

ヒト皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法の第三者評価報告書

評価対象品目： Vitrolife-Skin™（グンゼ株式会社）

皮膚腐食性試験代替法の第三者評価委員会

評価委員長 小野寺博志（医薬品医療機器総合機構）
委員 岡本裕子（株式会社コーセー / 日本化粧品工業連合会）
委員 五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部）

平成 20 年 6 月 10 日

略号

ECVAM : European Center for the Validation of Alternative Methods

GLP: Good Laboratory Procedure

ICCVAM : Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

ICH : International Conference on Harmonization

OECD : Organization for Economic Co-operation and Development

SOP: Standard Operation Procedure

要旨

ウサギを用いる皮膚腐食性試験の代替として提案された 3 次元培養ヒト皮膚モデル（以下、皮膚モデルと記す）Vitrolife-Skin™を用いる試験法の有用性を評価した。3次元培養ヒト表皮モデルEpiDerm™を用いた皮膚腐食性試験法は既に欧米でバリデーションが終了し、OECD ガイドラインになっている。Vitrolife-Skin™は我が国で開発された EpiDerm™と類似の皮膚モデルであり、線維芽細胞を含むコラーゲンからなる真皮層の上に角質層を持つ表皮層が重層化された構造を有している。今回 EpiDerm™と Vitrolife-Skin™を同時に被験物質の数を最小限にして検討する Catch up validation によって評価した。Vitrolife-Skin™を用いた試験及び結果の判定法は EpiDerm™とほぼ同様で、被験物質で処理した後、染色し、吸光度を計測することによって細胞生存率を求め、腐食性の程度を判定する。試験に用いた被験物質（12 種）は既に *in vivo* で腐食性の評価がされている物質で、試験実施施設（6 施設）には名称を隠しコード化して供与された。試験は事前に講習を受けた実施者が SOP に従い実施された。試験は 2 回繰り返し、判定結果が異なる場合は 3 回目の試験を実施し、多数決での判定を結果とした。測定値はいずれの物質も近似値を得ることができ、施設内の再現性は高いものと判断された。EpiDerm™においては 12 物質中 1 物質で 1 施設が異なる判定結果を示したが、Vitrolife-Skin™では全ての施設で判定結果は同じであった。また、判定に苦慮した物質は EpiDerm™モデルと Vitrolife-Skin™モデルで同一物質であり、施設間での再現性は極めて高かった。以上の結果より、Vitrolife-Skin™を用いた皮膚腐食性の評価は、特異性、感度、再現性の点において EpiDerm™と同等あるいはそれ以上の識別能力を有すると判断した。一方、モデルの支持組織であるコラーゲンに影響を及ぼす強アルカリ性物質等は判定に支障があること、今後、大量生産の際の製造方法の変更、それに伴う品質管理や同等性等確認の方法が課題として挙げられた。しかしながら、Vitrolife-Skin™は EpiDerm™同様、動物を用いないこと、短時間で結果が得られること、コスト面では EpiDerm™と比べ安価であること、また日本で製造販売されるため安定した供給が可能である利点が挙げられた。以上、VitroLife Skin™を用いる皮膚腐食性試験は動物実験代替法として有用であると評価した。

評価結果

1. 試験法の科学的及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実施されている。この方法は被験物質の皮膚刺激性を検出する感度は非常に優れているものの、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、更に動物に激しい苦痛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（以後、代替法と記す）の開発が切望されていた。OECD ガイドライン 431 には、皮膚腐食性試験として角質層を有し再構築された表皮から構成された皮膚モデルの記載がなされている。この試験法は、腐食性物質が角質層に吸収された後拡散し、下層の細胞に障害を及ぼすという現象をもとに、被験物質接種後の細胞生存率を指標に皮膚腐食性を評価している。これら EpiSkin™ や EpiDerm™ 等の 3 次元培養ヒト表皮モデルは欧米で既にバリデーション試験が実施され、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採用されている。

我が国で既存の化学物質を評価する場合、OECD で承認された試験方法による結果を受諾することは可能であるが、現在まで代替法での結果をもとに評価された例は多くない。安全性評価における代替法の普及が切望されている現状において、我が国でも積極的に受け入れることが必要となっている。また一方で、国内企業からも国際的な評価に耐えうる代替法が開発されることも推測される。その場合、バリデーション等が実施され、十分な有用性と再現性が証明されることにより代替法としての受け入れも可能となる。

今回、我が国で安定な供給が期待できる皮膚モデルが開発され、これを用いた皮膚腐食性試験代替法の有用性についての検討が必要となった。

Vitrolife-Skin™ はグンゼ(株)によって開発された線維芽細胞を有するコラーゲンからなる真皮層の上に角質層を持つ表皮層が重層化されている 3 次元培養ヒト皮膚モデル（以下、皮膚モデルと記す）である。類似の製品として EpiDerm™ があり、これはポリカーボネート膜上に角質層を持つ表皮が構築されたモデルである。これらの皮膚モデルは基本的に角質表皮層を構築させる基盤が異なるのみで、被験物質は角質層を通過し表皮細胞に作用して細胞障害を起こす。さらに、いずれの皮膚モデルにおいても細胞生存率の測定に用いる色素は同じ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 tetrazolium bromide (MTT) で、皮膚腐食性の評価機構において本質的な違いはないと考えられる。

OECD (2005) ガイドライン 34 の Catch-up バリデーション研究の定義では、既に妥当性の確認された方法と同じ原理による方法であれば、新規の方法であっても信頼性の高い施設で適切な方法でバリデーションを実施すれば、多数の被験物質と多施設による大規模なバリデーション実施することなく、小規模のバリデーションで評価可能とされている。今回実施されたバリデーションでは、細胞構成や機能が同等と考えられる Vitrolife-Skin™ と EpiDerm™ について、同じ被験物質を同時期に試験していることから Catch-up バリデーション研究に該当すると考える。これら 2 つのモデルを用いた皮膚腐食性試験結果で同等性を確認できるならば、Vitrolife-Skin™ が EpiDerm™ と同等の有用性を持つことが証明される。

また今回の実施報告は、EpiDerm™ 用いた皮膚腐食性試験代替法の我が国における評価としての意味をもつと考える。

2. 試験プロトコール構成の妥当性

実施された試験プロトコールは EpiDerm™ を用いたバリデーション研究とほぼ同じである。

Vitrolife-Skin™では前培養法及び染色液の容量、組織からの抽出法に違いがあるのみで、基本的な曝露時間と判定基準については同一のものを用いている。被験物質は角質層を通過して表皮細胞に作用し、MTTの取り込み量より求めた細胞生存率の減少から皮膚腐食性を判定する。

プロトコルの概略は以下のとおりである。6 wellプレートの各wellに培養液 1 mLを加えて皮膚モデルを置き、被験物質が液状の場合はピペッターで 100 µL、粉末など固形の場合は 100 mgを計測して上層に適用した (n=2)。固形物質の場合は適用後浮遊を防ぐ目的で画鋸等の頭で軽く押さえた。被験物質を 3分または 60分処理後、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、10 mLのPBSで 2~3回軽く洗浄した。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別の 24 wellプレートに皮膚モデルを移動した。EpiDerm™モデルの場合MTT色素を含む培養液を皮膚モデルの下方に 0.3 mL、Vitrolife-Skin™モデルの場合は上方から 1 mL加えた。37 °C、CO₂インキュベータ中に 2~3時間静置した後、Vitrolife-Skin™は直径 6 mmの円形状にくり貫き、以下の抽出を行った。イソプロパノールをEpiDerm™モデルでは 2 mL、Vitrolife-Skin™では 1 mL加えた。一晩冷蔵庫で放置、96 wellプレートに抽出液を 200 µLずつ移し (1物質あたり 1~3 well)、マイクロプレートリーダーを用いて 540 nmあるいは 570 nm領域での吸光度を測定した。イソプロパノールのみを加えたwellをblankとし、実測値とblank値の差を求めた。溶媒対照の吸光度を 100%とし各物質の 3分または 60分間処理時の%を計算した。3分間処理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分間処理したときに 15%未満の結果を示す物質を腐食性ありと判定した。一方、3分間処理したときに生存率が 50%以上、60分間処理したときに 15%以上の物質は非腐食性と判定した。試験は 2回繰り返し、2回の試験で判定が異なった場合は追加の試験を実施し、優位の判定結果をその物質の最終評価とした。

3. バリデーションに用いた物質の分類、選択理由の妥当性

今回実施した Vitrolife-Skin™モデルについて、被験物質の数 12 は ECVAM などで行われた EPISKIN™モデルや EpiDerm™モデルのバリデーションと比べ少ないが、Catch-up バリデーションを採用することで評価は可能と考えた。

予備試験では 10%水酸化ナトリウム溶液 (potassium hydroxide(10%)) 及び塩化ベンザルコニウムを陽性対照物質として選定して手技の確認がなされたが、本試験での陽性対照物質は 10%水酸化カリウム水溶液を用いた。本試験では陰性対照物質として 20%ラウリル硫酸ナトリウム溶液 [sodium lauryl sulfate(20%)] を用いた。被験物質の選定に当たっては ECVAM でのバリデーションで用いられた物質を基本とし、本邦の法規制 (毒劇法) を考慮しつつ、物性的なバランスも考慮した。12種類の性状は液体 6種、固体 4種、粉末 2種であった。

*In vivo*での皮膚腐食性の評価は Botham ら (1995) のデータをもとに分類した。腐食性物質は硫酸 (10%) [sulfuric acid(10%)], octanoic (caprylic) acid、水酸化ナトリウム溶液 (4.88%) [sodium hydroxide (4.88%)], フェノール (phenol)、酸化クロム () (無水クロム酸、chromium trioxide、chromium () oxide が正式名) 及びりん酸 (phosphoric acid) の 6種、非腐食性物質として 6種、過ほう酸ナトリウム四水和物 (sodium perborate、sodium peroxoborate tetrahydrate が正式名)、テトラクロロエチレン (tetrachloroethylene)、水酸化ナトリウム溶液 (5%) [potassium hydroxide(5%)], 4-amino-1,2,4-triazole、L-乳酸 (L-lactic acid) 及びイソプロパノール (isopropanol、別名 2-propanol) の 6種である。

次に被験物質を化学構造で分類すると、無機酸の腐食性物質は sulfuric acid(10%)、非腐食性物質

は phosphoric acid、無機塩基の腐食性物質は sodium hydroxide (4.88%)、非腐食性物質として potassium hydroxide (5%)と sodium perborate、有機酸の腐食性物質として octanoic acid、非腐食性物質は L-lactic acid、有機塩基の腐食性物質はフェノール、非腐食性物質は 4-amino-1,2,4-triazole、金属塩の腐食性物質は chromium trioxide、中性の非腐食性物質溶剤として tetrachloroethylene 及び isopropanol と、選択された物質は各種物性がほぼ均等に選択されている。

表 1. 被験物質

番号	被験物質名	腐食性*	コメント	規制	物性
1	Potassium hydroxide (10%)	C	陽性対照物質	劇物	液体
2	Sodium lauryl sulfate (20%)	NC	陰性対照物質		液体
3	Sulfuric acid (10%)	C	劇物判定薬	非劇物	液体
4	Octanoic (Caprylic) acid	C		非劇物	液体 bp 239.7
5	Sodium hydroxide(4.88%)	C	劇物判定薬	非劇物	液体
6	Phenol	C	劇物判定薬	劇物	固体 mp 40-43
7	Chromium trioxide	C		劇物	固体 mp 197
8	Phosphoric acid	C		非劇物	固体 mp 42.3
9	Sodium perborate	NC		非劇物	粉末 60 で分解
10	Tetrachloroethylene	NC		非劇物	液体 bp 121
11	Potassium hydroxide (5%)	NC			液体
12	4-Amino-1,2,4-triazole	NC		非劇物	粉末 mp159
13	L-Lactic acid	NC		非劇物	固体 mp 52.8
14	Isopropanol (2-propanol)	NC		非劇物	液体 bp 82.5

* C: corrosive, NC: non-corrosive [Botham, et al., 1995]

4. 試験法の正確性を評価するために用いられた物質の *in vitro* 及び参照データの有無

選定した 12 種類の被験物質の多くは ECVAM、ICCVAM で EpiDerm™、EPISKIN™あるいは Corrositex™を用いた皮膚腐食性試験バリデーションで使用された物質である。これら被験物質の評価結果は下記の資料として提出されている。

Liebsch et al., ATLA 2000; Barratt et al., Toxicol. in Vitro 1998; Fentem et al., Toxicol. in Vitro 1998; Worth et al., ATLA 1998; Botham et al., ATLA 1995

ICCVAM (2002) NIH Publication No: 02-4502

ICCVAM(1999) NIH Publication No:99-4495

本邦における「毒物及び劇物取締法」(毒劇物法)で劇物指定の際の判定基準となっている物質が陽性対照を含め 3 物質あり、いずれも腐食性物質である。しかし、劇物指定外物質でも腐食性を認める物質がある。毒劇物法では 10%濃度で腐食性を示すものを規制対象としており、試験研究からの *in vivo* 評価とは異なる。これは皮膚腐食性試験が物質としてのポテンシャルを評価する方法であり毒劇物指定条件の違いがある。今回は毒劇物の指定条件に限定せず、純粹に腐食性の評価を行った。

5. すべてのデータ及び結果

各施設で実施された本試験 2 回及び追試験の全ての結果(62 回)を、実験施設、実験者、試験種類(回数)、記録日、使用モデル名、測定波長とともに生の吸光度をデータシートに記入して提出されており、これらを用いて評価した。EpiDerm™モデルにおいては腐食性物質を正しく腐食性と判定した例は、陽性対照物質を除く 6 被験物質の 30 試験中 29 試験で、感度(sensitivity)は 29 / 30(96.7%)であった。一方、非腐食性物質を正しく非腐食性と判定した例は 6 被験物質 30 試験中 20 試験で、特異性(specificity)は 20 / 30 (66.7%)であった。非腐食性を腐食性と誤認判定した物質は potassium hydroxide (5%)と L-lactic acid で、全ての機関で判定が異なっていた。陽性予知能力(positive predictivity)は 39 の陽性事例のうち 29 例(74.4%)、陰性予知能力は 21 例中 20(95.2%)であった。合計すると正しい結果が得られた割合(一致率)は 60 試験中 49 例(81.7%)であった。腐食性物質である sulfuric acid を 2 回とも陰性と判定した施設が 1 施設あった。

Vitrolife-Skin™モデルでの感度は 30 / 30 (100%)、特異性は 20 / 30 (66.7%)、陽性予知能力 30 / 40 (75%)、陰性予知能力 20 / 20 (100%)であり、EpiDerm™モデルと同等の判定率であった。非腐食性を誤って腐食性と判定したのは potassium hydroxide (5%)と lactic acid と EpiDerm™モデルと同じ物質であった。

表 2 EpiDerm™の一致数

	Vitro	Corrosive	Non-Corrosive
Vivo			
Corrosive		29	1
Non-Corrosive		10 (5% KOH, Lactic Acid)	20

表 3 Vitrolife-Skin™の一致数

	Vitro	Corrosive	Non-Corrosive
Vivo			
Corrosive		30	0
Non-Corrosive		10 (5% KOH, Lactic Acid)	20

次に、12 種の被験物質について皮膚モデルでの判定結果と *in vivo* のデータを比較した。明らかな腐食性物質 (sulfuric acid) についてある 1 施設が異なった判定をしたため、sulfuric acid については 5 施設での結果を最終判定とした。被験物質数を分母として起算すると、EpiDerm™モデル及び Vitrolife-Skin™モデルの感度は、両モデル共に 12/12(100%)、特異性 4/6(66.7%)、正確性 10/12 (83.3%)、偽陽性率 2/12(16.7%)、偽陰性率 0/12(0%)といずれの結果も同一であった。よって、EpiDerm™及び Vitrolife-Skin™両モデルの間に腐食性の評価に差はないと考えられる。ECVAM で実施された EpiDerm™を用いた皮膚腐食性試験のバリデーション結果と比較してもほぼ同等で、特に、偽陰性率が少ない点で EPISKIN™よりも予測性は高いと評価した。

表 4. EpiDerm™及びVitrolife-Skin™の特異性、感度、一致性の比較
(国立衛研、sulfonic acidを除外して計算)

	EpiDerm™	Vitrolife-Skin™	EpiDerm(ECVAM)	EPISKIN(ECVAM)
試験物質数	12	12	24	60
感度	100% (12/12)	100% (12/12)	92%	82%
特異性	66.7% (4/6)	66.7% (4/6)	83%	84%
正確性	83.3% (10/12)	83.3% (10/12)	92%	83%
偽陽性率	16.7% (2/12)	16.7% (2/12)	17%	16%
偽陰性率	0% (0/12)	0% (0/12)	8%	18%

本試験において、L-lactic acidは、非腐食性物質(NC)として分類し皮膚モデルとの判定結果を比較したが、EpiDerm™及びVitrolife-Skin™を用いた試験では腐食性物質(C)と判定し偽陽性物質として区分された。Liebsch et al.(2000)の報告ではL-lactic acidの *in vivo* classificationはR34、すなわち腐食性ありとしている(彼らは一方でEpiDerm™モデルではNCとしているが)、Barratt et al.(1998)のECVAM Workshopでの報告にも同様の結果がある。したがって、今回のL-lactic acidの *in vivo* の判定の根拠については確認をとる必要があり、もし *in vivo* で腐食性が示されれば、皮膚モデルでの陽性の結果は正しいことになる。

Potassium hydroxideは10%溶液を陽性対照として用い、5%溶液を *in vivo* 陰性物質として評価している。In vitro ではいずれの皮膚モデルも5%溶液は腐食性ありと判定し、偽陽性物質との分類となる。しかし、NIH Publication No:99-4495, (1999)では *in vivo*での判定はdiscordant(一致していない)との記載がある。試験濃度により判定が異なることは予測範囲内であり、本結果は皮膚モデルでの検出感度が高いことによる可能性を示唆している。

6. 試験法の正確性(再現性、頑健性)

試験結果に影響を及ぼす要因としては被験物質の適用時間と洗浄方法であり、一連の操作で高度の技術を要求されることはない。吸光度測定はマイクロプレートリーダーで行い、細胞生存率の算出は溶媒対照を基準値とし、その比率として表される。

同一施設内で2回試験を繰り返し、1回目と2回目で異なる結果を得たのは、EpiDerm™では12物質中sulfuric acidとL-lactic acidの2物質であり、それぞれの物質につき2施設で観察された(施設1の実験番号48、施設2の14、施設3の15、施設5の51)、Vitrolife-Skin™の場合、sulfuric acid, octanoic acid, sodium hydroxideの3物質で観察された(施設2の実験番号34、施設3の15及び25)。同一物質で2回の試験で異なる判定結果が生じる割合は60の試験回数のうちEpiDerm™で4回(6.67%)、Vitrolife-Skin™で3回(5.0%)と、Vitrolife-Skin™モデルの方がわずかに低かった。判定が異なる理由としては細胞生存率が判定基準値近傍の値を示したためであるが、基準値の区切りにより判定が異なる場合においても細胞生存率は1回目、2回目、追加試験ともほぼ同じ値を示し、同一施設内での再現性は高かった。

EpiDerm™を用いた場合、施設1のみsulfuric acidの最終判定が他施設とは異なっていた。施設間での判定一致率は1/6(16.7%)(バリデーション報告書では1/5とあるが、6施設あるので誤記と思われる)物質間での判定不一致率では12物質中1物質となる。Vitrolife-Skin™を用いた場合、各施設間での被験物質に対する最終判定結果は全て一致した。

以上のように、施設内及び施設間での再現性に関しては、Vitrolife-Skin™を用いた方がEpiDerm™

に比べ良好の成績が得られている。

被験物質数を分母として起算した EpiDerm™及び Vitrolife-Skin™での感度は 12/12(100%)、特異性 4/6(66.7%)、正確性 10/12(83.3%)、偽陽性率 2/12(16.7%)、偽陰性率 0/12(0%)でいずれの項目でも両モデルの数値は一致し、差異を認めなかった。24 種の物質を対象にして ECVAM で実施された EpiDerm™のバリデーション研究の結果と比較した場合、Vitrolife-Skin™は特異性と正確性においてやや数値が低いものの、偽陰性率は 0 であった。60 種類の物質について行われた EPISKIN™の結果と比べると特異性の面では劣るものの、他の評価項目では優れていた。よって、EpiDerm™は EPISKIN™と比べて腐食性の予測モデルとして優れていると考えた。試験に用いた物質数や種類が異なっているため一元的な優劣の評価は困難であるが、今回の結果だけで評価すると Vitrolife-Skin™は現時点で最も予測性の高いモデルとして確立されている EpiDerm™と同等の性能を有すると思われた。

7. 試験法の信頼性

試験法は EpiDerm™を用いたバリデーション研究で実施されたものと同じのプロトコルを用いている。試験実施前に、標準操作手順書(SOP)を作成し試験実施者に対する技術講習会を開催し技術移転を行っている。

用いた皮膚モデルは各メーカーから直接実験施設に供与された。供与数は予備試験 1 回、本試験 2 回とし、それぞれ 2 キットを使用した。追加試験の実施が必要なときは、別途追加のキットが供与された。皮膚モデルは試験開始まで保管、または添付された培養液で前処理された。Vitrolife-Skin™については前培養期間が 0 あるいは 1~2 日前と幅があり、この前処理時間に関する影響については明らかではない。

バリデーション実行委員会は被験物質の皮膚腐食性を調査して選定し、各施設にコード化して配布した。そのため、実際の実施者は試験物質がブラインド化され判別不能となっている。被験物質の物性(液体・固体)により適用法を変え、固形の場合、画鋸の後ろで押さえる方法がとられている。しかし、画鋸に限定せず、規格や性状の影響も考慮し、押さえるものの形や大きさ等を記載した方がよかった。

Vitrolife-Skin™は被験物質が強アルカリ性の場合、基盤となるコラーゲンスポンジが溶解し、適用部位をパンチでくり抜くことが不可能なため、色素の抽出の際に支障が生じた。今回タンパク変性を有する物質は腐食性と判定しているが、今後こうした場合の判定基準についても SOP に記載すべきである。

細胞生存率(%)はマイクロプレートリーダーで吸光度を測定し、溶媒対照の吸光度と直接比較することによって求められる。判定基準値はあらかじめ設定されており、腐食性の評価に対して主観性の入るところはない。

試験は同じ被験物質で 2 回繰り返して行い、それぞれの試験判定が異なった場合は追加試験を実施し、最終試験結果を被験物質の評価とした。2 回の試験で異なった結果が生じる割合は EpiDerm™で 4/60(6.67%)、Vitrolife-Skin™で 3/60(5.0%)でほぼ同程度であった。基準値の境界付近で判定が分かれた場合でも、生存率は 1 回目と 2 回目、追試験ともほぼ同じ値を示した。

8. データの質

試験実施施設すべてが GLP に準拠しているわけではない。しかし、試験実施者は、技術講習会に参加し技術移転を受けた者に限定し、SOP に沿って実施された。皮膚モデルは製造会社から品質が保証さ

れているものと同一キットが直接実施者に配送され、被験物質は一機関からコード化されたものが送付された。コードの開示は全施設から結果収集が終了したのち行われ、盲検性について信頼性の向上に努めた。

試験結果のまとめは所定の記録用紙（入力欄）が作成され、実施施設名、記録者、測定波長、被験物質番号と吸光度を皮膚モデル毎に入力する様式がとられた。吸光度データシート（結果確認欄）は吸光度から計算された各被験物質の生存率とその判定が記入され、添付されている。被験物質の添加量、測定値に関して適切性を確認するためのデータクリーニングが行われ、そのコメントも回収された。吸光度の転記ミスを防止するため96穴プレートの図示を用いたが、結果的には多くの記載ミスがあった。しかし確認後、適切に訂正され、意図的なデータの改変は認めなかった。

皮膚モデルの前培養時間についてのコメントはなく、結果的に影響は認めなかったが、SOP等で変動幅がある項目についてはコメントを記録するべきである。

ピペットや電子天秤、マイクロプレートリーダー等の機器類は点検補正記録を保存しておくことがデータの質の向上につながると思われる。（GLP 適合施設は問題外）

9. 他の科学的な報告との比較の有無

OECDの*in vitro*腐食性試験ガイドラインとして、「抽出皮膚電気抵抗性試験(TER)」、「ヒト皮膚モデル試験」及び「*in vitro*膜バリア試験」が承認されている。これらはいずれも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及びCorrositex)の特異性、感度、正確性、偽陽性率及び偽陰性率について比較した結果を報告している。

本研究での結果はこれらと比較されている。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判定だけをもって、単純に皮膚モデルの優越性を評価することは困難であるが、Vitrolife-Skin™は少なくとも現在最も予測性の高いモデルとして確立されているEpiDerm™と同等の予測性を有すると思われる。

10. 3Rsへの関与（動物福祉面からの妥当性）

いずれの皮膚モデルとも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。

11. 試験法の有用性と限界（コスト、時間からの妥当性など）

Vitrolife-Skin™1キット(24 well)の価格は約6万円、1試験で陽性、陰性対照とともに使用する場合8 well使用で3試験が実施可能であり、1試験当たりのコストは約2万円である。これはEpiDerm™の約半分に相当する。試験実施に費やす時間は両試験とも1日以内であり、*in vivo*との一致率も同等と考えられた。

Vitrolife-Skin™は製品を入手後、直ちに前培養を施し実験を開始する必要がある。また、この前培養時間の差異による結果への影響については明らかではない。Vitrolife-Skin™はポリカーボネート膜上に表皮が構築されたEpiDerm™よりヒトの皮膚構造に類似し、線維芽細胞を含むコラーゲン上に表皮層が重層化されている。しかし、被験物質が強アルカリ性の場合は基盤であるコラーゲンを溶解することにより、染色に必要な皮膚モデルの切り抜きが不可能となり測定に支障をきたした例があった。しかし、この場合は腐食性物質と判定することが適切であり、SOPに対応する記載が必要であるとしている。同様に、被験物質によってはコラーゲンが膨張し、ポンチによる組織の切り取りが均一でない可能性がある。また、着色性物質やアルカリ性物質のような細胞や培養器材への吸着が強いものにつ

いては MTT の発色に影響を及ぼす可能性があり、コラーゲンのみのブランクを測定する等、配慮が必要と考えられる。これらの事項は Vitrolife-Skin™ の改善点として挙げられている。

今後、大量生産等のため製造方法が変更される可能性がある。その場合、本研究に用いられたものと同質性を保証することが必要である。皮膚モデルの品質の同等性や反応性の均一化に関する規格を定めておく必要がある。

12. その他（特許の有無など）

特許については示されていない。Vitrolife-Skin™ は既に市販されている。

13. 結論

Vitrolife-Skin™ は皮膚腐食性評価のための皮膚モデルとして、EpiDerm™ と同等の判定の正確性、再現性、信頼性を有していた。Vitrolife-Skin™ を用いた皮膚腐食性試験は、動物や特殊な機器を使用せず短時間で容易に評価できた。また、EpiDerm™ に比べ安価であり、本邦で製造販売されているため安定した供給と管理が可能である。よって、Vitrolife-Skin™ は皮膚腐食性試験の代替法として有用であると結論した。

14. 文献

- Barratt, M.D. et al., The ECVAM International Validation Study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and Distribution of the test chemicals. *Toxicology in Vitro*, 12, 471-482 (1998)
- Botham, P.A. et al., A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 6. *ATLA*, 23, 219-255 (1995)
- Fentem, J.H. et al., The ECVAM International Validation Study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the management team. *Toxicology in Vitro*, 12, 483-524 (1998)
- ICCVAM (2002) NIH Publication No.02-4502. ICCVAM Evaluation of EPISKIN, and EpiDerm (EPI-200) and rat skin transcutaneous electrical resistance (TER) assay: in vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals.
- ICCVAM (1999) NIH Publication No.99-4495. Corrositex: An in vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals.
- Liebsch, M., et al., The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing. *ATLA*, 28, 371-401 (2000)
- OECD guideline for the testing of chemicals. Draft proposal for new guideline: 431, in vitro Skin Corrosion: Human skin model test.
- Worth, A.P. et al., An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion. *ATLA*, 26, 709-720 (1998)
- 吉村 功ら(2005)日本動物実験代替法学会バリデーション委員会、皮膚腐食性試験バリデーション結果報告.