

平成16年度厚生労働科学研究

安全性評価のための動物実験代替法の開発

および評価体制の確立に関する研究

(H16-医薬-005)

報告書

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬品医療機器等法（薬機法）総合研究事業

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 大野 泰雄

平成17（2005）年 4月

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）

研究班員

大森 崇（京都大学医学部）

小澤正吾（国立医薬品食品衛生研究所）

田中憲徳（食品薬品安全センター）

戸倉新樹（産業医科大学医学部皮膚科）

豊田英一（日本化粧品工業連合会）

吉村 功（東京理科大学工学部）

様式A-1 (5)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成17年4月__日

厚生労働大臣 尾辻 秀久 殿

住 所 〒227-0034横浜市青葉区桂台2-13-15

フリカナ 材ノヤ

研究者 氏 名 大野 泰雄 印

(所属機関 国立医薬品食品衛生研究所)

平成 16年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業) に
係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : 安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究
(H16-医薬-005)

国庫補助金精算所要額 : 金 23,000,000円也 (うち間接経費 0 円)

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添1のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書 (別添3のとおり)
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (別添4のとおり)
5. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添5のとおり)
6. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究

平成 16 年度 総括研究報告書

総括・分担研究報告書 大野 泰雄

平成 17 (2005) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告		
安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究	---	1
大野泰雄		
II. 分担研究報告		
1. 代替法の評価とバリデーション	-----	14
大野泰雄		
2. 代謝活性化能を含む細胞の開発	-----	245
小澤正吾		
3. 光感作性試験代替法開発に関する研究	-----	252
戸倉新樹		
4. 急性毒性予測のための細胞性試験法の開発	-----	256
田中憲穂		
5. 代替法についての国際情勢の調査	-----	270
感作性試験代替法の開発		
豊田英一		
6. 代替法開発のための統計解析手法の研究	-----	286
吉村功		
7. バリデーションの統計解析	-----	291
大森崇		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	305
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	308

厚生労働科学研究費補助金(医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス研究事業)
総括研究報告書

安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究
(H16-医薬-005)

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の化粧品指令第7次改正に関し、この3月初旬までに約7割の加盟国が国内法を整備した。但し、2009年3月に代替法が存在すると予測されたのは、皮膚腐食性、急性光毒性、皮膚刺激性、眼刺激性、経皮吸収/皮膚透過性及び光遺伝毒性のみであった。米国では4種の眼刺激性試験代替法がICCVAMにより評価された。OECDではin vitroの光毒性試験、経皮吸収試験、皮膚腐食性試験(Transcutaneous Electrical Resistance Test及びHuman Skin Model Test)がコーディネーター会議で採択された(2004.4)。

酵母光成育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーの多施設バリデーション報告を評価委員会で評価し再現性の良い方法であると認めたが、酵母試験の反応ダイナミックレンジを大きくする必要があった。RIを用いない感作性試験代替法(LLNA-DA法)を評価し、簡便かつ迅速にLLNA法と同等の結果が得られる方法であると、多施設バリデーションを行うべきとした。

ヒト由来細胞株(THP-1, U-937)を用い、CD86やCD54発現亢進を指標にした感作性試験代替法を開発した。また、ヒト表皮角化細胞を用い、アポトーシス誘導を指標とするIn vitro光アレルギー性試験を検討し、フローサイトメトリー法で解析する方法を確立し、非常に簡便でかつ鋭敏な方法であることを示した。

S9mix存在及び非存在下で21化学物質の細胞毒性の IC_{50} 値を求め、 LD_{50} 値および反復投与毒性の無影響量との相関を調べたが、6時間処理では良い相関は得られなかったが、24時間処理では相関は著しく改善された。皮膚構成細胞に発現するP450分子種を明らかにした。また、CYP1A2を組み込んだ細胞系を用いてヘテロサイクリックアミン2種の代謝活性化による殺細胞作用を検討したが、皮膚腐食性評価の指標としては不十分であった。

遺伝毒性や発がん性における閾値存在について、in vitro試験で用量反応関係のある閾値に限定できる場合は、統計学的な判断が可能であるということを論証した。マウスリンフォーマ試験の解析には大森法が最良であることを示した。ヒト皮膚3次元モデルを用いた皮膚刺激性試験においてミスの起こりにくいデータ入力フォーマットを作成するとともに、データクリーニングの手順書を作成した。また、ET50の推定法についてロジスティックモデルと対数線形モデルの併用が有効であることを確かめた。

分担研究者

豊田英一 日本化粧品工業連合会
技術委員会
田中憲穂 食品薬品安全センター
秦野研究所
小澤正吾(国立医薬品食品衛生研究所
薬理部)
吉村 功(東京理科大学工学部
経営工学科)
大森 崇(京都大学医学部)
戸倉新樹(産業医科大学医学部皮膚科)

動物実験については欧米を中心に動物愛護団体等からの反対運動が活発に行われており、動物を用いない安全性試験代替法の開発が迫られている。そこで、本研究では代替法に関する国際情勢を考慮しながら、化粧品や医薬品の安全性評価のために用いられている試験法で代替法の開発が十分でないもののうち、単回投与毒性試験、感作性試験、光感作性試験の代替法及び代謝活性化を介した毒性を評価するin vitro試験系を開発する。また、開発された試験法が行政試験法として適切であるか評価する。また、代替法開発のための統計解析手法の研究を行う。

具体的には

A. 研究目的

1) 動物実験代替法に関する国際情報を収集する。

2) 開発された代替法については、行政試験法として受け入れても現在の安全性評価に支障を来さないか否かを評価する。なお、開発者のみのデータではその評価に必要な情報が十分に得られないことから、必要に応じて独自に多施設バリデーションを行い、その再現性や in vivo 試験結果との対応性を明らかにする。

3) 皮膚に存在する代謝活性化酵素を恒常的に発現している細胞を用いた試験法を開発する。

4) 急性毒性を in vitro の細胞死で予測するために、化学物質の生体内での代謝因子を組み込んだ試験系を開発する。

5) in vitro 感作性を検討するために、免疫担当細胞を用い CD86 発現を指標とする試験系を開発する。

6) 光アレルギー性接触皮膚炎の原因となる物質の光感作能を in vitro の系で評価する。

7) 代替法実験データからの毒性の有無、インビボ結果との対応性を判定するために、どのような統計解析手法を用いるのが良いか、開発と性能評価の両面から検討する。

B. 研究方法

B-1) 海外における代替法情報の調査

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 との連携を通じて実施した。この他、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-2) 新規代替法の評価

研究班による新しい代替法の評価希望の募集は日本動物実験代替法学会ホームページ及び同ニュースレターで行った。研究班では応募された試験法の概要を検討し、更に詳細な評価を行う価値があるか否かを検討し、価値があると判定された方法については、日本動物実験代替法学会に当該分野の専門家や代替法専門家、統計専門家により総合的な評価を行うよう依頼する。この結果、代替法として可能性のある方法の場合はより広い専門家、臨床医師、行政担当者、業界代表者等からなる評価会議で最終的な評価を行う。評価会議の委員は以下のとおり。

評価会議委員長

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)

委員

井上 達(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長)

小野 宏((財)食品薬品安全センター 秦野研究所、OECD 代表)

紀平哲也(厚生労働省医薬食品局審査管理課)

佐神文郎(エーザイ(株)信頼性保証本部レギュラトリーサイエンス推進部、日本製薬工業協会基礎部会長)

田中憲穂(食品薬品安全センター 秦野研究所細胞毒性学研究室長)

戸倉新樹(産業医科大学 医学部皮膚科教授)

豊田英一((株)資生堂安全性研究所、日本化粧品工業連合会技術委員会委員長)

西岡 清(横浜赤十字病院長)

溝口昌子(聖マリアンナ医科大学皮膚科教授)

宮地良樹(京都大学医学研究科皮膚科学教授)

吉田武美(昭和大学薬学部毒物学教授)

吉村 功(東京理科大学工学研究科経営工学教授)

B-2-1) 光毒性試験代替法の評価

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーの評価方法については、平成14年および15年度報告に述べた。今年度は昨年度に中間報告された多施設バリデーションの結果の最終報告を受け、更に評価委員会で評価した。なお、評価委員会の組織・構成は以下のように変更した。

評価委員会委員長

田中憲穂((財)食薬センター・秦野研究所 2004年12月まで)

大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所・薬理部 2005年1月より)

光毒性試験代替法評価WG担当副委員長

大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所・薬理部 2005年12月まで)

岡本裕子((株)コーセー基礎研究所)

光毒性試験代替法評価WG委員

今井弘一(大阪歯科大学中央歯学研究所組織培養実験施設長)

板垣 宏((株)資生堂ライフサイエンス研究センター安全性研究所)

大森 崇(京都大学大学院医学研究科社会健康医学系専攻医療統計学部門)

小島肇夫(日本メナード化粧品(株)総合研究所)

畑尾正人((株)資生堂基盤研究センター)
若栗 忍((財)食品薬品安全センター・秦野研究
所)
オブザーバー
笛木 修((独)医薬品医療機器総合機構・新薬
審査第一部)

B-2-2) 皮膚感作試験代替法の評価

RI を用いない皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA)法はダイセル化学工業より上記光毒性試験バッテリー申請の時に作成した様式に従って、申請書が作成された。研究班ではこの方法が行政試験法としての可能性の高い方法であると考え、日本動物実験代替法学会(代替法学会)に詳細な評価を依頼した。そこで、代替法学会では新たに感作性試験代替法評価のためのワーキンググループ(WG)を評価委員会に設置し、検討を行った。評価にあたった委員は下に示した。第一回のWGでは申請書を慎重に検討し、18項目にわたる質問を出した。第二回会議ではそれに対する申請者の回答を検討し、試験の特徴を明らかにするため、更にリンパ球サブタイプの変動を調べる追加実験を求めた。第三回会議では申請者から提出されたフローサイトメトリーを用いた検討結果を検討し、一次評価報告書(案)をまとめた。

評価委員会委員長

田中憲穂((財)食薬センター・秦野研究所 2004年12月まで)

大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所・薬理部 2005年1月より)

感作性試験代替法評価WG担当副委員長

大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所・薬理部 2005年12月まで)

金澤由基子((財)食品薬品安全センター・秦野研究所・毒性部 2005年1月より)

感作性試験代替法評価WG委員

五十嵐良明(国立医薬品食品衛生研究所・療品部)

金澤由基子((財)食品薬品安全センター・秦野研究所・毒性部)

高木弘毅(アベンティスファーマ(株)研究開発本部・臨床研究センター・生物統計・データマネジメント部 統計グループ)

筒井尚久(三菱ウェルファーマ(株)研究本部安全性研究所)

手島玲子(国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部)

萩野滋延((株)資生堂ライフサイエンス研究セン

ター安全性研究所)

牧 栄二(ヤンセン協和(株)研究開発本部データ管理部)

オブザーバー

笛木 修((独)医薬品医療機器総合機構・新薬審査第一部)

B-3) in vitro 感作性試験法の検討

細胞は、THP-1(ヒト単核球細胞株)及びU-937(ヒト組織球リンパ腫細胞株)をATCCより購入して使用した。CD86及びCD54の発現は、上記の細胞に被験物質を処理し、細胞生存率とともにフローサイトメトリーを用いて測定した。

B-4) in vitro 光感作性試験代替法の検討

UVB誘導性のヒト表皮角化細胞のアポトーシスをフローサイトメトリー法で解析した。ヒト表皮角化細胞株はHaCaTを用いた。紫外線照射装置は、Broadband-UVB照射装置とNarrowband-UVB照射装置の2種類を使用した。上記2種類のUVBをディッシュに80%セミコンフルエントに培養したHaCaT細胞に対して照射後、6、12、24時間CO₂インキュベーター内で培養し、フローサイトメトリーでアポトーシス、ネクローシスを解析した。アポトーシスの指標としては、フォスファチジルセリンの細胞外細胞膜発現を用いた。ネクローシスの指標としては、7-AADによる核染色を用いた。

B-5) 代謝活性化系を含む安全性試験代替法の開発

B-5-1) S9mixを用いた試験系

化学物質は化学物質毒性試験報告 Vol.1-9(化学物質点検推進連絡協議会、1994~2002)に掲載されている化学物質の中から21種類を選択した。これらの物質を代謝による影響を基に4つのパターン、即ちType A:毒性を示さないもの、Type B: S9の存在(S9+)および非存在(S9-)で毒性発現に差がないもの、Type C: S9+で毒性が強くなるもの、Type D: S9+で毒性が弱くなるものの中から21物質を選んだ。これらの物質は、単回経口投与毒性試験でLD50¹や反復経口投与毒性試験において無影響量が調べられている物質である。細胞毒性検索の為にBALB/c 3T3細胞を用い、代謝活性化系としてはフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンにより酵素誘導したラット肝S9を用いた。本実験の基本プロトコルでは、S9+/S9-で6時間処理後、新鮮培地に交換して更に18時間および24時間培養後の毒性発現を検討した。

B-5-2) 代謝活性化能を有する細胞を用いる試験系

皮膚細胞に発現している薬物代謝酵素分子種の同定するため、成人表皮ケラチノサイト、皮膚繊維芽細胞、胎児表皮メラノサイト、皮膚ランゲルハンス細胞から総 RNA を抽出し、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2A7、CYP2B6、CYP2C、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7、CYP4B1 の相対発現レベルを測定した。皮膚での発現が認められた CYP 分子種につき、cDNA を Genecopoeia 社から購入、または、全長を増幅可能なプライマーで増幅し、哺乳動物発現ベクター pCR3.1 に組み込んだ。

シトクロム P450 の一分子種、CYP1A2、およびアリルアミン N-アセチル転移酵素 NAT2 の両方を組み込んだチャイニーズハムスター卵巣由来細胞 CHO は Dr. J. S. Felton から供与された。これら細胞に種々の被験物質を 37℃、24 時間作用させ、その細胞死をコロニー形成率が 37% に減じる被験物質の濃度をもって被験物質の毒性の強度とした。

B-6) バリデーショndataの管理とデータ解析

代替法学会が組織した「皮膚刺激性試験代替法バリデーション研究」を事例として、データ管理・クリーニングの方法を検討した。次に、この検討結果に基づいて、光毒性試験代替法バッテリーのバリデーションでは実施前にデータ記入のためのデータシートファイルを作成した。これらのデータシートファイルをチェックし、誤りや不明な点がある場合は問い合わせを行った。問い合わせの項目を眼刺激性試験代替法バリデーション研究のデータクリーニングと同じ項目を用いることで、効果を計ることとした。その結果をバリデーション研究の報告として整理した。

B-7) 代替法実験結果の統計解析手法の検討

遺伝毒性や発がん性における閾値検討のための統計解析法の検討では、過去に行われた議論、事例に基づいて閾値問題の定式化を行った。次に、発がん性に関した一つの事例を題材にして、閾値推定の方法についての考察を行った。

マウスリンフォーマ試験(MLA)結果の統計解析法の検討では、比較する統計解析法として、1 次回帰検定、2 次回帰検定、ダネット型検定、大森法を対象にした。大森法は、ダネット型検定、Margolin 手順、1 次回帰検定を逐次適用する複合手法である。

ET50 のための観測時点配置と推定法検討の対象として、3次元ヒト皮膚モデル「Vitrolife Skin」

を用いた皮膚刺激性試験の評価指標として ET50 を考えた。現実のバリデーション研究で頻発する、ET50 が推定できない実験データにおける推定法として、複数の推定法を逐次用いる方法を考え、この方法の性能を、シミュレーション実験を通して検討した。さらに、その推定精度を良くするには、どのように測定時点を配置するのが良いかを、シミュレーション実験を行い、検討した。

(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。研究の多くは情報収集と解析、統計解析、および培養細胞を用いた *in vitro* の研究である。動物を用いる実験では動物の苦痛が最小限になるようにした。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。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) 海外における代替法情報の調査

C-1-1) EU における状況

2003年3月11日付けで公布されたEUの化粧品指令第7次改正では、2004年9月11日までに各国の国内法を整備し、施行することが要求されているが、2005年3月2日時点で国内法を作成した国は18カ国(Belgium, Czech Republic, Estonia, France, Germany, Hungary, Ireland, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, Netherlands, Poland, Slovakia, Slovenia, Spain, United Kingdom)、国内法を作成中の国は7カ国(Austria, Denmark, Finland, Greece, Italy, Portugal, Sweden)であり、Cyprusについては情報が得られなかった。

化粧品指令第7次改正では種々の動物試験の段階的廃止に関する timetable (案) 作成が要求されており、ECVAM は 2004年4月30日に、"Report for establishing the timetable for phasing out animal testing for the purpose of the Cosmetic Directive" を報告した。これによれば皮膚腐食性、皮膚刺激性、光毒性、光遺伝毒性を除く多くの試験法は、化粧品指令第7次改正の禁止年には完全代替は困難と予測されている。この報告書について化粧品非食品に関する科学諮問委員会(SCCNFP; Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers)はECVAMの作成した動物試験廃止に関する timetable 案は受け入れ難くかつ非現実的であるとした。

SCCNFP の意見書では、完全代替は非現実的であり、現実的な対応としての部分代替の予測も記載している点の特徴である。SCCNFP は、動物試験の禁止年までに完全代替が可能なのは経皮吸収のみと予測されている。

一方、EU 委員会は 2004 年 10 月 1 日付けで、これまで公表された ECVAM 案や SCCNFP の意見をもとに、必要な資源(科学技術、ヒト、財政面での支援と調整)の全てについて最適条件が設定された場合として、動物試験廃止が予測される時期を答申した¹¹⁾。この答申によると、皮膚腐食性、急性光毒性、皮膚刺激性(Hazard identification)、眼刺激性、経皮吸収/皮膚透過性及び光遺伝毒性については、期日以前に代替法が存在すると予測している。

C-1-2) 米国における状況

ICCVAM は急性全身毒性を評価するための細胞毒性試験を ECVAM と共同でバリデーションを実施中であり、2 種の細胞毒性試験のプロトコルの最新版を告示した(2004.10.19)。また、ICCVAM は皮膚腐食性試験代替法の評価の実施基準改訂版を公表した(2004.5.28)。また、4 種の眼刺激性試験代替法が強刺激性物質と腐食性物質の評価に使用できるか否かを検討するための専門家会議を開催した(2005.1.11-12)。この 4 種の刺激性試験代替法は BCOP(Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay)、HET-CAM(Hen's Egg Test- Chorioallantoic Membrane Test)、ICE(Isolated Chicken Eye Test)及び IRE(Isolated Rabbit Eye Test)である。

C-1-3) OECD の動向

約 1 年近く動きが止まっていた in vitro 光毒性試験ガイドライン 432、in vivo 経皮吸収試験ガイドライン 427、in vitro 経皮吸収試験ガイドライン 428、in vitro 皮膚腐食性試験ガイドライン 430(Transcutaneous Electrical Resistance Test)及び in vitro 皮膚腐食性試験ガイドライン 431(Human Skin Model Test)について、各国コーディネーターによる第 16 回ワーキンググループ会合が 4 月に開催され、これらのガイドラインが採択された。現在審議中の試験ガイドラインには in vitro 皮膚腐食性のための膜バリア試験ガイドライン 435(Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion)、小核試験ガイドライン 487(Micronucleus Test)がある。

C-2) 新規代替法の評価

C-2-1) 資生堂から提案された光毒性試験代替法バッテリーについて

資生堂から提案された「酵母-赤血球試験」は平成 15 年度に開催された評価委員会で適切な方法であると評価されたが、多施設でのバリデーションの結果が無かったことから、施設間のばらつきを評価するための多施設バリデーションを実施された。その結果については経過報告に基づき、平成 15 年度報告に多くを述べた。今年度は日本動物実験代替法学会バリデーション委員会が提出された。その内容は前年度報告と重複するところが多いのでここでは省略し、バリデーション委員会の報告書に基づいて行った評価委員会で多施設バリデーション結果の評価結果を以下に要約する。

① 施設内・施設間再現性

実験条件に問題があった b 施設を除けば、施設内での再現性は良かった。また、施設間の違いは陽性と擬陽性、擬陽性と陰性の範囲に収まっていた。適切な設備を備えた施設で訓練を受けた者が行えば再現性は悪くないとされた。

② 酵母-赤血球試験の妥当性

本研究の結果は 1 施設を除き、擬陽性を陽性と判定した場合、感度が 100%、特異度が 47%となる。擬陽性を陽性とすれば、陽性物質を誤って陰性と判定しないという意味で、酵母-赤血球試験の有用性が示されたことになる。

③ カットオフ値

赤血球光溶血試験のカットオフ値については特に問題は認められなかったが、酵母試験の dynamic range が陽性対照で常に 10mm 位の値を示す条件を資生堂に確立してもらう必要がある。その上で、カットオフ値を適切に定めることによって感度を高めることができると思われる。

④ 吸光度の測定波長

溶血はヘモグロビン変性の影響を受けにくい 525nm で検出する方がばらつきが少ないことから、SOP でも波長を 525nm に変更すべきである。

⑤ 判定方法の改善

酵母-赤血球試験での総合判定には、2 回

の実験の再現性吟味に加えて、複数濃度の試験による用量反応関係を利用する方が良いと思われる。特に非照射下での結果に用量反応関係がある物質の場合は慎重な判定を行うべきである。この場合、3T3-NR 法でも利用されているように、光照射と非照射で明らかに差のある用量反応関係が得られた場合は光毒性ありと判断しても差し支えないと考えるが、用量作用関係をきちんととれなかった時には、再試験を行うべきとした方が良いとの意見があった。

⑥3T3-NRU 法との比較

in vivo との対応性については、3T3-NRU 法より優れているとの証拠は無いが、擬陽性も陽性と判断すると、感度はほぼ同等と考えられる。

⑦GLP 遵守

かなり大幅なデータクリーニングが必要であった。GLP 遵守を徹底すべきである。または、データの信頼性確保のためのシステムを作っておくべきである。

⑧その他

i) 6-Methylcoumarin と Bithionol はモルモットでは陰性であったが、他の動物種において陽性反応が確認されていることから、光毒性陽性物質として判断して良い。chlorhexidine については光毒性は弱いと陽性との報告もある。

ii) Rose Bengal の様に可視光で活性化されるものはランプによる影響を受けやすい可能性がある。

iii) 太陽光シミュレータでは培養液の温度上昇による影響に留意する必要がある。

iv) 試験結果はランプや検出器により影響を受けやすいことから、陽性対照物質への応答の幅を決め、試験の成立を判断すべき。

v) 酵母試験による非水溶性物質の評価については更に検討が必要である。

vi) 被験物質を増やして更に多施設でのバリデーションが必要であるか否かについては今後の

検討課題である。

C-3) *in vitro* 感作性試験法の検討

資生堂と花王の両社が独自に開発してきた試験プロトコールを共有化し、より精度が高く、汎用性も高い試験方法の開発を目指しプロトコールの最適化を行った。具体的に我々が検討した点は、①前培養時間、②被験物質処理時間、③播種する細胞数、④細胞毒性試験(MTT 法)による濃度設定、⑤抗体の種類、⑥抗体の処理濃度、⑦非特異的染色を防ぐための Fc レセプターブロックとアインタイプコントロールの導入などである。これらの項目について、感作性物質と非感作性物質の違いを明確に捉える条件を設定した。その結果、本試験法における曝露時間は 24 時間あるいは 48 時間、播種する細胞数は 1×10^6 個/ML が適切であるとした。なお、一般に細胞の活性化はその増殖性と関係があること言われているが、高密度で細胞を播種し、ある程度増殖が抑制されている方が感作性物質による活性化が生じやすい可能性が考えられた。これらの条件検討結果に、これまでの知見も加味して以下のような試験プロトコールを策定した。

- ・細胞株: THP-1
- ・測定指標: CD86、CD54
- ・被験物質処理時間: 24 時間
- ・被験物質: 9 品 (感作性物質 6 品、非感作性物質 3 品)
- ・処理濃度: MTT 法により求めた IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) の 0.1 倍, 0.5 倍, 1 倍および 2 倍の 4 濃度
- ・感作性物質: DNCB, *p*-phenylenediamine (*p*PD), 2-mercaptobenzothiazole (20-MBT), nickel sulfate hexahydrate, cobalt sulfate heptahydrate, ammonium tetrachloroplatinate
- ・非感作性物質: SLS, Tween 80, DMSO

なお、フローサイトメトリーは FACSCalibur (Becton Dickinson) および EPICS XL-MCL system II (Beckman Coulter) を用いた。

この試験プロトコールに基づいて行ったバリデーション結果、相対発現量が 150%以上を陽性とした場合、CD86 では 2-MBT が 2 施設とも陰性となった以外は全ての感作性物質において 2 施設で陽性となり、逆に非感作性物質で陽性となる化合物は認められなかった。一方、CD54 では、相対発現量が 150%以上を陽性とした場合、*p*PD 以外は全ての感作性物質において 2 施設とも陽性となったが、非感作性物質である Tween80 が陽性となる場合もあった。CD86 と CD54 を組み合わせた場合、各指標単独では捉えられなかった 2-MBT や *p*PD が陽性となり、*in vivo* 試験結果と

の対応性は 2 施設とも良好であった。相対発現量が 200%以上を陽性とした場合には、感作性物質において 150%以上陽性とする判断基準に較べて検出率は下がるが、非感作性物質はいずれにおいても陰性と判断された。CD86 と CD54 を組み合わせた場合には、今回評価した9サンプルでは *in vivo* 試験の結果とすべて一致した。また、2 施設間再現性は、本試験結果では良好と判断された。

C-4) *in vitro* 光感作性試験代替法の検討

UVB 誘導性ヒト表皮角化細胞において、Broadband-UVB および Narrowband-UVB を照射した後のアポトーシス、ネクローシスの推移を解析した結果、紫外線照射量、時間依存性にアポトーシス、ネクローシスが增加し、Broadband-UVB では、照射 12 時間をピークに、そして、60 mJ/cm² をピークにアポトーシスを生じていた。一方、Narrowband-UVB では照射後 24 時間をピークに、そして、300, 600 mJ/cm² をピークにアポトーシスが現れることが分かった。

TCSA を 10⁻⁴ M でインキュベーションし、UVA 4 J/cm² 照射したものは、TCSA が HaCaT 細胞の細胞表面、細胞質内、また核内にと広く局在していることが確認され、TCSA 光修飾表皮細胞を作製できていることが確認できた。これに UVA 1, 2, 4 J/cm² 照射し、フローサイトメリーでアポトーシス、ネクローシスを解析した。TCSA 10⁻⁴ M の濃度では、UVA 非照射群では 40%程がネクローシスを生じていたが、UVA 照射群は 90 % 以上でネクローシスを生じていた。10⁻⁵ M で非照射群でネクローシス細胞はほとんど認めなかった。つまり、TCSA の細胞毒性は 10⁻⁵ M 以下であれば、ほとんどないと思われた。次に細胞毒性のない 10⁻⁵ M で UVA 4 J/cm² 照射したところ 40% 近くがネクローシスを生じていた。一方、アポトーシスについては UVA 非照射群、また UVA 1, 2 J/cm² 照射群ではほとんど認められなかった。しかし、UVA 4 J/cm² 照射群では 10⁻⁵ M の濃度で約 20 % 近くがアポトーシスを生じていた。

C-5) 代謝活性化系を含む安全性試験代替法の開発

C-5-1) S9mix を用いた試験系

試験した化学物質中、S9+および S9-の条件下で共に細胞毒性を示さない物質 (Type A) は thiophene と trimethyl phosphate の 2 物質で、これらの物質は最高濃度 (5 mg/mL もしくは 10 mM) においても生存率が 70%以上を示した。S9+および S9-の条件下で同程度の毒性を示す

物質 (Type B) は、2-tert-butylphenol, 2-ethylanthraquinone, 2,3,6-trimethylphenol, thiourea dioxide の 4 物質であった。S9+で毒性が強くなる、いわゆる、代謝活性化されて毒性が発現する物質 (Type C) は、acenaphthene, 3-aminophenol, 2,4-di-tert-butylphenol, 3-ethylphenol, 4-ethylphenol, 3-methylphenol, 4-nitro-o-anisidine, 1-methoxynaphthalene, n-ethylaniline, n-methylaniline の 10 物質であった。特に、acenaphthene, 3-aminophenol, 3-ethylphenol, 4-ethylphenol, 3-methylphenol, 1-methoxynaphthalene の 6 種の物質は、S9+と S9-の条件下では IC₅₀ 値で 10 倍以上の毒性の差が見られた (Fig. 3)。S9+で毒性が弱くなる物質 (Type D) は、4-aminophenol, 6-tert-butyl-m-phenol, di-n-butyl adipate, 2-ethylhexyl methacrylate, n-phenylmaleimide の 5 物質であった。そのうち、4-aminophenol, di-n-butyl adipate, 2-ethylhexyl methacrylate の 3 物質は S9+で殆ど毒性が認められず、S9 により代謝を受け速やかに無毒化する事が示唆された。

S9-および S9+の細胞毒性値と *in vivo* 急性毒性の LD₅₀ 値の相関を調べたが、いずれの条件下でも細胞毒性と *in vivo* 急性毒性との間に良い相関は得られなかった。 *in vivo* 反復投与毒性無影響量との相関も認められなかった。そこで、追加実験として S9 非存在下での 6 時間および 24 時間処理した場合の細胞毒性と *in vivo* 毒性の相関を検討したところ、S9-の 6 時間処理の実験において、 *in vivo* 毒性との比較では良い相関が得られなかったが、IC₅₀ 値と *in vivo* 毒性との相関は mmol 換算の場合で、24 時間暴露では r = 0.53 と 6 時間処理の r = 0.19 に比べて相関係数は著しく改善され、検体の処理時間が大きく影響した。

C-5-2) 代謝活性化能を有する細胞を用いる試験系

皮膚細胞に発現している薬物代謝酵素分子種を同定した。その結果、ヒト初代ランゲルハンス細胞では CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A5, CYP3A7、ヒトケラチノサイトでは CYP1A1, CYP1B1, CYP2C, CYP2E1, CYP3A5, CYP4B1、ヒト繊維芽細胞では CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6, CYP2C, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A5, CYP3A7、ヒトメラノサイトでは CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6, CYP2E1 の発現が検出された。これらのうち、CYP2A6, CYP2A6, CYP2E1, CYP3A5, CYP4B1 はヒト肝にも発現が認められていることが知られているのでヒト肝 polyA+RNA (Clontech) を購入し、

Reverse transcriptase-PCR法で全長 cDNA を単離した。その他の CYP1B1, CYP2C (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19), CYP2D6 は Genecopoeia 社から購入した。これらについては、今後、塩基配列の確認の上、使用する予定である。

今回、CYP1A2 単独あるいは CYP1A2 とアリルアミン N-アセチル転移酵素 NAT2 を組み込んだチャイニーズハムスター細胞について、ヘテロサイクリックアミンの障害性を比較した。その結果、IQ については NAT2 の影響が出ているが、NAT2 をさらに組み込んでも細胞毒性が強くなるはなかった。それに対し、PhIP については NAT2 を発現した細胞で、CYP1A2 単独より細胞毒性が強くと発現した。このことより、これらヘテロサイクリックアミンについては、細胞障害性が代謝活性化酵素の導入により確認された。

C-6) バリデーショndataの管理と解析

データの質管理における最大の問題点は、誤入力である。すべてのデータ解析は生データが正しいものとして行われるので、誤入力を防ぐのが、データマネージメントの最大課題である。これを防ぐために、(1)入力に記入漏れがある場合には警告を出す、(2) 不要な入力は受け付けない、(3) 選択肢が限られている場合はメニューから選択させる、(4) GLP 準拠の紙出力との照合を行う、ことを条件に入れた記入シートを用意して、データの提出を行うことにした。結果として、従来の経験よりかなり誤記入を減少させることができた。それでも提出後のチェックで 1%程度の誤記入が見いだされた。

光毒性試験代替法バッテリーのバリデーションのためのデータシートファイルは眼刺激性代替法バリデーション研究のデータクリーニング結果の考察を生かし作成した。結果は、眼刺激性試験代替法バリデーション研究での提出ファイル数に対する問い合わせの延べファイル数が 1.13 倍 (1535/1742) であったのに比べ、光毒性試験代替法バリデーション研究では 0.53 (222/420) であった。

C-7) 代替法実験結果の統計解析手法の検討

閾値を実験的に求めるには、用量 d を複数の水準 d_1, d_2, \dots, d_k に設定して、反応 Y_1, Y_2, \dots, Y_k を観測する実験を行うのが標準である。このデータで閾値の有無を検討するには、まず、用量反応関係を表す関数 $y=f(d;\beta)$ を想定する。この関数の中に閾値を表すパラメータを入れる。たとえば直線回帰であれば、勾配が正で切片が負

であることが閾値の存在を意味する。問題の定式化においては、このように、閾値を表すパラメータを入れたモデルを想定するのが統計学的接近法である。このように問題を設定したとき、統計学的に閾値の有無を判定することは、パラメータについての帰無仮説を、ある対立仮説において十分な検出力で棄却する問題となる。この問題は、対立仮説を限定しない限り有限のサンプルサイズでは解答できない。したがって、閾値の有無を統計的方法で判定するには、用量反応関係を生物学的に限定することが必要になる。たとえば、Hirabayashi et al (2003)は、このような限定したモデルでの選択を通して、閾値の存在についての主張を行っている。本研究では、このやり方で問題に接近するのが統計的に閾値問題を扱う一つの方法論であるということを示した。

MLA の統計解析法のシミュレーションモデルに基づく検討では、第 1 種の過誤 (実質有意水準) を 1% に共通に設定したときの検出力は、用量反応パターンに依存して変わるが、 $2 \times 4 = 8$ パターンの全体に対して比較的共通に高い検出力を保っていたのは、2 次回帰検定で、以下が、大森法、Dunnett 型検定、1 次回帰検定の順であった。

MLA の統計解析法の実データに基づく検討では、一致度を評価指標にした場合、性能の良さは、大森法、Dunnett 型検定、1 次回帰検定、2 次回帰検定の順であった。なお、実質有意水準は 0.3%~0.1%が最良であった。用量変数は用量そのままでも順位変換をしたものでも、大差なかった。反応変数は MF そのままでも、対数を取った LMF でも、大差なかった。また、マイクロエル MLA の方が、一般に agar MLA より高い検出力を保持していた。

ET50 推定法とそのための観測時点設定法の検討では、用量反応関係として、吸光度に対するロジスティックモデルを想定し、最小二乗法で推定したとき、実際に推定値が得られるのは、全体の 63%程度であり、他の場合には推定値が得られないことが分かった。そこで、ロジスティック回帰法で推定値が求まらないときは、対数直線法を用いるという方法を考案したところ、推定値が得られる場合が、97%まで上昇した。ここで対象としている Vitrolife Skin を用いた試験は、実験の進め方や費用・労力の関係で、ET50 が推定可能という範囲で、選択する時点数をなるべく小さくしたい。そのために必要な時点数と測定時点の検討を行ったところ、時点数としては少なくとも 4 時点、できれば最低でも 5 時点が望ましい、という結果になった。測定時点が 4 時点の場合は、測

定時点として、1 時間後と 24 時間後という両端の他に、予想される ET50 値の前後に 2 時間外れたところで測定を行うことが望ましい。もし、5 時点の測定が可能であれば、予想 ET50 の時点でも測定を行うのが精度上望ましいことが分かった。

D. 考察

平成16年度は 2003 年 3 月 11 日に公布された「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」の各国の国内法の整備が進められる年として、また EU 委員会による動物試験の段階的廃止の timetable 案が公表される年として注目される年であった。このうち、国内法の整備状況については、化粧品指令第 7 次改正の期日よりも全般に遅れている模様である。この理由としては、化粧品に係わる法規は各国まちまちであり、整備すべき関連法規が多数存在する国も多いと推定されることが考えられる。

動物試験の段階的廃止の timetable 案についてであるが、ECVAM や SCCNFP の意見を考慮した EU 委員会の答申によると、EU 域内での動物試験が禁止される 2009 年 3 月に代替法が存在すると予測されるのは、皮膚腐食性、急性光毒性、皮膚刺激性 (Hazard identification)、眼刺激性、経皮吸収/皮膚透過性及び光遺伝毒性であった。また、その他の試験については、動物試験が禁止される期限までには代替法がないと予測されている。この EU 委員会による動物試験の段階的廃止の timetable は、各ステーク合意に基づくものであるが、一部化粧品指令に反した予測であり、そのまま認められるとは限らない。EU においては、関係研究者は、化粧品指令第 7 次改正に定めた目標に向かって、多額のファンドを集め、また研究者を集めて、代替法の開発研究に多大な貢献をして行くものと考えられる。

代替法に関するグローバルハーモナイゼーションと代替法の評価体制の構築については、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。この評価体制については、昨年度までの厚生労働科学研究班の活動により大枠が構築できたものと考えられる。今後は、JaCVAM により評価されるべき代替法の継続的な提案と、評価結果をガイドライン化へと結びつけるシステム作りが課題である。また、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る。これら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 (人的にも、資金的にも) が必要と考える。また、JaCVAM による評価結果を研究報告書のみで終了させず、ガイドライン化へと結びつけるシステム作りが必要である。

in vitro 感作性試験代替法に関しては、今回の共同研究により、CD86 や CD54 の発現亢進といったヒト細胞株の活性化を指標にした本試験法が、*in vivo* との対応性のみならず施設間再現性という観点からも *in vitro* 皮膚感作性試験代替法として有用である可能性が示された。しかし本試験法が国際的に新たな試験法として正式に認知されるには、試験条件の更なる改良や多施設間のバリデーション研究など多くの課題も存在している。

in vitro 光感作性試験代替法の開発に向けた研究では、フローサイトメトリーを用いたアポトーシス、ネクロトーシスの解析では非常に簡便でかつ鋭敏に測定することができた。また、光感作性物質である TCSA 処理表皮細胞に UVA 4 J/cm² 照射することで、40% のネクロトーシスと 20% のアポトーシスを確認できた。今回の結果は、培養後 24 時間の解析結果であり、アポトーシスはもっと早い段階で生じている可能性がある。従って、今後は 6、12 時間後の解析を行う。また、他の光感作性物質での検討も行っていく。

代謝能を有する *in vitro* 代替法の開発については、6 時間処理の条件下における IC₅₀ 値は、*in vivo* 急性毒性や反復投与毒性の NOEL 値との間に良い相関が得られなかった。一方、MEIC の共同研究では、処理時間を 24 時間とした場合、*in vivo* 毒性との比較においてより相関の高いデータが得られたことから、24 時間処理の追加の実験をおこなった。その結果、*in vivo* 毒性に近似したデータが得られる事が分った。

ヒト皮膚に発現が認められると考えられるシクロロム P450 分子種の発現をヒト皮膚各種初代培養細胞を用いて調べた。また、ヒト皮膚に発現が認められる CYP1A1 に機能が非常に類似しているが、主に肝に発現している CYP1A2 が組み込まれた細胞系を用いてヘテロサイクリックアミン 2 種を被験物質として代謝活性化による殺細胞作用を指標にして検討した結果、皮膚腐食性試験代替法の系として、殺細胞作用を指標にすることについては検討の余地がある。今後は代謝活性化系を組み込んだ細胞と、細胞毒性を観察する細胞とを共培養する系について種々の毒性指標を試していく。

in vivo 毒性試験から閾値問題を検討するための統計解析法に関しては、閾値の有無の判定問

題をモデル選択の問題としてきた。このとき、その判定方法は十分な精度を持っているかどうかの吟味が必要となる。しかし、学問的・社会的批判に耐える性能を持つ *in vivo* 実験を計画するのは困難である。必要なサンプルサイズが非常に大きくなり、現実的でなくなるからである。これに比べて *in vitro* 試験であればサンプルサイズの制約はかなり緩くなる。そのかわり *in vitro* 試験での結果が生体での結果を反映するものかどうかの疑問が生じる。これについての解答は現在のところ存在していない。

データマネージメントについては、記入シートの工夫によって誤記入は大幅に減少させることはできたが、チェックは必要であった。そこでチェックのための手順書を先例にならって作成し、データクリーニングを行ったところ、後のデータ解析で生データを確認することがほとんど不要となった。また、一通りのデータ解析を行った後で、データ検討会を開き、実験参加者の意見を確かめたところ、実験手順書の不遵守による過剰なデータの存在が分かった。今後のバリデーションにおいては、手順の遵守と、不遵守への対処も、事前に解析計画に入れておくべきである、ということが分かった。

MLA の統計解析法に関しては、シミュレーションに基づく検討で、2 次回帰検定が最良で大森法がそれにつく検出力を保持していたのに対し、実データに基づく検討では、大森法が最良で 2 次回帰検定が最も性能が悪かった。この食い違いの理由として、統計モデルでの陰性の定義と毒性試験家の考えている陰性の定義の食い違いが考えられた。すなわち、生体にはある種の防御機構、修復機構があるため、反応の大きさがあるレベル以下である場合には、生物個体はそれを毒性発現に至らせない。毒性試験家はそのような例を通して、被験物質の陽性・陰性を判断し、その判断に適合した用量反応関係を評価している。これは小さな毒性発現を陰性とすることになる。これがシミュレーションに基づく統計的判定と実データに基づく毒性家の判定との食い違いの原因であるならば、どちらの判断を優先すべきであるかが問題になる。被験物質の毒性の有無を、生体への影響で捉えるなら、実データに基づく毒性家の判定により合致する方法をデータ解析法として用いるのが合理的であろう。

ET50 の推定については、点推定より信頼区間の構成法が重要である。信頼区間については、被覆確率が名義信頼水準に近いことが必要であるが、検討した方法では、それが保持できないことが多いことが分かった。どちらかというと自由的

(liberal)になる傾向がある。これをどのようにして補正するかは、今後の研究課題である。

E. 結論

- 1) 2009 年の化粧品の安全性評価のための動物実験廃止等に関わる第七改正について、2005 年 3 月初旬において EU 加盟国の約 7 割が国内法を整備した。
- 2) ECVAM や SCCNFP の意見を考慮した EU 委員会の答申によると、2009 年 3 月に代替法が存在すると予測されるのは、皮膚腐食性、急性光毒性、皮膚刺激性 (Hazard identification)、眼刺激性、経皮吸収/皮膚透過性及び光遺伝毒性であった。
- 3) ICCVAM は 4 種眼刺激性試験代替法が GHS 基準に基づく判定に有効であるか評価した。
- 4) OECD は *in vitro* 光毒性試験ガイドライン 432、*in vivo* 経皮吸収試験ガイドライン 427、*in vitro* 経皮吸収試験ガイドライン 428、*in vitro* 皮膚腐食性試験ガイドライン 430 (Transcutaneous Electrical Resistance Test) 及び *in vitro* 皮膚腐食性試験ガイドライン 431 (Human Skin Model Test) を採択した。
- 5) ヒト細胞株における CD86 や CD54 の発現亢進を指標にした感作性試験代替法を開発した。
- 6) 光アレルギーを生じる光感作性物質で代表的な TCSA において、その光修飾表皮細胞に UVA を照射した場合、若干のアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。つまり、これら物質のアポトーシス誘導能を解析することにより光感作能を予測できる可能性があると思われた。
- 7) バリデーション研究を開始する前から研究の計画段階から準備を行うことが有効である。バリデーション研究を実施する際には、データファイルシートを工夫する、技術移転でデータの入力についての説明する、誤解のないようにプロトコール・実施手順書・データファイルシートを吟味する、データクリーニングの手順を確立する、などのことが必要であることが参加者全員に広く認識されるべきである。

F. 引用文献

Hirabayashi Y., Yoshida K., Arizawa S., Kodama Y., Knnno J., Kurokawa Y., Yoshimura I., Inoue T. Evaluation of nonthreshold leukemogenic response to methyl nitrosourea in p53-deficient C3H/He mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 190, 251-261 (2003)

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) 大野泰雄、動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受け入れの現状. 国立医薬品食品衛生研究所報告 122, 1-10, 2004.
 - 2) 大野泰雄、日本における動物実験代替法の開発と活動状況. *Fragrance J.* 33, 1-14, 2005.
 - 3) K. Toda, S. Ishida, K. Nakata, R. Matsuda, S. Ozawa, J. Sawada, Y. Ohno, K. Inoue, K. Shudo and Y. Hayashi: Improvement in reliability of probabilistic test of significant differences in GeneChip experiments. *Anal. Sci.*, 20, 731-733, 2004.
 - 4) Hongo T, Kajikawa M, Ishida S, Ozawa S, Ohno Y, Sawada J, Umezawa A, Ishikawa S, Kobayashi T, and Honda H: Three-Dimensional High-Density Culture of Hep G2 Cells in a 5-ml Radial-flow Bioreactor for Construction of Artificial Liver. *J. Bioscience and Bioengineering*, 99, No 3, 237-244, 2005
 - 5) 大野泰雄他、Balb/c 3T3 細胞を用いた 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、AAATEX 2005, in print.
 - 6) 豊田英一、“動物実験代替法の国際動向とハーモナイゼーション”、*Fragrance J.* 33, 15-21, 2005.
 - 7) 豊田英一、“化粧品リスクアセスメントに関するグローバル動向と課題”、*日本化粧品科学会誌*、28, 288-291, 2004.
 - 8) K. Toda, S. Ishida, K. Nakata, R. Matsuda, S. Ozawa, J. Sawada, Y. Ohno, K. Inoue, K. Shudo and Y. Hayashi: Improvement in reliability of probabilistic test of significant differences in GeneChip experiments. *Anal. Sci.*, 20, 731-733, 2004.
 - 9) 田中憲穂: 医療用具の製品化を目的とした前臨床試験、バイオマテリアル-生体材料- 22:320-327(2004)
 - 10) 田中憲穂: 照射食品の遺伝的安全性試験、*食品照射* 39:13-27(2004)
 - 11) 田中憲穂: 照射食品の生物学的安全性、*Food and Food ingredients Journal of Japan* 209 (2004)
 - 12) Agneta Rosengre, Linda Faxius, Noriho Tanaka, Mika Watanabe, Lars Magnus Bjursten, Comparison of implantation and cytotoxicity testing for initial toxic biomaterials, *Journal of Biomedical Materials Research*, in press (2005)
 - 13) Ryo Kurihara, Fujio Shiraishi, Noriho Tanaka, Shinya Hashimoto, Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastal Japanese waters, *Environmental Toxicology and Chemistry*, in press (2005)
 - 14) Shin Asada, Kiyoshi Sasaki, Noriho Tanaka, Ken Takeda, Makoto Hayashi and Makoto Umeda, Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 Cells (Bhas 42 Cells), *Mutation Res.*, 投稿中
 - 15) 西山 智, 柳原宏和, 吉村 功. 最大対比法を活用するための SAS/IML プログラム. *計量生物学*, 24, 57--70, 2004.
 - 16) 西山 智, 吉村 功. 複合最大対比法の提案とその毒性試験データ解析への応用. *計量生物学*, 25, 1--8, 2004.
 - 17) Chiba Y., Matsuyama Y., Sato T., Yoshimura J. A simulation study for a linear measurement error model when error variances varied between measurements. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics* (To appear), 2005.
2. 学会発表
 - 1) Yasuo Ohno, GLP regulation in Japan, Korea and China and Its Contribution to Animal Welfare, "Balancing Animal Welfare and Regulatory Compliance Issues in Preclinical Studies" supported by FDA, NIH, USDA, AALAC. Detroit Metropolitan Airport Westin Hotel, June 29-30, 2004.
 - 2) 本郷有克、梶河真理子、石田誠一、小澤正吾、大野泰雄、澤田純一、梅沢 彰、石川陽一: 高密度 3 次元培養時におけるヒト肝ガン由来細胞 HepG2 の機能評価 第三回日本再生医療学会総会 (2004.3)
 - 3) 本郷有克、梶河真理子、石田誠一、小澤正吾、

- 大野泰雄、澤田純一、梅沢 彰、石川陽一：高密度 3 次元培養時におけるヒト肝ガン由来細胞 HepG2 の機能評価 日本生物工学会平成 16 年度大会 名古屋(2004)
- 4) 宮島敦子、小澤正吾、何晋徳、田中宏昌、仲井健也、篠内桃子、上川雄一郎、窪田敬一、緒方宏泰、大野泰雄。ヒト肝における CYP1A、2B、2C、3A 遺伝子および関連核内受容体遺伝子の発現量の個体差。日本薬学会第 125 年会(横浜)2005 年 3 月
 - 5) 足利太可雄、坂口 斉、米山桂子、茵 さき子、宮澤正明、吉田雪子、伊藤勇一、鈴木尋之、板垣 宏、豊田英一、“Relationship between CD86/CD54 expression and cell viability in in vitro skin sensitization test of water-soluble chemicals using THP-1 cells”, Society of Toxicology 44th annual meeting, 2005.
 - 6) 坂口 斉、足利太可雄、宮澤正明、吉田雪子、伊藤勇一、米山桂子、茵 さき子、板垣 宏、豊田英一、鈴木尋之、“The relationship between CD86/CD54 expression and cell viability on in vitro skin sensitization test using THP-1 cells, in the case of water-insoluble chemical”, Society of Toxicology 44th annual meeting, 2005.
 - 7) 豊田英一、“動物実験代替法に関する国際動向と開発の現状”、大阪化粧品技術者会セミナー、2004.
 - 8) 豊田英一、“EU における動物実験の規制”、第 33 回日本環境変異原学会第 18 回日本動物実験代替法学会合同学術大会、2004.
 - 9) 森 眞輝、穂谷昌利、杉山真理子、板垣 宏、豊田英一、“In vivo 光毒性試験の動物実験代替法としての Yeast-RBC アッセイの開発の提案”、第 33 回日本環境変異原学会第 18 回日本動物実験代替法学会合同学術大会、2004.
 - 10) 上月裕一、山下富義、市川秀之、板垣 宏、橋田 充、豊田英一、“包括的経皮吸収評価法の開発”、第 33 回日本環境変異原学会第 18 回日本動物実験代替法学会合同学術大会、2004.
 - 11) 北垣雅人、若栗 忍、板垣 宏、田中憲徳、豊田英一、“急性毒性試験代替法の開発(2) II. 2 施設間における急性毒性試験を予測するための 2 種の細胞毒性試験の評価”、第 33 回日本環境変異原学会第 18 回日本動物実験代替法学会合同学術大会、2004.
 - 12) 若栗 忍、北垣雅人、板垣 宏、豊田英一、田中憲徳、“急性毒性試験代替法の開発(2) I. 2 施設間における 2 種の細胞毒性試験の安定性”、第 33 回日本環境変異原学会第 18 回日本動物実験代替法学会合同学術大会、2004.
 - 13) 豊田英一、“化粧品リスクアセスメントに関するグローバル動向と課題”、日本化粧品科学会第 29 回学術大会、2004.
 - 14) 田中憲徳：生殖細胞および培養細胞を用いた遺伝毒性試験法の開発と国際標準化への貢献(学会賞講演)、日本環境変異原学会、2004 年 11 月、長崎
 - 15) 浅田晋、佐々木澄志、山影康次、田中憲徳、梅田誠：Bhas42 細胞を用いた抗形質転換作用検出系の確立とその応用、日本環境変異原学会、2004 年 11 月、長崎
 - 16) 中川ゆづき、田中憲徳：In vitro 小核試験およびプラスミド DNA 切断性試験を用いたコウジ酸の光遺伝作用の検討、日本環境変異原学会、2004 年 11 月、長崎
 - 17) 田中憲徳、板垣宏、今井弘一、大野泰雄、大森 崇、岡本裕子、川端留美、小島肇夫、土肥孝彰、藤田百合子、畑尾正人、笛木修、若栗忍、吉村 功：酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験を用いた光阻害試験：バッテリーのバリデーション及び評価委員会での検討中間報告、日本動物実験代替法学会、2004 年 11 月、長崎
 - 18) 吉村 功、板垣 宏、大野泰雄、大森 崇、岡本裕子、川端留美、小島肇夫、田中憲徳、谷川浩子、土肥孝彰、長谷川靖司、藤田百合子、穂谷昌利、森 眞輝、若栗 忍、：酵母-赤血球試験の光毒性試験代替法としてのバリデーション研究、日本動物実験代替法学会、2004 年 11 月、長崎
 - 19) 本郷有克、若栗 忍、石川陽一、梅田 誠、田中憲徳：基礎代謝としてのグルコース取り込みを指標とする細胞毒性試験、日本動物実験代替法学会、2004 年 11 月、長崎
 - 20) 渡辺美香、小林美和子、若栗忍、佐々木澄志、山陰康次、倉田信弘、田中憲徳：試験法および細胞種の違いによる細胞毒性試験結果の検討、日本動物実験代替法学会、2004 年 11 月、長崎
 - 21) 北垣雅人、若栗忍、板垣宏、田中憲徳、豊田英一：急性毒性試験代替法の検討(2) II. 2 施設間における急性毒性試験を予測するための 2 種の細胞毒性試験の評価、日本動物実験代替法学会、2004 年 11 月、長崎
 - 22) 若栗忍、北垣雅人、板垣宏、田中憲徳、豊田英一：急性毒性試験代替法の検討(2) I. 2

- 施設間における2種の細胞毒性試験の安定性、日本動物実験代替法学会、2004年11月、長崎
- 23) 吉村功. 生物統計の視点から考えられる閾値問題. 第31回日本トキシコロジー学会学術年会, 大阪国際会議場, 大阪, 2004.7.6-8.
- 24) 吉村功. 統計家からの疑問- インビトロ試験のデータから定量的結論を導く音は邪道か?. 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会, 長崎ブリックホール, 長崎, 2004.11.30- 12.2.
- 25) 白石垂矢子他. 皮膚刺激性試験代替法としての Vitrolife-skin のバリデーション研究. 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会, 長崎ブリックホール, 長崎, 2004.11.30- 12.2.
- 26) 大野泰雄他. 皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法のバリデーション. 日本代替法学会学術年会, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会, 長崎ブリックホール, 長崎, 2004.11.30- 12.2.
- 27) 田中憲穂他. 酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験を用いた光毒性試験バッテリーのバリデーション及び評価委員会での検討中間報告. 日本代替法学会学術年会, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会, 長崎ブリックホール, 長崎, 2004.11.30- 12.2.
- 28) 吉村功他. 酵母赤血球試験の光毒性試験代替法としてのバリデーション研究. 日本代替法学会学術年会, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会, 長崎ブリックホール, 長崎, 2004.11.30-12.2.
- 29) 島内隆寿他. Narrowband-UVB によるケラチノサイトのアポトーシス誘導は broadband-UVB より遅延する. 第34回 UV-ABCclub, 幕張プリンスホテル, 千葉, 2005. 3.19-20.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

J. 謝辞

本研究の遂行にあたっては日本動物実験代替法学会の評価委員会(田中憲穂委員長)とバリデーション委員会(吉村 功委員長)、バリデーション参加機関、及びそれぞれに属する委員及び職員の方々のお世話になった。ここに感謝申し上げます。

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究
（代替法の評価とバリデーション）

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

酵母生育阻害及び赤血球溶血性を指標とする *in vitro* 光毒性試験バッテリーについての多バリデーションの最終報告書を作成した。評価委員会ではこの結果を再度評価し、3T3-NRU 光毒性試験法とほぼ同等の結果が得られることを確認したが、陽性対照物質での結果が擬陽性に近いという問題点が指摘され、提案者にプロトコールの修正を求めた。また、皮膚感作性試験法である Local Lymph Node Assay (LLNA 法) の改善法として、ATP 含量の変化を指標とする方法 (LLNA-DA 法) が提案された。評価委員会では LLNA-DA 法評価のための作業グループを組織し、提出された資料を慎重に審議した。その結果、本法が RI を用いず、かつ、簡易で迅速な方法であり、LLNA 法と同等の識別能力を有するものとして、多施設でバリデーションすべき試験であるとした。また、新たに評価会議を組織した。更に、皮膚感作性試験として LLNA-BrdU 法の評価が新たに申請された。

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、なるべく動物を使用しない試験法に置き換える事が要請されている。また、内分泌かく乱化学物質試験法や Toxicogenomics などの新しい毒性評価方法が現れている。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、代替法の開発研究とその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、同時にバリデーションも実施している。OECD では代替試験法の validation 及び行政的受け入れ基準を作成し、新たな代替法を積極的に受け入れている。また、ECVAM と ICCVAM は代替法の取り入れについて相互にハーモナイズする方向で協調している。このように欧米では行政機関が中心となって、新しい安全性試験法の開発・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。

本研究班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ことを目的に、化粧品や医薬品の安全性評価のために用いられている試験法で代替法の開発が十分でないものうち、単回投与毒性試験、感作性試験、光感作性試験の代替法及び皮膚代謝酵素発現細胞を開発する。また、代替法開発のための統計解析手法の研究を行うとした。

分担研究者は研究の総括と新規に開発された試験法の評価とバリデーションを分担し、平成16年度は資生堂から提案された酵母生育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた光毒性試験代替法の評価を継続して行うとともに、皮膚感作性を調べるための LLNA 法の代替法である LLNA-DA 法の評価を行った。また、皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法の多施設バリデーションを行った。

B. 研究方法

B-1) 光毒性試験代替法の評価

資生堂から提案された「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリー（酵母-赤血球試験）評価の方法の詳細は前年度報告に述べた。要約すると、提案された方法は日本動物実験代替法学会に委託し、その評価対象代替法や関連分野の専門家からなる評価委員会にて一次評価

を行った。行政試験として価値があると評価された方法は研究班の主任研究者が内容を確認した後、研究班が組織した行政試験として適切と判定された方法はより広い分野の委員から構成される評価会議で二次評価することとした。一方、多くの方法は判定するに十分な多施設バリデーション結果が無い。そこで、施設内データのみに基づき評価委員会で適切と判定された方法は日本動物実験代替法学会の協力を得て、多施設バリデーションを実施する。得られた結果は事前に提出された結果とともに評価委員会で評価され、行政試験として適切と判定された方法は上記評価会議で二次評価することとした。

評価委員会および評価会議の委員は以下に述べた通り。

評価委員会(光毒性試験代替法作業グループ)

委員長

田中憲穂(食薬センター・秦野研究所)

副委員長

岡本裕子(コーセー基礎研究所)

委員

板垣 宏(資生堂・安全性分析センター)

今井弘一(大阪歯科大学・歯科理工学)

大野泰雄(国立衛研・薬理部)

大森 崇(京都大学・医学研究科)

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)

オブザーバー

笛木 修(医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)

なお、板垣委員は申請者でもあることから、会議においては情報提供のみ行い、審議には参加しなかった。

評価会議

委員長

大野泰雄(国立衛研・薬理部)

委員

小野 宏(食薬センター・秦野研究所)

紀平哲也(厚生労働省医薬食品局審査管理課)

田中憲穂(食薬センター・秦野研究所)

豊田英一(日本化粧品工業連合会・技術委員会)

戸倉新樹(産業医科大学・医学部)

西岡 清(東京医科歯科大学・医学部)

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)

吉田武美(昭和大学薬学部毒物学)

吉村 功(東京理科大学工学研究科経営工学)

井上 達(国立衛研、安全センター)

佐神文郎(日本製薬工業協会基礎研究部会、エーザイ・リョウリー・サイエンス推進部)

なお、井上委員および佐神委員は平成16年度から委員になっていただいた。また、豊田委員は申請者の属する施設の上司であることから、審議には参画せず、日本化粧品工業連合会・技術委員会副会長の森福義(ポーラ化成工業)が代行することとされた。

B-2) 秘密の保持と評価結果の公表について

審議結果は公開シンポジウムや研究報告書等で公開することを前提にしている。しかし、個人情報事務局で保管し、公開せず、委員にも配布せず、必要に応じて口頭あるいは書面提示の上で説明する。

B-1) 皮膚感作性試験代替法の評価

RI を用いない皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA)法はダイセル化学工業より上記光毒性試験バッテリー申請の時に作成した様式に従って、申請書が作成された。研究班ではこの方法が行政試験法としての可能性の高い方法であると考え、日本動物実験代替法学会(代替法学会)に詳細な評価を依頼した。そこで、代替法学会では新たに感作性試験代替法評価のためのワーキンググループ(WG)を評価委員会に設置し、検討を行った。評価にあたった委員は下に示した。第一回のWGでは申請書を慎重に検討し、18項目にわたる質問を出した。第二回会議ではそれに対する申請者の回答を検討し、試験の特徴を明らかにするため、更にリンパ球サブタイプの変動を調べる追加実験を求めた。第三回会議では申請者から提出されたフローサイトメトリーを用いた検討結果を検討し、一次評価報告書(案)をまとめた。他は昨年度報告に述べた光毒性試験代替法バッテリー評価の際の方法と同じ。

感作性試験評価作業グループ

委員長

田中憲穂(食薬センター・秦野研究所 2004年12月まで)

大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所・薬理部 2005年1月より)

副委員長

大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所・薬

理部 2005年12月まで)

金澤由基子(食品薬品安全センター秦野研究所・毒性部 2005年1月より)

委員

委員

五十嵐良明(国立衛研・療品部)

高木弘毅(アベンティスファーマ(株)臨床研究センター 生物統計・データマネジメント部)

筒井尚久(三菱ウェルファーマ(株)安全性研究所)

手島玲子(国立衛研・機能生化学部)

萩野滋延(資生堂、ライフサイエンス研究センター安全性研究所)

牧 栄二(ヤンセン協和(株)研究開発本部データ管理部)

オブザーバー

笛木 修(医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)

(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。動物実験データは既存のデータを用い、新たな動物実験は行わなかった。ヒト組織や個人情報情報は扱っていない。

C. 研究結果と考察

C-1) 資生堂から提案された光毒性試験代替法バッテリーについて

C-1-1) 多施設バリデーション

資生堂から提案された「酵母-赤血球試験」は平成15年度に開催された評価委員会でも適切な方法であると評価されたが、多施設でのバリデーションの結果が無かったことから、施設間のばらつきを評価するための多施設バリデーションを実施された。その結果については経過報告に基づき、平成15年度報告に多くを述べた。今年度は日本動物実験代替法学会バリデーション委員会が提出された(添付資料1)。その内容は前年度報告と重複するのでここではまとめのみ以下に記載する。

1) 酵母-赤血球試験の妥当性

不適切な施設を除き、擬陽性を陽性と判定した場合の感度は100%、特異度が47%である。擬陽性を陽性とすれば、陽性物質を誤って陰性といわないという意味で、酵母-赤血球試験の有用性が示されたことになる。

2) 施設間差

実験条件に問題があった施設bを除け

ば、施設間の違いは陽性と擬陽性、擬陽性と陰性の範囲に収まっていた。

3) カットオフ値

赤血球光溶血試験のカットオフ値については特に目立った問題は見られなかったが、酵母光生育阻害試験のカットオフ値には再検討の余地が見出された。これを適切に定めることによって感度を高めることができるかもしれない。

4) 吸光度の測定波長

実験結果によれば、540nmより525nm前後の波長帯を用いる方が良かったので、SOPでも波長を525nmに変更することを検討すべきである。

5) 判定方法の改善

2回の実験の再現性吟味と、酵母-赤血球試験での総合判定には用量反応関係を利用する方が良いと思われる。特に非照射下での結果に用量反応関係がある場合は慎重な判定を行うべきである。

6) GLP 遵守

かなり大幅なデータクリーニングが必要であった。GLP 遵守を徹底すべきである。

C-1-2) 評価委員会での評価

バリデーション委員会の報告書に基づいて評価委員会でも施設バリデーション結果を評価した。その報告を添付資料2に示した。

以下の、そのまとめを示す。

1) 施設内・施設間再現性

実験条件に問題があったb施設を除けば、施設内での再現性は良かった。また、施設間の違いは陽性と擬陽性、擬陽性と陰性の範囲に収まっていた。適切な設備を備えた施設で訓練を受けた者が行えば再現性は悪くないとされた。

2) 酵母-赤血球試験の妥当性

本研究の結果は、1施設を除き、擬陽性を陽性と判定した場合、感度が100%、特異度が47%となる。擬陽性を陽性とすれば、陽性物質を誤って陰性と判定しないという意味で、酵母-赤血球試験の有用性が示されたことになる。

3) カットオフ値

赤血球光溶血試験のカットオフ値については特に問題は認められなかったが、酵母試験のdynamic rangeが陽性対照で常に10mm位の値を示す条件を資生堂に確立してもらう必要がある。その上で、カットオフ値を適切に定めることによって感度を高めることができる