

- 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。

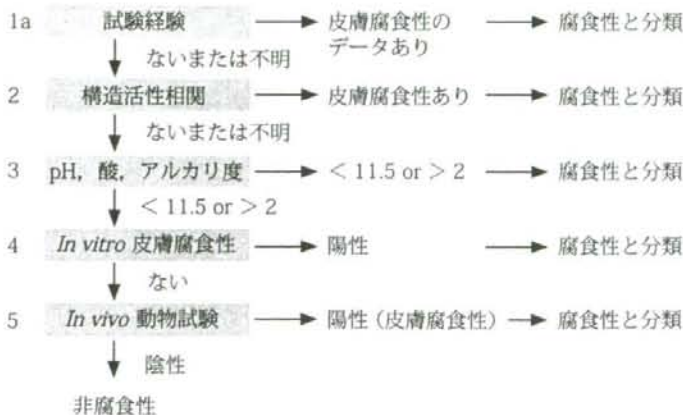


図 1 OECD による腐食性評価の現状^(1,2改題)

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℃で 24 時間適用する。

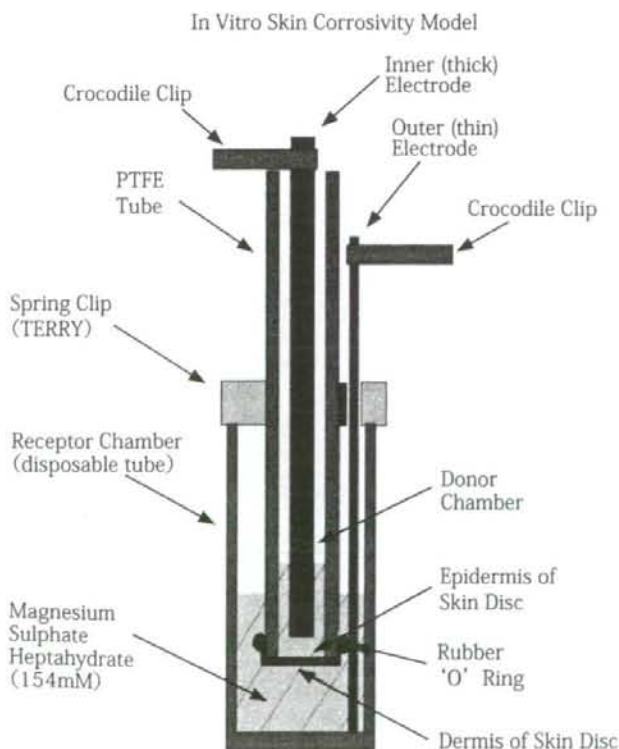


図 2 摘出皮膚電気抵抗試験 (TER) 操作図 (ICCVAM⁸⁾)

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。

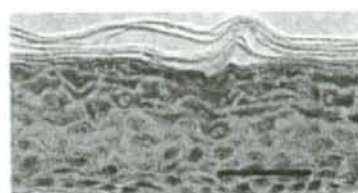
3. 再構築培養ヒト皮膚モデル（ヒト皮膚モデル）による方法

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

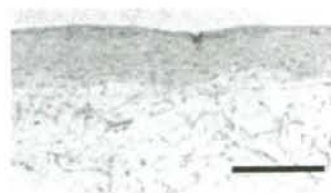
角質層を持つ再構築された表皮からなる 3 ヒト皮膚モデルを用いる。OECD ガイドライン 431 では、Skin^{2TM} ZK1350、EPISKINTM および EpiDermTM などの市販品でも、実験室で開発、構築されたモデルでも適用可能としている。腐食性物質が角質層に吸収され、拡散後、下層の細胞に毒性を示すという仮説を基本とした試験法である。試験法は、被験物質適用後の細胞生存率をもとに皮膚腐食性を評価する方法である。なお、Skin^{2TM} ZK1350 は現在市販されていない。

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 (ゲンゼ: 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。



400 μm

図 3-1 EPI-100: EpiDermTM



100 μm

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，画鋏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，画鋏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，画鋏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ピーカーは，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 (ICCVAM[®])

	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 (ICCVAM[®] 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., Fentem, 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 Validation 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 epidermal 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

1. バリデーションとは

バリデーションという用語の理解はケースバイケースで異なる。そこでまず、本章で扱うバリデーションという言葉の定義から確認しておきたい。OECD ガイドライン GD34 には、以下のよう
に定義されている。

1.1 バリデーション (Validation) : 個々の研究法、方法、製法、評価の信頼性と適性を限定された目的のために確立する過程

動物実験代替法に限らず、試験法のバリデーションとは、reliability (信頼性) と relevance (適性) を見極めることが目的である。つまり、OECD はこれからガイドラインとして認めようという安全性試験、環境保全のための試験にはこのバリデーションを求めていくというものである。現在データ構築が進んでいるトキシコゲノミックスもプロテオミックスなどの新しい毒性評価の方法についても今後検討すると記載されている。

もちろん試験法がバリデーションをするに値するものかという成立基準が存在する

1. 作用機構および機能、既存の標的臓器が明確
2. 最小限の対照物質が明確
3. 正確かつ信頼性がある

この成立基準を満たした試験法についてバリデーションで明らかにするべきものを GD34 から引用すると、以下の3点が要素として挙げられる。

1. 施設内、施設間の再現性 (信頼性)
2. データの質 (GLP 準拠) の確認
3. 感度、特異度、正確度、陽性の予測性、陰性の予測性、有用性、限界など

2. バリデーションに必要な要素

そこで、この3要素を満たすために行うバリデーションに必要なものを挙げ、これまでの経験をもとに説明を加える。

2.1 バリデーションマネージメントチーム

図1に示すように、試験法の専門家、生物統計家、バリデーションの専門家により構成される第三者組織。試験の成立基準を確認し、バリデーション実施の有無を決定した後、試験計画、プロトコルの作成、参加施設の決定や被験物質の選定、コード化、得られた結果が適正に実施さ

れたことの検証，結果の解析，報告書の作成などを担当する。

被験物質の選定，コード化などを被験物質グループまたはデータの処理や評価を統計解析グループなどのコンサルタントグループに任せる場合もある。

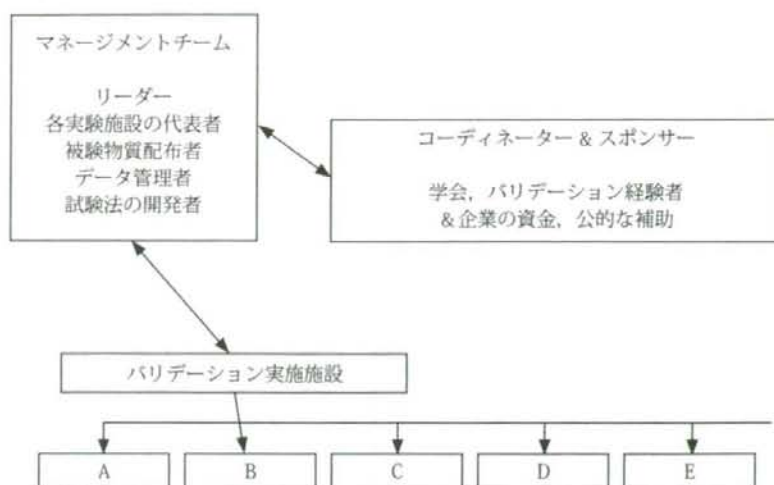


図1 バリデーション組織 (例)

2.2 参加施設

試験法やGLP基準を把握している，またはそれらができる複数の参加施設。試験法の開発者や試験法に精通した施設をリード施設に認定して，技術講習の講師やSOP（標準操作手順書）の作成，トラブル対応を任せる場合が多い。参加施設の力量を客観的に評価するためには，技術講習会に試験関係者を必ず出席させる，およびその後に陽性対照物質を用いた予備試験を行い，データを確認して参加施設の適合条件をクリアできなければ参加を認めないという取り決めが，その後の混乱を回避するためにも重要である。

2.3 コーディネーターおよびスポンサー

バリデーションマネジメントチームを作り，参加者を公募して，バリデーションを開始する。すべてに費用がかかる。その企業のスポンサーまたは公的補助が大切であり，欠かせない。先立つ物がなければ残念ながら，そこに素晴らしい試験方法があってもバリデーションを実施できないからである。

そして，もっとも重要であるものは人材である。バリデーションマネジメントチームに優秀な専門家が必要である。そのために，学会や有識者の協力が必要となる。優秀な資金調達者がいれば，費用も賄える。

2.4 計画および公式プロトコール

試験スケジュールおよび目標の設定などが明確でありながら、ある程度の許容範囲を持ち、若干のSOP逸脱においても結果に大きな影響を与えないプロトコールが望まれる。科学的適合基準または予測モデルを含むものも設定する。

2.5 SOP（標準操作手順書）

試験法の手順を記載した手引き。試験に必要な資材なども記載する。試験方法の移転のしやすさを測る上でも、試験法の肝は詳細に書かねばならないが、結果に影響を与えにくい事項は書き込みすぎないことが望まれる。

2.6 プレバリデーション結果

最小限1施設における試験結果。この結果をもとに、公式バリデーションのプロトコール、SOP、被験物質が選定される。

2.7 適切な被験物質（陽性対照を含む）の選択と既存の毒性情報

既存の毒性情報の所在が明確な化学物質の中から、陽性・陰性物質の比、陽性物質の毒性強度、プレバリデーションで明らかになった判断不能な被験物質をバランスよく盛り込むこと、それらの被験物質を物性、溶解性、溶媒などを考慮して選択し、コード化することが重要である。

2.8 バリデーションの基準

さらに、信頼性と適性を評価するためには基準が必要である。ICCVAM（Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods）やOECDガイドラインの中では、以下のように記載されている。

規制の目的にてバリデーションする新しい試験方法、あるいは変法では以下のバリデーション基準を満たさねばならない。これらの基準はもちろん、方法や目的によりある程度かわりうる。しかし、その目的にあった試験法の評価とデータベースが一致しなければいけない。なぜなら、試験法は異なった目的、組織（規制当局）、物質の分類、ケースバイケースで異なるからである。よって、この基準は、試験法のバリデーションの受入れには欠くことができないものである。

1. 試験法の科学的および規制上の合理性
2. 試験法の指標の生物学的な関係
3. 詳細な試験計画
4. 試験法の再現性（施設内、施設間再現性）

5. 対照物質の存在
6. 適応性を見極められる情報とデータ
7. GLP (Good Laboratory Practical) に準拠したデータ
8. すべてのデータおよび詳細な試験計画が公開され、利用できること

2.9 規制受入れ基準

さらに、バリデーションされた試験法は自動的に行政に受入れられる訳ではない。規制受入れのためには、以下の基準を満たしている必要がある。

1. 専門家による科学的な評価を受けている
2. 試験計画や標準作業手順書がある
3. 既存の試験法との間に関係がある
4. 化学物質の十分なデータがある
5. 試験法がリスク評価に有用である
6. 試験法の限界が明確である
7. 頑強（若干の変更による影響を受けない）かつ習得が容易
8. 時間と経費の削減
9. 同様の試験と調和させやすい
10. 試験法が安定
11. 動物実験の3Rs（reduction：削減, refinement：苦痛の緩和, replacement：置き換え）に合致

3. 試験法の確立プロセス

最近の国際的な試験法の確立プロセスにおいて、ある試験法が開発され、論文に掲載されただけではもちろんのこと、バリデーションも段階があり、プレだけではなく、公式なバリデーションが行われただけでは試験法として行政的な受入れはされない。その後には第三者の専門家による評価が必要である。図2に簡単なフローを示すように、このような厳しい基準をクリアして新規試験法は公的に認められるのである。



図2 試験法確率のプロセス²⁾

3.1 バリデーシヨンの種類

バリデーシヨン終了までにはこのような過程、資料の確認を経ることになる。上記したバリデーシヨンとは予測的なものであり、これから実験を行うものを前提としているが、回帰的なバリデーシヨンとして過去のデータを利用して、例えば、使用動物数を減らすなどの検討もバリデーシヨンの範疇に入る。また、すでにガイドライン化した方法を改良した場合や、類似の生物材料（例えば、皮膚腐食性試験の評価を新たな培養皮膚を用いた場合）を用いたバリデーシヨンを実施する場合に図3に示すようにキャッチアップバリデーシヨンというより小規模なバリデーシヨンで立証する場合も想定される。さらに、GD34によると、構造活性相関のバリデーシヨンは別の検討が進んでいる。

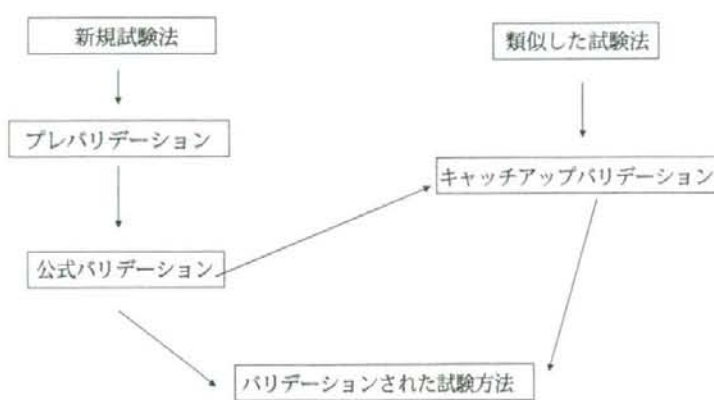


図3 バリデーシヨンの種類^{3改定}

3.2 専門家による評価

規制受入れ基準の中にある専門家による評価（peer review）についても、その評価項目を以下にまとめておく。

1. 試験法が科学的、規制の上での妥当性
2. 試験プロトコルの構成の妥当性
3. バリデーシヨンに用いられた物質の分類
4. 試験法の正確性を評価する物質の in vitro および参照データ
5. データおよび結果の利用性
6. 試験法の正確性
7. 試験法の信頼性
8. データの質
9. 他の科学的な報告

10. 3Rs への関与
11. 試験法の有用性と限界
12. 文献
13. 別添資料

4. バリデーションや評価の組織

このように、バリデーションや評価を実施すると言っても大変な労力を要する。ましてバリデーションマネジメントチームの構築にはノウハウが多く、評価においても種々の専門家への要請が必要、公的な認証をも考慮する必要があることから、世界各地にバリデーションセンターが設立されている。米国には NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Method)、欧州には ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)、昨年 2005 年 11 月に、日本でも国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター内に JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) が設立された。

JaCVAM はその名の通り考えると、alternative のバリデーションを行う。Alternative test という用語の定義は GD34 では動物実験の 3Rs (Reduction: 削減, Refinement: 苦痛の緩和, Replacement: 置換え) に関与した試験すべてが該当する。決して、Replacement のみを指す用語ではない。よって、実験動物を用いた生物試験は遠からず alternative は関与しており、JaCVAM はすべての試験のバリデーションについて担当していると言えよう。

5. 最後に

以上、バリデーションとその後の規制の受入れまで、GD34 および ICCVAM ガイドラインに記載された内容の要点を中心に簡単にまとめた。

バリデーションおよび評価とは多くの研究者の協力を経て、大変な労力と時間を要する作業である。しかし、だからと言って決して良い結果、思うような結論が出るわけではなく場合によっては全く行政的な受入れの余地がない試験法と評価されてしまう場合もありうる。

表 1 に示すような、光毒性試験、腐食性試験、LLNA (Local Lymph Node Assay) など OECD で現在認められている動物実験代替法が正式に承認されるまで数年、試験法が開発されるまで遡ると十年を要すると言われている。そのような労力と時間をかけて新規試験法を開発するメリットはどこにあるのか企業としては難しい問題である。しかし、試験法とは生き物である。放置す

ればすぐにさび付く。仮に動物実験であろうと、これで良いという 100% 満足のいく試験法はこの世にはない。目的に応じた試験法の規制にも合わせねばならない。よって、新しい試験法の開発や試験法の改良は企業としては必須なのである。

それをアシストするために JaCVAM が日本でも作られた。この機関をうまく利用して頂きたい。開発者の負担を減らしながら、素晴らしい試験方法が日本で開発されることを期待している。

表 1 OECD ガイドラインになっている動物実験代替法

Guideline No.	Classification	Test method	Adopted
429	<i>Skin Sensitisation</i>	<i>Local Lymph Node Assay</i>	<i>Updated ,24th April 2002</i>
430	<i>In Vitro Skin Corrosion</i>	<i>Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)</i>	<i>Original ,13th April 2004</i>
431	<i>In Vitro Skin Corrosion</i>	<i>Human Skin Model Test</i>	<i>Original ,13th April 2004</i>
432	<i>Phototoxicity</i>	<i>In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test</i>	<i>Original ,13th April 2004</i>

文 献

- 1) OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO(2005) 14
- 2) ICCVAM (1997) Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods: a report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. NIH Publicatio No : 97-3981, 1997, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)
- 3) Worth, A. P. and Balls, M. (2001) The importance of the prediction model in the validation of alternative tests, ATLA 29, 135-143

第1章 皮膚一次刺激性試験

小島肇夫

1 皮膚一次刺激性評価の歴史

これまで、化粧品原料や製剤の皮膚刺激性の第一次安全性評価（スクリーニング）において、ウサギやモルモットが汎用されてきた¹⁻³⁾。現在も使用している施設もあると思うが、比較的簡便な試験法である。簡便といっても、動物に苦痛を与えず、かつ有用な皮膚状態を確保するためには、毛周期の把握や毛刈技術などに熟練する必要があり、それによって結果が異なることも知られている。実験者は得られた結果をもとに、皮膚一次刺激性の強度をスクリーニングしてきた。常識的に言えば、何十、何百万人の健康人、場合によっては皮膚疾患患者も使われるかもしれない化粧品の安全性を評価するのであるから、例えば、3例の動物を用いてスクリーニングする場合、1例でも皮膚刺激性が生じてはいけぬ。しかし、動物の皮膚はヒトと比較して、感度が高く、特に油性物質において強い皮膚刺激性を引き起こす⁴⁾。そのため現状汎用されている原料でさえ、1例も皮膚反応を引き起こさない物質であることはありえない。そこで、実験者側はヒトパッチテストとの比較や過去のデータベースと比較して、平均評価点が何点未満なら皮膚刺激性が弱い、中程度、強いなどの区分を独自で定めている。このように、本試験方法は、化粧品原料や製剤の皮膚刺激性におけるスクリーニングに汎用され、化粧品原料や製剤の安全性評価に利用されてきた有用なものである。

2 動物実験代替法評価の現状

しかし、欧米を中心とする動物愛護の流れは押し留めようもなく、日本の化粧品業界にも波及してきた。2009年までに動物実験を用いた化粧品を販売できない、原料の試験を実施できないというEU7次改正に従うため⁵⁾、欧州化粧品工業会（COLIPA）で検討が進んでおり、今後は代替法を利用せざるを得ない状況である。その場合でも、まず実験ありきではなく、過去のデータベースの利用、物理化学的な特性や構造活性相関で評価するなど、実験を行う前にすべきことは多い。

動物実験を減らすことを考慮した最初の提案として、腐食／皮膚刺激性の評価スキームが1998年、OECDから発表され⁶⁾、その後、複数の評価スキームの礎となった。このOECD案を基本としたWorthの案の抜粋をスキーム1に示す⁷⁾。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。過去のデータ、構造活性相関、pH、アルカリ度を調べた後、*in vitro*腐食性試験で評価し、次に動物実験を行うというものである。この動物実験にあたる試験が代替法に替わることになる。問題は、この方法をどの目的で