

C-2. 二次元培養系曝露実験プロトコール

C-2-1. 条件検討-① (播種数、後培養)

細胞懸濁液を培地にて $1.0\text{E}+06$ cells/ml に調製し、公比 2 にて 11 段階希釈した後、96 ウェルプレートに $100\text{ }\mu\text{L}$ ずつ播種し、培養した結果を図 1 A と図 1 B に示した。

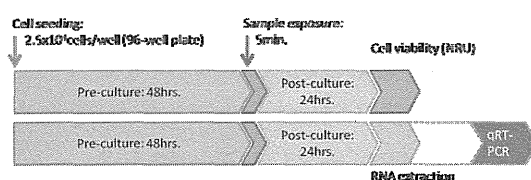
播種後に細胞の増殖を経時的に確認できる細胞濃度は、 $5.0\text{E}+04$ cells/well 以下であった。また、後培養 2 日では、細胞がオーバーコンフルエントになったため、後培養は 1 日以下とした。

C-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 ($5.0\text{E}+04$, $2.5\text{E}+04$, $1.25\text{E}+04$, $6.25\text{E}+03$ cells/well) で設定して検討した結果、再現性よく細胞の増殖を確認できる播種細胞数は、 $2.5\text{E}+04$ ($25,000$) cells/well であった (図 2 A)。

次に SLS の曝露時間を 1 分、5 分、30 分で検討した結果、1 分と 5 分の曝露では、ほとんど差がなかったことから、曝露時間は実際の実験ハンドリングを考慮し、5 分曝露を採用した (図 2 B)。

上記の条件絞り込みを行い、以下のプロトコール①を設定した。



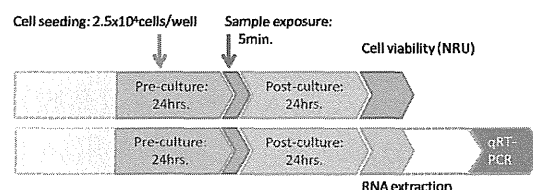
このプロトコール①に基づき、iHCE-NY、HCE-T、SIRC を用いて、SLS、X-100、EtOH の曝露実験を行ったところ、各細胞間に大差は認められなかった (図 2 C)。

C-2-3. 条件検討-③ (前培養、曝露時間)

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 ($5.0\text{E}+04$, $2.5\text{E}+04$, $1.25\text{E}+04$, $6.25\text{E}+03$ cells/well) で設定して検討した結果、このプロトコールにおいて再現性よく細胞の増殖を確認できる播種細胞数は、 $2.5\text{E}+04$ ($25,000$) cells/well であった (図 2 D)。

次に SLS の曝露時間を 1 分、5 分、30 分で検討した結果、1 分と 5 分の曝露では、ほとんど差がなかったことから、曝露時間は実際の実験ハンドリングを考慮し、5 分曝露を採用した (図 2 E)。

上記の条件絞り込みを行い、以下のプロトコール②を設定した。



C-3. 高感度指標遺伝子の選出

C-3-1. 被験物質曝露細胞からの RNA 抽出

細胞毒性試験の結果から算出される IC_{50} 値は、回収された total-RNA のコントロール (無処置) に対する濃度で予測できることを見出した。これは、遺伝子解析実験のみで細胞毒性試験を省略しても従来の IC_{50} 値を推測

することができる可能性があることを示している。結果の一例を表 2 に示した。

C-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) のうち、細胞生存率に影響のない濃度 (IC₅₀ 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) 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。

SLS と EtOH を 5 分曝露させた条件での遺伝子発現の推移についての結果、および参考までに 30 分曝露させた条件での遺伝子発現の推移の結果を表 3 にまとめた。検討の結果、*cyclin-D1*、*snail-1*、*keratin-3* が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であることが分かった。

C-4. 三次元角膜再構築モデルの作製

C-4-1. モデル構築の培養条件検討

培養条件がわずかでも変わってしまうと、三次元角膜再構築の構造が変化することがわかった。その一例を図 2 F に示した。

C-4-2. 再構築モデルの評価

• MTT 法

SLS 曝露による iHCE-NY の三次元角膜再構築モデルに対する被験物質の曝露プロトコールの検討を行った。SLS の、濃度を 1%、曝露時間を 5 分に設定し、曝露量を 50 μ L/insert、洗浄は PBS を 800 μ L $\times$ 5 回実施した。評価は、MTT を用いて行った (図 2 G)。

• 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結果、iHCE-NY の三次元角膜再構築モデルへの Fluorescein sodium の適用時間は、60 分とした (図 2 H)。

• 電気抵抗 (無処置)

iHCE-NY の三次元角膜再構築モデルの無処置における電気抵抗 (ER [Ω]) は、300 Ω 以上で再現性よく確認することができた (図 2 I)。

• 組織標本 (無処置)

HCE-T、nHCE-T、iHCE-NY を用いて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、ミ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。

HCE-T で作製した三次元角膜再構築モデルは、細胞層が 3 ～ 4 層までしか形成されなかった。

nHCE-T で作製した三次元角膜再構築モデルは、細胞層が5～6層まで形成できるようになった。細胞形態的にも、表層に移動するほど扁平となり、細胞が分化していることがわかる。

iHCE-NY で作製した三次元角膜再構築モデルも、nHCE-T と同様に細胞層が5～6層まで形成されており、表層に移動するほど扁平となっていたことから、細胞が分化していることがわかる。

ヒト正常角膜上皮の組織構造、市販の三次元角膜再構築モデルの組織像（図2J）、および上記の三次元角膜再構築モデルの組織像（図2K）に示した。

iHCE-NY の免疫染色（ZO-1、Involucrin）結果を図2Lに示した。ZO-1、Involucrinを検出することができた。

C-5. 三次元角膜再構築モデルの曝露プロトコル作製

iHCE-NY を用いて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。

結果として、NC の物質曝露でも細胞生存率が低かったため、現状のモデルでは感度が良すぎるという結果となった（図2M）。また、インサートの内部がエアリーフトのままで後培養した場合、細胞生存率は回復せず、むしろ刺激や反応が強く出る傾向があったことから、後培養の条件を再検討する必要がある。

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ることなく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わかった。

D-2. 二次元培養系曝露実験プロトコル

iHCE-NY を用いた二次元培養系曝露実験プロトコルの検討を行った。結果として、以下のプロトコルをまとめた。

- 前 培 養：24 時間
- 曝露時間：5 分
- 播種細胞数： 2.5×10^4 cells / well
- 後 培 養：24 時間

D-3. 高感度指標遺伝子の選出

SLS と EtOH を5分曝露させた条件での遺伝子発現の推移についての結果、*cyclin-D1*、*snail-1*、*keratin-3* が

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であることが分かった。

D-4. 三次元角膜再構築モデルの評価

HCE-T は、三次元角膜再構築モデルとしては、組織像が薄いということが分かった。一方、HCE-T からクローニングして遺伝子導入した nHCE-T、および山本が作製した iHCE-NY は、三次元角膜再構築モデルとしての組織像は、非常に正常角膜上皮組織像に近いといえる。

MTT 法、FL 法、電気抵抗など、近年の眼刺激性試験代替法で用いられている評価方法を検討し、いずれも良好な結果を得ることができた。

D-5. 三次元角膜再構築モデルの曝露実験

iHCE-NY を用いて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（曝露時間：5 分）を考案し、実施した。

残念ながら現状のモデルでは、結果として、NC の物質曝露でも細胞生存率が低かったため、感度が良すぎる（三次元角膜再構築モデルとしては脆弱）という結論に至った。また、インサートの内部がエアリーフトのままで後培養した場合、細胞生存率は回復せず、むしろ刺激や反応が強くなる傾向があったことから、後培養では、インサート内に培地を再添加するなどのプロトコルの改良が必要であると考えている。

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活化細胞（iHCE-NY）の作出に成功した。

この iHCE-NY を用いて、計 6 年の眼刺激性試験代替法に関わる研究に従事してきた。

研究分担者の山本に課せられた 6 年間のミッションは全てコンプリートすることができた。主な研究成果を表 4 にまとめた。

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

- 山本直樹、平野耕治、山下宏美、加藤義直、佐藤淳、中村政志、原和宏、谷川篤宏、堀口正之、谷口孝喜、小島肇. 不活化角膜上皮細胞（iHCE-NY）を用いた眼刺激性試験代替法に関する研究. 日本組織培養学会第 85 回大会, 京都, 2012.
- 山本直樹. 新規作出したヒト角膜不活化細胞を用いた眼刺激性試験評価系の確立. 日本動物実験代替法学会第 25 回大会, 東京, 2012.

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。

表1. 三次元角膜再構築モデル作製に使用した検討プロトコール (一部)

[illegible]

表 2. 細胞毒性試験における IC₅₀ 値の推測

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

表 3. 高感度指標遺伝子を選出するための実験結果

● 曝露時間 5 分

	SLS	EtOH
播種細胞数	2.5×10^4 cells	2.5×10^4 cells
曝 露 時 間	Expo. 5 min	Expo. 5 min
IC ₅₀	267 μ g/mL	15 %
<i>cyclin-D1</i>	267 μ g/mL	12 %
	Control Ct. - 0.5	Control Ct. - 0.5
<i>snail-1</i>	79 μ g/mL	10 %
	Control Ct. + 0.5	Control Ct. + 0.5
<i>keratin-3</i>	119 μ g/mL	6 %
	Control Ct. + 0.5	Control Ct. + 0.5

● 曝露時間 30 分

	SLS	EtOH
播種細胞数	2.5×10^4 cells	2.5×10^4 cells
曝 露 時 間	Expo. 30min	Expo. 30min
IC ₅₀	79 μ g/mL	10%
<i>cyclin-D1</i>	53 μ g/mL	8 %
	Control Ct. - 0.5	Control Ct. - 0.5
<i>snail-1</i>	53 μ g/mL	8%
	Control Ct. + 0.5	Control Ct. + 0.5
<i>keratin-3</i>	35 μ g/mL <	6 % <
	Control Ct. + 0.5	Control Ct. + 0.5

表 4. 厚生労働科学研究 山本研究分担者の研究成果

研究年度	主な研究成果	
19年度	正常角膜上皮細胞(前駆細胞)の分離法を確立	
20年度	正常角膜上皮細胞(前駆細胞)の培養法を確立	
21年度	不死化遺伝子ベクターの構築と不死化角膜上皮細胞を樹立	
22年度	不死化角膜上皮細胞の解析①	
23年度	不死化角膜上皮細胞の解析②	
	【2次元培養】 評価遺伝子マーカーの選定	【3次元培養】 培養法の開発
24年度	【2次元培養】 試験プロトコルの確立	【3次元培養】 試験プロトコル概要の 確立

図 1 A. 前培養 1 日のプロトコールにおける細胞の経時的変化

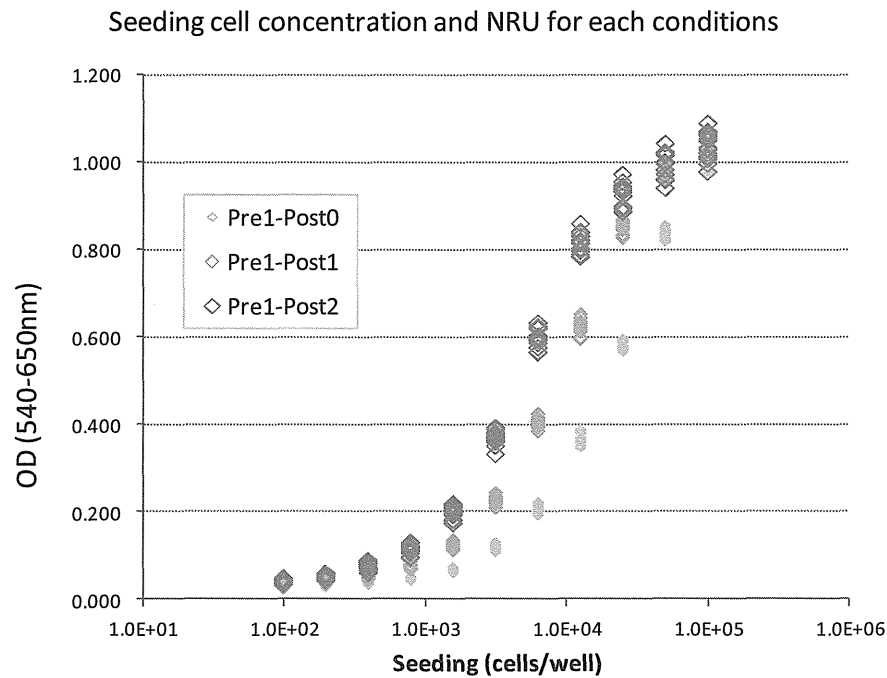


図 1 B. 前培養 2 日のプロトコールにおける細胞の経時的変化

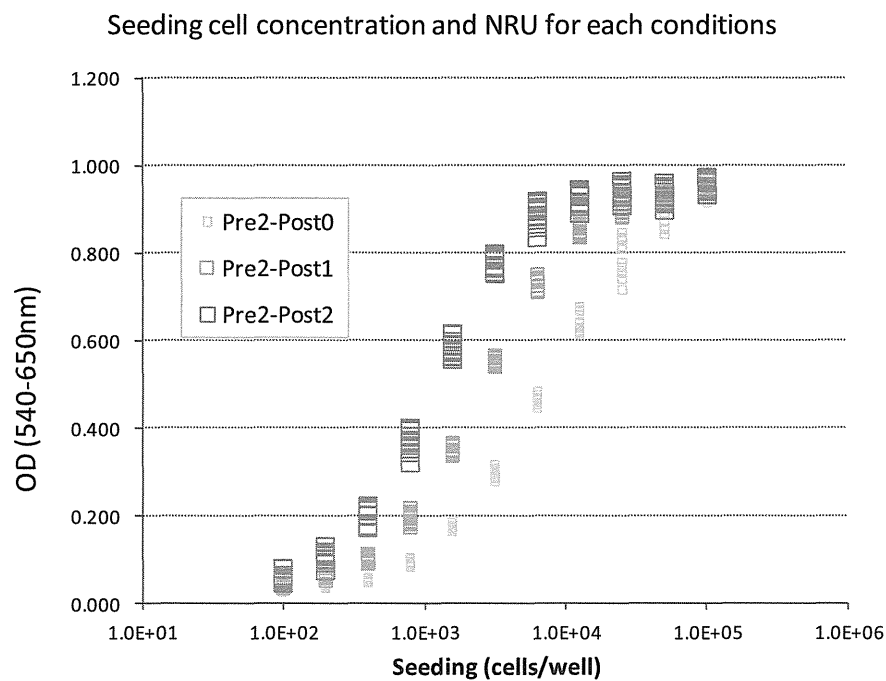


図 2 A. 播種細胞数の検討

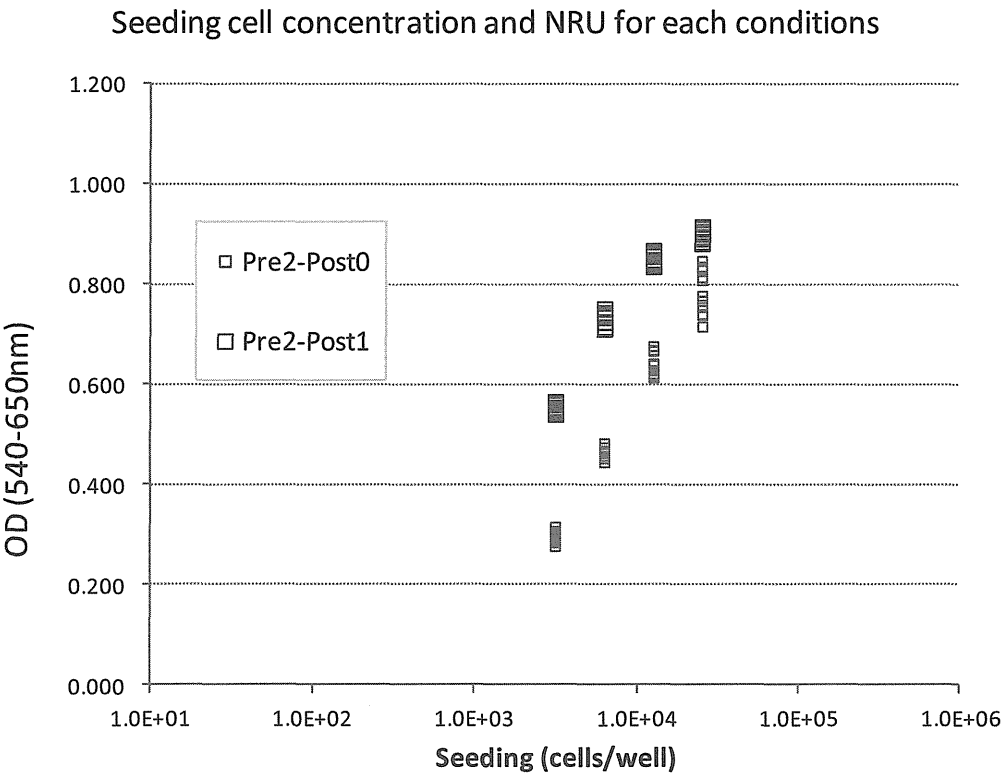


図 2 B. 曝露時間の検討結果

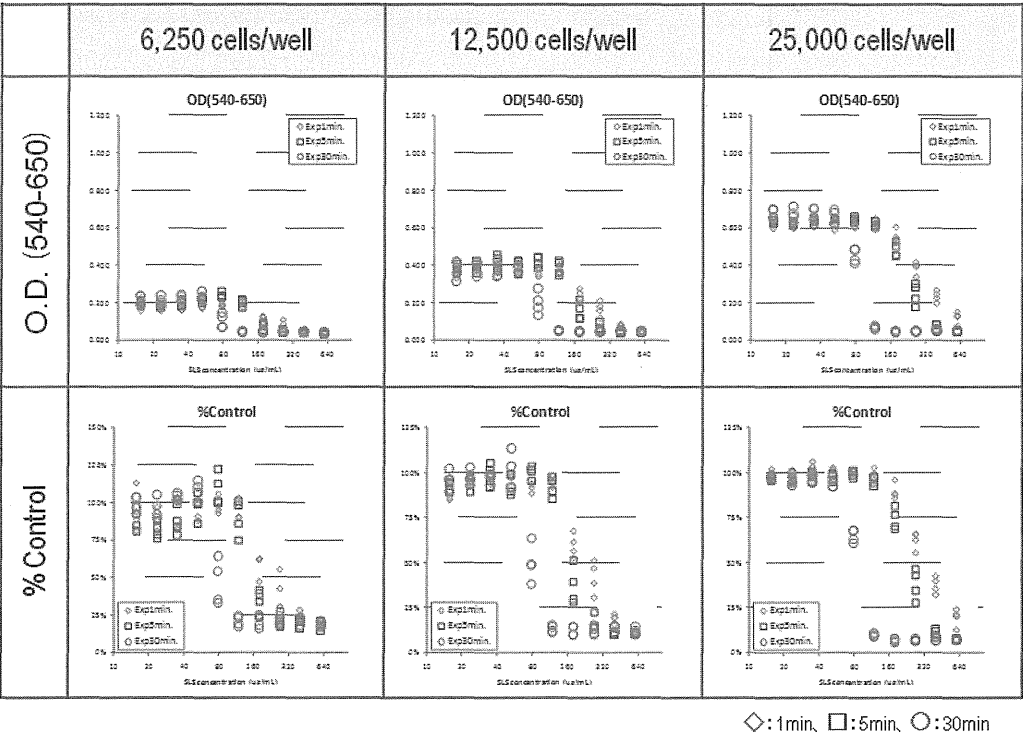
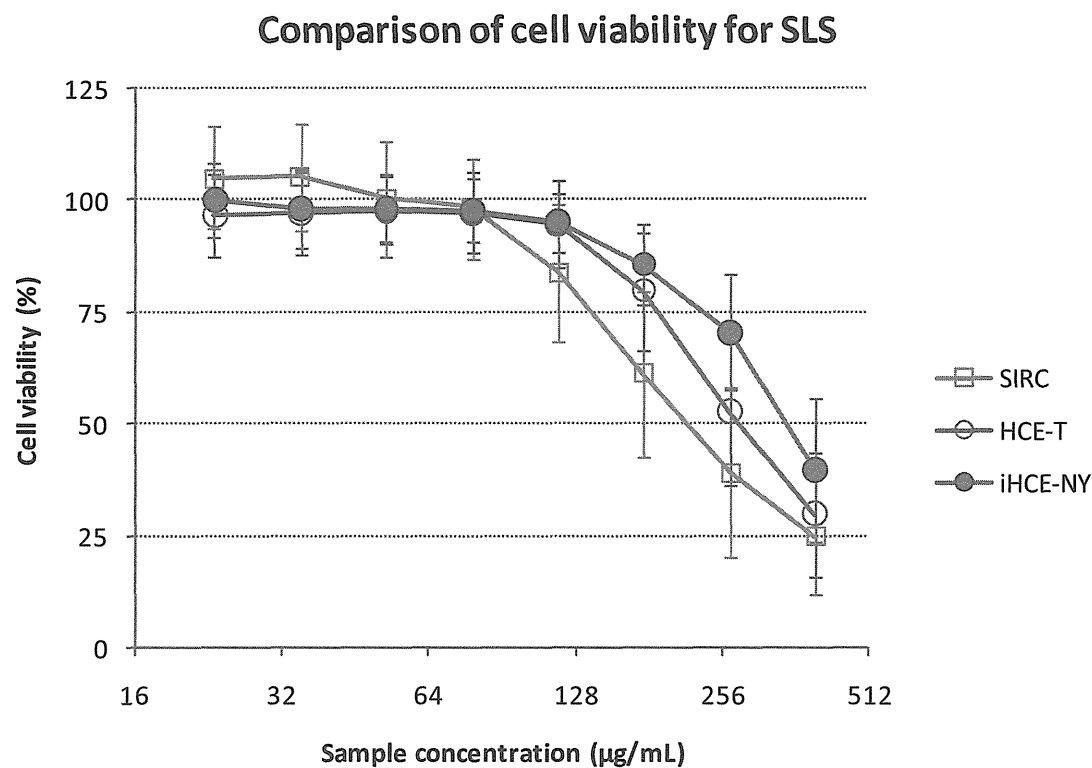


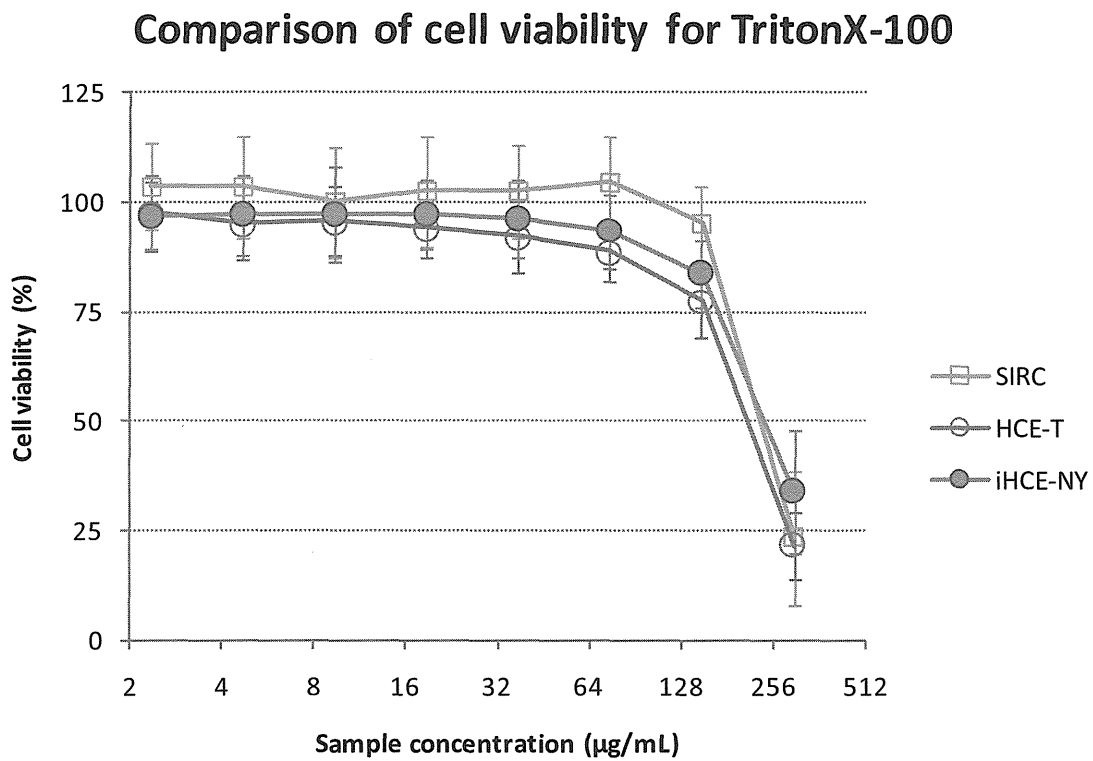
図 2 C. プロトコール①による曝露実験の結果

- SLS



	IC ₅₀
iHCE-NY cell	363 ± 72 ? /ml
HCE-T cell	293 ± 77 ? /ml
SIRC cell	239 ± 93 ? /ml

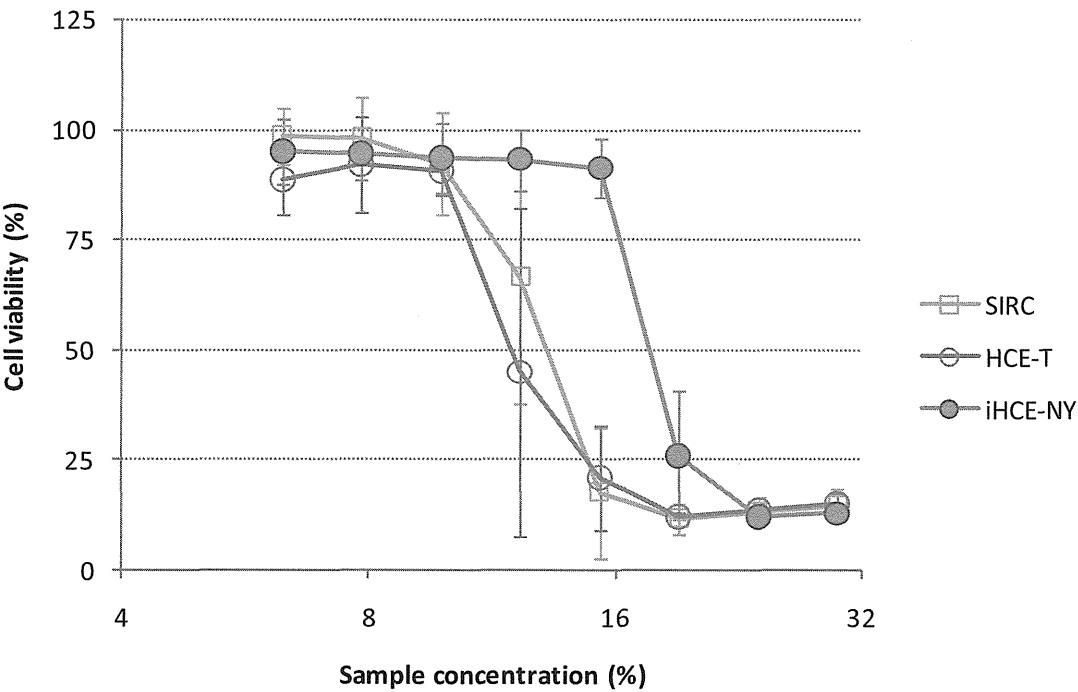
- Triton X-100



	IC ₅₀
iHCE-NY cell	248 ± 34 ? /ml
HCE-T cell	211 ± 19 ? /ml
SIRC cell	242 ± 41 ? /ml

- EtOH

Comparison of cell viability for EtOH



	IC ₅₀
iHCE-NY cell	17.7 ± 0.7 %
HCE-T cell	12.3 ± 1.5 %
SIRC cell	13.1 ± 1.4 %

図 2 D. 播種細胞数の検討

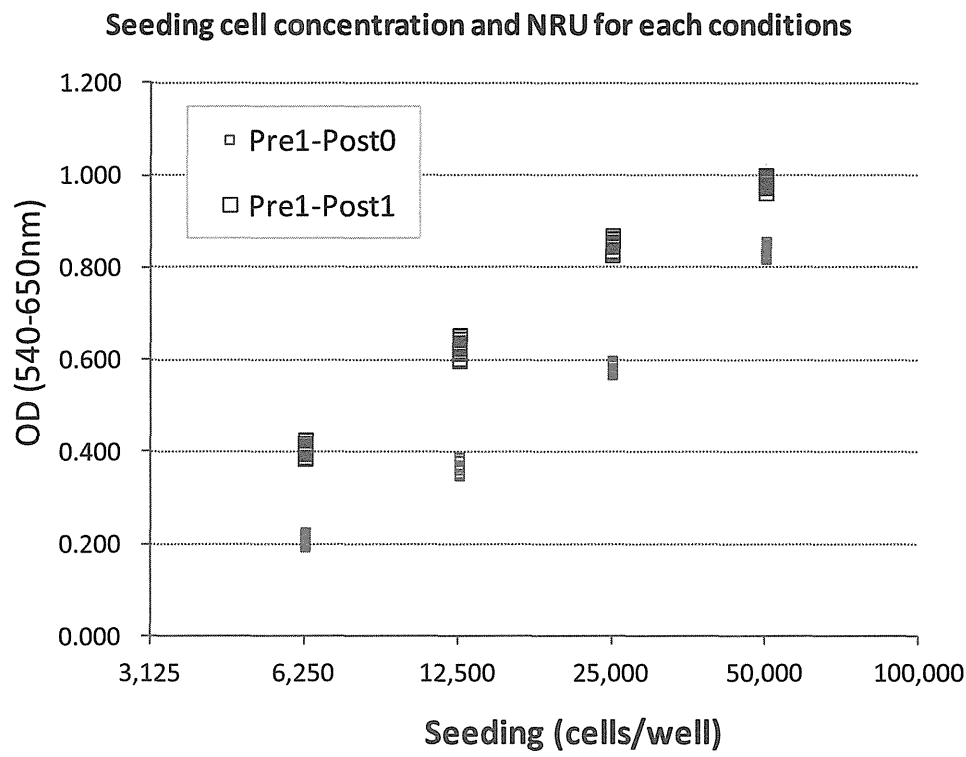


図 2 E. 曝露時間の検討結果

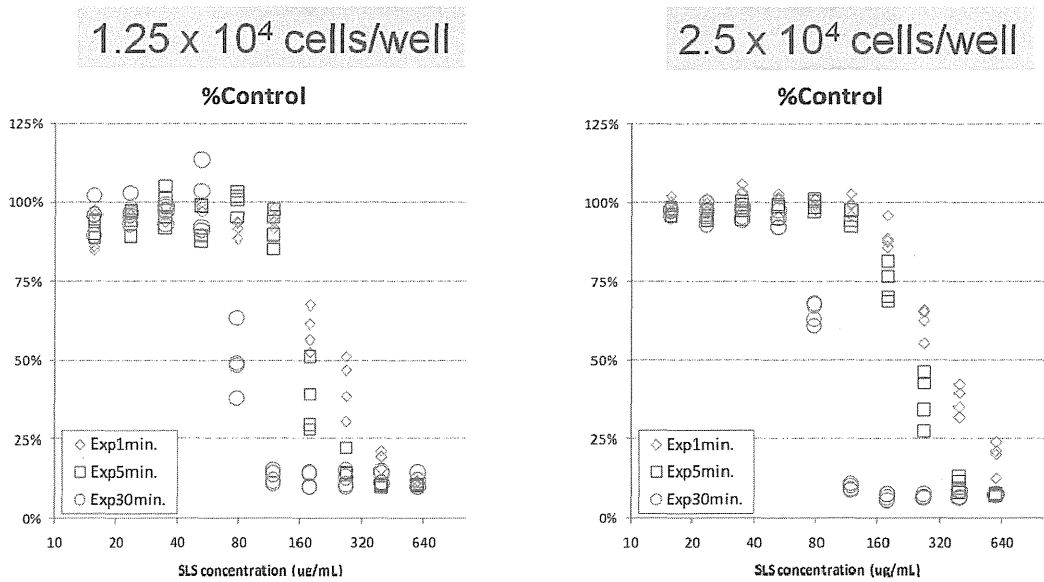


図 2 F. 三次元角膜再構築モデルの作製条件検討（一例）

条件	播種増殖	分化誘導	エアリフト	培地交換（1回/日）		培地交換（2回/日）	
1	3	1	1				
2	3	1	2				
3	3	1	3				
5	3	2	1				
6	3	2	2				

図 2 G. 三次元角膜再構築モデルの曝露条件の検討結果

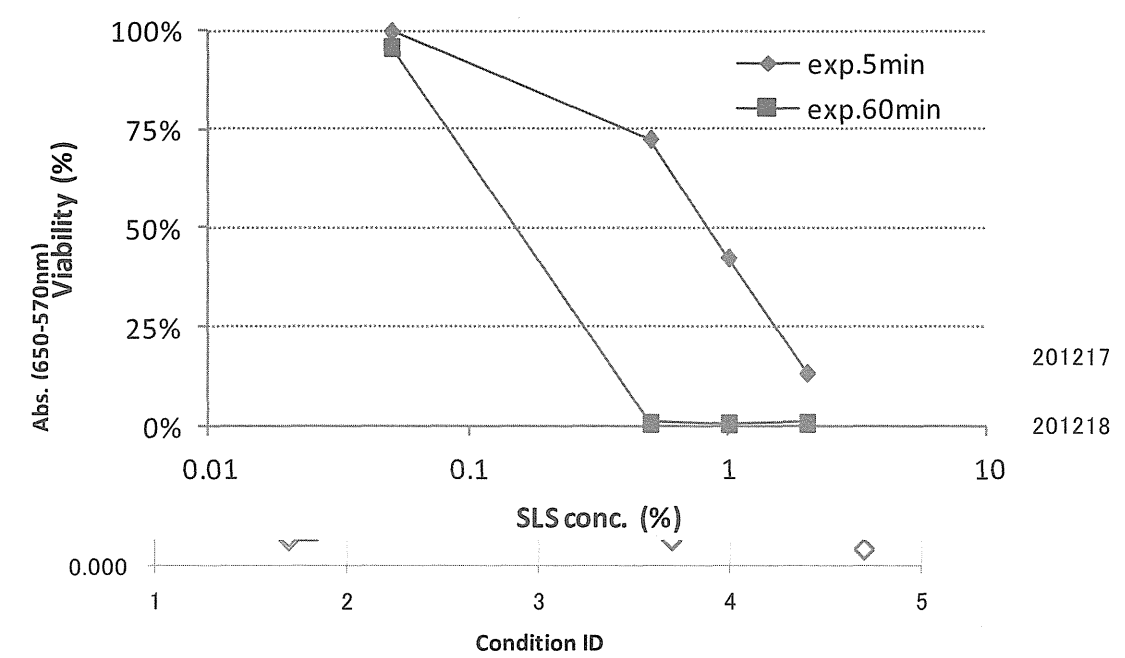
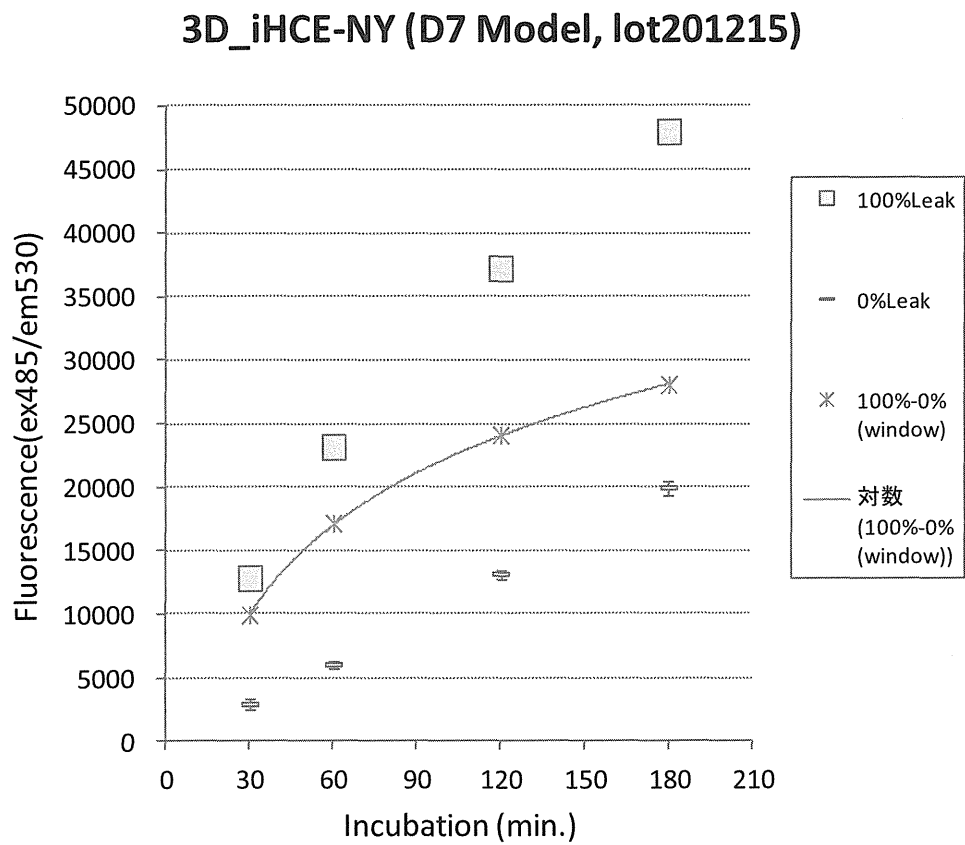
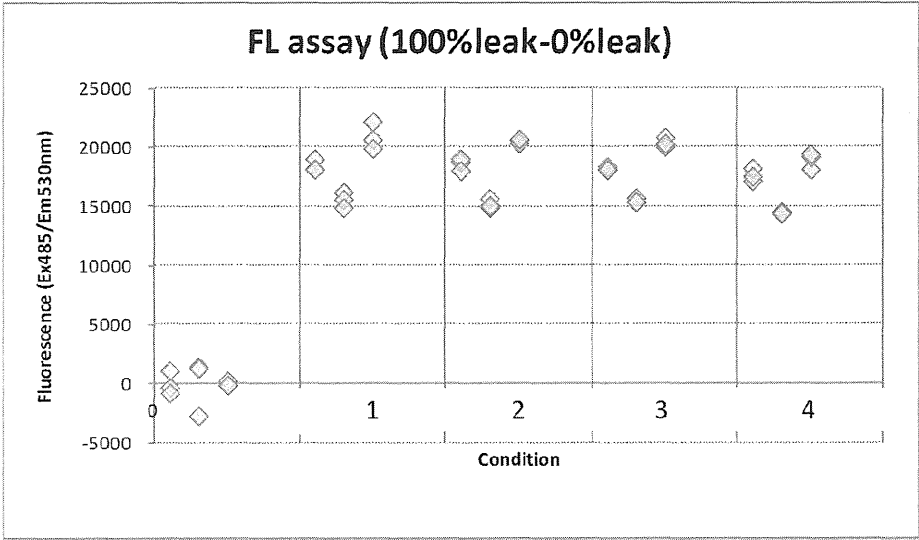


図 2 H. 三次元角膜再構築モデルの FL 法の条件検討



Incubation (min.)	100% Leak	0%Leak			100%-0% (window)	s/n
		mean	stdev	cv%		
30	12790	2892	415	14	9898	4.4
60	23114	6014	329	5	17100	3.8
120	37179	13130	340	3	24049	2.8
180	47928	19920	533	3	28008	2.4



Condition ID: {1} Diff24, {2} Diff 1.5, {3} Diff24 (half conc.), {4} Diff48 (half conc.)

図 2 I. 三次元角膜再構築モデルの電気抵抗測定結果

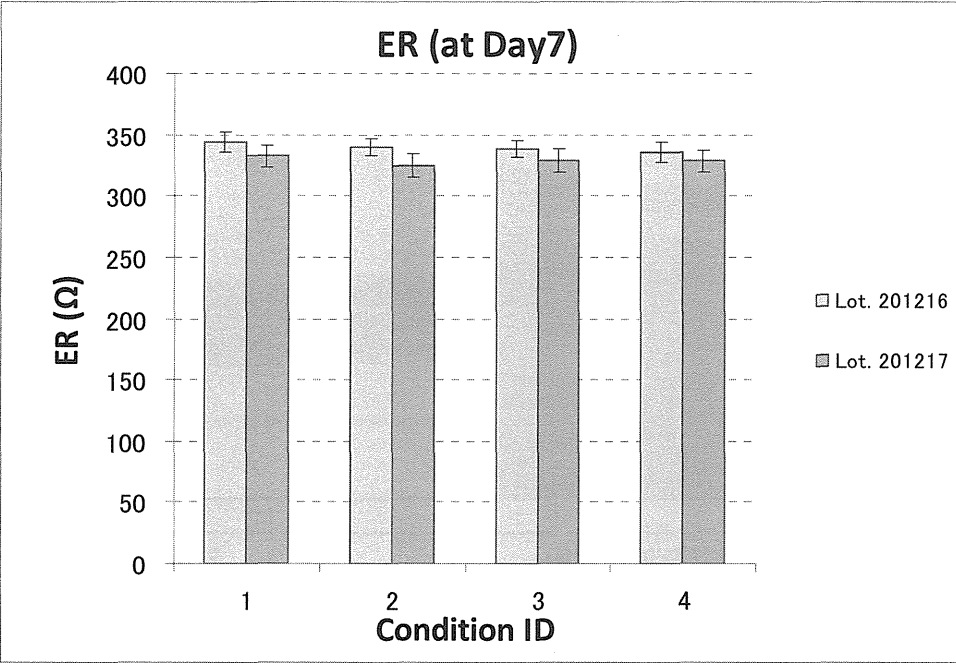


図 2 J. ヒト正常角膜上皮の組織構造と市販の三次元角膜再構築モデルの組織像

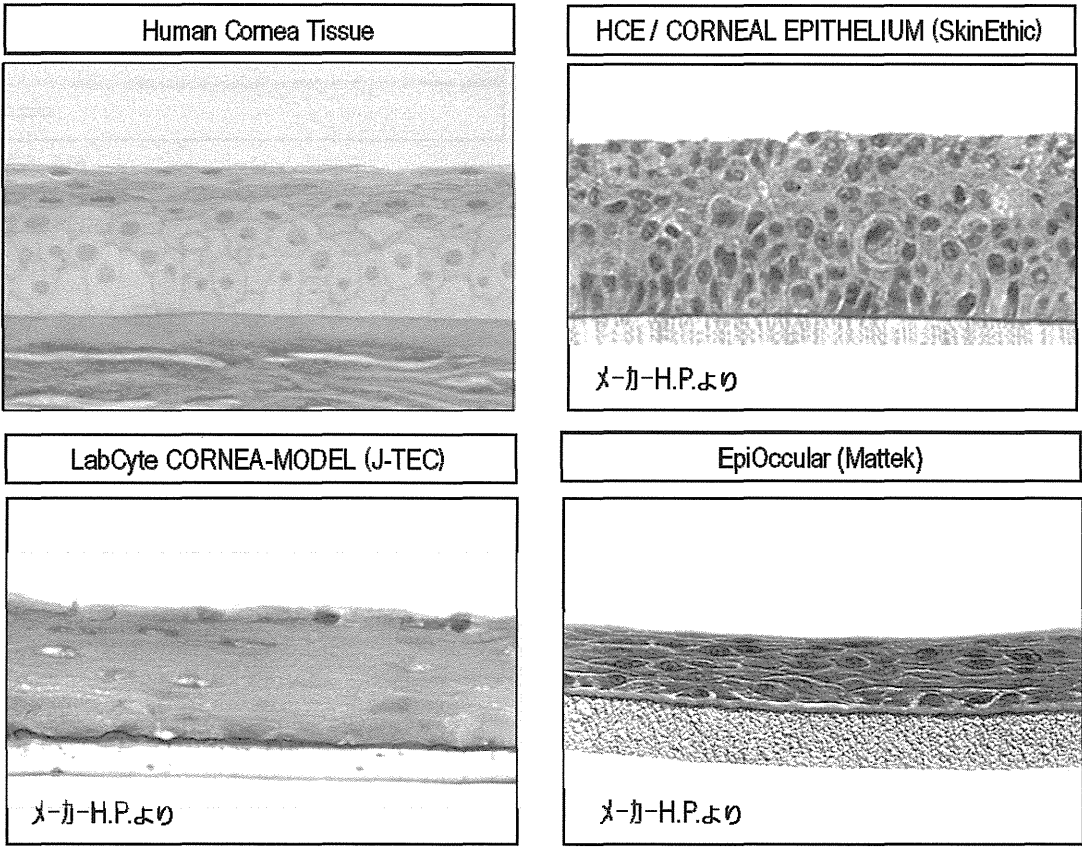


図 2 K. HCE-T、nHCE-T、iHCE-NY を用いた三次元角膜再構築モデルの組織像

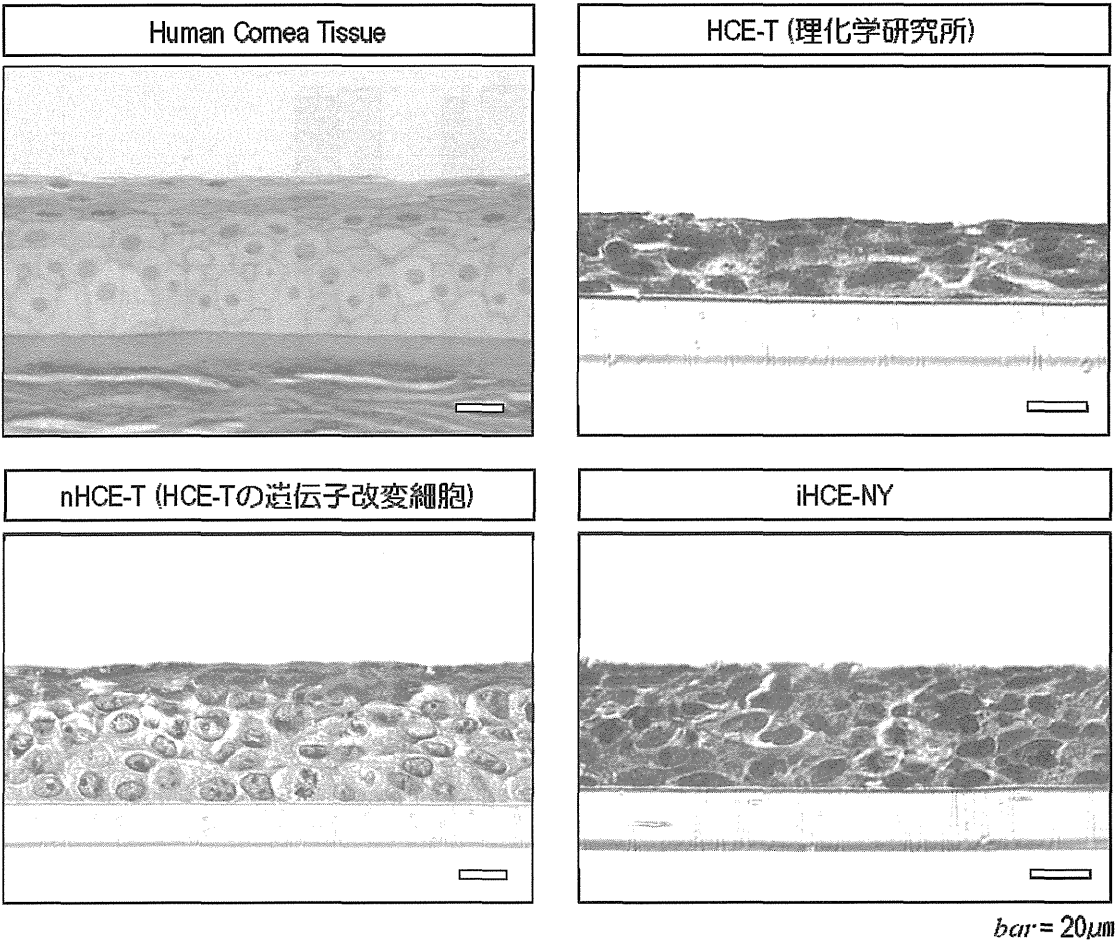


図 2 L. iHCE-NY の免疫染色結果

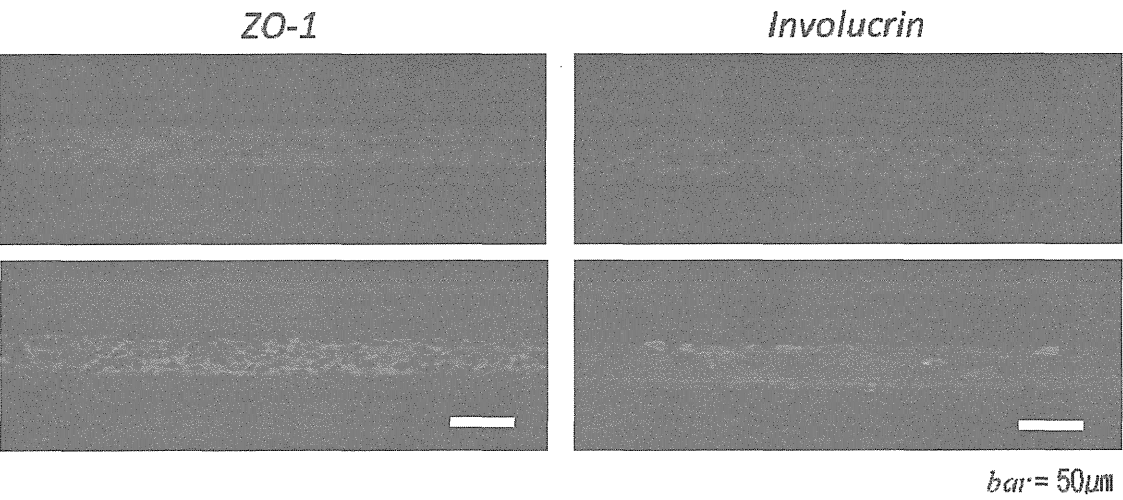


図 2 M. iHCE-NY 三次元角膜再構築モデルを用いた曝露実験

Lot. 201220

