

<お願い>  
(独)農業生物資源研究所の省略形としては  
「生物研」を使用願います。

プレスリリース

平成25年8月9日  
独立行政法人農業生物資源研究所  
国立医薬品食品衛生研究所  
関東化学株式会社

## 角膜構造を再現した培養モデルでの新たな安全性試験法を開発 —動物実験をせず、安全性を判別できる代替実験法として期待—

### ポイント

- ・新素材「コラーゲンビトリゲル<sup>®</sup>」を使って、ヒトの角膜上皮細胞の培養モデルを構築しました。
- ・この培養モデルを用いて、眼に対する化学物質の高感度な安全性試験法を開発しました。
- ・本試験法は、動物を用いず安全性を判断でき、かつ刺激性のより少ない、安全な化粧品などの開発を可能とする実験法として活用されることが期待されます。

### 概要

1. 独立行政法人農業生物資源研究所（生物研）は、国立医薬品食品衛生研究所、関東化学（株）と共同で、動物を使用しない、眼に対する化学物質の安全性試験法の開発に成功しました。
2. 研究グループではこれまでに、牛由来のコラーゲンを用いて「コラーゲンビトリゲル<sup>®1)</sup>」という新素材を開発しています。本研究では、本素材を「足場」に使ってヒトの角膜上皮細胞を培養し、およそ6層に重なるまで増殖させて「ヒト角膜上皮」の構造を再現した培養モデル<sup>2)</sup>を作製しました。さらに、この培養モデルを用いて眼に対する安全性を評価するための、新しい「眼刺激性試験法<sup>3)</sup>」を開発しました。「ビトリゲル<sup>®</sup>」は農業生物資源研究所の登録商標です。
3. この試験法では、化学物質を投与した際の電気抵抗値の変化を指標として、化学物質の刺激性の強さを測定します。ウサギの眼の角膜の白濁、腫れや細胞死を指標としていた従来法と比べ、迅速、高感度で再現性の高い試験結果が得られました。
4. この試験法は、動物を用いず安全性を判断でき、かつ刺激性のより少ない、安全な化粧品などの開発を可能とする実験法として活用されることが期待されます。
5. この成果は、7月20日に英国科学誌 *Toxicological Sciences* のオンライン版に掲載されました。

予算：農林水産省アグリ・ヘルス実用化研究促進プロジェクト「牛等の動物由来の原料を用いた医療用新素材の開発」

特許：特願 2010-188887、特願 2010-254255

## 問い合わせ先など

|          |   |       |
|----------|---|-------|
| 研究代表者：   | (独)農業生物資源研究所 理事長                              | 廣近 洋彦 |
| 研究推進責任者： | (独)農業生物資源研究所 動物科学研究領域長                        | 栗田 崇  |
| 研究責任者：   | (独)農業生物資源研究所 動物科学研究領域<br>動物生体防御研究ユニット 上級研究員   | 竹澤 俊明 |
|          | 電話：029-838-6294 E-mail:t.takezawa@affrc.go.jp |       |
| 広報担当者：   | (独)農業生物資源研究所 広報室長                             | 井濃内 順 |
|          | 電話：029-838-8469                               |       |

本資料は厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、文部科学記者会、科学記者会、筑波研究学園都市記者会、農政クラブ、農林記者会、農業技術クラブに配付しています。

## 開発の社会的背景

化粧品や医薬品、農薬を開発する際には、これらの成分として含まれる化学物質について、ヒトに対する安全性（＝毒性）を確認する必要があります。現在、このような「安全性試験」の多くは動物を用いて行われていますが、動物実験の結果が必ずしもヒトでの安全性を反映しないことが課題となっています。また動物愛護上の問題から、欧州では既に、化粧品成分の安全性評価を目的とした動物実験の実施が全面禁止されています（ただし全身毒性試験は除く）。このような背景から、世界的に動物を使用しないヒト細胞を利用した動物実験代替法の開発が進められています。しかしながら、動物実験を完全に代替できるような優れた代替法は確立されていません。

## 研究の経緯

私たちはこれまでに、従来型のコラーゲンゲルと比べて約 100 倍高密度のコラーゲン線維で構成される「コラーゲンビトリゲル<sup>®</sup>」を開発しています（図 1）。コラーゲンビトリゲル<sup>®</sup>の薄膜は強度や透明性に優れ、片面に 1 種類の細胞を培養できるのみならず両面に異なる種類の細胞を培養することもでき、さらにタンパク質や化学物質を透過させることもできます。また、コラーゲンビトリゲル<sup>®</sup>の薄膜上で培養した細胞は、ビトリゲル<sup>®</sup>薄膜を介して下側の培養液から栄養を得ることができるため、細胞表面を空気にさらしながらの培養が可能です。

私たちはコラーゲンビトリゲル<sup>®</sup>の用途の一つとして、ヒトの様々な組織・器官を再現した培養モデルを構築するための「足場」として利用し、構築した各種の培養モデルを様々な動物実験の代替品として用いることを目指しています。

ヒトの角膜は、上皮、実質および内皮の 3 つの組織から構成されており、そのうち一番外側の上皮組織は透明で薄いコラーゲン膜の上に角膜上皮細胞が 6 層に重なった組織で、この角膜上皮細胞はコラーゲン膜の下側より栄養を取り入れています。この角膜上皮は眼に入った異物と最初に接触する組織ですので、その培養モデルの開発は重要です。コラーゲンビトリゲル<sup>®</sup>の薄膜をプラスチックの枠に張ったチャンバーは、ビトリゲル<sup>®</sup>薄膜上に細胞を単層培養した後に、ビトリゲル<sup>®</sup>薄膜の下側からのみ栄養を与えて細胞表面を空気にさらすことで、細胞が重なって増える環境を提供できるため、角膜上皮の培養モデルの構築に有用です。本研究では、「コラーゲンビトリゲル<sup>®</sup>膜チャンバー」内に構築したヒトの角膜上皮細胞の培養モデルを活用して、ウサギの眼を用いた「眼刺激性試験」を代替する試験法の開発に取り組みました。

## 研究の内容・意義

1. コラーゲンビトリゲル<sup>®</sup>の薄膜をプラスチックの枠に張った「コラーゲンビトリゲル<sup>®</sup>膜チャンバー」という細胞培養容器を開発しました（図 2）。この培養容器は、膜の片面または両面に細胞を培養することにより、様々な培養モデル構築の足場として利用できます。
2. コラーゲンビトリゲル<sup>®</sup>膜チャンバー上でヒトの角膜上皮由来の細胞を培養し、およそ 6 層に重なるまで増殖させてヒトの角膜上皮を再現した培養モデル（図 3）を作製し、この培養モデルを用いた新しい「眼刺激性試験法」を開発しました。
3. 新たに開発した「眼刺激性試験法」では、化学物質の刺激性の強さの指標として、化学物質を投与した際の電気抵抗値の変化を用います。新たな試験法では、ウサギの眼の角膜の白濁、浮腫や細胞死を指標としていた従来法と比べ、迅速、高感度で再現性の高い試験結果が得られました。

## 今後の予定・期待

今回開発した新たな「眼刺激性試験法」を用いて 30 種類の化学物質の刺激性を評価したところ、従来法では無刺激性と判定されていた物質の中にも、非常に弱い刺激性を示す物質があることがわかりました。本試験法の利用により、刺激のより少ない、安全な化粧品やシャンプーなどが開発できると期待されます。今後は開発した試験法について、正確性と再現性を証明するための試験を行い、その結果について専門家による第三者機関の審査を受けるというプロセスを経て、国際的な公定法「**OECD テストガイドライン<sup>4)</sup>**」への登録を目指すことで、世界中のメーカーが製品の安全性試験として利用できるシステムを構築します。

現在、動物実験代替法は、主に化粧品の安全性試験で使用されていますが、将来的には医薬品や食品など他の分野にも普及すると予想され、その必要性はますます増加すると考えられます。今後も、コラーゲンビトリゲル<sup>®</sup>を利用した消化器官や血管などの培養モデルと動物実験代替法の開発を進める予定です。

## 発表論文

Hiroyuki Yamaguchi, Hajime Kojima, Toshiaki Takezawa, **Vitrigel-Eye Irritancy Test Method Using HCE-T Cells**. Toxicological Sciences DOI: 10.1093/toxsci/kft159

## 用語の解説

### 1. コラーゲンビトリゲル<sup>®</sup>

生体内結合組織に匹敵する高密度コラーゲン線維の新素材であるコラーゲンビトリゲル<sup>®</sup>は、従来の低密度コラーゲン線維からなるコラーゲンを低温で十分に乾燥することでガラス状の硬く透明な乾燥体とした後、再水和することで作製できます。コラーゲンビトリゲル<sup>®</sup>の薄膜は、透明性のみならず強度や高分子タンパク質の透過性にも優れています。そのため、細胞の培養、あるいは薬剤の徐放などに活用できます。このような背景から、再生医療、創薬あるいは動物実験代替法の分野での実用化が期待されています。

### 2. 培養モデル

培養容器内でヒトなどの細胞を培養し、高等動物の組織の構造および機能を再現させたモデル。例えば、ヒトの角膜上皮を再現した培養モデルでは、ヒトの角膜と同じ約 6 層に多層化した細胞層を、細胞表面を空気にさらす特殊な培養方法によって再現しています。

### 3. 眼刺激性試験法

化学物質が眼に付着した際に眼におよぼす傷害の有無およびその重篤さを評価するための試験法。従来はウサギを使った動物実験で行われてきましたが、世界的な動物実験の削減、廃止の流れをうけ、動物の代わりに、食肉用のウシなどから摘出した角膜、培養細胞、培養モデルなどを使った試験法（動物実験代替法）の開発が進められています。しかしながら、動物実験を完全に代替できるような優れた代替法は確立されていません。

### 4. OECD テストガイドライン

化学物質の安全性試験を国際的に共通の方法で審査するために、経済協力開発機構（OECD）が定めた統一的な試験法。日本の化学物質審査規制法や欧州の化学

物質の登録、評価、認可及び制限（REACH）など各国の化学物質を管理する法令は、原則としてOECDテストガイドラインの試験法に基づいて規定されています。

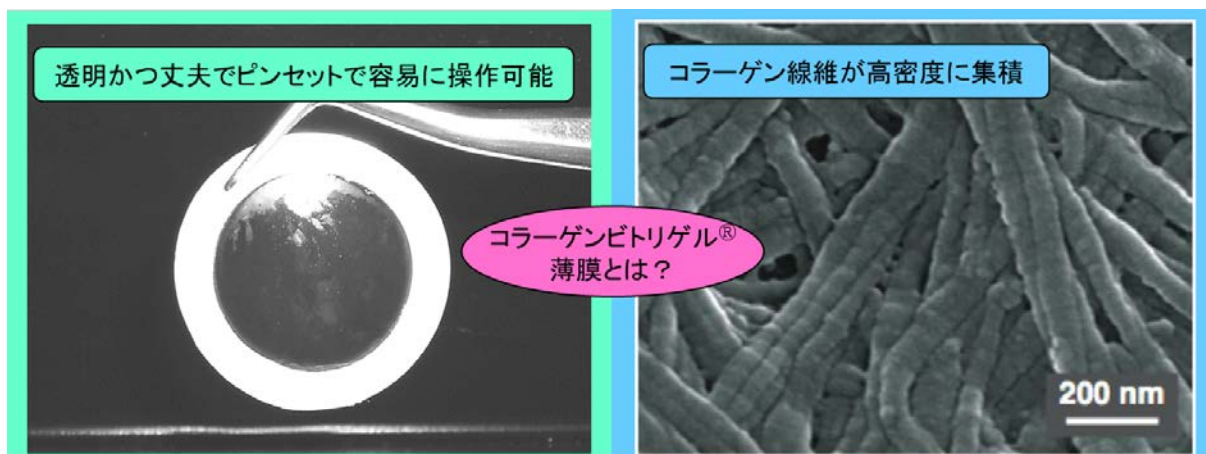


図1 コラーゲンビトリゲル®薄膜（左、白色リングの内側の透明な部分）とその電子顕微鏡写真（右）



図2 コラーゲンビトリゲル®膜チャンバー  
（筒状の枠の底面にコラーゲンビトリゲル®膜がはられている）

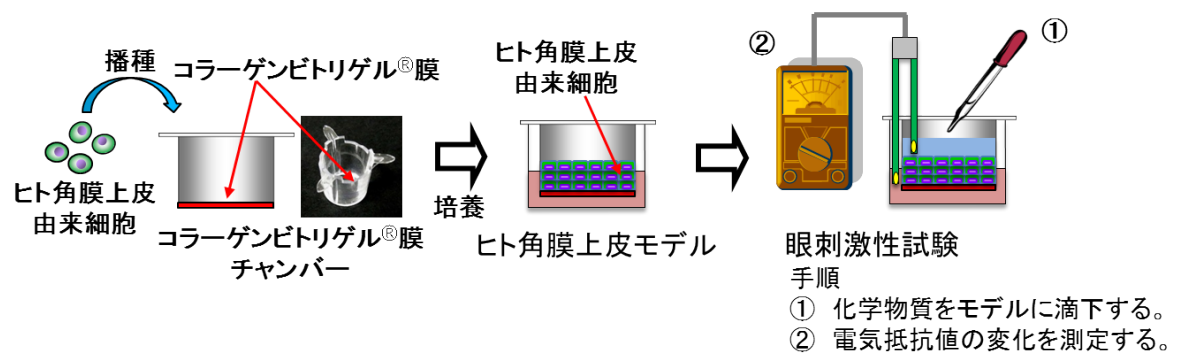


図3 コラーゲンビトリゲル®膜チャンバーを用いた眼刺激性試験法