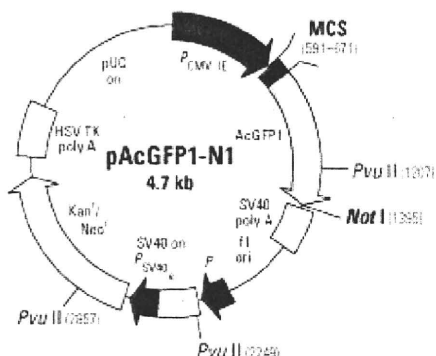


NCBIに登録されたアミノ酸配列 (Accession Number : NP\_043127) の非翻訳領域を除いて作成したベクター (SV40 Large T antigen ORF - GFP ベクター) を構築した。



さらに今年度ではpAcGFP1-N1ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) にSV40を導入し、IRESを介さずGFPにつなぎ、発現プラスミドベクターを作製した。

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 antigen (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) : VG0402より購入) を用いた。

#### B-5-2. 発現プラスミドベクターの確認

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。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 (pAcGFP1-N1) のマルチクローニングサイトを制限酵素 (EcoRI / BamHI) 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と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-5-3. 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-6. iHCE-NY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 (iHCE-NY) を初回の細胞選択で薬剤選択を行い、その後はセルソーター (FACS Vantage SE ; BD) を用いて、GFPの蛍光で9回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場合と初回の細胞選択で薬剤選択を行わず、全てセルソ

ーターを用いて GFP の蛍光で 10 回セルソーティングを行い遺伝子導入細胞の選択を行い、結果を比較した。

正常ヒト角膜上皮細胞 (HCE)、初回の細胞選択において薬剤選択を行った代表的なクローン (iHCE-NY 090409) と薬剤選択を行わなかった代表的なクローン (iHCE-NY 090502) および対照の不死化角膜上皮細胞 (HCE-T) を用いて、核型解析 (Karyotype) とプロテオミクスを行い、比較検証した。

#### B-6-1. 核型解析 (Karyotype)

カリオタイプは種ごとに一定であり、ヒトの 2 倍体細胞は 22 対の常染色体と 1 対の性染色体、計 46 本の染色体を持つ。不死化遺伝子の導入により正常の染色体の状態ではないが、出来る限り正常の染色体数に近い細胞クローンを選出することが望ましい。そこで、得られたクローンについての核型解析を行った。

実際の核型解析の手法は、以下のとおりである。

1. 培養中の細胞に対して、コルセミド溶液を最終濃度 0.06  $\mu\text{g/ml}$  になるように加える。
2. 添加後、16 時間培養を続ける。
3. 0.075M KCl を加える (低張処理)。
4. 継代の常法に従って細胞を 15 ml 遠心チューブに回収。遠心、PBS で洗浄・遠心後、Trypsin-EDTA で処理し、細胞を単一分散する。
5. 遠心して上澄みを吸引する。
6. 低張液処理 37°C に加温した 5 ml の塩化カリウム溶液に細胞をごく軽いピペティングで浮遊させる。

7. 37°C 恒温槽で 10 分間静置。
8. 5 ml の低張塩化カリウム液に対して 0.5 ml のカルノア固定液を加え、転倒混和する。
9. 室温で 5 分静置。遠心 1,000 rpm, 5 min 後に、上清を吸引する。
10. 5 ml のカルノア固定液を加え、転倒混和する。
11. 室温で 5 分静置。遠心 1,000 rpm, 5 min 後に、上清を吸引する。
12. 5 ml のカルノア固定液を加え、転倒混和する。
13. 室温で 5 分静置。遠心 1,000 rpm, 5 min 後に、上清を吸引する。
14. 低張液と同量のカルノア固定液を加え、転倒混和する。
15. 室温で 5 分静置。遠心 1,000 rpm, 5 min 後に、上清を吸引する。
16. 細胞を 1ml のカルノア固定液に浮遊させる。
17. エタノールで清拭し乾燥させたスライドガラスの上に、1 滴を数 cm 上方より滴下することで展開し、メタノール固定後にギムザ染色して検鏡する。

#### B-6-2. プロテオミクス (プロテオーム解析)

プロテオーム (Proteome) とは、ある組織や細胞に存在しているタンパク質の総体である。複数の組織や細胞の間でプロテオームを比較することにより、生命現象を総合的に理解することが可能となる。プロテオームを扱う解析をプロテオミクスと言う。

実際のプロテオミクスの手法は、以下のとおりである。

1. サンプルを溶解し、分子量と等電点による 2 次元電気泳動を行う。

2. Image analyzer Typhoon 9400 を用いてスポットの検出を行う。
3. Image master 2D Platinum DeCyder 2D のソフトウェアを用いてスポット分析を行う。
4. スポットを回収し、ゲル内プロテアーゼ処理を行う。
5. Multi dimensional HPLC Paradigm と ESI イオントラップ型質量分析装置を用いて質量分析 (LC/MS/MS) を行う。
6. データベースと照合し、Mascot Search を行い、スポットの同定を行う。

#### B-7. 高感度で簡便な試験評価系とマーカーの開発に関する予備実験

従来の手法では、 $10^4$  個の細胞から遺伝子 (total-RNA) を抽出し、逆転写反応を行い、その後目的遺伝子の Primer & Probe を用いてリアルタイム PCR を行っていた。

1. 細胞( $10^4$  cells)より遺伝子抽出
2. 逆転写反応 (cDNA の作製)
3. 前増幅反応 (Pre-Amp PCR)
4. リアルタイム PCR を実施

従来法の場合、試薬反応時間等だけでも7時間以上かかっており、コストも 200test で 200,000 円以上かかっていた。

そこで、様々なメーカーから販売されている試薬と組み合わせを検討した結果、細胞を溶解して遺伝子 (total-RNA) を取り出し、Primer & Probe set を用いた 1 step RT real time PCR を行う新しい手法を考案した。

1. 細胞( $10^4$  cells)より遺伝子抽出
2. Probe を用いた 1step RT-real time PCR を実施

この手法であれば、2ステップで終了し、時間もおよそ3時間以内で終了する。コストは 200test で 100,000 円以下に抑えることができる。

一方、評価マーカーとしては、角膜上皮細胞で検出されるマーカーを中心に検討した。

#### B-8. 追加クローニングした HCE-T による三次元角膜再構築モデルの作製に関する予備実験

追加クローニングした HCE-T による分化能 (細胞重層化能) を評価した。

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、既報のようにエアリフト法による培養を行い、分化能 (細胞重層化能) を評価した。

(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。

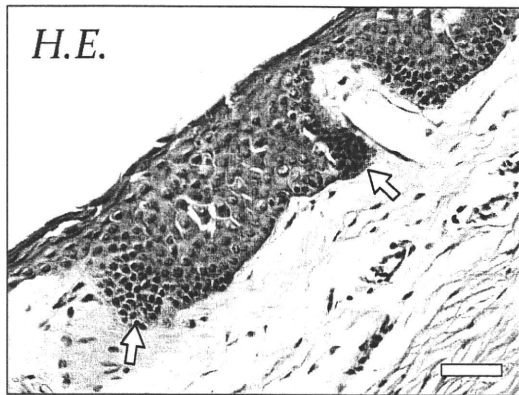
### C. 研究結果

#### C-1. ヒト角膜輪部組織の細胞

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。

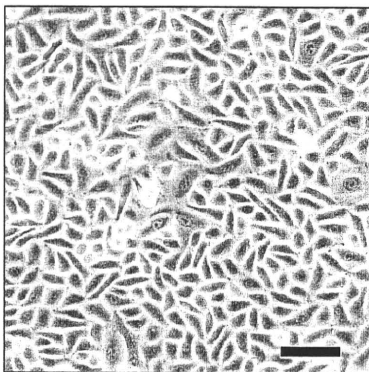
角膜輪部組織の組織切片標本をヘマトキ

シリン・エオジン (H.E.) 染色したところ、角膜上皮の基底部領域の細胞で、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) 細胞集団が存在していた。



### C-2. HCEの初代分離培養

研究目的で米国アイバンク (Northwest Lions Eye Bank) より購入した眼球組織の角膜輪部より角膜上皮幹/前駆細胞の分離を行った。

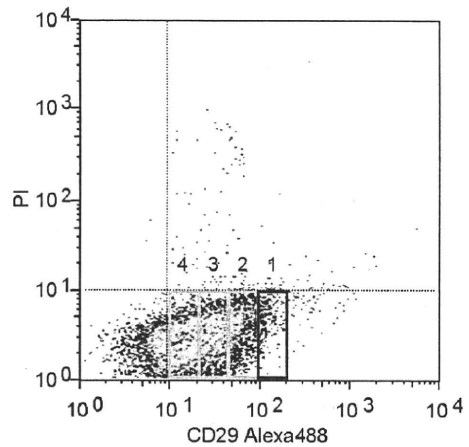
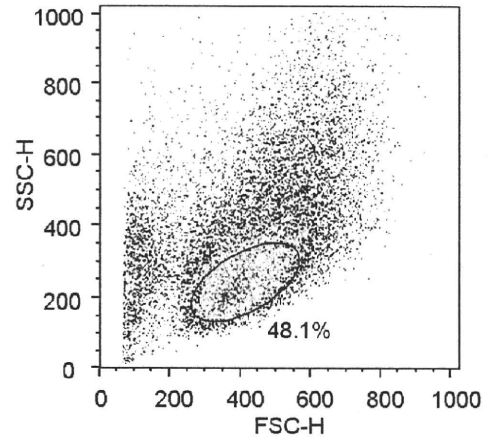


分離培養した HCE は、4 継代目までは上皮細胞様の多角形の細胞形態を呈しており、6 継代目ぐらいから一部の細胞で紡錘形の形態に変化するものも観察された。

### C-3. HCE-T の追加クローニング

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

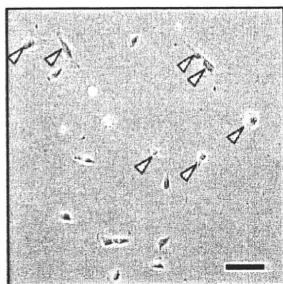
細胞を分取した。細胞の大きさを反映する前方散乱光: Forward Scatter (FSC)、細胞内の構造や顆粒の状態を反映する側方散乱光: Side Scatter (SSC) および CD29 の発現強度について、いくつかの条件でソーティングした。



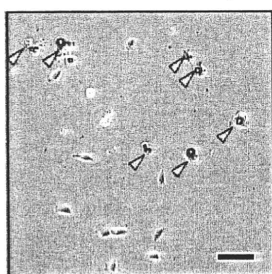
結果として、FSC mid、SSC small で CD29 の発現が最も強いフラクションから分離した細胞を用いることとした。

次に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。

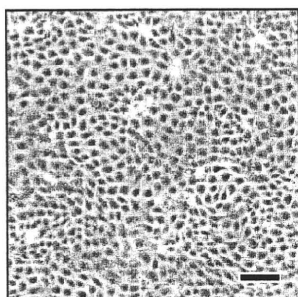
レーザー照射前



レーザー照射後



目的細胞以外の細胞を LMD のレーザーで照射することにより、細胞個々のレベルで選択することができるようになった。



#### C-4. 発現プラスミドベクターの構築と導入

終止コドンを除く SV40 Large T antigen 遺伝子の翻訳領域 (2,479bp) を増幅した。ベクター-DNA (pAcGFP-N1) のマルチクローニングサイトを制限酵素 (EcoR I / BamH I) で処理し、PCR で増幅させた SV40 Large T antigen 遺伝子を In-Frame となるように挿入し、IRES を介さず GFP につなぎ 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と SV40 Large T Ag 遺伝子の発現

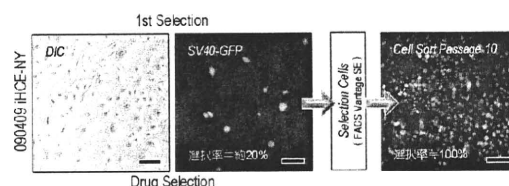
を確認するための Primer を作製し、Sequencer を用いて片鎖解析による塩基配列のシーケンスを行い、SV40 Large T antigen 遺伝子が In-Frame で挿入されており、IRES を介さず GFP につなぎ、ligation できたことを確認した。作製した Vector の全シーケンスデータを添付資料①に示した。

平成 21 年度の厚生労働科研で開発した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を用いて、HCE 細胞に SV40 Large T antigen を導入した。

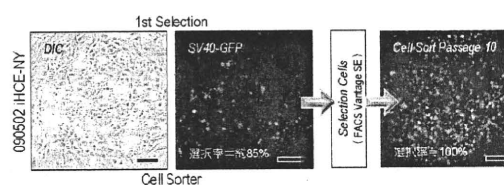
#### C-5. iHCE-NYの選択分離と細胞特性

初回の細胞選択で薬剤選択を行い、その後はセルソーター (FACS Vantage SE ; BD) を用いて、GFP の蛍光で9回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代表的なクローン (iHCE-NY 090409) と初回の細胞選択で薬剤選択を行わず、全てセルソーターを用いて GFP の蛍光で10回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代表的なクローン (iHCE-NY 090502) が作製された。

##### iHCE-NY 090409

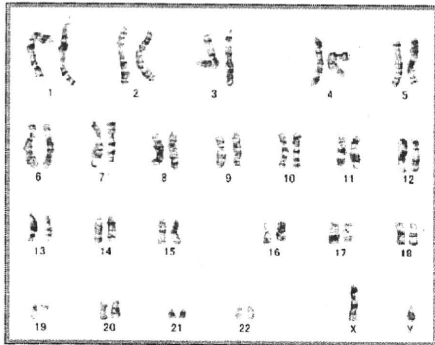


##### iHCE-NY 090502

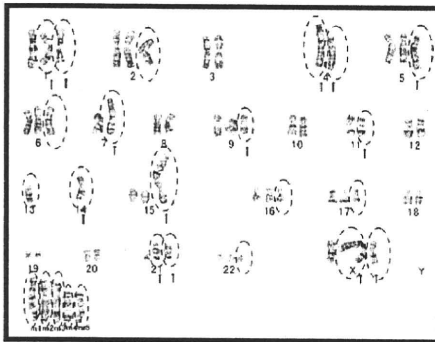


### C-5-1. 核型解析 (Karyotype)

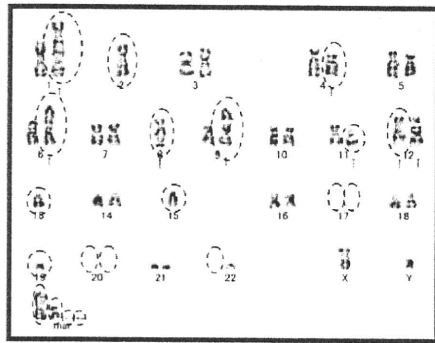
HCE、HCE-T、iHCE-NY 090409 およ  
び iHCE-NY 090502 の核型解析を行った。



HCE は、Mode=46 であった。

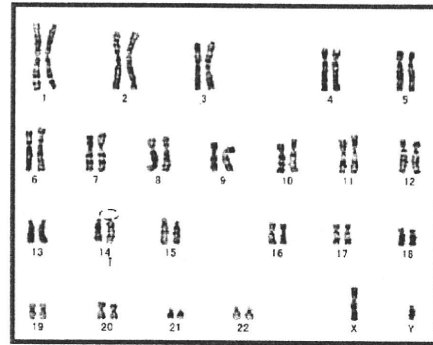


HCE-T は、Mode=59 であった。



iHCE-NY 090409 は、上記の結果にもあ

るように Mode の判定が不可能であり、34  
~89 まで様々であった。



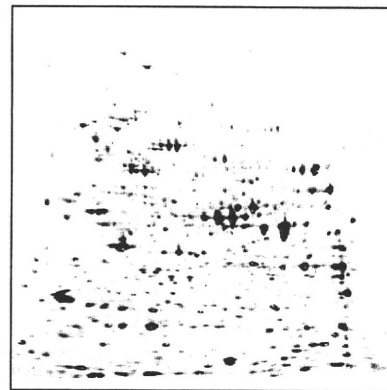
iHCE-NY 090502 は、Mode=46 であっ  
た。

### C-5-2. プロテオミクス (プロテオーム解析)

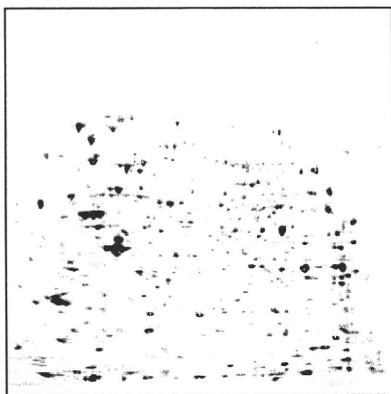
まず、角膜上皮組織における個人差を検  
証した。研究用角膜として米国アイバンク  
より購入した角膜組織の一部を用いたプロ  
テオミクスを行ったところ、メジャーなス  
ポットには相違はないものの、詳細なスポ  
ットでは違いがあることが明らかとなった。

次に角膜上皮組織 (未培養)、ヒト正常角  
膜上皮細胞 (HCE、培養細胞)、不死化角  
膜上皮細胞 (HCE-T、培養細胞)、不死化  
ヒト角膜上皮細胞 (iHCE-NY 090502、培  
養細胞) の二次元電気泳動を行った。

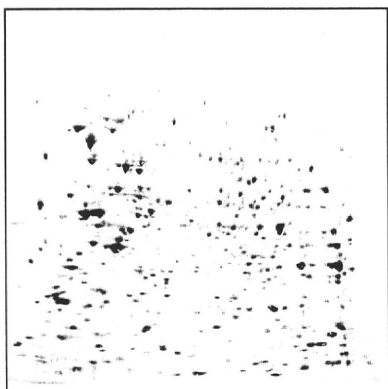
#### 1. 角膜上皮組織 (未培養)



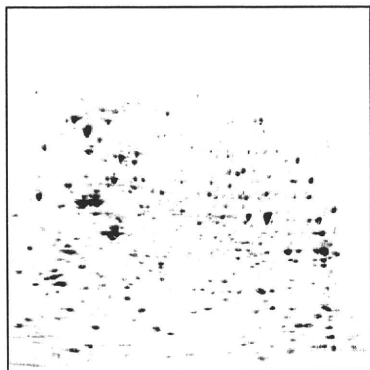
## 2. HCE



## 3. HCE-T



## 4. iHCE-NY 090502



現在、各スポットの検出と質量解析を行っている。

## C-6. 高感度で簡便な試験評価系とマーカーの開発に関する予備実験

新しい手法を用いて、二次元培養の角膜

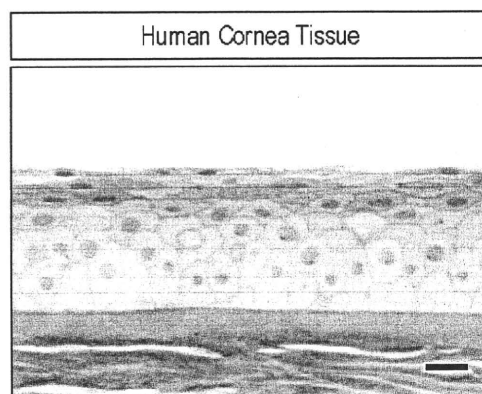
上皮細胞で検出される候補マーカーの検出を試みた。

iHCE-NY 090502 を用いて 18S rRNA を Endogenous Control ( $Ct = 13.9 \pm 0.5$ ) として検証したところ、CD29 ( $Ct = 23.1 \pm 0.5$ )、CD44 ( $Ct = 26.7 \pm 0.4$ )、E-cadherin ( $Ct = 35.1 \pm 0.8$ )、ZO-1 ( $Ct = 27.8 \pm 0.3$ )、Occludin ( $Ct = 29.8 \pm 0.2$ ) であった。

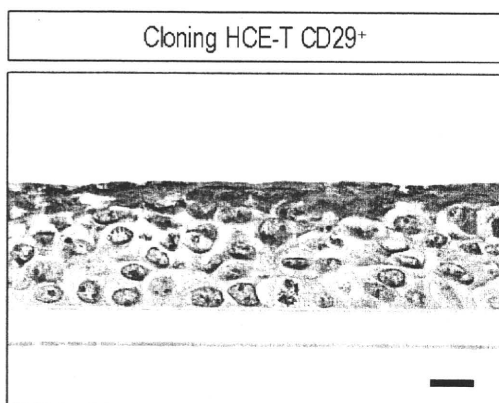
## C-7. 追加クローニングした HCE-T (cHCE-T) による三次元角膜再構築モデルの作製に関する予備実験

エアリフト法による培養を施した細胞をセルカルチャーインサートに載せたまま、SUPER FIX (クラボウ) で固定し、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、追加クローニングした HCE-T (cHCE-T) の分化能 (細胞重層化) を評価するため、H.E.染色を行い観察したところ、セルカルチャーインサートのメンブレンに近い細胞から空気に暴露されている表面にむかって徐々に細胞が扁平となって重層化していることが明らかとなった。しかし、現在の条件では安定した三次元培養モデルが構築できていないことから、今後、さらに培養条件を検討する必要がある。

正常ヒト角膜組織切片標本



追加クローニングした HCE-T (cHCE-T) を用いた三次元角膜再構築モデルの作製



#### D. まとめ

##### D-1. ヒト角膜輪部組織

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。今回の詳細な組織標本の作製と観察結果から、角膜上皮の基底部領域の細胞で、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）細胞集団が存在していることが確認された。また山本が本年度に発表した論文の中でこれらの細胞は、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 low-affinity neurotrophin receptor p75 (p75NTR) が陽性であることを報告した。

##### D-2. HCE の分離培養

ヒト角膜輪部より分離した角膜上皮幹/前駆細胞を培養したところ、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。検討に用いている培地は、市販の無血清培地であり、今後、未熟な幹/前駆細胞の状態を保持したまま培養できる手法が開発されると、自己の組織幹細胞を用いた再生医療がさらに注目されることとなる。

確立したヒト角膜輪部から角膜上皮幹/前駆細胞の分離・培養手法の再現性は非常に高く、安定した分離培養法であることが確認できた。

##### D-3. HCE-T の追加クローニング

細胞株樹立時にクローニングを行っていないためヘテロな細胞集団であり、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。本研究においてセルソーターと改良した細胞生物学的クローニング手法による追加クローニングを行い、細胞分化能（重層化能）を回復した細胞 (cHCE-T) としてクローニングすることに成功した。平成 23 年度以降、山本が作出した iHCE-NY の不死化遺伝子導入細胞の対照として cHCE-T を並行して実験する。

##### D-4. iHCE-NY の比較解析

研究成果の代表的な細胞として iHCE-NY 090409 と iHCE-NY 090502 を例示した。iHCE-NY 090409 と iHCE-NY 090502 の核型解析の結果に違いが発生した理由として、遺伝子導入後の細胞が不安定な状態において、通常的手法で行われる薬剤耐性を利用した細胞選択法は、細胞に対して様々な影響を与えることが推定され、その結果としてこのような結果の相違が生じたのではないかと推察している。



プロテオミクスの結果から、HCE と HCE-T や iHCE-NY の SV40 を導入した不死化角膜上皮細胞において、全体のスポットが極端に変化しなかった。一方、培養細胞と角膜上皮組織（未培養）を比較すると比較的大きなスポットの違いがあり、角膜上皮組織では Vitamin A 関連酵素などのスポットが検出されたが、全ての培養細胞では殆ど検出されなかった。細胞にとって培養系に移行することは、大きな環境変化が起こっていると考えられるべきである。今後、LC/MS/MS による詳細なスポット解析を継続して実施していく。

また、同一サンプルから採取した total-RNA を用いた DNA microarray の実験も行っており、遺伝子発現量とタンパク質発現における網羅的な解析を行っていく。

#### D-5. 高感度な試験評価系の確立にむけた予備実験

新しく確立した遺伝子発現半定量解析手法を用いて角膜上皮細胞で比較的特異的に検出されるマーカーを検出することができた。一連の手技において従来よりも時間は1/3に短縮され、経費も半分に抑えることができた。

#### D-6. cHCE-T を用いた三次元角膜再構築モデルの作製

追加クローニングした cHCE-T を用いることで、特殊なフィーダー細胞や羊膜などを用いなくても、細胞形態が扁平に変化しながら重層化することができるようになった。再構築モデルの切片標本では、生体の角膜上皮と形態的に類似していた。

#### E. 考察と結論

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 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。本研究において、SV40 の導入によって、プロテオミクスの結果ではドラステイックな変化はないことが分かった。今後、プロテオミクスで使用した同一サンプルでの DNA microarray による遺伝子発現解析を行い、遺伝子から発現タンパク質までの網羅的な比較を行う。

現在の技術では、遺伝子を挿入する領域を意図する所に行うことができない。理想的な遺伝子の挿入領域としては、遺伝子 (DNA) のホットスポット (偽 attP 部位) などであり、このような領域に目的遺伝子を挿入することで、理論上では他の遺伝子への影響が限りなく少なくなる。つまり正常細胞の特性を保持した不死化細胞を作製することができる可能性がある。

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、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、まずは iHCE-NY の二次元培養モデルを用いた試験系とマーカーの選択についての予備実験を行った。今後、さらにマーカーの種類を増やし、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。

追加クローニングした cHCE-T を用いて、

三次元角膜再構築モデルの作製についての予備実験を行った。今後、cHCE-Tおよび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。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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. [添付資料-②]

### 2. 学会発表

- 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. (岡山) [添付資料-③]

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

今のところ、新規特許出願については未定である。

本科研費交付前に申請・取得しているが、本研究の遂行には欠かせない特許

は以下のとおりである。

- 標本作製に関する特許:『難浸透性組織迅速固定液(特許番号:3723204)』山本直樹ほか. 2005.
- 新規幹細胞マーカーに関する特許出願状況:『網膜幹細胞の分離方法および網膜幹細胞(出願番号:特願2006-279917)』山本直樹ほか. 2006.

### 2. 実用新案登録

なし。

### 3. その他

なし。

添付資料 - ①

SV40 Large T Antigen を含む Vector の全塩基シーケンス結果

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC  
GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCA  
TTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACG  
TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATCATA  
TGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCC  
CAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGC  
TATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACT  
CACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAA  
AATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGG  
TAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCC  
GCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTT  
TGCAGCTAATGGACCTTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGCCTGGGGGAATATTCCTCTGATG  
AGAAAGGCATATTTAAAAAATGCAAGGAGTTTCATCCTGATAAAGGAGGAGATGAAGA  
AAAAATGAAGAAAATGAATACTCTGTACAAGAAAATGGAAGATGGAGTAAAATATGCTC  
ATCAACCTGACTTTGGAGGCTTCTGGGATGCAACTGAGGTATTTGCTTCTTCCTTAAAT  
CCTGGTGTGATGCAATATACTGCAAACAATGGCCTGAGTGTGCAAAAAAATGTCTAC  
TAACTGCATATGCTTGCTGTGCTTACTGAGGATGAAGCATGAAAATAGAAAATTATACA  
GGAAAGATCCACTTGTGTGGGTTGATTGCTACTGCTTCGATTGCTTTAGAATGTGGTTT  
GGACTTGATCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAAACTAC  
CTACAGAGATTTAAAGCTATAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAA  
CTACTGATTCTAATTGTTTTGTGATTTTTAGATTCCAACCTATGGAACCTGATGAATGGGA  
GCAGTGGTGGAAATGCCTTTAATGAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTA  
GTGATGATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAAGAAGAGAAAG  
GTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCATGCTGTGTT  
TAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTTGCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCTGCACTGC  
TATACAAAAAATTATGGAAAAATATTCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTAT  
AATCATAACATACTGTTTTTTCTTACTCCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAA  
CTATGCTCAAAAATGTGTACCTTTAGCTTTTTAATTTGTAAAGGGTTAATAAGGAAT  
ATTTGATGTATAGTGCCTTAACTAGAGATCCATTTTCTGTTATTGAGGAAAGTTTGCCT  
GGTGGGTTAAAGGAGCATGATTTTAATCCAGAAGAAGCAGAGGAACTAAACAAGTGTC  
CTGGAAGCTTGTAACAGAGTATGCAATGGAACAAAATGTGATGATGTGTTGTTATTGC  
TTGGGATGACTTGAATTTAGTACAGTTTTGAAATGTGTTTAAAATGTATTAAAAAA

GAACAGCCCAGCCACTATAAGTACCATGAAAAGCATTATGCAAATGCTGCTATATTTGC  
TGACAGCAAAAACCAAAAACCATATGCCAACAGGCTGTTGATACTGTTTTAGCTAAAA  
AGCGGGTTGATAGCCTACAACCTAGAGAACAAATGTTAACAAACAGATTTAATGAT  
CTTTTGGATAGGATGGATATAATGTTTGGTTCTACAGGCTCTGCTGACATAGAAGAATG  
GATGGCTGGAGTTGCTTGGCTACACTGTTTGTGGCCAAAATGGATTTCAGTGGTGTATG  
ACTTTTTAAATGCATGGTGTACAACATTCCTAAAAAAGATACTGGCTGTTTAAAGGA  
CCAATTGATAGTGGTAAAACCTACATTAGCAGCTGCTTTGCTTGAATTATGTGGGGGAA  
AGCTTTAAATGTTAATTTGCCCTTGGACAGGCTGAACTTTGAGCTAGGAGTAGCTATTG  
ACCAGTTTTTAGTAGTTTTTGGAGGATGTAAAGGGCACTGGAGGGGAGTCCAGAGATTTG  
CCTTCAGTTCAGGGAATTAATAACCTGGACAATTTAAGGGATTATTTGGATGGCAGTGT  
TAAGGTAACTTAGAAAAGAAACACCTAAATAAAAGAACTCAAATATTTCCCCCTGGAA  
TAGTCACCATGAATGAGTACAGTGTGCCATAAAACACTGCAGGCCAGATTTGTA AAAACAA  
ATAGATTTTAGGCCCAAAGATTATTTAAAGCATTGCCTGGAACGCAGTGAGTTTTTGT  
AGAAAAGAGGATAATTCAAAGTGGCATTGCTTTGCTTCTTATGTTAATTTGGTACAGAC  
CTGTGGCTGAGTTTGCTCAAAGTATTCAGAGCAGAATTGTGGAGTGGAAAGAGAGATTG  
GACAAAGAGTTTAGTTTGTGAGTGTATCAAAAATGAAGTTTAAATGTGGCTATGGGAGT  
TGGAGTTTTAGATTGGCTAAGAAACAGTGATGATGATGATGATGACAGCCAGGAAAATG  
CTGATAAAAATGAAGATGGTGGGGAGAAGAACATGGAAGACTCAGGGCATGAAACAGGC  
ATTGATTCACAGTCTCAAGGCTCATTTAGGCCCTCAGCCCTCACAGTCTCACAGTC  
TGTTTCATGATCATAATCAGCCATATCACATCTGTAGAGTTTTTACTTGGCTTTAAAAAAC  
CTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACACGGGATCCACCGGTGATGGTGAGCAAGGGC  
GCCGAGCTGTTACCGGCATCGTGCCCATCCTGATCGAGCTGAATGGCGATGTGAATGG  
CCACAAGTTCAGCGTGAGCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCC  
TGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCTGTGCCCTGGCCACCCTGGTGACCACC  
CTGAGCTACGGCGTGAGTGTCTCACGCTACCCCGATCACATGAAGCAGCACGACTT  
CTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGCTACATCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCGAGGATG  
ACGGCAACTACAAGTCGCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGATAACCTGGTGAATCGC  
ATCGAGCTGACCGGCACCGATTTCAAGGAGGATGGCAACATCCTGGGCAATAAGATGGA  
GTACAACCTACAACGCCACAATGTGTACATCATGACCGACAAGGCCAAGAATGGCATCA  
AGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGATGGCAGCGTGCAGCTGGCCGACCAC  
TACCAGCAGAATAACCCCATCGGCGATGGCCCTGTGCTGCTGCCCATAACCACTACCT  
GTCCACCCAGAGCGCCCTGTCCAAGGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGATCTACT  
TCGGCTTCGTGACCGCCGCGCCATCACCCACGGCATGGATGAGCTGTACAAGTGAGCG  
GCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATAACCATTTGTAGAGTTTTTACTTGGCTTTAA  
AAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTT  
AACTTGTATTATGCAGCTTATAATGGTTACA**AATAAA**AGCAATAGCATCACAAATTTAC

**AAATAAAGCATTTTTTTC****ACTGC**ATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTAT  
CTTAAGGCGTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTA  
AATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAG  
AATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAG  
AACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACG  
TGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGA  
ACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGA  
AAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTAC  
GCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTG  
GCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCA  
AATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG  
GAAGAGTCCTGAGGCGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGAAAA  
GTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAA  
CCAGGTGTGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTC  
AATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCCTAACTCCGCC  
CAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCG  
AGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCA  
GGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAG  
ATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGG  
GCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCG  
CCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGG  
CAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTT  
GTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCT  
GTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGC  
TGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAG  
CGAGCACGTAICTGGATGGAAGCCGGTCTTGTGCATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCA  
TCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCG  
AGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGC  
CGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACAT  
AGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCC  
TCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTT  
GACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAAC  
CTGCCATCACGAGATTTGATTCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAAT  
CGTTTTCCGGGACCGCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCT  
TCGCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACC  
CGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTGCTTTGTTCA

TAAACGCGGGGTTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCCACCGAGACCCCAT  
GGGGCCAATACGCCCGGTTTTCTTCCTTTTCCCCACCCACCCCAAGTTCGGGTGAA  
GGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTC  
ATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGA  
TCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCG  
TCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAAT  
CTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAG  
AGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACT  
GTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTAC  
ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTC  
TTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACG  
GGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT  
ACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATC  
CGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCC  
TGGTATCTTTATAGTCCTGTTCGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTG  
ATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTTACGGT  
TCCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCT  
GTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT

一重アンダーライン : CMV Promoter  
二重アンダーライン : 制限酵素 (Xho1, BamH1)  
ボールド : SV40 Large T Antigen  
点線アンダーライン : AcGFP  
イタリック : SV40 Poly A signal

論文発表：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.

In Vitro Cell.Dev.Biol. Animal (2010) 46:774–780  
DOI 10.1007/s11626-010-9344-9

## Cultured human corneal epithelial stem/progenitor cells derived from the corneal limbus

Naoki Yamamoto · Koji Hirano · Hajime Kojima · Mariko Sumitomo · Hiromi Yamashita · Masahiko Ayaki · Koki Taniguchi · Atsuhiko Tanikawa · Masayuki Horiguchi

Received: 26 March 2010 / Accepted: 19 August 2010 / Published online: 16 September 2010 / Editor: J. Denry Sato  
© The Society for In Vitro Biology 2010

**Abstract** Stem/progenitor cells of the human corneal epithelium are present in the human corneal limbus, and several corneal epithelial stem/progenitor cell markers have been reported. Recently, the neurotrophin family receptors were reported to be useful markers of corneal epithelial stem/progenitor cells. Therefore, we examined an enzymatic separation method for obtaining corneal epithelial stem/progenitor cells and measuring the change in the expression of low-affinity neurotrophin receptor p75 (p75<sup>NTR</sup>), a receptor belonging to the neurotrophin family. As a result, it was found that our separation method preserved cell viability. Furthermore, p75<sup>NTR</sup> was mainly observed in

epithelial basal cells as were the corneal epithelial stem/progenitor markers p63 and integrin  $\beta$ 1. p75<sup>NTR</sup> was also observed in the cultured cells, but its frequency decreased with passage. In conclusion, we propose that our culture method will enable the culture of corneal stem cells and that it is a useful tool for elucidating the molecular basis of the niche that is necessary for the maintenance of epithelial stem cells in the corneal limbus. Furthermore, we conclude that p75<sup>NTR</sup> is a useful cell marker for evaluating the characteristics of stem/progenitor cells in culture.

**Keywords** Human corneal epithelium · Corneal limbus · Low-affinity neurotrophin receptor p75 (p75<sup>NTR</sup>) · p63 · Integrin  $\beta$ 1

N. Yamamoto (✉) · M. Sumitomo · H. Yamashita · K. Taniguchi  
Laboratory of Molecular Biology and Histochemistry,  
Fujita Health University Joint Research Laboratory,  
1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho,  
Toyoake, Aichi 470-1192, Japan  
e-mail: naokiy@fujita-hu.ac.jp

K. Hirano · A. Tanikawa · M. Horiguchi  
Department of Ophthalmology,  
Fujita Health University School of Medicine,  
1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho,  
Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

H. Kojima  
Division of Pharmacology, Biological Safety Research Center,  
Japanese Center for the Validation of Alternative Methods  
(JaCVAM), National Institute of Health Sciences,  
1-18-1, Kamiyoga,  
Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

M. Ayaki  
Department of Ophthalmology,  
Showa University Fujigaoka Rehabilitation Hospital,  
2-1-1, Fujigaoka, Aoba-ku,  
Yokohama 227-8518, Kanagawa, Japan

### Introduction


The cornea is comprised of five layers, the corneal epithelium, Bowman's membrane, the corneal stroma, Descemet's membrane, and the corneal endothelium. Several types of non-differentiated cells are present in the corneal epithelium: stem cells with self-replication competence; progenitor cells produced by the asymmetric division of stem cells; and transient amplifying (TA) cells, which are produced by the differentiation of progenitor cells (Qi et al. 2008). As the corneal epithelium is damaged by exposure to ultraviolet rays and oxygen (Ihiga et al. 2005), it undergoes constant turnover; i.e., TA cells from the basal layer of the corneal epithelium replace the corneal epithelial cells that detach from the surface of the corneal epithelium at a high rate under steady-state conditions. Homeostasis of the corneal epithelium is governed by a small subpopulation of corneal epithelial stem/progenitor cells located in the basal epithelium layer of the limbus. (Qi et al. 2007).

添付資料-③

学会発表：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. (岡山)

ヒト角膜輪部由来角膜上皮細胞の分離・培養

*A study of culture of human corneal epithelial cells derived from corneal limbus*



山本直樹<sup>1)</sup>


共同研究者  
平野 耕治<sup>2)</sup>, 小島 肇<sup>3)</sup>, 綾木 雅彦<sup>4)</sup>, 住友 万里子<sup>5)</sup>, 山下 宏美<sup>6)</sup>,  
大野 亜由美<sup>7)</sup>, 田島 香里<sup>8)</sup>, 谷川 篤宏<sup>9)</sup>, 谷口 孝喜<sup>10)</sup>, 堀口 正之<sup>11)</sup>

<sup>1)</sup> 岡山県立大学 基礎医学研究施設 分子生物学・細胞化学  
<sup>2)</sup> 岡山県立大学 医学部 眼科  
<sup>3)</sup> 岡山県立大学 医学部 眼科  
<sup>4)</sup> 岡山県立大学 医学部 眼科  
<sup>5)</sup> 岡山県立大学 医学部 眼科  
<sup>6)</sup> 岡山県立大学 医学部 眼科  
<sup>7)</sup> 岡山県立大学 医学部 眼科  
<sup>8)</sup> 岡山県立大学 医学部 眼科  
<sup>9)</sup> 岡山県立大学 医学部 眼科  
<sup>10)</sup> 岡山県立大学 医学部 眼科  
<sup>11)</sup> 岡山県立大学 医学部 眼科

背景・目的

- 昨年の本学会で発表した角膜上皮細胞に関する研究成果を基に、研究をさらに遂行・発展させ、角膜実質細胞などの細胞を出来るだけ混入させることがなく、かつ細胞への影響が少ない角膜上皮細胞の分離法と継代培養法を検討した。
- さらに分離・培養した細胞における角膜上皮幹/前駆細胞マーカーの発現、および角膜上皮細胞の特異的マーカーの発現が継代によって推移するかを検証した。

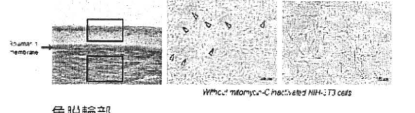
材料



Northwest Lens Eye Bank (U.S.A.)より研究用角膜を購入


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



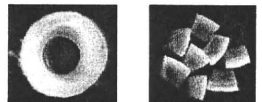
1.2 Lim Dissep II - 65mm  
WPI/C + retinoyl-C + hydroxyethyl NH-TPG cells

角膜輪部



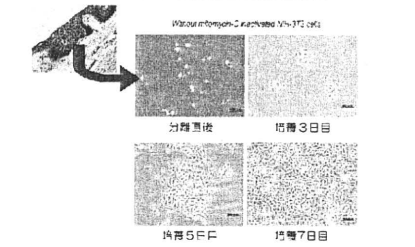
1.2 Lim Dissep II - 65mm

角膜組織からの  
角膜上皮細胞の初代分離培養法の検討



- 予めデスマスクと一緒に角膜上皮細胞を剥離する。
- 角膜輪部組織を5mmの大きさに細切
- 0.2%トリカプトン溶液を加えて37°Cで30min 消化
- PBSで洗浄
- Col + FNC 3-テック ティックに播種して培養 (CMT-20 CELLTEC)

角膜組織からの  
角膜上皮細胞の初代分離

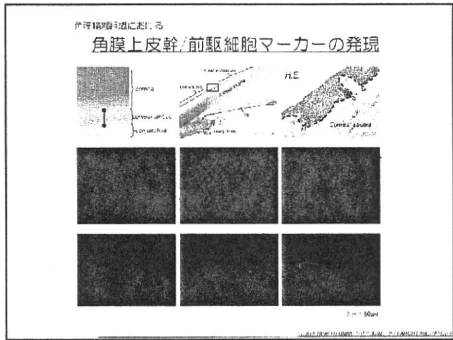
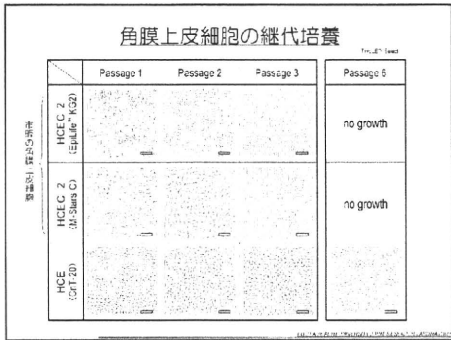


WPI/C + retinoyl-C + hydroxyethyl NH-TPG cells

分離直後      培養3日目

培養5日目      培養7日目



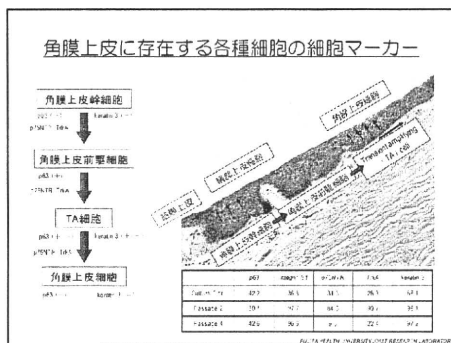
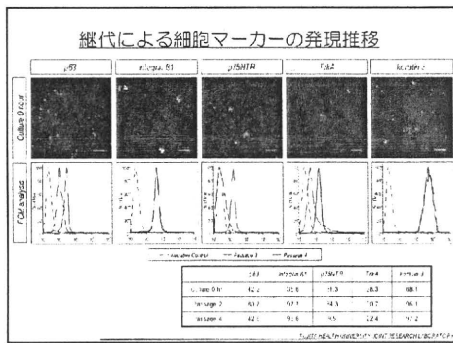


### p75NTR とは？

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。

- 上皮系幹細胞マーカーとしての有用性: Kimura C, Yasumoto O, et al. *Oncogene* 17, 167-176, 1999; Yamamoto Y, et al. *Mol Med* 4(1999) 2310-19; Yamamoto Y, et al. *Mol Med* 4(1999) 41, 85-91, 2008 (山本直樹=特許 2009-20229 角膜幹細胞)
- 間葉系幹細胞マーカーとしての有用性: Yamamoto Y, et al. *J Dermatol Sci* 46, 43-52, 2007 (山本直樹=特許 2009-057354 角膜口鼻組織幹細胞) (山本直樹=特許 2009-20229 角膜幹細胞)

Neurotrophin family  
 • Nerve Growth Factor (NGF) NGF receptor = TrkA  
 • Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)  
 • Neurotrophin-3 (NT-3)  
 • Neurotrophin-4/5 (NT-4/5)



### まとめ

- 分選直後は数個の細胞集団で観察され、培養開始後およそ7日ではほぼコンフルエントとなり、細胞は多角形の上皮細胞の形態を呈していた。
- 6継代目からは紡錘様の形態を呈する細胞が観察されるようになった。
- p63、p75NTR、TrkAは継代数が増加するにつれて陽性細胞数は減少した。
- integrin beta 3、keratin 3は2継代目からほとんどの細胞が陽性であり、継代数が増加しても陽性細胞数は減少しなかった。

分担研究報告書

光毒性試験に関する再評価に関する研究

研究分担者 大野泰雄  
国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

Reactive oxygen species (ROS: 活性酸素)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。

ソーラーシュミレーター（光照射装置）の機種差など解決すべき点が多く、バリデーション実施に向け、準備委員会で議論を重ねた。

キーワード：ROS、活性酸素、光毒性試験、医薬品、安全性評価

研究分担者及び研究協力者の氏名・所属機関名及び所属機関における職名

研究分担者

大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所  
副所長

研究協力者

小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
薬理部 新規試験法評価室  
室長

細井一弘 参天製薬株式会社  
日本製薬工業会 基礎研究部  
会

A. 研究目的

光毒性試験代替法としては、Balb/c 3T3細胞を用いたニュートラルレッドアッセイ(3T3 NRU)が2004年にOECDテストガイドラインNo. 432として認証されている<sup>1)</sup>。本方法は、本邦においても化粧品業界のみならず、製薬業界でも汎用されており、広く普及している。しかし、製薬工業会の調査では<sup>2)</sup>、本試験法での陽性率は50%程となるものの、陽性となったものの多くは続いて行われた動物実験で陰性となっていると報告されている。本方法は偽陰性が極めて少ない特徴を持ち安全性評価には有用であるが、一方で偽陽性が高過ぎれば、医薬品開発においては必ずしも有用な方法とは言えない。

そこで、上記の問題解決を念頭に、新たなスクリーニング試験法の活用を模索してきた。その中で、尾上ら（静岡県立大学）が開発したReactive oxygen species (ROS: 活性酸素)アッセイ<sup>3-4)</sup>が候補に挙げられた。そこでこの試験法の活用を念頭に、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。

B. 研究方法

B-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。

B-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の必要性、そのバリデーションの必要性について議論した。

B-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。

なお、ROSアッセイの試験法については、

尾上研究分担者の報告書を参照されたい。

(倫理面への配慮)

倫理的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) 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

第一回会議にて、以下の内容について尾上先生から講義を受けるとともに、実験施設を見学して、ROSアッセイへの理解を深め、安全性評価での必要性について議論した。

##### C-1-1) 試験方法について

- ✓ 原理、必要機器、ソーラーシュミレーター(以後、光照射装置)と照射時間、判定方法、注意点等
- ✓ 光照射装置の相違による試験方法や結果の相違点の有無

(質疑応答)

- UV吸収(モル吸光係数含む)と光毒性の相関は乏しい(BenzocaineやSulisobenzoneは非常に大きなモル吸光係数を示すが、ROS産生能は無く、臨床及び非臨床で光毒性陰性である)。
- 活性酸素の発生系は、I型(Superoxide-dependent)とII型(Singlet oxygen-dependent)があり、双方を測定することで光毒性の予測性が向上する(I型のみを測定したメルクのデータでは予測性が低い)。
- 定量評価ではなく、変化の程度を評価している。
- 外資製薬大手の多くがROSアッセイに取り組んでいる(ファイザー、GSK、ノバルティス、イーライリリー、ロシュ、メルクetc.)。
- 3T3 NRUで陽性となるものは、基本的にはROSアッセイでも陽性になる。
- ROSアッセイは、光遺伝毒性、光アレルギー、光安定性についてもそのポテンシャルを評価していると言える。
- 溶媒に利用するDMSOはラジカルスカベンジ作用を有するが、低濃度で利用し、実験条件を統一することで、評価する上で許容範囲内の変化に納めることができる考えている。

##### C-1-2) 光照射装置の検討結果

- ✓ ROSアッセイへの適用の可能性
- ✓ 今後、参加機関で必要な検討項目：照射ムラ、温度上昇への対策等

(質疑応答)

- 使用機器、温度管理状況は結果に大きな影響を与えるため、多施設バリデーション

を実施するには、これらをどの程度統一できるかがカギとなる。

• 熱量(照射エネルギー量)を統一すれば、ROS発生条件が同じというわけではない(データ有)。

• 石英のフタを圧着させることで、フタによる光線の減弱、熱による溶液の蒸発の問題を克服できた(10万円以下で入手可能)。

• 予備的にセリック社製光照射装置(SXL2500V2)でROSアッセイを実施した結果、尾上が使用しているAtlas社製のSuntest CPS plusのデータと極端に大きな差は無く、使用可能と思われる。

##### C-1-3) バリデーション

小島よりバリデーションの説明がなされ、参加施設の公募についても言及した。

(質疑応答)

- 施設間の再現性と毒性の予測性を示すことでバリデーションが出来たとみなされる。
- In vitro試験をスクリーニング法として使用する場合は偽陽性が多くて良く、偽陰性が基本的に無い方法が求められる。
- バリデーションの成否はどのような物質を幾つ選ぶかで大きく影響を受ける(グレーゾーンの化合物をどの程度評価対象とするか)。
- 実験施設は3施設あれば良い。
- 組織は過去の事例に沿って行う(バリデーション実行委員会の下に、統計グループ、被験物質選定グループ、記録管理グループを置き、コード化した化合物を実験施設に配布する)。次回会合までにバリデーションの計画案をメンバーに配布する。
- GLP適合施設において、実施されることが望ましいが、必ずしもGLP施設で行う必要は無いがGLPの精神に基づいて実施する必要がある。
- 化合物数は20~30程度は必要である。参加施設の許容量とのかねあいで決める。
- 化合物の入手、配布等は小島が対応するが、各施設で使用する実験機器、消耗品、人件費等はバリデーション参加機関で負担する。
- ICHにおいてどのようなゴールを目指すのか議論が必要である(物性or毒性)。
- ICHが受け皿とならないなら、OECDの試験法ガイドラインに持っていくことも可能である。

##### C-1-4) その他

光照射装置として、Atlas社製(Suntest

CPS plus) とセリック社製 (SXL2500V2) のソーラーシュミレーターがあり、それぞれ 3 施設ずつ確保できる。双方でバリデーションを目指す (Suntest CPS plus は国際的には主流と思われ、SXL2500V2 は国内で 3T3 NRU を実施している企業の多くが保有している)。

- Suntest CPS plus は、静岡県立大、田辺三菱製薬、ファイザー (海外) が保有している。ファイザーの協力を尾上先生経由で依頼する。
- SXL-2500V は、塩野義製薬、大正製薬、田辺三菱製薬、武田薬品が保有しているが、田辺三菱製薬は都合により利用できない。武田薬品は移転時期とバリデーションが重なるので参加を見合わせるが、被験物質選定等で参加を検討する。そのため、SXL-2500V2 でのバリデーション実施に先立ち、本光照射装置を保有する施設の参加を募る必要性もある。
- ドクターヘンレ (SOL500) とナガノサイエンス (LTX01) のソーラーシュミレーターは保有施設が少ないため、バリデーションには使用しない。
- これまでのデータは利便性から pH 7.4 で実施しているが、皮膚の pH を考慮すると、pH 5.5 が適切かも知れない (なお、ファイザー社内資料に pH の差は結果に大きく影響しないというデータあり)。
- ROS アッセイの結果を毒性評価のためのデータとせず、物性データの一つとして申請資料に出来ればメリットは大きい。GLP 毒性試験として報告書を作成するのであれば、企業としてのメリットは小さくなる。規制当局は物性データとして受入れる用意はあるか？
- In silico は、II 型の予測性はある程度可能であるが、I 型の予測性は低い。

#### C-2) ROSアッセイ バリデーション準備委員会第二回会議

バリデーションの実施を前提に、計画案について討論した。以下の内容が概要として決まった。

- 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する。
- 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。
- ガイドライン化も Atlas 社製を用いた方法を先行する。セリック社製での方法についてもガイドライン化を目指す。Atlas 社製を用いた方法のプロトコルが確定し、プレバリデーション結果判明後

に検討する。

- プレバリデーションの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。
- 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。

#### C-2-1) Atlas社製光照射装置を用いた評価法に関する検討

##### C-2-1-1) 被験物質の溶解性について

- DMSOへの難溶性物質が多く、被験物質の濃度設定と判定基準の見直しが望ましい。
- 現行：最高用量200  $\mu\text{M}$ におけるROS生成量からの判定
- 提案：最高用量200  $\mu\text{M}$ が調製できない場合、例として100  $\mu\text{M}$ での生成量から判定
- (但し、陽性物質の当該濃度におけるROS生成量データの収集が必要)

##### 【提案】

- バリデーションには難溶性化合物を 2~3 物質加え、溶解性の悪い物質に対する試験フローを作成し、プロトコルに反映させる。
- 化合物の濃度依存的に ROS 生成量が減弱することは確認済みである。難溶性化合物については基準化合物を設けた上で、相対的に判定することも検討する。
- 難溶性物質については、界面活性剤の添加やシクロデキストリン、リポソーム等で検討した経験がある。Singlet Oxygen については問題なかったが、Superoxide の検出については影響がある。

##### C-2-1-2) 試験器材について

- 照射終了後、石英の蓋に水滴の付着が観察される。
- その他、使用する96ウェルプレートは平底タイプが望ましい。
- 提案：ウェルごとに付着する水滴の量 (0~10  $\mu\text{l}$ ) が異なるため、場合によっては影響を確認する必要があるとの指摘があったが、微量であるため、評価系への影響は無視する。

##### C-2-1-3) Atlas社製光照射装置 (Suntest CPS plus) でのプレバリデーションのプロトコル検討

- ✓ 今後の検討順
- ① 被験物質の選択