

LabCyte EPI-MODEL24 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 25 年 4 月 19 日

JaCVAM 評価会議

吉田武美（日本毒性学会）：座長
浅野哲秀（日本環境変異原学会）
五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部）
大島健幸（日本化学工業協会）
小笠原弘道（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）
小野寺博志（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）
黒澤 努（日本動物実験代替法学会）
杉山真理子（日本化粧品工業連合会）
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）
長谷川隆一（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）
牧 栄二（日本免疫毒性学会）
増田光輝（座長推薦）
横関博雄（日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会）
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）
吉村 功（座長推薦）
渡部一人（日本製薬工業協会）

任期：平成 24 年 4 月 1 日～平成 26 年 3 月 31 日

以上

本報告での評価対象は、LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験（以下、当該試験法と略す）である。当該試験法は、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング（以下、JTC）によって開発された日本製の培養表皮モデルを用いたものである。培養表皮モデルを用いる皮膚刺激性試験は、被験物質が表皮モデルに与える損傷を細胞生存率を測定することで、代替的に評価するもので、すでに OECD Testing Guideline (TG) 439 として認証されている¹⁾。当該試験法も、OECD TG439 と同様に、ECVAM で改変された UN GHS CLP 規制に基づいて刺激性 (Category2) と非刺激性 (Category3 および No Category) を識別することを目的としている¹⁾。今回、皮膚刺激性試験代替法の第三者評価委員会の報告²⁾を受け、以下の 10 項目について評価したので報告する。

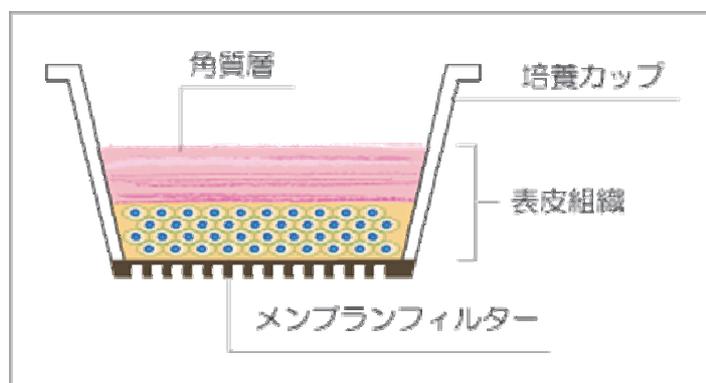
1. 当該試験法は、どのような従来試験法を代替するものか。または、どのような毒性を評価あるいは予測するものか。

当該試験法は、急性皮膚刺激性試験 (OECD TG 404) の代替法である。OECD TG 404 は、ウサギの皮膚に被験物質を 4 時間適用することにより皮膚刺激性の評価を行うことを目的としている。皮膚刺激性試験として、培養表皮モデルを用いた代替法 OECD TG439(2010) は、EpiSkinTM、EpiDermTMSIT (EPI-200) および SkinEthicTM (RHE) としてすでに認証を受けていた¹⁾が、類似の培養表皮モデルとして、当該試験法も 2013 年に追認された³⁾。

2. 当該試験法と従来試験法の間にはどのような科学的なつながりがあるか？

OECD TG404 では、皮膚表面に直接適用された被験物質によって引き起こされる可逆的な皮膚炎症反応を、肉眼的に紅斑および浮腫として検出し、皮膚刺激性としてとらえている。

LabCyte EPI-MODEL24 は、メンブランフィルター上に培養した角質層を含む再構築ヒト表皮モデルである。当該試験法は、この表皮モデルの上に被験物質を適用し、角質層を拡散・透過した被験物質が、角質層下の表皮細胞に与えた損傷を表皮細胞の生存率として皮膚刺激性を評価する方法である。さらに、当該試験法は OECD TG439 に性能標準⁴⁾として掲載された化学物質リストをもとに、me-too (小規模) バリデーションを行い、すでに収載済みの他の表皮モデルと同等の皮膚刺激性検出能が確認されたため、科学的に妥当であるとして OECD TG 439 に追記された³⁾。



3. 当該試験法とそのデータは、透明で独立な科学的評価を受けているか。

日本動物実験代替法学会により、OECD TG 439 に性能標準⁴⁾として掲載された化学物質リストをもとにバリデーションが行われ、さらに性能標準の変更により追加バリデーションが実施された⁵⁾。この結果をまとめた報告書は、Independent International Scientific Peer Review Panel により評価された。

その後、Peer Review Panel の指摘^{6,7)}に対し、改訂プロトコル⁸⁾を基にバリデーションが実施され、OECD 皮膚刺激専門家グループによる確認を経て OECD TG439 に追記された³⁾。
以上の経緯のように、透明で独立な科学的評価を受けている。

4. 当該試験法は、従来試験法の代替法として、どのような物質又は製品を評価することを目的としているか。

当該試験法は、一般化学物質の皮膚刺激性を OECD TG439 の分類にしたがって、評価することを目的としている。

5. 当該試験法は、ハザード評価あるいはリスク評価のどちらに有用であるか。

当該試験法は、化学物質の皮膚刺激性について、UN GHS CLP 規制の分類にしたがって、刺激性と非刺激性を識別できる。

したがって、当該試験法は曝露された化学物質のハザードを評価するのに有用であるが、リスク評価への有用性は確認されていない。

6. 当該試験法は、目的とする物質又は製品の毒性を評価できるか。その場合、当該試験法の適用条件が明確になっているか。

当該試験法は、UN GHS CLP 規制に基づく分類を目的としているため、4 で示した物質を評価することは可能である。

当該試験法の適用条件は明確になっている。MTT 還元法により細胞生存率を求めて評価に用いることから、着色による影響や還元物質による影響を受ける。また、開放適用により評価を行うため、エアロゾルやガスは適用外となる。

7. 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あるか。

改訂プロトコル⁹⁾にしたがって実施される限り、頑健である。

8. 当該試験法の技術習得は、適切な訓練と経験を経ている担当者にとって容易なものであるか。試験法の実施に特殊な設備が必要か。

当該試験法に必要な設備は、培養設備およびフォルマザンの生成量を測定するためのマイクロプレートリーダーのみであり、特殊な設備は不要である。

LabCyte EPI-MODEL24 は JTC から購入可能であるため、培養に関する適切な訓練と経験を経ている担当者であれば技術習得が容易である。

9. 当該試験法は、従来試験法と比べて時間的経費的に優れているか。

当該試験法にかかる時間は、5 日間である。試験期間は OECD TG404 と同程度であるが、馴化期間の必要な動物実験より優れている。

当該試験法では、動物実験に伴う経費が削減でき、経費的に優れている(1 キット/24 well : 5.4 万円)。

10. 当該試験法は、動物福祉の観点及び科学的見地から、目的とする物質又は製品の毒性を評価する代替法として、行政上利用することは可能か。

当該試験法は、動物を用いずに皮膚刺激性を評価できるので、動物福祉の観点から有用である。また、当該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(薬事法、農薬取締法、労働安全衛生法)において行政的な利用は可能であるが、我が国の医薬部外品、化粧品に必要とされる 24 時間適用による皮膚刺激性への応用の可能性については評価されていない。

4 時間適用にて認められる皮膚刺激性は、24 時間適用した場合、増強することが知られている¹⁰⁾。したがって、当該試験法で刺激性なし(GHS 刺激性区分にて無刺激性)と評価されても、24 時間適用では刺激性ありと評価される場合がある。しかしながら、4 時間適用で検出可能な強い皮膚刺激性(GHS 刺激性区分にて刺激性)を評価可能であることから、スクリーニング法として利用できる可能性がある。

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. 赤松浩彦, 寒水孝司: LabCyteEPI-MODEL24 皮膚刺激性試験代替法の第三者評価報告書の第三者評価報告書 (26, Nov, 2012)
3. OECD (2013), Draft Updated TG 439 *In vitro* skin irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, 25th Meeting of the Working Group of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme(WNT), Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

4. EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
5. 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.
6. 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>]
7. 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>]
8. 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.
9. Kojima, H., Katoh, M., Shinoda, S., Hagiwara, S., Suzuki, T., Izumii, R., Yamaguchi, Y., Nakamura, M., Kasahara, T., Shibai, A., (2013), Me-too Validation Study of *in vitro* Skin Irritation Test using the reconstructed human epidermis, LabCyte EPI-MODEL24, *J. Applied Toxicology*, accepted.
10. Cruzan, G., Dalbey, W.E., D'aleo, C.J. and Suger, E.J. (1986), A composite model for multiple assays of skin irritation, *Toxicol Ind Health*, 2(3), 309-20.

以上