

# 新規試験法提案書

## 皮膚刺激性試験代替法 EpiDerm および SkinEthics

平成25年 1 月

国立医薬品食品衛生研究所

# 新規試験法提案書

平成 25 年 1 月 20 日

No. 2012-02

## 皮膚刺激性試験代替法 EpiDerm および SkinEthics の提案

平成 24 年 7 月 4 日に東京、国立医薬品食品衛生研究所にて開催された新規試験法評価会議（通称：JaCVAM 評価会議）において以下の提案がなされた。

提案内容：皮膚刺激性試験代替法 EpiDerm および SkinEthics は倫理的に優れた試験法であり、適切な利用条件下で適用するならば、化学物質の皮膚に対する 4 時間適用の一次刺激性を評価することが可能である。

この提案書は、European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) による第三者評価資料および OECD Test Guideline (TG) 439 の成立時により準備された資料をもとに、皮膚刺激性試験代替法評価委員会によりまとめられた文書を用いて JaCVAM 評価会議が評価および検討した結果、その有用性が確認されたことから作成された。

以上の理由により、行政当局の安全性評価方法として「皮膚刺激性試験代替法 EpiDerm および SkinEthics」の使用を提案するものである。

吉田武美



JaCVAM 評価会議 議長

西川秋佳



JaCVAM 運営委員会 委員長

## 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

## JaCVAM 運営委員会

- 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）：委員長  
大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所）  
小川久美子（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）  
菅野 純（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 毒性部）  
斎藤和幸（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）  
佐々木正広（厚生労働省 医薬食品局 化学物質安全対策室）  
関野祐子（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 薬理部）  
高木篤也（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 毒性部 動物  
管理室）  
長谷部和久（厚生労働省 医薬食品局 化学物質安全対策室）  
広瀬明彦（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 総合評価研究  
室）  
本間正充（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 変異遺伝部）  
光岡俊成（厚生労働省 医薬食品局 審査管理課）  
小島 肇（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 薬理部 新規  
試験表評価室）：事務局

**JaCVAM statement  
on two *in vitro* assays  
for skin irritation testing**

At the meeting concerning the above method, held on 4 July 2012 at the National Institute of Health Sciences (NIHS), Tokyo, Japan, the members of the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) Regulatory Acceptance Board unanimously endorsed the following statement:

**The *in vitro* assay using the reconstructed human epidermis models such as EpiDerm and SkinEthics is considered to have sufficient accuracy and reliability for prediction of skin irritating test substances applied for 4 hours under proper conditions.**

Following the review of the results of the ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) statements and OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) Test Guideline revised No. 439, it is concluded that two *in vitro* assays using the reconstructed human epidermis models such as EpiDerm and SkinEthics for skin irritation testing are clearly beneficial.

The JaCVAM Regulatory Acceptance Board has been regularly kept informed of the progress of the study, and this endorsement is based on an assessment of various documents, including, in particular, the evaluation report prepared by the JaCVAM ad hoc peer review panel for skin irritation testing.



Takemi Yoshida  
Chairperson  
JaCVAM Regulatory Acceptance Board



Akiyoshi Nishikawa  
Chairperson  
JaCVAM Steering Committee

20 January, 2013

The JaCVAM Regulatory Acceptance Board was established by the JaCVAM Steering Committee, and is composed of nominees from the industry and academia.

Mr. Takemi Yoshida (Japanese Society of Toxicology): Chairperson  
Mr. Norihide Asano (Japanese Environmental Mutagen Society)  
Mr. Yoshiaki Ikarashi (National Institute of Health Sciences: NIHS)  
Mr. Takeyuki Oshima (Japan Chemical Industry Association)  
Mr. Hiromichi Ogasawara (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)  
Mr. Hiroshi Onodera (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)  
Mr. Tsutomu Miki Kurosawa (Japanese Society for Animal Experimentation)  
Ms. Mariko Sugiyama (Japan Cosmetic Industry Association)  
Mr. Akiyoshi Nishikawa (Biological Safety Research Center: BSRC, NIHS)  
Mr. Ryuichi Hasegawa (National Institute of Technology and Evaluation)  
Mr. Eiji Maki (Japanese Society of Immunotoxicology)  
Mr. Mitsuteru Masuda (nominee by Chairperson)  
Mr. Hiroo Yokozeki (Japanese Society for Dermatoallergology and Contact Dermatitis)  
Ms. Midori Yoshida (BSRC, NIHS)  
Mr. Isao Yoshimura (nominee by Chairperson)  
Mr. Kazuto Watanabe (Japan Pharmaceutical Manufacturers Association)



This statement was endorsed by the following members of the JaCVAM steering Committee after receiving the report from JaCVAM Regulatory Acceptance Board:

Mr. Akiyoshi Nishikawa (BSRC, NIHS): Chairperson  
Mr. Yasuo Ohno (NIHS)  
Ms. Kumiko Ogawa (Division of Pathology, BSRC, NIHS)  
Mr. Jun Kanno (Division of Cellular and Molecular Toxicology, BSRC, NIHS)  
Mr. Kazuyuki Saito (Pharmaceutical & Medical Devices Agency)  
Mr. Masahiro Sasaki (Ministry of Health, Labour and Welfare)  
Ms. Yuko Sekino (Division of Pharmacology, BSRC, NIHS)  
Mr. Atsuya Takagi (Animal Management Section of the Division of Cellular and Molecular Toxicology, BSRC, NIHS)  
Mr. Kazuhisa Hasebe (Ministry of Health, Labour and Welfare)  
Mr. Akihiko Hirose (Division of Risk Assessment, BSRC, NIHS)  
Mr. Masamitsu Honma (Division of Genetics and Mutagenesis, BSRC, NIHS)  
Mr. Toshinari Mitsuoka (Ministry of Health, Labour and Welfare)  
Mr. Hajime Kojima (Section for the Evaluation of Novel Methods, Division of Pharmacology, BSRC, NIHS):Secretary

# 皮膚刺激性試験代替法 EpiDerm および SkinEthics

## 目次

評価会議報告書 -----	1
第三者評価報告書 -----	7
評価委員会の意見-----	8
皮膚刺激性試験のための <i>in vitro</i> 試験の科学的評価についての声明---	9
皮膚刺激性試験のための 3 種の <i>in vitro</i> 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 -----	23
再構築ヒト表皮を用いた <i>in vitro</i> 皮膚刺激性試験の性能標準に関する ESAC 声明-----	37



# 皮膚刺激性試験代替法 EpiDerm および SkinEthics の評価会議報告書

JaCVAM 評価会議

平成 24 年（2012 年）7 月 4 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

皮膚刺激性試験代替法 EpiDerm および SkinEthics について、第三者評価委員会からの報告を受け<sup>1)</sup>、以下の 9 項目について審議した。本 2～8 項目は OECD ガイダンス文書 No. 34 に示された検討項目である<sup>2)</sup>。なお、本動物実験代替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。

#### < 審議内容 >

1. 検討対象の試験法は、日本のどの法規制やガイドラインに関係しているか。

本試験法は、医薬品、医療機器、医薬部外品若しくは化粧品の原料、又はその他の物質若しくは製品に関する法規制又はガイドラインが求めている皮膚刺激性に関係する。

2. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデータは、透明で独立な評価を受けているか。

本試験法は、ECVAM 科学諮問委員会 (ESAC) によって評価を受け公表されており、その内容は OECD GD No. 34 に準拠している。したがって、透明で独立な評価を受けている。

3. 当該試験法で得られるデータは、対象毒性を十分に評価あるいは予測できるものであるか。データは、当該試験法と従来の試験法の、代替法としての繋がりを示しているか。あるいは (同時に) そのデータは、当該試験法と、対象としているあるいはモデルとしている動物種についての影響との繋がりを示しているか。

本試験法は、正常ヒト由来表皮細胞からなる 3 次元培養表皮モデルによる試験法であって、試験試料を直接曝露し、接触した表皮細胞の生存率を評価しており、従来の試験法であるヒトおよび動物を用いる皮膚刺激性試験法と類似性がある。そのデータは従来の 4 時間貼布試験法と良好な一致性を示している。

4. 当該試験法は、ハザードあるいはリスク、あるいはその両方を評価するのに有用であるか。

本試験法は、化学物質の皮膚刺激性について、GHS をベースとした EU の「化学品及び混合物の分類、表示、包装に関する規則 (CLP 規則)」に基づき、刺激性 (カテゴリー 2 ; スコア 2.3 以上) と非刺激性 (カテゴリー表示なし : スコア 2.3 未満) を識別できる。

したがって、本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。

5. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件及び適用できない条件が明確であるか。

- ・ 試験物質のセットは、OECD により適切に選択された 20 種である。また、これらは GHS をベースとした EU の CLP 規則により定義されたウサギ皮膚刺激性分類システムに従えば、刺激性 (カテゴリー 2 ; スコア 2.3 以上) の 10 種、カテゴリーなし (スコア 2.3 未満) の 10 種合計 20 種から成る。したがって、化学物質の GHS 分類の識別に関しては十分であると判断される。た

だし、製剤は扱っていない。

- ・ 試験法の適用限界として、細胞の生存率を指標としており、皮膚損傷からの回復効果をみることはできない。MTT還元法であ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。

6. 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、適切な訓練経験を持つ担当者と適切な設備のある施設において、技術習得が容易なものであるか。

各試験法のプロトコルが定められており、試験成立条件を満たす限り頑健である。微細なプロトコル変更による影響は調べられていない。本試験法は基本的な培養技術を習得した担当者と適切な培養設備のある施設において、技術習得が容易である。

7. 当該試験法は、時間的・経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。

本試験法の試験にかかる時間は、前培養を含めて3日間と短時間である点と、動物実験と比較して受け入れ可能な価格であることから行政上受け入れやすい。

- \* : 本試験の市販表皮モデル EpiDerm 11.3万円 (24well)  
Skin Ethics 納入価不明  
EPISKIN 9.8万円 (12well)

8. 当該試験法は、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に、新しい試験法あるいは改訂試験法であることが正当化されているか。

- ・ 本試験法は、従来の試験法であるヒトおよび動物を用いる皮膚刺激性試験法と類似性があることから科学的に妥当である。
- ・ 動物を使用せず、動物福祉の面から代替法として妥当であり、正当化されうる。
- ・ 表皮モデルは日本では入手に時間がかかり、購入後に長期保存ができないこともあるが、経済的にも正当化される。

9. 安全性評価のための行政的資料として、受け入れ可能な試験法であるか。

- ・ 本試験法は、4時間適用による皮膚刺激性を評価する方法であり、GHSの区分2で定められた皮膚刺激性を評価する試験法であるが、我が国の医薬部外品、化粧品の皮膚刺激性の評価に使用されてきた従来の動物モデルを用いた24時間適用による皮膚刺激性試験との同等性を判断するための科学的根拠が十分ではない。
- ・ 一般的な化学物質におけるハザードの評価に利用可能である。

以上の審議の結果、JaCVAM評価会議は、皮膚刺激性試験代替法EpiDermおよびSkinEthicsについて以下のように結論した。

本試験法は、倫理的に優れた試験法であり、適切な利用条件下で適用するならば、化学物質の皮膚に対する4時間適用の一次刺激性を評価することが可能である。

## 参考文献

1. 皮膚刺激性試験代替法EpiDermおよびSkinEthicsの第三者評価報告書
2. OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the

validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO(2005) 14

3. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), National Toxicology Program (NTP), et al. Background Review Document: “*in vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral systemic Toxicity”, NIH Publication No: 07-4518

皮膚刺激性試験第三者委員会報告書

皮膚刺激性試験代替法（培養表皮モデル）

平成 23 年 11 月 19 日

皮膚刺激性試験評価委員会

赤松浩彦（藤田保健衛生大学医学部）

寒水孝司（京都大学大学院医学研究科）

## 皮膚刺激性試験代替法（培養表皮モデル）を用いる方法に対する評価委員会の意見

この度、JaCVAM（日本動物実験代替法評価センター）からの依頼を受け、OECD テストガイドライン No. 439 *In Vitro Skin Irritation Reconstructed Human Epidermis Test Method* 成立のもとになった ECVAM（European Center for the Validation of Alternative Methods）がこれまでに提出した培養表皮モデルを用いる皮膚刺激性試験代替法に関する提案書（以前に行われたものは除く）を和訳するとともに、それらの内容および関連資料を検討致しました。

その結果、EpiSkin、EpiDerm SIT 法および SkinEthics RHE 法（MTT 指標）を用いた皮膚刺激性試験代替法を OECD テストガイドラインに記載された条件下で適切に用いれば、化学物質の皮膚刺激性の有無を区別できると判断しましたのでここに報告致します。

以上



欧州代替法バリデーションセンター (ECVAM)

保健・消費者保護研究所

共同研究センター

欧州委員会

JRC 理事会

## 皮膚刺激性試験のための in vitro 試験の科学的評価についての声明

2008年11月4・5日にブリュッセルで開催された第29回欧州委員会会議にて、ESAC (ECVAM 科学諮問委員会) 非理事会メンバーは以下の声明を全会一致で了承した。

2種類の in vitro 皮膚刺激性試験が、ECVAM 文書 “in vitro 皮膚刺激性試験のためのヒト皮膚モデル適用における性能標準” に概説された原理に基づき評価された(1)。これらの性能標準は2種類の試験方法の信頼性と正確性を評価するために用いられた。これら両試験方法はヒト再構築表皮に基づいており、フルバリデートおよび承認された標準的な参照方法 (EPISKIN 法) と同様の生物学的または毒性的効果の測定または予測が可能である (2007年 ESAC 声明およびバリデーション試験報告書) (2、3)。

ESAC 第三者評価パネルによって、以下の試験をもとに提出されたデータの評価が実施された。

1. EpiDerm SIT 法：最新バリデーション (バリデートされた EpiDerm 試験の変法 (MTT 指標))
2. SkinEthics RHE 法：追放的バリデーション (MTT 指標)

これらの試験における MTT 分析の性能は、バリデートされ、承認された方法と比較して、R38 皮膚刺激性および非ラベル (非皮膚刺激性) 物質予測のために十分な正確性および信頼性を持つと判断されたことを示す基準に合致した。過去にバリデートおよび承認された皮膚刺激性のための in vitro 法に関する限界を、ここで評価された2種類の方法においても適用する(4)。

この承認は、第三者評価のために作成された文書である、定義されたバリデーション基準をもとに文書の評価した独立した専門家の意見、ECVAM による第三者評価パネルが利用する補助文書および、プロセスを監視する第三者評価パネルの考察に基づいてなされている。

ECVAM

In vitro 毒性試験チーム

チーム長

Joachim Kreysa

2008年11月5日

## 出典

1. ECVAM (2007) *Performance Standards for Applying Human Skin Models to In Vitro Skin Irritation Testing*. Online: <http://ecvam.jrc.it/>
2. 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/>
3. ECVAM (2007) *Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL-1 $\alpha$* . Online: <http://ecvam.jrc.it/>
4. 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, 52 **35**, 559-601.

## 参考資料

性能標準を基に実施された皮膚刺激性試験としての2種類の *in vitro* 試験のバリデーションにおける ECVAM の背景情報

Claudius Griesinger

イスプラ、イタリア

2008年11月11日

## 目次

1. 性能標準に基づいたバリデーション試験の背景
2. ECVAM *in vitro* 皮膚刺激性の性能標準を参考とした2種類の *in vitro* 皮膚刺激性試験のバリデーション
3. 2種類の試験法により評価された指標
4. 2種類の試験法の予測値
5. 出典

### 1. 性能標準に基づいたバリデーション試験の背景

*in vitro* 皮膚刺激性試験にヒト皮膚モデルを適用するための ECVAM 性能標準(1)は、ECVAM 皮膚刺激性バリデーション試験 (SIVS) においてバリデートされた2種類の市販皮膚モデル、EPISKIN および EpiDerm の特性に基づいている(2-4)。

性能標準には、試験法の科学的有効性を証明するための指針および、新規の類似する試験法または変法が満たすべき最低限の基準が記載されている。性能基準には、(a)テストシステムとして使用される個々の組織の質に関する受入れ基準を含む一般的かつ機能的なモデルの条件が記載されており、(b)受け入れ基準 (例：陽性および陰性対照のためのガイダンス値)、(c)試験方法およびデータ解釈によるガイダンス (予測モデル)、(d)フルの前向きバリデーション試験(3)で使われた一連の代表的な化学物質からなる20の参照物質および、(e)試験法の信頼性および予測性の性能標準が含まれる。

性能標準とは、フルの前向きバリデーション試験の場合と比較して大幅に数を減らした一連の実験用化学物質 (PS 参照物質) に基づいた、新規の方法に対する評価およびバリデーションに役立つツールとなることを目的としている。有害性評価(5)を目的とした新規または改訂版の試験法のバリデーションおよび国際的な受入れについて示した OECD ガイダンス文書 No.34 に従うことによって、以下に示す2種類の試験法について性能標準に基づいた評価を行うことができる。

- a) バリデートされた方法と比較して、構造および機能的パラメーターが十分に類似している試験法 (similar : 類似方法または me-too : 同様の方法)。対応するバリデーション過程は、追放的バリデーションとする。
- b) 性能標準で概説されている限定的な実験評価の保証が可能な程度のバリデートされた方法のマイナーな変更 (modified : 改訂方法)。対応するバリデーション過程は、最新バリデーションと呼ぶ。

## 2. ECVAM in vitro 皮膚刺激性の性能標準を参考とした 2 種類の in vitro 皮膚刺激性試験のバリデーション

### 2-1 支持された試験法

#### 第 29 回 ESAC により支持された 2 種類の試験法

- a) SkinEthics RHE モデルによる試験法：類似／同様試験法、ECVAM が関与していない追加試験として ECVAM に提出された。本試験は性能標準を参考に、構造的および機能的特徴が十分に類似していることが ECVAM により確認された。よって、本試験法は非 ECVAM 関与の追走的バリデーション試験として認められた。
- b) EpiDerm SIT モデルによる試験法：以前にバリデートされた EpiDerm 法の変法(2)、ECVAM が関与していない追加試験として ECVAM に提出された。主な変更は、物質の曝露時間が 15 分から 60 分に延長されたことである。他の基本的なパラメーターの変更はない。よって、本試験法は非 ECVAM 関与の追走的バリデーション試験として認められた。

生体異物の皮膚刺激性評価のためにバリデートされたすべてのヒト再構築組織モデルは、ポストインキュベートを 42 時間とすることに注意する。しかしながら、試験は表皮表面が実際に生体異物で処理された時間、つまり曝露時間によって異なる。ECVAM SIVS のいわゆる共通プロトコル(3)に記載されている 15 分の比較的短い曝露時間に対して、本試験では曝露時間が延長されている。SkinEthics RHE では 42 分の曝露時間だが、上記の EpiDerm SIT 試験では 60 分の曝露時間である。曝露時間はテストシステムが持つ様々なバリア特性を反映しており、力学的反応を保証するためそれぞれのシステムに応じて調整されている。測定可能な効果を得るために、曝露時間は十分に長くする必要はあるが、システムが飽和しない程度の時間にする必要はある。

### 2.2 提出、評価および第三者評価過程

SkinEthics RHE 法は、スキンエシックラボラトリーズ（フランス・ニース）により 2008 年 4 月 7 日に提出された。EpiDerm SIT 法は、ドイツ連邦リスク評価研究所（ベルリン）により 2008 年 4 月 23 日に提出された。

両試験の提出物とも、ECVAM 性能標準文書に詳述されている基準をもとに ECVAM によって評価が行われた(1)。

両試験法の提出物に示された技術移転の外部評価に加え、SkinEthics RHE 法と標準作業手順書の技術移転は、2008 年 3 月から 5 月にかけて ECVAM で個別に評価された。ECVAM による個別評価は EpiDerm SIT 法の場合には不要とみなされた。その理由は、EpiDerm モデルはフル皮膚刺激性バリデーション試験(2-4)にて広範な評価が行われており、かつ試験方法はわずかに改定されたのみと考えられたからである。

ECVAM 評価後、試験法についての提出物および ECVAM によって作成された追加の補助資料が ESAC 第三者評価パネルにより精査されると共に、ECVAM 性能標準(1)に従って個別に評価された。この第三者評価過程は 2008 年 9 月 8 日に終了した。

### 3. 2種類の試験法により評価された指標

両試験において、主要評価項目として MTT 法が使用された。比色分析による細胞の生存率の評価は、MTT 色素が紫色のフォルマザンに変化するミトコンドリア還元を基本にしている。細胞生存率はヒト再構築表皮モデルにおける、化学物質による刺激性の推定に適したパラメーターであることが実証されている(3、4)。

さらに、SkinEthicsRHE および EpiDerm 法の両提出物において、副次的評価項目として IL (インターロイキン) -1 $\alpha$  の情報を提供している。提出書類に記載の IL-1 $\alpha$  のデータは、試験法の予測能力の改善については言及していない。したがって、両試験とも MTT 指標のデータのみを用いて、その予測能力を検討している。

#### IL-1 $\alpha$ 指標の背景

ECVAM SIVS の結果から、IL-1 $\alpha$  は指標として有用であることが示されていた(2)。IL-1 $\alpha$  は非古典的経路によって分泌された炎症性メディエーターである(6、7)。ECVAM SIVS では、IL-1 $\alpha$  が特定の条件下で有用であり、MTT 指標の偽陰性を特定するための段階的試験体系で用いられた場合などにおいて、ヒト再構築表皮法の感度を増加させる可能性があると判断されている(2-4)。

### 4. 2種類の試験法の予測値

MTT 指標を考慮したバリデートされた2種類の試験法の予測値を表1に示す。20の参照物質それぞれの試験予測値の中央値(もしくは最頻値)をもとに算出された。比較のために、参照法である EPISKIN の換算値を示している。提出された両試験法とも、性能標準で示された予測値に適合している(特異度=80%、感度=70%)。

表1. ECVAM バリデーション試験でフルバリデートされた参照法 (EPISKIN 法) と比較した場合の、皮膚刺激性試験のための2種類の新規バリデートされた in vitro 試験 (SkinEthics RHE および EpiDerm SIT 変法)の MTT 指標における予測値 (%)

	EPISKIN (参考法)	Modified EpiDerm SIT	SkinEthic RHE
特異度	80	80	80
感度	70	80	90
偽陽性率	20	20	20
偽陰性率	30	20	10
正確性	75	80	85

### 5. 出典

1. ECVAM (2007) *Performance Standards for Applying Human Skin Models to In Vitro Skin Irritation Testing*.  
Online: <http://ecvam.jrc.it/>
2. 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/>
3. ECVAM (2007) *Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the*

secondary endpoint IL-1 $\alpha$ . Online: <http://ecvam.jrc.it/>

4. 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.
5. OECD (2005) *OECD guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. OECD series on testing and assessment Nr. 34*.
6. Prudovsky I, Tarantini F, Landriscina M, Neivandt D, Soldi R, Kirov A, Small D, Kathir KM, Rajalingam D, Kumar TK. (2008) *Secretion without Golgi*. J Cell Biochem. **103(5)**:1327-43.
7. Prudovsky I, Mandinova A, Soldi R, Bagala C, Graziani I, Landriscina M, Tarantini F, Duarte M, Bellum S, Doherty H, Maciag T. (2003) *The non-classical export routes: FGF1 and IL-1 $\alpha$  point the way*. J Cell Sci. **116(Pt 24)**:4871-81.







38

39

## References

40

41

42

1. ECVAM (2007) *Performance Standards for Applying Human Skin Models to In Vitro Skin Irritation Testing*. Online: <http://ecvam.jrc.it/>

43

44

2. 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/>

45

46

3. ECVAM (2007) *Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL-1 $\alpha$* . Online: <http://ecvam.jrc.it/>

47

48

49

50

51

52

4. 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.

53

54



EUROPEAN COMMISSION  
JOINT RESEARCH CENTRE

Institute for Health and Consumer Protection  
In-vitro Toxicology Unit  
**European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)**

55

56 The ESAC was established by the European Commission, and is composed of nominees from the EU  
57 Member States, industry, academia and animal welfare organisations, together with representatives of  
58 the relevant Commission services.

59

60 This statement was endorsed by the following members of the ESAC:

61

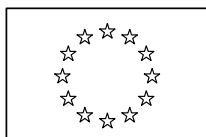
62 Ms Sonja Beken (Belgium)  
63 Mr Albert Breier (Slovakia)  
64 Ms Maija Dambrova (Latvia)  
65 Ms Katalin Horvath (Hungary)  
66 Ms Dagmar Jírová (Czech Republic)  
67 Mr Roman Kolar (Eurogroup for Animals)  
68 Ms Elisabeth Knudsen (Denmark)  
69 Mr Manfred Liebsch (Germany)  
70 Mr Lionel Larue (France)  
71 Mr Gianni Dal Negro (EFPIA)  
72 Mr Efstathios Nikolaidis (Greece)  
73 Mr Constantin Mircioiu (Romania)  
74 Mr. Walter Pfaller (Austria; moderator)  
75 Mr Jon Richmond (UK)  
76 Ms Vera Rogiers (ECOPA)  
77 Mr Hasso Seibert (ESF)  
78 Mr Dariusz Sladowski (Poland)  
79 Mr Jan van der Valk (The Netherlands)  
80 Mr Carl Westmoreland (COLIPA)  
81 Mr Timo Ylikomi (Finland)

82

83 The following Commission Services and Observer Organisations were involved in the consultation  
84 process, but not in the endorsement process itself:

85

86 Ms Elke Anklam (IHCP; chairman)  
87 Mr Joachim Kreysa (ECVAM)  
88 Mr Jürgen Büsing (DG RTD)  
89 Ms Silvia Casati (ECVAM, DG JRC)  
90 Mr Thomas Cole (ECVAM, DG JRC, ESAC secretary)  
91 Ms Laura Gribaldo (ECVAM, DG JRC)  
92 Mr Claudius Griesinger (ECVAM, DG JRC)  
93 Ms Eimear Kelleher (IHCP)  
94 Ms Karin Kilian (DG SANCO)  
95 Ms Barbara Mentré (DG ENTR)  
96 Ms Pilar Prieto (ECVAM, DG JRC)  
97 Mr Juan Riego Sintés (CPSQ, DG JRC)  
98 Ms Sigrid Weiland  
99 Ms Valérie Zuang (ECVAM, DG JRC)  
100 Mr Patric Amcoff (OECD)  
101 Mr Hajime Kojima (JaCVAM)  
102 Mr William Stokes (NICEATM)  
103 Mr Raymond Tice (NICEATM)  
104 Ms Marilyn Wind (ICCVAM)



## Informative Annex

### ECVAM Background Information on the Validation of two *in vitro* Test Methods for Skin Irritation Testing performed on the Basis of Performance Standards

Claudius Griesinger, Ispra, Italy, 11 November 2008

#### Contents

1.	Background to Validation Studies based on Performance Standards .....	4
2.	Validation of two <i>in vitro</i> skin irritation methods in reference to the ECVAM <i>in vitro</i> Skin Irritation Performance Standards .....	5
3.	Endpoints assessed by the two test methods .....	5
4.	Predictive values of the two test methods.....	6
5.	References.....	6

#### **1. Background to Validation Studies based on Performance Standards**

The ECVAM Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing (1) are based on the specifications of the two skin models that were validated during the ECVAM skin irritation validation study (SIVS), the commercially available EPISKIN and the EpiDerm test methods (2-4).

The Performance Standards describe guidance and minimum performance criteria that novel 'me-too' or modified test methods should fulfil so that they may be considered scientifically valid. The performance criteria include *inter alia* (a) a description of general and functional model conditions including acceptance criteria regarding the quality of individual tissues used as test system, (b) test acceptance criteria (e.g. guidance values for positive and negative control), (c) guidance regarding the test procedure and data interpretation (prediction model), (d) 20 reference chemicals that constitute a representative set of chemicals used during the full prospective validation study (3) as well as (e) performance criteria for test method reliability and predictivity.

The Performance Standards are intended as a tool to aid the evaluation, assessment and validation of novel methods on the basis of an experimental testing set of chemicals (the PS reference chemicals) that is markedly reduced in comparison with that of a full prospective validation study. According to OECD guidance document Nr. 34 on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment (5), two types of test methods can be evaluated on the basis of performance standards. These are

- a) Test methods that are sufficiently similar with regard to structural and functional parameters in comparison with the validated methodology ("similar methods" or "me-too methods"). The corresponding validation process is referred to as "catch-up validation".
- b) Modifications of validated methods ("modified methods") which are minor enough to warrant the limited experimental assessment as outlined in the Performance Standards. The corresponding validation process is referred to as "update validation".



144 **2. Validation of two *in vitro* skin irritation methods in reference to the ECVAM *in vitro* Skin**  
145 **Irritation Performance Standards**

146 **2.1 Test methods endorsed**

147 The two test methods endorsed by the 29<sup>th</sup> ESAC are

148 a) The SkinEthic RHE model, a similar/me-too method, submitted to ECVAM as a non-ECVAM  
149 coordinated catch-up study. The test was confirmed by ECVAM as sufficiently similar with  
150 regard to its structural and functional characteristics in reference to the Performance  
151 Standards and the test method was therefore admitted as a *non-ECVAM coordinated catch-up*  
152 *validation study*.

153 b) The EpiDerm SIT model, a modification of the previously validated EpiDerm method (2),  
154 submitted to ECVAM as a non-ECVAM coordinated update validation study. The main  
155 modification performed is the prolongation of the exposure time to the test substances from 15  
156 ('common protocol', ECAVM SIVS) to 60 minutes, while all other essential model parameters  
157 remained unchanged. The test method was therefore admitted by ECVAM as a *Non-ECVAM*  
158 *coordinated update validation study*.

159 It is important to note that all human reconstructed tissue models that have been validated so far for  
160 the assessment of skin irritancy potential of xenobiotics, use a postincubation time of 42 hours.  
161 However, the assays differ with regard to the exposure time employed, i.e. the period that the  
162 epidermal surface is acutely treated with the xenobiotic. In contrast to the relatively short exposure  
163 time of 15 minutes outlined in the so-called "common protocol" of the ECVAM SIVS (3), the assays  
164 validated in the current context use extended exposure times: the modified EpiDerm SIT assay  
165 features, as stated above, an exposure time of 60 minutes while the SkinEthic RHE uses an exposure  
166 time of 42 minutes. The exposure times are understood to reflect the different barrier properties of the  
167 test systems and are adjusted for each test system in order to guarantee a dynamic response: the  
168 exposure time needs to be long enough to allow the development of measurable effects while being  
169 short enough to ensure that the system is not driven into saturation.

170 **2.2 Submission, evaluation and peer review process**

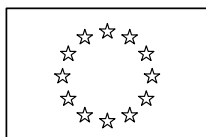
171 The SkinEthic RHE test method had been submitted by SkinEthic Laboratories, Nice, France on 7  
172 April 2008. The EpiDerm SIT test method had been submitted on 23 April 2008 by the Federal Institute  
173 for Risk Assessment (BfR), Berlin, Germany.

174 Both test method submissions were evaluated by ECVAM on the basis of the criteria laid out in the  
175 ECVAM performance standards document (1). In addition to the external assessment of transferability  
176 provided in both test method submissions, the transferability of the SkinEthic RHE method as well as  
177 its standard operating procedure (SOP) were independently assessed and confirmed in-house at  
178 ECVAM from March to May 2008. Such independent assessment by ECVAM was deemed not  
179 necessary in the case of the EpiDerm SIT method since the EpiDerm model had undergone extensive  
180 assessment during the full skin irritation validation study (2-4) and since the modification of the test  
181 method was considered minor.

182 After ECVAM evaluation, the test method submissions and additional auxiliary material made available  
183 by ECAVM were reviewed by an ESAC Peer Review Panel and independently evaluated by this panel  
184 with regard to the ECAVM Performance Standards (1). The Peer Review Process was finalised on  
185 September 8, 2008.

186 **3. Endpoints assessed by the two test methods**

187 Both tests use the MTT test as primary endpoint. This colorimetric assay for cell viability is based on  
188 the mitochondrial reduction of the vital dye MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium  
189 bromide] to a purple-coloured formazan. Cell viability has been demonstrated to be a suitable  
190 parameter to extrapolate on the irritancy potential of chemicals in human reconstructed epidermis  
191 models (3,4).



192 In addition, both the SkinEthic RHE and EpiDerm submission provided information on the secondary  
193 endpoint IL-1 $\alpha$  (Interleukin 1 alpha). The data on IL-1 $\alpha$  submitted in both dossiers did not demonstrate  
194 an improvement of the predictive capacity of the test methods. Therefore, for both methods, only the  
195 data for the MTT endpoint were considered with regard to the predictive capacity.

196 *Background to the IL1  $\alpha$  endpoint:*

197 As a result of the ECVAM SIVS, the IL-1 $\alpha$  endpoint had been suggested as a potentially useful adjunct  
198 (2). IL-1 $\alpha$  is an inflammatory mediator secreted by the non-classical pathway (6,7). The ECVAM SIVS  
199 had concluded that IL 1 $\alpha$  may be capable, under certain conditions, to increase the sensitivity of  
200 human reconstructed epidermis assays (2-4), e.g. when used in a tiered testing approach to identify  
201 false negatives of the MTT endpoint.

202 **4. Predictive values of the two test methods**

203 Considering the MTT endpoint, the two validated method have predictive values as shown in Table 1,  
204 calculated on the basis of the *median (or mode) of the individual laboratory predictions* for each of the  
205 20 reference chemicals. For comparison, the corresponding values for the reference method EPISKIN  
206 are provided. Both submitted test methods meet the values of predictivity indicated in the performance  
207 standards (specificity = 80% and sensitivity = 70%).

208 **Table 1: Predictive values (in %) for the MTT endpoint of the two novel validated in vitro tests for skin**  
209 **irritation testing (SkinEthic RHE and modified EpiDerm SIT) in comparison to the fully validated**  
210 **reference method (EPISKIN) of the ECVAM skin irritation validation study.**

	<i>EPISKIN (reference method)</i>	<b>Modified EpiDerm SIT</b>	<b>SkinEthic RHE</b>
<b>Specificity</b>	80	<b>80</b>	<b>80</b>
<b>Sensitivity</b>	70	<b>80</b>	<b>90</b>
<b>False positive rate</b>	20	<b>20</b>	<b>20</b>
<b>False negative rate</b>	30	<b>20</b>	<b>10</b>
<b>Accuracy</b>	75	<b>80</b>	<b>85</b>

211

212 **5. References**

213

- 214 1. ECVAM (2007) *Performance Standards for Applying Human Skin Models to In Vitro Skin*  
215 *Irritation Testing*. Online: <http://ecvam.jrc.it/>
- 216 2. ECVAM (2007) *Statement of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) on the*  
217 *Validity of In Vitro Tests for Skin Irritation*. Online: <http://ecvam.jrc.it/>
- 218 3. ECVAM (2007) *Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the primary endpoint MTT*  
219 *and the secondary endpoint IL-1 $\alpha$* . Online: <http://ecvam.jrc.it/>
- 220 4. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R.,  
221 Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A.,  
222 Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) *The*  
223 *ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the*  
224 *Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test*. *ATLA*  
225 **35**, 559-601.
- 226 5. OECD (2005) *OECD guidance document on the validation and international acceptance of*  
227 *new or updated test methods for hazard assessment*. *OECD series on testing and*  
228 *assessment Nr. 34*.



EUROPEAN COMMISSION  
JOINT RESEARCH CENTRE

Institute for Health and Consumer Protection  
In-vitro Toxicology Unit

**European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)**

- 229  
230
6. Prudovsky I, Tarantini F, Landriscina M, Neivandt D, Soldi R, Kirov A, Small D, Kathir KM, Rajalingam D, Kumar TK. (2008) *Secretion without Golgi*. J Cell Biochem. **103(5)**:1327-43.
- 231  
232  
233
7. Prudovsky I, Mandinova A, Soldi R, Bagala C, Graziani I, Landriscina M, Tarantini F, Duarte M, Bellum S, Doherty H, Maciag T. (2003) *The non-classical export routes: FGF1 and IL-1alpha point the way*. J Cell Sci. **116(Pt 24)**:4871-81.
- 234

## 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 <sup>1</sup> )	EpiSkin test method (20 reference chemicals <sup>3</sup> )	Modified EpiDerm test method (20 reference chemicals <sup>3</sup> )	SkinEthic test method (20 reference chemicals <sup>3</sup> )
Specificity (%) <sup>2</sup>	71.1	76.9	69.2	69.2
Sensitivity (%) <sup>2</sup>	84.6	85.7	85.7	100
Overall Accuracy (%) <sup>2</sup>	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	<b>I</b>
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	<b>I</b>
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	<b>I</b>
11	1-decanol *	2.3	R38	category 2	<b>I</b>
12	cyclamen aldehyde	2.3	R38	category 2	<b>I</b>
13	1-bromohexane	2.7	R38	category 2	<b>I</b>
14	2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine HCl	2.7	R38	category 2	<b>I</b>
15	5% potassium hydroxide	3	R38	category 2	<b>I</b>
16	di-n-propyl disulphide *	3	R38	category 2	<b>NI</b>
17	benzenethiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl	3.3	R38	category 2	<b>I</b>
18	1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	3.3	R38	category 2	<b>I</b>
19	heptanal	4	R38	category 2	<b>I</b>
20	1,1,1- trichloroethane	4	R38	category 2	<b>I</b>

\*) 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 (%)	<b>70</b>
Sensitivity (%)	<b>80</b>
Overall Accuracy (%)	<b>75</b>

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](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)。





38 skin irritation classification system will use a single irritant category (category 2) and hence  
39 continues to use a total of two classification categories to distinguish irritant (category 2) from  
40 non-irritant (no-category) substances. However, according to the GHS rules for skin irritation  
41 classification and labelling, the cut-off score to distinguish between no-category and category  
42 2 substances was shifted to an *in vivo* score of greater or equal 2.3 from a value of 2.0 (as  
43 used for the previous EU classification system). Consequently substances with an *in vivo*  
44 score between 2.0 and 2.3 that are considered irritant under the previous EU classification  
45 system will be considered non-irritants under the future CLP classification system, which  
46 does not implement the optional additional UN GHS category 3 ("mild irritants": substances  
47 with scores greater or equal to 1.5 and smaller than 2.3), which is available for those  
48 authorities (e.g. pesticides) that want to have more than one skin irritant category (Ref. 1).

49 **The performance of all three tests under CLP (i.e. UN GHS using one single irritant**  
50 **category) has now been re-evaluated to take account of this shift of cut-off value into**  
51 **consideration and has been found satisfactory (Table 1; Ref. 6 for extensive background**  
52 **regarding the re-calculation of these values). While the specificity of the EpiSkin method**  
53 **is decreased from 81.8%\* (previous EU system) to 71.1%\* (CLP), the test sensitivity**  
54 **has increased from 72%\* (previous EU system) to 84.6%\* (CLP). The two other**  
55 **methods show similar values for the specificity (both tests 69.2%\*), and higher**  
56 **sensitivity values than the reference method under CLP.**

57 **The original ESAC statements relating to the scientific validity of these test methods**  
58 **therefore remains valid and, with regard to their use in the context of classification**  
59 **decisions, can now be extended to the CLP system. Updated accuracy values under CLP**  
60 **are provided in this statement.**

61 **Moreover, on the basis of the documentation available confirming the overall**  
62 **satisfactory performance of the three methods, the ESAC is of the opinion that no**  
63 **further work is required at this stage and that the existing information on the validation**  
64 **studies and additionally available background information is sufficient to explain and**  
65 **justify the changes in performance of the tests and key aspects of the performance**  
66 **standards (i.e. reference chemicals and defined accuracy values) necessitated by the**  
67 **threshold shift upon adaptation of the GHS system in the EU. As is common practice,**  
68 **adaptations to technical progress should be performed as appropriate and necessary. It**  
69 **should be noted, that any conclusions on the applicability domain are based, at this**  
70 **stage, mainly on the testing set used during the ECVAM SIVS.**

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



74

75 **Table 1. Accuracy values for the three ECVAM-validated skin irritation in vitro test**  
76 **methods under CLP (UN GHS)**

	<b>EpiSkin test method</b>  (58 chemicals <sup>1</sup> )	<b>EpiSkin test method</b>  (20 reference chemicals <sup>3</sup> )	<b>Modified EpiDerm test method</b>  (20 reference chemicals <sup>3</sup> )	<b>SkinEthic test method</b>  (20 reference chemicals <sup>3</sup> )
<b>Specificity (%)</b> <sup>2</sup>	<b>71.1</b> (32/45)	<b>76.9</b> (10/13)	<b>69.2</b> (9/13)	<b>69.2</b> (9/13)
<b>Sensitivity (%)</b> <sup>2</sup>	<b>84.6</b> (11/13)	<b>85.7</b> (6/7)	<b>85.7</b> (6/7)	<b>100</b> (7/7)
<b>Overall Accuracy (%)</b> <sup>2</sup>	<b>74.1</b> (43/58)	<b>80</b> (16/20)	<b>75</b> (15/20)	<b>80</b> (16/20)

77 <sup>1</sup>) The test substances from the ECVAM Skin Irritation Validation Study (SIVS) conducted from 2003 to 2007.

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

81 <sup>3</sup>) Original 20 RC from the ECVAM Performance Standards May 2007

82

## 83 **2. Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM** 84 **Performance Standards**

### 85 **2.1 Updated list of Reference Chemicals**

86 Due to the threshold shift resulting from the adoption of the UN GHS system in the EU, the  
87 reference chemicals set listed in the original ECVAM Performance Standards were no longer  
88 properly balanced with regard to an equal representation of Irritant versus Non-irritant  
89 substances.

90 To address this and other issues (i.e. global commercial availability, evidence that some  
91 substances are non-irritant in human, handling qualities) the reference chemical set was  
92 updated. The updated reference chemical set retains the false negative and false positive rates  
93 obtained with the EpiSkin method under UN GHS on the basis of the full set of 58 test  
94 substances from the ECVAM skin irritation validation study allowing for the appropriate  
95 future validation of modified or similar (“me-too”) test methods.

#### 96 **Deletions**

97 The following six substances were deleted (in vivo scores in parentheses):

98 1) d-propylene glycol (0)

99 2) allyl heptanoate (1.7)

100 3) terpinyl acetate (2.0)

101 4) tri-isobutyl phosphate (2.0)

102 5) alpha-terpineol (2.7)



103           6) butyl methacrylate (3.0)

104    ***Additions***

105    The following six substances were added (in vivo scores in parentheses):

106           1) cinnamaldehyde (2.0)

107           2) 2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine HCl (2.7)

108           3) 5% potassium hydroxide (3.0)

109           4) benzenethiol, 5-(1,1-dimethyl)-2 methyl (3.3)

110           5) 1-methyl-3-phenyl-1-piperazine (3.3)

111           6) Tetrachloroethylene (4.0)

112





113

114 Moreover, the updated reference chemicals (table 2) meet the following criteria:

- 115 1. the chemicals are commercially available
- 116 2. they are representative of the full range of Draize skin irritancy scores (from non-  
117 irritant to strong irritant)
- 118 3. they have a well-defined chemical structure
- 119 4. they are representative of the chemical functionalities used in the validation  
120 process
- 121 5. they are not associated with an extremely toxic profile (e.g. carcinogenic or toxic  
122 to the reproductive system) and they are not associated with environmental  
123 concerns or prohibitive disposal costs.

124

125 **Table 2: Updated reference chemicals**

Nr.	Reference Chemical	In vivo Score	EU in vivo category	GHS-EU in vivo category	EPISKIN classification
1	1-bromo-4-chlorobutane	0	no	no category	<b>I</b>
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	<b>I</b>
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	<b>I</b>
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	<b>NI</b>
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	3.4	R38	category 2	I
20	Tetrachloroethylene	4	R38	category 2	I

126

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



129

130 **2.2 Updated defined accuracy values as specified in the ECVAM skin irritation**  
131 **Performance Standards**

132 The defined accuracy values (to be included in the ECVAM skin irritation Performance  
133 Standards) are derived from the performance of the validated reference method EpiSkin with  
134 the updated reference chemicals and under GHS-EU and on the basis of additional  
135 considerations relating to relevance in the species of interest. The values are given in table 3.

136

137 **Table 3: Defined Accuracy Values**

	Defined Accuracy Values
Specificity (%)	<b>70</b>
Sensitivity (%)	<b>80</b>
Overall Accuracy (%)	<b>75</b>

138

139

140

141

142

143

144

145

146 Joachim Kreysa

147 Head of Unit

148 In-Vitro Methods Unit

149 European Centre for the Validation of Alternative Methods

150

151

152

153 Ispra, 8<sup>th</sup> July 2009



154 **REFERENCES**

- 155 1. United Nations Economic Commission for Europe (UNECE) (2008). UN Globally  
156 Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals, 2nd revised edition;  
157 Online: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev02/02files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html); (as of  
158 April 2009).
- 159 2. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C.,  
160 Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C.,  
161 Kandr rov, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A.,  
162 Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on In  
163 Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and  
164 EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559-601.
- 165 3. ECVAM (2007) Statement of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) on  
166 the Validity of In Vitro Tests for Skin Irritation. Online: <http://ecvam.jrc.it/>
- 167 4. ECVAM (2008) Statement of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) on  
168 the scientific validity of in vitro tests for skin irritation testing. Online:  
169 <http://ecvam.jrc.it/>
- 170 5. REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF  
171 THE COUNCIL of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of  
172 substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and  
173 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006)
- 174 6. Griesinger, C., Barroso, J., Zuang, V., Cole, T., Genschow, E. and Liebsch M. (2009).  
175 Explanatory background document to the OECD draft test guideline on in vitro skin  
176 irritation testing. Available under "Validation Study Documents, section Skin  
177 Irritation" at: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- 178
- 179



180

181 The ESAC was established by the European Commission, and is composed of nominees from  
182 the EU Member States, industry, academia and animal welfare organisations, together with  
183 representatives of the relevant Commission services.

184

185 This statement was endorsed by the following members of the ESAC:

186

187 Ms Argelia Castaño (Spain)  
188 Ms Maija Dambrova (Latvia)  
189 Ms Alison Gray (ESTIV)  
190 Ms Katalin Horvath (Hungary)  
191 Ms Maggy Jennings (Eurogroup for Animals)  
192 Ms Dagmar Jírová (Czech Republic)  
193 Mr Roman Kolar (Eurogroup for Animals)  
194 Ms Elisabeth Knudsen (Denmark)  
195 Mr Manfred Liebsch (Germany)  
196 Mr Gianni Dal Negro (EFPIA)  
197 Mr. Walter Pfaller (Austria)  
198 Mr Tõnu Püssa (Estonia)  
199 Mr Jon Richmond (UK)  
200 Ms Vera Rogiers (ECOPA)  
201 Mr Hasso Seibert (ESF, acting as co-moderator at the meeting)  
202 Ms Annalaura Stamatì (Italy)  
203 Mr Jan van der Valk (The Netherlands)  
204 Mr Carl Westmoreland (COLIPA, acting as moderator at the meeting)  
205

206 The following Commission Services and Observer Organisations were involved in the  
207 consultation process, but not in the endorsement process itself:

208 **Commission services**

209 Mr Joachim Kreysa (DG JRC, Head of In vitro methods Unit/ECVAM, chairman)  
210 Mr Claudius Griesinger (DG JRC, ESAC secretariat)  
211 Ms Eimear Kelleher (DG JRC)  
212 Ms Karin Kilian (DG SANCO)  
213 Mr Juan Riego Sintès (DG JRC)  
214

215 **The following observers were present**

216 Mr Patric Amcoff (OECD)  
217 Mr Hajime Kojima (JaCVAM)  
218 Mr William Stokes (NICEATM)  
219 Ms Marilyn Wind (ICCVAM)

## 再構築ヒト表皮を用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験の性能標準に関する ESAC 声明

目次

I. ESAC 声明

II. 声明における参考文献

III. ESAC

IV. 声明に対する参考情報

1. 性能標準に対する一般的情報

2. *in vitro* 皮膚刺激性試験に対する更新された ECVAM の性能標準に対する詳細な背景

V. 参考情報における参考文献

### I. ESAC 声明

2009年7月7-8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31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9月22日に発効された。

2007年に ECVAM による皮膚刺激性バリデーション研究(以下、SIVS とする)が終了すると、ECVAM は EpiDerm 原法[1-2]と同様、EpiSkin 法をもとに再構築ヒト表皮(RhE)を用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験に対する性能標準を定義した。2008年、ECVAM は性能標準をもとに2種の試験法をバリデートした。1つは模倣的試験(SkinEthics RHE 法)、もう一つは改良的試験法(EpiDrem SIT 変法)である[3]。

SIVS は国連(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)」の採用前に計画・実行された[4]。そのため、SIVS は有害物質規制(EU DSD システム)[5]に記載されている EU 分類システムのもとで試験法を評価した。ただし、バリデーションで使われた被験物質の選定に関しては、GHS 分類システムを考慮した。

2008年12月、EU は UN GHS [4]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[6])」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、段階を経て、EU DSD システムにとって代わることになる。

UN GHS システムは、これまでと異なる刺激性と非刺激性を区分するカットオフ値を使用する。EU DSD のカットオフ値は、*in vivo* スコアが 2.0 で、UN GHS のそれは 2.3 である。

CLP 規制[6]の採用により、ECVAM は3種のバリデートされた *in vitro* 皮膚刺激性試験の性能を慎重に評価した。ESAC は、ECVAM による評価が UN GHS システムのもとでも3種のすべての試験法の性能が十分であることを確認したものと判断した[7]。

CLP 規制の採用により、ECVAM による皮膚刺激性の性能標準は次の2つ項目への適応が必要である。

- 1) 性能標準に記載された参照物質のセット
- 2) 指定された正確性と信頼性の値

2008年にEUがUN GHS[4,6]を採用したことを考慮して、従来のECVAMによる皮膚刺激性の性能標準は現在改定されている。ESACおよびECVAMからの専門家、ICCVAMとOECDからのESACのオブザーバー、企業からの招聘専門家で構成されたECVAM/ESAC Task Forceの枠組みで改定が実施された。性能標準の改定の技術的な詳細やECVAMがバリデートした*in vitro*皮膚刺激性試験の性能に関する文書は、BfR/ZEBETとの共同でECVAMが作成している。

ESACは、改定されたECVAMによる性能標準[9]はCLP規制下[6]で分類および表示として、急性の皮膚刺激性を予測するために提案された試験法の科学的妥当性の評価に使用できると結論している。

Joachim Kreysa

Head of Unit

In-Vitro Methods Unit

European Centre for the Validation of Alternative Methods

Ispira, 9 July 2009

## II. 声明における参考文献

1. 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.
2. ECVAM (2007) Statement of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) on the Validity of In Vitro Tests for Skin Irritation. Online: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/> "Publications / ESAC Statements"
3. 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/>
4. 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](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html); (as of April 2009). 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.ec.europa.eu/> "Publications / ESAC Statements"
5. EC (2001) Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 adapting to technical progress for the 28th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to

the classification, packaging and labelling of dangerous substances. Official Journal of the European Union L225, 1-333.

6. 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)

7. ECVAM (2009) Statement on the performance under UN GHS of three in-vitro assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards. Original statement March 2009, updated July 2009 to reflect further changes of the Reference Chemical set following the OECD acceptance process. Online: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/> under "Publications / ESAC Statements"

8. 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>

9. EC-ECVAM (2009). Performance Standards for in vitro skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE). Available under "Validation Study Documents, section Skin Irritation", at: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>

### III. ESAC

ESAC は欧州委員会により設立され、EU加盟国、産業界、アカデミア、動物愛護団体から推薦された者、および関係委員会からの代表で構成される。

この声明はESACの以下の委員により承認された。

Ms Argelia Castaño(Spain)

Ms Maija Dambrova (Latvia)

Ms Alison Gray (ESTIV)

Ms Katalin Horvath (Hungary)

Ms Dagmar Jírová (Czech Republic)

Mr Roman Kolar (Eurogroup for Animals)

Ms Elisabeth Knudsen (Denmark - acting as moderator at the meeting)

Mr Manfred Liebsch (Germany)

Mr Gianni Dal Negro (EFPIA)

Mr Walter Pfaller (Austria)

Mr Tõnu Püssa (Estonia)

Mr Dariusz Sladowski (Poland)  
Mr Jon Richmond (UK)  
Ms Vera Rogiers (ECOPA)  
Mr Michael Ryan (Ireland)  
Ms Annalaura Stammati (Italy)  
Mr Jan van der Valk (The Netherlands)  
Mr Carl Westmoreland (COLIPA)  
Mr Timo Ylikomi (Finland)

次の委員会およびオブザーバーの組織は議論の過程に参加したが、承認の過程には含まれていない。  
委員会

Mr Joachim Kreysa (DG JRC、 Head of In vitro methods Unit/ECVAM、 chairman)  
Mr Claudius Griesinger (DG JRC、 ESAC secretariat)  
Ms Susanne Hoke (DG ENTR)  
Ms Susanna Louhimies (DG ENV)  
Mr Juan Riego Sintes (DG JRC)

オブザーバー

Mr Hajime Kojima (JaCVAM)  
Mr William Stokes (NICEATM)  
Ms Marilyn Wind (ICCVAM)

IV. 声明に対する参考情報  
翻訳対象外(原著参照)

V. 参考情報における参考文献  
翻訳対象外(原著参照)