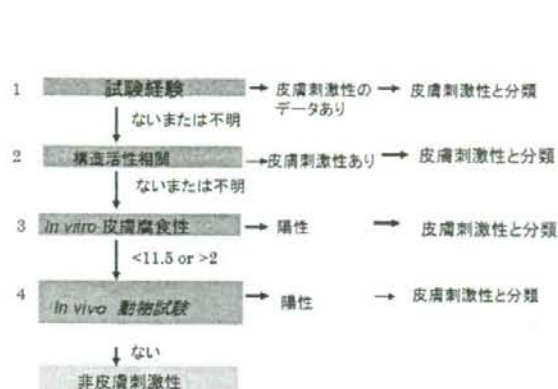
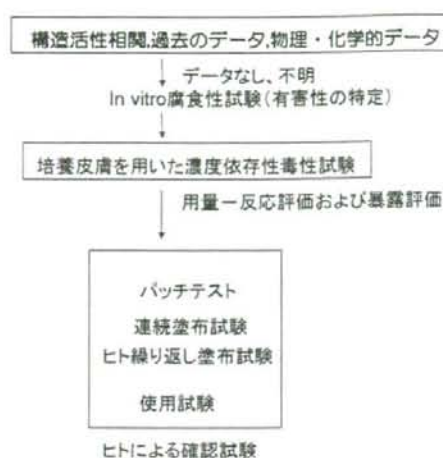


用いられるかによる。化学物質の腐食性という Hazard identification (危害性同定) は OECD ガイドライン 430 および 431 に記された *in vitro* 腐食性試験で評価可能である^{8, 9)}。しかし、ヒトパッチやヒト連続塗布試験、使用試験まで進め、安全性の確保に努める前に、リスクを評価しなければならない。リスク評価を行うためには、危害性同定に加え、用量反応評価、暴露評価が必要である¹⁰⁾。

スキーム1 皮膚刺激性評価スキーム^{7)改訂)}スキーム2 小島スキーム^{4)改訂)}

スキーム2に皮膚毒性のリスク評価に関する小島案を示すが⁴⁾、腐食性の危害性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する。その後、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を考えている。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。

3 代替試験法の使い方

3.1 定量的構造活性相関 QSAR

眼刺激性も合わせ、皮膚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¹¹⁻¹⁴⁾。その結果として、TOPKAT や DERECK などの化学物質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偽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、注意深く今後の試験に用いるならば有用な検討材料であると考えられる。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、将来的には利用にあたって判断の根拠が必要となる。

3.2 培養皮膚モデル

ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) のバリデーションでは、培養皮膚モデルとして 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¹⁵⁾。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培養表皮モデルである。日本で市販されている培養皮膚/表皮モデルを表1に示す。また、日本で市販されている培養表皮/皮膚モデルの一例の病理写真を図1および図2に示す。ヒト皮膚の病理写真と比較して、角質層の厚さ、角化細胞数などで完成度は及ばないが、各社モデルに大差はない。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、皮膚刺激性スクリーニングの利用は可能と考えている。

表1 日本で市販されている主な培養皮膚モデル

キット名	タイプ	販売先
EpiDerm	表皮モデル	クラボウ
Lab-Cyte	表皮モデル	J-TEC
TESTSKIN	皮膚モデル	東洋紡
Vitrolife-Skin	皮膚モデル	グンゼ

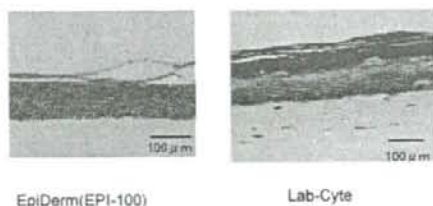


図1 培養表皮モデルの一例



図2 培養皮膚モデルの一例

当初、ECVAMバリデーションでは、被験物質の処理時間18時間後の細胞生存率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。

そこで、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^{16, 17)}、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¹⁸⁻²⁰⁾。

この方法で得られた結果では、EpiDermおよびEPISKINの正確性は80%を超えていた。この値はバリデーションマネジメントチームの設定した基準値に対応できている。

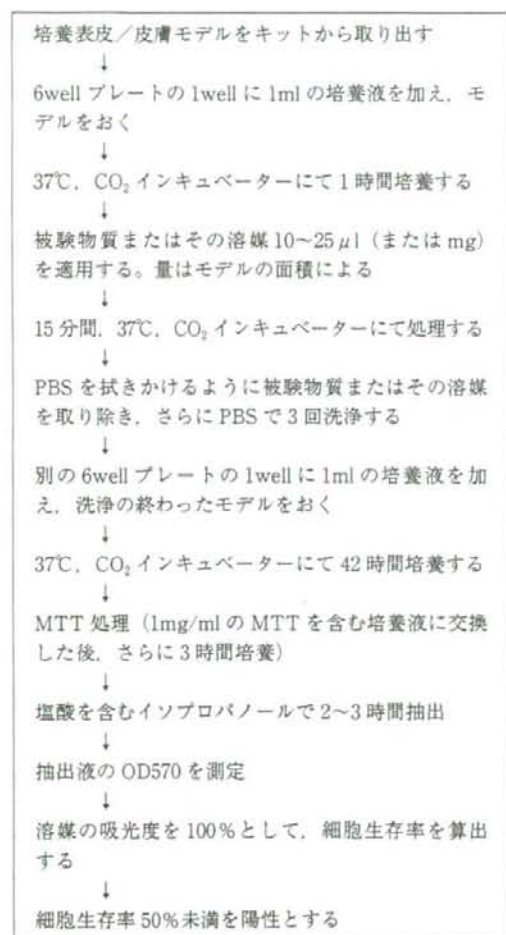
日本で行ったバリデーションでは、培養皮膚モデルTESTSKINおよびVitrolife-skinを用いてET50を算出する方法でウサギ皮膚刺激性よりヒトパッチテスト結果とよく相関すると報告した²¹⁻²³⁾。皮膚一次刺激性試験の目的はヒトの刺激性の予測であり、ウサギの刺激性予測ではない。ウサギの結果がヒトとよく相関するならともかく、ウサギの予測率も6割程度であり、偽陽性が多い試験法である。その方法と

in vitro を比較してもずれは大きくなるばかりである。その結果でも偽陽性、偽陰性率は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。

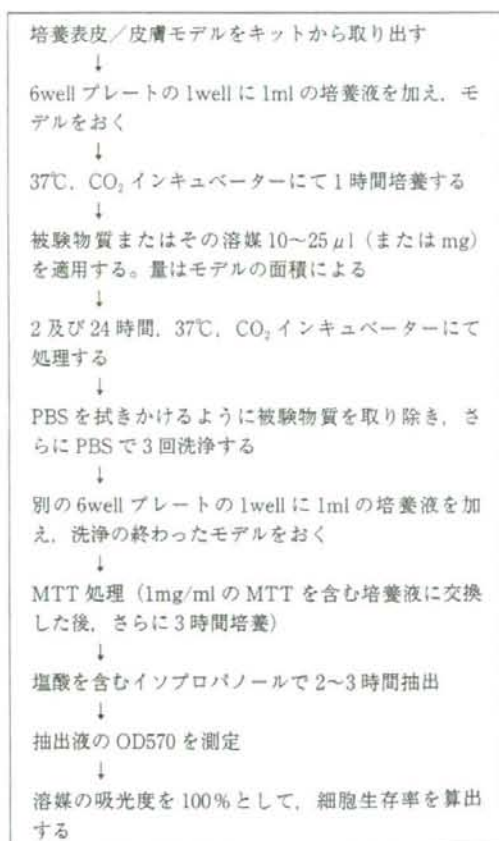
培養皮膚モデルも、製造先が違うモデルが存在する。この場合、バリデーションは必要となるのか。Worth 文献の中には、同様の方法を比較する場合、catch-up バリデーションが必要とされており²⁴⁾、よってモデル毎に catch-up バリデーションで十分であろう。3施設がブラインド化された10物質程度を共同研究で実施すればよいであろう²⁵⁾。得られた結果を過去のモデルと比較して再現性、予測性などに遜色ない結果が得られることが採用の条件である。

具体的方法として、良いバリデーション結果が報告されている試験手順として ECVAM バリデーションの方法と日本のバリデーション結果が報告されている試験手順として ET50 算出の方法を以下に示す。

ここで得られた評価は、製品への安全性分類のための表示に使われるものである。



スキーム1 ECVAM バリデーションの方法



スキーム2 ET50の算出方法

得られた結果から、皮膚刺激性を予測できる²⁶⁾。

- ① 2 および 24 時間とも細胞生存率 50%未満の場合、さらに、15、30、60 および 120 分処理を行い、ET50 を正確に算出する。または細胞毒性 < 2 時間として強い皮膚刺激性が予想される物質として分類する。
- ② 2 時間に細胞毒性はないが、24 時間で細胞生存率 50%未満の場合、さらに、2、4、8、および 24 時間処理を行い、ET50 を正確に算出する。または 2~24 時間の間に細胞毒性があるとして、中程度の皮膚刺激性が予想される物質として分類する。
- ③ 2 および 24 時間とも細胞生存率 50%以上の場合、細胞毒性 > 24 時間として皮膚刺激性は極めて弱いと予想される物質として分類する。

この結果をもとに、配合濃度および安全係数を考慮しながら、被験物質およびその溶媒を用いてパッチテストを実施し安全性を確認する。お断りしておくが、この方法は最終的な評価に至っていないバリデーション委員会の私案である。

さらに、用量反応性評価を行う場合には、各種濃度の被験物質を 2 または 24 時間適用して、細胞生存率を求める。この用量反応曲線はパッチテストの反応曲線と比較して、感度が約 10~50 倍であった²⁷⁾。ただし、パッチテストでは水溶液での反応性が高いこともあり、水溶性物質による感度は数倍であった。使用時には、溶媒による注意が必要である。

3.3 摘出皮膚を用いる方法

COLIPA では、マウスの摘出皮膚を評価に用いる SIFT (the Skin Integrity 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^{15, 16, 28)}。摘出した Pig Ear を用いる方法も当初提案されたが、次のバリデーション段階に進めていない¹⁵⁾。

SIFT は、ER (電気伝導度) および TEWL (角質水分蒸散量) を指標として、ER 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、t 検定においても偽評価の割合が高く、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。私達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²⁹⁾、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。イメージとしても *in vitro* とはいえ、*Ex vivo* というイメージに取られ、動物の削減にはつながるが、代替法ではないという印象を持つ方が多い。確かに摘出皮膚の結果は培養皮膚モデルより予測性は高い。しかし、培養皮膚モデルの予測性が極めて悪いならともかく、ある程度培養皮膚モデルが利用できそうな昨今、摘出皮膚を用いる評価は使いにくい時代になってきたと感じている。

■ 文 献 ■

- 1) 小林敏明, 市川秀之, 板垣 宏, 皮膚毒性, 毒性試験講座7, 機能毒性学, 福原武彦・小野宏編, 地人書館, p. 268- (1989)
- 2) 「日本化粧品工業連合会化粧品安全性評価に関する指針 2001」, 薬事日報社, pp. 1-33 (2001)
- 3) 薬事審査研究会監修, 「化粧品・医薬部外品製造申請ガイドブック第四版」, 薬事日報社 (2001)
- 4) 小島肇夫, 皮膚毒性の安全性評価, 「化粧品大全」, (株)情報機構, p. 407-416 (2006)
- 5) 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) 1210 (2004)
- 6) OECD Revised proposal for the harmonization of hazard classification based on skin irritation/corrosion, ENV/MC/CHEM/HCL (98) 4, p. 12, Paris, OECD (1998)
- 7) Worth AP., Fentem JH., Balls M., Botham PA., Curren RD., Earl LK., Esdaile DJ. and Liebsch M., An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, *ATLA*, **26**, 709-720 (1998)
- 8) OECD guidelines for testing of chemicals, 430, Paris, OECD (2004)
- 9) OECD guidelines for testing of chemicals, 431, Paris, OECD (2004)
- 10) 山本 郁, 化学物質のハザード性と安全性評価, *ファルマシア*, **40**, 215-219 (2004)
- 11) Cronin MTD., Dearden JC., Walker JD. and Worth AP., Quantitative structure-activity relationships for human health effects: commonalities with other endpoints., *Environmental and Toxicological Chemistry*, **22**, 1829-1843 (2003)
- 12) Hulzebos EM., Maslankiewicz L. and Walker JD., Certification of literature-derived SARs for skin irritation and corrosion, *QSAR and Combinatorial Science*, **22**, 351-363 (2003)
- 13) Patlewicz G., Rodford R. and Walker JD., QSARs for predicting skin and eye irritation, *Environmental and Toxicological Chemistry*, **22**, 1862-1869 (2003)
- 14) Cronin MTD., Jaworska JS., Walker JD., Comber MHL., Watts CD. and Worth AP., Use of QSARs in international decision-making frameworks to predict health effects of chemical substances, *Environmental Health Perspectives*, **10**, 1391-1402 (2003)
- 15) Fentem JH., Archer GEB., Balls M., Botham PA., Curren RD., Earl LK., Esdaile DJ., Holzshutter HG. and Liebsch D., The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the management team, *Toxicol. in Vitro*, **12**, 483-524 (1998)
- 16) Zuang V., Balls M., Botham PA., Coquette A., Corsini E., Curren RD., Elliott GR., Fentem JH., Heyling JR., Liebsch M., Medina J., Rouget R., Sabdt, J.J.M., Wiemann C. and Worth AP., Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, *ATLA*, **30**, 109-129 (2002)
- 17) Portes P., MH. Grandidier, Cohen C. and Rouget R., 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 (2002)
- 18) Kandarova H., Liebsch M., Genschow E., Gerner I., Traue D., Slawik B. and Spielmann H., Optimisation of EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation test, *ALTEX*, **21**, 107-114 (2004)
- 19) Cotovio J., Grandidier AH., Portes P., Rouget R. and Rubinstenn G., The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimization of the EPISKIN prediction model within the framework

- of the ECVAM validation process, *ATLA*, **33**, 329-349 (2005)
- 20) Kandarova H., Liebsch M., Gerner I., Elisabeth S., Genschow E. and Spielmann H., The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests— An assessment of the performance of the optimized test, *ATLA*, **33**, 351-367 (2004)
 - 21) Kojima H., Shiraishi A., Andoh Y., Okazaki Y., Ozawa N., Kawabata R., Kadono K., Sozu T., Suzuki T., Tabata A., Nakano Y., Morikawa N., Hori M., Yamashita K., and Yoshimura I., Validation study for Vitrolife-Skin™, a three-dimensional cultured human skin model, I, as an alternative to skin irritation testing using ET₅₀ protocol, *Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science*, Berlin (2005)
 - 22) Kojima H., Shiraishi A., Andoh Y., Okazaki Y., Ozawa N., Kawabata R., Kadono K., Sozu T., Suzuki T., Tabata A., Nakano Y., Morikawa N., Hori M., Yamashita K., and Yoshimura I., Validation study for Vitrolife-Skin™, a three-dimensional cultured human skin model, II, as an alternative to skin irritation testing using Post-Incubation (PI) protocol, *Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science*, Berlin (2005)
 - 23) Kojima H., Sonoda I., Nishizawa A., Hori M., Kawabata R., Ozawa N., Suzuki T., Usami M., Ishibashi T. and Yoshimura I., Validation study for TESTSKIN™, a three-dimensional cultured human skin model, as alternatives to skin irritation testing applied to forty cosmetic substances, *Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science*, Berlin (2005)
 - 24) Worth AP. and Balls M., The principles of validation and the ECVAM validation process, *ATLA*, **30** Suppl 2, 15-21 (2002)
 - 25) Kandarova H., Liebsch M., Schmidt E., Genschow E., Traue D., Spielmann H., Meyer K., Steinhoff C., Tornier C., Wever B. and Rosdy M., Assessment of the skin irritation potential of chemicals by using the Skin Ethic reconstructed human epidermal model and the common skin irritation protocol evaluated in the ECVAM skin irritation validation study, *ATLA*, **34**, 393-406 (2006)
 - 26) Kojima H., Considerations regarding the importance of *in vivo* data for the development of an alternative to conventional skin irritation testing, *AATEX*, **11**, 1, 31-38 (2005)
 - 27) Kojima H., Ishii I., Nakata S. and Konishi H., Dose-response evaluation using an epidermal model, an alternative to skin irritation testing, *AATEX*, **11**, 3, 177-184 (2006)
 - 28) Heyling JR., Diot S., Esdaile DJ., Fasano WJ., Manning LA. and Owen HM., A prevalidation study on the *in vitro* skin irritation function test (SIFT) for prediction of acute skin irritation *in vivo*: results and evaluation of ECVAM Phase III, *Toxicol. in vitro*, 123-138 (2003)
 - 29) 小島肇夫, 森 栄治, 花村朝夫, 佐々木哲二, 真鍋幸子, 丹野和信, 堅田友則, 小西宏明, 摘出皮膚培養キットを用いた皮膚一次刺激性試験代替法, *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **30**, 402-409 (1996)

第1章 代替法における工学的新技術の可能性

1 代替法国際動向から見た新技術導入の可能性

小島肇夫*

1.1 動物実験代替法における新技術導入の目的

バイオマテリアルにかかわらず、動物実験代替のために新技術を開発する目的としては、薬効開発や安全性評価に動物実験ができなくなるという国際情勢への対応、動物飼育施設が手近にないこと、研究分野を極めるうちに特許を取った、あるいは安全性を極める方法を開発し、受託で商売を始めたい、学問を極めたいなどが挙げられる。これらの目的を適えるための試験法公定化までの道筋を、以降に説明していきたい。

1.2 試験法の公定化

試験法の特許が取れ、これを使えば薬効や安全性評価に有用という方法が開発できたとする。ところが、多くの研究者に使って頂く為、少なくとも安全性評価に用いる試験法には行政による認証、公定化が必要である。単なるスクリーニングであり、自施設のみで用いる場合もあるが、それでは安全性の評価を客観的に行っていることにはならない。施設内ではともかく、社会的には認証されない。

論文も複数あり、専門家の間では高く評価されていたとしても本当に優れた試験であることを保証するための第三者評価が必要となる。これがバリデーションやPeer Review（専門家による第三者評価）である。これまでの筆者の経験では優れた方法が開発されたとしても、バリデーション結果から、バラツキが大きかったり、施設間の再現性がないケースを数多く経験している。決められたプロトコルを用い、技術的に訓練された研究者が精度よく、再現性のある試験結果が求められる試験法が良い方法である。図1に示すように、国際的な新規安全性試験法の認証システムがOECDガイダンス文書^{1,2)}で決められており、試験法が公定化されるためには、調査・研究開発から始まってバリデーション、専門家による第三者評価が必要である。一試験が評価を終え、ガイドラインに認められるためには順調に進んでも10年かかると言われており、多大な時間と経費が必要である。その過程を経てなおかつ開発時の輝きを失わない試験方法が公

* Hajime Kojima 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部
新規試験法評価室 室長

定化される。

1.3 バリデーション

1.3.1 動物実験代替法センターの設立

社会的なニーズもあり、1990年代の後半、欧州にECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)、米国にはNICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) が設立された。

いずれも動物実験代替法バリデーションセンター (Center for the Validation of Alternative Methods : CVAM) という。日本でも2005年に国立医薬品食品衛生研究所内にJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) が設立された。これらのセンターの業務は読んで字のごとく、動物実験代替法のバリデーションである。新規動物実験代替試験法の公定化のために必要なバリデーションの結果を求める機関である。JaCVAMを除く2機関は企業から試験法のバリデーション、第三者評価の依頼を受け、試験法マネジメントチームを立ち上げバリデーション研究を実施する。このようなシステムが国際的な試験法開発のルールとなりつつある。よって、試験法の公定化のためには、これらのCVAMにバリデーション、評価を依頼すればよい。一方、JaCVAMは厚生労働省の一研究所の一研究室であることから、企業からの委託研究を受けられない。バリデーション研究は日本動物実験代替法学会などの専門家集団に依頼している状況である。

1.3.2 バリデーションでの必須事項

試験法のバリデーション研究を実施するにあたり重要な問題、クリアしなければならない問題を列記しておきたい。

まず、試験法がバリデーションをするに値するものかという成立基準が存在する。

- ① 作用機構および機能、既存の標的臓器が明確
- ② 最小限の対照物質が明確
- ③ 適性かつ信頼性を確認できるデータの所在

この成立基準を満たした試験法についてバリデーションで明らかにするべきものをOCEDのGD (Guideline Document) 34から引用すると¹⁾、以下の3点が要素として挙げられる。

- ① 施設内、施設間の再現性 (信頼性)
- ② データの質

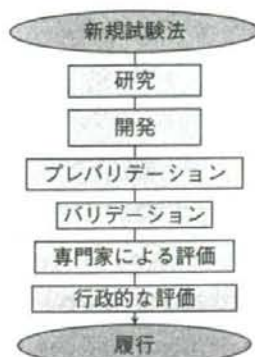


図1 試験法バリデーションのプロセス²⁾

③ 適性（感度，特異度，正確度，陽性の予測性，陰性の予測性，有用性，限界など）

そこで、この3要素を満たすために行うバリデーションに必要なものを挙げる。規制のためのリスクを評価する目的でバリデーションする新試験方法、あるいはこれまでの試験法の改良では以下のバリデーション基準を満たさねばならない。これらの基準はもちろん、方法や目的によりある程度変わる。しかし、その目的にあった試験法の評価とデータベースが一致しなければいけない。なぜなら、試験法は異なった目的、組織（規制当局）、物質の分類によりケースバイケースで異なるからである。よって、この基準は試験法バリデーションの規制の受入れのために欠くことができないものである。

<バリデーションの基準>

- ① 科学のおよび規制上の合理性
- ② 指標の生物学的な意義
- ③ 詳細な試験計画
- ④ 再現性（施設内，施設間再現性）
- ⑤ 対照物質の存在
- ⑥ 適性を見極められる情報とデータ
- ⑦ GLP（Good Laboratory Practical）に準拠したデータ
- ⑧ すべてのデータおよび詳細な試験計画が公開され、利用できること

1.4 第三者評価（Peer Review）

さらにバリデーションが終了しても、専門家による第三者評価（Peer Review）が必要となる。評価を実施するためには、試験法の開発やバリデーションに関与しない第三者の試験法、統計、バリデーションの専門家が必要である。表1に示すように、米国ではNICEATM、欧州ではECVAMがその専門家を集めて評価を委託する。日本にはJaCVAMがこれに当たっている。これら機関の仕事は評価に必要な資料を作成し、会議を運営し、評価文書を纏め上げることである。Peer Reviewの評価項目を以下にまとめておく。

- ① 科学的，規制の上での妥当性
- ② 試験プロトコルの構成の妥当性
- ③ バリデーションに用いられた物質の分類
- ④ 試験法の正確性を評価する物質の *in vitro* および参照データ
- ⑤ バリデーションデータと結果
- ⑥ 試験法の正確性
- ⑦ 試験法の信頼性

表1 日米欧の各段階における中心機関

	バリデーション	専門家による評価の世話役	行政受入れの評価
米国	NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)	NICEATM	ICCVAM (Interagency coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)
欧州	ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)	ECVAM	ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)
日本	学会 (日本動物実験代替法学会など)	JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)	JaCVAM 評価会議

- ⑧ データの質
- ⑨ 他の科学的な報告
- ⑩ 3Rs への関与
- ⑪ 試験法の有用性と限界
- ⑫ 文献
- ⑬ 別添資料

1.5 行政的な受入れ

バリデーションや専門家による第三者評価を経ても、試験法は自動的に行政に受入れられる訳ではない。規制受入れのためには、以下の基準を満たしている必要がある。この評価を欧州では ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)、米国には ICCVAM (Interagency coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) が²⁾行っている。日本では JaCVAM 評価会議がこれに当たっている。

- ① 専門家による科学的な評価
- ② 試験計画や標準作業手順書
- ③ 既存の試験法との関係
- ④ 化学物質の十分なデータ
- ⑤ 試験法がリスク評価に有用
- ⑥ 試験法の限界が明確
- ⑦ 頑強 (若干の変更による影響を受けない) かつ習得が容易

- ⑧ 時間と経費の削減
- ⑨ 同様の試験と調和
- ⑩ 試験法が安定
- ⑪ 動物実験の3Rs (reduction:削減, refinement:苦痛の軽減, replacement:置き換え)に合致

1.6 おわりに

以上のように、試験法が行政的に受け入れられるためにはある程度の段階を踏まねばならない。一つひとつの段階は一施設で実施できるような簡単なものではない。そこで繰り返しになるがそれらのまとめ役として国際的な機関、施設が作られた訳である。

人類の進歩のためには新技術の導入は不可欠である。バリテーションや専門家による第三者評価の検証システムを人類は考え出した。その点をよく理解頂き、CVAMを利用してバイオマテリアルの分野においても素晴らしい有益な試験法を開発して頂きたいと願うばかりである。

文 献

- 1) OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO(2005) 14
- 2) ICCVAM (1997) Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods: a report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. NIH Publication No: 97-3981, (1997), National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)

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, Reducemnet) 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着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)}。

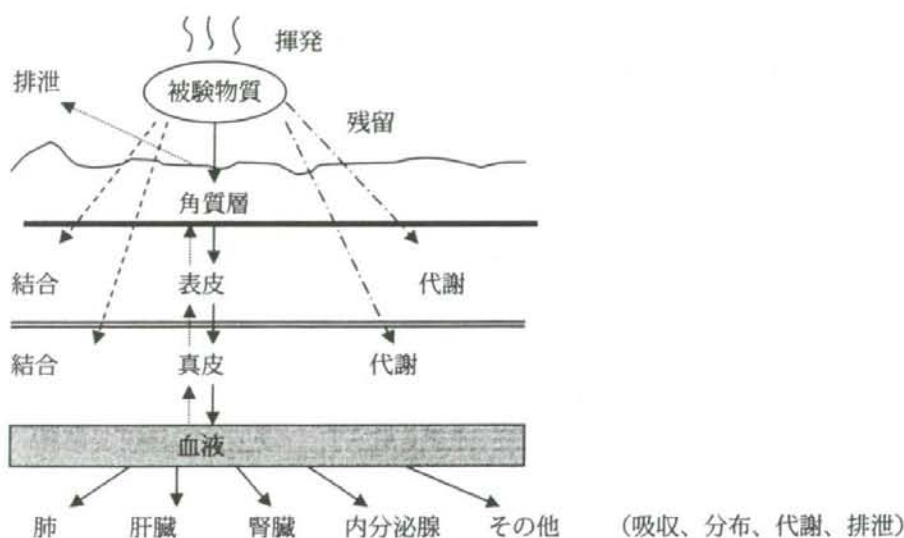


図1 経皮吸収の一般モデル

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 (Microdialysis)

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^{16), 20)}、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²³⁾。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¹⁵⁾。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パ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。チャンパ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 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⁷⁾。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。

$$In\ vivo\ ヒト\ 経皮\ 吸収 = In\ vivo\ 動物\ 経皮\ 吸収 \times \frac{in\ vivo\ ヒト\ 経皮\ 吸収}{in\ vivo\ 動物\ 経皮\ 吸収}$$

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/doubutsu/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_law_2/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.