OECD/OCDE

2004/04/13

試験ガイドライン No.428

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. 428: Skin Absorption: In Vitro Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264071087-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

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 vitro 皮膚吸収試験法

はじめに

1. この試験ガイドラインは、切除された皮膚に塗布した被験物質の吸収に関する情報を提供するよう計画された。これは *in vivo* 法(1)の OECD 試験ガイドラインと併せて実施しても良いし、別々に実施しても良い。この試験ガイドラインに基づいて試験を計画するにあたり、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。OECD ガイダンス文書は、*in vitro* 法によって得られる試験結果の信頼性が特殊な状況においても保証されるように、適切な方法を選択する助けとなるよう作成された。

最初に考慮すべき事項

2. 皮膚からの吸収と真皮への移動を測定する方法は、*in vivo* および *in vitro* の 2 つのカテゴリーに分けられる。*In vitro* 皮膚吸収試験法は十分に確立されており、これにより一連の動物種における薬物動態学的な情報が得られる。*In vivo* 法は、他の OECD ガイドライン(1)で個別に述べられている。*In vitro* 法もまた、長年、皮膚吸収を測定するのに用いられてきた。この試験ガイドラインが取り扱う *in vitro* 法の正式なバリデーション試験は行われていないが、OECD の専門家は 1999 年に、このガイドラインの妥当性を支持するのに十分なデータの蓄積があるという意見で一致している(3)。妥当性を実証する詳細な事実が、*in vivo* 法と *in vitro* 法との多数の比較例も含めてガイダンス文書に述べられている(2)。この主題について概説し、*in vitro* 法の背景を詳細に記述した研究書が多数刊行されている(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)。*In vitro* 法では、化学物質が皮膚への拡散、更に皮膚を通過して液体槽への拡散を測定するが、死んだ皮膚を用いて拡散のみを測定することも、また新鮮で代謝活性を持つ皮膚を用いて拡散と皮膚代謝を同時に測定することもできる。それらの方法は化学物質を皮膚表面から皮膚中へ、また皮膚を通過して送達することに関して異なる剤形間で比較するためのふるいとして活用されることになっており、ヒトの経皮吸収を評価するための有用なモデルともなっている。

3. *In vitro* 法が、状況や化学物質の種類を問わず適用できるというわけではない。皮膚への浸透について最初に定性的な評価をするために、*in vitro* 試験法を使用することができる。場合によっては、その結果を *in vivo* 法で追跡する必要があるかもしれない。ガイダンス文書(2)は、*in vitro* 法が状況に適切であるかどうかを更に念入りに調べるために参照すべきである。*In vitro* 法の採否を決定するための詳細なサポート情報が、OECD 専門委員会報告(3)に記載されている。

4. このガイドラインは切除した皮膚を使用し、被験物質の真皮への吸収と移動を測定するための一般原理を示す。ヒトをはじめ、多くの哺乳類由来の皮膚を使用できる。主要な拡散バリアが死細胞からなる角質層なので皮膚の透過性は摘出後も維持されるが、皮膚を通じての化学物質の能動輸送は確認されていない。皮膚は経皮吸収の間に若干の化学物質を代謝する能力を有することが示されているが(6)、血流に入る物質の性状に影響を及ぼす可能性はあるものの、この過程が実際に吸収量の律速となることはない。

試験の概要

5. 被験物質（放射性標識されている場合がある）を、拡散セルの 2 つのチャンバーに分けられた皮膚試料の表面に適用する。化学物質は指定された条件下で、指定された時間、皮膚上に置かれ、その後適切な洗浄処理により除去される。実験期間を通じて定められた時点でレセプター液をサンプリングし、被験化学物質および／または代謝産物について分析する。

6. 代謝活性化系を使用するときには、適切な方法によって被験化学物質の代謝産物を分析することができる。実験終了時に該当する場合には、被験化学物質およびその代謝産物の分布を定量する。

7. このガイドライン、および付随するガイダンス文書(2)に記されている適切な条件を用いると、所定の時間内における被験物質の吸収は、レセプター液と処理した皮膚を分析することで測定できる。レセプター液中の量のみで被験物質の吸収量を決定できるという証拠が得られない限り、皮膚中に残存する被験物質は吸収されたものと考える。（洗浄によって皮膚から除去された物質および皮膚層に残存する物質を）構成する他の部分を分析することにより、被験物質の全体的分布および回収率など更なるデータ評価が可能になる。

8. 試験実施機関における試験システムの成績と信頼性を示すためには、当該試験方法を用いて測定した重要な参照化学物質に関する測定結果があり、かつ、その結果が公表されている文献と一致しなければならない。被験物質と適切な参照物質（望ましくは親油性が被験物質に近い）を同時に実施するか、または多くの親油性の異なる参照物質（カフェイン、安息香酸およびテストステロン）に関する背景の蓄積データを提供することにより、この要求は満たされる。

試験方法

拡散セル

9. 拡散セルはドナー室とレセプター室とで構成され、両者の間に皮膚を置く（代表的な設計例を図 1 に示す）。セルは皮膚との境界部で良好なシールを形成し、サンプリングが容易にでき、皮膚の下側に接するレセプター液の混合状態がよく、セルおよびその内容物の温度調節に優れているものとする。静置型拡散セルおよびフロースルー型拡散セルのいずれも許容される。通常、ドナー室は投与が有限の被験製剤に暴露する間、閉塞しない状態に保たれる。ただし、投与の適用が無限および有限であっても特定の計画がある場合には、ドナー室は閉鎖してもよい。

レセプター液

10. レセプター液としては生理的なものが望ましいが、正当な理由があればそれ以外のものを使用してもよい。いずれにしてもレセプター液の正確な構成を提示する。被験化学物質がレセプター液に対して十分な溶解性があり、溶解性が吸収の障害とならないことを示す必要がある。また、レセプター液は皮膚試料の健全性に影響を及ぼしてはならない。フロースルー型では流速が被験物質のレセプター液への拡散を妨げてはならないし、静置型では溶液は連続的に攪拌され、定期的にサンプリングされるものとする。代謝作用を試験する場合には、レセプター液は実験期間を通じて皮膚の生存能力を支持するものとする。

皮膚試料

11. ヒトまたは動物由来の皮膚が使用できる。ヒト皮膚の使用については、民族的および国際的な倫理的配慮および状況判断が必要になる。生きている皮膚を使うことが望ましいが、組織としての健全性が維持されていれば、死んだ皮膚でも使用可能である。（酵素的に、熱的に、もしくは化学的に分離した）表皮膜またはデルマトームにより作製した分層皮膚（一般に、厚さ 200～400μm）のいずれでもよい。全層皮膚も使用できるが、皮膚層の被験化学物質の測定を特に要求されない限り、過剰な厚さ（1mm 超）は回避する。種、解剖学的部位および調製技術の選択については、正当な理由を示さなければならない。被験製剤につき最低 4 例の妥当なデータが必要である。

皮膚試料の健全性

12. 皮膚試料は適切に調製する。取り扱いが不適切であると角質層が障害を受ける可能性があるので、調製した皮膚の健全性を確認する。皮膚代謝を調べる場合には、切除したばかりの皮膚を可能な限り速やかに代謝活性を維持することが確認されている条件下で使用する。通常、新しく切除された皮膚は 24 時間以内に使用するのが原則であるが、代謝に係わる酵素系の種類により、保存可能な時間や保存温度は異なる可能性がある(13)。皮膚試料が使用前に貯蔵されていた場合には、バリア機能が維持されている証拠を示す必要がある。

被験物質

13. 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。

被験製剤

14. 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。

被験物質濃度と製剤

15. 通常、被験物質の代表的な製剤については、ヒトで現実にあり得ると想定される暴露濃度範囲を含む複数の濃度が用いられる。同様に、一連の代表的製剤についての試験も考慮されるものとする。

皮膚への適用

16. 正常状態でヒトが化学物質に暴露される場合、一般に限られた用量に接触する。したがって、ヒトの暴露と等価になるような用量は、固体の場合は通常、1～5 mg/cm^2、液体の場合は最高 10 $\mu L/cm^2$ までの範囲で適用する。適用量は、被験製剤の予想される使用状況、試験目的または物理的特性によって正当化されるものとする。例えば、単位面積あたり大容量を適用した場合には、皮膚表面への適用が実質的には無限である可能性がある。

温度

17. 化学物質の受動拡散（および皮膚吸収）は、温度の影響を受ける。拡散チャンバーおよび皮膚は、正常な皮膚温 32 ± 1°C に近い一定の温度に維持される。異なるセルデザインには、

レセプター／皮膚が生理的に正常な状態に保たれるよう、それぞれに相応したウォーターバスまたは発熱ブロック温度が必要になる。湿度は30～70%の間に保たれるのが望ましい。

暴露期間とサンプリング

18. 被験製剤の皮膚暴露は実験の全期間である場合も、また（ヒトでの特殊なタイプの暴露を正確に再現するよう）、それより短時間の場合もあり得る。過剰な被験製剤は適切な洗浄液により皮膚から除去し、その溶液は収集して分析する。被験製剤を除去する手順は使用状況を想定したものであり、かつ、正当な根拠がなければならない。吸収プロファイルの特性を十分に把握するため、通常、24 時間のサンプリング期間が必要となる。24 時間を越えると皮膚の健全性が劣化し始める可能性があるので、サンプリング時間は通常、24 時間を上回ってはならない。急速に皮膚を透過する被験物質には不要かもしれないが、ゆっくりと透過する被験物質には、より長い時間が必要になる。レセプター液のサンプリング頻度は、被験物質の吸収プロファイルをグラフ化できる程度とする。

終了時の手順

19. 試験システムの全ての構成要素を分析し、回収率を求める。構成要素には、ドナー室、皮膚表面洗浄液、皮膚試料およびレセプター液／室が含まれる。場合によっては、皮膚は暴露領域およびセルフランジの下の部分、ならびに角質層、表皮および真皮に分画し、個別に分析する場合もある。

分析

20. 全ての試験において、十分な回収率（目標としては平均値が放射能活性の 100 ± 10%、少しでもこの基準から外れる場合には、正当な理由がなければならない）が得られるものとする。レセプター液、皮膚試料、皮膚表面洗浄液および装置洗浄液中の被験物質量は、適切な手法を用いて分析する。

データおよび報告

データ

21. レセプター液、被験化学物質の試験システム内分布および吸収プロファイルの時間変化に関する解析結果を提示する。投与が有限の暴露条件を用いた場合には、洗浄により皮膚から除去された量、皮膚に付着している量、（および皮膚の異なる層ごとに分析された場合、各層に含まれる量）およびレセプター液中の量（割合、総量または適用量に対する百分率）を計算する。場合によっては、レセプター液データ単独で皮膚吸収を表現することもある。ただし、被験物質が試験終了後皮膚に残留する場合、その分を吸収された総量に加える必要があるだろう（ガイダンス文書段落 66 を参照）。投与が無限の暴露条件を用いる場合、データから透過定数（Kp）を算出できる場合がある。その場合には、吸収された量の百分率は重要ではない。

試験報告書

22. 試験報告書は、使用する試験システムの妥当性をはじめとして、プロトコールに明記される諸要求を含み、かつ以下の項目で構成されなければならない。

被験物質
- 物理的性質、物理化学的性状（少なくとも分子量と log P_{ow}）、純度（放射化学的純度）
- 特定データ（例えば、バッチ番号）
- レセプター液への溶解性

被験製剤
- 使用製剤および妥当性
- 均一性

試験条件
- 皮膚の由来と部位、調製法、使用前の保管条件、（クリーニング、抗生物質処理などの）前処置、皮膚の健全性測定、代謝活性、使用の妥当性
- セルデザイン、レセプター液組成、レセプター液流量またはサンプリング時間、手順
- 被験製剤の適用と適用量の定量化の詳細
- 暴露期間
- 被験製剤の皮膚からの除去の詳細（皮膚の洗浄）
- 皮膚の分析および皮膚における分布を明らかにするために用いた分画手法の詳細
- セルおよび装置の洗浄手順
- 測定方法、抽出法、検出限界および分析方法の有効性評価

結果
- 実験の総回収率（適用量=皮膚洗浄液+皮膚+レセプター液+セル洗浄液）
- 各コンパートメント中の各セルの回収率の表
- 吸収プロファイル
- 吸収データ総括表（速度、量または百分率として表示）。

結果の考察

結論

参考文献

(1) OECD (2004). Test Guideline 427: Skin absorption: *in vivo* Method. OECD, Paris.

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

(3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

(4) Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

(5) Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *in vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237-241.

(6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.

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

(8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M,Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191-205.

(9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

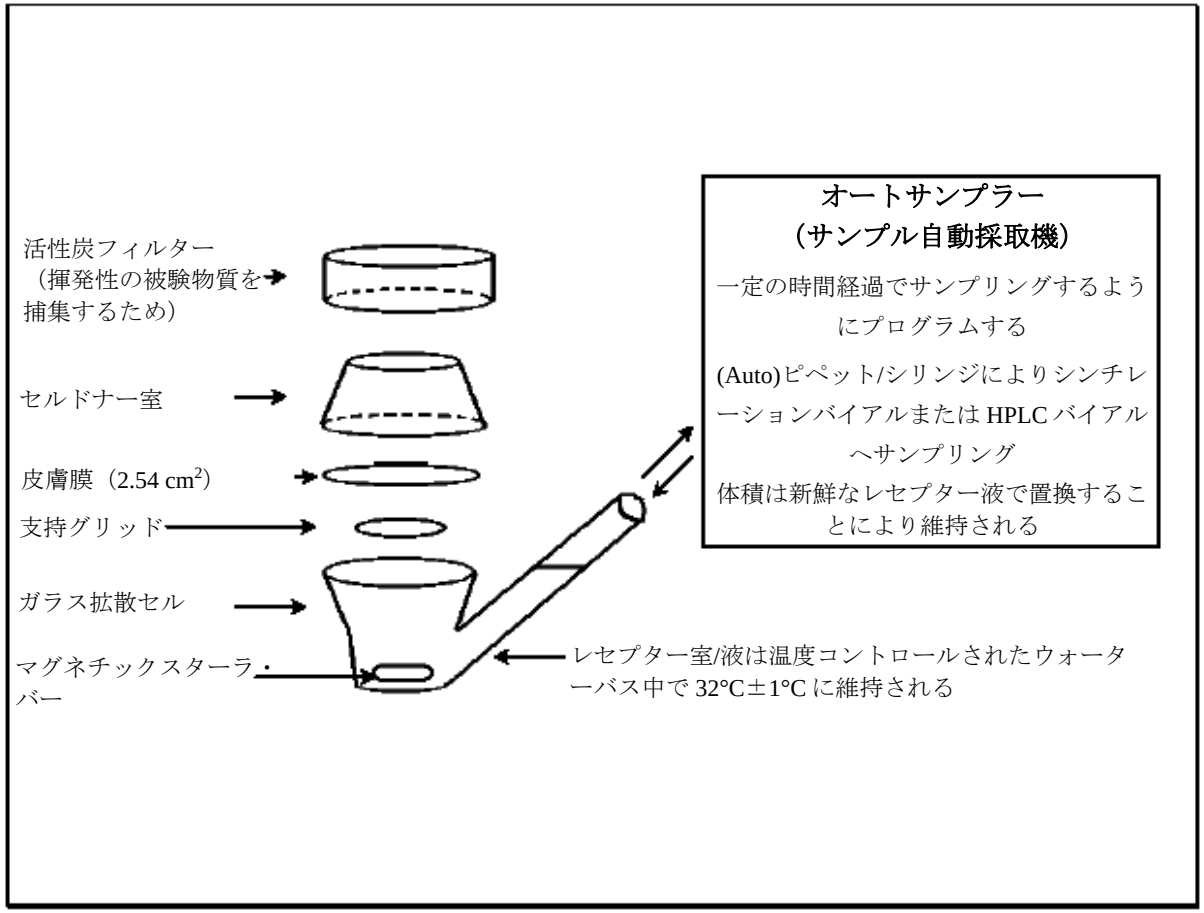
(10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et al*. (1996). Methods for assessing percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

(11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

(12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

(13) Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356-365.

図 1：*in vitro* 経皮吸収試験用静置型拡散セルの代表的なデザイン例



補遺

定義

非吸収量：暴露後に皮膚から洗い流された量、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から蒸発が明らかな量。

吸収量（*In vitro*）：特定の時間内にレセプター液または全身循環に到達した被験物質の質量。

吸収可能量（*In vitro*）：洗浄後、皮膚表面または皮膚中に存在する量。