

6-1-3 In vitro 経皮吸収試験の問題点

試験の原理

摘出した皮膚を用いた in vitro 経皮吸収試験の正当性は、表皮、特に角層が生体への異物の吸収や取り込みに対する重要なバリアーとなっているという事実に基づいている (SCCP/0970/06)。

問題点：水溶性化合物に関しては、角層がバリアー機能となることが知られているが、化粧品素材においては、油等の脂溶性化合物がかなり存在し、その場合には表皮がバリアー機能となるものと考えられる。従って、脂溶性化合物に関しては、摘出した皮膚を用いる正当な理由はないが、実際には、摘出した皮膚を用いた in vitro 経皮吸収試験が実施されている。

使用する皮膚

WHO は最適標準 (gold standard) としてヒト皮膚の使用を勧めている (SCCP/0970/06)。人間の皮膚が、明らかに最も良い選択であるが、いつも容易に利用可能であるというわけではない。代わりに、人間の皮膚と同様の透過の性質を有するブタ皮膚が使用されるかもしれない (SCCP/0970/06)。

ヒトあるいは動物の皮膚を用いることができる (OECD TG 428)。

被験物質が、in vivo においてかなりの量が皮膚代謝を受ける場合には、さらに検討が必要である。凍結皮膚を用いる場合には、代謝能が欠損している可能性があるため、被験物質の代謝が起こらないことや、あるいは代謝物の構造およびその経皮吸収性が正確にはわからないことに注意しなければならない。従って、凍結皮膚を用いた in vitro 実験は、皮膚中で代謝を受ける化合物の経皮吸収や、その代謝物についても正確な情報を与えないと考えられる (SCCP/0970/06)。

試験化合物の皮膚代謝が重要である場合には、新鮮な皮膚を使用しなければならない (SCCP/0970/06)。

問題点：日本でも最近、ヒト皮膚を安定的に供給できる体制が整いつつあり、試験計画と試験施設の倫理面が明確であれば、供給可能となった。しかしながら、その場合も空輸の関係で、凍結皮膚を用いる場合がほとんどである。従って、日本国内において、新鮮なヒト皮膚を用いて in vitro 経皮吸収試験を実施し、皮膚代謝まで明らかにすることは非常に難しいと考える。

使用可能な皮膚は、split-thickness (200~500 μm) または full-thickness (500~1000 μm) である [Sanco/222/2000]。ダーマトームで薄切された皮膚も使用することができる。皮膚厚は、文献に記載されている適切な方法で測定する。皮膚は実験用セルにあうように用意しなければならない (SCCP/0970/06)。

皮膚の厚さは、酵素、熱、化学処理により剥離した表皮、あるいはダーマトーム等で厚さ 200~400 μm に薄切した皮膚を用いる (OECD TG 428)。

問題点：ダーマトームで皮膚を厚さ 200~400 μm に薄切する技術は非常に難しく、かなりの熟練を要する。

表皮シートを使用する場合には、その理由が必要である。表皮膜はもろいことがあり、このモデルではマスバランス手法 (例：テープストリッピング) を適用することができない。表皮膜は、ヒトの *in vivo* 経皮吸収を過大評価する可能性があることも指摘されている (SCCP/0970/06)。

問題点：体毛は真皮側に存在する毛根から皮膚表面に伸びているため、剥離した表皮においては体毛の大きさの穴が貫通する。従って、その部分においては、化学物質は容易に通過するため、経皮吸収量を過大に評価する危険性がある。

分析

皮膚およびあるいはレシーバー溶液のサンプルは、液体シンチレーションカウンター、HPLC、GC、あるいは他の適当な方法の様に、適切にそしてバリデートされた方法を用いて、分析されなければならない。分析方法の感度、再現性、精度が証明されなければならない (SCCP/0970/06)。

問題点：Cold 分析を実施する場合には、分析方法のバリデーションが要求される。OECD ガイドラインには、バリデーションに関する記載は存在しない。バリデーションに関しては、FDA のガイドラインが存在し、通常、これに準拠して実施される。

FAD のガイドラインの項目は以下の通りである。

特異性(ブランク試料、n=6)

真度(3 濃度、n=5)

精度(3 濃度、n=5)

回収率(3 濃度)

検量線 (同じマトリクス)

定量下限

濃度レスポンス

安定性

凍結融解安定性 (3 回の凍結融解、低濃度と高濃度で各 n=3)

短期室温安定性 (低濃度と高濃度で各 n=3)

長期保存安定性 (低濃度と高濃度で各 n=3)

保存溶液安定性

測定実測試料中安定性

バリデーションの問題点として、OECDあるいはSCCPに項目の記載がないことから、FDAのガイドラインに準拠することになるが、その場合、上記の全項目を実施する事になり、金額面で、実施困難になる場合がある。

レセプター溶液

レセプター液の組成は、被験物質の拡散を妨げないよう選択する。例えば、試験条件下の被験物質のレセプター液中での溶解性および安定性は保証されなければならない。生理食塩液や緩衝生理食塩溶液は一般的に親水性化合物に用いられる。親油性物質に対しては、血清アルブミンまたは適当な可溶化剤/乳化剤を添加することができるが、その際皮膚状態(membrane integrity)を悪化させてはならない。レセプター液は分析操作にも妨害しないようにするべきである(SCCP/0970/06)。

問題点：化粧品素材においては、油等の脂溶性化合物がかなり存在し、その場合、生理食塩液では溶解しない。従って、古くから、*in vitro* 経皮吸収試験の報告は、多くが水溶性化合物である。一方、脂溶性化合物の報告も存在するが、その場合、レシーバー溶液に、可溶化剤/乳化剤として、ポリオキシエチレン(20)オレイルエーテルが用いられることが多い。しかしながら、この場合にも化合物の脂溶性によっては溶解性に限界がある。試験条件下の被験物質のレセプター液中での溶解性が、被験物質の拡散を妨げないよう選択すると述べられているが、これは暴露時間終了時の被験物質の透過量が、十分溶解可能な溶媒を選択することである。しかしながら、暴露時間終了時の被験物質の透過量は試験を実施しないとわからないので、実際に試験を実施して、被験物質の拡散を妨げないよう溶媒であるか否かを判断することは難しい。従って、脂溶性化合物の *in vitro* 経皮吸収試験に用いる事ができるレシーバー溶液のいくつかの記載が必要と考える。

原則としてレセプター液は、生理的 pH 値にするべきである。これに逸脱する場合には正当化する必要がある。例えば、OECD ガイドラインで提案されている 50/50 エタノール/水 を用いる場合には、それが皮膚 integrity には影響を及ぼさないことを示し、毒性学的関係書類に記載しなければならない。早期の採取時間で連続的な ND 値とならないようにするため、レセプター液量は最小限にしなければならない。

問題点：エタノールが5%以上含まれると、経皮吸収性に影響をおよぼすことが知られている。OECD ガイドラインで提案されている 50/50 エタノール/水は使用できないと考える。

レセプター液は、実験中の気泡の発生を抑えるため、脱気した溶液を用いて、試験期間中、非流出型拡散セルでは十分に攪拌し、流出型拡散セルでは絶えず液を流しておかなくてはならない。

問題点：レセプター溶液に、生理食塩水を用いる場合は、脱気することは可能であるが、脂溶性化合物で、レセプター溶液に溶化剤/乳化剤を添加する場合は、脱気すると泡立ち、

脱気することは非常に難しい。

レセプター溶液は、分析手法を妨げてはいけない。

試験システムを選択は研究報告書で正当化されるべきである。

レセプター溶液に透過した化合物の量は、吸収の過小評価を引き起こさないために、飽和レベルの 10%を超えるべきではない。

問題点：被験物質が油分の様な場合は、可溶化剤/乳化剤を用いても、その溶解性には限界がある。レセプター溶液に透過した化合物の量が、飽和レベルの 10%以下となると、油分の経皮吸収試験を実施することは非常に困難である。

皮膚の integrity

皮膚バリアーのチェック (=integrity) は試験に必須である。これは、指標となる化合物 (例：トリチウム水、カフェイン、スクロース) の透過を測定するか、もしくは物理的方法 (例：TEWL(Transepidermal Water Loss)、TER(Transcutaneous Electrical Resistance)) によって確認できる。得られたデータは試験報告書に記載しなければならない。

問題点：皮膚の integrity をチェックする方法としてトリチウム水を用いる場合が多い。日本の放射線障害予防規定においては、現在、国際基準に合わせる意味で、トリチウムは濃度で 1MBq/g、数量で 1GBq を下限値として、Radio Isotope(RI)としての取り扱いを免除することになっている。しかしながら、歴史的な背景から、日本の放射能に対する認識は欧米諸国とは異なる。従って、本規定が運用されることはほとんどなく、トリチウムを用いる場合は、施設の規定で、やはり、RI 実験となり、RI 施設で行うことが義務づけられる。従って、トリチウム水で皮膚の integrity をチェックした皮膚は、RI 施設から持ち出すことはできないことから、試験物質の透過性も RI 施設内で実施することになる。試験物質に放射性標識体を用いる場合は問題ないが、Cold の機器分析を実施する場合は、RI 室に分析機器を常設する必要がある。分析機器によっては、LC/MS/MS、ICP/MS 等、かなり高価なものがあるため、必ずしも RI 施設内に設置することが難しい現状である。これを避ける方法として、皮膚の integrity は $^3\text{H}_2\text{O}$ でチェックし、その皮膚とは別に、その近傍の皮膚を用いて、RI 施設外で試験化合物の試験を行い、Cold で機器分析を実施する方法がある。しかしながら、この様な方法は、ガイドラインに記載されておらず、その正当性に関しては不明である。OECD TG428 では $^3\text{H}_2\text{O}$ の使用を推奨している。

7. 総括

動物実験の3Rs (Replacement, Refinement, Replacemnet) の普及を受け^{1,2)}、欧米では化粧品規制や REACH に対応するため、動物実験代替法の利用が推奨されている。よって、欧米では安全性評価における経皮吸収試験や皮膚透過性は *in vitro* 試験が中心である³⁾。

本検討会においては各種、*in vitro* 試験法についての長短所を議論してきたが、いずれの試験も適用限界を理解し、実施する上での問題点を考慮しながら実施する必要がある。

但し、適用限界を理解した上で、ガイドラインやガイダンスに準拠した正しい試験で行った *in vitro* 試験から *in vivo* の結果を推定することが可能であると思われる。正しい方法というのは皮膚の選定、レセプター相の選定、皮膚代謝の有無、試験物質の物性等を十分に考慮することである。

本検討会で評価した3試験法はいずれも公知で、欧米では一般的に用いられている試験法であることを鑑みると、適用限界を十分に理解した上で評価すれば、化学物質のリスク評価および効能評価の一つの評価系として十分に活用できる。

1)動物の愛護及び管理に関する法律

http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend_law2/law.pdf

2)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

3)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, SEC82004, 1210

ガイドラインの比較 (in vitro 経皮吸収試験, 1/2)

Guideline	SCCP (2006.3)	OECD (TG428, 2004.4)	Colipa (1999)	
拡散セル	Flow through/Static cell (選択は化合物次第)	Flow through/Static cell (有限系：開放，無限系：閉塞)	チャンバー(ドナー，レセプター)で皮膚を挟んだもの。 セルの選択は薬剤による。	
レセプター液	親水性： 生食，緩衝生食液 脂溶性： アルブミン，可溶化剤/乳化剤の添加は可	・対象物質が溶解すること ・皮膚に影響を与えないこと ・代謝試験では皮膚能を維持すること	親水性： 生食液，緩衝生食液 脂溶性： アルブミン，可溶化剤を含む液	
皮膚膜	種	○ ヒト/ブタ，× げっ歯類 (△ 培養皮膚/再構成皮膚)	ヒト/動物 (ヒトの場合は倫理下で)	記載なし (Std protocol ではヒト，ブタ，ラット)
	部位	ヒト： 腹，脚，胸囲 ブタ： 腹，胸，背，側，耳	記載なし	記載なし
	皮膚厚	ヒト： ○ 200-500 μm △ 500-1,000 μm (表皮膜は過大評価の恐れ) ブタ： 500-1,000 μm でもOK	○ 表皮膜 (酵素/熱処理) /剥離皮膚 (200-400 μm) △ full-thickness skin × >1mm	○ whole, split-thickness (< 1 mm とすること)
Integrity test	必須： ³ H ₂ O, カフェイン，シヨ糖, TER, TEWL	必須： 方法については記載なし	必須： ³ H ₂ O, TEWL など	
被験物質	RI 体は大規模ロット (Cold体) とは若干異なる特徴を示す	RI ラベル化が理想的標準処方度で1 濃度以上	-	
適用量	固形/半固形： 2-5 mg/cm ² 液体： ~10 μL/cm ²	固形： 1-5 mg/cm ² 液体： ~10 μL/cm ²	実使用で (consumer use)	
n 数(/1サンプル)	> 6 (3ドナー×2 以上)	最低4	-	

ガイドラインの比較 (in vitro 経皮吸収試験, 2/2)

Guideline	SCCP (2006.3)	OECD (TG428, 2004.4)	Colipa (1999)
皮膚表面温度	32±1 °C	32±1 °C (湿度は 30-70 %)	30-32 °C
適用時間	24 時間 (越える場合は皮膚状態に注意)	・一般的には 24 時間 (対象物質の透過性による) ・適用途中でサブリックを実施 (透過率の推移を図示する)	24 時間
測定部位	・皮膚表面 ・角層 ・表皮 (角層を除く) ・真皮 ・レセプター液	・ドナーチャンバー ・皮膚表面 ・皮膚 ・レセプター液 場合によっては，塗布部位，塗布外部 (セル密着部位)，角層，表皮，真皮に分ける。	・皮膚表面 ・角層 ・表皮 (角層を除く) ・真皮 ・レセプター液
回収率	100±15 % (逸脱なら調査/説明)	RI 使用時の目標は，100±10 % (逸脱なら理由を記載)	100±15 %
算出値	絶対量 (μg/cm ²) 吸収率 (% of dose)	有限系の場合： 皮膚表面量，皮膚内量，レセプター液の速度および量あるいはパーセンテージ。 無限系の場合： 透過係数を算出，パーセンテージは必要ない。	絶対量 (μg/cm ²) 吸収率 (% of dose)

