

# 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	岡本裕子（株式会社コーセー）
委員	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）
オブザーバー	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（ゲンゼ株式会社）
	久野智弘（東洋紡）
	山口達哉（東洋紡）

## 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ののである。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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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。
- 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。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OECDTG404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 $\alpha$  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 $\alpha$ ) と刺激性の関連については、IL-1 $\alpha$ 、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 $\alpha$  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ー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 $\alpha$  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ールは、MTT 還元法による細胞毒性評価法、IL-1 $\alpha$  測定 の 2 試験ともに正式かつ詳細な SOP (EPISKIN SKIN IRRITATION TEST<sup>42hours</sup>、 DETERMINATION OF IL-1 $\alpha$  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、試験プロトコールについては R38 による識別に特化して作成されている。プロトコールの概略は以下のとおりである。

#### 【EPISKIN SKIN IRRITATION TEST<sup>42hours</sup>】

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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\alpha$  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、1.6mL の培養液をチューブに分取した。チューブは -20°C に保存した。MTT 色素を含む培養液 2.0mL を入れた well にヒト皮膚モデルを移し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 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 $\mu$ l 加えて、抽出した。96 well プレートに抽出液を 200  $\mu$ 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 $\alpha$ CONCENTRATION IN THE CULTURE MEDIUM】

IL-1 $\alpha$  測定のために分取した培養液を用いて実施した。IL-1 $\alpha$  モノクローナル抗体をプレコーデ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<sup>®</sup> (R&D Systems)を用いた。

手順は Quantikine<sup>®</sup> human IL-1 $\alpha$  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 $\alpha$  測定で 50pg/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 $\alpha$  測定で 50pg/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<sup>®</sup> (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 $\alpha$ 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60pg/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考える。

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	86604-75-3	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	350-30-1	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	103-85-7	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	25265-71-8	ECETOC
25	dipropylene glycol monobutyl ether	29911-28-2	TSCA
26	3,4-dimethyl-1H-pyrazole	2820-37-3	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	014864-90-6	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-8S-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	181258-67-7 (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	107898-64-4	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-thiophenecarboxylic 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 191044-63-7) 1-(3-isopropylphenyl)-1-phenylethane (CAS 191044-53-4) 1-(4-isopropylphenyl)-1-phenylethane (CAS 2320-06-1)	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, 6-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl (NB: CAS name from company)	7340-90-1	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-ethyl-hexanoate)], 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 $\alpha$ , 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.

#### 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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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。

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	0.4E	
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	0.82	
5	23.09	23.51	28.72		1.00	4.61	15.80		28.73	13.79	0.7E	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		7.88	13.11	1.8E	
8	1.59	17.46	14.91		1.35	18.81	5.23	1.49	1.67	6.43	1.5E	
9	4.48	6.59	5.56		8.89	31.94	4.26	5.67	2.75	8.98	4.41	
10	5.49	3.84	7.54		13.48	9.37	16.19		3.30	11.37	3.9E	
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	2.8E	
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	18.85	6.37	0.83	0.40	0.25		1.13	15.88	0.1E	
16	2.42	1.61	5.10		2.34	2.48	7.40		3.55	1.81	5.7E	
17	2.71	0.61	1.87		0.96	2.62	0.05		2.82	0.66	0.7C	
18	4.76	1.70	1.46		25.23	4.12	10.12	4.45	44.18	7.40	28.47	
19	5.20	1.53	2.45		10.59	4.86	6.78		3.54	27.13	4.7C	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	2.3C	
23	29.88	11.68	6.66	30.12	1.59	21.64	3.27	11.19	2.16	21.12	6.5E	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	1.6E	
26	1.92	1.70	1.35		13.09	4.45	11.39		0.74	3.10	0.1C	
27	14.90	17.82	13.22		42.94	2.13	13.72	0.94	7.51	7.93	5.7E	
28	3.73	1.95	6.32		6.81	9.22	5.77		5.12	1.80	2.4E	
29	2.28	1.32	0.38		0.54	1.22	1.33		0.44	0.55	1.1C	
30	14.52	4.91	4.32		9.80	21.52	13.54	9.77	4.36	2.33	2.7E	
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		6.92	8.95	1.0E	
33	1.98	2.77	7.27		6.46	13.06	5.76		7.14	6.45	5.07	
34	3.65	9.41	1.44		28.87	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	4.8E	
36	14.16	6.67	2.77		6.40	21.80	9.96	2.72	27.28	0.63	3.6E	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	1.28	7.75	8.08		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		7.99	3.33	6.13	
42	5.25	1.39	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	18.80	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		0.83	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	1.7E	
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	4.48		6.05	5.30	3.4E	
50	5.77	5.68	3.98		2.87	29.41	9.65	7.72	7.22	3.73	5.02	
51	18.87	10.25	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	11.0E	
54	8.51	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	4.4E	
56	2.06	1.44	1.54		30.48	10.88	32.10		8.40	2.89	2.3E	
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	1.18	0.3E	
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 $\alpha$ classification (Cut-Off: 60 mg/ml)				combined classification				combined classification (median over all laboratories)
			L'Oréal	Unilever	Sanofi	Sanofi	L'Oréal	Unilever	Sanofi	Sanofi	L'Oréal	Unilever	Sanofi	Sanofi	
1	2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxy-pyridine hydrochloride	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1-bromo-4-chlorobutane	no label	1	1	1	1									
3	1-bromohexane	R38	1	1	1	1									
4	1-decanol	R38	1	1	1	1									
5	3-chloro-4-fluoronitrobenzene	no label	0	1	1	1	0								
6	3-diethylaminopropionitrile	no label	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	3-mercaptohexane	no label	0	1	1	1	0								
8	4-methylthio-benzaldehyde	no label	0	1	1	1	0								
9	2,6-dimethyl-4-nitrobenzamide	no label	0	0	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	0	0
11	allyl phenoxycetate	no label	0	0	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	0	0
13	1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenylbutan-1-one	R38	1	1	1	1									
15	$\alpha$ -terpineol	R38	1	1	1	1									
16	capryl-isostearate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	2-methyl-3-[(1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl)oxy]-1-propanol, bonyl isomer	no label	1	1	1	1									
18	butyl methacrylate	R38	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	0	0
20	cyclamen aldehyde	R38	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	0	0
22	diethyl phthalate	no label	0	0	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	1	1
24	di-propylene glycol	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	dipropylene glycol monobutyl ether	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	3,4-dimethyl-1H-pyrazole	no label	1	1	1	1									
27	2-isopropyl-2-isobutyl-1,3-dimethoxypropane	R38	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1

28	ethyl cis-4-[4-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)methyl]-1,3-dioxolan-4-yl]methoxyphenylpiperazine-1-carboxylate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	Mixture of: 2-methyl-4-(2',3'-trimethyl-3'-cyclopentan-1'-yl)-4-penten-1-ol 56% (1R,2R) & 40% (1R,2S) isomer	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	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
31	A mixture of isomers: ethyl exo-4-cyclo[5.2.1.0(2.6)]decane-endo-2-carboxylate; ethyl endo-4-cyclo[5.2.1.0(2.6)]decane-exo-2-carboxylate	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	2S-(2-ruyl)-5R-hydroxy-4R-(1R,2-dihydroxyethyl)-6S-hydroxymethyl-1,3-dioxane	no label	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
34	hexyl salicylate	R38	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
36	isopropanol	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	[2-(cyclopropyloxy)ethyl]benzene(cyclopropyl 2-phenylethyl ether)	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	methyl stearate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
41	naphthalene acetic acid	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	sodium 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
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	1	1	1	1	1	1	1	1
44	phenylethylalcohol	no label	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	1	1	1	1	1	1	1	1
46	4-methyl-8-methylnonacyclo[3.3.1.1(3.7)heptan-2-ol	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
47	4-methyl-8-methylnonacyclo[3.3.1.1(3.7)heptan-2-yl acetate	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	2-(formylamino)-3-thiaphenecarboxylic acid	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	isostearic acid monoisopropanolamide	R38	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
50	2-phenylhexanethiolla	no label	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	0	1	0	1	1
52	propyl (2S)-2-(1,1-dimethylpropoxy)propanoate	no label	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

		no label	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
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	0	1	0	1	0	1	0	1
55	terpinyl acetate	R38	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
56	benzenethiol, 5-[1,1-dimethylethyl]-2-methyl	R38	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
57	triethylene glycol	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	triisobutyl phosphate	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
59	(E)-3,7,11-trimethyldodeca-1,4,6,10-tetraen-3-ol	R38	1	1	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	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	9	100.00		
26	no label	0	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	10	90.00		
5	no label	1	0	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	9	66.67		
6	no label	0	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	11	27.27		
53	no label	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	9	22.22		
54	no label	1.3	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	10	100.00		
49	R38	2	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	9	100.00		
27	R38	4	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	10	70.00		
60	R38	2	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	12	58.33		
55	R38	2	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	9	44.44		
56	R38	3.3	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	9	33.33		
43	R38	2	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	10	30.00		
20	R38	2.3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	10	20.00		
3	R38	2.7	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	10	10.00		
18	R38	3	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	10	10.00		

表 7 EPISKIN の MTT 還元法と IL- $\alpha$  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間



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)

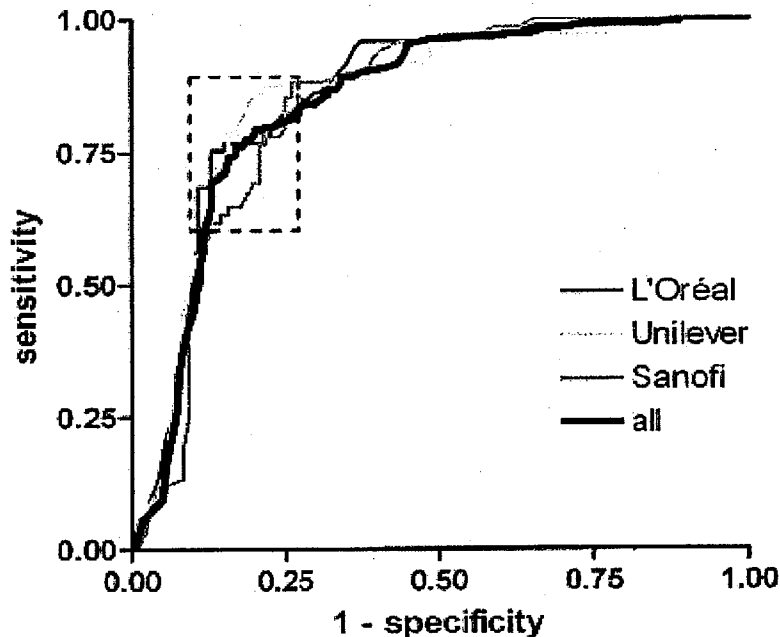


表 9 EPISKIN の施設間再現性 (0:non-irritant、1:irritant) Hoffmann, S., (2006)から引用

chemical number	EU classification	median classification			between-laboratory reproducibility
		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	+
36	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 $\alpha$  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

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、phase1 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 EPISKIN 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., Grandidier, M-H. Portes, P., Rouget, R. and G. Rubinsteen (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)

