

## 特別企画

「医薬部外品の製造販売承認申請における  
安全性に関する資料のあり方検討委員会報  
告」

— 感作性試験分科会 —

横関 博雄 (東京医科歯科大)  
中田 土起丈 (昭和大)  
坂口 齊 (花王)  
大野 泰雄、小島 肇 (国立衛研)  
金澤 由基子 (食薬センター)

2008/1/14

1

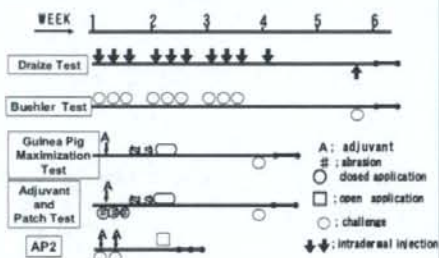
## 検討内容

- ・皮膚感作性試験の種類・概要 (GPMT/Buehler/LLNA)
- ・LLNAの特徴(メリット・デメリット)
- ・リスク評価方法
- ・海外peer reviewの動向

2008/1/14

2

## モルモットを用いる皮膚感作性試験



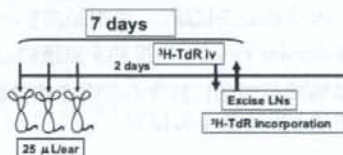
2008/1/14

3

## Local Lymph Node Assay (LLNA)

Animal: CBA/J (CBA/Ca) Female, 7-12 W  
(OECD No.429)

## Sensitization



2008/1/14

4

## LLNAの特徴(メリット・デメリット)

- ・メリット: 短期間、動物の苦痛低減、感作性の強さを数値化→EC3 (比較、統計処理可能) ヒトでの感作性と高相関
- ・デメリット: 水系媒体での低反応性 溶媒、配合成分の影響

## LLNAの適用範囲を明示

2008/1/14

5

## リスク評価の一般原則(4ステップ)

- Step1: Hazard identification**  
■物質固有の毒性を把握する (LLNA, ヒトデータ)
- Step2: Dose-response assessment**  
■有害事象が起こる可能性と曝露量との関係 (EC3, NOEL)
- Step3: Consumer exposure**  
■誰が、どのくらいの時間、どのくらいの頻度で (使用条件、不確定因子)
- Step4: Risk characterization**  
■ヒトでの曝露状況を踏まえた上での、危険性の把握 (S-RfD)

製品、原料に関わらず基本的に同じプロセス

2008/1/14

6

### リスク評価の一般原則 Risk characterization

#### ■ Sensitization Reference Dose (S-RfD) : 許容曝露量

人間母集団において、健康障害を引き起こすことがないと考えられる最大曝露量 (Maximum human exposure limit) を算出

$$\text{Acceptable Exposure Level (S-RfD)} = \frac{\text{NOEL}^*(\text{NOEL})}{\text{Uncertainty Factor (UF)}}$$

\*No Observed (Adverse) Effect Level: NO(A)EL

2008/1/14

7

### 海外のpeer review の動向

- 水溶液や混合物の評価は難しい
- Stand Aloneとして、感作強度の判別難しい
- スクリーニングとしての one dose LLNAを認める方向

海外の評価をどう受け止めるか、  
日本独自にpeer reviewを行う必要性は？

2008/1/14

8

### まとめ(今後の方針)

- LLNAは医薬部外品の感作性評価に有用である
- 種々の問題点を確認し、適用範囲を示す
- 海外のpeer reviewの推移を見極める
- 医薬部外品申請における皮膚感作性試験方法と評価基準の提案

2008/1/14

9

日本動物実験代替学会 第21回大会  
 医薬部外品の製造販売承認申請における  
 安全性に関わるあり方検討委員会報告

眼刺激性分科会からの報告

平成20年11月14日

## 委員会メンバー

平野 耕治	医師	藤田保健衛生大学
島 賢一郎	専門家	株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング
森田 正道	専門家	アイリス動物医療センター
萩野 滋匡	工業会	株式会社 資生堂
金子 豊蔵	専門家	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部
瀬戸 洋一	学会	プロクター・アンド・ギャンブル・ジャパン株式会社
小島 望	事務局	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 新規試験法評価室

## これまでの活動

開催日	概要
第1回 平成19年10月15日	医薬部外品の安全性評価と動物実験代替法を用いた安全性評価の現状と将来について
第2回 平成19年12月12日	眼刺激性試験代替法開発のこれまでの流れ、眼刺激性試験及び代替法開発の質疑応答
第3回 平成20年2月13日	ヒト角膜障害や痛みについて、代替法の国際動向概論
第4回 平成20年4月30日	ウサギの角膜について、Draize試験の概論
第5回 平成20年7月22日	欧米の状況と今後の予定、厚生科学研究ガイダンス
第6回 平成20年9月17日	試験法の第三者評価委員会眼刺激性試験との合同開催、BOOP及URCEの検討
第7回 平成20年10月15日	締結を用いた眼刺激性評価の検討、あり方検討委員会の今後の内容について

## 医薬部外品製造販売承認の現状

Q. 動物実験代替試験法による試験成績を申請資料として用いることは可能か？



- ・ OECD等により採用された代替法試験法
- ・ 適切なバリデーションでそれらと同等と評価された方法

「医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品品承認申請に添付する資料に関する質疑応答集 (Q&A)」(平成19年7月19日 事務連絡)  
 厚生労働省医薬食品局審査管理課

## 化粧品・医薬部外品開発における 眼刺激性試験を行なう目的

化粧品・医薬部外品:

本来、眼に入れてはならないものが誤って入ったときの安全性を評価

粘膜への影響を評価

① 眼に入った物質によりどのような損傷が、どの部位に、どの程度生ずるかを濃度や量との関係で明らかにする。

② 損傷の回復性の有無とその過程を明らかにする。

③ 洗眼処置による損傷の軽減の有無を明らかにする。

(参考: 文部科学省、眼刺激性試験の代替法のバリデーション、総務省、22(6)、221-217、1998)

眼に対する安全性を確保

眼に影響がない事、または応急処置により一過性の影響ですむことを保証

## 国内動向

・ 厚生科学研究 (1990年代)

- 参加機関: 29施設
- 被験物質数: 38種類(化粧品原料)

- 試験数: 11種類

- ・ 細胞毒性試験
- ・ その他
- SIRG-NR
- HeLa-MTT
- CHL-CV
- MATREX-MTT
- 赤血球溶血 など
- 受精試験
- ヘモグロビン変性 など

Ono T. et al. Toxicol in Vitro 13, 73-88 (1999)

眼刺激性分科会では、厚生科学研究バリデーション結果を評価し、今後、細胞毒性試験(2次元モデルを含む)の医薬部外品の眼刺激性試験での利用可能性について、更に検討することにした。

## 海外動向

- ・ 米国ICCVAMと欧州ESAC(ECVAM科学諮問委員会)が眼腐食性や強い眼刺激性物質を同定する方法として承認(2006年~2007年)
- ・ OECDがガイドライン案を公表(2008年)

- BCOP(ウシ摘出角膜の混濁及び透過性試験)
- ICE(鶏の摘出眼球試験)

現在、JaCVAMの第三者評価委員会による検討が行われているBCOPとICEについて、眼刺激性分科会としても医薬部外品の眼刺激性試験に用いることについて検討を進める。

## 眼刺激性分科会の今後の活動

- ・ 厚生科学研究で検証された細胞毒性試験(3次元モデルを含む)について医薬部外品の眼刺激性評価の観点で検討を行なう。
- ・ 海外での評価が進んでいる代替法、BCOP及びICEについて医薬部外品の眼刺激性評価の観点で検討を行なう。
- ・ 国内外で開発・評価が進められている眼刺激性試験の動物代替法について、最新動向調査を引き続き行ない、必要に応じて内容の検討を行なう。

医薬部外品の製造販売承認申請における  
安全性に関する資料のあり方検討会報告

## 光関連毒性分科会報告

分科会メンバー  
小島 肇 (JaCVAM)  
上出 良一 (慈恵会医科大学)  
田中 憲穂 (食品薬品安全センター)  
森元 辰実 (ノビア)  
今井 教安 (コーセー)

## 光関連毒性

光(紫外線)暴露により惹起される毒性

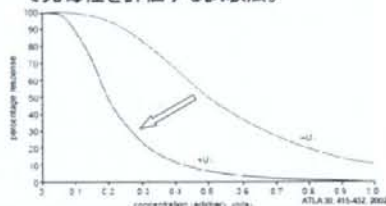
- ・ 光毒性
  - 医薬部外品申請ガイドラインに記載
  - 3T3 NRU-PT法が第三者評価を受け公定化

まずは光毒性(3T3 NRU-PT法)について検討し、次いで、光感作性および光変異原性について検討を行うこととした。

- 代替試験法は研究段階

## 3T3 NRU-PT法の概要

- ・ 細胞毒性評価をベースとした試験法。照射時と非照射時の細胞毒性の推移で光毒性を評価する試験法。



## 3T3 NRU-PT法の特徴

- ・ 試験法の特徴
  - ハザード評価のための試験法として有用。
  - ヒトのデータと良い相関性を示す。
  - 簡便で習得しやすく、高価な機器を必要としない。
  - 試験開始から3日で結果が得られる(迅速)
  - 動物を使用していない。

↓  
医薬部外品製造販売承認申請時の  
安全性に関する資料に  
光毒性試験法として応用可能と判断

## 3T3 NRU-PT法の短所

- ・ 3T3 NRU-PT法の短所
  - 光毒性の強さの判断は出来ない。
  - 代謝活性化による毒性を評価できない。
  - 難水溶性物質、非水溶性物質は正しく評価できない可能性がある。
  - 使用できる有機溶媒の種類・量が限られている。

## 医薬部外品申請用の安全性試験としての 3T3 NRU-PT法の運用(案)

- ・ 光毒性評価では本法を第一選択とする
- ・ 以下の条件に該当する場合は従来の動物を使用した試験法を実施することが出来る
  - 被験物質が本試験法に不適切な場合
  - 本試験法にて光毒性が疑われた場合
  - その他、必要と判断された場合

医薬部外品申請用の安全性試験としての  
3T3 NRU-PT法運用スキーム  
(案)



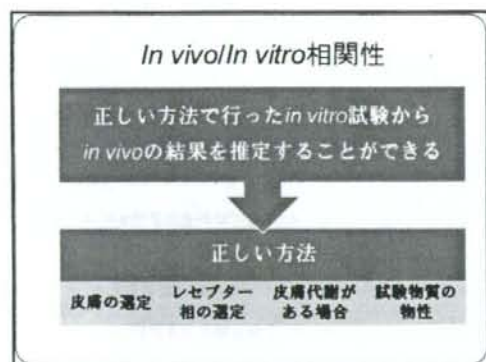
その他

- 使用設備(機器)の管理に関する情報開示
  - 照射光のスペクトラム(購入時のスペック)
  - UV強度計のメンテナンス記録
- 適切に試験が実施されるために、試験成立のために満たすべき項目の設定を検討中。

ex.

- NR抽出液の吸光度の下限値
- 陽性対照(塩酸クロルプロマジン)の値の下限値
- 照射による細胞生存率低下の限度。
  - 照射群と非照射群の陽性対照の吸光度で評価。







## 日本動物実験代替法学会 第21回大会

医薬部外品の製造販売承認申請における  
安全性に関わるあり方検討委員会報告

## 遺伝毒性分科会からの報告

平成20年11月14日

## 委員会メンバー

林 真	専門家	(財)食品薬品衛生安全性評価センター
堀野 健彦	専門家	国立医薬品食品衛生研究所 委員遺伝部
本間 正光	専門家	国立医薬品食品衛生研究所 委員遺伝部
江橋 真也	工業会	ライオン株式会社
笠松 俊夫	学会	花王株式会社
小島 肇	事務局	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 新規試験評価室

(敬称略)

## 医薬部外品申請における遺伝毒性試験

原則として医薬品遺伝毒性試験ガイドライン  
(ICHガイドライン)に従う

## in vitro 試験 (代替法)

- 1) Ames試験
- 2) 染色体異常試験

あるいは マウスリンフォーマTK試験

## in vivo 試験 (動物試験)

- 3) in vivo 小核試験

## 欧州で要求される遺伝毒性試験

(SCCPのNotes of Guidance 6th versionより)

## in vitro 試験 (代替法)

- 1) Ames試験
- 2) マウスリンフォーマTK試験
- 3) in vitro 小核試験

## in vivo 試験 (動物試験)

適切な動物試験を実施  
(多くの場合) in vivo 小核試験  
来年(2009年)3月以降は禁止

いずれかで陽性結果が  
得られた場合

## 議論

in vitro 小核試験の日本での受け入れ

ICHガイドラインが改訂され、評価項目に組み入れられる

今後、技術的な面での障害はなくなる見通し

2009年3月以降のEUでの動物実験禁止

部外品申請においても、代替法のみで問題ないことを示せば、動物実験を要求しない運用も可能

動物実験に頼らずに適切な評価が可能か?

## 展望

代替法のみで遺伝毒性の問題がないことの確認

現行の代替法の組合せでは(発がん性データに対して)  
偏陽性が多くなるのが問題

\* 欧州製工連 (COLIPA) では独自の取り組み

\* 代替法学会での遺伝毒性・発がん性予測試験の開発進展に期待 (Bhas cell transformation assay 等)

\* 日・米・欧間の意見交換も重要

医薬部外品の安全性評価のあり方検討委員会

皮膚刺激性分科会報告書

07/10～08/12

### 1. 試験名

皮膚刺激性試験

### 2. 検討委員会名簿

河合 敬一	河合敬一皮膚科医院
小島 肇	国立医薬品食品衛生研究所
杉山 真理子	(株)資生堂
寒水 孝司	大阪大学
辰見 寿	サンスター(株)
夏秋 優	兵庫医科大学 皮膚科
森 福義	(株)ポーラ
實川 節子：オブザーバー	日本ロレアル(株)

### 3. 目的

医薬部外品の製造承認申請においては、皮膚刺激性を評価する安全性の資料として「皮膚一次刺激性試験」、「連続皮膚刺激性試験」及び「ヒトパッチ試験」が求められている。このうち、「皮膚一次刺激性試験」と「ヒトパッチ試験」については、ともに皮膚一次刺激性に関する情報を得るための方法で、2種類の試験が設定されていたり、ヒトによる情報を求められたりする項目は他にはみられない。

当初、この観点から、皮膚一次刺激性試験の代替法として検討するのか、ヒトパッチ試験の安全性の担保が目的であるのかが議論になった。また、皮膚一次刺激性の情報としてはヒトパッチ試験のみで良いのではないかと意見もあったが、皮膚刺激性のあり方に関する検討ではあるものの、申請資料構成の問題でもあるので、本分科会以外の場で検討すべきと判断された。

以上の議論を経て、現時点で連続皮膚刺激性を評価する目的で検討された動物実験代替法はないことから、今回は、医薬部外品の製造販売承認申請において、皮膚一次刺激性を評価する動物実験代替法を利用することが可能であるか否かについて検討し、提案することとした。また、代替法を取り入れて評価する場合には、どのような限界や注意点を考慮すべきかについても検討を行った。

### 4. 該当する代替法の名称と選択理由

皮膚一次刺激性試験の代替法として次頁の表に示す方法が検討されているが、現時点（検討期間 07/10～08/12）において、公的に認知された動物実験代替法としては、EPISKIN のみと判断されたため<sup>2,3,4)</sup>、1年目の検討ではEPISKIN を対象として取り上げた。但し、08/11にEpiDerm SIT 及びSkinEthic RHE がESACによる追加認証を受けたため<sup>5)</sup>、2年目の検討対象に加えるかについて議論する予定である。

試験法（製造元）	状況
EPISKIN (SkinEthic 社)	<p>2007/4/26 欧州バリデーションセンター (ECVAM) にて開催された第 26 回会議にて ECVAM 科学諮問委員会非理事会メンバー (ESAC) は、EPISKIN 法（結果の判定に MTT 還元法を用いた場合）を、ウサギ皮膚一次刺激性 (Draize 皮膚刺激性試験: TG404) を代替する信頼性のある適切なスタンドアロン法であることを確認した。IL-1<math>\alpha</math> 放出量の測定については、MTT 還元法の有効な補助手段と見なし、陰性判定を確定するために使用可能とした。</p> <p>2007/12/18 SCCP は、化粧品および化粧品原料への利用について、EPISKIN を歓迎するとコメントしたが、Annex に含まれるような化粧品原料の評価の不足と色素、染毛剤の情報不足を指摘した<sup>6)</sup>。</p> <p>2008/6/6 OECD ガイドライン案として提出され、コメントを募集開始。その後、10月の OECD ガイドライン案 Ver. 5 では、ESAC による認証は IL-1<math>\alpha</math> の放出測定による判定を追加することにより、MTT 還元法で得られた陰性判定をする補助手段として有効としていたが、評価は MTT 還元法による生存率測定のみで修正された<sup>7)</sup>。</p>
EpiDerm SIT (MatTek Co.) SkinEthic RHE (SkinEthic Com.)	<p>EPISKIN と同様に、欧州において 2004 年から公式バリデーションが実施されたが、その結果について、2007/4/26 欧州バリデーションセンター (ECVAM) にて開催された第 26 回会議にて、ESAC は、「特異性が高く、陰性と判断された場合にさらなる試験が必要だが、プロトコルの改良により感受性の向上が見込める」と評価した (EpiDerm)。その後、OECD ガイドライン案 Ver. 5 (2008/10/29) には、2 試験法を加えて Reconstructed Human Epidermis (RHE) としてまとめられ、2008 年 11 月 4-5 日の ESAC にて、再評価により、in vitro 皮膚一次刺激性試験として認証された。</p>
LabCyte EPI-MODEL24 (株J-TEC)	<p>日本動物実験代替法学会にて、バリデーションを開始した (me-too 試験)。</p> <p>バリデーション予定期間：2008/3～2009/1</p>
EPI-100 (倉敷紡績株) テストスキン LSE001、 LSE002、LSE003 (東洋紡績株) Reconstituted Human Epidermis Small、 Large (SkinEthic Lab.) EpiDerm (MatTek Co.)	<p>JIS L 1918 「繊維製品の皮膚一次刺激性試験方法—培養ヒト皮膚モデル法」<sup>8)</sup> が登録されているが、実際には JIS L 1918 として左記の試験法を活用した事例はない。</p>

## 5. EPISKIN 試験法の概要

EPISKIN は、SkinEthic 社から販売されている 3 次元培養皮膚モデルである。試験物質を 3 次元培養皮膚の表面に 15 分接触させ、さらに 42 時間の培養後、細胞生存率を MTT の還元法で評価し、50% の生存率を識別点として、刺激性を評価する試験法である。

本試験法は、欧州でのバリデーションにおいて、良好な結果が得られたことから、ESAC は本法がウサギを用いた皮膚刺激性を予測する (R38 を予測する Draize 皮膚刺激性試験法を代替する)、信頼性のあるスタンドアローンな試験法であると評価した<sup>9)</sup>。

## 6. EPISKIN 試験法の特徴

### 6.1 試験法利用にあたっての長所

皮膚刺激性試験について ECVAM が定めた目標は、欧州連合のリスクアセスメントによって規定された皮膚刺激性物質 (R38 指定物質) と非刺激性物質を識別できる試験法を確立することであり、EPISKIN は R38 表示の識別を予測する方法として有用な方法と確認された。これは、EPISKIN の細胞生存率 50% 以下のものは、OECD TG404<sup>9)</sup> において少なくとも 3 個体中の 2 個体で評点 2 以上となると読み替えることができる<sup>10)</sup>。

したがって、未知の被験試料であっても EPISKIN にて細胞生存率 50% 以下との評価結果が出た場合には、原則 4 時間閉塞貼付する OECD TG404 にて少なくとも 2 個体で評点 2 以上が予測されるため、閉塞時間を原則 24 時間に設定した部外品申請試験でも同程度以上の反応 (3 個体中の 2 個体で 2 以上) が出ると予測できる<sup>11,12)</sup>。

### 6.2 試験法利用にあたっての問題点

#### 1) 皮膚刺激性の定量的評価

取り扱う対象として、欧州では強い刺激を含む広範囲の刺激性を有する化学物質が想定されるが、日本の部外品申請においては、比較的弱い刺激に偏ると考えられる。皮膚刺激性を識別する基準として、欧州での基準の他に、国連による化学品の分類及び表示に関する危険性有害性分類 GHS (The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals) があり、GHS 表示では、category II (irritant: 少なくとも 2 個体で 2.3 以上)、category III (mild irritant: 少なくとも 2 個体で 1.5 以上 2.3 未満) 及び非表示 (1.5 以上の個体が 1 以下) の分類となる。本国際標準への対応も期待されたことから、仮に細胞生存率 70% 以上を非表示、30% 以下を irritant、その間を mild irritant と分類した場合の予測性能を評価したところ、mild irritant の識別はほとんど不可能であったと ESAC の statement に報告されている<sup>10)</sup>。したがって、EPISKIN を用いる細胞生存率による評価では、皮膚刺激性の強さの程度はわからないと考えられる。

## 2) 弱刺激性物質の評価

欧州では刺激性ポテンシャルを知ることが目的なので、EPISKIN との相関性についての検討では、刺激性の強いもの～弱いものまで幅広く検討されたが、SCCP のコメントに化粧品原料の評価の不足が指摘されており<sup>9)</sup>、化粧品原料のような刺激性の弱い物質に絞った場合の精度は不明である。

## 3) 皮膚一次刺激性試験の目的の国際的相違

皮膚一次刺激性検討の目的は、欧州と日本では異なっている。欧州では、原料の取り扱い及び輸送時において化学物質の皮膚刺激性を把握する(R38 ラベルで識別する)ことである。一方、日本の医薬部外品の承認申請において求められているのは、承認申請された新規化合物が配合を予定された濃度において、市場で安全に使用できるかどうかを評価するため、①刺激性ポテンシャルの把握、②配合濃度における安全性の確認及び③ヒトパッチテストの予備検討である。したがって、Draize 法をベースとする 2 試験方法は以下の表のように試験条件の違いがあり、特に閉塞貼付における貼付時間の違いが EPISKIN によって医薬部外品の承認申請における皮膚一次刺激性試験を単純に代替できないポイントになると思われる。

	OECD TG404	部外品の承認申請
投与濃度	原則、液状物質は希釈せず、個体の場合は僅かな水で湿らせて良く接触するようにする	原則、皮膚一次刺激性を適切に評価するため、無刺激性を示す濃度が含まれるように数段階設定
投与方法	原則、4 時間の閉塞 (ガーゼパッチ)	原則、24 時間の開放または閉塞貼付

## 4) EPISKIN の利用環境

現時点では、国内で EPISKIN を入手して検討する際、入手経路の整備や価格の問題があり、これらの解決も必要となる。

## 7. 今後の検討方針

### 1) 各種試験法の対応性の検討

OECD TG404 にて R38 非表示 (ウサギ 4 時間閉塞貼付で 2 未満) と判断される被験試料について、ウサギの 24 時間閉塞貼付試験、さらにはヒト 24 時間閉塞パッチテストとの対応性を文献情報により評価する。

### 2) ヒトパッチ試験の実施手順の改善可能性の検討

1)の結果から、Reconstructed Human Epidermis (RHE) を用いた評価をもとに、安全に 24 時間閉塞パッチテストを実施するための手順を検討する。(可能であれば、スキーム化)

## 8. 参考論文

- 1) 化粧品・医薬部外品 製造販売ガイドブック 2006、薬事日報社編

- 2) Cotovio, J., Grandidier, M-H., Portes, P., Rouguet, R., and Rubinstenn, G.,(2005).The In Vitro Acute Skin Irritation of Chemicals : Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of the ECVAM Validation Process.ATLA, 33,329-349.
- 3) Performance standards for applying human skin models to in vitro skin irritation testing, ECVAM SIVS : Final Version 25 May 2007.
- 4) Roland Rouguet, Jose Cotovio, 實川 節子.(2007).再構成表皮モデルを用いた化学物質の皮膚刺激性 in vitro 評価試験のパリデーション. Fragrance Journal,10,75-80
- 5) ECVAM Background Document on the Recent Adaptions of the ECVAM Performance Standards for in vitro Skin Irritation Testing in the Context of the Drafting Progress of a EU Test Method and a OECD Draft Test Guideline, ISPRA, November, 2008
- 6) SCCP Memorandum on the in vitro test EPISKIN for skin irritation testing, SCCP/1145/2007
- 7) OECD guideline for the testing of chemicals. Draft proposal for new guideline: In vitro skin Irritation: Human Skin Model Test, Version 5
- 8) 繊維製品の皮膚一次刺激性試験方法 培養皮膚モデル法 JIS L 1918:2005(JTETC/JSA)、平成 17 年 1 月 20 日制定、日本工業標準調査会 審議 (日本規格協会 発行)
- 9) OECD guideline for the testing of chemicals. 404, Acute Dermal Irritation /Corrosion, Addapted : 24th April 2002.
- 10) ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法の第三者評価報告書、皮膚刺激性試験代替法の第三者評価委員会
- 11) Gfeller, W., Kobel, W., and Seifert, G.(1985).Overview of animal test methods for skin irritation, Food Chem Toxicol, Feb 23(2), 165-8.
- 12) Cruzan, G., Dalbey, WE., D'Aleo CJ., and Singer, EJ..(1986). A composite model for multiple assays of skin irritation, Toxicol Ind Health, Sep, 2(3), 309-20.

刺激性分化学会開催時期と検討内容

第1回会議：2007/10/4

○あり方検討委員会発足の背景と分科会の目的・役割説明

○動物実験代替法の現状と将来に関する説明

○分科会の進め方の議論

第2回会議：2007/12/15

○皮膚刺激性データベース作成における必要項目の確認

第3回会議：2008/3/1

○検討方針の変更に関する説明 ⇒皮膚一次刺激性代替としての EPISKIN

○分科会の検討方針確認 ⇒皮膚刺激性評価法の評価項目の検討が必要

第4回会議：2008/4/20

○分科会の検討方針再確認

○EPISKINの説明

第5回会議：2008/7/3

○繊維製品の皮膚一次刺激性試験方法としての培養皮膚モデル法の説明

JIS L 1918「繊維製品の皮膚一次刺激性試験方法—培養ヒト皮膚モデル」

⇒本分科会では検討対象としない

第6回会議：2008/10/9

○皮膚刺激性試験代替法第三者評価会議との合同

ESAC 皮膚刺激性 IN-VITRO 試験の妥当性に関する声明書の解析

第7回会議：2008/12/10

○日本動物実験代替法学会 第21回大会における発表内容

○OECDガイドラインの状況

○今後の検討方針に関する議論



医薬部外品の安全性評価のあり方検討委員会  
感作性試験分科会報告書

1. 試験名: 皮膚感作性試験

2. 検討委員会名簿

大野泰雄<sup>1)</sup>、金澤由基子<sup>2)</sup>、小島肇<sup>1)</sup>、坂口斉<sup>3)</sup>、中田土起文<sup>4)</sup>、横関博雄<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup>国立医薬品食品衛生研究所、<sup>2)</sup>(財)食品薬品安全センター、<sup>3)</sup>花王(株)、<sup>4)</sup>昭和大学、

<sup>5)</sup>東京医科歯科大学

3. 目的:

皮膚感作性とは、皮膚を介して化学物質に繰り返し接触することによって遅延型アレルギーの一種である接触アレルギー(アレルギー性接触皮膚炎)の感作成立を誘導し、その後再び同じ物質や類似物質に触れることで皮膚等の接触部位に紅斑や浮腫といった炎症反応を起こす毒性を言う。医薬部外品の製造販売承認申請においては、医薬品ガイドラインに記載されているモルモットを用いる皮膚感作性試験が実施されることが多い。本分科会では、これまでと同等又はそれ以上のヒトへの安全性を担保しつつ動物愛護の観点を踏まえて、今後の皮膚感作性評価のあり方を考える。現時点で社会的に認知されている動物実験代替法が医薬部外品の承認申請において有用であるか否かについて検討する。併せて、それらの試験法を用いて申請する場合の試験法の限界等を明らかとし、今後の申請への道筋を示す。

4. 検討した代替法の名称とその理由:

マウスを用いる局所リンパ節試験(Local Lymph Node Assay, LLNA)。

現在の医薬部外品承認申請において要求されている皮膚感作性試験法として、モルモットを用いる Guinea Pig Maximization Test(GPMT)と Buehler 法が最も用いられてきた。近年 LLNA が動物実験代替法の一つとして OECD テストガイドラインに記載され、欧米を中心に化粧品原料も含む化学物質等の申請に用いられるようになってきた。今後、皮膚感作性試験法として LLNA を用いた医薬部外品の承認申請が充分想定されるため、今回検討する事とした。

5. 試験法の概要(図1)

OECDテストガイドライン(No.429)では、CBA/JあるいはCBA/Ca系の雌性マウスを8-12週齢で用いる。すなわち、マウスの両耳に被験物質を3日間連続塗布し、3日後に<sup>3</sup>H-thymidineを静脈内投与する。その5時間後に耳介リンパ節を摘出し、その中に取り込まれた<sup>3</sup>H-thymidineを測定する。溶媒対照群に対して被験物質投与群の

<sup>3</sup>H-thymidine取り込み量の比 (Stimulation index: SI) が3以上であった場合、陽性と判断する。

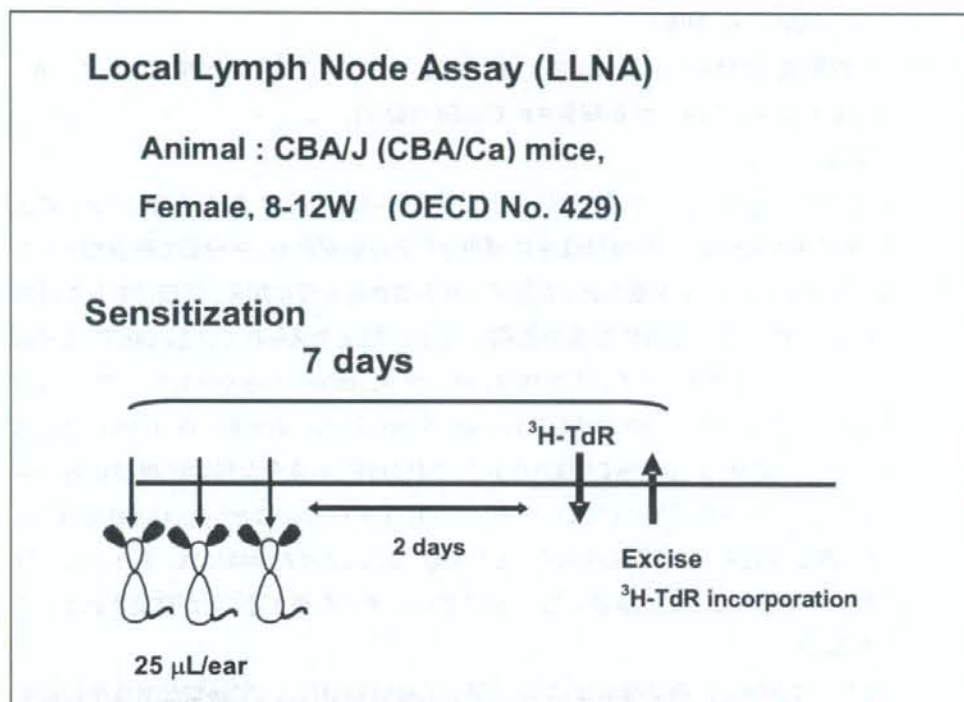


図1 LLNAの概略

#### 6. 試験法としての採用の可否

Basketter らの報告を中心に LLNA の文献を調査し、それらの概要をまとめつつ、委員会で検討した。文献から判断する限り、LLNA の結果は、これまで広く使われてきたモルモットを用いた試験結果並びにヒトでの結果と良い相関を示している。即ち、モルモット試験結果との比較では 119 個の化合物で一致率は 88%と報告されており、ヒトとの比較では 93 個の化合物で一致率は 88%と報告されている (Basketter ら、1999)。以上より、原則として皮膚感作能評価に使用できると考える。

##### 6-1 長所

これまで広く用いられてきた GPMT や Buehler 法に比較し、試験期間が短く、動物への投与が開放塗布だけであり、アジュバントを用いず且つ惹起処置を行わないので炎症反応などが無く動物の苦痛が削減される。動物が小型なので被験物質量が少なくて済み、評価結果が機器の測定値によるもの (SI 値) で、モルモットを用いた試験のような主観的な判定ではなく客観的な判定が可能。また、その数値から得られる値 (EC3 値: SI 値が 3 に

なると推定される濃度)により強度の比較が可能。色素など炎症反応が判定しにくい物質についても評価可能。

## 6-2 短所(使用範囲、制限)

1) 動物系統:動物系統により反応に差があり、CBA/J, CBA/Ca が推奨されている。BALB/cについてもいくつか報告されている(付録 1)。

### 2) 溶媒について

開放塗布で感作を実施する LLNA では、被験物質の溶解度・皮膚透過性により結果に影響を与えるので、溶媒は慎重に選択される必要がある。充分量で曝露出来ること、溶解していることを基準として選択する必要があるのに加え、皮膚に対して付着性(wetting)が悪い水溶性溶媒の使用は避けるべきと考えられている。OECD のテストガイドラインで推奨されている溶媒は、第一が Acetone:Olive oil(4:1; AOO)であり、次いで、dimethylformamide(DMF)、methyl ethylketone(MEK)、propylene glycol(PG)、dimethyl sulfoxide(DMSO)である。これ以外でも充分な科学的根拠があれば他の溶媒でも使用可能としている。そのため、エタノール、Diethylphthalate(DEP)、水+界面活性剤などが用いられることがある。ここに挙げた溶媒には、それぞれ特性があり、場合によっては溶媒の違いが評価の結果に影響することが確認されている(付録 2)。

全ての被験物質に適切な溶媒は無く、用いる被験物質によって適切な溶媒を選択する必要がある。先に記載した通り、被験物質の溶解性と十分に高い濃度で試験が実施出来ることの確認が重要である。尚、場合によっては溶媒自体が LLNA の反応を増強させる場合もあるため、溶媒対照群のリンパ球増殖能の増強をモニタリングする必要があると考えられる。

### 3) 活性剤における偽陽性

ラウリル硫酸ナトリウム(Basketter ら、1998)や塩化ベンザルコニウム(Basketter ら、1996)で偽陽性が認められており、界面活性剤の中には偽陽性を示す物質があると考えられる。活性剤の評価結果に関しては、注意が必要である。

### 4) 金属塩類における偽陰性

金属塩類(NiCl<sub>2</sub>, NiSO<sub>4</sub>)では、偽陰性となるとの報告(Basketter ら、1992)が多い。

### 5) 皮膚感作性リスクアセスメント

当初、皮膚感作性はリスク評価が出来ない化合物、すなわち閾値のない毒性として考えられてきたが、近年では皮膚感作性もリスクアセスメントが可能であることが示唆され、現在欧米を中心にリスクアセスメント手法が検討されている(付録 3)。しかしながら、日本に適用するには様々な課題がある。最も大きな課題点として挙げられる