OECD/OCDE

2004/04/13

試験ガイドライン No.431

In vitro 皮膚腐食性：ヒト皮膚モデル試験

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 (2004), Test No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model 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-431-2004.pdf.

©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

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：ヒト皮膚モデル試験

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、被験材料の適用後、皮膚に生じる不可逆的組織損傷をいう(1)。この試験ガイドラインでは、皮膚腐食性を評価するにあたって、生きている動物または動物組織を必要としない。

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(9)、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(10)(11)(12)(13)。すなわち、ヒト皮膚モデル試験（本ガイドライン）と経皮電気抵抗試験である（試験ガイドライン 430 を参照）。

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. 有効性評価試験の結果、ヒト皮膚モデル(3)(4)(5)(9)を用いた試験では、既知の皮膚腐食性と非腐食性を確実に区別できると報告された。その試験プロトコールにより、損傷が強い皮膚腐食性とそれに比べれば弱い皮膚腐食性を区別する指標も得られるであろう。

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)(13)(14)。しかし、この試験では通常、皮膚刺激に関する十分な情報は得られないし、化学品の分類と表示に関する世界調和システム（GHS）において許可されている腐食性物質の細区分への分類もできない(1)。

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. ヒト皮膚の三次元モデルは少なくとも再構成された表皮と機能する角質層から構成されているが、通常、この表面に被験物質を適用する。腐食性物質は、特定の暴露期間内に（細胞生存率を）明確な閾値レベルよりも低下させる能力により確認される（例えば、MTT 還元法（MTT 法）(15)。ヒト皮膚モデル試験の原理は、腐食性物質が拡散または浸食することによって角質層を透過することが可能で、下層の細胞層に対して細胞毒性であるという仮説に基づく。

手順

ヒト皮膚モデル

9. ヒト皮膚モデルは作製可能であり、市販のものを入手することも可能である(16)(17)(18)(19)（例えば EpiDerm™ と EPISKIN™ モデル）。更には、試験実施機関で開発または構築することも可能である(20)(21)。ヒト皮膚の使用については、国家的、国際的倫理観および状況を考慮する必要があるという認識である。新しいモデルを用いる場合には、（少なくとも段落 11 に記載される程度）検証されるものとする。本試験に使用するヒト皮膚モデルは、以下に従うものでなければならない。

モデルの一般的条件

10. ヒトケラチノサイトを用いて上皮を構築すること。機能する角質層の下に、生きた上皮細胞からなる複数の細胞層が存在すること。皮膚モデルには、更に、間質層が含まれていてもよい。角質層は細胞毒性マーカーに対して急速な浸透を拒むのに十分なバリアとして機能するように、これに必要な脂質特性を備えた多重層であること。モデルは物質が角質層の周囲を通過して、生きた細胞へと到達するのを防ぐのに十分な浸透防止機能を備えていること。角質層の周囲を被験物質が通過すると、皮膚暴露モデルとしては不完全なものとなる。皮膚モデルは、細菌（マイコプラズマを含む）またはカビに汚染されていないものであること。

モデルの機能条件

11. 生存率は、通常、MTT または代謝されて生体染色色素に変換される他の物質を用いて定量化する。この場合、陰性対照組織から抽出（可溶化）された色素の光学濃度（OD）は、抽出溶媒単独の OD より 20 倍以上大きくなければならない(概要については文献(22)を参照)。陰性対照組織は試験の暴露期間中の培養下で安定状態を維持し、その生存率測定は常に同程度とする。角質層は特定の細胞毒性マーカーである化学物質（例えば、1% Triton X-100）の急速な浸透に抵抗できるよう、十分に強固でなければならない。この性質は、細胞の生存率を 50%低下させるのに必要な暴露時間（ET_{50}）によって見積もることができる。ちなみに、EpiDerm™ および EPISKIN™ モデルにおいては、この値は 2 時間超である。組織は時間を越えて再現可能であること、また試験機関間でも再現可能であることが望ましい。更に、選択した試験プロトコールにしたがって組織を使用した場合、結果として参照化学物質（表 2 参照）の腐食惹起能を予測できるものとする。

被験物質および対照物質の適用

12. 対照を含めた各投与（暴露時間）で 2 つの組織を使用する。液体の物質の場合には、十分な被験物質が一様に皮膚面を覆うように適用する（最低 25 μL/cm^2 を使用）。固形の物質の場合には、十分な被験物質を適用して皮膚に均一に覆う。更に、脱イオン水または蒸留水で湿らせて皮膚との接触を良好に保持するようにする。必要に応じて、固形物は適用前に砕いて粉末にする。被験物質は、それにふさわしい方法で適用する（参考文献 5 を参照）。暴露期間終了時に、被験物質を適当な緩衝液または 0.9% NaCl で皮膚面から慎重に洗浄する。

13. 実験モデルによる試験が適切に行われていることを確保するため、陽性および陰性対照を設ける。陽性対照物質として推奨されるのは、氷酢酸または 8N 水酸化カリウム（8N KOH）である。陰性対照には、0.9% NaCl または水が推奨される。

細胞生存率の測定

14. 細胞生存率の測定には、定量的かつ検証済みの方法のみ使用することができる。更に、生存率の測定法は三次元の組織構造に使用可能なものとする。また、非特異的色素結合が生存率測定を妨害してはならない。したがって、蛋白結合性色素およびニュートラルレッドのように代謝されない色素は不適切である。最も頻繁に使用される測定法は、MTT[3-（4,5-ジメチルチアゾール-2-イル）-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド、チアゾリルブルー、CAS 番号 298-93-1]還元法で、正確で再現性の高い結果をもたらすことが示されている(5)。しかし、他の方法も使用できる。皮膚試料を適切な濃度の MTT 溶液（例えば、0.3～1 mg/mL）中で適切な温度下に 3 時間インキュベートする。沈殿した青いホルマザン産物を溶媒（イソプロパノール）で抽出し、540 および 595 nm の間の波長で OD を測定し、ホルマザン濃度を算出する。

15. 生体染色色素が被験物質の化学作用により細胞の代謝と同様の変化を受ける場合には、生存率の算出に誤りをもたらす可能性がある。そのような作用を持つ被験物質が洗浄後も完全には除去されずに皮膚に残留した場合、このような事態が生じることが示された(9)。被験物質が直接生体染色色素に作用する場合には、追加の対照で生存率測定に対する被験物質への障害を検出し、修正する(9)(23)。

結果の解釈

16. 各被験サンプルの OD 値を用いて、任意に 100%とした陰性対照に対する相対的な生存百分率を計算することができる。腐食性被験物質と非腐食性被験物質を区別するため、（もしくは、異なる腐食性のクラスを区別するため）設定した生存率のカットオフ値または結果を評価し、腐食性物質を特定するために用いた統計解析法については明らかな定義と記録が必要であり、かつ、それらが適切であることを示す。通常は、これらのカットオフ値は試験最適化の間に確立し、予備的有効性評価の段階で試験し、有効性評価試験で確認するものである。例えば、EpiDerm^{TM}モデルにおける腐食性の予測は、以下のとおりである(9)。

17. 被験物質が皮膚に腐食性であるとみなされるのは、

i) 3 分間暴露後の生存率が 50%未満の場合。または、

ii) 3 分間暴露後の生存率が 50%以上で、かつ 1 時間暴露後の生存率が 15%未満の場合。

18. 被験物質が皮膚に非腐食性であるとみなされるのは、

i) 3 分間暴露後の生存率が 50%以上または 1 時間暴露後の生存率が 15%以上の場合。

データおよび報告

データ

19. 各組織について、被験物質、陽性対照および陰性対照の OD 値、および算出した細胞生存率データを、また該当する場合は、反復試験のデータ、平均値および各測定値も含め、総括表として報告する。

試験報告書

20. 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
- 純度および物質または製剤の組成（重量百分率で）
- 物理的性質、pH、安定性および水溶性など、本試験の実施に重要な物理化学的性状
- 該当する場合は、被験物質／対照物質に対する前処理（例えば、保温、粉砕）、
- 分かっている場合は、その安定性

使用する皮膚モデルとプロトコールの正当化。

試験条件
- 使用する細胞システム
- 細胞生存率を計測するために使用する測定装置（例えば、分光光度計）の校正情報
- 使用する特異的な皮膚モデルをサポートする全情報（妥当性を含む）
- 使用する試験手順の詳細
- 試験で用いる用量
- 試験手順の全ての変更に関する記述
- モデルを用いた背景データの参考文献
- 使用した評価基準の記述

結果
- 各被験サンプルデータの総括表
- 観察された他の効果の記述

結果に関する考察

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/2001 doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6

(2) OECD (2002). OECD Guideline for Testing of Chemicals. No. 404: Acute Dermal Irritation, Corrosion,_revised Test Guideline as adopted 24 April 2002, 7 pp plus Annexes.

(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. ATLA23, 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) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhütter, H.-G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing. ATLA 28, pp. 371-401.

(10) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(11) ECVAM (2000). ECVAM News & Views. ATLA 28, 365-67.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (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/epiddocs/epis_brd.pdf

(13) 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.

(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) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Meth. 65, 55-63.

(16) Cannon, C. L., Neal, P. J., Southee, J. A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. in Vitro 8, 889 - 891.

(17) Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Bouwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, 211 - 225.

(18) Tinois E, Gaetani Q, Gayraud B, Dupont D, Rougier A, Pouradier DX (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In In vitro Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: 133-140.

(19) Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J (1991). In vitro and post – transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193: 310-319.

(20) Parenteau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, 163-171.

(21) Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parenteau, N.L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, 747-756.

(22) Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, 69-84.

(23) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxic. in Vitro 15, 57-93.

表 2　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）の国際バリデーション試験(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)　大部分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

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、皮膚のブランチングによる変色、脱毛の全面的な領域および瘢痕が現れる。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。

細胞生存率とは、細胞集団の総活性の尺度となるパラメータで、細胞のミトコンドリアの脱水素酵素が生体染色色素 MTT を還元する能力として測定するが、これは測定される評価項目および使用する試験のデザインに依存し、細胞総数および／または細胞の活性に係る。