

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、それらはいつて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、このような方法は、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ドライン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。

6. 参考文献

- 1) SCCP/0970/06 Opinion on basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients (2006)
- 2) OECD Guideline for the testing of chemicals. 428, skin absorption: *In vitro* method (2004)
- 3) Colipa regulatory, Guidelines for percutaneous absorption/penetration (1997)
- 4) WHO, Environmental Health Criteria 235, Dermal Absorption (2006)
- 5) SCCP The sccp's notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation 6th revision
- 6) Sanco/222/2000 rev. 7, Guidance document on dermal absorption (2004)
- 7) Food and Drug Administration, Guidance for industry: Bioanalytical method validation (2001).
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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

