

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

09/01～09/12

1. 試験名

皮膚刺激試験

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

本分科会では、皮膚刺激性を評価する試験の一環として医薬部外品の製造承認申請においてデータの提出を求められている「皮膚一次刺激性試験」を評価するために、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、検討を行った。

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¹⁾。

このうち、皮膚一次刺激性は、被験物質を皮膚（無傷及び有傷）に単回接触させることによって生じる紅斑、浮腫、落屑などの変化を指標とする皮膚反応で、その程度が強度で非可逆的な組織損傷による皮膚反応は皮膚腐食性として、区別する。本試験は、ヒト皮膚に被験物質を単回適用することによって生じる皮膚反応の程度を予測するために実施される¹⁾。

4. 該当する代替法の名称と選択理由

分科会による検討を開始した時点（2007/10）では、皮膚一次刺激性試験の代替法として、公的な評価が終了している試験は、07/4 に欧州バリデーションセンター（ECVAM）科学諮問委員会（ESAC）により認証を受けた EpiSkinTMのみであった。その後、EpiSkinTMを含む3試験法（次頁の表に示す）がESACによる認証を受けることとなり²⁾（経緯の概要を6.1.2に示す）、今年度は、EpiSkinTM、EpiDermTM SIT 及び SkinEthicTM RHE を対象試験法とした。これらの試験法を再構築ヒト表皮モデル（Reconstructed human Epidermis: RhE、ヒト由来の変異していないケラチノサイトを用いて再構築した組織モデル）として括って、市販品の入手が可能な方法として挙げ、現在 OECD ガイドライン化が進められている。ガイドライン案には、試験法に加えて、類似の再構築ヒト表皮モデルを用いた試験法（me-too test）を導入する場合の Performance Standard が添付文書として含まれている。ドラフトは2009/12/11に更新され（Version 4, 2010/1/26までコメント募集）、2010年春の採択を待つ段階である。なお、本試験法はTG404を代替する目的で開

発されているが、TG404³⁾には運用スキームに動物実験による確認が盛り込まれており、本試験法が採択された場合、TG404の改訂も必要になると思われる。

試験法（製造元）	状況
EpiSkin™ (Skinethic 社)	<p>2007/4/26 ECVAM で開催された第 26 回会議にて、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 (OECD TG404) を代替する信頼性のある適切なスタンドアローン法であることを確認した。IL-1α 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⁴⁾。</p> <p>2008/6/6 OECD ガイドライン案が提示され、コメント募集開始。</p> <p>2008/10 の OECD ガイドライン案 Ver. 5 では、評価法が MTT 還元法による生存率測定のみで修正された⁵⁾。</p> <p>2008/11/5 ESAC により、UN GHS 下で再評価が行われ、再度 <i>in vitro</i> 皮膚一次刺激性試験として認証を受けた²⁾。</p> <p>2009/12/11 OECD ガイドライン案 Ver. 4 のコメント募集⁶⁾</p>
EpiDerm™ SIT (MatTek Co.)	<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 ECVAM で開催された第 26 回会議にて、ESAC は、EpiDerm™ SIT を「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、プロトコールの改良により感受性の向上が見込める」と評価した。</p> <p>2008/11/5 ESAC により、UN GHS 下で再評価が行われ、皮膚一次刺激性試験として認証を受けた²⁾。</p> <p>2009/9/9 OECD ガイドライン案 Ver. 7.6 に、入手可能な RhE 市販品として収載⁷⁾</p>
SkinEthic™ RHE (Skinethic 社)	<p>2008 年にバリデーション実施</p> <p>2008/11/5 ESAC により、UN GHS 下で再評価が行われ、皮膚一次刺激性試験として認証を受けた²⁾。</p> <p>2009/9/9 OECD ガイドライン案 Ver. 7.6 に、入手可能な RhE 市販品として収載⁷⁾</p>

5. 再構築ヒト表皮モデルを用いる試験法の概要 (OECD ガイドライン案⁷⁾)

試験方法⁸⁻¹⁰⁾ :

再構築ヒト表皮モデルの表面に 15~30 分 (各市販モデルの試験法に従う) 接触させ、試験物質を取り除き、水溶性緩衝液などで洗浄する。

培地を交換し、さらに 42 時間 (20~37°C : 各市販モデルの試験法に従う) 培養後、細胞生存率を MTT 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。

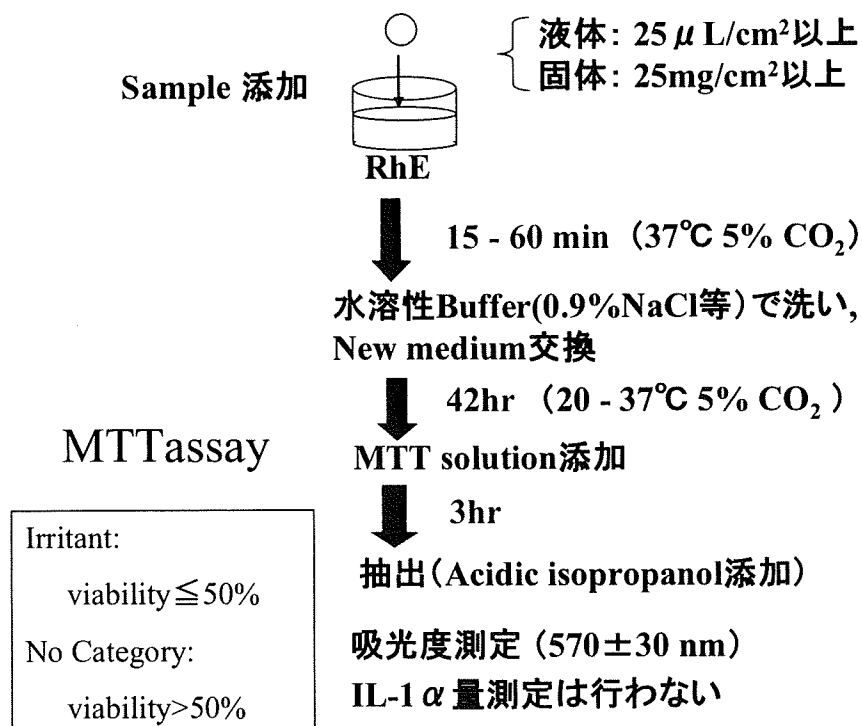
評価基準 : (各国規制に従う)

生存率 ≤ 50% Irritant : UN GHS Category 2

生存率 > 50% Non- irritant : UN GHS No Category

陽性対照の設定 :

バリア機能と組織の感受性の確認のため、試験ごとに陽性対照および陰性対照を設定すべきである。陽性対照は、5% SDS 水溶液、陰性対照は蒸留水またはリン酸緩衝液を用いる。陰性対照を 100% 生存率として、各試験物質の生存率を算出する。



6. 試験法としての採択の可否について

6.1 代替法の特徴

6.1.1 試験法の有用性と問題点

再構築ヒト表皮モデルは、これまで OECD TG404 で検討していた刺激性の識別を行うことができるので、動物福祉の観点から妥当な代替法である。

対象となった3試験法及び日本動物実験代替法学会でバリデーションを行った Lab Cyte の概要を以下の表に示した。これらの試験法はいずれも、特別な培養技術を必要とせず取り扱いが簡便であること、短期間（前培養を含めて3日間）で評価できることから、広く利用可能な試験法と思われる。一方、市販品であることから、皮膚モデルの品質管理は市販メーカーにて実施されるものの、日本での入手に関しては、入手までの時間がかかること、高価格、購入後長期間保存できない等の問題もある。現時点では、公的なバリデーションと第三者機関の評価が済んでいないため本検討対象にならなかったが、表中に含めた Lab Cyte のように、国内で開発された試験法もあり、me-too 試験法として承認を待たれる。但し、いずれも市販品であるため、供給の安定性には気を配り、各試験法で定められた手順に従って実施する必要がある。

また、試験物質の制限として、着色性の高い物質の評価には適さないもので、注意を要する⁶⁾。

	EpiSkin™ (SM)	SkinEthic™ RHE	EpiDerm™ (EPI-200SIT)	Lab Cyte EPI-MODEL24
メーカー	Skin Ethic (ロレアルグループ)	Skin Ethic (ロレアルグループ)	Mat Tek Co.	J-TEC
種類	再生ヒト表皮モデル	再生ヒト表皮モデル	再生ヒト表皮モデル	再生ヒト表皮モデル
公的認知	ESAC認証 (2007)	ESAC認証 (2008/11/5)	ESAC認証 (2008/11/5)5n	代替法学会にて 評価中(09/5～)
日本での入手先	株式会社 ニコダームリサーチ	株式会社 ニコダームリサーチ	クラボウ	J-TEC
1プレート ^{a)} の価格*	¥105,000/plate 12 well	¥105,000/plate 12 well	¥126,000/plate 24 well	¥4,5000/plate 12 well ¥54,000/plate 24 well

*：価格は、各社のHPより引用

6.1.2 開発目的の相違

化学物質の皮膚刺激性を識別する基準として、欧州では EU CLP (Classification, Labeling and Packaging) に則った基準 (OECD 404 にて、カットオフ値 2.0 以上を刺激物質として R38 指定を行う) と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 UN GHS (The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals) があり、GHS 表示では、Category 2 (irritant)、Category 3 (mild irritant) 及び非表示の分類とされていた。当初の欧州における刺激性試験代替法開発の目的は、EU CLP による R38 指定の要否の判断であった。2007/4 に EpiSkin™ のみ ESAC により認証を受けたのは、この目的においてである。ESAC の Statement では、EpiSkin™ を用いた細胞生存率による評価では、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、GHS の 3 分類は満たすことができないことが報告されている¹¹⁾。

その後、欧州連合は UN GHS を受け入れ、CLP は No Category と Category 2 の 2 分類で行うことを決め、カットオフ値は 2.0 から 2.3 に変更された (UN GHS/CLP system)。これに伴い、EU CLP で刺激物質と評価されていた *in vivo* スコアが 2.0~2.3 の物質の評価が変更になったため、評価物質の構成のバランスを含め、3 種類の *in vitro* 試験法 (EpiSkin™, EpiDerm™, SIT, SkinEthic™ RHE) が再検討された。このような経緯を経て、3 試験法が皮膚刺激性試験代替法として、公的に認められることとなった¹²⁾。

前述のように、欧州での代替法開発は、化学物質の刺激性の識別 (hazard identification) のためにこれまで利用していた OECD TG404 (1981 年に採択。1992 年と 2002 年に修正されている³⁾) を代替することであり、TG404 は、ウサギを用いて 4 時間閉塞貼付により評価する試験法である。

一方、日本の医薬部外品の製造承認申請において求められているのは、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ことである。したがって、具体的には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としての目的があると考えられる。欧州における代替法開発の目的と大きく異なるのは、申請資料は新規化合物の Risk assessment を目的としていることであり、ガイドブック¹⁾にはこれを反映して、ウサギ等を用いた 24 時間閉塞貼付により評価する試験法が記載されている。

したがって、Draize 法をベースとする 2 試験方法は次頁の表に示すような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皮膚反応に大きく影響する可能性がある。

(その他の条件を含む試験方法の違いは、添付資料 1 を参照)

	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

6.1.3 暴露時間と皮膚反応性

OECD TG404 と部外品の承認申請に用いる皮膚一次刺激性試験法において、暴露時間の違いによる皮膚反応への影響を検討する目的で、文献調査を行った。動物およびヒトを用いて、暴露時間による皮膚反応性の違いが示されている論文とその概要を添付資料 2 に示した¹³⁻¹⁸⁾。このうち 2 報^{15, 17)}で、ウサギを用いて、4 時間と 24 時間閉塞貼付した場合の皮膚反応性の違いを検討しており、Cruzan G らの報告¹⁷⁾では、88 種類の石油関連化学物質をウサギに 4 時間及び 24 時間閉塞貼付した際の皮膚刺激性を検討した結果が示されている。4 時間の閉塞にて陰性と評価された物質でも、24 時間閉塞では陽性となる物質が多く認められ、偽陰性が多いことが確認された(添付資料 3)。したがって、*in vitro* 再構築ヒト皮膚表皮モデルを用いて Non-Irritant と予測された場合でも、皮膚一次刺激性試験の結果は、腐食性による組織傷害を伴う皮膚反応は避けられるものの、強い皮膚反応が認められる可能性は否定できないと考えられた。一方、*in vitro* 再構築ヒト皮膚表皮モデルを用いて Irritant と予測された場合は、24 時間閉塞貼でも同様に陽性となると考えられた。

6.2 代替法の利用に関する結論

以上の検討結果から、公的に認められた代替法の利用について、本分科会では以下のような結論を持った。

(1) 代替法利用の可能性

公的に認められた代替法は、ウサギを用いて 4 時間閉塞貼付した場合に、スコア 2.3 以上となるような刺激性の強い物質の識別は可能である。しかし、24 時間閉塞貼付した場合には、皮膚反応は 4 時間閉塞した場合と比較して増強する可能性があることから、予測性が不完全なので、無条件で利用することはできない。

(2) 代替法利用における課題

日本の医薬部外品の製造承認申請においては、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、の 3 つの目的があり、上記 (1) に示したように、代替法の利用により①についての情報は得られると考える。但し、Non-irritant に分類された場合でも、②、③に関する情報は不十分である。目的②についての情報を得るためにヒトパッチテストを行う場合、代替法による情報のみでは 24 時

間閉塞パッチテストが安全に実施できるかどうか判断できないため、倫理的な問題がないかどうか注意して行う必要がある。

あり方検討会 皮膚刺激性試験分科会では、上記の結論を以下の提言としてまとめた。

「医薬部外品の許認可申請資料の皮膚一次刺激性評価として、現時点(2009年9月)で推奨されている代替法単独では予測性が十分とはいえない。しかし、評価が可能な場合は、動物愛護の観点から代替法の利用を望ましいとする。

動物実験と代替法のどちらを利用するかについての判断は申請者に委ねることとする。ただし、代替法で非刺激性と評価された場合でも、ヒトパッチテストを実施する際には、倫理的に問題がないことが確認されている必要がある。」

7. 参考文献

- 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) EC-ECVAM(2008).Statement on the scientific validity of *in vitro* test for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee(ESAC29),5 November 2008.
- 3) OECD guideline for the testing of chemicals. 404, Acute Dermal Irritation /Corrosion, Adapted : 24th April 2002.
- 4) SCCP Memorandum on the *in vitro* test EPISKINTM for skin irritation testing, SCCP/1145/2007.
- 5) OECD guideline for the testing of chemicals. Draft proposal for new guideline: In vitro skin Irritation: Human Skin Model Test, Version 5.
- 6) OECD guideline for the testing of chemicals. Draft proposal for new guideline: *In vitro* skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method, Version 4, Paris 11 December 2009.
- 7) OECD guideline for the testing of chemicals. Draft proposal for new guideline: *In vitro* skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method, Version 7.6.
- 8) EpiSkin™ SOP, Version 1.8(February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method^{15mm-42hours} for the prediction of acute skin irritation of chemicals.
- 9) EpiDerm™ SOP, Version 7.0(Revised March 2009), Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ skin irritation test(EPI-200-SIT). For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm(EPI-200).
- 10) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0(February 2009), SkinEthic skin irritation test-^{42bis} test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application +42 hours post incubation.

- 11) 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
- 12) OECD, Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *in vitro* Skin Irritation Testing.
- 13) Gfeller W et al,(1985), Overview of animal test methods for skin irritation, Food Chem Toxicol, (2),165-8.
- 14) Gilman, M.R. *et al*, (1978), The influence of concentration, exposure duration and patch occlusivity upon rabbit primary dermal irritation indices, DRUG AND CHEMICAL TOXICOLOGY, 1(4),391-400.
- 15) ARAMAKI, J. *et al*, (2001), I irritation patch testing with sodium lauryl sulphate : interrelation between concentration and exposure time, British Journal of Dermatology,145, 704-708.
- 16) Cruzan, G. *et al*, (1986), A composite model for multiple assays of skin irritation, Toxicol Ind Health,,2(3), 309-20.
- 17) Michael, K. *et al*, (2002), Strategy for irritation testing, American Journal of Contact Dermatitis 13(1), 21-29.
- 18) 伊藤正敏、松永佳世子、関東裕美ら, (2007), 一次刺激性評価のためのパッチテスト評価時間の検討, 第38回 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 共同研究シンポジウム.

8. 刺激性分科会開催時期と検討経緯

第8回会議：2009/4/9

- 2009/2 あり方検討会のコメント紹介
- OECD ガイドライン化の状況
- 貼付時間による皮膚反応への影響に関する文献検討結果の報告

第9回会議：2009/5/7

- ロレアル調査報告
- 代替法をもとに、ヒトパッチテストを実施する場合の評価フローの検討

第10回会議：2009/7/2

- OECD ガイドライン化の状況
- ロレアル調査報告
COLIPA（欧州化粧品工業連合会）の皮膚刺激性評価の考え方を盛り込んだ文献の紹介。
- 代替法をもとに、ヒトパッチテストを実施する場合の評価フローの検討
- 分科会の結論の検討

第11回会議：2009/9/24

- 代替法をもとに、ヒトパッチテストを実施する場合の評価フローの検討
- 分科会の結論文の作成

添付資料 1

皮膚一次刺激性試験法の比較

	OECD TG404	部外品申請試験法*
試験動物	原則若齢白色ウサギ	原則, 若齢白色ウサギまたは若齢白色モルモット
動物数	Initial Test 1匹→Confirmation Test 2匹まで	原則, 1群3匹以上
皮膚		除毛正常皮膚, なお, 損傷皮膚での用途を訴求する場合, 損傷皮膚でも実施
投与面積および用量	0.5gまたは0.5mL/6cm ²	皮膚一次刺激性を適切に評価しうる面積および用量(閉塞; 0.5mL/6cm ²)
投与濃度	原則, 液状物質は希釈せず, 固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
投与後の処置		原則, 無処置とするが, 必要に応じて洗浄等の操作を行ってもよい
観察	原則, 投与後1, 24, 48および72時間に投与部位の肉眼的観察を行う(回復確認のため14dまで)	原則, 投与後24, 48および72時間に投与部位の肉眼的観察を行う
試験結果の評価	紅斑と浮腫により判定し, 判定値からIrritant(Category2)とMild Irritant(Category3)に評価(GHS)	皮膚一次刺激性を適切に評価し得る採点法により判定する

*: 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2008 より

添付資料4

『医薬部外品の承認申請における安全性資料のあり方検討会報告』(2009/12/10 開催)における、刺激性分科会の報告に対する質問及び回答

分科会では、予測性が十分でない代替法であることを示した上で、その利用も期待する旨の提言としてまとめた。しかしながら、代替法の結果をもって倫理的な配慮をしながらヒトによる検討を行うには具体的にどうしたらよいか?について、あり方検討会報告の後、実際に、以下のよう質問が寄せられたので、回答した内容を以下に示す。

質問原文:「皮膚刺激性試験代替法を用いた場合、何の情報があれば倫理的に問題ないと説明できるか、考えられるものや考えられる条件を教えてください。」

質問原文に対し、解釈を加え、以下のような質問として取り扱った。

「皮膚一次刺激性試験として、動物実験を行わずに皮膚刺激性試験代替法を実施し、Non-irritantと評価された場合、どんな情報があれば、ヒトパッチテスト(24時間閉塞)を実施できるか?」

回答:

- ①構造類似の化合物の皮膚一次刺激性試験(ウサギ若しくはモルモットを用い、24時間閉塞適用)もしくは、ヒトによるパッチテストにおいて、皮膚反応は弱いことが確認されている場合。
- ②皮膚感作性試験(モルモット等)の対照群において、皮膚反応(刺激性)は弱いことが確認されている場合。
- ③連続皮膚刺激性試験(ウサギ若しくはモルモット)において、皮膚反応は弱いことが確認されている場合。

また、24時間閉塞パッチテストを実施する場合、本試験を実施する前に、少人数で実施する等、被験者の安全面に配慮する。

なお、倫理的説明材料として十分と判断できるかどうかは、各ケースで異なるので、これらの手順を踏めば、必ず試験を安全に実施できるとは限らない。個別のケースにおける倫理性については、申請者の責任下でご判断いただく必要がある。

被験試料の皮膚への暴露時間による 反応性への影響に関する論文調査

論文名	著者	出典	概要
Overview of animal test methods for skin irritation	Gfeller, W. <i>et al</i>	Food Chem Toxicol, 1985, Feb. 23(2), 165-8	レビュー。古いガイドラインは適用時間が24時間。しかし、多くの場合現実的でないで、4時間に変更されつつある。4時間と24時間を比較すると、明らかな違いがあり、長時間適用の方が強い。
The influence of concentration, exposure duration and patch oclusivity upon rabbit primary dermal irritation indices	Gilman, M.R. <i>et al</i>	DRUG AND CHEMICAL TOXICOLOGY, 1978, 1(4), 391-400	4種類の洗浄料のウサギによる4及び24時間閉塞貼付試験結果の比較
Irritation patch testing with sodium lauryl sulphate: interrelation between concentration and exposure time	ARAMAKI, J. A. <i>et al</i>	British Journal of Dermatology, 2001, 145, 704-708	ヒトパッチテストによる濃度と暴露時間の影響に関する考察
A composite model for multiple assays of skin irritation	Cruzan, G. <i>et al</i>	Toxicol Ind Health, 1986, sep, 2(3), 309-20	88種類の石油関連化学物質のウサギによる4及び24時間閉塞貼付試験結果の比較
Strategy for irritation testing	Michael, K. <i>et al</i>	American Journal of Contact Dermatitis, 2002, 13(1), 21-29	暴露時間と、皮膚反応性の比較(1-4時間)
一次刺激性評価のためのパッチテスト評価時間の検討	伊藤正敏、松永佳世子、関東裕美ら	第38回 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 共同研究シンポジウム(発表資料)2007	4、24及び48時間暴露した場合のヒトパッチテストによる皮膚反応の比較。

暴露時間と皮膚反応

皮膚反応性は
24時間 >> 4時間の場合がある

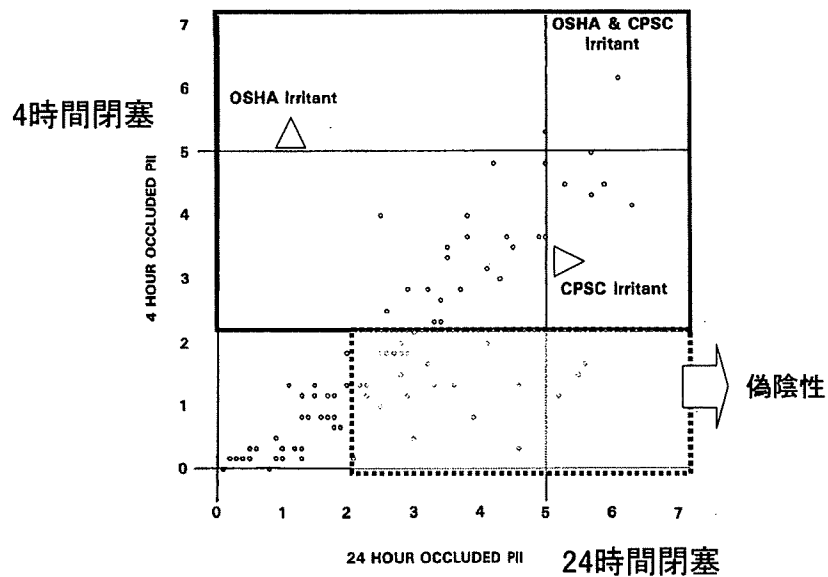


FIGURE 2. Comparison of primary skin irritation from 4 and 24 hours of exposure.

**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¹⁾、金澤由基子²⁾、小島肇¹⁾、坂口齊³⁾、中田土起丈⁴⁾、横関博雄⁵⁾

¹⁾国立医薬品食品衛生研究所、²⁾(財)食品薬品安全センター、³⁾花王(株)、⁴⁾昭和大学、⁵⁾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³H-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³H-thymidineを測定する。溶媒対照群に対して被験物質投与群の

^3H -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。

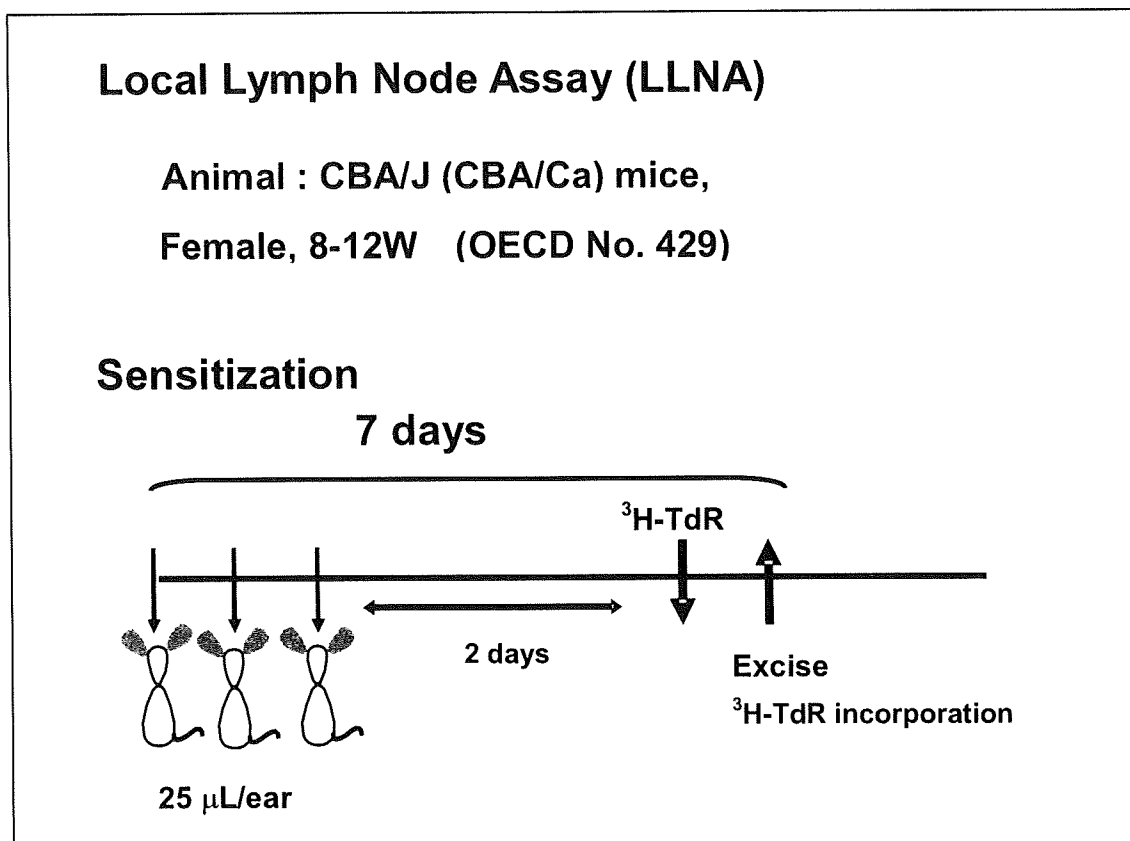


図1 LLNAの概略

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_2 , NiSO_4)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

のが不確実係数の設定である。欧米では専門家によってある程度標準的な不確実係数が示されているが(Apiら、2006)、不確定因子の数値化の根拠が曖昧であること、また、製品の形態・使用量・使用方法・生活習慣が異なる日本にそのまま用いることは難しいと考えられること、そして実際の審査側が対応可能か否かの問題もあることから、日本での運用に当たっては今後の課題とした。

尚、今回紹介したリスク評価は、感作誘導期に感作が成立するリスクを評価するもので、既に感作されたヒトの惹起反応のリスクを評価しているわけではなく、交差性などについては評価できない。

7. まとめ

OECD テストガイドライン No. 406 として認められて、長年広く使われてきたモルモットを用いた皮膚感作性試験である GPMT や Buehler 法に比べ、LLNA は動物に与える苦痛の低減や評価に用いる動物数の低減という点で意義ある代替法と考えられ、OECD テストガイドライン No. 429 として認められた方法である。そのため、近年欧米においては皮膚感作性試験法として、モルモットを用いた試験法よりも LLNA の方が主流になっている。一方、LLNA は生体に ^3H -thymidine を注射する試験である事から、試験終了後のその動物の処分に対する法的規制が厳しいため、日本国内では評価にほとんど用いられていないのが現状である。

ただし、従来モルモットの評価法が、惹起時の炎症反応を肉眼判定するという主観に基づく試験で、定量性という点でも充分な試験法とは言えなかったのに対し、LLNA は、耳介リンパ節細胞の増殖性を ^3H -thymidine 取り込み量として機器による測定値として得られるため、客観的で定量性のある試験と考えられている。このような点から、今後医薬部外品の皮膚感作性評価法として用いられてくる事が推測される。

今回、LLNA に関してこれまで報告された多くの論文での評価結果や報告書、さらに OECD テストガイドラインを精査した。そして、染毛剤などの医薬部外品、香料や防腐剤を含む原料を評価した論文等の報告から、LLNA が医薬部外品の皮膚感作性の有無の判定に GPMT と同程度の評価ができるであろうと判断した。ただし、LLNA においては、マウスの系統により反応性が異なる事が報告されている事からも、OECD テストガイドラインにも書かれている CBA マウスで評価する事が重要である。また、用いる溶媒により評価化合物の溶解性は異なり、そのため適切な溶媒を用いないと、感作性の有無だけでなくその強さのランク分類にも影響することが確認された。さらにいくつかの活性剤では偽陽性の結果や金属塩での偽陰性の結果も報告されている事が確認された。

今後は LLNA で適切な評価結果を得るためにも、マウスの系統及び評価に用いる溶媒の

選択と共に、LLNA で評価ができないまたは評価しづらい物質と分類される活性剤並びに金属塩の評価には十分に注意を払う必要があると思われた。

なお、近年 LLNA を用いたリスクアセスメントの手法も提案されているが、製品毎にどの程度の不確定因子を設定するかという点がまだ十分に検討がなされておらず、現在報告されている不確定係数の妥当性も含めて、LLNA を用いたリスクアセスメントの実用化にはまだ課題があると考えられる。

最後に、LLNA はマウスを用いる試験法であることから、動物実験の完全な置き換えとなる代替法ではない。そのため、世界的な動物愛護の関心の高まりや、欧州での動物実験の禁止を含む法律の施行などから、動物を用いない皮膚感作性の開発は今後の喫緊の課題である。

8. 参考文献

- 1) Api AM, Basketter DA, Cadby PA, Cano MF, Ellis G. Dermal Sensitization Quantitative Risk Assessment (QRA) For Fragrance Ingredients. rifm.org
- 2) Ashby J, Basketter DA, Paton D, Kimber I. Structure activity relationships in skin sensitization using the murine local lymph node assay. *Toxicology*. 1995, 103, 177-194.
- 3) Basketter DA, Roberts DW, Cronin M, Scholes EW. The value of the local lymph node assay in quantitative structure-activity investigations. *Contact Dermatitis*. 1992, 27, 137-142.
- 4) Basketter DA, Scholes EW. Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Food Chem Toxicol*. 1992, 30, 65-69.
- 5) Basketter DA, Selbie E, Scholes EW, Lees D, Kimber I, Botham PA. Results with OECD recommended positive control sensitizers in the maximization, Buehler and local lymph node assays. *Food Chem Toxicol*. 1993, 31, 63-67.
- 6) Basketter DA, Kimber I. Olive oil: suitability for use as a vehicle in the local lymph node assay. *Contact Dermatitis*. 1996, 35, 190-191.
- 7) Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I, Loveless SE. The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food Chem Toxicol*. 1996, 34, 985-997.
- 8) Basketter DA, Dearman RJ, Hilton J, Kimber I. Dinitrohalobenzenes: evaluation of relative skin sensitization potential using the local lymph node assay. *Contact*

- Dermatitis. 1997, 36, 97-100.
- 9) Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I. Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization. *Food Chem Toxicol.* 1998, 36, 327-333.
 - 10) Basketter DA, Lea LJ, Dickens A, Briggs D, Pate I, Dearman RJ, Kimber I. A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *J Appl Toxicol.* 1999, 19, 261-266.
 - 11) Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I. Skin sensitisation, vehicle effects and the local lymph node assay. *Food Chem Toxicol.* 2001, 39, 621-627.
 - 12) Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I. Measurement of allergenic potency using the local lymph node assay. *Trends Pharmacol Sci.* 2001, 22, 264-265.
 - 13) Basketter DA, Evans P, Gerberick GF, Kimber IA. Factors affecting thresholds in allergic contact dermatitis: safety and regulatory considerations. *Contact Dermatitis.* 2002, 47, 1-6.
 - 14) Basketter DA, Angelini G, Ingber A, Kern PS, Menné T. Nickel, chromium and cobalt in consumer products: revisiting safe levels in the new millennium. *Contact Dermatitis.* 2003, 49, 1-7.
 - 15) Basketter DA, Andersen KE, Liden C, Van Loveren H, Boman A, Kimber I, Alanko K, Berggren E. Evaluation of the skin sensitizing potency of chemicals by using the existing methods and considerations of relevance for elicitation. *Contact Dermatitis.* 2005, 52, 39-43.
 - 16) Basketter DA, Clapp C, Jefferies D, Safford B, Ryan CA, Gerberick F, Dearman RJ, Kimber I. Predictive identification of human skin sensitization thresholds. *Contact Dermatitis.* 2005, 53, 260-267.
 - 17) Basketter DA, Gerberick F, Kimber I. The local lymph node assay and the assessment of relative potency: status of validation. *Contact Dermatitis.* 2007, 57, 70-75.
 - 18) Basketter DA, Kan-King-Yu D, Dierks P, Jowsey IR. Does irritation potency contribute to the skin sensitization potency of contact allergens? *Cutaneous and Ocular Toxicology* 2007, 26, 279-286,
 - 19) Basketter DA, Clapp CJ, Safford BJ, Jowsey IR, McNamee P, Ryan CA, Gerberick GF. Preservatives and skin sensitization quantitative risk assessment. *Dermatitis.* 2008, 19, 20-27.
 - 20) Botham PA, Basketter DA, Maurer T, Mueller D, Potokar M, Bontinck WJ. Skin