

皮膚腐食性試験バリデーション結果報告

日本動物実験代替法学会バリデーション委員会
委員長 吉村 功

実行委員会委員

吉村 功 (東京理科大学 工学研究科 経営工学)
大森 崇 (京都大学大学院 医学研究科 社会健康医学系専攻
医療統計学部門)
大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所 安全生物研 薬理部)
小島 肇 (日本メナード化粧品(株) 総合研究所 研究技術部門
第二部安全性評価研究室)

実験責任者

安東朋子 (国立医薬品食品衛生研究所 安全生物研 毒性部)
稲垣勝裕 (日本農薬(株)総合研究所 安全性・医薬研究センター、
安全性グループ)
久保木真美 (日本曹達(株)小田原研究所 安全性研究部)
小坂忠司 ((財)残留農薬研究所 毒性第二部 免疫毒性研究室)
小島 肇 (日本メナード化粧品(株) 総合研究所 研究技術部門
第二部安全性評価研究室)
中村洋介 (住友化学工業(株)生物環境科学研究所生化学グループ)

皮膚三次元モデル提供者

鳥島 久 (倉敷紡績(株)バイオメディカル部)
森川訓行 (グンゼ(株)研究開発センター第5研究室)

序

動物福祉への関心の高まりに応ずるため、多くの動物実験代替法（以後、代替法と記す）が開発されてきた。それらの内、皮膚への直接作用としての強い障害性を調べる試験法の代替法（皮膚腐食性試験代替法）として、EUのECVAM Scientific Advisory Committeeは 1998 年にEPISKIN™とラット Transcutaneous Electrical Resistance Test皮膚腐食性試験(TER法)を、2000 年にはEpiDerm™とCORROSITEX™を認めた。米国では 1998 年にCORROSITEX™を全ての化学物質に有用とは言えないが、Department of Transport (DOT) で必要とされる状況においては有用であると評価した¹⁾。OECDにおいても、TER法とEPISKIN™, EpiDerm™法が皮膚腐食性試験として専門家会議で承認され（それぞれガイドライン 430 と 431）、正式な通知が待たれている。TER法を除き、これらの方法はいずれもヒト皮膚三次元モデルを利用した試験法である。しかし、これらの試験法について、我が国で検討された例がなく、手技や評価に関わる問題点が不明である。

我が国においてもVitrolife-Skin™（グンゼ）やTESTSKIN™（東洋紡）のような皮膚三次元モデルが開発され、皮膚刺激性等を評価するために市販されているが、これらヒト皮膚三次元モデルを皮膚腐食性試験代替法として利用することについては検討された例がない。

一方、10%水酸化カリウムやフェノールのように、皮膚障害性の強い化学物質は劇物と分類されているが、*in vivo*で強い皮膚障害を起こすと予想される物質を実験動物を用いて検討することは、強い苦痛が予想されることから、動物福祉の立場から実施が困難である。我が国においても、強い皮膚障害性の判定に、上記の*in vitro*皮膚腐食性試験を利用することが望ましい。

以上の状況を鑑み、日本でヒト皮膚三次元モデルとして開発されたVitrolife-Skin™とすでにECVAMにてバリデーションが終了しているEpiDerm™の特性を明らかにするために、多施設での小規模バリデーションを実施した。

方法

1) バリデーション組織

わが国で皮膚三次元モデルを販売している企業に基本計画を示し、バリデーションへの協力を求めたところ、クラボウ社(EpiDerm™)およびグンゼ社(Vitrolife-Skin™)より協力が得られた。そこで、日本動物実験代替法学会及び厚生労働省医薬局生活科学安全対策室を通じて、バリデーションへの参加施設を募集した。その結果、国立医薬品食品衛生研究所（毒性部）、日本農薬、日本曹達、残留農薬研究所、日本メナード化粧品及び住友化学工業より参加の申し入れがあった。そこで、日本動物実験代替法学会にバリデーションへの協力を求め、そのバリデーション委員会を中心に少数の被験物質を用いたバリデーション研究を実施するとされ、バリデーション実行委員会を組織した（添付資料 1）。

2) 被験物質および器材

バリデーション実行委員会では今までの皮膚腐食性試験のバリデーションで用いられた被験物質とその腐食性を調査した（添付資料 2）。実行委員会ではそれらの中から予備試験及び本試験用の陽性対照物質として 10%水酸化カリウム水溶液、20% Sodium lauryl sulfate 水溶液および塩化ベンザルコニ

ウムを、また、実験に直接関与しない国立医薬品食品衛生研究所薬理部の大野が被験物質として 12 物質を選考した（表 1）。被験物質は大野がコード化し、実験実施施設に配布した。各施設には陽性対照物質とともに、腐食性物質と非腐食性物質をそれぞれ 5 物質ずつ配布した（表 2）。なお、配布された被験物質はすべて劇物として扱うこと、冷暗所に保管すること、また、GLP に準じて、使用・保管記録をとるよう指示された。

ヒト皮膚三次元モデルEpiDermおよびVitrolife-Skin™はそれぞれクラボウ社とグンゼ社より購入し、実験スケジュールに従い、実験施設に直接配布した。配布数は予備試験を 1 回及び本試験を 2 回とし、それぞれ 2 キットずつ使用することから、6 キット配布するとしたが、追加試験を行う場合は、追加のキットを配布した。

3) バリデーシヨンの試験計画書の作成と技術移転

バリデーシヨン実行委員会ではバリデーシヨン実施に際しての詳細を検討し、試験計画書（添付資料 3）および標準操作手順書（SOP, 添付資料 4）を作成し、それに基づいて、陽性対照物質を用いて技術移転を行った。

4) バリデーシヨン実験の実施

適正な技術を持った者により実験が行われるよう、三次元モデルを用いた実験を行う者は技術移転の会に出席した参加施設のうち、本試験開始までにキットを使用した経験のある試験担当者に限るとした。試験期間は平成 16 年 2 ~ 3 月とした。

なお、実験は予備試験を 1 回、本試験を 2 回行い、2 回の本試験で最終判定が食い違った物質、および技術的な問題で 1 例のみしか結果が得られなかった物質については、追加試験を行うこととした。なお、追加試験のためのキットを予め注文してあったため、2 回の本試験で同じ結果が得られた場合においても確認のため、追加試験を実施した場合もある。

5) 腐食性の判定

被験物質の腐食性の最終判定は、2 ~ 3 回の本試験結果のうち、同一の判定の得られた 2 例の結果を最終判定結果とすることとした。しかし、追加試験のためのキット提供の都合から、4 月末に実験が終了した。

試験の実施に際しては GLP の原則を尊重し、試験計画書および SOP に従って実施された。また、試験記録および修正記録を明確にとることとされた。大きな逸脱があった場合には、結果を採用しないこともあるとされた。

6) データ解析

試験結果は実行委員長の吉村に提供するとされた。そこで、すべてのデータが提出されたことが確認されたところで、大野より被験物質コードと参加施設への割付表が開示された。これに基づいて、吉村がデータを確認したのち、結果を固定し、解析した。

結果

それらの結果を表 3 および 4 にまとめた。

1) 試験結果の再現性

2回の本試験で異なる結果が出たのは、EpiDerm™においては、66試験の内sulfuric acid、Lactic acidで各2施設であり、発生率4/66、即ち、6.06%であった。Vitrolife-Skin™においては、sulfuric acid、Octanoic acid、Sodium hydroxide(4.88%)で各1施設であり、発生率3/66、即ち、4.55%であった。

2) 予知能力

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とされている。そこで、これに従って判定された結果を基に、被験物質の腐食性を判定した。

EpiDerm™で腐食性物質を正しく腐食性と判定した事例は6被験物質30試験中、29試験であり、感度(sensitivity)は29/30、即ち、96.6%であった。一方、非腐蝕性物質を正しく非腐蝕性と判定した事例は6被験物質30試験中、20試験であり、特異性(specificity)は20/30、即ち66.7%であった。なお、非腐食性物質を誤って腐食性物質と判定したのは、5% Potassium hydroxideとLactic acidであり、この場合、いずれの施設でも腐食性物質と判定した。腐食性との結果が得られたもののうち、真に腐食性である割合、陽性予知能力(positive predictivity)は29/39即ち、74.4%であった。非腐食性との結果が得られたもののうち、真に非腐食性である割合、陰性予知能力(negative predictivity)は20/21、即ち、95.2%であった。正しい判定結果が得られた割合、一致率は49/60即ち、81.7%であった。

Vitrolife-Skin™では感度は30/30、即ち100%であり、特異性は20/30、即ち66.7%、陽性予知能力は30/40、即ち75%、陰性予知能力は20/20、即ち100%、一致率は50/60、即ち83.3%であった。EpiDerm™の場合と同様に、非腐食性物質を誤って腐食性物質と判定したのは、5% Potassium hydroxideとLactic acidであり、いずれの施設でも腐食性物質と判定した。

これらのように、いずれの場合も、EpiDerm™とVitrolife-Skin™によりほとんど同じ結果が得られた。また、判断を誤る物質も同じであった。

考察

OECDやEU、米国で皮膚腐食性試験代替法として承認されているEpiDerm™と我が国で開発されたVitrolife-Skin™の2種のヒト皮膚三次元モデルについて、OECDのバリデーション基準に準じて、多施設バリデーションを実施した。その結果、前者ではfalse negativeが30試験のうち1試験で認められたが、後者ではfalse negativeは認められなかった。一方、両皮膚三次元モデルの試験法とも5%水酸化カリウムと乳酸でfalse positiveとなった。結果としては、false negative及びfalse positiveの発現については、両皮膚三次元モデルともほとんど同じ結果が得られた。

今回、使用した被験物質数は陽性対照物質を除き、12物質であり、従来のバリデーションと比べ、少ないが、OECDで適切なガイドラインとして専門家会議で承認されている。皮膚三次元モデルと同等のものであり、完全に新規の方法と比べてより小数の被験物質でのバリデーション(catch up validation)でその妥当性を判断できると考えたものである。

一方、水酸化カリウム、硫酸、水酸化ナトリウム、及びフェノールは我が国の毒劇物判定において、皮膚粘膜刺激性において、これと同等以上の物質は劇物と判定するとされているものであるが、それぞれ10%硫酸、5%水酸化ナトリウム、5%水酸化カリウム、及び5%フェノールと同等以下の刺激性を有

する物質については劇物から除外されているものである。一方、5%水酸化カリウムを除き、10%硫酸や5%水酸化ナトリウムは腐食性物質として報告されているものであり、今回の試験においても腐食性の結果が得られた。これらを考えると、本試験を日本で採用する場合においては、皮膚粘膜刺激性の観点からの劇物の判定基準を見直す必要があると考えられる。

Vitrolife-Skin™において、強度のアルカリにより本皮膚三次元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した。今回の判定においては、強い刺激性があるものとして、腐食性と判定したが、SOP上もそのように改定する必要がある。なお、酸やアルカリ検体については、その他の障害は認められておらず、pH変化によるviability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たと考えられる。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ることも考えられることから、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皮膚モデルの膨潤率により変化する可能性があり、注意を喚起する必要があるとされた。更に、Vitrolife-Skin™では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った。

引用文献

- 1) ICCVAM: Corrositex[®]: An in vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods (NICEATM). NIH Publication No: 99-4495 (1999).

表 1 : 被験物質

番号	被験物質名	腐食性*	コメント		
1	Potassium hydroxide(10%)	C	陽性対照物質	劇物	液体
2	Sodium lauryl sulfate(20%)	NC	陽性対照物質		液体
3	Sulfuric acid (10%)	C	劇物判定薬	非劇物	液体
4	Octanoic (Caprylic) acid	C		非劇物	液体 bp 239.7
5	Sodium hydroxide(4.88%)	C	劇物判定薬	非劇物	液体
6	Phenol	C	劇物判定薬	劇物	固体 mp 40-43
7	Chromium trioxide	C		劇物	固体 mp 197
8	Phosphoric acid	C		非劇物	固体 mp 42.3
9	Sodium perborate	NC		非劇物	粉末 60 で分解
10	Tetrachloroethylene	NC		非劇物	液体 bp 121
11	Potassium hydroxide (5%)	NC			液体
12	4-Amino-1,2,4-triazole	NC		非劇物	粉末 mp159
13	L-Lactic acid	NC		非劇物	固体 mp 52.8
14	Isopropanol (2propanol)	NC		非劇物	液体 bp 82.5

C: corrosive, NC: non-corrosive

表 2 : 被験物質の各施設への配布表

被験物質名	腐食性*	施設 1	施設 2	施設 3	施設 4	施設 5	施設 6
Potassium hydroxide (10%)	C	1	2	3	4	5	6
Sodium lauryl sulfate (20%)	NC	7	8	9	10	11	12
Sulfuric acid (10%)	C	13	14	15	16	17	×
Tetrachloroethylene	NC	18	19	20	21	×	22
Octanoic (Caprylic) acid	C	23	24	25	26	×	27
Potassium hydroxide (5%)	NC	28	29	30	×	31	32
Sodium hydroxide (4.88%)	C	33	34	35	×	36	37
4-Amino-1,2,4-triazole	NC	38	39	×	40	41	42
Phosphoric acid	C	×	43	44	45	46	47
L-Lactic acid	NC	48	×	49	50	51	52
Isopropanol (2-propanol)	NC	×	53	54	55	56	57
Phenol	C	58	59	×	60	61	62
Sodium perborate	NC	63	64	65	66	67	×
Chromium trioxide	C	68	×	69	70	71	72

C: corrosive, NC: non-corrosive

表3: 結果のまとめ

被験物質 施設 被験物質番号	Potassium hydroxide (10%), Corrosive					Sulfuric acid (10%), Corrosive					Tetrachloroethylene, Non-Corro					
	国衛研	日農	日曹	メナ	住化	残農	国衛研	日農	日曹	メナ	住化	国衛研	日農	日曹	メナ	残農
EpiDerm 1回目	C	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	C	C	NC	NC	NC	NC	NC
EpiDerm 2回目	C	C	C	C	C	C	NC	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC
EpiDerm 追試	C	C	C	C	C			C	C		C					
判定	C	C	C	C	C	C	NC	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC
備考							FN									
VitroLife skin 1回目	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC
VitroLife skin 2回目	C	C	C	C	C	C	C	C	NC	C	C	NC	NC	NC	NC	NC
VitroLife skin 追試	C	C	C					C								
判定	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC
備考																

被験物質 施設 被験物質番号	Octanoic Acid, Corrosive					KOH (5%), Non-Corro.					NaOH (4.88%) Corrosive				
	国衛研	日農	日曹	メナ	残農	国衛研	日農	日曹	住化	残農	国衛研	日農	日曹	住化	残農
EpiDerm 1回目	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
EpiDerm 2回目	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
EpiDerm 追試		C	C				C	C				C	C		
判定	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
備考						FP									
VitroLife skin 1回目	C	C	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	NC	C	C	C
VitroLife skin 2回目	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
VitroLife skin 追試			C				C	C				C			
判定	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
備考						FP									

被験物質 施設 被験物質番号	4-Amino-1,2,4-triazole, Non-Corro.					Phosphoric acid, Corrosive					L-Lactic Acid, Non-Corro.				
	国衛研	日農	メナ	住化	残農	日農	日曹	メナ	住化	残農	国衛研	日曹	メナ	住化	残農
EpiDerm 1回目	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	C	C	NC	C
EpiDerm 2回目	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
EpiDerm 追試							C	C			C	C	C	C	
判定	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
備考											FP				
VitroLife skin 1回目	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
VitroLife skin 2回目	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
VitroLife skin 追試							C	C			C	C	C		
判定	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
備考											FP				

被験物質 施設 被験物質番号	Isopropanol, Non-Corro.					Phenol, Corrosive					Sodium Perborate, Non-Corro.					Chromium trioxide, Corrosive				
	日農	日曹	メナ	住化	残農	国衛研	日農	メナ	住化	残農	国衛研	日農	日曹	メナ	住化	国衛研	日曹	メナ	住化	残農
EpiDerm 1回目	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C
EpiDerm 2回目	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C
EpiDerm 追試							C													
判定	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C
備考																				
VitroLife skin 1回目	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	C	C*	C	C	C
VitroLife skin 2回目	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	C	C*	C	C	C
VitroLife skin 追試	NC										NC									
判定	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C
備考																				

国立衛研: 国立医薬品食品衛生研究所毒性部、日農: 日本農薬、日曹: 日本曹達、メナ: 日本メナード、住化: 住友化学、残農: 残留農薬研究所

NC: non-corrosive, C: corrosive, FN: false negative, FP: false positive

*: 日本曹達のNo 69はコラーゲンゲルが消失してしまったため、N or ?と判定されていたが、これはコラーゲンゲルに対する作用が極めて強いということでCorrosive

表 4-1: EpiDerm™

	Vitro	Corrosive	Non-Corrosive
Vivo			
Corrosive		29	1
Non-Corrosive		10 (5% KOH, Lactic Acid)	20

表 4-2: VitroLife-Skin™

	Vitro	Corrosive	Non-Corrosive
Vivo			
Corrosive		30	0
Non-Corrosive		10 (5% KOH, Lactic Acid)	20

添付資料1：腐食性試験代替法バリデーション組織および協力者名簿

日本動物実験代替法学会 バリデーション実行委員会

	所 属	氏 名
委員長	東京理科大学工学部経営工学科	吉村 功
	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 薬理部	大野泰雄
	京都大学大学院医学研究科医療統計	大森 崇

バリデーション協力機関における実験責任者

	協力機関	氏名
	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 毒性部	安東朋子
	日本農薬（株）総合研究所 安全性・医薬研究センター、安全性グループ	稲垣勝裕
	日本曹達（株）小田原研究所安全性研究部	久保木真美
	日本メナード化粧品（株）総合研究所研究技術部門第二部安全性評価研究室	小島 肇
	住友化学工業（株）生物環境科学研究所生化学グループ	中村洋介
	（財）残留農薬研究所 毒性第二部 免疫毒性研究室	小坂忠司

キット提供者

		氏名
	倉敷紡績（株）バイオメディカル部	鳥島 久
	倉敷紡績（株）バイオメディカル部	元野 満
	グンゼ（株）研究開発センター第5研究室	森川訓行

施設コーディネーター及び実験補助者

		氏名
	住友化学工業（株）生物環境科学研究所 生化学グループ	磯部直彦
	日本曹達（株）農業化学品事業部農業化学品登録グループ	金口幸裕
	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 毒性部	菅野 純
	（財）残留農薬研究所 毒性第二部	原田孝則
	日本農薬（株）総合研究所 安全性・医薬研究センター	野方 勝
	日本曹達株式会社、農業化学品事業部、農業化学品登録グループ	服部光雄
	日本曹達（株）小田原研究所安全性研究部	藤井義修
	（財）残留農薬研究所 毒性第二部 神経毒性研究室	石嶺さやか
	住友化学工業（株）生物環境科学研究所生化学グループ	森本隆史

添付資料2: 過去の皮膚腐食性試験代替法のバリデーションにおける被験物質

No.	被験物質名	Episkin *	EpiDerm Phase I**	EpiDerm Phase II**	EpiDerm &Episkin **	Pre- validation ***	C/CN ****	分類	被験物 質第一 次選択
1	Hexanoic acid	○	○			○	C	Organic acids	
2	1,2-Diaminopropane	○	○		○		C	Organic bases	
3	Carvacrol	○	○				C	Phenols	
4	Boron trifluoride dihydrate	○	○		○		C	Inorganic acids	
5	Methacrolein	○			○		C	Electrophiles	
6	Phenethyl bromide	○	○				NC	Electrophiles	
7	3,3'-Dithiodipropionic acid	○					NC	Organic acids	
8	Isopropanol	○					NC	Neutral organics	
9	o-Methoxyphenol (Guaiacol)	○	○				NC	Phenols	
10	2,4-Xylidine(2,4-dimethylaniline)	○	○				NC	Organic bases	
11	2-Phenylethanol(phenylethylalcohol)	○					NC	Neutral organics	
12	Dodecanoic (lauric) acid	○			○	○	NC	Organic acids	○
13	3-Methoxypropylamine	○					C	Organic bases	
14	Allyl bromide	○					C	Electrophiles	○
15	Dimethyldipropylenetriamine	○			○		C	Organic bases	
16	Methyl trimethylacetate	○					NC	Neutral organics	
17	Dimethylisopropylamine	○			○		C	Organic bases	
18	Potassium hydroxide (10% aq)	○			○		C	Inorganic bases	○
19	Tetrachloroethylene	○			○		NC	Neutral organics	○
20	Iron(III) chloride	○	○				C	Inorganic salts	
21	Potassium hydroxide (5% aq)	○	○				NC	Inorganic bases	○
22	n-Butyl propionate	○					NC	Neutral organics	
23	2-tert-Butylphenol	○			○		C	Phenols	
24	Sodium carbonate (50% aq)	○			○		NC	Inorganic bases	
25	Sulfuric acid (10% wt)	○			○		C	Inorganic acids	○
26	Isostearic acid	○			○		NC	Organic acids	
27	Methyl palmitate	○			○		NC	Neutral organics	
28	Phosphorous tribromide	○	○		○		C	Inorganic acids	○
29	65/35 Octanoic/decanoic(capric) acids	○					C	Organic acids	
30	4,4-Methylene-bis-(2,6-di-tert-butylphenol)	○					NC	Phenols	
31	2-Bromobutane	○					NC	Electrophiles	
32	Phosphorous pentachloride	○	○				C	Inorganic acids	
33	4-(Methylthio)-benzaldehyde	○					NC	Electrophiles	
34	70/30 Oleine/octanoic acid	○					NC	Organic acids	
35	Hydrogenated tallow amine	○			○		NC	Organic bases	
36	2-Methylbutyric acid	○					C	Organic acids	
37	Sodium undecylenate (33% aq)	○					NC	Soap/surfactants	
38	Tallow amine	○				○	C	Organic bases	
39	2-Ethoxyethyl methacrylate	○					NC	Electrophiles	
40	Octanoic (Caprylic) acid	○			○	○	C	Organic acids	○
41	20/80 Coconut/palm soap	○					NC	Soap/surfactants	
42	2-Mercaptoethanol Na salt (45% aq)	○					C	Inorganic bases	
43	Hydrochloric acid (14.4% wt)	○					C	Inorganic acids	
44	Benzyl acetone	○			○		NC	Neutral organics	○
45	n-Heptylamine	○			○		C	Organic bases	○
46	Cinnamaldehyde	○					NC	Electrophiles	○
47	60/40 Octanoic/decanoic acids	○			○		C	Organic acids	
48	Glycol bromoacetate (85%)	○			○		C	Electrophiles	
49	Eugenol	○			○		NC	Phenols	
50	55/45 Octanoic/decanoic acids	○	○			○	C	Organic acids	
51	Methyl laurate	○					NC	Neutral organics	
52	Sodium bicarbonate	○					NC	Inorganic salts	
53	Sulfamic acid	○	○		○		NC	Inorganic acids	○
54	Sodium bisulfite	○					NC	Inorganic salts	
55	1-(2-Aminoethyl)piperazine	○					C	Organic bases	
56	1,9-Decadiene	○			○		NC	Neutral organics	
57	Phosphoric acid	○	○	○			C	Inorganic acids	
58	10-Undecenoic acid	○					NC	Organic acids	
59	4-Amino-1,2,4-triazole	○			○		NC	Organic bases	○
60	Sodium lauryl sulfate (20% aq)	○			○		NC	Soap/surfactants	○
61	1,2-Benzisothiazolin-3-one (33%) in aqueous propylene glycol					○	C	Neutral organics	
62	1,2-Benzisothiazolin-3-one (33%) aqueous					○	NC	Neutral organics	
63	1,4-Diaminobutane (30%)					○	C	Organic bases	
64	2-Hydroxyisobutyric acid		○	○			NC	Organic acids	
65	4-Amino-5-methoxy-2-methylbenzenesulphonic acid		○				NC	Inorganic acids	
66	8N KOH		○	○			C	Inorganic bases	
67	Acetic acid (glacial)		○			○	C	Organic acids	
68	Acrylic acid (99%)		○			○	C	Organic acids	○
69	Alkyl(4EO)phosphate ester					○	NC	Neutral organics	
70	Aminotris(methylphosphonic acid), 50% in water					○	NC	Organic acids	
71	Behenyl(C20-22) trimethylammonium chloride, 80% in isopropanol					○	NC	Surfactant	

No.	被験物質名	Episkin *	EpiDerm Phase I**	EpiDerm Phase II**	EpiDerm &Episkin **	Pre- validation ***	C/CN ****	分類	被験物 質第一 次選択
72	Benzalkonium chloride		○				C	Soap/surfactants	○
73	Bromoacetic acid		○				C	Inorganic acids	
74	Bromoacetic acid (55.6%)					○	C	Organic acids	
75	Bromoacetic acid (8%)					○	C	Organic acids	
76	Butyl carbamate		○				NC		
77	Butylamine (40%)					○	C	Organic bases	
78	Butylbenzene					○	NC	Neutral organics	
79	Butyric acid		○				C	Organic acids	
80	C12-14 α -Olefin sulphonate, sodium salt					○	NC	Surfactant	
81	C13-15 Alkyl-di(2-hydroxyethyl)amine					○	C	Organic bases	
82	Cyclohexylamine (11.9%)					○	C	Organic bases	
83	Chromium trioxide		○	○			C		○
84	Coco(C12) 2EO sulphate, sodium salt (70%)					○	NC	Surfactant	
85	Coco(C12) dimethylamine oxide (30%)					○	NC	Amine oxide	
86	Coco(C12)dimethylbenzylammonium chloride					○	C	Surfactant	
87	Coco(C12)trimethylammonium chloride, 33% in water					○	NC	Surfactant	
88	Cocoamine					○	C	Organic bases	
89	Cyclohexylamine		○				C		
90	Dicocoamine					○	NC	Organic bases	
91	Dichloroacetyl chloride		○				C		
92	Dichloroacetic acid (36.1%)					○	C	Organic acids	
93	Diethylamine (35%)					○	C	Organic bases	
94	E4		○				NC		
95	Fatty acid monoethanolamine coco					○	NC	Neutral organics	
96	Fatty alkylethoxylate 2EO					○	NC	Neutral organics	
97	Formic acid		○	○			C	Organic acids	○
98	Glyoxylic acid		○				NC	Organic acids	
99	Hexadecyltrimethylammonium chloride 50% isopropanol					○	C	Surfactant	
100	Lactic acid		○				NC	Organic acids	
101	L-Glutamic acid hydrochloride		○	○			NC		
102	Mercaptoacetic acid (15.1%)					○	C	Organic acids	
103	Methyl 2,2-dimethylpropanoate				○		NC	Neutral organics	
104	Methylphosphoric acid bis(oxiranylmethyl) ester		○				NC		
105	N-(2-methylphenyl)imidodicarbonimidic acid		○				NC	Organic acids	
106	n-Hexanol					○	NC	Neutral organics	
107	n-Nonanol					○	NC	Neutral organics	
108	n-Undecanol					○	NC	Neutral organics	
109	Oleic/caprylic(80:20) acid					○	NC	Organic acids	
110	Oxalic acid		○	○			NC	Organic acids	
111	Phenol		○	○			C	Phenols	○
112	Phentamethyl-N-tallow-1,3-propanediammonium chloride 50% isopropanol					○	C	Surfactant	
113	Polyoxyethylene (15) tallow amine					○	NC	Organic bases	
114	Polysolvan		○				NC		
115	Propionic acid		○	○			C	Organic acids	
116	Propylene glycol n-butyl ether					○	NC	Neutral organics	
117	Pyrrolidine (34.5%)					○	C	Organic bases	
118	Silver nitrate		○				C		
119	Sodium bisulphate		○				NC		
120	Sodium disilicate		○				NC		
121	Sodium hydroxide (4.88%)					○	C	Inorganic	○
122	Sodium dodecyl sulphate					○	NC	Surfactant	
123	Sodium metasilicate					○	C	Inorganic	
124	Sodium perborate					○	NC	Inorganic	○
125	Sodium percarbonate					○	NC	Inorganic	○
126	Sodium silicate A140					○	C	Inorganic	
127	Sodium silicate H100					○	NC	Inorganic	
128	Triethanolamine					○	NC	Organic bases	
129	α -Ketoglutaric acid		○	○			NC	Organic acids	

*: Fentem, J. H., Archer, G. E. B, Balls M., Botham, P. A., Curren R. D., Earl, L. K., Esdaile D. J., Holzhtutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team, Toxicology in Vitro, 12, 483-524.

** : EpiDerm Phase I, II, III: Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson J. P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhtutter, H.-G. (2000) The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, ATLA, 28, 371-401.

***: Prevalidation: Botham, P. A., Chamberlain M., Barratt, M., Curren R.D., Esdaile D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hilderbrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc M., Regnier, F.-F., Steiling, w., Walker, A. P. and Balls M.(1995) A Prevalidation Study on In Vitro Skin Corrosivity Testing, The Report and recommendations of ECVAM Workshop 6, ATLA, 23, 219-255.

****: C : corrosive, NC: non corrosive

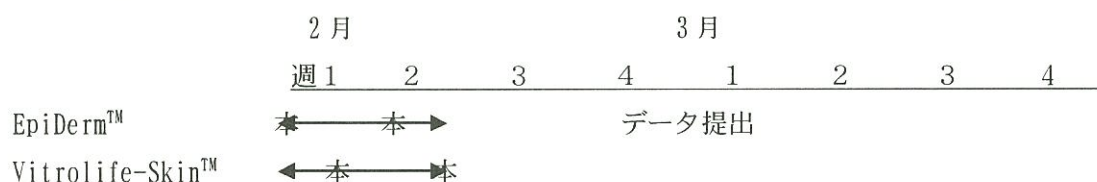
添付資料 3：皮膚腐食性試験研究計画書

国立医薬品食品衛生研究所 大野泰雄

平成 16 年 1 月 27 日作成 第 4 稿

1. 使用キット EpiDerm™ (クラボウ) 及び Vitrolife-Skin™ (グンゼ)
2. 被験物質 10 物質 (選定された 12 物質より、腐食性物質 5 物質及び非腐食性物質 5 物質、計 10 物質が配布される)、陽性対照物質:水酸化カリウム 10%水溶液、20% SLS 水溶液および塩化ベンザルコニウム、陰性対照および陽性対照を除く被験物質は、1 月末までに大野 (国衛研・薬理部) より配布される。配布された被験物質は冷暗所に保管。すべて劇物として扱う。使用記録・保管・使用時の注意を徹底する。
3. 試験参加施設 別紙リスト参照
4. 試験参加基準 平成 16 年 1 月 28 日に開催される技術移転の会に出席した参加施設のうち、本試験開始までにキットを使用した経験のある試験担当者に限る (2 月初旬に陽性対照物質などを用いた予備試験を実施した者)
5. 試験期間 平成 16 年 2 月～3 月
6. データ提出 平成 16 年 3 月末、データ提出先:吉村 功 (東京理科大学・工学部)
7. 試験概要 予備試験、本試験 2 回 (一試験毎に 2 キット使用) 各 6 キット (本試験結果が食い違った場合、追加試験 1 キット)
GLP の原則を尊重し、プロトコールおよび SOP に従って実施する。試験記録および修正記録を明確にとる。大きな逸脱があった場合には、結果を採用しないこともある。

8. 試験スケジュール案



できるだけ、2 キットを同日に使用する。

本試験 1 回当たりの延べ所要時間	1 日目	約 9 時間		
	2 日目	約 1 時間	計約 10 時間×2 回	
				計約 20 時間

9. 試験問い合わせ先

- 1) 被験物質 大野泰雄
- 2) データシート 吉村 功
- 3) 試験方法 小島 肇 (メナード)、クラボウ、グンゼ

以上

試験に用いる被験物質数

1. 予備試験

蒸留水、10%水酸化カリウム水溶液、塩化ベンザルコニウムの3点を3及び60分間適用 (N=2)。
各キット 12 well のみ使用。

この結果、蒸留水を陰性対照として、10%水酸化カリウム水溶液および塩化ベンザルコニウムでいずれの処理時間でも10-20%の細胞生存率であれば、手技的に問題ないレベルにあると判断される。

2. 本試験の被験物質

10物質、陽性対照物質 (10%水酸化カリウム水溶液)、陰性対照物質 (蒸留水) を同日に2キットとも処理。

3. 追加試験

2回の本試験で最終判定が食い違った物質、および技術的な問題で1例のみしか結果が得られなかった物質のみについて実施。

4. 最終判定

2~3例の結果のうち、同一の判定の得られた2例の結果を最終判定結果とする。

添付資料 4：皮膚腐食性試験バリデーション SOP

平成 16 年 1 月 31 日作成

1. 試験に使う器材及び試薬 (2 キット使用：本試験の場合)

試験施設で準備するもの：ピペットマンまたはマイクロマン (100 μ L)、1 mL および 5 mL ピペッター、吸引除去装置、0.1 mg まで計れる化学天秤、時計、ストップウォッチまたはタイマー、20mL 容ビーカーまたは 6well プレート 12~24 個、ピンセット (先端が細いもの。但し、とがっていないもの)、絶縁テープ (シーリングテープ、パラフィルムでも良い)、ペーパータオル、イソプロパノール、蒸留水 (市販品、自家製の脱イオン水でも良い)、磷酸緩衝液 (PBS、0.01mol/L Phosphate Buffered Saline (-) 和光 164-1851、pH 7.4 であれば自家製のものや他社のものでも良い) 約 800 mL、MTT 溶液 (キットの培養液で 0.5 mg/mL にて必要量を用事調整)

大野より送付：MTT、陽性対照物質 (水酸化カリウム 10% 水溶液、塩化ベンザルコニウム、20% SLS)、被験物質 (10 検体)、96 well、24 well、および 6 well プレート各 4~50 枚

クラボウより送付：EpiDerm™ 必要数、画鋲 (頭が Φ 7.7mm 以下で断端が若干膨らんでいるもの、6ヶづつ送付)、

ゲンゼより送付：Vitrolife-Ski™n 必要数、直径 6 mm ポンチ、木槌、カッティングマット

2. 使用機器・場所

CO₂ インキュベーター、冷蔵庫、マイクロプレートリーダー、クリーン度の高い場所、無菌操作は必ずしも行わなくてよい。

3 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、培養皮膚モデル (以下、モデルと記す) の入った 24 well プレートの状態を確認する。使用まで冷蔵保管 (48 時間以内)。試験当日に、付属の培養液を 37°C で温める。6 well プレート 4 枚の well にそれぞれ培養液 1mL を加え、モデルを各 well に置き、37°C、CO₂ インキュベーターにて 1 時間以上、培養する。(注意：モデルを 6 well プレートに移す際、モデルの下部に空気を入れないようにする。モデルに寒天が付着している場合は、ペーパータオルで拭き取る。)

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 24 well プレートを 37°C、CO₂ インキュベーターに入れる。付属の培養液を 37°C で温める。1 時間後、6 well プレート 4 枚の well にそれぞれ培養液 1 mL を加え、モデルを各 well に置く。カラーゲングルのみのモデルについても同様の操作を行う。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°C、CO₂ インキュベーターにて培養する。(注意：冷やしてはいけない)

以後は各モデル共通の操作となる。

3) 試験前のモデルの確認 (well に穴や明らかに薄い部分があるような異常な well 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濾紙等で除去する)

4) 被験物質を適用 (希釈等の操作は不要)

100 μ L 又は 100 mg をキット上部に適用。

N=2 に適用。Vitrolife-Skin™ ではカラーゲングルのみのモデル (n=1) にも適用する。これについての操作は細胞を含むモデルと同様に行う。

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葉包紙に包んでおく (用時処理)。葉包紙等で作成した軽い漏斗を用いて well に適用後、画鋲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°C の熱をかけて溶ける場合) 37°C 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)：マイクロマンなどで計り取る。マイクロマン未使用の場合には、被験物質を計りこんだ後、画鋲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、画鋲の後ろで軽く押さえる。

⑥溶液：ピペットマンを用いて 100 μ L 適用。

陰性対照：蒸留水、陽性対照液はピペットマンを用いて 100 μ L 適用。塩化ベンザルコニウムは①の

方法で適用。

- 5) 被験物質順に適用し、3分、60分間処理を行う。処理は常温(15-25℃)。
- 6) 10mL以上のPBSで2回洗浄。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ませた後、2~3回PBS液中でふってすすぐ。これを2回繰り返す。PBSは被験物質、処理毎に交換する。3分処理の洗浄に用いたビーカーは、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) モデルを0.3mLのPBSの入ったwellに移す。
- 8) 全被験物質の処理が終わった後モデルをペーパータオル上などでよくPBSを切る。
EpiDerm™の場合には、MTT 0.5 mg/mLを含む培養液 0.3 mLの入った24 well プレートにモデルの下部に空気を入れずに移す。
Vitrolife-Skin™の場合には、MTT 0.5 mg/mLを含む培養液 1mLの入った24 well プレートにモデル全体を沈める。
- 9) 37℃、CO2 インキュベーターに3時間入れる。
- 10) モデルをWellから取り出し、10 mL以上のPBSの入った2つビーカー中で順次2回洗う。
- 11) EpiDerm™ではペーパータオル上でPBSをよく切り、別の24 well プレートにモデルを移す。
Vitrolife-Skin™の場合には、移す前に直径6 mmのポンチで適用部を打ち貫き、ペーパータオル上でPBSをよく切り、別の24 well プレートにモデルを移す。イソプロパノールをEpiDerm™の場合には2 mL、Vitrolife-Skin™では1mL加えて、フォルマザンを抽出する。
- 12) 水滴が入らないように、シールして冷蔵庫にて一晩保存。
- 13) ピペッティングにより均一化した抽出液を96 well プレートに200 μL/well ずつ移す。
- 14) マイクロプレートリーダーを用いて、OD540または570の吸光度を測定。
イソプロパノールのみもwellに加え、ブランクとする。
- 15) 生データをデータシートに入力。陰性対照を100%として、3分、60分間処理における平均生存率を計算。

EpiDerm™の場合

$$\text{生存率} = 100 \times (\text{処理モデルの吸光度} - \text{blank}) / (\text{陰性対照の吸光度} - \text{blank})$$

Vitrolife-Skin™でコラーゲンゲルのみのモデルを併用する場合

$$\text{生存率} = 100 \times (\text{処理モデルの吸光度} - \text{被験物質を適用したコラーゲンゲルのみの吸光度}) / (\text{陰性対照の吸光度} - \text{陰性対照を適用したコラーゲンゲルのみの吸光度})$$

- 16) 判定モデル
腐食性有り：被験物質を適用した2つのwellの生存率を平均値が3分で生存率50%未満、或いは、3分で生存率50%以上、60分間で15%未満
吸光度と判定結果をデータシートに記載。

以上

<注意事項>

1. 無理な計画を立て、操作を誤らないようにする。
2. 分刻みとなる処理記録の記載を忘れずに。なお、処理モデルの洗いに時間がかかり、処理時間が延びてしまう場合もあります。そのような場合は正確に処理時間を記録する。
3. 計量による適用では100±5 mgの範囲を許容範囲とします。正確に適用量を記載する。
4. 液体の場合、その粘性や重みにより正確な量を適用できないことがあるので、そのような場合は注射用シリンジ等、正確な液量を適用できる器材を使用する。
5. wellへの薬物の適用間隔は30秒以上とることが望ましい。粉体は特に時間がかかる。
6. MTT溶液の作成に際しては超音波処理して完全に溶解する。
7. Vitrolife-Skin™では腐食性物質を適用した場合、リングがモデルからはずれることがある。その場合はゲルの端をピンセットで持ち、以後の操作を遂行する。

腐食性試験吸光度データシート(入力欄)

実験施設

データ記録者

記録月日

モデル名 EpiDerm

試験種類

波長

物質番号入力(下記の96穴プレートの吸光度入力欄の列に対応するように入力してください)

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

96穴プレート吸光度入力欄(吸光度計で測定した吸光度を入力してください。欠測の場合は未記入としてください。)

黄色: ブランクの吸光度、水色: 上に入力した被験物質に対応する吸光度、ピンク: 陰性対照の吸光度

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											

コメントのある方はここに記入して下さい。