

determining the nature and depth of corneal injury, was recommended for inclusion in the protocol when the standard ICE endpoints (i.e., corneal opacity, swelling, and fluorescein retention) produce borderline results. With this in mind, the development of a standardized scoring scheme using the formal language of pathology to describe any effects was advocated, along with defining the appropriate circumstances under which histopathology would be warranted. The Panel noted the need for reference photographs for all subjective endpoints (i.e., corneal opacity, fluorescein retention, and histopathology) to ensure consistency among laboratories.

Given the limited amount of ICE reliability data, additional studies using the recommended ICE test method protocol were suggested to better characterize the repeatability and the intra- and inter-laboratory reproducibility of the test method. The Panel recommended also optimization studies that were considered to be potentially useful for improving ICE test method performance. These studies included efforts to optimize the decision criteria used for identifying corrosives and severe irritants, an evaluation of the impact of routinely performing replicate experiments, and an evaluation of the impact of variations in the time between death and testing of the chicken eyes on test method performance.

The Panel specified that any optimization and validation studies should use existing animal data, if available, and that additional animal studies should only be conducted if important data gaps are identified. A minority opinion of one Panel member stated that no additional animals should be used for this purpose.

The Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method

The Panel concluded that the BCOP BRD proposed version of the test method has been shown to have adequate accuracy and reliability for detecting corrosive or severe eye irritants in the tiered testing scheme outlined in the BCOP BRD, with the following caveats:

- The test should not be used to identify corrosive or severely irritating ketones, alcohols, and solids. Further optimization and validation are necessary before these classes of materials can be assessed with this test.
- It needs to be confirmed that the BCOP test method can identify, as well as or better than the Draize test, those substances known to cause serious eye injury in humans. It appears from the list of chemicals tested that at least some of these substances have been tested in BCOP (e.g., floor strippers and heavy duty cleaners).
- A histopathological examination should be added to the test unless the test substance is from a class of materials known to be accurately predicted using only opacity and permeability in the BCOP assay.

The Panel concluded that the BRD proposed protocol for the BCOP test method is useful for identification of severe or corrosive ocular irritants in the tiered testing scheme outlined in the BCOP BRD, with the caveats noted above, as well as those noted below:

- 0.9% sodium chloride should be used instead of distilled water as the test substance diluent.
- Determination of osmolarity and pH of test solutions should be conducted.

- The optimum age range for cattle should be determined.
- Users should be aware of zoonoses, including the possibility of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE).
- Concurrent negative, positive, and benchmark controls should be used.

With respect to suggested modifications to improve performance (accuracy and reliability) of the recommended standardized protocol for the BCOP test method, the Panel recommended the following modifications:

- Use of the larger holder as suggested by Ubels et al. (2002, 2004).
- Re-examine the use of the calculated total score when the endpoint is severe injury only.
- Changes to the medium used to bathe the eyes, including a determination of whether fetal bovine serum is needed.

While the Panel believes these modifications are important, the Panel concluded that the data presented in the BCOP BRD support use of the BCOP assay in its current form for identifying ocular corrosives and severe irritants other than alcohols, ketones, and solids in a tiered testing strategy for regulatory hazard classification and labeling purposes.

The Panel also suggested that histopathological examination be added to the recommended test protocol unless the test substance is from a class of materials known to be accurately predicted using only opacity and permeability in the BCOP assay.

While actually a change to the BCOP method, the Panel suggested the possibility of using the porcine eye as a model for the human eye. The Panel recognizes that this change would require complete validation, but wants to be sure this possibility is considered for future work.

During a vote on Section 12.2 (Recommended Standardized Test Method Protocol) of the BCOP report at the Panel meeting, three panel members expressed minority opinions. Dr. Freeman abstained from voting on Section 12.2 because he believed the discussion on this section had not been satisfactorily resolved due to time constraints. Drs. Stephens and Theran did not agree with the final language presented for Section 12.2 because they believed the BCOP group members withdrew their original summary conclusion under undue pressure.

Regarding recommended optimization studies to improve performance (accuracy and reliability) of the recommended BCOP test method protocol, the Panel recommended using a larger holder similar to that suggested by Ubels et al. (2002), re-examining the use of the calculated total score when the endpoint is serious injury only, changing the medium used to bathe the eyes, using antibiotics if eyes are kept above 0 °C, and defining appropriate ages of donor animals. While the Panel feels these improvements are important, it believes the data presented in the BRD are sufficient for supporting use of the BCOP assay in identifying ocular corrosives and severe irritants, except for alcohols, ketones and solids, in a tiered testing strategy for regulatory hazard classification and labeling purposes.

With respect to the recommended validation studies to evaluate performance of the optimized BCOP test method protocol, the Panel concluded validation studies, or submission of additional

data supporting the three-minute exposure time suggested for volatile solvents, will be necessary before the BCOP test method can be recommended for use with alcohols and ketones.

Validation studies or submission of additional data will be necessary before the BCOP test method is acceptable for solids. The Panel concluded the information in the BCOP BRD, along with the Panel's suggestions, is sufficient to support the use of this test method to identify severe irritants and corrosives, with the exception of alcohols, ketones and solids, in the tiered testing scheme described in the BRD.

The Panel concluded that an additional validation study is not necessary for the recommended additional histopathological examination to the BCOP test method. Although adding histology to the BCOP assay involves additional endpoints, current practice has not been to insist on validation of histopathological examination when it is added to an *in vivo* test method. A standardized histopathological scoring system was suggested by the Panel, but this should be arrived at by the experts in the field and will not require validation. NICEATM/ICCVAM should facilitate the development of a histopathological scoring system for corneal damage (with visual aids). Changes in the calculation method for the BCOP test score, or the use of the individual endpoint data instead of a calculated score also do not need to be validated.

When validation studies are conducted, the Panel believes the studies proposed in the BCOP BRD are appropriate but should be limited to the classes of test substances in question. Validation studies should be carefully planned. Tests should first be done to confirm that any modifications of the protocol do not decrease reliability. Once the inter- and intra-laboratory variability is defined, it will not be necessary to have a large number of laboratories test every chemical in the validation study. Validation should focus on the class of chemicals in question. The study should involve a very small number of experienced laboratories with only a limited number of duplicate samples at each laboratory.

Any validation or optimization studies should use existing animal data, if available. Additional animal studies should only be conducted if important data gaps are identified and such studies should be carefully designed to maximize the amount of pathophysiological information obtained (e.g., wound healing) and to minimize the number of animals used.

With respect to Section 12.3 of the BCOP report, one Panel member, Dr. Stephens expressed a minority opinion. The report leaves open the possibility of additional animal studies as part of this process. Dr. Stephens believes that no additional animal studies should be conducted for such optimization or validation exercises.

The Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane Test Method

The Panel concluded that, for the purpose of detecting severe eye irritants in the tiered-testing strategy outlined in the HET-CAM BRD, the HET-CAM test has been shown to be useful for identification of severe or corrosive ocular irritants. The Panel stated that the high false positive rate was a limitation of the HET-CAM test method. It was proposed that positive results from the HET-CAM test method could be re-tested in a modified HET-CAM test method (e.g. using a lower concentration of test substance) to confirm the results. Alternatively, substances producing a positive result could be tested in a different *in vitro* test method (e.g., ICE, IRE,

BCOP). Substances producing negative results (e.g., HET-CAM score defined as nonirritant, mild irritant, or moderate irritant) would follow the tiered-testing strategy.

It was agreed that the most appropriate version of the HET-CAM test method for use in a tiered-testing strategy is the test method protocol recommended in the HET-CAM BRD. The proposed HET-CAM standardized test method protocol is adapted from the one by Spielmann and Liebsch (INVITTOX 1992). The proposed standardized test method protocol contains negative controls, solvent control (if appropriate), positive controls and benchmark controls (if appropriate). The method also recommends using the time required for an endpoint to develop as the criteria for assessing irritation potential (IS(B) analysis method). The Panel stated that procedures for applying and removing solids from the chorioallantoic membrane (CAM), which may adhere to the CAM and demolish the CAM upon removal, should be included in the standardized test method protocol provided in the HET-CAM BRD.

Due to the numerous variations in the test method protocols and different analysis methods that have evolved since the development of the test method, the Panel stated that the use of a standardized test method protocol in future studies would allow for new data to be generated. These data would allow further evaluation of the usefulness and limitations of the recommended test method protocol.

With regard to optimization of the recommended standardized test method protocol, the Panel stated that a retrospective analysis should be conducted to determine if different decision criteria might enhance the accuracy and/or reliability of the test method for the detection of ocular corrosives and severe irritants, as defined by the European Union (EU 2001), United Nations Globally Harmonized System (UN 2003), and the U.S. Environmental Protection Agency (EPA 1996) classification systems. The Panel proposed the use of a modular approach to validation to identify needed validation modules (e.g., interlaboratory reliability) and focus on evaluating those modules.

The Panel stated that the recommendation to optimize and to use an optimized method should not minimize the value of data already obtained with the method of Spielmann and Liebsch (INVITTOX 1992). As some laboratories already apply the method of Spielmann and Liebsch (INVITTOX 1992), the data generated in these laboratories should still be valid and be used for labeling of ocular corrosives and severe irritants. The Panel proposed that an optimized test method may be used when a positive finding is obtained in the HET-CAM test method of Spielmann and Liebsch (INVITTOX 1992); the substance could be re-tested in the optimized test method protocol.

The Panel further stated that inclusion of different endpoints (e.g., trypan blue absorption, antibody staining, membrane changes, etc.) for evaluation of irritancy potential may increase the accuracy of the HET-CAM test method. It was proposed that these additional endpoints may help reduce the number of false positives observed in the HET-CAM test. The Panel suggested that these endpoints could be included, but were not required, during optimization of the HET-CAM test method.

With respect to validation of the HET-CAM test method, the Panel agreed that if the test method were optimized and modifications made to the test method protocol had a major impact on the conduct of the study, a validation study should be conducted.

The Panel specified that any optimization and validation studies should use existing animal data, if available, and that additional animal studies should only be conducted if important data gaps are identified. A minority opinion of one Panel member stated that no additional animals should be used for this purpose.

The Panel further recommended that an evaluation be conducted to determine the relationship or predictability between the short-term effects observed in the HET-CAM and long-term effects observed in rabbits or humans be conducted. The Panel proposed that such an evaluation may provide additional support for the use of the HET-CAM method to assess the delayed and long-term effects of ocular corrosives and severe irritants.

Proposed List of Reference Substances for Optimization or Validation Studies and to Use in Establishing Performance Standards

The Panel reviewed the adequacy and completeness of the proposed list of reference substances and concluded that the list of proposed substances is comprehensive, the substances appear to be readily available and in acceptably pure form, and the range of possible ocular toxicity responses in terms of severity and types of lesions appears to be adequately represented. The Panel also concluded that, while it is recognized the selection of reference substances is in part limited by the availability of appropriate *in vivo* reference data, the current list has too many substances and is unwieldy, surfactants are over-represented and thus could be reduced in number, and more inorganic substances should be added, if feasible. The Panel also recommended that substances known to induce severe ocular lesions in humans should be included in the list, even in the absence of rabbit data. For all validation studies, Material Safety Data Sheets (MSDS) for the recommended substances should be provided (e.g., a coded MSDS); also pre-study safety briefings should be conducted routinely. Finally, the Panel recommended that an assessment based on the ranking of experimental data for severity for both the reference test method and the *in vitro* test, using the proposed reference substances, be conducted routinely.

For any future validation studies that are performed subsequent to protocol optimization, the Panel recommended that a two-staged approach be used to evaluate accuracy and reliability. Accordingly, the first stage would evaluate test method reliability using a subset of substances that could be tested in multiple laboratories, followed by a second stage encompassing a larger number of substances to evaluate test method accuracy. The Panel suggested that the accuracy assessment include a statistical analysis of the ranking of experimental data for severity for both the *in vivo* reference method and the *in vitro* test.

6) 皮膚腐食性試験代替法の行政的な受入れのための評価

研究要旨

皮膚腐食性試験代替法としての皮膚三次元モデル (Vitrolife-Skin™) においては、多施設バリデーションにおいて、国際的に承認されている EpiDerm™ と同等の識別能力を有するものと考えられたことから、JaCVAM 評価会議において行政的受入れのための検討を実施している。

A. 研究目的

皮膚に対する直接的な傷害の有無の判定は化学物質の安全性評価において重要である。即ち、不可逆的な傷害である皮膚腐食性を示すものは劇物と判定され、その取り扱いについて厳しい規制を受ける。また、皮膚腐食性を示す物質を経口投与等で毒性試験することは動物に大きな苦痛を与えるとともに、適正な毒性試験遂行に支障を来す。そこで、従来よりウサギを用いる in vivo 皮膚刺激/腐食性試験法 (Draize et al, Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. JPET 82: 377-390, 1944, OECD guideline 404) により皮膚腐食性の有無が評価されてきた。しかし、この方法は動物に激しい苦痛とストレスを与える。そこで、in vitro 皮膚腐食性試験代替法が開発されてきた。OECD はガイドライン 430 と 431、435 でそれぞれ TER 法と EPISKIN™ と EpiDerm™ 法、Corrositex を承認している。一方、我が国では OECD で承認された方法で得られた結果は基本的に受け入れるとの姿勢ではあるが、実際に腐食性試験代替法で得られたデータを基に評価された例は見あたらなかった。また、皮膚刺激性試験代替法としての皮膚モデルは日本でも VitroLife Skin™ を始めとして、いくつか開発されているが、皮膚腐食性試験代替法としてのバリデーションは不十分であった。そこで、わが国発の皮膚モデルが既に OECD 等で承認されたものと同様の能力を有するの可否を判定することを主目的とし、わが国で開発された VitroLife Skin™ と国際的に承認されている EpiDerm™ 法との比較バリデーションを行うこととし、三次元培養皮膚モデル Vitrolife-Skin™ に関する日本のバリデーションを平成 16 年度に実施した。その結果、Vitrolife-Skin™ は腐食性試験代替法として EpiDerm™ と同等の識別能力を有するものと考えられた。平成 17 年度は、このバリデーション結果を組み込んだ評価文書を作成した。

B. 研究方法

平成 18 年度から、以下のメンバーを 2007-2008 年評価会議委員として要請し、平成 17 年度の報告書内容を資料として用いて第三者評価を行った。

(委員長)

井上 達 (国立医薬品食品衛生研究所)

(委員)

田中憲法 (日本動物実験代替法学会)

林 真 (国立医薬品食品衛生研究所)

吉田武美 (日本トキシコロジー学会)

吉村 功 (東京理科大学)

溝口昌子 (聖マリアンナ医科大学)

佐神文郎 (日本製薬工業協会)

岡本裕子 (日本化粧品工業連合会)

小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)

C. 結果および考察

平成 17 年度の報告書はバリデーションに関係した委員が作成したものであった。これは専門家による第三者評価という点ではやや客観性に欠けると判断された。そこで、以下のメンバーで評価文書を再構築した。

委員長

小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)

委員

岡本裕子 (日本化粧品工業連合会)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)

その結果、Vitrolife-Skin™ は EpiDerm™ と同様、動物を用いないこと、短時間で容易に評価できること、コスト的には EpiDerm™ より安価であり、さらに日本で製造されているため安定した供給と管理が可能である利点が上げられた。よって、VitroLife Skin™ は皮膚腐食性試験の代替法として有用であると評価された。

この評価文書をもとに、行政的な受入れの可否を最終判断している状況である。

D. 資料

添付資料 6-1：ヒト皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法の第三者評価報告書(案)

2007.5.25

ヒト皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法の第三者評価報告書（案）
（Ver. 0.2）

皮膚腐食性試験代替法の第三者評価委員会

評価委員長 小野寺博志（医薬品医療機器総合機構）
委員 岡本裕子（コーセー）
委員 五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部）

要旨

ウサギを用いる皮膚腐食性試験の代替法として提案された Vitrolife-Skin TMの評価を行った。Vitrolife-Skin TMは我が国で開発されたヒト皮膚モデルであり、OECD が皮膚腐食性試験代替法として認証している EpiDerm とほぼ同様な角質層を保持し再構築された 3次元皮膚構造を有している。既に EpiDerm は既に欧米でバリデーションが実施されている Vitrolife-Skin TMを同時に比較評価することで、検討する被験物質の数を制限した Catch up validation によっても Vitrolife-Skin TMの評価は可能である。試験及び評価法は EpiDermTMとほぼ同様に、被験物質を短時間で処理した後、細胞を色素で染色し、吸光度により細胞生存率を求め、判定基準に従って腐食性の有無と程度を判定した。用いた 12種の被験物質は in vivo で腐蝕性が確認されている物質を選択し、試験実施施設にはコード化して供与された。試験は技術講習を受けた 6施設の習熟者が SOPに従って実施した。細胞生存率の判定が境界基準付近で判定が未確定の場合は、実施施設における繰り返し試験を行った。細胞生存率はいずれの物質も近似値となり、施設内再現性は高いと判断された。EpiDermTMにおいては 12物質中 1物質について 1施設で他施設と異なった結果を得たが、Vitrolife-Skin TMにおいては全ての施設で結果が異なることはなかった。また、判断を困難とした物質は EpiDermTM と Vitrolife-Skin TMで同じであり、施設間再現性は極めて高かった。よって、Vitrolife-Skin TMを用いての腐食性評価は、特異性、感度、再現性の点において EpiDermTMと同等の識別能力を有すると判断した。一方、強アルカリ性物質に対する改善が必要とされる部分があること、今後、実生産による製造方法の変更やそれに伴う品質の管理や同等性の維持が懸念点として挙げられた。しかしながら、Vitrolife-Skin TMは EpiDermTM同様、動物を用いないこと、短時間で容易に評価できること、コスト的には EpiDermTMより安価であり、さらに日本で製造されているため安定した供給と管理が可能である利点が上げられた。以上、VitroLife SkinTMは皮膚腐食性試験の代替法として有用であると評価した。

評価結果

1. 試験法の科学的および規制面からの妥当性

皮膚腐食性試験は皮膚刺激性試験の一環として行われ、種々のガイドラインでは Draize らにより提唱されたウサギを用いる方法が推奨されている。この方法は被験物質の刺激性を検出する感度は非常に優れているものの、判定を肉眼で行うため客観性に乏しく施設間での再現性がない、更に動物に激しい苦痛とストレスを与えることが問題となり、従来より動物を用いない代替法の開発が切望されていた。OECD ガイドライン 431 には、皮膚腐食性試験として角質層を持ち再構築された表皮から構成された 3 次元ヒト皮膚モデルについて記載されている。この試験法は、腐食性物質が角質層に吸収され後拡散、下層の細胞に障害を及ぼすという考えをもとに、被験物質適用後の細胞生存率により皮膚腐食性を評価している。これら EPISKINTM や EpiDermTM 等のヒト皮膚モデルは欧米で既にバリデーション試験が実施され、欧州における化学物質の皮膚腐食性評価を目的に承認され、欧州の化学物質のリスク表示識別等に採用されている。

既存の化学物質を評価する場合、我が国では OECD で承認時に実施された方法についてはその結果を受諾可能であるが、現在まで代替試験法での結果をもとに評価された例は少ない。安全性評価における代替法の普及が切望されている現状において、今後、我が国でもその受け入れが必要となる。また一方で、国内企業からも国際的な評価に耐えうる代替試験法が開発されることも推測される。その場合、バリデーション等が実施され、十分な有用性、再現性が証明されれば行政的にも代替法が受け入れられることが予想される。

今回、我が国に安定な供給が期待できる皮膚モデルが開発され、腐食性試験での代替試験法としての有用性が検討された。

この皮膚モデルはグンゼ(株)によって開発された線維芽細胞を有する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タイプの培養皮膚モデル Vitrolife-SkinTM はである。EpiDermTM はポリカーボネート膜上に角質層を持つ表皮が構築されたモデルである。これらのモデルは表皮層の角質層を構築させる基盤が異なるのみで、同様の角質層を有し、被験物質は角質層を通過して表皮細胞に直接曝露され毒性を惹起させる。また、いずれの皮膚モデルも細胞生存率の測定には同色素を用いており、皮膚腐食性の評価において本質的な違いはないと考えられる。

OECD (2005) ガイドライン 34 の用語集には Catch-up バリデーション研究の定義がされている。Vitrolife-SkinTM は既にバリデーションが実施され承認されている EpiDermTM と構造的及び機能的にも同等で、同じ被験物質を EpiDermTM と同時に試験した。したがって、今回実施されたバリデーションは Catch-up バリデーション研究に該当するといえる。これら 2 つのモデルの試験結果が同等であれば Vitrolife-SkinTM も有用であると評価できる。さらに、信頼性の高い施設による適切なバリデーションであれば、多数の物質と多施設による大規模なバリデーションの必要性は必ずしもなく、小規模のバリデーションでも評価可能とされており、本バリデーションはこれに該当すると判断した。

今回の評価では、OECD ガイドライン 431 で採用されている EpiDermTM の試験を同時に実施していることから、我が国における皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法ガイドラインの追試としてのバリデーションの意味からも、それを評価することは意義があると考えられる。

2. 試験プロトコール構成の妥当性

試験法は EpiDermTMを用いたバリデーション研究で実施されたものと同一とし、Vitrolife-SkinTMでは前培養法及び染色液の容量と組織からの抽出法に変更があるのみで、基本的な曝露時間と判定基準についても同じく一致させている。

プロトコールの概略は以下のとおりである。24 well 入りのヒト皮膚モデルプレートは、培養液 1 ml を入れた 6 well プレートずつ各 4 列に被験物質を希釈することなく 100 µl または 100 mg をキット上部に適用する。被験物質により適用方法は適宜変更される。被験物質が溶液の場合はピペッターで 100 µl 計測し、粉末など固形の場合は 100 mg を計測して適用する、固形物質の場合は適用後画鋏の頭で軽く押さ、浮遊を防ぐ。3 分または 60 分処理後、プレートから被験物質をデカンテーションにより取り除いた後、10 ml の PBS で 2~3 回軽く洗浄する。洗浄後ペーパータオル等で水分を切り、別の 24 well プレートにヒト皮膚モデルを移し、EpiDermTMの場合 MTT 色素を含む培養液をヒト皮膚モデルの下方に 0.3 ml、Vitrolife-SkinTMの場合は 1 ml を上方から加える。37℃、CO₂ インキュベータで 2~3 時間インキュベーション後、イソプロパノールを EpiDermTMには 2 ml、Vitrolife-SkinTMは直径 6 mm の円形にくり貫いた適用部位に 1 ml 加えてフォルマザンを抽出する。その後一晩冷蔵庫で放置、96 well プレートに抽出液を 200 µl ずつ移し（1 物質あたり 1~3 well）、マイクロプレートリーダーにて 540 nm あるいは 570 nm 領域での吸光度を測定する。イソプロパノールのみを加えた well をブランクとし、測定値からブランク値を引いた値を求めた。溶媒対照（蒸留水）での吸光度を 100% とし各物質の 3 または 60 分間処理時の吸光度を生存率として % で求める。腐食性の有無については、3 分処理で生存率が 50% 未満、あるいは 3 分処理で生存率が 50% 以上であるが 60 分間処理で 15% 未満の物質を腐食性ありと判定する。一方、3 分処理で生存率が 50% 以上、60 分間処理で 15% 以上の物質は非腐食性と判定する。試験は 2 回繰り返し、それぞれの試験結果を総合して判定した。2 回の試験で判定が異なった場合は追加の試験を実施し、優位の判定結果をその物質の最終評価とした。

3. バリデーションに用いた物質の分類、選択理由の妥当性

EpiDermTMの有用性は 24 の被験物質について EPISKINTMと比較して評価した。今回実施した Virolife-SkinTMについて、被験物質の数 12 は ECVAM など実施された EPISKINTMや EpiDermTMのバリデーションと比べ、少ないが、Catch-up バリデーションを採用することで少数でも評価は可能と考えた。

予備試験では 10%水酸化ナトリウム溶液(potassium hydroxide(10%))及び塩化ベンザルコニウムを陽性対照物質として選定して手技の確認がされ、本試験では 10%水酸化カリウム水溶液の 1 つにした。陽性対照物質を塩化ベンザルコニウムではなく 10%水酸化カリウム水溶液を用い、陰性対照物質 20%ラウリル硫酸ナトリウム溶液(sodium lauryl sulfate(20%))を用いなかった理由の記載はない。12 種類の物質が選定されたが、その被験物質は ECVAM バリデーションで用いられたのを基本とし、本邦の法規制（毒劇法）を考慮し、さらに物性的なバランスも考慮したとしている。12 種の性状は液体 6 種、固体 4 種、粉末 2 種との報告である。

In vivo の皮膚腐食性は Botham ら (1995) のデータをもとに分類したもので選定している。腐食性物質は 6 種(硫酸 sulfuric acid(10%), octanoic (caprylic) acid、水酸化ナトリウム溶液 sodium hydroxide (4.88%)、フェノール phenol、chromium trioxide (酸化クロム(VI)または無水クロム酸、chromium(VI) oxide が正式名)、りん酸 phosphoric acid)、非腐食性物質として 6 種 (sodium

perborate (ペルオキソほう酸ナトリウム四水和物または過ほう酸ナトリウム四水和物、sodium peroxoborate tetrahydrate が正式名)、テトラクロロエチレン tetrachloroethylene、5%水酸化ナトリウム溶液(potassium hydroxide(5%))、4-amino-1,2,4-triazole、L-乳酸(L-lactic acid)とイソプロパノール(isopropanol (2-propanol))である。

次に被験物質を化学構造で分類すると、無機酸として sulfuric acid(10%)が腐食性、phosphoric acid が非腐食性、無機塩基として sodium hydroxide (4.88%)が腐食性、potassium hydroxide (5%) と sodium perborate は非腐食性、有機酸として octanoic acid が腐食性、L-lactic acid が非腐食性、有機塩基としてフェノールは腐食性、4-amino-1,2,4-triazole は非腐食性、金属塩として chromium trioxide は腐食性、中性物質として溶剤の tetrachloroethylene と isopropanol が非腐食性物質であり、各種物性がほぼ均等に選択されている。ただ、tetrachloroethylene は塩素系溶媒で他の物質で代替可能であり、環境汚染を考慮し避けるべきだったかもしれない。

表 5-2

(日本動物実験代替法学会評価委員会. ヒト皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法の評価結果報告(2006))

4. 試験法の正確性を評価するために用いられた物質の in vitro および参照データの有無

選定した 12 種類の被験物質の多くは ECVAM、ICCVAM で EpiDermTM、EPISKINTTMあるいは CorrositexTMのバリデーションで使用された物質である。これらの被験物質の代替法による評価結果については下記に示す文献として提出されている。

Liebsh et al., ATLA 2000; Barratt et al., Toxicol. In Vitro 1998; Fentem et al., Toxicol. In Vitro 1998; Worth et al., ATLA 1998; Botham et al., ATLA 1995

ICCVAM (2002) NIH Publication No: 02-4502

ICCVAM(1999) NIH Publication No:99-4495

本邦において劇物の指定対象となっている物質は陽性対照を含めて 3 物質である。劇物指定の 3 物質はいずれも腐食性物質である、しかし劇物指定されていない物質にも腐食性を認めるものがある。毒劇物法では 10%濃度で腐食性を示すものを規制しており、試験研究での in vivo 評価とは異なる。これは原品のポテンシャルを見ている方法と日本の毒劇物規定のちがいなので今回は毒劇物の評価に限定しておらず、あくまで腐食性の評価である。

5. すべてのデータおよび結果

各施設で実施された本試験 2 回及び追試験を実施した全ての試験(62 回)についての結果が提出されており、これをもとに結果の一致率を提示している。EpiDermTMにおいて in vivo で腐食性物質と分類されたものを腐食性と正しく判定した例は、陽性対照物質を除く 6 被験物質 30 試験中 29 試験で、感度(sensitivity)は 29/30(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例は 6 被験物質 30 試験中 20 試験で、特異性(specificity)は 20/30 (66.7%)であった。非腐食性を腐食性と誤判定した物質は 5% potassium hydroxide と L-lactic acid で、全ての機関で判定が異なっていた。これはあくまでも報告書の in vivo データとの比較である。in vivo データについて確認し、in vivo データの判定に違いがあれば、一致率はより良い値となる。陽性予知能力(positive predictivity)は 39 の陽性事例のうち 29 例 (74.4%)、陰性予知能力は 21 例中

20(95.2%)であった。合計すると正しい結果が得られた割合(一致率)は60試験中49例(81.7%)であった。腐食性物質である sulfuric acid を2回とも陰性と判定した施設が1施設あった。

Vitrolife-Skin™での感度は30/30(100%)、特異性は20/30(66.7%)、陽性予知能力30/40(75%)、陰性予知能力20/20(100%)であり、EpiDerm™と同等の判定率であった。非腐食性を誤って腐食性と判定したのは5% potassium hydroxide と lactic acid と EpiDerm™と同じ物質であった。

表 5-6

表 5-7

(日本動物実験代替法学会評価委員会. ヒト皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法の評価結果報告(2006))

次に、12種類の被験物質の皮膚モデルでの判定結果と in vivo データで比較した。1施設において明らかな腐食性物質(sulfuric acid)についての判定が他の5施設とは異なっているため、5施設での判定結果をその物質の判定結果とした。被験物質数を分母として起算すると、EpiDerm™及び Vitrolife-Skin™の感度は、両者共に12/12(100%)、特異性4/6(66.7%)、正確性10/12(83.3%)、偽陽性率2/12(16.7%)、偽陰性率0/12(0%)といずれも同一であった。よって、EpiDerm™及び Vitrolife-Skin™両モデルの間に腐食性の評価において差はないと考えられる。ECVAM で実施された EpiDerm™のバリデーション結果と比較してもほぼ同等であり、特に、偽陰性率が少ない点が EPISKIN™よりも予測性は高いと評価できる。

表 5-8

(日本動物実験代替法学会評価委員会. ヒト皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法の評価結果報告(2006))

本試験において、L-Lactic acid は、非腐食性物質(NC)として分類し in vitro の皮膚モデルとの判定結果を比較したが、EpiDerm™及び Vitrolife-Skin™の評価結果では腐食性物質(C)と判定されたため偽陽性物質として区分された。文献1 Liebsch et al.(2000)の報告では lactic acid の in vivo classification は R34、すなわち腐食性ありとしている(彼らは一方で EpiDerm™では NC としているが)。Barratt et al.の ECVAM Workshop での報告にも同様の結果がある。今回の lactic acid の in vivo の判定の根拠については確認をとる必要があり、もし in vivo で腐食性ありなら、皮膚モデルでの陽性の判定は正しいことになる。

Potassium hydroxide は10%溶液を陽性対照として用い、5%溶液を in vivo 陰性物質として評価している。In vitro ではいずれの皮膚モデルも5%溶液は腐食性ありと判定し、偽陽性物質との区分となる。しかし、文献4(NIH Publication No:99-4495, 1999)では in vivo での判定は discordant、一致していないとの記載がある。試験濃度によって判定が異なることは予測できることであり、本結果は皮膚モデルの検出感度が高いことによる可能性もある。

6. 試験法の正確性(再現性、頑健性)

試験法に影響を及ぼす手技は試料の適用時間の管理と洗浄方法が主であり、高度の技術を要求

されることはない。吸光度の測定はマイクロプレートリーダーで行い、細胞生存率は溶媒対照と比較し計算値として表される。

同一施設内で2回試験を繰り返し実施し1回目と2回目で異なる結果が出たのは、EpiDermTMを用いた場合は72試験中sulfuric acidとlactic acidの2つの物質であり、それぞれ2施設（施設1の48、施設2の14、施設3の15、施設5の51の4例）であった。Vitrolife-SkinTMを用いた場合、sulfuric acid, octanoic acid, sodium hydroxideの3物質で各1施設（施設2の34、施設3の15及び25の3例）であった。異なった結果が生じる割合はEpiDermTMで4/60(6.67%)、Vitrolife-SkinTMで3/60(5.0%)と、Vitrolife-SkinTMの方がわずかに低かった。この異なった判定の違いは細胞生存率が判定基準値近傍の値を示したためであるが、基準値の区切りにより判定が異なった場合においても生存率は1回目、2回目、追加試験ともほぼ同じ値を示し、施設内での再現性は高いといえる。

EpiDermTMを用いた場合、施設1のみsulfuric acidの最終判定が他の施設とは異なっていた。施設間の食い違い（相同？）率は1/6(16.7%)（バリデーション報告書では1/5とあるが、6施設あるので間違いと思われる）物質数での食い違い率としてみた場合、12物質中1物質となる。Vitrolife-SkinTMを用いた時、各施設でそれぞれの被験物質に対する最終判定は全て一致した。

以上のように、施設内及び施設間再現性に関しては、Vitrolife-SkinTMの方がEpiDermTMに比べ良い結果が得られている。

被験物質数を分母として起算した感度、特異性、正確性の結果が示されている。前述のように、今回EpiDermTM及びVitrolife-SkinTMの感度は12/12(100%)、特異性4/6(66.7%)、正確性10/12(83.3%)、偽陽性率2/12(16.7%)、偽陰性率0/12(0%)のいずれも一致し、両製品間に差はないと考えられる。この値をECVAMで24種類の物質について実施されたEpiDermTMのバリデーションの結果と比較してみると特異性と正確性においてやや数値が低い、偽陰性率は0であった。60種類の物質について行われたEPISKINTMと比べると特異性の面では劣るものの、他の評価項目では優れていた。よって、EpiDermTMはEPISKINTMと比べ腐食性予測のモデルとして優れている可能性がある。試験物質の数や種類の選択が異なっているため一元的な優劣の評価は困難であるが、今回の結果だけで見るとVitrolife-SkinTMは現在最も予測性の高い方法として確立されているEpiDermTMと同等の予測性を有すると思われる。

7. 試験法の信頼性

試験法はEpiDermTMを用いたバリデーション研究で行われたものと一致させている。試験実施に先立ち、標準操作手順書(SOP)を作成し技術講習会を開催し技術移転を行っている。

皮膚モデルは各メーカーから直接実験施設に供与された。供与数は予備試験1回、本試験2回としそれぞれ2キットを使用した。追加試験を実施するときは、別途追加のキットが供与された。皮膚モデルは試験開始まで保管、あるいは添付された培養液で前処理された。特に、Vitrolife-SkinTMについては前培養時間が試験当日あるいは1~2日前と幅があり、これが及ぼす影響について明らかではない。

本試験法のバリデーション実行委員会は腐食性の調査を実施し選定した被験物質を各施設にはコード化して配布した。そのため、実験者は試験物質に対する主観が入らないように考慮されている。被験物質は液体か固体等の物性の違いにより適用法を変えている。固形の場合、画鋏の後ろで押さえるとの記載があるが、規格や性状の影響も考慮し画鋏にこだわらず、形や大きさ等を

記載した方がよい。

Vitrolife-SkinTMは被験物質が強アルカリ性の場合コラーゲンスポンジが溶解し、適用部位をパンチでくり抜くことが不可能なため、色素の抽出が困難で支障が生じるとの記載がある。今回の報告ではタンパク変性を起こす物質は腐食性と判定している。今後はこうした場合の判定基準についても SOP に記載すべきである。

細胞生存率(%)はマイクロプレートリーダーで吸光度を測定し、溶媒対照と比較することによって機械的に計算で求められる。判定基準値はあらかじめ決められており、腐食性の評価に対して主観性が入るところはない。

試験は 2 回繰り返して行い、それぞれの試験判定が異なった場合は追加の試験を実施し、最終結果の判定の方を被験物質の評価とした。異なった結果が生じる割合は EpiDermTMで 4/60(6.67%)、Vitrolife-SkinTMで 3/60(5.0%)でほぼ同程度であった。異なった結果が生じた原因としては細胞生存率が基準値付近の値をとったためであるが、基準値の区切りで判定が分かれた場合でも生存率は 1 回目と 2 回目、追試験ともほぼ同じ値を示している。

8. データの質

試験実施施設についてはすべてが GLP に準拠しているわけではない。しかし、試験実施者は、技術講習会に参加し技術移転を受けた者に限定し、SOP に沿って実施された。皮膚モデルキットは製造社から品質が保証されているものと同一キットが直接実施者に配送され、被験物質は一つの機関からコード化され送付され試験が実施された。コードの開示は全施設からの結果収集が終わった後に行われ、盲検性により信頼性の向上に努めている。

結果のまとめには記録用紙（入力欄）が作成され、実施施設名、記録者、測定波長、被験物質番号と吸光度を皮膚モデルごとに入力するようになっている。吸光度データシート（結果確認欄）には吸光度から計算されたそれぞれの被験物質の生存率と判定が記入され、添付されている。被験物質の添加量、測定値に関して正しいかどうかのデータクリーニングが行われ、そのコメントも回収されている。吸光度は転記ミスを防止するため 96 穴プレートの図示を用いたが、結果的には多くの記載ミスがあり、確認後、適切に訂正された。意図的なデータの改変は認めなかった。

皮膚モデルの前培養時間についてのコメントはなく結果的には影響はなかったが、SOP で変動幅がある項目についてはコメントを記録する方がよい。

ピペットや天秤、マイクロプレートリーダー等の機器校正を実施しているか記録を残しておく方がデータの質は上がると思われる。(GLP 適合で行えば解決)

9. 他の科学的な報告との比較の有無

OECD の *in vitro* 腐食性試験ガイドラインとして、「摘出皮膚電気抵抗性試験(TER)」及び「ヒト皮膚モデル試験」が承認されており、「*in vitro* 膜バリア試験」が検討中である。これらはいずれもバリデーションが実施され、ICCVAM はこれらの試験法(Rat Skin TER, EPISKIN, EpiDerm 及び Corrositex)の特異性、感度、正確性、偽陽性率及び偽陰性率について比較した結果を報告している。

本研究での結果はこれと比較されている。試験物質の数や選択物質が異なっているため結果の判定だけで単純に皮膚モデルの優越性を評価することは難しいが、少なくとも現在最も予測性の高い方法として確立されている EpiDermTMと比較して Vitrolife-SkinTMは同等の予測性を有す

ると思われる。

10. 3Rs への関与（動物福祉面からの妥当性）

いずれの皮膚モデルとも動物を使用しておらず、動物福祉面から代替法として妥当である。

11. 試験法の有用性と限界（コスト、時間からの妥当性など）

Vitrolife-SkinTMの1キット(24 well)は約6万円、1試験で陽性、陰性対照とともに使用する場合8 wellで3試験が可能であり、1試験当たり約2万円が必要である。これはEpiDermTMの2分の1のコストで済む。試験時間的には両試験とも1日以内に試験結果が得られる。In vivoとの一致率は同等と考えられる。

Vitrolife-SkinTMは皮膚モデルを入手後、すぐに前培養して実験を開始する必要がある。また、この前培養時間の差異による結果への影響については明らかではない。EpiDermTMポリカーボネート膜上に表皮が構築されたモデルであるが、Vitrolife-SkinTMはよりヒトの皮膚に近く、線維芽細胞を含むコラーゲン上に表皮層が重層化されている。しかし、強アルカリ性の被験物質は培養基盤のコラーゲンを溶解することにより、染色に必要な皮膚モデルを切り抜く事が不可能となり判定に支障をきたした例があった。この場合は判定を腐食性物質とすることは適切であるが、SOPにはそうした記載が必要であるとしている。同様に、被験物質によってはコラーゲンを膨張させポンチによる組織の切り取りが一定にならない可能性があり注意が必要とされている。また、着色性物質やアルカリ性物質のように細胞や培養器材への吸着が強いものがあり、そうした物質についてはMTTの発色が影響される場合があり、コラーゲンのみのブランクをとる等、注意が必要と考えられる。これらはVitrolife-SkinTMについての改善点として上げられている。

今後、大量生産のため皮膚モデルの製造方法の変更がある可能性が考えられる。その場合、本研究に用いられたものと同様の保証は懸念される。製品の品質の恒常性や反応性の確認は規格として決めておく必要がある。

12. その他（特許の有無など）

特許については示されていない。Vitrolife-SkinTM皮膚モデルは既に市販されている。

13. 結論

Vitrolife-Skin TMはEpiDermTM同様、動物を用いないこと、短時間で容易に評価できること、コスト的にはEpiDermTMより安価であり、さらに日本で製造されているため安定した供給と管理が可能である利点が上げられた。よって、VitroLife SkinTMは皮膚腐食性試験の代替法として有用であると評価した。

14. 文献

Barratt, M.D. et al., The ECVAM International Validation Study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and Distribution of the test chemicals. *Toxicology in Vitro*, 12, 471-482 (1998)

Botham, P.A. et al., A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 6. *ATLA*, 23, 219-255 (1995)

Fentem, J.H. et al., The ECVAM International Validation Study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the management team. *Toxicology in Vitro*, 12, 483-524 (1998)

ICCVAM (2002) NIH Publication No.02-4502. ICCVAM Evaluation of EPISKIN, and EpiDerm (EPI-200) and rat skin transcutaneous electrical resistance (TER) assay: in vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals.

ICCVAM (1999) NIH Publication No.99-4495. Corrositex: An in vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals.

Liebsch, M., et al., The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing. *ATLA*, 28, 371-401 (2000)

OECD guideline for the testing of chemicals. Draft proposal for new guideline: 431, in vitro Skin Corrosion: Human skin model test.

Worth, A.P. et al., An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion. *ATLA*, 26, 709-720 (1998)

日本動物実験代替法学会評価委員会. ヒト皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法の評価結果報告(2006)

7) 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方

研究要旨

医薬部外品（薬用化粧品）の安全性評価ガイドラインの中で動物実験代替法をどう使いこなしていくか検討するため、医薬部外品に関係の深い委員による「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会（以降、あり方検討会）と記す」を設立した。このあり方検討会の下に、さらに皮膚刺激性、感作性、皮膚透過性・経皮吸収、光関連毒性、遺伝毒性、眼刺激性の6分科会を設立し、検討作業を進めている。

A. 研究目的

化粧品の2009年問題、動物実験代替法（以下、代替法と記す）の利用が進む国際情勢や動物愛護団体の活動を勘案して、医薬部外品（薬用化粧品）の安全性評価ガイドラインの中で動物実験代替法をどう使いこなしていくか検討が必要となってきた。

そこで、JaCVAM評価会議とは別にこの問題について検討するため、医薬部外品に関係の深い委員による「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会（以降、あり方検討会）と記す」を設立した。

B. 研究方法

B-1) あり方検討会委員

委員長

小島 肇（国立衛研）

委員

飯島正文（昭和大学）

松永佳世子（日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会理事長）

大野泰雄（国立衛研）

増田光輝（国立衛研）

佐々 斉（日本化粧品工業連合会 安全性部会 部会長）

西山直宏（日本化粧品工業連合会 安全性部会）

岡本裕子（日本化粧品工業会 代替法専門

委員会 副委員長）

板垣 宏（日本動物実験代替法学会 会長）

辻 浩司（厚生労働省）

B-2) 方法

検討の対象となる代替法はバリデーションや第三者評価が終了している試験法であること、代替法の結果からヒト試験に適合しているか、進んでよいかの判断を行う、代替法の蓄積データからどこまで代替法で安全性評価ができるかを検討するものである。

ただし、本あり方検討委員会において、試験法の細かな議論をすることは時間的に難しいとの意見が多く、この検討委員会の下に試験法毎に分科会を設けて資料のとりまとめ、および試験法毎の原案の作成することになった。あり方検討会における議論の結果、図1に示すように、皮膚刺激性、感作性、皮膚透過性・経皮吸収、眼刺激性、光関連毒性、遺伝毒性の6分科会を設立することになった。

C. 結果および考察

あり方検討会および各分科会にて、会議を重ね、委員間のコンセンサスを取るとともに、あり方検討会の示す方向性に従い、代替法の長短所をまとめる作業を進めている。

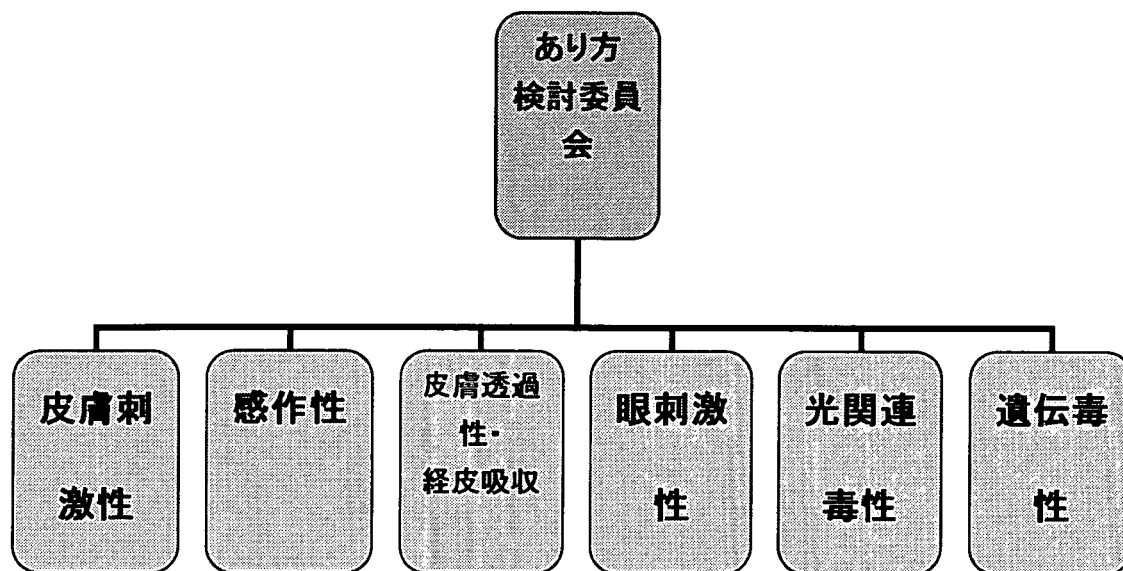


図1. あり方検討会組織図

表2. あり方検討会分科会リスト

	皮膚刺激性	皮膚感作性	光毒性
医師	河合敬一(河合敬一医院)	中田土起文(昭和大)	上出良一(慈恵会医大)
学者	夏秋 優(兵庫医科大)	横関博雄(東京医科大)	田中憲穂(食薬センター)
業界推薦	寒水孝司(大阪大)	大野泰雄(国立衛研)	小島 肇(国立衛研)
学会推薦	小島 肇(国立衛研)	小島 肇(国立衛研)	森辰実(ノエビア)
	森福義(ポーラ)	坂口 斉(花王)	今井教安(コーセー)
	杉山真理子(資生堂)	金澤由紀子(食薬センター)	以上 5 名
	以上 6 名	以上 6 名	
	眼刺激性	経皮吸収	遺伝毒性
医師	平野耕治(藤田保健衛生大学)		
学者	梶 賢一郎(J-TEC)	藤井まき子(昭和薬科大)	林 真(国立衛研)
	金子豊蔵(国立衛研)	杉林堅次(城西大)	能美健彦(国立衛研)
	小島 肇(国立衛研)	小島 肇(国立衛研)	本間正充(国立衛研)
業界推薦	萩野滋延(資生堂)	桑原 裕史(カネボウ)	小島 肇(国立衛研)
学会推薦	瀬戸洋一(P&G)	上月 裕一(資生堂)	江幡真也(ライオン)
	以上 6 名	以上 5 名	笠松俊夫(花王)
			以上 6 名

D. 資料

- 資料7-1 概要説明資料
- 資料7-2 あり方検討会第一回会議議事録
- 資料7-3 あり方検討会第二回会議議事録
- 資料7-4 あり方検討会皮膚刺激性分科会
第一回会議議事録
- 資料7-5 あり方検討会皮膚刺激性分科会
第二回会議議事録
- 資料7-6 あり方検討会皮膚刺激性分科会
第三回会議議事録
- 資料7-7 あり方検討会感作性分科会
- 資料7-8 あり方検討会感作性分科会
第二回会議議事録
- 資料7-9 あり方検討会感作性分科会
第三回会議議事録
- 資料7-10 あり方検討会皮膚透過性・経皮
吸収分科会 第一回会議議事録
- 資料7-11 あり方検討会皮膚透過性・経皮
吸収分科会 第二回会議議事録
- 資料7-12 あり方検討会眼刺激性分科会
第一回会議議事録
- 資料7-13 あり方検討会眼刺激性分科会
第二回会議議事録
- 資料7-14 あり方検討会眼刺激性分科会
第三回会議議事録
- 資料7-15 あり方検討会光関連毒性
分科会 第一回会議議事録
- 資料7-16 あり方検討会光関連毒性
吸収分科会 第二回会議議事録
- 資料7-17 あり方検討会遺伝毒性
分科会 第一回会議議事録
- 資料7-18 あり方検討会遺伝毒性
分科会 第二回会議議事録