

## 《 R &amp; D 》

三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた薬物の皮膚透過性および皮膚刺激性評価  
—動物実験代替法確立に向けて—

杉 林 堅 次 Kenji Sugibayashi

城西大学薬学部

## 1. はじめに

皮膚局所に適用する医薬品製剤には、皮膚組織やその周辺部位での薬効（局所作用）を期待するものだけでなく、いわゆる全身作用を期待する経皮吸収型製剤（Transdermal Drug Delivery Systems, TDS）があり、さらに、最近では機能性を有する化粧品も市場を賑わすようになってきた。したがって、現在では、治療薬だけでなく化粧品有効成分の皮膚透過性や経皮吸収性を正しく評価する方法論の確立が以前にも増して必要とされるようになった。また一方で、効果が高くなれば皮膚局所での刺激性などの副作用についても正しく予測することが重要となり、加えて、主薬およびその濃度、さらには基剤の選択基準の確立が必要となってきた。

現在、薬物の皮膚透過量や透過速度はヒト皮膚を用いて主に *in vitro* 実験法で評価されている。しかし、特に本邦では新鮮なヒト皮膚が必要な量入手できるとは限らない。そこで、動物皮膚や人工膜が使われることとなるが、動物皮膚使用に当たっては動物愛護の問題を回避することができないし、また、人工膜の使用では代謝酵素やトランスポーターが関与する皮膚透過を表現することができない。このような状況下、特に三次元培養ヒト皮膚モデルが物質の皮膚透過性を評価する代替材料として有用である可能性が考えられた。加えてヒトに適用する前に実験動物を用いず皮膚刺激性を予測するための一手段にも三次元培養ヒト皮膚モデルの利用が考えられた。そこで、ここでは三次元培養ヒト皮膚モデルを皮膚透過性および皮膚刺激性評価材料として用い

た研究とその有用性について論じる。

## 2. 三次元培養ヒト皮膚モデル

ヒトや哺乳動物の皮膚は表皮（epidermis）と真皮（dermis）から構成される。このうち皮膚表面側に位置する表皮は主に角化細胞（keratinocytes）からなる。表皮はまた、深部から基底層、有棘層、顆粒層、透明層（手掌と足裏にのみ存在）、そして角層（stratum corneum）と、分化過程が異なる層からなる。ここで、角層は角化細胞が分化した、死んだ角質細胞（corneocytes）とそれを取りまく細胞間脂質とからなる。薬物や化粧品成分の皮膚透過において多くはこの角層の透過性が律速となる。一方、真皮は線維芽細胞（fibroblasts）がコラーゲン線維中に分散した形状を示している。

三次元培養皮膚モデルは Bell らによって最初に調製された<sup>1)</sup>。彼らはまず、コラーゲンに線維芽細胞を加え、培養して真皮モデルを作成した。次に、表皮の細胞である角化細胞を真皮モデルの上で成長させると、発生初期の皮膚と同じ構造体となるのを発見した。また、この多層膜を空気に接触させ表皮膜表面を角化させると角層となり、三次元培養皮膚モデルが完成した。Fig. 1 に、三次元培養皮膚モデルを調製する現在の主な操作手順を示す。なお、これらのモデルは現在、tissue engineering の研究領域で多用されている<sup>2)</sup>。

Table 1 に現在簡便に入手できる三次元培養皮膚モデルとその販売機関、特徴をまとめて示す。

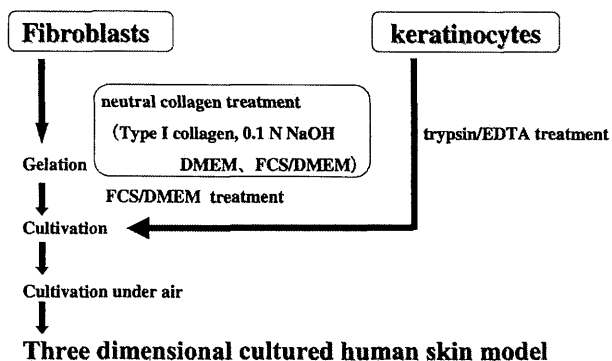


Fig. 1. Schematic Presentation of Preparation Method of Three-Dimensional Cultured Human Skin Model.

### 3. 物質の皮膚透過性評価材料としての 三次元培養ヒト皮膚モデルの有用性

我々は、水溶性から脂溶性の種々低分子薬物の水溶液をヒト摘出皮膚、ヘアレスラット摘出皮膚および三次元培養ヒト皮膚モデル (TESTSKIN™ LSE-high) に適用して、これらの膜を介した薬物透過性を side-by-side 型の拡散セルを用いて調べた<sup>3)</sup>。Fig. 2 にその典型例として水溶性の一硝酸イソソルビド (ISMN) と脂溶性の二硝酸イソソルビド (ISDN) の3種皮膚を介する透過データを示す。図から明らかなように、8時間に亘るヒト皮膚および

TABLE 1. Three Dimensional Cultured Human Skin Models Available in World and Japanese Markets.

Brand name	Manufacturer	Site of skin for the model	Used site
EpiDerm	MatTek/Kurabo	stratum corneum model	ECVAM/Japan
EPISKIN	Episkin-SNC	stratum corneum model	ECVAM
SkinEthic	SkinEthic Lab.	stratum corneum model	ECVAM
PREDISKIN	BIOPREDIC	stratum corneum model	ECVAM
TESTSKIN	Organogenesis	epidermis/dermis	
TESTSKIN LSE-high	Toyobo	epidermis/dermis	Japan
MATREX LDM	Toyobo	dermis model	Japan
Vitrolife-Skin	Gunze	epidermis/dermis	Japan
LabCyte Epi-model	J-Tech	epidermis model	Japan

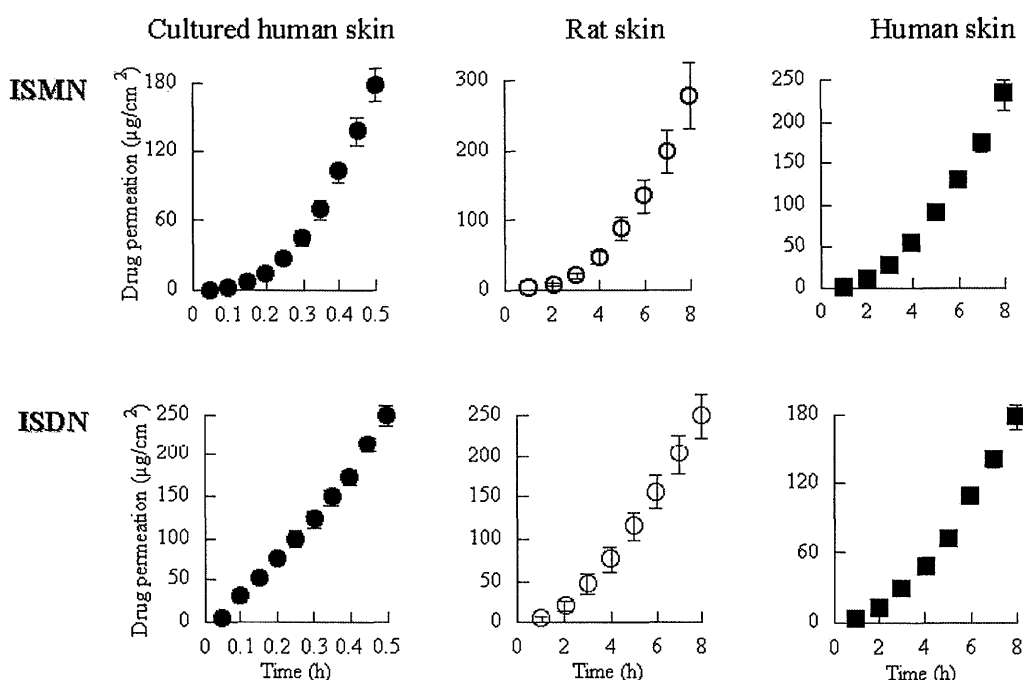


Fig. 2. Time Course of the Cumulative Amount of ISMN and ISDN Permeated through Three-Dimensional Cultured Human Skin, Excised Hairless Rat Skin and Excised Human Skin.

ヘアレスラット皮膚を介する両薬物の累積透過挙動が30分間の三次元培養ヒト皮膚モデルを介する透過挙動と極めて類似している。これは、これら薬物の水基剤から皮膚への分配性については実皮膚と三次元培養皮膚モデルで極めて類似していること、また、皮膚バリアーにおける薬物拡散性については三次元培養皮膚モデルが実皮膚より10倍程度高いことに起因していた。Fig. 3にヘアレスラット皮膚、ヒト皮膚および三次元培養ヒト皮膚モデルを介する各種薬物の透過係数 (permeability coefficient,  $P$ ) の関係性を示す。ラット皮膚とヒト皮膚を介する透過性がほぼ1:1相関を示すものの、三次元培養皮膚モデルを介する薬物透過が対数軸で約1オーダーずれることに注意いただきたい。しかし、いずれにしても三次元培養ヒト皮膚モデル透過性とヒトまたはラット皮膚透過性とに高い相関性がみられたことから、種々物質のヒトやラット皮膚透過性を予測する代替膜として三次元培養ヒト皮膚モデルが極めて有用であることが明らかである。

我々はその後、経皮吸収促進剤のスクリーニングや代謝過程を有する物質の皮膚透過過程の解析にも

三次元培養皮膚モデルを用いて評価し、促進剤や皮膚中代謝の評価にも培養皮膚モデルが利用できることを明らかにした<sup>4,5)</sup>。また我々は、水溶性高分子が毛嚢経由で皮膚透過されることを証明する一手段として、毛嚢のない三次元培養ヒト皮膚モデルが対照として利用できることに注目している。この研究は、現在進行中である。

三次元培養皮膚モデルを用いた皮膚透過性評価法の問題点は培養ウェルをそのまま用いることができないことである。すなわち、ウェルをそのまま用いて透過試験を行うと、大部分の物質の透過経路が角化不十分または角層が薄い培養膜周辺に集中する。また、全ての三次元培養皮膚モデルがTEST-SKIN™ LSE-highのような挙動を示すと限らない(例えば物質の実皮膚への分配性が培養皮膚モデルと異なる場合も当然存在する)。また、同じ皮膚モデルでも、培養日数や培養時における条件のわずかな違いで同様なバリアー能を有する培養モデルができるとは限らない。

ここで注意しておくべきは、ヒト皮膚透過性を予測するのに重要なことは、ヒト皮膚と同じ透過性を

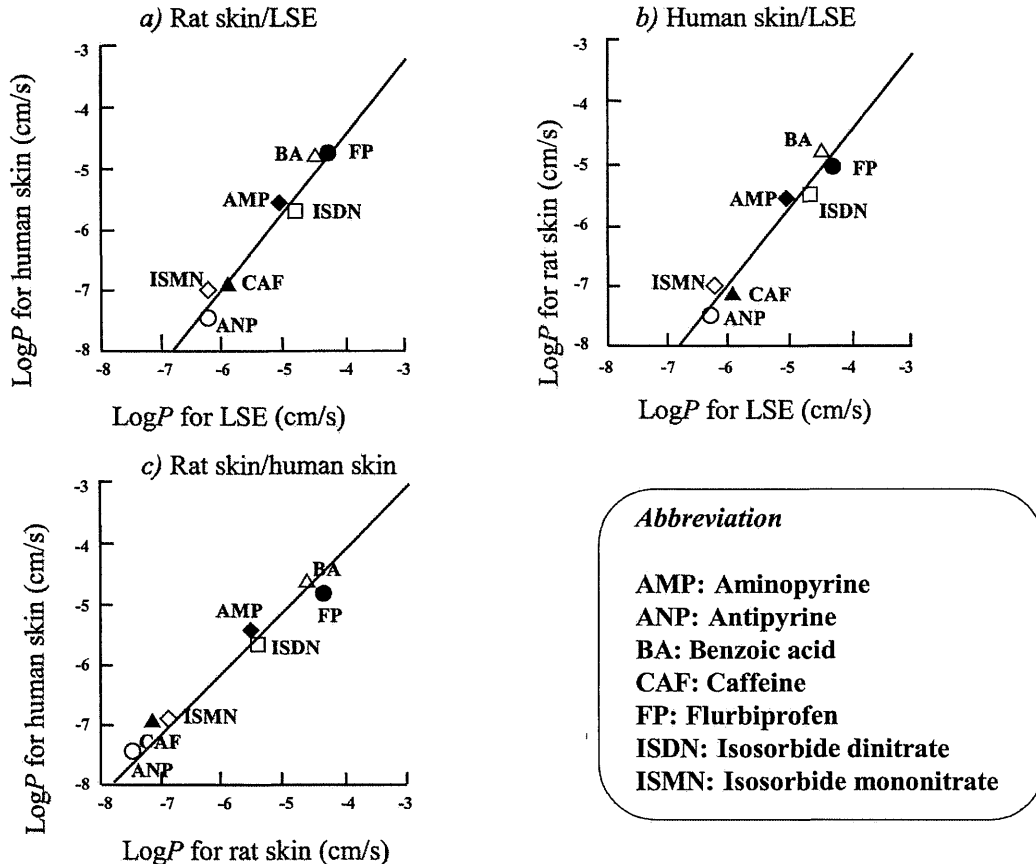


Fig. 3. Relationships of Membrane Permeability Coefficients,  $P$ , of Drugs.

示す培養皮膚モデルを探すことではなく、できるだけ早く確実にヒト皮膚透過性を予測できる培養皮膚モデルを探すことにある。そのことを考慮すると、TESTSKIN™ LSE-highのような三次元培養皮膚モデルはその有用な評価材料であると考えることができる。なお現在、企業と共同して High-throughput screening に対応できる、三次元培養皮膚モデルを用いた同時多量サンプル経皮吸収予測システムについて検討中である。

#### 4. 物質の皮膚刺激性評価材料としての三次元培養ヒト皮膚モデルの有用性

薬物の皮膚透過性と並んで薬物または製剤自体の皮膚刺激性の評価法の確立も非常に重要な問題である。また、安全性評価における代替法の確立は、医薬品よりも化粧品分野でより切実である。EUでは、2009～2013年には、動物実験を使用して安全性評価を行った原料を含む化粧品のEU域内での販売が禁止となり、そのため代替法の導入を加速している。本邦でも、EUおよび米国について設立された代替法普及のためのコーディネート機関（それぞれ ECVAMとICCVAM）に対応するJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) が2005年11月にスタートした。

我々はこのような状況下、皮膚一次刺激の評価材料としての三次元培養ヒト皮膚モデルの可能性について注目し研究を開始した。まず、Neutral Red 法やMTT試験法による細胞障害反応を使って皮膚刺激を評価できるのではないかという当時の現状があったが、皮膚刺激性を起炎物質適用後いつ測定すればよいかについては評価が定まっていなかった。

そこで、まず種々起炎物質を三次元培養ヒト皮膚モデルに適用後の皮膚刺激性の速度論について MTT 試験法を用いて測定した<sup>6,7)</sup>。

Fig. 4 にその代表例として 3%、10% および 30% 乳酸を三次元培養ヒト皮膚モデル TESTSKIN™ LSE に適用したときの MTT 試験によって求められた生細胞数率 (viability) の経時変化を示す。3%、10% および 30% 乳酸適用後全てのケースで、最初の遅い viability 減少とその後に続く速い viability の減少が見られた。また、遅い速度から速い速度への移行時間は乳酸濃度が高くなるに従い短くなることがわかった。Fig. 5 には陽イオン性界面活性剤である塩化セチルピリジニウム (CPC) の 1% 水溶液を無傷皮膚 (intact skin) と角層を取り除いた stripped skin に適用したときの viability 変化を示している。図から明らかなように、intact skin では Fig. 4 で見られたときと同様の viability の 2 相性減少が見られたものの、stripped skin では 1 相性で変

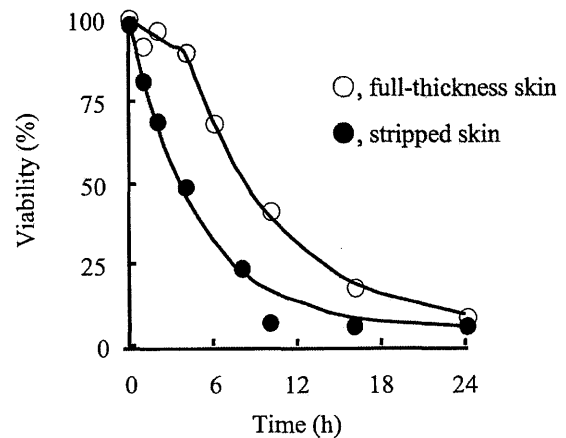


Fig. 5. Time Course of the Viability (%) of Intact and Stripped LSE after Application of 1% CPC.

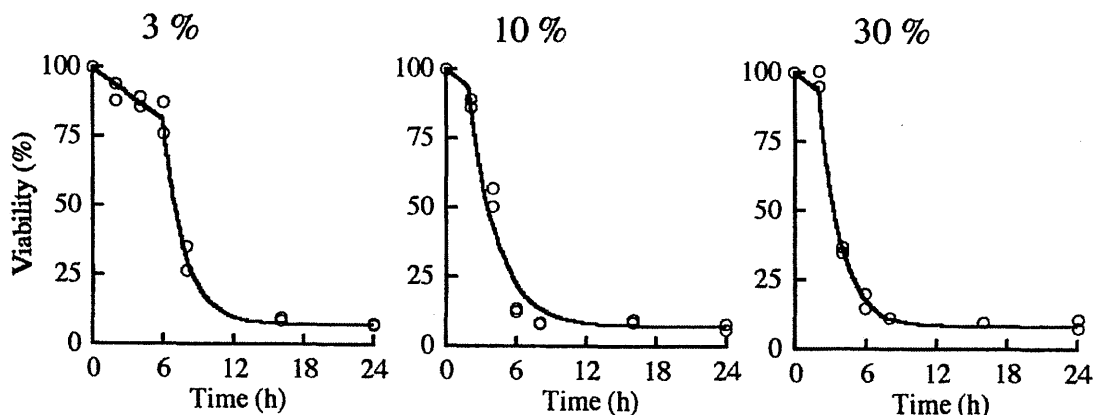


Fig. 4. Time Course of the Viability (%) of LSE after Application of 3, 10 and 30% Lactic Acid.

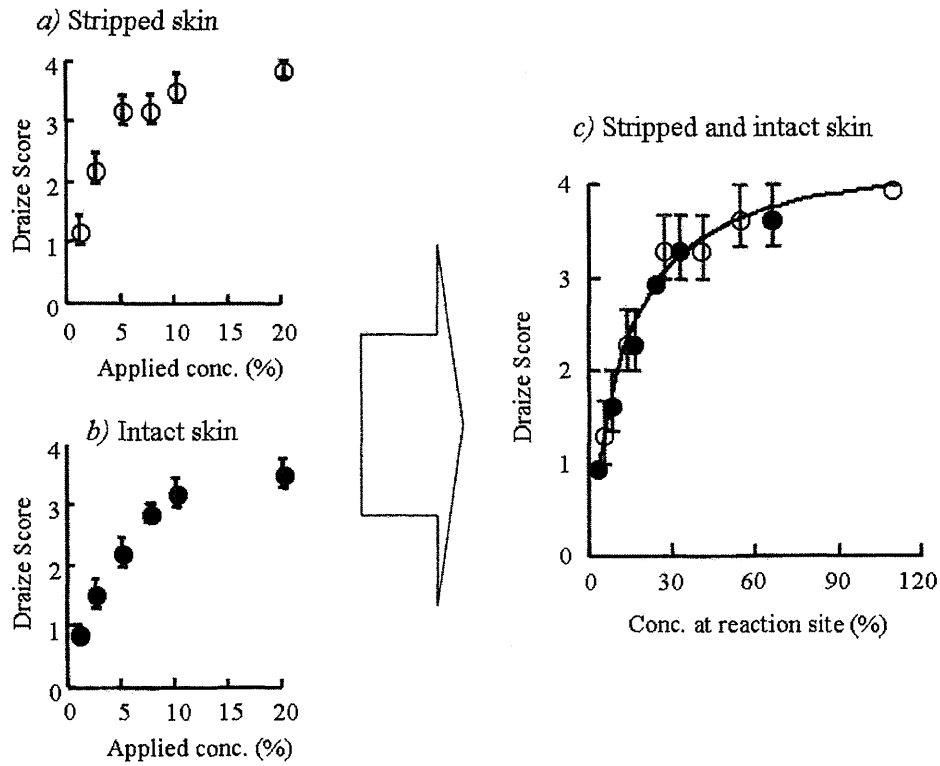


Fig. 6. CPC Concentration-Response Curve (Draize Test in Guinea Pigs).  
 a) stripped skin (CPC application concentration-response curve), b) intact skin (CPC application concentration-response curve), c) stripped and intact skin (CPC skin concentration-response curve).

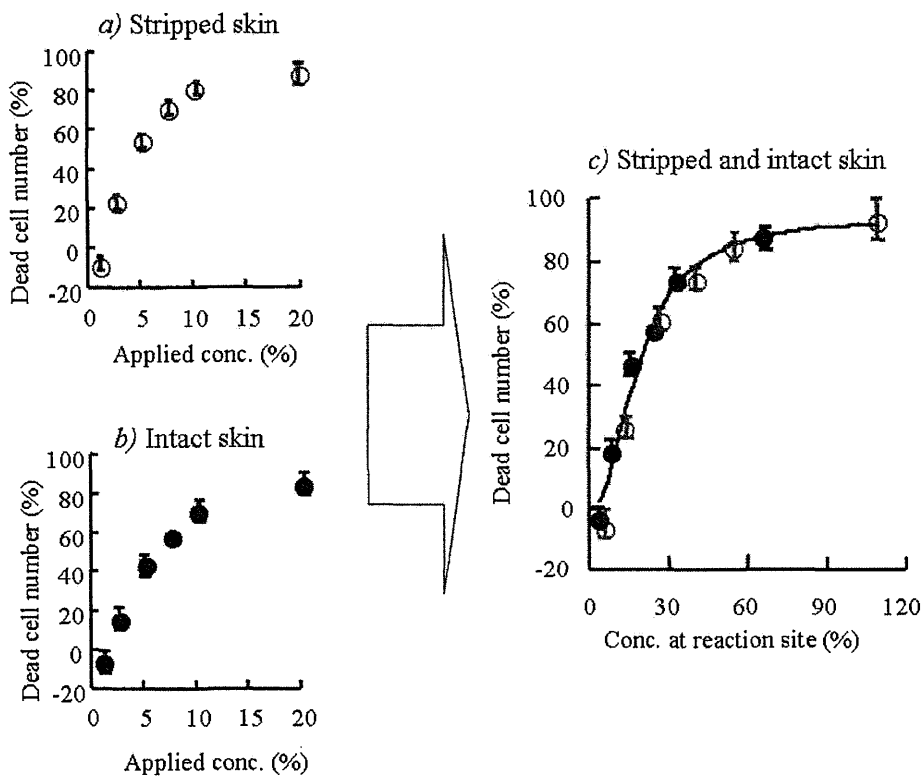


Fig. 7. CPC Concentration-Response Curve (MTT Assay in Guinea Pigs).  
 a), b), c) : same as in Fig. 6.

極点は見られなかった。また、これら遅い速度とその後の速い速度はそれぞれ1次反応に従い、適用24時間ではほぼ一定値に収束することがわかった。すなわち、角層バリアーが堅固なときは比較的遅い速度で viability が減少するものの、起炎物質が角層バリアーを透過すると急に速い viability 減少が引き起こされることが示唆された。

次に、CPC をモルモットに（皮膚刺激反応が一定となる）48時間適用し、皮膚刺激性を MTT 試験（*in vitro* 評価法）と従来からの評価法である Draize 法（*in vivo* 評価法）によって評価した<sup>8)</sup>。Figs. 6, 7

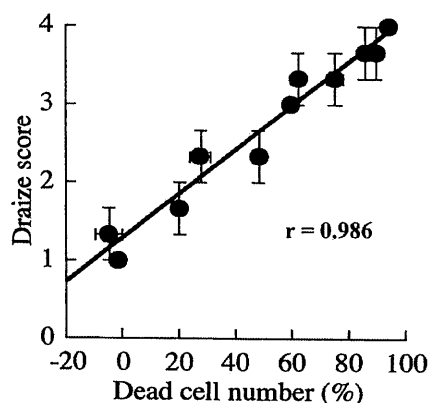


Fig. 8. Correlation between Draize Irritation Score and MTT Assay Results in Guinea Pigs.  
Draize score =  $2.820 \times 10^{-2} \cdot \% \text{ fraction of dead cell number} + 1.272$ .

にその試験結果を示す。両図から明らかなように、Draize 法による *in vivo* 試験でも MTT 試験を用いた *in vitro* 試験でも、皮膚刺激性（Draize スコアまたは死細胞率, *I*）と CPC 適用濃度（*C*）には  $E_{\max}$  モデル（Hill 式）\*で示される関係にあった。さらに興味あることに、適用濃度より皮膚中濃度で表記すると、intact skin と stripped skin でも皮膚中濃度が同じなら同様な皮膚刺激が見られることも明らかとなった（Figs. 6c, 7c）。加えて、Draize 法によるスコア結果と MTT 試験法による死細胞数の相関を見ると、Fig. 8に見られるように極めて良好な直線関係が見られ、Draize 法の代替法としての MTT 試験法の有用性が認められた。

これらの結果に勇気づけられ、次に CPC を三次元培養ヒト皮膚モデルに（皮膚刺激反応が一定となる）24時間適用し、皮膚刺激性を MTT 試験法によって評価した。結果を Fig. 9 に示す。モルモットに対する MTT 試験結果（Fig. 7）とほぼ同様の関係が認められた。さらに興味あることに、Fig. 7 と Fig. 9 の死細胞数のデータを皮膚中濃度  $\times (IC_{50} \cdot \text{モルモット皮膚}) / (IC_{50} \cdot \text{三次元培養皮膚})$  に対してプロットする

$$* I = \frac{I_{\max} \cdot C^{\gamma}}{IC_{50}^{\gamma} + C^{\gamma}}$$

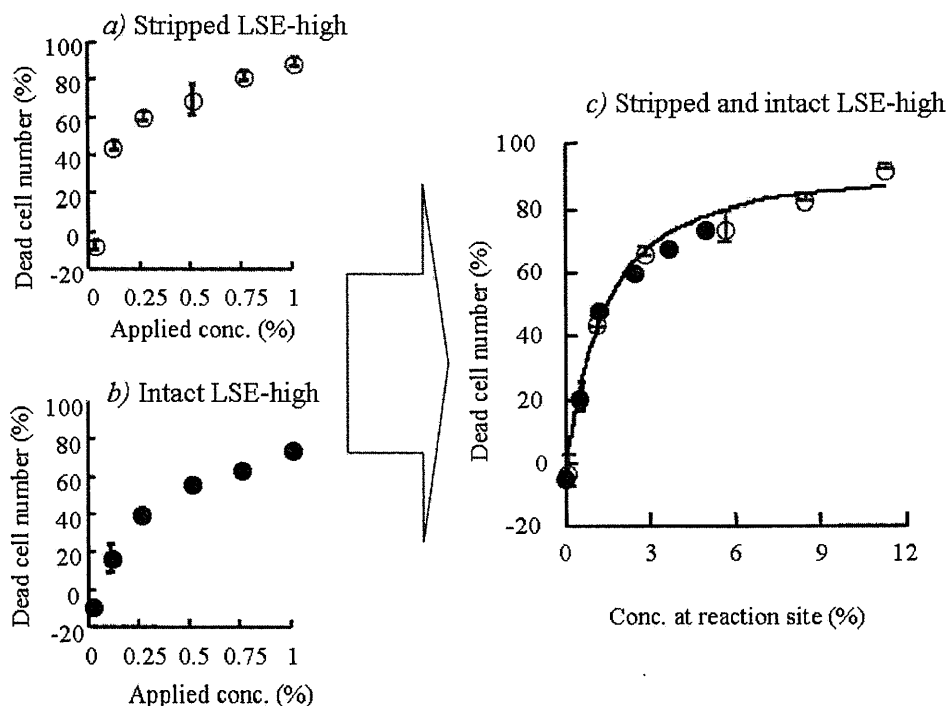


Fig. 9. CPC Concentration-Response Curve (MTT Assay in LSE-High).  
a), b), c): same as in Fig. 6.

と、両図はほぼ同じような挙動を示すことがわかった。

以上より、例えばモルモットを用いて行ったDraize試験はモルモットにおけるMTT試験で代替でき、さらに、モルモットにおけるMTT試験は三次元培養皮膚モデルのMTT試験で代替評価できることから、現在汎用されている動物を用いたDraize試験 (*in vivo* 試験) に替わって三次元培養皮膚モデルで代替評価できることが示唆された。

## 5. お わ り に

動物実験またはヒト試験代替法としての三次元培養ヒト皮膚モデルの有用性をさらに確立していくには、まず①三次元培養ヒト皮膚モデルの品質を高くかつばらつきのないようにすることが重要である<sup>9)</sup>。また、②より実皮膚に似せるために、表皮中にケラチノサイト以外のメラノサイトやランゲルハンス細胞をも構築すること、さらに、③毛嚢や汗腺などの付属器官を付与することも必要に応じて対応していかなければならない。加えて、④三次元培養ヒト皮膚モデルにも実皮膚のように乳頭層状の非平面構造が必要になるように思う。しかし、上述したことと重複するが、実皮膚と同じ膜を作ることが重要ではなく、実皮膚と比較しやすい培養皮膚を作ることが重要であることを認識すべきである。

今回紹介したのは、経皮吸収試験と皮膚一次刺激試験の代替法に関するものである。このほか、皮膚感作性試験に関する問題もあるが、これに関してはまだまだ研究途上である。また、今回紹介した経皮吸収試験と皮膚一次刺激試験の代替法に関してさらに検討が必要なものも多い。ただ、動物試験やヒト試験なしに医薬品や化粧品を開発する時期も迫ってこよう。三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた代替法の今後のさらなる進展が望まれる。

## 引 用 文 献

- 1) E. Bell, H.P. Ehrlich, D.J. Buttle, T. Nakatsuji, Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness, *Science*, **211**, 1052–1054 (1981).
- 2) N. Morikawa, K. Morota, K. Tomihata, T. Taira, Y. Takahashi, S. Morita, M. Suzuki, Three dimensional cultured skin model used for tissue engineering research, *J. Jpn. Assoc. Regenerative Dent.*, **3**, 12–22 (2005).
- 3) T. Watanabe, T. Hasegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi, K. Takayama, K. Sugibayashi, Utility of the three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate skin permeation of drugs, *Altern. Animal Test. Experiment.*, **8**, 1–14 (2001).
- 4) T. Watanabe, T. Hasegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi, K. Sugibayashi, Effect of penetration enhancers on the permeation of drugs across three-dimensional cultured human skin model: Comparison with the effects using excised hairless rat skin, *Altern. Animal Test. Experiment.*, **8**, 15–22 (2001).
- 5) K. Sugibayashi, T. Hayashi, K. Matsumoto, T. Hasegawa, Utility of a three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate the simultaneous diffusion and metabolism of ethyl nicotinate in skin, *Drug Metabolism Pharmacokin.*, **19**, 352–362 (2004).
- 6) K. Sugibayashi, T. Watanabe, T. Hasegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi, Kinetic analysis on the *in vitro* cytotoxicity using Living Skin Equivalent for ranking the toxic potential of dermal irritants, *Toxicol. In Vitro*, **16**, 759–763 (2002).
- 7) S. Kano, K. Sugibayashi, Kinetic analysis on the skin disposition of cytotoxicity as an index of skin irritation produced by cetylpyridinium chloride: Comparison of *in vitro* data using a three-dimensional cultured human skin model with *in vivo* results in hairless mice, *Pharm. Res.*, **23**, 329–335 (2006).
- 8) T. Watanabe, T. Hasegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi, H. Itagaki, K. Sugibayashi, Utility of MTT assay in three-dimensional cultured human skin model as an alternative for draize skin irritation test: approach using diffusion law of irritant in skin and toxicokinetics-toxicodynamics correlation, *Pharm. Res.*, **19**, 669–675 (2002).
- 9) R. Roguet, The use of standardized human skin models for cutaneous pharmacotoxicology studies, *Skin pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **15** (suppl. 1), 1–3 (2002).