



2013年10月8日, 東京

三次元培養モデルの現状と 可能性

小島 肇

国立医薬品食品衛生研究所

NEWS EUROPE

[Home](#) | [UK](#) | [Africa](#) | [Asia](#) | [Europe](#) | [Latin America](#) | [Mid-East](#) | [US & Canada](#) | [Business](#) | [Health](#) | [Sci/Environment](#)

11 March 2013 Last updated at 17:23 GMT



EU bans sale of all animal-tested cosmetics

A complete ban on the sale of cosmetics developed through animal testing has taken effect in the EU.

The ban applies to all new cosmetics and their ingredients sold in the EU, regardless of where in the world testing on animals was carried out.

The 27 EU countries have had a ban on such tests in place since 2009. But the EU Commission is now asking the EU's trading partners to do the same.

Animal rights lobbyists said EU officials had "listened to the people".

The **anti-vivisection group BUAV and the European Coalition to End Animal Experiments (ECEAE)** said they had spent more than 20 years



The search for alternatives to animal testing goes on

Related Stories

UK retains strict animal test law

資生堂、化粧品・医薬部外品における動物実験の廃止を決定

資生堂は、動物実験代替法(以下、代替法)に基づく安全性保証体系を確立し、これにより2013年4月から開発に着手する化粧品・医薬部外品における社内外での動物実験を廃止します。なお、社会に対して安全性の説明をする必要が生じた場合^{*1}は除きます。本件については、2013年2月28日開催の取締役会において決定しました。

動物実験に対する考え方

**マンダムは、動物実験を行わない方針で、
化粧品開発を進めています。**

マンダムは、生活者の安全の確保を第一に考えて商品を開発しております。製品等の安全性確認は基本的にヒトを用いた試験(パッチテスト、ステインギングテスト等)および動物実験代替法を活用しており、外注委託を含めて動物実験は実施しておりません。今後も動物実験を行わない方針です。

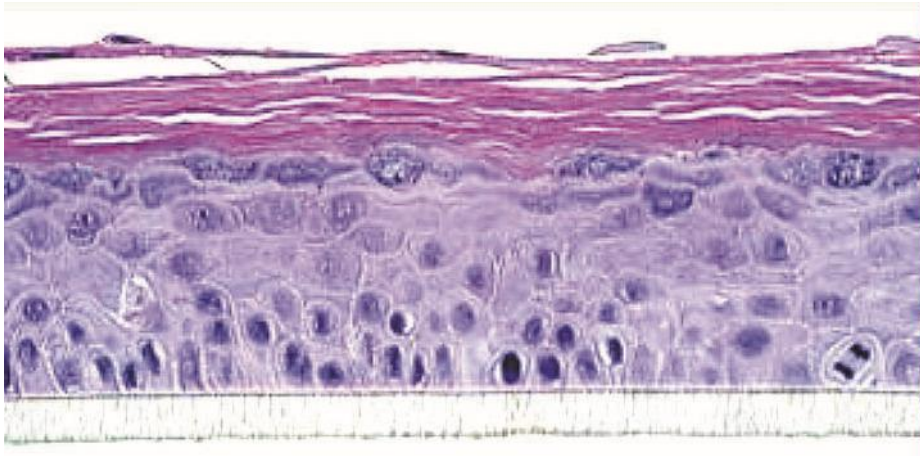
これからもステークホルダーの皆様のご意見を参考にさせていただき、安全で環境にやさしい商品開発を進めてまいります。

目次

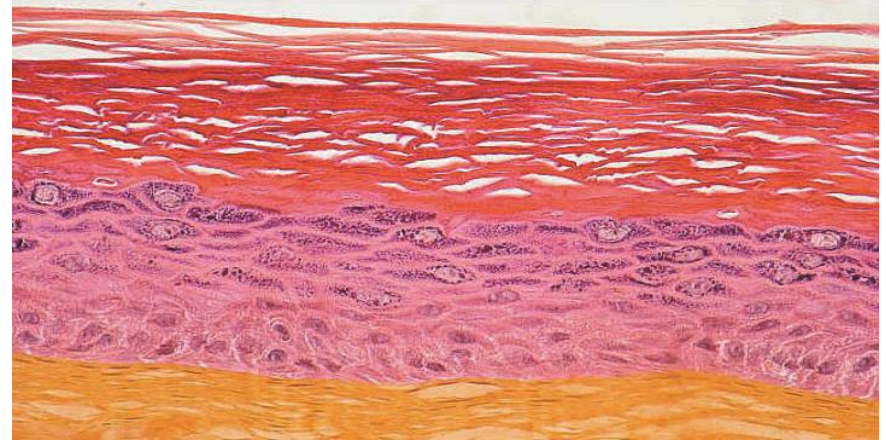
- 三次元培養モデルの種類
- 三次元培養モデルを用いたテストガイドライン
- 三次元培養を用いた昨今の研究
- 試験法のバリデーション

三次元培養モデルの種類

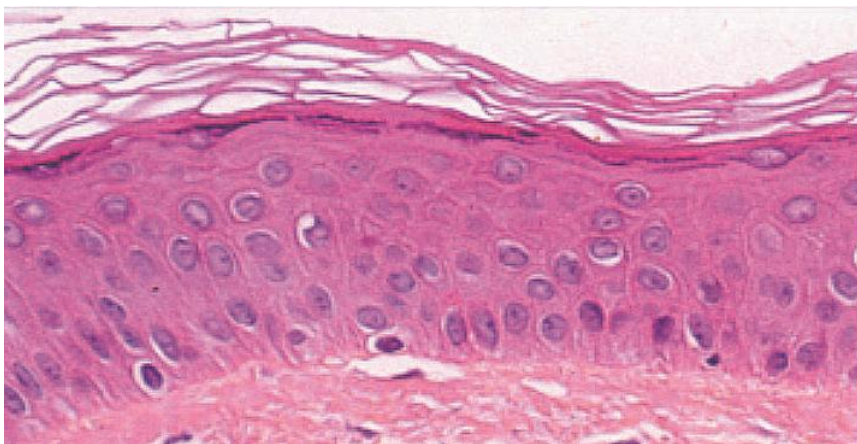
再生ヒト表皮モデル



SkinEthics



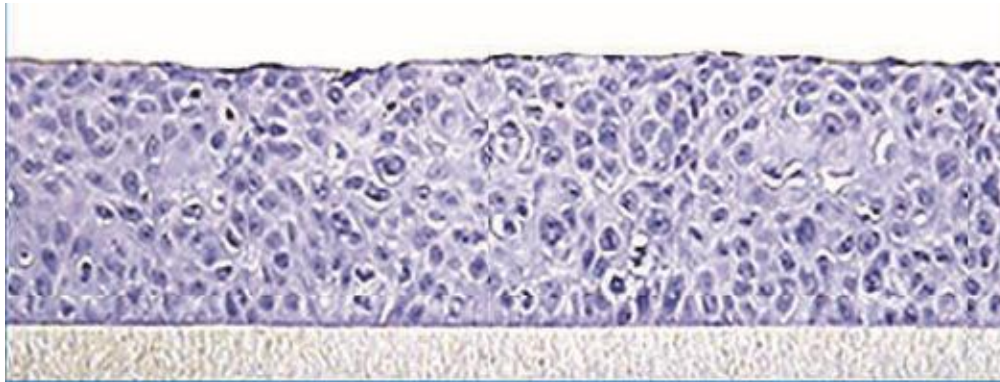
EPISKIN



in vivo

利用方法：
皮膚腐食性試験、
皮膚刺激性試験、
光毒性試験、
経皮吸収試験および代謝など

再生ヒト角膜上皮モデル



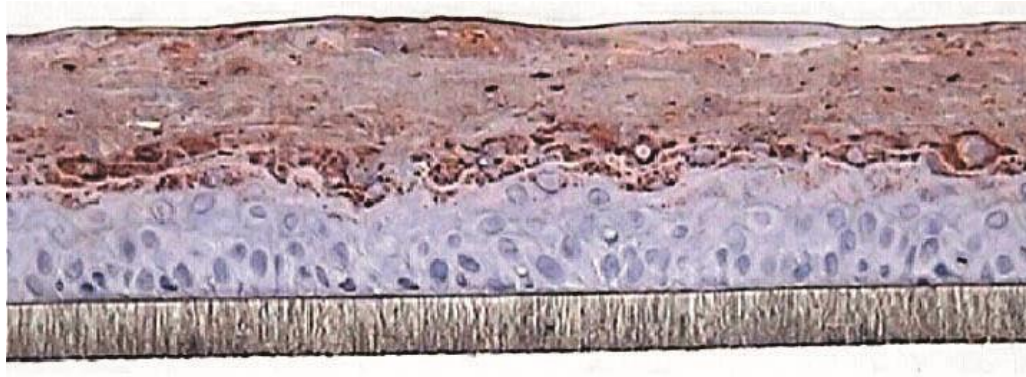
SkinEthic™ HCE



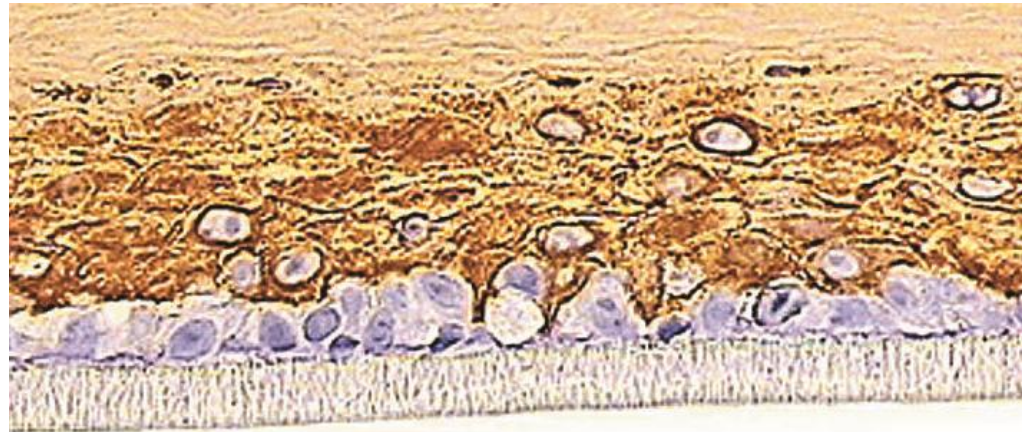
in vivo

利用方法：
眼性試験、角膜透過性試験および代謝など

再生ヒト角膜上皮モデルの免疫染色像

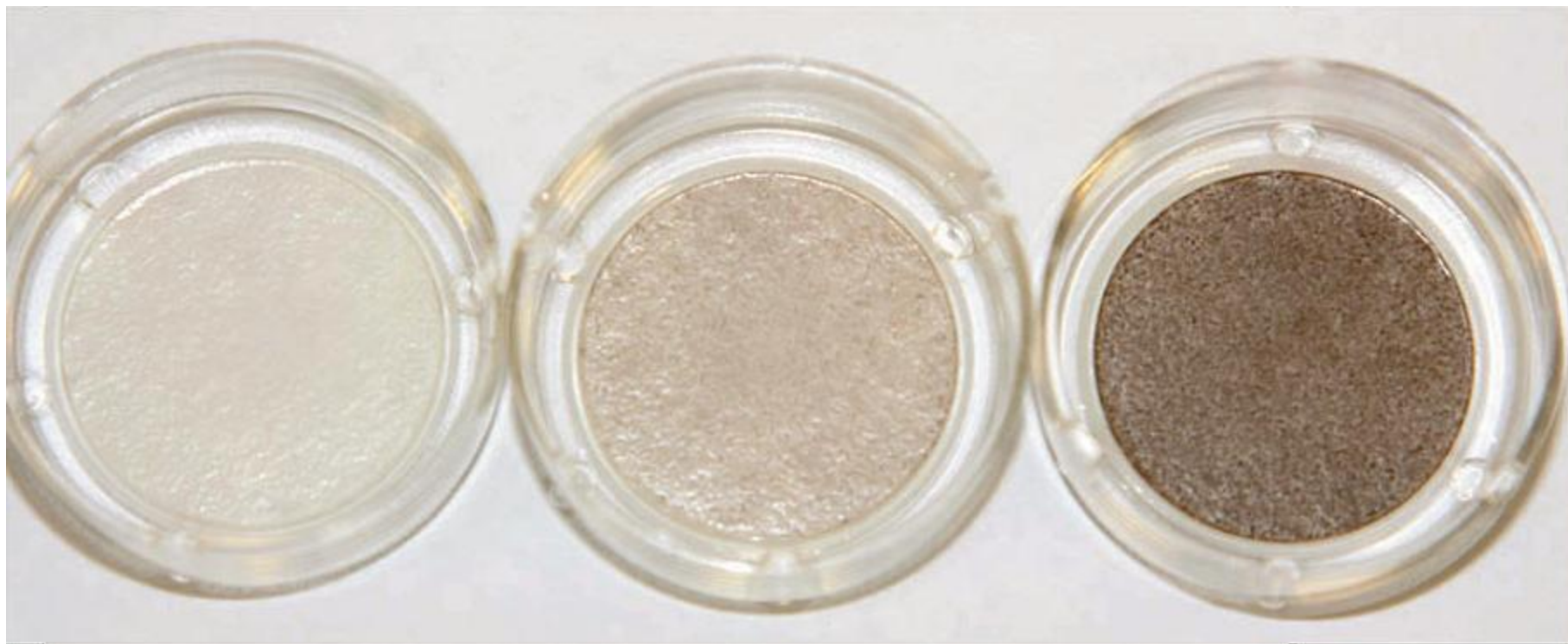


Filaggrin



Keratin 10

メラノサイト入り再生ヒト表皮モデル



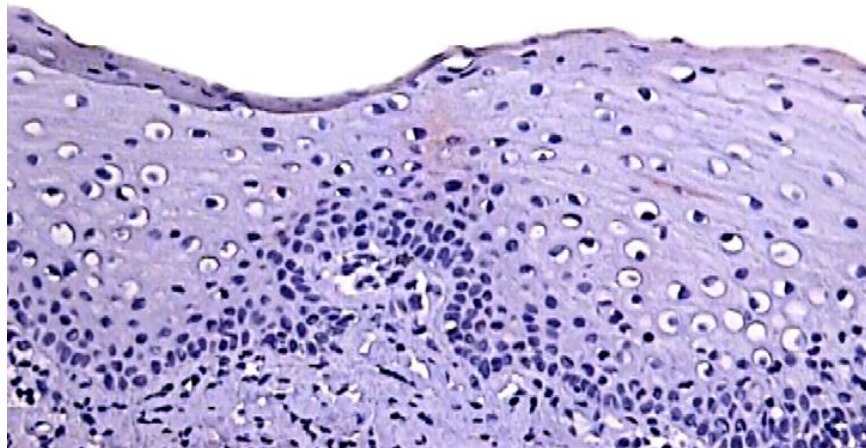
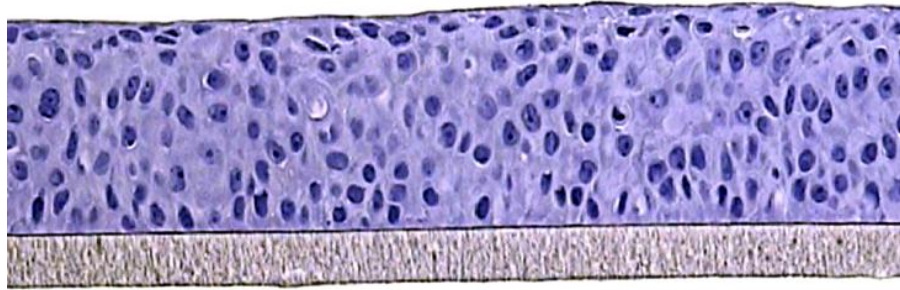
利用方法:メラニン生成抑制効果の検証、黒化作用機構の研究

メラノサイト入り再生ヒト表皮モデル



Fontana Masson染色

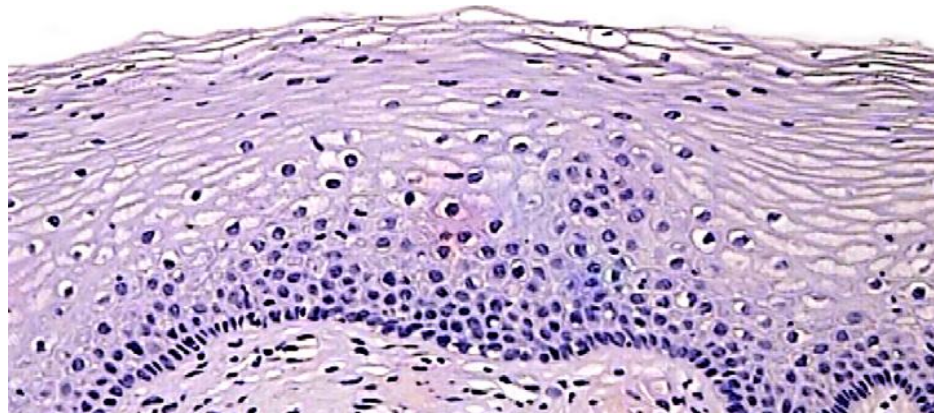
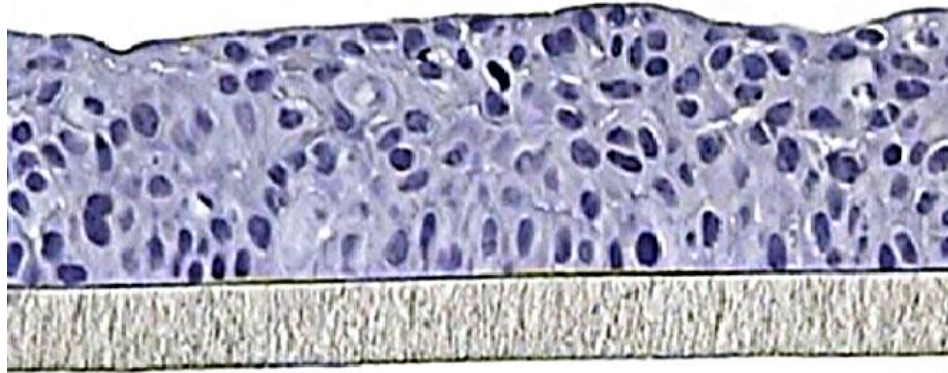
再生ヒト口腔粘膜モデル



in vivo

利用方法:オーラルケア用品・歯科材料の刺激性評価、
口腔粘膜への浸透性と代謝、オーラルケア用品の抗炎症評価など

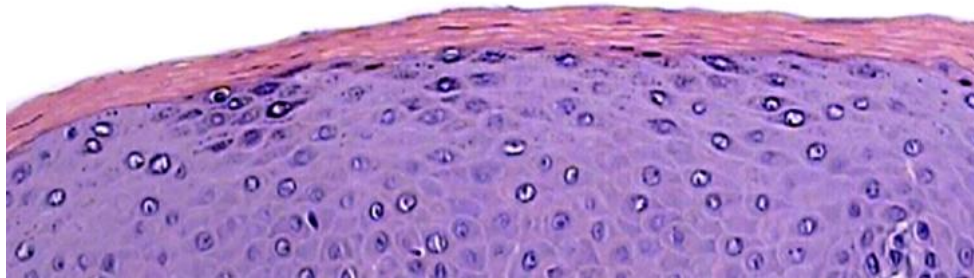
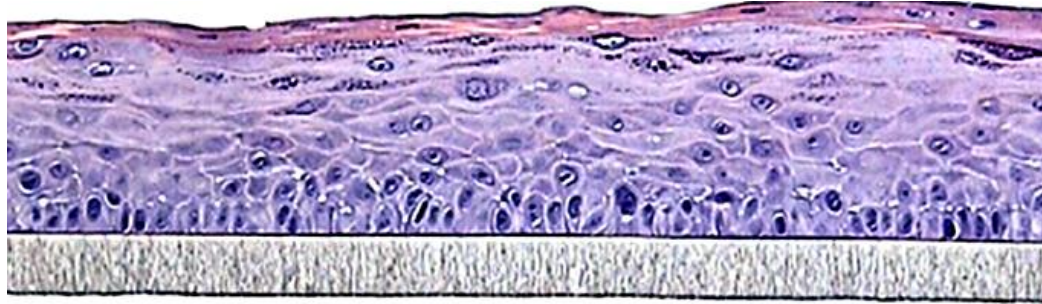
再生ヒト膣粘膜上皮モデル



in vivo

利用方法: 婦人衛生用品・入浴剤・ボディソープなどの膣粘膜刺激性評価、
膣粘膜への浸透性と代謝など

再生ヒト歯肉上皮モデル



in vivo

利用方法:オーラルケア用品・歯科材料の腐食性、刺激性評価、
歯肉への透過性と代謝など

皮膚3次元モデル

▶ 製品・サービス

▶ 核酸自動分離装置

▶ 病理研究製品

▶ バイオイメージング製品

▶ 汎用実験機器

▶ 細胞・組織製品

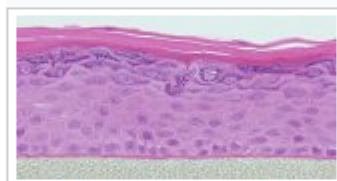
▶ 皮膚3次元モデル

▶ 遺伝子受託サービス

▶ 癌・薬物動態関連

▶ ペプチド関連製品

▶ フィルター



皮膚3次元モデル EPI-200関連製品 EPI-200・212・200X・606・606X・201・296キット

- ・EPI-200,212 NHEKから成る表皮モデル(8mm)
- ・EPI-200SIT,212SIT OECD承認の皮膚刺激性試験専用
- ・EPI-606,296 サイズが異なるモデル
- ・EPI-606X,200X,212X バリア能亢進モデル
- ・EPI-201 角層未熟モデル

▶ 製品の詳細を見る

▶ 製品購入・見積り依頼へ



皮膚3次元モデル OCL-200関連製品 OCL-200・212・200EIT・212EIT・606キット 角膜3次元モデル

- ・OCL-200,212 角膜モデル(8mm)
- ・OCL-200EIT,212EIT 欧州validation実施中の眼刺激性試験専用キット
- ・OCL-606 サイズが大ききモデル

▶ 製品の詳細を見る

▶ 製品購入・見積り依頼へ

HOME

事業内容


会社概要

IR情報


医療関係者向け


採用情報

HOME >> 事業内容 >> 研究開発支援事業

このページを印刷 

事業内容

再生医療製品事業 

研究開発支援事業 

▶ エピ・モデル


▶ エピ・キット


▶ メラノ・モデル


▶ 角膜モデル

- 価格と購入方法
- 出荷予定表
- 学術論文・研究報告
- ラボサイトQ&A
- 資料請求はこちら

EPI-MODEL24
皮膚刺激性試験セット
データシート

皮膚刺激性試験プロトコール
手技ビデオ 

ラボサイト
取扱講習会 

皮膚基礎研究
ワークショップ 

研究開発支援事業

R&D SUPPORT



J-TECでは、医療用培養表皮や培養軟骨の開発で蓄積した高度な培養技術を応用して、研究用ヒト培養組織を開発し、販売しています。研究用ヒト培養組織とは、ヒトの細胞を用いて体外で培養し、再構築させた組織モデルのことです。ヒト組織に極めて近い構造を再現できるため、動物や単純な培養細胞の代替となる種々の実験への適用が可能です。この製品は外用医薬品や化粧品の開発、皮膚を用いた各種研究に使用することができます。

研究用ヒト培養組織ラボサイトシリーズ LabCyte

ヒト3次元培養表皮

EPI-MODEL

エピ・モデル

メラノサイト含有ヒト3次元培養表皮

MELANO-MODEL

メラノ・モデル

ヒト3次元培養角膜上皮

CORNEA-MODEL

角膜モデル

ヒト表皮モデル作製キット

EPI-KIT

エピ・キット

EPI-MODEL24 皮膚刺激性試験セット
データシート

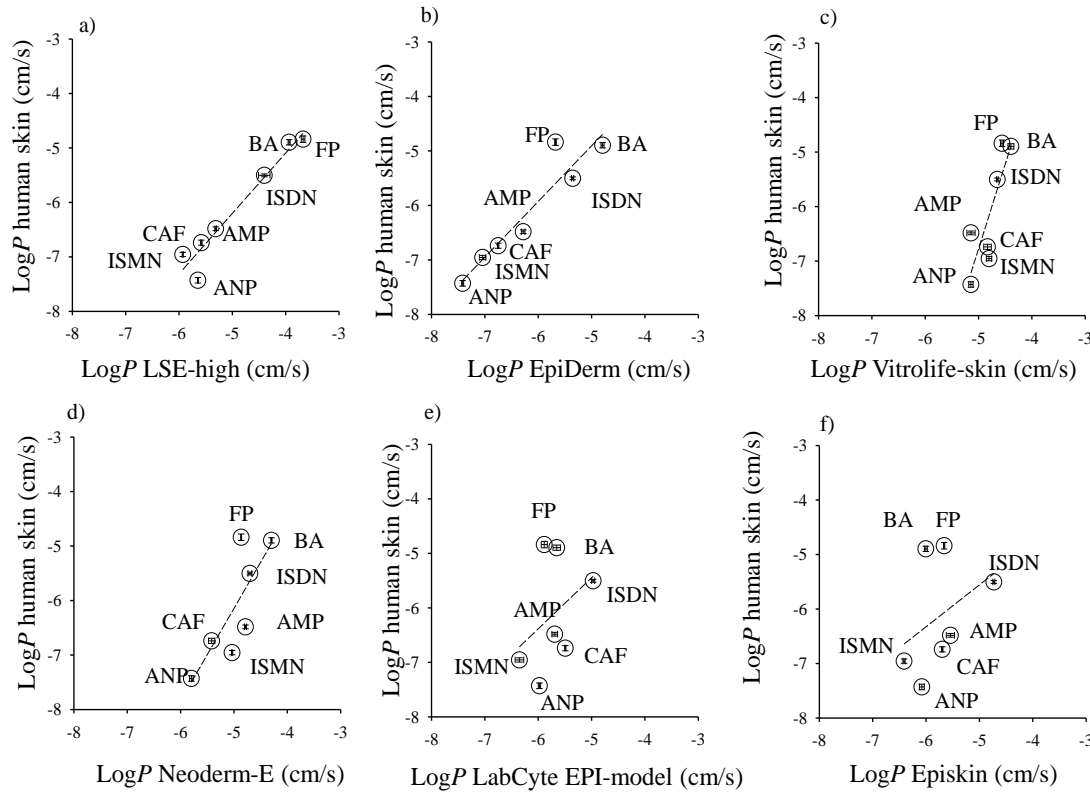
皮膚刺激性試験プロトコール
手技ビデオ 

皮膚刺激性試験を体験してみませんか？

ラボサイト 取扱講習会 

皮膚基礎研究

クラスターフォーラム 



杉林ら引用

Relationships between $\log P$ values in excised human cadaver skin and $\log P$ values in cultured skin models. (a): **LSE-high** versus excised human cadaver skin, (b): **EpiDerm** versus excised human cadaver skin, (c): **Vitrolife-skin** versus excised human cadaver skin, (d): **Neoderm-E** versus excised human cadaver skin, (e): **LabCyte EPI-model** versus excised human cadaver skin, and (f): **Episkin** versus excised human cadaver skin. Each point represents the mean \pm S.E. (n=4-6).

三次元培養モデルの利用

- 安全性評価
難水溶性物質の評価、製品の評価、暴露評価
- 作用機構の解明
二次元培養では機能発現がない物の解明
- 有用性評価
製品の評価

三次元培養モデルを用いたテスト トガイドライン

代替法が
関与した
OECDのTG
(2011)

分類	試験法
皮膚腐食性試験	CORROSITEX Skin Corrosivity Test
	EpiSkin Skin Corrosivity Test
	EpiDerm Skin Corrosivity Test
	Rat TER Skin Corrosivity Test
皮膚刺激性試験	In vitro reconstructed human epidermis (RhE) test methods, EpiDerm, EPISKIN, SkinEthic
光毒性試験	3T3 NRU Phototoxicity Test
眼刺激性試験	Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method
	Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method
皮膚感作性試験	Updated Murine local lymph node assay (LLNA) for skin sensitization (20% 動物数削減)
	Nonradioactive LLNA protocol (LLNA: BrdU-ELISA)
	Nonradioactive LLNA protocol, LLNA:DA
単回投与毒性試験	Up and Down Procedure (UDP)
	Fixed Dose Procedure (FDP)
	Acute Toxic Class Method (ATC)
	Acute inhalation toxicity
	Inhalation toxicity - acute toxic class method
内分泌かく乱スクリーニング	Stably transfected human estrogen receptor- α transcriptional activation assay for detection of estrogenic agonist-activity of chemicals
	H295R Steroidogenesis Assay
遺伝毒性試験	In vitro micronucleus test
	Transgenic rodent in vivo gene mutation assays.
経皮吸収試験	Skin Absorption: In Vitro Method

2012および2013年に成立したOECD TG

Method	Lead Country	International acceptance
BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists	USA	OECD TG 457 (2012)
Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists Test	USA & Japan	OECD updated TG 455 (2012)
Fluorescein Leakage (FL) test method	EU	OECD TG 460 (2012)
Use of anesthetics, analgesics, and humane endpoints for routine use in the TG 405	USA	OECD updated TG 405 (2012)
<i>In vitro</i> skin irritation testing including LabCyte EPI-Model	Japan	OECD TG updated 439 (2013)
Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method	USA & EU	OECD TG updated 437 (2013)
Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method	Netherland	OECD TG updated 438 (2013)
<i>In vitro</i> skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method	EU	OECD TG Updated 431 (2013)
<i>In vitro</i> skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method	EU	OECD TG Updated 431 (2013)

JaCVAMが成立に関与したOECDテストガイドライン

JaCVAMが主導

- **No. 442a: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay Non-RI method (LLNA:DA)**
- **No. 442b: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay Non-RI method (LLNA:BrdU-ELISA)**
- **No.455:The Stable Transfected Human Estrogen Receptor-alpha Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist-Activity of Chemicals**
- **TG439 : Skin irritation assay using LabCyte EPI-MODEL24**

JaCVAMが支援

- **No. 429: Updated Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay**
- **No. 437 Bovine Corneal Opacity and permeability Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants**
- **No. 438 Isolated Chicken Eye Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants**
- **No. 439 In vitro skin Irritation assay**
- **No.457 BG1 Luc ER TA Assay for Detection of Estrogenic Agonist- and antagonist Activity of Chemicals**
- **NO.460 Fluorescein leakage (FL) Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants**

Table with Internationally Accepted Alternative Test Methods for Cosmetic Products/Ingredients Safety Testing, successfully worked upon by ICATM

Method	International Acceptance
<i>Dermal Corrosivity Test Methods</i>	
<i>CORROSITEX Skin Corrosivity Test</i>	OECD TG 435 (2006)
EpiSkin Skin Corrosivity Test. EpiSkin, EpiDerm,	OECD TG 431 (2004)
Rat TER Skin Corrosivity Test	OECD TG 430 (2004)
<i>Dermal Irritation Test Methods</i>	
<i>In vitro</i> reconstructed human epidermis (RhE) test methods EpiDerm; EPISKIN; SkinEthic	OECD TG 439 (2010)
<i>Dermal penetration Test Methods</i>	
Skin Absorption: In Vitro Method	OECD TG 428 (2004)
<i>Phototoxicity Test Methods</i>	
3T3 NRU Phototoxicity Test	OECD TG 432 (2004)
<i>Ocular Toxicity Test Methods</i>	
Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method for identification of ocular corrosives and severe irritants	OECD TG 437 (2009)
Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method	OECD TG 438 (2009)
Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants	OECD TG 460 (2012)
Use of histopathology as an additional endpoint in Ocular safety testing	OECD Guidance Document 160 (2011)

Table with Internationally Accepted Alternative Test Methods for Cosmetic Products/Ingredients Safety Testing, successfully worked upon by ICATM

<i>Acute Toxicity Tests</i>	
<i>In Vitro</i> cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity tests	OECD Guidance document 129 (2010)
<i>Endocrine Disruptor Test Methods</i>	
Performance-Based Test for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists	OECD TG 455 (2012)
H295R Steroidogenesis Assay	OECD TG456 (2011)
BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists	OECD TG 457 (2012)
<i>Genetic Toxicity Test Methods</i>	
Bacterial Reverse Mutation Test	OECD TG471 (1997)
In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test	OECD TG473 (1997)
In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test	OECD TG476 (1997)
<i>In Vitro</i> micronucleus Test	OECD TG 487 (2010)

三次元培養モデルおよび摘出組織に関するテストガイドライン

分類	試験法
皮膚腐食性試験	<i>Reconstructed human epidermis (RHE) test method</i> , EpiDerm, EPISKIN, SkinEthic, epiCS
	Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER)
皮膚刺激性試験	In vitro reconstructed human epidermis (RhE) test methods, EpiDerm, EPISKIN, SkinEthic, LabCyte EPI-MODEL
眼刺激性試験	Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method
	Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method

OECD/OCDE

437

Adopted:
26 July 2013

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage

OECD/OCDE

438

Adopted:
26 July 2013

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage

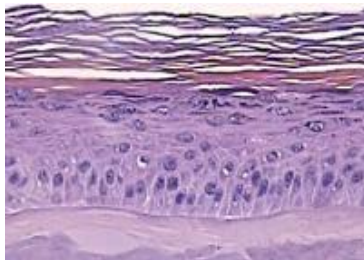
OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS***In vitro* skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method****Table 3: QC batch release criteria**

	Lower acceptance limit	Upper acceptance limit
EpiSkin™ (SM) (18 hours treatment with SDS)(35)	IC ₅₀ = 1.0 mg/mL	IC ₅₀ = 3.0 mg/mL
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1% Triton X-100)(36)	ET ₅₀ = 4.0 hours	ET ₅₀ = 8.7 hours
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100)(37)	ET ₅₀ = 4.0 hours	ET ₅₀ = 10.0 hours
epiCS®(1% Triton X-100)(38)	ET ₅₀ = 2.0 hours	ET ₅₀ = 7.0 hours

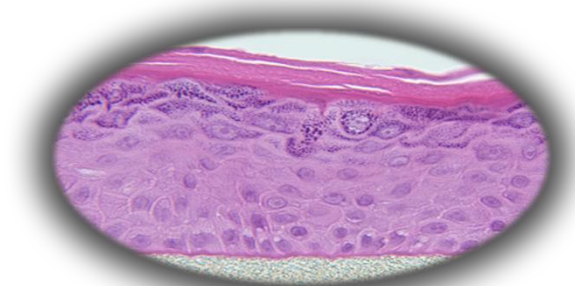
OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method

4. There are three validated test methods that adhere to this Test Guideline. Prevalidation, optimisation and validation studies have been completed for an *in vitro* test method (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), using a RhE model, commercially available as EpiSkin™ (designated the Validated Reference Method – VRM). Two other commercially available *in vitro* skin irritation RhE test methods have shown similar results to the VRM according to PS-based validation (21), and these are the EpiDerm™ SIT (EPI-200) and the SkinEthic™ RHE test methods (22).



EpiSkin



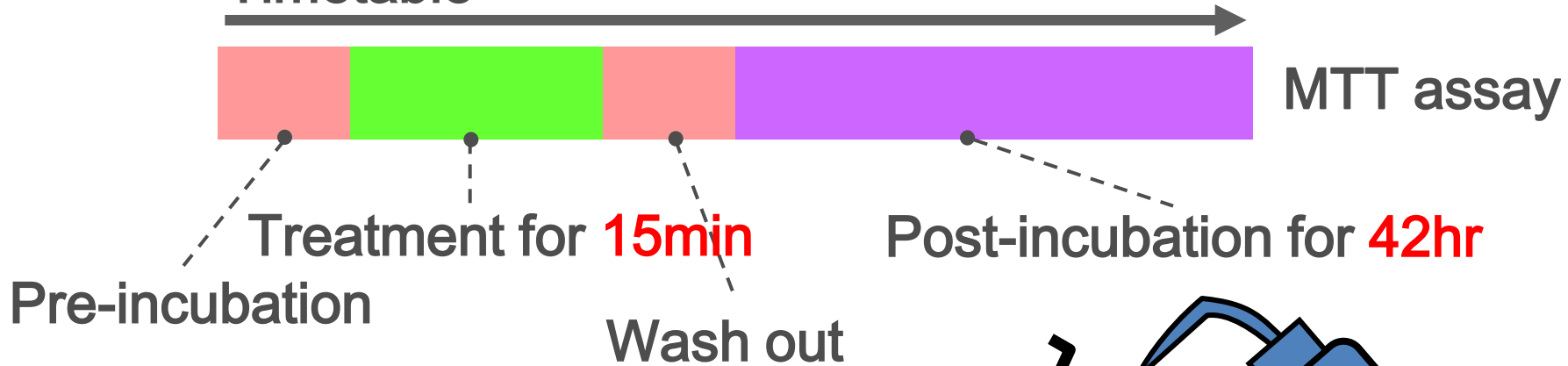
EpiDerm Tissue Model

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS***In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method****Table 3: QC batch release criteria of the test methods included in this TG**

	Lower acceptance limit	Upper acceptance limit
EpiSkin™ (SM) (18 hours treatment with SDS) (27)	IC ₅₀ = 1.0 mg/ml	IC ₅₀ = 3.0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1% Triton X-100) (28)	ET ₅₀ = 4.0 hr	ET ₅₀ = 8.7 hr
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100) (29)	ET ₅₀ = 4.0 hr	ET ₅₀ = 10.0 hr
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 hours treatment with SDS) (40)	IC ₅₀ = 1.4 mg/ml	IC ₅₀ = 4.0 mg/ml

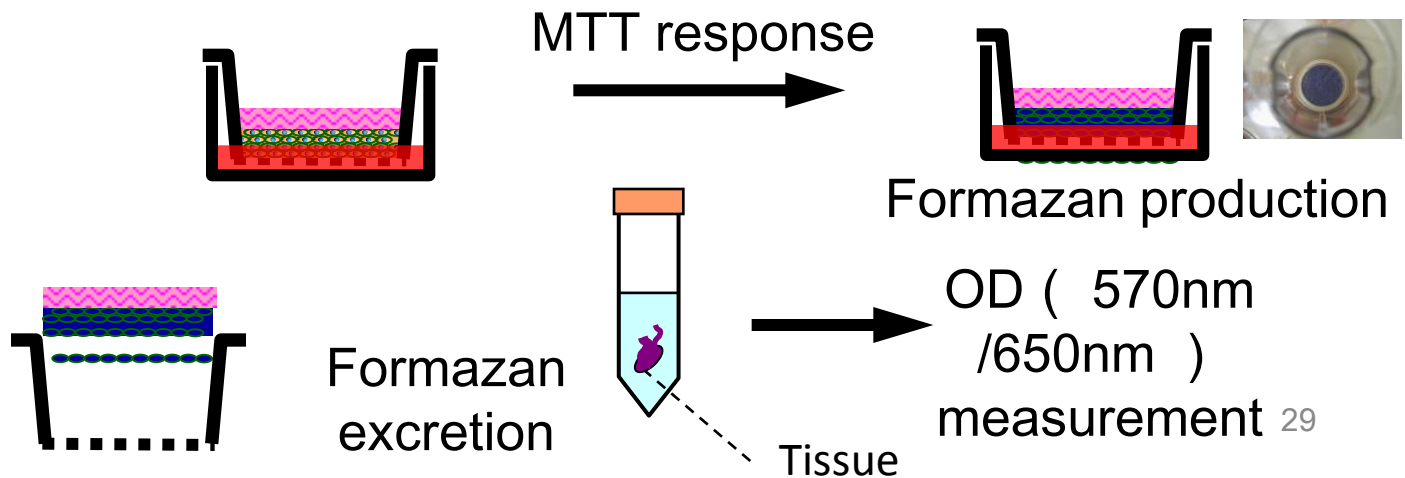
Episkin Protocol

Timetable



MTT assay

Viability



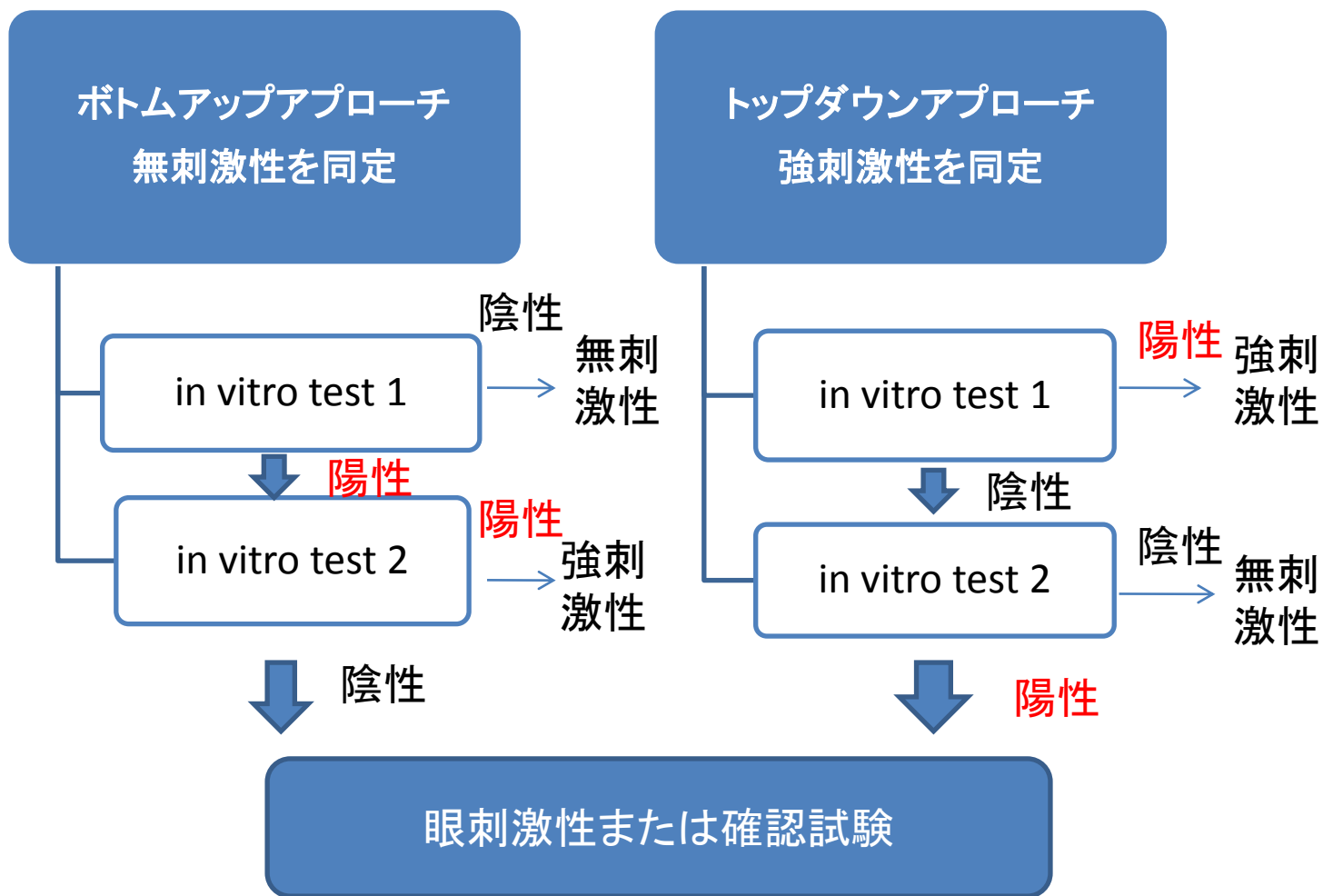
培養表皮モデルを用いた試験法の比較

	TG431	TG439
対象毒性	腐食性	皮膚刺激性
記載キット	EpiSkin™, EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE1, epiCS®	EpiSkin、SkinEthics、EpiDerm、LabCyte-Epi Model
指標	MTTアッセイによる細胞毒性	MTTアッセイによる細胞毒性
処理時間	3分、1時間、4時間 (EpiSkinのみ)	15～60分
回復時間	なし	42時間
予測モデル	生存率15及び50%で腐食性評価、生存率35%で評価 (EpiSkinのみ)	生存率50%でGHS基準2.3を区分
習熟用物質	12	10

三次元培養を用いた昨今の研究

現在の代替法の特徴

- 単独試験法で安全性を担保できる代替法はない。
- 物性、既存物質との比較、構造活性相関、別の代替法との組み合わせが必要である。
- 試験ありきでなく、情報を活用した毒性の想定が重要である。
- 有害性の評価には有用だが、リスク評価はできない。
- 正確性が良くても、偽陰性の多い方法は認められない。



眼刺激性評価における代替法の組合せ

ECVAM-LED VALIDATION STUDIES – EYE IRRITATION (EIVS)

Objective: stand-alone test methods to identify chemicals not classified as eye irritant under GHS for use in a bottom-up testing strategy

Test systems: EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE

Status:

- 104 chemicals selected and undergoing testing in 3 laboratories
- Testing phase **not finished yet, additional tests needed**
- Analysis of data thereafter, Validation Report possibly to ESAC for peer review in March 2014

Note: The test methods are not intended to differentiate between GHS Category 1 (irreversible effects) and 2A-B (reversible effects). This differentiation would be left to another tier of the Bottom-up/Top-down testing strategy (ECVAM Workshop 2005; Scott et al., 2009).

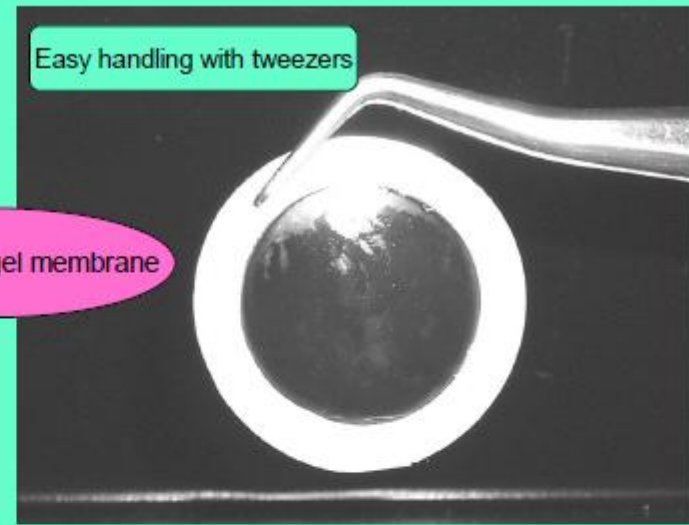
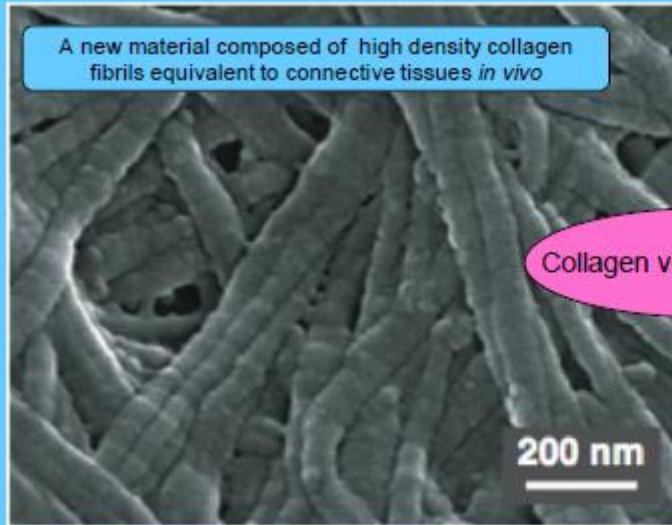


培養角膜モデルLabCyte CORNEA-MODEL24 を用いた眼刺激性試験代替法共同研究

¹小島 肇、²安中 希、³土屋成一郎、⁴吉武裕一郎、⁵許 睿、⁶鈴木 克、⁷嶋谷 亘、⁸梶田明美、⁹中村 牧、¹⁰渡辺美香、¹¹中嶋圓、¹²坂本興嗣、¹³竹田竜嗣、¹⁴久間將義、¹⁵池田英史、¹⁶稲垣 愛美、¹⁷棟近由記美、¹⁸山本 裕、¹⁹笠原利彦、²⁰福田隆之、²¹仲原 聡、²²渡辺真一、²³倉田 隼人、²⁴篠田伸介、²⁵加藤雅一

- ¹国立医薬品食品衛生研究所、²(株)アイビー化粧品、³石原産業(株)、⁴オッペン化粧品(株)、⁵花王(株)、⁶(一財)化学物質評価研究機構、⁷(株)化合物安全性研究所、⁸(株)鎌倉テクノサイエンス、⁹小林製薬(株)、¹⁰(財)食品薬品安全センター秦野研究所、¹¹(公財)食品農医薬品安全性評価センター、¹²大正製薬(株)、¹³DRC(株)、¹⁴東洋ビューティ(株)、¹⁵日本コルマー(株)、¹⁶(財)日本食品分析センター、¹⁷日本農薬(株)、¹⁸(株)ノエビア、¹⁹富士フィルム(株)、²⁰(株)ボゾリサーチセンター、²¹(株)マンダム、²²ライオン(株)、²³ロート製薬(株)、²⁴(株)薬物安全性試験センター、²⁵(株)ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング

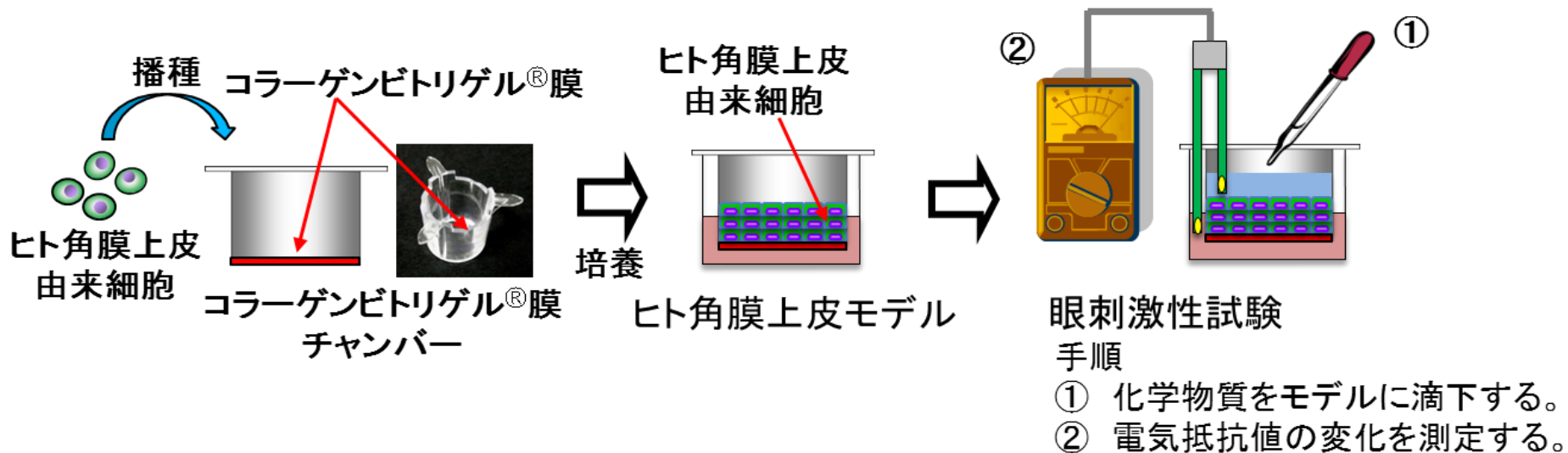
Background- 1 : Collagen vitrigel membrane (CVM)



Takezawa T, *et al.*, Cell Transplantation, 13: 463-473, 2004
Takezawa T, *et al.*, Tissue Engineering, 13: 1357-1366, 2007

Takezawa T, *et al.*, Cell Tissues Organs, 185: 237-4241, 2007
Takezawa T, *et al.*, Yakugaku Zasshi, 130: 565-574, 2010

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



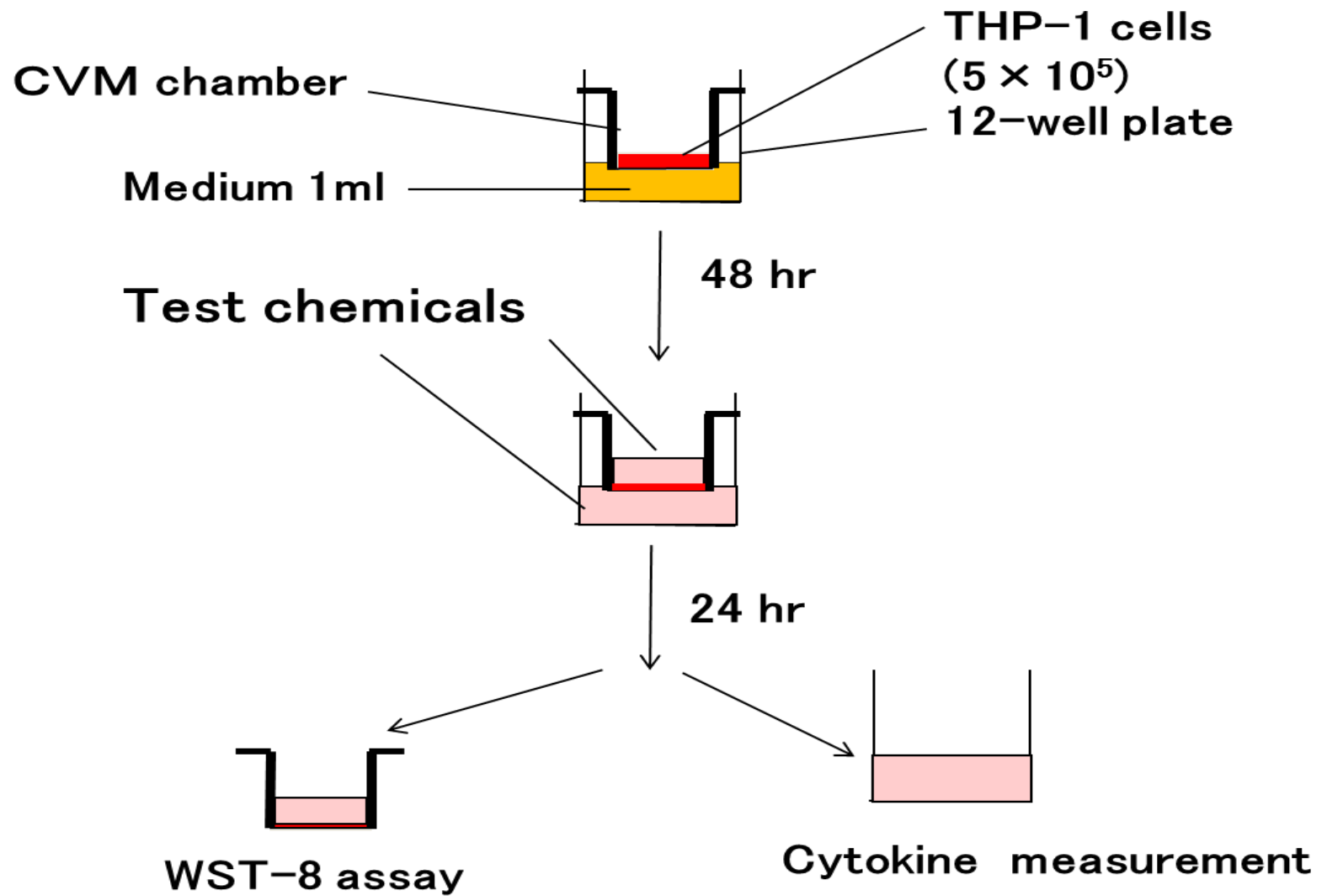
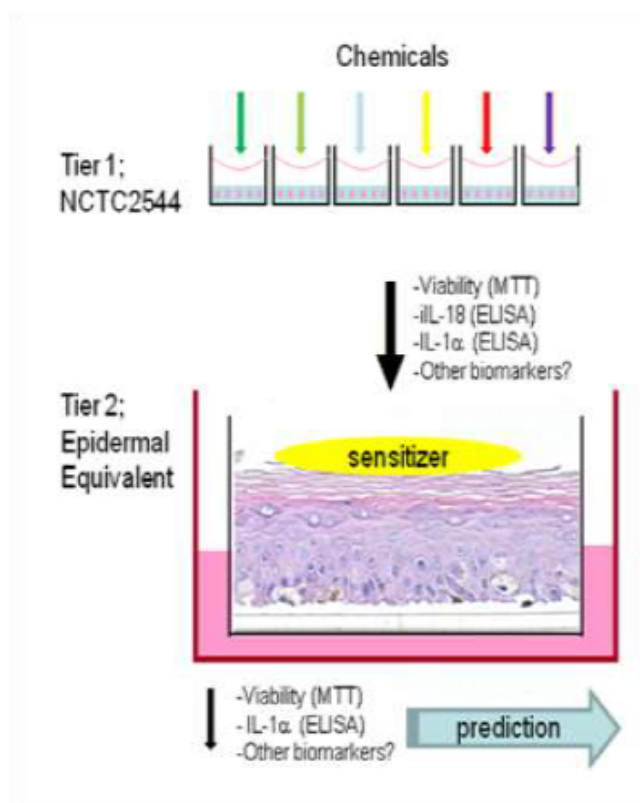


Fig.1 Vitrigel-SST model

A 2-tiered approach for identification and classification of skin sensitizers



• Identification of contact sensitizers in Tier 1

-IL-18 expression

- Identification of potency of sensitizers in Tier 2

- EC50, MTT

- IL-1 α expression

NCTC2544/IL-18:

- 30 chemicals tested
- WLR: >95%
- Transferable
- BLR: >95%
- Accuracy: 97% (labeling)

RHE potency test:

- 16 chemicals tested
- WLR: >95%
- Transferable
- BLR: >95%
- Concordancy: 92% (classification)

Assessed by Cosmetics Europe

- 10 coded compounds

GENOTOXICITY; COLIPA-led validation study

Study Objective:

Pre-validate the micronucleus test and the comet assay in reconstructed human epidermis models (*ECVAM involved in steering committee, sponsoring one lab & statistical support*)

Test System: EpiDerm™

State of play:

- Testing phase finished in 2013
- Analysis of data ongoing

No Change

R社の掲げる万能細胞ビジネス(次世代バイオ産業)

HPより借用

事業領域	研究試薬 研究機器	創薬支援	テラーメイド 医療	再生医療
実現時期	現在	現在～5年後	5～10年後	5～20年後
市場規模	数百億円	数千億円	数兆円	数兆円
事業モデル	培地・抗体 研究用細胞 デバイス 機器	創薬モデル細胞 創薬用デバイス 検査受託	検査受託 細胞加工 細胞バンキング	医療用細胞 細胞バンキング

本シンポジウムの論点

iPS細胞を用いた試験法の必要性

- 創薬支援

- 1) 創薬の短期スクリーニング

- 2) ヒト組織(正常、疾病患者)の利用

- 3) ヒト臓器モデルの利用

- 行政的な受入れ

- 1) 高いレベルの安全性確保に期待

- 2) 国際的なハーモナイゼーション

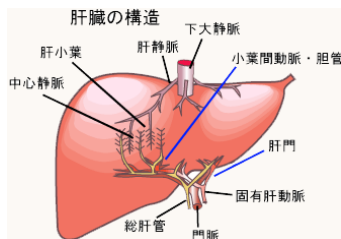
新しい安全性試験法などは国際的にその妥当性が認められて初めて広く使うことができる。

従来の有害性評価試験法の課題

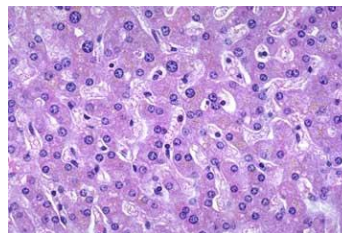


in vivo

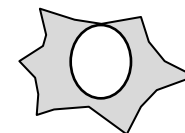
個体



組織



培養細胞



in vitro

生体の反応を反映しているか？ 予測精度が高いか？ **「In vivo とin vitroの壁」**

精度高い



精度低い

効率よい評価系か？ (コスト、スピード)

高い、処理が大変

動物を用いたin vivo実験 → **実績や信頼性はあるが、効率が悪い。**

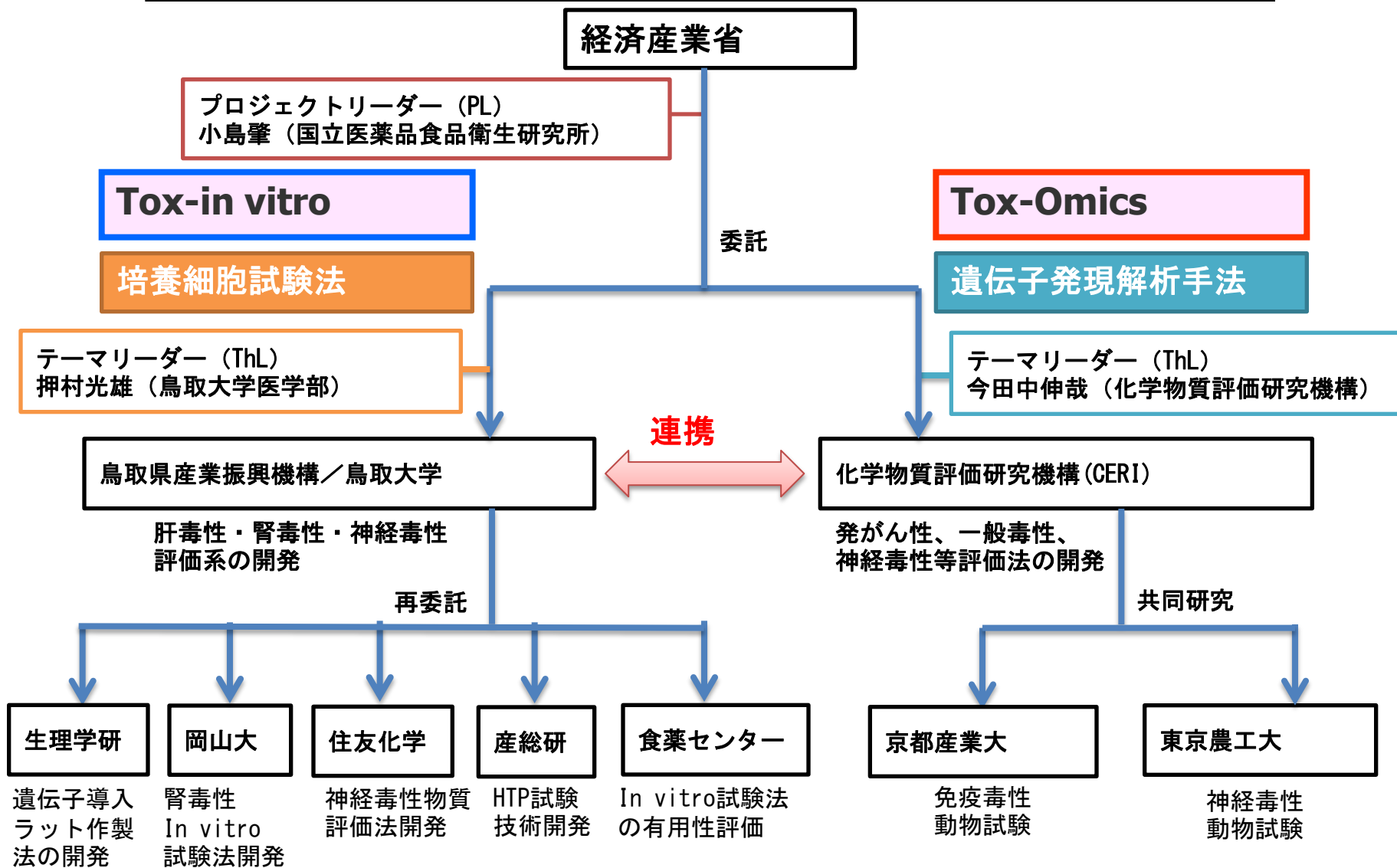
細胞を用いたin vitro実験 → **効率が良くハイスループット化可能**

安い、多検体可能、HTS

本邦発の先端技術を用いて**効率が良く、信頼性が高い**試験法を構築するための**基盤システム**を開発する

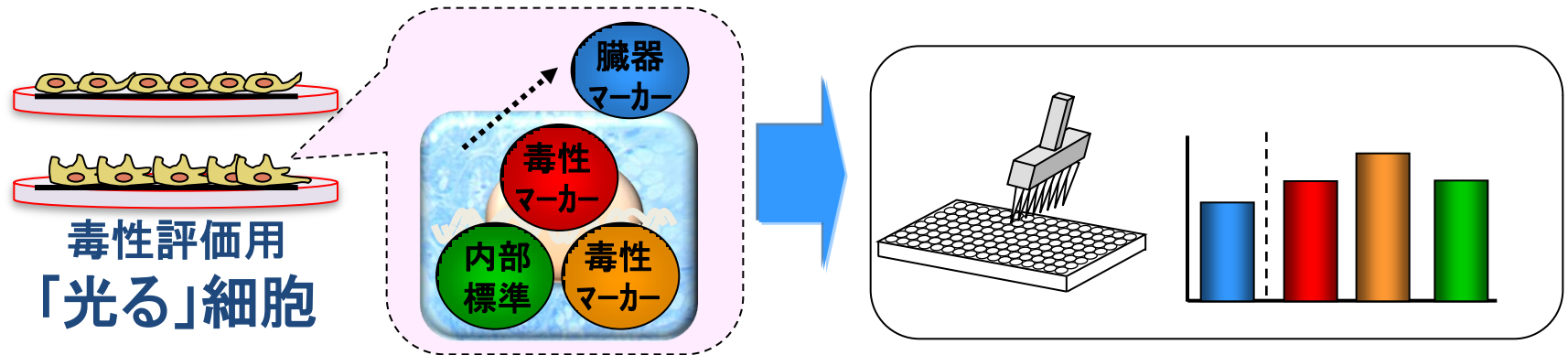
→ **様々なエンドポイント**に対応した**有害性評価手法**の開発が可能

プロジェクトの実施体制 (ARCH-Tox)



新しい in vitro 有害性評価システム

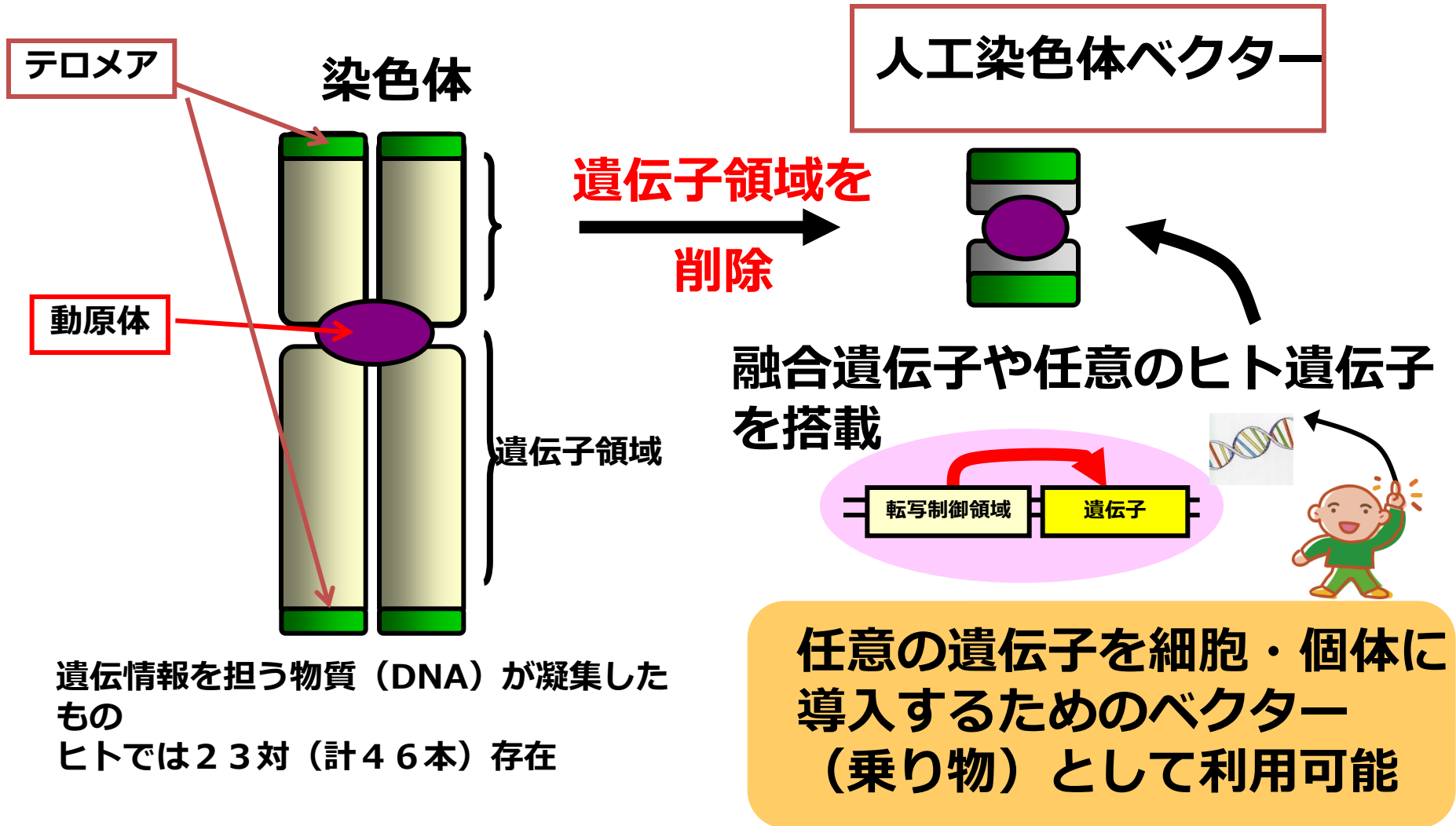
- ① 28日間反復投与動物試験を**遺伝子導入した細胞**を用い **in vitro試験法で補完**できる有害性スクリーニングシステム
- ② **迅速かつ低コスト**で評価できる。
- ③ ガイドライン化を目指した**信頼性(再現性)の高い**試験法である。



最新の技術を活用

- 1) **人工染色体ベクター**・・・高品質な遺伝子導入細胞の樹立
- 2) **多色多様発光システム**・・・毒性を発光で定量化
- 3) **遺伝子導入キメラマウス**・・・in vitroと in vivoの比較解析
- 4) **細胞培養技術**・・・初代培養細胞/組織幹細胞の三次元培養

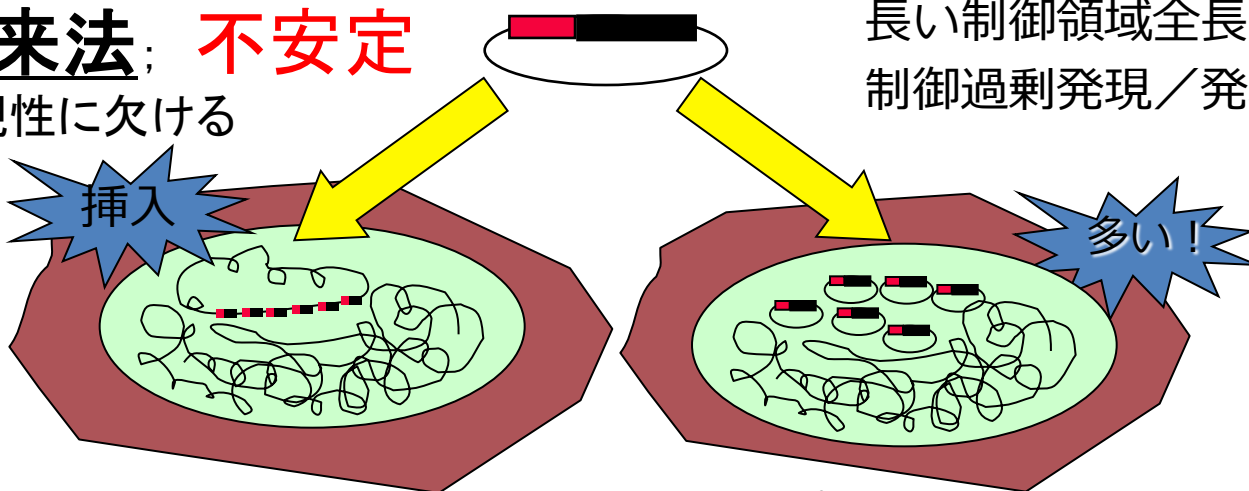
1) 人工染色体ベクター 安定で高品質



ウイルス/プラスミドベクター + 外来遺伝子制御領域 + 遺伝子

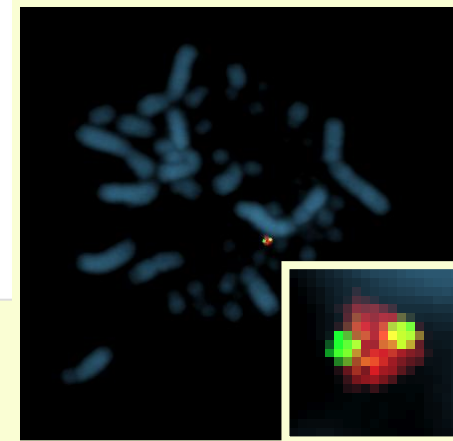
従来法: 不安定

再現性に欠ける



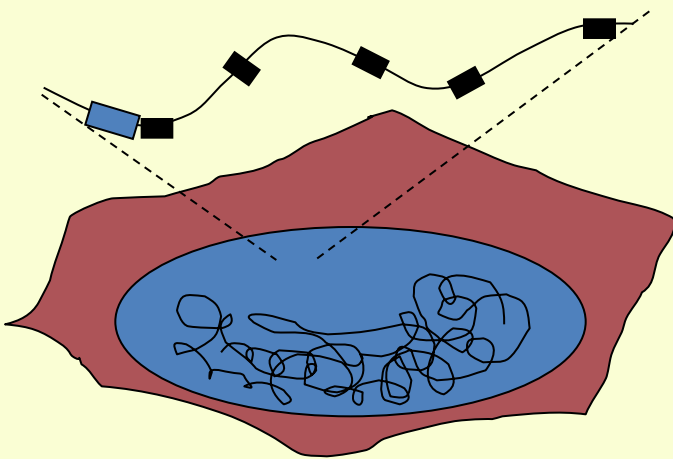
長い制御領域全長を導入できない
制御過剰発現/発現消失が起きる

宿主遺伝子を破壊する可能性がある 導入コピー数のコントロール不可



ヒト人工染色体

人工染色体ベクター (HAC) + ゲノム遺伝子



導入DNAサイズに**制約がない**

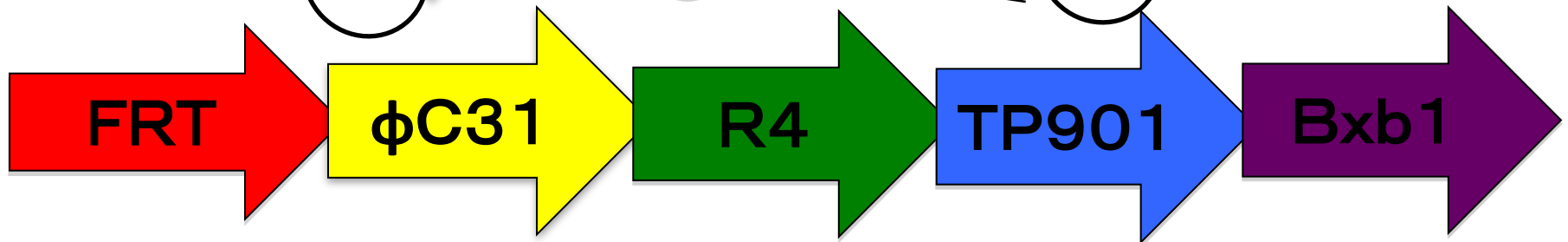
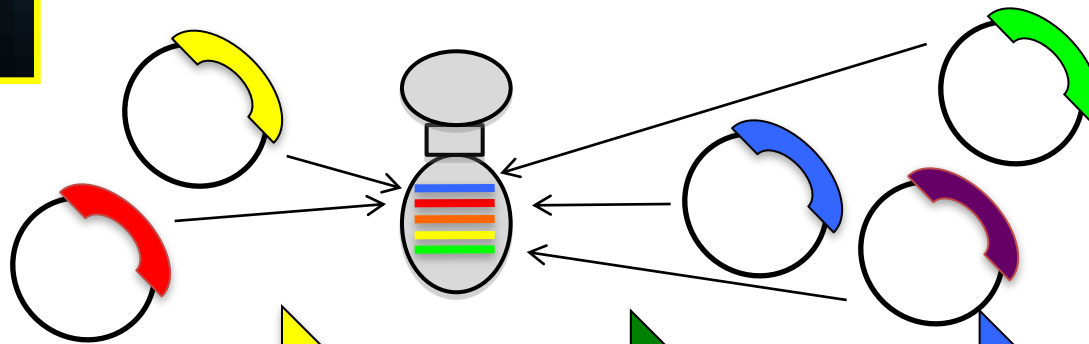
(調節領域を含む遺伝子全長の導入が可能)

複数の遺伝子の導入が可能

宿主細胞の**生理的**発現制御を受ける
過剰発現/発現消失が起きにくい

長期間、安定に機能する

「マルチインテグレーションシステム」
を用いると**複数の遺伝子導入が可能**



最大5カ所に遺伝子を導入可能！
早い、簡単、高性能化

Yamaguchi et al. PloS ONE 2011

2) 多色多様発光技術

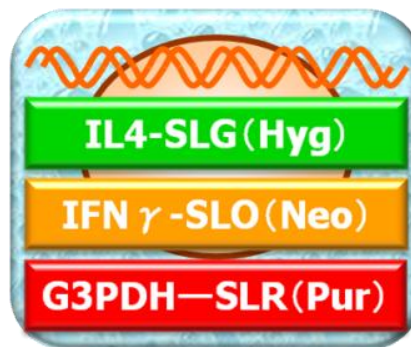
効率的なスクリーニングシステム

3つの遺伝子発現を同時に計測



・マルチ遺伝子転写活性測定システム
 第4385135号、米国US7572629、中国CN1784496、欧州EP1784496

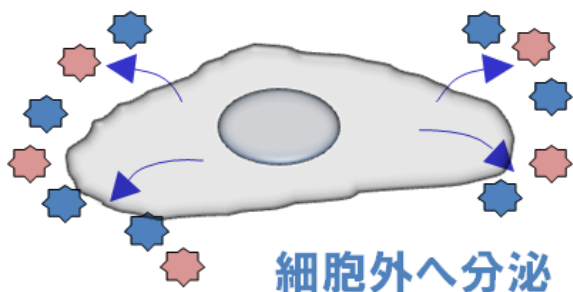
2免疫系・1コントロール遺伝子発現をハイスループットに計測可能



2つの遺伝子発現を分泌液で計測

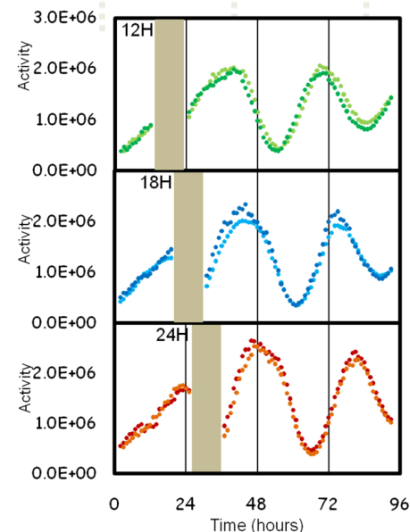


分泌型ルシフェラーゼ Cluc&GLuc



細胞培地 (in vitro)、
 血液や尿 (in vivo)
 で計測可能

・ウミホタルルシフェリン発光基質及びその製造法: PCT/JP2006/319000 日本、EC、中国で審査中、米国公開中
 ・ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子: 日本4484429(H22/04/02)

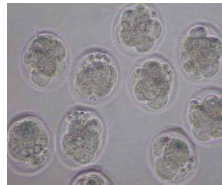
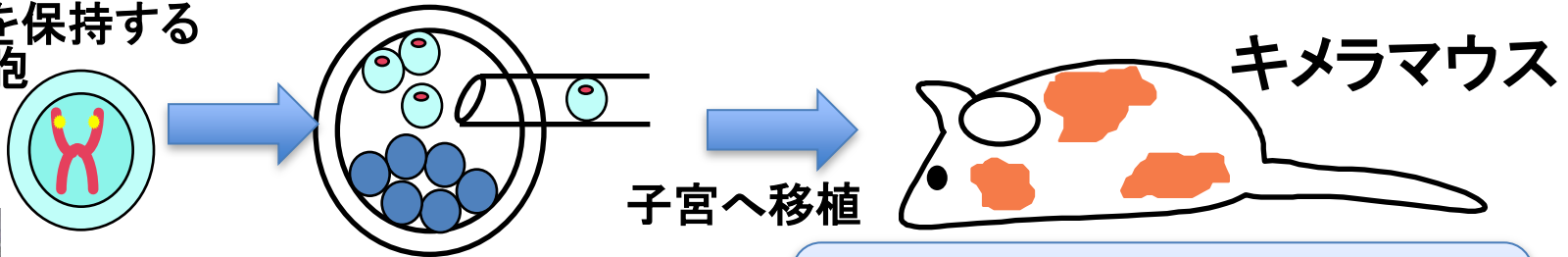


3) 遺伝子導入キメラマウス

in vitro と *in vivo* の壁

→ 人工染色体導入マウス: 「染色体工学」と「発生工学」技術を融合して開発した新しい遺伝子改変動物作製技術

人工染色体を保持する
マウスES細胞



8細胞期胚へ移植

事業化実施例: ヒト化抗体産生マウス
協和キリンで医薬品事業の大きな柱となっている。
前臨床8種類、臨床3種の抗体医薬品の開発継続中

人工染色体導入 ES細胞から人工染色体導入キメラマウス作製

胚盤胞補完法

多能性幹細胞から *in vitro* で臓器を作製することは、構成細胞の多様性や3次元的な立体構造を再現する必要があるため **非常に困難**

→ 個体での胚発生を利用して目的の組織(細胞)を構築する。
(再生医療では、ブタにヒトiPS細胞を移植して膵臓を作製する試み)

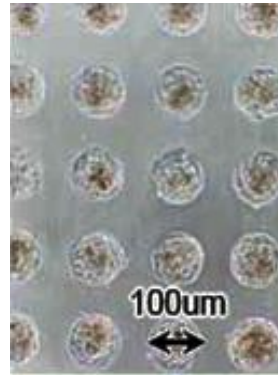
4) 細胞培養技術 三次元培養／幹細胞分化誘導



肝臓



肝スフェロイド



トランスパレント製の三次元培養法

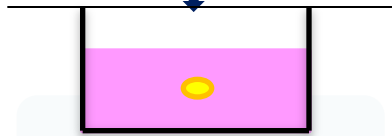
培養3週間後(腎臓様構造)

腎臓



Cell cluster

rKS細胞



Unique culture condition

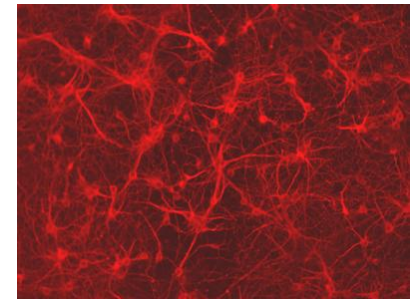
マウスES細胞



分化誘導



神経



岡山大学 喜多村

ラットよりrKS細胞を樹立、試験管内で腎臓様構造体の作製に成功

【Kitamura S et al. FASEB J, 2005)。

Tox-in vitro研究開発の目標

化審法

本研究では、**石油精製化学物質等の反復投与毒性試験の実施**

分解性

蓄積性

28日間反復投与動物試験を培養細胞を用いた*in vitro*試験法で補完できる有害性スクリーニングシステムを開発することで、化学物質の有害性評価を高度化し、迅速かつ効率的な試験の実施に貢献することを目的とする。

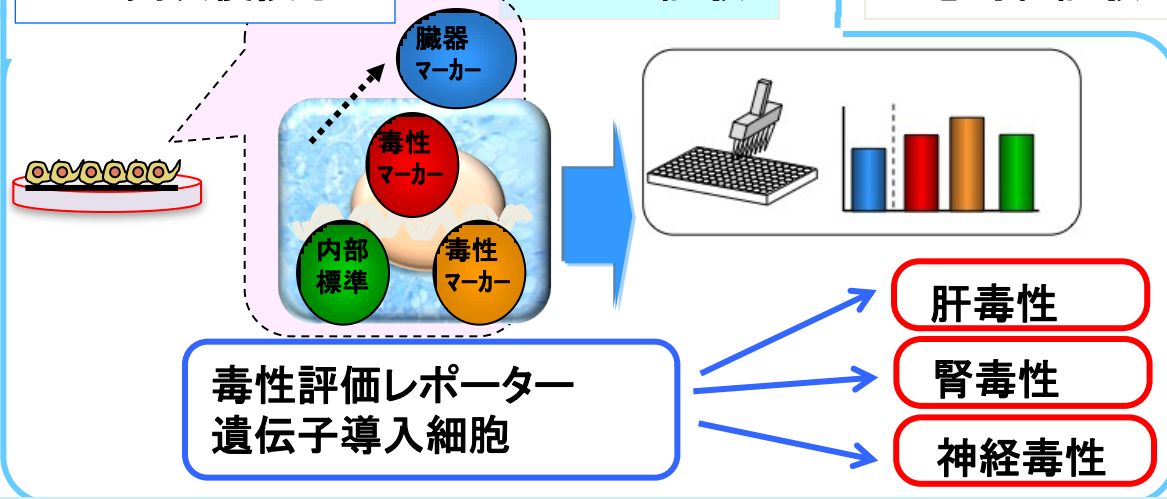
化学物質のスクリーニング毒性試験

28日間反復投与

In vitro試験

生態毒性試験

〔目標〕毒性評価レポーター遺伝子を導入した細胞を用いて、迅速かつ効率良く有害性を評価できる新たな試験法を開発する

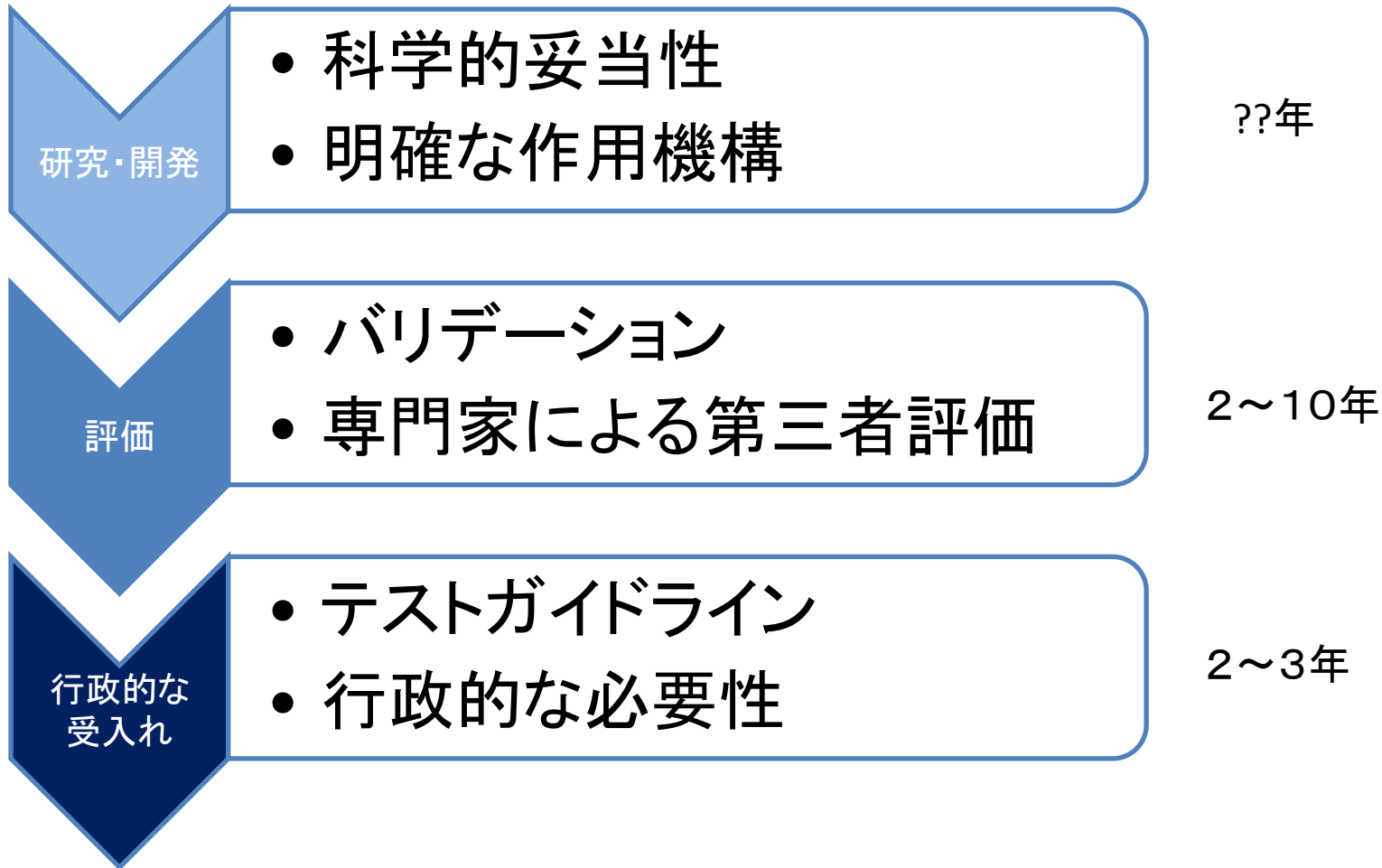


【期待される成果】

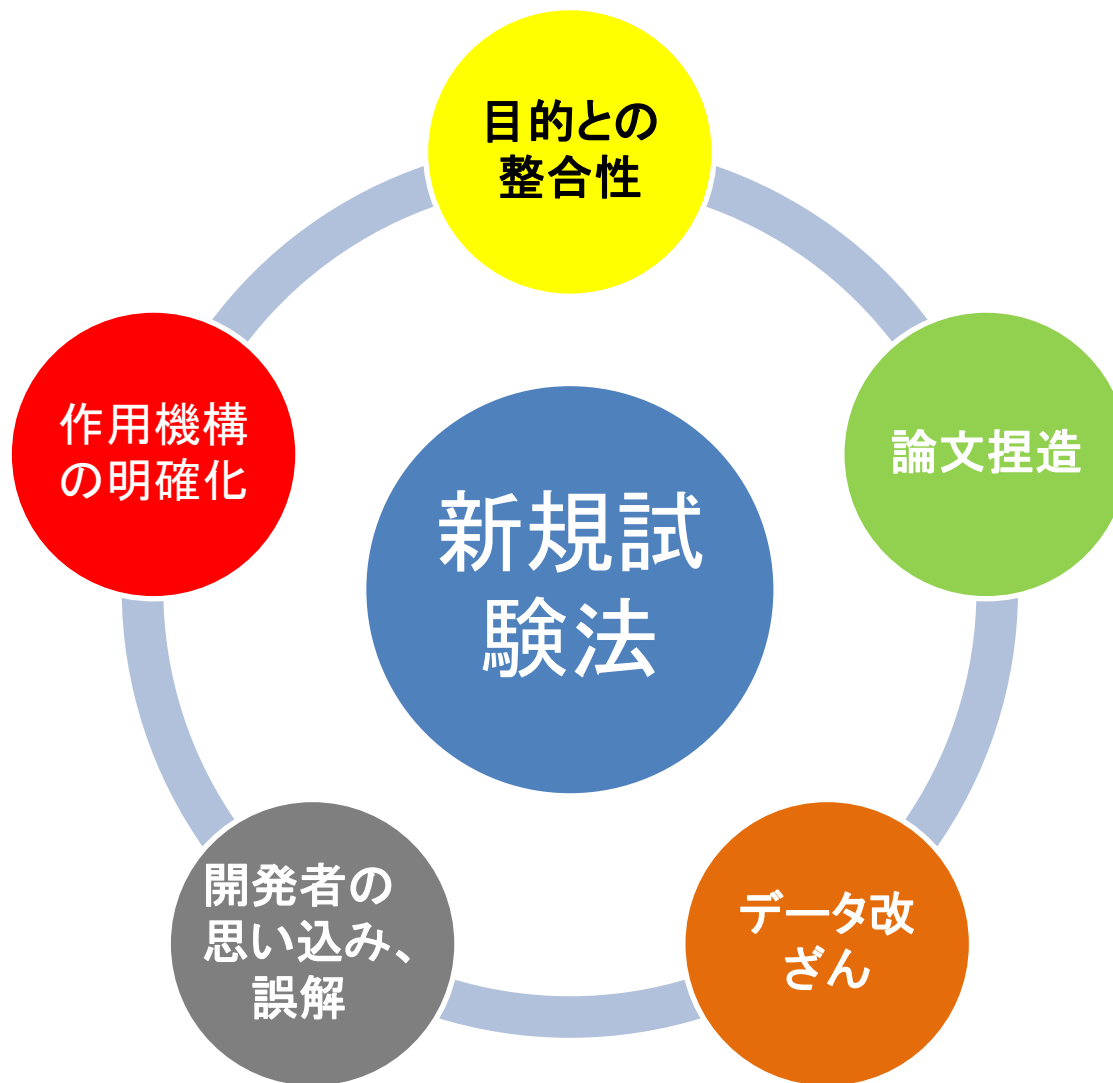
- ✓ **時間削減/費用削減**; HTPスクリーニングにより多検体の迅速な解析が可能
- ✓ **再現性向上/高精度化**; 将来的に国際的ガイドライン化が可能な試験法を開発
- ✓ **複数のエンドポイントの試験法の開発**; 新しい腎毒性、肝毒性、神経毒性試験法
- ✓ **in vitro有害性評価試験法を開発する基盤システムの構築**; 信頼性が高く、効率の良いスクリーニング手法を開発する際に広く活用されるメソッドへの発展

試験法のバリデーション

試験法の行政的な受入れまでの経緯



バリデーションが必要な理由



新規毒性試験法におけるバリデーションおよび行政受け入れの過程

試験法の定義

- ・選択または開発
- ・詳細な解説の供与
- ・背景情報の収集

試験プロトコルの正確性と再現性の初期評価

- ・施設内評価
- ・初期の施設間評価
- ・プロトコルの洗練、最適化、最小化

試験プロトコルの正確性と再現性の広範な評価

- ・追加の施設間評価
- ・データの蓄積
- ・プロトコルの確定

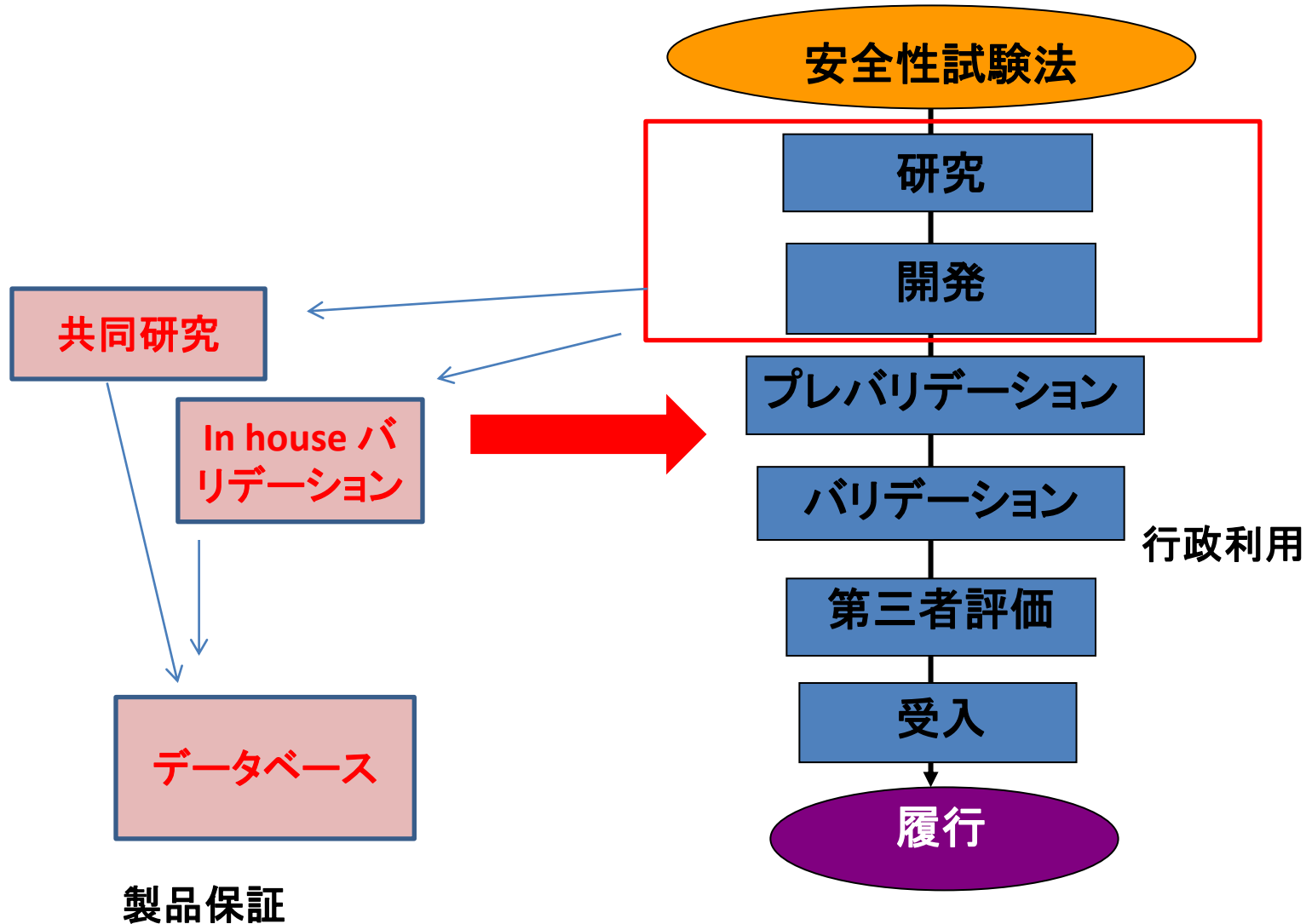
総合評価と結論

- ・専門家による第三者評価
- ・バリデーション研究の結論
- ・推奨、印刷

行政当局による評価および結論

- ・使用法の提案

目的に合わせた試験法の開発と利用





About JaCVAM



Update on JaCVAM



Academic activities



Submission of Alternative
Methods to JaCVAM



International Cooperation

御静聴ありがとうございました

Policy and Mission: JaCVAM's policy and mission is to promote the 3Rs in animal experiments for the evaluation of chemical substance safety in Japan and establish guidelines for new alternative experimental methods through international collaboration.

the 3Rs in animal experiments—Reduction (of animal use)

Refinement (to lessen pain or distress and to enhance animal well-being)

Replacement (of an animal test with one that uses non-animal systems or phylo-genetically lower species)
(OECD GD34)

News

⊕【NEW】news texts dummy texts news texts dummy texts
news texts dummy texts(2009.7.16)

⊕news texts dummy texts news texts (2009.7.3)

⊕news texts dummy texts news texts dummy texts news
texts dummy texts (2009.7.3)

Contents

⊕About JaCVAM

Message from JaCVAM / Policy and Mission of JaCVAM /

Organization of JaCVAM / Glossary /

Proposal for Engagement Rules

⊕JaCVAM Activities