



S/N G:185 A:174 T:244 C:225

KB.bcp

KB 1.2 Cap:65

SYN2245-2-21_SYN2245P6

SYN2245-2-21_SYN2245P6

KB_3730_POP7_BDTV3.mob

Pis 1929 to 15960 Pk1 Loc:1928

Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 991

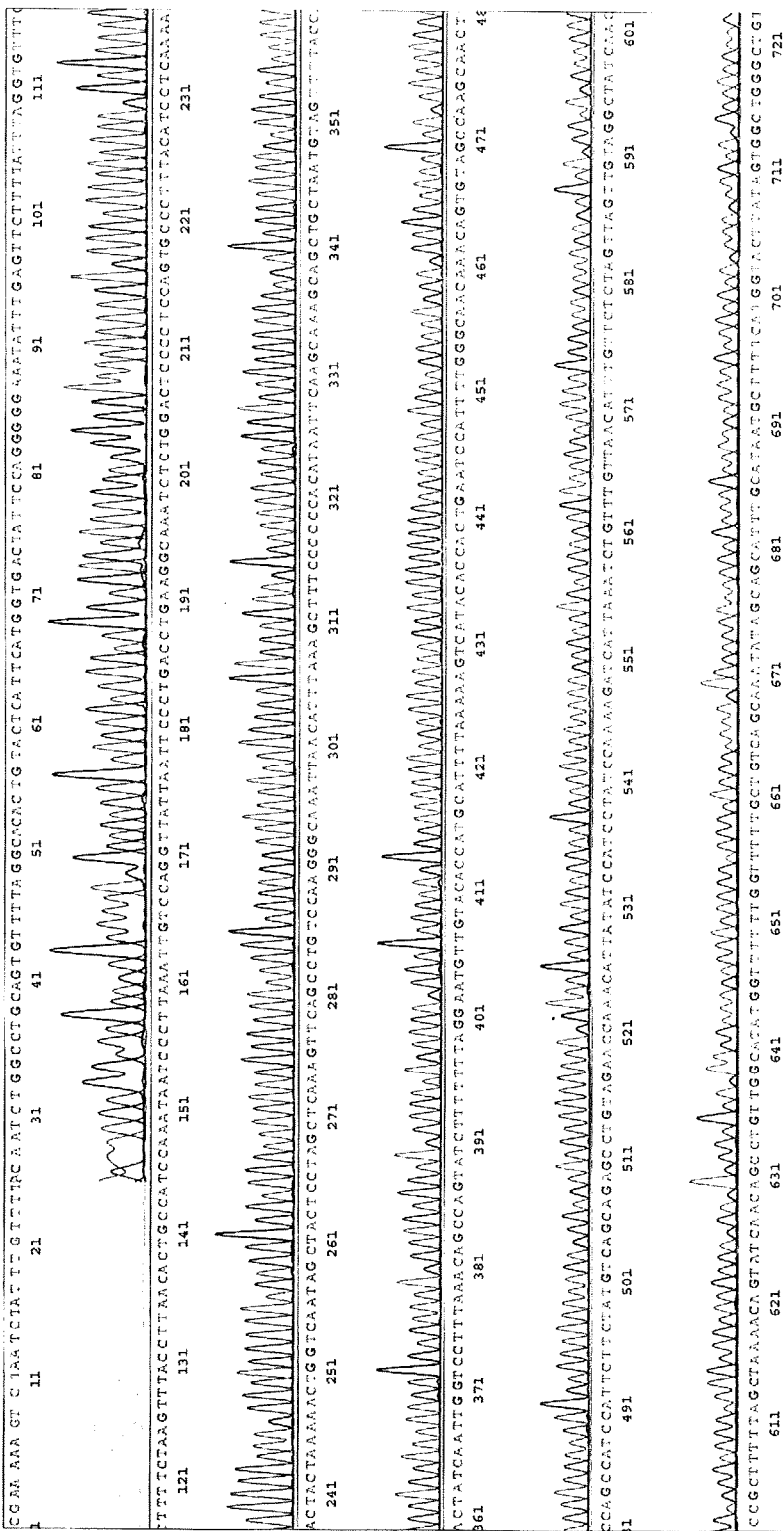
Inst Model/Name 3730/3730XL-N01-17119-009

Apr 28, 2009 11:13PM, CST

Apr 28, 2009 11:36PM, CST

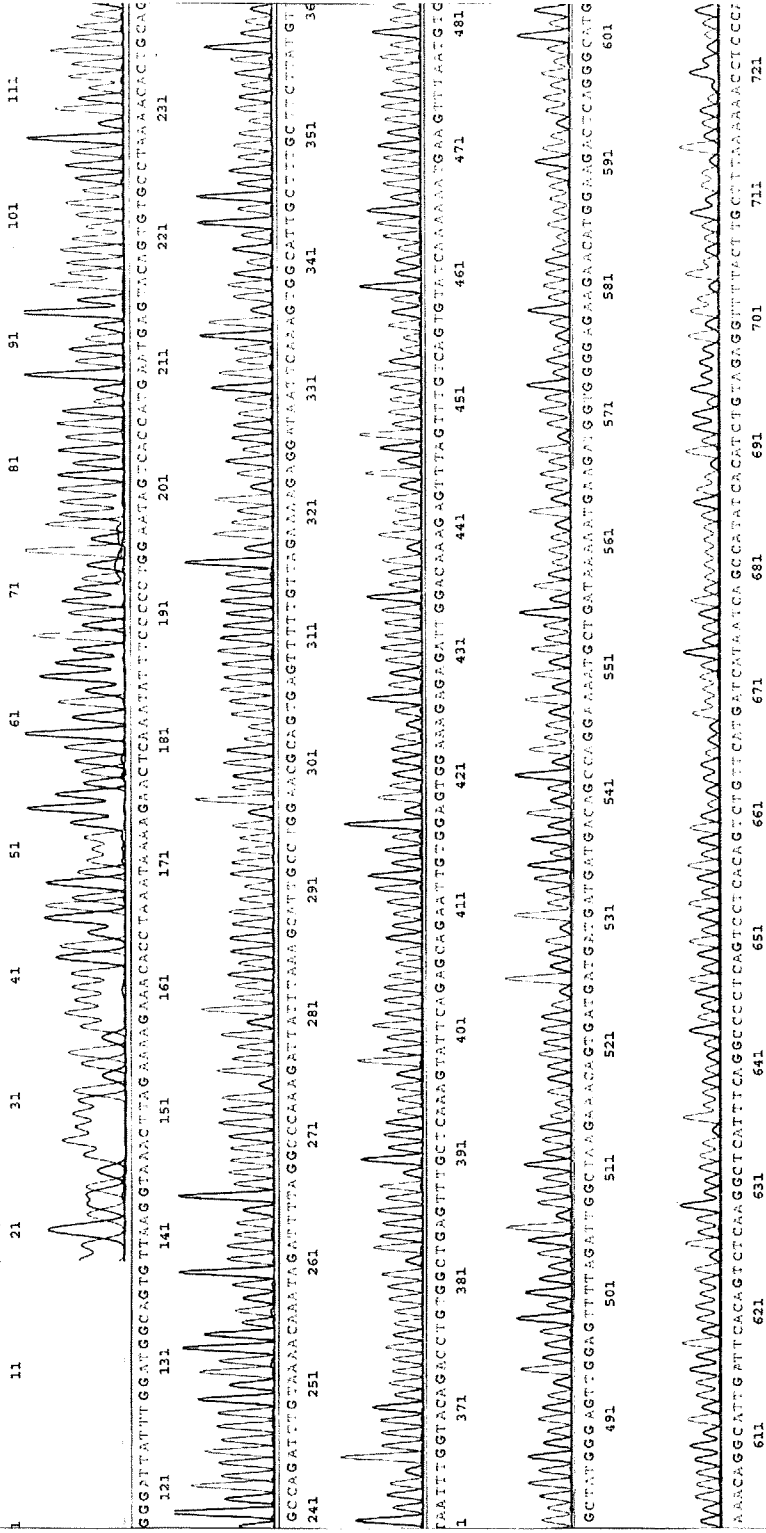
Spacing: 15.2 Pts/Panel/1450

Plate Name: 20090428N01R03





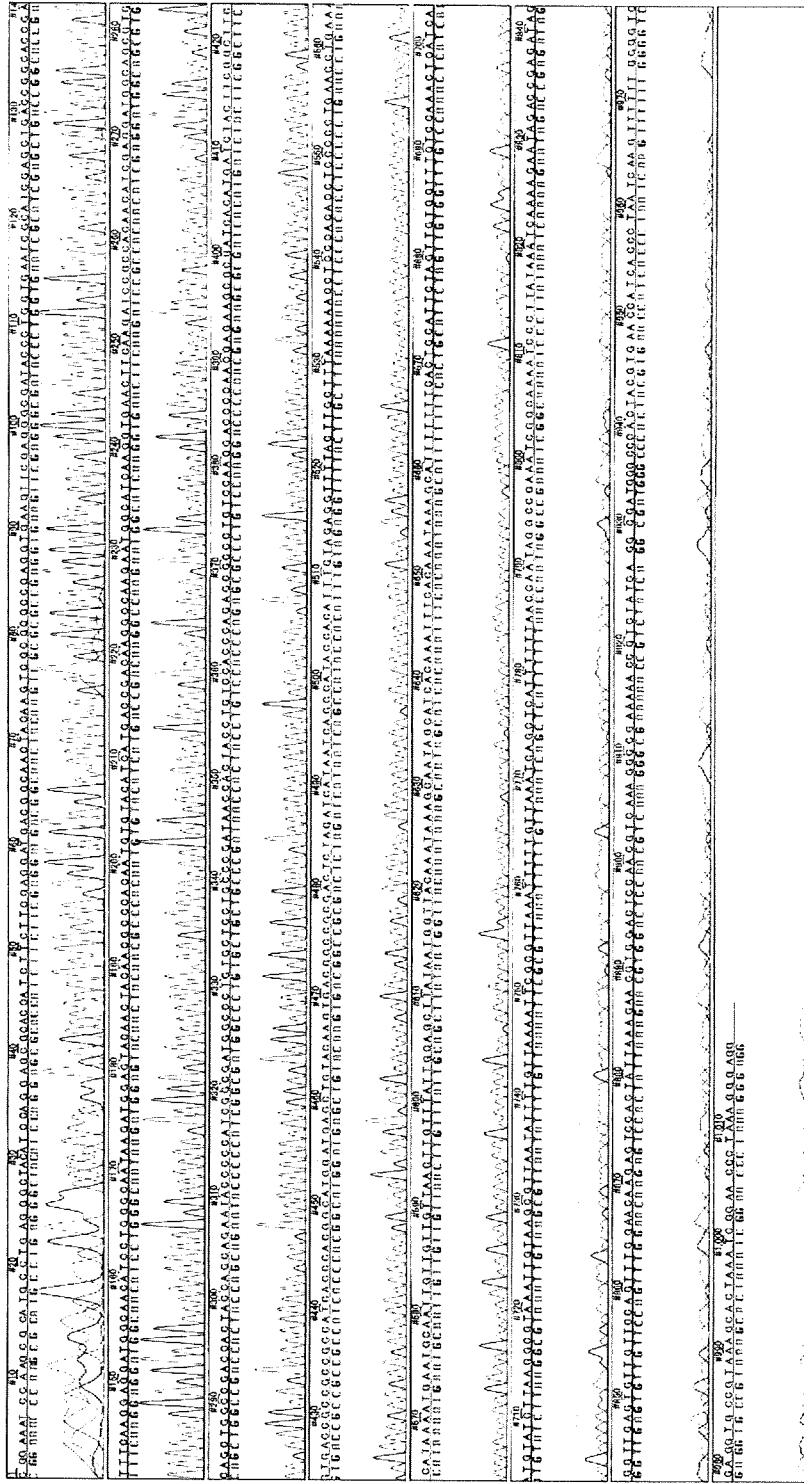
SYN2245-2-21_SYN2245P7
SYN2245-2-21_SYN2245P7
KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Pls 1902 to 15960 Pk1 Loc:1901
Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 1011
Inst Model/Name 3730/3730XL-N01-17119-009
Apr 28, 2009 11:13PM, CST
Apr 28, 2009 11:36PM, CST
Spacing:14.98 Pts/Panel1450
Plate Name: 20090428N01R03



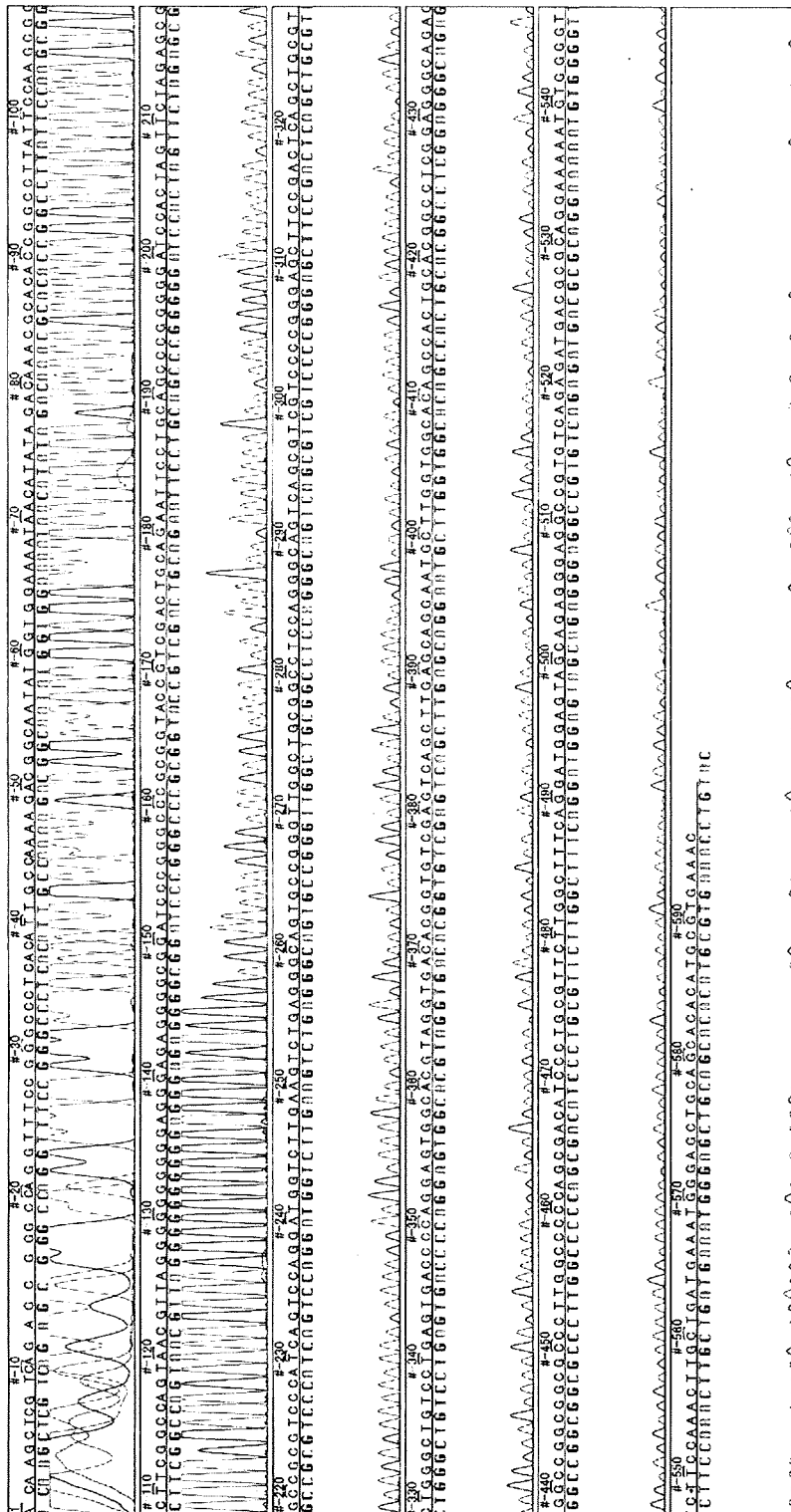
Printed on: Mon May 04, 2009 10:58AM, CST Electropherogram Data Page 1 of 1

hTERT (SYN-2142-1) のシーケンス片鎖解析

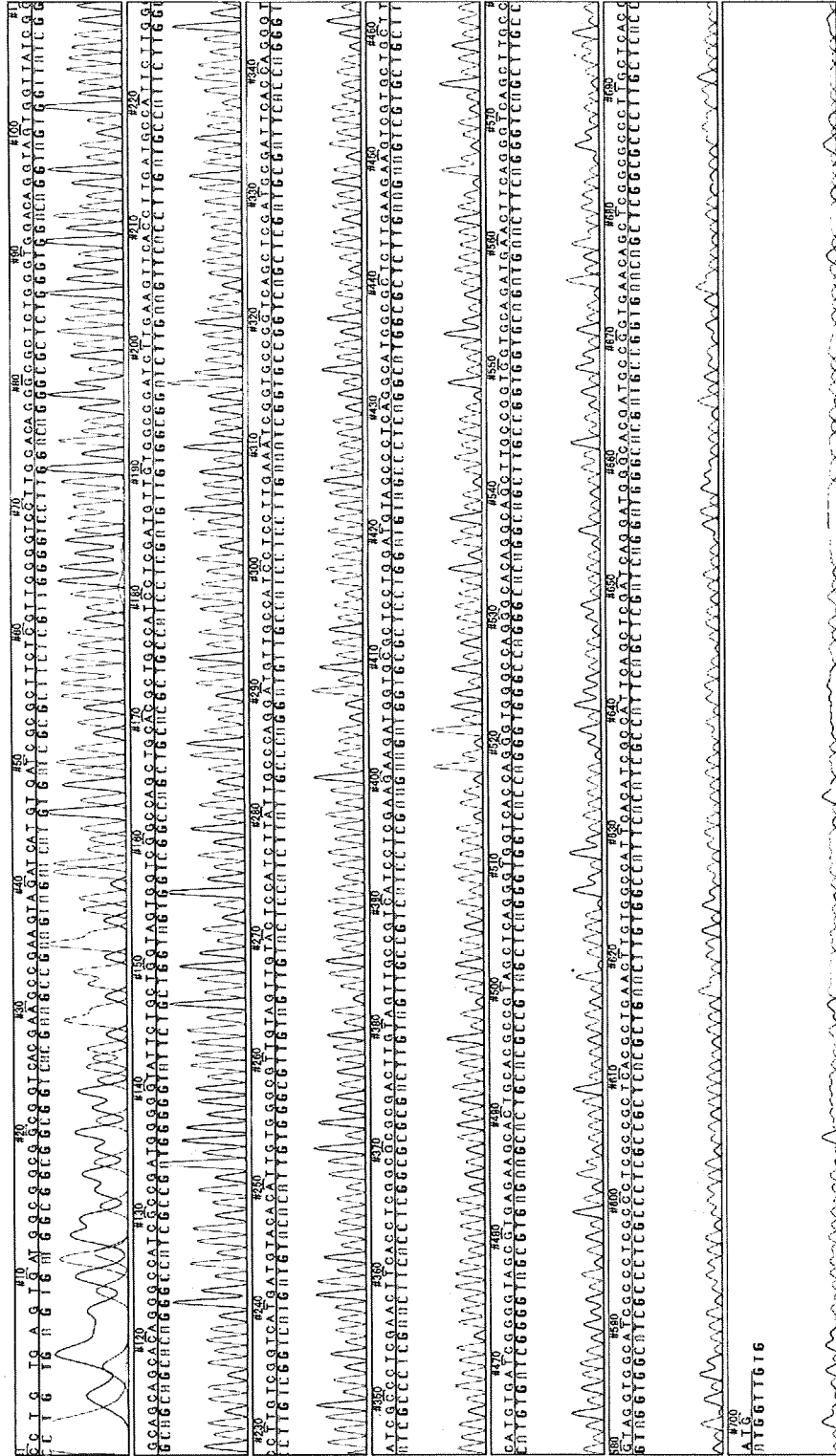
Espectrogram: L07A1 SYN2142-1-5_Acct01
Sequence: hTERT (11)



2008-01-06 11:54:17-6 Page: 3 of 3



Experimental Data: SYN2142-1-5, SYN2-42-1B02
 Sequencer(tm) "SYN2142_SEP"



Cell surface marker of corneal epithelium stem cells and culture condition.

Naoki YAMAMOTO ¹⁾, Koki TANIGUCHI ²⁾, Koji HIRANO ³⁾, Masayuki HORIGUCHI ²⁾, Masakazu KATOH ²⁾, Ken-ichiro HATA ²⁾ and Hajime KOJIMA ⁴⁾

¹⁾Laboratory of Molecular Biology and Microchemistry, Fujita Health University, Joint Research Laboratory, Aichi, JAPAN.
²⁾Department of Ophthalmology, Fujita Health University, School of Medicine, Aichi, JAPAN.
³⁾Japan Telex Engineering Co., Ltd. Aichi, JAPAN.
⁴⁾Division of Pharmacology, National Institute of Health Science (NIHS), Tokyo, JAPAN

● FUJITA HEALTH UNIVERSITY JOINT RESEARCH LABORATORY

Introduction

- Human corneal epithelial cells were difficult to culture.
- Many commercially available corneal epithelial cell lines were not undifferentiated because the cells were cultured at different times points.
- Therefore we investigated culture conditions that could maintain separation of undifferentiated cells including the corneal epithelial stem cells.
- We also developed a method to transfect the immortalization gene to human corneal epithelial cells, which generated a stable human corneal epithelial cell line that could be used in an eye irritation assay.

Purpose

- We examined the expression of the tissue stem cell marker (p75NTR, CD271) in corneal epithelial stem cells of the human corneal limbus.
- We investigated a primary method for the culture of corneal epithelial cells and developed a process for generating new immortalized human corneal epithelial cells.

Materials and Methods

- We purchased a human cornea tissue from an American eye bank for using of research
- The human cornea tissue was fixed by SUPER FIX (KURABO JAPAN YAMAMOTO N. et al. Japan patent NO. 3723204) made the paraffin specimen and immunohistostained by using p75NTR and p63 antibody
- The cornea tissue including the corneal limbus was cut about 5 mm size, treated using enzyme and cultured at serum-free medium on coating dish
- Serum-free medium: EGF, bFGF, Insulin, Hydrocortisone, Transferrin, Ascorbic acid et al. (The Cornea) Cornea Research Team

What's p75NTR ?

The Official name : low affinity p75 Neurotrophin receptor

Another name : p75 Nerve Growth Factor Receptor (p75NFR)

EC Number : 4.2.1.1 (2021)

Neurotrophin family

- Nerve Growth Factor (NGF)
- Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)
- Neurotrophin - 3 (NT-3)
- Neurotrophin - 4/5 (NT-4/5)

- The usefulness as the epithelial stem cell marker
 - Yamamoto N. et al. *Oncogene* 17, 157-166, 1998
 - Yamamoto N. et al. *Exp. Cell Res. Commun.* 24, 2005
 - Yamamoto N. et al. *Med. Mol. Morphol.* 41, 83-91, 2008
 - Yamamoto N. et al. Under submittal of Japan Patent NO. 2004-270917
- The usefulness as the ocular epithelial stem cell marker
 - Yamamoto N. et al. *J. Dermatol. Sci.* 45, 43-52, 2007
 - Yamamoto N. et al. Under submittal of Japan Patent NO. 2006-087384
 - Yamamoto N. et al. Under submittal of Japan Patent NO. 2006-220235

Result-1 Immunohistostaining of Corneal limbus

- p75NTR-positive cells were observed around epithelial cell base of the corneal limbus.
- The p75NTR-positive cells were with positive of p63 which expressed at the corneal epithelial stem cell

Result-3 Analysis of human corneal epithelial cells

Cell immunostaining

Cell Passage	p75NTR	Integrin beta1	Keratin 3
Passage 2	Positive	Positive	Positive
Passage 4	Negative	Positive	Positive
Passage 6	Negative	Negative	Positive

FACS

Cell Passage	p75NTR Positive Cells (%)	Integrin beta1 Positive Cells (%)	Keratin 3 Positive Cells (%)
Passage 2	82.4%	92.4%	82.4%
Passage 4	2.2%	92.4%	82.4%
Passage 6	0.0%	92.4%	82.4%

- Many of culture cells were p75NTR-positive at passage 2 but became almost negative at passage 4.
- On the other hand integrin beta1 was almost positive by passage 4
- These results show that culture cells were maintained with a comparatively undifferentiation by passage 2

Result-2 Culture of human corneal epithelial cells

- The polygonal cell form was maintained under passage 5
- At passage 6, cell form was changed by cell differentiation: hypertrophy or extension

Making of immortalization human corneal epithelial cells

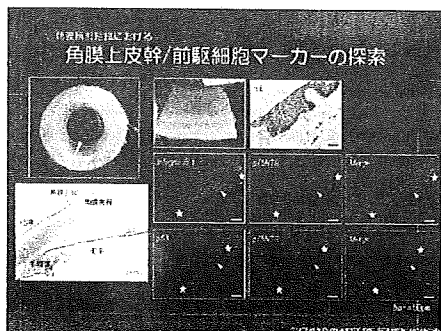
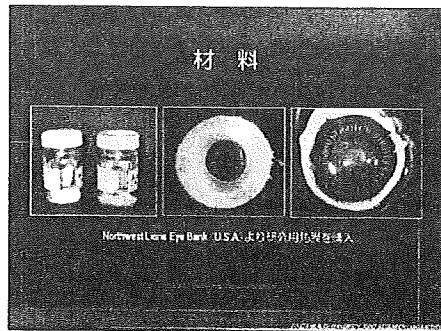
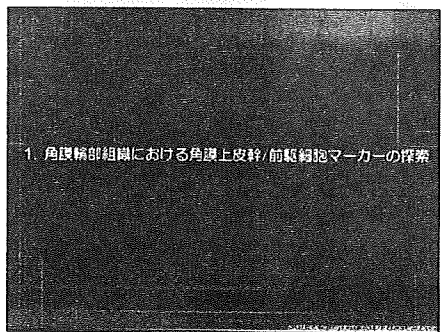
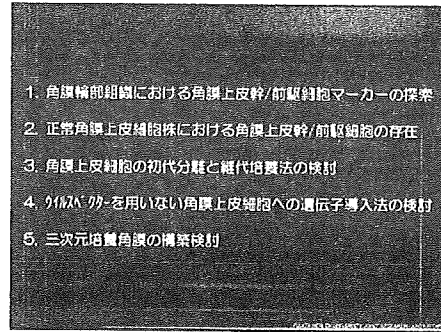
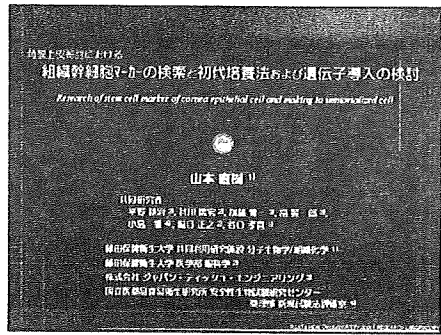
- We succeeded transfection of the immortalization gene (SV40 Large T Agt) into normal human corneal epithelial cells by the electroporation method
- The immortalization cells were keratin 3 positive. (The keratin 3 is one of the specific markers of human corneal epithelial cell)

Discussion

- The tissue stem cells from the cornea, the crystalline lens, and the iris were found to be p75NTR-positive cells. (Reference: Yamamoto N. et al. *Med. Mol. Morphol.* 41, 83-91, 2008.) In this report, we describe the development of a new method of cell isolation and culture conditions which made it possible to culture corneal epithelial cells without using feeder cells and serum.
- The polygonal cell form of normal corneal epithelial cells could not maintain the form over passage 6.
- However, the immortalized cells maintained the polygonal cell form and stained positive for keratin 3 over passage 10.
- Future studies will focus on using the new immortalized human corneal epithelial cell line as a standard reagent in the eye irritation assay.

This study was supported by a grant-in-aid for research (grant number 18310034) from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) and the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW).

第82回日本組織培養学会, 2009.



p75NTR とは？

Low-affinity neurotrophin receptor p75 (p75NTR; CD271)
 別名: p75 Nerve Growth Factor Receptor
 近年、上皮系/間葉系幹細胞マーカーとして注目されている。

↑ 上皮系細胞 (epithelial cells) への発現
 Nakatani T, et al. *Journal of Cell Biochemistry* 102: 200-210 (2005)
 Nakatani T, et al. *Wound Repair and Regeneration* 14: 205-211 (2006)

↑ 間葉系細胞 (mesenchymal cells) への発現
 Nakatani T, et al. *Journal of Cell Biochemistry* 102: 200-210 (2005)
 Nakatani T, et al. *Wound Repair and Regeneration* 14: 205-211 (2006)

↑ 培養条件
 • Neurotrophin-3 (NT-3)
 • Serum Free Medium (SFM)
 • 37°C, 5% CO₂
 • 100% Humidity

2. 正常角膜上皮細胞株における角膜上皮幹/前駆細胞の存在

正常角膜上皮細胞株における
角膜上皮幹/前駆細胞の存在


培養経過 (Passage) の変化

	Passage 1 (P1)	Passage 2 (P2)	Passage 3 (P3)	Passage 4 (P4)
角膜上皮細胞				
角膜上皮細胞				

↑ non-feeder cell での、HOECに円形の胎児細胞を添加した状態で増殖することは困難であり、Passage 3 (P3) でほとんど増殖が停止しなくなる。

3. 角膜上皮細胞の初代分離と継代培養法の検討


角膜組織からの
角膜上皮細胞の初代分離培養法の検討




- 角膜輪部組織を5mmの大きさに細切
- コラーゲンと70% EtOH を加えて37°Cで1夜インキュベート
- PBSで洗浄
- コラーゲンaseに播種して培養

角膜組織からの
角膜上皮細胞の初代分離培養法の検討

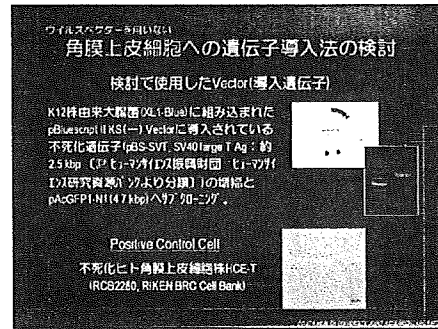
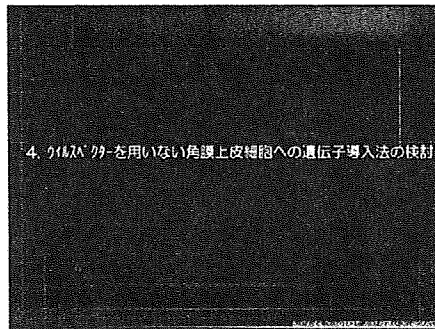
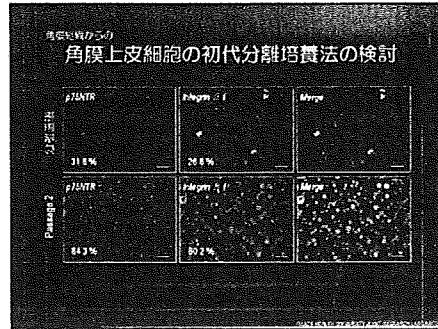
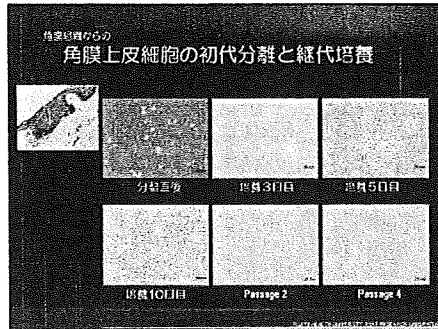
角膜中央部



角膜輪部



角膜輪部を適切な角度で細切を行うことで円形～多角形の角膜上皮細胞を分離できる。

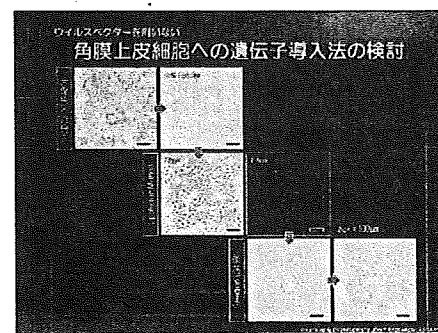


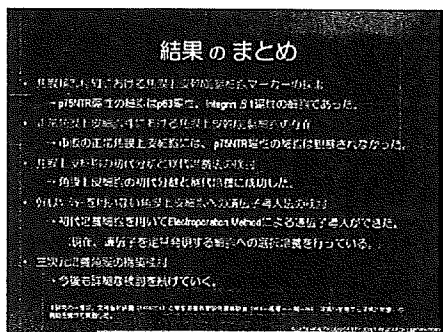
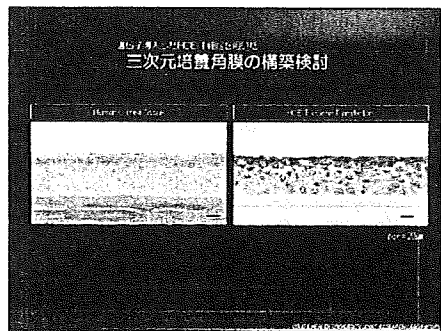
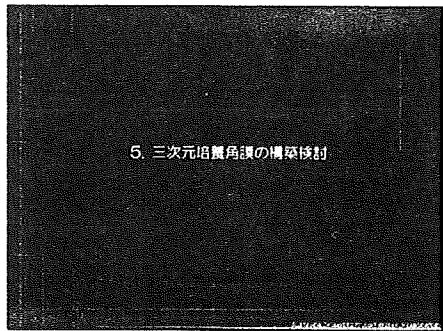
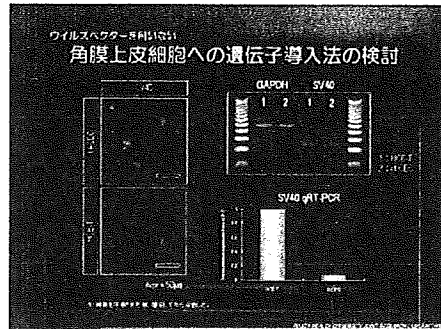
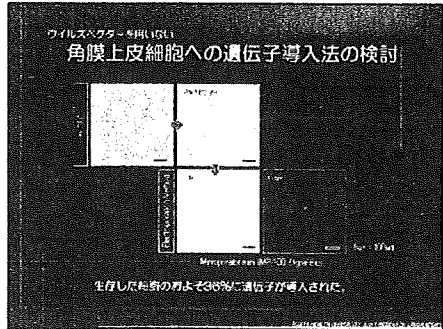
ウイルスベクターを用いない
角膜上皮細胞への遺伝子導入法の検討

① 目的: コーヒー油抽出物

導入方法	Lipofection Method			Electroporation Method		
	導入効率 (%)	細胞生存率 (%)	細胞増殖率 (%)	導入効率 (%)	細胞生存率 (%)	細胞増殖率 (%)
Electroporation	10	21	27	1	10	10
Lipofection	4	55	14	51	1	1
Electroporation	12	31	46	33	1	1
Lipofection	5	18	25	31	1	1
Electroporation	17	24	21	31	1	1
Lipofection	6	35	21	17	1	1
Electroporation	13	11	22	15	1	1
Lipofection	12	32	19	17	1	1

導入効率: 10% (細胞生存率: 21%)
導入効率: 4% (細胞生存率: 55%)
導入効率: 12% (細胞生存率: 31%)
導入効率: 5% (細胞生存率: 18%)
導入効率: 17% (細胞生存率: 24%)
導入効率: 6% (細胞生存率: 35%)
導入効率: 13% (細胞生存率: 11%)
導入効率: 12% (細胞生存率: 32%)





第 41 回日本臨床分子形態学会総会, 2009.

角膜上皮細胞の組織幹細胞マーカーと初代

山本 道樹¹、平野 耕治²、谷川 英宏³、加藤 雅一⁴、齋藤 隆一⁵

¹ 慶応義塾大学 医学部眼科、² 慶応義塾大学 医学部眼科、³ 慶応義塾大学 医学部眼科、⁴ 慶応義塾大学 医学部眼科、⁵ 慶応義塾大学 医学部眼科

分離培養法および遺伝子導入法の検討

齋藤 隆一¹、小島 肇久²、橋本 雅彦³、坂口 正之⁴、谷川 英宏⁵

¹ 慶応義塾大学 医学部眼科、² 慶応義塾大学 医学部眼科、³ 慶応義塾大学 医学部眼科、⁴ 慶応義塾大学 医学部眼科、⁵ 慶応義塾大学 医学部眼科

Introduction

- Human corneal epithelial cells were difficult to culture
- Many commercially available corneal epithelial cell lines were not undifferentiated because the cells were cultured at different times points
- Therefore we investigated culture conditions that could maintain separation of undifferentiated cells including the corneal epithelial stem cells
- We also developed a method to transfect the immortalization gene to human corneal epithelial cells, which generated a stable human corneal epithelial cell line that could be used in an eye irritation assay.

Purpose

- We examined the expression of the tissue stem cell marker (p75NTR, CD271) in corneal epithelial stem cells of the human corneal limbus.
- We investigated a primary method for the culture of corneal epithelial cells and developed a process for generating new immortalized human corneal epithelial cells

What's p75NTR ?

The Official name : low affinity p75 Neurotrophin receptor

→ Another name : p75 Nerve Growth Factor Receptor, p75NRP

→ CD families: Adv.271, CD271

Neurotrophin family

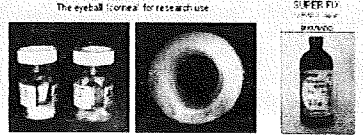
• p75NTR is a member of the TNF receptor superfamily. It is a type I transmembrane protein with an extracellular domain containing a cysteine-rich domain and a cytoplasmic domain containing a TNF receptor-associated domain.

• p75NTR is expressed in a wide variety of tissues, including the nervous system, immune system, and hematopoietic system.

Material and Method -1

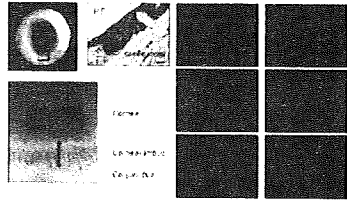
- We purchased a human cornea tissue from an American eyebank for using of research.
- The human cornea tissue was fixed by SUPER FIX (ALFABIO JAPAN) made for paraffin specimen, and embedded/stained by using p75NTR and p63 antibody.

The eyeball (cornea) for research use



From Methuen-Lucan Eye Bank, U.S.A.

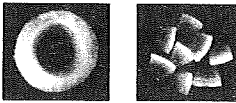
Result 1
Immunohistostaining of Corneal limbus



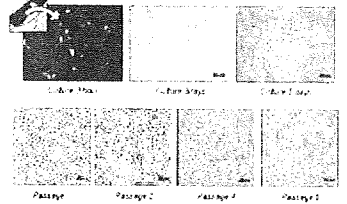
- CD133 positive cells were observed around epithelial cells of the corneal limbus.
- The CD133 positive cells were richly positive of β-catenin expression at the corneal limbus (Fig. 1).

Material and Method -2

- The cornea tissue including the corneal limbus was cut about 5 mm size, treated using enzyme, and cultured at serum-free medium on coating dish.



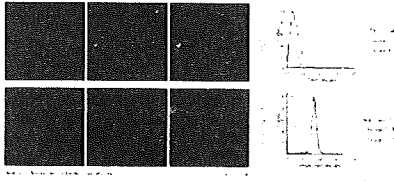
Result 2
Culture of human corneal epithelial cells



- The polygonal cell form was maintained over passage 5.
- At passage 6, cell form was changed to cell clusters (cluster hyperbathy) or extrusion.

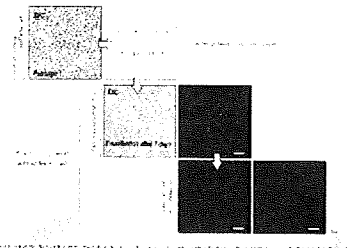
Result 3
Analysis of human corneal epithelial cells

Cell Transduction FACS



- The cells were cultured in serum-free medium.
- The cells were cultured in serum-free medium.
- The cells were cultured in serum-free medium.
- The cells were cultured in serum-free medium.

Method and Result 4
Making of immortalized-human corneal epithelial cells



- The cells were cultured in serum-free medium.
- The cells were cultured in serum-free medium.
- The cells were cultured in serum-free medium.
- The cells were cultured in serum-free medium.

Discussion


- The tissue stem cells from the cornea, the crystalline lens, and the iris were found to be CD133-positive cells. In this report, the new method that we developed the method of cell isolation and culture condition made it possible for the culture of corneal epithelial cells without using feeder cells and serum.
- The polygonal cell form of normal corneal epithelial cells could not maintain the form over passage 6.
- However, the immortalized cells maintained the polygonal cell form and stained positive for keratin 5 over passage 10.
- Future studies will focus on using the new immortalized human corneal epithelial cell line as a standard reagent in the eye irritation assay.

This study received the public welfare science research expenses grant by HISAKAWA public health foundation 2007-2009 and the assistance of Agency of Education, Culture, Sports, Science and Technology (Funding Activity Support Research (FAPS)) 1974214.

第41回藤田学園医学会総会, 2009.

ヒト角膜上皮細胞の分離培養法と不死化細胞株の樹立

Establishment of primary culture and immortalized cell lines of human corneal epithelial cells



山本直樹, 平野正吾, 谷口孝典

藤田医科大学 眼科 角膜病学 角膜移植学 角膜保存学
 藤田医科大学 眼科 角膜病学 角膜移植学 角膜保存学

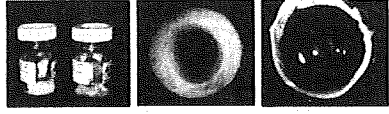
背景と目的

- ヒト角膜上皮細胞は分離・培養が非常に難しい細胞の一つである。
- 培養されている角膜上皮細胞は、幹細胞特異的マーカーを発現する細胞は存在しなかった。
- 角膜上皮幹細胞特異的マーカーを含む未分化細胞を分離培養できる方法を検討した。
- 医薬品外品の原料評価における眼刺激性試験代替法として用いることができる安定した細胞株の構築を目指す。

1. ヒト角膜上皮細胞における細胞幹細胞マーカーの発現
2. 角膜上皮幹細胞特異的マーカーの効率的な分離と培養法の検討
3. G418^Rを用いない角膜上皮細胞への遺伝子導入法の検討

1. ヒト角膜上皮細胞における細胞幹細胞マーカーの発現
2. 角膜上皮幹細胞特異的マーカーの効率的な分離と培養法の検討
3. G418^Rを用いない角膜上皮細胞への遺伝子導入法の検討

材 料



Northard Lens Eye Bank (北アライバンク)より眼移植用眼を調製

超純化培養液


SUPER FIX

- 2000年 新しく国産品の開発を開始
- 2005年 新しく国産品に互換性を持つ特許を取得
種別特許権発注国特許 特許第372294号
- 2007年 超純化培養液を発売

"SUPER FIX (design No. 100)・KURABO"



- 優れた細胞増殖性
培養操作の難しい細胞に有用
- 抗毒性や遺伝子の保存性が向上
先端細胞化学分析に有用



p75NTR とは?

Low-affinity neurotrophin receptor p75 (p75NTR: CD271)
別名 p75^{Nerve Growth Factor Receptor}
近年、上皮系、間葉系幹細胞のマーカとして注目されている

- 分子由来: 1987年、神経細胞の細胞表面に存在する低親和性神経栄養因子受容体として発見された。
- 分子構造: 細胞外ドメインは5つのIg-likeドメインから構成され、細胞内ドメインはキナーゼドメインを有する。
- 発現: 神経細胞、上皮細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞、がん細胞などに発現する。
- 機能: 神経栄養因子 (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5) と結合し、細胞増殖、生存、分化、移動、シナプス形成などを調節する。

角膜上皮幹 前駆細胞マーカーの探索

角膜上皮幹細胞の探索とマーカーの同定。左側の写真は角膜の断面と上皮層を示している。右側の写真は蛍光顕微鏡によるマーカー発現の画像である。

1. ヒト角膜幹細胞組織における組織幹細胞マーカーの発現
2. 角膜上皮幹 前駆細胞の初代分離と継代培養法の検討
3. 遺伝子導入を用いない角膜上皮細胞への遺伝子導入法の検討

角膜上皮細胞の分離と継代

角膜上皮細胞の初代分離と継代培養。Culture 0 days, Culture 3 days, Culture 6 days, Passage 1, Passage 2, Passage 3, Passage 4 の画像が示されている。

- 角膜上皮細胞は、角膜上皮層から初代分離が可能である。
- 6 passages 以上継代培養可能である。


角膜上皮細胞の初代分離培養法の検討

角膜上皮細胞の初代分離と培養。Passage 0, Passage 1, Passage 2 の画像が示されている。

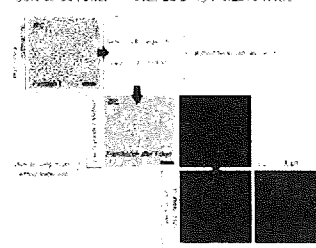
1. ヒト角膜幹細胞組織における組織幹細胞マーカーの発現
2. 角膜上皮幹 前駆細胞の初代分離と継代培養法の検討
3. 遺伝子導入を用いない角膜上皮細胞への遺伝子導入法の検討

ウレタスベクターを用いた
角膜上皮細胞への遺伝子導入法の検討
使用したVector(導入遺伝子)

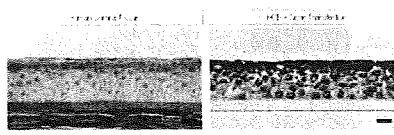
K12株由来大腸菌(HL1-Blue)に組み込まれたpBluescript II KS (+) Vectorに導入されている不活化遺伝子(pBS-SV40 large T Ag : 約2.6 kbp [約70-75%])
財団法人振興財団、G1-2財団研究奨励金(2次分譲)の増幅と
pAcSFP1-N1 (4.7 kbp)へ約70-75%



ウレタスベクターを用いた
角膜上皮細胞への遺伝子導入法の検討



遺伝子導入後の細胞の増殖を測定
三次元培養角膜の構築検討



結果のまとめ

- 角膜上皮細胞に用いた角膜上皮細胞の増殖を測定
→ p75HFR質点の導入(p75HFR質点の導入)による増殖の増加
- 角膜上皮細胞の増殖を測定するための増殖法の検討
→ 角膜上皮細胞の増殖を測定するための増殖法(成功)
- 角膜上皮細胞を用いた角膜上皮細胞への遺伝子導入法の検討
→ 遺伝子導入法を用いた(Fish injection Method)による遺伝子導入の検討
- 三次元培養角膜の構築検討
→ 角膜上皮細胞の増殖を測定するための増殖法(成功)

参考文献: 藤田学園医学会誌, 2009, 32(1): 1-10

分担研究報告書

「感作性試験代替法の開発」

研究分担者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者 足利太可雄、坂口齊、岡本賢二、水野誠、加藤義直、稲葉宏幸
中村恒彰、佐藤淳、岡本裕子、桑原裕史、小坂七重、菌さき子

研究要旨

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。これまでの検討により、既知化合物に関する in vivo との対応性や、施設間再現性が良好であることを明らかにしてきた。

本研究では 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った。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、検討を行った 3 施設では機器の感度に大きな違いがないことを確認した。

以上の結果から、h-CLAT のプロトコールが決定された。今後はバリデーションによりその有用性を確認していきたい。

A. 研究目的

我々はランゲルハンス細胞の代替としてヒト単球細胞株である THP-1 細胞を用い、CD86 と CD54 の発現亢進を指標とした試験法 (h-CLAT) を開発してきた^{1, 2, 3)}。その後厚生労働科学研究において、国内 7 施設による共同研究を実施した結果、本試験法は技術移転が容易であり、基本的に施設間再現性が良好であることを明らかにした⁴⁾。さらに本試験法の汎用性を向上させることを目的として、細胞と血清のロット差及び前培養条件に関する検討^{5, 6, 7)}や、予測モデル、陽性対照物質 (DNCEB) の推奨適用濃度、及び CD86/CD54 発現亢進最小濃度 (EC150, 200) の算出方法の見直しを行った。

さらに化粧品業界においては特に感作性試験代替法の実用化が強く期待されていることから、化粧品原料に関する h-CLAT の有用性を目的として防腐剤、染毛剤および香料

30 品を評価し、h-CLAT の有用性を示した^{8, 9, 10)}。

本試験法を国際的にも標準化させるためには、詳細なプロトコールが必要であり、そのためには裏付けとなる背景データの取得が重要である。そこで今回は、本試験法の信頼性をさらに向上させることを目的として、課題と考えられる 3 つのテーマについて背景データの取得を行った。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である。こうした情報の取得は信頼性の高い試験法の確立に寄与するものと考えている。

B. 研究方法

試験方法：細胞は、ヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞を ATCC より購入して使用

した。CD86 及び CD54 の発現は、上記の細胞に被験物質を 24 時間処理し、細胞生存率とともにフローサイトメトリーを用いて測定した。細胞株、血清、抗体については標準プロトコールに記載した基準を満たしたものを使用した。適用濃度は、予め予備試験として細胞毒性試験を行い、生存率が 75%に相当する濃度 (CV75 (=IC25) と定義) を基準に、公比 1.2 で 8 濃度 (1.2x, 1x, 1/1.2x, 1/1.2²x, 1/1.2³x, 1/1.2⁴x, 1/1.2⁵x 及び 1/1.2⁶x (CV75) 設定した。試験は 3 回行い、コントロールと比較して CD86/CD54 どちらかの発現量がそれぞれ 1 濃度でも 150, 200%を超えた試験が 2 回以上あった場合を陽性とした。

被験物質: 代表的な感作性物質として DNCB および Ni を、代表的な非感作性物質として SLS を用いた。

詳細はそれぞれの項目に記載した。また各検討においては、施設間再現性も確認する目的で、複数の施設で試験を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は感作性試験代替法を開発することで実験動物の福祉向上を目指すものであるため *in vitro* の実験のみを行っており、ヒトや動物の権利や福祉に抵触するところはない。

C. 研究結果及び考察

C-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

C-1-1 イントロダクション

h-CLAT を適切に行なうためには、適切な THP-1 細胞を用い試験を行なう必要がある。そのためには、THP-1 細胞を選択する基準が重要となるが、以前の厚生労働科学研究で行なった細胞選択の検討においては、DNCB、Ni、SLS を CV75 (予備の PI assay より細胞生存率が 75%になると予想される濃度) で評価し、その結果で判断していた。しかし、DNCB では度々 CV75 での生存率が 70%以下となり、結果も陰性になることがわかった。また、細胞の使用可否の判断前に PI assay を行なわなければならない等の課題もあった。その後の検討で、DNCB に関しては 4.0µg/mL が陽性対照として適切な濃度であることが判明し、現在では細胞の選択の際、および試験毎のポジティブコントロールとして DNCB はこの濃度で CD86、CD54 とともに陽

性であることで評価されている。一方で、Ni と SLS についてはこれまで CV75 での評価しか行ったことがなかった。しかし、PI assay を行なわずに、固定濃度での細胞の採用可否を判断できる事が望まれ、今回 Ni 及び SLS についても評価することとした。

C-1-2 方法

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なった 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。

C-1-3 結果及び考察

1) 1 施設での予備評価

表 1 に 1 施設が行った Ni の 1 濃度 (100µg/mL) と SLS の 3 濃度 (50, 55, 60µg/mL) の 10 回の試験結果を記載した。

Ni (100µg/mL) に関しては、①10 回の実験すべてで CD86、CD54 が共に陽性基準値を超えて陽性と判定された、②細胞生存率 (平均値±SD) は 83.1±2.9%であった。

SLS (50, 55, 60µg/mL) に関しては、①10 回の実験すべてでいずれの濃度でも、CD86、CD54 が共に陽性基準値を超えずに陰性と判定された。②細胞生存率 (平均値±SD) は 50 µg/mL は 93.8±1.7 55 µg/mL、55 µg/mL は 87.5±4.2、60 µg/mL : 72.0±10.4 であった。

以上の結果から、1 施設で評価した固定濃度は細胞選択の際に有用となる可能性が考えられ、以下の 3 施設間での再現性も含めた評価に移行することとした。

2) 3 施設での評価

2-1) Ni (100µg/mL) の評価