

- ② 3施設によるプロトコル確認
- ③ 参加施設（静岡県立大、田辺三菱製薬、米国ファイザー）の決定、バリデーション実行委員会によるプロトコル確定
- ④ 被験物質の送付
- ⑤ 試験実施：被験物質受領後
- ⑥ 各施設での試験結果QC&運営委員会への送付
- ⑦ バリデーション実行委員会によるQC、結果解析

- ・ Sulisobenzoneは陰性対照とする。
- ・ 5-FUのように、non-ROSメカニズムで光毒性を示すものもあり、ROSアッセイの限界を知る上でもROSを介さない光毒性物質をプレバリデーションから被験物質に加えることとした。

【提案】

- ・ バリデーション化合物の選択については、EFPIAの協力も得た上で国際バリデーションを遂行する。
- ・ 費用は厚生労働科学研究費補助金と日本製薬工業会が負担する。
- ・ バリデーション化合物に選択予定の向精神薬の譲渡・譲受については各社対応が必要である。

C-2-2) セリック社製光照射装置 (SXL2500V2) を用いた評価法に関する検討

C-2-2-1) 機器、温度、照射ムラ、施設間標準化の方法について

セリック社製光照射装置の照射台にはアクリル板が使用されており、光照射により熱を持ち易い。照射時間依存的に照射台の表面温度が上昇し、39℃以上になる。アクリル板の上にCO₂インキュベーターで使用する金属版を置いたところ、温度上昇は34℃程度には抑えられた。

【提案】

Atlas社製光照射装置での試験温度は25～30℃を想定している。30℃以上になるとSuperoxideの発生量が上昇するため、絶対値による機器間のデータ合わせは適当ではない。

セリック社製光照射装置を用いる場合は、基準化合物を用い、標準化した基準で判定する必要がある。

C-2-2-2) セリック社製光照射装置を用いたプレバリデーションスケジュール

- ① プレートカバーの購入
- ② 温度のモニター調査：〔各社3T3試験の方法に従い、温度上昇、照射量について調査〕

- ③ Quinineを用いて条件検討（50, 100, 200 μMの3用量、照射時間は60分）
- ④ プレバリデーション用化合物（3化合物を予定）を用いて検討：〔被験物質の送付は衛研が担当（必要量：50～100 mg）〕

C-2-3) バリデーション用被験物質の選定

- ・ Atlas社製プレバリデーション用の被験物質は13物質とする。
- ・ バリデーション用被験物質は、市販医薬品から40～50化合物を選定する。

C-2-4) その後の動向

第二回会議以降、米国ファイザーの辞退が決まり、新たに食品薬品安全センター秦野研究所の参加が決まった。当初の予定では年度内にバリデーションを開始する予定であったが、トレーニングを兼ねた第一回バリデーション実行委員会を4月に開催し、すぐに技術移転を開始することになった。

D. 考察

ROSアッセイの光毒性試験としての有用性を確認し、バリデーション実施について検討してきた。ICH実行委員会からの要請もあり、日本製薬工業協会の協力を得て、来年度から開始の目途が立った。

試験法のバリデーションを開始するまでには、バリデーション実行委員会（準備委員会も含む）の慎重な対応が必要である。一度バリデーションを開始してしまうと参加者の都合や予算の関係もあり、後戻りできない場合がある。実施前には、その試験法への関心やバリデーション参加意欲のある協力者をバリデーション実行委員に選び、共に問題点を挙げ、事前に懸念事項をつぶしていかなければならない。特に、本試験法は簡便な方法であるが、光照射装置を限定しないという当初の方針に従い、複数のプロトコルを用意し、実験を並行して遂行する必要がある。

技術移転が確認できれば、来年度は、被験物質の選定が重要となる。欧州から専門家を招待し、国際的な議論の末、被験物質数、その分類を見極めていかなければならないと考える。

E. 結論

ROSアッセイの活用を念頭に、日本製薬工業協会 基礎研究部会の協力を得て、新たな光毒性試験方法のバリデーション実施の可能性を探った。

バリデーション実施に向け、光照射装置の機種差など解決すべき多くの点について

て、準備委員会で議論を重ね、来年度から開始の目途が立った。

F. 参考文献

- 1) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 432: in vitro 3T3 NRU phototoxicity testing, Paris, France (2002)
- 2) 小野寺博志：光毒性試験に関する国内外の現状とガイドライン策定についての調査研究、厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）国際的な整合性を旨とする医薬品等の品質、有効性及び安全性に関する研究 平成19年総括研究報告書 pp.121-123 (2008)
- 3) Onoue S *et al.*, *J Pharm Biomed Anal* 46 (2008) 187-193.
- 4) Onoue S *et al.*, *Pharm Res* 25 (2008) 861-868

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
 - 1) 大野泰雄：代謝物の安全性評価と FDA 及び ICH の指針について. 第 37 回日本トキシコロジー学会シンポジウム (2010. 6. 17)
 - 2) 大野泰雄：「動物の愛護及び管理に関する法律」（動愛法）の改定に向けて。日本動物実験代替法学会 第 23 回大会シンポジウムのオーガナイズ (2010. 12. 5)
 - 3) 大野泰雄：薬理学における動物実験代替法研究の重要性。日本薬理学会 (2010. 3. 23 誌上发表)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

ヒトパッチテストの再検討と使用試験

研究分担者 松永佳世子
藤田保健衛生大学医学部皮膚科学

研究要旨

国際協調を重視した化粧品・医薬部外品における安全性試験法の再評価として、ヒトパッチテストの再検討と使用試験を検討した。ヒトパッチテストについては、陽性コントロールおよび陰性コントロールを置いた健常人の予知パッチテストを施行し、パネル間の易被刺激性の指標に有用である可能性が示唆された。使用試験については、本年度は、新規成分を含む医薬部外品の使用試験について企業より情報提供を受け、検討を加えた。使用試験は1製品について20名から50名程度であり、安全性の検討項目も試験により異なっていた。安全性について合理的な使用試験を行うための、携帯電話を利用した管理システムを試作した。

キーワード：医学部外品、化粧品、医薬外用薬、安全性評価、パッチテスト、使用試験

研究分担者

松永佳世子 藤田保健衛生大学 医学部
皮膚科学 教授

研究協力者

飯島正文 昭和大学 医学部 皮膚科学
教授

川島 眞 東京女子医科大学 医学部
皮膚科学 教授

杉浦 伸一 名古屋大学医学系研究科
医療システム管理学寄附講座 准教授

A. 研究目的

国際協調を重視した化粧品・医薬部外品における安全性試験法¹⁾の再評価として、ヒトパッチテストの再検討と使用試験の必要性を検討し標準化を行うことを本研究3年間の目的とした。初年度である平成22年度はヒトパッチテストについて陽性コントロールの有用性、ヒト使用試験について既存の使用試験データの解析、携帯電話を使用した合理的な使用試

験のモデルとなるシステムを構築することを目的とした。

B. 研究方法

B-1) ヒトパッチテスト

ヒトパッチテストについては、陽性コントロールおよび陰性コントロールを置いた健常人の予知パッチテストを施行し、陽性コントロールの妥当性について検討した。

B-2) 既存の使用試験の検討

本年度は、新規成分を含む医薬部外品の使用試験について企業より情報提供を受け、検討を加えた。

B-3) 携帯電話を利用した使用試験安全管理システム

安全性について合理的な使用試験を行うための、携帯電話を利用した管理システムを試作した。

C. 研究結果

C-1) ヒトパッチテスト

パネル間の易被刺激性の指標に有用である可能性が示唆された。

C-2) 既存の使用試験の検討

使用試験は3社より提供を受けた。使用試験の対象は1製品について20名から50名程度であり、安全性の検討項目も試験により異なっていた。

C-3) 携帯電話を利用した使用試験安全管理システム

安全性について合理的な使用試験を行うために、ユビキタス移動体インフラ、すなわち携帯電話等をモバイル端末として、インターネット上に新たなデータベースを構築する仕組みを利用した携帯電話による管理システムを試作した。

D. 考察

本研究の目的は、医薬部外品・化粧品の安全性評価に利用できる代替法研究・バリデーションであるが、究極の安全性評価は実際のヒトによる使用目的部位への使用試験につぎる。皮膚の安全性、すなわち、皮膚刺激性や感作性については、経皮吸収が重要であり、それは、皮膚の部位、皮膚の状態によって左右される。このような部位差や皮膚の状態をパッチテストでは再現しにくい現状がある。

本年は、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリン酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウムなどを陽性コントロールとし、また、蒸留水、生理食塩水、白色ワセリンなどを陰性コントロールとして指標として置くことによって、対象の易被刺激性を検討することができた。

企業から提供を受けた医薬部外品の使用試験は、企業によって、安全性の評価項目や指標が異なっていた。対象の数が

20から50と限られており、安全性試験として十分とは言えない。

そこで、使用試験の対象を多くし、その管理を合理的にするために、また、市販後の調査を広くしかも早く的確に把握する目的でユビキタス移動体インフラ：携帯電話を用いた使用試験のシステムを試作した。使用試験の質の向上、試験責任者などへの被験者からのアクセスも迅速に可能で、試験責任者から指示もだせるシステムが完成した。平成23年度には、このシステムを使った使用試験による安全性評価方法の開発を行う。また、ヒトパッチテストで評価した医薬部外品・市販外用薬をこのシステムを利用した使用試験により、合理的に評価できるか検討を行う予定である。

E. 結論

ヒトパッチテストについては、陽性コントロールおよび陰性コントロールを置いた健常人の予知パッチテストを施行し、パネル間の易被刺激性の指標に有用である可能性が示唆された。使用試験については、安全性の検討項目も試験により異なっていた。安全性について、より合理的な使用試験を行うための、携帯電話を利用した管理システムを試作した。

F. 参考文献

- 1) Rojgiers V, Pauwels M. (2008) Safety Assessment of Cosmetics in Europe, Karger
- 2) 日本化粧品工業連合会編 (2008) 化粧品の安全性評価に関する指針2008、薬事日報社

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 矢上品子, 松永佳世子: 皮膚検査法の実際パッチテスト・プリックテスト、皮膚病診療 32: 67-70 (2010)
- 2) 松永佳世子: イラストでみる病来世入り・治療 接触皮膚炎 Allergia Trends 12:14-17 (2010)
- 3) 矢上品子, 松永佳世子: パッチテストをどう活かすか 産学官連携の取組み、アレルギーの臨床 787-789 (2011)
- 4) 廣川景子, 亀山梨奈, 中川真実子, 井上智子, 安部正通, 稲葉弥寿子, 山北高志, 森 敏恵, 鈴木加余子, 松永佳世子: 化粧品パッチテスト2007のまとめ J Environ Dermatol & Cutan 4:89-98 (2010)
- 5) Miura M, Isami M, Yagami A, Matsunaga K. Allergic contact chilitis caused by

ditrimethylpropane triethylhexanoate in a lipstick. Contact Dermatitis 64:301-302 (2011)

- 6) Furue M, Yamazaki S, Jimbow K, Tsuchida T, Amagai M, Tanaka T, Matsunaga K, Muto M, Morita E, Akiyama M, Soma Y, Terui T, Manabe M. Prevalence of dermatological disorders in Japan: A nationwide, cross-sectional, seasonal, multicenter hospital-based study. J Dermatol. 38;38353-3863 (2011)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

- なし
- 2. 実用新案登録
- なし
- 3. その他
- なし

分担研究報告書

医薬部外品の安全性を動物実験の3Rsに配慮して評価するための試験法のあり方について

研究分担者：杉林 堅次 城西大学 薬学部 薬粧品動態制御学講座

研究協力者：藤堂 浩明 城西大学 薬学部 薬粧品動態制御学講座

研究要旨

3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験が行われているが、いくつかの化学物質で偽陰性や偽陽性反応が認められている。我々は、種々3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた *in vitro* 皮膚透過性試験を行ったところ、それぞれの3次元培養ヒト皮膚モデルにより、物質透過特性が異なることがわかった。また、EpiDermを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験で偽陽性反応および偽陰性反応が認められた化学物質の極性を調査した結果、水溶性の化学物質で偽陽性反応、脂溶性の化学物質では偽陰性反応が多く認められることが示された。さらに、偽陰性反応が認められた化学物質には、エステル結合を有するものが多いことが分かった。化学物質の皮膚刺激性は化学物質の刺激部位での濃度や接触時間に依存するため、偽陽性反応および偽陰性反応が生じる原因には、化学物質の3次元培養ヒト皮膚モデルとヒト皮膚間の透過性や代謝能の違いによる化学物質の皮膚中の concentration-distance profile の違いが関係していることが分かった。よって、3次元培養ヒト皮膚モデルを動物実験の3Rsに配慮して使用する場合には、3次元培養ヒト皮膚モデルの物質透過特性を十分把握する必要があることが分かった。

A. 研究目的

欧州連合内では、化粧品およびその原料の安全性に関する化粧品指令第7次改正により、2009年または2013年から動物実験を行った化粧品の製造・輸入が禁止される流れにある。一方で、3次元培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性代替試験法への取り組み、主にバリデーション研究が長年に亘り行われてきた結果、ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) では3次元培養ヒト皮膚モデルの一つである EpiSkin™ (SkinEthic, St. Philippe, France) および EpiDerm™ (MatTek Inc, Ashland, MA) を用いた皮

膚刺激性試験の評価方法を承認した。しかしながら、皮膚刺激性試験とは異なり、皮膚透過性試験では未だ動物実験代替法に関して十分な検討がされておらず、その方法の開発が急務とされている。3次元培養皮膚モデルを用いた物質の透過性は、EpiSkin™ (Netzlaff et al., 2006)、Skinethic™ HRM (SkinEthic, St. Philippe, France) や Graftskin™ LSE™ (Organogenesis, Canton, MA) (Schmook et al., 2001) を用いた報告がある。しかしながら、これらの報告は、3次元培養皮膚を介した物質透過性をヒト皮膚透過性と比較しているに留まっており、3次元培養ヒト皮膚モデル間の物質透過性の

比較や 3 次元培養ヒト皮膚モデルからのヒト皮膚透過性の予測などは行われていない。

そこで、まず本邦で入手可能な 3 次元培養ヒト皮膚モデルを用いて物質の透過性を評価し、各 3 次元培養皮膚モデルの物質透過特性を調査する。さらに、3 次元培養ヒト皮膚モデルからヒト皮膚透過性が予測できるかを調査した。

また、3 次元培養ヒト皮膚モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験にて、いくつかの試験物質で偽陰性や偽陽性反応が認められている。そこで、3 次元培養ヒト皮膚モデルである EpiDerm を用いた試験で偽陽性および偽陰性反応が認められた化学物質の極性および物質の透過特性から、その原因について調査した。

B. 実験方法

1. 理論

1.1. 透過パラメータの算出

透過実験より得られる累積透過量一時間プロファイルより flux を算出し、得られた flux より透過係数 P を算出した。拡散パラメータ (DL^2) や分配パラメータ (KL) などの皮膚透過パラメータは、Fick の第 2 則より算出した式 (1) から得られるラグタイム (式 (2)) を用いて算出した (Jaymin, 1993)。

$$Q = KLCv \left[\frac{D}{L^2} t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-\frac{D}{L^2} n^2 \pi^2 t\right) \right] \quad (1)$$

$$t_{Lag} = \frac{L^2}{6D} \quad (2)$$

$$P = (DL^2) \cdot (K \cdot L) \quad (3)$$

ここで、 Q は累積透過量、 K は分配係数、 L はバリア層の厚み、 C_v は基剤中物質濃度、 D は拡散係数、 t は時間を示す。なお、透過係数 P は拡散パラメータ DL^2 と分配パラメータ KL の積で表すことができる (式 (3))。

また、化学物質のヘアレスラット摘出皮膚および 3 次元培養ヒト皮膚モデルを介する物質の透過抵抗は、角層 (stratum corneum: SC) と下層の生きた表皮・真皮 (viable epidermis and dermis: Ved) の 2 層から構成されていると考えることができる。物質の透過抵抗は各層を介した透過係数 (permeability coefficient: P) の逆数に等しい。全抵抗 (R_{tot}) と全層皮膚透過係数 (P_{tot}) の関係は以下の式で表すことができる。

$$R_{tot} = R_{sc} + R_{ved} = \frac{1}{P_{tot}} = \frac{1}{P_{sc}} + \frac{1}{P_{ved}} \quad (4)$$

ここで、 R_{tot} 、 R_{sc} 、 R_{ved} は皮膚全層、角層および生きた表皮・真皮層の物質の透過抵抗を、 P_{tot} 、 P_{sc} 、 P_{ved} は、それぞれ皮膚全層、角層および生きた表皮・真皮層を介した透過係数を示す。

1.2 ヒト皮膚を介した物質の透過係数と油水分配係数の関係

Morimoto ら (Morimoto et al., 1992) や Watanabe ら (Watanabe et al., 2001) は、油水分配係数の異なる化学物質を適用し、これら化学物質の P と Ko/w の関係について調べた。Figure 1 にヒト皮膚を介した種々化学物質の P と化学物質の Ko/w の関係を示す (Morimoto et al, 1992)。この結

果より、化学物質の Ko/w の増大に伴い、 P が高くなることが分かる。

1.3. ヒト皮膚よび動物皮膚の透過パラメータと油水分配係数の関係について

Figure 2 に Fig.1 に示した P をさらに KL と DL^2 の 2 つのパラメータに分け、これらパラメータと油水分配係数の関係について示した。これより、 KL は適用物質の油水分配係数が大きくなるにつれて大きくなり、その形は $\log P$ と $\log Ko/w$ の関係と類似していた。一方、 DL^2 は適用物質の油水分配係数に関わらず一定であることが分かる。

2. 試薬

アンチピリン (ANP)、カフェイン (CAF)、アミノピリン (AMP) および安息香酸 (BA) は和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) から購入した。二硝酸イソソルビド (ISDN) は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。一硝酸イソソルビド (ISMN)、ニコチン酸エチル (EN) およびニコチン酸 (NA) は東京化成工業株式会社 (東京, 日本) から購入した。フルルピプロフェン (FP) はリードケミカル (富山, 日本) から供与された。その他の試薬および溶媒は市販の特級または HPLC 用を用いた。これらの試薬は精製せずにそのまま使用した。Table 1 にこれらの分子量および $\log Ko/w$ を示す。

3. 3次元培養皮膚モデル

3次元培養ヒト皮膚モデル EpiDerm™ Epi606X は倉敷紡績株式会社 (大阪, 日本)、

Neoderm-E® は Tego Science (Gumcheon-gu, Seoul, Korea)、Vitrolife-skin はグンゼ株式会社 (京都, 日本)、Labcyte EPI-model は株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (愛知, 日本)、TEST SKIN™ LSE-high は東洋紡績株式会社 (大阪, 日本) そして Episkin™ は Skinethic (St. Philippe, France) より購入した。ヒト皮膚 (TRANSKIN™) は株式会社ケー・エー・シー (京都, 日本) より購入した。体重 220-260 g の雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht 系) は城西大学生命科学研究センター (埼玉, 日本) から購入した。なお、すべての動物実験は、城西大学の倫理委員会の承諾を得たのち、倫理規定に従い行った。

4. *In vitro* 皮膚透過性試験

種々3次元培養ヒト皮膚モデルを 6 well または 12 well プレートから取りはずし、pH7.4 リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後に使用した。EpiDerm, Neoderm-E と Vitrolife-skin は side-by-side diffusion cell (有効透過面積 0.95 cm^2)、Labcyte EPI-model と Episkin は Franz type diffusion cell (有効透過面積 0.5 cm^2) に挟んだ。PBS を角層および真皮側に適用し 1 時間水和させた。水和後、適用した PBS を除去し、水溶性物質の場合は PBS、脂溶性物質の場合は 40% polyethylene glycol 400 (40% PEG) を真皮側に適用した。角層側には、side-by-side diffusion cell の場合は種々物質を懸濁させた PBS 溶液、

Franz type diffusion cell の場合は種々物質を溶解させた PBS 溶液を適用した。レシーバーセルから経時的にサンプリングし、その都度同量の溶液を補充した。採取した溶液をサンプル溶液とした。サンプル溶液中の物質濃度は HPLC を用いて測定した。また、透過抵抗を評価するため、stripped skin を用いた試験を行った。ヘアレスラットの場合はセロハンテープ（セロテープ®、ニチバン株式会社、埼玉）を用いて 20 回テープストリッピングしたもの、EpiDerm の場合はスタンドライトを用いて 15 分照射後、乾燥させた角層を剥がしたものを stripped skin とした。また、ヘアレスラット摘出皮膚は、ペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg, *i.p.*）麻酔下のヘアレスラットの腹部を剃毛処理後、左右から 2 枚ずつ皮膚を摘出し、真皮側の脂肪を丁寧にハサミで取り除いた後、1 時間水和を行い実験に使用した。ヒト摘出皮膚は解凍後に 12 時間水和処理をしい使用した。

5. 種々皮膚ホモジネートを用いた代謝実験

ヘアレスラット皮膚、ヒト摘出皮膚、EpiDerm, LSE-high, Episkin, Vitrolife-skin および LabCyte EPI-model をハサミにて細断した後、ホモジナイザーを用いてホモジナイズし、PBS を用いて 10% 皮膚懸濁液を調製した。調製した懸濁液を遠心分離（9000 g, 20 min, 4°C）した後、その上清を採り酵素溶液とした。種々濃度に調製したニコチン酸エチル（EN）溶

液に酵素溶液を適用し、37°C でインキュベートをしながら経時的にサンプリングを行った。サンプリングにより得られた試料は、アセトニトリル溶液と等量混合後、攪拌した。サンプル中の EN およびニコチン酸（NA）は HPLC を用いて定量し、NA の生成速度を代謝速度として酵素パラメータ（ V_{max} , K_m ）を Hanes-Woolf plot を用いて算出した。Hanes-Woolf plot は（1）式で示され、 C_{EN} は適用した EN 濃度、 V は代謝速度を表す。なお、ホモジネート中のタンパク量は Lowry 法を用いて測定した。

$$\frac{C_{EN}}{V} = \left(\frac{1}{V_{max}} \right) C_{EN} + \frac{K_m}{V_{max}} \quad (5)$$

6. 定量条件

透過実験より得られた各物質のサンプル溶液は、内部標準物質を含んだアセトニトリルと 1:1 で混和した。その溶液を遠心分離（15000 rpm, 5 min, 4°C）し、その上清 20 μ L を HPLC に注入した。種々物質の HPLC 測定は以下の条件で行った。ANP; acetonitrile : water = 30 : 70、絶対検量線法、測定波長 254 nm、ISMN と CAF; acetonitrile : water = 10 : 90、絶対検量線法、測定波長それぞれ 220 nm および 254 nm、AMP; acetonitrile : 0.1% phosphoric acid containing 5 mM SDS = 10 : 90、内部標準物質として butyl *p*-hydroxy benzoic acid、測定波長 245 nm、ISDN; acetonitrile : water = 55 : 45、内部標準物質として butyl *p*-hydroxy benzoic acid、測定波長 245 nm、BA; acetonitrile : 50 mM

potassium dihydrogen phosphate=45 : 55、内部標準物質として ethyl *p*-hydroxy benzoic acid、測定波長 245 nm、FP; acetonitrile : 0.1% phosphoric acid=50 : 50、内部標準物質として isopropyl *p*-hydroxy benzoic acid、測定波長 245 nm、EN および NA; acetonitrile : 0.1% phosphoric acid=25 : 75、絶対検量線法、測定波長 260 nm。測定には株式会社 島津製作所 (京都, 日本) 社製の HPLC を用いて行った。HPLC system は、送液ユニット (LC-10AD)、UV 検出器 (SPD-10AV)、カラムオープン(CTO-10AC)、オートインジェクター (SIL-10A)、デガッサー (DGU-12A)、システムコントローラー (SCL-10A)から構成されている。また、カラムは、Wakopak wakosil-2 5C18HG, 4.6 mm i.d.×250 mm (和光純薬工業 (株), 大阪, 日本) を HPLC データの解析は、Smart Chrom (株式会社ケーワイエーテクノロジー, 東京, 日本) を用いた。

7. 統計解析

ヒト皮膚と種々3次元培養ヒト皮膚モデル間の $\log P$ の相関性の検定には Spearman rank correlation を用い、いずれの場合も危険率 5% 未満を有意と判断した。

C.D. 結果・考察

1. 種々三次元培養ヒト皮膚モデルとヒト皮膚を介した物質の透過係数 (P) の関係

Figure 2 に各培養皮膚を介した種々化学

物質の P と Ko/w を両対数プロットした結果を示す。LSE-high では、化学物質の $\log Ko/w$ の増加に伴い $\log P$ が増加した (Fig. 2a)。得られた値はすべてヒト皮膚の $\log P$ よりも高い結果を示した。同様の結果は我々の以前の研究 (Watanabe et al., 2001) から得られている。一方、EpiDerm では、脂溶性の最も高い FP を除いて、ヒト皮膚の P とほぼ同じ値を示した (Fig. 2b)。Vitrolife-skin、および Neoderm は、水溶性化学物質の P がヒトの皮膚の P よりも非常に高い値を示した。一方、LabCyteEPI-model や Episkin は、適用した化学物質の $\log Ko/w$ に関わらず P はほとんど変わらなかった。

Figure 3 に、縦軸に培養皮膚、横軸にヒト皮膚を介した種々化学物質の $\log P$ をプロットした結果を示す。Fig. 3a に示すヒト皮膚と LSE-high 相間では、傾き 1.0 の良好な直線関係が得られた。同様な結果は我々の過去の報告からも得られている (Watanabe et al, 2001)。EpiDerm とヒト皮膚の P との間には、 $\text{Log } P_{\text{human}}=1.022 \times \text{Log } P_{\text{EpiDerm}}-0.202$ ($r=0.9401$) ($p<0.05$) の良好な直線関係が得られるが (Fig. 3b)、EpiDerm の P 値は LSE-high と異なりヒト皮膚と同程度の値を示した。一方、Vitrolife-skin、Neoderm-E、LabCyte EPI-model および Episkin とヒト皮膚の P との間では、それぞれ、 $\text{Log } P_{\text{human}}=2.929 \times \text{Log } P_{\text{Vitrolife-skin}}+7.871$ ($r=0.8035$) (no significant correlation)、 $\text{Log } P_{\text{human}}=1.688 \times \text{Log } P_{\text{Neoderm-E}}+2.32$

($r=0.8162$) (no significant correlation)、
 $\text{Log } P_{\text{human}}=0.937 \times \text{Log } P_{\text{LabCyte EPI-model}}-0.759$ ($r=0.3894$) (no significant correlation) および
 $\text{Log } P_{\text{human}}=0.768 \times \text{Log } P_{\text{Episkin}}-1.17$ ($r=0.8162$) (no significant correlation)となりこれらの3次元培養ヒト皮膚モデルの P はヒト皮膚の P と 1:1 の相関性を得られなかった。

2. 種々3次元培養ヒト皮膚モデルとヒト皮膚との透過パラメータの比較

Figure 4にヒト皮膚と種々3次元培養ヒト皮膚モデルの KL を物質の Ko/w に対して両対数プロットした結果を示す。LSE-highでは、水溶性物質でLSE-highの KL がヒト皮膚の値よりも若干高い値を示すものの、その他の物質ではヒト皮膚と同程度の値を示した (Fig. 4a)。同様の結果は我々の以前の研究 (Watanabe et al., 2001) から得られている。EpiDermでは、ヒト皮膚と同様に Ko/w の上昇に伴い、 KL は増加したが、7種類の全ての物質でその値はヒト皮膚の分配パラメータより低い値を示し、その差は脂溶性が高くなるにつれ大きくなった (Fig. 4b)。一方、Neoderm-E, Vitrolife-skin, LabCyteEPI-model および Episkin では、ヒト皮膚と同様に適用物質の Ko/w の上昇に伴い、 KL は上昇するが、 Ko/w の上昇により得られる KL の増加挙動はヒト皮膚とは大きく異なることが分かった。

Figure 5にヒト皮膚と3次元培養ヒト皮

膚モデルの DL^2 と Ko/w を両対数プロットした結果を示す。3次元培養皮膚の DL^2 は Ko/w に関わらず一定の値を示したが、3次元培養ヒト皮膚モデルの DL^2 はヒト皮膚のそれより高い値を示すことが分かった。

3. 偽陰性および偽陽性が生じる原因について：全層皮膚バリア能に対する角層バリア能の寄与

3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた試験で偽陽性反応および偽陰性反応が認められた化学物質の極性を調査した。その結果、水溶性の化学物質で偽陽性反応、脂溶性の化学物質では偽陰性反応が多く認められることが示された (Fig. 6)。さらに、偽陰性反応が認められた化学物質には、エステル結合を有するものが多いことが分かった (Fig. 7)。そこで、化学物質の concentration-distance profile に及ぼす全層皮膚バリア能に対する角層バリア能の寄与を3次元培養ヒト皮膚モデルおよびヘアレスラット皮膚を用いて比較・評価した。このとき、水溶性の ISMN、中間の ISDN および脂溶性の FP と極性の異なる3種の化学物質を選択した。

Table 3 にヘアレスラット摘出皮膚および EpiDerm を介した化学物質の透過係数、各層の抵抗および全抵抗に対する角層のバリア比を示す。水溶性の ISMN および中間の ISDN では、ヘアレスラット摘出皮膚と EpiDerm で角層バリア比 (R_{sc}/R_{tot}) に違いが認められた。一方で、脂溶性物質である FP では両皮膚間で差が認められなかった。

したがって、EpiDerm は水溶性および中間の極性の化学物質に対する角層バリア能が低いことが示された。これは EpiDerm の組織構造、特に角層の脂質ラメラ構造が実皮膚と比較して不完全であることが原因として考えられた。

Figure 8 に得られたパラメータより算出した物質の concentration-distance profile を示す。角層バリア比より算出した、実皮膚と培養皮膚の生きた表皮・真皮のバリア比 (R_{ved}/R_{tot}) は、水溶性の化学物質では 0.012 および 0.162、中間の極性の化学物質では 0.049 および 0.200 となる。この値は、化学物質の全皮膚中濃度に対する生きた表皮・真皮中濃度とよく相関する。すなわち、培養皮膚の生きた表皮・真皮中の化学物質濃度はヘアレスラット皮膚に比べ脂溶性物質の FP ではほとんど変わらないものの、水溶性の ISMN では約 14 倍、中間の極性の ISDN では約 4 倍になると考えられた。したがって、培養皮膚の低い角層バリア能が水溶性の化学物質を用いた皮膚刺激性試験での偽陽性反応の原因となっていることが示唆された。

4. 偽陰性および偽陽性が生じる原因について：物質の皮膚透過性と代謝能の比較

偽陰性反応が認められている化学物質にはエステル結合を有する脂溶性物質が多い (Fig. 7)。脂溶性物質の生きた表皮真皮中濃度は低いものの、脱エステル体は通常のエステル体より水溶性となるため、その生きた表皮真皮中濃度は高くなると予想され

る。また、脱エステル体に皮膚刺激性があるとすると、その皮膚刺激性はエステラーゼ活性に依存することとなる。したがって、培養皮膚のエステラーゼ活性が実皮膚より著しく低い場合、偽陰性反応の原因は皮内エステラーゼ活性の違いによることが考えられる。そこで、ヒト皮膚および 3 次元培養ヒト皮膚モデルのエステル結合を有する化学物質の皮膚透過性を評価した。さらに各培養皮膚モデル中のエステラーゼ活性及びエステラーゼの皮内分布について調べ、化学物質の皮膚中濃度におよぼすエステラーゼ活性や皮内分布の影響について調べた。

Figure 9 にヘアレスラット皮膚、ヒト皮膚、および EpiDerm を介した EN と NA の透過プロファイルを示す。ヘアレスラット皮膚では代謝物である NA が、ヒト皮膚や 3 次元培養ヒト皮膚モデルでは適用物である EN に透過が多く認められた。また、EpiDerm では NA の透過がほとんど認められなかった。Jeffery らは、ヒト皮膚とラット皮膚のエステラーゼ活性が異なることを報告している (Jeffery J et al., 2006)。また、Sugibayashi らはヘアレスラット皮膚と 3 次元培養ヒト皮膚モデル LSE-high のエステラーゼ活性が異なることを報告している (Sugibayashi K et al., 2004)。このことからヘアレスラット皮膚、ヒト皮膚および EpiDerm のエステラーゼ活性の違いが EN と NA の透過量に影響を及ぼすと考えられた。また、EN の 3 次元培養ヒト皮膚モデルを介した透過速度はヘアレスラット摘出皮膚およびヒト皮膚よりも著しく速かった。

このことから、ENはEpiDermに存在するエステラーゼで代謝を受けることなく透過していくと考えられた。したがって、生きた表皮・真皮中の皮膚中濃度違いの要因は、エステル結合を有する化学物質の皮膚透過性およびエステラーゼ活性の違いであると思われた。すなわち、適用物質のENではなく、代謝物のNAが刺激性を示す本体であれば、NAを生じる実皮膚では刺激性を示す可能性があるが、NAをほとんど生じない培養皮膚では皮膚刺激性が現れないと考えられる。

Table 3にヘアレスラット皮膚、ヒト皮膚および種々3次元培養ヒト皮膚モデルのエステラーゼ活性パラメータを示す。EpiDerm, LSE-high, Episkin, Vitrolife-skin および LabCyte Epimodelの K_m および V_{max} に差は認められなかったものの、それらの活性はヘアレスラットおよびヒト摘出皮膚よりも著しく低かった。 K_m は発現酵素種と関係していると考えられ、Imaiらはヒト皮膚にエステラーゼ1およびエステラーゼ2が発現していることを報告している(Imai T et al., 2006)。3次元培養ヒト皮膚モデルはヒト表皮ケラチノサイトを再構成させたものであり、摘出ヒト皮膚を同一の K_m 値を示すと思われたが本実験では K_m 値が異なっていた。ヒト皮膚での V_{max} はヘアレスラット皮膚に比べおよそ10倍低く、3次元培養ヒト皮膚モデルでは、さらに10倍低かった。そのため、3次元培養ヒト皮膚モデルでは酵素発現量が著しく低いことが考えられた。これらの結

果から、 K_m/V_{max} が著しく低い3次元培養皮膚では適用物質の代謝されにくいことが示唆された。適用した化学物質の代謝物に皮膚刺激性があるとすると、その皮膚刺激性はエステラーゼ活性に依存することとなる。本研究では培養皮膚のエステラーゼ活性が実皮膚より著しく低いことがわかった。したがって培養皮膚の低いエステラーゼ活性が偽陰性反応の原因であると示唆された。

E. 結論

化学物質の3次元培養皮膚モデルへの分配性は、各モデルにより異なり、この違いが各3次元培養ヒト皮膚モデルの透過特性に大きく影響していることがわかった。また、ヒト皮膚と良く似た透過挙動を示すEpiDermでさえ、角層のバリア能は低いことがわかった。一方、種々3次元培養ヒト皮膚モデルは実皮膚と比較して、エステラーゼ活性が著しく低いことがわかった。さらに、化学物質の培養皮膚モデル中の透過速度は、実皮膚より著しく速かった。このことから親化合物および代謝物のconcentration-distance profileが実皮膚と異なり、代謝物の皮膚中濃度が著しく低くなると考えられ、結果として代謝物の皮膚刺激性が高いものは、3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた場合偽陰性反応を示す可能性が高くなることが示唆された。

以上より、3次元培養皮膚モデルを用いた*in vitro*透過性試験を行う際には、これらモデルの特性を十分に把握する必要があると考えられた。また、3次元培養皮膚モ

デルで評価可能な化学物質の分子量や極性の範囲を把握することで、*in vitro* 透過性試験として 3 次元培養皮膚モデルが利用できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kano S., Todo H., Sugie K., Fujimoto H., Nakada K., Tokudome Y., Hashimoto F., Utilization of Reconstructed Cultured Human Skin models as an Alternative Skin for Permeation Studies of Chemical Compounds, AATEX., 15, 61-70 (2010).

2) Todo H., Kimura E., Yasuno H., Tokudome Y., Hashimoto F., Ikarashi Y., Sugibayashi K., Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through skin, Biol. Pharm. Bull., 33, 1394-1399 (2010).

2. 学会発表

1) Hiroaki Todo, Kenji Sugibayashi, Utilization of reconstructed cultures human skin models as an alternative membrane for skin permeation study of chemicals, 日本薬物動態学会 25 回年会、Saitama, 2010 年 10 月.

2) 藤堂 浩明、培養皮膚を用いた皮膚刺激性試験により false-positive/-negative を引き起こす原因について：皮膚中濃度を用いた解析、第 2 回経皮投与製剤 FG シンポジウム、神奈川、2010 年 11 月.

3) 古井 克典、藤堂 浩明、杉林 堅次、

三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験結果に及ぼす皮膚バリア機能及び代謝能の影響、第 23 回日本動物実験代替法学会、東京、2010 年 12 月.

4) 古井 克典、藤堂 浩明、杉林 堅次、三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験結果に及ぼす皮膚バリア機能及び代謝能の影響、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

Table 1 Physicochemical properties of the chemical compounds used in experiment

Drug	Abbreviation	Log K_o/w	M.W.
Antipyrine	ANP	-1.507	188
Isosorbide-5-mononitrate	ISMN	-0.151	191
Caffeine	CAF	-0.123	194
Aminopyrine	AMP	1.065	231
Isosorbide dinitrate	ISDN	1.225	236
Benzoic acid	BA	1.410	122
Flurbiprofen	FP	2.179	224

Table 2 Permeability coefficient of ISMN, ISDN and FP through each layer and the resistance to the drug permeation

Hairless rat skin						
	P_{tot} (cm/s)	P_{ved} (cm/s)	R_{sc}	R_{ved}	R_{sc}/R_{tot}	R_{ved}/R_{tot}
ISMN	1.50×10^{-7}	1.25×10^{-5}	6.65×10^6	8.01×10^4	0.988	0.012
ISDN	1.85×10^{-6}	3.79×10^{-5}	5.42×10^5	2.64×10^4	0.951	0.049
FP	1.35×10^{-5}	2.63×10^{-5}	7.41×10^4	3.80×10^4	0.486	0.514
EpiDerm						
	P_{tot} (cm/s)	P_{ved} (cm/s)	R_{sc}	R_{ved}	R_{sc}/R_{tot}	R_{ved}/R_{tot}
ISMN	1.55×10^{-7}	9.57×10^{-7}	6.46×10^6	1.05×10^6	0.838	0.162
ISDN	4.42×10^{-6}	2.18×10^{-5}	1.80×10^5	4.60×10^4	0.800	0.200
FP	3.48×10^{-6}	7.52×10^{-6}	2.87×10^5	1.33×10^5	0.537	0.463

Table 3 Enzymatic parameters for hairless rat skin, human skin and cultured human skin models

	K_m ($\mu\text{mol/mL}$)	V_{max} ($\mu\text{mol/min/mg protein}$)	V_{max}/K_m (min/mg protein)
Hairless rat skin	1.406	2.23×10^{-1}	0.158
Human skin	7.73	2.50×10^{-2}	2.65×10^{-3}
LSE-high	12.7	6.46×10^{-3}	5.10×10^{-4}
EpiDerm	12.1	1.81×10^{-3}	1.45×10^{-4}
LabCyte	14.0	1.02×10^{-3}	7.29×10^{-5}
Vitrolife-skin	12.0	1.07×10^{-3}	8.91×10^{-5}
Episkin	13.0	3.13×10^{-3}	2.40×10^{-4}

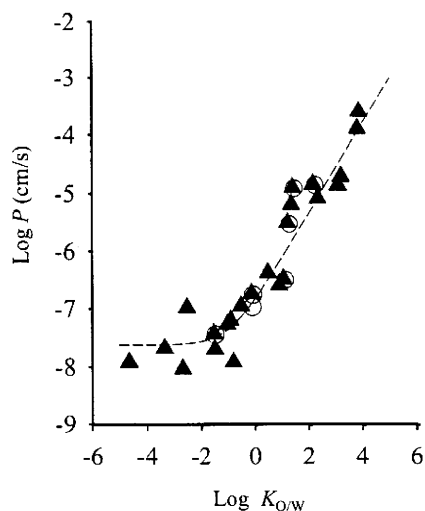


Fig. 1. Relationship between $\log P$ values in excised human cadaver skin and $\log K_{ow}$ values of chemical compounds. Semi-solid line represents the calculated value: $P_{human} \text{ (cm/s)} = 1.77 \times 10^{-7} K_{ow}^{0.780} + 2.37 \times 10^{-8}$ (Morimoto *et al.*, 1992), Symbol represents observed value. Symbols: ▲; values cited from Morimoto *et al.*, 1992, ○: values cited from Watanabe *et al.*, 2001.

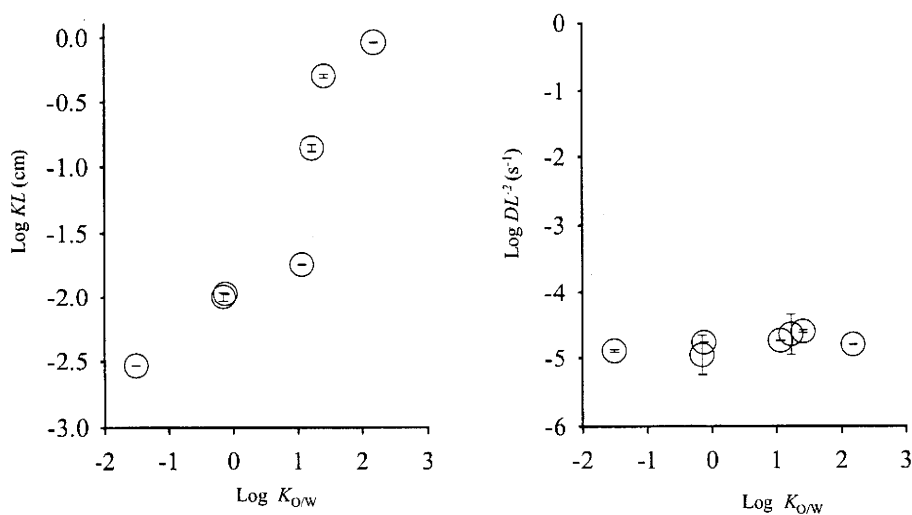


Fig. 2. Relationships between $\log KL$ (a) and $\log D/L^2$ (b) values in excised human cadaver skin and $\log K_{ow}$ values of chemical compounds. Each point represents the mean \pm S.E. (n=4-6).

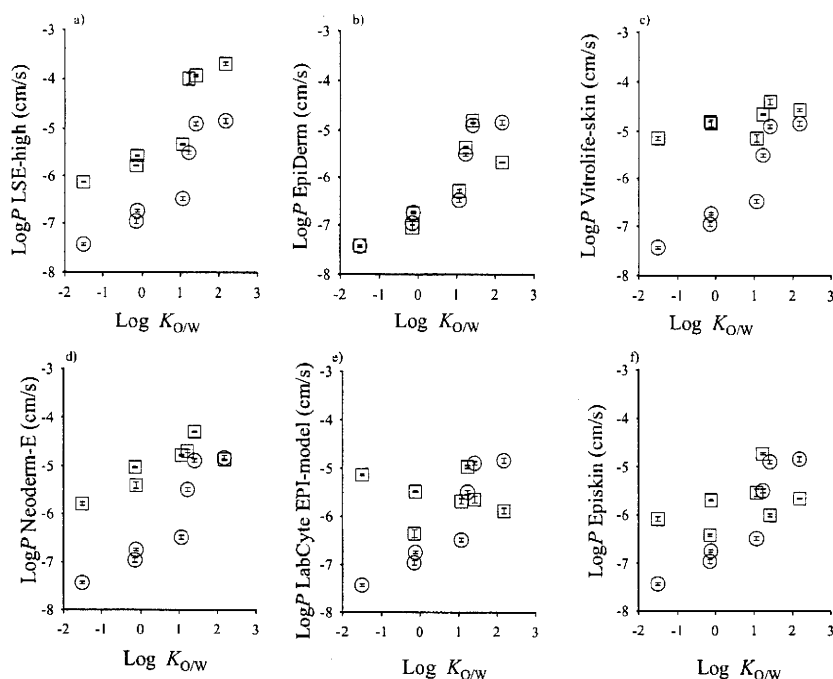


Fig. 3. Relationships between $\log P$ values in cultured skin models and $\log K_{o/w}$ values of chemical compounds. (a): LSE-high, (b): EpiDerm, (c): Vitrolife-skin, (d): Neoderm-E (e) LabCyte EPI-model and (f): Episkin. Symbols: \circ ; human skin, \square ; cultured skin model. Each point represents the mean \pm S.E. ($n=4-6$).

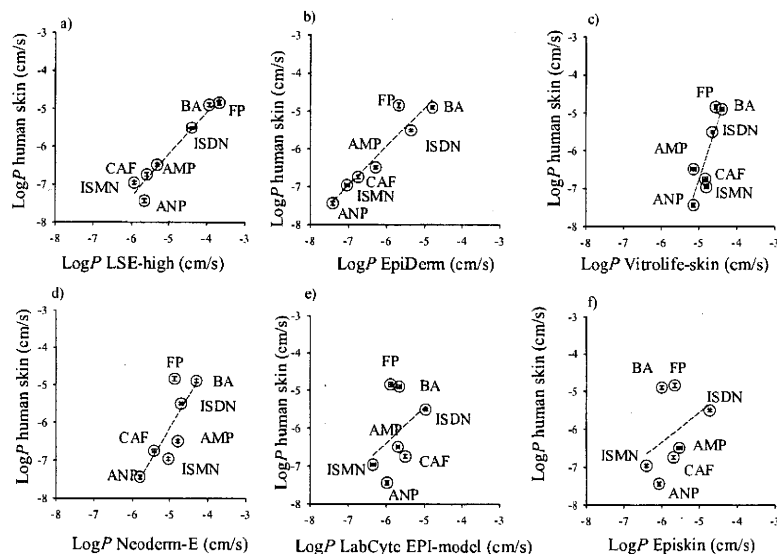


Fig. 4. Relationships between $\log P$ values in excised human cadaver skin and $\log P$ values in cultured skin models. (a): LSE-high versus excised human cadaver skin, (b): EpiDerm versus excised human cadaver skin, (c): Vitrolife-skin versus excised human cadaver skin, (d): Neoderm-E versus excised human cadaver skin, (e): LabCyte EPI-model versus excised human cadaver skin, and (f): Episkin versus excised human cadaver skin. Each point represents the mean \pm S.E. ($n=4-6$).

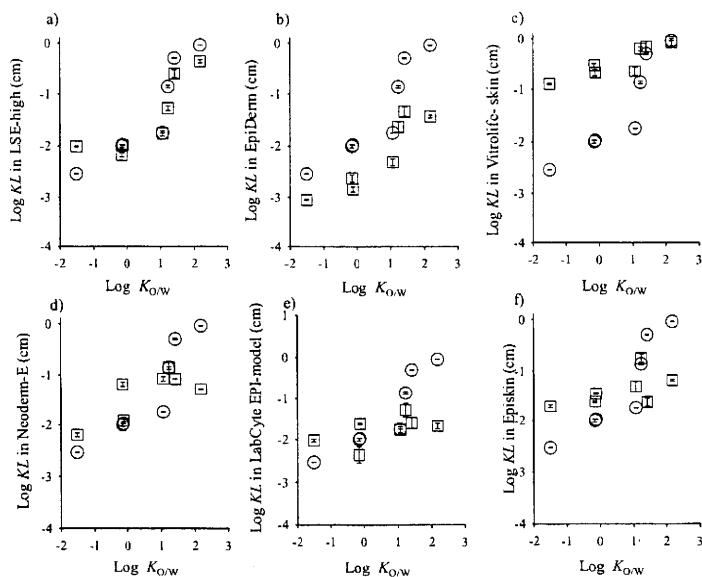


Fig. 5. Relationships between $\log K_L$ values in cultured skin models and $\log K_{O/W}$ values of chemical compounds. (a): LSE-high, (b): EpiDerm, (c): Vitrolife-skin, (d): Neoderm-E, (e): LabCyte EPI-model and (f): Episkin. Symbols: ○; human skin, □; cultured skin model. Each point represents the mean \pm S.E. (n=4-6).

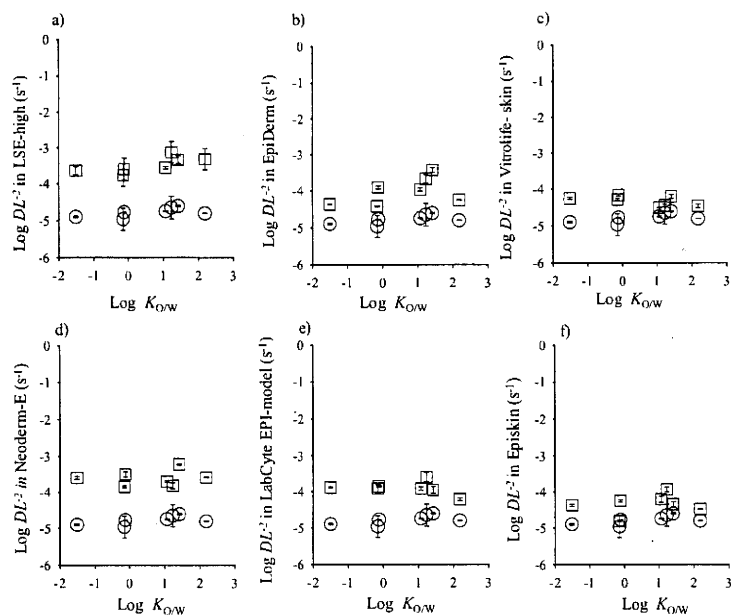


Fig. 6. Relationships between $\log DL^2$ values in cultured skin models and $\log K_{O/W}$ values of chemical compounds. (a): LSE-high, (b): EpiDerm, (c): Vitrolife-skin, (d): Neoderm-E, (e): LabCyte EPI-model and (f): Episkin. Symbols: ○; human skin, □; cultured skin model. Each point represents the mean \pm S.E. (n=4-6).

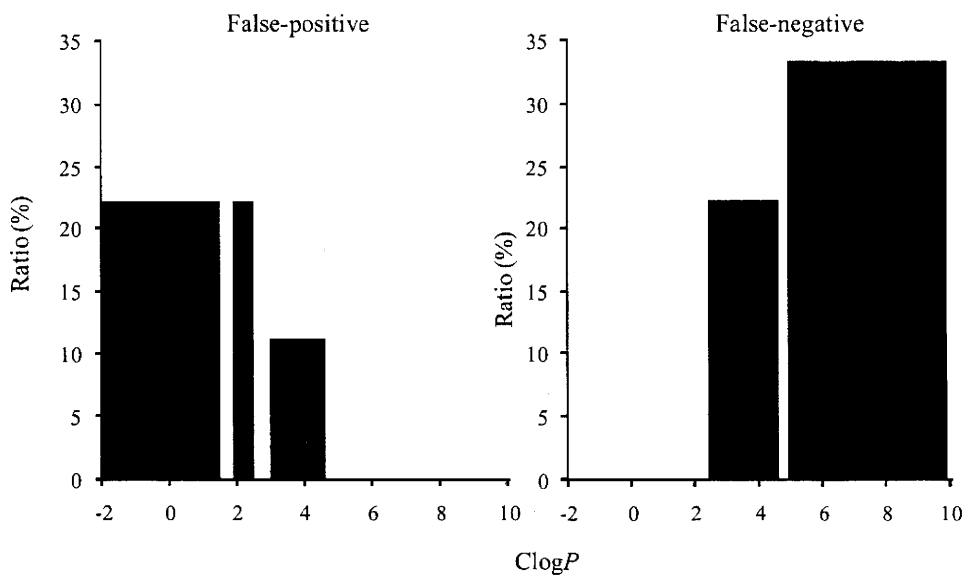


Fig. 6. Relationships between $ClogP$ of chemical compounds and false-positive or false-negative ratios.

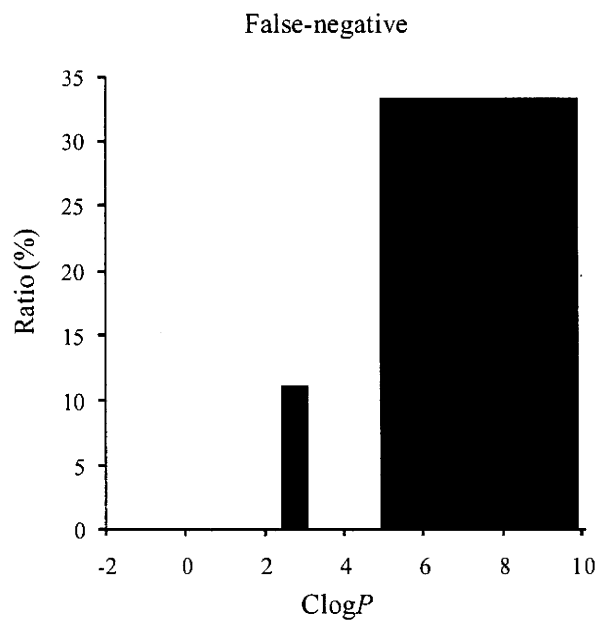


Fig. 7. Relationships between $ClogP$ of ester derivatives and false-negative ratio.