

EpiSkin™を用いた*in vitro*皮膚刺激性試験の検討

青木聡子¹, 太田 亮²

Investigation of the *in vitro* skin irritation test using the EpiSkin™ model

Satoko AOKI¹, Ryo OHTA²

緒言

Draize法による皮膚刺激性試験は、動物(主にウサギ)の背部皮膚に被験物質を塗布し、肉眼的に紅斑・浮腫を観察してその程度をスコア化し、被験物質の刺激性を判定する方法である¹⁾。OECDテストガイドライン(TG)404-Acute Dermal Irritation/Corrosion²⁾に従い、Draize法によって多くの化学物質の刺激性/腐食性の判定が行われてきた。しかし、動物愛護上の問題などから、ウサギを用いた皮膚刺激性試験に代わる皮膚刺激性を評価する*in vitro*試験法の開発が進められてきた。European Centre for the Validation of Alternative Methods(ECVAM)のもとでは、1999年から5種の皮膚刺激性試験代替法のプレバリデーション試験³⁾が行われ、その後正式に58種の化学物質を被験物質として、EpiSkin™を含む3種のモデルを用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション試験が行われた^{4,5)}。最終的にはEpiSkin™とEpiDerm™ SITの2種の3次元培養ヒト表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法が、2007年にECVAMの科学諮問委員会により承認された⁶⁾。

このような経過を経て、2010年7月にOECD TG 439 - *In Vitro* skin irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method⁷⁾ OECD TG 404の代替法として採択された。OECD TG 439では、本ガイドラインで認められた3種の3次元培養ヒト表皮モデル(EpiSkin™, EpiDerm™

SIT, SkinEthic™ RHE)のうち、EpiSkin™を用いる試験法を「検証済み標準試験法(Validated Reference Method-VRM)」としている。また、上記3種のモデルを使用して試験を行う場合には、操作者の手技の熟練度を証明するために10種の化学物質(Proficiency Chemicals)を用いて刺激性の判定が一致することが求められている。

今回、EpiSkin™を用いた皮膚刺激性試験代替法の手技確立のため、OECD TG 439のTable 1に記載の10種の化学物質(表1)を被験物質として試験を行った。

材料と方法

1. 表皮モデルおよび培地

EpiSkin™ small(SkinEthic社)はヒトケラチノサイト由来の表皮とコラーゲン基板(Type IおよびType IVコラーゲン)で構成される表皮モデル(表面積0.38 cm²)である。試験に使用したEpiSkin™ smallは日本用モデル(10日培養出荷モデル)をニコダームリサーチ社から購入し、海外モデルと同様に培養13日で試験に用いた。また輸送が遅れたものについては培養15日(使用期限:培養19日)で用いた。維持培地はキットに付属のものをそのまま使用した。アッセイ用培地は、培地中の3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT, Sigma-Aldrich)濃度が0.3mg/mLになるよう、使用直前に調製して用いた。

2. 対照物質および被験物質

陰性対照は10倍ダルベッコ PBS(+) (Sigma-Aldrich)を日局注射用水(大塚製薬工場)で希釈し

1 毒性部毒性学研究室

2 毒性部副部長

表 1 被験物質 (OECD TG 439, Table 1 に記載の Proficiency Chemicals)

| 被験物質 | CAS No. | In vivo score | 刺激性 | | 性状 | 純度 | 製造者 |
|------------------------|-----------|---------------|-----|--|----|--------|---------------|
| | | | 分類 | | | | |
| 1 ナフタレン酢酸 | 86-87-3 | 0 | NI | | 固体 | >98.0% | 東京化成工業 |
| 2 イソプロパノール | 67-63-0 | 0.3 | NI | | 液体 | ≥99.9 | 和光純薬工業 |
| 3 ステアリン酸メチル | 112-61-8 | 1 | NI | | 固体 | 99% | Alfa Aeser |
| 4 ヘプチルブチレート | 5870-93-9 | 1.7 | NI | | 液体 | ≥98% | Sigma-Aldrich |
| 5 サリチル酸ヘキシル | 6259-76-3 | 2 | NI | | 液体 | ≥99.0% | Sigma-Aldrich |
| 6 シクラメンアルデヒド | 103-95-7 | 2.3 | I | | 液体 | >92.0% | 東京化成工業 |
| 7 1-ブロモヘキサン | 111-25-1 | 2.7 | I | | 液体 | ≥97.0% | 和光純薬工業 |
| 8 水酸化カリウム (5%水溶液) | 1310-58-3 | 3 | I | | 液体 | - | 関東化学 |
| 9 1-メチル-3-フェニル-1-ピペラジン | 5271-27-2 | 3.3 | I | | 固体 | 97% | Sigma-Aldrich |
| 10 ヘプタナール | 111-71-7 | 3.4 | I | | 液体 | ≥95.0% | 和光純薬工業 |

NI: 刺激性なし (GHS分類: 区分外)

I: 刺激性あり (GHS分類: 区分2)

たもの(以下, PBS(+))を用いた。陽性対照は, 5 w/v% ラウリル硫酸ナトリウム (SLS, Sigma-Aldrich, 純度: 99%) 水溶液を用いた。

被験物質は, 表1に示した化学物質10種を用いた。

3. 試験方法

試験プロトコルは ECVAM のホームページで公開されている Standard Operating Procedure (SOP, Version: 1.8, February 2009)⁸⁾ に従った。

試験には陰性対照, 陽性対照および各被験物質につき各3個の表皮モデルを使用した。受領した表皮モデルは, 12ウェルプレートに移し, 24時間以上維持培地で培養(37°C, 5% CO₂, 湿度95%以上)した。被験物質が液体の場合はピペットで10 μLを表皮モデル表面に塗布した。固体の場合は5 μLの日局注射用水をピペットで塗布した後, 被験物質10 ± 2 mgを秤量皿ロートで適用し, スパチュラで広げた。陰性対照, 陽性対照および被験物質は15 ± 0.5分間(室温: 22-24°C)適用した後, 各表皮モデルにつき25 mLのPBS (+)で洗浄した。洗浄後の表皮モデルは新たな維持培地に移した後, 42 ± 1時間培養した。42時間培養後の表皮モデルは, アッセイ用培地(0.3 mg/mL MTT)に移し, 3時間 ± 5分間培養後, 表皮をコラーゲン基板ごと専用パンチでくり抜き, ピンセットで表皮とコラーゲン基板をはがした。表皮とコラーゲン基板は, 各表皮モデルにつき500 μLの酸性イソプロパノール液(0.04 N HCl

含有イソプロパノール)に浸漬, 攪拌して生成ホルマゼンを抽出した。抽出は室温(22-24°C), 遮光下で約4時間行った。次いで, 96ウェルプレートを用い, 各抽出液を200 μLずつ2ウェルに分注し, プレートリーダーを用いて測定波長570 ± 5 nmで光学濃度(OD)値を測定した。なお, ブランクのOD値は, 酸性イソプロパノール液を200 μLずつ6ウェルに分注して測定した。

陰性対照については, 3個の表皮モデルそれぞれのOD値から6ウェルのブランクOD値の平均値を差し引き, 得られた3個の表皮モデルの各OD値の平均値(OD_{NC})を細胞生存率100%とした。陽性対照および被験物質の細胞生存率は, 各表皮モデルのOD値からブランクのOD平均値を差し引いたものをOD_{NC}で除し, 100を乗じて細胞生存率を算出した後, 3個の表皮モデルの平均をとった。

なお, SOPに記載の「適用7分後の陽性対照の再塗布(一度塗布した検体をスパチュラで塗り広げる作業)」は, 陰性対照および被験物質の塗布方法と合わせるため行わなかった。また, 刺激性判定の補助としての培地中IL-1 αの測定は, ECVAMのバリデーションスタディ時には行われたが, OECD TG 439には記載がないため本試験では行わなかった。

4. 判定基準

OECD TG 439に従い, 陰性対照のOD値の平均が0.6以上1.5(小数第2位四捨五入)以下, 陽性対照の細胞生存率の平均が40%(小数第1位四

表2 陰性対照と陽性対照のOD値, 細胞生存率およびSD値

| | 陰性対照 | | 陽性対照 | |
|------|--------|--------|-----------|--------|
| | OD 平均値 | SD (%) | 細胞生存率 (%) | SD (%) |
| 平均値* | 0.8 | 6 | 12 | 4 |
| 最小値 | 0.6 | 4 | 3 | 0 |
| 最大値 | 0.9 | 8 | 18 | 8 |

*: 5回実施

【試験成立基準】

陰性対照のOD値の平均: 0.6以上1.5(小数第2位四捨五入)以下

陽性対照の細胞生存率の平均が40(小数第1位四捨五入)%以下

かつ陰性対照および陽性対照の細胞生存率のSD値が18(小数第1位四捨五入)%以下

表3 被験物質の細胞生存率の実施結果と既報との比較

| 被験物質 | 実施結果 | | | Validation phase II ^{b)} | | | | Cotovio <i>et al.</i> ^{c)} | |
|----------------------|------|-----|------------------|-----------------------------------|-------|-------|-----|-------------------------------------|----|
| | Mean | SD | 判定 ^{a)} | Mean (%) | | | 施設間 | Mean | SD |
| | (%) | (%) | | Lab 1 | Lab 2 | Lab 3 | SD | Lab 1 | |
| ナフタレン酢酸 | 106 | 6 | NI | 96 | 89 | 92 | 4 | - | - |
| イソプロパノール | 94 | 8 | NI | 100 | 82 | 82 | 11 | - | - |
| ステアリン酸メチル | 109 | 7 | NI | 104 | 90 | 101 | 7 | 96 | 9 |
| ヘプチルブチレート | 99 | 7 | NI | 104 | 102 | 112 | 5 | - | - |
| サリチル酸ヘキシル | 108 | 4 | NI | 100 | 102 | 95 | 4 | - | - |
| シクラメンアルデヒド | 18 | 5 | I | 24 | 9 | 42 | 17 | - | - |
| 1-プロモヘキサン | 33 | 10 | I | 26 | 19 | 47 | 14 | 26 | 11 |
| 水酸化カリウム(5%水溶液) | 11 | 3 | I | - | - | - | - | 26 | 17 |
| 1-メチル-3-フェニル-1-ピペラジン | 41 | 14 | I | 9 | 17 | 11 | 4 | - | - |
| ヘプタナール | 7 | 0 | I | - | - | - | - | 6 | 3 |

Mean: 細胞生存率の平均値(%)

SD: 細胞生存率のSD値(%)

NI: 刺激性なし / I: 刺激性あり

Lab 1~3はそれぞれECVAMバリデーション試験の試験施設(Lab 1: L' Oreal, Lab 2: Unilever, Lab 3: Sanofi aventis)

a): OECD TG 439による判定

b): 引用文献 Spielmann H, Hoffmann S, Liebsch M, et al. (2007)

c): 引用文献 Cotovio J, Grandider MH, Portes P, et al. (2005)

引用した文献値は小数第1位を四捨五入して表示した。

捨五入)以下で, かつ陰性対照および陽性対照の細胞生存率の標準偏差(SD)値が18%(小数第1位四捨五入)以下の場合, 試験成立とした。被験物質の刺激性の有無の判定においては, 被験物質適用表皮モデルの細胞生存率のSD値が18%以下で試験成立とし, 細胞生存率が50%(小数第1位四捨五入)以下の場合に「刺激性あり」, 50%を上回る場合に「刺激性なし」と判定した。

結果

1. 陰性対照(表2)

陰性対照のOD値は0.6~0.9(平均:0.8), 細胞生存率のSD値は4~8%(平均:6%)であった。

2. 陽性対照(表2)

陽性対照の細胞生存率は3~18%(平均:12%),SD値は0~8%(平均:4%)であった。

3. 被験物質(表3)

刺激性の判定結果は, 被験物質10種全てOECD TG 439の記載と一致した。以下に, 各被験物質の細胞生存率の平均値およびSD値を示す。

1)ナフタレン酢酸

細胞生存率の平均値は106%, SD値は6%となり, 刺激性なしと判定した。

2)イソプロパノール

細胞生存率の平均値は94%, SD値は8%となり, 刺激性なしと判定した。

3) ステアリン酸メチル

細胞生存率の平均値は109%, SD値は7%となり, 刺激性なしと判定した。

4) ヘプチルブチレート

細胞生存率の平均値は99%, SD値は7%となり, 刺激性なしと判定した。

5) サリチル酸ヘキシル

細胞生存率の平均値は108%, SD値は4%となり, 刺激性なしと判定した。

6) シクラメンアルデヒド

細胞生存率の平均値は18%, SD値は5%となり, 刺激性ありと判定した。

7) 1-ブロモヘキサン

細胞生存率の平均値は33%, SD値は10%となり, 刺激性ありと判定した。

8) 水酸化カリウム (5%水溶液)

細胞生存率の平均値は11%, SD値は3%となり, 刺激性ありと判定した。

9) 1-メチル-3-フェニル-1-ピペラジン

細胞生存率の平均値は41%, SD値は14%となり, 刺激性ありと判定した。

10) ヘプタナール

細胞生存率の平均値は7%, SD値は0%となり, 刺激性ありと判定した。

考察

1. 陰性対照および陽性対照

陰性対照では, ホルマザン抽出時の攪拌操作の良否がOD値に影響することがわかった。このOD値については, 試験成立基準の上限値(1.5)に近づくことはほぼ無く, 攪拌が足りないと下限値(0.6)に近づく傾向にあった。このことから, 4時間の抽出時間中は攪拌を充分に行い, かつ各表皮モデルの抽出操作を均等に行うことが必要であると考えられた。

陽性対照では, 各回の試験で細胞生存率の平均値およびSD値ともに試験成立基準を満たし, 検体の塗布および洗浄が正しく行われたことが確認できた。なお, ニコダームリサーチ社の方法に従い, SOPに記載の適用7分後に陽性対照検体を再度塗布する作業を省略したが, 問題はなかった。

2. 被験物質

今回の結果とECVAMで行ったバリデーシ

ョン試験⁴⁾, バリデーシオン試験前に行われたCotovioらの報告⁹⁾との比較を表3に示した。

表皮モデルを用いた*in vitro* 皮膚刺激性試験法で被験物質を評価する場合, 結果のばらつきの原因として, 被験物質の特性によるもの以外に手技的な要因(塗布および洗浄の手技)が挙げられる。

塗布の作業については, 熟練すれば問題はないと考えられるが, 被験物質と表皮モデルとの接触時間が15分間と短いので, 塗布を正確に行わないと正しい結果が得られない可能性がある。なお, SOPに記載の「適用7分後の陽性対照の再塗布」については, 塗布の作業をより確実にするためと推察される。被験物質が固体の場合は, 可能な限り粉碎して細かい粉末にすることがOECD TG 439およびSOPに記載されている。今回行った1-メチル-3-フェニル-1-ピペラジンの結果は既報よりも細胞生存率の平均値, SD値ともにやや高い傾向にあった。この原因として, 今回の検討では1-メチル-3-フェニル-1-ピペラジンは結晶性の粉末をそのまま塗布に用いたために, 被験物質の刺激性が弱く, ばらついた結果となったことが推察された。これは, 検体を乳鉢等で細かい粉末にすることによって, より既報に近い結果が得られる可能性が高いと考えられる。

洗浄作業については, SOPでは, 検体塗布後1個の表皮モデルにつきPBS(+) 25 mLで洗浄することとなっている。このことから, PBS(+)に溶解しない非水溶性物質や粘性のある物質など洗浄しにくいものについては, 洗浄むらがないよう特に注意する必要がある。今回検討した10物質中, イソプロパノール, 1-メチル-3-フェニル-1-ピペラジンおよび水酸化カリウム水溶液を除く7物質が水に不溶もしくは難溶性物質であるが, 結果のばらつき等の問題は生じなかった。

なお, 1-ブロモヘキサンについて試験を繰り返した結果, 細胞生存率のSD値が18%を超えた(細胞生存率の平均値36%, SD値24%, 参考データ)。1-ブロモヘキサンはECVAMのバリデーシオン試験時に, EpiSkin™のあるロット使用時に細胞生存率がばらついたこと, EpiDerm™では偽陰性となり正しく判定できなかったことが報告されている。ECVAMのChemicals Selection Sub-Committeeにより misclassificationがあっ

た被験物質と物理化学的性状等との関係が調査されたが、1-ブロモヘキサンについては原因は不明としている¹⁰⁾。同じく3次元培養ヒト表皮モデルであるLabCyte EPI-MODELのバリデーション試験においても、1-ブロモヘキサンでは3回の試験で刺激性/非刺激性の判定にばらつきがでている¹¹⁾。一方、ヒトの皮膚刺激性試験(4時間パッチテスト)では、ウサギでは刺激性と判定される1-ブロモヘキサンが刺激性と判定されたのはヒト30例中16例と約半数にとどまり、ヒトでは刺激性/非刺激性の境界であったことが報告されている¹²⁾。よって、この結果のばらつきは1-ブロモヘキサン特有のものであり、1-ブロモヘキサンが刺激性/非刺激性の境界にある物質であることも細胞生存率にばらつきがでる一因ではないかと推察された。

以上のことより、EpiSkinTMを用いて*in vitro*皮膚刺激性試験を実施したところ、10種の化学物質の刺激性判定はすべてOECD TG 439のTable 1の記載と一致し、OECD TG 439に基づいたEpiSkinTMを用いた同試験法は、当研究所において問題なく実施できることが確認できた。なお、今回は検討を行っていないが、被験物質が組織に着色する場合やMTTに干渉する場合は、別途適切なコントロールをおく事がSOPに記載されており、そのような物質については更に背景データの収集が必要であると考えられる。

文献

- 1) Draize JH, Woodard G, Calvery HO: Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. And Exp. Therapeutics.* 1944; **82**: 377-390.
- 2) OECD: Guideline for the Testing of Chemicals, Guideline 404:Acute Dermal Irritation/Corrosion.2002
- 3) Fentem JH, Briggs D, Chesne C, et al.: A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. results and evaluation by the management team. *Toxicol In Vitro.* 2001; **15**:57-93.
- 4) Spielmann H, Hoffmann S, Liebsch M, et al.: 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. *Altern Lab Anim.* 2007; **35**:559-601
- 5) Eskes C, Cole T, Hoffmann S, et al.: The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: selection of test chemicals. *Altern Lab Anim.* 2007; **35**: 603-619
- 6) ECVAM: Statement on the validity of in vitro tests for skin irritation.2007
- 7) OECD: Guideline for the Testing of Chemicals, Guideline 439: *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. 2010
- 8) ECVAM: Skin irritation validation study-validation of the EpiSkinTM test method 15 min-42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. EpiSkinTM skin irritation test method 15 min - 42 hours Standard Operating Procedure, Version : 1.8. 2009
- 9) Cotovio J, Grandidier MH, Portes P, et al.: The in vitro skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process. *Altern Lab Anim.* 2005; **33**: 329-349
- 10) Zuang V, Eskes C, Worth A, et al.: Report from the Chemicals Selection Sub-Committee to the management team on potential reasons for the misclassification of chemicals in the EpiSkinTM and EpiDermTM Assays
- 11) Katoh M, Hamajima F, Ogasawara T, et al.: Assessment of human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for in vitro skin irritation testing according to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-validated protocol. *J. Toxicol. Sci.* 2009; **34**: 327-334
- 12) Jirova D, Liebsch M, Basketter D, et al.: Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular in vitro assays and animal in vivo data. *AATEX* 2008; **14**: 359-365