
培養皮膚モデルを用いたドレーズ試験
に代わる皮膚刺激性評価法に関する
研究

15590137

平成 15 年度～平成 17 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 18 年 3 月

研究代表者 杉林 堅次

城西大学 薬学部 教授

目次

	はしがき	i~ iii
Background	1
First chapter	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 result in hairless mice	2
	1. Introduction	2
	2. Theoretical	3
	3. Material and methods	5
	3-1. Chemicals	5
	3-2. Animal and Skin Sample	5
	3-3. CPC Application	5
	3-4. MTT assay	6
	3-5. HPLC Analysis	7
	Separation of Epidermis and Dermis of the Skin	
	3-6. Sample	8
	Horizontal Sectioning of Hairless mouse Skin	
	3-7. after MTT assay	8
	3-8. Histochemical Analysis for Succinate	8

	Dehydrogenase	
	Transcutaneous Electrical Resistance (TER) and 3-9. Dye Binding Test	9
	4. Result	9
	5. Discussion	18
Second chapter	Evaluation of skin irritation using cultured cells -Effect of skin concentration and applied period on the skin irritation-	22
	1. Introduction	22
	2. Materials and methods	24
	2-1. Chemicals	24
	2-2. Animal and Skin Sample	24
	2-3. Cell culture	24
	2-4. CPC application	25
	2-5. Parameter calculations	26
	3. Results	26
	3-1. CPC application to cultured cells	26
	3-2. CPC application to human keratinocytes and human fibroblasts	30

4.	Discussion · · · · ·	31
	References · · · · ·	32

〈はしがき〉

この研究成果報告書は、平成 15 年度～平成 17 年度科学研究費補助金（基盤研究（C））「培養皮膚を用いたドレーズ試験に代わる皮膚刺激性評価法に関する研究」の研究成果をまとめたものである。

皮膚に適用する外用剤や化粧品などは、皮膚刺激や皮膚感受性発現の可能性について十分検査しておかねばならない。現在まで、皮膚刺激は患者または使用者の皮膚を用いたパッチテストによって評価されてきた。また、ヒト試験前には Draize 試験が大々的に行われてきた。しかし、こと化粧品最終製品等は、動物愛護の考え方もあって、2002 年から動物実験による評価が行えないことになった。このような現状では、Draize 試験法に変わる評価方法が確立していることが前提であると思われたが、皮膚刺激性評価代替法は今だ確立されていない。現在、Draize 試験に代わるものとして培養皮膚モデルの利用が期待されている。培養皮膚は実際の皮膚に極めて近い構造を有しているものの血管系が存在しないため紅斑や浮腫といった皮膚刺激反応を呈さない。そのため MTT assay や Neutral Red Uptake などの細胞毒性試験がその評価に利用されている。しかし、これらの結果と Draize 法との相関性は明らかになっておらず、今まで蓄積された Draize 試験による結果をもやり直す必要に駆られている。そこで上記の問題点を解決するため、「ドレーズ試験に代わる培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価法に関する研究」を始めた。

これらの研究は、陽イオン界面活性剤である塩化セチルピリジニウム（CPC）をモデル起炎物質として選択し、これを培養ヒト皮膚および動物皮膚に適用し、皮膚中細胞（角化細胞および繊維芽細胞）のバイアビリティの時間推移を MTT 試験より評価し、得られた結果を速度論的に解析した。

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： 藤堂 浩明 （城西大学薬学部 助手）
研究分担者： 石井 宏 （城西大学薬学部 助手）

交付決定額	(金額合計：円)		
	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	800,000		800,000
平成 16 年度	1,200,000		1,200,000
平成 17 年度	1,100,000		1,100,000
総計	3,100,000		3,100,000

研究発表

(1) 学会誌等

1. Satoshi Kano^{1,2}, Kenji Sugibayashi² (¹ Maruho Co., Ltd. Kyoto R&D center, ² Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University), 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, pp. 329-335 (2006).

(2) 口頭発表

1. Satoshi Kano^{1,2}, Tetsuya Hasegawa², Kenji Sugibayashi² (¹ Maruho Co., Ltd. Kyoto R&D center, ² Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University), Toxicokinetics/Toxicodynamics approach to skin irritation, Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC2004), May 30 – June 3, 2004.
2. 加納聡^{1,2}, 長谷川哲也², 杉林 堅次² (¹マルホ・京都 R&D センター, ²城西大薬), 皮膚刺激の速度論的解析 ～in vitro と in vivo の比較～, 2004 年 6 月 3 日～6 月 4 日.
3. 加納聡^{1,2}, 藤堂浩明¹, 杉林堅次¹ (¹ 城西大学薬、² マルホ (株) 京都 R &D センター), 塩化セチルピリジニウムによる皮膚刺激性の速度論的解析：三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた in vitro 法とヘアレスマウスを用いた in vivo 法の比較—, 第 18 回日本動物実験代替法学会大会, 2004 年 11 月 30 日～2004 年 12 月 2 日.
4. 瀧ノ上 由文¹, 加納 聡^{1,2}, 藤堂 浩明¹, 杉林 堅次¹ (¹城西大薬, ²マルホ 京都 R&D センター), 細胞毒性試験による皮膚刺激性評価の種差に関する検討, 日本薬学会 125 年会, 2005 年 3 月 29～31 日.
5. 杉林堅次, 皮膚刺激の速度論的評価, 第 1 回 経皮吸収型製剤フォーラム, 2005 年 9 月 4 日～9 月 6 日.
6. 瀧ノ上 由文、石井 宏¹、加納 聡²、藤堂 浩明¹、杉林 堅次¹ (¹城西大学薬、²マルホ (株) 京都 R&D センター), 培養細胞を用いた皮膚刺

7. 激性評価：皮膚刺激性に及ぼす適用後時間と皮膚中濃度の影響，日本動物実験代替法学会第19回大会，2005年12月1日～2日．
8. 杉林 堅次，化学物質が皮膚に触れると、そして化学物質を皮膚に適用すると，日皮協会員研修会 特別講演，2006年3月16日．

(3) 出版物

1. 藤堂 浩明，杉林 堅次，医薬品製剤における最新 剤形・処方設計ノウハウ集，第4章 第3節 経皮吸収製剤の設計と評価，技術情報協会，2005年12月．

Background

化粧品や皮膚適用医薬品は開発に際し安全性の観点から適用部位での刺激性評価が必要となる。現在、その評価法として Draize 試験^{1,2)}が用いられている。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点数で評価する方法である。主にモルモットやウサギで評価し、最終的にヒトによるパッチテストが行われる。しかし、Draize 試験は評価に専門的な知識と経験を必要とし、さらに視覚的な評価であるため、評価法により異なった結果が生じる可能性がある。加えて、刺激性評価に動物の使用を制限する動きが欧米を中心に高まっており、化粧品に関しては欧州諸国の多くが動物実験を法的に禁止している³⁻⁵⁾。これらの動きと連動して、動物実験に代わる皮膚刺激性代替法の開発が進められている。現在、培養細胞や人工的に作成された皮膚（三次元培養ヒト皮膚モデル）を使用し細胞膜の変化（Neutral Red Uptake 法）^{6,7)}や細胞内ミトコンドリア活性（MTT assay）⁷⁻⁹⁾、さらには皮膚水分消失量（TEWL 法）^{10,11)}などが評価され、皮膚刺激性を評価する代替法として期待されている。

しかし、これらの結果と Draize 法との相関性は明らかになっておらず、今まで蓄積された Draize 試験による結果をもやり直す必要に駆られている。そこで上記の問題点を解決するため、「ドレーズ試験に代わる培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価法に関する研究」を始める。

第1編 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

1. Introduction

近年、PK (pharmacokinetics) と PD (pharmacodynamics) 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¹³⁾。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た。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組織あるいはその下部組織中の薬物濃度 (dermatokinetics) と効力 (dermatodynamics) の関係について論じる必要がある。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合物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。

皮膚刺激は、皮膚において最も一般的な副作用の一つである。さらにその評価は、皮膚適用製剤を開発する上で不可欠である。皮膚刺激は、外来の化学物質や物理的因子などによるダメージによって生じる可逆的な炎症反応として定義され、最終的に紅斑や浮腫などの皮膚反応を引き起こす。従来から化学物質の皮膚に対する刺激性の評価法としてヒトに対するパッチテストが行われている。また、その前段階ではウサギやモルモットなどの動物を用いた Draize 試験^{1,2)} がその主役をなしている。一方、近年の細胞培養工学の発展により、実際の皮膚の構造に極めて近い三次元培養ヒト皮膚モデルが開発された。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している。このようなヒトとの種差に加えて動物愛護の問題などもあって、動物を用いた Draize 試験の代替法として三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた手法が近年注目されている。この培養皮膚は、Caco-2 や Calu-3 膜といった上皮細胞単層膜とは異なり、三次元型の培養細胞膜である。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している。培養皮膚には血管系が存在しないため、動物を用いた Draize 試験のように紅斑や浮腫が起こらないといった問題点もあるが、MTT 試験や Neutral Red Uptake 試験法などの細胞毒性試験を利用し、培養皮膚によって皮膚刺激性が評価されている。現在この方法（培養皮膚を用いた MTT 試験による皮膚刺激性評価）は、動物実験代替法（alternative to animal experiments）として The European Centre for the Validation of Alternative Methods（ECVAM）によってバリデーションが実施されている¹⁴⁾。

MTT 試験は、細胞内ミトコンドリアのコハ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 formazan の割合を生細胞数（率）とする方法である。すでに当教室では、モルモットを用いた皮膚刺激性評価において、Draize 試験による皮膚刺激性値と MTT 試験による死細胞率との間に良好な相関関係が認められることを報告している¹⁵⁾。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。そこで本研究では、皮膚刺激反応の時間推移および皮膚中濃度との関係について塩化セチルピリジニウム（CPC）をモデル刺激物質として用いて検討した。CPC は

歯磨き剤等に用いられている界面活性剤で¹⁶⁾、皮膚刺激性を有することが知られている¹⁷⁾。また、CPCは高いUV吸収性を示すためHPLCにより容易に定量可能である。皮膚中のCPC濃度はHPLCにより測定し、皮膚刺激性はMTT試験により評価した。その際のCPCによる経時的な皮膚刺激反応(MTT試験による生細胞率の減少)は一次速度定数を用いて表した。試験系には培養皮膚であるLSE-high(Toyobo)およびヘアレスマウスを用い、in vitro(LSE-high)およびin vivo(ヘアレスマウス)の結果を比較した。

2. Theoretical

皮膚刺激の速度論的解析は、Sugibayashiらの方法¹⁸⁾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。これらの仮定から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

$$V = (100 - V_{\infty}) \cdot \exp(-k_1 \cdot t) + V_{\infty} \quad (1)$$

$t \geq T$ のとき

$$V = (100 - V_{\infty}) \cdot \exp(-k_1 \cdot T) \cdot \exp(-k_2 \cdot (t - T)) + V_{\infty} \quad (2)$$

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_{∞} を刺激物質適用後の無限最大時間の生細胞率とした。

一方、角層を剥離したstripped LSE-highおよびstripped animal skinでは、生細胞率

は以下の式で表される.

$t \geq 0$ のとき

$$V = (100 - V_{\infty}) \cdot \exp(-k_{ss} \cdot t) + V_{\infty} \quad (3)$$

ここで, k_{ss} は stripped LSE-high および stripped skin における一次刺激速度定数である.

3. MATERIALS AND METHODS

3-1. Chemicals

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.

3-2. Animal and Skin Sample

20-40g の Hos: Hr-1 系雄性ヘアレスマウス (星野実験動物飼育所, 埼玉) を用いた. 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た. stripped skin は, 粘着テープ (セロテープ, ニチバン (株), 東京) により 20 回ストリッピングして角層を剥離した¹⁹⁾.

LSE-high は東洋紡株式会社 (大阪) より購入した. stripped LSE-high は角層をピンセットで取り除いて作成した.

3-3. CPC Application

LSE-high には, CPC の 1%生理食塩液溶液 80 μ L を角層側のアッセイリング内に適用した. アッセイトレイ (東洋紡 (株)) の真皮側にはアッセイ培地 (東洋紡 (株)) を 1.2 mL 適用し, 37°C, 5% CO₂ 下で各時間インキュベートした. インキュベート時間

は、LSE-high の場合、1, 2, 4, 6, 8, 16 および 24 時間、stripped LSE-high の場合は、1, 2, 4, 8, 16 および 24 時間とした。

ヘアレスマウスには、CPC の 20%生理食塩液溶液 30 μ L を Finn Chamber[®] (Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finland) を用いて適用した。適用部位は、さらに粘着性伸縮包帯 (Elastpore, ニチバン (株)) で覆い保護した。適用時間は intact skin の場合、1, 2, 4, 6, 12 および 24 時間、stripped skin の場合は、1, 2, 4, 8 および 24 時間とした。適用部位は腹部の左右 2 箇所とし、そのうち 1 箇所はコントロールとして生理食塩液を適用した。

3-4. 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。真皮側のアッセイ培地を取り除き、MTT 溶液 1.2 mL を残りの組織の真皮側に適用して 37°C 、5% CO_2 下で 3 時間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。打ち抜いた組織をポリエチレンチューブ (micro tube 1.5 mL with cap, 旭テクノグラス (株), 東京) に移し、0.04N 塩酸-イソプロパノールを 700 μ L を加えて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, (株) 島津製作所, 京都) 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。

なお、生細胞率 (%) は以下の式に従って算出した。

$$\text{Viability (\%)} = \text{O.D.}_{570}(\text{sample}) / \text{O.D.}_{570}(\text{saline}) \times 100 \quad (4)$$

3-5. HPLC Analysis

皮膚試料は、アセトニトリル 200 μL を加えた。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 μL を添加し、はさみにて mince した後、遠心分離 (18,800 \times g, 20min, 4°C) し、その上清 20 μL を HPLC に注入した。

HPLC 条件を以下に示した。

送液ポンプ	LC-10ATvp ((株) 島津製作所)
UV 検出器	SPD-10Avp ((株) 島津製作所)
検出波長	258 nm
カラムオープン	CTO-10ASvp ((株) 島津製作所)
オートインジェクター	SIL-10ADvp ((株) 島津製作所)
分析カラム	Inertsil ODS-2, 4.6 \times 250mm (ジーエルサイエンス (株), 東京)
ガードカラム	Cartridges Guard Column E, Inertsil ODS-2 (ジーエルサイエンス (株))
カラム温度	40°C
移動相	アセトニトリル/0.2 M 過塩素酸ナトリウム混液 (80:20)
流速	1.0 mL/min
データ処理	BORWIN (日本分光 (株), 東京)

3-6. Separation of Epidermis and Dermis of the Skin Sample

3-3. に記載の方法でヘアレスマウスの腹部に、CPC の 20%生理食塩液溶液を適用した。皮膚表面に残存する CPC を除去した後、粘着テープ（セロテープ、ニチバン（株））により 20 回ストリッピングして角層を剥離した。投与部位の皮膚を摘出し、生検パンチで直径 8 mm に打ち抜いた。得られた皮膚試料は、heating 法²⁰⁾ を参考に、表皮と真皮を分離した。すなわち、皮膚試料をアルミホイルに挟んで 50°C で 1 分間加温し、表皮層をピンセットおよび注射針（23G）を用いて真皮層から分離した。それぞれの試料は重量測定後、CPC 濃度の測定まで-20°C で保管した。各試料中の CPC 濃度は HPLC にて測定した。

また、別途 MTT assay 後のヘアレスマウス皮膚についても同様に表皮層と真皮層を分離し、それぞれホルマザンを抽出して吸光度を測定した。

3-7. Horizontal Sectioning of Hairless mouse Skin after MTT assay

MTT assay 後のヘアレスマウス皮膚（直径 8 mm）は、その厚みを変化させないように注意しながら 2 枚のスライドグラスに挟み、ドライアイスで冷却したイソペンタン中で凍結し、使用までの間-80°Cにて保管した。凍結試料は、クリオスタットを用いて皮膚表面より水平方向に 20 μm の厚みで 16 枚（320 μm まで）薄切した。薄切した組織は、2 枚（40 μm 分）ずつポリエチレンチューブ（micro tube 1.5 mL with cap, 旭テクノグラス（株））に移し、0.04N 塩酸-イソプロパノールを 200 μL を加えて暗所に一晩放置した。抽出したホルマザンの測定は、分光光度計（UV-160A, （株）島津製作所）を用いて、検出波長 570 nm で行った。

3-8. Histochemical Analysis for Succinate Dehydrogenase

ヘアレスマウスの腹部に 20% CPC および生理食塩液を 24 時間適用し、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[®] 4583, サクラ精機株式会社, 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, Nussloch, Germany) を用いて 10 μ 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[®], Merck KGaA, Darmstadt, Germany) にて封入して直ちに鏡検した。

3-9. Transcutaneous Electrical Resistance (TER) and Dye Binding Test

CPC をヘアレスマウス腹部に 2, 4, 6 および 24 時間適用後、皮膚を摘出し拡散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 μ L 適用した。室温にて 2 時間放置後、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, (株) 島津製作所) にて 565 nm の吸光度を測定した。

4. Results

Fig. 1 に intact LSE-high および stripped LSE-high における 1% CPC 適用後の生細胞

数と時間の関係を示す。また、得られたデータを (1), (2) および (3) 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。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 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。このときの組織 (LSE-high) 中 CPC 濃度の時間推移を Fig. 2 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 時間以降ほぼ一定となった。一方, Fig. 3 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。また, 皮膚中 CPC 濃度 (Fig. 4) は stripped skin において 8 時間以降一定となったが, intact skin では 24 時間まで増加しつづけた。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 1 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 h^{-1} とヘアレスマウスが LSE-high の約 2.8 倍であった。 k_2 および k_{ss} はそれぞれ 0.097, 0.204 および 0.296, 0.494 h^{-1} といずれもヘアレスマウスが LSE-high の約 2 倍であった。

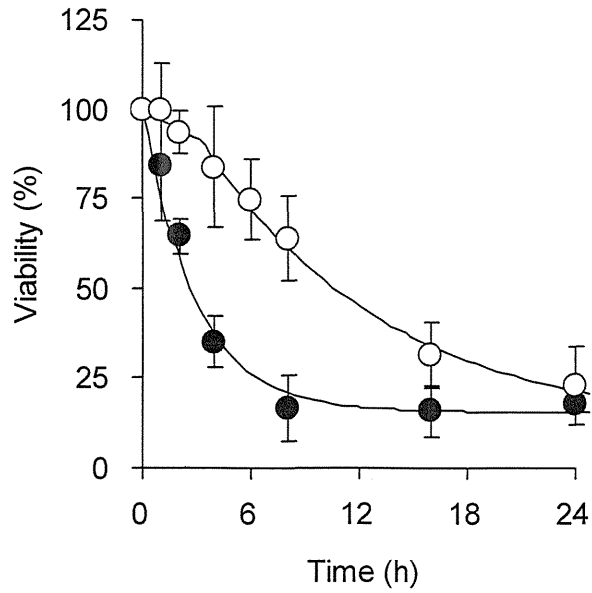


Fig. 1 Time course of the cell viability (%) of intact and stripped LSE-high after application of 1% CPC to LSE-high.
 Symbols: (○), intact skin; (●), stripped skin.
 Lines show theoretical values.
 Each value represents the mean \pm S.D. (n=3-7).

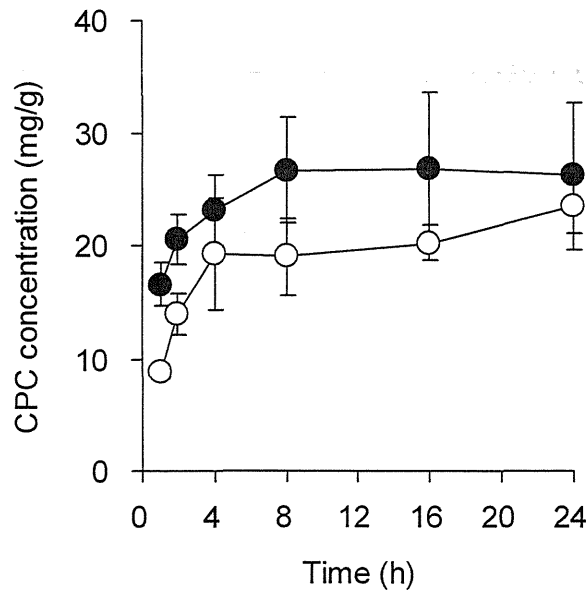


Fig. 2 Time course of skin concentration of CPC after application of 1% CPC to LSE-high.
 Symbols: (○), intact skin; (●), stripped skin.
 Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

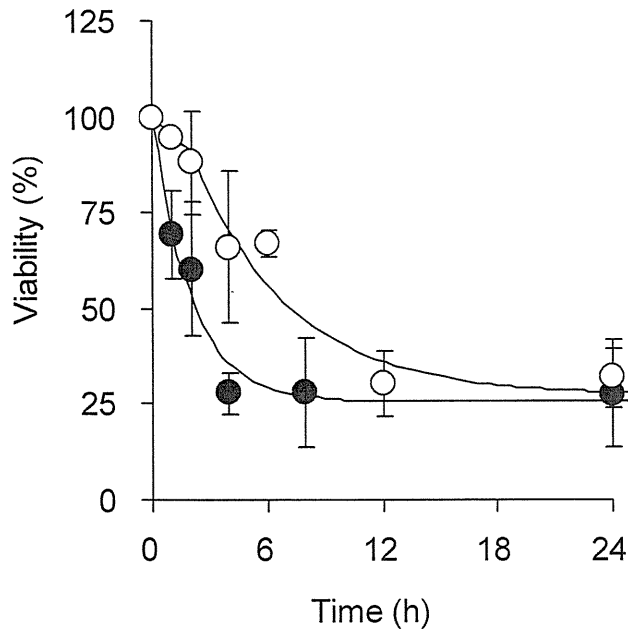


Fig. 3 Time course viability (%) of intact and stripped hairless mouse skin after topical application of 20% CPC to hairless mouse. Symbols: (○), intact skin; (●), stripped skin. Lines show theoretical values. Each value represents the mean \pm S.D. (n=3-7).

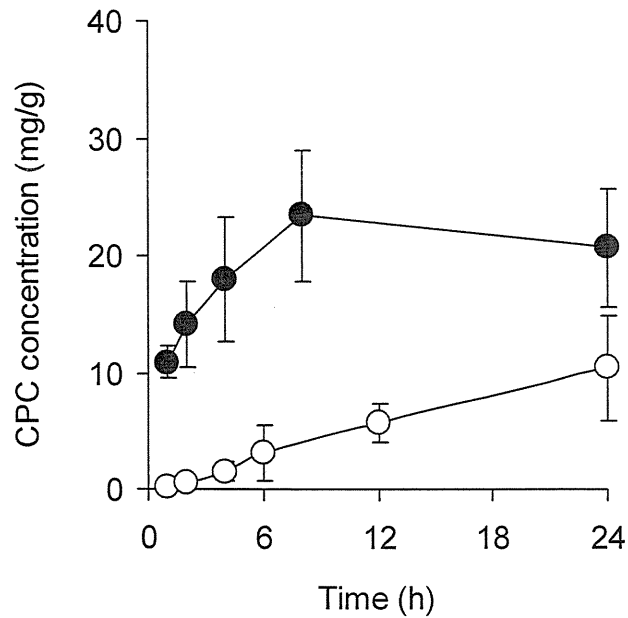


Fig. 4 Time course of skin concentration of CPC after topical application of 20% CPC to hairless mouse. Symbols: (○), intact skin; (●), stripped skin. Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

Table 1 Kinetic parameters for decreased cell viability 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 (h^{-1})	0.032		0.091	
T (h)	3.21		2.38	
k_2 (h^{-1})	0.097		0.204	
k_{ss} (h^{-1})		0.296		0.494
V_{∞} (%)	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 Fig. 5 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、皮膚刺激を観察するのに十分なものではなかった。また、クリオスタットを用いて皮膚表面より水平に薄切し、各 section 毎の吸光度を測定した (Fig. 6)。Control 群と 20% CPC 適用群で逆転が見られ、明確な差は認められなかった。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 (Fig. 7)。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 Fig. 8 に示した。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。

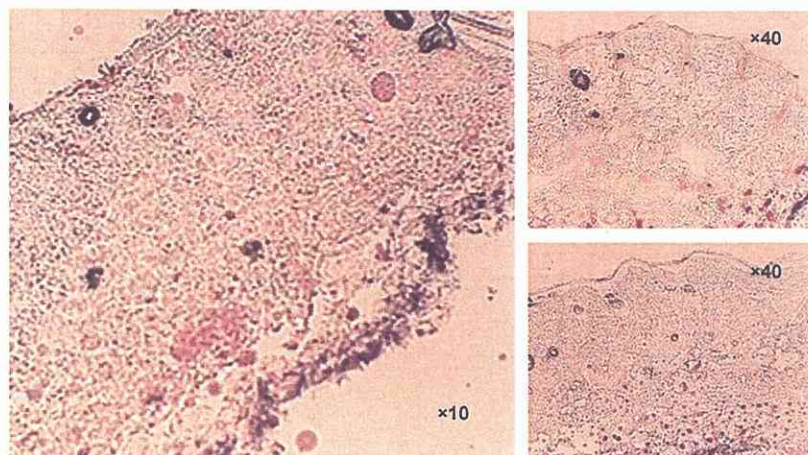


Fig. 5 Typical photomicrographs of hairless mouse skin after MTT assay.

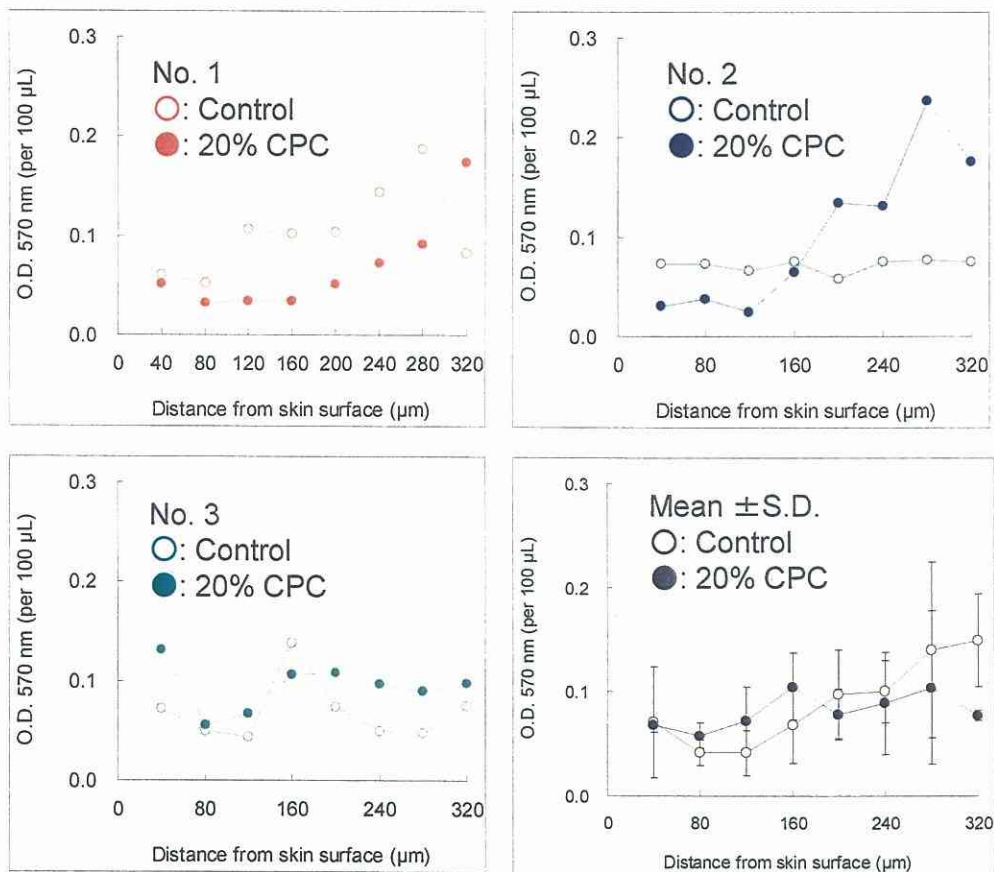


Fig. 6 Distribution of MTT-formazan in the section of skin after topical application of 20% CPC for 24 h to hairless mouse.

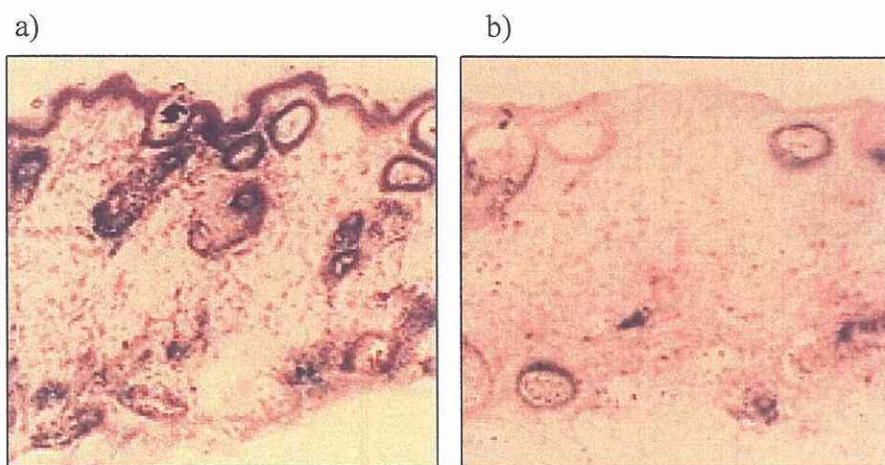


Fig. 7 Enzyme histochemical analysis for succinate dehydrogenase activity in mouse skin.

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

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

Magnification; $\times 10$.

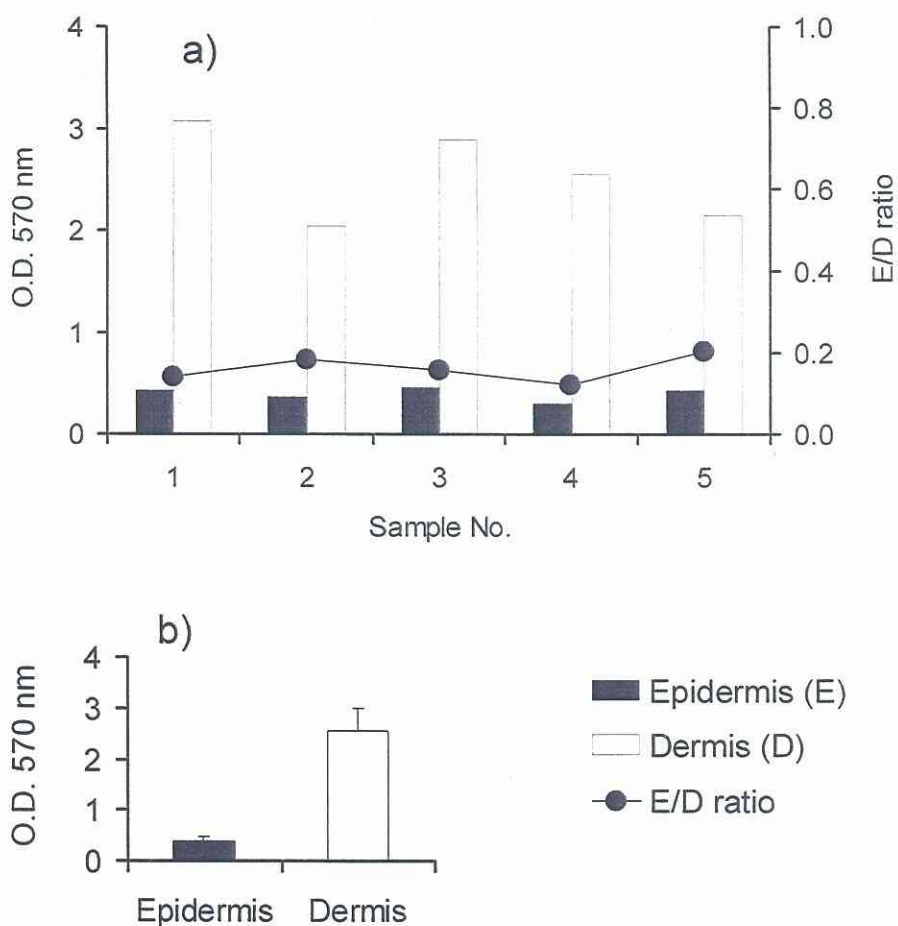


Fig. 8 Distribution of MTT-formazan in epidermis and dermis after topical application of 20% CPC for 24 h to hairless mouse

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

Fig. 9 に表皮および真皮中 CPC 濃度の時間推移を示した。真皮中濃度は 12 時間以降一定となる傾向を示したが、表皮中濃度は 24 時間まで増加し続けた。

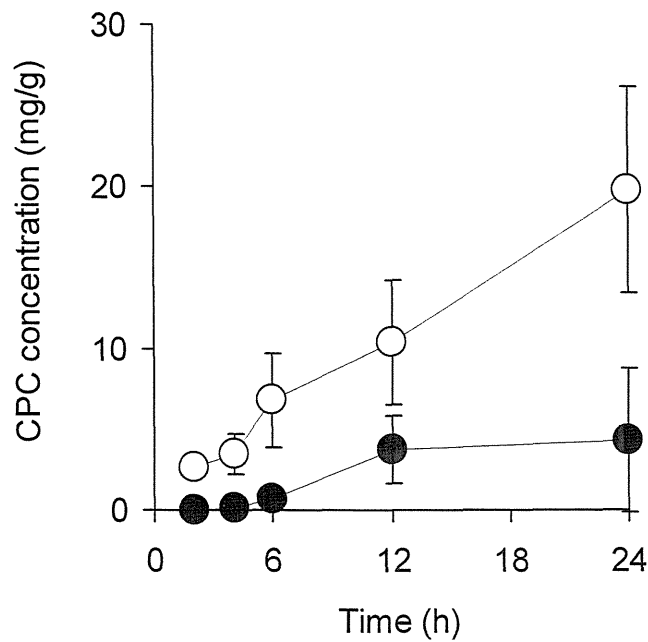


Fig. 9 Time course of CPC concentration in epidermis and dermis after topical application of 20% CPC to hairless mouse.
Symbols: (○), epidermis; (●), dermis.
Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

Fig. 10 に TER (電気抵抗値) の経時的変化を, Fig. 11 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 時間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 時間以降一定となった。これらのことから変曲点 (約 4 時間) 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。

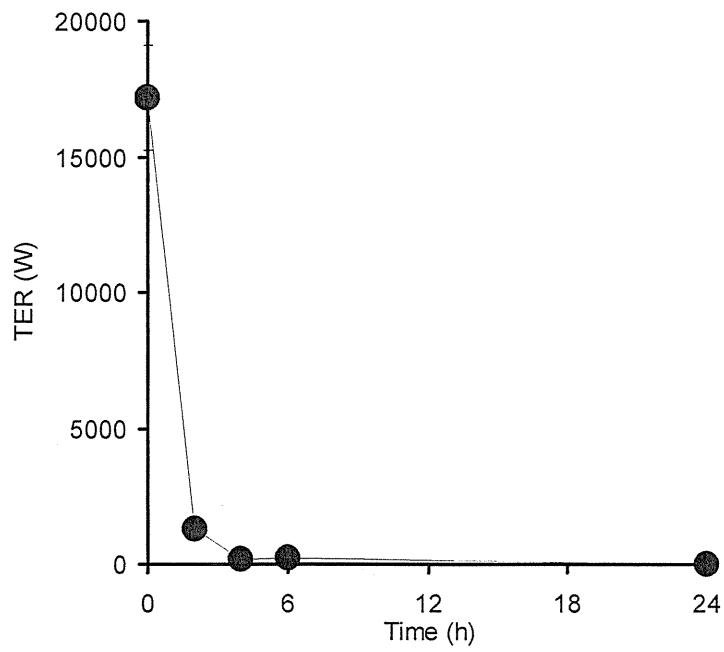


Fig. 10 Time course of transcutaneous electrical resistance after topical application of 20% CPC to hairless mouse
Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

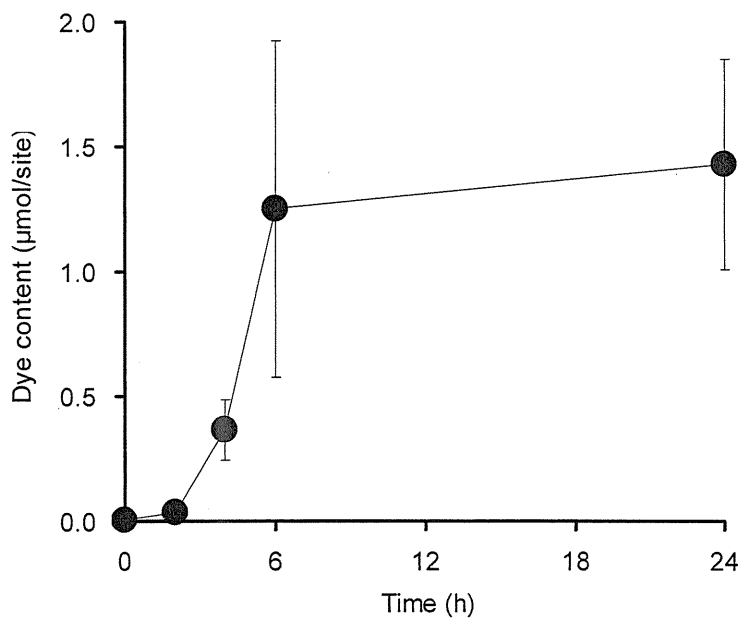


Fig. 11 Result of dye binding test; time course of dye content after application of 20% CPC to hairless mouse
Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

5. Discussion

現在のところ toxicodynamics に関する報告はそれほど多くない。しかしながら、用量と反応という点から考えると PK/PD データと同様に考えることができる。すなわち、薬物の効果について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”がある^{21, 22)}。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知れない。ケラチノサイトやフィブロブラストなどの細胞培養系に刺激物質を添加すると刺激反応（細胞障害性）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されると考えられ、刺激性、特に一時刺激反応は直接反応モデルの中でも最も繁用されている E_{max} モデルで示すことができるだろう。今回の実験において反応部位は、生きた表皮と真皮中のケラチノサイトやフィブロブラストと考えられる。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を形成する角層を透過する必要がある。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から成る真皮層中の薬物濃度には濃度勾配が生じる。濃度の違いだけでなくケラチノサイトやフィブロブラストなどの細胞間で傷害の受けやすさが異なる可能性もある。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。また、表皮と真皮を分離してそれぞれの CPC 濃度を測定した結果、真皮中 CPC 濃度は定常状態を示す傾向が認められたのに対し、表皮中 CPC 濃度は 24 時間まで増加し続けた。通常、表皮中薬物濃度は真皮よりも早く一定（定常状態）になると考えられるが、CPC は界面活性剤であり、角層バリアを破壊すると考えられる。つまり、角層バリアの破壊によって吸収速度が増加するために表皮

中 CPC 濃度が増加し続けると考えられた。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変化が確認され、4 時間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。

皮膚を一つの反応部位と考える場合、もし反応部位における刺激物質の濃度が一定またはそれ以上であれば同レベルの反応が続くと思われる。そのため皮膚の Viability が 1 次反応で減少していくことを容易に想像できると考えた。これまでの研究において経時的な生細胞率の減少は、LSE-high (in vitro) およびヘアレスマウス (in vivo) の両者の intact skin において変曲点を有する二相性を示した。これは、当教室にて実施された乳酸やラウリル硫酸ナトリウムを用いた結果¹⁸⁾と一致した。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、角層バリアの崩壊とともに皮膚中濃度は上昇し、生細胞率の減少速度が増加したものと考えられた。一方、両皮膚ともに stripped skin では、CPC の適用初期より速やかに生細胞率が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の遅れ (lag time) がほとんどないことを示唆している。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ポテンシャルとその作用部位への到達性によって決定される。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²³⁾。このことが化学物質の皮膚刺激能と実際の皮膚刺激が異なる原因であり、単純な培養細胞による皮膚刺激性の評価を困難にしていると考えられる。本研究において観察された LSE-high (in vitro) とヘアレスマウス (in vivo) の類似した皮膚刺激挙動は、培養皮膚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、今回 CPC の適用濃度は、in vivo では in vitro の 1/20 であった。さらに測定した皮膚中濃度は、in vivo よりも in vitro の方が高く、皮膚透過性の違いが原因であると考えられた。一般に LSE-high の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。言い換えると、適用濃度に対する皮膚刺激反応の評価に培養皮膚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。当教室では、培養皮膚と実際のヒトおよび動物の皮膚を用いて薬物の皮膚透過性について研究し、実際のヒト皮膚および動物皮膚との皮膚透過の類似性についてすでに報告している²⁴⁾。したがって、皮膚刺激性の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。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。

皮膚刺激は、化学物質や物理的因子によってダメージを受けたケラチノサイトやフィibroblastから放出される炎症性メディエータによって生じる炎症反応として定義されている。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。今回我々は MTT 試験による細胞障害性によって CPC による皮膚刺激性を評価した。培養ヒト皮膚モデルを用いたこの方法は、ECVAM によってバリデーションが実施されているが、20 化合物を評価したプレバリデーションの結果では、いくつかの偽陰性と偽陽性が認められ、その特異性はおよそ 67%であったことから、現在のところ細胞毒性試験では必ずしも刺激物質と非刺激物質間で正しい予測結果を示すとは限らない^{14, 25)}。

皮膚刺激性には様々な種類があり、そのメカニズムも多様である。また刺激物質の種類によってもクロトン油のようにサイトカインを強く産生させるものや、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) などの比較的産生能の弱いものが知られている²⁶⁾。SLS は陰イオン性の界面活性剤であり、最も有名な皮膚刺激物質の一つである。CPC は陽イオン

性の界面活性剤であり、CPC もまた皮膚刺激性を示すことが知られている。本研究でも観察されたように、多くのイオン性界面活性剤は角層のバリア機能を低下させる²⁷⁾。このことは、界面活性剤による経皮吸収促進効果のメカニズムとしても知られている。特に、イオン性界面活性剤は角層を膨潤させ、細胞間の keratin と相互作用する²⁸⁾。さらに、イオン性界面活性剤は細胞壁を破壊し、cytoplasm を放出させる^{29, 30)}。この理由から界面活性剤の皮膚刺激性は細胞毒性試験によって評価できると考えられる。表皮層のケラチノサイトの cytoplasm にはアラーム・サイトカイン³¹⁾と呼ばれている pro-inflammatory cytokine の IL-1 α が含まれている。放出された IL-1 α は、それ自身を含む他の inflammatory cytokine 等の産生を誘導し、さらに複雑な inflammatory cascade (cytokine network) が形成されていく^{32, 33)}。そこで、我々は現在、皮膚において産生される炎症性メディエータ等の時間推移および刺激濃度の評価を行っている。

第 2 編 Evaluation of skin irritation using cultured cells -Effect of skin concentration and applied period on the skin irritation-

1. Introduction

第 1 章では、モルモットとマウスおよび人工皮膚モデルとして Living Skin Equivalent (LSE-high ;TOYOBO Co., Ltd) を用い、起炎剤の皮膚刺激性に及ぼす角層の影響を明らかにしてきた。しかし、局所適用医薬品の皮膚中濃度を測定するにはヒトから皮膚を摘出しなければならない。皮膚の摘出は浸襲性が高く、健康なヒトを用いた臨床試験の実施は倫理上問題がある。将来、局所適用医薬品においても動物実験による評価の規制も高まると考えられ、代替法による局所適用医薬品の評価は不可欠である。薬物による効果の発現あるいは皮膚刺激は薬物が角質を通過し、表皮細胞 (角化細胞) あるいは真皮細胞 (繊維芽細胞) に接触することで引き起こされる。この発生機序から考えると、培養細胞を用いて薬物濃度と皮膚刺激性との関係性を評価することは非常に有用であると考えられる。In vitro モデルを発展させることは、in vivo における予測性を向上させ、実験動物規制および薬物適正使用に寄与できると考えられている。

第 1 章では、ヒト皮膚モデルとして LSE-high (TOYOBO Co., Ltd) モルモットおよびヘアレスマウスを用い、陽イオン界面活性剤である塩化セチルピリジニウムによる皮膚刺激性について報告した³⁴⁾。この結果から、感受性においてはヒトとヘアレスマウスにそれほど違いはないが、モルモットはヒトの 10 倍近い値を示した。後述するが、CPC の皮膚刺激と皮膚中濃度の関係式における濃度依存性を表す指標である γ 値はヘアレスマウスとモルモットはほぼ同じであったが、ヒトと比較すると約 2 倍の値を示した。これ結果から、CPC による皮膚刺激性に種差があると推察された。

一次性皮膚刺激は非アレルギー性の皮膚障害により引き起こされた皮膚の炎症反応といふことができる。非アレルギー性の皮膚障害はアレルギー性接触性皮膚炎に見られる IV 型アレルギー反応や、蕁麻疹にみられる I 型アレルギー反応といった機序を介さず、皮膚角化細胞や角質

層に何らかの直接的なダメージが与えられた結果、生じた皮膚障害を指す。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表皮角化細胞が種々のサイトカインを産生し、これらにより活性化された T 細胞が集積し、皮膚炎を引き起こすと考えられている³⁵⁾ (Fig. 12)。表皮は外側から、角層、淡明層、顆粒層、有棘層、基底層の5層からなる。特に有棘層は表皮体積の大部分を占め、5~10層からなる。一方、真皮は表皮側から、乳頭層、乳頭下層、網状層に分けられ、血管、神経、汗腺などの皮膚付属器官も存在している³⁶⁾。表皮の有棘層の中には免疫担当細胞であるランゲルハンス細胞が存在する³⁶⁾。ランゲルハンス細胞は種々のサイトカインの産生能、抗原提示能を有している³⁶⁾。血管周囲のみであるが、真皮にも免疫担当細胞であるマクロファージや肥満細胞は少数存在する³⁶⁾。真皮は皮膚に物理学的強度、柔軟性を与えるためコラーゲン、エラスチン、ムコ多糖を含み繊維層を形成しており、細胞密度は表皮に比べ低い。組織学的構成から、表皮が皮膚の免疫反応を担っていると思われる。In vitro 皮膚刺激性試験法の開発を進める上で皮膚免疫反応機序の解明は急務である。

今回我々は、ヘアレスマウス、モルモットおよびヒトの培養繊維芽細胞を用いて刺激性に関する種差について検討した。さらに、ヒトの角イ蛸田胞と繊維芽細胞の薬物濃度と皮膚刺激性の関係について調査し、角化細胞と繊維芽細胞の皮膚刺激への関与について検討した。

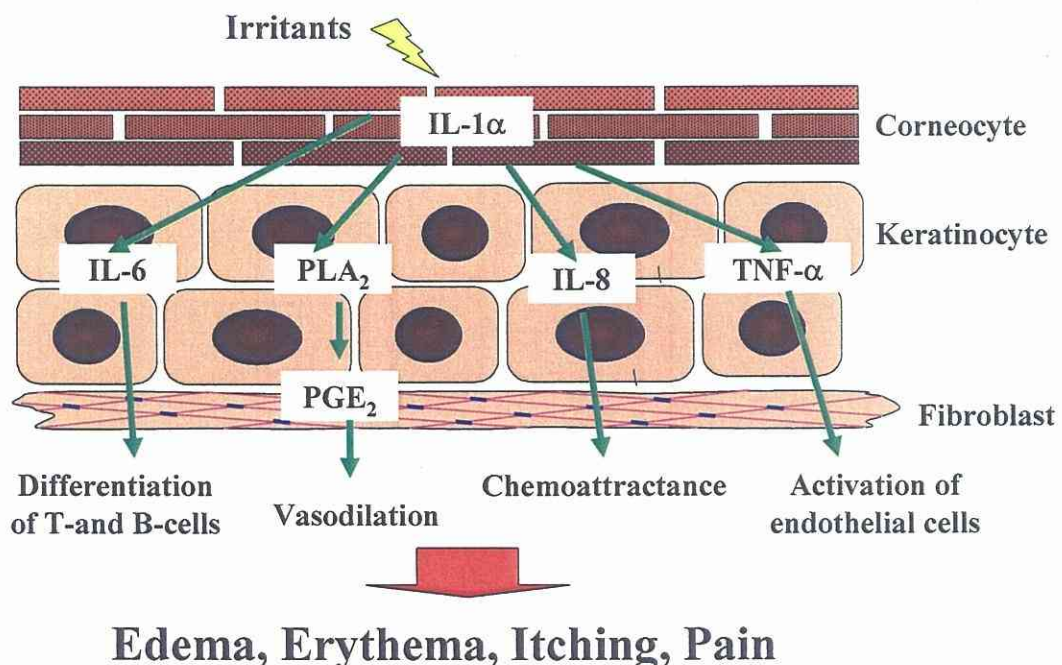


Fig. 12 Diagram of inflammatory mechanism of first-order skin irritation.

2. Materials and methods

2-1. Chemicals

CPC は東京化成工業株式会社（東京）から購入した。Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) は日本製薬（東京）から購入した。Fetal bovine serum (FBS) は大日本住友製薬株式会社（大阪）から購入した。MTT [3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] は Sigma (St. Louis, Missouri, USA) から購入した。コラゲナーゼは和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。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。

2-2. Animal and Skin Sample

Trypsin-EDTA および Penicillin-Streptomycin は Invitrogen Corp (Carlsbad, CA, USA) より購入したヒト皮膚繊維芽細胞株 (HDF) , ヒト表皮角化細胞 (HEK) および表皮角化細胞増殖培地 (基礎培地+添加剤) は東洋紡績株式会社（大阪）から購入した。Hos:Hr-1 系雄性ヘアレスマウスは三共ラボサービス株式会社（東京）から、Hartley 系雄性モルモットは埼玉実験動物（埼玉）から購入した。

2-3. Cell culture

ヒト皮膚繊維芽細胞およびヒト表皮角化細胞は 10%FBS 添加 DMEM で 37°C, 5%CO₂ 条件化で培養した。ヘアレスマウスおよびモルモット新生仔をエーテル吸入で死亡させた後、背部から皮膚を摘出し、0.05%コラゲナーゼ含有培地に 4°C の条件化で 40 時間浸した。40 時間後 10%FBS 含有 DMEM に移し、表皮を剥離した。剥離後、ピンセットおよびピペットを用いて真皮を崩し、バラバラになった繊維芽細胞を 37°C, 5%CO₂ 条件下で培養した。

2-4. CPC application

(1) Effect of CPC concentrations on the cell viability (dead cell number) of human fibroblasts

培養細胞を 96 well microplate にそれぞれ 0.05×10^4 , 0.1×10^4 , 0.25×10^4 , 0.75×10^4 , 1.0×10^4 cell/well として播種し, 2 時間インキュベートした. その後, CPC 濃度が 0.001, 0.005, 0.01, 0.1 mg/ml (終濃度) である培地をそれぞれ 100 μ l ずつ適用し, 24 時間インキュベートした. 次に, CPC 含有培地を除去し, Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し, MTT 濃度を 0.333 mg/ml にした培地を 100 μ l 適用し, 4 時間インキュベートした. これに, MTT 含有培地を取り除き, 0.04 N 塩酸-イソプロパノール溶液を 100 μ l 注入し, 1 時間暗所に放置し, 細胞内で生成された MTT-formazan をマイクロプレートリーダー (BioRad, 東京) で測定した.

(2) Effect of CPC application times on the cell viability (dead cell number) of human fibroblasts

96 well microplate に 1well 当たり 2×10^4 cell 播種し, 2 時間インキュベートし, それぞれ 0.0001, 0.0003, 0.001 mg/ml の濃度の CPC を 2 および 4 時間適用した. その後の操作は 4-1 と同様の方法で行った.

(3) Effect of CPC concentrations on the cells viability (dead cell number)

各培養細胞を 96 well microplate に 1 well 当たり 2×10^4 cell 播種し, 2 時間インキュベートした. 2 時間後, CPC 濃度を 0 (control), 0.0003, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03 mg/ml とした培地をそれぞれの well に 100 μ l 適用し, 2 時間インキュベートした. その後の操作は (1) と同様の方法で行った.

(4) Effect of CPC application times on the cell viability (dead cell number) of human fibroblasts and human keratinocytes

ヒトの角化細胞と繊維芽細胞の cell viability に対する CPC 濃度の影響

換作は (3) と同様の方法で行った。

2-5. Parameter calculations

CPC による刺激性を評価するために (1) 式より dead cell number (%) を算出した。

$$Dead\ cell\ number\ (\%) = 100 - \left(\frac{absorption_{(sample)}}{absorption_{(control)}} \times 100 \right) \quad (1)$$

各適用濃度より得られた dead cell number (%) から Sigmoid E_{max} model に従う以下の

(2) 式に非線形最小二乗法を用いて fitting し、各パラメータを算出した。

$$I = \frac{I_{max} \times C^\gamma}{IC_{50}^\gamma + C^\gamma} \quad (2)$$

なお、(2) 式の I_{max}、C、IC₅₀ および γ はそれぞれ最大細胞毒性 (死細胞率: %), CPC 濃度, 50%細胞毒性発現濃度, 形状因子を表している。

3. Results

3-1. CPC application to cultured cells

(1) Cell viability (absorbance) of human fibroblasts

0.001-0.1 mg/ml の濃度範囲の CPC を 24 時間適用した場合の cell viability に対する CPC の濃度を Fig. 13 に示す。それぞれの濃度で、cell viability (吸光度) に差が見られなかった。また、細胞数の違いによって得られた cell viability (吸光度) にも差が見られなかった。おそらく適用時間が長すぎたため濃度の影響が確認できなかったと考えられた。

(2) Cell viability (dead cell number) of human fibroblasts

CPC を 2 時間および 4 時間適用した場合の dead cell number (%) を Fig. 14 に示す。4 時間適用 (●) した場合、CPC 濃度 0.0003 と 0.001 mg/ml の刺激性に差が見られなかつ

た. 一方, 2 時間適用の場合, 同じ濃度ポイントで差が確認できた. 以上より, CPC の適用時間を 2 時間に設定することで dose-response を確認できると判断した.

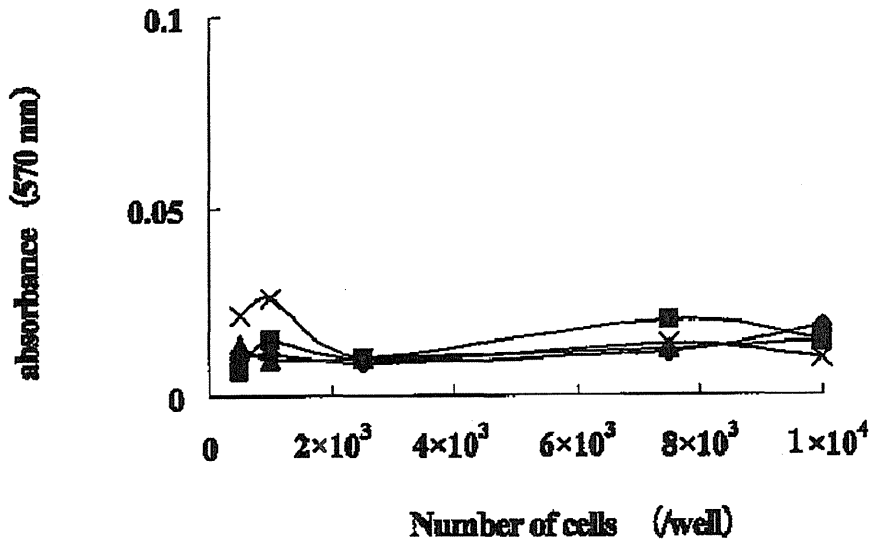


Fig. 13 Time course of cell viability (%) after application of different CPC concentrations to human fibroblasts.

Symbols:(◆), 0.01 mg/ml, (■), 0.05 mg/ml, (▲), 0.1 mg/ml, (×), 1.0 mg/ml. (n=4)

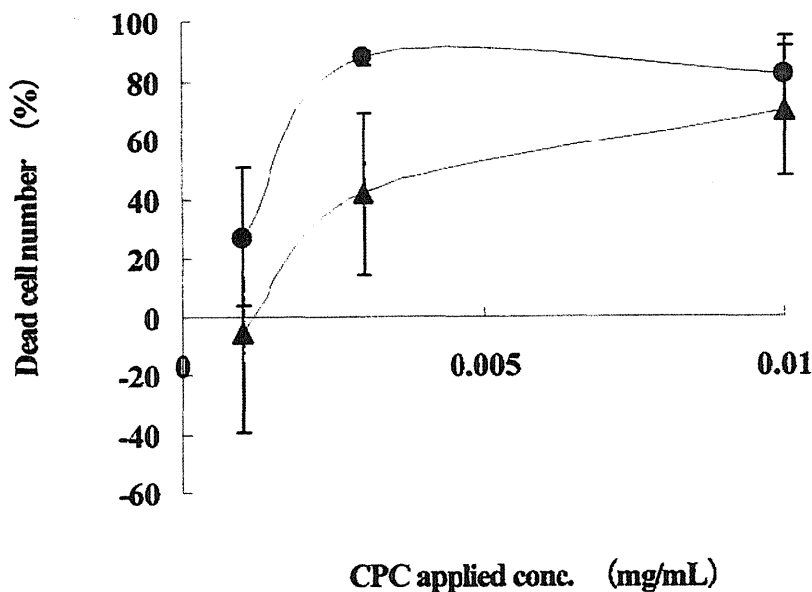


Fig. 14 Effect of different CPC application times on dead cell number (%) after application of CPC to human fibroblasts.

Symbols: (●), 4h, (▲), 2h. (n=4)

(3) Viability of human, hairless rat and guinea pig fibroblasts

各繊維芽細胞の位相差顕微鏡（オリンパス株式会社，東京）写真を Fig. 15 に示す。また，ヒト，ヘアレスマウスおよびモルモットの繊維芽細胞の viability に及ぼす CPC 濃度の影響を Fig. 16 に示す。Table 2 に Fig. 16 の結果からシグモイ型最大効果モデルを用いて解析した結果を示す。モルモットの IC_{50} 値は他 2 種の約 1/10 であった。モルモットとヘアレスマウスの γ 値はほぼ同じであったが，ヒトの γ 値の約 3 倍であった。

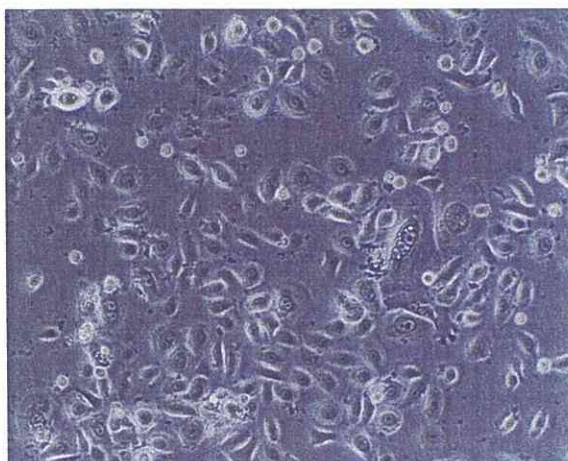


Fig. 15 Light microscopic observation of human dermal fibroblasts.

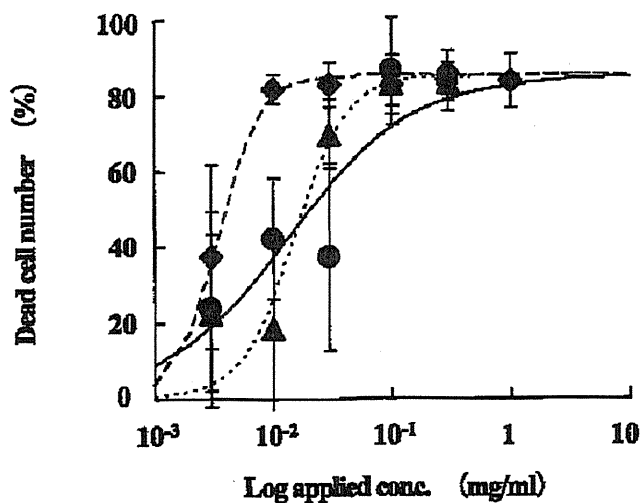


Fig. 16 Effect of different CPC concentrations on dead cell number (%) after application of CPC to human, hairless rat, and guinea pig dermal fibroblasts.

Symbols: (●), human. (▲), hairless rat. (◆), Guinea pig. (n=30)

Table 2 Pharmacodynamic parameters of fibroblasts species after application of CPC

	LSE-high	Hairless rat	Guinea Pig
I_{max} (%)	84.9	85.0	85.0
IC_{50} (%)	1.3×10^{-2}	1.5×10^{-2}	0.35×10^{-2}
γ	0.83	1.94	2.5

3-2. CPC application to human keratinocytes and human fibroblasts

(1) Viability of keratinocytes and human fibroblasts

Fig. 17に角化細胞の位相差顕微鏡（オリンパス株式会社，東京）写真を示す．さらに，Fig. 18にヒト皮膚繊維芽細胞とヒト角化細胞のviabilityに及ぼすCPC濃度の影響を示す．Table 3にFig. 18の結果からシグモイ型最大効果モデルを用いて解析した結果を示す．角化細胞の IC_{50} 値は繊維芽細胞の約1/10であった． γ 値は両細胞ともほぼ同じであった．

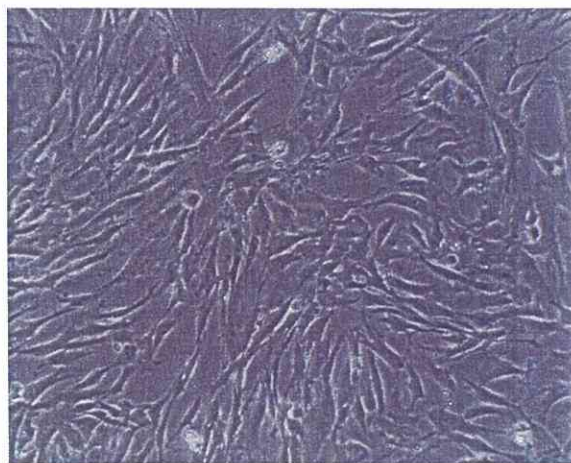


Fig. 17 Light microscopic observation of human epidermal keratinocytes.

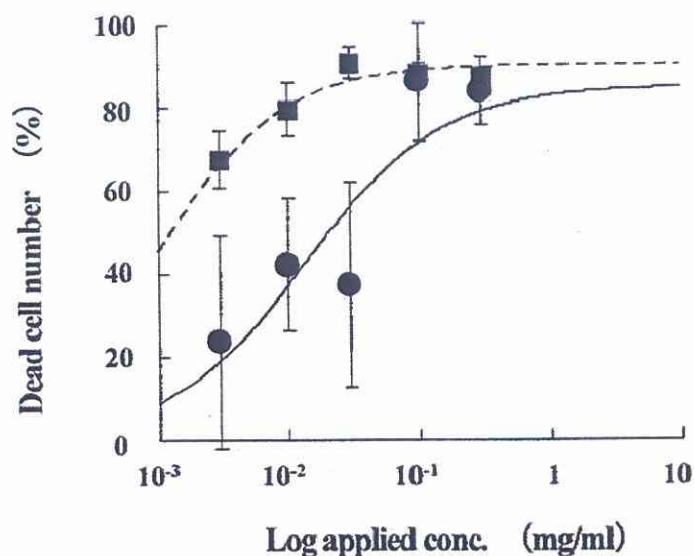


Fig. 18 Effect of different CPC concentrations on dead cell number (%) after application of CPC to human and hairless rat keratinocytes. Symbols: (■), Keratinocyte (n=10), (●), Fibroblast (n=30)

Table 3 Pharmacodynamics parameters of human fibroblasts and human keratinocytes after application of CPC

	Fibroblasts	Keratinocytes
I_{max} (%)	84.9	90
IC_{50} (%)	1.3×10^{-2}	0.1×10^{-2}
γ	0.83	0.9

4. Discussion

ヒト、ヘアレスマウスおよびモルモットの繊維芽細胞を用いて刺激性を検討した結果、モルモットはヒトよりも4倍ほど感受性が高いことが明らかとなった。マウスやラットは刺激に対する紅斑反応の判定が困難である。一般的に皮膚刺激性試験はモルモットやウサギを用いて動物実験を行っている。しかし、本研究の結果からモルモットを用いて評価した場合、人の刺激性を予測するには過大評価になる可能性がある。感受性はマウスの方がヒトに近いことから、マウスを用いて評価できる方法を開発することで刺激性の予測を高めることができると考えられる。

また、ヒトの繊維芽細胞と角化細胞を用いて刺激性を評価した結果、角化細胞は繊維芽細胞の約10倍の感受性を示した。感受性の高い角化細胞が皮膚表面に存在することで、免疫反応を速やかに発現させ、外来物質の深部組織への到達の防止および体外への速やかな排出を行っていると考えられる。角層中濃度の評価が今後さらに重要となることが推定される。

References

1. J.H. Draize, G. Wooddard, and H.O. Calvery. 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 (1994).
2. T. Kaenko, A. Hashimoto, T. Hayashi, N. Umehara, M. Tezuka. Safety studies of a new wound dressing material SG-01 for several experimental injury in rabbits and guinea pig. *Drug Delivery System.* 20:145-156 (2005).
3. 栗下 昭弘, 安全性評価と動物実験代替法. *AATEX.* 7:17-19 (2005).
4. 佐藤 温重, 動物愛護と代替法研究. *AATEX.* 7:20-22 (2000).
5. S. Pappinen, S. Pasonen-Seppänen, M. Suhonen, R. Tammi, A. Urtti. Rat epidermal keratinocyte organotypic culture (ROC) as a model for chemically induced skin irritation testing. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 208:233-241 (2005).
6. M. Kotani, Y. Masamoto, M. Watanabe. An alternative study of the skin irritant effect of an homologous series of surfactants. *Tocol. In Vitro.* 8:229-233 (1994).
7. L. Sanchez, M. Mitjans, M.R. Infante, M.P. Vinardell. Assessment of the potential skin irritation of lysine-derivative anionic surfactants using mouse fibroblasts and human keratinocytes as an alternative to animal testing. *Pharm. Res.* 21: 1637-1641 (2004).

8. K. Muller-Decker, G. Furstenberger, F. Marks. Keratinocyte-derived proinflammatory key mediators and cell viability as in vitro parameters of irritancy: A possible alternative to the Draize skin irritation test. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127:99-108 (1994).
9. K. Sugibayashi, T. Watanabe, T. Hasegawa, H. akahashi, T. Ishibashi. Kinetic analysis on the in vitro cytotoxicity using Living Skin Equivalent for ranking the toxic potential of dermal irritants. *Toxicol. In Vitro.* 16: 759-763 (2002).
10. J. Pinnagoda, R.A. Tupker, T. Agner, , J. Serup. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Derm.* 22:164-178 (1990).
11. R.A. Tupker, J. Pinnagoda, P.-J. Coenraads, J.P. Nater. The influence of repeated exposure to surfactants on the human skin as determined by transepidermal water loss and visual scoring. *Contact Derm.* 20:108-114 (1989).
12. 黒木 登志夫, 許 南浩, 千田 和広 (編) . 新培養細胞実験法, 羊土社, 東京, 66-80 (1999).
13. FDA: Guidance for Industry, Exposure-response relationships - Study Design, Data Analysis, and Regulatory Applications, April 2003.
14. P. A. Botham. The validation of in vitro methods for skin irritation. *Toxicol. Lett.* 149: 387-90 (2004).
15. 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 correlation. *Pharm. Res.* 19: 669-675 (2002).

16. J. J. Jr. Parran. Mouthwash compositions. US patent No. 4323551. The Procter & Gamble Co. (1981).
17. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS). No. UU5075000.
18. K. Sugibayashi, T. Watanabe, T. Hasegawa, H. Takahashi, and T. Ishibashi. 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).
19. M. Washitake, T. Yajima, T. Anmo, T. Arita, and R. Hori. Studies on percutaneous absorption of drugs. III. Percutaneous absorption of drugs through damaged skin. *Chem. Pharm. Bull.* 21: 2444-2451 (1973).
20. C. Surber, K. P. Wilhelm, M. Hori, H. I. Maibach, and R. H. Guy. Optimization of topical therapy: partitioning of drugs into stratum corneum. *Pharm. Res.* 7: 1320-1324 (1990).
21. N. L. Dayneka, V. Garg, and W. J. Jusko Articles. Comparison of four basic models of indirect pharmacodynamic responses. *J. Pharmacokinetic. Biopharm.* 21: 457-478 (1993).
22. W. J. Jusko, and H. C. Ko. Physiologic indirect response models characterize diverse types of pharmacodynamic effects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 56: 406-419 (1994).

23. F. N. Marzulli. Barrier to skin penetration. *J. Invest. Dermatol.* 39: 387-393 (1962).
24. 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).
25. J. H. Fentem, D. Briggs, C. Chesne, G. R. Elliott, J. W. Harbell, J. R. Heylings, P. Portes, R. Roguet, J. J. van de Sandt, 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).
26. E. Berardesca, and F. Distanto. The modulation of skin irritation. *Contact Dermatitis.* 31: 281-287 (1994).
27. J. Scala, D. E. McOsker, and H. H. Reller. The percutaneous absorption of ionic surfactants. *J. Invest. Dermatol.* 50: 371-379 (1968).
28. A. C. Williams, and B. W. Barry. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56: 603-618 (2004).
29. A. de Brugerolle de Fraissinette, V. Picarles, S. Chibout, M. Kolopp, J. Medina, P. Burtin, M. E. Ebelin, S. Osborne, F. K. Mayer, A. Spake, M. Rosdy, B. De Wever, R. A. Ettlín, and A. Cordier. 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).
30. R. Osborne, and M. A. Perkins. An approach for development of alternative test methods

based on mechanisms of skin irritation. *Food and Chemical Toxicology*. 32: 133-142 (1994).

31. H. Baumann, and J. Gauldie. The acute phase response. *Immunol. Today*. 15: 74-80 (1994).
32. T. A. Luger. Epidermal cytokines. *Acta Derm. Venereol. Suppl.* (Stockh). 151: 61-76; discussion 106-110 (1989).
33. 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: 535-346 (1994).
34. T. Welss, , D.A. Basketter, , K.R. Schröder. In vitro skin irritation: Facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol. In Vitro*. 18:231-243 (2004).
35. 鈴木 正 (編) . *皮膚科学*, コーセー研究所 (株) , 東京, (1992).
36. S. Kano, K. Sugibayashi. Kinetic analysis on the skin disposition of cytotoxicity as an index of skin irritation produced by cetylpyridinium chloride: Comparison of in vitro data using a three-dimensional cultured human skin model with in vivo results in hairless mice. *Pharm. Res.* 23: 329-335 (2006).

