

参 考 文 献

- 1) 小塚雄民, 「タール系色素による女子顔面黒皮症」, 高瀬吉雄「皮膚と化粧品科学」, 南山堂, 1982, pp.267-274.
- 2) 「化粧品の安全性評価試験法概略」, 日本化粧品工業連合会編「化粧品の安全性評価に関する指針 2001」, 薬事日報社, 2001, pp.1-33.
- 3) 土井邦雄, 「臓器毒性・毒性試験」, 日本トキシコロジー学会教育委員会編集, 「トキシコロジー」, 朝倉書店, 2002, pp.217-218.
- 4) 松永佳世子, 「皮膚外用剤の添加物 接触皮膚炎を中心に」, 薬局, 53 (11), 2002, 71-75.
- 5) 増田光輝, 「製品企画・設計における PL 対策」, フレグランスジャーナル, 1995-3, 1995, 17-24.
- 6) 笠井裕, 「化粧品の安全性を取り巻く状況－パブリック・リレーションの重要性－」, 香粧会誌, 28 (4), 2004, 292-298.
- 7) 風間成孔, 「改正薬事法対応～化粧品・医薬部外品薬事申請業務の留意点」, 「化粧品大全」, 情報機構, 2006, pp.509-522.
- 8) 医薬品医療機器情報ホームページ (www.info.pmda.go.jp).
- 9) 国民生活センター (www.kokusen.go.jp/recall/data/s-20061011_1.html).
- 10) Commission Staff Working Documents "Time Tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC)", EN, SEC82004), 2004, 1210.

1. 試験の進め方, 決定樹

腐食/皮膚刺激性の評価スキームは1998年, OECDから発表されている¹⁾。その後, 2009年までに動物実験を用いた化粧製品を販売できない, 原料の試験を実施できないというEU7次改正に従うために欧州化粧品工業会(COLIPA)で検討が進み, 複数の評価スキームの検討が進んでいる。これまでOECDスキームを含め, 文献上で主なものとして3提案がなされている。僭越ながら, 私の提案までいれると4案がある。それらを以後に示すが, この項では腐食性がないと判断された場合以降に絞ってスキームを改良した。

in vitro 皮膚刺激性試験は, 皮膚刺激性代替法のバリデーションは最終段階にあり, 数年後にはバリデーションが終了した方法が明らかになると思われる。そこで今後の試験案について記載した。ただし, 現状では皮膚刺激試験代替法のバリデーションが終了したとしても, 専門家による評価が済むまでには時間を要する。よって, 現在開発中の原料をお持ちの方は, 刺激性の有無または強弱を動物実験で評価して頂きたい。

まず, OECDスキームを基本としたWorthの案を図1に示す²⁾。ほとんど, 腐食性と同時に皮膚刺激性の有無を判断するものである。以後のすべての案の基本とも言えるスキームである。図2に示すように, BothamがこのOECD案をもとに評価スキームを示している³⁾。ただ, このスキームにはOECDに1997年に提案されたヒト4時間貼付パッチのガイドライン案が組み込まれているものの⁴⁾, これらは保留状態にあり, 現実的ではない。刺激性が不明確な場合には動物試験またはヒト試験となるが, 倫理的に許可が下りるか疑問なスキームである。

次に, 図3に示すRobinsonの案は化粧品の安全性評価を想定しており⁵⁾, これは現実的な内容である。ただし, 蓄積性・慢性毒性の*in vitro* 試験はまだ検討段階であること, ヒト試験の例が4時間パッチテストであり⁶⁾, 日本での化粧品評価にはそぐわない点などの問題が多い。

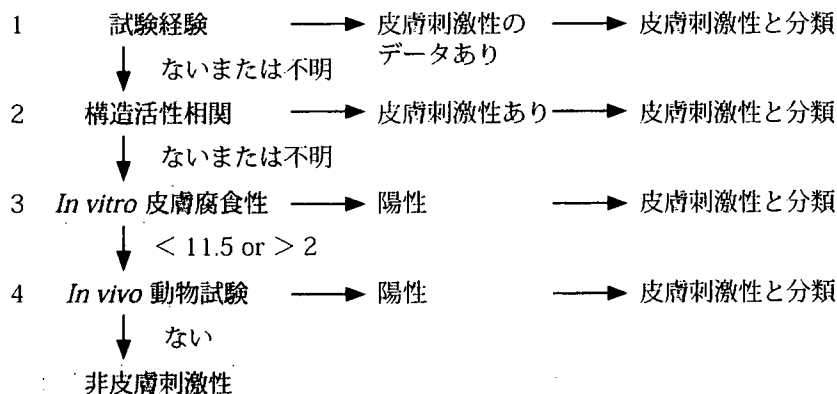


図1 OECDによる皮膚刺激性評価の現状^{1,2改良)}

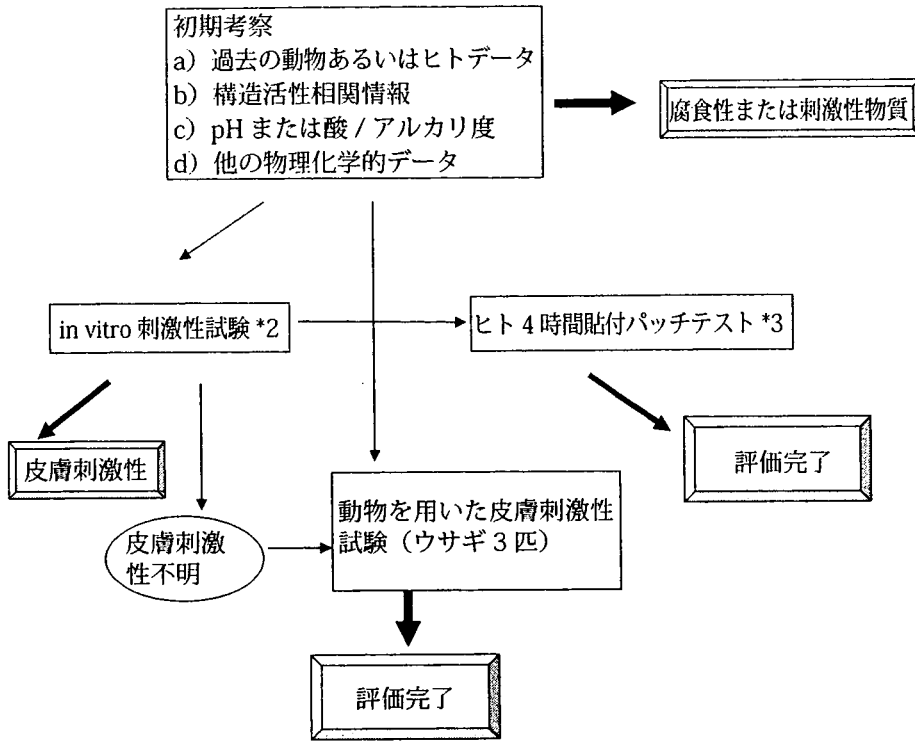


図2 Botham スキーム^{3改良}

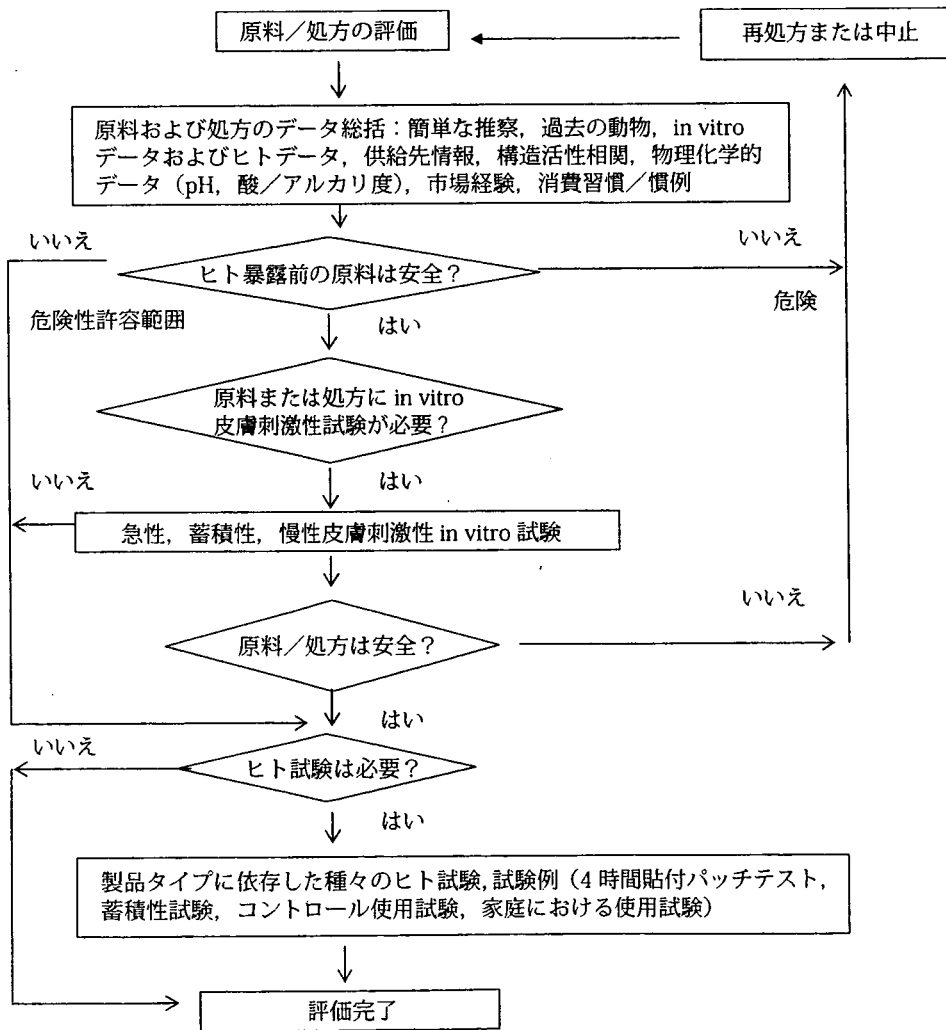


図3 Robinson スキーム^{5改良}

図4に小島案も示すが⁷⁾、腐食性の危害性は同定されているという前提で、培養皮膚モデルを用いて用量反応性を評価した後、さらに24～48時間閉塞貼布ヒトパッチテストを組み合わせ、総合的に皮膚刺激性を評価すべき提案となっている。ただし、培養皮膚モデルで用量反応性を評価できるというバリデーションはまだ実施されていない。

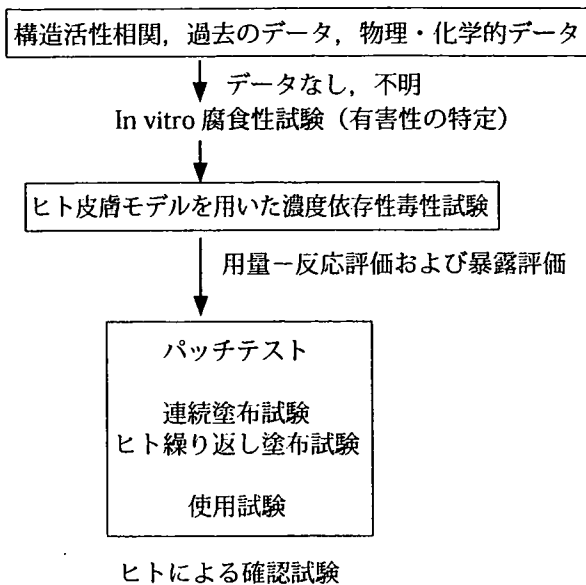


図4 小島スキーム^{7)改良)}

2. 定量的構造活性相関 QSAR

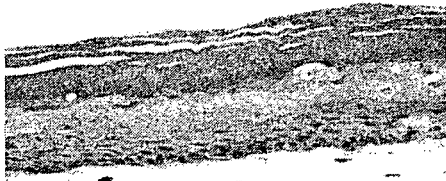
眼刺激性も合わせ、刺激性を構造活性相関 (QSAR) で予測する多くの検討がなされ、総説がまとめられている⁸⁻¹¹⁾。その結果として、TOPKATやDERECKなどの構造により皮膚刺激性を予測するソフトが紹介され、良い予測性が報告されている。ただし、これらの検索結果は疑陽性が多いという印象を持っている。スクリーニングとして、陽性となった物質の開発を中止するのではなく、注意深く以後の試験に用いるならば有用な検討材料であると考え。ただし、構造活性相関もバリデーションに関するガイドライン文書が検討されており、将来的には判断の根拠が必要となる。

3. 再構築培養ヒト皮膚モデル (ヒト皮膚モデル) を用いる方法

欧米ではヒト皮膚モデルとしてEPISKINおよびEpiDremを用いた試験結果が報告されている。これ以外に、PREDISKINも検討されたが、一次バリデーション終了後、次の段階に進めなかった¹²⁾。現在上記の二つのモデルは欧米で汎用されている有力なヒト皮膚モデルである。日本で使用されているものを含め、表1に私の知る限りのヒト皮膚モデルを示す。また、日本で市販されているヒト皮膚モデルの病理写真を図5に示す。ヒト皮膚の病理写真と比較して、角化細胞と比較して、角質層の厚さ、角化細胞数など完成度は遠く及ばないが、各社モデルに大差はない。よって、正常皮膚と比較して経皮吸収も早く、毒性を起こしやすいようである。処理方法などである程度付加を減少させれば、皮膚刺激性の評価は可能と考えている。

表 1 日欧米で市販されている主なヒト皮膚モデル

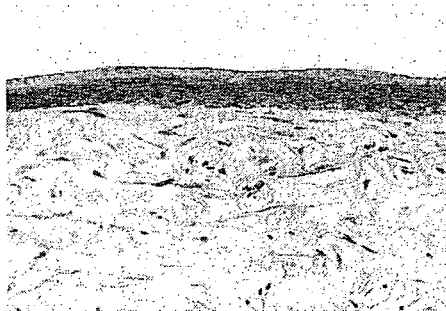
キット名	販売先	国名
Apiligraf	Organogenesis Inc.	米国
EpiDerm	Matek	米国
	クラボウ	日本
EPISKIN	EPISKIN	フランス
Neoderm-ED		韓国
Lab-Cyte	J-TEC	日本
SkinEthic	SkinEthic	フランス
TESTSKIN	東洋紡	日本
Vitrolife-Skin	ゲンゼ	日本



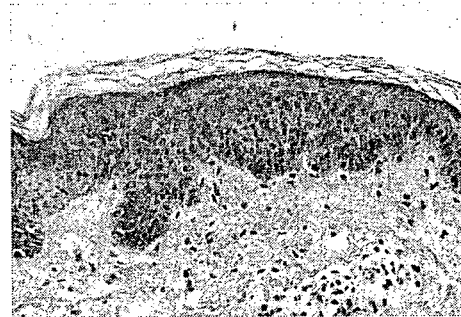
(a) Neoderm-ED (J-TEC)



(b) EpiDerm (クラボウ)



(c) Vitrolife-Skin (ゲンゼ)



(d) ヒト皮膚

図 5 ヒト皮膚モデルとヒト皮膚の病理写真の比較

当初、処理時間 18 時間の細胞生存率 50%が境界であったり、被験物質の ET50 (溶媒対照に対して 50%の細胞毒性を示す処理時間) を分母として SLS20%水溶液の ET50 を割り、その値が 0.8 以下なら陽性として *in vivo* 結果を比較する手段が取られた。しかし、これらの方法ではマネジメントチームの設定した感度、特異性、正確性のそれぞれの基準値 60%をクリアできず、処理方法の改定が行われた。

まず、15 分間被験物質処理後、18 時間培養後の細胞生存率を指標とした検討が行われ^{13,14)}、さらに 42 時間培養後の細胞毒性を指標とし、50%細胞毒性が認められる場合を陽性と判断する方法がもっとも良いと報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。

この方法で得られた ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) のバリデーション結果では、表 2 に示すように、EpiDerm および EPISKIN の正確性は 80% を越えていた。この値はバリデーションマネジメントチームの設定した基準値に対応できている。

表 2 EpiDerm および EPISKIN, SIFT 予測モデルの可能性 (動物の結果との比較)

モデル名	予測モデル	感度 (%)	特異性 (%)	一致度 (%)	疑陽性率 (%)	疑陰性率 (%)	参考文献
EpiDerm	ET50 利用			58	37	47	Zuang, 2002
	15 分処理後 18 時間培養	90	60	75	31	14	Zuang, 2002
	15 分処理後 42 時間培養	70	88	80	18	21	Kandarova, 2005
EPISKIN	18 時間処理後, 細胞生存率 50% 以下を陽性			58	60	23	Zuang, 2002
	15 分処理後 18 時間培養	75	75	75	31.8	19.2	Cotovio, 2005
	15 分処理後 42 時間培養	85	78.6	81.3	26.1	12.0	Cotovio, 2005
SIFT	TEWL * または ER ** の 5 倍値			47	33	73	Zuang, 2002
	TEWL * または ER ** の 5 倍値	30	80	55	47	40	Heylings, 2003
	TEWL および ER の t 検定	80	60	70	25	33	Heylings, 2003

* : TEWL 電気伝導度

** : ER 電気抵抗度

この方法は、ヒト皮膚モデルである Vitrolife-skin を用いた日本におけるバリデーションにおいても実施した PI (Post-Incubation) と同様の操作である。10 分間処理後培養は 42 時間ではなく、18 時間ではあるが、このバリデーションの結果は、表 3 に示すように ET₅₀ を算出した結果と比較して、施設間再現性が低く、また動物実験との対応性も低かった¹⁸⁾。この原因を現在検討中である。

表 3 日本におけるヒト皮膚モデルバリデーションの結果 (ヒトパッチ結果との比較)

モデル名	予測モデル	感度 (%)	特異性 (%)	一致度 (%)	疑陽性率 (%)	疑陰性率 (%)	参考文献
TESTSKIN	ET50 が 2 時間 未満を陽性	94	62	69	38	6	Kojima, 2005
Vitrolife-Skin	ET50 が 2 時間 未満を陽性	100	44	70	56	0	Kojima, 2005
	10 分間処理後, 18 時間培養	59	59	59	41	41	Kojima, 2005

日本で行ったバリデーションでは、ヒト皮膚モデル TESTSKIN および Vitrolife-skin を用いて ET₅₀ を算出する方法でウサギ皮膚刺激性よりヒトパッチテスト結果とよく相関すると報告した。皮膚一次刺激性試験の目的はヒトの刺激性の予測であり、ウサギの結果ではない。ウサギの結果がヒトとよく相関するならともかく、ウサギの予測率も 6 割程度であり、疑陽性が多い試験法である。その方法と *in vitro* を比較してもずれは大きくなるばかりである。その結果でも疑陽性、疑陰性率は 20% を超えていたが、ウサギの予測率と大差はなく、利用可能と考察した^{19,20)}。

ヒト皮膚モデルも、製造先が違ふモデルが存在する。この場合、バリデーションは必要か。Worth 文献の中には、同様の方法を比較する場合、catch-up バリデーションが必要とされており²¹⁾、よってモデル毎に catch-up バリデーションで十分であろう。3 施設がブラインド化された 10 物質程度をバリデーションで実施すればよいであろう²²⁾。得られた結果を過去のモデルと比較して再現性、予測性などに遜色ない結果が得られることが採用の条件である。

4. 摘出皮膚を用いる方法

SIFT (Skin Irritation Function Test) が最終的なバリデーションに移行する可能性が高い^{12,13,23)}。Pig Ear を用いる方法が当初提案されたが、次のバリデーション段階に進めていない¹²⁾。

摘出した皮膚の TER (電気伝導度) および TEWL (角質水分蒸散量) を指標として、TER または TEWL いずれかの値が、事前測定値と比較して 5 倍以上または t 検定で 5% の危険率で有意な場合に陽性とするという予測モデルで評価する。

その結果を表 2 に示したが、t 検定においても疑評価の割合が高く、予測モデルの改良が必要という状況である。

日本では摘出皮膚を用いた研究は少ない。我々は摘出ウサギ皮膚を用いて皮膚刺激性を検討し、よい相関を報告しているが²⁴⁾、MTT による細胞毒性を指標としており、評価方法が SIFT と異なる。もちろん、バリデーションまでには到っていない。

文 献

- 1) OECD(1998) Revised proposal for the harmonization of hazard classification based on skin irritation/corrosion, ENV/MC/CHEM/HCL (98) 4, pp.12., Paris : OECD
- 2) Worth, A. P., Fentum, J. H., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J. and Liebsch, M. (1998) An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, ATLA, 26, 709-720

- 3) Botham, P. A., Earl, L. K., Fentem, J. H., Rouget, R., va de Sandt, J. J. M.(1998) Alternative methods for skin irritation testing, ATLA, 26, 195-211(1998)
- 4) OECD draft guideline testing of chemicals (1997)Proposal fro a draft new guideline, Acute dermal irritation study in human volunteers, April 1997
- 5) Robinson MK, Cohen C, de Fraissinette Ade B, Ponec M, Whittle E, Fentem JH.(2002)Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products., Fd. Chem. Toxicol., 40, 573-592(2002)
- 6) Basketter DA, York M, McFadden JP, Robinson MK. (2004)Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test., Contact Dermatitis. 51(1) : 1-4
- 7) 小島肇夫 (2006) 皮膚毒性の安全性評価, 407-416, 化粧品大全, 株式会社 情報機構
- 8) Cronin, M. T. D., Dearden, J. C., Walker, J. D. and Worth, A. P. (2003) Quantitative structure-activity relationships for human health effects : commonalities with other endpoints. Environ. and Toxicol. Chem, 22, 1829-1843
- 9) Hulzebos, E. M., Maslankiewicz, L. and Walker, J. D. (2003) Cerification of literature-derived SARs for skin irritation and corrosion, QSAR and Combinatorial Science, 22, 351-363
- 10) Patlewicz, G., Rodfold, R. and Walker, J. D. (2003) QSARs for predicting skin and eye irritation, Environ. and Toxicol. Chem, 22, 1862-1869
- 11) Cronin, M. T. D., Jaworska, J. S., Walker, J. D., Comber, M. H. I., Watts, C. D. and Worth, A. P. (2003) Use of QSARs in international decision-making frameworks to predict health effects of chemical substances, Environ. Health Perspec, 10, 1391-1402
- 12) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhutter, H. -G. and Liebsch, D. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results snd evaluation by the management team, Toxicol in Vitro, 12, 483-524
- 13) Zuang, V., Balls, M., Botham, P. A., Coquette, A., Corsini, E., Curren R. D., Elliott, G. R., Fentem, J. H., Heyling, J. R., Liebsch, M., Medina, J., Rouget R., Sabdt, J. J. M., Wiemann, C. and Worth, A. P. (2002) Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, ATLA, 30, 109-129
- 14) Portes, P., M. -H. Grandidier, Cohen, C. and Rouget, R. (2002) Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals : follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro, 16, 765-770

- 15) Kandarova, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004) Optimisation of EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation test, ALTEX, 21, 107-114
- 16) Cotovio, J., Grandidier, A.-H., Portes, P., Rouget, R. And Rubinstenn, G. (2005) The *in vitro* acute skin irritation of chemicals : optimization of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA, 33, 329-349
- 17) Kandarova, H., Liebsch, M., Gerner, I., Elisabeth, S., Genschow, E. and Spielmann, H. (2004) The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests- An assessment of the performance of the optimized test, ATLA, 33, 351-367
- 18) H. Kojima, A. Shiraishi, Y. Andoh, Y. Okazaki, N. Ozawa, R. Kawabata,, K. Kadono, T. Sozu, T. Suzuki, A. Tabata, Y. Nakano, N. Morikawa, M. Hori, K. Yamashita, I. Yoshimura, Validation study for Vitrolife-Skin™, a three-dimensional cultured human skin model, I, as an alternative to skin irritation testing using ET₅₀ protocol, Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin (2005)
- 19) H. Kojima, A. Shiraishi, Y. Andoh, Y. Okazaki, N. Ozawa, R. Kawabata,, K. Kadono, T. Sozu, T. Suzuki, A. Tabata, Y. Nakano, N. Morikawa, M. Hori, K. Yamashita, I. Yoshimura, Validation study for Vitrolife-Skin™, a three-dimensional cultured human skin model, II, as a alternative to skin irritation testing using Post-Incubation (PI) protocol, Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin (2005)
- 20) H. Kojima, I. Sonoda, A. Nishizawa, M. Hori, R. Kawabata, N. Ozawa, T. Suzuki, M. Usami, T. Ishibashi and I. Yoshimura, Validation study for TESTSKIN™, a three-dimensional cultured human skin model, as alternatives to skin irritation testing applied to forty cosmetic substances, Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin (2005)
- 21) Worth AP, Balls M. (2002)The principles of validation and the ECVAM validation process. ATLA. 30 Suppl 2, 15-21
- 22) Kandarova, H., Liebsch, M., Schmidt, E. Genschow, E., Traue, D., Spielmann, H., Meyer, K., Steinhoff, C., Tornier, C., Wever, B. and Rosdy, M. (2006) Assessment of the skin irritation potential of chemicals by using the Skin Ethic reconstructed human epidermal model and the common skin irritation protocol evaluated in the ECVAM skin irritation validation study, ATLA, 34, 393-406
- 23) Heyling, J. R., Diot, S., Esdaile, D. J., Fasano, W. J., Manning, L. A. and Owen, H. M. (2003)

A prevalidation study on the *in vitro* skin irritation function test (SIFT) for prediction of acute skin irritation in vivo : results and evaluation of ECVAM Phase III, *Toxicol. in Vitro*, 123-138

- 24) 小島肇夫, 森 栄治, 花村朝夫, 佐々木哲二, 真鍋幸子, 丹野和信, 堅田友則, 小西宏明 (1996)
摘出皮膚培養キットを用いた皮膚一次刺激性試験代替法, *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, 30, 402-409

1. 評価スキームおよび QSAR

化学物質の皮膚腐食性／刺激性の評価スキームは 1998 年、OECD から発表されている^{1,2)}。ただし、これら进行评估する場合には、まずヒトや動物における経験の有無が挙げられている。これらのデータがない場合に QSAR : Quantitative Structure-Activity Relationships (構造活性相関) をみることが提案されている。Barrat は酸、塩基、フェノール、有機酸、中性有機物、塩基性有機物など種々に分類された化学物質において、オクタノール／水の分配係数、分子量、融点、解離定数などを主成分分析したところ、良い予測性が得られたという報告をしている³⁻⁶⁾。ただし、構造活性相関もバリデーションに関するガイドライン文書が検討されており、将来的には判断の根拠が必要となる。

次に、pH / 酸あるいはアルカリ度の検討が挙げられている⁶⁾。pH2 未満、11.5 より大きい場合には腐食性物質とするとされている。pH と酸／アルカリ度を組み合わせ、皮膚腐食性と比較したところ、良い一致性が認められたという報告もある⁷⁾。

さらに、バリデーションされた *in vitro* 試験法で腐食性を判断する。発表時点ではバリデートされた方法はなかったが、2000 年に二つのガイドラインが公定化され、現在ではこれらの抽出皮膚を用いた試験および培養皮膚を用いた試験で評価できる。さらに、OECD では蛋白変性モデルについてのガイドライン案が検討されている。これらの試験で陽性の場合にはそれ以降の評価は終了であるが、陰性と判断された場合には、一匹の動物を用いて判断し、さらに疑わしい結果が出た場合にはさらに 2 匹を追加して評価することになっている。現在の状況に合わせた評価スキームを図 1 にまとめた。

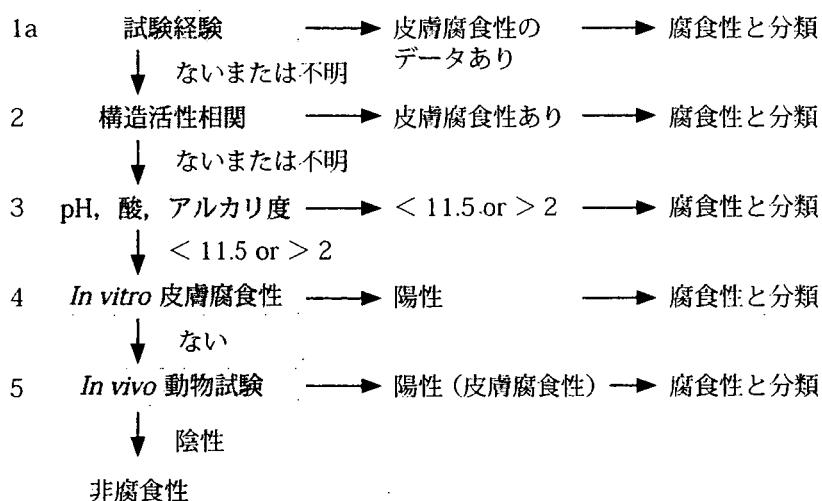


図 1 OECD による腐食性評価の現状^(1,2 改良)

以下に個々の *in vitro* 試験法について説明し、その利用方法について述べたい。これらは、バリデーションが実施され、Peer Review が ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) でなされている *in vitro* 試験法であり^{8,9)}、EU の Annex V of the Dangerous Substances Directive¹⁰⁾ に従い定められた。

2. 摘出皮膚を用いる方法

OECD ガイドライン 430 「摘出皮膚電気抵抗試験 (TER)」¹¹⁾ In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER) の原理および方法の詳細について述べる。

- 1) 原理 切除したラット皮膚を試験システムとして使用し、その電気抵抗を指標とする。
- 2) 方法 摘出した直径 20mm 円盤状の皮膚 (ラット, 28-30 日令ほど) を図 2 に示すように、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) チューブの下部に表皮面を上にしてあて、ゴム製の O リングではさむ。皮膚のついた PTFE チューブを硫酸マグネシウム (154mM) 溶液につけ、被験物質溶液 150 μ L を表皮面に、30°C で 24 時間適用する。

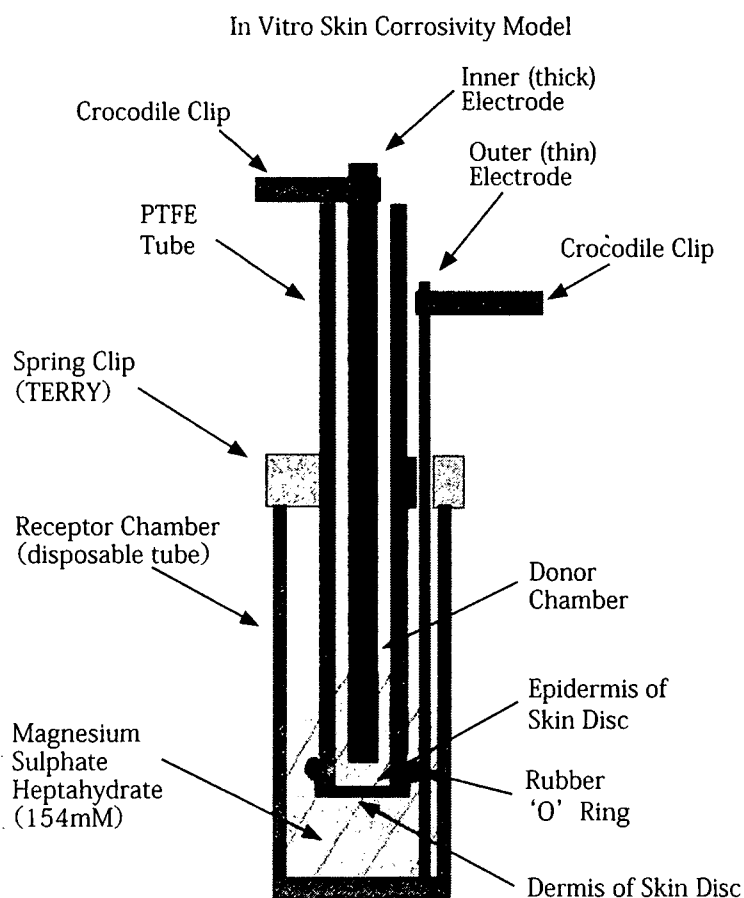


図 2 摘出皮膚電気抵抗試験 (TER) 操作図 (ICCVAM⁸⁾)

Wheatstone 電橋装置に低電圧をかけ、100 Hzにおける電気抵抗度を測定する。

さらに、電気抵抗が5k Ω以下の場合には、10%スルフォローダミンB染色液にて2時間染色し、皮膚に吸着された色素の量を吸光度から算出する。

電気抵抗度が5k Ωより小さく、明らかに損傷のある場合または、損傷がなくても色素量が陽性対照物質である10 M塩酸以上の場合、腐食性と判断する。

3. 再構築培養ヒト皮膚モデル（ヒト皮膚モデル）による方法

OECD ガイドライン 431「ヒト皮膚モデル試験」¹²⁾として、ヒト皮膚モデルの使用が報告されている。OECD ガイドラインに示された原理、方法を以下に示すとともに、ガイドライン制定のもとになったバリデーション結果、評価報告書の概要を以下にまとめる。

1) 原理

角質層を持つ再構築された表皮からなる3ヒト皮膚モデルを用いる。OECD ガイドライン 431では、Skin^{2TM} ZK1350, EPISKINTM および EpiDermTM などの市販品でも、実験室で開発、構築されたモデルでも適用可能としている。腐食性物質が角質層に吸収され、拡散後、下層の細胞に毒性を示すという仮説を基本とした試験法である。試験法は、被験物質適用後の細胞生存率をもとに皮膚腐食性を評価する方法である。なお、Skin^{2TM} ZK1350 は現在市販されていない。

ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) でバリデーションが実施された3ヒト皮膚モデル EpiSkinTM および EpiDermTM、日本でバリデーションされた3ヒト皮膚モデル EPI-100: EpiDermTM (クラボウ: 図3-1) および3ヒト皮膚モデル Vitrolife-SkinTM (グンゼ: 図3-2) である。病理写真が示すように、EpiDermTM は角質層を持つ表皮からなるモデルであり、Vitrolife-SkinTM は線維芽細胞を含むコラーゲンを真皮層の上に角質層を持つ表皮層が重層化されているヒト皮膚モデルである。

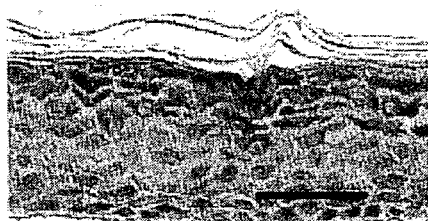


図3-1 EPI-100: EpiDermTM

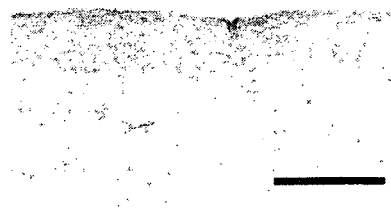


図3-2 Vitrolife-SkinTM

EpiDermTM で最終的にバリデーションされた方法¹³⁾と以下に示す日本におけるバリデーションで用いたモデルと方法は同じである¹⁴⁾。

その試験方法、評価基準を示す。

2) 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、モデルの入った 24well 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、6well プレート 4 枚の well にそれぞれ培養液 1mL 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、モデルの入った 24well 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、6well プレート 4 枚の well にそれぞれ培養液 1mL 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 に異常：穴、明らかに薄い部分があるモデルは使用しない。また、水滴等があれば、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 μL または 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℃の熱をかけて溶ける場合）37℃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 μL 適用。

溶媒対照：蒸留水、陽性対照もピペッターを用いて 100 μL 適用。

- (5) 被験物質順に適用し、3分、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みこませた後、2～3回 PBS 液中でふって濯ぐ。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、EpiDerm™ 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-Skin™ では 1mL を上部から加える。
- (8) 37℃、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 24well プレートにヒト皮膚モデルを移し、イソプロパノールを EpiDerm™ の場合には 2mL、Vitrolife-Skin™ では 1mL 加えて、フォルマザンを抽出する。Vitrolife-Skin™ の場合には、直径 6mm 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、シールして冷蔵庫にて一晩保存。
- (12) 96well プレートに 200 μL/well ずつ移す。1well のみで測定してもよいが、2-3well 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、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

この判定結果をデータシートに記載する。試験を 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、追加試験を実施する。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する。

なお、本プロトコールは、EpiDerm™ に準じた試験法であり、EPISKIN の試験法とは若干異なる¹⁵⁾。EpiDerm™ と Vitrolife-Skin™ のプロトコールの相違点を抜粋して、表 1 にまとめた。

表1 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	2 mL	1mL
4	くり貫き	なし	直径 6mm パンチ使用

4. 非生物試験モデル

現在ガイドライン案 435 「in vitro 膜バリア試験」¹⁷⁾ が検討されている。

- 1) 原理 合成のマクロ分子生物バリアおよび Chemical Detection System (CDS) からなる。この方法の原理は、皮膚上で作用する腐食の作用機構と同様に、適用された腐食性物質により引き起こされる膜バリア障害を検出するものである。商業的には Corrositex として利用できる。
- 2) 方法 被験物質の適用により、pH インジケータの色の变化またはバリアの下のインジケータ液の特性を含む多数の変化を引き起こす。暴露時間と観察期間における変化の程度から腐食性の程度を判定するものである。

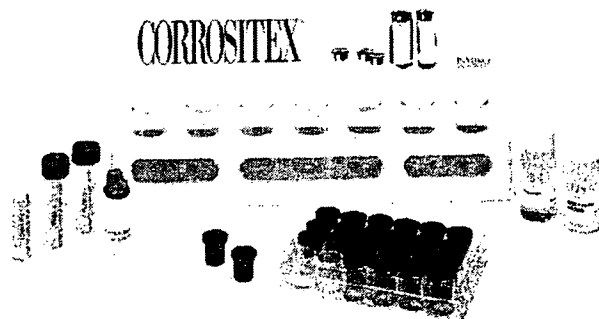


図4 Corrositex™ (ICCVAM⁹⁾)

5. モデルの比較結果

- 1) 日本のバリデーションから得られた培養皮膚の結果

表2に示すように、EpiDerm™ および Vitrolife-Skin™ の感度、特異性、一致度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^{13,15,16)}

ほぼ同等の結果であると考えられる。むしろ、同じヒト皮膚モデルでも疑陰性が多い 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考えられる。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。日本の疑陰性が 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は、被験物質の数、種類の選択の問題もあり、慎重に対処すべき問題である。

表 2 EpiDerm™ および Vitrolife-Skin™ の感度、特異性、一致度の比較
(国立衛研, sulfonic acid を除外して計算)

	EpiDerm™ ¹⁴⁾	Vitrolife-Skin™ ¹⁴⁾	EpiDerm (ECVAM) ¹³⁾	EPISKIN (ECVAM) ¹⁵⁾
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%
一致度	83.3% (10/12)	83.3% (10/12)	92%	83%
疑陽性率	16.7% (2/12)	16.7% (2/12)	17%	16%
疑陰性率	0% (0/12)	0% (0/12)	8%	18%

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す場合がある。この場合には、強い毒性があるものとして、腐食性と判定する。また、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る。ただし、酸やアルカリ検体における pH 変化による生存率測定のための色素の発色への影響は、洗浄などの操作により解消できる。一方、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り、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、やはり注意する必要がある。

日本で得られた結果は、施設間および施設内再現性が高く¹⁴⁾、欧州で実施された EpiDerm™ の結果はよく類似しており¹³⁾、試験系は大きな変動を受けず、頑健なものであると判断している。また、習得に要する時間も短く、技術的に容易な移転が可能な方法であると思われる。

2) ICCVAM による比較

ICCVAM のまとめを表 3 に引用した。同じ培養皮膚でも疑陽性が多い EPISKIN™ の予測性は高くない。これはヒト皮膚モデルの性能の差というよりも、方法の違いによるものと考えられる。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。

TERは動物の皮膚から抽出した皮膚を用いる点で完全な代替法とはいえない。また、電気伝導度を測定するため、機器が必要である。また、疑陽性率が高い。

タンパク質変性モデル (CorositestTM) はもっとも簡便なキットである。ICCVAMで腐食性試験代替法として評価され、特定の目的のためには妥当な方法であると評価されている。しかし、日本での販売実績が低く、感度は今までに承認された試験法のなかではもっとも低い。

表3 試験法の特異性、感度、一致度の比較 (ICCVAM⁸⁾)

	TER	EPISKIN	EpiDerm	CORROSITEX
化学物質数	122	60	24	163
感度	94% (51/54)	82% (23/28)	92% (11/12)	85% (76/89)
特異性	71% (48/68)	84% (27/32)	83% (10/12)	70% (52/74)
一致度	81% (99/122)	83% (50/60)	92% (22/24)	79% (128/163)
疑陽性率	29% (20/68)	16% (5/32)	17% (2/12)	30% (22/74)
疑陰性率	6% (3/54)	18% (5/28)	8% (1/12)	15% (13/89)
研究室間の変動係数	34.7	11.3	12.3	30.3
	3.8-322	3.9-148.8	0.9-51.2	7.7-252.5
	120	20	144	180

3) コスト、時間からの妥当性

日本で行うキットのコストを計算してみた。

EpiDermTMの場合、1キット (24well) 約12万円、1試験で陽性、陰性対照ともに使用する場合には、8wellで約4万円が必要である。一方、Vitrolife-Skinの場合、1キット (24well) 約6万円、1試験で陽性、陰性対照ともに使用する場合には、8wellで約2万円が必要である。表4に示す他のモデルと比較しても安価であり、かつキットをフルに使用すれば、よりコストダウンが計れる。時間的にも他のキットと同様、1日で評価が可能である。

表4 試験法の比較 (ICCVAM⁸⁾ 改変)

	TER	EPISKIN	EpiDerm	CORROSITEX
試験法詳細	適合	適合	適合	適合
プロトコールの完成度	適合	適合	適合	適合
腐食性評価の有用性	適合	適合	適合	適合
UNパッキンググループへの有用性	不適合	グループII/IIIまたはIの分類	不適合	適合
再現性および信頼性	適合	適合	適合	適合
動物実験3Rsへの考察	RefineとReduction	Replacement	RefineとReduction	Replacement
費用	500-850 \$ / 試験	450\$ / キット	200\$ / 物質	300\$ / 物質
試験期間	2日間	1日間	1日間	4時間

なお、SkinEthic¹⁸⁾ や EST-100¹⁹⁾ などの新たな培養皮膚を用いた腐食性試験の Catch-up バリデーションが欧米では実施されている。いずれもよい結果が得られており、モデルに拘らず、ヒト皮膚モデルを用いた腐食性試験が広がる可能性が高い状況となってきた。

文 献

- 1) OECD(1998) Revised proposal for the harmonization of hazard classification based on skin irritation/corrosion, ENV/MC/CHEM/HCL (98) 4, pp.12., Paris : OECD
- 2) Worth, A. P., Fentum, J. H., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J. and Liebsch, M. (1998) An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, ATLA, 26, 709-720
- 3) Barratt, M. D. (1996) Quantitative structure-activity relationships (QSARs) for skin corrosivity of organic acids, bases and phenol : Principal components and neutral network analysis of extended dataset, Toxicol. in Vitro, 10, 85-94
- 4) Barratt, M. D. (1996) Quantitative structure-activity relationships for skin irritation and corrosivity of neutral and electrophilic organic chemicals, Toxicol. in Vitro, 10, 247-256
- 5) Barratt, M. D., Dixit, M. B. and Jones, P. A. (1996) The use of in vitro cytotoxicity measurements in QSAR methods for the prediction of the skin corrosivity potential of acids, Toxicol. in Vitro, 19, 283-290
- 6) Barratt, M. D., Brantom, P. G., Fentem, J. H., Gerner, I., Walker, A. P. And Worth, A. P. (1998) The ECVAM International validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemical, Toxicol. in Vitro, 12, 471-482
- 7) Young, J. R., How M. J., Walker, A. P. and Worth, W. M. H. (1998) Classification as corrosive or irritant to skin of preparations containing acids or alkaline substances without testing on animals. Toxicol. In Vitro, 2, 19-26
- 8) ICCVAM (2002) NIH Publication No. 02-4502 ICCVAM Evaluation of EPISKINTM, EPIDERMTM(EPI-200) and Rat skin transcutaneous Electrical resistance (TER) assay
- 9) ICCVAM (1999) NIH Publication No. 99-4495 Corrositex : An In vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals
- 10) EU, Annex V of the Dangerous Substances Directive
- 11) OECD guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for new guideline : 430, in vitro Skin Corrosion : Transcutaneous electrical resistance test (TER)

- 12) OECD guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for new guideline : 431, *in vitro* Skin Corrosion: Human skin model test
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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, Toxicol. in Vitro, 12, 483-524 (1998)
- 16) 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
- 17) OECD guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for new guideline: 435, *in vitro* membrane barrier test method for Skin Corrosion
- 18) Kandarova, H., Liebsch, M., Spielmann, H., Genschow, E., Schmidt, E., Traue, D., Guest, R., Whittingham, A., Warren, N., Gamer, A. O., remmele, M., Kaufmann, T., Wittmer, E., Wever, B. D. and Rosdy, M., (2006) Assessment of the human epidermals model SkinEthic RHE for *in vitro* skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431, Toxicol. in Vitro, 20, 547-559
- 19) Hoffmann, J., heisler, E., Karpinski, S., Losse, J., Thomas, D., Siefken, W., Ahr, H. -J., Vohr, H.-W. and Fuchs, H. W. (2005) Epidermal-skin -test 1000 (EST-1000) -A new reconstructed epidermis for *in vitro* skin corrosivity testing, Toxicol. in Vitro, 19, 925-929