

にマウントした。その際、tape stripping 時にかかる圧力に対応するため皮膚の下に目の細かい金属性メッシュを挟んだ (Fig. 1)。皮膚が適切にマウントされているのを確認した後、縦型拡散セルを PBS (pH 7.4) で満たし、32°C で 1 時間水和させた。ブタ耳皮膚は食用ブタから摘出後 4 時間以内のものを屠殺場より入手し、ヘアレスラットと同様の方法で縦型セルにマウントし、水和させた。

2. *in vitro* tape stripping

skin sample を 1 時間水和させた後、セロテープ[®] (SEKISUI) を皮膚に乗せ、D-square[®] (CuDerm Cop.) を用いて (約 200 g/cm²)、あるいは指で軽く擦り (5~10 g/cm²) 圧着させた (Fig. 2)。その後、速やかに一定の力でテープを剥がし、角質層を剥離した。ヘアレスラット皮膚では最大で 20 回まで、ブタ耳皮膚では 70 回まで tape stripping を行い、stripping 後のテープは黒い台紙に貼り付け角質層の剥離様態を観察した。

3. *in vitro* measurement of TEWL

TEWL の測定は恒温、恒湿に保ったアクリル製恒温箱 (75×50×50 cm) の中で行った。はじめに、stripping を行う前 (intact skin) の TEWL を測定し、その後ヘアレスラット皮膚では stripping 2 回ごと、ブタ耳皮膚では stripping 5 回ごとに測定した。測定は 5 分間行い、2~5 分の間の平均値を測定値として用いた。

C. 研究結果

1. ヘアレスラット腹部皮膚の TEWL

強い圧力 (200 g/cm²) で tape stripping を行ったときの TEWL と角質層剥離状態の観察結果を Fig. 4 および 5 に示す。

200 g/cm² の圧力でテープを適用したとき、4 回目の stripping で最も高い値を示し、2 回目の stripping では、サンプル間で大きなバラツキが見られた (Fig. 4)。stripping 後のテープ観察結果 (Fig. 5) では、角質層の不均一な剥離が見られ、stripping 4~6 回目の間に角質層はほとんど除去されていた。これらの結果は前回の報告結果と一致する。

同様に、弱い圧力 (5~10 g/cm²) にて tape stripping を行ったときの結果を Fig. 6 および 7 に示す。角質層剥離状態 (Fig. 7) を見ると、強い圧力を用いたものと異なり、初期の stripping 回数において、角質層の部分的欠損は認められず、また、完全除去するのに多数回の stripping を要している。弱い圧力での tape stripping は、角質層の剥離が均一といえるほどではないが、垂直方向の剥離は起きにくいものと思われる。

TEWL の結果 (Fig. 6) を見ると、6 回目の stripping まではさほど変化せず、サンプル間のバラツキもほとんど見られなかった。その後はバラツキを伴うようになるが、TEWL の上昇パターンは各サンプルで類似していた。

2. ブタ耳皮膚の TEWL

ヒト皮膚代替モデルとして有望であると報告されているブタ耳皮膚において、tape stripping の圧着圧の違いが角質層剥離の均一性、および TEWL にどのような影響をもたらすか検討した。実験結果を Fig. 8~11 に示す。

Intact skin では、ヘアレスラットよりも TEWL 値がばらついた。これは耳的摘出時、あるいは搬送時に角質層にダメージを負ったものと考えられる。ブタ耳皮膚は強い圧力でテープを適用しても、均一な角質層の剥離が見られ (Fig. 9)、TEWL の一定な上昇パターンが見られた (Fig. 8)。また、弱い圧力でテープを適用したときの TEWL 値の上昇パターンは、サンプル間で良好な一致性を示した (Fig. 10)。

D. 考察

TEWL を integrity の指標とするには、皮膚の段階的損傷に対して、測定値が定量的にそれを反映し、かつ、再現性のあることが条件となる。テープストリッピングは皮膚角質層の損傷モデル作成法として一般的であり¹⁾、また、皮膚に適用された薬物の角質層内濃度勾配を求める方法として皮膚外用剤の同等性試験に応用されている²⁾。同等性試験に適用する場合、角質層の均一な剥離は絶対条件である。そのため、テープストリッピングによる角質層の剥離は、1 回に 1 層の均一なものであるといった先入観があった³⁻⁶⁾。すなわち、本研究において当初見られた TEWL のバラツキを、TEWL 測定に内在する問題点とみなし、テープストリッピングに起因するバラツキと考えなかったことに問題があった。TEWL の測定値は湿度、温度さらには、プローブ周辺のわずかな空気の動き (風) に影響される⁷⁾。我々は恒温・恒湿の部屋に空気の流れを遮断するための恒温箱を設置し、この環境下で TEWL を測定している。この条件での、ヘアレスラット腹部摘出インタクトスキンの TEWL は $10.13 \pm 1.93 \text{ g/m}^2/\text{h}$ (n=15, CV=19.12%)、背部皮膚では $9.64 \pm 1.68 \text{ g/m}^2/\text{h}$ (n=21, CV=17.40%) であり、95% 信頼区間の上限値は、それぞれ、 $13.99 \text{ g/m}^2/\text{h}$ と $13.00 \text{ g/m}^2/\text{h}$ となる。これら皮膚を試験に用いる場合、この値を超える TEWL を示す試料については、試験に用いない、あるいは、得られた試験結果の解釈には慎重で

あるべきである。一方、今後、皮膚外用剤の試験試料として有望なブタ耳皮膚については、今のところ例数は少ないものの、 $15.11 \pm 3.21 \text{g/m}^2/\text{h}$ ($n=6$, $CV=21.26\%$) である。このバラツキの原因として、納入されるまでに(飼育状態も含む)、皮膚に何らかの損傷を生じていることが考えられ、ブタ耳を試験試料として用いるためには、飼育施設の協力を得て、品質管理を行っていく必要がある。

現在、我々はヒト皮膚の TEWL 測定は行っていないが、ヒト由来組織の提供環境が整う可能性もあり⁸⁾、ヒトインタクト皮膚の TEWL 基準値を調べる必要があるかもしれない。

我々は本研究において、摘出皮膚を用いた in vitro 皮膚外用剤試験の品質を高めるために、試験に用いる皮膚試料の integrity 評価法について検討した。しかしながら、動物愛護の観点から、ヒト皮膚代替人工膜を用いることによる皮膚外用剤試験が望まれており、今後の検討課題と考えている。

E. 引用文献

1) M. Washitake, T. Yajima, T. Anmo, T. Arita, and R. Hori : Studies on percutaneous absorption of drugs through damaged skin. Chem. Pharm. Bull., 21(11) : 2444-2451, 1973
 2) 局所皮膚適用製剤の後発医薬品のための生物学的同等性試験ガイドライン

3) Y.N. Kalia, I. Alberti, A. Naik, R.H. Guy : Assessment of topical bioavailability in vivo : The importance of stratum corneum thickness. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 14(1) : 82-86, 2001

4) Y.N.Kalia, I. Alberti, N. Sekkat, C. Curdy, A. Naik, and R.H. Guy : Normalization of stratum corneum barrier function and transepidermal water loss in vivo. Pharm.Res., 17(9) : 1148-1150, 2000

5) M.B. Reddy, A.L. Stinchcomb, R.H. Guy, and A.L. Bunge : Determining dermal absorption parameters in vivo from tape strip data. Pharm. Res., 19(3) : 292-298, 2002

6) I. Alberti, Y.N. Kalia, A. Naik, J.-D. Bonny, R.H.Guy : Effect of ethanol and isopropyl myristate on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum, in vivo. Int J Pharm., 219:11-19, 2001

7) 高橋元次 : 皮膚の性状計測と評価法, 皮膚刺激性・監査試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 第Ⅱ部(第1節) : 119-129, 技術情報協会

8) 手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について“医薬品の研究開発を中心に”厚生労働省ホームページ, <http://www.mhlw.go.jp/> (2003.11.10 現在)

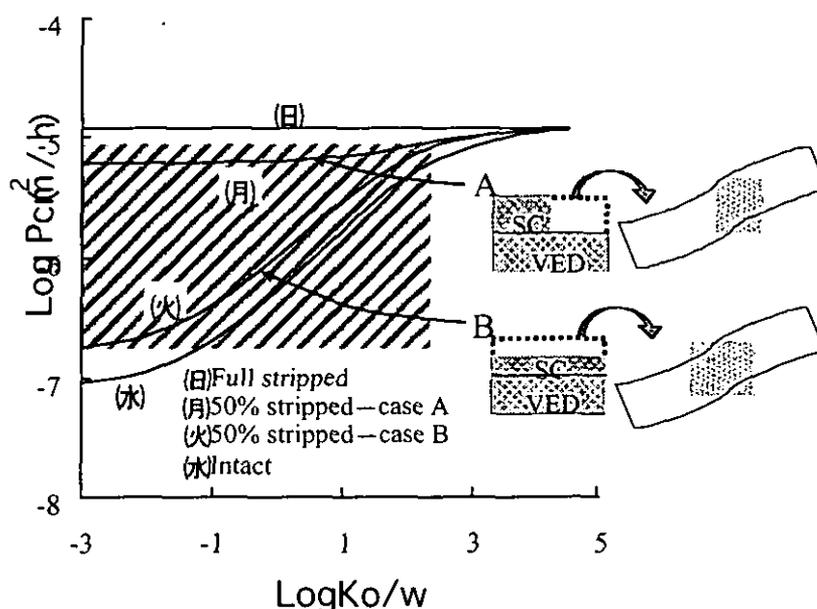


Fig. 1 The relationship between peeling of the stratum corneum and fluctuation of the substance permeation

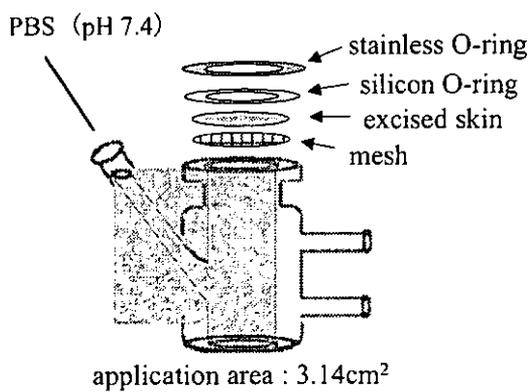


Fig.2 Vertical type diffusion cell for TEWL measurement

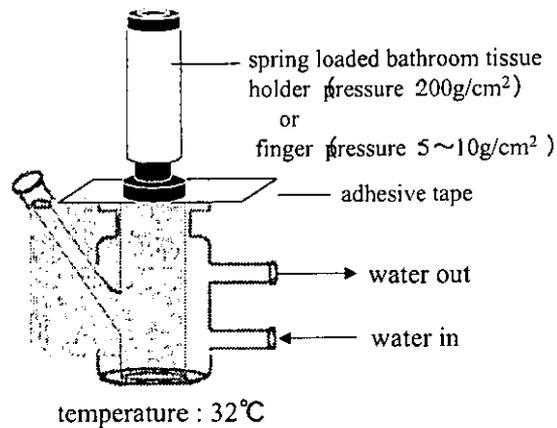


Fig.3 in vitro tape stripping

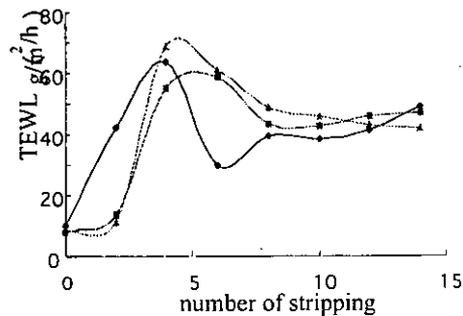
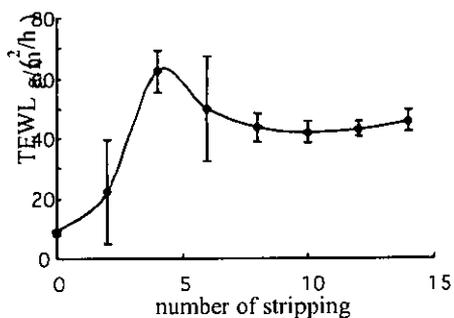


Fig.4 Effect of strong-pressured-stripping on the TEWL of hairless rat skin
(left : mean of the three samples \pm SD, right : individual data of three samples)

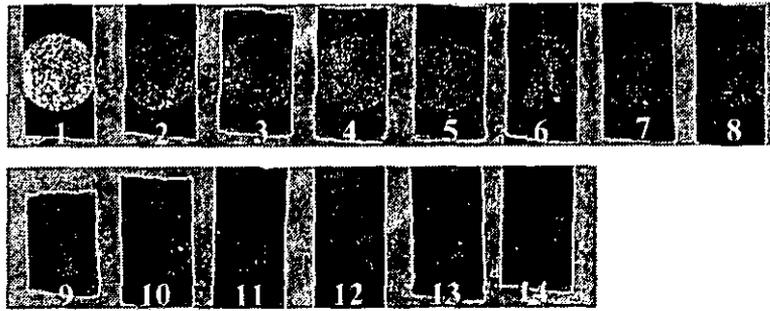


Fig.5 Images of stratum corneum of hairless rat skin stripped by strong pressure

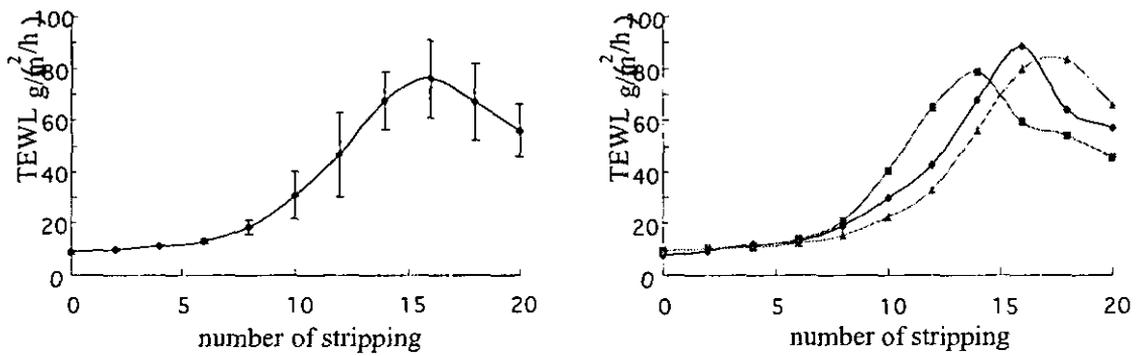


Fig. 6 Effect of weak-pressured-stripping on the TEWL of hairless rat skin
(left : mean of the three samples \pm SD, right : individual data of three samples)

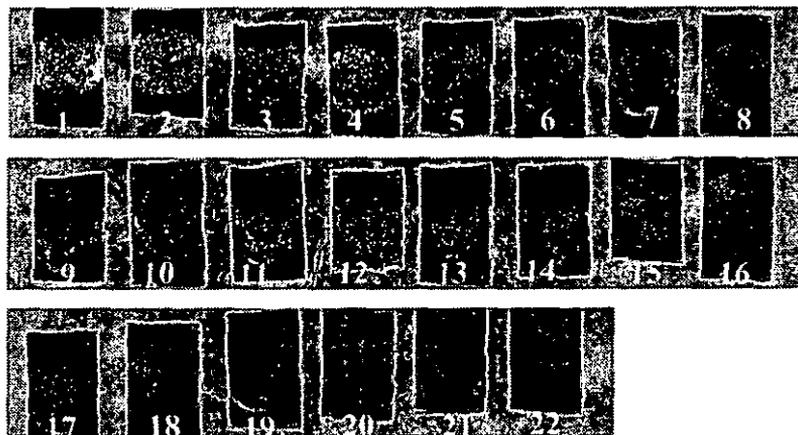


Fig. 7 Images of stratum corneum of hairless rat skin stripped by weak pressure

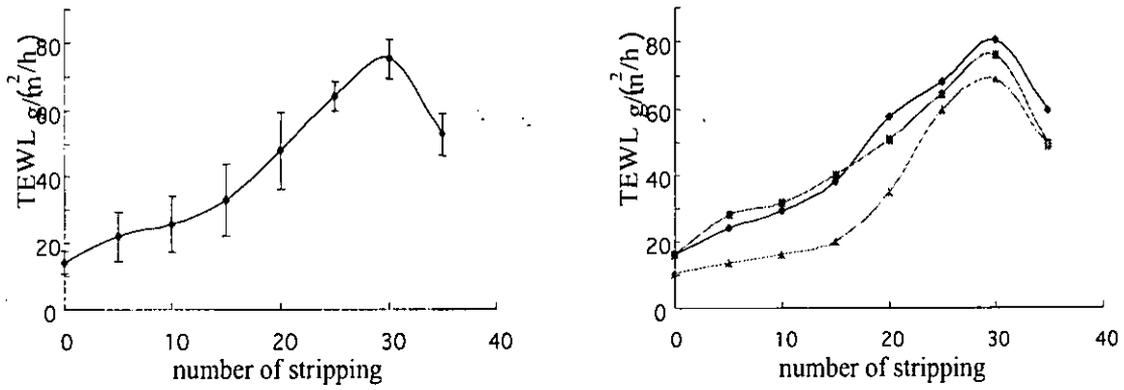


Fig. 8 Effect of strong-pressured-stripping on the TEWL of porcine ear skin
(left : mean of the three samples \pm SD, right : individual data of three samples)

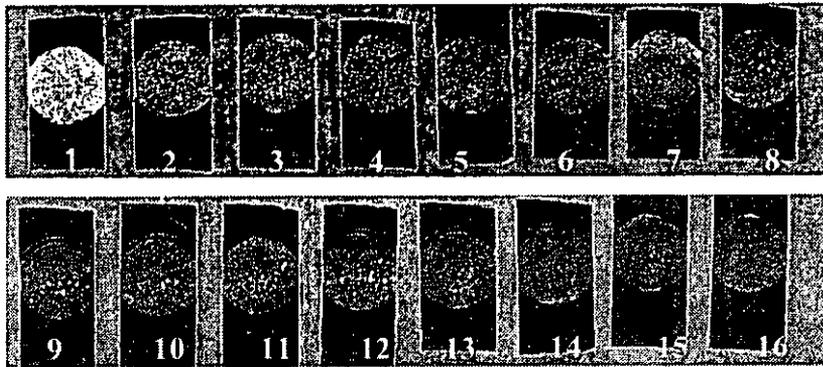


Fig. 9 Images of stratum corneum of porcine ear skin stripped by strong pressure

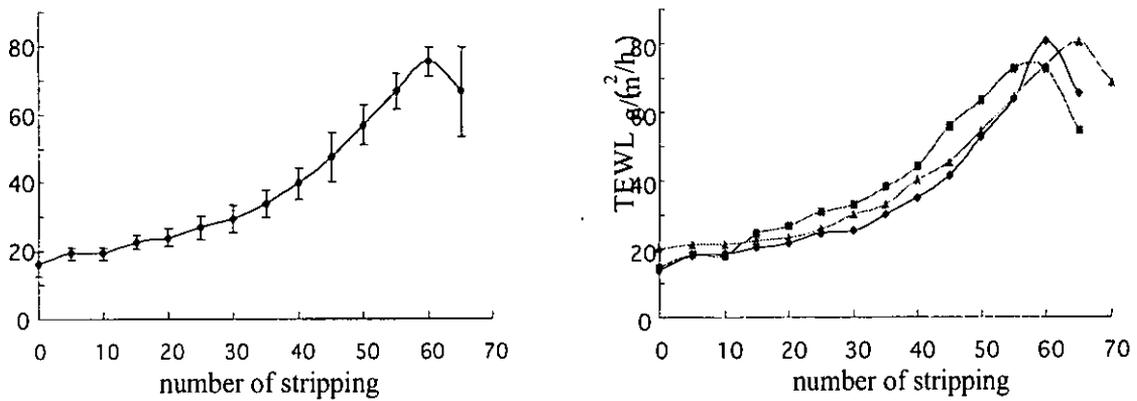


Fig.10 Effect of weak-pressured-stripping on the TEWL of porcine ear skin
(left : mean of the three samples \pm SD, right : individual data of three samples)

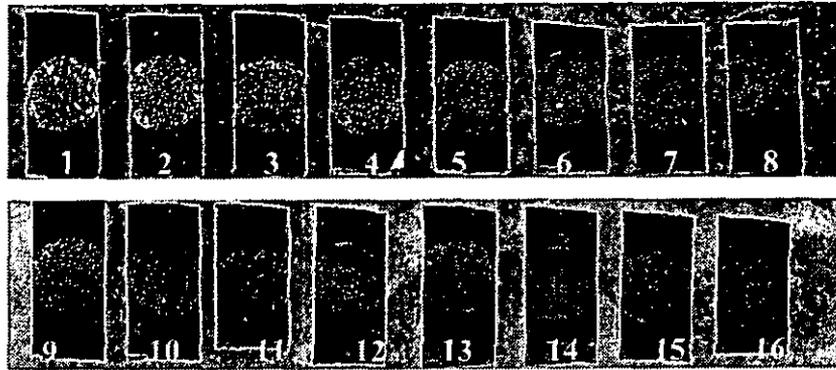


Fig.11 Images of stratum corneum of porcine ear skin stripped by weak pressure

別紙 5

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当無し					

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
分担研究報告書

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

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三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。三次元培養皮膚モデルとして、これまで、TESTSKIN LSE High、Vitrolife-Dermis、EPI-606 および Vitrolife-skin の四種類の培養皮膚を用いて検討した。本年度は皮膚三次元培養皮膚モデルを当研究室で構築し、その皮膚モデルを用いて *in vitro* 経皮吸収試験への適応性についての評価を行った。この結果、コラーゲンゲルあるいはコラーゲンスポンジ上に作成した三次元培養皮膚モデルにおける透過のパターンがモルモットの剥離皮膚での透過速度と大きく異なり、三次元皮膚培養モデルを実験動物代替法の動物の皮膚モデルとして、物質の透過実験に用いることは困難であることが明らかになった。

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、2002 年 5 月に最終案が専門家会議で承認された。この案では *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。

一方、皮膚ケラチノサイトを用いた皮膚三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、皮膚三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。平成 13 年度は皮膚三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、モルモットの腹部剥離皮膚との比較評価を行

った。サリチル酸(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た。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 倍の値であった。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間には、類似したパターンを示すことが分かった。

また、平成 14 年度は三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、培養皮膚の強度を増すため、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、三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。三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つ

た。

今年度は皮膚三次元培養皮膚モデルを当研究室で構築し、その皮膚モデルを用いて *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)およびアセトニトリルは和光純薬より購入した。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。線維芽細胞のNH5F46細胞及び角化細胞のA431細胞は理化学研究所細胞バンクより購入した。

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CR6A型クロマトパックを連結して用いた。

3) 三次元培養皮膚モデルの構築

3-1) コラーゲンゲルへの三次元培養皮膚モデルの構築

内径60mmのシャーレにNH5F46細胞 2×10^5 cells/wellを含むDMEM-10%FBS培養液3.3mLとコラーゲンゲル(Cellmatrix Type I-A)1.7mLを加え、2時間放置する。固化したゲルをスパーテルで剥がした後、5%CO₂存在下37°Cで1昼夜培養した。その後、DMEM-10%FBS培養液5mLを加え、5%CO₂存在下37°Cで6日間培養を行った。

培養液を除き、Epi-Life-KG2:DMEM-10%FBS(1:1)混液5mLで3時間培養した。培養液を除き、次に、Epi-Life-KG2培養液を加え、更に3時間培養した。6-wellマイクロプレートに入れたアッセイリングの上にコラーゲンゲルの線維芽細胞膜を移す。直ちにコラーゲンゲル線維芽細胞膜の上にガラスリングを置く。A431細胞 2×10^5 cells/wellを0.2mLのEpi-Life-KG2培養液に懸濁させた液をガラスリング内に加えた。1時間後、Epi-Life-KG2培養液2mLを加え、24時間培養する。その後、三次元培養用培地(Ca²⁺ 1.8mM, ascorbic acid 50 μ g/mL in Epi-Life-KG2:DMEM-10%FBS(1:1))2mLに交換し、更に24時間培養した。その後、培養液1mLを除き、A431細胞培養の表面を空気にさらしながら、11~13日間培養し、三次元培養皮膚モデルを構築した。

3-2) コラーゲンスポンジへの三次元培養皮膚モデルの構築

内径60mmのシャーレにNH5F46細胞 2×10^5 cells/wellを含むDMEM-10%FBS培養液0.2mLをコラーゲンスポンジ(高研より)内に播種し、5%CO₂存在下37°Cで24時間培養した。その後、DMEM-10%FBS培養液5mLを加え、DMEM-10%FBS培養液5mLで1時間培養した後、Epi-Life-KG2:DMEM-10%FBS(1:1)5mLに交換し、1時間培養した。Epi-Life-KG2培養液5mLに交換して3時間培養した。培養液を除き、次に、Epi-Life-KG2培養液を加え、更に3時間培養した。6-wellマイクロプレートに入れたアッセイリングの上にコラーゲンスポンジの線維芽細胞膜を移す。直ちにコラーゲンスポンジの線維芽細胞膜の上にガラスリングを置く。A431細胞 2×10^5 cells/wellを0.2mLのEpi-Life-KG2培養液に懸濁させた液をガラスリング内に加えた。1時間後、Epi-Life-KG2培養液2mLを加え、24時間培養する。その後、三次元培養用培地(Ca²⁺ 1.8mM, ascorbic acid 50 μ g/mL in Epi-Life-KG2:DMEM-10%FBS(1:1))2mLに交換し、更に24時間培養した。その後、培養液1mLを除き、A431細胞培養の表面を空気にさらしながら、11~13日間培養し、三次元培養皮膚モデルを構築した。

4) 透過実験

三次元培養皮膚モデルが乗っているアッセイリングをFranz型拡散セルに装着した。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 1.0 mL を加え、32℃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 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：50 mM リン酸塩緩衝液（pH 6.0）
/アセトニトリル混液（19：1）

流量：1 mL/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：50 mM リン酸塩緩衝液（pH 6.0）
/アセトニトリル混液（3：2）

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 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。MP, EP および CC の保持時間は、それぞれ、7.2, 11.7 および 13.3 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、5.5, 7.5 および 12.1 分であった。

2) 三次元培養皮膚モデルについて

2-1) コラーゲンゲルの線維芽細胞膜について

NHSF46 細胞 2×10^5 cells/well をコラーゲンゲルに播種したときのコラーゲンゲルの形状の変化を Fig.2 に示した。内径 60mm のシャーレに NHSF46 細胞 2×10^5

cells/well を含む DMEM-10%FBS 培養液 3.3mL とコラーゲンゲル(Cellmatrix Type I-A) 1.7mL を加え、3-1) のコラーゲンゲルへの三次元培養皮膚モデルの構築の方法で 6 日間培養を行ったものである。

内径 60mm のシャーレに線維芽細胞の NHSF46 細胞を播種したものであるが、コラーゲンゲルの内径は 0, 2, 4, 6, 7 日目で、それぞれ、5.2, 3.6, 3.9, 2.9 及び 2.5cm と減少した。線維芽細胞の増殖により、コラーゲンゲルが収縮していた。

2-2) 三次元培養皮膚モデルについて

3-1) コラーゲンゲルへの三次元培養皮膚モデルの構築及び 3-2) コラーゲンスポンジへの三次元培養皮膚モデルの構築で作成したアッセイリング上の膜の Fig.3 に示した。

コラーゲンゲルに培養して作成した三次元培養皮膚モデルの 7 日後及び 14 日後の hematoxylin 及び eosin を用いての組織染色した後の断面図を Fig.4 に示した。Fig.4a は 7 日間培養後の三次元培養皮膚モデルの断面図であり、Fig.4b は 11 日間培養後の三次元培養皮膚モデルの断面図である。断面図で密に見える部分が角化細胞(A431 細胞)の増殖を示すもので、階層的に角化細胞が層積されていることが観察された。

顕微鏡の倍率は 800 倍を用いている。角化細胞の下層に広い間隔を開けて染色されている細胞はコラーゲンゲル中で裏打ち細胞として最初に培養された線維芽細胞である。

Fig.4(b)で示された 11 日間培養の三次元培養皮膚モデルでは角質(horny layer)が観察された。

3) コラーゲンゲル上に培養した三次元培養皮膚モデルの透過について

3-1) コラーゲンゲル上に培養した線維芽細胞膜の透過

三次元培養皮膚モデルを作成のため、コラーゲンゲルに裏打ち細胞膜として線維芽細胞を培養し、続いて、角化細胞を培養するという、二段階の培養を計画し、線維芽細胞 NHSF46 を 2×10^5 cells/well でコラーゲンゲル内に播種し、5%CO₂ 存在下 37℃で 7 日間培養し、6 個の膜を作成した。しかし、いずれも Franz 型拡散セルに装着する段階で作成した膜の強度が弱く、破れてしまい、透過実験を行うことができなかった。

3-2) コラーゲンゲル上に培養した三次元培養皮膚モデルの透過

コラーゲンゲル上に培養した裏打ち細胞の線維芽細胞及びその上に予め構築した角化細胞膜の三次元培養皮膚モデルを Franz 型拡散セルに装着した。次に、透過試験用原液 1.0 mL を donor 側に加え、32°C で 0.5~3 時間に receptor 側に透過してくる BA, RN および SA の各時間毎の累積透過量を測定した。その結果を Fig. 5 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. 5 の直線の傾きから透過速度を求めた。BA, RN および SA の透過速度は、それぞれ、45.5, 16.1 および 35.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ であった。lag time はほぼ 0 であった。

また、同様に、MP, EP および CC の各時間毎の累積透過量を Fig. 6 に示した。

MP, EP および CC の透過速度は 26.7, 26.7 および 29.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ であった。MP, EP および CC の lag time はほぼ 0 時間であった。

3-3) コラーゲンスポンジ上に培養した三次元培養皮膚モデルの透過

コラーゲンスポンジ上に培養した裏打ち細胞の線維芽細胞及びその上に構築した角化細胞膜の三次元培養皮膚モデルを Franz 型拡散セルに装着した。次に、透過試験用原液 1.0 mL を donor 側に加え、32°C で 0.5~3 時間に receptor 側に透過してくる BA, RN および SA の各時間毎の累積透過量を測定し、その結果を Fig. 7 に示した。各時間の累積透過量は、5 回の実験の平均値を用いた。

Fig. 7 の直線の傾きから透過速度を求めた。BA, RN および SA の透過速度は、それぞれ、75.8, 28.4 および 54.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ であった。lag time は、0.16, 0.18 及び 0.15 時間であった。

また、同様に、MP, EP および CC の各時間毎の累積透過量を Fig. 8 に示した。

MP, EP および CC の透過速度は 44.2, 44.5 および 46.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ であった。MP, EP および CC の lag time は、0.05, 0.1 および 0.13 時間であった。

4) 三次元培養皮膚モデル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. 5~Fig. 8 で示した透過速度を Table 1 にまとめた。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。

コラーゲンゲル上に作成した三次元培養皮膚モデルを用いての透過指標物質の透過速度に比べ、上に作成した三次元培養皮膚モデルでの透過速度は大きな値を示していた。モルモットの腹部剥離皮膚を用いた透過指標物質の透過速度と三次元培養皮膚モデルでの透過速度の間に類似の傾向が観察されなかった。同様に、透過指標物質の質量分布比の間にもその相関関係が観察されなかった。この結果より、三次元皮膚培養モデルを実験動物代替法の動物の皮膚モデルとして、物質の透過実験に用いることは困難であることが明らかになった。

一方、コラーゲンゲルあるいはコラーゲンスポンジ上に作成した三次元培養皮膚モデルを用いた透過実験により得られた透過速度を比較し、その結果を Fig. 9 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。コラーゲンゲルあるいはコラーゲンスポンジ上に作成した三次元培養皮膚モデルでの透過実験では、透過に用いる指標物質により、同様の透過速度を示す傾向があることが明らかになった。この結果より、コラーゲンゲルあるいはコラーゲンスポンジ上に作成した三次元培養皮膚モデルでは、透過指標物質の透過速度はそれぞれのモデルによって異なるが、透過指標物質の透過速度のパターンは同じ傾向を示すことが明らかになった。

D. 結論

コラーゲンゲルあるいはコラーゲンスポンジ上に作成した三次元培養皮膚モデルを用いた透過実験により、下記のことが明らかになった。

1. SA の透過速度を三次元培養皮膚モデルとモルモットの剥離皮膚の場合と比較したとき、0.8 あるいは 1.3 倍とほぼ同じ透過速度を与えた。
2. 他の 5 種類の透過指標物質の透過速度は、モルモットの剥離皮膚の 3.6~9.5 倍あるいは 5.6~16.1 倍と大きな透過速度与えた。
3. 透過のパターンがモルモットの剥離皮膚での透過速度と大きく異なり、三次元皮膚培養モデルを実験動物代替法の動物の皮膚モデルとして、物質の透過実験に用いることは困

難であることが明らかになった。

4. コラーゲンゲルあるいはコラーゲンスポンジ上に作成した三次元培養皮膚モデルでは、透過指標物質の透過速度はそれぞれのモデルによって異なるが、過指標物質の透過速度の

パターンは同じ傾向を示した。

E. 研究発表
なし。

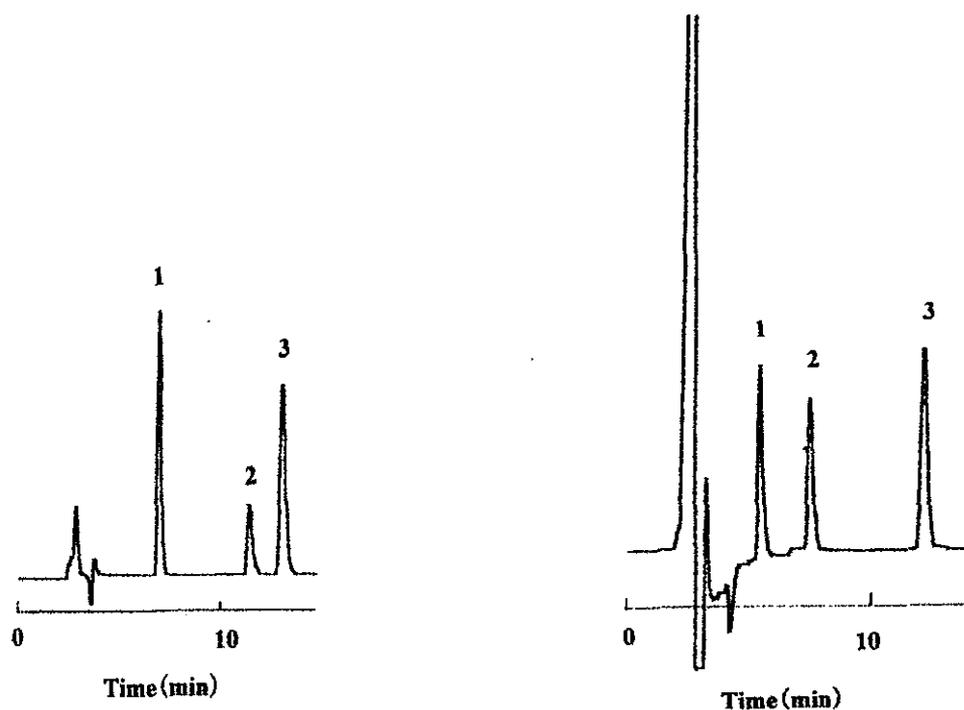


Fig.1 HPLC chromatograms for MP, EP and CC (a) and for BA, RN and SA (b)
 (a) : 1: BA, 2: RN and 3: SA in chromatogram
 (b) : 1: MP, 2: EP and 3: CC in chromatogram

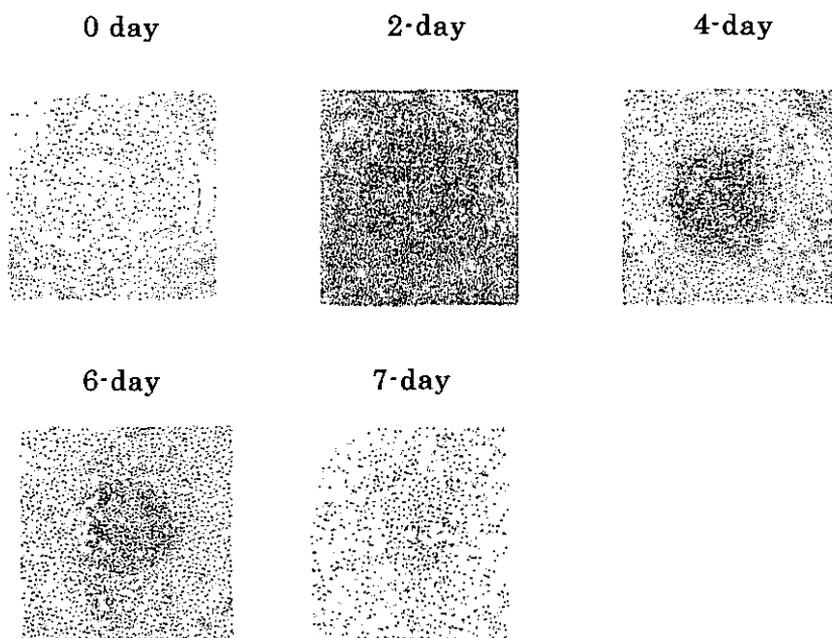


Fig.2 Effect of incubation time on collagen gel diameter after incubating NHSF46 cells

(a)

(b)

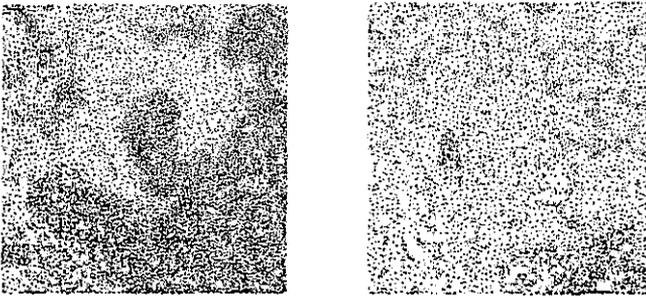


Fig. 3 Three-dimensional skin models on collagen gel (a) and collagen sponge (b)

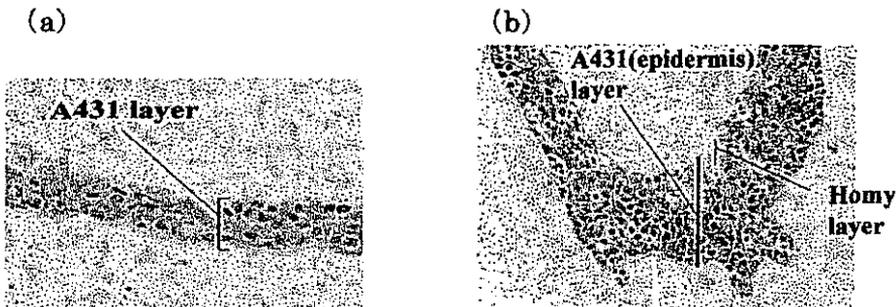


Fig. 4 Sectional plans of three-dimensional skin models on collagen gel after incubating for 7 days (a) or 11 days (b)

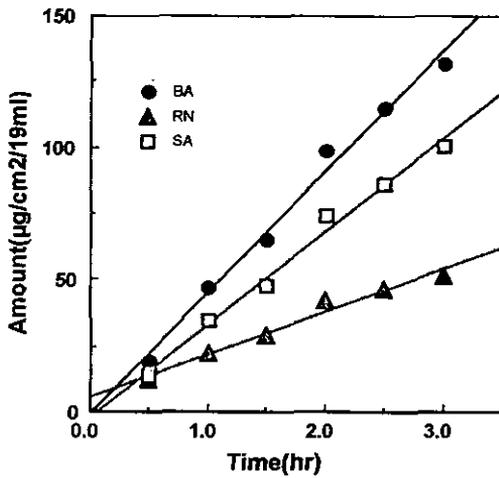


Fig.5 Permeation of BA,RN and SA through three-dimensional skin model on Collagen membrane

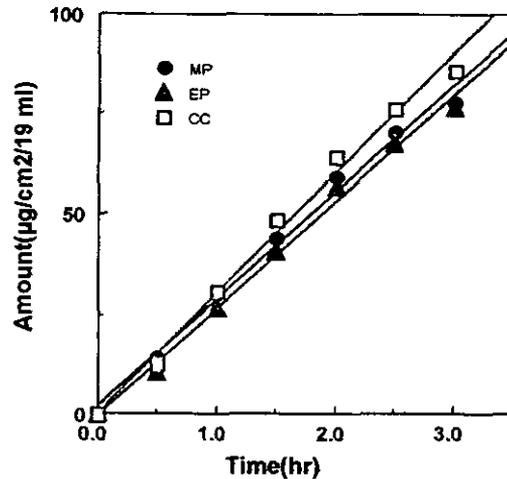


Fig.6 Permeation of MP,EP and CC through three-dimensional skin model on Collagen membrane

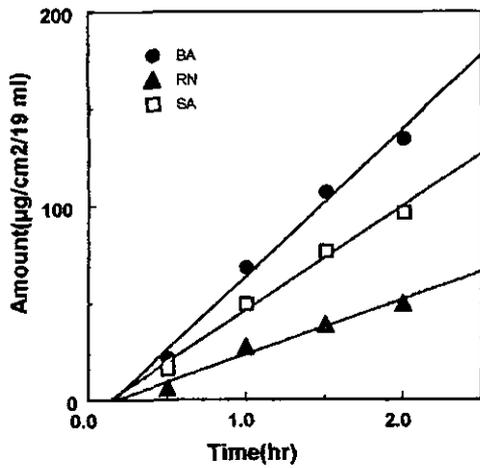


Fig.7 Permeation of BA,RN and SA through three-dimensional skin model on Collagen sponge

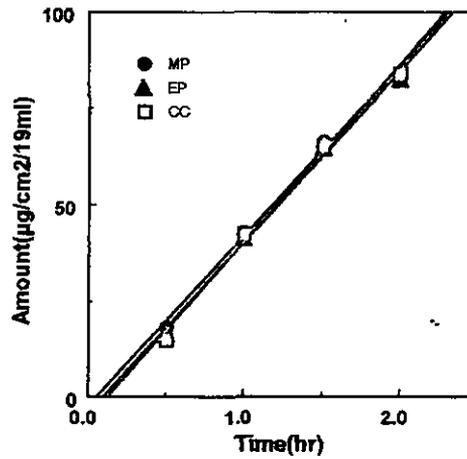


Fig.8 Permeation of MP,EP and CC through three-dimensional skin model on Collagen sponge

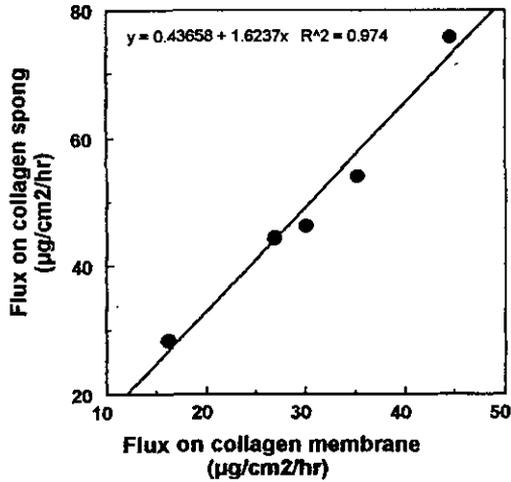


Fig.9 Relationship between Flux on collagen membrane and collagen sponge

Table 1 Flux of MP, EP, CC, BA, RN and SA using three-dimensional skin models on collagen gel and collagen sponge and capacity factor of each compound

	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) on collagen gel	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) on collagen sponge	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$) using abdominal skin of Guinea-pig	K'
BA	44.5	75.8	4.7	0.35
RN	16.1	28.4	1.9	0.80
SA	35.0	54.0	44.9	0.39
MP	26.7	44.2	4.7	4.36
EP	26.7	44.5	6.0	9.49
CC	29.9	46.2	8.2	20.38

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
分担研究報告書

細胞を用いる代替試験法の開発

分担研究者： 田中 憲穂 （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

国が実施した既存化学物質の毒性試験報告の中で、培養細胞を用いて実施された遺伝毒性試験の S9 存在下 (S9+) および非存在下 (S9-) で得られた細胞毒性試験データより、代謝と毒性発現の関連を調べた。その結果、183 物質の約半数 (51%) は、S9 の存在下で毒性発現が変わることが明らかとなった。そこで、代謝系を導入した *in vitro* 細胞毒性試験を試みた。S9mix の組成を検討したところ、MLA 用のものよりも染色体試験に用いている S9mix の方が効果的であった。細胞については、BALB3T3 細胞よりも CHL 細胞が化学物質に対する毒性反応が良くあらわれた。また、処理時の最適 S9 濃度は化学物質によって異なった。一方、化学物質処理時に培地に血清を含むか含まないかで毒性が異なる事も分かった。

A. 研究目的

細胞毒性試験は眼粘膜刺激性や皮膚刺激性などの局所毒性試験、さらに動物個体を用いる急性全身毒性試験の代替試験として、国内外でバリデーションスタディが行われてきた。眼粘膜毒性試験の代替法として EC/UK や厚生科学研究班（粧工連）で実施されたバリデーションスタディや、ヒトの急性全身毒性との相関を調べた MEIC の国際共同研究がその代表的なものであるが、いずれも、毒性発現に代謝が大きく関与している事が知られているにもかかわらず、代謝系を絡ませた試験はこれまで実施されていない。

そこで本研究では、OECD 既存化学物質の安全性点検事業の一環として実施された 183 種の染色体異常試験の結果より、その濃度決定のために行われた S9mix 存在下 (S9+)、および非存在下 (S9-) の細胞毒性試験データから、代謝系を絡ませる事によりどの程度の化学物質において毒性発現が変化するかを調べた。また、ラット肝 S9 を用いる簡便な試験系を開発することを目的として、種々の代表的な化学物質を用いて、細胞種や S9 処理の条件などの基礎的検討をおこなった。

B. 研究方法

I. 既存化学物質の代謝と細胞毒性

1) 化学物質毒性試験報告 Vol.1-9 (化学物質点検推進連絡協議会、1994~2002) に掲

載されている CHL 細胞を用いる染色体異常試験より、濃度設定試験のデータを集計して分析した。

2) ラット肝 S9 による代謝活性化 (6 時間処理) および代謝活性化をしない 6 時間処理のデータがあるものに関して、183 の化学物質について S9+ と S9- における IC₅₀ 値を調べ、IC₅₀ 値が求められない場合は、最高濃度における毒性を調べた。

3) 動物を用いた単回経口投与毒性試験および反復投与毒性のデータがあるものについては、その毒性値を併記した。

4) それぞれの化学物質は S9 の有無による毒性反応から大まかに下記の 4 つのタイプに分類した。

- ① S9-, S9+ ともに毒性が見られない物質
- ② S9-, S9+ ともにほぼ同じ毒性を示す物質
- ③ S9+ で毒性が強くなる物質
- ④ S9+ で毒性が弱くなる物質

II. 代謝系導入における諸条件の検討

試験法：96 ウエルプレートを用いたニュートラルレッド法に、ラット肝 S9 を用いる代謝系を組み合わせ、*in vitro* 細胞毒性試験を行った。

細胞：BALB 3T3 細胞と CHL 細胞を用いた。
化学物質：代謝を受けて毒性が増強される事が予測される物質：AFB1 (aflatoxin B1)、BP (benzo(a)pyrene)、CP (cyclophosphamide)、MCA (3-methyl-cholanthrene)、

NDMA (N-nitrosodimethylamine)と、代謝を受けても毒性が増強しないと考えられるMMS (methyl methanesulfonate) を用いた。

S9mix の組成： 染色体異常試験用と MLA (マウスリンフォーマ) 試験用の 2 種の S9mix 組成を用いた。

S9mix I: 染色体試験用の S9mix 組成

- ・ S9(フェノバルビタール& 5, 6-ベンゾフラボンにより酵素誘導したラット肝) 30%
- ・ HEPES(pH7.2) 4 mM
- ・ MgCl₂ 5 mM
- ・ KCl 33 mM
- ・ グルコース 6 リン酸 5 mM
- ・ NADP 4 mM

S9mix II: MLA 用の S9mix 組成

- ・ S9(フェノバルビタール& 5, 6-ベンゾフラボンにより酵素誘導したラット肝) 40%
- ・ グルコース 6 リン酸 118 mM
- ・ NADP 6.5 mM

処理時間と S9 の濃度： 2 種類の処理時間(3 時間及び 6 時間) と S9 の濃度は 0%、2%、5%の 3 濃度を用いて試験を行った。

(倫理面への配慮)

本実験では動物を用いないこと、また倫理面で配慮が必要なヒト材料を用いる事は無かった事から、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と判断した。

C. 結果

I. 既存化学物質の代謝と細胞毒性

1) 調査した 183 化学物質中、S9-、S9+ の条件下で共に細胞毒性を示さない物質は 48 物質(26.2%)あり、これらの物質は最高濃度 (5 mg/kg もしくは 10 mM)においても生存率が 70%以上を示した(Fig 1)。その大部分は、動物を用いる単回投与や反復投与毒性試験においても低い毒性を示した。

2) S9-、S9+の条件下で同程度の毒性を示す物質は 34 物質(18.6%)であった。これらの物質はラット S9 添加によっても代謝されず代謝が絡まない物質であることが推測された。動物を用いる試験結果においても約 50%程度は弱い毒性値を示した。

3) S9+で毒性が強くなる、いわゆる、代謝活性化されて毒性が発現する物質は 43 物質(23.5%)で、そのうち 22 物質(12.0%)は S9-で毒性が認められなかった。

4) S9+で毒性が弱くなる物質は 58 物質(31.7%)で、そのうち 12 物質(6.6%)は S9+で毒性が認められなかった。S9+と S9(-)条件下で得られた IC₅₀ 値の比較では、S9mix を加えた場合と加えない場合で IC₅₀ 値に 400 倍の開きがある物質もあった。

II. 代謝系導入における諸条件の検討

96 ウェルプレートを用いるニュートラルレッド試験法を適用することで、少量の S9 反応液と化学物質で試験を実施する事ができた。しかしながら処理条件については下記のような結果が得られ、更に今後も条件検討が必要である。

細胞種と S9mix の組成

染色体試験に用いている S9mix の組成を用いる事により効果的な代謝活性化能が認められた。Fig 2 に示すように、用いる細胞種と組成の異なる S9mix、すなわち、染色体試験用の S9mix I と MLA 用の S9mix II では毒性反応に大きな違いが見られた。既存化学物質のデータによれば、3-aminophenol の毒性は S9+の条件では S9-に比べて毒性反応に 18 倍程度の開きがある。本実験では BALB 細胞よりも CHL 細胞で効果的に毒性が発現し、S9mix の組成は S9mix I の組成がより低い濃度で毒性反応が見られた。

S9 の濃度と処理時間

S9 濃度と処理時間に関する 6 種の化学物質の毒性反応は、CP の様に S9 を添加することにより代謝を受け顕著に毒性が発現する物質から、MMS のように S9+と S9-間で毒性にそれほど差が見られないものなど、化学物質によりその反応は多様であった (Fig 3)。既に報告されているように、それぞれの化学物質によって代謝に最適な S9 濃度は異なる事が本実験によっても再現できた。

細胞毒性の強さ

S9 濃度： 0% < 2% < 5% BP, MCA

S9 濃度： 0% < 5% < 2% AFB1, CP

S9 濃度： 0% < 2% < 5% NDMA, MMS

化学物質と S9mix の処理時間は、3 時間処理よりも 6 時間処理でより強い毒性を示すものが認められた(Fig 3)。この結果より、一般的には 6 時間処理が適当と考えられるが、ヒトリンパ球のように細胞によっては 6 時間処理で S9 に対する毒性が発現する場合がある事から、事前に用いる細胞の S9 に対する反応は調べておく必要がある。

化学構造と毒性反応

既存化学物質の CHL 細胞を用いる試験データにおいて 4-aminophenol は S9-で毒性が強く、代謝の系では毒性が 10 倍程度弱くなる事が報告されている。BALB 3T3 細胞を用いる本試験系においても同様に顕著な毒性の差が見られた (Fig 4)。しかしながら、類縁構造を有する 3-aminophenol の毒性に関しては、既存化学物質の CHL 細胞を用いる試験データにおいて、CHL 細胞では S9+の条件では毒性が強く出ることが報告されている。しかしながら、BALB 3T3 細胞を用いた本試験の結果では S9+と S9-でさほど差が見られず、むしろ S9+の条件で毒性が軽減していた (Fig 4)。4-aminophenol と 3-aminophenol に関してはアミノ基の位置によって毒性に差があることから、その構造により代謝のかかり易さがあると考えられる。

培地に含まれる血清の影響

化学物質を S9mix を含む処理培地ともに細胞に処理する場合、その処理培地に通常細胞培養に添加する FCS を含むか含まないかで毒性に差が出てくる可能性がある。CHL 細胞と BALB 3T3 細胞について血清の影響を 3-aminophenol の毒性反応で調べた (Fig 5)。その結果、両細胞ともに血清の有無により結果が異なり、特に CHL の場合、血清無添加ではより低濃度域に毒性がシフトした。BALB3T3 細胞では 10%血清添加より無添加の方が毒性に差がみられた。またこの際、血清を添加した培地の CHL 細胞と血清無添加の BALB3T3 細胞では、S9mix II よりも染色体試験に用いる S9mix I の組成で毒性が明瞭になった。化学物質と血清中のタンパクの結合、血清中の薬物代謝関連因子の作用などが考えられる。

D. 研究発表

1. 論文発表

1) L. Muller, D. Blakey, K. L. Dearfield, S. Galloway, P. Guzzie, M. Hayashi, P. Kasper, D. Kirkland, J.T. Macregor, J. M. Parry, L. Schechtman, A. Smith, N. Tanaka and H. Yamasaki: Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results-report on initial activities of the IWGT Expert Group, Mutation Research 540:165-176(2003)

2) 渡辺美香、小林美和子、佐々木澄志、田中憲穂： V79 細胞を用いたコロニー形成試験における低 pH による重金属の細胞毒

性作用の変化, 秦野研究所年報 26:14-18 (2003)

3) Agneta Rosengre, Linda Faxius, Noriho Tanaka, Mika Watanabe, Lars Magnus Bjursten: The long-term foreign body reaction is not influenced by initial implant material cytotoxicity, submitted to Biomaterials & Biocompatibility (2004)

4) Kiyomi Ohmori, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Noriho Tanaka and Makoto Umeda: An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells, Mutation Res., 557, 191-202 (2004)

2. 学会発表

1) 若栗 忍、林久美子、田中憲穂：代謝活性化法による化学物質の簡易細胞毒性試験、第 16 回日本動物実験代替法学会大会、東京 (2002)

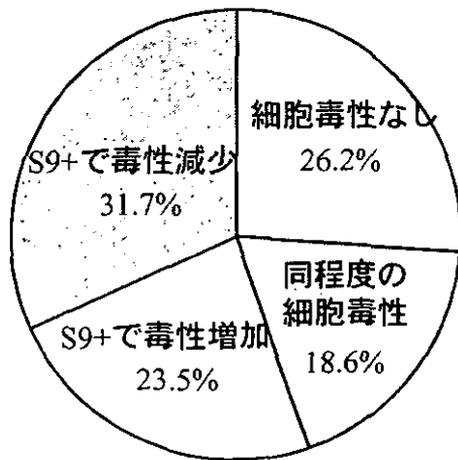


Fig. 1 既存化学物質における代謝活性化系導入による細胞毒性

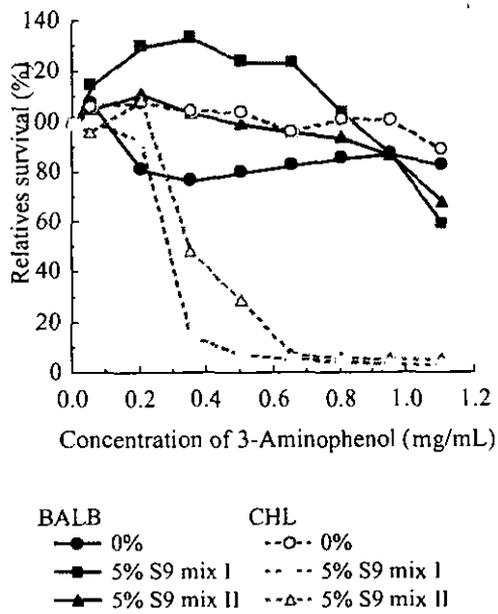


Fig. 2 3-Aminophenol の異なる S9 mix の組成と細胞種による細胞毒性

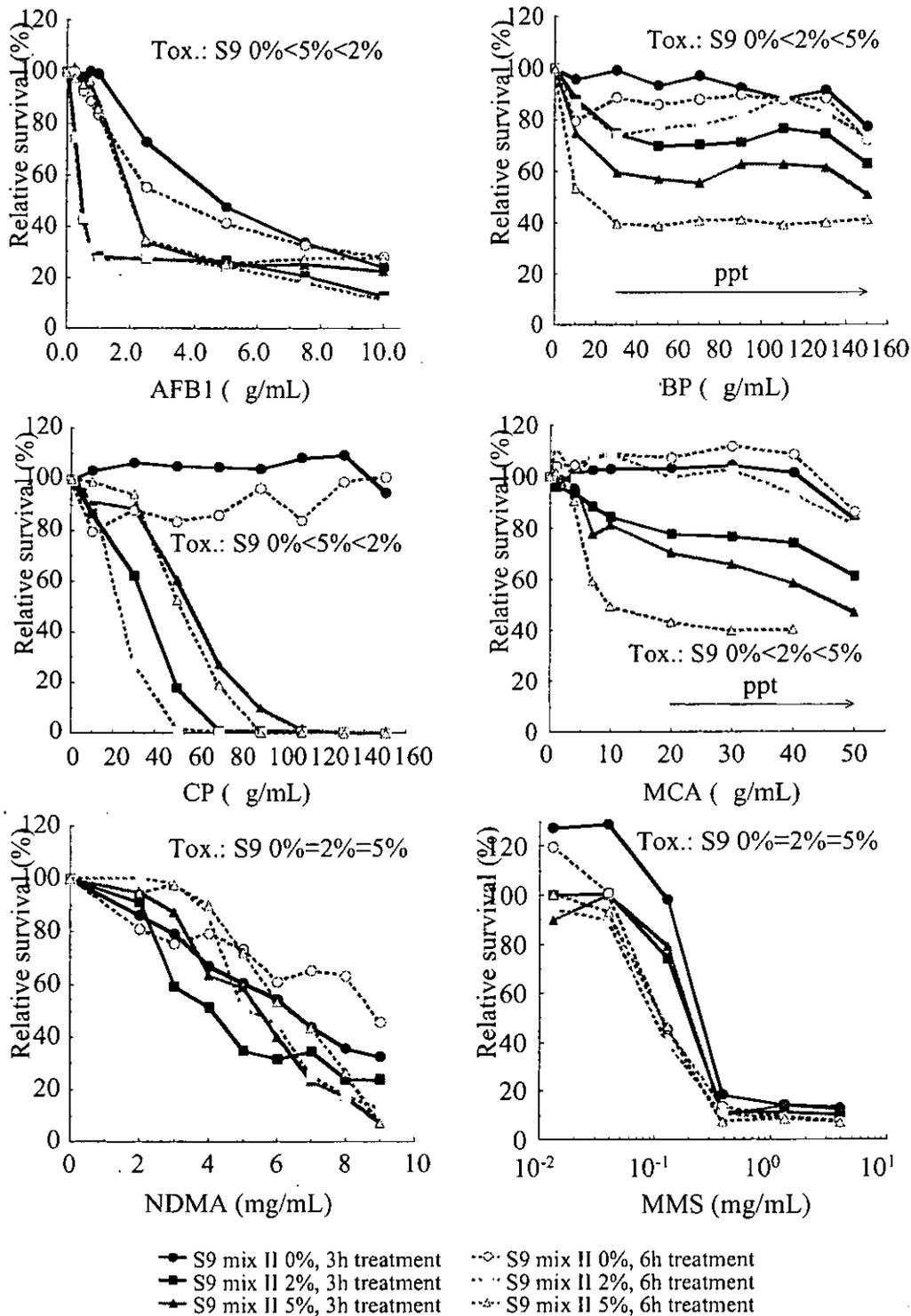


Fig. 3 S9-NR 法による BALB 細胞を用いた細胞毒性 (S9 濃度と処理時間)