

表 5 EPISKIN の MTT 還元法による皮膚刺激性の予測性能 Hoffmann, S., (2006)から引用

	specificity		sensitivity	
	n	%	n	%
all runs (individually classification)	311	79.74	236	73.73
three valid runs (individually classification)	285	80.70	210	77.62
all runs (median classification)	99	80.80	75	74.67
three valid runs (median classification)	95	82.15	70	78.56

表 6 EPISKIN による MTT 還元法で結果が一致しなかった試験物質一覧 Hoffmann, S., (2006)から引用 (太字は識別が違っていたもの。グレーのセルは SD が >18)

chem. no	EU class	dominant median	L'Oréal run				Unilever run				Senofi run				total number of runs	misclassifying runs [%]
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
2	no label	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	100.00	
17	no label	1.7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	100.00	
26	no label	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	100.00		
8	no label	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	10	90.00		
5	no label	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	10	80.00		
7	no label	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	9	86.67		
8	no label	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	10	60.00		
52	no label	0.7	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	11	27.27		
53	no label	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	9	22.22		
54	no label	1.3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	9	22.22		
34	R38	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	100.00		
49	R38	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	100.00		
51	R38	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	100.00		
27	R38	4	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	10	70.00		
60	R38	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	9	66.67		
23	R38	3	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	12	58.33		
55	R38	2	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	9	44.44		
56	R38	3.3	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	9	33.33		
43	R38	2	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	10	30.00		
20	R38	2.3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	10	20.00		
3	R38	2.7	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	10	10.00		
18	R38	3	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	10	10.00		

表 7 EPISKIN の MTT 還元法と IL- $\alpha$  測定法の追加による皮膚刺激性の予測性能 Hoffmann, S., (2006)から引用

	n	MTT	MTT + PM-total
specificity	99	82.83%	78.79%
sensitivity	75	74.67%	90.67%

### 7. 試験法の正確性(再現性、頑健性)

MTT 還元法について、4種の統計手法による施設内再現性を表 8 にまとめた。すべてのデータを基にした解析とデータ受け入れ基準をクリアした 3 回のデータのみによる解析結果は同等であった。分散分析で有意差があった試験物質の数は施設間で差が認められた。しかし、すべての試験施設において、試験の 90%以上が SD18%以下と試験設定基準に適合しており大きな問

題はないと判断された。

表 8 4種の統計手法による施設内再現性の評価 Hoffmann, S., (2006)から引用

	L'Oréal		Unilever		Sanofi	
	all	three valid runs	all	three valid runs	all	three valid runs
sample size	58	55	58	56	58	54
ANOVA: number of chemicals with significant run differences	5	5	14	11	8	8
number of chemicals with $s_R > 18$	4	2	7	5	5	2
mean correlation of runs	0.9513	0.9792	0.9144	0.9358	0.9330	0.9691
proportion of identically classified chemicals	52/58	52/55	52/58	53/56	50/58	50/54

ESAC の Peer review panel では、検定の有意水準の大きさ(1%)について議論しているが、仮説検定の適用そのものについての十分な検討が必要である。

施設間再現性は、各試験物質の3施設の結果について、分散分析、SDによる解析及び陽性、陰性識別の施設間の一致性について解析された。これによると、58試験物質中ですべての施設で、判定識別が一致したものは、50種であり、50/58(86.2%)であった(表9)。また、Receiver Operation (RO)曲線による各施設の比較では、施設による若干の差はあるもののほぼ同等で差がなかった(図1)。

図1 各施設によるRO曲線(受け入れ基準適合データによる)

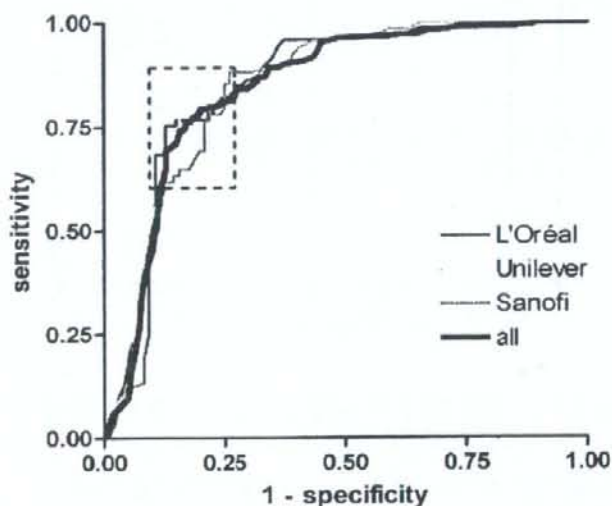


表 9 EPISKIN の施設間再現性 (0:non-irritant, 1:irritant) Hoffmann, S., (2006)から引用

chemical number	EU classification	median classification			between-laboratory reproducible
		L'Oréal	Unilever	Sanofi	
2	no label	1	1	1	+
5	no label	1	1	1	+
6	no label	1	0	0	-
7	no label	0	1	1	-
8	no label	1	1	1	+
9	no label	0	0	0	+
10	no label	0	0	0	+
11	no label	0	0	0	+
12	no label	0	0	0	+
16	no label	0	0	0	+
17	no label	1	1	1	+
19	no label	0	0	0	+
21	no label	0	0	0	+
22	no label	0	0	0	+
24	no label	0	0	0	+
25	no label	0	0	0	+
26	no label	1	1	1	+
28	no label	0	0	0	+
30	no label	0	0	0	+
32	no label	0	0	0	+
33	no label	0	0	0	+
35	no label	0	0	0	+
36	no label	0	0	0	+
39	no label	0	0	0	+
41	no label	0	0	0	+
42	no label	0	0	0	+
44	no label	0	0	0	+
48	no label	0	0	0	+
50	no label	0	0	0	+
52	no label	0	1	0	-
53	no label	0	0	0	+
54	no label	0	0	0	+
57	no label	0	0	0	+
1	R38	1	1	1	+
3	R38	1	1	1	+
4	R38	1	1	1	+
13	R38	1	1	1	+
15	R38	1	1	1	+
18	R38	1	1	1	+
20	R38	1	1	1	+
23	R38	0	1	0	-
27	R38	0	1	0	-
29	R38	1	1	1	+
31	R38	1	1	1	+
34	R38	0	0	0	+
37	R38	1	1	1	+
40	R38	1	1	1	+
43	R38	1	1	1	+
45	R38	1	1	1	+
46	R38	1	1	1	+
47	R38	1	1	1	+
49	R38	0	0	0	+
51	R38	0	0	0	+
55	R38	0	1	0	-
56	R38	1	0	1	-
58	R38	1	1	1	+
59	R38	1	1	1	+
60	R38	0	1	0	-
reproducible non-labeled chemicals					90.9%
reproducible R38-labeled chemicals					80.0%
overall reproducibility					86.2%

L-1 $\alpha$  測定については、各施設で試験実施試験物質が異なることから、陽性対照と陰性対照の結果をもとに評価したが、両者ともに施設間で結果が異なった。共通して実施された試験物質の中で非表示の 25 種中 22 種は識別が一致しており、良い施設間再現性が認められている。しかし、R38 表示物質の種では結果が一致したものは 1 種のみであった。

各施設の MTT 還元法による結果の平均値のばらつき(標準偏差)について、物質ごとに施設間変動を評価している。試験物質の特性に応じて、施設間変動の大きさが異なるので結果の解釈について注意が必要である。また、ESAC の Peer review panel では施設間での結果の違い

を強調している。いずれにせよ、施設数が 3 施設と少数なので、施設間変動の十分な検討は困難であろう。

## 8. 試験法の信頼性

正式バリデーションは、Phase 1 と Phase 2 に分けて実施されている。Phase 1 は、それまでのプレバリデーションで最適化検討された試験プロトコルを検証し、その結果を Phase 2 に反映させることを目的として実施され、Phase 2 にすべてが集約される形で構成されている。バリデーションは、OECD No.34 の原則に準拠して実施されている。

Phase 2 では、正式かつ詳細な SOP を使用し、試験結果の受け入れ基準も設定されている。また、技術伝達を実施した後、3 施設で実施されている。試験物質は独立した CSSC によって選択・管理されている。使用している EPISKIN は市販されているヒト皮膚モデルであることから、バリデーション研究の開始時に生産施設の監査が実施され、ヒト皮膚モデルの品質が確認されている。また、生物統計家がバリデーションのマネージメントチームに参加しており、結果の解析を担当した。特に施設内再現性については詳細に調査されている。

以上の観点から、試験法の信頼性に問題はないと判断できる。

## 9. 他の科学的な報告との比較の有無

皮膚刺激性代替法の観点から、ECVAM の皮膚刺激タスクフォースにおいて、正式バリデーションで検討された試験法は 3 種であった。

それらは、EPISKIN、3 次元皮膚モデル EpiDerm、マウス皮膚を用いて TEWL の測定と電気抵抗を測定する ex vivo 試験である皮膚総合機能試験 (skin integrity function test: SIFT) であった。これらを比較した場合、SIFT は、phase 1 検討において、EPISKIN と比較して、予測性能が低く、false negative が高い (73%) ことから、マネージメントチームの基準に適合しなかった。

EpiDerm は、EPISKIN と同様に良好な結果を示したことから同時に phase 2 へ移行した。EPISKIN と EpiDerm は、統一プロトコルで評価されたところ、施設内再現性は、EpiDerm は、EPISKIN と比較してやや低かった。予測性能について、MTT 還元法では、EPISKIN の感度は 75%、特異性は 81% であったが、L-1 $\alpha$  放出の測定を組み合わせることで、79% の感度を持ちつつも特異性は 91% に増加した。一方、EpiDerm では、MTT 還元法において、感度は 57% であり、特異性は 85% であったが、IL-1 $\alpha$  放出の測定をみあわせても予測性は改善されなかった。従って、現状では EPISKIN の皮膚刺激性代替法としての有用性が確認されている。

しかし、EpiDerm の結果は今後の SOP の改良等で EPISKIN と同等の有用性が確保できるとの見通しが得られている。

一方、ヒト皮膚モデルである EPISKIN を利用した代替試験法として、in vitro 皮膚腐食性試験法 OECD TG 431 が承認されている。この場合の評価も刺激性と同様に、化学物質適用後の組織の細胞生存率を MTT 還元法で評価する方法であるが、これは、化学物質の適用時間を 3 分、1 時間、4 時間の 3 段階としている点が異なる。また、化学物質除去後、直ちに MTT 還元法を適用する点も異なっている。

判定の概要は、各暴露時間における細胞生存率が 35% 未満を陽性と判断し、それぞれを EU 腐食性物質表示 R34,35 及び UN パッキンググループ I II III に対応させている (R34 I, R35 II, R35 III)。60 種の化学物質を用いて評価した EPISKIN の皮膚腐食性予測性能は、感度は 82% であり、特異性は 84%、一致性は、83% と良好であった。これらの結果は皮膚刺激性の予

測性能とほぼ同等である。

以上より、同じ皮膚モデルが異なる皮膚反応評価に利用されており、皮膚反応評価に皮膚モデルを利用することの有用性が示されたが、皮膚モデルを有用に利用するためには、評価する反応によってプロトコール、識別点を十分吟味して設定する等、SOPの重要性が示唆された。

#### 10. 3Rs への関与(動物福祉面からの妥当性)

ヒト皮膚モデルは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。この方法は、主としてEUの危険物指令によるR38表示の識別のために実施される皮膚刺激性試験法 OECD TG 404 を代替できるとされ、3Rsの観点からはreplacementの方法として提案されている。

#### 11. 試験法の有用性と限界(コスト、時間からの妥当性など)

EPISKINは1キット12個で市販されている。1物質の評価に3個使用された場合、陽性対照、陰性対照を含めて1キットで2つの試料が評価できる。試験実施に費やす時間は前培養を含めて3日間と短期間で実施できる。また、皮膚モデルの取り扱いが簡便で、簡単な無菌操作以外に、特別な培養技術は必要ない。また、特別な機器も必要としない。IL-1 $\alpha$ 測定では、ELISAキットを使用している。これも通常の生化学的な手法の範囲の技術で実施できることから、広く利用できる試験法である。

皮膚モデルの品質管理は、細胞の状態や角質層の状態について管理項目を設定して品質管理され販売されている。しかし、現状において、日本でこれらを使用する場合、入手に時間がかかることや、高価格、購入後、長時間保存できないという不便さがある。さらに、市販品であることから大量生産等による製造方法の変更等その安定供給については留意する必要がある。

今回のEPISKINを用いたin vitro皮膚刺激性試験法は、EUの危険物指令によるR38表示の識別に焦点を絞って開発されている。R38表示の識別のために使用されているin vivo皮膚刺激性試験法は OECD TG 404 を基本としている。

OECD TG 404 は、3匹の動物を用い、4時間の閉塞貼付除去1、24、48、72時間後の反応をドレイズの評価基準で評価する方法である。評価は、個別動物の刺激値で評価する方法と3匹の平均刺激値で評価する方法が使用されている。

化学物質に関する皮膚刺激性の識別において、EU危険物指令のR38表示での基準は、少なくとも2個体でドレイズ評価(24、48、72時間の紅斑と浮腫をそれぞれ合計し得られた個体別平均)が2点以上となったものにR38と表示するというものである。一方、GHS表示では、category II (irritant: 少なくとも2個体で2.3以上)、category III (mild irritant: 少なくとも2個体で1.5以上2.3未満)、非表示(1.5以上の個体が1以下)となっている。GHS表示は国際標準と考えられることから、この識別への利用が期待される。

GHS表示への適用を考慮し、Phase 1で得られた20種の結果について、細胞生存率70%以上を非表示、30%以下をirritant、その間をmild irritantと識別した場合の予測性能を評価したところ、irritantと非表示物質の識別は100%であったが、mild irritantはほとんど識別できず、一致性は75%であったと報告されている。

Phase 2の結果については、in vivo識別を変えた場合の各細胞生存率の感度と特異度のバランスの分析から、予測性能が妥当であった細胞生存率を用いて解析している。細胞生存率50%以上を非表示、30%以下をirritant、その間をmild irritantと識別した場合の予測性能を評価したところ、IL-1 $\alpha$ の測定(60pg/mlによる識別)を加味してもirritantおよび非表示物質の識別は共に88.6%であったが、mild irritantの識別は6%で、mild irritantはほとんど識別できず、

phase 1 の結果が再現されたと報告されており、今回の予測モデルによる 3 段階の識別は困難であると解析されている。

しかし、今回の結果は、細胞生存率 50%以下の化学物質は R38 表示または GHS category II に分類されることを示唆しており、今後の in vitro 評価による学物質の皮膚刺激表示の統一見解を得るために有用であると考ええる。

また、R38 表示に関する検討は、EPISKIN の細胞生存率 50%以下のものは、OECD 404 において少なくとも 2 個体でドレイズ評価 2 点以上となると読み替えることができることから、R38 以外にも OECD 404 を利用した各種皮膚刺激性試験結果の識別への活用も期待される。

EU の SCCP による化粧品および化粧品原料への利用に関するメモランダムでは、本試験法について、皮膚刺激性を予測できる方法の導入である点は歓迎しているが、MTT 還元法では着色による影響や還元物質による妨害等も考慮する必要がある点、化粧品原料の皮膚刺激性は相対的にごく弱い刺激領域に分布していること、化粧品における刺激性に今回選択された化学物質中に化粧品指令 76/768/EEC による禁止物質、制限物質、色素、防腐剤、UV フィルター等がほとんど含まれていなかったことから、これらとの対応性について更なる情報が必要であることが指摘されている。

## 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。

## 13. 結論

3 次元皮膚モデル EPISKIN を用いた in vitro 皮膚刺激試験法は、EU における危険物指令の R38 表示の識別を予測する方法として、OECD No.34 に準拠してバリデーション研究が実施されており、その結果の再現性、予測能力、信頼性についても妥当であった。したがって、本試験法の承認に関する ESAC の認証は納得できるものであり、本試験法が R38 表示による化学物質の分類を予測する in vitro 試験として有用な方法であることが確認された。

#### 14. 文献

1. ESAC Peer Review Panel for the Skin Irritation Validation Study –Consensus Report
2. Performance Standards for Applying Human Skin Models to In Vitro Skin Irritation Testing, ECVAM SIS Final Version; 2007-05-25
3. ECVAM Skin Irritation Validation Study- Validation of the EPISKIN Skin Irritation Test<sup>42 hours</sup> Assay for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals, EPISKIN Skin Irritation Test<sup>42 hours</sup> S.O.P.
4. ECVAM Skin Irritation Validation Study- Validation of the EPISKIN Skin Irritation Test<sup>42 hours</sup> Assay for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals, S.O.P. EPISKIN Skin Irritation Test<sup>42 hours</sup> Determination of IL-1 $\alpha$  concentration in the culture medium S.O.P.
5. Report from the Chemicals Selection Sub-Committee to the Management Team on Potential Reasons for Misclassification of Chemicals in the EPISKIN and EpiDerm Assays, Chemicals Selection Sub-Committee of the ECVAM Skin Irritation Validation Study
6. SCCP Memorandum on the in vitro test EPISKIN for skin irritation testing, SCCP/1145/07
7. Hoffmann, S., (2006) ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL-1 $\alpha$ , 135pp, Will be available under Downloads of study documents, at <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/index.htm>,
8. Spielmann, H., et al., (2007) The ECVAM International Validation Study on in vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assay and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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 P.A. 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
13. Heylings, J. R., Diot, S., Esdaille, 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 vitro: results and evaluation of ECVAM phase 3. *Toxicology In vitro* 17, 123-138
14. 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. *ATLA* **21**, 107-114
15. 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
  16. Cotovió, J., Grandier, M-H. Portes, P., Rouget, R. and G. Rubinsteen (2005) The *in vitro* acute Skin Irritation of chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of ECVAM Validation Process. *ATLA* **33**, 329-349
  17. OECD guideline for the testing of chemicals. Draft proposal for new guideline: 431, *in vitro* Skin Corrosion: Human skin model test.
  18. 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)



## 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、わが国においても、GHSに準拠する化学物質に関わる法規制において、BCOPやICE法による腐食性・強刺激性物質を評価することが可能であると考えられた。

### 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 (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) 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

籾内桃子 (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 (残留農薬)  
山本直樹 (藤田保健衛生大)  
増田光輝 (国立衛研)

#### B-2) 方法

いずれの試験においても、ICCVAMにおけるバリデーション研究の情報 (BRD) をもとに、JaCVAM眼刺激性試験代替法評価委員会がPeer Reviewを実施した。

### C. 結果および考察

#### C-1) ウシ摘出角膜の混濁および透過性試験 (BCOP)

ICCVAMで実施されたBCOP法の第三者評価は、バリデーションに必要な項目、プロセス、データが十分に検討されている。ESACの評価と同様、ICCVAMのバリデーションの結果を受け入れることに問題はないと判断される。

ある特定の化学物質 (アルコール・ケトン

類などの揮発性物質および固形物等) ではその精度が十分ではない等の試験の限界を考慮に入れた上で適切なプロトコールに基づき試験を実施すれば、化学物質の眼刺激性の段階的評価の1つとして、腐食性・強刺激性物質をスクリーニングする試験法としてBCOP法を使用することに問題はないと判断される。

現在、EUではBCOP法が陽性という結果で化学物質をR41に区分することを既に受け入れている。また、米国ではFDA・EPAが化学物質の眼刺激性評価において、腐食性・強刺激性物質の判断にBCOP法の結果を受け入れることを公式に発表している。

わが国においても、GHSに準拠する化学物質に関わる法規制において、BCOP法による腐食性・強刺激性物質を評価することが可能であると考えられる。

#### C-2) ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法 (ICE)

ICCVAMで実施されたICE法の第三者評価はバリデーションに必要な項目、プロセス、データが検討されている。ESACの評価と同様、ICCVAMのバリデーションの結果を受け入れることに問題はないと判断される。

特定の化学物質 (アルコール類、界面活性剤、固体等) ではその精度が十分ではない等の試験の限界を考慮に入れた上で、適切なプロトコールに基づき試験を実施すれば、ICE法は、化学物質の眼刺激性の段階的評価の1つとして、腐食性・強刺激性物質をスクリーニングすることが可能であると判断される。

現在、EUではICE法の陽性結果をもって化学物質をR41に区分することを既に受け入れている。また、米国では、FDA・EPAが化学物質の眼刺激性評価において、腐食性・強刺激性物質の判断にICE法の結果を受け入れることを公式に発表している。

わが国においても、GHSに準拠する化学物質に関わる法規制において、ICE法による腐食性・強刺激性物質の眼刺激性を評価するこ

とが可能である。

試験法 Isolated Chicken Eye Test Method :  
ICE)

D. 資料

資料 5-1 眼刺激性試験代替法の第三者評価  
報告書 (ウシ摘出角膜の混濁および透過性試  
験 BCOP : Bovine Corneal Opacity and  
Permeability Test)

資料 5-2 眼刺激性試験代替法の第三者評価  
報告書 (ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性

## 眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書

評価対象試験：ウシ摘出角膜の混濁および透過性試験  
(BCOP : Bovine Corneal Opacity and Permeability Test)

平成21年3月30日

### 眼刺激性試験代替法評価委員会

委員長	簾内	桃子 (国立医薬品食品衛生研究所)
委員	竹内	小苗 (プロクター・アンド・ギャンブル・ジャパン株式会社)
	増田	光輝 (国立医薬品食品衛生研究所)
	山本	直樹 (藤田保健衛生大学)
	小坂	忠司 (残留農薬研究所)
	宮岡	悦良 (東京理科大学)

## 略語

3Rs: Replacement, Reduction, and Refinement Alternative  
BCOP: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test  
BRD: Background Review Document  
BSE: Bovine Spongiform Encephalopathy  
CAS: Chemical Abstracts Service  
CV: Coefficient of variation  
ECVAM: the European Center for the Validation of Alternative Methods  
ESAC: ECVAM Scientific Advisory Committee  
EU: European Union  
GHS: Global Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals  
GLP: Good Laboratory Practices  
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution  
ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods  
IVIS: *In Vitro* Irritancy Score  
MAS: Maximum Average Score  
MMAS: Modified Maximum Average Score  
OECD: Organization for Economic Co-operation and Development  
SD: Standard Deviation  
US EPA: United States Environmental Protection Agency

## 要旨

ウシ摘出角膜の混濁および透過性試験 (BCOP: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test) 方法は、ウシ眼球から採取した角膜を用いて被験物質の眼刺激性を評価する試験法であり、ウサギを用いた眼刺激性試験 (Draize法) の代替法として開発された。ICCVAMにおけるバリデーションの情報 (BRD) をもとにJaCVAM眼刺激性試験代替法評価委員会において、本試験法についてのPeer Reviewを実施した。

本試験は、ウシ眼球から摘出した角膜に被験物質を暴露し、その結果角膜に生じる物理的特性の変化を混濁度と透過性の2つの項目をもとに評価し、眼の腐食性および強刺激性を判定する方法である。

本バリデーションには、様々な種類と製剤形態から成る十分な数の被検物質が用いられた。ICCVAMのBRDによると、BCOP試験法の正確性は、GHS分類による腐食性・強刺激性の眼刺激性分類と比較して正確率、感度および特異性はそれぞれ81%、84%および80%であった。偽陽性率および偽陰性率はそれぞれ20%および16%であった。一致度の低いアルコール類・ケトン類・固体物質を除くと正確率、偽陽性率および偽陰性はそれぞれ92%、12%および0%となり、腐食性・強刺激性の検出精度は十分高いと判断された。試験法の信頼性は、施設間・内変動において良好な結果が得られており、十分であると判断された。

以上のような結果から、化学物質の眼刺激性の段階的評価の1つとして、腐食性および強刺激性物質をスクリーニングする目的のためにBCOP法を使用することに問題はないと判断された。わが国のGHSに準拠する化学物質に関わる法規制において、BCOP法により腐食性・強刺激性物質を評価することが可能であると考えられる。

## 1 試験法の科学的および規制の上での妥当性

ウシ摘出角膜の混濁および透過性試験 (BCOP: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test) は、ウシ眼球から採取した角膜に被験物質を暴露し、その結果、角膜に生じる物理的特性の変化から被験物質の眼刺激性を評価する試験法である。

角膜は偶発的な事故などにより刺激物に暴露される眼表面組織の広範囲を占めており、その損傷は視力障害を引き起こす可能性がある。したがって、従来の眼刺激性試験評価法であるウサギを用いた眼刺激性試験 (Draize法) では、角膜への影響に評価の重みをおいている。ウシ眼球から採取した角膜を用いる本試験法も、Draize法と同様な考え方に基いて化学物質の眼刺激性を評価していると判断される。

ヒト、ウサギおよびウシの角膜には解剖学的および生理学的な違いがあり、この違いがDraize法やBCOP法を用いた場合のヒト眼刺激性の予測性におよぼす影響については明らかではない。しかしながら、現在、Draize法を使用することで、化学物質がヒトの眼に対して重篤な損傷を与える可能性について十分予知できている。したがって、BCOP試験法の妥当性を検討するにあたっては、Draize法との比較を行うことで、その目的が達成されることが考えられる。

生体を用いた試験では、化学物質の眼の暴露に対する保護作用が働くが、BCOP試験法ではこの作用は組み入れられないため、より過酷な試験条件下で評価していると考えられる。また、暴露直後の角膜の刺激性反応は評価できるが、その後の回復性や角膜以外の眼組織については、評価できない。しかし、病理組織学的評価を組み入れることにより、角膜の損傷の度合いから、回復性や他の眼組織への影響を予測することは可能であると思われる。

化学物質の危険有害性の情報については、ラベルや安全性データシートを通じて使用者に伝達されるような法律や規則が各国において定められている。眼刺激性については、現在、ウサギを用いた眼刺激性試験 (Draize法) による腐食性 (非回復性) の有無、さらに、回復性の刺激についてはその重症度 (強・中・弱刺激性) 等をもとに、米国環境保護庁 (US EPA)、欧州連合 (EU)、および化学品の分類と表示に関する世界調和システム (GHS) において分類基準が示されている (EPA 1996, EU 2001, UN 2003)。

ICCVAMのバリデーション (ICCVAM 2006) では、US EPA、EU、GHSのそれぞれの分類基準に応じて、腐食性および強刺激性物質の判定法としての評価を行っている。わが国においては、化学物質に関する法律のうち、2009年1月現在、労働安全衛生法がGHSを導入している。また、今後、化学物質の流通の更なるグローバル化を考えると、危険有害情報の共有化が必要となり、国内の他の化学物質に関する法律もGHSを導入していくことが推測される。よって、BCOP法のGHS分類基準に対する評価は、国内法への適用にも対応するものである。

## 2 試験法のプロトコールの妥当性

本試験は、以下の2つの評価項目をもとに、眼の腐食性・強刺激性を評価する。

1. 混濁度 (Opacity) : オパシトメーターによる角膜の光透過度を測定することにより、角膜の濁度、すなわち変性を定量的に評価する。
2. 透過性 (Permeability) : 分光光度計を用いてフルオレセインナトリウムの角膜透過性を測定することにより、角膜上皮のバリア機能を定量的に評価する。

この2つの評価値をもとに *In Vitro* Irritancy Score (IVIS) を計算し、眼の腐食性および強刺激性を判定する。ICCVAMのバリデーションで用いられたプロトコールの概要は、以下のとおりである。

### 1) 眼球の入手

主に食用目的で屠場にて処分されたウシから新鮮な眼球を入手する。眼球は、適切な保存条件で運搬する。

## 2) 角膜の準備

角膜の損傷を目視で確認後、強膜を2-3 mm残して角膜を摘出し、前部・後部のコンパートメントからなる専用チャンバーにセットする。チャンバーを培地で満たし、 $32 \pm 1^\circ\text{C}$ で1時間角膜を保持する。1時間後、新しい培地に入れ替え、光透過度をオパシトメーターで測定し、損傷が認められない角膜を試験に使用する。

## 3) 試験群

各試験群あたり3個の角膜を使用する。被験物質が液体の場合、界面活性剤は10%希釈液を使用するが、それ以外は原液(100%)を使用する。被験物質が固体の場合は、20%の溶液または懸濁液を調製して使用する。陽性対照として、被験物質が液体の場合はエタノール、固体の場合はイミダゾールを用いる。

## 4) 暴露

培地を除いた角膜上皮側のチャンバーに被験物質を注入し、 $32 \pm 1^\circ\text{C}$ で被験物質が液体の場合は10分間、固体の場合は4時間暴露させる。その後、被験物質を取り除き、角膜を培地で洗う。被験物質が液体の場合は、再び新しい培地を注入し $32 \pm 1^\circ\text{C}$ でさらに2時間保持する。

## 5) 測定

### 5-1) 混濁度 (Opacity)

被験物質が個体の場合は取り除いた直後、液体の場合は被験物質を取り除いた直後と2時間後の2回、角膜の混濁度を測定する。チャンバー内を新しい培地と入れ替え、角膜の光透過度をオパシトメーターで測定する。

### 5-2) 透過性 (Permeability)

混濁度を測定した後、被験物質が液体の場合は0.4%、固体の場合は0.5%のフルオレセインナトリウム溶液を前部チャンバーに注入し、90分後に角膜を透過して後部チャンバー側に移行したフルオレセインナトリウムを分光光度計で測定 ( $\text{OD}_{490}$ ) する。

### 5-3) 病理組織学的評価

透過性を測定後、固定・染色して、角膜の損傷を観察する。

## 6) 判定

以下の計算式を用いて *In Vitro* Irritancy Score を計算する。Opacity、Permeability と各暴露群の平均値を用いる。

(計算式)  $\text{In Vitro Irritancy Score (IVIS)} = \text{mean opacity} + (15 \times \text{mean OD}_{490})$

IVIS が  $> 55.1$  となる場合、腐食性・強刺激性と判定される。また、平均の透過性 ( $\text{mean OD}_{490}$ ) が  $> 0.600$  となる場合も腐食性・強刺激性と判定される。

BCOP試験方法のプロトコールの詳細は、BRD (Background Review Document) に提示されている。1994から2004年までに実施されたBCOPに関する8つのバリデーション試験は、統一のプロトコールを用いていないが、これらのプロトコール間の違いは試験の結果に大きな影響を与えないと判断されている。また、これらのプロトコールでは眼刺激性試験を評価するにあたっての必要な項目を網羅している。

改良点、検討事項として以下の点が考えられる。

### 1) ウシ眼球の運搬条件

バリデーション試験のプロトコールでは、摘出した眼球の運搬中の保存温度は統一されていない。氷上保存では角膜の白濁の恐れがあるので、摂氏4-10度が好ましいと思われる。眼球を浸漬する溶液には、HBSSなど角膜に影響を与えない溶液の選定が必要である。また、低温で保存されているため、現段階において、眼球、特に角膜に対しての影響が十分検討されていない抗生物質の添加は必要ないと考えられる。

## 2) 被験物質の希釈溶媒

浸透圧などの細胞への影響を考慮すると、被験物質の希釈溶媒は蒸留水ではなく、生理用食塩水が適切であると考えられる。

## 3) 陽性（腐食性・強刺激性）対照物質

Draize法の結果と一致し、かつ、再現性の高い適切な陽性対照物質の選定が必要である。

## 3 バリデーションに用いられた化学物質の分類、選択理由の妥当性

8つのバリデーション試験において、計161の化学物質または製品（混合物）が評価された。

化学物質区分でまとめると、主に、アルコール類、炭化水素、カルボン酸類、エステル類、ヘテロ環式化合物、ケトン類、オニウム化合物などであり、その他、アミン類、エーテル・ポリエーテル類、無機・有機塩、有機硫黄化合物であった（表1）。それらは、製品として分類すると、主に化学合成中間物、クレンザー、医薬品成分、石油製品、溶媒、シャンプー、界面活性剤などであり、その他、洗剤、防虫剤、潤滑剤、洗顔剤、殺菌剤、可塑剤などであった（表2）。

これらのバリデーションに用いられた被験物質の数や種類（物質区分、製品分類、液体・固体の物性、刺激性の程度など）は十分であると判断される。

表1 BCOP試験法のバリデーションに供与された被験物質の化学物質区分

分類	供試数	分類	供試数
ハロゲン化アシル	3	イミド類	2
アルコール類	22	無機塩	6
アルデヒド類	1	ケトン類	12
アルカリ	3	ラクトン	3
アルミニウム化合物	1	ニトリル化合物	1
アシド類	2	ニトロ化合物	2
アミジン類	6	油類	1
アミン酸	10	オニウム化合物	12
アミノ類	4	有機塩	3
ホウ素化合物	1	有機硫黄化合物	5
カルボン酸類	17	有機リン酸化合物	1
エステル類	12	有機ケイ素化合物	1
エーテル/ポリエーテル類	9	フェノール類	1
製剤	69	多環式化合物	3
ヘテロ環式化合物	12	テルペン類	1
炭化水素	18	ワックス類	1



表2 BCOP試験法のバリデーショに供与された被験物質の製品分類

分類	供試数	分類	供試数
接着剤	1	難燃剤	1
農薬	2	香料	3
不凍剤	1	食品添加物	1
殺菌剤/防カビ剤/消毒剤	11	除草剤	3
飲料	1	防虫剤	8
漂白剤	3	潤滑油・潤滑油添加剤	6
キレート剤	2	塗料・ニス(成分)	1
化学・合成中間体	28	殺虫剤	8
クリーナー	15	石油製品	16
クレンザー(パーソナルケア品)	13	写真薬剤・現像液	2
結合剤	1	植物成長調整剤	2
切削液	2	可塑剤	4
油性洗淨剤	1	防腐剤	2
乾燥剤	1	試薬	5
洗剤	11	毛髪用シャンプー	14
医薬品・代謝物	17	石けん	3
ドライクリーニング製剤	1	溶剤	34
工業用染料	3	界面活性剤	39
乳化剤	1	陰イオン界面活性剤	3
エッチング・電気メッキ剤	2	陽イオン界面活性剤	6
火薬	1	非イオン界面活性剤	5
柔軟剤	1	温度計液	1
肥料	1		

#### 4 試験法の正確性を評価するために用いられた化学物質の*in vivo*および参照データ

現在入手できる化学物質のヒトに対する眼刺激性のデータは十分とは言いがたい。試験データとしてあるものは、そのほとんどが弱刺激性物質である。事故により強刺激性物質に暴露された報告はあるが、詳細については不明である。したがって、現段階においてヒトに対する眼刺激性のデータは、参照データとしては適切ではないと考えられる。

今回のバリデーションでは、ウサギを用いた眼刺激性試験(Draize法)のデータが参照として用いられた。Draize法は、OECDテストガイドラインが作成されており(OECD TG 405)、我が国でも使用されている方法である。Draize法では、ウサギの眼粘膜に化学物質を暴露させ、細隙灯顕微鏡などを用いて暴露後少なくとも72時間まで肉眼的に観察し、角膜、虹彩および結膜の刺激性程度を採点する。角膜混濁の採点に重みづけをしており、観察時間ごとにMaximum Average Score(MAS)やModified Maximum Average Score(MMAS)を算出し、眼刺激性程度を評価する。

Draize法のデータについては、既存の試験結果、またはBCOP試験と並行して実施した結果を用いており、その多くはGLPに準拠した試験であったため、GHS、EPA、EUのいずれかの分類基準による評価が可能なデータをバリデーションに用いた。

Draize法については、ヒトと比較した場合の正確性や試験法の信頼性について検討されている。弱刺激性から中刺激性の物質に対しては、ヒトと同様の反応が確認されており(McDonald et al. 1987)、強刺激性物質については、チオグリコール酸で同様な反応が報告されている(Grant 1974、

Butscher 1953)。一方、ヒトとウサギでは異なる反応を示したケースも報告されている(McDonald et al. 1987)。しかしながら、現在、Draize法により、化学物質がヒトの眼に対して重篤な損傷を与える可能性について十分予知できており、腐食性・強刺激性を判定することを目的としたBCOP法の評価において、Draize法を参照データとして用いることに問題はないと判断できる。

## 5 データと結果の利用性

以下の8つのバリデーション試験から、161の化学物質について、平均光透過度、平均OD<sub>490</sub>、標準偏差、繰り返し試験数、平均IVIS (*In Vitro Irritancy Score*) 値、眼刺激分類評価、被験物質のCAS No.などのデータを得ている。

Gautheron et al. (1994)	52物質供試
Balls et al. (1995)	51物質供試
Swanson et al. (1995)	20物質供試
Gettings et al. (1996)	25物質供試
Casterton et al. (1996)	64物質供試
Southee. (1998)	9物質供試
Swanson and Harbell. (2000)	12物質供試
Bailey et al. (2004)	16物質供試

8つのバリデーション試験のうち、5つのバリデーション試験ではGLPに準拠して行われたことが確認されており、また、7つのバリデーション試験では被験物質をコード化して評価されている。

## 6 試験法の正確性

正確性の評価は、GHS、EPA、EUの各法規制の分類基準ごとに行われている。Draize法のデータと比較した場合、BCOP試験法は眼に対する腐食性・強刺激性物質の判定において、表3に示したような結果を得た。

表3 腐食性・強刺激性物質の予見に関してのBCOP法の精度結果  
(ウザギを用いた試験データを基にGHS、EPA、EUの各基準で分類した場合との比較)

	正確率		感度		特異性		偽陽性率		偽陰性率	
	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
GHS分類	81	119/147	84	36/43	80	83/104	20	21/104	16	7/43
EPA分類	79	113/143	75	30/40	81	83/103	19	20/103	25	10/40
EU分類	80	114/143	82	33/40	79	81/103	21	22/103	18	7/40

(個々のバリデーション試験の結果を、化学物質ごとでまとめ、最も多く分類された刺激カテゴリー、あるいは最も重度の刺激カテゴリーを判定結果として選択し、各法規制の分類基準と比較した。)

GHSの分類基準におけるそれぞれのバリデーション試験結果は、表4のとおりであった。化学物質区分ごとにもみると、分類基準に関わらず、偽陽性率は全般的に低いが、アルコール類は偽陽性率が高く、その他、ケトン類、カルボン酸類やヘテロ環式化学物質でも比較的高い偽陽性率が確認された。偽陰性率も全般的に低いが、アルコール類、カルボン酸類、エーテル・ポリエーテルやヘテロ環式化学物質の一部で偽陰性率の高い結果が得られた。被験物質を物理的物性で区分

すると、固体で偽陰性を示した物質が多かった。GHSの分類基準について、これら被験物質区分での偽陽性・偽陰性率を表5にまとめた。

表4 GHS分類基準と比較した場合の各バリデーション試験結果

試験	判定法	N	正確率	感度	特異性	偽陽性率	偽陰性率
Gautheron et al. (1994)	IVIS	47	77	69	79	21	31
Balls et al. (1995)	IVIS	54	70	77	66	34	24
Swanson et al. (1995)	IVIS	8	100	100	100	0	0
Gettings et al. (1996)	Perm	23	87	75	93	7	25
Casterton et al. (1996)	O/P	55	67	48	86	14	52
Southee. (1998)	IVIS	15	79	76	83	17	24
Swanson and Harbell. (2000)	IVIS	9	78	100	75	25	0
Bailey et al. (2004)	IVIS	14	93	67	100	0	33

表5 被験物質分類ごとのGHS分類基準と比較した場合の偽陽性・偽陰性率

	偽陽性	偽陰性
アルコール類	53% (8/15)	67% (2/3)
ケトン類	40% (4/10)	-
カルボン酸類	38% (3/8)	14% (1/7)
ヘテロ環式化学物質	33% (2/6)	17% (1/6)
固体	10% (2/20)	42% (5/12)
全体	21% (21/104)	16% (7/43)

一致度の低いアルコール類・ケトン類・固体物質を除いた場合のBCOP試験法の評価結果は、以下に示すように正確率が上がり、偽陽性・偽陰性率はさらに低下した。

正確率：87-92% (92%)

偽陽性率：12-16% (12%)

偽陰性率：0-12% (0%) (カッコ内はGHS分類基準における結果)

以上の結果から、BCOP試験法においてアルコール類・ケトン類・固体物質を除いた腐食性・強刺激性の検出精度は、十分高いと判断できる。

## 7 試験法の信頼性

### 施設内変動について

*In vitro* Irritancy Score (IVIS) のrepeatability (反復性) の検討が3つのバリデーション試験で行われており、その結果は以下の通りであった。

Southee. (1998) : IVISの%CV、中央値 11.8-14.2 (3施設の値)

Joseph Sina. (2006) : IVISの%CV、範囲 1.1-13 (強刺激物質のみを抽出した場合)

Gautheron et al. (1994) : IVISの%CV、中央値 18.1

IVISのreproducibility (再現性) の検討は2つのバリデーション試験で行われ、その結果は以下の通りであった。

Gettings et al. (1996) : Permeabilityの%CV、平均値 33.4、中央値 29.0

Southee. (1998) : IVISの%CV、平均値 12.6-14.8、中央値 6.7-12.4 (3施設の値)

### 施設間変動について

3つのバリデーション試験 (Balls et al. (1995)、Gautheron et al. (1994)、Southee. (1998)) の結果は、67-94%の被験物質が施設間の分類で一致した。一致度が低いものは、化学物質区分でまとめるとアルコール類、ケトン類、ヘテロ環式化学物質であり、また製品区分で分けると、有機溶媒、界面活性剤、化学中間体、洗剤、農薬であった。

BCOP法の信頼性は、施設内変動・施設間変動とも良好な結果が得られていると判断される。

### 陽性対照物質のデータ

陽性対照として用いられたエタノールとイミダゾールのヒストリカルデータは表6に示した通りである。

表6 BCOP試験法の陽性対照物質のヒストリカルデータ

陽性対照	Opacity	OD <sub>490</sub>	In Vitro Score
エタノール (10分暴露)			
平均値 (n=632)	31.2	1.422	52.7
SD	4.8	0.345	6.4
CV	15.3%	24.3%	12.1%
上限・下限値	21.7-40.7	0.742-2.112	39.9-65.4
イミダゾール (4時間暴露)			
平均値 (n=125)	76.4	1.768	103.0
SD	18.4	0.488	16.6
CV	24.1%	27.6%	16.2%
上限値・下限値	39.7-113.2	0.792-2.745	69.7-136.2

陽性対照として用いられたエタノールは、変動が比較的少ないので、試験の成否を判断する標準物質としては適切と考えられる。しかしながら、Draize法の結果との一致性が低い(偽陽性)ことから、今後、Draize法の結果と一致し、かつ、再現性の高い適切な腐食性・強刺激性を呈する陽性対照物質の選定が必要である。

## 8 試験法のデータの質

バリデーションに用いられた試験の一部は異なるプロトコールで実施されており、また、IVISの平均値のみでSDの報告のない試験法もあるが、ほとんどのBCOP法およびDraize法の試験は、GLPに準拠して実施されている。

## 9 その他の試験法における科学的な報告

バリデーションに用いられた8つの試験以外にもBCOP法の結果を公表している14の文献 (Gautheron et al. 1992、Vanparys et al. 1993、Rachui et al. 1994、Rougier et al. 1994、Sina et al. 1995、Cassidy and Stanton. 1997、Chamberlain et al. 1997、Bruner et al. 1998、Ubels et al. 1998、2000、2002、2004、Cooper et al. 2001、Jones et al. 2001) があるが、被験物質情報の無記載、*in vivo*のデータが無いことなどにより、バリデーションには組み入れられなかった。