

はじめに

この度、「経皮吸収性の試験法と評価法」に関するテーマでこれまでの経験や原稿を総括する機会を頂いた。種々の総説や論文から本分野に関わる現状をまとめることができたと自負している。ただし、多くの試験法を記載したものの、公定化されていない試験法については簡単な紹介に留めたことをご容赦頂きたい。私はバリデーションや試験法を公定化する仕事をしていることもあり、多くの研究者により評価されていない方法には慎重である。例えば、培養表皮モデルを用いる皮膚透過性試験は、杉林らの精力的な研究でその有用性と限界は明らかになりつつあるが、バリデートはされておらず、プロトコルが確立されていない。そこで、あくまでもこれまで得られている知見の抜粋に留めた。また、私は数学者ではないので、本書では極力数式を省略したことも御容赦頂きたい。本分野の専門家にとっては、物足りない内容であることを、本書を手にとって頂いた専門家に陳謝しておきたい。

上記の記載を除き、できるだけ経皮吸収性の試験法と評価法のノウハウを記載したつもりである。試験実施者が参考にして頂き、実験を円滑に実施できることを祈念している。

国立医薬品食品衛生研究所
小島 肇夫
平成 25 年 10 月

はじめに

本章では、*in vitro* 経皮吸収試験法(皮膚透過性試験法)として、OECD テストガイドライン No.428^{1,2)}および SCCP(Scientific Committee on Consumer Products)基準³⁾を中心に抜粋し、試験法を構築する上で特に留意する事項を並べた。この試験法の目的は、実使用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 / または量的な情報を得ることである。

これらを満たさないデータに適切な理由がないものは、結果として採用されるべきではない。特に、*in vitro* 試験では被験物質の物性・溶媒、レセプター液、摘出皮膚の種およびその状態の選択が重要である。記載されていない拡散セルや被験物質の適用量、適用時間、測定方法などはほぼ同様である。なお、SCCP 基準は OECD ガイドライン No.428 を受け、化粧品の評価に実験動物の使用を極力避けるためか、ヒトまたはブタの摘出皮膚が推奨され、他の動物の使用は認めていない³⁾。

1. 試験実施上の留意点^{4,5)}

in vitro 法の長所は再現性が良く、簡便であり、物理化学的な測定因子を求めることができるが、あくまで皮膚透過性として角層の透過性を評価するものである。表 1 に試験実施に必要な情報をまとめた。また、参考資料として、OECD テストガイドライン No.428 と SCCP 基準の相違点を表 2 にまとめた。

- 5) 適用状態：適用面積、適用時間、閉塞性、適用量、操作方法およびこれらの記録
- 6) 結果：サンプリング回数、時間毎の回収量、ドナー側の残存量、皮膚中量、洗浄液中の量、結果の解釈
- 7) 考察、結論

2. *in vitro* 皮膚透過性試験の事例

in vitro 皮膚透過性試験は、1990年代から続く OECD における専門家の議論を経て、テストガイドライン No.428 として統一化された²⁵⁾。その際に実施された共同研究の試験法をもとに事例を紹介する²⁶⁾。この共同研究では、カフェイン(caffeine)、ベンゼン酸(benzoic acid)およびテストステロン(testosterone)が使用され、ヒト摘出皮膚を用いる9施設とラット摘出皮膚を用いる1施設で試験法が検討された²⁵⁾。被験物質がコード化されていないこと、微細な試験条件が統一されなかったことからバリデーションとはなっていない。以下に上記物質をヒト適用皮膚を用いた皮膚透過性試験の事例のみをまとめた。

2.1 被験物質

¹⁴C でラベルされた被験物質として、[1-methyl-¹⁴C] caffeine(51.2mCi/mmol) , [ring-UL-¹⁴C] benzoic acid(6.2mCi/mmol) および [4-¹⁴C] testosterone(53.6mCi/mmol) が使用された。上記の非ラベル化合物も使用された。エタノール/水(1:1)を溶媒として 4.0mg/mL 適用前に活性が測定された。Caffeine および testosterone が 1MBq/mL、benzoic acid が 4MBq/mL であった。

2.2 皮膚膜の用意

凍結した皮膚から、ヒトの皮膚膜が用意された(主に -20℃で最大1年間保管されたもの)。これらは施設毎の倫理基準に従い、供給および使用された。

その厚さは、多くの施設で 0.7 ~ 1.1mm であったが、0.8 ~ 1.8mm または 0.5 ~ 0.7mm という厚さの皮膚膜を用いた施設もあった。個々の個体から、5 ~ 7 の皮膚膜が供給された。

2.3 拡散セルおよびレセプター液の準備

拡散セル：非流出型およびフロースルー型

レセプター液：生理食塩水(caffeine および benzoic acid)

5% 牛血清アルブミンを含む生理食塩水(testosterone)

フロースルー型のレセプター相の流量は、約 1.5mL/h と設定された。

はじめに

欧米では動物愛護の高まりから化粧品の安全性評価における経皮吸収試験での *in vivo* 試験は行い難い状況にある。しかし、経皮吸収試験は本来、皮膚から吸収された薬剤の体内移行や代謝、排泄までを評価する試験であり、医薬品や農薬のリスク評価には避けて通れない試験である。OECD テストガイドライン NO.427^{1,2)} に記された試験法を構築する上で特に留意する事項を並べてみた。これらを満たさないデータに適切な理由がないものは、結果として採用されるべきではない。特に、皮膚透過部位、種差、性差、匹数、適用方法、皮膚損傷の有無、被験物質の物性が重要な留意点である。

1. 試験法^{3,4)}

1.1 皮膚、血、尿、糞中の被験物質濃度測定

図1に示すように、一般的な経皮吸収においては、被験物質は皮膚(角質層、表皮、真皮)を経て、血液を介して各臓器に運ばれる。皮膚で結合、代謝、排泄される場合もあるが、体内に分布し、代謝、排泄される^{5,6)}。

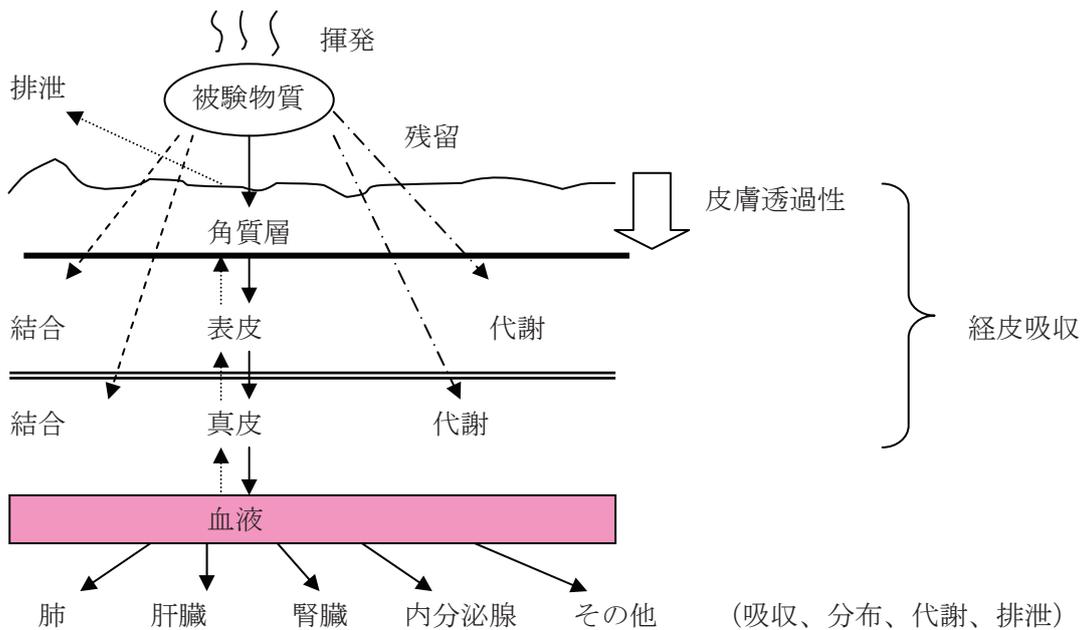


図1 経皮吸収の一般モデル

- 6) 試験液量 装置に応じた試験液量とする。
- 7) 回転数 適切な回転数とする。
- 8) サンプルング 試験時間の最終時点から遡って4点、最終時点を含め5点以上とし、皮膚透過プロファイリングがわかるようなサンプルング時点を設定する。
- 9) 試験液の補充 サンプルング毎にサンプルングした試験液と同量の試験液を補充する。

(4) 透過した薬物量の補正

サンプルングすることによって、試験液から取り除かれた薬物量を補正し、試験液に透過した累積薬物量を算出する。

1.2 平均透過率による判定

規定された試験時間または透過率がプラトーに達した後の1時点および同時点の透過率の半分程度放出した時点の1点において、標準製剤の平均透過率に対する試験製剤の平均透過率が、その比で0.7～1.3の範囲である。ただし、試験製剤の透過率のばらつきは、標準製剤の透過率のばらつきと同程度かそれよりも小さいものとする。

2. 放出試験

局所皮膚製剤(半固形製剤および貼付剤)の処方変更のための生物学的同等性試験ガイドラインには、同等性の評価法および判定法として皮膚透過性試験に並び、放出試験の記載がある。

放出試験は、製剤からの薬物の放出性を評価する試験であり、最終局所製剤の製剤特性を特徴付けるために用いられる方法の一つである。放出試験では、試験液の適切な選択や膜等を使用して製剤の形状に変化をもたらさない試験条件を選択する。試験において、製剤と試験液を隔てる膜を用いる場合は、透過過程が律速とならない膜を用いる。薬剤や添加剤の性質あるいは製造工程の不注意による変化をみつける方法である²⁾。クリーム、軟膏、ゲルの製造工程における管理法として、また最終製剤の規格作製法として推奨されている²⁾。