

201132026A

厚生労働科学研究費補助金  
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に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24（2012）年4月

研究代表者 小 島 肇

（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部）

## 目 次

I. 総括研究報告		
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に 関する研究 -----	小島 肇	1
II. 分担研究報告		
1. 化粧品原料の経皮吸収に関する研究 -----	杉林堅次	15
2. 分子生物学的・組織化学的手法を用いた眼刺激性試験・眼毒性試験 代替法の開発 -----	山本直樹	25
3. 光毒性・光感作性試験代替法に関する諸検討 -----	大野泰雄	51
4. 活性酸素種産生能を指標とした光毒性リスク評価方法の開発 -----	尾上誠良	55
5. 皮膚刺激性及び眼刺激性試験代替法のバリデーションに関する研究 -----	小島 肇	59
6. ヒトパッチテストの再検討と使用試験 -----	松永佳世子	69
7. 使用試験の情報管理統括に関する研究 -----	杉浦 伸一	73
8. 代替法についての国際情勢の調査 -----	杉山真理子	79
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----		113
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----		117

平成 23 年度総括研究報告書

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に関する研究  
(H22-医薬-一般-002)

研究代表者 小島 肇  
国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

化粧品・医薬部外品における安全性試験の中で、まだ代替法の開発が不十分な分野を中心に *in vitro* 試験の開発を進めた。例えば、①培養表皮または皮膚モデルを用いた皮膚透過性試験については、透過パラメータと適用物質の物理化学的性質との関係について調べた。②光毒性試験に関しては、活性酸素種産生能を指標とした試験（ROS アッセイ）のプロトコル整備を行った。③眼刺激性試験においては、遺伝子導入で得られた角膜形質発現細胞を用い、測定指標の検討及び三次元角膜再構築モデルの構築を検討した。さらに、以前、日本動物実験代替法学会でバリデーションが実施された培養表皮モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験の追加バリデーション、眼刺激性試験代替法である SIRC アッセイについてバリデーション、及び ROS アッセイのバリデーションを実施した。

一方、ヒト試験については、現在はパッチテストだけが活用されているが、欧米では汎用されている使用試験の指標について、携帯メールによる副作用情報収集システムを用いた臨床試験は有用かつ実用性があると結論した。

これらの検討に加え、欧米で開発される試験法の情報収集を入手しながら、国際協調を重視し、医薬部外品・化粧品の安全性評価に代替法を取り入れるべく検討した。

キーワード：バリデーション、眼刺激性、光毒性、使用試験

研究分担者

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所 所長）  
杉林堅次（城西大学薬学部 教授・薬学部長）  
尾上誠良（静岡県立大学薬学部 准教授）  
山本直樹（藤田保健衛生大学 講師）  
松永佳世子（藤田保健衛生大学医学部皮膚科学教授）  
杉浦伸一（名古屋大学大学院医学系研究科医療システム管理学寄附講座 准教授）  
杉山真理子（日本化粧品工業連合会・技術委員会・動物実験代替専門委員会委員長）

A. 研究目的

欧州にて、2009年より化粧品成分に対する動物実験禁止、及び化粧品の販売禁止が適用されている。さらに、2013年よりその拡大が予定されており、わが国で販売される新規化粧品や医薬部外品(薬用化粧品等)等においても、動物実験代替法（以下、代替法と記す）を用いた安全性評価に関する国際協調を急がねばならない。この状況に対応すべく、平成21年度までの厚生労働科学研究において、代替法を用いた医薬部外品の安全性評価のあり方について、皮

膚科医、毒性試験の専門家、業界代表者及び行政サイドとともに検討してきた。この検討会では、動物愛護の昨今の世界情勢を考慮に入れながら、安全性評価の質の維持を優先して議論を重ねた。その結果、①開発されている代替法（*in vitro*試験）が少ない。②OECDガイドラインや公的な機関で認証された試験法については、その適用範囲と限界を加味すれば、積極的に利用できるとの見解を明らかにした。ただし、国際的な状況を鑑み、医薬部外品の評価に必要な*in vitro*試験の開発を後押しするとともに、開発が進んでいる代替法に対処するため、本あり方検討会での継続審議が必要であると結論された。

以上のような状況を鑑み、本研究では、化粧品・医薬部外品における安全性試験の中で、まだ代替法の開発が不十分な分野を中心に *in vitro* 試験の開発を進めた。例えば、①培養表皮または皮膚モデルを用いた皮膚透過性試験については、透過パラメータと適用物質の物理化学的性質との関係について調べた。②光毒性試験に関しては、活性酸素種産生能を指標とした試験(ROS アッセイ)のプロトコル整備を行った。

③眼刺激性試験においては、遺伝子導入で得られた角膜形質発現細胞を用い、測定指標の検討及び三次元角膜再構築モデルの構築を検討した。さらに、以前、日本動物実験代替法学会でバリデーションが実施された培養表皮モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験の追加バリデーション、眼刺激性試験代替法である SIRC アッセイ、及び ROS アッセイのバリデーションを実施した。

一方、ヒト試験については、現在はパッチテストだけが活用されているが、欧米では汎用されている使用試験の指標について、携帯電話を用いた有害性情報の入手に関する適切な対処ができるシステムを検討した。

これらの検討に加え、欧米で開発される試験法の情報収集を入手しながら、国際協調を重視し、医薬部外品・化粧品の安全性評価試験法について検討した。

## B.研究方法

### B-1) 代替法開発

B-1-1) 培養表皮または皮膚モデル (3 次元培養皮膚モデル) を用いた皮膚透過性試験についての研究・開発

水溶性物質適用後の 3 次元培養ヒト皮膚モデル中薬物濃度を調べ、得られた実測値を予測値と比較した。

動物実験の 3 Rs に配慮する方法の 1 つとして、*in silico* による物質の皮膚中濃度予測法の確立が挙げられる。皮膚中濃度は透過性試験から得られた透過パラメータより予測できる。そこで、物質の物理化学的パラメータより皮膚中濃度を予測する方法を確立するために、透過パラメータと適用物質の物理化学的性質との関係について調べた。

B-1-2) ROS アッセイによる光毒性リスク評価方法に関する研究

難水溶性薬物として、8 種類の光毒性陽性物質 (amiodarone、anthracene、avobenzene、bithionol、fenofibrate、hexachlorophene、piroxicam、rosiglitazone) と 9 種類の光毒性陰性物質 (bumetizole、camphor sulfonic acid、drometrizole、octrizole、octyl methacrylate、octyl methoxycinnamate、octyl salicylate、SDS、UV-571) を選択した。ROS アッセイプロトコールに従い、被験物質 (200  $\mu\text{M}$ ) と終濃度 0.5% Tween20 を含む反応液を 96 ウェルプレートに分注して Atlas Suntest CPS series による 1 時間の擬似太陽光照射後 (ca. 2.0  $\text{mW}/\text{cm}^2$ )、ROS (Singlet oxygen と Superoxide) の産生量をそれぞれ測定した。実験は 3 回繰り返す、各化

合物の光毒性リスクを評価した。

B-1-3) 分子生物学的・組織科学的手法を用いた眼刺激性試験・眼毒性試験代替法の開発

1) 正常角膜上皮培養細胞、iHCE-NY 細胞、nHCE-T を用いてマイクロアレイによる遺伝子解析を行った。

2) マイクロアレイによる遺伝子解析結果を基に、iHCE-NY 細胞の二次元培養モデルを用いて、細胞に与える影響を検出できる高感度 (被験物質が MTT 法や CV 法より低濃度) な指標 (遺伝子マーカー) を選出した。

3) 2 種類の不死化角膜上皮細胞 (iHCE-NY、nHCE-T) を用いて、再現性が高く、安定して三次元角膜再構築モデルが作製できる培養方法を検討した。

### B-2) バリデーション

B-2-1) 培養表皮モデル (LabCyte) を用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験の追加バリデーション

1) バリデーション実行委員会

委員長：小島 肇 (国立衛研)、

委員：加藤雅一 (J-TEC)

2) 参加施設

① 山口 能宏、中村 牧 (小林製薬株式会社)

② 篠田 伸介、萩原 沙織 (薬物安全性試験センター)

③ 笠原 利彦、芝井 亜弥 (富士フイルム株式会社)

3) トレーニング

2011年6月10日にJ-TEC株式会社にて、改定 SOP (標準作業手順書) を用いた技術指導が J-TEC 研究員によりなされた。

4) 実施期間

検討は2011年8月～9月の間に実施された。

5) 使用モデル

LabCyte EPI-MODEL24は、ヒト表皮細胞を用いて培養された3次元培養表皮モデルである。

ヒト表皮細胞を培養増殖させた後、気液層界面で培養して、角質層を形成させて、ヒト表皮組織に類似した組織構造を再現している。

6) 改定 SOP の概要

本研究は、昨年度のバリデーションで用いた SOP ver.8.2 の洗浄方法を明確化した SOP ver.8.3 を用いて実施した。被験物質をモデルに 15 分間処理した後、42 時間後培養を行い、MTT アッセイで細胞生存率を求めた。50% 細胞毒性を基準に陰陽性の判定を実施した。SOP の主な改定点を表 1 に示す。被験物質除去の際に、PBS (リン酸緩衝液) を多量に用いることは主な改定点である。

7) 被験物質

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Methodの<sup>10)</sup> performance standardに記載されている20物質のうち、昨年度のバリデーションでばらつきの大きかった5被験物質を含む6物質をコード化して参加3施設に配布し(表2参照)、改定SOPを用いたバリデーションを実施した。

表2に示すように、コード化された6被験物質は、昨年度のバリデーションにおいて、SD $\geq$ 18%となり、逸脱が多数発生した5被験物質、及び performance standardに記載されているものの、昨年度バリデーションにおいて試験されなかった被験物質tetrachloroethylene である。

表1. SOPの改定点

洗浄方法の明確化	SOP ver. 8.2	SOPver. 8.3
1. 被験物質の除去	明記せず。	洗浄直前にインサートを傾けて廃棄する。
2. 洗浄量	明記せず。	大量のPBSを用いて、インサート容量以上の大量のPBSを用いて洗浄する。
3. 洗浄回数	10回以上、できる限り洗浄する。	15回以上、できる限り洗浄する。
4. 各洗浄後のタッピング	明記せず。	一回行う。
5. 最終洗浄後のタッピング	明記せず。	行わない。

表2. 使用された被験物質及び逸脱数

No.	物質名	SD $\geq$ 18%となったデータ数(逸脱数)			
		Lab a	Lab b	Lab c	合計
2	diethyl phthalate	0/3	1/4	1/4	2/11
4	allyl phenoxy-acetate	1/4	1/4	0/3	2/11
5	isopropanol	0/3	1/4	2/5	3/12
13	1-bromohexane	1/4	2/5	0/3	3/12
15	di-n-propyl disulphide	0/3	3/5	0/3	3/11

## B-2-2) SIRCアッセイのバリデーション

### 1)バリデーション実行委員会

委員長：簾内桃子(国立衛研)

委員：萩野滋延(資生堂)、大森 崇(同志社大学)、山影康次(食薬センター秦野研究所)、小島肇(国立衛研)及び代替法国際協調会議(ICATM)の代表者

### 2)参加施設

①福田隆之(株ボゾリサーチセンター)

②池田 英史(日本コルマー株式会社)

③韓 美珍(バイオトクステック)

### 3) トレーニング

2011年11月10日に仙台にて、ビデオを用いた技術指導が萩野委員によりなされた。

### 4)の実施期間

検討は2012年1月～3月の間に実施された。

### 5)試験法

SIRCアッセイは被験物質の72時間処理後において、Crystal violetが生細胞の細胞膜に入り込んで染色する性質を利用した方法で生細胞のみを測定する。Crystal violet染色法は多くの細胞に適用でき、得られる結果も比較的安定しているため、細胞毒性の簡易試験法として用いられている。また、操作が簡便で、標本の資料保管が可能であることは本試験法の優位性を示すものである。参照物質としてtriethanolamineを用い、その細胞毒性と比較してIC50値が3回の結果の多数決により小さい場合に、その物質は眼刺激性物質と判定される。

### 6)被験物質

コード化されていない4被験物質を用い、施設のトレーニングにあたるtransfeabilityを確認する目的でphase Iが実施された。

## B-2-3)ROSアッセイのバリデーション

日本動物実験代替法検証センター(JaCVAM)主催のバリデーション運営委員会(VMT)の下、ROS アッセイ プロトコルを確立した。Dr. Manfred Liebsch (International Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments、ZEBET)、Europe Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)、Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM)、and Korean Center for the Validation of Alternative Methods (KoCVAM)の協力の下、VMT 主導で化合物選択を実施し、最終的に2種の標準物質、23種の光毒性陽性化合物ならびに19種の光毒性陰性化合物を選定した。バリデーションには田辺三菱製薬株式会社(Lab#1)、(財)食品薬品安全センター(Lab#2)、静岡県立大学薬学部(Lab#3)が参加し、GLPの精神ののっとして各種検討を実施した。ROS アッセイプ

ロトコルに従い、コード化された 42 種類の被験物質 (200  $\mu\text{M}$ ) を含む反応液を 96 ウェルプレートに分注して Atlas Suntest CPS series による 1 時間の擬似太陽光照射後 (ca. 2.0  $\text{mW}/\text{cm}^2$ )、ROS (Singlet oxygen と Superoxide) の産生量をそれぞれ測定した。実験は 3 回繰り返し、各化合物の光毒性リスクを評価した。

### B-3) ヒトパッチテストの再検討と使用試験

#### B-3-1) 携帯メールによる副作用等情報収集システムを用いた臨床試験

##### 1) 試験名

*In vivo* 共焦点レーザー顕微鏡を用いた R1110 の色素沈着症に対する効果の検討

##### 2) 試験デザイン

肝斑：単盲検 (被験者盲検) 基剤対照左右比較試験、日光黒子：オープン試験 (対照設定なし)

##### 3) 投与製剤

- ・R1110 (ハイドロキノン 4% 含有する美容液)
- ・プラセボ (R1110 からハイドロキノンを除いた製剤)

##### 4) 投与期間と方法

12 週間、1 日 2 回、朝・夕 疾患部位のみに塗布、朝使用時には日焼け止め製品を併用

##### 5) 対象・症例数

対象： 日光黒子または肝斑を顔面に有する者 (女性)

症例数： 10 例 (肝斑 6 例、日光黒子 4 例)

##### 6) 被験者

被験者募集会社パネルより募集。研究担当医師による適格性を診断後、組入れ。

##### 7) 実施施設

藤田保健衛生大学病院、皮膚科外来

##### 8) 研究責任者

松永佳世子教授

##### 9) 分担研究者

秋田浩孝准教授

##### 10) 実施期間

疫学・臨床研究倫理審査委員会承認：2011 年 3 月 17 日、臨床試験登録：2011 年 4 月 13 日、使用期間：2011 年 4 月 13 日～2011 年 7 月 20 日のうち 12 週間

評価は 0、4、8、12 週の 4 回 (肝斑 2 グループ、日光黒子 1 グループ)、14 時～17 時頃実施

##### 11) 評価項目

- ・共焦点レーザー顕微鏡による撮影
- ・ダーモスコピーによる皮膚診断
- ・スキントーンカラースケールによる判定

- ・皮膚所見 (安全性評価)
- ・メグザメーター、色差計による測定
- ・VISIA による評価

#### 12) 患者管理

患者様 Web 日誌

#### B-3-2) 携帯電話を利用した使用試験安全管理システム

インターネットを用いて副作用情報を収集するために必要な要素として、セキュリティ、アクセサビリティ及び操作性の観点から評価する必要がある。また、これらの要求事項に適合する具体的なシステムとして①新規プログラムを構築する方法、②既存のサービスを利用する方法及び③既存の web アプリケーション上にプログラムを構築する方法がある。①については汎用性が乏しく開発コストが莫大になる。また②については、様々な状況に対応できるサービスが提供されていない。したがって本研究では、クラウドコンピュータ上に提供されている web アプリケーションを用いた副作用情報収集サイトについて検討した。

現在提供されている web アプリケーションは Google 社による Google Apps と Microsoft 社により提供される Office365 が利用可能である。

今回我々は、これらの両システムを用いて、副作用情報入力サイトを構築し、化粧品及び医薬部外品の副作用症例の収集方法についてアクセサビリティ、セキュリティ及び操作性の観点から評価した。

#### B-4) 国際情勢

情報収集は、過去の本研究による経験から、いくつかのホームページ (SCCS、OECD、ECVAM、ICCVAM、EPAA など) を定期的に検索すると共に EU については同地域の化粧品工業会である欧州化粧品工業会 (COLIPA)、米国については米国化粧品工業会 (Personal Care Products Council ; PCPC、旧称 CTFA : Cosmetic、Toiletry and Fragrance Association) との連繋を通じて実施した。この他、代替法の承認状況等については、専門学会の会誌やニュースレターも参考とした。

(倫理面への配慮)

倫理的な問題が生じる実験を実施しておらず、特に配慮すべき問題はない。

#### C. 研究結果

##### C-1) 代替法開発

C-1-1) 3 次元培養皮膚モデルを用いた皮膚透過性試験について研究・開発

培養皮膚中濃度が水溶性及び脂溶性物質にも

かかわらず高値を示したことから、3次元培養皮膚モデルを用いて安全性や有効性を評価する場合には、注意が必要であると考えられた。

各透過パラメータを適用物質の物理化学的特性より予測できれば、物質の安全性及び有効性評価の予測に非常に有用な手段となりうると考えられた。生きた表皮・真皮中の薬物濃度は薬物の物理化学的性質から予測できる可能性が示唆された。

#### C-1-2) ROSアッセイによる光毒性リスク評価方法に関する研究

被験物質 17 種類のうち、15 化合物が 0.5% Tween 20 ミセル溶液に溶解することを確認し、本化合物群については 200 $\mu$ M の濃度で ROS アッセイ を実施した。溶解しなかった anthracene と UV-571 については同ミセル溶液で希釈を検討したところ、anthracene は 50  $\mu$ M に、そして UC-571 は 100 $\mu$ M で完全溶解を確認し、これらの濃度で ROS アッセイ を実施することとした。2.0 mW/m<sup>2</sup> の照射強度で擬似太陽光を照射した際、光毒性陽性標準物質である quinine からは singlet oxygen ( $\Delta A_{440\text{ nm}} \cdot 10^3$ : 486 $\pm$ 15) と superoxide ( $\Delta A_{560\text{ nm}} \cdot 10^3$ : 286 $\pm$ 3) の産生を認め、一方、光毒性陰性標準物質である sulisobenzone からは ROS の産生を検出できなかった。これらの傾向は、20 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) で ROS アッセイ を行った際の結果とほぼ同様であり、quinine の ROS data {singlet oxygen ( $\Delta A_{440\text{ nm}} \cdot 10^3$ : 442 $\pm$ 68); superoxide ( $\Delta A_{560\text{ nm}} \cdot 10^3$ : 330 $\pm$ 566)}は非常に良い対応を示した。以前求めた criteria を用いて各化合物の光毒性リスクをそれぞれ評価したところ、光毒性陽性化合物はすべて陽性と識別され、また、光毒性化合物はいずれも criteria 以下の ROS 産生に留まった。ミセルを利用した新しい ROS アッセイ は難水溶性化合物の光毒性リスク評価において有用であると考えられる。

#### C-1-3) 分子生物学的・組織科学的手法を用いた眼刺激性試験・眼毒性試験代替法の開発

- 1) iHCE-NYは不死化によって細胞増殖に関与する遺伝子群の発現が亢進しており、正常角膜上皮細胞に発現する遺伝子の過剰発現は観察されなかった。
- 2) 二次元培養におけるiHCE-NYを用いた曝露実験のプロトコルを確立した。
- 3) SLSやEtOHを用いた曝露実験を行い、細胞毒性試験よりも高感度で細胞に対する影響を検出できる3遺伝子(cyclin-D1、snail-1、keratin-3)を決定した。
- 4) 細胞毒性試験におけるIC50値は、サンプル

から回収されたtotal-RNAの濃度に相関した。

- 5) iHCE-NY及びnHCE-Tを用いて、既製品の三次元角膜再構築モデルと比較すると安価で、簡便な三次元角膜再構築モデルを再現性よく確立することができた。
- 6) 三次元角膜再構築モデルの標本作製法を確立した。

#### C-2)バリデーション

##### C-2-1)培養表皮モデル (LabCyte) を用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験の追加バリデーション

表2に示すように、SD  $\geq$  18%となったデータ数(逸脱数)は、昨年のバリデーションでは5物質において15データ/56データも存在したが、洗浄法の改良により、同物質数で1データ/46データに激減した。被験物質の洗浄法変更に伴い、著しくバラツキが少なくなり、データの安定性が改良された。また、di-n-propyl disulphideを除く5被験物質の判定結果も、全施設で一一致した。tetrachloroethyleneは、全試験で刺激性物質と判定された。

##### C-2-2) SIRCアッセイのバリデーション

phase I バリデーションの結果、Lab Cの習熟度がまだ低く、参照物質であるtriethanolamine、C03、C04の結果が他の施設と比較してばらついていて結果として、C04 Sodium dehydroacetateの結果が他の参加施設の結果と食い違った。

そこで、LabCには実験を繰り返すように依頼した。その結果、再試験により、Lab C(追加)の結果が他の参加施設と同様になった。

##### C-2-3)ROS アッセイのバリデーション

Atlas 社製の solar simulator を用いた 3 施設では、光毒性陽性標準物質である quinine に注目すると、singlet oxygen の変動係数 (CV) は 1.5–2.1% の範囲であり、また superoxide の CV は 2.6–7.4% 程であった。一方、光毒性陰性標準物質である sulisobenzone からの ROS 産生は極めて小さいか、検出不能であった。施設間の再現性については、quinine の singlet oxygen で CV が 15.4% であり、superoxide では 17.0%すなわち、本結果から ROS アッセイ結果の日内・日間変動は小さく、良好な施設間再現性を示した。また、選定した 42 化合物の被験物質についても各施設で併せて ROS アッセイ を実施したところ、難溶性のため評価不能であった被験物質を除くと、光毒性物質の陽性検出率は全施設とも 100% であった。なお、42 化合物のうち、200  $\mu$ M での評価が可能であったのは 25–28 化合物であり、約 4 割の被験物質は希釈を余儀なくされた。また、rose bengal は

559 nm 付近に極大吸収 (90、400 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) を持つため、superoxide の測定は不可能であった。光毒性陰性物質の陰性検出率は、施設により 42–82% と異なるものの、いずれの施設においても偽陰性予測を認めず、初期スクリーニング法としての有用性が示唆された。

### C-3) ヒトパッチテストの再検討と使用試験

#### C-3-1) 携帯メールによる副作用等情報収集システムを用いた臨床試験

- 1) 期間及び人数：2011年6月22日～2011年7月20日、携帯6名・PC4名で運用
- 2) 回答率：91.5% (194/212)
- 3) 試験品使用(朝)：90.6% (192/212)
- 4) 日焼け止め使用：86.8% (184/212)
- 5) 試験品(夜)：89.6% (190/212)
- 6) 紫外線暴露の有無：44.3% (94/212)
- 7) 肌トラブル(自覚)の有無：5.2% (11/212)  
かゆみ：0件  
刺激感(ひりひり・チクチク)：0件  
赤み：11件  
皮膚にブツブツある：4件  
上記の赤み及び皮膚にブツブツがあると回答(延べ15件)した患者は同一の症例 (No.1) であり、プラセボ塗布部 (左) での症状であり、8週目及び12週目の医師による問診では異常がなかった。この症例以外に、かゆみや刺激感を伴い、赤みや皮疹のある症例はなかった。リマインドメールの送付されるレベルの有害事象は R1110塗布により起きなかった。
- 8) 日誌回答忘れについては、No.2：2回、No.6：1回、No.9：2回、No.10：7回の延べ12回 (5.7%) であり、特定の症例で日誌忘れが生じた。

#### C-3-2) 携帯電話を利用した使用試験安全管理システム

##### 1) アクセサビリティ

Google Apps と Office365 とともにクラウドコンピュータ上で提供されるアプリケーションソフトウェアを用いてシステムを構築した。作成したサイトへの侵入は、ID 及びパスワードが必要であり、アクセサビリティに関して両者に差はなかった。

Google Apps ではサイトの ID 及びパスワードは g-メールアドレスを用いている。一方、Office365 の ID 及びパスワードは有料の専用アドレスを用いて、閲覧者にはホットメールといわれるフリーメールアドレスを提供することで利用可能であった。

##### 2) 操作性

Office 365 によるサイトの作成では、手書きの書類のイメージで入力フォームを作成できるた

め、サイト内のスペースを有効に活用した画面構成を設定することができた。副作用報告など、入力項目が多い場合、視覚的にも利用者に理解されやすかった。一方、Google Apps によるサイトの作成では、入力項目を並行して配置できないため、入力項目を縦一列に配置する必要があった。また、入力情報の修正を行う場合、Google Apps では入力した内容をそのまま修正することはできなかった。そのため入力内容を自分宛にメール送信し、その画面から修正入力する必要があった。一方、Office 365 の場合では、入力した情報は 1 被験者 1 ファイルとしてライブラリに保存されているため、そのライブラリを呼び出すことで入力者自身が容易に修正することが可能であった。

##### 3) 自動集計機能 (グラフ化など)

Office 365 においては目的に応じて抽出した内容をグラフ化することができた。Google Apps においても予め規定された集計フォームのみをグラフ化することができたが、設定が複雑で利用者が容易に表示グラフを作ることが困難であった。

##### 4) セキュリティ (写真のアップロードなど)

Google Apps を利用した場合、見かけ上、作成したサイトで画像のアップロードを行うことはできるが、画像は Google 社のファイル管理サイト：Picasa (<http://picasa.google.com/>) に保存される設定となっている。一方で Office 365 では、サイトの同一領域内に情報が保存されるため、他の者が閲覧することは不可能である。

Google Apps 及び Office365 のいずれについてもクラウド上の web アプリケーションを用いているため、外部からのウイルス侵入等に対するセキュリティは確保されている。しかし、Google Apps は無料で公開されているサービスが多い反面、システム側の要求事項にしばられるため、Picasa 等の写真のアップローダーを用いる必要がある。操作ミスにより、画像を流出させる危険性が示唆差された。

両システムは操作機器に情報を残さない為、機器の盗難によりデータが流出するリスクは少なかった。

### C-4) 情報収集

#### C-4-1) EU における動物実験禁止と代替法開発の動向

2009年3月11日に化粧品指令第7次改正が施行され、また、反復投与毒性、生殖毒性、毒物動態以外の動物実験を実施した原料を配合した化粧品の EU 域内での販売が禁止されたことから、EU においては代替法開発が一層緊急性を帯びてきた。



2011年9月に欧州委員会から出された欧州議会・閣僚理事会の報告では、2013年禁止の3項目(反復投与毒性、生殖毒性、薬物動態)については2013年までに完全代替不可であることが指摘されている。欧州委員会FP7の下で2011年1月から開始された共同研究プログラム Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing (SEURAT)-1は動物実験の代替法、特に反復投与毒性、の開発を促進することを目的としている。これらは化粧品評価だけでなくREACHへの対応のためでもある。今後ますます代替法開発と活用が促進されるものと考えられる。

#### C-4-2) 米国における代替法開発の動向

(A)連邦機関は ICCVAM が推奨する *in vitro* 眼刺激性試験法、及び *in vivo* 試験における局所麻酔、全身性鎮痛剤の常用と人道的観点に関して合意の回答を公表した。

(B)ICCVAM が米国連邦有害性物質法における眼刺激性/腐食性に用いる動物数低減のための推奨案を告示した。

(C)NICEATM がヒトアレルギー性接触皮膚炎誘発性化学物質分類のための LLNA の利用性と限界に関して報告及び推奨した。

(D)ICCVAM の第三者科学専門家委員会が内分泌攪乱物質を同定するための新規試験法に関するピアレビューの報告書を公開した。

(E)ICCVAM が推奨した LLNA:DA 及び LLNA:BrdU-ELISA の活用を連邦機関が受け入れ、もしくは支持した。

(F)NICEATM と ICCVAM のワークショップ「レギュラトリー安全性試験の最善策」が開催された。

また、5ヵ年計画(2008年~2012年)の更新に向けて NICEATM と ICCVAM が2011年11月に意見の募集を行っており、2013年~2017年の5ヵ年計画に向けた動向にも今後注視していく。

#### C-4-3) アジア(国外)における代替法開発の動向

中国では2011年4月11日及び12日に、北京工商大学の主催により、北京において中国動物実験代替法フォーラムが開催された。中国の SFDA は、動物愛護の観点から代替法に関する各国の検討及び導入状況を把握しようと動いている。

韓国では、KoCVAM が2011年に、ICATM に加わり、新しい動物試験代替法の国際的な検証研究と専門家による評価報告書の作成、及びガイドラインの開発等を推進することになった。

#### C-4-4) その他の国際的な代替法開発の動向

OECD の安全性試験ガイドラインにおける新

規試験法として、TG 443 拡張1世代生殖毒性試験、TG 456 H295R ステロイド合成アッセイ及び TG 488 トランスジェニックげっ歯類体細胞及び胚細胞遺伝子変異アッセイの3法が採択された。また、2種の新規試験法ドラフトガイドライン及び4種の改訂試験法ガイドラインが、受け入れのための意見募集の段階にある。OECD では安全性試験のテストガイドライン策定、新規試験法あるいは改訂試験法における代替法採択の動向からも、動物愛護に対する積極的な取り組みが伺える。

ICCR のトピックスとしては、ICCR-5 が開催され、昨年同様動物実験代替法に関する議論がなされた。今回は新たに、参加団体間の議論を活発なものとするためにオープンセッションが開催され、各種トピック等の ICCR における議論プロセスが情報提供された。

ICATM では2009年に署名された協力覚書の修正が行われ、韓国の加盟が認められた。毒性学会大会においては、ICATM の概説や各組織から ICATM への貢献と今後の計画についてのセッションが生まれ、バリデーショナル研究の推進や専門家による第三者評価を国際的に実施している状況や、動物実験代替法の行政への受け入れを加速するための活動が報告された。

ICH においては、新薬承認審査の基準を国際的に統一し、各種試験や提出書類などのガイドラインの標準化や改訂作業が進められている。これらガイドラインの改定においては、動物福祉・愛護(3R)の観点についても重視されている。ガイドラインの最終合意に向けて進行している遺伝毒性試験[S2]及びバイオ医薬品の安全性試験[S6]においても使用動物数の削減に向けた具体的内容が記載されており、早期の標準化を期待したい。

#### C-4-5) 日本における代替法開発の動向

平成23年2月4日に厚労省から事務連絡「医薬部外品の承認申請資料作成時における動物実験代替法の利用と JaVCAM の活用について」が通知されたことを受けて JaVCAM において行政試験法としての代替法受け入れに配慮した評価法提案のために「ガイダンス検討会」が組織された。毒性試験代替法(3T3 NRU PT)や感受性試験代替法(LLNA)についてガイダンス案が作成された。また、*in vitro* を補完する位置づけとして *in silico* による評価を議論する目的で「*in silico* ワーキンググループ」が粧工連動物実験代替専門委員会内に設立され、今後新たな評価手法の開発が望まれる。

## D. 考察

### D-1)試験法の開発・バリデーション

3次元培養ヒト皮膚モデルに適用した物質の皮膚中濃度はヘアレスラット皮膚と比べて高値となることが分かった。この結果より、3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた有効性や安全性の結果は、動物やヒトを用いた試験結果と異なる結果が得られる可能性が示唆された。またこの結果は、水溶性物質で false-positive が3次元培養ヒト皮膚モデルで認められる結果を支持していると考えられた。

皮膚透過パラメータを用いて予測した皮膚中濃度は実測値に近い値を示したことから、皮膚透過パラメータは、物質の皮膚中濃度を予測する手段となりうると考えられた。さらに、物質の油水分配係数より適用物質の皮膚透過パラメータを算出できる可能性が示唆された。今後、物理化学的性質と皮膚透過パラメータについてより詳細な検討を行うことで、適用物質の生きた表皮・真皮中濃度を予測することも可能になると考えられた。

二次元培養におけるiHCE-NYを用いた眼刺激性試験代替法のプロトコルを確立し、SLSやEtOHを用いた曝露実験を行い、細胞毒性試験よりも高感度で細胞に対する影響を検出できる3遺伝子(cyclin-D1、snail-1、keratin-3)を決定した。また、iHCE-NY及びnHCE-Tを用いて、既製品の三次元角膜再構築モデルと比較すると安価で、簡便な三次元角膜再構築モデルを再現性よく確立することができた。

ROSアッセイは、難溶性物質の評価は困難であるものの、*in vitro/in vivo* 光毒性試験の必要性を判断するスクリーニング系の一つとして有用であることをバリデーションで確認中である。現在、使用する光照射装置の種類を増やして、アッセイ系の汎用性についての比較検討を推進している。改良検討中のROSアッセイは、難溶性物質の評価に有用であり、これまでにROSアッセイで評価が困難であった化合物の光毒性リスク評価を可能にするものと期待できる。

培養表皮モデルLabCyteを用いた皮膚刺激性試験において、ばらつきによる逸脱を少なくする洗浄法の改良を行った。LabCyteのOECDテストガイドライン収載に向け、有用な改定となった。

### D-2)使用試験

携帯電話を用いた副作用情報収集システムを用いた臨床試験では、携帯通信費が定額であるかどうか、携帯操作に慣れているかどうかなど、本システム運用の課題と考えられた。試験依頼者が個人情報にアクセスせずに、試験

品の使用状況や安全に使用されているのかを認知することができるため、医師と患者、更に依頼者とのコミュニケーションがスムーズにできると考えられる。モニタリングの規模(数十名～数百名)に応じて、運用にかかる費用が変動するため、試験期間や試験規模を考慮に入れて本システムを採用することが肝要と考えられる。

### D-3)情報収集

本年度の代替法の開発と評価に関する進展を概観すると、化粧品業界への影響の観点では、動物実験を行った原料を配合する化粧品の販売が2013年にEUで禁止される予定の3試験項目(反復投与毒性、生殖毒性、薬物動態)について、禁止時期を延期するか否かの検討が行われたことである。予定されていた2011年内には、最終結論は公表されなかった。

国際協力の観点では、2011年3月に韓国が代替試験法協力国際会議(ICATM)へ加わった。代替法の検証研究、評価、ガイドラインの開発等について更なる国際協力が期待される。

代替法開発の観点では、EUにおいて反復投与毒性の開発の促進をめざした巨大プロジェクトSEURAT-1が開始された。開発の潮流は、2013年に禁止される難易度の高い試験の代替へと移ってきている。日本においては、*in vitro* を補完する位置づけとして *in silico* による評価を議論する目的で「*in silico* ワーキンググループ」が粧工連の動物実験代替専門委員会内に設立された。

行政的な受け入れの観点からは、日本において、2011年2月4日に厚労省から事務連絡「医薬部外品の承認申請資料作成時における動物実験代替法の利用とJaVCAMの活用について」が通知されたことを受けて、JaCVAMにおいて行政試験法としての代替法受け入れに配慮した評価法提案のために「ガイダンス検討会」が組織されたことが挙げられる。光毒性試験代替法(3T3 NRU PT)や感作性試験代替法(LLNA)についてガイダンス案が作成された。

代替法の開発と評価は、非常に長い年月を要するためガイドラインとして文書化された場合は別として、単年度では明確にその全貌を捉えることは困難である。したがって、本邦における代替法の開発と評価を推進し、さらには今後の国際協調への参考情報とするためには、関連する国際情勢の調査と解析を継続して実施し、積み重ねていく必要があると考える。

## E. 結論

1)3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた有効性や安全性の結果は、動物やヒトを用いた皮膚透

過性試験と異なる結果が得られる可能性が示唆された。皮膚透過パラメータは、物質の皮膚中濃度を予測する手段となりうると考えられた。

- 2) 眼刺激性試験代替法として、iHCE-NY及びnHCE-Tを用いれば、既製品の三次元角膜再構築モデルと比較すると安価で、簡便な三次元角膜再構築モデルを再現性よく確立することができた。
- 3) ROSアッセイは、難溶性物質の評価は困難であるものの、*in vitro/in vivo* 光毒性試験の必要性を判断するスクリーニング系の一つとして有用であることをバリデーションで確認している。
- 4) 培養表皮モデルLabCyteを用いた*in vitro*皮膚刺激性試験において、ばらつきによる逸脱を少なくする洗浄法の改良を行った。LabCyteのOECDテストガイドライン収載に向け、有用な改定となった。
- 5) 携帯メールによる副作用情報収集システムを用いた臨床試験は有用かつ実用性があると結論した。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) Kano, S., Todo, H., Furui, K., Sugie, K., Tokudome, Y., Hashimoto, F., Kojima, H., Sugibayashi, K.: Comparison of Several Reconstructed Cultured Human Skin Models by Microscopic Observation: Their Usefulness as an Alternative Membrane for Skin in Drug Permeation Experiments, *Altern. Animal Test. Experiment*, 16(2): 51-58 (2011)
- 2) 藤堂浩明: 第11章 経皮吸収性・透過性試験の) 実験手法、最新 動物実験代替法の技法ノウハウ、p245-259、(株)技術情報協会、2011年
- 3) 藤堂浩明、杉林堅次: 第3章、3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた試験とその有用性、p58-66、シーエムシー出版、2011年
- 4) 小島肇夫: 動物実験代替法における国際協調、日薬理誌、138、103-107 (2011)
- 5) 小島肇夫: 経皮吸収と安全性、次世代経皮吸収型製剤の開発と応用、pp.157-164、シーエムシー出版、東京 (2011)
- 6) 小島肇夫: 監修および序章、動物実験代替法と動物実験の住み分け、pp.3-9、第1章第2節 日本における各種承認申請に必要な安全性試験と代替法の受理の現状、pp.19-23、第1章第3節 REACH.GHSなどの各種規制

との違い、pp.24-29、第2章 皮膚腐食性試験の実験手法、pp.33-43、第4章 眼刺激性試験代替法の実験手法、pp.71-87、最新 動物実験代替法の技法ノウハウ、技術情報協会、東京 (2011)

- 7) 小島肇夫: 第8回国際動物実験代替法会議参加記、COSME TECH JAPAN,1 (5) : 29-33 (2011)
- 8) 小島肇夫: 技術講座 安全性評価試験 (1)、COSME TECH JAPAN,1 (6) : 10-13 (2011)
- 9) Pfulher S, Fellows M, van Benthem J, Corvi R, Curren R, Dearfield K, Fowler P, Frötschl R, Elhajouji A, Le Hégarat L, Kasamatsu T, Kojima H, Ouédraogo G, Scott A, Speit G: In vitro genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop, *Mutat. Res.*, 723(2):101-7 (2011)
- 10) 小島肇夫: 技術講座 安全性評価試験 (2)、COSME TECH JAPAN,1 (7) : 18-22 (2011)
- 11) 小島肇夫: 技術講座 安全性評価試験 (3)、COSME TECH JAPAN, 2(1) : 73-77(2012)
- 12) 小島肇夫: 技術講座 安全性評価試験 (4)、COSME TECH JAPAN, 2(2) : 65-69(2012)
- 13) 小島肇夫: 技術講座 安全性評価試験 (5)、COSME TECH JAPAN, 2(3) : 44-49 (2012)
- 14) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. : Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim.*, 40, 33-50 (2012)
- 15) Satomi Onoue, Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Ryo Inoue, Hideyuki Ito, Tsutomu Hatano, Shizuo Yamada: In vitro photochemical and phototoxicological characterization of major constituents in St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts. *Phytochemistry*, 72, 1814-20 (2011)
- 16) Yoshiki Seto, Ryo Inoue, Masanori Ochi, Graham Gandy, Shizuo Yamada, Satomi Onoue: Combined use of in vitro phototoxic assessments and cassette dosing pharmacokinetic study for phototoxicity characterization of fluoroquinolones. *AAPS J.*, 13, 482-492 (2011)
- 17) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Naoko Igarashi, Ryo Inoue, Ami Oishi, Toshihiko Toida, Shizuo Yamada, Satomi Onoue: In vitro photobiochemical characterization of sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin formulation of bufexamac. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 55, 591-596 (2011)
- 18) 尾上 誠良: 創薬過程における薬剤性光線過敏症の予測. *臨床免疫・アレルギー科*, 566,

- 546-550 (2011)
- 19) 大野泰雄: 薬理学における動物実験代替法研究の重要性、日本薬理学雑誌138, 99-102, 2011.
  - 20) Yodate HT, Kai T, Aoki M, Minowa Y, Yamada T, Kimura T, Ono A, Yamada H, Ohno Y, Urushidani T.: Identification of a novel set of biomarkers for evaluating phospholipidosis-inducing potential of compounds using rat liver microarray data measured 24-h after single dose administration. *Toxicology*. 295, 1-7, 2012.
  - 21) Uehara T, Minowa Y, Morikawa Y, Kondo C, Maruyama T, Kato I, Nakatsu N, Igarashi Y, Ono A, Hayashi H, Mitsumori K, Yamada H, Ohno Y, Urushidani T.: Prediction model of potential hepatocarcinogenicity of rat hepatocarcinogens using a large-scale toxicogenomics database. *Toxicol Appl Pharmacol*. 255, 297-306, 2011.
  - 22) 鈴木加余子, 松永佳世子: パッチテストアレルギーに関するアンケート 2010. *J Environ Dermatol Cutan Allergol* 2011; 5:91-102.
  - 23) Sasaki R, Suzuki K, Hayashi T, Inasaka H, Matsunaga K.: Improvement of cheilitis granulomatosa after dental treatment. *Case Rep Dermatol* 2011;3:151-154.
  - 24) Suzuki K, Hirokawa K, Yagami A, Matsunaga K. Allergic contact dermatitis from carmine in cosmetic blush. *Dermatitis* 2011;22:348-349.
  - 25) Suzuki K, Yagami A, Matsunaga K.: Allergic contact dermatitis caused by a skin-lightening agent. ,5'-dipropylbiphenyl-2,2'-diol. *Contact Dermatitis* 2011;66:46-52.
  - 26) 矢上晶子, 松永佳世子: I型アレルギーによる蕁麻疹 Up to date.アレルギーの臨床 2011;416:17-22.
  - 27) 鈴木加余子, 松永佳世子: ジャパニーズスタンダードアレルギー陽性率の推移.医学のあゆみ 2012;240:538-544.
  - 28) 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* 2011; 38:353-363.
  - 29) 松永佳世子: 加水分解コムギアレルギーの真実. *HBR* 2012;23:6-9.
  - 30) 矢上晶子, 松永佳世子. パッチテストの基本手技と解釈.医学のあゆみ 2011;240: 321-326.
  - 31) 矢上晶子, 松永佳世子. 既成パッチテストテープはどこまで使えるか. *What's new in 皮膚科* 2012-2013;46-47.
- 1) 藤堂浩明、古井克典、平井綾乃、石井宏、杉林堅次: 三次元培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験において false-positive/-negative を引き起こす原因について、第 36 回日本化粧品学会、東京、2011 年 6 月
  - 2) 藤堂浩明: 物質の有効性および安全性評価ツールとしての三次元培養ヒト皮膚モデルの有用性、第 5 回皮膚基礎研究クラスターフォーラム、船堀、東京、2011 年 7 月
  - 3) 藤堂 浩明: リスク評価における皮膚透過性研究の重要性、第 4 回 千葉科学大学コスメティックサイエンスシンポジウム、東京、2011 年 7 月
  - 4) 藤堂浩明、杉林堅次: 物質の皮膚透過性と皮膚中濃度予測法に関する研究、川崎、神奈川、2011 年 11 月
  - 5) 押坂勇志、藤堂浩明、杉林堅次: In silico 皮膚中濃度測定方法の有用性、第 36 回日本化粧品学会、東京、2011 年 6 月
  - 6) 押坂勇志、藤堂浩明、杉林堅次: 物質の皮膚透過パラメータを用いた皮膚中濃度の予測法の確立とその応用、第 24 回日本動物実験代替法学会、仙台、宮城、2011 年 11 月
  - 7) Takeshi Oshizaka, Hiroaki Todo, Kenji Sugibayashi: Physico-chemical approach for prediction of the skin concentration of topically applied drugs, 2nd Asian Federation for Pharmaceutical Sciences, Kuala Lumpur, Malaysia, December 2011
  - 8) 押坂勇志、藤堂浩明、杉林堅次: 皮膚に浸透する物質の物理化学的パラメータを用いた有効性・安全性評価、第 132 回日本薬学会、北海道、2012 年 3 月
  - 9) Hiroaki Todo, Kenji Sugibayashi: Effect of skin barrier function and metabolic ability on the skin concentration-distance profiles of chemical compounds in reconstructed cultured human skin model, 8th world congress on alternatives and animal use in the life sciences, Montreal, Canada, August 2011
  - 10) Hiroaki Todo, Takeshi Oshizaka, Kenji Sugibayashi: Prediction of skin concentration of topically applied drugs, 26th JSSX Annual Meeting, Hiroshima, November 2011
  - 11) Kojima, H.: Update of skin equivalent and its regulatory use, BIT's 4th Annual World Congress of Industrial Biotechnology-2011, Dalin, China (2011.4)
  - 12) 小島 肇: 安全性評価のための in vitro 試験法を確立するために何をなすべきか、日本組織培養学会第 84 回大会、成育医療センター (2011.5)
  - 13) 山本直樹、平野耕治、小島 肇、住友万里子、山下宏美、中村政志、原 和宏、谷川篤

G-2. 学会発表

- 宏、谷口考喜、堀口正之：ヒト角膜組織より分離した角膜上皮細胞への不死化遺伝子の導入と評価、日本組織培養学会第84回大会、成育医療センター（2011.5）
- 14) 小島 肇：医薬品・医療機器の許認可に求められる安全性試験、第7回大阪大学医工連携シンポジウム 第2回 MEI産学官連携部門勉強会講演会 大阪大学銀杏会館（2011.6）
- 15) Yamamoto, N., Hirano, K., Sumitomo, M., Yamashita, H., Nakamura, M., Hara, K., Tanikawa, A., Horiguchi, M., Taniguchi, K. and Kojima, H. : Generation and Analysis of a New Immortalized Human Corneal Epithelium Cell Line, 2011 In Vitro Biology Meeting, Raleigh, North Carolina, USA(2011.6)
- 16) Kojima, H.: Current and future of correlation with Japan and Korea on alternative to animal experiments, 8th Congress of Korean Society for Alternative to Animal Experiments, Korea (2011.7)
- 17) 小島 肇：代替法から in vitro toxicology への発想転換、第38回日本トキシコロジー学会学術年会、パシフィコ横浜（2011.7）
- 18) 小島 肇：動物実験代替法の申請資料への活用、皮膚基礎研究クラスターフォーラム第6回教育セミナー、タワーホール船堀（2011.7）
- 19) 小島 肇：欧米、日本における代替法の現状と化粧品の安全性評価における代替法、千葉科学大学コスメティックサイエンスシンポジウム(第4回)、化学会館・Fホール（2011.7）
- 20) Kojima, H. : Section II-11 The International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM), JaCVAM, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 21) Uno, Y., Kojima, H., Hayashi, M.: In vivo Comet assay: update on the ongoing international validation study coordinated by JaCVAM, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 22) Kojima, H., Yamakage, K., Oba, S., Tsuge, H., Aoki, M.: Preliminary study of the revision of Japanese Pharmacopoeia test for rubber closure for aqueous infusions, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 23) Ono, A., Takeyoshi, M., Bremer, S., Jacobs, M., Laws, S., Sozu, T. and Kojima, H.: Results of the validation study of the stably-transfected estrogen receptor alpha transcriptional activation antagonist assay using the HeLa9903 cell line, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 24) Hayashi, K., Hayashi, T., Sakaguchi, M., Watanabe, S. and Kojima, H.: Inter-laboratory phase II validation study of in vitro eye irritation test; Short Time Exposure (STE) test, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 25) Nakamura, M., Suzuki, T., Shinoda, S., Kato, M. and Kojima, H.: Additional validation of alternative skin irritation test method using LabCyte EPI-MODEL24 of cultured skin, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 26) McFarland, R., Kulpa-Eddy, J., Isbrucker, R., Halder, M., Kojima, H., Johnson, N., Jones, B., Allen, D., Casey, W. and Stokes, W.: International workshop on alternative methods to reduce, refine, and replace the use of animals in human vaccine potency and safety testing, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 27) Kulpa-Eddy, J., McFarland, R., Isbrucker, R., Halder, M., Kojima, H., Johnson, N., Jones, B., Allen, D., Casey, W. and Stokes, W.: International workshop on alternative methods to reduce, refine, and replace the use of animals in veterinary vaccine potency and safety testing, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 28) Stephens, M., Kojima, H., Patlewicz-Tier, G., Spielmann, H. and Telley, L.: AltTox.org: communication platform for 21st century toxicology, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 29) Kojima, H.: Necessity of validation study of new or updated test methods for hazard assessment, Workshop on Validation of 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxic Test, Guangzhou, China (2011.11)
- 30) Kojima, H.: JaCVAM update, シンポジウム動物実験代替法センターの国際協調、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台（2011.11）
- 31) 小島 肇：厚生労働省の新規対応、シンポジウム日本における代替法研究の新しい胎動、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台（2011.11）
- 32) Kojima, H.: JaCVAM update、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台（2011.11）
- 33) 丸山 裕子、湯浅 敦子、日置孝徳、笠原 利彦、小島 肇：LLNA BrdU-ELISA におけるリンパ節細胞懸濁液調製方法の最適化に関する検討、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台（2011.11）

- 34) 篠田伸介、萩原沙織、山口能宏、中村 牧、笠原利彦、芝井亜弥、加藤雅一、小島 肇：培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 皮膚刺激性試験法の追加共同研究、日本動物実験代替法学会 第 24 回大会、仙台 (2011.11)
- 35) 内野 正、竹澤俊明、山下 邦彦、小島 肇、五十嵐良明、西村哲治：ビトリゲルチャンパーを用いた皮膚感作性試験代替法モデルの基礎的検討、日本動物実験代替法学会 第 24 回大会、仙台 (2011.11)
- 36) 山口宏之、竹澤俊明、小島 肇：コラーゲンビトリゲル膜チャンパー内に構築したヒト角膜上皮モデルの有用性：化学物質暴露後の経上皮電気抵抗値の経時変化を指標として眼刺激性を外挿する新しいアプローチ、日本動物実験代替法学会 第 24 回大会、仙台 (2011.11)
- 37) 加藤義直、山本直樹、山下宏美、佐藤 淳、水谷 宏、中田 悟、小島 肇：新規不死化ヒト角膜上皮細胞株 (iHCE-NY) を用いた眼刺激性試験代替法への取り組み、日本動物実験代替法学会 第 24 回大会、仙台 (2011.11)
- 38) 濱田修一、高島理恵、嶋田圭祐、財前和代、川上哲、田中仁、松本浩孝、中井智博、鈴木洋、松村奨士、真田尚和、井上健司、武藤重治、萩尾宗一郎、林亜耶、高柳智美、萩原庸介、前田晃央、成見香瑞範、高沢博修、小川いづみ、大山ワカ子、中嶋圓、森田健、小島 肇、林真、本間正充：反復投与肝臓小核試験法の有用性の検討 (MMS 共同研究)、日本環境変異原学会第 40 回大会、東京 (2011.11)
- 39) 宇野芳文、小島 肇、林 真：インビボコメットアッセイ：JaCVAM 国際バリデーション試験の進捗状況報告 (第 3 報)、日本環境変異原学会第 40 回大会、東京 (2011.11)
- 40) 中村 昌文、武吉 正博、小野 敦、小島 肇：国際的バリデーションの行われた三種類のエストロゲン様活性測定法の比較検証、環境ホルモン学会、東京(2011.12)
- 41) 小島 肇：動物実験代替法の国際的動向と JaCVAM 活動について、日本輸入化粧品協会技術部会、東京 (2011.12)
- 42) 小島 肇：毒性発現機序からみたリスク評価の現実 「毒性試験の代替に病理が果たす役割」、第 28 回日本毒性病理学会総会、東京 (2012.2)
- 43) 小島 肇：生物学的製剤基準とワクチンの品質確保にどこまで動物実験は有用か、国際化時代の生物学的製剤基準とワクチンの品質確保のありかた、東京 (2012.2)
- 44) 山本直樹：新規作出したヒト角膜不死化細胞を用いた眼刺激性試験評価系の検討。日本動物実験代替法学会第 24 回大会、宮城、2011
- 45) 井上 僚、世戸 孝樹、越智 幹記、尾上 誠良、山田 静雄：光毒性リスク回避を指向した bufexamac の Cyclodextrin 製剤開発。日本薬学会 第 131 年会 (静岡)、要旨集 (4)p.246, 2011 年 3 月 29 日
- 46) 世戸 孝樹、井上 僚、越智 幹記、Gandy Graham、尾上 誠良、山田 静雄：創薬支援のための薬剤性光線過敏症リスク評価に関する薬剤科学的研究 (9)-スループット向上を指向した光毒性評価のためのスクリーニング系の開発。日本薬学会 第 131 年会 (静岡)、要旨集 (4)p.186, 2011 年 3 月 30 日
- 47) 尾上 誠良：創薬過程における薬剤性光線過敏症の予測。第 23 回アレルギー学会春期臨床大会、要旨集 p.45、2011 年 5 月 14 日
- 48) 世戸 孝樹、井上 僚、越智 幹記、尾上 誠良、山田 静雄：Bufexamac の光感受性低減を指向した cyclodextrin 製剤の開発。日本薬剤学会第 26 年会 (東京)、要旨集 p.189, 2011 年 5 月 31 日
- 49) 世戸 孝樹、井上 僚、越智 幹記、Gandy Graham、尾上 誠良、山田 静雄：創薬支援のための薬剤性光線過敏症リスク評価に関する薬剤科学的研究 (10) -皮膚移行性評価のスループット向上を指向したリスク評価系の構築-。第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (横浜)、要旨集 p.136, 2011 年 7 月 11 日~13 日
- 50) Yoshiki Seto, Yosuke Aoki, Ryo Inoue, Yoshiki Kojo, Masashi Kato, Masanori Ochi, Satomi Onoue, Shizuo Yamada: Developing respirable powder formulation of pirfenidone for reduced phototoxic risk. 26th JSSX Annual Meeting in Hiroshima. (Hiroshima). Abstr. P.256. Nov17, 2011
- 51) Ohno. Y.: Japanese regulation for food safety and role of National Institute of Health Sciences. 1<sup>st</sup> Pan Asia Conference on Food & Drug Safety Assessment Policies and Regulations in Different Countries I (2011.4.15)
- 52) 大野泰雄：ICH M3(R2)ガイドラインへの経緯、日本毒性学会(2011,7.13)
- 53) 大野泰雄：レギュラトリーサイエンスと国立衛研、名古屋市立大学大学院薬学研究科医薬品質保証学分野・医薬品安全性評価学分野発足公開シンポジウム (2011.7.16)
- 54) 大野泰雄：医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期とヒト初回投与について、国立精神・神経センター (2011.7.22)
- 55) 大野泰雄：MD 試験および探索的 IND をめぐる最近の国際的動向、APDD シンポジウム(2011.12.16)
- 56) 大野泰雄：安全性評価における動物実験と

- in vitro 代替法の利点および問題点、その現状について、東京都健康安全研究センター技術懇話会(111208)
- 57) Yasuo Ohno: Reliability of Data for New Drug Application in Japan - Non-GLP Tests -, Global Quality Assurance Conference (2011.11.15)
- 58) Mariko Sugiyama: Current Status on Animal Alternatives in Japan, The First International Symposium on Cosmetics -Alternatives to Animal Experimentation for Cosmetics -, 2011.
- 59) 大野泰雄, 秋田正治, 今井教安, 大森崇, 岡本裕子, 奥村秀信, 河野有希, 杉山真理子, 萩野滋延, : 24 時間閉塞による皮膚刺激性試験の代替法開発のための被験物質リストの作成, 第24回日本動物実験代替法学会, 2011.
- 60) 杉山真理子: 化粧品の安全性, 第43回化粧品技術基礎講習会, 2011.
- 61) 杉山真理子: 低刺激性製剤の開発, 第39回 SCCJ セミナー, 2012.
- 62) Matsunaga K, Yagami A, Sano A, Ota R, Hirokawa K, Nishimura K, Furuta K, Tanaka B, Suzuki K: Valuable 10 years experiences in Japan - setup and prevail the guideline. World Congress of Dermatology. Seoul, South Korea. 2011/5/24-29
- 63) Matsunaga K, Yagami A, Sano A, Kobayashi T, Morita Y, Ota R, Hirokawa K, Nishimura K, Suzuki K: Outbreak of immediate hypersensitivity to hydrolyzed wheat proteins in 'Cha-no-shizuku', World Congress of Dermatology. Seoul, South Korea. 2011/5/24-29
- 64) Matsunaga K, Yagami A, Sano A, Ota R, Hirokawa K, Nishimura K, Furuta K, Tanaka B, Suzuki K: Cosmetic dermatitis in recent years in Japan, The 11th APEODS & The 3rd CODFICTION. Chandigarh, INDIA. 2011/10/14-16
- 65) Matsunaga K, Yagami A, Sano A, Kobayashi T, Morita Y, Ota R, Hirokawa K, Nishimura K, Suzuki K: Outbreak of immediate hypersensitivity to hydrolyzed wheat proteins in 'Cha-no-shizuku' The 11th APEODS & The 3rd CODFICTION in Chandigarh, INDIA. 2011/10/14-16
- 66) 佐野晶代, 矢上晶子, 伊佐見真美子, 秋田浩孝, 松永佳世子: 染毛剤によるアレルギー接触皮膚炎の1例, 第255回日本皮膚科学会東海地方会. 2011/3/13
- 67) 西村景子, 伊佐見真美子, 矢上晶子, 高橋正幸, 三和拓人, 森田雄介, 小林東, 佐野晶代, 古田加奈子, 美浦麻衣子, 鈴木加余子, 松永佳世子: 化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを行った症例 2010年のまとめ. 第36回日本化粧品学会. 2011/6/9-10
- 68) 松永佳世子: 楽しくパッチテストをやってみよう. 札幌市皮膚科医会総会. 2011/7/8
- 69) 松永佳世子: 「プリックテスト、パッチテストの実際とその適応となる疾患」について. 第5回相模原アレルギーセミナー. 2011/8/6
- 70) 松永佳世子: 職場で注意が必要な皮膚アレルギーの知識と対策. 平成23年度日本産業衛生学会東海地方会. 2011/11/5
- 71) 太田理会, 矢上晶子, 佐野晶代, 小林東, 西村景子, 廣川景子, 鈴木加余子, 松永佳世子: 加水分解小麦末含有石鹼使用者に生じた小麦アレルギーの臨床的特徴. LATEX ALLERGY OAS フォーラム 2011 第16回ラテックスアレルギー研究会. 2011/7/31
- 72) 矢上晶子, 佐野晶代, 西村景子, 小林東, 松永佳世子, 森田雄介, 廣川景子: 加水分解小麦末含有石鹼使用者に生じた小麦アレルギーの臨床的検討. 第37回藤田保健衛生大学アレルギー勉強会. 2011/8/8
- 73) 松永佳世子: 接触皮膚炎 up-to-date. 浦安皮膚臨床懇話会学術講演会. 2011/10/20
- 74) 松永佳世子: パッチテスト試薬 2011 共同研究中間報告. 第41回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会. 2011/7/16-17
- 75) 西村景子, 伊佐見真美子, 矢上晶子, 高橋正幸, 三和拓人, 森田雄介, 小林東, 佐野晶代, 古田加奈子, 美浦麻衣子, 鈴木加余子, 松永佳世子: 化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを行った症例 2010年のまとめ. 第41回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会. 2011/7/16-17
- 76) 太田理会, 矢上晶子, 佐野晶代, 小林東, 西村景子, 森田雄介, 廣川景子, 鈴木加余子, 松永佳世子: 加水分解小麦末含有石鹼使用者に生じた小麦アレルギーの臨床的特徴. 第41回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会. 2011/7/16-17
- 77) 矢上晶子, 佐野晶代, 西村景子, 森田雄介, 松永佳世子: Hevb6(プロヘベイン)により感作された職業性ラテックスアレルギーの1例. 第63回日本皮膚科学会西部支部学術大会. 2011/10/8-9
- 78) 太田理会, 西村景子, 佐野晶代, 岩田洋平, 矢上晶子, 松永佳世子: 納豆(発行大豆)により遅発性アレルギーの一例. 第63回日本皮膚科学会西部支部学術大会. 2011/10/8-9
- 79) 松永佳世子: 女性であることを10倍楽しむには! ~実際の診療現場において~. 第6回BMW研究会. 2011/12/3
- 80) 松永佳世子: 最近話題の皮膚アレルギー-茶のしづく石鹼による即時型小麦アレルギー, 接触皮膚炎 2010の動向-. 第18回岐阜アレルギー

ギー疾患研究会.2012/1/19

- 81) 松永佳世子：思いもよらぬ接触皮膚炎の原因。第 75 回日本皮膚科学会東京支部学術大会。2012/2/28
- 82) 松永佳世子：茶のしずく石鹼と小麦アレルギーの問題について。藤田保健衛生大学アレルギー勉強会。2012/1/16
- 83) 松永佳世子：「化粧品はどこまで安全か？『茶のしずく石鹼等による小麦アレルギー』はなぜ起きたのか？」。第 3 回伊豆湘南皮膚免疫アレルギー懇話会。2012/3/21

- 84) 松永佳世子：「最近話題の皮膚アレルギー」。第 24 回 北河内女医の会。2012/3/24

H. 知的所有権の取得状況

H-1. 特許取得

特になし

H-2. 実用新案登録

特になし

H-3. その他

特になし



## 分担研究報告書

### 化粧品原料の経皮吸収に関する研究

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

皮膚に適用する物質の皮膚透過性や皮膚中濃度は、物質の有効性や安全性を評価する上で重要となる。3次元培養ヒト皮膚モデルは、動物皮膚の代替膜として *in vitro* 皮膚透過試験や皮膚刺激性試験に用いられているが、角層バリア能が動物皮膚やヒト皮膚よりも脆弱であるため、3次元培養皮膚モデル中の皮膚中濃度は、ヒト皮膚や動物皮膚と比べて高値を示すと考えられた。そこで本年度は、物理化学的性質の異なる物質を適用後の3次元培養ヒト皮膚モデル中の物質濃度を測定し、それらの皮膚中濃度とヘアレスラットの皮膚中濃度と比較した。また、皮膚適用物質の皮膚中濃度は、角層および生きた表皮・真皮の2層膜からなる抵抗モデルで表すことができるため、皮膚抵抗モデルを用いて算出した皮膚中濃度を実測値と比較して、抵抗モデルによる皮膚中濃度予測法の検証を行った。皮膚抵抗モデルにより算出した皮膚中濃度は実測値と非常によく一致したが、3次元培養ヒト皮膚モデル中の物質の皮膚中濃度は、ヘアレスラット皮膚よりも著しく高い値を示すことが分かった。この結果より、皮膚抵抗モデルによる皮膚中濃度の算出は、物質の有効性や安全性を予測する上で有用であること、3次元培養皮膚モデルを用いた試験では、刺激性や有効性が実皮膚と比較して *false-positive* の結果が得られる可能性があると考えられた。

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

#### A. 研究目的

皮膚局所に適用する医薬品や医薬部外品の局所作用を分類すると、UVケア化粧品のように皮膚表面での作用を期待するもの、美白剤のように生きた表皮・真皮にて作用を期待するもの、抗シワ剤のように真皮での作用を期待するものに分けることができる。物質の有効性や安全性を評価するには、物質の皮膚中濃度が重要となる。皮膚中濃度の評価方法として、「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」にまとめられている *tape-stripping* 法による皮膚薬物動態学的試験

(*Dermatopharmacokinetics* 試験・DPK 試験)

がよく知られている。この試験は、角層内に存在する薬物量から生物学的同等性を評価する方法である。通常、薬物は皮膚に適用された製剤から適用部位の角層に移行し、角層を投下した後に生きた表皮に到達する。そのために、粘着性テープで薬物適用部位の角層を剥がして角層に存在する薬物の定量により、薬物の皮膚中での生物学的同等性を評価することができる。

物質の安全性を考える場合、角層中濃度だけでなく、角層下に位置する生きた表皮や真皮中濃度も重要となるため、*tape-stripping* 法による角層中物質濃度評価だけでは十分とは言えない。物質の皮膚中濃度は *in vitro* 皮膚透過性試験より得られたパラメータより皮膚抵抗モデルを用いて算出できること

を報告している。また、皮膚透過パラメータを用いて算出した皮膚中濃度の予測値は、実測値とよく相関していることから、皮膚透過性試験は物質の安全性を評価する上でも重要となる。

昨年の研究分担報告書に、3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた物質透過性は培養ヒト皮膚モデル毎に異なるため、物質のヒト皮膚透過性予測が難しいと述べた。また、3次元培養ヒト皮膚の角層バリア能がヒト皮膚やヘアレスラット皮膚の角層バリア能と比較して低い場合、適用物質の3次元培養皮膚中濃度が高値となることを予測した。そこで本年度は水溶性物質適用後の3次元培養ヒト皮膚モデル中薬物濃度を調べ、得られた実測値を予測値と比較した。

動物実験の3Rsに配慮する方法の1つとして、*in silico*による物質の皮膚中濃度予測法の確立が挙げられる。すでに述べたように、皮膚中濃度は透過性試験から得られた透過パラメータより予測できる。そこで、物質の物理化学的パラメータより皮膚中濃度を予測する方法を確立するために、透過パラメータと適用物質の物理化学的性質との関係について調べた。

## B. 理論

### 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—時間プロファイルより皮膚当加速度 (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)。

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

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

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

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))。

皮膚は、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。

### 2. *In silico* 皮膚透過性

一般的に物質の皮膚透過性は物質の皮膚への溶解拡散現象で説明することができる。そのため、物質の構造特性、すなわちオクタノール/水分配係数 ( $K_{o/w}$ )、分子量 ( $M.W.$ )、溶解度、 $pKa$  などの物理化学的性状から物質の皮膚透過性を予測することが行われている。これらは Quantitative structure-activity relationship (QSAR) や Quantitative structure-permeation relationship (QSPeR) 解析と言われている。Potts と Guy らは、 $M.W.$  ( $18 < M.W. < 765$ ) と  $K_{o/w}$  ( $-3 < \log K_{o/w} < 6$ ) の範囲で、 $K_{o/w}$  と  $M.W.$  の2つのパラメータが全層皮膚を介した透過係数 ( $P_{tot}$ ) と良好な関係があると実験データに基づく経験論的モデリング法で報告しており、皮膚透過性を予測する式として知られている (式 5)。

$$\log P_{tot} = -2.7 + 0.71 \times \log K_{o/w} - 0.0061 \times M.W. \quad (5)$$

### 3. 物質の皮膚中濃度と刺激性の関係

皮膚を角層と生きた表皮・真皮からなる2層膜拡散モデルとして考えると、式 (5) より、Fig. 1 の角層 (sc) と生きた表皮・真皮 (ved) 界面での point a, b, c において、ab と bc の比は  $R_{sc}$  と  $R_{ved}$  の比で示されることになる。すなわち point b での薬物濃度は次式で表すことが出来る。

$$C_b = K_{sc} C_v \frac{R_{ved}}{R_{tot}} \quad (6)$$

(6) 式を用いることにより、単位面積あた

りの角層中の薬物量  $M_{sc}$  は次式のように表すことができる。

$$M_{sc} = \frac{K_{sc} C_v L_{sc} \left(1 + \frac{R_{ved}}{R_{tot}}\right)}{2} \quad (7)$$

また、角層から表皮・真皮への分配係数は  $K_{sc}$  と  $K_{ved}$  の定義から  $K_{ved}/K_{sc}$  と表すことができる。したがって、単位面積当たりの生きた表皮と真皮 (ved) 中の薬物  $M_{ved}$  は次式のように表すことができる。

$$M_{ved} = \frac{K_{ved} C_v L_{ved} \frac{R_{ved}}{R_{tot}}}{2} \quad (8)$$

最終的に単位面積あたりの皮膚中の薬物量  $M_{tot}$  は次のように示すことができる。

$$M_{tot} = \frac{C_v}{2} \left\{ K_{sc} L_{sc} \left(1 + \frac{R_{ved}}{R_{tot}}\right) + K_{ved} L_{ved} \frac{R_{ved}}{R_{tot}} \right\} \quad (9)$$

(9) 式を皮膚の厚さ ( $L_{tot}$ ) で除し、さらに  $R$  を透過係数  $P$  で示すと、定常状態時の皮膚中濃度は、

$$\bar{C}_{ss} = \frac{C_v}{2L_{tot}} \left\{ K_{sc} L_{sc} \left(1 + \frac{P_{tot}}{P_{ved}}\right) + K_{ved} L_{ved} \frac{P_{tot}}{P_{ved}} \right\} \quad (10)$$

となる。以上より、分配係数  $K$ 、透過係数  $P$  を full-thickness skin と stripped skin 透過実験から求めれば、皮膚中濃度  $\bar{C}_{ss}$  を予測することが可能となる。

さらに、(10) 式と以下に示す化学物質濃度と効果の関係を示す Emax model (Hill 式) (Fig. 2, (11) 式) を利用すれば、皮膚透過性試験の結果から物質の有効性や安全性を推測することができる。

$$E = \frac{E_{max} \times C^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C^\gamma} \quad (11)$$

ここで、 $E$  は効果、 $E_{max}$  は最大効果、 $C$  は適用濃度、 $EC_{50}$  は 50% 効果発現濃度、 $\gamma$  は形状因子である。

#### 4. 皮膚透過パラメータの算出

2 層膜皮膚モデルを用いた物質の皮膚透過挙動の解析

薬物の皮膚透過性および皮膚中挙動を解析するために、stratum corneum と stripped skin からなる 2 層膜モデルを構築した。

角層における位置  $x$ 、時間  $t$  の物質濃度  $C_{sc}$  は Fick の第 2 法則から、

$$\frac{\partial C_{sc}}{\partial t} = D_{sc} \frac{\partial^2 C_{sc}}{\partial x^2} \quad (12)$$

Viable epidermis および dermis における位置  $x$ 、時間  $t$  の物質濃度  $C_{ved}$  は、(13) 式で表される。

$$\frac{\partial C_{ved}}{\partial t} = D_{ved} \frac{\partial^2 C_{ved}}{\partial x^2} \quad (13)$$

初期条件と境界条件は以下のようになる。

$$t = 0 \quad \begin{array}{ll} -L_{sc} < x < 0 & C_{sc} = C_0 \\ 0 < x < L_{ved} & C_{ved} = 0 \end{array} \quad (14)$$

$t > 0$

$$x = -L_{sc}$$

$$C_{sc} = K_{d/sc} \cdot C_d$$

$$V \frac{dC_d}{dt} = A D_{sc} \frac{dC_{sc}}{dx}$$

$$x = 0 \quad C_{ved} = K_{ved/sc} \cdot C_{sc}$$

および

$$D_{sc} \frac{dC_{sc}}{dx} = D_{ved} \frac{dC_{ved}}{dx}$$

$$x = L_{ved} \quad C_{ved} = 0$$

(15)

ここで、 $L_{sc}$  は角層の厚み、 $L_{ved}$  は生きた表皮および真皮の厚み、 $K_{d/sc}$  はドナー側から角層への分配係数、 $K_{sc/ved}$  は角層から生きた表皮への分配係数、 $C_d$  はドナー側の薬物濃度、 $C_s$  は角層の薬物濃度、 $C_{ved}$  は生きた表皮および真皮の薬物濃度、 $D_{sc}$  は角層中の薬物拡散係数、 $D_{ved}$  は生きた表皮および真皮中の薬物拡散係数、 $A$  は拡散有効面積を示す。

位置  $x$ 、時間  $t$  における  $C_{sc}$  もしくは  $C_{ved}$  は、(12) もしくは (13) 式、初期条件 ((14) 式) および境界条件 (式 (15)) によって算出される。また、薬物のレシーバ側への透過速度  $J$  は Fick の第 1 法則である (16) 式で表すことができる。さらに、 $J$  を積分することにより単位時間あたりの物質の累積皮膚透過量  $Q$  が求められる ((17) 式)。

$$J = -D \left( \frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (16)$$

$$Q = -D \int_{x=L_{\text{skin}}} \left( \frac{dC_{\text{ved}}}{dx} \right) dt \quad (17)$$

また、Fickの第2法則は差分法により、(18)、(19)式に変換できる。

$$\frac{dC_{i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{i,j+1} - C_{i,j}) \quad (18)$$

$$\frac{d^2 C_{i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{i-1,j} - 2C_{i,j} + C_{i+1,j}) \quad (19)$$

ここで、 $C_{i,j}$  は皮膚における  $i$  番目の位置の  $j$  番目の時間の濃度を表す。 $\Delta x$  は  $x_{i+1} - x_i$  を表し、 $\Delta t$  は  $t_{j+1} - t_j$  を表す。式 (18)、(19) を式 (12) および (13) に代入すると式 (20)、(21) となる。

$$C_{sc_{i,j+1}} = rD_{sc} C_{sc_{i-1,j}} + (1 - 2rD_{sc}) C_{sc_{i,j}} + rD_{sc} C_{sc_{i+1,j}} \quad (20)$$

$$C_{ved_{i,j+1}} = rD_{ved} C_{ved_{i-1,j}} + (1 - 2rD_{ved}) C_{ved_{i,j}} + rD_{ved} C_{ved_{i+1,j}} \quad (21)$$

ここで、 $r$  は  $\Delta t / \Delta x^2$  を示す。また、式 (16) は差分法を用いると式 (22)、式 (17) は式 (23) で表すことができる。

$$J_j = -D_{\text{skin}} \frac{C_{n+1,j} - C_{n,j}}{\Delta x} \quad (22)$$

$$Q_j = Q_{j-1} + J_j \cdot \Delta t \quad (23)$$

ここで、 $n$  は皮膚の分割数を示す。 $J_j$  を以上の方法に従って表計算ソフト Microsoft® Excel を用いて計算した。なお、今回は  $n=10$  とした。また、計算では  $D_{\text{skin}} \Delta t / \Delta x^2$  が 0.5 以下となるように  $\Delta t$  を設定した。さらに、式 (21) から  $Q_j$  を求めた。拡散係数  $D_{sc}$  と  $D_{ved}$ 、分配係数  $K_{d/sc}$  と  $K_{sc/ved}$  は累積透過量  $Q_j$  の実測値を非線形最小二乗法を用いてカーブフィッティングすることにより算出した。最小二乗法の計算では表計算ソフト Microsoft® Excel 中のソルバー機能を用いた。ソルバーの条件としては、制限時間が 100 秒、反復回数が 100 回、精度が 0.000001、交差が 5%、収束が 0.001 であり、解の検索のアルゴリズムは準ニュートン法を用いた。

## 実験方法

### 1. 試薬

アンチピリン (ANP)、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) は東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。フルルビプロフェン (FP) はリードケミカル (富山、日本) から供与された。フルオロリン酸ジイソプロピル (DFP) は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から購入した。その他の試薬および溶媒は市販の特級品または高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用を精製せずにそのまま用いた。Table 1 にこれらの分子量および油水分配係数を示す。

### 2. 3次元培養皮膚モデル

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

### 3. *In vitro* 皮膚透過性試験

3次元培養ヒト皮膚モデルである EpiDerm を 6 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 は side-by-side diffusion cell (有効透過面積 0.95 cm<sup>2</sup>) にセットし、PBS を角層および真皮側に適用し 1 時間水和させた。水和終了後、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、物質の飽和水溶液もしくは懸濁液を適用した。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、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