

され、その結果を評価委員会に審議依頼されたものである。

1-3)バリデーション委員会の構成

バリデーション委員会の構成は以下のとおり。バリデーション参加者および協力者の名簿は第5章に添付した。

委員長

吉村功：東京理科大学工学部経営工学科

委員

大野泰雄：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部（当時）

大森 崇：京都大学大学院医学研究科

川端留美：大鵬薬品工業(株) 安全性研究所

1-4) 評価委員会の構成

腐食性試験代替法を評価するための評価委員会は局所刺激性試験（光刺激性試験）代替法を評価するために組織された委員会の委員に引き続き依頼した。委員は以下のとおり。

委員長

田中憲徳（平成16年12月まで）：食品薬品安全センター 秦野研究所

大野泰雄（平成17年1月より）：国立医薬品食品衛生研究所

副委員長

若栗 忍：食品薬品安全センター 秦野研究所

委員

板垣 宏：資生堂 安全性・分析センター 代替法開発プロジェクト室

今井弘一：大阪歯科大学

大森 崇：京都大学大学院医学研究科

岡本裕子：コーセー 基礎研究所

小島肇夫：日本メナード化粧品 総合研究所（平成17年11月より国立医薬品食品衛生研究所 薬理部）

畑尾正人：資生堂 基盤研究センター 薬剤開発研究所

1-5) 評価資料

評価委員会で評価の対象とした資料は以下のとおり。

バリデーション評価

V-1 皮膚腐食性試験研究計画書

V-2 腐食性試験関係者名簿

V-3 過去の皮膚腐食性試験代替法のバリデーションにおける被験物質

- V-4 結果のまとめ
- V-5 試験に用いる被験物質数
- V-6 腐食性試験吸光度データシート
- V-7 皮膚腐食性試験バリデーションSOP
- V-8 操作手順一例
- V-9 皮膚腐食性試験代替法バリデーション会議議事録案
- V-10 皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法のバリデーション
- V-11 皮膚腐食性試験バリデーション結果報告

文献 1

- 1-1 Botham PA, Chamberlain M, Barratt MD, Curren RD, Esdaile, DJ, Gardner JR, et al. (1995) A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 6. *ATLA* 23:219-255.
- 1-2 Barratt MD, Brantom PG, Fentem JH, Gerner I, Walker AP, and Worth AP. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* test for skin corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. in Vitro* 12:471-482.
- 1-3 Fentem JH, Archer GEB, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, et al. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the management team. *Toxicol. in Vitro* 12:483-524.
- 1-4 Liebsch, M, Traue, D, Barrabas, C, Spielmann, H, Uphill, P, Wilkins, S, et al. (2000) The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing. *ATLA* 28:371-401.

文献 2

- 2-1 Federal Register, 69,104,2004
- 2-2 OECD Guideline 432: In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion
- 2-3 OECD Guideline 430: In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)
- 2-4 OECD Guideline 431: In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test

文献 3

- 3-1 ICCVAM (2002) ICCVAM Evaluation of EPISKIN, EpiDerm (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, Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Available:
<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiderm.htm> [accessed 4 June 2003].

文献 4

- 4-1 ICCVAM (1999) Corrositex®: An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of

Chemicals. NIH Publication No. 99-4495. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available:
<http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/reports/corprrep.pdf> [accessed 4 June 2003].

文献 5

5-1 EpiDerm パンフレット

5-2 Kubilus, J., Klausner, M., Sheasgreen, J., Hayden, P. J., Long Term Reproducibility of Epiderm, an Epidermal model for dermal testing and Research, 5th World Congress, Berlin, Germany, 2005

5-3 Klausner, M., Sheasgreen, J., Hayden, P. J., Liebsch, M. and Kubilus, J., A reproducible, structurally appropriate skin model for dermal safety and efficacy testing, 21st International federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress, Berlin, 2000

文献 6

6-1 Vitrolife-skin パンフレット

6-2 Morota, K., Morikawa, N., Morita, S-I., Kojima, H. and Konishi, H., Development and evaluation of the cultured skin model, *Tiss. Cult. Res. Commun.*, 17, 87-93, 1998.

6-3 Morikawa, N., Morota, K., Suzuki M. Kojima, H., Nakata, S. And Konishi H., Experimental study on a novel chemical application procedure for in vireo skin corrosivity testing using the Vitrolife-Skin human skin model, *AATEX*, 11, 1, 68-78, 2005

引用文献

- 1) Draize JH, Woodard G, Calvery HO (1944) Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 82: 377-390.
- 2) OECD (2002) Test Guideline 404. OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Dermal Irritation/Corrosion. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. Available:<http://www1.oecd.org/ehs/test/health.htm> [accessed 4 June 2003].
- 3) ICCVAM (1999) Corrositex®: An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 99-4495. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available:
<http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/reports/corprrep.pdf> [accessed 4 June 2003].
- 4) ICCVAM (2002) ICCVAM Evaluation of EPISKIN, EpiDerm (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. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Available:
<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiderm.htm> [accessed 4 June 2003].
- 5) OECD (2003) OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Draft Proposal for a New Guideline 430, In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER). OECD ENV/JM/TG(2002)8.

Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. Available: <http://www.oecd.org> [accessed 4 June 2003].

- 6) OECD (2003) OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Draft Proposal for a New Guideline 431, *In Vitro* Skin Corrosion Human Skin Model System. OECD ENV/JM/TG(2002)8. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. Available: <http://www.oecd.org> [accessed 4 June 2003].

第2章 皮膚腐食性について

2-1) 皮膚腐食性の定義と分類

化学物質等による皮膚局所への毒性は大きく刺激性と腐食性に分けられている。腐食性は、接触部位の生体組織に非可逆的な組織損傷を引き起こす反応のことである。その主な所見は潰瘍、局所壊死、および瘢痕の形成である。他方、刺激性は、免疫学的機構の関与しない、薬物の単回、反復および長期の接触による直接障害に起因する生体組織の局所炎症作用を意味し、通常可逆性と見なされている。肉眼所見では紅斑および浮腫として認められる¹⁾。

また、2003年に国連から発出され2008年中（アジア太平洋諸国は2006年中）を目標に国際的に導入が進められている化学品の分類および表示に関する世界調和システム(GHS: Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals) では、「皮膚腐食性とは皮膚に対する不可逆的な損傷を生じさせることである²⁾。即ち、試験物質の4時間以内の適用で、表皮を貫通して真皮に至る明らかな壊死が認められる所見が得られる。腐食反応は、潰瘍、出血、出血性痂皮により、また14日間の観察での、皮膚脱色による変色、付着全域の脱毛、および瘢痕によって特徴づけられるとしている。他方、皮膚刺激性とは、試験物質の4時間以内の適用で、皮膚に対する可逆的な損傷を生じさせることであるとしている³⁾。また、「腐食性物質は、皮膚組織の破壊、すなわち最大4で時間暴露した後試験動物3匹中1匹以上に、表皮を貫通して真皮に至るような明らかに認められる壊死を生じる被験試料であり、腐食性反応の代表的なものには、潰瘍、出血、出血性の痂皮が認められ、14日間の観察期間終了時までには、皮膚の脱色による変色や付着全域におよぶ脱毛および 瘢痕によって特徴づけられるとしている。また、表2-1に示したように、腐食性区分を更に三つ細分し、「細区分1A は3 分間以内の暴露後、1 時間以内の観察期間で反応が認められる場合、細区分1B は3 分間から1 時間までの暴露期間後、14 日以内の観察期間に反応が認められる場合、細区分1C は1 時間から4 時間までの暴露後、14 日以内の観察期間に反応が認められる場合である」と分類している。

表2-1. 皮膚腐食性の区分および細区分

腐食性 区分 1 (細区分を採用しない所 管官庁に適用される)	腐食性 細区分 (限られた所管官庁 に適用される)	動物3 匹中1 匹以上における腐食性	
		暴露時間	観察期間
腐食性	1A	≤3 分間	≤1 時間
	1B	>3 分間- ≤1 時間	≤14 日間
	1C	>1 時間 - ≤4 時間	≤14 日間

* 環境省ホームページ(<http://www.env.go.jp/chemi/ghs/pdf/chapter3.pdf>, 126p³⁾)

2-2) 皮膚腐食性発現機序

皮膚組織は表皮、真皮ならびに皮下組織に分かれる。表皮は角質細胞が層状に重積した角質層、扁平または横に長い紡錘形の細胞からなる顆粒層、表皮の中で最も厚く、下層では円柱状で上層に行くに従って扁平になり、6層から10層に及ぶ有棘細胞間は細胞間橋で結合され、細胞間にリンパ液が流れ、細胞への栄養を送る役割をしている有棘層、ならびに表皮の最下層で真皮とは波形になって接し、真皮の毛乳頭の毛細血管から栄養を補給され常に細胞分裂を行い細胞の新生と増殖を繰り返す、立方体ならびに円柱状細胞1層からなる基底層がある。真皮は表皮を下から支え水分を多く含み、コラーゲン、エラスチンと両者の間隙を埋める基質からなる結合組織層である乳頭層と網状層に分かれ、細胞成分は、線維芽細胞、組織球・マクロファージ、肥満細胞、形質細胞などが存在する。皮下組織は皮膚の最下層で、膠原線維と弾力線維が交錯する網状構造の間隙に脂肪細胞が入り込む構造をしている。強い酸性を示す無機酸や一部の有機酸、逆に強い塩基性の化学物質や Chromium trioxide のような酸化剤などが皮膚に一定期間接触すると、それらの化学物質が直接皮膚組織に接触し、皮膚を構成している上皮組織や支持組織に含まれる細胞成分や、コラーゲン、エラスチンなどからなる皮膚を構成している高次構造である細胞外マトリックスなどに含まれる多くのタンパク質の構造を強く変性させる。また、分子レベルでも、生体分子の構造と機能に大きな障害を与える。その結果、化学物質と接触した皮膚組織の正常構造を根本的に破壊するとともに、当該組織の壊死や溶解等の組織障害を起こす。皮膚腐食性は、皮膚に瘢痕を残すような不可逆的な障害を皮膚腐食性と呼び、紅斑や軽い浮腫のような皮膚の炎症を誘発するが瘢痕を残さないような皮膚刺激性とは区別されている。

2-3) 皮膚腐食性誘発薬物

皮膚腐食性物質には硫酸や水酸化ナトリウムのような無機の酸や塩基、有機酸、アミン類、金属塩、フェノール類、親電子化合物、界面活性剤、酸化剤など、多くのものがある。それらの例を非皮膚腐食性物質とともに、表 2-2, 2-3, 2-4 および 2-5 に示した。

表 2- 2. Chemicals Recommended for Validation of New *In Vitro* Human Skin Model Corrosivity Test Methods

Chemical ¹	CASRN	Chemical Class ²	UN <i>In Vivo</i> PG ³	Validated Test Method Prediction	pH ²
<i>In Vivo</i> Corrosives					
Phosphorus tribromide	7789-60-8	inorganic acid	I	C	1.0
Sulfuric acid (10%)	7664-9399	inorganic acid	II/III	C	1.2
Boron trifluoride dihydrate	13319-75-0	inorganic acid	I	C	1.5
Glycol bromoacetate (85%)	3785-34-0	electrophile	II/III	C	2.0
Caprylic acid	124-07-02	organic acid	II/III	C	3.6
2-tert-Butylphenol	88-18-6	phenol	II/III	C	3.9
Dimethyldipropylenetriamine	10563-29-8	inorganic base	I	C	8.3
Dimethylisopropylamine	996-35-0	organic base	II/III	C	8.3
1,2-Diaminopropane	78-90-0	organic base	I	C	8.3
n-Heptylamine	111-68-2	organic base	II/III	NC	8.4
2-Mercaptoethanol, sodium salt (45% aq. sol.)	37482-11-4	inorganic base	II/III	NC	12.0
Potassium hydroxide (10% aq. sol.)	1310-58-3	inorganic base	II	C	13.1
<i>In Vivo</i> Noncorrosives					
Sulfamic acid	5329-14-6	inorganic acid	NC	C	1.5
Isostearic acid	30399-84-9	organic acid	NC	NC	3.6
Phenethyl bromide	103-63-9	electrophile	NC	NC	3.6
Eugenol	97-53-0	phenol	NC	NC	3.7
1,9- Decadiene	1647-16-1	neutral organic	NC	NC	3.9
<i>o</i> -Methoxyphenol	90-05-1	Phenol	NC	C	3.9
Sodium lauryl sulfate (20% aq. sol.)	151-21-3	surfactant	NC	NC	3.9
Tetrachloroethylene	127-18-4	neutral organic	NC	NC	4.5
4-Amino-1,2,4-triazole	584-13-4	organic base	NC	NC	5.5
4-(methylthio)-Benzaldehyde	3446-89-7	electrophile	NC	NC	6.8
Sodium carbonate (50% aq. sol.)	497-19-8	inorganic base	NC	NC	11.7
Dodecanoic acid (lauric acid)	143-07-7	organic acid	NC	NC	ND

ICCVAMの報告 (The ICCVAM Dermal Corrosivity and Irritation Working Group Proposed ICCVAM minimum performance standards: *In vitro* human skin model systems for skin corrosion, June 23, 2003⁴⁾)より引用。

Abbreviations: aq = aqueous; C = corrosive; CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number; PG = Packing Group; NC = Non-corrosive; ND = not determined (unable to measure); UN= United Nations.

¹The 40 reference chemicals comprise a representative selection from 163 reference chemicals that was originally used to validate the reference test method; the complete list and the selection criteria are provided in (1).

²The chemical class, the concentration tested, and the pH values were obtained from the original sources as indicated in (1). The PH values are rounded to one decimal point.

³ Within the UN Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS), the PG classifications correspond as follows: PGI=1A, PG II =1B, PGIII=1C.

表2-3. *In Vivo* Reference Data for 17 Corrosive Chemicals Evaluated in the ECVAM Validation Study

(ECETOC, 1995⁵)

ECVAM (#) and Name	ECVAM Chem. Class	PII	Exposure	N	Response
(15) dimethyldipropylenetriamine	Org. Base	NPC	4 hr	1	Ne at 1 hr
(13) 3-methoxypropylamine	Org. Base	6.7	4 hr	6	Br 6/6 at 1 hr
(17) dimethylisopropylamine	Org. Base	5.6	4 hr	6	Br 6/6 at 1 hr
(45) heptylamine	Org. Base	6.7	4 hr	6	Br 6/6 at 1 hr
(48) glycol bromoacetate (85%)	Electrophile	7.7	4 hr	1	Ne 1/1 at 1 hr
(23) 2-tert-butylphenol	Phenol	5.7	4 hr	6	Ne 5/6 at 1 hr
(18) KOH (10%)	Inorg. Base	NPC	4 hr	3	Ne 3/3 at D 1
(42) 2-mercaptoethanol (Na)	Inorg. Base	NPC	3 min	3	Ne 1/3 at D 1 2/3 neg at D 7
(47) 60/40 octanoic/decanoic acid	Org. Acid	NPC	4 hr	3	Ne 2/3 at D 1 Ne 3/3 at D 7
(29) 65/35 octanoic/decanoic acid	Org. Acid	NPC	4 hr	3	Es 2/3 at D 1 Es 3/3 at D 2
(40) octanoic acid	Org. Acid	4.4	4 hr	3	Ne 3/3 at D 2
(50) 55/45 octanoic/decanoic acid	Org. Acid	5.1	4 hr	3	Ne 3/3 at D 2
(3) carvacrol	Phenol	>4.0	4 hr	4	Es 3/4 at D 1 Es 4/4 at D 2
(14) allyl bromide	Electrophile	7.2	4 hr	2	Ne 2/2 at D 7
(38) tallow amine	Org. Base	NPC	4 hr	3	Ne 2/3 at D 7
(36) 2-methylbutyric acid	Org. Acid	>4.0	4 hr	4	Es 2/4 at D 7
(5) methacrolein	Electrophile	4.1	4 hr	3	Ne 3/3 at D 9

ECETOC (1995)のデータから引用

Abbreviations: Br = Burned, D=day, Es = Eschar, Inorg. = Inorganic, N = Number of rabbits tested, Ne = Necrotic, neg = negative (for corrosion), NPC = Not possible to calculate, Org. = Organic, PII = Primary Irritation Index

表 2-4. 皮膚腐食性物質一覽 (Botham et al 1995⁶⁾)

販売名	化学名	化学分類	外 観
Acetic acid (glacial) ^a		Organic acid	Clear liquid
Acrylic acid (99%) ^a		Organic acid	Clear liquid
Armeen CD ^b	Cocoamine	Organic base	Clear liquid
Armeen TD ^b	Tallowamine	Organic base	Opaque gel
Arquad 16-50 ^b	Hexadecyltrimethyl-ammonium chloride, 50% in isopropanol	Surfactant	Clear liquid
Arquad DMMCB-50 ^c	Coco(C12)dimethylbenzyl-ammonium chloride, 50% in aqueous ethylene glycol	Cationic surfactant	Clear viscous liquid
Bromoacetic acid (8%) ^a		Organic acid	Clear liquid
Bromoadetic acid (55.6%) ^a		Organic acid	Clear liquid
Butylamine (40%) ^a		Organic base	Clear liquid
Capric/caprylic (45:55) acid ^b		Organic acid	Clear liquid
Caprylic acid ^b		Organic acid	Clear liquid
Cyclohexylamine (11.9%) ^a		Organic base	Clear liquid
1,4-Diaminobutane (30%) ^a		Organic base	Clear liquid
Dichloroacetic acid (36.1%) ^a		Organic acid	Clear liquid
Diethylamine (35%) ^a		Organic base	Yellow liquid
Duoquad T-50 ^b	Pentamethyl-N-tallow-1,3-propanediammonium chloride, 50% in isopropanol	Cationic surfactant	Yellow liquid
Formic acid (33.9%) ^a		Organic acid	Clear liquid
Hexanoic acid ^a		Organic acid	Clear yellow liquid
Mercaptoacetic acid (15.1%) ^a		Organic acid	Clear liquid
Proxel BD ^b (biocide A)	1,2-Benzisothiazoli-3-one (33%) in aqueous propylene glycol	Neutral organic	Tan opaque liquid
Pyrrolidine (34.5%) ^a		Organic base	Yellow liquid
Sodium hydroxide (4.88%) ^a		Inorganic	Clear liquid
Sodium metasilicate ^b		Inorganic	Granular powder ^c
Sodium silicate A140 ^b		Inorganic	Clear gel
Synprolam 35X2 ^b	C13-15Alkyl-di(2-hydroxyethyl)amine	Organic base	Clear viscous liquid

a: Jacobs & Martens: classification from animal data.

b: Original animal data.

c: Prepared in distilled water at 1g/ml.

表 2-5. 非皮膚腐食性物質一覽(Botham et al 1995⁶⁾)

販 売 名	化 学 名	化学分類	外 觀
Armeen 2C ^d	Dicocoamine	Organic base	Crystalline powder ^c
Aromox DMMCD-W ^b	Coco(C12)dimethylamine oxide (30%)	Amine oxide	Clear liquid
Arquad C-33-W ^d	Coco(C12)trimethylammonium chloride, 33% in water	Cationic surfactant	Clear gel
Butylbenzene ^a		Neutral organic	Clear liquid
Dequest 2000 ^e	Aminotris(methylphosphonic acid), 50% in water	Organic acid	Clear liquid
Dowanol PNB ^f	Propylene glycol n-butyl ether	Neutral organic	Clear liquid
Elfan OS46 ^d	C12-14a-Olefin sulphonate, sodium salt	Anionic surfactant	Yellow viscous liquid
Empicol LZPV/C ^d	Sodium dodecyl sulphate	Anionic surfactant	Dry pellets ^c
Empigen OB ^d	Coco(C12)dimethylamine oxide (30%)	Amine oxide	Clear liquid
Empilan CME ^d	Fatty acid monoethanolamide coco	Neutral organic	Dry chips ^c
Empilan KB2 ^d	Fatty alkylethoxylate 2EO	Neutral organic	White opaque cream
Ethomeen T/25 ^d	Polyoxyethylene(15)tallowamine	Organic base	Yellow viscous liquid
Genamin KDM-F ^d	Behenyl(C20-22)trimethyl-ammonium chloride, 80% in isopropanol	Cationic surfactant	Powdered flakes ^c
Genapol LRO ^d	Coco(C12)2EO sulphate, sodium salt (70%)	Anionic surfactant	Clear gel
n-Hexanol ^a		Neutral organic	Clear liquid
Hostaphat KLD ^d	Alkyl(4EO)phosphate ester	Neutral organic	Clear viscous liquid
Lauric acid ^b		Organic acid	Fine powder ^c
n-Nonanol ^a		Neutral organic	Clear liquid
Oleic/caprylic (80:20) acid ^b		Organic acid	Yellow liquid
Proxel AB ^b (biocide B)	1,2-Benzisothiazolin-3-one (33%), aqueous	Neutral organic	Opaque tan liquid
Sodium perborate ^e		Inorganic	Crystalline powder ^c
Sodium percarbonate ^e		Inorganic	Granular powder ^c
Sodium silicate H100 ^b		Inorganic	Clear viscous liquid
Triethanolamine ^a		Organic base	Clear viscous liquid

n-Undecanol ^a	Neutral organic	Clear liquid
--------------------------	-----------------	--------------

a: Jacobs & Martens : classification from animal data.

b: Original animal data.

c: Prepared in distilled water at 1g/ml.

d: CESIO classification from animal data.

e: Harmonised Electronic Dataset (HEDSET) data.

f: Manufacturers' data sheet and summary of test data.

引用文献

- 1) 門馬純子(1990)局所刺激性、第二章：医薬品毒性試験ガイドライン84-99、「医薬品の開発」第22巻、大森義仁・戸部満寿夫編集、医薬品の安全性・毒性試験、広川書店。
- 2) http://www.ne.jp/asahi/kagaku/pico/eu/reach_seminar/2005/REACH_QA_050917.pdf
- 3) 環境省ホームページ(<http://www.env.go.jp/chemi/ghs/pdf/chapter3.pdf>)
- 4) The ICCVAM Dermal Corrosivity and Irritation Working Group Proposed ICCVAM minimum performance standards: *In vitro* human skin model systems for skin corrosion, June 23, 2003
- 5) ECETOC Report No.66 (1995) Skin irritation and Corrosion: Chemicals reference data bank European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels, Belgium.
- 6) Botham PA, Chamberlain M, Barratt MD, Curren RD, Esdaile, DJ, Gardner JR, et al. (1995) A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 6. ATLA 23:219-255.

第3章 In vivo 皮膚腐食性試験法について

3-1) ドレイズ皮膚腐食性試験法

皮膚腐食性は化学物質等を塗布や接触による皮膚の障害を明らかにするための皮膚刺激性試験の一環として調べられている。

皮膚刺激性・腐食性を調べる方法としては Environmental Protection Agency^{1,2)}、Toxic Substances Control Act³⁾、Federal Hazardous Substances Act⁴⁾、OECD⁵⁾ など、多くのガイドラインが示されているが、いずれも Draize らによって 1944 年に報告されたウサギを用いる方法に基礎をおいている⁶⁾。Gfeller らが作成した Draize 原法⁷⁾と OECD/EEC との比較表を表 3-1 に示した。日本では化粧品の安全性評価のための試験法の例として、皮膚一次刺激性試験法が示されている(表 3-2)。

表 3-1. OECD/EEC ガイドラインと Draize 法の皮膚一次刺激性試験法の相違点

(W. Gfeller et al, 1985⁷⁾)

	試験法	
	OECD/EEC	Draize
動物種	ウサギ	OECD と同じ
週 齢	特に記載なし	特に記載なし
体 重	特に記載なし	特に記載なし
1 群の動物数	3 匹 (少なくとも)	6 匹
投 与 量		
液体	0.5mL (希釈しない)	OECD と同じ
固体あるいは半固体	0.5g	0.5g(*)
パッチ材料	ガーゼ	ガーゼ: 2 枚
パッチテープ	非刺激性、半閉鎖包帯でゆるく巻く	粘着、通気性のないゴム引き布などで巻く
閉鎖包帯	使用してよい	特に記載なし
暴露時間 (時間)	4 時間	24 時間
洗 浄	可	特に記載なし
擦 過	必要なし	各動物に正常および擦過皮膚
観察時間 (時間) (**)	0.5-1, 24, 48, 72	0, 48
採 点 法	Draize 法	OECD と同じ
腐 食 性	記録する	考慮せず

(*): 適当な溶媒で均一な溶液とする

(**): パッチ除去後

門馬(1990)が翻訳したものから引用⁸⁾

表 3-2. 日本において化粧品の皮膚一次刺激性試験法として示された方法⁹⁾

試験動物	原則として若齢成熟白色ウサギ、又は若齢成熟モルモット
動物数	原則として1群3匹以上
皮膚	除毛健常皮膚
投与面積および用量	皮膚一次刺激性を適切に評価し得る面積および用量
投与濃度	原則として皮膚一次刺激性を適切に評価し得る数段階濃度
投与方法	24時間の開放、又は閉塞貼付
投与後の処置	原則として無処置とするが、必要に応じて洗浄等の操作を行ってもよい。
観察	原則として投与後24, 48 および72時間に投与部位の肉眼的観察を行う。
試験結果の評価	皮膚一次刺激性を適切に評価し得る採点法により判定する。

日本では主に OECD が 1981 年に定めた方法が採用されている。それらは若い成熟白色ウサギまたはモルモットを1群3匹以上用い、除毛したのち、被験物質を24時間開放あるいは閉塞貼付し、処置後24, 48, 72時間肉眼的に観察し、表3-3に示した基準で、現れた紅斑や浮腫をそれぞれ0-4段階で評価し、強度な紅斑から軽度な痂皮の形成や強度の浮腫が生じた場合には腐食性ありと判定される。Draize 原法では正常皮膚と角質除去皮膚の両方に被験物質を塗布し、24時間と72時間目のそれぞれの紅斑評点と浮腫評点を加えて平均値を求めた値(最高値8)はPII(Primary Irritation Index)として、刺激性の程度を示す指標として使用されている。PII値が<2では無刺激性或いは弱い刺激性、2-6では中等度刺激性、>6では強度刺激性とされる⁶⁾。(Maibach and Patrick 2001では5以上が強度刺激とされている¹⁰⁾。

表 3-3. 皮膚反応の評価基準と評点⁶⁾

(A) 紅斑および痂皮の形成	
紅斑なし-----	0
非常に軽度な紅斑(かろうじて識別できる)-----	1
はっきりした紅斑-----	2
中等度から強度な紅斑-----	3
強度な紅斑(beet redness)から軽度な痂皮の形成(深部損傷)まで----	4
	最高点 = 4
(B) 浮腫の形成-----	
浮腫なし-----	0
非常に軽度な浮腫(かろうじて識別できる)-----	1
軽度な浮腫(はっきりした膨隆による明確な縁が識別できる)-----	2
中等度な浮腫(約1mmの膨隆)-----	3
強度な浮腫(1mm以上の膨隆と暴露範囲を越えた広がり)-----	4
	最高点 = 4

門馬(1990)が翻訳したものから引用⁸⁾

なお、水泡形成(vesiculation)、潰瘍形成(ulceration)、重篤な痂皮形成(severe eschar formations)はドレイズ評点には加味されていないが、全ての Draize 法にベースを置く試験は刺激性と腐食性の両方を評価するのに使用されている。可逆的でない、強い障害が現れた時は試験期間が延長され、7日と14日目にも処置部位が観察される。また、ガイドラインによっては処置3分後の観察(ECC)や処置3分、1

時間、および4時間の暴露 (The United Nations' recommendations for the Transport of Dangerous Goods) を勧告しているものもある。

Draize 試験は、被験物質のヒトでの作用を、どちらかというと過大評価させる判定を下すとされている。なお、弱い刺激性と中等度の刺激性との間を十分に区分できないとの批判もあるが、Draize 試験の目的は公衆に強い危害を与える物質を同定することであり、化合物同士の刺激性を比較することでは無いとされている¹⁰⁾。

3-2) Draize 試験の信頼性

In vitro の代替法は元々の in vivo 試験法と比較し、同等あるいはそれ以上の能力を持つことが行政的受け入れのために必要である。代替法のバリデーションにより、そのばらつき等のデータを得ることができるが、その結果を正当に評価するためには代替しようとする in vivo 法のばらつき等、その信頼性に関するデータが必要である。

Weil and Scala¹¹⁾ はDraizeのウサギ皮膚試験法の再現性を、24施設の協力を得て、10物質を用いて検討した。その結果、施設内での再現性は中程度あるが、施設間の再現性はよく無いこと、また、その主な理由は観察が肉眼による主観的なものであることによる、とした。

また、N.Y. Choksiら¹²⁾ は GHS 分類での刺激性物質(PII>2.3)、弱い刺激性物質(1.5<PII<2.3)、および非刺激性物質(PII<1.5)を in vivo 試験法で評価する際の偽陰性の割合を皮膚刺激性および腐食性に関する ECETOC の 187 物質について検討した。但し、真実の分類は不明であることから、1回きりの結果が正しいと推定した。多数回試験した物質については、多数決で分類を決めた。その結果、(1)弱い刺激性物質が無刺激性物質として過小評価される可能性は全ての物質について計算した結果は<5%、一方多数の試験を行った物質についてのみ計算した場合には<10%であった。(2) 刺激性物質を無刺激性物質と過小評価してしまう割合は<1%であった。また、(3) 刺激性物質を弱い刺激性物質と過小評価してしまう可能性は、計算対象を全ての物質とするか、あるいは多数回試験を行った物質のみを対象にするかによって異なるが、9-30%であった。

また、Ticeら¹³⁾ はいくつかの前提のもとで、in vivo刺激性試験において陽性物質を過小評価する可能性は1.1% - 10.3%であり、腐食性物質を過小評価する可能性は5 - 7%と結論している。

なお、これらの結果をまとめたStokesの発表では¹⁴⁾ (表3-4および表3-5) 刺激性物質を中等度の刺激性物質と判定する可能性は10.3% であり、刺激性物質を非刺激性物質と判定する可能性は0.01%、中等度の刺激性物質を非刺激性物質と判定する可能性は5.5%、刺激性物質を非刺激性物質と判定する可能性は0.01%以下であるとした。

表3-4. Distribution of Animal Scores

Estimated probability of ... (No. animals)	True Classification of test substances		
	Nonirritant	Mild Irritant	Irritant
An animal scoring: < 1.5	95.7% (222)	14.2% (47)	0.7% (1)
An animal scoring: 1.5 -2.3	3.9% (9)	81.6% (270)	19.2% (28)
An animal scoring: > 2.3	0.4% (1)	4.2% (14)	80.1% (117)
No. Studies Evaluated	66	88	43

Stokes (2004)

表3-5. Estimated Probabilities of Classification

著者らの判定*	True classification of test substances		
	Negative	Mild irritant	Irritant
Negative	99.5%	5.5%	0.01%
Mild irritant	0.5%	94.0%	10.3%
Irritant	<0.01%	0.5%	89.7%

Stokes (2004)

*: 3匹の動物での紅斑浮腫スコアを以下の基準で分類し、多数決で判定した。

Negative: 紅斑浮腫スコア<1.5、Mild irritant: 同1.5以上2.3以下、Irritant: 同>2.3

引用文献

- 1) EPA (1978)
- 2) EPA (1982)
- 3) TSCA (1979) Toxic Substances Control Act,
- 4) FHSA (1981) Federal Hazardous Substances Act
- 5) OECD (2002) Test Guideline 404. OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Dermal Irritation/Corrosion. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. Available:<http://www1.oecd.org/ehs/test/health.htm> [accessed 4 June 2003].
- 6) Draize JH, Woodard G, Calvery HO (1944) Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. J. Pharmacol. Exp. Ther., 82: 377-390.
- 7) Gfeller W, Kobel W, Seifert G. (1985) Overview of animal test methods for skin irritation. Food Chem Toxicol. 1985 Feb;23(2):165-8.
- 8) 門馬純子(1990)局所刺激性、第二章：医薬品毒性試験ガイドライン 84-99、「医薬品の開発」第22巻、大森義仁・戸部満寿夫編集、医薬品の安全性・毒性試験、広川書店。
- 9) 厚生省薬務局審査課監修(1996)化粧品・医薬部外品製造申請ガイドブック第三版、薬事日報社
- 10) Maibach H and Patrick E (2001) Dermatotoxicology, in "Principles and Methods in Toxicology", 1039-1084
- 11) Weil CS and Scala RA (1971) Study of intra- and interlaboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests. Toxicol Appl Pharmacol. 19(2):276-360.
- 12) Choksi NY, Tice RR, Haseman JH, Stokes WS et al (2004) Estimation of False Negative Rates for the *In Vivo* Rabbit Dermal Irritation Assay, Society of Toxicology - 43rd Annual Meeting, Baltimore, MD, March 21 - 25, 2004, ICCVAM/NICEATM POSTER PRESENTATION ABSTRACT)
- 13) Tice RR, Choksi NY, Allen DG, Haseman JH, Hill R, Lewis M, Lowther D, Stokes WS (2004), Estimation of the Underprediction Rates for the *In Vivo* Rabbit Dermal Corrosion Assay.
- 14) Stokes WS (2004) Preliminary Evaluation of the Underprediction Rate of the *In Vivo* Dermal Irritation Test Method Part I: Introduction, NICEATM Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods. October 20, 2004. (<http://ntp-server.niehs.nih.gov/files/SACATMdermal1019041.pdf#search='Tice%2C%20Skin%20and%20Stokes'>)

第4章 ヒト皮膚モデルの適用範囲とパフォーマンス

OECD ガイドライン 431「ヒト皮膚モデル試験」¹⁾として、ヒト皮膚モデルの使用が報告されている。OECD ガイドラインに示された原理、方法を以下に示すとともに、ガイドライン制定のもとになったバリデーション結果、評価報告書の概要を以下にまとめる。

4-1) 原理

角質層を持つ再構築された表皮からなる3次元ヒト皮膚モデルを用いる。OECD ガイドライン 431では、Skin²™ ZK1350、EPISKIN™ および EpiDerm™ などの市販品でも、実験室で開発、構築されたモデルでも適用可能としている腐食性物質が角質層に吸収され、拡散後、下層の細胞に毒性を示すという仮説を基本とした試験法である。試験法は、被験物質適用後の細胞生存率をもとに皮膚腐食性を評価する方法である。なお、Skin²™ ZK1350 は現在市販されていない。

4-2) ヒト皮膚モデルのバリデーション経緯

4-2-1) Skin²™ ZK1350 の評価

1995年 Botham²⁾が ECVAM ワークショップにて、初めてヒト皮膚モデルを用いた *in vitro* 腐食性試験のプレバリデーションについて報告している。この報告で、TER アッセイ、CORROSITEX とともに、ヒト皮膚モデル Skin²™ ZK1350 が評価されている。この報告では、25種の腐食性物質と25種の非腐食性物質を用いて評価している。被験物質は、文献および既存データから、OECD ガイドライン 404 に準拠して実施された *in vivo* 結果をもとに腐食性の可否を評価したものを選択している。参加施設は、P&G、ZEBET、Huntingdon Research Centre の3施設であった。

Skin²™ ZK1350 は、ヒト胎児細胞からなる表皮と真皮を持つ。ナイロンメッシュの中に皮膚線維芽細胞を培養し、ケラチノサイトをこの上部に播種し、表皮に分化されたモデルである。Advanced Tissue Science から市販されていた。このモデルは、US の DOT ですでに採用されている。

試験法は、皮膚モデルの角質部位に10秒間被験物質を適用し、MTTを用いて、吸光度による細胞生存率と *in vivo* 腐食性/非腐食性を比較評価する。細胞生存率80%以下を腐食性、それ以上を非腐食性物質と分類して比較する。

プレバリデーションでは、すべての被験物質が皮膚モデルへ適用可能であったが、粘度の高い物質は正確な量を適用することが難しかった。3施設で得られた細胞生存率は良い再現性を示した。数点外れた値も見られたが、ANOVA の検定で有意差 ($P > 0.1$) はなかった。腐食性/非腐食性の分類では50物質中30物質で一致した。各施設(A, B, C)における腐食性/非腐食性の一致性はそれぞれ70, 92, 80%であった。また、偽陰性数はそれぞれ9, 1, 4種、偽陽性数は、それぞれ6, 3, 6種であった。腐食性物質の中で、すべての施設が *in vitro* で非腐食性と判定したものは0であったが、2つの施設で *in vitro* 非腐食性と判定された物質は、caprylic acid、mercaptoacetic acid、1,2-Benzisothiazolin-3-one(33%) in a aqueous propylene glycol および Sodium silicate の4種であった。一方、非腐食性物質の中ですべての施設で *in vitro* 腐食性と判定された物質は Fatty alkylethoxylate 2EO の1種であった。2施設で *in vitro* 腐食性と判定された物質は、Coco(C12)trimethylammonium chloride、Coco(C12)dimethylamine oxide(30%) および Fatty alkylethoxylate 2EO の3種であった。施設間のペアで比較したところ、一致性は良好であった(施設 B/C80%、施設 A/B70%、施設 A/C60%) が、施設 A/C の一致性がやや低かった。以上より、ヒト皮膚

モデルを用いた in vitro 皮膚腐食性試験は、腐食性/非腐食性の同定の予測性が高いと結論された。また、施設間のばらつきについて、今回の結果は受け入れられるが、公式バリデーションの実施にあたり、施設内、施設間の特異性を決定するため、繰り返し実験が必要であること、公式バリデーション開始前には公式なトレーニングを積むこと、腐食性/非腐食性を区別する境界の再考の必要性が指摘された。

表 4-1 In vitro-in vivo comparisons in Skin²™ ZK1350

Laboratory	A	B	C
Samples tested	50	50	50
Qualified samples	50	50	50
Corrosives identified correctly	16	24	21
Non-corrosives identified correctly	19	22	19
Concordance (%)	70	92	80
False positives	6	3	6
False negatives	9	1	4
Sensitivity (%)	64	96	84
Specificity (%)	76	88	76

Skin²™ ZK1350 の公式バリデーション結果は 1998 年、Fentem により報告されている³⁾。このバリデーションでは Skin²™ ZK1350 に追加して別の皮膚モデルである EPISKIN も評価されている。公式バリデーションは 60 物質を用いて実施された。その内訳は、腐食性物質 27 種、非腐食性物質 33 種である。Skin²™ ZK1350 の評価には BASF Akiengesellschaft、ZEBET、Huntingdon Research Centre の 3 施設が参加した。

公式バリデーションに採用された被験物質は不明確ではない in vivo データをもとに選択されている。また、プレバリデーションでは、腐食性/非腐食性の識別について評価したが、公式バリデーションでは、腐食性/非腐食性の識別に加え、EU リスク表示 R35 (UN パッキンググループ I に該当) 物質、R34 (UN パッキンググループ II/III に該当) 物質の検出も目的としている。したがって、試験結果の判定基準に変更がなされている。今回使用した 27 種の腐食性物質の内訳は、R34 物質 21 種、R35 物質 6 種であった。また、代替試験法の評価基準として、受け入れ可能な予測割合 (overprediction rate (%) ≤ 20 (%) および underprediction rate (%) ≤ 20 (%)) を設定しそれに基づいて代替試験法を評価している。

Skin²™ ZK1350 による in vitro 皮膚腐食性試験では、プレバリデーションと同様、角質部位に 10 秒間被験物質を適用し、MTT を用いて、吸光度による細胞毒性和 in vivo 腐食性の度合いを評価している。細胞生存率 80% 以下が腐食性、それ以上を非腐食性と識別する判定に加え、細胞生存率 >50%-80% を R34 (UN グループ III) 物質、10%-50% を R34 (UN グループ II) 物質、細胞生存率 <10% を R35 (UN グループ I) 物質と判定し評価した。

表 4-2. ECVAM バリデーション使用物質³⁾

No.	Chemical	C/NC	EU risk phrase	UN packing group	PII value*
Organic acids					
1	Hexanoic acid	C	R34	II/III	---
29	65/35 Octanoic/decanoic (capric) acids	C	R34	II/III	NPC†
36	2-Methylbutyric acid	C	R34	II/III	>4
40	Octanoic (caprylic) acid	C	R34	II/III	4.44
47	60/40 Octanoic/decanoic acids	C	R34	II/III	NPC
50	55/45 Octanoic/decanoic acids	C	R34	II/III	5.11
7	3,3-Dihydropropionic acid	NC			0
12	Dodecanoic (lauric) acid	NC			0.44
26	Isostearic acid	NC			4.53
34	70/30 Oleic/erucic acid	NC			3.78
58	10:Undecanoic acid	NC			2.42
Organic bases					
2	1,2-Diaminopropane	C	R35	I	---
15	Dimethylpropylammonium	C	R35	I	NPC
38	Tallow amine	C	R35	II	NPC
55	1-(2-Aminoethyl)piperazine	C	R34	II	---
13	3-Methoxypropylamine	C	R34	II/III	6.67
17	Dimethylisopropylamine	C	R34	II/III	5.61
45	n-Heptylamine	C	R34	II/III	6.67
10	2,4-Xylydine (2,4-dimethylaniline)	NC			1.44
35	Hydrogenated tallow amine	NC			3.56
59	4-Amino-1,2,4-triazole	NC			0
Neutral organics					
8	Isopropanol	NC			0.78
11	2-Phenylethanol (phenylethylalcohol)	NC			0.92/2.22
16	Methyl trimethylacetate	NC			0
19	Tetrachloroethylene	NC			5.67
22	n-Butyl propionate	NC			1.08
27	Methyl palmitate	NC			4.56
44	Benzyl acetone	NC			1.21
51	Methyl laurate	NC			3.89
56	1,9-Decadiene	NC			3.0
Phenols					
3	Carvacrol	C	R34	II/III	>4
23	2-tert-Butylphenol	C	R34	II/III	5.67
9	o-Methoxyphenol (Guaiacol)	NC			2.38
30	4,4-Methylene-bis(2,6-di-tert-butylphenol)	NC			0
49	Eugenol	NC			2.92
Inorganic acids					
4	Boron trifluoride dihydrate	C	R35	I	---
28	Phosphorus tribromide	C	R35	I	---
32	Phosphorus pentachloride	C	R35	I	---
25	Sulfuric acid (10% wt.)	C	R34/R35‡	I/II/III‡	---
57	Phosphoric acid	C	R34	II	---
43	Hydrochloric acid (14.4% wt)	C	R34	II/III	---
53	Sulfamic acid	NC			---
Inorganic bases					
18	Potassium hydroxide (10% aq.)	C	R34/R35‡	I/II/III‡	NPC
42	2-Mercaptoethanol, Na salt (45% aq.)	C	R34		NPC
21	Potassium hydroxide (5% aq.)	NC			5.22
24	Sodium carbonate (30% aq.)	NC			2.33
Inorganic salts					
20	Iron (III) chloride	C	R34	I	---
52	Sodium bicarbonate	NC			0.11
54	Sodium bisulfite	NC			1.0
Electrophiles					
5	Methylacrolein	C	R34	II/III	4.11
14	Allyl bromide	C	R34	II/III	7.17
48	Glycol dibromacetate (85%)	C	R34	II/III	7.67
6	Phenethyl bromide	NC			0
31	2-Bromobutane	NC			2.44
33	4-(Methylthio) benzaldehyde	NC			0.89
39	2-Ethoxyethyl methacrylate	NC			1.56
46	Cinnamaldehyde	NC			3.71
Soaps/surfactants					
37	Sodium undecylsulfate (33% aq.)	NC			1.67
41	20/80 Coconut/guano soap	NC			2.67
60	Sodium lauryl sulfate (20% aq.)	NC			6.78

*PII = primary irritation index (EC/ETOC, 1993; Bagley et al., 1996); †NPC = not possible to calculate; ‡ = the animal data and other supporting information are not sufficiently comprehensive to enable unequivocal classifications to be made, although it is more probable that R34 (II/III) labels are appropriate. Chemical identification numbers are as in Table 2.