

心分離後、上清中化学物質濃度を測定した。

## 6. 抽出率測定

前処理後のヘアレスラット腹部皮膚および EpiDerm をハサミで細断し、既知濃度の各化学物質溶液を加え、皮膚中濃度測定と同条件でホモジネート溶液を作製した。なお、EpiDerm は前処理後、ポリカーボネート膜を剥がしたものを使用した。上清中化学物質濃度を皮膚中濃度測定と同条件で測定した。抽出率は抽出された化学物質濃度を適用した既知の化学物質濃度で除して算出した。

## C. 結果および考察

### 1. 皮膚中濃度測定値

Table 4 にヘアレスラットおよび EpiDerm 中の FP および ANP 濃度を示す。両物質共に、EpiDerm の全層中濃度および生きた表皮・真皮中濃度は、対応するヘアレスラット皮膚より高値を示した。刺激性と強く関係する生きた表皮・真皮中濃度は、FP では 15.1 倍、ANP では 86.2 倍のヘアレスラット皮膚より高値を示し、水溶性物質の ANP の方が脂溶性の FP よりも高値を示した。これは、EpiDerm の皮膚角層バリアの脆弱さが皮膚中濃度の違いに起因していると考えられた<sup>20-23)</sup>。

Table 5 に EN を適用した時のヘアレスラットおよび EpiDerm の生きた表皮・真皮中濃度を示す。EN は皮内エステラーゼにより nicotinic acid (NA) を代謝産物として生じる。NA の EpiDerm 中濃度は、ヘアレスラット皮膚の 0.05 倍の値を示した。先行研究の結果より EpiDerm の皮内カル

ボキシエステラーゼ活性はヘアレスラット皮膚と比べて著しく低いことが明らかである<sup>14)</sup>。また、EpiDerm の角層は脆弱で化学物質の透過速度がヘアレスラット皮膚よりも高い<sup>24, 25)</sup>。これらが EN および NA の EpiDerm の生きた表皮・真皮中濃度がヘアレスラット皮膚と異なる理由と考えられた。

Table 6 には、EpiDerm を用いた皮膚刺激性試験で false negative を示した HS のヘアレスラットおよび EpiDerm の生きた表皮・真皮中濃度を示す。HS は皮内エステラーゼにより salicylic acid (SA) を代謝産物として生じる。SA の生きた表皮・真皮中濃度は Table 5 に示した NA とは異なり、EpiDerm 中濃度がヘアレスラット皮膚よりも高値を示した。EpiDerm を用いた皮膚刺激性試験で HS は false negative を生じるため、本結果は仮説と一致しなかった。これは HS の皮膚刺激性評価に用いている家兎と EpiDerm の皮内カルボキシエステラーゼファミリーの違いが考えられたため<sup>26, 27)</sup>、今後家兎皮膚を用いたさらなる検討が必要であることが示唆された。

### 2. 皮膚中濃度計算値

Table 7 に FP (a)、ANP (b) のヘアレスラット皮膚および EpiDerm の皮膚中濃度実測値および計算値を示す。いずれの物質も実測値と計算値は比較的近い値を示したが、実測値と計算値の差は EpiDerm の方がヘアレスラット皮膚よりも小さかった。これは、適用した FP 溶液中のイオン型分率が大きかったことや ANP が親水性であることから、皮膚中濃度に及ぼす物質の毛嚢を介した透過ルートの寄与が大

きいためと考えられた。

Table 8 に EN を適用した時のヘアレスラット皮膚および EpiDerm の皮膚中濃度実測値および計算値を示す。EN および NA 共に実測値と計算値は比較的近い値を示した。

#### D. 結論

水溶性物質の EpiDerm の生きた表皮・真皮中濃度はヘアレスラット皮膚より著しく高い値を示したことから、3次元培養ヒト皮膚モデルの脆弱な皮膚角層バリアの影響による動物皮膚との皮膚中濃度の違いが false positive の原因であることが確認された。

脂溶性エステル物質では、皮内代謝産物の生きた表皮・真皮中濃度が EpiDerm で低い値を示したことから、動物皮膚との皮内カルボキシエステラーゼ活性および化学物質の透過速度の違いによる皮膚中濃度の違いが false negative の一要因であると考えられた。

以上より、3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価は、3次元培養ヒト皮膚モデルの特徴を理解して行う必要があると推定された。

#### E. 参考文献

- 1) S. Kano, K. Sugibayashi, Kinetic analysis on the skin disposition of cytotoxicity as an index of skin irritation produced by cetylpyridinium chloride: comparison in vitro data using a three-dimensional cultured human skin model with in vivo results in hairless mice. *Pharm. Res.*, 23, 329-335 (2006).
- 2) 小島肇夫, 動物実験代替法における国際協調, *Folia Pharmacol. Jpn.* 138, 103-107 (2011).
- 3) ECVAM statement, <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- 4) J. H. Fentem, P. A. Botham, ECVAMs Activities in Validating Alternative Tests for Skin Corrosion and Irritation. *ATLA*, 30, 61-67 (2002).
- 5) N. Alépée, C. Tornier, C. Robert, C. Amsellem, M. H. Roux, O. Doucet, J. Pachot, M. Méloni, A. B. Fraissinette, A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic™ RHE) for full replacement of the Draize skin irritation test. *Toxicol. in Vitro*, 24, 257-266 (2010).
- 6) J. R. Heylings, H. M. Clowes, Comparison of tissue sources for the skin integrity function test. *Toxicol. in Vitro*, 15, 597-600 (2001).
- 7) C. Faller, M. Bracher, N. Dami, R. Roguet, Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. *Toxicol. in Vitro*, 16, 557-572 (2002).
- 8) P. A. Botham. The validation of in vitro methods for skin irritation. *Toxicol. Lett.*, 149, 387-390 (2004).
- 9) P. A. Botham, L. K. Earl, J. H. Fentem, R. Roguet, J. J.M. van de Sandt, Alternative Methods for Skin Irritation Testing: the Current Status. *ATLA*, 26, 195-211 (1998).
- 10) D.A. Kidd, M. Johnson, J. Clements, Development of an in vitro corrosion/irritation prediction assay using the EpiDerm™ skin model. *Toxicol. in Vitro*,

- 21, 1292–1297 (2007).
- 11) J. H. Draize, G. Woodard, H. O. Galvery., Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 82, 377–390 (1944).
- 12) Summary Report of the ECVAM Skin Irritation Validation Study (SIVS), ECVAM SIVS Summary Report Final. version 2006-10-04.
- 13) C. Eskes, T. Cole, S. Hoffmann, A. Worth, A. Cockshott, The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. *ATLA*, 35, 603–619 (2007).
- 14) 城西大学大学院修士論文, 古井克典 (2011).
- 15) K. Sugibayashi, H. Todo, T. Oshizaka, Y. Owada, Mathematical Model to Predict Skin Concentration of Drugs: Toward Utilization of Silicone Membrane to Predict Skin Concentration of Drugs as an Animal Testing Alternative. *Pharm. Res.*, 27, 134-142 (2010).
- 16) N. Hada, T. Hasegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi, K. Sugibayashi, Cultured skin loaded with tetracycline HCl and chloramphenicol as dermal delivery system: Mathematical evaluation of the cultured skin containing antibiotics, *J. Control. Release.*, 108, 341-350 (2005).
- 17) S. Ohmori, T. Hayashi, M. Kawase, S. Saito, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, Transdermal delivery of the potent analgesic dihydroetorphine: kinetic analysis of skin permeation and analgesic effect in the hairless rat, *J. Pharm. Pharmacol.*, 52, 1437-1449 (2000).
- 18) K. Sato, N. Mitsui, T. Hasegawa, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, Potential usefulness of solubility index for prediction of the skin permeation rate of 5-ISMN from pressure-sensitive adhesive tape, *J. control Release*, 73, 269-277 (2001).
- 19) K. Sugibayashi, T. Hayashi, K. Matsumoto, T. Hasegawa, Utility of a three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate the simultaneous diffusion and metabolism of ethyl nicotinate in skin, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 19, 352-362 (2004).
- 20) P. M., Boelsma E., S. Gibbs, M. Mommaas, Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 15, 4-17 (2002).
- 21) M.D. Ynsa, E. Gontiera, A. Mavon, P. Moretto, M. Rosdy, Comparative study between reconstructed and native human epidermis using nuclear microscopy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 249, 710–714 (2006).
- 22) F. Netzlaff, M. Kaca, U. Bock, Haltner-Ukomadu E., P. Meriers, Lehr C., Schaefer U., Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin® in comparison to various human skin preparations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 66, 127-134 (2007).
- 23) S. Kano, H. Todo, K. Sugie, H. Fujimoto, K. Nakada, Y. Tokudome, F. Hashimoto, H. Kojima, K. Sugibayashi, Comparison of Several Reconstructed Cultured Human skin Models by Microscopic Observation: Their

Usefulness as an Alternative Membrane for Skin in Drug Permeation Experiments, AATEX., 16, 51-58 (2011).

24) S. Kano, H. Todo, K. Sugie, H. Fujimoto, K. Nakada, Y. Tokudome, F. Hashimoto, K. Sugibayashi, Utilization of Reconstructed Cultured Human Skin models as an Alternative Skin for Permeation Studies of Chemical Compounds, AATEX., 15, 61-70 (2010).

25) T. Watanabe, T. Hsegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi, K. Takayama, K. Sugibayashi, Utility of the three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate skin permeation of drugs, Altern. Animal Test. Experiment., 8, 1-14 (2001).

26) D. Beydon, J. Payan, M. Grandclaude, Comparison of percutaneous absorption and metabolism of di-*n*-butylphthalate in various species. Toxicology in Vitro., 24, 71-78 (2010).

27) C. Jewell, C. Ackermann, N. A. Payne, G. Fate, R. Voorman, F. M. Williams, Specificity of Procaine and Ester Hydrolysis by Human, Minipig, and Rat Skin and Liver. Drug Metab. Dispos., 35, 2015-2022 (2007).

## E. 成果

### 学会発表

1) 3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験における false positive および false negative の原因解明に関する研究、平井 綾乃、藤堂 浩明、杉林 堅次、第56回日本薬学会関東支部大会、2012年10月、東京

2) Evidence-Based Approach to Develop Functional Cosmetics: Skin Penetration and Concentration of Active Ingredient

Candidates、杉林 堅次、International Conference on Nutraceutical and Cosmetic Science (ICNaCS2012)、2012年10月、マレーシア

3)培養皮膚を用いた薬剤評価の現状と課題、杉林 堅次、三次元生体組織構築公開シンポジウム、2012年11月、東京

4) 皮膚適用または暴露された化学物質の有効性および安全性評価のための in vitro および in silico アプローチ、杉林 堅次、日本薬学会第133年会、2013年3月、神奈川

5) 3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験における偽陽性反応および偽陰性の原因解明に関する研究、平井 綾乃、藤堂 浩明、杉林 堅次、日本薬学会第133年会、2013年3月、神奈川

Table 1 Physicochemical parameters of model compounds.

Model compounds	<i>M.W.</i>	Log $K_{o/w}$
FP	224.27	2.17
ANP	188.23	-1.51
EN	141.11	1.32
NA	123.11	0.36
HS	222.29	5.50
SA	138.12	2.19

Table 2 HPLC systems for determination of model compounds.

Pump	LC-20AD	Shimadzu co., Kyoto, Japan
UV detector	SPD-20A	Shimadzu co., Kyoto, Japan
System controller	SCL-10AVP	Shimadzu co., Kyoto, Japan
Auto injector	SIL-20A	Shimadzu co., Kyoto, Japan
Degasser	DGU-20A3	Shimadzu co., Kyoto, Japan
Column	Inertsil <sup>®</sup> ODS-3 4.6 mm × 150 mm	GL Sciences Inc., Tokyo, Japan
Column oven	CTO-20A	Shimadzu co., Kyoto, Japan
Analysis software	LC solution	Shimadzu co., Kyoto, Japan

Table 3 HPLC conditions for determination of model compounds.

Model compounds	Mobile phase	Detection (nm)	Internal standard
FP	Acetonitrile : 0.1%phosphoric acid = 1 : 1	254	isopropyl <i>p</i> -hydroxybenzoate
ANP	Acetonitrile : water = 3 : 7	254	Absorlute calibration method
EN, NA	Acetonitrile : 0.1%phosphoric acid + 5mM SDS = 1 : 2	260	Absorlute calibration method
HS, SA	Acetonitrile : 0.1%phosphoric acid = 8 : 2	254	Hexyl <i>p</i> -hydroxybenzoate

Table 4 Concentrations of FP and ANP in the hairless rat skin and EpiDerm after their topical application.  $C_{tot,ss}$ : total steady-state concentration.  $C_{ved,ss}$ : concentration in the viable skin after stripping off the stratum corneum layers.

		Hairless rat skin	EpiDerm
FP	$C_{tot,ss}$ (mg/mL)	0.64 ± 0.00	11.18 ± 0.31
	$C_{ved,ss}$ (mg/mL)	0.45 ± 0.00	6.79 ± 0.08
ANP	$C_{tot,ss}$ (mg/mL)	1.05 ± 0.06	128.36 ± 4.20
	$C_{ved,ss}$ (mg/mL)	0.50 ± 0.04	43.09 ± 16.14

Table 5 Concentrations of EN and NA in the viable epidermis and dermis of hairless rat skin and EpiDerm.  $C_{ved,ss}$ : concentration in the viable skin after stripping off the stratum corneum layers.

		Hairless rat skin	EpiDerm
EN	$C_{ved,ss}$ ( $\mu\text{mol/mL}$ )	15.61 $\pm$ 2.69	46.52 $\pm$ 4.75
NA	$C_{ved,ss}$ ( $\mu\text{mol/mL}$ )	20.42 $\pm$ 0.94	1.02 $\pm$ 0.02

Table 6 Concentrations of HS and SA in the viable epidermis and dermis of hairless rat skin and EpiDerm.  $C_{ved,ss}$ : concentration in the viable skin after stripping off the stratum corneum layers.

		Hairless rat skin	EpiDerm
HS	$C_{ved,ss}$ ( $\mu\text{mol/mL}$ )	1.90 $\pm$ 0.01	16.28 $\pm$ 4.99
SA	$C_{ved,ss}$ ( $\mu\text{mol/mL}$ )	0.25 $\pm$ 0.00	0.69 $\pm$ 0.05

Table 7 Comparison of observed and calculated values of concentration of FP (a) and ANP (b) in the hairless rat skin and EpiDerm.  $C_{tot,ss}$ : steady-state concentration in full-thickness skin.  $C_{ved,ss}$ : concentration in the viable skin.

(a) FP

		Observed values	Calculated values
Hairless rat skin	$C_{tot,ss}$ (mg/mL)	0.64 ± 0.00	0.25
	$C_{ved,ss}$ (mg/mL)	0.45 ± 0.00	0.14
EpiDerm	$C_{tot,ss}$ (mg/mL)	11.18 ± 0.31	6.02
	$C_{ved,ss}$ (mg/mL)	6.79 ± 0.08	4.08

(b) ANP

		Observed values	Calculated values
Hairless rat skin	$C_{tot,ss}$ (mg/mL)	1.05 ± 0.06	1.75
	$C_{ved,ss}$ (mg/mL)	0.50 ± 0.04	0.12
EpiDerm	$C_{tot,ss}$ (mg/mL)	128.36 ± 4.20	71.33
	$C_{ved,ss}$ (mg/mL)	43.09 ± 16.14	27.80

Table 8 Comparison of observed and calculated values of the concentration of EN and NA in the viable epidermis and dermis of hairless rat skin and EpiDerm.  $C_{ved,ss}$ : steady state concentration in the viable skin.

		Observed values	Calculated values
Hairless rat skin	EN $C_{ved,ss}$ (μmol/mL)	15.61 ± 0.58	37.64
	NA $C_{ved,ss}$ (μmol/mL)	20.42 ± 0.94	52.07
EpiDerm	EN $C_{ved,ss}$ (μmol/mL)	46.52 ± 4.75	101.60
	NA $C_{ved,ss}$ (μmol/mL)	1.02 ± 0.02	0.21



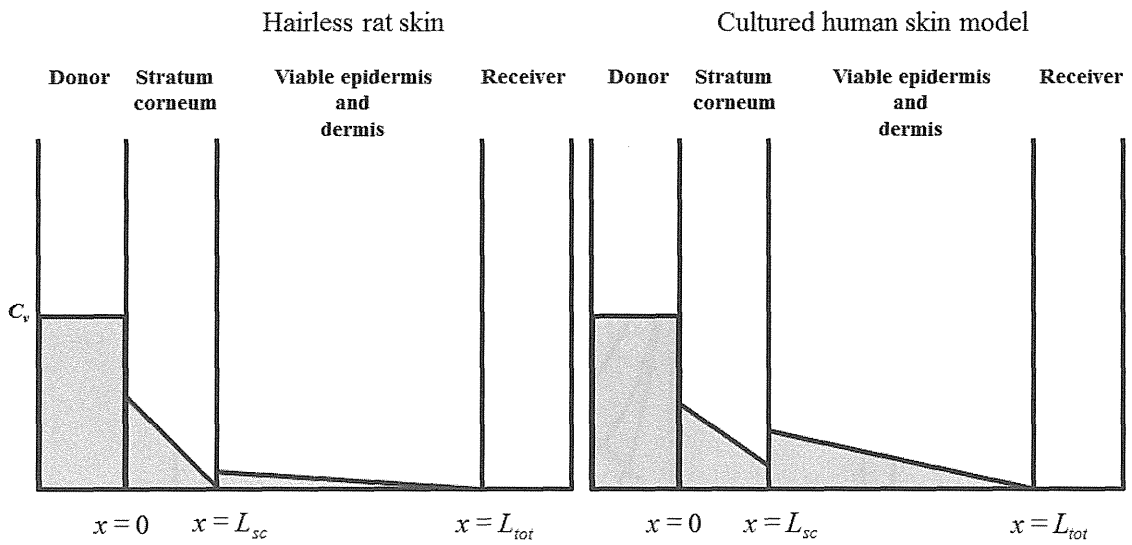


Fig. 1 A typical concentration-distance profile of a hydrophilic compound in hairless rat skin and cultured human skin model.

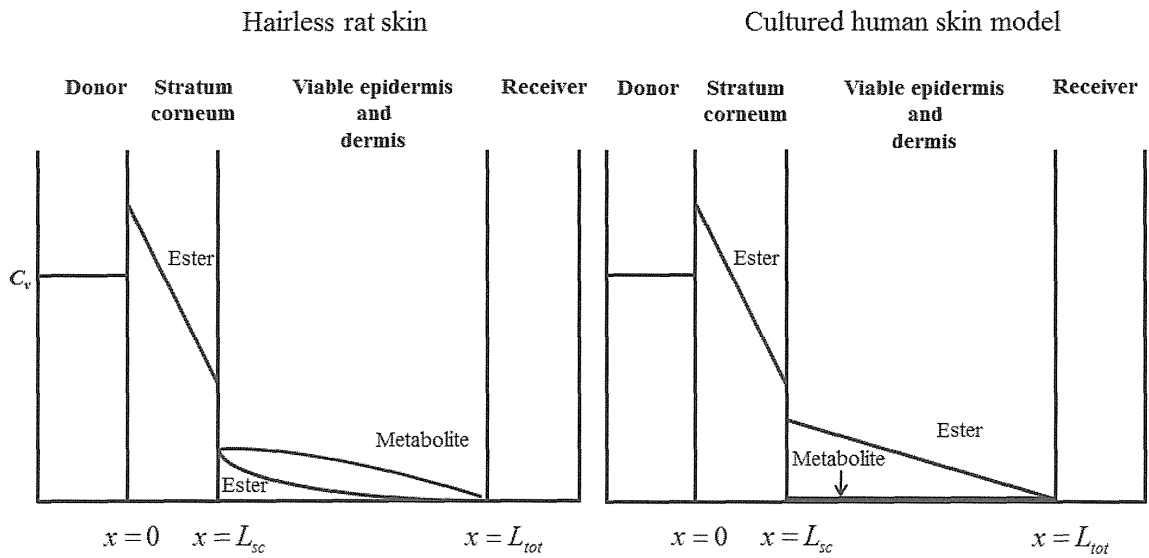


Fig. 2 A typical concentration-distance profile of an ester and its metabolite in excised hairless rat skin and cultured human skin model.

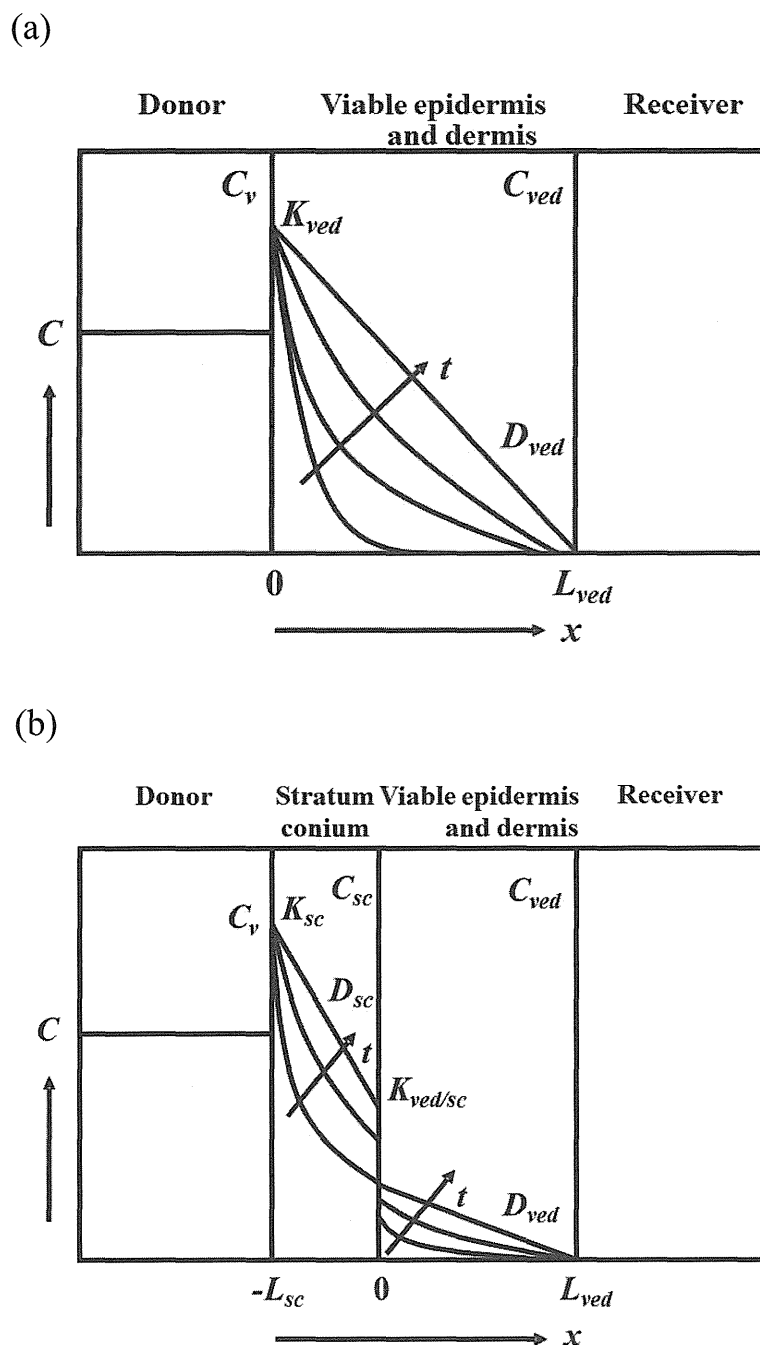


Fig. 3 Typical concentration-distance profiles in one-layered (a) and two-layered (b) membrane diffusion models during membrane permeation of chemical compounds. Abbreviations  $C$ ,  $C_v$ ,  $C_{sc}$ ,  $C_{ved}$ : concentration of chemical compounds,  $x$ : position of the membrane,  $t$ : time after starting the permeation experiment,  $L_{ved}$ ,  $L_{sc}$ : thickness,  $D_{ved}$ ,  $D_{sc}$ : diffusion coefficient,  $K_{ved}$ ,  $K_{sc}$ ,  $K_{ved/sc}$ : partition coefficient.

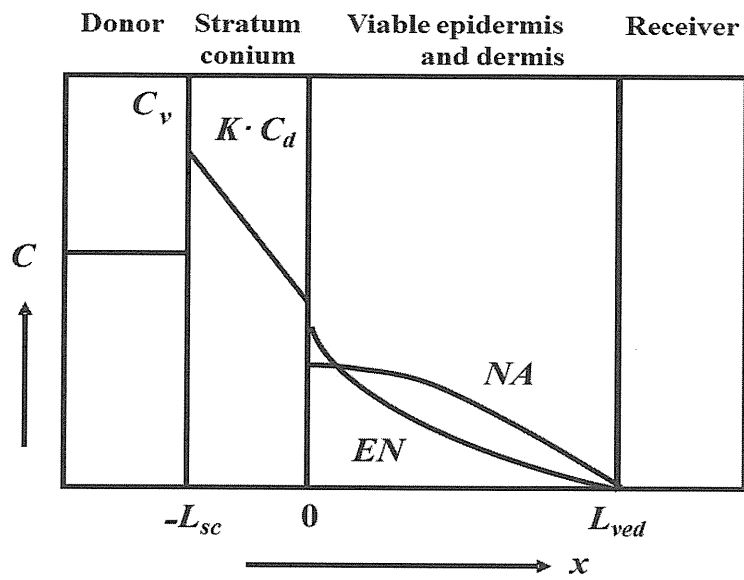


Fig. 4 A typical concentration-distance profiles of EN and NA in hairless rat skin and cultured human skin after the topical application of EN.

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

研究分担者 山本 直樹（藤田保健衛生大学 共同利用研究施設 講師）

協力研究者 山下 宏美、加藤 義直、佐藤 淳、中村 政志、原 和宏、  
谷川 篤宏、谷口 孝喜、堀口 正之、平野 耕治

### 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眼刺激性試験・眼毒性試験の中で重要な位置付けを占める試験法に着目し、有害性同定のための代替法を新規開発する。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（二次元培養モデルと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）を用いて、昨年度までに二次元培養モデルの曝露実験プロトコールの予備検討を行った。さらに正常ヒト角膜上皮培養細胞との比較についてマイクロアレイを用いた遺伝子解析を行った。

平成24年度では、マイクロアレイ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、細胞毒性試験よりも低濃度被験物質でも細胞に与えるごくわずかな影響を検出できる高感度指標遺伝子を選出した。さらに、iHCE-NY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法の確立および三次元角膜再構築モデルを用いた曝露実験プロトコールの検討を行った。

成果として、iHCE-NYを用いた二次元培養における曝露実験プロトコール（前培養1日、後培養1日、曝露時間5分）の確立、細胞毒性試験よりも低濃度において細胞に対する影響を検出できる遺伝子（*cyclin-D1*, *snail-1*, *keratin-3*）の選出およびiHCE-NYを用いた三次元角膜再構築モデルの作製法と曝露実験プロトコールの概案を提示した。

## 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）を基準に作成されている。このDraize法は、被験物質の強い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。なお、経済協力開発機構（OECD）のウサギを用いた眼刺激性試験改訂ガイドライン（TG405、2012年10月改訂）の提示がされ、本改訂により局所麻酔剤及び全身性鎮痛剤を適用することにより、ウサギを用いた眼刺激性試験を実施する際に動物の痛みと苦痛が軽減されると考えられている。

この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（TG437）やニワトリ眼球を用いたICE法（TG438）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、現実的には各実験室で日常的に実施するには困難な状況である。なお、BCOP法やICE法についても、現在さらに改訂案が議論されており、試験法自体も現在進行形という状況であるといえ

よう。

一方、GHS分類における刺激性あり（2B以上）と無刺激（NI）をスクリーニングできるウサギ角膜上皮細胞を用いた試験法として、SIRC法やSTE法などがある。これらの試験法は、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。

さらにヒト不死化ヒト角膜上皮細胞として日本ではHCE-Tがあり、ヨーロッパでも同様の不死化ヒト角膜上皮細胞が報告されている。しかし不死化遺伝子（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ョ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は、理化学研究所より分譲を受けることができるが、HCE-Tは不死化細胞作成の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。しかし、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。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。また、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。この HCE-T を用いた眼科領域の基礎研究は、200 報を超える論文が報告されているが、2008 年に京都府立医科大学の研究グループが array CGH という方法で HCE-T のゲノム構成が正常 2 倍体細胞から大きく変化していることを見出した。さらにサブクローニングによってこの細胞が性質の異なるヘテロな亜集団の集合であることも確認されたことから、この細胞を安易に角膜上皮細胞の *in vitro* モデルとして利用することへの警鐘を鳴らす論文を発表した (Yamasaki K. et al, *IOVS* 2008.)。

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。しかし、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ため、角膜上皮細胞を用いたモデルではない。

一方、三次元角膜再構築モデルとしては、HCE / CORNEAL EPITHELIUM (SkinEthic)、LabCyte CORNEA-MODEL (J-TEC) などによる研究が行われている。また、前述した HCE-T を用いた三次元角膜再構築モデルの研究も行われている。

バリデーションスタディにおいて、

施設内・施設間再現性が高く、反復実験において変動幅の少ない細胞を用いることが望ましい。ヒトの眼刺激性に対する評価の代替試験法であれば、本来ヒト角膜上皮細胞を用いることが当然であろう。しかし、日本国内では日本アイバンク協会に提供して頂いたヒト角膜組織を研究目的で使用することが禁止されている。またヒト正常角膜上皮由来細胞は 4 継代以上培養することが困難である。

(Yamamoto N et al. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010)

本研究において使用する iHCE-NY 細胞は、研究代表者が作製したヒト角膜輪部由来の新規不死化角膜上皮細胞株であり、①ウサギ角膜上皮由来細胞 (SIRC) ではなく正常ヒト角膜上皮細胞由来であること、②既報のヒト角膜上皮不死化細胞 (HCE-T) のように作製時に生ウイルスを使用せず、新しく開発した技術による遺伝子導入不死化細胞であること、③特殊なフィーダー細胞や羊膜などを必要としないこと、④細胞培養・維持が容易で同時多施設あるいは同一施設内反復試験に適した細胞であることなど、これまでの *in vitro* 眼刺激性試験評価系よりもヒト眼刺激性を評価できる代替試験材料として多くのアドバンテージポイントを有している。

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三次元再構築モデルの開発と試験プロトコルの検討を行う。

平成24年度の具体的な研究課題は、以下のとおりである。

1. iHCE-NYを用いた二次元培養系の曝露実験プロトコルを作成する。
2. 平成23年度に実施したマイクロアレイ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、細胞毒性試験よりも低濃度被験物質でも細胞に与えるごくわずかな影響を検出できる高感度指標遺伝子を選出する。
3. iHCE-NY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法の確立および三次元角膜再構築モデルを用いた曝露実験プロトコルの検討を行う。

## B. 研究方法

### B-1. 供試細胞

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、このHCE-Tを山本が細胞表面マーカーによるクローニングを行い、分離樹立した細胞（nHCE-T）を用いた。

さらに、近年二次元培養法による細胞を用いた眼刺激性試験代替法で使用されているウサギ角膜上皮由来細胞のSIRCも併せて対照として使用した。

### B-2. 二次元培養系曝露実験プロトコル

平成23年度の実験結果を基に、播種細胞数、曝露前培養時間、被験物質の曝露時間を検討した。

播種細胞数は $1.0E+06$  cells/mlに調製し、公比2にて11段階希釈した条件で検討した。曝露前培養時間（前培養）は、0日（0時間）、1日（24時間）、2日（48時間）を比較した。曝露後培養時間（後培養）は、0日（0時間）、1日（24時間）、2日（48時間）を比較した。

評価基準としては、被験物質の曝露前にコンフルエントにならない播種

細胞数と曝露前培養時間（前培養）の設定、および被験物質曝露後培養時間（後培養）によって細胞が増えることが確認できる各条件を設定することである。

被験物質の曝露時間は、1分、5分、30分を比較検討した。実際に眼に物質が入った場合、通常は痛み等を伴うため、速やかに洗眼することが多いことから、眼内に留まる時間は比較的短いと推定される。よって評価基準としては、実際の臨床で想定される眼内貯留時間（1分程度）の結果とほぼ同じ程度の短い時間で、かつ細胞実験の実際の手技において、短時間で曝露できるか、である。

#### B-2-1. 条件検討-①（播種数、前/後培養）

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  $\mu$ l ずつ播種した。

前培養2日のプロトコールは、播種培養1日後に培地を交換し、合計2日間、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  前で前培養し、被験物質（ここではPBSのみ）を曝露した。前培養1日のプロトコールは、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の条件で培養し、播種培養1日後に被験物質（ここではPBSのみ）を曝露した。

被験物質（ここではPBSのみ）を曝露した後、1日、または2日の後培

養してから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  $\mu\text{g/ml}$ ）に置換して、2時間静置した（ $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ ）。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-2-2. 条件検討-②（前培養、曝露時間）

条件検討-①の結果に基づき、プロトコール①として、前培養2日、後培養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、CAS No.151-21-3）、Triton X-100（SIGMA X100、CAS No. 9002-93-1）、EtOH（WAKO 057-00456、CAS No. 64-17-5）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 $\text{IC}_{50}$ 値を算出した。

#### B-2-3. 条件検討-③（前培養、曝露時間）

条件検討-①の結果に基づき、プロトコール②として、前培養1日、後培養



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、CAS No.151-21-3）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 $IC_{50}$ 値を算出した。

### B-3. 高感度指標遺伝子の選出

SLSおよびエタノールを被験物質として、細胞生存率に影響のない濃度（ $IC_{50}$ の濃度よりも薄い被験物質濃度、細胞毒性が検出されない濃度）が含まれるような希釈系列を作製し、細胞毒性試験よりも低濃度被験物質でも細胞に与えるごくわずかな影響を検出できる高感度指標遺伝子を選出する。

#### B-3-1. 被験物質曝露細胞からのRNA抽出

曝露条件として、iHCE-NY播種細胞数を $2.5E+04$  cells/well、前培養1日、曝露時間5分、後培養1日と設定した。この曝露実験は、NR取り込み試験用と高感度指標遺伝子を選出するための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。なお、参考実験として曝露時間30分でも同様の実験を実施した。

平成23年度の研究成果を基に、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）を採択した。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20分に延長した検討を平成23年度に実施したところ、得られるRNA量の減少や純度に大きな影響は見られなかったため、酵素処理の時間は20分で実施した。

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）として、抽出したRNA試料を遠心分離（ $9,000\times g$ , 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た。

濃度の異なる被験物質曝露後の細胞から抽出したRNAサンプルは、リアルタイムPCRの実施まで $-80^{\circ}C$ で凍結保存した。

#### B-3-2. 高感度指標遺伝子の選出

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-4. 三次元角膜再構築モデルの作製

三次元培養角膜再構築モデルの作製プロトコールは、3種類の供試細胞を用いて、培養条件の検討を行った。

B-4-1. 供試細胞

三次元角膜再構築モデル作製には、HCE-T、nHCE-T、および iHCE-NY を用いて比較検討した。

B-4-2. モデル構築の培養条件検討

主に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素材やポアサイズの検討
- コーティング物質の検討  
セルカルチャーインサートのコーティング試薬や条件の検討
- 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、その後のエアリーフト培養の各工

程における培養日数

- 培地（培養液）の液量  
インサート内液と外液の各培養ステップにおける液量の検討

実際に検討した実験条件例の一部を表1に示した。

### B-4-3. 再構築モデルの評価

以下の三次元角膜再構築モデル作製プロトコルを用いて検討した。

Day	0	1	2	3	4	5	6	7	10-13
Condition	Fri	Sat	Sun	Mon	Tue	Wed	Thu	Fri	Mon-Thu
1	Seed	Growth	Diff24			AL			Harvest Measure Fix Section
2	Seed	Growth	Diff1.5? AL			AL			
3	Seed	Growth	(Half) Diff24			AL			
4	Seed	Growth	(Half) Diff48			AL			

- MTT 法（SLS 曝露）

SLS 曝露による被験物質の曝露プロトコルの検討を行った。SLS は、濃度を 2%、1%、0.5%、0.05% に設定し、曝露時間を 5 分と 60 分、曝露量を 50 $\mu$ L/insert とし、洗浄は PBS を 800 $\mu$ L  $\times$  5 回実施した。三次元角膜再構築モデルの評価は、MTT を用いて行った。MTT の反応時間が 3 時間、抽出は 300 $\mu$ L のイソプロパノールで行った。

- FL 法（無処置）

THE FLUORESCCEIN LEAKAGE TEST (INVITTOX Protocol No. 71) を基に FL 法の条件検討を行った。Fluorescein sodium の濃度は 0.01% とし、適用時間は 30、60、120、180 分で行った。測定波長は、Ex: 485nm、Em: 530nm に設定した。測定機器は、Gemini EM Fluorescence Microplate Reader (Molecular Devices 社製)

を用いた。

- 電気抵抗（無処置）

三次元角膜再構築モデルの重層構造および細胞間結合の評価として、Millicell ERS-2 電圧抵抗計 (Millipore 社製) を用いて電気抵抗を測定した。

- 組織標本（無処置）

作製した三次元角膜再構築モデルは、SUPER FIX など固定した後、常法に基づきパラフィンブロックまたはクライオブロックを作製し、マイクロトームにて薄切切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H.E. 染色) を行った。なお iHCE-NY については、免疫染色 (ZO-1、Involucrin) も行った。

### B-5. 三次元角膜再構築モデルの曝露プロトコル作製

作製した三次元角膜再構築モデルを用いた被験物質による曝露実験プロトコルの基礎検討を実施した。

#### B-5-1. 被験物質曝露プロトコルの検討

6 日間作製プロトコル (ショートタームプロトコル) で作製した三次元角膜再構築モデルを用いて、被験物質を 5 分間曝露した後、後培養を 0 日 / 1 日で検討した。

Day	0	1	2	3	4	5	6	7	10-13
Condition	Fri	Sat	Sun	Mon	Tue	Wed	Thu	Fri	Mon-Thu
1	Seed	Growth	Diff24			AL			Harvest Measure Fix Section
2	Seed	Growth	Diff1.5-AL			AL			
3	Seed	Growth	(Half) Diff24			AL			
4	Seed	Growth	(Half) Diff48			AL			

陽性コントロールとして、2% SLS (Sigma L6026、CAS No. 151-21-3) を設定した。GHS分類のNCとして、3-Methoxy-1,2- propanediol (東京化成工業 M0125、CAS No. 623-39-2) と Tween 20 (Sigma P1379、CAS No. 9005-64-5) を曝露した。GHS2として、Ethanol (Wako 057-00456、CAS No. 64-17-5) と 5% Triton X-100 (Sigma X100、CAS No.9002-93-1) を曝露した。GHS1として、1-Butanol ( Wako 026-03326 、 CAS No. 71-36-3 ) と 50% Benzalkonium Chloride (東京化成工業 B0414、CAS No. 63449-41-2) とした。

曝露後の三次元角膜再構築モデルをMTT法で評価した。対照 (PBS) の吸光度を100%とした時の各被験物質による細胞毒性を計算した。

(倫理面への配慮)

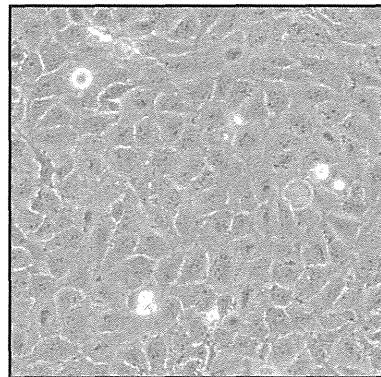
本研究で使用したヒト正常角膜上皮細胞は、市販されている細胞、研究用で販売・分譲されている細胞、および研究用として購入した眼球 (角膜) 組織から分離培養した細胞を用いているため、特別な倫理面への配慮は必要ないと考えている。

## C. 研究結果

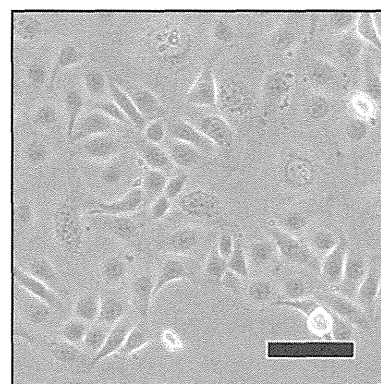
### C-1. 供試細胞

各細胞の位相差顕微鏡写真を示す。

- iHCE-NY

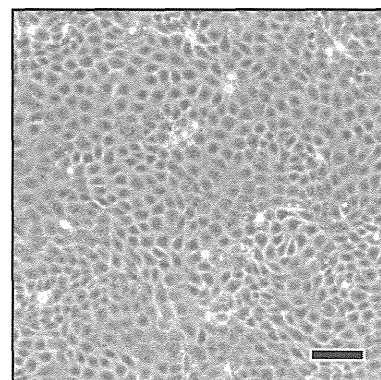


- HCE-T



クローニングしていないため、細胞の大きさや形態がさまざまである。

- nHCE-T



HCE-TをCD29でソーティングし、遺伝子導入とクローニングを行ったため、細胞形態がほぼ一律となった。