

9) OECD *In vivo* 経皮吸収試験法ガイドラインについて

鈴木正巳

ポーラ中央研究所

## 1. はじめに

OECD (経済協力開発機構) においては、医薬品を除く一般産業化学物質の毒性試験法に関するガイドラインが1981年にとりまとめられ、「化学物質毒性試験ガイドライン」として採択された。

その後、安全性試験に関する動物実験代替法の開発と相俟って、本プロシーディングの他の項に記述されている種々の安全性試験法のOECDガイドラインが検討されてきている。経皮吸収試験法についても1994年に第一次ガイドライン案が、更に加盟各国の意見を取り入れた第二次ガイドライン案が1996年に作成され、検討されてきている。

これらガイドラインを設定する目的は、国際的ハーモナイゼーションの基に化粧品、医薬品などの構成成分である化学物質の安全性を確保することにあると考える。国際的ハーモナイゼーション推進の必要性は、規制緩和、貿易摩擦の解消、動物愛護の精神の実現にあると思われる。

経皮吸収という現象は化学物質の安全性と有効性の両者を評価する際に重要な事象である。安全性上は局所での有害反応ならびに全身的有害反応の一因となり、有効性上は局所での効能・効果ならびに標的部位での効能・効果に影響する。

化学物質の皮膚への接触を想定した場合、化粧品や外用医薬品など意図的に接触するものと、農薬や日用雑貨品などに原因して偶発的に接触するものがあるが、安全性の観点からは意図的あるいは偶発的に拘らず、化学物質の経皮吸収性が一つの評価要因である。このことは行政上からも重要であり、医薬品や医薬部外品の新規成分の承認申請には吸収・分布・代謝・排泄のデータが必要で、特に経皮投与主体の有用成分では経皮吸収データが不可欠である。

これに関連した国内ガイドラインとしては平成3年(1991年)1月29日付厚生省薬務局通知・薬新薬第6号「薬物動態試験ガイドライン」がある。

OECDガイドラインは化学物質の安全性の確保を目的として検討され、設定を目指しており、経皮吸収試験法は *in vivo* ならびに *in vitro* の2つのガイドラインとしてまとめられつつある。本稿ではこのうち *in vivo* 試験法について紹介し、また問題点にも触れてみたい。

なお、*in vivo* 経皮吸収試験法のOECDガイドラインは以下の項目で構成されている。

- 1) Introduction (序論)
- 2) Initial Considerations (基本的考え方)
- 3) Principle of the Test (試験の原則)
- 4) Description of the Method (試験方法)
- 5) Procedure (操作手順)
- 6) Data and Reporting (データと報告)
- 7) Literature (文献)

## 2. ガイドラインの内容説明

## 1) 序論

(1) 通常実験動物で実施される毒性的研究の大部分は経口投与を用いている。しかしながら、多くの化学物質への接触は皮膚を通して起こる。皮膚に接触した後の安全性評価をするに当たって、経口投与の使用には難点がある。このガイドラインに述べられた *in vivo* 経皮吸収実験は、皮膚に接触した後の安全性評価をする際の経口投与実験からの外挿に必要な要件を与える。 *in vivo* 経皮実験が成されている場合には、急性皮膚毒性の測定(テスト・ガイドライン402)は通常必要としない。しかしながら、皮膚を通して吸収された場合は代謝されないが、経口投与された化合物は、しばしば一般循環系に到達する前に肝臓で代謝されて変化する。このことが経口毒性からの経

皮膚毒性への外挿を複雑にさせるかも知れない。

(2) 化学物質は循環系に到達する前に皮膚の多くの細胞層を通過しなければならない。皮膚透過を左右する層は死んだ細胞からなる角質層である。皮膚を通しての透過性は化学物質の親油性と表皮最外層の厚さの両者如何で定まる。一般に、ラットとラビットの皮膚はヒトの皮膚より透過性が高いと思われるのに対して、モルモット、ブタそしてサル（ヒト）の皮膚透過性はヒトのそれと同等である。

(3) 経皮吸収測定法は2つのカテゴリー、*in vivo*法と*in vitro*法に分けることが出来る。*in vivo*法は、種々の実験動物種において皮膚吸収に関する良好な情報を与えることが出来る。近年、*in vitro*法が進歩してきている。これらの方法は動物またはヒトの皮膚の全層あるいは一部の層を通しての受容液への透過を利用する。*in vitro*成績から外挿することによって*in vivo*の吸収を評価することが可能である(1)(2)。

## 2) 基本的考え方

(4) このガイドラインに述べられている*in vivo*の方法は皮膚を通しての被験物質の透過速度と、その後の血液への取込みと全身への分布とを測定することと言える。その技法は広く用いられてきている(3)(4)(5)。多くの場合、*in vitro*の経皮吸収研究が適切であるかもしれないし、また科学的に正確／適切であるときは選択されるかもしれない。しかしながら、*in vivo*の経皮吸収研究のみがリスク評価に対する必要な成績をもたらすことが出来ると言える。

### (5) ☆ *in vivo* 経皮吸収試験法の利点：

- ・ 生理学的、代謝的に完全な実験系
- ・ 多くの毒性試験に共通の動物種が使用可能
- ・ 動物での吸収データは行政当局による容認が容易（筆者追加）

### ☆ *in vivo* 経皮吸収試験法の欠点：

- ・ 生きた動物を用いること
- ・ ヒトと使用動物種（ラット）との皮膚透過性の相違の測定は困難（ヒトでの経皮吸収性を過大評価する可能性(6)(7)(8)）

- ・ 初期吸収の様相の観察が困難
- ・ 成績の保証のためにラジオリベルした物質が必要

## 3) 試験の原則

(6) 可能ならばラジオリベルされた被験物質を1用量あるいは幾つかの適当な投与量で数グループの動物の刈毛した皮膚に投与する。被験化合物は適切な包帯などによって保護し、一定の時間皮膚に接触したままにする。被験物質の摂取は防止装置（例えば首カセ）を装着することにより防ぐ。投与終了時に、包帯を除去し、皮膚を適当な清浄剤によって洗う。包帯と洗浄したものは分析のために保存し、新しい包帯などで保護する。投与期間の前、期間中そして投与後に、動物は個別の代謝ケージに収容する。そして実験期間を通して排泄物と呼気を分析のために収集する。揮発性の代謝産物が生成されないという十分な情報がある場合は、呼気の収集は省略することが出来る。試料採取の終了時に動物が屠殺され、分析のために、血液を収集し、投与部位を採取する。排泄されない物質に関して残骸が分析される。試料は適切な手段によって分析され、経皮吸収の程度が評価される(6)(7)(8)。

### <筆者追加>

経皮吸収の全体像を図1に示した。試験の原則に述べられたことを補足するなら、*in vivo*の経皮吸収試験では

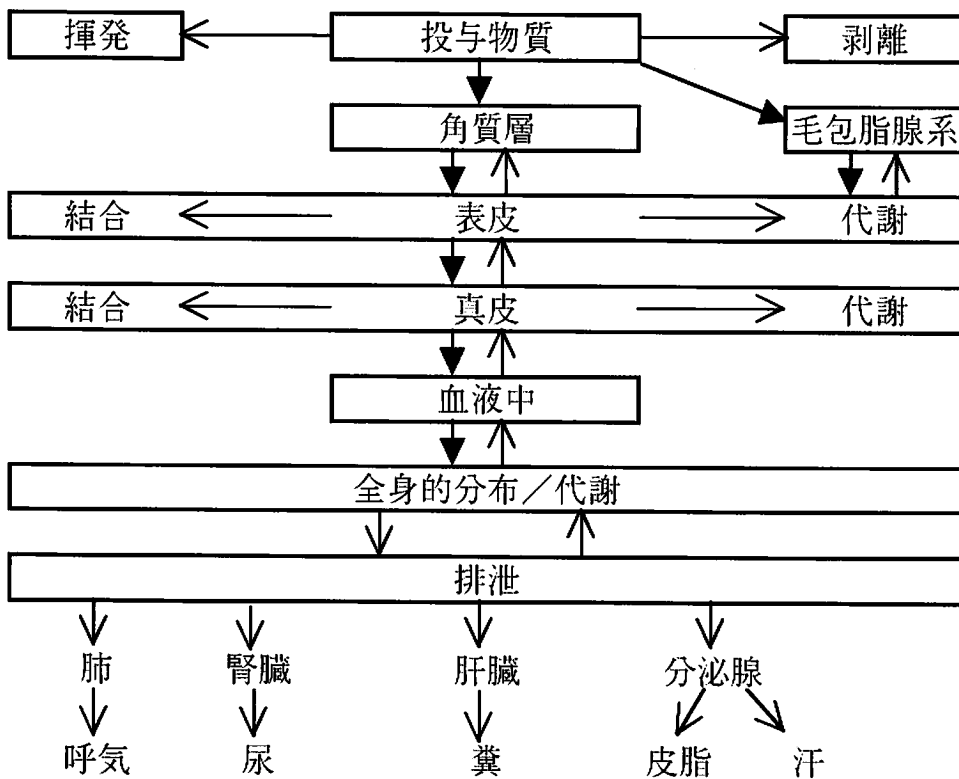
- ・ 吸収されずに投与部位に残存する投与物質
- ・ 皮膚（角質層、表皮、真皮）に存在する投与物質ならびにその代謝産物
- ・ 血液中に存在する投与物質ならびにその代謝産物
- ・ 動物の体内あるいは標的臓器に存在する投与物質ならびにその代謝産物
- ・ 排泄物中に排泄される投与物質ならびにその代謝産物を測定することにより吸収量を評価することが基本である。

## 4) 試験方法

### 動物種の選択

(7) ラットが推奨される。しかしヒトの

図1 経皮吸収の全体像



皮膚吸収速度により類似した吸収速度を有するヘアレス動物や種も使用することが出来る(6)(7)(8)。若い成熟した健康な、一般に用いられる系統の実験動物が用いられるべきである。実験の開始時に、動物の体重変動は平均体重の±20%を越えないようにすべきである。

#### 飼育環境

(8) 実験動物室の室温は22℃(±3℃)であるべきである。相対湿度は最低30%で、部屋の洗浄の間を除いて70%を越えないようにすべきであり、標準は50-60%に設定する。照明は人工的に明暗12時間間隔に設定する。飼育に関しては、通常の実験用飼料を用い、飲料水の無制限の給水とともに自由に摂取させる。研究の間そして出来れば馴化の間も、動物は代謝ケージに個別に収容する。飼料と水の不足状態は結果をどっちつかずのものにするであろうから、

そのような事態の可能性は最小限にする。

#### 実験動物の準備

(9) 動物は個別に識別出来るように印をつける。また実験室の状態に馴化するように、研究開始に先立って少なくとも5日間代謝ケージに飼育する。

(10) 馴化期間に続いて、被験物質の投与16時間前までに、各動物の肩から背の部位を刈毛する。損傷した皮膚の透過性はインタクトな皮膚と異なる。皮膚を傷付けるのを防ぐよう注意すべきである。面積はcm<sup>2</sup>皮膚当たりの被験物質の吸収量を確実に算定するに十分な大きさであるべきであり、少なくとも10cm<sup>2</sup>が望ましい。皮膚は刈毛のあと投与の前日に数時間洗ってもよい。しかしながら、皮膚あるいはそのバリア能が変質する可能性に対して用心深く配慮すべきである。洗浄および清浄剤の選択の

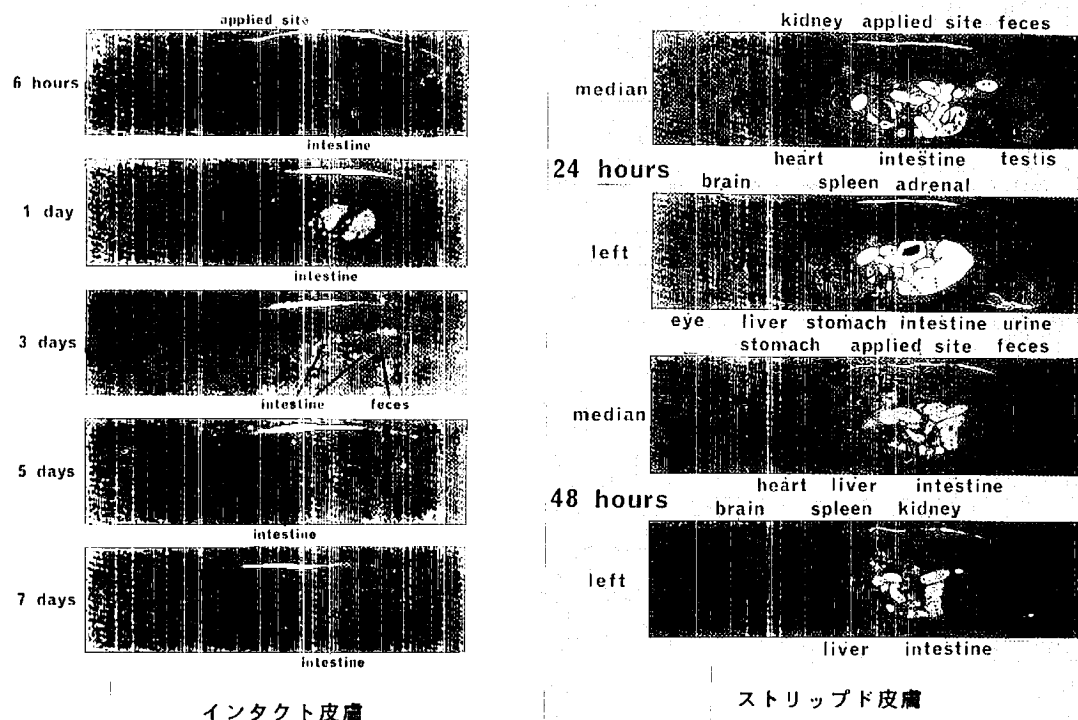


図2 全身オートラジオグラムによるラットでのヒドロコルチゾンの経皮吸収性の観察<sup>11,12)</sup>

理由は報告書において説明する。処置の後に動物は代謝ケージに戻す。

<筆者追加>

動物の被毛を取り除く際には一般に電気バリカンで刈毛した後に電気カミソリで剃毛する。これは試料投与を容易にするため、また刈毛だけではOリングを皮膚に接着するのは困難であるためであるが、この時皮膚を傷付けると著しく経皮吸収性が異なってしまう。図2に極端な例であるが、ラットにおいてストリッピングによって角質層を剥離した場合のヒドロコルチゾンの吸収性をインタクト皮膚と比較した成績を示した。損傷された皮膚では極めて経皮吸収性が高いことが解る。従って、除毛の際皮膚を傷付けないことが正確なデータを得るために重要である。出来るだけヘアレス動物を用いることが望ましい。このガイドラインでは動物の背部に投与部位を限定しているようであるが、後で述べるように(図16参照)同じ動物であっても部位に

よって経皮吸収性は異なる。安全性試験の項目として経皮吸収を観察する場合、より吸収性の高い腹部皮膚を投与部位とすることも一考すべきであろう。

被験物質

(11)もし可能であるならば、被験物質は代謝的に安定な位置で、好ましくは<sup>14</sup>Cによってまた適切な放射化学的純度(>98%)でラジオラベルする。ラジオラベル化合物は使用時に必要に応じてノンラジオラベル化合物で希釈する。被験物質の比活性と放射化学的純度を知っておく。関連した試料の中の化合物に対して適切な確認法の手段があり、化合物の代謝が十分に把握されている場合、ノンラジオラベル化合物が使用可能である。

投与試料の調製

(12)被験物質は皮膚によく接触するように適当なベヒクル(例えばアセトン)に混ぜて調製する。液体は通常希釈されずに試

験される。また、希釈しても試験が可能である。計画された投与条件での被験物質の安定性を知っておく。皮膚の透過性はベヒクルによって著しく変化し得るので、用いる溶媒には注意深い配慮が必要である。通常、ベヒクルが必要な場合は、市販処方用いられている物質を優先して使用する。

## 5) 操作手順

### 使用動物の数および性

(13) 各試料採取時に一つの性別で少なくとも4匹の動物を使用する(例数4以上)。もし雄雌の間でかなりの性差を示す成績があるならば、より反応しやすい性を選ぶ。もしその様な成績がないならば、両方の性の動物を用いる。

### 投与試料の適用

(14) 投与直前に、動物を代謝ケージから出し、被験物質あるいはベヒクルと反応しない材質で出来た、3~4 cmの既知の内径のOリングをシアノアクリレート接着剤を用いて刈毛した部位の皮膚に固定する。リングが皮膚に確実に接着したなら、一時点につき最低4匹の動物を用いて、単回投与として適当な用量の被験物質をOリング内の刈毛した皮膚上に均一に投与する。Oリングを固定する時また化合物を投与する時に、動物は安静にさせるか麻酔をかけることを推奨する。より多くの量が当該部位に用い得るとしても、投与部位以外の部位への漏れが無いようにするため、 $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ の用量が推奨される。適当なカバーでOリングを覆って固定する。Oリングは非密封状態を保ちまた処置皮膚上でカバーがこすり取られるのを防ぐだけの十分な厚さが必要である。それから動物を個別代謝ケージに戻す。

### <筆者追加>

このガイドラインではOリングによる投与方法にのみ言及している。しかしながら、投与試料の剤形も考慮に加えて、動物に適用する場合他の投与方法も考えられる。例えば、Bartekら<sup>1)</sup>は大型動物に経皮投与する保護具として図3に示した如く、接着フォームなどから成るものを用いて試料を適用している。筆者らはヘアレスマウスあ

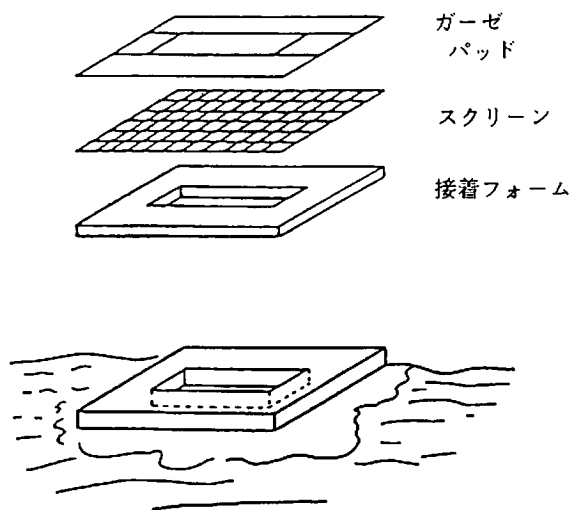


図3 *in vivo* 経皮投与の保護具の例<sup>1)</sup>

るいはラットに検体を適用する際、図4あるいは図5に示した閉塞投与方法をしばしば用いている。ルミラー膜(東レ)で裏打ちした直径3 cmの濾紙に検体を均一に塗布し、動物の背部に貼付して、その上をマイクロポア・サージカルテープ(3M)で巻いて被覆している。ラットの場合は更にその上を弾力包帯で保護している。クリーム状の試料の適用ではOリングを付着するよりも濾紙などに均一に塗布して投与するほうが動物に対する処置として苦痛が少ないと考える。

なお、この項でOリングの内径を3~4 cmとしているが、3 cmであると投与面積は $7 \text{cm}^2$ であり、実験動物の準備の項で記述されている望ましい面積 $10 \text{cm}^2$ に満たないという矛盾が生じる。正式のガイドラインでは訂正されるであろう。

### 投与期間および観察

(15) 投与時間は6あるいは24時間が用いられるが、その選択は期待する投与時間と被験化合物の予想される透過/吸収カイネティクスとに基づく。投与の間、一定間



図4 ヘアレスマウスへの経皮投与図

隔で動物の毒性／異常性の反応兆候を観察する。投与期間の終了時に投与部位皮膚の刺激性反応について観察する。

#### 残存投与試料の除去

(16) 投与期間の終了時に動物に麻酔をかけ、各動物からカバーを除去し、分析のために別々に保管する。身体の他の部位を汚染しないよう注意して、全ての動物の処置した皮膚を綿花を用いて洗浄剤によりすくなくとも3回洗う。洗浄剤は被験物質の取り込みへの影響が最小で、かつ皮膚から被験物質を効果的に除去できるものを選択する。投与部位を綿花を用いて乾燥する。動物あたり1セットにして綿花と洗浄液をは分析のために保管する。新しいOリング・カバーを装着して、動物を個別の代謝ケージに戻し、以降の観察に供する。

#### <筆者追加>

この項で洗浄剤を用いると述べているが、アルコールのような有機溶媒を用いると被験物質の経皮吸収を促進したり、皮膚中から物質を抽出したりする可能性がある。綿花での拭き採りか、温水で湿らせた綿花での拭きとりで十分と考える。

#### 測定試料の採取時期

(17) 投与開始後6そして24時間に試料を収集する。その後は実験の終了まで毎日収集する。通常は3ポイントで十分であるが、期待する目的あるいはカイネティック・データ状況により適切なタイムポイントを設定して試料を収集することができる。

#### 測定試料の採取

(18) 研究期間を通して代謝ケージにより尿と糞の別々の収集する。また、代謝ケージにより $^{14}\text{C O}_2$ や揮発性の $^{14}\text{C}$ でラベルされた化合物の収集も出来、必要に応じて(5%以上産生する場合)、それらを分析する。各採取時間毎に、尿、糞そして捕集した液体( $^{14}\text{C O}_2$ や揮発性の $^{14}\text{C}$ でラベルされた化合物)を各動物群から個別に収集する。もし揮発性の放射性化合物が生成しないという十分な情報があるならば、解放型のケージも使用出来る。

(19) 各動物群について適切な時期に、人道的に動物をサクリフェイスして、血液を全血および血漿の分析のために採取する。カバーとOリングを分析のために除去する。投与部位の皮膚そして同じ面積の刈毛した非投与部位の皮膚を採取し、分析する。個々の動物の残骸を分析のために保管する。通常残骸のトータル分の分析で足りるが、もし他の研究によって指摘されており、必



図5 ラットへの経皮投与図

要と考えられる場合は標的臓器を採取し分析する。サクリフェイス時、代謝ケージからサンプルを採取した後、ケージとトラップを適切な溶媒によって洗浄する。洗浄液は捕集して保管おき、分析する。同様の洗浄液が投与部位の除去などに用いられた器具からも得られる。

### 分析

(20) 各測定試料の中の化合物の量を、適切な環境のもとで、親化合物と代謝産物あるいはラジオラベルした物質に関して認知された手段によって分析する。被験物質の回収率は100±10%が望ましい。ラジオラベル物質を用いている場合は、全ての化合物と代謝産物を分析し得る。より正確な経皮吸収結果を得るために、親化合物のみの分析よりも代謝産物に独自の分析を用いる方が適切である場合がある。

### 6) データと報告

#### データ

(21) 以下の項目に関して、各測定時間毎に各動物群で測定する。

- ・保護用器具（カバーとOリング）に付着している化合物の量
- ・皮膚から洗い出すことの出来る化合物の量

- ・皮膚から洗い出すことの出来ない皮膚上あるいは皮膚中の化合物の量
- ・血液中の化合物濃度
- ・排泄物中の化合物の量
- ・動物残骸あるいは個別分析のため除去された臓器の中に残留する化合物の量

(22) 排泄物中と動物残骸中の化合物の測定量から各時間における総吸収量と投与量に対する吸収パーセントが評価可能である。投与期間を通しての $\text{cm}^2$ 皮膚当たりの化合物の吸収量も得ることが出来る。被験物質の濃度や接触時間に無関係な定数として、別々の結果を比較できるようにするため透過定数が算出される。一般的に、皮膚中に残留する投与物質は全身的に吸収される可能性があるということが考えられる。

### 試験報告書

(23) 試験報告書は以下の情報を含まねばならない。

#### ☆被験物質に関して

- ・物理的性質、純度、物理化学的性質
- ・同定のデータ
- ・もし適切ならば、ラジオラベリングの詳細
- ・濃度 (mg/ml) と投与量 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  あるいは

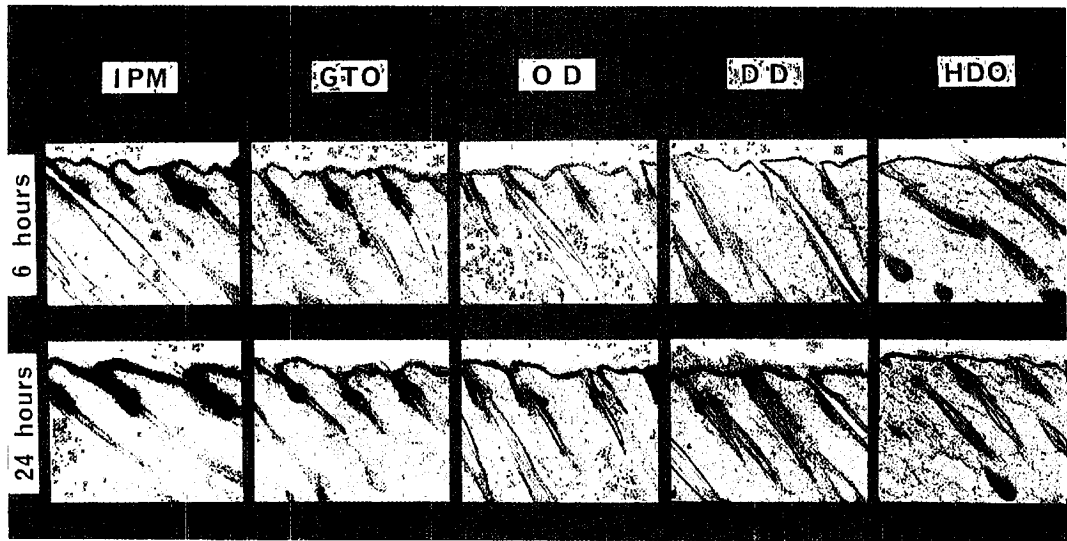


図6 香粧品用油剤の経皮吸収性<sup>4)</sup>

IPM : isopropyl myristate

DD : decanoxyl decane

GTO : glyceryl tri-(oleate)

HDD : 2-hexyldecanoxyl octane

OD : octadecane

は  $\text{mg}/\text{cm}^2$ )

☆ベヒクル (もし適切ならば) に関して

- ・もし水とは異なるならば、ベヒクルの選択の正当性
- ・ベヒクルの pH

☆被験動物に関して

- ・用いた種属と系統
- ・動物の数、年齢、性
- ・入手先、飼育条件、飼料など
- ・試験開始時における動物個々の体重

☆試験条件に関して

- ・被験物質調製の詳細、調製物の投与量、達成濃度、安定性そして均質性
- ・被験物質の投与の詳細 (投与部位、評価方法、密封/非密封、抽出法、検出法、確認法)
- ・飼料と給水の性質の詳細

☆結果に関して

- ・毒性の徴候を含む、毒性反応のデータ
- ・各測定時間における吸収のデータ
- ・適切な場合には結果の統計的処理

被験化合物の経皮吸収に関する引用可能な他のデータとの比較を加えて、結果を説明する。

最後に結果のディスカッションを加え

る。

#### 7) 文献

- 1) Scott, R. C., Batten, P. L., Clowes, H. M., Jonnes, B. K. and Ramsay, J. D. (1992) Further Validation of an in vitro method to reduce the need for in vivo studies formeasuring the absorption of chemicals through rat skin. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 19, 484-492.
- 2) ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No.20.
- 3) Zendzian, R. P. (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8(5), 829-835.
- 4) Kempainen, B. W., Reifenrath, W. G. (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.
- 5) EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.
- 6) Bronaugh, R. L., Wester, R. C., Bucks, D., Maibach, H. I. and Sarason, R. (1990) In vivo percutaneous absorption of fragrance ingredients in rhesus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.*, 28, 369-373.
- 7) Feldman, R. J. and Maibach, H. I. (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest. Dermatol.*, 54, 399-404.
- 8) Scott, R. C. and Dugard, P. H. (1989) The properties of skin as a diffusion barrier and route for absorption.



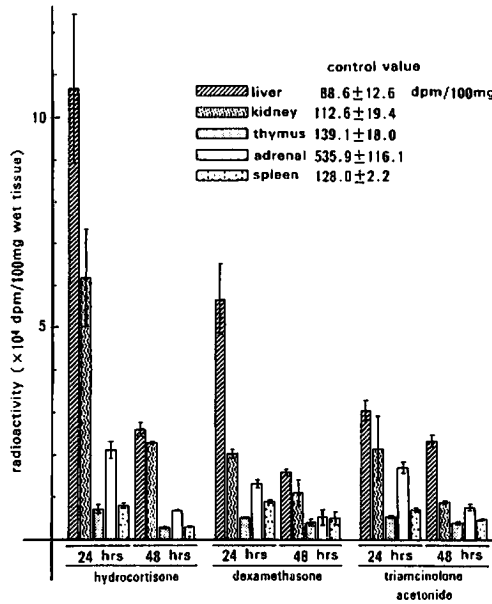


図7 ラット剥離皮膚に投与したコルチコステロイドの各種臓器への分布量測定による経皮吸収性の観察<sup>2)</sup>

Handbook Exp. Pharmacol., 87/11, 93-114.

- 9) Wester, R. C. and Maibach, H. I. (1991) *In vivo* percutaneous absorption. In: Dermatotoxicology, 4th ed., Marzulli FM and Maibach HI. Hemisphere Publishing company, New York, 75-96.
- 10) Zendzian, R. P. (1991) US Environmental Protection Agency. Dermal absorption studies of pesticides. Sub-division F: Hazard Evaluation: Humans and domestic animals. Series 85-3.

#### <筆者追加>

安全性の面からではないが、ここで筆者らの実験した *in vivo* 経皮吸収試験の結果に関して、参考のため二三紹介しておく。

化粧品に用いられる成分としての油剤についてモルモットを実験動物として経皮吸収をマイクロオートラジオグラフィにより観察した結果を図6に示した<sup>4)</sup>。この方法によっても化学物質の吸収の程度を比較することが出来、また皮膚局所での吸収経路を観察することが可能である。油剤は経皮膚付随器官つまり毛包経路で主に吸収されており、isopropyl myristateが吸収性が高く、2-hexyldecanoxy octaneが吸収性が低かった。

図7にはラット剥離皮膚に投与したコルチコステロイドの経皮吸収性を各種臓器へ

の放射活性の分布測定により検討した結果を示した<sup>2)</sup>。この成績からは投与24時間において

hydrocortisone > dexamethasone > triamcinolone acetonide

の順に吸収量が多いことが判明した。

しかしながら、同じコルチコステロイドをラットのインタクト皮膚に投与して、排泄物(尿および糞)の中に排泄された放射活性から経皮吸収性を観察すると、図8のようになり、dexamethasoneの吸収量が低いという結果であった<sup>1)</sup>。図7と図8の成績は吸収の度合と同時に臓器への蓄積性と代謝排泄の速度を考慮すべきであることを示している。

化粧品の有用成分であるパンテチンのモルモットにおける経皮吸収を、基剤の影響の観点から観察した結果を図9ならびに図10に示した<sup>5)</sup>。肝臓と腎臓への分布量と排泄物(尿および糞)の中への排泄量を勘案すると、パンテチンの吸収性を高める基剤としてW/Oクリームが優れていることが示唆された。

これらの実験はガイドラインに記述され

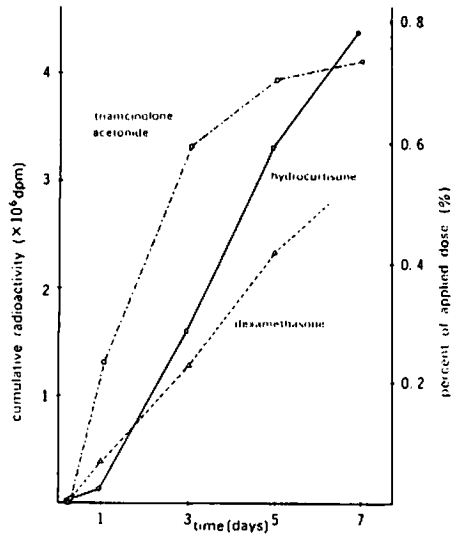


図8 ラットにおける排泄物中含有量測定による  
コルチコステロイドの経皮吸収性の評価<sup>1)</sup>

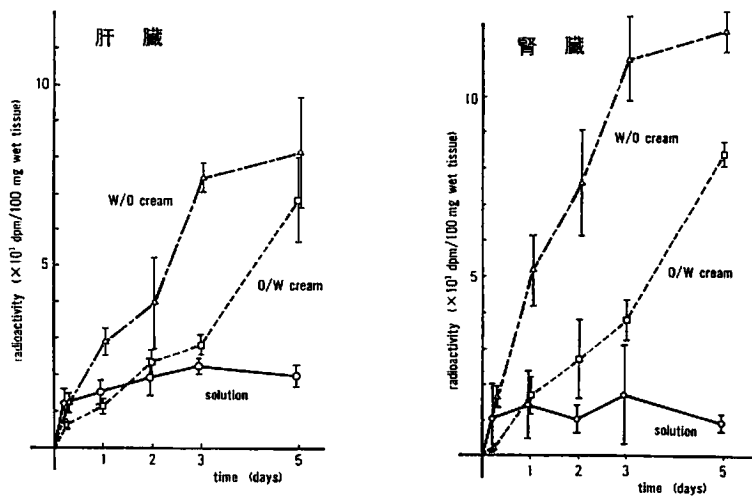


図9 モルモットでの肝臓および腎臓への分布量測定による  
バンテチンの経皮吸収に対する基剤の影響<sup>2)</sup>

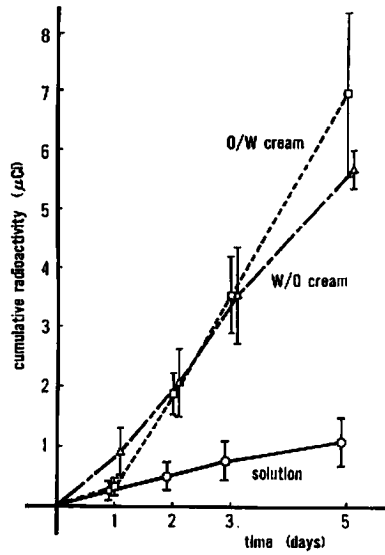


図10 モルモットでの排泄物中含有量測定による  
バンテチンの経皮吸収に対する基剤の影響<sup>5)</sup>

Tregear	Marzulliら	McGreesh	透過性
ラビット	マウス	ラビット	高
ラット	モルモット	ラット	↓
モルモット	ヤギ	モルモット	
ヒト	ラビット	ネコ	
	ウマ	ヤギ	
	ネコ	サル	
	イヌ	イヌ	
	サル	ブタ	
	ブタ		
	ヒト		
	チンパンジー		

表1 動物種差による皮膚透過性の相違 (in vitro 測定)<sup>6)</sup>

た経皮吸収の試験法に則している点が多々有り、参考になれば幸いである。

### 3. *In vivo* 経皮吸収試験法の問題点

*In vivo* 経皮吸収試験法には大きく以下に述べる3つの問題点がある。

1) 動物の種差により経皮吸収性が異なることによりヒトでの吸収性の外挿の妥当性がガイドラインの中にも *in vivo* 経皮吸収試験法の欠点として触れられているが、動物の種差によって経皮吸収性は異なっている。表1に Westerら<sup>6)</sup>が種差による皮膚透過性の相違をまとめたものを示した。ヒトに近

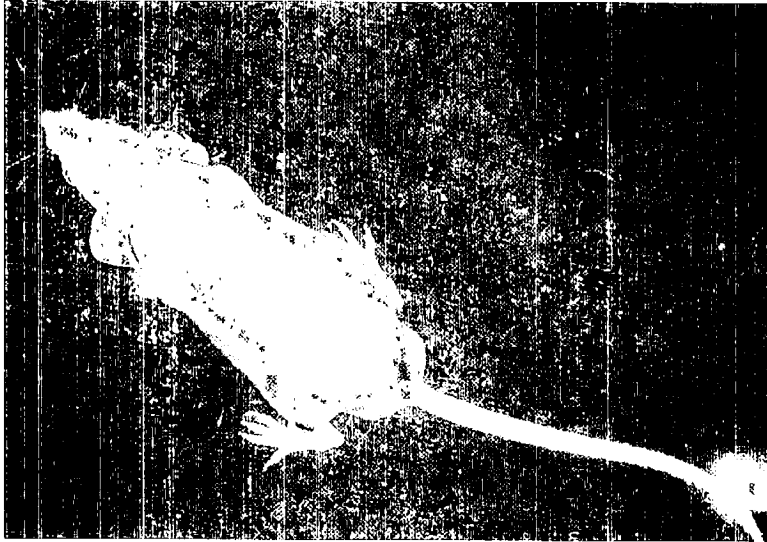


図 11 ヘアレスマウス

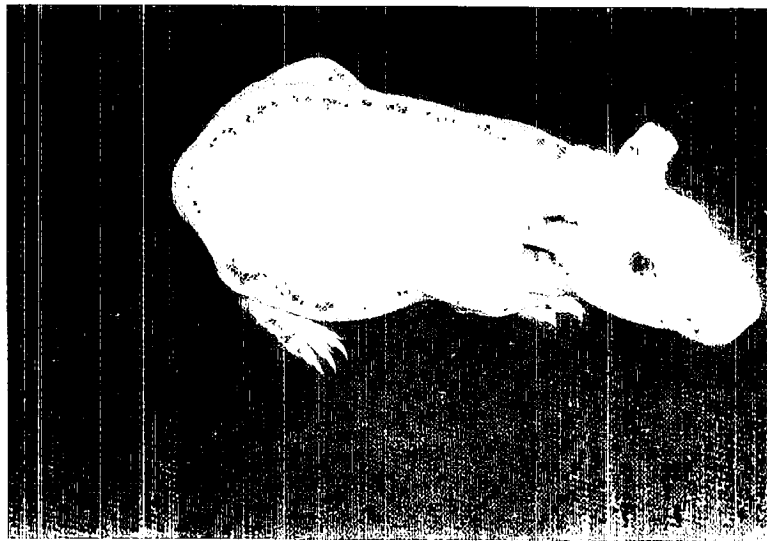


図 12 ヘアレスモルモット

似する吸収性を示す動物はブタやサルであるが、これらの動物は実験動物としての利用に取扱い、価格そして入手面から困難さがある。従って、ラットやマウスが多くの経皮吸収実験に用いられるが、これら動物の皮膚はヒトに比較して吸収性が高く、ヒトでの吸収性を過大評価する可能性がある。ラットやマウスにより得られたデータをヒ

トに当てはめて考える際は、十分な配慮が必要である。図11にヘアレスマウス、図12にヘアレスモルモット、そして図13にゲッチンゲン・ミニチュアビッグの外観を参考のため示した。

また、Bartekら<sup>3)</sup>が報告している6種の化合物の経皮吸収性の動物間での比較を図14に、Hoelgaardら<sup>7)</sup>がリノール酸に関してヒ

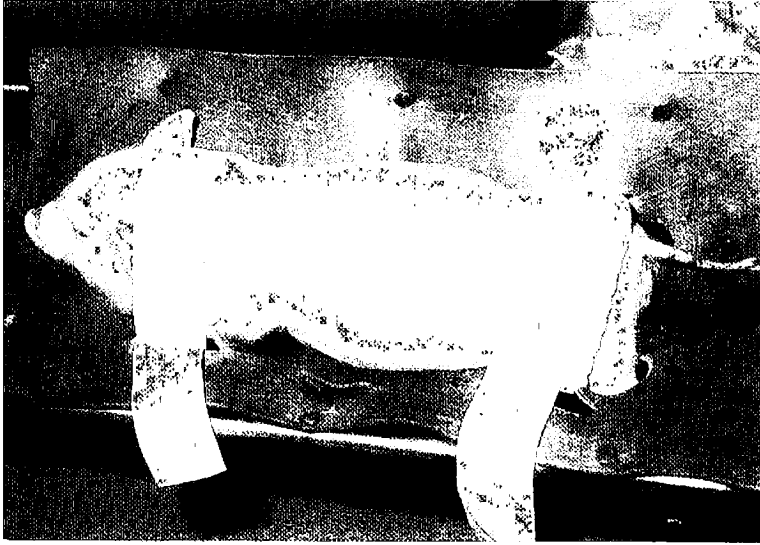


図13 ゲッチングン・ミニチュアピッグ

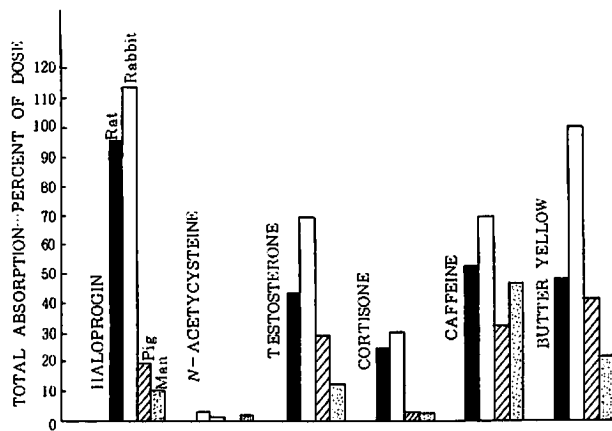


図14 各種化合物の経皮吸収性の動物間比較<sup>3)</sup> (in vivo)

ト皮膚とヘアレスラット皮膚で透過性を観察した結果を図15に示したので参考にされたい。両図の成績からヒトに比べラットの皮膚は経皮吸収性が高いことは明らかであり、ガイドラインで推奨される実験動物であるラットを用いる場合は十分な配慮が必要なことを示している。なお、図16に示し

た様に同一のヘアレスラット皮膚でも部位により透過性が異なることもあり、投与部位の決定においても配慮されるべきであろう。

2) 動物愛護という世界的風潮を考慮した場合の生きた動物を用いることの是非

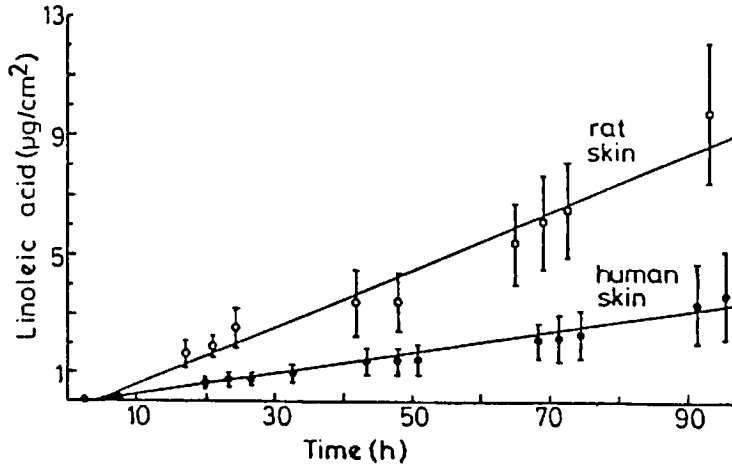


図 15 ヒト皮膚とヘアレスラット皮膚におけるリノール酸の透過性の比較<sup>7)</sup>

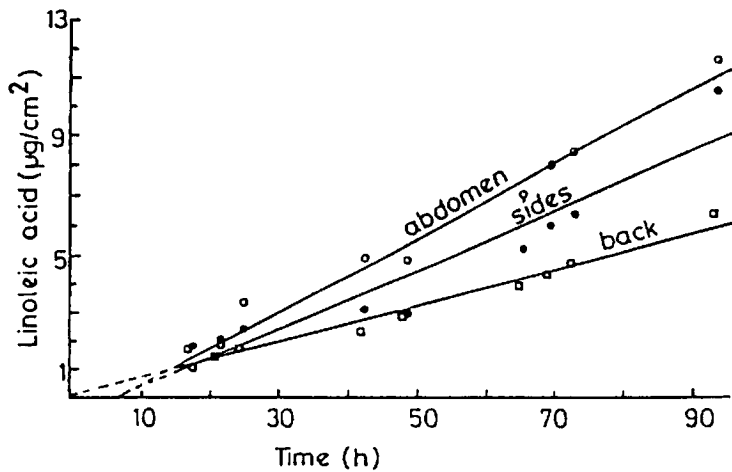


図 16 皮膚採取部位の違いによるヘアレスラット皮膚でのリノール酸の透過性の差異<sup>7)</sup>

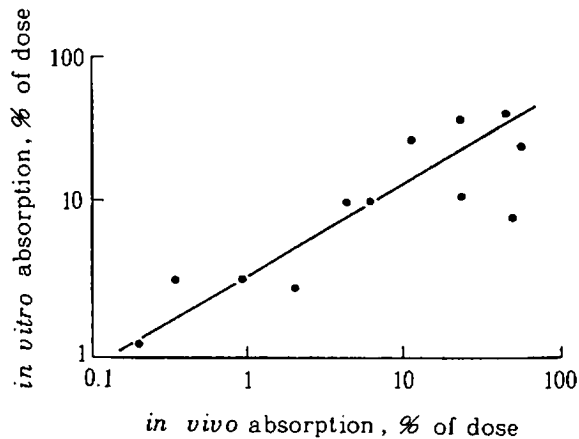


図 17 *in vivo* と *in vitro* との経皮吸収量の比較<sup>8)</sup>

化合物	hippuric acid	nicotinamide	nicotinic acid
	acetylsalicylic acid	thiourea	salicylic acid
	chloramphenicol	benzoic acid	phenol
	caffeine	urea	dinitrochlorobenzene

動物実験代替法の開発は、動物愛護の精神を尊重して、生きた動物を用いることを極力減じることによりその大きな目的がある。しかしながら、*in vivo* 経皮吸収試験法においては生きた動物を用いることが不可欠であり、それによりより確実な経皮吸収データを得ることができる。そこで、この点を改善するため OECD ガイドラインでは *in vivo* 経皮吸収試験法とともに *in vitro* 経皮吸収試験法の設定が検討されている。後者に関しては詳細が本プロシーディングの前稿に述べられているので参照されたいが、ここで問題となるのは *in vivo* と *in vitro* の経皮吸収実験成績の相関性が認められるか否かである。

Franz<sup>8)</sup> はヒトにおいて 12 種の有機化合物について *in vivo* と *in vitro* の経皮吸収性の相関を検討し、図 17 に示した如く高い相関性があると報告している。また、Bronaugh<sup>9)</sup> は 3 種の有機化合物についてラットで実験し、図 18 に示した如く、*in vivo* と *in vitro* の経皮吸収の成績が 5 日間トータルでみると良く一致したと述べている。これら高い相関を認めた報告はあるが、全ての化合物に

適合するとは判断出来ない。*in vitro* のデータは *in vivo* の経皮吸収性を予測するデータとなる可能性は高いが、注意深く評価すべきであり、安全性の観点から *in vitro* の透過性データのみで判断するにはまだ時期尚早と考える。

### 3) ラジオラベルした化合物を被験物質とした場合、特別な施設が必要

我が国においては、行政上一定量以上のラジオアイソトープの使用に当たって、「放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律」により規制されている。使用に先立って、法律に適合するようラジオアイソトープ使用施設などの条件を整え、科学技術庁に申請して使用許可を受ける必要がある。この点からの実験上の制限も課題であろう。

## 4. おわりに

ここで紹介したガイドライン案に関しては、1997 年 10 月に米国において OECD 運営委員会がワークショップを開催し、検討が

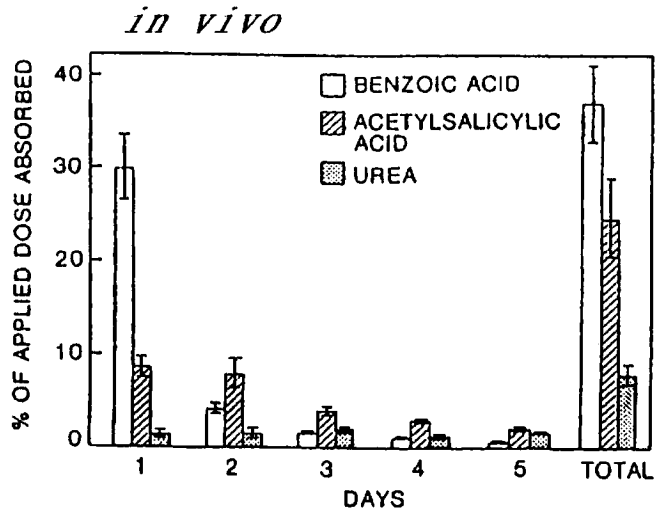


FIG. Percutaneous absorption in the rat *in vivo*. Values are  $\bar{x} \pm SE$  of five to eight determinations.

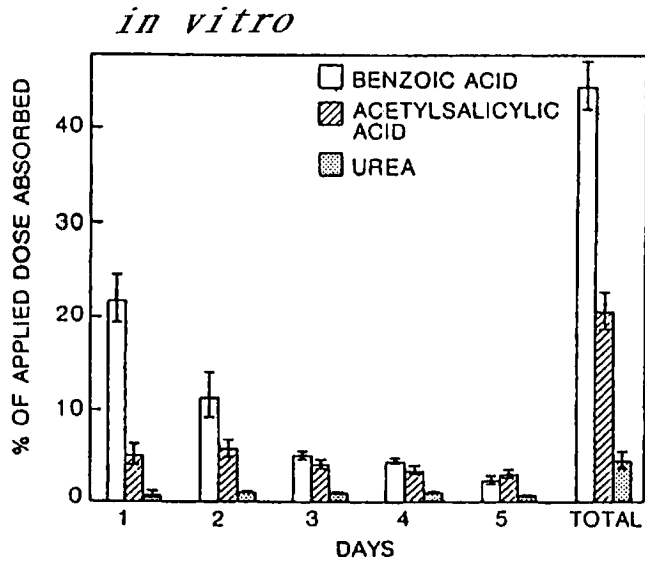


FIG. Percutaneous absorption in the rat *in vitro*. Values are the  $\bar{x} \pm SE$  of four to eight determinations.

図 18 ラットにおける 3 種化合物の *in vivo* と *in vitro* の経皮吸収の比較<sup>9)</sup>



なされる予定であった。しかし、特に *in vitro* 経皮吸収試験法の案に課題が残り、開催が見送られたとのことである。現在、更にガイドライン案の改訂作業を行っており、より詳細な内容にして本年（1998年）夏までに完成を目指しているという。何れにせよ本ガイドラインは基本的な試験方法を示した指針であって、その時点での科学水準に照らして適正な評価を行うことができるなら、細部の実験の改善は可能であり、ガイドライン内容の項のおわりで筆者追加として述べた実験例も役立つと考える。動物実験代替法として *in vivo* 経皮吸収試験法に代替する適切な *in vitro* 経皮吸収試験法が確立されることを期待して本稿を終わりたい。

## 5. 参考文献

- 1) 鈴木正巳 (1982) コルチコステロイドの経皮吸収と全身分布に関する研究, 日皮会誌, 92, 757-776.
- 2) 鈴木正巳 (1984) コルチコステロイドの経皮吸収と全身への影響に関する研究—特に分布と諸臓器の変化との関連について—, 日皮会誌, 94, 831-843.
- 3) Bartek, M. J., LaBudd, J. A. and Maibach, H. I. (1972) Skin Permeability in vivo: Comparison in Rat, Rabbit, Pig and Man, J. Invest. Dermatol., 58, 114-123
- 4) Suzuki, M., Asaba, K., Komatsu, H. and Mochizuka, M. (1978) Autoradiographic Study on Percutaneous Absorption of Several Oils Useful for Cosmetics, J. Soc. Cosmet. Chem., 29, 265-282.
- 5) 鈴木正巳, 小松秀雄, 佐藤政博 (1986) パンテチン

- の経皮吸収に関する研究, 日皮会誌, 96, 725-735.
- 6) Wester, R. C. and Maibach, H. I. (1985) In vivo Animal Models for Percutaneous Absorption, In "Percutaneous Absorption-Mechanisms, Methodology, Drug Delivery-" ed. by Bronaugh, R. L. and Maibach, H. I., Marcel Dekker, New York and Basel, 251-266.
- 7) Hoelgaard, A. and Mollgaard, B. (1982) Permeation of Linoleic Acid through Skin in vitro, J. Pharm. Pharmacol., 34, 610-611.
- 8) Franz, T. J. (1975) Percutaneous Absorption on the Relevance of in vitro Data, J. Invest. Dermatol., 64, 190-195.
- 9) Bronaugh, R. L., et al. (1982) Methods for in vitro Percutaneous Absorption Studies. I. Comparison with in vivo Results, Toxicol. Appl. Pharmacol., 62, 474-480.

### < 質疑応答 >

Q 1 : (板垣座長) *in vivo* 経皮吸収は必要な実験項目と考えますか?

A 1 : 安全性を評価する上で全身的影響、標的臓器に対する影響などを観察するためには必要である。経皮投与後のコルチコステロイドの標的臓器（胸腺、副腎、脾臓）への萎縮作用はその例と考える。

Q 2 : (森本先生) 経皮投与、観察期間が6～24時間と述べられており、短かすぎると考えるが、意見を聞きたい。

A 1 : 我々は長い実験では7日間ぐらい観察する。被験物質を皮下投与して生物学的半減期を観察して、投与、観察期間を決めるのが良いと考える。