

# 非臨床 News 第6号

## 再生医療関連特集号

はじめに	安全性研究部統括部長 和泉 宏幸	2
	薬理研究部長 片山 誠一	2

### 再生医療関連研究紹介

◆ 再生医療研究のためのマウスの脊髄損傷モデル	3
◆ ノードマウスを用いた肝炎モデルの再生医療研究への有用性	4
◆ <i>In vivo</i> 造腫瘍性試験	5
◆ 軟寒天コロニー形成試験 - <i>In vitro</i> 造腫瘍性試験 -	6
◆ 免疫組織化学染色によるヒト間葉系幹細胞の検出	7

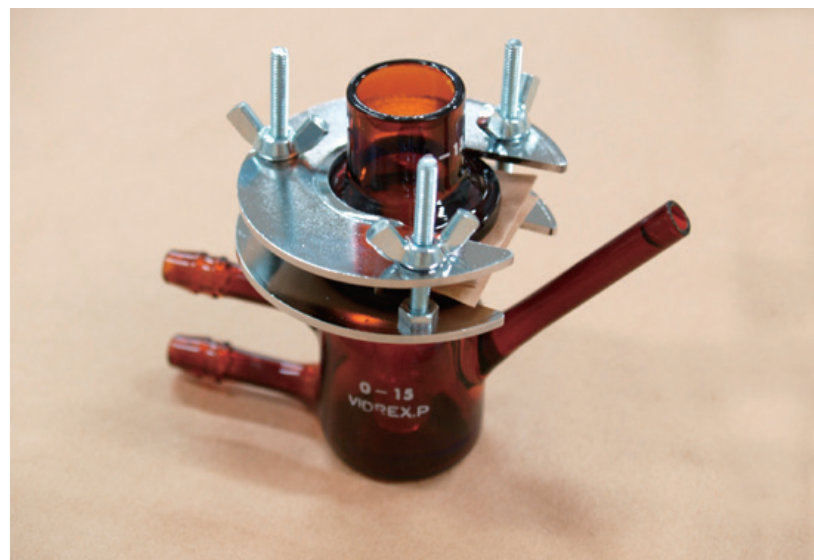
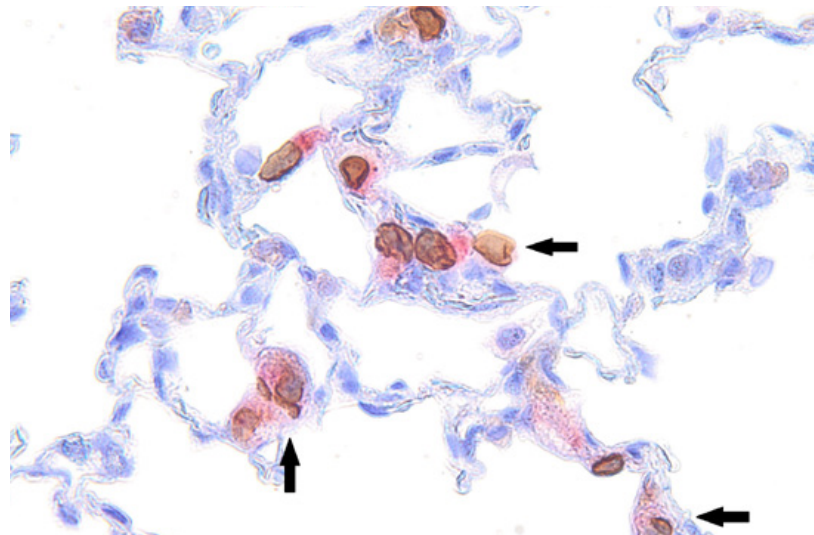
### 最新研究紹介

◆ ミニブタを用いた TEWL 及び紅斑値による皮膚状態の評価	8
◆ ミニブタの皮膚の病理組織学的検討	9
◆ <i>In vitro</i> 皮膚透過性試験	10

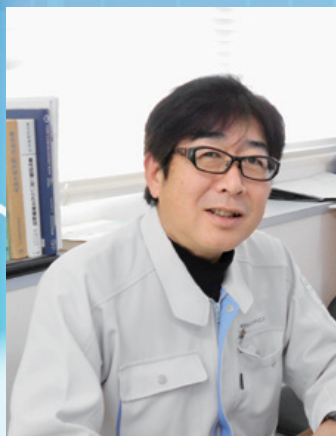
学会発表実績 / 投稿実績 (2014年8月~2015年8月)	11
---------------------------------	----

### トピックス

1. ナレッジサービス	11
2. 再生医療のためのサル心筋梗塞モデル	12
3. 再生医療等製品 GLP 適合性追加調査	12



## はじめに



安全性研究部統括部長

和泉 宏幸

近年、再生医療分野の発展により再生医療等製品が多数開発され、その品質、有効性及び安全性の評価が必要とされています。特に、安全性試験については2014年に再生医療等製品GLPが施行され、その確立は急務です。再生医療等製品には、ES/iPS細胞加工製品、体細胞/体性幹細胞加工製品、遺伝子導入ウイルス製品等があり、これらの安全性評価には、従来からの単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験のほか、生着する微小環境において腫瘍を形成することが無いかを確認する*in vivo*での造腫瘍性試験、悪性形質転換細胞を検出するための*in vitro*での造腫瘍性試験等が必要とされています。

当社では、数年前から熊本研究所薬理研究部にて再生医療等製品の有効性評価を実施しており、昨年からは新たに、同研究所の安全性研究部にて安全性評価試験の確立に取り組んできました。そしてこのほど、安全性評価試験をGLP下で実施できる施設、設備及び試験法を構築し、再生医療等製品の有効性評価から安全性評価まで一貫して提供できるサービス体制を整えました。

再生医療等製品の評価については、今後も変遷していくことが予測されます。当社では、お客様のご要望に応えられるよう、最新の情報を速やかに収集し、最適な評価法を提案できるよう日々努力してまいります。今後とも何卒よろしくご厚意申し上げます。

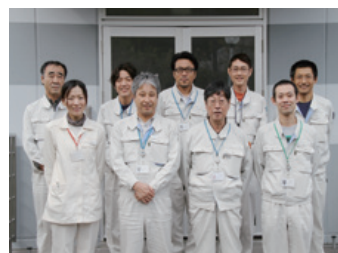


薬理研究部長

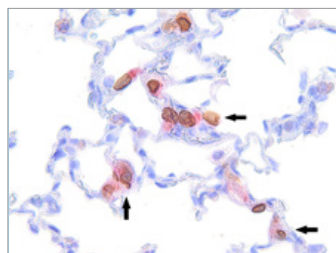
片山 誠一

薬理研究部では、近年、再生医療等製品の有効性評価に対するお問い合わせが増加しており、これまで薬効薬理試験で用いてきた多様な病態モデルを応用した受託サービスを提供しております。病態モデルについては新旧を問わず、中枢、疼痛、抗腫瘍、炎症、泌尿器系、呼吸器系、糖脂質代謝、アレルギー、消化器系、循環器系、血液系、感染症及び*in vitro*薬効試験等、幅広い分野の試験を受託しており、特に炎症・線維化・自己免疫疾患に関係した有効性評価の需要が高まってきております。当社は、手術を要する薬効試験を得意としており、コンベンショナル動物、遺伝子改変動物及びミュータント動物を用いた試験の経験が豊富です。これまで、骨髄・脂肪由来幹細胞又はiPS細胞由来心筋細胞等を用い、肝炎、脳梗塞、心筋梗塞、下肢虚血、関節炎又は泌尿器系等に関連した受託・検討実績があり、お客様とご相談の上、取り組んでいる他の試験種もあります。更に当社では、これまで抗腫瘍試験を中心とした免疫不全動物の取り扱い実績が豊富であることから、新たに「免疫不全動物を用いた再生医療等製品の有効性評価系の検討（心筋梗塞、肝炎、脳梗塞、等）」も進めております。従来の方法では治療が困難であった疾患に対して、再生医療等製品の開発という新たな取り組みをされるお客様の多様なニーズに今後ともお応えしていきたいと考えております。

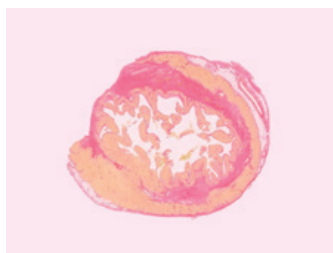
## 表紙写真紹介



熊本研究所  
再生医療研究に携わる薬理研究部メンバー



抗ヒトラミン抗体及び抗ヒトミトコンドリア抗体による二重染色（ラット肺組織、矢印：陽性細胞）



シリウスレッド染色を施したサル心筋梗塞モデルの心臓。赤色部分が線維化領域



*In vitro* 皮膚透過性試験で使用する静的拡散セル（Franzセル）

薬理

# 再生医療研究のためのマウスの脊髄損傷モデル



熊本研究所  
後列左から高橋研究員、守住グループリーダー、佐々木、榊原、樋口研究員、  
前列左から樋川研究員、今泉グループリーダー、廣中、林田研究員

脊髄損傷は、主に外部から脊柱に強い圧力がかかることによって脊椎が破損し、脊髄が損傷を受けることで発生します。現在、日本には10万人以上の患者があり、毎年5000人以上増加しています。交通事故、高所からの落下に加え、近年ではスノーボードなどのスポーツによる受傷も増加しています。

脊髄は一度損傷すると修復が難しく、治療方法も確立されておられません。しかし近年では神経幹細胞やiPS細胞を用いた細胞移植療法の有用性が検討されており、再生医療の適用可能分野として注目されています。

当社では再生医療分野での利用を念頭に置いて、マウスを用いた脊髄損傷モデルを作製し、運動機能を評価しました。また、損傷部位の生化学的・病理学的評価を行いました。

動物はモデル作製時に9週齢のC57BL/6J系統雌性マウスを用いました。運動機能の評価にはBBBスケール (Basso, Beattie, and Bresnahan Locomotor Rating Scale) を用いました<sup>\*1</sup>。このスケールは、正常状態を21点、後肢の動きが全くない状態を0点とし、1点刻みでマウスの後肢を中心とした運動機能を評価するものです。モデル作製前日の体重及びBBBスケールに基づいて、マウスをモデル群とsham群に群分けしました。モデル群の動物には、Boullandらの方法に準じて、2%イソフルラン麻酔下で第12胸椎～第1腰椎をクレンメで圧挫する方法を用いました<sup>\*2</sup>。Sham群の動物にはクレンメによる脊髄の圧挫処理を施しませんでした。

その結果、Sham群動物と比較して脊髄損傷群の動物ではモデル作製後9日目までに一過性の体重減少が見られましたが、その後の体重増加の程度はsham群と同様でした (Fig. 1)。BBBスケールではモデル作

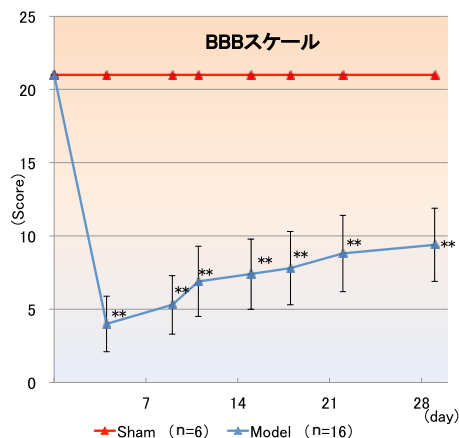


Fig. 2 Sham 群と脊髄損傷群の BBB スケール変化  
データは平均値±標準誤差で表示、\*\* : P < 0.01 (Student's t-test)

製前に21点であった評点が、モデル作製後4日目には3点にまで低下しました。その後は緩やかな回復がみられました (Fig. 2)。HE染色による病理学的検索では脊髄の損傷部位の幅が減少し、出血及び細胞浸潤、神経細胞の減少が認められました。クレーバーバレーラ (KB)染色では損傷部位の神経線維束消失、灰白質の神経細胞減少が認められました (Fig. 3)。また、GFAP及びIba-1の免疫強度増加、リン酸化ニューロフィラメントHの血中濃度上昇も認められました。

以上のように、本モデルでは脊髄損傷による運動障害とそれに伴う病理学的変化が観察されたことから、再生医療分野での利用に適したモデルと考えられました。

参考文献

- \* 1: Experimental Neurology 139: 244-256, 1996. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection/ D. Michele Basso et al.
- \* 2: PLoS ONE 8: e71701, 2013. A Neonatal Mouse Spinal Cord Injury Model for Assessing Post-Injury Adaptive Plasticity and Human Stem Cell Integration/ Jean-Luc Boulland et al.

(原稿執筆/高橋 郁夫 E-mail: Takahashi.lkuo@ma.medience.co.jp)

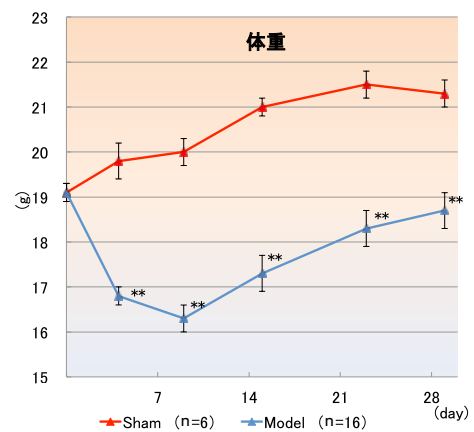


Fig. 1 Sham 群と脊髄損傷群の体重変化  
データは平均値±標準誤差で表示、\*\* : P < 0.01 (Student's t-test)

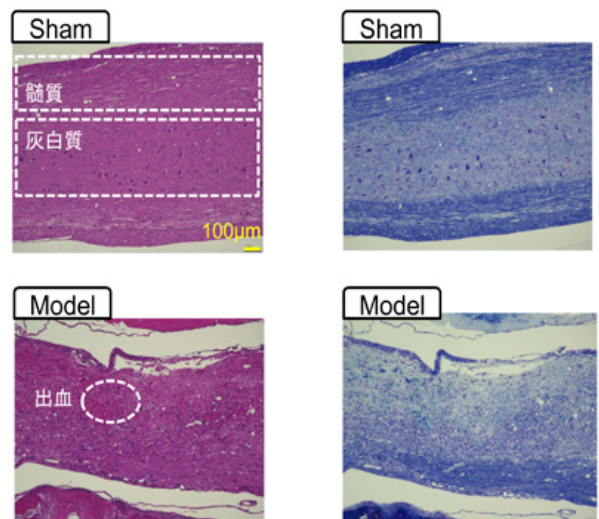


Fig. 3 BBB スケール 1 点の時点 (Day4) における脊髄の HE 染色 (左) 及び KB 染色 (右) 像

写真提供協力: エーザイ株式会社

薬理

ヌードマウスを用いた肝炎モデルの再生医療研究への有用性

肝硬変は、ウイルス感染、アルコール、自己免疫性などさまざまな原因による肝障害が慢性化した難治性疾患であり、不可逆性の線維化を伴い、約80%が肝臓がんに行進することが知られています。国内には約25～40万人の患者がいると推定されています。根治治療はなく、薬剤による対症療法が行われているのが現状です。このような現状から再生医療に大きな期待が寄せられ、研究が進められています\*1。当社はマウスを用いた研究でこの課題に取り組みました。

肝硬変の動物モデルとして、マウスに四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) を反復投与するモデルが広く知られています。また、ヒト由来の細胞を投与する再生医療の基礎研究では免疫不全動物が有用であるとされています。そこで、ヌードマウスを用いてCCl<sub>4</sub>により肝硬変を惹起し、このモデルを用いて市販のヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (h-MSCs) の効果を評価しました。

Balb/cマウスではCCl<sub>4</sub>を週に2回、8週間腹腔内投与することによって、ALT優位の慢性肝炎を示す肝機能の変化、すなわち肝臓重量及び肝臓中ハイドロキシプロリン (HYP) 量の増加 (Fig.1)、肝臓の線維化が起こることがすでに確認されています (Fig.2)。

そこでBalb/cを背景系統とするヌードマウスにCCl<sub>4</sub>を週に2回、8週間腹腔内投与したところ、媒体群の動物ではBalb/cマウスと同様に無処置群と比較してALT優位の慢性肝炎を示す肝機能の変化が起こり (Fig.3)、肝臓重量の増加 (Fig.4)、肝臓中HYP量の増加 (Fig.5)、及び肝臓の線維化 (Fig.6) とマクロファージ主体の炎症性細胞浸潤が認められ、ヌードマウスでもCCl<sub>4</sub>投与によって肝硬変が誘発されることが確認できました。

更にヌードマウスを用いたCCl<sub>4</sub>誘発肝炎モデルにヒト脂肪由来間葉系幹細胞を静脈内投与したところ、病理組織学的には線維化 (Fig.6) や炎症の程度に媒体群との差は認められませんでした。肝臓中HYP量は媒体群より低値を示し、肝炎が改善されていることがわかりました (Fig.5)。

以上の結果より、ヌードマウスのCCl<sub>4</sub>誘発肝硬変モデルでは、Balb/cマウスと比較して病態の程度は弱いものの、慢性肝炎を示す肝機能障害が確認され、拒絶反応を起こさないヌードマウスのモデルはヒト由来細胞を用いた再生医療研究に有用であると考えられました。

参考文献

\*1: The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 68: 109-118, 2015. Mesenchymal stem cells: *In vivo* therapeutic application ameliorates carbon tetrachloride induced liver fibrosis in rats/Nermin Raafat et al.

(原稿執筆/林田 尚之 E-mail:Hayashida.Yoshiyuki@mv.medience.co.jp)

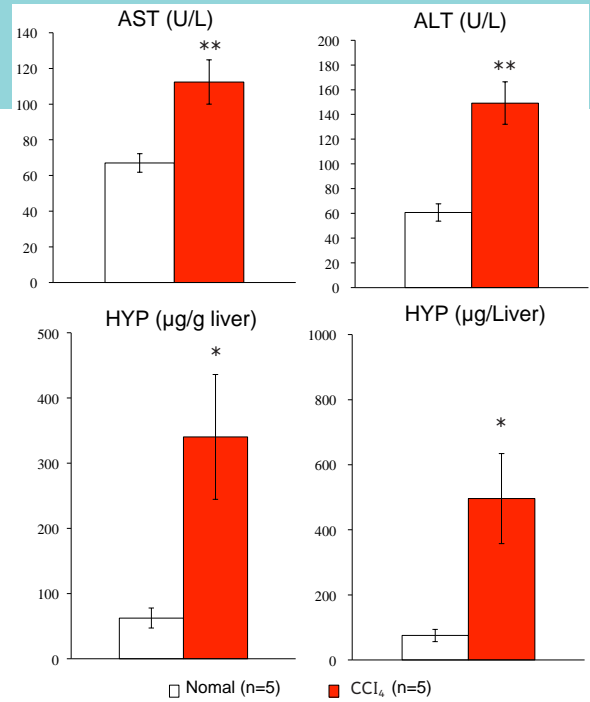


Fig. 1 AST, ALT, 肝臓中ハイドロキシプロリン量 (Balb/c マウス) Each value represents mean ± S.E.M. \* : p<0.05, \*\* : p<0.01 ; Significant difference from normal group (Student's t-test)

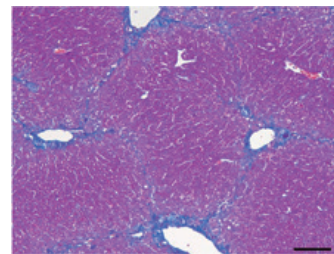


Fig.2 四塩化炭素誘発肝硬変モデルの肝臓の病理組織学的検査写真 (Balb/c マウス) マッソントリクローム染色 . Bar = 100µm. 血管周囲以外にも線維化 (青く染まった部分) が認められる

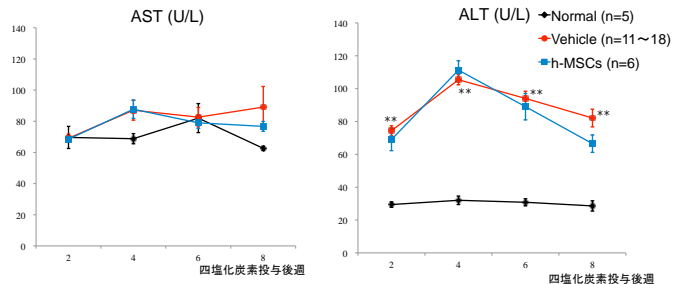


Fig. 3 AST, ALT の経時変化 (ヌードマウス) Each value represents mean ± S.E.M. \*\* : p<0.01; Significant difference from normal group (Student's t-test)

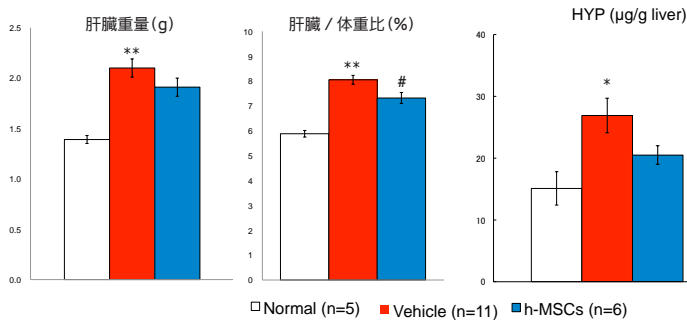


Fig. 4 肝臓重量及び肝臓 / 体重比 (ヌードマウス) Each value represents mean ± S.E.M. \* : p<0.05, \*\* : p<0.01; Significant difference from normal group (Student's t-test) # : p<0.05; Significant difference from vehicle group (Student's t-test)

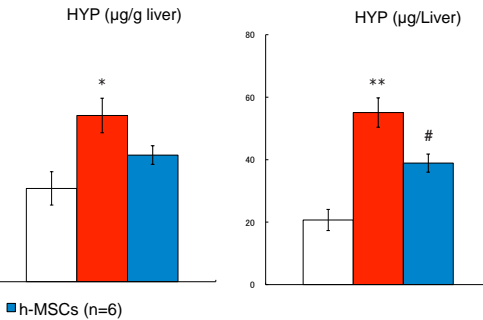


Fig. 5 肝臓中ハイドロキシプロリン量 (ヌードマウス) Each value represents mean ± S.E.M. \* : p<0.05, \*\* : p<0.01; Significant difference from normal group (Student's t-test) # : p<0.05; Significant difference from vehicle group (Student's t-test)

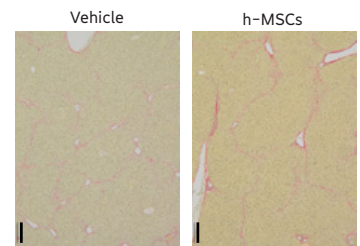


Fig. 6 四塩化炭素誘発肝硬変モデルの肝臓の病理組織学的検査写真 (ヌードマウス) シリウスレッド染色 . Bar=100µm. 線維化 (赤く染まった部分) の程度に両者の差は認められなかった

## 安全性 In vivo 造腫瘍性試験



熊本研究所  
左から飯田、山田、牧野、島津研究員

### 【背景・目的】

近年多数の再生医療等製品が開発され、再生医療の今後の発展が大いに期待されています。しかし、一方で再生医療等製品には、培養期間中に製品自体が変質した結果あるいは体内に移植した製品が患者さんの遺伝子に働きかけた結果、腫瘍を形成してしまうリスクがあります。この腫瘍を形成する性質を「造腫瘍性」と呼びます。特に、再生医療の要として期待されているiPS細胞やES細胞は完全な多能性と無限の増殖性をもつが故に、造腫瘍性リスクが非常に高いと考えられ、再生医療等製品として用いるためには造腫瘍性についての科学的な評価が必要です。造腫瘍性は*in vitro*又は*in vivo*で評価することができます。

*In vivo*の造腫瘍性試験は、再生医療等製品を免疫不全動物に移植（投与）し、造腫瘍性の有無が判断できるまで一定期間観察する試験です。被験物質となる再生医療等製品の特性により投与方法や観察期間等は異なるのですが、本稿ではスタンダードな試験として、当社で実施した皮下投与による16週間造腫瘍性試験の検討結果を紹介します。また、参考としたWHOのガイドライン<sup>\*1</sup>では、代表的な方法としてヌードマウスの使用が示されていますが、本検討試験ではヌードマウスに加え、再生医療等製品がより生着しやすいと考えられている重度の免疫不全動物であるNOD SCIDマウス及びNOGマウスを用いて評価しました。

### 【方法】

免疫不全度の異なるヌード、NOD SCID及びNOGの3系統の雄性マウスを用い、陽性対照としてHeLa細胞（ヒト子宮頸がん細胞）と、陰性対照としてMRC-5細胞（ヒト線維芽細胞）をそれぞれ背部皮下に投与しました。使用動物数は各群雄10匹（2群/系統×3系統）とし、投与は、 $10^6$  cells/body、投与容量0.1 mLで行い、その後16週間観察しました。検査項目としては、一般状態観察、体重測定、腫瘍径計測及び剖検を実施しました。

### 【結果】

投与後10週までのデータをTable1及びFig.1に示します。

陽性対照群ではいずれの系統も投与後6週から腫瘍形成が観察され始め、投与後8週までに全例で腫瘍が認められました。各系統間で比較すると、全例で腫瘍が形成されたのは、ヌードマウスは投与後6週、NOD SCIDマウスは投与後8週、NOGマウスは投与後7週でした。陰性対照群については、投与後10週までいずれの動物にも腫瘍形成は認められませんでした。

### 【まとめ】

ヌード、NOD SCID及びNOGマウスの全ての系統において、陽性対照群の全例に腫瘍形成が認められ、皮下投与したHeLa細胞の造腫瘍性が確認されました。現在は、実施した病理組織学的検査の組織像や転移について更に詳細なデータをとりまとめています。

今回、免疫不全動物の代表的な3系統のマウスについて造腫瘍性試験を実施し、背景データを取得しました。また、*in vivo* 造腫瘍性試験はGLP適用での実施が可能です。今後とも様々なニーズに対応できるよう努力してまいりますので、再生医療等製品の*in vivo* 造腫瘍性試験実施をご検討の際は、ご相談ください。

### 参考文献

\*1：WHO Technical Report Series 878, Annex 1 2010.WHO Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks.

(原稿執筆/飯田 真志 E-mail：iida.masashi@ms.medience.co.jp)

Table1 腫瘍形成匹数

Group		Week 1-5	Week 6	Week 7	Week 8	Week 9	Week 10
ヌード	MRC-5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/9 <sup>a)</sup>	0/9
	HeLa	0/10	10/10	10/10	10/10	8/8 <sup>b)</sup>	8/8
NOD SCID	MRC-5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	HeLa	0/10	7/10	7/10	10/10	10/10	10/10
NOG	MRC-5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	HeLa	0/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10

a)：1例が突然死した（死因不明）。

b)：腫瘍が認められていた動物のうち、2例の腫瘍径が20 mmを超えたため、人道的見地から安楽死させた。

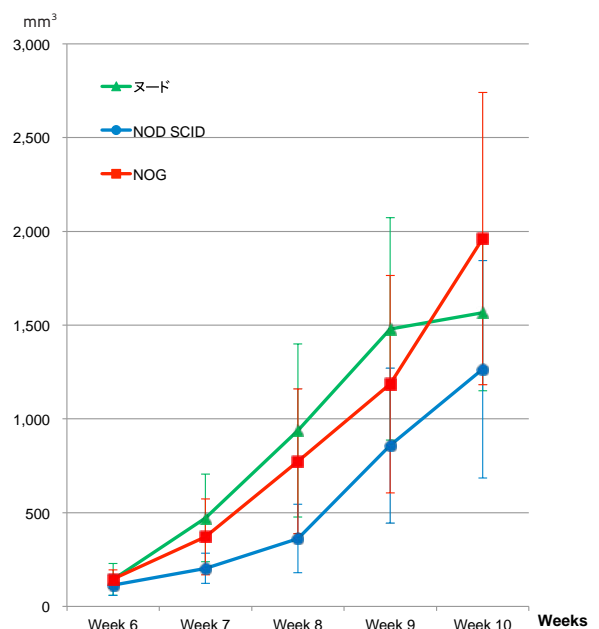


Fig.1 腫瘍体積

腫瘍体積 = 1/2 × 長径 × 短径 × 短径

安全性

軟寒天コロニー形成試験 – *in vitro* 造腫瘍性試験 –



熊本研究所  
後列左から柿田、入田、飯開研究員、  
前列左から吉田研究員、山本チームリーダー、財前研究員

【背景】

悪性形質転換は、遺伝子的・エピジェネティクスな変化によって生じ、内外の成長抑制シグナルとは無関係に増殖する細胞集団の形成を引き起こします。悪性形質転換した細胞の多くは不死化し、細胞外増殖因子をそれほど必要としない、細胞間接触による抑制を受けない、といった性質を示します。軟寒天コロニー形成法は、*in vitro*で行う腫瘍形成能（足場非依存性増殖能）を確認するために用いられ、再生医療に関する安全性試験で必要とされる試験です。

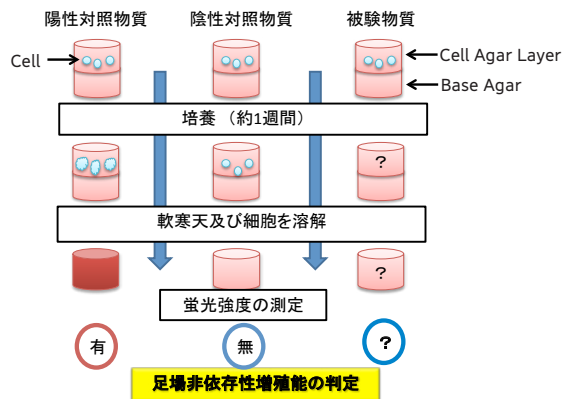
今回、蛍光強度を測定するキットを用いた軟寒天コロニー形成試験を立ち上げましたので紹介します。

【方法】

陽性対照：HeLa細胞、陰性対照：MRC-5細胞  
使用キット：CytoSelect 96-Well Cell Transformation Assay (Soft Agar Colony Formation)、Cell Biolabs社製

HeLa細胞及びMRC-5細胞を軟寒天培地中に播種し、1週間培養後、キットを用いて軟寒天及び細胞を溶解し、蛍光強度を測定しました。播種時と培養後の蛍光強度を比較し、足場非依存性増殖能を評価しました。

概略図



【結果】

陽性対照であるHeLa細胞の1週間培養後（Day 7）の蛍光強度は、細胞数に依存した変化を示しました。また、播種時（Day 0）と比較して明らかな蛍光強度の増加が認められ、足場非依存性増殖能を有することが確認されました。一方、陰性対照であるMRC-5細胞のDay 7の蛍光強度は、Day 0と比較しても低値であり、足場非依存性増殖能は認められませんでした（Fig. 1）。

【まとめ】

CytoSelect 96-Well Cell Transformation Assayを用いてHeLa細胞の足場非依存性増殖能を確認することができました。当該キットを用いた軟寒天コロニー形成法試験は、GLP適用での実施も可能です。また、従来のコロニー数をカウントする方法についてもGLP適用での実施が可能です。今後とも、お客様のご要望に対応できるよう努力してまいりますので、再生医療等製品の*in vitro*造腫瘍性試験実施をご検討の際は、ご相談ください。

（原稿執筆/山本 健一 E-mail:Yamamoto.Kenichi@mu.medience.co.jp）

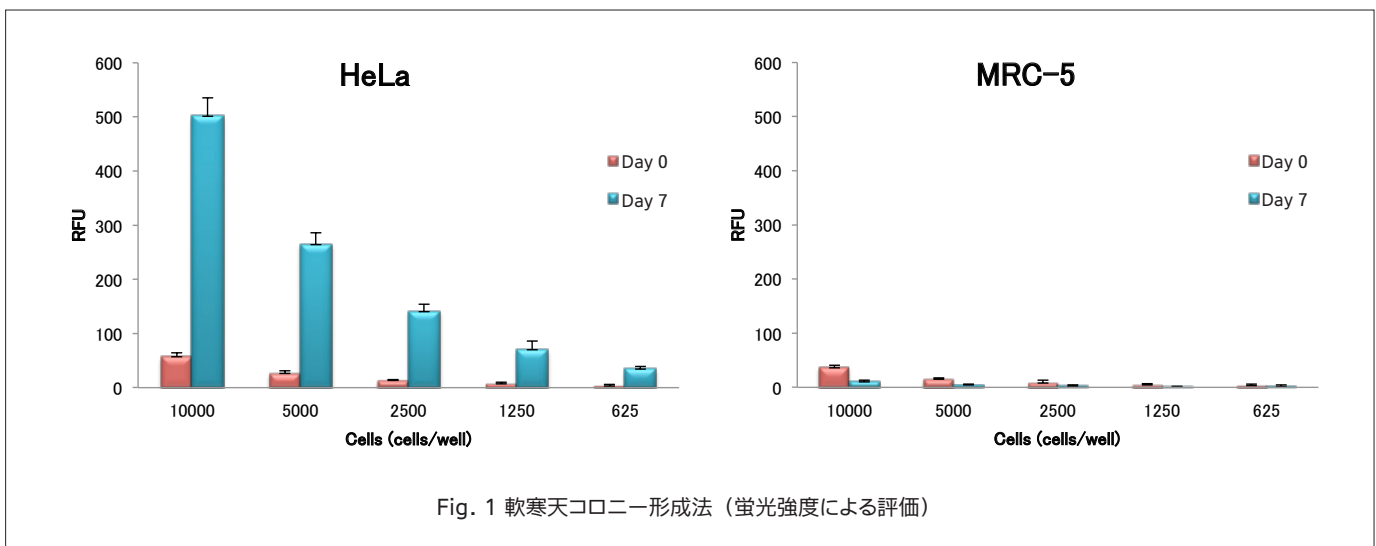


Fig. 1 軟寒天コロニー形成法（蛍光強度による評価）

病理

免疫組織化学染色によるヒト間葉系幹細胞の検出



熊本研究所  
後列左から河上研究員、浜村統括部長、山口研究員、  
前列左から渡辺、隈部、村田研究員

【背景】

再生医療等製品の体内動態試験では、被験物質が細胞・組織であるため、これまで低分子医薬品に使用していた手法を用いることができません。それに代わる手法の1つとして、免疫組織化学染色（免疫染色）があります。当社では、非臨床試験に用いられる種々の動物種を想定した、免疫染色によるヒト細胞検出の検討を行っています。今回、ラットに投与したヒト間葉系幹細胞(Human mesenchymal stem cell, HMSC)の検出を試みた結果を紹介いたします。

【方法】

HMSCをラットの尾静脈内に投与した後、肺組織を10%リン酸緩衝ホルマリン注入固定し、定法に従いパラフィン包埋切片を作製しました。2種類のヒト特異的抗体（抗ヒトラミン抗体、抗ヒトミトコンドリア抗体）を用いて、酵素標識抗体法による免疫染色を行いました。

【結果】

Fig. 1A及びFig. 1Bは、それぞれ抗ヒトラミン抗体、抗ヒトミトコンドリア抗体を用いて免疫染色を行ったラット肺組織です。矢印に示すように、抗ヒトラミン抗体では核内に、抗ミトコンドリア抗体では細胞質内に陽性反応が認められ、肺の毛細血管内のHMSCが確認できます。また、Fig. 2は、上記の2種類の抗体を用いて二重染色を行ったものです。HMSCが2色（茶：ラミン、赤：ミトコンドリア）に染色されています。

【まとめ】

ヒト特異的抗体を用いた免疫染色により、動物体内でヒト細胞を検出することが可能であることが示されました。特に、2種類のヒト特異的抗体を用いた二重染色を行うことで非特異反応と真の陽性細胞との識別が容易となり、より正確なデータを得ることができると考えられます。

近年、ヒト細胞の組織への分布に加えて、免疫染色によるヒト細胞の分化に関する解析も報告されています。お客様の様々なご要望にお応えできるよう、更なる技術向上に努めていきたいと思っております。

(原稿執筆/隈部 志野 E-mail : Kumabe.Shino@me.medience.co.jp)

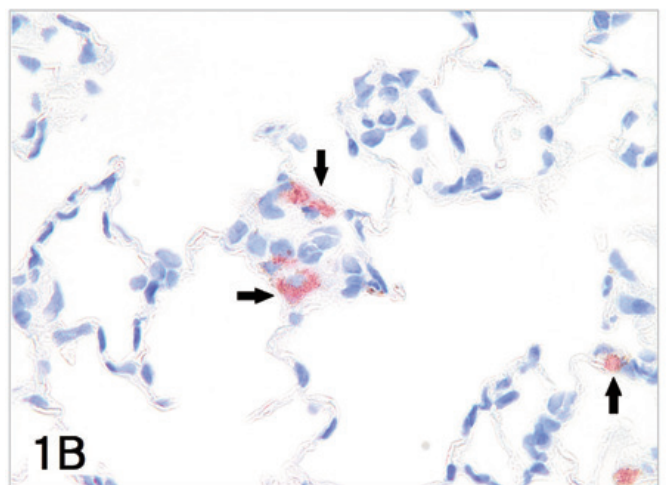
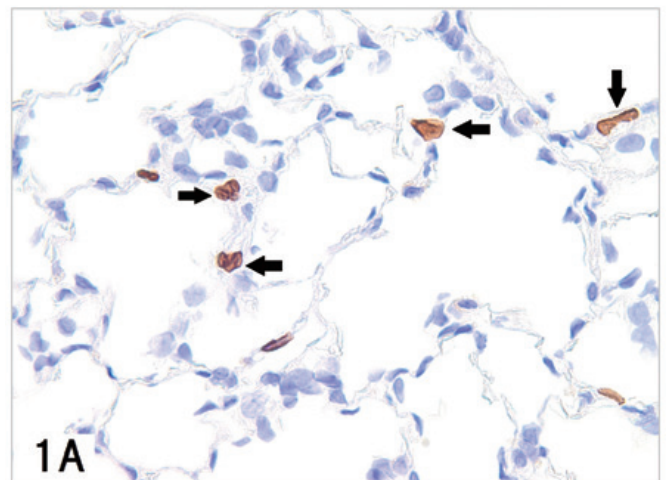


Fig. 1 ヒト特異的抗体を用いた免疫染色(ラット肺組織、矢印：陽性細胞)  
A 抗ヒトラミン抗体  
B 抗ヒトミトコンドリア抗体

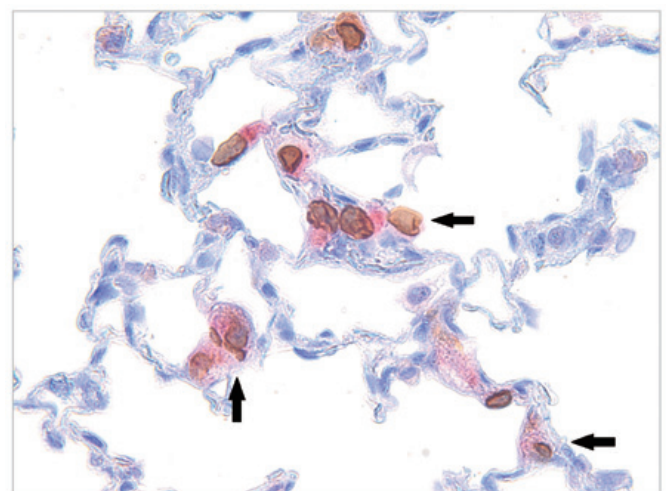


Fig. 2 抗ヒトラミン抗体及び抗ヒトミトコンドリア抗体による二重染色(ラット肺組織、矢印：陽性細胞、茶：ラミン、赤：ミトコンドリア)

安全性

ミニブタを用いた TEWL 及び紅斑値による皮膚状態の評価



鹿島研究所  
安全性研究部の大動物試験に携わる研究員

ミニブタの皮膚は、構造及び生理機能がヒトの皮膚に類似していることが報告されており、非臨床試験における経皮投与試験に適した動物種であると考えられています。ただし、ミニブタの皮膚吸収性や刺激反応性は個体差によるばらつきが大きいので、各個体の皮膚の状態を正確に把握することは、経皮投与試験における薬物の安全性及び皮膚刺激性を評価する上で極めて重要です。そこで皮膚バリア機能の指標であるTEWL (trans epidermal water loss) と皮膚の赤味を示す紅斑値の有用性について確認しました。

【方法】

実験① テープストリッピングにより損傷を惹起したミニブタの皮膚のTEWL及び紅斑値を、Tewameter<sup>®</sup>TM300MP、Courage+Khazaka社製を用いて経時的に測定し、損傷の回復に伴う各測定値の変化を確認しました。また、TEWL及び紅斑値それぞれが損傷前の値にまで回復した時点で皮膚の一部をバイオプシーパンチにて採取し、病理組織検査を実施してバリア機能を有する角質層の状態を観察しました。

実験② 皮膚の損傷前(健常皮膚)、損傷直後、及びTEWLや紅斑値が回復した時点(計4時点)における皮膚の薬物吸収性を確認するため、各時点に薬物を経皮投与し、経時的に採血して血漿中薬物濃度を比較しました。

【結果】

実験① TEWLは損傷直後から上昇するのに対し、紅斑値はTEWLと比較して損傷後、遅延して上昇しました(図1)。また、TEWLが損傷前

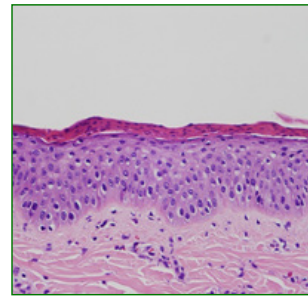


図2 TEWL 回復時点での角質層

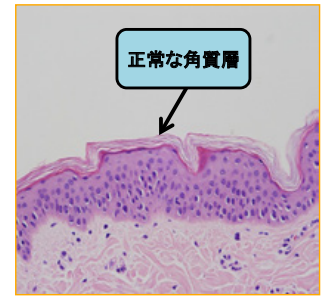


図3 紅斑値回復時点での角質層

にまで回復した時点では正常な角質層は組織学的に確認できませんでした(図2)。一方、紅斑値はTEWLが回復した時点ではまだ高値を示しており、紅斑値が損傷前の値に回復した時点では正常な角質層(図3)が認められました。

実験② 薬物の吸収性は、損傷直後>TEWL回復時点>紅斑回復時点<損傷前(健常皮膚)でした(図4)。紅斑回復時点での薬物吸収性は概ね損傷前の健常皮膚と同等であったのに対し、TEWL回復時点では損傷前と比較して高い吸収性を示しました。

【まとめ】

一定の損傷を受けた皮膚では、TEWLが回復したにも関わらず角質層の再生が不完全な状態にあり、バリア機能が低い、すなわち薬物の吸収性が高い状態であることが確認されました。一方紅斑値については、角質層の再生に伴い回復がみられ、薬物吸収性も紅斑値の回復とともに健常皮膚と同等となりました。したがって、TEWLに紅斑値を加えることにより、より正確に皮膚の状態を把握することが可能と考えられました。

以上のように、当社ではTEWLや紅斑値を用いて薬物の安全性や刺激性をより正確に評価することが可能です。また、バイオプシーパンチは、動物を死亡させることなく標本を採取することが可能であり、皮膚の病理標本を経時的に採取することも可能ですのでご用命いただければ幸いです。

(原稿執筆/遠藤 和守 E-mail:Endou.Kazumori@mh.medience.co.jp)

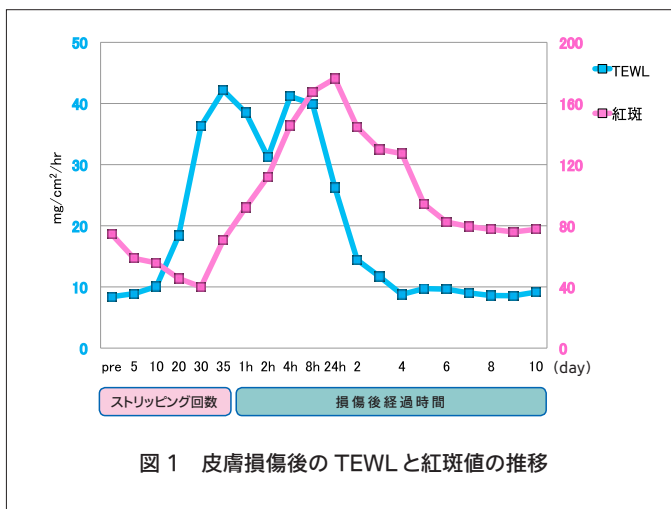


図1 皮膚損傷後の TEWL と紅斑値の推移

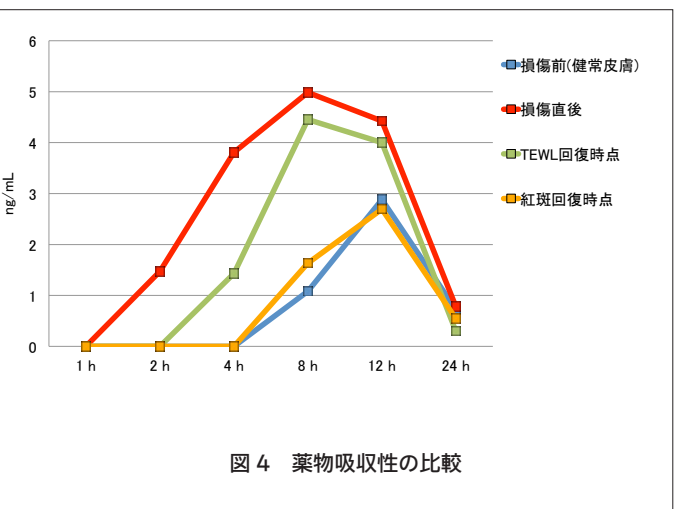


図4 薬物吸収性の比較



病理

ミニブタの皮膚の病理組織学的検討



鹿島研究所  
左から菅野グループリーダー、石井、山田研究員

ミニブタは、イヌ・サルと同様に非げっ歯類動物として安全性試験に用いられています。近年、JeppesenらがGöttingen Minipigの病理組織学的検査における背景病変についての論文を発表するなど<sup>\*1</sup>、病理組織学的な基礎データも徐々に報告されてきており、ミニブタを用いた試験は更に増えるものと考えられます。特に、ミニブタは皮膚の特徴が他の実験動物と比較してヒトと類似していると言われていたことから経皮投与の試験に用いられることが多く、当社では、全身臓器の背景病変と共に、皮膚に関する病理学的な基礎データ収集も行っています。そこで今回は、投与部位として用いる皮膚の各部位の特徴とストリッピング処置における皮膚の変化について紹介します。

【投与部位として用いる皮膚の各部位の特徴】

当社の経皮試験で用いられる投与部位は、主に胸部から腹部にかけての体幹部左右両側の皮膚です。Fig. 1は胸部と腹部の境界付近の体幹部皮膚をバイオプシーパンチで採材した皮膚の組織写真です。AからEの順番に、背側から腹側にかけて採材しています。体幹部皮膚では、背側と腹側で真皮の膠原線維層の厚さが異なり、背側の方が真皮の膠原線維層 (Fig. 1矢印) が厚いことがわかります。表皮の厚さに明らかな違いはみられません。また、いずれの部位でもイヌやサルと比べて毛包などの皮膚付属器が少ないことがわかります。このほか、耳翼尾側の皮膚 (Fig. 2) や乳頭周囲の皮膚は体幹部皮膚よりも脂肪組織が多く、これらの部位は皮下投与に用いる部位として検討し、背景データを収集しています。

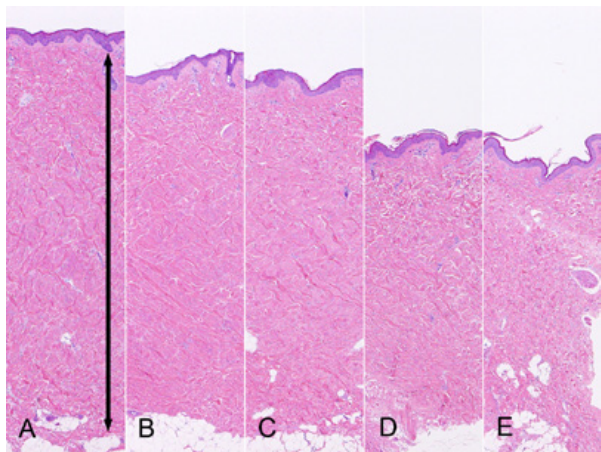


Fig. 1 体幹部皮膚

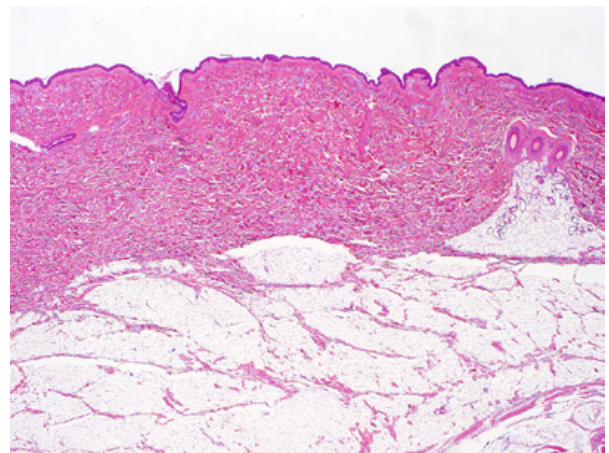


Fig. 2 耳翼尾側の皮膚

【ストリッピングの影響】

損傷皮膚モデルとして、テープストリッピングによって表皮を損傷させ、病理組織学的検査を行いました。Fig. 3は、テープストリッピングを行った皮膚を、バイオプシーパンチで採材した表皮の組織写真です。左のAから順にそれぞれ0、5、10、15、20回のストリッピングを行いました。ストリッピングにより角質層が減少し、15回、20回 (D、E) では角質層は完全に除去され、表面に扁平化した核が認められると共に有棘層 (Fig. 3矢印) の厚さが減少しています。このように、病理組織学的な表皮の損傷・剥離の程度は、ストリッピングの回数とよく関連します。

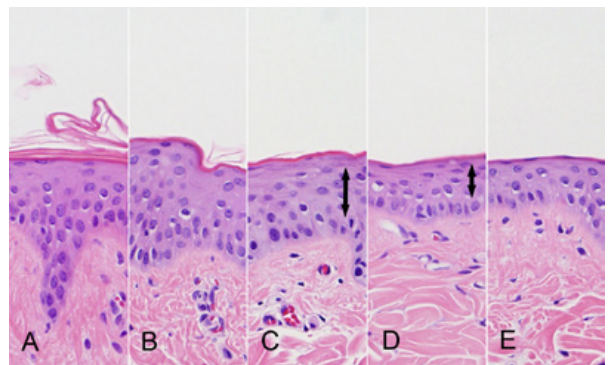


Fig. 3 ストリッピングの影響

以上、当社で行っているミニブタの皮膚についての基礎的な検討結果を紹介しました。今後も皮膚を含め、ミニブタに関する基礎データの収集を実施していきますので、ご意見、ご要望などがありましたら、ご連絡いただければ幸いです。

参考文献

\* 1: Toxicologic Pathology 43:257-266, 2015. Spontaneous background pathology in Göttingen minipigs / Jeppesen G et al.

(原稿執筆 / 山田 直明 E-mail: yamada.naoaki@mn.medience.co.jp)

## 分析代謝 *In vitro* 皮膚透過性試験



鹿島研究所  
後列左から間舘、金子(哲)、田崎研究員、鳥居チームリーダー、  
庵、斎藤、那須、橋田研究員、  
前列左から越川、金子(健)、津村、山口、木村研究員

*In vitro*皮膚透過性試験は、経皮による吸収速度の評価、暴露量の推定、経皮吸収剤の同等性評価など、種々の評価において有用性の高いツールとして活用されています。

当社は、OECD、SCCSなどの試験法ガイドラインに準拠し、実験動物だけでなくヒト皮膚においても*in vitro*皮膚透過性試験を実施することが可能です。また、標識体を用いる場合には、マスバランス評価の実施はもちろんのこと、非標識体の場合でも、測定方法の検討・確立から対応します。

### [方法]

第一選択とされている試験用の皮膚は、非営利特定団体エイチ・イー・ビー研究機構を通じて米国National Disease Research Interchange (NDRI) から供給されたヒト皮膚組織を入手するか、若しくは、海外で採取された皮膚組織片を国内代理店を介して供給を受けています。ヒト皮膚の場合、ダーマトームを用いて適度な厚さに調整しています(若しくは処理済の皮膚を入手)。このときのsplit-thickness skinは、表皮層と真皮層を含みます。また、試験の目的に応じ、実験動物(マウス、ラット、ブタ)を用いることができ、ヘアレスマウスやブタ耳の皮膚が汎用されています。これら動物の皮膚の場合には、脂肪層を除去したfull-thickness skinを用いています。

皮膚は適当な大きさにカットし、図1に示すように透過セルにセットします。レセプターチャンバーにはレセプター液を入れ、ドナーチャンパー側に薬剤を適用し、経時的にレセプター液の濃度を測定することで、化合物の皮膚透過速度を評価することが可能となります。

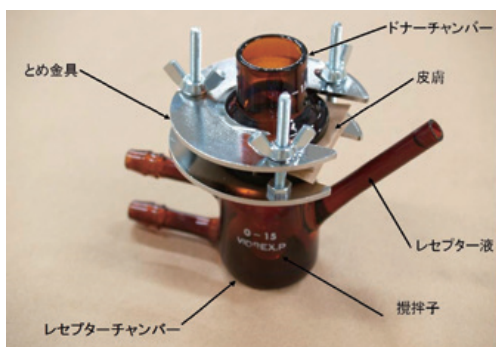


図1 静的拡散セル (Franz セル)

なお、ここで用いる皮膚のintegrityを保証することが、各種ガイドラインに示されています。当社では比較的厳格な結果が得られる、トリチウム水浸透率に基づく方法を使用しており、トリチウム水の透過係数が一定の基準値未満のものを正常皮膚とみなして (integrityの完全性)、試験に使用しております。

### [結果]

ここでは、皮膚の角層バリアをテープストリッピングにより障害を起こした皮膚(損傷皮膚)と正常皮膚での薬剤の透過の相違の例を図2に示します。正常皮膚と比較して、損傷皮膚ではトリチウム水の透過係数が著しく高く、このとき、化合物Xの透過速度も大きくなっています。一方、正常皮膚における化合物Xの透過では、適用後4時間までは濃度は横ばいとなっており、一定のタイムラグが生じています。

### [まとめ]

当社では、さまざまな投与経路での薬物の動態、薬効、安全性評価を行っており、経皮投与、吸入投与などの特殊な投与経路についても長年にわたり取り組んできました。今回紹介した*in vitro*皮膚透過性試験についても、新規化合物の安全性評価や、動物実験代替法の1つとして、新薬開発などの様々な場面で、ニーズに即応した試験デザインにて信頼性の高いデータを提供することで、お客様のお力になればと考えています。測定法につきましても、放射能測定、HPLC (UV、蛍光)、LC/MS/MS、原子吸光など化合物に応じて対応が可能ですので、お声をかけていただければ幸いです。

### 参考文献

- OECD, 2003. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 428: Skin Absorption: *In vitro* Method. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris.
- SCCS, 2012. The SCCS's Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation, 8th Revision. Scientific Committee on Consumer Safety
- 厚生労働省, 局所皮膚適用製剤(半固形製剤及び貼付剤)の処方変更のための生物学的同等性試験ガイドラインについて, 平成22年11月1日 薬食審査発1101第1号

(原稿執筆/田崎 健二 E-mail:Tasaki.Kenji@md.medience.co.jp)

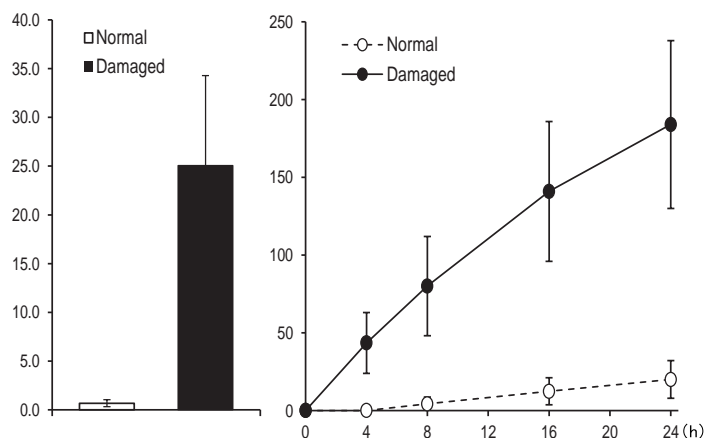


図2 正常皮膚と損傷皮膚での薬物透過の比較  
(左)トリチウム水の透過係数 ( $K_p$ ,  $\times 10^{-3}$  cm/h)  
(右)化合物Xの累積透過量 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )の時間推移

**2014年 学会発表実績 (8月～12月)**

**【45th Annual Meeting on Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS)】**

● Evaluation of Repeated Dose Liver and Gastrointestinal Tract Micronucleus Assay Using Young Adult Rats (IV): Summary of Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS. / 濱田修一、他

**【16th International Society of Addiction Medicine Annual Meeting】**

● Behavioral pharmacological effects of nicotine: its relevance to smoking habit / 廣中直行  
【BioJapan 2014】

● iPS細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発 / ヒトiPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発 / 長田智治

**【19th NORTH AMERICAN ISSX MEETING, 29th JSSX MEETING】**

● VALIDATION OF UPTAKE ASSAY FOR ASSESSING LONG-LASTING INHIBITORY EFFECTS IN OATP1B1-AND OATP1B3-EXpressING CELLS / 金子健一、他

**【2014年大会 情報計算化学生化学会】**

● Comparison of *in vitro* system to evaluate arrhythmogenic potentials of compounds using human iPS-cell derived cardiomyocytes with field potential measurement and clinical report / 北村哲生、他

**【第28回 液体クロマトグラフィー研究懇談会】**

● 非臨床試験におけるLC技術の活用 / 常深慎

**【2014年 液体クロマトグラフィー研修会】**

● HPLC分析・LC/MS分析の基礎とノウハウー酸による除タンパク / 常深慎

**【第5回 スクリーニング学研究会】**

● 細胞外電位によるヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた*in vitro*不整脈作用評価法と臨床報告の比較 / 北村哲生、他

**【2014 National Workshop on Non-clinical Safety Evaluation and Quality Management】**

● Effectiveness of liver micronucleus assay studies / 濱田修一、他  
● Standard procedures of *in vivo* alkaline comet assay / 高沢博修、他

**【日本環境変異原学会 第43回大会】**

● ホルモン固定組織を用いた肝臓小核標本作製〜コラゲナーゼ処理法との比較検討〜 / 志賀野美幸、他

**※ベストプレゼンテーション賞を受賞しました**

● Pig-a/PIGRETアッセイに関する短期試験への有用性: MMS共同研究報告 / 堀端克良 (国立薬品食品衛生研究所)、高島理恵、他

**【安全性評価研究会(谷学) 12月セミナー】**

● 医薬品開発における行動薬理評価および依存性評価について / 廣中直行

**【4th Asian conference on Environmental Mutagens (4th ACEM)】**

● Genotoxicity evaluation as part of general toxicity studies: potentials and challenges of integration studies / 濱田修一

**2015年 学会発表実績 (1月～8月)**

**【第21回日本毒性病理学会スライドカンファランス(教育講演)】**

● 呼吸器系(肺) / 増殖性病変 / 涌生ゆみ

**【第31回 日本毒性病理学会総会及び学術集会】**

● SDラットの腎臓Formixにおける加齢性病変 / 友成由紀、他

● シスプラチン投与によりカニクイザルでは遠位尿管管が傷害される / 小林亮介、他

● ウサギの網膜におけるニューロフィラメントの蓄積に関する病理組織学的検索 / 川迫一史、他

**【日本安全性薬理研究会 第6回学術年会】**

● An *in vitro* method to evaluate sodium channel block potentials of drugs using human iPS-cell derived

cardiomyocytes by field potential / 北村哲生、他

● Göttingen系ミニプタを用いたホルター心電図検査の基礎検討 / 細田秀勝、他

● Analysis of the epicardial ECG in a dog model of drug-induced heart failure / 今泉真和、他

● 安全性薬理試験における行動評価トランスレーショナルリサーチへの試み / 廣中直行

**【第34回 実験動物病理標本交見会】**

● ラットの下垂体腫瘍 / 黒滝哲郎

● ラットの空腸腫瘍 / 川迫一史

**【第88回 日本薬理学会年会】**

● Effects of drugs on cardiac function in a dog model of drug-induced cardiac hypofunction / 佐々木一暁、他

● Study of anticancer drug sensitivity to tumor cells using a 3-dimensional culture method / 森川崇、他

● Evaluation of lactate-induced panic-like responses in rats / 田代貴士、他

● A Study of Evaluation System for Angiogenesis in a Rabbit Model of Hindlimb Ischemia / 林田尚之、他

**【公益社団法人 日本農芸化学会】**

● マウスNK活性低下モデルにおける各種食品成分の効果検討 / 山澤拓実、他

**【第55回 獣医病理学研究会(第2回日本獣医病理学専門家協会学術集会内で開催)】**

● ラットの小腸腫瘍 / 山田直明

**【実験病理組織技術研究会 第22回総会・学術集会】**

● 好酸球の簡易染色法追加報告 / 山口浩美、他

● 免疫染色トラブル事例報告 / 渡辺秀幸、他

● 走査電子顕微鏡標本の作製工程における洗浄時間がウサギ角膜内皮の形態に及ぼす影響 / 四郎丸千恵、他

**【2015年(第5回) 薬物毒理学会年會】**

● Comparison of *in vitro* system to evaluate arrhythmogenic potentials of compounds using human iPS-cell derived cardiomyocytes with field potential measurement and clinical report / 北村哲生、他

● Species differences of effects of morphine on respiratory functions in Sprague-Dawley rats, beagle dogs and cynomolgus monkeys / 馬成俊、他

**【第42回 日本毒性学会学術年会】**

● Göttingen系ミニプタを用いたTEWL及び紅斑値による皮膚状態評価法の検討 / 遠藤和守、他

● Göttingen系ミニプタにおける基礎的な免疫反応の特徴 / 赤川唯、他

● 3軸加速度センサー内蔵携帯歩行計を用いたMPTP誘発パーキンソン病モデルサルの行動異常および振戦の定量解析 / 平嶋昌、他

● カニクイザルにおける腎障害バイオマーカーの検討 / 小林大蔵、他

● ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いたhERGチャネルタンパク質の細胞内輸送阻害の評価 / 吉川公人、他

● 実験動物のホルモン測定試薬の定量性能の比較検討 / 橋田祐樹

● 動物の行動評価の基礎と応用 - LSIM の挑戦 - / 廣中直行

**2014年 投稿実績 (8～12月)**

【The Journal of Veterinary Medical Science 76 : 1161-1164, 2014】

Follicular thyroid carcinoma characterized by abundant stromal components with chondroid and osseous metaplasia in a dog / 小林亮介、他

**2015年 投稿実績 (1月～8月)**

【Journal of Toxicologic Pathology 28 (1) : 1-9, 2015】

Histological Dermal Changes Caused by Preparative and Applying Procedure in Percutaneous Dose Toxicity Studies of

Dogs, Rabbits, and Rats / 満石三喜男、他

【Journal of Toxicologic Pathology 28 (2) : 73-78, 2015】

Morphometric analysis of progressive changes in hereditary rabbit cerebellar cortical abiotrophy caused by abnormal synaptogenesis / 佐藤順子、他

【Journal of Toxicologic Pathology 28 (2) : 121-124, 2015】

Spontaneous and bilateral necrosis of the femoral head in a young experimental beagle dog / 小林亮介、他

**【Journal of Comparative Pathology】**

Neurofilament Accumulation in Rabbit Retinas / 川迫一史、他

【American Journal of Physiology - Renal Physiology, 308 : F1128-F1134, 2015】

Functional roles of TRPV1 and TRPV4 in control of lower urinary tract activity: dual analysis of behavior and reflex during the micturition cycle / 芳山亮晴(山梨大学大学院医学工学総合研究部泌尿器科学)、水町涼治、他

【日本薬物動態学会ニュースレター 30 (2) : 30, 2015】

19th North American ISSX Meeting, 29th JSSX Meeting, 2014年10月19日～10月23日 / 金子健一

【Fundamental Toxicological Sciences 2 (3) : 101-110, 2015】

Positive and negative ions by air purifier have no effects on reproductive function or postnatal growth and development in rats / 山本大、他

【The Journal of Toxicological Sciences 40 (3) : 295-307, 2015】

General Considerations in Ocular Toxicity Risk Assessment from the Toxicologists' Viewpoints / 大竹誠司、他

**【Mutation Research 780-781 : 2-17, 2015】**

Evaluation of the repeated-dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays with 22 chemicals using young adult rats: Summary of the collaborative study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/The Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) - Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS) / 濱田修一、他

**【Mutation Research 780-781 : 18-24, 2015】**

Evaluation of a repeated dose liver micronucleus assay in rats treated with two genotoxic hepatocarcinogens, dimethylnitrosamine and 2-acetylaminofluorene: The possibility of integrating micronucleus tests with multiple tissues into a repeated dose general toxicity study / 高島理恵、他

**【Mutation Research 780-781 : 64-70, 2015】**

Micronucleus induction in rat liver and bone marrow by acute vs. repeat dose of the genotoxic hepatocarcinogen monocrotaline / 高島理恵、他

**【Mutation Research 783 : 13-18, 2015】**

Recommended protocols for the liver micronucleus test: report of the IWGT working group / 宇野芳文 (田辺三菱製薬安全性研究所)、濱田修一、他

**【Mutation Research 783 : 19-22, 2015】**

Micronucleus test in rodent tissues other liver or erythrocytes: Report of the IWGT working group / 宇野芳文 (田辺三菱製薬安全性研究所)、濱田修一、他

【Mutation Research 786-788 : 144-150, 2015】

Results of the international validation of the *in vivo* rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens: individual data for 1,2-dibromoethane, p-anisidine, and o-anthranilic acid in the 2nd step of the 4th phase validation study under the JaCVAM initiative / 高沢博修、他

**【Mutation Research 786-788 : 45-76, 2015】**

JaCVAM-organized international validation study of the *in vivo* rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens: II. Summary of definitive validation study results / 宇野芳文 (田辺三菱製薬安全性研究所)、高沢博修、他

**【毒性質問箱 17 : 62-70, 2015】**

一般毒性試験における遺伝毒性評価: 組込み試験の可能性と課題 / 濱田修一

**Topics**

**ナレッジサービス**

当社では、GLP施行当初から、GLP適合受託研究施設として *in vivo* 及び *in vitro* の毒性試験、遺伝毒性試験、安全性薬理試験、薬効薬理試験、TK/PK分析試験及び薬物動態試験を実施しています。また、ご要望に応じて報告書の作成支援(翻訳等)や各種実験手技教育等も行ってきました。

この度、多種多様なご要望にすぐにお応えできるように準備を整え「ナレッジサービス」と名付けて受託メニューに加えましたので、その内容を紹介します。長年の研究から培われた高い技術を有する研究者や専門技能認定を有する研究者が、お客様のご要望に応じて適切なサービスをご提案、ご提供します。右記以外の内容についてもお客様のニーズに柔軟に対応しますので、お気軽にお問い合わせください。

**教育/研修**

- I 病理
- II 動物実験手技
- III 眼科学的検査
- IV 遺伝毒性試験
- V 生殖発生毒性試験
- VI GLP 及び信頼性に関するサービス

**レンタルラボサービス**

- ・動物種: ミニプタ
- ・技術サポート: 飼育・観察、採血、各種検査等

**ヒト iPS 心筋を用いた実験**

- I 試験受託・試験報告書作成
- II 実験インキュベータ、評価システムの販売
- III オープンラボ: 試験計画から測定、データ解析までサポート

**メディカルライティング**

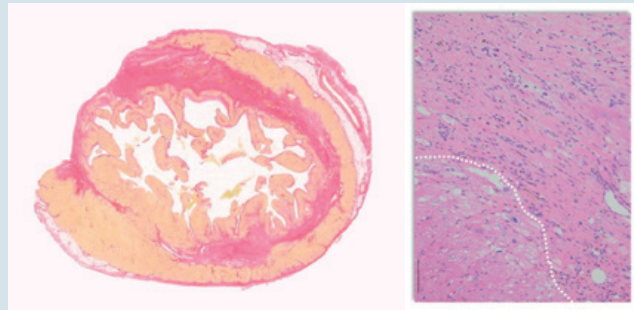
- I CTD 第2部の翻訳、QC、作成支援
- II 治験概要書の翻訳、QC、作成支援

(原稿執筆/高橋 要 E-mail: Takahashi.Kaname@mm.medience.co.jp)

## 再生医療のためのサル心筋梗塞モデル

心不全の治療には、様々な治療薬が用いられているものの、病態の進行を完全に抑制したり、あるいは完全治癒させる治療法は心移植術以外に存在せず、より有用な心不全治療薬の開発が望まれています。また、心筋梗塞の治療は、急性期におけるカテーテル法や、再狭窄予防の薬物治療がこれまで主な役割を果たしてきました。現在では、これらに加えてES細胞、iPS細胞などを用いた再生医療も盛んに研究が行われています。心不全、心筋梗塞といった病態の治療薬のスクリーニング、治療方法の確立などのためには、心筋梗塞の病態に陥った非ヒト動物モデルが有用であり、当社でもこれまでラットやウサギの心筋梗塞モデルを用いた評価を実施してきました。今回、更に人により近いモデルでの評価を実施できるよう新たにカニクイザルを用いた虚血再灌流モデルを立ち上げました。また、マイクロミニピッグを用いた心筋梗塞モデルも検討を予定しており、引き続きお客様の様々な要望にお応えできるよう受託メニューを充実させていきたいと考えております。

(原稿執筆/佐々木 一暁 E-mail:Sasaki.Kazuaki@mr.medience.co.jp)



【シリウスレッド染色】  
赤色部が線維化領域

【HE染色（高倍率）】  
白点線より上部部分が  
線維化領域

## 再生医療等製品 GLP 適合性追加調査

## 再生医療等製品GLP適合性追加調査

熊本研究所では、2016年2月25-26日に再生医療等製品GLPの適合性調査を受け、現在認可待ちです。

当社は、新区分での1) *in vitro* 毒性試験、2) *in vivo* 毒性試験(一般毒性試験、動物を用いた造腫瘍性試験)、3)その他の試験である動物を用いない造腫瘍性試験(軟寒天コロニー形成試験)の全てをGLP適用で実施可能です。今後もお客様のニーズにお応えすべく、実施体制の整備に努めてまいります。

(原稿執筆/張文 E-mail:cho.fumi@ma.medience.co.jp)

## 信頼性保証部門責任者の交代

2015年12月11日に、鹿島研究所と熊本研究所の信頼性保証部門責任者が交代しました。

両責任者ともに米国におけるQA専門家団体のRQAP-GLP資格取得者であり、QAUは新体制で2016年をスタートしました。女性ならではの細やかさとグローバルな視点で両場所の品質保証をサポートし、お客様に安心して試験をご依頼いただける品質と信頼性を確保するように努力していく所存です。今後とも、ご指導ご鞭撻のほど宜しくお願い申し上げます。



熊本信頼性保証グループのメンバー  
左から竹下、戌亥、松村、溝口(現、鹿島研)研究員、  
右端が張グループリーダー

鹿島信頼性保証部門責任者 石丸 照美  
(右写真)

熊本信頼性保証部門責任者 張 文



(原稿執筆/石丸照美 E-mail:ishimaru.terumi@mh.medience.co.jp)

## 株式会社LSIメディエンス 創薬支援事業本部

- ◆試験研究センター 鹿島研究所 〒314-0255 茨城県神栖市砂山 14 番地 1 ☎ 0479-46-2871 FAX 0479-46-2874
- ◆試験研究センター 熊本研究所 〒869-0425 熊本県宇土市栗崎町 1285 番地 ☎ 0964-23-5111 FAX 0964-23-5122
- 【関東】創薬第1営業部 第1グループ 〒101-8517 東京都千代田区内神田一丁目13番4号 THE KAITEKIビル ☎ 03-5577-0807 FAX 03-5577-0857
- 【関西】創薬第1営業部 第2グループ 〒541-0044 大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号 ☎ 06-6204-8411 FAX 06-6204-8716

<http://www.medience.co.jp/>

株式会社LSIメディエンス 非臨床 News 第6号 2016年3月発行