

ANNEX 1DEFINITIONS AND ABBREVIATIONS

Agonist: A substance that binds to a specific receptor and triggers a response in the cell. It mimics the action of an endogenous ligand that binds to the same receptor.

Antagonist: A type of receptor ligand or chemical that does not provoke a biological response itself upon binding to a receptor, but blocks or dampens agonist-mediated responses.

Anti-estrogenic activity, the capability of a chemical to suppress the action of 17 β -estradiol mediated through estrogen receptors.

CV: Coefficient of variation

Cytotoxicity: the harmful effects to cell structure or function ultimately causing cell death and can be a result of a reduction in the number of cells present in the well at the end of the exposure period or a reduction of the capacity for a measure of cellular function when compared to the concurrent vehicle control.

DCC-FBS: Dextran-coated charcoal treated fetal bovine serum.

DMSO: Dimethyl sulfoxide

E2: 17 β -estradiol

EC50 value, the concentration of agonist that provokes a response halfway between the baseline (Bottom) and maximum response (Top).

EE: 17 α -ethynyl estradiol

ER; Estrogen receptor

ERE: Estrogen Response Element

Estrogenic activity, the capability of a chemical to mimic 17 β -estradiol in its ability to bind to and activate estrogen receptors. hER α mediated specific estrogenic activity can be detected in this Test Guideline.

FBS: Fetal bovine serum

hER α : Human estrogen receptor alpha

MT: Metallothionein

OHT: 4-Hydroxytamoxifen

PC: Positive control

PC10: the concentration of a test chemical at which the response in an agonist assay is 10% of the response induced by positive control (E2 at 1nM) in each plate

PC50: the concentration of a test chemical at which the response in an agonist assay is 50% of the response induced by positive control (E2 at 1nM) in each plate

PCMax: the concentration of a test chemical inducing the RPCMax

RPCMax: maximum level of response induced by a test chemical, expressed as a percentage of the response induced by 1 nM E2 on the same plate

RT PCR: Real Time polymerase chain reaction

SD: Standard deviation

ENV/JM/TG(2009)14

STTA: Stably Transfected Transcriptional Activation Assay.

TA: Transcriptional activation

Validation, a process based on scientifically sound principles by which the reliability and relevance of a particular test, approach, method, or process are established for a specific purpose. Reliability is defined as the extent of reproducibility of results from a test within and among laboratories over time, when performed using the same standardised protocol. The relevance of a test method describes the relationship between the test and the effect in the target species and whether the test method is meaningful and useful for a defined purpose, with the limitations identified. In brief, it is the extent to which the test method correctly measures or predicts the (biological) effect of interest, as appropriate (16).

VC: The vehicle that is used to dissolve test and control chemicals is tested solely as vehicle without dissolved chemical.

ANNEX 2**False positives: Assessment of non-receptor mediated luminescence signals**

1. False positives might be generated by non-ER-mediated activation of the luciferase gene, or direct activation of the gene product or unrelated fluorescence. Such effects are indicated by an incomplete or unusual dose-response curve. If such effects are suspected, the effect of an ER antagonist (*e.g.*, 4-hydroxytamoxifen (OHT) at non-toxic concentration) on the response should be examined. The pure antagonist ICI 128780 may not be suitable for this purpose as a sufficient concentration of ICI 128780 may decrease the vehicle control value, and this will affect the data analysis.

- 2. To ensure validity of this approach, the following needs to be tested in the same plate: Agonistic activity of the unknown chemical with / without 10 μ M of OHT
- Vehicle Control (VC)(in triplicate)
- OHT (in triplicate)
- 1 nM of E2 (in triplicate) as agonist Positive Control (PC)
- 1 nM of E2 + OHT (in triplicate)

3. ***Data interpretation criteria***

Note: All wells should be treated with the same concentration of the vehicle.

- If the agonistic activity of the unknown chemical is NOT affected by the treatment with ER antagonist, it is classified as "Negative".
- If the agonistic activity of the unknown chemical is completely inhibited, apply the decision criteria.
- If the agonistic activity at the lowest concentration is equal to, or is exceeding, PC10 response the unknown chemical is inhibited equal to or exceeding PC10 response. The difference in the responses between the non-treated and treated wells with the ER antagonist is calculated and this difference should be considered as the true response and should be used for the calculation of the appropriate parameters to enable a classification decision to be made.

4. ***Data analysis***

Check the performance standard.

Check the CV between wells treated under the same conditions.

1. Calculate the mean of the VC
2. Subtract the mean of VC from each well value **not** treated with OHT
3. Calculate the mean of OHT
4. Subtract the mean of the VC from each well value treated with OHT
5. Calculate the mean of the PC
6. Calculate the relative transcriptional activity of all other wells relative to the PC.

ANNEX 3**Preparation of Serum treated with Dextran Coated Charcoal (DCC)**

1. The treatment of serum with dextran-coated charcoal (DCC) is a general method for removal of estrogenic compounds from serum that is added to cell medium, in order to exclude the biased response associated with residual estrogens in serum. 500 mL of fetal bovine serum (FBS) can be treated by this procedure.

Components

2. The following materials and equipment will be required:

Materials

- Activated charcoal
- Dextran
- Magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- Sucrose
- 1 M HEPES buffer solution (pH 7.4)
- Ultrapure water produced from a filter system

Equipment

- Autoclaved glass container (size should be adjusted as appropriate)
- General Laboratory Centrifuge (that can set temperature at 4°C.)

Procedure

3. The following procedure is adjusted for the use of 50 mL centrifuge tubes:

[Day-1] Prepare dextran-coated charcoal suspension with 1 litre of ultrapure water containing 1.5 mM of MgCl_2 , 0.25 M sucrose, 2.5 g of charcoal, 0.25 g dextran and 5 mM of HEPES and stir it at 4°C, overnight.

[Day-2] Dispense the suspension in 50 mL centrifuge tubes and centrifuge at 10000 rpm at 4°C for 10 minutes. Remove the supernatant and store half of the charcoal sediment at 4°C for the use on Day-3. Suspend the other half of the charcoal with FBS that has been gently thawed to avoid precipitation, and heat-inactivated at 56°C for 30 minutes, then transfer into an autoclaved glass container such as an Erlenmeyer flask. Stir this suspension gently at 4°C, overnight.

[Day-3] Dispense the suspension with FBS into centrifuge tubes for centrifugation at 10000 rpm at 4°C for 10 minutes. Collect FBS and transfer into the new charcoal sediment prepared and stored on Day-2. Suspend the charcoal sediment and stir this suspension gently in an autoclaved glass container at 4°C, overnight.

[Day-4] Dispense the suspension for centrifugation at 10000 rpm at 4°C for 10 minutes and sterilise the supernatant by filtration through 0.2 μm sterile filter. This DCC treated FBS should be stored at -20°C and can be used for up a year.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小島肇夫	感作性・刺激性試験		現場レベルでの皮膚測定・評価～トラブル事例・対策～	サイエンス&テクノロジー	東京	2007	268-273
小島肇夫	皮膚刺激性試験について		最新動物実験代替法	技術情報協会	東京	2007	63-71
小島肇夫	皮膚腐食性試験について		最新動物実験代替法	技術情報協会	東京	2007	75-84
小島肇夫	バリデーションについて		最新動物実験代替法	技術情報協会	東京	2007	267-273
小島肇夫	皮膚一次刺激性評価法		機能性化粧品素材開発のためのin vitro/細胞/組織培養評価法ハンドブック	シーエムシー出版	東京	2007	308-314
小島肇夫	代替法国際動向から見た新技術導入の可能性		動物実験代替法のためのバイオマテリアル・デバイス	シーエムシー出版	東京	2007	1-5
小島肇夫	in vivo経皮吸収試験法		最新・経皮吸収剤～開発と基礎から申請のポイントまで～	株式会社情報機構	東京	2008	95-103
小島肇夫	in vitro経皮吸収試験法		最新・経皮吸収剤～開発と基礎から申請のポイントまで～	株式会社情報機構	東京	2008	104-113

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
大野泰雄	日本薬理学会の奨める動物実験－苦痛の評価と軽減－「はじめに」および日本薬理学会の新動物実験指針	日本薬理学雑誌	129	5-9	2007
大野泰雄	動物福祉と動物実験代替法への考慮の必要性について	Biophilia	3	4-5	2007
大野泰雄	動物実験代替法の国際動向	Fragrance Journal	10	20-28	2007

大野泰雄	WC6 (第6回国際動物実験代替法会議)を終えて	日本動物実験代替法学会News Letter.	34	2-4	2007
大野泰雄	Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization: Results of the First Japanese Inter-laboratory Study	Altern. Animal Test EXperiment	13 (1)	27-35	2008
大野泰雄	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	薬学雑誌	128 (5)	735-740	2008
小島肇夫	動物実験代替に関する最近の動向	化粧品技術者会誌	40 (4)	263-268	2007
小島肇夫	JaCVAMの設立と使命	日皮協ジャーナル	57	129-134	2007
小島肇夫	日本における動物実験代替法の開発動向	Fragrance Journal	10	29-34	2007
小島肇夫	動物実験代替法のバリデーション	COSMETIC STAGE	8	54-56	2007
小島肇夫	急がれる動物実験代替法の開発-皮膚モデルの現状	New Drug Discovery	23	4	2007
小島肇夫	動物実験代替法の現状と展望	日本薬理学会会誌	130	505-509	2008
小島肇夫	EUにおける動物実験代替法の現況とREACH対策	日皮協ジャーナル	30 (2)	156-162	2008
小島肇夫	皮膚感作性試験代替法の現状	Visual Dermatology	7 (3)	328-331	2008
小島肇夫	Perspectives on validation and regulatory acceptance of animal alternative testings in Japan	P&G Actives Risk Communication	2 (1)	1-4	2008
小島肇夫 大野泰雄	Validation of human skin models for skin corrosivity tests in Japan	AATEX	13	36-44	2008
小島肇夫	JaCVAM: An organization supporting the validation and peer review of new alternative to animal testing	WC6	Proceedings	483-485	2008
小島肇夫	アレルギーロジ-VSトキシコロジー	皮膚アレルギーの旅	7 (1)	1-7	2008

小島肇夫	安全性評価と動物実験代替法の現状	薬学雑誌	128 (5)	747-752	2008
小島肇夫	動物実験の3Rsにおける国内外の動向	ファルマシア	44 (9)	857-861	2008
小島肇夫	REACH対応に必要な動物実験代替法の現状	COSMETIC STAGE	2 (5)	1-4	2008
小島肇夫	Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement	Journal of Pharmacological and Toxicological Methods	58	16-26	2008
小島肇夫	An <i>in vitro</i> evaluation methods to test ocular irritation using a human corneal epithelium model	Altern. Animal Test Experiment	13 (2)	83-90	2008
小島肇	動物実験代替法に関する2008年の国際動向	Fragrance Journal	2009-1	65-69	2009
小島肇夫	動物実験代替法の現状と展望	J. Environ Dermatol Cutan Allergol	3 (1)	1-6	2009
小島肇夫	動物実験の3Rsにおける国内外の動向	城西大学生命科学研究センター報告	7	37-50	2009

第22章 感作性・刺激性試験／安全性評価のトラブル時の対応

国立医薬品食品衛生研究所 小島 肇夫

1. トラブル発覚までの経路

感作性・刺激性という皮膚トラブルが発生しやすい製品は、化粧品や医薬品が多いと考えられる。これらのトラブルの発覚に至るまでにはいろいろな経路がある。主に思いつくだけでも、以下のものが挙げられる。

- 1) ホームページやメール、電話、手紙などによるお客様からの苦情
- 2) 本社、支店などの営業担当者へお客様または営業店からの直接的な苦情
- 3) 医療機関からの連絡
- 4) 保健所、中毒センター、消費者センターなどの公的機関からの連絡
- 5) マスコミからの問い合わせ、または報道

2. トラブルへの対処

2.1 トラブルの把握

いつ、どこで、誰が、どのように(トラブルが通常使用で起こったのか、誤使用で起こったのか)、使用時の皮膚の状態、その健康被害がどの程度であったかで対応も異なろう。ともかく、子供に重篤な被害が生じたとか、アナフィラキシーショックなどを含め生命の危険性がある場合には、被害者には早急に医療機関を受診して頂き、治療をお願いしなければならない。再発防止のため、販売中止および回収、原因究明を早急を実施すべきである。

それ以外の場合では、被害者には早めに医療機関を受診して頂くようにお勧めするべきである。皮膚トラブルによる痛みやかゆみなどを軽減して頂かねばならない。症状が中々改善しない場合もあるので、ともかく疑われる製品の使用を止めて頂くべきである。トラブル報告を受けた企業は、通常、1件だけの緊急性のない皮膚トラブル発覚では紫外線、物理的刺激などの別の要因や持病のアトピー素因、蕁麻疹が悪化したことによる場合もあり、状況把握に留める場合が多い。数件、そのような症例が発覚して、品質、処方成分や容器などの製品の不備に気づくことになる。その場合の対策としては、ともかく、安全性に自信がある製品であり、かつこれまで何もトラブルがなかったとしても、自社製品に皮膚トラブルが起こりうる可能性を十分に頭に入れ、原因究明および製品の改善、場合によっては販売中止および回収のために真摯

に対応すべきである。

2.2 お客様からの苦情への対応

被害者であるお客様の所に、すぐに営業担当者を向かわせて、誠意ある態度で接しさせることである。次に状況を詳しくお聞きするとともに、その症状の改善のために誠意を尽くさせることである。その地域毎に日頃から接触皮膚炎に詳しい皮膚科医を把握しておき、すぐにその病院を紹介し、一日でも早く症状を改善して頂くべきである。治療費の問題や、精神的な保障については本章の趣旨から外れることからここでは述べないでおく。さらにお客様の要望によっては、企画担当者、処方を担当責任者や安全性を担当責任者がご説明に伺う必要もでてこよう。この場合も、誠意ある態度で接することを忘れてはならない。本社や研究所から来た偉い方々でありお高く留まっているという意識で見られることが多いので、感情的な苦言を受けても冷静に頭を低く接ししなければならない。一方、品質、安全性を担保すべき担当者がすべきことは、症状発覚までの経緯を詳しく聞き取る、原因となった製品を引き取る、持ち帰って官能評価を行う、自社分析または受託機関に分析を依頼する、症状を再現できるか試してみるなどで原因を探るべきである。その製品に関して所有する分析、安全性、工場における生産記録などすべての記録を調べる必要もあろう。昨今、簡単に動物実験を行って成分に関する原因を探るということができにくくなりつつある。その場合にはある程度の動物実験代替法(通常、安全性を評価している試験管外試験、例えば培養細胞や培養皮膚モデルの利用や、マウスを用いる方法であるが、Local Lymph node assay等)を用いて評価することをまずお勧めする。動物実験代替法というものは、強く反応が出すぎるきらいはあるが、既存製品と比較しながら試験を行うと差が明確になる場合もありうる。次にその結果を参考に、ボランティアに重篤な健康障害を起こす可能性が低いと判断した場合には、予知的パッチテストや使用状況を再現した試験などで試してみる事が重要である。

2.3 医療機関への対応

一方、医療機関からのトラブル報告については、製品に非がないに関わらず、社会を騒がしたことは確かなので、真摯な態度で接し、原因追求に協力を願い出ることが肝要である。被害者である患者様の同意が得られたならば、担当医に診断パッチテストのために処方成分を送付して、パッチテストの実施をお願いする。患者様の皮膚状態などにより、必ずしも原因を追究できるわけではないが、ともかく、倫理的な問題さえクリアできれば診断パッチテストを実施しておくべきである。その際に問題となるのは、製品に記された成分をすべてお送りするのか、あるいはキャリアオーバーのような表側に現れていない成分までお送りするのか、担当

医とコンセンサスをよく取ることである。さらに、もっとも重要な問題は、処方配合濃度を開示できない場合において、成分のみをそのまま送付せず、ある程度の濃度で調整した成分を送付すべきことである。私の聞いたところによると、pH調整剤である水酸化カリウムをそのままお送りして、担当医がそれをほとんど薄めずに貼付して皮膚傷害を起こしてしまった例もあるようである。このような事故を起こさないためには、配合成分濃度を開示すべきであるが、全成分表示に加え、処方を丸裸にすることは企業秘密に関わる。できないならば、処方配合成分の5～10倍で皮膚刺激性を起こさない濃度に溶媒あるいは分散媒を用い、雑菌汚染による皮膚障害も配慮して調整すべきである。溶媒中で固まってしまう成分においては、貼付時の適用方法を記載した注意事項を添付して診断パッチの際にミスが起こりにくいような配慮をすべきである。また、香料や染毛剤のように、アレルギー反応の可能性が高い成分に関しては、情報を添付し、まず開放塗布試験から実施して頂くことも肝要である。できれば、診断パッチテストの際には、日本接触皮膚炎・皮膚アレルギー学会が推奨するアレルゲンの貼付も同時にお願いできれば、患者様のアレルゲン同定に寄与しやすいと考えている。

2.4 公的機関、マスコミへの対応

公的機関、マスコミからの問い合わせについては、製品に非がないに関わらず、社会を騒がしたことは確かなので、真摯な態度で接し、原因を明らかにすると明言した後、できるだけ早急に原因追求を進めるべきである。場合によっては、経験に基づく助言を受けることも必要となろう。そして、原因が明らかになった暁には、問い合わせを受けた先に原因究明の結果や再発はないように改善した点などを報告して、誠意を尽くすことが肝要であろう。

3. 安全性評価の経緯

ひと昔前の黒皮症事件以来¹⁾、化粧品会社は、安全性試験の専門家の協力を得て、新規化粧品原料の安全性評価ガイドライン(案)を作成し²⁾、安全性の確保に務めてきた。現在では、表1に示すように多くの既知のアレルゲン(アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性接触蕁麻疹誘起物質)も明確になっているし、構造活性相関ソフトも販売されており、純粋な成分であれば、ある程度はその感作性や刺激性を予測できる時代である。分析技術も進歩し、不純物でさえ、明確にしやすい時代となっている。

表1 アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性接触蕁麻疹の原因となる主な化学物質^{3,4)}

分類	物質名
医薬品類	ネオマイシン、スルホンアミド、ベンゾカイン
金属	ニッケル、クロム、コバルト、金、水銀
植物成分	ペルーバルサム、ロジン、ペンタデシルカテコール、アビエチン酸
殺虫剤	ヘキサクロロフェン、チロメサル
工業薬品	ホルムアルデヒド、エポキシレジン、芳香族アミン、硫化テトラメチルチラウム、2,4-ジニトロベンゼン、メルカプトベンゾチアゾール、ジフェニルフグアジニン、エチレンジアミン
医薬部外品	p-フェニレンジアミン
化粧品	香料、色素
外用剤添加剤	ラノリン、ラノリンアルコール、セタノール、ステアリルアルコール、プロピレングリコール、ポリオキシエチレングリコール、ポリオキシソルビタン脂肪酸エステル、ミツロウ、1,3-ブチレングリコール、亜硫酸塩類、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、グルクロン酸クロルヘキシジン、パラベン、ベンジルアルコール、メントール、ゼラチン、エタノール、安息香酸

法規の改正もあり、ここ数年で業界内におけるリスク評価の考え方も大きく変わった。全成分表示による化粧品の届出免除という規制緩和およびPL法の導入を経て⁵⁾、企業による自己責任の考え方が定着しつつある⁶⁾。一方、平成17年4月に実施となった薬事法の改正により、医薬品、医薬部外品、化粧品、医療機器の製造、輸入が許可・認可制度に変わった。これに伴い、品質管理、製造販売後の安全管理の責任は製造販売業者が主体的に行うことになり、GVP (Good Vigilance Practice: 市販後安全管理) およびGQP (Good Quality Practice: 製造の品質保障管理) が制度化され⁷⁾、業界の対応事項がより厳しくなった。厚生労働省のHPによると⁸⁾、化粧品や医薬部外品による重篤な皮膚障害も増加しておらず、表2に示すように、2004年～2006年の3年間、年間23件ほどの回収で推移している。海外では許可されているが、日本では使用できないホルマリン関連防腐剤などの使用による回収は残るであろうが、昨今の化粧品または医薬部外品の皮膚トラブルは起こりにくくなっている状況には違いない。皮膚科医と研究者の連携で、昨今もK社の抗菌デスクマットが回収となるなど⁹⁾、抗菌剤による文具、日用品のトラブル検出システムもできつつある。

ただし、2009年までに動物実験を用いた化粧製品を販売できない、原料の試験を実施できないというEU 7次改正に従うため¹⁰⁾、欧州化粧品工業会 (COLIPA) で検討が進んでいる。国際協調や海外での製造販売、海外ブランドの進出が進んでいる昨今、日本においても安全性は

かりでなく、有用性評価でさえ、動物実験を用いず代替法を利用せざるを得ない状況である。代替法の開発は、安全性のレベルを下げないことが大前提であるが、試験管内試験のみで本当に安全性を担保できるのか不安が無い訳ではない。また、動物実験を安全性評価に使えなくなるからといって、ヒトの試験を安易に行つて良いことではない。ヒト試験で安全性を評価することは倫理的には許されない場合が多い。ヒト試験実施の際には、施設毎に計画を倫理委員会に答申しなければならない、試験実施の際にはインフォームドコンセンサスが必要など、ヒト試験実施には厳しいハードルが待っている。バリテーションや第三者の専門家で評価され、公的に認められた動物実験代替法で安全性のスクリーニングを行い、ヒトによる確認試験を確実に行うというスタイルが今後の安全性評価に望まれることになろう。

表2 2004年～2006年における化粧品および医薬部外品の回収数⁶⁾

年	回収数		
	総数*	化粧品	医薬部外品
2004	24	19	5
2005	24	23	1
2006	23	17	6

*：その製品の使用等が、一時的な若しくは医学的に治癒可能な健康被害の原因となるか又は重篤な健康被害のおそれはまず考えられない状況であるクラスⅡの数を示す。ちなみに、クラスⅠ：重篤な健康被害又は死亡の原因となりうる状況にあたる製品はなかった。

4. まとめ

上記した規制やシステム、そしてマスコミの厳しい目から、現代は、種々のトラブルに早急に対応しなければならない時代になっている。場合によっては、販売中止および回収もありうる。さらに、原因究明も早急かつ正確に行うべく尽力しなければならない。ただ、原因究明も容易にできるかは別問題である。被害者の肌質、皮膚状態が一定ではないことに加え、心理面、経済的な面も絡む社会的な問題でもあり、科学的に原因究明できるものばかりではない。仮にそうであったとしても、我々研究者に求められることは、自社製品にトラブルが起こりうる可能性を十分に頭に入れ、原因究明および製品の改善のために真摯に対応することにつきる。

参 考 文 献

- 1) 小塚雄民, 「タル系色素による女子顔面黒皮症」, 高瀬吉雄「皮膚と化粧品科学」, 南山堂, 1982, pp.267-274.
- 2) 「化粧品の安全性評価試験法概略」, 日本化粧品工業連合会編「化粧品の安全性評価に関する指針2001」, 薬事日報社, 2001, pp.1-33.
- 3) 土井邦雄, 「臓器毒性・毒性試験」, 日本トキシコロジー学会教育委員会編集, 「トキシコロジー」, 朝倉書店, 2002, pp.217-218.
- 4) 松永佳世子, 「皮膚外用剤の添加物 接触皮膚炎を中心に」, 薬局, 53 (11), 2002, 71-75.
- 5) 増田光輝, 「製品企画・設計におけるPL対策」, フレグランスジャーナル, 1995-3, 1995, 17-24.
- 6) 笠井裕, 「化粧品の安全性を取り巻く状況－パブリック・リレーションの重要性－」, 香粧会誌, 28 (4), 2004, 292-298.
- 7) 風間成孔, 「改正薬事法対応～化粧品・医薬部外品薬事申請業務の留意点」, 「化粧品大全」, 情報機構, 2006, pp.509-522.
- 8) 医薬品医療機器情報ホームページ (www.info.pmda.go.jp).
- 9) 国民生活センター (www.kokusen.go.jp/recall/data/s-20061011_1.html).
- 10) Commission Staff Working Documents "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, SEC82004), 2004, 1210.

1. 試験の進め方, 決定樹

腐食/皮膚刺激性の評価スキームは1998年、OECDから発表されている¹⁾。その後、2009年までに動物実験を用いた化粧製品を販売できない、原料の試験を実施できないというEU7次改正に従うために欧州化粧品工業会(COLIPA)で検討が進み、複数の評価スキームの検討が進んでいる。これまでOECDスキームを含め、文献上で主なものとして3提案がなされている。僭越ながら、私の提案までいれると4案がある。それらを以後に示すが、この項では腐食性がないと判断された場合以降に絞ってスキームを改良した。

in vitro 皮膚刺激性試験は、皮膚刺激性代替法のバリデーションは最終段階にあり、数年後にはバリデーションが終了した方法が明らかになると思われる。そこで今後の試験案について記載した。ただし、現状では皮膚刺激試験代替法のバリデーションが終了したとしても、専門家による評価が済むまでには時間を要する。よって、現在開発中の原料をお持ちの方は、刺激性の有無または強弱を動物実験で評価して頂きたい。

まず、OECDスキームを基本としたWorthの案を図1に示す²⁾。ほとんど、腐食性と同時に皮膚刺激性の有無を判断するものである。以後のすべての案の基本とも言えるスキームである。図2に示すように、BothamがこのOECD案をもとに評価スキームを示している³⁾。ただ、このスキームにはOECDに1997年に提案されたヒト4時間貼付パッチのガイドライン案が組み込まれているものの⁴⁾、これらは保留状態にあり、現実的ではない。刺激性が不明確な場合には動物試験またはヒト試験となるが、倫理的に許可が下りるか疑問なスキームである。

次に、図3に示すRobinsonの案は化粧品の安全性評価を想定しており⁵⁾、これは現実的な内容である。ただし、蓄積性・慢性毒性の*in vitro*試験はまだ検討段階であること、ヒト試験の例が4時間パッチテストであり⁶⁾、日本での化粧品評価にはそぐわない点などの問題が多い。



図1 OECDによる皮膚刺激性評価の現状^{1,2)改良)}

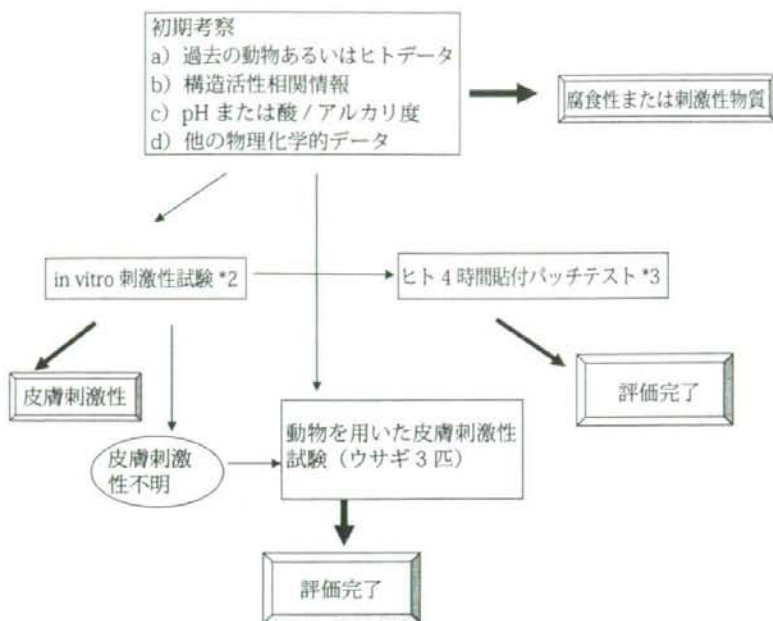


図2 Botham スキーム^{3(改良)}

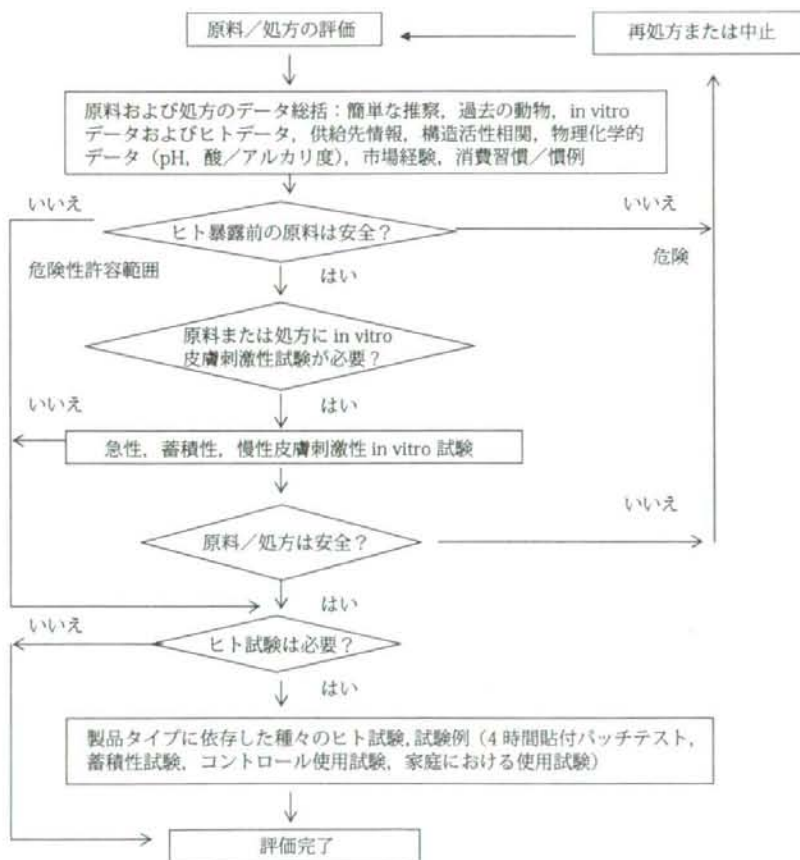


図3 Robinson スキーム^{5(改良)}

図4に小島の案も示すが⁷⁾、腐食性の危害性は同定されているという前提で、培養皮膚モデルを用いて用量反応性を評価した後、さらに24～48時間閉塞貼布ヒトパッチテストを組み合わせ、総合的に皮膚刺激性を評価すべき提案となっている。ただし、培養皮膚モデルで用量反応を評価できるというバリデーションはまだ実施されていない。



図4 小島スキーム⁷⁾⁽⁸⁾

2. 定量的構造活性相関 QSAR

眼刺激性も合わせ、刺激性を構造活性相関 (QSAR) で予測する多くの検討がなされ、総説がまとめられている⁸⁾⁽¹¹⁾。その結果として、TOPKAT や DERECK などの構造により皮膚刺激性を予測するソフトが紹介され、良い予測性が報告されている。ただし、これらの検索結果は疑陽性が多いという印象を持っている。スクリーニングとして、陽性となった物質の開発を中止するのではなく、注意深く以後の試験に用いるならば有用な検討材料であると考ええる。ただし、構造活性相関もバリデーションに関するガイドライン文書が検討されており、将来的には判断の根拠が必要となる。

3. 再構築培養ヒト皮膚モデル (ヒト皮膚モデル) を用いる方法

欧米ではヒト皮膚モデルとして EPISKIN および EpiDrem を用いた試験結果が報告されている。これ以外に、PREDISKIN も検討されたが、一次バリデーション終了後、次の段階に進めなかった¹²⁾。現在上記の二つのモデルは欧米で汎用されている有力なヒト皮膚モデルである。日本で使用されているものを含め、表1に私の知る限りのヒト皮膚モデルを示す。また、日本で市販されているヒト皮膚モデルの病理写真を図5に示す。ヒト皮膚の病理写真と比較して、角化細胞と比較して、角質層の厚さ、角化細胞数など完成度は遠く及ばないが、各社モデルに大差はない。よって、正常皮膚と比較して経皮吸収も早く、毒性を起こしやすいようである。処理方法などである程度付加を減少させれば、皮膚刺激性の評価は可能と考えている。

表1 日欧米で市販されている主なヒト皮膚モデル

キット名	販売先	国名
Apiligraf	Organogenesis Inc.	米国
EpiDerm	Matek クラボウ	米国 日本
EPISKIN	EPISKIN	フランス
Neoderm-ED		韓国
Lab-Cyte	J-TEC	日本
SkinEthic	SkinEthic	フランス
TESTSKIN	東洋紡	日本
Vitrolife-Skin	ゲンゼ	日本

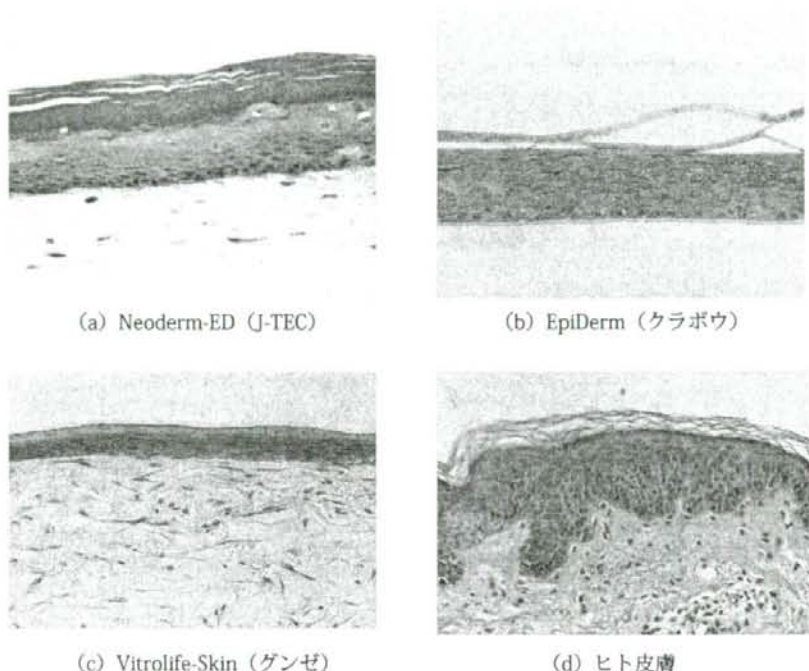


図5 ヒト皮膚モデルとヒト皮膚の病理写真の比較

当初、処理時間18時間の細胞生存率50%が境界であったり、被験物質のET50（溶媒対照に対して50%の細胞毒性を示す処理時間）を分母としてSLS20%水溶液のET50を割り、その値が0.8以下なら陽性として *in vivo* 結果を比較する手段が取られた。しかし、これらの方法ではマネージメントチームの設定した感度、特異性、正確性のそれぞれの基準値60%をクリアできず、処理方法の改定が行われた。

まず、15分間被験物質処理後、18時間培養後の細胞生存率を指標とした検討が行われ^{13,14)}、さらに42時間培養後の細胞毒性を指標とし、50%細胞毒性が認められる場合を陽性と判断する方法がもっとも良いと報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。

この方法で得られた ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) のバリデーション結果では、表 2 に示すように、EpiDerm および EPISKIN の正確性は 80% を越えていた。この値はバリデーションマネージメントチームの設定した基準値に対応できている。

表 2 EpiDerm および EPISKIN, SIFT 予測モデルの可能性 (動物の結果との比較)

モデル名	予測モデル	感度 (%)	特異性 (%)	一致度 (%)	疑陽性率 (%)	疑陰性率 (%)	参考文献
EpiDerm	ET50 利用			58	37	47	Zuang, 2002
	15 分処理後 18 時間培養	90	60	75	31	14	Zuang, 2002
	15 分処理後 42 時間培養	70	88	80	18	21	Kandarova, 2005
EPISKIN	18 時間処理後, 細胞生存率 50% 以下を陽性			58	60	23	Zuang, 2002
	15 分処理後 18 時間培養	75	75	75	31.8	19.2	Cotovio, 2005
	15 分処理後 42 時間培養	85	78.6	81.3	26.1	12.0	Cotovio, 2005
SIFT	TEWL *または ER** の 5 倍値			47	33	73	Zuang, 2002
	TEWL *または ER** の 5 倍値	30	80	55	47	40	Heylings, 2003
	TEWL および ER の t 検定	80	60	70	25	33	Heylings, 2003

* : TEWL 電気伝導度

** : ER 電気抵抗度

この方法は、ヒト皮膚モデルである Vitrolife-skin を用いた日本におけるバリデーションにおいても実施した PI (Post-Incubation) と同様の操作である。10 分間処理後培養は 42 時間ではなく、18 時間ではあるが、このバリデーションの結果は、表 3 に示すように ET₅₀ を算出した結果と比較して、施設間再現性が低く、また動物実験との対応性も低かった¹⁸⁾。この原因を現在検討中である。

表 3 日本におけるヒト皮膚モデルバリデーションの結果 (ヒトパッチ結果との比較)

モデル名	予測モデル	感度 (%)	特異性 (%)	一致度 (%)	疑陽性率 (%)	疑陰性率 (%)	参考文献
TESTSKIN	ET50 が 2 時間 未満を陽性	94	62	69	38	6	Kojima, 2005
Vitrolife-Skin	ET50 が 2 時間 未満を陽性	100	44	70	56	0	Kojima, 2005
	10 分間処理後, 18 時間培養	59	59	59	41	41	Kojima, 2005

日本で行ったバリデーションでは、ヒト皮膚モデル TESTSKIN および Vitrolife-skin を用いて ET₅₀ を算出する方法でウサギ皮膚刺激性よりヒトパッチテスト結果とよく相関すると報告した。皮膚一次刺激性試験の目的はヒトの刺激性の予測であり、ウサギの結果ではない。ウサギの結果がヒトとよく相関するならともかく、ウサギの予測率も 6 割程度であり、疑陽性が多い試験法である。その方法と *in vitro* を比較してもずれは大きくなるばかりである。その結果でも疑陽性、疑陰性率は 20% を超えていたが、ウサギの予測率と大差はなく、利用可能と考察した^{19,20)}。

ヒト皮膚モデルも、製造先が違うモデルが存在する。この場合、バリデーションは必要か。Worth 文献の中には、同様の方法を比較する場合、catch-up バリデーションが必要とされており²¹⁾、よってモデル毎に catch-up バリデーションで十分であろう。3 施設がブラインド化された 10 物質程度をバリデーションで実施すればよいであろう²²⁾。得られた結果を過去のモデルと比較して再現性、予測性などに遜色ない結果が得られることが採用の条件である。

4. 摘出皮膚を用いる方法

SIFT (Skin Irritation Function Test) が最終的なバリデーションに移行する可能性が高い^{12,13,23)}。Pig Ear を用いる方法が当初提案されたが、次のバリデーション段階に進めていない¹²⁾。

摘出した皮膚の TER (電気伝導度) および TEWL (角質水分蒸散量) を指標として、TER または TEWL いずれかの値が、事前測定値と比較して 5 倍以上または t 検定で 5% の危険率で有意な場合に陽性とするという予測モデルで評価する。

その結果を表 2 に示したが、t 検定においても疑評価の割合が高く、予測モデルの改良が必要という状況である。

日本では摘出皮膚を用いた研究は少ない。我々は摘出ウサギ皮膚を用いて皮膚刺激性を検討し、よい相関を報告しているが²⁴⁾、MTT による細胞毒性を指標としており、評価方法が SIFT と異なる。もちろん、バリデーションまでには到っていない。

文 献

- 1) OECD(1998) Revised proposal for the harmonization of hazard classification based on skin irritation/corrosion, ENV/MC/CHEM/HCL (98) 4, pp.12., Paris : OECD
- 2) Worth, A. P., Fentum, J. H., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J. and Liebsch, M. (1998) An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, ATLA, 26, 709-720

- 3) Botham, P. A., Earl, L. K., Fentem, J. H., Rouget, R., va de Sandt, J. J. M.(1998) Alternative methods for skin irritation testing, ATLA, 26, 195-211(1998)
- 4) OECD draft guideline testing of chemicals (1997)Proposal fro a draft new guideline. Acute dermal irritation study in human volunteers, April 1997
- 5) Robinson MK, Cohen C, de Fraissinette Ade B, Ponec M, Whittle E, Fentem JH.(2002)Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products., Fd. Chem. Toxicol., 40, 573-592(2002)
- 6) Basketter DA, York M, McFadden JP, Robinson MK. (2004)Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test., Contact Dermatitis. 51(1) : 1-4
- 7) 小島肇夫 (2006) 皮膚毒性の安全性評価, 407-416, 化粧品大全, 株式会社 情報機構
- 8) Cronin, M. T. D., Dearden, J. C., Walker, J. D. and Worth, A. P. (2003) Quantitative structure-activity relationships for human health effects : commonalities with other endpoints. Environ. and Toxicol. Chem, 22, 1829-1843
- 9) Hulzebos, E. M., Maslankiewicz, L. and Walker, J. D. (2003) Cerification of literature-derived SARs for skin irritation and corrosion, QSAR and Combinatorial Science, 22, 351-363
- 10) Patlewicz, G., Rodfold, R. and Walker, J. D. (2003) QSARs for predicting skin and eye irritation, Environ. and Toxicol. Chem, 22, 1862-1869
- 11) Cronin, M. T. D., Jaworska, J. S., Walker, J. D., Comber, M. H. I., Watts, C. D. and Worth, A. P. (2003) Use of QSARs in international decision-making frameworks to predict health effects of chemical substances, Environ. Health Perspec, 10, 1391-1402
- 12) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhutter, H. -G. and Liebsch, D. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results snd evaluation by the management team, Toxicol in Vitro, 12, 483-524
- 13) Zuang, V., Balls, M., Botham, P. A., Coquette, A., Corsini, E., Curren R. D., Elliott, G. R., Fentem, J. H., Heyling, J. R., Liebsch, M., Medina, J., Rouget R., Sabdt, J. J. M., Wiemann, C. and Worth, A. P. (2002) Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, ATLA, 30, 109-129
- 14) Portes, P., M. -H. Grandidier, Cohen, C. and Rouget, R. (2002) Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals : follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro, 16, 765-770