

評価会議報告書

*In vitro*膜バリア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

In vitro 膜バリア試験は、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、腐食性物質により引き起こされる膜バリア障害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、欧米でバリデーション研究が実施され、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、化学物質の有害性の分類・表示等のための試験法として採用されている。また、本試験法は 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) 435 として承認されている¹⁾。

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「*In vitro* 膜バリア試験を用いた皮膚腐食性試験代替法の評価報告書」²⁾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： *In vitro* 膜バリア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、ウサギ皮膚の代わりに合成の高分子で構成される人工の膜バリア (*in vitro* 膜バリア) を用い、化学物質による皮膚腐食性発現機構の重要なステップである皮膚のバリア機能の障害を、化学物質検知システム (Chemical Detection System : CDS) によって検出することにより、被験物質の皮膚腐食性を評価する。被験物質を *in vitro* 膜バリアの表面に適用すると、腐食性の被験物質が皮膚に作用する機序と同様にして引き起こす膜バリアの損傷により、被験物質は膜バリアを浸透・通過して CDS 側に到達し、pH インジケータの色の変化またはインジケータ液の他の特性の変化を引き起こす (化学反応、電気化学反応など)。腐食性の程度は、曝露時間と観察期間における CDS の変化の程度から判定する。本試験法のシステムは商業的には Corrositex[®]として販売されている。

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、腐食性の被験物質が生きた皮膚に作用する際に引き起こされる膜バリア損傷を、人工の膜を用いて評価するものであり、皮膚腐食性発現機序が原理的に考慮されている。

Corrositex[®]法は、ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods : 欧州代替法評価センター) によるバリデーション研究がなされ^{3,4,5)}、ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee : ECVAM 科学諮問委員会) により信頼性と再現性が高いと評価されている⁶⁾。この結論は、米国の代替法に関する省庁間連絡会議 (ICCVAM : Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) においても確認されている^{7,8)}。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。更に、本試験法は、OECD においても評価され、TG435 として承認されている¹⁾。本邦に

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²⁾。

以上の点から、Corrositex[®]法は皮膚腐食性を評価する方法として原理的妥当性があり、また、その評価に用いた資料ならびに評価内容については、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

本試験法は、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。

本試験法のシステムは商業的には Corrositex[®]として販売されており、膜バリア試料の性能の均一性を保つことは比較的容易と思われ、特別な手技も必要ないと思われることから、技術移転性は高いと判断できる。また、習熟度確認物質を用いて専門技術の習熟について確認することができ、多くの習熟度確認物質を一定の条件で評価することにより、CDS の変化の程度による腐食性分類の精度を高めることができるかと推測される。

Corrositex[®]法の予測性について、ICCVAM による集計結果と Botham および Fentem の論文に記載された感度、正確度、特異度で示すと、正確度 73-80%、感度 71-89%、特異度 65-76%であった^{3,5,7)}。ただし、これらの結果は試験間で差が大きく、皮膚腐食性試験資料編纂委員会では、評価物質選択の客観性なども考慮して、Fentem の結果を採用することが妥当と判断している。この Fentem の予測性の結果を表 1 に示した（正確度 73%、感度 71%、特異度 76%であり、偽陰性率 29%、偽陽性率 24%となる）。したがって、本試験法は偽陰性となる場合が多いと判断される。

皮膚腐食性試験資料編纂委員会により作成された評価報告書²⁾によれば、Corrositex[®]法のもっとも大きな問題点は、バリデーション研究で選択された物質の中で、試験に適用できる物質が限定されていることである（適合性試験により Botham では 70-76%、Fentem では 63%しか試験を実施できなかった）。Corrositex[®]法は原理的に CDS の色または他の特性の変化を生じない物質には適用できない。例えば、pH が 4.5~8.5 の範囲の水溶性物質は、多くの場合評価できない。このため、膜バリアを用いた試験を開始する前に、適合性試験として、被験物質が CDS によって検出可能かどうかを確認しておく必要がある。このように適用できる物質について注意する必要があるものの、本試験法は固体（水溶性/非水溶性）、液体（水溶液/非水溶液）および乳剤に適用できる。

表 1. Corrositex[®]の予測性

	Fentem et al. (1998) ⁵⁾
正確度	73%
感度	71%
特異度	76%
評価物質数	38/60

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「TG430 経皮電気抵抗試験 (TER)」があり、ICCVAM では本試験法とそれらの試験法 (EpiSkin™, EpiDerm™ および TER) について特異性、感度、正確性等が比較されている^{2,7,8)}。試験物質の数量や種類が異なっているため、結果の判定だけをもって、単純に当該試験法の優越性を評価することは困難であるものの、本試験法は、他の試験法と比べて感度が低いと判断される (EpiSkin™ と TER の感度はそれぞれ 98.5% と 94%)²⁾。

以上の点から、Corrositex®法は一部の被験物質と混合物において腐食性の有無を評価できると考えられるものの、その適用範囲は狭く、また、適用可能物質の範囲が不明確である。したがって、本試験法は多数の物質をスクリーニング評価する目的には適していないと考えられる。また、他の試験法と比べて偽陰性が多いことに留意する必要がある。

なお、*in vitro* 膜バリア試験法における検出方法としては、色の変化の他に、化学反応、電気化学反応も原理的には選択可能であり¹⁾、適用範囲を拡張できる可能性はあるが、そのような検出方法を含めたバリデーション研究はこれまでに行われていないと思われる。

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、特別な手技が必要でない試験法であり、本試験法のシステムは市販されている。また、生きた動物を用いないという点で、3Rs の精神に合致しており、社会的受け入れ性は高い。

行政上の利用性：

Corrositex®法は適用可能物質に CDS 使用上の制約があり、偽陰性が多いことから、多様な物質をスクリーニング評価する目的には適していないと考えられる。ただし、本試験法によって陽性と判定されたものを陽性物質として識別することに限定すれば、利用可能と判断する。

Corrositex®以外の *in vitro* 膜バリア試験法については知られていないが、開発された場合には十分なバリデーション結果に基づいて、その行政的利用性の評価を行うべきである。

参考文献

- 1) OECD (2015), Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 435: *In Vitro* membrane barrier test method
- 2) 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 *In vitro* 膜バリア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)。
- 3) Botham, P.A. et al. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 6. *ATLA*, 23, 219-255
- 4) 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

- 5) 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
- 6) ECVAM. (2001), Statement on the application of the CORROSITEX[®] Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. *ATLA* 29, 96-97.
- 7) ICCVAM (1999), NIH Publication No.99-4495. Corrositex: An *in vitro* test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals.
- 8) 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.