JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	膜ダイナミクスを利用した動物実験代替法
Author(s)	高木，昌宏
Citation	科学研究費助成事業研究成果報告書：1-5
Issue Date	2015-06-03
Type	Research Paper
Text version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/10119/12829
Rights	
Description	研究種目：挑戦的萌芽研究，研究期間：2013～2014，課題番号：25630374，研究者番号：00183434，研究分野：生体機能工学

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月　 ３ 日現在

機関番号：１３３０２
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2013～2014
課題番号：２５６３０３７４

研究課題名（和文）膜ダイナミクスを利用した動物実験代替法

研究課題名（英文）Development of an alternative method to animal test for evaluation of skin-irritation

研究代表者
高木　昌宏（TAKAGI, Masahiro）

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・教授

研究者番号：００１８３４３４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：界面活性剤の皮膚刺激評価法に動物実験（ドレイズ試験）があるが、代替法の開発が望まれる。リポソームに界面活性剤を添加することで起きる、膜ダイナミクスを解析し、皮膚刺激性の関係を考察した。高刺激性界面活性剤ではリポソームが膜揺らぎを経て膜陥入した後に、膜孔を形成するダイナミクスを観察した。低刺激性界面活性剤では膜揺らぎを経て破裂するダイナミクスを観察した。刺激が起こるメカニズムについて分子レベルで考察し、ダイナミクスの背景、そして皮膚刺激の背景には、膜断面積の増減、フリップフロップが関係していると考え、分子レベルでのモデルを構築した。リポソームの膜ダイナミクスは、代替法の有力候補である。

研究成果の概要（英文）：We studied about development of an alternative method of Draize test(Animal Test for Skin Irritation). Comparing the membrane dynamics of TritonX-100(Irritant) with that of Tween20 (Non-irritant), we considered that the degrees of irritation by surfactants could be predicted qualitatively. The dynamics induced by SLES was similar to that induced by TritonX-100. On the other hand, the dynamics induced by amino acid surfactants(FLDS-L, ACMT-L) were similar to the dynamics induced by Tween20.
We observed the membrane invagination and pore formation for irritating surfactant. On the other hand, the large deformation could not be observed in the case of non-irritating surfactant. The deformation process was analyzed by the acquisition of the excess surface area. In order to acquire the excess surface area, the surfactant molecules should be included in the inner leaflet of bilayers to obtain the excess surface area. Based on this idea, we proposed a new model for skin-irritation.

研究分野：生体機能工学

キーワード：リポソーム　界面活性剤　皮膚刺激性　動物実験代替法

１．研究開始当初の背景

「ドレイズ法」は、1944 年に毒性学者ジョン・ドレイズ（John H. Draize）らにより考案された、拘束したウサギの眼に対し試験物質を適用して、その応答を調べる急性毒性試験法で、角膜、虹彩、結膜の変化に応じたスコアにより刺激性を定量化する方法である(OECD Test Guideline 405)。2006 年度に使用されたウサギは 24 万羽で、試験後に殺処分されたことが知られている。近年中に、化粧品の安全性試験における動物実験の禁止、動物実験が行われた化粧品及び原料の販売禁止が決まっており、有効な代替法の開発が望まれている。

痛み等の刺激性には、プロスタグランジンなどの脂質メディエーターが深く関与しており、細胞膜は、刺激と密接に関係がある事が分かっているが、その詳細は明らかになっていない。

我々は、直径 10 ミクロン以上の細胞サイズ巨大リポソームに関する研究を行っており、「脂質ラフト」を備えたリポソームや、生細胞の特徴である内外で組成の異なる、「非対称リポソーム」の作製に成功し、特許出願、論文発表を行ってきた(Hamada et al. J.Phys.Chem B 2007, 2008)。これらの技術を用いて、アミロイドペプチドやナノ粒子の細胞毒性に関する研究、人工脂質を用いた可逆的膜構造の制御でも成果を挙げてきた（Hamada et al. JACS 2012, Soft Matter 2012)。

２．研究の目的

細胞モデルとして巨大リポソームを用いて、界面活性剤等の外部刺激により惹起される動的構造変化を画像解析する。例えば、リポソームの揺動波や、収縮スピード等を定量化する。既存のドレイズスコアとの対比に始まり、最終的には、動物実験に匹敵するか、それを凌駕する高い精度で、界面活性剤が引き起こす皮膚刺激性を定量的に解析する方法を開発する（図 1)。

図１：ドレイズ代替法の必要性

髪や体を洗う界面活性剤としては、ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)が頻繁に用いられてきた。しかし、SDS はその高い皮膚浸透性からくる皮膚刺激性を示すことが解っている。皮膚への刺激を抑える目的で、SDS にポリオキシエチレンを結合させて分子量を大きくすることで皮膚への浸透を抑えたラウレス硫酸ナトリウム(SLES)など、様々な界面活性剤が今日まで開発されている。

低刺激性界面活性剤として、アミノ酸系界面活性剤が注目されている。アミノ酸系界面活性剤とは、生物の主要な成分でもあるアミノ酸を構造内の親水基と疎水基の中間部に持つ界面活性剤の総称である。アミノ酸系界面活性剤は、毒性や刺激性が弱いことから安全性が高いと言われている。加えて他の界面活性剤よりも生分解性が高いために、人体や自然環境に対しても影響が少ないと注目されている。こうしたアミノ酸系界面活性剤が低刺激性である明確な根拠や理由はまだ明らかにされていない。

本研究を通して、動物実験代替法を開発する意義に加えて、生物模倣膜のデザインと、生物に対する影響を指標とした、界面活性剤など膜と相互作用する物質の作用メカニズム解析へと発展させるところに、本研究の特色がある。

３．研究の方法

我々は現在、細胞モデル膜として巨大リポソームを作製する技術を有している。これら 3 種類のリポソームについて、皮膚刺激性の界面活性剤がもたらす膜ダイナミクスを定量的に解析し、現状で最も頻繁に用いられている動物実験法である「ドレイズ法」の代替法を開発する。

具体的な方法を以下に記す。

脂質と蛍光試薬

・試薬

1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) (Avanti Polar Lipids)]、Rhodamine DHPE, Glucose, Chloroform, Methanol

・ストック溶液調製法

DOPC(終濃度 2mM)：Chloroform を溶媒として用いて調製した。Rhodamine DHPE(終濃度 0.1mM)：Chloroform を溶媒として用いて調製した。Glucose(終濃度 10mM)：Methanol を溶媒として用いて調製した。

・観察チャンバーの作製

Silicon rubber (2.0 mm), Silicon cover（0.2 mm）Membrane filter（0.4 μm, Nuclepore, Whatman）, Micro cover glass（MATUNAMI, 30×40 mm）

・作製法

Silicon rubber と Silicon cover の間に Membrane filter を配置した。Silicon rubber と Silicon cover の間に Membrane filter を配置したことにより、顕微鏡観察中におけるリポソーム溶液と界面活性剤溶液の混和を可能とした。このチャンバーを用いることにより界面活性剤添加時からリポソーム可溶化

までの動的構造変化をリアルタイム観察することができる。

・顕微鏡観察
試料・試薬

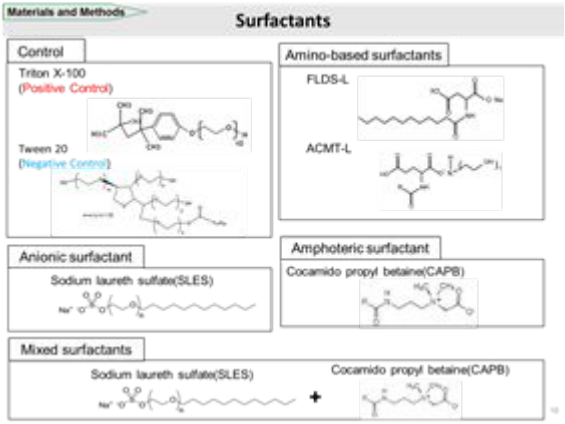

図２：使用した界面活性剤

リポソーム溶液，界面活性剤（図 2），超純水(TritonX100 は、ドレイズ法のポジティブコントロール、Tween20 はドレイズ法のネガティブコントロール)
・使用機器
倒立型リサーチ顕微鏡（IX71，Olympus），共焦点スキャナユニット（CSU10，横河電気），対物レンズ（PlanApoN 60×/1.42），カメラ（IMPACTRON CCD CAMERA，MODEL ADT-33B FLOVEL），レコーダー（RD-E-300，TOSHIBA），観察チャンバー
・観察法
静置水和法によって作製したリポソーム溶液を超純水で 10 倍希釈した。その希釈したリポソーム溶液を silicon cover 側に開けた孔の中に 8μl 入れ Micro cover glass で密閉した。観察用のチャンバーを顕微鏡ステージに乗せ、レーザー光(488nm)をサンプルに照射した。観察対象のリポソームが見つかり次第、録画を開始した。界面活性剤 32μl を silicon rubber 側から添加し、リポソーム動的構造変化を観察した。
・使用ソフトウェア
解析に用いたソフトウェアを以下に示す。
DVD2AVI version 1.85.0.0
Aviutl version 0.99h4
Imagej version 1.4.3.67
Image browser version 4.2.0.121
・解析方法
解析の手順を以下に示す。
1．レコーダーの HD 内に保存された動画を DVD に焼き、PC で読み込んだ。
2．DVD2AVI で DVD を読み込み、データとして保存した。
3．2 で作製したデータを Aviutil で読み込み、解析対象個所を avi ファイルとして保存した。
4．avi ファイルを Imagej で読み込み、コントラスト調製を行った。
5．最後に image browser で画像を読み込み、スケールバーや観察時間を挿入した。

・余剰表面積の解析
時間経過（t）に伴うリポソームの変形について解析した。界面活性剤添加前のリポソーム直径を D、変形後のリポソーム長軸直径を I とし、リポソームの変形を評価した。

４．研究成果
・非イオン性界面活性剤
TritonX-100(positive control)(10,5,1%)を加えたリポソームは、膜ゆらぎを経て膜陥入を引き起こし、最終的にポアを形成して収縮するダイナミクスを示した(図 3)。そして、TritonX-100 は I/D 値が一度増加していることから表面積が増加していた(図４)。

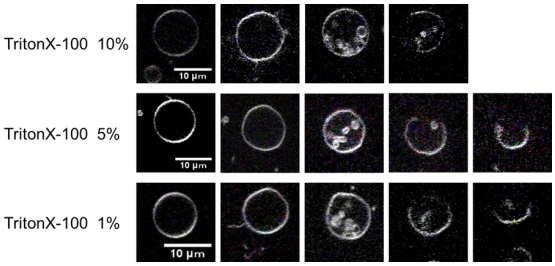

図３：刺激性界面活性剤（TritonX-100）

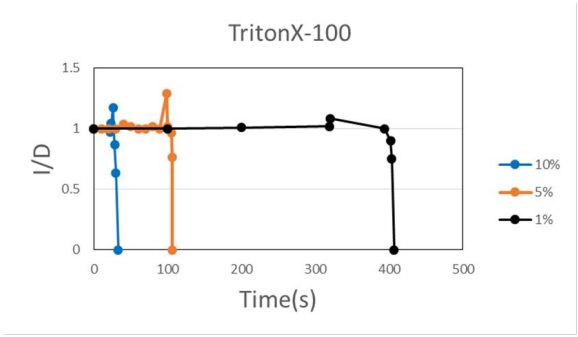

図４：膜ダイナミクス解析（TritonX-100）

Tween20(10,5,1%)を加えたリポソームは界面活性剤添加前のリポソームから、膜が揺らいだ後に破裂して小さな小胞ができるダイナミクスを示した(図 5)。

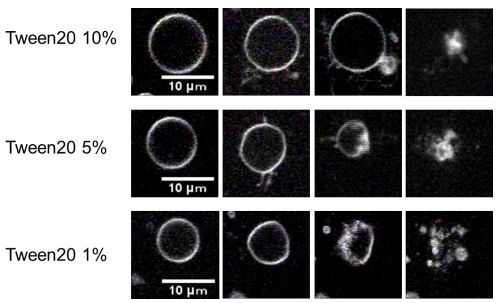

図 5：非刺激性界面活性剤（Tween20）

そして、Tween20 は I/D 値の増加が確認できなかった。

・ラウレス硫酸ナトリウム(SLES)
SLES(10,5%)を加えたリポソームは、リポソームが収縮しながら膜揺らぎを経て膜陥入後に破裂するダイナミクスを示した。そして、I/D 値(10,5%)に増加が見られた TritonX-100 のダイナミクスに近いと考えられた。

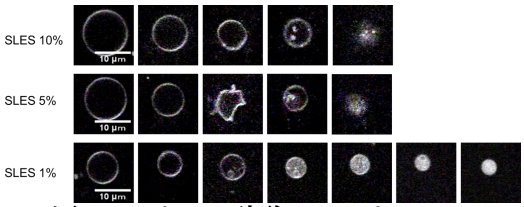

図 6：ラウレス硫酸ナトリウム

アミノ酸系界面活性剤
・ACMT-L
ACMT-L(10,5,1%)を加えたリポソームは、主にリポソームが破裂するダイナミクスを示した(図 7)。他にも収縮しながら破裂するダイナミクスが観察された。Tween20 を加えた時は膜が揺らいだ後に破裂して小さな小胞を形成したが、ACMT-L は揺らがずに破裂して、小胞は形成しなかった。破裂したダイナミクスは Tween20 と同じで、I/D 値の増加も確認できなかったことから Tween20 のように刺激性が弱いと考えられた。

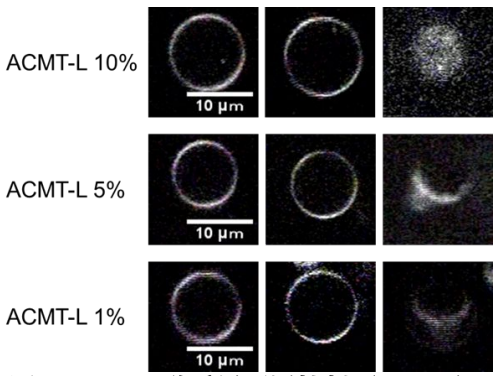

図 7：アミノ酸系界面活性剤（ACMT-L）

・FLDS-L
FLDS-L(10,5%)を加えたリポソームは主にリポソームを破裂するダイナミクスを示した。他にも膜揺らぎを経て膜陥入後に破裂するダイナミクスも観察された。しかし、I/D 値(10,5%)の増加は確認できなかった。FLDS-L(1%)を加えたリポソームはリポソームが徐々に収縮し、小さくなった状態から変化しないダイナミクスを示した。I/D 値でも同じように観察を開始して 5 分後から変化が見られなかった。FLDS-L(10,5%)は、Tween20 や ACMT-L と同じように破裂するダイナミクスであったが、膜陥入が観察できたことから Tween20 や ACMT-L よりは刺激性が強いと考えられた。しかし、SLES のようにリポソームを収縮させていないので SLES より刺激性は弱いと考えられた。

・考察
界面活性剤の膜ダイナミクス
TritonX-100 のような刺激の強い界面活性剤を加えたリポソームは、膜揺らぎを経て膜陥入後にポアを形成して収縮していくダイナミクスを示した。Tween20 のような刺激の弱い界面活性剤を加えたリポソームは、膜揺らぎ後に破裂するダイナミクスを示した。従って、界面活性剤の刺激性の強さによって異なるダイナミクスや I/D 値の増減が示された。この 2 つの界面活性剤の膜ダイナミクスと I/D 値を元に新規界面活性剤の膜ダイナミクスと I/D 値を比べることで刺激性の強さを予測できると考えた。そこで、比較的に刺激が強いと言われている SLES を加えたリポソームでは、TritonX-100 に似たダイナミクスを示し、I/D 値の増加も見られた。そして、刺激の弱いアミノ酸系界面活性剤の ACMT-L,FLDS-L と中性界面活性剤の CAPB を加えたリポソームでは、Tween20 に似たダイナミクスを示し、I/D 値の増加が確認できなかった。これらのことから、刺激性の強さを予測できると言える。今回観察された膜ダイナミクスを参考に刺激性の強さを評価した。

高刺激性界面活性剤と低刺激性界面活性剤の膜ダイナミクスのメカニズム
高刺激性界面活性剤は、界面活性剤がリポソームの膜に入り、表面積が増え、余剰表面積を獲得する。その余剰表面積を解消するために膜陥入が起きる。その後もリポソーム膜の界面活性剤が増え、界面活性剤が凝集することでポアを形成すると考えている。反対に低刺激性界面活性剤は、界面活性剤がリポソームの膜に入り、最終的に破裂すると考えている。高刺激性界面活性剤に見られる膜陥入やポア形成は界面活性剤が内外葉に入り、低刺激性界面活性剤に見られる破裂は界面活性剤が外葉のみに入ると考えた。
界面活性剤はフリップフロップすることで外葉から内葉に移動する。このことから、フリップフロップする速度の違いが膜のダイナミクスに影響を与えているのではないかと考えた。

・結論
SLES を加えたリポソームは収縮しながら膜揺らぎを介して膜陥入後に破裂する TritonX-100 に似たダイナミクスを示した。ACMT-L と FLDS-L と CAPB をそれぞれ加えたリポソームは破裂するダイナミクスと収縮しながら破裂するダイナミクスで Tween20 に似たダイナミクスを示した。また、SLES と ACPB の界面活性剤混合系では比率によりダイナミクスは異なるがラウレス硫酸ナトリウムの刺激性を弱ることが解った。これらの結果より、界面活性剤の刺激性を予測できると言える。今後、さらに試験物質を増やし、ドレ

イズ試験代替法としての有用性を評価する必要があると考えている。

界面活性剤のフリップフロップする速度によって、高刺激性界面活性剤と低刺激性界面活性剤の膜ダイナミクスに違いがでると考えられる。高刺激性界面活性剤は膜の外葉から内葉へのフリップフロップが早いため膜陥入後に界面活性剤分子が凝集してポアが形成すると考えられる。低刺激性界面活性剤は膜の外葉から内葉にフリップフロップが遅いため破裂する。

このモデルを検証するための実験を今後も行っていく予定である。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

1. Hiroki Himeno, Naofumi Shimokawa, Shigeyuki Komura, David Andelman, Tsutomu Hamada, Masahiro Takagi. Charge-induced phase separation in lipid membranes. Soft Matter 10, 7959 - 7967 (2014). **（査読有）**

2. Masamune Morita, Tsutomu Hamada, Mun'delanjiC.Vestergaard, Masahiro Takagi. Endo- and exocytic budding transformation of slow-diffusing membrane domains induced by Alzheimer's amyloid beta. Phys. Chem. Chem. Phys., 16, 8773-8777 (2014). **（査読有）**

3. Huong T.T. Phana, Mun'delanji C. Vestergaard, KeangOk Baek, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi, Localization of amyloid beta (Aβ1-42) protofibrils in membrane lateral compartments: Effect of cholesterol and 7-Ketocholesterol.
FEBS Letters 588, 3483-3490 (2014) **（査読有）**

4. Huong T.T. Phan, Tsuyoshi Yoda, Bindu Chahal, Masamune Morita, Masahiro Takagi, Mun'delanji C. Vestergaard, Structure-dependent interactions of polyphenols with a biomimetic membrane system. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, 1838, 2670–2677 (2014) **（査読有）**

〔学会発表〕（計 15 件）

1. **竹村征樹, 下川直史,辻野義雄,高木昌宏**
界面活性剤による刺激性と膜ダイナミクスの関連性 日本化学会第 95 春季年会
平成 27 年 3 月 27 日 日本大学理工学部船橋キャンパス 千葉県 船橋市

2. **下川直史、姫野泰輝、濱田勉、高木昌宏、好村滋行、David Andelman**
静電効果と脂質の相転移の結合を取り入れた荷電脂質膜の相分離 日本物理学会第 70 回年次大会, 平成 27 年 3 月 22 日 早稲田大学 東京都 新宿区

3. **姫野泰輝、下川直史、濵田勉、高木昌宏**
脂質分子の電荷が引き起こす膜構造変化と塩添加の影響：膜孔形成と相分離構造とのカップリング. 日本物理学会第 70 回年次大会
平成 27 年 3 月 22 日 早稲田大学 東京都 新宿区

4. **斉田拓巳,姫野泰輝、下川直史、高木昌宏**
発表標題：荷電脂質や塩添加に影響される脂質膜中のコレステロールの局在
日本物理学会第 70 回年次大会
平成 27 年 3 月 22 日 早稲田大学 東京都 新宿区

5. **下川 直史、長田 真理子、高木 昌宏**
脂質二重膜での相分離におけるハイブリッド脂質の物理的役割. 平成 26 年度北陸地区講演会と研究発表会 平成 26 年 11 月 21 日
富山大学 富山県 富山市

6. **竹村征樹, 下川直史,辻野義雄, 高木昌宏**
界面活性剤による膜ダイナミクスと刺激性評価 平成 26 年度北陸地区講演会と研究発表会. 平成 26 年 11 月 21 日 富山大学 富山県 富山市

7. **竹村 征樹, 下川 直史,辻野 義雄,高木昌宏. 膜ダイナミクスから見たアミノ酸系界面活性剤の皮膚刺激性. 第 66 回 日本生物工学会大会 平成 26 年 9 月 11 日**
札幌コンベンションセンター、札幌、北海道

8. **姫野泰輝、下川直史、濵田勉、高木昌宏**
発表標題：電脂質を含むベシクルにおける膜孔形成と相分離構造とのカップリング
日本物理学会 2013 年秋季大会 成 26 年 9 月 7 日 中部大学,愛知県、春日井市

9. **斉田拓巳、姫野泰輝、下川直史、高木昌宏**
発表標題：塩の添加が支配する荷電脂質膜の相分離 日本物理学会 2013 年秋季大会
平成 26 年 9 月 7 日 中部大学,愛知県、春日井市

10. Naofumi Shimokawa, Mariko Nagata, Masahiro Takagi. Phase separation in lipid membranes containing hybrid lipid POPC
学会名：Biomembrane Days 2014
発表年月日：平成 26 **年** 9 **月** 1 **日**
Harnackhaus, Berlin, Germany

11.Hiroki Himeno, NaofumiShimokawa, Shigeyuki Komura,DavidAndelman, Tsutomu Hamada, Masahiro Takagi
Charge-induced phase separation in lipid membranes：Biomembrane Days 2014
Harnackhaus, Berlin, Germany
平成 26 **年** 9 **月** 1 **日**

〔図書〕該当なし。

〔産業財産権〕該当なし。

〔その他〕ホームページ等
http://www.jaist.ac.jp/ms/labo/takagi.html

６．研究組織

(1)研究代表者 高木昌宏（TAKAGI Masahiro）
北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・教授
研究者番号：00183434