

## 速乾性擦式アルコール手指消毒剤の皮膚刺激性評価における動物実験代替法の開発

山本 宣之,<sup>\*,a</sup> 宮本 幸治,<sup>a</sup> 加藤 雅一<sup>b</sup>

## Development of Alternative to Animal Experiment in Evaluation of Skin Irritation Caused by Alcohol-based Hand Rubs

Nobuyuki YAMAMOTO,<sup>\*,a</sup> Koji MIYAMOTO,<sup>a</sup> and Masakazu KATO<sup>b</sup><sup>a</sup>NOF CORPORATION, Tsukuba Corporate Research Laboratory, 5-10 Tokodai, Tsukuba, Ibaraki 300-2635, Japan, and <sup>b</sup>Japan Tissue Engineering Co., Ltd., R&D Department, 6-209-1 Miyakitadori, Gamagori, Aichi 443-0022, Japan

(Received February 15, 2010; Accepted April 23, 2010)

Alcohol-based hand rubs are widely used for infection control in clinical practice. However, it is known that frequent use of the alcohol-based hand rubs may cause skin irritation. To predict the skin irritation in human, animal experiments are quite useful. Especially, the Draize Test using rabbits is suitable for this purpose because their skin is highly sensitive. On the other hand, the development of alternative to animal experiments is important not only from the viewpoint of ethical aspects but also from the efficient research and development. Reconstructed human epidermis (RhE) was developed as a human skin equivalent model *in vitro*, and has been applied to the evaluation of skin irritation. But the RhE has not been utilized for the evaluation of alcohol-based hand rubs because of the high skin permeability and cytotoxicity of alcohols. The aim of this study was to develop a new method using the RhE in evaluation of skin irritation caused by alcohol-based hand rubs. The authors propose an experimental technique named “Skin model blowing method (SMBM)” consisting of the sequential procedure as follows; applying small amount of testing sample on RhE, blow-dry, post incubation, and cell viability measurement. According to the SMBM, the skin irritation caused by alcohol-based hand rubs could be evaluated under the similar condition of their actual use. It was found that a high correlation existed between the cell viability obtained from SMBM and the skin irritation index in rabbit which had been reported previously.

**Key words**—alcohol-based hand rub; skin irritation; alternative to animal experiment; reconstructed human epidermis; three dimensional human skin model

## 緒 言

近年、感染防止のための有効な手段の1つとして、速乾性擦式アルコール手指消毒剤(擦式消毒剤)が注目され、医療施設において多用されている。2002年10月に公表された米国の「医療施設における手指衛生のためのCDCガイドライン」においても、手指について目に見える汚染がない場合には擦式消毒剤の使用が推奨されている。<sup>1)</sup>しかしながら、擦式消毒剤の頻回使用による手荒れの問題も指摘されており、<sup>2,3)</sup>手荒れを起こした皮膚は細菌の定着部位となるため、<sup>4)</sup>感染防止対策上も看過できな

い問題である。皮膚刺激性評価については、ヒトでの試験結果とウサギを用いたDraize試験法がよく一致することが報告されており、擦式消毒剤中に配合された殺菌成分の違いによって皮膚刺激の程度が異なることが報告されている。<sup>5-8)</sup>

一方、動物福祉や倫理の観点から、実験動物数の削減、実験動物の苦痛低減、あるいは実験動物を使用しない評価法への置換えを目指した3Rs (Reduction, Refinement, Replacement)の理念の下、動物実験代替法の開発が近年活発化している。<sup>9)</sup>中でも実験動物を使用しない*in vitro*評価系は、倫理的側面だけでなく研究開発の効率化にも寄与することから開発の進展が著しく、皮膚刺激性試験においてもヒト由来細胞を用いて構築された三次元培養ヒト皮膚モデル(皮膚モデル)の応用が進んでいる。皮膚モデルはヒト表皮と同様の角層構造を有するため、

<sup>a</sup>日油株式会社ライフサイエンス事業部筑波研究所第2研究室, <sup>b</sup>株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング研究開発部

\*e-mail: nobuyuki\_yamamoto@nof.co.jp

検体を皮膚モデル上に直接投与して評価できる特長を有する。これまでに市販の各種皮膚モデルについて多数の化合物に対する感受性が評価されており、<sup>10-12)</sup> 最近では欧州における化粧品規制や化学物質規制への対応から、公的試験法として OECD テストガイドラインへの提案も進められている。<sup>13)</sup>

しかしながら、皮膚モデルを用いた評価において、エタノール含有率の高い検体では細胞毒性とウサギ Draize 試験での皮膚刺激指数との相関性が極めて低いことが報告されている。<sup>14)</sup> この原因については、皮膚モデルに対するエタノールの透過性が実際の皮膚よりも高いため、配合成分にかかわらず、エタノールの濃度や接触時間によって細胞毒性が支配されるためと考えられている。<sup>14-16)</sup> 仮に検体中からエタノールを除去すると油剤など他の配合成分が分離する場合があります、やはり評価が困難となる。これらの理由から、従来、皮膚モデルを用いて擦式消毒剤の皮膚刺激性を予測することは困難であった。

そこで本研究では、擦式消毒剤の投与直後に送風乾燥することによりエタノールの影響を最小限に留める、新しい皮膚モデル評価法の開発を行った。また、過去に報告されたウサギを用いた擦式消毒剤の皮膚刺激性試験結果<sup>5)</sup>と比較し、得られた結果の妥当性について検証した。

## 実験方法

**1. 試薬** 「日本薬局方消毒用エタノール」(エタノール 76.9-81.4% (v/v) 含有) は小堺製薬株式会社、塩化ベンザルコニウム 0.2% (w/v) 含有擦式消毒剤「ウエルパス®」及びグルコン酸クロルヘキシジン 0.2% (w/v) 含有擦式消毒剤「ウエルアップ®」は丸石製薬株式会社、ポビドンヨード 0.5% (w/v) 含有擦式消毒剤「イソジン®パーム」

は明治製菓株式会社より購入した (Table 1)。リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) は日水製薬株式会社、3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) は株式会社同仁化学研究所、イソプロピルアルコール (IPA) はキシダ化学株式会社より購入した。

**2. 三次元培養ヒト皮膚モデル, エアブローワー**  
三次元培養ヒト皮膚モデル (皮膚モデル) は、LabCyte EPIMODEL 24 (株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング製, 皮膚モデル直径 6.4 mm) を用いた。培地はキットに付属のものを使用した。エアブローワーは、エアポンプ (株式会社ニッソー製, AWA-110, 吐出量: 1.3 l/min), シリコンチューブ, 4 チャンネルノズル (INTEGRA BIOSCIENCE 製, VACUBOY 4 チャンネルアダプタ) を連結して作製した。

**3. 消毒用エタノールとの接触による細胞生存率の経時変化** 皮膚モデル上に消毒用エタノール 50  $\mu$ l を投与し、所定時間後、PBS 500  $\mu$ l の添加と吸引除去を 3 回繰り返して行った。37°C, 24 時間インキュベーションした後、細胞生存率を評価した。

**4. 試験方法** 皮膚モデル上に検体 10  $\mu$ l を投与し、投与から 1 分以内に検体が乾燥するようにエアブローワーを用いて送風した。各皮膚モデルについて上記の操作を 5 回連続で行った後、37°C, 24 時間インキュベーションした。その後、細胞生存率を評価した。

**5. 細胞生存率の評価 (MTT-assay)** MTT 7.5 mg を皮膚モデルキット付属の培地 15 ml に溶解し、生細胞染色用培地を調製した。各皮膚モデルの培地を生細胞染色用培地に交換し、37°C, 3 時間インキュベーションして生細胞を染色した。その後、カップから皮膚モデルを外してマイクロチューブに移し、イソプロパノール 200  $\mu$ l を添加して室温、暗所にて一晩放置した。皮膚モデルから色素が十分抽出されたことを確認して 96 ウェルマイクロプレートに 150  $\mu$ l/well 分注し、マイクロプレートリーダー (SpectraMax 250, Molecular Devices 社製) を用いて測定波長 570 nm, 参照波長 650 nm にて吸光度を測定した。未処理の皮膚モデルを陰性対照 (細胞生存率 100%) として、吸光度の相対値からそれぞれの細胞生存率を算出した。

**6. データ解析** データは平均値  $\pm$  標準偏差で

Table 1. Types and Concentrations of Antiseptic Agent in the Sample

Code	Sample	Antiseptic agent
E	Ethanol for disinfection	—
IP	ISODINE® PALM	Povidone iodine 0.5% (w/v)
WU	WELLUP®	Chlorhexidine gluconate 0.2% (w/v)
WP	WELPAS®	Benzalkonium chloride 0.2% (w/v)

示した。評価結果について *t* 検定を行い、危険率が 5% 未満のとき有意差があると認めた。

## 実験結果

**1. 消毒用エタノールとの接触による細胞生存率の経時変化** 消毒用エタノールを皮膚モデルに投与した際の細胞生存率の経時変化について、皮膚モデルキット 3 ロットを用いて評価したところ、接触時間が 1 分以下では細胞生存率に影響が認められなかったのに対して、1 分を超えると経時的に細胞生存率が低下した (Fig. 1)。これはエタノールが皮膚モデル上層の角質層を透過して、下層の生細胞に障害を与えたためと考えられる。以上の結果から、擦式消毒剤の評価において接触時間を 1 分以下とすることにより、細胞毒性に及ぼすエタノールの影響を無視できることがわかった。

**2. 擦式消毒剤との接触による細胞生存率変化** 皮膚モデル上に投与する擦式消毒剤を 10  $\mu$ l とし、投与直後にエアブローを用いて送風することにより 1 分以内に乾燥させた。投与・乾燥操作を繰り返し 5 回行った後、37°C にて 24 時間培養し、その後、MTT を用いて生細胞を染色し、生成したホルマゼンを IPA で抽出して吸光度を測定することにより細胞生存率を評価した (Fig. 2)。以下、こ

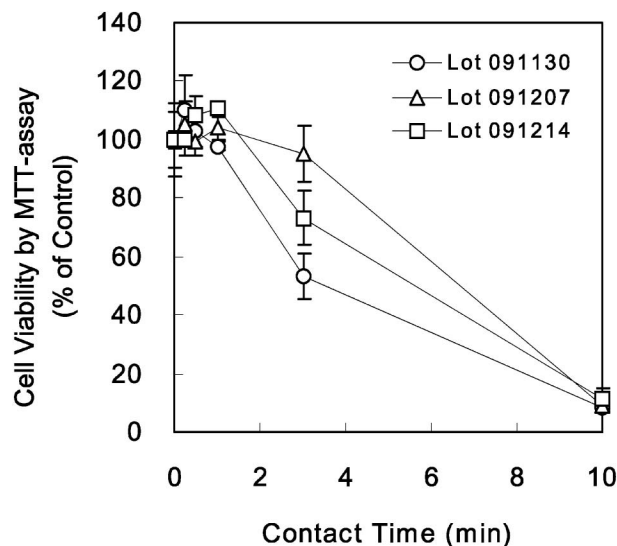


Fig. 1. Cell Viability Determined by MTT Time Course Assay

Epidermis models were exposed to the ethanol for disinfection complying with the Japanese Pharmacopoeia (ethanol content 76.9–81.4% (v/v)), and is expressed as a percentage relative to untreated one (negative control). Data are presented as mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$  for each lot of epidermis model kit).

の方法を「皮膚モデルブロー法」と記す。評価の結果、細胞毒性の強さは、エタノール消毒剤＝ポビドンヨード配合擦式消毒剤<グルコン酸クロルヘキシジン配合擦式消毒剤<塩化ベンザルコニウム配合擦式消毒剤の順であった (Fig. 3)。なお、ポビドンヨード配合擦式消毒剤を投与した皮膚モデルでは投与直後に着色が認められたが、24 時間培養後には自然に褪色して外観が未処理の皮膚モデルと同等となったため、チオ硫酸ナトリウムアルコールなどを用いた脱色処理は行わなかった。

## 考察

擦式消毒剤が皮膚に及ぼす影響を正確に評価するためには、原液で試験を行うことが望ましい。そこで本研究では、擦式消毒剤を直接、培養皮膚モデル

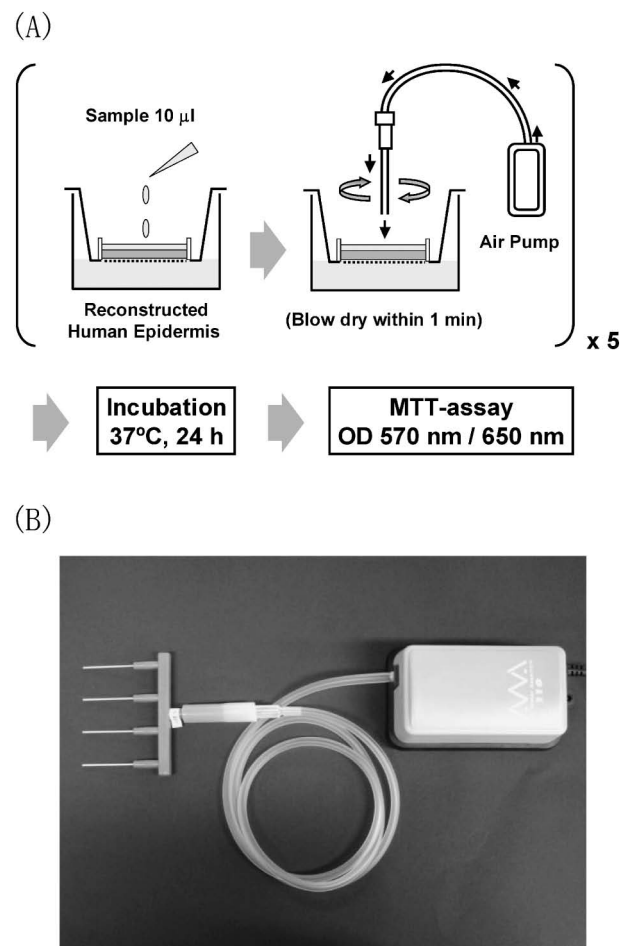


Fig. 2. Testing Protocol and the Blowing Equipment

(A) Schematic illustration of testing protocol named “Skin model blowing method”. (B) The blowing equipment consisting of air pump (exhaust volume: 1.3 l/min), tube and 4-channel nozzle. The 4-channel nozzle corresponds to tandem 4 epidermis models in the 24 well microplate.

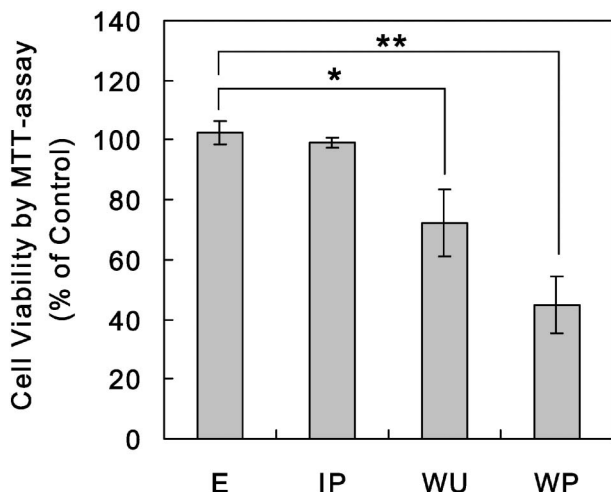


Fig. 3. Cell Viability Determined by MTT-assay

E, Ethanol for disinfection; IP, ISODINE® PALM; WU, WELLUP®; WP, WELPAS®. Epidermis models were exposed to alcohol-based hand rubs, and is expressed as a percentage relative to untreated one (negative control). Data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n=3). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared with Ethanol for disinfection.

に塗布することにより評価する試験系について検討した。

ヒトが擦式消毒剤を実際に使用する場合には、擦り込み操作によって 30 秒程度で乾燥するが、培養皮膚モデルに投与する場合には、アルコール成分が長時間残留することにより、細胞生存率が低下する。そこでまず、消毒用エタノールとの接触による細胞生存率の経時変化について検討したところ、接触時間が 1 分以内であれば細胞生存率に影響しないことが明らかとなった。

この結果を踏まえて筆者らは、検体を皮膚モデルに投与後、速やかに送風乾燥させる *in vitro* 試験法「皮膚モデルブロー法」を考案した。この方法を用いて各種擦式消毒剤の評価を行った結果、それぞれの細胞生存率に差異が認められた。

そこで次に、これらの細胞生存率と *in vivo* での皮膚刺激性を比較した。*In vivo* での皮膚刺激性については、辻らによって報告されているウサギでの皮膚刺激性試験結果<sup>5)</sup>を参照した。既報によれば、健常ウサギに対する各種手指消毒剤の塗布において、(A) 皮膚一次刺激 (単回塗布) での 14 日間累積刺激評点、及び、(B) 累積皮膚刺激 (1 日 5 回 7 日間連続塗布) での 14 日間累積刺激評点を指標として評価した結果、刺激性の強さは、塩化ベンザルコニウム製剤 > グルコン酸クロルヘキシジン製剤 >

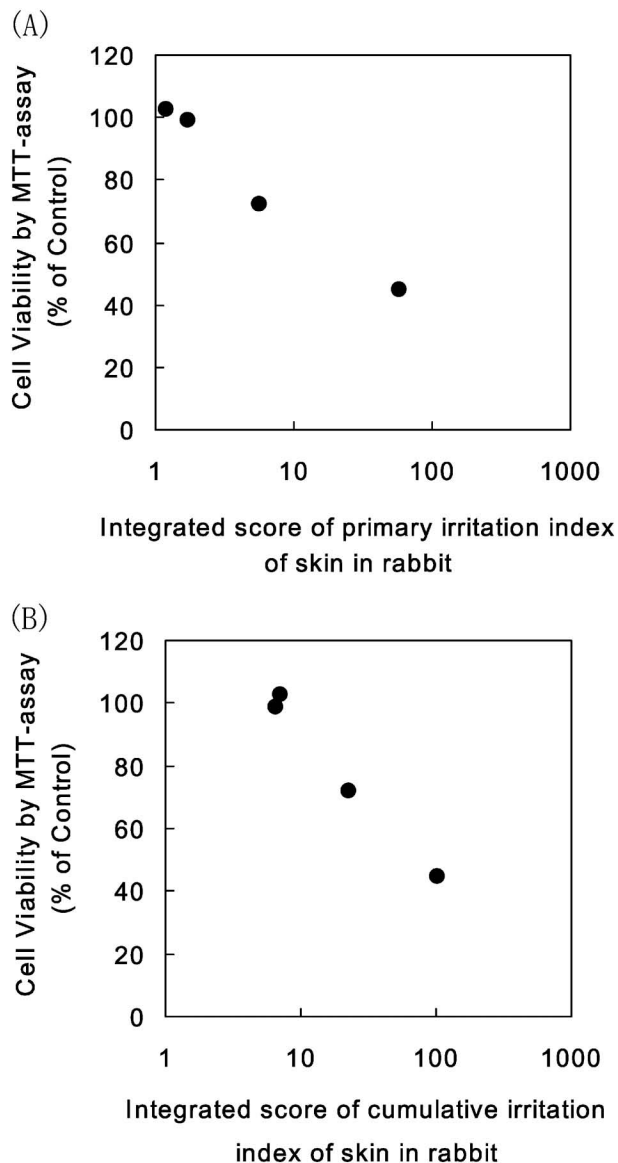


Fig. 4. Correlation of Skin Irritation Index (in vivo) and Cell Viability (in vitro)

(A) Integrated score of primary irritation index of skin in rabbit (previous work) and cell viability (this work). (B) Integrated score of cumulative irritation index of skin in rabbit (previous work) and cell viability (this work).

消毒用エタノール=ポビドンヨード製剤の順であった。この順位は、本研究の「皮膚モデルブロー法」における細胞生存率の傾向と一致した。そこで「皮膚モデルブロー法」での細胞生存率と (A), (B) それぞれの 14 日間累積刺激評点の定量的な比較を行ったところ、両者に高い相関性が認められた [Figs. 4(A) and (B)]. このことから「皮膚モデルブロー法」は、皮膚刺激性の程度を予測可能な *in vitro* 試験法であることが示唆された。

医療現場では各処置単位での手指衛生が推奨され

Table 2. Dosage Amount of Alcohol-based Hand Rubs in Each Subject

Subject	Single Dosage Amount	Application Site	Dose/Area
Human	$3 \times 10^3 \mu\text{l}$	Approx. 600 cm <sup>2</sup>	Approx. 5 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$
Reconstructed Human Epidermis	10 $\mu\text{l}$	0.32 cm <sup>2</sup>	31 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$

ており、手指衛生の実態調査においても極めて高い頻度で手指消毒剤を使用することが報告されている。<sup>17)</sup>「皮膚モデルブロー法」では検体の単位面積あたりの単回投与量がヒト実使用の約6倍にあたり (Table 2)、繰り返し5回投与では約30回分の塗布に相当することから、少量の検体を用いて頻回投与を模した試験が可能な点が長所として挙げられる。また、多数の検体を同時に評価する場合でも検体数に応じて培養皮膚モデルを用意すれば対応できる。

一方で短所としては、高粘度検体では投与量の制御が難しい点が挙げられるが、この課題については、高粘度検体に対応した微量吐出シリンジ型マイクロピペットを用いることにより改善できると考えられる。

これらの長所と短所をよく理解して使用するならば、「皮膚モデルブロー法」は擦式消毒剤の皮膚刺激性を予測可能な動物実験代替法として有用であると言える。

## REFERENCES

- Boyce J. M., Pittet D., *MMWR Recommen. Rep.*, **51**(RR16), 1-44 (2002).
- Asaka K., *Journal of New Remedies and Clinics*, **53**, 184-190 (2004).
- “Shoudoku Yaku no Shiyou Shishin,” 3rd ed., ed. by Japanese Society of Hospital Pharmacists, YAKUJI NIPPO Ltd., Tokyo, 1999, p. 276.
- Shino T., *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, **4**, 235-240 (1980).
- Tsuji A., Nakayoshi T., Sannomiya F., Yashiro J., Goto S., *Japanese Journal of Environmental Infections*, **8**, 33-41 (1993).
- Tsuji A., Sannomiya F., Yashiro J., Nakajima S., Goto S., *Japanese Journal of Environmental Infections*, **11**, 207-220 (1996).
- Tsuji A., Oshikata N., Yamamura Y., *Jpn. J. Med. Pharm. Sci.*, **49**, 725-732 (2003).
- Tsuji A., Oshikata N., Yamamura Y., *Jpn. J. Med. Pharm. Sci.*, **53**, 109-115 (2005).
- Yoshiyama Y., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 733-734 (2008).
- Tornier C., Rosdy M., Maibach H., *Toxicol. In Vitro*, **20**, 401-416 (2006).
- Kojima H., Ando T., Inagaki K., Ohhira M., Kosaka T., Nakamura Y., Torishima H., Morikawa N., Kanno J., Kuboki M., Genno M., Nokata M., Harada T., Morimoto T., Yoshimura I., Ohno Y., *AATEX*, **13**, 36-44 (2008).
- Katoh M., Hamajima F., Ogasawara T., Hata K., *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 327-334 (2009).
- Kojima H., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 747-752 (2008).
- Genno M., Yamamoto R., Kojima H., Konishi H., Klausner M., *Altern. Animal Test. Exp.*, **5**, 195-200 (1998).
- Li L., Margolis B. L., Hoffman M. R., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **88**, 1908-1912 (1991).
- Nagasawa M., Hayashi H., Nakayoshi T., *Dermatology*, **204**, 109-113 (2002).
- Wakisaka H., *Japanese Journal of Environmental Infections*, **24**, 47-52 (2009).