

2) 皮膚刺激性試験における動物実験代替法：ヒトパッチテストの方法と問題点

松永佳世子

藤田保健衛生大学医学部皮膚科

1. はじめに

1996年9月、「動物実験代替法毒性試験法のバリデーションおよびそれを行政的に受け入れるためのハーモニゼーションに関するOECDワークショップ」の最終報告がだされそのワーキンググループ第3班は、「化学物質と化学製品試験評価に適應される試験戦略と組み立て」を担当し、その中で、皮膚刺激性/腐食性試験戦略案をうちだしたり¹⁾。そのチャートは小島が²⁾示している。その中で注目すべきは、適切な(valid) *in vitro*皮膚腐食性試験があり、試験結果が陰性で、かつ適切な(valid) *in vitro*皮膚刺激性試験がなく、倫理的にヒトパッチテストを行うことができる場合はヒトパッチテストを行うとされている事項である。

このOECD最終報告¹⁾の問題点は、1) 適切な*in vitro*皮膚刺激性試験が現在あるのか、2) 未知の化学物質の皮膚刺激性試験をヒトパッチテストする前に適切な*in vitro*皮膚腐食性試験が存在するのか、3) 腐食試験が陰性であれば、ヒトパッチテストを行うが、その場合に科学的、倫理的、文化的問題点をクリアできるか、4) この戦略で本当に化学物質の皮膚刺激性が判定できるか、以上4点に絞られる。1) 2) については小島が詳細報告している²⁾。筆者は3) と4) の問題点を皮膚科医の立場から検討する。

1997年4月にOECDは化学物質試験OECDガイドライン「ヒトボランティアにおける急性皮膚刺激試験」の第1案を作成した³⁾。その後各国からのコメントを参考にして1997年11月に第2案がだされている⁴⁾。しかし、この第2案についても、同意が得られずさらにジョイントミーティングで検討されることになった。

2. 化学物質試験OECDガイドライン「ヒトボランティアにおける急性皮膚刺激試験」第2案(1997年11月)⁴⁾と問題点

以下に第2案の内容を概説し、問題点を述べる。第2案の内容は『』で示し、第1案に第2案で新たに追加された部分はアンダーラインを付けて示した。

【はじめに】

1. 『現在、有害性を確認するためのヒト皮膚刺激性の予知は、主に実験動物を使用することに依存している(OECD Guideline 404, 1992)⁵⁾。ヒト曝露頻度が高い化粧品や洗剤などの化学物質には危険性評価はしばしばヒト皮膚パッチテストが行われている。ヒト試験は以下の目的に合っている。1) 動物試験で得られたデータをヒトに外挿しやすくする、2) 動物種よりヒトで化学物質を試験することでヒトの健康障害を直接感知できる、3) ヒトの曝露が高い物質の危険性評価を提供する。このガイドラインは直接ヒトにおいて皮膚刺激性データを得ることを許可するガイドラインである。その目的はある物質が急性曝露によって明らかな皮膚刺激性障害を起こすか否か決定することである。方法は英国によって開発され広く検討されてきた⁶⁻¹³⁾。』

(問題点)

第1案にはフランスから、「この方法は国際的にヒト皮膚に使用される化粧品と製品に限られるのが正しいと思われる。洗剤や殺虫剤には使用すべきでない。」とのコメントがなされており、それに対して「ガイドラインの目的とするところは、すべての倫理的配慮がなされれば、すべての化学物質に使用できることである。いかなる適

用制限も倫理的観点に基づくのであって、化学物質の種類に基づくものではない。」との答えがなされている。ドイツからは「これはヒトボランティアでの有害性同定を目的とした最初の創案ガイドラインだ。ドイツは製品の適合性を試験する目的で商品の臨床試験の国際的に認められたガイドラインは歓迎するが、化学物質の有害性同定のガイドラインは歓迎しない。」とのコメントに対して、「このコメントは技術面でなく政治に関するものであり、各国代表調整委員に進言する必要がある。」と答えられている。

本ガイドラインの真の意味は、まず、ヒト皮膚刺激性試験の倫理的かつ科学的な合意を国際的に得ることにあると思われる。この点には同意できる。しかし、皮膚刺激試験のためのヒトパッチテスト方法を、ただ単に動物試験の代替法として、十分な安全性と有用性のvalidationなく決定してはならない点は譲れない。この点について、次の項目をみてみよう。

[安全性／倫理基準]

2. 『このアプローチを適応する場合は、いかなる地域の法律要項も満足し、Helsinkiガイドライン¹⁴⁾を完全に満たすもので、Good Clinical Practiceの原則¹⁵⁾に従い、そのプロトコールは試験開始前に審査され、独立した倫理審査委員会によって受け入れ可能と考えられ、実験は試験施設の国内の法律に従って施行されねばならない。』

(問題点)

この条件によれば、各国の法律が許可する試験方法に沿ったガイドラインでなければ、実際は試験が行われないことになる。したがって、ガイドラインに沿った試験方法へ各国が足並みを揃えるには、以下の個々の内容が十分に討論され、各国において合意されなければ難しい。個々の内容をみてみよう。

[初期考慮事項]

3. 『本試験がいかなる明らかな健康障害の危険性も起こさないことを示すために、経皮吸収データを含む毒性プロフィールについての適切な情報が入手可能であること。』

(問題点)

経皮吸収は*in vitro*の適切な情報はないと思われる。適切な情報の内容には、動物実験データも含んでよいのか。動物実験を行った結果、なんら明らかな皮膚障害の危険性がないという点が必要であるなら、動物実験代替法にはならない矛盾がある。

4. 物質は以下の場合にはヒトで試験されてはならない

『i) *in vitro*¹⁶⁾ないしは*in vivo*のいずれかの予知試験で刺激性あるいは腐食性が示されている、

ii) ヒト皮膚に対する腐食潜在性が構造活性相関あるいは強酸、強アルカリ予備¹⁷⁾などの物理化学的性質で予知できる、

iii) 皮膚感作性あるいは気道感作性を示す、

iv) 試験条件下でなんらかの急性毒性障害、遺伝子毒性、生殖ないしは発癌性障害のいずれかを示す。』

(問題点)

オーストリアから、「皮膚感作性の試験に先立ち、皮膚刺激性が検討されているはずだ。それならば、ヒトにおいて刺激性をパッチテストする必要はない。」との意見が第1案にだされている。これに対して、「皮膚感作性試験は必須予備試験には入っていない。」と答えている。

それでは、初期事項の「適切な毒性プロフィール」は具体的になになのか。また、このような適切な毒性プロフィールの存在する、かつこれらの危険性を示していない物質の皮膚刺激性を後に述べられる20% aq.SDS (これ自身皮膚刺激性が明らかに示されている)を陽性コントロールに、化学物質をそのまま貼付し、しかも貼付時間はボランティアの拘束時間を極端に長くとする実験方法で、慎重過ぎるプロトコールで進む必要があるのか。

5. 『ヒトボランティアの選択の詳細は文献を参照^{8, 18)}』

(問題点)

ここで引用されている文献¹⁸⁾の内容を紹介しておこう。なお、出典がContact DermatitisとFood and Chemical Toxicologyの2つが列記されているが、後者が正しい。

Walker AP、Basketter DAらの本論文では、被験者の数は適当な数 (adequate number)と記載されており、特定されていない。被験者として満足すべき基準 (inclusion criteria)として、1) 情報を十分伝えられた (informed) ボランティアで、関連した年齢、性、人種および健康状態に相応しいもの (appropriate of relevant age, sex, race, and health condition)、かつ2) 試験情報シートに明らかにされた条件に従うことに同意するパネリスト (panelist agreeing to follow the conditions specified in the Study Information Sheet)であることが必要。また、除外基準 (non-inclusion criteria)として1) もし特に要求されないなら、妊娠、授乳中である、2) 評価する際に妨害する可能性のある瘢痕や痣 (例：刺青、瘢痕、日焼け)がある、3) 皮膚反応に影響を与える薬剤や既往歴がある、4) 特に要求されていないなら、試験部位に刺激を受けた皮膚がある、5) 試験の目的を妨害する活動性の皮膚疾患がある、6) 他の同様の試験に参加している、7) 以前に試験に参加しており、本試験と前回の試験の間に適切な間隔がない場合を挙げている。また、中止基準 (withdrawal criteria)として、1) 試験情報シートの条件に従わない場合、2) 疾病に罹患するか、事故に遭遇するか、試験中に試験結果に影響を与える可能性のある状態になった場合、3) 試験にこれ以上参加したくないと希望した場合、としている。製品に適した使用グループに合わせて、性別、年齢、人種、皮膚タイプのボランティアが選択されるべきとしている。

もし、ここで文献のみを示すのであれば、除外し、試験原則で詳しく述べた方がよいと思う。US FDAからも、「この時点で印刷中の文献を引用するのは適切でない。」と意見がだされている。これに対して、「印刷物としてガイダンスが出される前には引用文献も出版されている。」と答えられている。

[試験原則]

6. 『被験物質は単回曝露 (exposure) でヒトボランティアの被覆皮膚に貼付。15分と30分間、次に1時間ずつ長くして4時間まで試験物質を貼付。これで刺激は最小に

抑える。但し、弱刺激物質を試験するために、24時間閉鎖パッチテストも可。24、48、72時間後に判定し、それぞれが十分な皮膚刺激とみなす反応ができれば処置を終了。』

(問題点)

試験期間と方法：OECD法の最大の欠点は、刺激がなく安全だと判定する物質の最低必要試験期間は15分と30分を省略できても12日間と10時間、両者を加えると18日間と10時間45分になる。しかもボランティアは毎日試験結果評価を受けるために通う必要がある。入浴ないしはシャワーの可否については一切記述がないが、これが制限されると殆ど不可能に近い試験ではないか？OECDのこの件に関する回答は、「ボランティアの選択は試験とその要する時間を説明する試験施設に任されている。この試験をすすんで協力してくれるボランティアは、いるはずだ。」であった。社内試験でも施行することが可能だろうか？日本からは「本ガイドラインは相対的に強い刺激物質を検出するために創案されている。これは最大曝露時間が4時間だということでも示されている。しかしながら、ガイドラインはまた、化粧品にも適用される。その場合は、化粧品の弱い刺激性も検出する十分に感度のよい方法であるべきだ。日本は弱い刺激性を検出するためには24時間閉鎖パッチテストが必要と考えている。」とコメントされ、残念ながら、これには直接の答えはなかったが、第2案では但し、弱刺激物質を試験するために、24時間閉鎖パッチテストも可。が付加されている。US NIOSH (アメリカ合衆国国立職業衛生安全性研究所) は「クローズドパッチよりROAT (repeated open application test)をまず行う方が安全だ。」と意見を述べているが、「ガイドラインを創案した専門家に考慮してもらうようにする。」と答えられているが、第2案では活かされていない。

7. 『刺激反応を呈した試験パネルの刺激反応を、同時に施行した陽性対照物質に対する反応と、相対的な比率で評価⁵⁾。』

(問題点)

ここで引用されているYork Mら⁵⁾の論文では、試験物質としてEC (ヨーロッパ共同体) 危険製剤条例 (EC Dangerous Prepa-

rations Directive)¹⁹⁾の中で刺激性でありR38と分類された6種類の物質が使用されている。それらのパッチテスト濃度は、NaOH 1% w/v aq., Acetic acid 10% w/v aq., SDS 20% w/v aq., Diethanolamine (99% pure) as is, Cetyl trimethyl ammonium chloride (25% aq.) as is supplied, Limonene Dextro as is. かれらは、この論文ではこれらの刺激物質をWebiril, Hill Top, Finn chamber, Van der Bendの4種類の異なるパッチテストユニットを使用して、貼付時間を決定するために、まず少数(4名まで)のパネリストに試験し、その時間を決定し、15名に本試験を行った。本試験の結果はSDS20%aq.では7/15から11/15が刺激反応を呈している。その結果として、4名の予備試験では15名の本試験の結果を予測できず、その理由は刺激閾値は個人差が大きいからとしている。すなわち、刺激閾値は個人差に左右されるので、これらの刺激物質の陽性コントロールが刺激反応を評価するときに必要なと結論したのであろう。この場合、刺激反応を最低限にして、被験者に負担をかけないことをめざしたと、述べられているが、SDSなどの刺激物質の濃度を下げることの方が、その目的に合っているのではないか。なぜなら、化粧品の中にSDSが20%で使用されることはないので、この条件設定は危険かつ、実用と合わない。SDSは1%以下でも刺激反応は惹起できるし、陽性コントロールとしても十分役割を果たせると考えられる²⁰⁾。

[試験方法]

ヒトボランティアの選択

8. 『このガイドラインはヒトボランティアを使用するためのものである。アトピーの症例を選択することは特に必要ではない。一般的に健康で、18歳以上で、妊娠授乳中でなく、試験物質に対してアレルギーのない、皮膚炎の症状のないもの。ボランティアの選択は皮膚科医の指示を受けるべき。』

(問題点)

アトピーの症例について、特別に述べる必要があるのだろうか。筆者らの共同研究によって²¹⁾、アトピー性皮膚炎患者においては、1, 3 -butylene glycolなどに対する刺激反応はnon-atopyの接触皮膚炎患者より強くしかも反応が遅延することが明らか

になっている。

9. 『液体試験物質は一般的には希釈せず、固體は、必要なら粉砕してよいが、皮膚としっかり接触させるため、少量の水(典型的には0.2ml)か、他の基剤で湿らせる。個々の対象が同量の試験物質を与えられるよう注意。基剤の試験物質が皮膚に刺激を与えるか考慮し、基剤の対照パッチをすべき。』

(問題点)

固體の被験物質0.2gを0.2mlの水あるいは適切な基剤で湿らせるか、ガーゼパッドを湿らせてその上にのせることは、本当に定量的なのか?すでに50%の濃度になっている。それならば、試験前に50%に希釈すると決定しておいた方がよい。試験物質の性状を把握せずにヒトパッチテストは施行できない。

[対象数]

10. 『最低30人のボランティアで、3分の1より少なくない者が同性に属する。数が多すぎないように、対象数は統計的分析に適切な評価を与えるに十分であるべきだ。』

(問題点)

日本では化粧品の原料と製品安全性を評価するためのヒトパッチテストは日本人で最低40名必要とされている²²⁾。対象数に関しては、オーストリア、フランスは多すぎるとしており、日本は「40名から30名に減少してよい統計学的根拠がない。」とコメントしている。US FDA (アメリカ合衆国食品医薬品局)は「刺激性の試験には25-30名の対象が適切であるが、十分な濃度で貼付されれば、すべての対象に陽性反応がでるので『少なくとも』30名とする必要はない。」と述べている。

試験の目的、貼付条件によって、刺激性の検出に必要な対象数は可変と推定される。低刺激性の化粧品を閉鎖貼付して、蒸留水の刺激性と比較する試験と、20%SDSaq.と化粧品原料のas isを比較する試験では、後者の方が対象は少なくすむのではないか。しかし、以上についての明確なデータはないので、今後、パネリストのサンプルサイズについては、多施設による研究で確認し

ていく必要がある。ガイドラインの「対象数は統計的分析に適切な評価を与えるに十分であるべきだ。」に同意する。

[試験物質の貼付法]

11. 『試験物質は適した皮膚部位、例えば上腕外側に、ガーゼパッドを付けた密封性のあるチャンバーによって貼付。正常の使用状況で化学物質が付く可能性の最も高い部位で行い、対象すべて同じ部位。一般的にはパッチは直径25mmとし、もっと小さいパッチ、例えばフィンチャンバーも使ってよい。』

(問題点)

貼付部位も限定すべきだとスイス、CAL EPAから意見がだされている。部位によって皮膚の厚さも大きく異なり、刺激試験の結果が異なることが予想される。須貝は²³⁾肩甲、上腕伸側、大腿伸側、傍脊椎部において弱刺激物質である蛍光色素の部位による刺激性を検討した結果、傍脊椎部>肩甲>大腿伸側>上腕伸側であったと報告している。アレルギーについても上背部が最も感度が良いとされている²³⁾。

[貼付量]

12. 『パッチは単位面積あたり適した量を放出すべき。すなわち50-100 mg/cm²が最適。液体試験物質は一般に0.2mlを、固体は一般に0.2 gの試験物質を湿らせてガーゼパッドに付ける。』

(問題点)

項目9で述べた。固形物では正確に定量できない。

[貼付時間]

13. 『許容できない強い反応をさけるために、試験には慎重なアプローチが適用されねばならない。段階的な貼付方法が、陽性ではあるが重度ではない刺激反応を起こすことができる。パッチは15と30分の時間ではじまり1、2、3、そして4時間まで段階的に長くする。新たな部位での24時間閉鎖貼付は、遅延型の刺激反応を適切に評価するために、短い貼付結果から生ずる皮膚刺激がない場合に行う。試験物質の段階希釈濃度で、最終使用目的の非刺激濃度を試験してもよい。』

(問題点)

項目6で述べた。貼付時間があまりにも段階的で煩雑であり、試験時間がかかり過ぎるために実行は困難である。新たな化学物質であれば、まだしも、化粧品や最終製品では現実的ではない。この点に関してはオーストリア、フランス、日本、各団体からも納得できないとの意見が多くだされている。

14. 『物質の貼付は常に未処置部位に行う。』

(問題点)

とくになし。

15. 『曝露期間の最後に、残りの試験物質は、もしできれば (where practicable)、今ある反応を変えたり、表皮を傷めることなく、水か適切な溶媒で除去されるべきである。』

(問題点)

とくになし

[曝露時間の制限]

16. 『貼付時間を層別増加することに加えて、もし試験物質が強い刺激を起こすと想定できる時は、パイロットグループのボランティアで適用時間を少なく行う必要がある。その後の進行は得られたデータに基づいて決定。後続のパッチは48、72時間判定が終わった後に貼付する。』

(問題点)

しかし、項目7で引用したYork Mら²⁴⁾の論文では少数のパイロットスタディーは強い刺激反応の予知として十分な意味をなさなかったと述べている。この場合もさらに短い曝露時間を設定して、72時間まで観察するわけであるが、被験者の拘束時間が長くなる。試験物質の実際の使用濃度に合わせて、段階希釈で貼付し、試験時間の設定をもっと単純にすべきではないか。

[臨床所見観察と皮膚反応の程度の判定]

17. 『パッチ除去直後とパッチ除去後1-2、48、72時間目に判定。もし、その反応の可逆性を決定することが必要な場合は、観察期間は72時間より延長してもよい。経皮水分蒸散が反応評価に考慮されるべきである。』

表1.

評点	反応
0	反応なし
1	弱陽性反応（通常処置部位殆どを占める軽度の紅斑とあるいは乾燥）
2	中等度陽性反応（通常明らかな紅斑とあるいは乾燥、処置部位を越えることがある）
3	強陽性反応（強いしばしば浮腫を伴った拡大する紅斑とあるいは痂皮形成）

試験前後の皮膚の状態は正確に記載し、皮膚刺激は評点をつける。皮膚刺激は表1の程度にしたがって点数化し、記録する。』

（問題点）

この判定は皮膚科医にとっても難しい。評点1と2の違いが特に解りにくい。軽度と明らかな紅斑の違いをどう判定するか。また、わずかな紅斑は判定しないのか。この点についてはフランスからも同様の疑問がだされている。なお、これに対する答えはなされていない。本邦ではわずかな紅斑を±、明らかな紅斑を+、紅斑に浮腫が伴った場合を++、小水疱（seropapuleのことであるが）があれば+++と判定している²⁴⁾。本邦基準はアレルギーと刺激をわけては考えていないため、より良い判定基準とは必ずしもいえない。筆者らが刺激性の評価を行う場合は、まず明らかなアレルギー反応の症例は除き、本邦基準で±を0.5、+を1、++を2点として算定し、須貝の提唱した皮膚刺激指数を算出している²⁵⁾。化粧品や外用剤の刺激性の評価に長く用いてきている。しかし、この方法が刺激性を評価する最も良い方法であるか、否かについては、十分な検討がなされているとはいえない。OECDガイドラインの評点1では、乾燥症状（dryness across most of the treatment site）があることと、軽度の紅斑（mild erythema across most of the treatment site）があることが、同等の程度の刺激と判断されている。これは正しいのだろうか。これまで、筆者らは、軽度の紅斑より、乾燥のほうが、弱い刺激反応と捕らえてきた。すなわち、表皮角層の軽度の障害があるが、炎症を起こしていない段階が乾燥である。この評点はいかに作成されたのか？COLIPAでは1995年11月にだされたCosmetic Product Test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibilityの中で、刺激反応の判定基準としてFrosch PJ & Kligman AM²⁵⁾からの引用とし

て紅斑と乾燥（落屑）および浮腫の3症状から評価する方法を付記5（Appendix 5）として掲載している¹⁹⁾。Frosch PJ & Kligman AM²⁵⁾の原著では紅斑、落屑、亀裂について点数化し、これの総得点で石鹸の刺激性を評価している。

18. 『4時間未満の曝露で1以上の反応が得られたボランティアにとっては、もし4時間試験物質に曝露されれば、より強い反応が惹起されることが、予測される。一旦1以上の反応が得られたら、そのボランティアはさらに、その試験物質で処置される必要はない。刺激性を観察することに加えて、他の作用についても記録され十分記載されねばならない。ボランティアはパッチ貼付について（例：知覚作用）また、パッチ除去時の即時反応（蕁麻疹）を認識できるように訓練された判定者について、なんでもコメントすることを奨励されるべきである。そのような観察は刺激作用を示していないかも知れないが、それらは必要なら報告書に含まれるべきである。もし、明らかな反応であれば、それらは適切なボランティアのケアを確保するために試験の管理上考慮されるべきである。』

（問題点）

5行目の文章は変な内容である。The volunteers should be invited to make comments related to the patch applications (e.g. sensory effects) and assessors trained to note immediate responses (i.e. urticaria) when the patches are removed. と書かれているが、・・・, and the assessors should be trained to note・・・の間違いか。後者であれば、「また、判定者はパッチ除去時の即時反応を認識できるように訓練されているべきだ。」となる。

フランスから「1以上の反応が4時間未満の貼布で生じた場合、処置は終了される。この場合、評点は1のままなのか、それよ

り高いのか。この質問は結果の統計学的分析に重要である。」とのコメントがなされている。これに対して、「評点は1のままだ。しかし、曝露時間の短縮と関係する。これらの2要因は一緒に評価方法に十分であるべきだ (should be sufficient)。本試験ガイドラインは厳格な基準を要求するための等級をつけることを目的に計画されていない。」と答えられている。

CAL EPA (カリフォルニア州環境保護局) からは「異なる曝露時間に対する化学物質の、一次皮膚刺激性のレベルを比較するために、刺激指数としての評価システムが決定されるべきだ。」との意見がだされているが、これには答えがない。

つまり、緻密な試験ではないということだろう。しかも評価システムが確立していない。それにしても、時間が掛かり過ぎる。

19. 『個々の試験物質評価において、得られた重要なデータは4時間曝露された後に刺激反応を示した、あるいは(もし、曝露が続けられれば)示したと予測されるボランティアの数である。個人が反応(もしあるなら)を生じるのに必要な時間は評価すべき結果の一部にはならない。これはボランティアの適切なケアを確保することのみ関係している。』

(問題点)

項目18でもコメントされているように、曝露時間が異なるにも関わらず、この曝露時間を考慮せずに、陽性コントロールと比較する方法が、論理的、統計学的に果たして正しいのか。この点も問題である。

ただし、本項目には各国、団体からのコメントは記載されていない。

[陽性対照物質の選択]

20. 『ルーチンに陽性対照物質を含むことによって、それを基準として使うことができる。皮膚刺激は絶対的な現象ではない。すべての物質は皮膚刺激を起こすことができ、それは投与量と付き方と範囲による。ヒト皮膚刺激試験は相対的であり、既知化学物質の刺激性と関係づける必要がある。』

(問題点)

投与量 (dose) には濃度も含まれているのか。皮膚科医にとっては、concentration :

濃度を入れてもらえると、理解しやすい。concentration が刺激に重要な因子になるという、認識が原案作成者に薄いのではないか。この点は、陽性コントロールとして SDS20% を選択したり、試験物質を項目12. 『パッチは単位面積あたり適した量を放出すべき。すなわち 50-100 mg/cm² が最適。液体試験物質は一般に 0.2ml を、固体は一般に 0.2g の試験物質を湿らせてガーゼパッドに付ける。』といった面積当たりの物質質量のみに注目し、基剤中の濃度を考慮しない方法でよいとする考えの基本になっていると思われる。

21. 『陽性刺激対照として、臨床研究でも広く用いられてきた^{5, 20, 26)}、99%以上の純度の SDS が好ましい。SDS はまた、容易かつ広く入手可能で他の副作用がない。ノナノイン酸は、SDS と異なる作用形式をもち、陽性対照として使用できる。』

(問題点)

デンマークから「20% w/v が陽性対照物質として推奨されている。しかし、とても高い濃度だ。一次刺激として作用するだけから腐食作用まで、本物質に対する反応には個人差が大きい。ノナノイン酸などの他の作用モードの刺激物を SDS の代替物質として含む方が関連性が確かになるだろう。」とコメントされ下線の部分が追加されている。

ドイツからは SDS が唯一の陽性対照物質とされるのは疑問だ。この物質は洗浄剤 (20°C で 45mN 以下の界面張力) の陽性対照物質であり、このタイプの参考物質は他の物質 (洗浄剤でない) が試験される場合は有用性はないであろう。したがって、例えば水酸化ナトリウムおよび酢酸などの他の物質が陽性対照物質として考慮される必要がある。」との意見がだされている。

日本からは「陽性対照物質として 20% を義務として使用することは受け入れ難い。なぜなら、20% の SDS には強い刺激反応と色素沈着を起こす日本人が多いからである。皮膚反応には大きな人種差がある。もっと低い濃度の SDS を使うオプションがあるべきだ。また、ガイドラインは陽性対照物質はボランティアの 33% 以上に刺激反応を起こすべきだと明言している。しかしながら、

このような高い頻度は日本では受け入れられない。われわれは陽性対照複合物を使う必要があると考えている。」とコメントされている。

以上のコメントの中で最後の日本のコメントだけに「本ガイドラインは陽性対照物質を必要 (require) とはしていない。」と答えられている。これが示すところはなになのか。いずれにせよ、20% SDS を貼布することは必要以上の刺激反応をボランティアに起こさせる可能性があるために、再考を要する。しかも、この点については、試験そのもののデザインを変更することも含めて考える必要がある。

22. 『SDS 曝露(exposure)はパネルにキャリアプレーションを付け、参考点として働く。SDS は EU (ヨーロッパ連合) 基準²⁰⁾ によれば皮膚刺激物質と分類されている。しかしながら、SDS が化学物質の皮膚刺激物質とみなされるべき反応閾値レベルなのか、それに近いのか、否かは明らかではない。そこで、近い物質として使用するのではなく、むしろ、少なくとも 1 地域 (the EU) でそうみなされているように、明らかな急性刺激を皮膚に起こす最小レベルの基準点として考えるのがより妥当で、それは 20% w/v 水溶液である⁹⁾。20% w/v SDS を陽性対照として推奨するが、使用する SDS の最終濃度はボランティアパネルの感受性によって選択されるべきである。これはまた、ボランティアのケアという意味で好ましい。この陽性対照による経験では、パネルの反応率は実際に様々で、その平均値は約 65% である^{5,6,8,11)}。反応率が 33% 未満の場合は、刺激物質を識別する試験能力は疑問視される。これは低刺激性の物質が陽性対照と統計学的に比較される時に特にそうである。』

(問題点)

ここでの下線部分の変更点は日本などの意見を反映して追加されたものと考えられる。陽性対照物質が必ずしも SDS である必要もなく、濃度も 20% SDS としなくてもよいことになる。さて、国際的な基準として各国間のデータの比較をどうするのか。

[データと報告]

23. 『データはパッチ除去後 24、48、72

時間後の刺激性と他のすべての観察された作用を一人一人別個に示す表形式でまとめる。』

(問題点)

特に問題ない。

[データ評価/解釈]

24. 『この試験の目的は、急性曝露によって明らかな皮膚刺激有害性のある物質が示すか否か決定することである。物質が陽性対照物質より多い、あるいは同等の試験パネルでの皮膚刺激頻度を示すならば、それは明らかな皮膚刺激物質とみなされる。一方、陽性対照より充分かつ明らかに少ない試験パネルでの反応頻度を生じるなら、それは明らかな皮膚刺激物質とみなさなくてよい。ボランティアケアという意味において得られた中間結果を最終的なデータ、例えば、刺激反応を示すパネルの割合などと混同しないことが重要である。皮膚刺激に対する感受性において個人差と試験物質の一般的な刺激性という問題を混同しないことも重要である。』

(問題点)

項目 21 で陽性対照物質は require されていないとしているが、試験データの解釈には陽性対照物質が必須になる。項目 21 の OECD 側の答えと大きく矛盾する。ここでも、何を陽性対照とするかは、どのような刺激、あるいは安全性をこの試験が明らかにするのか、その点にあると思われる。significant: 明らかな刺激性のみを検出するのが、目的とするのか、あるいは、化粧品としての安全性を考慮した、低い刺激も検出するための試験にするのか。前者の場合であれば、化粧品や最終製品の試験としてクリアしても、そのまま、市場には出し難い試験となる。これだけの時間とおそらく多額となる費用をかけても、有用性は化粧品や最終製品の試験としては少ないだろう。この点をいかに解決するかが、問題である。

[試験報告書]

25.

この項目に関しては特に問題ないので記載しない。原文を参照されたい⁴⁾。

3. 各国、各団体からの全体を通してのコメント

この化学物質試験 OECD ガイドライン「ヒトボランティアにおける急性皮膚刺激試験」の第2案は第1案に各国、各団体からコメントがだされて改定され第2案になっている。全体を通してのコメントを紹介する。

1. オーストラリア：試験前、試験中に倫理的な考慮がなされていれば、第1案は動物からヒトに外挿する結果の不確かさを排除している点でガイドライン 404 より明らかに改善されている。

2. オーストリア：ヒトにおいて施行される試験を取り巻く倫理的考慮に関して言葉に表していることを評価し、第1案に表現された以下のどんな内容も受け入れない。

3. フランス：動物とヒトの結果間に不一致があった場合どの結果を優先するかを問題にすべきだ。

4. ドイツ：国際的に受け入れられる商品の臨床試験についての国際的なガイドラインを見たい。有害性同定より、むしろこのようなガイドラインの目的は製品の適合性をテストすべきだ。このような試験については行政政治的な背景でのワークショップを開くべきだと提案。

5. イタリア：第1案に満足しコメントなし。

6. スイス：第1案が動物試験に適切な代替法であると信じると表明。パッチテストに関して、試験パッドと皮膚の間の物質の分布に影響を与えるので、性状と濃度、皮膚に固定する圧力、被覆材料などについてもっと詳細について決めるべきだ。

7. ノルウェー：原則的にヒトで試験することには同意しないが、ガイドラインは拒否せず。試験物質に関しては、この方法では試験の需要が増加する可能性があり批判的。製剤中の個々の化学物質の本来の性質に基づいて、製剤を分類するためのモデルを開発する方がよいのではないか。

8. アメリカ合衆国食品医薬品局 (US FDA)：第1案は、刺激とアレルギー反応を区別することが困難な場合があると述べるべきだ。

9. 国立環境衛生安全性研究所 (NIEHS)：

第1案は、主題の他に最も重要かつ最新の参考文献に支持された、高度に磨かれ正しく明解なガイドラインであると感じた。

10. 国立職業衛生安全性研究所 (NIOSH)：未知の刺激物質に対しては、その刺激とアレルギー反応を区別しやすくするためには反復塗布試験ないしは使用試験を行う方がより安全ではないかとコメント。

11. 日本：第1案はかなり強い刺激性を検出するために創案されている。この点は最高4時間貼付することに反映されている。しかしながら、本案は化粧品にも応用される。その場合は、方法は化粧品の弱い刺激性を感知するに十分な感度を持っているべきだ。日本は弱い刺激性を感知するためには24時間クローズドパッチテストがよいと思う。

4. OECD 第2案に対する疑問点と今後日本で検討すべき事項

このガイドラインは動物で行っていた、あるいは行っている、明らかな、つまり、かなり強い刺激物質の検出をいかにヒトを使って行うかが目的と考えられる。決して、化粧品や最終製品の、安全性を確保するために行うことを目的とはしていないことを、冒頭で明記すべきである。皮膚刺激性は、安全性と表裏一体である。もし、皮膚刺激性を安全性の指標として、考えるなら、このガイドラインは受け入れ難いものである。すなわち、SDS20%水溶液と比較して刺激がなければ、刺激性がないとする場合、その刺激は明らかに significant すなわち、強い刺激性を持っているものに限られるからである。

一方、安全性を確保するためには、現在施行されている24時間貼付試験が本ガイドラインより、明らかに優れている。化粧品や最終製品を安全性の点で優れたものにするためには、弱い刺激も見逃してはならず、さらに、より良い製品を作っていくことが、常に望まれる。そのために行うべき検討事項は多い。

そこで、第一にガイドラインについて提案したい。1) 目的を明らかにし、このガイドラインが動物ではなく、ヒトを使用して、なにかの物質あるいは最終製品の安全

性を確保するための試験ではなく、明らかな刺激性を有するか否かを確認する、初期のチェック試験であることを明記する、2) その上で、試験方法の再検討を行う。それならば、第1案も理解しやすいが、日本では倫理面で受け入れ難い点が多いと思われる。

第二に、特定の物質あるいは化粧品や最終製品の安全性確保のために行う、ヒト皮膚刺激試験は、別のガイドライン作成を考える。この時に重要な点は、実際に使用された時に、その安全性が確保される最も良い方法を開発することである。現在行われている、24時間閉鎖貼付パッチテストと市販後の製品の安全性との関連性から、まず調査をすすめる必要がある。さらに、ヒトパッチテストを行う場合、1) 対象数、2) 人種差、3) アトピー性皮膚炎も含んだ肌質と刺激性の問題、4) 男女差、5) 年齢差、6) 貼付部位、7) 洗浄剤の希釈濃度、8) 貼付時間、9) 判定基準、10) 陽性対照物質、11) 評価の刺激指数算出法の検討など、今後、明確にしていかなければならない多くの問題が存在する。今後、諸兄の御協力をお願いしたい。

5. 文献

- 1) OECD Environment Directorate: Chemicals Group and Management Committee (1996) Final report of the OECD workshop on harmonization of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods, Test guidelines programme, September 18-19th, Paris.
- 2) 小島肇夫 (1997) 皮膚刺激性試験における OECD ガイドラインと動物実験代替の現状と方法論について、動物実験代替法の現状と OECD ガイドラインに関するワークショップ・プロシーディング、12月、東京。
- 3) OECD Environment Directorate: Chemicals Group and Management Committee (1997) OECD guidelines for testing of chemicals, Proposal for a draft new guideline. Acute dermal irritation study in human volunteers, April.
- 4) OECD Environment Directorate: Chemicals Group and Management Committee (1997) Human skin patch testing: Comments on the guideline proposal, Test Guidelines Programme, December 3rd-4th.
- 5) York, M., Griffiths, H.A., et al. (1996) Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential, *Contact Dermatitis*, 34, 204-212.
- 6) Basketter, D.A., Griffiths, H.A., Wang, X.M., et al. (1996) Individual ethnic and seasonal variability in irritant susceptibility of skin: the implications for a predictive human patch test, *Contact Dermatitis*, 35, 208-213.
- 7) Basketter, D.A., Reynolds, F.S., Use of human volunteers for hazard and risk assessment of skin irritation. In *Volunteers in Research and Testing*, Combes R, Hubbard A, Illingworth J (Eds), Taylor and Francis, in press.
- 8) Basketter, D.A., Blaikie, L., Reynolds, F.S. (1996) The impact of atopic status on a predictive human test of skin irritation potential, *Contact Dermatitis*, 35, 33-39
- 9) Dykes, P.J., York, M., Dickens, A.D., et al. (1995) A stepwise procedure for evaluating irritant materials in normal volunteer subjects. *Human and Experimental Toxicology*, 14, 204-211.
- 10) York, M., Basketter, D.A., Cuthbert, J.A., et al. (1995) Skin irritation testing in man for hazard assessment - evaluation of four patch systems, *Human and Experimental Toxicology*, 14, 729-734.
- 11) Basketter, D.A., Griffiths, H.A., York, M., et al. (1995) Interlaboratory evaluation of a human predictive test of skin irritation hazard, *Allergology*, 10, 454.
- 12) Basketter, D.A., Whittle, E., Griffiths, H.A., et al. (1994) Identification of irritation and corrosion hazards to skin: An alternative strategy to animal testing, *Food and Chemical Toxicology*, 32, 539-542.
- 13) Basketter, D.A., Whittle, E., Griffiths, H.A., et al. (1994) The identification and classification of skin irritation hazard by a human patch test, *Good and Chemical Toxicology*, 32, 769-775.
- 14) World Medical Association (1993) Declaration of Helsinki, Recommendation guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, June 1664, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, October 1983 and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989. Proceeding of the XXVIth Conference, Geneva.
- 15) References for Good Clinical Practice
- 16) Whittle, E., Basketter, D.A. (1994) In vitro skin corrosively test using human skin. *Toxicology in Vitro*, 8, 861-863.
- 17) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., et al. (1988) Classification as corrosive or irritant to skin of preparations containing acidic or alkaline substances without testing on animals. *Toxicology in Vitro*, 2, 19-26.
- 18) Walker, A.P., Basketter, D.A., Baverel, M., et al. (1996) Test guidelines for assessment of skin compatibility of cosmetic finished products in man, *Food and Chemical Toxicology*, 34, 651-660.
- 19) 88/379/EEC Council Directive of 7 June 1988 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the classification, packaging and labeling of dangerous preparations, *Official Journal of the European Communities L 187*, 4(1988).

- 20) Lee, C H, Maibach, H.I. (1995) The sodium lauryl sulfate model: an overview, *Contact Dermatitis*, 33, 1-7.
- 21) Matsunaga, K., Sugai, T., Katoh, J., et al. (1997) Group study on contact sensitivity of 1,3-butylene glycol, *Environ Dermatol*, 4, 195-201.
- 22) 厚生省薬務局審査課 (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, 東京, 161-166.
- 23) 須貝哲郎 (1977) 接触皮膚炎とパッチテスト, *皮膚*, 19: 210-222.
- 24) 川村太郎, 笹川正二, 増田 勉, 他 (1965) 貼布試験標準化の基礎的研究, *日皮会誌*, 80, 301-314.
- 25) Frosch, P.J., Kligman, A.M. (1979) The soap chamber test, *Am A: The soap chamber test. Am Acad Dermatol*, 1, 35-41.
- 26) Agner, T. (1992) Noninvasive measuring methods for the investigation of irritant patch test reactions, *Dermato-Venereologica*, suppl. 173.
- 27) Wahlberg, J.E., Maibach, H.I. (1980) Nonanoic irritation- A positive control at routine patch testing? *Contact Dermatitis*, 6, 128-130.
- 28) Wahlberg, J.E., Wrangsjö, K., Hietasalo, A. (1985) Skin irritancy from nonanoic acid, *Contact Dermatitis*, 13, 266-269.