

阻止帯の差 (Z : mm)	光毒性の評価
$Z < 2$	—
$2 \leq Z < 5$	±
$5 \leq Z$	+

なお、この評価はバリデーション委員会が一括して行うため、各施設で行う必要はない。

#### 6. 被験物質の保管場所 (8 項参照 ; 試験記録①使用)

被験物質は、試薬保管庫、試薬保管用冷蔵庫、試薬保管用冷凍庫、試薬保管用デシケーター、試薬保管用冷蔵庫内デシケーターのいずれかに保管する。

#### 7. 保守・点検

照射装置を使用する際、フィルター部分に汚れがないことを確認する。

#### 8. 記録の保管

以下の試験記録の原本は、記録保管場所に 5 年間保管する。

- ①試薬・被験物質管理記録
- ②注射用水・生理食塩液管理記録
- ③被験物質溶解性検討記録
- ④太陽光シミュレーション装置使用記録
- ⑤紫外線強度計使用記録
- ⑥使用機器記録
- ⑦酵母光生育阻害試験条件等記録
- ⑧酵母光生育阻害試験プレート培地・上層培地調製記録
- ⑨酵母光生育阻害試験酵母菌液調製記録
- ⑩酵母光生育阻害試験酵母播種記録
- ⑪酵母光生育阻害試験陽性対照溶液調製記録
- ⑫酵母光生育阻害試験孵卵器使用記録
- ⑬酵母光生育阻害試験測定記録

#### 9. 参考文献

- 1) Sugiyama M. *et al.* (1994) In Vitro Assays to Predict Phototoxicity of Chemicals: (II) Yeast Growth Inhibition Assay and Battery System with Photohemolysis Assay. AATEX, 2, 193-202.
- 2) Sugiyama M. *et al.* (1994) Photohemolysis Test and Yeast Growth Inhibition Assay to Assess Phototoxic Potential of Chemicals. Alternative Methods In Toxicology Vol.10 In Vitro Skin Toxicology Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Rougier A. *et al.* (ed.) Marry Ann Libert, Inc., New York, 213-221.
- 3) 杉山真理子ら, 日本動物実験代替法学会 第 6 回大会要旨集 (東京) (1995) p110-111.

- 4) Sugiyama M. *et al.* (2002) A Strategic Approach for Predicting Phototoxicity of Cosmetic Ingredients. AATEX, 9, 29-39.
- 5) Mori M. *et al.* (2003) Effects of Light Sources on the Prediction of Phototoxicity by the Yeast Growth Inhibition Phototoxicity Assay and the Red Blood Cell Photohemolysis Assay. AATEX, Submitted.

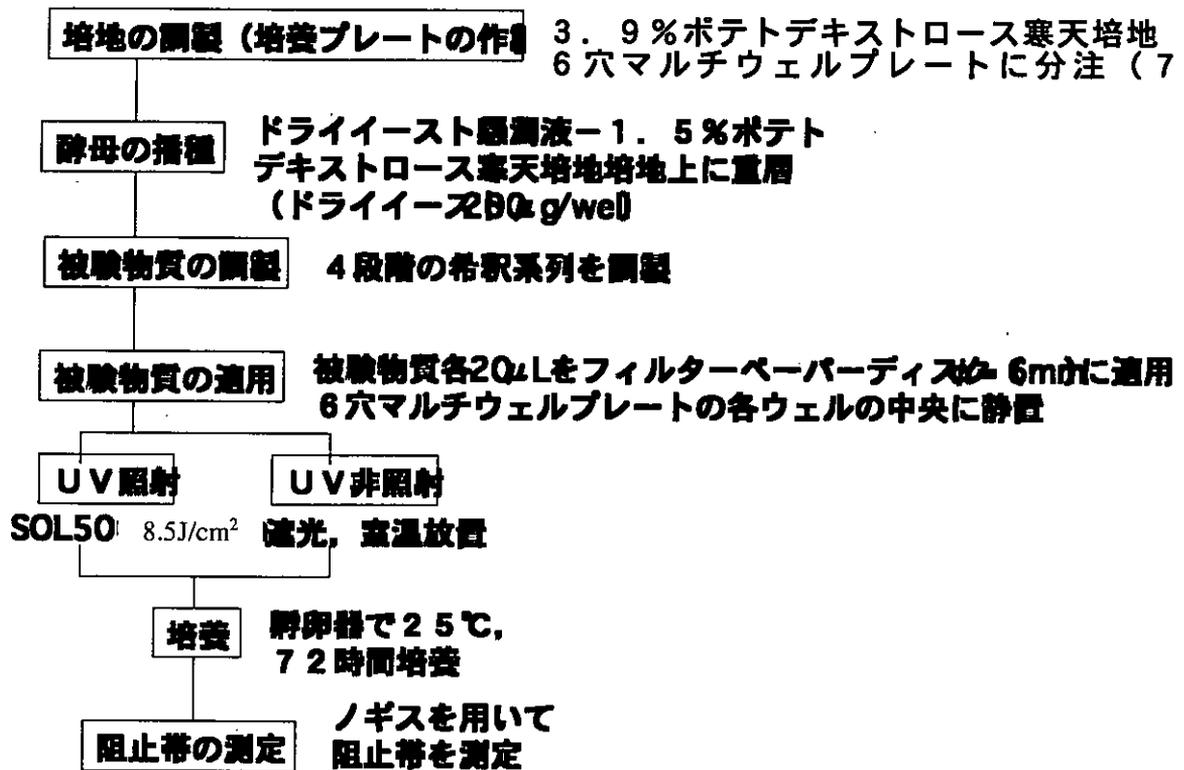
#### 10. 試験法の改定

試験法改定の必要が生じた場合は、バリデーション委員会で検討し、その結果を提案者に示し、承認を受ける。

#### 11. 履歴

- 1) 平成 15 年 11 月 21 日 制定
- 2) 平成 15 年 11 月 23 日 修正

3) 酵母光生育阻害試験フローチャート



以上

## 赤血球光溶血試験プロトコール

原案作成者及びその日：穂谷 昌利 平成 15 年 11 月 21 日  
承認者と承認日：大野泰雄 平成 15 年 11 月 25 日

## 1. 目的

本試験法は、赤血球を用いて被験物質の光溶血性を評価することを目的とする。  
本試験法は、光毒性試験の代替法として使用可能である。

## 2. 原理

光毒性の発現メカニズムは、化学物質が太陽光により励起され、基底状態に戻るときに放出されるエネルギーにより生じる活性酸素やフリーラジカルの生体への作用や、さらには光励起された化学物質自身の生体への作用と考えられている。この作用の生体側標的組織として細胞膜や核を含めた細胞内小器官が考えられる。

本法は、光毒性試験代替法としては、細胞膜破壊に基づく光毒性を検出する方法である。

## 3. 適用範囲

化粧品、医薬部外品に用いられる基剤、薬剤、色剤、香料などのうち、紫外部吸収 (280~400nm) が認められるものに適用する。

## 4. 材料及び実験方法

## 4. 1. 試験項目及びプレート枚数

至適濃度を決定するために行う予備試験を 1 回、至適濃度付近において行う本試験を 2 回実施する。いずれの試験とも duplicate で行う。1 回の実験で最大 3 被験物質を適用できるが、24 穴マルチウェルプレート 4 枚 (照射プレート 2 枚、非照射プレート 2 枚) 用いるため、3 被験物質あたり少なくとも 24 穴マルチウェルプレート 12 枚を必要とする。また、照射・非照射プレート 1 対につき 1 枚の 96 穴マイクロテストプレートを用いるため、3 被験物質あたり少なくとも 96 穴マイクロテストプレート 6 枚を必要とする。

## 4. 2. 陰性対照物質

被験物質溶液の調製に用いた溶媒を陰性対照物質とする。

## 4. 3. 陽性対照物質

アクリジン (東京化成工業株式会社) を用いる。

## 4. 4. 赤血球

綿羊無菌保存血を(株)日本生物材料センターより購入する。  
株式会社 日本生物材料センター (TEL:03-3811-1960)  
採血日から 1 週間程度を使用期限とする。また、1 度開封した血液は使用しない  
ほうが良い。

4. 5. 器具類

4. 5. 1. 24 穴マルチウェルプレート

FALCON 社製 No.3047 を用いる。同一試験内ではロットは同じものを用いる。

4. 5. 2. 96 穴マイクロテストプレート

FALCON 社製 No.3070 を用いる。

4. 5. 3. 漏斗

4. 5. 4. 脱脂綿

4. 5. 5. 分注器

4. 5. 6. ガラス器具

溶液調製用にピペット、ビーカー、メスシリンダー、スピッツ型ねじ口ガラス遠  
心管等。

溶血を避けるため、赤血球の取り扱いには使用しない。

4. 5. 7. プラスティック製器具

赤血球懸濁液調製用にピペット、遠沈管、メスシリンダー等。

4. 6. 機器

4. 6. 1. 太陽光シミュレーション装置

通常は、光源として紫外線 A (UVA) 領域、紫外線 B (UVB) 領域及び可視光領  
域に照射スペクトルを持つ Metal halide lamp (Dr. Hönle GmbH 社製, Bulb, 型番 0175),  
パワーサプライ (Dr. Hönle GmbH 社製, 型番 0298) を装備した SOL500 (Dr. Hönle  
GmbH 社製, 型番 5468) を用いる。フィルターは H1 フィルター (Dr. Hönle GmbH  
社製, 型番 4730) を使用する。新しい Metal halide lamp は、エネルギー強度が強  
いため約 100 時間ランプを点灯させてエネルギーを減衰させる必要がある。

太陽光シミュレーション装置の上部ラベルが読めるような向きで設置する。

4. 6. 2. 紫外線強度計

UVA の強度測定として、Dr. Hönle GmbH 社製の紫外線強度計 (UVA-Meter, 型番

37) を用いる。

#### 4. 6. 3. 小型遠心機

50mL 以上の遠沈管を適用できることが必要である。また、個々のウェルからチューブに採取して遠心分離して行う場合には 1.5mL マイクロチューブを適用できる機器が必要である。赤血球の浮き上がりを防ぐためにブレーキオフ機能を使用できることが望ましい。

#### 4. 6. 4. 高速遠心機

マイクロタイターバケットを適用可能である日立高速遠心機 CR20B2 等を用いる。赤血球の浮き上がりを防ぐためにブレーキオフ機能を使用できることが望ましい。

しかし、個々のウェルからチューブに採取して遠心分離して行う場合には使用しない。

#### 4. 6. 5. マイクロプレートリーダー

540nm 及び 525nm の吸光度を測定できるマイクロプレートリーダーを使用する (525nm 用のフィルターが無い場合はそれに近いものを使用する)。

#### 4. 6. 6. プレートミキサー

MICRO TUBE MIXER EM-36 (タイテック株式会社) を使用する。ただし、適切に混和可能であればその他のプレートミキサーでも使用可能である。

#### 4. 7. 塩溶液の調製

- ・生理食塩水: 0.9% (w/v) 塩化ナトリウム水溶液。
- ・PBS (-): ダルベッコ PBS (-) (日水製薬株式会社) 9.6g を蒸留水 1L に溶解させる。滅菌操作は必要としない。

#### 4. 8. 溶媒の選択と予備試験における最高溶解濃度の決定 (8 項参照; 試験記録①, ②, ③, ⑥使用)

##### 4. 8. 1. 原体が固体の場合

溶媒は、水、エタノール、アセトン、ジメチルスルホキシド (以下、DMSO) のいずれかとする。最高溶解濃度及び溶媒の選択は、以下の手順にしたがって決定する。

- 1) 各溶媒毎に 1 本の容量が 10mL であるスピッツ型ねじ口ガラス遠心管を用意する (計 4 本)。
- 2) スピッツ型ねじ口ガラス遠心管に被験物質を 50mg ずつ入れる。
- 3) 溶媒を 50 $\mu$ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 1g/mL を最高溶解濃度とする。なお、攪拌は、遠心管に栓をした後、遠心管の上部を持ち先端を指で数回たたいて行うか、超音波破碎機や試験管ミキサーを用いて行う。

- 4) 3) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 50  $\mu$ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 500mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 5) 4) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 100  $\mu$ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 250mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 6) 5) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 300  $\mu$ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 100mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 7) 6) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 500  $\mu$ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 50mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 8) 7) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 1000  $\mu$ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 25mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 9) 8) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 3000  $\mu$ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 10mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 10) 4 種溶媒の中で最も高濃度の被験物質を溶解する溶媒を選択する。
- 11) 溶解の程度が同じである場合は、水、エタノール、アセトン、DMSO の順で試験に用いる溶媒を決定する。

被験物質を溶解した媒体 10  $\mu$ L を赤血球 990  $\mu$ L に添加するため、最終濃度は投与した濃度の 1/100 となる。

#### 4. 8. 2. 原体が液体の場合

予備試験における最高濃度は原体とする。希釈系列を調製するための溶媒は、水、エタノール、アセトン、DMSO のいずれかとする。溶媒の選択は、以下の手順にしたがって決定する。

- 1) 各溶媒毎に 1 本の容量が 10mL であるスピッツ型ねじ口ガラス遠心管を用意する (計 4 本)。
- 2) スピッツ型ねじ口ガラス遠心管に被験物質を 50mg ずつ入れる。
- 3) 溶媒を 100  $\mu$ L 添加し攪拌する。なお、攪拌は、遠心管に栓をした後、遠心管の上部を持ち先端を指で数回たたいて行うか、超音波破碎機や試験管ミキサーを用いて行う。
- 4) 3) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 100  $\mu$ L 添加し攪拌する (250mg/mL)。
- 5) 4) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 300  $\mu$ L 添加し攪拌する (100mg/mL)。
- 6) 5) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 500  $\mu$ L 添加し攪拌する (50mg/mL)。
- 7) 6) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 1000  $\mu$ L 添加し攪拌する (25mg/mL)。
- 8) 7) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 3000  $\mu$ L 添加し攪拌する (10mg/mL)。
- 9) 4 種溶媒の中で最も高濃度の被験物質を溶解する溶媒を選択する。
- 10) 溶解の程度が同じである場合は、水、エタノール、アセトン、DMSO の順で試験に用いる溶媒を決定する。

被験物質を溶解した媒体 10 $\mu$ L を赤血球 990 $\mu$ L に添加するため、最終濃度は投与した濃度の 1/100 となる。

#### 4. 9. 被験物質溶液の調製（8項参照；試験記録①，②，③，⑥，⑭使用）

##### 4. 9. 1. 予備試験

被験物質溶液を 4 水準作製する。希釈においては以下の表に従う。

希釈列	原体が固体の場合	原体が液体の場合
第 1 水準	最高溶解濃度	原体
第 2 水準	最高溶解濃度の 10 分の 1	最高溶解濃度
第 3 水準	最高溶解濃度の 100 分の 1	最高溶解濃度の 10 分の 1
第 4 水準	最高溶解濃度の 1000 分の 1	最高溶解濃度の 100 分の 1

陽性対照としてアクリジン 10% (w/v) アセトン溶液を最高濃度とし、5 倍水準希釈系列を 4 水準調製する。

##### 4. 9. 2. 本試験

###### 1) 原体が固体の場合

最高溶解濃度を含む 4 倍希釈系列を 4 水準作製する。なお、予備試験において溶血度の差が最高溶解濃度より低濃度において最大となった場合には、予試験において、溶血度が最大であった濃度の 16 倍の濃度を本試験の最高濃度とし、その最高濃度を含む 4 倍希釈系列を 4 水準作製する（但し、最高濃度が最高溶解濃度を超える場合は最高溶解濃度を最高濃度とする）。

陽性対照としてアクリジン 10% (w/v) アセトン溶液を最高濃度とし、5 倍水準希釈系列を 4 水準調製する。

###### 2) 原体が液体の場合

原体を含む 4 倍希釈系列を 4 水準作製する。なお、予備試験において溶血度の差が原体より低濃度において最大となった場合には、予試験において、溶血度が最大であった濃度の 16 倍の濃度を本試験の最高濃度とし、その最高濃度を含む 4 倍希釈系列を 4 水準作製する（但し、最高濃度が原体を超える場合は原体を最高濃度とする）。

陽性対照としてアクリジン 10% (w/v) アセトン溶液を最高濃度とし、5 倍水準希釈系列を 4 水準調製する。

#### 4. 10. 赤血球懸濁液の調製（8項参照；試験記録①，②，⑥，⑭，⑯使用）

綿羊無菌保存血を脱脂綿で濾過し、3 倍量の生理食塩水で洗い流した後、遠心分離を行う（3000rpm, 10min）。血漿をアスピレーターを用いて除去し、もとの綿羊無菌保存血の 4 倍量の PBS (-) を加えてピペッティングを行い、遠心分離を行う

(3000rpm, 5min). この PBS (-) による洗浄操作をさらに 2 回行い, 溶血が生じていない(上清の緩衝液がほぼ無色透明)ことを確認後, 上清の緩衝液をアスピレーターを用いて除去する. 残りの沈殿した赤血球を原液として, PBS (-) にて 40 倍に希釈して 2.5% (v/v) の赤血球懸濁液を調製する. これらの遠心操作は赤血球の浮き上がりを防ぐためにブレーキオフ機能を使用することが望ましい.

#### 4. 1 1. 完全溶血 (100% control) の調製

2.5% (v/v) 赤血球懸濁液 1mL を 1.5mL チューブに分注し, 液体窒素中にて 1 分間凍結させた後, 水浴させて溶解させる. 4 枚のプレートを使用する場合, 1mL の完全溶血を 9 本程度作製しておく.

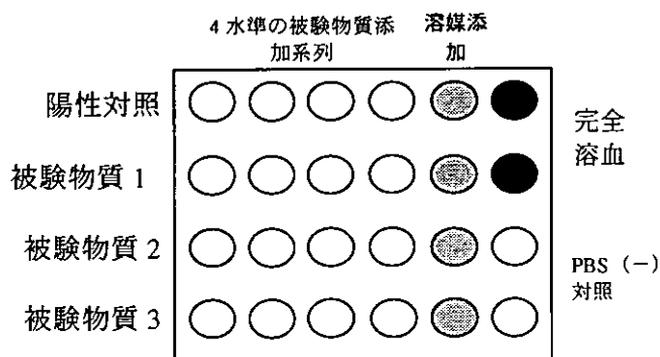
#### 4. 1 2. 被験物質の添加

24 穴マルチウェルプレートに被験物質添加用ウェルと完全溶血添加用ウェルを割り付ける. 被験物質添加用ウェルに, 2.5%赤血球懸濁液 990 $\mu$ L を分注器を用いて分注し, 被験物質溶液, 溶媒または PBS (-) 10 $\mu$ L を各ウェルに加える.

完全溶血用ウェルには完全溶血を各 990 $\mu$ L ずつ分注した後, PBS (-) 10 $\mu$ L を加える.

実験は通常 duplicate で行い, さらに照射用, 非照射用プレートを設定するため, 陽性対照と 3 被験物質で 4 枚のプレートを必要とする.

被験物質溶液を添加後, プレートミキサーを用いて良く混和し (30sec), 次項に従い, 照射用プレートの光照射を行う. 非照射用プレートはアルミホイルで遮光して照射終了まで室温で放置する.



#### 4. 1 3. 光照射 (8 項参照 ; 試験記録④, ⑤, ⑥, ⑭使用)

光源のスイッチを入れ, 約 10 分放置後, 紫外線強度計 (UVA-Meter, Dr. Hönle GmbH 社製) を用いて 24 穴マルチウェルプレートの蓋を透過した紫外線 (UVA) 強度を測定する. このとき, プレートを置く位置, 測定部位によっても強度が異なるため, 6ヶ所の測定値の平均を求める. 照射時間は次の式にしたがって求め, 照射用のプレートのみ UVA 15J/cm<sup>2</sup> (2.7-2.9 mW/cm<sup>2</sup>) を照射する. 一回の照射で複数のプレートを照射してもかまわない.

紫外線強度: A (mW/cm<sup>2</sup>)

照射時間 (s) = (15 × 1,000 mJ/cm<sup>2</sup>) / (A mW/cm<sup>2</sup>)

(提案施設での通常値：約 5,170 秒(2.9 mW/cm<sup>2</sup>) —約 5,560 秒(2.7 mW/cm<sup>2</sup>))

なお、プレートを置く位置は紫外線強度がなるべく一様な部位を選択する。また、明らかに照射むらがある場合には照射場所のローテーションも考慮する必要がある。

#### 4. 1 4. 溶血度の測定 (8 項参照；試験記録⑥使用)

照射終了後、照射用、非照射用プレートを再びプレートミキサーを用いてよく混和し (30sec)、プレートのまま遠心分離 (マイクロタイターバケットを用いて 2000rpm, 15min) し、未溶血の赤血球を沈殿させる。このとき、赤血球の浮き上がりを防ぐためにブレーキオフ機能を使用することが望ましい。24 穴マルチウェルプレートの各ウェルから静かに上清を採取し、96 穴マイクロテストプレートの 2 ウェルに 100  $\mu$ L ずつ移す (duplicate)。被験物質ごとに、照射用、非照射用の上清を割り付ける。

プレートのまま遠心分離できる機種がない場合は、個々のウェルからチューブに採取して遠心分離して行うことも可能であるが、あらかじめ条件設定が必要である。

#### 4. 1 5. マイクロプレートリーダーによる測定 (8 項参照；試験記録⑥, ⑭, ⑮使用)

マイクロプレートリーダーを用いて、540nm 及び 525nm の波長で 96 穴マイクロテストプレートの各ウェルの吸光度を測定する。

#### 4. 1 6. 光溶血度の算出

光溶血度は 540nm における吸光度(OD)を用い、以下の式にしたがい算出する。

溶血度の差 (L;%)

$$\begin{aligned} &= \text{照射プレート} [100 \times (\text{OD}_{\text{被験物質添加}} - \text{OD}_{\text{溶媒添加}}) / (\text{OD}_{\text{完全溶血}} - \text{OD}_{\text{PBS (-) 対照}})] \\ &\quad - \text{非照射プレート} [100 \times (\text{OD}_{\text{被験物質添加}} - \text{OD}_{\text{溶媒添加}}) / (\text{OD}_{\text{完全溶血}} - \text{OD}_{\text{PBS (-) 対照}})] \end{aligned}$$

なお、525nm における吸光度はタンパク変性の指標とする。また、OD 値は 96 穴マイクロテストプレートにおける duplicate で測定した結果の平均値を用いる。

### 5. 評価

以下の基準に従い溶血度の差の平均から光毒性の有無を評価する。

溶血度の差 (L;%)	光毒性の評価
L < 5	-
5 ≤ L < 10	±
10 ≤ L	+

なお、この評価はバリデーション委員会が一括して行うため、各施設で行う必要はない。

## 6. 被験物質の保管場所（8項参照；試験記録①使用）

被験物質は、試薬保管庫，試薬保管用冷蔵庫，試薬保管用冷凍庫，試薬保管用デシケーター，試薬保管用冷蔵庫内デシケーターのいずれかに保管する。

## 7. 保守・点検

照射装置を使用する際，フィルター部分に汚れがないことを確認する。

## 8. 記録の保管

以下の試験記録の原本は，記録保管場所に5年間保管する。

- ①試薬・被験物質管理記録
- ②注射用水・生理食塩液管理記録
- ③被験物質溶解性検討記録
- ④太陽光シミュレーション装置使用記録
- ⑤紫外線強度計使用記録
- ⑥使用機器記録
- ⑭赤血球光溶血試験条件等記録
- ⑮赤血球光溶血試験測定記録
- ⑯血球管理記録

## 9. 参考文献

- 1) Sugiyama M. *et al.* (1994) In Vitro Assays to Predict Phototoxicity of Chemicals: (I) Red Blood Cell Hemolysis Assay. AATEX, 2, 183-191.
- 2) Sugiyama M. *et al.* (1994) Photohemolysis Test and Yeast Growth Inhibition Assay to Assess Phototoxic Potential of Chemicals. Alternative Methods In Toxicology Vol.10 In Vitro Skin Toxicology Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Rougier A *et al.* (ed.) Marry Ann Libert, Inc., New York, 213-221.
- 3) 杉山真理子ら，日本動物実験代替法学会 第5回大会要旨集（秦野） p110-111（1991）。
- 4) Sugiyama M. *et al.* (2002) A Strategic Approach for Predicting Phototoxicity of Cosmetic Ingredients. AATEX, 9, 29-39.
- 5) Mori M. *et al.* (2003) Effects of light sources on the prediction of phototoxicity by the yeast growth inhibition phototoxicity assay and the red blood cell photohemolysis assay, submitted.

## 10. 試験法の改定

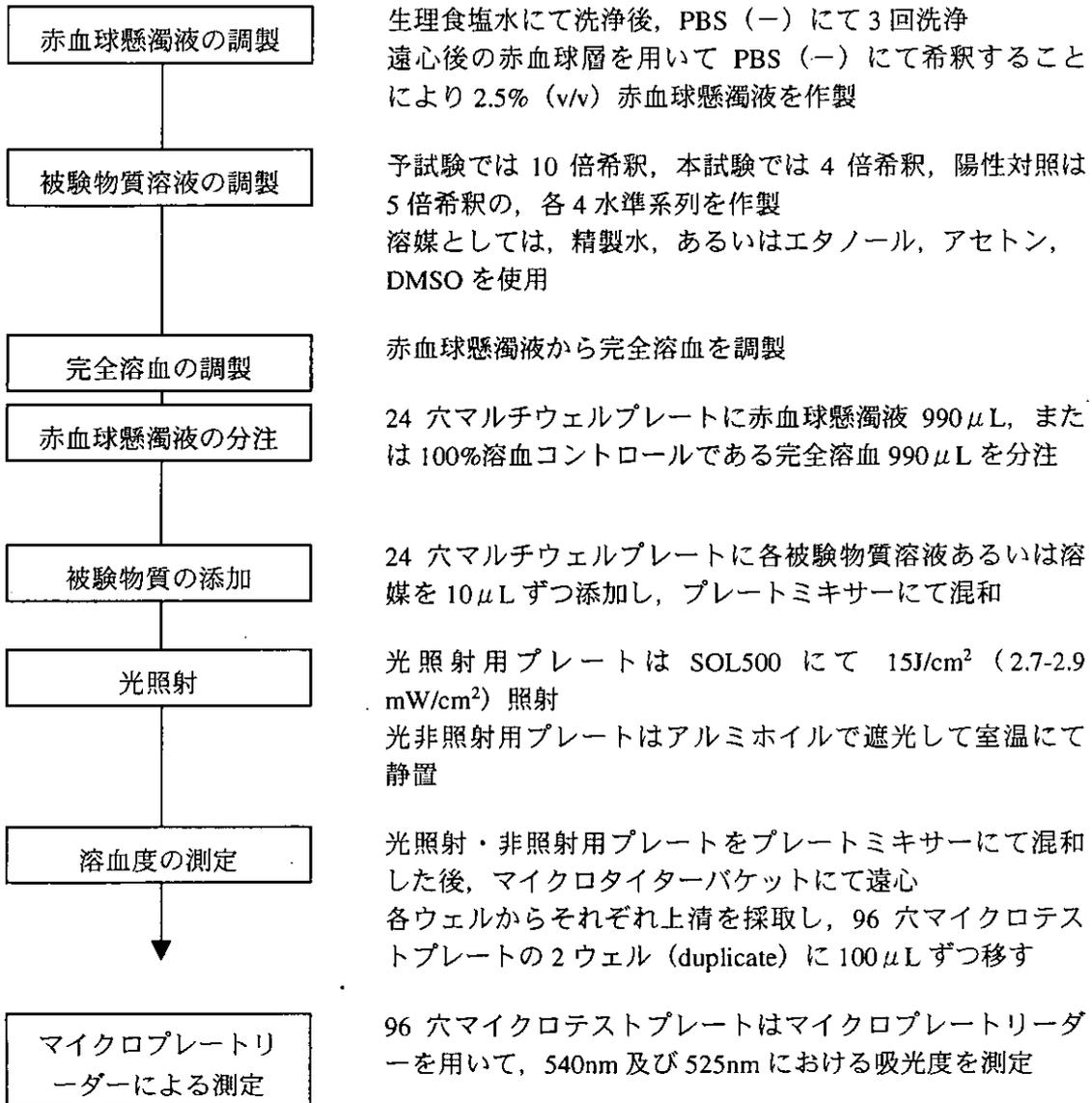
試験法の改定の必要が生じた場合は，バリデーション委員会で検討し，その結果を提案者に示し，承認を受ける。

## 11. 履歴

- 1) 平成15年11月21日 制定

2) 平成 15 年 11 月 23 日 修正

赤血球光溶血試験フローチャート



以上

添付資料 5

ECVAM 訪問報告

大野泰雄

訪問の目的：日本と ECVAM との代替法研究に関する協力について討議すること。

旅行日程：2003 年 8 月 4 日夜—2003 年 8 月 8 日

訪問日時：2003 年 8 月 6 日、10 時～16 時

訪問場所：イタリア ミラノ郊外の Ispra

訪問施設：Institute for Health and Consumer Protection (IHCP)-ECVAM, JRC - European Commission。

訪問者：ECVAM 所長 Thomas Hartung 博士

同行者：豊田英一（代替法に関する厚生労働科学研究班員、日本化粧品工業連合会、安全性部会長、資生堂）、板垣 宏（日本動物実験代替法学会副会長、資生堂）、草野麻弥（通訳）

持参資料

- 1) 厚生労働科学研究および日本動物実験代替法学会との協力で行っている、新しい動物実験代替法評価計画の概要に関する Power point 図
  - 2) 日本動物実験代替法学会の紹介文
- 入手資料（ECVAM、Hartung 所長より）
- 1) Joint Research Center (EC) 紹介
  - 2) ECVAM 紹介パンフレット各種
  - 3) GLP On-line in vitro Toxicology 紹介パンフレット
  - 4) T. Hartung, M. Balls, et al., ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1, Good Cell Culture Practice. ATLA 30, 407-414, 2002.
  - 5) Alternatives to animal experiments: Progress made and challenges ahead, ATPA 30, supplement 2, 2002 (Proceeding of the ECVAM Status Seminar 2002 held on 4-6 June 2002).
  - 6) The registry of cytotoxicity: Toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD50) and to reduce testing in animals, ATLA 31, 89-198, 2003.
  - 7) Andrew P. Worth and M. Balls, Alternative (Non-animal) methods for chemicals testing: Current status and future prospects. ATLA 30, Supplement 1, 2002. (A report prepared by ECVAM and the ECVAM working group on chemicals).

訪問経過

1. 自己紹介の後、大野がECVAMとの協力を推進するという今回の訪問目的について説明した。また、厚生労働科学研究の概要とそのもとで日本動物実験代替法学会との協力で行っている代替法評価プロジェクトの概要、及び平成13年度にtrialとして行った、3T3-NRU光毒性試験代替法の評価について紹介した。また、今回ECVAMを訪問したことの背景として、日本独自のバリデーシンのみに基づいて新しい試験法を国際的に認知してもらうには、色々な点で力不足であり、ECVAMとの協力を通じて、代替法に関して国際貢献したいと考えていること、また、どのような協力がECVAMとの間で可能か検討するために来たことを説明した。また、計画中の代替法のバリデーションへの協力を依頼した。

## 2. ECVAM の活動についてThomas Hartung博士の紹介

ECVAMはEU commissionのDGの一つであるJoint Research Centerの中の一つ組織であるIHCP (Institute for Health & Consumer Protection)に属している。JRCはEUの前身であるEECの設立前からあった欧州鉄鋼石炭協定のもとの原子力等のエネルギーを中心とする共同研究施設として生まれた。JRCには22,000人が勤務しており、その内Ispraには1,600人が勤務している。ECVAMはDIRECTIVE 86/609/EECに基づき、1991年に設立された。ECVAMでは新しい試験法の開発およびその最適化とバリデーション研究を主に行い、妥当性の証明された試験法をEUやOECDレベルで認知させるための活動を行っている。

Thomas Hartung博士は、M. Balls博士の後任として、昨年10月よりECVAM代表として活動している。

1999年の調査に基づく解析結果ではEUにおける動物使用の61%が医薬品開発（この1/3が生物製剤の品質管理のために使用）のために使用されており、環境保護のためには約15%、農薬のためには9%、化粧品の安全性評価のためには1%未満（0.4%）である。ECVAMは基本的には新試験法の開発は行わず、開発された試験法の評価による最適化とプレバリデーション、バリデーション、ポストバリデーションの活動を行っている。ポストバリデーションとは妥当性の示された新試験法をESACやICCVAM等でのpeer reviewを通じてEUの薬局方やEU、OECDレベルでの認知を目指す活動である。このときには文献の蓄積を考慮したweight of evidence法も使用する。この目的のために、ECVAMでは、study（外での研究、例えばvalidation study）、research（ECVAM内での研究）、taskforces、workshop、GLP、GCCP（good cell culture practice）、データベース作成、DG等からの諮問への対応、及び教育を行っている。

ECVAMとICCVAMとは協力関係を結び、Joint workshops and studies、Harmonization of peer-review process、Consultation group between ESAC and ICCVAM、Joint submissions to OECD、GLP、Exchange of personnel等を行っている。

## 3. 協力関係についての議論

我々が代替法学会との協力で行う validation へどこまで協力してもらえるか、また、バリデ

ーションにどこまで ECVAM が関与すれば良いと考えるか聞いた。Hartung 所長は、ECVAM との共同研究については、まず ECVAM にコンタクトして欲しい、まず第一歩を始めることが重要であると意見を述べた後、以下の具体的なコメントがあった。

1) プロトコルや SOPs、Prediction model 等を送ってもらえれば、コメントしても良い。2) データが出たところで、その解析結果にコメントしても良い。3) ECVAM と ICCVAM との共同バリデーションができればもっと良い。なお、4) 基準に則ったデータを伴った試験ならば ESAC へ上程できるし、それについては協力しても良い、と回答した。

具体的な日本のバリデーション計画としてはバリデーションは光毒性試験代替法（資生堂から提案のあった酵母と赤血球を組み合わせた試験法）を当面考えているが、これは既に学会で動き出しており、ECVAM と我々が速やかに対応できた場合にのみ協力が可能であることを説明した。さらに、本試験法については、日本国内で年内に validation が予定されているが、プロトコルや SOP をチェックしてもらうことは可能かの質問に対して可能との返答を得た。また、ECVAM が主催していない validation でも ESAC の peer review は可能かの質問に対して、可能との返答を得た。

一方、眼刺激性試験代替法について日本で行ったバリデーション結果がヨーロッパの雑誌に掲載されているのにも関わらず、無視されている状況を説明し、協力関係の必要性を述べた。これに対し、Hartung 所長からは、現在、Gillet 社ともう一社から眼刺激性試験代替法の validation 計画が提案されており、ECVAM と ICCVAM では眼刺激の Task Force を立ち上げる準備をしていること、また眼刺激性については weight of evidence validation のため、ECVAM は眼刺激性試験データと代替法についての情報を集めており、日本のデータを出してもらえば、その Task Force で検討すると述べられた。そこで、日本側からバリデーション論文と prediction 論文を合わせて提供するとした。必要ならば、computer file も提供できる。そこで更にバリデーションが必要というのならば、それも考えても良いと述べた。さらに日本の指針について ECVAM と ICCVAM の Task Force でコメント可能かと質問したところ、勿論、他のデータと同様にコメント可能という返答を得た。最後に、Hartung 所長から、もし、日本に ICCVAM や ECVAM と同様の組織があれば対等の関係ができるのにとのコメントがあった。

以上、ECVAM と我々との間の非公式な協力関係についての了解が得られた。ECVAM と日本動物実験代替法学会あるいは厚生労働科学研究班との間の正式な協力関係の設立については、上記の協力をすすめた上で、また、日本における JACVAM 設立を待つて行うべきと考え、具体的な契約等の話は出さなかった。また、被験物質等のやりとりも今のところ無いことから、費用負担についての話も出さなかった。

## 2. 国際代替法会議について

2011年の国際代替法会議を日本に誘致しようと考えていること、一方、スペインを押しつけて2008年の大会を日本に誘致するのは適当では無いと考えているが、何らかの主催者側の事情で開催できなくなってしまったならば、2008年でも構わない、との日本の基本的態度を説明した。また、これに関する状況について聞いた。

これに対し、Hartung 所長は、個人的には国際代替法会議が数人のみのグループで非民主的に計画していることについて問題と考えている。また、ドイツとスペインと2回続けてヨーロッパで行うことについても、良いとは思っていない。ただ、前回の会議の際に外に候補者が無かったので、スペインのホセ・カステル (ECOPA 副会長) のところでやると決まったものである。日本が手を挙げれば協力しても良いと回答された。

これに対し、日本としてはスペインを押しつけて手をあげるのは良くないと考えている。もし、スペインでできないと主催者が判断するならば、受けても良いとの基本的考えを繰り返した。

## 3. 日本動物実験代替法学会大会について

今年の日本動物実験代替法学会大会の準備状況について説明するとともに、11月7日代替法開発の現状と今後の展望のセッションでの講演、「欧州での毒性試験のための動物実験代替法の開発の現状」依頼を確認した。訪日スケジュールを連絡して欲しいと依頼した。また、訪日時に国立衛研あるいは厚生労働省での講演を依頼した。

ECVAM の新しい路線として、国際協力や国際的なハーモナイゼーションを重視しているとの印象を強く受けた。また、本邦においても、ECVAM と交渉可能な組織や窓口の必要性を感じた。

## 4. その他。

Hartung 所長の案内で ECVAM の施設を案内してもらった。具体的には、図書室、実験室 (培養室など)、情報管理室等。また、現在、ECVAM と ICCVAM が共同で実施している細胞毒性試験による単回投与毒性試験代替法の validation に関する展示ポスターについて説明された。この共同 validation は、細胞毒性試験で単回投与毒性試験を完全に代替することではなく、In vivo 試験の開始用量を細胞毒性で得ることを目的としていると説明した。

## 5. 感想

Hartung 所長は ECVAM の新しい戦略として、代替法のグローバルハーモナイゼーションを目

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）

分担研究報告書

「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」

「代替法についての情報収集と解析、代替法の評価」

分担研究者 豊田英一 日本化粧品工業連合会、技術委員会安全性部長

研究要旨

本年度は、昨年度末に公布された「動物実験を実施した原料を配合した化粧品の販売禁止に最終期限を設けたEU化粧品指令第7次改正」の各国批准と法制化が進められる年として、EU各国及び関連団体の動きが注目される年であった。

このような中でECVAMは、今後開発すべき試験法への取り組みを明確化させるために重点項目を再編成し公表するとともに、グローバルな共同研究体制を推進してきた。また、EUにおける行政サイドの取り組みとしては、危険物質指令に係わる欧州化学局(ECB)や化粧品非食品に関する科学諮問委員会(SCCNFP)が、安全性評価のために必要な試験項目と試験法を公開し、その中で現時点で適用可能な代替法を明確にした。

米国では、新規試験法の評価をICCVAMに提案するためのガイドラインの最新版が公開されたことから、代替法の開発や評価がこれまで以上に加速することが予想される。また、ICCVAMが承認したLLNAがEPAにより採用されたことは、米国においても行政サイドにおける代替法活用の道筋が明確化してきたことを示すものと考えられる。さらには、ICCVAMとECVAMの相互協力の流れは、確実に加速されつつある。

OECDについては、専門家会議で承認された3T3 NRU PT (in vitro 光毒性試験)等のガイドライン化が遅れているため、本年度は特筆すべき動向は認められなかった。

本邦における代替法の評価と利用に関する活動は、本厚生労働科学研究班が担当している。本年度は、人工膜や再構成皮膚を用いたin vitro 経皮吸収試験法の開発研究、3T3 NRU PT (OECDガイドライン化予定)の弱点を補強できる可能性が期待される新たな光毒性試験代替法の評価、将来の代替法評価機関設置に向けた準備研究を推進してきた。また、日本動物実験代替法学会においては、日本製の再構成皮膚(市販キット)を用いた皮膚刺激性試験のバリデーションを独自進行中である。本年度の特筆すべきこととしては、本厚生労働科学研究班が国会レベルで認識されたこと、代替法評価機関としての実務を推進したこと及びECVAMとの国際的共同研究へ一歩踏み出したことである。

本分担研究の3年間を通しての結論としては、本邦における問題は、本研究班の結論が行政的なガイドライン等への採用に結びつかない点にある。本研究班の目的とする“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(仮称:JaCVAM)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。また、代替法開発の状況を概観すると、今後開発が必要な試験法は、生体反応の解析を含め非常に難易度が高いと考えられ、これらの代替法の開発や評価を総合的に推進するためには、監督官庁の枠を超えた国家レベルでの積極的な研究支援が必要と考える。

A. 研究目的

本年度は、昨年度末に公布された「動物実験を実施した原料を配合した化粧品の販売禁止に最終期限を設けたEU化粧品指令第7次改正」<sup>1)</sup>の各国批准と法制化が進められる年として、EU各国及び関連団体の動きが注目される年であった。

この新しい動きはEUや米国のみならず本邦においても認められており、今後、本邦における代替法の開発や評価、さらにはグローバルハーモナイゼーションにおいて、ターニングポイントとなる年でもあった。

本研究においては、以前よりこれらの欧米の動向をより密接な情報収集活動により把握し、適切

な対応を講じることで、動物実験代替法の開発と利用を促進することを目標に調査研究を推進してきた。

## B. 研究方法

### B-1 情報収集

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との連繋を通じて実施した。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。

（倫理面への配慮）

本研究は動物実験代替法に関する情報を収集するものであり、実験動物の福祉向上を目指すものであり、ヒトや動物の権利や福祉に抵触するところはない。

## C. 研究結果

### C-1 EUにおける動物実験禁止、代替法開発の動向

#### C-1-1 化粧品指令第7次改正

化粧品指令第7次改正が2003年3月11日付けで公布された<sup>1)</sup>。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<sup>2)3)</sup>。

#### ●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）。EU委員会は、OECDのバリデーションの進展を考慮した上で、SCCNFP及びECVAMと協議して、種々の試験の段階的廃止に関する期限などの予定を立案する。

#### ●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

- ・EU委員会は、OECDのバリデーションの進展を考慮した上で、SCCNFP及びECVAMと協議し

て、種々の試験の段階的廃止に関する期限などの予定を立案する。

なお、この化粧品指令第7次改正公表後の動きとして、フランス政府および欧州化粧品原料連合会（European Federation for Cosmetic Ingredients）によるEU議会およびEU理事会に対する提訴が挙げられる<sup>4)</sup>。この提訴の理由は、第7次改正の該当規制が不明瞭で、加盟国批准の際に実施される自国法規制への取り込みは解釈の異なったものとなり、通商上の混乱を引き起こすとしている。現在、この提訴に対する判決はまだなされていない。

また、化粧品指令第7次改正を受けた他の動きとしては、動物試験禁止のタイムスケジュール策定に向けた会議が挙げられる。EU委員会は2004年9月11日までに具体的な試験禁止に向けた活動計画を策定する責任を担っている<sup>1)</sup>。そのため、EU委員会は、行政、学識経験者、産業界代表、動物愛護団体代表によるStakeholder Meetingを開催しているが、現時点ではその詳細は不明である。

#### C-1-2 ECVAMにおける代替法開発状況

ECVAMの諮問委員会であるESAC（ECVAM Scientific Advisory Committee）がこれまでに承認した安全性試験（承認年月）は、3T3 NRU 光毒性試験（1997年11月）、EPISKIN<sup>TM</sup>皮膚腐食性試験（1998年4月）、ラット TER 皮膚腐食性試験（1998年4月）、紫外線吸収剤への3T3 NRU 光毒性試験の適用（1998年5月）、皮膚感作性のためのLLNA試験（2000年3月）、EpiDerm<sup>TM</sup>皮膚腐食性試験（2000年3月）、CORROSITEX<sup>TM</sup>皮膚腐食性試験（2000年12月）、胎児毒性のための胚性幹細胞試験（2002年5月）、胎児毒性のための全胚培養試験（2002年5月）、胎児毒性のためのマイクロマス試験（2002年5月）<sup>6)</sup>であった。しかし、本年度はESACにより承認された安全性試験はなかった。

ECVAMの新代表であるDr. Thomas Hartungは、開発すべき試験法への取り組みを明確化させるために重点領域を以下のように11項目に再編成した<sup>7)</sup>。

- ・全身毒性（単回投与毒性、反復投与毒性、神経毒性、肺毒性、腎毒性、肝毒性、免疫毒性、血液毒性）
- ・局所毒性（光毒性、皮膚腐食性、皮膚刺激性、眼刺激性）
- ・感作性（皮膚感作性、吸入感作性）
- ・発ガン性
- ・生殖毒性

- ・トキシコキネティクス
- ・環境毒性
- ・科学的な情報サービス
- ・定量的構造活性相関
- ・生物学材料(発熱性物質試験)
- ・戦略開発(in vitro 毒性試験やバリデーションにおける GLP、Good Cell Culture Practice (GCCP)のガイドライン、Toxicogenomic approach)

本年度 ECVAM により開催された Workshop は、in vitro 胎児毒性試験(2003年1月)<sup>9)</sup>、皮膚刺激性試験(2003年5月)<sup>9)</sup>、急性毒性試験(2003年9月)<sup>10)</sup>、免疫毒性試験(2003年11月)<sup>11)</sup>、Toxicogenomics(2003年12月)<sup>11)</sup>であった。

### C-1-3 SCCNFP による安全性評価関連

化粧品非食品に関する科学諮問委員会(SCCNFP)による化粧品成分の試験及び安全性評価のためのガイダンス5次改訂版が、2003年10月20日のSCCNFP 25th plenary meetingで採択され、ホームページに公開された<sup>12)</sup>。このなかでSCCNFPによる成分の安全性評価のために要求される安全性試験項目及び試験法の記載がある。SCCNFPの見解は化粧品指令第7次改正に直接関係する行政サイドの意見として重要である。

以下に成分の安全性評価のために提出が要求される基本情報(試験法)を示すが、代替法の使用に関しては、2002年6月4日に提出されたSCCNFPの見解と同様であった。

- 急性毒性 (in vivo)
  - ・固定用量法 (EC B.1 bis, OECD420)
  - ・急性毒性等級法 (EC B.1 tris, OECD423)
  - ・上げ下げ法 (OECD425)
- 刺激性及び腐食性
  - 1) 皮膚刺激性 (in vivo) : (EC B. 4, OECD404)
  - 2) 皮膚腐食性試験 (in vitro)
    - ・ラット TER (EC B. 40, ドラフト OECD430)
    - ・EPISKIN™ (EC B. 40, ドラフト OECD431)
    - ・EpiDerm™ (EC B. 40, ドラフト OECD431)
    - ・CORROSITEX™ (酸と塩基のみに有効: ESAC)
  - 3) 粘膜刺激性
    - ・Draize 法 (in vivo) : (EC B. 5, OECD405)
    - ・バリデーションはなされていないが有効な in vitro 試験
      - ・BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability): 中性有機化合物
      - ・赤血球及び NRU (Neutral Red Uptake): 活性剤
      - ・HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorio-

allantoic Membrane): 最終製品のスクリーニング

- 皮膚感作性試験 (in vivo)
  - ・LLNA (ドラフト OECD429)
  - ・GPMT (EC B. 6, OECD406)
  - ・Buehler (EC B. 6, OECD406) : 感度が低いため科学的な根拠を示す必要あり
- 経皮吸収試験
  - ・経皮吸収試験 (in vivo) (ドラフト OECD427)
  - ・経皮吸収試験 (in vitro) (OECD428)
- 反復投与毒性試験 (in vivo)
  - 1) 反復投与 (28日間) 毒性試験
    - ・経口 (EC B. 7, OECD407)
    - ・経皮 (EC B. 9, OECD410)
    - ・吸入 (EC B. 8, OECD412)
  - 2) 亜慢性 (90日間) 毒性試験
    - ・経口/げっ歯類 (EC B. 26, OECD408)
    - ・経口/非げっ歯類 (EC B. 27, OECD409)
    - ・経皮/げっ歯類 (EC B. 28, OECD411)
    - ・吸入/げっ歯類 (EC B. 29, OECD413)
  - 3) 慢性毒性試験 (EC B. 30, OECD52)
- 変異原性/遺伝毒性試験 (in vitro)
 

以下の2種の試験法を組み合わせることが必要である。

  - 1) 微生物復帰突然変異試験 (AMES 試験) (EC B. 13/14, OECD471)
 

または、in vitro 哺乳類細胞遺伝子突然変異試験 (EC B. 17, OECD476) ただし、この試験法は特定の化学物質にのみ適用すること、また本試験法を選択した科学的根拠を示す必要がある。
  - 2) in vitro 哺乳類細胞染色体異常試験 (EC B. 10, OECD473)
- 発ガン性試験 (in vivo)
  - ・発ガン性試験 (EC B. 30, OECD452)
  - ・慢性毒性/発ガン性複合試験 (EC B. 33, OECD453)
    - ・化学構造的に発ガン性が懸念される場合や in vitro 変異原性試験で陽性の結果が得られた場合は、in vitro シリアンハムスター胚形質転換試験 (OECD 1996) が必要となる可能性がある。
- 生殖毒性試験 (in vivo)
  - ・二世代生殖毒性試験 (EC B. 35, OECD416)
  - ・げっ歯類及び非げっ歯類における催奇形性試験 (EC B. 31, OECD414)
  - ・全胚培養試験 (WEC)、マイクロマス試験 (MM) 及び胎児毒性幹細胞試験 (EST) の3種代替法は CMR 戦略において胎児毒性物質のスクリーニングに有用である。