

## 附則 「皮膚内濃度比較確認試験法」

### 1. はじめに

ヒト長期投与（安全性）試験における用量設定は皮膚内濃度を考慮し、その試験デザインは同製剤の重ね使用や同一有効成分を含有する化粧水、乳液・クリーム、パック等（同一成分を添加剤として含有する製剤も含む）の同時使用も想定して策定する必要がある。実際の使用方法における安全性を担保するため、このヒト長期投与（安全性）試験時の有効成分の皮膚内濃度は、承認申請処方製剤のそれと同等以上にしなければならない。また、既に承認済みの有効成分を、先に承認された処方製剤とは異なる処方製剤に配合して新たに申請する場合には、その有効成分の皮膚内濃度は、承認済みまたはヒト長期投与（安全性）試験実施済みの処方製剤のそれと同等以下でなくてはならない。ここでは皮膚を透過する有効成分の皮膚内濃度を比較するための考え方とその確認方法を提案する。

### 2. 皮膚内濃度比較の考え方

#### 2.1 皮膚内濃度の比較は皮膚透過試験により評価できる

一般的に、化粧品使用後の皮膚内有効成分濃度を直接測定するには様々な制約があり、測定値のばらつきも無視することができない。一方、皮膚透過試験は同じ条件で実施しやすく、また適切な条件を設定することによりばらつきを抑えられやすいことから、結果の頑健性も高いと考えられる。また、無限用量系（後述）では皮膚透過量の大小は皮膚内濃度の大小と一致する（付録 III「無限用量系と有限用量系の皮膚内濃度比較」参照）ことが知られている。処方比較によるヒト長期投与（安全性）試験の省略に資する評価を考慮する場合、皮膚内の正確な濃度を求めなくても、複数製剤間における皮膚透過量の大小が分かれば、その目的を達成することができると考えられる。以上のことから、皮膚内濃度の比較は、皮膚透過試験による比較にて評価可能であると考えた。

#### 2.2 皮膚透過試験は *in vitro* 試験を基本とする

化粧品開発を取り巻く昨今の社会情勢を考慮すると、皮膚に塗布した処方製剤の有効成分の皮膚内濃度を測定する手段として、動物実験を行うことは困難である。また、ヒトを被験対象として生体組織採取検査等の侵襲性の高い手法も存在するが、被験者の負担を考慮すると、実際に行うには難易度は高い。一方、*in vitro* 皮膚透過試験法は皮膚からの目的成分の抽出・定量の際の作業性やハイスループット性に優れている。また、異なる処方製剤における皮膚内濃度の相対的な比較は、*in vitro* 皮膚透過試験でも十分可能である。これらのことを考慮して、皮膚透過試験は *in vitro* 試験にて行うことを基本と考えた。

#### 2.3 試験用皮膚膜はヒト皮膚を推奨する

動物試料を用いる試験に対する昨今の社会的な考え方を考慮し、透過試験の皮膚膜にはヒト皮膚を用いることを推奨する。ヒト皮膚はアメリカ・フランスから一般流通しているものを入手することが可能である。ドナーによる個体差・部位差を考慮し、一度の試験で使用する皮膚は、同一ドナー・同一部位の皮膚を使用する必要がある。ヒト皮膚以外の皮膚膜を使用する場合は、ヒト皮膚との相関性について文献などを引用して言及する必要がある。

## 2.4 比較試験は無限用量系を推奨する

実際の使用量を考慮する有限用量系は、一般的に均一に塗布することが難しく、また、皮膚への塗布量が少ないため、それに伴い皮膚内へ移行する有効成分量も少なくなる。そのため、結果のばらつきが大きくなってしまい、皮膚内濃度の相対比較が困難になることがある。無限用量系の皮膚透過試験であれば、透過量の大小と皮膚内濃度の大小が一致し、実験環境の影響や塗布量のばらつきを抑えられるなどの優位性もある。また、適用量が極めて少ない場合を除き、皮膚透過量および皮膚内濃度は有効成分濃度および処方に依存することから、無限用量系が妥当である。したがって、ヒト長期投与（安全性）試験に用いる処方製剤と承認申請処方製剤を試験試料とした無限用量系における皮膚透過試験を同時に実施し、その透過量を比較することにより、2つの処方製剤における有効成分の皮膚内濃度の大小を判断することを推奨する。

## 2.5 有効成分を化粧水、乳液など複数剤形による展開を予定している場合の試験の考え方

同一の有効成分を含む製品が異なる剤形で存在し（同一の有効成分を含む化粧水、乳液、クリームなどの発売が予定されている等）、一度の化粧行動において同時使用が予想される場合には、有効成分の皮膚内濃度が最大になる条件でヒト長期投与（安全性）試験を実施する必要がある。

同時使用した場合の皮膚内濃度は単一の製品を使用した時の皮膚内濃度と異なることが考えられるため、各製品単品での皮膚内濃度だけでなく、同時使用を考慮した製品混合物についても皮膚内濃度を測定し、有効成分の皮膚内濃度が最大になる条件を提示する必要がある。無限用量系では実使用に即した重ね塗りはできないので、同時使用が予想される製品の使用比率に応じて混合した製品混合物を無限用量系にて適用する。

なお、有効成分と同一の成分を添加剤として含有している場合もあるので、同時使用を考える場合は、添加剤についても考慮する必要がある。

## 3. *in vitro* 皮膚透過試験

皮膚内濃度比較の考え方で述べたように、ヒトを被験対象として有効成分の皮膚内濃度を直接、正確に測定するのは難しいことが多いため、有効成分の皮膚内濃度の大小は、皮膚透過性の大小を比較することにより推定し、その結果を以って、ヒト長期投与（安全性）試験の省略の判断に資するものとする。以下に *in vitro* 皮膚透過性試験の概要を示す。

なお、以下に記した諸条件は、絶対的なものではなく、対象とする有効成分の性質などを考慮して、適宜変更が必要になることもある。また、本試験方法の適用が難しい場合、より適切に皮膚内濃度を評価可能な方法がある場合は、別の方法を用いることも可能である。

### 3.1 試験ガイドライン／ガイダンス

本試験を実施するに当たっては、下記ガイドライン／ガイダンスが参考になる。ただし、試料適用量は本試験と異なっているので注意すること。

- ・ OECD Test Guideline 428 (2004). Skin Absorption: *In Vitro* Method.
- ・ Scientific Committee on Consumer Safety. Basic Criteria for the *In Vitro* Assessment of Dermal

## Absorption of Cosmetic Ingredients (SCCS/1358/10).

- ・ *In vitro* 皮膚透過試験 (*In vitro* 経皮吸収試験) を化粧品・医薬部外品の安全性評価に資するためのガイダンスについて (薬生薬審発 1115 第 1 号、平成 28 年 11 月 15 日)

### 3.2 試験試料

比較を行いたい製剤を試験試料とする。複数製剤の混合品を試験試料として用いる場合は、*in vitro* 皮膚透過試験を実施している期間の安定性が確保されていることを確認した上で採用する。

### 3.3 皮膚膜 (注 1)

ダーマトーム処理されたヒト皮膚 (皮膚厚: 約 0.5 mm) を用いることが望ましい。使用するヒト皮膚は、同一ドナーの同一部位でそろえる。使用に当たっては、目視、電気抵抗値、経皮水分蒸散量 (TEWL) などを指標として、皮膚膜の *integrity* を確認し、試験実施に適切なものを使用しなければならない (注 2)。また、各試験試料への割付を行う際にも、皮膚膜の *integrity* を考慮し、偏りのないようにする必要がある (注 3)。

### 3.4 *in vitro* 皮膚透過試験装置

固定型拡散セル (フランツ型拡散セルなど) を用いることが望ましい。

### 3.5 セル数および適用までの操作

試験に供するセル数は各試験試料 5 セル以上とすることが望ましい。レセプター液は、基本的には生理食塩水または PBS を用いることとするが、被験有効成分の特性を考慮して、必要に応じて界面活性剤や有機溶媒等を溶解させたものなどを使用しても良い (注 4)。試験は、いわゆる無限用量系にて行い、適用量は概ね 500  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  とする。皮膚表面は  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  となるように制御する。

### 3.6 分析試料の採取

試験試料を塗布後、経時的にレセプター液をサンプリングして測定サンプルとする。

### 3.7 有効成分の測定

測定サンプルとしたレセプター液について、HPLC 等、被験有効成分に適した分析方法にて測定する。

### 3.8 評価

レセプター液中の被験有効成分量は、サンプリング時間ごとに単位面積あたりの透過量 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) として表し、時間と透過量の関係をプロットする (透過プロファイル)。各試験試料について、皮膚透過性の順序を確認する。

## 4. 試験実施の具体例 (注 5)

### 4.1 目的

有効成分 A を含有する化粧水、乳液、クリーム、混合製剤を用いた *in vitro* 皮膚透過試験を行い、4 製

剤における有効成分 A の皮膚透過量の差、順序を確認する。

## 4.2 方法

### 4.2-1 試験試料

試験試料は化粧水、乳液、クリーム、混合製剤の 4 製剤とする。混合製剤は化粧水：乳液：クリーム＝7：4：2 の比率（容量比）で用時混合したものとした。この混合比率は、化粧品の使用量調査結果<sup>1)</sup>に基づいて決定した。混合製剤については、混合後の製剤が見た目上均一になり、かつ実験中に分離等の変化が起こらないように混合した。

### 4.2-2 皮膚膜

アメリカ B 社よりダーマトーム処理された凍結ヒト皮膚（皮膚厚：約 0.5 mm）を購入した。入手した皮膚は、試験に供するまで約-20℃中に保管した。皮膚膜を *in vitro* 皮膚透過試験装置（フランチ型拡散セル）に固定後、電気抵抗値および TEWL を測定し、皮膚膜の integrity を評価した。

### 4.2-3 セル数および適用までの操作

試験に供するセル数は各試験試料あたり 5 セルとした。レセプター液は、生理食塩水に 1% Brij O20 を溶解させたものを使用した。TEWL 測定（integrity 評価）は、皮膚膜をセルにセッティングし、約 15 分間静置した後に測定した。その後、30 分～1 時間程度、生理食塩水にて皮膚表面を水和させた。この間に電気抵抗値測定（integrity 評価）を実施した。試験試料は、全群ともに過剰量かつ揮発を防ぐための閉塞環境による適用とし（いわゆる無限用量系）、適用量は概ね 500  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  とした。試験試料の適用後、アルミ箔を被せ、更にその上からパラフィルムで覆い、閉塞環境とした。皮膚表面は  $32\pm 1^\circ\text{C}$  となるように制御した。

### 4.2-4 レセプター液のサンプリング

レセプター液を経時的にサンプリングして測定サンプルとした。サンプリング時間は、適用後 1、2、4、6、8、24 時間の 6 点とした。

### 4.2-5 測定

測定サンプルとしたレセプター液を HPLC にて有効成分 A を測定した。

## 4.3 評価

レセプター液中の被験有効成分量は、サンプリング時間ごとに単位面積あたりの透過量 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) として表し、時間と透過量の関係をプロットした（透過プロファイル）。化粧水、乳液、クリーム、混合製剤について、皮膚透過性の順序を確認した。

## 4.4 結果・考察

有効成分 A の皮膚透過量は化粧水で最も高く、次いで乳液、クリームの順であり、今回、同時に測定した皮膚内濃度の順と一致していた。また、混合製剤の皮膚透過量は、化粧水の透過量よりも低下してい

た。本検討により、無限用量系にて *in vitro* 皮膚透過試験結果から、皮膚内濃度の大小関係を把握することが可能であると考えられた。なお、詳細は 2019 年 6 月発行の日本香粧品学会誌の「報告」に報告した<sup>2)</sup>。

#### (注 1) 皮膚膜の解凍および水和

皮膚の解凍は室温 15 分程度を目安として行う。皮膚の水和は、拡散セルに皮膚を挟み込んだ状態でセルの上側（表皮側）に生理食塩水（あるいは PBS）を加え、30 分～1 時間程度なじませる。解凍および水和後に余剰の水分が皮膚に付着している場合、ろ紙や綿棒等により取り除く。この時、皮膚に損傷を与えないよう丁寧に作業する。

#### (注 2) 皮膚膜の integrity

電気抵抗値は、皮膚の水和中すなわちセルの上側（表皮側）に生理食塩水（あるいは PBS）を加えた状態で測定する。測定終了後は、綿棒等を使ってセルや皮膚表面に残存する水分をよく拭き取る。この時、皮膚に損傷を与えないよう丁寧に作業する。一方、TEWL は水和の影響が大きいため、水和前に測定することが好ましい。安定した値を得るためには、皮膚を拡散セルに固定し、レセプター液を入れた後、水和前に測定するのがよい。Integrity の測定で異常値を示す皮膚は試験に供しない。

#### (注 3) 皮膚 integrity を参考にした試料の割り付け

適用開始前に、測定した電気抵抗値を参考にして皮膚に試験試料を割り付けることが望ましい。これにより、試験試料毎の皮膚の偏りが防げ、データのばらつきを抑えることが出来る。

#### (注 4) レセプター液の選定

レセプター液は、有効成分の溶解性等を考慮して決定する。界面活性剤等を使用する場合、その溶解量を多くすると皮膚の integrity に影響を与えることがあるため、考慮して選択する必要がある。

#### (注 5) 試験実施の具体例

ここに示す具体例は、本ガイドライン附則の理解を深めるために示した一例であり、申請の際に必要とされる絶対的な試験条件を示すものではない。

## 参考文献

- 1) Yamaguchi M et al. Actual consumption amount of personal care products reflecting Japanese cosmetic habits. J Toxicol Sci 42:797-814, 2017.
- 2) 藤堂浩明 他. 無限用量にて適用した種々剤形からのイソプロピルメチルフェノールの皮膚透過性と皮膚内濃度の関係について ヒト長期投与(安全性)試験の用量設定法ガイドライン策定のための検証結果 その 1. 日本香粧品学会誌 Vol. 43 No2, 2019.