

ストリッピングした皮膚を *stripped skin* とした。ヘアレスラット摘出皮膚は、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, *i.p.*) 麻酔下のヘアレスラットの腹部を剃毛処理後、左右から2枚ずつ皮膚を摘出し、真皮側の脂肪を丁寧にハサミで取り除いた後、1時間水和を行い実験に使用した。また分子内にエステル結合を有する物質の皮膚透過性を評価する場合には、皮膚中のカルボキシエステラーゼにより代謝されることが考えられたため、エステラーゼ阻害剤である DFP (2.7 nmol/mL in PBS) を用いて30分間水和処理した。また、DFP処理がエステル結合を分子内に持たない物質の皮膚透過に影響しないことは明らかとなっている。

4. 定量条件

透過実験より得られた各物質のサンプル溶液は、内部標準物質を含んだアセトニトリルと1:1で混和した。その溶液を遠心分離 (15000 rpm, 5 min, 4°C) し、その上清 20 μ L を HPLC に注入した。種々物質の HPLC 測定は以下の条件で行った。ANP; acetonitrile : water = 30 : 70、絶対検量線法、測定波長 254 nm、ISMN ; acetonitrile : water = 10 : 90、絶対検量線法、測定波長それぞれ 220 nm および 254 nm、ISDN; acetonitrile : water = 55 : 45、内部標準物質として butyl *p*-hydroxy benzoic acid、測定波長 245 nm、FP; acetonitrile : 0.1% phosphoric acid = 50 : 50、内部標準物質として isopropyl *p*-hydroxy benzoic acid、測定波長 245 nm。測定には株式会社 島津製作所 (京都、日本) 社製の HPLC を用いて行った。HPLC system は、送液ユニット (LC-10AD)、UV 検出器 (SPD-10AV)、カラムオーブン (CTO-10AC)、オートインジェクター (SIL-10A)、デガッサー (DGU-12A)、システムコントローラー (SCL-10A) から構成されている。また、カラムは、Wakopak wakosil-2 5C18HG, 4.6 mm i.d.×250 mm (和光純薬工業 (株)、大阪、日本) もしくは Cadenza CD-C18, 3 μ m, 75 × 4.6 mm (インタクト株式会社、京都、日本) を HPLC データの解析は、Smart Chrom (株式会社ケーワイエーテクノロジー、東京、日本) を用いた。

C. 結果・考察

1. 水溶性および脂溶性物質の3次元培養ヒト皮膚モデルとヘアレスラット皮膚中濃度の比較

Table 2 に水溶性薬物の ANP と脂溶性薬物の FP を EpiDerm およびヘアレスラットに適用後の、定常状態時の皮膚中濃度を示す。 $\bar{C}_{ss,tot}$ は全層皮膚の $\bar{C}_{ss,ved}$ は生きた表皮・真皮中濃度を示す。いずれの薬物でも EpiDerm 中の薬物濃度はヘアレスラット皮膚中濃度と比較しても高値を示し、ANP では約 100 倍、FP では約 10 倍の差が認められた。この結果は、培養皮膚中の物質濃度がヒト皮膚やヘアレスラット皮膚よりも高値となると予測した結果と一致した。昨年度の報告で、3次元培養ヒト皮膚モデルを介した物質の透過性について評価しており、EpiDerm は他の3次元培養ヒト皮膚モデルと比較してヒト皮膚やヘアレスラット皮膚を介した物質透過性と相関が認められていた。しかしながら、本研究結果により、培養皮膚中濃度が水溶性及び脂溶性物質にもかかわらず高値を示したことから、3次元培養皮膚モデルを用いて安全性や有効性を評価する場合には、注意が必要であると考えられた。

2. 皮膚透過パラメータを用いた皮膚中濃度の予測

B.理論 皮膚透過パラメータの算出に記した方法を用いて得た各透過パラメータを (10) 式に代入して各皮膚中の薬物濃度を予測した。Table 2 に予測結果を示す。予測値は ANP のヘアレスラットの $\bar{C}_{ss,ved}$ で約 8 倍の差が認められたものの、他の予測値は実測値とほぼ同一であった。この結果より、(10) 式で用いる各透過パラメータを適用物質の物理化学的特性より予測できれば、物質の安全性および有効性評価の予測に非常に有用な手段となりうると考えられた。

3. 油水分配係数と皮膚透過パラメータの関係

生きた表皮・真皮中の薬物濃度 $\bar{C}_{ss,ved}$ は、刺激性や効果に関わる部位である。(10) 式で用いる皮膚透過パラメータのうち、 P_{tot} は (5) 式に物質の分子量や油水分配係数を代入することで算出できる。そこで、本研究では油水分配係数 (K_{ow}) と P_{ved} および K_{ved}

との関係について調べた。Figure 3 に $\log K_{o/w}$ と $\log P_{ved}$ の関係を示す。皮膚適用物質の $\log K_{o/w}$ の増大に伴い $\log P_{ved}$ は増大したが、 $\log K_{o/w} > 1$ では、その値はほぼ一定の値となった。この結果より、 $\log K_{o/w}$ と $\log P_{ved}$ の関係は (24) 式で示すことができた。

$$\text{Log} P_{ved} = 3.0 \times 10^{-1} \times (1 - K_{o/w}^{-0.33}) - 5.0 \quad (24)$$

次に、 $\log K_{o/w}$ と $\log K_{ved}$ の関係について調べた。Figure 4 に $\log K_{o/w}$ と $\log K_{ved}$ の関係を示す。これらの関係は、Fig. 3 に示した $\log K_{o/w}$ と $\log P_{ved}$ の関係と類似しており、適用物質の $\log K_{o/w}$ の増加に伴い $\log K_{ved}$ は増加し、 $\log K_{o/w} > 1$ では、 $\log K_{ved}$ はほぼ一定の値となった。 $\log K_{o/w}$ と $\log K_{ved}$ の関係は式 (25) で示すことができる。

$$\text{Log} K_{ved} = 5.4 \times 10^{-1} \times (1 - K_{o/w}^{-0.33}) \quad (25)$$

式 (24) および (25) は共に $K_{o/w}$ のべき指数が -0.33 と同じ値を示すことから、 $\log P_{ved}$ は $\log K_{ved}$ と関係していると考えられた。

以上の結果より、生きた表皮・真皮中の薬物濃度は薬物の物理化学的性質から予測できる可能性が示唆された。

D. まとめ

3次元培養ヒト皮膚モデルに適用した物質の皮膚中濃度はヘアレスラット皮膚と比べて高値となることが分かった。この結果より、3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた有効性や安全性の結果は、動物やヒトを用いた試験結果と異なる結果が得られる可能性が示唆された。またこの結果は、水溶性物質で false-positive が 3次元培養ヒト皮膚モデルで認められる結果を支持していると考えられた。

皮膚透過パラメータを用いて予測した皮膚中濃度は実測値に近い値を示したことから、皮膚透過パラメータは、物質の皮膚中濃度を予測する手段となりうると考えられた。さらに、物質の油水分配係数より適用物質の皮膚透過パラメータを算出できる可能性が示唆された。今後、物理化学的性質と皮膚透過パラメータについてより詳細な検討を行うことで、適用物質の生きた表皮・真皮中濃度を予測することも可能になると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

Satoshi Kano, Hiroaki Todo, Katsunori Furui, Kenichi Sugie, Yoshihiro Tokudome, Fumie Hashimoto, Hajime Kojima, Kenji Sugibayashi, Comparison of several reconstructed cultured human skin models by microscopic observation: Their usefulness as an alternative membrane for skin in drug permeation experiments, Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 60: 373-384, (2011).

2. 書籍

- ・藤堂浩明、第11章 経皮吸収性・透過性試験の実験手法、最新 動物実験代替法の技法ノウハウ、p245-259、(株)技術情報協会、2011年
- ・藤堂浩明、杉林堅次、第3章、3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた試験とその有用性、p58-66、シーエムシー出版、2011年

3. 学会発表

- ・藤堂浩明、古井克典、平井綾乃、石井宏、杉林堅次、三次元培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験において false-positive/negative を引き起こす原因について、第36回日本化粧品学会、東京、2011年6月
- ・藤堂浩明、物質の有効性および安全性評価ツールとしての三次元培養ヒト皮膚モデルの有用性、第5回皮膚基礎研究クラスターフォーラム、船堀、東京、2011年7月
- ・藤堂浩明、リスク評価における皮膚透過性研究の重要性、第4回千葉科学大学コスメティックサイエンスシンポジウム、東京、2011年7月
- ・藤堂浩明、杉林堅次、物質の皮膚透過性と皮膚中濃度予測法に関する研究、川崎、神奈川県、2011年11月
- ・押坂勇志、藤堂浩明、杉林堅次、In silico 皮膚中濃度測定方法の有用性、第36回日本化粧品学会、東京、2011年6月
- ・押坂勇志、藤堂浩明、杉林堅次、物質の皮膚透過パラメータを用いた皮膚中濃度の予測法の確立とその応用、第24回日本動物実験代替法学会、仙台、宮城、2011年11月
- ・Takeshi Oshizaka, Hiroaki Todo, Kenji Sugibayashi, Physico-chemical approach

for prediction of the skin concentration of topically applied drugs, 2ndAsian Federation for Pharmaceutical Sciences, Kuala Lumpur, Malaysia, December 2011

・押坂勇志、藤堂浩明、杉林堅次、皮膚に浸透する物質の物理化学的パラメータを用いた有効性・安全性評価、第 132 回日本薬学会、北海道、2012 年 3 月

・Hiroaki Todo, Kenji Sugibayashi, Effect of skin barrier function and metabolic ability on the skin concentration-distance profiles of chemical compounds in reconstructed cultured human skin model, 8th world congress on alternatives and animal use in the life sciences, Montreal, Canada, August 2011

・Hiroaki Todo, Takeshi Oshizaka, Kenji Sugibayashi, Prediction of skin concentration of topically applied drugs, 26th JSSX Annual Meeting, Hiroshima, November 2011

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

Table 1 Physicochemical properties of the chemical compounds used in experiment

Drug	Abbreviation	Log K_o/w	M.W.
Ascorbic acid	AC	-1.70	176
Antipyrine	ANP	-1.507	188
Lidocaine	LC	-0.645	234
Isosorbide-5-mononitrate	ISMN	-0.151	191
Isosorbide dinitrate	ISDN	1.225	236
Methyl paraben	MP	1.93	152
Ethyl paraben	EP	2.27	166
Propyl paraben	PP	2.81	180
Butyl paraben	BP	3.53	194

Table 2 Comparison of observed and estimated skin concentrations of drugs
Hairless rat skin

		Observed	Estimated
Antipyrin	$\bar{C}_{ss,tot}$	$(1.0 \pm 0.06) \times 10^3$	7.9×10^2
	$\bar{C}_{ss,ved}$	$(5.0 \pm 0.4) \times 10^2$	6.1×10^1
Flurbiprofen	$\bar{C}_{ss,tot}$	$(2.7 \pm 0.03) \times 10^2$	4.2×10^2
	$\bar{C}_{ss,ved}$	$(4.9 \pm 0.01) \times 10^2$	8.7×10^1
EpiDerm			
Antipyrin		Calculated	Calculated
	$\bar{C}_{ss,tot}$	$(1.2 \pm 0.04) \times 10^5$	1.5×10^5
	$\bar{C}_{ss,ved}$	$(4.3 \pm 1.6) \times 10^4$	1.5×10^4
Flurbiprofen	$\bar{C}_{ss,tot}$	$(8.4 \pm 0.4) \times 10^3$	4.4×10^3
	$\bar{C}_{ss,ved}$	$(6.0 \pm 0.3) \times 10^3$	4.3×10^3

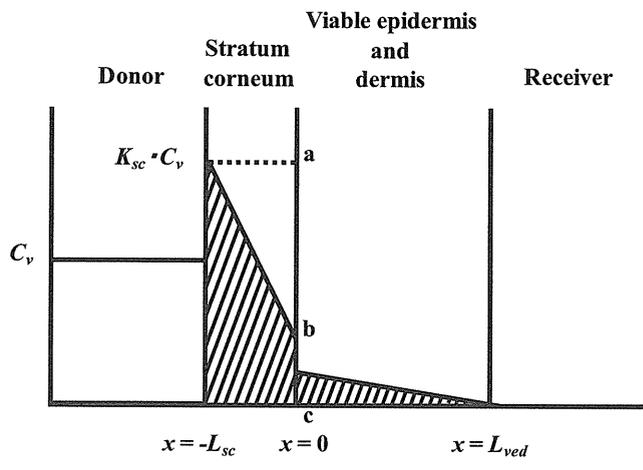


Fig. 1 Relationship between skin conc. and effect or toxicity

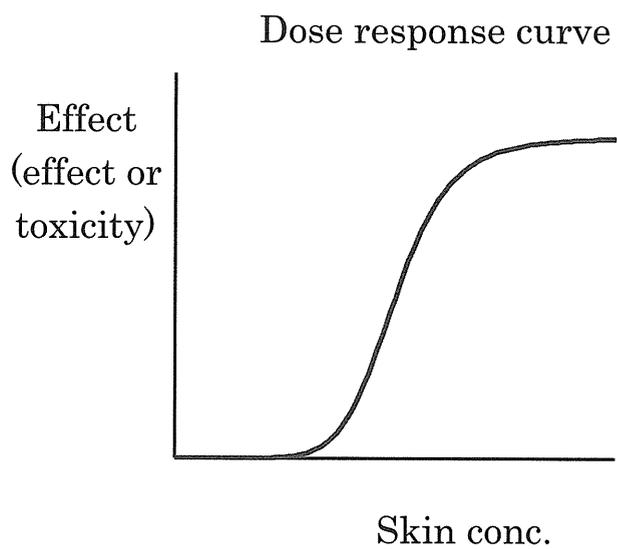


Fig. 2 Relationship between skin conc. and effect or toxicity of drugs

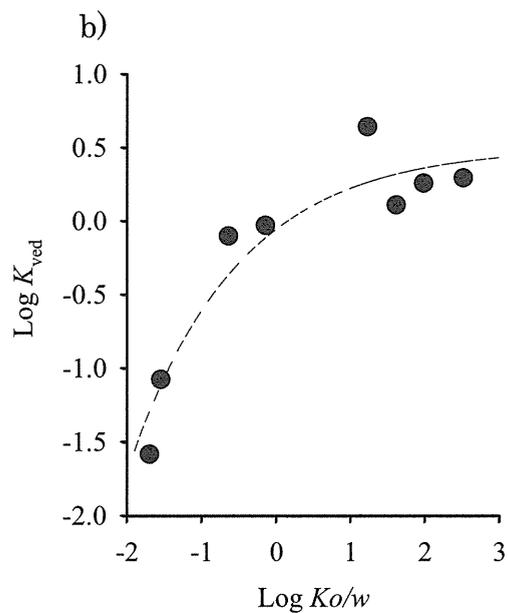
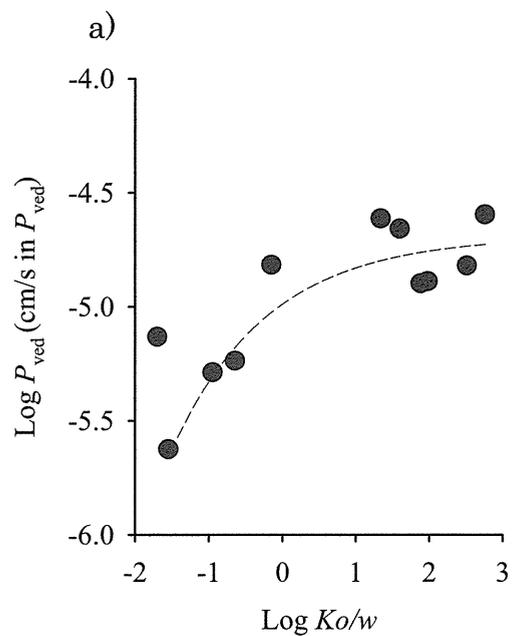


Fig. 3 Prediction models for permeability coefficients of drugs through stripped skin a) and partition coefficients of drugs into viable

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

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

分担研究者 山本 直樹（藤田保健衛生大学 共同利用研究施設 講師）

研究要旨

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を開発する。具体的には、不死化遺伝子を導入して作製した新規不死化角膜上皮細胞を用いて、NOAEL（無作用量）の検出を含めた試験法（二次元培養法と簡便で安定した三次元角膜再構築モデル）を検討し、新しい眼刺激性試験・眼毒性試験代替法を開発する。

山本が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）から山本がクローニングした細胞（nHCE-T）を用いた。まず平成22年度からの継続研究である正常角膜上皮培養細胞、iHCE-NY細胞、nHCE-Tを用いてマイクロアレイによる遺伝子解析を行った。次に、マイクロアレイによる遺伝子解析結果を基に、iHCE-NY細胞の二次元培養モデルを用いて、細胞に与える影響を検出できる高感度（被験物質がMTT法やCV法より低濃度）な指標（遺伝子マーカー）を選出した。さらに、2種類の不死化角膜上皮細胞（iHCE-NY、nHCE-T）を用いて、再現性が高く、安定して三次元角膜再構築モデルが作製できる培養方法を検討した。

iHCE-NYは不死化によって細胞増殖に関与する遺伝子群の発現が亢進しており、正常角膜上皮細胞に発現する遺伝子の過剰発現は観察されなかった。二次元培養におけるiHCE-NYを用いた曝露実験のプロトコール、および細胞毒性試験よりも高感度で細胞に対する影響を検出できる3遺伝子を選出した。iHCE-NYおよびnHCE-Tを用いて、既製品の三次元角膜再構築モデルと比較して安価で、再現性の良い三次元角膜再構築モデルを確立した。

平成24年度では、再現性の良い安定した三次元角膜再構築モデルを用いた細胞毒性試験のプロトコールを確立する。

協力研究者

山下 宏美 藤田保健衛生大学)

加藤 義直、佐藤 淳 日本メナード化粧品株式会社)

中村 政志、原 和宏 ホーユー株式会社

谷川 篤宏、谷口 孝喜、堀口 正之、平野 耕治
以上、藤田保健衛生大学

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。

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23年度の具体的な研究課題は、以下のとおりである。

1. 平成22年度からの継続研究である正常角膜上皮培養細胞、iHCE-NY細胞、nHCE-Tを用いてマイクロアレイによる遺伝子解析を行った。
2. マイクロアレイによる遺伝子解析結果を基に、iHCE-NY細胞の二次元培養モデルを用いて、細胞に与える影響を検出できる高感度（被験物質がMTT法やCV法より低濃度）な指標（遺伝子マーカー）を選出した。
3. 2種類の不死化角膜上皮細胞（iHCE-NY、nHCE-T）を用いて、再現性が高く、安定して三次元角膜再構築モデルが作製できる培養方法を検討した。

B. 研究方法

B-1. 細胞材料の現状

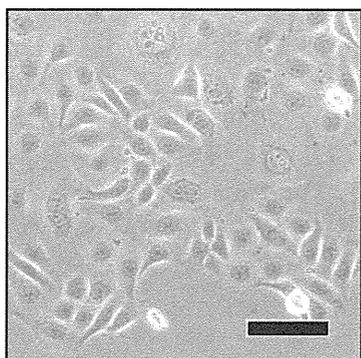
市販されている正常角膜上皮細胞は、2 継代程度しか維持させることができない。また、日本国内のヒト角膜組織から新たに研究目的で細胞を分離培養することが禁止されており、さらにヒト角膜上皮から比較的未分化な角膜上皮細胞を安定して分離・培養する方法が確立されていない。一方、既存の不死化角膜上皮細胞 (HCE-T) は、細胞樹立当時は重層化能をもっていたようであるが、度重なる継代の結果、現在では重層化能が減衰 (消失) してしまった細胞になっている。さらに樹立時にクローニングがされていないため、ヘテロな細胞集団である。

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細胞 (HCE) に山本が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。

一方、対照としてヒト角膜上皮から分離・培養した正常ヒト角膜上皮細胞に生ウイルスにSV40-*adeno virus*組換えウイルスベクターを導入して作成した不死化した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) を用いた。この細胞株は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。しかし、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、現在供給されている細胞は、細胞分化能 (重層化能) が減衰したと報告されている。



そこで、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 $\beta 1$) の発現量の相違と keratin-3 の発現を確認した細胞を用いて、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い、新たな細胞株 (nHCE-T) とした。

B-3. マイクロアレイ解析

平成22年度からの継続研究として、正常ヒト角膜上皮培養細胞、山本が作製した不死化角膜上皮細胞 (iHCE-NY細胞) および理化学研究所から分譲されている不死化角膜上皮細胞 (HCE-T) を山本がクローニングした細胞 (nHCE-T) のそれぞれの遺伝子発現解析を行い、不死化による正常細胞との違いを検証した。

B-3-1. 供試細胞

- HCE (正常ヒト角膜上皮培養細胞)
- iHCE-NY (不死化角膜上皮細胞)
- nHCE-T (不死化角膜上皮細胞)

B-3-2. 使用キットと試薬

- CodeLink™ Bioarray (Applied Microarrays, Inc.)
- CodeLink™ Controls and Buffer kit (Applied Microarrays, Inc., cat# 320001)
- Message Amp™ II - Biotin Enhanced Kit (Life Technologies Corporation (Ambion), cat.# AM1791)
- Cy5 streptavidin for microarray (GE Healthcare Bio-Science Corp., cat.# 28-9002-24)
- 1 x TNT buffer; 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, and 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6)
- Cy5 - streptavidin working solution; 10 μ g Cy5 - streptavidin and 5 ml TNB buffer
- TNB buffer; 0.5% NEN blocking reagent (PerkinElmer, cat.# FP1020), 0.05% Tween 20, and 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6)

B-3-3. 標識 aRNA の作製とハイブリダイ

ゼーション

1. Total RNA QC チェックを、分光光度計または Agilent 2100 バイオアナライザーを用いて行う。
2. Total RNA 1 ug を分取する。
3. MessageAmp™ II-Biotin Enhanced Kit を用いて、標識 aRNA を作製する。
4. 10 ug 標識 サンプル 及び 5 x fragmentation buffer を用いて、94 °C、20 分加温後クラッシュアイスで急冷する。
5. 以下の溶液を用いて、ハイブリダイゼーション溶液 260 ul を調製する。
78 ul hybridization buffer component A
130 ul hybridization buffer component B
27 ul nuclease-free water
25 ul fragmented aRNA
6. ハイブリダイゼーション溶液を 90°C で 5 分間インキュベートした後、室温になるまで放置し、マイクロアレイ上にアプライする。
7. マイクロアレイをチャンバー内に入れ、37°C、18 時間 (300 rpm) インキュベートする。
8. ハイブリダイズしたアレイを 0.75 x TNT buffer で 46°C、60 分間洗浄する。
9. アレイを Cy5 - streptavidin working solution に 25°C、30 分浸す。
10. アレイを 1 x TNT buffer で 25°C、5 分間洗浄を 4 回繰り返す。
11. アレイを 0.1 x SSC/0.05% Tween 20 溶液で 25°C、30 秒間洗浄を 2 回繰り返す。
12. アレイを 25°C、600 x g、3 分間遠心乾燥する。

B-3-4. スキャニングとデータ解析

1. アレイ用スキャナー GenePix® 4000B (Molecular Devices 社) を用いて、洗浄後のアレイのスライドのスキャニングを行う。
2. 解析ソフトウェア CodeLink™ Expression Analysis Software v5.0 (Applied Microarrays, Inc.) を用いて、得られたイメージ画像 (TIFF 画像、16bit 形式) から、各スポットにおける蛍光強度値の定量化を行う。その際に、各スポットの蛍光強度値 (raw intensity) からバックグラウンド値

(background) の差をシグナル値 (net intensity) として算出する。

B-4. iHCE-NY 細胞の細胞毒性試験

iHCE-NY 細胞の二次元培養モデルを用いて、高感度 (被験物質が MTT 法や CV 法より低濃度) で細胞に与えるわずかな影響も検出できる指標 (遺伝子マーカー) の選出と実験手法を確立する。

B-4-1. iHCE-NY 細胞の培養条件検討 (播種細胞数・前培養時間・後培養時間)

2 回/週の頻度で継代培養している細胞を酵素処理 (TRYPLE™ SELECT, Gibco 12563-011) にて剥離回収した。細胞懸濁液を培地にて 1.0E+06 cells/ml に調製し、公比 2 にて 11 段階希釈した後、96 ウェルプレート (CellBIND, Costar 3300) に 100 µl ずつ播種した。

播種したプレートは 1 日間あるいは 2 日間前培養した (37°C, 5% CO₂)。

前培養後、培地を交換してさらに 1 日、あるいは 2 日の後培養した (37°C, 5% CO₂)。

それぞれ後培養が終了した後、ニュートラルレッド (NR [Wako 140-00932]) の取り込み試験を行った。なお対照として後培養なしの条件でも試験を行った。後培養の後、培地を NR 含有培地 (50 µg/ml) に置換して、2 時間静置した (37°C, 5% CO₂)。PBS (-) にて洗浄後、抽出液 (水 : エタノール : 酢酸 = 49:50:1) を添加し 3 時間以上室温 (暗所) にて静置した。吸光マイクロプレートリーダー (VersaMax, Molecular Devices) にて吸収波長 540nm および 650nm の吸光度を測定した。

B-4-2. 曝露時間の検討

前培養時間を 1 日、後培養時間を 1 日として、播種細胞数を 4 濃度 (5.0E+04, 2.5E+04, 1.25E+04, 6.25E+03 cells/well) で設定した。

被験物質として SLS (Sigma L6026) を用いた。曝露時間は、1 分、5 分、30 分を検討した。曝露に関わる一連の操作 (培地除去、被験物質添加と除去および洗浄) については分注機 (EDR-384U, BioTec) を用いて 96 ウェルを同時に処理した。それぞれの条件における NR 取り込み試験の結果から、SLS の IC₅₀ 値を算出した。

B-4-3. 培養細胞の RNA 抽出条件の検討

培養細胞から RNA を抽出する試薬として、CellAmp® Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (Real Time) (TaKaRa 3732) を用いた。96 ウェルフォーマットでの操作を考慮し、培養細胞から安定的に RNA を抽出するための酵素処理法 (Proteinase K プロトコール) を検討した。この方法は試薬キットの説明書中にオプションとして記載されているが、手順書に記載された反応時間 (5 分) を順守すると処理するウェル数が限られてしまう。そこで、反応時間を 10 分、あるいは 20 分に延長した場合でも得られる RNA 量に影響が無いか確認した。

また、PCR の効率を向上させる目的で、抽出した RNA の純度を上げる操作 (試薬に溶解しない物質の除去) がどうか検討した。抽出した RNA 試料を遠心分離し (9,000 × g, 5 分)、上清について分光光度計 (NanoDrop® ND-1000) を用いて 260nm と 280nm の吸光度比を測定して RNA の純度に影響があるか確認した。

B-4-4. 2 種類の被験物質 (SLS、エタノール) による曝露実験

曝露条件として、播種細胞数を 3 濃度 (5.0E+04, 2.5E+04, 1.25E+04 cells/well)、前培養 1 日、曝露時間 5 分あるいは 30 分、後培養 1 日と設定した。SLS およびエタノール (Wako 057-00456) について、細胞生存率に影響のない濃度が含まれるようにそれぞれ 7 濃度の希釈系列を作製して被験物質とした。ここまでの曝露実験は、NR 取り込み試験用と RNA 抽出用に 96 ウェルプレート 2 枚を 1 セットで調製した。

この処理によって調製された 2 枚のプレートから、1 枚は NR 取り込み試験を実施して、各被験物質の細胞生存率を算出した。

残りの 1 枚は RNA 抽出試薬および Proteinase K プロトコールを用いて RNA を抽出した。RNA 試料は遠心し、その上清を分光光度計によって品質を確認した後、次に使用するまで凍結保存した (-80°C)。これを遺伝子マーカー発現の変動について解析する試料とした。

B-5. 高感度指標 (マーカー) の検索

データベースを基に BLAST サーチを行

い、先に実施した microarray 上にスポットしてある 54,841 遺伝子から角膜上皮細胞に比較的特化して発現している遺伝子、microarray の結果を基にした細胞周期関連遺伝子、細胞死の関連遺伝子などの候補遺伝子 (28 gene + 2 Endogenous Control) を以下のように絞り込んだ。

1) 角膜上皮細胞マーカー

- p63
- Mucin-1
- Mucin-16
- Keratin-3
- Keratin-12

2) 細胞接着因子

- ZO-1
- E-cadherin
- Desmoglein-3
- Occludin
- Involucrin
- CD29
- CD44
- Trk-A

3) 細胞周期マーカー

- Ki-67
- PCNA
- Cyclin-D1
- p15
- p21
- p27

4) アポトーシス関連因子

- Caspase-3
- Caspase-7
- Bcl-2
- BAX
- Snail-1
- Snail-2

5) 細胞内タンパク質

- Type-1 collagen
- MMP-9
- Beta-catenin

6) Endogenous Control

- GAPDH
- 18S rRNA

上記の候補遺伝子の発現について iHCE-NY 細胞に SLS と EtOH の各濃度を曝露して遺伝子発現量の変化を調査した。

B-6. 核型解析 (Karyotype)

カリオタイプは種ごとに一定であり、ヒ

トの正常 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。不死化遺伝子を導入した iHCE-NY 細胞は、樹立当初、正常の角膜上皮細胞と同様の染色体数ではあったが、染色体の一部が隆起した所見が観察されていた。そこで、長期間にわたる連続継代 (80 継代) によって、iHCE-NY 細胞の染色体数がどのように変化するかを検証するため、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 µg/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-7. 三次元角膜再構築モデルの作製

B-7-1. 供試細胞

- ・ nHCE-T (不死化角膜上皮細胞)
- ・ iHCE-NY (不死化角膜上皮細胞)

B-7-2. モデル構築の培養条件検討

以下の項目について、様々な条件で検討した。

- ・ セルカルチャーインサートの検討
メーカーとインサートの各種ポアサイズ (6 種類)
- ・ コーティング物質の検討
コラーゲンソリューションなどのコーティング試薬 (5 種類)
- ・ 分化誘導培地の組成
血清濃度、成長因子濃度、培地ミネラル濃度、抗酸化物質、タンパク質分解阻害剤などの濃度
- ・ 培養日数とプロトコール
継代維持培地から分化誘導培地、その後のエアリフト培養の各工程における培養日数
- ・ 培地 (培養液) の液量
インサート外液とインサート内液の各培養ステップにおける培地の液量の検討

(倫理面への配慮)

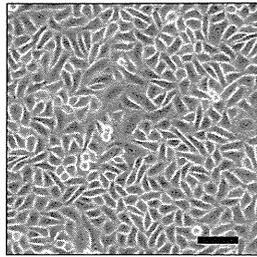
本研究で使用したヒト正常角膜上皮細胞は、市販されている細胞、研究用で販売・分譲されている細胞、および研究用として購入した眼球 (角膜) 組織から分離培養した細胞を用いているため、特別な倫理面への配慮は必要ないと考えている。

C. 研究結果

C-1. 供試細胞

C-1-1. HCEの初代分離培養

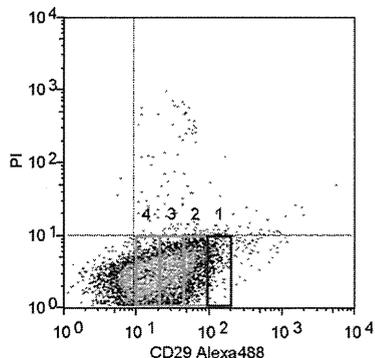
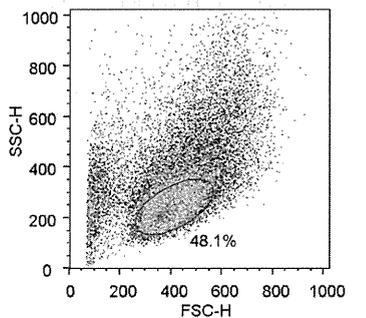
研究目的で米国アイバンク (Northwest Lions Eye Bank) より購入した眼球組織の角膜輪部より角膜上皮幹/前駆細胞の分離を行った。



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-1-2. HCE-T のクローニング (nHCE-T 細胞株の分離・樹立)

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



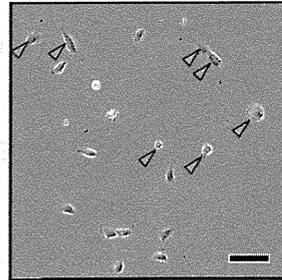
の発現強度について、いくつかの条件でソーティングした。

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。

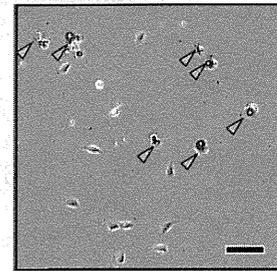
次に従来の限界希釈法よりも多い細胞数

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。

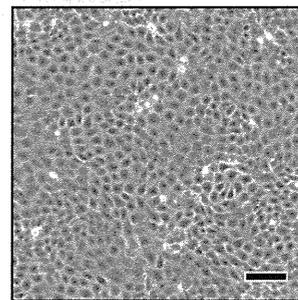
レーザー照射前



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-2. マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析に用いた細胞サンプル (HCE、iHCE-NY、nHCE-T) から RNA を抽出した結果を図1に示す。マイクロアレイ解析を行うために十分な精製度と濃度の RNA が回収できた。

HCE と iHCE-NY のマイクロアレイバーサスデータを図2-a) に示す。プローブ数 (スポット数) 54,841 個のうち、HCE が iHCE-NY より発現が 2 倍上昇 (2 up) しているスポット数は 1965 個、3 倍上昇 (3 up) しているスポット数は 527 個、4 倍上昇 (4

up) しているスポット数は220個であった。一方、発現が1/2に低下 (2 down) しているスポット数は1758個、1/3に低下 (3 down) しているスポット数は521個、1/4に低下 (4 down) しているスポット数は264個であった。

GO Term Listを用いて、4 upおよび4 downの遺伝子機能解析の結果を図2-bに示す。HCEと比べてiHCE-NYの方が4 upしている遺伝子は、細胞周期関連遺伝子が殆どであり、4 downしている遺伝子は、細胞接着に関連する遺伝子が多かった。

次にBioSystems Pathway Listを用いて遺伝子パスウェイ解析を行った。HCEよりもiHCE-NYの方が4 upしているパスウェイは、Cell cycle, Mitoticを中心に25個であり、4 downしているパスウェイは、ECM-receptorやCell junctionなどを中心に48個であった。

また、HCEに対して各々iHCE-NYとnHCE-Tが2 up、2 down、3 up、3 down、4 up、4 downしている遺伝子、およびiHCE-NYとnHCE-Tが共に2 up、2 down、3 up、3 down、4 up、4 downしている遺伝子の数を図2-cに示す。iHCE-NYとnHCE-Tが共に4 upしているパスウェイは、Cell cycle, Mitoticなどを中心に8個であり、4 downしているパスウェイは、ECM-receptorやCell junctionを中心に19個であった。

C-3. iHCE-NY 細胞の細胞毒性試験

C-3-1. iHCE-NY 細胞の培養条件検討 (播種細胞数・前培養時間・後培養時間)

各条件のNR取り込み量(吸光度:540nm & 650nm)と細胞播種濃度との関係から、NR取り込み量が飽和する条件を確認した。特に前培養2日、後培養2日、播種細胞数が $1.0E+05 \sim 6.25E+03$ cells/wellの条件では顕著であった(図3-1a)。一方、前培養1日の結果から、NR取り込み量が飽和になるためには、十分な細胞播種濃度が必要であることを確認した(図3-1b)。

この検討では、後培養時間の条件設定を行うものであるが、前培養の後にも十分に細胞が増殖できる条件が望ましい。この条件を満たす細胞播種濃度は、前培養1日の場合 $5.0E+04$ cells/well以下、前培養2日の場

合 $2.5E+04$ 以下が適当と考えられた。また、その後のNR取り込み試験やRNA抽出を考慮すると、ある程度の細胞数が必要と推定し、吸光度が飽和の半分程度(0.5前後)となる条件を最低必要な細胞数と設定した。さらに試験実施期間の短縮のため前培養日数、および後培養日数を1日に固定した。これらの設定から、iHCE-NY細胞の培養条件として、播種細胞数4濃度 ($5.0E+04$, $2.5E+04$, $1.25E+04$, $6.25E+03$ cells/well)、前培養1日、後培養1日を後の検討に用いた。

C-3-2. 曝露時間の検討

播種細胞濃度別のNR取り込み試験結果を図3-2a, 2b, 2c, 2dに示す。播種細胞数が $5.0E+04 \sim 1.25E+04$ cells/wellの場合、曝露したSLSの濃度に関係なくNR取り込み量あるいは細胞生存率は安定しているが、播種細胞数を $6.25E+03$ cells/wellまで少なくすると細胞生存率のバラツキが大きくなった。

また、播種細胞数と曝露時間の組合せ条件におけるSLSの IC_{50} 値について比較した結果を図3-2eに示す。検討した曝露時間の中で最も長い30分の場合、SLSの IC_{50} 値は検討した全ての播種細胞数において非常に安定していた。播種4濃度全体の IC_{50} 値のCV値が11%(平均 $85 \mu\text{g/mL}$ 、標準偏差 $9.7 \mu\text{g/mL}$)であったことから播種細胞数の影響が少ないことが示された。

曝露時間が1分あるいは5分の場合、播種細胞数に影響を受け易い事が示された。

曝露時間1分と5分におけるSLSの IC_{50} に大きな違いが見られなかった事から、作業の実行可能性を考慮して曝露時間1分の条件は不採用とした。

この後の遺伝子マーカー選出のための曝露条件として5分と30分を後の検討に用いた。また、播種細胞数として、得られるデータの安定性が確保できていた $5.0E+04$, $2.5E+04$, $1.25E+04$ cells/wellをこの後の検討で使用した。

C-3-3. 培養細胞のRNA抽出条件の検討

図3-3にProteinase K反応時間とRNA量および、吸光度比(260nm/280nm)を示す。Proteinase Kの反応時間を20分まで延長した場合でも、得られるRNA量や

純度に大きな影響は見られなかった。また、遠心操作の有無については、播種細胞数が $5.0E+04 \sim 2.5E+04$ cells/well の場合は、得られる RNA 量や純度に大きな影響は見られなかったが、 $1.25E+04$ cells/well と少なくなると遠心上清の方が得られる RNA 量や純度が向上していた。

これらの結果から、RNA を抽出する条件として、Proteinase K の反応時間を 20 分まで延長し、純度向上のため遠心操作を加え、その上清を遺伝子マーカー発現の変動について解析する試料とした。

C-3-4. 2種類の被験物質 (SLS、エタノール) による曝露実験

曝露条件として、播種細胞数を3濃度 ($5.0E+04$, $2.5E+04$, $1.25E+04$ cells/well)、前培養1日間、曝露時間5分あるいは30分、後培養1日間と設定した。SLSおよびエタノール (Wako 057-00456) について、細胞生存率に影響のない濃度が含まれるようにそれぞれ7濃度の希釈系列を作製して被験物質とした。

この条件において得られた細胞生存率 (NR取り込み試験) およびRNAの量と純度について、図3-4a, 4b に示す。

C-4. 高感度指標 (マーカー) の検索

曝露条件として、播種細胞数を3濃度 ($5.0E+04$, $2.5E+04$, $1.25E+04$ cells/well)、前培養1日、曝露時間5分あるいは30分、後培養1日と設定した。

SLSおよびエタノールについて、細胞生存率に影響のない濃度が含まれるようにそれぞれ7濃度の希釈系列を作製して被験物質とした。具体的には、SLSは400, 267, 178, 119, 79, 53, 35 $\mu\text{g/mL}$ 、EtOHは24, 19, 15, 12, 10, 8, 6%の濃度で曝露し、候補遺伝子 (28 gene + 2 Endogenous Control) の発現量の推移を調査した。

Endogenous Controlと比較して、Cyclin-D1はCt値より-0.5の濃度で細胞毒性試験のIC₅₀値より1濃度低くても細胞に対する影響を検出できた。同様に、snail-1とkeratin-3はCt値より+0.5の濃度で細胞毒性試験のIC₅₀値より1濃度またはそれ以上薄い濃度において細胞に対する影響を検出できた (表1)。

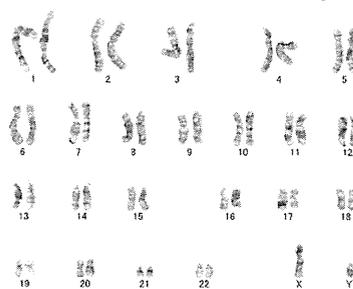
なお、細胞毒性実験におけるIC₅₀値は、

各被験物質で曝露後に回収されたtotal-RNA濃度と無処置のウェルから回収したtotal-RNA濃度の関係から予測することが可能であった (表2)。

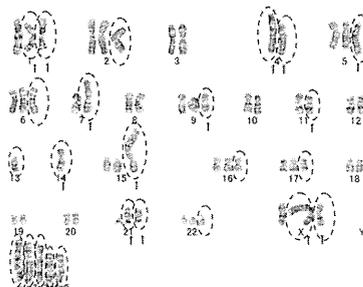
C-5. 核型解析 (Karyotype)

HCE、nHCE-T、iHCE-NY (5 passage) およびiHCE-NY (80 passage) の核型解析を行った。

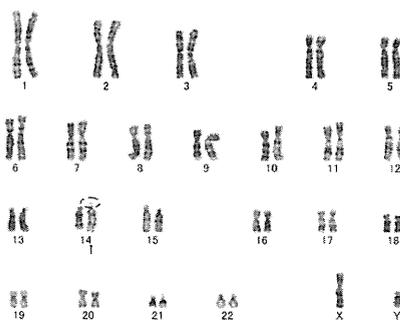
HCEのモードは46であった。



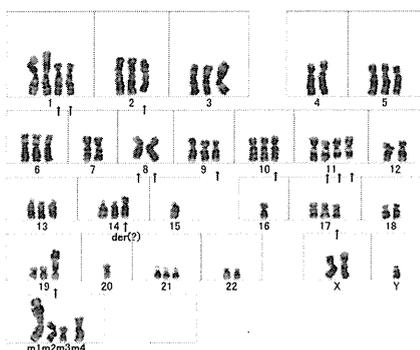
nHCE-Tのモードは59であった。



iHCE-NY (5 passage) のモードは46であった。



iHCE-NY (80 passage) のモードは 63 ~65 であった。



C-6. 三次元角膜再構築モデルの作製

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、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。市販されている三次元角膜再構築モデルのホームページ情報と比較した結果を図4に示す。

D. 考察

D-1. nHCE-T 細胞株の分離・樹立

ヒト角膜上皮から分離・培養した正常ヒト角膜上皮細胞に生ウイルスにSV40-*adeno virus* 組換えウイルスベクターを導入して作成した理化学研究所より分譲されているヒト不死化角膜上皮細胞株(HCE-T)は、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、現在供給されている細胞は、細胞分化能(重層化能)が減衰したと報告されている。

今回、HCE-T細胞の中から分化能を有する細胞を細胞の性質を変えずに独自の手法で分離して樹立したnHCE-T細胞株は、今年度の研究において、三次元的に角膜構造を再構築できる分化能を有していることが明らかとなった。

D-2. マイクロアレイ解析による比較

新たに樹立したiHCE-NY細胞は、従来

のヒト不死化角膜上皮細胞からクローニングしたnHCE-Tと同様に正常角膜上皮細胞のHCEと比べて発現が増加している遺伝子は、主にCell cycle, Mitoticを中心とした細胞周期や細胞増殖に関与するものであった。一方、発現が減少している遺伝子は、ECM-receptorやCell junctionなど細胞接着や細胞膜タンパク質の一部であり、細胞の培養環境への適応や継代による細胞増殖の安定性によって、発現遺伝子が減少したものと考えられる。角膜上皮細胞のマーカー遺伝子として代表されるものは、不死化によって減少することがなかったことから、不死化による角膜上皮細胞としての特異性が低下することはなかった。

D-3. iHCE-NY細胞の細胞毒性試験

播種細胞数の検討では、 $6.25E+03$ cells/well まで少なくすると細胞生存率のバラツキが大きくなった。これは細胞数が不十分であったためNRの取り込み量も少なくなり、細胞生存率を計算する際に除数(分母)の値が小さくなることからバラツキが増幅されていることに起因すると考えられた。

被験物質の曝露時間の検討では、曝露時間が1分あるいは5分の場合は、播種細胞数に影響を受け易い事が示された。この結果から、SLSの IC_{50} 値は、曝露時間が短くなる程、播種細胞数の影響を受け易くなるということが考えられた。

各種の条件検討の結果から、二次元培養におけるiHCE-NY細胞の曝露実験のプロトコールは、以下のように結論付けた。

- 前培養：24時間
- 曝露時間：30分
- 播種細胞数： 2.5×10^4 cell/well
- 後培養：24時間

D-4. 高感度指標(マーカー)の検索

Endogenous Controlと比較して、Cyclin-D1, snail-1, keratin-3は細胞毒性試験の IC_{50} 値より1濃度またはそれ以上薄い濃度において細胞に対する影響を検出できた。

また、各被験物質で曝露後に回収されたtotal-RNA濃度と無処置のウェルから回収したtotal-RNA濃度の関係から、細胞毒性試験の IC_{50} を予測することが可能であった。

D-5. 核型解析 (Karyotype)

正常角膜上皮細胞はモード 46 で正常な染色体数であった。市販されている nHCE-T 細胞はモード 59 で異常染色体が形成されていた。

一方、iHCE-NY も細胞樹立初期の 5 passage までは、モード 46 で正常細胞と同じ染色体数であった。ただし、14 番染色体の先端に隆起が観察されていた。80 passage まで培養を連続継代することでモードは 63~65 に変化していた。そもそも SV40 の導入によって細胞が不死化するメカニズムは完全に解明されていない。また現状の遺伝子導入法では、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かったが、近年の研究では目的遺伝子の導入する領域を調整できる手法が確立されている。

D-6. 三次元角膜再構築モデルの作製

市販されている三次元角膜再構築モデルは、生体の角膜構造とはかなり異なっていると思われる。

分離・樹立した nHCE-T や iHCE-NY は、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. 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。

SV40 の導入によって、平成 22 年度に行ったプロテオミクスおよび平成 23 年度に行った DNA microarray による遺伝子発現解析の結果から、遺伝子から発現タンパク質までにおいて、ドラスティックな変化はない

ことが明らかとなった。

平成 23 年度の研究成果をまとめると、以下のとおりになる。

1. iHCE-NY は不死化によって細胞増殖に関与する遺伝子群の発現が亢進しており、正常角膜上皮細胞に発現する遺伝子の過剰発現は観察されなかった。
2. 二次元培養における iHCE-NY を用いた曝露実験のプロトコルを確立した。
3. SLS や EtOH を用いた曝露実験を行い、細胞毒性試験よりも高感度で細胞に対する影響を検出できる 3 遺伝子 (cyclin-D1, snail-1, keratin-3) を決定した。
4. 細胞毒性試験における IC50 値は、サンプルから回収された total-RNA の濃度に相関する。
5. iHCE-NY および nHCE-T を用いて、既製品の三次元角膜再構築モデルと比較すると安価で、簡便な三次元角膜再構築モデルを再現性よく確立することができた。
6. 三次元角膜再構築モデルの標本作製法を確立した。

平成 24 年度の研究では、以下の内容を行っていく。

1. 三次元角膜再構築モデルに分布する特異的タンパク質の検索。
2. 三次元角膜再構築モデルを用いた細胞毒性試験のプロトコルを検討する。
3. 三次元角膜再構築モデルの品質管理および品質管理法を検討する。
4. iHCE-NY と nHCE-T ではなく市販供給されている HCE-T を用いて三次元角膜再構築モデルの作製を検討して比較する。
5. 既存モデルとの差別化について検討する。
6. 三次元角膜再構築モデルを用いた最近の眼刺激性試験代替法で検討されている評価方法 (電気抵抗、フルオレセイン透過試験など) での検証。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Yamamoto N., Hirano K., Sumitomo M., Yamashita H., Nakamura M., Hara K., Tanikawa A., Horiguchi M., Taniguchi K., Kojima H. Generation and analysis of a new immortalized human corneal epithelium cell line. 2011 In Vitro Biology Meeting, North Carolina, 2011. [添付資料-①]
- 2) 山本直樹、平野耕治、小島肇、住友万里子、山下宏美、中村政志、原和宏、谷川篤宏、谷口孝喜、堀口正之. ヒト角膜組織より分離した角膜上皮細胞への不死化遺伝子の導入と評価. 日本組織培養学会第84回大会, 東京, 2011.
- 3) 山本直樹. 新規作出したヒト角膜不死化細胞を用いた眼刺激性試験評価系の検討. 日本動物実験代替法学会第24回大会, 宮城, 2011.

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。

図 1. マイクロアレイ解析で使したサンプルの精製度

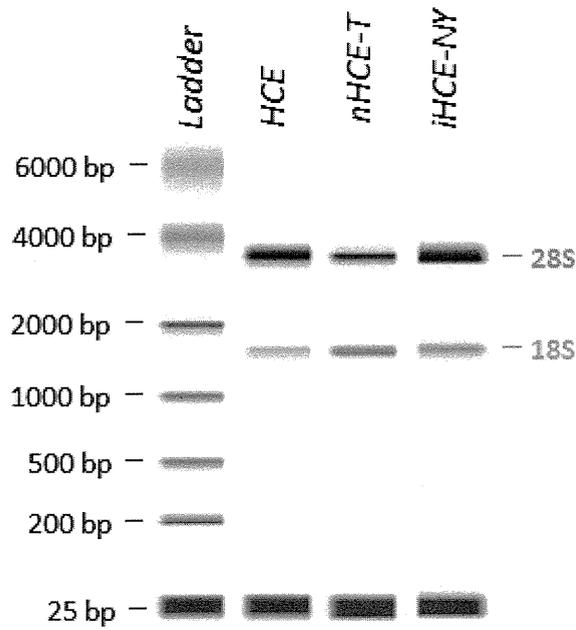
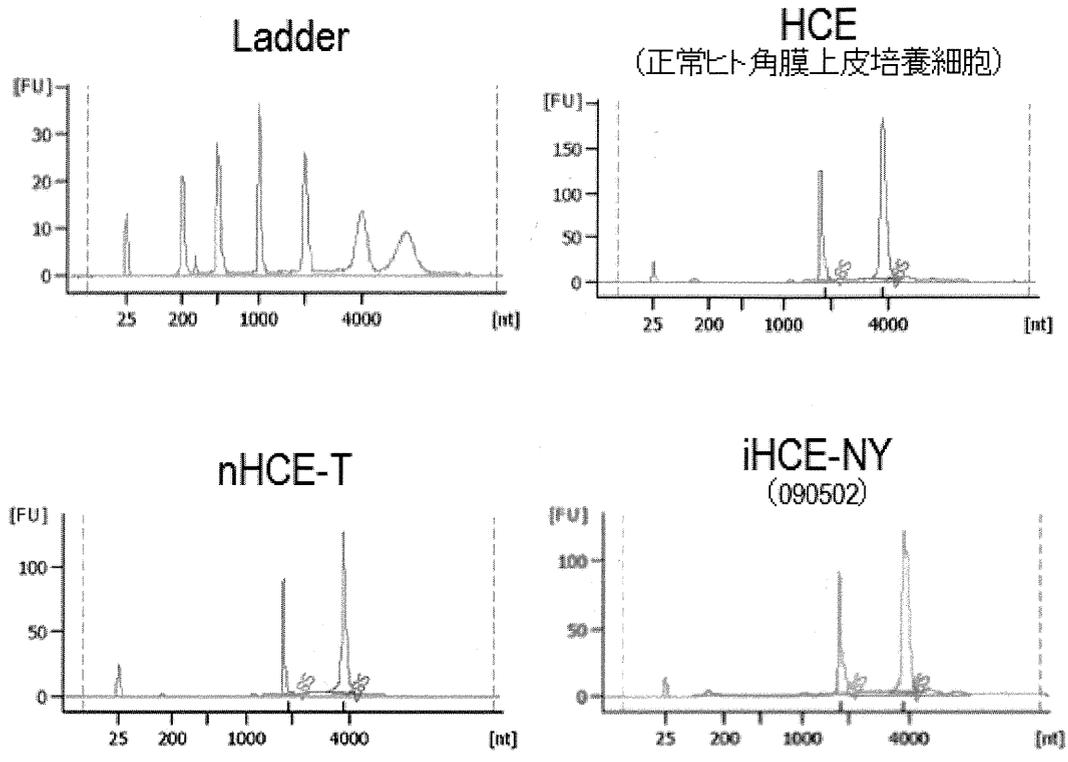


図 2-a. 実際のマイクロアレイのスポット (HCE v.s. iHCE-NY)

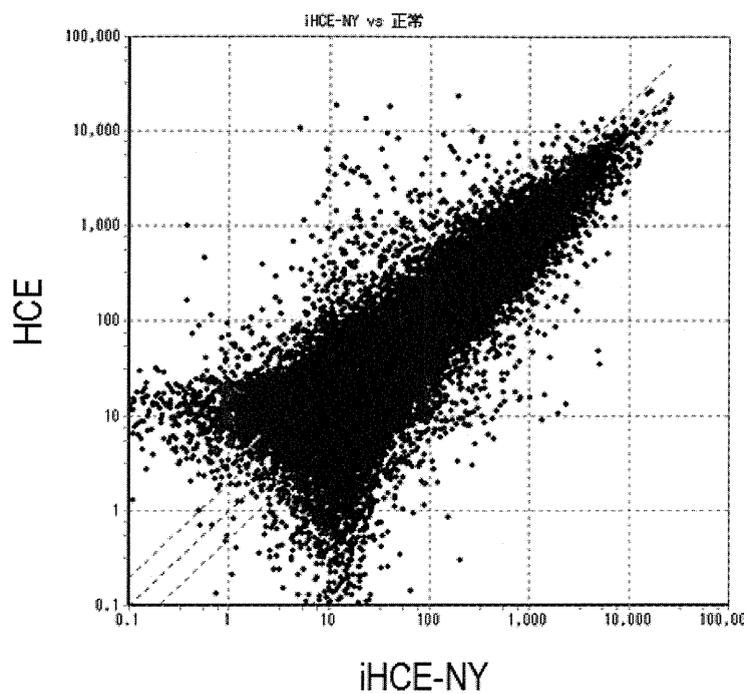
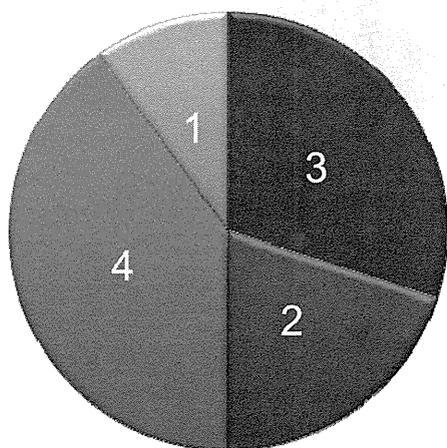


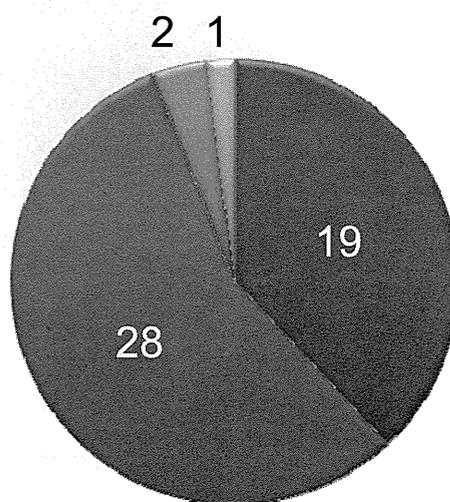
図 2-b. 遺伝子機能解析

4 up



- chromosome segregation
- protein targeting
- cell division
- mitosis

4 down



- cell adhesion
- extracellular region
- extracellular space
- cell-cell signaling