

ブタ角膜上皮細胞を用いた培養角膜モデルの開発

倉敷芸術科学大学 生命科学部 生命動物科学科
古本佳代、青木実菜、佐々木 洋、柳原裕太、古川敏紀

Keywords: ブタ、角膜、培養モデル

1. 学術的背景・研究目的

ドレイズ眼粘膜刺激性試験法は医薬品、化粧品およびそれらの原料の眼刺激性を評価するための方法として国際的に認められている。しかしながらこの方法はウサギの眼に眼刺激性を評価したいサンプルを塗布あるいは滴下し、一定時間後に瞼、角膜、結膜等を観察し、流涙、浮腫、瞼の閉塞、上皮の壊死、混濁などの変化により判定することから、動物愛護の観点から大きな批判を招いている。さらにヨーロッパでは動物実験をした化粧品の販売（輸入も含む）が禁止されており、化粧品におけるリスク評価は*in vitro*代替法による眼科刺激評価に頼らざるを得ない状況になっている。

このような背景から、本研究ではドレイズ眼粘膜刺激性試験法の*in vitro*代替法の確立を最終目的とし、ブタ角膜上皮再構築モデルの開発を行うためのブタ眼球の汚染除去法、角膜上皮細胞の分離法の検討を行った。

2. 概要

(1) 眼球の汚染除去法の検討

産業動物の眼球は無菌的に摘出されないため、角膜上皮細胞を分離するにあたって細菌、真菌等の培養の障害となる微生物を除去する必要がある。ブタ眼球をヨード製剤での処理のみ、ヨード製剤で処理後、抗生剤+抗真菌剤含有のPBS(-)で一晩処理、抗生剤+抗真菌剤含有のPBS(-)で一晩処理、PBS(-)のみで処理し微生物の除去効果を見た。ヨード製剤では安定して微生物を除去できたが、細胞へのダメージも大きく細胞培養にも影響が見られた。

(2) 角膜上皮細胞の分離法の検討

ウサギ角膜上皮細胞の分離方法に従って分離可能であるか検討を行った。ブタ角膜組織片をコラーゲンゲル上に静置(M-starsD培地、10% FBS)、メスで搔爬したブタ角膜上皮組織をコラーゲンゲル上に静置(M-starsD培地、5% FBS)、ブタ角膜組織片をディスペーゼ処理し、細胞を分散後コラーゲンゲル上に播種(DMEM/F12培地、5% FBS、10ng/ml EGF)の条件で培養を行った。細胞の様子を見ながら1-2日おきに培地交換を行った。ディスペーゼ処理による分散法は線維芽細胞の混入が少なく、回収細胞数が多かった。

3. 今後の展望

今後はブタ角膜上皮細胞の培養により適した培地、および3次元培養に適したフィーダー細胞の検討を行い、角膜上皮再構築モデルの作成を行う。さらにこの角膜上皮再構築モデルを用いて、動物における反応とメカニズム上の類似性を検討し、*in vitro*代替法の確立へとつなげていきたい。