

LabCyte EPI-MODEL24 皮膚刺激性試験代替法の評価報告書

平成 24 年 10 月 31 日

皮膚刺激性試験評価委員会

委員名：

赤松浩彦（委員長：藤田保健衛生大学医学部）

寒水孝司（京都大学）

用語集

Accuracy：正確度

Concordance: 一致率

European Centre for Validation of Alternative Methods (ECVAM)：欧州代替法検証センター

False negative rate：偽陰性率

False positive rate：偽陽性率

Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS): 化学品の分類および表示に関する世界調和システム

Independent International Scientific Peer Review Panel：第三者専門技術評価国際委員会

Inter-laboratory validation study:施設間バリデーション

Intra-laboratory validation study:施設内バリデーション

Japanese Centre for Validation of Alternative Methods (JaCVAM)：日本動物実験代替法評価センター

Performance standard：性能標準

Reliability：信頼性

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)：経済協力開発機構

Test Guideline (TG):テストガイドライン

Validation study：バリデーション

Validation study management team：バリデーション運営委員会

1. 本試験法の科学的妥当性と規制試験法としての妥当性

LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法は、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (J-TEC) によって開発された日本製の培養表皮モデルである。本モデルと類似した培養表皮モデルのバリデーションが ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) によりバリデートされ、EU で認証された¹⁾。これを受け、日本でも日本動物実験代替法学会にてプロトコル確定のためのプレバリデーション(phase I)を経て、ECVAM で作成された GHS 分類¹⁾による皮膚刺激性試験代替法としての performance standard (性能標準)²⁾に掲載された化学物質リストをもとに、me-too (小規模) バリデーション(phase II)が実施された。バリデーションの実施中、ECVAM 性能標準のリストが改訂されたこともあり、追加バリデーション(phase III)を実施した³⁾。これらをまとめた報告書が Independent International Scientific Peer Review Panel (Peer Review) により評価され、その結果として、1-bromohexane の偽陰性を改善する指示があった⁴⁾。プロトコルの改良が J-TEC により実施され⁵⁾、改訂プロトコルを用い、新たに 3 施設の協力による JaCVAM (Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods) によるバリデーション(phase IV)が実施された。さらに、phase IV で明らかになったばらつきの大きさを改善するため、プロトコルが統一され、それを用いた追加バリデーション(phase V)が実施されている。

本評価書は、phase IV から V にいたるバリデーション結果をもとに、LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験の評価を行ったものである。なお、これらの結果は、OECD 皮膚刺激性専門家グループにおいても確認され、OECD 培養表皮モデルを用いた in vitro 皮膚刺激性試験法として、LabCyte EPI-MODEL24 が OECD test guideline (TG439) に追記されることになった⁶⁾。

図 1 に、バリデーション研究過程を示すフローチャートを示す。

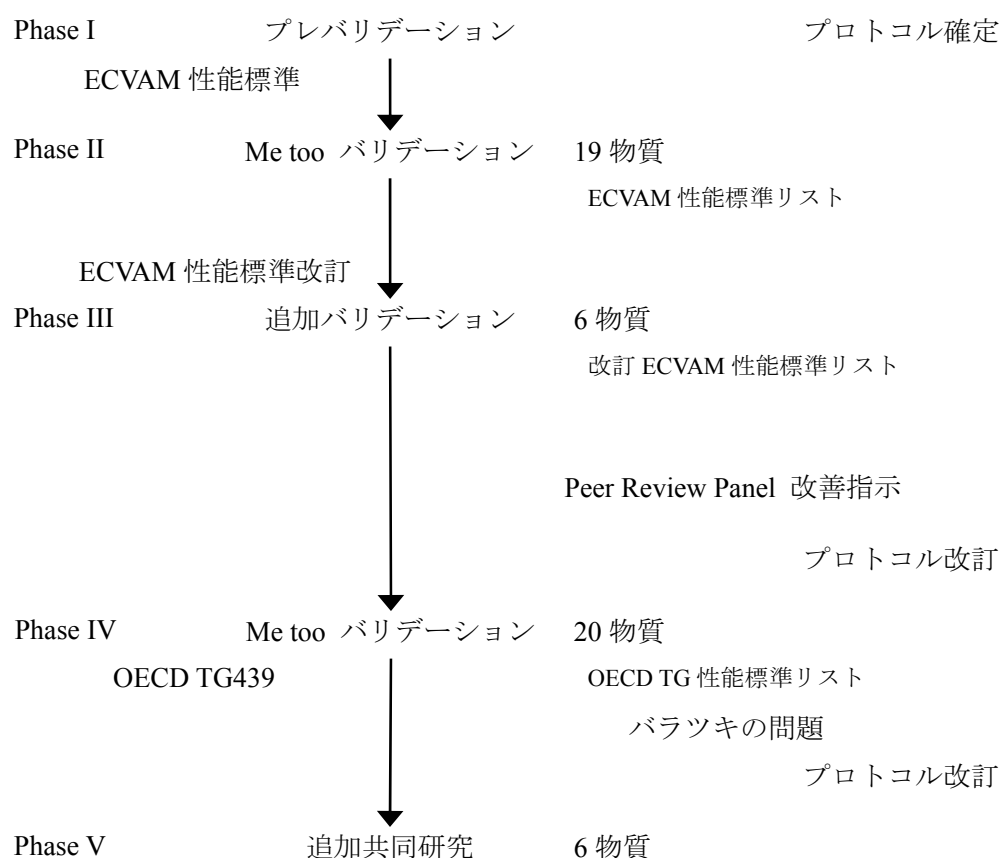


図 1 LabCyte EPI-MODEL24 皮膚刺激性試験法バリデーション研究の経過

2. 試験法の妥当性

試験プロトコルは、TG 439 に示される参照試験法（EpiSkinTM 試験法）とほぼ同様である。試験プロトコルは、バリデーション（phaseⅢ）からバリデーション（phaseⅣ）において、Peer Review からの指示を受けて ver.8.2 として改良された。また、バリデーション（phaseⅣ）では、参加 3 施設のうち、1 施設が特異度において TG439 に示す基準を満たさなかった。その原因として、ばらつきが大きいことが原因と判断されたため、ばらつきを減らす目的で、プロトコルを大きく変更しない範囲内での洗浄方法の詳細な統一が図られた（SOPver.8.3）⁷⁾。変更された点を表 1 に示す。バリデーション（phase V）では、SOPver.8.3 に従って実施された結果、試験におけるばらつきは減少した。

表 1 SOPver.8.3 における被験物質洗浄方法の明確化

洗浄操作	SOP ver.8.2	SOPver.8.3
1.洗浄前の被験物質の除去	明記されていない。	洗浄直前にインサートを傾けて廃棄する。
2.洗浄液量	明記されていない。	インサート容量以上の大量の PBS を用いて洗浄する。
3.各洗浄操作後の PBS 除去	明記されていない。	廃液ビンの上で軽くたたいて廃液する操作（タッピング）を一回行う。
4.最終洗浄後の PBS 除去	明記されていない。	インサートを傾けて除去する操作のみで上述のタッピング操作は行わない。

試験法（SOPver.8.3）の概要を以下に示す。24 ウェルプレートの各ウェルに、キットに備えつけの培養液 0.5mL を加えて LabCyte のインサートを設置し、一晩前培養して、試験に供した。被験物質が液体の場合は 25μL を LabCyte 表面に適用した。被験物質が固体の場合には 25mg をマイクロチューブに秤量しておき、予め蒸留水 25μL を添加しておいた培養表皮表面に適用した。1 被験物質につき、3 インサートを使用した。15 分間室温で静置して被験物質を暴露した。適用時間終了後、インサートを傾けてインサート内の被験物質を除去し、ポリ洗浄ビンにいった PBS（リン酸緩衝液）をインサート内に吹き付けることにより洗浄し、インサートを傾けて PBS を除去した。この操作を 10 回以上繰り返し、組織表面の被験物質を取り除いた。その後、新しいウェルに培地 1mL を加え、インサートを移動し、42 時間培養を行った。その後、MTT を添加した培地 0.5mL を加えた新しいウェルにインサートを移動し、培養した。3 時間後、各インサートの培養表皮組織をマイクロチューブに各々入れ、イソプロパノールを 300μL 加えて一晩以上静置して MTT フォルマザンを抽出した。96 ウェルプレートに抽出液を 200μL ずつ移し、マイクロプレートリーダーを用いて 570nm、および 650nm の吸光度を測定した。570nm を測定波長とした吸光度から、650nm を参照波長とした吸光度を差し引いた値を測定値とした。イソプロパノールのみを加えたウェルをブランクとして、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細胞生存率(%)を計算した。使用した 3 組織の平均細胞生存率が 50%以下の結果を示す物質を皮膚刺激性（GHS 分類 1、あるいは 2）と判定した。陰性対照は蒸留水を用いた。陽性対照は 5% SDS（ラウリル硫酸ナトリウム）水溶液を用いた。これらの実験を、繰り返し 3 回実施し、その平均値から陽性か陰性かを判定した。

3. バリデーション試験に用いた物質の分類と妥当性

バリデーション試験では、phaseⅣで表 2-1 および phase V で表 2-2 に示すそれぞれ 20 および 6 物質、合計 21 物質が供された。これらは TG 439 の性能標準に掲載されたリスト中の 20 物質をすべて含んでいる。表 2-1 の物質 No.20 1,1,1-trichloroethane は OECD TG 案には掲載されていたが、バリデーション phaseⅣを実施中に公定化された最終段階では tetrachloroethylene（表 2-2、物質 No.21）に置き換わった。表 1-2 に記載された残りの 5 物質は、表 2-1 にも掲載されている。

選ばれている 20 物質は、刺激性強度（GHS ランク）、物性、国際市場での入手しやすさなどを考慮して選抜され、性能標準では、小規模バリデーションにおいて、これらの物質を用いて基準以上の結果が得られることが証明されれば、既存モデルと同程度と扱われるとされている。なお、category 3 に属する物質 No.8~10 は TG439 に準拠して無刺激性と分類されている。

表 2-1. Minimum List of Reference Chemicals for Determination of Accuracy and Reliability
Values for Similar or Modified RhE Skin Irritation Test Methods and Codes

No.	Name	CAS number	UN GHS in vivo Cat.	Supplier
1	1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	No Cat.	WPCI
2	diethyl phthalate	84-66-2	No Cat.	WPCI
3	naphthalene acetic acid	86-87-3	No Cat.	WPCI
4	allyl phenoxy-acetate	7493-74-5	No Cat.	WPCI
5	Isopropanol	67-63-0	No Cat.	WPCI
6	4-methylthio-benzaldehyde	3446-89-7	No Cat.	WPCI
7	methyl stearate	112-61-8	No Cat.	KCC
8	heptyl butyrate	5870-93-9	No Cat. (Optional Cat. 3)	Sigma-Aldrich
9	hexyl salicylate	6259-76-3	No Cat. (Optional Cat. 3)	Sigma-Fluka
10	Cinnamaldehyde	104-55-2	No Cat. (Optional Cat. 3)	Sigma-Aldrich
11	1-decanol	112-30-1	Cat.2	WPCI
12	cyclamen aldehyde	103-95-7	Cat.2	WPCI
13	1-bromohexane	11-25-1	Cat.2	WPCI
14	2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine HCl	86604-75-3	Cat.2	WPCI
15	di-n-propyl disulphide	629-19-6	Cat.2	WPCI
16	potassium hydroxide 5%	1310-58-3	Cat.2	WPCI
17	benzylthiol,5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl	7340-90-1	Cat.2	TCI
18	1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	5271-27-2	Cat.2	TCI
19	Heptanal	111-71-7	Cat.2	KCC
20	1,1,1-trichloroethane	71-55-6	Cat.2	WPCI

1) CAS No.: Chemical abstracts service registry number.

KCC = Kanto Chemical Co. Inc.; TCI = Tokyo Chemical Industry Co. Ltd; WPCI = Wako Pure Chemical Industries Ltd;

No cat. = 無刺激性 Cat3 = 無刺激性, Cat.2 = Category 2 : 刺激性

表 2-2 The list of chemicals and code with the additional study

No.	Name	CAS number	Supplier
2	diethyl phthalate	84-66-2	WPCI
4	allyl phenoxy-acetate	7493-74-5	WPCI
5	Isopropanol	67-63-0	WPCI
13	1-bromohexane	11-25-1	WPCI
15	di-n-propyl disulphide	629-19-6	WPCI
21	Tetrachloroethylene	3446-89-7	WPCI

WPCI = Wako Pure Chemical Industries

4. 試験法の正確性を評価するために用いられた参照化合物の *in vivo* 参照データ

in vivo 参照データは、GHS 刺激性区分を 2.3 として、それ以上 (Category2) を 10 物質、それ未満を 10 物質選定している。Category3 刺激性 1.7-2.3 は無刺激性に区分されている⁹⁾。その情報は、TG439 性能標準で確認できる。

5. 試験法のデータと結果の利用性

バリデーション PhaseIV の結果を表 3 に、phaseV の結果を表 4 に示す。標準偏差 (SD) が 18%を超える結果は、採用されておらず、追加実験結果が採用された。表 3 に物質 No.15 の施設 b は 1 ~ 3 回目までの結果が採用されなかった。OECD 性能標準には追加実験は 2 回までとされていることから¹⁰⁾、4 および 5 回目の結果のみが採用された。この結果から、施設 b における物質 No.15 については繰り返し数が 3 回未満なので、判定結果は欠測になった。表 3 に示すように、バリデーション (phaseV) では、施設 b における物質 No.15 は、2 回目から 4 回目をもとに、判定された。

なお、表 3 に掲載された物質 No.20 の結果は、3 節で述べた理由から解析には利用していない。

表 3. Mean viability of chemicals at each laboratory (Phase V)

Chem. No.	Lab a				Lab b					Lab c				
	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	12.4	11.3	19.0		16.5	10.7	10.6			9.0	9.8	9.8		
2	91.7	81.5	69.6		60.9	57.5	*65.5	69.5		90.5	*77.4	102.0	93.0	#66.7
3	108.0	113.0	105.0		96.5	96.7	90.2			89.4	*90.8	106.0	98.9	#96
4	19.1	*43.4	65.1	59.3	66.6	70.6	*48.1	66.2		90.1	93.0	93.2		
5	89.6	77.0	67.6		75.9	*57.5	74.8	77.1		*68.5	86.6	*66.4	67.2	74.4
6	16.2	15.9	17.0		17.3	13.5	11.4			15.5	16.1	12.0		
7	110.0	110.0	104.0		98.8	93.1	76.3			91.2	102.0	108.0		
8	109.0	122.0	111.0		93.1	106.0	86.6			95.5	106.0	119.0		
9	105.0	111.0	102.0		98.0	95.7	83.5			99.6	100.0	113.0		
10	15.7	20.3	16.0		11.5	15.9	11.4			17.3	14.1	14.9		
11	14.2	16.5	9.4		12.4	17.3	16.2			22.1	15.1	14.1		
12	8.9	15.9	10.0		11.0	7.8	9.0			6.0	7.4	5.7		
13	*48	16.2	16.1	15.5	*39.5	6.6	*49.6	17.2	19.0	17.5	17.0	16.2		
14	2.1	4.3	4.1		4.9	5.2	9.1			2.8	3.4	3.2		
15	19.9	95.9	83.5		*39.1	*28	*52.7	17.5	18.5	81.1	83.2	86.3		
16	0.9	1.7	1.6		4.6	2.0	3.3			0.9	3.1	11.6		
17	6.9	46.6	1.0		10.6	21.0	11.6			6.3	5.0	6.6		
18	6.7	4.5	3.6		9.8	10.9	11.0			1.3	1.8	2.2		
19	9.5	10.3	10.4		9.5	7.0	9.5			11.9	10.2	10.9		
20	8.7	12.0	7.8		9.1	7.9	37.6	#17.4		7.6	7.0	6.8		

* SD >18%, Not accepted data.

Additional experiments, Not accepted data.

In vitro skin no irritant

In vitro skin irritant

表 4. Mean cell viability at each Lab in the additional validation study (Phase V)

No	Name	Lab a			Lab b				Lab c		
		1	2	3	1	2	3	4	1	2	3
2	diethyl phthalate	94.5	90.7	92.5	*49.9	48.2	53.6	67.3	94.4	77.8	92.5
4	allyl phenoxy-acetate	83.1	79.9	67.3	*64.7	62.4	57.8	64.0	91.0	84.3	79.2
5	Isopropanol	77.3	79.2	80.4	79.0	78.9	78.2		93.7	86.2	82.1
13	1-bromohexane	17.5	17.1	18.0	14.3	25.0	20.3		11.7	11.5	7.6
15	di-n-propyl disulphide	96.5	84.5	86.4	*72.1	31.1	29.6	43.8	36.9	78.6	70.7
21	Tetrachloroethylene	5.6	5.0	5.3	7.1	9.9	13.0		8.7	7.1	7.0

* SD >18%

In vitro skin no irritant

In vitro skin irritant

6. 試験法の正確性

表 3 および 4 の結果をもとに、平均値から求められた判定結果を表 5 および 6 に示す。表 4 に示すように、物質 No.4 施設 a の判定結果は 3 回中 2 回が陰性であったが、3 回の平均値を用いると陽性なり、結果が食い違った。追加バリデーションでは、さらなるプロトコルの改良ですべての施設のすべての実験で陰性となった。表 5 および 6 に示すように、物質 No.13 はすべての施設のすべての実験で陽性となり、プロトコルの改良が確認できた。

TG439 性能標準に準拠し、PhaseIV および V の結果を組み合わせ、物質 2、4、5、13、15、21 については、phaseV の結果を、それ以外の物質は PhaseIV の結果を最終結果として表 8 にまとめると、感度が 90% (2 施設)、100% (1 施設)、特異度が 70% (3 施設)、正確度 80% (2 施設)、85% (1 施設) となり、性能標準の基準である感度 90%、特異度 70%、正確度 80% に全て適合した。これにより、最終的なプロトコル (SOPver.8.3) を用いれば、LabCyte を用いた皮膚刺激性試験の正確性は高いと判断した。ただし、14 物質については、旧プロトコル (SOPver.8.2) で実施された結果であり、最終プロトコル (SOPver.8.3) に適合するかは不明である。そこで、最終プロトコルで実施された 14 物質を含んだより広範な物質のデータ (表 9、図 2,3) を J-TEC より提供を受け、プロトコルの改訂に伴う結果への影響を評価した。沿

結果、偏りは小さく、精度の向上に寄与していると判断した。

表 5. Classification using three independent viabilities (Phase IV)

No.	UN GHS <i>in vivo</i> Cat	Lab a				Lab b				Lab c			
		1	2	3	F	1	2	3	F	1	2	3	F
1	No Cat.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	No Cat.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	No Cat.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	No Cat.	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
5	No Cat.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6	No Cat.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
7	No Cat.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8	No Cat.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9	No Cat.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10	No Cat.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
11	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
12	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
13	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
14	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
15	Cat.2	P	N	N	N	P	P	ND	ND	N	N	N	N
16	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
17	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
19	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
20	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

P: Positive, N: Negative, F: Final determination by median, ND: Not detected for invalid

表 6. Classification using three independent viabilities (Phase V)

No	Name	Lab.a		Lab.b		Lab.c	
		Mean	Judge	Mean	Judge	Mean	Judge
2	diethyl phthalate	92.5	NI	56.4	NI	88.3	NI
4	allyl phenoxy-acetate	76.8	NI	61.4	NI	84.8	NI
5	Isopropanol	79.0	NI	78.7	NI	87.3	NI
13	1-bromohexane	17.5	I	19.9	I	10.3	I
15	di-n-propyl disulphide	89.1	NI	34.8	I	62.1	NI
21	Tetrachloroethylene	5.3	I	10.5	I	7.6	I

表 7 Classification using three independent viabilities (Phase IV and phase V)

No.	UN GHS <i>in vivo</i> Cat	Lab a				Lab b				Lab c			
		1	2	3	F	1	2	3	F	1	2	3	F
1	No Cat.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	No Cat.	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N
3	No Cat.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	No Cat.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	No Cat.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6	No Cat.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
7	No Cat.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8	No Cat.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9	No Cat.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10	No Cat.	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
11	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
12	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
13	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
14	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
15	Cat.2	N	N	N	N	P	P	P	P	P	N	N	N
16	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
17	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
19	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
20	Cat.2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

表 8. 2x2 tables merged with additional study

Lab a		In vivo classification		
		Irritant	Non-Irritant	Total
In vitro prediction	Irritant	9	3	12
	Non-irritant	1	7	8
	Total	10	10	20
Sensitivity (%)		90.0		
Specificity (%)		70.0		
Accuracy (%)		80.0		
Lab b		In vivo classification		
		Irritant	Non-Irritant	Total
In vitro prediction	Irritant	10	3	13
	Non-irritant	0	7	7
	Total	10	10	20
Sensitivity (%)		100.0		
Specificity (%)		70.0		
Accuracy (%)		85.0		
Lab c		In vivo classification		
		Irritant	Non-Irritant	Total
In vitro prediction	Irritant	9	3	12
	Non-irritant	1	7	8
	Total	10	10	20
Sensitivity (%)		90.0		
Specificity (%)		70.0		
Accuracy (%)		80.0		

表 9. SOPver.8.2 と SOPver.8.3 を用いた LabCyte EPI-MODEL24 皮膚刺激性試験

Chemical			LabCyte EPI-MODEL24 SIT			
Name	In vivo score	In vivo class	Ver.8.2	In vitro Class	Ver8.3	In vitro Class
			Viability (%)	I/NI	Viability (%)	I/NI
1-bromo-4-chlorobutane	0	NI	19.8 ± 3.4	I	27.8 ± 0.8	I
diethyl phthalate	0	NI	87.6 ± 27.9	NI	90.8 ± 15.7	NI
di-propylene glycol	0	NI	101.0 ± 8.5	NI	95.4 ± 3.8	NI
naphtalen acetic acid	0	NI	99.7 ± 7.6	NI	94.6 ± 6.6	NI
3-ChloronitroBenzene	0	NI	99.2 ± 4.7	NI	88.8 ± 7.1	NI
3,3-Dithiodipropionic Acid	0	NI	96.3 ± 5.5	NI	99.0 ± 2.4	NI
4,4-Methylenebis(2,6-di-tert-butylphenol)	0	NI	101.3 ± 2.2	NI	99.1 ± 5.6	NI
4-Amino-1,2,4-Triazole	0	NI	99.1 ± 1.8	NI	94.5 ± 2.1	NI
Benzyl Benzoate	0	NI	101.9 ± 3.3	NI	96.5 ± 2.8	NI
Sodium Bicarbonate	0	NI	100.0 ± 0.3	NI	101.0 ± 4.5	NI
Erucamide	0	NI	95.0 ± 6.6	NI	97.0 ± 3.5	NI
1,5-hexadiene	0	NI	91.2 ± 5.1	NI	64.9 ± 10.1	NI
Polyethylene glycol 400	0	NI	102.7 ± 4.3	NI	96.3 ± 2.4	NI
Glycerol	0	NI	109.1 ± 14.7	NI	96.6 ± 4.6	NI
3,3-Dimethylpentane	0	NI	79.8 ± 9.8	NI	65.1 ± 7.8	NI
allyl phenoxy-acetate	0.3	NI	82.3 ± 22.9	NI	81.4 ± 9.1	NI
Isopropanol	0.3	NI	84.6 ± 2.7	NI	74.7 ± 7.4	NI
Benzyl Salicylate	0.3	NI	97.2 ± 3.3	NI	98.5 ± 7.7	NI
Lauric Acid	0.3	NI	104.4 ± 9.0	NI	93.6 ± 4.1	NI
4-methyl-thio-benzaldehyde	1	NI	22.6 ± 1.8	I	33.1 ± 2.4	I
Methyl Stearate	1	NI	104.4 ± 7.7	NI	90.8 ± 5.1	NI
Benzyl Acetate	1	NI	26.2 ± 13.4	I	25.6 ± 1.8	I
Hydroxycitronellal	1	NI	24.2 ± 7.1	I	26.2 ± 1.9	I
Isopropyl Myristate	1	NI	100.8 ± 6.2	NI	96.0 ± 8.6	NI
Isopropyl Palmitate	1	NI	107.5 ± 7.3	NI	100.0 ± 8.7	NI
n-Butyl Propionate	1	NI	36.8 ± 12.1	I	33.8 ± 3.5	I
Sodium Bisulphite	1	NI	49.0 ± 33.5	NI	66.9 ± 1.8	NI
Benzyl Alcohol	1.3	NI	13.6 ± 7.0	I	12.6 ± 2.0	I
allyl heptanoate	1.7	NI	103.0 ± 6.8	NI	88.7 ± 9.9	NI
heptyl butyrate	1.7	NI	108.1 ± 2.0	NI	104.2 ± 5.9	NI
2-Ethoxy Ethyl Methacrylate	1.7	NI	49.0 ± 23.1	I	31.5 ± 10.7	I
hexyl salicylate	2	NI	106.7 ± 16.3	NI	97.2 ± 4.9	NI
Linalyl Acetate	2	NI	93.5 ± 7.3	NI	95.0 ± 10.0	NI
terpinyl acetate	2	NI	32.1 ± 5.3	I	28.9 ± 8.8	I
Linalol	2	NI	16.6 ± 8.8	I	26.6 ± 4.9	I
Cinnamaldehyde	2	NI	29.1 ± 7.2	I	30.2 ± 5.9	I
Eugenol	2	NI	27.0 ± 7.4	I	35.4 ± 4.4	I
cyclamen aldehyde	2.3	I	30.1 ± 5.9	I	26.8 ± 1.9	I
1-decanol	2.3	I	32.3 ± 8.8	I	27.9 ± 6.8	I
1-bromohexane	2.7	I	39.9 ± 3.3	I	32.7 ± 4.0	I
alpha-Terpineol	2.7	I	21.4 ± 10.3	I	25.1 ± 0.5	I
1-BromoPentane	2.7	I	21.9 ± 3.6	I	29.8 ± 3.5	I
2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine HC	2.7	I	12.7 ± 3.2	I	13.1 ± 1.3	I
butyl methacrylate	3	I	28.9 ± 4.6	I	30.0 ± 6.6	I
di-n-propyl disulphide	3	I	71.7 ± 7.5	NI	69.8 ± 20.3	NI
Potassium Hydroxide 5%	3	I	3.0 ± 0.5	I	0.1 ± 0.2	I
Heptanal	3.3	I	17.3 ± 3.2	I	21.4 ± 0.2	I
benzylthiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl	3.3	I	27.6 ± 8.4	I	28.1 ± 4.9	I
1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	3.3	I	15.2 ± 4.6	I	5.3 ± 6.9	I
SLS (20% aq)	4	I	12.0 ± 2.3	I	12.7 ± 1.6	I
1,1,1 Trichloroethane	4	I	11.8 ± 1.7	I	20.9 ± 2.6	I
Tetrachloroethylene	4	I	17.0 ± 5.7	I	22.9 ± 1.4	I
Capric acid (decanoic acid)	4	I	11.2 ± 5.9	I	17.0 ± 1.3	I
SLS (5% aq)		I	13.4 ± 1.7	I	15.9 ± 0.2	I

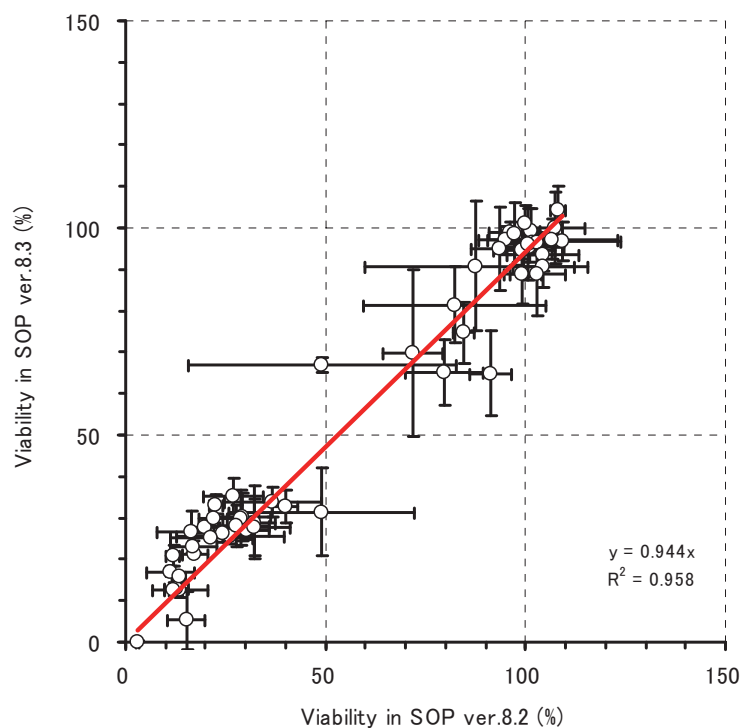


図2 SOPver.8.2とSOPver.8.3を用いたLabCyte EPI-MODEL24 皮膚刺激性試験における生細胞率の相関

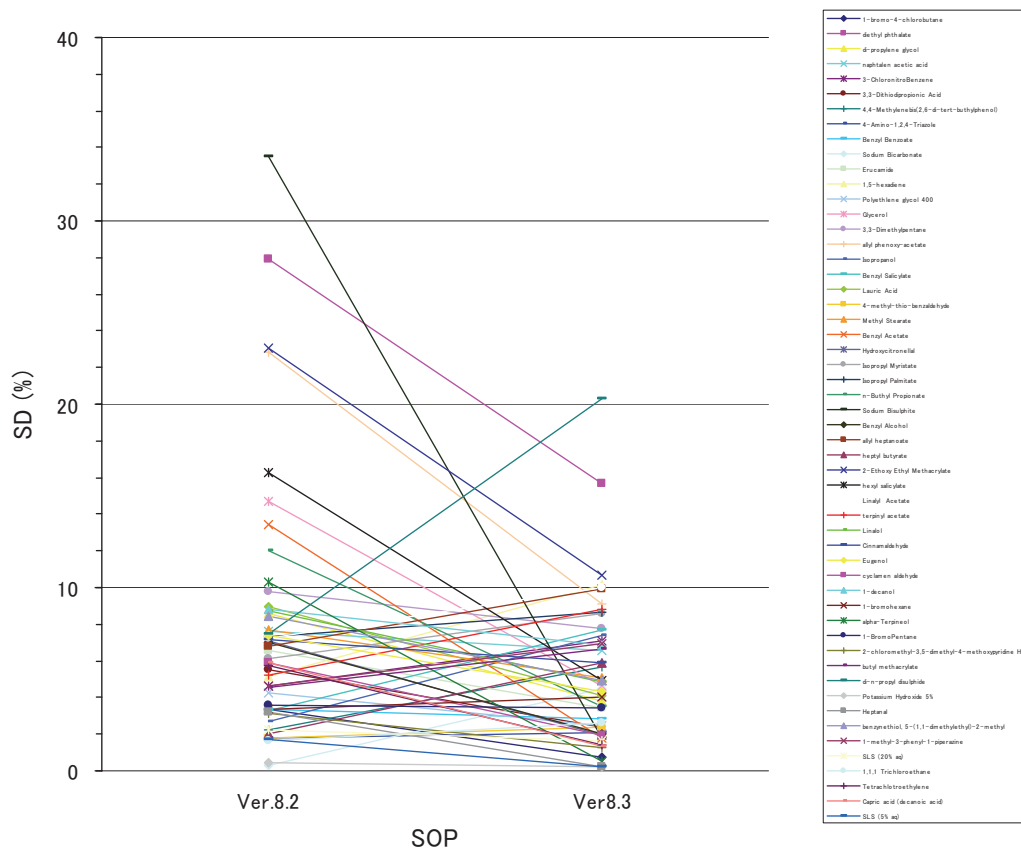


図3 SOPver.8.2とSOPver.8.3を用いたLabCyte EPI-MODEL24 皮膚刺激性試験における生細胞率 SD の相関

7. 試験方法の信頼性

表 10 に示すように、phaseⅣでは 5 物質において、ばらつきの大きな結果が得られた。各物質で SD が 18%を越えるデータが 2～3 みられ、合計 13 データとなった。データはしめしていないが、ばらつきの大きかった 5 物質の SD は phaseⅡ と比べ、phaseⅣでは大きくなっている。すなわち、1-bromohexane の偽陰性を改善するために行った被験物質の洗い方改は適切ではなかったといえる。そこで、さらなるプロトコルの改善がなされた phaseⅤでは、SD 値は小さくなり、表 3 に示すように、SD が 18%を越える値は 3 データのみに改善された。

バリデーション PhaseⅣ、およびⅤ を組み合わせた施設内の再現性については、表 8 に示すように、3 回の繰り返し試験で判定結果が全て同じ結果となった物質の割合は、95%（2 施設：施設 b, c 19/20 物質）、100%（1 施設）となり、性能標準の基準である 90%以上に全施設が適合した。

バリデーション PhaseⅣ、およびⅤ を組み合わせた施設間の再現性については、表 9 に示すように、3 施設の判定結果が全て同じ結果となった物質の割合は、95%（19/20 物質、除く物質 No.15）となり、性能標準の基準である 80%以上に適合した。

以上の結果および、表 5 および 7 に示す施設内、施設間の高い再現性結果から本試験法の改訂プロトコルの信頼性は高いと判断した。

表 10. Chemicals obtained large variations at me-too validation study

No.	Name	Data number of SD > 18%			
		Lab a	Lab b	Lab c	Total
2	diethyl phthalate	0/3	1/4	1/4	2/11
4	allyl phenoxy-acetate	1/4	1/4	0/3	2/11
5	Isopropanol	0/3	1/4	2/5	3/12
13	1-bromohexane	1/4	2/5	0/3	3/12
15	di-n-propyl disulphide	0/3	3/5	0/3	3/11

8. データの質

試験に参加した施設は GLP の精神に則り、試験に関するすべての記録を残し、記録用紙を各施設の試験責任者が確認した後、バリデーション実行委員長に送付した。バリデーション実行委員長はすべての記録用紙を確認し、不明な点があれば問い合わせ、相互で確定したデータのみを解析に用いている。よって、データの質は確保されていると判断した。

9. 試験法の有用性と限界

LabCyte EPI-MODEL24（24 インサート/キット）は、1 キット 5 万 4 千円 1 キットで未知検体を 6 物質（他に陰性対照、陽性対照）評価可能である。

動物実験と比較して、5 日間という短時間で結果を得ることができる。一方、LabCyte EPI-MODEL24 入手後は 4 日以内に試験を開始する必要があり、試験実施に 5 日間を要するため、火曜日到着ですぐに試験を実施しない場合、土曜日、日曜日での作業が発生する。

OECD TG404 に示されるドレイズ試験は、3 匹のウサギを用いて 4 時間閉塞貼付を行い、除去後、1,24,48,72 時間後の反応をドレイズ評価基準で評価する方法である。GHS 分類においては、区分 2（刺激性：少なくとも 2 個体で 2.3 以上）、区分 1（弱刺激性：少なくとも 2 個体で 1.7 以上 2.3 未満）、区分外（非刺激性：1.7 未満）となっている。このうち、TG439 では区分 3 を分類することはできないとされている。

適用限界として、MTT 干渉作用のある物質と着色性物質が挙げられる。プロトコルには、これらの物質の検出方法についての記載があり、その影響が明らかな物質については、その程度を定量する必要があると考えられる。また、エアロゾルやガスについては、適用外であるとされている。

10. その他の試験方法の科学的な報告

TG439 に掲載されている培養表皮モデル EpiSkin、EpiDerm、SkinEthics を用いた皮膚一次刺激性試験に関する論文報告は多い。これらの試験法は JaCVAM 皮膚刺激性評価委員会においても、国内の専門家により評価され、OECD TG 内容が認証されている¹¹⁾。

11. 結論

3次元培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験法は、GHS 分類による皮膚刺激性の識別をと予測する方法として、TG439 性能標準に従いバリデーションが実施されており、その結果、正確性、信頼性についても妥当であった。したがって、本試験法は GHS 分類による皮膚刺激性を予測する *in vitro* 試験として有用な方法であると判断した。

参考文献

1. EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
2. EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
3. Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012), Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.
4. OECD (2011), Validation report for the skin irritation test method using LabCyte EPI-MODEL24, OECD Series on Testing and Assessment No. 159, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
5. OECD (2011), Peer review report of validation of the skin irritation test using LabCyte EPI-MODEL24, OECD Series on Testing and Assessment No. 155, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
6. Katoh, M. and Hata K. (2011), Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 skin Irritation test method for adaptation to the requirements of OECD test guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122
7. OECD (2012), *In vitro* skin irritation: human epidermis test method, Draft updated guideline 439 for the testing of chemicals, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
8. LabCyte EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3 (June 2011), Skin irritation test using the reconstructed human model “LabCyte EPI-MODEL24” Available at: [<http://jacvam.jp/>]
9. EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE). Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing] N.B. This is the current version of the ECVAM PS, updated in 2009 in view of the implementation of UN GHS.
10. OECD (2010), *In vitro* skin irritation: reconstructed human epidermis test method, OECD Guideline for the testing of chemicals No.439, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
11. JaCVAM: Available at: <http://jacvam.jp/> (2012)

