

α の放出測定は、バリデーション評価が終了していない点、その改善効果がわずかであり、あくまでも補助的な位置づけにとどまることから、MTT還元法による評価を基本として評価し、IL-1 α の放出測定は参考データとして取り扱うことが妥当と判断された。その場合でも、結果の再現性、予測能力、信頼性は妥当であった。

- ⑤ OECD の Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (No. 34) に基づいてバリデーションがなされている。
- ⑥ 培養皮膚モデルの製造に関し、生産施設の監査が実施され、品質確認されている。
- ⑦ バリデーションマネジメントチームが組織され、その中に生物統計の専門家が含まれている。
- ⑧ バリデーション結果が専門家に評価されている点から得られたデータの信頼性・質・正確性は国際水準を満たしていると判断できる。
- ⑨ データ解析において、施設内変動性、施設間変動性について評価しており、施設内再現性・施設間再現性に問題はないものである。
- ⑩ 58種の試験資料は、in vivo データが入手できる既存の信頼できる3つのデータベースに登録されているものから選択されており、選択基準は妥当である。陰性コントロールはPBS、陽性コントロールは0.5%SDSが設定されている。
- ⑪ 以上より、3次元皮膚モデル EPISKIN を用いた in vitro 皮膚刺激試験法の承認に関する ESAC の評価結果を検討した結果、ESAC の評価で追加された IL-1 α の放出測定は、バリデーション評価が終了していない点、その改善効果がわずかであり、あくまでも補助的な位置づけにとどまることから、MTT還元法による評価を基本として評価し、IL-1 α の放出測定は参考データとして取り扱うのが妥当と判断された。MTT還元法だけで評価した場合でも、結果の再現性、予測能力、信頼性は妥当であったことから、本試験法が、OECD テ

ストガイドライン 404 に基づく 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。

また、LabCyte についても、

- ① 本試験法はすでに承認されている再構築皮膚モデルを用いた in vitro 皮膚刺激性試験法と類似の試験法である。使用された皮膚モデルはヒトケラチノサイトから再構築された表皮モデルであり、その機能と細胞毒性発現メカニズムおよびその性能は同等であることからこれを in vitro 皮膚刺激性試験に用いることは科学的に妥当である。
- ② この方法は、すでに承認された試験法と同様、OECD のテストガイドライン 404 を代替するものであり、試験法適用の目的は、化学物質の GHS 表示における皮膚刺激識別の category II とそれ以下を識別することにある。
- ③ 試験プロトコールは、皮膚モデルへの試験物質暴露方法とその細胞毒性評価について適切なプロトコールが存在しており、その試験法は、既存試験法とほとんど同じで、本試験が正確に実施できる。IL-1 α の放出測定の追加は、改善効果がわずかであり、かつ、MTT還元法による評価で良好な結果がえられていることから、最終プロトコールからは削除されている。
- ④ 試験において、陽性対照物質 (5%SDS) および陰性対照 (注射用蒸留水) が設定されている。予測モデルには、細胞生存率を用いており、既存試験法と同様に、細胞生存率 50%以下となる化学物質を category II と評価している。
- ⑤ バリデーション評価結果の採用基準 (陰性対照の OD は 0.7 以上、陽性対照の細胞生存率は 40%未満) が明示されている。
- ⑥ OECD の Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (No. 34) に基づいてバリデーションがなされている。
- ⑦ LabCyte EPI-MODEL24 は、OECD GLP Consensus Document No. 5 に従い、製造ロット毎に MTT 法による組織生存率とバリア機能の確認による品質管理が行

われている。

- ⑧ バリデーションマネージメントチームが組織され、その中に生物統計の専門家が含まれている。
- ⑨ データ解析において、施設内変動性、施設間変動性について評価しており、施設内再現性・施設間再現性には、おおむね問題はないものである。
- ⑩ 使用した 25 種の試験試料は、ECVAM が作成した「再構築皮膚モデルを用いた in vitro 皮膚刺激性試験法に関する performance standards」を基に選択されている。これらは、in vivo データが入手できる既存の信頼できる 3 つのデータベースに登録されているものから選択されており、かつ、GHS 表示における category II と no category に識別される試験試料をバランスよく含んでいることから選択基準は妥当である。
- ⑪ 試験の予測性は、ECVAM が作成した「再構築皮膚モデルを用いた in vitro 皮膚刺激性試験法に関する performance standards」で設定されている一致性に関する値、特異性 (specificity): 70%、感度 (sensitivity): 80%、精度 (overall

accuracy): 75%を満たしており、その予測性は妥当なものであった。

D. 結論

以上より、再構築皮膚モデル EPISKIN および LabCyte を用いた in vitro 皮膚刺激試験法は、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。

なお、LabCyte を用いた用いた in vitro 皮膚刺激試験法の第三者評価については、日本動物実験代替法学会に依頼した成果である。

E. 資料

- 資料 6-1 ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法の第三者評価報告書
- 資料 6-2 ヒト皮膚モデル『LabCyte EPI-MODEL 24』を用いた皮膚刺激性試験代替法の第三者評価報告書 ver. 4
- 資料 6-3 LabCyte 評価英文要旨

ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法の第三者評価報告書

評価対象:3次元皮膚モデル EPISKIN に関する ESAC の statement の評価

皮膚刺激性試験代替法の第三者評価委員会

評価委員長
委員

岡本裕子 (株式会社コーセー)
赤松浩彦 (藤田保健衛生大学)
鹿庭正昭 (国立医薬品食品衛生研究所)
杉林堅次 (城西大学)
寒水孝司 (大阪大学)
森本隆史 (住友化学株式会社)
小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所)
実川節子 (日本ロレアル株式会社)
鳥島 久 (倉敷紡績株式会社)
森川訓行 (グンゼ株式会社)
久野智弘 (東洋紡)
山口達也 (東洋紡)

オブザーバー

要旨

欧州代替法バリデーションセンター(ECVAM)で行われた第 26 回会議(2007 年 4 月 26 日)において、ECVAM 科学諮問委員会の非理事会メンバー(ESAC)によって提出された 3 次元皮膚モデル EPISKIN を用いた in vitro 皮膚刺激試験法の承認に関する ESAC の statement について評価した。

ESAC の評価は、欧州で 1998 年から開始された、ウサギによる皮膚一次刺激性試験結果を予測できる試験法探索のための ECVAM 皮膚刺激タスクフォースから提出された正式バリデーション報告書をもとに実施されている。

このバリデーションの目的は、現在行われている欧州での R38 表示(EU classification system: 皮膚刺激性物質を R38 として分類表示し、非刺激性物質を表示しない)による化学物質の分類を in vitro 試験が予測できるかどうかを評価することであった。

3 次元ヒト皮膚モデル EPISKIN を用いた in vitro 皮膚刺激試験法の概要は、試験物質を皮膚の表面に 15 分接触させ、更に 42 時間培養後、MTT の還元を用いた組織生存率を測定し、50% 生存率を識別点として刺激性を識別するものである。バリデーションにおいて、良好な結果が得られたことから、ESAC は、3 次元ヒト皮膚モデルである EPISKIN を用いた試験法が、ウサギ皮膚刺激性を予測するため、また R38 表示を区別する目的で使用される Draize 皮膚刺激性試験(OECD TG 404 および EU 危険物指令 Directive 67/548/EEC の付属 Annex V に記載の試験法 B.4)を代替する、信頼性があり適切なスタンド・アローンの試験法であると評価した。

また、特異性を損なわずに感受性を向上させる可能性があるという理由で、IL-1 α の放出測定による判定を追加することが、MTT 還元法で得られた陰性判定を確定するために有効な補助法であると判断している。

本委員会では、ESAC が評価した資料について検証・確認を行い、以下の結論を得た。

- ① ウサギによる皮膚一次刺激性試験が、人の皮膚の損傷を評価するのに対し、本試験法では人細胞を用いた三次元モデルを用いることから、代替試験として科学的に妥当である。
- ② この方法は、OECD の TG404 を代替するものと明記されており、試験法適用の目的が化学物質の皮膚刺激表示 R38(2 段階)及び GHS(3 段階)の表示の識別評価に用いるためと明記されている。
- ③ 試験プロトコールは、皮膚モデルへの試験物質暴露方法とその細胞毒性評価にいたる詳細なプロトコールが存在している。またその内容も本試験が正確に実施できるようなものであると判断できる。
- ④ ESAC の評価において、追加された IL-1 α の放出測定は、バリデーション評価が終了していない点、その改善効果わずかであり、あくまでも補助的な位置づけにとどまることから、MTT 還元法による評価を基本として評価し、IL-1 α の放出測定は参考データとして取り扱うのが妥当と判断された。その場合でも、結果の再現性、予測能力、信頼性は妥当であった。
- ⑤ OECD の Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (No.34)に基づいてバリデーションがなされている。
- ⑥ ヒト皮膚モデルの製造に関し、生産施設の監査が実施され、品質確認されている。
- ⑦ バリデーションマネージメントチームが組織され、その中に生物統計の専門家が含まれている。

- ⑧ バリデーション結果が専門家に評価されている点から得られたデータの信頼性・質・正確性は国際水準を満たしていると判断できる。
- ⑨ データ解析において、施設内変動性、施設間変動性について評価しており、施設内再現性・施設間再現性に問題はないものである。
- ⑩ 58種の試験資料は、in vivo データが入手できる既存の信頼できる3つのデータベースに登録されているものから選択されており、選択基準は妥当である。陰性コントロールはPBS、陽性コントロールは0.5%SDSが設定されている。
- ⑪ 以上より、3次元皮膚モデル EPISKIN を用いた in vitro 皮膚刺激試験法の承認に関する ESAC の評価結果を検討した結果、ESAC の評価で追加された IL-1 α の放出測定は、バリデーション評価が終了していない点、その改善効果わずかであり、あくまでも補助的な位置づけにとどまることから、MTT 還元法による評価を基本として評価し、IL-1 α の放出測定は参考データとして取り扱うのが妥当と判断された。MTT 還元法だけで評価した場合でも、結果の再現性、予測能力、信頼性は妥当であったことから、~~納得できるものであることが確認され、~~本試験法が、OECD TG404 に基づく 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。

評価結果

1. 試験法の科学的および規制面からの妥当性

現在広く利用されているウサギを用いる皮膚刺激性試験法は、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実験間や施設間での再現性が乏しいこと、更に動物に苦痛とストレスを与えることから、動物福祉の観点から、その代替法の開発が切望されている。

今回、欧州代替法バリデーションセンター(ECVAM)科学諮問委員会の非理事会メンバー(ESAC)によって3次元ヒト皮膚モデル EPISKIN を用いた in vitro 皮膚刺激試験法の承認に関する statement が提出された。

皮膚刺激性は、皮膚表面に直接投与された物質によって引き起こされる可逆的な皮膚の炎症反応であって、肉眼的には紅斑と浮腫として認められるものである。皮膚刺激反応は、刺激物質が、皮膚角質層に吸収され、拡散し、下層の細胞に影響を与えるため生ずると考えられることから、3次元皮膚モデルを用いて被験物質暴露後の細胞生存率等を指標に皮膚刺激性を評価する代替法は妥当であるとして利用されている。

EPISKIN は、真皮に相当するコラーゲンマトリックスの上でヒト成人ケラチノサイトを培養し、表皮構造を再構成した再構築皮膚モデルである。また、本試験法は、MTT還元法による細胞毒性評価を第一指標に、また第二指標に炎症性サイトカイン IL-1 α の放出量を指標としている。MTT還元法による皮膚モデルの細胞毒性評価については、事前の検討においてその妥当性が検討され採用されている。サイトカイン放出(IL-1 α)と刺激性の関連については、IL-1 α 、AK(adenylate kinase)およびIL-8を指標に検討した結果、刺激性の過程と関連が考えられること、購入可能なキットがあることからIL-1 α が有効であるとして採用されているが、その詳細な説明については記載されていない。

ECVAM 皮膚刺激タスクフォースによって実施された正式バリデーションは、バリデーションの計画、実施、データの解析、得られた結果の独立した検証等、OECD No.34に基づいて実施されていることから、バリデーションのプロセスに問題はなかった。この正式バリデーションの結果、EPISKIN を用いた in vitro 皮膚刺激試験法が、欧州における人体と環境に対する危険物の分類と表示に関する指令 Directive 67/548/EEC に基づく化学物質の皮膚刺激性リスク識別、R38表示(EU classification system: 皮膚刺激性物質をR38として分類表示し、非刺激性物質を表示しない)を区別する目的で使用される Draize 皮膚刺激性試験である OECD TG 404 および EU 危険物指令 Directive 67/548/EEC の付属 Annex V に記載の試験法 B.4を代替する、信頼性があり適切なスタンド・アローン評価法であるとESACは評価している。

R38表示はEU域内における皮膚刺激性(irritant)のリスク表示であるが、同様な識別として、国連による化学品の危険有害性分類・表示の国際的な調和の実現のためのシステムとして「化学品の分類及び表示に関する世界調和システム」(The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals :GHS)がある。

日本でもGHS分類の受け入れについて、環境省、厚生労働省及び経済産業省が省庁間連携事業として、GHS危険有害性の分類マニュアルを作成し対応している。GHSにおける皮膚刺激/腐食性分類規定も、OECD TG 404により得られた皮膚刺激性結果をもとに分類されていることから、今後のGHS分類への対応も考慮すべき問題である。

2. 試験プロトコール構成の妥当性

ECVAM 皮膚刺激タスクフォースで実施された正式バリデーションは、Phase 1とPhase 2に

分けて実施された。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することを目的として実施された。その結果、false negative を減少させるための改良が行われ、刺激によって皮膚から放出される炎症メディエーターである IL-1 α の放出量の測定が SOP に追加された。SOP を最適化し、技術伝達を実施した後、Phase 2 は、3 施設で実施された。

Phase 2 で実施された試験プロトコルは、MTT 還元法による細胞毒性評価法、IL-1 α 測定の 2 試験ともに正式かつ詳細な SOP (EPISKIN SKIN IRRITATION TEST^{42hours}、DETERMINATION OF IL-1 α CONCENTRATION IN THE CULTURE MEDIUM) が存在し、その内容は、基本的には本試験を正確に実施できるようなものであった。また、SOP には、この試験の目的が、欧州における R38 表示に従って、化学物質の皮膚刺激性ポテンシャルを分類・予測するためモデルとして設計されていることが明記されている。

R38 表示も国連による GHS 表示も OECD TG 404 により得られた皮膚刺激性結果をもとに分類されていることから、正式バリデーションでは、得られた in vitro 結果と GHS 分類との解析も考慮して試験物質を選択しているが、試験プロトコルについては R38 による識別に特化して作成されている。プロトコルの概略は以下のとおりである。

【EPISKIN SKIN IRRITATION TEST^{42hours}】

12 well プレートを用い、各 well に培養液 2 ml を加えてヒト皮膚モデルを置き、24 時間前培養し、試験に供した。被験物質が液状の場合はピペッターで 10 μ l を皮膚モデル上層に適用し、固形の場合は 10 mg を計測し、あらかじめ 5 μ L の蒸留水でしめらせた皮膚モデル上層にスパチュラで適用した (n=3)。適用時間は 15 分間とし、15 分後に、25 ml の PBS を用いて試験物質を除去し、インサートに残った PBS をふき取った後、新しい培養液を入れた 12 ウェルプレート移動し、42 時間培養した。42 時間後、IL-1 α 測定のためプレートを 15 分間プレートシェーカーにかけ、1.6 mL の培養液をチューブに分取した。チューブは -20 $^{\circ}$ C に保存した。MTT 色素を含む培養液 2.0 mL を入れた well にヒト皮膚モデルを移し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ インキュベータ中に 3 時間静置し培養した。3 時間後、付属のパンチをもちいて円形状にくり貫き、マイクロチューブにいれ、酸性イソプロパノールを 500 μ l 加えて、抽出した。96 well プレートに抽出液を 200 μ l ずつ移し (1 物質あたり 2 well)、マイクロプレートリーダーを用いて 545 nm から 595 nm の領域での吸光度を測定した。イソプロパノールのみを加えた well をブランクとし、実測値とブランク値の差を求めた。陰性対照の吸光度を 100%とした時の各物質の生存率 (%) を計算した。使用した 3 つのモデルの平均生存率 (3 つの皮膚モデルの個別生存率からの平均) が 50% 以下の結果を示す物質を R38 (irritant) と判定した。陰性対照は PBS を用いた。陽性対照は 5% SDS を用いた。試験は原則として繰り返し 3 回実施した。

【DETERMINATION OF IL-1 α CONCENTRATION IN THE CULTURE MEDIUM】

IL-1 α 測定のために分取した培養液を用いて実施した。IL-1 α モノクローナル抗体をプレコーティングしたプレートを用い、サンドイッチ酵素免疫抗体法を用いて測定した。測定には、Quantikine[®] (R&D Systems) を用いた。

手順は Quantikine[®] human IL-1 α Procedure、R&D Systems に従った。使用した 3 つの皮膚モデルの個別測定値からの平均値を pg/ml で示した。MTT 還元法で、平均生存率が 50% 超の結果を示し、かつ、IL-1 α 測定で 50 pg/ml 以上の結果を示す物質を R38 (irritant) と判定し 50% 超の結果を示し、かつ、IL-1 α 測定で 50 pg/ml 未満の結果を示す物質を表示なし (Non irritant) と判定した。また、SOP には、この結果は、Quantikine[®] (R&D Systems) を使用した場

合に役に立つ方法であると記載されている。

この試験は MTT-還元法で陰性となった試験物質及び 3 回の結果判定がばらついた試験物質のみに適用されている。

上記 2 試験法の判定基準の妥当性は、得られた結果解析により検証された。

MTT 還元法については、細胞生存率による判定基準を変化させたときの感度と特異度のバランスの分析から、参加 3 施設全体の総合結果から、感度と特異度のバランスが安定して高いのは、生存率 24% から 77% で、最も予測性能が高い (1.593) のは生存率 55% であり、これは、設定した判定基準 50% の接近していたことから、生存率 50% を識別としたことの妥当性が検証されている。

一方、IL-1 α 測定の判定基準は、SOP では 50pg/ml と設定され、バリデーションは実行されたが、同様の結果解析により、判定基準を 60 pg/ml に変更することで、識別予測能が向上することが確認された。ECVAM はこの結果を受け入れ、最終的に判定基準は 60pg/ml に変更された。

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

試験物質の選択は、Chemicals Selection Sub-committee(CSSC)によって実施された。試験物質数は 58 種であった。試験物質を表 1、2 に示す。

試験物質の選定基準は、in vivo データが入手可能であり、データの質が確保されているものとして、3つのデータベース (i European Centre for the Ecotoxicity and Toxicology of Chemicals (ECETOC)データベース、ii European Chemical Bureau(ECB)による新規化学物質データベース(New Chemicals Database, NCD)、iii Toxic Substance Control Act (TSCA)データベース)に登録されている化学物質から選定された。in vivo データは、ドレイズ試験結果から、3 羽以上の個別動物の個別平均刺激値から得られた優位な中央値 (dominant median (Draize) score)を採用している。この中央値を採用することで、EU 分類 R38(irritant:2 以上/no label)だけでなく、GHS 分類 (Irritant I:2.3 以上、Mild irritant MI:1.5 以上 2.3 未満、non-irritant NI:1.5 未満)への適用が可能となる。

ECETOC、TSCA からの試験物質の個別 in vivo データは記載されているが、NCD からの試験物質の個別 in vivo データは秘密保持の問題で記載されず、中央値の記載のみであった。

58 種の試験物質の内訳は、EU 分類において、R38 表示物質が 25 種、no label が 33 種であった。GHS 分類によると、Irritant が 13 種、Mild irritant が 17 種、non-irritant が 28 種となった。EU-GHS 分類では、R38-I が 13 種、R38-MI が 12 種、no label-MI が 5 種、no label-NI が 28 種であった。これらは、さまざまな分子構造、置換基、物理化学的性質を持つものであった。これらは、それぞれ個別にコードがつけられ、参加施設に配布された。

以上より、CSSC による試験物質の選択については、選択基準が明確であり、58 種を選択していることから、質的にも量的にも妥当であった。

しかし、採用された in vivo データについて、ドレイズ法によるとされているが、ドレイズ法には、OECD-TG404 を含めいくつかの変法があることから、どのような試験法によって得られたかを確認しておく必要がある。

日本において実際に運用しようとする場合、今回 EU で試験物質として選定された 58 物質に加えて、日本において特に使用頻度が高い皮膚刺激性物質についても、バリデートし、試験物質リストに追加することが必要ではないかと考えられる。その点については、日本全体というよりも、業界単位でリストアップするほうが効率的で、現実的な対応ができると思われる。

表 1 試験物質一覧 Hoffmann, S., (2006)から引用 * No.14, No.38 は phase 2 試験から除外

chemical number	substance name	CAS-number	source
1	2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine hydrochloride	86804-75-3	NCD
2	1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	ECETOC
3	1-bromohexane	111-25-1	ECETOC
4	1-decanol	112-30-1	ECETOC
5	3-chloro-4-fluoronitrobenzene	360-30-1	ECETOC
6	3-diethylaminopropionitrile	5351-04-2	ECETOC
7	3-mercaptohexano	51755-83-0	NCD
8	4-methylthio-benzaldehyde	3446-89-7	ECETOC
9	2,6-dimethyl-4-nitrobenzeneamine	16947-63-0	NCD
10	allyl heptanoate	142-19-8	ECETOC
11	allyl phenoxyacetate	7493-74-5	ECETOC
12	2-ethylhexyl 4-aminobenzoate	26218-04-2	NCD
13	1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenylbutan-1-one	68047-07-4	NCD
14*			
15	a-terpineol	98-55-5	ECETOC
16	capryl-isostearate	209802-43-7	NCD
17	2-methyl-3-[(1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl)oxy]-1-propanol, bornyl isomer	128119-70-0	NCD
18	butyl methacrylate	97-88-1	TSCA
19	2,5-dimethyl-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-yl acetate	4166-20-5	NCD
20	cyclamen aldehyde	103-95-7	ECETOC
21	A mixture of: 5-exo-decylbicyclo[2.2.1]hept-2-ene; 5-endo-decylbicyclo[2.2.1]hept-2-ene	22094-85-5	NCD
22	diethyl phthalate	84-66-2	ECETOC
23	di-n-propyl disulphide	629-19-6	ECETOC
24	di-propylene glycol	26265-71-8	ECETOC
25	dipropylene glycol monobutyl ether	29911-26-2	TSCA
26	3,4-dimethyl-1H-pyrazole	2820-97-3	NCD
27	2-isopropyl-2-isobutyl-1,3-dimethoxypropane	129228-21-3	NCD
28	ethyl cis-4-[4-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]piperazine-1-carboxylate	67914-69-6	NCD
29	Mixture of: 2-methyl-4-(2',2',3'-trimethyl-3'-cyclopenten-1'-yl)-4-penten-1-ol 56% (1'R,2R) & 40%(1'R,2S) isomer	014864-90-8	NCD
30	Mixture of: diethyl cis-1,4-cyclohexanedicarboxylate; diethyl trans-1,4-cyclohexanedicarboxylate	0072903-27-6	NCD
31	A mixture of isomers: ethyl exo-tricyclo[5.2.1.0(2,6)]decane-endo-2-carboxylate; ethyl endo-tricyclo[5.2.1.0(2,6)]decane-exo-2-carboxylate	80657-64-3 (mix).	NCD
32	2S-(2-furyl)-5R-hydroxy-4R-(1R,2-dihydroxy)ethyl-6S-hydroxymethyl-1,3-dioxane	7089-59-0	NCD
33	heptyl butyrate	5870-93-9	ECETOC
34	hexyl salicylate	6259-76-3	ECETOC
35	cyclohexadecanone	2550-52-9	NCD
36	isopropanol	67-63-0	ECETOC
37	[2-(cyclopentylloxy)ethyl]benzene(cyclopentyl 2-phenylethyl ether)	not allocated	NCD
38*			
39	methyl stearate	112-61-8	ECETOC
40	1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	5271-27-2	NCD
41	naphthalene acetic acid	86-87-3	TSCA
42	disodium 2,2'-(1,4-phenylene)bis-(1H-benzimidazole-4,6-disulfonic acid or monosulfonic acid, monosulfonate or disulfonate	180898-37-7	NCD
43	A mixture of isomers: 1-(1,1-dimethylpropyl)-4-ethoxy-cis-cyclohexane; 1-(1,1-dimethylpropyl)-4-ethoxy-trans-cyclohexane	181258-87-7 (cis), 181258-89-9 (trans)	NCD
44	phenylethylalcohol	60-12-8	ECETOC
45	(+/-) trans-3,3-dimethyl-5-(2,2,3-trimethyl-cyclopent-3-en-1-yl)-pent-4-en-2-ol	107898-54-4	NCD
46	4-methyl-8-methylenetricyclo[3.3.1.1(3,7)]decan-2-ol	122760-84-3	NCD
47	4-methyl-8-methylenetricyclo[3.3.1.1(3,7)]dec-2-yl acetate	122760-85-4	NCD

48	2-(formylamino)-3-phenylpropanoic acid	43028-69-9	NCD
49	isostearic acid monoisopropanolamide	152848-22-1	NCD
50	2-phenylhexanenitrile	3508-98-3	NCD
51	Mixture of isomers: 1-(2-isopropylphenyl)-1-phenylethane (CAS 191044-60-7) 1-(3-isopropylphenyl)-1-phenylethane (CAS 191044-59-4) 1-(4-isopropylphenyl)-1-phenylethane (CAS 2320-06-)	52783-21-8 (mix.)	NCD
52	propyl (2S)-2-(1,1-dimethylpropoxy)-propanoate	0319002-92-1	NCD
53	silane A-1430	2530-87-2	TSCA
54	Mixture of isomers: 1-(spiro[4.5]dec-7-en-7-yl)pent-4-en-1-one (CAS 224031-70-3) 1-(spiro[4.5]dec-6-en-7-yl)pent-4-en-1-one (CAS 224031-71-4)	224031-70-3	NCD
55	terpinyl acetate	80-26-2	ECETOC
56	benzenethiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl (NB: CAS name from company)	7340-80-1	NCD
57	triethylene glycol	112-27-6	TSCA
58	tri-isobutyl phosphate	126-71-6	TSCA
59	(E,E)-3,7,11-trimethyldodeca-1,4,6,10-tetraen-3-ol	125474-34-2	NCD
60	bis[(1-methylimidazol)-(2-ethylhexanoate)], zinc complex	not allocated	NCD

表 2 試験物質の皮膚刺激分類と刺激値 Hoffmann, S. (2006)から引用

* No.14、No.38 は phase 2 試験から除外

chemical	classification		dominant median	dominant endpoint
	ECS	GHS		
1	R38	I	2.7	B
2	no label	NI	0.0	B
3	R38	I	2.7	E
4	R38	I	2.3	E
5	no label	NI	1.0	E
6	no label	NI	0.0	B
7	no label	NI	0.0	B
8	no label	NI	1.0	E
9	no label	NI	0.3	E
10	no label	MI	1.7	E
11	no label	NI	0.3	E
12	no label	NI	0.7	E
13	R38	MI	2.0	E
14*				
15	R38	I	2.7	O
16	no label	NI	1.0	E
17	no label	MI	1.7	E
18	R38	I	3.0	E
19	no label	NI	0.0	B
20	R38	I	2.3	O
21	no label	MI	1.7	E
22	no label	NI	0.0	E
23	R38	I	3.0	E
24	no label	NI	0.0	E
25	no label	NI	0.0	E
26	no label	NI	0.0	B
27	R38	I	4.0	E
28	no label	NI	0.0	B
29	R38	MI	2.0	B
30	no label	NI	1.3	E
31	R38	MI	2.0	O
32	no label	NI	0.0	B
33	no label	MI	1.7	E
34	R38	MI	2.0	B
35	no label	NI	0.0	B
36	no label	NI	0.3	E
37	R38	I	3.0	E
38*				
39	no label	NI	1.0	E
40	R38	I	3.3	E
41	no label	NI	0.0	B
42	no label	NI	0.0	B
43	R38	MI	2.0	B
44	no label	NI	1.0	E
45	R38	I	2.7	E
46	R38	MI	2.0	B
47	R38	MI	2.0	B
48	no label	NI	0.0	B
49	R38	MI	2.0	E
50	no label	MI	1.7	E
51	R38	MI	2.0	E
52	no label	NI	0.7	E
53	no label	NI	0.0	B
54	no label	NI	1.3	E
55	R38	MI	2.0	B
56	R38	I	3.3	O
57	no label	NI	0.0	B
58	R38	MI	2.0	E
59	R38	I	4.0	E
60	R38	MI	2.0	E

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 58 種類の試験物質の in vitro 評価結果は下記の資料として提出されている。

- 1 Hoffmann, S., (2006) ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL-1 α , 135pp, Will be available under Downloads of study documents, at <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/index.htm>,
- 2 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.

5. データの質

正式バリデーションの Phase 2 の結果を基に評価した。

各施設で実施された試験結果は SOP に添付されたデータシートに記載してマネージメントチームの生物統計家のみ提出されている。またデータシートは ECVAM によってパスワード保護され、パスワード保護が解除されていない場合に限り、解析データとして受け入れ可能としている。

Phase 2 における試験は、1 試験ごとに 3 つの皮膚モデルを用いて実施し、3 回の試験結果から評価されている。Phase 1 から得られた結果を基に、陰性対照の OD 値が 0.6 以上であること、陽性対照の細胞生存率が 40% 以下であること、さらに試験物質の各試験における 3 つの皮膚モデルでの細胞生存率の SD が 18% 以下になることをデータ受け入れ基準として試験実施している。また、この基準を満たさない場合、3 回の試験に加えて 1 度だけ再試験の実施が認められている。これらのデータ取り扱いは、マネージメントチームによって議論され、最終的に、各試験物質について得られたすべてのデータを評価するが、受け入れ基準に適合した 3 回のデータ解析結果に重点をおくと結論した。

すべてのデータを基にした解析と受け入れ基準をクリアしたデータのみによる解析が個別に実施され、生物統計家による評価結果から、両者に大きな差が確認されなかったことから、最終結論にはすべてのデータを採用して得られた数値が採用された。

以上より、データの質については検討結果に基づいて受け入れ基準を設定し、最終受け入れについて議論されており、問題ないと判断できる。

6. 試験結果とその解析

各施設で実施された phase 2 の結果を用いて評価した。データ解析は生物統計家によって実施されている。MTT 還元法の施設内再現性の評価には、3 回の試験結果の一元配置分散分析(有意水準 1%)、施設内標準偏差の比較、Pearson の相関係数、得られた 3 回の繰り返し結果の識別が一致した割合で比較する方法の 4 種の統計手法が採用された。IL-1 α 測定では、相関係数による評価の代わりに変動係数が用いられた。

予測性能の評価は、本バリデーションが、EU のリスク表 R38 を予測するために計画されたも

のであることから、予測結果と試験物質の識別の 2×2 分割表による評価を実施した。すなわち、感度 (sensitivity)、特異性 (specificity)、一致性 (accuracy)、陽性予知能力 (positive predictability)、陰性予知能力 (negative predictability) によって評価した。

MTT 還元法に関する施設内・施設内間の結果の解析および総合的な予測性能の評価は、3 回または 4 回の個別試験結果すべてまたはその中央値 (median) を用いて解析した。IL-1 α 測定の結果は、判定基準 60 pg/ml を採用して解析した。各試験物質に関する各施設の平均放出量を用いて評価した。

MTT 還元法について、3 施設で実施された 58 種の試験物質に対する試験数は、ロレアルでは、178 (4 回実施 4 品) でそのうち、細胞生存率の SD18% 以下を満たさず、10 試験が基準外となった。ユニリーバでは、187 (4 回実施 13 品) でそのうち、18 試験が基準外となった。Sanofi では 182 (4 回実施 8 品) で、そのうち 16 試験が基準外となった。58 種の試験物質に関し、細胞生存率の SD18% 以下を満たした 3 回の結果が得られた数は、ロレアルでは、55/58 であった。ユニリーバでは、56/58 であった。Sanofi では 54/58 であった (表 3)。

MTT 還元法において、すべての各施設の各試験物質における中央値を用いた解析において、R38 表示を正しく判定した例は、75 試験中 56 試験であり、感度は 56/75 (74.7%) であった。99 試験中 80 試験であり、非表示を正しく評価した例は 99 試験中 80 試験であり、特異性は 80/99 (80.8%) であった。一致率は 136/174 (78.2%) であった (表 4、表 5)。

R38 表示の 25 種の試験物質において、中央値を用いた場合、いずれかの施設で陰性と評価された試験物質数は 12 種であり、その中ですべての施設の結果がすべて陰性と評価されたものは 3 種あった (試験物質 No.34、49、51)。一方、非表示物質 33 種のなかで、いずれかの施設で陽性と評価された試験物質数は、10 種であり、すべての施設で陽性と評価されたものが 3 種あった (試験物質 No.2、17、26) (表 6)。

IL-1 α 測定の結果の追加に関しては、判定基準 60 pg/ml を採用して解析した。IL-1 α 測定を追加した場合の一致性は、R38 表示を正しく判定した例は、75 試験中 68 試験であり、感度は 68/75 (90.7%) であった。非表示を正しく評価した例は試験中 78 試験であり、特異性は 78/99 (78.8%) であった。一致率は 146/174 (83.9%) であった。IL-1 α 測定の追加により、予測性能の向上が確認された (表 7)。

IL-1 α 測定追加した場合、試験物質の優位な中央値の識別で評価すると、R38 表示激物質を正しく判定した例は、25 物質中 23 物質であり、感度は 23/25 (92.0%) であった。非表示を正しく評価した例は 33 物質中 26 物質であり、特異性は 26/33 (78.8%) であった。一致率は 49/58 (84.5%) であった。

以上より、試験物質数が 58 物質と比較的十分な数であることから、感度、特異度、一致度の指標の精度について大きな問題はなく、予測性能について結論は妥当であるといえる。

ESAC の評価において、IL-1 α の放出測定による判定を追加することが、MTT 還元法で得られた陰性判定を確定するために有効な補助法であると判断しその追加が提案されている。

IL-1 α の放出測定については作用機構に立脚した評価項目であるが、今回の結果からは、施設バリデーション研究が終了したとは認められず、さらに IL-1 α の放出測定の追加により、著しい改善効果が得られたとも言いがたいことから、MTT 還元法による評価を基本として評価し、IL-1 α の放出測定は参考データとして取り扱うのが妥当と判断された。

表3 各施設におけるMTT還元法の個別試験結果の標準偏差(S.D.)

Hoffmann, S., (2006) から引用 * No.14、No.38 は phase 2 試験から除外

chemical number	L'Oréal run				Unilever run				Sanofi run			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	0.77	0.15	1.20		1.22	3.44	0.57		0.43	1.08	0.45	
2	0.79	0.71	0.56		0.29	0.93	0.19		0.26	0.69	0.32	
3	14.26	10.05	17.12		34.14	4.80	13.93	8.54	5.18	11.49	12.61	
4	1.83	2.76	1.26		1.11	2.48	1.81		0.18	2.20	0.83	
5	23.09	23.51	28.72		1.00	4.61	16.80		26.73	13.79	0.75	0.84
6	17.74	12.08	18.49	5.79	10.74	11.73	6.54		27.66	25.19	29.11	
7	3.94	5.51	13.88		15.52	5.08	2.27		7.68	13.11	1.85	
8	1.59	17.46	14.91		1.35	19.81	5.23	1.49	1.67	6.43	1.56	
9	4.48	6.59	5.56		8.89	31.94	4.26	5.67	2.75	8.96	4.41	
10	6.49	3.84	7.64		13.48	9.37	16.19		3.30	11.37	3.95	
11	2.15	7.08	7.24		11.99	9.69	7.71		3.42	5.99	4.11	
12	3.47	11.58	6.48		5.02	10.35	14.33		3.37	7.16	2.85	
13	0.71	1.39	0.35		0.55	0.32	2.48		4.45	0.39	17.52	
14												
15	11.69	7.84	18.86	6.37	0.83	0.40	0.25		1.13	15.88	0.15	
16	2.42	1.61	5.10		2.34	2.48	7.40		3.55	1.81	5.76	
17	2.71	0.61	1.87		0.96	2.62	0.05		2.62	0.66	0.70	
18	4.76	1.70	1.46		25.23	4.12	10.12	4.45	44.18	7.40	26.47	
19	5.20	1.53	2.45		10.50	4.66	6.70		3.54	27.43	4.70	5.44
20	11.36	2.89	13.13		0.60	3.89	2.20		3.52	29.88	6.17	31.69
21	3.04	7.26	3.92		10.28	4.61	7.29		2.65	1.72	7.62	
22	4.16	5.88	4.53		2.83	3.41	15.27		8.76	1.19	2.30	
23	29.88	11.68	6.66	30.12	1.59	21.64	3.27	11.19	2.16	21.12	6.56	10.49
24	11.58	5.09	7.29		4.36	9.53	8.02		27.24	6.38	2.83	3.99
25	3.38	6.60	1.18		2.02	3.28	9.97		13.10	10.08	1.68	
26	1.92	1.70	1.35		13.09	4.45	11.39		0.74	3.10	0.10	
27	14.90	17.82	13.22		42.94	2.13	13.72	0.94	7.51	7.83	5.75	
28	3.73	1.95	6.32		6.61	9.22	5.77		5.12	1.60	2.45	
29	2.28	1.32	0.38		0.54	1.22	1.33		0.44	0.55	1.10	
30	14.52	4.91	4.32		9.80	21.52	13.54	9.77	4.36	2.33	2.76	
31	1.32	2.90	1.03		0.35	16.36	2.92		2.00	0.89	0.92	
32	1.13	5.65	4.00		5.71	7.37	12.24		6.82	8.85	1.08	
33	1.98	2.77	7.27		6.46	13.06	5.78		7.14	6.45	5.07	
34	3.65	9.41	1.44		28.67	8.09	3.96	1.15	14.11	6.73	3.74	
35	4.85	3.99	2.25		7.67	14.06	7.44		9.55	9.10	4.88	
36	14.16	6.67	2.77		6.40	21.60	9.96	2.72	27.28	0.63	3.68	7.56
37	1.68	1.94	0.50		0.25	1.05	1.31		0.41	12.27	0.74	
38												
39	1.44	4.32	6.94		7.46	6.02	8.58		2.21	3.96	7.24	
40	1.26	7.75	6.08		11.42	3.92	11.15		22.69	0.81	6.62	0.1
41	2.10	3.86	2.01		4.54	6.69	3.71		7.89	3.33	6.13	
42	5.25	1.38	5.86		44.07	3.91	10.71	6.91	5.98	6.07	6.10	
43	3.17	15.38	5.13		2.43	2.90	4.13		20.17	16.80	7.59	16.92
44	5.23	5.13	5.00		14.97	16.43	33.46	10.04	10.19	5.19	12.70	
45	1.15	0.54	0.41		0.95	1.57	1.11		0.63	2.68	0.81	
46	3.41	9.73	4.73		1.33	0.66	3.48		0.30	2.24	0.75	
47	1.11	6.41	2.37		4.52	10.49	10.89		1.26	3.38	1.75	
48	10.98	5.31	2.42		4.10	5.76	5.54		9.24	6.11	2.62	
49	14.55	4.81	3.40		3.43	2.16	4.46		6.05	5.30	3.46	
50	5.77	5.68	3.98		2.87	29.41	9.65	7.72	7.22	3.73	5.02	
51	16.87	10.26	8.62		3.61	4.09	1.87		3.88	8.93	7.14	
52	34.45	5.08	9.21	5.32	15.30	10.20	38.07	16.14	3.11	6.64	17.22	
53	28.20	14.17	24.75		21.20	22.61	18.91		5.55	9.38	11.08	
54	8.61	7.49	5.31		2.25	17.55	9.84		5.77	4.54	10.69	
55	15.88	16.75	11.31		0.78	1.28	0.40		20.99	23.03	4.46	
56	2.06	1.44	1.64		30.46	10.88	32.10		8.40	2.69	2.35	
57	3.91	7.04	2.45		6.84	13.38	5.94		3.39	6.47	1.91	
58	0.47	0.33	1.72		0.49	0.93	0.44		0.74	1.16	0.36	
59	0.80	2.32	8.11		0.90	0.61	10.91		6.20	7.39	10.40	
60	2.86	1.54	4.42		1.98	0.78	0.64		3.70	5.93	17.62	

表 4 EPISKIN における試験結果総括 Hoffmann, S., (2006)から引用 * No.14、38 は phase 2 試験から除外

chemical number	chemical	EU class	MTT classification (based on mean viability over all runs per laboratory)				IL-1 α classification (Cut-Off: 60 mg/ml)				combined classification		combined classification (median over all laboratories)
			L'Oréal	Unilever	Sanofi		L'Oréal	Unilever	Sanofi	L'Oréal	Unilever	Sanofi	
1	2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypropylidene hydrochloride	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1-bromo-4-chlorobutane	no label	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1-bromohexane	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1-decanol	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	3-chloro-4-fluoronitrobenzene	no label	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
6	3-diethylaminopropionitrile	no label	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
7	3-mercaptohexanol	no label	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
8	4-methyllic-benzaldehyde	no label	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
9	2,6-dimethyl-4-nitrobenzamide	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	allyl heptanoate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	allyl phenylacetate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	2-ethylhexyl 4-aminobenzoate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	1-(4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl)-2-phenylbutan-1-one	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	α -terpineol	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	capryl-isooleate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	2-methyl-3-((1,7-dimethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl)oxy)-1-propanol, bo nyl isomer	no label	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	butyl methacrylate	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	2,5-dimethyl-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-yl acetate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	cyclamen aldehyde	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	A mixture of: 5-exo-decylbicyclo[2.2.1]hept-2-ene; 5-endo-decylbicyclo[2.2.1]hept-2-ene	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	diethyl phthalate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	di-n-propyl disulphide	R38	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
24	di-propylene glycol	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	dipropylene glycol mono-butyl ether	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	3,4-dimethyl-1H-pyrazole	no label	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	2-isopropyl-2-isobutyl-1,3-dimethoxypropane	R38	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1

28	ethyl cis-4-[4-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]piperazine-1-carboxylate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	Mixture of: 2-methyl-4-[2',3'-trimethyl-3'-cyclopenten-1'-yl]-4-penten-1-ol 56% (1R,2R) & 40% (1R,2S) isomer	R38	1	1	1													1
30	Mixture of: diethyl cis-1,4-cyclohexanedicarboxylate; diethyl trans-1,4-cyclohexanedicarboxylate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	A mixture of isomers: ethyl exo-tricyclo[5.2.1.0(2,6)]decane-endo-2-carboxylate; ethyl endo-tricyclo[5.2.1.0(2,6)]decane-exo-2-carboxylate	R38	1	1	1													1
32	2S-(2-furyl)-5R-hydroxy-4R-(1R,2-dihydroxy)ethyl-6S-hydroxymethyl-1,3-dioxane	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	heptyl butyrate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	hexyl salicylate	R38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	cyclohexadecanone	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	isopropanol	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	[2-(cyclopropyloxy)ethyl]benzene(cyclopropyl 2-phenylethyl ether)	R36	1	1	1													1
39	methyl stearate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	R38	1	1	1													1
41	naphthalene acetic acid	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	disodium 2,2'-(1,4-phenylene)bis-(1H-benzimidazole-4,5-disulfonic acid or monosulfonic acid, monosulfonate or disulfonate)	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	A mixture of isomers: 1-(1,1-dimethylpropyl)-4-ethoxy-cis-cyclohexane; 1-(1,1-dimethylpropyl)-4-ethoxy-trans-cyclohexane	R38	0	1	1													1
44	phenylethylalcohol	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	(+/-) trans-3,3-dimethyl-5-(2,2,3-trimethyl-cyclopent-3-en-1-yl)-pent-4-en-2-ol	R38	1	1	1													1
46	4-methyl-8-methyltetrahydrocyclo[3.3.1.1(3,7)]decan-2-ol	R38	1	1	1													1
47	4-methyl-8-methyltetrahydrocyclo[3.3.1.1(3,7)]decan-2-yl acetate	R38	1	1	1													1
48	2-(formylamino)-3-thiophene-carboxylic acid	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	isostearic acid monoisopropanolamide	R38	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
50	2-phenylhexanenitrile	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	Mixture of isomers: 1-(2-isopropylphenyl)-1-phenylethane 1-(3-isopropylphenyl)-1-phenylethane 1-(4-isopropylphenyl)-1-phenylethane	R38	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
52	propyl (2S)-2-(1,1-dimethylpropoxy)propanoate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	silane A-1430	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

54	Mixture of isomers: 1-(spiro[4.5]dec-7-en-7-yl)pent-4-en-1-one 1-(spiro[4.5]dec-6-en-7-yl)pent-4-en-1-one	no label	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
55	terpinyl acetate	R38	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
56	benzothiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl	R38	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
57	triethylene glycol	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	tri-isobutyl phosphate	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
59	(E,E)-3,7,11-trimethyldodeca-1,4,6,10-tetraen-3-ol	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
60	bis[(1-methylimidazol)-(2-ethyl-hexanoate)], zinc complex	R38	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

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				Sanofi 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	1	9	100.00	
8	no label	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	10	90.00	
5	no label	1	0	1	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	1	9	66.67	
6	no label	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	10	60.00	
52	no label	0.7	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	11	27.27	
53	no label	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	9	22.22	
54	no label	1.3	0	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	0	10	100.00	
49	R38	2	0	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	0	9	100.00	
27	R38	4	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	10	70.00	
60	R38	2	0	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	0	12	58.33	
65	R38	2	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	9	44.44	
56	R38	3.3	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	9	33.33	
43	R38	2	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	10	30.00	
20	R38	2.3	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	10	20.00	
3	R38	2.7	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	10	10.00	
18	R38	3	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	10	10.00	

表 7 EPISKIN の MTT 還元法と IL- α 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)

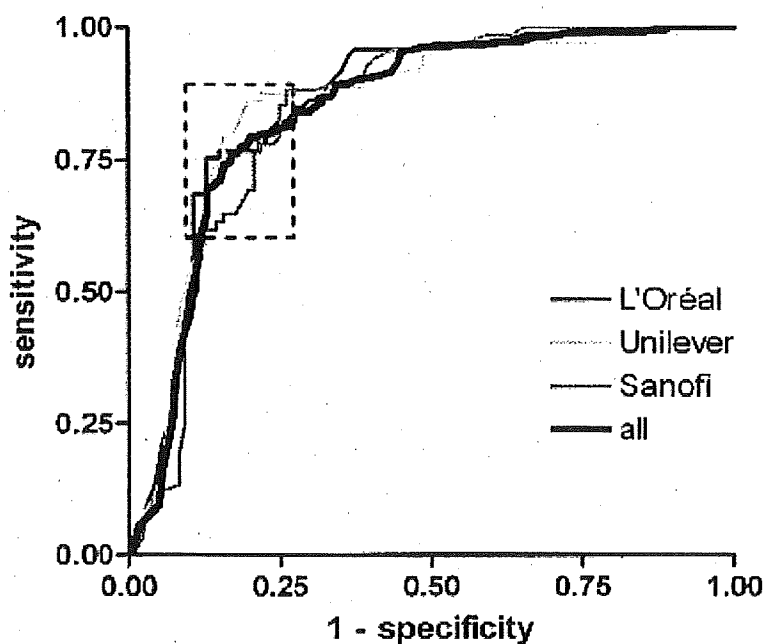


表 9 EPISKIN の施設間再現性 (0:non-irritant、1:irritant) Hoffmann, S., (2006)から引用

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	+
38	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 α 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