

05-1

塩化セチルピリジニウムによる皮膚刺激性の 速度論的解析：三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた *in vitro*法とヘアレスマウスを用いた *in vivo*法の比較

加納聡^{1,2}、藤堂浩明¹、杉林堅次¹
城西大学・薬学部・臨床薬物動態学講座¹
マルホ株式会社・京都 R&D センター・研究部²

Kinetic analysis of skin irritation by cetylpyridinium chloride: Comparison between *in vitro* method using three-dimensional cultured human skin model with *in vivo* method using hairless mice

Kano Satoshi^{1,2}, Todo Hiroaki¹, Sugibayashi Kenji¹
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University¹
Maruho Co., Ltd. Kyoto R&D Center Research Laboratories²

近年、PK(pharmacokinetic)とPD(pharmacodynamics)およびそれらの相関(PK/PD相関)はますます注目され、医薬品の適正使用において重要な役割を担っている。その中でも局所作用、特に皮膚への適用を考える場合には血中濃度ではなく適用部位である皮膚組織あるいはその下部組織中の薬物濃度と効力の関係について論じる必要がある。また、皮膚中の薬物濃度と薬理反応の程度のみならず皮膚刺激などの副作用を速度論的に捉えること、すなわちTK/TD(toxicokinetics/toxicodynamics)相関も製剤全体を評価する上で極めて有用であると考えられる。皮膚刺激は、外来の化学物質や物理的因子などによるダメージによって生じる可逆的な炎症反応として定義され、最終的に紅斑や浮腫などの皮膚反応を引き起こす。従来から化学物質の皮膚に対する刺激性の評価法としてヒトにおけるパッチテストの他、ウサギやモルモットを用いたDraize試験が行われてきた。一方、近年の細胞培養工学の発展により、実際の皮膚の構造に極めて近い三次元型培養皮膚モデルが開発され、MTT試験やneutral redの取り込み試験を用いた細胞毒性試験により皮膚刺激性が評価されている。現在この方法(培養皮膚を用いたMTT試験による皮膚刺激性評価)は、動物実験代替法としてthe European Centre for the Validation of Alternative Methods(ECVAM)によってバリデーションが実施されている。しかしながら、Draize試験やMTT試験は、いずれも適用した被験物質の濃度とそれ際の皮膚刺激性について報告されているにすぎず、刺激発現部位での薬物濃度と刺激性の関係について検討した報告例はほとんどない。さらに被験物質を適用してから十分に時間が経過した後の最終的な反応を評価しており、皮膚刺激反応の時間推移、すなわち皮膚刺激性を速度論的に解析した報告はほとんどない。そこで本研究では、皮膚刺激反応の時間推移および皮膚中濃度との関係について塩化セチルピリジニウム(CPC)をモデル刺激物質として用いて検討した。皮膚中のCPC濃度はHPLCにより測定

し、皮膚刺激性はMTT試験により評価した。その際のCPCによる経時的な皮膚刺激反応(MTT試験による生細胞率の減少)は一次速度定数を用いて表した。得られた培養皮膚であるLSE-highを用いた*in vitro*結果についてヘアレスマウスを用いた*in vivo*結果と比較し、LSE-highの皮膚刺激評価ツールとしての有用性を評価した。CPCを適用したときの皮膚刺激の経時的な変化は、intact(full-thickness)LSE-highとstripped LSE-highで明らかに異なる挙動を示し、この異なる挙動は角層の有無に起因していると考えられた。ヘアレスマウスもまた同様に角層の有無によって異なる皮膚刺激挙動を示した。intact skinにおける皮膚刺激挙動は2相性を示し、2つの一次速度定数(k_1 および k_2)で表すことができた。また、stripped skinでは2相性を示さず単純な1つの一次速度定数(k_{ss})で表すことができた。intact skinにおける変曲点後の速い一次速度定数(k_2)は、stripped skinにおける k_{ss} と一致すると予想したが、*in vitro*(LSE-high)と*in vivo*(ヘアレスマウス)のいずれにおいても一致しなかった。 k_{ss} は k_2 の2~3倍であったことから、CPCによるバリアー機能の破壊が完全ではない可能性が考えられた。さらに、 k_2 および k_{ss} はヘアレスマウスがLSE-highのおよそ2倍となり皮膚刺激反応の種差が認められた。皮膚中のCPC濃度は、intact LSE-highにおいて変曲点付近である4時間以降ほぼ一定となった。また、stripped LSE-highでは適用初期よりほぼ一定のCPC濃度を示したことから、皮膚中のCPC濃度が一定(定常状態)のときに皮膚のviabilityは一定の割合で減少し、1次速度定数で表すことができると考えられた。一方、ヘアレスマウスにおける皮膚中CPC濃度は、intact skinおよびstripped skinともに測定した時間内には定常状態に達しなかった。しかしながら、ヘアレスマウスにおいても皮膚のviabilityの減少は1次速度定数で表すことができた。このことから、皮膚中の薬物濃度レベルがある一定以上のときに皮膚のviabilityの減少が一定になると考えられた。