

評価会議報告書

皮膚腐食性試験代替法

ヒト表皮モデル法

JaCVAM 評価会議

平成 29 年（2017 年）5 月 11 日

JaCVAM 評価会議

- 大野 泰雄 (公益財団法人 木原記念横浜生命科学振興財団) : 座長
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部)
石井 雄二 (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)
井上 智彰 (日本免疫毒性学会)
今井 教安 (日本動物実験代替法学会)
岩瀬裕美子 (日本製薬工業協会)
篠田 和俊 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
杉山真理子 (日本化粧品工業連合会)
仲井 俊司 (日本化学工業協会)
中村るりこ (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
野口 真希 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
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)
沼澤 聡 (日本毒性学会)
森田 健 (日本環境変異原学会)
横関 博雄 (日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会)

任期：平成 28 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

ヒト表皮モデルを用いた皮膚腐食性試験法は、ウサギを用いる皮膚腐食性試験の代替法として開発された試験法である。本試験法では、腐食性物質が角質層を傷害または角質層に吸収された後拡散し、表皮細胞に到達して細胞毒性を示すという仮説に基づき、被験物質曝露後の細胞生存率を指標に皮膚腐食性を評価する。

本試験法については、EpiSkin™、EpiDerm™、SkinEthic™、epiCS®という4種の表皮モデルがあげられている。いずれのモデルによる試験もバリデーション研究が実施され、ECVAM（European Centre for the Validation of Alternative Methods：欧州代替法評価センター）によりその信頼性と再現性が高いことが確認された¹⁻⁴⁾。EpiSkin™、EpiDerm™においては、ESAC（ECVAM Scientific Advisory Committee：ECVAM 科学諮問会議）での評価後、その結論は ICCVAM（Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods：米国代替法に関する省庁間連絡会議）においても確認された^{5,6)}。上記4種モデルについては OECD（Organisation for Economic Co-operation and Development：経済協力開発機構）にてテストガイドライン（TG）431 として承認された。この TG は昨今種々の点で改訂されており、現在は 2016 年版となっている⁷⁾。

JaCVAM 評価会議は、皮膚腐食性試験資料編纂委員会により作成された「ヒト表皮モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法の評価報告書」⁸⁾を用いて、本試験法の妥当性について検討した。

1. 試験法の定義

名称： ヒト表皮モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法

代替する対象毒性試験： ウサギを用いる皮膚腐食性試験

試験法の概略： 本試験法では、ウサギ皮膚の代わりに角質層を有する3次元再構築ヒト表皮モデルを用い、被験物質が角質層下の表皮細胞層に対し細胞毒性を示す能力を評価する。表皮モデル表面に被験物質を一定時間適用した後洗浄し、表皮細胞の生存率を MTT [3 - (4,5 - Dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5-diphenyltetrazolium bromide] の還元量から求め、皮膚腐食性を判定する。

2. 評価に用いた資料及び評価内容の科学的妥当性

本試験法は、4種の表皮モデルのいずれのモデルも、ECVAM によるバリデーション研究とそれに続く ESAC による第三者評価により、実験動物を用いた皮膚腐食性試験の代替法として科学的に妥当であると報告されており¹⁻⁴⁾、EpiSkin™および EpiDerm™を用いた試験法については ICCVAM においても同様に確認された⁶⁾。上記4種の表皮モデルを用いる方法については現在 OECD テストガイドラインとして承認されている⁷⁾。JaCVAM 皮膚腐食性試験資料編纂委員会では、現在まで公開されている情報^{1-7,9-11)}を基にヒト表皮モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法としての科学的妥当性について評価した。その結果、本試験法は、「腐食性物質が角質層の傷害または角質層への吸収を経て下層の表皮細胞に対し毒性を示す」という皮膚腐食性発現機序に基づき、細胞への毒性を指標にしたものであり、原理的にも妥当であると判断された。

3. 本試験法の有用性と適用限界

いずれの表皮モデルも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。強い酸性 (pH 2.0 以下) またはアルカリ性 (pH 11.5 以上) 物質は、強い局所傷害を引き起こす可能性があることから、皮膚腐食性と判断しても良いことになっている⁹⁾。しかしながら、これは腐食性についての情報が他にない場合に行われるワーストケースとしての判断であり、例えば緩衝作用が小さい物質や混合物の場合は偽陽性の判断となる可能性も考えられる¹⁰⁾。このため、このような物質に対しても動物を用いる必要のない本試験法で皮膚腐食性を評価することは有用である。

いずれのモデルも UN GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals : 国連 GHS) 分類における腐食性 (区分 1) について、その有無の予測性は高く、OECD で集計した化学物質では、感度は 95~100%、特異度は 72~79%、正確度は 84~90%であり、偽陰性率は 0~5%と低いレベルであった (表 1)。各モデルによる国連 GHS 分類の細区分 (1A~1C) の予測性については、80 物質を 2 または 3 回実験して得られた値を見る限り、EpiSkinTMのみが 1B/1C を 80%程度識別可能であった。その他のモデルは細区分の評価には利用できないと判断した。

MTT 還元物質に対しては、TG431 に対応方法が記載されており、これに準じることで評価可能である。ガス、エアロゾルについてはバリデーションが実施されておらず、適用可否は判断できない。それら以外の物質については、物理状態 (液体・固体等) および水溶性の有無にかかわらず適用可能であり、混合物にも適用可能な場合がある。

表 1. 化学物質の全セット*における予測性 (腐食性 [国連 GHS 区分 1] の有無)¹¹⁾

	EpiSkin TM	EpiDerm TM	SkinEthic TM	epiCS [®]
正確度	89.6%	87.9%	84.6%	84.3%
感度	98.5%	100%	94.6%	95.3%
特異度	79.3%	73.9%	73.0%	71.6%
偽陽性率	20.7%	26.1%	27.0%	28.4%
偽陰性率	1.5%	0%	5.4%	4.7%

*) OECD の集計による。

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れ性及び行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性 :

本試験法は、通常の培養技術を習熟した施設であれば実施できる試験法であり、OECD TG431 に承認された表皮モデルは市販されている。また、生きた動物を用いないという点で、3Rs の精神に合致しており、社会的受け入れ性は高い。

行政上の利用性 :

本試験法において陽性の結果が得られた場合、被験物質を腐食性物質 (国連 GHS 分類における区分 1) と判定することは可能であるが、UN GHS 分類の細区分のためには EpiSkinTMのみ利用可能である。なお、本試験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。

参考文献

- 1) ECVAM (1998) Statement on the scientific validity of the EpiSkin test (An in vitro test for skin corrosivity)
- 2) ECVAM (2000) Statement on the application of the EpiDerm™ human skin model for skin corrosivity testing
- 3) ECVAM (2006) Statement on the application of the SkinEthic™ human skin model for skin corrosivity testing
- 4) ECVAM (2009) ESAC Statement on the scientific validity of an in-vitro test for skin corrosivity testing
- 5) ICCVAM (1999) NIH Publication No.99-4495. Corrositex: An in vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals.
- 6) ICCVAM (2002) NIH Publication No.02-4502. ICCVAM Evaluation of EPISKIN™, and EpiDerm™ (EPI-200) and rat skin transcutaneous electrical resistance (TER) assay: in vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals.
- 7) OECD (2016) Guideline for the testing of chemicals. 431, in vitro Skin Corrosion: Human skin model test.
- 8) JaCVAM 皮膚腐食性資料編纂委員会：皮膚腐食性試験評価報告書 ヒト表皮モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法の評価報告書（2017年2月24日）.
- 9) OECD (2014) Series on Testing and Assessment No. 203, Guidance document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for skin corrosion and irritation
- 10) Sheel J. et.al., Classification and labeling of industrial products with extreme pH by making use of in vitro methods for the assessment of skin and eye irritation and corrosion in a weight of evidence approach, Toxicology in Vitro, 25, 1435-1447 (2011)
- 11) OECD (2015) Series on Testing & Assessment No. 219, Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro reconstructed human epidermis (RhE) test methods for skin corrosion testing as described in TG 431