

評価会議報告書

経皮電気抵抗試験を用いた皮膚腐食性試験代替法

JaCVAM 評価会議

平成 29 年（2017 年）7 月 25 日

JaCVAM 評価会議

大野 泰雄（公益財団法人 木原記念横浜生命科学振興財団）：座長
飯塚 尚文（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）*
五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部）
石井 雄二（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）
井上 智彰（日本免疫毒性学会）
今井 教安（日本動物実験代替法学会）
岩瀬裕美子（日本製薬工業協会）
篠田 和俊（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）
杉山真理子（日本化粧品工業連合会）
仲井 俊司（日本化学工業協会）
中村るりこ（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）
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）
沼澤 聡（日本毒性学会）
野口 真希（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）**
森田 健（日本環境変異原学会）
横関 博雄（日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会）

任期：平成 28 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

*：平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日

**：平成 29 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

ラット摘出皮膚を用いる経皮電気抵抗試験 (TER: Transcutaneous Electrical Resistance) は、ウサギを用いる皮膚腐食性試験の代替として開発された試験法である。本試験法では、腐食性物質が角質層に吸収された後拡散し、下層の表皮細胞を傷害するという考えをもとに、被験物質曝露後の電気抵抗値を指標として皮膚腐食性を評価する。本試験法については、ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods: 欧州代替法評価センター) でバリデーション研究が実施され、ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee: ECVAM 科学諮問会議) や^{1,2,3)} ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods: 米国代替法に関する省庁間連絡会議)^{4,5)}において本試験法の信頼性等が確認された後、OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development: 経済協力開発機構) にてテストガイドライン (TG) 430 として 2004 年に承認されている。この TG は何度か改訂されており、現在は 2015 年版となっている⁶⁾。

JaCVAM 評価会議は、皮膚腐食性試験資料編纂委員会により作成された「経皮電気抵抗試験を用いた皮膚腐食性試験代替法の評価報告書」⁷⁾を用いて、本試験法の妥当性について検討した。

1. 試験法の定義

名称: 経皮電気抵抗試験を用いた皮膚腐食性試験代替法

代替する対象毒性試験: ウサギを用いる皮膚腐食性試験

試験法の概略: 本試験法では、ラット (28-30 日齢ほど) から切除した 20 mm 円盤状の皮膚を試験システムとして使用する。被験物質を表皮面に一定時間適用し、角質層に吸収された後に拡散し、下層の表皮細胞に対し傷害する程度を、経皮電気抵抗を指標として測定することにより皮膚腐食性を評価する。さらに、電気抵抗が 5 k Ω 以下の場合には、10% スルホローダミン B 染色液にて染色し、皮膚に吸着された色素の量を吸光度から算出する。この結果、経皮電気抵抗が 5 k Ω より小さく、明らかに損傷のある場合 (例えば穿孔)、または、明らかな損傷がなくても色素量が陽性対照物質 (10M塩酸) の結果以上の場合、皮膚腐食性と判定する。

2. 評価に用いた資料及び評価内容の科学的妥当性

本試験法は、ECVAM による広い範囲の被験物質を用いたバリデーション研究により、妥当性が検証され、ESAC により信頼性と再現性は高いと評価されている^{1,2,3)}。この結論は、ICCVAM においても確認されている。これらの結果は公表されており、透明で独立な科学的評価が行われていると考える^{4,5)}。本試験法は、OECD により試験法ガイドラインに採択された (TG 430)⁶⁾。本邦においては、JaCVAM 皮膚腐食性試験資料編纂委員会が、これらの資料を用いて本試験法を評価している⁷⁾。また、本試験法は、腐食性物質が角質層を透過・拡散したのちに表皮細胞を傷害し、皮膚のバリア機能を傷害するという皮

皮膚傷害機構を模倣しており、皮膚バリア機能の指標として経皮電気抵抗を評価しており、皮膚腐食性発現機序が考慮されている。

以上の点から、本試験法の評価に用いた資料ならびに評価内容については、皮膚腐食性を評価する方法として科学的妥当性があると考えられる。

3. 本試験法の有用性と適用限界

本試験法に対する Botham^{1,8)}と Fentem³⁾の予測性の検討結果および ICCVAM による集計結果を表 1 に示した。両者の結果を合わせた結果とそれぞれの論文の正確度、感度、特異度に大きな差はなく、正確度は約 81%、感度は約 94%、特異度は約 71%であった。この中で、偽陰性は 3 物質 (6%) について認められているものの、これら 3 物質の腐食性の UN GHS¹⁾細分類はいずれも強度が弱い側のレベルにある (UN GHS 区分 1A には相当しない)と推察されるため、「腐食性は強くないと判断できる⁷⁾」という資料編纂委員会の判断は支持できる。

表 1. TER の予測性

	ICCVAM による集計結果	Botham et al. (1992 and 1996)	Fentem et al. (1998)
感度	94% (51/54)	96% (27/28)	93% (25/27)
特異度	71% (48/68)	70% (26/37)	71% (22/31)
正確度	81% (99/122)	82% (53/65)	81% (47/58)

OECD の *in vitro* 腐食性試験ガイドラインとして、他に「TG431 ヒト表皮モデル試験」および「TG435 *in vitro* 膜バリア試験」があり、ICCVAM では本試験法とこれらの試験法 (EpiSkinTM, EpiDermTMおよび Corrositex[®])について特異性、感度、正確性等のバリデーション研究が比較されている^{5,9,10)}。この結果、本試験法は他の試験法と同等の予測性を有すると評価されている。

以上の点から、本試験法は種々の化学物質に対して適用でき、すべてのタイプの腐食性および非腐食性を分類するための代替法として有用であると考えられる。ただし、プロトコルから類推して、難水溶性の固体や粘性の高い物質は適切に評価できない可能性がある。また、UN GHS による腐食性の細分類への適用には検討が不十分であり、有用性を評価できない。なお、本邦における行政的な受け入れにおいては、UN GHS 区分 1 の細区分を求められていない。

1 国連 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)

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れ性及び行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性：

本試験法は、ラットの摘出皮膚を用いているため完全な置き換え試験ではない。しかしながら、本試験法を用いることで動物数の削減が可能であり、また、腐食性物質による動物へのストレスを与えることは無いことから、動物実験代替法の3Rsの原則に適った試験法である。本試験法は、必要な技術が複雑ではなく、適切な訓練によって容易に習得できると考えられる。

以上の観点から、本試験法は社会的に受け入れられるものであると判断する。

行政上の利用性：

本試験法は、種々の化学物質に適用でき、腐食性および非腐食性を分類するための代替法として、行政的利用が可能であると考えられる。ただし、EUでは動物実験を行った化粧品等の販売を禁止していることから、化粧品等の評価への本試験法の適用は問題が生じる懸念がある。

参考文献

- 1) Botham, P.A. et al. (1996) A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 6. *ATLA*, 23, 219-255
- 2) Barratt, M.D. et al. (1998) 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
- 3) Fentem, J.H. et al. (1998) 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
- 4) ICCVAM (1999) NIH Publication No.99-4495. Corrositex: An *in vitro* test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals.
- 5) 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.
- 6) OECD (2015) Guideline for the testing of chemicals. 430, *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER).
- 7) JaCVAM 皮膚腐食性資料編纂委員会：皮膚腐食性試験評価報告書 経皮電気抵抗試験を用いた皮膚腐食性試験代替法の評価報告書（2017年2月24日）。
- 8) Botham, P.A. et al. (1992) The skin corrosivity test *in vitro*. Results of an inter-laboratory trial. *Toxicol In Vitro*. 6(3):191-4
- 9) ICCVAM (1999) NIH Publication No.99-4495. Corrositex: An *in vitro* test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals
- 10) JaCVAM 皮膚腐食性資料編纂委員会：皮膚腐食性試験評価報告書 ヒト表皮モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法の評価報告書（2017年2月24日）。