

「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報告」

皮膚透過性・経皮吸収試験分科会報告

上月 裕一¹, 杉林 堅次², 藤井 まき子³, 桑原 裕史⁴, 小島 肇⁵

¹ 資生堂, ² 城西大学, ³ 昭和薬科大学, ⁴ カネボウ化粧品,

⁵ 国立医薬品食品衛生研究所

吸収・分布・代謝・排泄に関する資料

- ・新規有効成分
- ・ポジティブリスト

- ・実施用時の適用経路が経皮のものについては，原則，経皮吸収についての資料が必要



In vivo 経皮吸収試験

- ・必要に応じて分布・代謝・排泄
経皮吸収が認められる場合
安全係数があまり大きくない場合
- ・必要な場合は蓄積性
毒性が送れて発現する場合

$$\text{安全係数} = \frac{\text{無毒性量}}{\text{全身暴露量}}$$

*In vivo*経皮吸収試験と*In vitro*皮膚透過試験

I n v i v o

経皮吸収試験

- ・ より現実に近い
 - ・ 血流
 - ・ 分布, 代謝, 排泄
- ・ 吸収量が少なく, 定量限界以下

I n v i t r o

皮膚透過試験

- ・ 生理的条件ではない
- ・ 条件をコントロールしやすい

分科会の目的

・*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、申請資料に採否の可否を検討する。

検討した代替法

- ・OECD guideline for the testing of chemicals, skin absorption : *in vitro* method (2004): **OECD TG428**
- ・SCCP opinion on basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients (2006): **SCCP/0970/06**
- ・Colipa regulatory, Test guidelines for *in vitro* assessment of dermal absorption and percutaneous absorption of cosmetic ingredients (1999): **Colipa TG**

選択理由

・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。

In vitro 経皮吸収試験概要(1/3)

皮膚を拡散セルに装着

- ヒト皮膚
- ブタ皮膚
- 動物皮膚



皮膚のintegrity(角層のダメージ)をチェック

- $^3\text{H}_2\text{O}$ の透過性
- 標準化合物(カフェイン, スクロース)
- Transepidermal Water Loss(TEWL)
- Transcutaneous Electrical Resistance(TER)



被験物質の適用

- 固体: $1 \sim 5 \text{ mg/cm}^2$
- 液体: $10 \mu\text{L/cm}^2$ 以下



In vitro 経皮吸収試験概要(2/3)

経時的にレセプター溶液の採取

- ・タイムコースの把握



24時間適用終了時後に試料の採取

- ・塗布部拭取
- ・角層
- ・表皮
- ・真皮
- ・レセプター液



被験物質の定量

- ・RI
- ・HPLC(/MS)
- ・GC(/MS)



In vitro 経皮吸収試験概要(3/3)

データ解析

- ・試料から被験物質の適度な回収率で試験成立
塗布部拭取＋角層＋表皮＋真皮＋レセプター液
＝ $100 \pm 15\%$
- ・経皮吸収性＝表皮残存量＋真皮残存量＋レセプター透過量

ガイドラインの比較(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: $^3\text{H}_2\text{O}$, 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: $^3\text{H}_2\text{O}$, 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 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$	固形: 1-5 mg/cm^2 液体: ~10 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$	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(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) ・適用途中でサンプリングを実施 (透過プロファイルを図示する)	24 時間
測定部位	<ul style="list-style-type: none"> ・皮膚表面 ・角層 ・表皮(角層を除く) ・真皮 ・レセプター液 	<ul style="list-style-type: none"> ・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.	<ul style="list-style-type: none"> ・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)

In vitro経皮吸収試験の主な問題点(1/2)

試験手順	ガイドラインの記載	問題点
皮膚	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)。	日本国内において、新鮮なヒト皮膚の入手は難しい。
皮膚厚	200～400μm(OECD TG 428), 200～500 μm(SCCP/0970/06)	ダーマトームで皮膚を薄切する技術は熟練を要する。
Integrity check	皮膚バリアーのチェックは試験に必須である (SCCP/0970/06)。	³ H ₂ Oの透過性を用いる場合が多いが、歴史的な背景から、日本ではRI施設での取り扱いが選択される。

In vitro経皮吸収試験の主な問題点(2/2)

試験手順	ガイドラインの記載	問題点
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に選択する (SCCP/0970/06)。	油等の脂溶性化合物に使用可能なレセプター溶液の記載がない。
分析	適切に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 (SCCP/0970/06)。 (Cold分析の場合)	FDAのガイドラインに準拠すると、実施困難の場合がある。 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

In vitro 経皮吸収試験の適用限界

*In vivo*条件下では、皮膚から微少循環系（血管およびリンパ管）に取り込まれた化合物が体循環コンパートメントに移行するが、その様な吸収は評価できない。

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。

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。

*In vivo/In vitro*相関性

正しい方法で行った*in vitro*試験から
*in vivo*の結果を推定することができる

正しい方法

皮膚の選定

レセプター
相の選定

皮膚代謝が
ある場合

試験物質の
物性