



in vitro 皮膚刺激性試験

～試験例～

化粧品業界で使用する溶媒と防腐剤

ご協力施設

ロート製薬株式会社様
小林製薬株式会社様
日本コルマー株式会社様
株式会社マンドム様
サンスターグループ様

◆背景・目的

2021年4月に動物を用いない皮膚刺激性を評価することを目的とした通知「医薬部外品・化粧品の安全性評価における皮膚刺激性評価体系に関するガイダンスについて」が発出されました（薬生薬審発0422第3号）。本ガイダンスの皮膚刺激性評価フローで適用可能な物質は「低リスク成分」などの一部の化学物質に限られています。以下に「薬生薬審発0422第3号」を抜粋します。

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が用いられてきた。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激性試験法が用いられてきた。

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（OECD: the Organisation for Economic Co-operation and Development）が皮膚刺激性試験に関するin vitro試験法「再構築ヒト表皮（RhE: Reconstructed human Epidermis）を用いる試験法」をOECD試験法ガイドライン（TG: Test Guideline）439として採択した。

本試験法は、化学物質を動物の皮膚に4時間適用した際の皮膚刺激性試験（OECD TG404）の代替法としてOECD TGに採択され、国内においても日本動物実験代替法評価センター（JaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods）により行政提案が行われている。OECD TG439は、国連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（UN GHS: the United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals）の皮膚腐食性／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（軽度刺激性）を同定することはできない。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、ヒトパッチテストの予測に対して有用であることを報告している。

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、動物を用いずに皮膚刺激性を評価することを目的として、RhEを用いる試験法、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、もしくは皮膚刺激性があっても科学的にRhEを用いる試験法と前述のヒトによる試験で皮膚刺激性が評価可能な物質群に限定した評価別添2フローであることに留意する必要がある。

出典：薬生薬審発0422第3号

市販製剤には本ガイダンスで定義する「低リスク成分」以外の医薬部外品添加物および化粧品成分も含まれており、それらの成分についても動物を用いずに評価できることが望まれています。

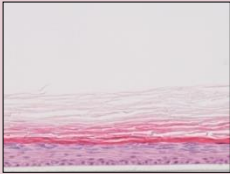
J-TECでは、OECD TG439に収載されたEPI-MODEL24と未収載のEPI-MODEL246D品があり、ユーザー様から化粧品原料を評価するにあたり、使用する溶媒による細胞毒性の影響や化粧品で使用されている防腐剤をどの濃度で評価すべきかといったお問合せをいただくことがある。

そこで化粧品会社のご協力を得て、化粧品原料として汎用される溶媒、防腐剤、多価アルコール類をEPI-MODEL24とEPI-MODEL246Dを用いて評価しました。これらのデータがユーザーの皆様の実験の一助となることやガイダンスで評価可能な物質の適用拡大となる参考資料の一つとして活用していただければ幸いです。

J-TECではRhEとしてEPI-MODEL24とEPI-MODEL246Dを製造・販売しています。EPI-MODEL246DはEPI-MODEL24と比較すると角質層が脆弱なことから、感度よく刺激性を検出するRhEとして報告されています⁽¹⁾。

注1): 日本化粧品技術者会誌 Vol.47, No.1 2013

◆EPI-MODEL24とEPI-MODEL24 6Dの違い

製品名	EPI-MODEL24	EPI-MODEL24 6D
OECD TG431収載	○	×
OECD TG439収載	○	×
組織切片図		
水分蒸散量	低い	高い
バリア機能	高い	低い

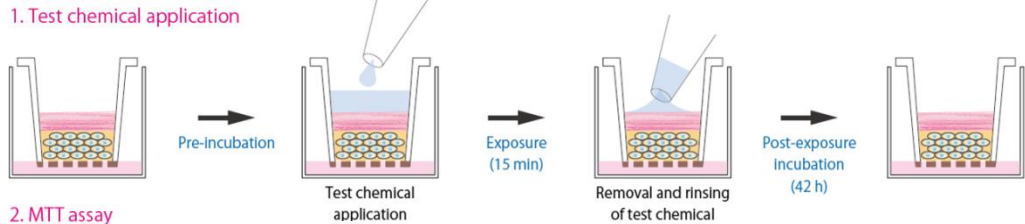
EPI-MODEL24 6Dは角質層が薄くバリア機能が脆弱なモデルであり、刺激に対する感度が高いRhEとして利用できる可能性があります。今回の試験ではEPI-MODEL24とEPI-MODEL24 6Dを使用して、各被験物質の刺激性に違いがあるかを確認しました。

◆本試験で用いた被験物質

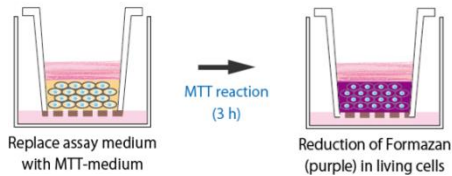
アルコール類	炭化水素油	多価アルコール類	添加剤・他
ベンジルアルコール	ミネラルオイル	プロピレングリコール	DMSO
エタノール		ジプロピレングリコール	安息香酸
		グリセリン	フェノキシエタノール
		ジグリセリン	プロピルパラベン
		ブチレングリコール	メチルパラベン
		1, 2-ヘキサンジオール	
		プロパンジオール	
		エチルヘキシルグリセリン	

◆OECD TG439 皮膚刺激性試験法

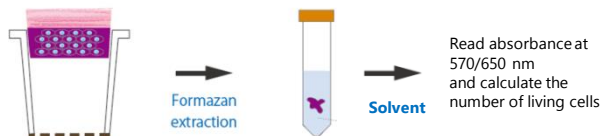
1. Test chemical application



2. MTT assay



3. Quantification of living cells



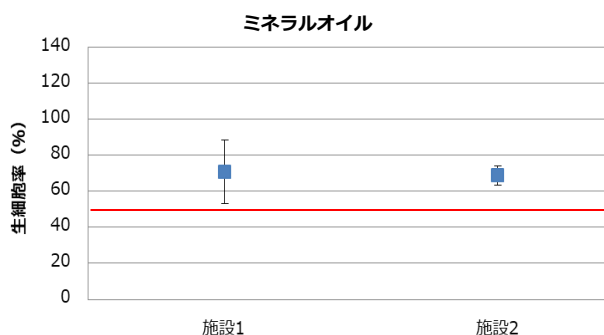
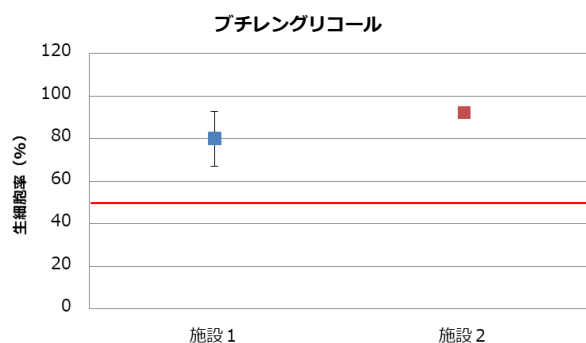
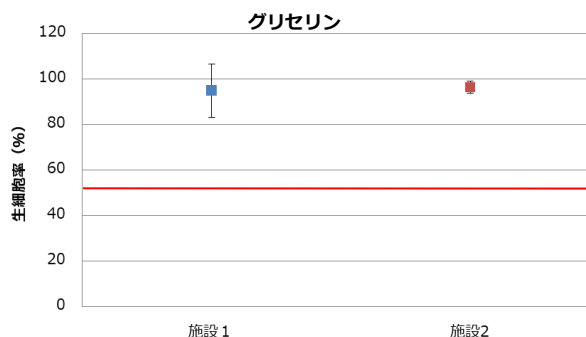
Chemical classification

Cell viability	Classification
Average ≤ 50%	Irritant
Average > 50%	Non-irritant

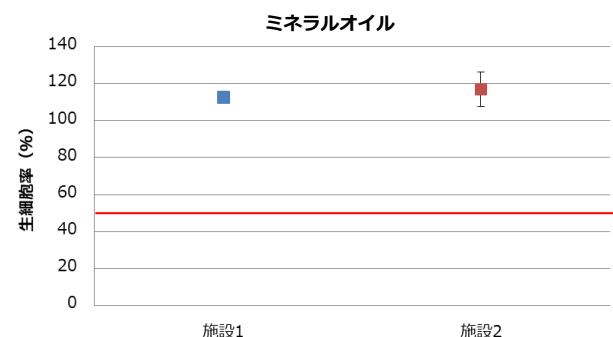
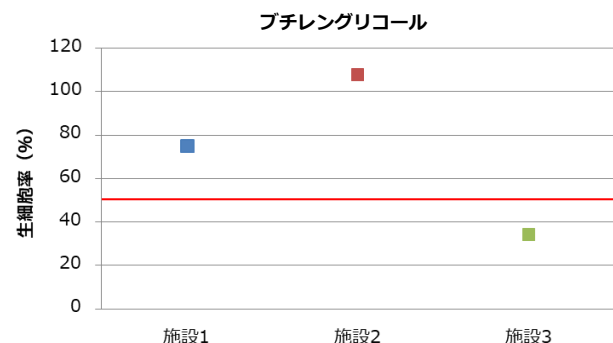
◆化粧品の安全性試験における溶媒の検討：原液での評価

➤ 試験プロトコル：前培養→被験物質の適用（15分）→洗浄→後培養（42時間）→MTT試験

EPI-MODEL24



EPI-MODEL24 6D



■ 施設1 ■ 施設2 ■ 施設3

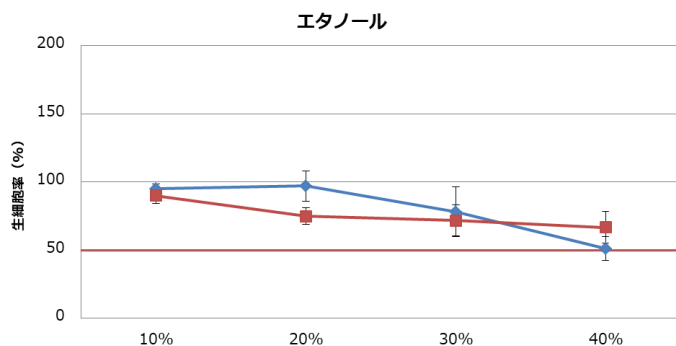
EPI-MODEL24 6Dを用いた試験では、ブチレングリコールは1施設において刺激性と判定されました。他の被験物質は、EPI-MODEL24とEPI-MODEL24 6Dを用いた両試験で非刺激性と判定されました。

◆化粧品の安全性試験における溶媒の検討：希釈液での評価

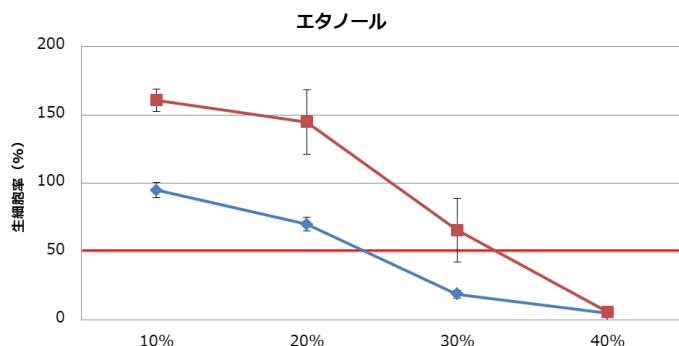
➤ 試験プロトコル：前培養→被験物質の適用（15分）→洗浄→後培養（42時間）→MTT試験

- ✓ 薬生薬審発0422第3号に該当する「低リスク成分」と適用外の化合物について、評価しました。
- ✓ 今回の試験では原材料ではなく、試薬を被験物質として利用しました。
- ✓ 被験物質となる化合物は希釈して適用し、1つの被験物質について2施設で評価しています。

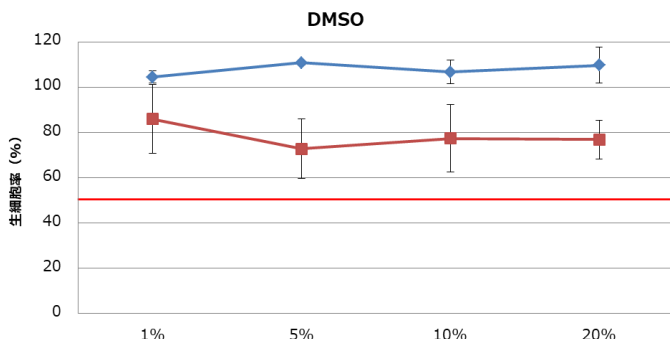
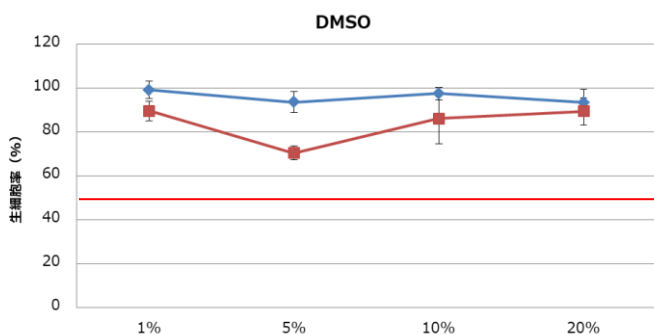
EPI-MODEL24



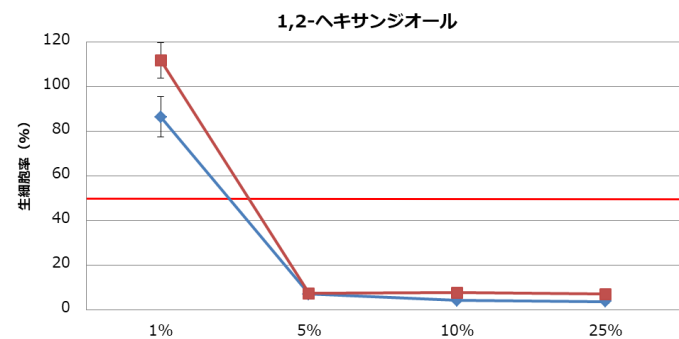
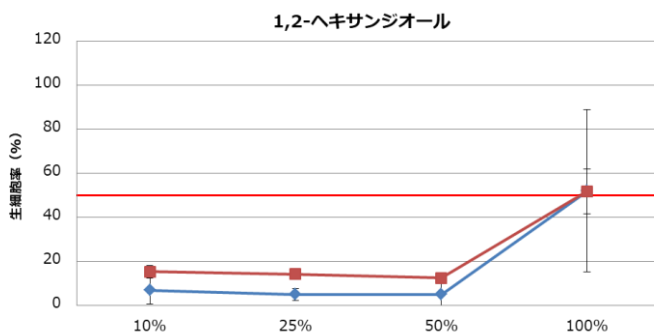
EPI-MODEL24 6D



エタノール濃度が40%になると、EPI-MODEL24を用いた試験では生細胞率が50%のボーダー付近となるものもありました。EPI-MODEL24 6D用いた試験では、エタノールが20%濃度で生細胞率が50%付近になった施設もありました。どちらのモデルを用いた試験でも濃度依存的に生細胞率の低下が認められました。



DMSOは20%まで、EPI-MODEL24およびEPI-MODEL24 6Dを用いた両試験で非刺激性の判定となりました。



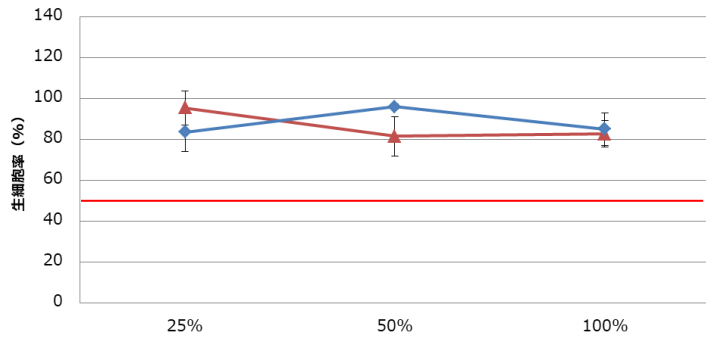
◆施設1 ◆施設2

EPI-MODEL24では希釈すると刺激性の判定となりました。

EPI-MODEL24 6Dでは、1% 1,2-ヘキサンジオールは非刺激性と判定されました（EPI-MODEL24未実施濃度）。

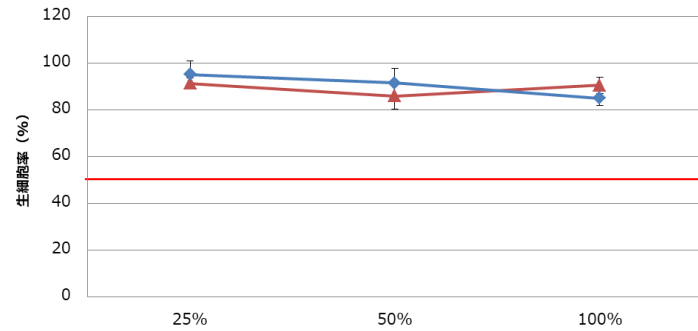
EPI-MODEL24

プロピレングリコール



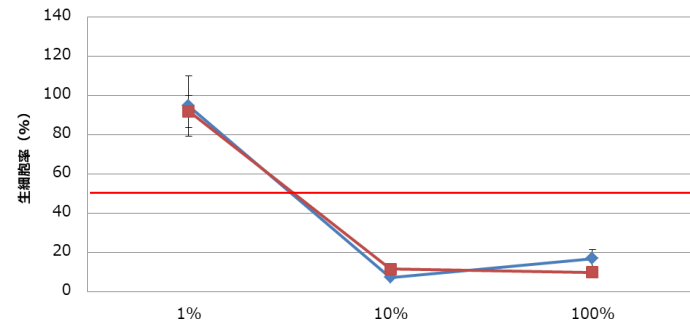
2施設中1施設で、100% プロピレングリコールはEPI-MODEL24 6Dを用いた試験で刺激性と判定されました。

ジプロピレングリコール



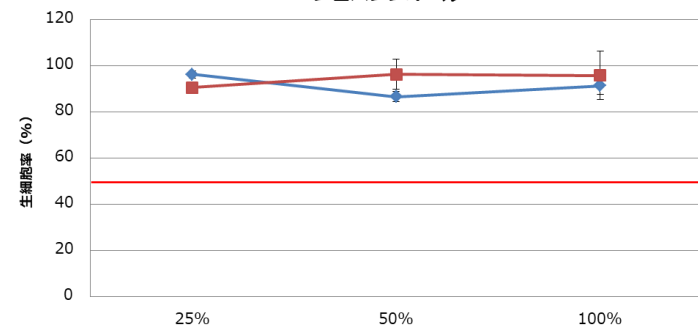
2施設中1施設で、100% ジプロピレングリコールはEPI-MODEL24 6Dを用いた試験で刺激性と判定されました。

ベンジルアルコール



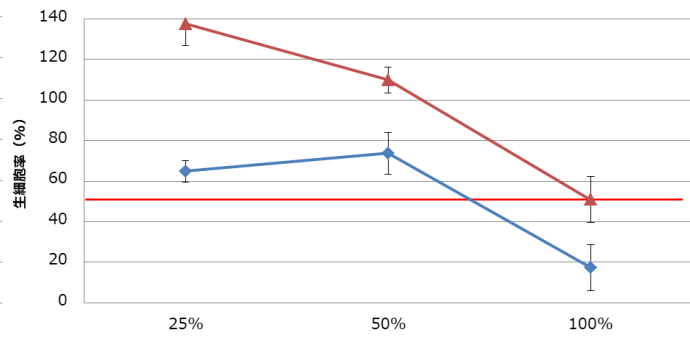
1% ベンジルアルコールはEPI-MODEL24およびEPI-MODEL24 6Dを用いた両試験で非刺激性と判定とされました。

プロパンジオール

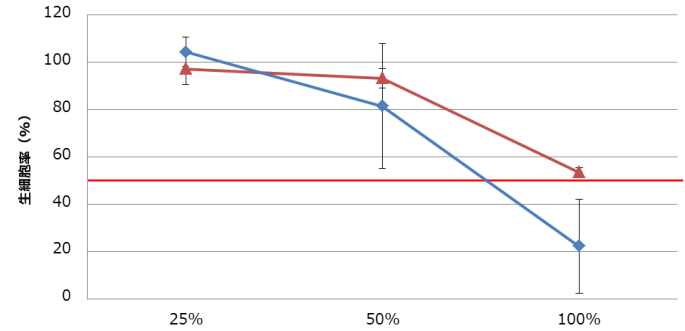


EPI-MODEL24 6D

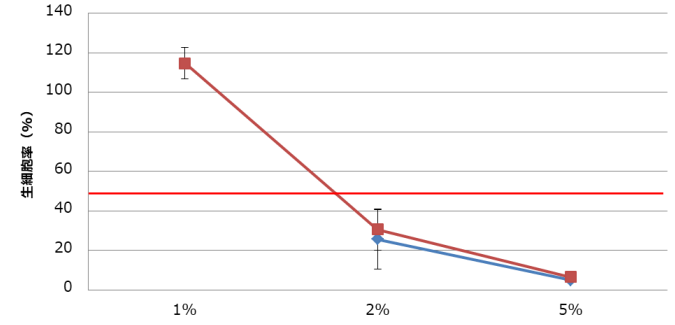
プロピレングリコール



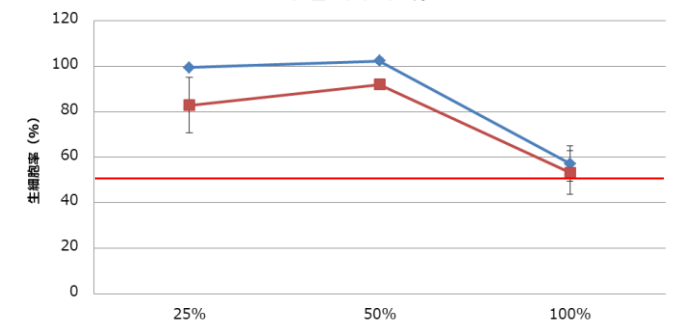
ジプロピレングリコール



ベンジルアルコール



プロパンジオール



—●— 施設1 —■— 施設2

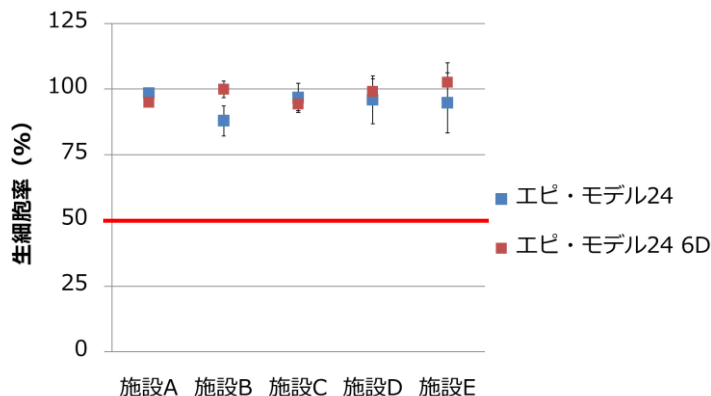
100% プロパンジオールはEPI-MODEL24 6Dを用いた試験で50%付近の生細胞率となりました。

◆防腐剤の刺激性評価についての検討

➤ 試験プロトコル：前培養→被験物質の適用（15分）→洗浄→後培養（42時間）→MTT試験

試験A：溶媒の検討

5施設において、50%ブチレングリコール(50% BG) の刺激性を評価しました。



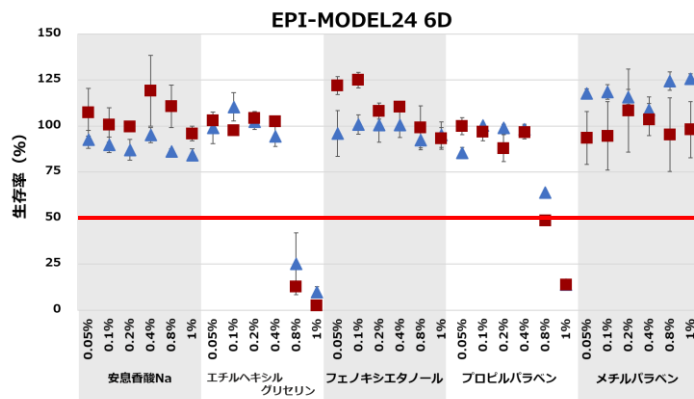
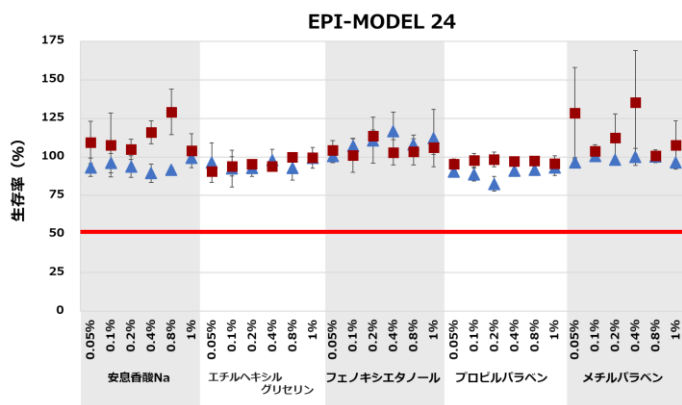
全5施設で、50% BGは非刺激性
→溶媒として使用できることを確認
以下の試験で溶媒として使用

試験B：添加剤の刺激性試験

50% BGで安息香酸、エチルヘキシルグリセリン、フェノキシエタノール、プロピルパラベン、メチルパラベンなどの添加剤を各濃度に溶解し、皮膚刺激性を評価しました。1被験物質に対して2施設で評価を行いました。

※注意

OECD TG439では陰性対照に蒸留水を使用します。本試験では被験物質を50% BGで溶解しました。このため50%BGを陰性対照としました。EPI-MODEL24 6DはOECD TG439未収載ですが、判定は50%生細胞率を活用しました。



刺激性のリスクが高い防腐剤を溶解・希釈して適用・暴露すると、いずれの被験物質もEPI-MODEL24では、非刺激性の試験結果となりました。

0.8% 1.0% エチルヘキシルグリセリン、1.0% プロピルパラベンは、EPI-MODEL24 6Dを用いた試験で刺激性の結果となりました。EPI-MODEL24では非刺激性の結果でしたが、EPI-MODEL24 6Dを使用することで、弱刺激を検出できる可能性があることがわかりました。

EPI-MODEL24 6DはEPI-MODELに比べ、角質層が薄く脆弱な表皮モデルです。EPI-MODEL24ではエチルヘキシルグリセリンやプロピルパラベンを角質層に留め、細胞層内へ入ることが起きにくいと考えられます。

本試験では、50% BGを使用しましたが、異なる溶媒を使用することで結果が変化する可能性があります。リスクがある添加剤は、溶解・希釈を行い、表皮モデルを使用することで、刺激性の有無を検出できる可能性があることが推察できました。