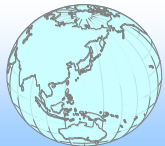




「医薬部外品の製造販売承認申請における 安全性に関する資料のあり方検討会報告」

皮膚感作性試験分科会

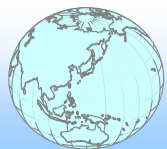
坂口 斉（花王株式会社）



検討委員会名簿

氏名	所属
大野泰雄	国立医薬品食品衛生研究所
金澤由基子	財団法人 食品薬品安全センター (日本動物実験代替法学会)
小島肇	国立医薬品食品衛生研究所
坂口齊	花王株式会社 (日本化粧品工業連合会)
中田土起丈	昭和大学
横関博雄	東京医科歯科大学

敬称略

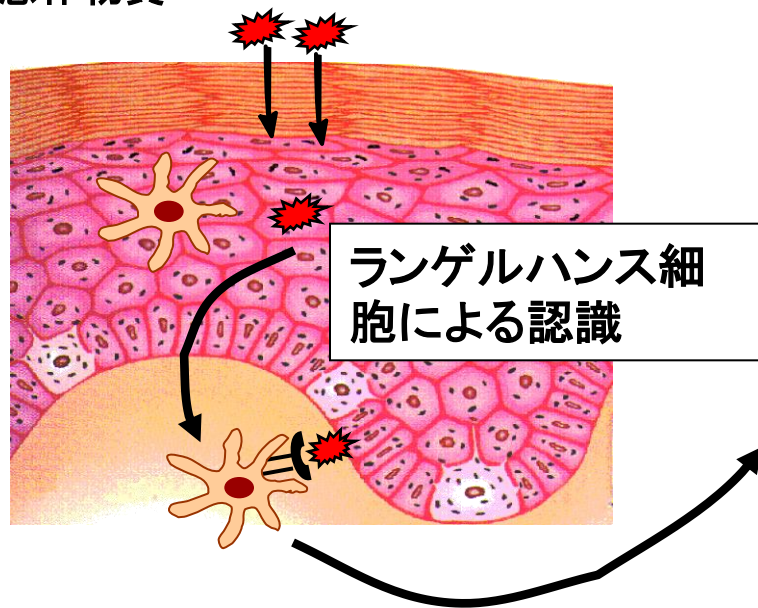


皮膚感作性

皮膚に化学物質が繰り返し接触することで感作成立が誘導され、その後再び同じ物質や類似物質に触れることで皮膚等の接触部位に紅斑や浮腫といった炎症反応を起こす毒性

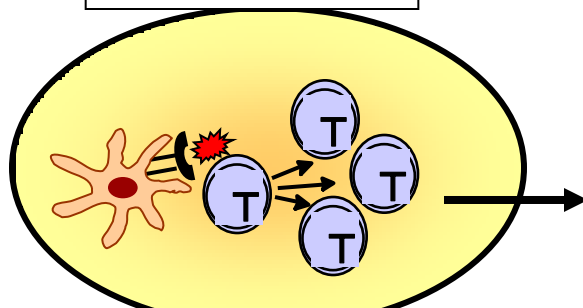
感作過程

感作物質



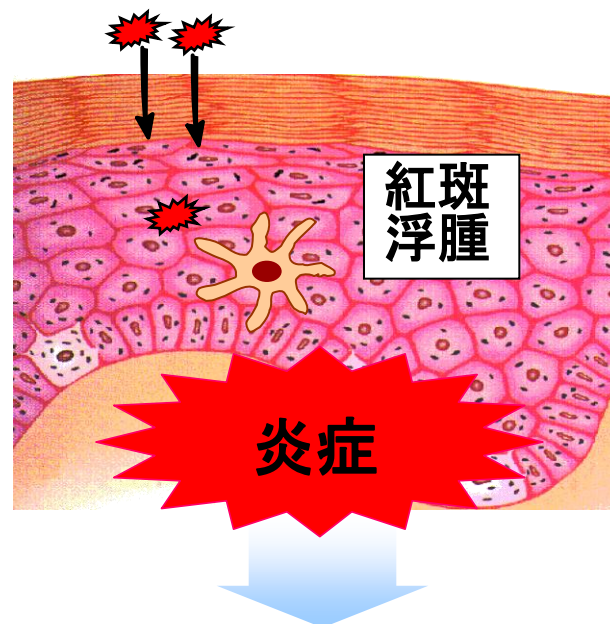
リンパ節

抗原提示

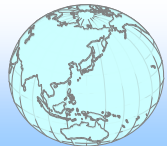


Local Lymph Node Assay

惹起過程

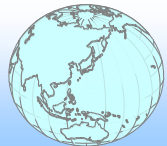


モルモットでの試験



発表内容

1. 目的
2. 検討した代替法の名称とその理由
3. 試験法の概要
4. 試験法としての採用の可否
 長所
 短所（使用範囲、制限）
5. まとめ



本分科会の目的

現状：

医薬部外品の製造販売承認申請においては、医薬品ガイドラインに収載されているモルモットを用いる皮膚感作性試験が実施されることが多い



これまでと同等又はそれ以上のヒトへの安全性を担保しつつ
動物愛護の観点を踏まえて、今後の皮膚感作性評価のあり
方を考える

- **社会的に認知されている動物実験代替法**が医薬部外品の承認申請において**有用であるか？**
- それらの試験法を用いて申請する場合の**試験法の限界等を明らか**とし、今後の申請への道筋を示す

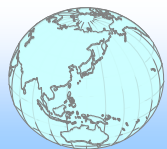


検討した代替法の名称とその理由

試験名：マウスを用いる局所リンパ節試験
(**Local Lymph Node Assay: LLNA**)

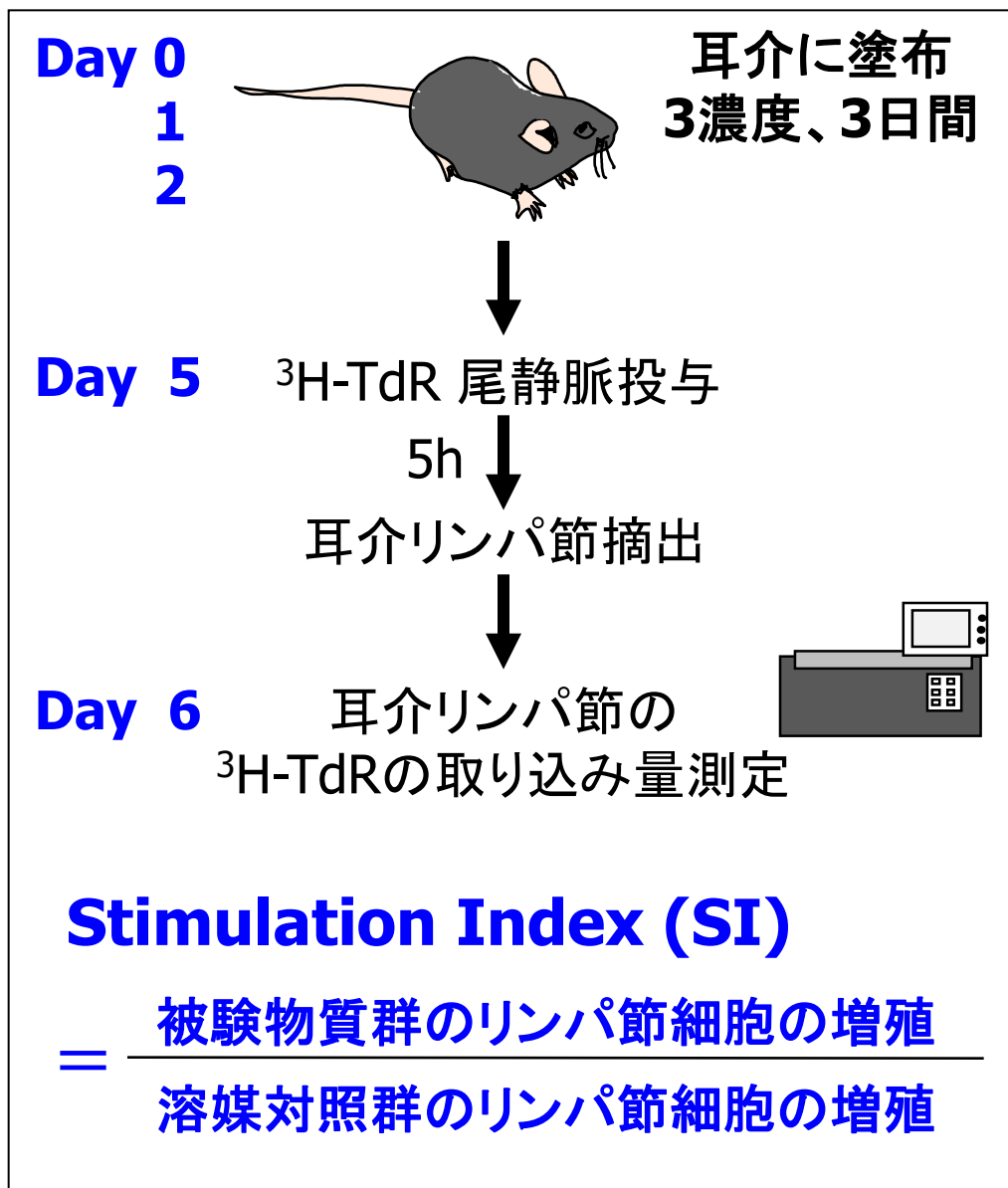
理由：

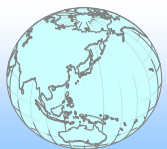
- 医薬部外品承認申請における皮膚感作性試験法として、モルモットを用いるGuinea Pig Maximization Test (GPMT)とBuehler法が最も用いられてきた
- 近年LLNAが動物実験代替法の一つとしてOECDテストガイドラインに収載され、欧米を中心に化粧品原料も含む化学物質等の申請に用いられるようになってきた
- 今後、皮膚感作性試験法として**LLNA**を用いた医薬部外品の承認申請が充分想定されるため、今回検討する事とした



試験法の概要: LLNA OECD TG 429

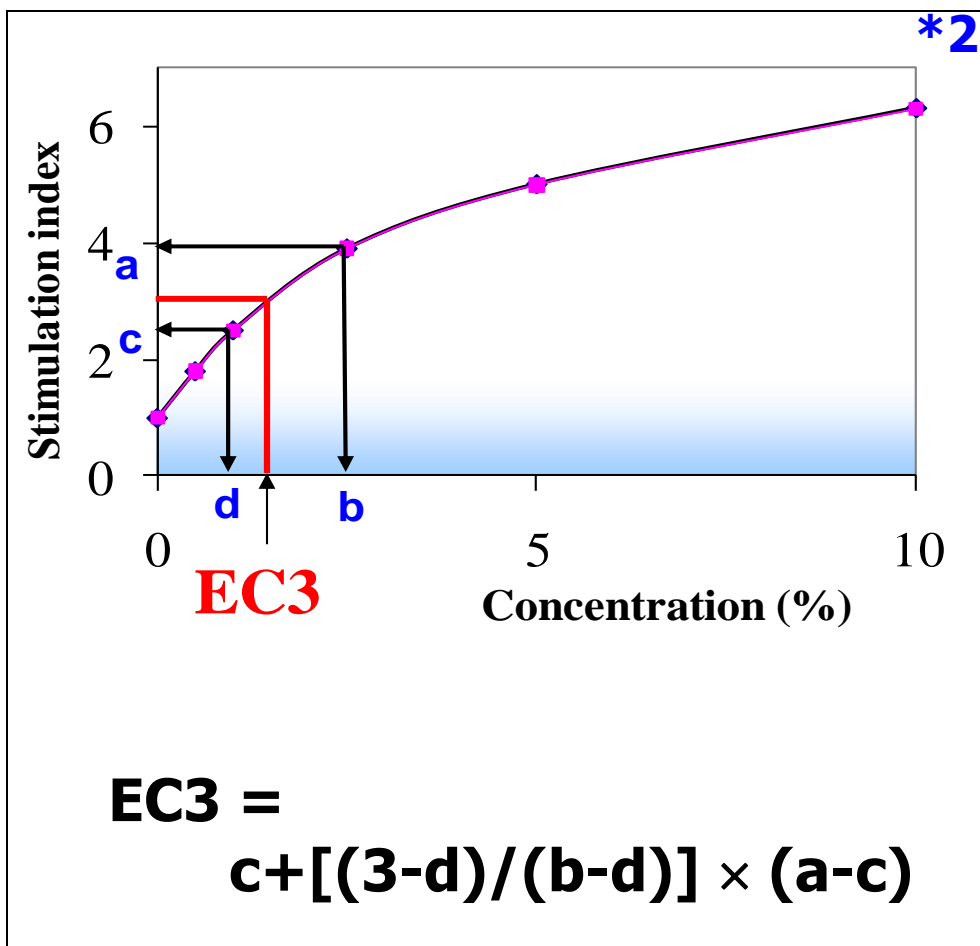
- マウス: CBA/Ca or CBA/J ♀
- 匹数: $n = 4$ / 群、最低3濃度
- 塗布量: $25\mu\text{L}$ / 耳介
- 試験濃度:
100%, 50%, 25%, 10%, 5%,
2.5%, 0.5% など
- 試験溶媒:
acetone/olive oil (4:1 v/v)
DMF, MEK, PG, DMSO
(最大の試験濃度と溶解性を加味して選択)
- 陽性判定:
Stimulation Index ≥ 3





LLNAによるランク分類

EC3 values^{*1} :
SI値が3になる濃度



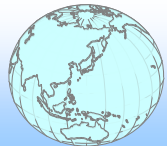
EC3値によるランク分類^{*3}

EC3値(%)	カテゴリー
< 0.1	Extreme
≥ 0.1 to < 1	Strong
≥ 1 to < 10	Moderate
≥ 10 to ≤ 100	Weak

*1: Basketter *et al.*, 1999
J. Appl. Toxicol.. 19, 261-266.

*2: Basketter *et al.*, 2004
Society of Toxicology, poster

*3: Kimber *et al.*, 2003
Food Chem. Toxicol. 41, 1799-1809.

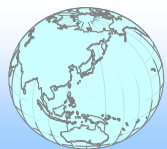


試験法としての採用の可否

- Basketterらの文献を調査し、それらの概要をまとめ委員会で検討
- 文献からLLNAは、これまで広く使われてきたモルモットを用いた試験結果並びにヒトでの結果と良い相関を示していた
- モルモット試験結果との比較では119個の化合物で一致率は88%と報告されており、ヒトとの比較では93個の化合物で一致率は88%と報告されていた(Basketterら、1999)

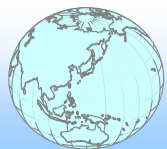


原則として皮膚感作能評価に使用できると考えた



試験法としての採用の可否: 長所

- 試験期間が短い(GPMTやBuehler法と比較)
- 動物への苦痛が低減
 - サンプル塗布は開放塗布のみ
 - アジュバントを用いない
 - 惹起処置を行わないので炎症反応などが無い
- 評価に必要な被験物質量が少量
- 客観的な判定が可能
 - 評価結果が機器の測定値によるもの(SI値)
 - モルモット試験での目視による主観的な判定ではない
- EC3値(SI値が3になると推定される濃度)により強度の比較が可能
- 色素など炎症反応が判定しにくい物質についても評価可能



試験法としての採用の可否: 短所 1

使用範囲、制限

■ 動物系統:

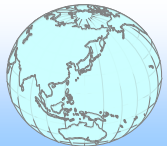
動物系統により反応に差があり、CBA/Ca、CBA/Jを推奨

■ 活性剤における偽陽性:

ラウリル硫酸ナトリウムや塩化ベンザルコニウムで偽陽性が認められており、界面活性剤の中には偽陽性を示す物質があると考えられる
活性剤の評価結果に関しては、注意が必要

■ 金属塩類における偽陰性:

金属塩類(NiCl_2 , NiSO_4)では、偽陰性となるとの報告が多い



試験法としての採用の可否: 短所 2

使用範囲、制限

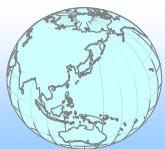
■ 溶媒について

【被験物質の濃度と溶媒の選択についてのガイダンス (OECD TG 429)】

- A. 試験に用いる溶媒は、充分量で曝露できることと溶解していることを基準として選択する
- B. 溶媒の種類は、**acetone/olive oil (4:1 v/v; AOO)**、**dimethylformamide**、**methyl ethyl ketone**、**propylene glycol**、**DMSO**の順に推奨されているが、十分な科学的裏づけが出来ている場合に限り、他の溶媒を用いても良い。
- C. 水溶性の溶媒は用いるべきではない

感作時の塗布が開放塗布であることから、溶媒の選択は皮膚の透過性や蓄積性に大きく影響するため非常に重要

(Basketter et al., Food Chem. Toxicol., 2001, 39, 621-527)



溶媒の違いによるLLNA結果への影響 1

Chemical		Vehicle							
		AOO	DMF	MEK	PG	DMSO	Acetone	50% EtOH	90% EtOH
MCI/MI	EC3	0.0049	0.0075	0.0068	0.048	0.0075	0.0076		
	Rank	Extreme	Extreme	Extreme	Strong	Extreme	Extreme		
Isoeugenol ¹	EC3	1.0	1.4	1.0	2.5	0.9		4.9	1.8
	Rank	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	Strong		Moderate	Moderate
Cinnamic aldehyde ¹	EC3	1.7	0.5	1.1	1.4	0.9		1.2	1.6
	Rank	Moderate	Strong	Moderate	Moderate	Strong		Moderate	Moderate
3-Dimethylamino propylamine ¹	EC3	2.2	1.7	1.8	>1.0	3.2		7.1	4.1
	Rank	Moderate	Moderate	Moderate		Moderate		Moderate	Moderate
Dibromo dicyanobutane ¹	EC3	5.2	6.4	0.4					1
	Rank	Moderate	Moderate	Strong					Moderate

他の溶媒より弱くランク付けされる場合

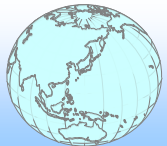
他の溶媒より強くランク付けされる場合

■ 溶媒によってEC3が異なり、ランクが変化する場合がある

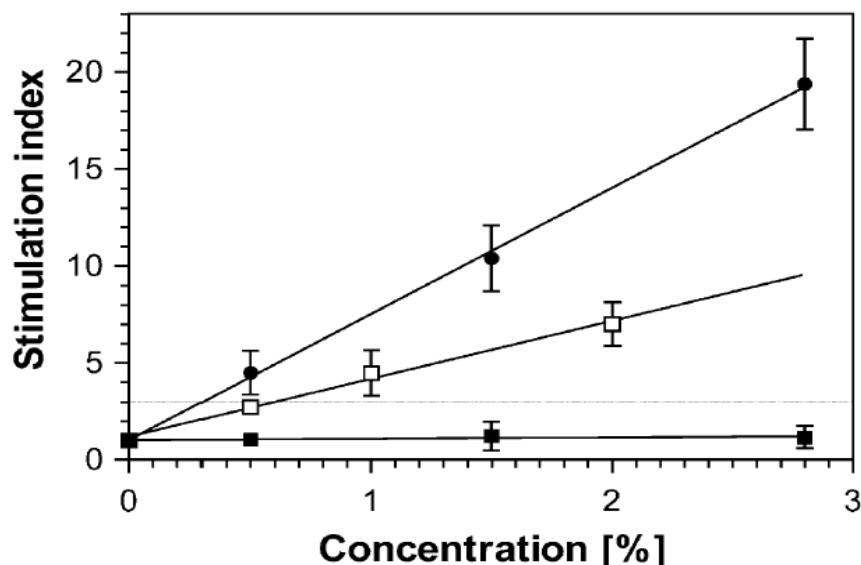
*1) ZM Wright et al., Int. J. Cosmet. Sci., 2001, 23, 75-83

■ DMSO、DMF、MEKは相対的に強い反応性

■ PGは相対的に弱い反応性



溶媒の違いによるLLNA結果への影響 2



溶媒 ; Acetone/aqua/Olive oil (AAOO)

被験物質 ;

● p-Toluenediamine (PTD)

■ Hydroxyethyl-p-phenylenediamine (HE-PPD)

溶媒 ; DMSO

被験物質 ;

□ Hydroxyethyl-p-phenylenediamine (HE-PPD)

P Aeby et al., J. Invest. Dermatol., 2004, 122, 1154-1164

HE-PPD

溶媒; DMSO ⇒ EC3=0.5~1 Rank=Strong

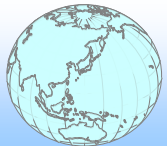
AAOO ⇒ EC3=NC Rank=Non sensitizer

評価結果を検証する上で、(特に陰性結果に対して)

① 溶媒への溶解性

② 十分に高い濃度での試験実施

の確認が必要である



試験法としての採用の可否: 短所 3

■ 皮膚感作性リスクアセスメント

許容曝露量

Acceptable
Exposure Level
(S-RfD)

=

EC3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

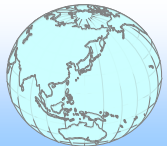
不確定因子 (Uncertainty Factor) *

*: Apiら (2006) により例示されている

- 不確定因子の数値化の根拠が曖昧である
- 製品の形態・使用量・使用方法・生活習慣が異なる日本にそのまま用いることは難しい



- ◆ 日本での運用に当たっては今後の課題
- ◆ 感作されたヒトの惹起のリスクや交差性を評価出来ない



まとめ

LLNAは

- 動物の苦痛低減や動物数の削減から意義ある代替法
 - 客観的で定量性のある試験(リンパ節細胞の増殖性を指標)
 - 染毛剤などの医薬部外品、香料や防腐剤等を正確に評価
- 医薬部外品の皮膚感作性の有無の判定に有用であろう**

注意点

- CBAマウスで評価する事
 - 適切な溶媒を用いて評価する事
- } 感作性の有無だけでなく
その強さのランク分類にも影響

今後の課題

- LLNAを用いたリスクアセスメントの実用化
- 動物を用いない皮膚感作性試験の開発



お知らせ

h-CLATシンポジウム ―日本で生まれた感作性試験代替法の概要とその応用―

日時： 平成22年1月20日(水)13:00～17:00

場所： 国立医薬品食品衛生研究所講堂

プログラム

13:00	開会の挨拶	大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所)
13:05	1. 試験の原理と概要	坂口 斉(花王株式会社)
13:25	2. 具体的試験法	足利太可雄(株式会社資生堂)
13:45	3. 施設間再現性	太田尚子(ポーラ化成工業株式会社)
14:05	―― 休憩 ――	
14:20	4. 細胞選択条件	岡本賢二(株式会社カネボウ化粧品)
14:40	5. 血清選択条件	藺さき子(株式会社資生堂)
15:00	6. 細胞培養条件	中村恒彰(ライオン株式会社)
15:20	―― 休憩 ――	
15:40	7. 香料の評価	水野 誠(株式会社コーセー)
16:00	8. 防腐剤の評価	小坂七重(花王株式会社)
16:20	9. 染毛剤の評価	加藤義直(日本メナード化粧品株式会社)
16:40	Pre validationの状況および 閉会の挨拶	小島 肇(国立医薬品食品衛生研究所)