

皮膚腐食性試験バリデーション結果報告

日本動物実験代替法学会バリデーション委員会
委員長 吉村 功

実行委員会委員

吉村 功（東京理科大学 工学研究科 経営工学）
大森 崇（京都大学大学院 医学研究科 社会健康医学系専攻
医療統計学部門）
大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所 安全生物研 薬理部）
小島 肇（日本メナード化粧品(株) 総合研究所 研究技術部門
第二部安全性評価研究室）

実験責任者

安東朋子（国立医薬品食品衛生研究所 安全生物研 毒性部）
稲垣勝裕（日本農薬(株)総合研究所 安全性・医薬研究センター、
安全性グループ）
久保木真美（日本曹達(株)小田原研究所 安全性研究部）
小坂忠司（(財)残留農薬研究所 毒性第二部 免疫毒性研究室）
小島 肇（日本メナード化粧品(株) 総合研究所 研究技術部門
第二部安全性評価研究室）
中村洋介（住友化学工業(株)生物環境科学研究所生化学グループ）

皮膚三次元モデル提供者

鳥島 久（倉敷紡績(株)バイオメディカル部）
森川訓行（グンゼ(株)研究開発センター第5研究室）

序

動物福祉への関心の高まりに応ずるため、多くの動物実験代替法（以後、代替法と記す）が開発されてきた。それらの内、皮膚への直接作用としての強い障害性を調べる試験法の代替法（皮膚腐食性試験代替法）として、EUのECVAM Scientific Advisory Committeeは 1998 年にEPISKIN™とラット Transcutaneous Electrical Resistance Test皮膚腐食性試験(TER法)を、2000 年にはEpiDerm™とCORROSITEX™を認めた。米国では 1998 年にCORROSITEX™を全ての化学物質に有用とは言えないが、Department of Transport (DOT) で必要とされる状況においては有用であると評価した¹⁾。OECDにおいても、TER法とEPISKIN™, EpiDerm™法が皮膚腐食性試験として専門家会議で承認され（それぞれガイドライン 430 と 431）、正式な通知が待たれている。TER法を除き、これらの方法はいずれもヒト皮膚三次元モデルを利用した試験法である。しかし、これらの試験法について、我が国で検討された例がなく、手技や評価に関わる問題点が不明である。

我が国においてもVitrolife-Skin™（グンゼ）やTESTSKIN™（東洋紡）のような皮膚三次元モデルが開発され、皮膚刺激性等を評価するために市販されているが、これらヒト皮膚三次元モデルを皮膚腐食性試験代替法として利用することについては検討された例がない。

一方、10%水酸化カリウムやフェノールのように、皮膚障害性の強い化学物質は劇物と分類されているが、*in vivo*で強い皮膚障害を起こすと予想される物質を実験動物を用いて検討することは、強い苦痛が予想されることから、動物福祉の立場から実施が困難である。我が国においても、強い皮膚障害性の判定に、上記の*in vitro*皮膚腐食性試験を利用することが望ましい。

以上の状況を鑑み、日本でヒト皮膚三次元モデルとして開発されたVitrolife-Skin™とすでにECVAMにてバリデーションが終了しているEpiDerm™の特性を明らかにするために、多施設での小規模バリデーションを実施した。

方法

1) バリデーション組織

わが国で皮膚三次元モデルを販売している企業に基本計画を示し、バリデーションへの協力を求めたところ、クラボウ社(EpiDerm™)およびグンゼ社(Vitrolife-Skin™)より協力が得られた。そこで、日本動物実験代替法学会及び厚生労働省医薬局生活科学安全対策室を通じて、バリデーションへの参加施設を募集した。その結果、国立医薬品食品衛生研究所（毒性部）、日本農薬、日本曹達、残留農薬研究所、日本メナード化粧品及び住友化学工業より参加の申し入れがあった。そこで、日本動物実験代替法学会にバリデーションへの協力を求め、そのバリデーション委員会を中心に少数の被験物質を用いたバリデーション研究を実施するとされ、バリデーション実行委員会を組織した（添付資料 1）。

2) 被験物質および器材

バリデーション実行委員会では今までの皮膚腐食性試験のバリデーションで用いられた被験物質とその腐食性を調査した（添付資料 2）。実行委員会ではそれらの中から予備試験及び本試験用の陽性対照物質として 10%水酸化カリウム水溶液、20% Sodium lauryl sulfate 水溶液および塩化ベンザルコニ

ウムを、また、実験に直接関与しない国立医薬品食品衛生研究所薬理部の大野が被験物質として 12 物質を選考した（表 1）。被験物質は大野がコード化し、実験実施施設に配布した。各施設には陽性対照物質とともに、腐食性物質と非腐食性物質をそれぞれ 5 物質ずつ配布した（表 2）。なお、配布された被験物質はすべて劇物として扱うこと、冷暗所に保管すること、また、GLP に準じて、使用・保管記録をとるよう指示された。

ヒト皮膚三次元モデルEpiDermおよびVitrolife-Skin™はそれぞれクラボウ社とグンゼ社より購入し、実験スケジュールに従い、実験施設に直接配布した。配布数は予備試験を 1 回及び本試験を 2 回とし、それぞれ 2 キットずつ使用することから、6 キット配布するとしたが、追加試験を行う場合は、追加のキットを配布した。

3) バリデーシヨンの試験計画書の作成と技術移転

バリデーシヨン実行委員会ではバリデーシヨン実施に際しての詳細を検討し、試験計画書（添付資料 3）および標準操作手順書（SOP, 添付資料 4）を作成し、それに基づいて、陽性対照物質を用いて技術移転を行った。

4) バリデーシヨン実験の実施

適正な技術を持った者により実験が行われるよう、三次元モデルを用いた実験を行う者は技術移転の会に出席した参加施設のうち、本試験開始までにキットを使用した経験のある試験担当者に限るとした。試験期間は平成 16 年 2～3 月とした。

なお、実験は予備試験を 1 回、本試験を 2 回行い、2 回の本試験で最終判定が食い違った物質、および技術的な問題で 1 例のみしか結果が得られなかった物質については、追加試験を行うこととした。なお、追加試験のためのキットを予め注文してあったため、2 回の本試験で同じ結果が得られた場合においても確認のため、追加試験を実施した場合もある。

5) 腐食性の判定

被験物質の腐食性の最終判定は、2～3 回の本試験結果のうち、同一の判定の得られた 2 例の結果を最終判定結果とすることとした。しかし、追加試験のためのキット提供の都合から、4 月末に実験が終了した。

試験の実施に際しては GLP の原則を尊重し、試験計画書および SOP に従って実施された。また、試験記録および修正記録を明確にとることとされた。大きな逸脱があった場合には、結果を採用しないこともあるとされた。

6) データ解析

試験結果は実行委員長吉村に提供するとされた。そこで、すべてのデータが提出されたことが確認されたところで、大野より被験物質コードと参加施設への割付表が開示された。これに基づいて、吉村がデータを確認したのち、結果を固定し、解析した。

結果

それらの結果を表 3 および 4 にまとめた。

1) 試験結果の再現性

2回の本試験で異なる結果が出たのは、EpiDerm™においては、66試験の内sulfuric acid、Lactic acidで各2施設であり、発生率4/66、即ち、6.06%であった。Vitrolife-Skin™においては、sulfuric acid、Octanoic acid、Sodium hydroxide(4.88%)で各1施設であり、発生率3/66、即ち、4.55%であった。

2) 予知能力

2回の試験で異なる結果が得られた場合の判定については、3回目の試験を実施し、その結果を合わせ、3回の試験結果を基に多数決で判定するとされている。そこで、これに従って判定された結果を基に、被験物質の腐食性を判定した。

EpiDerm™で腐食性物質を正しく腐食性と判定した事例は6被験物質30試験中、29試験であり、感度(sensitivity)は29/30、即ち、96.6%であった。一方、非腐蝕性物質を正しく非腐蝕性と判定した事例は6被験物質30試験中、20試験であり、特異性(specificity)は20/30、即ち66.7%であった。なお、非腐食性物質を誤って腐食性物質と判定したのは、5% Potassium hydroxideとLactic acidであり、この場合、いずれの施設でも腐食性物質と判定した。腐食性との結果が得られたもののうち、真に腐食性である割合、陽性予知能力(positive predictivity)は29/39即ち、74.4%であった。非腐食性との結果が得られたもののうち、真に非腐食性である割合、陰性予知能力(negative predictivity)は20/21、即ち、95.2%であった。正しい判定結果が得られた割合、一致率は49/60即ち、81.7%であった。

Vitrolife-Skin™では感度は30/30、即ち100%であり、特異性は20/30、即ち66.7%、陽性予知能力は30/40、即ち75%、陰性予知能力は20/20、即ち100%、一致率は50/60、即ち83.3%であった。EpiDerm™の場合と同様に、非腐食性物質を誤って腐食性物質と判定したのは、5% Potassium hydroxideとLactic acidであり、いずれの施設でも腐食性物質と判定した。

これらのように、いずれの場合も、EpiDerm™とVitrolife-Skin™によりほとんど同じ結果が得られた。また、判断を誤る物質も同じであった。

考察

OECDやEU、米国で皮膚腐食性試験代替法として承認されているEpiDerm™と我が国で開発されたVitrolife-Skin™の2種のヒト皮膚三次元モデルについて、OECDのバリデーショ基準に準じて、多施設バリデーションを実施した。その結果、前者ではfalse negativeが30試験のうち1試験で認められたが、後者ではfalse negativeは認められなかった。一方、両皮膚三次元モデルの試験法とも5%水酸化カリウムと乳酸でfalse positiveとなった。結果としては、false negative及びfalse positiveの発現については、両皮膚三次元モデルともほとんど同じ結果が得られた。

今回、使用した被験物質数は陽性対照物質を除き、12物質であり、従来のバリデーションと比べ、少ないが、OECDで適切なガイドラインとして専門家会議で承認されている。皮膚三次元モデルと同等のものであり、完全に新規の方法と比べてより小数の被験物質でのバリデーション(catch up validation)でその妥当性を判断できると考えたものである。

一方、水酸化カリウム、硫酸、水酸化ナトリウム、及びフェノールは我が国の毒劇物判定において、皮膚粘膜刺激性において、これと同等以上の物質は劇物と判定するとされているものであるが、それぞれ10%硫酸、5%水酸化ナトリウム、5%水酸化カリウム、及び5%フェノールと同等以下の刺激性を有

する物質については劇物から除外されているものである。一方、5%水酸化カリウムを除き、10%硫酸や5%水酸化ナトリウムは腐食性物質として報告されているものであり、今回の試験においても腐食性の結果が得られた。これらを考えると、本試験を日本で採用する場合においては、皮膚粘膜刺激性の観点からの劇物の判定基準を見直す必要があると考えられる。

Vitrolife-Skin™において、強度のアルカリにより本皮膚三次元モデルの支持組織であるコラーゲンスポンジが完全に溶けてしまい、腐食性の判定に支障を来した。今回の判定においては、強い刺激性があるものとして、腐食性と判定したが、SOP上もそのように改定する必要がある。なお、酸やアルカリ検体については、その他の障害は認められておらず、pH変化によるviability測定のための色素の発色への影響は洗浄などの操作により解消できたと考えられる。一方、着色物質の中には、細胞や培養基材への吸着の強いものがあることも考えられることから、それら被験物質の場合には取り扱いには注意する必要がある。また、ポンチで切り取る組織の大きさが皮膚モデルの膨潤率により変化する可能性があり、注意を喚起する必要があるとされた。更に、Vitrolife-Skin™では被験物質として用いたアルカリがコラーゲンスポンジに残留することにより発色が影響される場合があり、このような被験物質の場合ではコラーゲンスポンジのみのブランクが必要であった。

引用文献

- 1) ICCVAM: Corrositex[®]: An in vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods (NICEATM). NIH Publication No: 99-4495 (1999).

表 1 : 被験物質

番号	被験物質名	腐食性*	コメント		
1	Potassium hydroxide(10%)	C	陽性対照物質	劇物	液体
2	Sodium lauryl sulfate(20%)	NC	陽性対照物質		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 (2propanol)	NC		非劇物	液体 bp 82.5

C: corrosive, NC: non-corrosive

表 2 : 被験物質の各施設への配布表

被験物質名	腐食性*	施設 1	施設 2	施設 3	施設 4	施設 5	施設 6
Potassium hydroxide (10%)	C	1	2	3	4	5	6
Sodium lauryl sulfate (20%)	NC	7	8	9	10	11	12
Sulfuric acid (10%)	C	13	14	15	16	17	×
Tetrachloroethylene	NC	18	19	20	21	×	22
Octanoic (Caprylic) acid	C	23	24	25	26	×	27
Potassium hydroxide (5%)	NC	28	29	30	×	31	32
Sodium hydroxide (4.88%)	C	33	34	35	×	36	37
4-Amino-1,2,4-triazole	NC	38	39	×	40	41	42
Phosphoric acid	C	×	43	44	45	46	47
L-Lactic acid	NC	48	×	49	50	51	52
Isopropanol (2-propanol)	NC	×	53	54	55	56	57
Phenol	C	58	59	×	60	61	62
Sodium perborate	NC	63	64	65	66	67	×
Chromium trioxide	C	68	×	69	70	71	72

C: corrosive, NC: non-corrosive

表 4 -1 :EpiDerm™

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

表 4 -2 : Vitrolife-Skin™

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