

3) 皮膚刺激性試験：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

小島 肇夫

日本メナード化粧品(株)総合研究所

本稿では、皮膚刺激性試験代替法の現状と方法論に触れる前に、皮膚刺激性試験及びOECD(経済協力開発機構)の急性皮膚刺激/腐食性試験ガイドラインの経緯についてまとめた。これらの経緯を認識した上で、*in vitro*試験の開発はなされており、また今後も行われるべきと考えるからである。

1. 皮膚刺激性試験の経緯

化学物質の皮膚に対する刺激性と一口にいても、急性皮膚刺激性/腐食性、一次刺激性、累積刺激性、皮膚感作性、光毒性、光感作性などに分類される。一次刺激性については、Draizeらによる皮膚粘膜の局所作用試験に基づいて、1959年にFDA(Food and Drug Association)がまとめた皮膚毒性試験法が基本形となってきた(Staff of the division of pharmacology food and drug administration, 1959)。本方法は1970年代にかけてさらに手法的な検討がなされ、Federal Registerから改定版が発表されている(高瀬吉雄, 1983)。その他、化粧品の一次刺激性を調べるため、ウサギの背部皮膚を用いた開放式経皮投与、皮内注射などの試験方法も検討され(鈴木 守, 1987)、またヒトにおける予知的貼付試験(ヒトパッチ試験)の施行もこの時期から行われた始めた(川村太郎, 1965)。

これらの検討を経て、日本では新規化粧品原料の安全性評価の例として挙げられている、24時間閉塞貼付による動物皮膚一次刺激性試験及びヒトパッチ試験が一般的に行われるようになった(厚生省薬務局審査課, 1996)。また、米国でも1991年に米国化粧品工業会であるCTFA(The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association)が安全性

試験ガイドライン(CTFA Safety Testing Guidelines, 1991)をまとめている。

EUにおいては、欧州の化粧品工業会にあたるCOLIPA(The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association)において、最終製品における安全性評価のガイドライン(COLIPA, 1997)や、ヒトにおける皮膚適合性試験ガイドライン(Walker, 1996)が最近発行された。これらは、1993年に出された化粧品指令第6次改正(EC Cosmetic Directive, 1993)に影響されており、安全性の重要性を唱えながら、極力動物を用いないとする相反する内容が記載されている。この化粧品指令の内容は、適切な代替法が開発されればとの条件付きで、実験動物を用いて安全性を評価した化粧品原料あるいは最終製品の販売を1998年1月より禁止するというものである。なお、昨年代替法の開発の遅れからこの指令は2000年まで延期することがEU議会で認められた。

このヒト皮膚適合性試験ガイドラインの目的に記載されているように、動物を用いる試験は化学物質や最終製品の強い刺激性を評価するためには有益であるが、刺激がないか弱い製品が大半を占める化粧品にはほとんど使用されていない状況である。よって、化粧品の最終製品に対しては、代替法開発の必要はないとの見解が示されており、動物とヒトとの反応性の相違を考えると、ヒトにおける評価は有益であるとされている。この中で、最終製品の評価法として、単回の開放塗布、繰り返しの開放塗布、単回の閉塞貼付または半閉塞貼付、繰り返しの閉塞貼付または半閉塞貼付、使用試験、非コントロール下での使用試験が羅列されている(Walker, 1996)。すべてのタイプの製品に、これらの試験法が適用される

わけではないが、必要性に応じての使い分けよう記載されている。

化粧品原料に関しては、OECDガイドラインの考え方に依存しており、原料も化学物質の一つとして評価している。もちろん、皮膚刺激性のみの結果で原料の使用可否を決定するわけではなく、新ガイドラインでは要求された場合との断りはあるものの、感作性や遺伝毒性などの種々の毒性試験結果を総合的に評価することが求められている (COLIPA, 1997)。

2. OECDガイドラインにおける急性皮膚刺激性／腐食性試験の経緯

1970年末から始まった国際的な試験方法の統一化の流れは、皮膚刺激性にも及び、1981年OECDは化学物質の安全管理のための国際的な標準試験法として、ガイドラインNo.404「急性皮膚刺激性／腐食性試験」を発表した (OECD guidelines for testing of chemicals, 1981)。本試験方法は、化学物質の皮膚に対する急性な毒性を評価する方法として、現在まで幅広く利用されている。具体的には、哺乳動物、主に白色ウサギの使用を推奨し、刈毛処理した少なくとも3匹の背部皮膚に、パッチ絆にのせた被験物質を4時間閉塞曝露貼付する。パッチ絆除去後、生じた皮膚反応を肉眼にてDraizeの判定基準にて評価する簡単な試験方法である。因みに、EU域内では、1983年に新規化学物質の安全な取り扱い、包装、輸送のための危険性に応じ、物質にラベルを付けることが規定されている。皮膚刺激性に関しても、ガイドラインNo.404にて評価した結果により、腐食性を示す場合はR35 (3時間の適用にて強い不可逆的な傷害を引き起こす)、R34 (4時間の適用にて強い不可逆的な傷害を引き起こす)、また4時間の適用における刺激性物質にはR38と分類されることになっている (Guide to the classification and labeling of dangerous substances and preparations, 1983)。

OECDでは、試験方法の有用性を維持するため、定期的な見直しを行っており、このガイドラインNo.404も動物福祉に関連して可能な改良がなされるべきとの観点から1992年に見直しが行われた (OECD guide-

lines for testing of chemicals, 1992)。この改良は a) *in vitro* 試験での結果から、動物実験を行わなくても良い可能性を持たせた、b) 重度の刺激性／腐食性が疑われる時には、先行して1匹の動物実験を行い、重度の結果が得られた時には試験を中止するというものである。さらに昨今の動物福祉の盛り上がり等を考慮に入れ、1996年より「代替毒性試験法におけるバリデーションの調和及び受諾基準に関するワークショップ」による検討が進められている。ワークショップでは3つのテーマ①新規または毒性試験変法のバリデーション及び受諾に関する原則基準、②バリデーションの実践的な方法、③化学物質及び化学製品の試験及び評価のために適用される試験戦略／案に分けた検討が行われている。その中の③試験戦略／案では、局所刺激性の戦略に関するテーマとして、眼刺激性、光毒性とともに皮膚刺激性に関する戦略／案の提案がなされている (OECD test guidelines programme, 1996)。この中から、皮膚刺激性試験の評価スキームを Fig. 1 に示すが、現在のガイドラインNo.404をより具体的に示し、新たにヒトパッチ試験が加わった点が目新しいと言える。

3. OECDガイドラインの新提案の概略

新スキームでは、化学物質の急性皮膚刺激性／腐食性を評価する場合には、まず構造活性相関をみる事が提案されている。しかし、備考として、バリデートされ、受理された方法を用いるべきと記載されているものの、信頼できるデータベースの不足、評価に用いる指標にまだ明確な方向性は示されていない。構造活性相関と一口にいつても、化学物質の分類に使えるような因子は極めて多数挙げられ (厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室, 1997)、どの因子が皮膚刺激性に有効かは明確になっていない。最近の文献では、オクタノール／水の分配係数、分子量、融点、解離定数などを主成分分析したところ、良い予測性が得られたという報告もあり (Barratt, 1995, Whittle, 1996)、より多くの指標のデータベース化、指標の組み合わせについての検討が不可欠

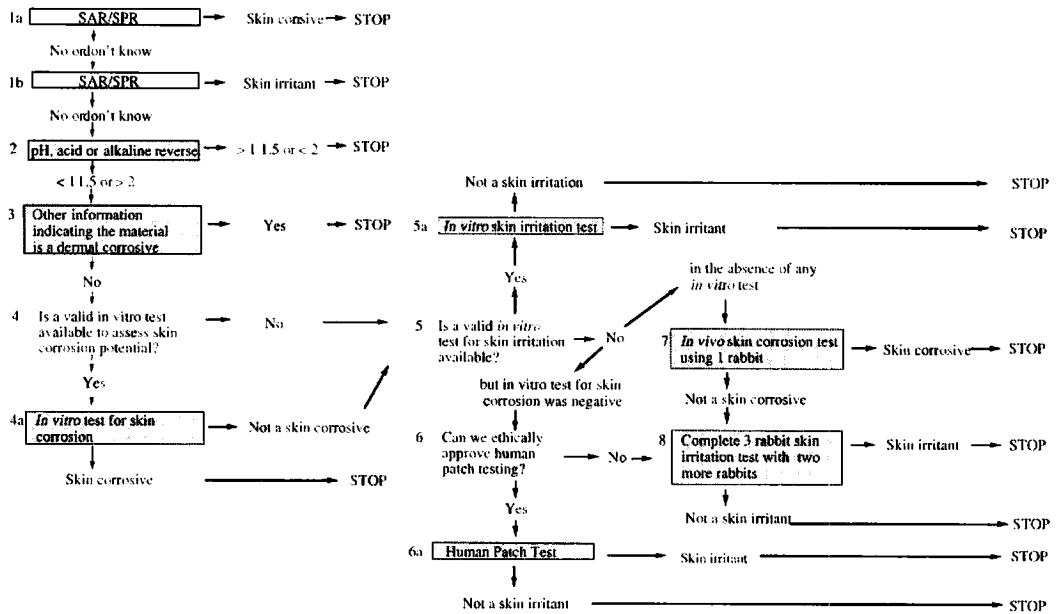


Fig. 1 Proposed testing strategy of OECD for skin corrosion/irritation of acceptance criteria for alternative toxicological test methods (OECD test guidelines programme, 1996)

になろう。

次に、pH/酸あるいはアルカリ度の検討が挙げられている。pH2未満、11.5より大きい場合には皮膚刺激性物質とすると記載されているが、備考にはpHも有用であるが、酸/アルカリ度がより有用であると記載されている。強酸・強アルカリが皮膚障害を引き起こすことは常識と考えても、いくつ以上が危険かの明確な指針となりうる値であるか、酸/アルカリ度はいくつ以上が危険なのかについては触れられていない。関連文献にて、pHと酸/アルカリ度を組み合わせ、皮膚腐食性と比較したところ、良い一致性が認められたという報告がある(Young, 1988)。

3番目に、他の情報を活用した皮膚腐食性評価が挙げられている。この評価は、実験を伴わず、データベースの活用に限ると備考に記載されている。ただ、最近のデータベースに関する論文には、ガイドライン No. 404 に沿った試験方法にて得られた結果であるとともに、GLPの精神にのったデータであることが重要と記載されている(Bagley, 1996)。また、CTFAが進めているCIR(Cosmetic Ingredient Review)によ

る化粧品原料の安全性再評価のように(Anderson, 1997)、データベースに関する文献を有効に使うことで皮膚に対する安全性を予測することはより必要になってくるであろう。

現在のガイドライン No. 404 (OECD guidelines for testing of chemicals, 1992)にも記載されている「*in vitro*試験での結果から、動物実験を行わなくても良い」項目は腐食性の評価と刺激性の評価の二つに分けて記載されており、より具体的になった。*in vitro*腐食性試験の確立が一番の大きな問題であり、備考にはバリデーション及び受理された試験方法はないと記載されている。ただ、備考にはさらに*in vitro*腐食性試験については、ECVAM(European Center for the Validation of Alternative Methods)にて予備的なバリデーションがすでに終了しており、現在バリデーション実施中であるとの記載がある。これは1996年時点での記載であり、現時点の状況は“*in vitro*試験の経緯と現状”の項にてより詳細に示すことにする。ともかく、この提案のポイントは*in vitro*腐食性試験の確立にあると言っても過言ではなく、本試験が確立されており、その結果が陽性なら

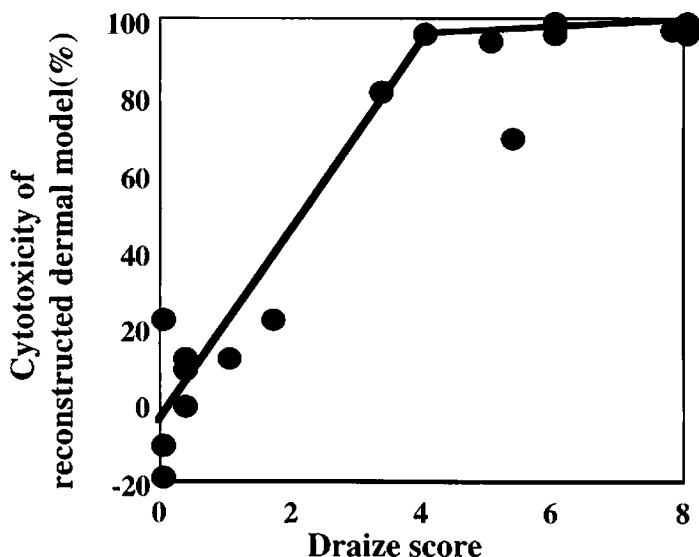


Fig. 2 Comparison of cytotoxicity on the reconstructed dermal model and Draize skin irritation score in rabbit. (諸田勝保, 1997)

ば、皮膚腐食性物質と確定される。

*in vitro*腐食性試験の結果が陰性である場合、*in vitro*皮膚刺激性試験の確立の有無が問われることになる。備考にはこの方法があれば*in vitro*腐食性試験を実施しなくとも良いと記載されているが、可能性としては否定できないものの、理論的には不可能である。もし、確立されている場合、陽性なら刺激物質、陰性なら無刺激と判断される。確立されておらず、*in vitro*腐食性試験もない場合、動物実験を行う従来からの手法を行うことになる。すなわち、1匹のウサギにて腐食性の有無を検討し、腐食性が認められれば、試験を中止する。陰性が疑わしい結果が得られた場合には、さらに2匹を追加して判断するというものである。

*in vitro*腐食性試験が確立され、陰性の結果が得られた場合、科学的・倫理的・文化的にすべて受け入れられれば、動物実験の実施は不要となり、ヒトパッチ試験を実施しなければならない。特に科学的な面において、毒性または毒性の可能性に関するデータ／情報／知識が事前に義務付けられる。倫理的には、ヘルシンキ合意 (World Medical Association, 1964) が基本となるが、国際法や国内法が適用される。ヒトパッチ試験法に関しては、現在 OECD が新たなガイドラインを検討中である。このガイドラ

イン案は1997年4月に出され (OECD guidelines for testing of chemicals, 1997)、11月に各国からのコメントを参考にした第2案が発表されている (OECD test guidelines programme, 1997)。本案はヒトボランティアへのGCP (Good Clinical Practice) を配慮し、貼付時間を15分から4時間に伸ばしていく慎重なプロトコルである。しかし、その分だけ試験時間・コスト・ボランティアへの負担が増すなどの欠点を持っている。また、陽性対照としてSLS (Sodium Lauryl Sulfate) 20%水溶液を用いるなどボランティアの確保を困難にする受け入れ難い内容にもなっている。第2案にて上記の内容は各国からの反対にあい、骨抜きに近い状態になっていることを記載しておくが、嚔によると内容を白紙に戻し再検討することになったとも言われている。本稿での記載はこの程度に留め、詳細な説明及び問題点の記載は松永先生の原稿を参照されたい。

この提案は現在検討中のものであり、数年後に採択される内容はまだ予測できない。スキームも複雑になってきているが、ポイントは*in vitro*腐食性試験が認可された方法となるか否かにつきよう。ヒトパッチ試験の試験方法もまだ多くの検討が必要であるが、*in vitro*試験の有無によってその扱いは

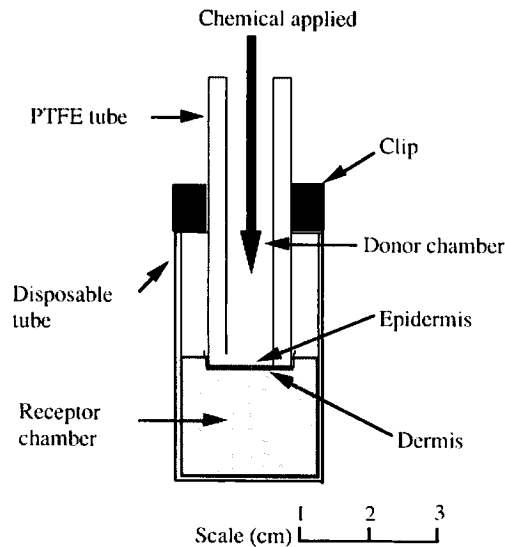


Fig. 3 Apparatus for the *in vitro* epidermal slice model using TER (transcutaneous electrical resistant) assay (Oliver, 1988)

大きく異なってくると考えられる。

4. *in vitro* 試験の経緯と現状

1977年に小西宏明(1977a, 1977b)が、培養細胞を用い、その形態変化を指標として界面活性剤の皮膚毒性を評価する報告をして以来、*in vitro* 試験としては、主に培養細胞を用い皮膚刺激性が評価されてきた(藤井誠史郎, 1979, 小西宏明, 1987, 千葉勝由, 1987, Chamberlain, 1994)。この方法は、最近マイクロプレートを用いる試験方法の導入、種々の炎症由来因子の発見とその簡便な検出法の開発(Shibata, 1997)及び正常なヒト由来皮膚角化細胞が容易に入手できるようになった(Torishima, 1990)という技術的な進歩から、刺激における作用機構及び代替試験方法に対する検討がより多くなった。

しかし、培養細胞を用いる方法は培養液中にて細胞に検体を処理することもあり、1) 角質のようなバリアー機能がないことから、経皮吸収の問題を加味できない、2) 油性物質や粉体などの非水溶性物質の評価がしづらい、3) 皮膚は角化細胞や線維芽細胞、ランゲルハンス細胞、リンパ球、メラノサイトなどが複雑な構造を呈しており、単一細胞のみの評価には疑問が残るなどの点から(Chamberlain, 1994)、近年は、摘出皮

膚や培養3次元皮膚構築モデルの需要が増しつつある(Oliver, 1988, Li, 1991, Gay, 1992, Slivka, 1993, Monterio-Riviere, 1997)。

これらのモデルは血管や毛根がないなどの構造的な問題に加え、十分な皮膚の機能を満たしていない点から、必ずしも上記の問題点を満足させるものではない。しかし、これらを用いた多くの成果が得られるつつあり、動物実験又はヒトパッチテスト結果との良い相関性が報告されている(Botham, 1992, Laska, 1992, Oliver 1988, 1990, Osborne, 1994, Roguet, 1994, Kojima, 1995, 小島肇夫, 1996, 小谷麻由美, 1996, 諸田勝保, 1997, Morota, 1998)。我々の検討においてもFig. 2に示すように、*in vivo* 刺激性と高い一致性を示す結果が得られている(諸田勝保, 1997, Morota, 1998, 1999)。また、ヒトと動物の種差の解消や結果が安定して得られるなどの利点も挙げられる。しかし、一方で1) Fig. 3に示すラット摘出皮膚による電気伝導度測定(TER)試験において(Oliver, 1988)、Fig. 4に示すように皮膚に対する腐食性は評価できるものの、刺激性を評価できない結果が得られている(Botham, 1992)、2) 我々が検討した皮膚摘出チップを用いた結果では、カチオン界面活性剤やエタノール及びそれを多く含む製剤が偽陽性を示す結果が得られている(小島肇夫, 1996)、その他、3) 素

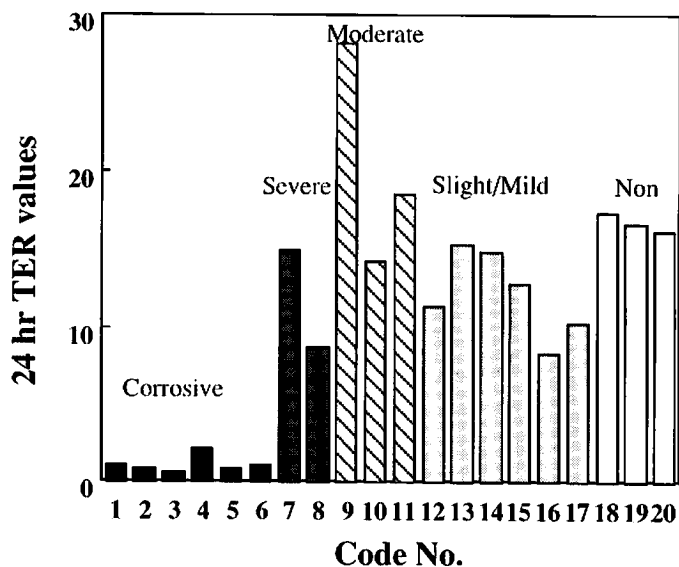


Fig. 4 Comparison of 24 hr TER (transcutaneous electrical resistant) and skin irritation classification (Botham, 1992)

材及びキットが実験動物より高価である、4) *in vitro* 試験を毒性評価に用いた後、ヒト試験を行う際には、精神的な抵抗があるなどの欠点も明らかになってきている。

OECDガイドラインのスキームにおいても簡単に説明したが、ECVAMでは、予備試験 (Botham, 1995) を経て、国際的な *in vitro* 皮膚腐食性試験のバリデーションが実施されている。本バリデーションの目的は、腐食性物質の分類、R35やR34の同定が可能かであり、試験方法としては、① TER試験、② 蛋白変性検出キット、CORROSITEX™、③ 培養皮膚3次元モデル Skin2™ ZK1350による腐食性試験、④ 培養角質モデル EPISKIN™ による細胞毒性試験が挙げられ、60化学物質によるバリデーションが3試験機関ずつにて実施された。実験はすでに終了しており、順調ならば論文投稿されている状況である。これらの結果にて、4試験方法の中で、EPISKIN™ 及び TERが組織委員会の評価基準を満たしたことが中間報告されている (ECVAM News & Views, 1997)。

日本でも、近年、3次元モデルを用いた皮膚刺激性の代替に関する多くの報告がある。我々はキットメーカー・販売先の協力を得て、培養皮膚3次元モデルを用いた細胞毒性試験の中から、Skin2™ ZK1300 (森

栄治, 1995, Kojima, 1998)、ゲンゼ製皮膚モデル (Kojima, 1995, 諸田勝保, 1997, Morota, 1998)、Epiderm™ (Genno, 1998) や摘出皮膚チップを用いた細胞毒性試験 (小島肇夫, 1996) について、種々の検討を行っている。また、石橋卓也 (1997) は培養皮膚3次元モデル (MATREX™) を用い、モデル表面を顕微鏡観察することにより、弱い皮膚刺激性を予測できる方法を報告している。Fig. 5にその方法によるSLS処理におけるモデル表面の顕微鏡観察写真を示す。薬物により、細胞を播種したモデル表面の様子が変化している様子がわかるが、この変化と皮膚刺激性がよく一致しており、動物実験代替というよりも、新しい皮膚刺激の評価方法であると報告している。我々の検討でも、非水溶性物質における3次元モデルの試験結果が、動物よりもヒト刺激性と近いことを報告しており (森 栄治, 1995, Kojima, 1998)、やはり新しい皮膚刺激の評価方法として期待している。

日本では、急性皮膚刺激性/腐食性試験に関する代替法バリデーションは実施されておらず、安全性を評価する方法として使用できる *in vitro* 試験方法はまだ存在しない。しかし、国際協調が叫ばれる昨今、ECVAMにて腐食性試験の対応が進んでいる現状を考慮し、日本でもバリデーション



Fig. 5 Microscopic finding on the surface of Living Skin Equivalent (MATREX™) treated with sodium lauryl sulfate : SLS (× 40, 石橋卓也, 1997)

が必要な時期に来ていると考えている。と、同時に、良い試験方法がない皮膚一次刺激性試験代替法のさらなる開発、さらに新たな皮膚毒性評価方法としての検討など取り組む課題は多い。これら試験方法の導入に関する幅広い議論が必要な時期に来ているのかも知れない。

5. 謝辞

Fig.3及び4の資料掲載に快く承諾をいただいたElsevier Scienceに感謝致します。また、Fig.5の写真を提供して下さった河合皮膚科医院の河合敬一先生に感謝致します。

6. 参考文献

石橋卓也, 中川幹雄, 河合敬一(1997)培養ヒト皮膚三次元モデルを用いた簡単なインビトロ皮膚刺激性試験方法, *Environmental Dermatology*, 4, suppl. 1, 106.

川村太郎, 笹川正二, 増田 勉, 本川史朗, 木下正子, 原田昭太郎, 石崎 達, 永井隆吉, 広川浩一, 安西 喬, 姉小路公久, 肥田野 信, 川野 正, 池上一郎, 佐藤重男, 青山卓夫(1965)貼布試験標準化の基礎的研究, *日本皮膚科学会誌*, 80, 301-314.

厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室(1997)化学物質のリスクアセスメントー現状と問題点一, 85-88, 薬業時報社, 東京.

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, 161-166, 薬事日報社, 東京.

小島肇夫, 森 栄治, 花村朝夫, 佐々木哲二, 真鍋幸子(1996) 抽出皮膚培養キットを用いた皮膚一次刺激性試験代替法, *粧技誌*, 30, 402-409.

小谷麻由美, 政本孝三, 渡邊正己 (1996) 界面活性剤の皮膚刺激性評価における代替法研究, *粧技誌*, 30, 62-70.

小西宏明, 井上佳子, 安藤寛治, 小林正久, 徳田安章, 高瀬吉雄 (1977a) 培養細胞試験を中心とした界面活性剤の皮膚障害試験Ⅰ. 非イオン型界面活性剤, *信州医誌*, 25, 246-258.

小西宏明, 井上佳子, 渥美隆正, 安藤寛治, 小林正久, 高瀬吉雄 (1977b) 培養細胞試験を中心とした界面活性剤の皮膚障害試験Ⅱ. 陰イオン型界面活性剤, *信州医誌*, 25, 259-270.

小西宏明(1987) 皮膚毒性予測のための*in vitro*細胞毒性試験, *トキシコロジーフォーラム*, 10, 130-136.

鈴木 守(1987)化粧品における生物科学の進歩ー安全性から有用性へー, 6-7, フレグランスジャーナル社, 東京.

高瀬吉雄, 小川秀興, 岡本暉公彦(1983)新しい皮膚

の生理と安全性, 174-193, 清至書院, 東京.

千葉勝由, 遠山 清(1989)培養細胞を用いた化粧品油性原料の安全性評価, *化粧品科学会誌*, 13, 194-202.

藤井誠四郎, 宇塚 誠, 植原計一, 小林敏明, 中嶋啓介(1979) ポリオキシエチレン系非イオン型界面活性剤の皮膚刺激性と培養細胞の増殖抑制作用, *西日本皮膚*, 41, 97-103.

森 栄治, 花村朝夫, 小島肇夫, 小西宏明(1995) 培養皮膚3次元モデルを用いた皮膚刺激性の予測, *SCCJ研究討論会講演要旨集*, 95-99.

諸田勝保 (1997)培養皮膚を用いた動物実験代替法の開発, *日皮協ジャーナル*, 38, 131-314.

Anderson, F. A. (1997) Thirty-third report of the cosmetic ingredient review expert panel, *International Journal of Toxicology*, 16, Supplement 1, 1-143.

Bagley, D. M., Gardner, J. R., Hilland, G., Lewis, R. W., Regnier, J.-F., Stringer, D. A. and Walker, A. P. (1996) Skin irritation : Reference chemicals data bank. *Toxicology in Vitro*, 10, 1-6.

Barratt, M. D. (1995) Quantitative structure activity relationships for skin corrosivity of organic acids, bases and phenols, *Toxicology Letters*, 75,169-176.

Botham, P. A., Hall, T. J., Dencit, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheesmen, M., Esdaile, D. J. and Gardner, J. (1992) The skin corrosivity test *in vitro* results of an inter-laboratory trial, *Toxicology in Vitro*, 6, 191-194.

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, *ATLA*, 23, 219-255.

Chamberlain, M. and Earl, L. (1994) Use of cell cultures in irritancy testing, in "*In Vitro Skin Toxicology*" by Rougire, A., Goldberg, A. M. and Maibach, H. I., 59-67, Mary Ann Liebert Inc., New York.

COLIPA (1997) Guidelines for the safety assessment of a cosmetic product.

CTFA (1991) Evaluation primary skin irritation potential, In *CTFA Safety Testing Guideline* by Curry, A. S., Gettings, S. D. and McEwen, G. N., 1-5, CTFA, Washington, D. C.

EC Cosmetic Directive, The 6th Amendment, Council Directive 93/35/EEC, 14th June 1993.

ECVAM News & Views(1997) *ATLA*, 25, 491-494.

Gay, R., Swiderek, M., Nelson, D. and Ernesti, A. (1992) The living skin equivalent as a model *in vitro* for ranking the toxic potential of dermal irritants, *Toxicology in Vitro*, 6, 303-315.

Genno, M., Yamamoto, R., Kojima, H., Konishi, H. and Klausner, M. (1998) Evaluation of alternative to Primary Draize skin irritation test using skin model (EOI-100), *AATEX*, 5, 195-200.

Guide to the classification and labeling of dangerous sub-

- stances and preparations (1983) Criteria for the choice of chemicals indicating special risks (R phrases) and safety advice (S phrases), Official Journal of the European Communities, 257, 13-20.
- Kojima, H., Mori, E., Hanamura, A., Konishi, H. and Katagiri, M. (1995) Prediction of primary rabbit skin irritation using cultured 3-dimensional skin model, *Environmental Dermatology*, 2, suppl. 1, 53.
- Kojima, H., Sato, A., Katada, T. and Konishi, H. (1998) Evaluation of skin irritation on the reconstituted human dermal model using insoluble substances, as fatty acid, fatty alcohols and hydrocarbons, AATEX, 5, 201-210
- Laska, D. A., Poulsen, R. G., Horn, J. W., Meador, V. P. and Hoover, D. M. (1992) An evaluation of TESTSKIN™: An alternative dermal irritation model. *In Vitro Toxicology, A Journal of Molecular and Cellular Toxicology*, 5, 177-189.
- Li, L., Margolis, L. B. and Hoffman, R. M. (1991) Skin toxicity determined *in vitro* by three-dimensional, native-state histoculture, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88, 1908-1912.
- Monterio-Riviere, N. A., Inman, A. O., Snider, T. H., Blank, J. A. and Hobson, D. W. (1997) Comparison of an *in vitro* skin model to normal human skin for dermatological research, *Microscopy Research and Technique*, 37, 172-179.
- Morota, K., Morikawa, N., Morita, S., Kojima, H. and Konishi, H. (1998) Development and evaluation of the cultured skin model, *Tiss. Cult. Res. Commun.*, 17, 87-93.
- Morota, K., Morikawa, N., Kojima, H. and Konishi, H. (1999) Alternative to primary Draize skin irritation test using cultured human skin model: Comparison of six end points, AATEX, accepted.
- OECD guidelines for testing of chemicals (1981) Acute dermal irritation/corrosion, 404, Paris, France: OECD
- OECD guidelines for testing of chemicals (1992) Acute dermal irritation/corrosion, 404, Paris, France: OECD
- OECD test guidelines programme, Options for a testing strategy for the testing of skin and eye irritancy (1996) Final report of the OECD workshop on harmonization of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods, 18th-19th September 1996, the Chateau de la Muette, Paris.
- OECD guidelines for testing of chemicals (1997) Proposal for a draft new guideline, Acute dermal irritation study in human volunteers, April, 1997
- OECD test guidelines programme, Human skin patch testing: Comments on the guideline proposal (1997) Ninth meeting of the national co-ordinators of the test guidelines programme, 3rd-4th December 1997, the Chateau de la Muette, Paris.
- Oliver, G. J. A., Pemberton, M. A. and Rhodes, C. (1988) An *in vitro* model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial validation, *Toxicology in Vitro*, 2, 7-17.
- Oliver, G. J. A., Pemberton, M. A. and Rhodes, C. (1990) An *in vitro* skin corrosivity test: modification and validation, *Food and Chemical Toxicology*, 24, 507-512.
- Osborne, R. and Perkins, M. A. (1994) An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation, *Food and Chemical Toxicology*, 32, 133-142.
- Rouget, R., Cohen, C., Dossou, K. G. and Rougier, A. (1994) Episkin, A reconstituted human epidermis for assessing *in vitro* the irritancy of topically applied compounds, *Toxicology in Vitro*, 8, 283-291.
- Shibata, M., Tsuda, T., Itagaki, H., Kato, S., Kobayashi, T., Ichikawa, H. and Morikawa, Y. (1997) Interleukin-1 α and Interleukin-8 release by human keratinocyte cell culture treated with surfactants, *ATLA*, 25, 161-171.
- Slivka, S. R. and Zeigler, F. (1993) Use of an *in vitro* skin model for determining epidermal and dermal contributions to irritant responses, *J. Toxicol.-Cut. & Ocular Toxicol.*, 12, 49-57.
- Staff of the Division of Pharmacology Food and Drug Administration, Department of Health Education and Welfare (1959) Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics, in "FDA official of U.S. business office" 46, Topeka, Kansas
- Torishima, H., Arakawa, H., Matsui, S. and Watamabe, M. (1990) Application of normal human epidermal keratinocytes in serum-free medium as an alternative to the Draize ocular irritating test, AATEX, 1, 20-26.
- Walker, A. P., Basketter, D. A., Barevel, M., Diembeck, W., Matthies, W., Mouglin, D., Pape, M., Rothlisburger, R. and Dupulis, J. (1996) Test guideline for assessment of skin compatibility of cosmetic finished products in man, *Food and Chemical Toxicology*, 34, 651-660.
- Whittle, E., Barratt, D., Carter, J. A., Basketter, D. A. and Chamberlain, M. (1996) Skin corrosivity potential of fatty acids: *In vitro* rat and human skin testing and QSAR studies, *Toxicology in Vitro*, 10, 95-100.
- World Medical Association (1964) Declaration of Helsinki. Recommendation guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, June 1964, 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 XXVth Conference, Geneva, 1993.
- Young, J. R., How, M. J., Walker, A. P. and Worth, W. H. (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.