

図 2-c. HCE に対する iHCE-NY と nHCE-T の遺伝子発現の比較

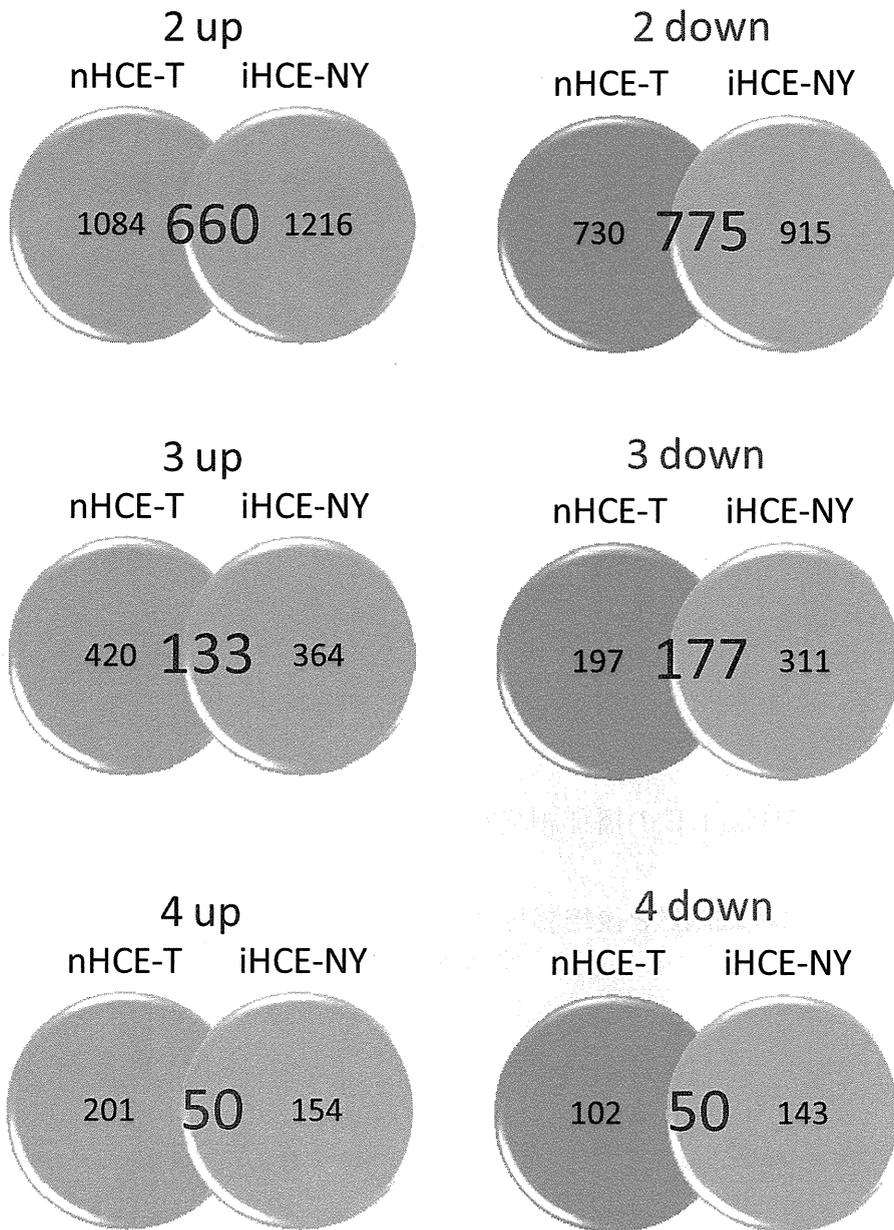


図 3-1a. 前培養日数 2 日の播種細胞数と後培養日数における NR 取込み量

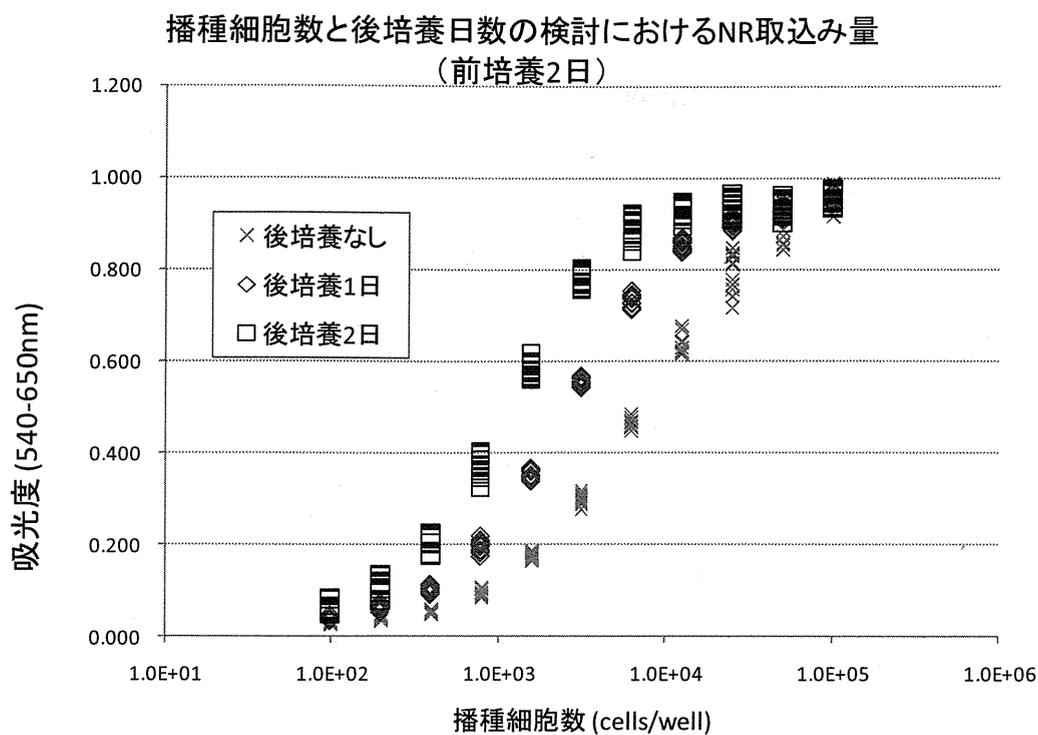


図 3-1b. 前培養日数 1 日の播種細胞数と後培養日数における NR 取込み量

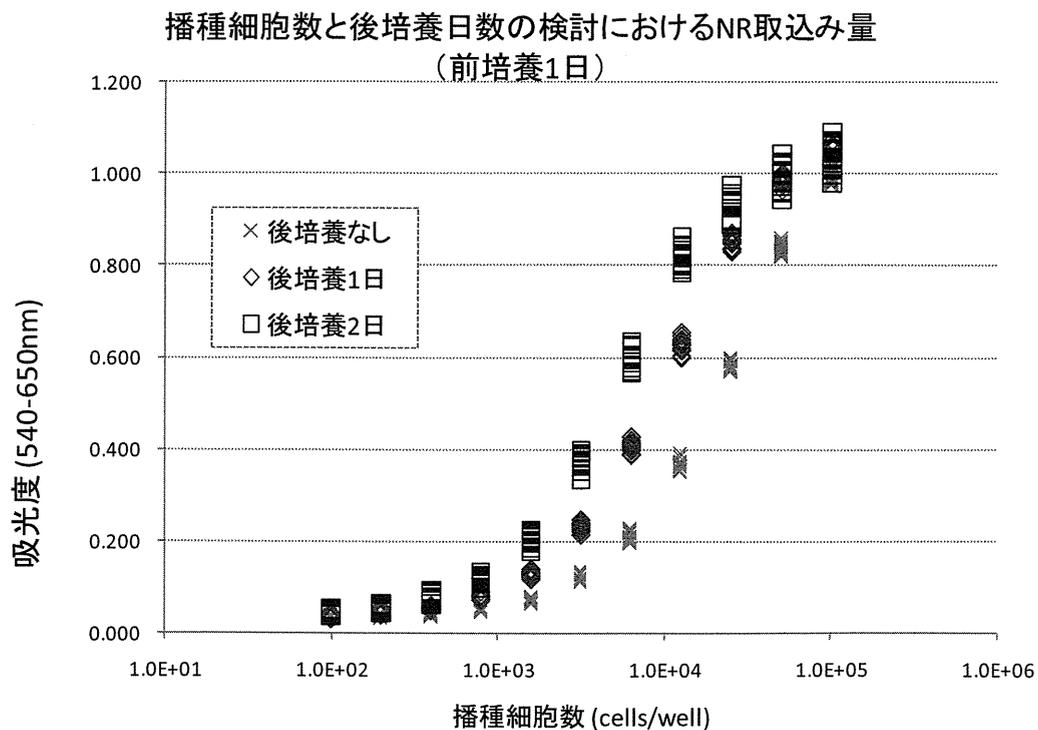


図 3-2a. 播種細胞数 5.0E+04 cells/well における SLS 曝露時間の影響

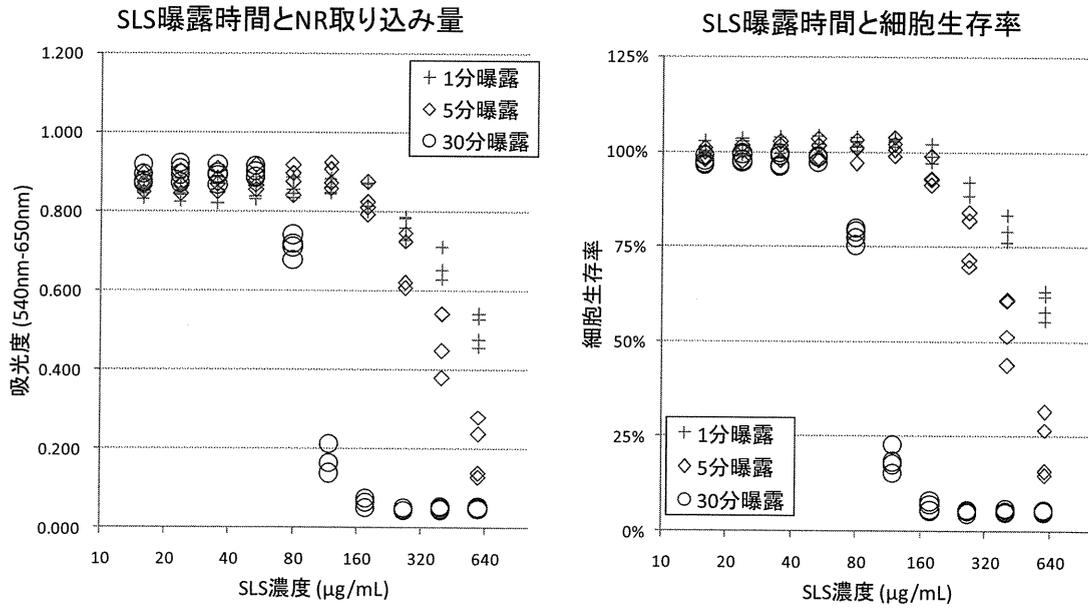


図 3-2b. 播種細胞数 2.5E+04 cells/well における SLS 曝露時間の影響

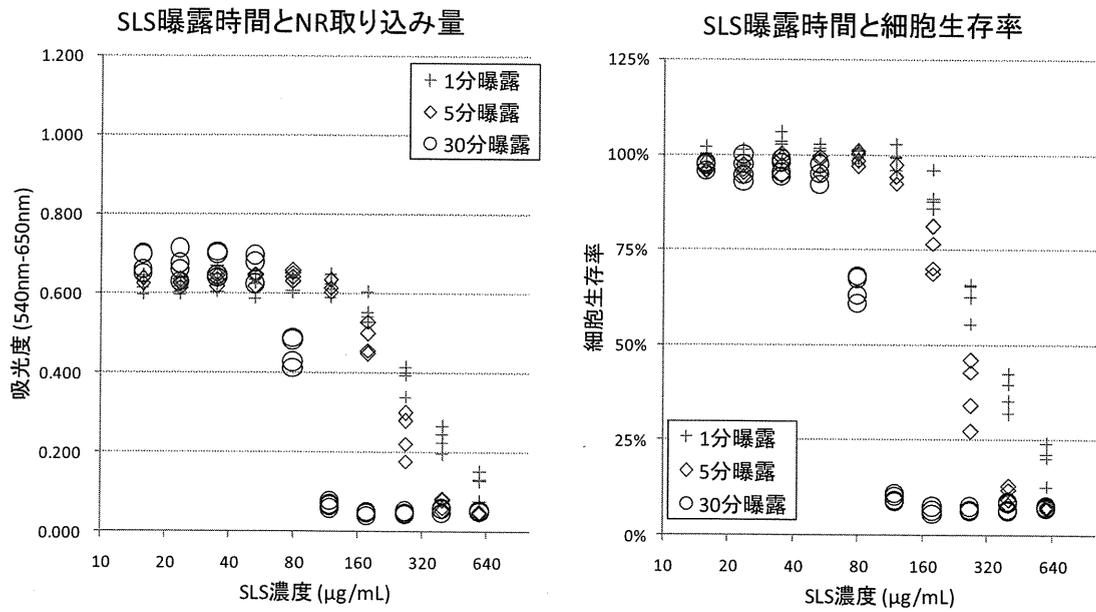


図 3-2c. 播種細胞数 1.25E+04 cells/well における SLS 曝露時間の影響

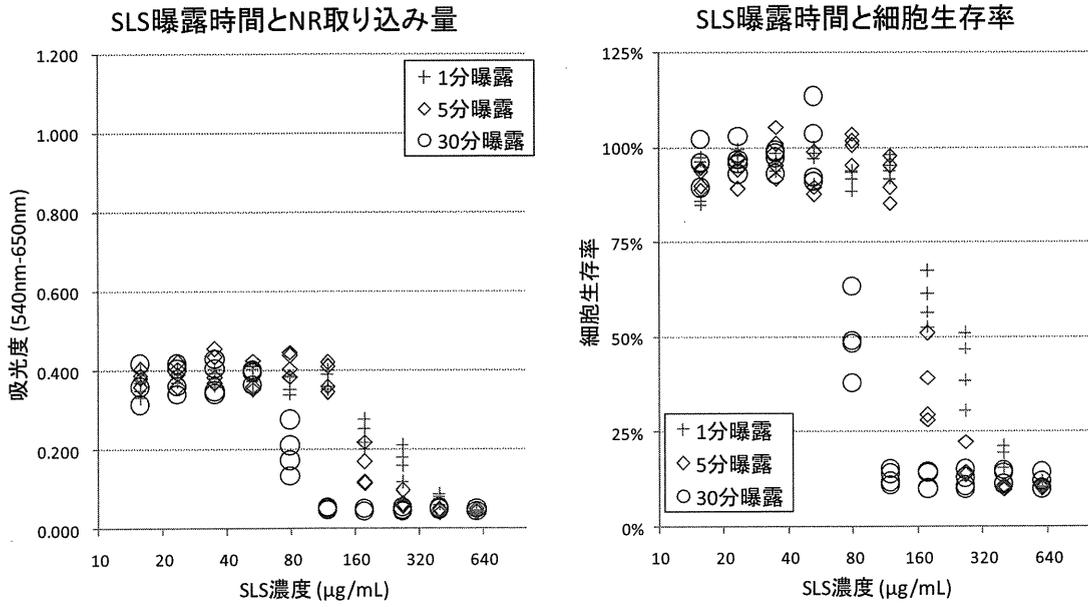


図 3-2d. 播種細胞数 6.25E+03 cells/well における SLS 曝露時間の影響

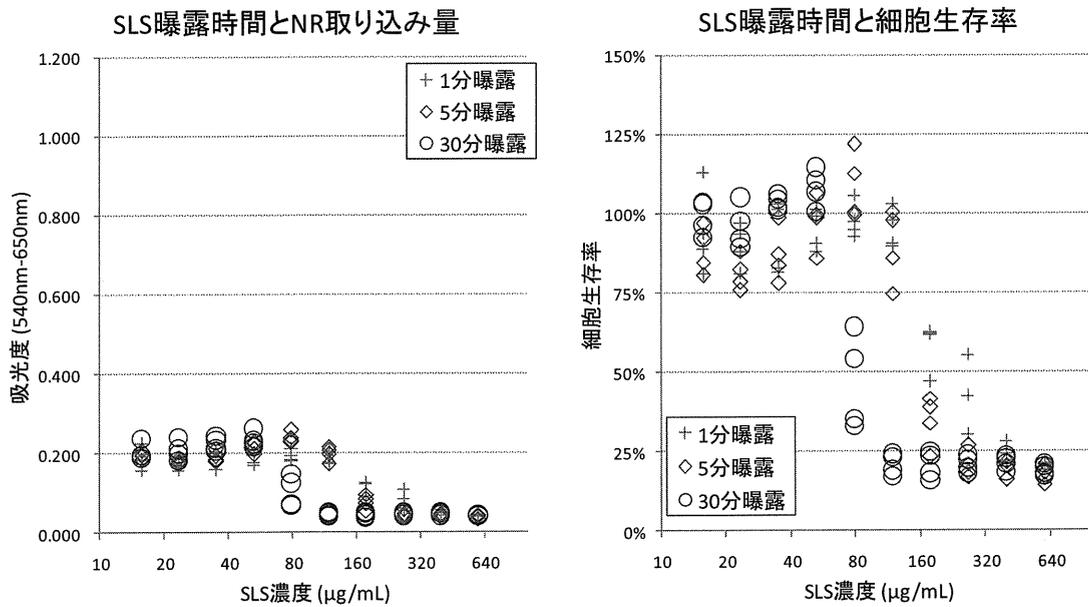


図 3-2e. 播種細胞数と曝露時間の組合せにおける SLS の IC₅₀ 値

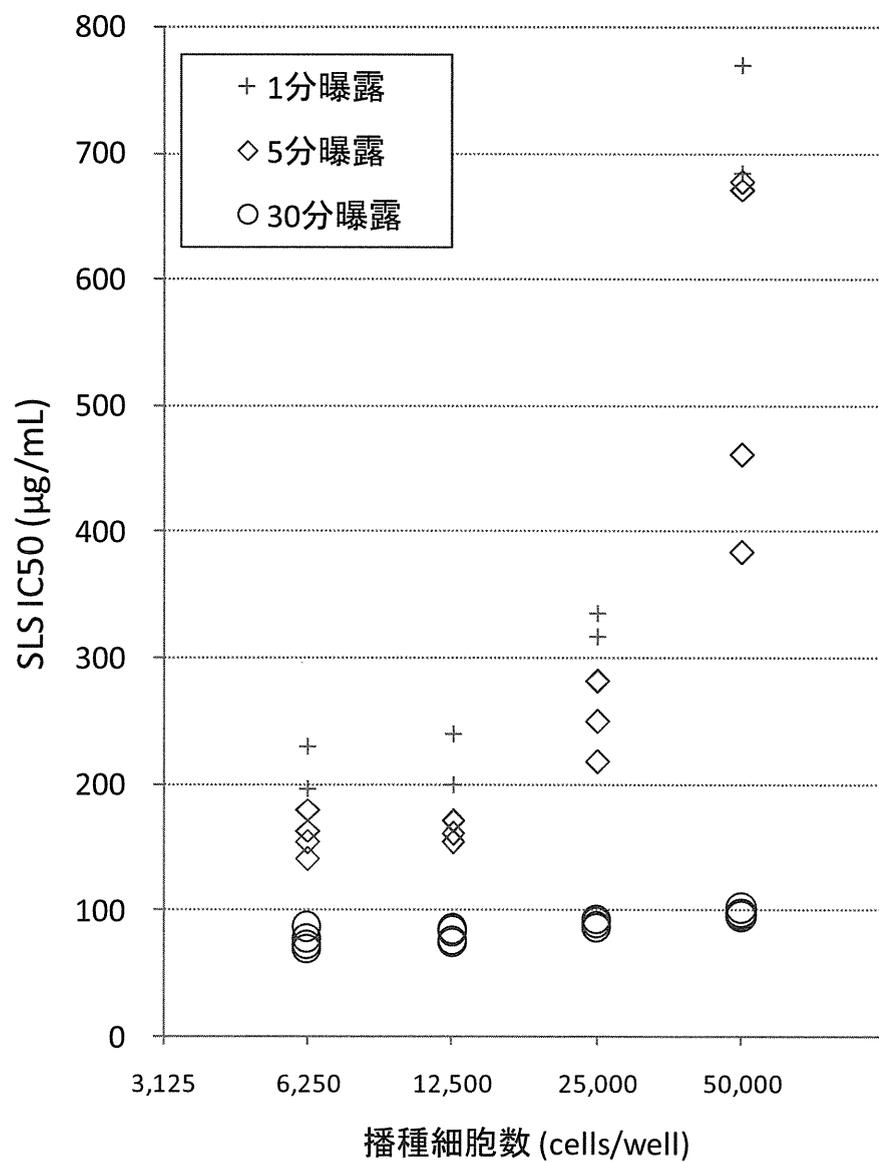


図 3-3. Proteinase K 反応時間と RNA 量および吸光度比 (A260/A280)

播種細胞数
(cells/well)

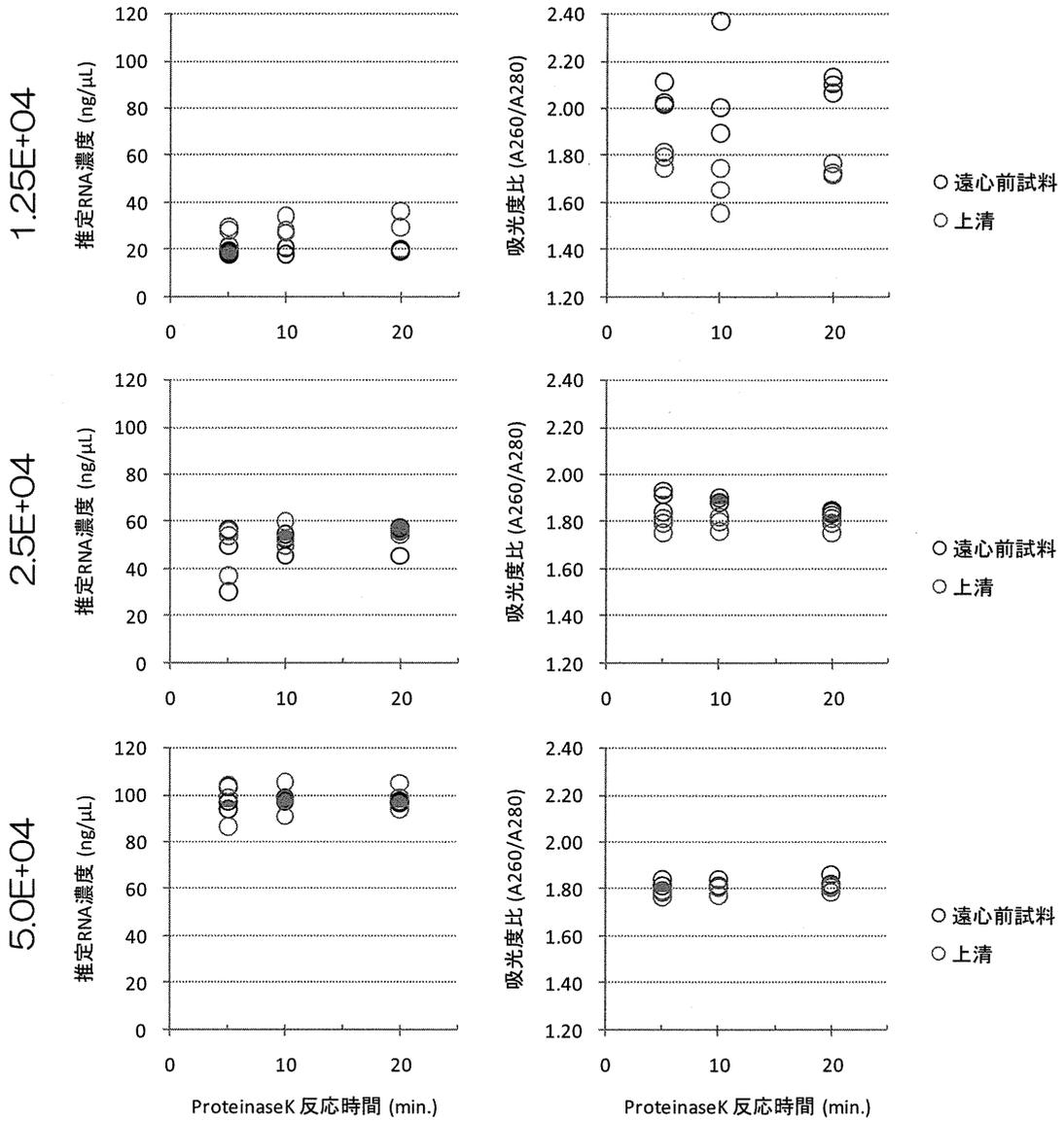


図 3-4a. SLS 曝露実験

播種細胞数
(cells/well)

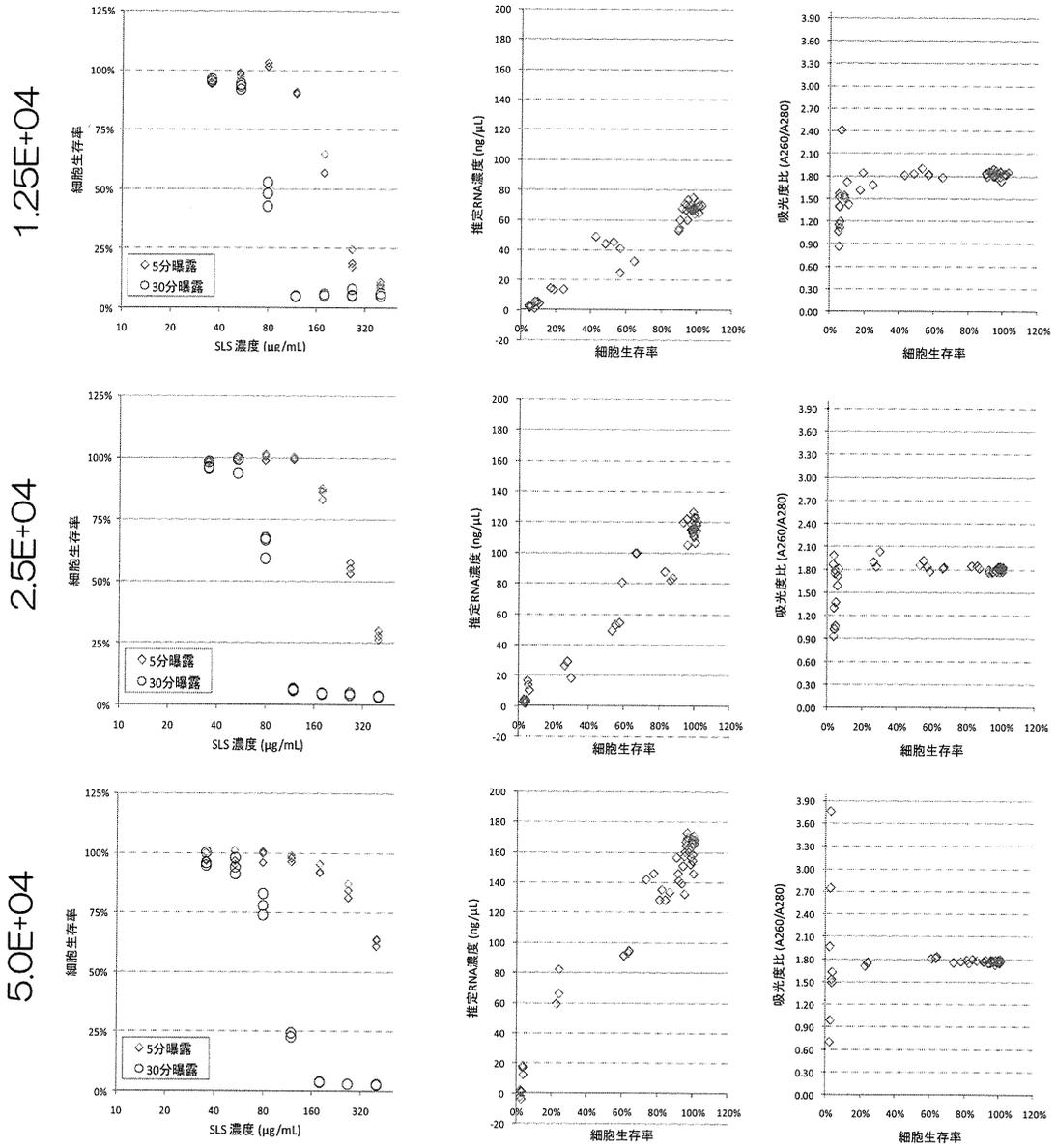
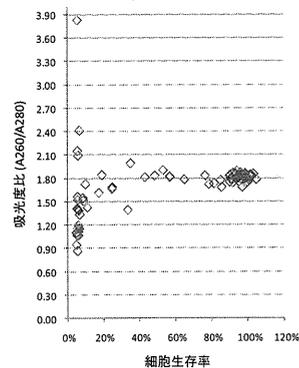
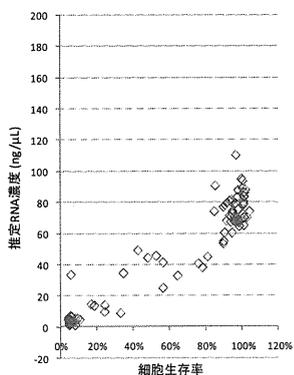
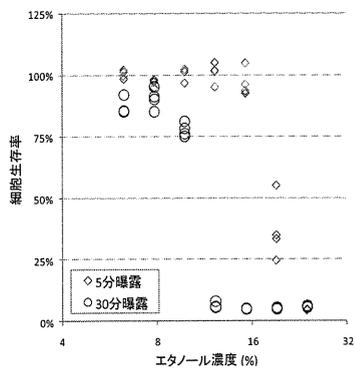


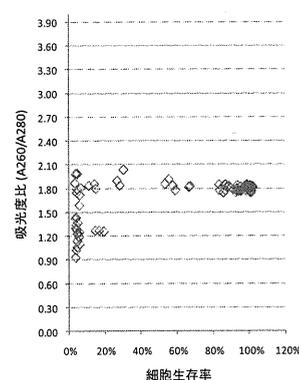
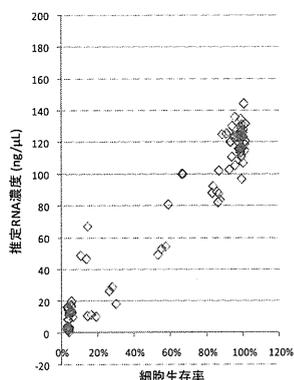
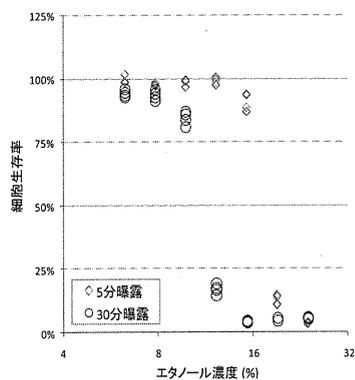
図 3-4b. エタノール曝露実験

播種細胞数
(cells/well)

1.25E+04



2.5E+04



5.0E+04

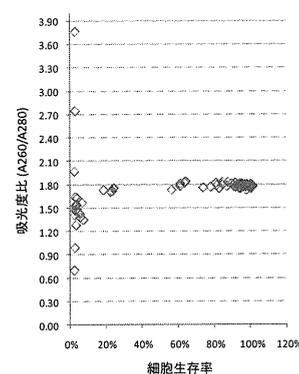
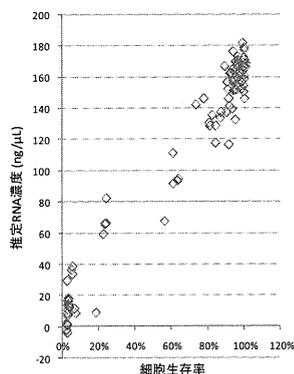
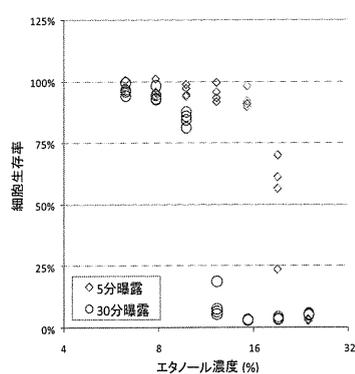


表 1. SLS とエタノール(EtOH)の曝露実験における遺伝子の発現

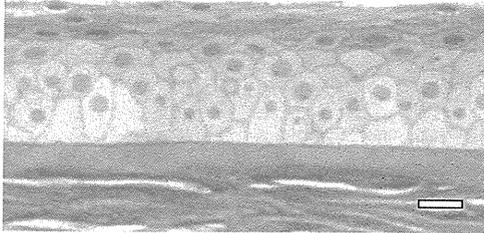
	SLS			EtOH
播種細胞数	2.5 x 10 ⁴ cells	2.5 x 10 ⁴ cells	5.0 x 10 ⁴ cells	2.5 x 10 ⁴ cells
曝露時間	Expo. 5min	Expo. 30min	Expo. 30min	Expo. 30min
IC ₅₀	267 µg/mL	79 µg/mL	79 µg/mL	10%
<i>cyclin-D1</i>	267 µg/mL	53 µg/mL	53 µg/mL	8%
	Control Ct. - 0.5			
<i>snail-1</i>	79 µg/mL	53 µg/mL	53 µg/mL	8%
	Control Ct. + 0.5			
<i>keratin-3</i>	119 µg/mL	35 µg/mL ↓	35 µg/mL	6% ↓
	Control Ct. + 0.5			

表 2. Total-RNA 濃度からの細胞毒性実験における IC₅₀ の予測

SLS (ug/mL)	Cell viability (%)	RNA conc. (ng/mL)
400	28.3 ± 1.8	24.3 ± 5.58
267	55.5 ± 2.1	52.1 ± 2.62
178	85.8 ± 2.3	84.5 ± 3.00
119	99.9 ± 0.5	113.6 ± 8.74
79	100.5 ± 1.3	118.9 ± 2.37
53	99.9 ± 0.7	117.2 ± 5.96
35	99.8 ± 0.4	114.0 ± 1.79
0 (Control)	100 ± 1.4	116.9 ± 1.63

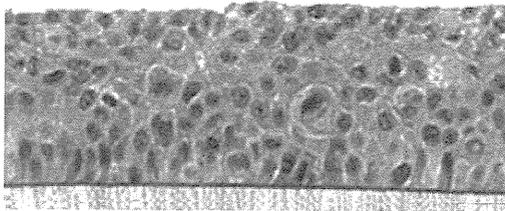
図 4. 三次元角膜再構築モデルの比較

正常ヒト角膜上皮 (組織標本)



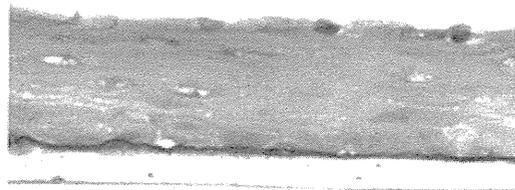
bar = 20 μm

HCE / CORNEAL EPITHELIUM (SkinEthic)



メ-カ-H.P.より

LabCyte CORNEA-MODEL (J-TEC)

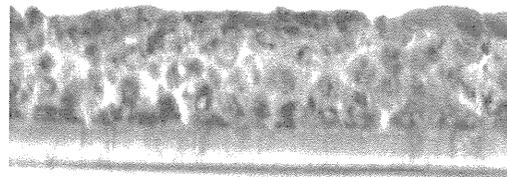


メ-カ-H.P.より

nHCE-T



iHCE-NY



bar = 20 μm

添付資料—①

学会発表 : 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.

A-3005

Generation and Analysis of a New Immortalized Human Corneal Epithelium Cell Line.

N. Yamamoto¹, K. Hirano², M. Sumitomo¹, H. Yamashita¹, M. Nakamura³, K. Hara³, A. Tanikawa², M. Horiguchi², K. Taniguchi¹ and H. KOJIMA⁴

¹Laboratory of Molecular Biology and Histochemistry, Joint Research Laboratory, Fujita Health University, Aichi, JAPAN; ²Department of Ophthalmology, School of Medicine, Fujita Health University, Aichi, JAPAN; ³Hoyu Co., Ltd., Aichi, JAPAN; and ⁴Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, Division of Pharmacology, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, Tokyo, JAPAN

Background

- We previously reported that p75^{NTR} (CD271)-positive cells are observed among the tissue stem/progenitor cells in the crystalline lens and retina, allowing immunological purification of tissue stem/progenitor cells. We observed and separated p75^{NTR}-positive stem/progenitor cells from the human corneal limbus epithelium, and the cultured them using serum-free medium (*In Vitro Cell Dev Biol-Animal*, 2010).
- However, during culture, it proved difficult to maintain the properties of corneal epithelium for more than 5 passages. Furthermore, past efforts to create transgenic corneal epithelium frequently involved the use of defective viral vectors.

Purpose

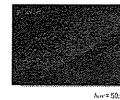
- We transduced an immortalizing gene into corneal epithelium stem/progenitor cells from the corneal limbus without using a defective viral vector, and analyzed the resulting novel immortalized human corneal epithelium cell line (iHCE-NY).

What's p75NTR

The Official name : low affinity p75 Neurotrophin receptor

⇒ Another name : p75 Nerve Growth Factor Receptor (p75NFR)
⇒ CD Number was 271 (CD271)

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



The usefulness as the epithelial stem cell marker

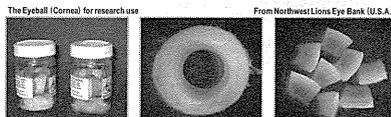
Kunimura C., Yasumoto S. et al. *Oncogene* 17, 187-198, 1998.
Yamamoto N. et al. *Tiss. Cult. Res. Commun.* 24, 2005.
Yamamoto N. et al. *Med. Mol. Morphol.* 41, 83-91, 2008.
Yamamoto N. et al. Under submitted of Japan Patent NO. 2006-279917

The usefulness as the mesenchymal stem cell marker

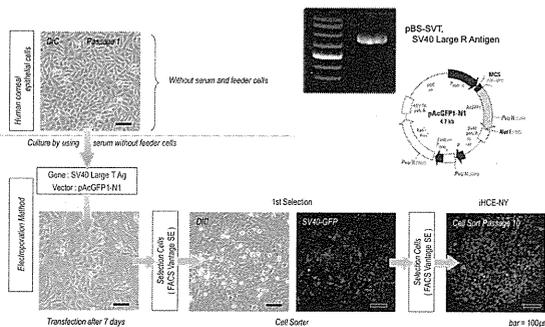
Yamamoto N. et al. *J. Dermatol. Sci.* 48, 43-52, 2007.
Yamamoto N. et al. Under submitted of Japan Patent NO. 2006-097394
Yamamoto H. et al. Under submitted of Japan Patent NO. 2006-230235

Materials and Methods

- We used normal human corneal epithelium cells (HCE), obtained during research on normal human cornea tissue, from an American eye bank.
- The cornea tissue including the corneal limbus was cut about 5 mm size, treated using enzyme, and cultured at serum-free medium on coating dish.
- For transduction, we used a GFP vector that contains the SV40 Large T Antigen gene (SV40), purchased from JCRB Gene Bank.
- We performed transgenesis using a modified electroporation protocol. We cloned the resulting novel immortalized human corneal epithelium cell line (iHCE-NY), and analyzed its gene expression and proteomics. In addition, we used another immortalized corneal epithelial cell line, HCE-T (RCB2280, Riken BRC), as a standard for comparison.



Serum-free medium : EGF, bFGF, Insulin Hydrocortisone Transferrin, Ascorbic acid et al.

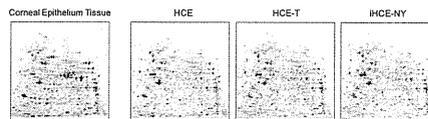


Results and Discussion

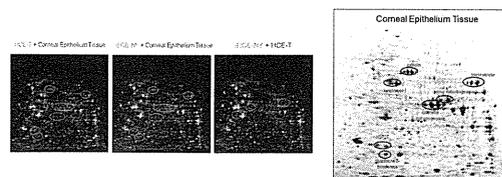
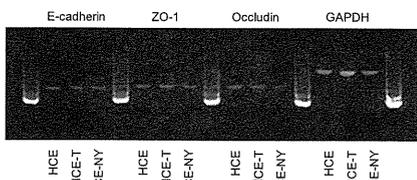
- We successfully constructed iHCE-NY without using a defective viral vector.
- On analysis of karyotype, mode was 46 in HCE and iHCE-NY, but varied mode was 49~63 in HCE-T.



- Proteomics of HCE, HCE-T and iHCE-NY revealed very small changes following SV40 transgenesis. However, enzymes associated with vitamin A were detected within the corneal epithelium tissue, but were barely detectable in any of the cultured cells.



- On analysis of gene expression, the markers of corneal epithelium barrier function were detected; these included E-cadherin, ZO-1 and Occludin.



- We found it was possible to generate immortalized cells of the corneal epithelium without using a defective viral vector. We found that the protein expression of iHCE-NY and HCE-T was relatively similar to that of HCE. In future, we will examine the capacity of iHCE-NY to undergo differentiation.

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

光毒性・光感作性試験代替法に関する諸検討

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

近年、薬剤性光線過敏症のリスク評価ならびにその回避を目的として有用な光毒性評価系開発が求められており、その一環として ROS assay が開発されている。本評価系の問題点として難水溶性薬物への不適合が挙げられるが、本研究では本課題を解決するために界面活性剤を加えた評価系開発を行った。

協力研究者

尾上 誠良 静岡県立大学 薬学部

A. 研究目的

薬剤性光線過敏症は特定の薬剤投与後、露光により惹起される皮膚及び眼の異常反応であり、2009年に International Conference on Harmonization (ICH) のトピック S10 “Photosafety evaluation of pharmaceuticals” として取り上げられ、創薬段階での本副作用評価について注目を集めている。また、多くの既存薬で本副作用が認められるため、臨床において服用患者の quality of life 及びコンプライアンスの低下を招く恐れがあり、安全性の観点から薬剤性光線過敏症リスクを低減することが望まれている。薬剤による光毒性は光刺激性、光遺伝毒性及び光アレルギー性の3種に大別され、発症機序の上流では活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の関与が報告されている。この ROS 産生を指標とする ROS assay は *in vitro* 光毒性リスク評価ツールとして高いスループットと予測性を有している。しかしながら、本試験法において難水溶性化合物の光毒性リスク予測は必ずしも容易ではなく、それ故、被験物質の溶解性を改善した新たな評価系が必要となる。先に Onoue らは界面活性剤を用いた ROS assay を構築し、細胞膜上の環境を模擬した評価系を提示しているが、本評価系が被験物質の溶解性向上にも寄与することが

期待できる。そこで、本研究では Tween20 を用いた micelle-based ROS assay を用いて 17 種類の難水溶性薬物の光毒性リスク評価を試みた。

B. 研究方法

難水溶性薬物として、8種類の光毒性陽性物質 (amiodarone, anthracene, avobenzone, bithionol, fenofibrate, hexachlorophene, piroxicam, rosiglitazone) と 9種類の光毒性陰性物質 (bumetizole, camphor sulfonic acid, drometizole, octrizole, octyl methacrylate, octyl methoxycinnamate, octyl salicylate, SDS, UV-571) を選択した。ROS assay プロトコールに従い、被験物質 (200 μM) と終濃度 0.5% Tween20 を含む反応液を 96 ウェルプレートに分注して Atlas Suntest CPS series による 1 時間の擬似太陽光照射後 (ca. 2.0 mW/cm^2)、ROS (Singlet oxygen と Superoxide) の産生量をそれぞれ測定した。実験は 3 回繰り返し、各化合物の光毒性リスクを評価した。

(倫理面への配慮)

本研究において動物実験は発生しない。

C. 研究結果

被験物質 17 種類のうち、15 化合物が 0.5% Tween20 ミセル溶液に溶解することを確認し、本化合物群については 200 μM の濃度で ROS assay を実施した。溶解しなかった anthracene と UV-571 については同ミセル溶液で希釈を検討したところ、

anthracen は 50 μM に、そして UC-571 は 100 μM で完全溶解を確認し、これらの濃度で ROS assay を実施することとした。2.0 mW/m^2 の照射強度で擬似太陽光を照射した際、光毒性陽性標準物質である quinine からは singlet oxygen ($\Delta A_{440\text{ nm}} \cdot 10^3$: 486 \pm 15) と superoxide ($\Delta A_{560\text{ nm}} \cdot 10^3$: 286 \pm 3) の産生を認め、一方、光毒性陰性標準物質である sulisobenzone からは ROS の産生を検出できなかった。これらの傾向は、20 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) で ROS assay を行った際の結果とほぼ同様であり、quinine の ROS data {singlet oxygen ($\Delta A_{440\text{ nm}} \cdot 10^3$: 442 \pm 68); superoxide ($\Delta A_{560\text{ nm}} \cdot 10^3$: 330 \pm 566)} は非常に良い対応を示した。難水溶性化合物 17 種類について ROS assay を実施した結果を Fig. 1 に示す。以前求めた criteria を用いて各化合物の光毒性リスクをそれぞれ評価したところ、光毒性陽性化合物はすべて陽性と識別され、また、光毒性化合物はいずれも criteria 以下の ROS 産生に留まった。ミセルを利用した新しい ROS assay は難水溶性化合物の光毒性リスク評価において有用であると考えられる。

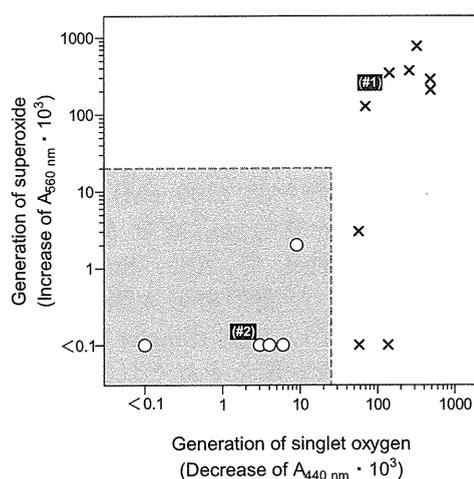


Fig. 1 Outcomes from the micelle-based ROS assay for poorly water-soluble chemicals. Standard samples (1 and 2) and non-coded 17 poorly water-soluble chemicals, including 8 phototoxins (×) and 9 non-phototoxic chemicals (○), were assessed by the ROS assay in micellar solution of 0.5% Tween 20. All chemicals were assessed at 200 μM , except for anthracene (#1, 50 μM) and UV-571 (#2, 100 μM). The shaded region is indicative of low phototoxic potential. Each value represents mean of three experiments.

D. 考察

現在の創薬活動から創出される医薬品候補はその 70% 程度が難水溶性と言われており、また、実際に上市されている経口用医薬品のうち約 40% が難水溶性である。これらの知見を考慮すれば、難水溶性医薬品の光毒性評価において適用可能なオプションを用意することは急務の課題であろう。今回実施した micelle-based ROS assay はこの問題を解決可能な一つの対応策として期待され、今後更なるデータ蓄積によってその信頼性がより高まるものと考えられる。

E. 結論

本結果より、micelle-based ROS assay は、難溶性物質の評価に有用であり、これまでに ROS assay で評価が困難であった化合物の光毒性リスク評価を可能にするものと期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nukada Y, Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Mugita N, Hirota M, Miyazawa M, Ito Y, Sasa H, Nishiyama N., Predictive performance for human skin sensitizing potential of the human cell line activation test (h-CLAT) Contact Dermatitis. 65(6):343-53, 2011
- 2) 大野泰雄、薬理学における動物実験代替法研究の重要性、日本薬理学雑誌138, 99-102, 2011.
- 3) Yudate HT, Kai T, Aoki M, Minowa Y, Yamada T, Kimura T, Ono A, Yamada H, Ohno Y, Urushidani T. Identification of a novel set of biomarkers for evaluating phospholipidosis-inducing potential of compounds using rat liver microarray data measured 24-h after single dose administration. Toxicology. 295, 1-7, 2012.
- 4) Uehara T, Minowa Y, Morikawa Y, Kondo C, Maruyama T, Kato I, Nakatsu N, Igarashi Y, Ono A, Hayashi H, Mitsumori K, Yamada H, Ohno Y, Urushidani T. Prediction model of potential hepatocarcinogenicity of rat

hepatocarcinogens using a large-scale toxicogenomics database. Toxicol Appl Pharmacol. 255, 297-306, 2011.

2. 学会発表

- 1) Ohno. Y., Japanese regulation for food safety and role of National Institute of Health Sciences. 1st Pan Asia Conference on Food & Drug Safety Assessment Policies and Regulations in Different Countries I (2011.4.15)
- 2) 大野泰雄、ICH M3(R2)ガイドラインへの経緯、日本毒性学会(2011,7.13)
- 3) 大野泰雄、レギュラトリーサイエンスと国立衛研、名古屋市立大学大学院薬学研究科医薬品質保証学分野・医薬品安全性評価学分野発足公開シンポジウム(2011.7.16)
- 4) 大野泰雄、医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期とヒト初回投与について、国立精神・神経センター (2011.7.22)
- 5) 大野泰雄、MD試験および探索的INDをめぐる最近の国際的動向、APDDシンポジウム(2011.12.16)
- 6) 大野泰雄、安全性評価における動物実験とin vitro代替法の利点および問題点、その現状について、東京都健康安全研究センター技術懇話会(111208)
- 7) Yasuo Ohno, Reliability of Data for New Drug Application in Japan – Non-GLP Tests – , Global Quality Assurance Conference (2011.11.15)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

活性酸素種産生能を指標とした光毒性リスク評価方法の開発

研究分担者 尾上 誠良 静岡県立大学 薬学部

研究要旨

薬剤投与後に露光によって惹起される薬剤性光線過敏症は近年注目を集める副作用の一つである。本副作用リスク回避のために効果的な予測方法の開発が国内外で急務の課題となっている。本研究では光化学的試験方法である ROS アッセイに注目し、本試験法の多施設バリデーションスタディを実施した。

A. 研究目的

薬剤性光線過敏症はその投与方法にかかわらず薬剤摂取後、露光により引き起こされる副作用であり、光刺激性、光アレルギー、光遺伝毒性、光がん原性に大別される。オゾン層破壊に伴う太陽光スペクトルの変化も相俟って、創薬段階における本副作用リスクの回避が強く望まれている。これまでも多くの *in vitro* ならびに *in vivo* 評価方法が開発されているが、ハイスループットスクリーニングについてはまだ報告例が少なく、そこで我々は先に reactive oxygen species (ROS) assay を開発した。本試験法は被験物質を光照射する際に発生する ROS 量をモニタリングすることを特徴とする光化学反応性評価法であり、種々のモデル化合物を用いた検討において薬剤性光線過敏症リスクを予測出来る可能性を示唆した。既に日内変動や頑健性に関する基礎的検討は概ね終了しているが、施設間再現性については未だ明らかになっておらず、今回 3 施設にて ROS assay に関する多施設バリデーションスタディを行い、その transferability ならびに信頼性を精査した。

B. 研究方法

日本動物実験代替法検証センター(JaCVAM)主催のバリデーション運営委員会 (VMT) の下、ROS assay プロトコルを確立した。Dr. Manfred Liebsch (International Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments, ZEBET), Europe Center for the Validation of Alternative Methods

(ECVAM), Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), and Korean Center for the Validation of Alternative Methods (KoCVAM) の協力の下、VMT 主導で化合物選択を実施し、最終的に 2 種の標準物質、23 種の光毒性陽性化合物ならびに 19 種の光毒性陰性化合物を選定した。バリデーションスタディには田辺三菱製薬株式会社 (Lab#1), (財)食品薬品安全センター (Lab#2), 静岡県立大学薬学部 (Lab#3) が参加し、GLP の精神にのっとり各種検討を実施した。ROS assay プロトコルに従い、コード化された 42 種類の被験物質 (200 μ M) を含む反応液を 96 ウェルプレートに分注して Atlas Suntest CPS series による 1 時間の擬似太陽光照射後 (ca. 2.0 mW/cm²), ROS (Singlet oxygen と Superoxide) の産生量をそれぞれ測定した。実験は 3 回繰り返し、各化合物の光毒性リスクを評価した。

(倫理面への配慮)

本研究において動物実験は発生しない。

C. 研究結果

Atlas 社製の solar simulator を用いた 3 施設では、光毒性陽性標準物質である quinine に注目すると、singlet oxygen の変動係数 (CV) は 1.5–2.1% の範囲であり、また superoxide の CV は 2.6–7.4% 程度であった。一方、光毒性陰性標準物質である sulisobenzone からの ROS 産生は極めて小さいか、検出不能であった。施設間の再現性については、quinine の

singlet oxygen で CV が 15.4% であり, superoxide では 17.0% であった. すなわち, 本結果から ROS assay 結果の日内・日間変動は小さく, 良好な施設間再現性を示した. また, 選定した 42 化合物の被験物質についても各施設で併せて ROS assay を実施したところ, 難溶性のため評価不能であった被験物質を除くと, 光毒性物質の陽性検出率は全施設とも 100% であった (Fig. 1). なお, 42 化合物のうち, 200 μM での評価が可能であったのは 25–28 化合物であり, 約 4 割の被験物質は希釈を余儀なくされた. また, rose bengal は 559 nm 付近に極大吸収 ($90,400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を持つため, superoxide の測定は不可能であった. 光毒性陰性物質の陰性検出率は, 施設により 42–82% と異なるものの, いずれの施設においても偽陰性予測を認めず, 初期スクリーニング法としての有用性を示唆した.

D. 考察

多施設バリデーションスタディの結果, transferability と predictive capacity については共に問題がなかったが, 幾つかの limitation が再確認できた. それは, 幾つかの擬陽性と溶解性の問題である. 前者に関しては, phenytoin, penicillin G, chlorhexidine, cinnamic acid, L-histidine, そして octyl methacrylate において認められた. ROS assay は光毒性そのものを検出する評価系ではなく, あくまでも被験物質の光化学反応性を評価するためのツールである. それ故, 光毒性の有無にかかわらず光分解やその他の光反応性を有する被験物質は本評価系において陽性となる. 今回擬陽性を認めた光毒性陰性化合物群はいずれも何らかの光反応性が指摘されており, ROS assay 結果と矛盾するものではない. 化合物の溶解性に関する問題点は, 現在の創薬において創製される候補化合物の大半が難水溶性であることを考慮すれば解決すべき課題の一つであり, 何らかの方策が必要と考える.

E. 結論

本結果より, ROSアッセイは, 難溶性物質の評価は困難であるものの, *in vitro/in vivo* 光毒性試験の必要性を判断するスクリーニング系の一つとして有用であると考え. 現在, 使用する照射装置の種類を増やして, アッセイ系の汎用性についてさらなる検討を推進してい

る.

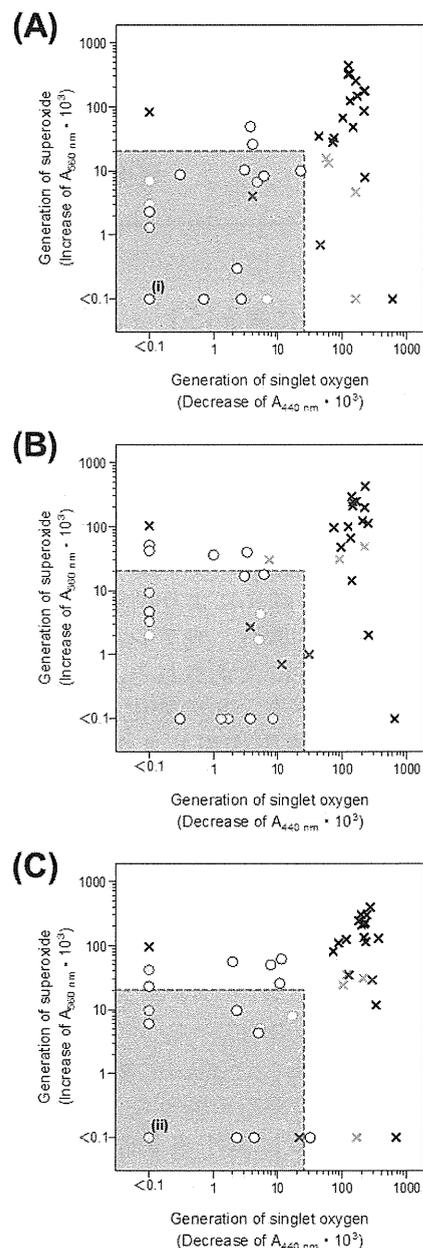


Fig. 1 Predictive capacity of ROS assay in 3 participating laboratories. Plot of singlet oxygen data versus superoxide data for all coded test samples obtained from Lab#1 (A), Lab#2 (B), and Lab#3 (C). ○, Non-phototoxic drugs/chemicals; and ×, phototoxins at concentrations of 2 μM (red symbols), 20 μM (orange symbols), and 200 μM (black symbols). According to the criteria for phototoxins (200 μM) defined previously, the shaded region is indicative of low phototoxic potential. (i) Overlapped symbols for non-phototoxic compounds: 2 chemicals at 20 μM and a chemical at 200 μM ; and (ii) a chemical at 2 μM and 2 chemicals at 20 μM .

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satomi Onoue, Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Ryo Inoue, Hideyuki Ito, Tsutomu Hatano, Shizuo Yamada: In vitro photochemical and phototoxicological characterization of major constituents in St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts. *Phytochemistry*, **72**, 1814-20 (2011)
- 2) Yoshiki Seto, Ryo Inoue, Masanori Ochi, Graham Gandy, Shizuo Yamada, Satomi Onoue: Combined use of in vitro phototoxic assessments and cassette dosing pharmacokinetic study for phototoxicity characterization of fluoroquinolones. *AAPS J.*, **13**, 482-492 (2011)
- 3) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Naoko Igarashi, Ryo Inoue, Ami Oishi, Toshihiko Toida, Shizuo Yamada, Satomi Onoue: In vitro photobiochemical characterization of sulfobutylether- β -cyclodextrin formulation of bufexamac. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **55**, 591-596 (2011)
- 4) 尾上 誠良: 創薬過程における薬剤性光線過敏症の予測. *臨床免疫・アレルギー科*, **566**, 546-550 (2011)

2. 学会発表

- 1) 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 bufexamac の Cyclodextrin 製剤開発. 日本薬学会 第 131 年会 (静岡), 要旨集 (4) p.246, 2011 年 3 月 29 日
- 2) 世戸 孝樹, 井上 僚, 越智 幹記, Gandy Graham, 尾上 誠良, 山田 静雄: 創薬支援のための薬剤性光線過敏症リスク評価に関する薬剤科学的研究 (9)-スループット向上を指向した光毒性評価のためのスクリーニング系の開発-. 日本薬学会 第 131 年会 (静岡), 要旨集 (4) p.186, 2011 年 3 月 30 日
- 3) 尾上 誠良: 創薬過程における薬剤性光線過敏症の予測. 第 23 回アレルギー学会春期臨床大会, 要旨集 p.45, 2011 年 5 月 14 日
- 4) 世戸 孝樹, 井上 僚, 越智 幹記, 尾上 誠良,

山田 静雄: Bufexamac の光感受性低減を指向した cyclodextrin 製剤の開発. 日本薬剤学会第 26 年会 (東京), 要旨集 p.189, 2011 年 5 月 31 日

- 5) 世戸 孝樹, 井上 僚, 越智 幹記, Gandy Graham, 尾上 誠良, 山田 静雄: 創薬支援のための薬剤性光線過敏症リスク評価に関する薬剤科学的研究 (10) -皮膚移行性評価のスループット向上を指向したリスク評価系の構築-. 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (横浜), 要旨集 p.136, 2011 年 7 月 11 日~13 日
- 6) Yoshiki Seto, Yosuke Aoki, Ryo Inoue, Yoshiki Kojo, Masashi Kato, Masanori Ochi, Satomi Onoue, Shizuo Yamada: Developing respirable powder formulation of pifenidone for reduced phototoxic risk. 26th JSSX Annual Meeting in Hiroshima. (Hiroshima). Abstr. P.256. Nov17, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

分担研究報告書

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

分担研究者 小島 肇
国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

皮膚刺激性試験代替法 LabCyte EPI-MODEL24 を用いた方法（LabCyte）については、バリデーション報告書を昨年度、OECD 事務局に提出した。今年度、LabCyte の OECD テストガイドラインを目指し、バラツキを少なくする試験法の改良を行った。一方、眼刺激性試験代替法 SIRC アッセイについては、国際バリデーション実行委員会を組織し、プレバリデーションを開始した。

キーワード：皮膚刺激性試験、眼刺激性試験、バリデーション、動物実験代替法

協力研究者

加藤雅一 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング（J-TEC）株式会社 研究開発部 ラボサイトクラスター 主幹研究員

簾内桃子 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 薬理部第三室 主任研究員

A. 研究目的

2008-2009 年に掛け、ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング（J-TEC）株式会社が開発した培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24（LabCyte）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研究を実施した²⁾。このバリデーション研究を通して、目的であった LabCyte 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）、EURL（European Union Reference Laboratory）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）³⁾、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⁴⁾。そこで、製造元である J-TEC 株式会社において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：日本動物実験代替法評価センター）運営委員会が判断したことから⁵⁾、昨年度、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した⁶⁾。しかし、試験成立条件のひとつである生細胞率の変動の許容基準（標準偏差18%以内）を逸脱し、再試験となる被験物質が比較的多く発生した。

そこで、今年度はそのバラツキによる逸脱数を少なくする目的で、各施設の試験方法を厳密に統一した上で、変動しやすい5被験物質を含む6物質を選択し、追加検討をLabCyte皮膚刺激性試験バリデーション研究に準じて実施した。

一方、眼刺激性試験代替法SIRCアッセイは、ウサギ角膜由来のSIRC細胞に被験物質を種々の濃度で72時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。本試験法は、資生堂で開発され⁷⁾、1990年代には厚生労働科学研究（大野班）でバリデーションされた方法を⁸⁾、資生堂が改良したものである⁹⁾。2010-2011年に、JaCVAM眼刺激性評価委員会で評価され、バリデーションが必要と判断された。そこで、JaCVAMが、化粧品・医薬部外品の許認可に必要な眼刺激性の情報を得られる代替試験法としてSIRCアッセイの再現性、予測性をバリデーションで確認することを目的として公募を行い、3施設によるバリデーション研究が実施されることになった。

B. 研究方法

B-1) 培養表皮モデル (LabCyte) の追加検討

B-1-1) 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）

B-1-2) 参加施設

1) 山口 能宏、中村 牧（小林製薬株式会社）

2) 篠田 伸介、萩原 沙織（薬物安全性試験センター）

3) 笠原 利彦、芝井 亜弥（富士フィルム株式会社）

B-1-3) トレーニング

2011年6月10日にJ-TEC株式会社にて、改定SOP（標準作業手順書）を用いた技術指導がJ-TEC研究員によりなされた。

B-1-4) 実施期間

検討は2011年8月～9月の間に実施された。

B-1-5) 使用モデル

LabCyte EPI-MODEL24は、ヒト表皮細胞を

用いて培養された3次元培養表皮モデルである。

ヒト表皮細胞を培養増殖させた後、気液層界面で培養して、角質層を形成させて、ヒト表皮組織に類似した組織構造を再現している

B-1-6) 改定SOPの概要

本研究は、昨年度のバリデーションで用いたSOPver. 8.2の洗浄方法を明確化したSOPver. 8.3を用いて実施した。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%細胞毒性を基準に陰陽性の判定を実施した。SOPの主な改定点を表1に示す。被験物質除去の際に、PBS（リン酸緩衝液）を多量に用いることは主な改定点である。

B-1-7) 被験物質

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Methodの¹⁰⁾ performance standardに記載されている20物質のうち、昨年度のバリデーションでばらつきの大きかった5被験物質を含む6物質をコード化して参加3施設に配布し（表2参照）、改定SOPを用いたバリデーションを実施した。

表2に示すように、コード化された6被験物質は、昨年度のバリデーションにおいて、SD \geq 18%となり、逸脱が多数発生した5被験物質とした。また、performance standardに記載されているものの、昨年度バリデーションにおいて試験されなかった被験物質tetrachloroethyleneである。

表1. SOPの改定ポイント

洗浄方法の明確化	SOP ver. 8.2	SOP ver. 8.3
1. 被験物質の除去	明記せず。	洗浄直前にインサートを傾けて廃棄する。
2. 洗浄量	明記せず。	大量のPBSを用いて、インサート容量以上の大量のPBSを用いて洗浄する。
3. 洗浄回数	10回以上、できる限り洗浄する。	15回以上、できる限り洗浄する。
4. 各洗浄後のタッピング	明記せず。	一回行う。
5. 最終洗浄後のタッピング	明記せず。	行わない。

表2. 使用された被験物質および逸脱数

No.	物質名	SD ≤ 18%となったデータ数(逸脱数)			
		Lab a	Lab b	Lab c	合計
2	diethyl phthalate	0/3	1/4	1/4	2/11
4	allyl phenoxy-acetate	1/4	1/4	0/3	2/11
5	isopropanol	0/3	1/4	2/5	3/12
13	1-bromohexane	1/4	2/5	0/3	3/12
15	di-n-propyl disulphide	0/3	3/5	0/3	3/11

B-2) SIRCアッセイのバリデーション

B-2-1)バリデーション実行委員会

委員長：簾内桃子（国立衛研）

委員：萩野滋延（資生堂）、大森 崇（同志社大学）、山影康次（食薬センター秦野研究所）、小島肇（国立衛研）および代替法国際協調会議（ICATM）の代表者（図1参照）

B-2-2) 参加施設

- 1) 福田隆之（栞ボゾリサーチセンタ

- ー)
 2) 池田 英史（日本コルマー株式会社）
 3) 韓 美珍（バイオトクステック）
 B-2-3) トレーニング
 2011年11月10日に仙台にて、ビデオを用いた技術指導が萩野委員によりなされた。
 B-2-4) の実施期間
 検討は2012年1月～3月の間に実施された。
 B-2-5) 試験法
 SIRCアッセイは被験物質の72時間処理後において、Crystal violetが生細胞の細胞膜に入り込んで染色する性質を利用した方法で生細胞のみを測定する⁷⁾。Crystal violet染色法は多くの細胞に適用でき、得られる結果も比較的安定しているため、細胞毒性の簡易試験法として用いられている。また、操作が簡便で、標本の資料保管が可能であることは本試験法の優位性を示すものである。参照物質としてtriethanolamineを用い、その細胞毒性と比較してIC50値が3回の結果の多数決により小さい場合に、その物質は眼刺激性物質と判定される⁹⁾。
 B-2-6) 被験物質
 コード化されていない4被験物質を用い（表5参照）、施設のトレーニングにあたるtransfeabilityを確認する目的でphase Iが実施された。

（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) 培養表皮モデル（LabCyte）の追加検討

表2に示すように、SD ≥ 18%となったデータ数(逸脱数)は、昨年のバリデーションでは5物質において15データ/56データも存在したが、表3に示すように、同物質数で1データ/46データに激減した。洗浄法の改良により、著しくバラツキが少なくデータの安定性は改良された。また、表4に示すように、di-n-propyl disulphideを除く5被験物質の判定結果も、全施設で一致した。tetrachloroethyleneは、全試験で刺激性物質と判定された。