

たる成分である。あえて、申請資料を提出させ続けることに意味があるかは疑問である。製剤の安全性を担保するために必要ないとは言わないが、化粧品の配合成分は染毛剤やパーマネント・ウェーブ剤を除いて、各成分がその効能効果や毒性を顕著に増強させないことを前提に処方されており、添加剤以外の成分を変更する毎に申請しなければいけない現状には疑問を感じ得ない。業界が進めている医薬部外品の全成分表示が普及した暁には不要ではないかと考えている。

表 2 医薬部外品新添加剤の安全性資料

試験項目	添加物	製品
1 単回投与毒性	○	△注 1)
2 皮膚一次刺激性	○	
3 連続皮膚刺激性	○	
4 皮膚感作性	○	
5 光毒性	○注 2)	
6 光感作性	○注 3)	
7 眼刺激性	○	△注 4)
8 遺伝毒性	○	
9 ヒトパッチ	○	○

*毒性についてより慎重に扱う必要があるものについては反復投与毒性試験等の資料が必要である。

注 1) 経口投与における概略の致死量が 2g/kg 以下の場合には、製剤についても実施すること。ただし、配合量等から考慮して安全と推定される場合には省略できる。

注 2), 注 3) 紫外部吸収スペクトル(290-400nm)の範囲で吸収極大が認められない場合には省略できるが、280-450nmの範囲で吸収極大の有無を確認すること。

注 4) 角膜、虹彩の刺激反応が認められた場合または粘膜に使用されることがある製剤で、眼に入る可能性のあるものについては、製剤でも試験を実施すること。なお、最大配合濃度ではこれらの反応が認められないことを確認すれば、製剤についての試験は省略してよい。

第2項 化粧品

薬事法には、「化粧品とは、人の身体を清潔にし、美化し、魅力を増し、容貌を変え、又は皮膚若しくは毛髪をすこやかに保つために、身体に塗擦、散布その他これらに類似する方法で使用されることが目的とされている物で、人体に対する作用が緩和なものをいう⁶⁾」と記されている。

前述したように、ポジティブリストとして掲載される防腐剤、紫外線吸収剤およびタール系色素の配合制限、ネガティブリストに掲載されるポジティブリスト以外の配合禁止又は制限成分が示され、これらに違反しなければ企業は自主責任において成分を自由に選択できるようになった。新規成分の許認可申請をする必要はないが、新たな成分をポジティブリストに掲載するためには、医薬部外品以上の定められた安全性試験を実施し、改正を厚生労働省に要請しなければならない。

その場合には、表3に示すような単回投与毒性、皮膚一次刺激性、連続皮膚刺激性、感作性、光毒性、光感作性、眼刺激性、遺伝毒性、パッチテストに加え、反復投与毒性、生殖発生毒性、吸収・分布・代謝・排泄に関する資料が求められる。これらは「毒性試験法ガイドライン」、各種の毒性試験ガイドラインおよび「化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2006」安全性試験の例に定められた試験方法に準拠して実施しなければならない⁷⁻¹⁰⁾。さらに、単回投与毒性、眼刺激性、ヒトパッチについては、原則として当該成分のほかに試験製剤についても試験が求められている。

表3 ポジティブリスト掲載要領

No.	資料の範囲
1	単回投与毒性に関する資料 ^{注1)}
2	反復投与毒性に関する資料
3	生殖発生毒性に関する資料
4	皮膚一次刺激性に関する資料
5	連続皮膚刺激性に関する資料
6	感作性に関する資料
7	光毒性に関する資料 ^{注2)}
8	光感作性に関する資料 ^{注3)}
9	眼刺激性に関する資料 ^{注4)}
10	遺伝毒性に関する資料
11	ヒトパッチに関する資料
12	吸収・分布・代謝・排泄に関する資料

注1)当該成分の経口LD50値が2g/kg以下の場合には、製剤についても実施すること。ただし、配合量等から考慮して安全と推定される場合には省略できる。

注2)、注3)吸光度測定によって紫外部に吸収がない場合には省略できる。

注4)角膜、虹彩の刺激反応が認められた場合または粘膜に使用されることがある商品に配合する場合には、試験製剤についても実施すること。

しかし、その他配合成分の安全性評価は企業姿勢の問題であり公にはされない。新規成分を頻繁に開発している企業もあれば、長い使用経験のある成分のみで処方構築する場合もあるので安全性担保の必要性も明確ではない。ある会社は膨大な試験法を実施しているかもしれないし、一方の会社は何も試験をしていないかもしれない。最終的には、消費者にトラブルが多発し、消費者や保健所、皮膚科医、消費者保護団体からのクレームを受け、回収(行政命令だけでなく、自主も含む)、行政への届出、または皮膚トラブル例が報道されない限りは、全成分表示のみとそれに伴う情報開示請求のみが安全性評価の手掛かりである。2001年の規制緩和により黒皮症事件¹⁴⁾の再来を危惧する皮膚科医もおられた。しかし、化粧品にとって大きな範疇を占める接触皮膚刺激性および感作性等を中心に試験法が整備されてきたこともあり、2001年以降皮膚トラブルの増加は見られていない¹⁵⁻¹⁷⁾。なお、化粧品の安全性を担保する試験法として、日本化粧品工業連合会 安全性部会が「化粧品の安全性評価に関する指針 2008」をまとめている¹⁸⁾。主な試験法は表 2 に示す医薬部外品添加剤で要求される試験法に準じている。

第3項 雑品

雑品とは、薬事上の承認を受けていない製品である。化粧品の範疇にも入らず、医薬品や医薬部外品の効能もうたっていない場合には雑品扱いとなる。施設の届出も必要なく、それぞれの協会が作成する自主基準に必ずしも従う必要はない。たとえば、足用スプレーに関して「足のむくみがとれる」と表現すれば医薬品扱いであるが、「足がスッキリする」という表現すると雑品扱いである。クリームでも本来はスキンケア用に作られたとしても、何も表示がなければ雑品扱いとなる¹⁹⁾。

ただし、カラーコンタクトのトラブル²⁰⁾など、消費者の誤った使用法や製造会社の知識不足などからトラブルを起こしやすい商品でもある。今後、消費者庁などの厳しい監視や規制が必要な分野かもしれない。

参考文献

- 1) 薬事的な観点から見た消毒薬の選択方法、Y's Letter、2(36)、1-3(2008)
- 2) 厚生省医薬安全局長：化粧品規制緩和に係わる薬事法施行規則の一部改正等について(2000年医薬発第990号)
- 3) 厚生労働省：薬事法および採血および供血あっせん業取締法の一部を改正する法律について(2002年厚生労働省発医薬第0731011号)
- 4) 医薬品、医薬部外品、化粧品および医療機器の品質管理の基準に関する省令(2004年厚生労働省令第136号)
- 5) 医薬品、医薬部外品、化粧品および医療機器の製造販売後安全管理の基準に関する省令(2004年厚生労働省令第135号)
- 6) 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2006、薬事日報社、東京(2006)
- 7) 厚生労働省医薬食品局審査管理課：医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請に添付する資料に関する質疑応答集(Q&A)について(2006)
- 8) 医薬品毒性試験法ガイドライン(1989年薬審1第24号)
- 9) 非臨床薬物動態試験ガイドライン(1998年医薬審第496号)
- 10) 反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正(1999年医薬審655号)
- 11) 遺伝毒性試験ガイドライン(1999年医薬審第1604号)
- 12) 医薬品の生殖発生毒性試験についてのガイドラインの改正について(2000年医薬審第1834号)
- 13) ポジティブリストの収載要領について(2001年医薬審発第325号)

- 14) 小塚雄民：女子顔面黒皮症－その研究の軌跡、日本化粧品技術者協会、15,5-(1981)
- 15) 伊藤正俊：医薬ジャーナル、36(12)、3271-(2000)
- 16) 東京都生活文化局消費生活部：化粧品類の安全性当に関する調査(2007)
- 17) 松永佳世子：パッチテストによる皮膚一次刺激性評価 共同研究委員会、第38回皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 総会学術大会共同研究シンポジウム(2008)
- 18) 日本化粧品工業連合会：化粧品の安全性評価に関する指針 2008、薬事日報社、東京(2008)
- 19) 医薬品・健康食品・化粧品・医療用具・健康器具編 Q&A：http://www.yakujihou.com/2006/05/post_61.html(2009)
- 20) 厚生労働省：www.whlw.go.jp/wp/siesaku/ia/20/dl/09/pdf(2009)

込むことは難しいが、総合的な免疫機能としての変化が検出できる。アレルギー試験としては、皮膚感作性試験としてモルモットマキシミゼーション試験 (Guinea Pig maximization test : GPMT)、マウスでの局所リンパ節アッセイ (local lymph node assay, LLNA) のバリデーションが行われ、ヒトでの皮膚感作性と相関があることが示されている⁴⁾。異常免疫亢進や自己免疫の試験は確立されたものがないが、マウスまたはラットでの膝窩リンパ節アッセイ (popliteal lymph node assay : PLNA) で検出できる場合があることが示されている⁵⁾。呼吸器のアナフィラキシー反応の検出にはモルモットを用いた活動性全身アナフィラキシー (active systemic anaphylaxis, ASA) が検討されていたが、ヒトでの薬物アレルギーのデータと相関を取った報告がなく、試験系として確立していない。

e. バイオ医薬品の免疫毒性評価 バイオ医薬品の中でもサイトカインや抗体医薬品では免疫系に作用することが多く、免疫毒性の評価が必要になることが多い。また、作用の種特異性が高い場合があり、用いる動物種を考慮する必要がある。一般的にはサルで毒性評価が行われることが多いが、ヒト細胞を用いた培養系も用いられる。シグナリング抗体、ADCC抗体の医薬品によるサイトカイン産生、放出による毒性の評価はサルを含めて実験動物では評価することが難しく、ヒト細胞を用いた培養系で評価することが検討されている。

バイオ医薬品はバイオ医薬品自体に対する免疫が誘導されるかどうかの免疫原性も問題となるが、ヒトタンパク質の場合は実験動物では免疫が誘導され、ヒトでの免疫原性を実験動物で評価することは難しい。そこでヒト細胞 (末梢血単核球など) を用いた培養系で免疫原性を評価する系が検討されている。この系では、抗原提示細胞である樹状細胞などの活性化を指標としたり、T細胞への抗原提示後のT細胞の活性化を指標としている。 [井上智彰]

文 献

- 1) Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006) : Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- 2) Weaver, J. L., Tsutsui, N., Hisada, S., Vidal, J.-M., Spanhaak, S., Sawada, J., Hasting, K. L., van der Laan, J. W., van Loveren, H., Kawabata, T. T., Sims, J., Durham,

S. K., Fueki, O., Matula, T. I., Kusunoki, H., Ulrich, P., Nakamura, K. (2005) : Meeting report, Development of the ICH guidelines for immunotoxicology evaluation of pharmaceuticals using a survey of industry practices. *J. Immunotoxicology*, 2, 171-180.

- 3) Descotes, J. (2005) : Immunotoxicology. Role in the safety assessment of drugs. *Drug Safety*, 28, 127-136.
- 4) Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H. and Stokes, W. S. (2001) : ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. III. Data analyses completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274-286.
- 5) Guillaume, R. and Descotes, J. (2005) : Popliteal lymph node assay : Factors and perspectives. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 451-458.

6.9 皮膚・粘膜毒性

哺乳動物の表面を構成し、日常的に外部からの物理的・化学的障害および生物外敵にさらされる皮膚や粘膜 (眼粘膜, 口腔粘膜, 陰粘膜など) は、生体機能を保持する防御器官として重要な役割を果たしている。

皮膚・粘膜への化学物質の影響を考えるうえで、皮膚毒性・粘膜毒性物質の把握や評価法の理解は重要である。本稿ではまず、皮膚の構造と機能、皮膚透過性・経皮吸収について概説した後、皮膚毒性の種類、代表的な毒性物質、その評価法について触れ、引き続いて粘膜毒性についても同様に代表的な毒性物質、その評価法について触れることとした。

6.9.1 皮膚毒性

a. 皮膚の構造と機能¹⁻³⁾ 皮膚は主に3つの組織に大別される (図6.9.1)。表皮, 真皮, 皮下組織である。表皮は0.06~0.2mmの厚さで体内組織を守っており、最下層から最表層に向かって基底層, 有棘層, 顆粒層, 角質層と呼ばれる。真皮の厚さは表皮の9倍あり、基底膜によって分離されている。主にコラーゲンなどの細胞外マトリックスからなる真皮と皮下組織は脂肪細胞で隔てられており、皮下組織にはこの細胞の産生する脂肪組織が豊富にあり、血管, リンパ管および神経線維が分布している。

これらの組織が、外界からの物理化学的な刺激への保護機構として作用し、体温や水分の調節, 免疫応答, ホルモン, 代謝などの生体の恒常性維持に寄

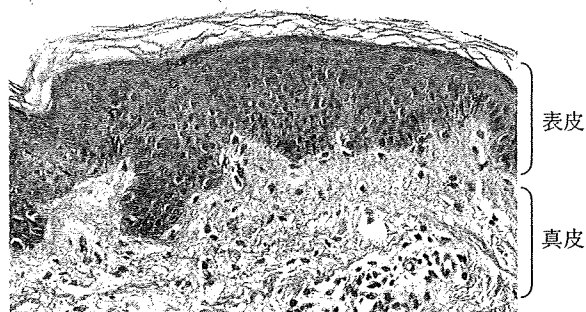


図6.9.1 皮膚の病理像

与している。ただし、内因性の障害あるいは別箇所での広範囲の外因性の障害により症状が現れることもある。

b. 皮膚透過性・経皮吸収^{4~11)} 経皮吸収試験は本来、皮膚透過後に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、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方法である。経皮吸収 (percutaneous absorption) という言葉が皮膚透過性 (skin permeation) と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、次に全身循環系に吸収された量を測定する経皮吸収、それぞれの方法の実施上の留意点についてまとめてみた。

1) 皮膚透過性試験 皮膚透過性を評価するにあたり、重要な項目を表6.9.1に列記した。これら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¹²⁾の中の、皮膚薬物動態学的試験、残存量試験にも記載されている。

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ので、どの部位を実験に用いるかで結果が異なる。一般的に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。毛孔や汗腺は高分子やイオン性物質の透過性が高いが、毛孔や汗腺は皮膚全体の0.1%を占めるにすぎない。皮膚付属器官を介する低分子の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、分子量が小さい薬剤は皮膚への拡散性が大きく、ほとんどの薬剤は受動拡散される。このように、ほとんどの物質の透過経路は角質上層部にあり、部位およびその厚さに影響を

表6.9.1 皮膚透過性・経皮吸収の評価に必要な情報

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
チャンバー	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 皮膚中の量 洗浄液中の量

受ける。

②種差、性差、匹数：ラットが一般的で、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皮膚透過性はヒトのそれに似ており、ラットやウサギは透過しやすい。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匹以上が必要と考えられる。

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、薬剤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。チャンバーの適用状態も吸収に大きな影響を及ぼす。損傷皮膚で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の皮膚に薬剤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。閉塞貼布が開放塗布よりも吸収が高い。

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の状態で結果が異なってくる。さらに、損傷部位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。

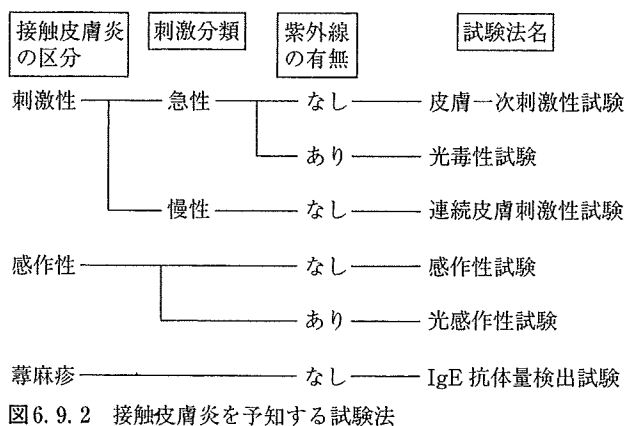


図6.9.2 接触皮膚炎を予知する試験法

④物性：「①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。ニトログリセリンなどは脂溶性で、分子量が小さく、経皮吸収がきわめて高い。このような薬剤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。溶解度限界近辺の薬剤を適用すれば、皮膚透過性は最大となる。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するので、可溶化剤による皮膚透過性の増加はみられない。

⑤試験環境：有機物は化学物質の透過性や吸収を増大させる。したがって、pHは大きな変動因子である。局所温度が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。エステティックサロン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。

公的な *in vitro* ガイドラインとして、OECD^{13, 14)}、COLIPA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association; 欧州化粧品香料協会)¹⁵⁾、SCCP (Scientific Committee on Consumer Products; 消費者製品科学委員会)¹⁶⁾、EU¹⁷⁾、EPA (U.S. Environmental Protection Agency; 米国環境保護庁)^{18, 19)}、ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods; 欧州代替法評価センター)²⁰⁾、WHO²¹⁾ からガイドラインやガイドダンス、提案がなされている。SCCP基準は、OECDガイドライン428¹³⁾を受け、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。

2) 経皮吸収試験 経皮吸収試験の影響因子を表6.9.1に示すとともに、試験法の注意点をまとめてみた。

①皮膚、血、尿、糞中の被験物質濃度測定：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。

これを明らかにするため、OECDガイドライン427¹⁴⁾では、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、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、放射活性比が $100 \pm 10\%$ となるようにしなければならない。経時的に採血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¹¹⁾の中の、残存量試験、薬物動態学的試験にも記載されている。

②その他：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薬剤の吸収・分布を経時的に病理標本を作製して確認する全身オートグラフィ法、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マイクロダイアリシス法(macro dialysis)、ディスク状の寒天ゲルを麻酔下あるいは覚醒下のラット腹部の真皮と皮下組織の間に埋め込み、移行量を測定する方法がある。

c. 皮膚毒性の種類、物質、検出法²²⁻³²⁾ 化学物質の皮膚毒性は経皮毒性と局所毒性に分類される。前者は皮膚に暴露された化学物質が吸収されたために示す全身毒性である。一方、後者は化学物質が暴露された皮膚の局所傷害である。

局所毒性の分類方法を図6.9.2にまとめた^{33, 34)}。接触皮膚炎と総称される。このほかに、化学物質によって引き起こされる蕁麻疹、瘡瘍、色素沈着異常などが皮膚毒性といわれる。これらを評価する試験法は多岐にわたるが、以降には汎用されている方法のみを示す。

表6.9.2 代表的な皮膚腐食性物質

物質名
アンモニア, 一酸化カルシウム, クロリン, エチレンオキシド, 塩化水素, フッ化水素, 過酸化水素, 臭化メチル, 酸化窒素, リン, フェノール, 水酸化ナトリウム, ジイソシアン酸トルエン

表6.9.3 主な光毒性物質

分類	物質名
フロクマリン系 多環芳香族炭化水素 薬剤	8-メトキシソラレン, 5-メトキシソラレン, トリメトキシソラレン アントラセン, フルオロアントラセン, アクリジン, フェナントレン ジメチルクロルテトラサイクリン, スルファニルアミド, ナリジクス酸, フェノチアジン, クロロチアジド, クロルプロマジン, ペノキサプロフェン, アミルジメチルアミノベンゼン酸, ポリフィリン誘導体
染料	エオジン, アクリジンオレンジ

1) 腐食性³⁵⁾ 化学物質の直接的な作用により、皮膚は不可逆的な傷害を受ける。これが腐食性と呼ばれる。代表的な腐食性物質は、表6.9.2に示す強酸、強アルカリ性物質などである。これらを評価する試験法として、OECDに定められていた動物試験が廃止され、*in vitro*の3試験法がガイドライン化されている^{36~38)}。腐食性ではないが、強い皮膚刺激性（可逆的な皮膚反応）の予測も代替法により可能である。

2) 皮膚一次刺激性^{39~45)} 従来から、ウサギやモルモットなどの動物を用いる皮膚一次刺激性試験が汎用されてきた。OECDガイドラインにも掲載され⁴⁶⁾、簡便で、感度がヒトよりも高いとされている。動物愛護運動の盛り上がりを受け、この方法をなくすため、ECVAMを中心に培養皮膚モデルを用いた試験法のバリデーション研究が実施され、EUでの認証を経てOECDガイドライン案の検討が進んでいる⁴⁷⁾。日本でも培養皮膚を用いたバリデーション研究や専門家による第三者評価が実施されている。さらなる皮膚刺激性の確認のためにはヒトパッチを導入すべきである。ただし、ヒトの皮膚刺激性そのものがばらつきの大きいものであることを認識して、トラブルを起こさないような対処に心掛けるべきである。また、とくに中~弱程度の刺激性は判定者により大きな差が生じるため、判定者の教育が重要である^{48~51)}。

3) 慢性皮膚刺激性^{42, 43, 52)} 動物の皮膚は皮脂がヒトとケタ違いに多く、水溶性物質は皮膚になじみにくい。一方、油性物質を使用すると累積刺激性を起こしやすい。とくに、基剤として汎用する白

色ワセリンでも連続皮膚刺激性を起こしやすい。つまり、偽陽性の出やすい試験法である。臨床的には、ヒト繰り返し塗布試験または使用試験が妥当であろう。これらの方法により、規模によっては少人数の方でしかみられない、弱い刺激性やTEWL（水分蒸散量）の低下や、健常人でも季節や体調の変わり目で起こすスティンギング（ひりひり、ぴりぴり感）のような肌荒れを評価できる^{53, 54)}。

4) 光毒性^{55~59)} 主な光毒性物質を表6.9.3に示す。従来から、ウサギやモルモットなどの動物を用いる光毒性試験が汎用されてきた。簡便で、感度がヒトよりも高いとされている。動物愛護運動の盛り上がりを受け、この方法をなくすため、OECDガイドラインに示されるBalb 3T3細胞を用いた試験法が汎用されている⁶⁰⁾。紫外線照射にソーラーシミュレーターを用いるなど、従来の試験法の短所も改善されている。本試験法を用いれば、光毒性の有害性の同定は可能であるが、一方で偽陽性が多く出る欠点も抱えている。

5) 感作性^{61~68)} 接触アレルギー性皮膚炎を引き起こす物質を表6.9.4に示す。医薬品、香料、防腐剤など多数の物質が報告されており、さらに類似構造による交差反応まで考慮しなければいけない。ただし、臨床で報告されている発現頻度の高い物質が必ずしも感作性が高い物質とは限らない。接触アレルギー性皮膚炎は原因物質の感作性強度だけでは説明がつかず、暴露頻度、暴露条件などに左右されやすい。したがって、試験法を選択する場合には、リスク評価が重要な要件となる。

代表的な試験法としては、モルモットを用いる試

表6.9.4 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

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，チロメサール
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，2-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，グルコン酸クロルヘキシジン，p-オキシ安息香酸エステル（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

表6.9.5 光感作性物質

分類	物質名
抗菌剤，抗真菌剤	スルファニルアミド，フェンチクロル
殺菌剤	TCSA（3,3',4',5'-テトラクロロサリチルアニリド），3,5,4'-トリプロモサリチルアニリド
香料	6-メチルクマリン，ムスクアンブレット
紫外線吸収剤	オキシベンゾン，t-ブチル-4-メトキシジベンゾイルメタン，p-メトキシケイ皮酸2-エチルヘキシル
薬剤	ケトプロフェン，スプロフェン，ピロキシカム，フェノチアジン，クロルプロマジン，プロメタジン，ジフェニヒドラミン，クロロチアジド，フロセミド，クロルプロパミド，トルブタミド

験方法⁶⁹⁾，とくにフロイトの完全アジュバントを用いる Maximization 法，アジュバントと被験物質の混合物を皮内投与できるように調整できない場合に用いるアジュバントパッチ法，およびアジュバントを用いない方法として Buehler 法が汎用されてきた。しかし，昨今の動物愛護運動の流れを受け，OECD ガイドラインに示されるマウスを用いた局所リンパ節アッセイ（local lymph node assay, LLNA）の利用が増えている⁷⁰⁾。従来のモルモットを用いた試験法やヒトの試験法との相関性が高いとされている。この試験法を用いれば，感作性の有害性の同定は可能である。ただし，ラジオアイソトープ（RI）を用いなければならず，どこの施設でも可能な試験法ではない。そこで，RIを用いない代替法として，ATP測定を指標とした LLNA-DA や放射線標識したチミジンの代わりに 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) の取り込みを指標とした LLNA-BrdU が日本において開発されている。

これら方法が確立されたとしても，マウスを用いることには代わりがない。そこで，さらなる *in vitro* 試験として，感作性物質とペプチド中のアミノ酸の結合による構造変化を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で調べるペプチド結合試験やヒト

リンパ球由来細胞株が発現する表面抗原の変化を指標とした試験法の研究・開発が進んでいる。

ただし，これら試験法は LLNA でも述べたように，有害性の同定には有用であるが，リスク評価には適さないので，モルモットを用いる方法などの試験法との併用が重要となろう。

6) 光感作性^{71,72)} 表6.9.5に主な光感作性物質を示している。臨床的に光毒性と光感作性物質が重複している場合が多く，明確な線引きができていない。

この評価には，モルモットを用いた試験法が汎用されてきた。ただし，OECD や EU で定められた公的な試験法はなく，代替法としてバリデーショ，評価が進行中の試験法はない。

7) 蕁麻疹⁷³⁾ 肥満細胞からのヒスタミンおよび血管性ペプチドの放出による急速な血管透過性の増加により，痒みを伴い，一過性の膨疹や紅斑などの症状が起こる I 型即時性過敏反応である。化学物質に暴露された皮膚局所で，暴露後数分から1時間以内に起こる。鼻炎，結膜炎，喘息，まれにアナフィラキシーショックを引き起こす場合があり，注意が必要である。IgE とアレルゲンの結合を介しての免疫反応では，表6.9.4にも示す物質のほか，天然ゴム製品に残存するラテックスタンパクに参与した

アレルギーが一般的である。免疫が関与しないヒスタミンの放出促進薬剤には、クラーレ、アスピリン、アゾ染料、安息香塩および昆虫、植物や動物性トキシンなどがある。医療機関を訪れた蕁麻疹患者の中で、この症例が占める割合は1.1%という報告がある。

本アレルギーの評価方法としては、IgE抗体量検出試験が一般的である。

8) 痤瘡⁷⁴⁾ 痤瘡 (acne) の中でもっとも代表的な疾患である尋常性痤瘡は脂腺性毛包をおかす慢性炎症性疾患で、一般に痤瘡といえば“尋常性痤瘡”，すなわち“ニキビ”のことを指す。痤瘡は毛包の角化細胞の過剰増殖を特徴とする病変であり、毛包内にケラチン栓の形成あるいは皮脂の貯留が起こり、毛包腔の拡張が起こる。痤瘡には多くの疾患が含まれており、その原因もきわめて多岐にわたっている。もっとも一般的な病変は顔、背中、および胸に生じる。痤瘡を引き起こす化学物質は、面皰(めんぼう)形成性コメドと呼ばれる。コールタールや切削油、リノレン酸などの化粧品原料が著名である。このほかにもっともひどい形態を示す疾患が、ハロゲン化芳香族炭化水素によって引き起こされる塩素痤瘡である。ポリ塩化ビフェニル、ヘキサクロロベンゼン、ダイオキシンで引き起こされる。比較的稀な疾病であるが、職業病および環境に起因する疾患として重要である。

試験法としては、ウサギの外耳道に化学物質を最低2週間塗布し、毛包中の過角化の程度を肉眼(マイクロスコープなど)、組織学的に評価する方法が一般的である。動物愛護運動の高まりの中、この方法を代替するためにはヒトボランティアの協力を得て、背中の毛包が使われることもあるが、他の皮膚毒性がないことを確認したうえで実施すべきである。

9) 色素沈着異常⁷⁵⁾ 色素過剰沈着および色素沈着減少が含まれる。色素過剰沈着は、接触皮膚炎や光毒性によって認められることが多い。直接的または間接的に下垂体ホルモンを介してメラノサイトを活性化させる化学物質(エストロゲン、ヒダントイン、コルチコトロピン)、またはメラニン非依存性に皮膚成分と結合して色素沈着を引き起こす化学物質であるクロロキン、クロルプロマジン、フェノチアジン、テトラサイクリン、ブスルファン、ビスマス、水銀、ソラレン類、タール色素、防腐剤、香

料もある。

メラノサイトに選択的な毒性を示し、メラニンの主要な生成過程を阻害することで白皮を引き起こすヒドロキノン、フェノール類、カテコール類、ブチルヒドロキシトルエン、メルカプトアミンなども知られている。

10) 腫瘍 皮膚発がんを引き起こす物質としては、放射線、紫外線、ヒ素、タールおよびその関連物質、ベンゾピレンなどの多環式芳香族炭化水素、ベンゾアクリジンなどの複素環式化合物、発がんプロモーターであるオカダ酸やクロトン油のホルボールエステルが知られている。

評価法として、皮膚への連続塗布による発がん性試験または中期発がん性試験などが有用である。

6.9.2 粘膜毒性

粘膜といっても、口腔、眼、泌尿生殖器、直腸などそれぞれ組織、透過性、分泌物などに大きな相違がある。粘膜に皮膚科外用剤や眼薬、口腔内洗浄剤、生理用品、下剤などを用いる場合には、刺激性の評価は必須である。しかし、眼刺激性以外、定められた方法はない。

a. 眼毒性

1) 眼構造と機能^{76~78)} 化学物質に暴露される眼球前部の構造は、主に角膜、虹彩、結膜から成っている。角膜は上皮および内皮の間に間質を有しているが、間質には血管がなく、水和膠原線維が薄層状に配列している。角膜上皮の細胞毒性や細胞間結合障害により角膜は混濁する。損傷が強い場合にはこの混濁は戻らなかつたり、角膜が薄くなつたり、溶けてしまう。間質では水和の程度を増強させるような化学物質によって角膜水腫が起こり、角膜は混濁する。

結膜は、血管に富む間質を支持組織とする非角化扁平上皮からなる粘膜で、眼瞼の内部表面と前眼球の外側縁を覆っている。虹彩は眼球内部の膜構造であり、血管に富み、眼房水中に位置している。

2) 毒性の種類、毒物、検出法^{22, 24, 76~83)} 強酸や強アルカリは角膜の浸潤性傷害を起こし、浮腫に始まり、ついで損傷部への炎症細胞の浸潤、さらに角膜辺縁からの血管および線維芽細胞の侵入が起こる。ブタノールやアリルアルコールの暴露による角膜傷害、溶剤や洗剤などの飛沫あるいは点眼薬の長期反復投与においては刺激性結膜炎が多い。化学物

質による結膜傷害の機序や反応は皮膚の場合と同様である。ある種の化学物質によるI型あるいはIV型アレルギー性結膜炎も多い。アンモニアなどのある種の刺激物はすみやかに角膜を透過して眼房水や虹彩にも影響を及ぼす。虹彩は刺激性化学物質に反応して充血と浮腫を起こす。高度の場合にはタンパクに富む浸出液による眼房水の混濁が起こる。

眼刺激性の評価方法には、ウサギが一般に用いられてきた。ウサギの眼はヒトと比較して、角膜およびボーマン氏膜が薄く、角膜上皮の新生が遅い、眼瞼が緩い、瞬膜がよく発達している、角膜における血管増殖がしばしば起こる、眼房水のpHが異なることから、ウサギのほうが人間より刺激性に対して感度が高いといわれている。これをもとに、ドレイズ試験が汎用され⁸⁴⁾、角膜、結膜、虹彩を点数化して評価されてきた。しかし、本試験も動物に苦痛や痛みを与えるという動物愛護の関係から動物実験代替法の検討が増えている。この背景として、研究室間での変動が大きいことや、スコア化が主観的、ヒトの刺激性を評価するには予測性が乏しいことなどが挙げられている。

そこで、代替法による評価が進んでおり、強度の角膜損傷を捕らえる目的で牛の摘出角膜試験や鶏の摘出眼球試験がOECDガイドライン案として承認された⁴⁷⁾。また、日本では培養細胞を用いる細胞毒性試験が水溶液の角膜損傷を代替する試験として検討され、ガイダンス案が作成されている⁸⁵⁾。

腐食性物質は皮膚や粘膜にかかわらず毒性を示すが、刺激性の強度によっては皮膚と同等の障害を起こすとは限らない。したがって、評価の際には注意が必要である。

b. その他粘膜毒性^{22, 79, 86)}

1) 口腔粘膜刺激性 一般的な口腔粘膜毒性物質としては、誤飲による刺激性物質のほかに、歯牙に対するフッ素イオンおよびテトラサイクリン系抗生物質が有名である。PCPC (The Personal Care Products Council; 米国パーソナルケア製品協議会。最近CTFAからPCPCへ改名された) のCTFAガイドラインが示す試験法として、歯磨きや口腔洗浄剤のような衛生用品の評価をハムスターやラットの口腔に多数回適用後 (FDAでは4回/日, 28日間)、目視および組織評価が挙げられている。

ヒトの口腔モデルを用い、細胞毒性やインターロイキンの放出を測定し、組織学的検査を行う *in vitro* 試験やヒトの臨床試験などもPCPCでは推奨している。

2) 腔粘膜刺激性 ウサギを用いる試験法がPCPCガイドラインに記載されている。5-10日間連続適用により、腔粘膜への毒性 (潰瘍, 炎症浸潤, 紅斑, 浮腫) を肉眼および組織学的に観察する。

3) 陰茎粘膜刺激性 衛生製品の評価のため、ウサギを用いる試験法がPCPCガイドラインに記載されている。1回適用後に、紅斑や浮腫を肉眼で観察する。 [小島肇夫]

文 献

- 1) 成澤 寛 (2006): 皮膚科学 (片山一朗, 土田哲也, 橋本隆, 古江増隆, 渡辺晋一編), 文光堂, pp.8-25.
- 2) 上野賢一, 大塚藤男 (2006): 皮膚科学第8版, 金芳堂, pp.1-44.
- 3) 西川武二 (2007): 標準皮膚科学第8版, 医学書院, pp.5-29.
- 4) Bronaugh, R.L., et al. (2005): 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, pp.163-168.
- 5) 杉林堅次 (2007): 化粧品大全, 情報機構, pp.389-395.
- 6) 杉林堅次 (2007): 機能性化粧品素材開発のための実験法 (芋川玄爾編) シーエムシー出版, pp.347-354.
- 7) 島村剛史, 夏目秀視, 森本雍憲 (2007): 最新動物実験代替法, 技術情報協会, pp.221-238.
- 8) Haw-Yueh Thong, Hongbo Zhai and Haward I. Maibach (2007): Dermatotoxicology 7th Eds. (Zhai, Hongbo, Wilhelm Klaus-Peter, and Maibach, I. Howard) pp.51-61, CRC Press, New York.
- 9) Roberts, S. M. and Walters, A. K. (2007): Dermatol absorption and Toxicity Assessment 2nd Eds., (Roberts, S. Michael and Walters, A. eds.) pp.1-15, Kenneth, Informa healthcare, New York.
- 10) Monterio-riviere, A. Nancy, Baynes, E. Ronald and Riviere, E. Jim (2007): Dermatol absorption and Toxicity Assessment 2nd Eds. (Roberts, S. Michael and Walters, A.) pp.17-35, Kenneth, Informa healthcare, New York.
- 11) 小島肇夫 (2008): 最新・経皮吸収剤一開発の基礎から申請までのポイントまで一, 情報機構, pp.95-113.
- 12) 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.
- 13) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 427 (2002): In vivo Skin absorption. Paris.
- 14) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 428 (2002): In vitro Skin absorption. Paris.
- 15) COLIPA (1995): Guidelines for percutaneous absorption, Brussels.
- 16) SCCFNP (2002): 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.
- 17) EC (2004) : Guidance document on dermal absorption, Sanco/222/2000 rev.7, 19/03/2004. European Commission, Health and consumer protection.
 - 18) 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.
 - 19) Recommended Protocol for In vitro Percutaneous Absorption Rate Studies (1996) : Federal Register, Vol 61, No. 65.
 - 20) Howes D., et al. (1996) : Methods for Assessing Percutaneous Absorption. The report and recommendations of ECVAM workshop 13, ATLA 24, 81-106.
 - 21) Kielhorn, Janet, et al. (2006) : Dermal Absorption, Environmental Health Criteria Series, No. 235, WHO.
 - 22) 小林敏明, 市川秀之, 板垣 宏 (1989) : 毒性試験講座7, 機能毒性学, (福原武彦・小野 宏編) 地人書館, pp.268-302.
 - 23) 日本化粧品工業連合会 (2001) : 化粧品の安全性評価に関する指針, pp.8-14 & 18-24, 薬事日報社.
 - 24) 杉山真理子 (2001) : 非臨床試験マニュアル, pp.173-181 エル・アイ・シー.
 - 25) Cohen, E. David and Rice H. Robert (2001) : Casarett & Doull's Toxicology 6th Eds. (Klaassen D. Curtis eds.) pp.653-671, McGraw Hill, New York.
 - 26) 土井邦雄 (2002) : トキシコロジー (日本トキシコロジー学会教育委員会編) 朝倉書店, pp.216-221.
 - 27) 小島肇夫 (2006) : 化粧品大全, pp.407-416, 情報機構.
 - 28) 化粧品・医薬品部外品 (2006) : 製造販売ガイドブック 2006, 薬事日報社, pp.141-147.
 - 29) THE SCCP'S NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION 6TH REVISION (2006) : http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_04.pdf#search='SCCP guidance'.
 - 30) CTFA (2007) : Safety Evaluation Guidelines, CTFA, pp.13-24, Washington, D.C.
 - 31) 義澤克彦 (2008) : 日薬理誌, 13 : 285-290.
 - 32) Hayes, B. B., Patrick, E. and Maibach, I. H. (2008) : Toxicology (Hayes, A. W. ed.) pp.1359-1405, CRC Press, New York.
 - 33) 松永佳世子 (2002) : 薬局, 53 (11) : 71-75.
 - 34) 片山一朗, 土田哲也, 橋本 隆, 古江増隆, 渡辺晋一編 (2006) : 皮膚科学, 文光堂, pp.198-204.
 - 35) 小島肇夫 (2007) : 最新動物実験代替法, 技術情報協会, pp.75-84.
 - 36) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 431 (2004) : in vitro Skin Corrosion : Human skin model test. Paris.
 - 37) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 430 (2004) : in vitro Skin Corrosion : Transcutaneous electrical resistance test (TER). Paris.
 - 38) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 435 (2004) : in vitro membrane barrier test method for Skin Corrosion. Paris.
 - 39) 岡田稜伸 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 技術情報協会, pp.21-24.
 - 40) 小島肇夫 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 技術情報協会, pp.95-106.
 - 41) 板垣 宏 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, pp.107-116, 技術情報協会.
 - 42) Weltfreund and Maibach, I. Howard (2007) : Dermatotoxicology 7th Eds. (Zhai, H., Wilhelm Klaus-Peter, and Maibach, I.) pp.125-138, Howard, CRC Press, New York.
 - 43) Levin, Y. C. and Maibach, I. H. (2007) : Dermatotoxicology 7th Eds. (Zhai, H., Wilhelm, K.P., and Maibach, I.) pp.383-389, Howard, CRC Press, New York.
 - 44) 小島肇夫 (2007) : 最新動物実験代替法, 技術情報協会, pp.63-71.
 - 45) 小島肇夫 (2007) : 機能性化粧品素材開発のための実験法 (芋川玄爾編) シーエムシー出版, pp.308-314.
 - 46) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 404, (2002) : Acute Dermal Irritation/Corrosion. Paris.
 - 47) ECVAM statement (2008) : <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>
 - 48) 森 福義 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 技術情報協会, pp.29-33.
 - 49) 河合敬一 (2001) : Environ. Dermatol, 8 (suppl.1) : 90.
 - 50) 小島肇夫 (2003) : 皮膚の測定・評価マニュアル, 技術情報協会, pp.305-326.
 - 51) 森 福義 (2006) : 化粧品大全, pp.396-406, 情報機構.
 - 52) 岡田稜伸 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 技術情報協会, pp.25-27.
 - 53) 森 福義 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 技術情報協会, pp.35-36.
 - 54) 森 福義 (2006) : 化粧品大全, 株式会社情報機構, pp.417-430.
 - 55) 佐藤 淳 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 技術情報協会, pp.63-67.
 - 56) 大野泰雄 (2005) : Altern. Animal Test Experiment. 10 (2), 54-157.
 - 57) 楠原寛子, 桑原裕史 (2007) : 機能性化粧品素材開発のための実験法 (芋川玄爾編) シーエムシー出版, pp.326-331.
 - 58) 楠原寛子 (2007) : 最新動物実験代替法, 技術情報協会, pp.148-158.
 - 59) Moulton, M. Natalie and Maibach, I. Howard, (2007) : Dermatotoxicology 7th Eds. (Zhai, H., Wilhelm Klaus-Peter, and Maibach, I. eds.) pp.209-214, Howard, CRC Press, New York.
 - 60) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 432 (2004) : in vitro 3T3 NRU phototoxicity testing. Paris.
 - 61) 柿島 博 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 技術情報協会, pp.39-43.
 - 62) 医薬品非臨床試験研究会 (2002) : 医薬品非臨床試験ガイドライン2002, 薬事日報社, pp.71-75.
 - 63) 宮澤正明, 坂口 斉 (2007) : 機能性化粧品素材開発のための実験法 (芋川玄爾編) シーエムシー出版, pp.332-339.
 - 64) 金澤由基子他 (2007) : 最新動物実験代替法, 技術情報協会, pp.107-134.
 - 65) Sterilling, W. and Vohr Hans-Werner, (2007) : Dermatol absorption and Toxicity Assessment 2nd Eds. (Roberts, S. Michael and Walters, A. Kenneth eds.) pp.523-535, Informa healthcare, New York.
 - 66) Klerck, Geroge (2007) : Dermatotoxicology 7th Eds. (Zhai, H., Wilhelm Klaus-Peter, and Maibach, I. eds.) pp.443-

- 462, Howard, CRC Press, New York.
- 67) Kimber, I. et al. (2007) : Dermatotoxicology 7th Eds. (Zhai, H., Wilhelm Klaus-Peter, and Maibach, I. H. eds.) pp.505-516, CRC Press, New York.
- 68) 小島肇夫 (2008) : Visual Dermatology, 7 (3), 328-331.
- 69) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 406 (1992) : Skin Sensitisation, Paris.
- 70) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 429 (2002) : Skin Sensitization : Local Lymph Node Assay, Paris.
- 71) 佐藤 淳 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, pp.69-72, 技術情報協会.
- 72) 医薬品非臨床試験研究会 (2002) : 医薬品非臨床試験ガイドライン2002, pp.77-81 薬事日報社.
- 73) 秀 道広 (2005) : Visual Dermatology, 4 (7).
- 74) 赤松浩彦 (2003) : Visual Dermatology, 2 (3).
- 75) 三橋善比古 (2006) : Visual Dermatology, 5 (6).
- 76) 土井邦雄 (2002) : トキシコロジー (日本トキシコロジー学会教育委員会編) pp.220-221, 朝倉書店.
- 77) Fox, A. D. and Boyes, K. W. (2001) : Casarett & Doull's Toxicology 6th Eds. (Klaassen D. Curtis) pp.565-595, McGraw Hill, New York.
- 78) Blazka, E. M. and Hayes, A. W. (2008) : Toxicology (Hayes, A. W. ed.) pp.1131-1178, CRC Press, New York.
- 79) 聳城 豊 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, pp.75-80, 技術情報協会.
- 80) 日本化粧品工業連合会 (2001) : 化粧品の安全性評価に関する指針, pp.15-17, 薬事日報社.
- 81) CTFA (2007) : Safety Evaluation Guidelines, CTFA, pp.25-40, Washington, D.C..
- 82) 高橋 豊 (2007) : 機能性化粧品素材開発のための実験法 (芋川玄爾編) pp.315-325, シーエムシー出版.
- 83) 大野泰雄 (2007) : 最新動物実験代替法, pp.63-71, 技術情報協会.
- 84) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 405, (2002) : Acute Eye Irritation/Corrosion, Paris.
- 85) 大野泰雄 (2004) : 国立衛研報, 122, 1-10.
- 86) CTFA (2007) : Safety Evaluation Guidelines, CTFA, pp. 41-47, Washington, D.C..

6.10 血液毒性

血液細胞は主に骨髄でつくられて血液中へ入り全身をくまなく循環して、組織への酸素、栄養、ホルモン、水、熱などの輸送、血管の統合性維持、生体防御としての免疫・止血機能など、生体機能の恒常性維持のために様々な役割を演じている。血液毒性とは、医薬品など種々の化学物質がもたらす血液および造血臓器に対する悪影響（副作用）をいい、血液成分とくに前駆細胞を含めた血球が直接影響を受ける場合（一次性）と組織障害や全身障害の結果生じる場合（二次性）がある。前者は医薬品などの化学物質によることが多く、後者は局所あるいは全身

性の造血器以外の臓器、たとえば肝臓、腎臓、脾臓などに対する影響に反応するか、あるいは代償性変化として認められる。造血臓器は腸粘膜や生殖腺と同様に細胞分裂が活発なため、癌、感染症、免疫疾患の治療に用いる抗腫瘍剤、分裂抑制剤および放射線の標的となる。また、鉄など栄養素の供給、毒素や代謝物の排除（尿素）、エリスロポエチンおよび顆粒球コロニー刺激因子（granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF）など生理活性物質に影響する毒性物質の二次的影響を受けやすい。

6.10.1 造血器とその異常

造血臓器としては、骨髄、脾臓およびリンパ組織がある。骨髄は骨髄系およびリンパ球系細胞の産生においてもっとも重要な臓器である。脾臓は造血としてよりもむしろ障害を受けたり老化した赤血球や血小板の処理、血液の貯蔵（プール）ならびにリンパ装置の1つとして機能する。ヒト胎児における造血は、肝、脾、骨髄、胸腺、リンパ節などで認められるが、胎生期後半には骨髄がもっぱら造血を行うようになる。出生時にはすべての骨髄で活発な造血（赤色髄）がみられるが、小児期以降の造血は椎骨、肋骨、胸骨、骨盤など体幹部の骨に限られるようになる。長骨における造血は成長とともに低下して上腕骨や大腿骨では近位側および骨端の海綿質腔に赤色髄がみられるにすぎず、長骨の中央や遠位端は脂肪に置き換わって黄色髄になる。何らかの要因で造血の要求が高まると脂肪髄が再活性化されて造血細胞に置き換わり、さらに極限状態では胎児期にみられるような髄外造血像を呈するようになる。髄外造血は通常、肝臓や脾臓でみられるが、リンパ節、副腎、腎臓、軟骨、靭帯、脂肪組織で認められる場合もある。正常なヒトでは血球（赤血球、白血球、血小板）は毎秒 $1\sim 3\times 10^6$ 個つくられているが、溶血性貧血や化膿性炎症の場合は産生量がこの数倍に増加する。黄色髄は造血の予備能であり、骨髄の貯蔵血球（プール）とともに異常時の生体防御の対応として重要である。骨髄のもう1つの役割として肝臓、肺、腹腔内、脾臓、腎臓、皮膚などに移行して組織マクロファージとなる単球の産生がある。

骨髄は造血細胞と間質からなる。造血幹細胞（CD34⁺）は様々な液性因子によって分化・増殖して、赤血球、白血球、血小板となって血中に入る。間質は造血細胞を取り巻く間質細胞（stromal cell）

2

非臨床試験法をめぐる新たな流れ

—JaCVAMの活動を中心に—

はじめに

動物実験は、科学の発展と人類の福祉に不可欠なものである。これまでの医薬品・医療機器、農薬、その他新規化学物質等の開発では、主に動物実験により安全性を検証してきた。これに対し、動物愛護の観点から非臨床試験における動物の扱いについても配慮が要求されてきた。現時点では、倫理的、科学的に妥当な動物実験を行うことにより社会の理解を得る努力が必要である。

表1 動物実験の適切性については、欧米では古くから社会の関心が深く、1954年には、動物実験における3R(refinement, reduction, replacement)の原則が Russel & Burch (1954) により示された。動物実験代替法とは「科学研究や教育、毒性試験、生産等の目的のために動物を用いる方法を動物を用いない方法に置き換えること(replacement)であり、動物使用数の削減(reduction)や動物使用に伴う苦痛の削減(refinement)を含む(Russel & Burch 1959)」と定義された。

日本においても適正な動物実験実施のために具体的な配慮を行う必要性が高まり、昭和55年に学術会議で「動物実験ガイドラインの策定について」という勧告が出された。これに基づき当時の文部省から「大学等における動物実験について」の基本的な考え方が示された。しかし、日本国内に統一的なガイドラインがなかったことから、日本は動物実験における動物福祉の問題を重視していないといった批判が生まれた。そこで、平成16年に日本学術会議は「動物実験に対する社会的理解を促進するために」という提言の勧告を再度行った。主な目的は、統一的なガイドラインの策定及び自主管理の客観性や透明性確保のための第三者評価の実施であった。

表1 動物実験の適正な実施のために

日本学術会議「動物実験ガイドラインの策定について」	(昭和55年勧告)
文部省「大学等における動物実験について」	(昭和62年文部省学術国際局長通知)
↓	
日本学術会議「動物実験に対する社会的理解を促進するために(提言)」	(平成16年)
①国内統一ガイドラインの策定	
②自主管理の客観性・透明性確保のための第三者評価	

表2 平成17年には、「動物の愛護及び管理に関する法律」が改正され、動物実験や実験動物に関する記述が組み込まれ、前記の代替法に関する3Rの原則が盛り込まれ、それらを考慮して実施すべきことが要求されるようになり、違反する場合には罰則が伴うこととなった。

この改正に続き、環境省は「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」を策定し、動物実験の取り扱いに関する基本的な考え方を通知した。

表2 実験動物の適正な飼養及び保管

「動物の愛護及び管理に関する法律」の改正	(平成17年法律第68号)
「苦痛の軽減」に加え「代替法の利用」「動物利用数の削減」が盛り込まれ、「3Rの原則」が明記された。	
環境省「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」の策定	(平成18年環境省告示第88号)
法律改正を受け、動物の福祉の観点から3Rの原則を盛り込んだ実験動物の取り扱い等が規定された。	

表3 また、文部科学省・厚生労働省・農林水産省の各省は、それぞれ所掌する分野における動物実験についての基本指針を作成した。内容は、いずれもほとんど同様であり、実施機関長の責務、実験責任者の責務、動物実験委員会の設置と役割、動物実験等の実施上の配慮、実験動物の飼養及び保管、その他であった。なお、文部科学省と農林水産省の指針には、動物実験の第三者評価を実施することに努めるとの記載があったが、厚生労働省の指針には入っていなかった。しかし、その必要性について厚生労働省の傘下の研究機関や動物実験施設においても認識され、日本製薬工業協会の希望もあり、HS財団は第三者評価のシステムを構築し、2008年より事業を開始した。

一方、指針ができ、動物実験に関する3Rの原則が示されたとしても、実際に

どんな代替法があるのか、動物の苦痛の軽減のためにはどうしたらよいのか、について具体的に示されないと動物実験委員会での審議に不都合である。また、現在の方法が不十分であるならば、新たに代替法を開発する必要がある。そこで、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 薬理部内に動物実験代替法の開発と評価にかかわる JaCVAM (正式名称：「新規試験法評価室」) が設立された。本項では JaCVAM と、代替法の現状とその開発状況について解説する。

表 3 動物実験に関する指針 (2006. 6. 1)

<p>基本指針 (文部科学省, 厚生労働省, 農林水産省)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・実施機関長の責務 ・動物実験責任者の責務 ・動物実験委員会の役割 ・動物実験等の実施上の配慮 <ul style="list-style-type: none"> ○ 科学的合理性の確保：適正な動物実験等の方法の選択 (代替法の利用, 実験動物の選択, 苦痛の軽減) ○ 安全管理 ・実験動物の飼養及び保管 ・その他：当該研究機関等以外の者による検証を実施することに努める (文部科学省, 農林水産省)
<p>詳細指針</p> <ul style="list-style-type: none"> ・日本学会会議「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」

1 動物実験代替法

表 4 現在、日本で公的に認められている *in vitro* の安全性試験法には、遺伝毒性試験、染色体異常試験、プラスチック製の医療機器の溶出液の安全性評価のための細胞毒性試験、及び注射剤のエンドトキシン検出のためのリムラス試験がある。後二者は日本薬局方に記載されているものである。また、化粧品・医薬部外品製造申請ガイドブックの化粧品・医薬部外品の安全性評価の項に、厚生労働省の考えとして化粧品原料の眼刺激性評価のために代替法を使ってもよいとの記載がある。ただし、これには妥当な方法があればという条件がついている。厚生科学研究班 (主任研究者：大野泰雄) の報告として *in vitro* と *in vivo* の試験法を組み合わせた化粧品原料の眼刺激性評価に関する指針案が示されている (1999)。一方、OECD は動物福祉を考慮に入れて、さまざまなガイドラインの改訂を行ってき

た。別に規制がなされていない限り、それらも日本で利用できる。また、医薬品の承認申請資料の国際的ハーモナイゼーションのためのICHでも、3Rの原則に則った毒性試験の改訂が多くなされてきた。

表4 日本で公的に認められている代替法

<ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝毒性試験 ・ 染色体異常試験 ・ プラスチック製医療用具溶出液の安全性評価のための細胞毒性試験 (JP) ・ 注射剤のエンドトキシン検出のためのリムラス試験 (JP) ・ 化粧品原料の眼刺激性試験代替法 (妥当な方法があればとの条件付) ・ OECD ガイドライン ・ ICH ガイドライン ・ <i>In vitro</i> 眼刺激性試験ガイドライン案 (1999)

2 世界の動物実験代替法

表5-1 OECDは、特に急性毒性試験に対する世論の反対が非常に強かったため、急性の経口毒性試験の従来の方法(指針番号401)が2002年12月に廃止され、それに代わるものとして、より少数の動物で概略の致死量が検出でき、毒性症状の検出もできる固定用量法(420)、急性クラス分け法(423)、及びアップアンドダウン法(425)の三つの方法が承認された。また、新規の試験法の徹底をはかるために、2003年以後に401に従って実施された試験結果を受け入れないとの決定を行った。反復経口授与の毒性試験についても、今までの方法より多くの情報を得るための改訂がなされた(407-409)。

表 5-1 動物福祉を考慮して OECD で改訂/新規導入された毒性試験法ガイドライン
(例 1)

急性経口投与毒性試験	Red. : reduction
401 Acute Oral Toxicity (2002.12.20廃止)	Ref. : refinement
420 同上 Fixed Dose Method (2001.12.20改訂 : Red.)	
423 同上 Acute Toxic Class Method (2001.12.20改訂 : Red.)	
425 同上 Up-and-Down Procedure (2001.12.20改訂 : Red.)	
反復経口投与毒性試験	More inf. : more information
407 Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents (1995. 7 .27改訂 : More inf.)	
408 Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents (1998. 9 .21改訂 : More inf.)	
409 Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents (1998. 8 .21改訂 : More inf.)	

表 5-2 急性の皮膚腐食性試験においても、動物使用数の削減 (402) や、*in vitro* のスクリーニングも用いてなるべく動物に苦痛を与えないようにされた (404)。また、皮膚の電気抵抗の変化に適した試験系で調べることによって評価を行う方法 (430) や、ヒト皮膚モデルを使った方法 (431)、膜のバリアの能力を調べることによって皮膚腐食性を評価する方法 (435) 等の *in vitro* の方法が導入された。

眼刺激性試験についても、*in vitro* の方法を組み込むことによって強いものは排除したうえで、ある程度の刺激性のものか無刺激性のものを動物で確認するといったスキームが示された (405)。

皮膚感作性試験についても、従来の方法を改良する (406) とともに新たに Local Lymph Node Assay という、感作処置は行うが、惹起は行わず、動物に与える苦痛がより少ない方法が導入された (429)。

表 5-2 動物福祉を考慮して OECD で改訂/新規導入された毒性試験法ガイドライン (例 2)

皮膚腐食性試験
402 Acute Dermal Toxicity (1987. 2 .24改訂 : Red)
404 Acute Dermal Irritation/Corrosion (2002. 4 .24改訂 : Ref, Red, vitro screen)
430 Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER) (2004. 4 .13)
431 Human Skin Model Test (2004. 4 .13)
435 In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion (2006. 7 .19)
眼刺激性/腐食性試験
405 Acute Eye Irritation/Corrosion (2002. 4 .24改訂 : Ref, Red, vitro screen)
皮膚感受性試験
406 Skin Sensitisation (1992. 7 .17改訂 : Red.)
429 Local Lymph Node Assay (2002. 4 .24改訂 : Ref. More inf.)

表 5-3 生殖毒性試験についても、動物使用数削減に向けた改訂がなされた(414, 421). 光毒性試験については、3T3細胞を用い、neutral red 取り込みを指標とする *in vitro* の方法が2004年に導入された (432).

皮膚吸収性試験についても、2004年に *in vivo* 及び *in vitro* の方法が同時に導入された (427, 428).

表 5-3 動物福祉を考慮して OECD で改訂/新規導入された毒性試験法ガイドライン (例 3)

生殖毒性試験
414 Prenatal Developmental Toxicity Study (2001. 1 .22改訂 : Red. More inf.)
421 Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (1995. 7 .27 : Red.)
光毒性試験
432 In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test (2004. 4 .13)
皮膚吸収性試験
428 Skin absorption : In Vitro Method (2004. 4 .13)

表 5-4 表 5-5 現在も、動物の福祉を考慮した試験法の改訂が行われている。すなわち、