

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592611

研究課題名(和文)培養角膜上皮細胞シートを用いた眼刺激性試験方法の開発

研究課題名(英文)Development of ocular irritancy test using cultured corneal epithelial sheet

研究代表者

伊藤 典彦 (ITO, Norihiko)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：80264654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：点眼薬や化粧品目の眼刺激性試験にはウサギを用いるドレイズ眼刺激性試験が使用されてきた。この試験は動物に苦痛を強いること、そして感度が低いことから廃絶が求められている。我々は3次元的に再構築されたウサギ培養角膜上皮細胞シートを用いた動物実験を代替する試験方法を開発し眼刺激性の検出に成功した。本研究においては、角膜への毒性が疑われていたフルオロキノロン点眼薬が角膜に対して安全であることを明らかにした。さらに、産業動物の廃棄材料を用いた第二世代の試験方法の開発に成功した。この新しい試験方法では簡便性と再現性が向上し同時多検体の試験が可能となった。

研究成果の概要(英文)：The in vivo Draize eye test, which has become the international standard assay for eye irritation is often criticized for both ethical and scientific reasons. The 7th amendment of the Cosmetic directive will lead to the ban of animal testing for cosmetic ingredients. Thus, alternative strategies are necessary which allow the testing of chemicals with wide physicochemical properties under conditions similar to in vivo exposure.

We recently created an experimental model of cell damage repair closer to the live body than conventional models, by using layered sheets of cultured corneal epithelium. The corneal epithelial defect was repaired in the ophthalmic MFLX solution treatment and the ophthalmic LVFX solution treatment to a degree similar to that in the negative control group. Furthermore, we have developed more convenient test that enable us to perform high throughput eye irritancy test.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼刺激性試験 動物実験代替法 培養角膜上皮細胞 再生医学 ドレイズ試験 眼科学 獣医眼科学

## 1. 研究開始当初の背景

従来、直接眼に投与する点眼薬や誤って眼に入る洗顔剤、洗髪剤、化粧品等の香粧品の眼刺激性試験にはウサギの結膜嚢に被検物質を入れるドレイズ眼刺激性試験（世界経済開発機構ガイドライン）が使用されてきた。この従来法を用いた前臨床試験ではその刺激性が検出されず臨床治験開始後に開発が中止された医療用点眼薬、また販売後に「強くしみる」ために当局から指導が入り、製品の自主回収、製造中止に至った香粧品が存在する。すなわち従来法であるドレイズ眼刺激性試験では真の眼刺激性を検出することが困難であった。さらに香粧品安全性試験では動物実験は全面廃止に向かっており、従来法に代替する眼科学の最新技術から創り出される試験方法が待望されていた。

我々の発想に基づき *in vitro* に3次元的に再構築されたウサギ培養角膜上皮細胞シートを応用した第一世代の試験方法が開発され眼刺激性の検出に成功した。本試験方法の特徴は培養角膜上皮シートの中央部に円形の欠損を作成、被検薬を暴露、欠損部の修復率で眼刺激性を判定することである。従来法では安全と判定され販売後に製品回収、製造中止となった原因の香粧品原体は不飽和のオレフィン二重結合を有するポリオキシエチレンオレイルエーテルであった。類似した構造を持つポリオキシエチレンアルキルエーテル誘導体や同じ炭素鎖長であるポリオキシエチレンステアリルエーテルとの刺激性の差異をドレイズ眼刺激性試験は検出することはできなかった。しかし我々が開発した第一世代の試験方法は化学物質間の微細な構造の相違に起因する刺激性を検出することができた。

## 2. 研究の目的

### (1) フルオロキノロン点眼薬の毒性検出。

我々が開発した第一世代の試験方法を用いて角膜への毒性が疑われているフルオロキノロン点眼薬の角膜への毒性を明らかにする。

### (2) 第二世代の試験方法の開発。

世界的な動物実験廃止の流れの中、この方法を日本から世界に発信するため、材料を産業動物である豚角膜へ変更する。物質の網羅的評価を行う際、現在の評価系では1ウエルで1検体を評価する。培養角膜上皮細胞を1ウエル作製するためには多大な時間と労力を要する。さらに各ウエル間の性能のばらつきが大きいいため被検物質の評価の際には多くの

母数を必要とする。多数の培養角膜上皮を作製するとさらにばらつき大きくなるという悪循環が生じる。多数の被検物質を網羅的に評価するのは困難である。そこで、簡便性と再現性を向上させた第二世代の試験方法を開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) フルオロキノロン点眼薬の毒性検出。

角膜上皮細胞は白色ウサギの角膜組織片から取得した。基質には豚羊膜を使用し6ウエルプレート内のトランズウエル内に重層化した培養角膜上皮細胞シートを作製した。上皮の欠損は水酸化ナトリウム水溶液を浸透させたスポンジの接触で作製した。スポンジの除去後、被験薬を1日3回滴下、1分後に洗浄、培養を4日間継続、欠損部の修復率を面積で評価した。被験薬にはモキシフロキサシン(MFLX)点眼薬とレボフロキサシン(LVFX)点眼薬を、陰性対照には培養液を、陽性対照には塩化ベンザルコニウム(以下BAC)0.01%溶液を用いた。

### (2) 第二世代の試験方法の開発。

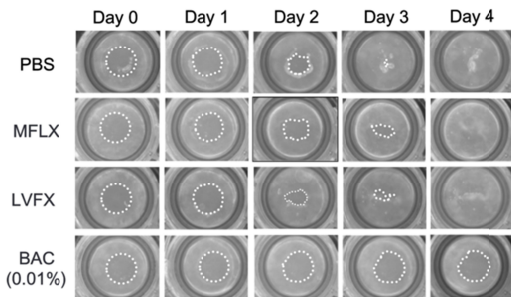
角膜上皮細胞は豚眼球から取得した。基質にはコラーゲンを使用し第一世代の試験方法同様に、6ウエルプレート内の各トランズウエル内に重層化した培養角膜上皮細胞シートを作製した。細胞シートは直径2mmディスクになる様に皮膚生検用トレパンで打ち抜いた。ディスクの細胞シートは別に用意された6ウエルプレート内のコラーゲンゲル上に複数静置した。被検物質の暴露は各ウエルに従来と同様、点眼の要領でおこなった。ディスク片縁から伸展する細胞を観察し1ウエル内に静置したディスクからの平均伸展面積を比較した。試験方法の感度を検出するための被検物質にはBACを0.01%から0.00001%までPBSで10倍階段希釈された溶液を使用した。陰性対照にはPBSを使用した。さらに、この試験方法を用いてBACを0.01%含有する点眼薬Aと含有しない点眼薬Bの毒性の検出をおこなった。

## 4. 研究成果

### (1) フルオロキノロン点眼薬の毒性検出。

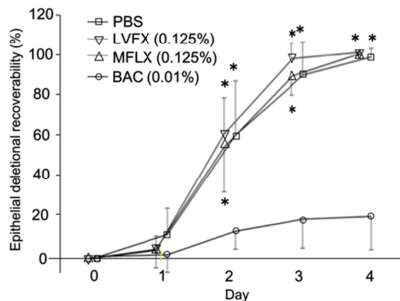
陰性対照のPBSでは4日目に上皮細胞欠損部の完全な修復がみられた。陽性対照のBACでは修復が抑制された(図1)。

図1 フルオロキノロン点眼薬は4日間で欠損部を充填する



一方、MFLX 点眼薬と LVFX 点眼薬では欠損部は修復され、陰性対照の PBS との間に有意な差はみられなかった (図 2)。

図2 フルオロキノロン点眼薬は欠損部の充填を阻害しない

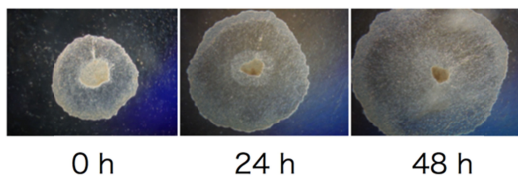


生体に近い重層化された培養角膜上皮シートを用いた今回の実験系で、MFLX 点眼薬と LVFX 点眼薬は陰性対照と同様に欠損部の修復を抑制しなかった。MFLX 点眼薬と LVFX 点眼薬はいずれも角膜への毒性を有する点眼薬ではないと考えられた。

(2) 第二世代の試験方法の開発。

培養角膜上皮細胞シートから打ち抜かれコラーゲンゲル上に静置されたディスクの片縁から伸展する細胞がみられた (図 3)。この細胞の伸展は 0.01% BAC 溶液では抑制された。

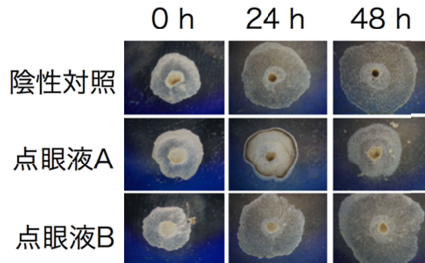
図3 ディスク片縁から角膜上皮細胞の伸展がみられる



BAC を含有する点眼薬 A と含有しない点眼

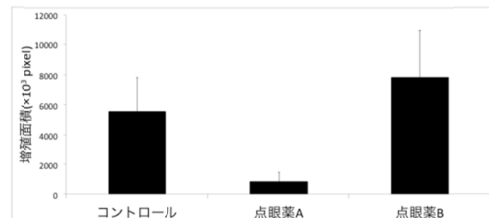
薬 B を用いた所、点眼薬 A では細胞の伸展はみられなかった (図 4)。

図4 BACを含有する点眼薬Aでは細胞の伸展がみられない



伸展面積を比較した所、伸展の抑制は有意であり点眼薬 A は角膜への毒性を有する可能性があることが明らかとなった (図 5)。

図5 BACを含有する点眼薬Aは有意に細胞の伸展を阻害する



培養角膜上皮シートから作製したディスク片縁からの細胞伸展を観察する第二世代の試験方法で被検物質の毒性を検出することができた。感度はシート中央部に欠損部を作製しその修復を観察する第一世代の試験方法と同等であった。第二世代の試験方法では1ウェルに複数のディスクを配置することで同一条件での母数の多い評価が可能であった。

以上の結果が示すように、当初の目的であった培養角膜上皮細胞シートを用いた眼刺激性試験の確立に成功し特許を出願した。この度確立された試験方法は産業動物の廃棄部位を使用するため完全な動物実験代替法である。1枚の培養角膜上皮シートから複数の試験ディスクを作成することでシート作成の労力を軽減すると同時に同時多検体の試験が可能となりシート間の感受性のばらつきに影響を受けない試験が可能となった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Miyake, T., N. Ito, et al. (2012).  
"Comparison of moxifloxacin and  
levofloxacin in an epithelial disorder  
model using cultured rabbit corneal  
epithelial cell sheets." Graefes Arch Clin  
Exp Ophthalmol 250(7): 1035-1041. 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

関禎子(計7名、4番目)「原子間力顕微鏡と再生医療材料である培養細胞を用いた薬剤評価方法の開発。」第13回日本再生医療学会総会、2014年3月4日～6日、京都国際会議場(京都市)

関禎子(計7名、4番目)「原子間力顕微鏡を用いた角膜上皮・内皮細胞の観察、及び薬剤の評価方法の開発。」角膜カンファランス2014、2014年1月30日～2月1日、沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)

関禎子(計8人、8番目)「原子間力顕微鏡を用いた3次元皮膚モデルの評価方法の検討。」第26回日本動物実験代替法学会、2013年12月19日～21日、京都テルサ(京都市)

伊藤典彦「再生から創成。」鶴田フォーラム、2013年12月14日、東工大蔵前会館(東京都)

関禎子(計6名、3番目)「AFMによる細胞培養基質の解析。」第35回日本バイオマテリアル学会大会、2013年11月25日～26日、タワーホール船橋(東京都)

伊藤典彦「再生医療、動物から人へ、人から動物へ。」第34回動物臨床医学会総会、2013年11月13日～15日、大阪国際会議場(大阪市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：生体に対する負荷を評価する方法

発明者：伊藤典彦

権利者：伊藤典彦

種類：特許

番号：特願 2011-197442

出願年月日：平成 23 年 9 月 9 日

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 典彦 (ITO, Norihiko)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：80264654

### (2) 研究分担者

中村 隆宏 (NAKAMURA, Takahiro)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：30411078