

培養表皮モデルLabCyte EPI-MODEL24皮膚刺激性試験法の追加共同研究

篠田伸介¹⁾, 萩原沙織¹⁾, 山口能宏²⁾, 中村 牧²⁾, 笠原利彦³⁾, 芝井亜弥³⁾, 加藤雅一⁴⁾, 小島 肇⁵⁾

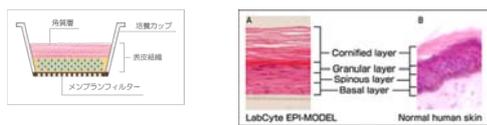
¹⁾株式会社薬物安全性試験センター, ²⁾小林製薬株式会社, ³⁾富士フイルム株式会社,
⁴⁾株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング, ⁵⁾国立医薬品食品衛生研究所

緒言

2008年から2010年にかけて、培養表皮モデルLabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激性試験法の有用性を検証するため、日本動物実験代替法学会、Japanese Center for the Validation of Alternative Methods(JaCVAM)の主導により、4回のバリデーション研究が実施された。その結果、3施設中2施設の結果がOECD test guideline 439 (OECD TG439)に示される許容基準に合致することを確認し、2010年の本大会で報告した。

しかし、試験成立条件のひとつである生細胞率の変動の許容基準(標準偏差18%以内)を逸脱し、再試験となった被験物質が比較的多く発生した。そこで、その逸脱数を少なくする目的で、各施設の試験方法を厳密に統一した上で、変動しやすい被験物質6種類を選択し、LabCyte EPI-MODEL24皮膚刺激性試験をバリデーション研究に準じて実施した。

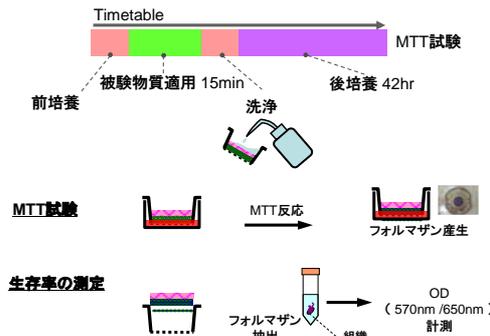
LabCyte EPI-MODEL24



LabCyte EPI-MODEL24は、ヒト表皮細胞を用いて培養された3次元培養表皮モデルである。ヒト表皮細胞を培養増殖させた後、気液層界面で培養して、角質層を形成させて、ヒト表皮組織に類似した組織構造を再現している。(Figures A and B).

*バリア機能品質管理試験 (SLSを18時間処理した後の50%細胞毒性を示す濃度) IC50=1.4-4.0mg/mL(mean 2.57mg/mL)

LabCyte EPI-MODEL24皮膚刺激性試験



追加共同研究で使用された被験物質

TG439 No.	Name	CAS number	Storage	Chemical code		
				Lab 1	Lab 2	Lab 3
2	diethyl phthalate	84-66-2	RT	3	11	25
4	allyl phenoxy-acetate	7493-74-5	RT	1	15	23
5	isopropanol	67-63-0	RT	4	12	26
13	1-bromohexane	11-25-1	RT	2	16	24
15	di-n-propyl disulphide	629-19-6	RT	5	13	21
20	tetrachloroethylene	3446-89-7	RT	6	14	22

被験物質選択理由

追加バリデーションにおいてSD \geq 18%となり、再試験が多数発生した被験物質

TG439 No.	Name	SD \geq 18%となったデータ数			3施設計
		Lab a	Lab b	Lab c	
2	diethyl phthalate	0/3	1/4	1/4	2/11
4	allyl phenoxy-acetate	1/4	1/4	0/3	2/11
5	isopropanol	0/3	1/4	2/5	3/12
13	1-bromohexane	1/4	2/5	0/3	3/12
15	di-n-propyl disulphide	0/3	3/5	0/3	3/11

追加バリデーションにおいて試験されなかった参照被験物質: tetrachloroethylene

陰性対照および陽性対照の施設内・施設間再現性

陰性対照			陽性対照		
施設	試験回数毎のOD値	平均および標準偏差	施設	試験毎の生存率(%)	平均および標準偏差
Lab1	0.98	0.96 \pm 0.03	Lab1	2.29	1.97 \pm 0.32
	0.93			1.65	
	0.98			1.96	
Lab2	0.75	0.86 \pm 0.09	Lab2	2.88	2.18 \pm 0.65
	0.91			2.02	
	0.92			1.62	
Lab3	1.06	1.02 \pm 0.13	Lab3	2.33	3.43 \pm 0.96
	1.19			3.66	
	0.90			4.20	
	0.93			3.52	

陰性対照の値は、全て試験許容基準を満たした。
陽性対照の値は、全て試験許容基準を満たした。

追加共同研究の計画

OECD TG439内のperformance standardに記載されている20物質から、追加バリデーション研究でSD \geq 18%の結果が多く発生した物質5種と、選択されなかったtetrachloroethyleneをコード化して参加3施設に配布し、改訂プロトコルを用いた追加共同研究を実施した。

共同研究実行委員会
委員長:小島 肇(国立衛研)
委員:加藤雅一(J-TEC)

共同研究参加者(参加施設)

山口 能宏, 中村 牧 (小林製薬株式会社)
篠田 伸介, 萩原 沙織 (薬物安全性試験センター)
笠原 利彦, 芝井 亜弥 (富士フイルム株式会社)

予備試験

各施設において、明確化した洗浄方法のマスターのための予備試験が数回実施された。

実施期間

追加共同研究は、2011年8月~9月の間に実施された。

洗浄方法の明確化(SOP ver.8.3)追加バリデーションSOP ver.8.2との比較

洗浄方法の明確化	SOP ver.8.2	SOP ver.8.3
1. 被験物質の除去	明記せず。	洗浄直前にインサートを傾けて廃棄する。
2. 洗浄量	明記せず。	インサート容量以上の大量のPBSを用いて洗浄する。
3. 各洗浄後のタッピング	明記せず。	一回行う。
4. 最終洗浄後のタッピング	明記せず。	行わない。

追加共同研究におけるLabCyte EPI-MODEL24皮膚刺激性試験結果

各施設における試験結果

TG439 No.	Name	Lab.1			Lab.2			Lab.3			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	4
2	diethyl phthalate	94.5	90.7	92.5	94.4	77.8	92.5	79.6	99.2	91.9	
4	allyl phenoxy-acetate	83.1	79.9	67.3	91.0	84.3	79.2	83.9	79.8	63.4	
5	isopropanol	77.3	79.2	80.4	93.7	86.2	82.1	78.1	102.0	76.5	
13	1-bromohexane	17.5	17.1	18.0	11.7	11.5	7.6	13.3	8.8	13.0	
15	di-n-propyl disulphide	96.5	84.5	86.4	36.9	78.6	70.7	31.8	11.2	20.3	16.7
20	tetrachloroethylene	5.6	5.0	5.3	8.7	7.1	7.0	5.1	4.1	5.9	

SD \geq 18%となったデータ数は、1データ/55データと激減した。
di-n-propyl disulphideを除く5被験物質において、全施設の3回の試験結果が一致した。

SD \geq 18%で許容範囲外となった試験
In vitro skin no irritant (NI: 皮膚非刺激性)
In vitro skin irritant (I: 皮膚刺激性)

各施設の皮膚刺激性判定結果

TG439 No.	Name	Lab.1		Lab.2		Lab.3	
		平均	判定	平均	判定	平均	判定
2	diethyl phthalate	92.5	NI	88.3	NI	90.2	NI
4	allyl phenoxy-acetate	76.8	NI	84.8	NI	75.7	NI
5	isopropanol	79.0	NI	87.3	NI	85.5	NI
13	1-bromohexane	17.5	I	10.3	I	11.7	I
15	di-n-propyl disulphide	89.1	NI	62.1	NI	16.1	I
20	tetrachloroethylene	5.3	I	7.6	I	5.0	I

di-n-propyl disulphideを除く5被験物質の判定結果が、全施設で一致した。
tetrachloroethyleneは、全試験で刺激性と判定された。

In vitro skin no irritant (NI: 皮膚非刺激性)
In vitro skin irritant (I: 皮膚刺激性)

追加共同研究における確認項目

試験許容基準

陰性対照値 0.7 \leq 平均OD(A570/650) \leq 2.5
陽性対照 SLS 5%溶液
平均生存率 \leq 40%

標準偏差 生細胞率の標準偏差 SD \leq 18%
許容基準外となった物質は、2回まで追試験可能

追加共同研究の目標

SD \geq 18%となる被験物質データ数が減少すること
tetrachloroethyleneが刺激性と判定されること

考察、および総括

SD \geq 18%を示す結果は著しく減少した。
本共同研究 1データ/3施設
前バリデーション 5データ/2施設 \rightarrow 0データ/2施設
本結果を前バリデーション結果に加えて評価すると、OECD TG439に示されるアクセプタンスクライテリアを満たし、試験の信頼性は高くなった。
その理由は、被験物質の洗浄方法をより明確化したことが主な要因であると考えられる。
特に、被験物質の除去の際、PBSを大量に用いることを統一したことが効果的であったと考える。

謝辞

本発表で引用いたしましたLabCyte EPI-MODEL24皮膚刺激性試験追加バリデーション研究は、
株式会社ファンケル
株式会社薬物安全性試験センター
小林製薬株式会社
にご協力いただきました。