

8) OECD *In vitro* 経皮吸収試験法ガイドライン案について

夏目秀視

城西大学・薬学部

1. はじめに

医薬品や化粧品、あるいはその添加物等の *in vitro* 経皮吸収試験法は、それらの経皮吸収における基礎データを科学的な根拠に基づき得る必要がある。また最適な *in vivo* 試験法のプロトコルを決定する上で、*in vitro* 経皮吸収試験法は、経皮吸収に関連する *in vivo* で起こりえる様々なプロセスを可能な限り予測できることが望ましい。言い換えれば、*In vivo* 経皮吸収試験法が同一動物種においてダイレクトな結果を提示できるのに対し、*in vitro* 経皮吸収試験法は精度の高い予測的結果を提示する。それゆえ、*in vitro* のガイドラインにより実験条件設定やデータの解釈、処理によって *in vivo* の結果をしばしば反映しないような事態を生じてはならない。

今回紹介する OECD による第 2 次ガイドライン (案) は、主に the European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association の COLIPA ガイドライン及び European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) をドラフトとして作成され、最終的に採択されたものではないが、大幅な変更はないものと思われる。ここではまず初めに、ガイドライン案の骨子を要約し、次にガイドラインの概説及び問題点について触れてみたい。

2. OECD ガイドラインの要約

INTRODUCTION

1) *In vitro* 経皮吸収試験法は、適切な実験原理に基づき、適切な解析 (解釈・説明) を行い、*in vivo* 経皮吸収試験法の結果を正確に記述できるデータを提示するものである。本試験法は、化学物質の皮膚中及び皮膚を介して溶液リザーバーへの拡散量を測定するもので、拡散だけの測定には“死んだ”

皮膚を、また拡散及び皮膚代謝を同時に測定するときには新鮮で代謝活性を有する皮膚を用いる。本試験法は、異なった製剤間 (処方、組成間) の化学物質の皮膚への送達性を比較し、スクリーニングを行うのに用いることができ、また、ヒトにおける経皮吸収の危険性 (安全性) を評価する有用なモデルとなる。

2) 本ガイドラインは、摘出皮膚における化学物質の蓄積性や透過性を測定するための一般的な原理・原則を提示する。本試験法には、ヒトを初め、多くの哺乳動物の皮膚を用いることができる。皮膚の透過特性は、皮膚を摘出後も通常維持されていないが、能動輸送系に関連した化学物質の透過特性はこの限りではない。化学物質の拡散バリアー (透過律速) は、原則的に角質層である。適用する化学物質によっては皮膚中で代謝されるが、ほとんどの化学物質では、通常の投与量ではこの代謝過程は速度律速とはならない。

INITIAL CONSIDERATION

3) *In vitro* 経皮吸収試験法は、経皮吸収の律速段階が角質層であるので、全てのケースで利用できる。本試験法は、*in vivo* の経皮吸収性を予測するのに十分な実績 (経験、データの蓄積) を持っている。

4) 本試験法の利点は、ヒトや他の動物種の摘出皮膚を利用できる；同一被検者又は動物から試験に用いる複数の皮膚を摘出することができる；生きた動物を用いなくて済む；様々な実験条件で試験することができる；皮膚中または全身循環系のどちらかで代謝されるような化合物も試験することができる、である。本試験法の欠点は、十分な量のヒト皮膚を供給できない；薬動的データが不足している；皮膚透過性に種差がある；末梢血流のシンク条件を十分再現できない、である。不十分なヒト皮膚供

給は、結果として動物の皮膚が多くの実験に供されることになる。*In vitro* データから *in vivo* の状態を外挿することは難しいが、適切な実験条件を用いることで十分 *in vivo* の予測をすることができる。

PRINCIPLE OF THE TEST

5) 皮膚を拡散セル (透過実験用セル) に挟んだ後、試験物質 (放射標識体も利用可) を皮膚に適用する。あらかじめ設定した条件下で定められた試験期間内では、試験物質は皮膚上に残存している。レセプターセル中の溶液を適当な時間間隔で採取し、試験物質、場合によってはその代謝物 (代謝活性の保持された系を使用) を適切な方法を用いて分析する。実験終了時、その実験系での試験物質、場合によってはその代謝物の分布を測定する。使用した皮膚の integrity、必要ならば皮膚の代謝活性を調べる。

6) Dermal delivery (皮膚送達) は、試験物質が試験終了までに皮膚中に吸収された量とレセプター溶液中に出現した量の総和として定義される。Percutaneous absorption (経皮吸収) は、ある実験時間内で全身的に利用可能な送達された量の割合として定義される。経皮吸収のまず最初の評価に関しては、皮膚中試験物質濃度 (量) は、

7) 有限量の実験において経皮吸収量に含まれる。ただし、実験終了時に皮膚表面を洗浄した後の皮膚中薬物濃度がレセプター溶液薬物濃度よりも非常に高いときは、両濃度を足すと、ある試験物質の経皮吸収を過大評価するおそれがある。このような場合、皮膚中の試験物質の分布及び相互作用は、皮膚中分布の時間推移を定量的に測定したり、オートラジオグラフィーを作成することによって研究し、皮膚リザーバーがどのような運命を辿るかを理解する。透過係数 (吸収速度) の測定に利用される無限量の実験に関して、もし実験終了時に皮膚中薬物濃度がレセプター溶液薬物濃度に等しいか、あるいは高いときには、何個かの拡散セルを用いて各々の採取時間毎に皮膚中及びレセプター溶液中の薬物濃度を測定し、それを繰り返す。

DESCRIPTION OF THE METHOD

Diffusion cell design

8) 皮膚を間に挟むことのできるドナー及びレセプターチャンバーからなる様々なタイプのガラス、テフロン又はステンレスの拡散セルがある。セルは、挟んだ皮膚周囲の密封性が良く、溶液の採取が容易で、レセプター溶液の攪拌が十分なされ、セル内の温度及びセル内の溶液量が十分にコントロールできるように設計する。Static (非流出型) 及び flow-through (流出型) 拡散セルのどちらも使用できる。Flow-through セルは、シンク条件を維持しやすい。もし代謝的に活性な皮膚を使用する場合は、flow-through セルを用い適切な組織培養液を流す必要がある。

Receptor fluid

9) レセプター溶液は、通常、生理的緩衝液 (例えば、組織培養液、血清アルブミンを含む生理食塩水) を用いる。この系では、皮膚のバリアー特性、pH、viability が維持される。予備試験又はスクリーニング試験を行うとき、用いるレセプター溶液の組成の正当性を証明し、その溶液中の試験物質の正確な溶解度を測り、皮膚の integrity に及ぼすその溶液の影響を、適切な物理的特性を有し透過特性の明らかな化学物質を用いて証明する。代謝実験を行うとき、レセプター溶液は、実験の間皮膚の viability が維持できなければならない。Flow-through において、流速は少なくとも 1 時間あたりセル容量の 5 倍を必要とする。Static セル系において、レセプター溶液は十分攪拌され、定期的に採取される。

Skin membrane

10) 皮膚は、目的に併せてヒト又は異なった動物種のものを利用する。酵素的、熱的又は化学的に剥離した表皮、又はダーマトームで厚さ (200 - 400 μm) を調節した split thickness skin を調製する。原則的に full thickness skin の使用は認めない (試験物質の真皮中濃度を測定する必要がある場合を除く)。皮膚の調製時に損傷を与える可能性があり、皮膚の integrity をチェックする。代謝実験では、新鮮な皮膚を摘出して代謝活性が維持できる条件ですぐに使用する。皮膚を保存して使用する場合、バリアー機能

が維持されているかどうかをチェックする。皮膚を抗菌剤や洗浄剤で処理したときは、その旨を記述する。

Membrane integrity

11) 用いる皮膚に損傷があってはならない。これは、試験物質で処理する前、あるいはドナーコンパートメントの条件を決定するときに、浸透特性が既知の標準分子（例えば、トリチウム水）の浸透性を測定して調べることができる。Transepidermal water loss（経表皮水分損失、TEWL）の測定を皮膚の integrity のチェックに用いることができる。そのデータが却下された基準を示す必要がある。

Skin metabolism

12) ヒト及び動物の皮膚の viability は、生理食塩水または組織培養液で flow-through セル中で少なくとも 2 4 時間維持される。それゆえ、試験物質の経皮吸収に及ぼす代謝物の影響を直接評価できる。試験物質が皮膚で代謝される可能性を、代謝物が皮膚切片もしくはホモジネート中で見られるかを測定するような別の実験で試験する。別に、viable な動物皮膚等を用いて経皮吸収／代謝実験からヒト皮膚代謝の可能性に関する有用な情報を得ることができる。

Test substance

13) 被検物質は、組成、純度及び安定性が既知であり、放射標識体を用いるときは、可能ならば代謝部位に放射標識する。レセプター溶液中の試験物質の溶解度を調べる。

Test preparation

14) 試験物質は、溶媒又はデリバリーシステムを用いずに直接皮膚に適用できる。ほとんどのケースで、材料は適当な基剤（単純な溶液から複雑な相混合物）で適用する。溶媒又は処方成分は、試験物質の角質層への放出性に影響するか、又は皮膚バリアー機能に影響する。選択したデリバリーシステムの妥当性をプロトコールに明記する。

Test preparation application

15) 皮膚表面（角質層）への適用は、無

限系で単位面積当り熱力学的活量が維持される量を、有限系では単位面積当り限量で行う。正常なヒト皮膚への化学物質の暴露を想定した条件では、通常有限量を適用し、最大単位面積当り 10 mg までとする。透過係数（吸収速度）を決定するのに用いられる無限量の適用において、皮膚を十分に水和する（水和により皮膚への試験物質の浸透が増加する）。このように、適用速度又は適用容量の妥当性をプロトコールに明記する。皮膚への暴露は、実験期間内又はより短い期間（特殊な皮膚への暴露を想定して）とする。短期間暴露での皮膚の洗浄は、皮膚の損傷が無いようにする。適用する基剤及び量は、企図した実験の使用条件に近づける。

Temperature and humidity

16) 化学物質の拡散（吸収）は、温度により影響を受ける。拡散チャンバー及び皮膚の温度は、一般的な皮膚温である 32℃ に近づける。このためには、厳密な温度コントロールが必要である。温度の制御は、レセプター／皮膚の温度が生理的に正常になるようにセルの設計によって水浴や温度コントローラーを選択して行う。湿度（皮膚の）に関しては、適切な皮膚の水和を保証する必要がある（特に、製剤を数時間以上適用しているとき）。ドナーチャンバーは、試験の目的及び試験物質の揮発性に依存してその物質の暴露の間、密封系にするか、あるいは開放系にする。

Study time

17) 採取期間は、吸収プロファイルが特徴付けられるように、通常 2 4 時間を必要とする。素早く皮膚に浸透する化学物質は、より短い期間を、またゆっくり浸透するのは、より長い期間とする。暴露時間と採取期間をプロトコールに明記する。

Terminal procedures

18) 暴露終了時、多くの場合は実験終了時に、皮膚上の過量の試験製剤を洗い流し、分析のために回収する。レセプターコンパートメント中の試験物質を採集して中を空にし、壁面を洗い流して、それら全てを分析のために回収する。セルを取り外し、

皮膚中の試験物質を分析する（可能であれば、親化合物及び代謝物を分離分析）。抽出効率を提示する。必要な場合には、皮膚を暴露したエリアと、セルのふちの部分に挟まれたエリアとを分け、さらに角質層、表皮及び真皮に分けて分析する。皮膚の分析方法をプロトコールに明記する。

Sampling

19) 実験が適切であれば、staticセル系において、レセプター溶液の適切な採取速度を選択して吸収プロファイルをグラフ化し、吸収速度を決定する。Flow-throughセル系において、還流速度と分析方法は、採取時間を決定する。十分量のサンプル採集が、定常状態の吸収速度を決定するのに必要である。

Analysis

20) レセプター溶液、洗浄液及び処理した皮膚のエリアの試験材料の量を分析する（可能ならば、適切な放射標識テクニック等を用いて行う）。代謝活性が維持された皮膚を用いたとき、レセプター溶液は代謝物及び親化合物があるかどうかを分析する。可能性があるときは、局所適用後の試験物質の物質収支を計算する。

DATA AND REPORTING

Data

21) レセプター溶液の分析から得た時間に対する試験物質の経皮吸収プロファイル及び各セル中の物質収支を提示する。無限投与量の条件のとき、ラグタイムと透過係数（吸収速度）も提示する。有限投与量のとき、全浸透量を投与量の%として提示する。皮膚の integrity を証明するデータを付加し、必要な場合代謝活性の妥当性も提示する。

Test report

22) 試験報告書には、プロトコールに明記した必要条件を含むとともに、可能な限り以下のデータも包含する。

試験物質：

- －物理的性質、物理化学的特性、純度（放射標識体、比活性）
- －同定データ

－レセプター溶液中の溶解度

試験製剤：

- －用いた処方、妥当性

試験条件：

- －皮膚の起源及び部位、調製方法、使用するまでの貯蔵方法、前処理条件（洗浄法、抗菌処理、etc.）、integrity 及び代謝活性の評価法、試験条件の妥当性
- －セルの形、設計、レセプターの処方、組成
- －試験方法の詳細及び適用量の定量化
- －皮膚から試験製剤の除去法の詳細（皮膚の洗浄法など）
- －皮膚の分析法及び皮膚分布を解析するための皮膚分割法の詳細
- －分析方法、抽出法、定量限界及び分析方法の妥当性

データ：

- －用いた試験物質の総量（Application = Skin rinsing + Receptor + Cell washings）
- －個々のセルの回収量
- －浸透量の定量（レセプター回収量及び／またはレセプター回収量＋皮膚残留量）

結果・考察：

- －関連する公表されたデータとの比較を含む

結論：

- －データの専門的な評価及びヒトの危険性評価に対するデータ利用の限界

3. 概説及び問題点

ここでは、本ガイドライン（案）の主な部分の概説と問題点について記述する。

INITIAL CONSIDERATION

本章で特に問題となるのは、(1) 吸収の律速段階が角質層であること、(2) ヒト皮膚供給の確保、(3) 種差及び、(4) 薬動的データの不足である。(1) の根拠は、ECVAM 中にも記載されているように、Potts and Guy (Pharm. Res., 9, 663-669 (1992)) の予測式 (Fig. 1) とそれを裏付ける多くの

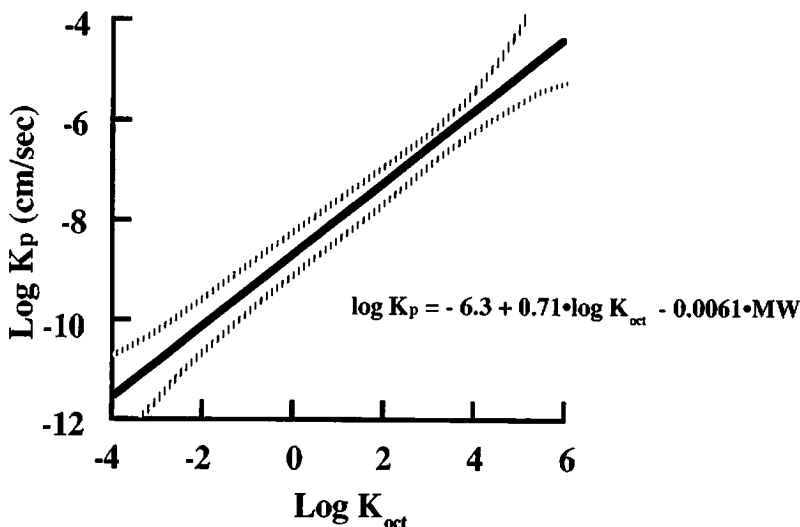


Fig. 1 Log K_p (permeability coefficient) versus log K_{oct} (octanol/water partition coefficient) for Compounds of Constant MW (400 Da, molecular weight)

データによる。彼らは薬物の皮膚透過が、オクタノール-水分配係数と薬物の分子量によって概算値を求められると述べており、これは(1)を仮定することで成り立つ。

しかし、Flynnらが示しているように(J. Pharm. Sci., 70, 52-66 (1981))、脂溶性の高い薬物では生きた表皮及び真皮が吸収の律速となる場合もある (Fig. 6参照)。また、塩薬物の吸収も高くなる傾向がみられる。それゆえ、(1)の記述には但し書きをつけるか、基準を設けるべきと思われる。(2)及び(3)は、本文中にも掲げられている *in vitro* 経皮吸収試験法の欠点であるが、DESCRIPTION OF THE METHOD に書かれている条件を満足させていくと、現状では莫大な動物の摘出皮膚を用いることになり、動物愛護の観点から問題となると思われる。代替法の観点から言うと、本ガイドライン(案)によれば *in vitro* 法は *in vivo* 法の代替であり、それは生きた動物を用いるのではなく摘出した皮膚を用いることになっている。これらの解決策として2つのことが考えられる。一つは、摘出皮膚を用いた *in vitro* 吸収試験法を行う前に、候補試験物質

の吸収性に関する選択基準を設けることである。これにより、経皮吸収に適さない候補物質を排除し、無駄な *in vitro* 吸収試験を減らすことができる。Fig. 2に、ECVAMで提案された経皮吸収試験法の評価法を示す。図から明らかなように、*in vitro* 吸収試験実施に至る前に、可能性の高い薬物が選別できるシステムになっている。しかし、この評価法がOECDのガイドライン(案)に採用されなかったのは、選択基準の理論的な背景の十分な立証とデータの蓄積が不十分であることが主な理由と考えられ、評価法がガイドライン(案)に組み込まれるように努力がなされなければならない。

もう一つは、摘出皮膚を用いない *in vitro* 吸収試験法を開発することである。ヒト皮膚をほとんど使用できない日本の現状において、ある試験物質の承認までの過程で、動物 *in vitro* 経皮吸収試験→動物 *in vivo* 経皮吸収試験→(ヒト *in vitro* 経皮吸収試験)→ヒト *in vivo* 経皮吸収試験が行われる (Fig. 3)。動物の使用をできる限り少なくするためには、動物 *in vitro* 経皮吸収試験→ヒト *in vitro* 経皮吸収試験→ヒト *in vivo* 経皮

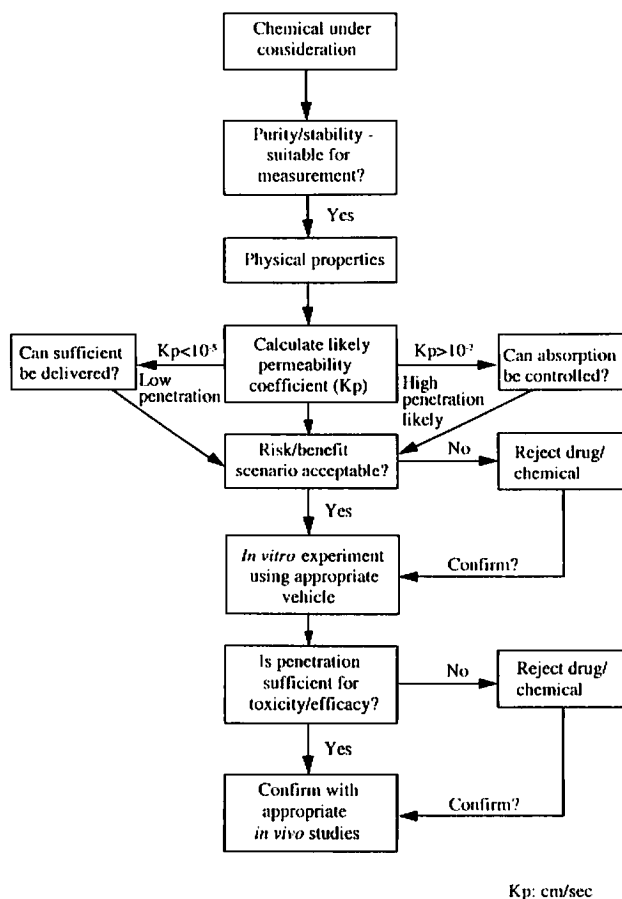


Fig. 2 Strategy for assessing percutaneous absorption by ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods)

吸収試験又は動物 *in vitro* 経皮吸収試験→ヒト *in vivo* 経皮吸収試験のような外挿を行う必要がある。それゆえ、ヒトまたは動物の *in vitro* 経皮吸収試験法を代替する方法があれば、究極的には臨床試験のみを行うだけで済むことになる。

その方法として、培養表皮あるいは角質層類似の人工膜が考えられる (Fig. 3)。培養表皮は、現時点で角質層形成能が乏しく吸収性の評価には適していない。一方、吸収に係わる物理化学的性質が類似 (すなわち、角質層に類似) の人工膜は吸収性の評価には最適となろう。Fig. 4に、ヒト皮膚の代わりに架橋型のヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) とシリコンのグラフト共重合体膜を用いて薬物の透過性を *in vitro* で評価したときの種々薬物の透過係数の対数値とヒト皮膚での透過係数の対数値

との関係を示した。膜 A と膜 B は、HEMA とシリコンの含有割合が異なっているが、どちらもヒト皮膚での薬物透過性と相関性が高い。また、表皮や真皮が試験物質の吸収の律速となるような場合や、代謝が関係するような場合は、培養表皮の上に人工膜を積層することで評価が可能となる。この分野はまだまだ発展途上で多くの研究とデータの蓄積が必要であり、早急な進展が望まれる。

(4) の薬動学的データの不足に関しては、ヒトへの外挿を考える上で重要な問題となっているが、現状ではその解決は非常に困難と思われる。各企業のデータの開示はもちろんのこと、現在報告されているデータの信頼度、さらには健常人のデータから患者のそれへの外挿のことも十分考えていく必要がある。

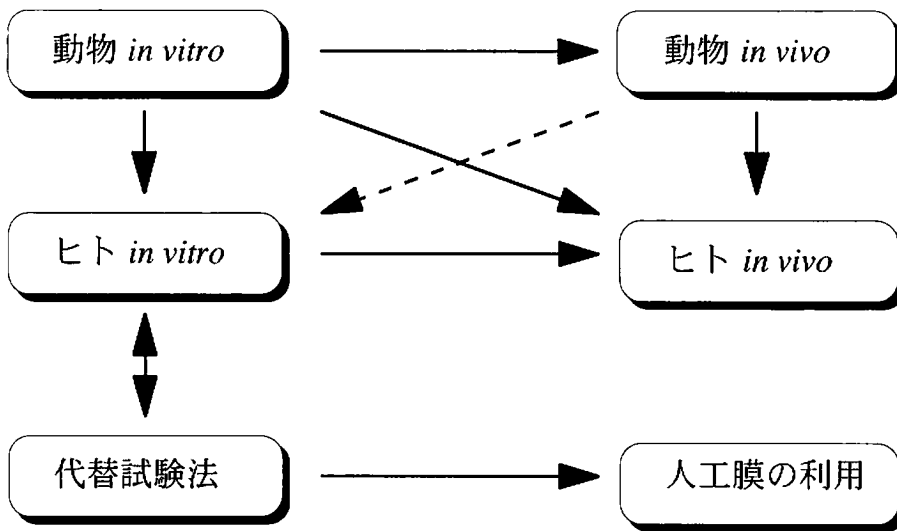


Fig. 3 *In vitro* 及び *in vivo* 実験の外挿と実験の進め方

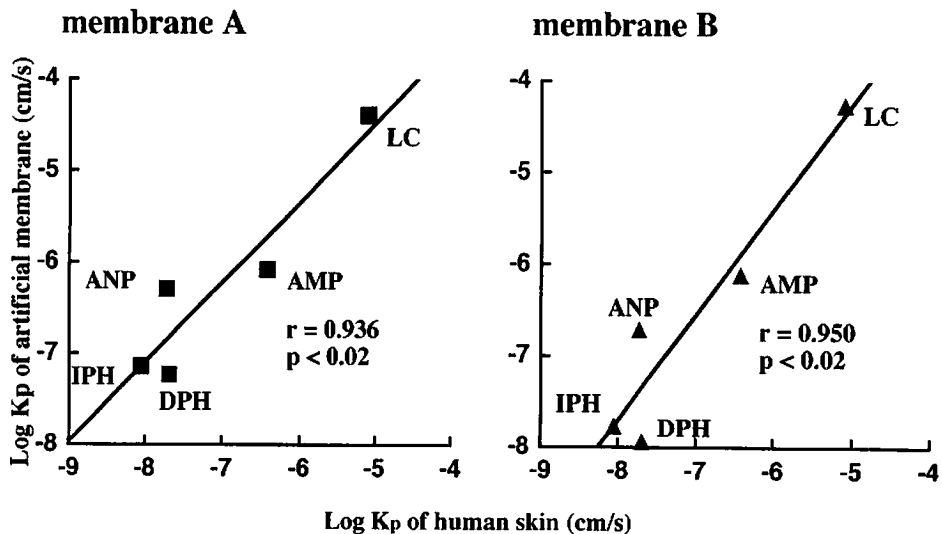


Fig. 4 Relationship between log K_p of artificial membrane and human skin

IPH: isoproterenol hydrochloride, ANP: antipyrine, DPH: dopamine hydrochloride, AMP: aminopyrine, LC: lidocaine

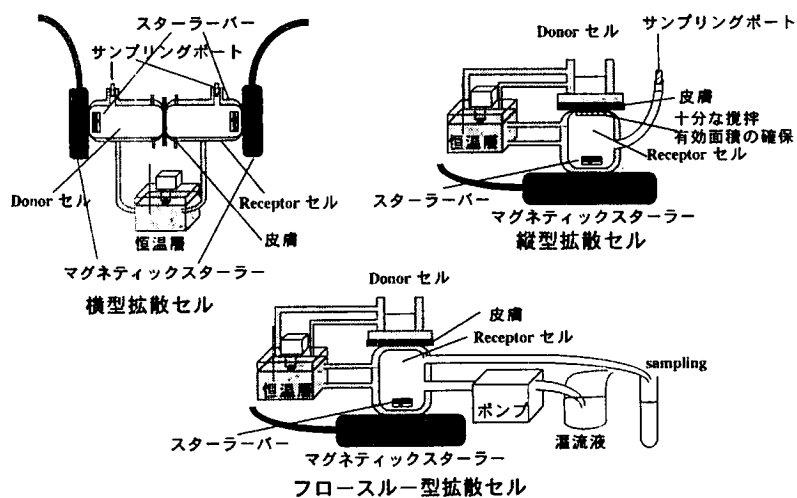


Fig. 5 *In vitro* 経皮吸収実験法

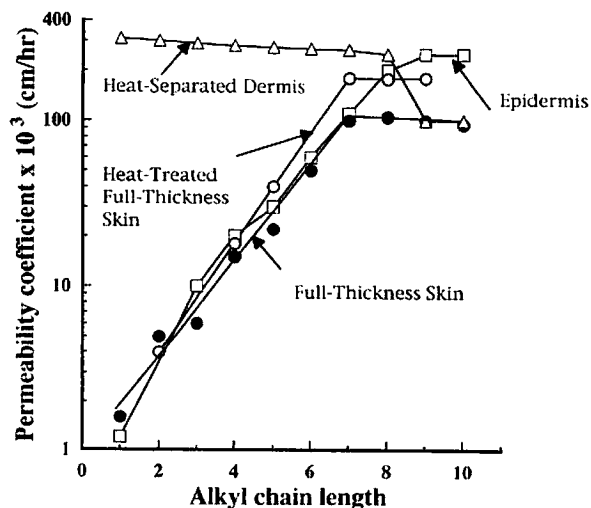


Fig.6 Semilog plot of permeability coefficients for heat-processed hairless mouse membranes and normal hairless mouse skin as a function of alkyl chain length. All data were obtained at 37°C

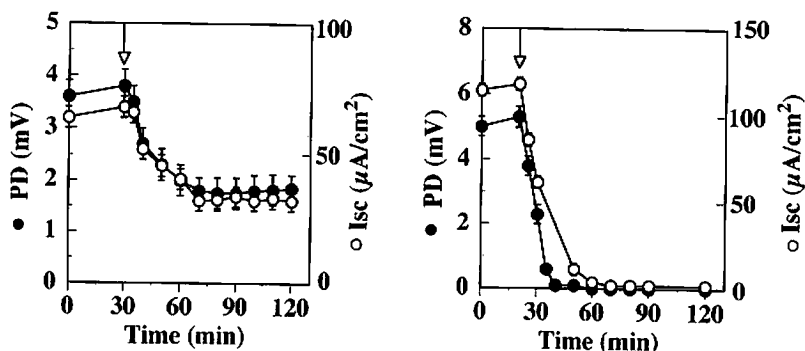


Fig.7 Effect of glucose-free and oxygen-free conditions on PD and Isc : (a) glucose-free, (b) oxygen-free condition

Each point represents the mean \pm S.E. (n=3)

Arrow show change to glucose-free or oxygen-free condition.

PRINCIPLE OF THE TEST

ここでは、Dermal delivery (皮膚送達) と Percutaneous absorption (経皮吸収) の定義の正確な理解が重要であるが解釈が難しいように思われる。定義上、経皮吸収は、*in vitro* 法ではレセプター溶液中に出現した量ということになるが、全身的 (全身循環系) に利用可能などは書かれているが、血管内に移行したとは書かれていない。抗炎症剤などを含有したパップ剤等の局所製剤が多い我が国においては、皮下組織の病変部位への薬物送達は重要であり、もし経皮吸収の定義が血管内に移行したことを指すのであれば、Dermal delivery (皮膚送達) の定義に沿って局所製剤が位置付けられ、定義を満たす試験が必ず必要となる。また、用いた試験法の妥当性には、十分注意を払うべきと考えられる。

DESCRIPTION OF THE METHOD

本ガイドライン (案) では、拡散セルは横型、縦型の別は書かれておらず、どちらも使用できる状況にある。しかし、書かれている内容は、縦型セルに沿ったものであ

り、本文の改訂が必要と思われる。Fig. 5 に、典型的なセルの模式図を示した。通常、無限量の実験では横型を、製剤に近いサンプルを適用するときは縦型を用いる。有限量では両方のセルが用いられる。横型セルの場合は、ドナー、レセプターのどちらのセル内も、セル外側を循環する水で温度を容易に制御できる。またドナー側も攪拌できることから、非攪拌層の影響も極力小さくできる。一方、縦型セルではドナー (上側) セルを攪拌することは難しく、非攪拌層による影響に注意が必要である。また、レセプター (下側) セルのサンプリングポートが通常セル横側から出ており、皮膚と接触する部分に空気が溜まりやすく、十分な攪拌が出来ず、有効透過表面積が変動する場合がある。フロースルー型は、図には縦型を載せたが横型もある。シンク条件の維持に優れているが、定量感度の問題もあり、流速はこのことを含めて設定する必要がある。

用いる摘出皮膚で主に問題となる事として、酵素や熱等で剥離した皮膚がどの程度使えるか、原則的に full thickness skin は使

Table 1 Comparison of models on pig skin*

	¹⁴ C]-octyl methoxycinnamate % applied dose		¹⁴ C]-benzophenone % applied dose		¹⁴ C]-salicylic acid % applied dose	
	full thickness skin	split-thickness skin	full thickness skin	split-thickness skin	full thickness skin	split-thickness skin
Skin surface	96.53 ± 0.68	81.16 ± 6.48	92.10 ± 8.43	92.65 ± 1.18	70.59 ± 3.84	68.65 ± 1.72
Epidermis (stratum corneum + viable epidermis)	11.05 ± 0.12	7.43 ± 1.35	2.41 ± 0.92	2.11 ± 1.52	12.98 ± 3.27	7.83 ± 3.53
Dermis**	0.93 ± 0.23	4.03 ± 0.49	0.22 ± 0.14	1.71 ± 0.75	6.47 ± 2.57	6.22 ± 1.20
Receptor fluid	0.12 ± 0.04	0.49 ± 0.03	0.004 ± 0.002	0.21 ± 0.09	2.93 ± 1.37	6.72 ± 1.63
Biological recovery (epidermis + dermis + receptor fluid)	12.10 ± 0.91	11.94 ± 1.45	2.63 ± 1.05	4.03 ± 2.21	18.46 ± 5.88	20.77 ± 2.01

*values are the mean ± SE of 3 determinations

**upper dermis for split-thickness skin and full dermis for full-thickness skin (overall percentage recoveries = 100 ± 15%)

用できないこと、および皮膚の viability がどの程度なのかということが上げられる。Fig. 6 に試験した物質のアルキル鎖の長さ(鎖長の増加は脂溶性度の増加を意味する)に対するヘアレスマウス摘出皮膚を介するそれら物質の透過係数を示す(G.L. Flynn et al., J. Pharm. Sci., 70, 52-66 (1981))。この図は2つの点で非常に重要と考えられる。一つは、ヘアレスマウスにおいて full thickness skin と、角質層及び生きた表皮からなる epidermis の透過性とがアルキル鎖の長さが7程度の脂溶性度まではほぼ等しいということである。このように、ヒトやブタの摘出皮膚では表皮下の組織が厚いため、full thickness skin の使用は脂溶性度がより低い試験物質の透過速度も過小評価を伴う危険性が大きい (Table 1) が、マウスやラットの腹部摘出皮膚を用いた場合、*in vitro* で得られた透過速度から予測される *in vivo* 経皮吸収後の体内動態は、かなり脂溶性が高い物質でもほぼ正確に反映させることができる。ダーマトーム処理は非常に繁雑であり、またマウスやラットは最も汎用される動物であることから、この摘出皮膚に関するガ

イドライン (案) の記述がこのまま採用されると小動物の使用に関し面倒な取り扱いとなることは否めない。

もう一つは、熱で処理した摘出皮膚ではアルキル鎖の長さが5程度の脂溶性度から、透過性が高くなる傾向がみられることである。これは、熱処理による角質層の脂質部分の構造が変化している可能性が高い。このことは、酵素処理や化学処理により剥離した皮膚でも同様のことが考えられ、データの提示または収集が必要と思われる。

次に、皮膚の viability とそれに関連した代謝実験については、活性評価が非常に難しいと考えられる。摘出皮膚ではないが、Fig. 7 に家兎摘出鼻粘膜を Ussing type diffusion cell にセット後の鼻粘膜の viability がどのように変化するかを試験した結果を示す (H. Kubo et al., Int. J. Pharmaceut., 103, 27-36 (1994))。このセルでは電気生理学的パラメータである経上皮膜電位および短絡電流から細胞 viability をチェックすることができる。摘出鼻粘膜のセットは、通常摘出してから10分以内に行う。30分以上すぎると50%の確立で経上皮膜電位は回復せ

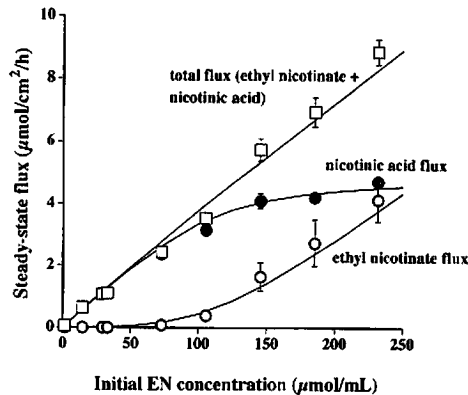


Fig. 8 Relation between fluxes of ethyl nicotinate and nicotinic acid through full-thickness skin and initial donor concentration of ethyl nicotinate
 Solid lines illustrate predicted value calculated by differential equations using obtained permeation and enzymatic parameters.

ず、細胞死に至る。図は、細胞のviabilityを維持するのに必要な条件の一つであるグルコース及び酸素供給を、それぞれフリーにしたときの経上皮膜電位および短絡電流の時間的変化である。どちらの場合もフリー条件下でこれらのパラメータは著しく減少し、特に酸素フリーでは経上皮膜電位は速やかに消失している。これらのことは、細胞のviabilityが維持できる実験条件手技及び設定が非常に繊細であることを示している。

このことを皮膚のviabilityとそれに関連した代謝実験について考えてみるとどうなるか。もともと、皮膚の透過実験はほとんどの試験物質の透過バリアーが角質層にあると仮定して行われ、表皮細胞のviability等の皮膚生理機能に関連した*in vitro*実験系での研究はほとんど行われてこなかった。ガイドライン(案)においては、代謝実験において表皮細胞のviabilityが維持されていることが明記されおりそのチェックが必要であるが、どのようにチェックするかは書かれていない。摘出皮膚では、生きた表皮の上には死んだ角質層があり、下には真皮

がある。それゆえ、摘出粘膜のように直接培養液等に生きた表皮がさらされることがない。加えて、ガイドライン(案)で記述されている使用可能なレセプター溶液では生理学的な観点からviabilityが維持されるとは考えにくい。Fig. 8にヘアレスラットの摘出皮膚を用い、試験物質としてニコチン酸エチルを各種濃度で適用したときの、その濃度に対するレセプター溶液へのニコチン酸エチル、その代謝物であるニコチン酸及びそれらの和の透過速度を示した(K. Sugibayashi et al., Pharm. Res., 13, 855-860 (1996))。このときレセプター溶液にはリン酸緩衝液を用い、8~10時間実験を行っている。ニコチン酸のレセプター溶液への出現速度は、適用濃度に対しミカエリスメンテン型のパターンを示し、皮膚中の制限された酵素量による代謝の飽和が観察されている。別に新鮮な皮膚ホモジネートから得た代謝パラメータを用い各場合の透過速度をシミュレートした結果、実線で示したシミュレート結果と実測値とはほぼ一致した。これらの結果は、摘出皮膚のviabilityとは無関係に少なくとも実験10時間程度ま

で代謝活性が維持されていることを示している。

これらのことを総合して考えると、予備的検討の中で摘出皮膚の *viability* の評価とは切り離して、試験物質の代謝に関係する酵素活性がその実験系で十分維持できることを証明するデータの蓄積または提示を行い、さらに摘出皮膚の *viability* の定義を示す必要がある。もし、用いる摘出皮膚で代謝されるような試験物質の吸収実験を行う前に、代謝活性および *viability* をチェックすることになると、かなりの時間をそれに費やすことになるので実験をスタートするときにはその保証には疑問符がつくことになるであろう。

4. おわりに

いままで *in vitro* 経皮吸収試験法の概略およびいくつかの問題点について解説した。本ガイドライン（案）は一般的な経皮吸収

実験法に基づいて書かれているが、対象物質が医薬品、化粧品およびその添加物、さらには毒物等であり、多くのデータ、試験期間を必要としているように感じられる。ここでは主な経皮吸収の対象物質である医薬品の観点から、特に解説を行ったが、化粧品、添加物、毒物といったものの経皮吸収は、有害作用として結果を評価するので、医薬品とは別の方法論や評価法に関する文面が必要かもしれない。さらに、局所製剤や化粧品については経皮吸収の定義が全身移行か、局所移行かによってもチェックすべき項目が変わってくることも予想され、本ガイドライン（案）の細部のさらなる検討が必要であろう。また、このガイドライン（案）を受け入れるためには、どのような追加試験や調査が必要なのか、さらには行政的に受け入れるためのバリデーションのストラテジーと過程についての合意に達することも必要であり、国際的に通用するガイドラインになることを切望する。