

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. Rubinstein (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