

いて整理し、各段階における再発防止のための対策について検討した。医薬部外品の承認申請区分の変更、皮膚適用に係る医薬部外品安全性評価ガイドライン（仮称）作成、長期投与（安全性）試験の試験設定、使用上の注意の改正及び製造販売後調査ガイドラインについて新たな提言を行った。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

以前の申請区分	
区分 1	新有効成分
区分 2	前例あり
区分 2-2	新指定医薬部外品
区分 2-3	新範囲医薬部外品
区分 3	新添加物 剤形追加 等



新区分	
区分 1	新有効成分含有医薬部外品
区分 2-1	新効能医薬部外品
区分 2-2	新剤形医薬部外品
区分 2-3	新含量医薬部外品
区分 2-4	新配合医薬部外品
区分 2-5	新用法医薬部外品
区分 3	新添加物含有医薬部外品
区分 4	類似医薬部外品
区分 5-1	同一医薬部外品
区分 5-2	新指定医薬部外品
区分 5-3	新範囲医薬部外品

図 1. 医薬部外品の承認申請区分の変更

表 1. 医薬部外品の承認申請書に添付する資料の範囲

	イ			ロ			ハ			ニ											ホ					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2				
(1) 新有効成分 含有医薬部外品	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
(2)-1 新効能医 薬部外品	○	○	○	×	×	○	△	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△	○	○			
(2)-2 新剤形医 薬部外品	○	○	○	×	×	○	○	△	○	×	×	×	×	×	×	×	×	○	△	△	△	△	○			
(2)-3 新含量医 薬部外品	○	○	○	×	×	○	△	×	△	×	×	×	×	×	△	△	△	△	△	△	△	△	○			
(2)-4 新配合医 薬部外品	○	○	○	×	×	○	△	×	△	×	×	×	×	×	△	×	×	△	△	△	△	△	○			
(2)-5 新用法医 薬部外品	○	○	○	×	×	○	△	×	△	×	×	×	×	×	△	×	×	△	△	△	△	△	○			
(3) 新添加物含 有医薬部外品	製剤の添付資料は、該当する申請区分(1)(2)(4)又は(5)による。新添加物に関する添付資料は以下のとおり。																									
	○	○	○	○	○	○	△	△	○	○	△	○	△	△	○	○	○	△	○	×	×	×				
(4) 類似医薬部 外品	×	×	×	×	×	○	△	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
(5)-1 同一医薬 部外品	×	×	×	×	×	○	△	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
(5)-2 新指定医 薬部外品	×	×	×	×	×	○	△	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
(5)-3 新範囲医 薬部外品	×	×	×	×	×	○	△	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	

注) 右欄の記号及び番号は表 2 に規定する資料の記号及び番号を示し、原則として、○は添付を×は添付の不要を△は個々の医薬部外品により判断されることを意味するものとする。なお、×が付されている資料であっても、個々の品目の申請内容に応じて、添付が必要となる場合がある。

表 2. 医薬部外品の承認申請書に添付する資料の範囲

規則第 40 条第 1 項第 2 号で定める資料	左欄資料の範囲
イ 起原又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料	1 起原又は発見の経緯に関する資料 2 外国における使用状況に関する資料 3 特性及び他の医薬部外品との比較検討等に関する資料
ロ 物理的・化学的性質並びに規格及び試験方法等に関する資料	1 構造決定に関する資料 2 物理的・化学的性質等に関する資料 3 規格及び試験方法に関する資料
ハ 安定性に関する資料	1 長期保存試験に関する資料 2 苛酷試験に関する資料 3 加速試験に関する資料
ニ 安全性に関する資料	1 単回投与毒性に関する資料 2 反復投与毒性に関する資料 3 遺伝毒性に関する資料 4 がん原性に関する資料 5 生殖発生毒性に関する資料 6 局所刺激性に関する資料 7 皮膚感作性に関する資料 8 光安全性に関する資料 9 吸収・分布・代謝・排泄に関する資料 10 ヒトパッチテストに関する資料 11 ヒトにおける長期投与（安全性）試験に関する資料
ホ 効能又は効果に関する資料	1 効能又は効果を裏付ける基礎試験に関する資料 2 ヒトにおける使用成績に関する資料

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
塩見真理子、 青山裕美、 岩月啓氏	ロドデノール誘発性脱色素斑 Rhododenol-induced leukoderma の臨床	皮膚病診療	36	590-595	2014
杉林堅次、 藤井まき子、 藤堂浩明	<i>In vitro</i> 経皮吸収試験 (<i>In vitro</i> 皮膚透過試験) 評価報告書	AATEX-JaCVAM	3(2)	55-62	2014

IV. 研究成果の刊行物・別刷



ロドデノール誘発性脱色素斑 Rhododenol induced-leukodermaの臨床

塩見真理子* 青山 裕美* 岩月 啓氏*

Key words

ロドデノール誘発性脱色素斑, 化学白斑

はじめに

近年、ロドデノール(以後、RD)を含有した薬用化粧品の使用者に白斑患者が多発し、2013年7月より製造販売業者による自主回収が行われたことは記憶に新しい。RD誘発性脱色素斑とはRD含有化粧品を使用後、主に使用部位に生じるさまざまな程度の脱色素斑のことであり、使用中止により徐々に色素再生がみられることが多い。われわれは2013年にRD含有化粧品を使用した2人に白斑様の色素脱失が生じたことを報告した¹⁾。

本邦におけるRD誘発性脱色素斑の患者数は2014年2月25日時点で18,312人、RD含有化粧品のこれまでの使用者は、推計約34万人とされている(製造販売業者発表)。正確な割合は不明であるが上記の数字よりRD含有化粧品使用者での発症率は約5.4%と推定される。「RD含有化粧品の安全性に関する特別委員会(以後、特別委員会)」が日本皮膚科学会に設置され調査を行っている。

I. 症状

化粧品使用後に続発するものであるため、主として顔面、頸、手、前腕に不整形の点状脱色素斑として始まる。これらは拡大、融合して大小不同の脱色素斑となるが、その間に島嶼状に正常皮膚部が残存し、とくに毛孔を中心とした点状に残ることがある。この症状は毛包からの色素再生の可能性もある(図1, 2)。また、患部の毛髪はまれに

淡色化することがあるが大部分の症例では正常色を呈する。

上記の好発部位のほかに、まれではあるが塗布したとは考えにくい軀幹部、被髪頭部などにも発生することもある。これら異所性発生を示す症例の病態は尋常性白斑を合併している可能性があり、その病態が興味深い。

臨床症状は脱色素斑が主症状で、完全脱色素斑や不完全脱色素斑を呈する。完全脱色素斑とは、ほぼ完全にメラニン色素が消失し、それ以上、色素消失がみられない脱色素斑をいう。不完全脱色素斑とは健常部に比べてメラニン色素の低下を認めるが、完全には消失していない脱色素斑を指す。診療の手引きでは、両者の区別は視診で行い、混在している、連続している、時期によって変動すると明記されている²⁾。実際、部位によって完全脱色素斑が主体であったり不完全脱色素斑が主体である症例、初診時は完全脱色素斑であってもものに不完全脱色素斑が主体になる症例もある。また、肉眼的に完全脱色素斑であってもダーモスコピーで観察すると小さなモザイク状に淡褐色斑が混在するケースもあり、診断に迷うので視診で判定する。完全・不完全脱色素斑の占める割合により病型分類されている。1つは、完全脱色素斑を主とする病型で完全脱色素斑のみ、もしくは完全脱色素斑が脱色素斑面積全体のうち6割以上を占める(図3)。第2には完全脱色素斑と不完全脱色素斑

*Shiomi, Mariko/Aoyama, Yumi(准教授)/Iwatsuki, Keiji(教授) 岡山大学医学部皮膚科学教室(〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1)



図1 不整形, 大小不同の脱色素斑

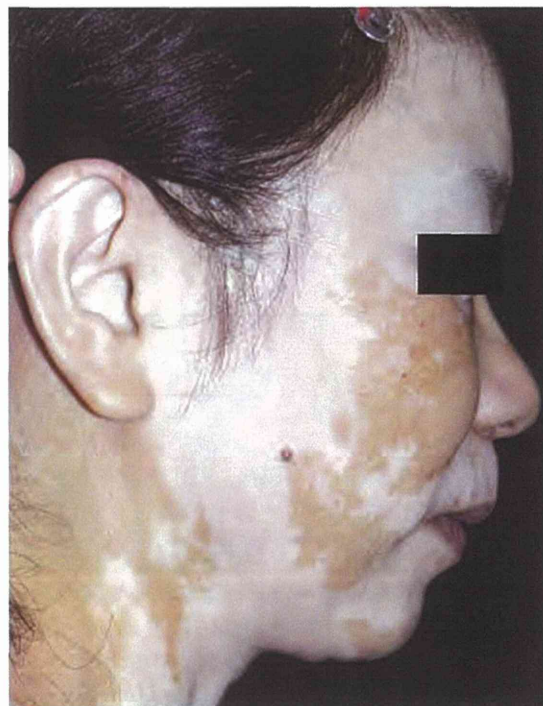


図3 完全脱色素斑

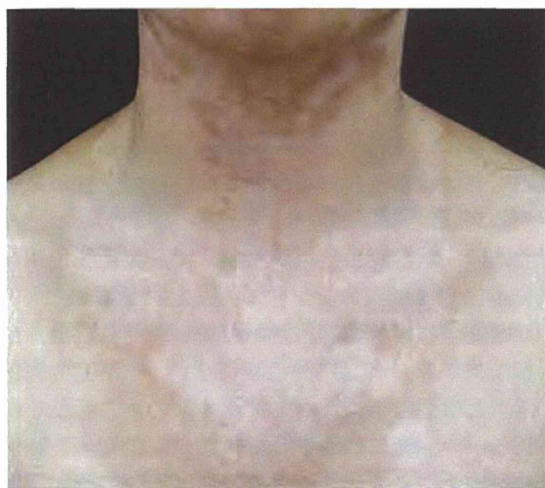


図2 化粧品塗布部に一致した脱色素斑

がほぼ同じ割合で混在するものである。第3は不完全脱色素斑を主とする病型で不完全脱色素斑のみ、もしくは不完全脱色素斑が脱色素斑面積全体のうち6割以上を占めるものである(図4)。また、色素脱失のみならず、脱色素斑の周囲の皮膚に種々の程度に褐色の色素増強を来すことがしばしばある(図5)。この色素増強は化粧品の使用中止後に悪化し、時間経過とともに元の色調に戻っていく症例が多く観察される。

RD誘発性脱色素斑と診断するためにはRD含有化粧品の使用歴があることに加え、RD含有化粧品を使用する前には脱色素斑がなく、使用後に、使用した部位におおむね一致して脱色素斑が生じ

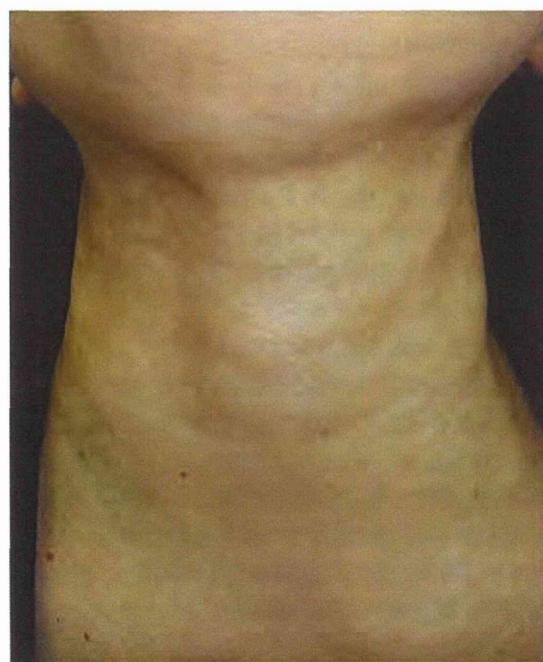


図4 不完全脱色素斑

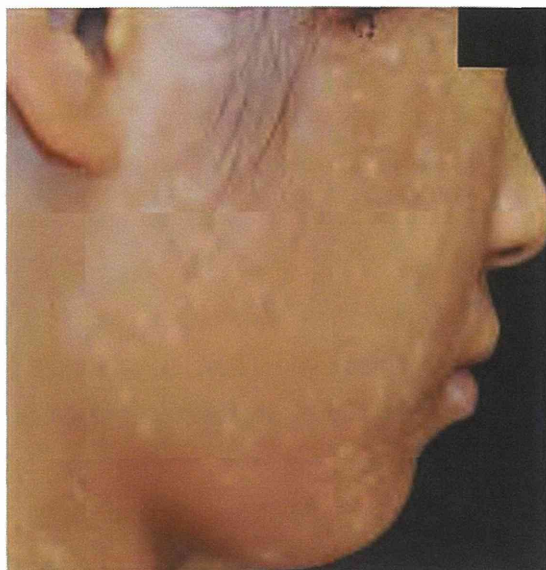


図5 脱色素斑周囲の皮膚色が以前よりも褐色調になった症例

たという病歴に加え、RD含有化粧品使用中により脱色素斑の拡大が停止する、またはRD含有化粧品使用中により脱色素斑の少なくとも一部に色素が再生することを確認する(表)²⁾。とくに完全脱色素斑優位型では臨床症状が尋常性白斑と類似しており、鑑別が問題になる。分節型のような特異的な配列の場合は容易に区別できるが、汎発型ではほとんど区別できない。RD含有化粧品使用歴のない白斑症例でも初期には不完全脱色素斑で発症したり、炎症を伴うこともあり区別できない症例が実に多い。詳細な問診と経時的な皮疹の観察が診断には不可欠である。

RD誘発性脱色素斑はすべての年代におこりうる。当科症例では最低年齢24歳から最高年齢88歳まであり、平均年齢は55.3歳であった。性別は化粧品を使用後に発症する特性上、ほとんどが女性である。RD化粧品の使用開始から脱色素斑を発症するまでの期間はわずか1カ月のものから3年以上に及ぶ例もありいろいろであるが多くの1~2年の使用期間を経て発症している。

II. 病理

病理組織所見はH-E染色ではメラノサイトの減少と消失、基底層部でのメラニン色素の著しい減少、消失が主で、その他真皮浅層に軽度のリンパ球浸潤、血管拡張、浮腫、メラノファージがみられる(図6)。毛包漏斗部にリンパ球浸潤がみられることが多い。

とくに脱色素斑部ではメラノサイトは消失し、真皮にメラノファージが散見される(図7, 8)。色素沈着部では、表皮基底細胞層のメラニンが増加しメラノサイト数には異常がないことが多い。真皮にメラノファージが散見され、メラノファージの有無はRD脱色素斑の特異的な所見ではない。これらの所見は、RD含有化粧品使用歴のない尋常性白斑患者にも共通してみられ、H-E標本で両者を区別することは困難である。

III. 発生病態

4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール：RDは、フェノール環をもつメラニン生成抑制剤の一種である(図9)。RDの原料となる4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール：ラズベリーケトン：ラズベリーケトンは香料として広く使用されている物質で、ラズベリーケトン製造工場において色素脱失をきたした症例が報告されている³⁾。ラズベリーケトンは香りが強いため化粧品の主成分には不向きであったので、その誘導体であるRDがメラニン色素抑制剤として開発された。

RDにはチロシナーゼ蛋白質の分解を促進することによるチロシナーゼ活性阻害作用があり、そのため高いメラニン生成抑制効果を示すと考えられている⁴⁾。

メラニンの生成は、アミノ酸の1つであるチロシンから出発する。チロシンはチロシナーゼによって、ドーパ、次いでドーパからドーパキノンへと変換する。ドーパキノンの代謝産物は互いに重合してメラニンポリマーとなり黒色を呈するユーメラニンとなる。一方、黄色を呈するフェオメラニンはドーパキノンが、非酵素的にシステインと結合してシステイニルドーパとなり、それが重合

表 ロドデノール誘発性脱色素斑 医療者(皮膚科医)向けの診療の手引き(日本皮膚科学会 ロドデノール含有化粧品
の安全性に関する特別委員会2013年12月12日作成 (Ver.6))

別紙2 疾患概念と診断基準, 臨床分類

【疾患概念】

ロドデノール誘発性脱色素斑 Rhododenol induced-leukodermaとはロドデノール含有化粧品を使用後, 主に使用部位に生じるさまざまな程度の脱色素斑. 使用中止により一部あるいは全体に色素再生がみられることが多い.

【診断基準】

必須項目

1. ロドデノール含有化粧品を使用していた.
注)患者申告 購入履歴 回収記録を根拠に判断する.
2. ロドデノール含有化粧品を使用する前には脱色素斑がなく, 使用後, 使用した部位におおむね一致して生じた完全ないし不完全脱色素斑がある.

小項目

1. 使用中止により(必須項目2. の)脱色素斑の拡大が使用中止後およそ1か月以内に停止した.
2. 使用中により(必須項目2. の)脱色素斑の少なくとも一部に色素が再生した.
注)写真や診療録, ダーモスコピー所見などの記録を参照し, 医師が視診により重症度判定基準を用いて判定する.

参考項目

1. 脱色素斑出現前に紅斑などの炎症症状の先行をみる場合がある.
2. 脱色素斑の程度は一様ではなくむらがあり, 辺縁不整の場合が多い.
3. 複数のロドデノール含有化粧品を併用した場合や繰り返し塗布した部位に発症しやすい.

除外診断

Vogt-小柳-原田病, サットン母斑, 感染症(痛風, 梅毒, Hansen病, HIV)に伴う白斑, 単純性枇糠疹, 老人性白斑, 尋常性白斑, 他の原因による炎症後脱色素斑, 薬剤性の白斑黒皮症, 職業性白斑, まだら症, Waardenburg症候群, 結節性硬化症などの先天性色素異常症などを除外する.

判定

必須項目2項目と小項目の少なくとも1項目を満たす場合は確実例とする.
必須項目2項目を満たすが, 小項目の1, 2ともに満たさない場合はその時点では疑い例とする.
疑い例については引き続き注意深く色素再生の有無を経過観察することが望ましい.
注)このような症例には, 尋常性白斑の合併例, 誘発例が含まれる可能性がある. しかし, 臨床像および病理学的所見から尋常性白斑とロドデノール誘発性脱色素斑を鑑別することは困難な場合があり, 診断には細心の注意が必要である.

【臨床分類】

- ①完全脱色素斑優位型
完全脱色素斑のみ, もしくは完全脱色素斑優位(脱色素斑面積全体のうち6割以上が完全脱色素斑)
- ②完全・不完全脱色素斑混合型
完全脱色素斑と不完全脱色素斑優位がほぼ同じ割合で混在する
- ③不完全脱色素斑優位型
不完全脱色素斑のみ, もしくは不完全脱色素斑(脱色素斑面積全体のうち6割以上が不完全脱色素斑)

したものである⁵⁾.

RDはチロシンに類似した構造をもち, チロシナーゼの活性中心に結合する. そのためチロシンがチロシナーゼによりメラニン生合成系に入る経路を拮抗阻害し, メラニン生成反応を抑制する.メラノーマ細胞を用いたメラニン生成抑制を検討

した結果より, RDのIC₅₀は5.0 μg/mlで, 他のメラニン生成抑制剤アルブチン(55 μg/ml)やコウジ酸(120 μg/ml)に比べてと低い濃度でメラニン生成を抑制できることがわかる. さらにRDは, チロシナーゼの分解を促進する. これらの作用は可逆性で, 化粧品の使用を中止すればチロシナーゼ拮

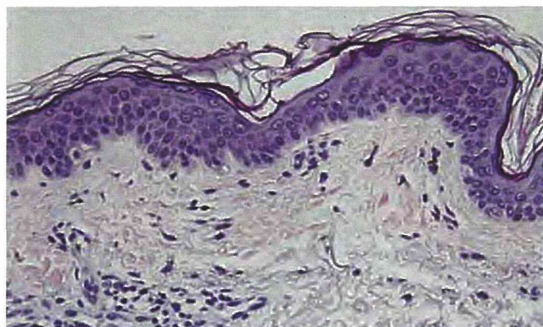


図6 明細胞の減少，真皮浅層血管周囲の軽度のリンパ球浸潤(H-E染色，×40)

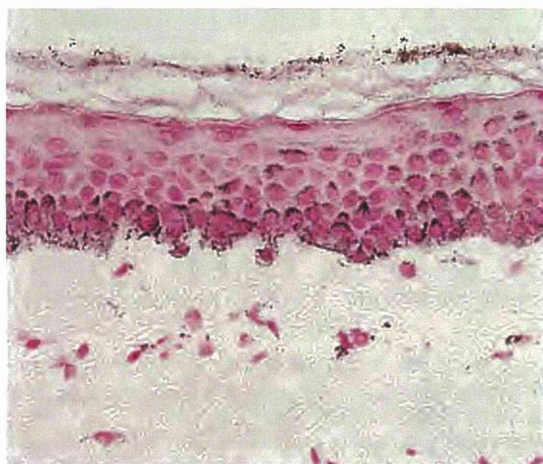


図7 正常部. 基底層部にメラノサイトを認める (Fontana-Masson染色，×40).

抗阻害作用によるRDによるメラニン産生抑制作用は消失すると考えられている。さらに本事例の発生後に原因究明の一貫として検討された一連の研究結果から，RDはチロシナーゼの基質となり代謝された結果生じる代謝産物がメラノサイトに対する細胞毒性を有し，その毒性はチロシナーゼ活性依存性であることが明らかになりつつある。臨床症例で白斑部のメラノサイトが減少していることを考え合わせるとRDにより患者皮膚のメラノサイトの細胞障害が誘導されていると考察できる。日本皮膚科学会RD含有化粧品安全性に関する特別委員会による一次調査票のまとめでは，2011年から2013年の月別発症例数が7月，8月で増

594



図8 脱色素斑部. 病変部ではメラノサイトは認めない (Fontana-Masson染色，×40).

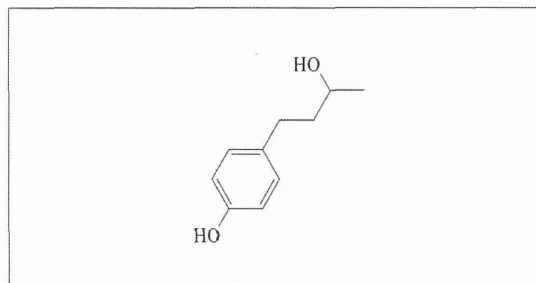


図9 4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール：ロドデノールの構造式

加していた。その理由として製品の使用頻度が高まる以外に，紫外線量が増える夏季はメラノサイトのチロシナーゼ活性が高くなっているため細胞毒性を有するRD代謝産物がより多く生成され，メラノサイトが障害され，結果として白斑が生じやすかったと考えられる。

またRD脱色素斑症例の病変部の表皮付近や毛包漏斗部に，尋常性白斑と同様のCD4陽性T細胞や，CD8陽性T細胞の浸潤が観察される。これはRD，またその代謝産物に反応するT細胞がメラノサイトを攻撃することでメラノサイトのアポトーシスを誘導した可能性も考えられる。個体間でRDやその代謝産物からのストレスに対するメラノサイトの防御能力に差があるために，RD化粧品使用者のうち一部にのみ脱色素斑が生じたので

はないかと推察される。

脱色素斑の発生には掻痒，発赤等の炎症症状が先行することがあるが，炎症症状を認めないことも少なくない。自験例では炎症症状の先行を認めたものは41% (75例中31例)であった。

パッチテストで使用したRD含有化粧品や2% RDで陽性反応が出ることがある。特別委員会が行ったパイロット調査では2% RDでの全体の陽性率は17.5%であった(103例中18例で陽性)。このうち炎症症状があった症例でのパッチテスト陽性率は23% (61人中14例)であり，炎症症状のない症例での陽性率は10.8% (37例中4例)であった。疫学的なデータからは感作が成立していることと臨床症状の重症度には関連はなく，白斑形成機序における抗原特異的T細胞の直接的な関与は低いと考えられる。むしろ皮膚炎を生じた症例ではバリアが低下するのでRDの組織移行が二次的に促進された可能性がありうる。

本症がRDまたはその代謝産物の化学的または薬理学的作用により発症していることは疑いの余地がないが，自験例では95例中8例でRD塗布部位ではない遠隔部位にも白斑がみられ，2例で進行性の白斑がみられる症例があった。いずれも顔面の脱色素斑は典型的で使用中で回復しているのでRD脱色素斑に尋常性白斑を誘導した可能性がある。RDによるメラノサイトの細胞障害によりT

細胞による自己免疫性の誘導が示唆され大変興味深い。

IV. 治療

RD誘発性脱色素斑はRD含有化粧品使用中後数カ月で回復を認めることが多い。自験例では78.9% (38例中30例)で中止後平均4.4カ月後には脱色素斑面積が軽快していた。このように自然軽快することが多いため，特別委員会では当該化粧品を中止したうえで遮光をしっかりと行い，無治療で経過観察をすることを第一選択としている¹⁾。特別委員会委員ならびに協力委員の施設における二次調査の結果，当該化粧品中止以外の治療法として，ステロイド，ビタミンD₃，タクロリムスなどの外用療法，ビタミンC，ビタミンE，トラネキサム酸，抗アレルギー薬などの内服治療，紫外線治療などがあったが，個々の症例における治療効果はさまざまであり，有効性の評価は今後の検討課題である。

<文 献>-----

- 1) 塩見真理子ほか：姫路赤十字病院誌 37：5，2013
- 2) 日本皮膚科学会 ロドデノール含有化粧品の安全性に関する特別委員会：日皮会誌 124：285，2014
- 3) Fukuda, Y. et al. : J Occupa Health 40, 118, 1998
- 4) 佐々木 稔ほか：フレグランスジャーナル 39：37，2011
- 5) 富田 靖ほか：標準皮膚科学 第10版. 医学書院，東京，p.13, 2013

*In vitro*経皮吸収試験 (*In vitro*皮膚透過試験) 評価報告書

杉林 堅次¹, 藤井 まき子², 藤堂 浩明¹

¹城西大学, ²昭和薬科大学

***In vitro*経皮吸収試験 (*In vitro*皮膚透過試験) 評価報告書**

杉林 堅次¹, 藤井 まき子², 藤堂 浩明¹

¹城西大学, ²昭和薬科大学

要旨

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。本委員会においては各種 *in vitro* 皮膚透過試験法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ことを提言したい。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* 試験結果から *in vivo* 挙動を推定することは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したものである。

本委員会で評価した 4 資料がいずれも公知で、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 *in vitro* 試験結果を評価すれば、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。

Evaluation report on *the in vitro* skin absorption tests

Kenji Sugibayashi¹, Makiko Fujii², Hiroaki Todo¹

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University

²Showa Pharmaceutical University

Summary

In vitro skin absorption tests are used primarily in Europe and the Americas for assessing the safety of chemicals for transdermal absorption and skin permeability. A JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) editorial committee on the skin absorption assessment discussed the advantages and disadvantages of several methods of *in vitro* skin absorption tests and concluded that these tests should be applied only after understanding the limits of their application and giving proper consideration to problematic points of testing. The committee concluded that it is possible to predict *in vivo* profiles from *in vitro* results that are performed with a proper understanding of the limits of applicability and in strict accordance with applicable guidelines and guidance. The expression “strict accordance” refers to having a thorough understanding of all test parameters, including selection of skin for testing, selection of receptors, recognizing the presence or absence of dermal metabolism, and the properties of test chemicals.

The four documents that we evaluated during this study meeting are well-known and these test methods are generally used in both Europe and the Americas. Thus, *in vitro* skin absorption testing is a useful method for assessing the risks and the efficacy of chemicals, when used with a understanding its limitations.

1. 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 (*in vitro* 皮膚透過試験)に関する各種ガイドラインを比較し、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。

2. 検討した資料の名称とその理由

・SCCP (Scientific Committee on Consumer Safety) opinion on basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients (2006)¹⁾.

・OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) test guideline for the testing of chemicals, TG428, skin absorption: *In vitro* method (2004)²⁾.

・Colipa (European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association) regulatory, Guidelines for percutaneous absorption / penetration (1997)³⁾.

・WHO (World Health Organization), Environmental Health Criteria 235, Dermal Absorption (2006)⁴⁾.

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。

3. 試験法の概要(手順など)

表1参照

4. 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。

4-1 *In vitro* 経皮吸収試験 (*in vitro* 皮膚透過試験)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

4-1-1 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循環系に入る可能性がある被験物質の質的および(あるいは)量的な情報を得ることである。特に後者は、個々の物質についての反復投与毒性試験の無毒性量 (NOEL: No observable adverse

effect level)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)¹⁾。

OECD TG 428²⁾ 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⁵⁾に記載されている安全係数の求め方と注意点を表2に示す。

4-1-2 *In vitro* 経皮吸収試験 (*in vitro* 皮膚透過試験)の適用限界

In vivo 条件下では、微小循環系(血管およびリンパ管)が化合物を皮膚組織から体循環コンパートメントへ運んでいる(吸収、absorption)。*In vitro* の条件下では、そのような吸収過程は評価できない (SCCP/0970/06)¹⁾。

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層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。*In vitro* ではこれらの過程を再現できないので、*in vitro* 系での最終的な表皮(角層)中濃度は、*in vivo* レベルと比較して高くなる (SCCP/0970/06)¹⁾。

試験化合物が表皮の組織に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。この現象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)¹⁾。

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)¹⁾。単純溶媒系でなく製剤での実施が不可欠である。

表 1-1 ガイドラインの比較 (in vitro 経皮吸収試験)

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, ショ糖, 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	-

表 1-2 ガイドラインの比較 (in vitro 経皮吸収試験)

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) ・適用途中でサフ'リック'を実施 (透過プロファイルを図示する)	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)

表 2 安全係数 (Margin of Safety: MOS) ⁵⁾

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) で除すことによって

$$\text{MOS} = \frac{\text{NO(A)EL}}{\text{SED}}$$

として計算できる。MOS 値は試験動物群から平均的なヒトへ、次に平均的なヒト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物学的利用能の絶対量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) に基づくことが望ましいが、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。このとき、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 428⁷⁾ (経皮吸収: *in vitro* 法) に従い、*in vitro* 試験では、固体で通常 1~5 mg/cm^2 、液体で最高 10 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 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/cm^2 未満の *in vitro* 試験を実施することは技術的に不可能であるが、通常皮膚に適用される化粧品量は実使用条件下で 1 mg/cm^2 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* 試験では実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。

4-1-3 In vitro 経皮吸収試験 (in vitro 皮膚透過試験)の問題点

1) 試験の原理

摘出した皮膚を用いた *in vitro* 経皮吸収試験 (*in vitro* 皮膚透過試験) 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主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)¹⁾。

問題点: 水溶性化合物の皮膚透過性については角層が主バリアーとなることが知られている。しかし、化粧品素材においては油剤等の脂溶性化合物がかなりの数存在し、それらの皮膚透過性には角層だけでなくそれ以下の表皮や真皮もまたバリアーとなると考えられる。したがって、角層以下の層のバリアー能の寄与が高い物質の *in vitro* 経皮吸収試験 (*in vitro* 皮膚透過試験) には特に注意が必要である。

2) 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⁴⁾。もちろん、ヒト皮膚が経皮吸収試験に最も適した試料であるが、それらはいつも容易に入手できるとは限らない。そこで、代わりにヒト皮膚と同様の透過性を示すブタ皮膚が使用されることもある (SCCP/0970/06)¹⁾。ヒト、ブタまたはラット皮膚を用いることができる (COLIPA)³⁾。ヒトあるいは動物の皮膚を用いることができる (OECD TG 428)²⁾。

In vivo 試験において被験物質がかなりの程度で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も注意しなければならない。したがって、凍結皮膚を用いた *in vitro* 実験では、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)¹⁾。

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)¹⁾。

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。したがって、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 (*in vitro* 皮膚透過試験) を実施し、皮膚代謝まで明らかにすることは現段階で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)⁶⁾。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)¹⁾。

試験皮膚には、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 に薄切したものをを用いる (OECD TG 428)²⁾。

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。表皮膜の使用は、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)¹⁾。

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毛穴が貫通している。毛穴を通して化学物質が通過する可能性もあるため、経皮吸収量を過大に評価する危険性がある。

3) 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で、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)¹⁾。

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、表 3 に示すように U.S. FDA (Food and Drug Administration) のガイドラインが存在し⁷⁾、通常、これに準拠して実施される。FDA のガイドラインの項目は表 3 に示す通りである。

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ことになり、金額面で、実施困難になる場合がある。

表 3 U.S. FDA のガイドライン

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

4) 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。生理食塩液や等張緩衝液が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べきである (SCCP/0970/06)¹⁾。

問題点: 化粧品素材においては、油剤等の脂溶性化合物がかなりの数存在し、その場合、生理食塩液では溶解しない。したがって、古くから、極めて脂溶性の高い化合物の *in vitro* 経皮吸収試験 (*in vitro* 皮膚透過試験) はほとんど報告されていない。一方、数は少ないものの、脂溶性化合物を用いた試験では、レセプター溶液に可溶化剤/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⁴⁾。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、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溶媒であるか否かを判断することは難しい。したがって、脂溶性化合物の *in vitro* 経皮吸収試験 (*in vitro* 皮膚透過試験) に用いることができるレセプタ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、WHO 235⁴⁾ 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及ぼすことが知られている。WHO 235⁴⁾ 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。

レセプター液には、実験中の気泡の発生を抑えるため脱気した溶液を用いる。また、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、生理食塩液を用いる場合は、脱気することは可能であるが、脂溶性化合物で、レセプター溶液に可溶化剤/乳化剤を添加する場合は、脱気すると泡立つため、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。試験システムの選択は研究報告書で正当化されるべきである。また、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。

5) 皮膚バリアーのチェック(integrity)

皮膚の 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)の皮膚透過性を測定するか、もしくは物理的方法(例:TEWL(Transepidermal Water Loss)、TER(Transcutaneous Electrical Resistance)によって確認する。また、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、RI(Radio Isotope)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。したがって、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。また、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 はトリチウム水でチェックし、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 TG428²⁾ではトリチウム水の使用を推奨している。

5. 結論

動物実験の 3Rs (Reduction、Refinement、Replacement)の普及を受け^{8,9)}、欧米では化粧品規制や REACH(Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals、リーチ法)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¹⁰⁾。

本委員会においては各種、*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* 試験結果から *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したものである。

本委員会で評価した 4 資料はいずれも公知で、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。