

欧州代替法バリデーションセンター (ECVAM)

保健・消費者保護研究所

共同研究センター

欧州委員会

JRC 理事会

## 皮膚刺激性試験のための *in vitro* 試験の科学的評価についての声明

2008年11月4・5日にブリュッセルで開催された第29回欧州委員会会議にて、ESAC (ECVAM 科学諮問委員会) 非理事会メンバーは以下の声明を全会一致で了承した。

2種類の *in vitro* 皮膚刺激性試験が、ECVAM 文書 “*in vitro* 皮膚刺激性試験のためのヒト皮膚モデル適用における性能標準” に概説された原理に基づき評価された(1)。これらの性能標準は2種類の試験方法の信頼性と正確性を評価するために用いられた。これら両試験方法はヒト再構築表皮に基づいており、フルバリデートおよび承認された標準的な参照方法 (EPISKIN 法) と同様の生物学的または毒性的効果の測定または予測が可能である (2007年 ESAC 声明およびバリデーション試験報告書) (2、3)。

ESAC 第三者評価パネルによって、以下の試験をもとに提出されたデータの評価が実施された。

1. EpiDerm SIT 法：最新バリデーション (バリデートされた EpiDerm 試験の変法 (MTT 指標))
2. SkinEthics RHE 法：追放的バリデーション (MTT 指標)

これらの試験における MTT 分析の性能は、バリデートされ、承認された方法と比較して、R38 皮膚刺激性および非ラベル (非皮膚刺激性) 物質予測のために十分な正確性および信頼性を持つと判断されたことを示す基準に合致した。過去にバリデートおよび承認された皮膚刺激性のための *in vitro* 法に関する限界を、ここで評価された2種類の方法においても適用する(4)。

この承認は、第三者評価のために作成された文書である、定義されたバリデーション基準をもとに文書の評価した独立した専門家の意見、ECVAM による第三者評価パネルが利用する補助文書および、プロセスを監視する第三者評価パネルの考察に基づいてなされている。

ECVAM

In vitro 毒性試験チーム

チーム長

Joachim Kreysa

2008年11月5日

## 出典

1. ECVAM (2007) *Performance Standards for Applying Human Skin Models to In Vitro Skin Irritation Testing*. Online: <http://ecvam.jrc.it/>
2. ECVAM (2007) *Statement of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) on the Validity of In Vitro Tests for Skin Irritation*. Online: <http://ecvam.jrc.it/>
3. ECVAM (2007) *Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL-1 $\alpha$* . Online: <http://ecvam.jrc.it/>
4. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) *The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test*. ATLA, 52 **35**, 559-601.

## 参考資料

性能標準を基に実施された皮膚刺激性試験としての2種類の *in vitro* 試験のバリデーションにおける ECVAM の背景情報

Claudius Griesinger

イスプラ、イタリア

2008年11月11日

## 目次

1. 性能標準に基づいたバリデーション試験の背景
2. ECVAM *in vitro* 皮膚刺激性の性能標準を参考とした2種類の *in vitro* 皮膚刺激性試験のバリデーション
3. 2種類の試験法により評価された指標
4. 2種類の試験法の予測値
5. 出典

### 1. 性能標準に基づいたバリデーション試験の背景

*in vitro* 皮膚刺激性試験にヒト皮膚モデルを適用するための ECVAM 性能標準(1)は、ECVAM 皮膚刺激性バリデーション試験 (SIVS) においてバリデートされた2種類の市販皮膚モデル、EPISKIN および EpiDerm の特性に基づいている(2-4)。

性能標準には、試験法の科学的有効性を証明するための指針および、新規の類似する試験法または変法が満たすべき最低限の基準が記載されている。性能基準には、(a)テストシステムとして使用される個々の組織の質に関する受入れ基準を含む一般的かつ機能的なモデルの条件が記載されており、(b)受け入れ基準 (例：陽性および陰性対照のためのガイダンス値)、(c)試験方法およびデータ解釈によるガイダンス (予測モデル)、(d)フルの前向きバリデーション試験(3)で使われた一連の代表的な化学物質からなる20の参照物質および、(e)試験法の信頼性および予測性の性能標準が含まれる。

性能標準とは、フルの前向きバリデーション試験の場合と比較して大幅に数を減らした一連の実験用化学物質 (PS 参照物質) に基づいた、新規の方法に対する評価およびバリデーションに役立つツールとなることを目的としている。有害性評価(5)を目的とした新規または改訂版の試験法のバリデーションおよび国際的な受入れについて示した OECD ガイダンス文書 No.34 に従うことによって、以下に示す2種類の試験法について性能標準に基づいた評価を行うことができる。

- a) バリデートされた方法と比較して、構造および機能的パラメーターが十分に類似している試験法 (**similar** : 類似方法または **me-too** : 同様の方法)。対応するバリデーション過程は、追放的バリデーションとする。
- b) 性能標準で概説されている限定的な実験評価の保証が可能な程度のバリデートされた方法のマイナーな変更 (**modified** : 改訂方法)。対応するバリデーション過程は、最新バリデーションと呼ぶ。

## 2. ECVAM in vitro 皮膚刺激性の性能標準を参考とした 2 種類の in vitro 皮膚刺激性試験のバリデーション

### 2-1 支持された試験法

#### 第 29 回 ESAC により支持された 2 種類の試験法

- a) SkinEthics RHE モデルによる試験法：類似／同様試験法、ECVAM が関与していない追加試験として ECVAM に提出された。本試験は性能標準を参考に、構造的および機能的特徴が十分に類似していることが ECVAM により確認された。よって、本試験法は非 ECVAM 関与の追走的バリデーション試験として認められた。
- b) EpiDerm SIT モデルによる試験法：以前にバリデートされた EpiDerm 法の変法(2)、ECVAM が関与していない追加試験として ECVAM に提出された。主な変更は、物質の曝露時間が 15 分から 60 分に延長されたことである。他の基本的なパラメーターの変更はない。よって、本試験法は非 ECVAM 関与の追走的バリデーション試験として認められた。

生体異物の皮膚刺激性評価のためにバリデートされたすべてのヒト再構築組織モデルは、ポストインキュベートを 42 時間とすることに注意する。しかしながら、試験は表皮表面が実際に生体異物で処理された時間、つまり曝露時間によって異なる。ECVAM SIVS のいわゆる共通プロトコル(3)に記載されている 15 分の比較的短い曝露時間に対して、本試験では曝露時間が延長されている。SkinEthics RHE では 42 分の曝露時間だが、上記の EpiDerm SIT 試験では 60 分の曝露時間である。曝露時間はテストシステムが持つ様々なバリア特性を反映しており、力学的反応を保証するためそれぞれのシステムに応じて調整されている。測定可能な効果を得るために、曝露時間は十分に長くする必要はあるが、システムが飽和しない程度の時間にする必要がある。

### 2.2 提出、評価および第三者評価過程

SkinEthics RHE 法は、スキンエシックラボラトリーズ（フランス・ニース）により 2008 年 4 月 7 日に提出された。EpiDerm SIT 法は、ドイツ連邦リスク評価研究所（ベルリン）により 2008 年 4 月 23 日に提出された。

両試験の提出物とも、ECVAM 性能標準文書に詳述されている基準をもとに ECVAM によって評価が行われた(1)。

両試験法の提出物に示された技術移転の外部評価に加え、SkinEthics RHE 法と標準作業手順書の技術移転は、2008 年 3 月から 5 月にかけて ECVAM で個別に評価された。ECVAM による個別評価は EpiDerm SIT 法の場合には不要とみなされた。その理由は、EpiDerm モデルはフル皮膚刺激性バリデーション試験(2-4)にて広範な評価が行われており、かつ試験方法はわずかに改定されたのみと考えられたからである。

ECVAM 評価後、試験法についての提出物および ECVAM によって作成された追加の補助資料が ESAC 第三者評価パネルにより精査されると共に、ECVAM 性能標準(1)に従って個別に評価された。この第三者評価過程は 2008 年 9 月 8 日に終了した。

### 3. 2種類の試験法により評価された指標

両試験において、主要評価項目として MTT 法が使用された。比色分析による細胞の生存率の評価は、MTT 色素が紫色のフォルマザンに変化するミトコンドリア還元を基本にしている。細胞生存率はヒト再構築表皮モデルにおける、化学物質による刺激性の推定に適したパラメーターであることが実証されている(3、4)。

さらに、SkinEthicsRHE および EpiDerm 法の両提出物において、副次的評価項目として IL (インターロイキン) -1 $\alpha$  の情報を提供している。提出書類に記載の IL-1 $\alpha$  のデータは、試験法の予測能力の改善については言及していない。したがって、両試験とも MTT 指標のデータのみを用いて、その予測能力を検討している。

#### IL-1 $\alpha$ 指標の背景

ECVAM SIVS の結果から、IL-1 $\alpha$  は指標として有用であることが示されていた(2)。IL-1 $\alpha$  は非古典的経路によって分泌された炎症性メディエーターである(6、7)。ECVAM SIVS では、IL-1 $\alpha$  が特定の条件下で有用であり、MTT 指標の偽陰性を特定するための段階的試験体系で用いられた場合などにおいて、ヒト再構築表皮法の感度を増加させる可能性があると判断されている(2-4)。

### 4. 2種類の試験法の予測値

MTT 指標を考慮したバリデートされた2種類の試験法の予測値を表1に示す。20の参照物質それぞれの試験予測値の中央値(もしくは最頻値)をもとに算出された。比較のために、参照法である EPISKIN の換算値を示している。提出された両試験法とも、性能標準で示された予測値に適合している(特異度=80%、感度=70%)。

表1. ECVAM バリデーション試験でフルバリデートされた参照法 (EPISKIN 法) と比較した場合の、皮膚刺激性試験のための2種類の新規バリデートされた in vitro 試験 (SkinEthics RHE および EpiDerm SIT 変法)の MTT 指標における予測値 (%)

	EPISKIN (参考法)	Modified EpiDerm SIT	SkinEthic RHE
特異度	80	80	80
感度	70	80	90
偽陽性率	20	20	20
偽陰性率	30	20	10
正確性	75	80	85

### 5. 出典

1. ECVAM (2007) *Performance Standards for Applying Human Skin Models to In Vitro Skin Irritation Testing*.  
Online: <http://ecvam.jrc.it/>
2. ECVAM (2007) *Statement of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) on the Validity of In Vitro Tests for Skin Irritation*. Online: <http://ecvam.jrc.it/>
3. ECVAM (2007) *Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the*

secondary endpoint IL-1 $\alpha$ . Online: <http://ecvam.jrc.it/>

4. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) *The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test*. ATLA **35**, 559-601.
5. OECD (2005) *OECD guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. OECD series on testing and assessment Nr. 34*.
6. Prudovsky I, Tarantini F, Landriscina M, Neivandt D, Soldi R, Kirov A, Small D, Kathir KM, Rajalingam D, Kumar TK. (2008) *Secretion without Golgi*. J Cell Biochem. **103(5)**:1327-43.
7. Prudovsky I, Mandinova A, Soldi R, Bagala C, Graziani I, Landriscina M, Tarantini F, Duarte M, Bellum S, Doherty H, Maciag T. (2003) *The non-classical export routes: FGF1 and IL-1 $\alpha$  point the way*. J Cell Sci. **116(Pt 24)**:4871-81.