OECD/OCDE

2004/04/13

試験ガイドライン No.427

In vitro 皮膚吸収試験法

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 (2004), Test No. 427: Skin Absorption: In Vivo Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264071063-en.

©OECD(2004)

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

427

2004 年 4 月 13 日採択

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 vivo 皮膚吸収試験法

はじめに

1. 多くの化学物質への暴露は主として皮膚を経て起こるが、実験動物を用いる毒性試験の大多数は経口投与経路で実施されている。このガイドラインで述べる *in vivo* 経皮吸収試験により経口吸収試験安全性評価を外挿して、経皮暴露後の安全性を評価するための必要な手がかりが得られる。

2. 物質が循環系に達するまでに、皮膚の多くの細胞層を通過する。ほとんどの物質にとって通過するための律速となるのは、死細胞からなる角質層である。皮膚での透過性は化学物質の親油性と表皮外層の厚さ、ならびに、その分子量や濃度などの因子に依存する。一般に、ラットとウサギの皮膚はヒトよりも透過性が高いのに対し、モルモット、ブタおよびサルの皮膚透過性はヒトにより近い。

最初に考慮すべき事項

3. 経皮吸収を測定する方法は、*in vivo* および *in vitro* の 2 つのカテゴリーに分けられる。*In vivo* 法により、さまざまな実験動物種の皮膚吸収に関して良好な情報がもたらされる。最近では、*in vitro* 法も開発されている。*In vitro* 実験系では、動物またはヒト皮膚の全層あるいは部分層を透過して流体槽へと輸送される系を利用する。*In vitro* 法は、別の OECD 試験ガイドライン(1)で述べられている。ある特定の状況に最適な方法を選択するにあたっては、皮膚吸収試験の実施に関する OECD ガイダンス文書(2)を参照されたい。その文書には、*in vivo* および *in vitro* 両法の適合性に関して、より詳細な説明が含まれている。

4. このガイドラインで述べられる *in vivo* 法によれば、被験物質が皮膚を通過して全身部位へ浸透した量を決定できる。この技術は、長年にわたって広く用いられている(3)(4)(5)(6)(7)。多くの場合 *in vitro* 経皮吸収試験が妥当な結果をもたらすと思われるが、*in vivo* 試験しか必要なデータを提供できない状況があり得る。

5. *In vivo* 法の利点は、それが生理的また代謝的に完全なシステムを使用すること、多くの毒性試験と共通の種を使用できること、そして他種を使用するにあたって改変が可能であることである。欠点は、生きている動物を使用しなければならないこと、信頼性の高い結果を得るためには放射性標識された物質が必要であること、吸収の初期相を決定することが困難であること、また好んで使われる種（ラット）とヒトの皮膚では透過性に違いがあることである。動物の皮膚は、通常、ヒトより透過性が高いので、ヒト経皮吸収を過大評価する可能性がある(6)(8)(9)。また、苛性/腐食性物質は、生きている動物で検査してはならない。

試験の概要

6. 主として使用される剤形の被験物質（望ましくは放射性標識された）を、一つ以上の適切な用量を選んで動物の毛刈りした皮膚に塗布する。被験物質を動物が飲み込むことがないように、適切なカバー（非閉塞性、準閉塞性、または閉塞性）の下に、被験物質と皮膚と

の接触が一定期間保持されるようにする。暴露時間終了時にカバーを取り外し、適切な洗浄液で皮膚を洗浄する。カバーと洗浄液は分析用に保存し、新しいカバーを取り付ける。暴露期間中もその前後も動物を個別の代謝ケージに収容し、全期間にわたって排泄物と呼気を捕集し分析する。揮発性の放射性代謝産物が全くないか、ほとんど形成されないという十分な情報がある場合には、呼気の捕集は省略できる。各試験には、通常、被験製剤に暴露する数群の動物群を設定する。1群は暴露期間終了時に屠殺し、他の群は、その後予定されている時間間隔(2)で屠殺する。最後のサンプリング時に残りの動物を屠殺し、分析のために採血する。また、製剤の適用部位も分析に供する。死体は排泄されなかった被験物質の分析に供する。サンプルは適切な手段で分析し、経皮吸収量を算出する(6)(8)(9)。

試験方法

動物種の選択

7. ラットは最も一般的に用いられる種であるが、皮膚吸収率がヒトにより近い無毛系統や他種の動物も使用可能である(3)(6)(7)(8)(9)。一般的に用いられる実験動物の系統には、雌雄いずれか一方の若齢成熟動物（通常は雄）を使用する。試験開始時において、使用動物の体重のばらつきは、平均体重の± 20%を超えないこととする。例えば、200g～250 g の雄ラットでは、この範囲の上半分に入るものが適切である。

動物数および性

8. 1群に4匹以上の動物（雌雄いずれか）を、各被験製剤および予定された屠殺時ごとに使用する。各群の動物は異なる時間間隔、例えば、暴露期間終了後（通常は、6または24時間）、またそれ以降（例えば、48、72 時間）で屠殺する。雌雄間で経皮毒性にかなりの違いがあることがデータで示されている場合には、より感受性の高い方を選択する。そのようなデータがない場合は、雌雄いずれを使用してもよい。

飼育および給餌条件

9. 動物飼育室の温度は22°C±3°C とする。相対湿度は目標値を50～60％とし、30％以上、70％を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で12時間明期、12時間暗期とする。飼料としては通常の実験動物用飼料を用いてさしつかえない。飲水は自由に摂取させる。試験期間および望ましくは順化の間も、動物は代謝ケージに個別に収容する。飼料と水がこぼれると試験結果の信頼性が危うくなるので、そのような事態が起きる確率を最小にする。

動物の準備

10. 動物は個体識別ができるようにマークし、試験開始前に5日間以上ケージで飼育して飼育室環境に馴化させる。

11. 馴化期間終了後（投与約24時間前）、各動物は肩および背中の毛を刈る。傷ついた皮膚の浸透性は無傷の皮膚とは異なるので、皮膚をすりむかないように注意する。毛を刈った後（被験物質を塗布する約24時間前、段落14を参照）、皮膚面をアセトンで優しく拭いて脱脂する。わずかな石鹸残渣も被験物質吸収を促進する可能性があるので、更に石鹸で洗浄するのは推奨できない。皮膚1 cm^2 あたりに吸収された被験化学物質の量について信頼できる数値を算出するためには、適用領域は十分な大きさでなければならず、10 cm^2 以上の大き

さが望ましい。この大きさは、体重 200～250 g のラットなら実現可能である。準備後、動物を代謝ケージに戻す。

被験物質

12. 被験物質とは、浸透特性を調べる物質そのものを意味する。被験物質は、放射性標識されることが望ましい。

被験物質の準備

13. 被験物質製剤（皮膚に塗布する被験化学物質の純品あるいは希釈物、またはこれを含む物質）は、ヒトまたは他の想定対象種が暴露されるものと同じ（か、その実用的な代用）物とする。「実用」に供される製剤と異なる場合は、正当な理由がなければならない。必要な場合には、被験物質は適切な溶媒に溶解するか、懸濁する。水以外の溶媒に関しては、その被験物質との想定される吸収特性および相互作用について知られていなければならない。

皮膚への適用

14. 皮膚表面の特定領域を適用部位と定め、既知量の被験製剤をその部位に均一に塗布する。この量は、通常、ヒトで起こり得る暴露量に相当するものでなければならず、一般に固体の場合 1～5 mg/cm^2 で、液体の場合は 10 μL/cm^2 とする。これとは異なる量が適用される場合には、被験製剤の想定される使用状況、試験目的または製剤の物理的性質に由来する正当な理由がなければならない。適用後、処理部位は身づくろい行動から保護されるものとする。装置の代表例を図 1 に示す。通常、適用部位は非閉塞性カバー（浸透性ナイロンガーゼカバー）で保護する。ただし、長期にわたって適用を続けるには適用部位を遮蔽する必要がある。準揮発性の被験物質の蒸発により回収率が容認できないほど低下する場合（段落 20 を参照）には、蒸発する被験物質をトラップできるように適用装置を炭フィルターでカバーする（図 1 参照）。どの装置も皮膚に損傷を与えたり、被験製剤を吸収したり、これと反応したりすることがないように配慮することが重要である。動物は、排泄物を収集するために個別の代謝ケージに戻す。

暴露期間とサンプリング

15. 暴露期間とは、被験製剤の適用開始から皮膚洗浄による除去完了までの時間間隔をいう。ヒトの場合に想定される暴露時間に基づき、適切な暴露期間（一般に 6 または 24 時間）を設定する。

暴露期間後、予定屠殺時まで動物を代謝ケージで飼育する。全試験期間を通じて、一定間隔で動物を観察し、毒性／異常反応の徴候について調べる。また暴露期間終了時には、被験物質を適用した皮膚を肉眼的に観察し、炎症徴候の有無を確認する。

16. 代謝ケージは、全試験期間を通じて尿と糞便を別々に集めることができるものとする。また、^{14}C-二酸化炭素や他の揮発性の ^{14}C-合成物が 5%を超えて発生する場合には、これらについても分析する必要があるので代謝ケージはこれらを捕集できるものとする。尿、糞便およびトラップ溶液（^{14}C-二酸化炭素と揮発性の ^{14}C-代謝産物を含む）は、各サンプリング時に各群の個体ごとに採取する。揮発性の放射性代謝産物がほとんどか、あるいは全く形成されないという十分な情報がある場合には、オープンケージを使ってもよい。

17. 排泄物は暴露期間中は最初の皮膚接触から 24 時間後まで、その後は試験終了時まで毎日収集する。排泄物については通常 3 回の収集間隔で十分であるが、被験製剤に想定された目的または既存の動的データが示唆するものに従い、より適切な収集時間または追加の収集時間を設定することになる可能性もある。

18. 暴露期間終了時に各動物から保護装置を取り外し、分析のために個別に収容する。全ての動物の処理された皮膚には適切な綿棒を使用して、3 回以上洗浄薬剤で洗浄する。その際、体の他の部分を汚染しないよう注意する。洗浄薬剤は水性石鹸溶液など、衛生処理でよく使用されるものを用いる。最終的には皮膚を乾燥させる。使用した綿棒と洗浄液は分析のために保管する。個別の代謝ケージに戻す前に、後のグループの動物の処理部位を新しいカバーで保護する。

終了時の手順

19. 各群において各動物は予定の時間に屠殺し、分析のために血液を採取する。保護装置またはカバーは分析のために除去する。各動物について適用部位の皮膚と、これと同等の毛刈りされた非適用部位の皮膚を別々に採取し、分析する。適用部位は、被験化学物質の性状に関するより多くの情報を得るために角質層とその下にある表皮とを分離し、分画する場合がある。暴露期間後の時間経過にともなうこの部位（角質層）への沈着量を決定することにより、被験化学物質の角質層における動態が推測できる。（最後の皮膚洗浄および屠殺の後に）各保護カバーを取り外して皮膚分画を容易にする。適用部位皮膚は周囲の皮膚を環状に付着させた形でラットから切除し、板にピンで止める。一片の粘着テープをこの皮膚表面に静かに押し付けてからテープを剥がすと角質層の一部が付着する。角質層の全てが取り除かれ、テープが皮膚面に付着しなくなるまで同様の操作を繰り返す。動物ごとに全てのテープ細片を一つの容器に入れ、そこに組織消化剤を加えて角質層を可溶化する。残りの死体から吸収量を分析する前に、想定される標的組織は全て個別に測定するため、分別採取する。各動物の死体は分析のために保存する。通常、死体全体の分析のみで十分である。（他の試験結果がその必要性を示唆している場合には、）標的器官をそれぞれ分別して、分析する。予定屠殺時に膀胱に残存している尿は、それ以前の蓄尿に加える。予定屠殺時に排泄物を採取した後、そのケージとトラップは適当な溶媒で洗浄する。汚染が予想される器材についても同様に分析する。

分析

20. 全ての試験において、十分な回収率（すなわち、放射能の平均値の 100 ± 10%）が達成されるものとする。回収率がこの範囲を外れる場合は、正当な理由付けが求められる。各サンプルへの投与総量については、十分に検証された方法で分析する。

21. 適用ごとに、反復実験値の変動についても統計的考察を加える。

データおよび報告

データ

22. 各サンプリング時において、被験化学物質および／またはその代謝産物を測定するにあたり、動物ごとに以下の項目について測定する。個別のデータに加えて、サンプリング時の群化データも平均値として報告する。

- 保護装置に付着した量
- 皮膚から除去できる量
- 洗浄により皮膚から除去できない量
- 血液サンプル中の量
- 排泄物中および呼気中（該当する場合）の量
- 死体および個別分析のために取り出された各器官中の残存量

23. 排泄物、呼気、血液および死体中の被験化学物質および／または代謝産物の量を知ることにより、各時点で吸収された被験化学物質の総量を決定できる。また、暴露期間中被験物質に暴露された皮膚の 1 cm^2 あたりの被験化学物質吸収量も算出できる。

試験報告書

24. 試験報告書には用いられた試験系の正当化を含め、プロトコールに明記されている諸要求を網羅し、かつ以下の情報を含まなければならない。

被験物質
- 特定データ（例えば、CAS 番号（付けられている場合）、供給元、純度（放射化学的純度）、既知の不純物、ロット番号）
- 物理的性質、物理化学的性状（例えば pH、揮発性、溶解性、安定性、分子量および log P_{ow}）

被験製剤
- 剤形およびこれを使用する妥当性
- 被験製剤の詳細、適用量、到達濃度、溶媒、安定性および均一性

供試動物
- 使用した動物種、系統
- 動物数、週齢、性
- 供給元、飼育条件、飼料、その他
- 試験開始時の動物の個体ごとの体重

試験条件
- 被験製剤適用の詳細（適用部位、測定方法、閉塞／非閉塞、体積、抽出、検出）
- 飼料および水の質の詳細

結果
- 全ての毒性の徴候
- 吸収データの表（率、量または百分率として表示）
- 実験の総回収率
- 被験化合物の経皮吸収に関して利用可能なデータとの比較を含めた試験結果の解釈

結果の考察

結論

参考文献

(1) OECD (2004). Test Guideline 428: Skin absorption: *in vitro* Method. OECD, Paris.

(2) OECD (2004). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

(4) Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements.*J.Am.Coll.Toxicol.* 8 (5), 829-835.

(5) Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

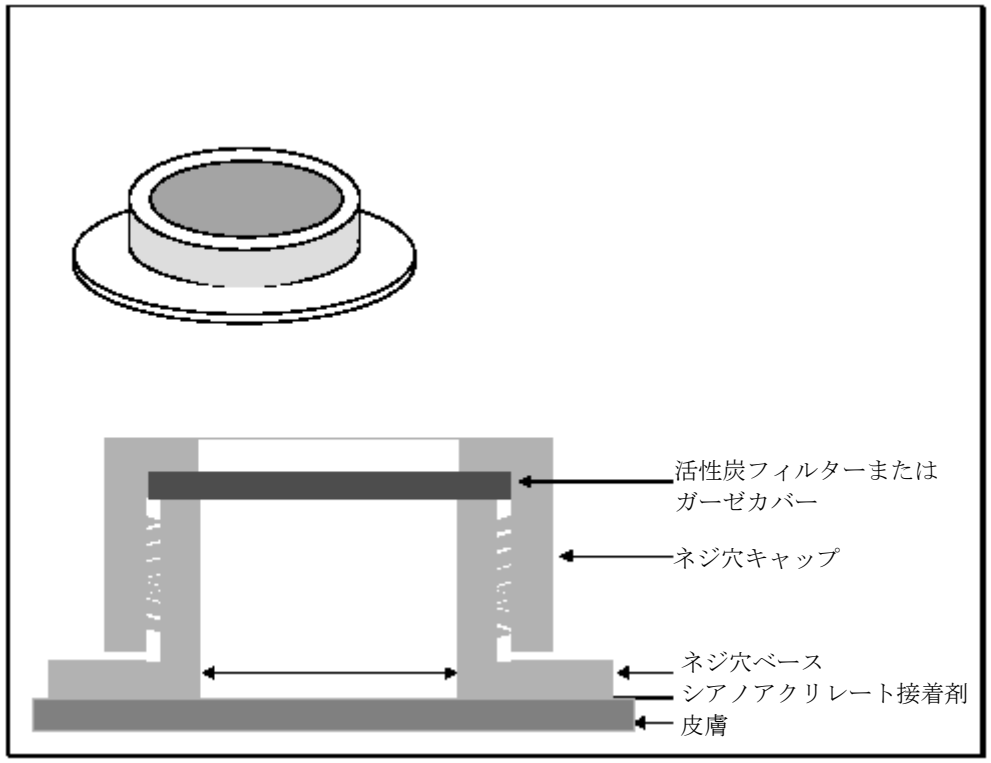
(6) EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

(7) EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances,

(8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) In vivo percutaneous absorption of fragrance ingredients in rhesus monkeys and humans. Fd. Chem. Toxic. 28, 369-373.

(9) Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. J. Invest. Dermatol. 54, 399-404.

図 1：*In vivo* 経皮吸収試験中に皮膚適用部位を固定し保護する目的で使用する代表的な装置の一例



補遺

定義

非吸収量：暴露後に皮膚から洗い出された量、非閉塞性カバーに付着していた量および暴露期間中に皮膚表面から蒸発が明らかな量。

吸収量：（*in vivo*）尿、ケージの洗浄液、糞、呼気（測定された場合）、血液、組織（採取された場合）、および適用部位の皮膚を切除した後の死体に含まれる量。

吸収可能量：洗浄後、皮膚表面または皮膚中に存在する量。