

—Symposium Review—

**皮膚適用又は暴露された化学物質の有効性及び安全性評価のための
In Vitro 及び *In Silico* アプローチ**

杉林堅次,* 藤堂浩明, Wesam R. Kadhum

***In Vitro* and *In Silico* Approaches to Evaluate Usefulness and Safety of
Chemical Compounds Applied or Exposed on Skin**

Kenji Sugibayashi,* Hiroaki Todo, and Wesam R. Kadhum

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University; 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan.

(Received July 27, 2013)

Recently, animal experiments become very difficult to be done in the research and development of cosmetics and cosmeceuticals due to animal welfare and 3Rs (replacement, reduction, refinement) concept. However, usefulness and safety of these preparations must be strictly guaranteed before human use. We thus proposed three sets of extrapolation methods to estimate *in vivo* profiles from *in vitro* and *in silico* approaches, to evaluate permeation profiles through real human skin from those through animal skin and cultured human skin model, and to estimate responses such as usefulness and safety of cosmetics and cosmeceuticals from their skin permeation and concentration profiles. Although we need more data and discussion, the present extrapolation methods must be very useful for estimation of cosmetics and cosmeceuticals without using animal experiments.

Key words—cosmetics; *in vitro* approach; *in silico* approach; skin application or exposure; usefulness; safety

1. はじめに

現在、化粧品の研究・開発では、実験動物を用いた試験ができる限りなくす方向に進んでいる。この方向性の是非については、動物福祉の観点とヒトへの安全性の確保とのバランスの問題となり、まだ議論が進行中であると理解している。本論文ではその議論にはあえて避けるものの、動物実験をすることなしに、皮膚適用又は暴露された化学物質の有効性及び安全性をいかに確保するかについて焦点を当てて論じることにする。特に、タイトルにあるように、*in vitro* や *in silico* 試験法で化学物質の有効性及び安全性を予測できるのか、また、それらの現段階の限界や問題点を中心に示す。

Figure 1 に化学物質の有効性と安全性の評価に係わる種々の試験法とそれぞれの関係性をまとめて示す。左側のカラム [Figs. 1(a) and (d)] が *in silico*

法から *in vitro* 法へ、そして *in vivo* 法への外挿法を示している。また、中のカラム [Figs. 1(b) and (e)] が 3 次元培養ヒト皮膚モデル（以下、3D 培養ヒト皮膚モデル）から動物皮膚、そしてヒト皮膚への外挿法を示している。さらに、右側のカラム [Figs. 1(c) and (f)] が、皮膚透過性から皮膚中濃度、そして皮膚中レスポンスへの外挿を示している。

化粧品の機能性と安全性、すなわちレスポンス（反応）はヒトでかつ *in vivo* (Fig. 1 上段) で評価されるに越したことはない。しかし、ヒト試験には倫理的な問題があり、ときとして安全面で実施不可能になることが多い。加えて、ヒト試験結果は一般にはばらつきが多いため多くの被験者数が必要となり、そのため研究・開発に費用がかかりすぎるという大きな問題点がある。化粧品研究でも、従来は、ヒト試験の代わりに、又はヒト試験の前に、実験動物を用いた試験が繁用されていた。もちろん、医薬品の研究開発では現在も動物実験が多用されている。実験動物の多くは純系化されているので、ヒト試験結果に比べばらつきが小さいという利点がある。さらに、動物実験結果からヒトの挙動を予測す

The authors declare no conflict of interest.

城西大学薬学部 (〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1)

*e-mail: sugib@josai.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 133 年会シンポジウム S29-103 で発表した内容を中心に記述したものである。

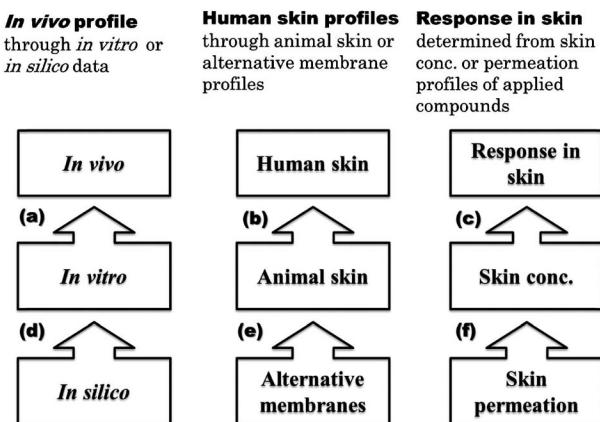


Fig. 1. Three Extrapolations to Evaluate Usefulness and Safety of Chemical Compounds Applied or Exposed on Skin

る、animal scale up の考え方もほぼ確立している [この外挿は Fig. 1(b)に相当する].

一方、*in vivo* 試験の代わりに従来から *in vitro* 試験が頻繁になされている [Fig. 1(a)]. ここでかならず問題となる、*in vivo* 挙動と *in vitro* 挙動の相関性、すなわち、*in vitro-in vivo correlation* は IVIVC と言われ、医薬品開発では頻繁に議論されているところでもある。また、最近になって、インフォマティクス（計算科学）の考え方方が進んできており、いわゆる *in silico* 法が *in vitro* や *in vivo* 挙動を予測するのに使われ始めた [Fig. 1(d)]. 一方、3D 培養ヒト皮膚モデルが化粧品開発に使用されるようになってきた [Fig. 1(e)]. もちろん、3D 培養ヒト皮膚モデルを用いた試験は *in vitro* 試験の 1 つと考えられるが、ヒト試験でも動物試験でもない。これらに対し、われわれは一連の研究から、皮膚透過性から皮膚中濃度が、そして皮膚中濃度からレスポンスが予測できることを明らかにしている [Figs. 1(c) and (f)].

本総説では、Fig. 1 に示した考え方を用いて、より簡便にかつ正確に化粧品のヒト *in vivo* におけるレスポンス (Fig. 1 の上段)、すなわち、ヒトにおける有効性や安全性を評価する方法及び方法論について最近の結果を参考しながら説明する。

2. Fig. 1(a)について：経皮吸収の IVIVC

結論から述べれば、正しい *in vitro* 皮膚透過試験を行えば、*in vivo* 経皮吸収挙動を十分反映する結果が得られる。では、どのようにして正しい *in vitro* 皮膚透過試験を行うのか。既に、U.S. Food and Drug

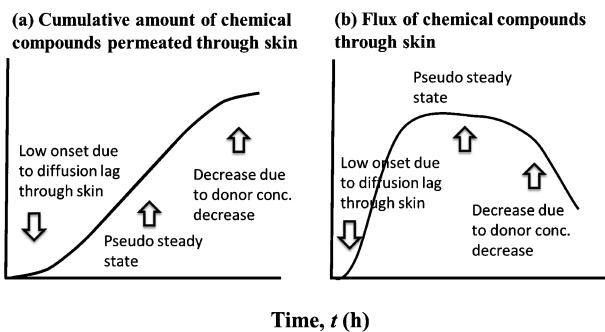


Fig. 2. *In Vitro* Skin Permeation Profiles of Chemical Compounds

(a) Cumulative amount *versus* time curve, (b) flux *versus* time curve.

Administration (FDA) やアメリカ薬学会 (American Association of Pharmaceutical Scientists; AAPS) は数回のワークショップを開いて正しい *in vitro* 皮膚透過試験方法を発表している。¹⁾ また、Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) でも *in vitro* 皮膚透過試験法のガイドラインを出している。²⁾

Figure 2 に化学物質の累積皮膚透過量 (a) と皮膚透過速度 (b) の経時変化の典型例を示す。皮膚透過試験開始直後は、いわゆる lag time period となる。このピリオドでは、皮膚に適用した（又は皮膚に暴露された）化学物質は皮膚中への侵入期であり、化学物質は皮膚全層を透過しあえていないことが多い。そして、lag time period の後には定常状態 period があらわれる。皮膚に適用した（暴露された）化学物質濃度がほとんど減少しない時間範囲においては、定常状態相では完全に 0 次反応の皮膚透過速度がみられることになり、このとき累積透過量は経過時間に比例し、透過速度は一定になる。しかし、さらに時間が経過すると、皮膚に適用した（暴露された）化学物質の濃度（量）は減少することになるので、最終的に累積透過量-時間曲線は上に凸となり、透過速度は減少していく。

皮膚を透過した化学物質のほとんど（物質にもよるがほぼ 95%以上と考えてよい）は、その後、全身循環系に移行する。³⁾もし、物質の全身循環系からの消失速度が線形速度論に従い、また、静脈内投与後の血中濃度-時間挙動が $C_{iv}(t)$ で示されるなら、皮膚適用後の血中濃度-時間挙動 $C_{ta}(t)$ は皮膚透過速度 $flux(t)$ を用いて以下の式 Eq. (1) で求めることができる。⁴⁾

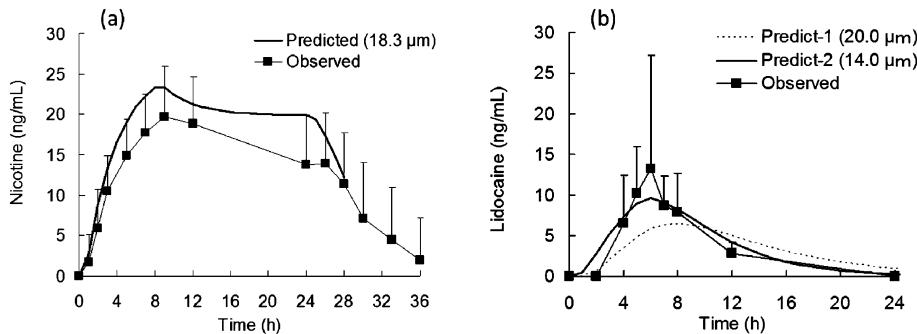


Fig. 3. *In Vitro* to *In Vivo* Approach for Nicotine Tapes (a) and Lidocaine Tape (b)
Predicted plasma concentration was obtained by convolution using *in vitro* skin permeation data.

$$C_{ta}(t) = \int_0^t \text{flux}(\theta) \frac{C_{iv}(t-\theta)}{D_{iv}} d\theta \quad (1)$$

この方法又は Eq. (1) を convolution と言う。最近われわれは Eq. (1) を用いてニコチンパッチとリドカインパッチをヒト皮膚に適用した後の血中濃度-時間曲線をユカタンミニブタ皮膚透過挙動から予測した。⁵⁾ Figure 3 にその結果を示す。ユカタンミニブタとヒトの角層の厚みの違いを考慮した以外はなんらの操作も行っていないが、大変興味深いことに、*in vitro* 皮膚透過試験結果からの血中濃度予測値は実測値に極めてよく一致した。

3. Fig. 1(b)について：実験動物とヒト皮膚を介した透過性の相関

Figure 4 に分子量が 122–236 Da で極性が大きく異なる ($\log K_{ow}$ が -1.5 – $+2.2$) 7 種薬物のヒト皮膚透過係数の対数値（縦軸）とヘアレスラット皮膚透過係数の対数値（横軸）の関係を示す。⁶⁾ Figure 4 から明らかなように、両者は極めて良好な相関を示した。このように、ヘアレスラット皮膚透過実験を適切に行えば、ヒト皮膚透過性を十分予測できることが明らかとなった。しかし、ここで用いた分子量域と極性域から逸脱するものについては、まだまだ十分な研究成果はない。また、Fig. 4 に示した *in vitro* 皮膚透過性試験では、基剤として水を用いている。これからはローション、ゲル、クリーム、感圧粘着テープ剤など、製剤として実用化されている剤形で評価する必要がある。特に、エタノールなどの吸収促進能はヒト皮膚と実験動物皮膚で異なる可能性もある。さらに、皮膚透過速度には皮膚の部位差があるので、実験動物皮膚透過性がヒトのどの部位の皮膚の透過性に相当するのかなどの問題も残されている。

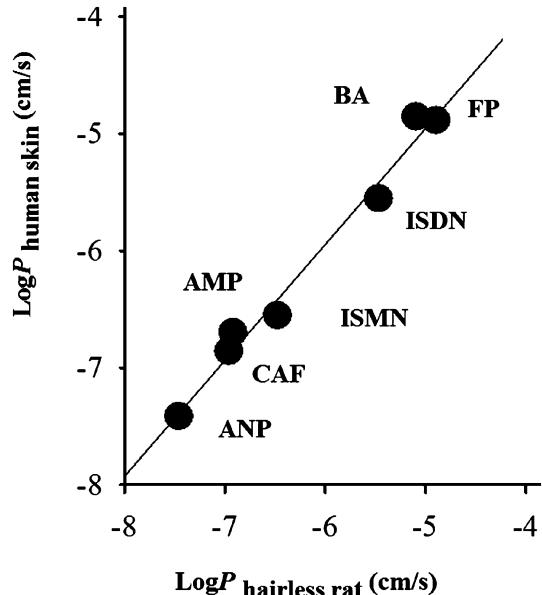


Fig. 4. Comparison of Drug Permeabilities through Hairless Rat Skin and Human Skin

Abbreviations for model compounds: FP: flurbiprofen; BA: benzoic acid; ISDN: isosorbide dinitrate; ISMN: isosorbide mononitrate; AMP: aminopyrine; CAF: caffeine; ANP: antipyrine.

4. Fig. 1(c)について：皮膚中の有効性・毒性と皮膚中濃度の関係

皮膚に適用された薬物や医薬部外品中の化学物質の皮膚中におけるレスポンス（有効性や安全性）がそれらの皮膚中濃度によって推定することができるかどうかという課題を解決することは大変重要である。既に、薬物の副作用を抑え、有効性を良好に発揮させるために、therapeutic drug monitoring(TDM)が広く用いられている。TDM では投与した薬物の安全性や効果の指標としてその血中濃度を用いる。また、ジェネリック薬物の開発は先発品と同じ血中濃度-時間曲線下面積 (area under the blood concen-

tration time curve; AUC) を基準としている。これらは化学物質の安全性や効果の判定にその濃度を用いることができることを示唆している。われわれは、これらを参照して、皮膚中の有効性や安全性の評価にも皮膚中の化学物質濃度が使われるを考え研究を進めた。Figure 5 に示した結果は陽イオン性界面活性剤 cetyl pyridinium chloride (CPC) の種々濃度の溶液を無傷皮膚 (intact skin) と角層を取り除いた皮膚 (stripped skin) に適用して皮膚細胞中の viability を調べた結果である。⁷⁾ CPC は皮膚刺激がみられるので、われわれはその刺激性の試験法として cell viability の評価法として多用されている MTT アッセイによって皮膚細胞の viability を測定した。

一般に、適用量や適用濃度とレスポンスの関係、特に化学物質の皮膚中濃度と皮膚刺激性は以下に示す Hill 式が成り立つことが知られている [Eq. (2)].

$$E = \frac{E_{\max} \times C^{\gamma}}{EC_{50} + C^{\gamma}} \quad (2)$$

ここで、 E と E_{\max} はレスポンスと最大レスポンス、 C と EC_{50} は適用濃度と 50% レスpons 発現濃度、そして γ は形状因子である。ただし、 C と EC_{50} はより厳密には反応場における化学物質濃度と考えることができる。

Figure 5(a), (b) に示した intact skin と stripped skin に CPC を適用したときの皮膚刺激性 (cell viability の減少) はまさに Hill 式で示されるレスポンスであったことを示している。当たり前のことであるが、stripped skin に CPC を適用したときの viability の減少は intact skin に適用したときの viability の減少より大きい。Figure 5(a), (b) から明ら

かのように、両者の適用濃度と viability の減少の関係は Hill 式により示された。ここまで予測通りであったが、Fig. 5(c) に示したように、レスポンスに対してこのときの皮膚中の CPC 濃度を横軸によると、stripped skin と intact skin に適用したときの viability の減少が同じ Hill 式上に示された。この結果は、皮膚中のレスポンスが皮膚中濃度で予測できることを示している。

Hill 式で示されるレスポンスは直接反応と言われている。一方、酵素反応や受容体での結合などが関係するレスポンスは、間接反応に従うと報告されている。⁸⁾ 間接反応の詳細は省略するが、いずれにしても皮膚中のレスポンスは皮膚中濃度の関数であるので、皮膚中濃度がレスポンスを予測する重要なパラメータになることを示している。

5. Fig. 1(d)について : In vitro 及び in vivo 挙動を予測するための in silico アプローチ

化学物質の皮膚透過の律速段階は角層透過にあり、外用医薬品や経皮吸収型製剤 (transdermal drug delivery system; TDDS 又は transdermal therapeutic system; TTS) の主薬の主な透過経路は脂質で満たされた角層細胞間ルートである。したがって、皮膚透過はほぼ物理的な膜透過過程として取り扱うことができる。一般に、皮膚のような溶解拡散膜を介する化学物質の透過性は分子の大きさの目安となる分子量 MW、そして基剤から皮膚中脂質への分配性の基準となるオクタノール/水分配係数 K_{ow} によって予測し得る。Potts と Guy⁹⁾ は皮膚透過係数 P の対数値が以下に示すような式 Eq. (3) で示されることを報告している。

$$\log P = -2.7 + 0.71 \times \log K_{ow} - 0.00061 \times MW \quad (3)$$

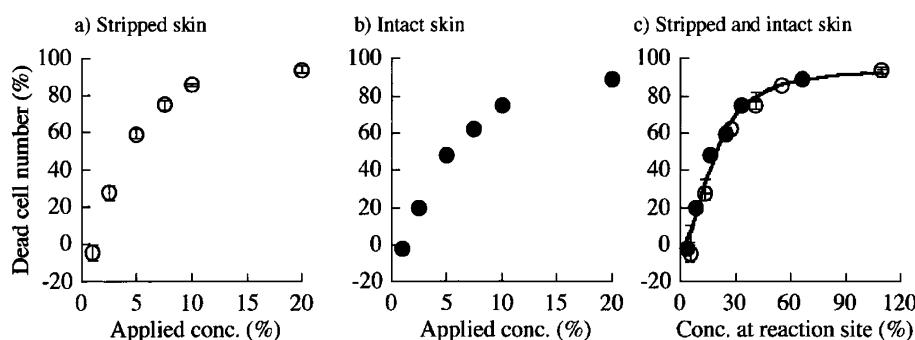


Fig. 5. MTT Assay in LSE-high after Application of CPC on (a) Stripped Skin, (b) Full-Thickness Skin, and (c) Stripped Skin and Full-Thickness Skin

ただし、 $18 < MW < 765$ 及び $-3 < \log K_{ow} < 6$ である。また、われわれのグループ¹⁰⁾は 17 種のモデル薬物を使用して、ヒト皮膚とヘアレスラット皮膚透過係数の対数値が以下に示すような式 Eq. (4), (5) で示されることを報告した。

human skin:

$$\log P(\text{cm/s}) = 1.17 \times 10^{-7} K_{ow}^{0.751} + 2.73 \times 10^{-8} \quad (4)$$

hairless rat skin:

$$\log P(\text{cm/s}) = 4.78 \times 10^{-7} K_{ow}^{0.589} + 8.33 \times 10^{-8} \quad (5)$$

ここで、われわれのグループの式 Eq. (4), (5) で MW の項がないのは、分子量分布が 130–357 ならば、分子量による変動は無視できたためである。いずれにせよ、Eq. (4), (5) は皮膚透過性が K_{ow} によって予測し得ることを示唆している。現在、われわれは皮膚透過性と皮膚中濃度について *in silico* でどこまで予測が可能なのか研究・調査している。

6. Fig. 1(e)について：3 次元培養ヒト皮膚モデルの有用性

Figure 4 に示したように、ヒト皮膚透過性を予測するのに実験動物皮膚を用いることができる。しかし、実験動物を用いることなしにヒト皮膚透過性が予測できればなおよい。そこでわれわれは、3D 培養ヒト皮膚モデルを用いて種々化学物質の透過性を比べ、ヒト皮膚透過性と比較した。Figure 6 にその結果（ヒト皮膚透過係数と 3D 培養ヒト皮膚モデル透過係数の対数値の相関性）を示す。⁶⁾ なお、3D 培養ヒト皮膚モデルとして living skin equivalent (LSE)-high (東洋紡) を用いた。培養皮膚透過性がヒト皮膚透過性より一様に高かったもの（約 16 倍高い）、Fig. 6 に示したように、傾きがほぼ 1.0 となり、高い相関性がみられることがわかった。すなわち、Fig. 6 を使うことにより、ヒト皮膚透過性が予測できることがわかった。もちろん、この予測性をさらに高めるためには、今後さらに広範囲の化学物質を用いて評価していかねばならないことは言うまでもない。

7. Fig. 1(f)について：皮膚透過速度を用いた皮膚中濃度の予測

皮膚に適用した化学物質の皮膚中濃度を測定するのは極めて難しい。その 1 つの原因是、皮膚透過性は経時に数点から十数点測定できるものの、皮膚

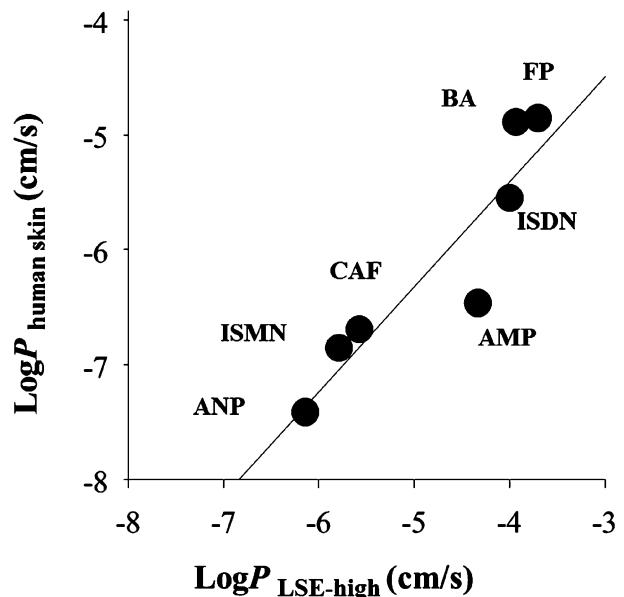


Fig. 6. Comparison of Drug Permeabilities through Three-Dimensional Cultured Human Skin Model and Real Human Skin

Abbreviations for model compounds: FP: flurbiprofen; BA: benzoic acid; ISDN: isosorbide dinitrate; ISMN: isosorbide mononitrate; AMP: aminopyrine; CAF: caffeine; ANP: antipyrine.

中濃度では一例一点のデータしか得られないので、ヒト又は動物皮膚の消費量が極めて多くなることがある。また、皮膚表面からの薬物の正確な回収は極めて難しい。皮膚表面の基剤をしっかり回収しようとすると、皮膚中の化学物質も回収することになる。また、逆にやさしく回収しようすると、回収率が 100% から大きく下回ることになる。すなわち、正しく回収するテクニックを得るのは極めて困難である。また、皮膚中の化学物質の定量感度を保つ必要もある。さらに、定常状態に至るまで比較的長い時間のサンプリングポイントが必要なこともある。また、特に欧州では化粧品開発を目的として実験動物を使うこともできないという大きな問題点も存在している。

われわれは、皮膚の 2 層拡散モデルを仮定して皮膚透過実験から得られる透過パラメータを利用して、皮膚に適用した化学物質の皮膚中濃度を予測する方法を確立した。¹¹⁾ 以下に示す式 Eq. (6) は定常状態時の平均皮膚中濃度 \bar{C}_{ss} を示す。

$$\bar{C}_{ss} = \frac{C_v}{2L_{tot}} \left[K_{sc} L_{sc} \left(1 + \frac{P_{tot}}{P_{ved}} \right) + K_{ved} L_{ved} \frac{P_{tot}}{P_{ved}} \right] \quad (6)$$

ここで、 C_v は適用濃度、 L_{tot} , L_{sc} , L_{ved} は皮膚の全層、角層、そして生きた表皮と真皮の厚み、 K_{sc} ,

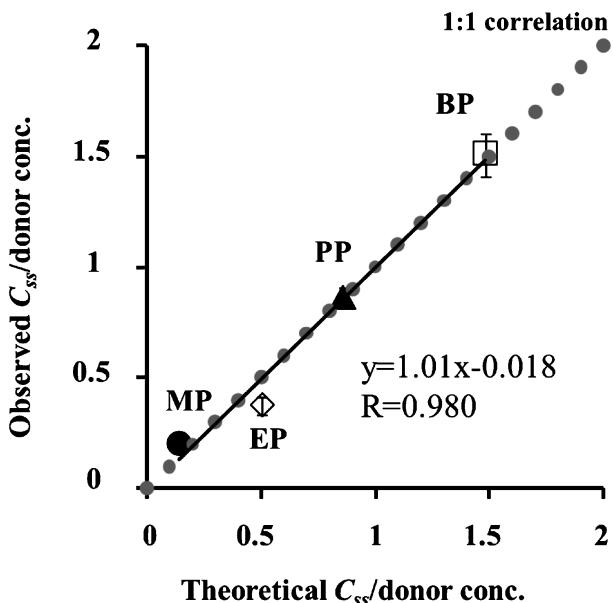


Fig. 7. Relationship between Theoretical and Observed Steady-State Concentration of Parabens in Hairless Rat Skin
Abbreviation for model compounds: BP: butyl paraben; PP: propyl paraben; EP: ethyl paraben; MP: methyl paraben.

K_{ved} は基剤から角層への、また生きた表皮層への分配係数、そして P_{tot} , P_{sc} , P_{ved} は皮膚の全層、角層、そして生きた表皮と真皮の透過係数を示す。各皮膚の厚みは実測可能であり、他のパラメータは皮膚透過性から算出することができる、結果として皮膚透過挙動を測定すれば、皮膚中濃度が推定できることになる。Figure 7 はパラベン類の皮膚透過性から計算した皮膚中濃度と実測値を比較したものである。両者は極めて一致したことから、2層膜モデルを用いた皮膚中濃度予測が極めて有効であることが明らかとなった。¹¹⁾

8. おわりに

以上、Fig. 1 に示した方法論に従って、ヒト *in vivo* におけるレスポンスを予測・推定してきた。われわれが試験した物質数はまだ少なく、検討すべきことも残されている。しかし、化粧品開発では動物実験が使えないこと、とはいものの安全性の確保には今まで以上に気を使わねばならないことに留意すべきである。こういう状況では、3D ヒト

皮膚モデルの利用や *in silico* 法の応用も進めていかねばならない。安全性や有効性といったレスポンスにはそのレスポンスが生じる部位での化学物質濃度が重要であることもよく理解しなければならない。広範な知識と考え方が必要であるので、多くの研究分野の専門家とも連携して、化粧品の安全性・有効性確保に当たらねばならないと思っている。

REFERENCES

- 1) Skelly J. P., Shah V. P., Maibach H. I., *Pharm. Res.*, **4**, 265–267 (1987).
- 2) Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), “OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, Test No. 428, Skin Absorption: *In vitro* method,” 2004.
- 3) Sugibayashi K., Yanagimoto G., Hayashi T., Seki T., Juni K., Morimoto Y., *J. Control. Release*, **62**, 193–200 (1999).
- 4) Sato K., Oda T., Sugibayashi K., Morimoto Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2232–2238 (1988).
- 5) Takeuchi H., Ishida M., Urano H., Sugibayashi K., *Yakuzaigaku*, **72**, 251–261 (2012).
- 6) Watanabe T., Hasegawa T., Takahashi H., Ishibashi T., Takayama K., Sugibayashi K., *Alternative Animal Testing and Experimentation*, **8**, 1–14 (2001).
- 7) Watanabe T., Hasegawa T., Takahashi H., Ishibashi T., Itagaki H., Sugibayashi K., *Pharm. Res.*, **19**, 669–675 (2002).
- 8) Dayneka N. L., Grag V., Jusko W. J., *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **21**, 457–478 (1993).
- 9) Potts R. O., Guy R. H., *Pharm. Res.*, **12**, 1628–1633 (1995).
- 10) Morimoto Y., Hatanaka T., Sugibayashi K., Omiya H., *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 634–639 (1992).
- 11) Sugibayashi K., Todo H., Oshizaka T., Oeda Y., *Pharm. Res.*, **27**, 134–142 (2010).