

ら、考察にあたって留意する必要がある。

- 6) 1回目と2回目の結果があるニッケルとコバルトの結果を総合的にまとめる必要はないか。

回答：総合的にまとめることはバリデーション委員会としては考えていない。ニッケルとコバルトの1回目の結果はバラツキが大きく、改善された2回目とは別々の結果として解釈すべきと考える（大森）。

- 7) 溶媒 DMSO の結果にバラツキが大きい。炎症によるものではないか？ また、報告書には「投与時に注意をすれば DMSO を溶媒として利用できる」という記載になっているが、どう注意するのかを詳しく述べてもらいたい。

回答：DMSO は皮膚になじみ難いという情報を技術講習会等で実施施設に与え、確実に塗布するように注意した。炎症については、1% SLS 水溶液の塗布を並行に行っているため、炎症があったとしても、どちらの物質によるものか判断できない（小島、大森）。

- 8) 概括報告書の第2実験の要約および第2実験の報告書の結論には「LLNA-DA 法は金属塩にも使用可能」と書かれているが、第2実験において金属塩で高い施設間再現性を示しているが、アレルギー物質である硫酸ニッケルを陽性と評価できないことから、誤解を受けない表現にした方が良いと考えられる。

4. LLNA-DA の最終評価について

以上の質疑応答後、評価委員にて最終評価のまとめ方について議論された。

1) 施設間再現性

バリデーションレポートに提示された再現性の基準 $\exp(\tau^2)$ が 1.2 以下に基づく判定については、グラフと照らし合わせても妥当であると考えられた。また、この方法による判定で施設間再現性はおおむね良好と判断された。ただし、析出や沈殿が認められた被験物質については、事前調製による物質の安定性が施設間再現性に影響した場合もあつたのではないかと考えられた。そのため、物質の安定性に問題がないと推定される物質のみを用いて施設間再現性について検討し、全物質における検討結果と合わせて考察し、本方法の施設間再現性について結論を出すべきこととされた。なお、物質の安定性に問題があると推定される物質についても施設間再現性について検討し、施設間再現性の変動要因などを考察することとした。

物質の安定性については、3-アミノフェノールをはじめ本研究に用いた被験物質の安定性など有機化学の専門家に聞いてみなければいけない問題もあり、被験物質の安定性と結果の解釈には（また、実験を行う際にも）注意が必要であるとされた。（奥田有機化学部長の話では p-aminophenol ほどではないが、溶液として放置すると酸化される可能性が高い。アルカリ性だとそれが更に早まる可能性があるとのことであった。）小島オブザーバーに、ダイセルで経時的な物質の安定性を測定できるか打診するよう依頼がなされた。なお、レポートには全物質についての物質ごとの施設間再現性の結果が提示されていることから、仮に、析出・沈殿が試験を実施した大部分の施設で認められた物質 C、E、H、J、K（具体的な物質名は註表 1 を参照されたい。）とそれ以外の結果を見てみると、物質 C、E、H、J、K では再現性が良好な物質とそうでない物質とがあり、それ以外の物質では再現性が良好であったことから、LLNA-DA 法による施設間再現性はおしなべて良好であった。

2) 代替可能性

LLNA-DA 法による代替可能性についての結果は、LLNA 法と比較して、感度 87.5%、特異度 75%、

正確性 83%と良い結果が出ている。LLNA-DA 法が LLNA 法と同程度の性能を有するののかという視点で議論された。LLNA 法で中程度の感作性を有する 3-アミノフェノールが LLNA-DA の結果では 3 施設とも陰性であることは留意すべきとされた。しかし 3-アミノフェノールについては溶液中で不安定であることから、この結果のみから LLNA-DA 法による代替の可能性を否定することはできないとした。また、LLNA 法で強度 (strong) に分類される塩化コバルトに関して、第 1 実験および第 2 実験のいずれにおいても施設間で判定結果に相違がみられたことは LLNA-DA 法の感度を LLNA 法と比較する上で留意すべきとされた。この点については、大森委員長から第 1 実験の 1 施設で高濃度群の個体に死亡例が発現したため、第 1 実験の残り 2 施設と第 2 実験では当初予定した最高濃度で実験が行われなかったことが原因かもしれないと説明された。

最終的にバリデーションで用いた 14 物質の結果と一次評価報告書に書かれている情報だけでは代替の可能性について結論を持たず、LLNA 法と LLNA-DA 法の両者の結果のある物質についてのデータを現時点で集め、合わせて検討したうえで結論をもつこととした。そのため、評価委員会は小島オブザーバーに、ダイセル、国立衛研 五十嵐先生に連絡して論文や LLNA との比較ができる結果の提出を打診するよう依頼した。なお、一次報告書に、陰性物質が少なかったことが指摘されていたが、今回のバリデーションでは LLNA 法での陰性物質が新たに 5 物質追加され、Nickl sulfate を除けば、それらがいずれの施設でも陰性と評価された (要確認) ことから、LLNA-DA 法の陰性検出力は良いものと考えられた。その他、LLNA 法にも通じることであるが、今回の DMSO を溶媒とした時のように刺激性があると考えられる場合の、刺激性と感作性の識別をどのように可能とするかについては、今後の課題である旨の記述も必要ではないかという意見がだされた。

以上の内容を考慮して、一次評価報告書に加え、バリデーション結果を考慮して二次評価報告書を作成することが確認された。

スケジュールとしては、大野委員長が 9 月末までに作成し、10 月に各委員が加筆してまとめるとされた。

その他、この評価の最終ゴールは何かという質問が萩野委員からなされた。行政試験法として承認申請に使えるか否かを評価することであり、そのために JaCVAM として OECD ガイドラインや厚生労働省への提案書の提出などを考えていると大野委員長より説明された。

大森オブザーバーから、開発者の在籍するダイセルへの連絡および彼らに配慮した評価進行をお願いしたいと要望が出された。

5. LLNA-BrdU バリデーションの進捗について

LLNA-BrdU バリデーション実行委員長の小島オブザーバーから現在の進捗について説明があった。1 回目の実験で不備な結果が得られたため、年内終了を目標に 2 回目のバリデーションを計画中であると説明された。

6. その他

LLNA の peer review が ICCVAM で計画されている。日本から牧先生、金澤先生および小島が対処すると小島オブザーバーから報告があった。

LLNA non-RI シンポジウムが 9 月にイスラで開催される。日本から大森先生、出原先生、武吉先生、寒水先生は出席の予定と小島オブザーバーから報告があった。

以上

註

表1：バリデーションで用いられた被験物質

被験物質 A	2,4-dinitrochlorobenzene
被験物質 B	hexylcinnamic aldehyde
被験物質 C	3-aminophenol
被験物質 D	glutaraldehyde
被験物質 E	cobalt chloride
被験物質 F	isoeugenol
被験物質 G	formaldehyde
被験物質 H	dimethyl isophthalate
被験物質 I	isopropanol
被験物質 J	nickel sulfate
被験物質 K	abietic acid
被験物質 L	methyl salicylate
被験物質 M	lactic acid
被験物質 N	potassium dichromate

2007年第二回 LLNA 評価委員会議事録

日時：平成19年11月8日（木）13:00-16:00

場所：国立医薬品食品衛生研究所 8号館 センター会議室

出席者：高木弘毅（サノフィ・アベンティス株式会社 研究開発本部）、萩野滋延（資生堂、ライフサイエンス研究センター代替法研究所）、大野泰雄（国立衛研）、手島玲子（国立衛研・代謝生化学）

オブザーバー：大森 崇（京都大学大学院 医学研究科）、笛木 修（医薬品医療機器総合機構）、出原賢治（ダイセル）、小島 肇（国立衛研・薬理部） 以上、順不同、敬称略

配布資料：

1. 2007年第一回会議議事録
2. ダイセル化学工業(株)より提案のあった皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA法)の一次評価報告書
3. ダイセル化学工業(株)より提案のあった皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA法)の二次評価報告書(案)
4. LLNA-DA法による31物質の評価結果
5. LLNA-DA法バリデーション研究における追加資料 被験物質の溶媒中での安定性に関する検討結果 6-9欠番
10. ECVAM Workshop Alternative Endpoints for the Local Lymph Node Assay, September 25-26, 2007, Ispra, Italy
11. Revised ECVAM Draft LLNA Performance Standards: Updated Comparison to ICCVAM Draft

議題：

会に先立ち、大野委員長より、先回会議において2次評価報告書の締め切りを9月末と設定したが、案の作成が遅れたことが陳謝された。

1. 前回議事録および2次評価報告書の確認

8月3日までにメールで確認された第一回議事録案に、大野委員長が追加で加筆した議事録案が資料1として提出された。大野委員長が加筆した内容が確認された。

次に、大野委員長より資料3に示す2次評価報告書(案)の内容が紹介された。本評価の第一目的はLLNA-DA法とLLNAとの比較検討であることが確認された。国立衛研 奥田有機化学部長からの化学物質の安定性に関するコメントを加えているが、本会にてダイセルより被験物質の安定性や社内データについて報告を頂き、その内容をもとに追記するとの見解が示された。

2. LLNA-DA法についてのダイセル追加報告

第一回委員会における追加資料の要求に応じて、ダイセル 出原氏より、被験物質の安定性、社内データも合わせたLLNA等との対応性について報告がなされた。まず、資料5を用いて、被験物質の溶媒中での安定性に関する検討結果が報告された。被験物質の中で比較的安定性に疑問が持たれたアピエチン酸、3-アミノフェノール、ヘキシルシンナムアルデヒドの3物質の配布溶媒中における4℃、25℃の安定性試験の結果が報告された。その結果、2週間まで3物質とも両温度で安定であるとの説明がなされた。

LLNA等との対応性については、資料4に示すように、以前に提出した17物質に加え、合計31物質のLLNA, Maximization test およびヒト試験結果との対応性が報告された。LLNA-DA法の結果はいずれにも感度、特異度が高いと説明された。

3. 海外の動向

1) ECVAM ワークショップ

資料 10 を用い、本年 9 月に開催された ECVAM ワークショップに出席した大森氏および出原氏よりシンポジウムの内容が紹介された。ワークショップの内容は予想していた作用機作の検討ではなく、Dr Stokes から提案されたバリデーションの performance standard についての議論が中心であった。なお、日本の LLNA-DA バリデーション結果は高く評価され、議事をまとめた proceeding に掲載される予定であると説明があった。

2) ICCVAM

資料 11 を用い、小島氏よりこの performance standard については、来年 3 月に peer review が予定されており、改良 LLNA 法について国際的なバリデーションの統一化が検討される予定であると説明された。

4. その他

現在実施中の LLNA-BrdU 法のバリデーションについては、LLNA-DA 評価委員会の被験物質に関するコメントを参考に、各種用量を計測した被験物質を送付し、用時調製にて各施設で実験が進んでいると小島氏より説明があった。

以降、オブザーバーの大森氏（バリデーション実施者）、出原氏（申請者）が退席して評価委員が意見交換を行った。

5. LLNA-DA の最終評価について

大野委員長より、施設間評価を行うとともに、ダイセルより提出のあった 31 物質にバリデーションのみで検討された 2 物質を加えて、LLNA 等との対応性評価したいと提案された。以下に質疑応答内容を記す。

バリデーション結果を吟味して施設間再現性を確認し、それが良好と判断されてから対応性について検討すべきと考える。ダイセルの被験物質が安定であったという結果は認めるが、容器が溶ける可能性を考慮に入れ、同じ容器を用いた安定性試験結果ではない。懸濁液で結果がばらついた事実は明確である。均一な物質を適用できたというバリデーションの担保にはなっていない（高木委員）。

懸濁のあった被験物質の結果を除いて解析し、施設間再現性をみてはどうか（萩野委員）。

すでに終了した実験結果を知った上で除いて評価することはよくない（高木委員）。

以上の議論から、バリデーションのすべての結果を用いて再現性について評価する。ただし、ダイセルの溶媒中での安定性試験結果やバリデーションの際、被験物質の析出があったことは考察に明記すべきとされた。

5-1 施設間再現性

グルタルアルデヒドやホルムアルデヒドは陽性といっても SI が 3 をわずかに越える程度である。バリデーション報告書には「本来このような結果であれば追試験を行っている」と記載がある（高木委員）。

1 回目の金属の結果を除くとデータは安定し 2 回目の金属の結果は安定している。金属は 2 回目の結果で施設間差を判断すべきと考える。施設間再現性は高いと考える（手嶋委員）。

Exp (σ^2) が 1.2 未満であり、1 回目の施設間変動は極めて少ないと考えられる。2 回目の金属が安定しているのは、教育を徹底したとバリデーション報告書に記載されている（高木委員）。

析出のある物質の結果はばらついていないようである（手嶋委員）。

A00 と他の溶媒のバラツキから差があるといえないか（萩野委員）。

ATP の測定の際に生ずる施設間の差が施設間差より大きいと考えられる。溶媒によって反応性に差があるとは言えないと考える（高木委員）。

以上の議論から、施設間再現性は概ね良いと結論された。析出があるなどの問題があったことは考察に明記することで報告書をまとめるとされた。

5-2 LLNA との対応性

施設間再現性が高いことが認められたことから、LLNA との対応性について検討した。

3-aminophenol は in vivo 陽性にも拘らず、すべての施設で陰性であった。析出もない（大野委員長）。

LLNA の陽性・陰性を区別できると考える（萩野委員）。

また、Maximization test、ヒト試験結果との比較について対応性を検討した。

陽性・陰性の区別はできている（萩野委員）。

硫酸ニッケルが食い違う点は LLNA の検出力の問題と考える。金属は溶解度限界濃度において適用されており、陽性とすることは不可能であろう（高木委員）。

皮膚科医より、ニッケルのような感作物質は感作まで時間がかかると聞いたことがある。短期間暴露で評価する LLNA 法全体に関わる限界かもしれない（小島）。

SI3 値と LLNA EC3 の比較検討をバリデーション報告書ではしていない。EC3 と比較して強度を比較すべきではないか（萩野委員）。

考察に SI3 値のバラツキについて考察すべきである。SI と EC の施設毎の比較結果がないことが気になる（高木委員）。

これらの結果を踏まえ、EC3 の議論は厳密にはできないが、バリデーション結果とダイセルの結果を用いて対応性を評価できると判断したい。LLNA-DA の感作性の予測性は高いという内容を報告書に記載するとされた。

以上の検討結果を受け、大野委員長が第 2 次評価報告書をまとめるとされた。今後メールでこの報告書案を検討し、完成後、LLNA-DA 評価を終了することになった。特に、face to face の議論が必要な場合には再度会議を開催するとされた。

以上

4) 皮膚刺激性試験代替法の第三者評価

研究要旨

皮膚刺激性試験代替法として欧州で認証されているEPISKINについて、
専門家による第三者評価を実施している。

A. 研究目的

化粧品分野において、2003年に採択されたEU directive 7次改正において、2004年からEU域内における最終製品の動物実験禁止が適用され、2009年を持って、最終製品および化粧品成分に対する動物実験禁止、および販売の禁止が適用される。これに対応するため、2007年4月、ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)が皮膚刺激性試験代替法として、培養表皮モデルEPISKINを認証した。EPISKINに被験物質を15分間処理し、48時間後にMTT法による細胞毒性とインターロイキン1 α を評価指標として測定するものである。この評価結果を日本においても第三者の専門家により確認するために、まず、皮膚刺激性ワーキンググループを設立して委員の協力のもと評価資料を準備した。次にこの資料を用いて第三者評価を行うため、皮膚刺激性評価委員会を設立した。

B. 研究方法

B-1) 皮膚刺激性評価委員会委員

委員長

岡本裕子(コーセー)

委員

寒水孝司(大阪大学)

森本隆史(住友化学)

杉林堅次(城西大)

鹿庭正昭(国立医薬品食品衛生研究所)

赤松浩彦(藤田保健衛生大学)

B-2) 皮膚刺激性ワーキンググループ 委員

寒水孝司(大阪大学)

實川節子(ロレアル)

鳥島久(クラボウ)

山口達也(東洋紡)

森川訓行(グンゼ)

小島肇(国立医薬品食品衛生研究所)

B-3) 方法

EPISKINの第三者評価として、JaCVAMからESAC statementの内容を確認の上、翻訳および追加資料の作成が依頼された。この翻訳はICCVAMやECVAMにも許可を得ている。

以上の提案をもとに、今後の進め方について岡本委員長を中心に意見交換された。内容の確認といっても、第三者評価をするつもりで資料を読まなければならない。OECDガイダンス文書No.34に示された第三者評価の項目毎に確認していく必要があるとされた。

C. 結果および考察

評価委員会にて内容を確認し、作業を進めている。

D. 資料

資料4-1 ESAC statement



EUROPEAN COMMISSION
DIRECTORATE GENERAL JRC
JOINT RESEARCH CENTRE
Institute for Health and Consumer Protection
European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)

STATEMENT ON THE VALIDITY OF *IN-VITRO* TESTS FOR SKIN IRRITATION

At its 26th meeting, held on 26-27th April, 2007 at the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Ispra, Italy, the non-Commission members of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC)¹ unanimously endorsed the following statement:

After a review of scientific reports and peer reviewed publications on the following range of *in-vitro* tests, which had been subjected to a full validation study:

1. EpiDerm (with MTT reduction and IL-1 α release);
2. EPISKIN (with MTT reduction and IL-1 α release);

of these, the EPISKIN method showed evidence of being a reliable and relevant stand-alone test for predicting rabbit skin irritation, when the endpoint is evaluated by MTT reduction, and for being used as a replacement (**based on the performance of the assay as specified in the annex**) for the Draize Skin Irritation Test (OECD TG 404 & Method B.4 of Annex V to Directive 67/548/EEC) for the purposes of distinguishing between R38 skin irritating and no-label (non-skin irritating) test substances. At the present time, the IL-1 α endpoint should be regarded as a useful adjunct to the MTT assay, as it has the potential to increase the sensitivity of the test, without reducing its specificity. This endpoint could be used to confirm negatives obtained with the MTT endpoint.

At this time, due to its high specificity, the EpiDerm model reliably identifies skin irritants, but negative results may require further testing (e.g. according to the tiered strategy, as described in the OECD TG 404). Improvement of the EpiDerm protocol should be made to increase the level of sensitivity.

This endorsement takes account of the dossiers prepared for peer review; the views of independent experts who evaluated the dossiers against defined validation criteria; supplementary submissions made by the Management Team; and the considered view of the Peer Review Panel appointed to oversee the process.

Thomas Hartung
Head of Unit
ECVAM
Institute for Health & Consumer Protection
Joint Research Centre
European Commission
Ispra

27 April 2007



EUROPEAN COMMISSION
DIRECTORATE GENERAL JRC
JOINT RESEARCH CENTRE
Institute for Health and Consumer Protection
European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)

1. The ESAC was established by the European Commission, and is composed of nominees from the EU Members States, industry, academia and animal welfare, together with representatives of the relevant Commission services.

This statement was endorsed by the following members of the ESAC:

Ms Sonja Beken (Belgium)
Ms Dagmar Jírová (Czech Republic)
Mr Tõnu Püssa (Estonia)
Mr Lionel Larue (France)
Mr Manfred Liebsch (Germany)
Ms Annalaura Stamatì (Italy)
Mr Jan van der Valk (The Netherlands)
Mr Constantin Mircioiu (Romania)
Mr Albert Breier (Slovakia)
Ms Argelia Castaño (Spain)
Mr Patric Amcoff (Sweden)
Mr Jon Richmond (UK)
Mr Carl Westmoreland (COLIPA)
Ms Vera Rogiers (ECOPA)
Ms Nathalie Alépée (EFPIA)
Mr Robert Combes (ESTIV)
Mr Hasso Seibert (European Science Foundation)

The following Commission Services and Observer Organisations were involved in the consultation process, but not in the endorsement process itself.

Mr Thomas Hartung (ECVAM; chairman)
Mr Jens Linge (ECVAM; ESAC secretary)
Ms Susanna Louhimies (DG Environment)
Ms Barbara Mentré (DG ENTR)
Ms Grace Patlewicz (ECB, DG JRC)
Mr Christian Wimmer (DG Research)
Mr Hajime Kojima (JACVAM)
Ms Laurence Musset (OECD)
Mr Barry Philips (Eurogroup for Animal Welfare)
Mr William Stokes (NICEATM, USA)

Annex

General information on the ECVAM skin irritation validation study

After extensive optimisation and prevalidation activities (see background to the SIVS here below), ECVAM launched a formal validation study on three *in vitro* test systems in 2003. Two of the assays employed reconstituted human epidermis models (EPISKIN, EpiDerm) and one, the skin integrity function test (SIFT) employed *ex vivo* mouse skin. The aim of the study was to replace the regulatory Draize skin irritation test (EU B. 4 method; OECD TG 404) currently performed on albino rabbits by assessing the relevance (predictive capacity) and reliability (reproducibility within and between laboratories) of these test systems with a set of 58 coded test chemicals. The goal of the study was to evaluate if the *in vitro* tests would predict *in vivo* classification according to the EU classification system using the risk phrase R38 for skin irritants and no classification for non irritants. In addition, the chemical selection was representative for the three categories [strong (category 2), mild (category 3) and non-irritants (no category)] of the Globally Harmonised classification System (GHS) for permitting a post-hoc evaluation of the results according to GHS. The validation study was conducted according to the principles and criteria documented in the OECD *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (No. 34). Furthermore, to ensure a high quality of the commercially produced human skin models, the facilities of the producers of the human skin models EPISKIN and EpiDerm were evaluated by independent auditors at the beginning of the ECVAM Skin Irritation Validation Study (SIVS). The study was sponsored by ECVAM, coordinated by a main contractor (ZEBET-BfR, Germany) and managed by a Management Team (MT; see table 1 for the composition of MT).

Table 1. Composition of the Management Team of the SIVS

Chair (Dr Phil Botham)
Co-chair (Dr Julia Fentem)
Sponsor representative (Dr Valérie Zuang, <i>alternate</i> : Dr Chantra Eskes)
Independent biostatistician (Dr Sebastian Hoffmann)
Representative of the main contractor (Dr Horst Spielmann)
Representative of the CSSC (Dr Andrew Worth)
ECB customer (Dr Thomas Cole)
<u>Representatives of the test systems:</u>
EPISKIN (Dr Roland Roguet)
EpiDerm (Dr Manfred Liebsch)
SIFT (Dr Jon Heylings)
<u>Observers from the US:</u>
ICCVAM (Dr Karen Hamernik; <i>alternate</i> : Dr Abby Jacobs)
NICEATM (Dr William Stokes; <i>alternate</i> : Dr Ray Tice)

A Chemicals Selection Sub-Committee (CSSC) was appointed to identify test chemicals to be used in the SIVS having high quality existing *in vivo* data with which to correlate the *in vitro* measurements. Since chemicals from the European Centre for the Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC) database of reference chemicals for skin irritation/skin corrosion had been extensively used in the preceding studies, the CSSC was requested to make use of novel sources for potential test

chemicals. For this purpose chemicals were selected from the New Chemicals Database (NCD) which is the central archive within the EU notification scheme for new commercial chemicals. In addition, existing chemicals readily available from major manufacturing and/or distribution sources were selected from alternative databases such as the Toxic Substance Control Act (TSCA) database maintained by the US Environmental Protection Agency (EPA) and the ECETOC database, excluding those chemicals used in the previous optimisation and prevalidation phases.

A total set of 58 chemicals comprising a set of 25 existing chemicals and 33 chemicals from the NCD were selected and tested in the SIVS. The selected chemicals (a) represented statistically justified sample sizes for distinguishing R38 from non classified chemicals, (b) provided a balanced representation of the three GHS categories to allow for post-hoc evaluation of the performance of the assays for that classification system, and (c) accounted as far as possible the large prevalence known to exist for chemicals which have oedema and erythema scores of 0. These chemicals were independently coded and distributed to the participating laboratories. The selected chemicals presented a variety of molecular structures, functional chemical groups, effect and use categories, as well as a wide range of physical-chemical properties. They represented a challenging set of chemicals relevant to current industrial commerce for the alternative methods being validated.

In phase 1 of the ECVAM SIVS, 20 chemicals (9 irritant, 11 non irritant) from NCD were tested under blind conditions in the lead laboratories (EPISKIN - L'Oreal, EpiDerm - ZEBET, SIFT - Syngenta). The methods applied (with Standard Operating Procedures, SOP's) were the refined, optimised protocols developed after the ECVAM prevalidation study. For the human skin model assays this consisted in applying the test chemicals to the surface of the skin for 15 minutes, followed by a post-treatment incubation period of 42 hours, and the subsequent assessment of their effects on cell viability by using the MTT assay.

The prediction model related to MTT used in Phases 1 and 2 was the following:

"The test substance is considered to be irritating to skin (R38), if the tissue viability after exposure and post incubation is less or equal (\leq) to 50%".

When cell viability (MTT reduction) was used as endpoint, the two skin models met the acceptance criteria set by the MT of the study. While the specificity (correct prediction of non-irritants) of both the EPISKIN and EpiDerm assays was 91%, their sensitivity (correct prediction of R38 irritants) was 67% and 56%, respectively. However, since almost all of the misclassified chemicals were lying at the threshold between irritant and non-irritant chemicals according to the EU classification scheme, the MT concluded that the predictive capacity of both EpiDerm and EPISKIN was sufficient to justify them to proceed to Phase 2. On the other hand, the predictive capacity of the SIFT method was considered inadequate. For SIFT, it was suggested that the lead laboratory re-evaluated the test protocol and prediction model, particularly in relation to the manner in which solids and non-surfactant materials are handled.

In Phase 2, all 58 chemicals were assessed in three different laboratories for each of the two reconstituted human skin methods. The EpiDerm test was conducted in the following laboratories: ZEBET (lead lab), Germany; Institute for *In vitro* Sciences (IIVS), USA; and BASF, Germany. The EPISKIN test was conducted in the following laboratories: L'Oréal (lead lab), France; Unilever, UK; and Sanofi-Synthélabo, France. Chemicals were re-coded from Phase 1 to ensure blind testing. The main endpoint

measured for both Epiderm and EPISKIN was cell viability measured by MTT reduction, as used in all previous testing. However, a second endpoint, interleukin-1 α release, was added for those chemicals which did not reduce cell viability below the threshold for predicting irritancy, to determine if it could be used to improve the sensitivity of the assays. This second endpoint was used in all three laboratories assessing EPISKIN and by the lead laboratory for Epiderm.

The prediction model related to the combined use of MTT and IL-1 α release in Phase 2 was the following:

The test substance is considered to be **irritant** to skin:
if the viability after 15 minutes of exposure and 42 hours of post-treatment incubation is more (>) than 50%, and the amount of IL-1 α release is more (>) than 60pg/ml.

The test substance is considered to be **non irritant** to skin:
if the viability after 15 minutes of exposure and 42 hours of post-treatment incubation is more (>) than 50%, and the amount of IL-1 α release is less or equal (\leq) to 60pg/ml.

The predictive capacities of the assays in this second phase are shown in Table 2. The within-laboratory reproducibility of classifications over three independent experiments meeting the acceptance criteria was 93.9% for EPISKIN (MTT) and 96.0% for EpiDerm (MTT). The between-laboratory reproducibility measured as the proportion of identical median classifications between laboratories was 89.5% for EPISKIN (MTT) and 88.5% for EpiDerm.

Table 2. Predictive capacities of EPISKIN and EpiDerm (MTT: based on the median classification per laboratory; MTT+IL1 α : based on the classification derived from the mean viability of the independent experiments per chemical and laboratory)

	EPISKIN (MTT)	EPISKIN (MTT+IL1-α)	EpiDerm (MTT)*
Sensitivity	74.7%	90.7%	57.3%
Specificity	80.8%	78.8%	83.8%
Concordance/Accuracy	78.2%	83.0%	72.4%

*The addition of IL-1 α to the EpiDerm protocol gave no improvement to the outcome

The study was forwarded to the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) with a proposal that EPISKIN could be considered as a replacement for the rabbit skin irritation method and Epiderm as a constituent of a testing strategy.

Background to the ECVAM skin irritation validation study

In 1998, the ECVAM Skin Irritation Task Force published a report on the actual status of *in vitro* skin irritation testing and proposed 10 "challenge chemicals" for which promising, concordant *in vivo* data from the rabbit test, *in vivo* data from 4hr human patch test, and *in vitro* data from the human skin model EpiDerm were available. Proponents of new *in vitro* test systems were encouraged to submit data obtained with new *in vitro* skin irritation test protocols for these chemicals (1) for assessment whether these tests could be considered in an ECVAM prevalidation study. At the same time the suitability of various endpoints for prediction of human skin irritation was evaluated in an EU 4th framework collaborative project in several human reconstructed skin models, revealing cell viability reduction (MTT reduction) and IL-1 α release the most promising endpoints. Because MTT reduction and IL-1 α release showed a high inter-correlation, and IL-1 α release was more variable, MTT-reduction was proposed to be the best endpoint for human skin models (2).

Of the test systems for which data were submitted to the ECVAM TF, five tests [perfused pig-ear, Prediskin, SIFT, EPISKIN, EpiDerm] had been considered promising for participation in the ECVAM prevalidation study. However, during the prevalidation study, two tests failed already in phase 2 due to insufficient reproducibility, whereas the other tests [SIFT, EPISKIN and EpiDerm] showed a sufficient intra- and interlaboratory reproducibility, but failed in their ability to correctly predict the skin irritation potential of 20 chemicals that were tested in phase 3 of the ECVAM prevalidation study (3). The ECVAM Management Team of the study therefore proposed refinement and optimisation of these three tests before considering them for formal validation.

In 2001, the ECVAM Skin Irritation Task Force and the laboratories responsible for the refinement of the tests met again and discussed ways forward to approach formal validation. In addition, since a post hoc analysis of prevalidation data for MTT reduction for EPISKIN and EpiDerm revealed similar sensitivity, it was recommended to develop a common test protocol for both skin models before the start of a formal validation study (4).

In November 2002, the ECVAM Skin Irritation Task Force (TF) discussed the refinements of the SIFT (5) and the skin model tests (6) and came to the conclusion that processing the tests to formal validation could be recommended. However, because all refinements were made using the 20 chemicals from the prevalidation study, the TF recommended to perform the SIVS in two phases: a first phase (phase 1) for the confirmation of the refinements made by the leading labs Syngenta (SIFT), L'ORÉAL (EPISKIN), and ZEBET (EpiDerm) by testing new chemicals in a controlled way under blind conditions. If the outcome of phase 1 were still promising, the tests would proceed to a second phase (phase 2), i.e. in a blind trial involving three laboratories per test.

During 2003, the EPISKIN test was further refined by L'OREAL by extending the post incubation period of the tissues (after 15 min chemical exposure) to 42 hours which allowed significant effects to increase, and recovery from weak effects.

In May 2003, an ECVAM Stakeholder Workshop recommended to conduct a formal validation study and to concentrate on the predictions of the EU classification system (R38 vs. no label), because the tests were developed and optimised for this classification scheme. L'ORÉAL and ZEBET collaborated then in developing a common test protocol to be used in the ECVAM SIVS, and evaluated it first with the 20 "challenge" chemicals of the ECVAM prevalidation study. In 2004, upon request of the ECVAM SIVS Management Team and in parallel to performing phase 1 of the SIVS, the database was further increased by testing all non-corrosive chemicals recommended in the ECETOC reference data base (ECETOC report No. 66). The data obtained in both skin models with the optimised common protocol were very promising, and published back to back in 2005 (7,8). The BfR was contracted in November 2003 further to the publication of a call for tender for the ECVAM SIVS by the European Commission in June 2003. The study started formally with the 1st Meeting of the SIVS Management Team (MT) on 17-18 November 2003.

Manuscripts on the outcome of the skin irritation validation study and on the chemicals selection, are currently being finalised for publication.

References

1. Botham, P.A., Lesley, K.E., Fentem, J.H., Roguet, R and J.J.M. van de Sandt (1998) Alternative Methods for Skin Irritation Testing: the Current Status. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 1, *ATLA* 26, 195-211
2. Faller, C., Bracher, M., Dami, N. and R. Roguet (2002) Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for assessment of Skin Irritation of cosmetics. *Toxicology In vitro* 16, 557-572
3. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne, C., Elliott, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., van de Sandt, J.J.M. and P.A. Botham (2001) A prevalidation study on *in vitro* tests for acute Skin Irritation: results and evaluation by the Management Team. *Toxicology In vitro* 15, 57-93

4. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliott, G. R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van de Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and A.P Worth (2002) Follow-up to the ECVAM prevalidation study on the *in vitro* tests for acute Skin Irritation. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 2. *ATLA* **30**, 109-129
5. Heylings J.R., Diot S., Esdaile D.J., Fasano W.J., Manning L.A. & Owen H.M. (2003). A prevalidation study on the *in vitro* irritation function test (SIFT) for prediction of acute skin irritation *in vivo*: results and evaluation of ECVAM phase III. *Toxicology In Vitro* **17**, 123-138.
6. Kandárová H., Liebsch M., Genschow E., Gerner I., Traue D., Slawik B. & Spielmann H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. *ALTEX* **21**, 107-114.
7. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and H. Spielmann (2005) The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on the Skin Irritation Tests - An assessment of the performance of the optimised Test. *ATLA* **33**, 351-367
8. Cotovió, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and G. Rubinstein (2005) The *in vitro* acute Skin Irritation of chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of the ECVAM Validation Process. *ATLA* **33**, 329-249

5) 眼刺激性試験代替法の第三者評価

研究要旨

眼刺激性試験代替法として欧米で認証されているウシ摘出角膜試験や鶏の摘出眼球試験について、専門家による第三者評価を実施している。

A. 研究目的

化粧品分野において、2003年に採択されたEU directive 7次改正において、2004年からEU域内における最終製品の動物実験禁止が適用され、2009年を持って、最終製品および化粧品成分に対する動物実験禁止、および販売の禁止が適用される。これに対応するため、2005年 ICCVAM および2007年11月、ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) がウシ摘出角膜試験や鶏の摘出眼球試験を強い眼刺激性を予測できる代替法として認証している。

この評価結果を日本においても第三者の専門家により確認するために、眼刺激性評価委員会を設立した。

B. 研究方法

B-1) 眼刺激性評価委員会委員 委員長

簾内桃子 (国立衛研)

委員 宮岡悦良 (東京理科大)

竹内小苗 (P&G)

小坂忠司 (残留農業)

山本直樹 (藤田保健衛生大)

増田光輝 (国立衛研)

B-2) 方法

欧米での評価が終了している眼刺激性試験

代替法としてウシ摘出角膜試験や鶏の摘出眼球試験の第三者評価として、ESAC statement や ICCVAM の Executive summary について内容確認の上、翻訳および追加資料の作成が依頼された。この翻訳は ICCVAM や ECVAM から許可を得ていると説明された。

以上の提案をもとに、今後の進め方について簾内委員長を中心に意見交換された。内容の確認といっても、第三者評価をするつもりで資料を読まなければならない。OECD ガイダンス文書 No.34 に示された第三者評価の項目毎に確認していく必要があるとされた。

C. 結果および考察

評価委員会にて内容を確認し、作業を進めている。

D. 資料

資料5-1 ESAC statement

資料5-2 ICCVAM Executive summary



EUROPEAN COMMISSION
DIRECTORATE GENERAL JRC
JOINT RESEARCH CENTRE
Institute for Health and Consumer Protection
European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)

ESAC statement on the conclusions of the ICCVAM retrospective study on Organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe irritants as determined by US EPA, EU(R41) and UN GHS classifications in a tiered testing strategy, as part of a weight of evidence approach

At its 26th Meeting, held on 26-27 April 2007 at the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Ispra, Italy, the non-Commission members of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC)¹ unanimously endorsed the following statement:

1. With regard to the results and conclusions from the ICCVAM retrospective study^{2,3} on:

“Organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe irritants as determined by US EPA, EU(R41) and UN GHS classifications in a tiered testing strategy, as part of a weight of evidence approach”

ESAC endorses the following conclusion:

There are sufficient data to support the use of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test method, and the Isolated Chicken Eye (ICE) test method in appropriate circumstances and with certain limitations³, as screening tests to identify substances as ocular corrosives and severe irritants in a tiered-testing strategy, as part of a weight-of-evidence approach.

2. With regard to the Isolated Rabbit Eye assay (IRE) and the Hen’s Egg Test – Chorio-Allantoic Membrane assay (HET-CAM), ESAC recommends that further work should be performed before a statement on their validity can be made.

It should be noted, however, that European authorities previously stated that while all four tests were not yet validated, positive outcomes from these tests could be used as the basis for classifying and labelling substances as severe eye irritants (R41)⁴.

Thomas Hartung
Head of Unit
ECVAM
Institute for Health & Consumer Protection
Joint Research Centre
European Commission
Ispra

27 April 2007

1. The ESAC was established by the European Commission, and is composed of nominees from the EU Members States, industry, academia and animal welfare, together with representatives of the relevant Commission services.

This statement was endorsed by the following members of the ESAC:

Ms Sonja Beken (Belgium)
Ms Dagmar Jírová (Czech Republic)
Mr Tõnu Püssa (Estonia)
Mr Lionel Larue (France)
Mr Manfred Liebsch (Germany)
Ms Annalaura Stamatì (Italy)
Mr Jan van der Valk (The Netherlands)
Mr Constantin Mircioiu (Romania)
Mr Albert Breier (Slovakia)
Ms Argelia Castaño (Spain)
Mr Patric Amcoff (Sweden)
Mr Jon Richmond (UK)
Mr Carl Westmoreland (COLIPA)
Ms Vera Rogiers (ECOPA)
Ms Nathalie Alépée (EFPIA)
Mr Robert Combes (ESTIV)
Mr Hasso Seibert (European Science Foundation)

The following Commission Services and Observer Organisations were involved in the consultation process, but not in the endorsement process itself.

Mr Thomas Hartung (ECVAM; chairman)
Mr Jens Linge (ECVAM; ESAC secretary)
Ms Susanna Louhimies (DG Environment)
Ms Barbara Mentré (DG ENTR)
Ms Grace Patlewicz (ECB, DG JRC)
Mr Christian Wimmer (DG Research)
Mr Hajime Kojima (JACVAM)
Ms Laurence Musset (OECD)
Mr Barry Philips (Eurogroup for Animal Welfare)
Mr William Stokes (NICEATM, USA)

2. “Background Review Documents on In vitro test methods for detecting ocular corrosives and severe irritants”:
 - o Bovine Corneal Opacity and Permeability test;
 - o Isolated Rabbit Eye test;
 - o Hen’s Egg Test – Chorio-Allantoic Membrane test;
 - o Isolated Chicken Eye test.Website:
http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd.htm
3. The “ICCVAM Test Method Evaluation Report on In vitro test methods for detecting ocular corrosives and severe irritants”. Website:
http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm
4. EC (2004). Manual of Decisions for Implementation of the 6th and 7th Amendments to Directive 67/548/EEC on Dangerous Substances. Updated version of July 2004. 189pp.

Ispra, Italy: European Chemicals Bureau, European Commission JRC. Website:
http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/New-Chemicals/Manual_of_decisions.pdf

EXECUTIVE SUMMARY

Introduction

This report describes the conclusions and recommendations of the Expert Panel (“Panel”) regarding the validation status of four *in vitro* ocular toxicity test methods: the Isolated Rabbit Eye (IRE), the Isolated Chicken Eye (ICE), the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP), and the Hen’s Egg Test - Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) assays. Those areas of each background review document (BRD) not mentioned in this report were considered adequate and acceptably accurate by the Panel.

The Isolated Rabbit Eye Test Method

The Panel concluded that the IRE BRD proposed version of the IRE test method appears to be capable of identifying ocular corrosives/severe irritants in a tiered-testing strategy with the caveat that the accuracy of this test method be corroborated using a larger number of substances and that reliability analyses be conducted when additional data become available. This recommendation was based on the relatively small number of substances (n=36) tested using the proposed IRE test method version and because only one laboratory (SafePharm, Derby, United Kingdom) had experience using this test method protocol. The Panel agreed that the recommended standardized protocol described in the IRE BRD, which included fluorescein penetration and evaluation of epithelial integrity as endpoints, was appropriate and significantly improved accuracy when compared to other versions of the IRE test method.

With respect to IRE optimization and validation, the Panel recommended that additional data be requested from users of this test method and that analyses of additional data be conducted. The Panel also suggested, that as the IRE test method had a relatively high false positive rate of 33% (with a false negative rate of 0%), optimization of the decision criteria to minimize the false positive rate without appreciably increasing the false negative rate is needed. This may best be accomplished using statistical methods (e.g., discriminant analysis) to improve the decision criteria for the IRE. The Panel noted that any further optimization or validation should be conducted using existing data. Additional animal studies would only be conducted if important data gaps were identified and such studies would be carefully designed to maximize the amount of pathophysiological information obtained (e.g., wound healing). A minority opinion of one Panel member stated that no additional animals should be used for this purpose. The Panel also recommended that a high quality database of *in vivo* and *in vitro* data of reference substances be established from existing literature and new data.

The Panel proposed several modifications to the recommended standardized protocol. These include identification of an appropriate source of rabbits (e.g., an abattoir such as Pel-Freeze) to provide eyes to be used in the IRE, and inclusion of an explicit statement that that rabbits should not be bred and killed specifically for use in the IRE test method. The policies of the various U.S. regulatory agencies with respect to use of rabbits in the IRE that were used in previous tests or experiments needs to be reviewed and updated as it impacts the number of animals available for use in this test. The decision criteria used to identify ocular corrosives/severe irritants should be clearly identified and a rationale provided for how it was developed. For any future studies,

defined positive, negative, and benchmark substances need to be identified based on the proposed list of reference substances. In addition, the Panel proposed that the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) facilitate the development of a standardized histopathology scoring system for corneal damage, along with an appropriate atlas with visual aids. In addition, the appropriate circumstances under which histopathology would be warranted should be more clearly defined. To maximize the likelihood of obtaining reproducible results, reference photographs for all subjective endpoints should be developed (e.g., corneal opacity, fluorescein penetration, histopathology) to aid training and transferability. A discussion of the use of proper safety precautions when handling animals and isolated eyes and awareness of the risk of contamination with potential zoonoses should also be included in the IRE BRD.

The Isolated Chicken Eye Test Method

The Panel concluded that the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) criteria for validation (ICCVAM 2003) have not been fully met for the ICE test method. Cited deficiencies include: the intralaboratory reliability of the ICE test method has not been adequately evaluated; the raw data from the three ICE studies included in this evaluation were not available for review; and detailed drawings/diagrams of the superfusion apparatus have not been made available to allow for transferability of the experimental setup. However, the Panel concluded that the ICE test method can be used in the identification of ocular corrosives/severe irritants in a tiered testing strategy, with specific limitations. Specifically, the Panel noted that alcohols tend to be overpredicted, while surfactants tend to be underpredicted. The Panel also recognized that solids and insoluble substances may be problematic in the ICE test method, since they may not come in adequate contact with the corneal surface, resulting in underprediction. Therefore, the Panel concluded that the low overall false positive rate (8% to 10%, depending on the regulatory classification scheme evaluated) indicates that the ICE test can be used at present to screen for severe eye irritants/corrosives. However, given the high false positive rates calculated for a small number of alcohols (50% [5/10]), the Panel noted that caution should be observed when evaluating ICE test results with this class of substances.

The Panel recognized that the recommended protocol is based on the original ICE protocol, which has changed only slightly since its development. However, there was concern expressed as to whether the appropriate number of eyes (n=3) is being used to ensure optimum performance. Therefore, the Panel recommended that the potential effects of using more than three eyes on the accuracy and reliability of the ICE test method be the subject of a formal study. The Panel also questioned the utility of using maximum mean scores, and thus to ensure optimum performance, recommended a formal evaluation of the most appropriate mathematical approach.

The Panel identified potential methodological areas of improvement to the protocol, including moving the superfusion apparatus to a horizontal position to obviate the need for test eye removal during dosing, adding centering lights to the optical pachymeter to ensure consistent central corneal thickness measurements across laboratories, and inclusion of concurrent negative and positive control eyes (at least 3 per group). In addition, histopathology, including