

新規試験法提案書

ヒト皮膚モデル（3次元皮膚モデルEPISKIN）を 用いた皮膚刺激性試験代替法

平成22年3月

国立医薬品食品衛生研究所

新規試験法提案書

平成 22 年 3 月 4 日

No. 2009-03

ヒト皮膚モデル（3次元皮膚モデル EPISKIN）を用いた皮膚刺激性試験代替法の提案

平成 22 年 3 月 4 日に東京、国立医薬品食品衛生研究所にて開催された新規試験法評価会議（通称：JaCVAM 評価会議）において以下の提案がなされた。

提案内容：ヒト皮膚モデル（3次元皮膚モデル EPISKIN）を用いた皮膚刺激性試験代替法を定められた方法で適切に利用すれば、化学物質の皮膚刺激性を科学的に評価できる。

この提案書は、ECVAM（European Center for the Validation of Alternative Methods）で提案された資料をもとに、ヒト皮膚モデル（3次元皮膚モデル EPISKIN）を用いた皮膚刺激性試験代替法のため JaCVAM 皮膚刺激性評価委員会によりまとめられた文書を用いて JaCVAM 評価会議が OECD ガイダンス文書 No.34 に従って、評価および検討した結果、その有用性が確認されたことから作成された。

以上の理由により、行政当局の安全性評価方法として「ヒト皮膚モデル（3次元皮膚モデル EPISKIN）を用いた皮膚刺激性試験代替法」の使用を提案するものである。

添付資料一覧

1. JaCVAM 評価会議報告書
2. ヒト皮膚モデル（3次元皮膚モデル EPISKIN）を用いた皮膚刺激性試験代替法のための第三者評価委員会報告書

小島 肇



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 新規試験法評価室
室長

井上 達



JaCVAM 評価会議 議長
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
センター長

JaCVAM 評価会議

井上 達 (医薬品医療機器総合機構)
田中憲穂 (食品薬品安全センター 秦野研究所)
吉田武美 (昭和大学薬学部)
横関博雄 (東京医科歯科大学)
吉村 功 (東京理科大学)
中村和市 (日本製薬工業協会)
岡本裕子 (日本化粧品工業連合会)
大島健幸 (日本化学工業協会)
小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)
見田 活 (医薬品医療機器総合機構)
吉田 緑 (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 病理部)
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部)

オブザーバー :

柴辻正喜 (厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室)
實國慎一 (経済産業省 製造産業局 化学物質安全室)

オブザーバー : JaCVAM 運営委員

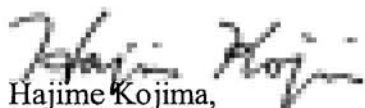
大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)
増田光輝 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部)
小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部)
秋田正治 (日本動物実験代替法学会)

**JaCVAM statement
on the *in-vitro* tests for skin irritation**

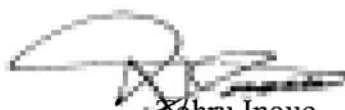
At the meeting concerning the above method, held on 4 March 2010 at the National Institute of Health Sciences (NIHS), Tokyo, Japan, the members of the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) Regulatory Acceptance Board [1] unanimously endorsed the following statement:

Following the review of the results of ECVAM (European Venter for the Validation of Alternative Methods) statement on the validity of *in-vitro* tests for skin irritation, it is concluded that the EPISKIN can be used for distinguishing between skin irritant and non-irritant chemicals within the context of the OECD testing guideline No. 404 on Skin irritation.

The JaCVAM Regulatory Acceptance Board has been regularly kept informed of the progress of the study, and this endorsement is based on an assessment of various documents, including, in particular, the report on the results from the study, and also on the evaluation supported by JSAAE of the study prepared for the JaCVAM ad hoc peer review panel.



Hajime Kojima,
Director,
JaCVAM,
National Centre for Biological Safety and Research (NCBSR)
NIHS,
Tokyo



Kohru Inoue,
Director,
NCBSR,
NIHS,
Tokyo

4 March, 2010

The JaCVAM Regulatory Acceptance Board was established by the JaCVAM Steering Committee, and is composed of nominees from the industry and academia.

This statement was endorsed by the following members of the JaCVAM Regulatory Acceptance Board:

Mr. Tohru Inoue (NIHS)
Mr. Noriho Tanaka (Food and Drug Safety Center)
Mr. Takemi Yoshida (Showa Univ.)
Mr. Hiroo Yokozeki (Tokyo Medical and Dental Univ.)
Mr. Isao Yoshimura (Tokyo Univ. of Science)
Mr. Kazuichi Nakamura (Japan Pharmaceutical Manufacturers Association)
Ms Yuko Okamoto (Japan Cosmetic Industry Association)
Mr. Takeyoshi Oshima (Japan Chemical Industry Association)
Mr. Hiroshi Onodera (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)
Mr. Iku Mitta (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)
Ms Midori Yoshida (NIHS)
Mr. Yoshiaki Ikarashi (NIHS)

The following members were involved as observers in the consultation process, but not in the endorsement process itself.

Mr. Masayoshi Shibatsuji (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Mr. Shinichi Jitsukuni (Ministry of Economy, Trade and Industry)

The following members of the JaCVAM Steering Committee were involved as observers in the consultation process, but not in the endorsement process itself.

Mr. Yasuo Ohno (NIHS)
Mr. Mitsuteru Masuda (JaCVAM)
Mr. Hajime Kojima (JaCVAM)
Mr. Masaharu Akita (JSAAE)

ヒト皮膚モデル（3次元皮膚モデル EPISKIN）を用いた皮膚刺
激性試験代替法の提案

目次

評価会議報告書	-----	1
第三者評価報告書	-----	7
皮膚刺激性 IN-VITRO 試験の妥当性に関する声明書	-----	31
STATEMENT ON THE VALIDITY OF <i>IN-VITRO</i> TESTS FOR SKIN IRRITATION	-----	41

ヒト皮膚モデル（3次元皮膚モデル EPISKIN）を用いた
皮膚刺激性試験代替法の評価会議報告書

JaCVAM 評価会議

平成 22 年（2010 年）3 月 4 日
平成 23 年（2011 年）4 月 20 日改定

JaCVAM 評価会議

井上 達 (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)
田中憲穂 (食品薬品安全センター 秦野研究所)
吉田武美 (昭和大学薬学部)
横関博雄 (東京医科歯科大学)
吉村 功 (東京理科大学)
中村和市 (日本製薬工業協会)
岡本裕子 (日本化粧品工業連合会)
大島健幸 (日本化学工業協会)
小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)
見田 活 (医薬品医療機器総合機構)
吉田 緑 (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 病理部)
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部)

任期：平成 21 年 1 月 1 日～平成 22 年 3 月 31 日

西川秋佳 (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)
田中憲穂 (食品薬品安全センター 秦野研究所)
吉田武美 (昭和大学薬学部)
横関博雄 (東京医科歯科大学)
吉村 功 (東京理科大学)
渡部一人 (日本製薬工業協会)
岡本裕子 (日本化粧品工業連合会)
大島健幸 (日本化学工業協会)
小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)
小笠原弘道 (医薬品医療機器総合機構)
吉田 緑 (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 病理部)
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部)
長谷川隆一 (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
浅野哲秀 (元日東電工株式会社)

任期：平成 22 年 4 月 1 日～平成 24 年 3 月 31 日

オブザーバー：JaCVAM 運営委員

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)
増田光輝 (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)
小島 肇 (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)
秋田正治 (日本動物実験代替法学会)
柴辻正喜 (厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室)
実国慎一 (経済産業省 製造産業局 化学物質安全対策室)

任期：平成 21 年 1 月 1 日～平成 22 年 3 月 31 日

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

関野祐子（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）
増田光輝（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）
小島 肇（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）
秋田正治（日本動物実験代替法学会）
柴辻正喜（厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室）
実国慎一（経済産業省 製造産業局 化学物質安全対策室）

任期：平成 22 年 4 月 1 日～平成 23 年 4 月 30 日

以上

ヒト皮膚モデル（3次元皮膚モデル EPISKIN）を用いた皮膚刺激性試験代替法について、第三者評価委員会からの報告を受け¹⁾、以下の8項目について審議した。7項目までは OECD ガイダンス文書 No. 34 に示された検討項目である²⁾。なお、本動物実験代替法の利用にあたっては、適用範囲を十分に配慮した上で使用されるべきである。

< 審議内容 >

1. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデータは、透明で独立な評価を受けているか。

当該試験法は、ヒト皮膚モデル（3次元皮膚モデル EPISKIN）を用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験法であり、ウサギ皮膚刺激性を予測あるいは Draize 皮膚刺激性試験*を代替するものである。

当該試験法は、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）によって評価され、“ヒト皮膚モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験法の承認に関する ESAC の statement”として公表されている。その内容は、OECD GD34 の原則に準拠され、適切なものである。

以上より、透明で独立した評価がなされていると判断できる。

*（OECD TG 404 および EU 危険物指令 67/548/EEC の付属 Annex V に記載の試験法 B.4）

2. 当該試験法で得られるデータは、対象毒性を十分に評価あるいは予測できるものであるか。データは、当該試験法と従来の試験法の、代替法としての繋がりを示しているか。あるいは（同時に）そのデータは、当該試験法と、対象としているあるいはモデルとしている動物種についての影響との繋がりを示しているか。

- 皮膚刺激性は、皮膚表面への直接投与による可逆的な皮膚の炎症反応を引き起こす性質である。
- 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じる。
- EPISKIN は、角質層の下に表皮細胞を持つ表皮モデルであり、被験物質曝露後に接触した表皮細胞の生存率を指標としている。
- 起炎性サイトカイン（IL-1 α ）を測定することで炎症反応を確認している。
- よって当該試験法で得られるデータは、動物を使用した Draize 皮膚刺激性試験法と類似した反応を測定したものであり、従来の試験法との繋がりを示している。

3. 当該試験法は、ハザードあるいはリスク、あるいはその両方を評価するのに有用であるか。

当該試験法は、化学物質の皮膚刺激性を識別する目的で用いられる皮膚刺激性試験法として有用である。化学物質の皮膚刺激性識別に用いられる皮膚刺激性試験法*の結果を予測できる。

ハザードを評価できる種々の分子構造、置換基、物理化学的性質を持つもの 58 物質が評価され、判定識別一致率（中央値による）は、49 種（49/58 : 84.5%）であった。

よって、提供されているデータから、当該試験法は暴露された物質のハザードを評価するのに有用である。

*OECD TG 404 および、EU 危険物指令 67/548/EEC の付属 Annex V に記載の試験法 B.4

4. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプ

プログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件及び適用できない条件が明確であるか。

当該試験法で検討されている被験物質には、Chemicals Selection Sub-committee(CSSC)によって58種が選択され、その内訳は、EU分類では、R38表示物質25種、no labelが33種、GHS分類では、Irritant 13種、Mild irritant 17種、non-irritant 28種、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種である。

適用限界として、MTT還元法であるから、着色による影響や還元物質による妨害等を受ける。

これらの被験物質には、種々の分子構造、置換基、物理化学的性質が含まれているが、製品の用途が明確でない。したがって、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている適用範囲は不明確である。

5. 当該試験法は、プロトコルの微細な変更に対して十分頑健で、適切な訓練経験を持つ担当者と適切な設備のある施設において、技術習得が容易なものであるか。

3施設による結果が、すべて一致した物質数は50種(50/58:86.2%)であり、施設間再現性に問題はなく、技術の易移転性は良好である。

プロトコルが定められていて、試験成立条件を満たす限りで頑健である。

当該試験法は通常の培養設備と培養技術で可能である。MTT色素を添加培養後専用パンチでくり抜く技術は、訓練が必要である。

6. 当該試験法は、時間的経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。

当該試験法の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ので、時間的には有用性がある。

ヒト皮膚モデルの価格は12well/約10万円である。

7. 当該試験法は、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に、新しい試験法あるいは改訂試験法であることが正当化されているか。

- 炎症反応の再現を確認しているので、科学的に妥当である。
- 動物を使用せず、動物福祉面から代替法として妥当である。
- 日本では、入手に時間がかかり、購入後に長期間保存はできない難点がある。
- 市販品であり、製造方法の変更や安定供給については注意が必要であるが、改良試験法(代替)として正当化されうる。

8. 安全性評価のための行政的資料として、受け入れ可能な試験法であるか。

本試験法は、化学物質の4時間適用による皮膚刺激性を評価する方法である。その範囲において、行政的な利用は可能である。

医薬部外品、化粧品に必要とされている24時間適用による皮膚刺激性への応用可能性については評価されていない。

以上の審議の結果、JaCVAM評価会議は、次のように結論した。

ヒト皮膚モデル(3次元皮膚モデル EPISKIN)を用いた皮膚刺激性試験代替法は、倫理的に優れた試

験法であり、適切な利用条件下で適用するならば、化学物質一般の皮膚に対する刺激性を科学的に評価可能である。

参考文献

- 1) ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法の第三者評価報告書
- 2) OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO(2005) 14

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 α の放出測定による判定を追加することが、MTT 還元法で得られた陰性判定を確定するために有効な補助法であると判断している。

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

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

- ⑧ バリデーション結果が専門家に評価されている点から得られたデータの信頼性・質・正確性は国際水準を満たしていると判断できる。
- ⑨ データ解析において、施設内変動性、施設間変動性について評価しており、施設内再現性・施設間再現性に問題はないものである。
- ⑩ 58種の試験資料は、in vivo データが入手できる既存の信頼できる3つのデータベースに登録されているものから選択されており、選択基準は妥当である。陰性コントロールはPBS、陽性コントロールは0.5%SDSが設定されている。

- ⑪ 以上より、3次元皮膚モデルEPISKINを用いたin vitro皮膚刺激試験法の承認に関するESACの評価結果を検討した結果、ESACの評価で追加されたIL-1 α の放出測定は、バリデーション評価が終了していない点、その改善効果わずかであり、あくまでも補助的な位置づけにとどまることから、MTT還元法による評価を基本として評価し、IL-1 α の放出測定は参考データとして取り扱うのが妥当と判断された。MTT還元法だけで評価した場合でも、結果の再現性、予測能力、信頼性は妥当であったことから、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 α の放出量を指標としている。MTT 還元法による皮膚モデルの細胞毒性評価については、事前の検討においてその妥当性が検討され採用されている。サイトカイン放出 (IL-1 α) と刺激性の関連については、IL-1 α 、AK (adenylate kinase) および IL-8 を指標に検討した結果、刺激性の過程と関連が考えられること、購入可能なキットがあることから IL-1 α が有効であるとして採用されているが、その詳細な説明については記載されていない。

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

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

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

2. 試験プロトコール構成の妥当性

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

分けて実施された。Phase 1 は、それまでのプレバリデーションで最適化検討された試験プロトコ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 α の放出量の測定が SOP に追加された。SOP を最適化し、技術伝達を実施した後、Phase 2 は、3 施設で実施された。

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

R38 表示も国連による GHS 表示も OECD TG 404 により得られた皮膚刺激性結果をもとに分類されていることから、正式バリデーションでは、得られた in vitro 結果と GHS 分類との解析も考慮して試験物質を選択しているが、試験プロトコールについては 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^{42hours}】

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

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

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

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

合に役に立つ方法であると記載されている。

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

上記2試験法の判定基準の妥当性は、得られた結果解析により検証された。

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

一方、IL-1 α 測定の判定基準は、SOPでは50pg/mlと設定され、バリデーションは実行されたが、同様の結果解析により、判定基準を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) ECVM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL-1 α , 135pp, Will be available under Downloads of study documents, at <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/index.htm>,
- 2 Spielmann, H., et al., (2007) The ECVAM International Validation Study on in vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assay and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

5. データの質

正式バリデーションの Phase 2 の結果を基に評価した。

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

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

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

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

6. 試験結果とその解析

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

表 3 各施設における MTT 還元法の個別試験結果の標準偏差(S.D.)

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

chemical number	L'Oréal run				Unilever run				Sanofi run			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	0.77	0.15	1.20		1.22	3.44	0.57		0.43	1.08	0.4E	
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	23.61	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	6.49	3.84	7.64		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	11.68	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		2.62	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	2.69	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 α 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
2	1-bromo-4-chlorobutane	no label	1	1	1	1									1
3	1-bromohexane	R38	1	1	1	1									1
4	1-decanol	R38	1	1	1	1									1
5	3-chloro-4-fluoronitrobenzene	no label	0	1	1	1	0								1
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								1
8	4-methylthio-benzaldehyde	no label	0	1	1	1	0								1
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									1
15	α -terpineol	R38	1	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									1
18	butyl methacrylate	R38	1	1	1	1									1
19	2,5-dimethyl-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-yl acetate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	cyclamen aldehyde	R38	1	1	1	1									1
21	A mixture of: 5-exo-decylbicyclo[2.2.1]hept-2-ene; 5-endo-decylbicyclo[2.2.1]hept-2-ene	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	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									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-thiophenecarboxylic 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
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
55	terpinyl acetate	R38	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
57	triethylene glycol	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	triisobutyl phosphate	R38	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
60	bis[1-methylimidazol](2-ethyl-hexanoate)], zinc complex	R38	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

表 5 EPISKIN の MTT 還元法による皮膚刺激性の予測性能 Hoffmann, S., (2006)から引用

	specificity		sensitivity	
	n	%	n	%
all runs (individually classification)	311	79.74	236	73.73
three valid runs (individually classification)	285	80.70	210	77.62
all runs (median classification)	99	80.80	75	74.67
three valid runs (median classification)	95	82.15	70	78.56

表 6 EPISKIN による MTT 還元法で結果が一致しなかった試験物質一覧 Hoffmann, S., (2006)から引用 (太字は識別が違っていたもの。グレーのセルは SD が >18)

chem. no	EU class	dominant median	L'Oréal run				Unilever run				Sanofi run				total number of runs	misclassifying runs [%]
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
2	no label	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	100.00	
17	no label	1.7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	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- α 測定法の追加による皮膚刺激性の予測性能 Hoffmann, S., (2006)から引用

	n	MTT	MTT + PM-total
specificity	99	82.83%	78.79%
sensitivity	75	74.67%	90.67%

7. 試験法の正確性(再現性、頑健性)

MTT 還元法について、4 種の統計手法による施設内再現性を表 8 にまとめた。すべてのデータを基にした解析とデータ受け入れ基準をクリアした 3 回のデータのみによる解析結果は同等であった。分散分析で有意差があった試験物質の数は施設間で差が認められた。しかし、すべての試験施設において、試験の 90%以上が SD18%以下と試験設定基準に適合しており大きな間

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)

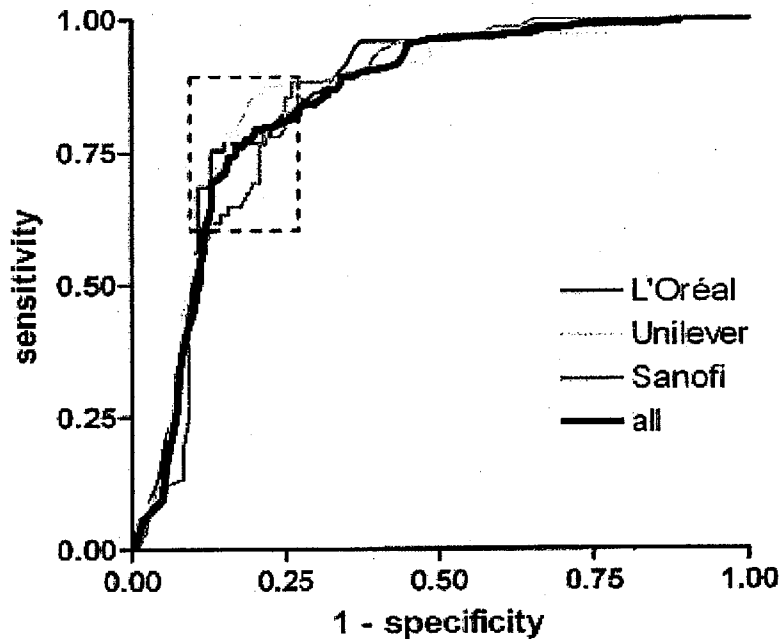


表 9 EPISKIN の施設間再現性 (0:non-irritant、1:irritant) Hoffmann, S., (2006)から引用

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 α 測定については、各施設で試験実施試験物質が異なることから、陽性対照と陰性対照の結果をもとに評価したが、両者ともに施設間で結果が異なった。共通して実施された試験物質の中で非表示の 25 種中 22 種は識別が一致しており、良い施設間再現性が認められている。しかし、R38 表示物質の種では結果が一致したものは 1 種のみであった。

各施設の MTT 還元法による結果の平均値のばらつき(標準偏差)について、物質ごとに施設間変動を評価している。試験物質の特性に応じて、施設間変動の大きさが異なるので結果の解釈について注意が必要である。また、ESAC の Peer review panel では施設間での結果の違い

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 α 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 α 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 α 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 α 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 α 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 α の放出測定は参考データとして取り扱うのが妥当と判断された。その場合でも、結果の再現性、予測能力、信頼性は妥当であった。

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^{42 hours} Assay for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals, EPISKIN Skin Irritation Test^{42 hours} S.O.P.
4. ECVAM Skin Irritation Validation Study- Validation of the EPISKIN Skin Irritation Test^{42 hours} Assay for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals, S.O.P. EPISKIN Skin Irritation Test^{42 hours} Determination of IL-1 α 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 α , 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)

欧州委員会
JRC 理事会
共同研究センター
保健・消費者保護研究所
欧州代替法バリデーションセンター(ECVAM)

皮膚刺激性 IN-VITRO 試験の妥当性に関する声明書

2007年4月26-27日にイタリアのイスプラにある欧州代替法バリデーションセンター(ECVAM)で行われた第26回会議において、ECVAM 科学諮問委員会の非理事会メンバー(non commission members)は全員一致で以下の声明を支持した。この支持表明はバリデーションの対象となった以下の in-vitro 試験に関する科学的報告書およびピア・レビューを受けた文献を検討した結果である。

1. EpiDerm(MTT の還元および IL-1 α の放出);
2. EPISKIN(MTT の還元および IL-1 α の放出);

両者のうち、EPISKIN 法に、(付属書類に示された試験の成績に基づいて)結果の判定に MTT の還元を用いた場合、ウサギ皮膚刺激性を予測するための、また R38 と表示される皮膚刺激物質と非表示物質(非刺激物質)を区別するための Draize 皮膚刺激性試験(OECD TG 404 & EU 危険物指令 67/548/EEC の Annex V の B.4)を代替する、信頼性があり適切なスタンド・アローン(stand alone)法である証拠が得られた。現時点では、特異性を損なわずに感受性を向上させる可能性があるという理由で、IL-1 α 放出量測定を追加することが MTT 還元法の有効な補助法と見なすことができる。この判定法は MTT 還元法で得られた陰性判定を確定するために使用可能であろう。

EpiDerm モデルは特異性が高く、現時点では、皮膚刺激性物質を高い信頼性を以って同定できたが、陰性と判定された結果は更なる試験が必要であろう(例えば、OECD TG 404 に示されているような、段階的ストラテジーによって)。EpiDerm はプロトコールを改良すれば、試験の感受性が向上するはずである。

この支持表明はピア・レビューのために準備された資料を参考にしている。また、独立した専門家が定義された判定基準に対して資料を評価した意見、Management Team によって作成された追加資料、バリデーションプロセスを監督するために任命された Peer Review Panel の意見を参考にしている。

Thomas Hartung
ユニットチーフ
ECVAM

保健・消費者保護研究所
共同研究センター
欧州委員会
イスプラ

2007年4月27日

1. ESAC は欧州委員会によって設立され、欧州連合(EU)加盟国、産業界、大学、動物愛護団体および欧州委員会の関連部門の代表によって構成されている。

この声明は ESAC の以下のメンバーによって支持された。

Ms Sonja Beken (Belgium)
Ms Dagmar Jírová (Czech Republic)
Mr Tõnu Püssa (Estonia)
Mr Lionel Larue (France)
Mr Manfred Liebsch (Germany)
Ms Annalaura Stamatì (Italy)
Mr Jan van der Valk (The Netherlands)
Mr Constantin Mircioiu (Romania)
Mr Albert Breier (Slovakia)
Mr Argelia Castanõ (Spain)
Mr Patric Amcoff (Sweden)
Mr Jon Richmond (UK)
Mr Carl Westmoreland (COLIPA)
Ms Vela Rogiers (ECOPA)
Ms Nathalie Alépée (EFPIA)
Mr Robert Combed (ESTIV)
Mr Hassao Seibert (European Science Foundation)

以下の欧州委員会の行政部門およびオブザーバー組織は諮問プロセスには参加したが、支持プロセスには参加していない。

Mr Thomas Hartung (ECVAM; chairman)
Mr Jens Linge (ECVAM; ESAC secretary)
Ms Susanna Louhimies (DG Environment)
Ms Barbara Mentré (DG ENTR)
Ms Grace Patlewicz (ECB, DG JRC)
Mr Christian Wimmer (DG Research)
Mr Hajime Kojima (JACVAM)

Ms Laurence Musset (OECD)
Mr Barry Philips (Eurogroup for Animal Welfare)
Mr William Stokes (Spain)
Mr Patric Amcoff (NICEATM, USA)

付属書類

ECVAM の皮膚刺激性試験法バリデーションについての概略

広範囲にわたる最適化とプレバリデーション活動(下記、SIVS の背景を参照)の後に、ECVAM は 2003 年に 3 種の in vitro 試験についての正式なバリデーションを開始した。そのうちの 2 種は再構成ヒト表皮モデル(EPISKIN, EpiDerm)を用いるもので、もう一種の skin integrity function test(SIFT)はマウスの皮膚を用いる ex vivo 試験である。

このバリデーションの目的は、58 種類の試験物質セットを用いてこれらの方法の妥当性(予測能力)と信頼性(施設内および施設間の再現性)を評価することにより、現在白兎を用いて行われている Draize 皮膚刺激性試験(EU B.4 method; OECD TG 404)を代替することにあつた。

このバリデーションの最終目的は、皮膚刺激性物質を R38 と表示し、非刺激性物質を表示しない欧州のシステム(EU classification system)に従った in vivo 試験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つた。さらに、化学物質の選択においては国際統一分類システム(Globally Harmonized Classification System, GHS)の 3 つのカテゴリー[強度(カテゴリー2)、軽度(カテゴリー3)、および非刺激性(カテゴリーなし)]の代表的なものを選択し、GHS の分類にしたがって、結果を事後に評価できるようになっていた。

このバリデーションは、OECD の *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (No.34)に示されている原則と基準に従って行われた。さらに、商業生産されているヒト皮膚モデルの品質を確認するため、ECVAM 皮膚刺激性試験バリデーション(ECVAM Skin Irritation Validation Study, SIVS)の開始時に、EPISKIN、EpiDerm の生産施設の監査が独立の審査機関によって行われた。

このバリデーションは、ECVAM がスポンサーとなり、主契約機関(ZEVET-BfR, ドイツ)が研究をコーディネートし、プロジェクト管理は Management Team (MT、メンバーについては表 1 を参照) によって行われた。

表1 SIVS Management Team の構成

Chair (Dr Phil Botham)
Co-chair (Dr Julia Fentem)
Sponsor representative (Dr Valérie Zuang, <i>alternate</i> : Dr Chantre Eskes)
Independent biostatistician (Dr Sebastian Hoffmann)
Representative of the main contractor (Dr Horst Spielmann)
Representative of the CSSC (Dr Andrew Worth)
ECB customer (Dr Thomas Cole)
<u>Representatives of the test systems:</u>
EPSKIN (Dr Roland Roguet)
EpiDerm (Dr Manfred Liebsch)
<u>Observers from the US:</u>
ICCVAM (Dr Karen Hamernik; <i>alternate</i> : Dr Abby Jacobs)
NICEATM (Dr William Stokes; <i>alternate</i> : Dr Ray Tice)

SIVS で使用される試験物質を決定するために、Chemicals Selection Sub-Committee (CSSC) が任命された。試験物質は高基準の *in vivo* データを有するもので、それに対して *in vitro* 測定データを比較できるものを選定する必要があった。

European Centre for the Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC) データベースからの皮膚刺激性・皮膚腐食性標準物質はそれまでの研究に広く用いられてきたので、CSSC は可能な試験物質を得るために新規の情報源を利用することが求められた。この目的で、新規に販売される化学物質に関する申請制度の中心的情報集積である欧州連合の New Chemicals Database (NCD) から新規の化学物質が選択された。更に、製造・販売を行っている主要な企業からの即使用が可能な既存の化学物質も、Toxic Substance Control Act (TSCA) データベースや US Environmental Protection Agency (EPA) および ECETOC のデータベースのようなデータベースから得られた。既にプロトコールの最適化やプレバリデーションの段階で用いられた化学物質は排除された。

既存物質 25 種、NCD から選択された新規物質 33 種、総計 58 種の化学物質が選択され、SIVS の試験に用いられた。

選択された化学物質数は (a) R38 を非分類の物質から区別するために統計的に充分であり、(b) GHS 分類システムによる試験の性能を事後評価できるように、この 3 カテゴリーをバランスよく代表しており、(c) 浮腫や発赤スコアが 0 であるような可能な限り多岐に渡る物質群から成り立っている。これらの化学物質は、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。

選択された化学物質は、さまざまな分子構造、置換基、機能や利用分野、さらに、広い物理化学的性質を示す。これらはチャレンジングな化学物質のセットであり、代替法がバリデートされようとしている現在の産業状況に対応している。

ECVAM SIVS の第一フェーズでは、NCD から得られた 20 種の化学物質(刺激性物質:9 種、非刺激性物質:11 種)が、盲検状態で主導施設(EPISKIN – L'OREAL, EpiDerm – ZEBET, SIFT - Syngenta)において試験された。用いられた方法(Standard Operating Procedures, SOP's)は詳細に検討され、最適化されたプロトコールが ECVAM プレバリデーション研究後に作成された。

ヒト皮膚モデルを用いた試験に関しては、試験物質を皮膚モデルの表面に 15 分接触させ、更に 42 時間培養後、MTT 試験法を用いて細胞の生存率に与える化学物質の影響を評価する。

フェーズ1および2で用いられた MTT 法の判定基準を以下に示す。

「暴露および後処理培養後における組織の生存率が 50%以下の場合、試験物質は皮膚刺激性(R38)であると考える」

細胞生存率(MTT 還元)が判定基準として用いられた場合、これら二つの皮膚モデルはバリデーションの Management Team(MT)によって設定された容認基準を満たしていた。

EPISKIN と EpiDerm による試験の特異性(非刺激性物質の正確な予測)は共に 91%であったが、感度(R38 皮膚刺激性物質の正確な予測)はそれぞれ 67%と 56%であった。しかしながら、刺激性物質と識別できなかったほとんどの化学物質は、欧州連合の分類方式から見て刺激性物質と非刺激性物質の境界にあるものであったので、MT は EpiDerm と EPISKIN の予測性能はフェーズ 2 へと進むのに充分と判断した。一方、SIFT の予測性能は充分でないと判断された。SIFT については、特に固体および非界面活性剤の測定に関して、試験プロトコールと予測モデルを主導施設において再評価することが勧められた。

フェーズ2では58種の化学物質すべてが、異なった3つの施設でそれぞれの再構成皮膚モデルに対して試験された。EpiDerm の試験はドイツの ZEBET(主導施設)、アメリカ合衆国の Institute for In vitro Sciences (IIVS)、そしてドイツの BASF によって行われた。EPISKIN の試験はフランスの L'OREAL(主導施設)、イギリスの Unilever、そしてフランスの Sanofi-Synthelabo が担当した。

盲検性を確かにするために、化学物質は再度コード付けした。EpiDerm と EPISKIN の判定基準はそれまでに実施されたすべての試験と同様に、MTT の還元によって測定された細胞生存率である。しかしながら、刺激性が予測できる閾値よりも細胞生存率が低くならなかった化学物質について感度を改善できるかを検討するために、第二の判定基準、インターロイキン-1 α の放出量の測定が加えられた。この第二の判定基準は EPISKIN を試験したすべての研究施設と EpiDerm を試験した主導施設で用いられた。

フェーズ2で用いられた MTT 法と IL-1 α を組み合わせた場合の判定基準は以下の通りである。

<p>試験物質は以下の場合、皮膚に対して刺激性と考える； 15 分の暴露および 42 時間の後処理培養後における組織の生存率が 50%を越え (>50%)、さらに IL-1αの放出が 60pg/ml を越える (>60pg/ml) 場合</p>
<p>試験物質は以下の場合、皮膚に対して非刺激性と考える； 15 分の暴露および 42 時間の後培養後における組織の生存率が 50%を越え (>50%)、さらに IL-1αの放出が 60pg/ml 以下である (\leq60pg/ml) 場合</p>

フェーズ 2 における試験の予測性能を表 2 に示す。

許容基準に適合した 3 回以上の個別の実験結果から得られた判定の一致性による施設内再現性は、EPISKIN で 93.9% (MTT)、EpiDerm で 96.0% (MTT) であった。各施設で得られた中央値による判定が一致した割合で評価した施設間再現性は EPISKIN で 89.5%、EpiDerm で 88.5% であった。

表 2. EPISKIN と EpiDerm の予測性能 (MTT: 研究施設ごとの中央値による判定をもとに算出; MTT + IL-1 α : 試験物質および研究施設ごとの個別実験における平均生存率から得られた判定をもとに算出)

	EPISKIN (MTT)	EPISKIN (MTT+IL1-α)	EpiDerm (MTT)*
感度	74.7%	90.7%	57.3%
特異性	80.8%	78.8%	83.8%
一致性	78.2%	83.0%	72.4%

* EpiDerm プロトコールについては IL-1 α の測定を行っても、結果の改善は見られなかった。

研究結果は、EPISKIN がウサギ皮膚刺激性試験法の代替と考えられること、また EpiDerm は今後の代替法の一つの候補と考えられること、という提案とともに、ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) に送られた。

ECVAM 皮膚刺激試験法バリデーション研究の背景

1998年、ECVAM Skin Irritation Task Force (ECVAM 皮膚刺激タスクフォース) は *in vitro* 皮膚刺激性試験の現状についての報告書を発表し、ウサギにおける *in vivo* 試験、*in vivo* ヒトパッチ4時間テストのデータに呼応し、ヒト皮膚モデル EpiDerm による *in vitro* データが利用できる、有望な 10 種の「チャレンジ化学物質」を提案した。

新規 *in vitro* 試験システムの提案者は、これらの物質に対する新規 *in vitro* 皮膚刺激性試験プロトコールによって得られたデータの提出を促し(1)、これらの試験を ECVAM のプレバリデーションに取り上げるかどうかを評価することとなった。同時に、欧州連合第4次枠組み共同プロジェクトにより、いくつかのヒト再構成皮膚モデルを用いてヒト皮膚刺激性の予測のために様々な判定基準の適正性が評価され、細胞生存率(MTTの還元)と IL-1 α の放出が最も有力な判定基準であることが示された。

MTT の還元と IL-1 α の放出は、高い相関を示し、IL-1 α はより激しい変動を示すことから、ヒト皮膚モデルについては MTT の還元が最も適した判定基準として提案された(2)。

ECVAM TF に提出された試験法は 5 つ[還元したブタ耳、Prediskin、SIFT、EPISKIN、EpiDerm]で、ECVAM のプレバリデーション研究に取り上げる有力な方法と考えられた。しかしながら、プレバリデーション研究では、フェーズ 2 において、2 つの試験法は再現性に乏しいことが分かった。その他の方法[SIFT、EPISKIN と EpiDerm]は良好な施設内および施設間再現性を示した一方で、ECVAM プレバリデーション研究のフェーズ 3 で試験された 20 種の化学物質について皮膚刺激性を正確に予測することはできなかった(3)。

従って、ECVAM Management Team はこれらの 3 つの試験法を正式なバリデーションにかける前に、詳細検討を行い最適化することを提案した。

2001年、ECVAM Skin Irritation Task Force と詳細検討を担当していた施設は再び、正式なバリデーションへの方策についての会議をおこなった。プレバリデーションで得られた EPISKIN と EpiDerm の MTT 還元についての事後評価は同等の感受性を示したので、正式なバリデーションを開始する前に、双方の皮膚モデルに共通なプロトコールを作成することが提案された(4)。

2002年11月、ECVAM Skin Irritation Task Force (TF) は SIFT(5)と皮膚モデル試験法(6)の詳細検討を議論し、正式なバリデーションへ移行することができると結論付けた。しかしながら、すべての詳細検討はプレバリデーション研究で用いられた 20 の化学物質を使用して行われていたので、TF は SIVS を二つのフェーズに分けて行うことを勧めた: 最初のフェーズ(フェーズ 1)では、新規の物質を管理された盲検条件で試験し、主導施設である Syngenta(SIFT)、L'OREAL (EPISKIN)、ZEBET (EpiDerm)によって行われた最適化検討の結果を確認する。もし、フェーズ 1 での結果が有望であるならば、その試験法は第二のフェーズ(フェーズ 2)に進むことにし、すなわち、一つの試験法を 3 施設で検討することになる。

2003年の間に EPISKIN 試験法は L'OREAL によって更に詳細検討が進み、化学物質による微弱な反応の回復や有意な影響の増幅が確認できることから、15 分間の

化学物質暴露に続く、組織の後処理培養時間を42時間に延長することとした。2003年5月に、ECVAM Stakeholder Workshopは正式なバリデーション研究を行うことを勧告し、試験法は欧州連合の分類システム(R38 ラベル 対 非ラベル)識別に従って開発され最適化されているので、この分類システムの予測に注力するよう求めた。

L'OREALとZEBETはECVAM SIVSに用いられる共通のプロトコルを開発することで協力し、手始めにECVAMのプレバリデーションで用いられた20種のチャレンジ化学物質を評価した。

2004年、ECVAM SIVS Management Teamの要請によって、SIVSフェーズ1と同時に、ECETOC対照データベース(ECETOC Report No.66)で推奨されている非腐食性化学物質をすべて試験することによって、更にデータの数が増加した。

二つの皮膚モデルを用い、共通のプロトコルによって得られたデータはかなり有望で、2005年に連続して発表された(7、8)。

欧州委員会による2003年6月のECVAM SIVSに関する公募に応じたBfRとは2003年11月に契約を交わした。2003年11月17-18日のSIVS Management Team(MT)の第一回会議を以って、バリデーションが正式に開始された。

皮膚刺激性試験バリデーションの結果および試験物質の選定については、現在発表原稿を作成中である。

参考資料

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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

6. 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
7. 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
8. 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



EUROPEAN COMMISSION
DIRECTORATE GENERAL JRC
JOINT RESEARCH CENTRE
Institute for Health and Consumer Protection
European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)

STATEMENT ON THE VALIDITY OF *IN-VITRO* TESTS FOR SKIN IRRITATION

At its 26th meeting, held on 26-27th April, 2007 at the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Ispra, Italy, the non-Commission members of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC)¹ unanimously endorsed the following statement:

After a review of scientific reports and peer reviewed publications on the following range of *in-vitro* tests, which had been subjected to a full validation study:

1. EpiDerm (with MTT reduction and IL-1 α release);
2. EPISKIN (with MTT reduction and IL-1 α release);

of these, the EPISKIN method showed evidence of being a reliable and relevant stand-alone test for predicting rabbit skin irritation, when the endpoint is evaluated by MTT reduction, and for being used as a replacement (**based on the performance of the assay as specified in the annex**) for the Draize Skin Irritation Test (OECD TG 404 & Method B.4 of Annex V to Directive 67/548/EEC) for the purposes of distinguishing between R38 skin irritating and no-label (non-skin irritating) test substances. At the present time, the IL-1 α endpoint should be regarded as a useful adjunct to the MTT assay, as it has the potential to increase the sensitivity of the test, without reducing its specificity. This endpoint could be used to confirm negatives obtained with the MTT endpoint.

At this time, due to its high specificity, the EpiDerm model reliably identifies skin irritants, but negative results may require further testing (e.g. according to the tiered strategy, as described in the OECD TG 404). Improvement of the EpiDerm protocol should be made to increase the level of sensitivity.

This endorsement takes account of the dossiers prepared for peer review; the views of independent experts who evaluated the dossiers against defined validation criteria; supplementary submissions made by the Management Team; and the considered view of the Peer Review Panel appointed to oversee the process.

Thomas Hartung
Head of Unit
ECVAM
Institute for Health & Consumer Protection
Joint Research Centre
European Commission
Ispra

27 April 2007



EUROPEAN COMMISSION
DIRECTORATE GENERAL JRC
JOINT RESEARCH CENTRE
Institute for Health and Consumer Protection
European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)

1. The ESAC was established by the European Commission, and is composed of nominees from the EU Members States, industry, academia and animal welfare, together with representatives of the relevant Commission services.

This statement was endorsed by the following members of the ESAC:

Ms Sonja Beken (Belgium)
Ms Dagmar Jírová (Czech Republic)
Mr Tõnu Püssa (Estonia)
Mr Lionel Larue (France)
Mr Manfred Liebsch (Germany)
Ms Annalaura Stamatì (Italy)
Mr Jan van der Valk (The Netherlands)
Mr Constantin Mircioiu (Romania)
Mr Albert Breier (Slovakia)
Ms Argelia Castaño (Spain)
Mr Patric Amcoff (Sweden)
Mr Jon Richmond (UK)
Mr Carl Westmoreland (COLIPA)
Ms Vera Rogiers (ECOPA)
Ms Nathalie Alépée (EFPIA)
Mr Robert Combes (ESTIV)
Mr Hasso Seibert (European Science Foundation)

The following Commission Services and Observer Organisations were involved in the consultation process, but not in the endorsement process itself.

Mr Thomas Hartung (ECVAM; chairman)
Mr Jens Linge (ECVAM; ESAC secretary)
Ms Susanna Louhimies (DG Environment)
Ms Barbara Mentré (DG ENTR)
Ms Grace Patlewicz (ECB, DG JRC)
Mr Christian Wimmer (DG Research)
Mr Hajime Kojima (JACVAM)
Ms Laurence Musset (OECD)
Mr Barry Philips (Eurogroup for Animal Welfare)
Mr William Stokes (NICEATM, USA)

Annex

General information on the ECVAM skin irritation validation study

After extensive optimisation and prevalidation activities (see background to the SIVS here below), ECVAM launched a formal validation study on three *in vitro* test systems in 2003. Two of the assays employed reconstituted human epidermis models (EPISKIN, EpiDerm) and one, the skin integrity function test (SIFT) employed *ex vivo* mouse skin. The aim of the study was to replace the regulatory Draize skin irritation test (EU B. 4 method; OECD TG 404) currently performed on albino rabbits by assessing the relevance (predictive capacity) and reliability (reproducibility within and between laboratories) of these test systems with a set of 58 coded test chemicals. The goal of the study was to evaluate if the *in vitro* tests would predict *in vivo* classification according to the EU classification system using the risk phrase R38 for skin irritants and no classification for non irritants. In addition, the chemical selection was representative for the three categories [strong (category 2), mild (category 3) and non-irritants (no category)] of the Globally Harmonised classification System (GHS) for permitting a post-hoc evaluation of the results according to GHS. The validation study was conducted according to the principles and criteria documented in the OECD *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (No. 34). Furthermore, to ensure a high quality of the commercially produced human skin models, the facilities of the producers of the human skin models EPISKIN and EpiDerm were evaluated by independent auditors at the beginning of the ECVAM Skin Irritation Validation Study (SIVS). The study was sponsored by ECVAM, coordinated by a main contractor (ZEBET-BfR, Germany) and managed by a Management Team (MT; see table 1 for the composition of MT).

Table 1. Composition of the Management Team of the SIVS

Chair (Dr Phil Botham)
Co-chair (Dr Julia Fentem)
Sponsor representative (Dr Valérie Zuang, <i>alternate</i> : Dr Chantra Eskes)
Independent biostatistician (Dr Sebastian Hoffmann)
Representative of the main contractor (Dr Horst Spielmann)
Representative of the CSSC (Dr Andrew Worth)
ECB customer (Dr Thomas Cole)
<u>Representatives of the test systems:</u>
EPISKIN (Dr Roland Roguet)
EpiDerm (Dr Manfred Liebsch)
SIFT (Dr Jon Heylings)
<u>Observers from the US:</u>
ICCVAM (Dr Karen Hamernik; <i>alternate</i> : Dr Abby Jacobs)
NICEATM (Dr William Stokes; <i>alternate</i> : Dr Ray Tice)

A Chemicals Selection Sub-Committee (CSSC) was appointed to identify test chemicals to be used in the SIVS having high quality existing *in vivo* data with which to correlate the *in vitro* measurements. Since chemicals from the European Centre for the Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC) database of reference chemicals for skin irritation/skin corrosion had been extensively used in the preceding studies, the CSSC was requested to make use of novel sources for potential test

chemicals. For this purpose chemicals were selected from the New Chemicals Database (NCD) which is the central archive within the EU notification scheme for new commercial chemicals. In addition, existing chemicals readily available from major manufacturing and/or distribution sources were selected from alternative databases such as the Toxic Substance Control Act (TSCA) database maintained by the US Environmental Protection Agency (EPA) and the ECETOC database, excluding those chemicals used in the previous optimisation and prevalidation phases.

A total set of 58 chemicals comprising a set of 25 existing chemicals and 33 chemicals from the NCD were selected and tested in the SIVS. The selected chemicals (a) represented statistically justified sample sizes for distinguishing R38 from non classified chemicals, (b) provided a balanced representation of the three GHS categories to allow for post-hoc evaluation of the performance of the assays for that classification system, and (c) accounted as far as possible the large prevalence known to exist for chemicals which have oedema and erythema scores of 0. These chemicals were independently coded and distributed to the participating laboratories. The selected chemicals presented a variety of molecular structures, functional chemical groups, effect and use categories, as well as a wide range of physical-chemical properties. They represented a challenging set of chemicals relevant to current industrial commerce for the alternative methods being validated.

In phase 1 of the ECVAM SIVS, 20 chemicals (9 irritant, 11 non irritant) from NCD were tested under blind conditions in the lead laboratories (EPISKIN - L'Oreal, EpiDerm - ZEBET, SIFT - Syngenta). The methods applied (with Standard Operating Procedures, SOP's) were the refined, optimised protocols developed after the ECVAM prevalidation study. For the human skin model assays this consisted in applying the test chemicals to the surface of the skin for 15 minutes, followed by a post-treatment incubation period of 42 hours, and the subsequent assessment of their effects on cell viability by using the MTT assay.

The prediction model related to MTT used in Phases 1 and 2 was the following:

"The test substance is considered to be irritating to skin (R38), if the tissue viability after exposure and post incubation is less or equal (\leq) to 50%".

When cell viability (MTT reduction) was used as endpoint, the two skin models met the acceptance criteria set by the MT of the study. While the specificity (correct prediction of non-irritants) of both the EPISKIN and EpiDerm assays was 91%, their sensitivity (correct prediction of R38 irritants) was 67% and 56%, respectively. However, since almost all of the misclassified chemicals were lying at the threshold between irritant and non-irritant chemicals according to the EU classification scheme, the MT concluded that the predictive capacity of both EpiDerm and EPISKIN was sufficient to justify them to proceed to Phase 2. On the other hand, the predictive capacity of the SIFT method was considered inadequate. For SIFT, it was suggested that the lead laboratory re-evaluated the test protocol and prediction model, particularly in relation to the manner in which solids and non-surfactant materials are handled.

In Phase 2, all 58 chemicals were assessed in three different laboratories for each of the two reconstituted human skin methods. The EpiDerm test was conducted in the following laboratories: ZEBET (lead lab), Germany; Institute for *In vitro* Sciences (IIVS), USA; and BASF, Germany. The EPISKIN test was conducted in the following laboratories: L'Oréal (lead lab), France; Unilever, UK; and Sanofi-Synthélabo, France. Chemicals were re-coded from Phase 1 to ensure blind testing. The main endpoint

measured for both EpiDerm and EPISKIN was cell viability measured by MTT reduction, as used in all previous testing. However, a second endpoint, interleukin-1 α release, was added for those chemicals which did not reduce cell viability below the threshold for predicting irritancy, to determine if it could be used to improve the sensitivity of the assays. This second endpoint was used in all three laboratories assessing EPISKIN and by the lead laboratory for EpiDerm.

The prediction model related to the combined use of MTT and IL-1 α release in Phase 2 was the following:

The test substance is considered to be **irritant** to skin:
if the viability after 15 minutes of exposure and 42 hours of post-treatment incubation is more (>) than 50%, and the amount of IL-1 α release is more (>) than 60pg/ml.

The test substance is considered to be **non irritant** to skin:
if the viability after 15 minutes of exposure and 42 hours of post-treatment incubation is more (>) than 50%, and the amount of IL-1 α release is less or equal (\leq) to 60pg/ml.

The predictive capacities of the assays in this second phase are shown in Table 2. The within-laboratory reproducibility of classifications over three independent experiments meeting the acceptance criteria was 93.9% for EPISKIN (MTT) and 96.0% for EpiDerm (MTT). The between-laboratory reproducibility measured as the proportion of identical median classifications between laboratories was 89.5% for EPISKIN (MTT) and 88.5% for EpiDerm.

Table 2. Predictive capacities of EPISKIN and EpiDerm (MTT: based on the median classification per laboratory; MTT+IL1 α : based on the classification derived from the mean viability of the independent experiments per chemical and laboratory)

	EPISKIN (MTT)	EPISKIN (MTT+IL1-α)	EpiDerm (MTT)*
Sensitivity	74.7%	90.7%	57.3%
Specificity	80.8%	78.8%	83.8%
Concordance/Accuracy	78.2%	83.0%	72.4%

*The addition of IL-1 α to the EpiDerm protocol gave no improvement to the outcome

The study was forwarded to the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) with a proposal that EPISKIN could be considered as a replacement for the rabbit skin irritation method and EpiDerm as a constituent of a testing strategy.

Background to the ECVAM skin irritation validation study

In 1998, the ECVAM Skin Irritation Task Force published a report on the actual status of *in vitro* skin irritation testing and proposed 10 "challenge chemicals" for which promising, concordant *in vivo* data from the rabbit test, *in vivo* data from 4hr human patch test, and *in vitro* data from the human skin model EpiDerm were available. Proponents of new *in vitro* test systems were encouraged to submit data obtained with new *in vitro* skin irritation test protocols for these chemicals (1) for assessment whether these tests could be considered in an ECVAM prevalidation study. At the same time the suitability of various endpoints for prediction of human skin irritation was evaluated in an EU 4th framework collaborative project in several human reconstructed skin models, revealing cell viability reduction (MTT reduction) and IL-1 α release the most promising endpoints. Because MTT reduction and IL-1 α release showed a high inter-correlation, and IL-1 α release was more variable, MTT-reduction was proposed to be the best endpoint for human skin models (2).

Of the test systems for which data were submitted to the ECVAM TF, five tests [perfused pig-ear, Prediskin, SIFT, EPISKIN, EpiDerm] had been considered promising for participation in the ECVAM prevalidation study. However, during the prevalidation study, two tests failed already in phase 2 due to insufficient reproducibility, whereas the other tests [SIFT, EPISKIN and EpiDerm] showed a sufficient intra- and interlaboratory reproducibility, but failed in their ability to correctly predict the skin irritation potential of 20 chemicals that were tested in phase 3 of the ECVAM prevalidation study (3). The ECVAM Management Team of the study therefore proposed refinement and optimisation of these three tests before considering them for formal validation.

In 2001, the ECVAM Skin Irritation Task Force and the laboratories responsible for the refinement of the tests met again and discussed ways forward to approach formal validation. In addition, since a post hoc analysis of prevalidation data for MTT reduction for EPISKIN and EpiDerm revealed similar sensitivity, it was recommended to develop a common test protocol for both skin models before the start of a formal validation study (4).

In November 2002, the ECVAM Skin Irritation Task Force (TF) discussed the refinements of the SIFT (5) and the skin model tests (6) and came to the conclusion that processing the tests to formal validation could be recommended. However, because all refinements were made using the 20 chemicals from the prevalidation study, the TF recommended to perform the SIVS in two phases: a first phase (phase 1) for the confirmation of the refinements made by the leading labs Syngenta (SIFT), L'ORÉAL (EPISKIN), and ZEBET (EpiDerm) by testing new chemicals in a controlled way under blind conditions. If the outcome of phase 1 were still promising, the tests would proceed to a second phase (phase 2), i.e. in a blind trial involving three laboratories per test.

During 2003, the EPISKIN test was further refined by L'OREAL by extending the post incubation period of the tissues (after 15 min chemical exposure) to 42 hours which allowed significant effects to increase, and recovery from weak effects.

In May 2003, an ECVAM Stakeholder Workshop recommended to conduct a formal validation study and to concentrate on the predictions of the EU classification system (R38 vs. no label), because the tests were developed and optimised for this classification scheme. L'ORÉAL and ZEBET collaborated then in developing a common test protocol to be used in the ECVAM SIVS, and evaluated it first with the 20 "challenge" chemicals of the ECVAM prevalidation study. In 2004, upon request of the ECVAM SIVS Management Team and in parallel to performing phase 1 of the SIVS, the database was further increased by testing all non-corrosive chemicals recommended in the ECETOC reference data base (ECETOC report No. 66). The data obtained in both skin models with the optimised common protocol were very promising, and published back to back in 2005 (7,8). The BfR was contracted in November 2003 further to the publication of a call for tender for the ECVAM SIVS by the European Commission in June 2003. The study started formally with the 1st Meeting of the SIVS Management Team (MT) on 17-18 November 2003.

Manuscripts on the outcome of the skin irritation validation study and on the chemicals selection, are currently being finalised for publication.

References

1. 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
2. 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
3. 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

4. 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 A.P 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
5. 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 vivo*: results and evaluation of ECVAM phase III. *Toxicology In Vitro* **17**, 123-138.
6. 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. *ALTEX* **21**, 107-114.
7. 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
8. Cotovió, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and G. Rubinsteen (2005) The *in vitro* acute Skin Irritation of chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of the ECVAM Validation Process. *ATLA* **33**, 329-249

