

20020102¹⁷A (1/2)

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大野泰雄

平成15（2003）年3月

目 次

I. 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	1
大野泰雄	
II. 分担研究報告書	
1. 光毒性試験代替法の文献的評価	8
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結果報告	
2. 「代替法についての情報収集と解析、代替法の評価」	153
豊田英一	
(資料 1) Commission Directive 2000/41/EC, June 19, 2000; Official Journal of the European Communities, L145, 20/06/2000, P0025-0026	
(資料 2) EUROPEAN PARLIAMENT, P5-TA(2002)0292,	
(資料 3) Council documents, 9843/02, 17/06/2002	
(資料 4) Council Press, 11584/02(Press 255), 26/08/2002	
(資料 5) PE-CONS 3668/2002, 08/01/2003	
(資料 6) EUROPEAN PARLIAMENT, A5-0001, 08/01/2003	
(資料 7) EUROPAL Daily Notebook, 15/01/2003	
(資料 8) Council Press, 5433/03(Press 13), 27/01/2003	
(資料 9) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council, February 27, 2003; Official Journal of the European Union, L66, 11/03/2003, P0026-0035 及び日本語訳文	
(資料 10) CTPA News update, February 6, 2003	
(資料 11) CTPA News update, March 3, 2003	
(資料 12) ATLA, 30, 261-262 (2002)	
(資料 13) FRAME News, Issue No.55, August 2002	
(資料 14) SCCNFP/0546/02, final June 4, 2003, Memorandum concerning of the actual status of alternative methods to the use of animals in the safety testing of cosmetic ingredients.	
(資料 15) Federal Register Vol.67, No.147, 31/07/2002, p49706-49707	
(資料 16) The Rose Sheet, Vol23, No.31, p8 (2002)	
(資料 17) ATLA, 30, Suppl 2, 23-32 (2002)	
(資料 18) ATLA, 30, Suppl 2, 227-236 (2002)	
(資料 19) The Rose Sheet, Vol23, No.49, p32 (2002)	
3. 第4次 OECD guideline, skin absorption : <i>in vitro</i> method (案) の評価 -TEWL および抵抗値を用いた皮膚 Integrity 試験の妥当性	310
森本 雅憲	
4. 3次元ヒト皮膚培養モデルを用いた経皮吸収試験に関する研究	318
大野泰雄、安藤正典、徳永裕司	
5. 光毒性試験法の研究室間小規模バリデーション	324
田中 憲徳	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	341
IV. 研究成果の刊行物・別刷	342

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

EU/COLIPA のバリデーション結果に基づいて作成された 3T3 細胞を用い neutral red 取り込みを指標とする in vitro 光毒性試験法(3T3-NR 法)について評価委員会及び評価会議での二段階評価を行った。また、バリデーション結果を施設毎の個別データから確認するとともに、公開シンポジウムを開催し、評価結果案を報告し、ここで得られた意見・情報に基づいて最終評価文書をまとめた。即ち、3T3-NR 法は評価結果の再現性や in vivo 結果との対応性が良いと評価された。但し、不溶性物質への適用が困難であることや新たな光源を使用する場合は、その妥当性を確認する必要があることなど幾つかの問題点認識して使用しなくてはならない。

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 化粧品指令の第 7 次改正に関し、EU 議会と EU 理事会は合意に達した(EU 官報 2003,3,11)。この改正で、幾つかの例外を除き、化粧品及び化粧品原料の安全性評価のための動物実験の禁止と動物実験を実施した化粧品および原料を配合した化粧品の販売禁止時期が 2009 年 3 月と定められた。ECVAM や ICCVAM はバリデーションされた代替法の相互認証や代替法の共同バリデーションに向けての相互協力をはじめた。OECD では皮膚感作性試験として LLNA 法を承認した。また、皮膚腐食性試験、光毒性試験及び皮膚吸収性試験の代替法が専門家会議で承認され、近くガイドライン化として公示される見込みである。

皮膚標本損傷の指標である経皮的水分損失 (TEWL) と皮膚透過性との関係を調べたところ、TEWL は損傷の程度は反映するが、物質透過性のバラツキ以上に大きなバラツキを示すことが示された。電気抵抗値は高度の損傷以外は信頼性が低いと考えられた。

光毒性試験代替法の 4 機関による小規模バリデーションを実施した。その中間結果では、Dr Honle の光源を用いた場合、陽性物質として用いた 3 物質はどの機関でも明らかに陽性結果が得られた。但し、弱い光毒性物質である dithionol と amiodarone HCl はそれぞれ 1 施設で疑陽性を示した。なお、Dr Honle 以外の 4 社の光源を対比して用いたが、CPZ について Dr Honle の光源を用いた場合とほぼ同様の結果を得た。

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
田中憲穂 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

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

行ってきており、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. 光毒性試験代替法の評価

評価委員会は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、および統計の専門家により構築した。評価委員会では 3T3 細胞を用い neutral red 取り込みを細胞毒性の指標とする光毒性試験(3T3-NR 法)について、EU/COLIPA の3次にわたるバリデーション結果報告¹⁻³⁾を基に一次評価試験を行った。この結果を研究班以外に臨床医師、毒性専門家、統計専門家、行政担当者も含む評価会議で二次評価した。ここで得られた意見を基に評価委員会で評価文書を修正した。また、論文掲載データの信頼性、結果の再現性、in vivo との対応性については、バリデーションの中心機関であった ZEBET の Dr Spielmann より第二次および第三次バリデーションに関する protocol, SOP, および全てのバリデーション参加機関の個別生データを入力し、検討した。更に、提供されたデータを用いた独自の解析および被験物質の in vivo 光毒性の有無を確認するために文献調査を行った。これらの結果を評価会議委員に報告し、評価文書を修正した。次いで公開シンポジウムを開催し、その結果に基づき、評価文書を再度修正し、評価会議の承認を受け、最終評価文書とした。

なお、評価委員会および評価会議の委員構成については添付の評価文書を参照されたい。

B-2 海外における代替法の現状の調査

いくつかのホームページ (SCCNFP, OECD, ECVAM, ICCVAM など) を定期的に代替法についての情報を検索するとともに、EU については同地域の化粧品工業会である COLIPA、米国については CTFA との連繋を通じて情報収集を行った。その他、代替法の承認状況等については、専門学会の会誌やニュースレターも参考とした。

B-3. 皮膚吸収性試験

雄性ヘアレスラットをペントバルビタールで麻酔し、角質層を傷つけないよう注意しながら、腹部皮膚を剃毛した。剃毛後、D-Square (CuDerm Corp.) を用いて、約 50g/cm² の圧力下、ストリッピング(S)を行った。指の腹で軽くテープを押さえつけることによる通常の S も行った。なお、このときの圧力は 5~10 g/cm² であった。S により角質層の付着したテープは黒色の台紙に貼り付け、剥離の様子を観察した。ラットを恒温・恒室に保ったアクリル製恒温箱に搬入し、Tewameter TM210 (Courage+Khazaka, ケルン) を用い、速やかに TEWL を測定した。測定後、ラット腹部皮膚を摘出し、有効拡散面積 0.95cm² の 2 チャンバー拡散セルに挟み、薬物の透過性を検討した。また、電気抵抗を測定した。

B-4. 三次元皮膚培養細胞モデルを用いた皮膚吸収性試験

三次元培養皮膚モデルは 6 穴マイクロプレートに入った倉敷紡績 (株) 製の EPI-606 と 2 4 穴マイクロプレートに入ったグンゼ製の Vitrolife-

Skin 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、各種薬物の透過実験を行った。

B-5. in vitro 光毒性試験

4 施設の協力を得た。照射光源としては Dr Honle 社のメタルハライドランプ SOL500 を含む複数の光源を用いて、試験結果を比較した。SOL500 以外の光源として、Lab B では UVA 光源として Vilber 社のトランスイルミネーター、Lab A と Lab C では WACOM 社のキセノンランプ、Lab D では ATLAS 社と SERIC 社のキセノンランプを使用した (Lab B の Trans-illuminator (Vilber Lourmat) 以外は太陽類似光)。また、照射量測定には Dr Honle 社の UV 検出器を使用した。被験物質としては吸収波長の異なる 5 種の既知光毒性物質 (Anthracene, bithionol, amiodarone HCl, chrolhexidine 2HCl, bergapten) を用いた。また、対照物質としては、Chlorpromazine HCl (CPZ, positive) と sodium lauryl sulfate (SDS, negative) を用い、アールの平衡塩緩衝液 (EBSS) に溶解して使用した。

試験は、Dr Honle の照射機器を用いる場合は、OECD ガイドライン案 (March 15, 2002) に従い、Balb/c 3T3 細胞 (A31-1-1 株)、培地は DMEM に 10% FCS を加えて用いた。光照射量は Dr Honle の場合は 5 J/cm²、他の光源ではその光源にあった最適条件に合わせることにし、照射時間は Dr Honle 社の機器以外は、それぞれの機器の最適暴露時間によった。

(倫理面への配慮)

本実験は動物実験代替法の開発を目的としており、動物福祉の向上に資するものである。また、可能なものについては過去の動物実験データを用いた。動物を用いる実験では麻酔薬を用い、動物の苦痛が最小限になるようにした。

C. 研究結果と考察

C-1. 動物実験代替法の文献的評価

文献に記載された情報のみではデータの質や再現性を十分に明らかにすることはできなかった。しかし、ZEBET の Dr Spielmann より入手したデータファイルを用いた検討により論文^{2, 3)}で示された結果の確認ができた。また、バラツキや誤評価の原因が主に被験物質の溶解性や技術的な問題によると推定された。また、幾つかの施設で偽陰性とされた furosemide は急性の光刺激性を検討するヒトパッチテストで陰性であること、また、臨床では光アレルギーによる障害であることが臨床医師により示され、急性の光刺激性については必ずしも偽陰性としなくとも良いと思われた。

評価委員会、評価会議、及び公開シンポジウムでの検討の結果として、論文及びデータファイルの両方を用いた解析の結果、3T3-NR 光毒性試験法は、以下に述べるような限界があるが、Table 1 に示したように、in vivo 結果との対応が極めて良

く、被験物質の光毒性の有無を評価するのに有効である、と結論された。

以下に本光毒性試験法の主な限界を例示する。

- ①光感作性を検出するための方法ではなく、光刺激性を評価するための方法である。
- ②適切な溶解溶媒のない物質や培養液と混和しても直ぐに分離してしまう物質への適用は困難である。また、着色物質では正しい評価が出来ない場合がある。揮発性の高い物質についても注意が必要である。
- ③UV-B は内因性光増感物質と反応して細胞毒性を起こすため UV-B 吸収が原因となる光毒性物質の作用はとらえ難い。
- ④光毒性発現に代謝活性化を要する物質の評価には適さない。
- ⑤3T3-NR法で光毒性物質と評価された物質を使用する際の適切な使用用量や濃度についてはin vivo試験等で確認する必要がある。

なお、3T3-NR 法には、技術的な理由によって誤評価やバラツキが認められる事例が認められたことから、細胞毒性試験法と光毒性試験の特性を良く理解した上で訓練を十分に受けた者が試験に利用しなければならない。また、原因不明の誤評価もわずかであるが認められたこと及び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、今後もそれらの原因について基礎的な検討を進めていく必要がある。更に、光源の変更など、試験法を若干変更した場合の頑健性等については不明確なところもある。このような場合には少数の被験物質を用いて試験法の妥当性について確認しておく必要がある。

なお、資生堂より酵母と赤血球を用いる光毒性試験が提案された。これは不溶性物質への適応性の良いことから、平成15年度に詳細な評価を行うとされた。

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

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盛り込んだEU化粧品指令第6次改正の施行延期の期限(2002年6月30日)⁴⁾に関して、EU議会とEU閣僚理事会は第7次改正案を承認し⁵⁾⁻⁷⁾、官報(Official Journal of the European Union)に3月11日付けで掲載された⁸⁾。この化粧品指令第7次改正の基本的骨子は、以下の通りである⁸⁾⁻¹⁰⁾。

- 化粧品及び化粧品原料のEU域内の動物実験禁止
 - ・化粧品：加盟国の国内法施行後に即時禁止
 - ※猶予期間は最大18ヶ月(2004年9月)
 - ・原料：代替法がある場合は加盟国の国内法施行後に即時禁止、完全な動物実験禁止はEU化粧品指令発効の6年後(2009年3月)。
- 動物実験を実施した製品または動物実験を実施した原料を含む製品のEU域内の販売禁止(EU域外での動物実験がなされた製品及び原料も含む)

・代替法がある場合は、加盟国の国内法施行後に即時禁止

※猶予期間は最大18ヶ月(2004年9月)

・完全な販売禁止は、化粧品指令発効の6年後(2009年3月)以降

例外：反復毒性、生殖毒性、薬物動態試験については2013年3月からの販売禁止

一方、ECVAM の諮問委員会である ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)は新たな安全性試験代替法として、胎児毒性のための胚性幹細胞試験、胎児毒性のための全胚培養試験、及び胎児毒性のためのマイクロマス試験を承認した(2002年5月)。

C-2-2 米国における代替法開発の動向

ICCVAM は推奨する in vitro 皮膚腐食性試験として EPISKIN と EpiDerm 試験、及び Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance Assay (TER 法)を官報(Federal Register)¹¹⁾に公表した。これらの試験法の評価には、欧州の ECVAM がバリデーションを実施して諮問委員会の ESAC が承認した方法については、ICCVAM のピアレビューパネルによる評価プロセスを省略して追認する新規導入の評価促進プロセスが適用された。なお、最終報告書では in vitro で陽性の結果が得られた場合は動物試験を省略することができるが、in vitro で陰性の結果が得られた場合は in vivo での確認試験が必要であるとしている^{12,13)}。また、ICCVAM は ECVAM と情報交換を持ち、お互いが承認した試験法については、完備型の評価を実施しない評価促進プロセスを適用する。また、急性全身毒性を評価するための細胞毒性試験については共同バリデーションを実施中である^{14,15)}。

2002年11月8-9日にシカゴで開催された米国とEUの産業に係わる閣僚会議において、EUにおける化粧品指令第7次改正に伴う動物実験実施製品の販売禁止に向かう欧州の動向に対応するために、動物実験代替法のパイロットプロジェクト設立が化粧品関連グループより推奨された。この会議での化粧品関連グループの提案は、米国 ICCVAM 及び欧州の ECVAM がバリデーションに使用している基準の連携、もしくは相互認証を求め、さらに早い時期での情報交換、これら2つの評価機関によりバリデーションされた代替法の相互受容、そして代替法研究に向けての相互協力を求めるものである¹⁶⁾。

C-2-3 OECD の動向

今年度は、皮膚感作性試験として、LLNA 法が Reduction、Refinement を考慮した試験法として正式に認められた(OECD ガイドライン 429)。また、in vitro 光毒性試験ガイドライン 432、in vitro 皮膚腐食性試験ガイドライン 430 (Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test)、in vitro 皮膚腐食性試験ガイドライン 431 (Skin Corrosion: Human Skin Model Test) および in

vitro 経皮吸収試験ガイドライン 428 については 2002 年 5 月末の専門家会議で承認され、近くガイドラインとして通知される見込みである。

急性経口毒性試験に関しては、少数の動物を用いる試験法の利用を促進するため、多数の動物を用いる急性経口毒性試験ガイドライン 401 が、2002 年 12 月に OECD ガイドラインから削除された。

C-2-4 日本における代替法開発の動向

日本における安全性試験代替法のバリデーションレベルでの研究に関しては、我々の研究以外では日本動物実験代替法学会が 3 次元皮膚モデルを用いる皮膚刺激性試験代替法の施設間バリデーションの結果を解析中である。また過去に提案された注射剤の細胞毒性試験に関して、バリデーションが実施可能か否かを検討中である。

C-3) 皮膚吸収性試験

経皮的水分損失 (Transepidermal water loss : TEWL) および皮膚電気抵抗値の測定は化学物質 (薬物など) の皮膚透過性試験に際し、皮膚の integrity を保証するための指標として用いられている。前回の報告において、TEWL の測定値は水溶性薬物の透過性を反映するものの、脂溶性薬物の透過性とは相関しないことが示唆されていた。そこで、今回は、このような現象を理論的に解明することを目的に、TEWL の異なる種々程度の角質剥離皮膚および極性の異なる 4 種薬物を用いて *in vitro* 皮膚透過実験を行った。また、同時に皮膚抵抗値もモニターした。その結果、角質を除くためのストリッピング (S) をしない場合、すなわち、intact 皮膚の TEWL はバラツキが小さく、再現性が見られた。しかし、一定の圧力 (50g/cm²) で 5 回と 15 回の S を行った場合の TEWL に有意差はなく、5 回のときは特に TEWL 値に大きなバラツキを伴った。強い圧力で角質層を剥離した場合、水平方向に対する不均一な角質層の除去が起こることにより、最も水溶性の強い物質である水の透過性を反映する TEWL のバラツキが大きくなることになると思われた。一方、完全に角質が除去された 15 回の S ではバラツキは小さくなる。なお、5 回の S のときの物質透過性のバラツキが変動係数で 0.8%~9.7% であるものが、TEWL では 60% にも達するのは、TEWL 測定バラツキには、さらに別の因子が関与する可能性を示唆するものであり、TEWL をヘアレスラット皮膚の障害の程度を評価する指標として用いるのには、問題が残る。

一方、角質の損傷のもう一つの指標である 1/R (電気抵抗) は Intact と 5 回 S でほとんど差がなく、15 S で大きく上昇した。このことから、1/R も皮膚の障害の程度を評価する指標として不向きであることが示唆される。

一方、透過係数 P は全ての薬物で S 回数が増加するに従って高まり、その様子は Intact << 5 S < 15 S となり、5 回の S でほとんどの角質

層は除去されているものと考えられた。実際、5 回以降の S では、テープに付着する角質層はほとんどなく、物質透過の実験結果を支持する結果であった。そこで、前回報告した実験の剥離条件である、セロテープを極めて軽く付着させて除去する方法も同様に試みた。その結果、12 層目まではむらのない剥離が観察され、ヘアレスラットの角質層はほぼ 15 層であると考えすることに問題はなく、強い圧力で剥離すると、むらのある剥離・複数層の除去が起こるものと思われた。本実験より、物質の透過性は角質層のダメージに呼応して変化し、水溶性であるほどダメージによる透過性上昇の大きいことが明らかとなった。

C-4 三次元皮膚培養細胞モデルを用いた皮膚吸収性試験

最近、皮膚ケラチノサイトを用いた皮膚 3 次元培養皮膚モデルが我が国でも簡単に入手できるようになり、それらの製品の品質面あるいは堅牢性の面での評価も向上している。そこで、我々は、ヒトあるいは動物由来の皮膚の代替法として、皮膚 3 次元培養皮膚モデルを用い、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。平成 13 年度は皮膚 3 次元培養皮膚モデルである TESTSKIN LSE High および Vitrolife-Dermis の 2 種類のモデルを用い、*in vitro* 経皮吸収試験への適応性について検討し、多くの場合、これらのモデルでの結果が抽出皮膚での結果と対応することを示した。今年度は皮膚 3 次元培養皮膚モデルである EPI-606 および Vitrolife-skin の 2 種類のモデルを用い、*in vitro* 経皮吸収試験への適応性についての評価を行った。その結果を Table 2 に示したが、モルモット抽出皮膚での結果との対応は良くなかった。EPI-606 の場合、脂溶性の高い薬物では比較的良く相関したことから、培養皮膚の強度増すために裏打ちのために用いたポリカーボネート膜が指標物質の透過に影響を及ぼしていることが示唆された。Vitrolife-skin の場合、コラーゲン膜中で培養され、3 次元培養皮膚モデルを構築したものであるが、コラーゲン膜そのものの強度が低く、透過実験中での膜の破損が見られた。3 次元培養皮膚モデルの強度を上げるため、トランスサージカルテープを用いて見たが、そのテープの透過指標物質の透過速度に対する律速が大きく、細胞層透過性の検討に使用できなかった。

C-5) *in vitro* 光毒性試験

7 種の化学物質を用いて、OECD ガイドラインの条件下で実施した場合の試験結果について、ラボ間での再現性を評価した。また、OECD のガイドライン作成の基礎データに用いられた光源のメタルハライドランプ (SOL500、Dr H nle 社) の結果と、それぞれの機関で使用しているメタルハライドランプ以外の光源を用いた場合との毒性反応の

特性を比較し、異なる照射光源によって得られた結果を比較評価した。

その結果、Dr Honle を光源として用いた場合、Table3 に示したように、陽性物質として知られている anthracene、chlorpromazine HCl (CPZ) および bergapten はどの機関でも明らかな陽性結果が得られた。一方、弱い光毒性物質である bithionol と amiodarone HCl ではそれぞれ1施設が疑陽性となった。一方、陰性対照の2物質のうち、SDS では全ての機関において明らかな陰性の結果が得られたが、chlorhexidine 2HCl は2機関で明らかな陰性、2機関で疑陽性の結果を示した。なお、再現性の得にくい物質にあっては施設内でも、試験ごとに得られる値がずれる場合があったが、数回の試験を行う事により予測性は上がるものと思われた。また、試験施設ごとの IC50 値に差が見られたが、PIF 値による最終的な判定結果には大きな変化はなかった。なお、同一施設内での再現性においても、施設によっては試験の度ごとに振れる場合もあった。これらは、実験者の技術やその習熟度に起因する事も考えられた。

一方、照射光源の違いによる光毒性試験の結果に関しては、化学物質としては CPZ のみのデータではあるが、WACOM 社、SERIC 社および ATLAS 社のキセノンランプ、および UVA 光源である Vilber 社のトランスイルミネータを用いて得られた結果は、いずれもほぼメタルハライドランプの結果に近似した値を示した。即ち、その施設での背景データと試験条件の精度が確保されていれば、照射光源を変えても問題はないと考えられるが、照射機器の条件設定に関しては更に検討を要する。しかしながら、本項での比較は 302nm に吸収波長を有する CPZ のデータのみであり、他の化学物質での比較では結果が異なる可能性もある。また、OECD のガイドラインに示す陽性対照物質である CPZ の示す許容値については、メタルハライドランプを用いた場合でも、その許容範囲内に収まらない場合もあり参考程度として理解すべき事、そして、その施設内での背景データがむしろ重要であると考えられた。

結論

- 1) 3T3-NR 光毒性試験代替法は被験物質の制限など、幾つかの問題があるが、再現性や in vivo 結果との対応が良い方法であることが評価委員会、評価会議および公開シンポジウムを通じて認められた。
- 2) 動物実験を実施した原料を配合した化粧品の販売禁止開始に最終期限を設けた EU 化粧品指令第7次改正が、EU 議会および EU 理事会で承認され、3月11日付けの官報に掲載された。このような中で、ECVAM や ICCVAM では、代替法開発をこれまで以上に促進すべく、バリデーショナルな代替法の相互認証や代替法の共同開発に向けての相互協力の流れが生じてき

た。OECD においても皮膚感作性試験として LLNA 法がガイドライン化され、皮膚腐食性試験、光毒性試験及び皮膚吸収性試験が専門家会議で承認された。なお、動物実験代替法の開発と利用の促進を図るためには、本邦においても、ECVAM や ICCVAM に匹敵する本邦独自の、行政認知の代替法評価機関を設置し、ガイドライン化へと結びつけるシステム作りが急務であると考えられる。

- 3) ヘアレスラット皮膚の Integrity の指標として TEWL を用いると、5回程度のストリッピングによる損傷がある場合には、そのバラツキの範囲内に Intact 皮膚の TEWL 値が含まれるため、傷のある皮膚を無傷の皮膚とみなす可能性があり、この皮膚を用いて透過試験を行うと、とりわけ水溶性物質の透過性について、著しく誤った結果を得ることになる。
- 4) 3次元皮膚モデルである EPI-606 および Vitrolife-skin を皮膚吸収性試験代替法として用いるのは適切では無い。
- 5) 光毒性試験の小規模バリデーショナル試験の結果、新たに設定された OECD のガイドラインについては、ほぼ満足する試験プロトコールである事、また使用する光源の波長特性を理解し十分な背景データを基準にすれば従来の光源でも適用可能と考えられる。

E. 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.
- 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.
- 4) Commission Directive 2000/41/EC, June 19, 2000; Official Journal of the European Communities, L145, 20/06/2000, P0025-0026 (添付資料-1)
- 5) PE-CONS 3668/2002, 08/01/2003
- 6) EUROPEAN PARLIAMENT, A5-0001, 08/01/2003
- 7) EUROPAL Daily Notebook, 15/01/2003
- 8) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council, February 27, 2003; Official Journal of the European Union, L66, 11/03/2003, P0026-0035 及び日本語訳文
- 9) CTPA News update, February 6, 2003

- 10) CTPA News update, March 3, 2003
 11) Federal Register Vol.67, No.147,
 31/07/2002, p49706-49707 (添付資料-15)
 12) The Rose Sheet, Vol23, No.31, p8 (2002) (
 13)http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epid
 erm.htm
 14) ATLA, 30, Suppl 2, 23-32 (2002)
 15) ATLA, 30, Suppl 2, 227-236 (2002)
 16)The Rose Sheet, Vol23, No.49, p32 (2002)

F. 研究発表

1. 論文発表

- Usami, M., Tabata, H., Ohno, Y.: Effects of methionine on selenium embryotoxicity in cultured rat embryos. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 22, 301-308, 2002.
- Shimizu, M., Ohta, K., Matsumoto, Y., Fukuoka, M., Ohno, Y., Ozawa, S. Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells. *Toxicology in Vitro* 16, 549-556, 2002
- Usami M, Mitsunaga K, Ohno Y. Estrogen receptor binding assay of chemicals with a surface plasmon resonance biosensor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 81: 47-55, 2002
- Sato K, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K. Effects of 17beta-estradiol and xenoestrogens on the neuronal survival in an organotypic hippocampal culture. *Neuroendocrinology*. 76: 223-34, 2002.
- Ohno, Y.: ICH guidelines —Implementation of the 3Rs (Refinement, Reduction, and Replacements): Incorporating best Scientific practices into regulatory process. *ILAR (Institute for laboratory animal research, National Research Council) vol 43, supplement, S95-98, 2002.*
- 大野泰雄、動物実験代替法の現状と課題、バイオサイエンスとインダストリー 60, 551-555, 2002.
- 大野泰雄、香化粧品の安全性とその試験法 代替法を含めてその現状と将来、皮膚と美容 35, 2-8, 2003.
- Y. Morimoto, Y. Wada, T. Seki, and K. Sugibayashi, In Vitro Skin Permeation of Morphine Hydrochloride during the Finite Application of Penetration-Enhancing System Containing Water, Ethanol and l-Menthol, *Biol. Pharm. Bull.*, 251, 134-136, 2002.
- L. Fang, Y. Kobayashi, S. Numajiri, D. Kobayashi, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, The enhancing effect of a triethanolamine-ethanol-isopropyl myristate mixed system

- on the skin permeation of acidic drugs, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 1339-1344, 2002.
- Uchino T., Tokunaga H., Onodera H., Ando M.: Effect of squalene monohydroperoxide on cytotoxicity and cytokine release in a three-dimensional human skin model and human epidermal keratinocyte, *Biol. Pharm. Bull*, 25, 605-610, 2001.
- 徳永裕司、鄭 然孫、内野 正、安藤正典：フタル酸ジエチルの in vitro 経皮吸収に関する研究、粧技誌、35, 312-316, 2001.
- Kurebayashi H, Harada R, Stewart RK, Numata H, Ohno Y. Disposition of a low dose of bisphenol A in male and female cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci*. 68: 32-42, 2002.
- Kurebayashi H, Betsui H, Ohno Y., Disposition of a low dose of 14C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicological Sciences* 73, in print , 2003.
- 若栗忍、田中憲穂：動物モデルによる新しい評価法 — In vitro 光細胞毒性試験について—、アニテックス、14:44-48, 2002.
- 遠藤仁、金井好克、宮崎正博、本間正充、宮村達男、鈴木哲朗、相崎英樹、梅田誠、田中憲穂、佐々木澄志、千葉寛、細川正清、松浦知和、小田裕昭、吉田：ヒト培養肝細胞の肝機能発現とその利用法-バイオ人工肝の多角的な応用をめざして-、細胞 34: 516-523, 2002.
- 佐々木澄志、浅田晋、田中憲穂、梅田誠：ヒト肝細胞樹立株を用いた毒性試験、細胞 34: 550-553, 2002.
- 若栗 忍、高橋淳子、林 真、田中憲穂：酒匂川流域水系の河川水を用いた細胞毒性試験、水環境学会誌、25, 669-674, 2002.
- ### 2. 学会発表
- Yasuo Ohno, Validation & Regulatory Acceptance of Alternative Methods. *Regulatory Acceptance in Japan*. 4th World Congress on Alternatives to Animal Experimentation. New Orleans (2002.8.14)
- 大野泰雄、臓器移植法の改定とヒト組織の研究利用. *イントロダクション*. 第16回日本動物実験代替法学会シンポジウム 東京 (2002.12.4)
- 大野泰雄、「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した光毒性試験代替法の評価」公開シンポジウム. 主催：厚生科学研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」班及び日本動物実験代替法学会代替法評価委員会、東京 (2002.12.5)
- 大野泰雄、OECD ガイドライン・皮膚吸収(427, 428) および皮膚腐食性(430, 431)について. 最近の OECD 毒性試験・ガイドラインの動向について. 国立衛研、特別講演会 (2003.2.5)

Noriho Tanaka: Detection of photogenotoxic substances in our environment, Workshop on comet assay: applications in toxicology and molecular epidemiology Lucknow, India, Feb.7-11,2003

田中憲穂: Balb/c 3T3 細胞を用いるニュートラルレッド取り込みを指標とした光毒性試験法の評価-試験プロトコルの提案-, 公開シンポジウム、日本動物実験代替法学会、代替法評価委員会、2002年12月、東京

若栗忍、林久実子、田中憲穂: 代謝活性化法による化学物質の簡易細胞毒性試験、日本動物実験代替法学会、2002年12月、東京

豊田英一、 “動物実験代替法の国際動向” 押し寄せてくる外国の圧力 1) OECD が目指しているもの: 最近の動向、第16回日本動物実験代替法学会 フォーラム 2002年12月5日

H.知的財産権の出願・登録状況
なし

Table 1. 論文データの独自解析結果 (塩部分のみ異なる被験物質は同じものとして計算)

	vs. Human		vs. Animal		vs. Human (or animal)	
	PIF	MPE	PIF	MPE	PIF	MPE
感度	91.3	94.4	100	100	91.7	94.7
特異性	90.0	87.5	71.4	66.7	78.6	75.0
陽性検出力	95.5	94.4	82.6	78.9	88.0	85.7
陰性検出力	81.8	87.5	100	100	84.6	90.0
精度	90.9	92.3	87.9	85.2	86.8	87.1

数字はすべて%値を示す。

Table 2: 皮膚三次元モデル(EPI-606, Vitrolife-skin)の薬物透過性

	EPI-606	Vitrolife-skin	abdominal skin of Guinea pig	K'
パラオキシ安息香酸メチル	5.8	33.0	4.7	4.36
パラオキシ安息香酸エチル	10.9	41.8	6.0	9.49
4-クロロ-m-クレゾール	24.5	44.8	8.2	20.38
安息香酸ナトリウム	13.1	55.9	4.7	0.35
レゾルシン	-	30.0	1.9	0.8
サリチル酸	4.0	37.3	44.9	0.39

Table 4: SOL 500 solar-simulator を用いた多施設による光毒性試験結果

Lab	PIF値=非照射 (IC50)/照射 (IC50)			
	A	B	C	D
Anthracene	> 2277	> 4167	> 128205	> 21222
Bithionol	28	3.1	20	11
Chlorpromazine	> 450	> 3.2	34	37
Bergapten	> 19	a)	> 4872	> 770
Amiodarone	4.4	14	9.8	9.1
Chlorhexidine	1.4	1.2	2.8	2.3
SDS	1.4	1.1	0.93	1.2

Chlorhexidine と SDS は光毒性陰性物質。他は陽性物質。

a: IC50 と PIF 値を決められなかった。

光毒性は PIF 値>5 は陽性、2-5 は擬陽性、<2 は陰性と判定。

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

EU/COLIPA のバリデーション結果に基づいて作成された 3T3 細胞を用い neutral red 取り込みを指標とする in vitro 光毒性試験法についての評価委員会での一次評価の結果を医師、毒性学者、行政担当者等を含む評価会議で二次評価した。次いで、公開シンポジウムを開催し、広く意見を求め、それに基づいて最終評価文書をまとめた。その結果、不溶性物質への適用が困難であることや新たな光源を使用する場合は、その妥当性を確認する必要がある、また、陽性結果を得た場合の対応など幾つかの問題点はあったが全体として、評価結果の再現性や in vivo 結果との対応性が良いと評価された。なお、論文のみからの評価ではデータの信頼性が十分確認できなかったが、Dr Spielmann よりバリデーションの protocol, SOP, および数値データを入手し、それを解析することにより論文データの妥当性を確認できた。また、不溶性物質への適応性の良い新たな光毒性評価試験法が提案された。それについて平成15年度に評価するとされた。

A. 研究目的

医薬品や化粧品の安全評価においては様々な動物実験結果が必要であるが、動物愛護の立場から、動物を用いる安全性試験をなるべく使用しない試験法に置き換える事が要請されている。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いとてはならない。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。米国では省庁横断組織である ICCVAM を設立し、代替法を文献的に評価している。OECD では代替試験法の validation 及び行政的受け入れの基準を作成し、積極的に新たな代替法を受け入れている。

このように欧米では代替法の開発・評価及び行政的受け入れ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らば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ことを目的に、代替法の開発研究と調査を行うとともに、新規代替法として提案された方法が行政的に取り入れることが可能か否か検討することとした。平成13年度においては、評価委員会と評価会議を設定し、代替法や統計学の専門会、基礎毒性学の研究者、および臨床医師により多面的かつ二段階で評価するための評価組織を構築し、光毒性試験代替法を評価委員会により一次評価を行った。今年度は臨床医師や毒性専門家を含む評価会議で二次評価を行い、公開シンポジウムの場で広く意見を求めた上で最終評価を行った（資料）。

B. 研究方法

評価委員会は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、および統計の専門家により構築した。評価委員会では光毒性試験についての in vivo の従来法および in vitro 代替法について調査するとともに、Dr Spielmann らが開発し OECD で検討していた 3T3 細胞を用い neutral red 取り込みを細胞毒性の指標とする光毒性試験(3T3-NR 光毒性試験法)について、EU/COLIPA の3次にわたるバリデーション結果報告¹⁻³⁾を基に一次評価試験を行った。この結果を臨床医師、毒性専門家、行政担当者からなる評価会議で二次評価した。ここで得られた意見を基に評価委員会で評価文書を修正した。また、バリデーションの中心機関であった ZEBET の Dr Spielmann よりバリデーションに関する protocol, SOP, および全てのバリデーション参加機関の個別生データを入手し、論文掲載データと逐次つきあわせ、信頼性、再現性、in vivo との対応性についての確認を行った。また、2次および3次のバリデーションデータを取りまとめ、独自のデータ解析を行い、in vivo データとの対応性、および論文では明らかにはできなかった評価結果のバラツキの原因について検討した。一方、バリデーションで使用した被験物質についての in vivo 光毒性について疑義が評価会議の席で示されたことから、その信頼性を確認するため Medline を通じて文献収集し、光毒性の有無を確認した。これらの結果を評価会議委員に報告し、意見を求め、その結果に基づいて修正した。次いで公開シンポジウムを開催し、広く意見を求め、その結果に基づき、評価委員会では評価文書を再度修正し、評価会議の承認を受け、最終評価文書とした。

なお、評価委員会および評価会議の委員を以下に示す。

評価委員会

委員長

金子豊蔵（国立衛研 毒性部 2002年12月まで）

副委員長

田中憲穂（食薬センター・秦野研究所 2003年1月より委員長）

委員

板垣 宏（資生堂・安全性分析センター）
今井弘一（大阪歯大学・歯科理工学）
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（コーセー基礎研究室）
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）
若栗 忍（食薬センター・秦野研究所）

評価会議

委員長

大野泰雄（国立衛研 薬理部）

委員

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）
森本雅憲（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）

（倫理面への配慮）

本研究は動物実験代替法の開発を目的としており、動物福祉の向上に資するものである。また、動物実験データは過去のデータを用い、新たな動物実験は行わなかった。

C. 研究結果と考察

C-1) 第一回評価会議での検討

昨年度に作成された評価委員会による一次評価結果を6月11日に開催した評価委員会に報告し、意見を求めた。

評価委員会の説明要旨は以下のとおり。

in vivo 光毒性試験については、①公的ガイドラインが無い。②施設内再現性はあると思われるが、施設間の再現性については不明。③ヒトでの光毒性との対応性に関する情報は不十分であり、in vitro の代替法を厳密に評価することができない。

EU/COLIPA の 3T3-NR 法の施設間バリデーション報告については、①Phase II 試験を除き、バリデーション結果の質を判断するために必要な情報が公表論文に十分に提供されているとは言えない。②信頼できる公的機関(ZEBET)を中心とする

バリデーションである。③被験物質は比較的広い領域から選択されており、その選択は適切であったが、被験物質数は最低限であった。④in vivo 光毒性の予測性は極めて高い。⑤施設内再現性は悪くないが、評価 parameter (PIF 値および MPE 値) の施設間再現性は余り良いとは言えない。但し、光毒性の判定の施設間再現性という観点からは、再現性がある。In vitro 光毒性試験法の長所は、① In vivo 光毒性の予測性が極めて良い。②動物を使用しない方法である。③細胞播種してから3日という短期間で試験が終了する。④試験法が簡便。⑤施設内再現性が高い。⑥使用できる細胞種や細胞毒性エンドポイントの幅が広い。短所としては、①光源の種類によって毒性発現に影響を受ける。②UV 測定器の波長ウィンドウがメーカーによって異なり、絶対照度を測定する事が難しい。③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。④PIF 値や MPE 値の施設間再現性が必ずしも良いとは言えない。

以上を踏まえた評価委員会の結論は①3T3-NR 法のバリデーション報告におけるデータの質や結果の再現性、試験法の頑健性等に関する情報は文献のみからは十分には得られなかった。但し、in vivo の光毒性の予測性は極めて良い。②国際的にも受け入れられる方向にあり、今後光毒性評価に有用な方法となると考える、というものであった。これらに対し、評価会議での審議結果は以下のように要約できる。

- 1) 偽陰性の存在は実際に使用する上で重大な問題であるが、in vivo 試験での偽陰性の程度がわからないので客観的な評価はできない。
- 2) 偽陰性の原因と偽陰性発現に対するグレイゾーン設置の影響も検討すべきである。
- 3) 太陽光シミュレーターを光源として用いており、可視光による光毒性にも対応している。
- 4) 欧米でのバリデーションでは偏りがある可能性があり、より広がりを持たせることが必要である。場合によってはバリデーションを行う必要があることについても報告書に記載すべき。
- 5) 文献の渉猟から、3T3-NR 法を最も妥当な標準試験法とすることには根拠がある。
- 6) 国際的なハーモナイゼーションの必要があり、OECD のガイドラインに準拠した形で進めることも問題がない。今後は試験法（細胞、光源、照射条件、判定など）を統一した後、施設間での乖離がないようなバリデーションスタディを行う必要がある。
- 7) 標準化試験法を確立評価することが肝要である。

なお、3T3 細胞は fibroblasts であるが、keratinocyte の方が in vivo 予測のためには良いのでは無いかとの意見がでたが、サイトカイン遊離等を指標とする場合においては必須であろうが、一般的な細胞毒性指標と fibroblast を用いた方法の方が感度が良く、多くの光毒性物質が検出されるとされた。また、光毒性評価一般に関して、「医

薬品等の申請に際し、光毒性試験が必ずしも全ての薬剤について要求されず、キノロン系の薬物の場合も問題が出てから行われるようになった。医薬品・化粧品審査でも旧態依然とした試験法を改定せずに、安全性をチェックできず、皮膚科領域でニューキノロン系の合成抗菌薬による多くの光線過敏症患者を新たに生み出してしまった事実を謙虚に受容すべきである。試験法を是正する原動力になるべき研究を行うべきである。」との趣旨のコメントが臨床医師から出された。

評価会議の議事録作成段階で以下のような意見が委員より提出された。

- 1) 光毒性陽性物質を見逃さないためには光源の選択を慎重に行うべきである。EU/COLIPA のバリデーションで用いられた Dr. Honle 社の機器を国内の光源に変える場合には同様のスペクトルを持つ機器である必要があるかどうかを検討する必要がある。
- 2) 光源を SOL500 に限定するには、至適条件設定のノウハウ、照射管変更によるデータの信頼性等が不明であり、OECD ガイドラインが要求している機器メンテナンスに関する日本における利便性等に問題が生ずる可能性がある。しかし、他の照射装置を可とするにはバリデーションをやり直す必要がある。
- 3) 油性素材の評価の可否については、被験物質数が少ないため今回の調査結果からは判断できなかった。水溶性素材に限定すべきなのかもしれない。
- 4) 施設間再現性の検証が不十分。クライテリアだけでは再現性が良いというが、個々の PIF ではどうか、OECD ガイドラインの新しいクライテリアで再確認する必要がある。
- 5) 被験物質の光毒性ポテンシャルを検出できたとしても、使用濃度における光毒性発現の有無は判断できない。「毒性を示すものは全て使用しない」というのではなく、安全倍率を考慮しながら使用可能な範囲を検討している。従って、本法だけでは光毒性の試験は終了せず、本試験法は動物試験数を減らすためのスクリーニング法として位置付けるべきである。
- 6) 動物試験との一致率に関しては、動物試験（ヒトも含めて）が本当に光刺激性を示したものなのか（光感作性であって光刺激性は示さないものを含んでいないか）の検証がなされていない中での一致率にどれだけ意味があるか疑問である。動物試験（ヒトも含めて）データは正しいと仮定した場合でも、前述のスクリーニング法として考えると、False negative が 0% に限りなく近くないと、全体の一致率が高いだけでは利用価値は下がる。従って、OECD の新しいクライテリアでの一致率を再検討する必要がある。但し、False negative がある程度あっても、代替法利用促進の観点から採用とする考えもある。（動物試験でもヒトとの一致率は 100% とは言えないのだから。）
- 7) 今後の進め方については、少なくとも OECD の

新しいクライテリアでの一致率がどうか、どの種の素材なら使用可能かなどを確認する。その結果をもとに代替法としての採用可否・採用形態(案)を作成し、再度評価会議（資料持ち回りでも可）にかける。その後、公開シンポジウムを行うべきである。

C-2. 評価会議での意見および議論を踏まえた検討

評価委員会では、評価会議の結果を受け、以下の検討を行い、その結果に基づき評価文書の修正を行った。

C-2-1) EU/COLIPA のバリデーションデータからの検討

バリデーションを行った中心機関 ZEBET 所長である Dr. Spielmann より、バリデーションに関する protocol, SOP および全ての施設の個別データを得た。これを基に論文データの確認とバラツキの原因、および線りゾーン設置の影響について検討した。その結果は資料 1) に示したが、以下のように要約できる。

評価指標 PIF 値および MPE 値の整合性

PIF 値については用量作用曲線作成ソフトの変更により論文データと比べ若干の相違が生じていたが、その差は小さいものであった。なお、データの転記ミスと思われる相違が一点あった。MPE 値については大きな差があった。これは用量作用曲線作成ソフトの変更とともに、MPE を計算するためのソフトも変更されたことによる。但し、論文では用量作用曲線の一部からのみ計算していたのに対し、提供データでは用量作用曲線の全体から計算するように変更したものであり、光毒性評価において妥当なものと考えられた。

光毒性評価結果の整合性

提供されたデータから、評価委員会の方式とは異なり、被験物質は全て別の物として扱い、false negative や false positive 等について解析した。この結果は論文からの解析結果とほとんど同じであり、3T3-NR 法の in vivo 光毒性の予知性をそれらの両面から確認できた。なお、評価結果の in vivo との一致率が 0.891 と極めて予測性が良いこと、また、PIF と MPE の両方の指標を計算し、強い方の結果を採用することにより false negative を 0.5% 程度減らせることを確認できた。

グレイゾーンの設置の影響

上と同様に提供データから解析した結果、gray zone を設けることで false negative は減少したが、依然 5.88% の値であり、完全には無くならないことが判明した。しかし、動物実験データの信頼性について宮地先生から疑問が呈されていることや、ヒトでのパッチテストでも陽性物質として著明な物質でも陽性率は 1% 前後であること (Spielmann et al, ATLA 28, 777-814, 2000)、また、最終的にヒトで試験することを考えれば、false negative の出現率は充分低いと考えられた。

用量作用曲線の検討

施設により評価に相違のあった物質を中心に、用量作用曲線を精査した結果、①光照射群で非照射群より viability が高くなることがある、②薬物濃度の上昇にともない viability があがることがある、③中間用量以上で光照射による毒性増強が見られない場合がある、④光照射で影響は出ていないが、光非照射群で viability が上がった結果として MPR 値が大きくなることもある、⑤非照射群のデータにバラツキの極めて大きい場合があることなどが判明した。ただし、これらと予測の施設間のバラツキとの関係については対応性を明らかにすることはできなかった。これらの結果は施設により技術レベルに大きな差があることを示しており、試験実施者の技術レベルの向上あるいはプロトコルの改善が必要と思われた。また、境界付近の結果が得られた時はデータの分布と用量作用曲線の形を検討する必要があると思われた。

施設間の評価結果のバラツキの検討

評価結果に施設間差のあった5品目についてその原因を調査した。その結果、水溶性が低いことによる artifact および被験物質自身の細胞毒性が比較的強いことによる影響によると思われるものがあったが、原因不明の technical error と思われるものがほとんどであった。しかし、furosemide については施設により差があるだけでなく、同一施設でも結果に差のあることがあり、false prediction が出た理由も不明であり、更に検討を要するとおもわれた。なお、2回の繰り返し実験を行っている場合、2回とも誤評価しているものは少なく、多くは一方が正しい予測をしていた。これらの結果も技術レベルを向上させることにより、誤判定を防ぐ必要性を示している。特に、被験物質の溶解法や溶解の確認についての教育も必要であることを示している。また、2回の繰り返し実験での評価が食い違い、一方が陰性となった時には被験物質の溶解等に留意しながら再試験を行うことにより、誤評価を最小にできるものと考えられる。

まとめ

Dr Spielmann より提供されたデータパッケージにより論文データの確認ができた。また、評価結果がばらついた原因の多くが技術的なものであると推定され、被験物質の溶解や光照射条件、また、培養方法についての訓練が必要と思われた。しかし、furosemide については施設により評価に差がある原因を推定できなかった。また、グレイゾーンの設置により false negative を減らすことができることが確認された。

2-2) In vivo データの信頼性についての検討

評価会議の席上、バリデーションで使用された被験物質について、in vivo での光毒性の有無について議論された。そこで、それらの光毒性陽性の被験物質について文献的に光毒性について調査した。その結果、今のところ、furosemide と neutral

red 以外の陽性物質については in vivo 試験で陽性との報告を検索できた。しかし、furosemide についてはドイツ、オーストリア、及びスイスのヒト光パッチテストグループが行ったヒト光パッチテストで陰性であったことから、急性の光毒性については陰性と判断すべきと考えられた。

C-3, 第二回評価会議での検討

評価委員会で修正した評価文書を評価会議委員に送付し、コメントを求めた。その結果、大部分の委員より修正を認めるの回答を得たが、幾つかのコメントも寄せられた。それらに基づき、評価文書を再度修正した。字句の修正に関する次項以外の主な意見を以下に要約する。

- 1) false negative が発生しうるのであれば、「あきらかに陰性」の場合でも繰り返し試験、さらには他の試験（動物を用いた試験など）の実施が必要である。
- 2) 技術レベルの差によるバラツキに関し、それが実験者個々人の訓練度合いによるものか、本質的なものかを検討する意味で、推奨するプロトコルでの validation を実施する必要がある。
- 3) グレイゾーンに属した場合は、被験物質の位置付けを明らかにするためにさらに動物試験など他の試験で確認する必要がある。
- 4) 本試験法で光毒性陽性と評価された化合物については、動物やヒトにおける無作用濃度を求めて使用すれば良いか。
- 5) 試験法に適用可能な化合物の範囲、上記の試験結果の活用案、さらには光源や光照射量測定への対応など、試験法をどのように使用するかの考え方の指針が必要である。

なお、1)のコメント対しては、動物実験やヒト試験より感度が良いというのが多くの委員の考えであり、本試験で陰性とされた被験物質については光毒性無しと判断しても良いと考える。2)については個々の指標レベルでは大きなバラツキが有っても評価結果のレベルでのバラツキは少ないことから、原因究明は必要ではあるが、本試験法の評価の上では必須では無いと考えた。3)については in vitro 或いは in vivo での再試験が必要と考える。4)については、その通りと考えた。5)については可能なところは評価文書に組み込むこととし、評価文書の関連箇所を修正した。

C-4) 公開シンポジウムでのコメント（資料3）

公開シンポジウムでは主に以下のような質疑が行われた。また、「対応」で示したように対応した。質問：24 物質の臨床データを知りたい。今回の結果は臨床データと対応するのか？

回答：化合物のほとんどで臨床報告があると思われる。また、3T3-NR 光毒性試験結果の臨床データとの対応は良い。総てがカバーされているわけではないが、ドイツ、オーストリア及びスイスの医師が行ったヒトにおける光毒性試験結果が引用

されている。(対応1)

質問：光アレルギーとの関係は明らかか？

回答：明らかではない。光アレルギー試験法としての妥当性を見ることは今回の評価の対象ではない。

3) 試験プロトコルの提案についての質疑

質問：照射の時、水、培養液による紫外線吸収の影響はあるのか？

回答：バッファーを用いており、またコントロールとの比較で評価している。

質問：付着している細胞の広がり具合で紫外線のあたり方が違うことが予想される。そのため、結果が異なるのでは？

回答：その可能性はあるかもしれない。

質問：ヒトへ外挿するにはヒトの細胞を使ったほうが良いのでは？

回答：細胞による差はある。ヒトケラチノサイトの報告もある。Hazard identification でやっているのヒトの細胞は使用しなかった。

質問：代謝活性化は？

回答：培養系は生体と違う。

回答：一般的に薬物代謝活性は培養により低下することから、in vivo にあった時と同じとはいえない。ヒト細胞でもバリデーションは必要。

回答：3T3 は高感度なので問題ないと考えている。

(メモ：代謝活性化に関しては対応していないことが報告書に記載されている。)

質問：光照射のむらについて

回答：場所を一定時間毎にずらしていけば照射量の均一化は可能。(対応2)

質問：PIF で光毒性の程度を定量的に比較することは可能か？

回答：自ラボ内であれば CPZ(陽性対照)を常において補正すれば問題ない。また、CPZ の値が揃っていれば補正の必要もない。ラボ間の違いはバリデーションで評価。(対応3)

4) 戸倉教授の講演についての質疑

質疑は無かった。

5) 総合討論

質問：臨床的には光アレルギーの出現頻度が多い。

この試験法では、光アレルギーと光毒性は区別可能か？

回答：この試験法は細胞毒性に基づくため、光アレルギーについては、光蛋白結合性などの他の試験法との組み合わせが必要である。(対応4)

回答：光変異原性試験については、使用不可能である。

質問：この試験法は化学物質の光毒性をスクリーニングする方法である。その観点では使用可能か？

回答：光アレルギーの多い臨床ではツールとなり得ないが、光毒性のスクリーニングとしては使用可能と思う。(対応5)

質問：光感作物質が光毒性ポテンシャルを持っているのなら、この試験法で感度を上げれば光感作物質は捕まるか？

回答：光蛋白結合性と 3T3 NRU PT を組み合わせれば可能かもしれない。

質問：EU や米国では医薬品のガイドラインにこの 3T3 NRU PT が入るといふ噂があるが、日本では動物試験のガイドラインもない。厚生労働省はガイドラインを作る気はないのか？要求が無いと行わないのか。

回答：今のところそのような話は聞いていない。但し、ガイドラインにあるからやるということではなく、化学構造や紫外線吸収等からみて必要ならば内服薬でも行うという態度が必要と考える。

質問：UVB に吸収を持つ化合物は UVB の光源を用いて試験したほうがよいか？

回答：サンセットは SOL500 よりも UVB 光が強いのでサンセットを使用してみるのも良いかもしれない。

回答：光アレルギー反応では、化学物質の吸収波長よりも A 側に作用波長がある。UVB が Action スペクトルになる物質は非常に少ない。

回答：UVB は DNA 傷害が多いので、真の毒性プロファイルを見出すことは難しい。(対応6)

質問：ヒトの光毒性を予測する上で、この in vitro 試験は in vivo 試験より感度が高いと思うか？

回答：in vitro の方が感度が高いと思う。

質問：in vivo データには光アレルギーか光毒性かは不明のものがある。また、false negative がある試験法で陰性ならば問題なしと評価して良いか？

回答：光刺激性物質はほとんど検出できている。False negative は極めて少ない。また、技術的な原因で起こることがほとんどである。In vivo 法より今回の 3T3-NR 法の方が感度が良いと考えられることから、これで陰性であるならば陰性として良いと考える。但し、フロセミドで偽陰性となった理由がよくわからなかった。それについて戸倉先生はどのように考えるか？

回答：フロセミドは光アレルギー反応を起こす典型的な薬物であることが知られている。アレルギーは Type II reaction であり、3T3-NR 法では Type I reaction と Type II reaction の区別ができない。(対応7)

質問：外用薬は光アレルギー試験結果を提出することになっているが、経口薬では提出が義務付けられていない。光アレルギー試験を実施して提出したほうがよいか？

回答：類薬の光毒性や被験物質の物理化学的性状や体内分布などに基づく考察により判断し、必要ならば試験を実施すべき。

質問：ピロキシカムの Prodrug はどのような結果を示すと考えられるか？

回答：わからない。

質問：False negative について何か意見を？

回答：試験系の問題点を明らかにするために適正な in vivo データが多数必要となる。

3. 質疑に対する対応

- 1) Dr Spielmann より了解を得たので、希望者にデータパッケージを送付する。
- 2) 推奨する試験プロトコルの項に記載する。また、必要ならば報告書に記載する。→「また、照射の平面的な照射むらによるバラツキを防止するために、一定時間毎に位置をずらすことも有用である。」との文を照射条件の項に入れた。
- 3) 今回のバリデーションはあくまで定性的な評価のみなので、定量的な評価が可能という文面は報告書には記載しない。
- 4) 光アレルギーについてはバリデーションされていないという内容とともに報告書に記載する。内容は対応5に示した。
- 5) Spielmann の論文でも光アレルギー物質を検出できた例も示されていることから、false negativeの可能性については否定できないという留保をつけて、記載する。「なお、光アレルギー性物質のスクリーニングにおける本方法の有用性は確認されていない」との文を推奨する試験プロトコルの項の結論に追加する。
- 6) 推奨する試験プロトコルの項の被験物質の試験への適用性に「なお、地球に到達する紫外線のうち、UV-A は皮膚への透過度が高く光毒性もやすく、より短波長である UV-B は皮膚への透過度は低いがその生物学的な作用は強い。一方、本来 UV-B は生体内の内因性の光増感物質と反応して皮膚傷害を起こすため、臨床的にも UV-B による外因性化学物質の光毒性そのものだけを特定することは難しいと考えられる。よって、本試験系でも UV-B 吸収が原因となる反応はとらえ難い可能性がある。」との文を追加した。
- 7) 回答の内容を6章のまとめの項に記載した。

C-5) 最終評価文書の確認

公開シンポジウムでのコメントを基に作成した、修正文書の評価委員会及び評価会議の各委員に送付し、コメントを求めた。その結果、字句の修正および本試験法の限界を6章のまとめの結論のところにも明記すべきとのコメントを得、そのように修正し、最終報告書とした。

C-6) 3T3-NR 光毒性試験法評価の結論

文献に記載された情報のみではデータの質や再現性を十分に明らかにすることはできなかった。しかし、ZEBET の Dr Spielmann より入手したデータファイルを用いた検討により論文で示された結果の大筋の確認とバラツキや誤評価の原因究明を行うことができた。

論文及びデータファイルの両方を用いた解析の結果、3T3-NR 光毒性試験法は、以下に述べるような限界があるが、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、と結論できる。

以下に本光毒性試験法の主な限界を例示する。

①光感作性を検出するための方法ではなく、光刺激性を評価するための方法である。

②通常、適切な溶解溶媒のない物質や培養液と混和しても直ぐに分離してしまう物質への適用は困難である。また、着色物質では正しい評価が出来ない場合がある。揮発性の高い物質についても試験系への適応に際しては注意が必要である。

③UV-B は内因性光増感物質と反応して細胞毒性を起こすため UV-B 吸収が原因となる光毒性物質の作用はとらえ難い可能性がある。

④光毒性発現に代謝活性化を要する物質の評価には適さない可能性がある。

⑤光毒性発現における用量依存性の検討は不可能なため、本試験試験法で光毒性物質と評価された物質を使用する際の適切な使用用量や濃度についてはin vivo試験等で確認する必要がある。

なお、技術的な理由によって、誤評価やバラツキが認められる事例がバリデーションで認められたことから、上記を含めた細胞毒性試験法の特性を良く理解した上で訓練を十分に受けた者が試験に利用しなければならない。また、原因不明の誤評価もわずかであるが認められたこと及び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、今後もそれらの原因について基礎的な検討を進めていく必要がある。更に、光源の変更など、試験法を若干変更した場合の頑健性等については不明確なところもある。このような場合には少数の被験物質を用いて試験法の妥当性について確認しておく必要がある。

C-6) 新しい代替法の募集結果

新しい動物実験代替法について、本研究班での評価希望の募集について、資生堂より独自の光毒性代替法の申請があった。これは酵母を用いる光毒性試験法と溶血性を指標とした光毒性試験を組み合わせたものであり、申請書に示された感度、再現性、in vivo 結果との対応性が3T3-NR法に匹敵するとともに、3T3-NR法で不得意とする不溶性の被験物質についても評価可能である利点がある。本研究班では評価すべき試験法であると判断し、平成15年度で検討を行うとした。なお、本試験法については施設間バリデーション結果が無いことから、評価委員会で検討したのち、適切と判断された場合には施設間バリデーションを行うように勧告し、その結果を待って、再度評価することになる。本試験の評価に関しては、平成14年度と同じ評価委員会および評価会議の委員に依頼することが妥当とされた。

C-7) 新しい代替法の募集

班会議では、新たな代替試験法を募集することについて検討し、本研究班が平成16年度以後継続するとの保証は無いが、場合によっては研究班で評価されない可能性を明示した上で募集することとされた。なお、申請された試験法によっては、

新たな評価委員会と評価会議を組織する必要がある。

D. まとめ

- 1) EU/COLIPA のバリデーション結果に基づいて作成された 3T3 細胞を用い neutral red 取り込みを指標とする in vitro 光毒性試験法(3T3-NR 法)についての評価委員会および評価会議で二段階評価した。次いで、2) 公開シンポジウムを開催し、得られた意見を参考に最終評価文書をまとめた。
- 2) 3T3-NR 法は不溶性物質への適用が困難であることなど幾つかの問題点はあるが、全体としては評価結果の再現性や in vivo 結果との対応性が良く、「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」と判定された。
- 3) 論文のみからの評価ではデータの信頼性が十分確認できなかったが、Dr Spielmann よりバリデーションの protocol, SOP, および数値データを入手し、それを解析することにより論文データの妥当性を確認できた。
- 4) 不溶性物質への適応性の良い新たな光毒性評価試験法が提案された。それについて平成 15 年度に評価するとされた。

E. 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. 添付資料

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結果報告

G. 健康危険情報

特になし。

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohno, Y.: ICH guidelines – Implementation of the 3Rs (Refinement, Reduction, and Replacements): Incorporating best Scientific

practices into regulatory process. *ILAR* (Institute for laboratory animal research, National Research Council) vol 43, supplement, S95-98, 2002.

- 2) 大野泰雄、動物実験代替法の現状と課題、*バイオサイエンスとインダストリー* 60, 551-555, 2002.
- 3) 大野泰雄、香化粧品の安全性とその試験法 — 代替法を含めてその現状と将来—、*皮膚と美容* 35, 2-8 (2003)
- 4) Usami, M., Tabata, H., Ohno, Y.: Effects of methionine on selenium embryotoxicity in cultured rat embryos. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 22, 301-308, 2002.
- 5) Shimizu, M., Ohta, K., Matsumoto, Y., Fukuoka, M., Ohno, Y., Ozawa, S. Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells. *Toxicology in Vitro* 16, 549-556 (2002)
- 6) Usami M, Mitsunaga K, Ohno Y. Estrogen receptor binding assay of chemicals with a surface plasmon resonance biosensor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002, 81:47-55.
- 7) Sato K, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K. Effects of 17beta-estradiol and xenoestrogens on the neuronal survival in an organotypic hippocampal culture. *Neuroendocrinology*. 2002, 76:223-34.

2. 学会発表

- 1) Yasuo Ohno, Validation & Regulatory Acceptance of Alternative Methods. Regulatory Acceptance in Japan. 4th World Congress on Alternatives to Animal Experimentation. New Orleans (2002.8.14)
- 2) 大野泰雄、臓器移植法の改定とヒト組織の研究利用. イントロダクション. 第16回日本動物実験代替法学会シンポジウム 東京 (2002.12.4)
- 3) 大野泰雄、「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した光毒性試験代替法の評価」公開シンポジウム. 主催: 厚生科学研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」班及び日本動物実験代替法学会代替法評価委員会、東京 (2002.12.5)
- 4) 大野泰雄、OECD ガイドライン・皮膚吸収(427, 428)および皮膚腐食性(430, 431)について. 最近のOECD 毒性試験・ガイドラインの動向について. 国立衛研、特別講演会 (2003.2.5)

I. 知的所有権の取得状況

無

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結果報告

平成14年度厚生労働科学研究
動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究 (H13-医薬-024)

研究代表者

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所 薬理部)

研究班員

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)

森本雍憲 (城西大学薬学部)

研究協力者

安藤正典 (国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部)

金子豊蔵 (国立医薬品食品衛生研究所 毒性部)

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結果報告

目次	1
要旨	7
第1章 序	8
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	10
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	21
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 Balb/c 3T3 細胞を用い、Neutral red 取り込みを指標とする 光毒性試験方法(3T3-NR 法)について	35
4-1) はじめに	35
4-2) 3T3-NR 法の評価	38
4-2-1) 3T3-NR 法を選択した理由	
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)	
4-2-2-1) バリデーションデータの質	
4-2-2-2) 試験結果のヒボ試験結果の対応性	
4-2-2-3) 試験法の信頼性	
4-2-2-4) 総合評価	
4-2-3) 光毒性評価パラメーターについて	63
4-2-3-1) はじめに	
4-2-3-2) PIF について	
4-2-3-3) MPE について	
4-2-3-4) 用量反応曲線	
4-2-3-5) 性能の比較	
4-2-3-6) 議論	
4-3) 3T3-NR 法以外の方法について	68
4-3-1) 各種 in vitro 光毒性試験法のまとめ(文献調査)	
4-3-1-1) 単層培養細胞を用いた試験法	
4-3-1-2) その他の細胞を用いた試験法	
4-3-1-3) 培養皮膚モデルを用いた試験法	
4-3-1-4) 生体膜損傷を指標とした試験法：光溶血性試験	
4-3-1-5) タンパク質に対する作用を指標とした試験法	
4-3-1-6) その他の化学物質を用いた試験法	
4-3-1-7) 試験法の組み合わせ (battery) による評価	
4-3-2) 各種 in vitro 光毒性試験法の評価	
4-4) 考慮すべき事項	78
4-4-1) 試験法の普及性	
4-4-1-1) 若干の修正に対する頑健性	
4-4-1-2) 教育訓練及び専門性	
4-4-1-3) 必要な装置や材料の入手	
4-4-2) コストとそれに見合う有用性	
4-4-3) 試験法導入に要する時間	
4-4-4) 3 R s の面からの考察	
4-4-4-1) Replacement	
4-4-4-2) Refinement	
4-4-4-3) Reduction	

4-4-5) 結論	
4-4-6) 要望事項	
4-5) 関連項目	86
4-5-1) EU/COLIPA 及び OECD により提案された試験プロトコールの一部変更について	
4-5-1-1) 細胞毒性評価指標の変更について	
4-5-1-2) 細胞種差の変更に関して	
4-5-1-3) 光照射に関すること	
4-5-1-4) 光毒性の有無を判定するためのパラメーターとカットオフ値	
4-5-2) ワークショップとバリデーションの必要性とその内容	
4-5-2-1) 概要	
4-5-2-2) 試験条件の最適化	
4-5-2-3) 他の試験法における活用	
4-5-3) 関連項目に関する要約	
4-5-3-1) 将来検討すべき項目	
4-5-3-2) 将来要望される Workshop	
第5章 推奨する試験プロトコール	93
5-1) 試験法の実際	
5-1-1) はじめに	
5-1-2) 被験物質の試験への適用性	
5-1-3) 使用細胞	
5-1-4) 試験法	
5-1-5) 被験物質の調製	
5-1-6) 用量段階	
5-1-7) 陽性対照	
5-1-8) 照射条件	
5-1-9) 細胞毒性の測定	
5-1-10) 結果の判定	
5-1-11) 結果の報告	
5-2) 試験法プロトコールの精密度と完全性	
5-3) 本試験系の限界	
5-4) 結論	