



2002 TABD Chairman Phil Condit, Chairman and CEO of the Boeing Company and Sir Charles Masefield, Vice Chair of BAE SYSTEMS, wrap up the 2002 TABD CEO Conference in Chicago

©2003 TransAtlantic Business Dialogue
Privacy Policy
Web Site Design, Hosting and Maintenance by **Burrells**

厚生労働科学研究補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

第4次 OECD guideline, skin absorption : *in vitro* method（案）の評価
－TEWL および抵抗値を用いた皮膚 Integrity 試験の妥当性－

分担研究者 森本 雍憲（城西大学薬学部）

研究要旨

経皮的水分損失（Transepidermal water loss : TEWL）の測定値は、水溶性薬物の透過性は反映するものの、脂溶性薬物の透過性とは相関しないことが示唆されていた。そこで、このような現象を理論的に解明することを目的に、TEWL の異なる種々程度の角質剥離皮膚および極性の異なる4種薬物を用いて *in vitro* 皮膚透過実験を行った。また、同時に皮膚抵抗値もモニターした。その結果、水溶性薬物では皮膚角質層の損傷が透過性増大に大きく寄与し、脂溶性薬物はその影響が小さいこと、そして、TEWL は損傷の程度は反映するが、物質透過性のバラツキ以上に大きなバラツキを示すことが問題点として浮かび上がった。一方、抵抗値は高度の損傷以外は信頼性が低いものと考えられた。

A. 研究目的

経皮的水分損失（Transepidermal water loss : TEWL）および皮膚抵抗値の測定は、皮膚への化学物質（薬物など）の暴露に関する試験に際し、無傷の皮膚を用いた試験であることを担保するために行われる。標記はこのことを盛り込んだ初めてのガイドラインである。経皮吸収試験に代表される皮膚外用剤の試験には、国際的にはヒト死体皮膚あるいはブタ皮膚などが用いられるものの、日本では、その入手のしやすさから、ヘアレスラット皮膚が繁用されている。そのため、ヘアレスラット皮膚の Integrity 評価に TEWL あるいは皮膚抵抗値の測定が妥当なものであるかを検証することは有用である。

前回の報告において、TEWL の測定値は、

水溶性薬物の透過性は反映するものの、脂溶性薬物の透過性とは相関しないことが示唆されていた。そこで、今回は、このような現象を理論的に解明することを目的に、TEWL の異なる種々程度の角質剥離皮膚および極性の異なる4種薬物を用いて *in vitro* 皮膚透過実験を行った。また、同時に皮膚抵抗値もモニターした。

B. 研究方法

1. モデル物質

Diclofenac sodium (DNa : Kow=-0.15), Lidocaine (LC:Kow=2.06), Ketoprofen (KP:Kow=3.00) および Ibuprofen (IP:Kow=3.44) を用いた。

2. ストリッピング

雄性ヘアレスラット（WBN/ILA-Ht、8

週令、180～200g)の腹腔にペントバルビタールナトリウム(50mg/mL)を0.1mL/100gで適用し、麻酔の効果が現れたことを確認して(麻酔後約10分)から、腹部皮膚を剃毛(ブラウン5413)した。このとき、角質層を傷つけないよう、十分注意をした。剃毛後、D-Square(CuDerm Corp.)を用いて、約50g/cm²の圧力下、ストリッピングを行った。ストリッピングは5回および15回行った。50g/cm²の圧力では、15回のストリッピングにより完全に角質が剥離したと仮定した。ストリッピングにより角質層の付着したテープは黒色の台紙に貼り付け、剥離の様子を観察した。この操作は、前回実験の検証のために、指の腹で軽くテープを押さえつけたときについても行った。なお、このときの圧力は5～10g/cm²であった。

3. TEWLの測定

ストリッピングを行わないもの(ストリッピング回数0回)およびストリッピングを行ったラットを、恒温・恒室に保ったアクリル製恒温箱(75×50×50cm)に搬入し、速やかにTEWLを測定した。測定にはTewameter TM210(Courage+Khazaka, ケルン)を用い、測定は5分間行った。測定値としては、測定開始2～5分間の平均値を用いた。なお、恒温箱の温度および湿度は、実験中それぞれ、23.3±0.34℃、および、46.1±1.67%に保たれていた。測定は湿度温度指示計HMI41(プローブ:HMP45、VAISALA、フィンランド)により連続的に行った。

4. 透過実験、抵抗値の測定

TEWL測定後のラット腹部皮膚を摘出し、有効拡散面積0.95cm²の2チャンバー拡散

セルに挟んだ。ドナーおよびレシーバーには1/30Mリン酸緩衝液を2.5mLずつ入れ、薬物をドナー側に懸濁させた。また、3MKCL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、これを角質層および真皮の表面近傍に設置して塩橋とし、銀/塩化銀電極と接続して抵抗を測定した。測定には、Short Circuit Current Amplifier CEZ910(NIHON KOHDEN)を用いた。実験は8時間行い、開始から2時間間隔でレシーバー溶液のサンプリングおよび抵抗値のモニターを行った。2チャンバー拡散セルの温度は実験中32℃に保った。

5. 定量

(1) HPLC

ポンプ：島津 LC-10AS、検出器：島津 SPD-10A、システムコントローラー：島津 SCL-10A、オートサンプラー：島津 SIL-10A_{XL}

(2) 移動相、検出波長、カラム

① DNa、KPおよびIP

移動相：10mMリン酸：アセトニトリル = 1 : 1 (1mL/min, 40℃)

検出波長：230nm

カラム：LiChrospher 100RP-18e

(5μm：メルク)

② LC

移動相：5mM 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム / 1%リン酸：アセトニトリル = 67 : 33 (1mL/min, 40℃)

検出波長：220nm

カラム：Intersil ODS-2 (GLサイエンス)

(3) 内部標準物質

LC：メチルパラベン、KP：DNa、DNa：KP、IP：KP

C. 研究の背景となる理論

物質の皮膚透過性は、その物質のオクタノール/水分配係数の関数となることが幾つかの研究で示されている^{1,2)}。Hatanakaらは(1)および(2)式を、Guyらは(3)式を報告した。

$$P(\text{cm/s}) = 1.17 \times 10^{-7} \text{Kow}^{0.751} + 2.73 \times 10^{-8} \quad \text{(ヒト)} \quad \text{----- (1)}$$

$$P(\text{cm/s}) = 4.78 \times 10^{-7} \text{Kow}^{0.589} + 8.33 \times 10^{-8} \quad \text{(ヘアレスラット)} \quad \text{--- (2)}$$

$$\text{Log } P(\text{cm/s}) = -6.3 + 0.71 \text{logKow} - 0.0061 \text{MW} \quad \text{(ヒト)} \quad \text{----- (3)}$$

ただし、P：透過係数、Kow：オクタノール/水分配係数、MW：分子量

これらの式は、皮膚を1層とみなし、多くの実験データを回帰して得ているが、実際には、皮膚はバリエー能の強い角質層と角質層以外の生きた表皮および真皮(VED)から成り、脂溶性の強い物質ではVEDが律速になることが知られている。また、角質層を完全に取除いた皮膚では、物質の極性とは無関係に、透過係数は一定値をとり、ラットではおよそ $1.2 \times 10^{-5} \text{cm/s}$ であることも知られている。そこで、物質の皮膚透過性を下図のような抵抗モデルで表し、抵抗(R)の逆数が透過係数(P)である関係を用いて、(4)式の2層モデルを構築した。

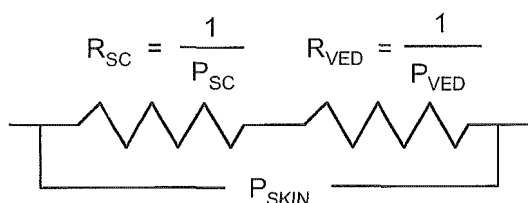


Fig. 1 Schematic diagram of 2-layer model

$$P_{SKIN} = \frac{P_{SC} \times P_{VED}}{P_{SC} + P_{VED}} \quad \text{----- (4)}$$

実験の目的は角質損傷による物質透過性への影響が、透過物質の極性によりどのように異なるかを調べることであるので、(4)式の P_{SC} が、テープによる角質層剥離(ストリッピング)によって変化することとした。

実験に用いる動物はヘアレスラットであるため、 P_{SC} の値は(2)式より計算し、 P_{VED} は $1.2 \times 10^{-5} \text{cm/s}$ と仮定した。また、ヘアレスラットの角質層は15層あるものとし、1回のストリッピングにより1層が剥離すると仮定し、さらに、角質層1層の抵抗は、全て等しいものとした。

以上の条件により、角質層の抵抗減少と物質透過性との関係をコンピュータによりシミュレーションすると、下図が得られる。

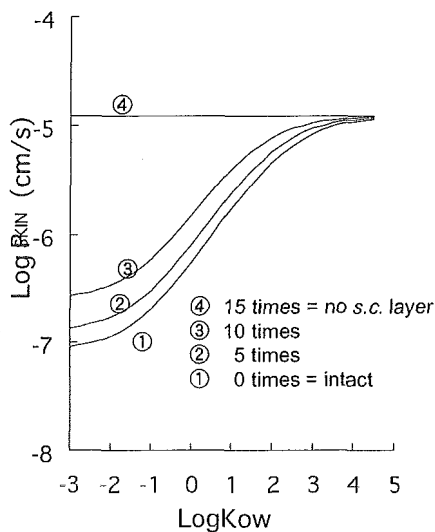


Fig. 2 Effect of stripping on the skin permeability of drugs (s.c. stratum corneum)

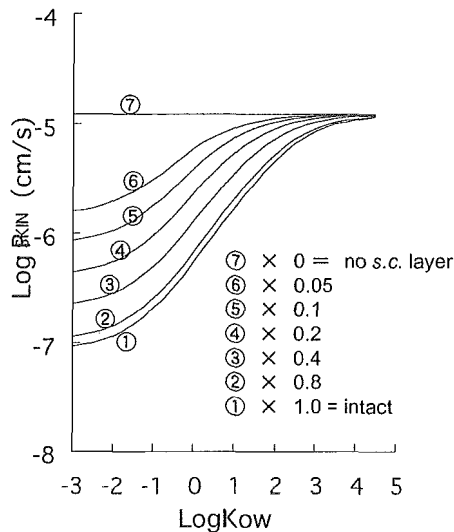


Fig. 3 Effect of c-resistance reduction on the skin permeability of drugs (s.c. stratum corneum)

Figure 2 に、ストリッピング回数が物質の透過性にどのように影響するかを示す。ストリッピング回数は単純に透過性上昇に比例関係を示さないことが分かる。そこで、角質層の抵抗をインタクト時の「1」に対し、これに「×」の次の数値で示すように抵抗を減少させたときのシミュレーションを行い Fig. 3 に示した。

水溶性薬物では、角質層の抵抗がわずかに残っているだけでも (×0.05) 角質を完全に剥離された皮膚に比べ、物質透過性の低いことが理解できる。すなわち、前回の、脂溶性薬物の皮膚透過性は TEWL の影響 (角質層ダメージの影響) を受けにくく、水溶性薬物では影響を受けやすいとした報告は、理論的に妥当であると考えられた。しかし、15 層ある角質層の各層が、同じ抵抗を有するとした仮定を含め、実験により上図の現象が得られるかを、確認した。

D. 研究結果と考察

1. オクタノール/水分配係数 (K_{ow}) と透過係数 (P)

実験結果を Table 1 および Fig. 4 に示す。今回使用したモデル物質の透過係数は全般に高めであるが、Intact skin 使用時には、脂溶性の上昇に伴い P は上昇し、理論に一致した。ストリッピング回数と P の関係は、全ての薬物で、Intact $\ll 5 S < 15 S$ となった。ランクオーダーは理論通りであるものの、 $5 S$ が $15 S$ の値に近いことは理論と異なり、5 回のストリッピングではほとんどの角質層は除去されているものと考えられた。Figure 5 に角質層剥離後のテープを示す。5 回以降のストリッピングでは、テープに付着する角質層はほとんどなく、物質透過の実験結果を支持する結果であった。このことから、今回の剥離条件、すなわち、D-square を用いて $50\text{g}/\text{cm}^2$ の圧力で除去することは、1 回に複数層の

角質層を除去している、あるいは、ヘアレスラットの腹部皮膚は一般に言われている15層よりも少ないかのいずれかであると考えられた。そこで、前回報告した実験の

剥離条件である、セロテープを極めて軽く付着させて除去する方法も同様に試みた (Fig. 6)。

Table 1 Effect of stripping on the skin permeability of

Subst	log k_{ow}	P (cm/s $\times 10^5$) at each stripped number		
		0 (intact)	5	15 (VED)
DNa	-0.15	0.4 \pm 0.06	2.5 \pm 0.02	3.3 \pm 0.01
LC	2.06	1.13 \pm 0.16	1.9 \pm 0.03	2.23 \pm 0.02
KP	3.00	1.7 \pm 0.48	8.5 \pm 0.83	9.9 \pm 0.98
IP	3.44	3.84 \pm 0.48	7.0 \pm 0.18	8.03 \pm 0.02

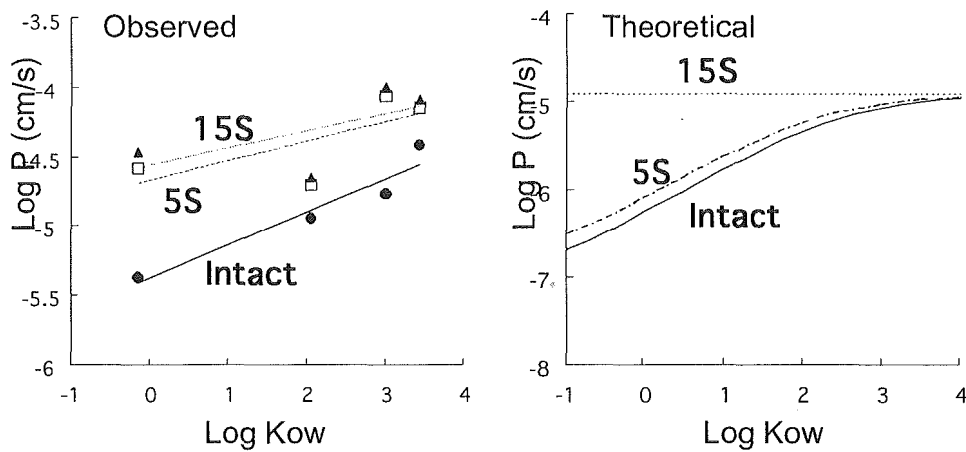


Fig. 4 Effect of stripping number on the skin permeability
 ● : Intact skin □ : 5 times stripped skin ▲ : 15 times stripped skin

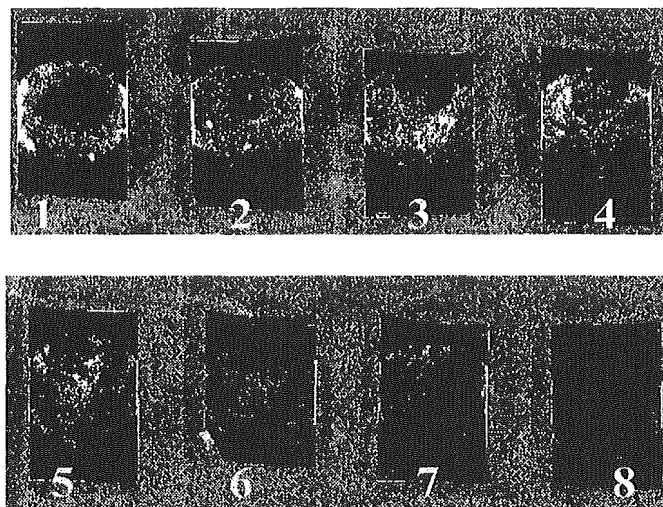


Fig. 5 The stripped stratum corneum (50g/cm²)

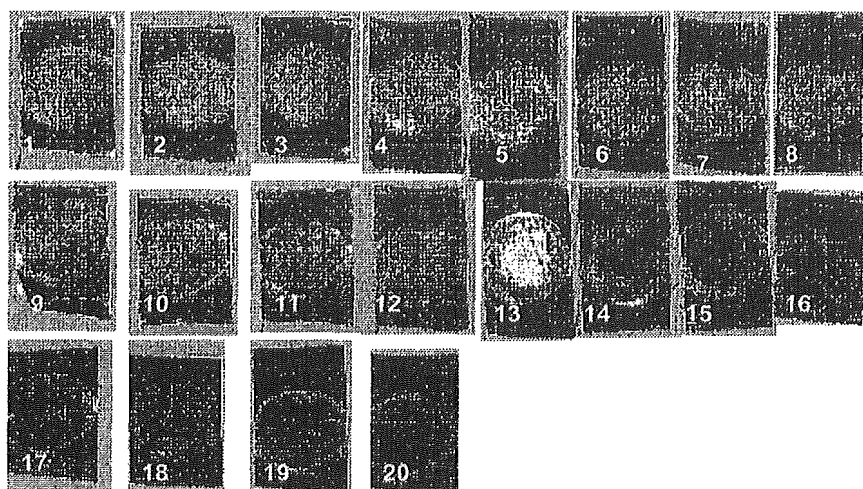


Fig. 6 The stripped stratum corneum in weak pressure (50g/cm²)

Figure 6 のように、12層目まではむらのない剥離が観察され、ヘアレスラットの角質層はほぼ15層であると考えられることに問題はなく、強い圧力で剥離すると、むらのある剥離・複数層の除去が起こるものと思われた。

本実験より、物質の透過性は角質層のダメージに呼応して変化し、水溶性であるほどダメージによる透過性上昇の大きいことが明らかとなった (Fig. 4)。

次に、TEWL および抵抗値がこのようなダメージを反映するかについて調べた。

2. TEWLとストリッピング回数

Figure 7 左にストリッピングの回数とTEWLの実測値を示す。ストリッピングをしない場合、すなわち、intact皮膚のTEWLはバラツキが小さく、再現性が見られた。しかし、5回と15回のTEWLに有意差はなく、5回するとき最も大きなバラツキを伴った。この現象については、Fig. 8で説明

できる。例として角質層の50%が剥離した場合を考える。強い圧力で角質層を剥離した場合、Fig. 5のように、水平方向に対する不均一な角質層の除去が起こり、極端な例では、ケースAようになる。ケースAでの物質の脂溶性とPの関係は完全にストリプトされた皮膚の透過性の2分の1まで上昇する。これに対し、角質層の厚みが2分の1になるようなケースBでは、Intact皮膚の約2倍の透過性上昇に過ぎない。つまり、斜線の範囲でバラツキが生じることになり、最も水溶性の強い物質である水の透過性を反映するTEWLのバラツキが大きくなることになる。5Sのバラツキはそのためであり、完全に角質が除去された15Sではバラツキは小さくなる。しかし、5Sのときの物質透過性のバラツキは変動係数で0.8% (DNa) ~9.7% (KP)であるものが、TEWLでは60%にも達するのは、TEWL測定のバラツキには、さらに別の因子が関与する可能性を示唆するものであり、

TEWL をヘアレスラット皮膚の Integrity 評価に用いるのには、問題が残る。

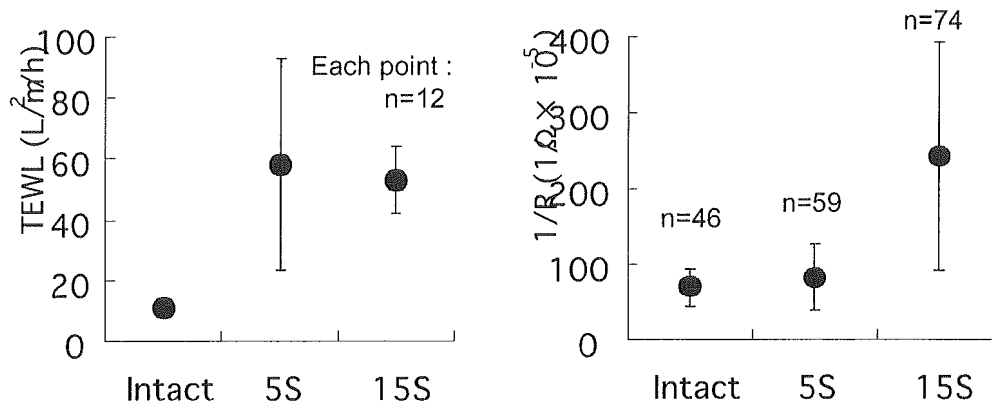


Fig. 7 Effect of stripping number on the TEWL (Left) and 1/R (right)

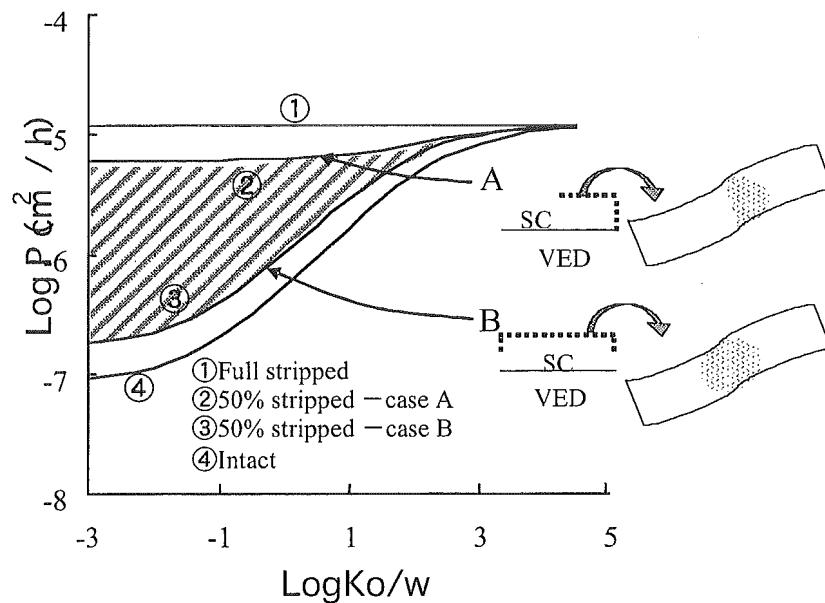


Fig. 8 The relationship between peeling of the stratum corneum and fluctuation of the substance permeation

3. 1/Rとストリッピング回数

1/Rは Intact と5 Sでほとんど差がなく、15 Sで大きく上昇した (Fig. 7 right)。このことから、1/Rは integrity 評価には不向きであることが示唆される。Intact な角質層は高い抵抗を示す代表的な生体組織

であり、Rの測定値が無窮大に近い値として測定不能のときがあるため、今後の検討課題である。

今回の研究の副産物として、角質層の均一な剥離には、弱い力によるテープの接着が決めてとなることが明らかとなり、また、

強い力によって接着させたテープは角質層の不均一な剥離を起こし、これが、水溶性薬物の透過のバラツキに大きく影響することが理論的に示された。Kalia らの研究³⁾では、ヒトにおいて、テープストリッピングによる角質層の抵抗減少は、不均一な剥離、すなわち、必ずしも1層が剥離するとは限らず、部分的に複数層が剥離する可能性があるため、その回数との相関性が弱くなることを指摘し、このバラツキを、TEWLで補正することが行われているが、本研究の結果と矛盾する。そのため、今後更なる検討が必要である。

E. まとめ

ヘアレスラット皮膚の Integrity の指標として TEWL を用いると、5 S 程度の損傷がある場合には、そのバラツキの範囲内に Intact 皮膚の TEWL 値が含まれるため、傷のある皮膚を無傷の皮膚とみなす可能性があり、この皮膚を用いて透過試験を行うと、とりわけ水溶性物質の透過性について、著しく誤った結果を得ることになる。

F. 引用文献

- 1) 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
- 2) R. O. Potts and R. H. Guy: Predicting skin permeability. *Pharm. Res.*, 9(5): 663-669, 1992
- 3) Y. N. Kalia, I. Alberti, A. Naik and R. H. Guy: Assessment of topical bioavailability in vivo: The importance of stratum

corneum thickness. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14(suppl 1):82-86, 2001

G. 健康危険情報 特になし。

H. 研究発表

1. 論文発表

1) Y. Morimoto, Y. Wada, T. Seki, and K. Sugibayashi, In Vitro Skin Permeation of Morphine Hydrochloride during the Finite Application of Penetration-Enhancing System Containing Water, Ethanol and l-Menthol, *Biol. Pharm. Bull.*, 25(1), 134-136, (2002).

2) L. Fang, Y. Kobayashi, S. Numajiri, D. Kobayashi, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, The enhancing effect of a triethanolamine-ethanol-isopropyl myristate mixed system on the skin permeation of acidic drugs, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 1339-1344 (2002).

2. 学会発表

なし

I. 知的所有権の取得状況

無し

3次元ヒト皮膚培養モデルを用いた経皮吸収試験に関する研究

分担研究者 大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所、薬理部長）
研究協力者 安藤正典（国立医薬品食品衛生研究所、環境衛生化学部長）
徳永裕司（国立医薬品食品衛生研究所、環境衛生化学部 第二室長）

研究要旨

最近、皮膚ケラチノサイトを用いた3次元培養皮膚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、角質層を有する皮膚3次元培養皮膚モデルを用い、各種化合物の*in vitro* 経皮吸収実験への応用を検討した。試験物質として、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）を用い、3次元培養皮膚モデルとして、EPI-606 および Vitrolife-skin の2種類の培養皮膚を用いた。EPI-606 の場合、培養皮膚の強度増すため、ポリカーボネート膜が裏打ちのために使われており、このポリカーボネート膜が透過指標物質の透過に影響を及ぼしていることが示唆された。Vitrolife-skin の場合、コラーゲン膜中で培養され、3次元培養皮膚モデルを構築したものであるが、コラーゲン膜そのものの強度が低く、透過実験中での膜の破損が見られた。3次元培養皮膚モデルの強度を上げるため、トランスサージカルテープを用いて見たが、そのテープの透過指標物質の透過速度に対する律速が大きく、使用できないことが分かった。

今回検討した2種類の3次元培養皮膚モデルは強度の面で透過実験の代替法と使用することが困難なモデルであることが示唆された。

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次元培養皮膚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次元培養皮膚モデル

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、平成13年度は皮膚3次元培養皮膚モデルであるTESTSKIN LSE High および Vitrolife-Dermis の2種類のモデルを用い、*in vitro* 経皮吸収試験への適応性についての評価を行った。

今年度は皮膚3次元培養皮膚モデルであるEPI-606 および Vitrolife-skin の2種類のモデルを用い、*in vitro* 経皮吸収試験への適応性についての評価を行ったので報告する。

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 $5 \mu\text{m}$ 、内径 4.6mm 、長さ 25cm) を資生堂より購入した。トランスポアサージカルテープは3M (株) より購入した。

三次元培養皮膚モデルは6穴マイクロプレートに入った倉敷紡績 (株) 製の EPI-606 と24穴マイクロプレートに入ったグンゼ製の Vitrolife-Skin 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、 1.0ml および 19.0ml である。透過断面積は 0.246cm^2 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 20mg を精密に量り、 100ml 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、 100ml とした。(0.2%)

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

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

50mM リン酸塩緩衝液 (pH 6.0)： 50mM リン酸二水素カリウム試液 500ml に 50mM リン酸水素二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型カラムオープン、島津製 SPD-6A型紫外吸光光度計、島津製 SIL-10AXL型カラムオープンおよび島津製 C-R6A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-60ISD型低温インキュベータを用いた。

3) 三次元培養皮膚の装着された Franz 型拡散セルの調製

EPI-606 の場合：ポリカーボネート膜を底辺にしたカップ上に生育されたモデルを6穴マイクロプレートより取り出し、テフロン膜をナイフで切り取り、テフロン膜を付けたまま 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-skin を 37°C

の5%炭酸ガスインキュベータ中に入れ、1時間放置した。マイクロプレート中のゾルを完全にゲル化させた後、コラーゲン膜のスポンジ上に培養された Vitrolife-skin 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

三次元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°C の定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 $400 \mu\text{l}$ を分取した。20%PG溶液 $400 \mu\text{l}$ を receptor 側に加え、一定の容量とした。但し、Vitrolife-skin の場合、三次元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後、donor 側に20%PG溶液 1ml を加え、 32°C の定温インキュベータ中で30分間放置した。放置後、donor 側の液を透過試験用原液 1.0ml に変更して同様に透過実験を行った。

各時間毎に採取した試料溶液 $20 \mu\text{l}$ 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°C

移動相： 50mM リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) / アセトニトリル混液 (19:1)

流量： $1 \text{ml}/\text{min}$

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 (pH 6.0) / アセトニトリル混液 (3:2)

(倫理面への配慮)

本実験は動物実験代替法の開発を目的としており、動物福祉の向上に資するものである。また、動物実験データは過去のデータを用い、新たな動物実験は行わなかった。

C. 結果および考察

1) 透過指標物質のHPLCクロマトグラム

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 μl を用いて HPLC を行い、そのクロマトグラムを Fig.1a に示した。MP, EP および CC の保持時間は、それぞれ、5.4, 7.3 および 11.7 分であった。

同様に、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 μl を用いて HPLC を行い、そのクロマトグラムを Fig.1b に示した。BA, RN および SA の保持時間は、それぞれ、7.2, 11.5 および 13.2 分であった。

2) 三次元培養皮膚モデルの EPI-606 について

透過試験用原液 1.0 ml を EPI-606 を用いて調製された Franz 型拡散セルの donor 側に加え、32°C 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。各時間の累積透過量は、3 回の実験の平均値を用いた。

Fig.2 の直線の傾きから透過速度を x 軸の接点から lag time を求めた。MP, EP および CC の透過速度は、それぞれ、5.8, 10.9 および 24.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ であり、lag time は、それぞれ、0.4, 0.5 および 0.2 時間であった。

また、同様に、EPI-606 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。

BA および SA の透過速度は 13.1 および 4.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ であった。RN の場合、測定時間の 3 時間後でも receptor 側に RN が透過してこなかった。BA および SA の lag time は 0.5 および 1.5 時間であった。

三次元培養皮膚モデルの EPI-606 の支持体として用いられているポリカーボネート膜の透過に対する影響を見るため、ポリカーボネート膜のみを拡散セルに装着し、6 種類の透過指標物質の透過実験を行った。その結果を MP, EP および CC について、Fig.4 に示した。

MP, EP および CC の透過速度は、それぞれ、9.1, 14.1 および 24.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ であり、lag time は、それぞれ、0.2, 0.1 および 0.1 時間であった。Fig.2 で示した EPI-606 とポリカーボネート膜を用いた場合の MP, EP および CC の透過速度の 5.8, 10.9

および 24.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ と Fig.4 での結果を比較した。ポリカーボネート膜のみを用いた場合の透過速度を 1 とした場合、EPI-606 とポリカーボネート膜を用いた場合の MP, EP および CC の透過速度は、それぞれ、0.64, 0.77 および 1.01 であった。MP あるいは EP の透過には三次元培養皮膚モデルの EPI-606 が透過に影響を与えているが、CC の透過には影響を与えておらず、ポリカーボネート膜の透過を見ているようなデータとなった。

ポリカーボネート膜のみを拡散セルに装着した場合の BA, RN および SA の累積透過量と時間の関係を Fig.5 に示した。

BA および SA の透過速度は 20.3 および 5.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ であった。RN の場合、測定時間の 3 時間後でも receptor 側に RN が透過してこなかった。BA および SA の lag time は 0.5 および 2.0 時間であった。Fig.3 で示した EPI-606 とポリカーボネート膜を用いた場合の BA および SA の透過速度は 13.1 および 4.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ と Fig.5 での結果を比較した。ポリカーボネート膜のみを用いた場合の透過速度を 1 とした場合、EPI-606 とポリカーボネート膜を用いた場合の BA および SA の透過速度は、それぞれ、0.65 および 0.69 であり、BA あるいは SA の透過には三次元培養皮膚モデルの EPI-606 が透過に影響を与えていることが明らかになった。ポリカーボネート膜は透過指標物質の RN を透過させておらず、ポリカーボネート膜の性質が如実にでていることが分かった。

3) 三次元培養皮膚モデルの Vitrolife-skin について

透過試験用原液 1.0 ml を Vitrolife-skin を用いて調製された Franz 型拡散セルの donor 側に加え、32°C 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.6 に示した。各時間の累積透過量は、3 回の実験の平均値を用いた。

MP, EP および CC の透過速度は、それぞれ、33.0, 41.8 および 44.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ であり、lag time は、それぞれ、0.0, 0.0 および 0.0 時間であった。

また、同様に、Vitrolife-skin 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.7 に示した。

BA, RN および SA の透過速度は 55.9, 30.0 および 37.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ であった。B

A、RNおよびSAの lag time は、それぞれ、0.0, 0.0 および 0.1 時間であった。

Vitrolife-skin の場合、コラーゲン膜のスポンジ膜とコラーゲン膜に培養した角化細胞のシートがあるが、その強度は弱く、20% PG 溶液 1.0 ml を donor 側に加えて 30 分間放置している間にも膜が破れる現象が観察された。そこで、Vitrolife-skin の膜を補強する目的で高分子膜のトランスサージカルテープの使用の可能性について検討した。BA、RN および SA の透過速度は 35.7, 17.1 および 22.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ であった。BA、RN および SA の lag time は、それぞれ、0.2, 0.4 および 0.4 時間であった。また、MP、EP および CC の透過速度は 14.8, 21.3 および 19.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ であった。MP、EP および CC の lag time は、それぞれ、0.2, 0.3 および 0.5 時間であった。高分子膜のトランスサージカルテープを用いた場合の透過速度がスポンジ膜としてコラーゲン膜を持つ Vitrolife-skin を用いた場合の透過速度より小さかった。従って、Vitrolife-skin の強度を増すためにトランスサージカルテープの上に Vitrolife-skin を置いて透過実験を行うという実験系を組むのは無理があることが分かった。

4) EPI-1606、Vitrolife-skin およびモルモットの腹部剥離皮膚を用いた時の透過速度の比較

Fig.2 および Fig.3 と Fig.6 および Fig.7 で示した透過速度を Table 1 に示した。また、平成 10 年～12 年にかけて厚生科学研究で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透過速度を示した。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。

EPI-606 とモルモットの剥離皮膚を用いた透過実験で k' 値が比較的大きな MP、EP および CC の 3 種類の透過指標物質を用いた時の透過速度の比較を行い、その結果を Fig.8 に示した。

両者の透過速度は非常に良い相関関係 ($P < 0.05$) を示した。同様に、EPI-606 の透過速度と k' の間にも良い相関関係を得ることができた。しかし、EPI-606 の強度を裏打ち

するポリカーボネート膜を用いて得られた MP、EP および CC の透過速度とモルモットの剥離皮膚を用いた場合の透過速度の間にも良い相関関係があることが観察された。このことは、3次元培養皮膚モデルである EPI-606 に対する MP、EP および CC の透過はポリカーボネート膜の影響を大きく受け、その結果が透過速度に反映されていることが示唆された。

Vitrolife-skin の透過速度とモルモットの剥離皮膚での透過速度の間には良い相関関係を見いだすことは出来なかった。

D. 結論

ヒトあるいは動物由来の皮膚の代替法として、角質層を有する皮膚 3次元培養皮膚モデル (EPI-606 および Vitrolife-skin) を用い、各種化合物の in vitro 経皮吸収実験への応用を検討した結果、2種類の 3次元培養皮膚モデルは強度の面で透過実験の代替法と使用することが困難であると示唆された。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

- 1) Kurebayashi H, Harada R, Stewart RK, Numata H, Ohno Y. Disposition of a low dose of bisphenol A in male and female cynomolgus monkeys. Toxicol Sci. 68, 32-42, 2002.
- 2) Kurebayashi H, Betsui H, Ohno Y., Disposition of a low dose of 14C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. Toxicological Sciences 73, in print, 2003.
- 3) Uchino T., Tokunaga H., Onodera H., Ando M.: Effect of squalene monohydroperoxide on cytotoxicity and cytokine release in a three-dimensional human skin model and human epidermal keratinocyte, Biol. Pharm. Bull, 25, 605-610, 2001.
- 4) 徳永裕司、鄭 然孫、内野 正、安藤正典：フタル酸ジエチルの in vitro 経皮吸収に関する研究、粧技誌、35, 312-316, 2001.

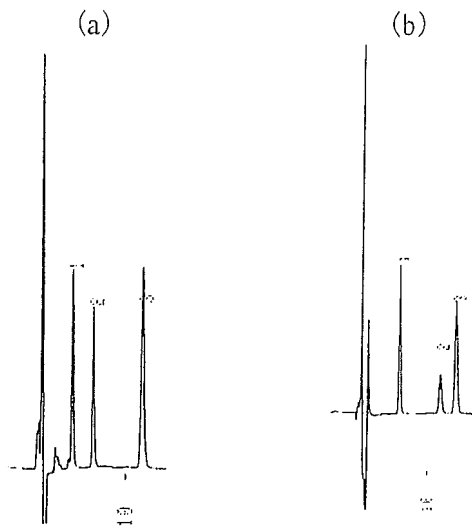


Fig.1 HPLC chromatograms for MP, EP and CC (a) and for BA, RN and SA (b)
 1: MP, 2: EP and 3: CC in chromatogram (a)
 1: BA, 2: RN and 3: SA in chromatogram (b)

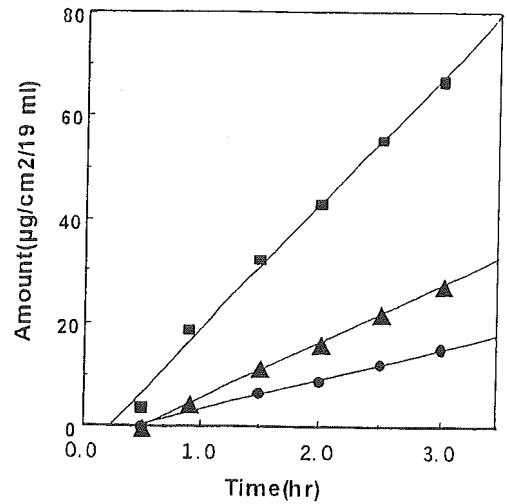


Fig.2 Permeation of MP, EP and CC through EPI-606
 ● MP $y = -2.3062 + 5.7728x$ $R^2 = 0.994$
 ▲ EP $y = -5.1988 + 10.865x$ $R^2 = 0.999$
 ■ CC $y = -5.7847 + 24.491x$ $R^2 = 0.993$

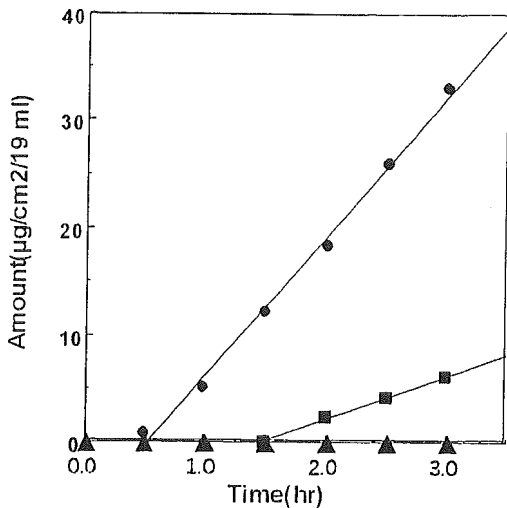


Fig.3 Permeation of BA, RN and SA through EPI-606
 ● BA $y = -7.0533 + 13.126x$ $R^2 = 0.995$
 ▲ RN
 ■ SA $y = -5.8100 + 3.9600x$ $R^2 = 0.997$

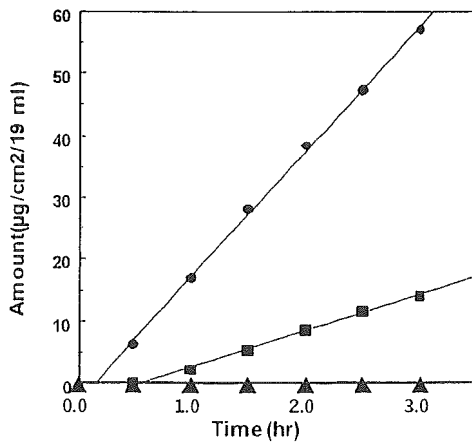


Fig.5 Permeation of BA, RN and SA through the polymer film from EPI-606
 ● BA $y = -3.3333 + 20.314x$ $R^2 = 0.999$
 ▲ RN
 ■ SA $y = -3.2467 + 5.7600x$ $R^2 = 0.997$

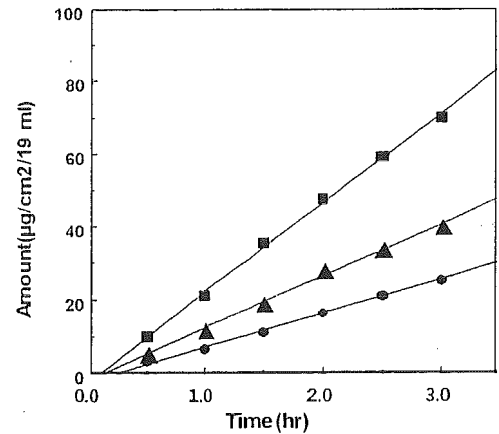


Fig.4 Permeation of MA, EP and CC through the polymer film of EPI-606
 ● MP $y = -2.0000 + 9.1429x$ $R^2 = 0.997$
 ▲ EP $y = -1.7200 + 14.126x$ $R^2 = 0.997$
 ■ CC $y = -1.9000 + 24.171x$ $R^2 = 0.998$

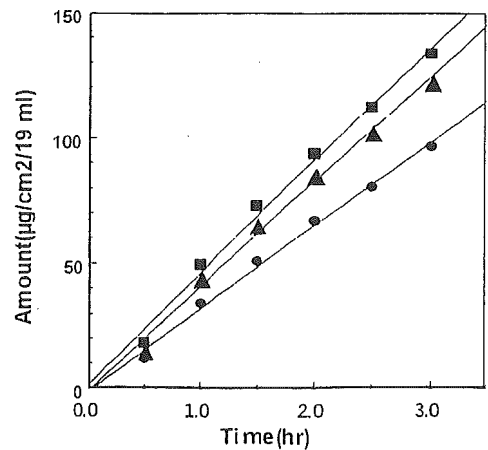


Fig.6 Permeation of MA, EP and CC through the Vitrlife-skin
 ● MP $y = -1.0400 + 33.023x$ $R^2 = 0.993$
 ▲ EP $y = -0.95333 + 41.811x$ $R^2 = 0.992$
 ■ CC $y = 1.4533 + 44.760x$ $R^2 = 0.991$

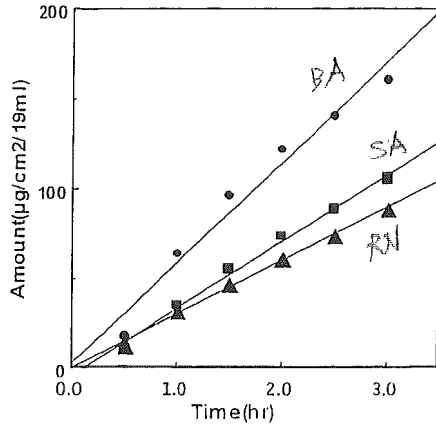


Fig. 7 Permeation of BA, RN and SA through Vitrolife-skin

● BA $y = 2.6267 + 55.937x$ $R^2 = 0.967$
 ▲ RN $y = 0.30667 + 29.977x$ $R^2 = 0.996$
 ■ SA $y = -3.7600 + 37.291x$ $R^2 = 0.993$

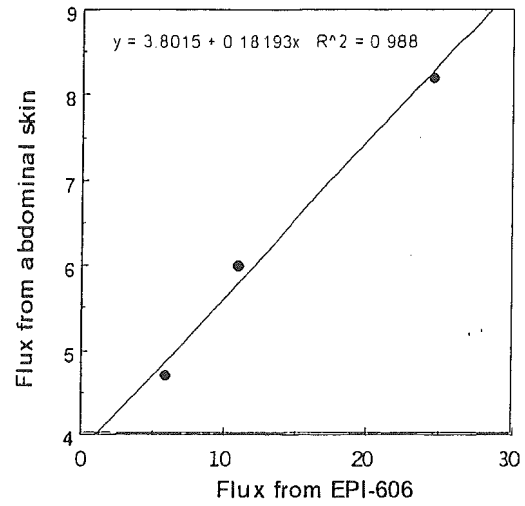


Fig. 8 Relationship between flux from abdominal skin and from EPI-606

Table 1 Flux of MP, EP, CC, BA, RN and SA using EPI-606, Vitrolife-skin and capacity factor of each compound

	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) using EPI-606	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) using Vitrolife-skin	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) using abdominal skin of Guinea-pig	k'
MP	5.8	33.0	4.7	4.36
EP	10.9	41.8	6.0	9.49
CC	24.5	44.8	8.2	20.38
BA	13.1	55.9	4.7	0.35
RN	-	30.0	1.9	0.80
SA	4.0	37.3	44.9	0.39

厚生労働科学研究補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

光毒性試験法の研究室間小規模バリデーション

分担研究者： 田中 憲徳 財）食品薬品安全センター秦野研究所
細胞毒性学研究室長

研究要旨

光毒性試験に関する動物実験代替法として、新たに細胞を用いる OECD ガイドラインが施行された。このガイドラインに従って試験を実施する場合の問題点を明らかにするため、ラボ間での結果の再現性、光源によって得られる毒性反応の差など、7種のモデル化学物質を用いて、4機関によって小規模バリデーションスタディを実施した。その結果、Dr Hönle を光源として用いた場合、陽性物質として知られている anthracene、chlorpromazine HCl (CPZ)、bergapten は、どの機関でも明らかに陽性の結果が得られた。しかし、CPZ については、OECD ガイドラインの許容値からはずれる値が1施設で得られた。また弱い光毒性物質である bithionol や amiodarone HCl では、試験ごとに判定の異なる結果も認められた。陰性対照の2物質のうち、SDS では全ての機関において明らかな陰性の結果が得られたが、chlorhexidine 2HCl は2機関で明らかな陰性、2機関で疑陽性の結果を示した。なお、試験施設ごとの IC50 値に差が見られたが、PIF 値による光毒性の判定結果には大きな変化はなかった。

一方、照射光源の違いによる光毒性試験の結果に関しては、化学物質としては CPZ のみのデータではあるが、WACOM 社、SERIC 社および ATLAS 社のキセノンランプ、および UVA 光源である Vilber Lourmat 社のトランスイルミネータを用いて得られた結果は、いずれもほぼメタルハライドランプの結果に近似した値を示し、その施設での背景データと試験条件の精度が確保されていれば、照射光源を変えても問題はないと考えられるが、照射機器の条件設定に関しては十分な検討が必要である。

A. 研究目的

7種の化学物質を用いて、OECD ガイドラインの条件下で実施した場合の試験結果について、ラボ間での再現性を評価した。また、OECDのガイドライン作成の為に基礎データに用いられた光源のメタルハライドランプ (SOL500、Dr Hönle 社) の結果と、それぞれの機関で使用しているメタルハライドランプ以外の光源を用いた場合との毒性反応の特性を比較し、異なる照射光源によって得られた結果を比較評価した。

B. 研究方法

1. 参加機関と照射光源

照射光源として、1 系列は標準光源として

事務局より配布した Dr Hönle 社のメタルハライドランプ SOL500 を用いた。さらに、各機関で用いている他の種類の光源を用いて、最適な光毒性が得られる条件下で試験を実施した。他の機器として、Lab B では UVA 光源として Vilber Lourmat 社のトランスイルミネーター、Lab A と Lab C では WACOM 社のキセノンランプ、Lab D では ATLAS 社と SERIC 社のキセノンランプを使用した (Lab B の Trans-illuminator (Vilber Lourmat) 以外は太陽類似光)。また、照射量測定には Dr Hönle 社の UV 検出器を使用した。

Lab A:①SOL500 (Dr Hönle)

②WXS-50C-5UV (WACOM R&D corporation)

Lab B:①SOL500 (Dr Hönle)
②Trans-illuminator (Vilber
Lourmat)
Lab C:①SOL500 (Dr Hönle)
②WXS-50C-5UV (WACOM R&D
corporation)
Lab D:①SOL500 (Dr Hönle)
②XC-500BFSS (SERIC)
③Suntest CPS (ATLAS)

2. プロトコール

1) 被験物質

吸収波長の異なる下記の5種の既知光毒性物質を用いた。

Anthracene, bithionol, amiodarone
HCl, chrolhexidine 2HCl, bergapten

2) 対照物質

Chlorpromazine HCl (CPZ, positive),
sodium lauryl sulfate (SDS, negative) を用
いた。

3) 溶媒

使用する溶媒は統一した。SDS と CPZ を
除いて DMSO を用いた。SDS および CPZ で
は蒸留水を用いる事を原則とした。

4) 操作法

- i) 試験プロトコールは、Dr Hönle の照射機
器を用いる場合は、March 15, 2002 の
OECD ドラフト案に従った。その他の照
射機器の場合は、その機器に合わせた各
施設のプロトコールに従った。
- ii) 細胞は Balb/c 3T3 A31-1-1、培地は
DMEM に 10% FCS を加えて用いた。細
胞、血清、被験物質などは全て事務局より
同一ロットのものを供給した。
- iii) 処理時の溶媒：アールの平衡塩緩衝液
(EBSS)
- iv) 照射量：Dr Hönle の場合は 5 J/cm^2
(1.7 mW/cm^2 で 50 分)、他の光源では
その光源にあった最適条件に合わせるこ
ととし、照射時間は Dr Hönle 社の機器以
外は、それぞれの機器の最適暴露時間
によった。
各施設での照射量の設定を Dr Hönle 社
の強度計で測定した場合の照射量で示す
と以下となった。

Lab A: WACOM - 3.4 mW/cm^2 で 25 分
(5 J/cm^2)

Lab B: Vilber Lourmat - 2.0 mW/cm^2
で 42 分 (5 J/cm^2)

Lab C: WACOM - 9.2 mW/cm^2 で 10 分
(5.5 J/cm^2)

Lab D: SERIC - 1.7 mW/cm^2 で
50 分 (5 J/cm^2)

ATLAS - 0.21 mW/cm^2 で 50 分
(0.63 J/cm^2)

- v) 照射機器：1 系列は標準光源として、事
務局より配布した Dr Hönle 社のメタル
ハライドランプを用いた。同時に、自社
で用いている他の光源を用いて、最適な
光毒性が得られる照射条件（各機関での
従来やり方）で試験を実施した。Dr Hön
le 社以外の各施設で用いているそれぞれの
光源の波長特性を調べておく。もし、
spectroradiometer がなければ、秦野研の
測定器で測定する。また、UV 強度計も
標準の強度計を用いてその違いを調べる
こととした。標準に用いる UV 強度計は
秦野研で使用している Dr Hönle 社のも
のを用いた。
- vi) 照射前の薬剤曝露時間(前処理)：60 分と
した。

C. 研究結果

1. Dr Hönle 社の光源を用いて OECD のガイ ドラインに準じて試験をした場合

Dr Hönle 社を光源として用いた場合に得
られた 4 機関のデータを、Table 1 および Fig
1-a~g に示した。anthracene は、光毒性陽
性物質として用いられる物質であり、本試験
の結果でも明らかな陽性を示した。どの機関
においても非照射条件下では最高濃度の
 $1000 \mu\text{g/mL}$ においても殆ど毒性を示さな
かったが、照射下での IC50 値はすべての機関
で $1 \mu\text{g/mL}$ 未満を示した。IC50 値および
PIF 値は各機関間において 50 倍以上の差が認
められた。Lab A での飛び値を除けば、おし
なべて施設内での再現性は同一傾向を示すも
のであった (Fig 1-a)。

Bithionol は 3 機関で明らかな陽性の結果
が得られたが、1 機関では 3 回中 1 回で陽
性、2 回で疑陽性となった (Fig 1-b)。

CPZ は、OECD のガイドラインにおいて陽
性物質としての使用が推奨されており、得ら

れる PIF 値は $PIF > 14.4$ に近似する事がガイドラインでは記載されている。この基準によると、4 機関中 3 機関で条件を満たした。一方、ガイドライン化に先立って行われたバリデーションスタディの基準では、許容される一定の幅が設定されていた（非照射での IC_{50} 値 = $7.0 \sim 90.0 \mu\text{g/mL}$ 、光照射での IC_{50} 値 = $0.1 \sim 2.0 \mu\text{g/mL}$ 、 PIF 値 > 6 ）。その観点からデータをみると、照射・非照射下での IC_{50} 値は約半数がこの許容値を外れる結果となった。しかしながら、 PIF 値で見ると許容値である $PIF > 6$ にはいる値を示した。また、Lab A では光照射下において高い毒性値と PIF 値が得られたが、全体的にはほぼ同様の陽性傾向がみられた (Table 1, Fig 1-c)。

Bergapten に関しては Lab C のみが非照射の条件で毒性が見られた。照射条件でも Lab C が最も低い濃度から毒性を発現し IC_{50} 値は低い値 (< 0.0078) を示した。一方、Lab B では、特に照射条件下で明確な用量反応曲線が得られなかったため適切な IC_{50} 値を得ることができなかった。しかしながら、Lab B においても光照射下において毒性の傾向は認められたことから、全ての機関で陽性の結果が得られたと判断した (Fig 1-d)。

Amiodarone HCl は光毒性物質として分類されているが、EU/COLIPA のバリデーションスタディでは、ラボ間での再現性がことなる事が報告されている。本実験では照射・非照射ともにどの機関も同様な傾向が得られた。Lab A では 3 回の試験の平均で PIF 値が 4.4 を示し、疑陽性の結果となったが、3 回の試験中、1 回では陽性の結果が得られており、また、他の 3 機関では陽性であったことから、総合的には弱いながらも陽性物質である事が示された (Fig 1-e)。また、ガイドラインで示す推奨値 $PIF > 3.25$ の条件はすべての機関で満たしていた。

陰性対照として用いた chlorhexidine 2HCl は EU/COLIPA のバリデーションスタディでも用いられ、陰性の結果 ($PIF=1.5$) が得られているが、照射群では IC_{50} 値に少し減少傾向が見られるものの PIF 値は低かった ($1.2 \sim 3.1$) しかし、 $PIF=2 \sim 5$ を疑陽性範囲とするならば、2 機関で疑陽性の結果とな

る。Lab C は、3 回の試験では DMSO を溶媒として、2 回の試験では水を用いて行ったが、 IC_{50} 値に両者で大きな差が見られるものの PIF 値では大きな変化は認められなかった (Table 1, Fig 1-f)。

同様に、陰性対照として用いた SDS では、照射・非照射ともに各機関で同程度の IC_{50} 値が得られ、陰性を示した (Fig 1-g)。

これらの結果から、同一プロトコールで試験を実施しているにもかかわらず、得られた IC_{50} 値は Lab 間で異なった場合があったが、最終的に判定に影響するような大きな PIF 値の変動は認められなかった。

2. 照射光源による光毒性の比較

照射光源による光毒性試験の結果に関しては、CPZ の場合を例にその結果を示した (Table 2 および Fig 2-a~d)。

本研究では全機関で標準光源として Dr Hönle 社のメタルハライドランプを用い、それに比較して、Lab A と Lab C では WACOM 社のキセノンランプを、Lab D では SERIC 社と ATLAS 社のキセノンランプを用いて試験を実施した。Lab B では UVA 領域 ($320 \sim 400\text{nm}$) の 365nm にピーク波長を有する Vilber Lourmat 社のトランスイルミネータ (ブラックランプ) を用いた。また、CPZ は、OECD のガイドラインにおいて陽性対照物質としての使用が推奨されている物質である。この CPZ を用いて、本バリデーションで用いた照射装置と同タイプを用いて実施された EU/COLIPA のバリデーションにおける許容値 (照射下での IC_{50} 値が $0.1 \sim 2.0 \mu\text{g/mL}$ 、非照射下での IC_{50} 値が $7.0 \sim 90.0 \mu\text{g/mL}$ 、 PIF 値は 6 以上) と OECD のガイドラインで記載されている推奨値 ($PIF > 14.4$) を基準にデータを検討した。

Lab A と Lab C は標準光源以外の系では、キセノン光源を用いた同一機種 (WACOM 社製) により試験を行った、(Table 2, Fig 2-a, Fig 2-b)。

その結果、Lab A と Lab C では非照射下における CPZ の IC_{50} 値がガイドラインで示す数値よりも毒性が強くなっている。また、標準光源における光照射下での IC_{50} 値は Lab A ではやはり記載の数値よりも強い結果とな

っているが、Lab Cは基準値に入っていた。PIF値はLab A、Lab Cともに基準を満たしていた。一方、両Labでの細かな照射条件の設定は異なると考えられるが、WACOM社のキセノンランプのデータは、Lab AとLab Cの両機関ともにOECDガイドラインの設定値を満たす結果が得られた。なお、両機関ともに3回の実験を実施しているが、実験間の再現性にややばらつきがみられた。更にガイドラインに記載の $PIF > 14.4$ に関しても、Lab AとLab Cは条件を満たしていた。

Lab BのVilber Lourmat社のトランスイルミネータ(ブラックランプ)を用いた場合のデータをTable 2とFig 2-cに示した。その結果、非照射・照射条件下でのIC50値およびPIF値は、Dr Hönleで得られた値に近似していた。太陽類似光であるDr HönleにおいてもUVA領域に特徴的な波長ピークを有している事がその要因となることも考えられる。EU/COLIPAのバリデーションでの許容値に関しては、平均値では条件を満たしていた。しかしながら、PIF値の得られた3回の試験中1回のみがOECDのガイドラインの設定値を満たす値($PIF = 15$)であった。

Lab Dでは、SERIC社とATLAS社の2種類のキセノンランプを用いた。非照射下におけるIC50値は2回の試験で基準値をはずれていたが、照射下で得られた結果は両光源ともに、IC50値、PIF値ともに基準値を満たした。しかしながら、ATRAS社ではガイドラインの推奨値($PIF > 14.4$)に満たない結果となった。

D. 考察

本研究では、光毒性試験の動物実験代替法としてOECDでガイドライン化された細胞を用いる光毒性試験について、ガイドライン下で実施する場合に問題となる、試験条件の適用性と光源が異なる場合のデータの評価について検討した。実施にあたっては、すでにこの試験を適用している4機関で、7種の化学物質を用いて小規模バリデーションスタディを実施した。本バリデーションでは、試験開始にあたり同一条件下での実験条件プロトコルに留意し、照射条件はもとより、実験に用いる細胞、血清、化学物質などはできる

だけ同じ条件になるように設定したが、光照射・非照射に関わらず得られたIC50値は研究施設間で異なる値を示した。しかしながら、最終的に光毒性値の指標となるPIF値の評価では、どの施設でもほぼ同様の判定結果が得られた。このことは、照射条件下と非照射条件下で得られる結果は、施設ごとには類似の傾向である事を意味していると考えられる。また、同一施設内での再現性においては、試験の度ごとに振れる場合もあった。この原因として、バリデーションに使用した機器(SOL500, Dr Hönle社)については、試験直前に配布したことから、機器の細部の条件設定などに起因する事も考えられた。

一方、OECDのガイドラインに示す陽性対照物質であるCPZの示す推奨値については、メタルハイドランプを用いた場合でも、実験条件によっては必ずしも、推奨される範囲内に収まらない場合もあり、参考程度として理解すべき事、そして、その施設内での背景データがむしろ重要であると考えられた。

光源種の問題に関しては、本研究ではメタルハイドランプ以外の4種の光源を用いて試験が実施された。これまで得られた結果については、ほぼ受け入れられる光毒性値を示した。しかしながら、本項での比較は302 nmに吸収波長を有するCPZのデータのみであることから、吸収波長の異なる他の化学物質と、異なる波長特性を有する各種光源との組み合わせによっては結果が異なる可能性もあり、同時に実施した他の化学物質によるデータの解析がまたれる。

E. 結論

光毒性試験の小規模バリデーション試験の結果、新たに設定されたOECDのガイドラインについては、ほぼ満足する試験プロトコルである事、またこの試験に用いる光源については、その光源の波長特性を理解し十分な背景データを基準にすれば従来の光源でも適用可能と考えられる。OECDガイドラインに示すCPZを始めとする対照物質の推奨値については、実験条件により幅があることが明らかである事から、参考の値程度にとどめ、厳密に取り扱わないような対応が必要と思われる。

F. 健康危険情報

本研究で用いる化学物質に関しては、それぞれの物質の有害情報に基づいて取扱い、施設に定める GLP、もしくは、それに準じる安全性試験への適用規則に準拠して取り扱った。また、実験実施後の廃棄物の処理に関しても同様に、定められた廃棄物処理基準に従って処理した。なお、本実験では動物を用いないこと、またヒト材料を用いる実験計画は無いので、動物倫理およびヒト材料を用いる場合の安全性ならびに倫理基準に該当する要件はないものとする。

G. 研究発表

1. 論文発表 (2002 年度)

- 1) 若栗忍、田中憲穂：動物モデルによる新しい評価法 - In vitro 光細胞毒性試験について -、アニテックス、14:44-48 (2002)
- 2) 永森静志、遠藤仁、金井好克、宮崎正博、本間正充、宮村達男、鈴木哲朗、相崎英樹、梅田誠、田中憲穂、佐々木澄志、千葉寛、細川正清、松浦知和、小田裕昭、吉田：ヒト培養肝細胞の肝機能発現とその利用法-バイオ人工肝の多角的な応用をめざして-、細胞 34 (13): 516-523 (2002)
- 3) 佐々木澄志、浅田晋、田中憲穂、梅田誠：ヒト肝細胞樹立株を用いた毒性試験、細胞 34 (13):550-553(2002)
- 4) 若栗 忍、高橋淳子、林 真、田中憲穂：酒匂川流域水系の河川水を用いた細胞毒性試験、水環境学会誌、25 (11), 669-674 (2002)

2. 学会発表

- 1) Noriho Tanaka: Detection of photogenotoxic substances in our environment, Workshop on comet assay: applications in toxicology and molecular epidemiology Lucknow, India, Feb.7-11,2003
- 2) 田中憲穂：Balb/c 3T3 細胞を用いるニュートラルレッド取り込みを指標とした光毒性試験法の評価 - 試験プロトコルの提案 -、公開シンポジウム、日本動物実験代替法学会、代替法評価委員

会、2002 年 12 月、東京

- 3) 若栗忍、林久実子、田中憲穂：代謝活性化による化学物質の簡易細胞毒性試験、日本動物実験代替法学会、2002 年 12 月、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし