OECD/OCDE

2021/06/14

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 (2021), Test No. 406: Skin Sensitisation Guinea Pig Maximisation Test and Buehler Test, 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-406-2021.pdf.

©OECD (2021)

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

OECD/OCDE 406

1992 年 7 月 17 日
訂正：
2021 年 6 月 14 日
（はじめにの更新）

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

皮膚感作性試験のモルモットマキシマイゼーション法およびビューラー法

はじめに

1. 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は、利用可能で最高の科学を反映するように定期的に点検される。本ガイドラインの点検で、動物福祉の問題に関する可能な改善について特別の注意が払われた。ガイドライン 406 の改訂版（1981 年に初版が採択され、1991 年、2021 年に改訂された）では、新たな皮膚感作性試験ガイドラインが考慮され、注目が集まっている。本試験ガイドラインは感作性試験に数十年間使用されてきたが、ユーザーは、他の *in chemico*、*in vitro* および *in vivo* 皮膚感作性試験ガイドラインが現在利用可能であり、モルモット試験を実施する前に新しい試験ガイドラインを始めとする利用可能な情報を考慮すべきであることを認識する必要がある。

2. ビューラー法もモルモットマキシマイゼーション法も動物を使用する。動物福祉上の理由から、他の皮膚感作性試験法が適用できない場合など、正当な理由がある場合に限り、このような試験を最後の手段として実施すべきである。

3. 最初のガイドライン 406 では 4 件のアジュバント試験と 3 件の非アジュバント試験が容認されていた。この試験ガイドラインでは、2 種類の試験について記載する。これは、皮膚感作の増強にアジュバント（フロイント完全アジュバント：FCA）を使用する Magnusson and Kligman のモルモットマキシマイゼーション試験（GPMT）(1)(2)(3)(4)と、非アジュバント試験のビューラー試験(5)(6)である。この 2 種類の手順を詳細に記載する。

4. ビューラー試験はモルモットマキシマイゼーション試験よりも感度が低いことが示されている(7)(8)。ビューラー試験もモルモットマキシマイゼーション試験も、皮膚感作性に関するデータが得られるが、用量レベルの選択に応じた定量的効力に関する情報はほとんどない。定量的効力に関する情報が必要な場合、感作性に関する必要な情報を入手するために、他の試験方法（局所リンパ節試験 [LLNA]や、動物を用いないしかるべき方法）を使用すべきである。

5. 用語の定義を、本ガイドラインの補遺に示す。

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化学物質に曝露する（感作曝露）。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、惹起曝露を行なう。惹起曝露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。対照動物には感作時に模擬処置を行なったうえで惹起曝露を実施する。

© OECD, (2021)

本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/に掲載されている諸条件に従って自由に使用することができる。

モルモットを用いた感作性試験に共通する項目

動物の性別

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 20ºC ± 3ºC、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。健康な状態を保つため、モルモットに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最長 6 カ月ごとに評価する。試験施設は、信頼性確認のための動物の使用を最小限に抑える戦略を検討すること。これには例えば、信頼性確認のために少ない例数を用いること（n=10）、独立した陰性対照群の使用を避けるため、信頼性確認試験の標準的試験への統合（溶媒が同じ場合）などがある。

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。感度および信頼性チェックのために選択した感作性物質の濃度は、感作性の閾値に近いものでなければならない。十分妥当な理由があり、上記の基準に適合する場合に限り、ほかの対照物質を使用することもできる(9)。

被験化学物質の除去

12. 被験化学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。被験化学物質処置群に 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、かつ被験化学物質が感作性物質と結論できない場合には、被験化学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。

©OECD 2021

用量

14. 各感作曝露に用いる被験化学物質の濃度は、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。惹起曝露に用いる濃度は、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化学物質
- 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化学物質

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。被験化学物質の濃度は注射 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. 被験化学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化学物質をろ紙（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、場合により希釈せずに適用する。

©OECD 2021

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。

惹起：貼付適用

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。被験化学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、さらに貼付表面が必要であれば、溶媒のみを塗布したパッチまたはチャンバーを他方の腹側部に適用してよい。パッチは 24 時間閉塞貼付する。

観察－被験物質処置群および対照群

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： 惹起パッチテスト反応評価のための Magnusson and Kligman の等級付け

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

再惹起

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。

一般状態観察

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。

©OECD 2021

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. 各感作曝露に用いる被験化学物質の濃度は、軽度の刺激性を示す最高濃度とする。惹起曝露に用いる濃度は、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の非刺激性の界面活性剤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化学物質をテストパッチシステムに十分含ませる（溶媒の選択には理由が必要である。液体の被験物質は場合により希釈せずに適用してよい）。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、適切なドレッシングで皮膚に 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。カット綿が望ましく、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曝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、適切なドレッシングで皮膚に 6 時間貼付する。模擬処置対照群（惹起処置のみを実施する群、段落 6 参照）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。適切な量の被験化学物質（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を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。適切なドレッシングでパッチまたはチャンバーを 6 時間貼付する。

©OECD 2021

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、以下の情報を含める。

被験化学物質：

- 単一成分物質
  - IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式やその他の識別子（バッチ／ロット番号および有効期限）などの化学的識別情報
  - 外観、水への溶解度、DMSO への溶解度、分子量、および入手可能なその他の関連する物理化学的特性
  - 曝露用溶媒における溶解度または安定な分散液に関する記述
  - 該当する場合で現実に実行可能であれば、純度、不純物の化学的同定など
  - 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）
  - 試験濃度

©OECD 2021

- 入手可能な範囲の保存条件および安定性

- 多成分物質、UVCB、混合物：

  - 成分の化学的同定（上記参照）、純度、含有量および関連のある物理化学的性質（上記参照）によるできる限りの特性評価

  - 外観、水への溶解度、DMSO への溶解度および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質

  - 既知組成の混合物／ポリマーの場合、分子量もしくは見かけの分子量、または試験実施に関連するそれ以外の情報

  - 曝露用溶媒における溶解度または安定な分散液に関する記述

  - 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）

  - 試験濃度

  - 入手可能な範囲の保存条件および安定性

溶媒：

- 特定データ（純度、該当する場合は濃度、使用容量）
- 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、性別
- 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
- 用量設定試験の結果を含めた用量選択（感作および惹起）の根拠
- 被験化学物質の調製、適用および除去の詳細
- 感作曝露と惹起曝露に用いた溶媒および被験化学物質の濃度、ならびに感作および惹起のために適用した被験化学物質の総量
- 飼料および水の質の詳細（飼料の種類/供給元、水の供給元を含む）
- 処置およびサンプリングのスケジュールの詳細
- 毒性評価方法
- 陽性または陰性の判定基準
- プロトコルからの逸脱、および逸脱が試験デザインと結果にどのような影響を及ぼしたかについての説明

信頼性チェック：

©OECD 2021

- 最新の信頼性チェック結果の概要（使用した化学物質、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）もしあれば、適用部位の個体別の皮膚刺激反応などの毒性の発現と徴候の経過
- モルモット個体別（動物毎のアプローチ）または平均値/中央値（プールした投与群アプローチ）の表
- 各動物に認められた影響の性質と程度に関する叙述的な記述
- 病理組織学的所見
- 該当する場合には統計解析

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、被験化学物質および信頼性および感度のチェックに用いた化学物質の結果とともに示すこと。

©OECD 2021

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 sensitizationpotential 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. CurrentConcepts in Dermatology, Drill V.A. and Lazar P. (eds), Academic Press, New York, N.Y.,25-40.

(7) Modjtahedi B.S, Fotenbach C.R., Marsano J.G, Gandhi A.M, Staab R., Maibach H.I. (2011). Guinea pig sensitization assays: An experimental comparison of three methodsCutaneous and Ocular Toxicology, Vol.30 (2). https://doi.org/10.3109/15569527.2010.544277

(8) Frankild S., Volund A., Wahlberg J.E., Andersen K.E. (2000). Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy. Acta Derm Venereol. 2000 Jul-Aug;80(4):256-62. DOI: 10.1080/000155500750012126

(9) Basketter DA, Selbie E, Scholes EW, Lees D, Kimber I, Botham PA. Results with OECD recommended positive control sensitizers in the maximization, Buehler and local lymph node assays. Food Chem Toxicol. 1993;31(1):63-67. doi:10.1016/0278-6915(93)90181-w

©OECD 2021

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、水疱やこのようなものの併発がみられる。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。

感作曝露：過敏状態を生じさせることを意図して試験動物/被験者を被験化学物質に実験的に曝露すること。

感作期間：感作曝露後の少なくとも 1 週間を指し、その間に過敏状態が生じる。

惹起曝露：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化学物質に実験的に曝露すること。

FCA (Freund's Complete Adjuvant)：フロイント完全アジュバント

GPMT (Guinea Pig Maximisation Test)：モルモットマキシマイゼーション法

©OECD 2021