

Skin²™ ZK1350による *in vitro* 皮膚腐食性試験では、各施設 2 回実施したが、一施設のみ 1996 年 9 月 16 日で Skin²™ の製造が中止されたため、50 物質 (50/60) 物質は 1 回しか実験を行えなかった。このバリデーションにおける施設内、施設間の再現性は高かった。しかし、ともに腐食性物質である 2-*t*-Butylphenol (No. 23) と Phosphorus pentachloride (No. 32) のバラツキはいずれの施設においても大きかった。3 施設における *in vitro* 腐食性分類結果は、54/60 物質が一致したが、4 物質 (Hexanoic acid (No. 1)、Dimethyldipropylenetriamine (No. 15)、Dimethylisopropylamine (No. 17)、Hydrochloric acid 14.4% (No. 43)) で 1 段階、2 物質 (2-*t*-Butylphenol (No. 23) および Phosphorus pentachloride (No. 32)) で 2 段階各施設による腐食性分類結果が異なっていた。

Skin²™ ZK1350 による腐食性物質識別では、33 の非腐食性物質はすべての施設で正確に *in vitro* 非腐食性と分類された。R34 の 21 物質の中で、7 物質はすべての施設で正確に予測できた。しかし、11 物質はすべての施設で非腐食性物質と間違って分類された。残りの 3 物質では、施設間で腐食性判定が異なり、2 物質 (Dimethylisopropylamine (No. 17)、2-*t*-Butylphenol (No. 23)) は 2 施設のみ正確に予測した。Hexanoic acid (No. 1) は 1 施設のみ正確に予測した。R35 の 6 物質はすべて正確に予測されなかった。その中の 3 物質 (1,2-Diaminopropane (No. 2)、Boron trifluoride dihydrate (No. 4)、Phosphorus tribromide (No. 28)) は R34 として、2 物質 (Dimethyldipropylenetriamine (No. 15) および Phosphorus pentachloride (No. 32)) は 2 施設で R34 として判断され、その他の 1 施設では非腐食性と予測された。しかし、Tallow amine (No. 38) はすべての施設で非腐食性物質と誤って予測された。

試験法の感度は 43%、特異性は 100% であり、非腐食性物質を非腐食性と識別することが示されたが、腐食性/非腐食性の識別において、腐食性物質を非腐食性物質と分類 (underprediction) した割合は 57%、また、EU リスク表示 R35/ I, R34/ II & III の識別においては、R35/ I を非腐食性と分類 (underprediction) した割合は 25%、また、R34/ II & III を非腐食性と分類した割合は 67% といずれも設定した許容範囲 20% 以下を超え、代替法として受け入れられないと判断された。

化学物質のタイプで分類すると、(a) 有機酸 (腐食性 6 物質、非腐食性 5 物質) : 非腐食性 5 物質の評価はすべての結果が非腐食性であった。しかし、R34/ II & III の 6 物質では、正確に識別できた結果は 3 施設で実施した 31 回の試験中で 2 回 (2/31) のみであったと記載されており、腐食性を示す有機酸に対する識別は困難であることが推測される。(b) 有機塩基 (腐食性 7 物質、非腐食性 3 物質) : 非腐食性 3 物質はすべての施設で正確に評価された。R34/ II & III の 4 物質は試験結果の 14/20 が正確であり、残り 6 試験結果は非腐食性と評価している。R35/ I の 3 物質を正確に予測した試験結果はなく試験結果の 10/16 は R34 に、残り 6 データは非腐食性物質に分類された。(c) 中性有機物 (非腐食性 9 物質) : 9 物質すべてが非腐食性として正確に予測された。(d) フェノール (腐食性 2 物質、非腐食性 3 物質) : 非腐食性 3 物質のすべての結果 (16/16) において非腐食性と正確に評価されている。R34/ II & III の 2 物質については、正確に識別した結果は、2/11 であって、その他の結果では 8 結果は非腐食性、1 結果は R35 と分類した。(e) 無機酸 (腐食性 6 物質、非腐食性 1 物質) : 非腐食性の 1 物質では、すべての結果 (5/5) で非腐食性と評価された。R34/ II & III に分類された物質では、1/10 は正確に R34 と識別したが残りの 9 結果では非腐食性と判断された。R35/ I に分類された物質のうち R35 と正確に識別できた結果は、1 回 (1/16) で残りの 13 試験で R34、2 試験は非腐食性と分類された。

(f) 無機塩基 (腐食性 2 物質、非腐食性 2 物質) : 非腐食性 2 物質はすべての結果で正確に非腐食性と識別しているが、R34/ II & III 物質である 2-Mercaptoethanol はすべての結果 (5/5) で非腐食性と誤

って判断された。(g) 無機塩 (腐食性 1 物質、非腐食性 2 物質) : 非腐食性 2 物質はすべての結果 (10/10) で正確に非腐食性と識別されたが、R34/II & III 物質である Ferric(iron)chloride はすべての結果 (5/5) で非腐食性と誤って判断された。(h) electrophiles (腐食性 3 物質、非腐食性 5 物質) : 非腐食性 5 物質はすべての結果 (26/26) で正確に非腐食性と識別されたが、R34/II & III 物質である 3 物質のうち 2 物質はすべての結果 (11/11) で R34 と識別されたが、1 物質 (Allyl bromide) についてすべての結果 (5/5) で非腐食性と誤って判断された。i) 石鹼および界面活性剤 (非腐食性 3 物質) : 非腐食性 3 物質はすべての結果 (15/15) で正確に非腐食性と識別された。

1998 年、Fentem により報告された ECVAM による公式バリデーションでは、Skin²™ ZK1350 は受け入れ基準に適合しなかった。また、プレバリデーションおよび公式バリデーションで共通している物質に対する評価が若干異なったことの考察として、今回の使用した被験物質の種類がプレバリデーションと異なった点やプロトコールの変更の影響があげられた。また、皮膚モデルとしての組織構造等に関する均一性 (製造工程・品質管理) も結果に影響している可能性が示唆された。

4-2-2) EPISKIN の評価

EPISKIN は、1998 年、Fentem により報告されている公式バリデーションにおいて³⁾、Skin²™ ZK1350 とともに評価されている。EPISKIN は再構築表皮からなる 3 次元ヒト皮膚モデルであり、SADUC-Biomateriaux Imedex™ から販売されている。皮膚モデルは、ヒトコラーゲンマトリックスとその上のヒトケラチノサイトによる再構築表皮で構成されている。

EPISKIN の評価には Rhone-Poulenc Agro、Agence du Medicament、INRS の 3 施設が参加した。

EPISKIN では、再構築表皮の表面に被験物質を適用し、除去後の細胞生存率を評価するが、適用時間を 3、60、240 分と 3 段階に分け、適用後の細胞生存率を MTT によって評価する。

EPISKIN では、2 つの予測モデルを用いて判定している。1 つは、240 分適用の値のみを採用した判定 (予測モデル A) であり、他方は 3 つの適用時間の結果を採用した判定 (予測モデル B) である。240 分適用単独評価の場合、細胞生存率 35% 以上のものは非腐食性と判定する。それ未満のものは腐食性と判定し、さらに 20% < 35% では R34 (UN グループ III) 物質、10% < 20% を R34 (UN グループ II) 物質、細胞生存率 < 10% を R35 (UN グループ I) 物質と判定した。また、3 つの適用時間を採用する場合では、3 分適用において、細胞生存率 35% 未満のものは腐食性、R35 (UN グループ I) 物質と判定し、3 分適用において生存率 35% 以上でかつ、60 分適用で生存率 35% 未満のものを、腐食性、R34 (UN グループ II) 物質と判定した。さらに、60 分適用において細胞生存率 35% 以上で、かつ 240 分適用で細胞生存率が 35% 未満となったものは R34 (UN グループ III) 物質と判定した。評価の詳細検討には予測モデル B を採用している。

EPISKIN はそれぞれの施設で 3 回実験を行い評価した。この試験法にはすべての被験物質が適用可能であった。施設内および施設間のばらつきは低かった。予測モデル B を用いた評価において、3 施設における 3 回繰り返し *in vitro* 腐食性分類結果は、被験物質中の 42 種 (42/60) がすべて一致していた。18 物質は施設毎に分類が異なった。EPISKIN による腐食性物質識別について各施設の 3 回繰り返し試験の中央値を採用して評価したところ、33 種の非腐食性物質中、23 物質が 3 施設で非腐食性と正確に予測された。残りの 10 種のうち 4 物質は 2 施設のみ非腐食性と正確に予測した。2 物質 (2,4-Xylidine (No. 10), 10-Undecanoic acid (No. 58)) は 2 施設で R34 と過大評価され、4 物質 (o-Methoxyphenol (No. 9), Potassium hydroxide (5% aq.; No. 21), Sodium undecylenate (33% aq.; 37),

Sulphamic acid(No. 53))はすべての施設で R34 または R35 と誤って分類された。R34/II & III の 21 物質中、14 物質がすべての施設で正確に予測されたが、3 物質は 2 施設でのみ正確に予想された。1 物質 (Hexanoic acid (No. 1)) はすべての施設で R35 と誤って分類され、3 物質 (3-Methoxypropylamine (No. 13), 2-Mercaptoethanol Na salt (45% aq.; No. 42), n-Heptylamine (no. 45)) は非腐食性と判断された。R35/I の 6 物質中、2 物質がすべての施設で正確に予想され、1 物質は 1 施設のみで正確に予想された。2 物質 (1,2-Diaminopropane (No. 2), Dimethyldipropylenetriamine (no. 15)) は R34 として、1 物質 (Tallow amine (No. 38)) はすべての施設で非腐食性として判断された。

化学物質のタイプで分類すると、(a) 有機酸 (腐食性 6 物質、非腐食性 5 物質) : R34/II & III の 6 物質のうち、4 物質はすべての施設で正確に予想された。1 物質は 1 施設で R35 に分類され、1 物質 (Hexanoic acid (No. 1)) はすべての施設で R35 に分類された。非腐食性 4 物質のはすべての施設で正確に分類され、残り非腐食性 1 物質は 1 施設が正確に、他施設は R34 と分類した。(b) 有機塩基 (腐食性 7 物質、非腐食性 3 物質) : R35 の 3 物質中 2 物質 (1,2-Diaminopropane (No. 2), Dimethyldipropylenetriamine (no. 15)) は R34 に、他の 1 物質 (Tallow amine (No. 38)) はすべての施設で非腐食性に誤って分類された。非腐食性 3 物質の内、2 物質はすべての施設で、他の 1 物質は 1 施設で正確に、他の施設で R34 に分類された。(c) 中性有機物 (非腐食性 9 物質) : 非腐食性 7 物質はすべての施設で正確に予測された。残りの 2 物質は 2 施設で正確であったが、1 施設が過大分類した (d) フェノール (腐食性 2 物質、非腐食性 3 物質) : R34 の 2 物質はすべての施設で正確に予測され、非腐食性 3 物質の内、2 物質は正確であったが、1 物質 (o-Methoxyphenol (No. 9)) はすべての施設で R34 と過大評価した。(e) 無機酸 (腐食性 6 物質、非腐食性 1 物質) : R35 の腐食性 2 物質はすべての施設で正確であったが、1 物質は 2 施設で R34 とした。R34 の 3 物質はすべての施設で正確であった。非腐食性 1 物質はすべての施設で R34 と分類された。(f) 無機塩基 (腐食性 2 物質、非腐食性 2 物質) : R34 の腐食性 1 物質 (2-Mercaptoethanol Na salt (45% aq.; No. 42)) はすべての施設で非腐食性となり、残りの腐食性 1 物質はすべての正確に判断された。非腐食性 2 物質のひとつはすべての施設で正確であったが、残りの 1 物質 (Potassium hydroxide (5% aq.; No. 21)) はすべての施設で R34 または R35 と分類した。(g) 無機塩 (腐食性 1 物質、非腐食性 2 物質) : R34 の腐食性 1 物質は 1 施設が正確であったが、他の施設は非腐食性とした。非腐食性 2 物質はすべての施設で正確であった。(h) electrophiles (腐食性 3 物質、非腐食性 5 物質) : R34 の腐食性 2 物質はすべての施設で正確であった。残りの腐食性 1 物質は 2 施設で正確であったが、1 施設は非腐食性と判断した。非腐食性 4 物質はすべての施設で正確であったが、残り非腐食性 1 物質は 2 施設で正確、1 施設は R34 と判断した。(i) 石鹼および界面活性剤 (非腐食性 3 物質) : 非腐食性 1 物質はすべての施設で正確であった。残りの 2 物質中、1 物質は 2 施設で正確であったが、1 施設は R34 とした。さらに残りの 1 物質はすべての施設が R34 と評価された。

試験法の感度は予測モデル A で 81%、予測モデル B で 83%、特異性は予測モデル A, B とともに 80% であった。腐食性/非腐食性の識別において、腐食性物質を非腐食性物質と分類 (underprediction) した割合は予測モデル A で 19%、予測モデル B で 17%、また、EU リスク表示 R35/I, R34/II & III の識別においては、R35/I を非腐食性と分類 (underprediction) した割合は予測モデル A, B でそれぞれ 19%、17%、R34/II & III を非腐食性と分類した割合は予測モデル A, B でそれぞれ 20%、18% と、underprediction についていずれも設定した許容基準を満たした。また、非腐食性物質を腐食性物質と分類 (overprediction) した割合は、予測モデル A, B とともに 20%、また、非腐食性物質を R35 と評価した割

合は、予測モデルA、B でそれぞれ9%、1%、非腐食性物質を R34 と評価した割合は、予測モデルA、B でそれぞれ11%、19%であった。また、R34/II & III物質を R35 と評価した(overprediction)割合は、予測モデルA、B でそれぞれ59%、8%となり、overpredictionについて、予測モデルAにおけるR34とR35の識別を除き、許容基準を満たした。以上より、EPISKINは、施設内および間の再現性が高く、非腐食性/腐食性の識別だけでなく、予測モデルBを用いた場合には、R35とR34の分類も可能であることから腐食性試験代替法として受け入れられる水準にあるものであることがわかった。ただし、n-Heptylamine (no.45)や2-Mercaptoethanol Na salt (45% aq.; No.42)のような還元物質は低く評価してしまふ特徴をもっている。また、このモデルも市販品であることから、供給面での問題が残る。

表 4-3 In vitro-in vivo comparisons

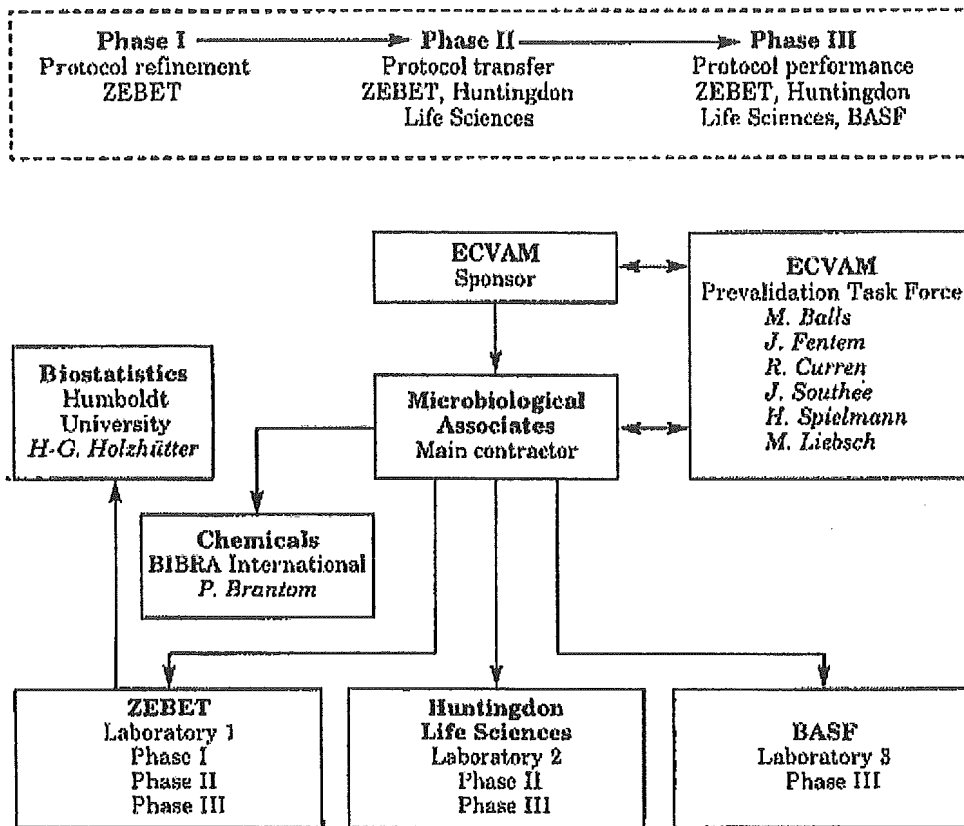
Test	Skin ^{2TM}	EPISKIN A/B
Samples tested	60	60
Qualified samples	60	60
Corrosives identified correctly(%)	43	81/83
Non-corrosives identified correctly(%)	100	80/80
Sensitivity(%) C	43	81/83
R34	32	21/75
R35	3	43/39
Specificity(%)	100	80/80
Predictivity(%) C	100	77/77
R34	60	43/64
R35	50	14/53
Accuracy(%) C	74	80/81
R34/R35	66	56/70
Objective C vs NC		
Underprediction rate (%)	57	19/17
Overprediction rate (%)	0	20/20

4-2-3) EpiDermTM の評価

EpiDermTM (日本ではクラボウがEPI-200として販売)は、ポリカーボネート膜を使用したインサート上に再構築されたヒトケラチノサイト表皮モデルであり、MatTek Corporation から市販されている。2000年にLiebschが、EpiDermを用いて追加バリデーションを報告している⁵⁾。このバリデーションはZEBETを中心に図4-1に示すような3段階に分かれて実施されている。Phase I (ZEBETのみで実施、被験物質50) およびPhase II (ZEBETとHuntingdonが参加、被験物質11) では、適用後3分間におけるモデルの細胞毒性をMTTで評価し、細胞生存率50%を境に腐食性/非腐食性を判断する予測モデル1 (PM1) にて評価した。ZEBETにおける追加試験を経てプロトコールが改良され、Phase IIIのプレバリデーションとして、3分および1時間の処理時間で、3分間の細胞生存率が50%以上または1時間の細胞生存率が15%以上の場合を非腐食性とし、それ以外を腐食性とする予測モデル2 (PM2) が検討された。3施設 (ZEBET、Huntingdon およびBASF) が参加して図4-1に示す組織にてECVAMの60物質から

腐食性のバランスを考慮して選んだ24物質（有機酸4、有機塩基6、中性有機物4、フェノール2、無機酸3、無機塩基2、electrophiles2、活性剤1：非腐食性物質12、腐食性物質12）を用い、バリデーションを実施した。

図 4-1 EpiDerm バリデーションの組織



The top of the figure (dashed box) shows the three consecutive phases of the ECVAM prevalidation scheme, the main purpose of each phase, and the participating laboratories. The chart below shows the organisational structure of the study. The three participating laboratories and the chemical distributor for phase III worked under subcontract to Microbiological Associates, the main contractor of an ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) project in which five studies similar to the present study were performed. Laboratory 1 was responsible for organising the whole study and subcontracted the biostatistical analysis of phase III. The ECVAM Prevalidation Task Force acted as an advisory team.

その結果、表 4-4 に示すような、PM1 および PM2 のデータ（24 物質、3 施設、2 回のデータの合計 144 データ）がまとまっている。PM1 の感度は 72%、特異性は 100% であった。PM2 では、感度 88%、特異性 86% となり、ECVAM マネージメントチームの基準に合致した。この PM2 が良い予測性を持つとして記載されている。なお、PM2 では、非腐食性物質の Sulphamic acid (No. 11) が全ての施設で腐食性として評価されており、一方、腐食性物質の Methacrolein が全ての施設で非腐食性と評価された。また、本試験法は MTT を指標としているが、被験物質数が少ないことから還元性物質について正確な評価については明確ではない。

結論として、EpiDerm は幅広い物質に対応でき、腐食性/非腐食性物質の区別に利用できることから、皮膚腐食性のため Annex V (EU Dangerous Substances Directive) 試験法の状況下で使用できると

考察されている。

表 4-4 EpiDerm の 2×2 表

Initial prediction model PM1

		<i>In vivo</i> classification		
		Corrosive	Non-corrosive	Total
<i>In vitro</i> prediction	Corrosive	52	0	52
	Non-corrosive	20	72	92
Total		72	72	144

Sensitivity = 72%; *specificity* = 100%; *positive predictivity* = 100%; *negative predictivity* = 78%; *accuracy* = 86%; $\chi^2 = 78.3$ (table = 3.8); *prevalence* = 1.00.

Refined prediction model PM2

		<i>In vivo</i> classification		
		Corrosive	Non-corrosive	Total
<i>In vitro</i> prediction	Corrosive	63	10	73
	Non-corrosive	9	62	71
Total		72	72	144

Sensitivity = 88%; *specificity* = 86%; *positive predictivity* = 86%; *negative predictivity* = 87%; *accuracy* = 87%; $\chi^2 = 75.1$ (table = 3.8); *prevalence* = 1.00.

4-3) ICCVAM による評価

4-2 に示した 3 つのバリデーション論文をもとに、ICCVAM はヒト皮膚モデルとして、EPISKIN および EpiDerm™ による腐食性評価を行っている。評価されたヒト皮膚モデルおよび試験法は以下の表 4-5 に示すものである。

EPISKIN の ECVAM バリデーション研究の結果から、60 物質の化学物質を評価し、以下のパフォーマンスを挙げている。

- 正確性 83% [50/60 物質または化学物質混合物]
- 感度 82% [23/28 物質または化学物質混合物]
- 特異性 84% [27/32 物質または化学物質混合物]
- 擬陽性率 16% [5/32 物質または化学物質混合物]
- 擬陰性率 18% [5/28 物質または化学物質混合物]

よって、EPISKIN は R35/I および R34/II & III の区別ができ、60 物質中 42 物質の結果が、3 施設で同じように判断されている。残った物質においても、不一致は 6 物質の 9 試験中 1 回、7 物質で 9 試験中 2-3 回、5 物質で 9 試験中 4-5 回となっており、再現性も高いとされている。

EpiDerm™ の ECVAM バリデーション研究の結果から、24 物質の化学物質を評価し、以下のパフォーマンスを挙げている。

- 正確性 92% [22/24 物質または化学物質混合物]

感度 92% [11/12 物質または化学物質混合物]

特異性 83% [10/12 物質または化学物質混合物]

擬陽性率 17% [2/12 物質または化学物質混合物]

擬陰性率 8% [1/12 物質または化学物質混合物]

よって、EpiDerm は R35/I および R34/II & III の区別ができ、24 物質中 19 物質の結果が、3 施設で同じように判断されている。残った物質においても、不一致は 3 物質の 6 試験中 1 回、2 物質で 6 試験中 2 回、となっており、再現性も高いとされている。

表 4-5 . EPISKIN™ および EpiDerm™ 試験法の比較表 (ICCVAM⁴)

	EPISKIN™	EpiDerm™ (EPI-200)
Assay	Reconstructed human epidermis and a functional stratum corneum (not an animal model). Tissue approximates the barrier of normal human skin.	
Known limits of use	No known restrictions except for chemicals that reduce MTT. Although a relatively small numbers of chemicals have been evaluated in some chemical classes (i.e., cleaners and detergents), classified by ECVAM as otherwise without limits.	
Tissue construct acceptability	QC measures are based on historical laboratory control data.	
Materials, equipment, and supplies needed	Similar	
Replicates	Single tissue (culture)/experiment (ECVAM, 2000b) or 3 replicates/experiments (OECD, 2001c)	Duplicate tissues/experiment, experiment replication if needed
Dosing procedures	Liquids: 50 µL applied neat Solids: 20 mg + saline	Liquids: 50 µL applied neat Solids: 25 mg + 25 µL H ₂ O
Exposure duration	3 minutes, 1 hour, 4 hours	3 minutes, 1 hour
Endpoint	Relative cell viability compared to concurrent negative control, based on MTT assay (measure of mitochondrial function); assay based on optical density.	
Negative and positive controls	No vehicle control (undiluted test material used) Negative control: saline Positive control: glacial acetic acid	No vehicle control (undiluted test material used) Negative control: water Positive control: 8.0 N KOH
Acceptable range of control responses	Negative control: 4-hour optical density at 545-595 nm = 0.113-0.309 for MTT incubations at 20-28°C. Positive control: viability at 4 hours must be 0-20%.	Negative control: 3-min and 1-hour optical density at 570 or 540 nm = ≥0.8. Positive control: viability at 3 min must be ≤30%.
Data analysis	Determination of relative viability at each exposure duration. No statistical analysis.	
Positive response	Relative cell viability <35% at any exposure duration (=packing group).	Relative cell viability <50% after 3 minutes and/or <15% after 60 minutes.
Criteria for accepting or rejecting a test	Acceptable control values Test repeated if inconsistent toxicity response pattern across exposure durations (i.e., less toxicity at a longer exposure duration) or if corrosivity classification is variable	Acceptable control values Test repeated if difference in viability between duplicate tissues >30% and the corrosivity classification is variable, or (recommended) if the resulting viability is near to a classification cut-off.

引用文献

- 1) OECD guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for new guideline: 431, in vitro Skin Corrosion: Human skin model test.
- 2) Botham, P. A., et al., A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing, ATLA, 23, 219-255 (1995)
- 3) Fentem, J. H., et al., The ECVAM International Vnvalidation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and Evaluation by the management team, Toxicology in Vitro, 12, 483-524 (1998)
- 4) ICCVAM (2002) NIH Publication No. 02-4502 ICCVAM Evaluation of EPISKIN™, EPIDERM™(EPI-200) and Rat skin transcutaneous Electrical resistance (TER) assay.
- 5) Liebsch, M., et al. (2000), The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing, ATLA, 28, 371-401.

第5章 ヒト皮膚モデルの日本における評価

評価委員会では、ヒト皮膚モデルを用いた腐食性試験代替法の可能性と限界を明らかにすることを目的に日本で実施されたバリデーション結果を評価した。本章では、その結果について記載する。

5-1) 評価したヒト皮膚モデル

ヒト皮膚モデルとしては、ECVAM でバリデーションが実施された 3 次元培養表皮モデル EpiSkin™ および EpiDerm™、日本でバリデーションされた三次元培養表皮モデル EPI-100 : EpiDerm™ (クラボウ : 図 5-1、添付資料クラボウファイル) および三次元培養皮膚モデル Vitrolife-Skin™ (グンゼ : 図 5-2、添付資料グンゼファイル⁷⁾) がある。しかし、入手の都合から、今回の評価対象は EpiDerm™ および Vitrolife-Skin™ とした。図に示す病理写真が示すように、EpiDerm™ (は角質層を持つ表皮からなるモデルであり、Vitrolife-Skin™ は線維芽細胞を含むコラーゲンからなる真皮層の上に角質層を持つ表皮層が重層化されている培養皮膚モデルである。

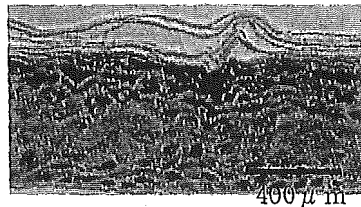


図 5-1. EPI-100 : EpiDerm™

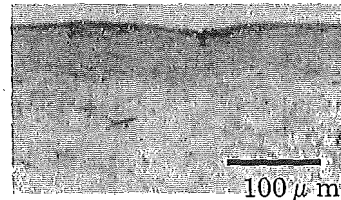


図 5-2. Vitrolife-Skin™

5-2) バリデーションの組織と実行 (添付資料 : バリデーション評価¹⁾)

5-2-1) 組織

以下の表 5-1 に示す参加施設、参加者が本バリデーションに協力した。試験実施施設数は 6、キットメーカー 2 社が協力した。被験物質のブラインド化と配送は国立衛研・薬理部 大野泰雄が、記録用紙の準備およびデータの収集、解析は東京理科大学工学部 吉村 功が担当した。

5-2-2) 試験実施期間

平成 16 年 2 月～3 月

5-2-3) 技術講習会と予備試験

平成 16 年 1 月 28 日に開催される技術移転の会を実施し、その後、試験法をより理解するため 2 月初旬に陽性対照物質などを用いた予備試験を実施した。試験担当者は、技術移転の会に出席した参加施設のうち、本試験開始までにキットを使用した経験のある者および予備試験を実施した者に限った。

表 5-1. バリデーション参加者

実験責任者

施設 No	氏名	所属
1	安東朋子	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 毒性部
2	稲垣勝裕	日本農薬（株）総合研究所 安全性・医薬研究センター、安全性グループ
3	久保木真美	日本曹達（株）小田原研究所安全性研究部
4	小島肇夫	日本メナード化粧品（株）総合研究所研究技術部門第二部安全性評価研究室
5	中村洋介	住友化学工業（株）生物環境科学研究所生化学グループ
6	小坂忠司	（財）残留農薬研究所 毒性部 免疫・急性毒性研究室

実験補助者

6	石嶺さやか	（財）残留農薬研究所 毒性部 神経毒性研究室
5	森本隆史	住友化学工業（株）生物環境科学研究所生化学グループ

キット提供者

	氏名	所属
	鳥島 久	倉敷紡績（株）バイオメディカル部
	元野 満	倉敷紡績（株）バイオメディカル部
	森川訓行	グンゼ（株）研究開発センター 第5研究室

施設コーディネーター等

	氏名	所属
	磯部直彦	住友化学工業株式会社、生物環境科学研究所
	金口幸裕	日本曹達（株）農業化学品事業部農業化学品登録グループ
	菅野 純	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 毒性部
	原田孝則	（財）残留農薬研究所 毒性部
	野方 勝	日本農薬（株）総合研究所 安全性・医薬研究センター
	服部光雄	日本曹達株式会社、農業化学品事業部、農業化学品登録グループ
	藤井義修	日本曹達（株）小田原研究所安全性研究部

日本動物実験代替法学会 バリデーション実行委員会

	氏名	所属
被験物質 担当	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
	大森 崇	京都大学大学院医学研究科医療統計
	川端留美	大鵬薬品工業（株）安全性研究所
統計解析 担当	吉村 功	東京理科大学工学部経営工学科

5-3) 被験物質

今回、使用した被験物質数は表 5-2 に示すように、陽性対照物質を除き、12 である。従来のバリデーションと比べ少ないが、OECD で適切なバリデーションに基づいて専門家会議で承認されたヒト皮膚モデルと同等のものであることから、完全に新規の方法と比べてより小数の被験物質でのバリデーション(catch up validation)でその妥当性を判断できると考えたものである。被験物質は表 4-2 に示す ECVAM バリデーションで使われた物質および腐食性を基本に、劇物判定基準も考慮して、腐食性の有無、物性などのバランスに配慮して選択した。このデータの信頼性については不明であるが、ECVAM のバリデーションデータとの比較も考慮するならば、妥当な in vivo データと考えて対処すべきであると考ええる。

バリデーション実施に際しては、表 5-3 に従い、国立衛研・薬理部においてブラインド化し、割付した試料を各施設に配布し、試験に供した。10 物質(選定された 12 物質より、各施設に腐食性物質 5 物質及び非腐食性物質 5 物質、計 10 物質を配布)、陽性対照物質:水酸化カリウム 10%水溶液、陰性対照物質 20% SLS 水溶液および塩化ベンザルコニウムを除く被験物質を配布した。配布した被験物質は冷暗所に保管し、すべて劇物として扱うことを施設に徹底した。また、被験物質の使用記録・保管・使用時の注意に関して、GLP に準じて行うよう徹底した。なお、塩化ベンザルコニウムは予備検討で陽性対照候補として試験したが、本試験では使用しなかったため、表 5-2 のリストから外した。

表 5-2. 被験物質

番号	被験物質名	腐食性*	コメント	規制	物性
1	Potassium hydroxide (10%)	C	陽性対照物質	劇物	液体
2	Sodium lauryl sulfate (20%)	NC	陰性対照物質		液体
3	Sulfuric acid (10%)	C	劇物判定薬	非劇物	液体
4	Octanoic (Caprylic) acid	C		非劇物	液体 bp 239.7°C
5	Sodium hydroxide (4.88%)	C	劇物判定薬	非劇物	液体
6	Phenol	C	劇物判定薬	劇物	固体 mp 40-43°C
7	Chromium trioxide	C		劇物	固体 mp 197°C
8	Phosphoric acid	C		非劇物	固体 mp 42.3°C
9	Sodium perborate	NC		非劇物	粉末 60°C で分解
10	Tetrachloroethylene	NC		非劇物	液体 bp 121°C
11	Potassium hydroxide (5%)	NC			液体
12	4-Amino-1,2,4-triazole	NC		非劇物	粉末 mp 159°C
13	L-Lactic acid	NC		非劇物	固体 mp 52.8°C
14	Isopropanol (2-propanol)	NC		非劇物	液体 bp 82.5°C

* C: corrosive, NC: non-corrosive (Botham, et al., 1995)

表 5-3. 被験物質の各施設への割付表

被験物質名	腐食性*	施設 1**	施設 2	施設 3	施設 4	施設 5	施設 6
Potassium hydroxide (10%)	C	1	2	3	4	5	6
Sodium lauryl sulfate (20%)	NC	7	8	9	10	11	12
Sulfuric acid (10%)	C	13	14	15	16	17	
Tetrachloroethylene	NC	18	19	20	21		22
Octanoic (Caprylic) acid	C	23	24	25	26		27
Potassium hydroxide (5%)	NC	28	29	30		31	32
Sodium hydroxide (4.88%)	C	33	34	35		36	37
4-Amino-1,2,4-triazole	NC	38	39		40	41	42
Phosphoric acid	C		43	44	45	46	47
L-Lactic acid	NC	48		49	50	51	52
Isopropanol (2-propanol)	NC		53	54	55	56	57
Phenol	C	58	59		60	61	62
Sodium perborate	NC	63	64	65	66	67	
Chromium trioxide	C	68		69	70	71	72

* * C: corrosive, NC: non-corrosive (Botham, et al., 1995)

** 施設名は施設番号に照らし合わせ、表 5-1 で確認できる。

5-4) プロトコール

EpiDerm™ で最終的にバリデーションされた方法²⁾と以下に示す日本におけるバリデーションで用いた方法は同じである。

その試験方法、評価基準を示す。

試験方法

- 1) EpiDerm™ の場合、送付されてきたキットの梱包を解き、ヒト皮膚モデルの入った 24 well プレートの状態を確認する。使用まで室温放置。付属の培養液を 37℃ で温める。1 時間後、6 well プレート 4 枚の well にそれぞれ培養液 1 mL を加え、ヒト皮膚モデルを各 well に置く。当日試験を開始できない場合には、キットのまま冷蔵庫で 1~2 日間保管する。
- 2) Vitrolife-Skin™ の場合、送付されてきたキットの梱包を解き、ヒト皮膚モデルの入った 24 well プレートを 37℃、CO₂ インキュベーターに入れる。付属の培養液を 37℃ で温める。1 時間後、6 well プレート 4 枚の well にそれぞれ培養液 1 mL を加え、ヒト皮膚モデルを各 well に置く。当日試験を開始できない場合には、この状態で 1~2 日間 37℃、CO₂ インキュベーターにて培養する。

以後は各ヒト皮膚モデル共通の操作となる。

- 3) 試験前のヒト皮膚モデルの確認 (すべての well について目視し、穴や明らかに薄い部分があるヒト皮膚モデルは使用しない。また、水滴等があれば、ヒト皮膚モデルを傷つけないように吸引除去する)

4) 被験物質を適用 (希釈等の操作は不要)

N=2 に適用。100 μ L 又は 100mg をキット上部に適用。

物性による適用方法：①粉体：被験物質を事前に計りこんで薬用紙に包んでおく (用時処理)。適用後、画鋸の後ろで軽く押さえる。吸水性がある場合には、化学天秤上で計り込む。

②固体：(40-50 $^{\circ}$ Cの熱をかけて溶ける場合) 37 $^{\circ}$ C前後で溶液ならば、溶液として適用する。

③固体 (その他)：乳鉢などを用いて均一な粉にし、①の方法で適用。

④クリーム・ゲル状 (低粘度)：ピペッターなどで計り取る。ピペッター未使用の場合には、被験物質を計りこんだ後、画鋸の後ろで軽く押さえる。

⑤クリーム・ゲル状 (高粘度)：被験物質を計りこんだ後、画鋸の後ろで軽く押さえる。

⑥溶液：ピペッターを用いて 100 μ L 適用。

溶媒対照：蒸留水、陽性対照もピペッターを用いて 100 μ L 適用。

5) 被験物質順に適用し、3分および60分間処理を行う。処理は室温。

6) 10mL の PBS で 2回洗浄。ヒト皮膚モデルをピンセットで摘み、かたむけて被験物質をペーパータオルにしませた後、2~3回 PBS 液中で軽くふってすすぐ。これを2回繰り返す。PBS は被験物質、処理時間毎に交換する。3分処理の洗浄に用いたビーカーは、そのまま同じ物質であれば、次の60分間処理に用いても良いが、PBS は交換する。

7) ペーパータオルなどでよく水を切った後、24well プレートに移し、EpiDermTM の場合には MTT を含む培養液をヒト皮膚モデルの下部に空気を入れないように 0.3mL、Vitrolife-SkinTM では 1mL を上部から加える。

8) 37 $^{\circ}$ C、CO₂ インキュベーターに約 2~3 時間入れる。

9) Well 中の MTT を含む培養液を吸引除去して、PBS を 2mL 加える。

10) PBS をペーパータオル上でよく切り、別の 24 well プレートにヒト皮膚モデルを移し、イソプロパノールを EpiDermTM の場合には 2mL、Vitrolife-SkinTM では 1mL 加えて、フォルマザンを抽出する。なお、Vitrolife-SkinTM の場合には、直径 6 mm のパンチでくり貫いた適用部位を抽出に用いた。

11) 水滴が入らないように、プレートをシールして冷蔵庫にて一晩保存。

12) 96 well プレートに 200 μ L/well ずつ移す。1 well のみで測定してもよいが、2-3 well の平均値を用いてもよい。

13) マイクロプレートリーダーを用いて、OD₅₄₀ または OD₅₇₀ の吸光度を測定。

イソプロパノールのみを well に加えものを、ブランクとする。ブランクを 0 として各 well の吸光度を求める。

14) 生データをデータシートに入力。溶媒対照を 100% として、3分および60分間処理における生存率を計算。

15) 判定予測モデル

腐食性

3分で生存率 50%未満

3分で生存率50%以上、60分間で15%未満

非腐食性

3分で生存率50%以上、60分間で15%以上

この判定結果もデータシートに記載。試験は2回繰り返し、それぞれの試験結果で判定する。結果が食い違った場合には、追加試験を実施した。表5-5に示すように、2回の試験で異なる結果が得られた場合の判定については、3回目の試験を実施し、その結果を合わせ、3回の試験結果を基に多数決で判定した。

なお、本プロトコールは、表4-5に示したEpiDerm™に準じた試験法であり、EPISKINの試験法とは若干異なる。EpiDerm™とVitrolife-Skin™のプロトコールの相違点を抜粋して、表5-4にまとめた。

表5-4. EpiDerm™とVitrolife-Skin™プロトコールの相違点

No.	項目	EpiDerm™	Vitrolife-Skin™
1	キット使用までの保管温度	冷蔵庫	37℃
2	MTT処理の培養液量	0.3mL	1mL
3	イソプロパノール抽出量	2mL	1mL
4	くり貫き	なし	直径6mmパンチ使用

5-5) バリデーションの結果について

5-5-1) データの信頼性

本バリデーション研究はGLPで実施されてはいないが、GLPの精神に則り実施された。即ち、試験実施の際にはキットの搬入から、被験物質の適用、ODの測定などで詳細な記録を求め、データの入力もミスしにくい入力用紙を用いている。また、データおよび試験の記録は、すべて大野または吉村まで送付され、その内容が確認された後に被験物質コードが開示されており、得られたデータの信頼性は高いと考える。

5-5-2) In vivo データとの対応性

表 5-5 に全試験結果を示し、表 5-6 および 5-7 に陽性対照物質である Potassium hydroxide (10%) を除き、個々の施設で得られたすべての試験結果をまとめた。

表 5-5 : EpiDerm 及び Vitrolife skin のバリデーション結果

2 回の繰り返し実験を行い、その判定結果 (P: 腐食性、N: 非腐食性) が相違した時に、追試を行い、その結果を合わせて多数の結果を総合判定とした。施設名は表 5-1 を、被験物質名は表 5-3 を参照されたい。

施設 1

chemical code	1	13	18	23	28	33	38	48	58	63	68
EpiDerm 1 回目	P	N	N	P	P	P	N	N	P	N	P
EpiDerm 2 回目	P	N	N	P	P	P	N	P	P	N	P
EpiDerm 追試	P							P			
総合判定	P	N	N	P	P	P	N	P	P	N	P
Vitrolife skin 1 回目	P	P	N	P	P	P	N	P	P	N	P
Vitrolife skin 2 回目	P	P	N	P	P	P	N	P	P	N	P
Vitrolife skin 追試	P							P			
総合判定	P	P	N	P	P	P	N	P	P	N	P

施設 2

chemical code	2	14	19	24	29	34	39	43	53	59	64
EpiDerm 1 回目	P	N	N	P	P	P	N	P	N	P	N
EpiDerm 2 回目	P	P	N	P	P	P	N	P	N	P	N
EpiDerm 追試	P	P		P	P					P	
総合判定	P	P	N	P	P	P	N	P	N	P	N
Vitrolife skin 1 回目	P	P	N	P	P	N	N	P	N	P	N
Vitrolife skin 2 回目	P	P	N	P	P	P	N	P	N	P	N
Vitrolife skin 追試	P				P	P			N		N
総合判定	P	P	N	P	P	P	N	P	N	P	N

施設 3

	chemical code	3	15	20	25	30	35	44	49	54	65	69
EpiDerm 1回目		P	N	N	P	P	P	P	P	N	N	P
EpiDerm 2回目		P	P	N	P	P	P	P	P	N	N	P
EpiDerm 追試		P	P		P	P			P			
総合判定		P	P	N	P	P	P	P	P	N	N	P
Vitrolife skin 1回目		P	P	N	N	P	P	P	P	N	N	N
Vitrolife skin 2回目		P	N	N	P	P	P	P	P	N	N	?
Vitrolife skin 追試		P	P		P	P			P			
総合判定		P	P	N	P	P	P	P	P	N	N	N

施設 4

		4	16	21	26	40	45	50	55	60	66	70
メナード												
EpiDerm1回目		P	P	N	P	N	P	P	N	P	N	P
EpiDerm2回目		P	P	N	P	N	P	P	N	P	N	P
EpiDerm 追試		P						P				
総合判定		P	P	N	P	N	P	P	N	P	N	P
Vitrolife skin 1回目		P	P	N	P	N	P	P	N	P	N	P
Vitrolife skin 2回目		P	P	N	P	N	P	P	N	P	N	P
Vitrolife skin 追試								P				
総合判定		P	P	N	P	N	P	P	N	P	N	P

施設 5

	chemical code	5	17	31	36	46	51	56	41	67	71	61
EpiDerm 1回目		P	P	P	P	P	N	N	N	N	P	P
EpiDerm 2回目		P	P	P	P	P	P	N	N	N	P	P
EpiDerm 追試		P	P				P					
総合判定		P	P	P	P	P	P	N	N	N	P	P
Vitrolife skin 1回目		P	P	P	P	P	P	N	N	N	P	P
Vitrolife skin 2回目		P	P	P	P	P	P	N	N	N	P	P
Vitrolife skin 追試												
総合判定		P	P	P	P	P	P	N	N	N	P	P

施設 6

	chemical code	6	22	27	32	37	42	47	52	57	62	72
EpiDerm 1回目		P	N	P	P	P	N	P	P	N	P	P
EpiDerm 2回目		P	N	P	P	P	N	P	P	N	P	P
EpiDerm 追試												
総合判定		P	N	P	P	P	N	P	P	N	P	P
Vitrolife skin 1回目		P	N	P	P	P	N	P	P	N	P	P
Vitrolife skin 2回目		P	N	P	P	P	N	P	P	N	P	P
Vitrolife skin 追試												
総合判定		P	N	P	P	P	N	P	P	N	P	P

表 5-6 : EpiDerm™の結果まとめ

	Vitro	Corrosive	Non-Corrosive
Vivo			
Corrosive		29	1
Non-Corrosive		10 (5% KOH, Lactic Acid)	20

表 5-7 : Vitrolife-Skin™の結果まとめ

	Vitro	Corrosive	Non-Corrosive
Vivo			
Corrosive		30	0
Non-Corrosive		10 (5% KOH, Lactic Acid)	20

EpiDerm™で腐食性物質を正しく腐食性と判定した事例は6被験物質、延べ30試験中、29試験であり、感度(sensitivity)は29/30、即ち、96.7%であった。一方、非腐食性物質を正しく非腐食性と判定した事例は6被験物質30試験中、20試験であり、特異性(specificity)は20/30、即ち66.7%であった。なお、非腐食性物質を誤って腐食性物質と判定したのは、5% Potassium hydroxideとLactic acidであり、この場合、いずれの施設でも腐食性物質と判定した。腐食性との結果が得られたもののうち、真に腐食性である割合、陽性予知能力(positive predictivity)は39の陽性事例の内29例、即ち、74.4%であった。非腐食性との結果が得られたもののうち、真に非腐食性である割合、陰性予知能力(negative predictivity)は21の陰性事例の内20例、即ち95.2%であった。1点の偽陽性を詳しくみると、施設1において、腐食性物質Sulfuric acidをEpiDerm™で2回とも陰性と判断した。この結果を調

べてみたが、60分処理の生存率が18.54%および38.80%であり、1回目の値が腐食性の判断基準である15%未満と比較して、近い数値であった。

合計すると、結果がいずれも正しい判定結果が得られた割合、一致率は60試験中49例、即ち81.7%であった。

Vitrolife-Skin™では感度は30/30、即ち100%であり、特異性は20/30、即ち66.7%、陽性予知能力は30/40、即ち75%、陰性予知能力は20/20、即ち100%、一致率は50/60、即ち83.3%であった。EpiDerm™の場合と同様に、非腐食性物質を誤って腐食性物質と判定したのは、5% Potassium hydroxide と Lactic acid であり、いずれの施設でも腐食性物質と判定した。

これらのように、いずれの場合も、EpiDerm™と Vitrolife-Skin™によりほとんど同じ結果が得られた。また、判断を誤る物質も同じであった。

5-5-3) 施設内再現性

2回の本試験において、施設内で異なる結果が出たのは、EpiDerm™においては、72試験の内 sulfuric acid、Lactic acid で各2施設であり、食い違いが生じた割合は4/60、即ち、6.67%であった。データは示していないが、sulfuric acidにおける施設2の60分後の細胞生存率が1回目17.26%、2回目9.46%、3回目12.02%、および施設3の60分後の細胞生存率が1回目15.72%、2回目10.58%、3回目9.01%と基準の15%前後に推移した結果による。Lactic acidにおいても、施設1の60分後の細胞生存率が1回目16.55%、2回目13.39%、3回目7.19%、および施設5の60分後の細胞生存率が1回目15.85%、2回目12.01%、3回目15.89%（ただし、3分後の生存率18.01%であったため陽性と判断）と基準の15%前後に推移した結果による。Vitrolife-Skin™においては、sulfuric acid、Octanoic acid、Sodium hydroxide (4.88%) で各1施設であり、食い違いが生じた割合は3/60、即ち、5.00%であった。sulfuric acidにおける施設3の60分後の細胞生存率が1回目5.90%、2回目16.09%、3回目6.34%と基準の15%前後に推移した結果による。Octanoic acidにおける施設3の60分後の細胞生存率が1回目21.37%、2回目11.77%、3回目10.71%であった。Sodium hydroxide (4.88%)においても、施設2の3分後の細胞生存率が1回目55.12%、2回目15.41%、3回目17.51%と基準の50%前後に推移した結果による。このように、判定基準前後の値で判定が割れた場合でも細胞生存率の値は極めて近い値であり、施設内再現性は高いと判断した。

5-5-4) 施設間再現性

施設における最終判定が異なった場合は、EpiDerm™においては、12物質中、施設1のsulfuric acidの結果が他の4施設の腐食性という判定結果と異なった場合のみであった。sulfuric acidの食い違いが生じた割合は1/5、即ち、20%であったが、12物質中1物質であった。データは示していないが、施設1の60分後の細胞生存率が1回目18.54%、2回目38.80%であり、この施設のみ陰性と判断した。Vitrolife-Skin™においてはなく、いずれも極めて施設間再現性は高いと判断した。

5-5-5) in vivo データの対応性

被験物質数を分母として計算した感度、特異性、および正確性についての今回の結果を表 5-8 にまとめた。EpiDerm™および Vitrolife-Skin™の感度、特異性、正確性の比較はまったく同じであり、ヒト皮膚モデル間に差はないと考える。ECVAM の結果と比べてもほぼ同等の結果であると考えられる。むしろ、同じ培養皮膚でも偽陰性が多い EPISKIN™の予測性は高くない。これは培養皮膚の性能の差というよりも、方法の違いによるものとする。EpiDerm™の方法も Pre-Validation を経て、改良された経緯があり、現方法がもっとも高い予測性を求めやすいと考える。日本の偽陰性が 0% であることは理想的な結果であるが、バリデーション結果が優れていたのかの判断は、被験物質の数や選択も考慮し、慎重に行うべきである。

表 5-8. EpiDerm™および Vitrolife-Skin™の感度、特異性、正確性の比較
(国立衛研、sulfuric acid を除外して計算)

	EpiDerm™	Vitrolife-Skin™	EpiDerm(ECVAM)	EPISKIN(ECVAM)
試験物質数	12	12	24	60
感度	100% (12/12)	100% (12/12)	92%	82%
特異性	66.7% (4/6)	66.7% (4/6)	83%	84%
正確性	83.3% (10/12)	83.3% (10/12)	92%	83%
偽陽性率	16.7% (2/12)	16.7% (2/12)	17%	16%
偽陰性率	0% (0/12)	0% (0/12)	8%	18%

5-5-6) その他の面からの考察

A. プロトコールの改善事項

Vitrolife-Skin™において、強度のアルカリにより本ヒト皮膚モデルの支持組織であるコラーゲンスポンジが完全に溶けてしまい、腐食性の判定に支障を来した。今回の判定においては、強い刺激性があるものとして、腐食性と判定したが、SOP 上もそのように改定する必要がある。なお、着色物質の中には、細胞や培養基材への吸着の強いものがあることも考えられることから、それら被験物質の場合には取り扱いには注意する必要がある。また、ポンチで切り取る組織の大きさがヒト皮膚モデルの膨潤率により変化する可能性があり、注意を喚起する必要があるとされた。更に、Vitrolife-Skin™では被験物質として用いたアルカリがコラーゲンスポンジに残留することにより発色が影響される場合があり、このような被験物質の場合ではコラーゲンスポンジのみのブランクが必要であった。

引用文献

- 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.
- 2) 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.

- 3) 吉村 功ら(2005)日本動物実験代替法学会バリデーション委員会、皮膚腐食性試験バリデーション結果報告.