

# 三次元培養皮膚モデルを用いた薬物の皮内動態と 傷害性の迅速評価法に関する研究

研究課題番号12672157

平成12年度—平成13年度科学研究補助金（基盤研究C）研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 杉林 堅次  
(城西大学・薬学部・教授)

# 三次元培養皮膚モデルを用いた薬物の皮内動態と 傷害性の迅速評価法に関する研究

研究課題番号12672157

平成12年度—平成13年度科学研究補助金（基盤研究C）研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 杉林 堅次  
(城西大学・薬学部・教授)

## はしがき

薬物治療の進歩に伴い、微量で強い治療効果を発現する反面、副作用も強い薬物が増えてきており、これと併行して、投与方法や投与剤形に工夫が必要な薬物も多くなった。また、このような状況下に、薬物の有効性と安全性、さらには信頼性に関して高い保証を与えるために、薬物の投与形態を最適化しようとする考え方が強く認識され始め、薬物の体内動態の精密制御を目的とした新しい投与形態、いわゆるドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System: DDS) が開発された。DDS は投与の方法や剤形を工夫し、体内での薬物の働きを時間的かつ空間的にコントロールすることによって、最高の治療効果を得ることを目的とした薬物投与技術である。古来から局所における薬物治療法のために用いられてきた皮膚適用製剤も皮膚から全身循環系に薬物を吸収させることにより経皮治療システム (Transdermal Therapeutic System: TTS) という DDS を生む土壌になった。TTS は薬物の長時間に亘る放出制御はもちろんのこと、肝臓等での初回通過効果や消化管での副作用を回避でき、投与の開始や中断が容易であるなどの多くの利点を有している。しかし、皮膚の最外層にある角質層が薬物の皮膚透過において律速となり、TTS に用いることができる薬物は限られている。そこで、角質層での薬物の低い透過性を克服するために様々な経皮吸収促進法、すなわち、経皮吸収促進剤の利用、プロドラッグ化、さらには、*iontophoresis*、*electroporation*、*phonophoresis* 等の物理的方法が試みられている。

すでに、摘出されたヒト皮膚を用いた *in vitro* 薬物透過性試験がアメリカ合衆国などで盛んに行われている。しかし、このようなヒト組織を用いた実験は倫理的な観点から我が国を含むすべての国において必ずしも使用できるとは限らない。このため、動物、特にラット、モルモット、さらにはミニプタ等が薬物経皮吸収評価用動物として使用されている。また、動物実験と併行して、実験動物を用いた皮膚透過データからヒト皮膚透過性への外挿法に関する研究されている。Morimoto らは類似した分子量を持つ物性の異なった 17 薬物のヒト皮膚とヘアレスラット透過性を評価し、ヒトとラット皮膚透過性は水溶性薬物では数倍異なったが、脂溶性薬物ではほとんど変わらなかったと以前に報告している。しかし、広範囲な物性を持つ薬物すべてに対応できる適切な外挿法はいまだ確立されておらず、さらに、実験動物の使用自体も動物愛護の観点から問題視されつつある。そこで、ヒトまたは動物皮膚を介した薬物透過性の代替評価法の確立が急がれている。すでに、シリコーンの単独膜やシリコーンと poly-(hydroxyethyl methacrylate) の合成膜が生体膜透過性を見積もるための代替膜として用いられてきた。しかし、これらの人工膜では当然のことながら生体膜特有の生理機能が欠如しているため、経皮吸収促進効果、皮膚代謝能、

さらには皮膚刺激性等を評価することができない。

近年、Combinatorial Chemistry や High Throughput Screening の進歩に伴いリード化合物を探索し開発することが容易になった。これらの新しいシステムにより強い薬理活性を見込んだ薬物選択が可能となったが、生体膜透過性の評価の迅速化が未だ進んでおらず、ここが医薬品開発の律速過程となっている。

TTS を初めとする外用剤の製剤技術や薬物の皮膚透過促進法の研究が進む一方で、仕事中に暴露される溶媒や中毒物質の経皮吸収に関しても研究がなされている。労働環境の改善の立場から、溶媒や忌避剤である *N, N*-diethyl-*m*-toluamide などの経皮吸収を極力抑える努力もされている。このような物質の経皮吸収性の評価にも、ヒト皮膚透過性を知ることが重要である。

一方、TTS の開発には主薬や添加剤、さらには製剤全体の皮膚刺激性の評価も必要である。皮膚刺激性に影響を与える因子として化学物質の種類や濃度、さらには接触時間等がある。一般に皮膚刺激による反応は用量相関性が高いといわれている。しかし、皮膚刺激を引き起こす作用機構はまるごとの生体組織を用いた実験系では多様化するため、容易に評価することが困難となる。そこで、刺激性を単純化して予想することも必要と考えられる。

近年、多くの種類の培養生体膜が薬物の膜透過能を左右する決定因子を検討するために使用されてきている。Caco-2 や Calu-3 膜は腸や肺由来の上皮細胞膜で、培養生体膜の代表例である。培養皮膚はこれら上皮細胞単層膜と異なり、角化細胞と繊維芽細胞からなる三次元型の培養細胞膜である。このようなヒト培養皮膚モデルを用いて試験することで、ヒト皮膚透過性や傷害性（刺激性）を簡便に予測できる可能性がある。

本報告書では、薬物のヒト皮膚透過性と刺激性を簡潔に予測する方法として、実際の皮膚組織に最も似ているといわれている培養ヒト皮膚モデルの1つである Living Skin Equivalent-high (LSE-high)（東洋紡績、バイオ研究所、敦賀、福井）を使用して研究した。この皮膚モデルは培養されたヒト表皮細胞と繊維芽細胞からなり、重度火傷の治療への適用が検討されている。ここで示した LSE-high は Organogenesis 社 で開発された LSE を原型とするが、薬物皮膚透過に対するバリアー能が LSE と比較して約 3 倍ほど強くなっている。

そこで、まず第 1 章では LSE-high の薬物の皮膚透過性評価材料としての有用性を、さらに、第 2 章では、LSE-high の皮膚刺激性評価材料としての有用性について評価した。

## 研究組織

研究代表者： 杉林 堅次 (城西大学・薬学部・教授)  
研究分担者： 長谷川 哲也 (城西大学・薬学部・助手)  
研究分担者： 高山 幸三 (星薬科大学・薬学部・教授)  
研究分担者： 石橋 卓也 (東洋紡績(株)・敦賀バイオ研究所・主席部員)

## 交付決定額 (配分額)

	直接経費
平成12年度	1,600千円
平成13年度	1,500千円
総計	3,100千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

渡辺哲也ら LSE-high を用いた薬物の皮膚透過性評価：ヒト及びヘアレスラット皮膚透過性との比較, *薬物動態*, **15S**, s 233, (2000)

T. Watanabe et.al, 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)

T. Watanabe et. al, Effect of Penetration Enhancers on the Permeation of Drugs across a Three-Dimensional Cultured Human Skin Model: Comparison with the Effects Using Excised Hairless Rat Skin, *Altern. Animal Test. Experiment.*, **8**, 15-22 (2001)

渡辺哲也ら, 水晶発振子を用いた薬物の in vitro 皮膚透過迅速測定法にする検討, *薬剤学*, **62**, in press, (2002)

(2) 口頭発表

杉林堅次ら，薬物の皮膚透過性と代謝能，さらには吸収促進能の評価のための3次元培養ヒト皮膚モデルの有用性，第8回 HAB 協議会学術年会 2001年5月，東京

渡辺哲也ら，Draize 皮膚刺激性試験に替わる三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた MTT 試験の有用性：皮膚中物質拡散と Toxicokinetics / Toxicodynamics 関連の利用，日本薬剤学会第17年会，2002年3月，静岡

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

工業所有権の名称	発明者名	権利者名	工業所有権の種類，番号	出願年月日	取得年月日
生体組織を用いたインビトロ試験法	石橋卓也 杉林堅次 長谷川哲也 渡辺哲也	東洋紡 (株)	特願 2002-6347	2002.1.15	-
刺激性試験法	石橋卓也 高橋秀和 杉林堅次 長谷川哲也 渡辺哲也	東洋紡 (株)	特願 2002-38890	2002.2.15	-

# 目次

## 第1章 薬物の皮膚透過性評価材料としての三次元培養ヒト皮膚モデル (LSE-high) の有用性

### 第1節 薬物の *in vitro* ヒト皮膚透過性評価材料としての LSE-high の有用性

- (1) LSE-high、ラットおよびヒト摘出皮膚を介した種々薬物の皮膚透過性の比較
- (2) 薬物の皮膚透過に対する LSE-high およびヘアレスラット皮膚の透過律速層の検討
- (3) 透過パラメータによる解析
- (4) LSE-high、ヘアレスラットおよびヒト皮膚を介する薬物透過性の関係
- (5) 小括

### 第2節 皮膚透過促進剤のスクリーニング材料としての LSE-high の有用性

- (1) LSE-high とヘアレスラットの皮膚透過性に及ぼす皮膚透過促進剤の影響
- (2) LSE-high とヘアレスラットの皮膚透過性に及ぼす *L*-メントールの濃度の影響
- (3) LSE-high とヘアレスラットの皮膚透過性に及ぼす皮膚透過促進剤の効果の比較
- (4) 小括

### 第3節 においセンサー（水晶発振子）を用いた薬物の迅速定量法に関する検討

- (1) インドメタシンの水晶発振子への吸着
- (2) インドメタシンの皮膚透過性
- (3) 小括

## 第2章 三次元培養ヒト皮膚モデルの皮膚刺激性評価材料としての有用性

### 第1節 皮膚刺激性に及ぼす角質層の影響

- (1) 理論
- (2) 皮膚刺激性と時間の関係
- (3) 2 相性について
- (4) 速度論的パラメータの解析
- (5) 小括

## 第2節

- (1) 理論
- (2) 塩化セチルピリジニウムの皮膚透過性パラメータの算出
- (3) Draize 試験と MTT 試験結果の比較
- (4) 小括

おわりに

文献



# 第 1 章 薬物の皮膚透過性評価材料としての三次元培養 ヒト皮膚モデル (LSE-high) の有用性

## 第 1 節 薬物の *in vitro* ヒト皮膚透過性評価材料としての LSE-high の有用性<sup>1)</sup>

皮膚に適用する製剤は皮膚および近傍組織の薬効を期待するものから薬物が全身循環系に移行した後に薬効を発揮する TTS があり、それぞれ薬物治療の重要な位置を占めている<sup>2)</sup>。これら皮膚適用製剤の開発では、ヒト皮膚透過性を測定または予測することが重要であると指摘されている。しかし、ヒトの *in vivo* 結果は臨床試験まで待たねばならず、*in vitro* 試験には組織摘出に係わる倫理的な問題のため全ての国で自由に使える状況ではない<sup>3)</sup>。一方、動物データからヒトへの外挿法や animal scale up が種々検討され、一応の成果が収められているものの<sup>4,5)</sup>、予測の精度が良好でないとの指摘がある。さらに実験動物自体の使用にも問題が投げかけられ、動物実験代替法の確立が急がれている。加えて、医薬品の候補化合物の選択は Combinatorial Chemistry の手法の進歩に伴い高速化してきている。そのため、これに対応した生体膜透過性や吸収速度の測定、さらにはそれに続く製剤化が新たな開発の律速段階となっている。皮膚適用薬に関しても High Throughput Screening System の確立が急がれ、そのため特に、皮膚透過性を迅速に評価することが必要である。

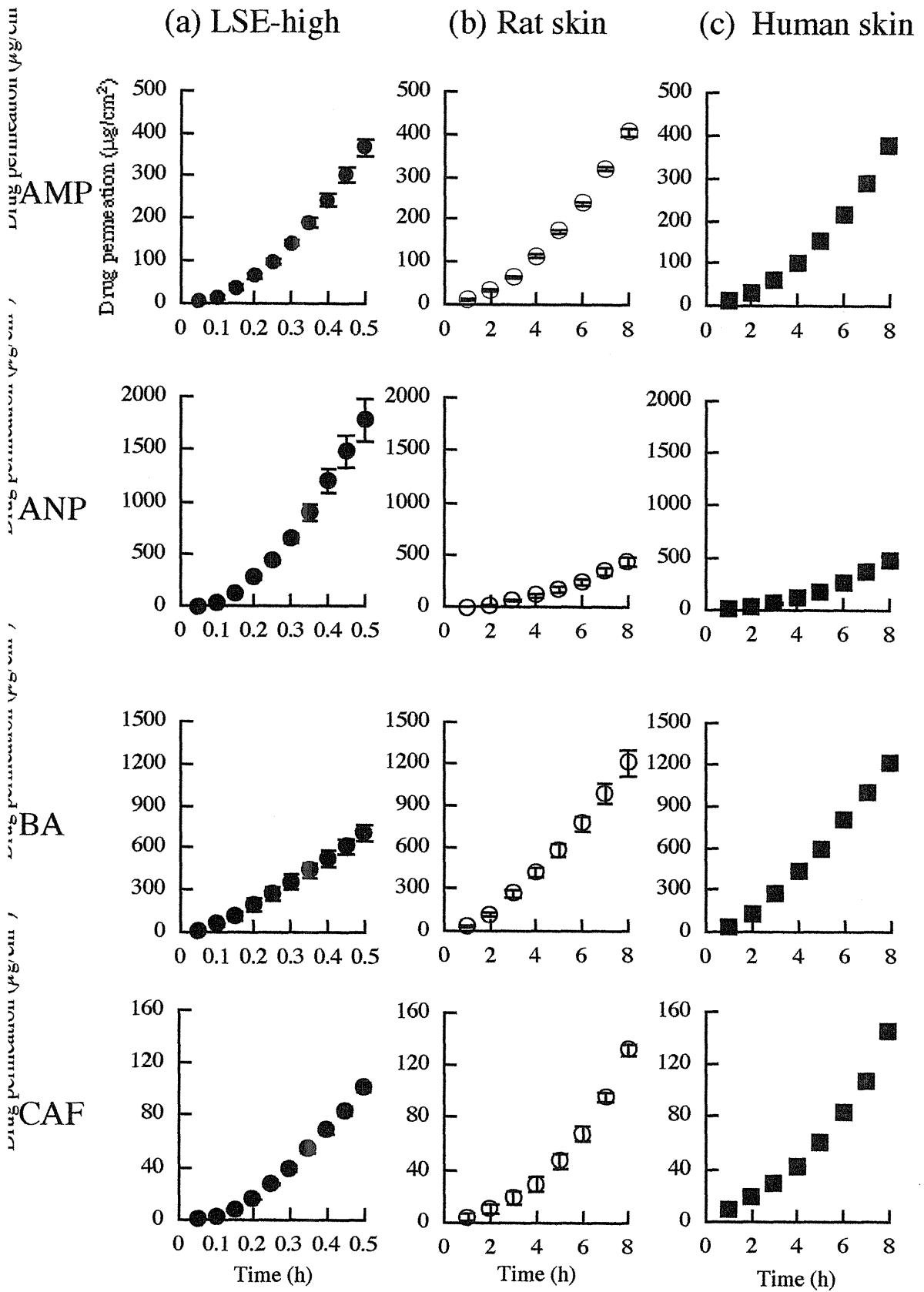
三次元培養皮膚モデルは組織工学・再生医学の領域から生まれたもので、繊維芽細胞を包埋したコラーゲンゲルからなる真皮と多層分化した角化細胞からなる表皮を有する。これは特に重傷のやけどや創傷治療への有用性が期待されている<sup>6)</sup>。

そこで、本章では三次元培養皮膚モデルの薬物の皮膚透過性の評価材料としての有用性について検討した。すなわち、種々薬物の三次元培養皮膚モデル透過性とヒトおよびヘアレスラット摘出皮膚透過性を比較し、相同性と相違性について速度論的に評価した。なお、三次元培養皮膚モデルとしては LSE-high を用いた。また、モデル薬物に、アミノピリン (AMP)、アンチピリン (ANP)、安息香酸 (BA)、カフェイン (CAF)、フルルピプロヘン (FP)、二硝酸イソソルビド (ISDN)、一硝酸イソソルビド (ISMN) を用いた。

## LSE-high、ラットおよびヒト摘出皮膚を介した種々薬物の皮膚透過性の比較

本研究の目的の一つは LSE-high を用いた *in vitro* 皮膚透過性からヒト摘出皮膚透過性を見積もることである。したがって、*in vitro* 皮膚透過実験に用いた薬物に関してなるべく多くの情報を得ることが重要である。そこでまず、7 種類の薬物の皮膚透過実験を LSE-high、ヘアレスラットおよびヒト摘出皮膚を用いて行った。

Fig. 1a, b および c はそれぞれ LSE-high、ヘアレスラットおよびヒト摘出皮膚を介した 7 種類の薬物の累積透過量 - 時間曲線を示す。ANP を除いて 3 つの皮膚すべて同じ縦軸のスケールで表現することができた。一方、横軸のスケールはヒト皮膚およびヘアレスラット皮膚が 8 時間に対し、LSE-high は 0.5 時間である。Fig. 1b, c に示すように、ヒト皮膚とヘアレスラットを介した各薬物の皮膚透過性はよく類似していた。また、LSE-high の 0.5 時間までの各薬物の累積透過量はヒトおよびラット皮膚の 8 時間までの累積透過量と類似しており、LSE-high の方が後者より 16 倍程度高い透過性を示すと考えられた。Lag time と次に続く定常状態 flux はヒトおよびヘアレスラット皮膚同様、LSE-high でも見られた。水溶性薬物 (ANP、CAF および ISMN) の累積皮膚透過量 - 時間挙動は下に凸の形になった。一方、脂溶性薬物 (AMP、BA、FP および ISDN) では水溶性薬物のデータに比べて累積皮膚透過量が時間に対して直線的に増加する傾向を示した。このため水溶性薬物は、脂溶性薬物に比べ lag time が大きい値を示すことが明らかになった。



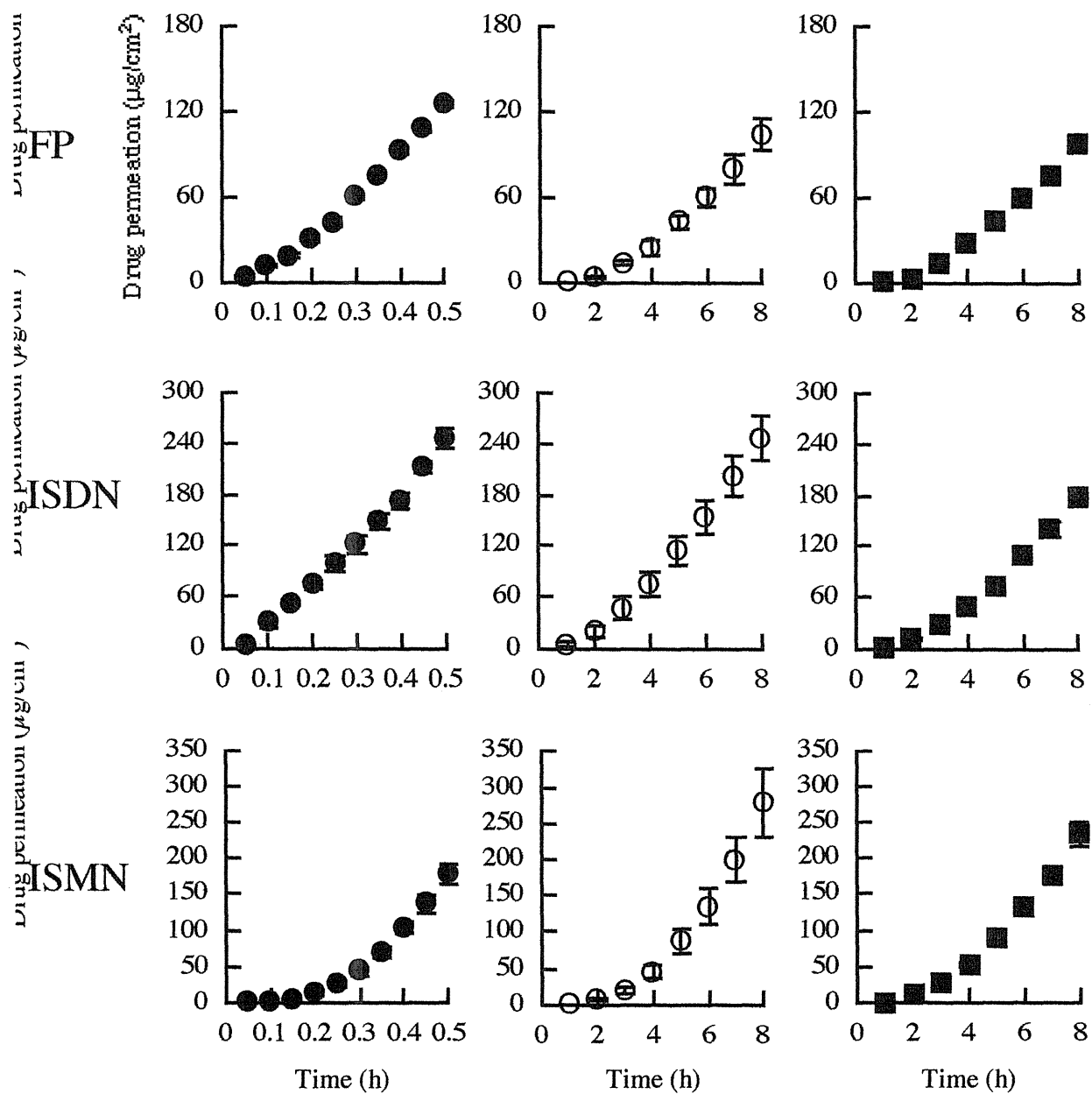


Fig. 1 Time course of changes in the cumulative amount of each drug that permeated through each full skin membrane

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments.

(1) 薬物の皮膚透過に対する LSE-high およびヘアレスラット皮膚の透過律速層の検討

薬物の皮膚透過過程は複数のバリアー層、すなわち角質層 (*sc*) とそれ以下の生きている表皮 (*ve*) と真皮 (*vd*) の透過からなると仮定することができる<sup>7)</sup>。その模式図を Fig. 2 に示す。メインバリアーがいずれかの層に存在すると仮定すれば、薬物の透過挙動から、Fick's の拡散式を用いて透過律速層を評価することが可能である。

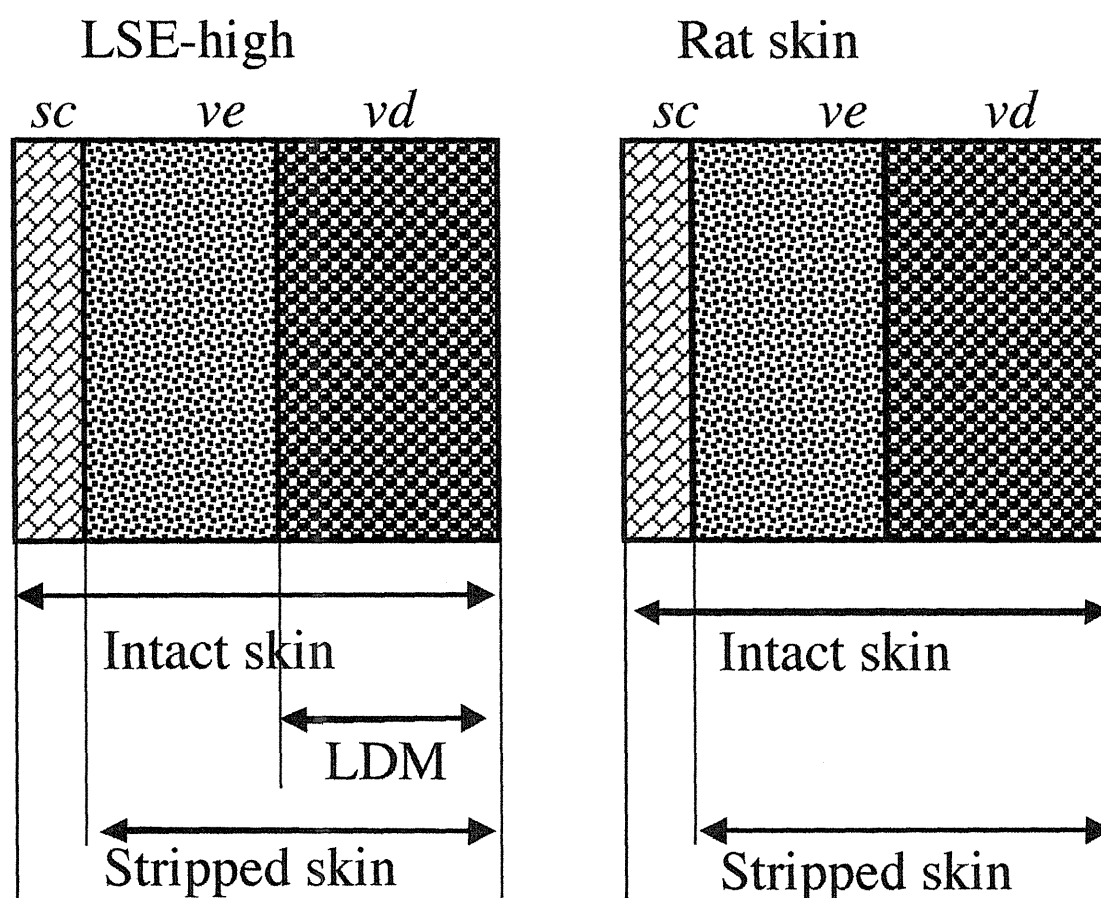


Fig. 2 Schematic representation of each layer of skin

Abbreviations; *sc*, stratum corneum; *ve*, viable epidermis; *vd*, viable dermis; *LDM*, Living Dermal Model

Fig. 3 に角質層を除去した LSE-high、LDM およびテープストリッピングしたヘアレスラット皮膚（角質層を取り除いた皮膚）を介した薬物の累積透過量 - 時間曲線を示す。これらの膜においても lag time とその後の見かけの定常状態 flux が観察された。

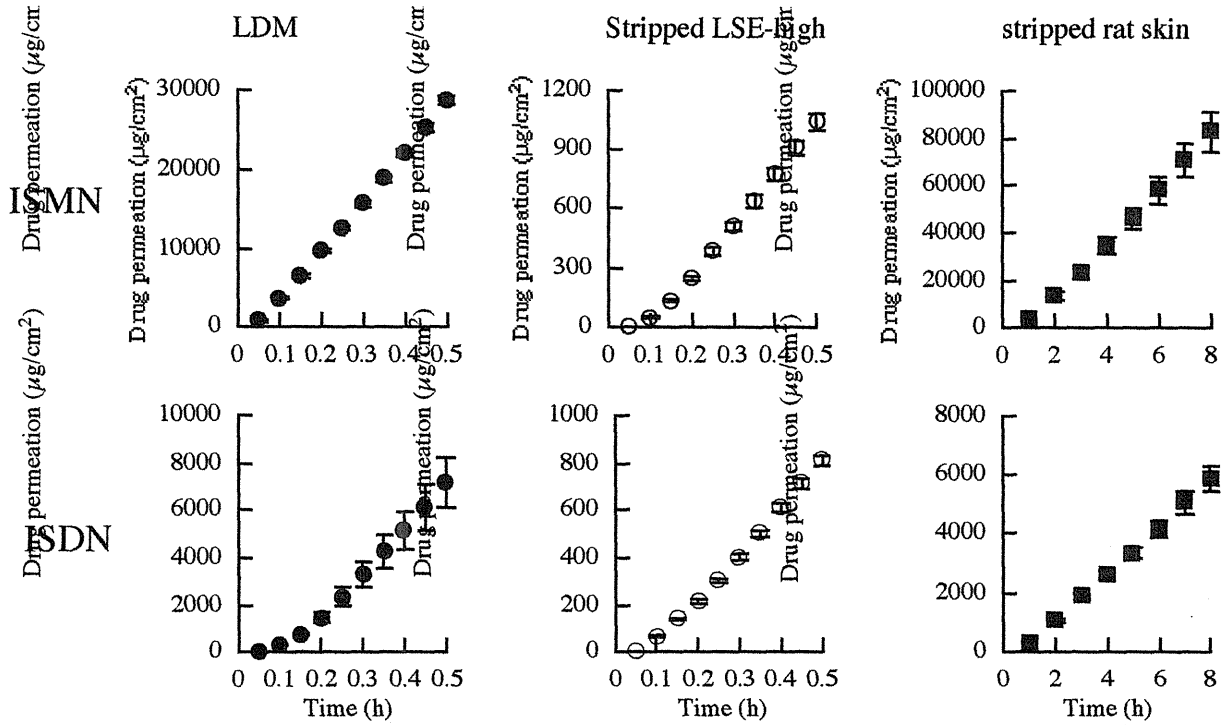


Fig. 3 Time course of changes in cumulative amount of ISDN and ISMN that permeated through each layer

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments.

各層の透過抵抗は (1) 式として表すことができる。

$$R_{tot} = R_{sc} + R_{ved} = \frac{1}{P_{tot}} = \frac{1}{P_{sc}} + \frac{1}{P_{ved}} \quad (1)$$

ISMN および ISDN の各層の透過抵抗を Figs. 1, 3 の透過プロファイルと式 (1) から求めた。その結果を Table 1 に示す。ヘアレスラット皮膚を介した ISMN と ISDN の透過に関する角質層の抵抗比  $R_{sc}/R_{tot}$  はそれぞれ 0.954 と 0.947 であることから、以前の報告<sup>8,9)</sup>と同様に透過抵抗は角質層にあることが明らかとなった。一方、LSE-high での  $R_{sc}/R_{tot}$  は ISMN で 0.748、ISDN で 0.661 であった。また、

LSE-high とヘアレスラットの角質層の透過抵抗を比較したところ、両薬物共に LSE-high よりもヘアレスラットの方が約 10 – 20 倍高かった。さらに、両皮膚における ISMN と ISDN の  $R_{ved}$  はほとんど等しく、LSE-high とヘアレスラット皮膚の違いは角質層の透過抵抗にあることがわかった。そこで、LSE-high の表皮層の抵抗比  $(R_{sc} + R_{ve})/R_{tot}$  を求めたところ、ISMN で 0.994、ISDN で 0.935 であった。以上より、全抵抗のほとんどは LSE-high の場合は表皮層にあり、ヘアレスラットでは角質層にあることが示唆された。

Table 1 Permeation resistance<sup>a)</sup> of ISMN and ISDN in each skin layer

Skin	$R_{tot}$	$R_{sc}$	$R_{ve}$	$R_{ved}$	$R_{vd}$	$R_{sc}/R_{tot}$	$R_{sc}+R_{ve}/R_{tot}$
Rat							
ISMN	10.270	9.799		0.471		0.954	
	(X10 <sup>6</sup> s/cm)						
ISDN	29.123	27.565		1.558		0.947	
	(X10 <sup>4</sup> s/cm)						
LSE-high							
ISMN	0.984	0.736	0.242	0.248	0.00943	0.748	0.994
	(X10 <sup>6</sup> s/cm)						
ISDN	2.073	1.371	0.632	0.702	0.0703	0.661	0.935
	(X10 <sup>4</sup> s/cm)						

<sup>a)</sup> Excised hairless rat skin and LSE-high consist of multiple layers. The resistance to drug permeation in each layer was supposed to be the reciprocal of the permeability coefficient through the layer. *Abbreviations*; *sc*; stratum corneum, *ve*; viable epidemis, *ved*; viable epidemis and dermis, *vd*; viable dermis

### (3) 透過パラメータによる解析

前節で示したように、ヘアレスラット皮膚の薬物透過抵抗のほとんど (90% 以上) が角質層にあり、LSE-high では表皮層であった。このことから、これらの皮膚を一枚膜と仮定し、薬物の皮膚透過性を比較するために、Fick の拡散式を用いて皮膚透過の速度論的パラメータを以下の方法により算出した。

角質層側に適用した薬物濃度を  $C_0'$ 、皮膚内の表面濃度を  $C_0$  とすると、薬物の皮膚/基剤間分配率  $K$  は  $C_0/C_0'$  となる。また、薬物の皮膚中拡散定数を  $D$ 、薬物の拡散距離 (皮膚の厚さ) を  $L$  とすると、単位面積当たりの薬物透過量  $Q$  は時間  $t$  の関数としてすでに示した (2) 式で表される。

$$Q = K C_0' \left\{ D t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp(-n^2 \pi^2 D' t) \right\} \quad (2)$$

ここで、 $D' = D/L^2$  は拡散パラメータ、 $K' = K \cdot L$  は分配パラメータである。

したがって、薬物の皮膚透過データを (2) 式に非線形最小二乗法にあてはめることにより  $D'$  および  $K'$  を算出することができる。また、透過係数  $P$  は次式より算出した。

$$P = \frac{DK}{L} = D' \cdot K' \quad (3)$$

Fig. 1 の透過データを用いてこれらの式から得られたパラメータを Table 4 にまとめて示す。表から明らかなように、すべての薬物において LSE-high とヘアレスラットの分配パラメータは類似していた。一方、拡散パラメータは LSE-high の値はヒト皮膚やヘアレスラット皮膚の値よりも 10-50 倍高かった。Table 4 には主バリアー膜に対する見かけの分配係数と拡散係数も一緒に示した。見かけの分配係数と拡散係数は透過制御膜の厚さを、LSE-high では  $150 \mu\text{m}$ 、ヒト皮膚で  $15.4 \mu\text{m}$ 、さらにヘアレスラットで  $18.2 \mu\text{m}$  として計算した。LSE-high の表皮層中の各薬物の見かけの拡散係数はヒトやヘアレスラットの角質層中の拡散係数よりも大きい値となった。また、LSE-high の見かけの分配係数はこれらの摘出皮膚よりも大きい値となった。すなわち、3 種の皮膚で各薬物の分配パラメータは同じであったのに対し分配係数が異なったのは、各皮膚のバリアーの厚みの違いが



関係しているためであると考えられた。なお、透過係数（分配パラメータと拡散パラメータの積として求めた）の結果も Table 2 に示した。

Table 2 Diffusion and partition parameters of 7 drugs on each skin

Skin	Aminopyrine	Antipyrine	Benzoic acid	Caffeine
<b>Diffusion parameter (1/s) <sup>a)</sup></b>				
LSE-high	$2.796 \times 10^{-3} (\pm 2.3 \times 10^{-4})$	$2.168 \times 10^{-3} (\pm 1.3 \times 10^{-4})$	$4.971 \times 10^{-3} (\pm 1.4 \times 10^{-3})$	$2.336 \times 10^{-3} (\pm 2.3 \times 10^{-3})$
Rat skin	$1.980 \times 10^{-4} (\pm 5.9 \times 10^{-6})$	$1.315 \times 10^{-4} (\pm 7.6 \times 10^{-6})$	$2.494 \times 10^{-4} (\pm 2.4 \times 10^{-5})$	$7.991 \times 10^{-5} (\pm 8.0 \times 10^{-5})$
Human skin	$1.471 \times 10^{-4}$	$1.268 \times 10^{-4} (\pm 6.1 \times 10^{-6})$	$2.612 \times 10^{-4} (\pm 1.2 \times 10^{-5})$	$1.965 \times 10^{-4}$
Ratio of LSE-high /Rat skin	14.1	16.5	19.9	29.2
Ratio of LSE-high /Human skin	19.0	17.1	19.0	11.9
<b>Partition parameter (cm) <sup>a)</sup></b>				
LSE-high	$1.717 \times 10^{-2} (\pm 1.9 \times 10^{-3})$	$3.470 \times 10^{-3} (\pm 8.1 \times 10^{-5})$	$2.700 \times 10^{-2} (\pm 5.6 \times 10^{-3})$	$1.160 \times 10^{-3} (\pm 2.610^{-5})$
Rat skin	$1.493 \times 10^{-2} (\pm 1.0 \times 10^{-3})$	$2.623 \times 10^{-3} (\pm 1.3 \times 10^{-5})$	$5.316 \times 10^{-2} (\pm 9.5 \times 10^{-3})$	$1.137 \times 10^{-3} (\pm 4.2 \times 10^{-4})$
Human skin	$2.326 \times 10^{-2}$	$2.994 \times 10^{-3} (\pm 9.2 \times 10^{-6})$	$4.947 \times 10^{-2} (\pm 1.6 \times 10^{-3})$	$1.015 \times 10^{-3}$
Ratio of LSE-high /Rat skin	1.15	1.32	0.51	1.02
Ratio of LSE-high /Human skin	0.74	1.16	0.55	1.14
<b>Permeability coefficient (cm/s) <sup>b)</sup></b>				
LSE-high	$4.720 \times 10^{-5} (\pm 1.7 \times 10^{-6})$	$7.340 \times 10^{-7} (\pm 1.5 \times 10^{-7})$	$1.189 \times 10^{-4} (\pm 5.5 \times 10^{-6})$	$2.711 \times 10^{-6} (\pm 9.0 \times 10^{-8})$
Rat skin	$2.945 \times 10^{-6} (\pm 1.1 \times 10^{-7})$	$3.517 \times 10^{-8} (\pm 2.3 \times 10^{-9})$	$1.291 \times 10^{-5} (\pm 1.4 \times 10^{-6})$	$1.221 \times 10^{-7} (\pm 6.1 \times 10^{-8})$
Human skin	$3.386 \times 10^{-6}$	$3.803 \times 10^{-8} (\pm 4.7 \times 10^{-9})$	$1.288 \times 10^{-5} (\pm 1.5 \times 10^{-6})$	$1.994 \times 10^{-7}$
Ratio of LSE-high /Rat skin	16.0	20.9	9.21	22.2
Ratio of LSE-high /Human skin	13.9	19.3	14.9	13.6
<b>Apparent diffusion coefficient (cm<sup>2</sup>/s) <sup>c)</sup></b>				
LSE-high	$6.291 \times 10^{-7} (\pm 5.1 \times 10^{-8})$	$4.877 \times 10^{-7} (\pm 3.0 \times 10^{-8})$	$1.119 \times 10^{-6} (\pm 3.1 \times 10^{-7})$	$5.256 \times 10^{-7} (\pm 5.8 \times 10^{-9})$
Rat skin	$4.696 \times 10^{-10} (\pm 1.4 \times 10^{-11})$	$3.185 \times 10^{-10} (\pm 1.8 \times 10^{-11})$	$5.914 \times 10^{-10} (\pm 5.6 \times 10^{-11})$	$1.895 \times 10^{-10} (\pm 3.9 \times 10^{-11})$
Human skin	$4.871 \times 10^{-10}$	$4.200 \times 10^{-10} (\pm 2.0 \times 10^{-11})$	$8.651 \times 10^{-10} (\pm 3.8 \times 10^{-11})$	$6.509 \times 10^{-10}$
Ratio of LSE-high /Rat skin	1339	1531	1862	2773.6
Ratio of LSE-high /Human skin	1292	1161	1293	807.5
<b>Apparent partition coefficient <sup>c)</sup></b>				
LSE-high	$1.145 (\pm 1.2 \times 10^{-1})$	$0.02313 (\pm 5.4 \times 10^{-3})$	$1.800 (\pm 3.8 \times 10^{-1})$	$0.07732 (\pm 1.7 \times 10^{-3})$
Rat skin	$9.695 (\pm 6.5 \times 10^{-1})$	$0.1703 (\pm 8.5 \times 10^{-3})$	$34.52 (\pm 6.2)$	$0.8878 (\pm 2.7 \times 10^{-1})$
Human skin	12.78	$0.1645 (\pm 5.0 \times 10^{-3})$	$27.18 (\pm 8.9 \times 10^{-1})$	0.5575
Ratio of LSE-high /Rat skin	0.118	0.136	0.0521	0.0499
Ratio of LSE-high /Human skin	0.0896	0.141	0.0662	0.139

Skin	ISDN	ISMN	Flurbiprofen
<b>Diffusion parameter (1/s) <sup>a)</sup></b>			
LSE-high	$7.083 \times 10^{-3} (\pm 7.1 \times 10^{-3})$	$1.171 \times 10^{-3} (\pm 1.2 \times 10^{-3})$	$4.187 \times 10^{-3} (\pm 4.2 \times 10^{-3})$
Rat skin	$1.937 \times 10^{-4} (\pm 1.9 \times 10^{-4})$	$1.061 \times 10^{-4} (\pm 1.1 \times 10^{-4})$	$1.265 \times 10^{-4} (\pm 1.3 \times 10^{-4})$
Human skin	$1.481 \times 10^{-4} (\pm 1.5 \times 10^{-4})$	$1.319 \times 10^{-4} (\pm 1.3 \times 10^{-4})$	$1.499 \times 10^{-4}$
Ratio of LSE-high /Rat skin	36.6	11.0	33.1
Ratio of LSE-high /Human skin	47.8	8.88	27.9
<b>Partition parameter (cm) <sup>a)</sup></b>			
LSE-high	$1.398 \times 10^{-2} (\pm 1.4 \times 10^{-3})$	$1.422 \times 10^{-3} (\pm 1.3 \times 10^{-4})$	$4.944 \times 10^{-2} (\pm 3.7 \times 10^{-3})$
Rat skin	$1.908 \times 10^{-2} (\pm 3.3 \times 10^{-3})$	$1.070 \times 10^{-3} (\pm 7.3 \times 10^{-5})$	$6.392 \times 10^{-2} (\pm 3.3 \times 10^{-3})$
Human skin	$1.867 \times 10^{-2} (\pm 1.1 \times 10^{-3})$	$1.041 \times 10^{-3} (\pm 8.2 \times 10^{-5})$	$9.286 \times 10^{-2}$
Ratio of LSE-high /Rat skin	0.73	1.33	0.77
Ratio of LSE-high /Human skin	0.75	1.37	0.53
<b>Permeability coefficient (cm/s) <sup>b)</sup></b>			
LSE-high	$1.033 \times 10^{-4} (\pm 2.9 \times 10^{-5})$	$1.643 \times 10^{-6} (\pm 3.9 \times 10^{-8})$	$2.036 \times 10^{-4} (\pm 1.7 \times 10^{-5})$
Rat skin	$3.451 \times 10^{-6} (\pm 1.6 \times 10^{-7})$	$1.112 \times 10^{-7} (\pm 8.0 \times 10^{-9})$	$8.122 \times 10^{-6} (\pm 1.0 \times 10^{-6})$
Human skin	$2.767 \times 10^{-6} (\pm 1.7 \times 10^{-7})$	$1.376 \times 10^{-7} (\pm 1.3 \times 10^{-8})$	$1.386 \times 10^{-5}$
Ratio of LSE-high /Rat skin	29.9	14.8	25.1
Ratio of LSE-high /Human skin	37.3	11.9	14.9
<b>Apparent diffusion coefficient (cm<sup>2</sup>/s) <sup>c)</sup></b>			
LSE-high	$1.594 \times 10^{-6} (\pm 3.5 \times 10^{-7})$	$2.635 \times 10^{-7} (\pm 1.9 \times 10^{-8})$	$9.421 \times 10^{-7} (\pm 1.3 \times 10^{-7})$
Hairless rat skin	$4.595 \times 10^{-10} (\pm 9.0 \times 10^{-11})$	$2.517 \times 10^{-10} (\pm 3.7 \times 10^{-11})$	$3.001 \times 10^{-10} (\pm 3.0 \times 10^{-11})$
Human skin	$4.906 \times 10^{-10} (\pm 1.4 \times 10^{-12})$	$4.370 \times 10^{-10} (\pm 1.1 \times 10^{-11})$	$4.968 \times 10^{-10}$
Ratio of LSE-high /Rat skin	3214	1047	3139
Ratio of LSE-high /Human skin	3249	603.0	1896
<b>Apparent partition coefficient <sup>c)</sup></b>			
LSE-high	$0.9321 (\pm 9.3 \times 10^{-2})$	$0.09477 (\pm 8.5 \times 10^{-3})$	$3.296 (\pm 0.25 \times 10^{-1})$
Rat skin	$12.39 (\pm 2.1)$	$0.6946 (\pm 4.8 \times 10^{-2})$	$41.51 (\pm 2.1)$
Human skin	$10.26 (\pm 5.9 \times 10^{-1})$	$0.5720 (\pm 4.5 \times 10^{-2})$	$51.02$
Ratio of LSE-high /Rat skin	0.0752	0.136	0.0794
Ratio of LSE-high /Human skin	0.139	0.166	0.0460

a) Diffusion and partition parameter for each drug were obtained by curve fitting of the permeation data through skin to eq. 3.

b) Permeability coefficient was calculated by partition parameter x diffusion parameter.

c) Barrier thickness was set to 150  $\mu\text{m}$  for total epidermis of the LSE-high and 18.2  $\mu\text{m}$  and 15.4  $\mu\text{m}$  for stratum corneum of human and hairless rat skin for determination of the diffusion and partition coefficients.

(4) LSE-high、ヘアレスラットおよびヒト皮膚を介する薬物透過性の関係

薬物の LSE-high 透過性から *in vitro* ヒト皮膚透過性を見積もるためには、LSE-high とヒト皮膚の透過係数の相関性を知ることが非常に重要となる。

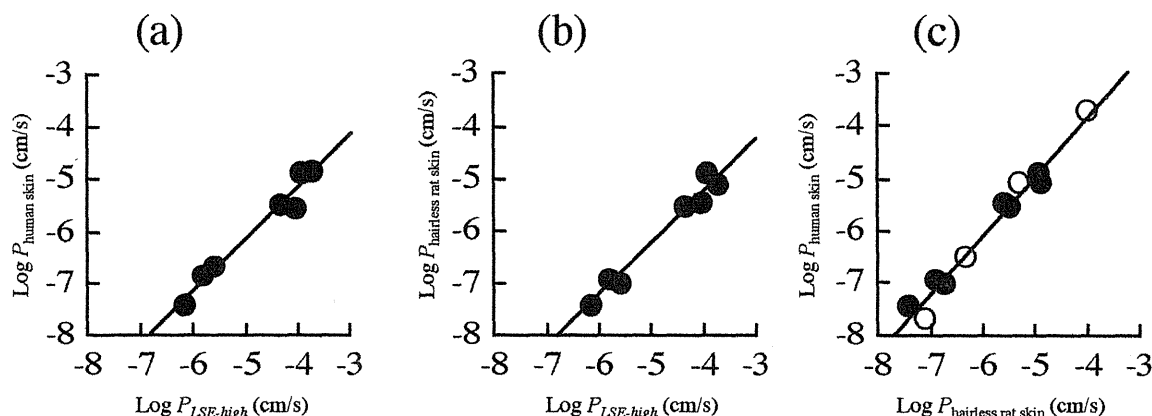


Fig. 4 Relationships of membrane permeability coefficient of drugs

Human skin vs. LSE-high,  $\log P_{\text{human skin}} = 0.991 \log P_{\text{LSE-high}} - 1.228$ ,  $r = 0.985$  (a), rat skin vs. LSE-high,  $\log P_{\text{rat skin}} = 1.018 \log P_{\text{LSE-high}} - 1.191$ ,  $r = 0.986$  (b), and rat skin vs. human skin,  $\log P_{\text{human skin}} = 1.017 \log P_{\text{rat skin}} + 7.821 \times 10^{-3}$ ,  $r = 0.991$  (c). The open symbols show the previous data 17)

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3).

Fig. 4 はそれぞれの膜を介した各薬物の  $P$  を比較したものである。図から明らかのように、ヒト皮膚とラット皮膚を介する  $P$  間と同様、LSE-high とヒト皮膚を介する  $P$ 、及びLSE-high とラット皮膚を介する  $P$  の間には良好な相関性が得られた。すなわち、ヒトとラット皮膚の各薬物の  $\text{Log}P$  間にはほとんど 1 : 1 の相関が得られたのに対し、LSE-high とヒトおよびラット皮膚間での  $\text{Log}P$  の関係は LSE-high が 1 オーダ高い方へシフトする形となった。また、ヒト皮膚の  $\text{Log}P$  は LSE-high の  $\text{Log}P$  を用いて以下のように表すことができた。

$$\text{Log}P_{\text{human skin}} = 0.992 \bullet \text{Log}P_{\text{LSE-high}} - 1.228 \quad (4)$$

この (4) 式を用いることで、LSE-high からヒト皮膚の薬物皮膚透過性を予測す

ることが可能であろう。

Morimoto らは類似した 17 種の薬物のヒト皮膚およびヘアレスラット皮膚透過性を試験し、 $P$  と  $Kow$  の関係を解析することによってヒトおよびラットの角質層は 2 つの領域または 2 つの薬物透過経路から構成されていることを証明した<sup>10)</sup>。Fig. 5 に各薬物の  $\text{Log}Kow$  と  $\text{Log}P$  の関係を示す。この図には、Morimoto らによって報告されたヒト皮膚とラット皮膚の皮膚透過係数のデータも含まれている。ヒト皮膚とヘアレスラット皮膚の  $\text{Log}P - \text{Log}Kow$  曲線はほぼ等しい挙動を示した。一方、LSE-high における  $\text{Log}P - \text{Log}Kow$  曲線は図の上方へシフトした。また、ANP の LSE-high 透過性は、他の 6 つの薬物のデータからわずかにはずれた。これは、ANP が本研究における最も水溶性が高い薬物であることから水溶性領域または経路が LSE-high の角質層にも存在する可能性を示唆していると思われる。

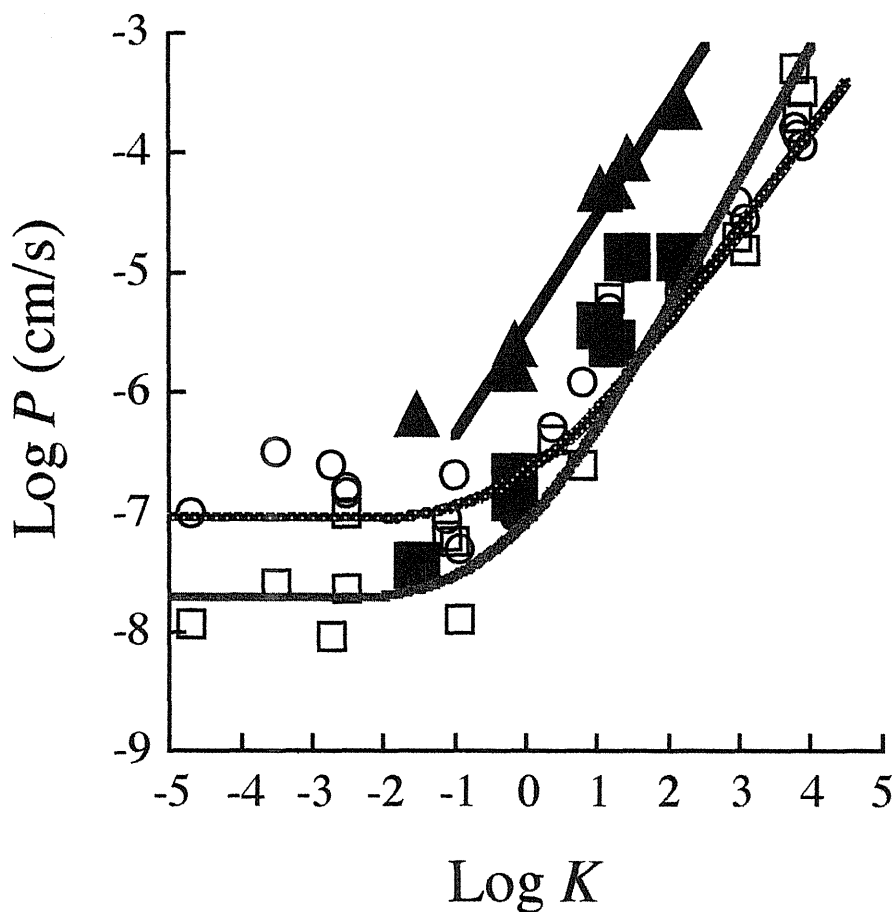


Fig. 5 Relationships between permeability coefficient for three-dimensional LSE-high, excised hairless rat or human skin and n-octanol/physiological saline – partition coefficient of drugs

▲, LSE-high; ●, ○, the excised hairless rat skin; ■, □, excised human skin. The open symbols show the previous data<sup>17)</sup>. Solid lines represent the estimated curve,  $P$  (cm/s) =  $1.158 \times 10^{-7} Kow^{0.821} + 1.29 \times 10^{-8}$  in human skin and  $P$  (cm/s) =  $2.158 \times 10^{-7} Kow^{0.0682} + 9.29 \times 10^{-9}$  in rat skin. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3).

## (5) 小括

本節に示した実験結果より、LSE-high は薬物のヒト皮膚透過性の評価材料として利用できること、また、薬物のヒト皮膚透過性を短時間で評価できることが示唆された。さらに、式 (4) を用いることで、LSE-high からヒト皮膚透過性を簡便に予測できることが示唆された。一方、LSE-high とヒト皮膚のバリアー機能および薬物透過特性に相違があることも明らかになった。

## 第 2 節 皮膚透過促進剤のスクリーニング材料としての LSE-high の有用性<sup>11)</sup>

TTS はすでに DDS の一つの柱となっている。しかし、皮膚は本来体外からの異物の侵入に対する保護バリアーとして機能しているため、消化管粘膜等に比べて一般に薬物の透過性は低い。したがって透過性が高い薬物を選択することが TTS を開発する上で極めて重要となる。

前章で述べたように薬物の低い皮膚透過性を改善するため、すでに種々の透過促進法が研究されている。なかでも、角質層のバリアーとしての性質を変えることによって薬物の皮膚透過性を増大させる機能を持つ皮膚透過促進剤を開発する試みが活発に展開されており、テルペン類<sup>12)</sup>、アルコール類<sup>13)</sup>、脂肪酸類<sup>14)</sup> などやそれらの併用<sup>15)</sup>により高い皮膚透過促進効果が得られることが証明されている。第 1 節において、著者は 7 種類の薬物を用いて LSE-high、ヒト皮膚およびラット皮膚透過性を検討し、ラットとヒト皮膚の 8 時間と LSE-high の 0.5 時間の薬物透過量がほぼ等しいことを明らかにした。そこで本章では、薬物の皮膚透過促進剤の効果を LSE-high を用いて評価した。得られた結果をヘアレスラットを用いた試験結果と比較し、LSE-high の有用性を考察した。なお、本実験では、前章で取り上げた薬物の中からそれぞれ水溶性と脂溶性の薬物である ISMN と ISDN を用いた。また、皮膚透過促進剤にはすでに有効性が確立されているアジピン酸ジイソプロピル、オレイン酸、1-メチル-2-ピロリドン、*l*-メントール、ミリスチン酸イソプロピル、ラウリルアルコールおよび *d*-リモネンを用いた。



(1) LSE-high とヘアレスラットの皮膚透過性に及ぼす皮膚透過促進剤の効果

Fig. 6 に各皮膚透過促進剤適用時の ISMN と ISDN 累積透過量-時間曲線を示す。各皮膚透過促進剤添加時の皮膚透過速度の促進効果および lag time の短縮効果がラット摘出皮膚と同様に LSE-high においても観察された。また、促進効果は ISDN より ISMN 透過で高い値が得られた。さらに、皮膚透過促進剤の効果は LSE-high よりラット皮膚の方が高く出る傾向が見られた。

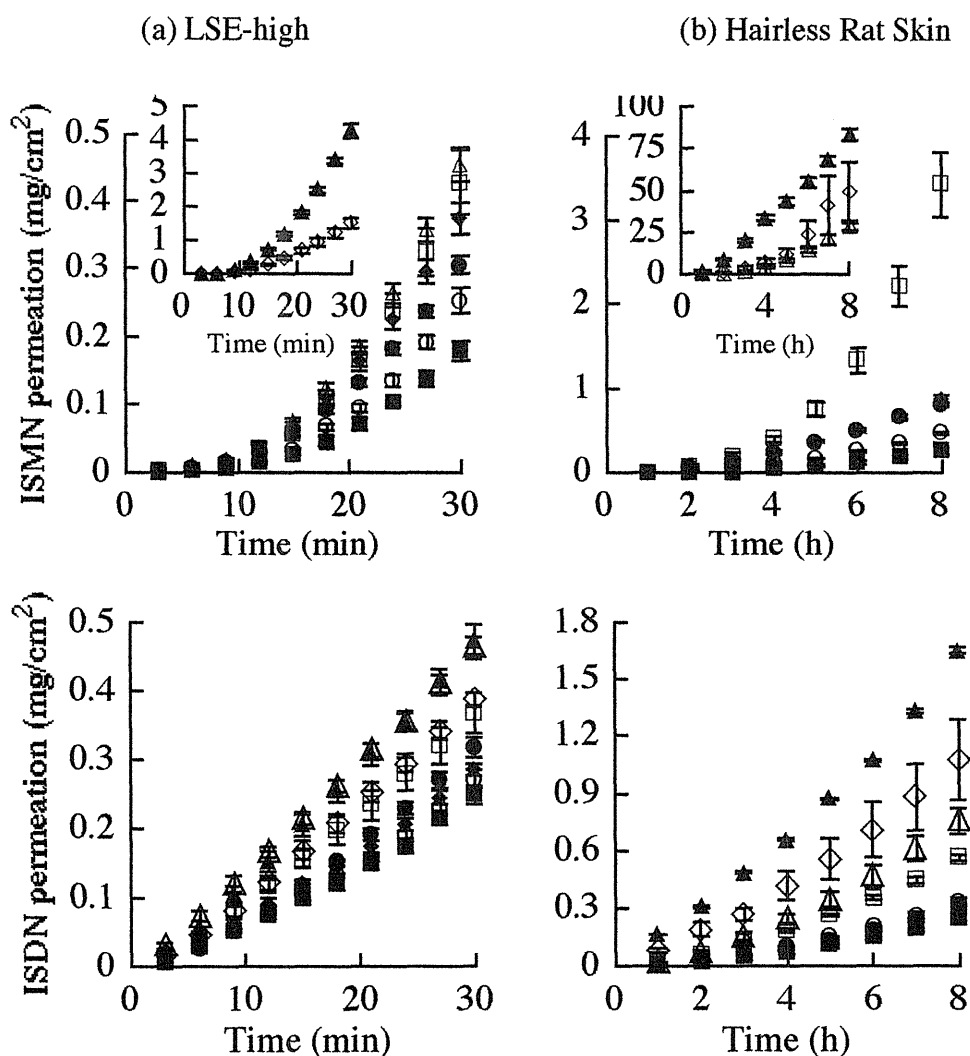


Fig. 6 Time course of changes in cumulative amount of ISMN and ISDN that permeated through LSE-high (a) and hairless rat skin (b)

●, isopropyl myristate; □, oleic acid; ○, diisopropyl adipate; ◆, 1-methyl-2-pyrrolidone; ▲, *l*-menthol; △, lauryl alcohol; ◇, *d*-limonen; ■, control, Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments.

### 3) LSE-high とヘアレスラットの皮膚透過性に及ぼす *l*-メントールの濃度の影響

Fig. 6 で最も促進効果の高かった *l*-メントールを用いて、促進効果に対する濃度依存性を調べた。Fig. 7 に *l*-メントール濃度に対する ISMN と ISDN の累積透過量を示す。ISMN では、LSE-high、ラット皮膚共に 3% まで濃度依存的に促進効果が増加したが、それ以上では減少した。一方、ISDN では LSE-high、ラット皮膚共に 10% まで濃度依存的に促進効果が増加した。

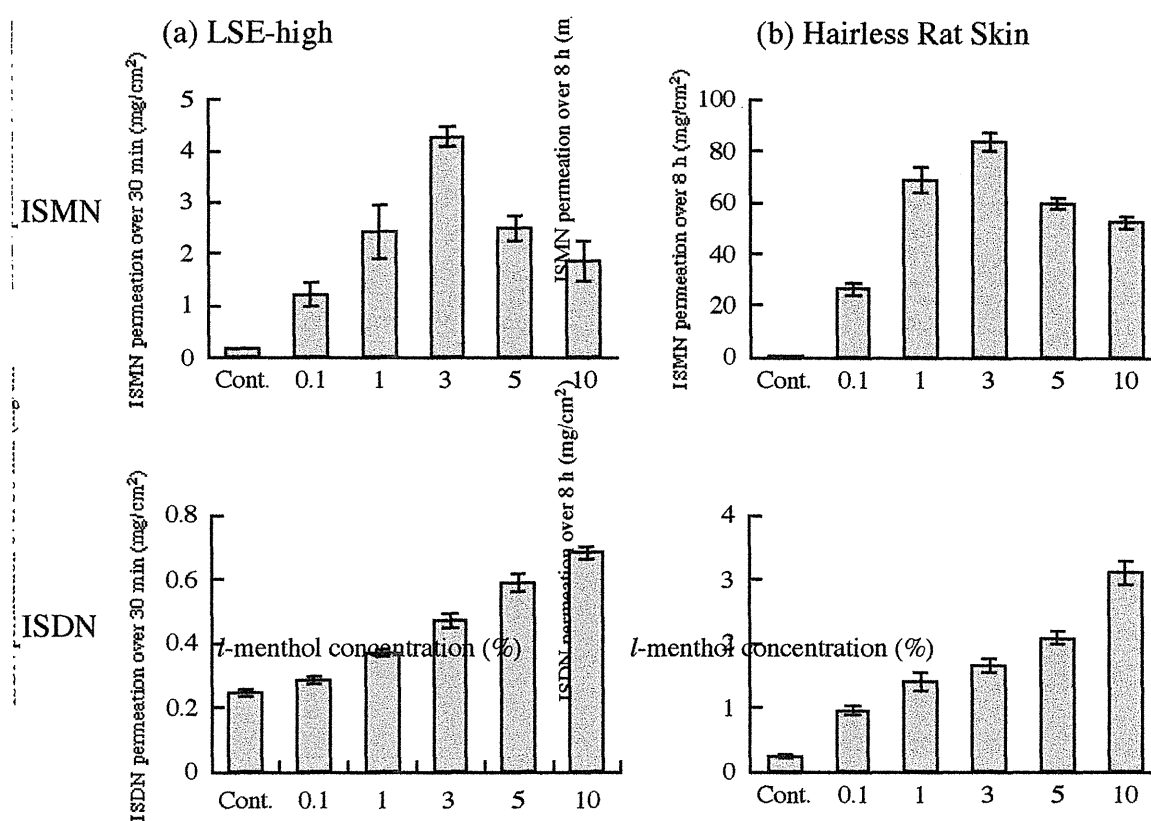


Fig. 7 Effect of different concentrations of *l*-menthol on the cumulative amount of ISMN and ISDN permeated through the LSE-high and hairless rat skin  
Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments.

4) LSE-high とヘアレスラットの皮膚透過性に及ぼす皮膚透過促進剤の効果の比較

LSE-high とヘアレスラット皮膚に関してコントロール（促進剤なし）に対する各促進剤併用時の薬物の定常状態 flux 比 (enhancing factor: EF) を求めた. Fig. 8 に両皮膚間の関係を示す. LSE-high とラット皮膚で ISMN、ISDN に対する各促進剤の促進効果のランクオーダはほぼ等しく、図中の直線は有意な相関性 (ISMN:  $r=0.944$ :  $p<0.05$ , ISDN:  $r=0.968$ :  $p<0.05$ ) を示した. また、用いた促進剤の中では *l*-メントール、*d*-リモネン、ラウリルアルコールそしてオレイン酸の順で促進効果が高かった.

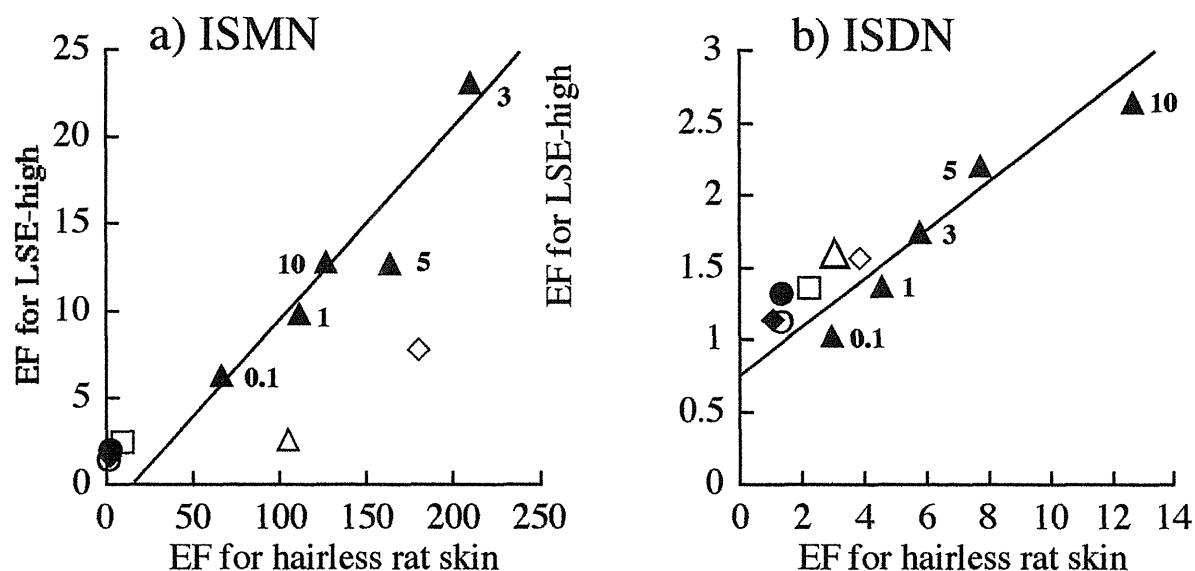


Fig. 8 Relationship between enhancing factor (EF) for LSE-high and hairless rat skin

●, isopropyl myristate; □, oleic acid; ○, diisopropyl adipate; ◆, 1-methyl-2-pyrrolidone; ▲, *l*-menthol; △, lauryl alcohol; ◇, *d*-limonen, Each value shows the applied *l*-menthol concentration.

## 5) 小括

LSE-high は、皮膚透過促進剤のスクリーニングに利用できることが示唆された。また、LSE-high を用いることで皮膚透過促進剤のスクリーニングを今までより短時間で評価できることが示唆された。さらに、LSE-high とラット摘出皮膚のバリアー機能の違いに注目すると、LSE-high と摘出皮膚を用いた促進剤の促進比から促進メカニズムの評価にもこの培養ヒト皮膚モデルが使用できると思われた。

### 第 3 節 においセンサー（水晶発振子）を用いた薬物の迅速定量法に関する検討<sup>16)</sup>

すでに第 1 章において、三次元培養ヒト皮膚モデルを用いて皮膚透過実験を行うことによってラット皮膚やヒト皮膚を介した薬物の皮膚透過性を約 10-20 倍速く評価できることを報告した<sup>1)</sup>。しかし、薬物の測定は一般に HPLC を用いて行うため、一連の透過サンプルの測定が終わるまでに数時間から数十時間を要する。したがって、本編の最終目標の 1 つである Combinatorial Chemistry や HTS に対応する皮膚透過性の迅速評価を可能にするためには皮膚透過した薬物の測定時間まで迅速化する必要があると思われる。

そこで、著者はエレクトロニクス分野でマイクロバランスとして知られている水晶発振子に着目した<sup>17,18)</sup>。これは水晶発振子の電極上に脂質膜を被覆し、その被覆した脂質に分子が吸着して、吸着量分だけ振動数の減少が起きるもので、すでにこの原理を利用して、匂い、苦味分子の測定センサーが現在実用化されている。

本節において、著者はニオイセンサーを用いて、薬物の皮膚透過量を迅速に定量できるかを評価した。

### 3) インドメタシンの水晶発振子への吸着

種々濃度のインドメタシンを含む 10% エタノール中に水晶発振子を入れ、水晶発振子の振動数変化 ( $\Delta F$ , Hz) を調べた. Fig. 9 にインドメタシンの吸着による水晶発振子の振動数の減少曲線を示す. 減少曲線は適用したインドメタシン濃度を増加するに従い大きく変動したが、すべての適用濃度において約 40 min で一定値となった. すなわち、バルク溶媒である 10% エタノールと水晶発振子に被覆した脂質 (塩化ジメチルジステアリルアンモニウム) 間でインドメタシンの分配が平衡になるのに約 40 min 要したと考えられた.

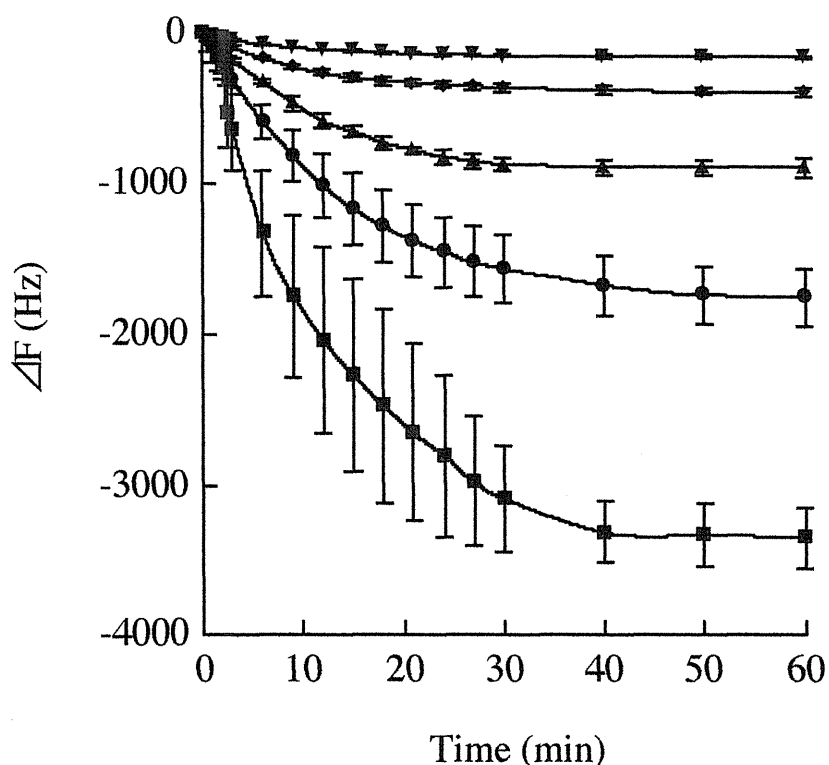


Fig. 9 Time course of change in frequency decrease in indomethacin in 10% ethanol measured by quartz crystal microbalance

Symbol (concentration of indomethacin):  $\blacktriangledown$ ; 4.17  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\blacklozenge$ ; 8.33  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\blacktriangle$ ; 16.67  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\bullet$ ; 25.0  $\mu\text{g/mL}$  and  $\blacksquare$ ; 33.3  $\mu\text{g/mL}$

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

そこで、振動数変化  $\Delta F$  と時間  $t$  との関係を調べたところ、試験したすべての濃度においてほぼ次式の関係がみられた。

$$\Delta F = A(1 - e^{-kt}) \quad (5)$$

ここで、 $A$  は定常状態時の振動数変化量、 $k$  は一次速度定数である。 $k$  はすべてのインドメタシン濃度においてほぼ等しく約  $0.08 \text{ min}^{-1}$  であった。さらに、60 min 後の  $\Delta F$  を定常状態時の値 ( $A$ ) とし、これと 10% エタノール中のインドメタシン濃度 (確認のため HPLC を用いて測定) との関係を調べた。その結果を Fig. 10a に示す。また、Fig. 10a に示した各点は水晶発振子に付着させた脂質 (塩化ジメチルジステアリルアンモニウム) 量がわずかに異なっていたので、膜脂質量で補正をした振動数変化についても調べた。結果を Fig. 10b に示す。インドメタシン濃度 ( $4.2\text{--}33.3 \mu\text{g/mL}$ ) と振動数変化の相関係数は Fig. 10a, b に示したデータでそれぞれ 0.959、0.977 であった。また、インドメタシン濃度が高いとき相関性が悪くなる傾向にあったので、4.2 から  $25.0 \mu\text{g/mL}$  間で相関係数を求めると、Fig. 10a, b でそれぞれ 0.982、0.998 であった。

以上より、膜脂質量で補正した振動数変化量とインドメタシン濃度 ( $4.2\text{--}25.0 \mu\text{g/mL}$ ) が比例することがわかった。そこで、以後は、この範囲内で検量線が成り立つものとしてインドメタシン濃度を求めることとした。

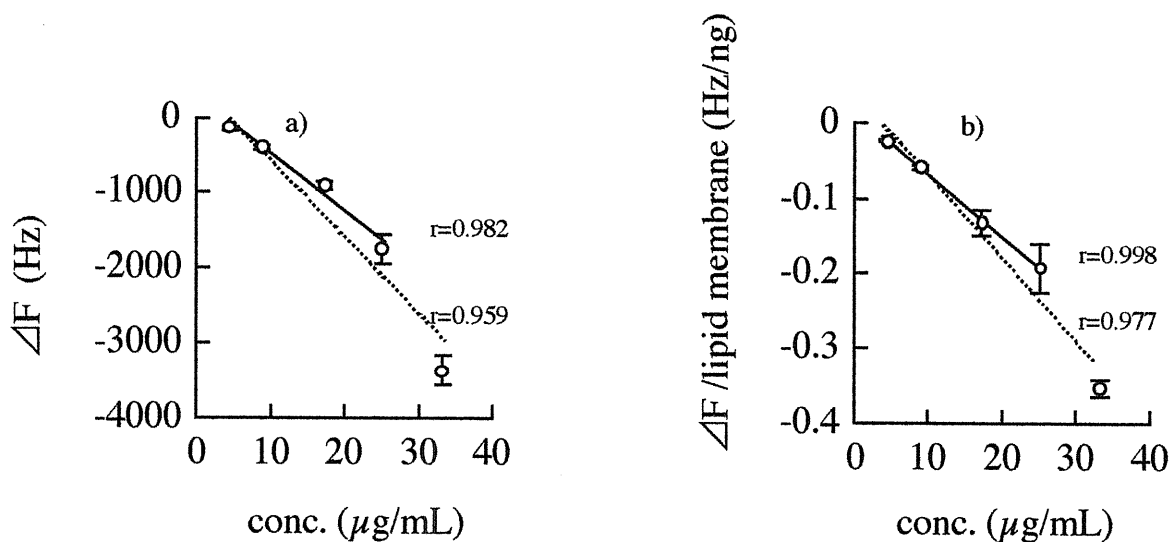


Fig. 12 Relation between frequency changes of quartz crystal microbalance and indomethacin concentration in 10% ethanol

a and b show the relation before and after correcting by lipid membrane mass, respectively. — ; from 4.2 to 25.0  $\mu\text{g/mL}$ , .....; from 4.2 to 33.3  $\mu\text{g/mL}$

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



#### 4) インドメタシンの皮膚透過性

次にインドメタシンの LDM 透過性を拡散セルを用いて調べた。なお、透過実験を 2 種類行い、一方は水晶発振子で、もう一方は HPLC でインドメタシンの膜透過量を測定した。Fig. 11 にインドメタシンの LDM 累積透過 - 時間曲線を示す。水晶発振子で評価した薬物の膜透過量 ( $\Delta$ ) を HPLC の値 ( $\circ$ ) と比較したところ、累積透過量は異なるものの定常状態透過速度はほぼ等しかった。なお、水晶発振子の 60 分以内のデータでは、検量線域より低いインドメタシン濃度であった。

水晶発振子で求めた累積透過量が低い原因について考察したところ、Fig. 11 に示したように、水晶発振子の振動数減少量が一定になるのに lag time が存在するためと思われた。そこで、水晶発振子で測定した累積皮膚透過量データ ( $Q'(t)$ ) と (6) 式を用いて、デコンボリューションにより真の累積皮膚透過量  $Q(t)$  を求めた。なお、 $Q'(t)$  と  $Q(t)$  の関係は次式で示される。

$$Q'(t) = \int_0^t Q(\theta)(1 - e^{-k(t-\theta)})d\theta \quad (6)$$

補正した結果  $Q(t)$  を Fig. 11 ( $\blacktriangle$ ) に示す。図から明らかなように、 $Q(t)$  は HPLC で測定した値とほぼ等しくなった。

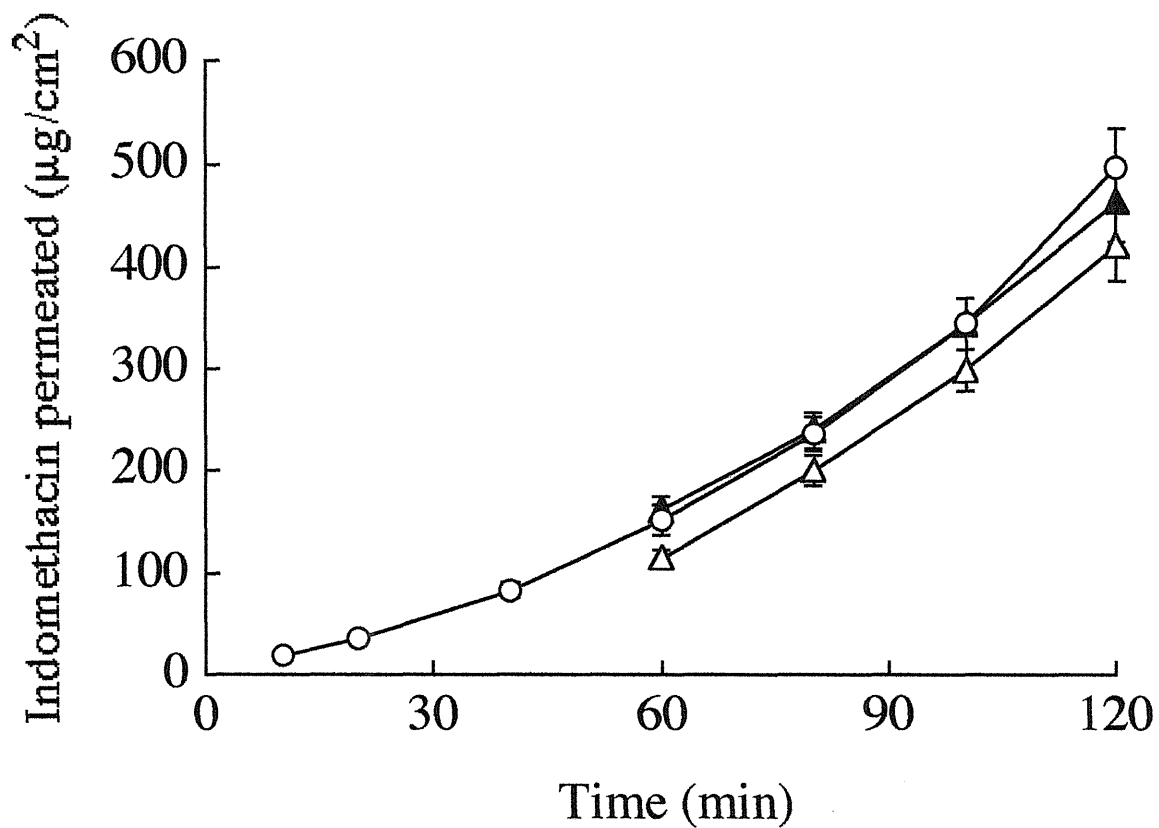


Fig. 11 Time course of changes in the cumulative amount of indomethacin permeated through living dermal model

○; HPLC, △; quartz crystal, ▲; quartz crystal corrected by deconvolution Each point represents the mean value  $\pm$  S.E. (n=3).

## 5) 小括

水晶発振子はインドメタシンの測定に関して低感度であったため初期の透過挙動を得ることができないなど、改善する余地は残されているものの、Caco-2<sup>19)</sup>、Calu-3<sup>20)</sup>、さらには LSE 等の培養組織膜の利用と並んで、生体膜透過挙動を迅速に評価する有用な方法となることが期待できるものと推察された。

## 第 2 章 三次元培養ヒト皮膚モデルの皮膚刺激性評価材料としての有用性

現代社会に生きる我々は、日常生活においてさまざまな化学物質と直接接触することが避けられない。なかでも、化粧品は、日常的に直接皮膚に使用するため、安全性の確保と皮膚刺激性の発現阻止に関しては細心の注意が必要とされている。また、治療薬の投与部位としても皮膚が頻繁に用いられ、適用部位局所の疾患の治療だけでなく、全身循環系に吸収されて薬効を発揮する経皮治療システム (TTS) が市場されている<sup>2)</sup>。したがって、このような外用剤中に含まれる薬物や添加物の皮膚刺激性にも注意しなければならない。特に、薬物の皮膚透過性を改善するために用いられた添加剤や電流によって皮膚刺激が増強する可能性があるため、十分な注意が必要である。近年では、皮膚刺激に関する消費者や患者の関心の高まりもあって、簡便かつ精度の高い皮膚刺激性の評価法の開発は今後ますます重要になることが予想される。

皮膚刺激は、外来の化学物質、熱あるいは紫外線といった物理的因子によってダメージを受けた角化細胞や繊維芽細胞から放出される炎症メディエータであるアラキドン酸代謝物やサイトカインなどによって生じる可逆的な炎症反応として定義されている<sup>21)</sup>。また、血液より浸出してくる炎症性の細胞も関与して、最終的に紅斑や浮腫などの皮膚反応が生じると考えられている<sup>22)</sup>。そこで、従来から、化学物質の目や皮膚に対する刺激性の評価法としてウサギやモルモットを用いた Draize 試験が行われてきた<sup>23, 24)</sup>。しかし、ヒトとの種差や動物愛護などの問題点が指摘され、ヒトに対する皮膚刺激性を正確に予想できる *in vitro* 代替法の開発が強く期待されるようになった。

一方、近年の組織培養工学の発展により、実際の皮膚の構造に極めて近い **three-dimensional cultured human skin model** が開発された<sup>25)</sup>。この皮膚培養細胞には血管系が存在しないため、ウサギやモルモットを用いた Draize 試験のように紅斑や浮腫が起こらない問題点もある<sup>26)</sup>。しかし、培養皮膚の皮膚刺激性は細胞内ミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素が 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を還元して生成するホルマザンを生細胞数 (率) とする MTT 試験<sup>27, 28)</sup> や細胞のニュートラルレッド取り込み量を生細胞数 (率) とするニュートラルレッド取り込み (NR) 試験法<sup>29, 30)</sup> を用いた細胞毒性試験から評価され、Draize

試験と *in vitro* MTT の試験結果は良い相関を示すことが報告されている。また、培養皮膚は炎症メディエータである IL-1 $\alpha$ 、IL-8 や PGE<sub>2</sub> 等を放出することも確認されている<sup>31-33)</sup>。

従来行われてきた Draize 試験や MTT 試験は、刺激物質を直接皮膚に適用した時の適用濃度とその時の皮膚刺激性について報告されているに過ぎず<sup>34, 35)</sup>、皮膚刺激発現部位での刺激物質濃度と皮膚刺激性の関係について検討した報告はほとんどない。そこで本編第 1 節では皮膚刺激性に及ぼす角質層の影響を評価した。また、第 2 節では toxicokinetics/toxicocodynamics の考え方にに基づき、刺激発現部位の濃度と皮膚刺激性の関係を検討して LSE-high の皮膚刺激性評価材料としての有用性を評価した。

## 第 1 節 皮膚刺激性に及ぼす角質層の影響

ヒトの表皮では絶えず細胞増殖と分化が繰り返され、新しく生成された表皮細胞はひたすら角化への分化を示す。また、その結果として角質層の新生と落屑が起こる。ヒト皮膚の角質層の厚みは、部位によって異なるものの平均約 20  $\mu\text{m}$  の薄層である。角質層では、ケラチン繊維を多く含有する扁平な角化細胞が緊密に重なり合い、その細胞間隙には多数の脂質二重層がラメラ構造をなし、角質層が外因性物質から生体を保護するための強力なバリアーとして作用している。そのため、皮膚刺激物質の皮膚透過性に対しても角質層は強力なバリアーとして作用している。また、皮膚刺激評価はウサギやモルモットなどの動物皮膚や三次元培養ヒト皮膚を用いる試験の他に、浮遊細胞を用いた MTT 試験や NR 試験の細胞毒性試験が行われている。しかし、浮遊細胞を用いた試験は、実際の *in vivo* 皮膚刺激性と相関しないという多くの報告がある<sup>36, 37)</sup>。これは、浮遊細胞には角質層のようなバリアーが存在しないためであると言われている。しかし、それに関わらず、実際に皮膚刺激性に対する角質層の影響を評価した報告はほとんどない。そこで、本章では皮膚刺激性に及ぼす角質層の影響を LSE を用いて速度論的に評価することとした。

### 3) 理論

LSE における生細胞数（率）は、LSE の表面に皮膚刺激物質が適用された後、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、角質層の透過抵抗を減少させる刺激物質を適用した場合、刺激物質によって角質層バリアーが破壊された後、急激に生細胞数（率）は速くなると仮定した。このような仮定の下、全層 LSE において皮膚刺激反応は以下の 2 つの式として表すことができる。

$$\text{when } 0 \leq t < T \quad V = 100 \cdot \exp(-k_1 \cdot t) \quad (7)$$

$$\text{when } t \geq T \quad V = 100 \cdot \exp(-k_1 \cdot T) \cdot \exp(-k_2 \cdot t) \quad (8)$$

ここで、 $V$  は時間  $t$  に対する LSE の生細胞率 (%),  $k_1$  と  $k_2$  ( $k_1 \leq k_2$ ) 各々適用初期と後期相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になる変換点を示す。

一方、角質層を剥離した LSE (stripped LSE) に刺激物質を適用した後の LSE の生細胞率は以下の式で表すことができる。

$$\text{when } t \geq 0 \quad V = 100 \cdot \exp(-k_{ss} \cdot t) \quad (9)$$

ここで、 $k_{ss}$  は stripped LSE における一次刺激速度定数である。しかしながら、試験終了時に、LSE の生存率が 0 になるとは限らないので、(7)、(8)、および (9) 式はそれぞれ (10)、(11)、および (12) の式とした。

$$\text{when } 0 \leq t < T \quad V = (100 - V_{\infty}) \cdot \exp(-k_1 \cdot t) + V_{\infty} \quad (10)$$

$$\text{when } t \geq T \quad V = (100 - V_{\infty}) \cdot \exp(-k_1 \cdot T) \cdot \exp(-k_2 \cdot t) + V_{\infty} \quad (11)$$

$$\text{when } t \geq 0 \quad V = (100 - V_{\infty}) \cdot \exp(-k_{ss} \cdot t) + V_{\infty} \quad (12)$$

ここで、 $V_{\infty}$  は刺激物質適用後の無限大時間の生存率を表す.



#### 4) 皮膚刺激性と時間の関係

Fig. 12 はオリーブ油適用後の時間に対する LSE の生存率を示す。オリーブ油適用後、24 時間まで生存率の低下は確認できなかった。このことからオリーブ油は皮膚に対して刺激性がないことが示唆された。

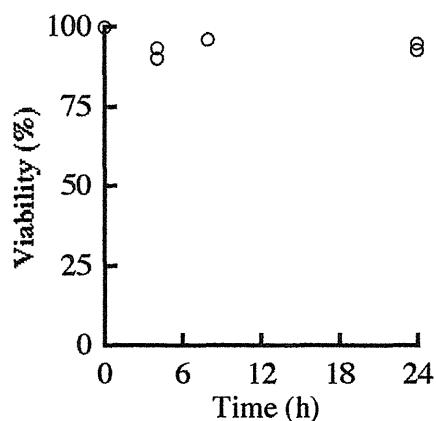


Fig. 12 Time course of the viability (%) of LSE after application of olive oil.

Fig. 13a, b, c は、3、10 および 30% の乳酸適用後の LSE の生存率をそれぞれ示す。また得られたデータを (11), (12) 式でフィッティングした理論曲線も併せて示す。3、10 および 30% 乳酸の  $ET_{50}$  値はそれぞれ 7.4、4.2 および 3.5 時間であった。興味深いことに、Fig. 13 に示されるように時間に対する生存率は 2 相性を示した。後半の減少曲線と比較して、初期の減少曲線は非常に遅かった。初期相から速い相に変わる変曲点は 3% 乳酸の時 6 時間であった。一方、10 および 30% 乳酸では約 2 時間であった。

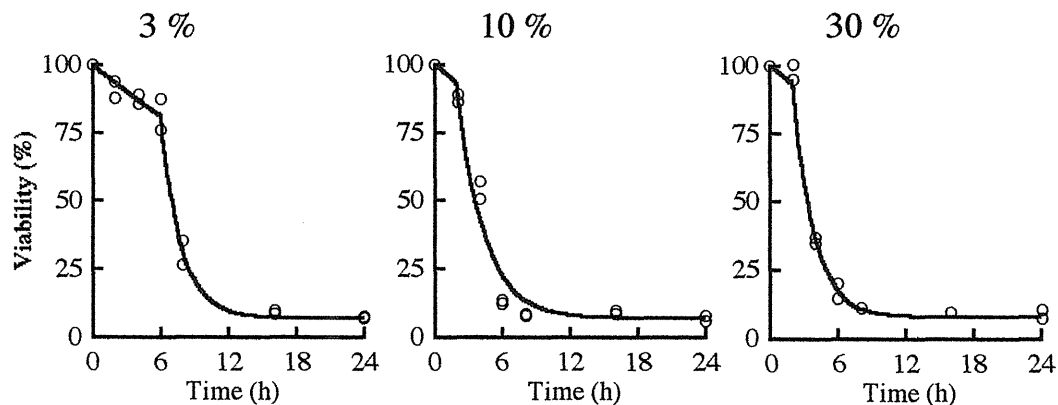


Fig. 13 Time course of the viability (%) of LSE after application of 3, 10 and 30% lactic acid

Lines show theoretical values.

Fig. 14a,b は 1 および 10% Triton X-100 適用後の時間に対する LSE の生存率と理論曲線を示す. 1 と 10% Triton X-100 の  $ET_{50}$  値はそれぞれ 2.2 と 0.9 時間であった. Triton X-100 においても乳酸と同様に 2 相性が観察された. 1% Triton X-100 適用の変曲点は約 2 時間であり、10% Triton x-100 は 0.5 時間よりも短かった.

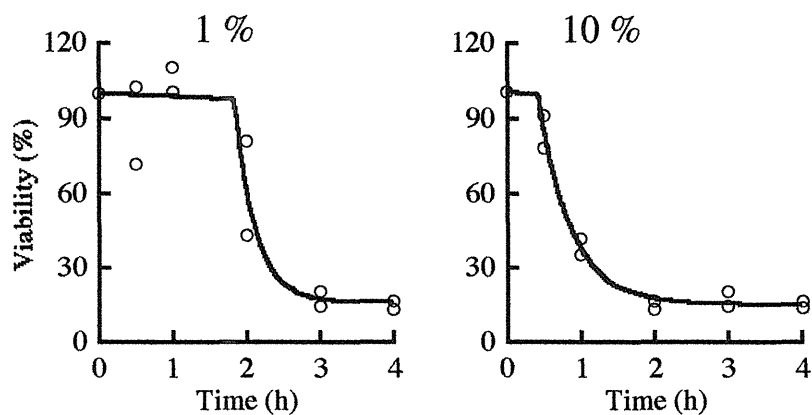


Fig. 14 Time course of the viability (%) of LSE after application of 1 and 10% Triton X-100

Lines show theoretical values.

Fig. 15a,b は 1、10% ラウリル硫酸ナトリウムの生存率と理論曲線の結果を示す。1% ラウリル硫酸ナトリウムの  $ET_{50}$  値は約 1.6 時間、10% ラウリル硫酸ナトリウムは 0.25 時間よりも短かった。これらの結果は、ラウリル硫酸ナトリウムが本研究で試験した皮膚刺激物質の中で最も刺激が強いことを示唆している。ラウリル硫酸ナトリウム処理においては明確な 2 相性が観察されなかった。

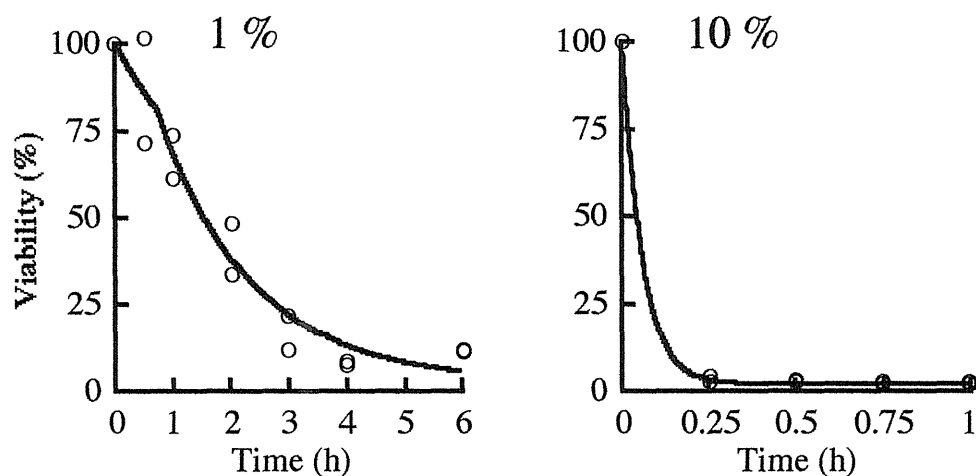


Fig. 15 Time course of the viability (%) of LSE after application of 1 and 10% sodium lauryl sulfate

Lines show theoretical values.

### (3) 2 相性について

各刺激物質の固有の細胞毒性は  $ET_{50}$  値によって明確にできるかもしれない。しかしながら、このパラメータでは皮膚刺激挙動の 2 相性を説明することができない。そこで、2 相性を説明するために角質層を除去した LSE を用いて試験した。

Fig. 16 は 3% 乳酸を適用した後の stripped LSE の時間に対する生存率とその理論曲線を示す。比較のために全層 LSE の結果も併せて再度示す。予想したように、stripped LSE に乳酸を適用した後の生存率は、時間に対して 1 つの一次減少速度で示すことができた。一方、全層 LSE では前述したように、生存率の挙動は 2 相性を示している。

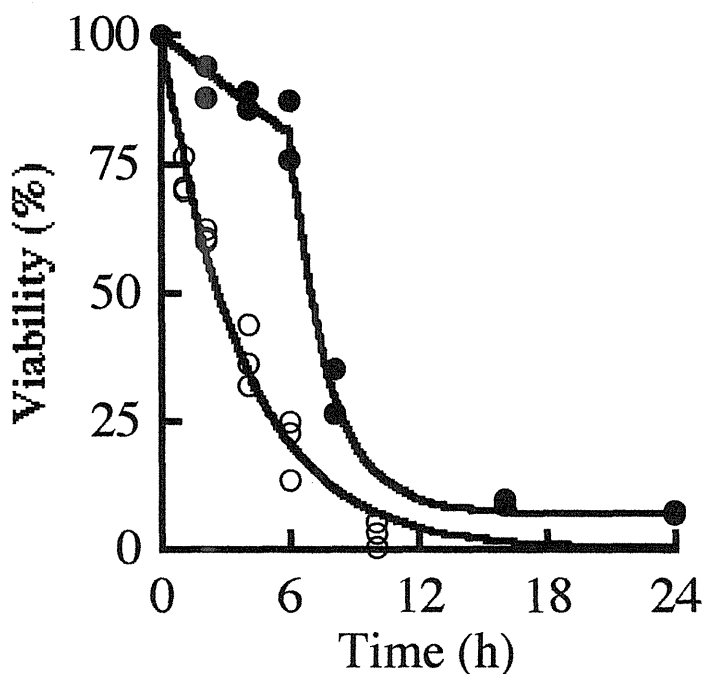


Fig. 16 Time course of the viability (%) of LSE after application of 3% lactic acid on the stratum corneum-stripped LSE

●, intact skin; ○, stripped skin.

Lines show theoretical values.

同様に 1% ラウリル硫酸ナトリウムも stripped LSE を用いて評価した。その結果を Fig. 17 に示す。同様に全層 LSE での結果も再度示す。Stripped LSE の皮膚刺激性（生存率）はラウリル硫酸ナトリウムの適用後、1 つの一次減少速度で表現された。

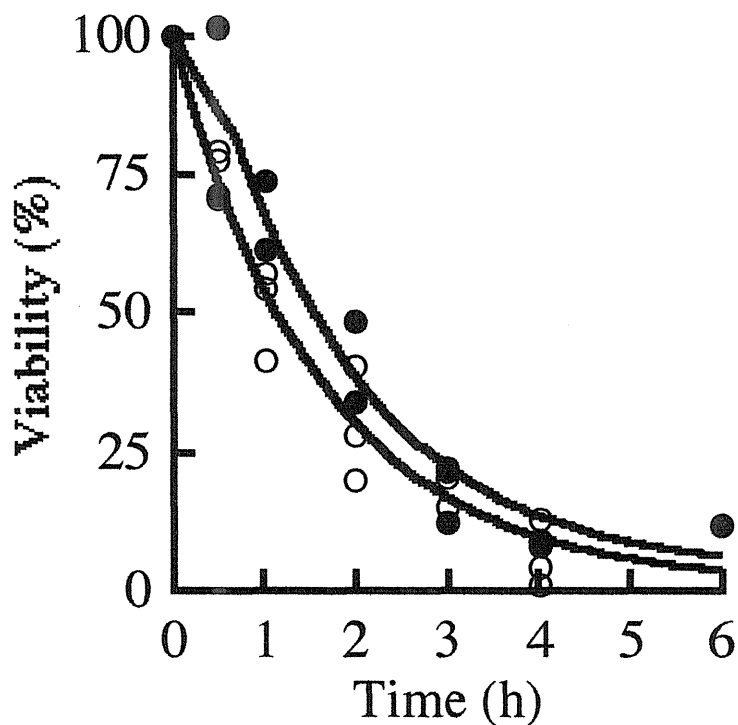


Fig. 17 Time course of the viability (%) of LSE after application of 1% sodium lauryl sulfate on the stratum corneum-stripped LSE

●, intact skin; ○, stripped skin.

Lines show theoretical values.

#### (4) 速度論的パラメータの解析

細胞毒性の時間経過は理論中で説明した 2 相モデルを用いて速度論的に解析した。Figs. 13-17 中の曲線はデータを (7) - (12) 式にフィッティングして得られた理論曲線を示す。得られた各パラメータを Table 3 に示す。なお、オリーブ油では生存率の低下が認められなかったため、また、10% ラウリル硫酸ナトリウムは 2 番目の測定値が  $V_{\infty}$  であったためフィッティングは行わなかった。

最初に、stripped LSE の生存率を (13) 式を用いて評価した。3% 乳酸及び 1% ラウリル硫酸ナトリウム適用による  $k_{ss}$  は、それぞれ  $0.265$  および  $0.683 \text{ h}^{-1}$  であった。また、全層 LSE の生存率も評価した。 $k_1$ 、 $k_2$  および  $T$  値は、3% 乳酸適用で、それぞれ、 $0.0382 \text{ h}^{-1}$ 、 $0.564 \text{ h}^{-1}$  および 6.0 時間、1% ラウリル硫酸ナトリウム適用で、それぞれ  $0.290 \text{ h}^{-1}$ 、 $0.614 \text{ h}^{-1}$  および 0.686 時間であった。得られた  $k_2$  は 3% 乳酸と 1% ラウリル硫酸ナトリウムで処理した時の  $k_{ss}$  と近い値であり、全層 LSE の後の刺激速度は stripped LSE の刺激速度に類似していることが示唆された。また、この速度定数がラウリル硫酸ナトリウムの方が乳酸より速いため、ラウリル硫酸ナトリウムは乳酸よりも強い刺激を持つことを示している。LSE の生存率において、より高濃度の乳酸 (10% と 30%) の影響も解析した。10% と 30% 乳酸処理後の  $k_2$  と  $T$  値は、3% 乳酸で得られた  $k_1$  値  $0.0382 \text{ h}^{-1}$  を用いて算出した。10% の時に  $k_2$  と  $T$  値はそれぞれ  $0.423 \text{ h}^{-1}$ 、1.91 時間であり、30% の時は  $0.561 \text{ h}^{-1}$ 、2.0 時間であった。 $T$  値は乳酸の濃度が 3% から 10% まで増加するにつれ短くなった。1% Triton X-100 適用時の  $k_1$  と  $k_2$  および  $T$  値はそれぞれ 0、 $3.52 \text{ h}^{-1}$  および 1.83 時間であった。10% Triton X-100 は  $k_1$  に 1% で得られた  $0 \text{ h}^{-1}$  を用いて計算したところ  $2.27 \text{ h}^{-1}$  および 0.41 時間であった。

Table 3 Kinetic parameters for decrease in LSE viability

Irritant	concentration	full-thickness skin			stripped skin
		$k_1$	$T$	$k_2$	$k_{ss}$
Olive oil	100%	0			nd
Lactic acid	3%	0.0382	6.000	0.564	0.264
	10%	0.0382	1.905	0.423	nd
	30%	0.0382	2.000	0.560	nd
Sodium lauryl sulfate	1%	0.2902	0.686	0.614	0.683
	10%				
Triton X-100	1%	$\cong 0$	1.829	3.523	nd
	10%	$\cong 0$	0.411	2.266	nd

nd: not determined

## 第 2 節 Draize 皮膚刺激性試験の代替法としての LSE-high を用いた MTT 試験の有用性<sup>38)</sup>

薬物や製剤の一次皮膚刺激性の評価にヒトのパッチテストやウサギやモルモットの Draize 試験が行われている<sup>23, 24)</sup>。皮膚の Draize 試験は、刺激物質や紫外線といった物理的因子によってダメージを受けた角化細胞や繊維芽細胞から放出されるアラキドン酸代謝物やサイトカインのような炎症メディエータ、また、血液より浸出してくる炎症性の細胞も関与して、最終的に現れる紅斑や浮腫などの皮膚反応をスコア化したものであり、一般的に広く用いられている<sup>23, 24, 34, 35)</sup>。しかし、Draize 試験には種差や動物愛護などの問題点が指摘され、ヒトに対する皮膚刺激性を正確に予想できる代替法の開発が強く期待されるようになった。



### 3) 理論

一般に皮膚刺激性は刺激物質の適用濃度に依存するが、より直接的には皮膚刺激部位における刺激物質濃度に関係すると考えられている。また、一般に皮膚刺激発現部位は皮膚最上層である角質層ではなく生きた表皮と真皮中にあると考えられる。しかし、界面活性剤などの刺激性物質の生きた表皮と真皮中の濃度は極めて測定しづらい。そこで、本実験では、刺激物質の皮膚透過性から皮膚刺激発現部位（生きた表皮と真皮）中での刺激性物質濃度を拡散則を用いて算出することとした。

いわゆる角質層を除去した *stripped skin* に刺激性物質を適用したとき、生きた表皮と真皮の平均皮膚濃度  $C$  は Fick の拡散則から以下の式で求められる。

$$C = \frac{K_{ved}}{2} \cdot C_v \quad (13)$$

ここで、 $K_{ved}$  は基剤と生きた表皮と真皮の分配係数、 $C_v$  は基剤中の刺激物質濃度である。一方、*intact skin* を用いたとき、生きた表皮と真皮中の刺激物質平均濃度  $C$  は全層皮膚の抵抗に対する真皮の抵抗の比  $RR$  を用いて以下のとして表すことができる。

$$C = RR \cdot \frac{K_{ved}}{2} \cdot C_v \quad (14)$$

但し  $RR$  は以下の式で示される。

$$RR = \frac{P_{sc}}{P_{sc} + P_{ved}} \quad (15)$$

ここで、 $P_{sc}$  と  $P_{ved}$  は刺激物質の角質層と生きた表皮と真皮の透過係数を示す。なお、角質層と生きた表皮と真皮の透過抵抗  $R_{sc}$  と  $R_{ved}$  はそれぞれ透過係数の逆数で示される。

上に示した方法を用いて、適用濃度から生きた表皮と真皮中濃度を算出するためには、 $K_{ved}$  の値が必要である。そこで、 $K_{ved}$  を刺激物質の皮膚透過挙動から、以下の方法で算出した。透過実験時において真皮側はシンク条件が成り立ち、さら

に stripped LSE-high 及び stripped モルモット皮膚が生きた表皮と真皮からなる 1 層膜モデルであるという仮定が成り立つとすると、時間  $t$  における単位面積当たりの生きた表皮と真皮を介した薬物透過量  $Q$  は以下の式で示される。

$$Q = K_{ved} L_{ved} C_v \left[ \frac{D_{ved}}{L_{ved}^2} t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-\frac{D_{ved}}{L_{ved}^2} n^2 \pi^2 t\right) \right] \quad (16)$$

ここで、 $D_{ved}$  は刺激性物質の生きた表皮と真皮中の拡散係数、 $L_{ved}$  は生きた表皮と真皮の厚さを示す。薬物の分配パラメータ ( $K_{ved} \cdot L_{ved}$ ) は皮膚透過データを非線形最小二乗法を用いて (16) 式にあてはめて求めた。なお、LSE-high とモルモット皮膚の  $L_{ved}$  は文献<sup>4)</sup>を参照してそれぞれ 530 と 1130  $\mu\text{m}$  とした。

一方、toxicokinetics/toxicodynamics の考え方に従えば、皮膚刺激性と皮膚刺激発現部位濃度の関係は、しばしば以下に示す (17) 式の *E<sub>max</sub> model* (Hill 式) で評価できることが示されている<sup>39)</sup>。

$$I = \frac{I_{\max} \cdot C^\gamma}{IC_{50}^\gamma + C^\gamma} \quad (17)$$

ここで、 $I$  は皮膚刺激度、 $I_{\max}$  は最大皮膚刺激度、 $C$  は皮膚刺激発現部位刺激物質濃度、 $IC_{50}$  は 50% 皮膚刺激発現濃度、そして、 $\gamma$  は形状因子である。

#### 4) 塩化セチルピリジニウムの皮膚透過性パラメータの算出

Fig. 18a, b はそれぞれ LSE-high とモルモット皮膚を介した CPC の累積皮膚透過量 - 時間曲線を示す。LSE-high とモルモット皮膚共に intact skin (●) よりも stripped skin (○) で lag time の短縮と、その時の偽定常状態 flux の増加が観察された。

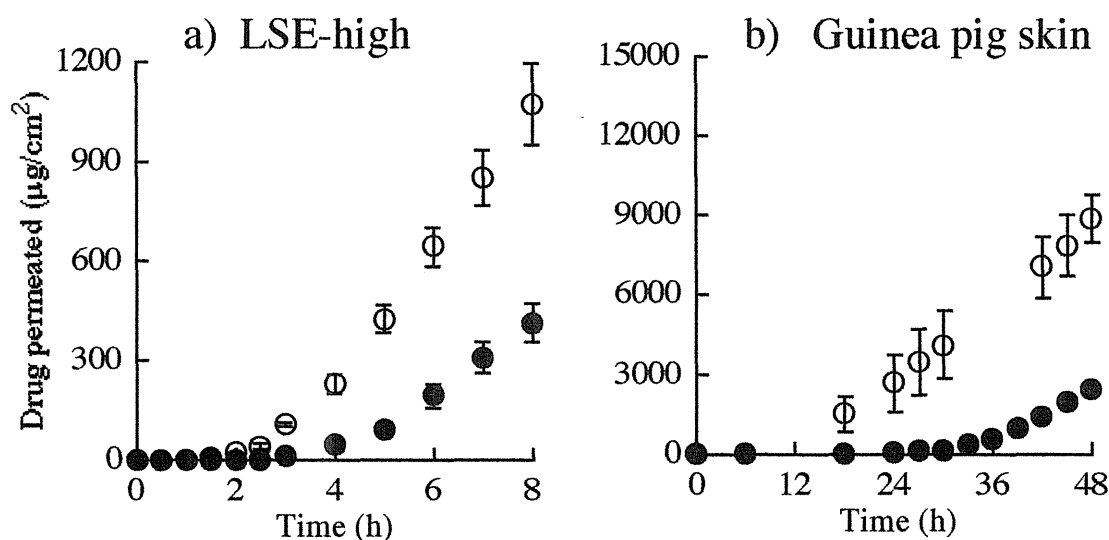


Fig. 18 Time course of changes in the cumulative amount of CPC that permeated through LSE-high (a) and guinea pig skin (b)

(●), intact skin; ○, stripped

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments.

次に LSE-high とモルモット皮膚を角質層と生きた表皮と真皮からなる 2 層膜構造と仮定し、生きた表皮と真皮層における透過係数  $P_{ved}$  を (4) と (17) 式を用いて算出した。また各皮膚膜を介する CPC の定常状態 flux から、(1) 式を用いて  $P_{ss}$  を求めた。さらに、(15)、(16) 式を用いて  $RR$ 、 $K_{ved}$  を算出した。それらの結果を Table 4 にまとめて示す。

Table 4 Permeation coefficient of CPC in each skin layer and permeation parameter ( $RR^a$ ) and  $K_{ved}^b$ )

	LSE-high	guinea pig
$P_{tot}$ ( $\times 10^{-6}$ cm/s)	2.569	0.8891
$P_{sc}$ ( $\times 10^{-6}$ cm/s)	4.58	2.249
$P_{ved}$ ( $\times 10^{-6}$ cm/s)	5.851	1.471
$RR$	0.439	0.604
$K_{ved}$	11.291	5.487

<sup>a)</sup>  $RR$  was calculated to eq.16

<sup>b)</sup>  $K_{ved}$  was obtained by curve fitting of the permeation data through skin to eq. 17, then  $ved$  thickness was set to 530  $\mu$ m for LSE-high and 1130  $\mu$ m for guinea pig<sup>40)</sup>

LSE-high とモルモット皮膚の皮膚透過係数を比較すると、LSE-high の方が  $P_{tot}$  は 2.8 倍、 $P_{sc}$  は 2.0 倍、 $P_{ved}$  は 4.0 倍大きかった。  $RR$  は LSE-high で 0.439、モルモット皮膚で 0.604 と計算されたことから、CPC の皮膚透過には、角質層だけでなく、生きた表皮と真皮層の抵抗も関与していることが明らかとなった。また、 $K_{ved}$  は LSE-high の方がモルモット皮膚よりも約 2 倍大きかった。

### (3) Draize 試験と MTT 試験結果の比較

モルモット皮膚の intact skin と stripped skin に CPC を適用した時の生きた表皮と真皮中の CPC 濃度に対する Draize score (Fig. 19) と MTT 試験による死細胞% (Fig. 20) を示す. なお、実線は Hill 式を用いてカーブフィッティングしたものである.

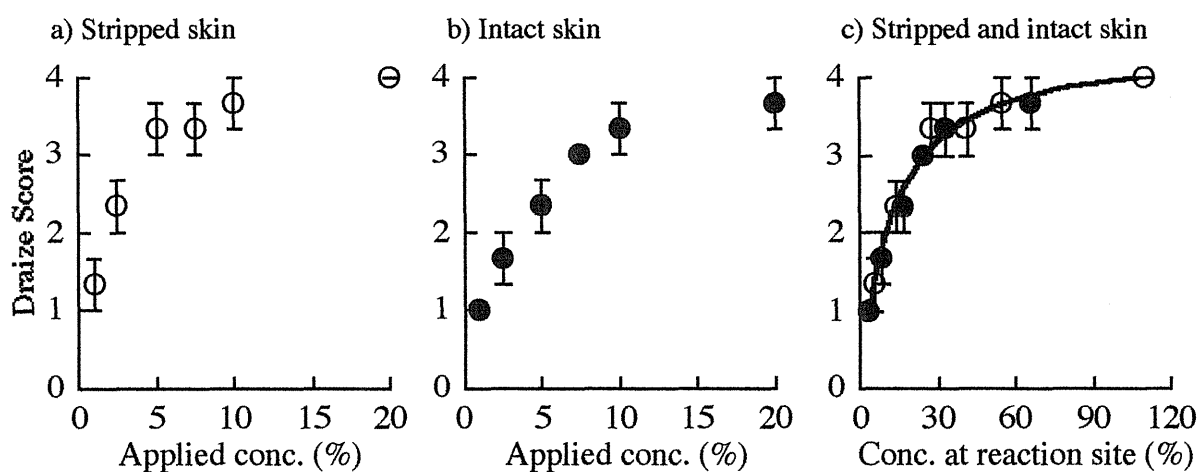


Fig. 19 Dose-response curve for the Draize score and CPC concentration applied (a,b) and at the reaction site (c) in guinea pig skin

a and b show the results for the stripped skin and intact skin, respectively.

●, intact skin; ○, stripped skin; solid line, fitting line to Hill equation

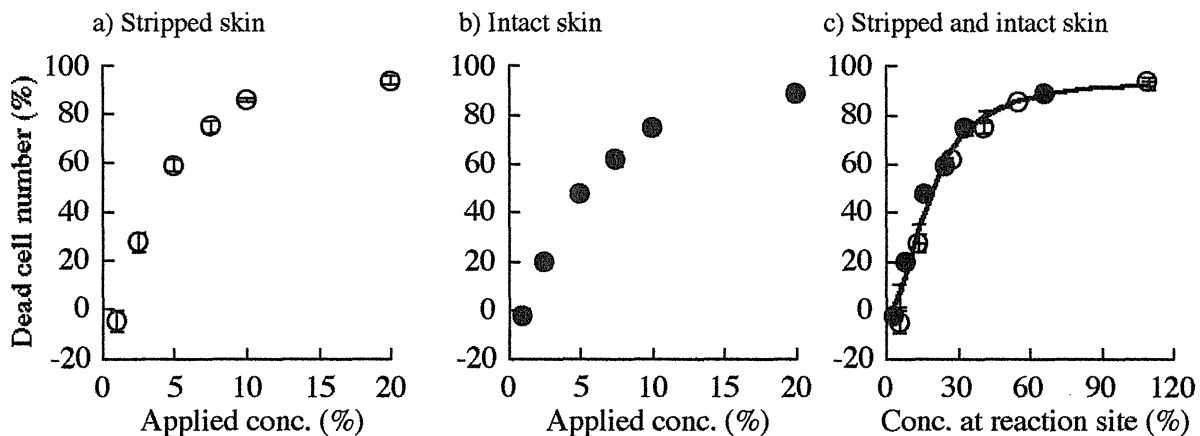


Fig. 20 Dose-response curve for percent of dead cell number in the MTT assay and CPC concentration applied (a,b) and at the reaction site (c) in guinea pig skin  
a and b show results for the stripped skin and intact skin, respectively.

●, intact skin; ○, stripped skin; solid line, fitting line to Hill equation

Table 5 に得られたパラメータを示す。Fig. 19 と Fig. 20 の実線のプロットが極めて一致していることから、stripped skin と intact skin の実験で、適用濃度が異なっても皮膚中濃度が同じ場合では、ほぼ同じ Draize score と死細胞% が得られることが明らかとなった。また、Draize score または死細胞 % と皮膚中濃度との関係は stripped skin と intact skin 共に Hill 式でよく表現できることがわかった。

Table 5 Skin irritation parameters for CPC on MTT assay and Draize score

(a) MTT		
	LSE-high	Guinea pig
$I_{max}$	93.464	94.148
$IC_{50}$	1.315	18.868
$\gamma$	1.411	2.138
(b) Draize		
$I_{max}$	—	4.466
$IC_{50}$	—	12.312
$\gamma$	—	1.043

Draize 試験結果と同様、MTT 試験でも刺激部位濃度が高くなるにつれて皮膚刺激性に飽和が見られた。さらに、Draize 試験と MTT 試験の  $IC_{50}$  値は 12.0、18.9 と比較的近い値となることがわかった。Fig. 23 にモルモット皮膚を用いた MTT 試験と Draize 試験の相関性を示す。図から得られる関係式は、

$$\text{Draize score} = 2.820 \times 10^{-2} \cdot \% \text{ fraction of dead cell number} + 1.272 \quad (18)$$

であり、相関係数は 0.986 であった。

以上より MTT 試験は Draize 試験の代替法として用いることができることが明らかとなった。

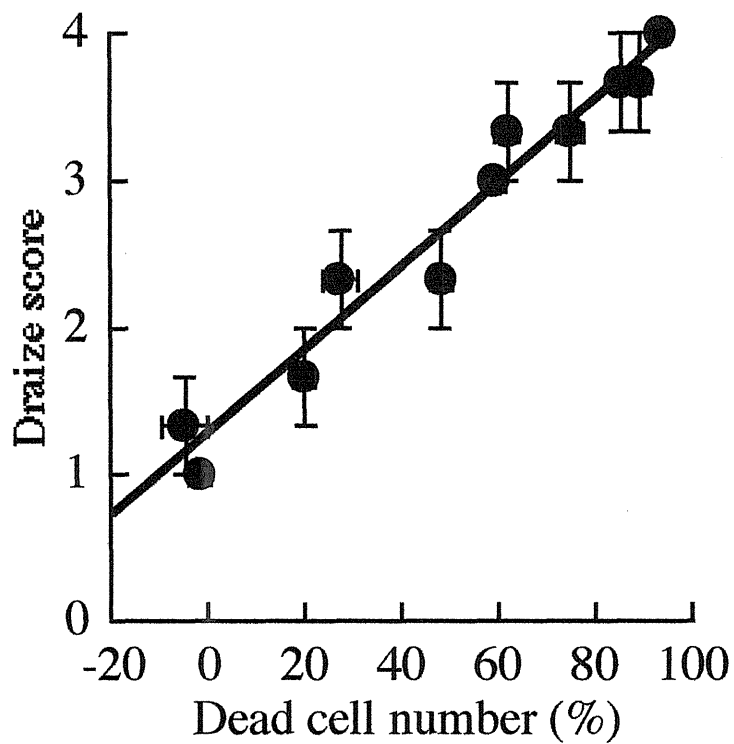


Fig. 21 Relationships between the Draize score and percent of dead cell number in the MTT assay using guinea pig skin

Solid lines represent the estimated curve,

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



次に LSE-high とモルモット皮膚の皮膚刺激における相関性を評価するため LSE-high を用いて MTT 試験を行った. Fig. 22 に intact 及び stripped の LSE-high を用いた MTT 試験結果を示す. 実線は Hill 式を用いてカーブフィッティングした結果である. LSE-high もモルモット皮膚と同様に RR を用いることにより、刺激部位濃度と皮膚刺激性の関係を評価できることが示唆された. また、モルモット皮膚の MTT 試験結果と LSE-high の MTT 試験結果は類似したパターンを示したことより、LSE-high の MTT 試験もモルモット皮膚の Draize 試験に替わる方法として考えられることが示唆された.

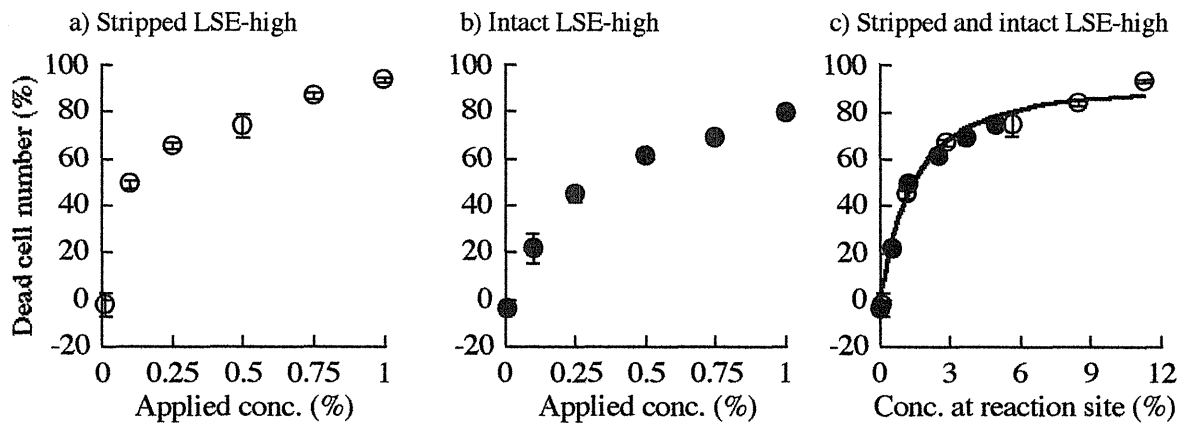


Fig. 22 Dose-response curve for percent of dead cell number in the MTT assay and CPC concentration applied (a,b) and at the reaction site (c) in LSE-high  
a and b show results for the stripped skin and intact skin, respectively.

●, intact skin; ○, stripped skin; solid line, fitting line to Hill equation

しかし、LSE-high を用いた時の、皮膚刺激度と刺激部位濃度との相関 (Fig. 22) では、モルモット皮膚を用いた時の結果と  $I_{max}$  と  $\gamma$  は同じ値であったが、 $IC_{50}$  値は異なった。これは、CPC がモルモット皮膚中の細胞透過性より LSE-high の細胞透過性が高いため、低濃度でも高い死細胞率が得られたものと考えられた。また、CPC の皮膚への分配係数も LSE-high の方がモルモット皮膚よりも大きかったことも影響しているものと考えられた。そこで、LSE-high の刺激部位濃度にモルモット皮膚の  $IC_{50}$  を LSE-high の  $IC_{50}$  で割った比を用いて補正した。その結果を Fig. 25 に示す。図より明らかなように LSE-high とモルモット皮膚はほとんど一致する結果となった。

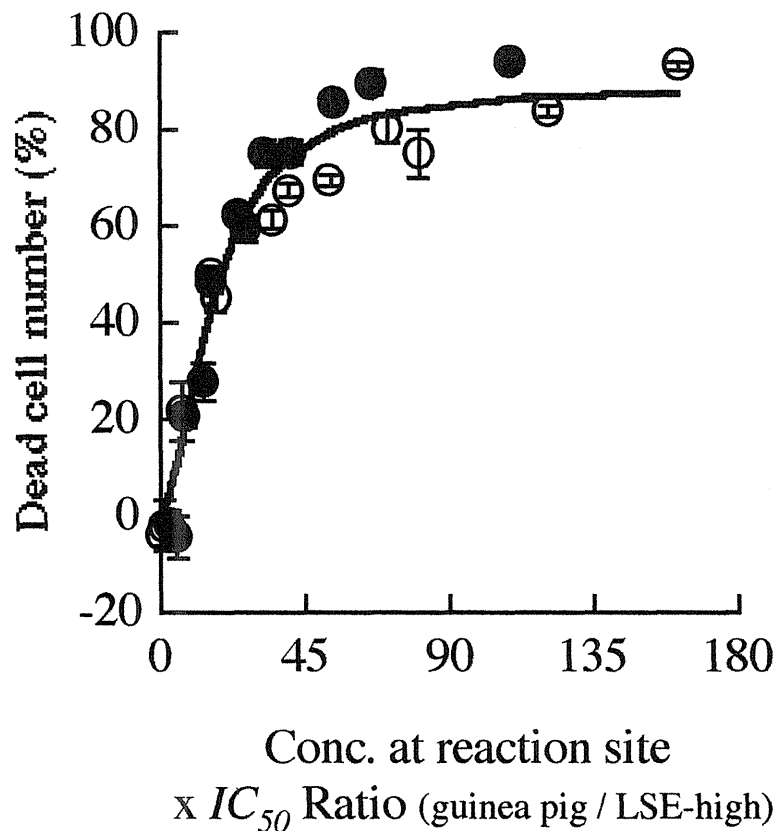


Fig. 23 Relationship between irritation scores from the MTT assay in guinea pig and LSE-high

●, Guinea pig skin; ○, LSE-high; solid lines, fitting line CPC concentration in the viable tissue of LSE-high was corrected by  $IC_{50}$  in guinea pig /  $IC_{50}$  in LSE-high

## (5) 小括

LSE-high を用いた MTT 試験がモルモット皮膚やウサギを用いた Draize 試験の代替法になる可能性が示唆された。また、皮膚刺激性は皮膚透過性を考慮し、皮膚刺激部位濃度を用いて Hill 式で表せることが示唆された。今回得られた結果は化粧品材料や医薬品添加物の刺激性評価の新規方法として有用と考える。

## おわりに

皮膚適用製剤の開発では、ヒト皮膚透過性やヒト皮膚刺激性を測定または推定することが重要である。しかし、*in vivo* ヒト試験は臨床試験まで待たなければならず、*in vitro* 摘出皮膚試験は組織摘出に係わる倫理的な問題のため全ての国で行える状況ではない。また、実験動物の使用自体も動物愛護の観点から問題視され、ヒトまたは動物皮膚を介した薬物透過性や皮膚刺激性の代替法の確立が急がれている。

そこで、著者は、ヒト皮膚または実験動物の摘出皮膚の代替膜に LSE-high がなりうると考え、次の項目について検討した。

- LSE-high の薬物の透過性について
- LSE-high を用いた皮膚透過促進剤のスクリーニングについて
- LSE-high と水晶発振子を用いた皮膚透過性の迅速定量法の確立について
- 皮膚刺激性に及ぼす角質層の影響について
- LSE-high を用いた皮膚刺激性評価について

以下にその要約を示す。

### 1) LSE-high の薬物の透過性について

LSE-high、ヒト摘出皮膚およびヘアレスラット摘出皮膚を用い、極性の異なる 7 種の薬物の透過性を比較した。その結果、LSE-high を介した 0.5 時間の累積薬物量と、ヒトやラット摘出皮膚を介した 8 時間の累積透過量がほぼ等しかった。また、薬物の LSE-high とヘアレスラット皮膚透過の律速段階を検討した結果、ヘアレスラット皮膚の主なバリアー能は角質層にあったが、LSE-high は角質層だけでなく角質層を含む表皮層全体にあった。さらに、各皮膚に対して、薬物の拡散パラメータと分配パラメータを算出した結果、用いたすべての薬物の拡散パラメータは、LSE-high の方がヒトおよびヘアレスラット皮膚よりも約 10-50 倍高かった。しかし、分配パラメータは、LSE-high、ヘアレスラットおよびヒト皮膚間でほとんど違いが見られなかった。すなわち、ヘアレスラットおよびヒト皮膚透過性より LSE-high 透過性が高いのは、分配パラメータでなく拡散パラメータの違いが関係していることが明らかとなった。さらに、水溶性薬物の LSE-high 透過時の lag time は、脂溶性薬物よりも長い傾向が見られた。類似した傾向は、ヘア

レスラットおよびヒト皮膚でも観察された。加えて、parallel permeation pathway model にしたがって、 $\text{Log}P_{\text{tot}}$  と  $\text{Log}K_{\text{ow}}$  の関係の評価したところ、LSE-high の  $\text{log}P_{\text{tot}} - \text{Log}K_{\text{ow}}$  の関係はヒト皮膚でのこの関係に対して平行に上側にシフトした。この結果には LSE-high とヒト皮膚の類似した分配パラメータと異なった拡散パラメータが反映していると考えられた。

以上より、LSE-high は、薬物のヒト皮膚透過性の評価材料として利用できること、また、薬物のヒト皮膚透過性を短時間で評価できることが明らかとなった。さらに、式 (5) を用いることで、LSE-high 透過性からヒト皮膚透過性を簡便に予測できることが示唆された。一方、LSE-high とヒト皮膚のバリアー機能および薬物透過特性に相違があることも明らかになった。

## 2) LSE-high を用いた皮膚透過促進剤のスクリーニングについて

LSE-high およびヘアレスラット皮膚に各皮膚透過促進剤を適用したところ、ISMN と ISDN の皮膚透過性は増加した。しかし、その促進率は LSE-high よりラット皮膚の方が高かった。これは、ラット皮膚と LSE-high の透過抵抗の違いに起因すると考えられた。つまり、LSE-high はラット皮膚より薬物に対する角質層の透過抵抗が約 10 倍低く、皮膚透過促進剤による角質層の構造変化が小さいため促進効果が低かったものと考えられた。また、LSE-high とラット皮膚間の促進比の関係を ISMN と ISDN で検討したところ、両薬物において直線関係が認められた。さらに、皮膚透過促進剤の促進効果は促進剤濃度によって影響する可能性があったため、各濃度の *l*-メントールについて促進効果を検討した。その結果、LSE-high とラット皮膚ともに、ISMN 透過では 3% で最大となり、5%、10% にすると促進効果は減少した。一方、ISDN 透過では 10% *l*-メントールで最大となった。このような促進能の差は、透過ルートに及ぼす ISMN と ISDN の極性の違いと促進剤の促進メカニズムを反映したためであると考えられた。

以上より、LSE-high は、皮膚透過促進剤のスクリーニングを短時間に評価できることが示唆された。また、LSE-high とラット摘出皮膚のバリアー機能の違いに注目すると、LSE-high と摘出皮膚を用いた促進剤の促進比と促進剤の濃度から促進メカニズムの評価にもこの培養ヒト皮膚モデルが使用できると思われた。

## 3) LSE-high と水晶発振子を用いた皮膚透過性の迅速定量法の確立について

水晶発振子マイクロバランスは空気中や溶液中の匂いや苦味物質の量を測定するのに使用されている。水晶発振子を用いる利点は測定時間が短く（数分）、前処理の必要がないことである。そこで、水晶発振子の電極上に吸着したインドメタシン量とその時のサンプル中インドメタシン濃度との関係を検討した。その結果、インドメタシン濃度に依存して振動数の減少度が大きくなった。特に、電極に付着させた脂質量あたりに換算すると、振動数減少度はインドメタシン濃度（4.2 – 25.0  $\mu\text{g/mL}$ ）に比例した。しかし、33.3  $\mu\text{g/mL}$  では直線性が得られなかった。また、インドメタシン溶液に水晶発振子を浸したとき、一定の振動数減少が得られるまで数十分を要した。動物やヒト皮膚は薬物の拡散抵抗が高いため、一般に数時間から数十時間の透過実験時間を要す。このような場合では、一定の振動数減少が得られるまでの lag time はほぼ無視できる。しかし、迅速評価のために培養皮膚等を用いた場合では、膜透過性が速いために数十分の lag time でも問題になる。この欠点を解消するためデコンボリューションを用いた。その結果、水晶発振子の測定値は HPLC の測定値とほぼ等しくなった。

以上より、水晶発振子は生体膜透過挙動を迅速に評価する有用な方法となることが期待できるものと推察された。

#### 4) 皮膚刺激性に及ぼす角質層の影響について

3% 乳酸と 1% ラウリル硫酸ナトリウムを stripped LSE に適用後の LSE 細胞の生存率の減少速度は、単純な一次速度で示された。また、全層 LSE にオリーブ油、乳酸、ラウリル硫酸ナトリウムまたは Triton X-100 を適用すると生存率は 2 相性の低下を示すことが明らかとなった。角質層のバリアー機能が完全な時、刺激物質の LSE 透過性が遅いため、皮膚中の刺激物質の濃度も低く、細胞の生存率の減少速度も遅くなると考えられる。Triton X-100 や乳酸の LSE への刺激挙動上の明らかな変曲点の存在は角質層バリアー機能の破壊が突然起こることを示唆している。すなわち、皮膚刺激物質の細胞の生存率は、角質層が完全な時は遅い一次減少速度で示され、その後、急に速い一次減少速度で示されたことから、ある一定の時間が経過した後に、急に角質層バリアーが破壊されることが示唆された。

したがって、皮膚の細胞毒性は 2 つの一次減少速度によって表現できた。また、皮膚刺激速度は適用濃度と刺激物質の固有の毒性と同様に、皮膚バリアー機能と密接に関係していることが明らかになった。

#### 5) LSE-high を用いた皮膚刺激性評価について

モルモット皮膚の intact skin と stripped skin の CPC の刺激部位濃度を用いることで、Draize 試験と MTT 試験から得られた皮膚刺激度共に、同じ Hill 式によって表すことができた。また、この時の  $IC_{50}$  は Draize 試験で 12.3、MTT 試験で 18.9 であった。さらに、モルモット皮膚の Draize 試験と MTT 試験の結果には良い直線関係が得られたことより、今まで行われてきた Draize 皮膚刺激性評価試験の代替法として MTT 試験法が用いられる可能性が示唆された。さらに、LSE-high を用いた時の、皮膚刺激度と皮膚刺激部位濃度との相関では、モルモット皮膚を用いた時の結果と  $I_{max}$  と  $\gamma$  は同じ値であったが、 $IC_{50}$  値は異なった。これは、CPC がモルモット皮膚中の細胞透過性より LSE-high の細胞透過性が高いため、低濃度でも高い死細胞率が得られたものと考えられた。また、CPC の皮膚への分配係数も LSE-high の方がモルモット皮膚よりも大きかったことも影響しているものと考えられた。そこで、LSE-high の刺激部位濃度にモルモット皮膚の  $IC_{50}$  を LSE-high の  $IC_{50}$  で割った比を用いて補正した。その結果、LSE-high とモルモット皮膚の刺激度はほとんど同じ線上にプロットされた。

以上より、LSE-high を用いた MTT 試験がモルモット皮膚やウサギを用いた Draize 試験の代替法になる可能性が示唆された。また、皮膚刺激性は皮膚透過性から求めた刺激部位濃度を用いて Hill 式で表せることが示唆された。

以上、LSE-high は薬物のヒト皮膚透過性や皮膚透過促進剤を短時間で評価できる材料として利用できることが明らかになった。さらに、ニオイセンサーを用いることで薬物測定をも迅速に行うことができた。すなわち、LSE-high とニオイセンサーを組み合わせることで皮膚適用製剤の開発に有効な High Throughput Screening に対応できると考えられた。

また、皮膚刺激性は皮膚刺激部位中の刺激物質濃度に依存することが明らかになり、さらに、LSE-high を用いた MTT 試験がモルモット皮膚やウサギを用いた Draize 試験の代替法になる可能性が示唆された。本方法は化粧品材料や医薬品添加物の刺激性評価の新規方法として将来有用になると予想される。

## 文献

- 1 T. Watanabe, T. Hasegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi, K. Takayama and K. Sugibayashi, Utility of three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate skin permeation of drugs, *Altern. Animal Test. Experiment.*, **8**, 1-14 (2001)
- 2 杉林堅次, 森本雍憲, 経皮治療システム (TTS), *日本臨床*, **56**, 65-75 (1998)
- 3 R.C. Wester and H.I. Maibach, Animal models for percutaneous absorption. In: V.P. Shah and H.I. Maibach, *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration*, Plenum, New York, 1993.
- 4 K. Sato, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, H. Omiya and N. Enomoto, Prediction of the *in-vitro* human skin permeability of nicorandil from animal data, *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**, 379-383 (1989)
- 5 長谷川哲也, 中川清世, 杉林堅次, *In vitro* 皮膚透過データから *In vivo* 経皮吸収性の簡便な予想のために (3), *ファームテックジャパン*, **16**, 23-28 (2000)
- 6 M.L. Sabolinski, O. Alvarez, M. Auletta, G. Mulder and N.L. Parenteau, Cultured skin as a 'smart material' for healing wounds, Experience in venous ulcers, *Biomaterials*, **17**, 311-320 (1996)
- 7 A. Martin, *Physical Pharmacy*, 4 th Ed., Lea & Febiger, Malvern, 1993, pp. 324-361.
- 8 S. Henry, D.V. McAllister, M.G. Allen and M.R. Prausnitz, Microfabricated microneedles, A novel approach to transdermal drug delivery, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 922-925 (1998)
- 9 K. Inoue, K. Ogawa, Y. Suzuki, J. Okada, A. Kusai, M. Ikeda and K. Nishimura, The skin permeation mechanism of ketotifen, Evaluation of permeation pathways and barrier components in the stratum corneum, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **26**, 45-53 (2000)
- 10 Y. Morimoto, T. Hatanaka, K. Sugibayashi and H. Omiya, Prediction of skin permeability of drugs: Comparison of human and hairless rat skin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 634-639 (1992)



- 11 T. Watanabe, T. Hasegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi and K. Sugibayashi, Effect of penetration enhancers on the permeation of drugs across a three-dimensional cultured human skin model: comparison with the effects using excised hairless rat skin, *Altern. Animal Test. Experiment.*, **8**, 15-22 (2001)
- 12 N. Ohara, K. Takayama and T. Nagai, Combined effect of *d*-limonene pretreatment and temperature on the rat skin permeation of lipophilic and hydrophilic drugs, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 439-442 (1995)
- 13 D. Kobayashi, T. Matsuzawa, K. Sugibayashi, Y. Morimoto and M. Kimura, Analysis of the combined effect of *l*-menthol and ethanol as skin permeation enhancers based on a two-layer skin model, *Pharm. Res.*, **11**, 96-103 (1994)
- 14 M. Fujii, N. Hori, K. Shiozawa, K. Wakabayashi, E. Kawahara and M. Matsumoto, Effect of fatty acid esters on permeation of ketoprofen through hairless rat skin, *Int. J. Pharm.*, **15** 117-125 (2000)
- 15 D. Kobayashi, S. Kawabata, K. Sugibayashi, Y. Morimoto and M. Kimura, *In vitro* in vivo difference in enhanced skin permeation of nicardipine hydrochloride by the *l*-menthol-ethanol system, *Skin Pharmacol.*, **9**, 130-136 (1996)
- 16 渡邊哲也, 長谷川哲也, 高橋秀和, 石橋卓也, 古澤宏幸, 岡畑恵雄, 杉林堅次, 水晶発振子を用いた薬物の *in vitro* 皮膚透過迅速測定法に関する検討, *薬剤学*, **62**, 印刷中 (2002)
- 17 岡畑恵雄, 清水治, 江波戸博, 二分子膜被膜水晶発振子を用いた麻酔薬の評価, *麻酔と蘇生*, **25**, 203-207 (1989)
- 18 岡畑恵雄, 最新センサ技術 水晶発振子をデバイスとする「匂いセンサ」とは?, *エレクトロニクス*, **2**, 105-107 (1991)
- 19 P. Vaishali and S. Salomon, Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1604-1607 (1998)
- 20 K.A Foster, M.L. Avery, M. Yazdanian and K. Audus, Characterization of Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery, *Int. J. Pharm.*, **208**, 1-11 (2000)
- 21 J.N. Lawrence, Application of *in vitro* human skin model to dermal irritancy: a brief overview and future prospects, *Toxic. In Vitro*, **11**, 305-312 (1997)

- 22 B.J. Nickoloff and Y. Naidu, Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **30**, 535-546 (1994)
- 23 J.H. Draize, G. Woodard and H.O. Galvery, Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **82**, 377-390 (1944)
- 24 M.K. Robinson, J.P. McFadden and D.A. Basketter, Validity and ethics of the human 4-h patch test as an alternative method to assess acute skin irritation potential, *Contact Dermatitis*, **45**, 1-12 (2001)
- 25 E. Bell, H.P. Ehrlich, D.J. Ruttle and T. Nakatsuji, Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness, *Science*, **211**, 1052-1054 (1981)
- 26 M. Chamberlain and L. Earl, Use of cell cultures in irritancy testing. In: A. Rougire, A.M. Goldberg and H.I. Maibach (ed.), *In vitro* skin toxicology, Mary Ann Liebert, Inc., New York, 1994.
- 27 T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983)
- 28 C.L. Cannon, P.J. Neal, J.A. Souttee, J. Kubilus and M. Klausner, New epidermal model for dermal irritancy testing, *Toxic. In Vitro*, **8**, 889-891 (1994)
- 29 K. Morota, N. Morikawa, S. Morita, H. Kojima and H. Konishi, Alternative to primary Draize skin irritation test using cultured human skin model: Comparison of six endpoints, *Alter. Animal Test. Experiment.*, **6**, 41-51 (1999)
- 30 K.P. Wilhelm, B. Bottjer, and C.P. Siegers, Quantitative assessment of primary skin irritants *in vitro* in a cytotoxicity model: comparison with *in vivo* human irritation tests, *Br. J. Dermatol.*, **145**, 709-715 (2001)
- 31 P. Maria and K. Johanna, Use of skin recombinants as an *in vitro* model for testing the irritation potential of cutaneous irritants, *Skin Pharmacol.*, **8**, 49-59 (1995)
- 32 M. Shibata, T. Tsuda, H. Itagaki, S. Kato, T. Kobayashi, H. Ishikawa and Y. Morikawa, Interleukin-1  $\alpha$  and interleukin-8 release by human keratinocyte cell culture treated with surfactants, *ATLA*, **25** 161-171 (1997)

- 33 F.J. Koschier, R. Roth, T.J. Stephens, E.T. Spence and M.A. Duke, *In vitro* skin irritation testing of petroleum-based compounds in reconstituted human skin models, *J. Toxicol., Cutan. Ocul. Toxicol.*, **13**, 23-37 (1994)
- 34 R. Osborne and M.A. Perkins, An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation, *Fd. Chem. Toxic.*, **32**, 142-153 (1994)
- 35 M.A. Perkins, R. Osborne, F.R. Rana, A. Ghassemi and M.K. Robinson, Comparison of *in vitro* and *in vivo* human skin responses to consumer products and ingredients with a range of irritancy potential, *Toxicol. Sci.*, **48**, 218-229 (1999)
- 36 R. Gay, M. Swiderek, D. Nelson and A. Ernesti, The living skin equivalent as a model *in vitro* for ranking the toxic potential of dermal irritants, *Toxic. In Vitro*, **6**, 303-315 (1992)
- 37 J.H. Fentem, D. Briggs, C. Chesne, G.R. Elliott, J.W. Harbell, J.R. Heylings, P. Portes, R. Roguet, J.J.M. Van de Standt and P.A. Botham, 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 T. Watanabe, T. Hasegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi, H. Itagaki and K. Sugibayashi, Utility of MTT assay in three-dimensional cultured human skin model as an alternative for draize skin irritation test: approach using diffusion law of irritant in skin and Toxicokinetics-Toxicodynamics, *Pharm. Res.*, accepted.
- 39 小泉保, 薬物生体内挙動と薬物反応の速度論的解析, *Yakugakuzasshi*, **120**, 445-454 (2000)

