

化粧品の安全性評価への適用を目指した 有限用量下の経皮吸収率を予測するモデルの構築

國田 凌輝

化学物質がもたらす毒性リスクは、毒性強度とヒトへの曝露量を用いて示される。肝臓や腎臓といった全身に影響する全身毒性のリスク評価において、毒性強度は目的物質を対象とした動物試験から得られた無毒性量が該当する。ヒトへの曝露量は、化粧品の場合は主に経皮曝露が想定され、化粧品使用量と目的物質の配合濃度、並びに目的物質の経皮吸収率（皮膚上に塗布された物質質量に対する、角層より下に透過した量のパーセント割合）の積から算出できる¹⁾。一般的に、無毒性量に対する経皮曝露量の比、いわゆる安全率が100を超える場合、化粧品に含まれる物質の全身毒性リスクは小さいとみなされる²⁾。したがって、化粧品に含まれる物質の全身毒性リスクを評価する上で、経皮吸収率は重要なパラメーターの1つと言える。

摘出皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過試験により、経皮吸収率を評価することができるが³⁾、動物愛護の観点も踏まえ、近年、摘出皮膚を用いない評価方法に注目が集まっている。これまで、摘出皮膚の代わりとして人工膜を用いた研究や、目的物質の構造情報や物理化学的特徴から皮膚透過性を計算予測可能な Quantitative structure-permeability relationship (QSPR) モデルに関する研究が進められてきた。一方、これらの研究は主に無限用量下で得られる透過係数 (Kp) を対象にしたものであり、経皮吸収率を得るための有限用量下とは異なる条件であることに注意が必要である。本研究では、人工膜や QSPR モデルを用いて得られる Kp をパラメーターとして、有限用量下の経皮吸収率を予測可能な方法を構築し、摘出皮膚を用いずに経皮吸収性を考慮した安全性評価の実現を目指した。

第1章では、経皮吸収に対する無限用量と有限用量の条件下の違いに着目し、有限用量下では基剤の蒸発により目的物質の皮膚透過時間は限定されると考えた。そこで、Fick の拡散第1法則を基に、蒸発により基剤から皮膚への物質の透過が終了することを仮定することで、 Kp をパラメーターとして有限用量下の経皮吸収率を予測する数理モデルを構築した。構築した数理モデルの妥当性を評価するため、7物質 ($121.12 \leq MW \leq 234.34$, $-2.3 \leq \log K_{o/w} \leq 2.0$) を対象に、豚摘出皮膚を用いた無限用量下の透過試験で得られた Kp を数理モデルに適用し、経皮吸収率の予測値を算出した。また、豚摘出皮膚を用いた有限用量下の透過試験より、経皮吸収率の実測値（平均値）を得た。経皮吸収率の予測値と実測値を比較した結果、予測値と実測値の乖離は2倍程度に収まることを確認した。したがって、新しく構築した数理モデルが経皮吸収率の予測に有用である可能性が示唆された。

第2章では、人工膜の一種、Strat-M®を介した透過試験で得られた Kp を数理モデルに適用した場合の経皮吸収率予測性を評価した。第1章で用いた7物質を対象に、Strat-M®と数理モデルより得られた経皮吸収率の予測値と実測値を比較した結果、 $\log K_{o/w} < -0.4$ の経皮吸収率について、予測値は実測値よりも2倍より低く見積もられ、乖離が生じた。したがって、 $\log K_{o/w} < -0.4$ のような親水性物質の経皮吸収率予測において、Strat-M®は向かない可能性が示唆された。一方、 $\log K_{o/w} \geq -0.4$ の物質の経皮吸収率については、予測値と実測値の乖離は2倍程度に収まることを確認した。ゆえに、目的物質の物理化学的特徴を把握することで、経皮吸収率予測に Strat-M®を適用できる可能性が示唆された。

第3章では、親水性物質も含めて経皮吸収率を予測可能な方法を構築するため、QSPR モデルの中でも一般的に利用可能な Potts and Guy モデルと ChemTunes モデルを対象とした。本章では2点に着目した。1点目は、QSPR モデルによる Kp 予測方法である。各モデルの Kp 予測性を評価した結果、ど

ちらも予測値が文献値より低く見積もられる傾向が観測された。これは経皮吸収率を低く見積もる可能性にも繋がるため、1つの物質に対し、Potts and Guy モデルと ChemTunes モデルで Kp を予測した後、値が高い方を予測値として採用する方法（バッテリーモデル）を適用することで、文献値に対して Kp 予測値が低く見積もられる程度を抑えた。2点目は、皮膚の個体差に伴う経皮吸収率のばらつきである。化粧品の安全性評価では、摘出皮膚を介した透過試験で得られた経皮吸収率データの平均値（mDA）に標準偏差（SD）を加味した値（msDA）を安全率の算出に利用することが求められている¹⁾。第1、2章の結果から、QSPR モデルにより得られた Kp を数理モデルに適用することで、mDA が予測できる可能性が示唆された。そこで、得られた mDA から msDA を予測するため、mDA と SD の文献値を解析することで回帰モデルを構築した。バッテリーモデルと数理モデルを用いて予測した mDA から、回帰モデルを用いて msDA を予測する方法を Integrating Mathematical Approaches: IMAS と定義した。

経皮吸収率データを持つ 54 物質 ($76.1 \leq MW \leq 362.5$, $-1.4 \leq \log K_{o/w} \leq 5.7$) を対象に、IMAS による msDA 予測値を文献値と比較した結果、乖離が2倍以内に収まった物質数は 27 物質 (50%) であった。ここで、 $MW > 220$ 、 $\log K_{o/w} > 3.1$ に該当する物質は、IMAS による msDA の予測値が文献値と比較して2倍より高く見積もられる傾向にあることが分かった。54 物質のうち、 $MW \leq 220$ 、 $\log K_{o/w} \leq 3.1$ の 40 物質を対象に、IMAS による msDA 予測値を文献値と比較した結果、乖離が2倍以内に収まった物質数は 26 物質 (65%) であった。

第4章では、 Kp と水への飽和溶解度 (C_{wat}^{sat}) の積から得られる最大皮膚透過速度 (J_{max}) を基に、経皮吸収率 (msDA) を 10%、40%、80% に分類する Kroes モデルに着目し、第3章で構築した IMAS と msDA 予測性を比較した。Kroes モデルの特徴として、 J_{max} に対して C_{wat}^{sat} が影響するため、結果として msDA の分類値にも大きく影響することが考えられた。第3章で用いた、経皮吸収率データを持つ 54 物質のうち、 $MW \leq 220$ 、 $\log K_{o/w} \leq 3.1$ に該当する 40 物質について、Kroes モデルを介して分類された msDA に基づき、群間の C_{wat}^{sat} を比較したところ、msDA が 80% に分類された群の C_{wat}^{sat} は 40% に分類された群よりも高い傾向が観測された。一方、 C_{wat}^{sat} が高い親水性物質は、脂質に富む角層の影響により msDA は低い傾向にあり、矛盾が生じている。Kroes モデルにより msDA が 40% に分類された物質のうち、最も高い C_{wat}^{sat} は 57.0 mg/cm^3 であったことを踏まえ、Kroes モデルにより msDA が 80% に分類され、かつ $C_{wat}^{sat} > 57.0 \text{ mg/cm}^3$ に該当する 14 物質の msDA について、IMAS と Kroes モデルの予測性を評価した。その結果、Kroes モデルと比較して、IMAS による msDA 予測値と文献値の乖離は少ないことが分かった。したがって、 $C_{wat}^{sat} > 57.0 \text{ mg/cm}^3$ のような親水性物質の msDA を予測する際には、Kroes モデルよりも IMAS による評価が適切であると考えられた。

以上より、本研究では人工膜や QSPR モデルを用いて得られる Kp を数理モデルに適用することで、有限用量下の経皮吸収率 (msDA) を予測可能な方法 IMAS を新たに構築した。特に IMAS は、化粧品に含まれる親水性の有効成分や添加物を対象に、安全率の算出による全身毒性リスクの説明時、目的物質の msDA 予測を通じて安全性評価に貢献できる可能性がある。

[引用文献]

1. SCCS, (2023): Scientific committee on consumer safety. SCCS/1647/22, the SCCS's Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation; 12th revision; Scientific Committee on Consumer Safety: Brussels, Belgium, 2023.
2. OECD, (2004): Organization for Economic Cooperation and Development. In Guidance Notes on Dermal Absorption; Series on Testing and Assessment Number 156; OECD Press: Paris, France, 2014.

Mathematical model for estimating the dermal absorption rates under finite dose conditions to facilitate cosmetic safety assessments

Ryoki Kunita

The toxicity risk posed by chemicals is expressed using the hazard and human exposure levels. In the risk assessment of systemic toxicity affecting organs such as the liver and kidneys, the hazard corresponds to the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) obtained from animal testing focused on the target chemical. For human exposure levels, in the case of cosmetics, percutaneous exposure is primarily considered, which can be calculated as the daily use amount of cosmetics, the concentration of the target chemical, and the dermal absorption rate (the percentage of the chemical amount which penetrates below the *stratum corneum* compared to the amount applied to the skin). Generally, if the ratio of the percutaneous exposure level to the NOAEL (Margin of safety: MoS) exceeds 100, the systemic toxicity risk of substances in cosmetics is considered low¹⁾. Therefore, the dermal absorption rate would be important parameters in assessing the systemic toxicity risk of chemicals in cosmetics.

Although dermal absorption rates can be evaluated through *in vitro* skin permeation tests using excised skin²⁾, recent years have seen a focus on alternative assessment methods that do not involve excised skin, considering animal welfare. Research has progressed using artificial membranes as a substitute for excised skin, as well as studies on Quantitative Structure-Permeability Relationship (QSPR) models, which can calculate the skin permeability based on the structural information and physicochemical characteristics of the target chemical. However, it is important to note that these studies primarily focus on permeability coefficients (Kp) obtained under infinite dose conditions, which are different from the finite dose conditions required to obtain dermal absorption rates. This study aims to develop a method for estimating dermal absorption rates under finite dose conditions by using Kp which can be obtained from artificial membranes or QSPR models, thereby achieving a safety evaluation that considers dermal absorption without using excised skin.

In Chapter 1, I focused on the differences between infinite and finite dose conditions regarding the effects to dermal absorption, positing that the skin permeation time of the target chemical is limited under finite dose due to the evaporation of the vehicle. Therefore, based on Fick's first law of diffusion, I constructed a mathematical model to estimate dermal absorption rates under finite dose conditions by assuming that the permeation from the vehicle to the skin ceases due to evaporation. To evaluate the validity of the constructed mathematical model, I applied the Kp obtained from infinite dose permeation tests using excised porcine skin to a mathematical model targeting seven chemicals ($121.12 \leq MW \leq 234.34$, $-2.3 \leq \text{Log } K_{o/w} \leq 2.0$) and calculated the predicted percutaneous absorption rates. I also obtained the actual measured values (averages) of percutaneous absorption rates from finite dosage permeation tests using excised pig skin. By comparing the predicted values with the actual measured values, I confirmed that the discrepancy between them was within a factor of 2. Therefore, the newly constructed mathematical model is suggested to be potentially useful for predicting percutaneous absorption rates.

In Chapter 2, I evaluated the predictive performance of the dermal absorption rates when applying Kp obtained from permeation tests using Strat-M[®]. For the seven substances used in Chapter 1, I compared the predicted dermal absorption rates derived from Strat-M[®] and the mathematical model with and observed values. As a result, for chemicals with $\text{Log } K_{o/w} < -0.4$, the predicted values were estimated to be more than twice as low as the observed values, indicating a discrepancy. Thus, it is suggested that Strat-M[®] may not be suitable for estimating the dermal absorption rates of hydrophilic substances like those with $\text{Log } K_{o/w} < -0.4$. On the other hand, for chemicals with $\text{Log } K_{o/w} \geq -0.4$, I confirmed that the discrepancy between the predicted and observed values remained within a 2-fold range. Hence, understanding the physicochemical characteristics of the target chemicals may allow Strat-M[®] to be applied for predicting percutaneous absorption rates.

In Chapter 3, to develop a method for predicting dermal absorption rates, including hydrophilic chemicals, I focused on commonly available QSPR models, specifically the Potts and Guy model and the ChemTunes model. This chapter focused on two points. The first is the Kp prediction method using QSPR models. The evaluation of

the predictive performance of each model indicated that both tended to provide predicted values lower than literature values. This could lead to underestimating the dermal absorption rate. Therefore, regarding a single chemical, after predicting Kp with the Potts and Guy model and the ChemTunes model, the higher of the two predicted values was applied as predicted Kp values from QSPR models. This method was defined as battery model. Battery model reduced the extent to which the predicted Kp values were underestimated compared to literature values. The second point is the variability in dermal absorption rates due to individual differences in skin. In the safety evaluation of cosmetics, it is required to use a value (msDA) that incorporates the standard deviation (SD) into the average dermal absorption rate data (mDA) obtained from permeation tests using excised skin. The results from Chapters 1 and 2 suggest that applying Kp obtained from QSPR models to the mathematical model may allow for the prediction of mDA. Therefore, to predict msDA from the obtained mDA, I constructed a regression model by analyzing literature values of mDA and SD. The method to predict msDA from the mDA predicted using the battery model and mathematical model through the regression model is defined as Integrating Mathematical Approaches: IMAS.

For 54 substances with percutaneous absorption rate data ($76.1 \leq MW \leq 362.5$, $-1.4 \leq \text{Log } K_{o/w} \leq 5.7$), I compared the msDA predictions by IMAS with literature values, finding that the number of chemicals whose discrepancies were within a 2-fold range was 27 (50%). Notably, chemicals with $MW > 220$ and $\text{Log } K_{o/w} > 3.1$ showed a tendency to overestimate IMAS-predicted msDA values compared to literature values. Among the 54 substances, I compared the IMAS-predicted msDA values with literature values for 40 chemicals with $MW \leq 220$ and $\text{Log } K_{o/w} \leq 3.1$, resulting in 26 chemicals (65%) whose discrepancies were within a 2-fold range.

In Chapter 4, I focused on the Kroes model, which classifies dermal absorption rates (msDA) into 10%, 40%, and 80% based on the maximum skin permeation rate (J_{max}), obtained from the product of Kp and the saturation solubility in water (C_{wat}^{sat}), comparing it with the msDA predictive performance of IMAS constructed in Chapter 3. It was considered that since C_{wat}^{sat} affects J_{max} , it could significantly influence the classification values of msDA. For 40 substances with $MW \leq 220$ and $\text{Log } K_{o/w} \leq 3.1$ of the 54 chemicals with dermal absorption rate data used in Chapter 3, I compared the C_{wat}^{sat} between groups classified by the Kroes model. A trend was observed where the C_{wat}^{sat} of the group classified with msDA of 80% was higher than that of the group classified with 40%. However, hydrophilic chemicals with high C_{wat}^{sat} tend to have low msDA due to the effects of the lipid-rich *stratum corneum*, leading to contradictions. Considering that the highest C_{wat}^{sat} among the substances classified with msDA of 40% by the Kroes model was 57.0 mg/cm³, I evaluated the predictive performance of IMAS and the Kroes model for the msDA of 14 chemicals classified with msDA of 80% and $C_{wat}^{sat} > 57.0$ mg/cm³. The results indicated that the discrepancies between the IMAS-predicted msDA values and literature values were smaller than those of the Kroes model. Thus, it was concluded that for predicting msDA of hydrophilic substances like those with $C_{wat}^{sat} > 57.0$ mg/cm³, the IMAS evaluation is considered more appropriate than the Kroes model.

In conclusion, this study established a new method, IMAS, for predicting dermal absorption rates (msDA) under finite dose conditions by applying Kp obtained from artificial membranes and QSPR models to a mathematical model. Particularly, IMAS has the potential to contribute to safety assessments through the estimation of msDA when calculating MoS to explain systemic toxicity risks for hydrophilic active ingredients and additives in cosmetics.

[References]

1. SCCS, (2023): Scientific committee on consumer safety. SCCS/1647/22, the SCCS's Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation; 12th revision; Scientific Committee on Consumer Safety: Brussels, Belgium, 2023.
2. OECD, (2004): Organization for Economic Cooperation and Development. In Guidance Notes on Dermal Absorption; Series on Testing and Assessment Number 156; OECD Press: Paris, France, 2014.

論文審査の結果の要旨

國田 凌輝 氏から提出された学位論文「化粧品の安全性評価への適用を目指した有限用量下の経皮吸収率を予測するモデルの構築」で取り上げている化粧品は、我が国においては、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（医薬品医療機器等法）」で、「人の身体を清潔にし、美化し、魅力を増し、容貌を変え、又は皮膚若しくは毛髪を健やかに保つために、身体に塗擦、散布その他これらに類似する方法で使用されることが目的とされている物で、人体に対する作用が緩和なものをいう。」と定義されている。化粧品の特異性としては、主として外傷や疾病時のみに用いられる医薬品とは異なり、ほぼ毎日、人体に使用することが挙げられる。根拠法である医薬品医療機器等法に関連する法令名においても、必ず「品質、有効性及び安全性の確保」という文言が示され、特に「安全性の確保」については、医薬品のみならず化粧品においても最も大切であり重要視されなければならないと考えられる。

化粧品の安全性評価、特に全身毒性を精緻に評価する目的で、これまで動物愛護の観点から、動物組織を用いない人工膜、3次元培養ヒト皮膚モデルや定量構造透過相関（QSPR: Quantitative Structure Permeation Relationship）モデルなどの検討がなされていたが、これらの既存技術の化粧品の安全性評価への適用方法に関する検討が進んでいない。そこで國田 凌輝 氏は、人工膜の1種である Strat-M® と QSPR モデルに着目し、これらの技術を化粧品の安全性評価に適用するための新しい数理モデル及び方法論を構築し、その有用性について評価を行った。その手順として、実際の化粧品の適用条件に近い有限用量下の経皮吸収率（ $DA = \text{経皮吸収量} / \text{サンプル塗布量}$ ）を予測可能な新しい数理モデルを構築し、既存の人工膜 Strat-M® 及び QSPR モデルと新しい数理モデルの組み合わせによる DA の平均値（ mDA ）の予測性を評価し、その後、QSPR モデルと新しい数理モデルから、*in vitro* 経皮吸収試験を実施せずに mDA に標準偏差（ SD ）を加味し、 DA のばらつきを考慮した $msDA$ を予測できる方法論 IMAS: Integrating Mathematical Approaches を構築した。以下、これらの研究内容を要約する。

第1章では、化粧品を使用する場面を踏まえ、基剤の蒸発により目的物質が皮膚に暴露される時間を考慮した Fick の拡散第1法則の透過パラメータ（ Kp : 透過率）を用いて、実際の化粧品の適用条件に近い有限用量下での DA が予測可能な新しい数理モデルを構築した。構築した数理モデルから得られる DA を、豚皮を用いた無限用量下での *in vitro* 経皮吸収試験からの Kp を用いて得られる DA と比較することで妥当性を評価したところ、予測値と実測値の乖離は2倍程度に収まることから、構築した数理モデルは DA の予測に有用である可能性が示唆された。

第2章では、人工膜 Strat-M® を用いて、無限用量下で目的物質を適用した場合に得られた Kp を、新しく構築した数理モデルに適用した場合、実際の化粧品の適用条件に近い有限用量下での DA の予測性を評価したところ、予測値と実測値の乖離は2倍程度に収まることが確認された。親水性の目的物質は Strat-M® を透過しにくいことから、親油性の目的物質においては、その物理化学的パラメータを把握することで DA が予測でき、化粧品の安全性評価に適用できる可能性が示された。

第3章では、経皮吸収性と目的物質の物理化学的性質に着目し、物理化学的特徴をパラメータとして

目的物質の皮膚透過性を予測する QSPR モデルと、第 1 章で構築した数理モデルの有限用量下での DA の予測性を検討した。 K_p を推定する QSPR モデルが複数あること、QSPR モデルを用いる場合に重要なパラメータとなる $K_{o/w}$ (n-オクタノール/水分配係数) を予測する *in silico* ツールにも種類があることから、両パラメータに関して、実測値とこれらの手法を用いて得られた予測値とを比較し DA の予測性を評価した。Potts and Guy と ChemTunes を QSPR モデルとして用いて検討を行ったが、 K_p が低く見積もられる目的物質が見受けられた。化粧品の安全性を考慮した場合、DA が低く見積もられることに繋がる K_p の低い見積もりを回避するため、予測された K_p の高い方を目的物質の予測値として採用するバッテリーモデルを適用した。化粧品の安全性評価においては、皮膚の個体差に伴う DA のばらつきを考慮した msDA を安全率の算出に利用する必要がある。そこで、バッテリーモデルと数理モデルを用いて予測した mDA から、SD が示されている 48 物質の DA データより作成した回帰モデルを用いて msDA を予測する新しい方法論 (IMAS: Integrating Mathematical Approaches) を構築した。すなわち、1) QSPR モデルとバッテリーモデルより K_p を予測し、 K_p を Cleek と Bunge により提唱された式を用いて、表皮及び真皮の親水性が透過性に与える影響を補正した K_p^{corr} を算出、2) Vecchia and Bunge が提唱したモデル式を用いて、 $K_{o/w}$ より分配係数 K を予測、3) 得られた K_p^{corr} と K を用いて、実際の化粧品の適用条件に近い有限用量下での mDA を算出、4) 作成した回帰モデルを用いて、mDA の msDA への変換、これらの手順を踏むことで *in vitro* 経皮吸収試験を実施せず msDA を予測できることが明らかとなった。IMAS による msDA の予測は、 $76.1 \leq MW \leq 300$ 、 $-1.4 \leq \log K_{o/w} \leq 3.1$ の範囲で、予測値と文献値との乖離が 2 倍以内であることが確認された。

第 4 章では、本研究で構築した IMAS による msDA による予測性と、目的物質の $\log K_{o/w}$ 、MW (分子量)、水への飽和溶解度 ($C_{\text{wat}}^{\text{sat}}$) を用いて msDA を簡便に予測できる Kroes モデルによる予測性を比較した。その結果、Kroes モデルでは、親水性物質の msDA が、摘出皮膚を介した透過試験で得られる実測値と比較して高く見積もられる傾向があるのに対し、IMAS では msDA の予測値と文献値との乖離が小さかったことから、親水性物質の msDA を予測するには IMAS が適していることを見出した。

以上、本研究では、実際の化粧品の適用条件に近い基剤の蒸発による暴露時間への影響を考慮することで、目的物質の有限用量下での DA を予測可能な新しい数理モデルを構築した。皮膚代替膜や QSPR モデル、および本研究で構築した数理モデルを組み合わせる方法に基づき、化粧品の安全性評価に応用可能な msDA を予測可能な新しい方法論として IMAS を構築した。

本研究の成果は、化粧品の安全性の確保のみならず、動物愛護の観点からは動物組織を用いない化粧品開発を可能とする。加えて、計算機科学技術を用いた新たな化粧品開発など、化粧品開発の自由度向上に大きく貢献できると思われる。よって本学位請求論文は課程によらない博士 (薬科学) の論文として価値のあるものと判断される。