OECD/OCDE

1992/07/17

試験ガイドライン No.406

皮膚感作性試験

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (1992), Test No. 406: Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-406-1992.pdf.

©OECD (1992)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at http://www.oecd.org/termsandconditions/

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 Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

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

1992 年 7 月 17 日理事会にて採択

皮膚感作性

はじめに

1. OECD の化学物質の試験に関するガイドラインは、科学的進歩を踏まえて定期的に見直されており、その見直しでは特に動物福祉の改善に注意が払われている。1981 年に採択された最初のガイドライン 406 に基づくこの改訂版は、1991 年 5 月にパリで開かれた OECD の専門家会議により得られたものである。

2. 現在のところ、物質の皮膚感作性の評価に重要な役割を果たすような定量的構造活性相関や *in vitro* のモデルはまだ十分に開発されていない。このため、*in vivo* モデルに基づく評価が依然として必要である。

3. 感作性を予測する試験では、数十年にわたってモルモットが試験動物として選択されてきた。試験法としては、フロイント完全アジュバント（Freunds Complete Adjuvant, FCA）の投与によって感作性を増強させるアジュバント試験と、非アジュバント試験の 2 種類が開発されており、最初のガイドライン 406 では 4 つのアジュバント試験と 3 つの非アジュバント試験が容認されていた。一方、この改訂版ではアジュバントを用いる Magnusson and Kligman のモルモットマキシマイゼーション法（Guinea Pig Maximisation Test, GPMT）(1)(2)(3)(4)と、非アジュバント試験のビューラー法（Buehler Test）(5)(6)が他の方法に比べて望ましいとし、その手順を詳細に記載している。ただし、感作性について必要な情報を得るために他の方法を用いる可能性がある場合も認識されている。

4. マウスの免疫系はモルモットのものより詳細に研究されてきた。最近、マウスを用いた感作性評価モデルが開発されたが、これらには測定指標の客観性、期間の短さ、動物処置の少なさという利点が認められている。その中でもマウス耳介腫脹試験（Mouse Ear Swelling Test, MEST）および局所リンパ節試験（Local Lymph Node Assay, LLNA）は有望視されている。両試験ともいくつかの研究機関で検証が行なわれ (7)(8)(9)(10)(11)、中等度から強度の感作性物質を確実に検出できることが示されている。したがって、この LLNA または MEST は皮膚感作性評価の第一段階として用いることができる。いずれかの試験で陽性結果が得られた場合には、被験物質は感作性物質の可能性ありとみなされ、モルモットの試験を更に行なう必要はないかもしれない。しかし、LLNA または MEST の結果が陰性であった場合には、モルモットの試験（GPMT 法またはビューラー法が望ましい）を本ガイドラインに記載されている手順に従って実施する必要がある。

5. 用いた定義を補遺に示す。

モルモットを用いた感作性試験の概要

6. まず皮内注射または表皮への適用によって試験動物を被験物質に暴露する（感作暴露）。10～14 日間の無処置期間（感作期間、この間に免疫応答が起きる）後、惹起暴露を行ない、それに対する試験動物の皮膚反応の広がりと程度を対照動物でみられるものと比較する。

対照動物については感作時に模擬処置を行なったうえで惹起暴露を実施する。

モルモットを用いた感作性試験に共通する項目

動物の性

7. 雄または雌の健康な若齢成熟動物を用いる。雌を用いる場合には未経産で非妊娠のものとする。

飼育および給餌条件

8. 動物飼育室の温度は 20 ºC ± 3 ºC、相対湿度は 30～70%とする。人工照明を用いる場合には 12 時間明期、12 時間暗期とする。飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。なお、モルモットには適切な量のアスコルビン酸を与える必要がある。

動物の準備

9. 動物は試験前に 5 日間以上、飼育室環境に馴化させる。試験前に動物を無作為化し、試験群に割り付ける。用いる試験方法に応じ、刈毛、剃毛、また場合によっては脱毛剤により除毛する。その際、皮膚を損傷しないように注意する。試験開始前および試験終了時に動物の体重を測定する。

信頼性のチェック

10. 軽度～中等度の皮膚感作性を有することが知られている物質を用い、使用する実験手法の感度と信頼性を 6 カ月ごとに評価する。

11. 適切に実施された試験では、軽度／中等度感作性物質に対してアジュバント試験で 30%以上、非アジュバント試験で 15%以上の反応が予測されるはずである。推奨物質はヘキシルシンナミックアルデヒド（CAS 番号 101-86-0）、メルカプトベンゾチアゾール（CAS 番号 149-30-4）およびベンゾカイン（CAS 番号 94-09-7）であるが、適切な理由があれば上記の基準を満たす他の対照物質を使用できる場合もある。

被験物質の除去

12. 被験物質の除去が必要と考えられる場合には、水または適切な溶剤を用いて行なう。その際、みられている反応や表皮の正常な状態を変化させないようにする。

モルモットマキシマイゼーション法

動物数

13. 被験物質処置群には少なくとも 10 匹、対照群には少なくとも 5 匹を用いる。被験物質処置群に 20 匹未満、対照群に 10 匹未満の動物を使用している場合で、かつ被験物質が感作性物質と結論できない場合には、被験物質処置群では少なくとも総数が 20 匹、対照群では少なくとも総数が 10 匹となるまで追加試験を行なうことが強く推奨される。

用量

14. 各感作暴露に用いる被験物質の濃度は、全身的に十分に耐性のある濃度で、軽度から中等度の皮膚刺激性を示す最高濃度とする。惹起暴露に用いる濃度は、刺激を示さない最高濃度とする。適切な濃度は 2 匹または 3 匹の動物を用いた予備試験で決定できる。この目的には FCA 処置動物の使用を考慮する。

感作：皮内注射

第 0 日 － 被験物質処置群

15. 除毛した肩部に 3 対の皮内注射（0.1 mL）を行なう。その際、正中線のそれぞれの側に各対の一方ずつがくるようにする。

注射 1： FCA と水または生理食塩液の 1：1（v/v）の混合物
注射 2： 適切な溶媒で所定濃度に調製した被験物質
注射 3： FCA と水または生理食塩液の 1：1（v/v）の混合物で所定濃度に調製した被験物質

16. 注射 3 において、水溶性物質は水相に溶解してから FCA と混合する。脂溶性または不溶性物質は FCA に懸濁してから水相と混合する。被験物質の濃度は注射 2 で用いたものと同じとする。

17. 注射 1 と注射 2 は近接させて、かつ頭部に最も近い部分に行ない、注射 3 は試験区画の尾側に行なう。

第 0 日 － 対照群

18. 3 対の皮内注射（0.1 mL）を被験物質処置動物と同じ位置に行なう。

注射 1： FCA と水または生理食塩液の 1：1（v/v）の混合物
注射 2： 未希釈の溶媒
注射 3： FCA と水または生理食塩液の 1：1（v/v）の混合物で 50%（w/v）に調製した溶媒

感作：貼付適用

第 5～7 日 － 被験物質処置群および対照群

19. 被験物質が皮膚刺激性物質でない場合には、貼付適用による感作の約 24 時間前に試験区画を短く刈毛または剃毛した後、局所刺激を生じさせるため、10%ラウリル硫酸ナトリウム含有ワセリン 0.5 mL を塗布する。

第 6～8 日 － 被験物質処置群

20. 試験区画を再度除毛する。適切な溶媒で調製した被験物質をろ紙（2 × 4 cm）に十分含ませた後、試験区画に適用し、48 時間閉塞貼付する。溶媒の選択には理由が必要である。固体

は細かく粉砕し、適切な溶媒と混合する。液体の場合には適切であれば希釈せずに適用する。

第 6～8 日 － 対照群

21. 試験区画を再度除毛する。溶媒のみを同様の方法で試験区画に適用し、48 時間閉塞貼付する。

<u>惹起：貼付適用</u>

第 20～22 日 － 被験物質処置群および対照群

22. 被験物質処置動物および対照動物の腹側部を除毛する。被験物質を塗布したパッチまたはチャンバーを動物の一方の腹側部に適用し、必要であれば溶媒のみを塗布したパッチまたはチャンバーも他方の腹側部に適用する。パッチは 24 時間閉塞貼付する。

<u>観察 － 被験物質処置群および対照群</u>

23. － パッチ除去の約 21 時間後に惹起区画をきれいにし、必要があれば短く刈毛または剃毛、あるいは脱毛剤により除毛する。
－ 約 3 時間後（惹起適用開始から約 48 時間後）、皮膚反応を観察し、以下に示した等級に従って記録する。
－ 上記の観察の約 24 時間後に 2 回目の観察（72 時間後）を行ない、再度記録する。

被験物質処置動物と対照動物の観察では盲検が推奨される。

表：<u>惹起パッチテスト反応評価のための **Magnusson and Kligman** の等級付け</u>

0 = 肉眼的変化なし
1 = 散在性または斑状の紅斑
2 = 中等度びまん性紅斑
3 = 強い紅斑と腫脹

<u>再惹起</u>

24. 初回惹起で得られた結果を明白にする必要がある場合には、適切であれば新たに対照群を設けて、初回惹起の約 1 週間後に 2 回目の惹起（再惹起）を検討する。初回惹起に用いた対照群に対して再惹起を行なってもよい。

<u>一般状態観察</u>

25. 感作および惹起手順の結果生じたすべての皮膚反応および異常所見（全身性の反応を含む）を観察し、記録する。疑わしい反応を確認するために他の方法（病理組織学的検査、皮膚

のひだの厚さ測定など）を用いてもよい。

ビューラー法

動物数

26. 被験物質処置群には少なくとも 20 匹、対照群には少なくとも 10 匹を用いる。

用量

27. 各感作暴露に用いる被験物質の濃度は、軽度の刺激性を示す最高濃度とする。惹起暴露に用いる濃度は、刺激を示さない最高濃度とする。適切な濃度は 2 匹または 3 匹の動物を用いた予備試験で決定できる。

28. 水溶性の被験物質の場合は、溶媒として水または低濃度で非刺激性の界面活性剤の溶液を用いるとよい。その他の被験物質の場合は、感作には 80%エタノール水溶液を、惹起にはアセトンを用いることが望ましい。

感作：貼付適用

第 0 日 － 被験物質処置群

29. 一方の腹側部を除毛（短く刈毛）する。適切な溶媒で調製した被験物質をテストパッチシステムに十分含ませる（溶媒には選択理由が必要であるが、液体の場合は適切であれば希釈せずに適用することができる）。このテストパッチシステムを試験区画に適用し、閉塞パッチまたはチャンバーを用いて皮膚に 6 時間貼付する。

30. テストパッチシステムは閉塞性であること。綿のパッドが適当で、円形でも正方形でもよいが、大きさは約 4～6 cm^2 とする。閉塞を確実にするため、適切な保定器を用いて保定することが望ましい。被覆材を用いる場合には追加暴露が必要なことがある。

第 0 日 － 対照群

31. 一方の腹側部を除毛（短く刈毛）する。溶媒のみを被験物質処置群と同様の方法で適用する。テストパッチシステムは閉塞パッチまたはチャンバーを用いて皮膚に 6 時間貼付する。模擬処置対照群は不要であると示すことができるならば、無処置対照群を用いてもよい。

第 6～8 日および第 13～15 日 － 被験物質処置群および対照群

32. 第 6～8 日に、第 0 日と同様の処置を同じ腹側部の同じ試験区画（必要であれば除毛する）に行なう。また、第 13～15 日にも再度行なう。

惹起

第 27～29 日 － 被験物質処置群および対照群

33. 被験物質処置動物および対照動物の無処置腹側部を除毛（短く刈毛）する。適切な量の被験物質（濃度は刺激を示さない最高濃度）を塗布した閉塞パッチまたはチャンバーを被験物質処置動物および対照動物の無処置腹側部の後部に適用する。必要であれば溶媒のみを

塗布した閉塞パッチまたはチャンバーも被験物質処置動物および対照動物双方の無処置腹側部の前部に適用する。パッチまたはチャンバーは 6 時間貼付する。

観察 ― 被験物質処置群および対照群

34. ― パッチ除去の約 21 時間後に惹起区画を除毛する。
― 約 3 時間後（惹起パッチ適用から約 30 時間後）、皮膚反応を観察し、モルモットマキシマイゼーション法に示した等級に従って記録する（段落 23 参照）。
― 30 時間後の観察の約 24 時間後（惹起パッチ適用から約 54 時間後）に再度皮膚反応を観察し、記録する。

被験物質処置動物と対照動物の観察では盲検が推奨される。

再惹起

35. 初回惹起で得られた結果を明白にする必要がある場合には、適切であれば新たに対照群を設けて、初回惹起の約 1 週間後に 2 回目の惹起（再惹起）を検討する。初回惹起に用いた対照群に対して再惹起を行なってもよい。

一般状態観察

36. 感作および惹起手順の結果生じたすべての皮膚反応および異常所見（全身性の反応を含む）を観察し、記録する。疑わしい反応を確認するために他の方法（病理組織学的検査、皮膚のひだの厚さ測定など）を用いてもよい。

データおよび報告（GPMT 法およびビューラー法）

データ

37. データは総括表にまとめ、各動物について観察時ごとの皮膚反応を示す。

試験報告書

38. 試験報告書には、以下の情報を含まなければならない。

被験物質：
- 物理的性質、また必要に応じて物理化学的性状
- 特定データ

溶媒：
- 選択理由

供試動物：
- 使用したモルモットの系統

- 動物数、週齢、性
- 供給元、飼育条件、飼料など
- 試験開始時および終了時の個体ごとの体重

試験条件：
- パッチ部位の準備方法
- 用いたパッチの材料および使用法の詳細
- 予備試験の結果（本試験で用いる感作濃度および惹起濃度に関する結論を含む）
- 被験物質の調製、適用および除去の詳細
- 感作暴露と惹起暴露に用いた溶媒および被験物質の濃度、ならびに感作および惹起のために適用した物質の総量

信頼性チェック：
- 最新の信頼性チェック結果の概要（使用した物質、濃度および溶媒の情報を含む）

結果：
- 各動物の結果（等級を含む）
- 認められた影響の性質と程度に関する叙述的な記述
- 病理組織所見（あれば）

結果の考察

モルモット試験の前にスクリーニング試験を行なう場合には、試験内容の記載または出典（手順の詳細を含む）を被験物質および参照物質の結果とともに示すこと。

参考文献

(1) Magnusson B. and Kligman A.M. (1969). The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximisation test. J. Invest. Dermatol., 52, 268.

(2) Magnusson B. and Kligman A.M. (1970). Allergic Contact Dermatitis in the Guinea Pig. Charles G. Thomas; Springfield, Illinois.

(3) Magnusson B. (1980). Identification of contact sensitizers by animal assay. Cont. Derm., 6, 46.

(4) Magnusson B., Fregert S. and Wahlberg J. (1979). Determination of skin sensitization potential of chemicals. Predictive testing in guinea pigs. Arbete och Hälsa, 26(E).

(5) Buehler E.V. (1965). Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. Arch. Dermatol., 91, 171.

(6) Ritz H.L. and Buehler E.V. (1980). Procedure for conducting the guinea pig assay. Current Concepts in Dermatology, Drill V.A. and Lazar P. (eds), Academic Press, New York, N.Y., 25-40.

(7) Kimber I., Hilton J. and Weisenberger C. (1989). The murine local lymph mode assay for identification of contact allergens: a preliminary evaluation of in situ measurement of lymphocyte proliferation Contact Dermatitis, 21, 215-220.

(8) Kimber I., Hilton J. and Botham P.A. (1990). Identification of contact allergens using the murine local lymph node assay: comparisons with the Buehler Occluded Patch Test in guinea pigs. Journal of Applied Toxicology, 10(3), 173-180.

(9) Kimber I., Hilton J., Botham P.A., Basketter D.A., Scholes E.W., Miller K., Robbins M.C., Harrison P.T.C., Gray T.J.B. and Waite S.J. (1991). The murine local lymph node assay: results of an inter-laboratory trial. Toxicology Letters, 55, 203-213.

(10) Basketter D.A., Scholes E.W., Kimber I., Botham P.A., Hilton J., Miller K., Robbins M.C., Harrison P.T.C. and Waite S.J. (1991). Interlaboratory evaluation of the local lymph node assay with 25 chemicals and comparison with guinea pig test data. Toxicology Methods, 1, 30-43.

(11) Gad S.C., Dunn B.J., Dobbs D.W., Reilly C. and Walsh R.D. (1986). Development and validation of an alternative dermal sensitisation test: the mouse ear swelling test (MEST). Toxicol. Appl. Pharmacol., 84, 93-114.

補遺

定義

皮膚感作性（アレルギー性接触性皮膚炎）とは、物質に対する免疫学的機序を介した皮膚反応をいう。ヒトにおける反応では掻痒症、紅斑、浮腫、丘疹、小水疱、水疱またはこれらの組合せなどがみられる。一方、他の動物種では反応が異なり、紅斑と浮腫しかみられない場合もある。

感作暴露：過敏状態を生じさせることを意図して試験動物／被験者を物質に実験的に暴露すること。

感作期間：感作暴露後の少なくとも1週間で、その間に過敏状態が生じる。

惹起暴露：試験動物／被験者が過敏症による反応を示すか調べるため、先に処置した試験動物／被験者を感作期間後に被験物質に実験的に暴露すること。