

医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会
— 光関連毒性分科会報告 —

1. 試験名

光毒性試験法

2. 検討委員会名簿

上出 良一 (東京慈恵会医科大学)

田中 憲穂 (食品薬品安全センター 秦野研究所)

小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所、JaCVAM)

森 辰実 (株式会社ノエビア)

荒島 雅樹 (株式会社ノエビア)

今井 教安 (株式会社コーセー)

3. 目的

医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料において、光(紫外線)照射によって惹起される毒性に関して、動物実験代替試験法である光毒性試験法の利用の適否を検討する。

4. 検討した代替法の名称とその理由

4-1. 代替法の名称

Balb/c 3T3 Neutral Red Up-take Phototoxicity Test

4-2. 理由

光(紫外線)照射によって惹起される毒性としては、光毒性および光感作性、光遺伝毒性が挙げられる。そのうち、医薬部外品製造販売ガイドブック 2008(薬事日報社)に記載されているのは光毒性試験と光感作性試験のみである。また、光感作性試験法については、現時点において公定化された代替試験法がない。これらの理由から、光関連毒性分科会としては、光毒性に関する代替試験法について検討を行うこととした。

光毒性の代替試験法は、いくつか報告されているが、中でも Balb/c 3T3 Neutral Red Up-Take Phototoxicity Test (3T3 NRU-PT 法)は、EU/COLIPA にてバリデーション研究が実施され、良好な成績を収めている。日本においては、平成 14 年に、厚生労働科学研究として大野らによって本試験法の EU でのバリデーション研究に対する評価研究が実施されており、問題のないことが確認されている(Balb/c 3T3 細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価結果報告)。また 2004 年 4 月 13 日には OECD テストガイドライン (No.432)に記載された試験法である。

一方で、他の光毒性試験法についての近年の動向としては、酵母光生育阻害試験法と光溶血試験法のバッテリー試験法が(株)資生堂から提案され、日本動物実験代替法学会を中心にバリデーション研究が実施された。現在は厚生労働科学研究班において専門家によるピアレビューが行われている。また、EU を中心に 3 次元培養皮膚モデルを使用した、光毒性試験法の開発も進められている。

これらの状況を鑑み、光関連毒性分科会としては、世界的なバリデーション研究が終了し、OECD のテストガイドラインにも収載され、一定の成果が評価されている 3T3 NRU-PT 法について、医薬部外品製造販売承認申請の際の安全性に関する資料への利用の適否について検討することとした。

5. 3T3 NRU-PT 法の概要

5-1. 原理

3T3 NRU-PT 法は、マウス由来の線維芽細胞の単層培養系を用い、被験物質の光照射時と非照射時における用量-生存率曲線を描き、光照射によって細胞毒性の増強が見られるか否かで化合物の光毒性の有無を判定する方法である。生細胞の判別には Neutral Red (NR)を用いる。NR は弱カチオン性の色素で、細胞膜を能動輸送により透過してリソゾームに蓄積される性質を持つ。細胞がダメージを受けたり、死ぬ事により、細胞膜の輸送能の低下やリソゾームの脆弱化が起これると NR が蓄積されなくなる。この性質を利用して生細胞と、ダメージを受けた細胞または死細胞とを区別する。

5-2. 手順

試験は、原則として「OECD Test Guideline 432」に示された方法で行う。

具体的には、96well のアッセイプレート 2 枚に培養した培養液を、8 段階に希釈した被験物質および溶媒を含む緩衝液に交換して 1 時間インキュベーションする。その後一方は光を照射し、もう一方は遮光して放置する。照射光は、UVA と可視光領域を持つ光が推奨されており、照射量は UVA 領域での計測で $5\text{J}/\text{cm}^2$ とする。照射後、被験物質を含んだ緩衝液を培養液に交換して 24 時間培養し、NR を含む培養液に交換してさらに 3 時間培養して NR を取り込ませる。その後、細胞内に取り込まれた NR を抽出し、測定した吸光度を用いて、溶媒対照を基準にして被験物質の各処理濃度における細胞生存率を算出して、用量-生存率曲線を得る。

結果の評価法としては、Photo Irritant Factor (PIF)を求める方法と Mean Photo Effect (MPE)を求める方法と 2 つの評価法が記されている。PIF は光照射時と非照射時の細胞 50% 生存濃度 (EC_{50}) の比であり、以下の式で求められる。

$$\text{PIF} = \text{EC}_{50}(\text{UV-}) / \text{EC}_{50}(\text{UV+})$$

MPE は光非照射時から照射時への用量-生存率曲線のシフトを評価する数値で、各濃度における生存率方向の移動率(Response Effect)と、濃度方向における移動率(Dose Effect)を掛け合わせた値(Photo Effect)の平均値である。それぞれの値を用いたときの判断基準は下表に示した。(MPE 算出用のソフトが OECD ウェブサイトよりダウンロードできる。)

EU/COLIPA のバリデーションにおいては Phase I 時には PIF のみで評価していたが、Phase II 実施時に MPE の概念が加わった。バリデーションの結果、どちらの評価軸を用いても評価結果に差はないとされている。

表：PIF および MPE による光毒性判定基準

Classification	PIF	MPE
No Phototoxicity	PIF < 2	MPE < 0.1
Probable Phototoxicity	2 < PIF < 5	0.1 < MPE < 0.15
Phototoxicity	5 < PIF	0.15 < MPE

5-3. 各種条件について

OECD テストガイドラインにおける 3T3 NRU-PT 法は、使用する細胞種としてバリデーションに使用した 3T3 clone A31 (ATCC もしくは ECACC) を使用することを推奨しており、他の細胞を使用しても試験は可能としているが、同等性を示す必要があるとしている。

また、照射光については、UVA と可視光領域の光を照射することとし、光源としては、ソーラーシミュレーターとしてキセノンランプもしくは水銀メタルハライドランプについて述べている。太陽光との近似性はキセノンランプの方が高いとしているが、水銀メタルハライドランプは放熱が少ないことと、コストが低い点をメリットとして挙げている。

細胞種や光源に限らず、ガイドラインにて推奨されている以外の条件下において、3T3 NRU-PT 法が適正に実施できる可能性はある。しかしながら、ガイドライン推奨と異なる条件下で本試験を実施する場合には、その試験条件の妥当性が評価され、科学的な説明がなされる必要がある。

6. 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料としての本試験の利用の適否について

6-1. 本試験法の長所

- ・ 試験法が比較的簡単である⁸⁾
- ・ 短時間で試験結果が得られる（細胞播種から結果を得るまで3日）⁸⁾
- ・ 96well マルチプレートの使用により省スペースで試験できる⁸⁾
- ・ マイクロプレートリーダーの使用で簡単に測定できる⁸⁾
- ・ 結果の再現性が高く安定している⁸⁾
- ・ 原理的にはどのような細胞も使用可能である⁸⁾
- ・ バリデーション研究にてヒトのデータと良い相関が得られている⁶⁾
- ・ 動物を使用していない⁶⁾

6-2. 本試験法の短所および使用上の範囲、限度

- ・ 光源の種類によって波長特性が異なり、化学物質との光化学反応や毒性として発現する生物学的な反応も変わってくる。そのため、光源の波長特性を予め把握しておくと同時に、その試験条件下での細胞毒性の発現について十分な背景データをとっておく必要がある⁸⁾
- ・ UV 測定器のメーカーによって、UV 検出する波長域が異なるためエネルギー値のみで照射条件を設定することは危険である⁸⁾
- ・ 緩衝液に溶けないような被験物質については正確なデータが得にくい^{6,8)}
- ・ 光毒性の有無を定性的に判断するための試験系であり、光毒性の強弱の程度、生体での用量・濃度反応関係については必ずしも評価できない^{6, 8)}
- ・ 被験物質の代謝など間接的な光毒性を検出できない⁶⁾
- ・ ヒト由来の組織を使用していない⁶⁾

6-3. 本試験法の利用の可否とその理由

以上に述べた試験法の長短所を踏まえて検討した結果、光関連毒性分科会は本試験法の採用について以下の点を合意した。

- ・ 3T3 NRU-PT 法は、医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料において、光毒性の有無を判定する為の動物実験代替試験法として利用可能である。
- ・ 適正に実施された 3T3 NRU-PT 法で光毒性が陰性と判定された場合には、原則としてそれ以上の確認は必要ない。
- ・ 3T3 NRU-PT 法にて光毒性が疑われた場合、動物試験を含めた他の試験法にて確認することができる。
- ・ 3T3 NRU-PT 法にて光毒性が疑われた場合でも、従来の動物を用いた試験法にて陰性が確認された場合は、光毒性は陰性と判断する。
- ・ 3T3 NRU-PT 法の適用が困難であった場合、またその他の理由で必要と判断された場合には、適切と思われる他の試験法にて確認する必要がある。

本試験を利用可と判断した理由は以下の通りである。

- ・ 本試験法とその妥当性を示すデータは、EU/COLIPA でのバリデーション研究ならびに、その報告論文に対する厚生労働科学研究班による評価研究にて、透明で独立な評価を受けている。
- ・ 本試験法で得られるデータは、対象毒性を十分に評価あるいは予測できるものであり、得られたデータは、従来の試験法の代替法としての繋がりを示している。
- ・ 本試験法は、光毒性に関して被験物質のハザードを評価するのに有効である。
- ・ 本試験法とその妥当性を示すデータは、医薬部外品およびその構成成分を含んだ十分に広い範囲を対象としたものである。また、その試験法を適用できる条件および適用できない条件が明確である。
- ・ 本試験法は、プロトコルの微細な変更に対して頑健性が高く、適切な訓練経験を持つ担当者で適切な設備のある施設において、技術習得が容易なものである。

- ・ 本試験法は時間的経費的に優れている。
- ・ 本試験法は、対象毒性を充分評価することが可能でありつつ、動物を一切用いず、比較的平易な設備で安価に実施することが可能であり、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に優位であることが正当化されている。

7. 付記事項

7-1. 試験法の運用について

光関連毒性分科会では、光毒性の評価に関する3T3 NRU-PT法と従来の動物を使用した試験法の運用について、以下のように考えた(別添の参考資料を参照)。

運用のポイントは以下の3つである。

- ・ 3T3 NRU-PT法を光毒性試験の第一選択試験法とし、まずは本試験法を実施する。
- ・ 適正に実施された3T3 NRU-PT法にて光毒性陰性の結果を得たときは、それ以上の確認試験を必要としない。
- ・ 被験物質の物性等により、3T3 NRU-PT法が適正に実施できていないと判断された場合、また、3T3NRU-PT法で光毒性陽性が疑われた場合は、動物試験を含めた他の試験法にて確認することが出来る。

具体的には、光毒性試験を実施する必要があると判断された被験物質に対し、まずは3T3 NRU-PT法を実施する。

溶解性やpHなど被験物質の物性を考慮し、3T3 NRU-PT法が適正に実施されたと判断できない場合は、動物を含む適正なその他の試験法を実施する。また、3T3 NRU-PT法を実施せずとも、明らかに本試験法への適用が困難であると判断された物質については、3T3 NRU-PT法を省略することが出来る。

また3T3 NRU-PT法にて、“Phototoxicity”あるいは“Probable Phototoxicity”と判定された場合にも、動物を含む適正なその他の試験法にて確認することができる。なお、従来の動物を用いる試験法により、光毒性が陰性と評価された場合は、被験物質の光毒性はないと判断できる。

3T3 NRU-PT法が適正に実施されたと判断でき、さらに“no Phototoxicity”と判定された場合は、それ以上の確認試験を実施する必要はない。この点に関しては、光関連毒性分科会では、適正な条件下で実施された3T3 NRU-PT法により、光毒性が陰性と判定された場合には、原則としてその被験物質は光毒性のポテンシャルを持たないか、持っても極めて弱く実質上の問題とならない程度であると判断できると考え、それ以上の確認試験を実施する必要はないと考えた。

さらに説明すると、EUにおけるPhase I～IIIまでのバリデーション研究および、それに関連した論文について、網羅的に調査研究を行った平成14年度厚生労働科学研究班の研究は、3T3 NRU-PT法とin vivo試験法との相関性が高いことを報告している。特に感受性(Sensitivity)は、ヒトデータとの相関性は91.3%(PIF)もしくは94.4%(MPE)と高く、動物デー

タとの相関性に至っては 100% (PIF、MPE) であった^{2,3,4,8}。このことから、in vivo(動物)にて陽性の物質を、3T3 NRU-PT 法にて誤って陰性と判定する可能性は非常に低いことが示唆される。つまり 3T3 NRU-PT 法にて、陽性と判定された物質中に、in vivo 試験で陰性となる物質が含まれている可能性は残るものの、陰性と判定された物質については、光毒性陰性と判断することが可能であると考えた。

さらに言えば、同研究において 3T3 NRU-PT 法の特異性 (Specificity) つまり in vivo で陰性の物質を正確に陰性と判断する能力については、対動物データで 71.4% (PIF による) と若干低いものの、対ヒトデータでは 90.0% (PIF による) と高く、PIF 判定による一致率 (Accuracy) も対動物で 87.9%、対ヒトで 90.9% と高い値を示すことが報告されている。

化粧品に関する光毒性試験については、2004 年 9 月より、EU 域内において動物実験は禁止となっていることから、国際調和の観点からも、可能な限り光毒性における動物実験の削減を目的として、上記のような運用方法を提案した。

しかしながら、本試験法には疑陽性の結果を得る可能性があること、また、そのシステム中に「Probable Phototoxicity」という結果が設定されていること、非水溶性物質などある種の化学物質の評価に適していないこと、またそれ以外にもいくつかの短所が指摘されていることなどを考慮すると、従来の動物を用いた試験法を含む他の光毒性試験法による確認が必要となる可能性はある。

7-2. 試験成立条件について

本試験法によるデータの質を維持する為に、試験成立を確認する項目を設ける必要があると考えた。以下に示す項目によって、試験施設ごとの背景データを元に、試験が適正に実施されたことを確認できると考える。

以下に確認項目を示し、参考までに OECD テストガイドラインで推奨されている数値を示す。

- ・ 陰性(溶媒)対照の細胞生育性: 光照射条件下および非照射条件下の各プレートの陰性(溶媒)対照の平均吸光度の値。OECD テストガイドラインでは 0.4(溶媒による背景データの約 20 倍)以上が推奨されている。
- ・ 光照射に対する細胞の感受性: 非照射条件下の陰性(溶媒)対照群に対する、光照射条件下の陰性(溶媒)対照群の細胞生存率。OECD テストガイドラインでは 80%以上であることが推奨されている。
- ・ 陽性対照に対する感受性: 陽性対照物質の PIF 値が実験施設の背景データから逸脱していないこと。OECD テストガイドラインでは、塩酸クロルプロマジン(Chlorpromazine)を陽性対照とした場合の PIF 値は 6 以上であることが推奨されている。

試験実施施設においては、OECD のテストガイドライン Table1 を参考に、リストに挙げられている化合物の PIF 値もしくは MPE 値が、表に示された値に近くなるような条件設定を検討する必要があるかもしれない。

7-3. 添付資料について

試験成立条件の設定と同じく、データの質を管理する為に、本試験法の結果を申請用資料として使用する場合には、以下の情報についても提示する必要があると思われる。

- ・ 光照射機器購入時のスペクトラム分布情報
- ・ UV 強度計に関する情報(メーカー、機種、型番、校正記録)
- ・ 陽性対照物質の背景データ

8. 総括

今回、「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会」の光関連毒性分科会では、医薬部外品申請時の光毒性評価のための試験法として、Balb/c 3T3 NRU-PT 法の利用の適否について検討した。

その結果、光関連毒性分科会では、本試験法は、前述の第6項に記したような理由に加え、比較的簡便かつ安価に実施することが可能であり、導入の際の障害も少なく、広く普及しやすい試験法であることから、医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料作成において、光毒性の有無を判定する試験法として利用可能であると判断した。

つまり、本試験法で光毒性が陰性と判定された場合には、原則としてそれ以上の確認は必要ない。しかしながら、本試験法にはいくつかの短所も指摘されており、従来の動物を用いた光毒性試験法に完全に置き換わるものではない。従って、光毒性の評価には、まず本試験法を第一選択肢とし、本試験法の適用が困難であった場合、またその他の理由で必要と判断された場合には、動物試験を含む適正なその他の試験法での確認が必要となる。また、本試験法にて光毒性が疑われた場合にも、他の試験法で確認することが出来る。

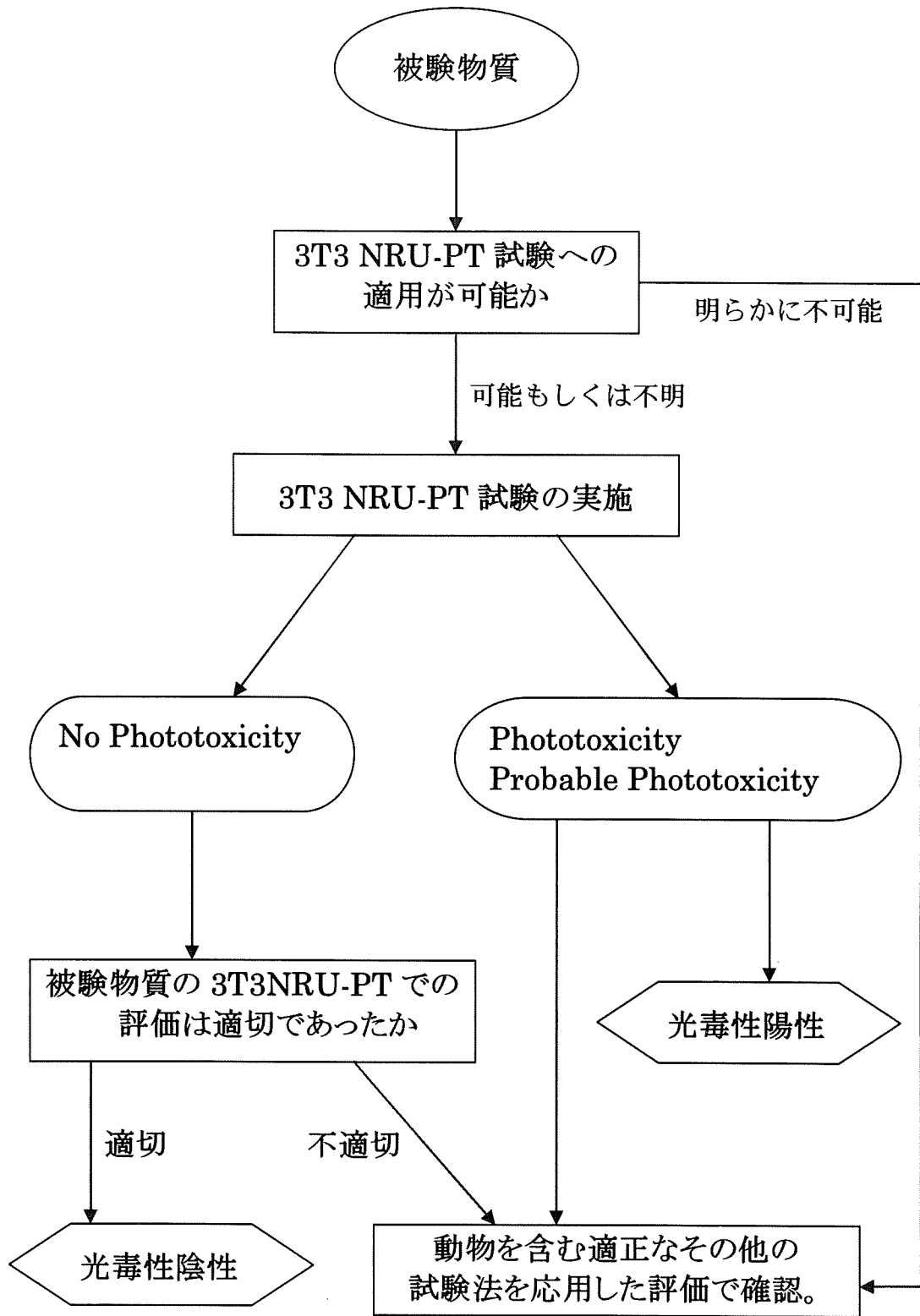
本試験法は、単層細胞培養系を使用した評価システムであり、培養液と混合しないもの、つまり水溶性でないもの、著しく培養系に影響を与えるものは適用できない。この点については、現状では従来の動物を用いた試験法にて評価するほかない。冒頭で紹介した酵母光生育阻害試験法や、近年 EU を中心に報告されている3次元皮膚モデルを使用した試験法を用いれば、3T3 NRU-PT 法で評価不可能な被験物質にも対応が可能になることが期待される。非水溶性物質に関する評価については、今後のさらなる代替法の開発研究に期待したい。

また、光毒性分科会では、現行の化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2008 収載の「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」の中で、光毒性試験、光感作性試験の省略に関する問いに対しての「紫外部吸収スペクトル(290nm~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、280nm~450nm の範囲で吸収極大の有無を確認すること。」という記載について議論した。光毒性の性質を考えれば、物質の吸収波長帯と照射する光の波長が合致すれば、例え紫外線でなくとも、可視光領域の光においても光毒性が発生する可能性は考えられる。このことから、光毒性試験の省略を判断する基準について、可視光領域での吸収を確認する必要性について様々な議論がなされた。本分科会では、最終的な結論を出すには至らなかったが、このような議論がされたことを最後に記しておく。

9. 引用文献

- 1) Spielmann H., et al., In vitro Phototoxicity testing, the report and recommendation of ECVAM workshop 2, ATLA, 22, 314-348, 1994.
- 2) Spielmann H., et al., EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: first results obtained with Balb/3T3 cell phototoxicity assay, Toxicol. In Vitro, 8, 793-796, 1994.
- 3) Spielmann H., et al., The international EU/COLIPA in vitro phototoxicity validation study: results of phase II (Blind Trial). part1: The 3T3 NRU phototoxicity test, Toxicol. In Vitro 12, 305-327, 1998.
- 4) Spielmann H., et al., A Study on UV Filter Chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, ATLA 26, 679-708, 1998.
- 5) THE SCCP'S NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION 6TH REVISION
- 6) CTFA Safety Evaluation Guidelines, Evaluation of Photoirritation and photoallergy potential
- 7) Liebsch M., et al. UV-induced effect, ATLA Vo.33, suppl.1, 131-146, 2005.
- 8) 大野泰雄ら, Balb/c 3T3 細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価結果報告, 平成 14 年度厚生労働科学研究 動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究 (H13-医薬-024)

3T3 NRU-PT 法の運用スキーム



医薬部外品の製造販売申請における安全性に関する資料のあり方検討会
—遺伝毒性分科会報告—

1. 試験名

遺伝毒性試験

2. 検討委員会名簿

林 真	(財)食品農医薬品安全性評価研究センター
能美 健彦	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
本間 正充	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
小島 肇	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 新試験法評価室
江幡 真也	ライオン(株)
笠松 俊夫	花王(株)

3. 目的

あり方検討委員会では、「医薬部外品(薬用化粧品)の安全性評価について動物実験代替法を用いて評価するためのあり方を検討する」ことを目的に議論することになっているが、遺伝毒性については、申請の際の評価バッテリーとして動物実験代替法(in vitro 試験)が既に組み入れられている。ただしin vitro 試験のみで評価するのではなく、動物実験(in vivo 試験)との組み合わせで評価する枠組みとなっている(医薬品遺伝毒性試験ガイドライン)。

一方、欧米においては医薬部外品というカテゴリーはなく、日本では医薬部外品とされる薬用化粧品は、米国において制汗剤、フケ止剤(シャンプー・リンス)がOTC薬として取り扱われているにしても、基本的に化粧品として扱われる。日米欧(EU)とも化粧品の安全性評価については個別の販売業者に委ねられているが、EUでは化粧品原料に対する安全性評価の指針として、消費者製品に関する科学委員会、Scientific Committee on Consumer Products(2009年よりScientific Committee on Consumer Safetyに改組)、から「Notes of Guidance」が示されている。特に日本同様、ポジティブリストに載せる必要のある原料、つまり色素、保存料及び紫外線吸収剤については、この指針においても遺伝毒性試験のバッテリーに対応した試験データが要求される。

このように遺伝毒性は複数の試験を組み合わせで評価するが、日本とEUの指針で取り上げる試験法が異なれば、同じ化粧品原料を評価する際に実施する遺伝毒性試験の内容が異なり、不必要な試験を実施することになる可能性がある。また急速に進展しているin vivo 試験の削減の動きに対しても、対応するin vitro 試験の導入について、日・EU間で共通の認識を確立することが重要と考えられる。本分科会では日本の医薬部外品申請とEUのポジティブリスト申請等で求められる遺伝毒性試験項目について状況の違いをまとめ、科学的妥当性を考慮した上で、in vitro 試験を活用する方向で共通化する可能性について探ることとした。

4. 遺伝毒性試験の指針に関する日本及び EU の状況

日本の「医薬品遺伝毒性試験ガイドライン」(1999年11月改訂)と、EU の SCCP(現: SCCS)から示されている「Notes of Guidance 6th Revision」(2006年12月改訂)で要求されている遺伝毒性試験の概要を表1に示した。

医薬品遺伝毒性試験ガイドラインは ICH(日米 EU 医薬品規制調和国際会議)ガイドラインがベースとなっており、要求される試験項目は

- 1)細菌を用いる遺伝子突然変異試験、いわゆる Ames 試験と、
 - 2a)ほ乳類細胞を用いて細胞遺伝学的に評価する in vitro 試験、いわゆる in vitro 染色体異常試験、あるいは
 - 2b)in vitro マウスリンフォーマ TK 試験
- のどちらか一方、そして
- 3)げっ歯類造血細胞を用いる染色体異常検出のための in vivo 試験(実質的には in vivo 小核試験)

の、3つのデータの組み合わせである。さらにオプションとして別の試験も実施できることになっている。

EU の Notes of Guidance では、ヘアカラー(酸化染料)とそれ以外の化粧品原料とで区分が異なり、

ヘアカラーを除く化粧品原料については、最初に要求される試験(Stage 1)として、

- 1)細菌を用いる復帰突然変異試験、いわゆる Ames 試験と、
- 2)ほ乳類細胞を用いる in vitro 突然変異試験(多くの場合、in vitro マウスリンフォーマ TK 試験)
- 3)in vitro 小核試験

の3つの試験が示されている。

これらの試験全てで陰性結果が得られれば、問題ないと判断されるが、どれか一つでも陽性結果が得られれば、Stage 2 として適切な in vivo 試験を実施することとしている。

ヘアカラー(酸化染料)についても、基本的に要求される試験は同じで、上記 Stage 1 に示された試験、1)Ames 試験、2)ほ乳類細胞を用いる in vitro 突然変異試験(多くの場合、in vitro マウスリンフォーマ TK 試験)、3a)in vitro 小核試験の3つである。ただし in vitro 小核試験の代わりに、3b)in vitro 染色体異常試験を実施してもよい。

さらに必要に応じて追加実施する試験として、in vitro 不定期 DNA 合成(UDS)試験、及び in vitro シリアンハムスター胚(SHE)細胞形質転換試験が挙げられているが、実際の申請時に要求されるのかは明確でない。

以上から両ガイドラインの状況の違いをまとめると、日本・EU で共通して要求されているのは、Ames 試験、in vitro マウスリンフォーマ TK 試験の2試験

(ただし日本では in vitro マウスリンフォーマ TK 試験の代わりに in vitro 染色体異常試験でも可)日本でのみ要求されているのは、

in vitro 染色体異常試験、in vivo 小核試験の2試験であるが、EU においても、要求される in vitro

試験で陽性結果が得られた場合は適切な *in vivo* 試験を実施することとなっており、その際は実質的に *in vivo* 小核試験が第一選択となること、また日本においても、部外品については、要求される *in vitro* 試験が陰性の場合、特に *in vivo* 小核試験を要求しない運用がなされていることを考えれば、現状では *in vivo* 小核試験の取り扱いが事実上共通化しているといえる。ただし EU では 2009 年 3 月より化粧品原料の *in vivo* 試験の実施が禁止されたため、現在では *in vitro* 試験のみで判断せざるを得ないと考えられる。

in vitro 染色体異常試験は EU においてもヘアカラーの評価に活用できることになっているが、ヘアカラー以外の化粧品の評価には採用されていないため、もっぱら日本で活用されている試験であるといえる。ただし上で述べたように *in vitro* マウスリンフォーマ TK 試験で代替できるため、日本においても必ずしも実施しなくてはならない試験ではない。

EU でのみ要求されているのは

in vitro 小核試験、*in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験、シリアンハムスター胚 (SHE) 細胞形質転換試験の 3 試験であるが、このうち *in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験と *in vitro* シリアンハムスター胚 (SHE) 細胞形質転換試験は、先に述べたようにヘアカラーの評価の場合にのみ実施が要求される可能性があるものであり、先に Ames 試験、*in vitro* マウスリンフォーマ TK 試験、*in vitro* 小核試験(あるいは *in vitro* 染色体異常試験)の基本的な組合せの試験実施を前提としており、必ずしも必須とされていない。

日本・EU それぞれのガイドラインの比較から、日本の部外品申請に使用したデータを EU の申請に活用、また EU での申請に使用したデータを日本の部外品申請に活用、といったデータの相互受け入れ性の観点から大きなギャップとなるのは、①*in vitro* 小核試験の日本での受け入れ性、②*in vitro* 染色体異常試験の EU での受け入れ性(ヘアカラーを除く)、及び③EU における *in vivo* 小核試験を含む *in vivo* 試験の禁止(2009 年 3 月より)、であることが浮かび上がった。

5. 日本・EU の指針のギャップに関する議論

上で示した日・EU の遺伝毒性試験指針のギャップについて、分科会の議論を通じて得られた見通しを示す。ただし議論はもっぱら日本側の受け入れ性に関することを中心としたため、②の「*in vitro* 染色体異常試験の EU での受け入れ性」については特に議論されなかった。

①*in vitro* 小核試験の日本での受け入れ性

In vitro 小核試験は細胞に被験物質を処理した後、細胞中の染色体が損傷を受けた場合に細胞が分裂・増殖する過程で出現する小核を指標として被験物質の遺伝毒性を判定する手法であり、現在 OECD 化学品評価試験法ガイドライン化が進められている。

本試験については、日本の医薬品遺伝毒性試験ガイドラインのベースとなる ICH ガイドラインの改訂作業が現在進行中であり、ドラフトの段階ではあるが、ほ乳類動物細胞を用いる *in vitro* 遺伝毒性試験として、現行の *in vitro* マウスリンフォーマ TK 試験、*in vitro* 染色体異常試験に加え、本試験が組み入れられることが固まっている。薬事上の位置付けから、医薬部外品に要求される遺伝毒性試験は医薬品に準じることが決まっており、ICH での決定が医薬部外品にも適用されること

になる。ただし現時点(2009年12月)では、ICHの議論は Step 3(専門家会合での合意案についてパブリックコメントを求め、最終化する段階)にあり、ICH ガイドラインの改訂に基づく「医薬品遺伝毒性試験ガイドライン」の改訂時期は不透明である。

また現時点では *in vitro* 小核試験は適切な試験法ガイドラインが存在しないが、OECD ガイドラインの最終化に向けたドラフト版が参照でき、これまでの国内外の研究により *in vitro* 染色体異常試験との同等性はバリデーションされていることから、その旨を説明する理由書を添付すれば利用可能との結論を得た。つまり *in vitro* 小核試験も今後は医薬部外品申請に利用可能となり、試験法の技術的な面での障壁は特になくとも考えられる。

③EUにおける *in vivo* 小核試験を含む *in vivo* 試験の禁止

現行の遺伝毒性試験が *in vitro* 試験と *in vivo* 試験の組み合わせで評価することになっているのは、単一の試験で網羅的に化学物質の遺伝毒性を判断することが困難であることが背景にある。特にげっ歯類の発がん性試験データとの比較では *in vitro* 試験、特に、ほ乳類動物細胞を用いる *in vitro* 遺伝毒性試験(*in vitro* マウスリンフォーマ TK 試験、*in vitro* 染色体異常試験、*in vitro* 小核試験)の高い偽陽性率が問題となっており、*in vitro* 試験で陽性となった場合には、*in vivo* 試験での確認が重要となっている(1、2)。

しかしながら EU では2009年3月以降、新たに動物実験を実施した化粧品原料の欧州での販売が禁止されたため(反復投与毒性、催奇形性、トキシコキネティックスの分野は2013年まで猶予)、*in vivo* 試験による *in vitro* 試験陽性のフォローアップはできなくなっている。逆にICHでは遺伝毒性評価のための試験バッテリーにおいて、科学的観点から依然、*in vivo* 試験が重視されており、ICHの改訂案はむしろ *in vivo* 試験によりウエイトを置き、動物試験及び臨床試験を実施することを前提に評価する医薬品の特徴を生かしたバッテリーとなっている(図1)。

そのため、日本とEUで医薬部外品の遺伝毒性の評価・解釈が異なる可能性、また部外品申請のために *in vivo* 試験を実施した原料が欧州で使用・販売できない、などの混乱が起きることが懸念されるが、この点については、医薬部外品の遺伝毒性試験は医薬品に準じることが決まっており、医薬品の評価と切り離さない限りは、申請に用いるデータセットの考え方についてこれ以上の議論は分科会では困難であるということになった。

6. 展望

分科会での日・EU の遺伝毒性試験指針のギャップについての議論で、EU の化粧品原料に対する *in vivo* 試験の禁止が、医薬部外品の遺伝毒性評価に影響を与える可能性が懸念された。科学的観点からは *in vitro* 遺伝毒性試験の偽陽性率が高い現状では、*in vitro* 試験陽性のフォローアップとして *in vivo* 試験での確認は重要であり、制度面からも医薬部外品は医薬品に準じた評価をせざるを得ない。ただし *in vitro* 試験で問題のないことが確認できれば、特に *in vivo* 試験を要求しない運用も可能と考えられる。

ICHの改訂案においても *In vitro* 試験の偽陽性率の高さに対応すべく、特に *In vitro* ほ乳類細胞試験について、1)評価すべき最高用量を 10mM から 1mM に下げる、2)試験成立のための細胞

毒性の条件を緩和する、3)沈殿が生じる用量の評価を不要とする、案が示されている。これらの変更がどの程度偽陽性率の低減に寄与するかは現時点では不明だが、in vitro 試験による遺伝毒性の判断がより妥当なものになることが期待される。

欧州化粧品工業会(COLIPA)もEUでのin vivo 遺伝毒性試験禁止に懸念を抱いており、in vitro 試験で化粧品原料の遺伝毒性を判断するために、次の2つのアプローチから成る独自の取り組みを行っている。

A) 現行 in vitro 遺伝毒性試験プロトコールの見直し

B) 現行 in vitro 遺伝毒性試験陽性のフォローアップに活用できる新たな in vitro 試験の開発

A)としては、ICHでも議論されているように、適用用量の変更やより適切な(感受性が高すぎない)細胞種の選定、などを挙げられており、その判断材料として、まず真に検出されるべき遺伝毒性物質やそうでない(偽陽性を示しやすい)物質の選別が行われている(3)。

B)としては、化粧品が適用される部位の皮膚に着目し、各種3Dヒト皮膚モデルを活用した遺伝毒性試験の開発に取り組んでいる。評価指標は小核とコメットを念頭に置き、現在バリデーション作業が進行中である。2009年8月に開催された遺伝毒性試験の国際ワークショップ(IWGT: International Workshop on Genotoxicity Tests)では、3Dヒト皮膚モデルを用いた小核試験の検討状況が報告され、経皮適用する剤の評価に有望であるとの評価を得ている。

また米国ではヒトボランティアの臨床サンプルを用いて遺伝毒性を評価する動きもあり、in vivo 試験禁止を織り込んだ様々な取り組みが始まっている。日本もこの流れに関与し、薬用化粧品などの医薬部外品の遺伝毒性について、in vivo 試験に頼らない判断がどのような場合に可能か否か、立場を明確にしておくことが必要と考えられる。

7. 総括

医薬部外品申請において要求される遺伝毒性試験について、EUの化粧品に対する遺伝毒性試験ガイダンスとの違いについて状況を整理し、今後の方向性について議論した。

まずガイドラインの違いについては、日本の「医薬品遺伝毒性試験ガイドライン」はICHガイドラインに準拠し、in vitro 試験ではAmes試験とほ乳類動物細胞を用いるin vitro 染色体異常試験あるいはin vitro マウスリンフォーマTK試験を要求している。さらに動物(in vivo)試験としてin vivo 小核試験が要求される。

一方、EUのSCCP(現:SCCS)による「Notes of Guidance 6th version」では、Ames試験とほ乳類動物細胞を用いる、in vitro マウスリンフォーマTK試験及びin vitro 小核試験(ヘアカラーについては、in vitro 染色体異常試験でも可)が要求されている。In vivo 試験はこれらのin vitro 試験で陽性結果が得られた場合に適切な試験を選択し実施するという位置付けになっていたが、2009年3月からin vivo 遺伝毒性試験の実施がEUで禁止されたため、in vitro 試験のみでの判断が求められている。

このことから日・EUの相互データ受け入れの観点から問題となるのは、①日本ではin vitro 小核試験が認められていないこと、②EUでは(ヘアカラーについては認められているが)in vitro 染色

体異常試験が認められていないこと、と③ *in vivo* 小核試験を含む *in vivo* 実験が EU で禁止されることが挙げられた。

このうち①については、現在 ICH ガイドラインの改定が進められており、ほ乳類動物細胞を用いた試験の選択肢に *in vitro* 小核試験が加えられる予定であることから、日本での受け入れは今後問題とならないと考えられた。②については分科会では日本側の受け入れの議論が中心であったため、特に取り上げなかった。③については、現行の *in vitro* 遺伝毒性試験は偽陽性が多く、科学的な観点から依然、遺伝毒性の判断には *in vivo* 試験が重視されているのが実情で、ICH の改定案は *in vivo* 試験によりウエイトを置いた医薬品の特徴を生かしたバッテリーとなっている。医薬部外品の遺伝毒性試験は医薬品に準じることが決まっており、医薬品の評価と切り離さない限りは、申請に用いるデータセットの考え方についてこれ以上の議論は分科会では困難であるということになった。

ただ ICH でも *In vitro* 試験の偽陽性率の高さに対応すべく、最高適用量を見直すなどの変更が加えられており、改訂後は偽陽性が減少することが期待される。COLIPA 等においても、*in vivo* 試験禁止に対応し、化粧品原料について独自の *in vitro* 遺伝毒性評価アプローチを検討している。医薬部外品申請では、*in vitro* 試験で問題がないという確証が得られるのであれば、*in vivo* 試験を要求しない運用も可能と考えられる。そのため IWGT 等における国際的な専門家の議論を参照しつつ、日本で受け入れ可能なアプローチを見極めていく必要があると考えられた。

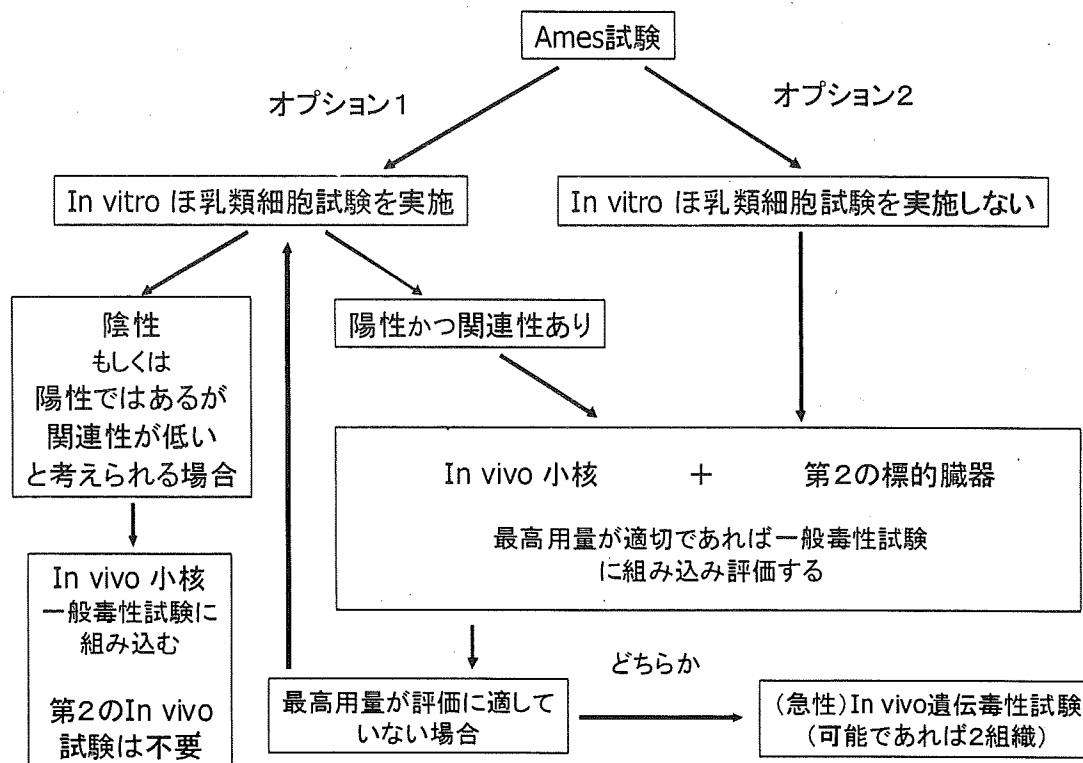
参考文献

- 1) Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L., Muller, L.: Evaluation of the ability of a battery of 3 *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I. Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mut. Res.* (2005) 584, 1-256.
- 2) Kirkland, D.J., Aardema, M., Banduhn, N., Carmicheal, P., Fautz, R., Meunier, J.-R, Pfuhler, S.: *In vitro* approaches to develop weight of evidence (WoE) and mode of action (MoA) discussions with positive *in vitro* genotoxicity results, *Mutagenesis.* (2007) 1-15.
- 3) Kirkland, D., Kasper, P., Muller, L., Corvi, R., Speit, G.: Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: A follow-up to an ECVAM workshop, *Mut. Res.* (2008) 99-108.

表1. 要求されている遺伝毒性試験の違い

Notes of Guidance 6 th version (SCCP)		医薬品遺伝毒性試験 ガイドライン(厚生労働省)
ヘアカラーを除く化粧品原料		1) 細菌を用いる遺伝子突然変異試験 2a) ほ乳類細胞を用いて細胞遺伝学的に 評価する in vitro 試験 2b) in vitro マウスリンフォーマTK試験 3) げっ歯類造血細胞を用いる染色体異常 検出のための in vivo 試験 + 上記の標準的組合せ試験に加えて、 オプションとして別の試験を実施できる
Stage 1	ー遺伝子損傷をみる試験ー 1) 細菌を用いる復帰突然変異試験 2) ほ乳類細胞を用いる in vitro 突然変異試験 ー染色体異常及び異数性をみる試験ー 1) in vitro 小核試験	
Stage 2	上記 in vitro 試験で陽性結果が得られた場合には適切 と考えられる in vivo 試験を実施。 (2009年3月以降は原則不可)	
ヘアカラー(酸化染料)		
基本的な 組合せ	1) 細菌を用いる復帰突然変異試験 2) ほ乳類細胞を用いた in vitro 突然変異試験 3a) in vitro 小核試験 3b) in vitro 染色体異常試験	
必要に応 じて追加	in vitro 不定期DNA合成(UDS)試験 in vitro SHE細胞形質転換試験 + 追加の試験が要求されることもある	

図1. 新しいICH遺伝毒性評価試験組合せ



1. 試験名

In vitro 経皮吸収試験

2. 検討委員会名簿

医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討委員会

皮膚透過・経皮吸収試験分科会

杉林堅次（城西大学）、藤井まき子（昭和薬科大学）、上月裕一（資生堂）、桑原裕史（カネボウ化粧品）、小島肇（国衛研）

3. 目的

化粧品や医薬部外品の安全性評価のために用いられている In vitro 経皮吸収試験について各種ガイドラインの比較を行い、信頼性や長短所等について議論し、採否の可否を検討する。

4. 検討した代替法の名称とその理由

OECD guideline for the testing of chemicals, skin absorption : in vitro method (2004)

SCCP opinion on basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients (2006)

Colipa regulatory, Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous absorption of cosmetic ingredients (1999)

いずれの評価法もガイドライン、ガイダンスとして公知のものであり、汎用性も高いために検討した。

5. 試験法の概要（手順など）

別紙 1 参照

6. 試験法として採用の可否

いずれの試験も科学的、倫理的にも評価するには十分である。但し、各試験の適用限界と実施する上での問題点を考慮する必要がある。

6-1 In vitro 経皮吸収試験の適用限界とガイドラインにそって実施する上での問題点

6-1-1 経皮吸収試験結果の具体的な利用法の記載

化粧品原料の経皮吸収試験の目的は、実使用条件においてヒト全身系に入る可能性がある被験物質の質のおよび（あるいは）量的な情報を得ることである。これらの量は、個々の物質についての反復投与毒性試験の無毒性量（NOAEL）とともに、安全係数（MOS、margin of safety）を算出する上で必要である（SCCP/0970/06）。

OECD TG 428 は記載なし。

化粧品成分の試験および安全性評価に関する SCCP ガイダンス第 6 版に記載されている、安全係数の求め方と注意点を以下に示す。

安全係数（Margin of Safety: MoS）

化粧品成分の安全性評価の最終段階であるリスクの評価では、不確実性の要因が適用される。化粧品の場合、この要因は安全係数（MoS）と呼ばれる。一般に、MoS は最小無影響量（無毒性量）（NO(A)EL）を、想定される化粧品成分の全身暴露量（Systemic Exposure Dosage: SED）で割ることによって計算できるとされている。

$$\text{安全係数 (MoS)} = \frac{\text{NO(A)EL}}{\text{SED}}$$

この MoS 値は試験動物群から平均的な人間へ、次に平均的な人間から感受性の高いグループへと外挿するのに用いられる。

一般に、ある物質が安全に使用できると宣言するためには MoS は 100 以上でなければならないとされている。

SED の計算は、予想される最高濃度に基づく一定時間の生体内利用性の絶対量（ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）に基づくことが望ましい。

SED の計算は経皮吸収率に基づいて行うこともできる。後者の場合、得られる数値は皮膚に適用される用量に依存する。この場合、評価する濃度が低いほど経皮吸収率は高くなる

可能性があることから、予想される最低濃度を含まなければならない。

OECD ガイドライン 428（経皮吸収：in vitro 法）に従い、in vitro 試験では、固体で通常 1~5 mg/cm²、液体で最高 10 µL/cm² というヒトへの暴露をシミュレートした適用量を使用しなければならない。

試験物質の適用量が 2 mg/cm² 未満の in vitro 試験は技術的に実施することは不可能であるが、通常皮膚に適用される化粧品量は実使用条件下で 1 mg/cm² に満たないことが経験から示されている。したがって、in vitro 試験では所期の使用条件を上回る量が適用され、試験用量の経皮吸収率%を SED の計算に使用すると、全身暴露量が過小評価されることになる。したがって、経皮吸収をパーセンテージで表す場合には、in vitro 試験から得られた吸収量も実使用条件下で適用した用量のパーセンテージで表す必要がある。これは実使用条件下で適用する製剤の既定量と、表に示す製品種類別の皮膚表面積（SSA）の既定値（6~2 項参照）の比によって推定することができる。

以上のように、化学物質の経皮吸収がどのように記載報告されているかによって、SED の計算方法には 2 種類あると結論づけられる。

6-1-2 In vitro 経皮吸収試験の適用限界

In vivo 条件下では、微少循環系（血管およびリンパ管）が皮膚から中央コンパートメントへ化合物を運んでいる（吸収、resorption）。In vitro の条件下では、その様な吸収は評価できない（SCCP/0970/06）。

表皮は絶えず増殖、分化、落屑を繰り返しており、一日当たり約一層分の角質細胞が取り除かれている。局所適用した場合、in vitro 試験における皮膚上、特に角層や毛嚢脂腺で検出された異物は、in vivo においては、それぞれ落屑あるいは皮脂分泌により取り除かれる。これらの過程は in vitro では再現できないので、in vitro での最終的な表皮（角層）レベルでの結果は、in vivo レベルと比較して高くなる（SCCP/0970/06）。

試験化合物が表皮へ不可逆的に結合することがあるが、これは in vivo においては皮膚表面の落屑によって除去される。この作用が示唆された場合には、別の試験により実証しなければならない（SCCP/0970/06）。

試験化合物は、拡散セルに装着された皮膚サンプルの上に、適切な製剤を用いて、適用されなければならない（SCCP/0970/06）。

単純溶媒系でなく製剤での実施が不可欠である。