

皮膚刺激性試験のための3種の *in vitro* アッセイの UN GHS 下における性能および ECVAM による皮膚刺激性の性能標準における参照物質と正確性の値の適用に関する声明

2009年3月9-10日に開催された欧州代替法評価センター科学諮問委員会(ESAC)の第30回会議にて、非常任メンバーは以下の声明を全会一致で了承した。その後、明記された手続きにより ESAC 事務局での校了と ESAC での最終合意を経て 2009年4月に声明が発効された。

1. UN GHS 下における ECVAM でバリデートされた皮膚刺激性 *in vitro* 試験の性能

3種の再構築ヒト表皮モデルを用いた皮膚刺激性 *in vitro* 試験法(Episkin 法、EpiDerm SIT 変法、SkinEthics RHE 法)が、従来の EU 分類システムに従って、ECVAM により既にバリデートされている。この分類システムは、数年後、国連(以下、UN とする)の「化学品の分類および表示に関する国際調和システム(GHS [1])」に基づく CLP 規制下(以下、参照)の新しい分類システムに置き換えられる。新たな CLP の規則に従った分類では、以下の期限が適用される。

- 2010年12月1日 物質の分類
- 2015年6月1日 混合物の分類(すなわち、調製品)

重要なこととして、2003年から2007年に実施された ECVAM による皮膚刺激性バリデーション研究(以下、SIVS とする[2])では、すでに新しい UN GHS 分類システムを考慮して試験物質が選択されていた。ECVAM による SIVS が終了すると、Episkin 法は皮膚刺激性を区別する方法として信頼できる唯一の試験法であるとされた(2007年4月 ESAC 声明 [3])。そのため、EpiSkin 法の予測性に関する性能が、2007年5月に発行された ECVAM による皮膚刺激性の性能標準の正確性と信頼性に対する要求水準を決定するために使用された。その後、EpiDerm SIT 変法と SkinEthics RHE 法が、20の指定された参照物質(2008年11月 ESAC 声明[4])を用いて、性能標準のもとバリデートされた。

2008年12月、EU は「分類」と「表示」のために UN GHS を採用し、「化学品および混合物の分類、表示、梱包に関する規制(CLP 規制 EC1272/2008 [5])」によりこれを実行する予定である。この規制は2009年1月20日から実施され、移行期間を経て、これまでの EU における化学品および混合物(すなわち、調製品)の分類の規制にとって代わることになる。UN GHS システムの規定に従うと、新たな CLP 規制下の皮膚刺激性分類システムは、単一の皮膚刺激性のカテゴリー(カテゴリー2)を使用するので、刺激性(カテゴリー2)と非刺激性(カテゴリーなし)を区別する2つのカテゴリーを使用する。しかし、皮膚刺激性の分類と表示に関する UN GHS の規則により、カテゴリーなしとカテゴリー2の物質を分けるカットオフ値は、*in vivo* スコアが(以前の EU 分類で使用されていた)2.0から2.3以上に変更された。結果として、*in vivo* スコアが2.0から2.3の物質は、以前の EU 分類では刺激性とみなされたが、今後の CLP の分類システムでは非刺激性とみなされることになる。ただし、2つ以上の皮膚刺激性のカテゴリーが必要という行政機関(例えば、農薬の評価)で利用される、任意に追加される UN GHS カテゴリー3(弱刺激性: 1.5以上2.3未満のスコア)の使用は意図しない。

3種の試験法の性能は、CLP 下(すなわち、1つの刺激性のカテゴリーを使用する UN GHS)で、カットオフ値の変更を考慮して再評価され、十分な結果が確認された(表1および[6]の正確性の値の再計算に関する詳細な結果)。Episkin 法の特異度は81.8%(従来の EU システム)から71.1%(CLP)に低下し、感度は72%(従来の

EUシステム)から84.6%(CLP)に向上した。他の2つの方法については、特異度は同様の値(どちらも69.2%*)であり、感度はCLP下で参照試験法(Episkin法)より高かった。

これら試験法の科学的な妥当性に関する旧ESAC声明は、皮膚刺激性を区分するための方法として、引き続き妥当であり、CLPシステムへの適用が可能である。CLP下で再計算した正確性の値はこの文書中に示されている。

さらに、3種の方法の十分な性能を確認できる書類をもとに、ESACは次の意見を述べている。

- 現段階で追加の作業は不要である。
- バリデーション研究に関する既存情報とその追加の背景情報が、EUでのGHSシステムの適用によるカットオフ値の変更によって生じた試験法の性能や性能標準の重要な側面(すなわち、参照物質と指定された正確性の値)の変化を説明・正当化するために十分である。

当然のことながら、必要に応じて、適切に技術的進歩への対応が必要である。現段階では、適用範囲に関するいかなる結論は、主として、ECVAMによるSIVSで使用された試験物質に基づくということに注意しなければならない。

*) All values are based on the final predictive decisions of the study calculated on the basis of the median of the individual laboratory predictions. Since the predictions are essentially categories (i.e. positive or negative) and take values of either 1 or 0, the final decision can be derived by using either the median or the mode.

表1 CLP (UN GHS)下におけるECVAMでバリデートされた皮膚刺激性 *in vitro* 試験の正確性の値

| | EpiSkin test method (58 chemicals ¹) | EpiSkin test method (20 reference chemicals ³) | Modified EpiDerm test method (20 reference chemicals ³) | SkinEthic test method (20 reference chemicals ³) |
|-----------------------------------|---|---|--|---|
| Specificity (%) ² | 71.1 | 76.9 | 69.2 | 69.2 |
| Sensitivity (%) ² | 84.6 | 85.7 | 85.7 | 100 |
| Overall Accuracy (%) ² | 74.1 | 80 | 75 | 80 |

1) The test substances from the ECVAM Skin Irritation Validation Study (SIVS) conducted from 2003 to 2007.

2) Based on the median (or mode) of the individual laboratory predictions. The values in parentheses provide the correct predictions per total number of substances either per categorical group (for sensitivity and specificity values) or per total number of substances tested (for accuracy value).

3) Original 20 RC from the ECVAM Performance Standards May 2007

2. ECVAMによる性能標準における参照物質と指定された正確性の値の適応

2.1 参照物質の更新リスト

EUでのUN GHSシステムの採用によるカットオフ値の変更により、ECVAMによる性能標準の原本に記載され

た参照物質は、刺激性と非刺激性の物質の数が同じではなくなった。

この問題と他の問題(すなわち、国際的に市販されていること、ヒトに対する非刺激性の事実、操作特性)に対処するため、参照物質のセットが更新された。更新された参照物質のセットには、改良的または模倣的試験法に対する適切な将来のバリデーションを考慮して、ECVAM による SIVS での 58 の試験物質をもとに、UN GHS 下での Episkin 法で得られた偽陰性と偽陽性が反映されている。

削除: 次の 6 つの物質を削除 (括弧内の数値は *in vivo* スコアを表す)

- 1) d-propylene glycol (0)
- 2) allyl heptanoate (1.7)
- 3) terpinyl acetate (2.0)
- 4) tri-isobutyl phosphate (2.0)
- 5) alpha-terpineol (2.7)
- 6) butyl methacrylate (3.0)

追加: 次の 6 つの物質を追加 (括弧内の数値は *in vivo* スコアを表す)。

- 1) cinnamaldehyde (2.0)
- 2) 2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine HCl (2.7)
- 3) 5% potassium hydroxide (3.0)
- 4) benzenethiol, 5-(1,1-dimethyl)-2 methyl (3.3)
- 5) 1-methyl-3-phenyl-1-piperazine (3.3)
- 6) 1,1,1-trichloroethane (4.0)

さらに、更新された参照物質(表 2)は次の基準を満たす。

1. 市販されている
2. 広範な Draize 皮膚刺激性スコア(非刺激性から強刺激性)について代表的である
3. 構造が明確である
4. バリデーションの過程で使用される化学的な機能について代表的である
5. 重篤な毒性プロファイル(例、発癌性や生殖毒性)、環境的な懸念、高額な廃棄価格について問題がない

表 2 更新された参照物質

| Nr. | Reference Chemical | <i>In vivo</i> Score | EU <i>in vivo</i> category | GHS-EU <i>in vivo</i> category | EPISKIN classification |
|-----|---|----------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------|
| 1 | 1-bromo-4-chlorobutane | 0 | no | no category | I |
| 2 | diethyl phthalate | 0 | no | no category | NI |
| 3 | naphthalene acetic acid | 0 | no | no category | NI |
| 4 | allyl phenoxy-acetate | 0.3 | no | no category | NI |
| 5 | isopropanol | 0.3 | no | no category | NI |
| 6 | 4-methyl-thio-benzaldehyde | 1 | no | no category | I |
| 7 | methyl stearate | 1 | no | no category | NI |
| 8 | heptyl butyrate | 1.7 | no | optional cat. 3 | NI |
| 9 | hexyl salicylate | 2 | R38 | optional cat. 3 | NI |
| 10 | cinnamaldehyde | 2 | R38 | optional cat. 3 | I |
| 11 | 1-decanol * | 2.3 | R38 | category 2 | I |
| 12 | cyclamen aldehyde | 2.3 | R38 | category 2 | I |
| 13 | 1-bromohexane | 2.7 | R38 | category 2 | I |
| 14 | 2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine HCl | 2.7 | R38 | category 2 | I |
| 15 | 5% potassium hydroxide | 3 | R38 | category 2 | I |
| 16 | di-n-propyl disulphide * | 3 | R38 | category 2 | NI |
| 17 | benzenethiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl | 3.3 | R38 | category 2 | I |
| 18 | 1-methyl-3-phenyl-1-piperazine | 3.3 | R38 | category 2 | I |
| 19 | heptanal | 4 | R38 | category 2 | I |
| 20 | 1,1,1- trichloroethane | 4 | R38 | category 2 | I |

*) Substances which are irritant in the rabbit but for which there is reliable evidence that they are non-irritant in humans.

2.2 ECVAM による皮膚刺激性の性能標準で指定かつ更新された正確性の値

(ECVAM による皮膚刺激性の性能標準に含まれる) 指定された正確性の値は、GHS-EU 下で、更新された参照物質を用いて、興味のある種類について適切な考察をもとに、バリデートされた参照試験法である Episkin 法の性能から設定されている。値は表 3 に与えられている。

表 3 指定された正確性の値

| | Defined Accuracy Values |
|----------------------|-------------------------|
| Specificity (%) | 70 |
| Sensitivity (%) | 80 |
| Overall Accuracy (%) | 75 |

Joachim Kreysa

Head of Unit

In-Vitro Methods Unit

European Centre for the Validation of Alternative Methods

Ispira, 8th July 2009

REFERENCES

1. United Nations Economic Commission for Europe (UNECE) (2008). UN Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals, 2nd revised edition; Online: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html; (as of 156 April 2009).
2. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559-601.
3. ECVAM (2007) Statement of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) on the Validity of In Vitro Tests for Skin Irritation. Online: <http://ecvam.jrc.it/>
4. ECVAM (2008) Statement of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of in vitro tests for skin irritation testing. Online: <http://ecvam.jrc.it/>
5. REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006)
6. Griesinger, C., Barroso, J., Zuang, V., Cole, T., Genschow, E. and Liebsch M. (2009). Explanatory background document to the OECD draft test guideline on in vitro skin irritation testing. Available under “Validation Study Documents, section Skin Irritation” at: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>

最後のページは翻訳対象外(原著参照)。