

1 医薬部外品・化粧品の安全性評価における
2 皮膚刺激性を評価するための評価体系に関するガイダンス
3

4 皮膚刺激性は、被験物質が皮膚に直接接触することにより生じる紅斑、浮腫、落屑などの
5 変化を指標とする皮膚反応である。その程度が強度で、非可逆的な組織損傷による皮膚反応
6 は、皮膚腐食性と呼ばれる。また、被験物質が皮膚に単回接触した際の刺激反応を皮膚一次
7 刺激性、繰り返し接触した際の刺激反応を連続皮膚刺激性と呼ぶ。

8 医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請では、皮膚一次刺激性を評価す
9 る手段として、従来、ウサギ又はモルモットを用いた皮膚一次刺激性試験法^{1),2)}が用いら
10 れてきた。また、連続皮膚刺激性評価においてもウサギ又はモルモットを用いた連続皮膚刺
11 激性試験法^{1),2)}が用いられてきた。

12 皮膚一次刺激性試験の代替法としては、2013年7月、経済協力開発機構(the Organisation
13 for Economic Co-operation and Development: OECD)が皮膚刺激性試験に関する *in vitro*
14 試験法「再構築ヒト表皮モデルを用いる試験法 (Reconstructed Human Epidermis Test
15 Method)」を OECD Test Guideline (TG) 439³⁾として採択した。本試験法は、化学物質を
16 動物の皮膚に4時間適用した際の皮膚刺激性試験(OECD TG404⁴⁾)の代替法として OECD
17 TGに採択され、国内においても評価が行われた⁵⁾。OECD TG439は、国連(the United
18 Nations: UN)による化学品の分類及び表示に関する世界調和システム(the Globally
19 Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals: GHS)の皮膚腐食性/
20 刺激性区分における区分2(刺激性)に該当する化学物質の有害性を同定すること、または
21 化学物質が区分外(無刺激性)であることを同定することが可能である。一方で、区分3(軽
22 度刺激性)を同定することはできない。

23 本試験法は、医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請において求められ
24 る24時間適用した際の皮膚刺激性を評価する目的で開発されたものではないが、ウサギに
25 による皮膚一次刺激性及びヒトパッチテストとの相関性を確認したところ、ヒトパッチテス
26 トの予測に対して有用であることを報告している⁶⁾。また、連続皮膚刺激性については、細
27 胞等を用いた動物実験代替法が開発されていない。一方で、従来化粧品や化粧品原料の評価
28 において繰り返し皮膚に適用するヒト連続皮膚刺激性試験法(Repeated Insult Patch Test:
29 RIPT、Repeated Open Application Test: ROAT、連用評価等)が安全性評価の手法として
30 用いられてきた。

31 本ガイダンスは、医薬部外品・化粧品の皮膚刺激性を評価するにあたって、動物を用いず
32 に皮膚刺激性を評価することを目的として、再構築ヒト表皮モデルを用いる試験法(OECD
33 TG439)、ヒトパッチテスト及びヒト連続皮膚刺激性試験法を用いた際の評価フロー及び留
34 意点等をまとめたものである。なお、本ガイダンスは皮膚刺激性が弱い物質、もしくは皮膚
35 刺激性があっても科学的に *in vitro* 皮膚刺激性試験と前述のヒトによる試験で皮膚刺激性
36 が評価可能な物質群に限定した評価フローであることに留意する必要がある。

37

38 1. ヒト試験を組み込んだ段階的アプローチによる皮膚刺激性評価

39 1-1. 概要

40 本ガイダンスにおいて示される段階的アプローチでは、*in vitro* 皮膚刺激性試験による有
41 害性の同定だけでなく、ヒトパッチテスト及びヒト連続皮膚刺激性試験を段階的に組み込
42 んで皮膚刺激性評価を実施する。本ガイダンスの適用は医薬部外品として実績がなく、皮膚
43 刺激性の動物実験データがない物質を対象とし、医薬部外品既承認原料及び皮膚刺激性の
44 動物実験データが十分にある原料は従来通りの評価で行う（本ガイダンスの適用範囲外）。
45 本ガイダンスにおいては、医薬部外品添加物及び化粧品原料で、皮膚刺激性がないか、あつ
46 ても弱く科学的に *in vitro* 皮膚刺激性試験、ヒトパッチテスト及びヒト連続皮膚刺激性試験
47 で評価可能な「低リスク原料」とであると予測できる原料において評価を進めることが可能で
48 ある。

49 まず、被験物質の皮膚刺激性における有害性を把握する手段として、物理化学的性状から、
50 皮膚浸透性及び原料としての分類を判断する（「1-2. 被験物質の物理化学的性状」の項）。
51 これらの情報から「低リスク原料」と分類されない原料においては、本ガイダンスの適用範
52 囲外とする。次に、「低リスク原料」と判断された原料（「1-2. 被験物質の物理化学的性状」
53 の項）について、既存情報の検索においてヒトに対して明確な皮膚刺激性を示唆する情報が
54 無い場合、次のステップとして *in vitro* 皮膚一次刺激性試験（OECD TG439）を実施する
55 ことが可能である。皮膚刺激性を示唆する情報がある場合には、本ガイダンスの適用範囲外
56 となる。但し、「低リスク原料」には動物とヒトの皮膚感受性に差がある原料を含むので、
57 動物で刺激性を示す既存情報があってもヒトで刺激性を示さないことが類推できる場合は、
58 本ガイダンスを適用する。

59 *In vitro* 皮膚一次刺激性試験の結果から原体において皮膚刺激性なしと判断されれば、ヒ
60 トにおける評価が可能となる。まず、使用時濃度を考慮した数段階の濃度でヒトパッチテス
61 トを実施し、結果が皮膚刺激性なしと判断されれば、ヒト連続皮膚刺激性を評価することが
62 可能である。本ガイダンスのフローを補遺 1 に示す。

63

64 なお、ヒト試験を行うにあたっては、「医薬部外品に関する臨床評価ガイドラインについて」
65 （厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長通知，薬生薬審発 0413 第 1 号，平成 29
66 年 4 月 13 日付）にしたがい、皮膚刺激性以外の安全性評価項目においてヒトへの健康被害
67 が起きないことを十分に確認した後に実施すべきである。また、被験者に対する倫理的配慮
68 を十分に考慮したヒト試験デザインを検討する必要がある⁷⁾。試験計画書は倫理審査委員
69 で審査されなければならない。

70

71 1-2. 被験物質の皮膚浸透性や原料分類

72 条件 A：皮膚浸透性の予測に基づく判断

73 化学物質が引き起こす皮膚刺激性は、主に紅斑や浮腫となって現れるが、これは化学物質
74 が角層を通過して浸透することを発端とした現象の結果であり、化学物質は角層よりも下
75 層にある表皮細胞層を損傷する。そのため、皮膚刺激性評価において皮膚への浸透にかかわ
76 るパラメータの把握は重要であり、皮膚へ浸透されないもしくは極めて浸透されにくい物
77 質は「低リスク原料」と分類される。皮膚浸透性が極めて低いと想定される物質は、以下の
78 いずれかの条件に該当する⁸⁾。

- 79 ① 分子量 1,000 以上⁹⁾
80 ② 分子量 500 以上で、かつ油水分配係数 (Log Kow) が-1 以下もしくは 5 以上^{9),10),11)}
81 ③ 処方中に固体として存在する無機粉末 (例 ; マイカ、タルクなどの鉱物、酸化亜鉛、
82 酸化チタン、酸化鉄のような金属酸化物) かつ、水、エタノールにほとんど溶けない
83 粉末¹²⁾

84

85 条件 B : 原料分類

86 原料分類として、皮膚刺激性が低い、もしくは皮膚刺激性があっても科学的に *in vitro* 皮
87 膚刺激性試験、ヒトパッチテスト及びヒト連続皮膚刺激性試験で評価可能であると予測で
88 きる物質群 (補遺 2) を選定した。原料区分策定にあたっては、既報告や国際的な評価機関
89 の報告をまとめた内容が、化粧品規制協力国際会議 (International Cooperation on
90 Cosmetics Regulation: ICCR) -13 Integrated Strategy Safety Assessment Workshop に
91 において報告された (Kojima H., 2019)。

92

93 本ガイダンスの適用範囲は、皮膚浸透性や原料分類から「低リスク原料」と判断された原
94 料に適用され、これらに該当しない原料については、適用範囲外となり、従来の方法で評価
95 しなければならない。また、OECD TG439 は水への溶解性に関わらず固体、液体、半固体、
96 ワックスに適用できるが、気体及びエアロゾルは、バリデーション試験で評価が行われてい
97 ないため、本試験法では評価できないとされている^{3),13)}。このことから「低リスク原料」に
98 該当しても、気体及びエアロゾル、新規性が高く皮膚刺激性の懸念が持たれるものは適用範
99 囲外とする。

100

101 2. 本段階的アプローチの判定と運用方法に関する留意点

102 被験物質の物理化学的性状の情報から、「低リスク原料」と判断され、皮膚一次刺激性試
103 験 (OECD TG439) (補遺 3、4 及び 5)、ヒトパッチテスト (補遺 6)、ヒト連続皮膚刺激性
104 試験 (補遺 7) について、すべて刺激性なしと評価された場合、当該物質の皮膚刺激性 (皮
105 膚一次刺激性及び連続皮膚刺激性) は陰性と判断される。

106

107 3. 本段階的アプローチの予測性 (補遺 8、9 及び 10)

108 本ガイダンスの適用範囲に該当する物質 (低リスク原料) (補遺 2) を含む 93 品につい

109 て、ヒトパッチテストまたは RIPT データを調査した結果、「低リスク原料」では、当該試
110 験濃度において、皮膚刺激性を示す知見は確認されなかった。さらに、OECD TG439、パ
111 ッチテスト、RIPT データが取得されている物質 19 品のうち、「低リスク原料」で OECD
112 TG439 陰性である物質 12 品及び蒸発残分 5%以下の植物エキス 18 品において、すべてヒ
113 トでの刺激性懸念はなかった。ただし、1) 高リスク素材の中には OECD TG439 陰性であ
114 るにも関わらず、ヒトパッチ刺激性物質が存在する、2) OECD TG439 の感度は 85%前後
115 であり¹⁴⁾、3) 農薬製剤では感度 44%という結果も報告されている³⁾。したがって、OECD
116 TG439 陰性と判断された「低リスク原料」であったとしても、ヒト試験は副作用の発現を
117 念頭において、医師の管理下で慎重に試験デザインを立案し、実施すべきである。

118

119 4. 本段階的アプローチの限界と留意点

120 本評価体系において採用した再構築ヒト表皮モデルを用いる試験法 (OECD TG439) は、
121 動物を用いて 4 時間適用した際の GHS 皮膚刺激性区分 2 (刺激性) 以上に該当する化学物
122 質の有害性を同定できるが、GHS 皮膚刺激性区分 3 (軽度刺激性) となる化学物質を同定
123 することができず、偽陰性も少なからず存在する。さらに、ヒト 24 時間閉塞パッチテスト
124 の予測性を評価するための検討においては、被験試料数や化学物質の範囲が十分と言えな
125 い。ゆえに、本評価フローにおいては、適用範囲を「低リスク原料」に限定しており、本ガ
126 イダンスは、「低リスク原料」に該当する医薬部外品添加物及び化粧品原料の評価に限定さ
127 れる。現時点では、「低リスク原料」に分類されない原料には適用されないことに留意する
128 必要がある。

129 なお、「低リスク原料」においてもヒトで明確な皮膚刺激性を示唆する情報がある場合、
130 及び再構築ヒト表皮モデルを用いる試験法で原体において陽性判定となった場合において
131 は、本ガイダンスの適用範囲外とすることを留意する必要がある。また、「低リスク原料」
132 に該当しても、原料の分子量分布や不純物の刺激性が懸念される原料においては、申請者は
133 個別に対応する必要があることを留意する必要がある。

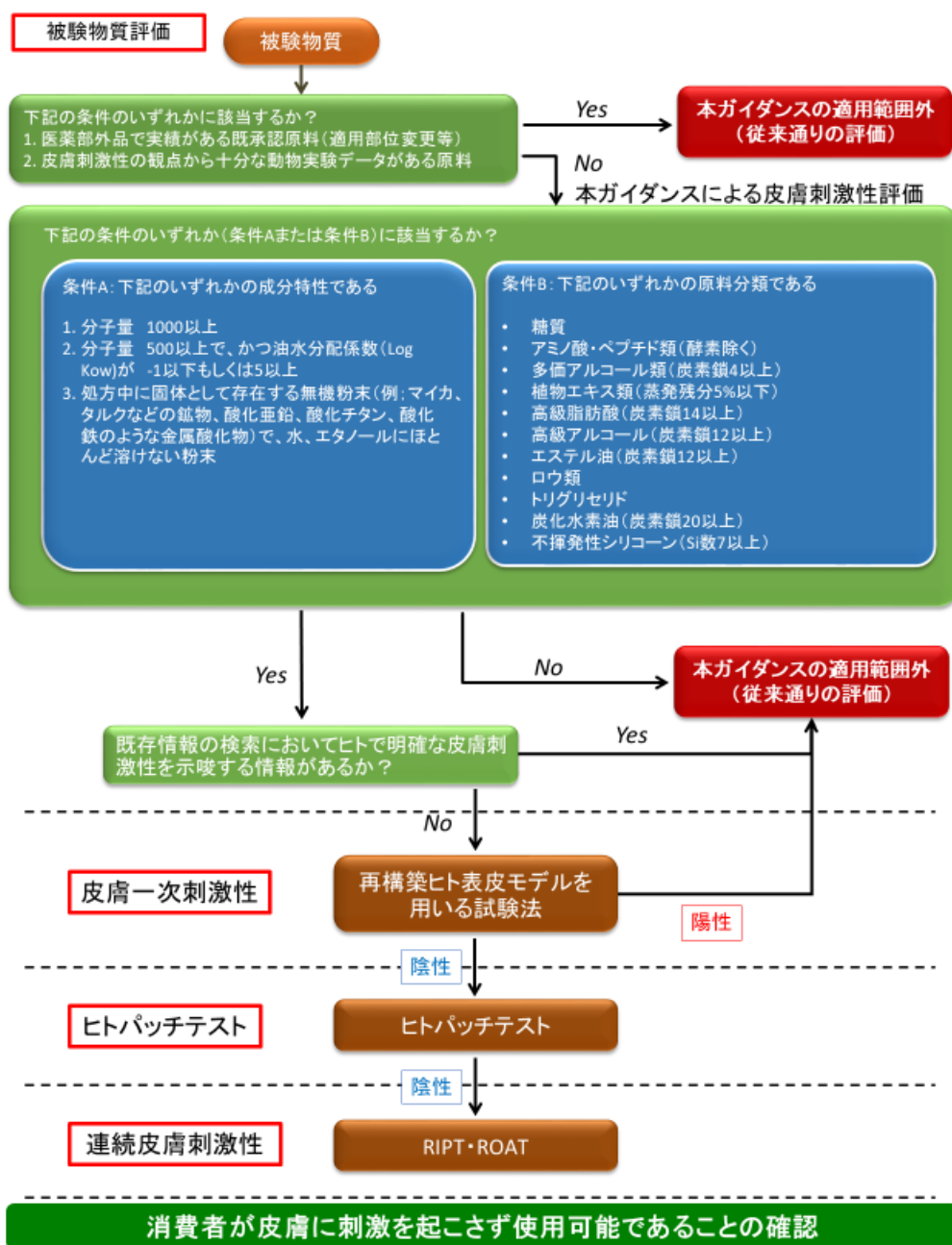
134

135 5. 引用文献

- 136 1) 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2017 (薬事日報社)
- 137 2) 医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請に添付する資料に関する質疑応
138 答集 (Q&A) について (厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課事務連絡, 平成
139 30 年 3 月 29 日付)
- 140 3) OECD (2020). Test Guideline 439. OECD Guideline for Testing of Chemicals. In Vitro
141 Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Available at:
142 [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-439-in-vitro-skin-irritation-](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-439-in-vitro-skin-irritation-reconstructed-human-epidermis-test-method_9789264242845-en)
143 [reconstructed-human-epidermis-test-method_9789264242845-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-439-in-vitro-skin-irritation-reconstructed-human-epidermis-test-method_9789264242845-en)
- 144 4) OECD (2015). Test Guideline 404. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute

- 145 Dermal Irritation/Corrosion. Available at:
146 [https://www.oecd.org/env/test-no-404-acute-dermal-irritation-corrosion-](https://www.oecd.org/env/test-no-404-acute-dermal-irritation-corrosion-9789264242678-en.htm)
147 [9789264242678-en.htm](https://www.oecd.org/env/test-no-404-acute-dermal-irritation-corrosion-9789264242678-en.htm)
- 148 5) LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法の評価会議報告書, JaCVAM 評
149 価会議, 平成 25 年 4 月 19 日
- 150 6) Sugiyama M., Akita M., Alépée N., Fujishiro M., Hagino S., Handa Y., Ikeda H., Imai
151 N., Jitsukawa S., Katoh M., Kurihara K., Kyotani D., Nomura S., Okamoto Y.,
152 Okumura H., Omori T., Sugibayashi K., Todo H., Toyoda A and Ohno Y. (2018),
153 Comparative assessment of 24-hr primary skin irritation test and human patch test
154 data with *in vitro* skin irritation tests according to OECD Test Guideline 439 (for
155 quasi-drugs in Japan), J. Toxicol. Sci., 43, No.12, 751-768.
- 156 7) 医薬部外品に関する臨床評価ガイドラインについて (厚生労働省医薬・生活衛生局医薬
157 品審査管理課長通知, 薬生薬審発 0413 第 1 号, 平成 29 年 4 月 13 日付)
- 158 8) SCCS/1602/18 THE SCCS NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF
159 COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION 10TH REVISION
- 160 9) Bos, J.D., Meinardi M.M.H.M. (2000), The 500 Dalton rule for the skin penetration of
161 chemical compounds and drugs. Exp. Dermatol., 9, 165-169.
162 (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x>)
- 163 10) European Commission (2004), Guidance Document on Dermal Absorption,
164 Sanco/222/2000 rev. 7.
- 165 11) Yano, T., Nakagawa, A., Tsuji, M., Noda, K. (1986), Skin permeability of various non-
166 steroidal anti-inflammatory drugs in man. Life Sci., 22, 39, 1043-1050.
- 167 12) 第十七改正日本薬局方 (平成 28 年 3 月 7 日厚生労働省告示第 64 号)
- 168 13) Welss, T., Basketter, D.A. and Schroder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and
169 future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. *in Vitro*, 18, 231-
170 243.
- 171 14) OECD (2010) EXPLANATORY BACKGROUND DOCUMENT TO THE OECD
172 TEST GUIDELINE ON IN VITRO SKIN IRRITATION TESTING, Available at:
173 [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(201](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)36&doclanguage=en)
174 [0\)36&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)36&doclanguage=en)
- 175 15) 化粧品原料の規格作成の手引き (第二版) 日本化粧品工業連合会
- 176 16) 化学辞典 株式会社化学同人
- 177 17) 早川律子 (1984) ヒトクローズドパッチテスト, 皮膚, 26(5), 1119-1127.
- 178 18) 川村太郎ら (1970) 貼付試験標準化の基礎研究, 日本皮膚科学会雑誌, 80, 301-314.
- 179 19) Fregert S. and Bandmann H.J. (1975) Test techniques, Patch Testing. Springer-
180 Verlag, Berlin, 20-27.

- 181 20) Shelanski H.A. and Shelanski M.V. (1953) A new technique of human patch tests,
182 Proceeding of Scientific Section, The Toilet Goods Association, 19, 46-49.
- 183 21) Marzulli F.N. and Maibach H.I. (1973) Antimicrobials: Experimental contact
184 sensitization in man, Journal of the Society of Cosmetic Chemists, 24, 399-421.
- 185 22) Hannuksela M. and Salo H. (1986) The repeated open application test (ROAT).
186 Contact Dermatitis, 14, 221-227.
- 187 23) Clemmensen A. (2008) The irritant potential of n-propanol in cumulative skin
188 irritation: a validation study of two different human *in vitro* test models, Skin
189 Research and Technology, 14, 277-286.
- 190 24) 伊藤正俊 (2019) 皮膚科医から化粧品の安全性評価の問題点, フレグランスジャーナル,
191 2019-9, 10-16.
- 192 25) Kanto, H. et al, Optical patch application time in the evaluation of skin irritation., J.
193 Dermatol., 40, 363-369, 2013.
- 194 26) Horita, K. et al, Study of the usefulness of patch testing and use test to predict the
195 safety of commercial topical drugs., J. Dermatol., 41, 505-513, 2014.
- 196 27) 河合敬一, 加藤則人, 松永佳世子 (2005) パッチテスト反応アトラス, 豊明市, 日本
197 接触皮膚炎学会.
- 198 28) 河合敬一, 松永佳世子, 伊藤正俊 (2003) 皮膚刺激判定用新基準, 豊明市, 日本接
199 触皮膚炎学会.
200
201



206 補遺 2 皮膚刺激性を基準とした原料分類

「低リスク原料」条件 B	
原料分類	各原料分類の説明 ^{15), 16)}
糖質	カルボニル基又はアルデヒド基を一つ持ち、二つ以上の水酸基をもつ炭素数 3 以上 6 以下の化合物（単糖類）及びそれらがグリコシド結合で二つ以上結合した化合物（二糖類、少糖類、多糖類）。また、単糖類のカルボニル基が還元され、水酸基になった化合物（糖アルコール）
アミノ酸・ペプチド類（酵素除く）	アミノ酸は、分子内にカルボキシル基とアミノ基を有する化合物であり、合成法や醗酵法によって製造される。ペプチドは、2 個以上のアミノ酸がペプチド結合によって結合したものであり、タンパク質の部分加水分解やアミノ酸の結合により合成される。
多価アルコール類（C4 以上）	分子内に 2 個以上の水酸基を持つ化合物。水酸基の数が 2 個のものは 2 価アルコール、3 個のものは 3 価アルコールと呼ばれている。24 時間閉塞パッチテストで刺激性が認められているプロピレングリコールを除外できる炭素鎖数に限定した ¹⁷⁾ 。
植物エキス類	植物由来物のことで、植物（藻類を含む）を基原とする原料（エキス、液汁、水）であり、植物の一部又は全体の抽出物、植物あるいは植物抽出物の乾燥物、植物の液汁、植物若しくは植物抽出物の水蒸気蒸留で得た水層である。植物の起源に関する情報から、医薬品や農薬に使用されておらず、発がん性等の健康被害の報告が無い植物に限定され、蒸発残分が 5%以下の植物エキスに限定される。
高級脂肪酸（炭素鎖 14 以上）	脂肪酸は、カルボン酸のうち鎖状炭化水素を有するものの総称で、高級脂肪酸は炭素数が 14 以上の偶数で、炭化水素基の部分が直鎖、炭化水素基の部分に存在する不飽和結合はシス（cis）型であるものを指す。
高級アルコール（炭素鎖 12 以上）	炭素数の多いアルコール類の総称で、炭素数 12 以上の脂肪族アルコールを指す。
エステル油（炭素鎖 12 以上）	酸とアルコールとから水を失って生成する化合物。脂肪酸とグリセリンとのエステルは動物の脂肪や植物油として存在する。
ロウ類	化学的には長鎖の脂肪酸と長鎖の一価アルコールのエステルで固形状のものをいう。
トリグリセリド	グリセロール 1 モルに脂肪酸 3 モルがエステル結合したもので、脂肪酸の種類、グリセロール上での結合位置により、極めて多くの分子種が存在し、それぞれ異なる物理化学的性質を示す。
炭化水素油（炭素鎖 20 以上）	炭素と水素とから成る有機化合物で、温度 15 度及び 1 気圧において液状を呈するものをいう。24 時間閉塞パッチテストで刺激性が認められているプリスタンを除く炭素鎖数に限定した ¹⁷⁾ 。

不揮発性シリコーン (Si 数 7 以上)	シロキサン結合を主骨格とし、低分子化合物 (低粘性の揮発性液体) から、高分子化合物 (樹脂) まで多様な化合物が存在する。揮発性シリコーンに刺激性がある可能性が否定できないため、D4、D5、D6 などの揮発性シリコーンを除外した。
-----------------------	--

207 注：特別な官能基や化学構造を追加した場合は除外するので留意する。

208 補遺 3 再構築ヒト表皮モデルを用いる試験法【皮膚一次刺激性】

209 1. 原理

210 本試験法は、ヒト皮膚の特に表皮の生化学的・生理学的特性を厳密に模倣した再構築ヒト
211 表皮 (Reconstructed human Epidermis: RhE) モデルを用いる *in vitro* 試験系である。本
212 試験系は、代表的な組織構造と細胞配列を有する表皮モデルを再構築する細胞源として、ヒ
213 ト由来の非形質転換ケラチノサイトを用いている。本試験系は、炎症メカニズムにおける初
214 期段階 (局所外傷をもたらす細胞損傷や組織損傷) を検出し、被験物質の細胞毒性を指標と
215 して皮膚刺激性を評価する試験系である。

216 OECD TG439 には複数のモデルが含まれており、本ガイダンスでは 24 時間閉塞ヒトパ
217 ッチテストとの相関性が確認された 4 つのモデルを対象としている^{5),6)}。各モデルに関する
218 説明は補遺 4 に示している。

219 本法では被験物質を RhE 組織に曝露した後、テトラゾリウム色素 (tetrazolium dye: TD)
220 が生細胞によって還元されて生じるホルマザン色素 (formazan dye: FD) を吸光度 (Optical
221 Density: OD) 測定法 (紫外可視吸光度測定法) 又は高速液体クロマトグラフィー/超高速
222 液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography: HPLC/Ultra-high
223 Performance Liquid Chromatography: UPLC) により定量することで求められる細胞生存
224 率を評価項目とする³⁾。

225

226 2. 試験手順

227 詳細な内容を確認する場合には、OECD TG439 を参照する³⁾。

228 被験物質及び対照物質の適用

229 試験に供する物質毎に複数の RhE 組織を用いる。被験物質としては、20~37°C の条件
230 においてマイクロピペットで扱えるものは液体として、それ以外は固体として試験を行う。
231 被験物質は、原体での適用を行う。液体の被験物質の場合、各モデルの皮膚刺激性試験法に
232 規定した適用量、適用時間等の条件で曝露する。曝露後、室温で Mg²⁺/Ca²⁺ 不含リン酸緩衝
233 生理食塩水 (PBS(-)) を用いて十分に洗浄し被験物質を除去する。固体の被験物質の場合、
234 事前に精製水又は PBS(-) で RhE 組織の表面を湿らせてから、各モデル皮膚刺激性試験法
235 に規定した時間と条件で曝露する。なお、可能な場合は、必ず適用前に粉碎して微粉末とす
236 る。曝露後、室温で PBS(-) を用いて十分に洗浄し被験物質を除去する。同時に陰性対照物
237 質及び陽性対照物質も試験を行い、使用する RhE 組織における陰性対照の OD 値と陽性
238 対照の刺激性分類がこれまでのデータに基づいて規定した試験成立範囲内であることを確
239 認する。なお、陰性対照は被験物質を処理した組織の相対的な細胞生存率パーセント (%細
240 胞生存率_{被験物質}) を計算するためのベースライン (100%細胞生存率) として用いる。対照物
241 質の適用及び後処理は、各モデルの被験物質 (液体又は固体) の適用手順に準じる。

242

243 細胞生存率

244 OECD TG439 では FD の紫外可視吸光度測定法又は HPLC/UPLC 法により得られた
245 被験物質及び陰性対照物質の測定値の平均に基づき細胞生存率を算出する。

246

247 $\%細胞生存率_{被験物質} = (\text{被験物質の測定値の平均} / \text{陰性対照物質の測定値の平均}) \times 100$

248

249 試験法の適用範囲

250 RhE 法は、固体、液体、半固体、ワックスに適用できる。液体については、水性、非水性
251 の両方に適用でき、固体については、水に可溶性、不溶性の両方に適用できる。可能であれ
252 ば、固体は適用前に必ず粉砕して微粉末にすべきであるが、これ以外に必要な前処理はない。
253 気体とエアロゾルは評価されておらず、そのため気体及びエアロゾルは適用範囲から除外
254 する。

255

256 3. 判定

- 257 • $\%細胞生存率_{被験物質}$ が 50%以下である場合は、皮膚刺激性と判断する。
- 258 • $\%細胞生存率_{被験物質}$ が 50%よりも高い場合は、皮膚刺激性なしと判断する(ただし、GHS
259 区分 3 の識別ができていないため、低刺激性物質も含まれる)。

260

261 4. 試験実施上の注意事項

262 新たに試験を実施する試験施設では、RhE 法の習熟度確認物質(補遺 5)等を活用し精度
263 の向上に努めること。

264

265 5. 試験成立条件について

266 以下の 3 条件を満たした場合、試験の結果を判定に用いる。

- 267 (1) 陰性対照の OD 値が各モデルの皮膚刺激性試験法に規定した陰性対照に関する試験成
268 立条件を満たすこと。
- 269 (2) 陽性対照の $\%細胞生存率$ が各モデルの皮膚刺激性試験法に規定した陽性対照に関する
270 試験成立条件を満たすこと。
- 271 (3) 被験物質、陰性対照物質及び陽性対照物質のそれぞれについて、3 組織以上を用いた細
272 胞生存率の標準偏差が 18%以下であること。

273

274 (1)又は(2)の条件を満たさない場合、又は(3)の陰性対照又は陽性対照の条件を満たさない場
275 合、当該試験は不成立となり、繰り返し実施する必要がある。

276 (3)の被験物質の条件を満たさない場合、被験物質に関する試験は不成立となり、被験物質
277 の再試験を実施する必要がある。

278

279 3 組織以上の測定値が一致しない場合や、 $\%細胞生存率$ が各モデルの皮膚刺激性試験法の

280 カットオフ値±5%となった場合は 2 回目の試験実施を検討すべきである。また、1 回目と
281 2 回目の試験結果が不一致の場合は 3 回目の試験実施を検討すべきである。

282

283 6. 細胞生存率の測定を干渉する場合の対処について

284 曝露処理を経た被験物質が FD の吸収波長と同様の吸収波長を有する場合、又は TD を
285 FD に直接還元する作用を有する場合、細胞生存率の測定を干渉する可能性がある。これら
286 の性質の有無を確認し、有する場合は被験物質の真の細胞生存率を求めるために補正が必
287 要となる。

288

289 補遺 4 各モデル皮膚刺激性試験法に関する説明

290 各モデルの試験法については、4つの極めて類似したプロトコルが示されており、いずれ
 291 の試験法も被験物質曝露後に42時間のインキュベーション時間がある³⁾。試験法のバリア
 292 機能の違いに関連する主要な3つのパラメータ、A) 前培養時間と培地量、B) 被験物質の
 293 適用、C) 後培養の培地量については、下記に示すように各試験で異なる。本ガイダンスで
 294 は、JaCVAM 評価会議において評価された4モデル⁵⁾に限定する。

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) 前培養				
培養時間	18～24時間	18～24時間	2時間以上	15～30時間
培地量	2 mL	0.9 mL	0.3 or 1 mL	0.5 mL
B) 化学物質の適用				
液体	10 µL (26 µL/cm ²)	30 µL (47 µL/cm ²)	16 µL (32 µL/cm ²)	25 µL (83 µL/cm ²)
固体	10 mg (26 mg/cm ²) + DW (5µL)	25 mg* (39 mg/cm ²) + DPBS (25µL)	16 mg (32 mg/cm ²) + DW (10µL)	25 mg (83 mg/cm ²) + DW (25µL)
ナイロンメッシュの使用	使用しない	適宜使用する	使用する	使用しない
適用時間	15分	60分	42分	15分
適用温度	室温	a)室温で25分 b)37℃で35分	室温	室温
C) 後培養				
培地量	2 mL	0.9 mL × 2	2 mL	1 mL
D) 許容基準				
陰性対照に関する試験成立条件	≥0.6, ≤1.5	≥0.8, ≤2.8	≥0.8, ≤3.0	≥0.7, ≤2.5
陽性対照に関する試験成立条件	< 40%	< 20%	< 40%	< 40%
組織間の標準偏差	SD ≤18%	SD ≤18%	SD ≤18%	SD ≤18%

295

296 DW: distilled water

297 DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffer Saline

298 *SOPに記載のとおり校正された薬さじで測定する

299 補遺 5 RhE 法の習熟度確認物質リスト¹

化学品	CAS 番号	<i>in vivo</i> スコア ²	物理的状态	UN GHS 区分 ³
分類されていない化学品 (UN GHS 区分外)				
ナフタレン酢酸 naphthalene acetic acid	86-87-3	0	固体	区分外
イソプロパノール Isopropanol	67-63-0	0.3	液体	区分外
ステアリン酸メチル methyl stearate	112-61-8	1	固体	区分外
酪酸ヘプチル heptyl butyrate	5870-93-9	1.7	液体	区分外 (任意区分 3)
サリチル酸ヘキシル hexyl salicylate	6259-76-3	2	液体	区分外 (任意区分 3)
分類された化学品 (UN GHS 区分 2)				
シクラメンアルデヒド cyclamen aldehyde	103-95-7	2.3	液体	区分 2
1-ブロモヘキサン 1-bromohexane	111-25-1	2.7	液体	区分 2
水酸化カリウム (5%水溶液) potassium hydroxide (5% aq.)	1310-58-3	3	液体	区分 2
1-メチル-3-フェニル-1-ピペラジン 1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	5271-27-2	3.3	固体	区分 2
ヘプタナール Heptanal	111-71-7	3.4	液体	区分 2

300 略号等：

301 Cas 番号：Chemical Abstract Service Registry Number (CASRN)

302 1 習熟度確認物質とは、バリデーション試験で使用する化学品の一部である。

303 2 OECD TG404(4)の結果に基づいた *in vivo* スコア。

304 3 OECD TG439 では、UN GHS の任意区分である区分 3 は区分外とみなす。

305

306 補遺 6 ヒトパッチテスト

307 1. 概要

308 ヒトパッチテストは、一般的にはアレルギー性接触皮膚炎の診断及び市場における皮膚
309 刺激性の予測を目的として実施される。診断を目的として、皮膚等に適用される製剤のアレ
310 ルギー性接触皮膚炎の原因を確認するために主に医療機関において行われるとともに、予
311 測を目的として、成分や製品の皮膚一次刺激性を再現性良く評価する方法として、また繰り
312 返し使用するうえでの皮膚刺激性を予測する有力な方法として用いられている⁷⁾。本評価フ
313 ローにおいては、皮膚刺激性を予測する有効な手段として、ヒトパッチテストを配置してい
314 る。

315

316 2. 試験操作手順

317 被験物質及び対照物質の適用

318 対象：成人 40 名以上

319 投与濃度：原則、原料においては十分な安全域を確認するために使用時濃度を含めた数段階
320 で実施する。なお、濃度設定については、倫理的問題がない場合には使用時よりも高い濃度
321 を設定すること。

322 陰性対照：通常は溶媒又は生理食塩水が用いられる。

323 貼布部位：原則、上背部（傍脊椎部：正中線の部分は除く）の外観上正常な部分に閉塞適用
324 する。又は、上腕あるいは前腕を用いる場合もある。

325

326 観察

327 貼布 24 時間後に貼布（パッチ絆）を除去し、除去による一過性の紅斑の消退を待つて肉
328 眼観察（通常 1 時間後、24 時間後とするが、皮膚反応の発現状態によっては 48 時間以後も
329 実施）を行う。

330

331 判定・評価

332 判定は本邦基準¹⁸⁾又はこれに準じた方法により実施する。なお、皮膚アレルギーの判定
333 基準（International Contact Dermatitis Research Group: ICDRG 基準¹⁹⁾等）を用いる場
334 合は、判定項目に弱い刺激反応を追加して判定するとよい。

335

336 判定基準として、本邦基準を以下に示す。

判定	反応
—	反応なし
±	軽度の紅斑
+	紅斑
++	紅斑＋浮腫、丘疹

+++	紅斑+浮腫+丘疹+小水疱
++++	大水疱

337

338 試験の実施に際し、非臨床試験の結果等より、物質の安全性を考慮し適切な試験条件を
 339 設定する。また、貼布期間中は、入浴、スポーツ、発汗の多い労働は控えることが適切で
 340 ある。陽性所見が観察された場合は、その所見が消退するまで観察し、それに要した日
 341 数、転帰等を記載する。

342

343 3. 試験実施上の注意事項

344 「医薬部外品に関する臨床評価ガイドラインについて」（厚生労働省医薬・生活衛生局医薬
 345 品審査管理課長通知、薬生薬審発 0413 第 1 号，平成 29 年 4 月 13 日付）⁷⁾を参照する。
 346 特に揮発性が高い原料等を評価する際に、閉塞条件下での刺激性が懸念されることから
 347 留意する⁷⁾。

348

349 補遺 7 ヒト連続皮膚刺激性

350 1. 概要

351 連続皮膚刺激性は、皮膚に繰り返し適用された際に生ずる紅斑、浮腫、落屑等の変化を指
352 標とした刺激性である。外用を目的とする医薬部外品・化粧品においては、ヒトが皮膚に繰
353 り返し適用することによって生じる皮膚反応の程度をあらかじめ予測する必要がある。

354 ヒト皮膚へ繰り返し適用し、刺激性を評価する方法としては繰り返し閉塞貼布試験
355 (Repeated Insult Patch Test: RIPT)、繰り返し開放塗布試験 (Repeated Open Application
356 Test: ROAT) が利用できる。RIPT は、被験物質を繰り返し皮膚に閉塞貼布することによ
357 り、累積刺激性や感作性の有無を評価する試験法で、閉塞貼布という過酷な条件で繰り返し
358 適用することから、累積刺激に関しては、潜在的有害性を評価することが可能である。一方、
359 ROAT は、被験物質を繰り返し皮膚に開放塗布することにより、実使用を想定したデータ
360 あるいは高濃度試験による過酷条件データの取得が可能な試験法である。本法は、揮発性が
361 高い原料等を評価する際に、閉塞条件下では強い刺激性が予測され、明らかに配合製剤の使用
362 条件とは異なる場合に適用される試験法である⁷⁾。本ガイダンスにおいて、RIPT 及び
363 ROAT は連続皮膚刺激性を評価するための試験として用いる。なお、医薬部外品申請の際
364 の皮膚感作性に関する資料として、これらの試験は現在推奨されていない。

365

366 2. 試験操作手順

367 RIPT^{20),21)}

368 対象：成人 40 名以上

369 投与濃度：原則、原料においては十分な安全域を確認するために使用時濃度を含めた数段階
370 で実施する。なお、濃度設定については、倫理的問題がない場合には使用時よりも高い濃度
371 を設定すること。

372 陰性対照：通常は溶媒又は生理食塩水が用いられる。

373 貼布部位：原則、上背部（傍脊椎部：正中線の部分は除く）の外観上正常な部分に閉塞適用
374 する。又は、上腕あるいは前腕を用いる場合もある。

375 連続貼付：被験物質を 24 又は 48 時間閉塞適用し、本操作を計 9 回（3 週間）実施する。

376 最終貼付：連続貼付の最終貼布終了 2 週間後、24 又は 48 時間閉塞貼布する。

377 観察：連続貼付及び最終貼付のすべての期間において肉眼観察を行う。連続貼付期間は 2 回
378 目以降の各貼布（パッチ絆）操作時に試験方法にしたがって行う。最終貼布においては、貼
379 布（パッチ絆）を除去し、除去による一過性の紅斑の消退を待つて行う（通常 1 時間後、24
380 時間後とするが、皮膚反応の発現状態によっては 48 時間以後も実施）。

381 判定・評価：判定は、本邦基準¹⁸⁾又はこれに準じた方法により実施する。なお、皮膚アレ
382 ルギーの判定基準（ICDRG 基準¹⁹⁾等）を用いる場合は、判定項目に弱い刺激反応を追加
383 して判定するとよい（補遺 6 ヒトパッチテスト参照）。

384

385 ROAT 22),23)

386 対象：成人 40 名以上

387 投与濃度：原則、原料においては十分な安全域を確認するために原体で実施する。再構築ヒ
388 ト表皮モデルを用いる試験法において液体として取り扱った被験物質はそのまま、固体
389 として取り扱った被験物質は精製水またはワセリンに溶解または均一になるように混合し
390 て、適用部位に適切に塗布できる最高濃度で実施する。

391 陰性対照：通常は溶媒又は生理食塩水が用いられる。

392 適用部位：前腕内側又は上腕内側に塗布する。

393 開放塗布：1 日 1 回又は 2 回、3~4 週間程度毎日適用する。

394 観察：開放塗布を行うすべての期間において、試験方法にしたがって肉眼観察を行う。肉眼
395 観察は、毎日塗布前に行い、試験方法に定めた最終観察日には塗布を行わない。なお、
396 毎日の適用および観察時刻は可能な限り同じ時間帯に行う。

397 判定・評価：判定は本邦基準¹⁸⁾又はこれに準じた方法により実施する。なお、皮膚アレルギー
398 の判定基準（ICDRG 基準¹⁹⁾等）を用いる場合は、判定項目に弱い刺激反応を追加し
399 て判定するとよい（補遺 6 ヒトパッチテスト参照）。

400

401 3. 試験実施上の注意事項

402 RIPT 及び ROAT を実施する際には、あらかじめ皮膚感作性リスクが無いことを十分に
403 確認した上で、所属機関の倫理審査委員会を経てから実施しなければならない²⁴⁾。試験の
404 実施に際し、貼布時間と刺激性に関する検討において、24 時間において刺激が認められな
405 い物質が 48 時間で突然強い刺激性を示す場合はなく、24 時間貼布試験法で刺激性を概ね
406 評価可能であると報告されている^{25),26)}。ROAT を実施する際には、実使用を想定した適用
407 方法及び適用期間を設定することが好ましい。また、皮膚刺激性の評価においては、皮膚科
408 専門医の指導の下で試験条件を設定し、皮膚科専門医、皮膚科医又はそれらに準ずる評価エ
409 キスパート者が判定基準を確認した上で、判定においては写真などを利用して記録を残し
410 適切に試験を実施する。また、皮膚反応の判定のトレーニングには「パッチテスト反応アト
411 ラス」^{27),28)}等を参照されたい。

412