

20010968

厚生科学研究研究費補助金

医薬安全総合研究事業

動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大野 泰雄

平成14(2002)年 4月

目次

I、総括研究報告

動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究

大野泰雄

II、分担研究報告

1、光毒性試験代替法の文献的評価

大野泰雄

(資料) Balb/c 3T3 細胞を用い neutral red 取り込みを指標とした
光毒性試験代替法の評価について

2、皮膚吸収試験代替法の開発と評価

大野泰雄 (協力研究者 安藤正典、徳永裕司)

3、皮膚吸収試験代替法の開発と評価に関する研究

森本雍憲 (研究協力者 夏目秀視)

4、皮膚刺激性及び光刺激性試験代替法の開発及び代替法の評価

田中憲穂

5、代替法についての情報収集と解析、代替法の評価

豊田英一

(資料)

添付資料-1 Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending for the seventh time Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products; Official Journal of the European Communities, C311E, 31/10/2000, P134-135

添付資料-2 CTPA NEWSLETTER, MAY, 2001

添付資料-3 CTPA News update, December12, 2001

添付資料-4 Council documents, 15073/01 ADD1, 01/02/2002,

添付資料-5 Council documents, 15073/1/01 REV1,15/02/2002

添付資料-6 Federal Register Vol.66, No.189, 28/09/2001, p49685-49686

添付資料-7 Federal Register Vol.66, No.189, 28/09/2001, p49686-496875

添付資料-8 Federal Register Vol.66, No.189, 07/02/2002, p5842-5844

添付資料-9 <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiderm.htm>

<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invitro.htm>

The Rose Sheet, Vol22, No42, p1, p9 (2001)

添付資料-10 <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/udp.htm>

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Draft Proposal for a new
Guideline:430 In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test
(TER)

添付資料-11 OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Draft Proposal
for a new Guideline:431 In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test

添付資料-12 OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Draft Proposal
for a new Guideline:432 In Vitro 3T3 NRU phototoxicity test (添付資料-12)

Ⅲ、研究成果の刊行に関する一覧表

Ⅳ、研究成果の刊行物・別刷

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
総括研究報告書

動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究

主任研究者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長

研究要旨

本研究では化粧品や医薬品の評価に用いられる動物試験法の代替法を評価・確立するために、代替法の開発研究および文献的調査および専門家による評価を行うことを目的に検討を進めた。代替法の文献的調査および専門家による評価においては、まず、評価体制を構築するための検討を行い、日本動物実験代替法学会に属する代替法の専門家から構成され、文献的に代替法を評価する評価委員会と研究班員および毒性学の専門家、臨床医師、および行政関係者から構成され、評価委員会の報告書を基に代替法を安全性評価に利用することの妥当性を多面的に評価する評価会議を構築した。また、必要に応じて広く一般の者から意見を求めるために公開シンポジウムを開催することが必要であるとした。また、平成13年度においては評価のpilot studyとして光毒性試験について検討し、評価委員会の文書を取りまとめた。平成14年度においてはこれを更に評価会議で検討する予定である。

OECDでは、動物実験代替法の行政的受け入れに関するガイダンスのfollow up会議を開催し、1996年の会議で合意された原則に基づき、更に詳細な内容について検討した。また、in vitroの皮膚腐食性試験ガイドラインやin vitroの光毒性試験ガイドラインのドラフト案作成のための会議が開催された。また、急性毒性試験ガイドラインについては動物愛護に考慮した新しい方法(420, 423, 425)が採用され、旧版(401)が削除された。

in vitro経皮吸収試験法において皮膚のintegrityを確認する上で経皮的水分損失(TEWL)の測定が有用であると示唆された。また、TEWL値と水溶性薬物の透過性との間には相関関係が認められたが、脂溶性薬物の透過性の間にはそのような関係は認められなかった。また、皮膚吸収性試験の代替法として、角質層を有する皮膚3次元培養モデル(TESTSKINおよびVitrolife-Dermis)をの有用性について検討した。

光毒性試験代替法のエンドポイントとしてコロニー形成試験法(CF PT法)の有効性を2種の細胞種を用い、ニュートラルレッド取り込み法(NRU PT法)と比較した。その結果、両細胞種で得られたPIF値は試験系に依存し、細胞種の違いに依存しなかった。一方、試験法ではCF PT法がより低い濃度で反応し、NRU PT法に比べて高い感度を示した。

分担研究者

豊田英一 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
田中憲徳 食品薬品安全センター
秦野研究所

研究協力者

金子豊蔵 国立衛研 毒性部
安藤正典 国立衛研 環境衛生化学部

が高まっている。そこでEUでは代替法センター(ECVAM)を設立し、代替法研究と評価を行ってきた。近い将来化粧品原料および最終製品に関する動物実験を全面的に禁止する予定である。同様の目的のために米国ではICCVAMを設立し、代替法の評価を行ってきた。OECDでは代替法を用いた試験法ガイドラインを複数作成中である。このように欧米では代替法の開発・評価を着実にやってきており、我が国でもこれに対応する体制を整える必要がある。

一方、代替法においては広い範囲の被験物質についてバリデーションを行い、それから得られる情報の種類や適用可能物質などについて明らかに

A. 研究目的

動物実験については動物愛護団体等からの反対運動が活発に行われており、代替法開発の必要性

しておくことがその適正利用に必要である。しかし、多大な費用と時間がかかることから、全ての試験法についてわが国でバリデーションを実行することは不可能である。そこで、本研究においては海外でのバリデーション情報を収集し、それを関連科学分野の専門家と行政担当者を含めた会議により総合的に評価する。また、適切な試験法が無いもの、あるいは既存の代替法が不十分なものについては、新たな試験法の開発あるいは既存の方法を改善するため皮膚吸収性試験および光毒性試験について実験的検討を行う。更に、動物実験代替法に関する欧米の社会情勢および行政的な受け入れ状況について調査した。

B. 研究方法

B-1. 動物実験代替法の文献的評価

代替法の評価組織については ECVAM および ICVAM の組織を参考にし、研究班で検討した。評価委員会の委員については動物実験代替法学会の全面的な協力を得て、研究班員、協力研究者、今年度評価することとなった光毒性試験代替法の専門家、および ICVAM での評価に関係した者をノミネートし、協力を依頼した。評価会議の委員については研究班員以外はトシキコロジー学会及び厚生労働省の担当部局の推薦を基に、毒性学者、皮膚科の臨床医師、行政関係者、および統計学の専門家をノミネートし、協力を依頼した。

B-2 海外における代替法の現状の調査

情報収集は、過去の本研究による経験から、いくつかのホームページ (SCCNFP、OECD、ECVAM、ICCVAM など) を定期的に監視することで行うと同時に EU については同地域の化粧品工業会である COLIPA、米国においては同様に CTFA との連繋を通じて実施した。また、有害性評価のための新試験法および改訂試験法のバリデーションと行政的受け入れに関する OECD 会議に出席し、会議に参画するとともに情報収集をおこなった。

B-3. OECD ガイドライン案への対応

OECD の動物実験代替法に関する in vitro 光毒性試験ガイドラインの修正案が 2002.3.15 付けで届いたが、締め切りまで時間がなかったことから、研究班内で対応し、コメントを作成し、OECD 事務局に送った。

B-4. 皮膚吸収性試験(1)森本

皮膚吸収性試験においては、雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht、10~12 週令、250~300g) の腹部皮膚を用いた。皮膚厚の調節は行わなかった。Transepidermal water loss (TEWL) の測定は第 4

次 OECD ガイドライン (案) に示してあるように、皮膚 integrity の測定に TEWL の測定を用いることができるか否かを検討した。また、皮膚に損傷がおこったとき、TEWL 値および電気抵抗がどのように変化するかを測定するためにセロハンテープで皮膚角質層を stripping する方法および 25G の針で腹部皮膚を穿刺し穴を 1 つ開ける方法の 2 種類の方法で皮フ損傷を作成した。皮膚透過実験は第 4 次 OECD ガイドライン (案) の透過実験の記載に従って行った。

B-5. 皮膚吸収性試験のための人工膜の調製

6K-01 の高分子を用いて人工膜を調製した。製膜した人工膜を内径 1.5 cm のシリコンパッキング 2 枚に挟んで固定し、横型拡散セルにはさみ各種薬物の透過性について検討した。製膜した人工膜を内径 1.5 cm のシリコンパッキング 2 枚に挟んで固定し、32℃の水を循環させた有効透過面積 0.95 cm² の横型拡散セルにはさみ各種薬物の透過性について検討した。

B-6. 三次元皮膚培養細胞モデルを用いた皮膚吸収性試験

三次元皮膚培養細胞モデルは 6 穴マイクロプレートに入った東洋紡製の TESTSKIN の LSE-high と 24 穴マイクロプレートに入ったグンゼ製の Vitrolife-Dermis の二種類を用いた。これらを縦型の Franz 型拡散セルに装着し、透過実験を行った。

B-7. in vitro 光毒性試験

マウス全胎児由来の BALB/c 3T3 A31-1-1 (BALB/c 3T3) と、アフリカミドリザル腎臓由来の VERO 細胞を用い、13 化学物質を用いて NRU 法による細胞毒性試験を実施した。一方、CF 法では 7 種の化学物質を用いて検討した。NRU PT 法はガイドライン案に示す方法に準じて行った。CF PT 法は通常のコロニー形成試験の方法に光照射と非照射下の条件により実施した。化学物質が光毒性を示すかどうかについては、Photo Irritation Factor (PIF、非照射下での IC50 値/照射下での IC50 値) 値を求める事により比較を行った。

C. 研究結果

C-1. 動物実験代替法の文献的評価

動物実験代替法を評価することを目的にその情報を収集し、解析・評価を行う評価委員会およびその報告を基により広い視野で評価するために現場の医師、毒性学者、行政担当者等からなる評価会議で検討する二段階評価スキームを考案した。今年度は光毒性試験代替法を評価するとし、日本動物実験代替法学会の支援を受け光毒性試験代替法および

バリデーシヨンの専門家等から評価委員会を構築した。また、研究班員、皮膚科の医師および日本トキシコロジー学会より推薦を受けた毒性学者および厚生労働省の担当者で評価会議を組織した。評価委員会では光毒性試験代替法について広く調査し、施設間バリデーシヨン結果の存在する 3T3 細胞を用い neutral red 取り込みを指標とする方法(3T3 NR 法)について評価した。3T3 NR 法は in vivo と対応性の良い結果を与えるが、そのバリデーシヨン結果の報告データの質や結果の再現性等に関する情報は文献からのみでは十分に得られなかった。今後、より詳細なデータをバリデーシヨン実施機関より入手するとともに、評価会議を開催する。

C-2) 海外における代替法の現状の調査

C-2-1) EU における動物実験禁止、代替法開発の動向

第 7 次改正

2000 年 6 月 30 日を期限に動物実験を実施した原料を配合した化粧品の販売禁止を求める EU 化粧品指令第 6 次改正については、さらに 2 年間延期する指令 (2002 年 6 月 30 日まで) が公布された¹⁾。

本年度の進展は、2001 年 2 月 23 日の EU 議会議環境委員会での審議、3 月 30 日の EU 議会の環境委員会での採択を経て、4 月 3 日の EU 欧州議会本会議での採択 (first reading) が行われた²⁾。そこで採択された基本的骨子は、以下の通りである。

- 1) 代替法が存在する場合は直ちに動物実験実施製品の販売禁止。さらに、いかなる場合でもすべての動物実験実施製品の販売禁止を 7 次改正採択後の 5 年後とする。
- 2) 7 次改正採択時にすでに使用されている成分に関して、採択後に化粧品関連業者以外の者により動物実験が行われた場合は販売禁止とならない。
- 3) 最終製品およびその成分のための動物実験は、代替実験方法がある場合は直ちに、そうでない場合でも 2004 年 12 月 31 日には禁止。

その後、議長国となったベルギーを主体として閣僚理事会で検討され、11 月 26 日に閣僚理事会の票決にかけられ賛成多数で採択された³⁾。その後、この法案は EU の法律専門家による検討後、2002 年 2 月 1 日に「共通の立場」の公式ドラフト案が公表された⁴⁾、2 月 14 日には公式に「共通の立場」が採択された⁵⁾。次のステップは欧州議会での second reading である。閣僚理事会での採択された「共通の立場」の基本的骨子は、以下の通りである。

- 1) 動物実験を実施した最終製品および原料を含む製品の販売禁止は、代替法として OECD の承認後。
- 2) EU 域内での最終製品の動物実験禁止 (法律施

行後 36 ヶ月)。

- 3) 代替法が欧州危険物指令の Annex V もしくは EU 化粧品指令の Annex IX (新設) に公布された以降の EU 域内での原料の動物実験禁止。

以上のように、EU における動物実験の禁止、代替法の開発、Validation の動向は、米国、日本とは全く独立して、自己完結型で進行しているが、一方でこれらの動きは世界をリードするものとしての位置付けもあり、先行した後にハーモナイゼーションに向けての努力を継続していくものと思われる。しかし、今年度は、代替法開発に関しては目立った動きはなかった。

第 7 次改正の閣僚理事会案では、動物実験を実施した最終製品および原料を含む製品の販売禁止や原料の動物実験は代替法として OECD の承認後となっており、代替法開発における具体的なデッドラインを設けていない。この点で、従来より緩和された産業界側寄りの閣僚理事会案に対し業界の代替法開発の遅延につながるという懸念もあり、ひき続き情報収集が必要である。

この点もふまえ、COLIPA は各社が動物実験開発研究にどのくらいの金額を投資するかの情報提供依頼などを行い、産業界は代替法開発に力をそそいでいる姿勢を、EU の議員などにアピールする姿勢を示したが、EU 議会の理解を得るまでには至っていない。

C-2-2) 米国における代替法開発の動向

ICCVAM における検討状況

ICCVAM は、米国官庁間の調整を図り共通の目標である代替法の Validation を統括する委員会として機能してきており、現在は NIEHS の恒久的委員会として位置付けられている。本年度は、ICCVAM が関与してきた 3 つの代替法についての報告書の公開とパブリックコメント募集が官報 (Federal Register) ⁶⁾⁷⁾⁸⁾ に公表された。

1 つが、皮膚腐食性試験代替法に関するものであり、EPISKIN、EpiDerm human skin models、Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance Assay (TER 法) の 3 つの代替法を含む試験法に関するもので、ICCVAM はこれら 3 つの試験法について “integrated testing schema (統合試験体系)” を提案している。即ち、in vitro で陽性反応が出た場合は、更なる試験は不要で、分類と表示 (危険物として) に使用できる。しかし、in vitro で陰性反応が出た場合は、in vivo での更なる試験が必要であるとしている⁶⁾⁹⁾。

もう一つは、2000 年 10 月に開催された全身毒性評価の in vitro 法に関する国際ワークショップの報告書および in vivo での急性毒性試験の初期量設定のための in vitro データの利用に関する指針に関するものである。ICCVAM は、in vivo の急性毒

性試験(修正 Up-and-Down 法)と in vitro の細胞毒性試験を併用するとテスト動物数を 30%減少することが可能であると報告している。また、in vivo での急性毒性試験の初期量設定のための in vitro データの利用に関する指針には、データとして利用できるものとして Balb/c 3T3 neutral uptake assay が記されている^{7) (10) (11)}。

もう一つは、急性経口毒性の試験法の一つである修正 Up-and-Down 法に関する報告書に関するものである。この報告書には、ICCVAM による修正 Up-and-Down 法の推奨、第三者的立場にいる科学者による評価、最終的なテストガイドラインが含まれている。NICEATM は ICCVAM に代わってこのレポートについての公開のコメントを求めている^{8) (12)}。

今年もまた、ICCVAM は ILSI Risk Science Institute や EPA とともに、OECD で認められている 3 つの急性毒性試験である、Fixed Dose Procedure、Acute Toxic Class Method、そして Up-and-Down Procedure に関するトレーニングセッションを開催した。このなかには、in vivo での急性毒性試験の初期量設定のための in vitro データの利用に関する事例研究も含まれており、ICCVAM の活動は、単に方法を評価するのみでなく、代替法の日常使用の促進という方向にも目を向けていることが明確になってきた。

以上のように、米国においては、ICCVAM 主導による代替法の peer review が着実に進行しており、代替法を認定する機関としての位置付けが明確になってきた。ICCVAM は、代替法の評価を目的に、NIEHS とその他 13 の政府研究機関から構成された組織である。ICCVAM の代替法の評価方法は、validation (試験を伴う) を主とする ECVAM とは異なり、これまで得られた結果の peer review である。この方法は、validation に伴う膨大な作業なしに提案された試験法を評価できることから、代替法の社会的認知が促進されるという特徴を持っている。このため、米国では幾つかの試験法に関する peer review が同時進行している。本邦においても動物実験代替法の開発と利用を促進するためには、ICCVAM のような行政主導の組織並びに peer review のような評価方法を検討することは必要と考えられる。

C-2-3) OECD の動向

OECD ガイドラインの動向

これまでに LLNA ガイドライン、in vivo 経皮吸収試験ガイドライン、in vitro 経皮吸収試験ガイドライン、in vitro 光毒性試験ガイドライン、皮膚刺激性・腐食性・眼刺激性試験法のガイドラインについて日本化粧品工業連合会・技術委員会安全性部会で検討し、質問やコメントを全般的なものと同個

なものに分けて取りまとめ、厚生科学研究班を通じて、OECD に提出してきた。

2001 年 10 月 30 日～31 日にベルリンで OECD の専門委員会が開催され、in vitro 皮膚腐食性試験ガイドライン及び in vitro 光毒性試験ガイドラインに関する検討が行われた。その結果、Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance Assay (TER 法) 及びヒト皮膚モデル (EipDerm) を用いる試験法については、大枠の合意によりガイドライン 430 (TER 法)¹³⁾ 及びガイドライン 431 (ヒト皮膚モデル)¹⁴⁾ のドラフト案及びそれに対するパブリックコメント募集の案内が 2002 年 3 月 27 日に OECD ホームページに公開された。

同時に開催された in vitro の光毒性試験ガイドラインの検討では、韓国、日本および米国の OECD 専門委員会の科学者たちが、OECD メンバー各国に対し動物試験と同等の毒性情報を与えるものとして、実験的にバリデートされた動物を使用しない試験であるこの試験をはじめて推奨した。この結果を踏まえ、in vitro の光毒性試験ガイドライン 432 のドラフト案及びそれに対するパブリックコメント募集の案内が 2002 年 3 月 15 日に OECD ホームページに公開された¹⁵⁾。

急性経口毒性試験に関しては、急性経口毒性試験ガイドライン 401 の削除を提案してきたが、2001 年 9 月に OECD の委員会のひとつである Environmental Policy Committee (EPOC) にガイドライン 401 の削除と急性経口毒性試験ガイドライン 420 (Fixed Dose Procedure)、急性経口毒性試験ガイドライン 423 (Acute Toxic Class Method)、急性経口毒性試験ガイドライン 425 (Up-And-Down Procedure) への置換に関するドラフト案を提出した。これらのガイドラインは昨年 12 月 17 付けで採用された。これに伴い、いままでの急性毒性試験ガイドラインが削除される。新ガイドラインでは必ずしも LD50 値を求めないことから、我が国でも毒・劇物の分類にも影響がでる可能性がある。

その他の試験法については、現在のところ審議状況に関する情報は得られていない。

OECD ガイダンス関連

2002 年 3 月 6～8 日に、スウェーデンのストックホルムで、有害性評価のための新試験法および改訂試験法のバリデーションと行政的受け入れに関する OECD 会議 (OECD Workshop on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of New and Updated Internationally Acceptable Test Methods in Hazard) が開催された。

この会議の目的は、1996 年にスウェーデンのソルナで開催された OECD の代替法のバリデーションと行政的受け入れの基準に関する会議 (OECD Workshop on Harmonization of Validation and

Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods ; Solna Report) の結果を踏まえ、行政目的のための有害性評価を目的とした試験法のバリデーションと受け入れに関する基準とそのプロセスについての実際的なガイダンスを作成することである。

具体的な目標としては以下の4項目についての原則と基準の作成があげられている。

- 1) 既存のバリデーション結果の扱い
- 2) バリデーションのプロセスの行い方と運営方法
- 3) 妥当性の確認された試験法の行政的受け入れ
- 4) 新規あるいは改訂試験法の独立した peer review と行政的な検討と実施のプロセス

この会議で合意された結果は OECD のガイダンス “The Development, Validation and Regulatory Acceptance of New and updated Test Methods in Hazard Assessment” に反映される。

以上のように、OECD は、代替法の行政的受け入れに関するガイダンスのドラフトを作成するとともに個別の試験法に関するガイドラインドラフトも公表したことから、代替法への取り組みが本格化してきたものと考えられる。また、EU 化粧品指令第7次改正案においても、OECD ガイドラインとの関係が記述されたことから、今後の動向については本研究班では注目していく必要がある。OECD 毒性試験ガイドラインは、新規化学物質に適用されることから、本邦においては行政を中心とした産官学による組織的な対応が必要と考えられる。

C-3. OECD ガイドライン案への対応

光毒性試験代替法に関しては以前より検討が行われて来た。そのまとめの会議がベルリンで開催され、我が国からは秦野研の田中班員が参加した(2001.10.30-31)。本会議では今までに寄せられたガイドライン案に対するコメントが検討され、その修正作業が行われた。その結果が2002.3.15付で通知された。これに対して研究班内で検討し、コメントを OECD に送付した。

また、皮膚刺激性試験代替法に関するガイドライン案の検討がベルリンで開催され、日本からは大野班長が出席した(2001.11.1-2)。会議では光毒性試験の場合と同様にコメント対応について検討した。その結果はまだ通知されていない。

一方、代替法のバリデーションと行政的受け入れのための基準に関する1996年のOECD会議のfollow up会議がストックホルムで開催され、日本からは大野班長らが参加した(2002.3.6-8)。この結果については現在OECDで整理中である。

C-3) 皮膚吸収性試験(1)森本

TEWLの測定

ヘアレスラットを麻酔し、使用部位である腹部をシェーバーで除毛後、上記に示した第4次OECDガイドライン(案)のStep 1に準じ外見で傷がついていないかを確認した。外見上、傷が無いと思われる、腹部皮膚摘出前の測定を *in vivo* とした。そして *in vivo* での TEWL 測定後、皮膚を摘出し、その皮膚を透過実験で使用する拡散セルにセットし、セル中を透過実験で使用する phosphate buffer 等のレシーバー溶液で満たした。その後、ドナー側から TEWL を測定した。この測定を *in vitro* とした。次に、広範囲の皮膚が損傷した場合として、セロハンテープで皮膚角質層を stripping し、その後の TEWL を測定した。*In vivo* において、stripping 回数に依存して TEWL は直線的に増加した。Full-thickness skin の TEWL に対する stripping を行ったときの TEWL には、いずれの場合も有意差がみられた。一方、stripping 回数群間の TEWL は 5 回 vs. 15 回、及び 5 回 vs. 20 回で有意差がみられたが、15 回 vs. 20 回ではみられなかった。以上のことから、TEWL を測定することで、皮膚の損傷の程度を推測できることがわかった。また、皮膚 integrity を確認する上で、TEWL の測定が有用であることが示唆された。

In vitro においても stripping 回数に依存して TEWL は増加し、full-thickness skin の TEWL に対する stripping を行ったときの TEWL に有意差がみられた。また、群間(5 回 vs. 15 回、5 回 vs. 20 回、及び 15 回 vs. 20 回)も有意であった。以上より、*in vitro* においても TEWL 値は stripping の回数に依存することがわかった。見た目では損傷していないと思われる皮膚 *in vivo* における TEWL の平均値は 10.57 (n = 24) であり、*in vitro* では TEWL 値は 8.0 (n = 10) であった。この値は測定者が代わってもほぼ等しかった。

損傷した皮膚の薬物透過性の測定

次に stripping により皮膚を傷つけたときの薬物透過実験を行い、薬物透過性と皮膚 integrity との関係調べた。皮膚透過実験は第4次OECDガイドライン(案)の透過実験の記載に従って行った。パラヒドロキシ安息香酸メチル(MP)の透過は、stripping 回数に依存して増加し、flux 及び log P も増加した。これらの結果は、stripping 回数に依存して、皮膚の透過抵抗が減少したことを示している。すなわち、stripping の様な皮膚の損傷は、皮膚の透過性を増加させる。*In vivo* において TEWL と log P の間には有意な相関関係が認められ、TEWL の値から MP の透過性をある程度予測できる可能性が示唆された。しかし、多くの化合物において、同様の傾向が存在するかは、更に多くのデータを収集する必要があると考えられた。

以上、stripping で示される様な皮膚損傷では、

TEWLの測定によりその程度を見積もることが可能であり、また薬物の皮膚透過性も損傷の程度により増加することがわかった。しかしながら、Step 1で確認できない皮膚損傷は広範囲の角質層の剥離よりも、むしろ局所的な小さな損傷の場合が多いと考えられる。そこで、皮膚の一部に25Gの注射針で小さな穴を開けて損傷を起こし、そのときのTEWLと皮膚電気抵抗をモニターした。また、水溶性薬物の安息香酸ナトリウム(BA)及び脂溶性薬物のMPの皮膚透過性を測定し、TEWLとの関係を調べた結果、薬物の透過実験に用いた皮膚のTEWL値と皮膚電気抵抗の逆数との間には、良好な直線関係が認められた。しかし、BAの透過実験で用いた皮膚電気抵抗とMPの透過実験で用いた電気抵抗は大きく異なった。これは電気抵抗を測定するための電極の設置位置等の条件が一定ではないことが考えられ、全ての透過速度の代わりに電気抵抗を用いてTEWLと関係付けることは困難と考えられた。また、穴を開けていない皮膚のTEWL値は4.93~14.14 (L/m²/h)で、その平均値は9.53±0.86 (L/m²/h)であり、stripping実験のそれとほぼ等しかった。一方、皮膚に穴を開けたときのTEWL値は15.11~46.88 (L/m²/h)であり、その平均値は23.07±3.04 (L/m²/h)であったが、その幅は大きかった。これは穴の開け方による、穴の大きさに関係しているかもしれない。これらの皮膚を用いてBA及びMPの皮膚透過性を調べたところ、BAの場合、皮膚を損傷していないcontrolに比べて、穴を開けた方の透過性は著しく上昇した。しかし、MPの透過性はcontrolに比べて増加したものの、その増加は著しいものではなかった。そこで、TEWL値とlog Pとの関係を調べてみた結果、安息香酸ナトリウム(BA)の場合、TEWL値とlog Pとの間に相関性が認められたのに対し、MPでは認められなかった。

これらの結果は、水溶性薬物のBAでは水溶性薬物の通り道であるpore routeの形成が皮膚透過性に影響し、脂溶性薬物のMPでは皮膚透過性に影響しないことを示唆している。また、TEWLの測定は、針で穴を開けたような皮膚損傷を見積もることが可能であるが、全ての薬物の皮膚透過性を予測することは困難であることがわかった。

C-5. 皮膚吸収性試験のための人工膜の調製

検討したいずれの薬物も6K-01膜を介して透過することがわかった。また、20K-01膜においても同様であった。水溶性ドメインを形成すると考えられるVPEの分子量が大きくなった20K-01の膜では、6K-01膜に比べて透過のラグタイムは、いずれの薬物も短くなり、薬物の膜の拡散性が高くなったと推察された。しかし、薬物透過速度(flux)は20K-01膜において、いずれの薬物も大きくなるも

の、あまり変わらず、そのため透過係数(P)はほぼ等しかった。ヒト皮膚から予測される透過曲線との比較から、ある程度これらの膜はヒト皮膚に近い薬物透過性を示すと考えられたが、全体的に高い傾向が認められた。また、得られたデータはヒト皮膚から予測された曲線というよりはむしろ、log K_{ow}に対してlog Pが直線となる傾向にあった。このことから、6K-01及び20K-01膜は均一な拡散膜である可能性も考えられた。そこで、よりflexibleで水溶性ドメインを形成しやすいと考えられるt-butyl methacrylate (BMA)を用いて2種類の膜(B75-6K-01とB10-6K-01)を調製し、薬物の透過性を評価した。B10-6K-01では、いずれの薬物も実験を開始してから12時間経っても透過が確認されなかった。

脂溶性の高いEP、PP、BPは、B75-6K-01膜を透過したが、水溶性のアンチピリン(ANP)はほとんど通らなかった。先と同様にlog Pとlog K_{ow}との関係をプロットしたところ、脂溶性薬物の透過性は分配係数に対し直線的に増加し、ほぼヒト皮膚から予測された直線に近い値を示したが、水溶性のANPのlog Pは著しく低下した。これらの結果から、現状では、用いる高分子を変えても水溶性ドメインを形成させることが難しいと考えられた

C-6 三次元皮膚培養細胞モデルを用いた皮膚吸収性試験

皮膚3次元培養細胞モデルを用い、各種化合物の*in vitro* 経皮吸収実験への応用を検討することを目的に実験を行った。また、平成10~12年度に行ったモルモットの腹部剥離皮膚を用いた*ex vitro* 的な経皮吸収試験との比較検討を実施し、皮膚3次元培養細胞モデルを用いた*in vitro* 経皮吸収試験への適応性についての評価を行った。

透過試験用原液1.0mlをTESTSKINを用いて調製されたFranz型拡散セルのdonor側に加え、32℃で0.5~3時間にreceptor側に透過してくるMP、EPおよびCCの累積透過量は物質によりほとんど差が無かった。一方、BA、RNおよびSAの累積透過量はBA>RN>>SAの順で、SAの透過はわずかであった。一方、Vitolife-DermisでもMP、EPおよびCCの累積透過量は物質によりほとんど差が無かった。しかし、BA、RNおよびSAの累積透過量はSA>RN>BAの順でTESTSKINと大きく異なっていた。

多くの薬物で試験物質のlog k'と各種皮膚での透過速度は類似したパターンを示していたが、SAから得られたFluxはTESTSKINあるいはVitolife-Dermisを用いた場合、ともに小さい値を示した。それ以外の試験物質では大きな値を示し、TESTSKINのFluxは腹部剥離皮膚から得られた

Flux の 2.6~11.4 倍の値を、また、Vitrolife-Dermis の Flux は、腹部剥離皮膚から得られた Flux の 1.5~7.7 倍の値を示した。

なお、Vitrolife-Dermis はスポンジ部分と皮膚モデルから構成されているが、スポンジ部分のみの透過性は Vitrolife-Dermis の透過速度の 2.6~3.4 倍であり、透過律速は Vitrolife-Dermis が担っていることが明らかになった。

界面活性剤の皮膚モデルの透過性への影響を調べるため、10mM のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) および塩化ベンザルコニウム (BK) について検討したところ、SDS は MP, EP, CC の透過速度に影響が与えなかったが、 k' 値が 1 以下である BA, RN 及び SA の透過速度を、それぞれ、0.57, 0.15 および 0.53 倍に減少させた。BK は、MP, EP, CC, BA の透過速度に余り影響を与えなかったが、RN および SA の透過速度をそれぞれ、0.4 および 3.4 倍に変化させた。

C-6) in vitro 光毒性試験

現在 OECD 事務局より提示されている光毒性試験の代替法としての光細胞毒性試験のガイドライン案¹⁾は、基本的に EU/COLIPA の光毒性試験のバリデーションスタディ²⁻⁴⁾で用いられた試験方法とほぼ同じ内容である。我々は、この提示された OECD ガイドライン案に関する問題点を調べる為、これまでいくつかの実験を実施してきた。本年度は用いる細胞の種類と適用する細胞毒性試験法を検討する目的で次のような研究を行った。

細胞を用いる光毒性試験の OECD ガイドライン (案) の基本となっている BALB/c 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド法による光細胞毒性試験 (NRU PT 法) により、BALB 3T3 細胞と VERO 細胞による反応性の違いを調べた。また、細胞毒性試験の中でも一般的に播種細胞が少なく、長期暴露する事により感度が高いとされるコロニー形成法に照射を適用 (CF PT 法) し、NRU PT 法と CF PT 法の特性を比較した。

その結果、NRU PT 法においては promethazine HCl と 8-MOP では両細胞間に PIF 値で 10-数 10 倍程度の差が認められたが、他の 11 化学物質についてはほぼ 2 倍以内の PIF 値を示した。CF PT 法では両細胞間で amiodarone HCl と PCP において数倍程度の差が認められたが、他の化学物質においては PIF 値 2 倍以内の差を示した。

一方、BALB 3T3 細胞における NRU PT 法と CF PT 法の PIF 値の比較を VERO 細胞における結果と比較したところ、いずれの細胞においても CF PT 法における PIF 値は NRU PT 法における PIF 値よりも大きく、CF PT 法の方が感度が高いことが示された。なお、sulfanilamide は NRU PT 法において照射

非照射いずれの系でも最高濃度でも細胞毒性が認められなかったが、CF PT 法では照射下で細胞毒性が認められたことから、PIF 値が大きくなる結果となった。また、BALB 3T3 細胞における 8-MOP および pyriithoxin、VERO 細胞における 8-MOP では非照射下における IC50 値が得られたことから、CF PT 法では NRU PT 法よりも感度よく毒性の検出ができた。

BALB 3T3 細胞および VERO 細胞のいずれにおいても NRU PT 法で得られた IC50 値は照射下において数倍から強いもので 100 倍近くまで増強された。また、非照射下ではほとんど変化がないものから 10 倍程度の増強が認められた。しかしながら、NRU PT 法と CF PT 法を比較した場合、照射下で増強が認められずに非照射下でのみ毒性が増強された物質は認められなかった。

D. 考察

D-1) 動物実験代替法の文献的評価

3T3-NR 光毒性試験法は in vivo 結果との対応が良く、被験物質の光毒性の有無を評価するのに有効であると思われた。しかし、文献的情報のみではデータの質や再現性が明らかにはできない。また、試験法を若干変更した場合の頑健性等について不明確なところもある。従って、我が国においても少数の被験物質を用いて施設間バリデーションを行い、試験法の再現性や in vivo との対応性など、試験としての妥当性について確認する必要があると考える。また、本試験法では感度の低い物質群の存在することも報告されており、それらについて更に基礎的な検討の推進が必要である。また、公開のワークショップ等を開催し、広く意見を求めることも必要であろう。なお、現在、Dr Spielmann より詳細なバリデーション情報を入手しており、文献のみで確認できなかった点について更に検討する予定である。

D-2) 海外における代替法の現状の調査

昨年度の報告でも述べたが、欧米では代替法開発、そしてそれらの Validation において中心的役割を担う機関が確立し (ECVAM、ICCVAM)、かつ OECD の検討状況も活性化してきた現状では、従来のような継続的ではあるが、断片的な情報収集、そして重要な課題への注目と対処から構成される体制にもやや限界が見えてきた。また、欧米で評価されたものを無批判に導入することはその適正な利用・評価についての情報を得る面においても好ましくない。今回、文献的に光毒性試験代替法について検討したが、文献から得られる情報からデータの信頼性やプロトコルの頑健性等を評価するには限界があることが明らかになった。バリデーション実施施設より、詳細なプロトコルや SOP を入手

して補う事が必要と思われた。また、それらの結果を確認するための小規模のバリデーションを実施することが我が国で行政的に受け入れる事が可能であるか否か判断するために必要と思われた。

欧米では代替法開発、そしてそれらのガイドライン化に向け Validation や peer review が積極的に進行している。その推進の原動力は、ガイドライン作成に関与する行政の積極的な対応である。EU では、EU 委員会の下部組織である ECVAM が、米国では 8 省庁の研究機関の連携による ICCVAM が、validation や peer review を推進している。OECD ガイドラインは、ECVAM や ICCVAM が個別に認定した試験法をグローバルに波及する影響力を有している。

一方、本邦においては、ECVAM や ICCVAM のような行政主導の代替法評価機関がなく、本研究班が代替法の開発、評価研究と海外情報の調査解析を行っているに留まり、その研究成果はガイドライン作成等の行政的な採り上げまでには至っていない。その結果、OECD ガイドライン化における本邦の提案力も弱くなり、欧米主導の OECD ガイドラインとなってしまう。今後の動物実験代替法に関する国際的ハーモナイゼーションを考えると、まず最初に手がけるべきは、行政参加の ECVAM や ICCVAM に匹敵する本邦独自の代替法評価機関の設置であると考えられる。

D-3) 皮膚吸収性試験

第 4 次ガイドライン (案) *in vitro* 経皮吸収試験法の提示すべきデータである皮膚 integrity に関して、日本において最も汎用される動物種の一つであるヘアレスラットを用いてガイドライン (案) に沿って実験を行い評価した。その結果、ヘアレスラット皮膚の integrity を確認する上で経皮的水分損失 (Transepidermal water loss ; TEWL) の測定が有用であることが示唆された。しかし、皮膚の損傷の程度を問わず TEWL 値と水溶性薬物の透過性との間には相関関係が認められたが、脂溶性薬物の透過性の間にはそのような関係は認められなかった。よって、透過物質の物理化学的性質を考慮して動物種ごとに TEWL 値の利用の範囲を明確にする必要があると思われた。

D-4) 皮膚吸収性試験のための人工膜の調製

薬物透過実験における摘出皮膚代替物として人工膜を調製し、物質透過特性を評価したところ、脂溶性薬物でヒト皮膚透過性とほぼ等しい透過特性が得られ、さらにポリエチレングリコール類の分子量を増大させることで、水溶性モデル薬物の ANP もヒトとほぼ等しい透過特性が得られた。これはポリオキシエチレン鎖が増大することで水溶性ドメ

インが増大し水溶性ルートが形成されたことによると考えられる。今回調製した人工膜を用いることでヒト皮膚における脂溶性及び水溶性薬物の透過性のある程度予測できる可能性が示唆されたが、より良い膜とするためにさらなる工夫が必要と考えられた。

D-5) *in vitro* 光毒性試験

現在、OECD のガイドライン案 (2002 年 3 月 15 日) では、NRU PT 法において、PIF 値と MPE 値をもとに光毒性の判定を行うことを記載している。PIF 値においては PIF<2 で陰性、PIF>5 で陽性、2<PIF<5 で擬陽性との見解を示している。CF 法を用いた光毒性試験における判定は確立されていないことから、NRU PT 法に準じて行うこととした。

NRU PT 法において BALB 3T3 と VERO 細胞における PIF 値を比較した場合、promethazine HCl と 8-MOP において差が認められた。前者は光照射下における IC50 値は細胞間でほぼ等しかったが、非照射下における IC50 値に 10 倍程度の差が認められたため、非照射下においては BALB 細胞の方が VERO 細胞より promethazine HCL に対する感受性が高かった。8-MOP においては両細胞とも非照射下では最高濃度においても細胞毒性が認められなかったが、光照射下において VERO 細胞の方が 65 倍程度強い細胞毒性を示した。しかしながら、8-MOP においては非照射下で IC50 値が求められなかったため、正確な PIF 値を求めることはできなかった。しかしながら、NRU PT 法、CF PT 法共に、細胞により PIF 値に大きな違いは得られず、ほぼ同程度の PIF 値を示したことから、各細胞における PIF 値は試験系に依存し、細胞種の違いにはほとんど影響されないことがわかった。

CF PT 法は播種細胞数の少なく、曝露時間が長いことから感度がよいことが知られているが、今回光照射試験として適応した場合、曝露時間が同じであっても NRU PT 法と比較し、光照射下、非照射下に関わらず、IC50 値は低い値を示し、より低濃度で細胞毒性作用を示した。また、PIF 値は、細胞種によらず、CF PT 法で、より大きな PIF 値を示し、光細胞毒性が強く検出された。特に sulfanilamide は NRU PT 法で光照射下、非照射下の両方で最高濃度まで全く毒性を示さなかったのに対し、CF PT 法では非照射下では、毒性が認められなかったが、光照射下で細胞毒性が確認された。このようにある種の化学物質においては NRU PT 法では光毒性を検出できないが、CF PT 法では検出できるものもあることが分った。逆に CF PT 法は感度が高い事から、試験条件に結果が影響されやすく、例えば、非照射下で溶媒対照におけるコロニー形成率は室温暗所ではふれやすく、光照射下の温度と同程度 (32-

34℃)の温度をかけることで比較的安定した値が得られた⁵⁾。また、播種細胞数が少なく、洗浄操作が多いことから細胞が剥がれやすいので各操作に注意を要する。

以上の結果より、BALB 3T3 細胞と VERO 細胞の PIF 値は試験系に依存し、細胞種の違いにはほとんど影響されなかった。一方、NRU PT 法と CF PT 法では薬剤に対する感受性が異なり、CF PT 法が光照射下、非照射下に関わらず IC50 値が低く、感度が高い事が示された。

E. 引用文献

C-1)の引用文献

- 1) Spielmann et al. (1994) EEC/COLIPA Project on In Vitro Phototoxicity Testing: First Results Obtained with A BALB/C 3T3 Cell Phototoxicity Assay, *Toxicology in Vitro* 8 793-796.
- 2) Spielmann et al. (1998) The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1 :The 3T3 NRU Phototoxicity Test, *Toxicology in Vitro* 12, 305-327.
- 4) Spielmann 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.

C-2 項の引用文献

- 1) Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending for the seventh time Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products; *Official Journal of the European Communities*, C311E, 31/10/2000, P134-135.
- 2) CTPA NEWSLETTER, MAY, 2001
- 3) CTPA News update, December 12, 2001
- 4) Council documents, 15073/01 ADD1, 01/02/2002.
- 5) Council documents, 15073/1/01 REV1, 15/02/2002.
- 6) Federal Register Vol.66, No.189, 28/09/2001, p49685-49686
- 7) Federal Register Vol.66, No.189, 28/09/2001, p49686-496875
- 8) Federal Registeds/invitro.htm
- 11) The Rose Sheet, Vol22, No42, p1, p9 (2001)
- 12) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/udp.htm>

13) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Draft Proposal for a new Guideline:430 In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)

14) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Draft Proposal for a new Guideline:431 In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test

15) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Draft Proposal for a new Guideline: 432 In Vitro 3T3 NRU phototoxicity test

C-6 項の引用文献

- 1) OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Draft Proposal for a New Guideline:432, *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test, 15 March 2002
- 2) Spielmann, H. et al.:EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxic. In Vitro.* , 8, 793-796, 1994
- 3) Spielmann, H. et al.:The international EU-COLIPA In vitro phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxic. In Vitro.* , 12, 305-327, 1998
- 5) Spielmann, H. et al.: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, 1998
- 6) 若栗忍、田中憲穂：光細胞毒性試験における照射条件と細胞株の基礎的検討、*秦野研究所年報*、24：32-38 (2001)

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 若栗忍、○田中憲穂：光細胞毒性試験における照射条件と細胞株の基礎的検討、*秦野研究所年報*、24：32-38 (2001)
2. Y.Nakagawa, Y.Takigawa and ○N.Tanaka: The rapid screening of photogenotoxic compounds using photo plasmid-relaxation assay, *Environmental Mutagen Research* 23:107-118(2001)
3. ○田中憲穂：安全性試験としての遺伝毒性(変異原性)試験の意義と試験概要、*JHOSPA(Journal of Japan Hygienic Olefin and Styrene Plastics Association)*、No12: 2-16(2001)

4. 若栗忍、○田中憲穂：動物モデルによる新しい評価法 67、*In vitro* 光細胞毒性試験について、アニテックス、14：44-48 (2002)

2. 学会発表

1. 若栗 忍, ○田中憲穂：光細胞毒性試験における細胞種および試験系の比較、日本組織培養学会第 74 回大会・第 15 回日本動物実験代替法学会大会・合同大会、2001.8
2. ○大野泰雄、日本動物実験代替法学会ディベート、
4. 眼粘膜刺激性試験 1) *in vitro* の立場から (2001.8)筑波学園都市
3. ○Yasuo Ohno and Naomi Motoji¹⁾, Ethics and ethics committee for use of human tissue to research purpose, (日本薬理学会総会シンポジウム 2002.3) 1)生体科学研究所
4. ○大野泰雄、動物実験代替法、第 1 3 2 回日本獣医学会学術集会(2001.10.7) 盛岡
5. ○Yasuo Ohno, ICH guidelines,
Implementation of the Three Rs:
Incorporating Best Scientific Practices into the Regulatory Process. ICLAS-CCAC
International Symposium on Regulatory Testing and Animal Welfare. International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)/Canadian Council on Animal Care (CCAC)主催「行政試験と動物福祉についての国際シンポジウム(6月20日 6月24日)」(ケベック)

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

光毒性試験代替法の文献的評価

分担研究者 大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所、薬理部長）

研究要旨

動物実験代替法を評価することを目的にその情報を収集し、解析・評価を行う評価委員会およびその報告を基により広い視野で評価するために現場の医師、毒性学者、行政担当者等からなる評価会議で検討する二段階評価スキームを考案した。今年度は光毒性試験代替法を評価するとし、日本動物実験代替法学会の支援を受け光毒性試験代替法およびバリデーションの専門家等から評価委員会を構築した。また、研究班員、皮膚科の医師および日本トキシコロジー学会より推薦を受けた毒性学者および厚生労働省の担当で評価会議を組織した。評価委員会では光毒性試験代替法について広く調査し、施設間バリデーション結果の存在する 3T3 細胞を用い neutral red 取り込みを指標とする方法(3T3 NR 法)について評価した。3T3 NR 法は in vivo と対応性の良い結果を与えるが、そのバリデーション結果の報告データの質や結果の再現性等に関する情報は文献からのみでは十分に得られなかった。今後、より詳細なデータをバリデーション実施機関より入手するとともに、評価会議を開催する。

A. 研究目的

医薬品や化粧品の安全評価においては様々ら安全性試験結果が必要である。一方、動物愛護の立場からは、安全性試験をなるべく実験動物を使用しない試験法に置き換える事が要求されている。しかし、新しい方法に置き換えることにより臨床試験志願者や患者、また、一般消費者に不必要なリスクを負わせることは許されない。安全性評価の観点から、新しい方法が少なくとも従来の方法と同等か、あるいはそれ以上の能力をもつことが客観的に示されていなくてはならない。そこで、EU では代替法センター(ECVAM)を設立し、代替法研究とバリデーションを行っている。同様の目的のために米国では ICCVAM を設立し、代替法を文献的に評価している。OECD では代替試験法を行政的に受け入れるための基準を作成した。

このように欧米では代替法の開発・評価を着実に進めており、我が国でもこれに対応する体制を整える必要がある。そこで本研究では科学的根拠に基づいて可能な限り化粧品や医薬品等の評価のために動物実験代替法を導入するために、代替法の開発研究と調査を行って来た。そこで本研究では動物実験代替法として提案された方法について行政的に取り入れることが可能か否か検討するために、評価委員会と評価会議を設定し、基礎的研究者および臨床医師により多面的に光毒性試験代替法を評価することとした。

B. 研究方法

班会議で代替法を評価するためのスキームについて検討した。また、班会議で調査すべき代替法について検討し、今年度は光毒性試験に関して調査すべきとされた。そこで日本動物実験代替法学会の協

力を得て、光毒性試験の専門家および米国の代替法評価組織である ICCVAM での評価に協力した経験を有する専門家等により評価委員会を設置した。光毒性試験に関して総説、単行本で調査した。また、文献については Medline で phototoxicity をキーワードとして最近検索したところ 1160 件の文献が得られた。そこで、最近の文献 500 報(ほぼ 1995 年まで)について評価委員で分担してスクリーニングし、重要文献を選択した。これらをもとに光毒性試験代替法についてまとめた。また、光毒性試験代替法をバリデーションした文献について検索し、それらについて検討した。その結果、施設間バリデーションの報告としては Spielmann らの 3 報のみであったことから、それらについて文献的にデータの信頼性、再現性、in vivo 結果との対応性等について検討した。

C. 研究結果と考察

C-1) 代替法の評価の手順について

本研究の目的は安全性評価のための動物実験代替法として報告されている試験法を客観的、科学的に評価することにより、その利点と問題点、限界を明らかにし、試験法としての妥当性の範囲を明らかにし、認定することにより、動物実験代替法の使用を促進することにある。この目的のために評価委員会と評価会議を組織した。

評価委員会は代替法について具体的に調査し、評価するための機関であり、代替法の評価および評価の対象となる試験法の専門家から構成した。一方、評価会議はより広い知識・経験・視野のもとで代替法を行政的な目的のための使用における妥当性について評価する。評価会議は臨床医師、統計の専門家、行政官、および厚生科学研究の班員、班友により構

成されている。評価委員会は提出された代替法の申請書を評価し、評価文書を作成し、試験法が特定の目的のために妥当とされた場合には厚生科学研究班に設置された評価会議に上げ、更に評価する。ここで申請された代替法が妥当とされた場合には公開のシンポジウムを開催し、広く意見を求め、その結果に基づいて最終評価を行う。

評価委員会の委員は平成13年度は光刺激性試験代替法を評価するとして、以下の委員を選考した。金子豊蔵（委員長：国立衛研 毒性部）、田中憲穂（副委員長：食品薬品安全センター 秦野研究所）、板垣 宏（資生堂 ライフサイエンス研究センター 安全性研究所）、今井弘一（大阪歯科大学 中央歯学研究組織培養実験施設）、大野泰雄（国立衛研：薬理部）、大森 崇（国立衛研 審査センター）、岡本裕子（コーセー 基礎研究所）、小島肇夫（日本メナード化粧品 総合研究所）、畑尾正人（資生堂 基盤研究センター 薬剤開発研究所）、若栗 忍（食品薬品安全センター 秦野研究所）

評価会議の委員は以下のとおり。大野泰雄（委員長：国立衛研 薬理部）、金子豊蔵（国立衛研 毒性部）、田中憲穂（食品薬品安全センター 秦野研究所）、豊田英一（日本化粧品工業連合会・技術委員会）、西岡 清（東京医科歯科大学医学部）、林 憲一（厚生労働省医薬局審査管理課）、溝口 昌子（聖マリアンナ医科大学皮膚科学）、宮地 良樹（京都大学大学院医学研究科）、森本雍憲（城西大学薬学部）、吉村 功（東京理科大学工学研究科経営工学）

評価する試験法については、バリデーションデータの蓄積、国際的な受け入れあるいは受け入れ見込みの状況、および我が国における必要性等を勘案して決定する。

C-2) 光毒性試験の評価結果について（添付資料1）

太陽光は地上の生物の生命の基盤となるものであるが、その強い紫外線は遺伝子を破壊し、強い熱線は気候を変動させ、環境に大きな影響を及ぼす。ヒトに対し光はしわ、角化症、毛細管拡張症、皮膚ガンなどを誘発する。一方、光は直接生体構成成分に作用して毒性を現すだけではなく、化粧品や皮膚塗布或いは体内に投与され体内に循環している薬物或いはその代謝物と反応し、毒性を起こすことが多い。例えば、キノロン系抗菌剤の内には光毒性を現す薬物が多くある。また、石鹼や洗浄剤に光毒性を示す物質が入っていたこともあった。

C-3) 光毒性の定義

光毒性とは光が原因となって起こる生体において不都合な作用全般を指す用語であるが、ここでは人間を含む動物が使用、摂取あるいは投与された薬物や化学物質等と光が相互作用を起こした結果生体に不都合な作用が現れる事象を教義の光毒性と定義する。このような光毒性は現れる生体影響をもとに光刺激性、光感作性、光遺伝毒性、光発がん性などに分類されるが、ここでは光、物質、生体組織が同

時に存在するときにおこる一次刺激反応であり、用量（濃度）依存的な応答として検出される光刺激性の代替法についてのみ調査した。

C-4) 光毒性誘発薬物

光毒性誘発物質には Psoralen のような植物や生薬成分や、コールタールの成分である acridine や anthracene のような産業生成物、抗菌剤、抗生物質やフェノチアジン系薬物など、様々な物がある。最近ではキノロン系抗菌剤である clinafloxacin や sparfloxacin のように光毒性が原因となって販売停止あるいは使用制限されたものもある。なお、in vitro で光毒性が示されたものが血中濃度等の関係で必ずしも in vivo で光毒性を示さない薬物もある。また、可視光で光毒性を現す薬物もある。また、より長波長領域で光照射による細胞毒性を現す薬物を利用してガンなどの治療への応用研究も広く行われている。

C-5) 光毒性発現機序

光吸収性物質は光線の照射により基底状態から励起状態に電子が遷移し、燐光、蛍光、熱あるいは振動エネルギーとして放出し、再び基底状態に移行するが、光毒性物質はその過程でラジカルを形成したり、charge transfer を起こし、細胞膜、DNA 等を中心に細胞全体を傷害することで生体に障害を与える。これらの光毒性反応には分子状酸素の関与が大きいことが知られている。一方、光吸収を示さない物質は直接光毒性物質になり得ない。

光毒性の見地から検討の対象となる光は UV-B、UV-A、可視光、赤外光に分けられる。これらの内、1 光子当たりのエネルギーは UV-B 領域の光が最も強く、分子中の電子を励起し、各種の化学反応を誘因し、結果として皮膚組織に障害を与え、紅斑をはじめとする生体反応を惹起する。一方、赤外線単位のエネルギーは相対的に低く、分子の振動や回転状態を変化させることはあっても、電子状態に影響することはなく、直接化学反応を誘因することはない。

この様な光毒性発現のメカニズムを踏まえて多様な in vitro 光毒性試験法が開発されている。これらは、主にスクリーニングを目的とした試験法とメカニズム評価に重点を置いた方法に大別されている。スクリーニングを目的とした試験法では、細胞や微生物等の致死や増殖阻害等を指標とした評価が主体であり、細胞の種類、培養形態や毒性の指標の異なる様々な試験法が評価されている。また、メカニズム評価に重点を置いた試験法では、光毒性の発現メカニズムの考察から光毒性反応の標的と想定される生体膜の損傷やタンパク質に対する作用を評価する試験法が報告されている。さらに、光毒性反応に対する分子状酸素の関与が高いことから、脂質の過酸化反応を評価する方法や発生する活性酸素種を化学物質で捕捉する方法等が報告されている。

これらの試験法のうち、3T3 NR 法が EU/COLIPA のバリデーションで光毒性試験代替

法としての妥当性が検討された。

C-6) 3T3-NR 法の評価

文献的情報に基づいて光毒性試験とその代替法について調査した。なお、*in vitro* の代替法を評価するための基準となる *in vivo* 光毒性試験法については、ガイドラインとして正式に認められたものは未だ存在していない。但し、経皮投与による試験法についてはモルモットを用いた森川らの方法(1975)を基礎とした方法が化粧品・医薬部外品製造申請ガイドブックに記載され、化粧品および化粧品原料の光毒性評価に広く用いられており、大卒のコンセンサスが得られている。動物を用いる新たな光毒性評価法としては OECD ガイドライン案が提案されている。この案は「Acute Dermal Photoirritation Screening Test」と「Acute Dermal Photoirritation Dose-Response Test」の2部から構成されている。動物福祉の観点から無用な試験の実施を避け、また強刺激性物質の試験を最小限にすることに重点が置かれている。

C-6-1) 3T3 NR 光毒性試験法一般について

in vitro で光毒性を評価する方法には単層培養細胞を用いる方法や培養皮膚モデルを用いる方法、溶血性試験、蛋白変成試験など様々な方法が試みられている。しかし、施設間バリデーションが実施されたものは Balb/c 3T3 細胞を用い、ニュートラルレッド取り込みを指標とする光毒性試験方法(3T3-NR 法)のみである。この方法は 96 ウェルプレートに播種した Balb/c 3T3 細胞を被験物質で 60 分間前処理後、50 分間光照射し、その後新鮮な培地に交換した、更に 24 時間培養した後、ニュートラルレッド取り込み法により細胞毒性を算出するものである。一般に、この 3T3-NR 法には次のような長所、短所があげられる。

長所：

- i) 試験法が比較的簡単である。
- ii) 細胞播種して結果が得られるまで3日という短期間で試験が終了する。
- iii) 96 ウェルプレートを用いるので、インキュベータのスペースをとらない。
- iv) マイクロプレートリーダーを用いて測定するので、測定が簡単である。
- v) 再現性の高い安定した結果が得られる。
- vi) バリデーションの結果より、OECD ガイドライン案では Balb/c 3T3 細胞を推奨しているが、原理的にはどのような細胞でも用いることができる。

短所：

- i) 太陽類似光の光源の種類によって波長特性が異なる為、化学物質との光化学反応や毒性として発現してくる生物学的な反応も変わってくる。そのため、ランプの波長特性を予め把握しておくと同時に、その試験条件下での細胞毒性の発現について十分な背景データをとっておく必要がある。

- ii) UV 測定器についても同様に、UV 強度を検出する為の波長ウィンドウがメーカーによって異なるので、絶対照度を測定する事が難しい。
- iii) 緩衝液に溶けないような被験物質については、正確なデータが得にくい可能性がある。
- iv) 現時点では代謝活性化の過程を含む光毒性試験が組めない。

C-6-2) 3T3-NR 法の施設間バリデーションについての Spielmann らの報告結果について

①バリデーションデータの質について

3T3-NR 法についての EU/COLIPA の施設間バリデーションの報告データの信頼性について Spielmann らの3つ文献報告から検討した。その結果、比較的データの質に関係する情報が記述されていた Phase II 試験の報告を除き、OECD で示された代替法のバリデーション基準(1996)を満足しているか否かを判断するために必要な情報が十分に提供されているとは言えなかった。なお、文献レベルでのバリデーション研究の質を評価する一つの方法として、データの質に関する記述がどこまでされているかをチェックするためのチェックリストを作成した。もちろん、このようなチェックリストを用いたとしても、文献のみによる質の検討には限界がある。別途、詳細なバリデーション情報を入手して再評価する必要がある。また、必要に応じて独自のバリデーションを行い、試験法の妥当性を確認することが望ましい。このバリデーションの規模と内容は事前に得られているデータの質の評価結果に依存している。

② 被験物質の選択について

評価の対象となった被験物質数は 44 化学物質であり、*in vivo* での光毒性の有無が明らかであったものとしては、紫外線吸収剤 10 種、香料 4 種、抗生物質・抗菌薬 8 種、抗炎症薬・鎮痛薬 3 種、その他の薬剤 11 種、その他の化学物質 4 種となり、計 40 種であった。紫外線吸収剤の比率が高いが、それ以外は比較的広い領域から選択されていて、被験物質の選択は適切であったと考えられる。しかし、被験物質の溶解性などの性状が 3T3-NR 法に与える影響について充分議論できるような被験物質の選択とはなっていないし、情報提供もなされていない。なお、プロトコルの範囲で溶解助剤を選択して得た判定結果は大きくは変動しなかった。

③ *in vivo* 試験結果との対応性について

ピボ試験結果との対応性として、我々は3つの研究のデータをまとめて、ピボ(ヒト、動物)と予測モデル(PIF、MPE)の関係を検討した。組み合わせにより異なるが、評価した被験物質は、26~38であった。評価指標として、感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率を求めた。この結果、ヒト試験を優先した場合のヒトまたは動物の結果と PIF の関係は、感度 88.5%、特異度 91.7%、陽性予測力 95.8%、陰性予測力 78.6%、一致率 89.5% であり、MPE では、感度 90.5%、特異度 90.0%、陽性予測力 95.0%、陰性予測力 81.8%、一致率 90.3%

と全体として高かった。この結果は、3T3 NR 法は、化学物質の光毒性ポテンシャルを予測する上で有効な試験法であると思われる。特にヒトで陽性とされている物質を陽性する陽性検出力は PIF で 95.8%、MPE で 94.7% と高い値を示したことは本試験法をスクリーニング法として用いることの妥当性を示している。また、2つのパラメーター (PIF、MPE) を併用することにより幅広い薬物について光毒性の程度についての数値データが得られ、評価に有用であると思われた。なお、これらのバリデーション研究で用いられたデータは多くはなく、被験物質の溶解性の影響等について検討すべき課題もある。

④ 3T3-NR 法の信頼性について

信頼性については、報告により記載が様々であった。施設内再現性については、UV Filter に関する Phase III 研究で評価することが望ましいと思われる。この研究は4つの施設で20物質を評価しており、報告には各施設で行われた2回の試験について個々の用量反応曲線から測定値から算出された PIF、MPE の値がそれぞれ記載されている。2つの PIF 値の比でみた場合、3倍を越える物質は、のべ80物質中わずか4物質であり(80物質中1施設1物質が1回しか測定されていない)、再現性は悪くなかった。

施設間再現性については、Phase II 研究と UV Filter 研究で評価がされているが、両者で評価方法は異なっている。Phase II 研究では、得られたデータを復元抽出することにより用量反応曲線を繰り返し再現し、その変動を評価する CV (classification variability) という指標が導入され評価されている。11施設で30物質を評価した Phase II 研究では、CV の最高値は、PIF で 18.8%、MPE で 20.0% となっており、それほど大きな値とはなっていない。一方、UV Filter に関する Phase III 研究では、測定されたデータを施設間、実験間、繰り返しの3つの要因に分け、変動係数が評価指標とされている。この係数も CV (coefficients of variation) として標記されているが、Phase II 研究の CV とは本質的に異なる指標である。UV Filter 研究では、施設間と施設内の CV の比較がされており、一般に施設内の値に比べ、施設間の値の方が大きい (PIF、MPE のいずれも最高値は約 200% であった) という結果が得られている。物質によっては、PIF や MPE の値が10倍以上異なるものもあった。したがって、PIF や MPE の値での施設間再現性は低いと思われる。ところで、これらの指標とは離れて、光毒性の判定の食い違いに注目した場合、施設により食い違いが生じた被験物質の数は、11施設で評価された Phase II 研究では、判定不能とされた1物質を除いた29物質中 PIF で13物質、MPE で11物質である。このうち、3施設以上食い違ったのは PIF で3物質、MPE で1物質であった。また、4施設で評価された Phase III 研究では、判定の食い違いが生じた被験物質の数は、20物質中 PIF で4物質、MPE で3物質であった。以上の結果から、この結果は、Balb/c 3T3 細胞を用いた NR 法は、光毒性の判定の施設

間再現性という観点からは、再現性を有する試験法であると思われる。

即ち、施設内の再現性は高いが、施設間の再現性は高いとは言えない。このバラツキが光毒性の予測性に大きな影響を与えている場合は少ないが、施設により誤ったデータが蓄積される可能性もある。また、本来、施設毎の生データを解析することにより、再現性を調べることが常道であり、これがもっとも重要な点であると考えているが、今回は文献結果からの解析であり、その評価に限界があることを認識する必要がある。

⑤ 総合評価

以上より、文献上に記載された要約指標の値に基づき総合的に判断した場合、3T3-NR 法は、感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率は 90% 前後と高く、化学物質の光毒性ポテンシャルを予測する上で有効であり、かつ結果の判定の観点からはある程度の施設間再現性を有する試験法であるといえるだろう。

ただし、この結論はあくまでも文献上からの評価である。我々の検討では生データやバリデーションにおけるデータ検討会や management 会議の議事録等を得ているわけではない。したがって、データの質を十分に確かめることはできていない。したがって、文献に試験結果が正しく反映されているか否かについての確認はできていない。また、3つの文献で評価された物質数は決して多くはなく、偽陽性が高めになる可能性があることを考慮すると、本方法のみで光毒性の有無を判定することにはリスクがあり、この試験法について更に検討する余地があると思われる。

よって、我々はこの試験法を代替法として、我が国で導入する場合には、大規模ではないにしてもこの結果を確認することを目的とした、質の高いデータに基づくバリデーション研究を実施する必要があると考える。

C-6-3) 標準的試験法について

Balb/c 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド取り込み法による光毒性試験はヒトや動物の光毒性データとの対応や施設間での再現性も良く、光毒性の評価に有効である事が示された。一方、使用する細胞の種類や光源等、必ずしもガイドライン案で示された方法で試験が可能であるとは限らない。そこで、基本的にはこの OECD のガイドライン案に準じた試験法を、データの信頼性を損なわないと思われる範囲で照射条件や用いる細胞株、試験の方法などに自由度を持たせて改変した方法を標準的試験法として提案した。

C-6-4) 3T3-NR 法の受け入れに関して

新しい試験法を行政的に受け入れる際には試験法の普及性、若干の修正に対する頑健性、教育訓練及び専門性の必要性、必要な装置や材料の入手の容易さ、コストとそれに見合う有用性、試験法導入に要する時間、動物愛護の立場から 3Rs の面からの妥

当性等について考慮する必要がある。今回検討した 3T3-NR 法はこれらの点でほぼ満足できるものである。この方法は動物実験代替法の側面以外にも、時間的、経済的な面から有利な点も多く、本実験方法がリスクとベネフィットのトータルバランスの点からも優れたものであると考えられる。

今回の光毒性試験の導入で大きな問題は光源である。どのような光源が妥当であるかについてはさらに検討を加えなければならない。光毒性試験を普及させるためには、色々なメーカーの光源についてデータを蓄積する必要がある。

なお、光毒性試験は化粧品のみならず、医薬品や医薬部外品、また、一般化学物質の安全性評価に必要である。また、局所作用のみならず全身的作用、複合作用や代謝による影響などについても十分配慮する必要も大きい。そのための諸因子を含めた幅広い *in vitro* 実験方法を開発する必要がある。

C-6-5) その他の問題点

- ① *in vivo* において光刺激性発現の場は皮膚であることを考慮すると、皮膚細胞の活用や測定指標（ニュートラルレッドの取り込み）の見直しが必要となるかも知れない。
- ② 評価パラメーターである PIF や MPE の cut-off 値の妥当性については実際にはバリデーションが実施されていない。これについては今後のデータの蓄積により再検討が必要となるかも知れない。
- ③ 代謝活性化については検出感度向上の観点から将来検討すべきと考えられる。
- ④ bergapten (bergamot oil 中の香料成分)等の香料は本 3T3 NRU 法が香料に対して感度が低いことが報告されており、その原因の解明とそれらの光毒性を正確に評価する新たな *in vitro* 試験法の開発が必要である。
- ⑤ 難溶性物質や製品を評価可能な 3次元皮膚モデルの使用や他の *in vitro* 試験との battery が考えられるが、今後の課題である。

D) 結論

3T3-NR 光毒性試験法は *in vivo* 結果との対応が良く、被験物質の光毒性の有無を評価するのに有効であると思われた。しかし、文献的情報のみではデータの質や再現性が明らかにはできない。また、試験法を若干変更した場合の頑健性等について不明確なところもある。従って、我が国においても少数の被験物質を用いて施設間バリデーションを行い、試験法の再現性や *in vivo* との対応性など、試験としての妥当性について確認する必要があると考える。また、本試験法では感度の低い物質群の存在することも報告されており、それらについて更に基礎的な検討の推進が必要である。また、公開のワークショップ等を開催し、広く意見を求めることも必要であろう。

なお、現在、Dr Spielmann より詳細なバリデー

ション情報を入手中であり、文献のみで確認できなかった点について更に検討する予定である。

参考文献

- 1) Spielmann et al. (1994) EEC/COLIPA Project on *In Vitro* Phototoxicity Testing: First Results Obtained with A BALB/C 3T3 Cell Phototoxicity Assay, *Toxicology in Vitro* 8 793-796.
- 2) Spielmann et al. (1998) The International EU/COLIPA *In Vitro* Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1 :The 3T3 NRU Phototoxicity Test, *Toxicology in Vitro* 12, 305-327.
- 3) Spielmann 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.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大野泰雄、動物実験の意義、新薬開発評価の基礎と臨床 2. 新医薬品に求められる臨床的特性、その試験研究手法と表現、編集 新薬開発評価の基礎と臨床研究会、監修栗原雅直、デジタルプレス p343-347、2001.5.30

2. 学会発表

1. 大野泰雄、日本動物実験代替法学会ディベート、4. 眼粘膜刺激性試験 1) *in vitro* の立場から (2001.8)筑波学園都市
2. Yasuo Ohno and Naomi Motoji¹⁾, Ethics and ethics committee for use of human tissue to research purpose, (日本薬理学会総会シンポジウム 2002.3) 1)生体科学研究所
3. 大野泰雄、動物実験代替法、第132回日本獣医学会学術集会(2001.10.7) 盛岡
4. Yasuo Ohno, ICH guidelines, Implementation of the Three Rs: Incorporating Best Scientific Practices into the Regulatory Process. ICLAS-CCAC International Symposium on Regulatory Testing and Animal Welfare. International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)/Canadian Council on Animal Care (CCAC)主催「行政試験と動物福祉についての国際シンポジウム (6月20日—6月24日)」(ケベック)

G. 知的所有権の取得状況

無し

Balb/c 3T3 細胞を用い neutral red 取り込みを指標とした
光毒性試験代替法の評価について

研究代表者

大野泰雄 (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、薬理部)

研究協力者：

板垣 宏 (資生堂 ライフサイエンス研究センター安全性研究所)

今井弘一 (大阪歯科大学 歯科理工学講座)

大森 崇 (国立衛研 審査センター)

岡本裕子 (株) コーセー 研究本部)

金子豊蔵 (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、毒性部)

小島肇夫 (日本メナード化粧品 総合研究所)

田中憲徳 (食品薬品安全センター 秦野研究所)

畑尾正人 (資生堂 基盤研究センター 薬剤開発研究所)

若栗 忍 (食品薬品安全センター 秦野研究所)

Balb/c 3T3 細胞を用い neutral red 取り込みを指標とした 光毒性試験代替法の評価について

目次

第 1 章 序	1
1-1) 序	
1-2) 本プロジェクトによる代替法評価の意図	
1-3) 代替法の評価の手順	
1-4) 評価する試験法について	
第 2 章 光毒性試験代替法について	3
2-1) 光毒性試験代替法を選択した理由	
2-2) 光毒性の定義	
2-3) 光毒性発現機序	
2-4) 光毒性誘発薬物	
第 3 章 In vivo 光毒性試験法について	14
3-1) はじめに	
3-2) 動物を用いる試験法における要因	
3-3) 経皮投与による試験法	
3-4) 経口投与や腹腔内投与による試験法	
3-5) その他の投与方法による試験法	
3-6) ヒトを用いる試験法	
3-7) おわりに	
第 4 章 光毒性試験代替法について	23
4-1) はじめに	23
4-2) Balb/c 3T3 細胞を用い、ニュートラルレッド取り込みを指標とする光毒性試験方法(3T3-NR 法)の評価	26
4-2-1) 3T3-NR 法を選択した理由	26
4-2-2) バリデーションデータの評価 (バリデーションとしての妥当性、結果の従来法との 相関性、統計解析の妥当性)	28