

第2節 *In Vivo* 経皮吸収試験法

要旨

欧米では動物愛護の高まりから化粧品の安全性評価における経皮吸収試験は *in vivo* 試験は行い難い状況にある。しかし、経皮吸収試験は本来、皮膚から吸収された薬剤の体内移行や代謝、排泄までを評価する試験であり、医薬品や農薬のリスク評価には避けて通れない試験である。本稿では、経皮吸収試験法の方法について記載した後、これら試験の実施上の留意点についてまとめてみた。

1. 序論

昨今、動物実験を行うためには計画書や報告書を各施設の審査委員会に提出して承認を受ける必要がある¹⁻⁴⁾。この承認には動物実験の3Rs (Replacement, Refinement, Replacement) への配慮が盛り込まれている必要がある^{5,6)}。そのような状況下、経皮吸収試験においては、OECDやEUなどで *in vivo* のガイドラインが多数あり⁷⁾、*in vivo* 実験のみを行い難い状況になっている。これは *in vivo* の皮膚透過性結果と経口毒性試験結果を合わせて考察すればある化学物質の毒性を評価できるからである⁸⁾。よって、医薬品や化粧品の安全性および有効性試験の中でも経皮急性試験は重要な評価スキームの一つであるが、特に、欧米では動物愛護の高まりから化粧品規制や化学物質の安全性再評価 REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) に対応するため、安全性評価における経皮吸収試験は *in vivo* が中心である⁹⁾。しかし、経皮吸収試験は本来、皮膚透過性後で吸収された化学物質の体内移行や代謝、排泄までを評価する試験であり、関連医薬品や農薬などのリスク評価には避けて通れない試験である。

本稿の目的は試験法の紹介であるが、経皮吸収 (percutaneous absorption) という言葉が皮膚透過性 (skin permeation) とも混同されて用いられている現状を考慮して、まず、皮膚透過性試験法、次に全身循環系に吸収された量を測定する経皮吸収試験法の方法について記載した後、これら試験の実施上の留意点についてまとめてみた。

2. 試験法

2.1 皮膚透過性試験法

2.1.1 ふき取り、テープストリッピング

動物やヒトどちらでも応用できるもっとも一般的で簡単な方法である。本法は皮膚中のセラミドや脂質を抽出する方法であるが、もちろん被験物質の皮膚透過性を評価するためにも利用できる。被験物質の適用一定時間後、拭き取り、その部分に透過された被験物質をアセトンなどの溶媒を使って抽出する方法である。被験物質が水溶液でない場合や、溶媒で皮膚に透過した被験物質を洗い出す場合には専用カップを利用して液が漏れないように実験を行う。さらに、テープストリッピング法も簡便である。皮膚の角質層は約20層からなることから、15回程セロハンテープなどで角質層を集め、溶媒を用いて被験物質を溶出させて測定するものである¹⁰⁾。いずれもこの後、高速液体クロマトグラフィーを利用して薬剤の浸透を定量化できる。ただし、皮膚透過性の高い被験物質は少ないこともあり、本方法では回収率が低く、定量化はできるものの定性試験に近い方法と考えられる。

これらの内容は局所皮膚的適用製剤の後発医薬品のための生物学的同等性試験ガイドラインの中の¹¹⁾、皮膚薬物動態学的試験、残存量試験にも記載されている。

2.1.2 ホモジネート

被験物質の定量化を考慮する場合には、被験物質を一定面積に適用した摘出皮膚のホモジネートを用いる方法が一般的である¹²⁾。この実験では動物の皮膚しか利用できない。摘出皮膚のどの厚さまでを用いるか、すなわち、余分な真皮層を除いた皮膚や皮下組織を試料としないような技術の統一が重要である。また、ホモジネートは冷却しながら行うものの、方法により加熱する場合が多く、被験物質の安定性への配慮が必要である。

2.1.3 レーザー光利用

レーザー光を用いた光音響経皮吸収測定法である¹³⁾。皮膚の表面や内部をレーザーで測定すると、従来の方法ではとらえることが困難、あるいはできなかった情報を簡便かつ正確に得ることができる方法である。

2.1.4 薬効評価

本来この項目は次項の経皮吸収試験に該当し、皮膚透過性試験とは言い難いかもしれない。継続的に被験物質を塗布し続け、保湿性、メラニンの減少、しわの軽減、炎症抑制、損傷の治癒な

どの作用を確認する薬理的な方法も¹²⁾、広義の皮膚透過性試験であると考える。

これらの内容は局所皮膚的適用製剤の後発医薬品のための生物学的同等性試験ガイドラインの中に¹³⁾、薬理的試験としてコルチコステロイドを用いた蒼白化反応の測定として記載されている。

2.2 経皮吸収試験法

2.2.1 皮膚、血、尿、糞中の被験物質濃度測定

図1に示すように、一般的な経皮吸収においては、被験物質は皮膚（角質層、表皮、真皮）を経て、血液を介して各臓器に運ばれる。皮膚で結合、代謝、排泄される場合もあるが、体内に分布し、代謝、排泄される^{14, 15)}。

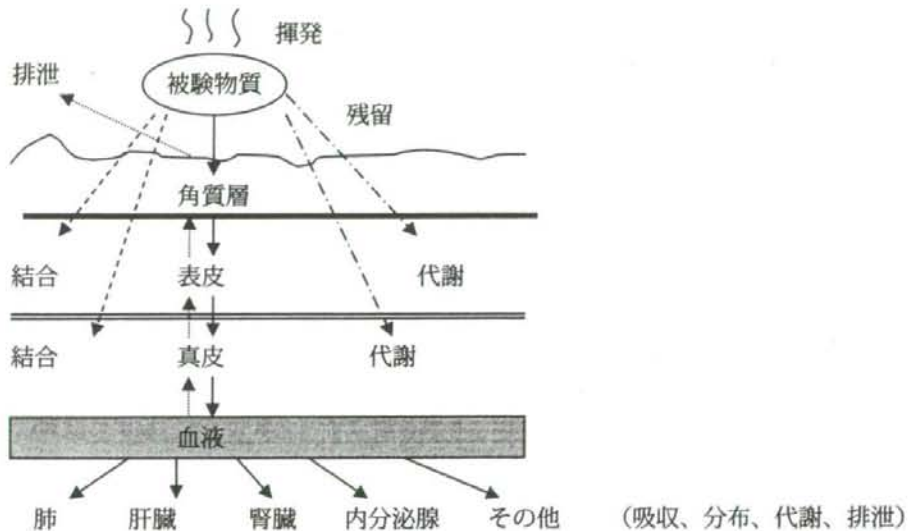


図1 経皮吸収の一般モデル

これを明らかにするため、OECD ガイドライン 427 では^{16, 17)}、あらかじめ設定された皮膚領域に適当なチャンバーを用いて、適量を適切な時間（6または24時間）適用した後、被験物質の吸収・分布・代謝・排泄を調べるため、代謝ケージを用いて皮膚、血液、尿、糞中（場合によっては呼気）、残存物の被験物質濃度が正確な回収率になるように要求している。これを全身循環系で確認するためには、放射線同位元素で標識した被験物質を用い、放射活性比を $100 \pm 10\%$ にしなければならない。血液を経時的に採取して観察を行う場合もある。

これらの内容は局所皮膚的適用製剤の後発医薬品のための生物学的同等性試験ガイドラインの中の¹³⁾、残存量試験、薬物動態学的試験にも記載されている。

2.2.2 全身オートグラフィー

放射線同位元素で標識した被験物質を用い、適切な時間適用された被験物質の吸収・分布を経時的に病理標本を作製して確認する方法である¹⁸⁾。定量性には欠けるが、被験物質の体内分布を確認するためにはもっとも適した方法である。

2.2.3 マイクロダイアリシス法 (Macroialysis)

微小透析プローブの半透膜を介して、被験物質を連続的に回収する方法である¹⁹⁾。麻酔下あるいは覚醒下動物の細胞外液、髄液、血液中の被験物質を連続的に回収し、モニターするものである。細胞外液中の物質動態をモニタリングする方法として、神経科学領域において広く用いられている。1972年 Delgado らによって開発され、probeの小型化などの改良が加えられ、現在のマイクロダイアリシス法に至っている²⁰⁾。

2.2.4 ゲルの埋め込み

ディスク状の寒天ゲルを麻酔下あるいは覚醒下動物のラット腹部の真皮と皮下組織の間に埋め込み、その上に被験物質を適用し、10時間に渡って経時的に血中濃度や寒天ゲルへの移行量を測定するものである²¹⁾。

3. 試験実施上の留意点

上記の内容を含め、経皮吸収試験の影響因子を表1に示すとともに^{10, 22)}、以下に試験法を構築する上でもっとも注意する点をまとめてみた。

表1 経皮吸収の影響因子

項目	パラメーター
被験物質	純度 分子量
溶媒	n-オクタノール/水分配係数 溶媒の種類、処方構成 溶解性 揮発性 経皮吸収促進剤の有無
皮膚	pH 種、系統 年齢、性別 適用部位 温度 損傷の有無
適用	適用面積 適用量/cm ² 適用期間

3.1 皮膚透過部位

皮膚透過は最外層の厚さに依存している。そこで、どの部位を実験に用いるかで結果が異なる。一般的には動物では腹側部または背部が実験に用いられる。ヒトでは上腕内側部や腹部、背部、顔面が使われる。足底部や手のひらは透過性が低い。吸収は表皮から真皮へと至る経皮吸収と付属器官からの吸収に分かれる²⁰⁾。毛孔や汗腺は高分子やイオン性物質の透過性が高いが、皮膚全体の0.1%にすぎない¹⁹⁾。低分子の皮膚付属器官を介する拡散速度は角質実質部より10倍ほど高い。一方、脂溶性が高く、分子量が小さい被験物質は皮膚への拡散性が大きく、ほとんどの被験物質は受動拡散される。ほとんどの物質の透過経路は角質上層部にあるので、部位およびその厚さには注意が必要である。

3.2 種差、性差、匹数

ラットが一般的である。ヘアレス動物を用いる場合も多い。モルモットやブタおよびサルはヒトに似ており、ラットやウサギはこれらより透過しやすい。この点を考慮して実験系を組まなければならない。性差のデータは不明である。匹数は4匹以上と考える。

3.3 適用方法および皮膚損傷の有無

動物を用いる場合には被験物質をなめないようにカラーをつけたり、ケージにつかないようにランドセルのようなチャンバーを装着させたりする。損傷皮膚は経皮吸収が高くなる。乾燥した皮膚や、脱脂したり、テープストリッピングした後に被験物質を適用するなどの方法がケースバイケースで利用される。チャンバーによる適用状態も吸収に大きな影響を及ぼす。閉塞貼布か、開放塗布も大きな問題である。閉塞の吸収が高いことは議論をまたない。

毛刈も重要な問題であり、ヘアレス動物を用いるならともかく、ラットやモルモットを用いる場合には剃毛か刈毛かで結果が異なってくる。さらに、技術的な傷があれば吸収に影響を及ぼし、ばらつきの原因になる可能性が高い。

3.4 物性

皮膚透過部位でも触れたが、皮膚からの吸収には脂溶性、イオン化、分子量、溶媒などの影響が大きい。皮膚透過性はn-オクタノール/水分配係数が大きいほど高くなる²⁴⁾。ニトログリセリンなどは脂溶性で分子量が小さく、極めて経皮吸収が高い²⁵⁾。このような被験物質の物性を考慮に入れた実験系の構築が重要である。

溶媒による溶解度も大きな影響因子である。溶解度限界近辺の被験物質を適用すれば最大の皮膚透過性となる。それ以上に可溶化剤を加えても溶解度が加えた被験物質量を上回ると経皮吸収は減少していくことから、可溶化剤による皮膚透過性の増加はない²⁶⁾。

3.5 試験環境

有機物は被験物質の透過性や吸収を増大する。よって、pHは大きな変動因子である²⁷⁾。

局所温度は室温であれば大差はないが、より低温では吸収は少なく、高温では大きくなる。エステで使われている温熱法がこの原理を利用している。湿度も同様に、低湿度での吸収は少なく、適度な高湿度では大きくなる。

3.6 測定項目^{14), 15)}

サンプリング毎の測定データには、皮膚、血液、尿、糞中（場合によっては呼気）の他に残存

物として、保護器具に付着した量、皮膚から取り除かれた量、皮膚から洗えなかった量、死体や分離分析で取り除いたあらゆる器官中の量をそれぞれグループ化して記録しなければならない。

3.7 記録^{14, 15)}

表1に主なものをまとめたが、実験報告書には、GLPに従い、以下の項目を残す。

- | | |
|-------------|--|
| ① 被験物質 | 起源、メーカー、純度（放射性化合物としての純度）、ロット、物理化学的性質（pH、揮発性、溶解度、安定性、分子量、n-オクタノール/水分係数） |
| ② 被験物質の調整方法 | 溶媒の選択・処方内容とその理由、濃度、安定性、溶解状態（溶解、分散、懸濁） |
| ③ 実験動物 | 起源、種、系列、性別、年齢、n数、順化状態の記録、飼育条件（温湿度、明暗時間、給餌、摂取水）、体重記録 |
| ヒト | 性別、年齢、n数、健康状態 |
| ④ 適用状態 | 適用部位、操作方法、閉塞性、適用量、抽出方法、測定方法およびこれらの記録 |
| ⑤ 結果 | 一般状態の記録、体重記録、吸収結果、回収量、結果の解釈 |
| ⑥ 考察、結論 | |

4. 結語

安全性評価のために動物実験は必要であり、まだそれに代わりうる動物実験代替法はない。*In vivo* 試験の有用性は何も揺らぐものではない。下式に示すように、ヒトの経皮吸収を評価するためには、*in vivo* との *in vivo* の結果が必要である¹⁾。GLPに則り、動物福祉の精神を遵守した実験計画を作成し、得られた結果を有益に使っていただく事を希望するものである。

$$\text{In vivo ヒト経皮吸収} = \text{In vivo 動物経皮吸収} \times \frac{\text{in vivo ヒト経皮吸収}}{\text{in vivo 動物経皮吸収}}$$

文 献

- 1) 文部科学省 研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針
http://www.mext.go.jp/b_menu/hakusho/nc/06060904.htm
- 2) 厚生労働省 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針
<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/dobutsu/0606.sisin.html>
- 3) 農林水産省 農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針
http://www.maff.go.jp/www/press/2006/20060601_press_2_b.pdf
- 4) 日本学術会議 動物実験の適正な実施に向けたガイドライン
<http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-20-k16-2.pdf>
- 5) 動物の愛護及び管理に関する法律
http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend_law2/law.pdf
- 6) 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準
http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law_series/nt_h180428_88.html
- 7) ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals), (1993). Percutaneous absorption. Monograph n° 20, ECETOC, Brussels, Belgium.
- 8) EC Guidance document on dermal absorption, Sanco/222/2000 rev.7, 19/03/2004. European Commission, Health and consumer protection
- 9) Commission Staff Working Documents (2004) Time tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC); EN, SEC 82004, 1210
- 10) Howes, D., et al., (1996). Methods for assessing percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 2481-106.
- 11) 薬食審査発第 0707001 号 (2003) 局所皮膚的適用製剤の後発医薬品のための生物学的同等性試験ガイドライン
- 12) 杉林堅次 (2007) 経皮吸収, 化粧品大全, 株式会社 情報機構, 東京, pp.389-395.
- 13) 高木隆一 (1995) 科学と工業, 48, 123
- 14) Cohen, D. E. and Rice, R. H. (2004) 皮膚の毒性反応, キャサレット&ドール編, トキシコロジー第6版, サイエンティスト社, 東京, pp.751-772.
- 15) 土井邦夫 (2002) 皮膚・粘膜毒性, トキシコロジー学会教育委員会編トキシコロジー, 朝倉書店, 東京, pp.215-221.
- 16) OECD (2002) Guideline 427: *In vivo* skin absorption. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Paris, France.

- 17) 島村剛史ら (2007) 経皮吸収試験について, 最新 動物実験代替法, 技術情報協会, 東京, pp. 221-229.
- 18) 鈴木正巳 (1990) 機能性化粧品の開発, シーエムシー出版, 東京
- 19) Nakashima, M., et al. (1996) J. Pharm Pharmacol, 48, 1143-1146.
- 20) Benveniste, H. and Hüttemeier P. C. (1990) Prog Neurobiol., 35(3), 195-215.
- 21) Yanagimoto, G., et al. (1998) Pharm Pharmacol Commun., 4, 261-265.
- 22) Wester, R. C. and Maiback, H. I. (2005) *in vivo* 経皮吸収測定法, 化粧品・医薬品の経皮吸収, ロバート L. プロナーおよびハワード I. メイバック編著, 杉林堅次監訳, フレグランスジャーナル社, 東京, pp. 149-161.
- 23) Scheuplein, R. (1967) J. Invest Dermatol. 48, 79-88.
- 24) Portts, R. O. and Guy, R. H. (1995) Pharm. Res., 12, 1628-1633.
- 25) 杉林堅次 (2006) 日皮協ジャーナル 56, 51-57.
- 26) 杉林堅次 (2006) 日本化粧品学会誌, 30(4), 261-265.
- 27) 杉林堅次 (2007) 芋川玄爾編, 機能性化粧品素材開発のための実験法, シーエムシー出版, 東京, pp. 340-346.

第3節 *In Vitro* 経皮吸収試験法

要約

in vitro 経皮吸収試験法として、OECD、EU、COLIPA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association)、SCCP (Scientific Committee on Consumer Products)、EPA (US Environmental Protection Agency) などにおいてガイドラインやガイダンス、提案などが発行されている。それらの概要に大きな差があるとはいえないが、最新の OECD ガイドラインおよび SCCC 基準を比較してそれぞれの留意点をまとめた。

1. 序論

動物実験の 3 Rs (Replacement, Refinement, Replacement) の普及を受け^{1,2)}、欧米では化粧品規制や REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) に対応するため、動物実験代替法の利用が推奨されている。よって、欧米では安全性評価における経皮吸収試験や皮膚透過性は *in vitro* 試験が中心である³⁾。

本稿の目的は *in vitro* 経皮吸収試験法の紹介であるが、*in vitro* で評価できるものは経皮吸収 (percutaneous absorption) ではなく、皮膚透過性 (skin permeation) であることから、これら試験の実施上の留意点についてまとめてみた。

2. 試験法

公的な *in vitro* ガイドラインとして、OECD⁴⁾、COLIPA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association)⁵⁾、SCCP (Scientific Committee on Consumer Products)⁶⁾、EU⁷⁾、EPA (US Environmental Protection Agency)^{8,9)}、ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)¹⁰⁾ などからガイドラインやガイダンス、提案がなされ、ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) モノグラフィーにもまとめられている¹¹⁾。表 1 にこれらに記載されている必要な情報をまとめた。それらの概要にあえて比較するほど大きな差があるとはいえないが、コアとなる OECD と SCCC のガイドラインの主要な相違点を表 2 にまとめた。記載されていない拡散セルや被験物質の適用量、適用時間、測定方法などはほぼ同様な記載がある。特に、SCCP 基準は OECD ガイドライン 428 を受け、化粧品の評価に実験動物の使用を極力避けるためか、ヒトまたはブタの摘出皮膚が推奨され、他の動物の使

用は認めていない。

表1 *in vitro* 経皮吸収の評価に必要な情報

項目	パラメーター
被験物質	純度 分子量
溶媒	n-オクタノール/水分配係数 溶媒の種類、または処方構成 溶解性 揮発性 経皮吸収促進剤の有無
チャンパー	pH 種類 レセプター液の循環の有無
レセプター	溶液の種類 被験物質の溶解性
皮膚	種、系統 年齢、性別 部位 温度 保管状態（温度、期間、損傷の有無） 調整方法（厚さ、洗浄、ストリッピング方法）
適用	適用面積 適用量/cm ² 適用期間 閉塞性の有無
サンプリング	回数 時間 量 ドナー側の残存量 皮膚中量 洗浄液中の量

表2 OECDガイドラインとSCCP基準の主な相違点

項目	OECDガイドライン 428	SCCP基準
摘出皮膚 種 部位 厚さ 強度	ヒトまたは動物 なし 200-400 μm なし	ヒトまたはブタ ヒト：腹、脚、胸 ブタ：腹、胸、背、側部、耳 ヒト：200-500 μm ブタ：500-1000 μm トリチウム水、カフェイン、ショ糖 TER、TEWL で確認
レセプター液	被験物質が溶解する 摘出皮膚に無影響 代謝試験では活性必要	親水性：生理食塩水、緩衝液 脂溶性：アルブミン、乳化剤使用 (摘出皮膚に無影響)
N数	最低 4	> 6
回収量	100 \pm 10%	100 \pm 15%
適用時間	24	24 ただし、酸化染毛剤の場合 10-60 分
算出値	非流出系 洗い流し量 (μg) 皮膚内量 レセプター (量、速度、%) 流出系 透過係数	絶対量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 吸収率 (%)

3. 試験実施上の留意点

in vitro 法の長所は再現性が良く、簡便であり、物理化学的な測定因子を求めることができる点である。これらの内容を OECD ガイドラインおよび SCCP 基準を中心に記載し^{4, 6)}、試験法を構築する上で留意する点をまとめてみた。

3.1 摘出皮膚

ヒトまたは動物起源が使われるが、ヒトの選択がベストである。ヒト皮膚はいつでも利用できるわけではなく、国内や国際的な倫理規定に従わなければならない。ヒトの皮膚では部位、保管状態によりばらつきがでる¹²⁾。

(1) 種差

ヘアレスマウス、ヘアレスラット、モルモット、ブタなどの摘出皮膚が使われる。ラットやウサギの透過速度が速く、ブタ、モルモット、イヌ、ヒトの透過速度は遅いといわれている（ラットはヒトやブタの2~10倍¹¹⁻¹³⁾）。これらの表皮の付属密度、角質層の特性、生体内変換速度などの違いをしっかりと認識しなければいけない¹³⁾。マウス、モルモット、ウサギはヒトに比較してバリア機能が適切でない⁶⁾。ブタはヒトと本質的な経皮吸収特性が似ているので、代替品として推奨される。

(2) 厚さ

ブタでも同様であるが、表皮をはがす際に真皮の部分まではがす必要があり、角質層から200-500 μm の厚みで摘出皮膚 (Split-thickness skin) を採集する必要がある^{4, 6)}。1 mm 以上の摘出皮膚は避けるべきであるが、ブタでは Split-thickness skin を得ることは難しく、full-thickness skin (500-1000 μm) の利用が適している。さらに、角質層を取り除いたストリップスキンを用いると特に親水性物質の皮膚透過性が著しく高くなる¹⁰⁾。

(3) 部位

ヒトでは腹、足、胸、ブタでは腹、胸、背、側部、耳がよい^{4, 6)}。

(4) 性と年齢

重要な因子ではないが、記録に残す。

(5) サイズ

最小面積は0.64 cm^2 、記録に残す⁶⁾。直径5 cm が妥当である⁵⁾。

(6) n 数

最低4、6以上との記載がある^{4, 6)}。

(7) 活性

皮膚の状態が保たれていれば、活性のない皮膚も利用できる。新鮮か、生きた状態が保たれた皮膚を透過実験に使用すると代謝も測定できる^{4,6)}。24時間以内であれば、新鮮といえるが、酵素処理や保管温度によって変わりうる。

(8) 温度

皮膚透過性と温度とは関連性があるので、実験中は皮膚上部の温度をコントロールする必要がある^{4,6)}。32±1℃が妥当である。

(9) 保管

摘出後すぐに-20℃以下でアルミホイルに包んで保管する。3ヶ月以内に用いる⁵⁾。使用時には室温で解凍30分後に用いる。活性を見る場合には4℃で保管する。この場合には24時間以内に用いる。保管状態によりバリエーションが異なることから、これらは重要なポイントである

(10) バリエーション

不十分な操作で角質層が損傷を受ける。よって、試験に先立ち、これらを確認しなければならない。そのために、トリチウム水やカフェイン、ショ糖などが利用される。トリチウム水の使用では0.58±0.17% (n=60)という結果が例示されている⁵⁾。その他、TER(電気伝導度)やTEWL(角質水分蒸散量)の測定でもよい⁶⁾。

昨今、シリコン膜、3次元培養皮膚または表皮モデル(以下、培養皮膚モデルと記す)等も利用されている^{6,15)}。皮膚透過性を評価する上で培養皮膚モデルは有用であり、摘出皮膚との相関性が高いという報告もある¹⁵⁾。ただし、培養皮膚モデルの透過性は摘出皮膚と比べて10倍高い¹⁶⁾。ヒトと同じ透過性の皮膚を捜すことが重要ではなく、早く確実にヒト透過性を予測できるモデルを探すことが重要であり¹⁵⁾、現在の培養皮膚モデルはその目的にかなっていないようである¹⁶⁾。ただし、すべてのガイドラインではまだこれらのモデルの使用を認めていない。

3.2 器材

(1) 拡散セル

非流出系として、並行型(side by sideセル、2チャンパーセル)および図1に示すような垂直型の拡散セル(フランツ型セル)が汎用されている^{4,6,17)}。並行型は薬物透過の基礎研究、垂直型は応用研究に用いられることが多い¹⁸⁾。セルの材質はガラスであるが、物質により吸着への配慮が必要である¹⁸⁾。角質層をドナー側におき、正しく*in vitro*皮膚透過性実験を行えば^{4,6)}、*in vivo*皮膚透過性と十分な相関が得られる^{19,20)}。レセプター液を攪拌してサンプリングする。感度はよい。また、これら非流出型以外にフロースルー型拡散セルもある。この型では生理状態を維持するため、必要な栄養素を継続的に取り替える機能を備えているため、皮膚の活性を維持できる¹⁸⁾。どちらも経時的なサンプリングが可能である。

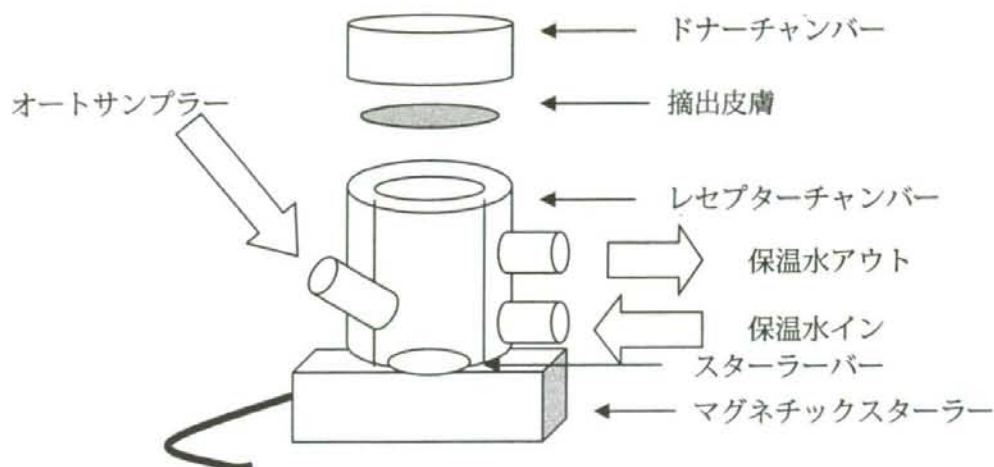


図1 非流出系の拡散チャンバー

(2) レセプター液

レセプター液の組成は被験物質の溶解性、安定性、拡散を妨げないように選択されなければならない。生理食塩水、緩衝液は親水性物質の場合には適切である。脂溶性物質の場合には血清アルブミンや適切な溶解剤（非イオン系界面活性剤）が使われるが、これらによって皮膚強度（バリア）に影響がないように選択する^{4,6)}。スターラーは150 rpmで回して溶液を攪拌する⁵⁾。レセプター中の被験物質の総量が10%を越えないようにサンプリングする⁶⁾。適正なpHも重要である。容量は最少として多くなりすぎないようにする。泡が入らないようにも注意する。期間中安定性を保つことが重要である。吸収特性と目的により、非流出型かフロースルー型拡散セルを選択する。

3.3 被験物質

放射性同位元素 (^{14}C , ^3H) などを組み込んだ被験物質が理想的である^{4,6)}。ただし、放射性同位元素の純度や組み込まれた位置により分子形が変化し、若干異なる挙動を示す場合があるので注意が必要である。放射性同位元素の活性は0.4 MBq/mgがよいという記載もある⁵⁾。

(1) 物性

in vivo 試験の皮膚透過部位の項でも触れたが、皮膚からの吸収には脂溶性、イオン化、分子量、安定性、溶解性、純度などの影響が大きい。親水性物質の評価は容易であり、脂溶性物質の評価は難しい⁷⁾。皮膚透過性はn-オクタノール/水分配係数が大きいほど高くなる²¹⁾。ニトログリセリンなどは脂溶性で分子量が小さく、極めて経皮吸収が高い²²⁾。このような被験物質の物性

を考慮に入れた実験系の構築が重要である。

溶媒による溶解度も大きな影響因子である。溶解度限界近辺の被験物質を適用すれば最大の皮膚透過性となる。それ以上に可溶化剤を加えても溶解度が加えた薬剤量を上回ると経皮吸収は減少していくことから、可溶化剤による皮膚透過性の増加はない¹⁰⁾。

(2) 溶媒

適用されるものと同じ溶媒を用いる^{4,6)}。原体、希釈、製剤などケースバイケースである。安定性を確保できる溶媒とする。

(3) 濃度

1濃度以上とする^{4,6)}。できれば、直線性を検討できる複数濃度の結果があるとよい。

(4) 適用量

固体なら1-5 mg/cm²、液体なら10 μL/cm²、酸化染毛剤の場合⁶⁾、20 mg/cm²とする。

(5) 温湿度

実験中は皮膚上部の温度をコントロールする必要がある^{4,6)}。32±1℃、湿度30-70%が妥当である。

(6) 暴露時間とサンプリング

洗い流さないものであれば、24時間適用する。サンプリングは24時間以内に数回行う。24時間を越えてのサンプリングは不適である^{4,6)}。酸化染毛剤のような洗い流す場合には、15-45分間処理し⁶⁾、その後よく被験物質を洗い流し、24時間までサンプリングを続ける^{6,9)}。農業では6-8時間処理が推奨される⁷⁾。

サンプリングは最初の30分後にまず1回目を行い、少なくとも6回必要である。

3.4 分析

(1) 回収

ドナーチャンバー、皮膚表面の洗浄液、摘出皮膚、レセプター液およびチャンバーに含まれるまたは付着するすべての被験物質を回収する^{4,6)}。

(2) 測定指標

シンチレーションカウンター、HPLC (高速液体クロマトグラフィー)、GC (ガスクロマトグラフィー) などを用いる^{4,6)}。マイクロオートラジオグラフィーを用いれば、定量的な解析や分布を確認できる。

(3) 回収率

100±10~15%^{4,6)}。

(4) 算出値

非流出系の場合、洗い流し量 (μg)、皮膚内量 (μg)、レセプター (量、速度、%) を求める。絶対量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)、吸収率 (%) との記載もある⁶⁾。流出系の場合には透過係数 (K_p) を求める⁶⁾。

3.5 記録

実験報告書には、GLPに従い、以下の項目を残す。

- ① 被験物質 起源、メーカー、純度 (放射性化合物としての純度)、ロット、物理化学的性質 (pH、揮発性、溶解度、安定性、分子量、 n -オクタノール/水分配係数)
- ② 被験物質の調整方法 溶媒の選択、処方内容とその理由、濃度、安定性、溶解状態 (溶解、分散、懸濁)
- ③ チャンバー、レセプター 種類、レセプター液の循環の有無、溶液の種類、被験物質の溶解性
- ④ 摘出皮膚 種、系統、年齢、性別、部位、温度、保管状態、調整法 (厚さ、洗浄、テープストリッピング方法)
- ⑤ 適用状態 適用面積、適用時間、閉塞性、適用量、操作方法およびこれらの記録
- ⑥ 結果 サンプル回数、時間毎の回収量、ドナー側の残存量、皮膚中量、洗浄液中の量、結果の解釈
- ⑦ 考察、結論

4. 結語

皮膚透過性がなければ、有効性も毒性も引き起こされない。ただ、例えば皮膚刺激性物質がどれくらい皮膚透過されれば皮膚反応となるかの閾値はわかっていない。よって、世界共通の試験法で実施された適切な皮膚透過性結果が得られ、データベースが構築されれば、基準値が定められるかもしれない。さらに *in vivo* 実験や皮膚刺激性や皮膚感作性試験などを減らすことができる可能性も高い。培養皮膚モデルでのデータ蓄積が進めば、ヒトやブタの摘出皮膚を使うことも可能性も考えられる。本分野で取り組むテーマはまだ多く、完全な動物実験代替法の確立を目指すには多くの研究者の協力が必要である。

文 献

- 1) 動物の愛護及び管理に関する法律
http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend_law2/law.pdf
- 2) 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準
http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law_series/nt_h180428_88.html
- 3) Commission Staff Working Documents (2004) Time tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC) ; EN, SEC 82004, 1210
- 4) OECD (2002) Guideline 428 : *In vitro* skin absorption. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 5) COLIPA (1995) Guideliens for percutaneous absorption, Brussels
- 6) SCCFNP (2000) Guidelines for *in vitro* methods to assess percutaneous absorption of cosmetic ingredients" in "Notes of Guidance for testing of cosmetic ingredients for their safety evaluation", SCCNFP/0321/00 Final
- 7) EC Guidance document on dermal absorption, Sanco/222/2000 rev. 7, 19/03/2004, European Commission, Health and consumer protection
- 8) EPA (United States Environmental Protection Agency) (1999) Proposed rule for *in vitro* dermal absorption rate testing of certain chemicals of interest to occupational safety and health administration. Federal Register, Volume 64, Number 110, June 9, 1999.
- 9) Recommended protocol for *in vitro* percutaneous absorption rate studies (1996). Federal Register, Vol 61, No. 65.
- 10) Howes D., et al (1996). Methods for assessing percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 2481-106.
- 11) ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals), (1993). Percutaneous absorption. Monograph n° 20, ECETOC, Brussels, Belgium.
- 12) 杉林堅次 (2007) 経皮吸収, 化粧品大全, 株式会社 情報機構, 東京, pp.389-395.
- 13) Cohen, D. E. and Rice R. H. (2004) 皮膚の毒性反応, キャサレット&ドール編, トキシコロジー第6版, サイエンティスト社, 東京, pp.751-772.
- 14) Watanabe, T., et al. (2001) Altern Animal Text EXperiment, 8, 1-14.
- 15) 杉林堅次 (2007) 薬剤学 67 (2), 89-95.
- 16) 杉林堅次 (2007) 芋川玄爾編, 機能性化粧品素材開発のための実験法, シーエムシー出版, 東京, pp.347-354.

- 17) 杉林堅次 (2006) 日本化粧品学会誌, 30(4), 261-265.
- 18) Bronaugh, R. L., et al (2005) *in vitro* 法による経皮吸収の測定, 化粧品・医薬品の経皮吸収, ロバート L. プロナーおよびハワード I. メイバック編著, 杉林堅次監訳, フレグランスジャーナル社, 東京, pp.163-168
- 19) Sato, K. et al. (1988) Chem. Pharm. Bull., 36, 2232-2238.
- 20) Sato, K. et al. (1988) Chem. Pharm. Bull., 37, 2624-2636.
- 21) Portts, R. O. and Guy, R. H. (1995) Pharm. Res., 12, 1628-1633.
- 22) 杉林堅次 (2006) 日皮協ジャーナル 56, 51-57.

薬学研究における動物実験代替法研究の重要性とその問題点

大野 泰雄

Importance of Research on Alternatives to Animal Experiments
in Pharmaceutical Sciences

Yasuo OHNO

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501 Japan

(Received January 11, 2008)

The Japanese animal protection law was amended in 2005 to include the 3Rs principle in animal experiments. According to this new law, the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, the Ministry of Health, Labor and Welfare, and the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries developed announced several guidelines in 2006. These guidelines indicated responsibility of the president of each research institute conducting animal experiments to meet obligating of the animal experiment committee (AEC) and the education to be provided to scientists. About half a year after this notification, I conducted a survey on how these guidelines were put into practice in the pharmaceutical colleges and universities. I received 29 answers from 24 institutes. It seemed that every institute was following, the guidelines, however, there were many institutes where the details were inadequate. For example, questions on the existence of alternative methods and degree of distress and pain were not asked in some questionnaires sent to the AEC. Education on proper conduct of animal experiments (3Rs, methods to evaluate and decrease distress and pain, and methods of euthanasia) was not conducted in many institutes. Further improvement seems necessary.

Key words— animal experiment; alternative; japanese animal protection law; guideline, ethical committee

1. 序言

生物現象を明らかにし、医薬品や化学物質等のヒトへの影響を研究する薬学において、動物実験は基本的研究材料として欠かすことはできない (Table 1)。その結果得られた知見を基に医薬品開発を行う際にも、その有効性と安全性の確認には動物実験に頼らざるを得ないところが多い。また、生命現象を理解することなく、医薬品の適切な使用は行えないが、薬剤師教育の有効な手段としても、動物実験は重要である。

一方、動物実験における動物福祉に関する社会の関心は極めて高く、動物愛護や動物の権利を擁護するため多くの関連団体が設立され、活発な活動が行われている。しかし、Figs. 1-3 に示したように、動物実験への反感の程度はその目的や使用する動物

の種類、また、実験の行い方により異なる。適切な説明が行われることにより、必要かつ適切な動物実験に対する同意が増加すると思われる。すなわち、動物実験に係わるすべての研究者及び教育者は、そ

Table 1. Sale of Experimental Animals (JSLAS, 2004)

Species	Conventional	Clean	SPF	Sum
Mouse	232589	1285337	4751033	6268959
Rat	43839	449854	2062193	2555886
Other rodents	48		7468	7516
Guinea-pig	11514	227718	66293	305525
Hamsters	4486	963	32744	38193
Rabbit	23015	69746	29300	122061
Dog	12689	70	0	12759
Cat	260	0	626	886
Monkeys	2248	0	0	2248
Pig	1228	130	0	1358
Goat	0	0	0	0
Sheep	35	0	0	35
Birds	5094	0	12199	17293
Total*	352467	2033893	6961860	9348220

* Include Suncus, ferret, amphibians, and fishes.

国立医薬品食品衛生研究所 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

e-mail: ohno@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S40 で発表したものを中心に記述したものである。