

Fig. 6

Tissues-specific mRNA expression of human carboxylesterase genes.

Data are expressed as the ratio of target mRNA to β -actin or PPIA mRNA.

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
杉林堅次	三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた薬物の皮膚透過性および皮膚刺激性評価—動物実験代替法確立にむけて	薬剤学	Vol.67, No.2	89-95	2007年
杉林堅次	化粧品分野における動物実験代替法の現状と課題：培養細胞を用いた皮膚刺激性評価	FRAGRANCE JOURNAL	327	69-73	2007年
杉林堅次	紫外線防御試験法の国際的動向と紫外線防御剤の開発の課題：化粧品に用いられるナノ粒子の暴露と安全性問題のあり方	FRAGRANCE JOURNAL	339	38-41	2008年

IV. 研究成果の刊行物・別刷

《 R & D 》

三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた薬物の皮膚透過性および皮膚刺激性評価
—動物実験代替法確立に向けて—

杉 林 堅 次 Kenji Sugibayashi

城西大学薬学部

1. はじめに

皮膚局所に適用する医薬品製剤には、皮膚組織やその周辺部位での薬効（局所作用）を期待するものだけでなく、いわゆる全身作用を期待する経皮吸収型製剤（Transdermal Drug Delivery Systems, TDS）があり、さらに、最近では機能性を有する化粧品も市場を賑わすようになってきた。したがって、現在では、治療薬だけでなく化粧品有効成分の皮膚透過性や経皮吸収性を正しく評価する方法論の確立が以前にも増して必要とされるようになった。また一方で、効果が高くなれば皮膚局所での刺激性などの副作用についても正しく予測することが重要となり、加えて、主薬およびその濃度、さらには基剤の選択基準の確立が必要となってきた。

現在、薬物の皮膚透過量や透過速度はヒト皮膚を用いて主に *in vitro* 実験法で評価されている。しかし、特に本邦では新鮮なヒト皮膚が必要な量を手に入れるとは限らない。そこで、動物皮膚や人工膜が使われることとなるが、動物皮膚使用に当たっては動物愛護の問題を回避することができないし、また、人工膜の使用では代謝酵素やトランスポーターが関与する皮膚透過を表現することができない。このような状況下、特に三次元培養ヒト皮膚モデルが物質の皮膚透過性を評価する代替材料として有用である可能性が考えられた。加えてヒトに適用する前に実験動物を用いず皮膚刺激性を予測するための一手段にも三次元培養ヒト皮膚モデルの利用が考えられた。そこで、ここでは三次元培養ヒト皮膚モデルを皮膚透過性および皮膚刺激性評価材料として用い

た研究とその有用性について論じる。

2. 三次元培養ヒト皮膚モデル

ヒトや哺乳動物の皮膚は表皮（epidermis）と真皮（dermis）から構成される。このうち皮膚表面側に位置する表皮は主に角化細胞（keratinocytes）からなる。表皮はまた、深部から基底層、有棘層、顆粒層、透明層（手掌と足裏にのみ存在）、そして角層（stratum corneum）と、分化過程が異なる層からなる。ここで、角層は角化細胞が分化した、死んだ角質細胞（corneocytes）とそれを取りまく細胞間脂質とからなる。薬物や化粧品成分の皮膚透過において多くはこの角層の透過性が律速となる。一方、真皮は線維芽細胞（fibroblasts）がコラーゲン線維中に分散した形状を示している。

三次元培養皮膚モデルは Bell らによって最初に調製された¹⁾。彼らはまず、コラーゲンに線維芽細胞を加え、培養して真皮モデルを作成した。次に、表皮の細胞である角化細胞を真皮モデルの上で成長させると、発生初期の皮膚と同じ構造体となるのを発見した。また、この多層膜を空気に接触させ表皮膜表面を角化させると角層となり、三次元培養皮膚モデルが完成した。Fig. 1 に、三次元培養皮膚モデルを調製する現在の主な操作手順を示す。なお、これらのモデルは現在、tissue engineering の研究領域で多用されている²⁾。

Table 1 に現在簡便に入手できる三次元培養皮膚モデルとその販売機関、特徴をまとめて示す。

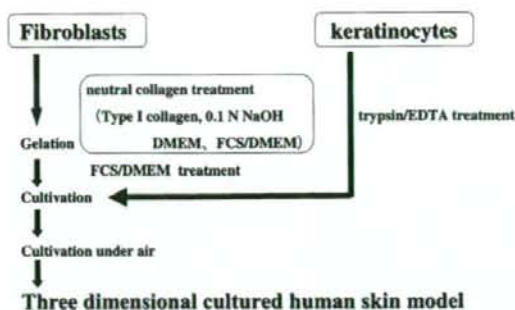


Fig. 1. Schematic Presentation of Preparation Method of Three-Dimensional Cultured Human Skin Model.

3. 物質の皮膚透過性評価材料としての三次元培養ヒト皮膚モデルの有用性

我々は、水溶性から脂溶性の種々低分子薬物の水溶液をヒト抽出皮膚、ヘアレスラット抽出皮膚および三次元培養ヒト皮膚モデル (TESTSKIN™ LSE-high) に適用して、これらの膜を介した薬物透過性を side-by-side 型の拡散セルを用いて調べた³⁾。Fig. 2 にその典型例として水溶性の一硝酸イソソルビド (ISMN) と脂溶性の二硝酸イソソルビド (ISDN) の 3 種皮膚を介する透過データを示す。図から明らかなように、8 時間に亘るヒト皮膚および

TABLE 1. Three Dimensional Cultured Human Skin Models Available in World and Japanese Markets.

Brand name	Manufacturer	Site of skin for the model	Used site
EpiDerm	MatTek/Kurabo	stratum corneum model	ECVAM/Japan
EPISKIN	Episkin-SNC	stratum corneum model	ECVAM
SkinEthic	SkinEthic Lab.	stratum corneum model	ECVAM
PREDISKIN	BIOPREDIC	stratum corneum model	ECVAM
TESTSKIN	Organogenesis	epidermis/dermis	
TESTSKIN LSE-high	Toyobo	epidermis/dermis	Japan
MATREX LDM	Toyobo	dermis model	Japan
Vitrolife-Skin	Gunze	epidermis/dermis	Japan
LabCyte Epi-model	J-Tech	epidermis model	Japan

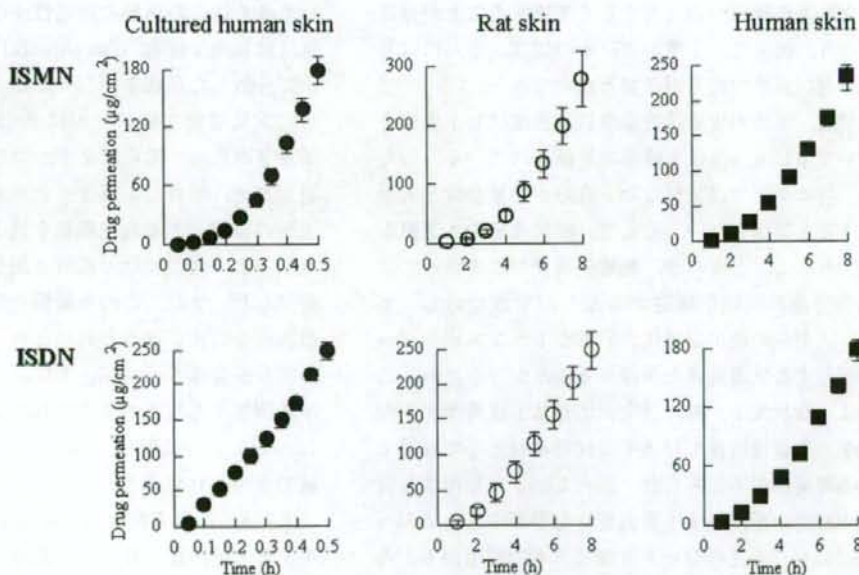


Fig. 2. Time Course of the Cumulative Amount of ISMN and ISDN Permeated through Three-Dimensional Cultured Human Skin, Excised Hairless Rat Skin and Excised Human Skin.

ヘアレスラット皮膚を介する両薬物の累積透過挙動が30分間の三次元培養ヒト皮膚モデルを介する透過挙動と極めて類似している。これは、これら薬物の水基剤から皮膚への分配性については実皮膚と三次元培養皮膚モデルで極めて類似していること、また、皮膚バリアーにおける薬物拡散性については三次元培養皮膚モデルが実皮膚より10倍程度高いことに起因していた。Fig. 3にヘアレスラット皮膚、ヒト皮膚および三次元培養ヒト皮膚モデルを介する各種薬物の透過係数 (permeability coefficient, P) の関係性を示す。ラット皮膚とヒト皮膚を介する透過性がほぼ1:1相関を示すものの、三次元培養皮膚モデルを介する薬物透過が対数軸で約1オーダーずれることに注意いただきたい。しかし、いずれにしても三次元培養ヒト皮膚モデル透過性とヒトまたはラット皮膚透過性とに高い相関性がみられたことから、種々物質のヒトやラット皮膚透過性を予測する代替膜として三次元培養ヒト皮膚モデルが極めて有用であることが明らかである。

我々はその後、経皮吸収促進剤のスクリーニングや代謝過程を有する物質の皮膚透過過程の解析にも

三次元培養皮膚モデルを用いて評価し、促進剤や皮膚中代謝の評価にも培養皮膚モデルが利用できることを明らかにした^{4,5)}。また我々は、水溶性高分子が毛嚢経路で皮膚透過されることを証明する一手段として、毛嚢のない三次元培養ヒト皮膚モデルが対照として利用できることに注目している。この研究は、現在進行中である。

三次元培養皮膚モデルを用いた皮膚透過性評価法の問題点は培養ウェルをそのまま用いることができないことである。すなわち、ウェルをそのまま用いて透過試験を行うと、大部分の物質の透過経路が角化不十分または角層が薄い培養膜周辺に集中する。また、全ての三次元培養皮膚モデルがTEST-SKIN™ LSE-highのような挙動を示すと限らない(例えば物質の実皮膚への分配性が培養皮膚モデルと異なる場合も当然存在する)。また、同じ皮膚モデルでも、培養日数や培養時における条件のわずかな違いで同様なバリアー能を有する培養モデルができるとは限らない。

ここで注意しておくべきは、ヒト皮膚透過性を予測するのに重要なことは、ヒト皮膚と同じ透過性を

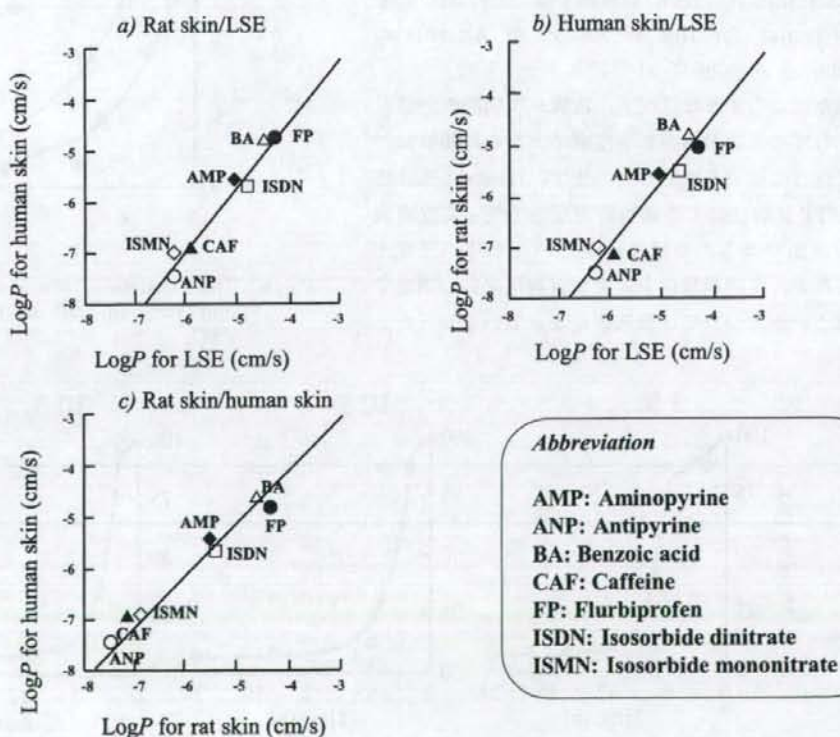


Fig. 3. Relationships of Membrane Permeability Coefficients, P , of Drugs.

示す培養皮膚モデルを探すことではなく、できるだけ早く確実にヒト皮膚透過性を予測できる培養皮膚モデルを探すことにある。そのことを考慮すると、TESTSKIN™ LSE-high のような三次元培養皮膚モデルはその有用な評価材料であると考えられることができる。なお現在、企業と共同して High-throughput screening に対応できる、三次元培養皮膚モデルを用いた同時多量サンプル経皮吸収予測システムについて検討中である。

4. 物質の皮膚刺激性評価材料としての三次元培養ヒト皮膚モデルの有用性

薬物の皮膚透過性と並んで薬物または製剤自体の皮膚刺激性の評価法の確立も非常に重要な問題である。また、安全性評価における代替法の確立は、医薬品よりも化粧品分野でより切実である。EU では、2009～2013 年には、動物実験を使用して安全性評価を行った原料を含む化粧品の EU 域内での販売が禁止となり、そのため代替法の導入を加速している。本邦でも、EU および米国について設立された代替法普及のためのコーディネート機関（それぞれ ECVAM と ICCVAM）に対応する JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) が 2005 年 11 月にスタートした。

我々はこのような状況下、皮膚一次刺激の評価材料としての三次元培養ヒト皮膚モデルの可能性について注目し研究を開始した。まず、Neutral Red 法や MTT 試験法による細胞障害反応を使って皮膚刺激を評価できるのではないかと当時の現状があったが、皮膚刺激性を起炎物質適用後いつ測定すればよいかについては評価が定まっていなかった。

そこで、まず種々起炎物質を三次元培養ヒト皮膚モデルに適用後の皮膚刺激性の速度論について MTT 試験法を用いて測定した^{6,7)}。

Fig. 4 にその代表例として 3%、10% および 30% 乳酸を三次元培養ヒト皮膚モデル TESTSKIN™ LSE に適用したときの MTT 試験によって求められた生細胞数率 (viability) の経時変化を示す。3%、10% および 30% 乳酸適用後全てのケースで、最初の遅い viability 減少とその後に続く速い viability の減少が見られた。また、遅い速度から速い速度への移行時間は乳酸濃度が高くなるに従い短くなることがわかった。Fig. 5 には陽イオン性界面活性剤である塩化セチルピリジニウム (CPC) の 1% 水溶液を無傷皮膚 (intact skin) と角層を取り除いた stripped skin に適用したときの viability 変化を示している。図から明らかなように、intact skin では Fig. 4 で見られたときと同様の viability の 2 相性減少が見られたものの、stripped skin では 1 相性で変

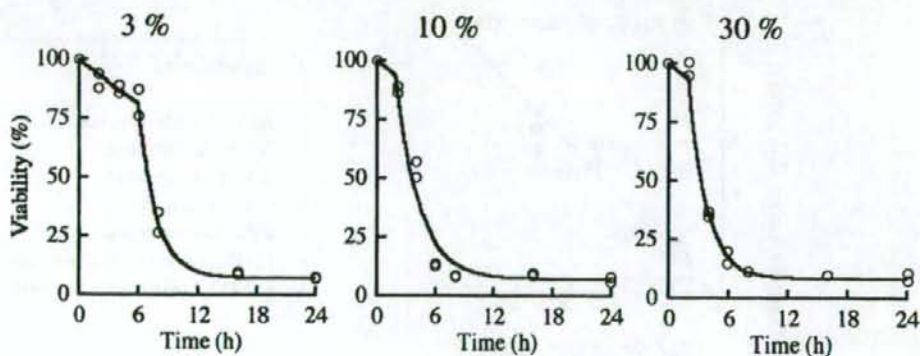


Fig. 4. Time Course of the Viability (%) of LSE after Application of 3, 10 and 30% Lactic Acid.

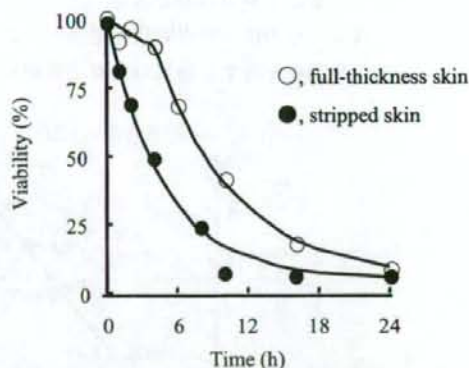


Fig. 5. Time Course of the Viability (%) of Intact and Stripped LSE after Application of 1% CPC.

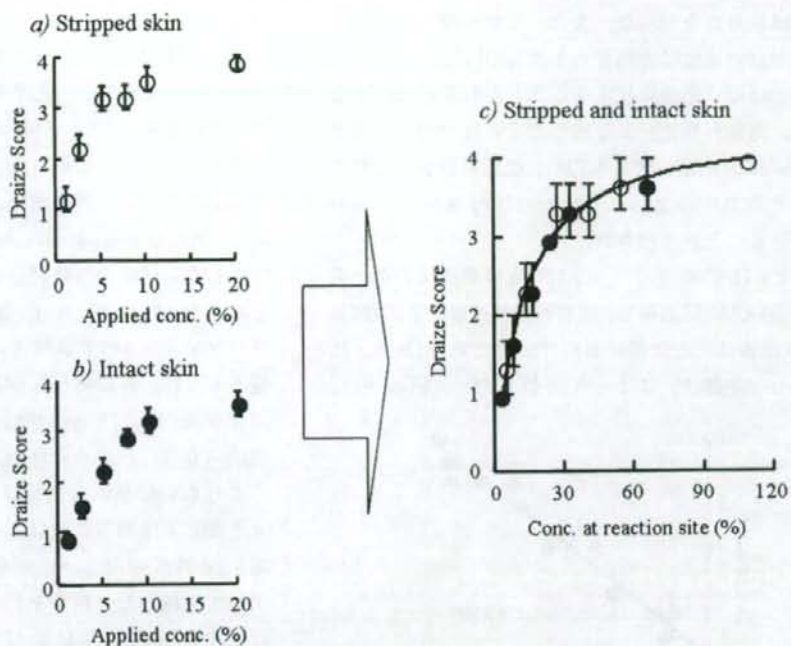


Fig. 6. CPC Concentration-Response Curve (Draize Test in Guinea Pigs).
 a) stripped skin (CPC application concentration-response curve), b) intact skin (CPC application concentration-response curve), c) stripped and intact skin (CPC skin concentration-response curve).

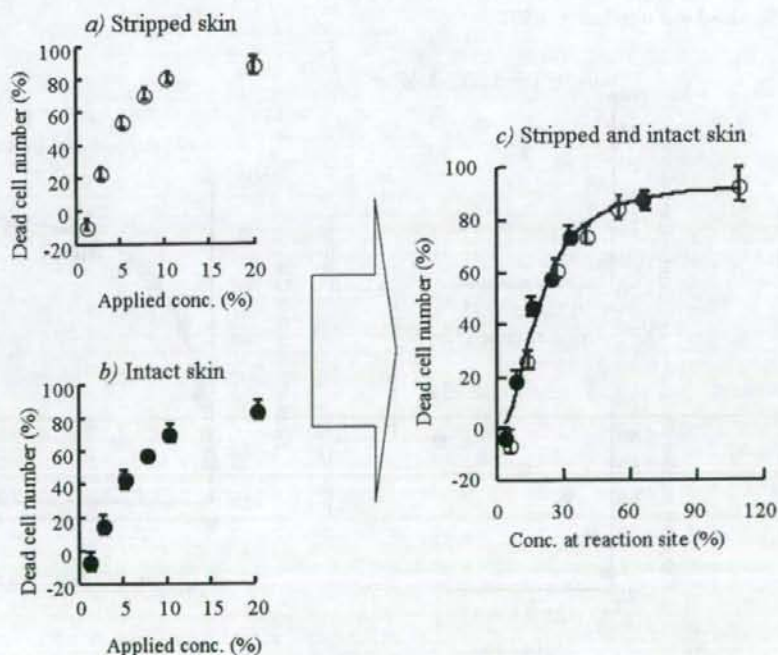


Fig. 7. CPC Concentration-Response Curve (MTT Assay in Guinea Pigs).
 a), b), c) : same as in Fig. 6.

極点は見られなかった。また、これら遅い速度とその後の速い速度はそれぞれ1次反応に従い、適用24時間ではほぼ一定値に収束することがわかった。すなわち、角層バリアーが堅固なときは比較的遅い速度でviabilityが減少するものの、起炎物質が角層バリアーを透過すると急に速いviability減少が引き起こされることが示唆された。

次に、CPCをモルモットに(皮膚刺激反応が一定となる)48時間適用し、皮膚刺激性をMTT試験(*in vitro*評価法)と従来からの評価法であるDraize法(*in vivo*評価法)によって評価した⁸⁾。Figs. 6, 7

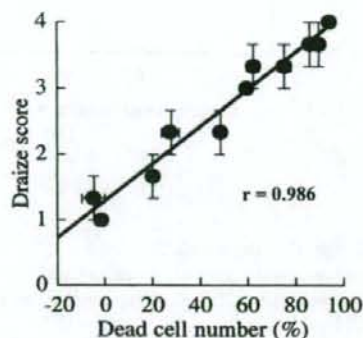


Fig. 8. Correlation between Draize Irritation Score and MTT Assay Results in Guinea Pigs.
Draize score = $2.820 \times 10^{-2} \cdot \% \text{ fraction of dead cell number} + 1.272$.

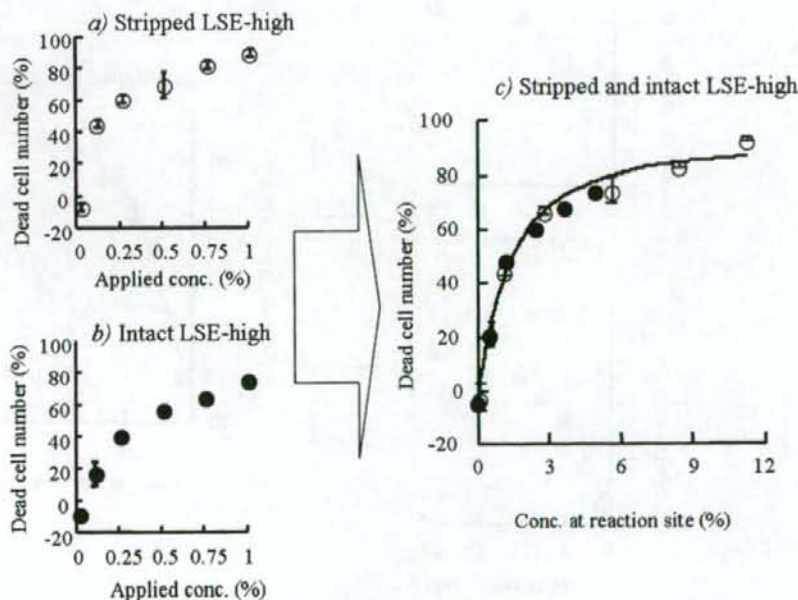


Fig. 9. CPC Concentration-Response Curve (MTT Assay in LSE-High).
a), b), c): same as in Fig. 6.

にその試験結果を示す。両図から明らかのように、Draize法による*in vivo*試験でもMTT試験を用いた*in vitro*試験でも、皮膚刺激性(Draizeスコアまたは死細胞率, I)とCPC適用濃度(C)には E_{\max} モデル(Hill式)*で示される関係にあった。さらに興味あることに、適用濃度より皮膚中濃度で表記すると、intact skinとstripped skinでも皮膚中濃度が同じなら同様な皮膚刺激が見られることも明らかとなった(Figs. 6c, 7c)。加えて、Draize法によるスコア結果とMTT試験法による死細胞数の相関を見ると、Fig. 8に見られるように極めて良好な直線関係が見られ、Draize法の代替法としてのMTT試験法の有用性が認められた。

これらの結果に勇気づけられ、次にCPCを三次元培養ヒト皮膚モデルに(皮膚刺激反応が一定となる)24時間適用し、皮膚刺激性をMTT試験法によって評価した。結果をFig. 9に示す。モルモットに対するMTT試験結果(Fig. 7)とほぼ同様の関係が認められた。さらに興味あることに、Fig. 7とFig. 9の死細胞数のデータを皮膚中濃度 $\times (IC_{50} \cdot \text{モルモット皮膚}) / (IC_{50} \cdot \text{三次元培養皮膚})$ に対してプロットする

$$* I = \frac{I_{\max} \cdot C^{\gamma}}{IC_{50}^{\gamma} + C^{\gamma}}$$

と、両図はほぼ同じような挙動を示すことがわかった。

以上より、例えばモルモットを用いて行った Draize 試験はモルモットにおける MTT 試験で代替でき、さらに、モルモットにおける MTT 試験は三次元培養皮膚モデルの MTT 試験で代替評価できることから、現在汎用されている動物を用いた Draize 試験 (*in vivo* 試験) に替わって三次元培養皮膚モデルで代替評価できることが示唆された。

5. おわりに

動物実験またはヒト試験代替法としての三次元培養ヒト皮膚モデルの有用性をさらに確立していくには、まず①三次元培養ヒト皮膚モデルの品質を高くかつばらつきのないようにすることが重要である⁹⁾。また、②より実皮膚に似せるために、表皮中にケラチノサイト以外のメラノサイトやランゲルハンス細胞をも構築すること、さらに、③毛嚢や汗腺などの付属器官を付与することも必要に応じて対応していかなければならない。加えて、④三次元培養ヒト皮膚モデルにも実皮膚のように乳頭層状の非平面構造が必要になるように思う。しかし、上述したことと重複するが、実皮膚と同じ膜を作ることが重要ではなく、実皮膚と比較しやすい培養皮膚を作ることが重要であることを認識すべきである。

今回紹介したのは、経皮吸収試験と皮膚一次刺激試験の代替法に関するものである。このほか、皮膚感作性試験に関する問題もあるが、これに関してはまだまだ研究途上である。また、今回紹介した経皮吸収試験と皮膚一次刺激試験の代替法に関してもさらに検討が必要なものも多い。ただ、動物試験やヒト試験なしに医薬品や化粧品を開発する時期も迫ってこよう。三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた代替法の今後のさらなる進展が望まれる。

引用文献

- 1) E. Bell, H.P. Ehrlich, D.J. Buttle, T. Nakatsuji, Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness, *Science*, **211**, 1052-1054 (1981).
- 2) N. Morikawa, K. Morota, K. Tomihata, T. Taira, Y. Takahashi, S. Morita, M. Suzuki, Three dimensional cultured skin model used for tissue engineering research, *J. Jpn. Assoc. Regenerative Dent.*, **3**, 12-22 (2005).
- 3) T. Watanabe, T. Hasegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi, K. Takayama, K. Sugibayashi, Utility of the three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate skin permeation of drugs, *Altern. Animal Test. Experiment.*, **8**, 1-14 (2001).
- 4) T. Watanabe, T. Hasegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi, K. Sugibayashi, Effect of penetration enhancers on the permeation of drugs across three-dimensional cultured human skin model: Comparison with the effects using excised hairless rat skin, *Altern. Animal Test. Experiment.*, **8**, 15-22 (2001).
- 5) K. Sugibayashi, T. Hayashi, K. Matsumoto, T. Hasegawa, Utility of a three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate the simultaneous diffusion and metabolism of ethyl nicotinate in skin, *Drug Metabolism Pharmacokin.*, **19**, 352-362 (2004).
- 6) K. Sugibayashi, T. Watanabe, T. Hasegawa, H. Takahashi, 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).
- 7) 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).
- 8) T. Watanabe, T. Hasegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi, H. Itagaki, 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).
- 9) R. Roguet, The use of standardized human skin models for cutaneous pharmacotoxicology studies, *Skin pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **15** (suppl. 1), 1-3 (2002).

培養細胞を用いた皮膚刺激性評価

加納 聡*¹ 杉林 堅次*²

Abstract : Skin irritation is one of the most common cutaneous adverse effects, and evaluation of its potential and extent is indispensable in development of topical drug formulations and cosmetics. Recently, the criticism to animal experiments has increased from a viewpoint of the animal welfare and protection. Especially, reduction in the animal experiments must be achieved worldwide in the cosmetics field. The marketing of cosmetics that developed by the animal experiment are prohibited by the 7th amendment of EU Cosmetic Directive in the EU from March, 2009. Therefore, the alternative methods to animal experiments using cultured tissues have been paid attention to evaluate cosmetics and cosmetic ingredients. Currently the *in vitro* skin irritation tests using a three-dimensional cultured human skin model have been validated by ECVAM as an alternative to animal experiments. It is also useful to estimate skin irritation using a simple cultured cell from mechanism of skin irritation. Moreover, developing the *in vitro* method will be connected to improved prediction of *in vivo* study, to reduction of animal research, and finally to proper use of pharmaceutical products.

Key words : skin irritation, cultured cell, three-dimensional cultured human skin model, MTT, cytotoxicity

1. はじめに

皮膚刺激性は、皮膚における最も一般的な副作用の一つである。また、皮膚刺激性の評価は、皮膚に適用する医薬品や化粧品などを開発する上で不可欠である。皮膚刺激性は、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、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は、ヒトのバッチテストによっ

て評価されるが、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⁾がその主役をなしている。

一方、近年動物愛護の観点から、動物実験に対する批判が高まり、特に化粧品分野においては世界的に動物実験を減らす流れにあり、EU化粧品指令第7次改正²⁾によって、欧州連合(EU)内では2009年3月から動物実験を用いて開発した化粧品の販売が禁止される。そのため、培養組織や細胞を用いた代替試験法に対する期待が世界的

"Evaluation of skin irritation using cultured cells."

*¹ Satoshi Kano (Maruho Co., Ltd., Kyoto R&D Center, マルホ株式会社京都R&Dセンター 研究部薬物動態研究グループ—600-8815 京都府京都市下京区中堂寺栗田町93)

*² Kenji Sugibayashi (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 城西大学薬学部薬品動態制御学講座—350-0295 埼玉県坂戸市けやき台1-1)

*¹ (写真左) 1993年福山大学薬学部薬学研究科修士課程修了、同年マルホ株式会社入社、現在、研究部薬物動態研究グループ主任研究員。

*² (写真右) 1985年城西大学薬学部講師、89年同助教授、98年同教授、現在、城西大学薬学部薬品動態制御学講座教授、同生命科学センター所長、薬科学科主任、日本化粧品科学会理事、日本実験動物代替法学会評議員、他。



に高まっている。

動物実験代替法に関して、毒性試験ガイドラインでは、遺伝毒性試験におけるAmes試験や染色体異常試験が*in vitro*毒性試験として有名であり、Balb/c 3T3細胞を用いた光毒性試験は、OECDガイドラインに採用されている³⁾。また、酵母光育成阻害試験と赤血球光溶血試験のバッテリー試験についてもその有用性が認められている⁴⁾。

皮膚刺激性試験に関しては、培養皮膚を用いた*in vitro*皮膚刺激性試験が動物実験代替法として注目されている。培養皮膚は、1970年代にGreenやBellなどの先達によって*in vitro*培養法が確立され、その技術を応用した製品が既に市販されている。この培養皮膚は、Caco-2などの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、TESTSKIN™ (TOYOBO Co., Ltd.) やVitrolife-Skin™ (Gunze Co., Ltd.) のように線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲルやスポンジからなる真皮層および多層に分化した角化細胞からなる表皮層の2層を有する皮膚モデルとEpiDerm™ (Kurabo Co., Ltd.) やLabCyte™ (Japan Tissue Engineering Co., Ltd) のように表皮層のみからなる表皮モデルに大別される。

2. 三次元培養皮膚(表皮)モデルを用いた*in vitro*皮膚刺激性試験

三次元培養皮膚(表皮)モデルは、実際の皮膚の構造に極めて近いものの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を起さないといった問題点がある。そのため、評価にはもっぱら細胞毒性試験が用いられ、1) MTT試験、2) ニューラルレッドの取り込み、3) 乳酸脱水素酵素の放出、その他4) サイトカインの放出等が指標として利用されている。これらの内、細胞毒性試験として汎用されている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の割合を生細胞率(または、死細胞率)とする方法であり、三次元培養皮膚(表皮)モデルを用いた*in vitro*皮膚刺激性試験については、ECVAM (European Center for the

Validation of Alternative Methods) を中心に試験条件やバリデーシオンの検討が実施されている^{5)~11)}。また、本邦においても利用可能な皮膚(表皮)モデルを用いたバリデーション試験が実施されている^{12) 13)}。

3. 日本で市販されている培養皮膚(表皮)モデル

皮膚モデル

TESTSKIN™ (TOYOBO Co., Ltd.)

Vitrolife-Skin™ (Gunze Co., Ltd.)

表皮モデル

EpiDerm™ (Kurabo Co., Ltd.)

LabCyte™ (Japan Tissue Engineering Co., Ltd.)

三次元培養皮膚(表皮)モデルの多くは、セルカルチャーインサート(培養カップ)を用いてポリカーボネートなどのメンブランフィルター上で培養されたキットとして販売されており、培養皮膚(表皮)モデルの専用培地が用意されている。

4. 三次元培養皮膚(表皮)モデルを用いた皮膚刺激性試験法

三次元培養皮膚を用いた皮膚刺激性試験の一般的な方法を以下に示す。

- ①プレートの各wellに培地を加え、モデル(セルカルチャーインサート)をセットする。
- ②37℃, 5% CO₂の条件で1時間プレインキュベートする。
- ③被験物質を適用し、37℃, 5% CO₂の条件で所定の時間インキュベートする。
- ④等張リン酸緩衝液(PBS)で洗浄し、被験物質を取り除く。
- ⑤MTTを含む培地に交換し、3時間インキュベート(37℃, 5% CO₂)する。
- ⑥被験物質を適用した部位を打ち抜き、塩酸を含むイソプロパノールでformazanを抽出する。
- ⑦抽出液の570nmにおける吸光度(OD570)を測定する。
- ⑧溶媒対照の吸光度を100%として、生細胞率(%)を算出する。

被験物質の適用時間については議論が残されるが、ECVAMは15分間被験物質を適用し、その後42時間培養後の生細胞率(%)が50%以下である場合に陽性とする方法を提唱している^{8)~10)}。培養皮膚(表皮)モデルとしてEPISKIN™およびEpiderm™を用いたECVAMのバリデーション¹⁴⁾では、sensitivity(非刺激物質の予測性)が、EPISKIN™およびEpiderm™でそれぞれ74.7%および57.3%、specificity(刺激物質の予測性)が、それぞれ80.8%および83.8%であった。さらに、IL-1 α の放出を組み合わせることでEPISKIN™におけるsensitivityは、90.7%に改善されている。また日本においては、小島らによってET50(50%細胞毒性を示す時間、50% Effective Time)による評価が提唱されている^{15)~16)}。

5. 培養細胞を用いた皮膚刺激性試験

化学物質による皮膚刺激は、化学物質が皮膚表面のバリアである角層を通過し、その下にある表皮細胞(角化細胞)あるいは真皮細胞(線維芽細胞)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、培養細胞を用いて皮膚刺激性を評価することは有用であると考えられる。また、*in vitro*試験法を進展させることは*in vivo*における予測性を向上させ、実験動物規制や薬物の適正使用に寄与できると考えられる。

そこで我々は、ヒト、モルモットおよびヘアレスマウスの皮膚線維芽細胞を用いて細胞毒性(MTT試験)の種差について検討した¹⁷⁾。刺激物質には、陽イオン界面活性剤である塩化セチルピリジニウム(CPC)を用いた。CPCは、歯磨きなど¹⁸⁾に広く用いられている界面活性剤で、皮膚刺激性を有することが知られている¹⁹⁾。

5-1. 実験方法

- ①各線維芽細胞は、96well マイクロプレートに1 well当たり 2×10^4 cell播種し、2時間プレインキュベート(37℃, 5% CO₂)した。
- ②0~0.03%のCPCを含む培地100 μ Lを各wellに適用し、2時間インキュベート(37℃, 5% CO₂)した。
- ③CPC含有培地を除去し、PBSで洗浄した。
- ④0.333mg/mLのMTTを含む培地を100 μ L適

用し、4時間インキュベート(37℃, 5% CO₂)した。

- ⑤MTT含有培地を除去し、0.04N塩酸/インプロパノール溶液を100 μ L加えてMTT-formazanを抽出した。
- ⑥マイクロプレートリーダーでOD570を測定した。

5-2. 解析方法

- ①0% CPCをコントロールとして、次式より死細胞率(Dead Cell Number, %)を算出した。

$$\text{Dead Cell Number (\%)} = 100 - \left[\frac{\text{OD570}_{\text{sample}}}{\text{OD570}_{\text{control}}} \right] \times 100$$

- ②死細胞率からSigmoid Emax modelに従う次式を用いて各パラメータを算出した。

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

なお、細胞毒性(死細胞率, %)をIとし、 I_{\max} , C, IC_{50} および γ は、それぞれ最大細胞毒性(死細胞率, %), CPC濃度, 50%細胞毒性発現濃度および形状因子を表している。

5-3. 結果

ヒト、モルモットおよびヘアレスマウスの皮膚線維芽細胞のCPCによる細胞毒性の結果を図1に示す。なお、これらのデータは投稿準備中につ

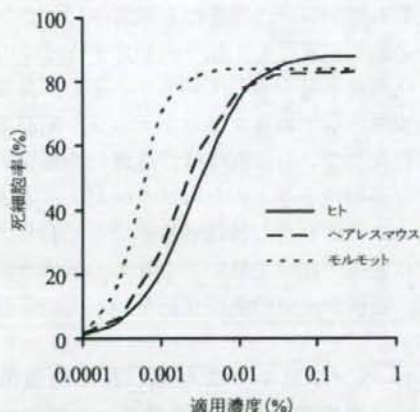


図1 陽イオン界面活性剤(CPC)による線維芽細胞に対する細胞傷害性の種差(投稿準備中につき、詳細なデータは省略した。)

き詳細を割愛させていただき、その概略を示した。最大細胞毒性である I_{max} は、種によって差はなかったが、感受性を示す IC_{50} は、ヒトとヘアレスマウスがほぼ同じであったのに対し、モルモットでは、ヒトおよびヘアレスマウスのおよそ1/3であった。また、濃度依存性を表す指標である γ は、ヘアレスマウスとモルモットが近い値を示したのに対し、ヒトはヘアレスマウスおよびモルモットのそれぞれ約1/2および約1/3であった。このことから、ヒトに比べて動物の方が刺激物質の濃度変化に対して鋭敏に反応し、さらに、モルモットではより低濃度で細胞毒性を発現することがわかった。つまり、動物実験による過大評価の可能性を示唆している。

6. 皮膚刺激に対する表皮および真皮の関与

一次性皮膚刺激は、非アレルギー性の皮膚障害によって引き起こされる炎症反応である。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、皮膚角化細胞や角層に何らかの直接的なダメージが与えられた結果生じる皮膚障害を指す。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²⁰⁾。表皮の有棘層中にはランゲルハンス細胞が存在し、種々のサイトカインの産生能、抗原提示能を有している²¹⁾。また、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が少数存在している。真皮は、皮膚に物理学的強度および柔軟性を与えるためコラーゲン、エラスチン、ムコ多糖を含む繊維層を形成しており、細胞密度は表皮に比べて低い。これらの組織学的構成から、表皮が皮膚の免疫反応を担っていると思われる。

6-1. ヘアレスマウスを用いた細胞毒性試験 (皮膚薄切片上でのコハク酸脱水素酵素活性の検出)²²⁾

ヘアレスマウス (Hos: Hr-1, ♂) の背部皮膚

にCPCを適用後、適用部位皮膚の凍結切片を複製し、皮膚切片上で組織内のコハク酸脱水素酵素活性を検出することで、表皮および真皮に対する細胞傷害性を視覚化した (図2)。コハク酸脱水素酵素は、ミトコンドリアのマーカー酵素であり、その酵素活性を示す青紫色 (formazan) は、皮膚全体に認められたが、特に表皮層で高い酵素活性が認められた (図2 a)。一方、CPC投与群では、コントロール群に比べて酵素活性を示す青紫色は全体的に薄かったが、皮膚の上部、特に表皮の活性が著しく低下し (図2 b)、明確な表皮への細胞傷害性が示された。

6-2. keratinocyteとfibroblastを用いた細胞毒性試験

ヒトの表皮角化細胞 (keratinocyte) と真皮線維芽細胞 (fibroblast) に対するCPCの細胞毒性 (MTT試験) の結果を図3に示す。 I_{max} と γ 値は keratinocyte と fibroblast でそれほど大きな差はなかったが、感受性を表す指標である IC_{50} 値では、keratinocyte が fibroblast の1/10の値を示した。この結果より、刺激物質への耐性は、keratinocyte よりも fibroblast の方が高いと言える。言い換えると keratinocyte の方が刺激物質に対して敏感に反応すると考えられる。皮膚の免疫に関して表皮は重要な役割を担っていることは既に述べた。つまり、表皮が刺激に対して先に反応することでそれ以下の組織の破壊を未然に防ぐ働きをしていると考えれば理にかなっている。培養皮膚には、表皮層と真皮層の2層からなる皮膚モデルと表皮層のみからなる表皮モデルがあることを述べたが、いずれのモデルによってもMTT試験を用いて皮

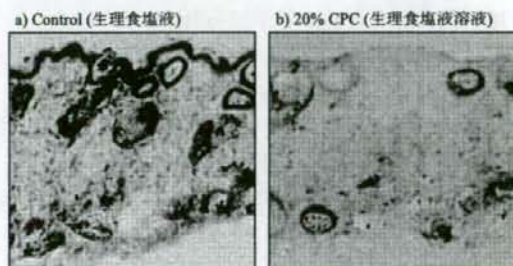


図2 皮膚におけるコハク酸脱水素酵素活性の検出²²⁾
a) ; 生理食塩水適用皮膚 b) ; 20% CPC適用皮膚
倍率; $\times 10$

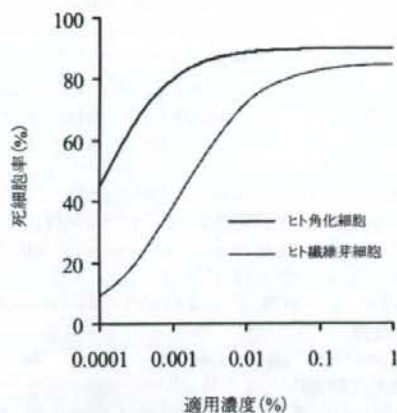


図3 陽イオン界面活性剤(CPC)のヒト角化細胞および繊維芽細胞に対する細胞傷害性(投稿準備中につき、詳細なデータは省略した。)

膚刺激性を予測する場合には、その結果に大差はないものと考えられる。

7. まとめ

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(皮膚透過性)によって決定される。つまり、皮膚刺激能(ポテンシャル)を持つ物質であっても、皮膚から吸収されなければ皮膚刺激性は示さない。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⁾。そして、このことが化学物質の持つ皮膚刺激能と実際の皮膚刺激性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。三次元培養皮膚(表皮)モデルは、その構造中に角層を有しており、*in vitro*皮膚刺激性試験に用いる利点の一つと考えられる。また、皮膚(表皮)モデルでは最終的な製剤を適用することができる点において単純な培養細胞系を用いる検討に対して絶対的なアドバンテージがある。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、ヒトにおける最終的な反応を予測するためには、その物質が持つポテンシャルと皮膚透過性の両面を考慮することが重要であ

る。我々は、PK/PDに着目した皮膚刺激性の速度論的な解析についても行っているが^{22) 24)}、詳細については誌面の都合で割愛する。

8. おわりに

今回紹介した方法は、単回の刺激(曝露)によって引き起こされる皮膚刺激、つまり一次刺激性を評価する方法である。刺激性のメカニズムは単一ではなく、様々な要因が関与している。一例を挙げると、クロトン油は皮膚刺激性物質として知られるが、細胞毒性(MTT試験)を指標としたこの方法では、検出することができない。また、いくつかの偽陽性を含む方法であり、完全な方法ではないことに注意されたい。さらに、幾つかの評価法を組み合わせたバッテリー試験は、ヒトにおける皮膚刺激性の予測の向上に繋がるものと考えられる。

参考文献

- 1) Draize J.H., Woodard G., Galvery H.O., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **82**, 377 (1944)
- 2) DIRECTIVE 2003/15/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 27 February 2003, amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products, Official J. European Union, L66/26.
- 3) OECD Guidelines for the testing of chemicals : 432, *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test
- 4) 大野泰雄, 平成14年度厚生労働科学研究, 動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究 (H13 - 医薬- 024) : Balb/c 3T3 細胞を用いた Neutral Red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価結果報告 (2003)
- 5) Botham P.A. et al., *Altern. Lab. Anim.*, **26**(2), 195 (1998)
- 6) Fentem J.H. et al., *Toxicol. In Vitro*, **15**(1), 57, (2001)
- 7) Faller C. et al., *Toxicol. In Vitro*, **16**(5), 557 (2002)
- 8) Zuang V. et al., *Altern. Lab. Anim.*, **30**(1), 109 (2002)
- 9) Kandárová H., *ALTEX*, **21**(3), 107 (2004)
- 10) Kandárová H. et al., *Altern. Lab. Anim.*, **33**(4), 351 (2005)
- 11) Cotovio J. et al., *Altern. Lab. Anim.*, **33**(4), 329 (2005)
- 12) Kojima H. et al., Validation study for Vitrolife-

- Skin™, a three-dimensional cultured human skin model, II, as an alternative to skin irritation testing using Post-Incubation (PI) protocol, 5th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2005)
- 13) 久保健太郎 他, *Fragrance Journal*, **34**(1), 56 (2006)
 - 14) ESAC statement, Statement of the validity of in-vitro tests for skin irritation (2007) (<http://ecvam.jrc.it/>)
 - 15) Kojima H. et al., Validation study for Vitrolife-Skin™, a three-dimensional cultured human skin model, I, as an alternative to skin irritation testing using ET50 protocol, 5th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2005)
 - 16) Kojima H. et al., Validation study for TEST-SKIN™, a three-dimensional cultured human skin model, as alternatives to skin irritation testing applied to forty cosmetic substances, 5th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2005)
 - 17) 石井宏 他, 培養細胞を用いた皮膚刺激性評価, 日本動物実験代替法学会代20回大会 (2006)
 - 18) Parran J.J. Jr., Mouthwash compositions, US patent No. 4323551, The Procter & Gamble Co. (1981)
 - 19) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS), No. UU5075000
 - 20) Welss T., Basketter DA, Schroder KR, *Toxicol. In Vitro.*, **18**, 231 (2004)
 - 21) 鈴木 正 編集, “皮膚科学”, コーセー研究所(株) (1992)
 - 22) Kano S., Sugibayashi K., *Pharm. Res.*, **23**(2), 329 (2006)
 - 23) Marzulli F.N., *J. Invest. Dermatol.*, **39**, 387 (1962)
 - 24) Sugibayashi K. et al., *Toxicol. In Vitro.*, **16**, 759 (2002)

化粧品に用いられるナノ粒子の暴露と安全性問題のあり方

杉林 堅次

Abstract : It is an urgent problem to evaluate safety concern of nanomaterials such as titanium oxide- and zinc oxide-nanoparticles that are broadly used as an UV-scattering cosmetic. The primary diameter of the nanomaterials is 15-50 nm. Possible exposure sites to human are the GI tracts, respiratory tracts (nasal cavity, trachea, tracheal branch and alveolus of the lung) and skin. Skin must be most important exposure site among them especially for general consumers. As easily understood by the 500 Dalton rule (where these small molecules have 0.2-0.4 nm in diameter), nanomaterials are hardly penetrated into the skin tissues through stratum corneum, primary permeation pathway of most compounds. We have to pay attention to the second permeation pathway (transfollicular pathway) of skin entry in case of nanomaterials. We also consider several wound skins which have low skin barrier function compared with normal skin for nanomaterial penetration into skin. In addition, we must consider the nanomaterial exposure in a quantitative way not qualitative way. For example, the resquamation rate and permeability coefficient of water are 1×10^{-9} and 2×10^{-7} cm/s, respectively. Physicochemical properties of nanomaterials are also important determinants for their skin entry.

Evaluation study on the nanomaterial safety is just the mark of the start line. We have to pay attention to this issue.

Key words : nanomaterial, safety, skin exposure, titanium oxide nanoparticle, zinc oxide nanoparticle, 500 Dalton rule, permeability coefficient

1. はじめに

地球上に生活する我々人類に大きな影響を与える紫外線はその波長により UVA (紫外線 A 波)、UVB (紫外線 B 波) および UVC (紫外線 C 波) に分けられる。これらのうち、一番短波長域にあり地上には到達しない UVC には殺菌効果があり、

UVB にはビタミン D の生合成を助ける有用な働きがある。その一方で、UVB は表皮に侵入してサンバーン (赤い水ぶくれのような状態) と言われる肌の炎症を引き起こし、加えて、直接的に、また、間接的に活性酸素を介して、表皮細胞中の DNA を損傷させる。重篤な場合、これらは表皮細胞の細胞死や皮膚癌の原因にもなる。特に、近年のオゾン層破壊による皮膚癌発生率の増加は紫外線照射による有害事象として注目すべきである。さらに、UVA は表皮のメラノサイトを刺激して、肌の色を黒くするサンタン (日やけ) を招く。サンタン自体は肌を守る作用があるものの、UVA の半分は皮膚深部 (真皮) にまで到達して、肌のハリを支えているコラーゲン架橋結合を破壊してシワの原因になる。

紫外線防御化粧品 (UV ケア化粧品) は、この

"Margin of safety and exposure of nanomaterials used in cosmetics."

Kenji Sugibayashi (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座—350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1)

1985 年城西大学薬学部講師、89 年同助教授、98 年同教授、現在、城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座教授、同生命科学研究センター所長、薬科学科主任、日本香粧品科学会理事、日本実験動物代替法学会評議員、他。



ような人体（特に肌）に悪い影響を与える紫外線（UVA、UVB）から肌を守るために極めて有用であり、化粧品としての価値だけでなくヘルスケアにも対応できる医薬部外品になる。特に、UVケア化粧品のうち日やけ止め化粧品に、紫外線散乱剤として粒子径が15~50 nmの無機（酸化チタンや酸化亜鉛）超微粒子（ナノ粒子）が紫外線吸収剤と併用され始めるようになって、肌への紫外線防御効果が著しく高まった。

一方で、極めて細い繊維状物質でひとつのナノ材料あるアスベスト（石綿）の吸入によって肺線維症や肺癌、さらには稀な腫瘍である悪性中皮腫の危険性が大きく増すことが社会問題になった。また、この事件を契機にして、社会で広く使われているナノ材料・ナノ粒子の安全性を根本から見

直すべきであるとの機運が高まった。酸化チタンや酸化亜鉛微粒子といったナノ粒子は皮膚から吸収されないと考えられて化粧品に含有された経緯があるが、アスベスト問題が浮上してから、酸化チタンや酸化亜鉛微粒子の安全性ももう一度根本から見直す必要がある。

2. ナノ材料の安全性

ナノ材料、特に紫外線防御剤のヒトへの安全性は、暴露部位を中心に考えていくべきであろう。表1に化学物質の暴露部位とその特徴をまとめて示す。すなわち、ナノ材料（紫外線防御剤）のヒトへの暴露経路としては、消化管、気道（鼻粘膜、気管・気管支、肺胞）、そして皮膚が考えられる。表に示したように、紫外線防御剤を中心に考えれ

表1 ナノ材料（紫外線防御剤）の暴露部位とその特徴

暴露部位	特徴	備考	
消化管（口、胃、小腸など）	経口暴露。乳児などは小腸にバイエル板（Peyer's patch）が発達しており、高分子も吸収される可能性がある。	紫外線防御剤の誤用による暴露が考えられる。	
気道	鼻粘膜	一般的に鼻呼吸において、粒径が2~20 μ mの粒子では90%が鼻腔内に捕捉（暴露）される。鼻粘膜には mucociliary clearance という異物排除機能がある。鼻から脳へ直接物質が移行することがありうる。	肌に適用した紫外線防御剤が乾燥し、経気道暴露に至る可能性がある。ナノ材料を扱う作業労働者に対する危険性も考慮する必要がある（肺胞はアスベストの最も重要な暴露経路であった）。
	気管・気管支	一般的に鼻呼吸において、粒径が1~5 μ mの粒子では約50%が気管気管支領域に留まるが、10~20 μ mの粒子が気管・気管支まで達することは少ない。一方、口呼吸においては、10~20 μ mの粒子の95%以上が気管気管支に沈着し、1~10 μ mの粒子の約60~80%は細気管支レベルに沈着する。気道への沈着は粒子の性状、気道の解剖学的要因、呼吸パターンに依存している。また、気道、肺胞腔内に沈着した粒子状物質は粘液線毛上皮系を主体とするクリアランス機構によって、その多くは排除される。	
	肺胞	一般的に鼻呼吸において、1~5 μ mの粒子の50%は肺胞領域に達するが、10 μ m以上の粒子は肺胞レベルには沈着しない。一方、口呼吸においては、1~5 μ mの粒子の40~50%は肺胞に沈着する。	
皮膚	物質の経皮吸収の最大のバリアーである角層は大きな分子は通さない。毛嚢経路でどの程度の分子が皮膚中に侵入するか検討が必要。また、皮膚に傷がある場合は、ナノ材料がその部分から深部に侵入する可能性がある。	紫外線防御剤の暴露経路としては最も重要。	

ば、その暴露経路の中心は経皮暴露であると考えられる。化粧品に含まれるナノ粒子ははたして皮膚中に滲入していくのか。

3. 物質の経皮吸収性と分子サイズ

物質のサイズ（分子量や分子容）と経皮吸収性の関係については、すでに本誌既刊号で考察したので、ここではその一部分だけを紹介する¹⁾。BosとMeinardiは「分子量500ダルトン限界説(500 Dalton rule)」を報告している²⁾。彼らは、現在までに皮膚感作性を示す物質の分子量のほとんどが500ダルトン以下であること、また、皮膚組織に薬物を送達する局所作用を期待する医薬品製剤やまた全身吸収性を期待したTDDS(Transdermal Drug Delivery Systems)中に含まれる薬物はほとんどが分子量500ダルトン以下であることを基準としてこの経験説を提唱している。すなわち、分子量500ダルトン以上の物質は皮膚を透過しないということである。分子量500ダルトン程度の物質の直径(または長径)は0.2-0.4nm程度であるのに対し、今回問題にしている紫外線防御剤中のナノ材料は15~50nmの微粒子粉体であることを考え合わせると、100倍程度の粒子径を有しているこれらナノ粒子は、常識から考えると皮膚から吸収することはほとんど不可能であると思われる。

しかし、皮膚には500ダルトン以下の物質の主透過経路である角層に加えて、毛嚢や汗腺といった付属器官が存在するため、ナノ材料のこれら付属器官を介した侵入の可能性についても検討する必要がある。また、アトピー性炎症を呈する皮膚をはじめとしてバリアー能が著しく低下した皮膚や、傷を有した皮膚も対象にする必要があるなら、ナノ材料の皮膚透過性に及ぼす皮膚疾患や傷の影響についても評価しておく必要もあろう。

すでに本誌で考察した皮膚浸透経路に関する記述と、皮膚が溶解拡散膜なのか細孔膜なのかについての議論¹⁾についても正確に理解してナノ材料の安全性について考察していかなければならない。

4. 経皮吸収の定量的理解について

科学の著しい発達につれて、微量の物質を定量できる測定機器が開発され、物質の定量感度が上昇した。今まで測定限界以下であった物質が皮膚中に見られるようになると、不思議なことに、「皮膚に浸透しない物質」から「皮膚に浸透する物質」に表現法が変わる。まったく節操ないことで、科学に携わっている者からみると残念でならない。これは定量(程度)の概念が一般消費者だけでなく、科学者や科学・技術情報担当者にないためである。

皮膚浸透性や皮膚透過性の定量的指標として透

表2 種々物質の皮膚透過係数と皮膚透過係数の指標

透過係数 (cm/s)	指標と特徴
1×10^{-9}	角層一層の剥がれる(ターンオーバー)速度 1日で角層1層に浸透する速度
4×10^{-9}	クロモグリク酸ナトリウムのヘアレスラット皮膚透過係数
5×10^{-9}	カルセインナトリウムのヘアレスラット皮膚透過性
2×10^{-8}	1日で角層全層(20 μ m)に浸透する速度
2×10^{-7}	水分子のヒトおよびヘアレスラット皮膚透過速度 5-フルオロウラシルのヘアレスラット皮膚透過速度 ジクロフェナク酸ナトリウムのヘアレスラット皮膚透過速度
3×10^{-7}	皮膚を擦っても消えないボールペンやマジック色素の透過速度*
1×10^{-7}	ISMNのヒトおよびヘアレスラット皮膚透過係数
3×10^{-6}	ISDNのヒトおよびヘアレスラット皮膚透過係数
1×10^{-5}	リドカインのヒトおよびヘアレスラット皮膚透過係数
2×10^{-5}	5-フルオロウラシルのヘアレスラット stripped skin 透過速度
1×10^{-4}	フルルビプロフェンやイブプロフェンのヘアレスラット皮膚透過係数

*角層の5層目に入れば消えないと仮定