

「代替法を用いて化粧品原料の眼刺激性を評価するにあたっての指針（案）」

1、序

新規原料を配合した化粧品の承認申請の際に添付すべき資料の一部として、眼刺激性に関する情報を得るために行われる試験法としてはウサギを用いた方法（ドレイズ試験）が従来より繁用されてきた。しかし、動物愛護の観点から、それに替わる適切な方法（代替法）があればそれを用いても良いことを示した。

現在までに、眼刺激性試験代替法として数多くの *in vitro* 試験法が開発された。それらの内にはドレイズ試験との対応性の良い方法もあるが、全ての被験物質について、ドレイズ試験を完全に代替できる方法はない。一方、施設間バリデーションの結果から、いくつかの代替法については、無刺激性物質や強刺激性物質の識別が可能であることが示されてきた。

そこで、本指針では化粧品原料の眼刺激性評価において、評価の科学的レベルを低下させることなく、動物の使用数を削減し、動物の苦痛を最小限にとどめることを目的に、代替法を活用し、従来のドレイズ試験法とを組み合わせたスキームを示した。なお、代替法を用いた評価の経験が浅いことから、その利用範囲をかなり限定した。今回の指針に従い、今後、多くの化粧品原料についてドレイズ試験及び代替法を用いた試験の結果が集積されることが期待されている。このデータベースに基づいて、近い将来において、本指針を見直す必要がある。

なお、本指針で示した評価のスキームはいずれの物質においても、また、いずれの施設においても同じ手順で行うことを求めるものではない。以下に述べる化粧品原料の眼刺激性評価における特質に配慮し、試験の目的、被験物質の特性、施設の経験・設備等に応じて、適切な方法を選択する必要がある。状況によってはウサギを用いた従来の方法のみによって評価しても構わない。

2、化粧品原料の眼刺激性評価における特質

化粧品は日常生活の中で使用されるものであることから、製品の安全性確保は最も重要なところである。また、化粧品は生体に対する作用がないか、或いは緩和なものとしてされている。化粧品原料の眼刺激性に関しては無刺激性や弱刺激性のものが多いが、刺激性を有するものもある。これらの刺激性物質については、化粧品に配合して安全に使用できる範囲を示すことが必要である。また、化粧品は、本来、眼に使用するものではなく、化粧品が眼に接触するのは、通常、偶発的な事故によって誤って眼に入った場合であり、通常、洗眼などの適

切な処置をとることにより傷害を軽減することが可能である。

3、眼刺激性試験代替法を用いた評価における考え方

全ての代替法はその試験系の依拠する機序により、また、感度や再現性、ドレイズ試験結果との対応性などの特性により、適応可能な被験物質の範囲やそれに基づく評価の信頼性が決まってくる。従って、用いる試験法は適切なバリデーションにより上記の特性が客観的に評価されたものでなくてはならない。その際には、被験物質の物理的・化学的性状や予想される刺激性の程度および事前に得られた毒性学的情報に応じて試験法を取捨選択し、また、他の方法と組み合わせることにより、適正な評価が可能となる。

眼刺激性を評価するためのスキームとしては、被験物質の物理的・化学的特性により代替法で評価するか、動物で評価するかを決定する第一段階、代替法により無刺激性物質と刺激性物質を識別するとともに、刺激性物質の刺激強度の大まかな評価を行う第二段階、無刺激性物質と判定し得なかったものについて、動物を用いて刺激性を評価する第三段階よりなる。なお、被験物質の物理的・化学的特性に関する情報は第二段階における適切な代替法の選択や得られた結果の評価にも必須である。また、施設の設備や経験等に応じて、第二段階を省いて、直接、第三段階で評価しても構わない。

第三段階の動物試験では、製品への配合濃度や *in vitro* 試験結果を勘案し、動物愛護の観点から、被験物質の希釈等により動物における苦痛の緩和を図る。

4、代替法として使用できる試験法及び留意点

バリデーションにより、評価可能な被験物質の範囲、感度、再現性、及びドレイズ試験法との対応性等が示された試験法を使用する。そのような方法の例としては、培養細胞の *viability* や増殖に及ぼす被験物質の影響を検討し、*IC50* 値等の結果を得る、細胞毒性試験法が挙げられる。(注1)

5、評価スキーム

第一段階：被験物質の化学構造、*pH*、酸度、アルカリ度等の物理的・化学的性状などの情報に基づき代替法で評価可能か、動物試験で評価すべきかを判断する。また、適切な代替法を選択する。(注2-5)

第二段階：代替法により、概略の刺激性を評価するとともに、代替法のみで被験物質が無刺激性物質(眼刺激性試験における最大総評価点：

0<MAS<5)とみなして良いか判断する。(注6-9)

第三段階：動物試験で被験物質の刺激性を評価する。この際、化粧品への配合濃度を考慮し、動物に与える苦痛が必要最小限になるように配慮する。即ち、事前の情報及び代替法での結果からMASが中等度刺激以上と評価された場合は、試験の目的等を勘案し、被験物質を希釈してドレイズ試験を行うことも考慮する。

6、参考資料

1) 化粧品・医薬部外品製造申請ガイドブック、第3版、厚生省薬務局審査課監修、薬事日報社、1996

注1) ウサギ角膜由来の細胞株(SIRC細胞)やヒト子宮がん由来の細胞株(HeLa細胞)などの細胞を用い、血清添加培養液を用いる方法は、一般に感度が高く、再現性も良い。ウサギを用いた眼刺激性試験結果とも比較的良く対応する。これらの方法を適切に用いることにより、刺激性物質と無刺激性物質との識別すること、及びある程度刺激強度を評価することが可能である。一方、その他の細胞毒性試験や人工皮膚モデル等の内にも刺激性物質と無刺激性物質の識別が可能な方法もある。

注2) pHが2.0以下及び11.5以上の強酸性もしくは強アルカリ性の被験物質で酸度やアルカリ度の高い場合は、通常、強刺激性と判定する。

注3) 皮膚に対して強い刺激性や腐食性を示す被験物質の場合も注2)の場合と同様に評価する。

注4) 細胞毒性試験においては、被験物質が培地と均一に混和できない場合は、得られた結果が被験物質の持つ細胞毒性を適切に反映していない可能性がある。

注5) 強酸性あるいは強アルカリ性で酸度あるいはアルカリ度が高い被験物質、及びアルコール等の揮発性物質への細胞毒性試験の適用性については確認されていない。

注6) 細胞毒性試験結果のみに基づいて無刺激性と判定する際の識別値は、

false negative を最小限にするために、いずれの状況においても無刺激性と考えられる絶対濃度以上（例えば、血清添加培地を用いた細胞毒性試験においては 50%抑制濃度 IC_{50} が $5000 \mu\text{g/ml}$ 以上）、もしくはこれまでの情報から無刺激性であることが明らかとなっている標準物質の IC_{50} 値に十分な安全係数を掛けた値以上とすることが適切である。

注 7) 代替法の内には、細胞毒性試験法のように用いる細胞の種類や培養条件等により、 IC_{50} 値に大きな差の生ずるものがある。このような場合は陰性対照や陽性対照物質を含むいくつかの標準物質を用い、それらの結果をもとに試験結果の妥当性を評価することが望ましい。

注 8) 被験物質の細胞毒性を評価する際の無刺激性の標準物質としては 10% Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (20 E.O.) (Tween 20)、陽性対照物質としては、10% Polyoxyethylene Octylphenylether (10 E.O.) (Triton X-100) 及び 10% Sodium Lauryl Sulfate が挙げられる。これらの化合物は試験法の特성에応じて選択し、被験物質と同時に試験する。

代替法のみで無刺激性と判定されなかった被験物質の刺激性については、標準物質及び陽性対照物質と比較し、以下のように評価する。

実質上無刺激： IC_{50} が Tween 20（MAS 0 程度）より大きい値の物質

軽度刺激性： IC_{50} が Tween 20 より小さく、SLS（MAS 30 程度）より大きい値の物質

中程度刺激性： IC_{50} が SLS より小さく、Triton X-100（MAS 50 程度）より大きい値の物質

強度刺激性： IC_{50} が Triton X-100 より小さい値の物質（MAS>50 相当）

注 9) 代替法のみで無刺激性物質とみなしても構わないとされた被験物質で、製品中に 10%以上配合されない場合は、動物試験を行わずとも無刺激性と評価して構わない。それ以外の被験物質については、動物試験を実施する。