-1. SV40 Large T antigen - GFP ベクター(SYN-2245-1)の構築

まず、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。

次に遺伝子クローン (VG0402) を鋳型として、終止コドンを除くSV40 Large T Ag 遺伝子の翻訳領域 (2,479bp) を増幅した。ベクターDNA (pAcGFP-N1) のマルチクロ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 In-Frameとなるように挿入・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を作製し、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-3-2. SV40 Large T antigen ORF - GFP ベクター (SYN-2245-2) の構築

遺伝子クローン (VG0402) を鋳型として、終止コドンとアミノ酸配列の非翻訳領域(合計:355bp)を除くSV40 Large T Ag 遺伝子の翻訳領域 (2,124bp) を増幅した。ベクターDNA (pAcGFP-N1) のマルチクロ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 ORF遺伝子を In-Frameとなるように挿入・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を作製し、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-3-3. hTERT - GFP ベクター (SYN-2142-1) の構築

Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT)は、テロメア長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ことがおこらないが、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 の 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。

B-4. 細胞への遺伝子導入

平成20年度の厚生労働科学研究において、細胞への遺伝子導入方法として、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を用いた遺伝子導入を検討した。しかし、十分に満足できる遺伝子導入の条件を確立することができなかった。

そこで、平成21年度ではおよそ10 µl程度の微量サンプル量で遺伝子導入ができる新しいエレクトロポレーション法による検討を行った。なお、平成21年度に作製した新しいベクターには Green Fluorescent Protein (GFP) が目的遺伝子の直後に連結して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緑色の蛍光を発していることから、遺伝子導入効率を判別することができる。

B-5. HCE-NYとHCE-Tの選択分離と細胞特性

HCE細胞にSV40 Large T antigenを導入した細胞 (HCE-NY) とHCE-T細胞にhTERT遺伝子を導入した細胞 (HCE-T hTERT) をセルソーター (FACS Vantage SE; BD) を用いて、GFPの蛍光でセルソーティングを行い、遺伝子導入細胞の選択を行った。

B-6. HCE-T hTERTを用いた三次元角膜培養モデル作製の試み

HCE-TにhTERT遺伝子を導入したことによる細胞分化能の回復を評価した。

HCE-T hTERTをセルカルチャーインサート上に播種し、無血清培地 (CnT-20) で3日間コンフルエントになるまで培養した。その後、血清含有培地 (アッセイ培地; J-TEC) で培養し、その後セルカルチャーインサートの内側の培地を抜き取り、既報のようにエアーリフト法による培養を行い、HCE-T hTERTの分化能 (細胞重層化) を評価した。

B-7. ヒト不死化角膜上皮細胞株における角膜上皮細胞特異的マーカーを指標とした被験物質による細胞障害の評価

ヒト不死化角膜上皮細胞株 (HCE-NY) を用いて、Triton X-100を被験物質 (24時間反応) として、角膜上皮細胞特異的マーカーのkeratin-3 mRNAの発現量の変化について、リアルタイムPCR法を用いて検討した。なお、検討したTriton X-100の処理濃度は、100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6, 0.8, 0 µg/mlとした。

なお、同時に既報に基づいたNeutral Red法による細胞生存率も検討した。

(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、研究用で販売・分譲されている細胞、および研究用として購入した眼球 (角膜) 組織から分離培養した細胞を用いているため、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

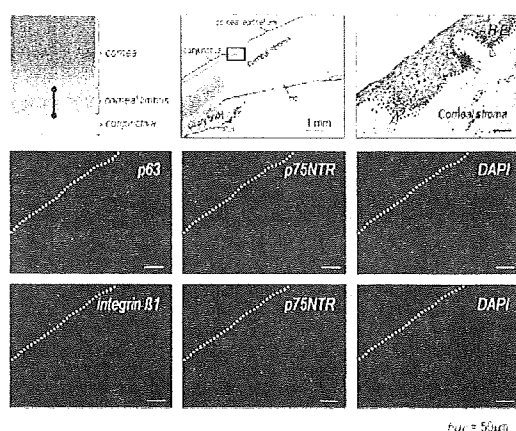
C-1. 正常ヒト角膜輪部由来細胞 (HCE) の培養と分析

C-1-1. ヒト角膜輪部組織の染色

ヒト角膜輪部組織には、角膜上皮幹／前駆細胞が存在することは、既に多くの論文で報告されている。そこで、今回使用した角膜輪部組織における角膜上皮幹／前駆細胞の存在を確認した。

角膜輪部組織の組織切片標本をH.E.染色したところ、角膜上皮の基底領域の細胞で、メラニン顆粒を有し、周辺の細胞よりも細胞核の大きさも細胞全体の大きさも小さく、細胞が凝集している（クラスターを形成している）ような細胞集団が存在していた。

免疫組織染色の結果では、Integrin β1 (CD29)、p63、およびp75NTR陽性の細胞は、角膜上皮の基底領域の細胞で最も強いシグナルが観察され、角膜上皮の表面に近づくにつれ、それらのシグナルは減少した。



C-1-2. HCEC-2とHCEの継代培養

HCEC-2は、無血清培地(EpiLife™+HCGS)と血清含有上皮細胞培養用培地 (M-Stars C) で培養した。HCE

は、PCT Corneal Epithelium Medium (CnT-20) を用いて培養した。

HCEC-2は、2継代目で既に上皮細胞様形態から変化し始め、3継代目では多くの細胞がディッシュに接着することが出来ず、その後、継代することが出来なかった。

HCEは、4継代目までは上皮細胞様の多角形の細胞形態を呈しており、6継代目ぐらいから一部の細胞で紡錘形の形態に変化するものも観察された。

	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 6
HCEC-2 (EpiLife+HCGS)				no growth
HCEC-2 (M-Stars C)				no growth
HCE (CnT-20)				

C-1-3. 正常ヒト角膜輪部由来細胞 (HCE) の分析

角膜組織から分離直後の細胞、2継代目、および4継代目の細胞を用いて、p63、Integrin β1 (CD29)、p75NTR、TrkA、およびkeratin-3の発現を検証した。

分離直後の細胞では、p63陽性細胞は40.4 ± 2.1 %、Integrin β1陽性細胞は34.4 ± 2.0 %、p75NTR陽性細胞は28.4 ± 3.1 %、TrkA陽性細胞は24.8 ± 3.2 %、keratin-3陽性細胞は70.3 ± 2.7 %であった。

2継代目と4継代目の細胞では、p63陽性細胞は78.6 ± 2.4 %と49.6 ± 4.7 %、Integrin β1陽性細胞は98.7 ± 0.4 %と97.0 ± 1.1 %、p75NTR陽性細胞は70.2 ± 5.0 %と7.8 ± 0.8 %、TrkA陽性細胞は85.5 ± 5.3 %と23.8 ±

2.0 %、keratin-3陽性細胞は98.6 ± 0.5 %と98.2 ± 0.5 %であった。

C-2. 構築した発現ベクターの解析

C-2-1. SV40 Large T antigen - GFP ベクター (SYN-2245-1)の解析

挿入するSV40の準備としてPCRによる目的領域を増幅した。Forward PrimerとReverse Primerは以下のように設計した。

SV40-Forward Primer :

CGGAATTCATGGATAAAGTTTTAAACAG

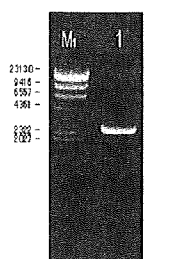
SV40-Reverse Primer :

CGGGATCCGGATCCAGACATGATAAGATAC

以下の条件でPCR Mixtureを調整し、PCRを実施した。

Template (10 ng/ μ l)	1.0 μ l
Forward Primer (20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Reverse Primer (20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
5×PrimersSTAR buffer	10 μ l
dNTPs Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ l)	0.5 μ l
dH ₂ O	33.5 μ l

PCRサイクルは、98℃ : 10秒、55℃ : 10秒、72℃ : 2分で実施した。次に3 μ lのPCR Productsを用いて、1% Agarose Gelにて電気泳動した。



M: λ -Hind III DNA Marker

1 : Clone 1553 \times dil (1 μ l)

以上の結果から、約2.6KbpのSV40 PCR Products (VG0402遺伝子クローン)を増幅させることができた。

そこで、この遺伝子クローンを鋳型として、終止コドンを除くSV40 Large T Ag 遺伝子の翻訳領域 (2,479bp)を増幅したPCR Productsを電気泳動とシーケンスした(添付資料-②)。



M : Supercoiled DNA Ladder Marker

1 : SYN2245-1

次にベクターDNA (pAcGFP-N1ベクター)のマルチクローニングサイトとPCR ProductsをLigationさせるため、切断酵素 (EcoR I と BamH I)を用いて切断処理を行った。

《PCR Productsの切断酵素処理》

PCR Products	0.5 μ g
EcoR I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
BamH I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
10×K buffer	5.0 μ l
H ₂ O	Up to 50 μ l

酵素処理は、37℃で4時間行った。

《ベクターの切断酵素処理》

ベクター	1.0 μ g
EcoR I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
BamH I (10 U/ μ l)	1.0 μ l
10×K buffer	5.0 μ l
H ₂ O	Up to 50 μ l

酵素処理は、37℃で16時間行った。