

# 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

加納 聰

# 目次

略号	6
記号	7
緒言	8
第1編 三次元培養ヒト皮膚モデルの特性	14
第1章 三次元培養ヒト皮膚モデルにおける 化学物質の透過性	15
第1節 実験方法	17
1. 実験材料	17
2. <u>In vitro</u> 皮膚透過実験	17
3. <u>In vitro</u> 皮膚透過実験サンプル測定の HPLC 条件	18
4. 統計解析	19
第2節 理論	20
1. 皮膚透過パラメータの算出	20
2. <u>化学物質の n-オクタノール/水分配係数 (<math>K_{o/w}</math>) と ヒト皮膚における透過係数 (<math>P</math>) の関係</u>	20
3. <u>化学物質の n-オクタノール/水分配係数 (<math>K_{o/w}</math>) とヒト皮膚 における皮膚透過パラメータ (<math>KL</math> および <math>DL^2</math>) の関係</u>	21
第3節 結果	22
1. <u>各化学物質の <math>\log P</math> に関するヒト皮膚と各培養皮膚モデル の相関</u>	22
2. <u>皮膚透過パラメータ (<math>\log KL</math> および <math>\log DL^2</math>) に関する ヒト皮膚と各培養皮膚モデルの相関</u>	25
第4節 考察	27
第5節 小括	30

第2章	三次元培養ヒト皮膚モデルの構造	31
第1節	実験方法	32
1.	<u>実験材料</u>	32
2.	<u>皮膚切片のヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色</u>	32
3.	<u>透過型電子顕微鏡 (TEM) による角層中ラメラ構造の観察</u>	33
4.	<u>共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による皮膚構造の観察</u>	33
5.	<u>皮内エステラーゼ分布の比較</u>	33
第2節	結果	34
1.	<u>HE 染色による比較</u>	34
2.	<u>TEM 観察による角層ラメラ構造の比較</u>	36
3.	<u>CLSM による皮膚構造の比較</u>	37
4.	<u>皮内エステラーゼ分布の比較</u>	39
第3節	考察	40
第4節	小括	42
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	43
第1章	死細胞率を指標にした皮膚刺激性の $E_{max}$ model による解析	45
第1節	実験方法	46
1.	<u>実験材料</u>	46
2.	<u>CPC の適用</u>	46
3.	<u>MTT assay</u>	48
4.	<u>HPLC による皮膚中濃度の測定</u>	49
第2節	理論	50
第3節	結果	51

第4節 考察	61
第5節 小括	63
<b>第2章 生細胞率を指標とした皮膚刺激性の経時的推移</b>	<b>64</b>
第1節 実験方法	64
1. <u>実験材料</u>	64
2. <u>CPC の適用</u>	65
3. <u>MTT assay</u>	65
4. <u>皮膚中 CPC 濃度の測定</u>	65
5. <u>皮内コハク酸脱水素酵素の観察</u>	65
6. <u>TER の測定および Dye Binding Test</u>	66
第2節 理論	66
1. <u>Intact skin における皮膚刺激反応</u>	67
2. <u>Stripped skin における皮膚刺激反応</u>	67
第3節 結果	68
第4節 考察	75
第5節 小括	78
<b>第3章 三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価におけるサイトカインの産生</b>	<b>79</b>
第1節 実験方法	80
1. <u>実験材料</u>	80
2. <u>CPC の適用</u>	80
3. <u>皮膚試料の採取</u>	80
4. <u>MTT assay</u>	81
5. <u>HPLC による組織中 CPC 濃度の測定</u>	81
6. <u>サイトカインの測定</u>	82

第2節	結果	82
1.	<u>ヘアレスマウスの皮膚中サイトカイン濃度</u>	82
2.	<u>CPCによる細胞毒性</u>	84
3.	<u>組織中CPC濃度</u>	85
4.	<u>生細胞率(%)の時間推移</u>	86
5.	<u>死細胞率(%)と組織中CPC濃度の関係</u>	87
6.	<u>CPC適用後のサイトカイン産生</u>	88
7.	<u>組織(LSE-high)中サイトカイン濃度</u>	91
第3節	考察	92
第4節	小括	95
総括		97
謝辞		109
引用文献		110

## 略語

ANP	Antipyrine
AMP	Aminopyrine
BA	Benzoic acid
CAF	Caffeine
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
CPC	Cetylpyridinium Chloride
DER	Dermis
DW	Distilled Water
ECVAM	European Center for the Validation of Alternative Methods
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffer Saline
FDA	Food and Drug Administration
FP	Flurbiprofen
HE	Hematoxylin-Eosin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-1 $\alpha$	Interleukin-1 $\alpha$
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
ISDN	Isosorbide dinitrate
ISMN	Isosorbide-5-mononitrate
JaCVAM	Japanese Center for the Validation of Alternative Methods
MIP-2	Mouse Macrophage Inflammatory Protein-2
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD	Pharmacodynamics
PK	Pharmacokinetics
RT	Room Temperature
SC	Stratum Corneum
SLS	Sodium Lauryl Sulfate
TD	Toxicodynamics
TEM	Transmission Electron Microscope
TER	Transepidermal Electric Resistance
TK	Toxicokinetics
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
VED	Viable Epidermis

## 記号

$C_v$	化学物質の基剤中濃度
$D$	化学物質の皮膚中の拡散係数
$DL^2$	化学物質の皮膚中の拡散パラメータ
$E_{max}$	最大効果
$I$	皮膚刺激度
$IC_{50}$	50% 皮膚刺激発現濃度
$I_{max}$	最大皮膚刺激度
$K$	化学物質の基剤／皮膚間の分配係数
$KL$	化学物質の基剤／皮膚間の分配パラメータ
$K_{o/w}$	化学物質の n-オクタノール／水分配係数
$k_1$	適用初期における生細胞率減少の一次速度定数
$k_2$	適用後期における生細胞率減少の一次速度定数
$k_{ss}$	stripped skin における生細胞率減少の一次速度定数
$L$	厚み
$OD_{570nm}$	570 nm における吸光度
$P$	化学物質の皮膚透過係数
$T$	変曲点
$t$	適用後の時間
$V$	時間 t に対する生細胞率 (%)
$V_{max}$	最大代謝反応速度
$V_{\infty}$	適用後の無限最大時間の生細胞率 (%)
$\gamma$	形状因子 (Hill 係数)

## 緒言

現在のところ、医薬品や化学物質のリスクアセスメントに動物実験は欠かせないものとなっている。しかしながら、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おり、実験動物を用いない代替試験法（代替法）の開発が進められている。日本においても動物の愛護及び管理に関する法律（動愛法）が2006年に改正され、実験動物の3Rs（Reduction、Refinement および Replacement）の徹底が図られている。また、米国、欧州および日本において、それぞれ ICCVAM（Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods）、ECVAM（European Center for the Validation of Alternative Methods）および JaCVAM（Japanese Center for the Validation of Alternative Methods）が組織され、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法の開発が推進されている。

3Rsのうち Replacement については、細胞を用いた *in vitro* 試験法が開発されている。医薬品の毒性試験ガイドラインでは、*in vitro* 毒性試験として遺伝毒性試験における Ames 試験や染色体異常試験がすでに記載されている。また、Balb/c 3T3 細胞を用いた光毒性試験は、OECD（Organisation for Economic Co-operation and Development）ガイドライン（TG-432）<sup>1)</sup> に採用されており、酵母光育成阻害試験と赤血球光溶血試験のバッテリー試験についてもその有用性が認められている。

皮膚刺激性試験に関しては、三次元培養ヒト皮膚モデル（培養皮膚モデル）を用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験が動物実験代替法として注目されている。培養



皮膚モデルは、1970年代に Green や Bell などの先達によって *in vitro* 培養法<sup>2)</sup> が確立され、その技術を応用した製品が既に市販されている。この培養皮膚モデルは、Caco-2 などの単層の二次元型とは異なり、z 軸方向に表皮-角層が重層する三次元型の構造をしている。真皮由来の繊維芽細胞 (fibroblast) をコラーゲンゲルやスポンジに包埋培養し真皮様組織を再構築した後、表皮角化細胞 (keratinocyte) を積層培養することで皮膚組織を再構築している。培養皮膚モデルには、このように真皮層と表皮層の 2 層を有する皮膚モデル (full-thickness モデル) に加え、表皮層のみからなる表皮モデルもあり、これらの多くは、セルカルチャーインサート (Transwell、培養カップ) を用いてポリカーボネートなどのメンブラン上で培養されたキットとして販売されている。これらは、ヒト由来細胞 (fibroblast、keratinocyte) を用いて調製され、ヒト皮膚に近い構造を再現 (Figure 1) していることから、代替法に用いる培養モデルとして期待されている。

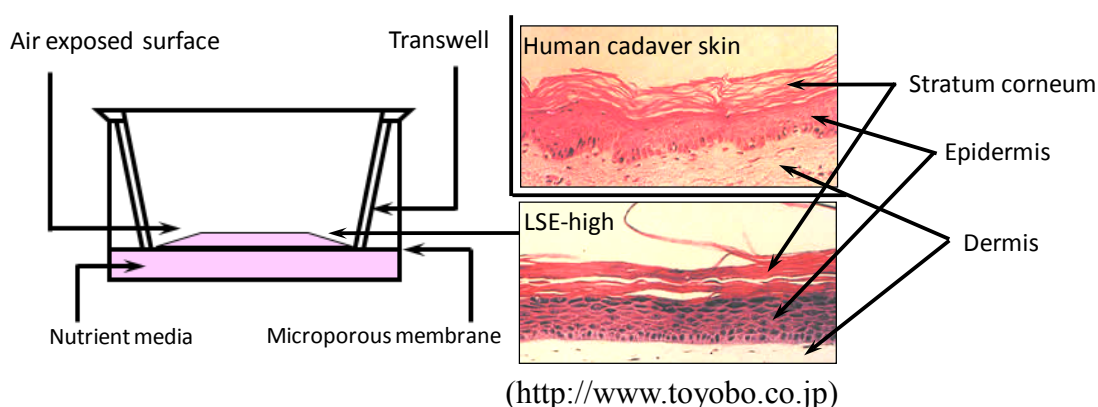


Figure 1 Structure of three dimensional cultured human skin model (LSE-high) and excised human cadaver skin

皮膚刺激性は、皮膚において最も一般的な副作用の一つである。ヒトにおける皮膚刺激性は、パッチテストによって評価されるが、その予測については

これまで動物を用いた Draize 試験<sup>3)</sup>が行われてきた。Draize 試験は、薬物を一定時間皮膚に適用し、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評価方法である。主にモルモットやウサギが用いられるが、皮膚の構造がヒトに近いとされるミニブタが用いられることもある。

上述した培養皮膚モデルは、実際の皮膚の構造に極めて近いものの、血管系が存在しないため動物を用いた Draize 試験のような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細胞毒性試験が用いられ、1) MTT 試験、2) ニュートラルレッドの取り込み、3) 乳酸脱水素酵素の放出、その他 4) サイトカインの放出などが指標として利用され、OECD ガイドライン (TG-439)<sup>4)</sup> においては、MTT 試験<sup>5)</sup>が採用されている。MTT 試験は、細胞毒性試験として汎用されており、細胞内ミトコンドリアのコク酸脱水素酵素によって MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) が還元されて生じるホルマゼンを定量し、その割合を生細胞率 (または、死細胞率) とする方法である。

2007 年に培養皮膚モデルとして Episkin<sup>TM</sup> および EpiDerm<sup>TM</sup> を用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験および腐食性試験が OECD ガイドライン (TG-439) として承認された。次いで、2010 年および 2013 年には、SkinEthic<sup>TM</sup> RHE および LabCyte EPI-Model 24 SIT が同試験に用いる培養皮膚モデルとして採用されている。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、現在、動物実験代替法の開発は世界的に加速している。本邦においても化粧品や医薬部外品のための動物を用いた皮膚刺激性試験は、培養皮膚モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験に置き換わろうとしている。

OECD ガイドライン (TG-439) における培養皮膚モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験のプロトコルを以下に概説する。

**Table 1 Protocol parameters specific to each of the test methods included in TG439<sup>4)</sup>**

	<b>EpiSkin™ (SM)</b>	<b>EpiDerm™ SIT (EPI-200)</b>	<b>SkinEthic RHE™</b>	<b>LabCyte EPI-MODEL 24 SIT</b>
<b>A) Pre-incubation</b>				
Incubation time	18- 24 h	18-24 h	< 2 h	15-30 h
Medium volume	2 mL	0.9 mL	0.3 mL	0.5 mL
<b>B) Chemical application</b>				
For liquids	10 µL (26 µL/cm <sup>2</sup> )	30 µL (47 µL/cm <sup>2</sup> )	16 µL (32 µL/cm <sup>2</sup> )	25 µL (83 µL/cm <sup>2</sup> )
For solids	10 mg (26 mg/cm <sup>2</sup> ) + DW (5 µL)	25 mg (39 mg/cm <sup>2</sup> ) + DPBS (25 µL)	16 mg (32 mg/cm <sup>2</sup> ) + DW (10 µL)	25 mg (83 mg/cm <sup>2</sup> ) + DW (25 µL)
Use of nylon mesh	Not used	If necessary	Applied	Not used
Total application time	15 min	60 min	42 min	15 min
Application temperature	RT	a) at RT for 25 min b) at 37°C for 35 min	RT	RT
<b>C) Post-incubation volume</b>				
Medium volume	2 mL	0.9 mL x 2	2 mL	1 mL
<b>D) Maximum acceptable variability</b>				
Standard deviation between tissue replicates	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18

RT: Room temperature

DW: Distilled water

DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffer Saline

一定時間プレインキュベートした後、被験物質を培養皮膚モデルの表面に適用する。所定の時間後、表面をリン酸緩衝液などで洗浄して被験物質を除去し、さらに所定の時間インキュベートした後、MTT を含有する培地に移して 3 h

培養する。培養皮膚モデルをパンチで打ち抜き、酸性イソプロパノール液に浸漬して、ホルマザンを抽出し、抽出液の 570 nm における吸光度 (OD<sub>570nm</sub>) を測定する。溶媒対象 (陰性対照) に対する被験物質の OD<sub>570nm</sub> 値の割合を生細胞率とし、生細胞率が 50% 以下の場合に「刺激性あり」、50% を上回る場合に「刺激性なし」と判定する。ただし、プレインキュベーション時間、被験物質の塗布量、適用時間など詳細な実験条件は、用いる培養皮膚モデルによって異なっている (Table 1)。

皮膚に適用された化学物質による皮膚刺激性は、基本的にはその物質が持つ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、皮膚刺激性を引き起こす物質であっても、皮膚中に浸透しなければ皮膚刺激性は示さない。化学物質の皮膚透過において角層が主なバリアであることはよく知られている<sup>6)</sup> このことは、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要因の一つであり、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であり、培養皮膚モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験においても化学物質の皮膚透過性を考慮することが重要と考えられる。

培養皮膚モデルは、その構造中に角層を有している。これは、軟膏、クリームおよびローションといった製剤の形で被験物質を適用することができるという点において培養皮膚モデルを *in vitro* 皮膚刺激性試験に用いる利点の一つである。しかし、その角層のバリア機能は培養皮膚モデルによって異なる可能性が考えられる。上述のとおり、OECD ガイドライン (TG-439) では、いくつかの培養皮膚モデルが採用されているが、実験条件の詳細は培養皮膚モデル毎に

異なっている。特に被験物質の適用時間が異なるのは、被験物質の透過性が培養皮膚モデルによって異なることに起因すると推察される。

本研究では、化学物質による皮膚刺激性の決定要因の一つとして化学物質の皮膚透過性に注目し、第 1 編では各種培養皮膚モデルの特性を明らかにすることを目的に検討を行った。まず、第 1 章において脂溶性の異なる化学物質の透過性を比較することで各種培養皮膚モデルの機能的な特徴を把握した。次いで、第 2 章において組織学的な検討を実施し、化学物質の透過性に影響を及ぼす要因として各種培養皮膚モデルの構造上の違いを明らかにした。

さらに、第 2 編では培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価への応用として培養皮膚モデルを用いた *in vitro* 評価と動物を用いた *in vivo* 評価を比較した。なお本研究では、*in vitro* 評価と *in vivo* 評価を比較するため、*in vivo* 評価においても *in vitro* 評価と同様に MTT 試験により求めた生細胞率または死細胞率を皮膚刺激性の指標として用いた。第 1 章では、皮膚刺激性の PK/PD 解析として死細胞率と皮膚中濃度の関係について  $E_{max}$  model を用いて解析し、第 2 章では生細胞率の経時推移について速度論的な解析を試みた。さらに、第 3 章では細胞毒性以外の評価法としてサイトカイン産生について確認した。

## 第 1 編 三次元培養ヒト皮膚モデルの特性

ヒトあるいは実験動物の摘出皮膚は、化学物質の皮膚透過実験や皮膚刺激性および腐食性の検討に広く利用されている。また、ヒトの細胞を用いて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）の利用が近年期待されており、OECD ガイドライン（TG-439）<sup>4)</sup> では、2007 年に培養皮膚モデルである Episkin<sup>TM</sup> および EpiDerm<sup>TM</sup> が皮膚刺激性および腐食性試験に採用された。次いで、2010 年および 2013 年には、SkinEthic<sup>TM</sup> RHE および LabCyte EPI-Model 24 SIT が同試験に採用された。

本邦で購入できる培養皮膚モデルには、TG-439 に採用されている Episkin<sup>TM</sup>、EpiDerm<sup>TM</sup> および LabCyte EPI-Model に加えて、TESTSKIN<sup>TM</sup> LSE-high（以下 LSE-high）、Vitrolife-skin、Neoderm-E などがある（Table 2）。

Table 2 The available three dimensional cultured skin models in Japan

Cultured Skin Models	Supplier (Manufacturer)
TESTSKIN <sup>TM</sup> LSE-high	Toyobo Co., Ltd.
EpiDerm <sup>TM</sup> Epi606X *)	Kurabo Industries Ltd.
Neoderm-E	Tego Science Inc.
Vitrolife-skin	Gunze Ltd.
LabCyte EPI-model *)	Japan Tissue Engineering Co., Ltd.
Episkin <sup>TM</sup> *)	Skinethic Laboratories

\*)： accepted by TG-439 in OECD guideline

本編では各種培養皮膚モデルの特性を明らかにすることを目的に、脂溶性の異なる化学物質の透過性を比較（第 1 章）し、組織学的な検討による各培養皮膚モデルの構造上の違いを明らかにした（第 2 章）。

## 第1章 三次元培養ヒト皮膚モデルにおける化学物質の透過性<sup>7)</sup>

培養皮膚モデルの有用性は、化学物質の皮膚刺激性試験および皮膚腐食性試験に並んで皮膚透過性についても数多く報告されている<sup>8-14)</sup>。しかしながら、これら報告の多くは、ヒトあるいは動物の摘出皮膚と培養皮膚モデルの間で化学物質の皮膚透過一時間プロファイルや皮膚透過係数 ( $P$ ) の値が異なることを示しているにすぎない。Watanabe らや Morimoto らは、ヒトの摘出皮膚とヘアレスラットの摘出皮膚において、脂溶性の化学物質の  $\log P$  値が概ね 1:1 の関係を示すことを報告している<sup>15, 16)</sup>。ここで、 $P$  値は、以下に示すように分配パラメータ ( $KL$ ) と拡散パラメータ ( $DL^2$ ) の積で表わすことができる。

$$P = \frac{DK}{L} = (DL^2)(KL)$$

皮膚透過パラメータである  $KL$  および  $DL^2$  は、化学物質の脂溶性や角層への浸透能と密接に関係している。Watanabe らは、物理化学的特性が異なる 7 種の化学物質の皮膚透過係数 ( $P$ ) の対数值 ( $\log P$ ) は、培養皮膚モデルである LSE-high とヒトの摘出皮膚の間で良い相関を示すことを報告している<sup>15)</sup>。ここで LSE-high とは、Bell らによって開発された Living Skin Equivalent (LSE)<sup>17)</sup> を原型とし、培養条件の改変により角層のバリア機能を向上させたモデルで、バリア機能の指標の一つである水の透過速度は、LSE のおよそ 1/3 に低減されている<sup>18)</sup>。さらに、Watanabe らの報告<sup>15)</sup> では、LSE-high の  $\log P$  の値は、ヒト皮膚のおよそ 10 倍高い値を示した。透過パラメータのうち  $\log KL$  が LSE-high とヒト皮膚で同程度であったのに対し、 $\log DL^2$  は LSE-high がヒト皮膚の 10 倍高い

値を示した。すなわち、LSE-high とヒト皮膚では、化学物質の皮膚（角層）への分配は同程度であるが、皮膚中の拡散はヒト皮膚に比べて LSE-high の方が 10 倍高い（速い）ために、LSE-high の透過係数 ( $P$ ) はヒト皮膚のおよそ 10 倍高い値を示すことを明らかにしている。このように、化学物質の皮膚透過パラメータである  $KL$  と  $DL^2$  のプロファイルを明らかにすることによって培養皮膚モデルの特性を表わすことができる。

化学物質による皮膚刺激性は、基本的にはその物質が持つ皮膚刺激能によるが、症状の発現には化学物質の皮膚透過性が密接に関係している。実際にヒトにおける皮膚刺激性を予測するためには、培養皮膚モデルの透過性とヒト皮膚における透過性の関係を把握しておくこと、望ましくは 1:1 の関係であることが重要である。

培養皮膚モデルは、真皮層を有する表皮／真皮モデルと表皮層のみからなる表皮モデルに大別される。本研究では、本邦で購入可能な 6 種の培養皮膚モデル（表皮／真皮モデル：LSE-high および Vitrolife-skin、表皮モデル：EpiDerm<sup>TM</sup> Epi606X、LabCyte EPI-model、Neoderm-E および Episkin<sup>TM</sup>）について、同程度の分子量で異なる脂溶性を示す 7 種類の化学物質（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ビプロフェン）を用いて *in vitro* 皮膚透過実験を行い、 $P$  値および皮膚透過パラメータ ( $KL$  および  $DL^2$ ) について培養皮膚モデルとヒト皮膚で比較した。

皮膚透過パラメータを用いた培養皮膚モデルの特性把握は、化学物質のヒト皮膚透過性の予測に有用であり、実験動物の削減（Reduction）にも寄与できると考える。



## 第1節 実験方法

### 1. 実験材料

アンチピリン (ANP)、カフェイン (CAF)、アミノピリン (AMP) および安息香酸 (BA) は、和光純薬工業株式会社 (大阪) より、硝酸イソソルビド (ISDN) は、シグマアルドリッチ (St. Louis, MO, U.S.A.) より、一硝酸イソソルビド (ISMN) は、東京化成工業株式会社より購入した。フルルビプロフェン (FP) は、リードケミカル (富山) より供与された。

TESTSKIN™ LSE-high (LSE-high) は、東洋紡株式会社 (大阪) より購入した。EpiDerm™ Epi606X (EpiDerm) は、倉敷紡績株式会社 (大阪) より購入した。Neoderm-E は、Tego Science Inc. (Seoul, Korea) より購入した。Vitrolife-skin は、グンゼ株式会社 (京都) より購入した。LabCyte EPI-model は、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (蒲郡、愛知) より購入した。Episkin™ (Episkin) は、Skinethic Laboratories (St. Philippe, France) より購入した。

いずれの培養皮膚モデルも、受領後 3 日以内に使用した。

### 2. In vitro 皮膚透過実験

各培養皮膚モデルは、pH 7.4 のリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後、メスを用いてウェルプレートから取りはずして使用した。EpiDerm、Neoderm-E および Vitrolife-skin は、side-by-side 型の拡散セル (有効拡散面積 :  $0.95 \text{ cm}^2$ )<sup>19)</sup> に装着し、LabCyte EPI-model および Episkin は、Franz 型の拡散セル (有効拡散面積 :  $0.50 \text{ cm}^2$ ) に装着した。PBS をドナーセルとレシーバーセルに適用し 1 h 水和させた後、ドナーセルから PBS を除去し、各化学物質を懸濁させた PBS をドナーセルに適用

した。レシーバーセルには、水溶性化学物質（ANP、ISMNおよびCAF）の場合はPBSを、脂溶性化学物質（AMP、ISDN、BAおよびFP）の場合は40%ポリエチレングリコール400溶液を適用した。透過実験は、32°Cで行った。所定の時間にレシーバー溶液を1 mL採取し、その都度同量のレシーバー溶液を補充した。採取したサンプル溶液中の化学物質濃度はHPLCを用いて測定した。

本研究にはWatanabeらの報告<sup>15)</sup>と同じ7種の化学物質を使用した（Table 1）。なお、Log  $K_{o/w}$ の値はWatanabeらの結果<sup>15)</sup>を引用した。さらに、ヒトの摘出皮膚およびLSE-highの透過実験の結果についてもWatanabeらの結果<sup>15)</sup>を引用した。

Table 1 Chemical structures and physicochemical parameters of model compounds<sup>15)</sup>

Antipyrine (ANP) <i>M.W.</i> : 188 Log $K_{o/w}$ : -1.507		Isosorbide dinitrate (ISDN) <i>M.W.</i> : 236 Log $K_{o/w}$ : 1.225	
Isosorbide-5-mononitrate (ISMN) <i>M.W.</i> : 191 Log $K_{o/w}$ : -0.151		Benzoic acid (BA) <i>M.W.</i> : 122 Log $K_{o/w}$ : 1.410	
Caffeine (CAF) <i>M.W.</i> : 194 Log $K_{o/w}$ : -0.123		Flurbiprofen (FP) <i>M.W.</i> : 224 Log $K_{o/w}$ : 2.179	
Aminopyrine (AMP) <i>M.W.</i> : 231 Log $K_{o/w}$ : 1.065			

### 3. *In vitro* 皮膚透過実験サンプル測定のためのHPLC条件

Table 2 に HPLC の測定システムを、Table 3 に各化学物質の定量条件を示す。

透過実験より得られたサンプル溶液は、AMP、ISDN、BA および FP の場合は、内部標準物質を含有したアセトニトリルと、ANP、ISMN および CAF の場合は、アセトニトリルと 1 : 1 で混和し、遠心分離（12,000 rpm、5 分、4°C）後、その上清を測定用試料とした。

Table 2 HPLC system and condition

Pump	LC-10AD	Shimadzu co., Kyoto
UV detector	SPD-10AV	Shimadzu co., Kyoto
Auto injector	SIL-10A	Shimadzu co., Kyoto
Column	Wakopak Wakosil-2 5C18HG 4.6 mm i.d.×250 mm	Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka
Column oven	CTO-20A	Shimadzu co., Kyoto
Integrator	SCL-10A	Shimadzu co., Kyoto
Flow rate	1.0 mL/min	
Column temperature	40°C	
Injection volume	20 µL	

Table 3 HPLC conditions for determination of model compounds.

Compounds	Mobile phase	Detection (nm)	Internal standard
AMP	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid containing 5 mM SDS = 10 : 90	245 nm	butyl p-hydroxy benzoate
ISDN	acetonitrile : water = 55 : 45	245 nm	butyl p-hydroxy benzoic acid
BA	acetonitrile : 50 mM potassium dihydrogen phosphate = 45 : 55	245 nm	ethyl p-hydroxy benzoate
FP	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid = 50 : 50	245 nm	isopropyl p-hydroxy benzoate
ANP	acetonitrile : water = 30 : 70	254 nm	—*
ISMN	acetonitrile : water = 10 : 90	220 nm	—*
CAF	acetonitrile : water = 10 : 90	254 nm	—*

\* Quantitation was calculated with absolute calibration method.

#### 4. 統計解析

各化学物質の  $\log P$  に関するヒト皮膚と各培養皮膚モデルの相関は、スピアマンの順位相関係数 (Spearman's rank correlation coefficient) を用いて有意水準 5% で検定した。

## 第2節 理論

### 1. 皮膚透過パラメータの算出

各化学物質の累積皮膚透過量を時間に対してプロットした累積皮膚透過量－時間プロファイルの定常状態時の傾きを皮膚に適用した化学物質の濃度で除すことで透過係数 ( $P$ ) を算出した。累積皮膚透過量－時間プロファイルは、フィックの拡散第 2 法則から導かれた式 (1) で表わすことができる<sup>20)</sup>。皮膚透過パラメータである  $DL^2$  と  $KL$  は、式 (1) より算出した。

$$Q = KLCv \left[ \frac{D}{L^2} t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-\frac{D}{L^2} n^2 \pi^2 t\right) \right] \quad (1)$$

$$P = \frac{DK}{L} = (DL^2)(KL) \quad (2)$$

ここで、 $Q$  は単位面積当たりの化学物質の皮膚透過量を、 $K$  は化学物質の皮膚／基剤間の分配係数を、 $L$  は化学物質の拡散距離 (皮膚の厚み) を、 $Cv$  は溶媒中の化学物質濃度を、 $D$  は皮膚中の拡散係数を、 $t$  は化学物質を皮膚に適用後の時間をそれぞれ表わす。また、 $P$  は  $DL^2$  と  $KL$  の積とし、式 (2) より算出した。

### 2. 化学物質の n-オクタノール／水分配係数 ( $K_{o/w}$ ) とヒト皮膚における透過係数 ( $P$ ) の関係

Watanabe ら<sup>15)</sup> および Morimoto ら<sup>16)</sup> が報告している化学物質の n-オクタノール／水分配係数 ( $K_{o/w}$ ) とヒト皮膚透過係数 ( $P$ ) の関係を Figure 2 に示す。

$\log K_{o/w}$  が正の値のとき、 $\log K_{o/w}$  とヒト皮膚における  $P$  値 ( $\log P$ ) は比例関係にある。今回モデル化学物質として選択した ANP、ISMN および CAF の

$\log K_{o/w}$  は負の値を示すが、Figure 2 中では比例関係の範囲内に位置すると考えられる。したがって、7種の化学物質の  $\log K_{o/w}$  に対し  $\log P$  はある傾きを持つ直線関係となる仮定に基づきその関係性を解析した。

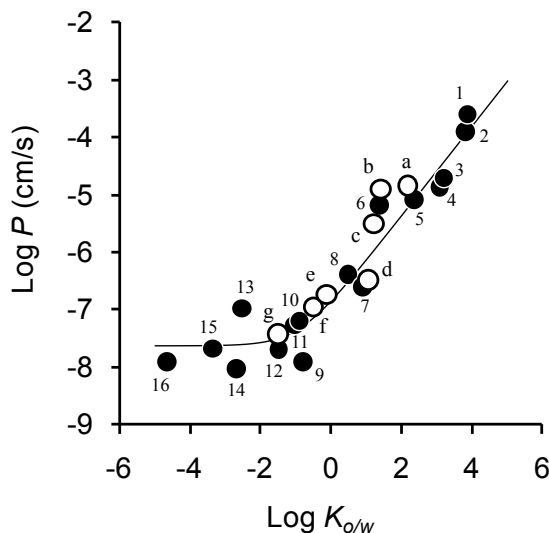


Figure 2 Relationship between  $\log P$  values in excised human cadaver skin and  $\log K_{o/w}$  values of chemical compounds

○: Watanabe et al, *AATEX*, 8, 1-14 (2001) <sup>15)</sup>

a; Flurbiprofen, b; Benzoic acid, c; Isosorbide dinitrate, d; Aminopyrine, e; Caffeine, f; Isosorbide-5-mononitrate, g; Antipyrine

●: Morimoto et al., *J Pharm Pharmacol*, 44, 634-639 (1992) <sup>16)</sup>

1; Ibuprofen, 2; Flurbiprofen, 3; Indomethacin, 4; Ketoprofen, 5; Lignocaine, 6; Isosorbide dinitrate, 7; Cyclobarbitone, 8; Aminopyrine, 9; 5-Fluorouracil, 10; Diclofenac sodium, 11; Nicorandil, 12; Antipyrine, 13; Morphine hydrochloride, 14; Isoprenaline hydrochloride, 15; Dopamine hydrochlorid, 16; Levodopa

### 3. 化学物質の n-オクタノール／水分配係数 ( $K_{o/w}$ ) とヒト皮膚における皮膚透過パラメータ ( $KL$ および $DL^{-2}$ ) の関係

Watanabe ら <sup>15)</sup> が報告している 7 種の化学物質の n-オクタノール／水分配係数 ( $K_{o/w}$ ) とヒト皮膚における皮膚透過パラメータ ( $KL$  および  $DL^{-2}$ ) の両対数プロットを Figure 3 示す。  $\log K_{o/w}$  が増加しても  $\log DL^{-2}$  はほぼ一定であった (Figure 3 右) のに対して、  $\log KL$  は  $\log K_{o/w}$  の増加に応じて増加し (Figure 3

左)、Figure 2 に示した  $\log K_{o/w}$  と  $\log P$  の関係と類似していた。

式 (2) に示した通り、 $P$  は  $KL$  と  $DL^{-2}$  の積として表すことができる。 $KL$  および  $DL^{-2}$  は、それぞれ分配と拡散を表すパラメータであるが、化学物質の皮膚透過性をそれぞれのパラメータに分けて表すことで、ヒトの摘出皮膚と培養皮膚モデルにおける化学物質の透過性の比較において、より詳細に培養皮膚モデルの特性を特徴づけることができると考えられる。

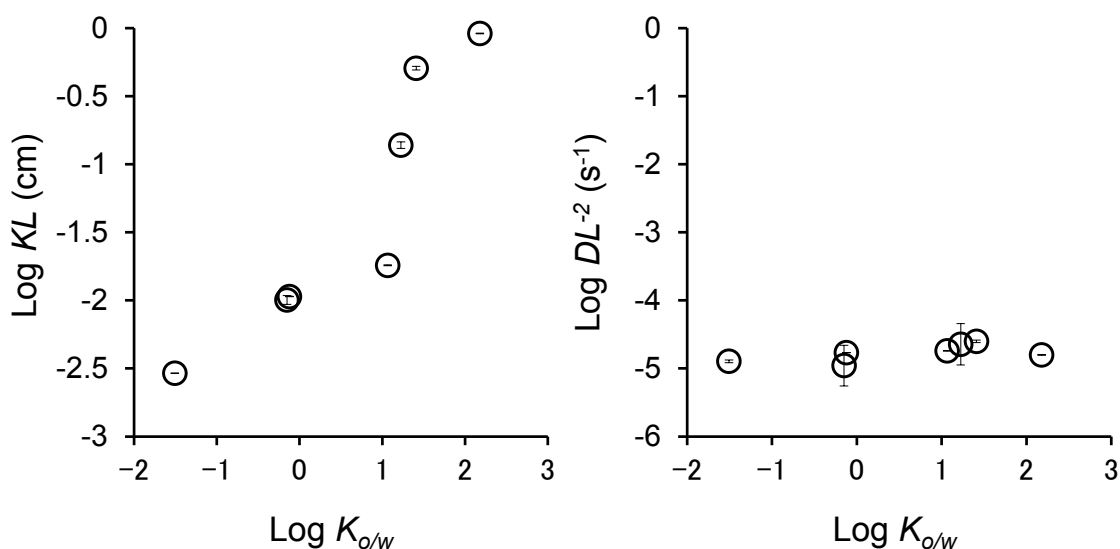


Figure 3 Relationships between  $\log KL$  and  $\log DL^{-2}$  values in excised human cadaver skin and  $\log K_{o/w}$  values of chemical compounds

Right: Relationships between  $\log KL$  values and  $\log K_{o/w}$  values of chemical compounds  
Left: Relationships between  $\log DL^{-2}$  values and  $\log K_{o/w}$  values of chemical compounds

### 第3節 結果

#### 1. 各化学物質の $\log P$ に関するヒト皮膚と各培養皮膚モデルの相関

各化学物質の  $K_{o/w}$  に対する各培養皮膚モデルにおける透過係数 ( $P$ ) の両対数プロットを Figure 4 に示す。なお、ヒト皮膚の結果 (Figure 3) も同時にプロットした。

LSE-high では、化学物質の  $\log K_{o/w}$  の増加に応じて  $\log P$  も増加した (Figure

4a) が、LSE-high における  $\log P$  は、いずれの化学物質もヒト皮膚に比べておよそ 10 倍高い値を示した。Epiderm についても化学物質の  $\log K_{o/w}$  の増加に応じて  $\log P$  が増加した (Figure 4b)。FP を除いて  $\log P$  はヒト皮膚とほぼ同程度の値を示した。Vitrolife-skin および Neoderm-E では、BA と FP の  $\log P$  がヒト皮膚に類似したものの、その他の化学物質では  $\log K_{o/w}$  に依存せず、 $\log P$  の値はほぼ一定であった (Figures 4c、d)。LabCyte EPI-model および Episkin においては、 $\log K_{o/w}$  と  $\log P$  の間に法則性は見出せなかった (Figures 4e、f)。

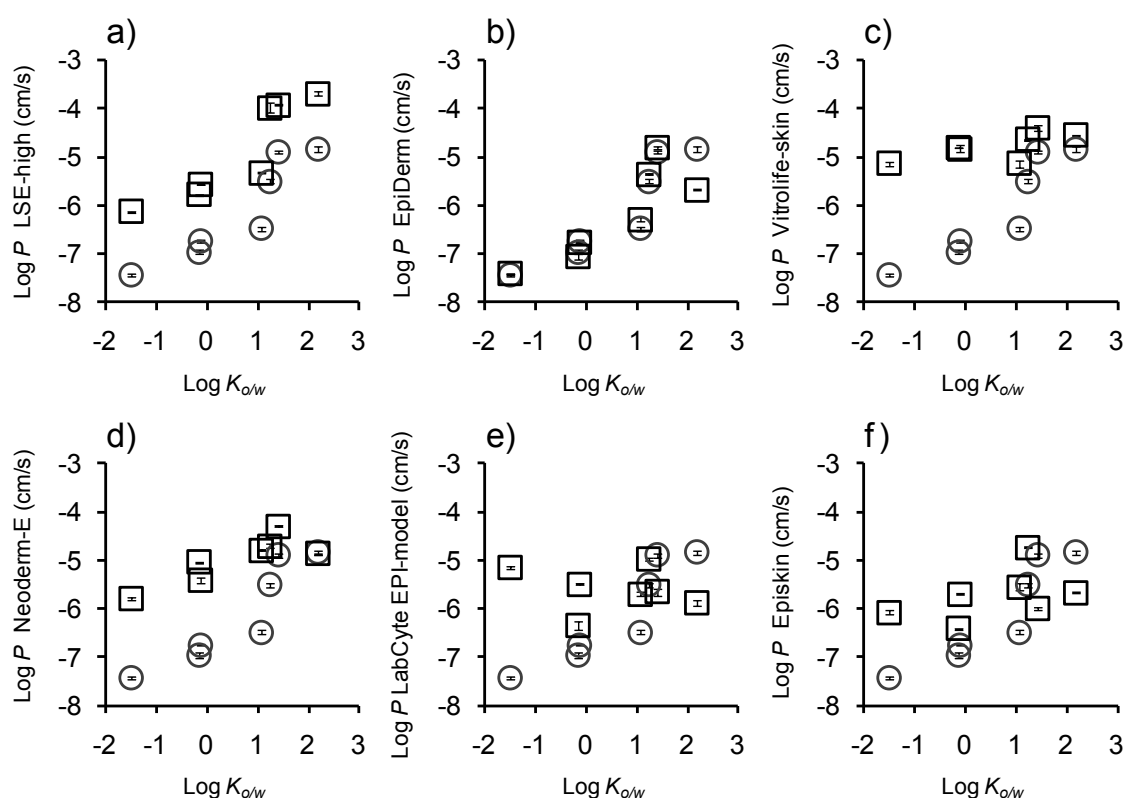


Figure 4 Relationships between  $\log P$  values in cultured skin models and  $\log K_{o/w}$  values of chemical compounds

a): LSE-high, b): EpiDerm, c): Vitrolife-skin,  
d): Neoderm-E, e): LabCyte EPI-model and, f): Episkin  
Symbols: ○; human skin, □; cultured skin model.  
Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=4-6).

各培養皮膚モデルにおける各化学物質の  $\log P$  (x 軸) とヒト皮膚における各化学物質の  $\log P$  (y 軸) との関係を示す。

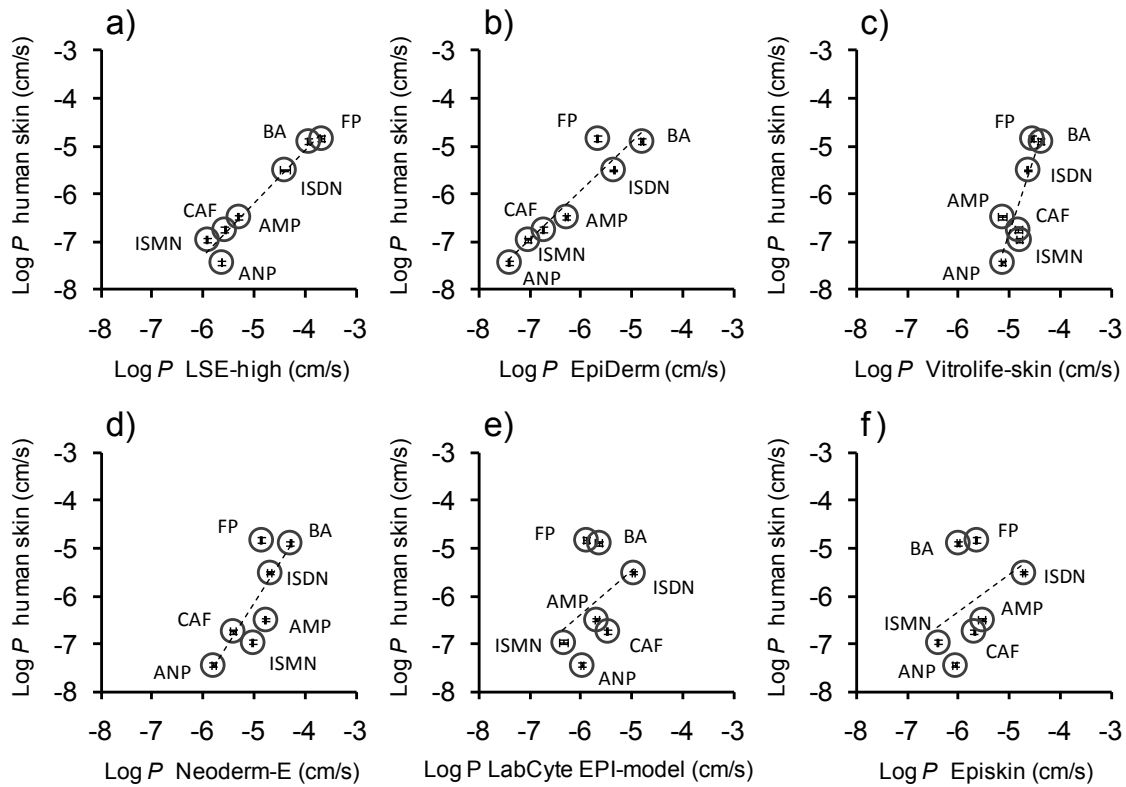


Figure 5 Relationships between  $\log P$  values in excised human cadaver skin and  $\log P$  values in cultured skin models

- 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,
  - f): Episkin versus excised human cadaver skin.
- Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=4-6).

Watanabe らの報告<sup>15)</sup>において、ヒト皮膚における  $\log P$  と LSE-high における  $\log P$  の関係は以下のように表される (Figure 5a)。

$$\text{Log}P_{\text{human}} = 0.992 \cdot \text{Log}P_{\text{LSE-high}} - 1.228 \quad (r=0.9401, p<0.05)$$

ヒト皮膚および LSE-high における  $\log P$  は、傾きがほぼ 1.0 の良好な相関を



示したものの、LSE-highにおける  $\log P$  が、ヒト皮膚に比べておよそ 10 倍高い値を示している。

EpiDerm について、ヒト皮膚との間でほぼ 1:1 の極めて良好な相関が認められた (Figure 5b)。

$$\text{Log}P_{\text{human}} = 1.022 \cdot \text{Log}P_{\text{EpiDerm}} - 0.202 \quad (r=0.9401, p<0.05)$$

LSE-high とは異なり、EpiDerm ではヒト皮膚とほぼ同等の  $\log P$  値を示した。一方、Vitrolife-skin、Neoderm-E、LabCyte EPI-model および Episkin では、ヒト皮膚との間に  $\log P$  に関する相関は認められなかった (Figures 5c-f)。

$$\text{Log}P_{\text{human}} = 2.929 \cdot \text{Log}P_{\text{Vitrolife-skin}} - 7.871 \quad (r=0.8035, p>0.05)$$

$$\text{Log}P_{\text{human}} = 1.688 \cdot \text{Log}P_{\text{Neoderm-E}} + 2.32 \quad (r=0.8162, p>0.05)$$

$$\text{Log}P_{\text{human}} = 0.937 \cdot \text{Log}P_{\text{LabCyteEPI-model}} - 0.759 \quad (r=0.3894, p>0.05)$$

$$\text{Log}P_{\text{human}} = 0.768 \cdot \text{Log}P_{\text{episkin}} - 1.17 \quad (r=0.8162, p>0.05)$$

## 2. 皮膚透過パラメータ ( $\log KL$ および $\log DL^2$ ) に関するヒト皮膚と各培養皮膚モデルの相関

各化学物質の  $K_{o/w}$  に対する  $KL$  の両対数プロットを Figure 6 に示す。LSE-high では、ANP の  $KL$  がヒト皮膚に比べ高値を示したのを除いて、ヒト皮膚とほぼ同様の  $KL$  値を示した (Figure 6a)。EpiDerm では、ヒト皮膚と同様に  $K_{o/w}$  の増加に応じて  $KL$  が増加した。しかしながら、いずれの化学物質の  $KL$  もヒト皮膚に比べて低い値を示し、その差は脂溶性化学物質で顕著であった (Figure 6b)。Neoderm-E、Vitrolife-skin、LabCyte EPI-model および Episkin では、ヒト皮膚と

は異なる  $KL$  の増加挙動を示した (Figures 6c-f)。

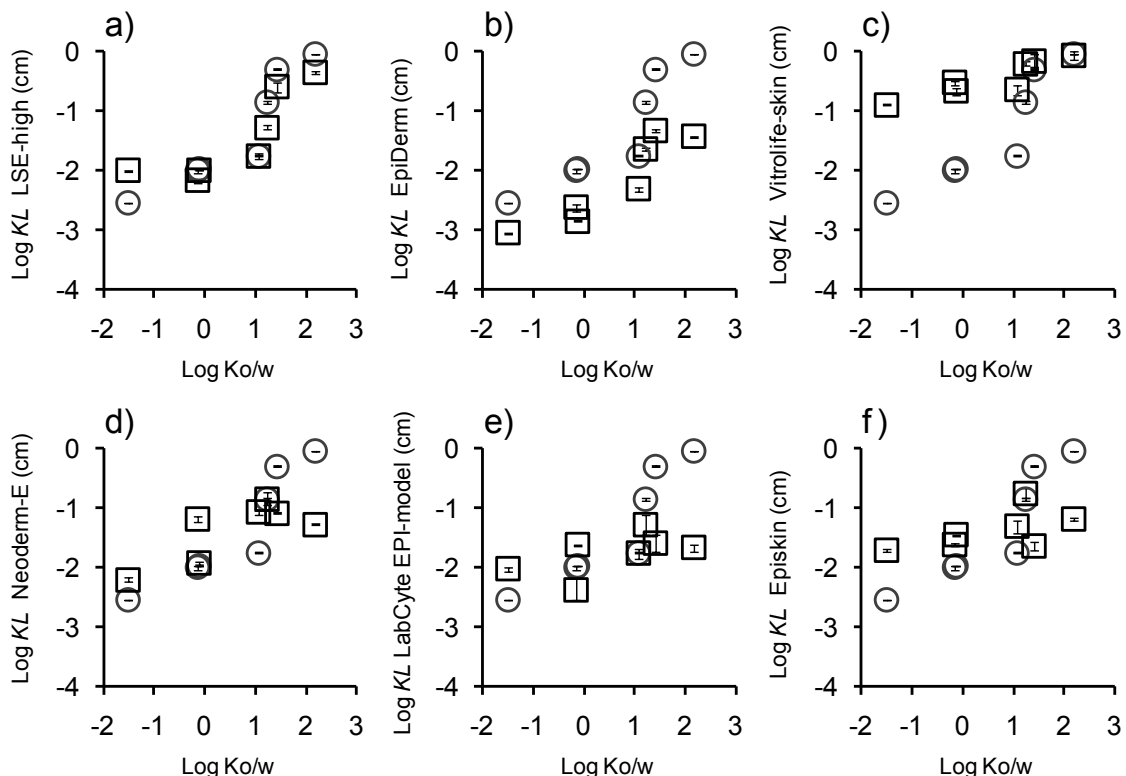


Figure 6 Relationships between log  $KL$  values in cultured skin models and log  $K_{o/w}$  values of chemical compounds

a): LSE-high, b): EpiDerm, c): Vitrolife-skin,  
d): Neoderm-E, e): LabCyte EPI-model, f): Episkin.  
Symbols: ○; human skin, □; cultured skin model.  
Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=4-6).

次に、各化学物質の  $K_{o/w}$  に対する  $DL^2$  の両対数プロットを Figure 7 に示す。

いずれの培養皮膚モデルにおいても  $DL^2$  の値は、ヒト皮膚に比べて高い値を示したものの、ヒト皮膚と同様に  $K_{o/w}$  の値に関係なくほぼ一定であった。

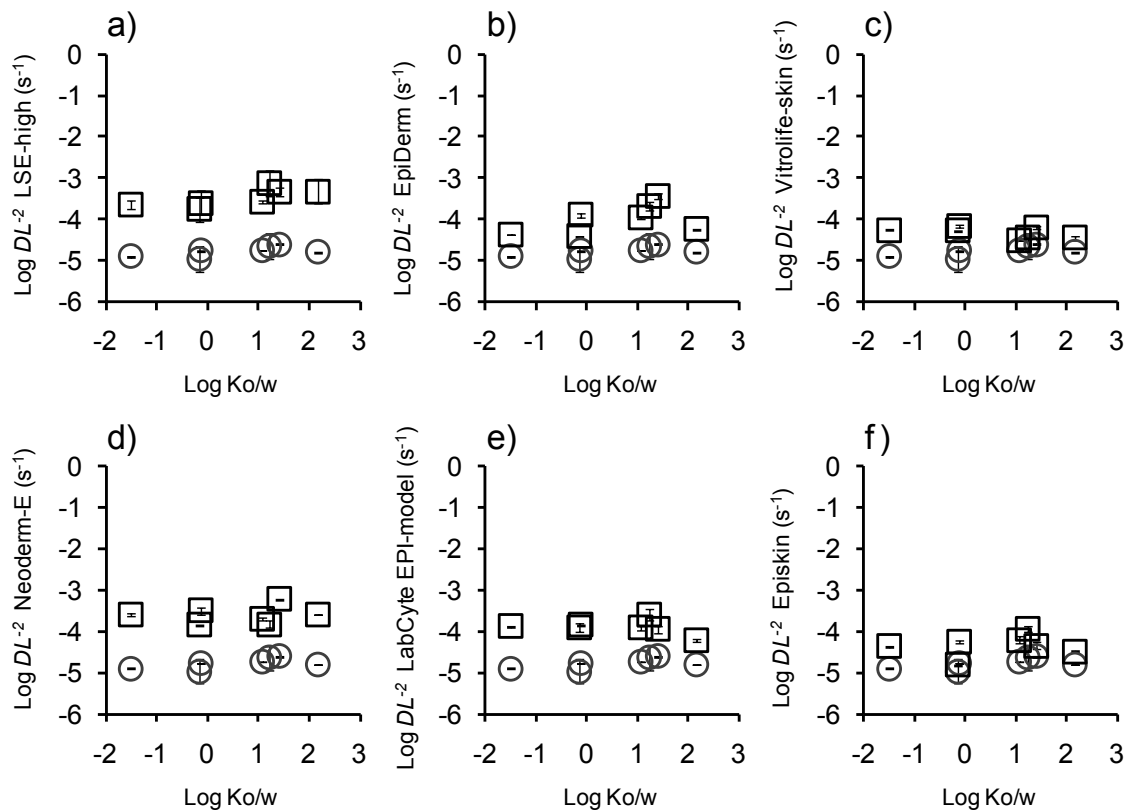


Figure 7 Relationships between  $\log DL^{-2}$  values in cultured skin models and  $\log K_{o/w}$  values of chemical compounds

a): LSE-high, b): EpiDerm, c): Vitrolife-skin,  
d): Neoderm-E, e): LabCyte EPI-model, f): Episkin.  
Symbols: ○; human skin, □; cultured skin model.  
Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=4-6).

#### 第4節 考察

作用部位である皮膚中への化学物質の到達性（皮膚透過性）は、皮膚刺激性を示す重要な要因の一つである。したがって、皮膚刺激性を評価する際には化学物質の皮膚透過性を考慮することが重要である。

EpiDerm 以外の培養皮膚モデルでは、各化学物質の透過係数（ $P$  値）はヒト皮膚よりも高い値を示した。Netzloff らは、培養皮膚モデルではバリア機能が低

いために化学物質の  $P$  値が高くなることを報告している<sup>8)</sup>。皮膚透過に関する培養皮膚モデルの評価の多くは、化学物質の透過挙動や  $P$  値のヒト皮膚との比較に焦点が当てられる。培養皮膚モデルを用いてヒト皮膚における  $P$  値を予測する際には、培養皮膚モデルとヒト皮膚の相関が 1:1 であることが望ましい。すなわち、ヒト皮膚と培養皮膚モデルにおける  $\log P$  の相関に関する傾きの評価が重要であり、傾きが 1.0 (1:1 の相関) よりも大きいあるいは小さい場合、培養皮膚モデルにおける僅かな  $P$  値の差が、推定したヒト皮膚における  $P$  値の誤差の原因となる可能性がある。

LSE-high と Epiderm では、今回適用した化学物質の脂溶性 ( $\log K_{o/w}$ ) の増加に従って  $\log KL$  の値は増加した。各培養皮膚モデルの  $\log KL$  をヒト皮膚における  $\log KL$  と比較すると、LSE-high はヒト皮膚と近似した値を示し、Epiderm ではヒト皮膚よりも低値を示した。また、それ以外の培養皮膚モデルでは、ヒト皮膚とは異なる  $\log KL$  の値を示した。化学物質は、皮膚に適用されると速やかに皮膚中へ分配される。化学物質が皮膚中へ分配される程度は、製剤から皮膚への分配係数 ( $K$ ) に依存する。皮膚の最外層である角層は、高親油性の膜であり、角層の構造は「レンガとモルタル (brick and mortar)」に例えられる<sup>21)</sup>。したがって、各層における細胞間脂質の構成や構造は、化学物質の溶媒 (基剤) から皮膚への分配係数の重要な決定因子になると考えられる。Ponc らは、EpiDerm および Episkin などの培養皮膚モデルとヒト皮膚における細胞間脂質の構成を比較し、培養皮膚での脂質構成がヒト皮膚とは異なることを報告している<sup>22)</sup>。すなわち、培養皮膚モデルの脂質構成比は、角層バリアの親油性の特徴と程度を理解する上で重要であると考えられるが、現時点では培養皮膚モデル

において  $\log KL$  の値がヒト皮膚と異なる理由を完全には説明できない。しかしながら、今回脂溶性の異なる化学物質の透過プロファイルから種々の培養皮膚モデルの異なる特性を捉えることができた。

$\log DL^2$  については、培養皮膚モデルおよびヒト皮膚の両方で適用した化学物質の  $\log K_{o/w}$  に依らずほぼ一定の値を示した。さらに、すべての培養皮膚モデルにおいてヒト皮膚より高い  $\log DL^2$  を示した。溶媒の固有拡散係数 ( $D_i$ ) は、Stokes-Einstein の式より得ることができ、それは分子量で表わすことができる。拡散パラメータ ( $DL^2$ ) における  $D$  は、見かけの拡散係数 ( $D_a$ ) を示し<sup>23, 24)</sup>、 $D_a$  は曲路率 (tortuosity)、有効拡散面積および真の拡散係数で構成される。化学物質の皮膚透過における拡散経路としては、細胞内 (角層 ; brick) および細胞外 (角層の細胞間スペース ; mortar) ルートが知られており、化学物質の主な透過経路は細胞外ルートである<sup>25)</sup>。したがって、ヒト皮膚と培養皮膚モデルで  $\log DL^2$  の値が異なるということは、両方で透過経路が異なることを示唆している。

前述のように、Epiderm に関しては、 $KL$  はヒト皮膚よりも低く、 $DL^2$  はヒト皮膚よりも高い値を示し、それぞれの差が相殺された結果、 $P$  がヒト皮膚と近似した値を示すものの、ヒト皮膚とは異なるプロファイルを示すと考えられた。このことから、培養皮膚モデルの特性を把握する上で、ヒト皮膚との透過係数 ( $\log P$ ) の 1:1 の相関だけでなく  $KL$  や  $DL^2$  といった皮膚透過パラメータの解析も極めて重要であることが分かった。

## 第5節 小括

皮膚刺激性を評価する上で、作用部位である皮膚中への化学物質の到達性（皮膚透過性）は、重要な要因の一つである。したがって、皮膚刺激性を評価する際には化学物質の皮膚透過性を考慮することが重要であり、培養皮膚モデルを用いてヒト皮膚における  $P$  値を予測する際には、ヒト皮膚と培養皮膚モデルにおける  $\log P$  の相関に関する傾きの評価が重要である。また、培養皮膚モデルの特性を把握するためには、さらに  $KL$  や  $DL^2$  といった皮膚透過パラメータの解析も重要である。

今回評価した培養皮膚モデルのうち、LSE-high および Epiderm の  $\log P$  は、ヒト皮膚と良い相関を示したものの、培養皮膚モデルにおける  $KL$  や  $DL^2$  といった皮膚透過パラメータがヒト皮膚と異なる理由は明らかにできていない。これらを明らかにするためには、皮膚透過実験だけでなく培養皮膚モデルの構造や細胞外脂質構成等の詳細な検討が必要である。

## 第2章 三次元培養ヒト皮膚モデルの構造<sup>26)</sup>

三次元培養ヒト皮膚モデル（培養皮膚モデル）は、化学物質の皮膚透過性試験に広く利用されている。培養皮膚モデルの中でも Episkin<sup>TM</sup> および EpiDerm<sup>TM</sup> は、皮膚刺激性試験および皮膚腐食性試験に用いられているが、化学物質の透過性に関する報告<sup>6,8,15)</sup> は少ない。

化学物質の皮膚中濃度は、*in vitro* 皮膚透過性試験で得られる累積透過曲線から予測することが可能であり<sup>27)</sup>、皮膚中濃度と皮膚刺激性の間には良好な相関が認められる<sup>28)</sup>。このことから、局所適用される化学物質の安全性評価には、化学物質の皮膚透過性評価が有用であると考えられる。

第 1 章では、脂溶性の異なる化学物質の皮膚透過プロファイルから透過性に対する培養皮膚モデルの特性を明らかにした。第 2 章では、さらに組織学的な検討を行い、培養皮膚モデルの構造的な違いについてヒト皮膚と比較した。また、Sugibayashi らは培養皮膚モデルの TESTSKIN<sup>TM</sup> LSE-high (LSE-high、東洋紡株式会社、大阪) とラットの摘出皮膚とでは、皮内のエステラーゼ活性が異なることを報告しており<sup>29)</sup>、エステル結合を有する化学物質では、その皮膚透過だけでなく未変化体および加水分解された代謝物の皮膚中濃度にも影響を及ぼす可能性が示唆されている。そこで、本研究ではヒト皮膚と培養皮膚モデルの組織学的違いに加えカルボキシエステラーゼ活性およびその皮内分布についても検討した。

## 第1節 実験方法

### 1. 実験材料

培養皮膚モデルは、第1章と同じもの(6種)を用いた(第1編第1章第1節1.実験材料)。

ヒトの摘出皮膚(BIOPREDIC International, France)は、株式会社ケー・エー・シー(京都)より購入した。実験に際しては、株式会社ケー・エー・シーの倫理安全性委員会の承認を得た。

ヘマトキシリン、パラホルムアルデヒドおよびグルタルアルデヒドは、EM gradeのものをElectron Microscopy Science Inc. (PA)より購入した。また、エオジンはTAAB Laboratories (UK)より、四酸化オスミウム(Crystal)はHeraeus Chemicals South Africa (South Africa)より、四酸化ルテニウム(Special reagent grade)は和光純薬工業株式会社(大阪)より、ヘキサシアノ鉄酸カリウム(Cica-reagent)は関東化学株式会社(東京)より、酢酸ウラニル(Acs Grade)はCERAC Inc. (Wisconsin)より、クエン酸鉛(電子顕微鏡用鉛染色液)はSIGMA-ALDRICHより、フルオレセイン-5-イソチオシアネート二酢酸は東京化成工業株式会社(東京)よりそれぞれ購入した。その他の試薬は、市販の特級およびHPLC用を用いた。

### 2. 皮膚切片のヘマトキシリン-エオジン(HE)染色

皮膚試料は、パラフィン包埋し、ミクロトーム(大和光機工業株式会社、埼玉)を用いて薄切(3 μm)した。脱パラ後、ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色を行い、光学顕微鏡(IX 71、オリンパス株式会社、東京)で観察した後、



デジタルカメラ（DP72、オリンパス株式会社）で撮影した。また、皮膚の厚みについて画像解析ソフト（DP2-BSW、オリンパス株式会社）を用いて測定した。

測定値は、10カ所の平均値とした。

### 3. 透過型電子顕微鏡（TEM）による角層中ラメラ構造の観察

皮膚試料は、2%パラホルムアルデヒドおよび2%グルタルアルデヒドを含有する0.1%リン酸緩衝液で前固定した後、2%四酸化オスミウム溶液で固定し、さらに0.2%四酸化ルテニウム／0.25%ヘキサシアノ鉄酸カリウム溶液にて固定した。その後、エポキシ樹脂に包埋し、ウルトラミクロトームで80～90 nmに薄切し、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で二重染色して透過型電子顕微鏡（TEM；JEM1200-Ex、日本電子株式会社、東京）で観察した。

### 4. 共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）による皮膚構造の観察

皮膚の内部構造を共焦点レーザー顕微鏡（CLSM；Vivascope 1500、Lucid Inc、Rochester、NY、US）を用いて観察した。直径2.8 cm、厚み5.85 mmのリングを皮膚観察部位に貼付し、対物レンズ（Lucid StableView 4.3 mm 水浸レンズ0.9NA）とリング内を精製水で浸し、830 nmのダイオードレーザー光を用いて皮膚内部組織を非侵襲的に観察した。なお、観察視野は、500 μm × 500 μm、分解能は水平方向1.25 μm および垂直方向5 μm である。

### 5. 皮内エステラーゼ分布の比較

フルオレセイン-5-イソチオシアネート二酢酸の2つのアセトキシ基がエス

テラーゼによって加水分解されて生じるフルオレセイン-5-イソチオシアネートが強い蛍光を発すること (Figure 8) を利用して皮膚中のエステラーゼ活性の分布の違いをヒト皮膚と各培養皮膚モデルで比較した。

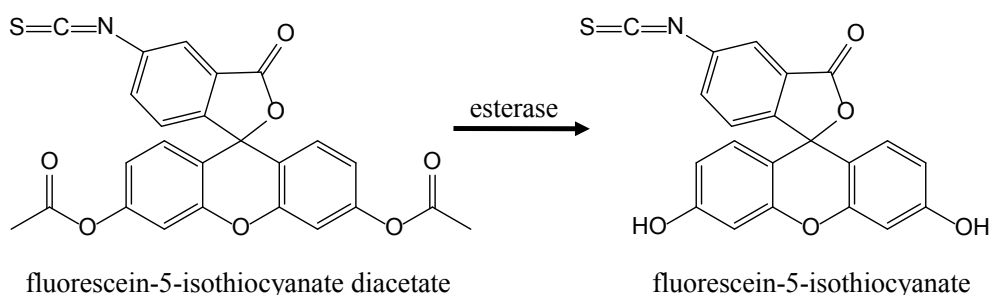


Figure 8 Metabolizing by esterase of fluorescein-5-isothiocyanate diacetate

皮膚試料を pH 7.4 のリン酸緩衝液 (PBS) でリンスした後、包埋剤 (O.C.T. Compound、Tissue-Tek<sup>®</sup> 4583、Sakura Finetechnical Co Ltd、東京) に包埋し、ドライアイスで冷却したイソペンタン中に浸漬して凍結した。クリオスタット (CM3050S、Leica Microsystems Ltd、Heerbrugg、Switzerland) を用いて 20  $\mu$ m の凍結切片を作成した。切片は、0.02 mg/mL フルオレセイン-5-イソチオシアネート二酢酸溶液中で 15 分間インキュベートし、過剰の反応液を PBS で洗浄した後、蛍光顕微鏡 (CK40、オリンパス株式会社) で観察した。

## 第2節 結果

### 1. HE 染色による比較

Figure 9 に光学顕微鏡で観察した画像を示す。ヒト皮膚 (Figure 9a) に比べて培養皮膚モデル (Figures 9b-g) では角層の分離が認められた。また、ヘマト

キシリンにより核が染色された細胞数は、ヒト皮膚よりも培養皮膚モデルの方が少なく、LSE-high (Figure 9b) および Neoderm-E (Figure 9f) において顕著であった。興味深いことに Vitrolife skin (Figure 9e) 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、ケラチノサイトの角化が不十分である可能性が考えられた。

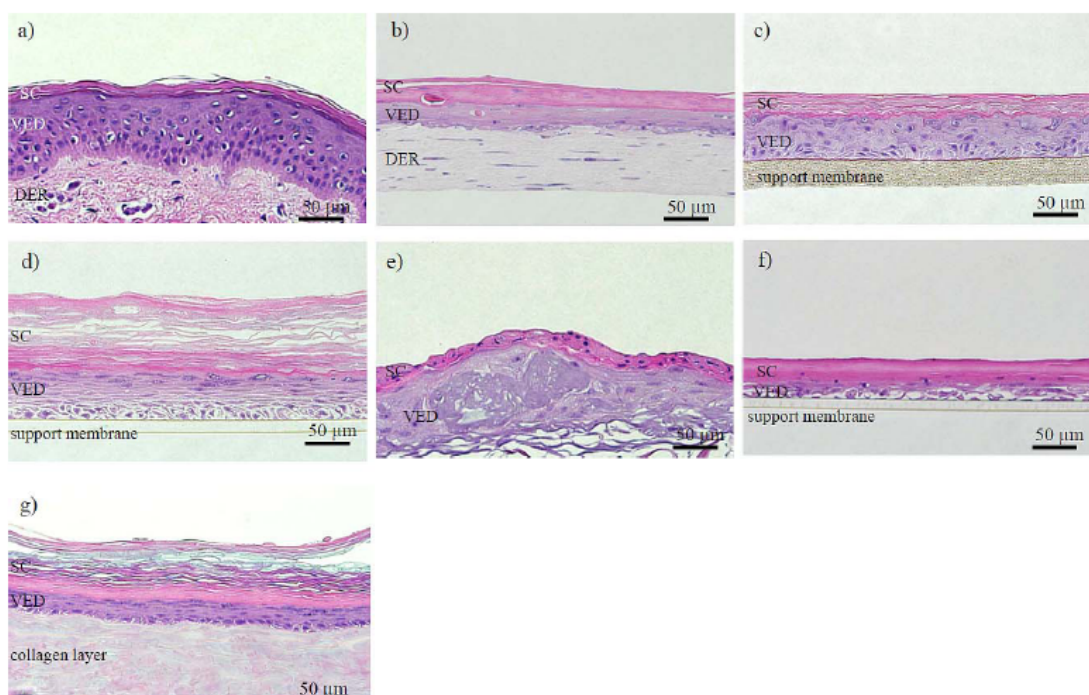


Figure 9 Histological observation of human and cultured human skin models

a) Excised human skin, b) LSE-high, c) EpiDerm, d) LabCyte EPI,  
 e) Vitrolife skin, f) Neoderm-E, g) Episkin  
 Scale bar = 50 μm

Figure 9に基づくヒト皮膚および各培養皮膚モデルの厚みを Table 4 に示す。ヒト皮膚の角層の厚みが  $11.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$  であったのに対し、各培養皮膚モデルでは  $13.2 \pm 4.6 \mu\text{m}$  から  $89.0 \pm 1.0 \mu\text{m}$  とヒト皮膚よりも培養皮膚モデルの方が角層は厚かった。一方、生きた表皮の厚みはヒト皮膚 ( $62.4 \pm 3.5 \mu\text{m}$ ) よりも三次元培養皮膚モデル ( $23.3 \pm 4.6 \sim 59.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ) の方が薄かった。

Table 4 Skin thickness of excised human skin and reconstituted cultured human skin model

	Stratum corneum (μm)	Viable epidermis (μm)	Dermis (μm)	Whole skin (μm)
Human	11.5 ± 0.6 (11.8 ± 3.3) <sup>#)</sup>	62.4 ± 3.5 (51.2 ± 12.2) <sup>#)</sup>	412 ± 24	493 ± 25
LSE-high	29.9 ± 0.9	29.2 ± 2.1	80.8 ± 2.1	136 ± 1
Epiderm	27.0 ± 0.71 (12 - 28) <sup>*)</sup>	53.0 ± 1.2 (28 - 43) <sup>*)</sup>	—	78.9 ± 0.7
Labcyte EPI-model	89.0 ± 1.0	59.1 ± 0.6	—	149 ± 1
Vitrolife skin	13.2 ± 4.6	23.3 ± 4.6	—	38.6 ± 5.2
Neoderm-E	27.8 ± 0.9	23.8 ± 0.9	—	52.2 ± 0.7
Episkin	69.3 ± 1.0 (79 - 102) <sup>*)</sup>	28.7 ± 0.9 38 - 48 <sup>*)</sup>	—	99.2 ± 2.6

<sup>#)</sup> Ponc et al., *Int J Pharm*, 203, 211-225 (2000)

<sup>\*)</sup> Sato et al., *J Pharm Sci*, 80, 104-107 (1991)

Each value represents the mean ± S.E. of 10 times.

## 2. TEM 観察による角層ラメラ構造の比較

ヒト皮膚および各培養皮膚モデルにおける角層中のラメラ構造を透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した (Figure 10)。ヒト皮膚においては角層中に多くのラメラ層が観察された (Figure 10a)。培養皮膚モデルにおいても角層中のラメラ構造を確認することができた (Figures 10b-g) が、その量はヒト皮膚に比べて少なく、LSE-high (Figure 10b) で観察されたラメラ層は、ヒト皮膚に比べて細く湾曲していた。一方、Epiderm (Figure 10c) では、比較的ヒトに近いラメラ層が観察された。LabCyte EPI-model (Figure 10d)、Neoderm-E (Figure 10f) および Episkin (Figure 10g) 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。

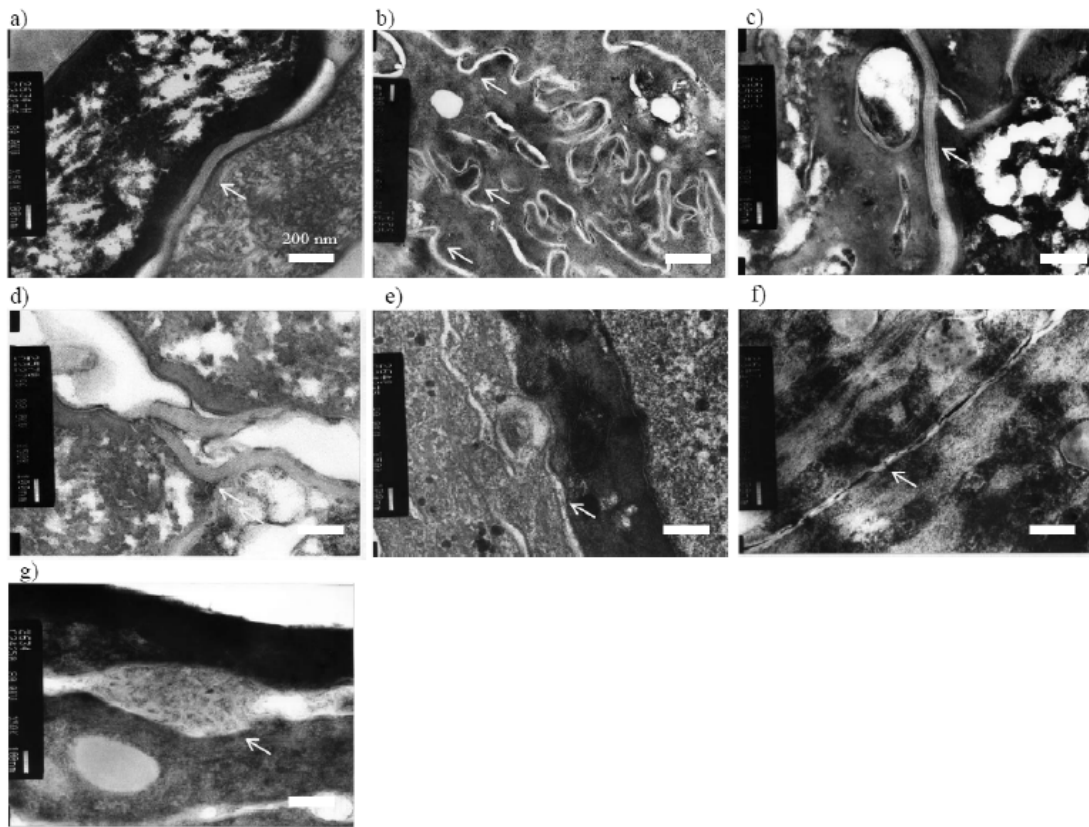


Figure 10 TEM observation of human and cultured human skin models

a) Excised human skin, b) LSE-high, c) EpiDerm, d) LabCyte EPI,  
 e) Vitrolife skin, f) Neoderm-E, g) Episkin  
 Scale bar = 200 nm.  
 White arrows show lamellar layers.

### 3. CLSM による皮膚構造の比較

ヒト皮膚および各培養皮膚モデルの共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による観察結果を Figure 11 に示す。ヒト皮膚 (Figure 11a) において、毛、毛包、皮溝、皮丘、毛穴 (小孔) が観察され、それらは、皮膚表面より深くなるにつれて小さくなった。さらに、より浅部において明確に角質細胞が観察された (Figures 11a、h)。一方、各培養皮膚モデルにおいて異なる像が観察されたが、いずれの培養皮膚モデル (Figures 11b-g) においても、皮溝および皮丘は観察されなかった。

Epiderm (Figure 11c)、LabCyte EPI-model (Figure 11d)、Neoderm-E (Figure 11f) および Episkin (Figure 11g) では、より浅部において核を伴う角質細胞が観察されたが、LSE-high (Figure 11b) および Vitrolife skin (Figure 11e) では、明確に角質細胞は観察されなかった。興味深いことに、LabCyte EPI-model (Figure 11d) では小孔が観察され、それは表面から 50  $\mu\text{m}$  まで認められた。同様の傾向は、LabCyte EPI-model の他のロットにおいても認められた (data not shown)。

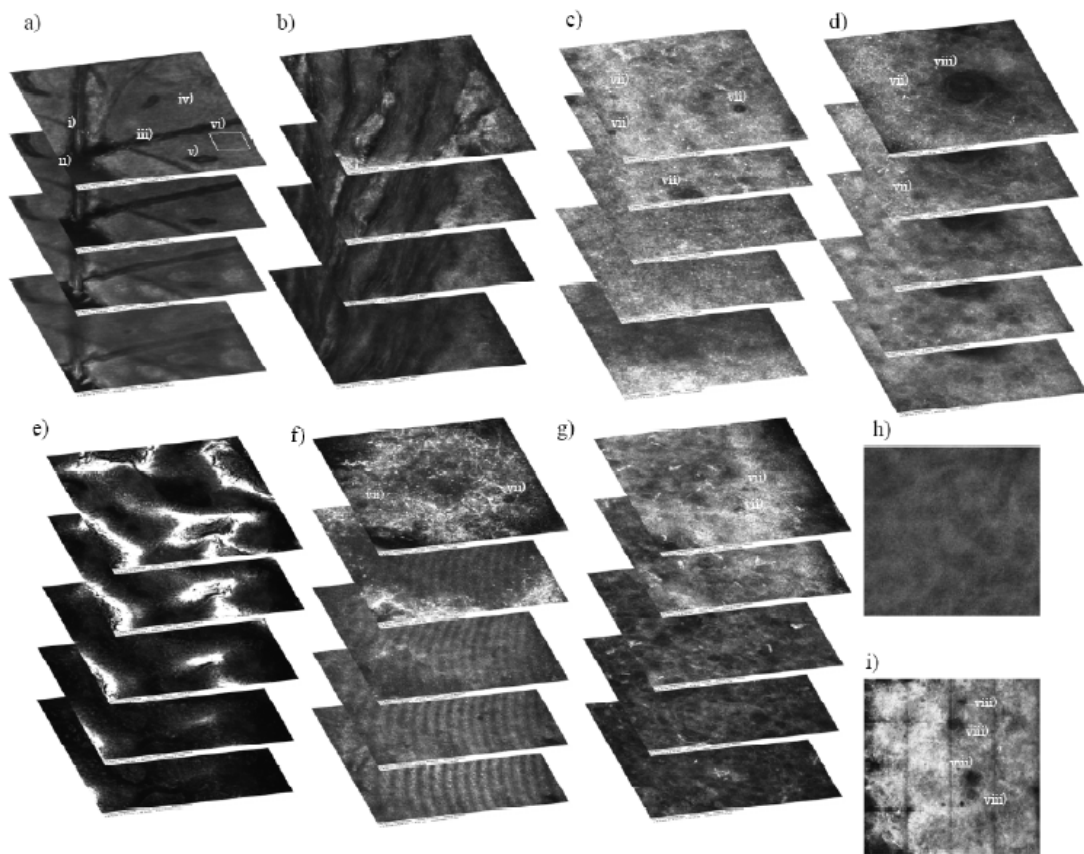


Figure 11 CLMS observation of human and cultured human skin models

- a) Excised human skin, b) LSE-high, c) EpiDerm, d) LabCyte EPI,  
 e) Vitrolife skin, f) Neoderm-E, g) Episkin,  
 h) Enlargement of vi) area, i) 500  $\times$  500  $\mu\text{m}$  skin images of LabCyte EPI model.  
 Scale bar = 200 nm. i) hair, ii) hair follicle, iii) sulcus cutis, iv) crista cutis,  
 v) sweat gland, vi) corneocyte, vii) corneocyte with nucleus, and viii) pore.

#### 4. 皮内エステラーゼ分布の比較

ヒト皮膚では、生きた表皮 (VED; Viable Epidermis) において高い蛍光強度が観察されたが、角層 (SC; Stratum Corneum) および真皮 (DER; Dermis) にはほとんど観察されなかった。LSE-high、EpiDerm および Episkin においても同様の傾向が観察され、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 および Vitrolife Skin では、生きた表皮だけでなく、角層においても高い蛍光強度が観察された (Figure 12)。

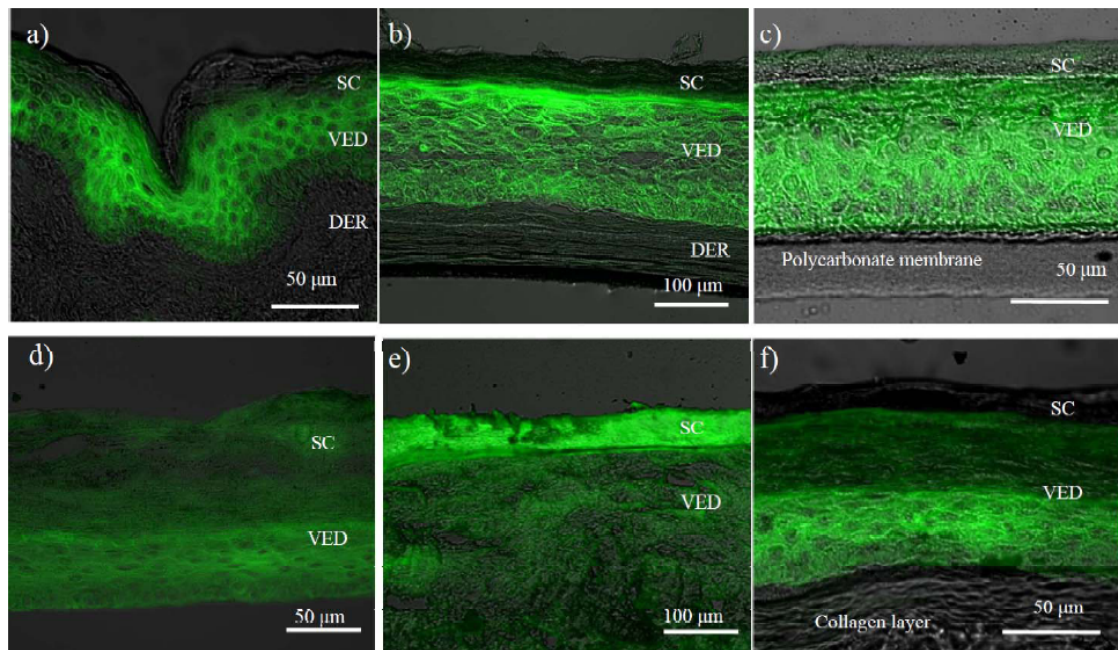


Figure 12 Fluorescein observation of human and cultured human skin models 15 min after application of fluorescein-5-isothiocyanate diacetate.

a) Excised human skin, b) LSE-high, c) EpiDerm, d) LabCyte EPI,  
e) Vitrolife skin, f) Episkin

Scale bar = 50 or 100 nm.

Abbreviations; SC: stratum corneum, VED: viable epidermis, DER: dermis.

### 第3節 考察

今回検討に用いた6種類の培養皮膚モデル(LSE-high、EpiDerm、Neoderm-E、Vitrolife-skin、LabCyte EPI-model および Episkin) とヒト皮膚では、角層、生きた表皮および真皮の厚みが異なることが明らかとなった。皮膚の最表層である角層は、外因性物質に対する最大のバリアである。したがって、角層の厚みが化学物質の皮膚透過性に影響することは容易に想像できる。本編第1章では化学物質の透過における拡散パラメータ ( $DL^2$ ) が、培養皮膚モデルではヒト皮膚に比べて一律高い値を示した。 $L$ が大きい(角層が厚い)場合、 $DL^2$ は小さくなるため透過性は低くなる。ヒト皮膚よりも厚いにもかかわらず、 $DL^2$ がヒト皮膚よりも高値を示すということは、培養皮膚モデルの拡散係数( $D$ )自体がヒト皮膚に比べてより高値であると考えられる。このことは、培養皮膚モデルにおける化学物質の透過がヒト皮膚よりも速いことを意味し、培養皮膚モデルの角層のバリア機能はヒト皮膚よりも低い可能性が考えられる。さらに、TEMおよびCLSMによる観察では、培養皮膚モデルの角質細胞内に特徴的な構造を見出した。角層の細胞間隙は、ラメラ構造を構成するセラミドや他の脂質で満たされている<sup>30,31)</sup>。したがって、ラメラ構造の成熟度や細胞間脂質の含量あるいは構成によって、皮膚に適用された化学物質の分配および拡散パラメータは影響を受ける。それぞれの培養皮膚モデルにおいて角層中のラメラ構造の局在が観察されたが、その量はヒト皮膚に比べて少なく、その形状については、EpiDermにおいて比較的ヒト皮膚に近似していたものの、他の培養皮膚モデルではヒト皮膚とは明らかに異なる形状であった。さらに、CLSMによる観察では、培養皮膚モデル(LabCyte EPI-model)における小孔の存在を明らかにした。これらの結果は、



いずれも培養皮膚モデルの角層バリア機能がヒト皮膚に比べて低いことを示唆する結果であり、培養皮膚モデルにおける拡散パラメータが一様にヒト皮膚に比べて高値を示すことの裏付けとも考えられる。

皮膚中の代謝酵素の量<sup>32,33)</sup> やその皮内分布の違いは、皮膚中代謝物の分布だけでなくその効果や毒性に影響する可能性がある。したがって、培養皮膚モデルをヒト皮膚の代わりに用いる場合、皮膚中の代謝酵素量およびその分布に関する研究は極めて重要といえる。

今回、エステラーゼに注目して検討した。フルオレセイン-5-イソチオシアネートの皮内分布は、皮内のエステラーゼ活性の分布が各培養皮膚モデルにおいて異なることを示唆した。皮膚中のエステラーゼは、表皮の顆粒層に局在することが報告されている<sup>34-36)</sup> が、今回の検討では、生きた表皮全体に高い蛍光強度が観察された。生きた表皮中の詳細な局在までは確認することができなかったが、少なくともヒト皮膚中のエステラーゼは、角層にはほとんどなく、生きた表皮中に局在することが明らかとなった。一方、いくつかの培養皮膚モデルでは、角層においてもエステラーゼの分布（蛍光）が観察された。さらにHE染色およびCLSMによる観察において核を伴う角質細胞が観察されている。この様に分化が十分でない角質細胞は、角層のバリア機能のみならずエステラーゼ活性にも影響すると考えられる。したがって、培養皮膚モデルを用いてエステル化学物質を評価する場合には注意が必要である。

#### 第4節 小括

培養皮膚モデルの組織学的観察により、今回検討に用いた6種類の培養皮膚モデル（Lse-high、EpiDerm、Neoderm-E、Vitrolife-skin、LabCyte EPI-model および Episkin）の構造的な違いを明らかにした。これらの違いが各培養皮膚モデル間あるいはヒト皮膚とでは異なる皮膚透過を示す原因である可能性が示唆された。したがって、ヒトの予測に関して培養皮膚モデルを用いる場合には、その組織学的な違いと特徴を十分に把握しておくことが重要である。

## 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

第1編において、本邦で入手可能な6種の培養皮膚モデルの特性について報告した。培養皮膚モデルの利点としては、ヒト由来細胞を用いていることや実際の皮膚に構造が近いことなどが挙げられる。しかしながら、化学物質の透過性や培養皮膚モデルの組織学的構造の詳細については、LSE-high および Epiderm が比較的ヒト皮膚に近似していたものの、その他の培養皮膚モデルでは実際の皮膚と大きく異なっていた。培養皮膚モデルの OECD ガイドライン (TG-439) への採用に際しては、それぞれバリデーション試験<sup>37-43)</sup> が実施されており、皮膚刺激性の陽性物質あるいは陰性物質に対する判定結果の正確性が確認されているが、いくつかの偽陰性や偽陽性も報告されている<sup>39, 44)</sup>。また、これらの報告では、被験物質の適用濃度に主眼が置かれ、刺激発現部位である皮膚における原因物質の濃度と刺激性の関係についての報告例はほとんどない。

そこで本研究では、モデル刺激物質を用いて化学物質の皮膚中濃度と皮膚刺激性の関係について調べた。モデル刺激物質には、塩化セチルピリジニウム (CPC) を用いた。CPC は、のど飴や歯磨きなどに抗菌作用を期待して用いられている陽イオン界面活性剤<sup>45)</sup>で、皮膚刺激性を有することが知られている<sup>46)</sup>。また、CPC は高い UV 吸収を持つことから HPLC による測定が容易である。

なお、本編では、培養皮膚モデルを用いた *in vitro* 評価と動物を用いた *in vivo* 評価を比較し、死細胞率を指標にした皮膚刺激性の  $E_{max}$  model による解析 (第1章) および生細胞率を指標にした皮膚刺激性の経時推移について速度論的な解

析（第 2 章）を試みた。さらに、第 3 章では細胞毒性以外の評価法としてサイトカイン産生について確認した。培養皮膚におけるサイトカイン産生に関して、表皮モデルでは IL-8 の産生が認められず、真皮層を有する full-thickness モデルにおいて培地中の IL-8 が増加するとの報告<sup>47,48)</sup>があることから、培養皮膚モデルは、第 1 編において化学物質の透過性や組織学的な構造がヒト皮膚に近似していた LSE-high および Epiderm のうち、full-thickness モデルである LSE-high を選択した。また、LSE-high は OECD ガイドライン (TG-439) には採用されていないものの、培養皮膚モデルの特性としては、比較的ヒト皮膚に近いことから詳細に検討することで、ヒトの結果を予測する上で有用なツールとして期待できると考えた。

## 第1章 死細胞率を指標にした皮膚刺激性の $E_{max}$ model による解析

近年、pharmacokinetics (PK) と pharmacodynamics (PD) およびそれらの相関は、医薬品の開発プロセスにおいて重要性を増す傾向にある。また、その有用性は FDA を中心に認められ、すでに Exposure-Response Relationships に関するガイダンスが公表されている<sup>49)</sup>。しかしながら、PK/PD 相関に関する報告の多くは薬物の血中濃度と薬理効果の関係を述べたものであり、また全身作用を期待する薬物への応用に限られている。生体局所での効果を期待する場合、特に皮膚への適用を考える場合には、血中濃度ではなく適用部位である皮膚中の薬物濃度と効力の関係を明らかにする必要がある。また、皮膚刺激性と皮膚刺激物質など皮膚における副作用と化学物質の関係について速度論的あるいは薬力学的に捉えること、すなわち皮膚における TK/TD (toxicokinetics/toxicodynamics) も PK/PD と同様に局所製剤を評価する上では極めて有用であると考えられる。

皮膚刺激性に関する多くの研究は、被験物質の適用濃度とその皮膚刺激性について報告されているにすぎず、刺激発現部位での化学物質濃度と刺激性の関係について検討した報告例はほとんどない。そこで本研究では、モデル刺激物質 (CPC) の皮膚中濃度と皮膚刺激性の関係について、培養皮膚モデル、ヘアレスマウスおよびモルモットを用いて種差および部位差の観点から検討を行った。なお、皮膚刺激性の評価は、培養皮膚モデル (*in vitro*) および動物 (*in vivo*) ともに MTT 試験による死細胞率を指標とした。

## 第1節 実験方法

### 1. 実験材料

塩化セチルピリジニウム (CPC) は、東京化成工業株式会社 (東京) より購入した。3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) は、Sigma Chemical Co. Ltd. (St. Louis, Missouri) より購入した。その他の試薬は、特級、HPLC 用または試薬グレードのものをそのまま使用した。

TESTSKIN<sup>TM</sup> LSE-high (LSE-high) は、東洋紡株式会社 (大阪) より購入した。Hos: Hr-1 系雄性ヘアレスマウス (20-40 g) は、Hoshino Laboratory Animals (埼玉) より購入した。Hartley 系雄性モルモット (300-450 g) は、Saitama Experimental Animal Laboratory (埼玉) より購入した。なお、動物実験は、城西大学生命研究センターの倫理規定に従って実施した。ヒト試験は、SMO として株式会社 総合臨床薬理研究所 (現 株式会社 総合臨床サイエンス) の支援のもと、エヌ・エスクリニク (現 医療法人社団晴幸会) にて実施した。倫理審査については、依頼者本人による 1 例のみの予備的な検討であったことから、エヌ・エスクリニク 荻部正隆院長 (当時) および村田恭子 皮膚科医師 (当時) により実施可能と判断された。

ヘアレスマウスおよびモルモットの stripped skin は、粘着テープ (Cellotape<sup>®</sup>, Nichiban Co. Ltd., 東京) により 20 回ストリッピングして角層を剥離して作成した。また、Stripped LSE-high は角層をピンセットで取り除いて作成した。

### 2. CPC の適用

モルモットおよびヘアレスマウスには、CPC の 1、5 および 20% 生理食塩

液溶液 100  $\mu$ L をパッチテスト用絆創膏（スモールサイズ、直径 16 mm、鳥居薬品株式会社、東京）にしみ込ませて適用した。モルモットの場合は、腹部あるいは背部の **intact** または **stripped skin** にそれぞれ 4 箇所ずつ適用し、そのうち 1 箇所はコントロールとして生理食塩液を適用した。ヘアレスマウスの場合は、腹部あるいは背部の **intact** または **stripped skin** に 2 箇所適用し、そのうち 1 箇所はコントロールとして生理食塩液を適用した。さらに粘着性伸縮包帯（エラストポア<sup>®</sup>、ニチバン株式会社、東京）で覆い適用部位を保護した。適用時間はモルモットの場合 48 h、ヘアレスマウスの場合 24 h とした。

**LSE-high** には、アッセイリングを装着した。アッセイリングは、片面にシリコンを薄く塗って組織中央に置き、ピンセットで軽く押さえて組織に密着させた。アッセイトレイの各ウエルに、アッセイ培地を 1.2 mL 入れ、アッセイリングを付けた **LSE-high** を気泡が入らないようにアッセイトレイに移した。

**Intact LSE-high** には、CPC の 0.003、0.01、0.03、0.1、0.3 および 1% 生理食塩液溶液 80  $\mu$ L を、**stripped LSE-high** には、CPC の 0.003、0.03、0.3 および 1% 生理食塩液溶液 80  $\mu$ L を角層側のアッセイリング内に適用した。**Control** には生理食塩液を用いた。アッセイトレイ（Toyobo Co., Ltd.）の真皮側にはアッセイ培地（Toyobo Co., Ltd.）を 1.2 mL 入れ、アッセイリングを付けた **LSE-high** を気泡が入らないようにアッセイトレイに移し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 24 h インキュベートした。

健康成人（1 名）の上腕内側に CPC の生理食塩液溶液 30  $\mu$ L を Finn Chamber<sup>®</sup>（Epitest Ltd Oy、Tuusula、Finland）を用いて適用した。左腕には、0%（Control; 生理食塩液、1 ヶ所）、0.25%（2 ヶ所）および 1%（2 ヶ所）の CPC 生理食塩液

溶液を、右腕には、0% (Control; 生理食塩液、1ヶ所)、0.125% (1ヶ所)、0.25% (1ヶ所)、0.5% (1ヶ所) および 1% (1ヶ所) の CPC 生理食塩液溶液を適用した。適用部位は、さらに粘着性伸縮包帯 (Elastpore、Nichiban Co. Ltd.、東京) で覆い保護した。適用時間は 48 h とした。被験物質剥離後に以下の判定基準 (Table 5) に従って皮膚刺激反応を判定した。

Table 5 本邦パッチテスト研究班による判定基準とその評点

判定	評点	皮膚反応
-	0	反応なし
±	0.5	軽い紅斑
+	1	紅斑
++	2	紅斑+浮腫
+++	3	紅斑+浮腫+丘疹 または 小水疱
++++	4	大水疱

### 3. MTT assay

各適用時間後、皮膚表面の余分な CPC を除去し、MTT assay を行った。すなわち、LSE-high の場合、1 mL のアッセイ培地で 2 回洗い流した後、その一部を直径 3 mm に打ち抜き、皮膚中濃度測定用試料として測定までの間-20°C で保管した。残りの組織試料の真皮側のアッセイ培地を取り除き、MTT 溶液 1.2 mL を真皮側に適用して 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 3 h インキュベートした。なお、MTT 溶液はアッセイ培地を用いて 0.333 mg/mL となるように調製した。インキュベート後、余分な MTT 溶液を 1 mL のアッセイ培地で洗い流し、CPC 適用部位を直径 8 mm に打ち抜いた。打ち抜いた組織をマイクロチューブに移し、0.04N 塩酸-イソプロパノールを 700 µL 加え、暗所に一晩放置してホルマザンを抽出した。ホルマザンの測定は、分光光度計 (UV-160A、Shimadzu、Kyoto、Japan) を用い



て、検出波長 570 nm で行った。

ヘアレスマウスの場合、投与部位を精製水で湿らせた脱脂綿にて 4 回拭いて、皮膚表面に残存する CPC を除去した。適用部位の皮膚を摘出し、生検パンチを用いて直径 8 mm に打ち抜いた。さらにその一部を直径 3 mm に打ち抜き、皮膚中濃度測定用試料として測定までの間-20°C で保管した。残りの皮膚試料は、直ちに MTT 試験に供した。なお、MTT 試験はアッセイトレイを用いて LSE-high と同様に操作した。

生細胞率 (Viability) および死細胞率 (Dead Cell Number) は、それぞれ以下の式に従って算出した。

$$\text{Viability (\%)} = OD_{570nm} (\text{sample}) / OD_{570nm} (\text{saline}) \times 100$$

$$\text{Dead Cell Number (\%)} = 100 - \text{Viability (\%)}$$

ヒトの場合は、投与部位を精製水で湿らせた脱脂綿にて 4 回拭いて、皮膚表面に残存する CPC を除去した後、左腕の 5 ヶ所 (0% (Control、1 ヶ所)、0.25% (2 ヶ所) および 1% (2 ヶ所)) について、皮膚生検を行った。CPC 適用部位を局所麻酔 (キシロカイン注ポリアンプ 2%、アストラゼネカ株式会社、大阪) し、生検パンチ (Dermapunch<sup>®</sup>、Φ4 mm、マルホ株式会社、大阪) にて皮膚試料を採取した。得られた皮膚試料は、脂肪組織を除去し、3 ヶ所 (0、0.25 および 1%) については、直ちに MTT 試験を行った。残りの 2 ヶ所 (0.25 および 1%) は、皮膚中 CPC 濃度測定用としてマイクロチューブに入れてドライアイス中で凍結後、測定までの間-30°C で保管した。皮膚中 CPC 濃度は、HPLC にて測定した。

#### 4. HPLC による皮膚中濃度の測定

皮膚試料は、重量を測定した後、アセトニトリル 200  $\mu\text{L}$  および内標準物質として n-nonyl *p*-hydroxybenzoate のアセトニトリル溶液 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 50  $\mu\text{L}$  を添加し、はさみにて mince (細切) した後、遠心分離 (18,800 $\times g$ , 20min, 4 $^{\circ}\text{C}$ ) し、その上清 20  $\mu\text{L}$  を HPLC システムに注入した。HPLC システムおよび条件を以下 (Tables 6、7) に示す。

Table 6 HPLC system for determination of CPC

Pump	LC-10ATvp	
UV detector	SPD-10Avp	Shimadzu co., Kyoto
Auto injector	SIL-10ADvp	
Degasser	DGU-20A3	
Column	Inertsil <sup>®</sup> ODS-2 4.6 mm $\times$ 250 mm	GL Sciences Inc., Tokyo
Guard Column	Cartridges Guard Column E Inertsil ODS-2	
Column oven	CTO-10ASvp	Shimadzu co., Kyoto
Analysis software	BORWIN	Jasco, Tokyo

Table 7 HPLC condition for determination of CPC

Detection	258 nm
Mobile phase	1.0 mL/min
Flow rate	Acetonitrile : 0.2 M sodium perchlorate = 8 : 2
Column temp.	40 $^{\circ}\text{C}$

#### 第2節 理論

MTT 試験による死細胞率と皮膚中濃度との関係は、以下に示す sigmoid  $E_{max}$  model (Hill equation) で表した。

$$I = \frac{I_{max} \cdot C^{\gamma}}{IC_{50}^{\gamma} + C^{\gamma}} \quad (3)$$

ここで、 $I$  は皮膚刺激度 (MTT 試験における死細胞率; %)、 $I_{max}$  は最大皮膚刺

激度、 $C$  は皮膚中 CPC 濃度、 $IC_{50}$  は 50% 皮膚刺激発現濃度、 $\gamma$  は形状因子 (Hill 係数) である。

### 第3節 結果

ヘアレスマウスにおける CPC の適用濃度に対する死細胞率の関係を Figure 13 に、その時の皮膚中 CPC 濃度を Figure 14 に示す。死細胞率および皮膚中濃度ともに intact skin に比べて stripped skin の方が高値を示した。また、その傾向は死細胞率において顕著で、intact skin において死細胞率は、CPC の適用濃度に応じて増加したが、stripped skin では低濃度 (1%) においてすでに頭打ちの傾向が認められた。

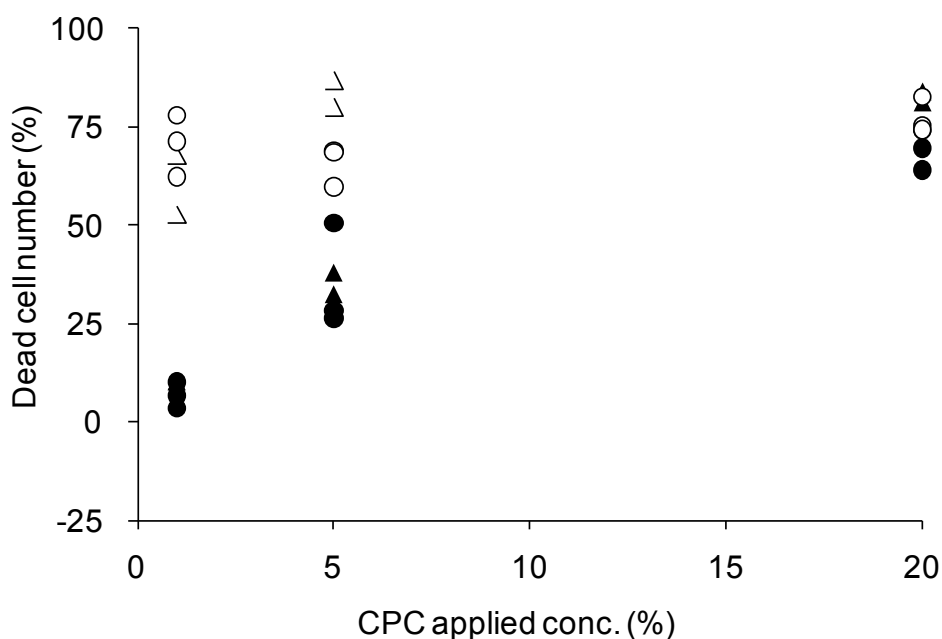


Figure 13 Dead cell number after topical application to hairless mouse

Symbols: ●, CPC application on intact abdominal skin; ▲, CPC application on intact dorsal skin; ○, CPC application on stripped abdominal skin; △, CPC application on stripped dorsal skin.

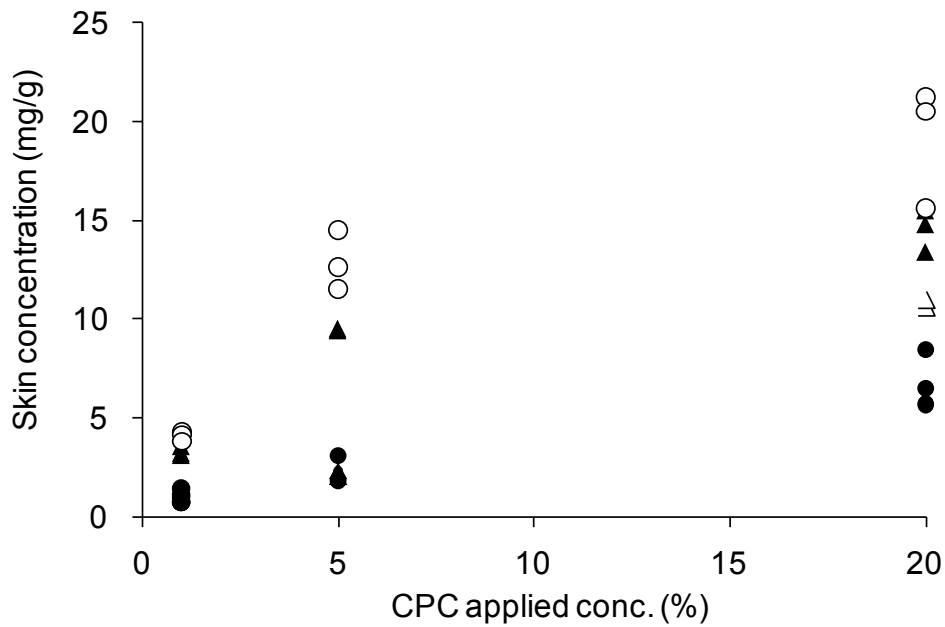


Figure 14 Skin concentration of CPC after topical application to hairless mouse

Symbols: ●, CPC application on intact abdominal skin; ▲, CPC application on intact dorsal skin; ○, CPC application on stripped abdominal skin; △, CPC application on stripped dorsal skin.

次に、死細胞率 (%) を皮膚中 CPC 濃度に対してプロットした (Figure 15)。

なお、実線は Hill 式 (式 3) を用いてカーブフィッティングしたものである。Intact skin および stripped skin、あるいは腹部および背部皮膚といった条件の違いで異なる皮膚中濃度および死細胞率を示したが、それぞれのデータは、ほぼ同一の曲線上にプロットされた。

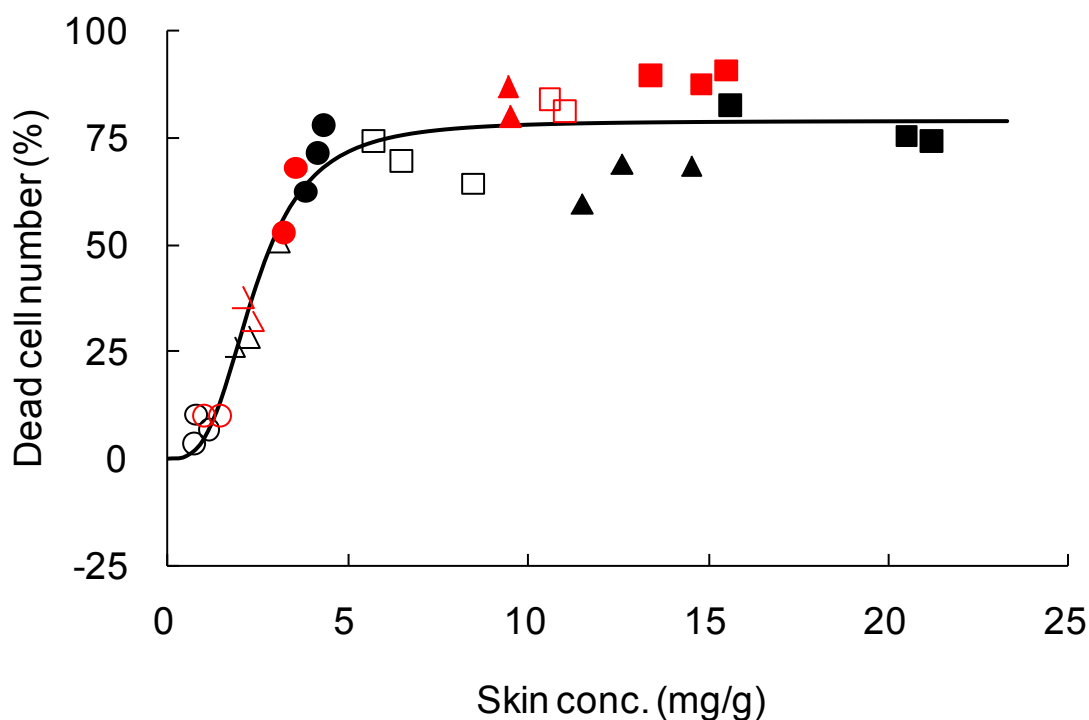


Figure 15 Relationship between percent of dead cell number by the MTT assay and skin concentration of CPC after topical application to hairless mouse

Symbols: ○, 1% CPC application on intact abdominal skin (n=3); △, 5% CPC application on intact abdominal skin (n=3); □, 20% CPC application on intact abdominal skin (n=3); ●, 1% CPC application on stripped abdominal skin (n=3); ▲, 5% CPC application on stripped abdominal skin (n=3); ■, 20% CPC application on stripped abdominal skin (n=3); ○, 1% CPC application on intact dorsal skin (n=3); △, 5% CPC application on intact dorsal skin (n=2); □, 20% CPC application on intact dorsal skin (n=2); ●, 1% CPC application on stripped dorsal skin (n=3); ▲, 5% CPC application on stripped dorsal skin (n=2); ■, 20% CPC application on stripped dorsal skin (n=3).

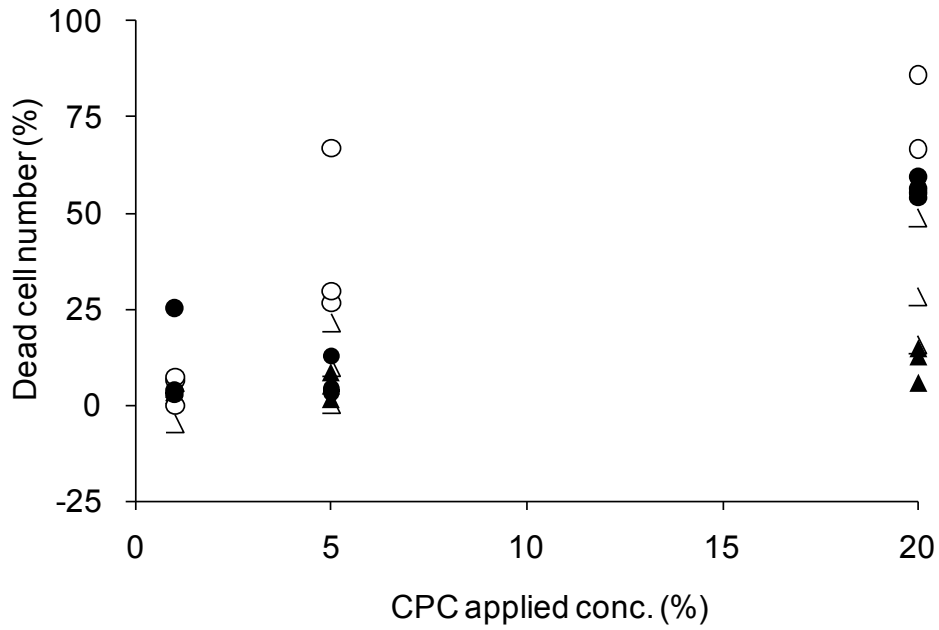


Figure 16 Dead cell number after topical application to guinea pig

Symbols: ●, CPC application on intact abdominal skin; ▲, CPC application on intact dorsal skin; ○, CPC application on stripped abdominal skin; △, CPC application on stripped dorsal skin.

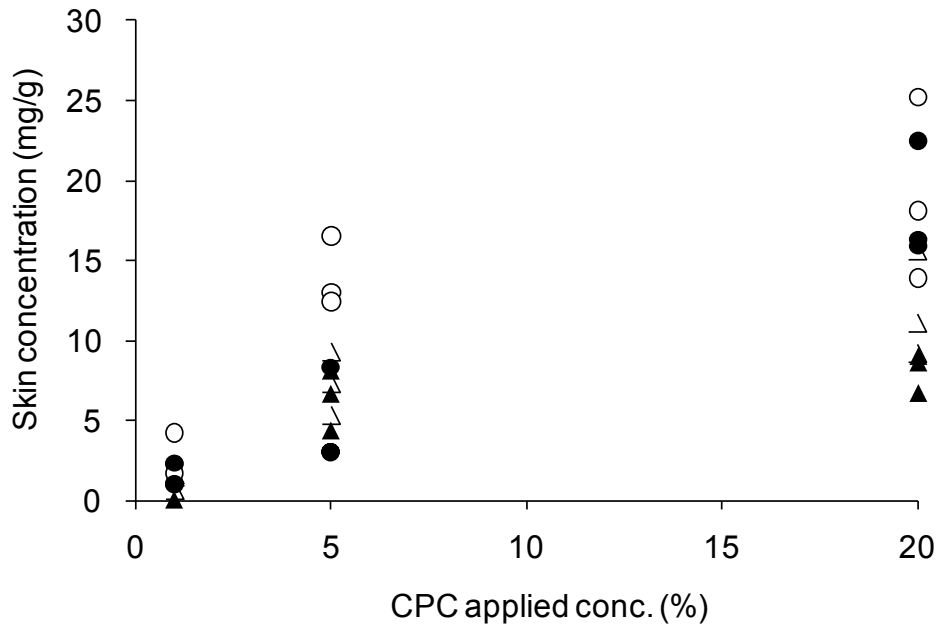


Figure 17 Skin concentration of CPC after topical application to guinea pig

Symbols: ●, CPC application on intact abdominal skin; ▲, CPC application on intact dorsal skin; ○, CPC application on stripped abdominal skin; △, CPC application on stripped dorsal skin.

同様に、モルモットにおける CPC の適用濃度に対する死細胞率の関係を Figure 16 に、その時の皮膚中 CPC 濃度を Figure 17 に示す。ヘアレスマウスほど顕著ではないが、死細胞率および皮膚中濃度ともに intact skin に比べて stripped skin の方が高値を示した。

次に、死細胞率を皮膚中 CPC 濃度に対してプロットし、カーブフィッティングした結果を同時に示した (Figure 18)。モルモットにおいても皮膚の状態 (intact skin および stripped skin) や適用部位 (腹部皮膚および背部皮膚) によらず、皮膚中 CPC 濃度と死細胞率の関係を同一の曲線でほぼ表すことができた。

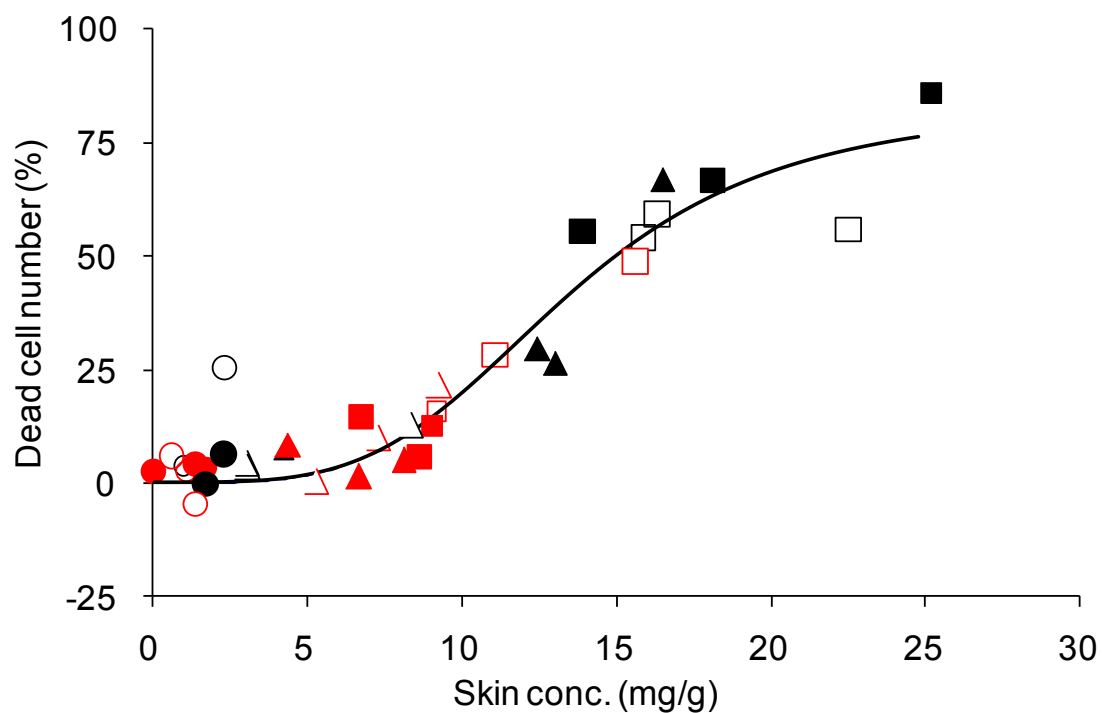


Figure 18 Relationship between percent of dead cell number by the MTT assay and skin concentration of CPC after topical application to guinea pig

Symbols: ○, 1% CPC application on intact abdominal skin (n=3); △, 5% CPC application on intact abdominal skin (n=3); □, 20% CPC application on intact abdominal skin (n=3); ●, 1% CPC application on stripped abdominal skin (n=3); ▲, 5% CPC application on stripped abdominal skin (n=3); ■, 20% CPC application on stripped abdominal skin (n=3); ○, 1% CPC application on intact dorsal skin (n=3); △, 5% CPC application on intact dorsal skin (n=3); □, 20% CPC application on intact dorsal skin (n=3); ●, 1% CPC application on stripped dorsal skin (n=3); ▲, 5% CPC application on stripped dorsal skin (n=3); ■, 20% CPC application on stripped dorsal skin (n=3).

LSE-high における CPC の適用濃度に対する死細胞率の関係を Figure 19 に、その時の皮膚（組織）中 CPC 濃度を Figure 20 に示す。ヘアレスマウスおよびモルモットと同様に、死細胞率と皮膚中濃度は intact skin に比べて stripped skin の方が高値を示した。さらに、皮膚中 CPC 濃度に対して死細胞率をプロットすると（Figure 21）、LSE-high (*in vitro*) においても動物 (*in vivo*) と同様に皮膚中 CPC 濃度と死細胞率の関係は同一の曲線でほぼ表すことができた。

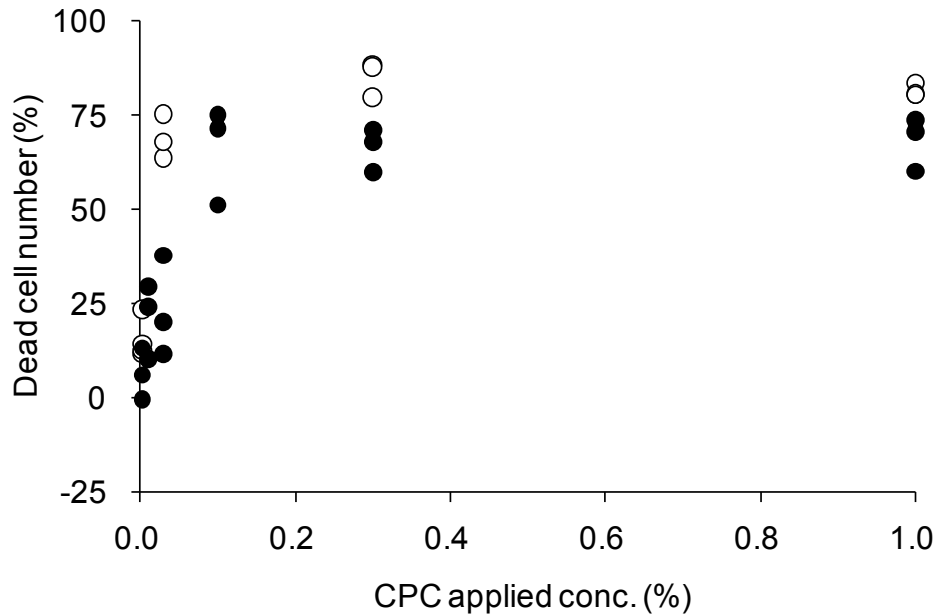


Figure 19 Dead cell number after topical application to LSE-high

Symbols: ●, CPC application on intact LSE-high; ○, CPC application on stripped LSE-high.



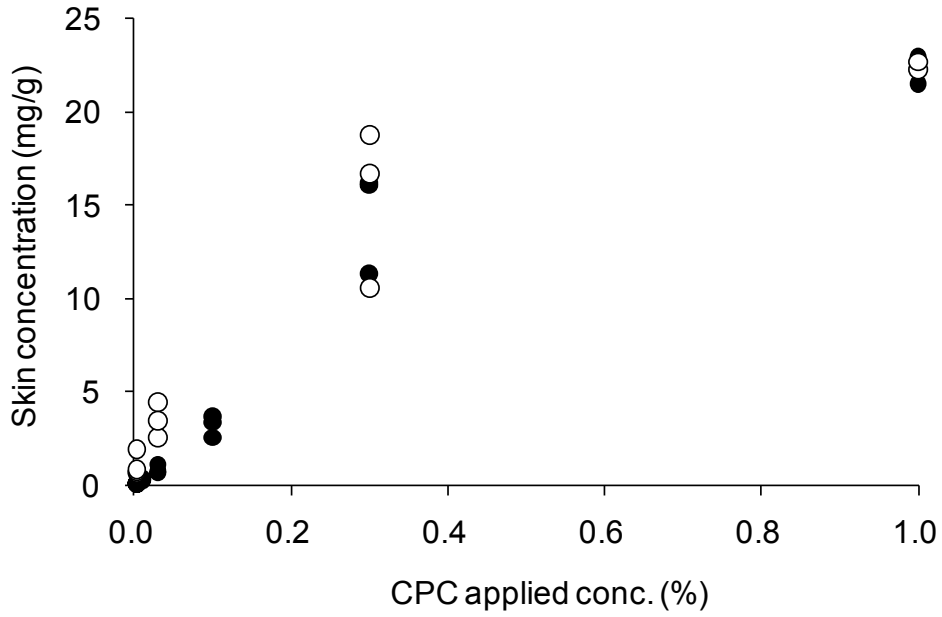


Figure 18 Skin concentration of CPC after topical application to LSE-high  
 Symbols: ●, CPC application on intact LSE-high; ○, CPC application on stripped LSE-high.

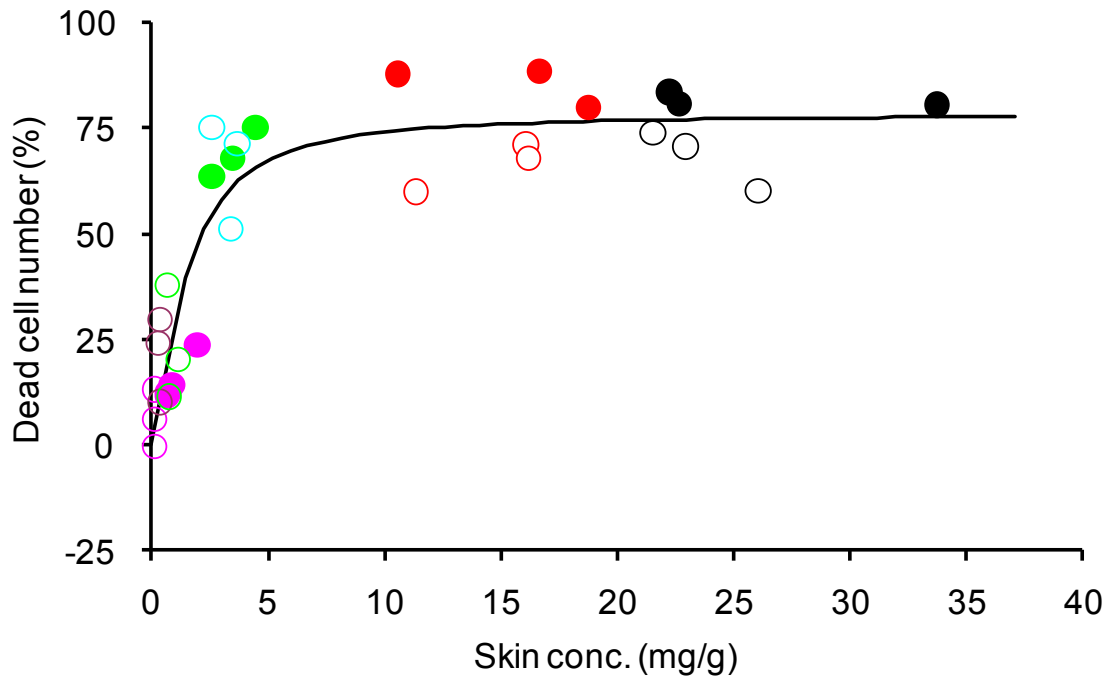


Figure 19 Relationship between percent of dead cell number by the MTT assay and tissue concentration of CPC after application to LSE-high

Symbols: ○, 1% CPC application on intact LSE-high (n=3); ○, 0.3% CPC application on intact LSE-high (n=3); ○, 0.1% CPC application on intact LSE-high (n=3); ○, 0.03% CPC application on intact LSE-high (n=3); ○, 0.01% CPC application on intact LSE-high (n=3); ○, 0.003% CPC application on intact LSE-high (n=3); ●, 1% CPC application on stripped LSE-high (n=3); ●, 0.3% CPC application on stripped LSE-high (n=3); ●, 0.03% CPC application on stripped LSE-high (n=3); ●, 0.003% CPC application on stripped LSE-high (n=3).

LSE-high、ヘアレスマウスおよびモルモットにおける皮膚刺激パラメータを Table 8 に示す。 $I_{max}$  (%) は、LSE-high、ヘアレスマウスおよびモルモットでそれぞれ 78.3、78.9 および 83.5 とほぼ同様の値を示したが、 $IC_{50}$  (mg/g) は、それぞれ 1.5、2.4 および 13.5 とヘアレスマウスの方がモルモットに比べておよそ 6 倍低い値を示し、LSE-high はモルモットに比べておよそ 9 倍低い値を示した。 $\gamma$  は、それぞれ 1.5、3.1 および 3.9 と LSE-high のみ小さい値を示した。

Table 8 Skin irritation parameters for CPC on MTT assay

	LSE-high	Hairless mouse	Guinea pig
$I_{max}$ (%)	78.3	78.9	83.5
$IC_{50}$ (mg/g)	1.5	2.4	13.5
$\gamma$	1.5	3.1	3.9

ヒトに CPC を適用した際の結果 (写真) を Figure 22 に示した。また、判定結果を Table 9 に示した。Control および 0.125% CPC の判定は－、0.25% CPC は－または±、0.5% CPC は±、1% CPC では+であった。

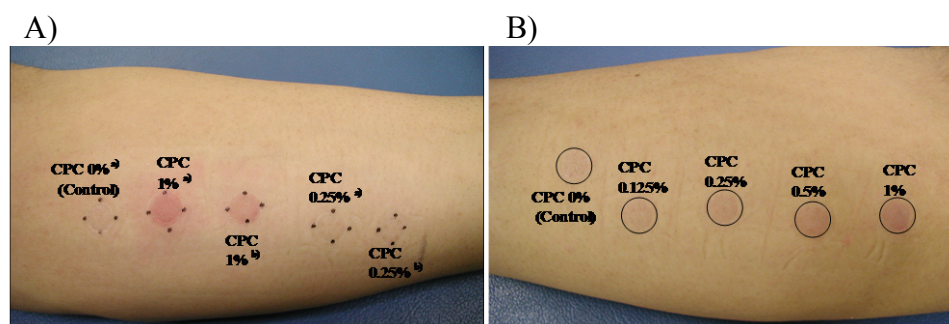


Figure 22 Skin reaction of area treated with CPC in human forearm

A); left arm, a); for MTT assay, b) for measurement of CPC concentration in skin  
B); right arm.

Table 9 Determination of skin irritation after topical application of 0.25 and 1% CPC to human forearm for 48 h

*Left arm*

CPC applied conc.	0% (Control)	1%	1%	0.25%	0.25%
skin response	—	+	+	±	±

*Right arm*

CPC applied conc.	0% (Control)	0.125%	0.25%	0.5%	1%
skin response	—	—	—	±	+

この時の死細胞率と皮膚中 CPC 濃度を Figure 23 に示した。いずれも用量の増加に応じて値が上昇した。適用濃度に対する死細胞率を Figure 24 に示した。なお、LSE-high の結果もあわせて示した。1% CPC を適用した際の死細胞率は、ヒトと LSE-high で差はなかったが、0.25% についてはヒトの方が LSE-high よりも低く、約 1/3 であった。Figure 25 に皮膚中濃度と死細胞率の関係を示した。興味深いことにヒトのデータは、ほぼ LSE-high の  $E_{max}$  曲線上にプロットされた。

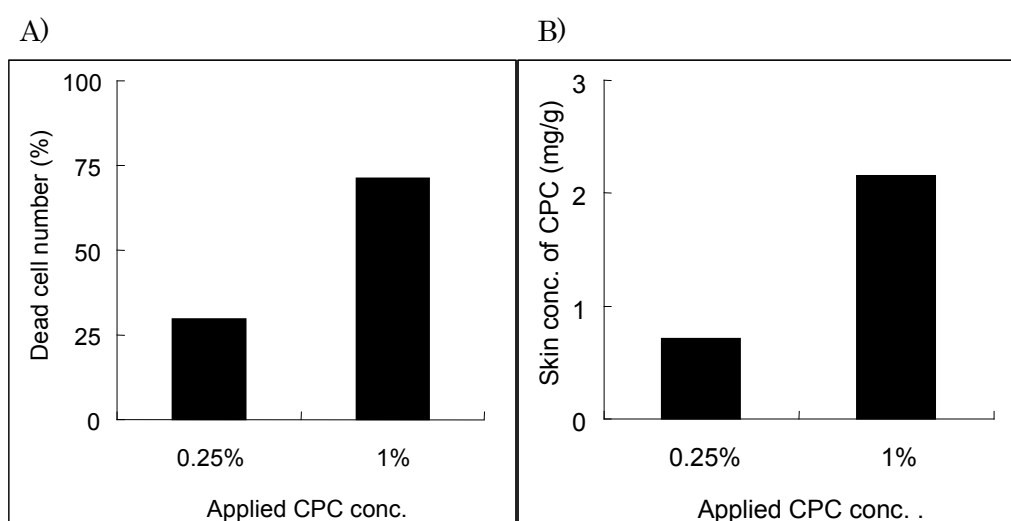


Figure 23 Dead cell number (A) and skin concentration of CPC (B) after topical application of 0.25 and 1% CPC to human forearm for 48 h

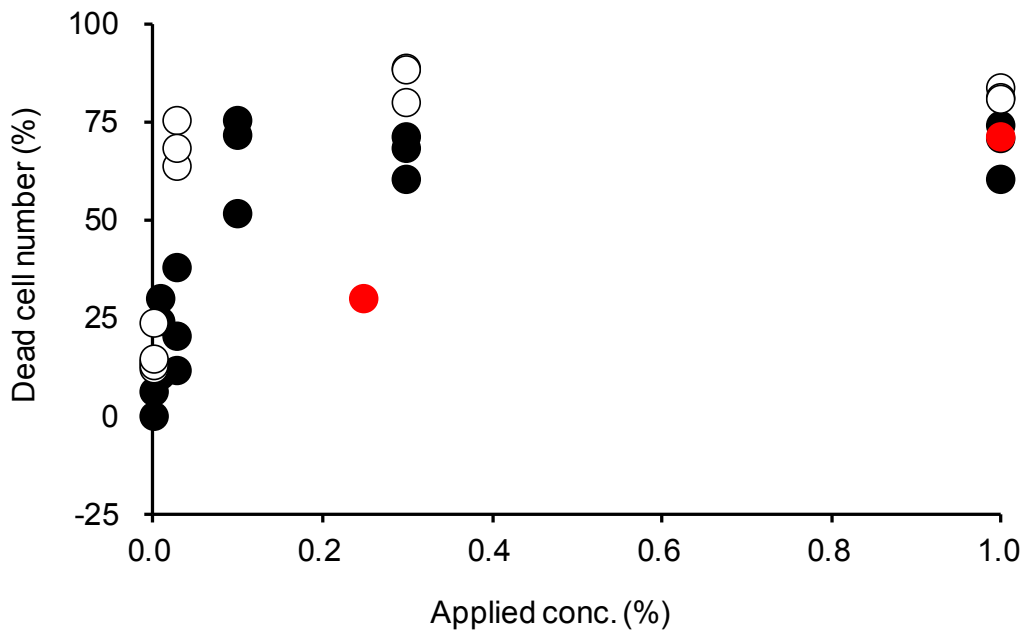


Figure 24 Relationship between percent of dead cell number by the MTT assay and applied concentration of CPC in human skin or LSE-high

- ; 0.25 or 1% CPC application to human skin.
- ; CPC (0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 and 1%) application to intact LSE-high.
- ; CPC (0.003, 0.03, 0.3 and 1%) application to stripped LSE-high.

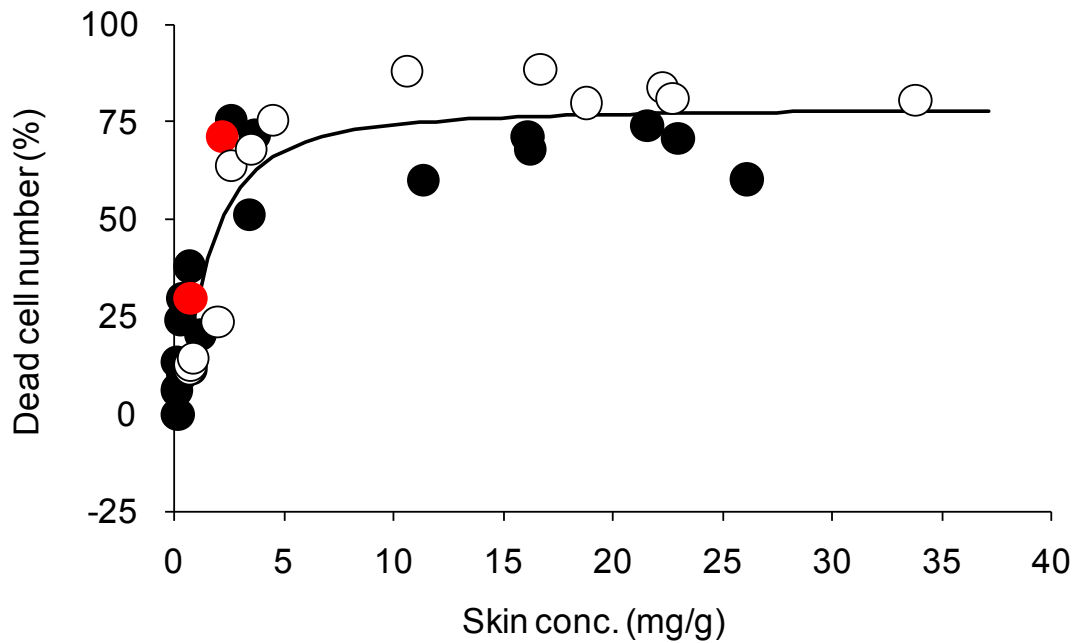


Figure 25 Relationship between percent of dead cell number by the MTT assay and tissue concentration of CPC in human skin or LSE-high

- ; 0.25 or 1% CPC application to human skin.
- ; CPC (0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 and 1%) application to intact LSE-high.
- ; CPC (0.003, 0.03, 0.3 and 1%) application to stripped LSE-high.

#### 第4節 考察

一般に PK/PD は、血中濃度を基に議論される。しかしながら、軟膏、クリームおよびゲルなどの局所外用剤（経皮送達システムは除く）の場合には、血中濃度を指標にすることができない。なぜなら皮膚表面に適用された薬物の作用部位は、当然ながら皮膚であり、体循環へ移行した薬物量（血中濃度）は局所外用剤の効果を適切に反映しない可能性があるからである。

皮膚適用製剤を開発する上で、皮膚刺激性は重要な問題である（この場合は、経皮送達システムも含まれる）。しばしば我々は、動物を用いた Draize 試験の結果が必ずしもヒトの結果を正しく予測できるわけではないことを経験する。この原因の一つに薬物の皮膚透過性の違いが考えられる。一般に薬物の皮膚透過性は、ヒトに比べて動物の方が高く、さらにモルモットよりもヘアレスマウスの方が高いと言われている。また、LSE-high などの培養皮膚モデルにおける皮膚透過性は実際のヒト皮膚に比べて高いことが知られている。すなわち、同じ製剤を適用した場合でも動物種によって皮膚中濃度が異なる可能性が考えられる。一方、皮膚刺激性に関する多くの研究は、被験物質の適用濃度と皮膚刺激性の有無について報告されているにすぎず、刺激発現部位での薬物濃度と刺激性の関係について検討した報告例はほとんどない。本研究において死細胞率を CPC の適用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においても intact skin に比べて stripped skin による結果が左にシフトしている。すなわち、同じ適用濃度であっても stripped skin の方が intact skin よりも強い皮膚刺激性を示している。ここで、皮膚透過性のバリアである角層を除去した stripped skin では intact skin に比べて皮膚中の CPC 濃度が高くなる

ことは容易に想像ができる。さらに、LSE-high ではヘアレスマウスやモルモットなどの動物実験に比べてより低濃度の CPC によって皮膚刺激が発現している。このことについても皮膚透過性の違いから容易に想像ができる。

死細胞率を皮膚中 CPC 濃度に対してプロットした場合には、LSE-high、ヘアレスマウスおよびモルモットではそれぞれ異なる曲線を示したものの、それぞれの種においては、いずれも intact skin および stripped skin あるいは背部皮膚および腹部皮膚といった皮膚の状態によらず 1 つの曲線で表すことができた。このことは、皮膚中濃度によって皮膚刺激の程度が決まるという我々の仮説を裏付けた。しかしながら、 $I_{max}$  は LSE-high、ヘアレスマウスおよびモルモットで差はなかった(LSE-high = ヘアレスマウス = モルモット)のに対して、 $IC_{50}$  は LSE-high < ヘアレスマウス < モルモットの順となり、それぞれ異なる結果となった。つまり、最大の皮膚刺激の程度に差はないが、皮膚刺激を発現する濃度に種差が認められた。ヘアレスマウスの  $IC_{50}$  は LSE-high の 1.5 倍、モルモットでは LSE-high の 9 倍であった。このことは、LSE-high およびヘアレスマウスにおいて  $I_{max}$  を示す皮膚中濃度であってもモルモットでは皮膚刺激を示さないことを示している。さらに、 $\gamma$  (Hill 係数) にも種差が認められた。 $\gamma$  は薬物固有の値であり種差はないように考えられたが、実際には LSE-high < ヘアレスマウス = モルモットであった。このことから皮膚刺激反応(細胞傷害性)自体に種差がある可能性も考えられ、これらの結果は、モルモットを用いて CPC の皮膚刺激性を評価した場合、ヘアレスマウスや LSE-high を用いた評価に比べて過小評価する可能性を示している。

ヒトにおける *in vivo* の検討では、死細胞率を皮膚中濃度に対してプロット

した場合、LSE-high と非常に近い値を示した。このことは、LSE-high を用いた皮膚刺激性評価の有用性を示唆している。しかしながら、0.25% CPC を適用した場合の死細胞率は、LSE-high のおよそ 1/3 であり、CPC の適用濃度で評価した場合、LSE-high では過大評価となる可能性がある。本来、皮膚刺激性評価の焦点は、主に刺激の有無である。そのため、適用した化学物質の濃度とその際の皮膚刺激性の関係が重視され、被験物質を適用してから十分に時間が経過した後の最終的な反応が評価される。皮膚刺激のポテンシャルの有無やランクオーダーに関する検討では問題ないと考えられるが、皮膚刺激の発現濃度に関する検討では、刺激発現部位での薬物濃度と刺激性の関係、すなわち、皮膚刺激における TK/TD 解析が有用であると考えられた。

## 第5節 小括

皮膚刺激性の程度は、皮膚中濃度によって決定され、動物や培養皮膚モデルを用いた適用濃度による評価では、皮膚透過性の違いから過小評価や過大評価の可能性があり、皮膚中濃度を考慮した解析が有用と考えられる。

## 第2章 生細胞率を指標とした皮膚刺激性の経時的推移

皮膚刺激性に関する多くの研究は、被験物質の適用濃度とその皮膚刺激性について報告されているにすぎず、刺激発現部位での薬物濃度と刺激性の関係について検討した報告例はほとんどない。さらに、被験物質を適用してから十分に時間が経過した後の最終的な反応を評価しており、皮膚刺激反応の時間推移、すなわち皮膚刺激性を速度論的に解析した報告はほとんどない。皮膚刺激性は、原因となる化学物質により引き起こされる炎症反応であり、第1章では、化学物質の皮膚中濃度と皮膚刺激性の関係について述べた。生体内の薬物濃度の変化の速度論的な解析は *pharmacokinetics* として一般的に行われる。そこで本研究では、皮膚中の化学物質によって引き起こされる炎症反応（皮膚刺激性）についても、同様に速度論的な解析が可能であると考え、皮膚刺激反応の時間推移の速度論的な解析について検討した。モデル皮膚刺激性物質として塩化セチルピリジニウム（CPC）を用い、皮膚刺激性は MTT 試験により評価した。その際の経時的な皮膚刺激反応（MTT 試験における生細胞率の減少）は一次速度定数を用いて表すことができると仮定して解析を行い、培養皮膚モデルである LSE-high (*in vitro*) とヘアレスマウス (*in vivo*) の結果を比較した。

### 第1節 実験方法

#### 1. 実験材料

モデル刺激物質として CPC を用いた。また、培養皮膚モデルは LSE-high を、動物はヘアレスマウスを用いた。なお、詳細は第2編第1章第1節 1. 実験材料



の項に記載した。

## 2. CPC の適用

第2編第1章第1節2. CPC の適用の項に準じて行った。なお、LSE-high の場合は、CPC 生理食塩液溶液の適用濃度を 1%とし、インキュベート時間は、LSE-high は、1、2、4、6、8、16 および 24 h、stripped LSE-high は、1、2、4、8、16 および 24 h とした。また、ヘアレスマウスには、CPC の 20%生理食塩液溶液を適用し、適用時間は intact skin の場合、1、2、4、6、12 および 24 h、stripped skin の場合は、1、2、4、8 および 24 h とした。適用部位は腹部の左右 2 箇所とし、そのうち 1 箇所は control として生理食塩液を適用した。

## 3. MTT assay

第2編第1章第1節3. MTT assay の項に準じて行った。

## 4. 皮膚中 CPC 濃度の測定

第2編第1章第1節4. HPLC による皮膚中濃度の測定の項に準じて行った。

## 5. 皮内コハク酸脱水素酵素の観察

ヘアレスマウスの腹部に 20% CPC および生理食塩液 (control) を 24 h 適用し、適用部位の皮膚を摘出した。皮膚試料は、包埋剤 (O.C.T. Compound、Tissue-Tek<sup>®</sup> 4583、Sakura Finetechnical Co. Ltd.、Tokyo) に包埋し、ドライアイスで冷却したイソペンタン中に浸漬して凍結した。クリオスタットを用いて 10  $\mu$ m

の切片を作成した。Sodium Succinate 750 mg、nitro blue tetrazolium chloride 75 mg および phenazine methosulfate 1.5 mg を 0.1M Tri-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 150 mL に溶解した反応液中で 37°C、60 分間遮光下にてインキュベートした後、各濃度のアセトン水溶液 (30、60、90、60、30%の順) に素早く通し、蒸留水にて水洗後、水溶性封入剤 (Aquatex<sup>®</sup>、Merck KGaA、Darmstadt、Germany) にて封入して直ちに鏡検した。

## 6. TER の測定および Dye Binding Test

CPC をヘアレスマウス腹部に 2、4、6 および 24 h 適用後、皮膚を摘出しディフュージョンチャンバーにセットした。ドナーおよびレシーバーセルには 150 mM 硫酸マグネシウム溶液を入れ、電気抵抗 (transepithelial electric resistance; TER) 値を測定した (Epithelial Tissue Voltohmmeter、World Precision Instruments、LTD)。電気抵抗値を測定後、ドナーセルの硫酸マグネシウム溶液を除去し、10% Sulforhodamine B (Acid Red 52) 水溶液を 500  $\mu$ L 適用した。室温にて 2 h 放置後、Sulforhodamine B 溶液を除去し、皮膚表面の余分な色素を精製水にて洗い流した。皮膚試料は、直径 8 mm に打ち抜いて試験管に入れ。メタノール 2 mL を加えて一晩放置し、皮膚中の Sulforhodamine B を抽出した。抽出液は分光光度計 (UV-160A、Shimadzu、Kyoto、Japan) にて 565 nm の吸光度を測定した。

## 第2節 理論

皮膚刺激の速度論的解析は、Sugibayashi らの方法<sup>50)</sup>に従った。すなわち、皮膚の生細胞率 (%) は皮膚表面に皮膚刺激物質を適用した後、適用濃度が一定

の時、一次速度に従って減少すると仮定した。また、刺激物質によって角層バリアが破壊された後、急激に生細胞率の減少は速くなると仮定した。

## 1. Intact skin における皮膚刺激反応

Intact skin における皮膚刺激反応を以下の 2 つの式で表した。

$0 \leq t < T$  のとき

$$V = (100 - V_{\infty}) \cdot \exp(-k_1 \cdot t) + V_{\infty} \quad (4)$$

$t \geq T$  のとき

$$V = (100 - V_{\infty}) \cdot \exp(-k_1 \cdot T) \cdot \exp(-k_2(t - T)) + V_{\infty} \quad (5)$$

ここで、 $V$  は時間  $t$  に対する生細胞率 (%)、 $k_1$  および  $k_2$  ( $k_1 \leq k_2$ ) はそれぞれ適用初期および後期の一次刺激速度定数、 $T$  は初期の遅い刺激相から速い刺激相への変曲点を示す。また、試験終了時に生細胞率が 0 になるとは限らないため、 $V_{\infty}$  を刺激物質適用後の無限最大時間の生細胞率とした。

## 2. Stripped skin における皮膚刺激反応

角層を剥離した stripped skin における皮膚刺激反応を以下の式で表した。

$$V = (100 - V_{\infty}) \cdot \exp(-k_{ss} \cdot t) + V_{\infty} \quad (6)$$

ここで、 $k_{ss}$  は stripped skin における一次刺激速度定数である。

### 第3節 結果

Figure 26 に intact LSE-high および stripped LSE-high における 1% CPC 適用後の時間に対する生細胞率を示す。また、得られたデータを (4)、(5) および (6) 式でフィッティングした理論曲線についても併せて示す。Intact LSE-high では変曲点が観察され、遅い相 ( $k_1$ ) と早い相 ( $k_2$ ) の 2 つの 1 次速度定数で表すことができた。一方、stripped LSE-high では変曲点は観察されず、1 つの 1 次速度定数 ( $k_{ss}$ ) で表された。

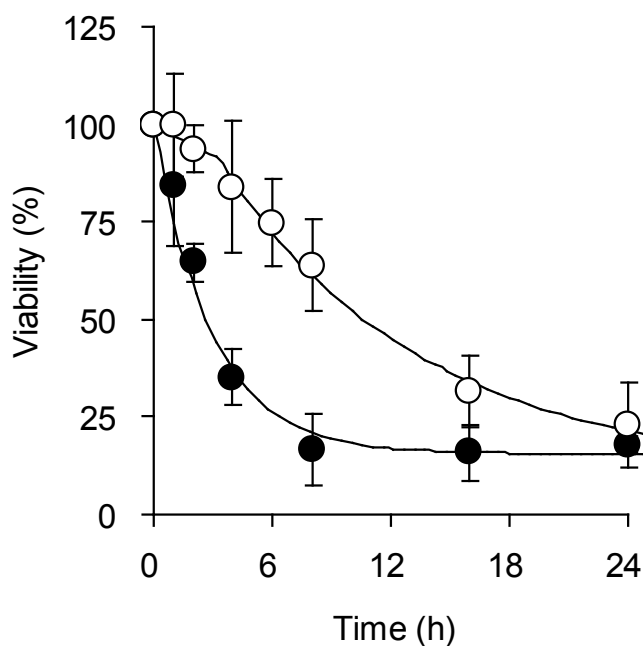


Figure 26 Time course of the viability (%) of intact and stripped LSE-high after application of 1% CPC to LSE-high.

Symbols: (○), intact skin; (●), stripped skin.

Lines show theoretical values.

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (n=3-7).

このときの組織 (LSE-high) 中 CPC 濃度の時間推移を Figure 27 に示す。組織中 CPC 濃度は、intact LSE-high および stripped LSE-high とともに適用後徐々に増

加し、4 h 以降ほぼ一定となった。

Figure 28 にヘアレスマウスにおける 20% CPC 適用後の時間に対する生細胞率および理論曲線を示す。生細胞率の時間推移は、LSE-high と同様に intact skin では変曲点を有する二相性を示し、stripped skin では一相性を示した。一方、皮膚中 CPC 濃度 (Figure 29) は stripped skin において 8 h 以降一定となったが、intact skin では 24 h まで増加しつづけた。

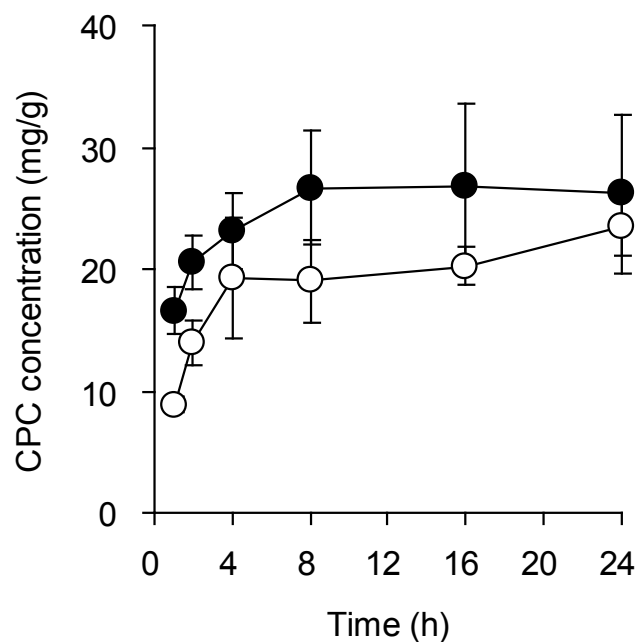


Figure 27 Time course of skin concentration of CPC after application of 1% CPC to LSE-high.

Symbols: (○), intact skin; (●), stripped skin.  
Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (n=3).

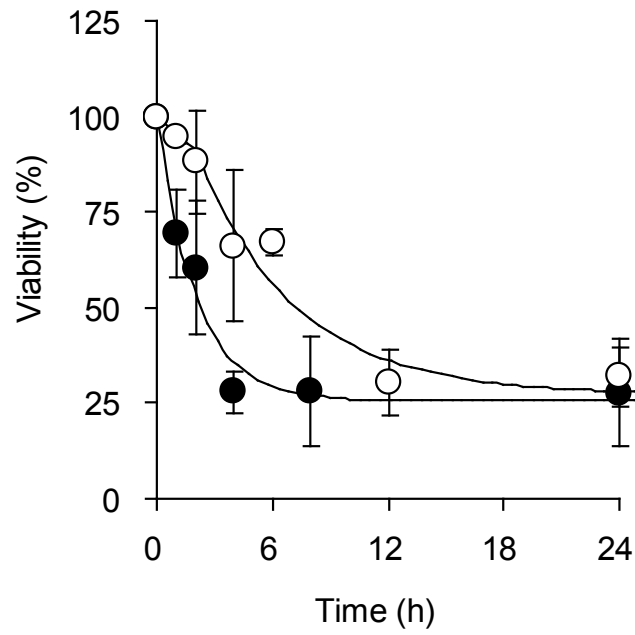


Figure 28 Time course of the viability (%) of intact and stripped hairless mouse skin after topical application of 20% CPC to hairless mouse.

Symbols: (○), intact skin; (●), stripped skin.  
 Lines show theoretical values.  
 Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (n=3-7).

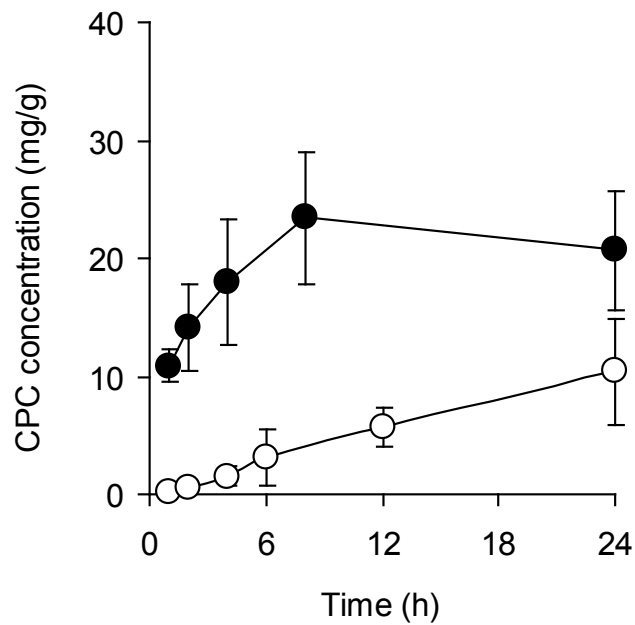


Figure 29 Time course of skin concentration of CPC after topical application of 20% CPC to hairless mouse.

Symbols: (○), intact skin; (●), stripped skin.  
 Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (n=3).

カーブフィッティングによって得られた各パラメータを Table 10 に示す。LSE-high とヘアレスマウスの  $k_1$  は、それぞれ 0.032 および 0.091  $\text{h}^{-1}$  とヘアレスマウスが LSE-high の約 2.8 倍であった。 $k_2$  については、LSE-high とヘアレスマウスでそれぞれ 0.097 および 0.204 とヘアレスマウスが LSE-high の 3.1 倍であり、 $k_{ss}$  については LSE-high とヘアレスマウスでそれぞれ 0.296 および 0.494  $\text{h}^{-1}$  とヘアレスマウスが LSE-high の 2.4 倍であった。

Table 10 Kinetic parameters for the viability decrease in LSE-high and hairless mouse skin after application of CPC.

	LSE-high		hairless mouse	
	intact	stripped	intact	stripped
CPC conc.	1%	1%	20%	20%
$k_1$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0.032		0.091	
$T$ (h)	3.21		2.38	
$k_2$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0.097		0.204	
$k_{ss}$ ( $\text{h}^{-1}$ )		0.296		0.494
$V_\infty$ (%)	10.8	17.0	30.8	25.6

MTT 適用後の皮膚試料について凍結切片を作成して観察した結果を Figure 30 に示す。皮膚全体にホルマザンの紫色が観察されたが、その色調は薄く、皮膚刺激として観察するには十分でなかった。

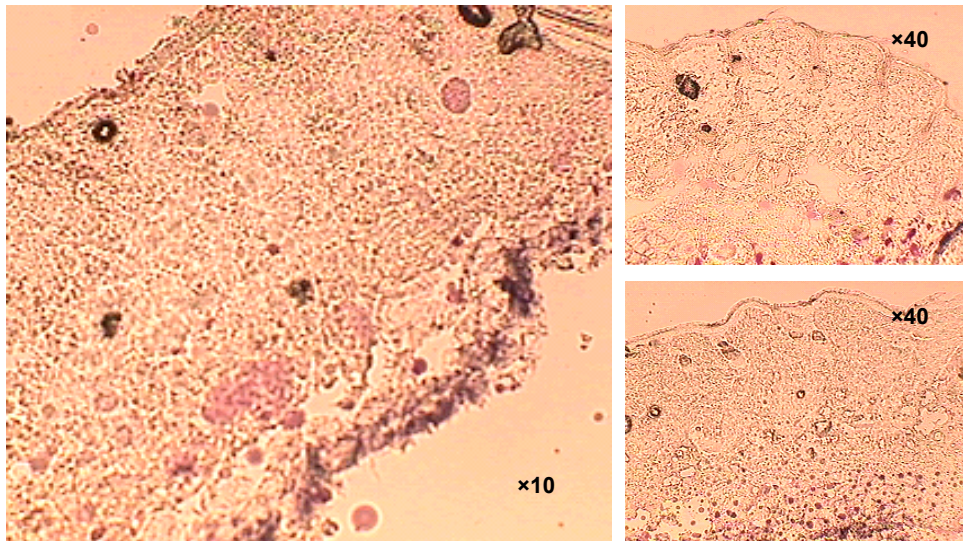


Figure 30 Typical photomicrographs of hairless mouse skin after MTT assay

そこで、凍結標本を用いて組織内のコハク酸脱水素酵素の活性を切片上で検出した (Figure 31)。コハク酸脱水素酵素は、ミトコンドリアの marker enzyme であり、その酵素活性を示す紫色 (ホルマザン) は、control 群に比べて CPC 投与群で薄く、皮膚の上部、特に表皮の活性が著しく異なった。次に、MTT assay 後の皮膚試料を表皮と真皮に分離し、それぞれのホルマザンを抽出した結果を Figure 32 に示す。表皮 (E) と真皮 (D) の吸光度の比 (E/D) は、およそ 0.2 であった。



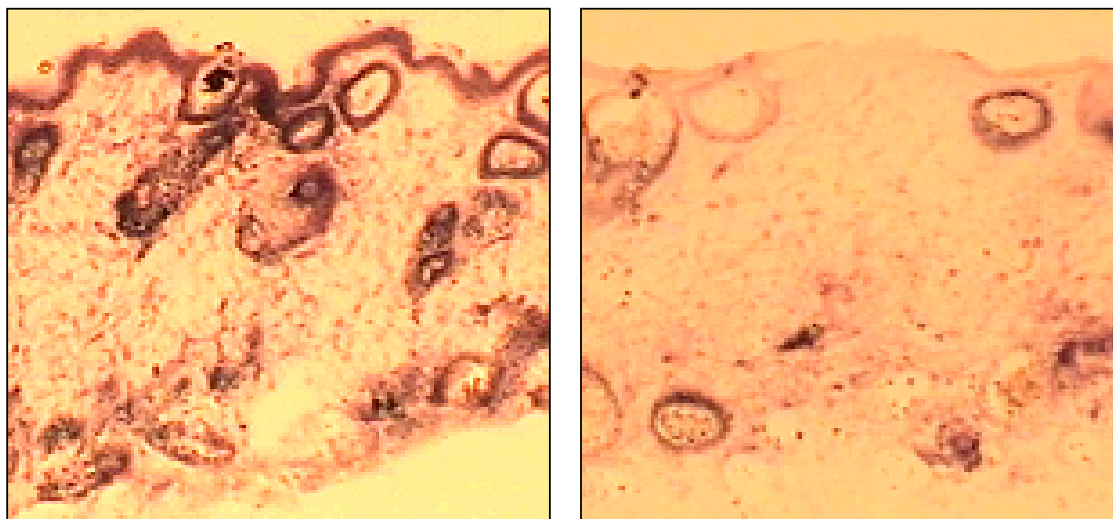


Figure 31 Enzyme histochemical analysis for succinate dehydrogenase activity in mouse skin.

a); an application site of physiological saline as control.

b); an application site of 20% CPC for 24 h.

Magnification;  $\times 10$ .

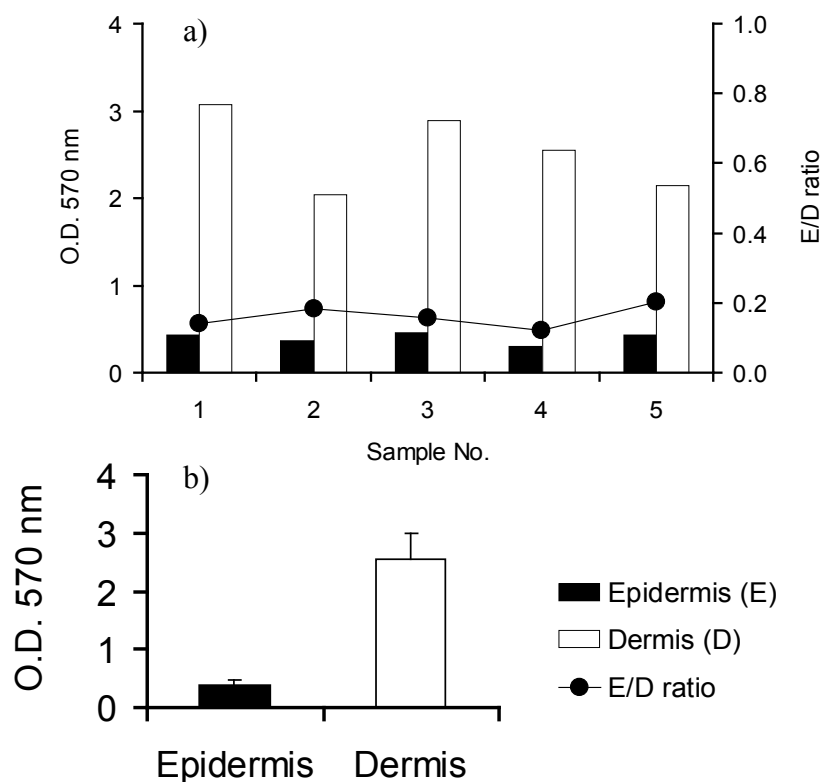


Figure 32 Distribution of MTT-formazan in epidermis and dermis after topical application of 20% CPC for 24 h to hairless mouse

a); individual data, b); mean data (Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of 5 animals)

Figure 33 に TER (電気抵抗値) の経時的変化を、Figure 34 に dye binding test における皮膚中の色素量を示す。CPC 適用後のヘアレスマウス皮膚の電気抵抗値は、適用 4 h 後にほぼ最低となり、それ以降一定の値であった。また、皮膚中に取り込まれた色素量は 6 h 以降一定となった。これらのことから変曲点 (約 4 h) 付近で著しく角層のバリア機能が低下しているものと考えられた。

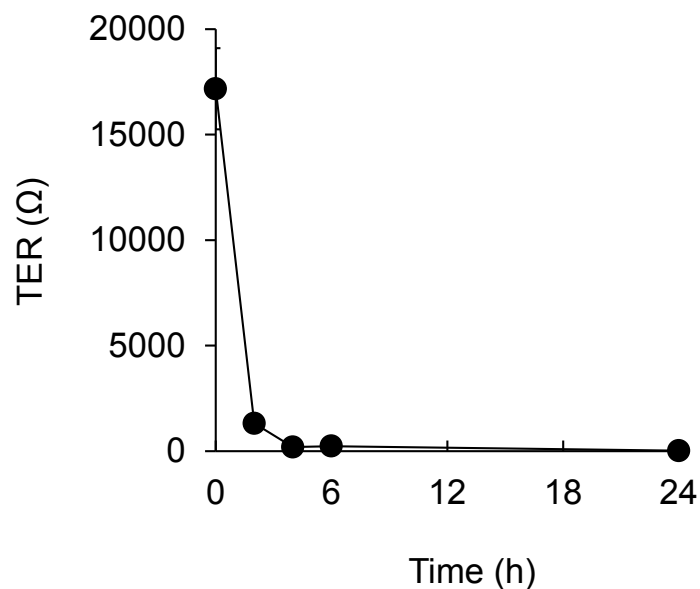


Figure 33 Time course of transepidermal electrical resistance after topical application of 20% CPC to hairless mouse

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (n=3)

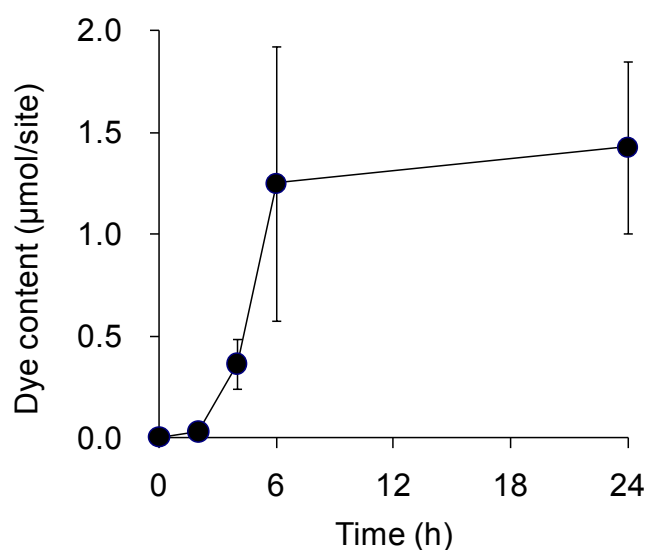


Figure 34 Result of dye binding test; time course of dye content after application of 20% CPC to hairless mouse

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (n=3)

#### 第4節 考察

現在のところ局所の反応や有害反応（毒性）に関する PK/PD の報告はそれほど多くない。しかしながら、局所の有害反応であっても用量と反応という点では PK/PD データと同様に扱うことができる。すなわち、薬物が直接効果を発現する“直接反応モデル”と生体反応を間接的に促進または阻害する“間接反応モデル”があり<sup>51,52)</sup>、皮膚における有害反応のうち皮膚感作性などは間接反応モデルに従うかもしれない。ケラチノサイトやフィibroblastなどの細胞培養系に刺激物質を添加すると刺激反応（細胞傷害性）が観察される。このとき、適用した刺激物質濃度と反応は直接反応モデルで示すことができると考えられ、実際の皮膚においても刺激性、特に一時刺激については直接反応モデルの中でも最も繁用されている  $E_{max}$  モデルで表すことができた(第2編、第1章)。

$E_{max}$  モデルに従う反応では、ある濃度を超えると反応は頭打ちとなる ( $E_{max}$  : 第 2 編第 1 章では  $I_{max}$  と表記)。つまり、この濃度域では、反応速度は一定となるため、生細胞率の減少を 1 次反応で表わすことができると考えた。本研究において、LSE-high (*in vitro*) およびヘアレスマウス (*in vivo*) の intact skin における CPC 適用後の経時的な生細胞率の減少は、変曲点を有する二相性を示した。これは、乳酸やラウリル硫酸ナトリウムを用いた Sugibayashi らの結果<sup>50)</sup>と同様であった。角層のバリア機能が十分なとき、すなわち適用初期においては CPC の透過速度は遅いため皮膚中濃度も低く、生細胞率の減少速度も遅い。その後、角層バリアの崩壊による皮膚中濃度の上昇に伴って、生細胞率の減少速度が増加したものと考えられた。一方、stripped skin では、LSE-high およびヘアレスマウスともに CPC の適用初期より速やかに生細胞率は減少し、単純な一相性の挙動を示した。このことは、CPC による皮膚刺激反応に遅れ (lag time) がほとんどないことを示唆している。さらに、TER および dye binding test の結果からも皮膚バリア機能の経時的变化が確認され、4 h 程度で角層のバリア機能が破綻していることが推察された。このことは、intact skin において変曲点が認められる原因が角層バリアの破綻であることを裏付けるものと考えられる。

皮膚刺激性の反応部位は、生きた表皮あるいは真皮と考えられる。皮膚表面に適用された薬物がこの部分に移行するためには、皮膚透過の律速段階となる角層の透過が必要である。さらに角層を透過した後も主にケラチノサイトで構成される表皮層とフィブロブラストで構成される真皮層中の薬物濃度には濃度勾配が生じる。本研究では、皮膚刺激性評価の指標として MTT assay を用いた。この方法の原理は、生細胞中のコハク酸脱水素酵素の活性に基づいている。

皮膚中の本酵素活性は、真皮に比べ表皮の方が高かったが、MTT formazan の測定への寄与は、表皮／真皮の比が 0.2 と表皮に比べ真皮が 5 倍高かった。これは、真皮よりも表皮の生細胞率が低いことを表している。表皮中 CPC 濃度は、真皮中濃度よりも高く、ケラチノサイトとフィibroblastでの細胞間の感受性の違いは明らかではないが、皮膚中の濃度勾配が皮膚内の生細胞率の差に影響している可能性が考えられた。

本研究において観察された *in vitro* (LSE-high) と *in vivo* (ヘアレスマウス) の類似した皮膚刺激挙動は、三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価法の有用性を示唆している。しかしながら、刺激物質である CPC の適用濃度は、LSE-high とヘアレスマウスでは 20 倍異なり (LSE-high: 1%、ヘアレスマウス: 20%)、測定した皮膚中濃度については、むしろヘアレスマウスよりも LSE-high の方が高値を示した。これは LSE-high とヘアレスマウスにおける CPC の皮膚透過性の違いが原因であると考えられた。第 1 編第 1 章において、ヒト皮膚と LSE-high における化学物質の透過 ( $\log P$ ) は、傾きがほぼ 1.0 の良好な相関を示すものの、LSE-high における  $\log P$  は、ヒト皮膚に比べておよそ 10 倍高いことを述べた。適用濃度に対する皮膚刺激反応の評価に LSE-high を用いた場合には、過大評価してしまう可能性を示している。したがって、皮膚刺激性の評価に LSE-high を用いる場合、ランクオーダーに関する検討についてはさほど問題はないと考えられるが、刺激の有無や発現濃度に関する検討では過大評価の問題が残される。今回算出した刺激速度定数 ( $k_1$ 、 $k_2$  および  $k_{ss}$ ) は、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 ( $T$ ) についても LSE-high よりもヘアレスマウスの方が早かった (1.3 倍)。

皮膚中濃度は LSE-high の方が高値であったことから、単純に皮膚透過性の違いだけでは説明ができない。第 2 編、第 1 章では、皮膚刺激反応の指標とした死細胞率は皮膚中濃度によって決定されることを明らかにした。しかしながら、LSE-high とヘアレスマウスの  $E_{max}$  ( $I_{max}$ ) 曲線は完全には一致せず、形状因子 (Hill 係数:  $\gamma$ ) が異なる結果であった。このことは、CPC による細胞傷害性自体に種差がある可能性を示唆しており、生細胞率を指標とした皮膚刺激性の経時的推移における一次速度定数が異なることとも関連していると考えられる。

本来、皮膚刺激性評価はある濃度における刺激の有無に焦点が当てられる。そのため、適用した被験物質の濃度と被験物質を適用してから十分に時間が経過した後の最終的な反応の関係が評価される。しかしながら、本研究から刺激発現部位での薬物濃度と刺激性の関係を速度論的に評価できることが明らかとなった。

## 第5節 小括

培養皮膚モデルである LSE-high (*in vivo*) とヘアレスマウス (*in vivo*) で類似した皮膚刺激挙動が観察された。すなわち、生細胞率を指標とした皮膚刺激性の経時的推移は、intact skin では、変曲点を有する二相性を示し、stripped skin では単純な一相性の挙動を示した。Intact skin および stripped skin における皮膚刺激挙動の違いは、角層バリアの破綻により説明できた。皮膚中の薬物濃度の変化と皮膚刺激挙動は密接に関係しており、皮膚刺激性の評価に際し、時間推移、すなわち速度論的な解析の有用性が示された。

### 第3章 三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価におけるサイトカインの産生

Watanabeらは、モルモットを用いた Draize 試験と培養皮膚モデル(LSE-high)を用いた MTT 試験による死細胞率の結果が相関することを報告している<sup>53)</sup>。その際の関係式は、

$$\text{Darize score} = 2.820 \times 10^{-2} \cdot \% \text{ fraction of dead cell number} + 1.272$$

であった。相関係数も 0.986 と良好な相関を示しているが、関係式の y 切片は、1.272 である。すなわち、第 2 編第 1 章の Table 5 に示した評点 1 を LSE-high による *in vitro* 皮膚刺激性試験では評価することができない。さらに、OECD ガイドラインの判定基準は、死細胞率が 50%以上（生細胞率が 50%以下）のとき、皮膚刺激性が陽性と判定するが、その際の Draize 試験の評点は上記の関係式に従うと 2.682 である。Draize 試験における 2 点が、“明らかな紅斑”であることを考慮すると、MTT 試験による *in vitro* 皮膚刺激性試験の感度は、動物を用いた Draize 試験よりも低いことが問題点として考えられた。皮膚刺激が非アレルギー性の皮膚障害により引き起こされる皮膚の炎症反応だとすると、刺激物質によりダメージを受けた表皮のケラチノサイトは、種々の炎症性サイトカインを産生することが予想される。そこで、サイトカインを測定することで MTT 試験よりも低用量の *in vitro* 皮膚刺激性評価が可能であれば、MTT 試験よりも高感度な評価法として期待できると考えた。

炎症反応の初期には IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  などが産生され、さらに炎症反応が進むにつれて種々の炎症性メディエータが放出されてサイトカインカスケードが形成される。本研究では、炎症性サイトカインとして IL-1 $\alpha$  および IL-6 に加え

てケモカインである IL-8 に注目し、培養皮膚モデルおよびヘアレスマウスの皮膚刺激性とサイトカイン産生について検討した。なお、マウスにおいてヒト IL-8 の相同物は存在しないため、ヒト IL-8 の機能性相同物である MIP-2 (mouse macrophage inflammatory protein-2) を測定した。

## 第1節 実験方法

### 1. 実験材料

モデル刺激物質として CPC を用いた。また、培養皮膚モデルは LSE-high を、動物はヘアレスマウスを用いた。なお、詳細は第 2 編第 1 章第 1 節 1. 実験材料の項に記載した。

### 2. CPC の適用

第 2 編第 1 章第 1 節 2. CPC の適用の項に準じて行った。なお、LSE-high の場合は、CPC の適用濃度を 0.01、0.03、0.1、0.3 および 1% とした。培地中のサイトカインの測定では、2、4、6、8 および 24 h に培地を交換した。組織中サイトカインおよび CPC 濃度の測定では、適用時間を 4、8 および 24 h とした。また、CPC の適用は LSE-high およびヘアレスマウスともに intact skin のみとした。

### 3. 皮膚試料の採取

ヘアレスマウスは、投与部位を精製水で湿らせた脱脂綿にて 4 回拭いて、皮膚表面に残存する CPC を除去した。適用部位の皮膚を摘出し、生検パンチを用いて直径 8 mm に打ち抜いた。重量を測定した後、0.1% Tween 20 含有 PBS



(pH 7.4) を 10 倍容加え、はさみにて mince した。60 秒間超音波処理した後、遠心分離 (13,000×g、5 min、4°C) して、上清を測定までの間-80°C にて保存した。

LSE-high は、MTT assay に供する場合には、第 2 編第 1 章第 1 節 3. MTT assay の項に準じて行った。組織中サイトカインを測定する場合は、直径 8 mm に打ち抜いた後、重量を測定し、10 倍容の 0.1% Tween 20 含有 PBS (pH 7.4) を加えてはさみにて mince した。60 秒間超音波処理した後、遠心分離 (13,000×g、5 min、4°C) して、上清を測定までの間-80°C にて保存した。

#### 4. MTT assay (LSE-high)

第 2 編第 1 章第 1 節 3. MTT assay の項に準じて行った。

#### 5. HPLC による組織中 CPC 濃度の測定

第 2 編第 1 章第 1 節 4. HPLC による皮膚中濃度の測定の項に準じて行った。ただし、HPLC システムは以下のものを使用し (Table 11)、Table 7 と同じ測定条件とした。

Table 11 HPLC system and condition for determination of CPC

HPLC system:	Alliance HPLC System	
	Separations Module: 2695	
	Dual Wavelength Absorbance Detector: 2487	Nihon Waters K.K., Tokyo
Analysis software:	Empower	
Column:	Inertsil <sup>®</sup> ODS-2 4.6 mm × 250 mm	
Guard Column:	Cartridges Guard Column E Inertsil <sup>®</sup> ODS-2	GL Sciences Inc., Tokyo

## 6. サイトカインの測定

マウス IL-1 $\alpha$ 、IL-6、MIP-2 およびヒト IL-1 $\alpha$ 、IL-6、MIP-2 は、それぞれ ELISA キット (Quantikine<sup>®</sup>、R&D Systems、Inc.) を用いて測定した。

培地は、キットに付属する希釈液 (Assay Diluent) にて適宜希釈して測定した。

LSE-high (組織) は、重量を測定後、0.1% Tween 20 含有 PBS (pH 7.4) を 1 mL 加え、はさみにて mince し、30 秒間超音波処理した後、遠心分離 (13,000  $\times$ g、5 min、4 $^{\circ}$ C) し、上清を希釈液 (Assay Diluent) にて適宜希釈して測定した。

ヘアレスマウス皮膚は、重量測定後、0.1% Tween 20 含有 PBS (pH 7.4) を 10 倍容加え、はさみにて mince (細切) した。60 秒間超音波処理した後、遠心分離 (13,000  $\times$ g、5 min、4 $^{\circ}$ C) し、上清を希釈液 (Assay Diluent) にて適宜希釈して測定した。なお、吸光度 (450 nm) の測定は Microplate Reader (Model 550、Bio-Rad Laboratories、Inc.) を用いて行った。

## 第2節 結果

### 1. ヘアレスマウスの皮膚中サイトカイン濃度

ヘアレスマウスに 20% CPC を適用した際の皮膚中 IL-1 $\alpha$ 、IL-6 および MIP-2 濃度の時間推移を Figure 35 に示す。まず IL-1 $\alpha$  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。

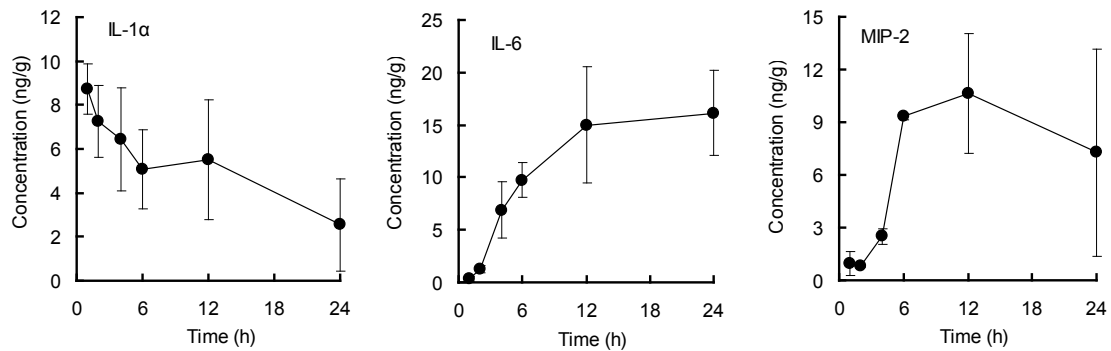


Figure 35 Time course of cytokines concentration in the skin after topical application of 20% CPC to hairless mice

Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3).

Figure 36 に 1、5 および 20% CPC 適用後 12 および 24 h の皮膚中サイトカイン濃度を示す。なお、1 および 5% CPC 適用後 24 h の IL-1 $\alpha$  については測定を実施しなかった。皮膚中の IL-1 $\alpha$  濃度は、適用 12 h において用量に応じて減少した。また、20% CPC を適用した際の皮膚中 IL-1 $\alpha$  濃度は 12 および 24 h で同程度であった。IL-6 は、12 h では 1、5 および 20% でほぼ一定の値を示したのに対し、24 h では 1、5 および 20% のうち 5% の時が最も高く、bell-shape となった。MIP-2 では、いずれの適用濃度においても 12 h の方が 24 h よりも高かったが、12 および 24 h とともに 5% のときが最も高く bell-shape を示した。このときの皮膚中 CPC 濃度を Figure 37 に示す。CPC の皮膚中濃度は 12 および 24 h でいずれも用量依存的であった。

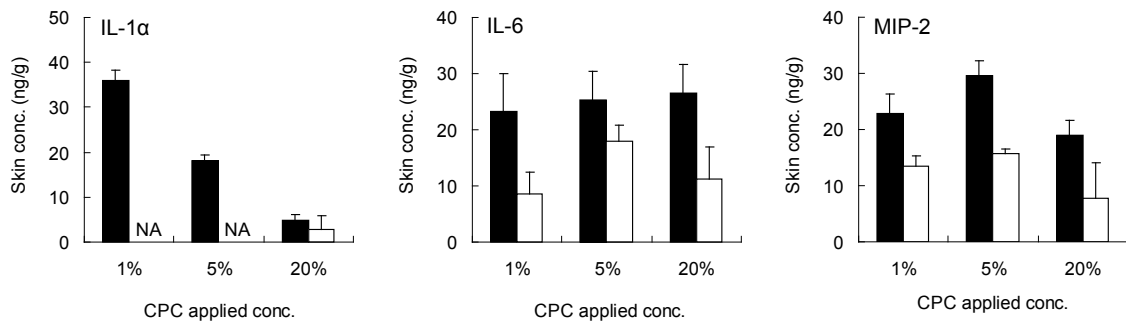


Figure 36 Dose dependency of IL-1 $\alpha$ , IL-6 and MIP-2 concentration in hairless mouse skin after topical application of 1, 5 and 20% CPC for 12 and 24 h

Symbols: ■; 12 h, □; 24 h  
 IL-1 $\alpha$  when 1 and 5% CPC was applied was not measured.  
 Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3).  
 NA: not applicable

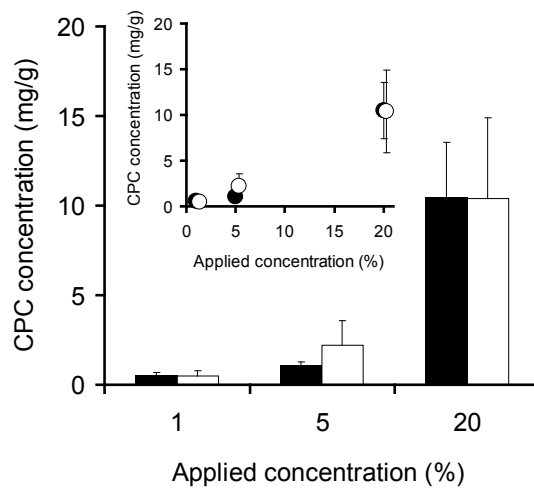


Figure 37 Skin concentration of CPC for 12 and 24 h after topical application of 1, 5 and 20% CPC to hairless mouse

Symbols: ■ and ●; 12 h, □ and ○; 24 h  
 Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3).

## 2. CPCによる細胞毒性

LSE-high に 0.01、0.03、0.1、0.3 および 1% CPC を 24 h 適用後、MTT 試験により評価した皮膚刺激性、すなわち死細胞率 (%) と CPC の適用濃度の関係を Figure 38 に示す。

適用した CPC の濃度に応じて死細胞率は増加し、CPC 0.3%以上ではほぼ頭打ちとなった。

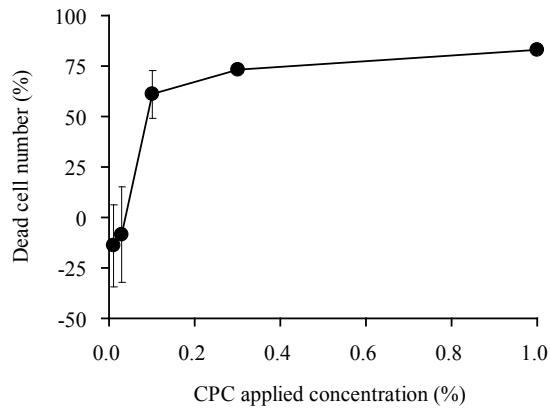


Figure 38 Dose response of dead cell number (%) of LSE-high after CPC application for 24 h

Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3).

### 3. 組織中 CPC 濃度

LSE-high に 0.01、0.03、0.1、0.3 および 1% CPC を 24 h 適用した後の組織 (LSE-high) 中 CPC 濃度を Figure 39 に示す。組織中 CPC 濃度は、適用した CPC の濃度に応じて直線的に増加した。

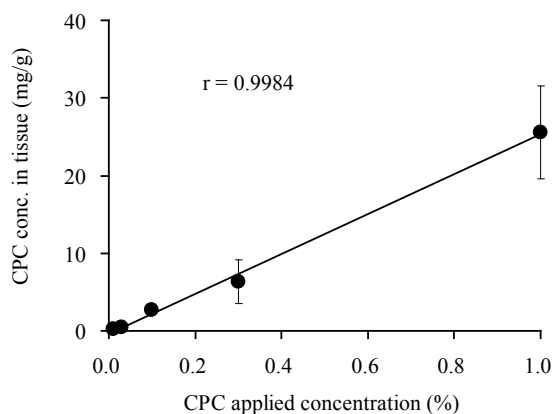


Figure 39 Dose response of CPC concentration in LSE-high after CPC application for 24 h

Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3).

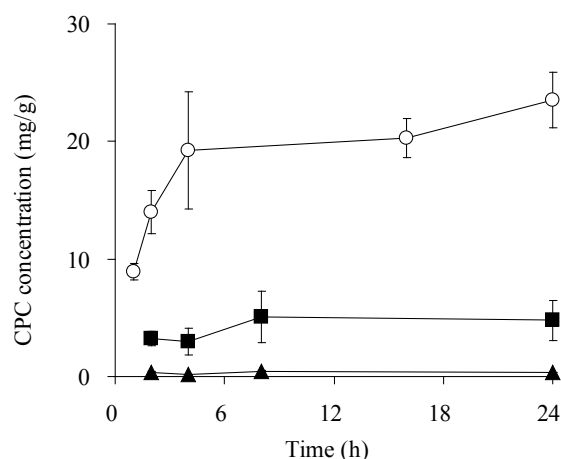


Figure 40 Time course of skin concentration of CPC after application of CPC to LSE-high

Symbols: (○) 1% CPC; (■) 0.3% CPC; (▲) 0.03% CPC  
Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3).

LSE-high に 0.03、0.3 および 1% CPC を適用した後の組織中 CPC 濃度推移を Figure 40 に示す。1% CPC を適用した際の組織中 CPC 濃度は、適用直後より速やかに上昇し、4 h 以降ほぼ一定の値を示したのに対して、0.03 および 0.3% CPC では、8 h まで緩やかに上昇したが、適用期間中はほぼ一定の濃度を示した。

#### 4. 生細胞率 (%) の時間推移

LSE-high に 0.03、0.3 および 1% CPC を適用した後の生細胞率 (%) の対数値の時間推移を Figure 41 に示す。0.03% CPC では、適用後 24 h まで生細胞率は一定であり、ほぼ 100%であった。0.3% CPC では、1% CPC と同様に変曲点を持つ二相性の挙動を示したが、その変曲点は 1% CPC よりも遅く、およそ 8 h であった。

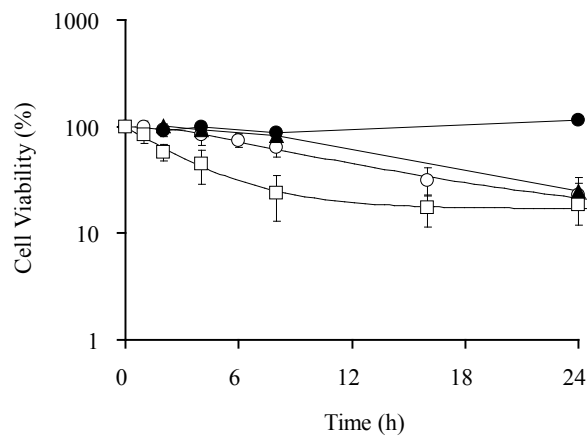


Figure 41 Time course of the viability (%) of LSE-high after application of CPC to LSE-high

Symbols: (○) 1% CPC for intact LSE-high; (▲) 0.3% CPC for intact LSE-high; (●) 0.03% CPC for intact LSE-high; (□) 1% CPC for stripped LSE-high. Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3).

### 5. 死細胞率 (%) と CPC の組織中濃度の関係

死細胞率 (%) と CPC の組織中濃度の関係を Figure 42 に示す。適用濃度との関係 (Figure 38) と同様の形状を示し、組織中 CPC 濃度がおよそ 5 mg/g 以上で死細胞率はほぼ頭打ちとなった。

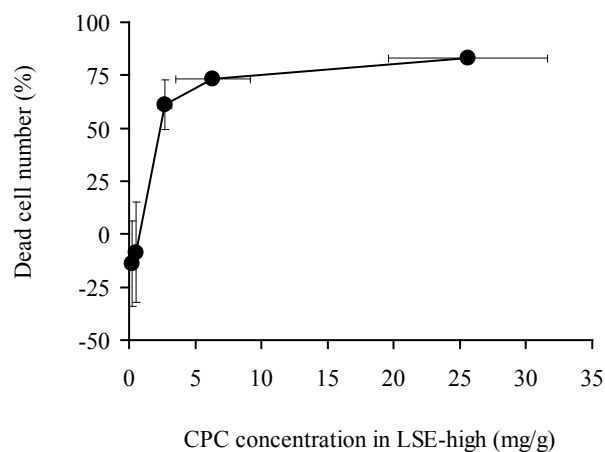


Figure 42 Relationship between CPC concentration in LSE-high and dead cell number (%) of LSE-high after CPC application for 24 h

Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3).

## 6. CPC 適用後のサイトカイン産生

LSE-high に 0.01、0.03、0.1、0.3 および 1% CPC を 24 h 適用した後の IL-1 $\alpha$ 、IL-6 および IL-8 の累積産生量をそれぞれ Figure 43、Figure 44 および Figure 45 に示す。コントロール (saline) 群においても経時的なサイトカインの産生が認められたが、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。

各時間間隔における IL-1 $\alpha$ 、IL-6 および IL-8 の産生速度をそれぞれ Figure 46、Figure 47 および Figure 48 に示す。各時間間隔における産生速度は、ばらつきはあるものの適用した CPC 濃度の増加に伴い増加したが、IL-8 については 6-8 h を除いて 0.3%以上で頭打ちの傾向が観察された。

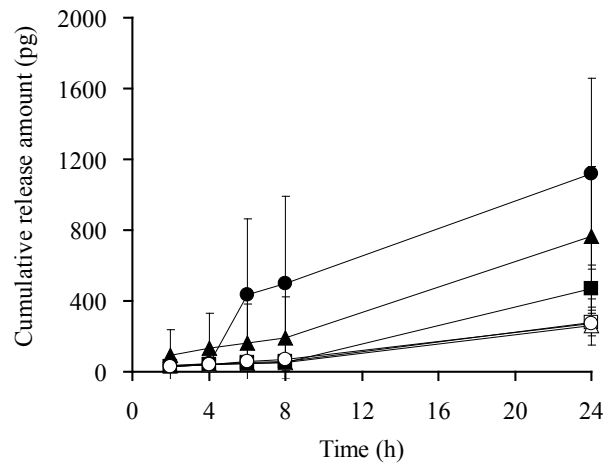


Figure 43 Cumulative release amount of IL-1 $\alpha$  after CPC application to LSE-high

Symbols: (○) saline (control); (□) 0.01% CPC; (Δ) 0.03% CPC;  
(■) 0.1% CPC; (▲) 0.3% CPC, (●) 1% CPC.  
Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3).



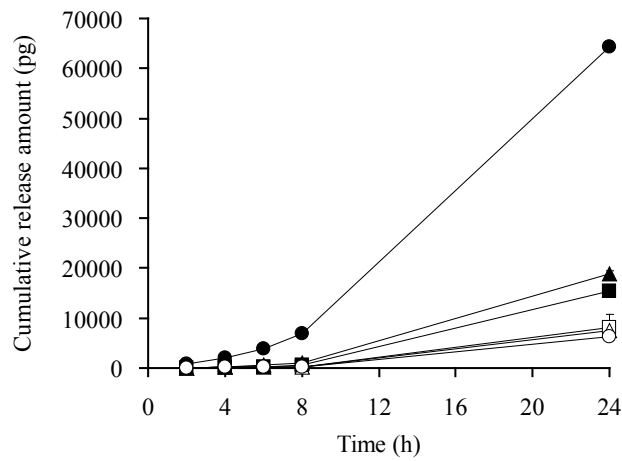


Figure 44 Cumulative release amount of IL-6 after CPC application to LSE-high

Symbols: (○) saline (control); (◻) 0.01% CPC; (△) 0.03% CPC;  
 (■) 0.1% CPC; (▲) 0.3% CPC; (●) 1% CPC.  
 Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3).

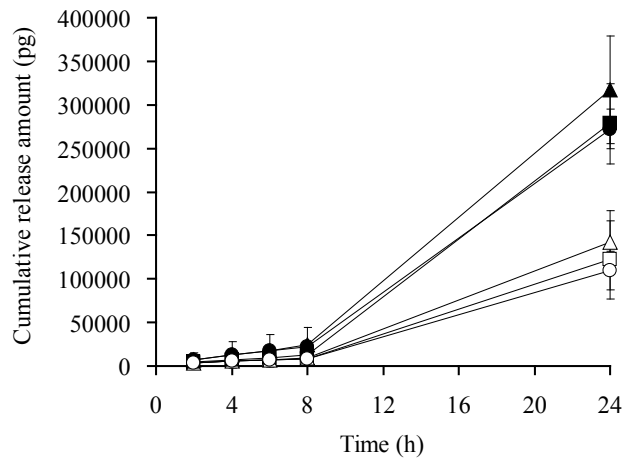


Figure 45 Cumulative release amount of IL-8 after CPC application to LSE-high

Symbols: (○) saline (control); (◻) 0.01% CPC; (△) 0.03% CPC;  
 (■) 0.1% CPC; (▲) 0.3% CPC; (●) 1% CPC.  
 Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3).

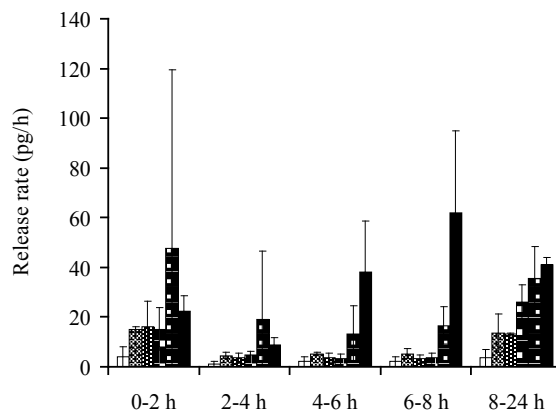


Figure 46 Release rate of IL-1 $\alpha$  after CPC application to LSE-high

Symbols: (□) saline (control); (▨) 0.01% CPC; (▩) 0.03% CPC;  
 (▧) 0.1% CPC; (▦) 0.3% CPC; (■) 1% CPC.  
 Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3).

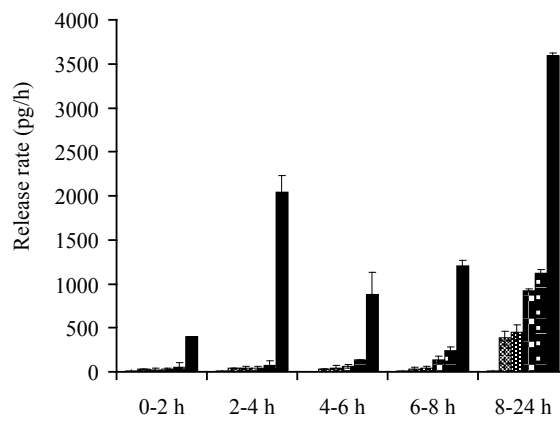


Figure 47 Release rate of IL-6 after CPC application to LSE-high

Symbols: (□) saline (control); (▨) 0.01% CPC; (▩) 0.03% CPC;  
 (▧) 0.1% CPC; (▦) 0.3% CPC; (■) 1% CPC.  
 Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3).

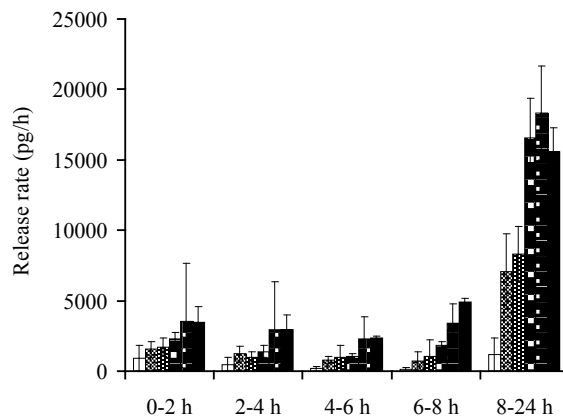


Figure 48 Release rate of IL-8 after CPC application to LSE-high

Symbols: (□) saline (control); (▨) 0.01% CPC; (▩) 0.03% CPC;  
 (▧) 0.1% CPC; (▦) 0.3% CPC; (■) 1% CPC.  
 Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3).

## 7. 組織 (LSE-high) 中サイトカイン濃度

LSE-high に 0.01、0.03、0.1、0.3 および 1% CPC を 24 h 適用した後の組織中サイトカイン濃度を Figure 49 に示す。0.03% CPC 適用した際の組織中サイトカイン濃度は、saline (control) 群と同様の推移を示した。0.3%以上で組織中の IL-1 $\alpha$  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 h 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 h までほぼ一定に推移した。

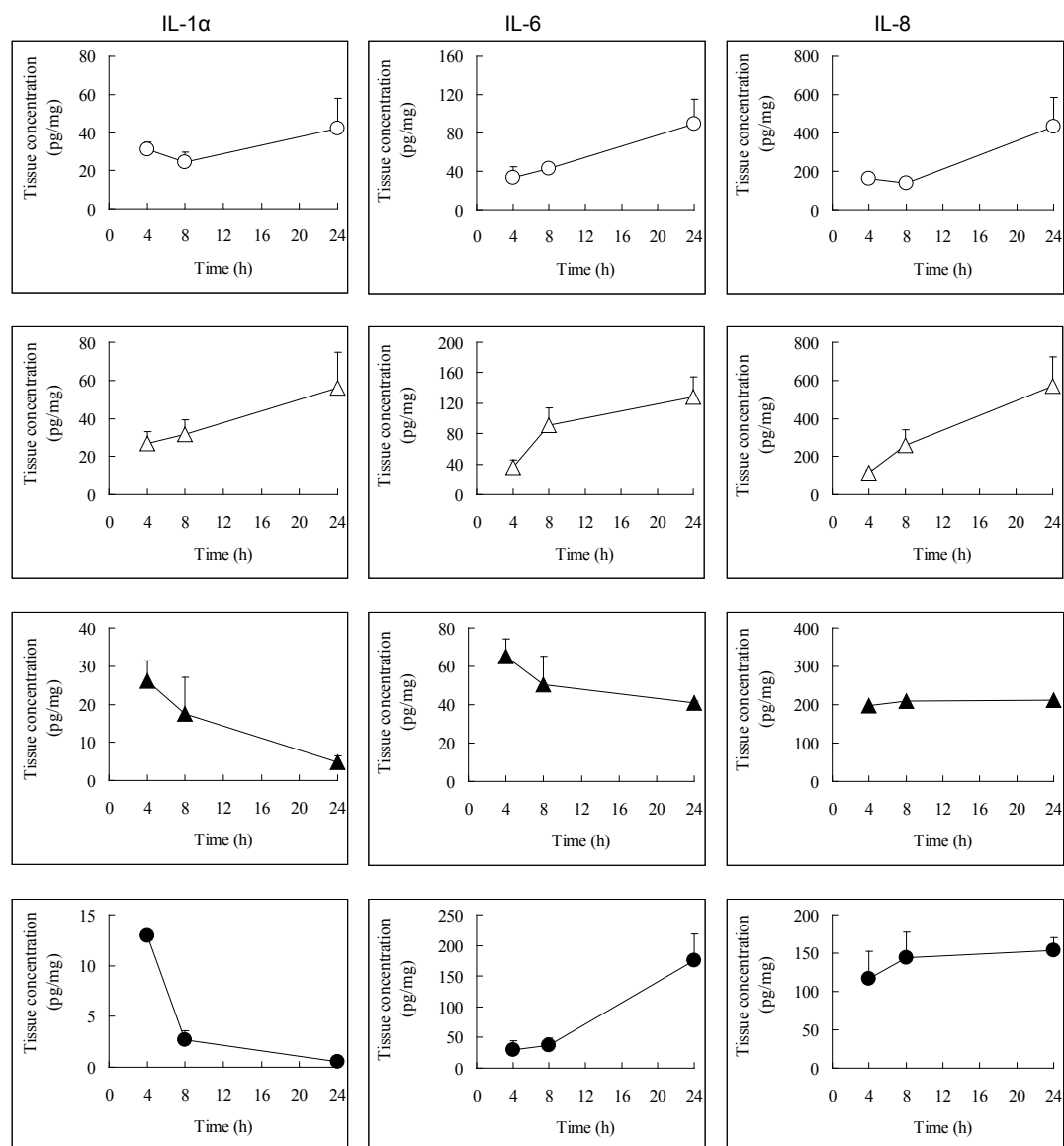


Figure 49 Time course of skin concentration of IL-1 $\alpha$ , IL-6 and IL-8 after application of CPC solution to LSE-high

Symbols: (○) application of saline (control); (△) application of 0.03% CPC;

(▲) application of 0.3% CPC, (●) application of 1% CPC.

Left column; IL-1 $\alpha$ , middle column; IL-6, Right column; IL-8.

Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3).

### 第3節 考察

皮膚刺激は、炎症反応であり、炎症反応の進行にあわせて種々の炎症性メディエーターが放出されサイトカインカスケードが形成される。本検討では、炎

症性サイトカインである IL-1 $\alpha$  および IL-6 に加えてケモカインである IL-8 に着目し、それらの時間推移を観察した。なお、マウスにおいてヒト IL-8 の相同物は存在しないため、代わりに MIP-2 を測定した。MIP-2 は、ヒト IL-8 の機能性相同物であり、ヒト IL-8 と同様に強力な好中球走化活性を提示して組織損傷などに応じて好中球を集めるのに重要なメディエータと考えられている<sup>54, 55)</sup>。

IL-1 $\alpha$  は、炎症反応の引き金となる重要な炎症性メディエータの一つ<sup>56)</sup>である。また、IL-1 $\alpha$  は表皮中のケラチノサイトにおいて細胞質中あるいは膜結合型として貯留されており、細胞や膜の傷害によって放出される<sup>57)</sup>。さらに、ケラチノサイト表面にある I 型の IL-1 $\alpha$  レセプターへ結合することで IL-6 や IL-8 といった炎症性サイトカインを産生するだけでなく IL-1 $\alpha$  自身の発現を誘導することが知られている<sup>58)</sup>。また、皮膚のケラチノサイト表面において IL-6 レセプターの存在が証明されており、ケラチノサイト自身からの IL-6 の産生も認められている<sup>59)</sup>。このように、外的侵襲に際して生体防御の最前線にある細胞が IL-6 を産生するということは、生体防御反応の早期に IL-6 が関与していることを示していると考えられる。さらに、ケラチノサイトは、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  などの刺激によって IL-8 を産生することが知られている<sup>60)</sup>。IL-8 は、C-X-C クラスに属するケモカイン<sup>61)</sup>であり、好中球の浸潤に強く関与している<sup>62)</sup>。Bernhofer らは、培養皮膚を用いた種々の洗顔クリームの皮膚刺激性評価において、表皮モデルを用いた場合には IL-8 の産生は認められなかったが、フィブロブラストの存在下、すなわち、full-thickness モデルによる検討では培地中の IL-8 が増加することを報告している<sup>47, 48)</sup>。また、Coquette らは培養皮膚モデルの SkinEthic を用いた皮膚刺激性試験において IL-8 の産生を報告<sup>63)</sup>してお

り、さらに彼らは産生された IL-8 と IL-1 $\alpha$  の比によって皮膚刺激と皮膚感作性を区別することができるとしている。

皮膚刺激物質の中には、クロトン油のように高いサイトカイン産生を示すものとラウリル硫酸ナトリウム (SLS) のように比較的サイトカイン産生が低いものがある<sup>64)</sup>。SLS は、陰イオン性の界面活性剤で、皮膚刺激性物質として良く知られている。今回モデル化学物質として用いた塩化セチルピリジニウム (CPC) もまた陽イオン性の界面活性剤であり、典型的な皮膚刺激物質の一つとして知られている<sup>45)</sup>。多くのイオン性界面活性剤は、細胞間のケラチンに作用して角層を膨潤させ<sup>65)</sup>、角層のバリア機能を低下させる<sup>66)</sup>。これは、界面活性剤による薬物の経皮吸収促進メカニズムの一つであると考えられる。さらに、イオン性界面活性剤は、細胞膜を破壊し、結果として細胞質を細胞外へ放出する<sup>67,68)</sup>。一方、MTT 試験は細胞内ミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素活性の測定による細胞毒性試験であり、上記の皮膚刺激のメカニズムを考慮すると、細胞内あるいは培地中の IL-1 $\alpha$  量と相関性を示すことが予想される。実際に、LSE-high を用いた本検討において、組織中の CPC 濃度の増加に応じて組織内 IL-1 $\alpha$  量は減少し、MTT 試験による生細胞数の減少と同様の挙動を示している。しかしながら、産生されるサイトカインを測定したこれまでの報告の多くは、MTT 試験や Draize 試験の結果と相関しない。これは、Draize 試験や MTT 試験が刺激物質を適用してから十分に時間が経過した後の最終的な値で評価するためと推定される。本検討において、CPC 適用直後、すなわち炎症反応の初期において、まず IL-1 $\alpha$  が産生 (放出) され、次いで IL-6 および IL-8 が産生されることが示唆されたが、皮膚中の CPC 濃度と各サイトカイン濃度の明確な相関は

得られていない。ヘアレスマウスにおいて皮膚中の各サイトカイン濃度は、CPC 適用後 12 h から 24 h に減少あるいは頭打ちが観察され、用量依存性に関しては bell shape が観察された。20% CPC 適用後 24 h では、その細胞傷害によってサイトカインの産生能までが低下している可能性が考えられる。モデル薬物に用いた CPC（陽イオン界面活性剤）の皮膚刺激性が MTT 試験によって評価できることから、そのメカニズムは細胞傷害であると考えられ、サイトカイン産生を評価するためには、生細胞率が低下しすぎない用量範囲での検討が重要であると考えられる。しかしながら、組織内 IL-1 $\alpha$  量と MTT 試験の結果は同様な挙動を示したものの、IL-6 および IL-8 については用量との相関は得られず、現時点では MTT 試験以上の情報は得られない。炎症性メディエータの産生には段階があり、十分に時間が経過した後の最終的な評価ではなく、各段階における解析が皮膚刺激のメカニズムを考える上で有用であると考えられるが、サイトカイン産生により皮膚刺激性を評価するためには更なる検討が必要である。

#### 第4節 小括

炎症反応の引き金となる重要な炎症性メディエータの一つである IL-1 $\alpha$  の組織内濃度は、MTT 試験による生細胞数の減少と同様の挙動を示した。また、炎症反応の初期において、まず IL-1 $\alpha$  が産生（放出）され、次いで IL-6 および IL-8 が産生されることが示唆されたが、細胞傷害の程度はサイトカイン産生能に影響するためサイトカイン産生の評価は、生細胞率が低下しすぎない用量範囲で行う必要がある。サイトカイン産生による評価は、MTT 試験よりも高感度な評価法として期待できるが、現時点では MTT 試験以上の情報は得られない。

炎症性メディエータの産生には段階があり、十分に時間が経過した後の最終的な評価ではなく、各段階における解析が皮膚刺激のメカニズムを考える上で有用であるが、サイトカイン産生により皮膚刺激性を評価するためには更なる検討が必要である。



## 総括

三次元培養ヒト皮膚モデルは、構造的には繊維芽細胞を包埋したコラーゲンゲルからなる真皮層と多層に分化した角化細胞からなる表皮層を有する三次元型の培養細胞膜であり、表皮層のみからなる表皮モデルも存在する。いずれも角層を有し、実際の皮膚に構造が近似していることやヒト由来細胞を用いることなどから、ヒト皮膚の代わりに化学物質の *in vitro* 透過実験に用いられる他、動物を用いた Draize 試験の代替法として皮膚刺激性／腐食性試験に利用されている。

そこで筆者は、ヒト皮膚代替膜としての三次元培養ヒト皮膚モデルの特性を明らかにする目的で、次の項目について検討した。

- (1) 三次元培養ヒト皮膚モデルにおける化学物質の透過性
- (2) 三次元培養ヒト皮膚モデルの構造
- (3) 死細胞率を指標にした皮膚刺激性の  $E_{max}$  model による解析
- (4) 生細胞率を指標とした皮膚刺激の経時的推移
- (5) 三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価におけるサイトカインの産生

以下にその要約を示す。

- (1) 三次元培養ヒト皮膚モデルにおける化学物質の透過性

培養皮膚モデルは、真皮層を有する表皮／真皮モデルと表皮層のみからな

る表皮モデルに大別される。本研究では、培養皮膚モデルのうち表皮／真皮モデルとして LSE-high および Vitrolife-skin を、表皮モデルとして EpiDerm、LabCyte EPI-model、Neoderm-E および Episkin を選択し、同程度の分子量で異なる脂溶性を示す 7 種類の化学物質（アンチピリン: ANP、カフェイン: CAF、アミノピリン: AMP、安息香酸: BA、硝酸イソソルビド: ISDN、一硝酸イソソルビド: ISMN およびフルルビプロフェン: FP）を用いて *in vitro* 皮膚透過実験を行い、皮膚透過係数 ( $P$ ) および皮膚透過パラメータ ( $KL$  および  $DL^2$ ) について培養皮膚モデルとヒトの摘出皮膚を比較することで培養皮膚モデルの特性を明らかにした。

ヒト皮膚における各化学物質の  $\log P$  は、 $\log K_{ow}$  の増加に応じて増加した。それに対して培養皮膚モデルでは、LSE-high および Epiderm における各化学物質の  $\log P$  は、 $\log K_{ow}$  の増加に応じて増加したが、Vitrolife-skin および Neoderm-E では、 $\log K_{ow}$  に依存せず、 $\log P$  の値はほぼ一定であった。さらに、LabCyte EPI-model および Episkin においては、 $\log K_{ow}$  と  $\log P$  の間に法則性は見出せなかった。ヒト皮膚と培養皮膚モデルにおける  $\log P$  の相関について、Epiderm における各化学物質の  $\log P$  は、ヒト皮膚とほぼ同等の値を示し、傾きが 1.0 の良好な相関が認められた。また、LSE-high においても傾きがほぼ 1.0 の良好な相関が認められたが、LSE-high における各化学物質の  $\log P$  は、いずれもヒト皮膚に比べておよそ 10 倍高い値を示した。その他の培養皮膚モデル (Vitrolife-skin、Neoderm-E、LabCyte EPI-model および Episkin) では、ヒト皮膚との間に  $\log P$  に関する相関は認められなかった。

$$\text{Log}P_{human} = 1.022 \cdot \text{Log}P_{EpiDerm} - 0.202 \quad (r=0.9401, p<0.05)$$

$$\text{Log}P_{human} = 0.992 \cdot \text{Log}P_{LSE-high} - 1.228 \quad (r=0.9401, p<0.05)$$

$$\text{Log}P_{human} = 2.929 \cdot \text{Log}P_{Vitrolife-skin} - 7.871 \quad (r=0.8035, p>0.05)$$

$$\text{Log}P_{human} = 1.688 \cdot \text{Log}P_{Neoderm-E} + 2.32 \quad (r=0.8162, p>0.05)$$

$$\text{Log}P_{human} = 0.937 \cdot \text{Log}P_{LabCyteEPI-model} - 0.759 \quad (r=0.3894, p>0.05)$$

$$\text{Log}P_{human} = 0.768 \cdot \text{Log}P_{episkin} - 1.17 \quad (r=0.8162, p>0.05)$$

透過パラメータのうち  $KL$  については、LSE-high ではヒト皮膚とほぼ同様の値を示したのに対して、EpiDerm では、ヒト皮膚と同様に  $K_{ow}$  の増加に応じて  $KL$  が増加したものの、いずれの化学物質においてもヒト皮膚に比べて低い値を示し、その差は FP などの脂溶性化学物質で顕著であった。Neoderm-E、Vitrolife-skin、LabCyte EPI-model および Episkin では、ヒト皮膚とは異なる  $KL$  の増加挙動を示した。

次に、 $DL^2$  については、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  $K_{ow}$  の値に関係なくほぼ一定であったが、いずれの培養皮膚においてもヒト皮膚に比べて高い値を示した。

ヒト皮膚と培養皮膚モデルの間で、透過係数 ( $\log P$ ) および透過パラメータ ( $KL$  や  $DL^2$ ) に少なからず違いが認められ、それらは、培養皮膚モデルによっても異なる傾向を示した。皮膚透過性のための代替膜として培養皮膚モデルを用いる場合、ヒト皮膚と培養皮膚モデル間の  $P$  値の相関は 1:1 であることが望ましいと考えられた。

## (2) 三次元培養ヒト皮膚モデルの構造

各種培養皮膚モデル (LSE-high、Epiderm、Vitrolife-skin、Neoderm-E、LabCyte EPI-model および Episkin) の構造的な違いについてヒト皮膚と比較した。すなわち、光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡 (TEM) および共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による観察に加えカルボキシエステラーゼの皮内分布について検討した。

光学顕微鏡による観察では、角層の厚みがヒト皮膚 (11.5  $\mu\text{m}$ ) に比べて培養皮膚モデル (13.2 ~ 89.0  $\mu\text{m}$ ) の方が厚く、一方、生きた表皮については、ヒト皮膚 (62.4  $\mu\text{m}$ ) よりも培養皮膚モデル (23.3 ~ 59.1  $\mu\text{m}$ ) の方が薄いことが明らかとなった。また、ヘマトキシリンにより核が染色された細胞数は、ヒト皮膚よりも培養皮膚の方が少なく、LSE-high および Neoderm-E において顕著であった。興味深いことに 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、ケラチノサイトの角化が不十分である可能性が考えられた。ヒト皮膚と培養皮膚モデルの間で角層の厚みや角化の程度に違いが認められ、培養皮膚モデルにおける角層のバリア機能がヒト皮膚よりも低い可能性が考えられた。

TEM による観察では、角層中のラメラ構造に注目した。ヒト皮膚においては角層中に多くのラメラ層が観察された。培養皮膚モデルにおいても角層中のラメラ構造を確認することができたが、その量はヒト皮膚に比べて少なく、LSE-high で観察されたラメラ層は、ヒト皮膚に比べて細く湾曲していた。一方、Epiderm では、比較的ヒトに近いラメラ層が観察された。LabCyte EPI-model、Neoderm-E および Episkin 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。

CLSM 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、より浅部において明確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。

このように、TEMおよびCLSMによる観察では、培養皮膚モデルの角質細胞内に特徴的な構造を見出した。ラメラ構造の成熟度や細胞間脂質の含量あるいは構成によって、各培養皮膚モデルにおいて化学物質の分配および拡散パラメータが異なる一因とも考えられる。

また、ヒト皮膚と各培養皮膚モデルにおける皮膚中のエステラーゼ活性の分布について、フルオレセイン-5-イソチオシアネート二酢酸の2つのアセトキシ基がエステラーゼによって加水分解されて生じるフルオレセイン-5-イソチオシアネートが強い蛍光を発することを利用して視覚化した。ヒト皮膚では、生きた表皮において高い蛍光強度が観察されたが、角層および真皮にはほとんど観察されなかった。LSE-high、EpiDerm および Episkin においても同様の傾向が観察され、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 および Vitrolife Skin では、生きた表皮だけでなく、角層においても高い蛍光強度が観察された。

組織学的観察により、今回検討に用いた6種類の培養皮膚モデル(Lse-high、EpiDerm、Neoderm-E、Vitrolife-skin、LabCyte EPI-model および Episkin) の構造的な違いを明らかにした。これらの違いが各培養皮膚モデル間あるいはヒト皮膚とでは異なる皮膚透過を示す原因である可能性が示唆され、培養皮膚モデルをヒト皮膚の代替膜として利用する場合には、その組織学的な違いと特徴を十

分に把握しておくことが重要である。

### (3) 死細胞率を指標にした皮膚刺激性の $E_{max}$ model による解析

皮膚刺激性に関する多くの研究は、被験物質の適用濃度とその皮膚刺激性について報告されているにすぎず、刺激発現部位での薬物濃度と刺激性の関係について検討した報告例はほとんどない。そこで本研究では、塩化セチルピリジニウム (CPC) をモデル刺激物質として、皮膚中濃度と皮膚刺激性の関係について、培養皮膚モデル、ヘアレスマウスおよびモルモットを用いて種差および部位差の観点から検討を行い、 $E_{max}$  model により解析した。なお、皮膚刺激性は、培養皮膚モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性で用いられる MTT 試験により評価した。

ヘアレスマウスにおいて MTT 試験により評価した皮膚刺激性、すなわち死細胞率 (%) は、*intact skin* および *stripped skin*、あるいは腹部および背部皮膚といった条件の違いで異なる皮膚中濃度および死細胞率を示したが、皮膚中 CPC 濃度に対してプロットすると、それぞれのデータは、ほぼ同一の曲線上にプロットされた。

モルモットにおいてもヘアレスマウスと同様の傾向を示し、皮膚中 CPC 濃度に対しては、皮膚の状態 (*intact skin* および *stripped skin*) や適用部位 (腹部皮膚および背部皮膚) によらず同一の曲線上にプロットされた。

LSE-high (*in vitro*) においてもモルモットおよびヘアレスマウス (*in vivo*) と同様に、皮膚中 CPC 濃度に対しては、*intact skin* および *stripped skin* によらず一つの曲線で表すことができた。

LSE-high、ヘアレスマウスおよびモルモットにおける皮膚刺激パラメータについては、 $I_{max}$  (%) が LSE-high、ヘアレスマウスおよびモルモットでそれぞれ 78.3、78.9 および 77.1 とほぼ同様の値を示したのに対し、 $IC_{50}$  (mg/g) は、それぞれ 1.5、2.4 および 13.5 とヘアレスマウスの方がモルモットに比べておよそ 6 倍低い値を示し、LSE-high はモルモットに比べておよそ 9 倍低い値を示した。 $\gamma$  は、それぞれ 1.5、3.1 および 3.9 と LSE-high のみ小さい値を示した。

ヒト (*in vivo*) に 1% CPC を適用した際の死細胞率は、LSE-high と同程度であったが、0.25% CPC の場合の死細胞率は、ヒトの方が LSE-high よりも低く、約 1/3 であった。しかしながら、皮膚中 CPC 濃度に対して死細胞率をプロットする、興味深いことにヒトのデータは、ほぼ LSE-high の  $E_{max}$  曲線上にプロットされた。

死細胞率を CPC の適用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も intact skin に比べて stripped skin による結果が左にシフトしたが、死細胞率を皮膚中 CPC 濃度に対してプロットした場合には、LSE-high、ヘアレスマウスおよびモルモットでそれぞれ異なる曲線を示すものの、それぞれの種においていずれも intact skin および stripped skin あるいは背部皮膚および腹部皮膚といった皮膚の状態によらず 1 つの曲線で表すことができた。このことは、皮膚刺激の程度は皮膚中濃度で表されるという我々の仮説を裏付けた。しかしながら、 $I_{max}$  の値は LSE-high、ヘアレスマウスおよびモルモットの 3 種で差はなかった (LSE-high = ヘアレスマウス = モルモット) もの、 $IC_{50}$  は LSE-high < ヘアレスマウス < モルモットの順となりそれぞれ異なる結果となった。したがって、最終的な皮膚刺激の程度には差がないが、皮膚刺激を發

現する濃度に種差が認められた。 $IC_{50}$ の違いは、LSE-high およびヘアレスマウスにおいて  $I_{max}$  を示す皮膚中濃度であってもモルモットでは皮膚刺激を示さないことを表している。さらに、 $\gamma$  (Hill 係数) は、LSE-high < ヘアレスマウス = モルモットの順となり、皮膚刺激反応 (細胞傷害性) 自体に種差がある可能性が考えられた。また、ヒトのデータについては2ポイント (0.25 および 1%、各  $n=1$ ) のみではあるが、皮膚中濃度に対して死細胞率をプロットした場合には、LSE-high に極めて近い結果となったことは極めて興味深い。これらの結果は、モルモットでは過小評価する可能性があることを示しており、従来から皮膚刺激性の評価に用いられてきた試験系と差があることも非常に興味深い。さらにこれらの結果は、LSE-high を用いた皮膚刺激性評価の有用性を示唆している。しかしながら、死細胞率を適用濃度に対してプロットした場合にはヒトにおける 0.25%は LSE-high よりも低く、約 1/3 の死細胞率であった。すなわち、LSE-high の場合でも適用濃度に対する評価では過大評価する可能性があり、LSE-high を用いて皮膚刺激性を評価する際にもその皮膚中濃度を考慮することが重要であると考えられた。

#### (4) 生細胞率を指標とした皮膚刺激の経時的推移

生体内の薬物濃度の変化の速度論的な解析は pharmacokinetics として一般的に行われる。本研究では、皮膚中の化学物質によって引き起こされる炎症反応 (皮膚刺激性) についても、同様に速度論的な解析が可能であると考え、皮膚刺激反応の時間推移の速度論的な解析について検討した。モデル皮膚刺激性物質として塩化セチルピリジニウム (CPC) を用い、皮膚刺激性は MTT 試験によ



り評価した。その際の経時的な皮膚刺激反応（MTT 試験における生細胞率の減少）は一次速度定数を用いて表すことができると仮定して解析を行い、培養皮膚モデルである LSE-high (*in vitro*) とヘアレスマウス (*in vivo*) の結果を比較した。

CPC (1%) を intact LSE-high および stripped LSE-high に適用した後の生細胞率の時間推移は、LSE-high (intact skin) では変曲点が観察され、遅い相 ( $k_1$ ) と早い相 ( $k_2$ ) の 2 つの 1 次速度定数で表すことができた。一方、stripped LSE-high において変曲点は観察されず、1 つの 1 次速度定数 ( $k_{ss}$ ) で表された。

#### Intact skin における皮膚刺激反応

$0 \leq t < T$  のとき

$$V = (100 - V_\infty) \cdot \exp(-k_1 \cdot t) + V_\infty$$

$t \geq T$  のとき

$$V = (100 - V_\infty) \cdot \exp(-k_1 \cdot T) \cdot \exp(-k_2(t - T)) + V_\infty$$

ここで、 $V$  は時間  $t$  に対する生細胞率 (%)、 $k_1$  および  $k_2$  ( $k_1 \leq k_2$ ) はそれぞれ適用初期および後期の一次刺激速度定数、 $T$  は初期の遅い刺激相から速い刺激相への変曲点を示す。また、試験終了時に生細胞率が 0 になるとは限らないため、 $V_\infty$  を刺激物質適用後の無限最大時間の生細胞率とした。

#### Stripped skin における皮膚刺激反応

$$V = (100 - V_{\infty}) \cdot \exp(-k_{ss} \cdot t) + V_{\infty}$$

ここで、 $k_{ss}$  は stripped skin における一次刺激速度定数である。

このときの組織 (LSE-high) 中 CPC 濃度は、intact LSE-high および stripped LSE-high とともに適用後徐々に増加し、4 h 以降ほぼ一定となった。同様にヘアレスマウスに 20% CPC を適用した後の生細胞率の時間推移は、intact skin では変曲点を有する二相性を示し、stripped skin では一相性を示した。皮膚中 CPC 濃度については、stripped skin において 8 h 以降一定となったが、intact skin では 24 h まで増加しつづけた。生細胞率の時間推移における各速度定数 ( $k_1$ 、 $k_2$  および  $k_{ss}$ ) は、いずれもヘアレスマウスが LSE-high の 2 倍以上高い値を示した。

凍結標本を用いてミトコンドリアの marker enzyme であるコハク酸脱水素酵素活性を切片上で検出した際には、その酵素活性を示す紫色 (ホルマザン) が、Control 群に比べて CPC 投与群において薄く、表皮において顕著であった。TER (電気抵抗値) の経時的変化と dye binding test の結果から生細胞率の時間推移における変曲点 (約 4 h) 付近で著しく角層のバリア機能が低下している可能性が考えられた。

#### (5) 三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価におけるサイトカインの産生

炎症性サイトカインとして IL-1 $\alpha$  および IL-6 に加えてケモカインである IL-8 に注目し、培養皮膚モデルおよびヘアレスマウスのモデル刺激物質による皮膚

刺激性とサイトカイン産生について検討した。なお、マウスにおいてヒトIL-8の相同物は存在しないため、ヒトIL-8の機能性相同物であるMIP-2 (mouse macrophage inflammatory protein-2) を測定した。

塩化セチルピリジニウム (CPC) をLSE-highに24 h適用した後の死細胞率 (%) は、適用したCPCの濃度に応じて増加し、CPC 0.3%以上ではほぼ頭打ちとなった。その時の組織中CPC濃度は、適用したCPCの濃度に応じて直線的に増加し、0.01、0.03、0.1、0.3および1% CPCでそれぞれ $0.208 \pm 0.063$ 、 $0.490 \pm 0.052$ 、 $2.72 \pm 0.531$ 、 $6.34 \pm 2.80$ および $25.6 \pm 0.599$  mg/gであった。また、組織中CPC濃度の時間推移は、1% CPCを適用した際には、適用直後より速やかに上昇し、4 h以降ほぼ一定の値を示したのに対して、0.03および0.3% CPCでは、8 hまで緩やかに上昇したが、適用期間中はほぼ一定の濃度を示した。

生細胞率 (%) の時間推移については、0.03% CPCでは、適用後24 hまで生細胞率は一定であり、ほぼ100%であった。0.3% CPCでは、1% CPCと同様に変曲点を持つ二相性の挙動を示したが、その変曲点は1% CPCよりも遅く、およそ8 hであった。死細胞率 (%) とCPCの組織 (LSE-high) 中濃度の関係は、適用濃度との関係と同様の形状を示し、およそ5 mg/g以上ではほぼ頭打ちとなった。

LSE-highに0.01、0.03、0.1、0.3および1% CPCを24 h適用した後のIL-1 $\alpha$ 、IL-6およびIL-8の産生量を測定した。コントロール (saline) 群においても経時的なサイトカインの産生が認められたが、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。各区間におけるIL-1 $\alpha$ 、IL-6およびIL-8の産生速度は、ばらつきはあるものの適用したCPC濃度の増加に伴い増加したが、IL-8については6-8 hを除いて0.3%以上で頭打ちの傾向が観察された。0.03% CPC適用した際の組

織中サイトカイン濃度は、saline (control) 群と同様の推移を示した。0.3%以上では組織中のIL-1 $\alpha$ 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 h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 hまでほぼ一定に推移した。

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。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、今回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ていた。しかしながら、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った。また、サイトカイン産生による評価は、MTT試験よりも高感度な評価法として期待できるものの、現時点ではMTT試験以上の情報は得られず、更なる検討が必要であると考えられた。

以上、各種三次元培養ヒト皮膚モデル（培養皮膚モデル）の特性を明らかにすることができた。培養皮膚モデルを用いた*in vitro*試験は、培養皮膚モデルの特性を十分に把握した上で使用することで、ヒト (*in vivo*) の予測に有用な手法になり得ると考えられた。

## 謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました城西大学薬学部薬粧品動態制御学教室 杉林堅次教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行に当たり有益な御指導、御助言、ならびに激励を賜りました城西大学薬学部薬粧品動態制御学教室 藤堂浩明准教授に心から深謝の意を表します。

また、本論文作成にあたりご教示とご校閲をいただきました城西大学薬学部衛生化学教室 工藤なをみ教授および城西大学薬学部病院薬剤学教室 上田秀雄准教授に深く感謝いたします。

また、本論文校閲において適切なお助言をいただきました城西大学薬学部生体防御学研究室 日比野康英教授および城西大学薬学部製剤学教室 夏目秀視教授ならびに城西大学薬学部臨床薬理学教室 荻原政彦教授に深く感謝いたします。

さらに、有益な御意見ならびに本研究に御協力頂いた城西大学薬学部薬粧品動態制御学教室諸氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究のために犠牲になった動物に感謝し、追悼の意を表します。

## 引用文献

- 1) OECD: In Vitro 3T3 NRU phototoxicity Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 432, Paris (2004)  
[<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 2) Bell E, Ivarsson B, and Merrill C, Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro, *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 1274-1278 (1979)
- 3) Draize JH, Woodard G, Calvery HO, Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *J Pharmacol Exp Ther*, 83, 377-390 (1944)
- 4) OECD: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 439, Paris (2013)  
[<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 5) Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods*, 65, 55-63 (1983)
- 6) Marzulli FN, Barrier to skin penetration, *J Invest Dermatol*, 39: 387-393 (1962)
- 7) Kano S, Todo H, Sugie K, Fujimoto H, Nakada K, Tokudome Y, Hashimoto F, and Sugibayashi K, Utilization of Reconstructed Cultured Human Skin Models as an Alternative Skin for Permeation Studies of Chemical Compounds, *Alten Animal Test Experiment*, 15, 61-70 (2010)
- 8) Netzlaff F, Kaca M, Bock U, Haltner-Ukomadu E, Meiers P, Lehr CM, and Schaefer UF, Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin in comparison to various human skin preparations, *Eur J Pharm Biopharm*, 66, 27-134 (2007)
- 9) Schmook FP, Meingassner JG, and Billich A, Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption, *Int J Pharm*, 215, 51-56 (2001)
- 10) Gabbanini S, Lucchi E, Carli M, Berlini E, Minghetti A, and Valgimigli L, In vitro evaluation of the permeation through reconstructed human epidermis of essentials oils from cosmetic formulations, *J Pharm Biomed Anal*, 50, 370-376 (2009)
- 11) Lotte C, Patouillet C, Zanini M, Messenger A, and Roguet R, Permeation and skin absorption: Reproducibility of various industrial reconstructed human skin models, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 15, 18-30 (2002)

- 12) Hammell DC, Stolarczyk EI, Klausner M, Hamad MO, Crooks PA, and Stinchcomb AL, Bioconversion of naltrexone and its 3-o-alkyl-ester prodrugs in a human skin equivalent, *J Pharm Sci*, 94, 828-836 (2005)
- 13) Asbill C, Kim N, El-Kattan A, Creek K, Wertz P, and Michniak B, Evaluation of a human bio-engineered skin equivalent for drug permeation studies, *Pharm Res*, 17, 1092-1097 (2000)
- 14) Wagner H, Kostka KH, Lehr CM, and Schaefer UF, Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents, *J Control Release*, 75, 283-295 (2001)
- 15) Watanabe T, Hasegawa T, Takahashi H, Ishibashi T, Takayama K, and Sugibayashi K, 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)
- 16) Morimoto Y, Hatanaka T, Sugibayashi K, and Omiya H, Prediction of skin permeability of drugs: comparison of human and hairless rat skin, *J Pharm Pharmacol*, 44, 634-639 (1992)
- 17) Bell E, Ehrlich HP, Ruttle DJ, and Nakatsuji T, Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness, *Science*, 211, 1052-1054 (1981)
- 18) Ishibashi T, 3-dimensional skin culture model TESTSKIN: Fabrication and application, *The Tissue Culture Engineering*, 25, 121-124 (1999)
- 19) Okumura M, Sugibayashi K, Morimoto Y, Effect of several enhancers on the skin permeation of water-soluble drugs, *Chem Pharm Bull*, 37, 1375-1378 (1989)
- 20) Scheuplein RJ, Mechanism of percutaneous absorption II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration, *J Invest Dermatol*, 48, 79-88 (1967)
- 21) Williams ML, and Elias PM, The extracellular matrix of stratum corneum: Role of lipids in normal and pathological function, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 3, 95-122 (1987)
- 22) Ponc M, Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J, and Mommaas M, Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models, *Int J Pharm*, 203,211-225 (2000)
- 23) Young DF, and Ball WP, Estimating diffusion coefficients in low-permeability porous media using a macropore column, *Environ Sci Technol*, 32, 2578-2584 (1965)

- 24) Desai SJ, Simonelli AP, and Higuchi WI, Investigation of factors influencing release of solid drug dispersed in inert matrices, *J Pharm Sci*, 54, 1459-1464 (1965)
- 25) Naik A, Kalia Y N, and Guy RH, Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. In: *Pharmaceutical Science & Technology Today* 3 (9), p. 318–326 (2000)
- 26) Kano S, Todo H, Sugie K, Fujimoto H, Nakada K, Tokudome Y, Hashimoto F, Kojima H, and Sugibayashi K., Comparison of several reconstructed cultured human skin models by microscopic observation: Their usefulness as an alternative membrane for skin in drug permeation experiments, *Altern Animal Test Experiment*, 16, 51-58 (2011)
- 27) Sugibayashi K, Todo H, Oshizaka T, Owada Y, Mathematical model to predict skin concentration of drugs: toward utilization of silicone membrane to predict skin concentration of drugs as an animal testing alternative, *Pharm Res*, 27, 134-142 (2010)
- 28) Kano S, Sugibayashi K, 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, 329-35 (2006)
- 29) Sugibayashi K, Hayashi T, Matsumoto K, and Hasegawa T, 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 Metab Pharmacokinet*, 19, 352-362 (2004)
- 30) Elias PM, Friend DS, The permeability barrier in mammalian epidermis, *J Cell Biol*, 65, 180-191 (1975)
- 31) Lampe MA, Williams ML, and Elias PM, Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation, *J Lipid Res*, 24, 131-140 (1983)
- 32) Luu-The V, Duche D, Ferraris C, Meunier JR, Leclaire J, and Labrie F, Expression profiles of phases 1 and 2 metabolizing enzymes in human skin and the reconstructed skin models Episkin and full thickness model from Episkin, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 116, 178-186 (2009)
- 33) Hu T, Khambatta ZS, Hayden PJ, Bolmarcich J, Binder RL, Robinson MK, Carr GJ, Tiesman JP, Jarrold BB, Osborne R, Reichling TD, Nemeth ST, and Aardema MJ, Xenobiotic metabolism gene expression in the EpiDermin vitro 3D human epidermis model compared to human skin, *Toxicol In Vitro*, 24, 1450-1463 (2010)
- 34) Clark NW, Scott RC, Blaim PG, and Williams FM, Fate of fluazifop butyl in rat and human skin in vitro, *Arch Toxicol*, 67, 44-48 (1993)



- 35) Jewell C, Prusakiewicz JJ, Ackermann C, Payne NA, Fate G, Voorman R, and Williams FM, Hydrolysis of a series of parabens by skin microsomes and cytosol from human and minipigs and in whole skin in short-term culture, *Toxicol Appl Pharmacol*, 225, 221-228 (2007)
- 36) Zhu QG, Hu JH, Liu JY, Lu SW, Liu YX, and Wang J, Stereoselective characteristics and mechanisms of epidermal carboxylesterase metabolism observed in HaCaT keratinocytes, *Biol Pharm Bull*, 30, 532-536 (2007)
- 37) Fentem JH, Briggs D, Chesne C, et al.: A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the management team. *Toxicol In Vitro*, 15, 57-93 (2001)
- 38) Spielmann H, Hoffmann S, Liebsch M, et al.: The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA*, 35, 559-601 (2007)
- 39) Eskes C, Cole T, Hoffmann S, et al.: The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, *ATLA*, 35, 603-619 (2007)
- 40) Heylings JR, Clowes HM, Comparison of tissue sources for the skin integrity function test, *Toxicol in Vitro*, 15, 597-600 (2001)
- 41) Faller C, Bracher M, Dami N, Roguet R, Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics, *Toxicol in Vitro*, 16, 557-572 (2002)
- 42) Botham PA, The validation of in vitro methods for skin irritation, *Toxicol Lett*, 149, 387-390 (2004)
- 43) Botham PA, Earl LK, Fentem JH, Roguet R, van de Sandt JJM, Alternative methods for skin irritation testing: the current status, *ATLA*, 26, 195-211 (1998).
- 44) Kidd DA, Johnson M, Clements J, Development of an in vitro corrosion/irritation prediction assay using the EpiDerm<sup>TM</sup> skin model, *Toxicol in Vitro*, 21, 1292-1297 (2007)
- 45) Parran J J Jr., Mouthwash compositions, US patent No. 4323551. The Procter & Gamble Co. (1981)
- 46) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS), No. UU5075000

- 47) Bernhofer LP, Seiberg M, Martin KM., The influence of the response of skin equivalent systems to topically applied consumer products by epithelial mesenchymal interaction, *Toxicol In Vitro*, 13, 219-229 (1999)
- 48) Bernhofer LP, Barkovic S, Appa Y, Martin KM., IL-1 $\alpha$  and IL-1ra secretion from epidermal equivalents and the prediction of the irritation potential of mild soaps and surfactant-based consumer products, *Toxicol In Vitro*, 13, 231-239 (1999)
- 49) FDA: Guidance for Industry, Exposure-response relationships - Study Design, Data Analysis, and Regulatory Applications, April 2003.
- 50) Sugibayashi K, Watanabe T, Hasegawa T, Takahashi H, and Ishibashi T, Kinetic analysis on the in vitro cytotoxicity using Living Skin Equivalent for ranking the toxic potential of dermal irritants, *Toxicology in Vitro*, 16, 759-763 (2002)
- 51) Dayneka NL, Garg V, and Jusko WJ, Comparison of four basic models of indirect pharmacodynamic responses, *J Pharmacokinetic Biopharm*, 21, 457-478 (1993)
- 52) Jusko WJ, and Ko HC, Physiologic indirect response models characterize diverse types of pharmacodynamic effects, *Clin Pharmacol Ther*, 56, 406-419 (1994)
- 53) Watanabe T, Hasegawa T, Takahashi H, Ishibashi T, Itagaki H, and Sugibayashi K, 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)
- 54) Schall T, *The Cytokine Handbook*, 2nd ed. A. Thomson. ed. Academic Press. New York. pp 419 (1994)
- 55) Driscoll KE, Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation, *Exp Lung Res*, 20, 473-90 (1994)
- 56) Coquette A, Berna N, Poumay Y, and Pittelkow MR, The keratinocyte in cutaneous irritation and sensitization. In: Kydonieus, AF, Wille, JJ (Eds), *Biochemical Modulation of Skin Reactions*. CRC Press, Boca Ration, FL, 2000;pp.125-143
- 57) Dinarello CA, Interleukin-1, interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist, *Intern Rev Immunol*, 16, 457-499 (1998)
- 58) Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson, MR, Bird TA, Giri JG, et al., Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor, *Proc Nat Acad Sci*, 90, 6155-6159 (1993)
- 59) Yoshizaki K, Nishimoto N, Matsumoto K, Tagoh H, Taga T, Deguchi Y, et al. Interleukin 6 and expression of its receptor on epidermal keratinocytes, *Cytokines*, 2, 381-387 (1990)

- 60) Wilmer JT, Luster MI, Chemical induction of interleukin-8, a proinflammatory chemokine, in human epidermal keratinocyte cultures and its relation to cytogenetic toxicity, *Cell Biol Toxicol*, 11, 37-50 (1995)
- 61) Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV., Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES, *Nature*, 347, 669-671 (1990)
- 62) Matsushima K, Oppenheim JJ., Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF, *Cytokine*, 1, 2-13 (1989)
- 63) Coquette A, Berna N, Vandebosch A, Rosdy M, De Wever B, and Poumay Y, Analysis of interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization, *Toxicol In Vitro*, 17, 311-321 (2003)
- 64) Berardesca E, and Distanto F, The modulation of skin irritation, *Contact Dermatitis*, 1, 281-287 (1994)
- 65) Williams AC, Barry BW, Penetration enhancers, *dv Drug Deliv Rev*, 56, 603-618 (2004)
- 66) Scala J, McOsker DE, and Reller HH, The percutaneous absorption of ionic surfactants, *J Invest Dermatol*, 50, 371-379 (1968)
- 67) de Brugerolle de Fraissinette, Picarles V, Chibout S, Kolopp M, Medina J, Burtin P, et al. Predictivity of an in vitro model for acute and chronic skin irritation (SkinEthic) applied to the testing of topical vehicles, *Cell Biol Toxicol*, 15, 121-135 (1999)
- 68) Osborne R, and Perkins MA, An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation, *Food Chem Toxicol*, 32, 133-142 (1994)