

## 経済協力開発機構（OECD）の化学物質の 試験に関するガイドライン

### In vitro 皮膚腐食性：経皮電気抵抗試験（TER）

#### はじめに

1. 皮膚腐食性とは、化学品の分類および表示に関する世界調和システム（GHS）によって定義されるように、被験物質の適用後、皮膚に生じる不可逆的な組織損傷をいう(1)。この試験ガイドラインでは、生きている動物を使用せずに腐食性を評価する手順が示される。
2. 皮膚腐食性の評価は、代表的に実験動物が使用されてきた(2)。2002年のガイドライン 404の改訂およびガイドライン 404の補足において、その手順で使用される動物の疼痛と苦痛に関する問題が検討され、それにより *in vitro* の代替法を用いて動物の疼痛と苦痛を伴うことなく皮膚腐食性を決定できるようになった。
3. ガイドライン 404 で *in vivo* 皮膚腐食性試験を *in vitro* 試験に完全に置き換えることができない主な理由は、*in vitro* 試験を検証するために公平かつ中立の立場で実施されたデータに欠けることであった。規制目的の皮膚腐食性試験に使用される代替法の確立に向けての最初のステップは、予備的有効性評価試験を実施することであった(3)。それに続き、皮膚腐食性を評価するための *in vitro* 手法(4)(5)を用いて公平な有効性評価試験が実施された(6)(7)(8)。これらの試験結果と公表された他の文献の結果から、以下の試験を *in vivo* 皮膚腐食性の評価の代替法として使用してもよいという勧告につながった(9)(10)(11)。すなわち、ヒト皮膚モデル試験（試験ガイドライン 431 を参照）と経皮電気抵抗試験である（本ガイドライン）。

#### 定義

4. 用いた定義を補遺に示す。

#### 最初に考慮すべき事項

5. 有効性評価試験およびその他公表された研究によれば、ラット経皮電気抵抗（TER）測定法(12)(13)は、既知の皮膚腐食性物質と非腐食性物質を確実に識別することが可能であるという(5)(9)。
6. このガイドラインで述べられる試験により、腐食性の化学品を特定できる。他の既存の情報（例えば、pH、構造活性相関、ヒトおよび/または動物のデータ）を用いた証拠の重み付けで支持される場合には、上記に加え、更に非腐食性物質および混合物を特定することも可能になる(1)(2)(11)(14)。しかし、この試験では皮膚刺激に関する情報は得られないうえ、化学品の分類および表示に関する世界調和システム（GHS）(1)において許可されている腐食性物質のサブカテゴリーへの分類もできない。
7. 単回の皮膚暴露後に生じる局所皮膚効果を完全に評価するためには、試験ガイドライン 404 に追加され(2)、更に GHS(1)に規定されている逐次試験戦略に従うことを推奨する。この試

験戦略は、生きた動物による試験を考慮する前に（本ガイドラインで述べる）*in vitro* 皮膚腐食性および皮膚刺激性試験を行うものである。

### 試験の概要

8. 2コンパートメント試験システムでは、皮膚ディスクはコンパートメント間を分離する機能を果たすが、その皮膚ディスクの表皮面に最長 24 時間にわたって被験物質を適用する。人道的に屠殺した 28~30 日齢のラットから皮膚ディスクを採取する。腐食性物質は、正常角質層の持つ健全性とバリア機能を失わせる能力（TER を閾値よりも下げる能力として測定できる）により確認される(12)。ラット TER については、5 kΩ のカットオフ値（閾値）が選択されたが、広範囲にわたる化学物質についての詳細なデータを調べた結果、大多数の物質はこの値より上（しばしば 10 kΩ 超）か、かなり下の値（しばしば 3 kΩ 未満）を示すという事実に基づき選択された。通常、動物に対して非腐食性物質は刺激性の有無を問わず、TER をこのカットオフ値より低下させない。更に、他の皮膚試料または他の装置を使用する場合カットオフ値が変化し得るので、更なる検証が必要になる。
9. 5 kΩ 付近値を含め、TER 陽性結果を確認する試験として色素結合ステップが試験手順に組み込まれる。色素結合ステップは、イオン透過性の増加が角質層の物理的破壊によるものかどうかを確定する。ラット皮膚を用いる TER 法の結果は、OECD ガイドライン 404(2)に規定されているウサギによる *in vivo* 腐食性試験の結果を予見することが示されている。ヒト皮膚パッチテストと比較する場合、ウサギの *in vivo* 試験は皮膚腐食性および皮膚刺激性に関して非常に保守的である点に留意する必要がある。

### 手順

#### 動物

10. この試験ではラットが実験動物として選択されるが、それは本試験においてラット皮膚の化学物質に対する感受性が既に示されているからである(10)。（皮膚を採取する際、）毛包が成体で発毛を開始する以前の休止期にあることを確保するために、ラットの週齢および系統が特に重要である。
11. 約 22 日齢の若齢雄または雌ラット（Wister 系または同等の系統）の背面および側面の毛を、小さいクリッパーで慎重に刈り取る。次に、毛刈りした領域を抗生物質溶液（例えば、微生物の増殖を防止するのに効果的な濃度のストレプトマイシン、ペニシリン、クロラムフェニコールおよびアンホテリシンを含む）に浸し、慎重に拭きながら洗浄する。1 回目の洗浄後、3 日目または 4 日目に再び動物を抗生物質溶液で洗浄し、2 回目の洗浄の 3 日以内に使用する。そのとき、角質層は脱毛から回復している。

#### 皮膚ディスクの準備

12. 28~30 日齢（この日齢が非常に重要）の動物を人道的に屠殺する。次に、各動物の背側皮膚を採取し、過剰な皮下脂肪を皮膚から慎重に剥離し、除去する。直径約 20 mm の皮膚ディスクを取り出す。保存した皮膚により得られた陽性および陰性対照データが、新鮮皮膚で得られたものに等しいことが示される場合には、ディスクを使用するまで皮膚を保存しても良い。
13. 各皮膚ディスクは PTFE（ポリテトラフルオロエチレン）チューブの一方端に配置し、表皮面をチューブと確実に接触させる。皮膚とチューブの接触を保持するために皮膚の上から

チューブの端にゴム製の O リングを圧入し、過剰な組織を取り除く。チューブと O リングの大きさを図 2 に示す。次に、ゴム製 O リングを PTFE チューブの末端までワセリンで慎重に密封する。チューブは  $\text{MgSO}_4$  溶液 (154 mM) を含むレセプター室内で、バネクリップで支持される (図 1)。皮膚ディスクは  $\text{MgSO}_4$  溶液に完全に浸す。10~15 のディスクが 1 匹のラット皮膚から得られる。

14. 試験を始める前に、各動物の皮膚の品質管理手法として 2 つの皮膚ディスクの電気抵抗を測定する。残りのディスクが試験に使用できるためには、両ディスクは 10 k $\Omega$  を超える抵抗値を示さなければならない。抵抗値が 10 k $\Omega$  より少ない場合、その皮膚由来の残りのディスクは廃棄する。

### 被験物質および対照物質の適用

15. 実験モデルを用いた試験が適切に行われたことを確認するため、試験ごとに陽性対照および陰性対照を並列して設置する。1 匹の動物からの皮膚ディスクを使用する。陽性および陰性対照物質として、10 M 塩酸と蒸留水がそれぞれ推奨される。
16. 液体被験物質 (150  $\mu\text{L}$ ) を、チューブの内側の上皮面に均一に適用する。固形の物質を検査する場合、固形の物質の充分量を表皮面の全てが確実に覆われるように均一にディスクに適用する。脱イオン水 (150  $\mu\text{L}$ ) を固形の物質の表面に加え、チューブを穏やかに攪拌する。皮膚との接触を最大にするために、固形の物質を 30°C に温めて被験物質を溶融もしくは軟化させるか、または挽いて粒状または粉末にする必要がある。
17. 各被験物質および対照物質に対して、3 つの皮膚ディスクを用いる。被験物質を 20~23°C で 24 時間適用する。適用終了後、30°C 以下の水道水を噴射し、物質が除去されなくなるまで洗浄する。

### TER の測定

18. TER は、低電圧交流ホイートストンブリッジを用いて皮膚のインピーダンスを測定することにより得られる(13)。ブリッジは一般的仕様として作動電圧 1~3 ボルト、50-1000 Hz の正弦波または矩形波交流で、少なくとも 0.1~30 k $\Omega$  の測定範囲である。測定に用いるデータブリッジの妥当性を検証するために、データ回路を直列型または並列型値を用い、100 Hz または 1 kHz の周波数でインダクタンス (誘導係数)、キャパシタンス (容量) およびレジスタンス (抵抗) をそれぞれ 2000 H、2000  $\mu\text{F}$  および 2 M $\Omega$  の値まで測定する。腐食性試験測定を目的とするにあたり、直列型値を用いて 100 Hz の周波数における抵抗値として記録する。電気抵抗を測定するに先立って皮膚の表面張力を低減する必要があるが、そのために十分量の 70% エタノールで表皮を覆う。数秒後にエタノールをチューブから除去し、3 mL の  $\text{MgSO}_4$  溶液 (154 mM) を組織に加えて水和する。データブリッジ電極は抵抗 (k $\Omega$ /皮膚ディスク) を測定するために、皮膚ディスクの両側に配置する (図 1)。電極の寸法およびクロコダイルクリップの下に露出する電極の長さは、図 2 で示される。内側電極に取り付けられるクリップは PTFE チューブの上にセットするが、これは抵抗を測定する間、電極の一定の長さを  $\text{MgSO}_4$  溶液に浸した状態に保つためである。外側の電極は、レセプター室内の内側で底に静置するように配置する。バネクリップと PTFE チューブの底面の距離は一定に維持する (図 2)。それは、この距離が抵抗値を左右するからである。したがって、内側電極と皮膚ディスクの間の距離は一定かつ最小限でなければならない (1~2 mm)。
19. 測定された抵抗値が 20 k $\Omega$  を超える場合、これは皮膚ディスクの表皮面を覆っていた被験物質が残存していることに起因する可能性がある。その場合、残存物質を除去するよう試み

るのもよい。例えば、手袋をした親指で PTFE チューブを密封して、約 10 秒間それを振とうする。MgSO<sub>4</sub> 溶液を廃棄し、新鮮な MgSO<sub>4</sub> に入れ替えて測定を繰り返す。

20. 測定に用いられた試験装置と手順によっては、得られた TER 値に影響を与える可能性がある。5 kΩ の腐食性閾値は、本ガイドラインに記載されている特殊な装置と手順に従って得られたデータに基づいて設定されたものであり、試験条件の変更または異なる装置の使用があった場合、異なる閾値と対照値を適用してもよい。したがって、有効性評価試験に使用されている化学物質(4)(5)、または化学物質に類似の化学物質クラスから選んだ一連の参照標準物質を試験することによって、方法論および抵抗閾値を校正する必要がある。参照化学物質として適切なものを表 1 に示す。

### 色素結合法

21. 特定の非腐食性物質に暴露すると抵抗は 5 kΩ のカットオフ値よりも低下するので、イオンは角質層を通過できるようになり、これにより電気抵抗は低下する(5)。例えば、中性有機物質および表面活性を持つ化学物質（洗剤、乳化剤および他の表面活性を含む）は皮膚の脂質を除去するのでイオン透過に対するバリアは更に低下する。このように、被験物質の TER 値が 5 kΩ 未満または 5 kΩ 付近で肉眼的な損傷がない場合には、対照および処理組織に対して色素の透過性試験を実施し、TER 値が皮膚の透過性増加によるものか、あるいは皮膚の腐食によるものかを決定する(3)(5)。後者、すなわち角質層が破壊された場合には、色素スルホローダミン B を皮膚表面に適用すると速やかに浸透して下部の組織を染色する。この特殊色素は広範囲にわたる化学物質に対して安定であり、以下に述べる抽出操作の影響も受けない。

### スルホローダミン B 色素の適用と除去

22. TER 評価の後、硫酸マグネシウムをチューブから廃棄し、皮膚に明らかな損傷がないかどうか慎重に調べる。大きな損傷が認められない場合には、スルホローダミン B 色素（酸性赤色素 52 号、C.I.45100、CAS 番号 3520-42-1）の 10% (w/v) 蒸留水希釈液 150 μL を各皮膚ディスクの表皮面に 2 時間、適用する。室温以下の水道水で約 10 秒間、これらの皮膚ディスクを洗浄し、過剰な色素または結合しなかった色素を除去する。各皮膚ディスクを慎重に PTFE チューブから取り外し、脱イオン水（8 mL）が入っているバイアル（20 mL のガラスシンチレーションバイアル）に移す。バイアルを 5 分間穏やかに攪拌し、更に非結合した色素を除去する。この洗浄手順を繰り返した後、皮膚ディスクを取り出し、30% (w/v) のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を含む蒸留水 5 mL が入っているバイアルに入れ、60°C で一晩培養した。
23. 培養後、各皮膚ディスクを取り出して廃棄し、残留溶液を 21°C で 8 分間遠心分離する（相対遠心力 ~175 xg）。上澄み液を 1 mL 取り、30% (w/v) の SDS を含む蒸留水 4 mL を加えて 5 倍 (v/v) に希釈する。溶液の光学濃度（OD）を、565nm で測定する。

### 色素含有量の算出

24. ディスクあたりのスルホローダミン B 色素含有量は、OD 値（565 nm におけるスルホローダミン B 色素のモル吸光係数を  $8.7 \times 10^4$ 、また分子量を 580 とする）から算出する(5)。適当な校正曲線を用い、各皮膚ディスクの色素含有量を決定する。更に、皮膚ディスクに対する平均色素含有量を算出する。

**結果の解釈**

25. 試験機関での方法において同時に実施された陽性および陰性対照値が許容範囲に収まる場合には、TER の平均結果は受理される。上述の方法および装置を用いて測定された許容抵抗値を以下の表に示す。

対照	物質	抵抗値範囲 (kΩ)
陽性	10 M 塩酸	0.5~1.0
陰性	蒸留水	10~25

26. 同時に測定された対照値が本法の許容範囲に収まる場合には、色素結合の平均結果は受理される。上述の方法および装置を用いて測定された対照物質の許容色素含有範囲を以下に示す。

対照	物質	色素含有量範囲 (μg/ディスク)
陽性	10 M 塩酸	40~100
陰性	蒸留水	15~35

27. 以下の場合に、被験物質は皮膚に非腐食性であると判断される。
- i) 被験物質の平均の TER 値が 5 kΩである場合。または、
  - ii) 平均の TER 値が 5 kΩ以下であり、かつ、
    - 皮膚ディスクには明らかな損傷が認められない。および、
    - ディスクの平均色素含有量が同時に得られた 10 M 塩酸陽性対照の平均色素含有量よりもはるかに低値である場合（許容範囲については段落 26 参照）。
28. 以下の場合、被験物質は皮膚に対して腐食性であると判断される。
- i) 平均の TER 値が 5 kΩ以下で、皮膚ディスクには明らかな損傷が認められない場合。または、
  - ii) 平均の TER 値が 5 kΩ以下であり、かつ、
    - 皮膚ディスクには明らかな損傷が認められないが、
    - ディスクの平均色素含有量が同時に得られた 10 M 塩酸陽性対照の平均色素含有量以上である場合（陽性対照値については段落 26 を参照）。

## データおよび報告

### データ

29. 該当する場合には、被験物質ならびに陽性／陰性対照の抵抗値 ( $k\Omega$ ) および平均色素含有量 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ ) を、(それぞれの試験データおよび平均  $\pm$  標準偏差で) 総括表にして報告する。その場合、皮膚ディスク／繰り返し実験のデータ、平均値およびそれぞれの値も含める。

### 試験報告書

30. 試験報告書は、以下の情報を含まなければならない。

#### 被験物質および対照物質

- 国際純正・応用化学連合 (IUPAC) または CAS などの化学名、および分かっている場合は CAS 番号
- 被験物質または製剤の純度および組成 (重量%)、物理的性質と純度
- 物理的性質、pH、安定性および水溶性など、試験の実施に関連する物理化学的性状
- 試験前の被験物質／対照物質に対する処理 (例えば、保温、粉碎など) (該当する場合)
- 分かっている場合、安定性

#### 供試動物

- 使用する系統および性
- ドナー動物として使用される時点の週齢
- 供給元、飼育条件、飼料など
- 皮膚試料調製の詳細

#### 試験条件

- 試験装置の校正曲線
- 色素結合試験成績の校正曲線
- TER 測定に用いた試験手順の詳細
- 該当する場合、色素結合評価に用いた試験手順の詳細
- 試験手順の修正についての説明
- 使用した評価基準の説明

#### 結果

- 各動物およびそれぞれの皮膚サンプルに関する TER データおよび色素結合データ (該当する場合) の表
- 観察された全ての効果の記載

#### 結果の考察

#### 結論

参考文献

- (1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris [http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)6](http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6)
- (2) OECD (2002). OECD Guideline for Testing of Chemicals. No. 404: Acute Dermal Irritation, Corrosion, revised version, as adopted on 24 April 2002, 7 pp plus Annex and Supplement.
- (3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219-255.
- (4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. in Vitro 12, 471-482.
- (5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. in Vitro 12, 483-524.
- (6) OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.
- (7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.
- (8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>.
- (9) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.
- (10) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm<sup>TM</sup>, EPISKIN<sup>TM</sup> (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In Vitro* test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epidocs/epis\\_brd.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epidocs/epis_brd.pdf)

- (11) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st -2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat
- (12) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An in vitro skin corrosivity test -modifications and validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 507-512.
- (13) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test in vitro; results of an interlaboratory trial. *Toxic. in Vitro* 6,191-194.
- (14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26: 709-720.
- (15) Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. *Fd. Chem. Toxicol.* 35, 845-852.
- (16) Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An In Vitro model for identifying skincorrosive chemicals. I. Initial Validation. *Toxic. in Vitro.* 2, 7-17.



表1 参照化学物質

1,2-ジアミノプロパン	CAS 番号 78-90-0	強腐食性
アクリル酸	CAS 番号 79-10-7	強腐食性
2-tert-ブチルフェノール	CAS 番号 88-18-6	腐食性
水酸化カリウム (10%)	CAS 番号 1310-58-3	腐食性
硫酸 (10%)	CAS 番号 7664-93-9	腐食性
オクタン酸 (カプリル酸)	CAS 番号 124-07-02	腐食性
4-アミノ-1,2,4-トリアゾール	CAS 番号 584-13-4	非腐食性
オイゲノール	CAS 番号 97-53-0	非腐食性
臭化フェネチル	CAS 番号 103-63-9	非腐食性
テトラクロロエチレン	CAS 番号 127-18-4	非腐食性
イソステアリン酸	CAS 番号 30399-84-9	非腐食性
4-(メチルチオ)-ベンズアルデヒド	CAS 番号 3446-89-7	非腐食性

表に記載されている化学物質のほとんどは、欧州代替法評価センター (ECVAM) の国際有効性評価試験(4)のために選択された化学物質の表から採用した。それらの選択にあたっては、以下の基準に基づいた。

- i) 同等数の腐食性および非腐食性物質
- ii) 多数の関連する化学物質クラスを網羅する市販されている物質
- iii) 腐食性作用に基づいて識別できるように、強腐食性から弱腐食性の物質を包含
- iv) 試験機関で取り扱う場合に、腐食性以外に**重大な危険性**をもたらすことのない化学物質の選択

図1 ラット皮膚 TER 測定のための装置

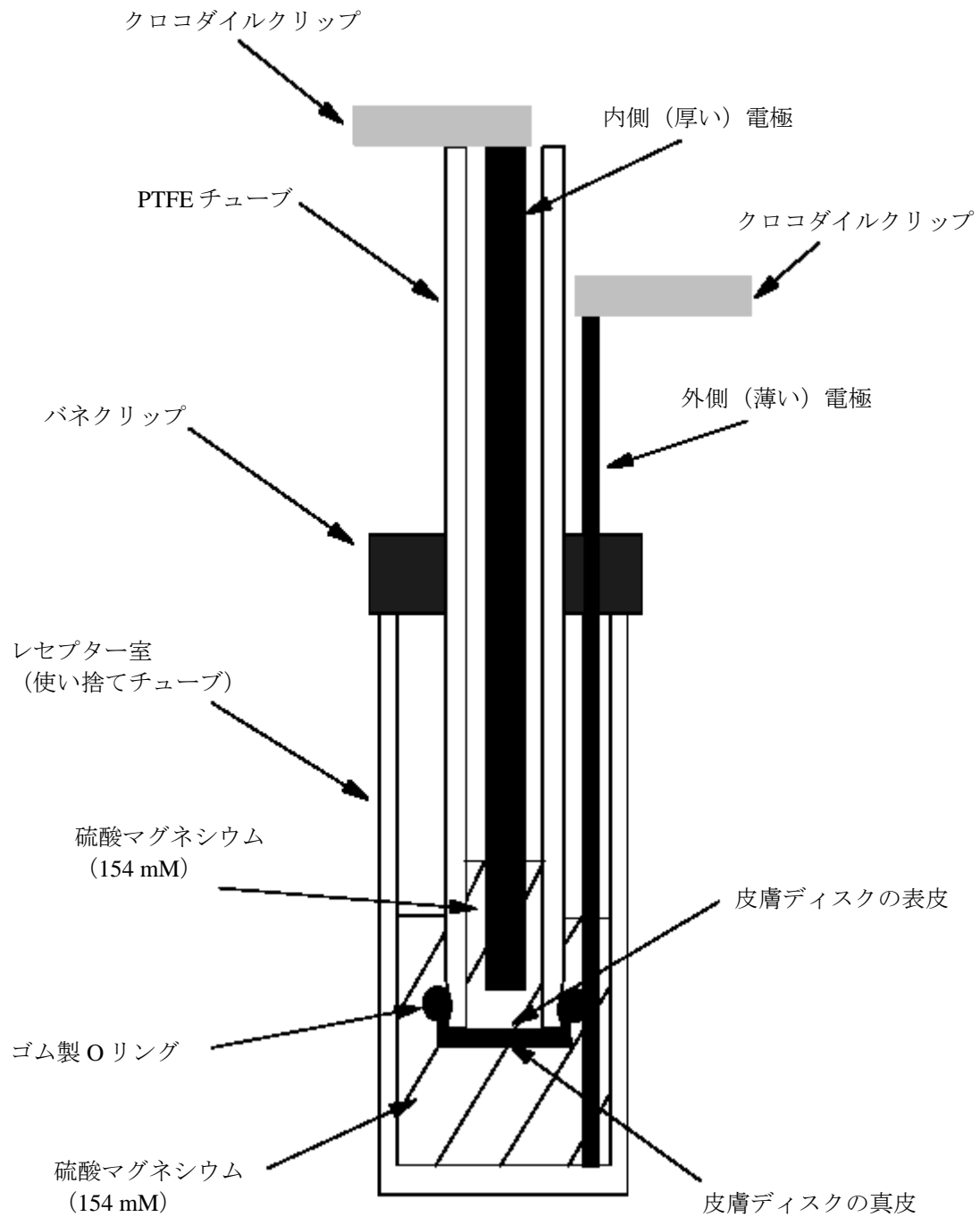
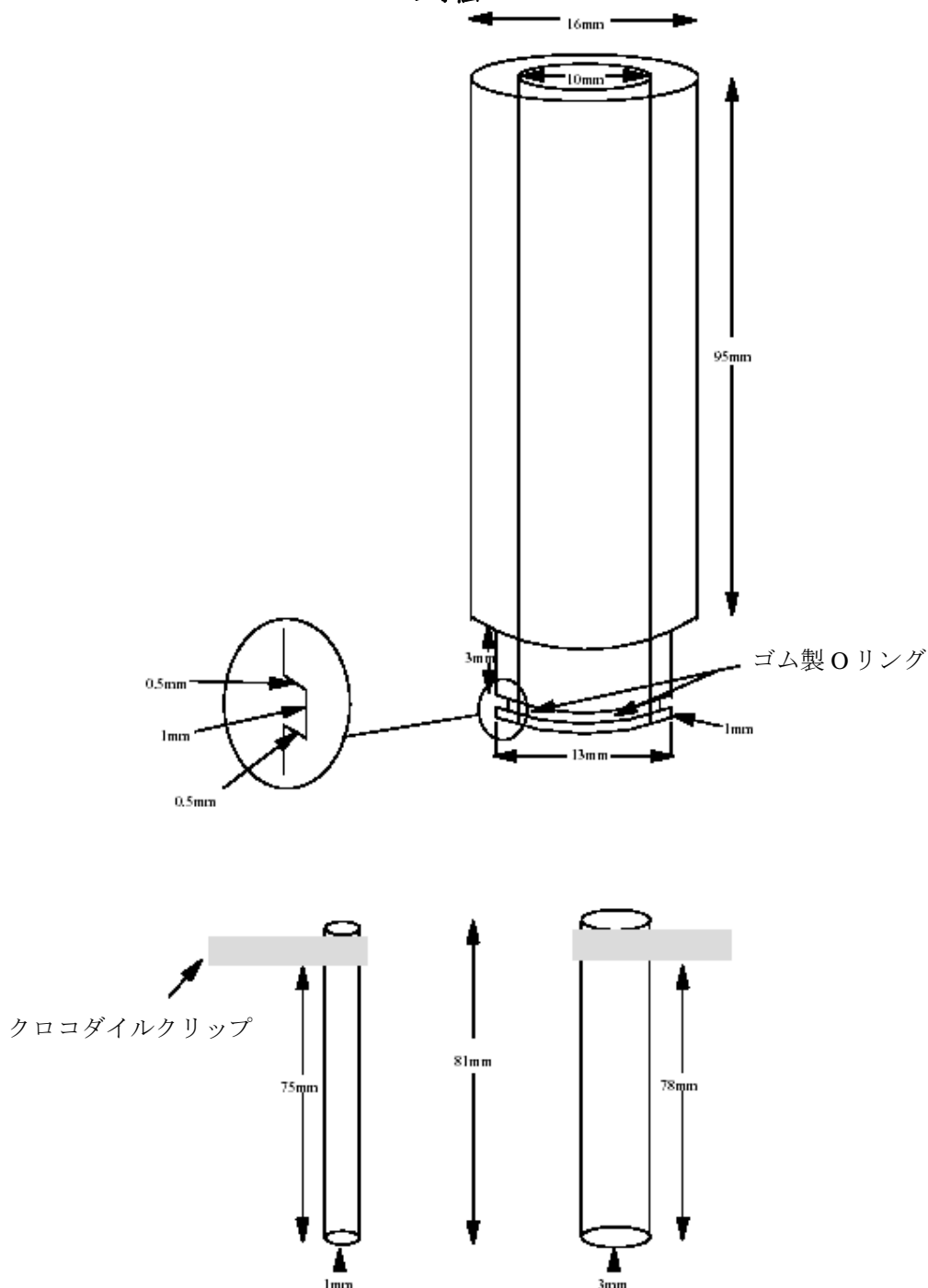


図2 使用するポリテトラフルオロエチレン (PTFE) チューブ、レセプターチューブおよび電極の寸法



#### 上記装置の機能を左右する因子

- PTFE チューブの内径
- PTFE チューブとレセプター室に対する電極の長さ。皮膚ディスクが電極に接触しないよう、 $\text{MgSO}_4$  と接触する電極の長さが標準に保たれるようにする。
- レセプター室の  $\text{MgSO}_4$  溶液量は、その液面が PTFE チューブの液面に対して図 1 に示すような深さとなるようにする。
- 皮膚ディスクは PTFE チューブにしっかり固定し、電気抵抗が正確に皮膚の性状を測定するようにする。

補遺定義

**In vivo 皮膚腐食性**とは、皮膚の不可逆的損傷が生じること。すなわち、被験物質を最長4時間適用後に生じる表皮から真皮にいたるまで肉眼で確認できる壊死である。腐食性反応として代表的に現れるのは、潰瘍、出血および血痂皮で、14日の観察期間終了までに、皮膚のブランピングによる変色、脱毛の全面的な領域および癬痕が現れる。疑わしい損傷を評価するためには、病理組織診断を考慮する。

**経皮電気抵抗 (TER)**とは、抵抗値をキロオームで表した皮膚の電気インピーダンスの尺度のこと。皮膚を透過するイオンをホイートストンブリッジ装置で記録することにより、そのバリア機能を評価する単純かつ強力な方法。