

総括報告書

in Vitro 試験法を用いた化粧品の安全性評価法 及びその国際的ハーモナイゼーションに関する研究

主任研究者 大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所 薬理部)

研究要旨

我が国のバリデーション結果に基づいて作成した代替法を組み込んだ眼刺激性評価ガイダンスについて欧米のコメントを求め、妥当とのコメントを得たので、最終案として厚生省に提出した。

OECD において検討されている光毒性、皮膚腐食性、眼刺激性、経皮吸収試験の 4 代替法の検討状況の調査および化粧品原料についての動物試験を禁止する EU 化粧品指令第 6 次改正のその後の動向調査を行った。光毒性試験法は、OECD からの最初の動物実験代替法としての加盟各国への検討依頼が出される状況に至っている。皮膚腐食性については、2 つの試験法が ECVAM により同様にバリデートされたが、OECD 側での動きは認められなかった。経皮吸収試験法、眼刺激性試験法については、いずれも検討途上にある。化粧品分野においては、EU 化粧品指令第 6 次改正に定められる猶予期限 (2000 年 1 月 1 日) が迫ってきたこともあり、第 7 次改正が検討され、最終製品に対する試験禁止と原料試験に対する ECVAM を中心とする個別対応が、当面の方向として示されている。しかしながら、EU コミッションの抱える種々の政治的な問題から、現在は検討保留の状態が続いている。

OECD のガイドライン案についての実験的検討を行った。皮膚吸収試験については安息香酸およびサリチル酸について検討し、化粧品や添加物の経皮吸収性を評価できると考えられた。化粧品や添加物の安全性の評価のためには、損傷皮膚を用いた経皮吸収試験を行い、データを蓄積する必要があると思われた。

分担研究者

高松 翼 日本化粧品工業連合会
安全性部会長
森本雍憲 城西大学薬学部
田中憲穂 食品薬品安全センター
秦野研究所
安藤正典 国立衛研 環境衛生化学部
研究協力者
金子豊蔵 国立衛研 毒性部

A. 研究目的

動物を用いた安全性試験について、動物愛護団体等からの反対運動が活発に行われており、欧米では動物実験を行っている化粧品会社の製品の不買運動が行われたり、米国パークレー市のようにウサギを用いた眼粘膜刺激性試験を禁止する行政機

関もある。また、EU では適切な代替法があればとの前提つきではあるが、2000 年には化粧品に関する動物実験を禁止する予定である。これが実施されると、眼粘膜刺激性試験の成績を要求している我が国への欧州企業製品の輸入及び我が国製品の EC への輸出が現状では困難となることが予想される。OECD や EU でも *in vitro* の試験法を用いた眼刺激性試験、皮膚刺激性試験、皮膚光毒性試験、経皮吸収試験等のガイドラインやそのバリデーションのあり方、それを用いた評価スキームについて検討されている。一方、わが国では厚生科学研究の基で *in vitro* の眼刺激性評価法については幅広い研究が行われ、その結果を欧米に発信しているが、その他の試験法については、経験が浅いととも情報も少ないことから、OECD や EU への対応に苦慮している。

そこで、本研究では、OECD 及び EU で検討の進んでいる上記試験項目について、文献的、実験的に検討することにより、その問題点を明らかにするとともに、その利用についての経験を積む。また、眼刺激性試験については欧米に先駆け、大規模バリデーションの結果に基づき評価スキーム案が作成されたが、既知の限定された物質による予測でもあり、より多くの物質への適用により、その妥当性を確固たるものとする必要がある。そこで、実際の化粧品原料について行われた *in vitro* 及び *in vivo* 眼粘膜刺激性試験結果を収集し、データベース化をはかるとともに、その解析により、評価スキームの妥当性について再検討する。

本研究の成果は、医薬品等他の分野の安

全性評価にも応用できるとともに、ごく近い将来において日米欧間の課題となることが予想される *in vitro* 試験法の利用に関するハーモナイゼーションに向けての基本的資料ともなる。

B. 研究方法

B-1) 調査活動

今までの厚生科学研究班で作成した化粧品原料の眼刺激性評価ガイダンス案を英訳し、欧米の専門家に送付し、コメントを求める。また、ECVAM 等の代替法の会議に出席し、コメントを求める。その結果を研究班で検討し、必要な修正を行った。

海外の状況については、文献的に調査するとともに、日本化粧品工業連合会加盟社の欧米駐在所より、また、直接 CPLIPA などの会議に出席して情報を収集した。

B-2) 実験的検討

皮膚吸収試験については、モルモット腹部より剥離した皮膚について、皮下脂肪を除き、凍結保存し、必要なときに解凍して用いた。皮膚は縦型の Franz 型拡散セルに装着し、donor 側に薬液（安息香酸、サリチル酸、およびパラベン）を加え、receptor 側に移行した薬物を定量した。

また、雄性ヘアレスラット腹部皮膚を横型の 2-チャンバー拡散セルに挟み、安息香酸ナトリウムおよびパラベンメチルの吸収を検討した。また、対照として *In vivo* 静注単回投与試験における安息香酸ナトリウムおよびパラベンメチルの動態を検討した。結果は MULTI を用いて 2-コンパートメントモデルで解析した。また、*In vitro* 経皮吸収試験の結果と *in vivo* 静注単回投与試験の結果を用い、コンポリューション法により、*in vivo* 経皮吸収時における血中濃度の推移を推測した。なお、塗付時の面積を 100 cm²とした。

光毒性試験方法は、原則的として、OECD

ガイドライン案に従って実施した。細胞は EU/COLIPA の評価試験で用いられた BALB3T3 A31 細胞の代わりに、当研究室で汎用されている感度の高い亜株である BALB3T3 A31-1-1 細胞株 (JCRB0601) を用いた。細胞は 96 ウェルプレートに 10^4 細胞 / 100ul 培地/ウェルを播種し、24 時間培養後に試験に供した。サンシュミレーター (SOL500, Dr. Honle 社) は UV-B をカットするための H1-フィルターを装着して使用した。被験物質としては EU/COLIPA の評価試験で用いられた物質 18 種を含む 28 物質を用いた。細胞の viability はニュートラルレッド (NR) 法で測定した。

C. 研究結果

C-1) 眼刺激性試験ガイドランスの作成

研究班では眼刺激性評価ガイドランス案を英訳し、海外の専門家に送付した。また、1998, 6, 15-17 にロンドン開催された European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) の会議で提示するとともに、詳しい説明を行った。その後、COLIPA からは提示したガイドランス案が消費者のリスクを増やすものではないとのコメントを得た。また、TNO の Prinston 博士から幾つかのコメントが寄せられた。研究班ではそれらについて検討し、特にガイドランス案を変更する必要はないと判断し、原案のまま厚生省に最終案として提出した。

C-2) 海外における代替法の現状の調査に関する検討

C-2-1) 動物実験代替法の開発に関する諸外国の状況について

欧州における状況

実験動物を用いて安全性を評価した化

粧品原料および最終製品の販売を 1998 年 1 月 1 日より禁止することを定めた EU COSMETIC DIRECTIVE 第 6 次改正の Article 4.1.i の施行を、2000 年 6 月 30 日まで延期することが、EU 議会により 1997 年 4 月 17 日に決定された。この決定内容は 2000 年 1 月 1 日までに再検討されることが付記されており、以来、ECVAM や COLIPA が中心となって代替試験法の再検討・開発が進められてきた。

その結果、皮膚腐食性試験に関しては EPISKIN TEST および RAT SKIN TRANSCUTANEOUS ELECTRICAL RESISTANCE (TER) TEST が 1998 年 4 月 3 日に、また光毒性試験に関しては 3T3 NRU PT TEST が 1998 年 5 月 20 日に、ECVAM の Scientific Advisory Committee (ESAC) によって科学的に確立された代替試験法として認められた。この ESAC の結論を受けて DGIII は、これらの代替試験から得られたデータを化粧品品の安全性評価に用いることに合意した。これらの代替法開発の現状は、EU COSMETIC DIRECTIVE 第 7 次改正の議論に反映されて行くものと考えられる。1999 年 2 月時点では、第 7 次改正案は DGIII で検討中であり、EU 議会へ上程されていない。

眼粘膜刺激性に関しては、1997 年 10 月に英国 Brighton で行われた眼粘膜刺激性に関するワークショップの結果が公表され、今後はワークショップで科学的に更なる研究が必要とされた分野に対して、COLIPA が中心となって EU に予算処置を求めていく模様である。

上記以外の試験法については、OECD ガイドライン制定の動きに合わせて議論が進行している。

個々の試験法の状況については高松の分担報告書を参照されたい。

米国における状況

米国においては、代替試験法に関する目立った動きはないが、EPA では高生産量物

質の初期評価に必要なデータに関しては、一部において代替試験法によるデータを認める可能性がある。

C-3 経皮吸収試験の実験的検討(1)

安息香酸(BA)のモルモット摘出皮膚透過はFranz型拡散セルで直線的に認められ、かつ再現性良く検討できた。また、BAを1/30Mリン酸緩衝液(pH7.4)に溶かしてdonor側に添加した場合に比べて化粧水あるいは乳液に溶かした場合の方がより早くモルモットの剥離皮膚を透過することが分かった。サリチル酸(SA)の剥離皮膚透過についても同様に検討できた。また、SAの皮膚透過は、乳液、化粧水および生理食塩液の順序であった。

C-4 経皮吸収試験の実験的検討(2)

1) In vitro 経皮吸収試験

ヘアレスラット摘出皮膚を介する安息香酸ナトリウムの透過は約6時間、パラベンメチルでは約2時間のラグタイムの後、直線的な透過プロファイルを示した。また、これら抗菌剤の物理化学的性質と透過パラメータを求めた。これら抗菌剤の透過速度は、用いた溶液の薬物濃度および溶解度に依存した。また、透過係数はほぼ同程度であった。

2) In vivo 静注単回投与試験

ラットに安息香酸ナトリウムを単回急速静注したときの体内からの消失は、時間に対して濃度の対数値が直線的に減少したことから、1-コンパートメントモデルで現わされると考えられた。一方、パラベンメチルでは、濃度の対数値の時間曲線が2相性を示し、2-コンパートメントモデルに従うと推察された。安息香酸ナトリウムの

半減期は約8分と体内からの消失が非常に速かった。また、みかけの分布容積は、約0.4Lと速やかな組織への分布が示唆された。パラベンメチルでは、血中からの半減期は約1分、 β 相の傾きから得られる体内からの半減期は、約3分と安息香酸ナトリウムの場合と同様に体内からの消失が非常に速かった。みかけの分布容積は、約0.13Lであり、組織への分布も大きかった。

3) 血中濃度推移の推測

安息香酸ナトリウムのin vitro経皮吸収試験の結果とin vivo単回急速静注試験の結果を用いてコンボリューション法により、安息香酸ナトリウムとパラベンメチルの血中濃度の類推曲線をシミュレートした。安息香酸ナトリウムでは、塗付後徐々に血中濃度が上昇し24時間前後で定常状態に達すると思われた。このときの定常状態血中濃度は、約 $1.2\mu\text{g/mL}$ と計算された。パラベンメチルでは、安息香酸ナトリウムよりも血中濃度の立ち上がりがおそく、また40時間以上で定常状態に達すると思われた。このときの定常状態血中濃度は、約 $200\mu\text{g/mL}$ と計算された。

C-5) 光毒性試験結果について

1) 最適照射線量について

EU/COLIPAの評価試験で陽性を示した10物質は、本試験でも全て陽性を示し、陰性物質は3J(30分)、5J(50分)のいずれの条件でも全て陰性となった。陽性物質によってえられた IC_{50} 値の線量依存の傾向には、2つのパターンが見られた。即ち、9物質中5物質は3Jですでに低い IC_{50} 値が得られた。一方、ほかの4物質は3Jより5Jへ

と線量の増加に依存して IC_{50} 値が更に低下した。しかしながら、3J の線量で陰性と判定されるような物質はなかった。ただし、アミダロン塩酸塩は 3J でやや弱い光毒性を示した。

2) 照射時間と照射線強度の関係について
総照射線量 3J の同一条件で 30 分照射した場合と、50 分照射した場合の光毒性の強さは、4 種の化学物質のいずれにおいてもほとんど差は見られなかった。

3) 前処理時間と照射時間の関係について
EU/COLIPA のプロトコールでは、光照射の前 60 分間、細胞を EBSS に被験物質を加えて前処理する。その後 50 分間、光照射下で処理する。そこで前処理の時間が妥当であるか、また、光照射下での被験物質の処理時間が適正であることを確認したところ、前処理の時間は光毒性の発現にさほど影響を及ぼさなかった。

D. 考察

皮膚吸収試験法については今回実施した試験により一応の情報を得ることができた。また、試験物質の donor 側の vehicle への溶解性を考慮することが、*in vitro* 経皮吸収試験を実施する場合の大きな要因であった。

今回、抗菌剤である安息香酸ナトリウムとパラベンメチルの経皮吸収性を OECD *in vitro* 経皮吸収試験法ガイドライン (案) に沿って評価し、化粧品や添加物等の試験法として有用であるかを評価した。

安息香酸ナトリウムとパラベンメチルの *in vitro* 経皮吸収試験では、経皮吸収試験法ガイドラインで大きな問題となる所はなかった。なお、本試験においては、

whole skin を用いて行ったが、化粧品等は、皮膚に損傷があっても使用することが考えられるので、一般に透過律速となる角質層を取り除いた条件においても、このような実験や類推を行う必要がある。

今回は、安全性の観点から経皮吸収後の体内動態を類推し、OECD *in vitro* 経皮吸収試験法ガイドライン (案) の評価を行った。しかし、化粧品や添加物等においては、これらを皮膚に適用したときの皮内滞留性、蓄積性も安全性に関して重要な評価ポイントと考えられる。今回はこの点の評価はできなかったが、簡便に類推できる評価法を検討することが今後の課題と考えられる。

化粧品等の光毒性試験の代替法として、BALB3T3 細胞を用いる方法が EU/COLIPA によって提案され、OECD ガイドライン案としても提案されている。この案は、光毒性試験を行う際の結果に影響を及ぼす要因について、あらかじめ予備検討がなされたうえで評価試験がなされている。たとえば、用いる細胞株により光毒性の感受性が異なる可能性があるが、OECD ガイドライン案で推奨する BALB3T3 A31 の細胞株は、感度が高く適切な細胞株の選択といえる。また、照射に用いる光源の種類も重要なファクターで、どれを用いるかにより結果に直接影響を及ぼす可能性がある。ここでは自然条件に近い太陽光類似の波長を示すキセノンランプ、またはメタルハロゲンランプの使用が推奨されている。このようになり吟味して作成されたガイドラインではあるが、細部にわたっては、未だ検討を要する事項もある。

本年度の研究では、これらの要因のうち

照射線量や照射時間、前処理の時間等について検討した。光毒性物質を検出する為に用いる照射線量としては、3Jと5Jのいずれの線量でも検出可能である事がわかった。次に、同一照射線量の3Jに調整して、UV照射強度と照射時間の関係を調べた。その結果、調べた実験条件下では3J(1.6mW×30min)と3J(1.0mW×50min)とで、ほとんど光細胞毒性に差は見られなかった。したがって、処理溶液に培地成分や血清を含まないEBSSを用いて被験物質を溶解し、それで長時間の薬物処理は出来ない事から、ガイドライン案に示す条件で良いと考えられる。ただし、光遺伝毒性の場合はエンドポイントが異なることから、その実験条件下で処理条件を十分に検討する余地がある。

細胞を用いる光毒性試験の代替法は、EU/COLIPA主催で実施された評価試験でin vivo光毒性の結果と良い相関を示すこと、アッセイ法が簡便で、同一プロトコールで実施した場合ほとんどの機関で同様の結果が得られたことから、光毒性物質の予知の面からは、動物実験の代替法として高く推奨できる方法である。しかしながら、光毒性として検出される物質の毒性発現の機構は、化学物質によつて多様である事から、より精度の高いプロトコールを完成させる為に、今後さらに検討する必要がある。

E. 結論

- 1) 眼刺激性試験ガイダンス最終案を厚生省に提出した。
- 2) OECD in vitro 経皮吸収試験法ガイドライン(案)により化粧品や添加物の経皮吸収性を評価できると考えられた。

3) 化粧品や添加物の安全性の評価のためには、より多くの物質の静注後の体内動態解析が必要と思われた。

4) 化粧品や添加物の安全性の評価のためには、皮膚に適用したときの皮内滞留性、蓄積性を簡便に類推できる評価法を検討する必要があると考えられた。

5) 化粧品や添加物の安全性の評価のためには、損傷皮膚を用いた経皮吸収試験を行い、データを蓄積する必要があると思われた。

F. 参考文献 なし

G. 研究発表 論文発表

- 1) OHNO, Y. et al : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients 1) Overview of the validation of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicol. in Vitro*, 13, 73-98 (1999)
- 2) S. HAGINO et al : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients 2) Chorioallantoic membrane (CAM) test. *Toxicol. in Vitro*, 13, 99-113 (1999)
- 3) Okamoto et al. : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients 3) Evaluation of Hemolysis test. *Toxicol. in Vitro*, 13, 115-124 (1999)
- 4) Hatao et al : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients:4) Hemoglobin denaturation

tests. *Toxicol. in Vitro*, 13, 125-137 (1999)

5) Kurishita et al.: Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients: 5) Skin²™ ZK1100 and tissue equivalent assay. *Toxicol. in Vitro*, 13, 139-151 (1999)

6) J. OHUCHI et al. : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients: 6) Evaluation of MATREX™. *Toxicol. in Vitro*, 13, 153-162 (1999)

7) Uchiyama et al. : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients: 7) Evaluation of cytotoxicity test by CornePack. *Toxicol. in Vitro*, 13, 163-173 (1999)

8) Tani et al. : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients: 8) Evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells. *Toxicol. in Vitro*, 13, 175-187 (1999)

9) Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. 9) Evaluation of cytotoxicity test on HeLa cells. *Toxicol. in Vitro*, 13, 189-198 (1999)

10) Okumura et al. : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. 10) Evaluation of cytotoxicity test on CHL cells. *Toxicol. in Vitro*, 13, 199-208 (1999)

11) Matsukawa et al. : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. 11) EYTEX. *Toxicol. in Vitro*, 13, 209-217 (1999)

1) 吉村 功他、日本トキシコロジー学会 (ドレイズスコアの代替法による予測についての統計学的検討、平成10年6月、名古屋)

2) 大野泰雄、安全性試験における in vitro と in vivo の接点—局所刺激性試験を中心として— 4. 眼粘膜刺激性試験 1) in vitro の立場から. 第45回日本実験動物学会総会シンポジウムIV (98, 5, 30)

分担研究報告書

in vitro 試験法を用いた化粧品の安全性評価法 及びその国際的ハーモナイゼーションに関する研究

分担研究者 大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所 薬理部)

研究要旨

昨年度に報告した代替法を組み込んだ化粧品の眼刺激性評価ガイダンス案を翻訳し、欧米に送付し、コメントを求めた。また、ECVAM の会議に出席し説明した。その結果、消費者の危険性を増やすことにはならず、妥当とのコメントを COLIPA より得た。そこで、これを厚生省に報告した。また、今までの三次にわたるバリデーションの結果をまとめ、欧米の雑誌に投稿し、掲載を了承された。

研究協力者

板垣 宏 (資生堂 安全性・分析センター)
柿島 博 (鐘紡(株)化粧品研究所)
笠井 裕 (花王(株)生物科学研究所)
金子豊蔵 (国立衛研毒性部)
栗下昭弘 (P&G 科学技術本部)
小島 肇 (日本メナード・総合研)
高松 翼 (資生堂・安全性分析センター)
林 真 (国立衛研・変異遺伝部)
森 福義 (ポーラ・安全性分析センター)
門馬純子 (医薬品機構 信頼性調査部)
吉田武美 (昭和大学薬学部毒物学)
吉村 功 (東京理科大学・工学部)

A. 研究目的

動物を用いた安全性試験について、動物愛護団体等からの反対運動が活発に行われており、欧米では動物実験を行っている化粧品会社の製品の不買運動が行われたり、米国パークレー市のようにウサギを用いた眼粘膜刺激性試験を禁止する行政機

関もある。また、EU では適切な代替法があればとの前提つきではあるが、2000 年には化粧品に関する動物実験を禁止する予定である。これが実施されると、眼粘膜刺激性試験の成績を要求している我が国への欧州企業製品の輸入及び我が国製品の EC への輸出が困難となることが予想される。

一方、最も残酷であると非難の多いウサギを用いた眼刺激性試験の代替法について我々は大がかりな施設間バリデーションを行い、その結果に基づき代替法とウサギを用いた試験を組み合わせた評価スキームを作成し、報告した。

そこで、本年度はこれを英訳し、海外に発信し、国際的な意見を求め、それに基づいて必要な場合には修正を行うこととした。

B. 研究方法

今までの厚生科学研究班で作成した化粧品原料の眼刺激性評価ガイダンス案を

英訳し、欧米の専門家に送付し、コメントを求める。また、ECVAM等の代替法の会議に出席し、コメントを求める。その結果を研究班で検討し、必要な修正を行う。

C. 研究結果及び考察

C-1) ガイダンスの翻訳

研究班では以下のような眼刺激性評価ガイダンス案を作成し、これを海外の専門家に送付した。また、1998,7,にロンドンで開催されたECVAMの会議で提示するとともに、詳しい説明を行った。

Guidance on alternative appraisal methods for determining the eye irritation potential of cosmetic raw materials

1. Introduction

Information on eye irritation potential is one of the required components that must be submitted with the application for the approval of cosmetic products containing new raw materials which have not previously been approved for use in cosmetic products. This is usually obtained by the Draize test, a test that uses rabbits. However, due to concerns over animal welfare, it has been suggested that alternative methods may be used if they are proved to be appropriate as substitutes for the method presently employed.

Several in vitro methods have been examined, of which some have correlated well with the results of the Draize test. However, non one test has been able to reliably predict the results of Draize test over the full range of test substances. On the other hand, the results of inter-laboratory validation studies have suggested that some of

these alternative methods can identify either non-irritants or strong irritants, or both.

This guidance describes a scheme that uses alternative methods in combination with the Draize test in order to reduce the number of animals required for testing and minimize the suffering of the animals without lowering the reliability of evaluation of the eye irritation potential of cosmetic raw materials. Alternative methods constitute only a part of the evaluation scheme. This is because experience of the utilization of those methods in actual situation seemed insufficient. As further test results are accumulated by testing many cosmetic raw materials by both the Draize test method and alternative methods in accordance with this guidance, revisions to the guidance may be necessary.

The appraisal scheme outlined in this guidance does not necessarily require the same procedure for every substance or at all testing facilities. The emphasis is on selecting the appropriate method according to the purpose of the test, properties of the test substance, experience and equipment available in the testing facilities, etc., while taking into consideration the following points. In some situations, the appraisal may only be conducted by the Draize test.

2. Points to be considered in the appraisal of eye irritation potential of cosmetic raw materials

As cosmetics are used in daily by ordinary people, safety of the products is of great importance. Specifically, cosmetics must demonstrate little or no

adverse effects. Most of the cosmetic raw materials are non- or weak irritants, but some of them demonstrate significant irritancy. For the latter group, it is necessary to establish the safe concentration range for their use in cosmetics. Cosmetics are not intended for use in the eye. The risk of injury due to accidental contact with the eye can be minimized by appropriate treatment such as rinsing the eye.

3. Choice of alternative methods for evaluating eye irritation potential

The range of substances that can be examined by alternative methods and the reliability of the appraisal depend on the mechanism upon which the alternative methods are based and on characteristics such as the sensitivity, reproducibility, correlation of the results with those of the Draize test. Therefore, the method to be employed must be one that has been evaluated objectively to characterize the above mentioned properties by appropriate validation. Proper appraisal of a test substance is possible if the method is appropriately chosen according to the physical/chemical properties and the degree of irritation potential of the test substance, as well as other toxicological information obtained in advance.

A scheme to appraise eye irritation potential should consist of three stages. In the first stage, the decision to conduct the appraisal by alternative methods or by the Draize test is made according to the physical/chemical properties of the test substance. When alternative methods are used, the non- and strong irritants are identified in

the second stage. Approximate appraisal of the degree of irritation potential of the irritants is also made for the other substances. In the third stage, the irritation potential is appraised using animals for those substances which cannot be judged as non-irritants. Information regarding the physical/chemical properties of the test substance is also necessary for the appraisal of data obtained at the second stage. Depending on the equipment and experience available in the testing facility, the second stage may be omitted.

Animal tests at the third stage must be conducted in a manner that minimizes the suffering of animals. This may be accomplished by diluting the test substance based on the concentration to be formulated in the products and the results of in vitro tests.

4. Available alternative methods and points to be considered

A test method for which the applicable range, sensitivity, reproducibility and correlation with the Draize test for appropriate test substances that have been determined through validation should be used. As an example of such a method, a cytotoxicity test method may be used to examine the influence of test substances on the viability and proliferation of cultured cells, affording results such as 50% inhibitory concentration, IC50, etc. (Note 1)

5. Scheme of Appraisal

First stage:

Determine whether the test substance can be appraised by alternative methods

or by animal test on the basis of the physical/chemical properties such as chemical structure, pH, acidity, alkalinity. If applicable, select appropriate alternative methods. (Notes 2-5)

Second stage:

Along with appraisal of approximate irritation potential, establish whether the test substance can be classified as a non-irritant (Maximum Average Score (MAS) in the eye irritation test is $0 \leq$ and ≤ 5) using only alternative methods.

Third stage:

If the test substance has not been established as a non-irritant, appraise the irritation potential of the test substance using the animal test. At this stage, take measures to minimize the suffering of animals, taking into account the concentration of the substance to be formulated in the cosmetics. If the test substance is expected to be at least moderately-irritant from information obtained in advance and/or the test results of the alternative methods, consider diluting the test substance taking into account factors such as the purpose of the test.

6. References

1) Guidebook on application for the manufacturing of cosmetics and quasi-drugs, Third Ed., Supervised by the Pharmaceuticals and Cosmetics Division, Pharmaceutical Affairs Bureau, Japanese Ministry of Health and Welfare, Yakuji Nippo Co., Ltd., 1996

Note 1)

Methods using cell lines derived from rabbit cornea (SIRC cells), human uterus carcinoma (HeLa cells), etc. in culture medium supplemented with serum generally provide high sensitivity and good reproducibility. These results show a relatively good correlation with the results of the Draize test. Using an appropriate combination of these methods, identification and classification as an irritant or non-irritant, and an approximate appraisal of the degree of irritating potential are possible. Among other cytotoxicity tests and artificial skin models, there are methods that can be used for identification and classification of irritants and non-irritants.

Note 2)

A test substance classified either as a strong acid or a strong alkali with a pH of below 2.0 or above 11.5, respectively, is generally considered to be a strong irritant when their acidity or alkalinity are high.

Note 3)

A test substance showing strong irritancy or corrosive action on the skin is also generally considered to be a strong irritant.

Note 4)

If a test substance cannot be uniformly mixed with the culture medium in the cytotoxicity tests, the results obtained may not properly reflect its cytotoxicity.

Note 5)

The applicability of cytotoxicity tests has not been confirmed for test

substances showing strongly acidic or alkaline characteristics, or for volatile substances such as alcohol.

Note 6)

A threshold that is employed for identification of non-irritants based only on the results of a cytotoxicity test should be set at a value that minimize the risk of false-negative results. This value should be higher than the concentration at which the test substance can be regarded as non-irritant under any experimental conditions (for example, when the IC50, in the cytotoxicity test with the culture medium containing serum is higher than 5000 (g/ml) or higher than the value obtained by multiplying by an ample safety factor, the IC50 value of a standard substance that has been clearly established as a non-irritant.

Note 7)

Among the alternative methods, there are some such as cytotoxicity test, in which the IC 50 value is greatly influenced by the kind of cell line used and the culture conditions. In such cases, it is desirable to appraise the validity of the test results by comparing the results with those of several standard substances, including both negative and positive reference substances.

Note 8)

A 10% polyoxyethylene sorbitan monolaurate (20 E.O.) (Tween 20) solution is used as a reference substance for non-irritancy in the appraisal of cytotoxicity of the test substance, and 10% polyoxyethylene

octylphenylether (10 E.O.) (Triton X-100) and 10% sodium lauryl sulfate (SLS) solutions are used as positive reference substances. Appropriate substances are selected according to the characteristics of the test method and tested at the same time as the test substance.

The irritation potential of substances that cannot be judged as non-irritant based only on the alternative methods are evaluated as follows by comparison with standard and positive reference substances.

Practically non-irritant : Substances with a higher IC50 than that of Tween 20 (MAS around 0)

Slight irritant : Substances with IC50 lower than that of Tween 20 and higher than that of SLS (MAS around 30)

Moderate irritant : Substances with IC50 lower than that of SLS and higher than that of Triton X-100 (MAS around 50)

Strong irritant : Substances with a lower IC50 than that of Triton X-100

Note 9)

If a test substance is found to be a non-irritant on the basis of alternative methods alone and will not be formulated in the products at a concentration in excess of 10%, it may be appraised as a non-irritant without animal tests. Animal tests are necessary for substances which do not meet the above conditions.

C-2) ガイダンス案への欧米のコメント

ヨーロッパ化粧品工業会 (COLIPA) より我々の作成したガイダンス案が消費者に対して新たなリスクを負わせるものではなく妥当であるとのコメントが寄せられ

た。また、オランダの安全性研究機関 TNO の Prinsen 博士より以下のようなコメントが寄せられた。

Dear Dr. Ohno,

Thank you for sending me the draft guidance document on eye irritation of cosmetic materials.

I have read with great interest and would like to make only some general suggestions. My present workload is too exhausting to extensively discuss this document.

Point 5. Second stage: As discussed during our meeting it seems that the use of the MAS can be quite unreliable for classification into a degree of eye irritation. (In the HO/EC study a compound with a MAS of 30 was in fact severely irritating).

Point 6. Note 1. "artificial skin models". Why skin models? Their prediction for eye irritation potential is dubious.

Point 6. Note 2. There are enough examples of skin corrosives that are not severely eye irritating (4 hour skin exposure versus a short eye exposure). An in vitro model could be used to confirm or disprove corrosivity thus avoiding overlabelling.

In general, apart from the testing of dilutions, the approach described by you very much follows the most recent tiered approach of the OECD which is soon due to be updated. A link to this international update or fitting in the

testing of dilutions would make the proposal more powerful.

Since your document concerns mainly the use of a cytotoxicity model as an alternative, the title of the document is perhaps too general.

Dr Ohno I hope my remarks will be useful to you and I hope our cooperation in the ECVAM workgroup on eye irritation will continue in a fruitful way.

C-3) Prinsen 博士のコメントについての対応

研究班では Prinsen 博士のコメントについて以下のように考え、特に変更する必要は無いとした。

Point 5. Second stage

As discussed during our meeting it seems that the use of the MAS can be quite unreliable for classification into a degree of eye irritation. (In the HO/EC study a compound with a MAS of 30 was in fact severely irritating).

(対応) MAS にバラツキが大きく信頼性が低いことは我々の結果でも示されている。しかし、1) 従来より Draiz 試験において、最大平均総評価点 (MAS) を用いて化粧品の評価を行ってきたが、特に問題は無かった、2) MAS は病理学的な変化と良く対応していた、3) MAS に替わる良い指標が無い、4) 角膜や結膜のスコアでは自由度が少なく、統計的な処理が困難、5) MAS に基づく化粧品等の評価においては、角膜に障害を与えないか否か、また、強い刺激を有するか否かの判定が重要であり、MAS の小さな差による細かい刺激性分類をそれほ

ど重視していない。6) 今回のスキームでは無刺激性と見なしても構わないとされたもの以外は従来の Draize 法で評価される。

(結論) 変更せず。解説書が作られれば、MAS のバラツキについて詳しく説明する。

Point 6. Note 1. "artificial skin models". Why skin models? Their prediction for eye irritation potential is dubious.

(対応) 確かに、人工皮膚モデルの予知性は我々のバリデーションにおいても細胞毒性試験法と比べ、悪かった。しかし、無刺激性と見なして良い物質の選択においては、可能との結果が得られている。もちろん人工皮膚モデルには様々な方法があり、その全てについての情報は得られていない。それぞれのモデル毎にその妥当性が適切なバリデーションで示される必要がある。

(結論) 変更せず。

Point 6. Note 2. There are enough examples of skin corrosives that are not severely eye irritating (4 hour skin exposure versus a short eye exposure). An in vitro model could be used to confirm or disprove corrosivity thus avoiding overlabelling.

(対応) ガイダンスの注 2 や 3 では酸やアルカリ、皮膚腐食性物質は常に強刺激性と判定しなくてはならないと言っているのではない。過去に得られた情報等に基づく判断により、第二段階や第三段階での評価を行うことは false positive を減らす上で望ましい。

(結論) 変更せず。解説書が作られれば、そこで詳しく説明する。

In general, apart from the testing of dilutions, the approach described by you very much follows the most recent tiered approach of the OECD which is soon due to be updated. A link to this international update or fitting in the testing of dilutions would make the proposal more powerful.

(対応) OECD のガイドラインで具体的な方法が提示された時点で対応を考える。我々の考えが反映されることが望ましい。

(結論) 変更せず。

Since your document concerns mainly the use of a cytotoxicity model as an alternative, the title of the document is perhaps too general.

(対応) 確かに細胞毒性試験法が適切な例としてあげられている。しかし、その他の方法も否定しているわけではない。適切に行われたバリデーションでその適切性が証明された方法については、受け入れる予定であるので、標記のようなタイトルにした。

(結論) 変更せず。解説書が作られれば、そこで詳しく説明する。

D. 結論

代替法を組み込んだ化粧品原料の眼刺激性評価のためのガイダンス案が完成し、厚生省へ報告した。しかし、実際の化粧品および化粧品原料についての経験はまだ充分とは言えないことから、これを行政的に取り入れた後、一定の期間動物実験と併用し、その結果を集計し、注意深くそれを

検討し、実際のサンプルについて問題ないことを再確認することが必要である。

E. 参考文献

なし

F. 研究発表

論文発表

- 1) OHNO, Y. et al : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients 1) Overview of the validation of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicol. in Vitro*, 13, 73-98 (1999)
- 2) S. HAGINO et al : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients 2) Chorioallantoic membrane (CAM) test. *Toxicol. in Vitro*, 13, 99-113 (1999)
- 3) Okamoto et al. : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients 3) Evaluation of Hemolysis test. *Toxicol. in Vitro*, 13, 115-124 (1999)
- 4) Hatao et al : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients: 4) Hemoglobin denaturation tests. *Toxicol. in Vitro*, 13, 125-137 (1999)
- 5) Kurishita et al.: Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients: 5) Skin²™ ZK1100 and tissue equivalent assay. *Toxicol. in Vitro*, 13, 139-151 (1999)
- 6) J. OHUCHI et al. : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic

- ingredients: 6) Evaluation of MATREX™ *Toxicol. in Vitro*, 13, 153-162 (1999)
- 7) Uchiyama et al. : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients: 7) Evaluation of cytotoxicity test by CornePack. *Toxicol. in Vitro*, 13, 163-173 (1999)
- 8) Tani et al. : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients: 8) Evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells. *Toxicol. in Vitro*, 13, 175-187 (1999)
- 9) Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. 9) Evaluation of cytotoxicity test on HeLa cells. *Toxicol. in Vitro*, 13, 189-198 (1999)
- 10) Okumura et al. : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. 10) Evaluation of cytotoxicity test on CHL cells. *Toxicol. in Vitro*, 13, 199-208 (1999)
- 11) Matsukawa et al. : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. 11) EYTEX *Toxicol. in Vitro*, 13, 209-217 (1999)

学会発表

- 1) 吉村 功他、日本トキシコロジー学会 (ドレイズスコアの代替法による予測についての統計学的検討、平成10年6月、名古屋)
- 2) 大野泰雄、安全性試験における invitro と in vivo の接点一局部刺激性試験を中心として— 4. 眼粘膜刺激性試験 1) in vitro の立場から. 第45回日本実験動物学会総会シンポジウムIV (98, 5, 30)

分担研究報告書

in Vitro 試験法を用いた化粧品の安全性評価法
及びその国際的ハーモナイゼーションに関する研究

分担研究者

高松 翼、日本化粧品工業連合会、技術委員会安全性部会

要約

OECDにおいて、動物実験代替法としての試験法ガイドライン制定が検討されている光毒性、皮膚腐食性、眼刺激性、経皮吸収試験の4試験項目について、その検討状況の調査、化粧品原料についての動物試験を禁止するEU化粧品指令第6次改正のその後の動向調査、また、これらに関連する最近の文献的研究を通じて、次年度以降の本研究計画策定に資することを目的とした。光毒性試験法は、OECDからの最初の動物実験代替法としての加盟各国への検討依頼が出される状況に至っていること、また化粧品分野では、ECVAMがこの方法をバリデートしたことが明らかとなった。皮膚腐食性については、2試験法がECVAMにより同様にバリデートされたが、OECD側での動きは認められなかった。経皮吸収試験法、眼刺激性試験法については、いずれも検討途上にあり、結論がでるには更に時間が必要と思われる。化粧品分野においては、EU化粧品指令第6次改正に定められる猶予期限(2000年1月1日)が迫ってきたこともあり、第7次改正が検討され、最終製品に対する試験禁止と原料試験に対するECVAMを中心とする個別対応が、当面の方向として示されている。しかしながら、EUコミッションの抱える種々の政治的な問題から、現在は検討保留の状態が続いている。

1 動物実験代替法の開発に関する諸外国の状況について

1) 欧州における状況

実験動物を用いて安全性を評価した化粧品原料および最終製品の販売を1998年1月1日より禁止することを定めたEU COSMETIC DIRECTIVE 第6次改正のArticle 4.1.iの施行を、2000年6月30日まで延期することが、EU議会により1997年4月17日に決定された(添付資料1: COMMISSION DIRECTIVE 97.18.EU)。この決定内容は2000年1月1日までに再検討されることが付記されており、以来、European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)やCOLIPAが中心となって代替試験法の再検討・開発が進められてきた。

その結果、皮膚腐食性試験に関してはEPISKIN TEST(添付資料2)およびRAT SKIN TRANSCUTANEOUS ELECTRICAL RESISTANCE (TER) TEST(添付資料3)が1998年4月3日に、また光毒性試験に関しては3T3 NRU PT TEST(添付資料4および5)が1998年5月20日に、ECVAMのScientific Advisory Committee (ESAC)によって科学的に確立された代替試験法として認められた。このESACの結論を受けてDGIIIは、これらの代替試験から得られたデータを化粧品の安全性評価に用いることに直ちに合意した。これらの代替法開発の現状は、EU COSMETIC DIRECTIVE 第7次改正の議論に反映されて行くものと考えられる。1999年2月時点では、第7次改正案はDGIIIで検討中であり、EU議会へ上程されていない。改正内容については様々な議論が行われており、最終的な方向が定まるまでには時間がかかると思われる。

眼粘膜刺激性に関しては、1997年10月に英国Brightonで行われた眼粘膜刺激性に関するワークショップの結果が公表され(添付資料6)、今後はワークショップで科学的に更なる研究が必要とされた分野に対して、COLIPAが中心となってEUに予算処置を求めていく模様である。

ここまで述べた試験法以外については、基本的にOECDガイドライン制定の動きに合わせて議論が進行している(添付資料7)。以下に、1998年9月に仏国Parisで行われた第10回各国代表者会議の結果等から現在の状況を示す。

* 眼刺激性試験(添付資料6)

眼刺激性試験を動物代替試験法で完全に置き換えることは困難である点では一致している。今後はヒトの眼刺激性の作用機序を理解し、その成因に基づいた代替試験法を開発するとの方向性がBrightonの会議で決定された。

* ヒトを用いた皮膚毒性試験(添付資料8)

提案されているガイドラインは、被験者に対する健康上の配慮、倫理上の配慮などからかなり制約を受けたものとなっている。本ガイドラインは、化学物質の皮膚腐食性・刺激性の危害表示に関するデータを得る目的で用いられる可能性もあり、このような制約下で制定したガイドラインの有用性と妥当性が議論されている。

* 経皮吸収試験(添付資料9)

経皮吸収試験には様々な方法が用いられているために、同一の基準に基づいたデータで試験系を評価することが困難な状況にある。1999年春頃を目処に提案されているガイドラインを再検討、次回の代表者会議に提案される運びになっている。

* 光毒性試験(添付資料4および5)

3T3 NRU PT TESTが1998年5月20日に、ECVAMにより科学的に確立された試験法として認められた。今後、OECDでガイドライン化を目指した議論が進行するものと考えられる。

2) 米国における状況

米国においては、代替試験法に関する目立った動きはないが、Environmental Protection Agency (EPA)では高生産量物質の初期評価に必要なデータに関しては、一部において代替試験法によるデータを認める可能性がある。

2 眼刺激性試験代替に関する最近の国際動向

1) 欧州における状況

ECVAM(European Center for the Validation of Alternative Methods)は、6月に英国にて眼刺激性試験に関するワークショップを開催した。このワークショップは、限られた専門家のみによる会議であり、日本から大野泰雄先生(国立医薬品食品衛生研究所・国立衛研)が出席した。ワークショップの目的は、

- a) Draize 試験代替に関する過去の多機関における validation の結果をまとめ、多くの代替法が成功しなかった理由を解析する、
- b) Draize 試験を短期間で reduction、refinementし、結果として replacement することを目指した戦略を練ることである。

具体的には、1) 対照物質を用いた in vitro 眼刺激性試験 validation の新しいアプローチ、2) 動物使用の reduction、refinementのための段階的な試験の実施、3) 将来の解析のため、過去の評価研究により得られたデータをもとにした多変量解析及び他の統計手法の応用、4) 眼刺激に関する作用機作の解明を目的としている。過去の validation としては、EC/HO (European Commission/British Home Office)、COLIPA(European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association)、BGA/BMBF(Bundesgesundheitsamt/German Department of Research and Technology)、CTFA(Cosmetics Toiletries and Fragrance Association)、IRAG(Interagency Regulatory Alternative Group)及び厚生省/粧工連における試験結果が挙げられている。これらのバリデーショが不成功に終わった理由として、a)計画と予測モデルが不十分であった、b)最大評価点を指標とした、c) in vitro と in vivo を比較する統計的な手法が適当でなかったとされている。今後、replacement よりも異種の予測基準による段階的なスクリーニングを目指すこととされ、その手順としては、コンピューターによるシミュレーション、物質の分類、対照物質の利用、1つ以上の validate された in vitro 試験の実施(細胞毒性試験と組織モデル

の組み合わせ)などの評価が挙げられている。

また、規制委員会への提言として、OECD ガイドライン 405(眼刺激性/腐蝕性試験)は、被験物質が固体の場合の試験削除、pH測定値の利用について修正すべきである、眼刺激に関する OECD 戦略においては、validateされた in vitro 試験(5a: 強刺激及び 6a: 刺激スクリーニング)を組み入れるべきであるとされている。

将来検討として、EU と OECD ガイドライン両方の基準にあった方法の開発、戦略の多様化、構造活性相関モデルの必要性、作用機作の解明、眼刺激回復モデル代替法の必要性などが挙げられている。これらの内容は Alternative To Laboratory Animals(ATLA) に投稿すべく準備が進められており、近々掲載される予定である。

なお、作用機作に関しては、1997 年 10 月に英国にてワークショップが開催された。日本から金子豊蔵先生(国立衛研)、及び栗下昭弘氏(P&G)が出席した。この内容は、すでに ATLA, 26(1998) 811-820 に報告され、今後の推奨されるスキームが掲載されている。

2) 米国における状況

Food and Chemical Toxicology 36(1998) 47-59 にて、エマルションに関する低用量法に関する検討(第 2 報)を CTFA の S.D. Gettings が報告している。前報でも高級アルコール処方における低用量法について検討しており、CTFA は Draize 試験の見直し、refinement に向けた展開を中心に進めているようである。

3) 日本における状況

厚生科学研究の成果として、ガイダンス案が厚生省に提出された。大野泰雄先生は事前に日本のガイダンス案を欧米の専門機関にも提示し、意見を求めた。バリデーションに関する論文は、Toxicology in Vitro により受理され、日本の特集号として現在印刷中である。validation 結果の統計解析に関する論文は現在、東京理科大学・工学部 吉村 功先生が作成中である。

以下に、ECVAM Workshop としてまとめられた今後に関する提言論文の要約を示した。

Eye Irritation Testing: The Way Forward
The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 33(添付資料-10)

要約

ECVAM(European Center for the Validation of Alternative Methods)は、6 月に英国にて眼刺激性試験に関するワークショップを開催した。ワークショップの目的は、a) Draize 試験代替に関する過去の多機関における validation の結果をまとめ、多くの代替法が成功しなかった理由を解析する、b) Draize 試験を短期間で reduction、refinement し、結果として replacement することを目指した戦略を練ることである。具体的には、1) 対照物質を用いた in vitro 眼刺激性試験 validation の新しいアプローチ、2) 動物使用の reduction、refinement のための段階的な試験の実施、3) 将来の解析のため、過去の評価研究により得られたデータをもとにした多変量解析及び他の統計手法の応用、4) 眼刺激に関する作用機作の解明を目的と

している。過去の validation として、EC/HO (European Commission/British Home Office)、COL IPA(European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association)、BGA/BMBF(Bundesgesundheitsamt / German Department of Research and Technology)、CTFA(Cosmetics Toiletries and Fragrance Association)、IRAG(Interagency Regulatory Alternative Group)及び厚生省/粧工連における試験結果を解析した。これらのバリデーションが不成功に終わった理由として、a) 計画と予測モデルが不十分であった、b) 最大評価点を指標とした、c) in vitro と in vivo を比較する統計的な手法が適当でなかったことが挙げられる。今後、replacement よりも異種の予測基準による段階的なスクリーニングを目指し、その手順としては、コンピューターによるシミュレーション、物質の分類、対照物質の利用、1 つ以上の validate された in vitro 試験の実施(細胞毒性試験と組織モデルの組み合わせ)などの評価が挙げられる。

また、規制委員会への提言として、OECD ガイドライン 405(眼刺激性/腐蝕性試験)は、被験物質が固体の場合の試験削除、pH測定値の利用について修正すべきである、眼刺激に関する OECD 戦略においては、validate された in vitro 試験(5a: 強刺激及び 6a: 刺激スクリーニング)を組み入れるべきであるとされた。将来検討として、EU と OECD ガイドライン両方の基準にあった方法の開発、戦略の多様化、構造活性相関モデルの必要性、作用機作の解明、眼刺激回復モデル代替法の必要性などが挙げられる。

3 光毒性試験法に関する最近の検討状況

1) 細胞毒性(単層培養)による評価

* 方法の原理

細胞を用いて化学物質適用による 50%抑制濃度を照射の有無で比較

* 材料、手法

材料として BALB/C 3T3 線維芽細胞(BALB/C 3T3 cells, clone31)、ヒトケラチノサイト、ヒトリンパ球を用いる方法等がある。BALB/C 3T3 を用い、ニュートラルレッドの取り込みで生存率を求める方法(3T3 NRU PT)が最も良く用いられている。

BALB/C 3T3 線維芽細胞を 96 穴マイクロプレートに播種し、24 時間培養

↓

培地を捨てて、EBSS に溶解した被験物質を加える(DMSO 溶解の場合は最終濃度 1%)

↓

1 時間のプレインキュベーションの後、照射(メロハイトランプ: UVA5J/cm²)(対照プレートは暗所下)

↓

被験物質溶液を捨てて、培地を加える

↓

24 時間後に NRU 法にて生存率を求め、50%抑制濃度を算出

PIF (Photoirritation Factor); EC50(-UV)/EC50(UV+)

PIF < 5 非光毒性が予測される

PIF \geq 5 光毒性が予測される
-UVA で細胞毒性が認められず、+UVA のみ細胞
毒性が認められた場合 “> PIF” で示し、
1 < PIF の場合光毒性が予測される
-UVA、+UVA とともに EC50 値が算出できないとき、
PIF \approx 1 とし、非光毒性が予測される
MPE(Mean Photo Effect); データの解析のため完全な
濃度反応曲線に基づく MPE モデルを適用。MPE \geq
0.1 の場合光毒性が予測され、MPE < 0.1 の場合非光
毒性が予測される。

*** 結果**

in vivo との対応性良好

Sensitivity 90%, Specificity 82%, Predictivity(+) 96%,
Predictivity(-) 64%, Accuracy 88%

9 施設で施設間 validation 実施、再現性良好であるこ
とを確認

3T3 NRU PT 法についてヨーロッパで validation を経て
現在 OECD ガイドライン化が進められている。

文献 A, B, C, D

2) 細胞毒性(3 次元培養; キット)による評価

SKIN2 Phototoxicity assay

*** 方法の原理**

3 次元皮膚モデルキットを用いて化学物質適用による
細胞生存率を照射の有無で比較

*** 材料、手法**

キット入手後保持培地を無血清培地に取り替える

↓

被験物質を蒸留水に溶解またはコーンオイルに懸濁
させ、50 μ l を濾紙を用いて 24 時間適用

↓

濾紙を除去し、照射(UVA 3J/cm²) (対照は暗所下)

↓

PBS で洗い、MTT 取り込みにより生存率を求める
対照と比較し、生存率の差が 30%以上認められた場
合陽性とする

*** 結果**

3次元皮膚モデルであるが、コストが高く、実際のヒト
の角層と比較して透過しやすい。

また、SKIN2 の撤退のため、現在は EpiDerm で検討が
行われているがキットの利用は入手できなくなった場
合に問題である。

文献: A, D

3) 真菌を用いる評価

*** 方法の原理**

真菌を用いて化学物質適用による生育阻止帯の大き
さを照射の有無で比較

*** 材料、手法**

真菌: Candida albicans, Candida utilis,
Saccharomyces cerevisiae

あらかじめ真菌を播種し、濾紙に被験物質溶液をしみ
込ませて静置

↓

照射(UVA 50J/cm² 等)(対照は暗所下)

↓

72 時間培養後、濾紙周囲の阻止帯を測定し対照と比
較

2mm 以上の差があるときを陽性とする

*** 結果**

in vivo との対応性は良好。シンプルで確立された方
法である。

文献: A, F, G

4) 赤血球溶血性

*** 方法の原理、コメント**

赤血球を用いて化学物質の細胞膜破壊作用によるヘ
モグロビン溶出を照射の有無で比較。

最も古くからあるシンプルな手法で、材料やプロトコ
ールに関しては様々な報告がある。

赤血球懸濁液に被験物質を添加し、照射により発生
したフリーラジカルの作用による赤血球膜の破壊作用
を、溶出したヘモグロビン量により測定。さらにヘモ
グロビンの酸化型(メトヘモグロビン)の形成を確認す
ることにより作用機構の検討が可能である。

細胞膜傷害に基づく光毒性は感度良く検出可能であ
るが、DNA との作用に基づく光毒性は検出されないた
め(8-methoxypsoralen)、他の方法との battery が必
要。

文献: A, H, I

5) ヒステジン酸化

*** 方法の原理、コメント**

ヒステジンは主に一重項酸素に対して反応するため、
光感受性のある化学物質の作用機構の解明に利用
可能。

被験物質とヒステジンを水と有機溶媒(1:1)の混合溶
液にし、UVA、UVB または可視光線を照射。非照射、
(ヒステジンのみ+照射)および(被験物質+照射)と比
較し、Quantum efficiency(量子効果(%))を算出。この
結果、Rose bengal、Anthracene および Acridine は明
らかな光酸化能のある物質であった。本法はスクリー
ニング法としての利用よりも作用機構の検討において
効果的と判断された。

文献: A, J

6) 蛋白との光結合

*** 方法の原理、コメント**

ヒト血清アルブミンと被験物質を混合、UVA を照射し、
ゲル濾過法(Sephadex G-10 gel filtration column)で
未結合の被験物質を分離して吸光度で確認する。こ
の結果、光アレルギー性物質はとらえることができた
が、Anthracene や Acridine など光アレルギー性の認
められない光毒性物質では光結合が認められなかつ
た。本法の代替法としての有効性の判断を持つため
には被験物質を増やして validation を行う必要があ
る。

文献: A, K

7) 補体光活性化法

*** 方法の原理、コメント**

動物では光増感物質の存在下で照射により補体生成
物があることに基づき in vitro の系を作製。ヒト血漿
を分離、被験物質と混合、照射したときに生成される
特殊な補体 fragment を ELISA キットを用いて測定。本
法は光増感物質による炎症惹起機構を評価できる可
能性はあるが、まだ開発の初期段階であり標準化さ
れていない。

文献: A, L

8) SOLATEX-PI(キット)

* 方法の原理、コメント

皮膚刺激を評価するキットとして知られている SKINTEX を応用したもの。照射による Protein matrix の変性を濁度により評価する。濁度が 40%以上増加した場合を陽性としている。

本法では強い光毒性物質である 8-Methoxypsoralen をとらえられないこと、Predictive value が他の試験と比較して低いこと、反応機構がはっきりしない等のデメリットが多い。

9) 文献リスト

A; Spielmann, H. et al, (1994). In Vitro Phototoxicity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314-348.

B; Spielmann, H. et al, (1994). EEC/COLIPA Project on In Vitro Phototoxicity Testing: First Results Obtained with a BALB/C 3T3 cell Phototoxicity Assay. Toxicol. In Vitro, 8 793-796.

C; Holzutter, H.G. (1997). A General Measure of In Vitro Phototoxicity Derived from Pairs of Dose - Response Curves and its Use for Predicting the In Vivo Phototoxicity of Chemicals. ATLA, 25, 445-462.

D; Spielmann, H. et al, (1998). A Study on UV Filter Chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. ATLA, 26, 679-708.

E; Liebsch, M. et al, (1994). First Results of the EC/COLIPA Validation Project "In Vitro Phototoxicity Testing". In Alternative Methods in Toxicology, Vol. 10, In Vitro Skin Toxicology - Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Ed. A. Rougier et al, pp.243-251, New York: Mary Ann Liebert.

F; Daniels, F. (1965). A Simple Microbiological Method for Demonstrating Phototoxic Compounds. J. Invest. Dermatol., 44, 259-263.

G; Sugiyama, M. et al. (1994). In Vitro Assay to Predict Phototoxicity of Chemicals: (II) Yeast Growth Inhibition Assay and Battery System with Photohemolysis Assay. AATEX, 2, 193-202.

H; Pape, W. J. W et al, (1994). Combined In Vitro Assay for Photohaemolysis and Haemoglobin Oxidation as Part of a Phototoxicity Test System Examined on Different Phototoxic Substances. Toxic. in Vitro, 8, 755-757.

I; Sugiyama, M. et al. (1994). In Vitro Assay to Predict Phototoxicity of Chemicals: (I) Red Blood Cell Hemolysis Assay. AATEX, 2, 183-191.

J; Lovell, W.W. and Sanders, D.J. (1990). Screening Test for Phototoxins using Solution of Simple Biochemicals. Toxic. In Vitro, 4, 318-320.

K; Barratt, M.D. & Brown, K.R. (1985). Photochemical Binding of Photoallergens to Human Serum Albumin: A Simple In Vitro Method for Screening Potential Photoallergens. Toxicology Letters, 24, 1-6.

L; Sladowski, D. et al. (1993). Preliminary Finding of an

In Vitro Assay Based on Human Complement Activation for the Detection of Chemicals with Phototoxicity Potential. ATLA, 21, 509-512.

別にこれらの文献等において取り上げられている物質リスト並びにその試験結果を一覧表に示した。(添付資料-11)

4 皮膚腐食性試験代替法の現状

化学物質の毒性評価法として皮膚腐食性試験が OECD ガイドライン 405 に記載されている。この試験の代替法バリデーションは Barratt, M.D. 等より文献報告され、in vivo との相関も高く、COLIPA では代替法として受け入れる方向で検討されている。

一方、化粧品安全性評価の一つとして、皮膚刺激性試験は、重要な試験の一つとして考えられているが、上記皮膚腐食性試験とは一線を画した形で検討が行なわれている。この代替法に関する最近の論文は少なく、小島等は、3次元モデルを用いて、脂肪酸、高級アルコール、炭化水素について in vivo と相関があると報告している。また ECVAM から ECVAM Skin Irritation Task Force が試験スキームを ATLA に報告しているのが現状である。

従って皮膚刺激性試験代替法に関するバリデーション研究は日本、海外共、具体的な進行はなく、今後の課題である。

関連文献

In vitro testing of tensides employing monolayer cultures: a comparison with results of patch tests on human volunteers; Luisa Benassi et al Contact Dermatitis, (1999), 40, 38-44

動物実験代替法の現状と OECD ガイドラインに関するワークショップ・プロシーディングー皮膚刺激性試験 ; 小島肇夫; AATEX, (1998), 5, supplement

動物実験代替法の現状と OECD ガイドラインに関するワークショップ・プロシーディングー皮膚刺激性試験 ; 松永佳代子; AATEX, (1998), 5, SUPPLEMENT

EVALUATION OF SKIN IRRITATION IN A RECONSTITUTED HUMAN DERMAL MODEL (3-D MODEL) USING WATER INSOLUBLE FATTY ACIDS, FATTY ALCOHOLS AND HYDROCARBONS; HAJIME KOJIMA ET AL ; AATEX, (1998), 5, (4), 201-210.

EVALUATION OF A NEW ALTERNATIVE TO PRIMARY DRAIZE SKIN IRRITATION TESTING USING THE EPIDERM TM SKIN MODEL; MICHIRU GENNO ET AL ; AATEX, (1998), 5, (4), 195-200

EXPRESSION OF SKIN-DERIVED ANTILEUKOPROTEINASE (SKALP) IN RECONSTRUCTED HUMAN EPIDERMIS AND ITS VALUE AS A MARKER FOR SKIN IRRITATION ; BOELSMA E GIBBS, ET AL ; ACTA DERM VENEREOL, (1998), 78, (2), 107-113