

博士（薬学）（課程） 2001年3月

薬物の皮膚透過並びに皮膚刺激の評価材料としての三次元培養ヒト皮膚モデルの有用性

渡邊 哲也

Combinatorial Chemistry や High Throughput Screening の進歩の伴いリード化合物の探索が容易になり、強い薬理作用を見込んだスクリーニングが可能となったが、化合物の生体膜透過性評価の迅速化が未だ進んでおらず、この部分が医薬品開発の律速過程となっている。皮膚適用剤の開発においても、ヒトや動物皮膚を用いた実験が倫理的及び動物愛護の観点から問題視されつつあり、ヒトや動物皮膚を介した薬物透過性の評価の代替法の確立が急がれている。さらに、皮膚適用剤の開発には皮膚刺激性の評価も必須であり、Draize 試験に替わる皮膚刺激性代替評価法の確立も必要な状況にある。一方、近年の組織培養工学の発展により、実際の皮膚の構造に極めて近い培養皮膚モデルが開発された。そこで、本研究では薬物の皮膚透過並びに皮膚刺激性の評価材料としての三次元培養ヒト皮膚モデルの有用性について検討した。なお、三次元培養ヒト皮膚モデルとして Living Skin Equivalent-high(LSE-high)を用いた。以下得られた結果を示す。

1. LSE-high の薬物の皮膚透過性評価材料としての有用性

1-1 薬物の in vitro ヒト皮膚透過性評価材料としての LSE-high の有用性

物性の異なる7種類の薬物を選択し、これらの LSE-high、ヘアレスラット及びヒト摘出皮膚透過性を調べた。各薬物の LSE-high を介した 0.5 時間までの累積透過量はヒト及びラット皮膚の 8 時間までの累積透過量と類似した。また、lag time と次に続く定常状態 flux がいずれの皮膚でも観察された。LSE-high とヒト皮膚を介した各薬物の皮膚透過係数(P_{tot})の $\text{Log}P_{tot}$ を比較したところ、LSE-high の $\text{Log}P_{tot}$ はヒト皮膚のそれより 1 オーダ高い方へシフトした。この関係から、LSE-high からヒト皮膚の薬物皮膚透過性を簡便に予測することができることが明らかとなった。

1-2 皮膚透過促進剤のスクリーニング材料としての LSE-high の有用性

皮膚透過促進剤の迅速スクリーニング膜として LSE-high の有用性を検討した。各透過促進剤溶液を用いて一硝酸イソソルビドと二硝酸イソソルビドの LSE-high とヘアレスラット皮膚透過性を測定し、コントロール群に対する各促進剤添加群の定常状態薬物 flux の比(EF)を求めた。LSE-high とラット皮膚で一硝酸イソソルビドと二硝酸イソソルビド透過に対する各促進剤の EF のランクオーダはほぼ等しく、有意な相関性を示した。

1-3 ニオイセンサー（水晶発振子）を用いた薬物の迅速定量法

透過実験の迅速評価には透過実験時間自体の短縮化だけでなく、透過薬物の迅速定量も必要である。

そこで、水晶発振子を用いて、薬物の皮膚透過性を迅速に測定できるか評価した。水晶発振子の電極上に吸着したインドメタシン量による振動数減少度は添加したインドメタシン濃度が 4.2-2.5 μ g/mL の範囲で比例することがわかった。また、薬物溶液に水晶発振子を浸したとき、一定の振動数減少が得られるまで数十分を要した。そこで、デコンポリューション法を用いて皮膚透過量を補正したところ、水晶発振子で測定したインドメタシンの皮膚透過量は HPLC の測定値とほぼ等しくなった。

2. LSE-high の皮膚刺激性評価材料としての有用性

2-1 皮膚刺激性に及ぼす角質層の影響

皮膚刺激評価にはウサギやモルモットなどの動物皮膚を用いる試験の他に、浮遊細胞系を用いた MTT 試験や NR 試験等の細胞毒性試験があるが、浮遊細胞には角質層バリアーが存在しないため、*in vivo* 皮膚刺激性と関連しないといわれている。そこで、皮膚刺激性に及ぼす角質層の影響を速度論的に評価した。全層 LSE に 3%乳酸を適用すると MTT 法で測定した生存率は 2 相性の低下を示した。角質層を除去した LSE を用いて同様の試験を行ったところ、生存率減少速度は単純な一次速度で示された。また、この時の速度定数は全層 LSE の後期相の速い速度定数と極めて類似していた。このことから、角質層バリアー機能が完全な時には刺激物質の LSE 透過性が遅いため、皮膚中の刺激物質の濃度も低く、細胞生存率の減少速度も遅くなると考えられた。すなわち、LSE の刺激挙動上の明らかな変曲点の存在は角質層バリアー機能の破壊が突然起こることに起因していると考えられた。

2-2 Draize 皮膚刺激性試験の代替法としての LSE-high を用いた MTT 試験の有用性

LSE-high を用いた細胞毒性試験 (MTT 試験) の有用性を、皮膚中の物質拡散則と toxicokinetics/toxicodynamics 相関 (Emax モデル) を利用して評価した。塩化セチルピリジニウム (CPC) をモルモットの intact 及び stripped skin に適用して、皮膚刺激部位濃度と Draize スコアーおよび MTT 試験結果の関係、さらには Draize スコアーと MTT 試験結果の関係を検討した。これらのデータは CPC の刺激部位濃度を用いることで、Draize 試験と MTT 試験結果共に、同じ Emax モデル (Hill 式) によって表すことができた。次に、LSE-high を用い、刺激部位濃度と MTT 試験結果の関係とモルモットと LSE-high の MTT 試験結果の関係を検討した。その結果、LSE-high もモルモット皮膚と同様に、刺激部位濃度と皮膚刺激性の関係を評価できることが示唆された。また、モルモット皮膚の MTT 試験結果と LSE-high の MTT 試験結果は類似したパターンを示した。しかし、LSE-high を用いた時の皮膚刺激度と刺激部位濃度の相関では、 I_{max} とはモルモット皮膚を用いた時の結果と同じ値であったが、 IC_{50} 値は異なった。これは、CPC の細胞膜透過性がモルモット皮膚より LSE-high で高いため、低濃度でも高い死細胞率が得られたものと考えられた。そこで、LSE-high の刺激部位濃度にモルモット皮膚と LSE-high の IC_{50} 比を用いて補正したところ、

LSE-high とモルモット皮膚の刺激性データはほとんど同じ曲線で示すことができた。

本研究によって、LSE-high は薬物のヒト皮膚透過性と透過促進剤のスクリーニングを短時間で評価できること、さらに、ニオイセンサーを合わせて用いることで皮膚適用製剤の High Throughput Screening に対応できることが明らかになった。また、LSE-high を用いた MTT 試験はモルモットやウサギを用いた Draize 試験の代替法になる可能性が示唆され、化粧品や医薬品添加物の刺激性評価の新規方法として有用と考えられた。