

A. 研究目的

医薬品、化粧品あるいは添加物等の *in vitro* 経皮吸収試験法は、適切な実験原理に基づき、適切な解析を行い、*in vitro* 経皮吸収試験法の結果を正確に記述できるデータを提示する必要がある。

OECD は、2000 年 12 月、第 4 次の skin absorption: *in vitro* method の OECD ガイドライン（案）を作成し、加盟各国に配布した。加盟各国からの意見を 2001 年 3 月までに求め、OECD はガイドラインの作成を検討しているところである。OECD ガイドライン（案）の中で、*in vitro* 皮膚吸収試験に用いられる皮膚としてヒトあるいは動物由来の皮膚を使うことができると記載されている。

最近、皮膚ケラチノサイトを用いた皮膚 3 次元培養細胞モデルが我が国でも簡単に入手できるようになり、それらの製品の品質面あるいは堅牢性の面での評価も向上している。そこで、我々は、ヒトあるいは動物由来の皮膚の代替法として、皮膚 3 次元培養細胞モデルを用い、各種化合物の *in vitro* 経皮吸収実験への応用を検討することを目的に実験を行った。また、平成 10 ～ 12 年度に行ったモルモットの腹部剥離皮膚を用いた *ex vitro* 的な経皮吸収試験との比較検討を実施し、皮膚 3 次元培養細胞モデルを用いた *in vitro* 経皮吸収試験への適応性についての評価を行った。

B. 研究方法

1) 試薬および試液

安息香酸ナトリウム (BA)、レゾルシン (RN)、サリチル酸 (SA)、パラオキシ安息香酸メチル (MP)、パラオキシ安息香酸エチル (EP) および 4-クロロ-m-クレゾール (CC) および試薬特級アセトニトリルは和光純薬工業株式会社より購入した。HPLC カラムは CAPCELL PAK C18(SG 120 type) (粒径 5 μ m、内径 4.6 mm、長さ 25 cm) を資生堂より購入した。

三次元皮膚培養細胞モデルは 6 穴マイクロプレートに入った東洋紡製の TESTSKIN の LSE-high と 24 穴マイクロプレートに入ったゲンゼ製の Vitrolife-Dermis の二種類を用いた。

Franz 型拡散セル：縦型のセルで、donor 側および receptor 側の容量は、それぞれ、1.0 ml および 19.0 ml である。透過断面積は 0.246 cm² の円形状であった。

透過試験用原液：BA, RN, SA, MP, EP および CC の、それぞれ、約 20 mg を精密に量り、100 ml のメスフラスコに入れ、20% プロピレングリコール (PG) 溶液を加えて溶解し、100 ml とした。(0.2%)

50 mM リン酸二水素カリウム試液：リン酸二水素カリウム 6.8 g に水を加えて溶解し、1000 ml とした。

50 mM リン酸水素二カリウム試液：リン酸水素二カリウム（無水）7.1 g に水を加えて溶解し、1000 ml とした。

50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 6.0)：50 mM リン酸二水素カリウム試液 500 ml に 50 mM リン酸二水素カリウム試液を加えて pH 6.0 に調整した。

2) 装置

HPLC 装置は島津製 LC-10A 型ポンプ、島津製 CTO-10A 型カラムオーブン、島津製 SPD-6A 型紫外吸光光度計、島津製 SIL-10AXL 型カラムオーブンおよび島津製 CR-6A 型クロマトパックを連結して用いた。池本理化製 40-209-61 型 6 連式マグネチックスターラーおよび東京理化製 LTI-601SD 型低温インキュベータを用いた。

3) 三次培養皮膚の調製

TESTSKIN の場合：ポリカーボネート膜を底辺に装着されたトランスウエル上で生育された TESTSKIN を 6 穴マイクロプレートより取り出し、ポリカーボネート膜をナイフで切り、トランスウエルと TESTSKIN の乗ったポリカーボネート膜を切り離した。ポリカーボネート膜をろ

紙上に置き、ピンセットにてポリカーボネート膜と TESTSKIN を分離した。TESTSKIN を Franz 型拡散セルに装着した。

Vitrolife-Dermis の場合：24穴マイクロプレートに入った Vitrolife-Dermis を37℃の5%炭酸ガスインキュベータ中に入れ、1時間放置する。マイクロプレート中のゾルを完全にゲル化させた後、スポンジ上に培養された Vitrolife-Dermis のプラスチック環を取り出し、その環を縦型の Franz 型拡散セルに装着した。

4) 透過実験

三次培養皮膚が装着された Franz 型拡散セルの receptor 側に20%PG溶液19mlを加え、マグネチックを入れた。donor 側に透過試験用原液1.0mlを加え、32℃の低温インキュベータ中に拡散セルを設置し、マグネチックスターラーで攪拌しながら、0.5~3時間、30分間隔で receptor 側の溶液400 μ lを分取した。20%PG溶液400 μ lを receptor 側に加え、一定の容量とした。

各時間毎に採取した試料溶液20 μ lを用いて、donor 側から receptor 側に透過した試験物質の測定を行った。

(HPLC操作条件)

1. BA, RNおよびSAの場合

検出器：紫外吸光度計(測定波長：230nm)

カラム：CAPCELL PAK C18(内径4.6mm、長さ25cm)

カラム温度：35℃

移動相：50mMリン酸塩緩衝液(pH6.0)ノアセトニトリル混液(19:1)

流量：1ml/min

2. MP, EPおよびCCの場合

検出器、カラム、カラム温度、流量は1.と同じである。

移動相：50mMリン酸塩緩衝液(pH6.0)ノアセトニトリル混液(11:9)

C. 結果および考察

1 μ g/mlのBA, RNおよびSAの3種類の化合物を含む20%PG溶液を調製し、その20 μ lを用いてHPLCを行い、そのクロマトグラムを Fig.1a に示した。BA, RNおよびSAの保持時間は、それぞれ、7.6, 12.0および13.9分であった。

同様に、1 μ g/mlのMP, EPおよびCCの3種類の化合物を含む20%PG溶液を調製し、その20 μ lを用いてHPLCを行い、そのクロマトグラムを Fig.1b に示した。MP, EPおよびCCの保持時間は、それぞれ、4.8, 6.1および8.9分であった。

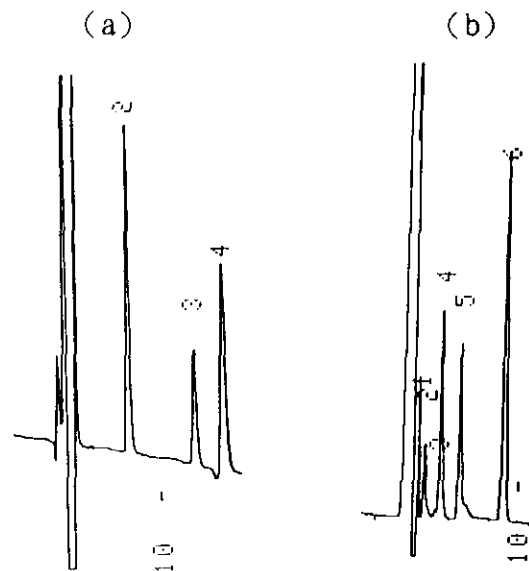


Fig.1 HPLC Chromatograms of MP, EP and CC(a) and of BA, RN and SA(b)

透過試験用原液1.0mlを TESTSKIN を用いて調製された Franz 型拡散セルの donor 側に加え、32℃で0.5~3時間に receptor 側に透過してくるMP, EPおよびCCの各時間毎の累積透過量を Fig.2 に示した。

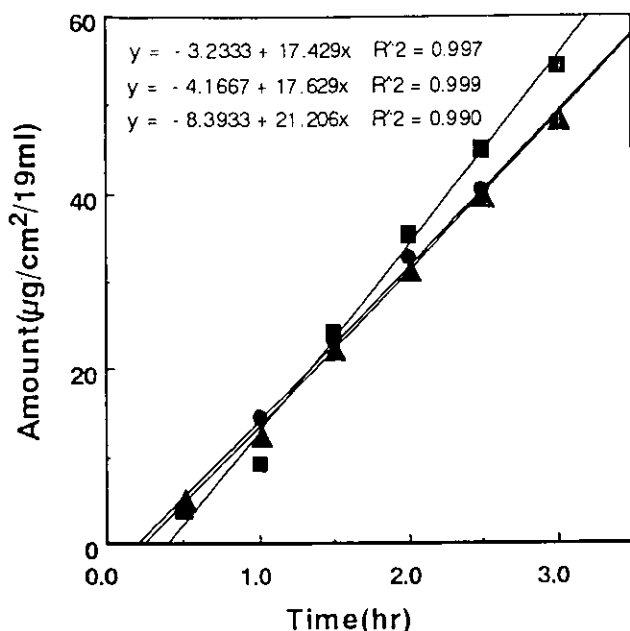


Fig.2 Permeation of MP,EP and CC through TESTSKIN

● MP, ▲ EP, ■ CC

また、同様に、TESTSKINを用いたときのBA、RNおよびSAの各時間毎の累積透過量を Fig.3 に示した。

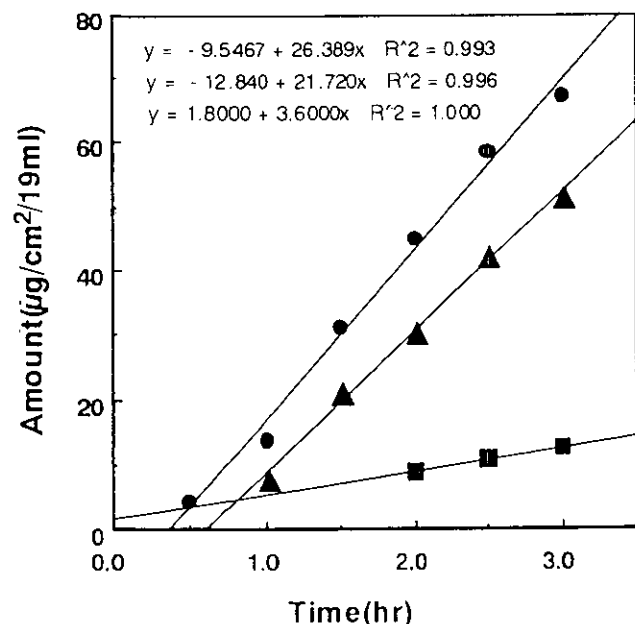


Fig.3 Permeation of SA, RN and SA through TESTSKIN

● BA, ▲ RN, ■ SA

また、同様に、スポンジ状の高分子膜の上で皮膚細胞を培養して得られた VitroLife-Dermis をスポンジ膜を Franz 型拡散セルに装着し、各種試験物

質の透過の実験を行い、Fig.4 および Fig.5 に示した。

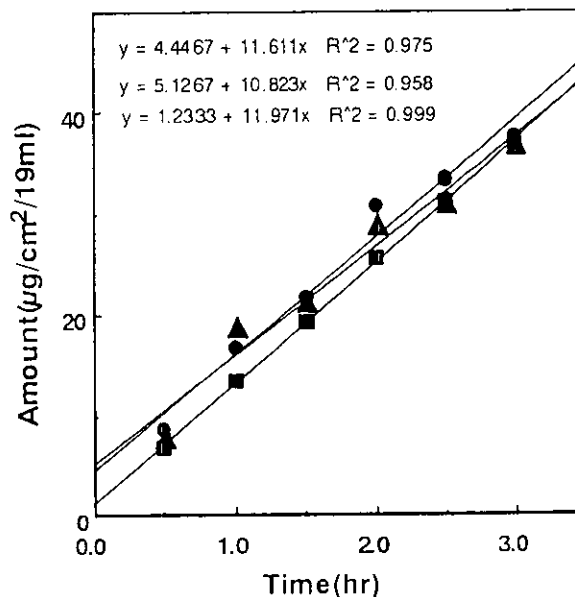


Fig.4 Permeation of MP,EP and CC through VitroLife-Dermis

● MP, ▲ EP, ■ CC

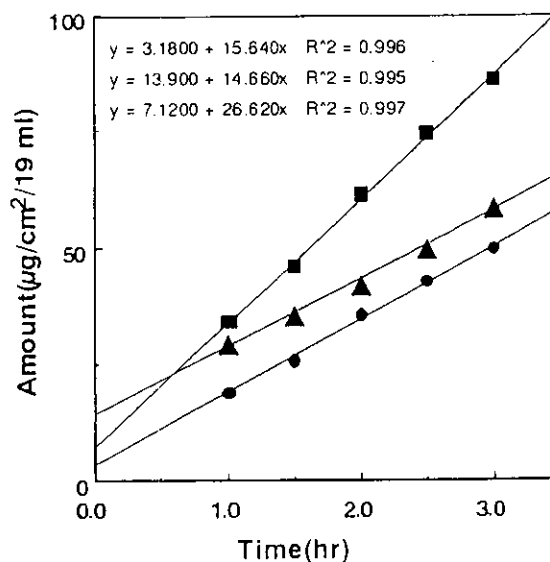


Fig.5 Permeation of BA, RN and SA through VitroLife-dermis with polymer film

● BA, ▲ RN, ■ SA

Fig.2 ~ Fig.5 で示した各種試験物質の累積透過量と透過時間から得られた一次方程式の傾きが透過速度 (Flux) であり、それら透過速度を Table 1 に示した。

Table 1 Flux of MP, EP, CC, BA, RN and SA using TESTSKIN, Vitrolife-Dermis and capacity factor of each compound

	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) using TESTSKIN	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) using Vitrolife-Dermis	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) using abdominal skin of Guinea-pig	k'
MP	17.4	11.6	4.7	4.36
EP	17.6	10.8	6.0	9.49
CC	21.2	12.0	8.2	20.38
BA	26.4	15.6	4.7	0.35
RN	21.7	14.7	1.9	0.80
SA	3.6	26.6	44.9	0.39

また、平成10年～12年にかけて行ったモルモットの腹部剥離皮膚を用いた透過実験から得られた Flux を示した。同時に、カラムとして、Unisil Q C18、移動相として、50 mMリン酸塩緩衝液 (pH 6.0) / アセトニトリル混液 (3:1)、流量 1 ml/min を用いて測定した各試験物質の質量分布比 ($k' = (t_R - t_0) / t_0$) も示した。

SA から得られた Flux が TESTSKIN あるいは Vitrolife-Dermis を用いた場合、ともに小さい値を示した。それ以外の試験物質では大きな値を示し、TESTSKIN の Flux は腹部剥離皮膚から得られた Flux の 2.6 ~ 11.4 倍の値を、また、Vitrolife-Dermis の Flux は、腹部剥離皮膚から得られた Flux の 1.5 ~ 7.7 倍の値を示した。

Fig.6 に SA を除く 5 種類の試験物質の $\log k'$ と TESTSKIN、Vitrolife-Dermis あるいは腹部剥離皮膚から得られた透過速度との関連性を示した。

Fig.6 に示したように、試験物質の $\log k'$ と各種皮膚での透過速度は類似したパターンを示していることが示唆された。

Vitrolife-Dermis はスポンジ部分と皮膚モデルを一緒に用いて実験を行った。そのため、高分子膜のスポンジ部分の試験物質の透過に及ぼす影響を検討するため、透過実験を行い、スポンジ部分のみを用いて透過実験を行った。Table 2 にスポンジ部分を含む Vitrolife-Dermis とスポンジ部分のみを用いての透過実験の結果を示した。

スポンジ部分のみでの透過速度はスポンジ部分を含む Vitrolife-Dermis の透過速度の 2.6 ~ 3.4 倍であり、透過律速は Vitrolife-Dermis が担っていることが明らかになった。

界面活性剤の皮膚への影響を調べるため、10 mM のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) あるいは塩化ベンザルコニウム (BK) 溶液を調製し、

その溶液 1.0 ml を TESTSKIN を用いて調製された Franz 型拡散セルの donor 側に加え、32°C で 30 分間処理した後、20% PG 溶液 1 ml で 3 回 donor 側を洗う。透過試験用原液 1.0 ml を donor 側に加え、各時間毎の MP、EP、CC、BA、RN 及び SA の透過速度を Table 3 に示した。

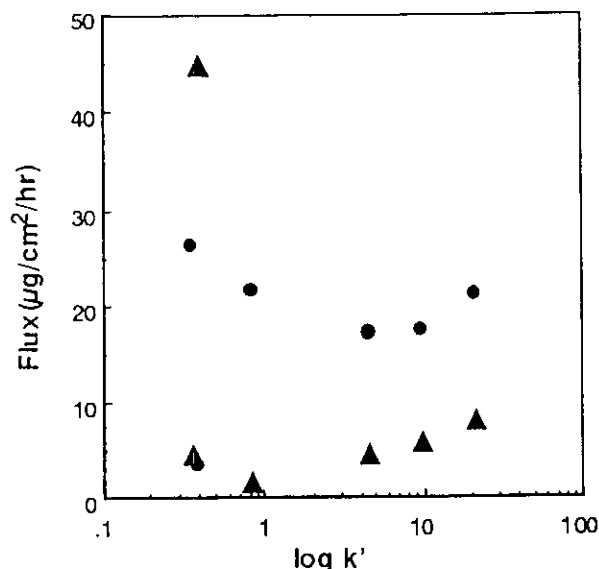


Fig.6 Relationship between Flux and $\log k'$
● Flux from TESTSKIN, ▲ Flux from abdominal skin

Table 2 Flux of MP, EP, CC, BA, RN and SA using Vitrolife-Dermis with polymer film or polymer film

	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) using Vitrolife-Dermis with polymer film	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) using polymer film
MP	11.6	35.5
EP	10.8	36.9
CC	12.0	38.4
BA	15.6	40.1
RN	14.7	50.1
SA	26.6	78.3

Table 3 から分かるように、SDS は MP、EP、CC の透過速度に影響が与えなかったが、 k' 値が 1 以下である BA、RN 及び SA の透過速度を、

Table 3 Flux of MP, EP, CC, BA, RN and SA using TESTSKIN after treating with 10 mM-SDS or BK

	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) using TESTSKIN	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) after treating with 10mM-SDS	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) after treating with 10mM-BK
MP	17.4	17.3	15.7
EP	17.6	18.6	15.9
CC	21.2	20.7	17.9
BA	26.4	15.1	20.7
RN	21.7	3.3	8.7
SA	3.6	1.9	12.2

それぞれ、0.57、0.15 および 0.53 倍

に減少させた。BKは、MP, EP, CC, BAの透過速度を、それぞれ、0.9, 0.9, 0.84, 0.79倍とわずかに減少させた。RNおよびSAの透過速度は、それぞれ、0.4および3.4倍に変化した。

同様に、スポンジ部分を含む Vitrolife-Dermis を10 mMのSDSあるいはBKで処理した後、6種類の試験物質の透過実験を行い、その結果をTable 4に示した。

Table 4 Flux of MP, EP, CC, BA, RN and SA using Vitrolife-Dermis after treating with 10 mM-SDS or BK

	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) using Vitrolife-Dermis	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) after treating with 10mM-SDS	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) after treating with 10mM-BK
MP	11.6	10.9	15.8
EP	10.8	11.4	14.8
CC	12.0	11.8	10.0
BA	15.6	12.1	12.7
RN	14.7	12.9	14.0
SA	26.6	21.1	18.1

SDSの場合、6種類の試験物質の透過速度は0.8~1.1倍であり、透過速度に変化がないことが示唆された。BKの場合、CC, BAおよびRNの透過速度は0.8~1.0倍であったが、MPおよびEPでは1.4倍と透過速度が増加し、SAでは、0.7倍と透過速度が減少した。

10mMのSDSあるいはBK溶液で30分間処理した後、0.5~3時間の透過実験を行い、測定終了後にTESTSKIN細胞のviabilityを測定した。TESTSKIN細胞の生存率は、細胞中のミトコンドリア活性を測定する試薬、Tetra color oneを添加し、37℃で2時間培養した後の培養液の490nmでの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。その結果をTable 5に示した。

Table 5 Cell viability of TESTSKIN after treating with 10mM SDS or BK solution and practicing the permeating test

	blank	control	SDS 1	SDS 2	BK 3	BK 4
Abs 1	0.076	0.418	0.215	0.188	0.166	0.158
Abs 2	0.084	0.455	0.210	0.180	0.157	0.159
average	0.080	0.437	0.213	0.184	0.162	0.159
viability(%)		100.0	37.2	29.2	22.9	22.0

透過実験に供しなかったTESTSKIN細胞から得られた吸光度を100%としたとき、10mMのSDSで処理し、実験に供したTESTSKIN細胞のviabilityは37.2%および29.2%であり、10mMのBKで処理した場合のTESTSKIN細胞のviabilityは22.9%および22.0%であった。10mMのSDSあるいはBKで30分間処理した

後、3時間の透過実験の後でもTESTSKIN細胞の20~30%が生存していることが示唆された。

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

皮膚吸収試験代替法の開発と評価に関する研究
分担研究者 森本 雍憲 城西大学薬学部 教授
（研究協力者）夏目 秀視 城西大学薬学部

研究要旨

第4次ガイドライン（案）*in vitro* 経皮吸収試験法の提示すべきデータである皮膚 integrity に関して、日本において最も汎用される動物種の一つであるヘアレスラットを用いてガイドライン（案）に沿って実験を行い評価した。その結果、ヘアレスラット皮膚の integrity を確認する上で経皮的水分損失（TEWL）の測定が有用であった。しかし、皮膚の損傷の度をあらかず TEWL 値と脂溶性薬物の透過性との間には相関関係が認められなかった。よって、透過物質の物理化学的性質を考慮して動物種ごとに TEWL 値の利用の範囲を明確にする必要があると思われた。

薬物透過実験における摘出皮膚代替物として人工膜を調製し、物質透過特性を評価したところ、脂溶性薬物でヒト皮膚透過性とほぼ等しい透過特性が得られ、さらにポリエチレングリコール類の分子量を増大させることで、水溶性モデル薬物の ANP もヒトとほぼ等しい透過特性が得られた。これはポリオキシエチレン鎖が増大することで水溶性ドメインが増大し水溶性ルートが形成されたことによると考えられる。今回調製した人工膜を用いることでヒト皮膚における脂溶性及び水溶性薬物の透過性をある程度予測できる可能性が示唆されたが、より良い膜とするためにさらなる工夫が必要と考えられた。

A. 研究目的

OECD guideline、skin absorption : *in vitro* method（案）が施行された場合、そこに記載されている試験法に日本が速やかに対応して行くためには、事前にガイドラインの精神さらにはその内容を正確に理解するとともに、我が国の実状に照らして実施可能な範囲と実施時期を検討・判断し、考え方を統一しておくことが重要である。具体的な検討項目の一つとして、摘出皮膚、特にヒト摘出皮膚の使用にまだまだかなりの制限

を受けている日本においては、化学物質の有効性と安全性を評価できるヒト摘出皮膚を代替した実験方法による皮膚透過性測定の意義を明確にし、このガイドラインに組み込まれていく必要がある。

このような考え方に立脚して本厚生科学研究の試験期間内においては、1) ガイドラインに沿った統一的な方法を確認すること、及び2) ヒト摘出皮膚を用いたときと同等の有効性と安全性を評価できる人工膜の調製と人工膜と培養皮膚の複合化システ

1) 試薬

パラヒドロキシ安息香酸メチル (MP) 及び、安息香酸ナトリウム (BA) は、東京化成工業株式会社 (東京) から購入した。ネンブタール®は、ナカライテスク株式会社 (東京) から購入した。その他の試薬は、全て市販の特級品を使用した。実験に用いた薬物の物理化学的性質を Table 1 に示した。

2) Skin

雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht, 10~12 週令, 250~300g) の腹部皮膚を用いた。皮膚厚の調節は行わなかった。

3) Transepidermal water loss (TEWL) の測定

第 4 次 OECD ガイドライン (案) に示してあるように、皮膚 integrity の測定に TEWL の測定を用いることができるか否かを検討した。また、皮膚に損傷がおこったとき、TEWL 値がどのように変化するかを測定するために 2 種類の方法で皮膚損傷を作成した。第 1 には、広範囲の皮膚が損傷した場合として、セロハンテープで皮膚角質層を stripping し、その後の TEWL を測定した。第 2 には、局所的な皮膚の損傷として、25G の針で腹部皮膚を穿刺

し穴を 1 つ開けたときの TEWL を測定した。これらの TEWL を測定して皮膚 integrity について評価した。

具体的な操作方法として、まず雄性ヘアレスラットをネンブタール®で麻酔後、シェーバーを用いて腹部を除毛し、Tewameter M210 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, ケルン、ドイツ) を用いて、箱の中でその腹部の TEWL を測定した (*in vivo* 測定)。

上述の様に TEWL を測定後、その腹部皮膚を摘出した。透過実験に用いる横型セルの片方に、角質層が上になるように摘出皮膚を置き、その上にセルと同径の開放型ガラス製リングをのせて皮膚を挟んだ。その後、横型セルを透過実験に用いるレシーバー溶液で満たし 32°C に維持して、角質層側の TEWL を測定した (*in vitro*)。

広範囲の皮膚の損傷は、セロハンテープで stripping を 5、15、及び 20 回行って作成し、その後同様に TEWL を測定した。局所的な皮膚の損傷は、注射針 (25G) で除毛後の腹部皮膚を穿刺し、穴を一つ開け、その後 TEWL を測定した。

TEWL の測定は 3 分間行い、後半 2 分間の平均値を用いた。統計解析は Microsoft 社製ソフ

Table 1 Physicochemical properties of drugs used in this experiment

Drug	Molecular weight	Solubility* (mg/mL)	Log K _{ow} **
BA	144.11	521.45	-1.77
ANP	188.23	816***	-1.55
MP	152.15	3.12	1.14
EP	166.17	1.14	0.50
PP	180.20	0.62	0.48
BP	194.23	0.32	2.86

* Solubility in phosphate buffer at 32°C (pH = 7.4)

** Log K_{ow} = log (concentration in octanol / concentration in phosphate buffer pH = 7.4) (32°C)

*** Solubility in water at 32°C (pH = 7.4)

Table 2 Description of the method

項目	条件	実施状況
Diffusion cell design	Cell design	横型 static 拡散セル
Skin	皮膚起源	雄性ヘアレスラット
	部位	腹部
	皮膚厚調節	皮膚厚調節できず
Skin integrity (cell viability)	浸透特性試験	TEWL 試験を用いて評価
Skin metabolism	代謝物の測定	HPLC を用いて測定
Test preparation	Solvent used	Phosphate buffer or 40% polyethylene glycol solution
Test preparation application	Skin hydration	実施せず
	Delivery system	使用しない
	放射標識体	使用しない
Temperature and humidity	Temperature	32°C (循環型恒温槽)
	Humidity	実施せず
Terminal procedures	回収液	分析した

ト Excel 2000 を用いて、等分散と仮定した 2 標本による *t*-検定を、*in vivo* 及び *in vitro* の条件で測定した TEWL 間で行った。

4) 損傷した皮膚の薬物透過性の測定

皮膚損傷の程度により薬物の皮膚透過性が、どのように変化するかを検討した。Stripping 及び針の穿刺により皮膚を傷つけた後、薬物透過実験を行い、薬物透過性と皮膚 integrity との関係調べた。皮膚透過実験は第 4 次 OECD ガイドライン (案) の透過実験の記載に従って行った (Table 2)。

種々の程度に損傷した摘出皮膚を、32°C の水を循環させた有効透過面積 0.95 cm² の横型拡散セルに挟んだ。Receiver 側に pH7.4、1/30 M リン酸緩衝液を、Donor 側には安息香酸ナトリウム (BA) を溶解あるいはパラヒドロキシ安息香酸メチル (MP) 懸濁した緩衝液を 2.5 mL 加えた。Receiver 側から経時的にサンプルを採取し、液量を一定に保つために同量のリン

酸緩衝液 (32°C) を補充した。薬物の定量は HPLC で行った (Table 3)。

5) 皮膚の電気抵抗の測定

3 M KCl で調製した 4% 寒天ゲルをポリエチレン製チューブに注入し、角質層及び真皮側に設置した O-リングを介してそれぞれの表面近傍に挿入して塩橋とした。皮膚と反対側の塩橋末端を 3 M KCl 溶液を介して銀/塩化銀電極と接続し、電極に接続されたデジタルマルチメーター (TR-6843、TAKEDA Riken) を用いて皮膚を介したの電位差をモニターした。別に白金電極を拡散セルに挿入し、接続した直流電源装置 Phoresor (PM600、IOMED 社) を通じて経時的に 100 μ A の電流を適用した。生じた電位差と適用電流からオームの関係を用いて皮膚を介した電気抵抗を算出した。

II) ヒト摘出皮膚を用いたときと同等の有効

Table 3 実験に用いた器具及び装置

横型 2-チャンバー拡散セル (static (非流出型)、容量: 2.5 mL, 有効拡散面積: 0.95 cm²)

循環型恒温槽 (THERMAL ROBO TR-2、井内盛栄堂 (株))

HPLC 装置

送液ユニット	: LC-9A	(島津製作所 (株)、京都)
UV 検出器	: SPD-6A	(島津製作所 (株))
自動積分計	: CR-6A	(島津製作所 (株))
カラムオープン	: CTO-6A	(島津製作所 (株))
システムコントローラー	: SCL-6B	(島津製作所 (株))
オートインジェクター	: SIL-6B	(島津製作所 (株))
カラム	: Inertsil ODS-2	(GL Sciences (株)、東京)
ホモジナイザー	: スクローラー SCR-100 型	(井内盛栄堂 (株))
TEWL 測定器	Tewameter TM210	(Courage + Khazaka Electronic GmbH、ケルン、ドイツ)

性と安全性を評価できる人工膜の調製

1) 試薬

アンチピリン (ANP)、4-ヒドロキシ安息香酸エチル (EP)、プロピル (PP)、ブチル (BP) は東京化成工業株式会社 (東京) より購入した。リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム・12 水塩は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。Methyl methacrylate (MMA)、glycidyl methacrylate (GMA)、t-butyl methacrylate (BMA)、chloroform、pyridine は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。Poly [polyoxyethylene 4,4-azobis (4-cyanopentanoate)] (VPE-0601、VPE-2001) は和光純薬工業株式会社 (大阪) より供与された。

透過実験に用いた薬物の物性を Table 1 に示した。

2) 高分子の合成

Table 4 に示すような仕込み比で各材料をトルエン中で混合した。この混合物を直ちに凍結した。凍結後、送風しながら融解した。この凍結融解を 3 回繰り返して、溶存している酸素を取り除いた。次に融解した混合液を水浴中、60℃で 24 時間攪拌し、重合した。この溶液を貧溶媒 (特級メタノール) に滴下し、重合したものを沈殿させた。採取した沈殿物をさらにメタノールで洗い精製した。余分のメタノールを吸引ろ過して、重合物をデシケーター内で一晩乾燥させた。

Table 4 Polymer composition (weight ratio)

Sample		MMA	GMA	BMA	Initiator		M _w *4
					VPE-0601	VPE-2001	
6K-01	A*1	15	1	—*3	4		68K
	B*2	18	1	—*3	—*3		
20K-01	A*1	15	1	—*3		4	117K
	B*2	14	1	—*3		—*3	
B75-6K-01	A*1	—*3	1	15	4		134K
	B*2	—*3	1	14	—*3		
B10-6K-01	A*1	15	2	2	1		97K
	B*2	9.4	1.2	1	—*3		

*1 composition before synthesis (loading)

*2 composition after synthesis (by NMR)

*3 not identified

*4 weight-average molecular weight (by GPC)

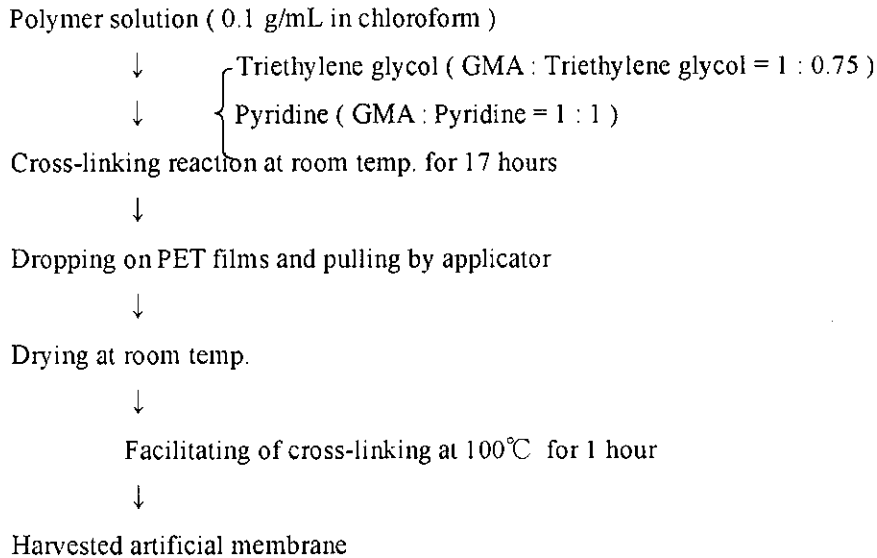


Chart 1 Preparation method of artificial membrane

3) 人工膜の調製

6K-01 の高分子を用いて以下の手順に従って人工膜を調製した (Chart 1)。

4) 人工膜透過実験

製膜した人工膜を内径 1.5 cm のシリコンパッキング 2 枚に挟んで固定し、32°Cの水を循環させた有効透過面積 0.95 cm² の横型拡散セルに挟んだ。Receiver 側に pH 7.4、1/30 M リン酸緩衝液を、Donor 側には薬物を溶解ある

いは懸濁した緩衝液を 2.5 mL 加えた。モデル薬物には水溶性薬物として 2,3-ジメチル-1-フェニル-5-ピラゾロン (ANP) を、また、脂溶性薬物としてパラベン類 (エチル (EP)、プロピル (PP)、ブチル (BP)) を用いた。ANP は 300 mg/mL、BP は 0.08 mg/mL の濃度で緩衝液に溶解して適用した。Receiver 側から経時的にサンプルを採取し、液量を一定に保つために同量のリン酸緩衝液(32°C)を補充した。薬物の定量は HPLC で行った。

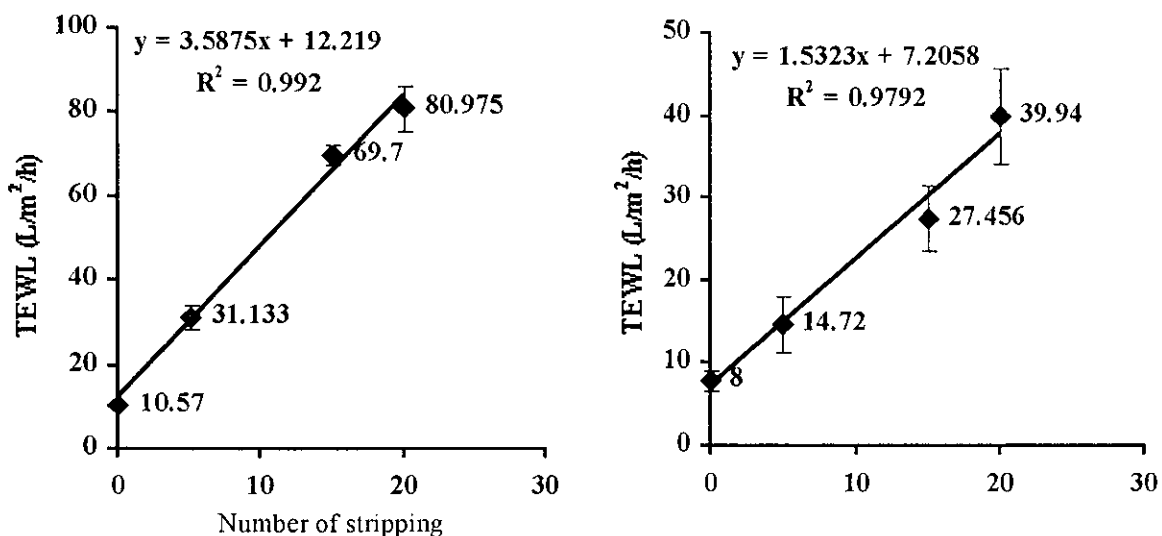


Fig. 1 Effect of stripping on TEWL

(In vivo, hairless rat skin)

Table 5 Effect of stripping on TEWL (*in vivo* and *in vitro*, hairless rat skin)

Number of stripping	TEWL 値 (<i>in vivo</i>)	TEWL 値 (<i>in vitro</i>)
0	10.18 ± 0.45 (n = 24)	8.00 ± 0.86 (n = 10)
5	31.13 ± 2.70 (n = 4)	14.72 ± 2.27 (n = 6)
15	69.70 ± 2.61 (n = 4)	27.46 ± 2.86 (n = 4)
20	80.98 ± 5.57 (n = 4)	39.94 ± 3.80 (n = 4)

mean ± S.E.

C. 研究結果・考察

1) TEWL の測定

ヘアレスラットを麻酔し、使用部位である腹部をシェーバーで除毛後、上記に示した第4次 OECD ガイドライン (案) の Step 1 に準じ外見で傷がついていないかを確認した。外見上、傷が無いと思われる、腹部皮膚摘出前の測定を *in vivo* とした。そして *in vivo* での TEWL 測定後、皮膚を摘出し、その皮膚を透過実験で使用する拡散セルにセットし、セル中を透過実験で使用する phosphate buffer 等のレシーバー溶液で満たした。その後、ドナー側から TEWL を測定した。この測定を *in vitro* とした。次に、広範囲の皮膚が損傷した場合として、セロハンテープで皮膚角質層を stripping し、その後の TEWL を測定した。Figures 1 及び 2 に *in vivo* 及び *in vitro* における TEWL に対する stripping 回数の影響を示した。Table 5 にそのときの実測データの平均値を示した。*In vivo* において、stripping 回数に依存して TEWL は直線的に増加した。Full-thickness skin の TEWL に対する stripping を行ったときの TEWL には、いずれの場合も有意差がみられた ($p < 0.0001$, Table 5)。一方、stripping 回数群間の TEWL は 5 回 vs. 15 回、及び 5 回 vs. 20 回で有意差がみられたが ($p < 0.0001$)、15 回 vs. 20 回ではみられなかった。以上のことから、TEWL を測定することで、皮膚の損傷の程度を推測できることがわかった。また、皮膚 integrity を確認する上

で、TEWL の測定が有用であることが示唆された。

In vitro においても stripping 回数に依存して TEWL は増加し、full-thickness skin の TEWL に対する stripping を行ったときの TEWL に有意差がみられた ($p < 0.001 \sim 0.0001$, Fig. 2, Table 5)。また、群間 (5 回 vs. 15 回、5 回 vs. 20 回、及び 15 回 vs. 20 回) も有意であった ($p < 0.0008$)。以上より、*in vitro* においても TEWL 値は stripping の回数に依存することがわかった。見た目では損傷していないと思われる皮膚 *in vivo* における TEWL の平均値は 10.57 ($n = 24$) であり、*in vitro* では TEWL 値は 8.0 ($n = 10$) であった。この値は測定者が代わってもほぼ等しかった。

2) 損傷した皮膚の薬物透過性の測定

以上の結果より、TEWL を測定することにより皮膚の損傷の程度を見積もることがわかった。しかし、その損傷による薬物の皮膚透過性が、どのように変化するかを確認する必要があるため、stripping により皮膚を傷つけたときの薬物透過実験を行い、薬物透過性と皮膚 integrity との関係を調べた。皮膚透過実験は第 4 次 OECD ガイドライン (案) の透過実験の記載に従って行った。Figure 3 に full-thickness skin 及び stripped skin の MP の透過プロファイルを示す。MP の透過は、stripping 回数に依存して増加し、flux

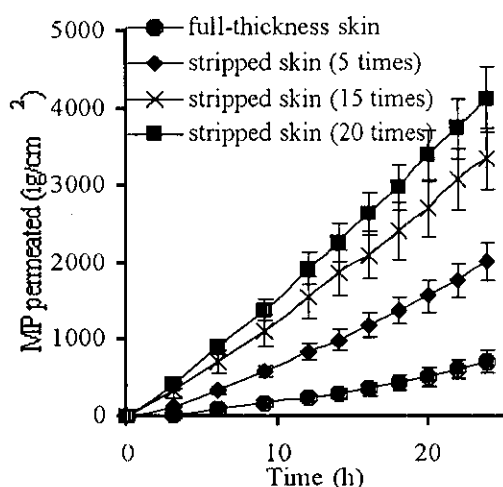


Fig. 3 Permeation of MP through excised hairless rat skin (full-thickness and stripped)

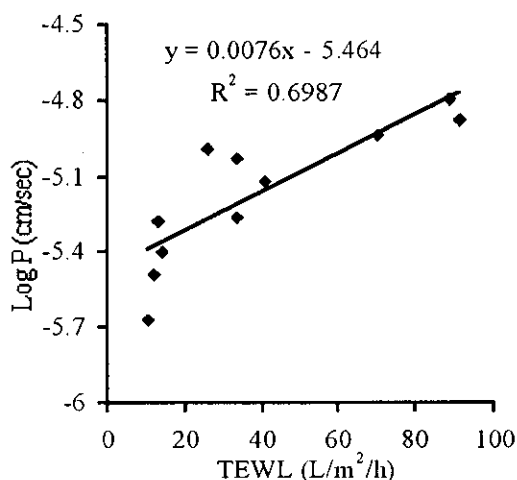


Fig. 4 Relationship between Log P and TEWL (in vivo)

Table 6 Flux and logarithm of permeability coefficient (P) of MP through excised hairless rat skin

skin	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$) *	Log P (cm/s)
Full-thickness skin	47.07 ± 5.96	-5.61
Stripped skin (5 回)	101.87 ± 5.98	-5.17
Stripped skin (15 回)	145.25 ± 13.70	-4.99
Stripped skin (20 回)	181.56 ± 14.62	-4.87

* mean \pm S.E. (n = 4)

及び log P も増加した。これらの結果は、stripping 回数に依存して、皮膚の透過抵抗が減少したことを示している。すなわち、stripping の様な皮膚の損傷は、皮膚の透過性を増加させる。In vivo における TEWL と log P との関係調べた (Fig. 4)。TEWL と log P の間には有意な相関関係が認められ ($p < 0.0001$)、TEWL の値から MP の透過性をある程度予測できる可能性が示唆された。しかし、多くの化合物において、同様の傾向が存在するかは、更に多くのデータを収集する必要があると考えられた。

以上、stripping で示される様な皮膚損傷では、TEWL の測定によりその程度を見積もることが可能であり、また薬物の皮膚透過性も損傷の程度により増加することがわかった。

しかしながら、Step 1 で確認できない皮膚損傷は広範囲の角質層の剥離よりも、むしろ局所的な小さな損傷の場合が多いと考えられる。そこで、皮膚の一部に 25G の注射針で小さな穴を開けて損傷を起こし、そのときの TEWL と皮膚電気抵抗をモニターした (Fig. 5)。また、水溶性薬物の BA 及び脂溶性薬物の MP の皮膚透過性を測定し、TEWL との関係調べた (Figs. 6 and 7)。Fig. 5 に示したように、薬物の透過実験に用いた皮膚の TEWL 値と皮膚電気抵抗の逆数との間には、良好な直線関係が認められた。しかし、BA の透過実験で用いた皮膚電気抵抗と MP の透過実験で用いた電気抵抗は大きく異なった。これは電気抵抗を測定するための電極の設置位置等の条件が一定ではないことが考えられ、全ての透過

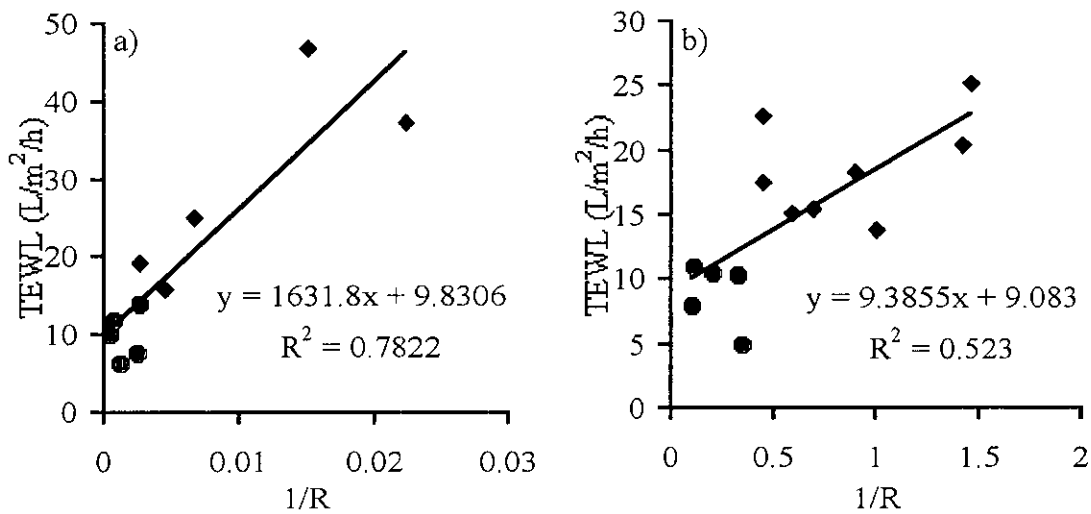


Fig. 5 Relationship between TEWL and 1/R a) BA b) MP ● control ◆ needle

速度の代わりに電気抵抗を用いて TEWL と関係付けることは困難と考えられた。また、穴を開けていない皮膚の TEWL 値は 4.93~14.14 (L/m²/h) で、その平均値は 9.53 ± 0.86 (L/m²/h) であり、stripping 実験のそれとほぼ等しかった。一方、皮膚に穴を開けたときの TEWL 値は 15.11~46.88 (L/m²/h) であり、その平均値は 23.07 ± 3.04 (L/m²/h) であったが、その幅は大きかった。これは穴の開け方による、穴の大きさに関係しているかもしれない。これらの皮膚を用いて BA 及び MP の皮膚透過性を調べたところ、BA の場合、皮膚を損

傷していない control に比べて、穴を開けた方の透過性は著しく上昇した (Fig. 6a)。しかし、MP の透過性は control に比べて増加したものの、その増加は著しいものではなかった (Fig. 6b)。そこで、TEWL 値と log P との関係調べてみた結果、BA の場合、TEWL 値と log P との間に相関性が認められたのに対し (Fig. 7a)、MP では認められなかった (Fig. 7b)。これらの結果は、水溶性薬物の BA では水溶性薬物の通り道である pore route の形成が皮膚透過性に影響し、脂溶性薬物の MP では皮膚透過性に影響しないことを示唆している。

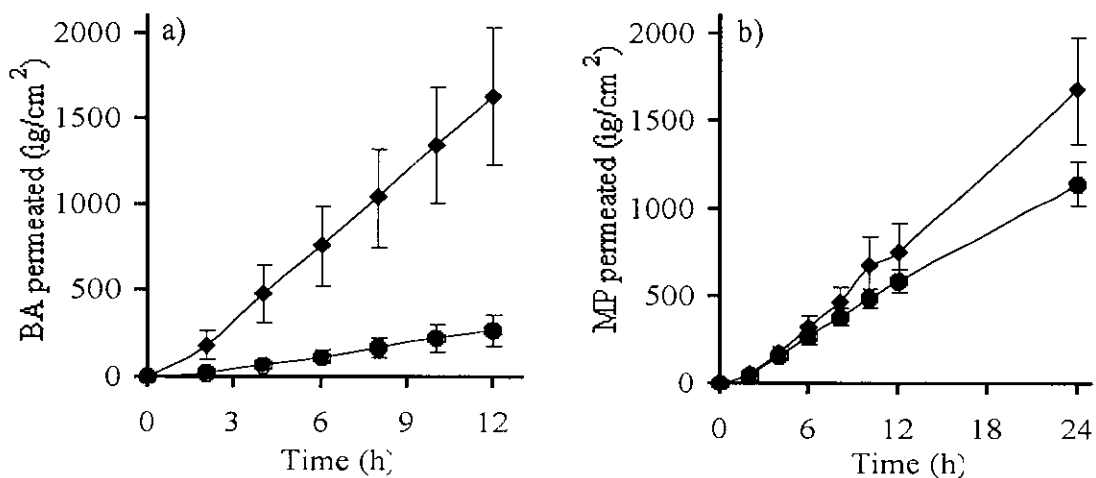


Fig. 6 Permeation of BA and MP through excised hairless rat skin

a) BA b) MP ● control ◆ needle

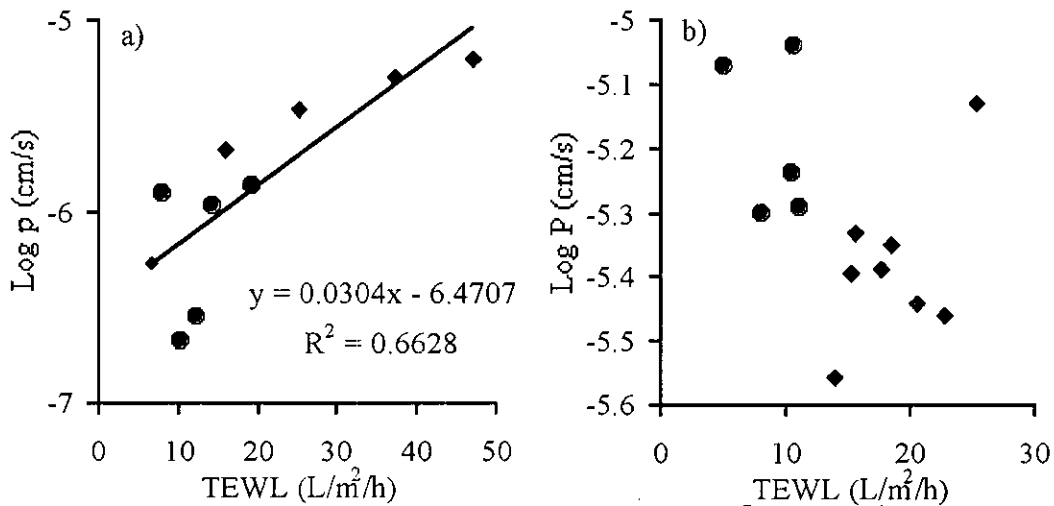


Fig. 7 Relationship between Log P and TEWL a) BA b) MP ● control ◆ needle

また、TEWL の測定は、針で穴を開けたような皮膚損傷を見積もることが可能であるが、全ての薬物の皮膚透過性を予測することは困

難であることがわかった。

II) ヒト摘出皮膚を用いたときと同等の有効性と安全性を評価できる人工膜の調製

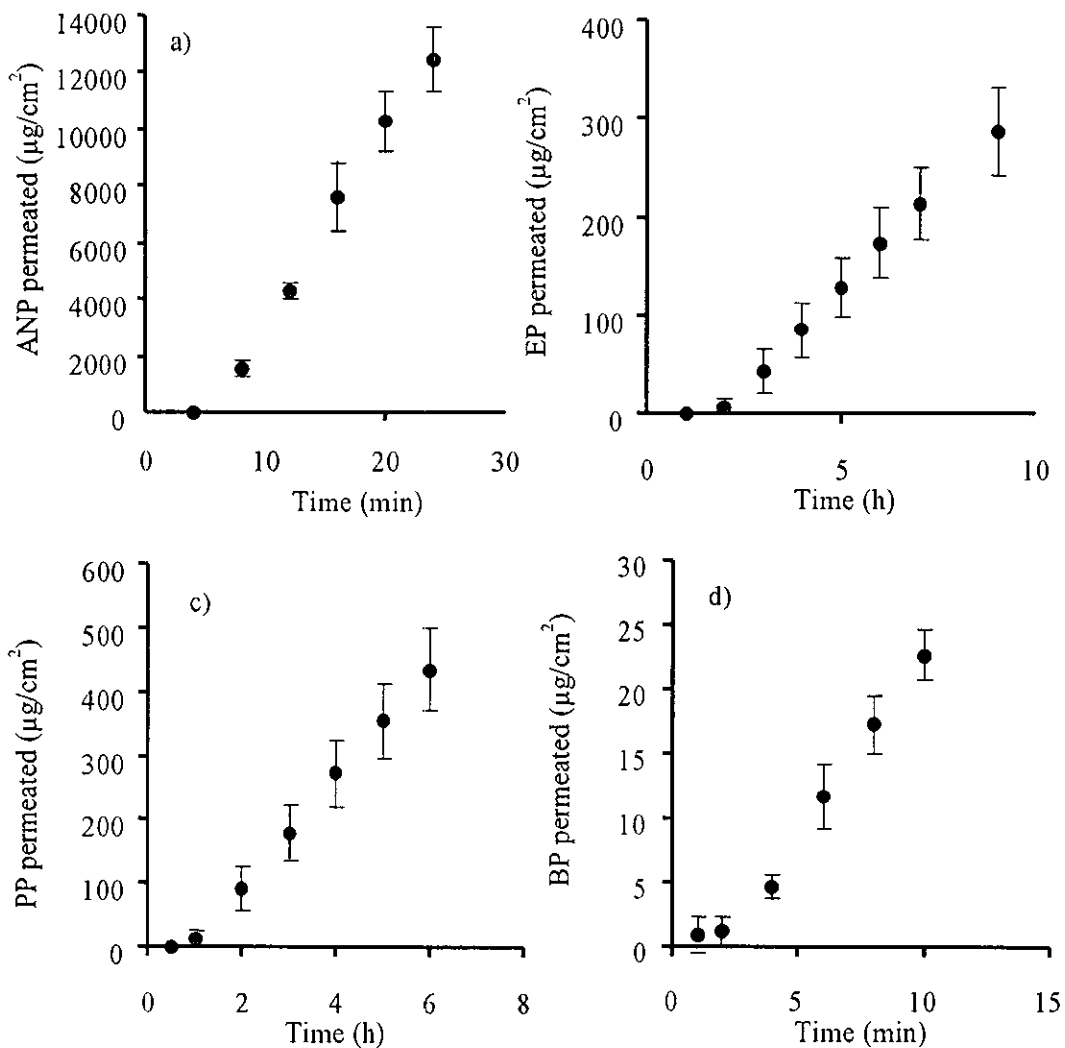


Fig. 8 Typical permeation profiles of drugs through artificial membrane (6K-01)

a) ANP, b) EP, c) PP, d) BP

Table 7 Lag time, flux and permeability coefficient of drugs through artificial membrane

Drug	Lag time (h)	Flux* ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	permeability coefficient (cm/s)
6K-01			
ANP (n=3)	14.33 (min)	641.47 \pm 35.44	2.67 $\times 10^{-7}$
EP (n=3)	1.28	35.92 \pm 9.36	1.34 $\times 10^{-5}$
PP (n=3)	1.63	37.50 \pm 0.80	1.77 $\times 10^{-5}$
BP (n=3)	2.46	3.14 \pm 0.21	1.09 $\times 10^{-5}$
20K-01			
ANP (n=3)	6.24 (min)	740.52 \pm 58.42	2.52 $\times 10^{-7}$
EP (n=3)	0.67	101.41 \pm 12.95	2.31 $\times 10^{-5}$
PP (n=3)	0.87	85.20 \pm 5.05	4.01 $\times 10^{-5}$
BP (n=3)	0.58	3.84 \pm 0.044	3.33 $\times 10^{-6}$

* : mean \pm S.E.

Figure 8 に 6K-01 膜を介した各種薬物の典型的な透過プロファイルを示す。いずれの薬物もこの膜を介して透過することがわかった。また、20K-01 膜においても同様であった。Table 7 にこれらの膜の透過パラメータを示す。水溶性ドメインを形成すると考えられる VPE の分子量が大きくなった 20K-01 の膜では、6K-01 膜に比べて透過のラグタイムは、いずれの薬物も短くなり、薬物の膜の拡散性が高くなったと推察された。しかし、薬物透過速度 (flux) は 20K-01 膜において、いずれの薬物も大きくなるものの、あまり変わらず、そのため透過係数 (P) はほぼ等しかった。これらの

結果を基に、log P と log K_{ow} (分配係数) との関係プロットした (Fig. 9)。ヒト皮膚から予測される透過曲線との比較から、ある程度これらの膜はヒト皮膚に近い薬物透過性を示すと考えられたが、全体的に高い傾向が認められた。また、得られたデータはヒト皮膚から予測された曲線というよりはむしろ、log K_{ow} に対して log P が直線となる傾向にあった。このことから、6K-01 及び 20K-01 膜は均一な拡散膜である可能性も考えられた。そこで、より flexible で水溶性ドメインを形成しやすいと考えられる t-butyl methacrylate (BMA) を用いて 2 種類の膜 (B75-6K-01 と B10-6K-01)

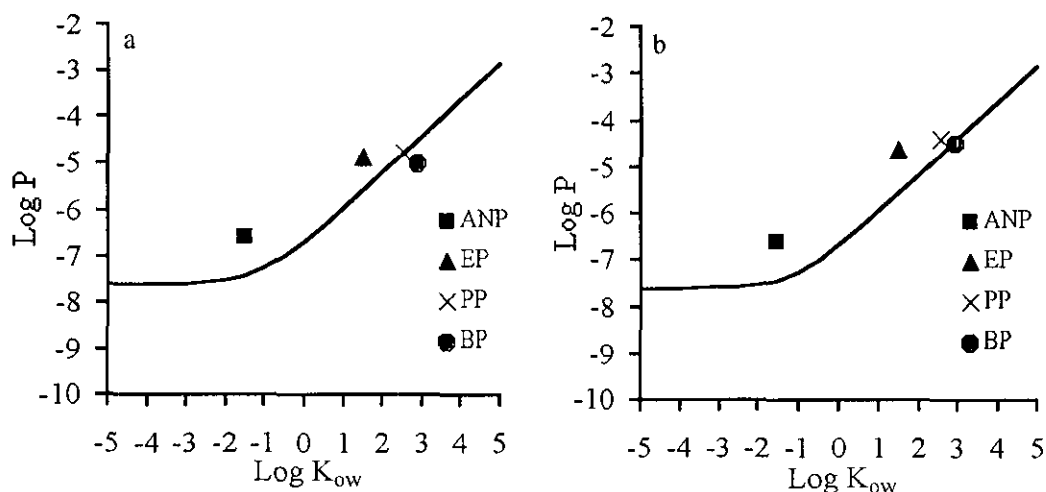


Fig. 9 The estimated permeability coefficients of drugs for human skin
a) 6K-01, b) 20K-01

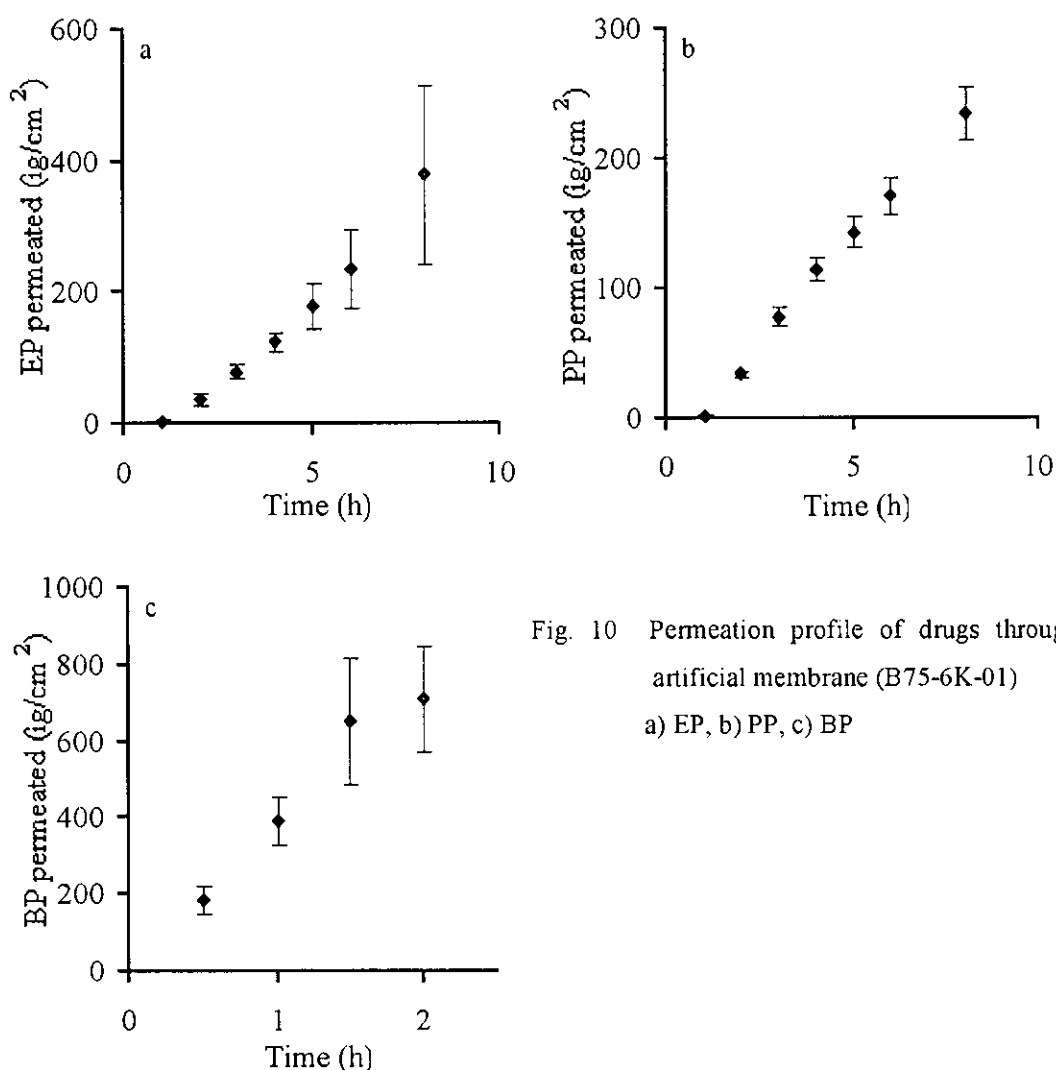


Fig. 10 Permeation profile of drugs through artificial membrane (B75-6K-01)
a) EP, b) PP, c) BP

Table 8 Lag time, flux and permeability coefficient of drugs through artificial membrane

Drug	Lag time (h)	Flux* ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	permeability coefficient (cm/s)
B75-6K-01			
EP (n=3)	1.32	48.37 \pm 7.87	1.10 $\times 10^{-5}$
PP (n=3)	0.79	34.47 \pm 1.45	1.62 $\times 10^{-5}$
BP (n=3)	0.14	482.29 \pm 55.72	4.19 $\times 10^{-4}$

* : mean \pm S.E.

を調製し、薬物の透過性を評価した。B10-6K-01では、いずれの薬物も実験を開始してから12時間経っても透過が確認されなかった。Fig. 10にB75-6K-01を介する種々薬物の透過プロファイルを、Table 8に透過パラメータを、そしてFig. 11にlog K_{ow} とlog Pの関係を示す。

脂溶性の高いEP、PP、BPは、B75-6K-01膜を透過したが、水溶性のANPはほとんど通らなかった。先と同様にlog Pとlog K_{ow} との関係をプロットしたところ、脂溶性薬物の透過性は分配係数に対し直線的に増加し、ほぼヒト皮膚から予測された直線に近い値を示し

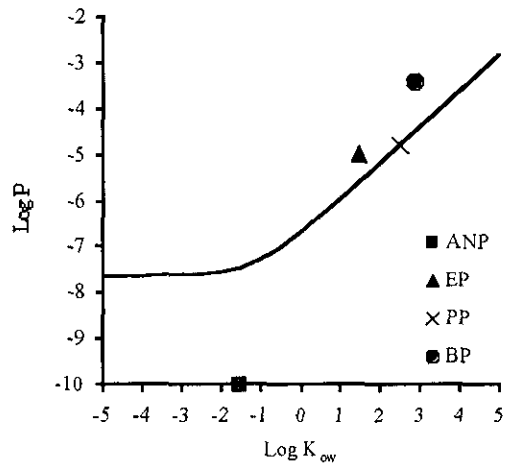


Fig. 11 The estimated permeability coefficients of drugs for human skin

たが、水溶性の ANP の log P は著しく低下し 分子を変えても水溶性ドメインを形成させる
 た。これらの結果から、現状では、用いる高 ことが難しいと考えられた。

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

皮膚刺激性及び光刺激性試験代替法の開発および代替法の評価
（細胞を用いる光毒性試験代替法）

分担研究者 田中憲穂 食品薬品安全センター 細胞毒性学研究室長

研究要旨

光毒性試験の代替法として提案された OECD ガイドライン案では、多くの細胞毒性試験法の中から BALB3T3 細胞を用いるニュートラルレッド（NRU PT）法が基本的な方法として記載されている。しかしながら、他の細胞株や他の試験法も適用可能であることから、本研究では細胞種と細胞毒性試験法の中でも感度が高いコロニー形成試験（CF PT）法についてモデル実験を実施し、その有効性を NRU PT 法との比較により調べた。試験では 13 種の化学物質に関して、BALB 3T3 細胞と VERO 細胞の 2 種の細胞株を用いて、試験法の比較と光毒性試験への適応性について検討した。その結果、両細胞で得られた PIF 値は試験系に依存し、細胞種の違いに依存しなかった。一方、試験法では CF PT 法がより低い濃度で反応し、NRU PT 法に比べて高い感度を示した。

A. 研究目的

現在 OECD 事務局より提示されている光毒性試験の代替法としての光細胞毒性試験のガイドライン案¹⁾は、基本的に EU/COLIPA の光毒性試験のバリデーションスタディ²⁻⁴⁾で用いられた試験方法とほぼ同じ内容である。我々は、この提示された OECD ガイドライン案に関する問題点を調べる為に、これまでいくつかの実験を実施してきた。本年度は用いる細胞の種類と適用する細胞毒性試験法を検討する目的で次のような研究を行った。

細胞を用いる光毒性試験の OECD ガイドライン（案）の基本となっている BALB 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド法による光細胞毒性試験（NRU PT 法）により、BALB 3T3 細胞と VERO 細胞による反応性の違いを調べた。また、細胞毒性試験の中でも一般的に播種細胞が少なく、長期暴露する事により感度が高いとされるコロニー形成法に光照射を適用（CF PT 法）し、NRU PT 法と CF PT 法の特性を比較した。

B. 研究方法

細胞としてはマウス全胎児由来の BALB 3T3 A31-1-1（BALB 3T3）と、アフリカミドリザル腎臓由来の VERO 細胞を用いた。被験物質には、promethazine HCl、8-MOP、chlorpromazine HCl、TCSA、amiodarone HCl、PABA、SDS、PCP、hexachlorophene、levomepromazine、sulfanilamide、benzylamine HCl、pyrithioxin の 13 化学物質を NRU 法による細胞毒性試験を実施した。一方、CF 法では chlorpromazine HCl、8-MOP、PCP、amiodarone HCl、hexachlorophen、sulfanilamide、pyrithioxin の 7 化学物質を用いた。

NRU PT 法はガイドライン案に示す方法に準じて行った。CF PT 法は通常のコロニー形成試験の方法に光照射と非照射下の条件により実施した。化学物質が光毒性を示すかどうかについては、Photo Irritation Factor (PIF、非照射下での IC50 値/照射下での IC50 値) 値を求める事により比較を行った。

C. 研究結果

Fig 1 には BALB 3T3 と VERO 細胞の NRU PT 法における PIF 値の比較を、Fig 2 には両細胞の CF PT 法における PIF 値の比較を示した。

NRU PT 法においては promethazine HCl と 8-MOP では両細胞間に PIF 値で 10-数 10 倍程度の差が認められたが、他の 11 化学物質についてはほぼ 2 倍以内の PIF 値を示した。

CF PT 法では両細胞間で amiodarone HCl と PCP において数倍程度の差が認められたが、他の化学物質においては PIF 値 2 倍以内の差を示した。

BALB 3T3 細胞における NRU PT 法と CF PT 法の PIF 値の比較を Fig 3 に、VERO 細胞における NRU PT 法と CF PT 法の IC₅₀ 値の比較を Fig 4 に示した。いずれの細胞においても CF PT 法における PIF 値は NRU PT 法における PIF 値よりも大きく、CF PT 法の方が感度が高いことが示された。sulfanilamide は NRU PT 法において光照射、非照射いずれの系でも最高濃度でも細胞毒性が認められなかったが、CF PT 法では光照射下で細胞毒性が認められたことから、PIF 値が大きくなる結果となった。また、BALB 3T3 細胞における 8-MOP および pyriithoxin、VERO 細胞における 8-MOP では非照射下における IC₅₀ 値が得られたことから、CF PT 法では NRU PT 法よりも感度よく毒性の検出ができた。

BALB 3T3 細胞における NRU PT 法と CF PT 法の IC₅₀ 値の比較を Fig 5 に、VERO 細胞における NRU PT 法と CF PT 法の IC₅₀ 値の比較を Fig 6 に示した。どちらの細胞系においても NRU PT 法で得られた IC₅₀ 値は照射下において数倍から強いもので 100 倍近くまで増強された。また、非照射下ではほとんど変化がないものから 10 倍程度の増強が認められた。しかしながら、NRU PT 法と CF PT 法を比較した場合、光照射下で増強が認められずに非照射下でのみ毒性が増強された物質は認められなかった。FIG 5 では BALB 細胞における sulfanilamide、amiodarone HCl、PCP、pyriithoxine と、VERO 細胞における sulfanilamide、PCP、pyriithoxine では矢印がほぼ上から下を示し、CF 法において照射下での IC₅₀ 値は小さくなりより強い毒性が確認されたが、非照射下では 2 系間で毒性にほとんど

差は認められなかった。Fig 6 では BALB 細胞における hexachlorophen、chlorpromazine HCl、VERO 細胞における hexachlorophen、amiodarone HCl、chlorpromazine HCl、8-MOP では矢印が斜め左下を示しており、CF 法において照射下、非照射下いずれの毒性も増強された結果となった。

D. 考察

現在、OECD のガイドライン案 (2002 年 3 月 15 日) では、NRU PT 法において、PIF 値と MPE 値をもとに光毒性の判定を行うことを記載している。PIF 値においては PIF<2 で陰性、PIF>5 で陽性、2<PIF<5 で擬陽性との見解を示している。CF 法を用いた光毒性試験における判定は確立されていないことから、NRU PT 法に準じて行うこととした。

NRU PT 法において BALB 3T3 と VERO 細胞における PIF 値を比較した場合、promethazine HCl と 8-MOP において差が認められた。前者は光照射下における IC₅₀ 値は細胞間でほぼ等しかったが、非照射下における IC₅₀ 値に 10 倍程度の差が認められたため、非照射下においては BALB 細胞の方が VERO 細胞より promethazine HCL に対する感受性が高かった。8-MOP においては両細胞とも非照射下では最高濃度においても細胞毒性が認められなかったが、光照射下において VERO 細胞の方が 65 倍程度強い細胞毒性を示した。しかしながら、8-MOP においては非照射下で IC₅₀ 値が求められなかったため、正確な PIF 値を求めることはできなかった。しかしながら、NRU PT 法、CF PT 法共に、細胞により PIF 値に大きな違いは得られず、ほぼ同程度の PIF 値を示したことから、各細胞における PIF 値は試験系に依存し、細胞種の違いにはほとんど影響されないことがわかった。

CF PT 法は播種細胞数の少なく、曝露時間が長いことから感度がよいことが知られているが、今回光照射試験として適応した場合、曝露時間が同じであっても NRU PT 法と比較し、光照射下、非照射下に関わらず、IC₅₀ 値は低い値を示し、より低濃度で細胞毒性作用を示した。また、PIF 値は、細胞種によらず、CF PT 法で、

より大きな PIF 値を示し、光細胞毒性が強く検出された。特に sulfanilamide は NRU PT 法で光照射下、非照射下の両方で最高濃度まで全く毒性を示さなかったのに対し、CF PT 法では非照射下では、毒性が認められなかったが、光照射下で細胞毒性が確認された。このようにある種の化学物質においては NRU PT 法では光毒性を検出できないが、CF PT 法では検出できるものもあることが分った。逆に CF PT 法は感度が高い事から、試験条件に結果が影響されやすく、例えば、非照射下で溶媒対照におけるコロニー形成率は室温暗所ではふれやすく、光照射下の温度と同程度 (32-34°C) の温度をかけることで比較的安定した値が得られた⁵⁾。また、播種細胞数が少なく、洗浄操作が多いことから細胞が剥がれやすいので各操作に注意を要する。

E. 結論

以上の結果より、BALB 3T3 細胞と VERO 細胞の PIF 値は試験系に依存し、細胞種の違いにはほとんど影響されなかった。一方、NRU PT 法と CF PT 法では薬剤に対する感受性が異なり、CF PT 法が光照射下、非照射下に関わらず IC50 値が低く、感度が高い事が示された。

F. 引用文献

- 1) OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Draft Proposal for a New Guideline:432, *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test, 15 March 2002
- 2) Spielmann, H. et al.:EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxic. In Vitro.*, **8**, 793-796, 1994
- 3) Spielmann, H. et al.:The international EU-COLIPA In vitro phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxic. In Vitro.*, **12**, 305-327, 1998
- 4) Spielmann, H. et al.:A study on UV filter chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. *ATLA.*, **26**, 679-708, 1998
- 5) 若栗忍、田中憲穂：光細胞毒性試験におけ

る照射条件と細胞株の基礎的検討、秦野研究所年報、24：32-38 (2001)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 若栗忍、○田中憲穂：光細胞毒性試験における照射条件と細胞株の基礎的検討、秦野研究所年報、24：32-38 (2001)

2. Y.Nakagawa, Y.Takigawa and ○N.Tanaka: The rapid screening of photogenotoxic compounds using photo plasmid-relaxation assay. *Environmental Mutagen Research* 23:107-118(2001)

3. ○田中憲穂：安全性試験としての遺伝毒性(変異原性)試験の意義と試験概要、JHOSPA(Journal of Japan Hygienic Olefin and Styrene Plastics Association)、No12: 2-16(2001)

4. 若栗忍、○田中憲穂：動物モデルによる新しい評価法 67、*In vitro* 光細胞毒性試験について、アニテックス、14：44-48 (2002)

2. 学会発表

1. ○若栗 忍、田中憲穂：光細胞毒性試験における細胞種および試験系の比較、日本組織培養学会第 74 回大会・第 15 回日本動物実験代替法学会大会・合同大会、2001.8