

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

皮膚腐食性試験資料編纂委員会

令和3年(2021年)12月7日

皮膚腐食性試験資料編纂委員会

高橋 祐次 (委員長：国立医薬品食品衛生研究所 毒性部)

中村るりこ (独立行政法人 製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター)

山城 朋子 (株式会社資生堂 品質・安全性評価室／日本化学工業協会)

小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部)

List of Abbreviations (略語一覧)

ANOVA :	Analysis of Variance Software (分散分析)
ESAC:	ECVAM Scientific Advisory Committee (ECVAM 科学諮問会議)
EURL ECVAM:	European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (欧州代替法評価センター)
GHS :	Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (化学 品の分類および表示に関する世界調和システム)
ICCVAM :	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (米国の代替法に関する省庁間連絡会議)
JaCVAM :	Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (日本動物実験代替法評価センター)
MTT :	3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
OECD :	Organisation for Economic Co-operation and Development (経済協力開発機構)
OD :	Optical densities (吸光度)
PBS :	Phosphate buffered saline (リン酸緩衝液)
SCT :	Skin Corrosive Test (皮膚腐食性試験)
SDS :	Sodium dodecylsulphate
TER :	Transcutaneous electrical resistance assay (経皮電気抵抗性試験)
TG :	Test Guideline (試験法ガイドライン)
UN :	United Nations (国際連合)

要旨

ウサギを用いる皮膚腐食性試験の動物実験代替法(以下、代替法と記す)として、経済協力開発機構(OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development)にて試験法ガイドライン(TG: Test Guideline)431として承認されたヒト表皮モデルを用いる試験法の有用性を評価した。当該TGは2019年の改定において、LabCyte EPI-MODEL24が追加されたことから、他のヒト表皮モデルと信頼性と妥当性という視点において、比較、評価した結果、TG431に掲載されているモデルの中で、EpiSkin™、EpiDerm™と同様に、LabCyte EPI-MODEL24が腐食性の有無を評価できるモデルとして推奨できると考えられた。また、国際連合化学品の分類および表示に関する世界調和システム(UN GHS: United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)分類の細区分を考慮した評価においても、LabCyte EPI-MODEL24 SCT(Skin Corrosive Test)は、EpiSkin™、EpiDerm™ SCTと同様に評価できる試験法である。当該モデルは、日本国内で製造されていることから、海外生産のモデルに比較してコスト、入手が容易である点で有用であると考えられた。

1. 試験法の科学的および規制面からの妥当性

皮膚腐食性試験は皮膚刺激性試験の一環として行われ、種々のガイドラインでは Draize らにより提唱されたウサギを用いる方法が推奨されてきた¹⁾。この方法は被験物質の刺激性や腐食性を検出する試験として長く使用されてきたものの、判定を肉眼で行うため客観性に乏しく実験間や施設間での再現性が乏しい。更に動物に激しい痛みとストレスを与えることが社会的に問題となり、以前より動物を使用しない動物実験代替法(以下、代替法と記す)の開発が切望されていた。

この代替法として、経済協力開発機構(OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development)で試験法ガイドライン(TG: Test Guideline)431には、皮膚腐食性試験として角質層を有し3次元的に再構築されたヒト表皮モデルを使用した評価方法が記載されている²⁾。この試験法は、腐食性物質が角質層の傷害または角質層に吸収された後拡散することにより、下層の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している。EpiSkin™や EpiDerm™等のヒト表皮モデルは欧米では既にバリデーション研究が実施され、欧州では化学物質の皮膚腐食性評価を目的として承認され、化学物質のリスク表示識別等に利用されていることや、昨今、国際連合「化学品の分類および表示に関する世界調和システム(UN GHS: United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)」分類に従って評価されるケースが増えていることから、我が国においても腐食性試験の代替法として TG431 の 2016 年改訂版³⁾について、JaCVAM 皮膚腐食性試験資料編纂委員会が信頼性と妥当性という視点から評価を行った。その結果、EpiSkin™、EpiDerm™、SkinEthics™および epiCS®が被験物質の皮膚腐食性を評価する試験法として推奨できるモデルであり、UN GHS 分類の細区分を考慮する場合は EpiSkin™がもっとも有用であるとした評価報告書を作成した⁴⁾。これはその後、JaCVAM 評価会議においても評価され、適用範囲を十分に配慮した上で使用されるべきであるとされた⁴⁾。

さらに、UN GHS の最新の改訂版である 8 版(2019 年発行)⁵⁾においては、皮膚腐食性/刺激性の評価に対し、TG430、431 または 435 に従って実施された試験について一定の判定基準が設けられ、これらが腐食性区分 1(場合によっては細区分にも)に適用可能であることが示されたことから、代替法の行政利用の加速化が期待されているところである。

本評価書では、OECD TG431 の 2019 年改訂版⁶⁾ で新たに追加掲載されたヒト表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 SCT(Skin Corrosive Test)についての腐食性試験法としての有用性を評価した。なお、本評価方法を用いる際の利便性を考慮して、既に評価済みである EpiSkin™ および EpiDerm™ SCT を用いる腐食性試験法の情報についても併記した。

2. 試験プロトコル構成の妥当性

被験物質が角質層を通過して表皮細胞に曝露され、MTT[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]の還元量から求めた細胞生存率の割合から皮膚腐食性を判定する。それらの概要を表1にまとめた。被験物質としては、液体、粘性物、半固体、固体、ロウ様物、粘着性物質を対象にしている。実験操作上の違いは、前培養法および染色液の用量、組織からの抽出法等であり、基本的な曝露時間と判定基準については表2を参照されたい。

試験プロトコルとして、EpiSkin™、EpiDerm™ SCT および LabCyte EPI-MODEL24 SCT を例に説明する⁶⁾。

1) EpiSkin™

12well プレーートの各 well に培養液 2 mL を加えた後にヒト表皮モデルを置き、被験物質が液状の場合はピペッターで 50 μ L 適用、粉末など固形の場合は 20mg を 100 μ L の NaCl 溶液 (9 g/L) と合わせて適用する。被験物質を 3 分間、60 分間、および 240 分間曝露後、25 mL の PBS で被験物質を洗い流す。洗浄後、ペーパータオル等の上にて水分を切るか、表皮の破損に注意しながらピペッターを用い表面に残った PBS を吸い取った後、MTT 色素を含む培養液 (0.3 mg/mL) を表皮モデルの下方に 2 mL 添加する。37°C、CO₂ インキュベータ中に 180 分間培養した後、以下の手順にて抽出を行う。MTT 色素を含む培養液を除去後、パンチ生検 (biopsy punch) を用いて表皮モデルをくり抜き、酸性化イソプロパノール 0.5 mL 添加したガラスチューブに浸漬し、一晩室温放置する。96 well プレーートに抽出液を 200 μ L ずつ移し、マイクロプレートリーダーを用いて 545 nm-594 nm の領域での吸光度を測定する。酸性化イソプロパノールのみを加えた well をブランクとし、実測値とブランク値の差を求める。陰性対照である 240 分間曝露の NaCl 溶液 (9 g/L) の吸光度を 100% とし、各検体の 3 分間、60 分間および 240 分間曝露時の吸光度を % として算出し細胞の生存率とする。

3 分間曝露したときの生存率が 35% 未満を示す物質は“腐食性”と判定する。一方、240 分間曝露したときに 35% 以上の結果を示す物質は“非腐食性”と判定する。さらに、腐食性の区分として、3 分間処理したときの生存率が 35% 未満の場合は区分 1 A とし、3 分間曝露したときの生存率が 35% 以上で、かつ 60 分間曝露したときの生存率が 35% 未満の結果を示す物質、あるいは 60 分間曝露したときの生存率が 35% 以上で、かつ 240 分間処理したときの生存率が 35% 未満の結果を示す物質は、区分 1B/C とする。

2) EpiDerm™ SCT

6 well プレーートの各 well に培養液 1 mL を加えた後にヒト表皮モデルを置き、被験物質が液状の場合はピペッターで 50 μ L、粉末など固形の場合は 25 mg を 25 μ L の水と合わせ、モデル上層に適用する。被験物質を 3 分間および 60 分間曝露後、プレートから被験物質をデカンテーションにより除去した後、一定の弱流の PBS を用いて 20 回程度洗浄を行う。洗

浄後、ペーパータオル等で水分を切り、破損に注意しながら新たな 24 well プレートに表皮モデルを移動する。MTT 色素を含む培養液(1.0 mg/mL)をヒト表皮モデルの下方に 0.3 mL 添加する。37°C、CO₂ インキュベータ中に 180 分間培養した後、MTT 色素を含む培養液を吸引し PBS を添加、吸引を 2 回程度繰り返すことで、余剰な色素を取り除く。インサートにイソプロパノールを 2 mL 添加し、一晩室温放置後、96 well プレートに抽出液を 200 μL ずつ移し、マイクロプレートリーダーを用いて 540 nm あるいは 570 nm の領域での吸光度を測定する。イソプロパノールのみを加えた well をブランクとし、実測値とブランク値の差を求める。陰性対照である水の吸光度を 100%とし、各検体の 3 分間または 60 分間曝露時の吸光度を%として算出し細胞の生存率とする。

3 分間曝露したときの生存率が 50%未満、あるいは 3 分間では生存率が 50%以上であるが 60 分間曝露したときに 15%未満の結果を示す物質を“腐食性”と判定する。一方、3 分間曝露したときに生存率が 50%以上で、かつ 60 分間曝露したときに 15%以上の物質は“非腐食性”と判定する。さらに、腐食性の区分として、3 分間曝露したときの生存率が 25%未満の場合は、区分 1 A、25%以上の場合は区分 1 B/C とする。

3) LabCyte EPI-MODEL24 SCT

24well プレートの各 well に培養液 0.5 mL を加えヒト表皮モデルを置き、被験物質が液状の場合はピペッターで 50 μL、粉末など固形の場合は 50 mg を 50 μL の水と合わせ、モデル上層に適用する。被験物質を 3 分間および 60 分間曝露後、培養カップをピンセットで取り出し、タッピングすることで被験物質を除去した後、一定の強流の PBS を用いて 10 回程度洗浄を行う。洗浄後、滅菌綿棒を用いて水分を取り除き、MTT 色素を含む培養液(0.5 mg/ml)が 0.5 mL 入った新たなプレートにインサートを移動する。37°C、CO₂ インキュベータ中に 180 分間培養した後、以下の手順にて抽出を行う。培養表皮をピンセットで取り出し、イソプロパノール 300 μL の入ったマイクロチューブに浸漬し、一晩冷暗所に放置後、96 well プレートに抽出液を 200 μL ずつ移す。マイクロプレートリーダーを用いて 570 nm および 650 nm の領域での吸光度を測定し、吸光度(570 nm)から吸光度(650 nm)を差し引いた値を測定値とする。イソプロパノールのみを加えた well をブランクとし、実測値とブランク値の差を求める。溶媒対照の水の吸光度を 100%とし各検体の 3 分間または 60 分間曝露時の吸光度を%として算出し細胞の生存率とする。

3 分間曝露したときの生存率が 50%未満、あるいは 3 分間では生存率が 50%以上であるが 60 分間曝露したときに 15%未満の結果を示す物質を“腐食性”と判定する。一方、3 分間処理したときに生存率が 50%以上、かつ 60 分間曝露したときに 15%以上の物質は“非腐食性”と判定する。さらに、腐食性の区分として、3 分間曝露したときの生存率が 15%未満の場合は、区分 1 A、15%以上の場合は区分 1 B/C とする。

表 1. 皮膚腐食性試験のために確認された RhE 試験方法からなる主な試験方法(OECD TG431 補遺 2 一部改⁶⁾)
±で示した数字は、ばらつき許容範囲を示す。

テスト方法	EpiSkin™	EpiDerm™SCT	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
モデル表面積	0.38cm ²	0.63 cm ²	0.3cm ²
組織数	曝露時間毎に 2 つ以上	曝露時間毎に 2~3 つ	曝露時間毎に 2 つ以上
使用量と適用	<p>液体および粘性物：50±3 μL (131.6μL/cm²)</p> <p>固体：20±2 mg (52.6 mg/cm²)+N 塩化ナトリウム溶液(9 g/L) 100 ±5 μL</p> <p>ロウ様/粘着性物質：ナイロンメッシュを用いて 50±2 mg (131.6 mg/cm²)</p>	<p>液体：ナイロンメッシュを用いる場合も用いない場合でも、50 μL (79.4 μL/cm²)</p> <p>被験物質とナイロンメッシュとの親和性は予試験で確認する。</p> <p>半固体：50 μL (79.4 μL/cm²)</p> <p>固体：25 mg (39.7 mg/cm²)+25 μL の水(必要であればそれ以上)</p> <p>ロウ様物：15 μL の水で湿らせた直径約 8 mm のフラットなディスク様の片を上に乗せる。</p>	<p>液体および粘性物：50 μL (166.7μL/cm²)</p> <p>固体：50±2 mg (166.7 mg/cm²)+50μL の水</p> <p>ロウ様物：容積式ピペットを用い、液体および粘性物として処理する。</p>

テスト方法 要素	EpiSkin™	EpiDerm™SCT	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
直接 MTT 還元性の事前確認	50 µL(液体)もしくは20 mg(固体)に0.3 mg/mL MTT 溶液 2 mL を加えて、37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95% で 180±5 分間培養 →溶液の色が青/紫に変わった場合、水処理でモデル構成細胞を死滅させたものに被験物質を処置する対照もとる。	50 µL(液体)もしくは25 mg(固体)に1 mg/mL MTT 溶液 1 mL を加えて、37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95% で 60 分間培養 →溶液の色が青/紫に変わった場合、凍結処理でモデル構成細胞を死滅させたものに被験物質を処置する対照もとる。	50 µL(液体)もしくは50 mg(固体)+0.5 mg/mL の MTT 溶液 500µL を加えて 37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95% で 60 分間培養 →溶液の色が青/紫に変わった場合、凍結処理でモデル構成細胞を死滅させたものに被験物質を処置する対照もとる。
着色障害の事前確認	10 µL(液体)もしくは10 mg(固体)に90 µL の水を加えて室温で15 分間攪拌する。 →溶液が着色した場合、MTT のみを加えない対照をとる。	50 µL(液体)もしくは25 mg(固体)に300 µL の水を加えて 37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95% で 60 分間攪拌する。 →溶液が着色した場合、MTT のみを加えない対照をとる。	50 µL(液体)もしくは50 mg(固体)に500 µL の水を加えて 37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95% で 60 分間攪拌する →溶液が着色した場合、MTT のみを加えない対照をとる。
曝露時間と温度	室温 (18-28°C) で 3 分間、60 分間 (±5 分間) および 240 分間 (±10 分間)	室温で 3 分間、および 37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95% で 60 分間	室温で 3 分間、および 37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95% で 60 分間
PBS によるすすぎ	PBS 25 mL(すすぎ一回毎に 2 mL)	PBS を一定した弱流で 20 回	PBS の一定の強流で 10 回以上
陰性対照	50 µL の NaCl 溶液 (9g/L) 曝露時間毎に	50 µL の水 曝露時間毎に	50 µL の水 曝露時間毎に
陽性対照	50 µL の氷酢酸で 240 分間曝露時のみ検討	8 N 水酸化カリウム 50 µL で 60 分間曝露のみで検討	8 N 水酸化カリウム 50 µL で 60 分間曝露のみで検討

テスト方法 要素		EpiSkin™	EpiDerm™SCT	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
MTT 溶液		2 mL (0.3 mg/mL)	300 µL (1 mg/mL)	500 µL (0.5 mg/mL)
MTT 溶液での培養時間および温度		37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95%で 180 分間(±15 分間)	37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95%で 180 分間	37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95%で 180 分間(±15 分間)
抽出溶媒		500 µL の酸性化イソプロパノール (0.04 N 塩酸を含むイソプロパノール) (分離した組織を十分に浸漬)	2 mL のイソプロパノール (インサート全体から抽出)	300 µL のイソプロパノール (分離組織を完全に浸漬)
抽出時間および温度		遮光し、室温で一晩	室温で振とうせずに一晩、もしくは室温で振とうした状態で (約 120rpm) 120 分間	遮光し、冷暗所で一晩
OD 測定条件		標準フィルターなしで 570nm (545-595nm)	標準フィルターなしで 570nm (もしくは 540nm)	650 nm の標準フィルターにより 570 nm
組織の品質確認		SDS で 18 時間処理 1.0 mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 3.0 mg/mL	1% Triton X-100 で処理 4.08 時間 ≤ ET ₅₀ ≤ 8.7 時間	SDS で 18 時間処理 : 1.4 mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 4.0 mg/mL

アスト方法 要素	EpiSkin™	EpiDerm™SCT	LabCyte EPL-MODEL24 SCT
試験回数	1 回、明確な結果が得られなかった時は 2 回	1 回、明確な結果が得られなかった時は 2 回	1 回、明確な結果が得られなかった時は 2 回
適合判定基準	<p>1. 陰性対照(塩化ナトリウム溶液)で処理された複製組織の OD 値の平均は、いずれの曝露時間についても 0.6 以上 1.5 以下であること。</p> <p>2. 陽性対照(氷酢酸)に 240 分間曝露された複製組織の生存率の平均値を、陰性対照に対する割合(%)で表した場合、20%以下であること。</p> <p>3. 生存率の幅が 20~100%の範囲、かつ OD が 0.3 以上の場合、2つの複製組織間の生存率の差は 30%を超えないこと。</p>	<p>1. 陰性対照(水)で処理された複製組織の OD 値の平均は、全ての曝露時間において 0.8 以上 2.8 以下であること。</p> <p>2. 陽性対照 (8N 水酸化カリウム)に 60 分間曝露された複製組織の生存率の平均値(陰性対照に対する割合(%)で表した場合、15%以下)であること。</p> <p>3. 生存率が 20-100% の場合において、複製組織間の変動係数(CV)は 30%を超えないこと。</p>	<p>1. 陰性対照 (水) で処理した複製組織の OD 値の平均は、いずれの曝露時間についても 0.7 以上 2.5 以下であること。</p> <p>2. 陽性対照 (8N 水酸化カリウム)に 60 分間曝露された複製組織の生存率の平均値(陰性対照に対する割合(%)で表した場合、15%以下)であること。</p> <p>3. 生存率が 20~100%の範囲、かつ OD が 0.3 以上の場合、2つの複製組織間の生存率の差は 30%を超えないこと。</p>

表 2-1. EpiSkin™ の予測モデル

3 分間、60 分間および 240 分間曝露後の生存率	予測性の評価
3 分間曝露後の生存率が 35%未満	腐食性 ・ UN GHS 細区分 1A*
3 分間曝露後の生存率が 35%以上で、かつ 60 分間曝露後の生存率が 35%未満の場合、もしくは 60 分間曝露後の生存率が 35%以上で、かつ 240 分間曝露後の生存率が 35%未満	腐食性 ・ UN GHS 細区分 1B あるいは 1C
240 分間曝露後の生存率が 35%以上	非腐食性

*) 腐食性の細区分における RhE 試験法の有用性を評価するために作成したデータによると、EpiSkin™ 試験法により区分 1A に分類された物質/混合物の約 22%が、実際には区分 1B または 1C に属するものである可能性がある(すなわち、過大評価)。

表 2-2. EpiDerm™SCT の予測モデル

3 分間および 60 分間曝露後の生存率	予測性の評価
段階 1	
3 分間曝露後の生存率が 50%未満	腐食性
3 分間曝露後の生存率が 50%以上で、かつ 60 分間曝露後の生存率が 15%未満	腐食性
3 分間曝露後の生存率が 50%以上で、かつ 60 分間曝露後の生存率が 15%以上	非腐食性
段階 2 段階 1 で腐食性と判断された物質/混合物	
3 分間曝露後の生存率が 25%未満	UN GHS 細区分 1A*
3 分間曝露後の生存率が 25%以上	UN GHS 細区分 1B あるいは 1C

*) 腐食性の細区分における RhE 試験法の有用性を評価するために作成したデータによると、EpiDerm™SCT により区分 1A に分類された物質/混合物の約 29%実際には区分 1B または 1C に属するものである可能性がある(すなわち、過大評価)。

表 2-3. LabCyte EPI-MODEL24 SCT 予測モデル

3 分間および 60 分間曝露後の生存率	予測性の評価
段階 1	
3 分間曝露後の生存率が 50%未満	腐食性
3 分間曝露後の生存率が 50%以上で、かつ 60 分間曝露後の生存率が 15%未満	腐食性
3 分間曝露後の生存率が 50%以上で、かつ 60 分間曝露後の生存率が 15%以上	非腐食性
段階 2 段階 1 で腐食性と判断された物質／混合物	
3 分間曝露後の生存率が 15%未満	UN GHS 細区分 1A*
3 分間曝露後の生存率が 15%以上	UN GHS 細区分 1B あるいは 1C

*) 細区分を裏付けるため、RhE 試験法の有用性評価の観点から生成されたデータによると、LabCyte EPI-MODEL24 SCT 試験法での細区分 1A の結果 30%は、実際には細区分 1B または細区分 1C の物質／混合物(すなわち、過大分類)からなる可能性があると示された。

3. 開発および評価に使われた物質の分類、選択理由の妥当性、*in vitro*および参照データの有無

LabCyte EPI-MODEL24 SCT の再現性は、TG431 性能標準に定められた 30 被験物質により調べられている⁷⁾。EpiSkin™との再現性は、60 の被験物質により調べられている⁸⁾。EpiDerm™ SCT の再現性は、24 の被験物質により調べられている⁹⁾。さらに、EpiSkin™と EpiDerm™ SCT の予測性が 80 被験物質で調べられていて¹⁰⁾、LabCyte EPI-MODEL24 SCT においては 79 被験物質で調べられている¹¹⁾。評価に使用された被験物質の多くは欧州代替法評価センター(EURL ECVAM : European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing)主導の皮膚腐食性試験バリデーション研究で使用された物質である。

4. 試験法の正確性(再現性)

LabCyte EPI-MODEL24 SCT においては、TG431 の性能標準に定められた 30 の被験物質を用いた 3 施設での 3 回の実験において、3 施設とも一致しなかった物質や偽陰性物質はなく、施設内再現性は 90%以上(表 3)、および施設間再現性 83.3%(表 4)と性能標準に定められた基準内(施設内一致率 : 80%、施設間一致率 : 70%)であった。

EpiSkin™においては、60 物質を用いた 3 施設での 2-way の ANOVA 解析を用い、施設内および施設間の変動については、それらの間に有意な差はないと判断された⁸⁾。60 物質(27 腐食性物質および 33 非腐食性物質)のうち、42 物質は 3 施設とも施設内および施設間再現性が良好であった。残る 18 物質ではいずれかの結果が異なっていたが、EURL ECVAM は本試験法の信頼性と再現性は高いと判断した¹²⁾。この結論は、ECVAM 科学諮問会議(ESAC: ECVAM Scientific Advisory Committee)および米国の代替法に関する省庁間連絡会議(ICCVAM : Interagency

Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)¹³⁾ での評価においても確認された。

EpiDerm™ SCT においては、24 物質を用いた 3 施設での 2 回の実験において、21 物質の腐食性を 3 施設すべてで正しく予測できた⁹⁾。EURL ECVAM は本試験法の信頼性と再現性は高いと判断した。この結論は、ESAC の評価後¹⁴⁾、ICCVAM においても確認された¹³⁾。

表 3. LabCyte EPI-MODEL24 SCT の施設内再現性結果

Lab A					Lab B					Lab C				
No	Run 1	Run 2	Run 3	Concordance	No	Run 1	Run 2	Run 3	Concordance	No	Run 1	Run 2	Run 3	Concordance
1	NC	NC	NC	✓	1	NC	NC	NC	✓	1	NC	NC	NC	✓
2	NC	NC	NC	✓	2	NC	NC	NC	✓	2	NC	NC	NC	✓
3	NC	NC	NC	✓	3	NC	NC	NC	✓	3	NC	NC	NC	✓
4	NC	NC	NC	✓	4	NC	NC	NC	✓	4	NC	NC	NC	✓
5	NC	NC	NC	✓	5	NC	NC	NC	✓	5	NC	NC	NC	✓
6	NC	NC	NC	✓	6	NC	NC	NC	✓	6	NC	NC	NC	✓
7	NC	NC	NC	✓	7	NC	NC	NC	✓	7	NC	NC	NC	✓
8	NC	NC	NC	✓	8	NC	NC	NC	✓	8	NC	NC	NC	✓
9	1A	1A	1A	✓	9	1A	1A	1A	✓	9	1B/C	1B/C	1B/C	✓
10	1B/C	NC	1B/C	✗	10	NC	NC	NC	✓	10	NC	NC	1B/C	✗
11	1B/C	1B/C	1A	✗	11	1A	1B/C	1B/C	✗	11	1B/C	1B/C	1B/C	✓
12	1A	1A	1A	✓	12	1A	1A	1A	✓	12	1A	1A	1B/C	✗
13	1B/C	1B/C	1B/C	✓	13	1B/C	1B/C	1B/C	✓	13	1B/C	1B/C	1B/C	✓
14	1B/C	1B/C	1B/C	✓	14	1B/C	1B/C	1B/C	✓	14	1B/C	1B/C	1B/C	✓
15	1B/C	1B/C	1B/C	✓	15	1B/C	1B/C	1B/C	✓	15	1B/C	1B/C	1B/C	✓
16	1A	1A	1A	✓	16	1A	1A	1A	✓	16	1A	1A	1A	✓
17	1A	1A	1A	✓	17	1A	1A	1A	✓	17	1A	1A	1A	✓
18	1A	1A	1A	✓	18	1A	1A	1A	✓	18	1A	1A	1A	✓
19	1A	1B/C	1A	✗	19	1B/C	1B/C	1B/C	✓	19	1A	1A	1A	✓
20	1A	1A	1A	✓	20	1A	1A	1A	✓	20	1A	1A	1A	✓
21	1A	1A	1A	✓	21	1A	1A	1A	✓	21	1A	1A	1A	✓
22	1A	1A	1A	✓	22	1A	1A	1A	✓	22	1A	1A	1A	✓
23	1A	1A	1A	✓	23	1A	1A	1A	✓	23	1A	1A	1A	✓
24	1A	1A	1A	✓	24	1B/C	1B/C	1B/C	✓	24	1B/C	1A	1A	✗
25	1A	1A	1A	✓	25	1A	1A	1A	✓	25	1A	1A	1A	✓
26	1A	1A	1A	✓	26	1A	1A	1A	✓	26	1A	1A	1A	✓
27	1A	1A	1A	✓	27	1A	1A	1A	✓	27	1A	1A	1A	✓
28	1A	1A	1A	✓	28	1A	1A	1A	✓	28	1A	1A	1A	✓
29	1A	1A	1A	✓	29	1A	1A	1A	✓	29	1A	1A	1A	✓
30	1B/C	1B/C	1B/C	✓	30	1B/C	1B/C	1B/C	✓	30	1B/C	1B/C	1B/C	✓
27/30				90.00%	29/30				96.70%	27/30				90.00%

表 4. LabCyte EPI-MODEL24 SCT の施設間再現性結果

No	GHS cat.	Lab A	Lab B	Lab C	Concordance
1	NC	NC	NC	NC	✓
2	NC	NC	NC	NC	✓
3	NC	NC	NC	NC	✓
4	NC	NC	NC	NC	✓
5	NC	NC	NC	NC	✓
6	NC	NC	NC	NC	✓
7	NC	NC	NC	NC	✓
8	NC	NC	NC	NC	✓
9	NC	1A	1A	1B/C	✗
10	NC	1B/C	NC	NC	✗
11	1B/C	1B/C	1B/C	1B/C	✓
12	1B/C	1A	1A	1B/C	✗
13	1B/C	1B/C	1B/C	1B/C	✓
14	1B/C	1B/C	1B/C	1B/C	✓
15	1B/C	1B/C	1B/C	1B/C	✓
16	1B/C	1A	1A	1A	✓
17	1B/C	1A	1A	1A	✓
18	1B/C	1A	1A	1A	✓
19	1B/C	1A	1B/C	1A	✗
20	1B/C	1A	1A	1A	✓
21	1A	1A	1A	1A	✓
22	1A	1A	1A	1A	✓
23	1A	1A	1A	1A	✓
24	1A	1A	1B/C	1A	✗
25	1A	1A	1A	1A	✓
26	1A	1A	1A	1A	✓
27	1A	1A	1A	1A	✓
28	1A	1A	1A	1A	✓
29	1A	1A	1A	1A	✓
30	1A	1B/C	1B/C	1B/C	✓

施設間再現性 83.3% (25/30)

5. 試験法の信頼性^{7, 10, 15)}

LabCyte EPI-MODEL24 SCT の 3 施設における細区分の予測性を表 5 にまとめた。3 施設の予測性はほぼ同等であったが、1-B および 1-C を 1-A とする場合は多く、正確に評価できた値は表 5 に示す LabCyte EPI-MODEL24 requirement の基準である 55%を 43.3%と下回った。一致しなかった物質は(表 3 または表 4 の No.9、12、16~20)であった。非腐食性物質を 1-A とする結果(表 3 または表 4 の No.9)から、5%の上記基準を上回り、平均 6.7%であった。

なお、LabCyte EPI-MODEL24 SCT を含む既存のモデルとの比較として、細区分の予測性を表 6 にまとめた。79 物質を 2、3 回実験して得られた値を見る限り、いずれの値も基準を満たしており、モデル間の予測性にほとんど差はなかった。

これらモデルは MTT 還元物質への対応方法も TG431⁶⁾ に記載されている。適用できない物質としてはガス、エアロゾールのみが記載されている(バリデーション未実施)。これらモデルは物理状態(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、ガス、エアロゾールを除く混合物でも適用可能とされている。なお、特定の種類の物質や混合物においてこれらモデルの適用性を否定するような明確な根拠が得られた場合には、適用範囲から除外するべきであるとされている。

表 5. OECD で集計した全セットの化学物質を用いた予測性の計算結果
(細区分：UN GHS 区分 1A、1B/1C、非腐食性)

	Lab A	Lab B	Lab C	All Labs	LabCyte EPI-MODEL24 requirements
Sensitivity (for predictions C vs. NC)	100%	100%	100%	100%	≥ 95.0%
Correctly classified 1A	90.0%	80.0%	86.7%	85.6%	≥ 80.0%
1A underclassified 1B-and-1C	10.0%	20.0%	13.3%	14.4%	≤ 20.0%
1A underclassified NC	0%	0%	0%	0%	0%
Correctly classified 1B-and-1C	<i>40.0%</i>	<i>46.7%</i>	<i>43.3%</i>	<i>43.3%</i>	≥ 55.0%
1B-and-1C overclassified 1A	<i>60.0%</i>	<i>53.3%</i>	<i>56.7%</i>	<i>56.7%</i>	≤ 45.0%
1B-and-1C underclassified NC	0%	0%	0%	0%	≤ 5.0%
Specificity (C vs NC)	83.3%	90.0%	86.7%	86.7%	≥ 70.0%
NC overclassified 1A	<i>10.0%</i>	<i>10.0%</i>	0%	6.7%	≤ 5.0%
NC overclassified 1B-and-1C	6.7%	0%	13.3%	6.7%	≤ 30.0%
Accuracy (C vs. NC)	94.4%	96.7%	95.6%	95.6%	≥ 87.0%
Accuracy (1A vs. 1B-and-1C vs. NC)	<i>71.1%</i>	<i>72.2%</i>	<i>72.2%</i>	<i>71.9%</i>	≥ 72.0%

Numbers in italic: rates that do not meet the required values.

表 6. OECD で集計した全セットの 79 化学物質を用いた予測性の計算結果
(細区分：UN GHS 区分 1A、1B/1C、非腐食性)

	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	LabCyte EPI- MODEL24 SCT	Criteria requirements
Sensitivity (for predictions C vs. NC)	98.5%	100%	100%	≥ 95%
Correctly classified 1A	83.3%	83.3%	86.1%	≥ 80%
1A underclassified 1B-and-1C	16.7%	16.7%	13.9%	≤ 20%
1A underclassified NC	0%	0%	0%	0%
Correctly classified 1B-and-1C	76.3%	71.0%	70.0%	≥ 55%
1B-and-1C overclassified 1A	21.5%	29.0%	30.0%	≤ 45%
1B-and-1C underclassified NC	2.2%	0%	0%	≤ 5%
Specificity (C vs NC)	79.3%	73.9%	78.4%	≥ 70%
NC overclassified 1A	0%	2.7%	2.7%	≤ 5%
NC overclassified 1B-and-1C	20.7%	23.4%	18.9%	≤ 30%
Accuracy (C vs. NC)	89.6%	87.9%	89.9%	≥ 87%
Accuracy (1A vs. 1B-and-1C vs. NC)	78.8%	74.2%	76.4%	≥ 72%

6. 他の科学的な報告との比較の有無

OECD の腐食性試験代替法ガイドラインとして、TG431 の他に「TG430 TER (Transcutaneous Electrical Resistance) Test Methods: 経皮電気抵抗試験」¹⁶⁾ および「TG435 *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion: *in vitro* 膜バリア試験」¹⁷⁾ が承認されている。これらはいずれも EURL ECVAM にてバリデーション研究が実施され、ICCVAM はこれらの試験法 (Rat Skin TER, EpiSkin™、EpiDerm™ SCT および Corrositex®) の正確度、感度および特異度について比較している (表 7)^{10, 13)}。

これらの比較においては同じ物質を用いて評価されておらず、試験物質の数量や選択物質の種類が異なっているため、結果の数値だけをもって単純にヒト表皮モデルの優越性を比較評価することは困難であるが、いずれの試験法も同等の予測性を有すると思われる。LabCyte EPI-MODEL24 SCT は EpiSkin™並びに EpiDerm™ SCT と比較されており、ヒト皮膚三次元モデルとしては十分な予測性を有していると考えられる。

表 7. 試験法の比較結果¹⁸⁾

	TER	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	LabCyte EPI- MODEL24 SCT	Corrositex
物質数	122	79*	79*	79	163
正確度	81%	89.6%	87.9%	89.9%	79%
感度	94%	98.5%	100%	100%	85%
特異度	71%	79.3%	73.9%	78.4%	72%

*:OECD EWG によって選択された 80 化学物質から商業的に入手不可の 1 化合物を除外

7. 3Rs 原則との関係(動物福祉面からの妥当性)

LabCyte EPI-MODEL24 SCT は他の表皮モデルと同様に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。

8. 試験法の有用性と限界(コスト、時間からの妥当性など)

化学物質の皮膚腐食性は、その物理化学的性質に強く依存したものであり、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、強い局所作用を有する可能性が高いことから、皮膚腐食性と判断しても良いことになっている¹⁹⁾。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、例えば酸や塩基の添加により pH が変わり易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²⁰⁾。このため、このような物質に対して動物を用いる必要のない TG431 で皮膚腐食性を評価することは有用である。

各試験実施施設で本モデルを導入する際には、正しく評価できることを予め確認する必要がある。TG431 には、習熟度確認物質を正しく分類できるか否か試験することにより、専門技術の習熟について確認することができるとの記載がある(表 8)。

LabCyte EPI-MODEL24 は、日本国内で製造されていることから海外で開発された製品に比較して入手が容易であり、試験計画への柔軟な対応が可能になると考えられる。例えば、EpiDerm™ が 2 回/月の発送であるのに対し LabCyte EPI-MODEL24 は 1 回/週、モデルの入手コストは EpiDerm™ の約半分である。

表 8. 習熟度確認物質 OECD Test Guideline No 431 Table 1⁶⁾ 一部改

化学物質 1	CASRN	化学物質 分類	UN GHS (<i>in vivo</i> 試験) による 区分	VRM (<i>in vitro</i> 試験) による 区分	物理的 状態
区分 1A の <i>in vivo</i> 腐食性物質					
ブロモ酢酸	79-08-3	有機酸	1A	1A	固体
3 フッ化ボロン 二水和物	13319-75-0	無機酸	1A	1A	液体
フェノール	108-95-2	フェノール類	1A	1A	固体
ジクロロアセチ ルクロリド	79-36-7	求電子剤	1A	1A	液体
区分 1B/1C の <i>in vivo</i> 腐食性物質					
グリオキシル 酸一水和物	563-96-2	有機酸	1B/1C	1B/1C	固体
乳酸	598-82-3	有機酸	1B/1C	1B/1C	液体
エタノールアミン	141-43-5	有機塩基	1B	1B/1C	粘稠性
塩酸 (14.4%)	7647-01-0	無機酸	1B/1C	1B/1C	液体
<i>in vivo</i> 非腐食性物質					
臭化フェネチル	103-63-9	求電子剤	NC	NC	液体
4-アミノ-1,2,4- トリアゾール	584-13-4	有機塩基	NC	NC	固体
4- (メチルチ オ) ベンズアル デヒド	3446-89-7	求電子剤	NC	NC	液体
ラウリン酸	143-07-7	有機酸	NC	NC	固体

<略語>

CASRN : CAS 登録番号

UN GHS : 国際連合「化学品の分類および表示に関する世界調和システム」

VRM : バリデーション済み標準試験法

NC : 非腐食性

9. その他

前回の皮膚腐食性試験代替法の評価後⁴⁾、現在までの間に、UN GHS 専門家小委員会において、動物実験代替法の導入に関する議論が進み、UN GHS の最新の改訂版である 8 版(2019 年発行)⁵⁾では、第 3.2 章 皮膚腐食性/刺激性に「3.2.2.3 *in vitro*(試験管内)/*ex vivo*(生体外)のデータに基づく分類」という項目が新たに追記された(Annex 1 参照)。

UN 文書においては商標登録された情報を記述することができないため、具体的なヒト表皮モデル名はないものの、それらの区分/細区分への判定基準が明記された。

これらが掲載された背景には JaCVAM をはじめ、EURLECVAM や ICCVAM といった組織による動物実験代替法の検証結果が貢献するところが大きいと考えられる。

10. 結論

LabCyte EPI-MODEL24 を信頼性と妥当性という視点において評価した結果、他のヒト表皮モデルを用いた皮膚腐食性試験(EpiSkin™、EpiDerm™ SCT)と同様に、被験物質の皮膚腐食性を評価する試験法として推奨できるモデルであると結論された。UN GHS 細区分を考慮した評価においても、LabCyte EPI-MODEL24 SCT は、EpiSkin™、EpiDerm™ SCT と同様に皮膚腐食性を評価できる試験法である。

11. 参考文献

- 1) OECD, Guideline for the testing of chemicals. 404, Acute Dermal Irritation/Corrosion 2015.
- 2) OECD, Guideline for the testing of chemicals. 431, *In Vitro* Skin Corrosion: Human skin model test. 2004.
- 3) OECD, Guideline for the testing of chemicals. 431, *In Vitro* Skin Corrosion: Human skin model test. 2016.
- 4) JaCVAM 資料編纂委員会, 皮膚腐食性試験代替法 ヒト表皮モデル. 2017.
- 5) GHS 関係省庁連絡会議仮訳, 化学品の分類および表示に関する世界調和システム(GHS)改訂 8 版. 化学工業日報社, 東京, 2020.
- 6) OECD, Guideline for the testing of chemicals. 431, *In Vitro* Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method. 2019.
- 7) OECD, 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. 2015.
- 8) Fentem, J. H. et al.: Toxicology *In Vitro*, 12: 483-524, 1998.
- 9) Liebsch, M. et al.: Alternatives to laboratory animals : ATLA, 28: 371-401, 2000.
- 10) OECD, Series on Testing and Assessment No. 190 Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-Categorisation, in Series on Testing and Assessment. 2013.
- 11) JaCVAM Validation Management Team, Validation Study for *in vitro* skin corrosion test method using reconstructed human epidermal tissue LabCyte EPI-MODEL24. 2019.
- 12) ECVAM, Statement on the scientific validity of the Episkin test (An *in vitro* test for skin corrosivity) 1998.
- 13) ICCVAM, NIH Publication No.02-4502 ICCVAM Evaluation of Episkin™, EpiDerm™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals 2002.
- 14) ECVAM, Statement on the Application of the Epidermtm Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing 2000.
- 15) Desprez, B. et al.: Toxicology *In Vitro*, 29: 2055-2080, 2015.
- 16) OECD, Guideline for the testing of chemicals. 430, *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER). 2015.
- 17) OECD, Guideline for the testing of chemicals. 435, *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. 2015.
- 18) JaCVAM, Peer Review Panel Evaluation of the Performance-based Validation Study on the LabCyte EPI-Model24 *in vitro* skin corrosion test method as a me-too test method according to OECD GD 219 and falling within the OECD TG 431, 2018.
- 19) OECD, Series on Testing & Assessment No. 203, Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. 2014.
- 20) Scheel, J. et al.: Toxicology *In Vitro*, 25: 1435-1447, 2011.

ANNEX 1: 化学品の分類および表示に関する世界調和システム(GHS)改訂8版より

3.2.2.3 *in vitro* (試験管内)/*ex vivo* (生体外)のデータに基づく分類

3.2.2.3.1 現在入手できるそれぞれの *in vitro/ex vivo* 試験方法は皮膚刺激性または皮膚腐食性のどちらかを評価するが、一つの試験で両方の影響は評価しない。従って *in vitro/ex vivo* 試験結果のみに基づいた分類は二つ以上の方法で得られたデータを必要とするであろう。区分3を導入する所管官庁は、現在入手可能な国際的に検証され受け入れられている *in vitro/ex vivo* 試験方法では、区分3と分類される物質を識別することはできないことを認識することが重要である。

3.2.2.3.2 可能な限り分類は国際的に検証され受け入れられている *in vitro/ex vivo* 試験方法を用いて取られたデータに基づくべきであり、これらの試験方法に記載されている分類判定基準が適用される必要がある。試験物質が用いられた試験方法の適用範囲内にある場合にのみ、*in vitro/ex vivo* のデータは分類に使用することができる。公表された文献に記載されている追加的な制限も考慮されるべきである。

3.2.2.3.3 皮膚腐食性

3.2.2.3.3.1 OECD TG430、431 または 435 に従って試験が実施された場合、表 3.2.6 の判定基準に基づいて、物質は皮膚腐食性区分1(また可能であり要求されていれば細区分1A、1B または 1C) に分類される。

3.2.2.3.3.2 いくつかの *in vitro/ex vivo* 試験方法では細区分1Bおよび1C(表3.2.6参照)を区別することはできない。細区分が所管官庁によって要求されており、既存の *in vitro/ex vivo* データが細区分を区別することができない場合には、これら二つの細区分を区別するための追加的な情報を考慮しなければならない。追加的な情報が無いまたは不十分である場合には、区分1が適用される。

3.2.2.3.3.3 腐食性とは同定されない物質は皮膚刺激性としての分類が検討されるべきである。

3.2.2.3.4 皮膚刺激性

3.2.2.3.4.1 腐食性に関する分類が除外され、しかも OECD TG439 に従った試験が実施された場合には、物質は表 3.2.7 の判定基準に基づいて皮膚刺激性区分2としての分類が検討されるべきである。

3.2.2.3.4.2 所管官庁が区分3を採用している場合、現在入手可能な皮膚刺激性に関する *in vitro/ex vivo* 試験方法(例えば OECD TG439)では、物質を区分3に分類することはできないことを認識することが重要である。このような場合、区分1または区分2に関するどちらの分類判定も実行されない場合、区分3または区分に該当しないを区別するために追加的な情報が必要とされる。

3.2.2.3.4.3 所管官庁が区分3を採用しない場合、皮膚刺激性に関して国際的に受け入れられ検証されている *in vitro/ex vivo* 試験、例えば OECD TG439 における陰性結果は皮膚刺激性の区分に

該当しないと結論するために使用することができる。

表 3.2.6. *in vitro/ex vivo* 方法に関する皮膚腐食性判定基準(TG431 部分のみ抜粋)

区分	再構築ヒト表皮モデル試験： OECD TG431、 附属書 2、方法 1、2、3、4			
	試験化学品を、ヒトの皮膚の上層部に性質がよく似た 3 次元再構築ヒト表皮 (RhE) に局所的に適用する 4 つの方法がある。試験方法は、腐食性化学品は拡散または浸食により角質層を貫通し、かつ下層の細胞に対して毒性があるという前提に基づく。組織の生存率は、MTT 染料の酵素反応による青色ホルマザン塩への変換を、青色ホルマザン塩を組織から抽出して定量することで評価する。腐食性化学品は、定められた閾値以下の組織の生存率を低下させる能力で決定される。 判定基準は、定義された曝露期間による組織の生存率に基づく。			
1	方法 1 3 分間、60 分間または 240 分間曝露後 35%未満	方法 2、3、4 3 分間曝露後 50%未満；または 3 分間曝露後 50%以上かつ 60 分間曝露後 15%未満		
1A	方法 1 3 分間曝露後 35%未満	方法 2 3 分間曝露後 25%未満	方法 3 3 分間曝露後 18%未満	方法 4 3 分間曝露後 15%未満
1B	3 分間曝露後 35%以上かつ 60 分間曝露後 35%未満または 60 分間曝露後 35%以上かつ 240 分間曝露後 35%未満	3 分間曝露後 25%以上かつ区分 1 の判定基準を満足	3 分間曝露後 18%以上かつ区分 1 の判定基準を満足	3 分間曝露後 15%以上かつ区分 1 の判定基準を満足
1C				
皮膚腐食性とは分類されない	240 分間曝露後 35%以上	3 分間曝露後 50%以上、かつ 60 分間曝露後 15%以上		