

201024046A

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

国際協調を重視した化粧品・医薬部外品における
安全性試験法の再評価に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小島 肇

平成23(2011)年 4月

目 次

I. 総括研究報告		
国際協調を重視した化粧品・医薬部外品における安全性試験法の再評価に関する研究	-----	1
小島 肇		
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眼刺激性試験・眼毒性試験代替法の開発	-----	15
山本直樹		
2. 光毒性試験に関する再評価に関する研究	-----	37
大野泰雄		
3. ヒトパッチテストの再検討と使用試験に関する調査	-----	43
松永佳世子		
4. 化粧品原料の経皮吸収に関する研究	-----	47
杉林堅次		
5. 代替法についての国際情勢の調査	-----	65
板垣 宏		
6. 活性酸素種産生能を指標とした光毒性リスク評価方法に関する研究	-	101
尾上誠良		
7. 皮膚刺激性及び眼刺激性試験代替法のバリデーションに関する研究	-	105
小島 肇		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	191
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	195

総括研究報告書

国際協調を重視した化粧品・医薬部外品における安全性試験法の再評価に関する研究

研究代表者 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

化粧品・医薬部外品における安全性試験の中で、まだ代替法の開発が不十分な分野を中心に *in vitro* 試験の開発を進めた。例えば、①培養表皮または皮膚モデルを用いた皮膚透過性試験については、培養皮膚モデル間の相違を明確化した。②光毒性試験に関しては、活性酸素種産生能を指標とした試験（ROSアッセイ）のデータ及びプロトコル整備を行った。③眼刺激性試験においては、遺伝子導入で得られた角膜形質発現細胞を用い、細胞株の安定性を検証できた。さらに、以前、日本動物実験代替法学会でバリデーションが実施された培養表皮モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験及び、眼刺激性試験代替法であるSTE (Short Time Exposure) 試験について、適切な追加バリデーションを実施できた。また、ROSアッセイのバリデーション開始に向け、事前準備を行った。

一方、ヒト試験については、現在はパッチテストだけが活用されているが、欧米では汎用されている使用試験の指標について過去の医薬部外品申請資料を用いて検討するとともに、携帯電話を用いた有害性情報の入手に関する適切な対処ができるシステムを検討した。

これらの検討に加え、欧米で開発される試験法の情報収集を入手しながら、国際協調を重視し、医薬部外品・化粧品の安全性評価に代替法を取り入れるべく議論を継続し、試験法の再評価を実施した。

研究代表者

小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 新規試験法評価室・室長）

研究分担者

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所 所長）

杉林堅次（城西大学薬学部 教授・薬学部長）

尾上誠実（静岡県立大学薬学部 准教授）

山本直樹（藤田保健衛生大学 講師）

松永佳世子（藤田保健衛生大学医学部皮膚科 教授）

板垣 宏（日本化粧品工業連合会 代替法専門委員会委員長）

A. 研究目的

欧州にて、2009年より化粧品成分に対する動物実験禁止、及び化粧品の販売禁止が適用されている。さらに、2013年よりその拡大が予定されており、わが国で販売される新規化粧品や医薬部外品(薬用化粧品等)等においても、動物実験代替法（以下、代替法と記す）を用いた安全性評価に関する国際協調を急がねばならない。この状況に対応すべく、平成21年度までの厚生労働科学研究において、代替法を用いた医薬部外品の安全性評価のあり方について、皮膚科医、毒性試験の専門家、業界代表者及び行政サイドとともに検討してきた。この検討会では、動物愛護の昨今の世界情勢を考慮に入れながら、安全

性評価の質の維持を優先して議論を重ねた。その結果、①開発されている代替法 (*in vitro* 試験) が少ない。②OECD ガイドラインや公的な機関で認証された試験法については、その適用範囲と限界を加味すれば、積極的に利用できるとの見解を明らかにした。ただし、国際的な状況を鑑み、医薬部外品の評価に必要な *in vitro* 試験の開発を後押しするとともに、開発が進んでいる代替法に対処するため、本あり方検討会での継続審議が必要であると結論された。

以上のような状況に鑑み、本研究では、化粧品・医薬部外品における安全性試験の中で、まだ代替法の開発が不十分な分野を中心に *in vitro* 試験の開発を進めた。例えば、①培養表皮または皮膚モデルを用いた皮膚透過性試験について研究・開発した。②光毒性試験に関しては、活性酸素種産生能を指標とした試験 (ROSアッセイ) のデータ及びプロトコル整備を行った。③眼刺激性試験においては、遺伝子導入で得られた角膜形質発現細胞を用い、簡便で安価な方法を検討した。さらに、以前、日本動物実験代替法学会でバリデーションが実施された培養表皮モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験及び、眼刺激性試験代替法である STE (Short Time Exposure) 試験について追加バリデーションを実施した。また、ROSアッセイのバリデーション開始に向け、事前準備を行った。

一方、ヒト試験については、現在はパッチテストだけが活用されているが、欧米では汎用されている使用試験の指標について過去の医薬部外品申請資料を用いて検討するとともに、携帯電話を用いた有害性情報の入手に関する適切な対処ができるシステムを検討した。

これらの検討に加え、欧米で開発される試験法の情報収集を入手しながら、国際協調を重視し、医薬部外品・化粧品の安全性評価試験法の再評価を実施した。

B. 研究方法

B-1) 代替法開発

B-1-1) 培養表皮または皮膚モデル (3次元培養皮膚モデル) を用いた皮膚透過性試験について研究・開発

本邦で入手可能な3次元培養ヒト皮膚モデルを用いて物質の透過性を評価し、各3次元培養皮膚モデルの物質透過特性を調査した。さらに、3次元培養ヒト皮膚モデルからヒト皮膚透過性が予測できるかを調査した。

また、3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験にて、いくつかの試験物質で偽陰性や偽陽性反応が認められている。そこで、3次元培養ヒト皮膚モデルである EpiDerm を用いた試験で偽陽性及び偽陰性反応が認められた化学物質の極性及び物質の透過特性から、その原因について調査した。

試薬として、アンチピリン、カフェイン、アミノピリン、安息香酸、二硝酸イソソルビド、一硝酸イソソルビド、ニコチン酸エチル、ニコチン酸、フルルビプロフェンを用いた。

3次元培養ヒト皮膚モデル EpiDerm™ Epi606X は倉敷紡績株式会社 (大阪, 日本)、Neoderm-E® は Tego Science (Gumcheon-gu, Seoul, Korea)、Vitrolife-skin はグンゼ株式会社 (京都, 日本)、Labcyte EPI-model は株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (愛知, 日本)、TEST SKIN™ LSE-high は東洋紡績株式会社 (大阪, 日本)そして Episkin™ は Skinethic (St. Philippe, France) を用いた。

B-1-2) ROSアッセイによる光毒性リスク評価方法に関する研究

モデル化合物群とし fluoroquinolone (FQ, 6種) を用い、これらの光化学的特性を、UV 吸収測定ならびに ROS assay にて評価した。なお、ROS assay に用いる擬似太陽光は Suntest CPS plus (250 W/m²) を用い、96 well microplate 上でアッセイを実施した。

また、光毒性について、3T3 neutral red uptake phototoxicity test (NRU PT) ならびに先に我々が開発した *in vitro* 光遺伝毒性評価方法である intercalator-based phototoxicity (IBP) assay を用いて評価した。さらに、カセットドージング法により皮膚移行性に焦点を当てて、UPLC/ESI-MS を用いて、各種薬物動態学的特性を評価した。

B-1-3) 分子生物学的・組織化学的手法を用いた眼刺激性試験・眼毒性試験代替法の開発

正常角膜輪部組織から分離培養した正常ヒト角膜上皮細胞(HCE)に不死化遺伝子のSV40 Large T Antigen (SV40) を導入して作出した不死化ヒト角膜上皮細胞 (iHCE-NY) 及び不死化細胞の対照株としての不死化ヒト角膜上皮細胞株 (HCE-T) を用いた。まずヒト角膜上皮細胞由来の不死化細胞作出の為に、SV40を組み込んだGFPベクターの構築と新しいエレクトロポレーション法による遺伝子を導入し、得られた Polyclonalな状態のiHCE-NYからクローニング (200株) を選出した。このクローンを用いて、Karyotype、プロテオミクスなどを解析した。HCE-Tについても独自の技術で追加クローニングを行った。また、高感度で簡便な試験評価系とマーカーの開発にむけた予備実験を開始した。さらに追加クローニングを行ったHCE-Tを用いて三次元角膜再構築モデルの作製に関する予備実験を行った。

B-2) バリデーション

B-2-1) 培養表皮モデル (LabCyte EPI-MODEL24) のバリデーション

2008-2009年に掛け、日本製の培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた方法の有用性を検証するため¹⁾、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会が皮膚刺激性試験代替法のバリデーションを実施した。このバリデーションを通して、目的であった LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験で得られる皮膚刺激性の判定が、複数の施設間でどの程度一致するか (施設間再現性)、ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) で認

証されている EPISKIN で得られた判定結果とどの程度一致するか (同等性)、動物実験結果とどの程度一致するか (代替可能性)、という3つの課題への解答を、多施設での実験を通して満たすことができた。

この試験法の第三者評価がOECD第三者評価委員会において実施され、その結果として、1-bromohexaneの偽陰性等の結果により、本モデルを用いた皮膚刺激性評価は不十分と判断された。そこで、製造元である株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (J-TEC) において試験法の見直しが行われ、プロトコルの改良がなされた。この改良はプロトコルにとって重要な問題であると JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) 運営委員会が判断したことから、厚生労働科学研究の支援を受け、この改良点を盛り込んだ改訂プロトコルを用いたバリデーション研究を実施することになった。

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method内のperformance standardに記載されている20物質をコード化して参加3施設に配布し、改訂プロトコルを用いた追加バリデーションを実施した。

1) バリデーション実行委員会

委員長：小島 肇 (国立衛研)、

委員：加藤雅一 (J-TEC)、大森 崇 (同志社大学)

2) 参加施設

小林製薬株式会社、ファンケル、DSTC (薬物安全性試験センター)

3) トレーニング

2010年7月27日に国立衛研にて、改良プロトコルを用い、J-TECより技術指導がなされた。

4) 予備試験

各施設において、1-bromohexaneが陽性になるよう改良されたプロトコル取得のための予備試験が数回実施された。

5) 実施期間

バリデーションは2010年9月～11月の間に実施された。

6) 改良プロトコルの概要

本研究は、先のバリデーションで用いられた

同一の試験プロトコル改良版に基づいて実施された。コード化された20被験物質をモデルに15分間処理した後、42時間後培養を行い、MTTアッセイで細胞生存率を求めた。50%細胞毒性を基準に皮膚刺激性の判定を実施した。

改訂の主な点は、被験物質の洗い流し方である。洗う回数などに変更はないが、モデルの底面に水流を当てない、洗浄毎に洗浄液を切ることを徹底しない、水分除去に利用していたコットンパッドを利用しないなどが改良された。

B-2-2) STE法のバリデーション

STE試験は、ウサギ角膜由来のSIRC細胞に被験物質を一定濃度、5分間曝露した際の細胞生存率をエンドポイントとした簡便な眼刺激性試験代替法である。2008-2009年に、日本動物実験代替法学会において、STE試験の技術易習得性、施設間再現性と代替可能性を評価するため、5施設によるバリデーションが実施され、高い技術易習得性が確認された。さらに、コード化された25被験物質によるバリデーションが実施され、良い施設間再現性が確認された。本研究では、先回のバリデーションと合わせて被験物質のGHS区分のバランスが最適になるように、主にCategory2の物質から選択したより多くの被験物質を用いて、先回のバリデーションに参加した3施設の協力を得て、代替可能性の再評価を目的とした。

1) バリデーション実行委員会

小島 肇 (国立衛研)、林和彦、坂口斉 (花王)、森本隆史 (住友化学株式会社)、ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) 代表、ECVAM 代表

・データ解析チーム

大森 崇、音泉 卓 (同志社大学)、寒水孝司 (京都大学)

・被験物質管理チーム

小島 肇 (国立衛研)、林和彦 (花王)、森

本隆史 (住友化学株式会社)

2) 参加施設

株式会社カネボウ化粧品、ポーラ化成工業株式会社、ライオン株式会社

3) 実施期間

バリデーションは2010年8月～10月の間に実施された。

4) プロトコル概要

先のSTE試験法バリデーションで用いた同一の試験プロトコルに基づいて実施した。コード化された40被験物質を用い、それぞれの被験物質の溶解性に基づき、生理食塩水、5%DMSO含有生理食塩水、及びミネラルオイルのいずれかを溶媒として選択し、5%、0.05%溶液を作成し、SIRC細胞に5分間曝露した後、MTTアッセイにより細胞生存率を求めた。計3回の実験を行い、平均値を求めた。

まず、5%試料液で評価し、STE試験における非刺激物、刺激物の刺激区分を行い、その刺激区分とGHS区分 (非刺激物、刺激物) との一致性を評価した。次にSTE試験の予測モデルを用いた眼刺激ランクとGHSカテゴリー分類 (非刺激物、刺激物: Category2及び刺激物: Category1) との一致性を評価した。

B-2-3) ROSアッセイ

1) ROSアッセイ説明会及びバリデーション準備委員会第一回会議

平成22年9月8日に、ROSアッセイ説明会及びバリデーション準備委員会を開催し、ROSアッセイへの理解を深めるとともに、本試験法の安全性評価上の必要性について議論した。

2) ROSアッセイ バリデーション準備委員会第二回会議

平成23年1月24日に、第二回のROSアッセイバリデーション準備委員会を開催し、ROSアッセイの安全性評価上及びそのバリデーションの必要性について議論した。

3) その後の動向

第二回会議以降、メールや電話で何度も調整が行われた。

B-3) ヒトパッチテストの再検討と使用試験

B-3-1) ヒトパッチテスト

ヒトパッチテストについては、陽性コントロール及び陰性コントロールを置いた健常人の予知パッチテストを施行し、陽性コントロールの妥当性について検討した。

B-3-2) 既存の使用試験の検討

新規成分を含む医薬部外品の使用試験について企業より情報提供を受け、検討を加えた。

B-3-3) 携帯電話を利用した使用試験安全管理システム

安全性について合理的な使用試験を行うための、携帯電話を利用した管理システムを試作した。

B-4) 国際情勢

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。この他、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。

(倫理面への配慮)

倫理的な問題が生じる実験を実施しておらず、特に配慮すべき問題はない。

C. 研究結果

C-1) 代替法開発

C-1-1) 3次元培養皮膚モデルを用いた皮膚透過性試験について研究・開発

化学物質の3次元培養皮膚モデルへの分配性

は、各モデルにより異なり、この違いが各3次元培養ヒト皮膚モデルの透過特性に大きく影響していた。また、ヒト皮膚と良く似た透過挙動を示す EpiDerm でさえ、角層のバリア能は低かった。一方、種々3次元培養ヒト皮膚モデルは実皮膚と比較して、エステラーゼ活性が著しく低かった。さらに、化学物質の培養皮膚モデル中の透過速度は、実皮膚より著しく速かった。このことから親化合物及び代謝物の concentration-distance profile が実皮膚と異なり、代謝物の皮膚中濃度が著しく低くなると考えられた。結果として代謝物の皮膚刺激性が高いものは、3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた場合、偽陰性反応を示す可能性が高くなった。

C-1-2) ROSアッセイによる光毒性リスク評価方法に関する研究

各種光科学的特性評価の結果、6種の FQ (norfloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, lomefloxacin, sparfloxacin) はすべて強い UV を吸収した。さらに ROS assay においても gatifloxacin を除く多くの FQ は強い ROS を産生したため、これらの化合物は顕著な光反応性を有することを示唆していた。次に、*in vitro* 光毒性リスク評価を行ったところ、すべての FQ は光刺激性や光遺伝毒性等の光毒性リスクを示したが、gatifloxacin は他の5種の FQ より比較的弱い毒性であった。カセットドージング法を用いた薬物動態学的評価の結果から皮膚移行性について評価したところ、levofloxacin, gatifloxacin 及び lomefloxacin は高い皮膚中濃度を示した。以上の結果をあわせて、decision matrix を構築したところ、今回試験した FQ では lomefloxacin が最も強い光毒性リスクを有しており、その他の FQ についてもこれまでの臨床報告と良い関連性を示した。

C-1-3) 分子生物学的・組織化学的手法を用いた眼刺激性試験・眼毒性試験代替法の開発

ベクターの GFP の直前に IRES (内部リボソーム進入部位) を挟まず SV40 をインサートして作製したプラスミドベクターを用いることで、HCE に SV40 を導入し GFP 蛍光を発する細胞を作製できた。Polyclonal な状態からクローニングして選出した細胞は、染色体のモードが 46 であり、プロテオミクスの結果から HCE や HCE-T と比較して drastic なスポット変化はなかった。

C-2) バリデーション

C-2-1) 培養表皮モデル (LabCyte EPI-MODEL24) のバリデーション

バリデーションの結果、3 回の SD が 18% を超えた場合がすべての施設で見られた。なお、これら物質はいずれも再試験で基準 (SD<18%) を満たした。陰性、陽性対照物質は、すべての場合に基準を満たしていた。

3 参加施設の内、1 施設 (Lab a) がコード番号 4 を陽性と判定したため、specificity が、わずかに performance standard の基準 (acceptance criteria 及び success criteria) を達成できなかった。その他の結果は、すべて基準を満たしていた。

C-2-2) STE 法のバリデーション

施設 2 及び 3 に試験不成立が見られた。不成立原因の多くは、陽性対照の基準範囲の逸脱であった。また、3 回の試験の SD が 15% を超えた場合も施設 2 及び施設 3 で見られた。なお、これら物質はいずれも再試験で基準 (SD<15%) を満たした。

ブランク、溶媒対照、陽性対照値の施設間再現性は高かったが、やや施設 2 のバラツキが大きかった。

コード化した被験物質については、3 施設がともに実施した 10 物質ではすべて同じ判定結果が得られ、先のバリデーション同様、施設間再現性が確認できた。また、先のバリデーションで

も用いられた 2 物質も同様の判定結果となり、バリデーション間の再現性が確認された。40 物質の中で、GHS 区分との比較では、コード番号 01 及び 25 の 2 物質の判定結果が異なった (GHS カテゴリー分類との比較では、コード番号 01、02 及び 25 の 3 物質が異なった)。

先のバリデーション結果と結果が確定した 60~61 物質により一致率を算出したところ、GHS 区分の一致率は 78% 以上 (61 物質) と高かった (GHS カテゴリー分類との比較では 65% (60 物質) であった)。

C-2-3) ROS アッセイ

1) ROS アッセイ説明会及びバリデーション準備委員会第一回会議

光照射装置として、Atlas 社製 (Suntest CPS plus) 及びセリック社製 (SXL2500V2) のソーラーシュミレータを、それぞれ 3 施設ずつ確保できた。双方でバリデーションを目指すことになった。

2) ROS アッセイ バリデーション準備委員会第二回会議

Atlas 社製光照射装置 (Suntest CPS plus) でのプレバリデーションを先行で実施し、セリック社製照射装置 (SXL2500V2) でのプレバリデーションは、Atlas 社の後とする。プレバリデーションの目的は技術移転及びプロトコルの検証であるため、被験物質はコード化しない。以後の被験物質はコードすることが決まった。

QC の第一段階は担当企業内で実施する。第二段階はバリデーション実行委員会で実施する。施設の許容範囲を考慮して被験物質を選択し、5 月までに 3 施設間のプレバリデーションを完了 (データ確認後) させることになった。

Atlas 社製プレバリデーション用の被験物質は 13 物質とする。バリデーション用被験物質は、市販医薬品から 40~50 化合物を選定することが決まった。

3) その後の動向

第二回会議以降、米国ファイザーの辞退が決まり、静岡県立大学、田辺三菱製薬に加え、新たに食品薬品安全センター秦野研究所の参加が決まった。当初の予定では年度内にバリデーションを開始する予定であったが、トレーニングを兼ねた第一回バリデーション実行委員会を平成 23 年 4 月に開催し、すぐにプレバリデーションを開始することになった。

C-3) ヒトパッチテストの再検討と使用試験

C-3-1) ヒトパッチテスト

ヒトパッチテストについては、陽性コントロール及び陰性コントロールを置いた健常人の予知パッチテストを施行し、パネル間の易被刺激性の指標に有用である可能性が示唆された。

C-3-2) 既存の使用試験の検討

使用試験は 3 社より提供を受けた。使用試験の対象は 1 製品について 20 名から 50 名程度であり、安全性の検討項目も試験により異なっていた。

C-3-3) 携帯電話を利用した使用試験安全管理システム

安全性について合理的な使用試験を行うために、ユビキタス移動体インフラ、すなわち携帯電話等をモバイル端末として、インターネット上に新たなデータベースを構築する仕組みを利用した携帯電話による管理システムを試作した。

C-4) 情報収集

C-4-1) EU における動物実験禁止と代替法開発の動向

欧州において、欧州委員会の保健・消費者保護総局 DG SANCO は 2013 年に禁止される試験について、各試験の専門家の意見を集めた報告書をウェブに掲載し、パブコメを実施したことが挙げられる。この報告書では、動物試験を実施した原料を配合した化粧品の EU 域内での販売が 2013 年に禁止される反復投与毒性、感作性、発癌性、毒物動態、生殖毒性について、2013 年ま

でこれらの試験の代替法の確立は困難と記述されている。2011 年に欧州委員会はこれらの 2013 年に禁止される試験について（禁止を延期するかどうか）の最終報告書を公表予定である。

C-4-2) 米国における代替法開発の動向

①Non- radioisotopic Local Lymph Node Assay (非 RI-LLNA) である LLNA:DA 及び LLNA: BrdU-ELISA が連邦機関に推薦された。②眼刺激性試験に関連し、*in vivo* 眼刺激性試験における局所麻酔及び全身性鎮痛剤の常用と人道的観点、Cytosensor microphysiometer (CM) を水溶性物質や製品を対象として重篤な眼刺激性ポテンシャルを同定することや水溶性界面活性剤や界面活性剤を含む製品の無刺激性の選定に用いること等が連邦機関に推薦された。

C-4-3) その他の国際的な代替法開発の動向

OECD の安全性試験ガイドラインにおける新規試験法としては TG 439 (皮膚刺激性/ 再構築ヒト表皮法)、TG 442A (皮膚感作性/ LLNA: DA 法)、TG 442B (皮膚感作性/ LLNA: BrdU-ELISA 法) 及び TG 487 (*in vitro* 哺乳動物細胞小核試験) の 4 法が採択された。また改定試験法として TG 417 (毒性動態) 及び TG 429 (皮膚感作性/ LLNA 法) の 2 法が採択された。

一方、ICCR のトピックスとしては、ICCR-4 が開催され、昨年同様、代替法に関する議論がなされた。

C-4-4) 日本における代替法開発の動向

JaCVAM では、国際動向への対応、試験法の評価とその活用に向けた作業の強化が求められ、国内外の学会、業界、関係各機関の一層の協力による試験法評価とその活用に向けた活動を継続した。

厚生労働省医薬食品局審査管理課からの事務連絡「医薬部外品の承認申請資料作成時における動物実験代替法の利用と JaVCAM の活用について」(平成 23 年 2 月 4 日付) が通知された。

C-4-5) 化粧品の安全性評価に関連する代替法の状況

欧州委員会及び COLIPA は、5000 万ユーロを投入して反復投与全身毒性の分野での動物実験代替法開発に関する戦略開発を行っている。このプロジェクトは第7次 Framework Programme on Research and Development (FP7) における調整活動である AXLR8 の傘下に入って進められている。

D. 考察

代替法の研究開発において、3次元培養皮膚モデルを用いた *in vitro* 透過性試験を行う際には、これらモデルの特性を十分に把握する必要があると考えられた。また、3次元培養皮膚モデルで評価可能な化学物質の分子量や極性の範囲を把握することで、*in vitro* 透過性試験として3次元培養皮膚モデルが利用できる可能性が示唆された。

また、光毒性試験 ROS assay の結果では gatifloxacin の光毒性リスクが少ないという臨床のデータと矛盾しない結果が得られたが、それ以外の FQ の *in vitro* 光毒性リスクの強弱は臨床データと必ずしも完全には一致していなかった。これら *in vitro* データと臨床データをよりリンクさせるため、本研究では新たにカセットドージングによる薬物動態学的解析を実施し、*in vitro* と *in vivo* データによる decision matrix の構築を試みた。本検討では特に薬物の皮膚移行特性に着目し、ROS assay データと併せて考察することで臨床報告との光毒性予測精度をより高めることに成功した。

眼刺激性試験代替法開発において、正常ヒト角膜輪部組織から分離培養したHCEを用いて、ウイルスベクターを用いることなく、世界で初めて角膜上皮細胞の不死化細胞 (iHCE-NY) の作出に成功した。SV40の導入によって、プロテオミクスの結果ではドラスティックな変化はないことが分かった。

化粧品原料の原体及び化学物質全般を評価できる眼刺激性試験として、従来のNeutral Red法やMTT法のような細胞生物学的手法による有害

性の同定だけでなく、NOAELを求めるための簡便で安価な試験評価系を確立するため、種々のマーカーを検討し、各種被験物質の暴露による細胞に対する影響について、NOAEL (無毒性量) を求めることができるマーカーを絞り込んでいく。また、今後、cHCE-T及びiHCE-NYを用いて、生体の角膜上皮組織に近い三次元角膜再構築モデルの作製を検討する。

以上の結果、代替法の開発が不十分な*in vitro* 試験の開発は順調に進行している。

バリデーションでは、培養表皮モデル (LabCyte EPI-MODEL24) を用いた方法については、2011年1月末にバリデーション報告書をまとめ、OECD事務局に送付した。

一方、STE法については、バリデーション報告書をまとめ、SPSFとともに、OECDに2月中旬に送付した。すでに、今秋より、ICCVAMでのpeer reviewを予定しており、BRD (背景評価文書) の作成を花王とともに進めている。

ROSアッセイについては、光毒性試験としての有用性を確認し、バリデーション実施について検討してきた。ICH実行委員会からの要請もあり、日本製薬工業協会の協力を得て、来年度から開始の目途が立った。

ところで、本研究の目的は、医薬部外品・化粧品の安全性評価に利用できる代替法研究・バリデーションであるが、究極の安全性評価は実際のヒトによる使用目的部位への使用試験につぎる。皮膚の安全性、すなわち、皮膚刺激性や感作性については、経皮吸収が重要であり、それは、皮膚の部位、皮膚の状態によって左右される。このような部位差や皮膚の状態をパッチテストでは再現しにくい現状がある。

このため、企業から提供を受けた医薬部外品の使用試験を調べたが、企業によって、安全性の評価項目や指標が異なっていた。対象の数が20から50と限られており、安全性試験として十分とは言えなかった。

そこで、使用試験の対象を多くし、その管理

を合理的にするために、また、市販後の調査を広くしかも早く的確に把握する目的でユビキタス移動体インフラ：携帯電話を用いた使用試験のシステムを試作した。使用試験の質の向上、試験責任者などへの被験者からのアクセスも迅速に可能で、試験責任者から指示もさせるシステムが完成した。平成 23 年度には、このシステムを使った使用試験による安全性評価方法の開発を行う。また、ヒトパッチテストで評価した医薬部外品・市販外用薬をこのシステムを利用した使用試験により、合理的に評価できるか検討を行う予定である。

これらの検討に加え、欧米で開発される試験法の情報収集を入手し、国際協調を重視し、医薬部外品・化粧品の安全性評価試験法の再評価を進めることができた。

E. 結論

- 1) 3次元培養皮膚モデルを用いた *in vitro* 透過性試験を行う際には、これらモデルの特性を十分に把握する必要がある。
- 2) 今回開発した光毒性評価方法 (ROSアッセイ) はスルーアウトならびに臨床との関連性も高く、創薬初期段階で複数の化合物の光毒性リスク評価に有用なスクリーニング系であると考えられる。
- 3) 正常ヒト角膜輪部組織から分離培養したHCEを用いて、ウイルスベクターを用いることなく、世界で初めて角膜上皮細胞の不死化細胞 (iHCE-NY) の作出に成功した。SV40の導入によって、プロテオミクスの結果ではドラステックな変化はないことが分かった。
- 4) 皮膚刺激性試験代替法 LabCyte EPI-MODEL24 を用いた方法及び眼刺激性試験代替法 STE 法のバリデーションを実施し、どちらも計画通り実験を実施でき、想定内の結果を得ることができた。これらの結果を受け、両バリデーション報告書を OECD 事務局に提出した。
- 5) ROSアッセイの活用を念頭に、日本製薬工業協会 基礎研究部会の協力を得て、新たな光毒性試験方法のバリデーション実施の可能性を探った。バリデーション実施に向け、光照射装置の機種差など解決すべき多くの点について、準備委員会で議論を重ね、来年度から開始の目途が立った。
- 6) ヒトパッチテストについては、パネル間の易被刺激性の指標に有用である可能性が示唆された。
- 7) 使用試験については、安全性の検討項目も試験により異なっていた。安全性について、より合理的な使用試験を行うための、携帯電話を利用した管理システムを試作した。
- 8) 本年度の代替法の開発と評価に関する進展を概観すると、新規試験法のガイドライン化の観点では、2010年7月に再構築ヒト表皮試験が OECD テストガイドライン 439 として、LLNA : DA が 442A として、LLNA : BrdU-ELISA が 442B として、*in vitro* 哺乳類細胞小核試験が 487 として採択されたことが挙げられる。また、OECD テストガイドライン 429 が改訂され rLLNA が加えられた。
- 9) 代替法開発体制の観点からは、EU において第 7 次 FP7 として 2010 年 1 月より AXLR8 (accelerate) という代替法開発の調整活動が動き出した。また、2010 年 7 月 13 日～15 日に第 4 回化粧品規制協力国際会議 (ICCR-4) がトロント (カナダ) で開催され、規制当局は ICATM の活動への協力、調整、支援を継続することについて合意した。
- 10) 代替法の活用の観点では、ICCR 等の国際協調の流れを受けて、平成 23 年 2 月 4 日付で厚生労働省医薬食品局審査管理課から事務連絡「医薬部外品の承認申請資料作成時における動物実験代替法の利用と JaCVAM の活用について」が通知された。
- 11) 2011 年に欧州委員会は 2013 年に禁止される試験について (禁止を延期するかどうか) の

最終報告書を公表予定である。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

- 1) Kano S., Todo H., Sugie K., Fujimoto H., Nakada K., Tokudome Y., Hashimoto F.: Utilization of Reconstructed Cultured Human Skin models as an Alternative Skin for Permeation Studies of Chemical Compounds, *AATEX*, 15, 61-70 (2010).
- 2) Todo H., Kimura E., Yasuno H., Tokudome Y., Hashimoto F., Ikarashi Y., Sugibayashi K.: Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through skin, *Biol. Pharm. Bull.*, 33, 1394-1399 (2010).
- 3) Onoue, S., Takahashi, H., Kawabata, Y., Seto, Y., Hatanaka, J., Timmermann, B., Yamada, S.: Formulation design and photochemical studies on nanocrystal solid dispersion of curcumin with improved oral bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99: 1871-1881 (2010).
- 4) Kawabata, Y., Yamamoto, K., Debari, K., Onoue, S., Yamada, S.: Novel crystalline solid dispersion of tranilast with high photostability and improved oral bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39: 256-262 (2010).
- 5) Onoue, S., Ochi, M., Gandy, G., Seto, Y., Igarashi, N., Yamauchi, Y., Yamada, S.: High-throughput screening system for identifying phototoxic potential of drug candidates based on derivatives of reactive oxygen metabolites. *Pharmaceutical Research*, 27: 1610-1619 (2010)
- 6) Seto, Y., Ochi, M., Onoue, S., Yamada, S.: High-throughput screening strategy for photogenotoxic potential of pharmaceutical substances using fluorescent intercalating dye. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52: 781-786 (2010)
- 7) Seto, Y., Ochi, M., Igarashi, N., Inoue, R., Oishi, A., Toida, T., Yamada, S., Onoue, S.: *In Vitro* Photobiochemical Characterization of Sulfobutylether- β -cyclodextrin Formulation of Bufexamac. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, in press
- 8) 尾上 誠良:「最前線:薬剤性光線過敏症」*ファルマシア* (日本薬学会), 47: 295-300.
- 9) Yamamoto N., Hirano K., Kojima H., Sumitomo M., Yamashita H., Ayaki M., Taniguchi K., Tanikawa A., and Horiguchi M.: Cultured human corneal epithelial stem/progenitor cells derived from the corneal limbus. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 46 (9), 774-780, 2010.
- 10) Kojima, H.: Commentary to the Discussion on Topics 3. "In Vitro Test Approaches with Better Predictivity" at the 5th International Workshop on Genotoxicity Testing, Genes and Environment, 32 (2), 40-42 (2010)
- 11) 小島肇夫:総合評価の方法、有用性化粧品の処方とその活用、鈴木正人監修、シーエムシー出版、東京、pp.147-151 (2010)
- 12) Kojima, H., Takeyoshi, M., Sozu, T., Awogi, T., Arima, K., Idehara, K., Ikarashi, Y., Kanazawa, Y., Maki, E., Omori, T., Yuasa, A., Yoshimura, I.: Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. *J Appl Toxicol.* 31 (1) 63-74 (2010)
- 13) Kojima, H.: 3Rs Activities in Japan, AVLR8 Alternative Testing strategies, Progress report 2010, 266 (2010)
- 14) 小島肇夫:パイロジェン試験、大阪医薬品協

会 会報第 745 号 31-63 (2011)

- 15) 小島肇夫: 動物実験代替法の現状と展望、創薬研究のストラテジー、pp. 41-48、株式会社金芳堂、京都 (2011)
- 16) 小島肇夫: 動物実験の 3R における国内外の動向、ドージンニュース No. 138、1-9 (2011)
- 17) 柘植英哉、森充生、大庭澄明、大内正、寺田三郎、五島隆志、田邊豊重、山影康次、田中憲穂、渡辺美香、畔上二郎、大向英夫、小島肇: 平成 21 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告、輸液用ゴム栓試験法の見直し (第 3 報) -細胞毒性試験法の検討-、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 42 (3) 258-271 (2011)
- 18) 矢上晶子、松永佳世子: 皮膚検査法の実際パッチテスト・プリックテスト、皮膚病診療 32 : 67-70 (2010)
- 19) 松永佳世子: イラストでみる病態生理・治療接触皮膚炎 Allergia Trends 12:14-17 (2010)
- 20) 矢上晶子、松永佳世子: パッチテストをどう活かすか 産学官連携の取組み、アレルギーの臨床 787-789 (2011)
- 21) 廣川景子、亀山梨奈、中川真実子、井上智子、安部正通、稲葉弥寿子、山北高志、森 敏恵、鈴木加余子、松永佳世子: 化粧品パッチテスト 2007 のまとめ J Environ Dermatol & Cutan 4:89-98 (2010)
- 22) Miura M, Isami M, Yagami A, Matsunaga K.: Allergic contact chilitis caused by ditrimethylpropane triethylhexanoate in a lipstick. Contact Dermatitis 64:301-302 (2011)
- 23) Furue M, Yamazaki S, Jimbow K, Tsuchida T, Amagai M, Tanaka T, Matsunaga K, Muto M, Morita E, Akiyama M, Soma Y, Terui T, Manabe M. Prevalence of dermatological disorders in Japan: A nationwide, cross-sectional, seasonal, multicenter hospital-based study. J Dermatol.
- 24) Hagino, S., Okazaki, Y., Kitagaki, M. and

Itagaki, H. Further verification of an in vitro tier system for the identification of cosmetic ingredients that are not ocular irritants. Altern Lab Anim 38, 139-152. 2010.

- 25) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N. and Itagaki, H. A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern Lab Anim 38, 275-284. 2010.
- 26) Hirota, M., Motoyama, A., Suzuki, M., Yanagi, M., Kitagaki, M., Kouzuki, H., Hagino, S., Itagaki, H., Sasa, H., Kagatani, S. and Aiba, S. Changes of cell-surface thiols and intracellular signaling in human monocytic cell line THP-1 treated with diphenylcyclopropanone. J Toxicol Sci 35, 871-879, 2010.
- 27) Kagatani, S., Sasaki, Y., Hirota, M., Mizuashi, M., Suzuki, M., Ohtani, T., Itagaki, H. and Aiba, S. Oxidation of cell surface thiol groups by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. The Journal of Investigative Dermatology, 130, 175-183, 2010.

F-2. 学会発表

- 1) Hiroaki Todo, Kenji Sugibayashi,: Utilization of reconstructed cultures human skin models as an alternative membrane for skin permeation study of chemicals, 日本薬物動態学会 25 回年会、Saitama, (2010. 10).
- 2) 藤堂 浩明、培養皮膚を用いた皮膚刺激性試験により false-positive/-negative を引き起こす原因について: 皮膚中濃度を用いた解析、第 2 回経皮投与製剤 FG シンポジウム、神奈川、(2010. 10)

- 3) 古井 克典、藤堂 浩明、杉林 堅次：三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験結果に及ぼす皮膚バリア機能及び代謝能の影響、第 23 回日本動物実験代替法学会、東京、(2010. 12)
- 4) 古井 克典、藤堂 浩明、杉林 堅次：三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験結果に及ぼす皮膚バリア機能及び代謝能の影響、日本薬学会第 131 年会、静岡、(2011. 3).
- 5) 世戸孝樹、越智幹訓、尾上誠良、山田静雄：創薬支援のための光線過敏症リスク評価に関する薬剤科学的研究 (8) -新規 *in vitro* 光遺伝毒性リスク評価ツールの開発-, 日本薬剤学会第 25 年会 (徳島), 要旨集 p. 233, (2010. 5)
- 6) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Tyo Inoue, Graham Gandy, Satomi Onoue and Shizuo Yamada: Combined use of photobiochemical and cassette dosing pharmacokinetic data for predicting phototoxic potential of pharmaceutical chemicals., 25th JSSX Annual Meeting in Tokyo. (Tokyo), Abstr. P. 238, (2010. 10)
- 7) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Hideyuki Ito, Tsutomu Hatano, Satomi Onoue and Shizuo Yamada: Safety assessments on nutraceuticals: Phototoxic potential of St. John's Wort. 3rd International Conference on Health and Longevity Sciences. (Shizuoka), Abstr. p. 34, (2010. 10)
- 8) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Gandy Graham, Satomi Onoue, and Shizuo Yamada: New screening strategy for predicting *in vivo* phototoxic risk of fluoroquinolones using photobiochemical and cassette dosing pharmacokinetic data, FIP PSWC 2010/AAPS Annual Meeting and Exposition (New Orleans, US), (2010. 11)
- 9) 井上僚、世戸孝樹、越智幹記、尾上誠良、山田静雄：光毒性リスク回避を指向した Bufenamac のサイクロデキストリン製剤開発、日本薬学会東海支部例会 (静岡), 講演要旨集 p. 93, (2010. 11)
- 10) 山本直樹、谷川篤宏、内藤紘策、綾木雅彦、小島 肇、平野耕治、堀口正之：マウス水晶体上皮細胞の不死化細胞の作出、第114回 日本眼科学会総会 (2010. 4)
- 11) 山本直樹、平野耕治、小島肇、綾木雅彦、住友万里子、山下宏美、大野亜由美、田島香里、谷川篤宏、谷口孝喜、堀口正之：ヒト角膜輪部由来角膜上皮細胞の分離・培養、第 83 回日本組織培養学会 (2010. 5)
- 12) 大野泰雄：代謝物の安全性評価と FDA 及び ICH の指針について、第 37 回日本トキシコロジー学会シンポジウム (2010. 6)
- 13) 大野泰雄：「動物の愛護及び管理に関する法律」(動愛法) の改定に向けて。日本動物実験代替法学会 第 2 3 回大会シンポジウムのオーガナイズ (2010. 12)
- 14) 大野泰雄：薬理学における動物実験代替法研究の重要性、日本薬理学会 (2010. 3.)
- 15) 小島 肇：ヒト iPS 細胞を用いた新規 *in vitro* 毒性評価系の構築、日本製薬工業協会セミナー (2010. 5)
- 16) 小島 肇：パネルディスカッション 新しい感作性及び局所刺激性(皮膚・眼)試験法の OECD テストガイドライン、日本トキシコロジー学会学術年会、沖縄 (2010. 6)
- 17) 小島 肇：医薬部外品、化粧品の Regulatory Science の展望、第 11 回光老化研究会、東京慈恵会医科大学 (2010. 7)
- 18) Kojima.H. : Global impact of 3'Rs on regulatory process: sharing experiences and future trends. XII International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010. 7)
- 19) Kojima.H., Inoue, T. and Ohno. Y. : JaCVAM's role of new alternatives to animal testing and international harmonization. XII International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010. 7)

- 20) 小島 肇：昨今の国際バリデーション研究の進捗，皮膚基礎研究クラスターフォーラム 第5回教育セミナー (2010. 8)
- 21) 小島 肇：皮膚感作性試験のインビトロ代替法の現状，日本免疫毒性学会学術大会，独立行政法人国立環境研究所 大山記念ホール (2010. 9)
- 22) Kojima, H., Arai, S. and Hojyo M. : Importance of each human model and the optimal protocol for regulatory use of skin irritation assay. The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Hokkaido University, Sapporo, Japan (2010. 9)
- 23) 小島 肇：パイロジェン試験，大阪医薬品協会技術研究委員会，大阪 (2010. 10)
- 24) 小島 肇、北條麻紀：3次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイの条件検討 第3報，日本環境変異原学会第39回大会，つくば (2010. 11)
- 25) 宇野芳文、小島 肇：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 (第2報)，日本環境変異原学会第39回大会，つくば (2010. 11)
- 26) 小島 肇、中村 牧、山口能宏、泉 瑠名、鈴木民恵、萩原沙織、篠田伸介、加藤雅一：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，日本動物実験代替法学会第23回大会，東京 (2010. 12)
- 27) 小島 肇、桑原裕史、林卓巳、坂口眞由美、豊田明美、後藤 悠、中村恒彰、渡辺真一、阿彦恭子、大森 崇、音泉 卓、寒水孝¹⁾、森本隆史、林 和彦、坂口 斉：眼刺激性試験代替法 (STE 試験) バリデーション研究 第3報，日本動物実験代替法学会第23回大会，東京 (2010. 12)
- 28) 小島 肇、北條麻紀：3次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイの条件検討日本動物実験代替法学会第23回大会，東京 (2010. 12)
- 29) 小島 肇：S5 化学物質の有害性評価に関する代替試験法開発—発癌性、発生毒性、免疫毒性—今後の展望，日本動物実験代替法学会第23回大会，東京 (2010. 12)
- 30) 小島 肇：培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価の現状，第10回ヒューマンサイエンス研究資源バンクセミナー，大阪 (2011. 1)
- 31) 小島 肇：動物実験代替法における国際動向，日本動物実験代替法学会・JaCVAM 合同ワークショップ 動物実験の3Rにおける国際動向，東京 (2011. 2)
- 32) 小島 肇：皮膚細胞研究の応用とその可能性，日本化粧品技術者会大阪支部 第15回勉強会ワークショップ，大阪 (2011. 2)
- 33) Kojima, H. : The Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) : Recent ICATM contributions and Future Plans, Information Session: The International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM) : Translating Science to Provide Improved Public Health Safety Assessment Tools, 50th Annual SOT meeting, Washington D. C (2011. 3)
- 34) Kojima, H. and Hojyo, M. : Optimal conditions for performance of the comet assay using a three-dimensional human epidermal model, 50th Annual SOT meeting, Washington D. C. (2011. 3)
- 35) W Casey, P Ceger, F Deal, D Allen, G Clark, P Pazos, E Grignard, J de Lange, S Bremer, M Nakamura, H Kojima, A Ono, W Stokes. : Final Results of an International Validation Study of an *In Vitro* ER TA Test Method in BG-1 cells, 50th Annual SOT meeting, Washington D. C. (2011. 3)

36) J Kulpa-Eddy, R McFarland, R Isbrucker, M Halder, H Kojima, B Jones, NW Johnson, D Allen, E Lipscomb, S Morefield, W Casey, W Stokes: International Workshop on Alternative Methods to Reduce, Refine, and Replace the Use of Animals in Vaccine Potency and Safety Testing, 50th Annual SOT meeting, Washington D.C. (2011.3)

37) F. Deal, W. Casey, P. Ceger, D. Allen, C. Yang, M. Nakamura, H. Kojima, A. Ono, H. Yoon, S. Han, W. Stokes: International Validation Study of an in vitro Cell Proliferation Test Method for Screening Potential Estrogenic Agonists and Antagonists in MCF - 7 cell, 50th Annual Meeting of Society of Toxicology (Washington DC, USA) 2011.3

38) 小島 肇: 日本における動物実験代替法の現状、シンポジウム S2H27 アジアにおける動物実験代替法の展開、第84回日本薬理学会年会、パシフィコ横浜 (2011.3)

39) 小島 肇: 動物実験代替法の行政的受け入れと国際協調、シンポジウム S30 レギュラトリーサイエンスは社会にどう役立っているかー葉

学系人材の役割と活躍の場を知るー、日本薬学会第131回年会、静岡 (2011.3)

40) 廣田衛彦、本山晃、萩野滋延、上月裕一、板垣宏、佐々齊、相場節也: 細胞表面-SH基を指標とした感作性試験代替法 (SH test) に関する基礎検討、日本トキシコロジー学会第37回学術年会 (2010.6)

41) 萩野滋延、松元有羽子、北垣雅人、吉田剛、板垣宏: 細胞毒性試験による眼刺激性のリスク評価、日本動物実験代替法学会第23回大会 (2010.12)

G. 知的所有権の取得状況

G-1. 特許取得

特になし

G-2. 実用新案登録

特になし

G-3. その他

特になし

分担研究報告書

分子生物学的・組織化学的手法を用いた眼刺激性試験・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 共同利用研究施設 講師）

研究協力者 山下 宏美、住友 万里子、田島 香里、中村 政志、原 和宏、
綾木 雅彦、谷川 篤宏、谷口 孝喜、堀口 正之、平野 耕治

研究要旨

【背景と目的】化粧品や医薬部外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試験法に着目し、有害性の同定のための代替法として3次元培養モデルを用いた眼刺激性代替法の開発だけでなく、NOAEL（無作用量）を求める方法を開発する。

【材料と方法】山本が開発した方法で正常角膜輪部組織から分離培養した正常ヒト角膜上皮細胞（HCE）に不死化遺伝子のSV40 Large T Antigen（SV40）を導入し作出した不死化ヒト角膜上皮細胞（iHCE-NY）および不死化細胞の対照株としての不死化ヒト角膜上皮細胞株（HCE-T）を用いた。まずヒト角膜上皮細胞由来の不死化細胞作出の為に、SV40を組み込んだGFPベクターの構築と新しいエレクトロポレーション法による遺伝子導入を行い、得られたPolyclonalな状態のiHCE-NYからクローニング（200株）と選出を行った。選出したクローンを用いて、Karyotype、プロテオミクスなどの解析を開始した。HCE-Tについても独自の技術で追加クローニングを行った。また、高感度で簡便な試験評価系とマーカーの開発にむけた予備実験を開始した。さらに追加クローニングを行ったHCE-Tを用いて三次元角膜再構築モデルの作製に関する予備実験を行った。

【結果】ベクターのGFPの直前にIRESを挟まずSV40をインサートして作製したプラスミドベクターを用いることで、HCEにSV40を導入しGFP蛍光を発する細胞を作製できた。Polyclonalな状態からクローニングして選出した細胞は、染色体のモードが46であり、プロテオミクスの結果からHCEやHCE-Tと比較してdrasticなスポット変化はなかった。追加クローニングしたHCE-Tを用いて三次元角膜再構築モデルを作製することができた。

【展開】iHCE-NYの二次元培養モデルでの検出指標の検索、三次元角膜再構築モデルの検討を行っていく。

A. 背景と目的

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。

Draize法の代替試験法として、様々な報告がされている。ウシ角膜組織を用いたBCOP法やニワトリ眼球を用いたICE法などは、腐食性や強刺激性物質の評価に適した試験法であるが、実際に試験を実施できる施設が限定的であり、現状において日本国内での実施は困難な状況である。

ウサギ角膜上皮細胞を用いた試験法としては、SIRC法やSTE法などがある。非刺激性物質の検出を主目的としたボトムアップのアプローチによる眼刺激性試験の第1段階としての評価試験として位置づけされている。使用されている細胞は、ウサギ角膜上皮由来細胞であり、後の研究で明らかとなったことであるが、元々角膜上皮細胞を採取したウサギがウイルス感染していたため、結果としてある意味“不死化”したウサギ角膜上皮細胞(SIRC)を用いている。細胞の操作性、増殖性、培養条件などは非常に容易であり、多くの施設でSIRCを用いた試験を導入することができる。

既報の不死化ヒト角膜上皮細胞としては、日本ではHCE-Tがある。ヨーロッパにも同様の不死化ヒト角膜上皮細胞が報告されているが、殆どの場合、不死化遺伝子(SV40)を角膜上皮細胞内へ導入する際、従来のエレクトロポレーション法やリポフェクシ

ン法では遺伝子が導入できないため、生ウイルスを用いた遺伝子導入が用いられている。HCE-Tも遺伝子導入時には生ウイルスを用いた感染導入法が用いられているが、現在供給される段階において、ウイルス粒子の産生を認めていないが、本来であればP2実験室での使用が望ましいこととなる。さらにHCE-Tは、樹立当時は重層化能をもっていたようであるが、一部の報告で重層化しないか、重層化し難いことが報告されている。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。

三次元モデルを用いた試験法としては、MATREXなどがあり、非刺激性物質の検出を目的としている。MATREXは、ヒト皮膚線維芽細胞を含んだコラーゲンゲルで作製されている。

本研究期間では、化粧品や医薬部外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刺激性試験法に着目し、分子生物学的・組織化学的手法を用いた眼刺激性試験・眼毒性試験代替法を開発するという目的に基づき、化粧品原料の原体および化学物質全般を評価できる眼刺激性試験として、有害性の同定だけでなく、NOAELを求めるための簡便で安価なヒト角膜3次元培養モデルの開発を行う。

平成22年度の具体的な研究課題は、以下のとおりである。

1. 不死化遺伝子のSV40 Large T Antigen (SV40)を組み込んだGFPベクターの構築。
2. 構築したプラスミドベクターを用いて、ヒト角膜上皮細胞由来の不死化細胞を作出する。
3. 作出された不死化ヒト角膜上皮細胞(iHCE-NY)のクローニングと細胞選出。
4. 選出したクローンの解析。
5. 不死化細胞の対照として使用する

HCE-Tの追加クローニング。

6. 高感度で簡便な試験評価系とマーカーの開発にむけた予備実験。
7. 追加クローニングを行ったHCE-Tを用いて三次元角膜再構築モデルの作製に関する予備実験。

B. 材料・方法・結果

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。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

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）とHCEに不死化遺伝子を導入して作製した不死化ヒト角膜上皮細胞（iHCE-NY）を用いた。なお生ウイルスを用いてSV40を導入したが、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）を不死化細胞の対照として用いた。

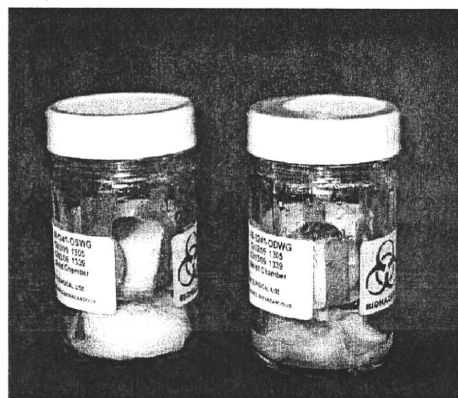
HCEの初代分離培養には、PCT Corneal

Epithelium Medium（CnT-20；CELLnTEC Advanced Cell Systems, Bern, Switzerland）を使用し、不死化遺伝子導入後は血清含有培地で培養した。

B-3. HCEの初代分離培養

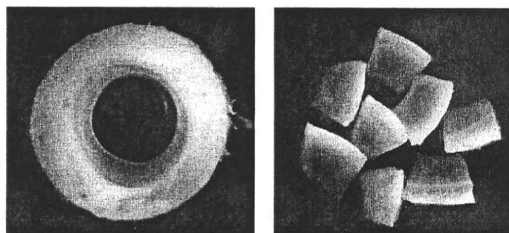
研究目的での使用として米国アイバンク（Northwest Lions Eye Bank）より眼球を購入し、研究に用いた。

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℃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。

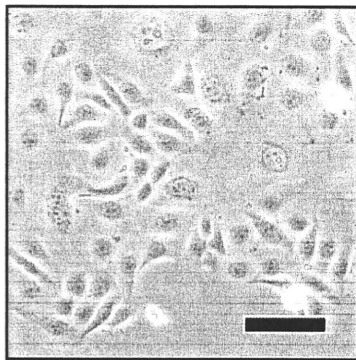


CnT-20を用いて培養した細胞を用いて、不死化遺伝子のSV40 Large T Antigen（SV40）の導入実験と不死化角膜上皮細胞の作出を行った。なお、ヒト角膜輪部組織

から正常ヒト角膜上皮幹/前駆細胞の分離・培養法に関する詳細は、論文として報告した。(Yamamoto N, Hirano K, Kojima H, Sumitomo M, Yamashita H, Ayaki M, Taniguchi K, Tanikawa A, Horiguchi M. Cultured human corneal epithelial stem/progenitor cells derived from the corneal limbus. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 46 (9), 774-780, 2010.)

B-4. HCE-T の追加クローニング

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を開始した。



上記写真のように、様々な形態をしている細胞が観察されたため、まずセルソーターを用いて細胞を選択することとした。具体的には、細胞の大きさと細胞内構造および上皮系・間葉系幹/前駆細胞マーカーの1つである CD29 (Integrin $\beta 1$) の発現量の

違いで細胞を分取した。

次に分取した細胞を限界希釈法によるクローニングを試みたが、従来の方法で培養すると細胞増殖性が著しく低下することが判明したため、従来の限界希釈法よりも多い細胞数を播種し、その後レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LMD) を用いて細胞の形態で判断しながら細胞のクローニングを行った。

B-5. 発現プラスミドベクター

B-5-1. 発現プラスミドベクターの構築

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、不死化遺伝子 (SV40 Large T antigen : SV40) を定常的に発現する Green Fluorescent Protein (GFP) ベクターに組み込んだ発現プラスミドベクターを厚生労働科学研究費補助金の医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業(国際協調を重視した化粧品・医薬部外品における安全性試験法の再評価に関する研究〔H22-医薬一般-002〕)で開発した。

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) および