

stripped skin 透過速度  $Flux_{st}$  は (2) 式より表すことができる。また、単位面積当たりの stripped skin 累積透過量  $Q_{st}$  は (3) 式で表すことができる。

$$Flux_{st} = -D_{ved} \left( \frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (2)$$

$$Q_{st} = -D_{ved} \int_0^{t'} \left( \frac{dC_{ved}}{dt} \right)_{x=L_{ved}} dx \quad (3)$$

また、(1) 式は (4) 式および (5) 式に変換することができる。

$$\frac{dC_{ved,i,j+1}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{ved,i,j+1} - C_{ved,i,j}) \quad (4)$$

$$\frac{dC_{ved,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{ved,i-1,j} - 2C_{ved,i,j} + C_{ved,i+1,j}) \quad (5)$$

ここで、 $C_{ved,i,j}$  は  $i$  番目の位置の  $j$  時間目の薬物濃度を表す。 $\Delta x$  は  $x_{i+1} - x_i$  を、 $\Delta t$  は  $t_{j+1} - t_j$  を表す。

(4) 式と (5) 式を (1) 式に代入すると次式が得られる。

$$C_{ved,i,j+1} = rD_{ved}C_{ved,i-1,j} + (1-2rD_{ved})C_{ved,i,j} + rD_{ved}C_{ved,i+1,j} \quad (6)$$

ここで、 $r$  は  $\Delta t/\Delta x^2$  を表す。差分式を使うと (2) 式と (3) 式はそれぞれ (7) 式と (8) 式になる。

$$Flux_{st,j} = -D_{ved} \frac{C_{ved,n+1,j} - C_{ved,n,j}}{\Delta x} \quad (7)$$

$$Q_{st,j} = Q_{st,j-1} + J_{st,j} \cdot \Delta t \quad (8)$$

$n$  を皮膚の区分数とした。そこで、 $Flux_{st,j}$  は  $n=10$  にセットして Microsoft® Excel を用いて計算した。なお、この計算では、 $\Delta t$  は  $D_{ved} \Delta t/\Delta x^2$  に対して 0.5 未満となるようにセットした。 $Q_{st,j}$  は (8) 式を使って  $Flux_{st,j}$  から計算した。 $D_{ved}$  と  $K_{ved}$  は非線形最小二乗法を使って透過データにカーブフィッティングして得られた。なお、最小二乗法は Microsoft® Excel Solver を使って行った。計算条件は制限時間 100 s、反復回

数 100 回、精度 0.000001、基本公差 5%、収束 0.0001 とした。Pseudo-Newtonian method をアルゴリズムとして用いた。

## 1.2 2層膜モデル透過挙動の解析

ヘアレスラット full-thickness skin および EpiDerm を角層と生きた表皮・真皮からなる 2層膜モデルとして仮定した (Fig. 1 (b))。角層中薬物濃度  $C_{sc}$  と生きた表皮・真皮中薬物濃度  $C_{ved}$  は (9) 式と (1) 式で表される。

$$\frac{\partial C_{sc}}{\partial t} = D_{sc} \frac{\partial^2 C_{sc}}{\partial x^2} \quad (9)$$

$$\frac{\partial C_{ved}}{\partial t} = D_{ved} \frac{\partial^2 C_{ved}}{\partial x^2} \quad (1)$$

ここで、 $D_{sc}$  は角層中の薬物拡散係数を表す。初期条件および境界条件は以下のように仮定した。

$$t=0 \quad -L_{sc} < x < 0 \quad C_{sc} = 0$$

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

$$t > 0 \quad x = -L_{sc} \quad C_{sc} = K_{sc} \cdot C_v$$

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

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

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

ここで、 $L_{sc}$  は角層の厚み、 $K_{sc}$  は基剤 - 角層間薬物分配係数、 $K_{ved/sc}$  は角層 - 生きた表皮・真皮間薬物分配係数を表す。 $C_{sc}$  と  $C_{ved}$  は初期条件と境界条件から Fick の拡散第 2 法則に従って変化すると考えて、差分式を用いて計算できる。レシーバー側への full-thickness skin 透過速度  $Flux_{full}$  は (10) 式より、単位面積当たりの full-thickness skin 累積透過量  $Q_{full}$  は (11) 式で表すことができる。

$$Flux_{full} = -D_{ved} \left( \frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (10)$$

$$Q_{full} = -D_{ved} \int_0^t \left( \frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} dt \quad (11)$$

また、(9) 式は (12) と (13) 式に、(1) 式は (4) と (5) 式に変換することができる。

$$\frac{dC_{sc,i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{sc,i,j+1} - C_{sc,i,j}) \quad (12)$$

$$\frac{d^2 C_{sc,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{sc,i-1,j} - 2C_{sc,i,j} + C_{sc,i+1,j}) \quad (13)$$

$$\frac{dC_{ved,i,j+1}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{ved,i,j+1} - C_{ved,i,j}) \quad (4)$$

$$\frac{d^2 C_{ved,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{ved,i-1,j} - 2C_{ved,i,j} + C_{ved,i+1,j}) \quad (5)$$

(12) 式と (13) 式を (9) 式に、(4) 式と (5) 式を (1) 式に代入すると (14) 式と (6) 式が得られる。

$$C_{sc,i,j+1} = rD_{sc} C_{sc,i-1,j} + (1-2rD_{sc}) C_{sc,i,j} + rD_{sc} C_{sc,i+1,j} \quad (14)$$

$$C_{ved,i,j+1} = rD_{ved} C_{ved,i-1,j} + (1-2rD_{ved}) C_{ved,i,j} + rD_{ved} C_{ved,i+1,j} \quad (6)$$

ここで、 $r$  は  $\Delta t / \Delta x^2$  を表す。差分式を使うと (10) 式、(11) 式はそれぞれ (15) 式、(16) 式になる。

$$Flux_{full,j} = -D_{ved} \frac{C_{ved,n+1,j} - C_{ved,n,j}}{\Delta x} \quad (15)$$

$$Q_{full,j} = Q_{full,j-1} + Flux_{full,j} \cdot \Delta t \quad (16)$$

$n$  を角層および生きた表皮・真皮の区分数とした。 $Flux_{full,j}$  は  $n=10$  にセットして Microsoft® Excel を用いて計算した。 $D_{sc}$  と  $K_{sc}$  は非線形最小二乗法を用いて透過実験データにカーブフィッティングして算出した。また、 $D_{ved}$  と  $K_{ved}$  には、stripped skin および stripped EpiDerm の 1 層膜モデルの透過挙動解析から算出した値を用いた。なお、計算は 1 層膜モデルの透過挙動解析と同様の方法で行った。

### 1.3 皮内代謝化学物質の皮膚透過挙動の解析

ニコチン酸エチル (EN) は皮膚透過中に生きた表皮・真皮のエステラーゼによってニコチン酸 (NA) に分解される。皮膚は代謝が生じない角層と代謝を生じる生きた表皮・真皮からなる 2 層膜モデルとして仮定した (Fig. 2)。角層中 EN 濃度  $C_{sc}$  は (9) 式で表される。

$$\frac{\partial C_{sc}}{\partial t} = D_{sc} \frac{\partial^2 C_{sc}}{\partial x^2} \quad (9)$$

ここで、 $D_{sc}$  は角層中における EN の拡散係数を表す。一方、生きた表皮・真皮での皮膚透過および代謝挙動は Fick の拡散第 2 法則に Michaelis-Menten 式を取り入れた式で表される。生きた表皮・真皮中 EN、NA 濃度  $C_{EN}$ 、 $C_{NA}$  は (17) 式と (18) 式で表される。

$$\frac{\partial C_{EN}}{\partial t} = D_{EN} \frac{\partial^2 C_{EN}}{\partial x^2} - \frac{V_{max} \cdot C_{EN}}{K_m + C_{EN}} \quad (17)$$

$$\frac{\partial C_{NA}}{\partial t} = D_{NA} \frac{\partial^2 C_{NA}}{\partial x^2} + \frac{V_{max} \cdot C_{EN}}{K_m + C_{EN}} \quad (18)$$

ここで、 $D_{EN}$ 、 $D_{NA}$  は生きた表皮・真皮中の EN および NA の拡散係数を表す。 $V_{max}$ 、 $K_m$  は最大代謝反応速度、ミカエリス定数を表す。初期条件および境界条件は以下のように仮定した。

$$t=0 \quad -L_{sc} < x < 0 \quad C_{sc} = 0$$

$$0 < x < L_{ved} \quad C_{EN} = C_{NA} = 0$$

$$t>0 \quad x = -L_{sc} \quad C_{sc} = K_{sc} \cdot C_v$$

$$x = 0 \quad C_{EN} = K_{ved/sc} \cdot C_{sc} \quad \text{および}$$

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

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

ここで、 $L_{sc}$  は角層の厚み、 $L_{ved}$  は生きた表皮・真皮の厚み、 $K_{sc}$  は基剤 - 角層間の

EN の分配係数、 $K_{ved/sc}$  は角層 - 生きた表皮・真皮間薬物分配係数を表す。 $C_{sc}$ 、 $C_{EN}$ 、 $C_{NA}$  は初期条件と境界条件から Fick の拡散第 2 法則に従って変化すると考えて、差分式を用いて計算できる。レシーバー側への透過速度  $Flux_{EN}$ 、 $Flux_{NA}$  は (19) 式および (20) 式で表される。

$$Flux_{EN} = -D_{EN} \left( \frac{dC_{EN}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (19)$$

$$Flux_{NA} = -D_{NA} \left( \frac{dC_{NA}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (20)$$

また、EN と NA の単位面積あたりの累積皮膚透過量  $Q_{EN}$ 、 $Q_{NA}$  は (21) 式および (22) 式で表される。

$$Q_{EN} = -D_{EN} \int_0^t \left( \frac{dC_{EN}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} dt \quad (21)$$

$$Q_{NA} = -D_{NA} \int_0^t \left( \frac{dC_{NA}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} dt \quad (22)$$

また、(9) 式は (12) と (13) 式に変換することができる。

$$\frac{dC_{sc,i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{sc,i,j+1} - C_{sc,i,j}) \quad (12)$$

$$\frac{d^2 C_{sc,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{sc,i-1,j} - 2C_{sc,i,j} + C_{sc,i+1,j}) \quad (13)$$

(12) 式と (13) 式を (9) 式、(17) 式、(18) 式に代入すると (14) 式、(23) 式、(24) 式が得られる。

$$C_{sc,i,j+1} = rD_{sc} C_{sc,i-1,j} + (1-2rD_{sc}) C_{sc,i,j} + rD_{sc} C_{sc,i+1,j} \quad (14)$$

$$C_{EN,i,j+1} = rD_{EN} C_{EN,i-1,j} + (1-2rD_{EN}) C_{EN,i,j} + rD_{EN} C_{EN,i+1,j} - \Delta t \cdot \frac{V_{max} \cdot C_{EN,i,j}}{K_m + C_{EN,i,j}} \quad (23)$$

$$C_{NA,i,j+1} = rD_{NA} C_{NA,i-1,j} + (1-2rD_{NA}) C_{NA,i,j} + rD_{NA} C_{NA,i+1,j} + \Delta t \cdot \frac{V_{max} \cdot C_{EN,i,j}}{K_m + C_{EN,i,j}} \quad (24)$$

ここで、 $r$  は  $\Delta t / \Delta x^2$  を表す。差分式を使うと (19) 式、(20) 式はそれぞれ (25) 式

と (26) 式になる。

$$Flux_{EN,j} = -D_{EN} \frac{C_{EN,n+1,j} - C_{EN,n,j}}{\Delta x} \quad (25)$$

$$Flux_{NA,j} = -D_{NA} \frac{C_{NA,n+1,j} - C_{NA,n,j}}{\Delta x} \quad (26)$$

$n$  は生きた表皮・真皮の区分数とした。そこで、 $Flux_{EN,j}$  と  $Flux_{NA,j}$  は  $n=10$  にセットして Microsoft® Excel を用いて計算した。なお、この計算では、 $\Delta t$  は  $D_{ved} \cdot \Delta t / \Delta x^2$  に対して 0.5 未満となるようにセットした。 $Q_{EN,j}$ 、 $Q_{NA,j}$  は  $Flux_{EN,j}$ 、 $Flux_{NA,j}$  の和から計算した。各拡散係数と分配係数は非線形最小二乗法を使って透過データにカーブフィッティングして得られた。なお、計算は 1 層膜モデルの透過挙動解析と同様の方法で行った。

#### 1.4. 皮膚透過係数の算出

*In vitro* 皮膚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 flux を算出し、得られた flux を薬物適用濃度で除して透過係数  $P$  を算出した。また、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。薬物の皮膚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。

$$R_{tot} = R_{sc} + R_{ved} = \frac{1}{P_{tot}} = \frac{1}{P_{sc}} + \frac{1}{P_{ved}} \quad (27)$$

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. 試薬・実験材料

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。サリチル酸ヘキシル (HS) は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。サリチル酸 (SA) は関東化学株式会社 (東京, 日本) から購入した。その他の試薬および溶媒は精製せずにそのまま使用した。Table 1 に本研究で使用した種々化学物質の分子量、 $\text{Log}K_{ow}$  を示す。

雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht 系、体重 200-240 g) は城西大学生命科学研究センターから購入した。なお、動物実験は城西大学動物実験管理委員会の承諾を得た後、城西大学動物実験規定に従った。また、3次元培養皮膚モデル EpiDerm™ Epi606X (EpiDerm) は倉敷紡績株式会社 (大阪, 日本) より購入した。

## 3. *In vitro* 皮膚透過試験

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腹部を剃毛処理後、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ものを使用した。

また、3次元培養ヒト皮膚モデル EpiDerm™ Epi606X (EpiDerm) は pH7.4 リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後、メスを用いてウェルプレートから取りはずし使用した。ヘアレスラット摘出皮膚、EpiDerm を side-by-side diffusion cell (有効透過面積 0.95 cm<sup>2</sup>) に挟み、PBS をドナーセルとレシーバーセルに適用し 1 時間水和させた後、ドナーセルからは PBS を除去した。レシーバーセルから 0 時間目のサンプリングを行い、同量の溶液を補充した。ドナーセルには、種々物質の飽和溶液、145 μmol/mL の EN 溶液および HS の原液を適用した。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。サンプル溶液中の化学物質濃度は 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。

## 4. サンプル溶液の定量法

Table 2 に測定システムおよび機器、Table 3 に種々化学物質の定量条件を示す。透過試験より得られたサンプル溶液を内部標準物質を含有したアセトニトリルとサンプル溶液を 1:1 で混和した。その溶液を遠心分離 (12,000 rpm、5 分、4°C) 後、その上清 20 μL を HPLC に注入し、定量した。

## 5. 皮膚中濃度測定

*In vitro* 皮膚透過試験終了後、適用した溶液を回収し、ヘアレスラット腹部皮膚の角層側および真皮側を PBS で洗浄した。表面に付着している PBS をキムワイプで拭った。生きた表皮・真皮中濃度評価の場合は、セロハンテープで 20 回テープストリップングを行い角層を除去した。有効透過面積部分をハサミを用いて切り取り、皮膚の重量を測定後、皮膚をハサミで細断し、PBS (FP, ANP 適用時)、2.7  $\mu\text{mol/L}$  DFP in PBS (EN 適用時)、2.7  $\mu\text{mol/L}$  DFP in acetonitrile (HS 適用時) を加え、電動ホモジナイザー (Polytron RT 1200, Kinematica Inc., Bohemia, NY, U.S.A.) を用いてホモジネート溶液を作製した (12,000 rpm、5 分、4°C)。その後 16% トリクロロ酢酸水溶液を加え 15 分攪拌し、遠心分離 (15,000 rpm、5 分、4°C) 後、上清中化学物質濃度を測定した。同様に *in vitro* 透過実験終了後、EpiDerm は角層側を PBS で洗浄し、支持体であるポリカーボネート膜を剥がした後、皮膚を横型拡散セルから取りはずし、表面に付着している PBS をキムワイプで拭った。生きた表皮・真皮中濃度評価の場合は、ピンセットを用いて角層を除去した。有効透過面積部分を切り取り、上記と同様に PBS、2.7  $\mu\text{mol/L}$  DFP in PBS、または 2.7  $\mu\text{mol/L}$  DFP in acetonitrile を加え、ホモジネート溶液を作製した。攪拌および遠心分離後、上清中化学物質濃度を測定した。

## 6. 抽出率測定

前処理後のヘアレスラット腹部皮膚および EpiDerm をハサミで細断し、既知濃度の各薬物溶液を加え、皮膚中濃度測定と同条件でホモジネート溶液を作製した。なお、EpiDerm は前処理後、ポリカーボネート膜を剥がしたものを使用した。上清中薬物濃度を皮膚中濃度測定と同条件で測定した。抽出率は抽出された化学物質濃度を適用した既知の薬物濃度で除して算出した。

## 7. 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、ヒト摘出皮膚および EpiDerm 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 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 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 (5) 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。

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

## C. 結果および考察

## 1. 角層バリア能

Table 4 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。得られた角層バリア能の結果より、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内の定常状態時の化学物質の concentration-distance profile は Fig. 3 で示すことができる。この結果より、3 次元培養皮膚モデルでは、適用した化学物質の皮膚中濃度が著しく増大する可能性があることが示唆された。

## 2. 代謝活性について

Table 5 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<sup>1)</sup>。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。これらの結果から、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内の定常状態時のエステル化合物およびその代謝物の concentration-distance profile は Fig. 4 で示すことができる。この結果より、3 次元培養皮膚モデルにエステル化合物を適用した場合には、代謝物の皮膚中濃度が 3 次元培養皮膚では著しく低下すると考えられた。

## 3. 皮膚中濃度

Table 6 にヘアレスラットおよび EpiDerm 中の FP および ANP 濃度を示す。両薬物共に、EpiDerm の全層中濃度および生きた表皮・真皮中濃度は、対応するヘアレスラット皮膚より高値を示した。刺激性と強く関係する生きた表皮・真皮中濃度は、FP では 15.1 倍、ANP では 86.2 倍のヘアレスラット皮膚より高値を示し、水溶性物質の ANPの方が脂溶性の FP よりも高値を示した。これは、EpiDerm の皮膚角層バリアの脆弱さが皮膚中濃度の違いに起因していると考えられた<sup>2-5)</sup>。

Table 7にENを適用した時のヘアレスラットおよびEpiDermの生きた表皮・真皮中濃度を示す。ENは皮内エステラーゼによりNAを代謝産物として生じる。NAのEpiDerm中濃度は、ヘアレスラット皮膚の0.05倍の値を示した。先行研究の結果よりEpiDermの皮内カルボキシエステラーゼ活性はヘアレスラット皮膚と比べて著しく低いことが明らかである。また、EpiDermの角層は脆弱で化学物質の透過速度がヘアレスラット皮膚よりも高い<sup>6,7)</sup>。これらがENおよびNAのEpiDermの生きた表皮・真皮中濃度がヘアレスラット皮膚と異なる理由と考えられた。

Table 8には、EpiDermを用いた皮膚刺激性試験でfalse negativeを示したHSのヘアレスラットおよびEpiDermの生きた表皮・真皮中濃度を示す。HSは皮内エステラーゼによりsalicylic acid (SA)を代謝産物として生じる。SAの生きた表皮・真皮中濃度はTable 7に示したNAとは異なり、EpiDerm中濃度がヘアレスラット皮膚よりも高値を示した。EpiDermを用いた皮膚刺激性試験でHSはfalse negativeを生じるため、本結果は仮説と一致しなかった。これはHSの皮膚刺激性評価に用いている家兎とEpiDermの皮内カルボキシエステラーゼファミリーの違いが考えられたため<sup>8,9)</sup>、今後家兎皮膚を用いたさらなる検討が必要であることが示唆された。

## 2. 皮膚中濃度計算値

Table 9にFP(a)、ANP(b)のヘアレスラット皮膚およびEpiDermの皮膚中濃度実測値および計算値を示す。いずれの物質も実測値と計算値は比較的近い値を示し

たが、実測値と計算値の差はEpiDermの方がヘアレスラット皮膚よりも小さかった。これは、適用したFP溶液中のイオン型分率が大きかったことやANPが親水性であることから、皮膚中濃度に及ぼす物質の毛嚢を介した透過ルートの影響が大きいと考えられた。

Table 10にENを適用した時のヘアレスラット皮膚およびEpiDermの皮膚中濃度実測値および計算値を示す。ENおよびNA共に実測値と計算値は比較的近い値を示した。

これらの結果より、皮膚透過性パラメータより薬物の皮膚中濃度が計算できる可能性が示された。

## D. 結論

水溶性物質のEpiDermの生きた表皮・真皮中濃度はヘアレスラット皮膚より著しく高い値を示したことから、3次元培養ヒト皮膚モデルの脆弱な皮膚角層バリアの影響による動物皮膚との皮膚中濃度の違いがfalse positiveの原因であることが確認された。

脂溶性エステル物質では、皮内代謝産物の生きた表皮・真皮中濃度がEpiDermで低い値を示したことから、動物皮膚との皮内カルボキシエステラーゼ活性および化学物質の透過速度の違いによる皮膚中濃度の違いがfalse negativeの一要因であると考えられた。また、皮膚透過実験より得られた各種パラメータを用いることで薬物の皮膚中濃度を計算できることが明らかとなった。本研究結果から、3次元培養皮膚モデルにて、false-positive/-negativeを生じる薬物の性

質が明らかとなり、3Rs を配慮した薬物の安全性を評価するためには、3次元培養ヒト皮膚モデルの特徴を理解して行う必要があると考えられた。

#### E. 参考文献

- 1) T. Imai, Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design, *Drug Metab Pharmacokinet.* 21, 173-85 (2006).
- 2) P. M., Boelsma E., S. Gibbs, M. Mommaas, Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 15, 4-17 (2002).
- 3) M.D. Ynsa, E. Gontiera, A. Mavon, P. Moretto, M. Rosdy, Comparative study between reconstructed and native human epidermis using nuclear microscopy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 249, 710–714 (2006).
- 4) F. Netzlaff, M. Kaca, U. Bock, Haltner-Ukomadu E., P. Meriers, Lehr C., Schaefer U., Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin® in comparison to various human skin preparations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 66, 127-134 (2007).
- 5) S. Kano, H. Todo, K. Sugie, H. Fujimoto, K. Nakada, Y. Tokudome, F. Hashimoto, H. Kojima, K. Sugibayashi, Comparison of Several Reconstructed Cultured Human skin Models by Microscopic Observation: Their Usefulness as an Alternative Membrane for Skin in Drug Permeation Experiments, *AATEX.*, 16, 51-58 (2011).
- 6) S. Kano, H. Todo, K. Sugie, H. Fujimoto,

K. Nakada, Y. Tokudome, F. Hashimoto, K. Sugibayashi, Utilization of Reconstructed Cultured Human Skin models as an Alternative Skin for Permeation Studies of Chemical Compounds, *AATEX.*, 15, 61-70 (2010).

- 7) T. Watanabe, T. Hsegawa, 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).
- 8) D. Beydon, J. Payan, M. Grandclaude, Comparison of percutaneous absorption and metabolism of di-*n*-butylphthalate in various species. *Toxicology in Vitro.*, 24, 71-78 (2010).
- 9) C. Jewell, C. Ackermann, N. A. Payne, G. Fate, R. Voorman, F. M. Williams, Specificity of Procaine and Ester Hydrolysis by Human, Minipig, and Rat Skin and Liver. *Drug Metab. Dispos.*, 35, 2015-2022 (2007).

#### F. 成果

##### F-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).

3) Kano S., Todo H., Furui K., Sugie K., Tokudome Y., Hashimoto F., Comparison of several reconstructed cultured human skin models by microscopic observation: Their usefulness as an alternative membrane for skin in drug permeation experiments, Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 60: 373-384, (2011).

## F-2. 書籍

・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

・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

## F-3. 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.

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

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

9) 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

10) 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

11) 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

12) 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

13) Hiroaki Todo, Takeshi Oshizaka, Kenji Sugibayashi, Prediction of skin concentration of topically applied drugs, 26th JSSX Annual Meeting, Hiroshima, November 2011

14) 3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験における false positive および false negative の原因解明に関する研究、平井 綾乃、藤堂 浩明、杉林 堅次、第56回日本薬学会関東支部大会、2012年10月、東京

15) Evidence-Based Approach to Develop Functional Cosmetics: Skin Penetration and Concentration of Active Ingredient Candidates、杉林 堅次、International Conference on Nutraceutical and Cosmetic Science (ICNaCS2012)、2012年10月、マレーシア

16) 培養皮膚を用いた薬剤評価の現状と課題、杉林 堅次、三次元生体組織構築公開シンポジウム、2012年11月、東京

17) 皮膚適用または暴露された化学物質

の有効性および安全性評価のための in vitro および in silico アプローチ、杉林 堅次、日本薬学会第133年会、2013年3月、神奈川

18) 3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験における偽陽性反応および偽陰性の原因解明に関する研究、平井 綾乃、藤堂 浩明、杉林 堅次、日本薬学会第133年会、2013年3月、神奈川

Table 1 Physicochemical properties of the chemical compounds used in experiment

Drug	Abbreviation	Log <i>K</i> <sub>o/w</sub>	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
Nicotinic acid ester	EN	1.32	141
Nicotinic acid	NA	0.36	123
Hexyl salicylate	HS	5.50	222
Salicylic acid	SA	2.19	138

Table 2 HPLC systems for determination of model compounds.

Pump	LC-20AD	Shimadzu co., Kyoto, Japan
UV detector	SPD-20A	Shimadzu co., Kyoto, Japan
System controller	SCL-10AVP	Shimadzu co., Kyoto, Japan
Auto injector	SIL-20A	Shimadzu co., Kyoto, Japan
Degasser	DGU-20A3	Shimadzu co., Kyoto, Japan
Column	Inertsil <sup>®</sup> ODS-3 4.6 mm × 150 mm	GL Sciences Inc., Tokyo, Japan
Column oven	CTO-20A	Shimadzu co., Kyoto, Japan
Analysis software	LC solution	Shimadzu co., Kyoto, Japan

Table 3 HPLC conditions for determination of model compounds.

Model compounds	Mobile phase	Detection (nm)	Internal standard
ANP	Acetonitrile: water = 3: 7	254	Absolute calibration method
ISMN, CAF	Acetonitrile : water=10 : 90	254	Absolute calibration method
AMP	Acetonitrile : 0.1% phosphoric acid containing 5 mM SDS= 10 : 90	245	Butyl <i>p</i> -hydroxy benzoic acid
ISDN	Acetonitrile : water=55 : 45	245	Butyl <i>p</i> -hydroxy benzoic acid
BA	Acetonitrile : 50 mM potassium dihydrogen phosphate=45 : 55	245	Ethyl <i>p</i> -hydroxy benzoic acid
FP	Acetonitrile: 0.1%phosphoric acid = 1 : 1	254	Isopropyl <i>p</i> -hydroxybenzoate
EN, NA	Acetonitrile: 0.1%phosphoric acid + 5mM SDS = 1: 2	260	Absolute calibration method
HS, SA	Acetonitrile: 0.1%phosphoric acid = 8: 2	254	Hexyl <i>p</i> -hydroxybenzoate

Table 4 Permeability coefficients of ISMN, ISDN and FP through each layer and the resistances 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	$1.50 \times 10^{-7}$	$1.25 \times 10^{-5}$	$6.65 \times 10^6$	$8.01 \times 10^4$	0.988	0.012
ISDN	$1.85 \times 10^{-6}$	$3.79 \times 10^{-5}$	$5.42 \times 10^5$	$2.64 \times 10^4$	0.951	0.049
FP	$1.35 \times 10^{-5}$	$2.63 \times 10^{-5}$	$7.41 \times 10^4$	$3.80 \times 10^4$	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	$1.55 \times 10^{-7}$	$9.57 \times 10^{-7}$	$6.46 \times 10^6$	$1.05 \times 10^6$	0.838	0.162
ISDN	$4.42 \times 10^{-6}$	$2.18 \times 10^{-5}$	$1.80 \times 10^5$	$4.60 \times 10^4$	0.800	0.200
FP	$3.48 \times 10^{-6}$	$7.52 \times 10^{-6}$	$2.87 \times 10^5$	$1.33 \times 10^5$	0.537	0.463

Table 5 Enzymatic parameters for hairless rat skin, human skin and cultured human skin models

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

Table 6 Concentrations of FP and ANP in the hairless rat skin and EpiDerm after their topical application.  $C_{tot,ss}$ : total steady-state concentration.  $C_{ved,ss}$ : concentration in the viable skin after stripping off the stratum corneum layers.

		Hairless rat skin	EpiDerm
FP	$C_{tot,ss}$ (mg/mL)	0.64 ± 0.00	11.18 ± 0.31
	$C_{ved,ss}$ (mg/mL)	0.45 ± 0.00	6.79 ± 0.08
ANP	$C_{tot,ss}$ (mg/mL)	1.05 ± 0.06	128.36 ± 4.20
	$C_{ved,ss}$ (mg/mL)	0.50 ± 0.04	43.09 ± 16.14

Table 7 Concentrations of EN and NA in the viable epidermis and dermis of hairless rat skin and EpiDerm.  $C_{ved,ss}$ : concentration in the viable skin after stripping off the stratum corneum layers.

		Hairless rat skin	EpiDerm
EN	$C_{ved,ss}$ (μmol/mL)	15.61 ± 2.69	46.52 ± 4.75
NA	$C_{ved,ss}$ (μmol/mL)	20.42 ± 0.94	1.02 ± 0.02

Table 8 Concentrations of HS and SA in the viable epidermis and dermis of hairless rat skin and EpiDerm.  $C_{ved,ss}$ : concentration in the viable skin after stripping off the stratum corneum layers.

		Hairless rat skin	EpiDerm
HS	$C_{ved,ss}$ (μmol/mL)	1.90 ± 0.01	16.28 ± 4.99
SA	$C_{ved,ss}$ (μmol/mL)	0.25 ± 0.00	0.69 ± 0.05

Table 9 Comparison of observed and calculated values of concentration of FP (a) and ANP (b) in the hairless rat skin and EpiDerm.  $C_{tot,ss}$ : steady-state concentration in full-thickness skin.  $C_{ved,ss}$ : concentration in the viable skin.

(a) FP

		Observed values	Calculated values
Hairless rat skin	$C_{tot,ss}$ (mg/mL)	0.64 ± 0.00	0.25
	$C_{ved,ss}$ (mg/mL)	0.45 ± 0.00	0.14
EpiDerm	$C_{tot,ss}$ (mg/mL)	11.18 ± 0.31	6.02
	$C_{ved,ss}$ (mg/mL)	6.79 ± 0.08	4.08

(b) ANP

		Observed values	Calculated values
Hairless rat skin	$C_{tot,ss}$ (mg/mL)	1.05 ± 0.06	1.75
	$C_{ved,ss}$ (mg/mL)	0.50 ± 0.04	0.12
EpiDerm	$C_{tot,ss}$ (mg/mL)	128.36 ± 4.20	71.33
	$C_{ved,ss}$ (mg/mL)	43.09 ± 16.14	27.80

Table 10 Comparison of observed and calculated values of the concentration of EN and NA in the viable epidermis and dermis of hairless rat skin and EpiDerm.  $C_{ved,ss}$ : steady state concentration in the viable skin.

		Observed values	Calculated values
Hairless rat skin	EN $C_{ved,ss}$ (μmol/mL)	15.61 ± 0.58	37.64
	NA $C_{ved,ss}$ (μmol /mL)	20.42 ± 0.94	52.07
EpiDerm	EN $C_{ved,ss}$ (μmol /mL)	46.52 ± 4.75	101.60
	NA $C_{ved,ss}$ (μmol /mL)	1.02 ± 0.02	0.21

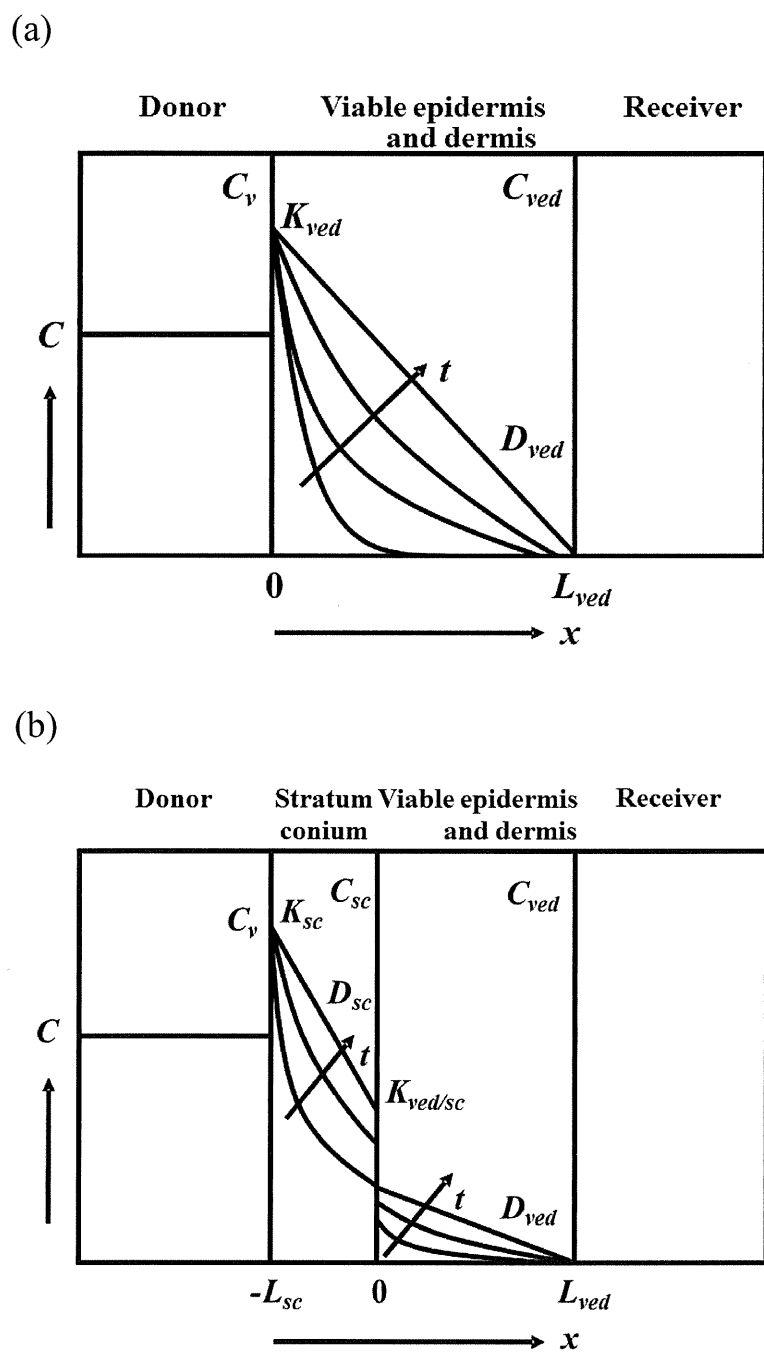


Fig. 1 Typical concentration-distance profiles in one-layered (a) and two-layered (b) membrane diffusion models during membrane permeation of chemical compounds.

Abbreviations  $C$ ,  $C_v$ ,  $C_{sc}$ ,  $C_{ved}$ : concentration of chemical compounds,  $x$ : position of the membrane,  $t$ : time after starting the permeation experiment,  $L_{ved}$ ,  $L_{sc}$ : thickness,  $D_{ved}$ ,  $D_{sc}$ : diffusion coefficient,  $K_{ved}$ ,  $K_{sc}$ ,  $K_{ved/sc}$ : partition coefficient.



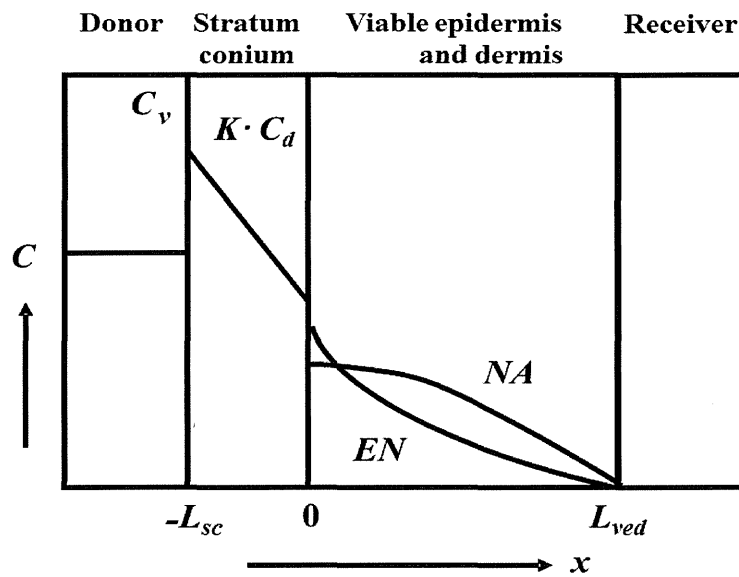


Fig. 2 A typical concentration-distance profiles of EN and NA in hairless rat skin and cultured human skin after the topical application of EN.

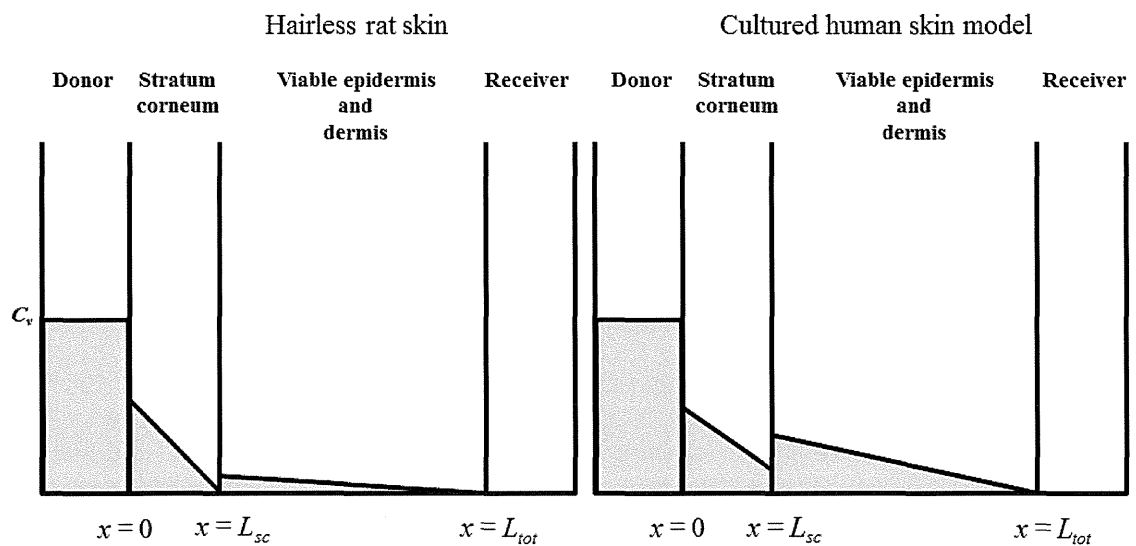


Fig. 3 A typical concentration-distance profile of a hydrophilic compound in hairless rat skin and cultured human skin model.

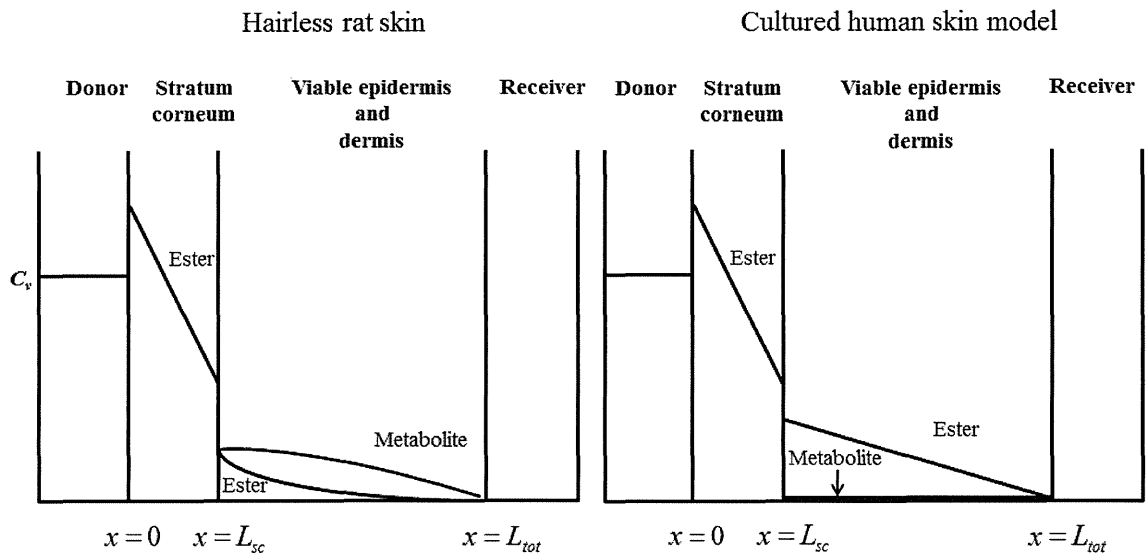


Fig. 4 A typical concentration-distance profile of an ester and its metabolite in excised hairless rat skin and cultured human skin model.

分担総合研究報告書

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

研究分担者 山本 直樹（藤田保健衛生大学 共同利用研究施設 講師）

協力研究者 山下 宏美、加藤 義直、佐藤 淳、中村 政志、原 和宏、  
谷川 篤宏、谷口 孝喜、堀口 正之、平野 耕治

研究要旨

化粧品や医薬部外品等の安全性評価のために用いられている眼刺激性試験・眼毒性試験の中で重要な位置付けを占める試験法に着目し、有害性同定のための代替法を新規開発する。具体的には、不死化遺伝子を導入して作製した新規不死化角膜上皮細胞を用いて、NOAEL（無作用量）の検出を含めた試験法（二次元培養モデルと三次元角膜再構築モデル）を検討し、新しい眼刺激性試験・眼毒性試験代替法を開発する。

山本が作出した不死化ヒト角膜上皮細胞（iHCE-NY）のクローニング、Karyotype、マイクロアレイ、プロテオミクスなどの解析結果をまとめた。これらの解析結果を基に、iHCE-NY細胞の二次元培養モデルを用いて、細胞毒性試験よりも低濃度被験物質でも細胞に与えるごくわずかな影響を検出できる高感度指標遺伝子を選出した。さらに、iHCE-NY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法の確立および三次元角膜再構築モデルを用いた曝露実験プロトコール、および三次元角膜再構築モデルの評価法（MTT法、FL法、電気抵抗、切片標本）を検討した。

成果として、iHCE-NYを用いた二次元培養における曝露実験プロトコール（前培養1日、後培養1日、曝露時間5分、播種細胞数： $2.5 \times 10^4$  cells / well）を確立した。さらに細胞毒性試験よりも低濃度において細胞に対する影響を検出できる遺伝子（*cyclin-D1*, *snail-1*, *keratin-3*）の選出およびiHCE-NYを用いた三次元角膜再構築モデルの作製法と曝露実験プロトコールの概案を提示した。

## A. 研究目的

現在の眼刺激性試験のガイドラインは、ウサギの眼結膜嚢に被験物質を暴露させた後の角膜、虹彩および結膜に対する刺激性について細隙灯顕微鏡などを用いて肉眼的に判定する方法(ウサギを用いた*in vivo*眼刺激性試験法: Draize法)を基準に作成されている。このDraize法は、被験物質の強い刺激性を検出する感度としては非常に優れているが、試験施設間での再現性に乏しく、動物に激しい苦痛とストレスを与えることが社会的に問題となり、昨今、試験目的のために動物を使用しない代替法の開発が進められている。なお、経済協力開発機構(OECD)のウサギを用いた眼刺激性試験改訂ガイドライン(TG405、2012年10月改訂)の提示がされ、本改訂により局所麻酔剤及び全身性鎮痛剤を適用することにより、ウサギを用いた眼刺激性試験を実施する際に動物の痛みと苦痛が軽減されると考えられている。

このDraize法の代替試験法として、様々な報告がされている。ウシ角膜組織を用いたBCOP法(TG437)やニワトリ眼球を用いたICE法(TG438)などは、腐食性や強刺激性物質の評価に適した試験法であるが、実際に試験を実施できる施設が限定的であり、現実的には各実験室で日常的に実施するには困難な状況である。なお、BCOP法やICE法についても、現在さらに改訂案が議論されており、試験法自体も現在進行形という状況であるといえよう。

一方、GHS分類における刺激性あり(2B以上)と無刺激(NI)をスクリーニングできるウサギ角膜上皮細胞を用いた試験法として、SIRC法やSTE法などがある。これら

の試験法は、非刺激性物質の検出を主目的としたボトムアップのアプローチによる眼刺激性試験の第1段階としての評価試験として位置づけされている。使用されている細胞は、ウサギ角膜上皮由来細胞であり、後の研究で明らかとなったことであるが、元々角膜上皮細胞を採取したウサギがウイルス感染していたため、結果としてある意味“不死化”したウサギ角膜上皮細胞(SIRC)を用いている。細胞の操作性、増殖性、培養条件などは非常に容易であり、多くの施設でSIRCを用いた試験を導入することができる。

さらにヒト不死化ヒト角膜上皮細胞として日本ではHCE-Tがあり、ヨーロッパでも同様の不死化ヒト角膜上皮細胞が報告されている。しかし不死化遺伝子(SV40)を角膜上皮細胞内へ導入する際、従来のエレクトロポレーション法やリポフェクション法では遺伝子が導入できないため、生ウイルスを用いた遺伝子導入が用いられている。HCE-Tは、理化学研究所より分譲を受けることができるが、HCE-Tは不死化細胞作成の遺伝子導入時には生ウイルスを用いた感染導入法が用いられている。しかし、現在供給される段階において、ウイルス粒子の産生を認めていないが、本来であればP2実験室での使用が望ましいこととなる。HCE-Tは、樹立当時は重層化能をもっていたようであるが、一部の報告で重層化しないか、重層化し難いことが報告されている。また、樹立時にクローニングがされていないため、ヘテロな細胞集団である。このHCE-Tを用いた眼科領域の基礎研究は、200報を超える論文が報告されているが、2008年に京都府立医科大学の研究グループが