

ヒト 3 次元培養皮膚モデル「Neoderm-ED」の 皮膚刺激性試験代替キットとしての利用

小島肇夫¹、竹岡史帆里¹、長谷川靖司¹、久保健太郎²、加藤雅一²

¹日本メナード化粧品(株) 総合研究所、²(株) ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング

Utilization of a kit in human 3-dimensional dermal model "Neoderm-ED" for
alternative to skin irritation testing.

Kojima Hajime¹, Takeoka Shihori¹, Hasegawa Seiji¹, Kubo Kentarou²,
and Kato Masakazu²

¹Research Institutes, Nippon Menard Cosmetic Co., Ltd.

²Japan Tissue Engineering Co., Ltd.

【目的】

動物を用いる皮膚刺激性試験を代替する目的において、我々は、これまでに培養皮膚モデルとして TESTSKIN・EpiDerm・VitrolifeSkin 等の様々なキットについて評価してきた。しかし、実用化という面で、まだ導入を絞りきれていない。その理由として、モデルの性能、使用期限、価格などの問題が挙げられる。そこで、本研究では既に海外において販売されているが、日本では新しいヒト 3 次元培養皮膚モデル「Neoderm-ED」の動物代替材料としての可能性を評価した。

【方法】

(キット) 直径 24mm (6 ウェルプレートサイズ) のトランスウェル上で作製したヒト線維芽細胞を含んだコラーゲンゲルの上にヒト角化細胞を播種し、作製されたヒト 3 次元培養皮膚モデル「Neoderm-ED」を用いた。(被験物質) 化粧品原料として用いる化学物質の中から、腐食性、皮膚刺激性の強度を考慮して選抜した 16 物質を用いた。陽性対照としては、1%SLS 水溶液を用いた。動物及びヒトの試験結果は当社における過去のデータベースを利用した。(性能評価) Φ 10mm のアッセイリングを用いて、培養皮膚モデルの表皮側に 100 μl の被験物質溶液を添加した。添加後、37°C・5%CO₂ インキュベーター内で 0.5~24 時間暴露した。各時間暴露した後、0.5mg/ml の MTT を含有した培地で 3 時間培養して、Φ8mm のバイオプシーパンチを用いてアッセイリング内を打ち抜いた。バイオプシー片の色素を酸性イソプロパノール溶液で抽出し、590nm で吸光度を測定した。溶媒対照と比較して、細胞毒性が 50%減少する時間 (ET50) を算出した。試験は 2 回繰り返した。(構造評価) H&E 染色; 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、5 μm のパラフィン切片を作製し、光学顕微鏡観察のため

に H&E 染色を行い、他社モデルと比較した。

【結果】

(性能評価) n=2 で測定された溶媒対照の吸光度は、溶媒 (蒸留水、オリーブ油) の種類に係わらず 1.5 前後の値を示し、また 2 回とも同様の結果であった。陽性対照として用いた 1%SLS における ET50 値は 1~2 時間の範囲であり、これまで検討した他のモデルと大きな差は見られなかった。その他の 15 物質の ET50 も再現性が得られ、本モデルは安定した培養皮膚であることを確認した。その結果として、ヒト皮膚刺激性との一致率は 68.7%、疑陽性率 18.8%、疑陰性率 12.5%であった。文献などの結果から、培養皮膚がヒト及び動物の皮膚刺激性と比較して疑陽性を示す物質はエタノール、色素などが知られている。本モデルでもエタノール 50%水溶液について検討したが、他のモデル同様、ET50 値が得られる程強い毒性はでないが、エタノール 8 時間以上処理で細胞毒性が検出され、疑陽性と評価した。また、カチオン界面活性剤の検出率は低く、疑陰性の結果を得た。これは培養皮膚の特徴でもあるが、他のモデルと比較して毒性発現は弱かった。(構造評価) H&E 染色による光学顕微鏡観察では、線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上に 8~12 層の生細胞層と 10~15 層の角質層を保持する表皮が観察された。また、生細胞層においては、通常の皮膚で観察される基底層・有棘層・顆粒層が存在していた。これらの構造は、東洋紡の LES に極めて近いものであった。

【結論】

ヒト 3 次元培養皮膚モデル「Neoderm-ED」は、16 被験物質の ET50 値算出による評価から、皮膚刺激性試験の代替材料として有望であることが示唆された。