

は、in vitro 皮膚一次刺激性試験に用いる皮膚モデルとしての皮膚組織およびバリア機能における integrity を有すると判断する。

本バリデーション研究は、OECD Guidance Document No.34⁷⁾の原則に基づき実施している。参加施設の中には、本邦における GLP 適合性調査を受けていない施設も含まれているが、GLP に準拠した試験を実践しており、信頼性を保証する目的でバリデーションマネジメントチームが、記録書類の生データ確認および試験監査を実施している。Phase1 のトレーニングでは SOP ver. 4.01 を用い、陰性対照物質、陽性対照物質 (5w/v% SLS)、コード化した3つの被験物質について、7施設が皮膚刺激性の評価を行った。その結果を受け SOP を改正し、Phase2 試験では SOP ver. 5.01 を、Phase3 試験では SOP ver. 6.01 を、それぞれ用いバリデーション研究を実施している。なお、Phase2 試験では7施設、Phase3 試験では6施設が参加している。SOP の改変では MDS(作業記録シート)記載事項の整合、英文追記等の子細な変更に加え、IL-1 α 測定に関する記載の削除がなされたが、試験の信頼性に影響を及ぼすような SOP の改正は無かった。SOP には試験方法、試験供試材料、判定基準等が詳細に記載されており、試験計画書および SOP ならびに作業記録シートにより、試験の再構成は可能であると考えられる。

試験成立条件として陰性対照における OD 値平均が0.7以上、且つ陽性対照 (5w/v% SLS) における組織生存率の平均が40%以下であることが SOP に規定されている。Phase1 から Phase3 において得られた陰性対照および陽性対照の評価結果より、LabCyte EPI-MODEL 24 を用いた in vitro 皮膚刺激性試験は、施設内再現性および施設間再現性があることが確認された。

以上のように、再構築された3次元培養ヒト表皮細胞モデルとしての LabCyte EPI-MODEL 24 の integrity が確認出来たこと、試験の信頼性がバリデーションマネジメントチームによって保証されていること、試験操作に適した SOP および作業記録シートが作成されていること、試験法の施設内再現性および施設間再現性が確認出来たことから、本試験法の信頼性に問題はないと判断する。

9. 他の科学的な報告との比較

本試験法は me-too 試験法であることから、培養に用いる培地の量、被験物質の投与量、IL-1 α の放出量の判定基準値について EPISKIN との操作上の相違点について、オリジナル試験法である対比を行っている (表 4)。

既存の再構築皮膚モデルによる結果と比較するため、ECVAM の標準試験物質による 20 物質の試験結果をまとめた (表 5,6)。細胞生存率では、物質により施設間のバラツキがあるものの、皮膚モデルの違いによる施設間再現性に大差は認められない。また、刺激物の分類に用いる category II の識別に関しても、各皮膚モデルでほぼ同様の傾向を示した。特に false positive、false negative になる試験物質は、各モデルでほぼ共通していることが確認された。

以上の結果から、一部の試験物質で生存率のばらつきはあるものの、また、試験の予測性能に関しては、他のモデルに比べ本モデルがやや低い傾向を示しているが、基準値である特異性 (specificity) : 70%、感度 (sensitivity) : 80%、精度 (overall accuracy) : 75% を上回っている (表 7)。したがって、LabCyte EPI-MODEL 24 は、EPISKIN や EpiDerm、SkinEthic と同様、GHS の刺激性物質カテゴリー分類の予測に用いることが出来る in vitro 皮膚刺激性試験法であると言える。

表 4 LabCyte EPI-MODEL 24 と EPISKIN の試験操作上の違い

(a) 培地の量

	LabCyte EPI-MODEL 24 SOP	EPISKIN SOP	Reason
Pre-incubation	0.5 mL	2 mL	LabCyte EPI-MODEL 24 cultures are performed in 24-well culture plates. A medium volume of 0.5 mL to 1 mL is appropriate to add to the 24-well culture plate. A medium volume of 1 mL is necessary for a 42-hour culture.
Post-incubation	1 mL	2 mL	
MTT assay	0.5 mL	2 mL	

(b) 被験物質の適用量

Test chemical	LabCyte EPI-MODEL 24 SOP	EPISKIN SOP	Reason
Liquid	25 μ L (75 μ L/cm ²)	10 μ L (25 μ L/cm ²)	The lowest amount of the test chemical that spread uniformly was applied to the test model.
Solid	25 mg+25 μ L DW (75 μ L/cm ²)	10 mg+10 μ L DW (25 μ L/cm ²)	

(c) 刺激物分類に用いる IL-1 α 放出量の判定値

LabCyte EPI-MODEL 24 SOP	EPISKIN SOP	Performance Standards (EPISKIN)
IL-1 α content ³ 120 pg/tissue (IL-1 α content ³ 120 pg/mL)	IL-1 α content ³ 100 pg/tissue (IL-1 α content ³ 50 pg/mL)	IL-1 α content ³ 120 pg/tissue (IL-1 α ³ 60 pg/mL)

10. 3Rs への関与(動物福祉面からの妥当性)

フィーダーとして用いられている 3T3-J2 細胞は、1963 年に Swiss マウスの 17~19 日齢全胎児から樹立された Swiss3T3 細胞株からクローニングされた細胞であり、これをセルバンク管理したものを用いている。皮膚モデルを構成するケラチノサイトは新生児包皮由来の細胞を用いている。動物由来の細胞を一部用いてはいるものの、セルバンクからの供給細胞であることから、LabCyte EPI-MODEL 24 を用いた in vitro 皮膚刺激性試験は、動物を用いた皮膚刺激性試験に置き換わる方法として動物福祉面で貢献するものである。

9. 試験法の有用性と限界

LabCyte EPI-MODEL 24 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。これらの特徴はすでに承認された再構築皮膚モデルと同等である。

LabCyte EPI-MODEL 24 の品質管理は、管理項目を設定して品質管理され販売されている。日本で開発された皮膚モデルであることから、日本での入手に対する利便性は向上しているが、購入後、長時間保存できないという皮膚モデルの不便さは共通している。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。本モデルの国際展開を考慮し、日本以外への出荷に関するモデルの安定性についても評価され、問題がないことが確認されている(Document 2-5)。

OECD TG 404 を用いた GHS 表示による皮膚刺激性分類は、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)の 3 段階となっている。しかし、ECVAM で実施された再構築皮膚モデルを用いたバリデーション研究において提案された予測モデルでは、category III を明確に識別できず、3 段階の識別は困難である事が確認されている^{12, 13)}。したがって、現状承認されている再構築皮膚モデルによる皮膚刺激性試験法は、category II とそれ以下の 2 段階の識別として用いられる。LabCyte EPI-MODEL 24 は、これらの類似試験法として開発されている。GHS 表示は国際標準として用いられることから、皮膚刺激のある化学物質の識別には有益である。また、LabCyte EPI-MODEL 24 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 2.3 点以上となると読み替えることができることから、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。

しかし、今回の予測モデルでは、category III に分類される弱い皮膚刺激性の識別は困難である。EU の SCCP (現在の SCCS) 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¹⁴⁾において、これらの皮膚モデルの利用について、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おり、これらの利用にあたって、注意する必要がある。

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

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。本試験法の妥当性については、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評価されている。

提出されたバリデーション結果資料を検証した結果、使用している皮膚モデルの本質及び性能は既存モデルと同等であることが確認された。また評価方法および予測モデルは、承認された試験法と本質的な相違な

いことが確認された。また、バリデーション結果から、その結果の再現性、予測能力、信頼性についても妥当であることが確認された。

以上より、LabCyte EPI-MODEL24 を用いた in vitro 皮膚刺激性試験法が、OECD TG 404 を用いた化学物質の皮膚刺激性について、GHS 表示による category II (irritant: 少なくとも2個体で2.3以上)とそれ以下を予測する in vitro 皮膚刺激性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. ECVAM (2007) Statement of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) on the Validity of In Vitro Tests for Skin Irritation. Online: <http://ecvam.jrc.it/>
2. ECVAM (2007) Performance standards for applying human skin models to in vitro skin irritation testing
3. ECVAM (2008) Statement of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of in vitro tests for skin irritation testing.
4. United Nations Economic Commission for Europe (UNECE) (2008). UN Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals, 2nd revised edition
5. ECVAM (2009) Statement on the performance under GHS of three in vitro assays for the Skin Irritation testing and the adaptation of the reference chemicals and defined accuracy values of the ECVAM ECVAM skin irritation performance standards
6. ECVAM (2009) Performance standards for in vitro skin irritation test methods based on reconstructed human epidermis (RhE)
7. OECD (2005) Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34.
8. OECD (1999) *OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring No 5, Compliance of Laboratory Suppliers with GLP Principles*. Paris, France
9. OECD Guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for a new guideline, In vitro Skin irritation: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method, Paris 29 May 2009 (Version 7.2)
10. Kato M et al. (2009) Assessment of human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for in vitro skin irritation testing according to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-validated protocol, *J. Toxicol. Sci.*, 34(3); 327-334
11. Hartung, T., Bremer, S., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Fortaner, S., Gribaldo, L., Halder, M., Hoffmann, S., Roi A.J., Prieto, P., Sabbioni, E., Scott, L., Worth, A. and Zuang, V. (2004) A Modular Approach to the ECVAM Principles on Test Validity. *ATLA* 32, 467-472.
12. Hoffmann, S., (2006) ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL-1 α , report from the study biostatistician to the management team
13. ECVAM (2009) Background document to the OECD draft test guideline on skin irritation testing based on reconstructed human epidermis (RhE)
14. SCCP Memorandum on the in vitro test EPISKIN for skin irritation testing, SCCP/1145/07

表 5 ECVAM 標準試験物質 (20 物質) における LabCyte EPI-MODEL 24 と EPISKIN の細胞生存率の比較

No.	Chemical	CAS number	GHS label	In vivo score (PII)	LabCyte							EPISKIN		
					1	2	3	4	5	6	7	1	2	3
01	1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	no	0	17.9	24.5	14.4	11	31.9	12	11.7	5.95	4.02	4.4
02	diethyl phthalate	84-66-2	no	0	73.8	72.4	87.8	86.6	88	72.7	98	95.31	75.04	92.54
03	naphthalen acetic acid	86-87-3	no	0	99.3	97.8	98.2	102	115	95.2	106	96.39	88.6	91.96
04	allyl phenoxy-acetate	7493-74-5	no	0.3	77	72.7	91.9	72	94.3	55.4	91.7	96.82	96.39	102.14
05	isopropanol	67-63-0	no	0.3	84.8	80.7	81.2	92.1	89.7	87.8	74.2	100.41	81.58	82.39
06	4-methyl-thio-benzaldehyde	3446-89-7	no	1	18.2	12.2	17.4	18.4	20.3	20.8	24.6	51.51	13.91	34.69
07	methyl stearate	112-61-8	no	1	99.1	97.4	78.3	107	106	94.7	104	103.99	90.33	101.08
08	heptyl butyrate	5870-93-9	no	1.7	102	112	105	109	119	102	110	103.99	102.32	111.54
09	cinnamaldehyde	104-55-2	no	2	13.8	11	16	12.3		12.3	12.2	6.7	7.4	6.3
10	hexyl salicylate	6259-76-3	no	2	108	105	96.6	104	113	98.6	104	99.85	101.87	94.56
11	cyclamen aldehyde	103-95-7	Category 2	2.3	8.8	9.8	13.5	8.6	10.3	7.2	14.4	24.37	8.53	42.48
12	1-decanol	112-30-1	Category 2	2.3	8.2	9.7	11.1	10.9	12.2	15.6	12	7.31	6.45	6.94
13	1-bromohexane	111-25-1	Category 2	2.7	53.3	81.4	73.1	45	89.1	59.1	77	26.22	18.88	46.79
14	2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine HCl	86604-75-3	Category 2	2.7	2	2.3	2.8	3.6		2.5	4.1	5.67	4.66	3.92
15	di-n-propyl disulphide	629-19-6	Category 2	3	61.9	65.7	88.7	70.9	85.1	73.9	90.9	52.04	11.17	76.12
16	potassium hydroxide (5%aq)	168-21815	Category 2	3	0.8	0.8	1	3.2		2.2	0.6	8	41.4	17.4
17	benzenethiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl	7340-90-1	Category 2	3.3	15.6	18.5	12.6	17.2		13.9	16.2	12.74	87.75	14.19
18	1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	5271-27-2	Category 2	3.3	3.4	3.2	3.4	5.3		4.2	4.1	9.47	17.4	11.04
19	heptanal	111-71-7	Category 2	3.4	23.3	14	8.6	19.2	8.4	8	8.1	9.2	8	6.4
20	tetrachloroethylene		Category 2	4								9.1	8	15.3

no data <IC50%

表6 ECVAM 標準試験物質(20 物質)における LabCyte EPI-MODEL 24 と EPISKIN、EpiDerm および SkinEthics の刺激物分類の結果比較

No.	Chemical	CAS number	GHS label	In vivo score (PII)	LabCyte							EPI SKIN			Modified EpiDerm			SkinEthics														
					1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	1	2	3	1	2	3												
					1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	1	2	3	1	2	3												
01	1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	no	0	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P			
02	diethyl phthalate	84-66-2	no	0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
03	naphthalen acetic acid	86-87-3	no	0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
04	allyl phenoxy-acetate	7493-74-5	no	0.3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
05	isopropanol	67-63-0	no	0.3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
06	4-methylthio-benzaldehyde	3446-89-7	no	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
07	methyl stearate	112-61-8	no	1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
08	heptyl butyrate	5870-93-9	no	1.7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
09	cinnamaldehyde	104-55-2	no	2	P	P	P	P	n.d.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	n.d.	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
10	hexyl salicylate	6259-76-3	no	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
11	cydamen aldehyde	103-95-7	Category 2	2.3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
12	1-decanol	112-30-1	Category 2	2.3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
13	1-bromohexane	111-25-1	Category 2	2.7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
14	2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine HCl	86604-75-3	Category 2	2.7	P	P	P	P	n.d.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	n.d.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
15	di-n-propyl disulphide	629-19-6	Category 2	3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
16	potassium hydroxide (5%aq)	168-21815	Category 2	3	P	P	P	P	n.d.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	n.d.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
17	benzenethiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl	7340-90-1	Category 2	3.3	P	P	P	P	n.d.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	n.d.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18	1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	5271-27-2	Category 2	3.3	P	P	P	P	n.d.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	n.d.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
19	heptanal	111-71-7	Category 2	3.4	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	n.d.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
20	tetrachloroethylene	127-18-4	Category 2	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: no data

<IC50%

表7 OECD 標準試験物質における LabCyte EPHMODEL 24、EPISKIN、EpiDerm および SkinEthics の予測性能の比較

	N	Mean	N	Mean	Portion	J-TEC LabCyte EPHMODEL 24	Acceptance criteria	EPISKIN	EPISKIN	EpiDerm	SkinEthics
Sensitivity(%)	6	77.8	7	72.4	78.0 (49/69)	80 (8/10)	80	90.0(27/30)	91.4	91.4 (32/35)	100(30/30)
Specificity(%)	6	71.6	7	72.5	71.0 (46/59)	70 (7/10)	70	73.3(22/30)	70	69.2 (27/39)	70(21/30)
Accuracy(%)	6	74.6	7	73.1	74.2(95/128)	75 (15/20)	75	81.6(49/60)	74.6	79.7(59/74)	85 (51/60)
Chemical No.	19		19 or 14		19 (7 lab)	20	20	20	58	20	20

Abstract

An *in vitro* skin irritation test was conducted using a reconstructed human epidermis model, LabCyte EPI-MODEL24, presented by Japan Tissue Engineering. This epidermal model was reconstructed by human keratinocytes from feeder cells, 3T3-J2, and the model consists of stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum, and stratum basale, as similar to human epidermis.

In vitro skin irritation test using such a human epidermis model has been already validated at the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), and the non-commission members of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) regarded the test method using reconstructed human epidermis model as a reliable and applicable stand-alone test for predicting rabbit skin irritation in 2007¹⁾. In the same year, “Performance standards on the *in vitro* skin irritation test using reconstructed human skin models”²⁾ was established based on this ECVAM validation studies. Then, the Modified EpiDerm test method and the SkinEthic test method were approved in 2008³⁾.

ESAC judged the test method using reconstructed human skin models to be a reliable, adequate and stand-alone method, which can be used as an alternative to predict rabbit skin irritation for Draize skin irritation test (OECD TG 404 & Method B.4 of Annex V to Directive 67/548/EEC). The EU has adopted UN GHS labeling⁴⁾ system for the dangerous substances directive since 2009 (UN GHS CLP in EU). Since the test methods using the skin model can distinguish between the UN GHS Category 2 (“irritant”: substances with scores greater than or equal to 2.3 to in at least 2 animals) and lower category (no-category in UN GHS in EU CLP regulation; the Regulation on the Classification, Labeling and Packaging of Substances and Mixtures), ESAC determined that the methods can be applied to GHS labeling in EU for two-level classification⁵⁾. Therefore, “Performance standards of applying human skin models to *in vitro* skin irritation test” established in 2007 is currently being revised including changes of reference chemicals⁶⁾.

This test method using LabCyte EPI-MODEL24 is positioned as a me-too method since it has developed as a similar test method to the *in vitro* skin irritation test using a reconstructed human epidermis model approved by ECVAM. Therefore, it has been validated as a catch-up validation based on “Performance standards of applying human skin models to *in vitro* skin irritation test” established by ECVAM. This test was conducted to evaluate the intra- and inter-laboratories reproducibility and the predictive performance in multiple facilities.

In the *in vitro* skin irritation test using LabCyte EPI-MODEL24, the test

substance was exposed to the surface of the skin model for 15 minutes and removed. The tissue viability was measured using MTT assay after 42 h-incubation of the model to classify the test substance by 50% of tissue viability as positive criteria of the skin irritation. Although the release determination of IL-1 α release was added to the skin irritation test protocol in anticipation of improving sensitivity of the test, it did not contribute to the determination of outcome. As a result, only MTT assay was adopted in the test protocol as well as in the method using previously-evaluated skin models.

The committee positioned the present test method as a similar model to the previously-approved in vitro skin irritation test using a reconstructed human epidermis model (a me-too method), and conducted a catch-up validation based on "Performance standards of applying human skin models to in vitro skin irritation test" established by ECVAM to verify and confirm the present method. The results are as follows.

- 1) The present test method was similar to the in vitro skin irritation test using a reconstructed human epidermis model which has been previously approved. The present skin model was an epidermal model reconstructed from human keratinocytes. It would be scientifically valid to use the model for in vitro skin irritation test, since function, cell toxicity mechanism and capability of the skin model were equal to the other models previously approved.
- 2) The test method replaces OECD TG404 as well as the other test methods previously approved. The aim of the application of the test method is to distinguish chemical substances between category 2 and lower category in UN GHS labeling
- 3) The test protocol properly describes the exposure methods of test substances to the skin models and the toxicological assessment, which is practically the same as conventional test methods, suggesting that the test can be performed correctly. The determination of IL-1 α release was eventually deleted from the protocol because the results showed only a slight improvement of the test sensitivity while MTT assay showed a preferable result.
- 4) A positive control (5% SDS solution) and a negative control (distilled water for injection) were employed in the test. Cell viability was used for a prediction model, in which test substances with the cell viability \leq 50% are classified into category 2 as well as in the other test methods previously approved.
- 5) Acceptance criteria (OD of the negative control is greater than 0.7 and viability of the positive control is less than 40%) for validation results were clearly described.
- 6) The validation was performed according to the Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for

Hazard Assessment (No.34) of OECD⁷⁾.

- 7) Quality control of LabCyte EPI-MODEL24 was performed under a guideline of OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring No 5⁸⁾ by confirming cell viability using MTT assay and barrier functions in each lot unit.
- 8) A validation management team was organized, where a biostatistics expert was included as a member.
- 9) The intra- and inter-laboratory variability was evaluated in the data analysis, suggesting that the reproducibility was sufficient
- 10) Twenty five substances were selected based on “Performance standards of applying human skin models to in vitro skin irritation test” established ECVAM. These substances were selected from three existing reliable databases providing in vivo data and including a good balance of test chemicals classified into category 2 and no category of GHS labeling. Therefore, the selection of chemical substances is valid.
- 11) The predictive performance was valid, since the test met the acceptance criteria for consistency, specificity: 70%, sensitivity: 80% and overall accuracy: 75%, which were set in “Performance standards of applying human skin models to in vitro skin irritation test” made by ECVAM.

In conclusion, the in vitro skin irritation test using a reconstructed human epidermis model, LabCyte EPI-MODEL24, shows the same function as those previously approved by ECVAM. Thus, the test method is applicable to GHS labeling for two-level classification into category 2 and lower category based on OECDTG404.

7) 酵母生育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた光毒性試験代替法の専門家による第三者評価

研究要旨

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーのバリデーション報告書等をもとに、専門家による第三者評価を進めた。

結果として、本試験法には光毒性物質のスクリーニング法として一定の有用性は認められるものの、十分な信頼性を持って実用化するためにはまだ検討すべき問題点が残っていると考えられた。

A. 研究目的

資生堂から提案された「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリー（酵母-赤血球試験）」は平成19年度に両報告書提出後に補足された議論も含めて、最終的なバリデーション報告書がまとまった。これを受け、試験法の公定化のために、第三者専門家による光毒性評価委員会を設立した。

B. 研究方法

B-1) 光毒性評価委員会委員

委員長

笛木 修（医薬品医療機器総合機構）

委員

戸倉新樹（産業医科大学）

小野寺博志（国立衛研）

山田 弘（医薬基盤研究所）

今井弘一（大阪歯科大学）

細井一弘（参天製薬）

B-2) 方法

本評価法の提案者である（株）資生堂品質評価センター（以下、資生堂）による検討実験では、香料、紫外線吸収剤、医薬品、抗菌剤、染料といった分類から、既に *in vivo* で光毒性が評価済みの24物質の評価が行われており、十分な感度と *in vivo* 判定との一致率が得られている。この結果の普遍性を示すために実施された、日本動物実験代替法学会により多施設バリデーション結果を評価に用いた。

C. 結果および考察

一次バリデーション実験では9物質が用いられ、実施施設（6施設）に6品目ずつ名称を隠し、コード化して供与された。実験に際しては実施に先立って技術講習会が行われ、GLPの原則に則ってSOPに従って実施された。施設内再現性を見たところ、1施設（施設b）

で、特に再現性が悪く、この理由として他施設を借用して実験を実施したため、実験環境の制御に困難性があったことが挙げられている。施設間再現性についても4物質（Acridine、4-*t*-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane: BMDM、Chlorhexidine: CHD および Bithionol）を除き、施設間で結果が一致せず、再現性は良好とはいえない結果であった。また、CHD および Bithionol は *in vivo* で陰性物質と判断されているものの、本実験結果では陽性との判断がなされており、逆に *in vivo* で陽性とされた物質で擬陽性あるいは陰性と判断される場合が存在した。一次バリデーションの結果において、施設bの結果を除外し、擬陽性判定を陽性判定と見なした場合には *in vivo* 判定との一致率は70%であった。

一次バリデーションの結果では、陽性物質の結果が擬陽性と判定されたり、結果がばらついたことから、この点を改善するために酵母光生育阻害試験の陽性結果の判定基準の変更やブレインキューベーション時間の設定等のプロトコール整備が行われ、補完実験が実施された。補完実験は一次バリデーションと同じ物質を用い、施設bを除いた5施設で実施された。補完実験では擬陽性判定が少なくなり、施設内再現性および施設間再現性共に一次バリデーションに比して良好な結果が得られており、プロトコール改善の効果が認められているものと判断された。

プロトコール改善後の本試験法では、陰性物質を誤って陽性と判断する可能性はあるものの、陽性物質を誤って陰性と判断した事例はなく、安全性上の観点から *in vitro* 光毒性スクリーニングの手法として、利用可能であると考えられる。本試験法のメリットとしては、①水難溶性物質の評価が可能と考えられている。②必ずしも無菌操作が必要でなく、操作が簡便である。③比較的 low コストである。等がある一方、デメリットとして、①バッテリー

一試験法のため、単一試験である3T3-NRU法に比べ試験に時間を要する。②偽陽性と判定される物質が存在する等の問題点も存在する。また、以下に挙げるような問題点については現状で未解決であり、今後の課題と考えられる。①本試験法のメリットの一つと考えられている水難溶性物質の評価が十分に行われていない。②最終的に整備されたプロトコールにおける検討物質数は9物質のみであり、本法が広範囲の被験物質に適用可能かどうか不明である。③3T3-NRU法との直接比較がなされておらず、同等性あるいは優越性が明確に示されていない。④異なる光源を使用した際の結果の安定性について評価されていない。⑤温度上昇による結果の差異が言及されているが、この点に関する追加検討が実施されていない。⑥代謝活性化系が設定されていないため、経皮投与以外の全身曝露の際の安全性

が評価できない。⑦バッテリーの2試験の実施順序を規定する必要性に関する検討がなされていない。⑧酵母光生育阻害試験における陽性判定のカットオフ値について再検討の余地がある。⑨赤血球光溶血試験の吸光度測定波長の選定に再検討の余地がある。

D. 結論

本試験法には光毒性物質のスクリーニング法として一定の有用性は認められるものの、十分な信頼性を持って実用化するためにはまだ検討すべき問題点が残っていると考えられる。

8) 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 (BCOP) や鶏摘出眼球試験 (ICE) 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

簾内桃子 (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一つとして、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一つとして、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。

D. 資料

資料 8-1 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 8-2 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試験法 Isolated Chicken Eye Test Method : ICE)

眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書

評価対象試験：眼に対する腐食性および強刺激性評価のための
ウシ摘出角膜の混濁および透過性試験

Bovine Corneal Opacity and Permeability Test (BCOP) for Identifying
Ocular Corrosives and Severe Irritants

Version 2

平成21年10月14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	(P&Gイノベーション合同会社)
	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。本試験法を眼に対する腐食性および強刺激性物質をスクリーニングする目的で使用するために行われた ICCVAM（Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods）におけるバリデーション試験の情報（BRD：Background Review Document）をもとにJaCVAM眼刺激性試験代替法評価委員会においても、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。

本バリデーション試験には、様々な種類と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一致度、感度および特異度はそれぞれ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。偽陽性率・偽陰性率の高いアルコール類・ケトン類・固体物質を除くと一致度、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、ある特定の化学物質（アルコール類・ケトン類および固体物質）における本試験法の限界を考慮に入れた上で、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評価する目的のために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 試験法の科学の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づ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の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と考えられる。

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。

化学物質が固体の場合、その物理的的刺激も考慮する必要があるが、BCOP法では溶液または懸濁液を調製するため、固体被験物質の物理的的刺激そのものを評価するには適していない。しかしながら、Draize法においても固型あるいは粒状の被験物質は微粉末にして眼粘膜に暴露することがOECDガイドライン（OECD TG 405）で規定されている。

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依じて、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 (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 とも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 (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
アミン類	10	オニウム化合物	12
アミノ酸	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

注) 被験物質によっては複数の化学物質区分にまたがっている場合もあるため、合計は被験物質総数と一致しない。