

Summary of Academic Dissertation

Satoshi Kano

Characterization and application to the skin irritation study of reconstructed cultured human skin models

Introduction: Recently, the animal experiments are limited from the viewpoint of the animal protection around EU and US. “Act on Welfare and Management of Animals” was also revised in Japan in 2006, and the thoroughness in 3Rs (Reduction, Refinement and Replacement) of laboratory animals is attempted. Moreover, the development of animal testing alternative is proceeding based on the 3Rs while taking the trilateral international cooperation in Japan, EU and US. Regarding the skin irritation test, the *in vitro* examination using the three-dimensional cultured human skin model (cultured skin model) that was reconstructed with the human cells (keratinocyte and fibroblast) have attracted attention. It has been approved as OECD guideline (TG-439). As for the skin irritation evaluation of the chemical compounds, the Draize test using the animal (*in vivo* examination) has been conducted until now. It is a visual scoring method of erythema, edema and degree of the desquamation of the stratum corneum after application a test material to the skin of the animal for a certain period of time. There are problems that erythema and edema do not occur like a Draize test using an animal, although skin irritation is already evaluated by a cytotoxicity test such as MTT assay using cultured skin model. The skin irritation is decided by the skin irritancy of the chemical compounds and the accessibility (skin permeability) to the site of action. In other words, the skin irritation does not appear even if it is a causative agent of the skin irritation if it does not penetrate into the skin. It is well known that the stratum corneum is a main barrier of the skin permeability of the chemical compounds. This is the cause that is different from the skin irritancy of the chemical compounds in the actual skin irritation, and this makes an evaluation of the skin irritation by the simple cultured cell difficult. In fact, the skin permeability of the chemical compound is a major factor in the evaluation of the skin irritation. The cultured skin model is similar in the structure to the actual skin and it has the stratum corneum. This is one of the advantages to use a cultured skin model for an *in vitro* skin irritation test, and the formulation such as ointment, cream and lotion can be applied. Much cultured skin models are commercially available as well as four cultured skin models adopted in OECD guideline (TG-439).

In the present study, to clarify characteristics of various cultured skin models that were able to be purchased in Japan, the structure and the permeability of the chemical compounds were made a comparison between various cultured skin models and a human skin. Furthermore, the *in vitro* study using the cultured skin model and the *in vivo* study using the animal were compared about the kinetic analysis for time course of viability, the analysis by E_{max} model for dead cell number, and the production of cytokine.

Characteristic of three-dimensional cultured human skin model: In the present study, LSE-high and Vitrolife-skin were selected as fullthickness (epidermis and dermis) model, and EpiDerm, LabCyte EPI-model, Neoderm-E and Episkin were selected as epidermis model of cultured human skin models. P value and skin permeation parameters (KL and DL^2) of chemical compounds were compared to those through excised human cadaver skin (human skin) using seven kinds of chemical compounds with different lipophilicities and almost the same molecular weight (Antipyrine, Isosorbide-5-mononitrate, Caffeine, Aminopyrine, Isosorbide dinitrate, Benzoic acid, Flurbiprofen). A fairly good correlation (slope 1.0; 1:1 relationship) was observed between LSE-high or Epiderm and human skin. On the other hand, other cultured skin models did not show good correlations with $\log P$ values in human skin. Although the $\log DL^2$ in cultured skin models were higher than in human skin, the $\log DL^2$ over the present $\log K_{o/w}$ were almost constant, as shown in human skin. The $\log KL$ in LSE-high was almost equal to that in human skin. All of the $\log KL$ in EpiDerm, however, were lower than those in human skin and the differences were especially marked by an increase in lipophilicity of chemical compounds. In the other cultured skin models, the increment behaviors of $\log KL$ were not the same as those in human skin.

In the comparison of HE-stained skin images, each cultured skin model had a thicker stratum corneum than human skin. On the other hand, a thinner viable epidermis and dermis in cultured skin models were observed than in human skin. The number of cell nuclei stained by hematoxylin in each cultured skin model was lower than in human skin, especially in LSE-high and Neoderm-E. Interestingly, many hematoxylin-stained cell nuclei were observed in the stratum corneum in Vitrolife skin. This may have been due to inadequate keratinization of keratinocytes. In the observation of stratum corneum by a transmission electron microscope, the lamella layers in LSE-high were narrow and tortuous compared to those in human skin. Epiderm showed a

fairly similar structure to human skin. Other cultured skin models have aggregated lipid structures and localized lamella analog layers in their intercellular space, whereas no lamella layers were observed in Vitrolife skin. In the observation by confocal laser scanning microscope, a hair, hair follicle, sulcus cutis, crista cutis and pore were observed in human skin. Furthermore, corneocytes were clearly observed in the shallow part of the human skin. On the other hand, the sulcus cutis and crista cutis were not confirmed in cultured skin models, but the obtained images were different from each other. In addition, the distribution of the esterase activity in the skin was investigated using the metabolite (fluorescein-5-isothiocyanate) with the strong fluorescence that was produced by esterase of the fluorescein-5-isothiocyanate diacetate. A high intensity of green fluorescence was locally observed in the viable epidermis of human skin. LSE-high, EpiDerm and Episkin showed similar green fluorescence distributions to human skin. On the other hand, the LabCyte EPI model and Vitrolife Skin showed green fluorescence not only in the viable epidermis but also in the stratum corneum.

Evaluation of skin irritation using the three-dimensional cultured human skin model:

Cytotoxicity (dead cell number or viability by the MTT assay) was assumed an index of the skin irritation in this study. Cetylpyridinium chloride (CPC) was used as a model skin irritant. LSE-high was selected as the cultured skin model (*in vitro*), and it was compared with the result of hairless mouse or guinea pig (*in vivo*) from the viewpoint of specific difference.

The relations of CPC concentration in skin and the cytotoxicity (dead cell number) were analyzed by E_{max} model. The various value of CPC concentration in skin and dead cell number were indicated by the difference in condition such as intact skin, stripped skin, abdominal skin and dorsal skin. When a dead cell number was plotted for skin concentration of CPC each data of LSE-high, hairless mouse and guinea pig were plotted on the same curve respectively. Although there was no species difference for maximal skin irritation degree (maximal dead cell number; I_{max}), species difference was observed about concentration indicating the skin irritation (half-maximal dead cell number; IC_{50}).

Then, about change over time of cytotoxicity (viability) of CPC, it was compared with LSE-high (*in vitro*) with a hairless mouse (*in vivo*). The time course of viability in intact skin was observed distinctly different from stripped skin. In particular, in intact LSE-high, biphasic behavior with inflection point was observed. The decrease in these viability was able to be expressed with the first order rate constant. As for the first order rate constant, however, a hairless mouse was bigger approximately 2 times (1.7-2.8 times) than LSE-high, and a hairless mouse was earlier 1.3 times about the inflection point. Since the inflection point in intact skin accorded with the behavior of transepidermal electric resistance (TER), it was considered that the failure of barrier function of the stratum corneum is contribute to the production of the inflection point.

Furthermore, the production of cytokine in the evaluation of skin irritation was also attracted attention. It was suggested in the skin concentration of IL-1 α , IL-6 and MIP-2 in hairless mouse that IL-1 α was produced at first, and subsequently IL-6 and MIP-2 were produced. Skin concentration of IL-1 α after 24 h application of 1, 5 and 20% CPC was decreased dose dependently. The skin concentration of CPC was dose dependent, but the highest value was shown in 5% CPC about IL-6 and MIP-2, and it was in bell-shape. In the LSE-high, production of cytokine increased with increasing applied concentration of CPC. There was no difference in the cytokine concentration in tissue for control (saline) and 0.03% CPC, and tissue IL-1 α decreased over time in more than 0.3% CPC and decreased conspicuously in 1% CPC. IL-6 decreased gently in 0.3% CPC but markedly increased after 24 h application of 1% CPC. In addition, IL-8 increased over time in control and 0.03% CPC, but it was approximately constant until 24 h in 0.3% and 1% CPC.

Conclusion: The characteristic of various three-dimensional cultured human skin models (cultured skin model) was clarified. Advantages of the cultured skin model may include that is reconstructed using human cells and that structure is similar to real skin. As the results of having examined the permeability of chemical compounds and the details of histological configuration were investigated, but it was greatly different from the real skin in many cultured skin models although LSE-high was most closely to human skin in all evaluated cultured skin models. The barrier function of stratum corneum of the cultured skin model was lower than human skin, and the cornification of the epidermal keratinocyte was insufficient. However, it became clear that the skin irritation caused by a chemical compound was decided by the concentration of the causative agent in the skin which was the action site. If it was used after having a good grasped the characteristic of the cultured skin model, it was thought that it could be in the technique that was useful for a prediction of human (*in vivo*) as for the *in vitro* test using the cultured skin model.

学位論文要旨

加納 聰

三次元培養ヒト皮膚モデルの特性と皮膚刺激性評価への応用

【緒言】 近年、動物愛護の観点から動物実験を制限する動きが欧米を中心に高まっている。日本においても2006年に動物の愛護及び管理に関する法律(動愛法)が改正され、実験動物の3Rs (Reduction、RefinementおよびReplacement) の徹底が図られている。また、日米欧において3極の国際協調体制をとりながら3Rsの考えのもと動物実験代替試験法の開発が進められている。皮膚刺激性試験については、ヒト由来細胞(keratinocyteおよびfibroblast)で再構築された三次元培養ヒト皮膚モデル(培養皮膚モデル)を用いる*in vitro*皮膚刺激性試験が注目されており、OECDガイドライン(TG-439)として採用されている。これまで化学物質の皮膚刺激性評価は、動物を用いるDraize試験(*in vivo*試験)が行われてきた。これは、動物の皮膚に被験物質を一定時間適用し、その部位に現れる紅斑や浮腫、さらには角層の落屑の程度を視覚的に点数化する方法である。一方、培養皮膚モデルには血管系が存在しないため、Draize試験のように紅斑や浮腫による評価ができない。そこで、培養皮膚モデルによる皮膚刺激性の評価にはもっぱらMTT試験等の細胞毒性試験が利用される。皮膚刺激性は、原因物質の皮膚刺激能とその作用部位への到達性(皮膚透過性)によって決定される。すなわち、皮膚刺激性の原因物質であっても、皮膚中に浸透しなければ皮膚刺激性は現れない。角層が化学物質の皮膚透過の主なバリアであることはよく知られている。このことが化学物質の持つ皮膚刺激能と実際の皮膚刺激性が異なる原因であり、単純な培養細胞による皮膚刺激性の評価を困難にしている。すなわち、皮膚刺激性の評価において化学物質の皮膚透過性は重要な要因となる。培養皮膚モデルの構造は、実際の皮膚に近く、その構造中に角層を有している。これは培養皮膚モデルを*in vitro*皮膚刺激性試験に用いる利点の一つであり、軟膏、クリームおよびローションといった製剤を適用することができる。OECDガイドライン(TG-439)で採用されている4種の培養皮膚モデル以外にも多くの培養皮膚モデルが市販されている。本研究では、本邦で入手可能な各種培養皮膚モデルの特性を明らかにする目的で、第1編において培養皮膚モデルの構造や化学物質の皮膚透過性を指標に各種培養皮膚モデルとヒト皮膚を比較した。さらに、第2編ではMTT試験による細胞毒性(生細胞率または死細胞率)を皮膚刺激性の指標とし、死細胞率の E_{max} modelによる解析や生細胞率の経時推移に速度論的解析を行った。さらに、皮膚刺激性評価におけるサイトカインの産生にも注目し、各結果を培養皮膚モデルを用いた*in vitro*評価と動物を用いた*in vivo*評価で比較した。

【第1編 三次元培養ヒト皮膚モデルの特性】 培養皮膚モデルとして2種の表皮/真皮モデル(LSE-highおよびVitrolife-skin)と4種の表皮モデル(EpiDerm、LabCyte EPI-model、Neoderm-EおよびEpiskin)について、分子量が同程度で脂溶性が異なる7種の化学物質(アンチピリン、カフェイン、アミノピリン、安息香酸、硝酸イソソルビド、一硝酸イソソルビドおよびフルルビプロフェン)の*in vitro*皮膚透過実験を行い、得られた透過係数(P)および透過パラメータ(分配パラメータ; KL および拡散パラメータ; DL^2)についてヒト皮膚および培養皮膚モデル間で比較した。 P 値に関してEpidermおよびLSE-highではヒト皮膚に対して傾きがほぼ1.0の良好な相関(1:1の相関)認められたが、その他の培養皮膚モデルでは、ヒト皮膚との間に相関は認められなかった。 DL^2 は、ヒト皮膚および培養皮膚モデルのいずれにおいても化学物質の K_{ow} の値に関係なく一定の値であったが、いずれの培養皮膚モデルもヒト皮膚よりも高値を示した。 KL については、LSE-highではヒト皮膚とほぼ同様であったが、EpiDermでは、いずれの化学物質もヒト皮膚よりも低値を示し、その差は脂溶性化学物質で顕著であった。なお、その他の培養皮膚モデルでは、ヒト皮膚とは異なる KL の増加挙動を示した。

各培養皮膚モデルの構造的な特徴については、光学顕微鏡による観察において角層の厚みがヒト皮膚よりも厚く、生きた表皮は、培養皮膚モデルの方がヒト皮膚よりも薄かった。また、ヘマトキシリンにより核が染色された細胞数がヒト皮膚よりも少なく、それはLSE-highおよびNeoderm-Eで顕著であった。さらに、Vitrolife skinではヘマトキシリンにより染色された核が角層中にも観察され、角化が

不十分である可能性が考えられた。透過型電子顕微鏡による角層中の細胞間脂質のラメラ層の観察では、その量がヒト皮膚よりも培養皮膚モデルでは少なく、LSE-highのラメラ層は細く湾曲していた。Epidermでは比較的ヒトに近いラメラ層が観察されたが、他の培養皮膚モデルでは油層の凝集が観察され、細胞内スペースにもラメラ様の層が観察された。共焦点レーザー顕微鏡では、ヒト皮膚において、毛、毛包、皮溝、皮丘、毛穴（小孔）が観察され、より浅部に角質細胞が観察された。一方、培養皮膚モデルには、毛および毛包は存在せず、さらに皮溝および皮丘は観察されなかった。また、fluorescein-5-isothiocyanate diacetateが皮膚中のエステラーゼによって加水分解されて生じるfluorescein-5-isothiocyanateが強い蛍光を発することを利用して皮膚中のエステラーゼ活性の分布について検討した。ヒト皮膚では、角層および真皮にエステラーゼ活性はほとんど認められず、生きた表皮への局在が観察された。LSE-high、EpiDermおよびEpiskinにおいても同様に皮膚中のエステラーゼ活性は生きた表皮に局在することが示唆された。一方、LabCyte EPI modelとVitrolife Skinでは、生きた表皮だけでなく、角層中にもエステラーゼ活性が観察された。

【第2編 三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価】 *In vitro*皮膚刺激性試験において皮膚刺激性の指標となる細胞毒性（MTT試験による死細胞率）を E_{max} modelにより解析した。なお、モデル刺激物質として塩化セチルピリジニウム（CPC）を用いた。培養皮膚モデル（*in vitro*）にはLSE-highを選択し、ヘアレスマウスおよびモルモット（*in vivo*）を用いて種差および部位差の観点から検討した。intact skinおよびstripped skin、あるいは腹部皮膚および背部皮膚といった条件の違いにより、様々な皮膚中CPC濃度および死細胞率を示したが、死細胞率を皮膚中濃度に対してプロットすると、LSE-high、ヘアレスマウスおよびモルモットのいずれのデータもそれぞれ同一曲線上にプロットされ、皮膚刺激の程度が皮膚中濃度により決定されるという我々の仮説を裏付けた。しかしながら、最終的な皮膚刺激の程度（ I_{max} ）に種差はなかったものの、皮膚刺激を発現する濃度（ IC_{50} ）には種差が認められた。次に、CPCによる細胞毒性（生細胞率）の経時変化について、LSE-high（*in vitro*）とヘアレスマウス（*in vivo*）で比較した。Intact skinにおいて生細胞率の経時推移は、いずれも変曲点を有する二相性の減少を示し、stripped skinでは一相性に減少した。これらの生細胞率の減少は、一次速度定数で表すことができたが、いずれもLSE-highに比べてヘアレスマウスの方がおよそ2倍（1.7～2.8倍）大きく、変曲点についてもヘアレスマウスの方が1.3倍早かった。Intact skinにおける変曲点は、transepidermal electric resistance（TER）の変動とも一致し、角層のバリア機能の破綻が一因と考えられた。さらに、サイトカイン産生について、ヘアレスマウスの皮膚中サイトカイン濃度の経時推移から、まずIL-1 α が産生し、次いでIL-6およびMIP-2が産生されることが示唆された。また、1、5および20% CPC適用後24時間の皮膚中IL-1 α 濃度は用量に応じて減少した。このときの皮膚中CPC濃度は用量依存的であったが、IL-6およびMIP-2については5% CPCで最も高い値を示し、bell-shapeとなった。LSE-highにおいて適用したCPC濃度の増加に伴いサイトカイン産生量は増加した。組織中サイトカイン濃度は、0.03% CPC適用時でSaline群と差はなかったが、0.3%以上では組織中のIL-1 α は経時的に減少し、1%では顕著に減少した。IL-6は、0.3%では緩やかに減少したが1%では適用24時間後に顕著に増加した。また、IL-8ではcontrolおよび0.03%では経時的に増加したが、0.3%および1%では24時間までほぼ一定に推移した。

【結論】 培養皮膚モデルの利点としてヒト由来細胞を用いることや実際の皮膚に構造が近いことが挙げられるが、化学物質の透過性や組織学的構造の詳細について検討した結果、評価した培養皮膚モデルのうちLSE-highが最もヒト皮膚に近似していたものの、多くの培養皮膚モデルでは実際の皮膚とは大きく異なった。培養皮膚モデルの角層バリア機能はヒト皮膚に比べて低く、表皮細胞の角化が不十分など培養皮膚モデルの構造が理由であったが、化学物質の透過性についてヒト皮膚との間に1:1の相関を示すものもあった。化学物質により引き起こされる皮膚刺激性は、その作用部位である皮膚中の原因物質の濃度によって決定されることが明らかとなり、培養皮膚モデルにおける学物質の透過性の違いなどの特性を十分に把握した上で使用することで、培養皮膚モデルを用いた*in vitro*試験は、ヒト（*in vivo*）の予測に有用な手法になり得ると考えられた。

論文審査の結果の要旨

医薬品や化学物質のリスク評価に動物実験は欠かせないものであるが、近年、動物愛護の観点から、動物実験を制限する傾向が欧米を中心に高まっている。欧州では、2013年以降、動物実験を用いて開発された化粧品の販売が全面禁止となり、これを受けて局所適用される化学物質の安全性評価法に関して、従来の動物実験に替わる方法の開発が世界的に進められている。

本研究は、これまでの化粧品、医薬部外品開発のための動物を用いた皮膚刺激性評価を、動物個体を用いることなく、しかも目的とする適用種であるヒト細胞により細胞工学的に構築された三次元培養ヒト皮膚モデル（培養皮膚モデル）によって評価が可能か否かを明らかにすることを目的としたものである。本研究の多くは、培養皮膚モデルの特性（構造と機能）を詳細に比較・検討する内容である。なお、表皮モデルとしてEpiDerm™、Epi606X、LabCyte EPI-model、Neoderm-E、Episkin™を、表皮/真皮モデルとしてTESTSKIN™（LSE-high）、Vitrolife-skinを用いているが、いずれの培養皮膚モデルも角層を有している。

本論文は2編から成り、第1編では、各種の培養皮膚モデルの特性を明らかにするために、化学物質の皮膚刺激性に大きく影響する皮膚透過性と培養皮膚モデルの構造特性をヒト皮膚と比較・検討している。続いて、第2編では、第1編の結果に基づき、LSE-highを用いてモデル刺激物質暴露後の皮膚刺激性と皮膚中濃度との関係を、マウスやモルモットの動物皮膚と比較・検討している。

第1編では、以下に示す結果を得た。

- 1 分子量が同程度で脂溶性が異なる7種の化学物質の *in vitro* 透過性（皮膚透過係数、 P ）を、培養皮膚モデルとヒト皮膚で比較した。その結果、培養皮膚モデルとヒト皮膚間で $\log P$ に相関関係が認められたのは、LSE-high と EpiDerm™ であった。 P 値に影響する分配パラメータと拡散パラメータの解析から、相関関係には分配パラメータが大きく影響していることを明らかにした。また、LSE-high と EpiDerm™ のうち、LSE-high の分配パラメータがヒト皮膚のそれとほぼ一致することを示した。
- 2 種々の培養皮膚モデル間の構造上の相違を、組織化学的及び生化学的な方法により解析した。その結果、ヒト皮膚に比べ培養皮膚モデルでは、化学物質の皮膚への分配性と拡散性に影響する角層細胞間脂質から成るラメラ構造が大きく異なり、すべての培養皮膚モデルの角層バリア機能がヒト皮膚と比べて低いことを示唆していた。さらに、暴露した化学物質が皮膚中で代謝され、代謝物が皮膚刺激を示す可能性があるため、角層、表皮、真皮におけるカルボキシエステラーゼ活性の局在を視覚化して比較・検討したところ、培養皮膚モデル間でカルボキシエステラーゼの分布が大きく異なるものの、LSE-high と EpiDerm™ はヒト皮膚に類似して主に表皮中に分布していることを見出した。以上、第1編では培養皮膚モデルを用いて皮膚刺激性を評価する際、ヒト皮膚と比べて化学物質の透過性の違いや組織的な違いがあることを十分に把握したうえで評価することが重要であると結論している。

第2編では、第1編の結果からヒトの皮膚刺激性を最も予測できると考えられた LSE-high を用いて、以下に示す結果を得た。

1 Toxicokinetics/toxicodynamics (TK/TD) の考え方にに基づき、皮膚中の化学物質によって誘導される細胞障害性（皮膚刺激性）を、 E_{max} モデルを用いて解析した。皮膚刺激物質として選択した塩化セチルピリジニウム（CPC）の皮膚中濃度と皮膚刺激性の関係を、培養皮膚モデル（LSE-high）、ヘアレスマウス及びモルモットの皮膚を用いて比較・検討した。その結果、細胞障害性に基づく皮膚刺激の程度は、上記3種の皮膚（モデル）ともに概ね薬物の皮膚中濃度に比例することを見出した。また、*in vivo* ヒト皮膚における皮膚刺激性は、3種の皮膚のうち LSE-high に近いことを明らかにした。さらに、CPC の皮膚中濃度の経時変化と皮膚刺激性は、ヘアレスマウスと LSE-high のいずれも TK/TD に基づいて解析することが可能であった。さらに、CPC を intact または strip 処理したヘアレスマウス皮膚あるいは LSE-high に適用した際の皮膚刺激性の速度論的な違いは、角層バリアの破綻により説明が可能であった。

2 培養皮膚モデル及びヘアレスマウスの皮膚中炎症性サイトカイン[インターロイキン 1 α (IL-1 α)、インターロイキン 6 (IL-6)、ケモカインであるインターロイキン 8 (IL-8)、mouse macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)] 産生の経時変化を測定し、モデル化合物の皮膚刺激性（炎症反応）を検討した。その結果、LSE-high に CPC (0.01~1%) を 24 時間適用した後の IL-1 α 、IL-6、IL-8 の産生は、CPC の濃度に依存して増加することを見出した。一方、20% CPC をヘアレスマウスに適用した際には、皮膚中の IL-1 α 濃度が適用初期に一過性に増大したが、その後は徐々に減少し、IL-8、MIP-2 では経時的に増加することを見出している。これらの結果から、皮膚刺激評価においては、生細胞数の評価方法に比べてサイトカイン産生による評価方法が高感度であるものの、炎症メディエーターの産生には測定段階の影響も考えられることから、皮膚刺激メカニズムを考慮したうえでの検討がさらに必要であるとしている。

以上、第2編では、皮膚中の薬物濃度の変化と皮膚刺激性（細胞障害性：炎症反応）は密接に関連していること、さらに皮膚刺激性を評価するうえで、サイトカイン産生の指標が有用であることを明らかにした。

以上述べたように、今回検討した三次元培養ヒト皮膚モデルの中では、LSE-high がヒト皮膚の特性に最も近似しており、その他の培養皮膚モデルはヒト皮膚と性質が大きく異なり、それらの特性は多様であることを見出した。

本研究は、ヒト皮膚に適用した化学物質の皮膚中挙動と生体反応を、三次元培養ヒト皮膚モデルを用いて得られた結果と比較することで、このモデルの有用性と問題点を明らかにしたものであり、本論文の内容は、研究の意義に加えて新規性および独創性のどの観点においても課程によらない博士（薬科学）論文として十分価値のあるものと判断した。

以上