

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 EPSKIN 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 EPSKIN 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 EPSKIN 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は簡便で、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られる。

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。ESAC の評価では、IL-1 $\alpha$  の放出測定による判定の追加が提案されたが、これについては、バリデーション研究による確認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 $\alpha$  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。

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 OECD TG 404 に基づく皮膚刺激性試験結果を用いた 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., Esdaile, 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. Rubinstein (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)

## 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

### 皮膚刺激性試験代替法の第三者評価委員会

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）  
吉田真由美（ポーラファルマ）  
小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所）

## 要旨

本報告では、Japan Tissue Engineering Co., Ltd.より提案された再構築皮膚モデルである LabCyte EPI-MODEL24 を用いた、in vitro 皮膚刺激性試験法について評価した。

本モデルは、3T3-J2 cell をフィーダー細胞にヒトケラチノ細胞から再構成された表皮モデルで、病理組織学的には角質層、基底層、有棘層および顆粒層を有したヒトの表皮と類似した構造を持つモデルである。

再構築皮膚モデルを用いた in vitro 皮膚刺激性試験法は、欧州代替法バリデーションセンター (ECVAM) でバリデーションが終了し、すでに 2007 年に ECVAM 科学諮問委員会の非理事会メンバー (ESAC) によって、EPISKIN test method が承認された<sup>1)</sup>。その評価を基に、2007 年に「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」<sup>2)</sup>が作成された。これをもとに評価された類似試験法である Modified EpiDerm test method および SkinEthic test method が 2008 年に承認されている<sup>3)</sup>。

ESAC は、再構築皮膚モデルを用いた試験法が、ウサギ皮膚刺激性を予測するため、EU の危険物 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・アロンの試験法であると評価した。その後、EU における危険物指令では、2009 年より、GHS 表示を採用することとなった。R38 表示 (irritant: 少なくとも 2 個体で 2.0 以上) から GHS 表示への変更に対するこれらの再構築皮膚モデルの評価は、バリデーション評価時点ですでに実施されており、GHS 表示における category II (irritant: 少なくとも 2 個体で 2.3 以上) とそれ以下 (EU における識別と表示、包装に関する規制: CLP において no category 分類) の 2 段階の識別は可能であったことから、ESAC において、2 段階識別として EU における GHS 表示<sup>4)</sup>への適用が可能であると判断されている<sup>5)</sup>。これらを受けて、ECVAM では、2007 年に作成した「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」について、reference chemicals の変更等を含む改正を実施している<sup>6)</sup>。

本試験法は、ECVAM が承認した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として開発されており、me-too 試験法に位置づけられる。したがって、その妥当性の評価は、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」を基にした catch-up バリデーションとして実施されている。本試験は、多施設における施設内及び施設間再現性と予測性を検証するために実施された。

LabCyte EPI-MODEL24 を用いた in vitro 皮膚刺激性試験法は、試験物質を皮膚モデルの表面に 15 分接触させ、試験物質を除去し、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、感受性を向上させる可能性があるという理由で、IL-1 $\alpha$  の放出測定による判定を加えていたが、その結果判定への寄与は低く、すでに評価された皮膚モデルと同様、最終的には MTT の還元を用いた評価のみが採用された。

本委員会では、提出された資料について、本試験法を、すでに承認された再構築皮膚モデルを用いた in vitro 皮膚刺激性試験法の類似の試験法 (me-too 試験法) として位置づけ、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」を基にした、catch-up バリデーションとして検証・確認を行い、以下の結論を得た。

- 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及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 TG404 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 $\alpha$  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)及び陰性対照(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)<sup>7)</sup>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<sup>8)</sup>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。

以上より、再構築皮膚モデルである LabCyte EPI-MODEL24 を用いた in vitro 皮膚刺激試験法は、すでに ECVAM で承認された試験法と同等の性能を持つものと判断され、本試験法が、OECD TG404 に基づく、GHS 表示における category II とそれ以下の 2 段階識別として GHS 表示への適用が可能であると判断された。



## 評価結果

### 1. 試験法の科学的および規制面からの妥当性

ヒトの皮膚での刺激性を評価するために、ウサギを用いる皮膚刺激性試験法(Draize 法)が広く利用されている。この Draize 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、その代替法の開発が切望されている。三次元ヒト皮膚モデル(EpiSkin<sup>TM</sup>, EpiDerm<sup>TM</sup>, SkinEthic<sup>TM</sup>)を用いた in vitro 皮膚刺激性試験について、多施設によるバリデーション試験および専門家による peer review が終了し、皮膚刺激性代替法として OECD のテストガイドラインが提案されている。

この in vitro 皮膚刺激性試験は、3次元皮膚モデルを用い、被験物質暴露後の細胞生存率を指標に皮膚の刺激性を評価する試験法である。使用される皮膚モデルがヒトの皮膚に類似した構造を有していること、また指標である細胞生存率も皮膚腐食性試験や光細胞毒性試験などの背景から妥当であると判断されることから、代替法として科学的にも最適な試験法であると考えられている。

3次元皮膚モデルを用いた in vitro 皮膚刺激性試験は、以下のような特徴を持ち、これら条件を満たす新規試験法は、3皮膚モデル(EpiSkin<sup>TM</sup>, EpiDerm<sup>TM</sup>, SkinEthic<sup>TM</sup>)の me-too 試験として受け入れられる<sup>9)</sup>。

- ・ 皮膚モデルは、ヒトケラチノサイトから再構成された表皮モデルであり、上皮細胞は基底層、有棘層および顆粒層の3層構造を有する。皮膚モデルの角質層および脂質は、細胞毒性の指標となる化合物に対して、ある程度のバリア機能を有する
- ・ 皮膚モデルは、組織学的検査にてヒトの表皮と類似構造を有する
- ・ 評価の指標は MTT 還元法による細胞毒性である
- ・ 試験結果に再現性がある
- ・ 作製されたいずれのバッチで品質が確保されている

今回のバリデーション試験で用いた Japan Tissue Engineering Co., Ltd. の LabCyte EPI-MODEL24 は、3T3-J2 cell をフィーダー細胞にヒトケラチノ細胞から再構成された表皮モデルで、組織学的には角質層、基底層、有棘層および顆粒層を有したヒトの表皮と類似した構造を持つモデルである。また、SLS を用いた検討から、化合物の浸透に対してバリア機能を有することが確認されており、いくつかのバッチで再現性も確認されている<sup>10)</sup>。2005年以降製造されたバッチでは品質の確認もされている(Document 2-2)。

本試験法の評価指標は、当初、MTT 還元法による細胞毒性と IL-1 $\alpha$  の放出量であった。試験結果から、既存の皮膚モデル試験法と同様に、MTT 還元法による細胞毒性のみでも評価できることが確認され、最終的な評価指標は MTT 還元法による細胞生存率となった。

以上から、この LabCyte EPI-MODEL24『LABCYTE EPI-MODEL』を用いた試験法は、先行する3皮膚モデルの me-too 試験であり、ヒトの皮膚で起こりうる刺激性を評価する Draize 法の代替法として妥当な試験法であると判断される。

本試験法は、OECD404 の Draize 法を代替するもので、その結果は Draize 法と同じく、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「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)の分類に適用することは妥当と考えられる。

### 2. 試験プロトコール構成の妥当性

本バリデーション試験は、日本動物実験代替法学会によって組織されたバリデーションマネージメントチームを中心に7施設にて実施されたものである。phase1、phase 2 および phase 3 の3つで構成されており、Phase 1 では提案されたプロトコール(Ver.4.1)の確認と技術習易性の確認を目的に実施された。

Phase 2 では Phase 1 の結果を受けて最適化されたプロトコール(Ver. 5.01)に従い、7施設で20化合物をブラインド条件下で試験することにより、施設内および施設間再現性を検証した。

Phase 3 では ESAC Statement 2009 にて EU/GHS 識別への適合のために新たに追加された performance standard 案に従い、6化合物について6施設で phase 2 と同じく、施設内および施設間再現性を検証した。Phase3 では IL-1 $\alpha$  の測定を省き、MTT 還元法による生存率で判定を行うプロトコール(Ver. 6.01)にて実施した。

IL-1 $\alpha$  の測定を含むプロトコール(Ver. 5.01)の詳細は以下のとおりである。

## 【LabCyte EPI-MODEL24 SKIN IRRITATION TEST<sup>42hours</sup>】

24 well プレートの第一列(6well)に 0.5mL/well の割合で培地を加えて、そこに表皮モデルを置き、15~30 時間の前培養を行なう。被験物質暴露前に、24 well の第 3 列にプレインキュベーター用の培地を 1.0mL/well の割合で添加しておく。

被験物質の暴露は第一列で行い、1 被験物質あたり 3 つの表皮モデルを使用する。被験物質が液体の場合は、25  $\mu$ L をマイクロピペットで表皮モデルの表皮表面に適用し、固体の場合は表皮表面を 25  $\mu$ L の蒸留水で湿らせた後で、被験物質 25mg を表皮モデルに適用する。暴露時間は 15 分とし、適用 15 分後には表皮モデルを 24well から取り出し、PBS を用いて被験物質を除去するように洗浄する。洗浄した表皮モデルは 24well プレートの第 3 列に戻し、42 時間再び培養する。

42 時間の培養後、MTT を含んだ培地を 24well プレートの第 4 列に 0.5mL/well の割合で添加し、表皮モデルを第 4 列に移して、3 時間培養した。培養前に、第 3 列の培地全量を IL-1 $\alpha$  測定用に 1.5mL マイクロチューブに移し取り、測定まで -20 $^{\circ}$ C で保存する。3 時間の培養後、表皮モデルから培養皮膚の部分のみをつまみ出し、1.5mL のマイクロチューブに移す。マイクロチューブに 300  $\mu$ L のイソプロパノールを加えて、冷暗所で 15 時間以上静置して、抽出する。抽出液は 96well プレートに移し、570nm と 650nm における吸光度を測定した。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それぞれの表皮モデルごとに求めた。

570nm における実測値とブランク値の差から、650nm における実測値とブランク値の差を引いた値を、測定値とした。3 つの表皮モデルの平均測定値を陰性対照の平均測定値で除することで、陰性対照の吸光度を 100% とした時の各被験物質の生存率(%)を計算した。この生存率が 50% 以下の結果を示す被験物質を Category2 (irritant) と判定し、50% を超える結果を示す被験物質では IL-1 $\alpha$  測定の追加検討を実施した。陰性対照には蒸留水を、陽性対照には 5%SLS を用いた。

生存率が 50% を超える結果を示した被験物質では、MTT での培養前に分取しておいた培養液を用いて、Interleukin-a Alpha IL-1 $\alpha$  ELISA kit (Manufacture: Invitrogen) で IL-1 $\alpha$  を測定した。方法は、Stabilized Chromogen を加えた後のインキュベーション時間を 15 分に変更した点を除いては、Interleukin-a Alpha IL-1 $\alpha$  ELISA kit のプロトコールに従って測定した。

MTT 還元法で、平均生存率が 50% 超の結果を示し、かつ、IL-1 $\alpha$  測定で 120pg/tissue 以上の結果を示す被験物質を Category2 (irritant) に、平均生存率が 50% 超の結果を示し、かつ、IL-1 $\alpha$  測定で 120pg/tissue 未満の結果を示す被験物質を No-category (Non irritant) と判定した。

生存率および IL-1 $\alpha$  の判定基準については、先行している EpiSkin<sup>TM</sup> の判定基準を元に生存率 50% および IL-1 $\alpha$  の 120pg/tissue が設定された。試験物質の暴露時間 15 分の設定については予備検討を実施し、設定の妥当性が検証されている (Document 1)。

プロトコール (Ver. 5.01) とプロトコール (Ver. 6.01) の試験法の変更点は、IL-1 $\alpha$  の測定が SOP より削除された点であった。MTT 還元法による細胞毒性の指標のみで十分識別可能である事が確認された結果から変更された。また、バリデーション試験終了後に、被験物質が細胞を染色したり、MTT を直接還元する化合物かどうかを確認する手技 (Document 2-4) が盛り込まれた、最終プロトコール (Ver. 7.2) が提案されている。

### 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

本バリデーション研究に使用された試験物質の選択は、バリデーション・マネージメントチーム (VMT) によって行われた。バリデーション研究は、phase 1, 2, 3 で実施された。

バリデーション研究の phase 1 では、JaCVAM により、液体、粘性物質、固体と物性の異なるものとして、3 種の試験物質 (ethanol, glycerol, naphthalene acetic acid) が選定され、試験操作の技術確認が行われた。

本試は、me-too 試験法であることから、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」を基に試験物質が選択された。これらは、ECVAM により、バリデーション研究のパフォーマンス標準物質として選定された 58 物質から、選抜・パフォーマンス標準物質として、20 物質 (刺激性物質 10 種、非刺激性物質 10 種) が選定された (2007 年)<sup>2)</sup>。バリデーション研究の phase 2 では、この 20 物質のうち、tri-isobutyl phosphate が、日本では市販されておらず、入手できなかったことから、VMT により、残りの 19 物質及び 5%SLS solution が試験物質として選定された。なお、VMT では、5%SLS solution について、バリデーションの評価には加えなかった。

刺激性物質—非刺激性物質の閾値が EU 基準の 2.0 から、国連・GHS 基準の 2.3 に変更されたことに伴って、選抜・パフォーマンス標準物質 20 物質における刺激性物質—非刺激性物質の見直しが行われ、選抜・パフォーマンス標準物質 20 物質の一部組み換えが ECVAM より提案された (2009 年)<sup>5)</sup> (表 1)。バリデーション研究の phase 3 では、その ECVAM 提案に沿って、6 つの新規物質を追加試験実施し、phase 2 の 19 物質に、

6つの新規物質を追加し、最終的に25物質が試験物質として選定された(表2)。

1,1,1-trichloroethaneは、2009年4月の時点では標準物質として設定されていたが、最終的には同じ刺激分類であるtetrachloroethyleneに変更されており、optionとしての位置づけとなっているが、その以外の2009年のECVAM提案によるバリデーション研究のパフォーマンス標準物質19種は、今回のバリデーション研究で選択されている。

なお、試験物質は、JaCVAMより依頼された独立したラボの化学物質マネージャーによりコード化され、MSDSとともに、試験担当ラボに配布された。

さらに、参考として、リードラボにおいて、試験物質について、「EpiDerm」に関する検討において使用された54物質を使用して、同様の検討が実施されている(Document 2-1)。

ECVAMにおける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ている。

以上より、VMTによる、LabCyte EPI-MODEL24のバリデーション研究における試験物質の選択については、ECVAMにより選定されたパフォーマンス標準物質58物質から選抜された、パフォーマンス標準物質20物質(2007年)、ESAC提案に沿って組み換えられた、新規のパフォーマンス標準物質20物質(2009年)に原則として沿って実施されているとともに、参考資料ながら、ECVAMにより選定されたパフォーマンス標準物質58物質に相当する、54物質を試験物質とした検討も行われていることから、選択基準が明確であり、また、質的にも量的にも妥当であった。

#### 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

LabCyte EPI-MODEL24のバリデーション研究のphase 2及び3において選定した25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) ECVM Skin Irritation Validation Study Phase II: 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>,

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.

3. ESAC statement on the performance under UN GHS of three in-vitro assays for skin irritation testing and the adaptation of the reference chemicals and defined accuracy values of the ECVAM skin irritation performance standards (2009)

表 1 ECVAM による標準物質一覧(2009 年 7 月)

No.	Chemical	CAS number	GHS label	In vivo score (PII)
01	1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	no	0
02	diethyl phthalate	84-66-2	no	0
03	naphthalen acetic acid	86-87-3	no	0
04	allyl phenoxy-acetate	7493-74-5	no	0.3
05	isopropanol	67-63-0	no	0.3
06	4-methyl-thio-benzaldehyde	3446-89-7	no	1
07	methyl stearate	112-61-8	no	1
08	heptyl butyrate	5870-93-9	no	1.7
09	cinnamaldehyde	104-55-2	no	2
10	hexyl salicylate	6259-76-3	no	2
11	cyclamen aldehyde	103-95-7	Category 2	2.3
12	1-decanol	112-30-1	Category 2	2.3
13	1-bromohexane	111-25-1	Category 2	2.7
14	2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine HCl	86604-75-3	Category 2	2.7
15	di-n-propyl disulphide	629-19-6	Category 2	3
16	potassium hydroxide (5%aq)	7447-40-7	Category 2	3
17	benzenethiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl	7340-90-1	Category 2	3.3
18	1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	5271-27-2	Category 2	3.3
19	heptanal	111-71-7	Category 2	3.4
20	tetrachloroethylene	127-18-4	Category 2	4

表 2 VMT により選択された試験物質一覧

No.	Chemical	CAS number	GHS label	In vivo score (PII)
01	1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	no	0
02	diethyl phthalate	84-66-2	no	0
03	di-propylene glycol	25265-71-8	no	0
04	naphthalen acetic acid	86-87-3	no	0
05	allyl phenoxy-acetate	7493-74-5	no	0.3
06	isopropanol	67-63-0	no	0.3
07	4-methyl-thio-benzaldehyde	3446-89-7	no	1
08	methyl stearate	112-61-8	no	1
09	allyl heptanoate	142-19-8	no	1.7
10	heptyl butyrate	5870-93-9	no	1.7
11	cinnamaldehyde	104-55-2	no	2
12	hexyl salicylate	6259-76-3	no	2
13	terpinyl acetate	80-26-2	no	2
14	cyclamen aldehyde	103-95-7	Category 2	2.3
15	1-decanol	112-30-1	Category 2	2.3
16	1-bromohexane	111-25-1	Category 2	2.7
17	2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine HCl	86604-75-3	Category 2	2.7
18	$\alpha$ -terpineol	98-55-5	Category 2	2.7
19	butyl methacrylate	97-88-1	Category 2	3
20	di-n-propyl disulphide	629-19-6	Category 2	3
21	potassium hydroxide (5%aq)	7447-40-7	Category 2	3
22	benzenethiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl	7340-90-1	Category 2	3.3
23	1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	5271-27-2	Category 2	3.3
24	heptanal	111-71-7	Category 2	3.4
25	1,1,1-trichloroethane	71-55-6	Category 2	4
Positive control	SLS 5% (w/v)	151-21-3		

## 5. データの質

本バリデーション研究は、下記の書面を参考に実施されていることから国際的な水準を満たしていると考えられる。

- (1) Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (No.34, OECD, 2005)<sup>7)</sup>に準拠している。
- (2) 最新の ECVAM の Performance standard<sup>6)</sup>に準拠して試験法を評価している。
- (3) Modular Approach to validation (Hartung et al. 2004)<sup>11)</sup>を参照している。

各施設で実施された試験結果はプロトコール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に提出され、2名の統計家により吸光度の「原データ(outputs from the OD meter)」と「データシート

の値(entered data on the datasheet)が比較され、実行委員長により試験記録用紙の質(quality of methods documents sheet)が保証されている。

バリデーション試験において、試験試料は、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。陰性対照のOD値が0.7以上であること、陽性対照の細胞生存率が40%以下であることをデータ受け入れ基準として試験実施している。

以上より、受け入れ基準を設定しデータが確認されていることから、データの質については、問題ないと判断できる。

## 6. 試験結果とその解析

データ解析は生物統計家によって実施されている。解析に使用している統計学的方法はすべて基本統計量の算出程度のものである。

Phase 2 及び phase 3 試験における MTT 還元法の施設内、施設間再現性は、3回の個別の試験結果の分布により視覚的に評価されている。

本バリデーションが、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 分割表によって予測性能が評価されている。すなわち、感度(sensitivity)、特異性(specificity)、一致性(accuracy)によって評価された。

MTT 還元法に関する予測性能は、3回の試験結果の中央値(median)を用いて評価された。IL-1 $\alpha$  測定の結果は、判定基準 120 pg/ml を基に試験実施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された。

phase 2 には 7 施設、phase 3 には 6 施設が参加した。全体を通じて、受け入れ基準に不適合となり再試験を実施したのは Laboratory a の phase 2 における 1 回のみであった。これは陰性対照の OD 値が 0.7 以下となり不適合となった。不適合となった結果は最終的な解析には含まれなかった。不適合の割合は、全試験数の 0.2% であった。

MTT 還元法において、phase 2 及び phase 3 で実施された 25 種の試験物質における各施設の感度は 75.0%-91.6%、特異性は 69.2%-76.9%、一致率は 76.0%-82.0% であった。また、各施設の結果を平均すると、感度は 83.3%、特異性は 73.1%、一致率は 78.0% であった(表 3)。これらの結果は、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」<sup>5)</sup> で設定されている基準(感度(sensitivity): 80%、特異性(specificity): 70%、一致性(accuracy): 75%) を超えている。25 種の試験物質中、GHS の category II 以下に分類されている 13 種で、すべての施設で陽性と判断されたものは 3 種(1-bromo-4-chlorobutane、4-methyl-thio-benzaldehyde、cinnamaldehyde)、GHS で category II に分類されている 12 種中、すべての施設で陰性と判断されたものは 1 種(di-n-propyl disulphide) であった。

1-bromo-4-chlorobutane、4-methyl-thio-benzaldehyde は ECVAM における正式バリデーションにおいてもすべての施設で陽性と判定され、同様の結果であった。一方、di-n-propyl disulphide は ECVAM の結果では MTT 還元法では施設間で判定が一致せず 2/3 施設で陰性と判断されたが、IL-1 $\alpha$  測定結果から、すべての施設で陽性と判断されている<sup>12)</sup>。

IL-1 $\alpha$  測定の結果の追加に関しては、結果の一致性の向上への寄与は低かった。

以上より、本試験法の予測性は十分であると判断できる。

表 3 25 試験物質における LabCyte EPI-MODEL 24 の予測性能(GHS-EU、Phase2 および 3)

	N	Mean	Min.	Max.	ECVAM criteria
Sensitivity(%)	6	83.3	7	79.6	80
Specificity(%)	6	73.1	7	74.5	70
Accuracy(%)	6	78	7	77.4	75

## 7. 試験法の正確性(再現性、頑健性)

MTT還元法について、Phase 2 及び phase 3 試験における MTT 還元法の施設内、施設間再現性は、3回の試験結果の分布により視覚的に評価された。

各施設における陰性対照の OD の分布 (Fig.1) および陽性対照の細胞生存率の分布 (Fig.2) から、採択基準を満たした陰性対照物質の吸光度の施設内・間のばらつきは、許容できる大きさである。また、陽性対照物質の細胞生存率の施設内・間のばらつきは小さい。phase 2 及び phase 3 で実施された 25 種の試験物質の各施設における細胞生存率の分布 (Fig.3) では、4 つの被験物質 (terpinyl acetate、1-bromohexane、di-n-propyl disulphide、butyl methacrylate) 以外については、細胞生存率のばらつきは小さい。これらの被験物質は、刺激性が中程度であるため、バリデーション報告書で考察されているように、理論的にばらつきが大きくなることが予想される。

以上の結果から、一部の被験物質で細胞生存率にばらつきはあるものの、本試験法の施設内および施設間再現性は概ね問題ないと判断できる。

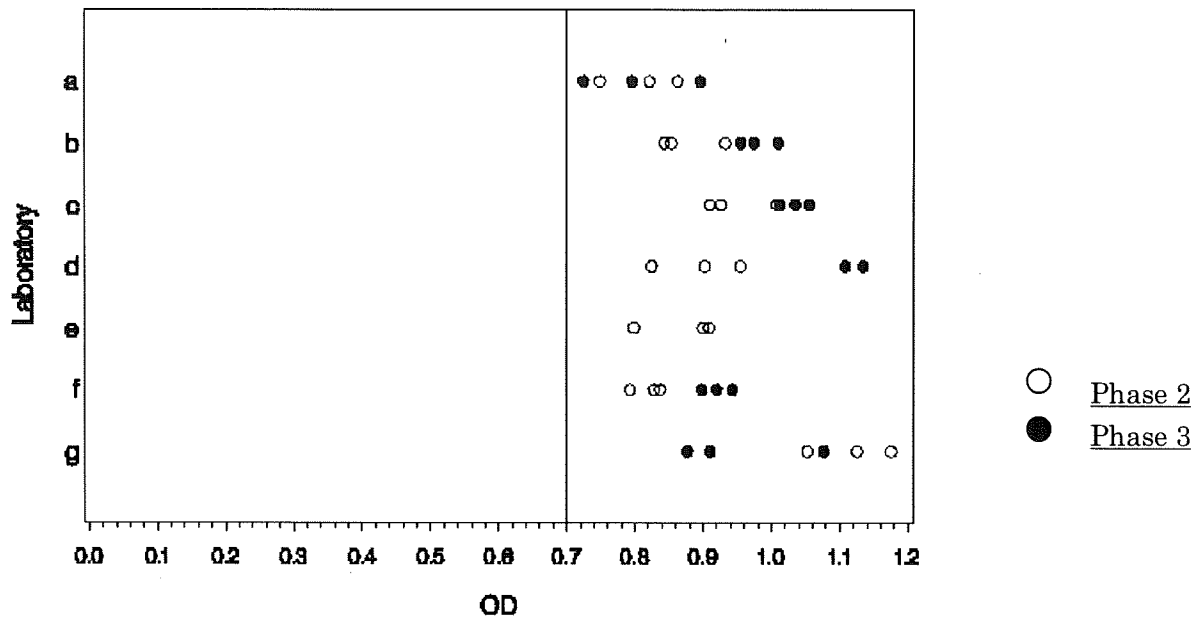


Fig. 1 Distribution of the absorbance for the negative control.

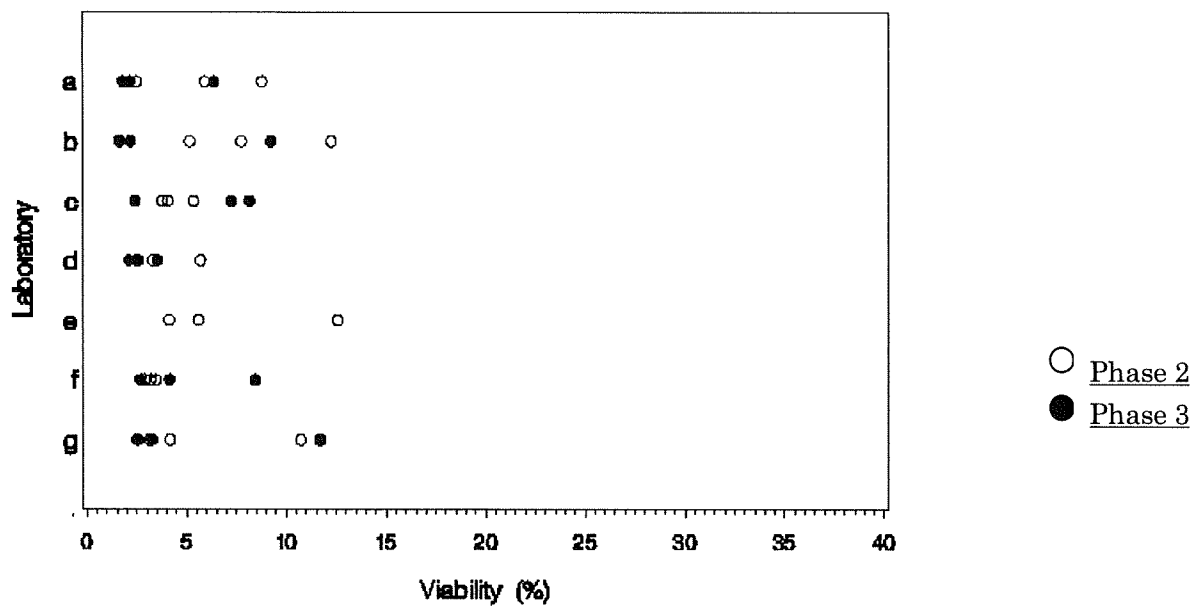


Fig.2 Distribution of the viability for the positive control.



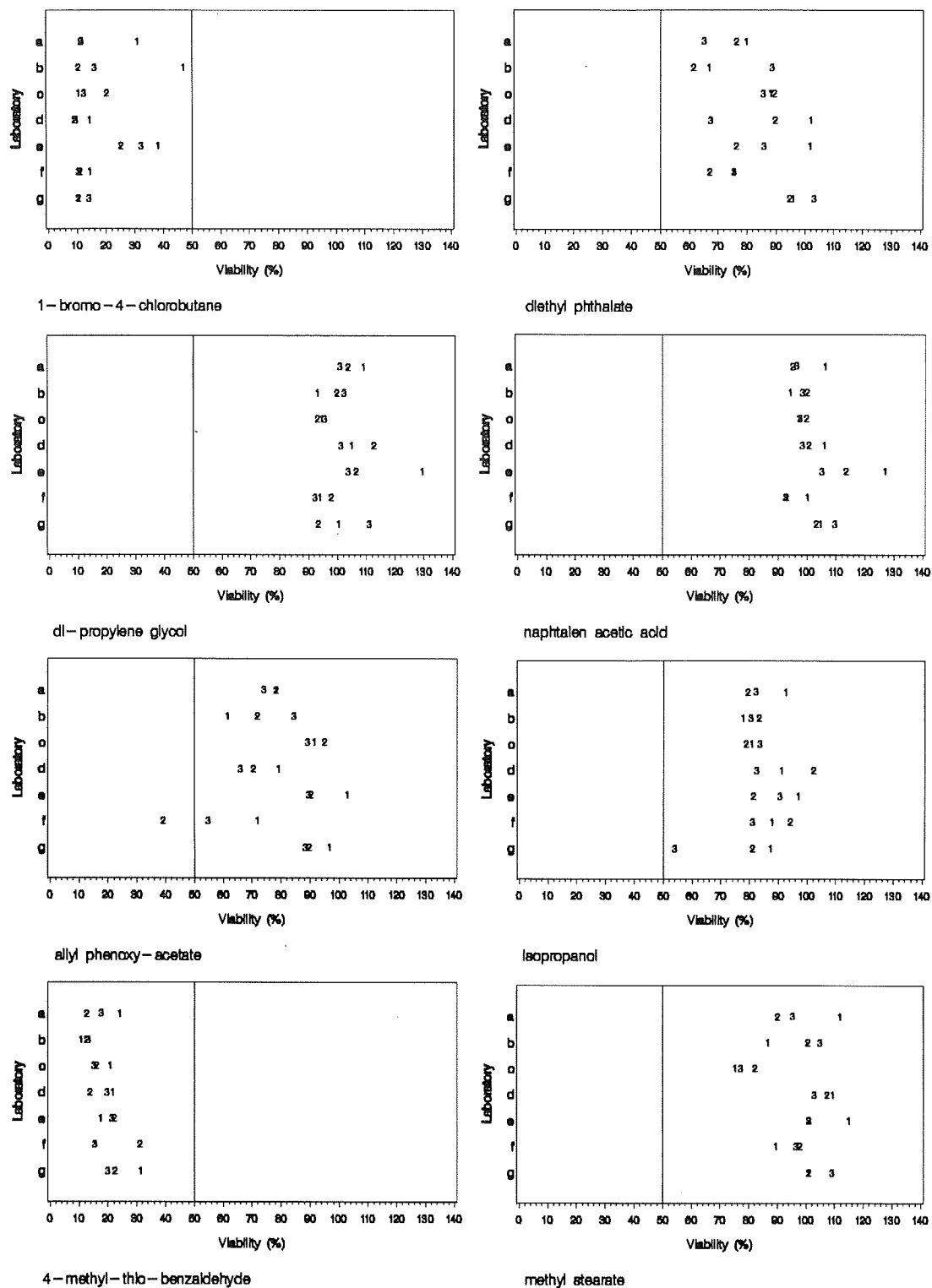


Fig. 3 Distribution of the tissue viability for each chemical.

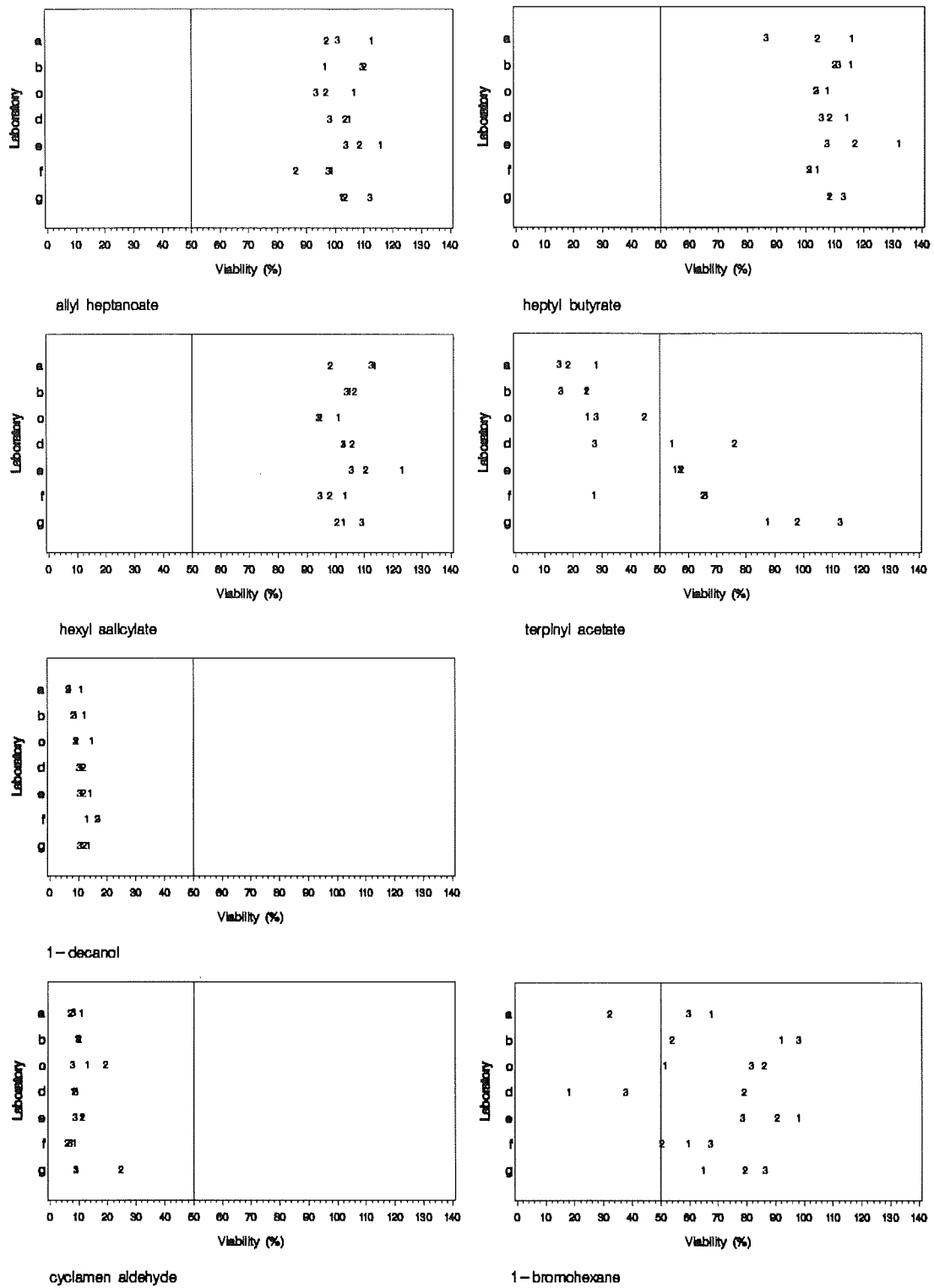


Fig. 3 Distribution of the tissue viability for each chemical (continued).

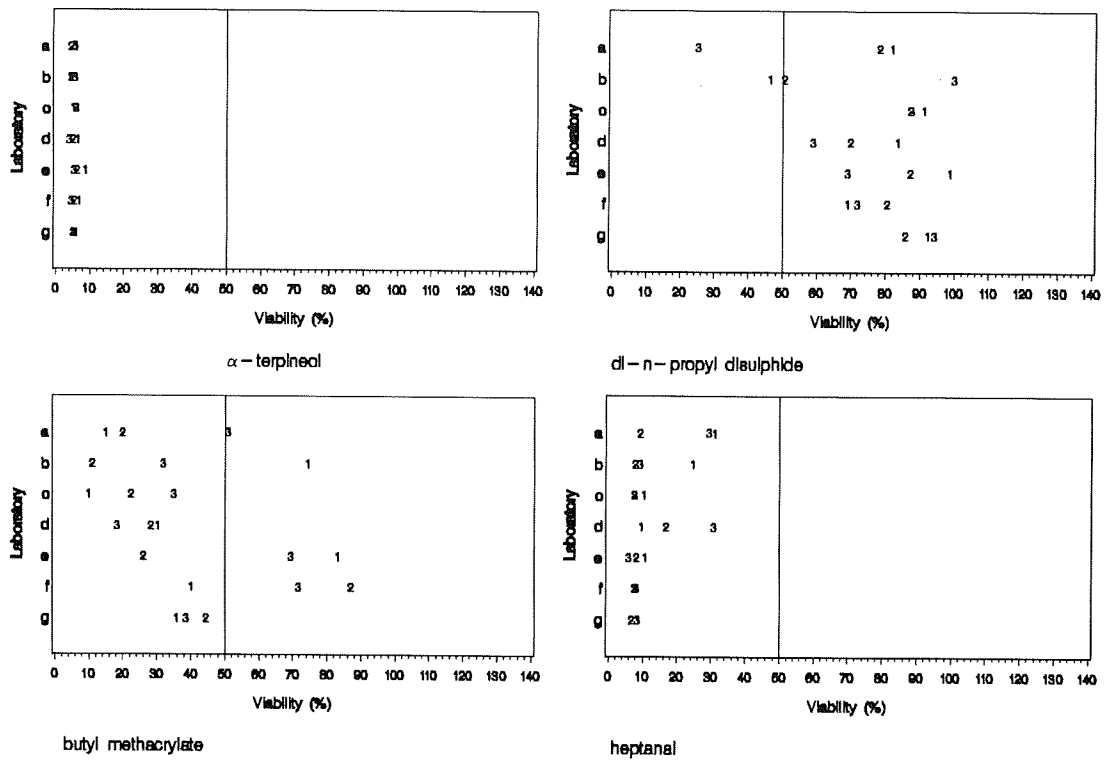


Fig. 3 Distribution of the tissue viability for each chemical (continued).

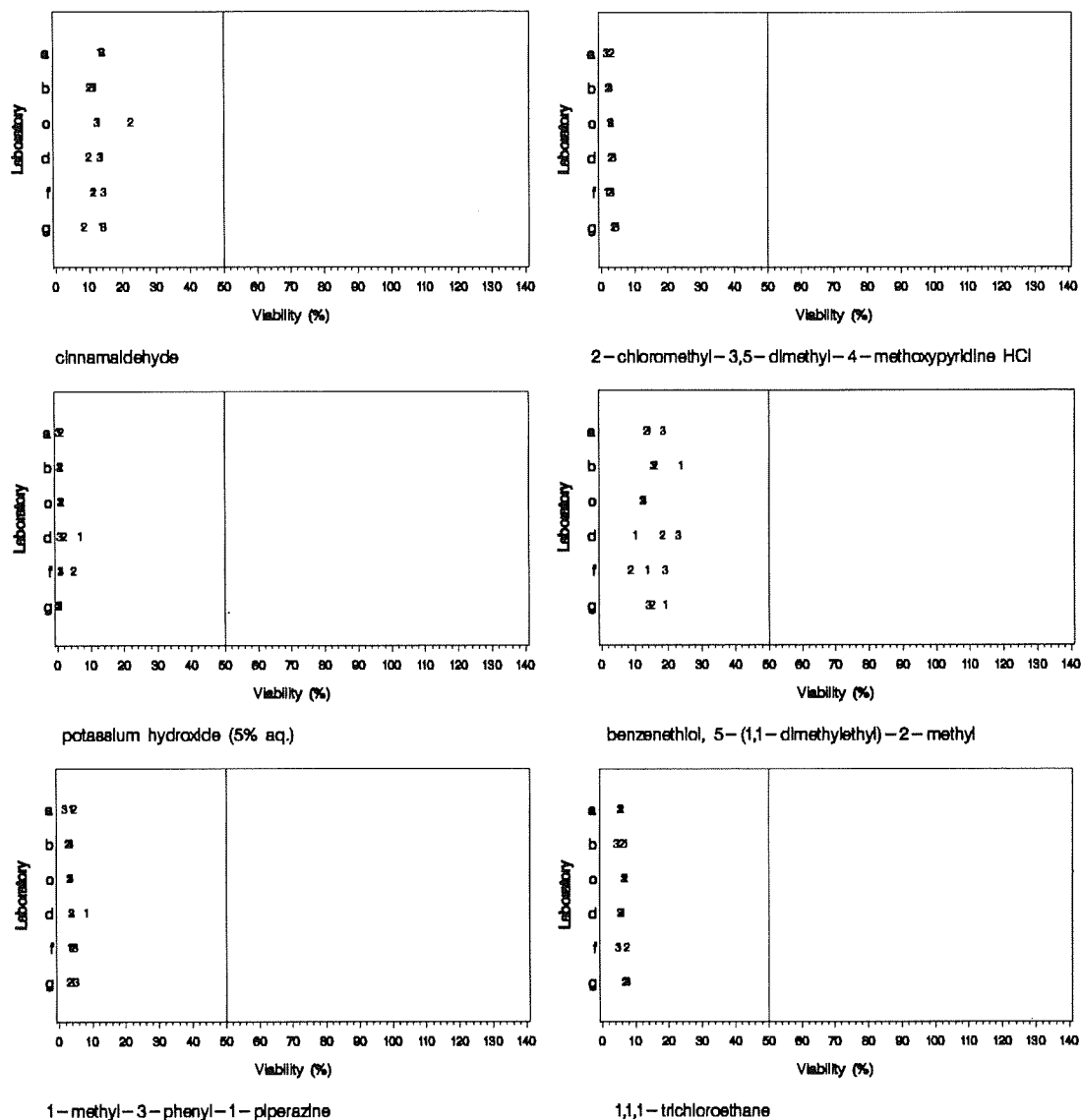


Fig. 3 Distribution of the tissue viability for each chemical(continued).

## 8.試験法の信頼性

LabCyte EPI-MODEL 24 は、マウス胎児由来の 3T3-J2 細胞をフィーダーとして新生児包皮由来の健常ヒト表皮ケラチノサイトを重層化させることにより、再構築された3次元培養ヒト表皮細胞モデルである。この皮膚モデルは、OECD GLP Consensus Document No.5<sup>8)</sup>に従い、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。本モデルの品質保証基準は、陰性対照である注射用蒸留水で処理した際の組織生存率(OD 値)が、blank の OD 値 0.037~0.040 の 20 倍以上であること、バリア機能については SLS 処理時(0.1, 0.2, 0.3, 0.4%)の IC<sub>50</sub>(%)が 0.14%以上 0.4%以下と設定されている。実際にバリデーション研究で用いられたヒト表皮細胞モデルでは、組織生存率が 1.259~1.788、バリア機能の指標である IC<sub>50</sub> は 0.21~0.27 と基準を満たしていた。また、2005 年から 2009 年にかけて月毎に集計した組織生存率は、1.03±0.18~2.07±0.40 で変動係数(CV%)は 2.0 から 23.8 とバラツキはあるものの、陰性対照に対する反応には再現性が認められた。バリア機能に関しては、2008 年から 2009 年のデータが集計されており、0.23~0.28±0.03 と安定している(Document 2-3)。したがって、LabCyte EPI-MODEL 24