

アポトーシス、ネクローシスの % 推移を解析した。紫外線照射量、時間依存性にアポトーシス、ネクローシスが増加し、Broadband-UVB では、照射後 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。以上より、本法により非常に鋭敏にアポトーシス、ネクローシスを解析できることが分かった。

C-2) TCSA 光修飾表皮細胞

TCSA を 10⁻⁴ M でインキュベーションし、UVA 4 J/cm² 照射したのもでは、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できた。10⁻⁵ M ではその蛍光が減弱し、PBS のみでは自家蛍光のみであった。以上より TCSA 光修飾表皮細胞を作製できていることが確認できた。

C-3) TCSA 光修飾表皮細胞のアポトーシス、ネクローシス解析

各濃度で作製した TCSA 光修飾細胞に対して、UVA 1, 2, 4 J/cm² 照射し、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。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。従って、TCSA は 10⁻⁵ M の濃度で UVA 4 J/cm² 照射したところで、光毒性を生じた結果となった。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 照射群では各濃度で 10 % 以下と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。

D. 考察

フローサイトメトリーを用いたアポトーシス、ネクロ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。

本研究によって、10⁻⁵ M の濃度で作製した TCSA 光修飾表皮細胞に UVA 4 J/cm² 照射することで、40 % のネクローシスと 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。

E. 結論

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

作能を予見できる可能性があると思われた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

1) 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

無い。

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）
分担研究報告書

急性毒性予測のための細胞性試験法の開発
-代謝活性化の導入-

分担研究者： 田中 憲穂（財）食品薬品安全センター-秦野研究所 細胞毒性学研究室長

研究要旨

これまでわが国で実施された既存化学物質の安全性試験の結果より、化学物質の約半数が代謝系の導入により毒性が増強もしくは減少し、その毒性発現は代謝の影響を受ける事がわかっている。in vitro 細胞毒性の結果から in vivo 全身毒性の予測をするには、細胞毒性試験において代謝系を導入することにより、in vivo 毒性の予測率がよくなることが推測される。そこで本研究では、既存化学物質 21 物質を用いて、S9mix の存在下及び非存在下で細胞毒性値:IC₅₀ 値を求め、in vivo 急性毒性の LD₅₀ 値および反復経口毒性の無影響量の値との相関を調べた。

その結果、S9+/-の 6 時間処理では代謝活性化の有無にかかわらず、細胞毒性値と in vivo 毒性の間に良い相関は得られなかった。しかしながら、S9-で 24 時間処理することにより、in vivo 毒性との相関は著しく改善され、in vivo 毒性の予測には処理条件が大きく寄与する事が示唆された。

A. 研究目的

細胞毒性試験は眼粘膜刺激性や皮膚刺激性などの局所毒性試験のみならず、in vivo 急性全身毒性試験の代替試験として、国内外でバリデーションスタディが行われてきた。最近には特に、細胞毒性と in vivo 急性全身毒性との相関に関心が集まり、ICCVAM でもバリデーションスタディがおこなわれている。これまでの研究では MEIC のヒト急性毒性との相関を調べた国際共同研究がその代表的なものであるが、薬物代謝が毒性発現に大きく関与している事が知られているにもかかわらず、代謝系を絡ませた細胞毒性試験はこれまで実施されていない。

そこで本研究では、昨年度開発したマイクロウエルプレートを用いる簡便な多謝系を導入

した細胞毒性試験法を用いて、OECD 既存化学物質の安全性点検事業の一環としてわが国で実施された約 200 種の化学物質の中から 21 物質を選択し、S9mix 存在下 (S9+)、および非存在下 (S9-) で細胞毒性試験を行い、代謝系を絡ませる事により毒性発現がどのように変化するかを調べた。S9+/-の条件で得られた 21 物質の IC₅₀ 値について、in vivo 急性毒性試験における LD₅₀ 値と反復経口毒性試験における無影響量の値との相関を検討した。

また、化学物質の処理直後や処理後一定の培養時間をおいた場合の毒性や、S9-で 24 時間処理した場合の毒性値などで細胞毒性値がどのように変わるかについても調べた。

B. 研究方法

I. 化学物質の選択と in vivo 毒性

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選択した。これらの物質はすでに in vitro 染色体異常試験が実施され、その予備試験として、CHL 細胞による細胞毒性が調べられている。その結果、S9 の有無により 4 つの異なる毒性発現パターン、即ち Type A: 毒性を示さないもの、Type B: 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。

II. 代謝系導入における諸条件の検討

試験法: 96 ウェルプレートを用いたニュートラルレッド法に、ラット肝 S9 を用いる代謝系を組み合わせ、細胞毒性試験を行った。

細胞: マウス由来の BALB/c 3T3 clone A31 細胞を用いた。

化学物質: Table 1 に示す 21 種の化学物質を用いた。

S9mix の組成: 細胞を用いる遺伝毒性試験に汎用される下記の 2 種の S9mix 組成を用いた。

S9mix I: 染色体異常試験用の S9mix 組成

- S9 (フェノバルビタール&5,6-ベンゾフラボンにより酵素誘導したラット肝) 30%
- HEPES (pH7.2) 4 mM
- MgCl₂ 5 mM
- KCl 33 mM
- グルコース6リン酸 5mM
- β-NADP* 4mM

S9mix II: MLA 用の S9mix 組成

- S9 (フェノバルビタール&5,6-ベンゾフラボンにより酵素誘導したラット肝) 40%
- グルコース6リン酸 118 mM
- β-NADP+ 6 mM
- KCl 30 mM

処理時間とS9の濃度: 細胞播種24時間後に化学物質で6時間処理し、その後新鮮な培地に交換して18時間培養した。培地中のS9の濃度は5%で試験を行った。

III. 処理直後と18時間培養後の毒性発現

本実験の基本プロトコールでは、S9 +/- 条件下での6時間処理後、新鮮培地に交換して更に18時間培養後の毒性発現を見た。化学物質によっては、6時間処理直後とその後18時間培養した場合では、毒性反応が異なる可能性がある。そこで4種の化学物質を用いて比較検討した。化学物質は3-ethylphenol, 4-ethylphenol, 2,4-di-tert-butylphenol, SDSの4種を用い、S9 -/+ の二つの条件下で細胞毒性試験を実施した。

IV. 24時間処理による毒性発現

S9 +/- の6時間処理の実験において、in vivo 毒性との比較において良い相関が得られなかったことから、S9 条件下で24時間処理の実験を追加実施し、in vivo 毒性との相関を検討した。

(倫理面への配慮)

本実験では動物を用いないこと、また倫理面で配慮が必要なヒト材料を用いる事は無かったことから、動物倫理およびヒト材料を用いる場合の安全性、ならびに倫理基準に該当する要件はないと判断した。

C. 結果と考察

I. 化学物質の代謝と細胞毒性

それぞれの化学物質の S9+/- の条件下における毒性発現のパターンを Fig 1-4 に示し、そのまとめた結果を Table 1 に示した。

1) Type A: 試験した化学物質中、S9+/- の条件下で共に細胞毒性を示さない物質は 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 (Fig. 1)。

2) Type B: S9+/- の条件下で同程度の毒性を示す物質は、2-tert-butylphenol, 2-ethylanthraquinone, 2,3,6-trimethylphenol, thiourea dioxide の 4 物質であった。これらの物質は S9+/- のいずれの条件でも殆ど同様の毒性反応を示した。ラット S9 添加によっても代謝をうけず殆ど代謝が絡まない物質であることが推測された (Fig. 2)。

3) Type C: 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)。

4) Type D: S9+ で毒性が弱くなる物質は、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 (Fig. 4)。

II. 細胞毒性と in vivo 急性毒性と反復毒性

細胞毒性試験の S9+/- で得られた IC₅₀ 値と、既存化学物質の安全性点検事業の一環としてわが国で実施された急性毒性試験の LD₅₀ 値と経口反復投与毒性試験の無影響量を示した (Table 1)。

この中で、S9+ の条件下で細胞毒性が明瞭に強くなる Type C の物質中、acenaphthene (28 倍)、3-ethylphenol (18 倍)、3-methylphenol (16 倍) に関する in vivo 毒性について急性毒性の LD₅₀ 値と比較してみると、いずれも急性毒性は弱く、反復投与毒性の値も acenaphthene の 12mg/kg/day の値を除き、それほど強いものではなかった。そこで、21 物質全てについての細胞毒性値と in vivo 急性毒性値、および、また、細胞毒性と反復毒性試験の毒性値の相関を Fig. 5 と Fig. 6 に示した。

細胞毒性と in vivo 急性毒性の相関

S9-/+ の細胞毒性値と in vivo 急性毒性の LD₅₀ 値の相関をそれぞれプロットした。LD₅₀ 値での上限の破線上のプロットはこの濃度以上は毒性が調べられなかった物質である。また、上図は mg/mL:mg/kg 換算、下図は mmol/L:mmol/kg 換算で示したものである。

この結果から分るように、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 (Fig. 5)。

細胞毒性と in vivo 反復毒性の無影響量

S9-/+ の細胞毒性値と in vivo 反復投与毒性無影響量の相関をそれぞれプロットした。この結果においても、いずれの条件下でも細胞

毒性と in vivo 反復毒性の間に良い相関は得られなかった(Fig. 6)。

III. 処理直後と18時間培養後の毒性発現

化学物質の細胞に対する傷害性はその毒性発現の機作により異なる事が考えられる。本研究では6時間処理の直後、さらに18時間培養した後にNR法により細胞毒性の発現を調べた(Fig. 7)。

界面活性剤として知られる SDS については、細胞膜に直接作用する事からその毒性は S9+/-の有無に関わらず、処理直後と18時間培養後では殆ど差が見られなかった。また2,4-di-tert-butylphenol では、代謝されて毒性が強くなるが、処理直後と18時間培養後では SDS と類似の濃度依存カーブを示した。一方、3-ethylphenol と4-ethylphenol は、代謝して毒性を発現すると同時に、処理直後よりも18時間培養後に毒性が強く顕れた。このように、処理直後と18時間培養後では毒性発現が異なった。

IV. 24時間処理による細胞毒性

追加実験として実施した 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 Fig 8 に示した。この図では、IC₅₀ 値や LD₅₀ 値が明確に求められなかった物質は除外した。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、 $r = 0.53$ 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。

まとめ

MEIC の共同研究などで細胞毒性と in vivo 急性毒性の間には良い相関が得られている事についてはすでに報告してきた。しかしながら、今回試験した21種の既存化学物質について得られた S9+/-の6時間処理の条件下における細胞毒性(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。また今回の研究のねらいとして、S9-で得られた IC₅₀ 値よりも S9+での IC₅₀ 値の方が、生体での毒性により近似する可能性を想定したがそれも予想を外れた。それらの理由については幾つかの事が考えられる。用いた化学物質の選択として、今回は21種の化学物質を選んだが、これらは既存化学物質として比較的類似の構造を有している物質が多く、結果として、in vivo での毒性が比較的 low LD₅₀ 値に大きな差のないものを選択していた。そして、LD₅₀ 値に関しては2000 mg/kg を最高濃度で打ち切っていることから、相関値の計算において、明瞭に近似してこなかった可能性もある。今回の本試験では、S9 の処理のため化学物質を6時間以上暴露する事ができず、6時間処理後、更に18時間の培養時間を経た後の毒性を調べたが、このプロトコールが妥当であったかの問題がある。過去に我々の実施した 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事から、24時間処理の追加の実験をおこなった。その結果、6時間処理よりも24時間処理することによって、in vivo 毒性に近似したデータが得られる事が分った。本研究において実施した、6時間処理直後と、更にその後18時間培養経過後では毒性の発現が異なり、更に、24時間処理した場合は in vivo 毒性により近似してくる事から、処理時間は極めて大きな要因となる

事が明らかとなった。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kiyomi Ohmori, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Noriho Tanaka and Makoto Umeda: An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells, *Mutation Res.*, 557, 191-202(2004)
 - 2) 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)
 - 3) 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)
 - 4) 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)
 - 5) 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)
 - 6) 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)
 - 7) 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
- ##### 2. 学会発表
- 1) 田中憲穂: 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
 - 2) 浅田晋、佐々木澄志、山影康次、田中憲穂、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
 - 3) 中川ゆづき、田中憲穂: 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
 - 4) 田中憲穂、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
 - 5) 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、田中憲穂、谷川浩子、土肥孝彰、長谷川靖司、藤田百合子、穂谷昌利、森真輝、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
 - 6) 本郷有克、若栗忍、石川陽一、梅田誠、田中憲穂: 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
 - 7) 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、田中憲穂: 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
 - 8) 北垣雅人、若栗忍、板垣宏、田中憲穂、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
 - 9) 若栗忍、北垣雅人、板垣宏、田中憲穂、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

Table 1 21 化学物質の細胞毒性結果と *in vivo* 毒性結果

| 化学物質 | NR 法 IC ₅₀ 値 | | 毒性の タイプ* | 急性毒性 LD ₅₀ 値 (mg/kg) | 反復毒性 NOELs (mg/kg/day) |
|---|-------------------------|---------|-------------|------------------------------------|---------------------------|
| | S9 - | S9 + | | | |
| Thiophene | > 0.8 | > 0.8 | A | 1400 | 25 |
| Trimethyl phosphate | > 1.4 | > 1.4 | A | 840 | < 40 |
| 2- <i>tert</i> -Butylphenol | 0.039 | 0.025 | B | 1323 | 20 |
| 2-Ethylanthraquinone | 0.18 | 0.24 | B | > 2000 | 10 |
| 2,3,6-Trimethylphenol | 0.24 | 0.25 | B | 1700 | 100 |
| Thiourea dioxide | 0.31 | 0.59 | B | 1521 | 12 |
| Acenaphthene | 0.36 | 0.013 | C | > 2000 | 12 |
| 3-Aminophenol | >1.1 | 0.22 | C | 775 | < 80 |
| 2,4-Di- <i>tert</i> -butylphenol | 0.021 | 0.005 | C | 1881 | 75/20 |
| 3-Ethylphenol | 0.41 | 0.023 | C | 1700 | 300 |
| 4-Ethylphenol | 0.37 | 0.031 | C | > 2000 | 300/100 |
| 3-Methylphenol | 0.71 | 0.045 | C | 2124 | 300/100 |
| 4-Nitro- <i>o</i> -anisidine | 0.53 | 0.30 | C | 997 | 30 |
| 1-Methoxynaphthalene | 0.092 | < 0.013 | C | 2000 | 30 |
| <i>N</i> -Ethylaniline | 1.2 | 0.50 | C | 468 | 1 |
| <i>N</i> -Methylaniline | 0.54 | 0.16 | C | 749 | 5 |
| 4-Aminophenol | 0.013 | > 1.1 | D | --- | 20 |
| 6- <i>tert</i> -Butyl- <i>m</i> -cresol | 0.037 | 0.073 | D | 393 | 12.5 |
| Di- <i>n</i> -butyl adipate | > 2.6 | > 2.6 | D | --- | > 1000 |
| 2-Ethylhexyl methacrylate | 0.047 | > 2.0 | D | > 2000 | 65 |
| <i>N</i> -Phenylmaleimide | < 0.013 | 0.038 | D | 171 | 2.5 |

* A: non-tox、B: S9 - = S9 +、C: 毒性 S9 + > S9 -、D: 毒性 S9 - = S9 +

結果はすべて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) による。

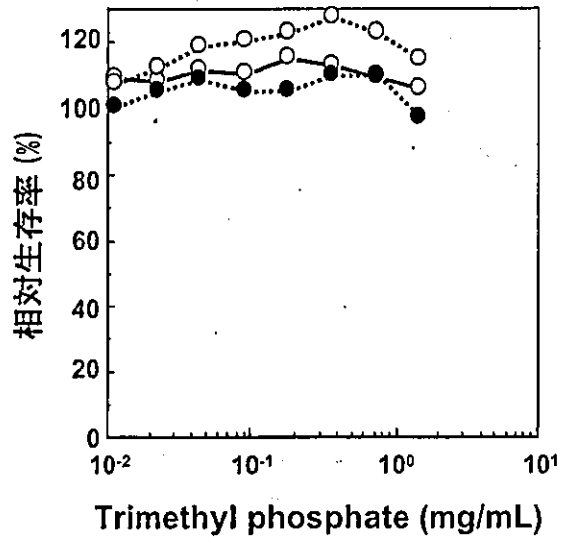
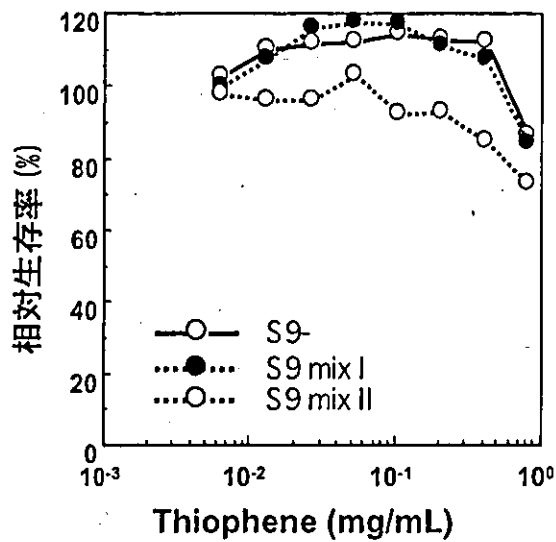


Fig. 1 Type A: 細胞毒性が認められない物質

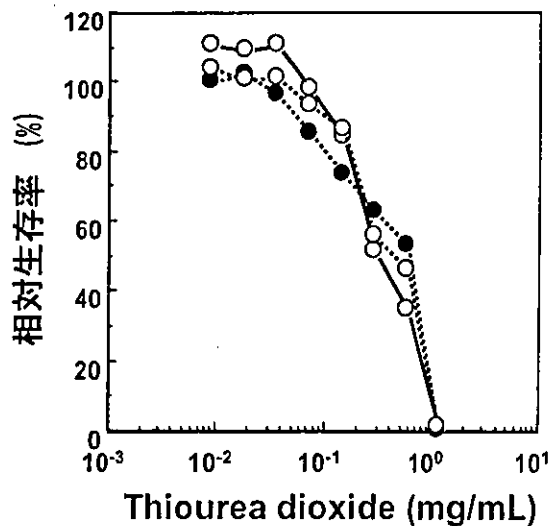
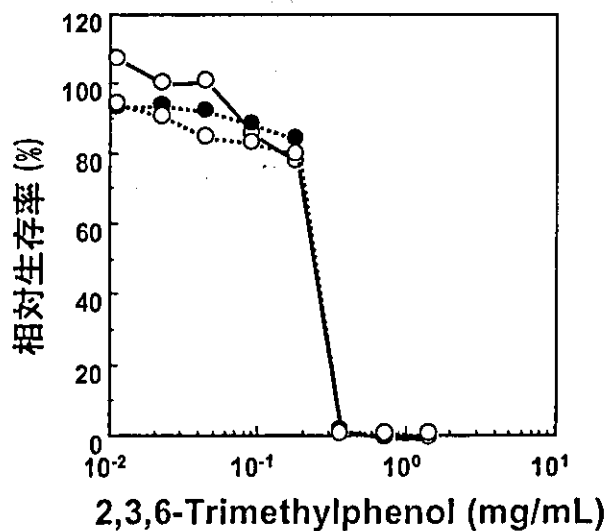
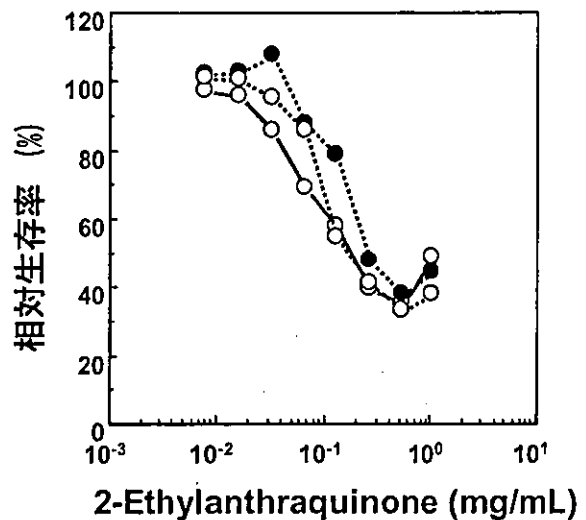
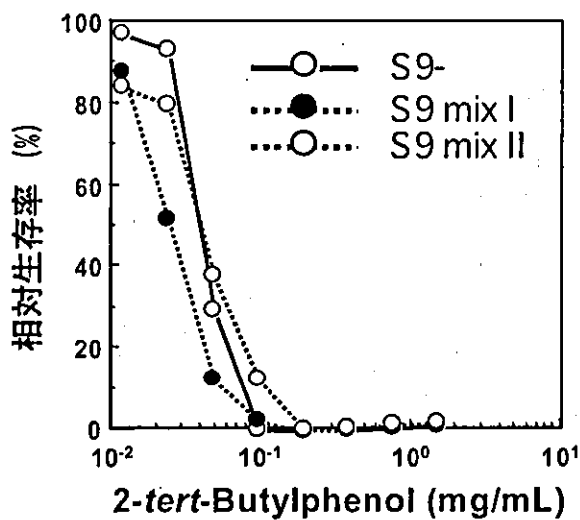
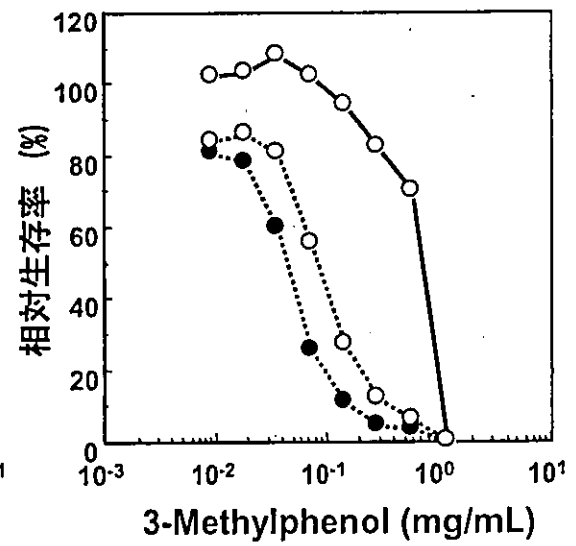
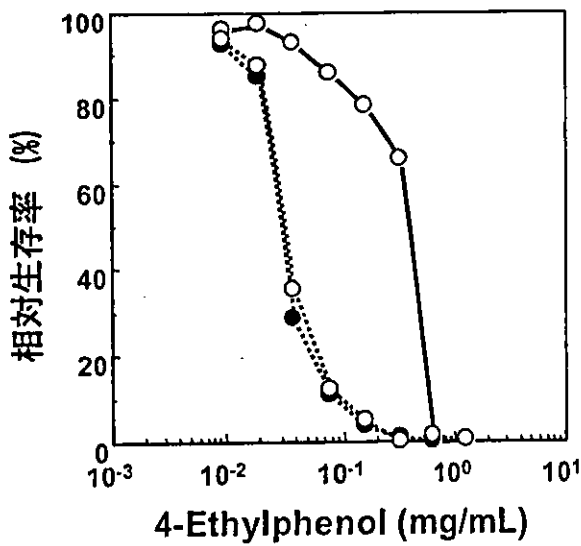
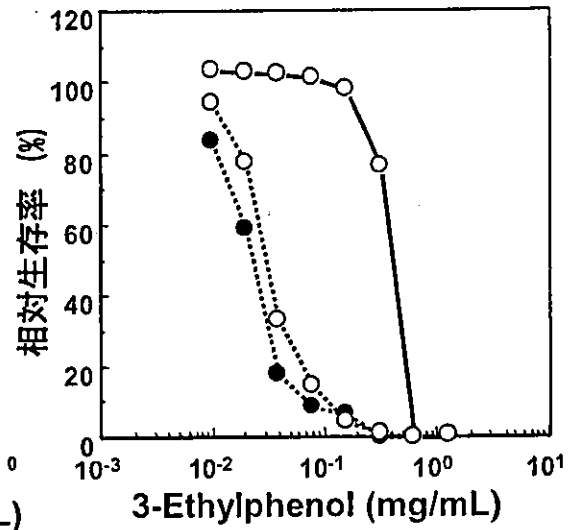
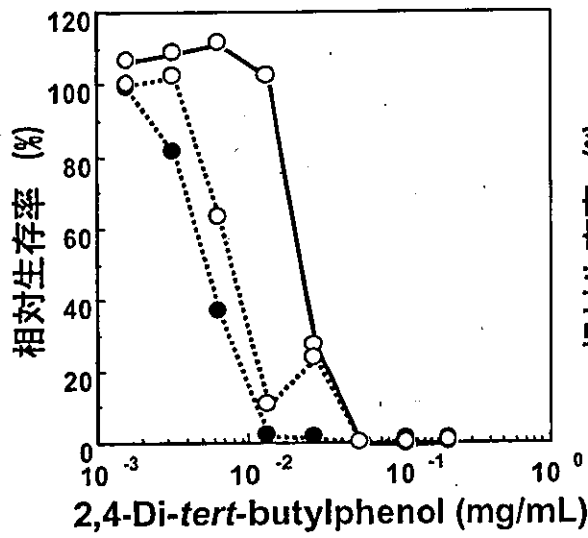
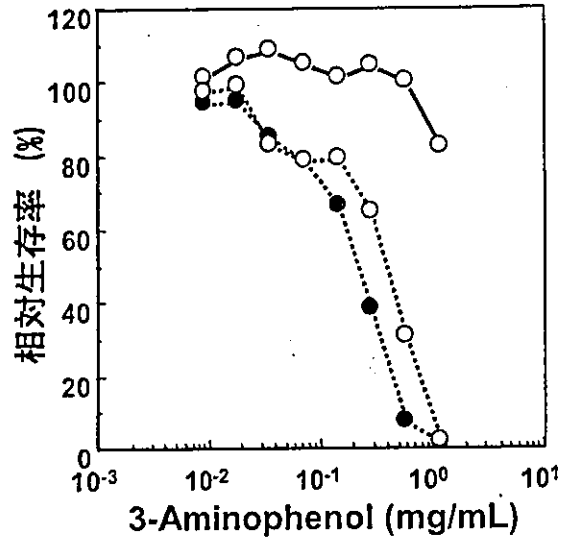
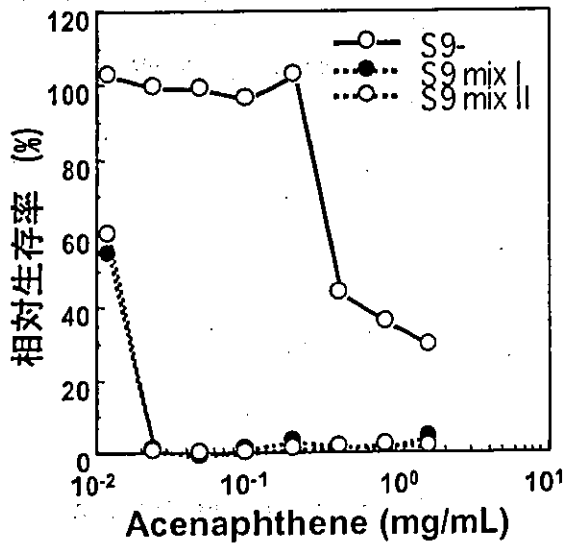
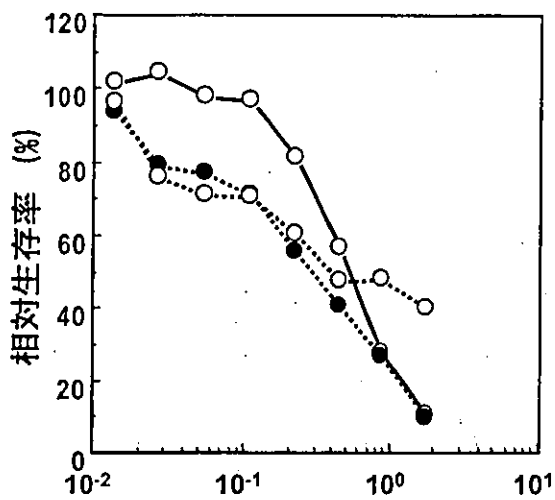


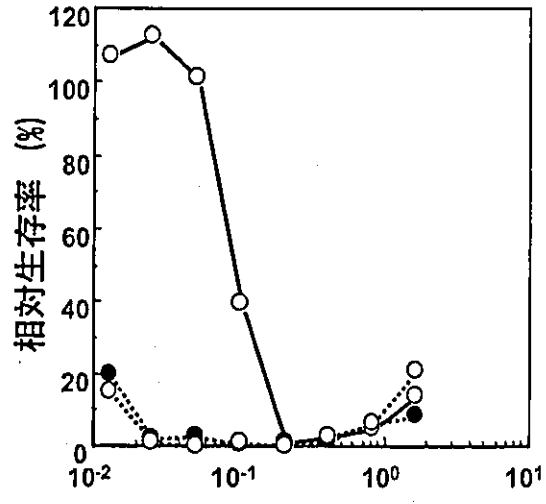
Fig. 2 Type B: S9+/-で細胞毒性が変わらない物質



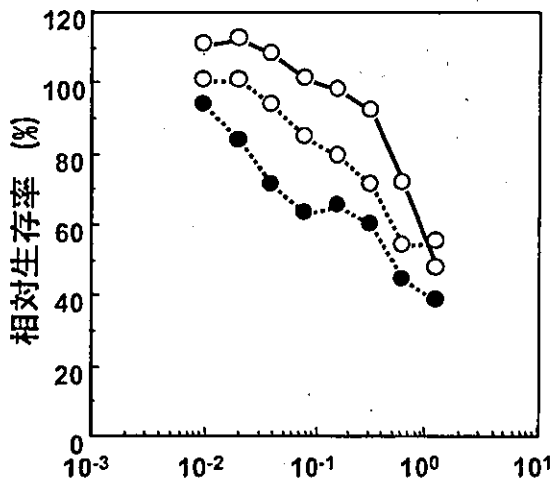
(次ページへ続く)



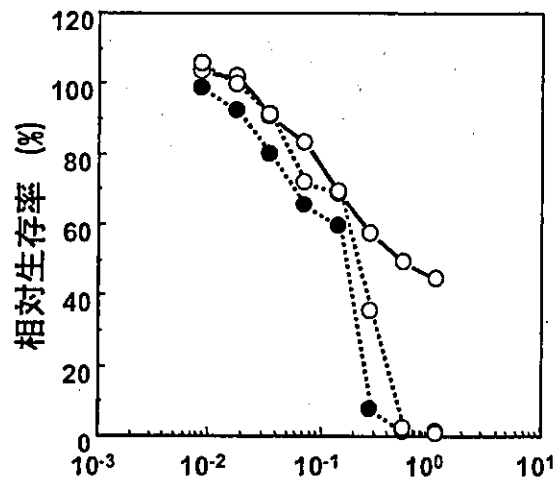
4-Nitro-*o*-anisidine (mg/mL)



1-Methoxynaphthalene (mg/mL)



N-Ethylaniline (mg/mL)



N-Methylaniline (mg/mL)

Fig. 3 Type C: S9+で細胞毒性が強くなる物質

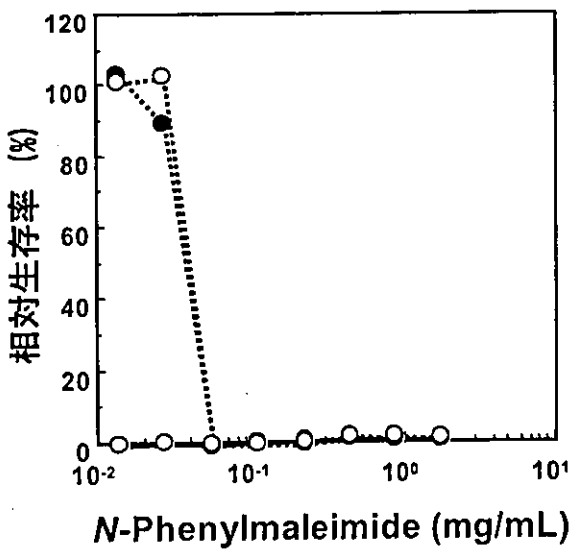
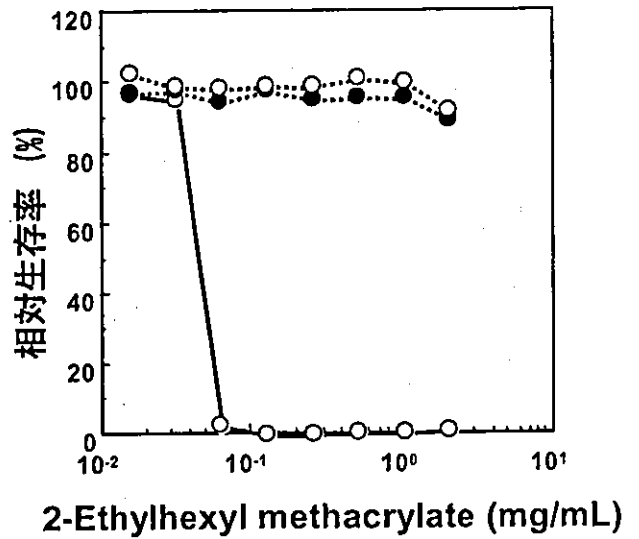
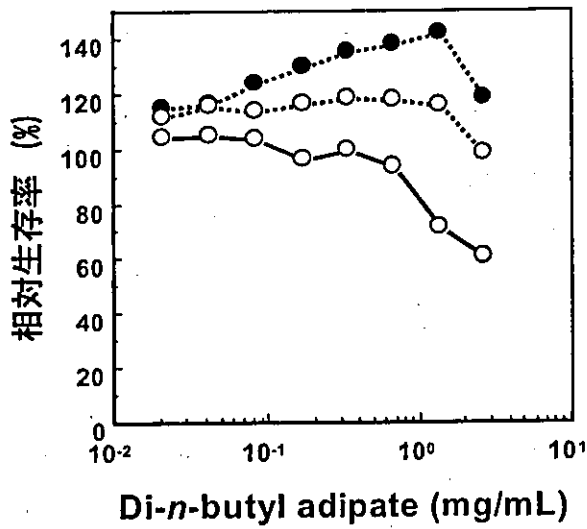
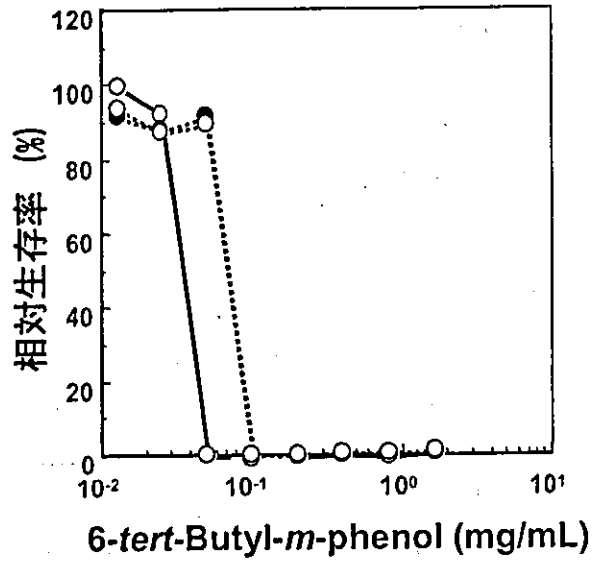
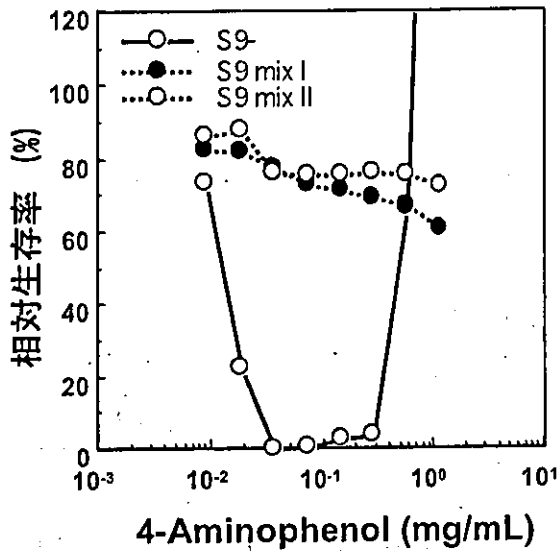


Fig. 4 Type D: S9+で細胞毒性が弱くなる物質

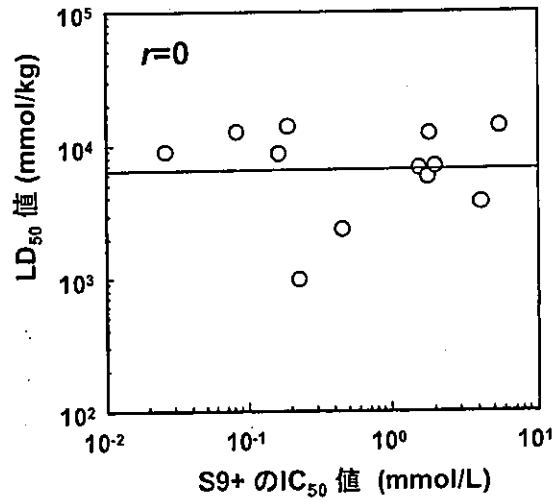
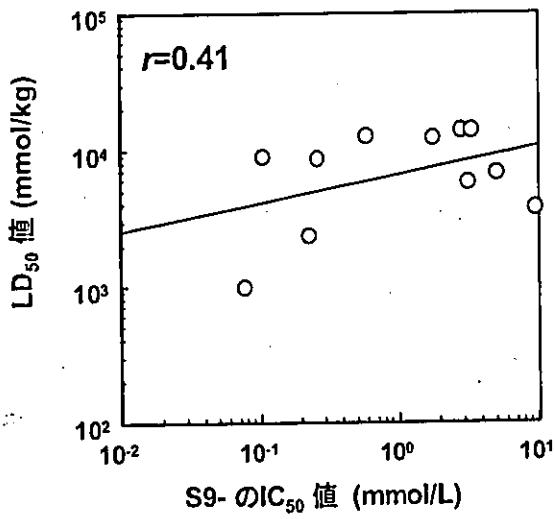
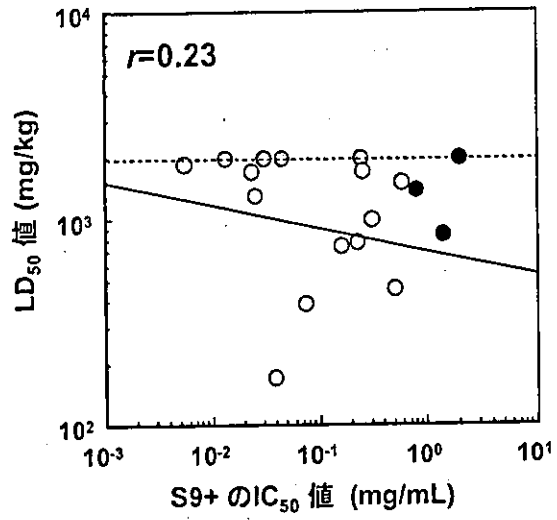
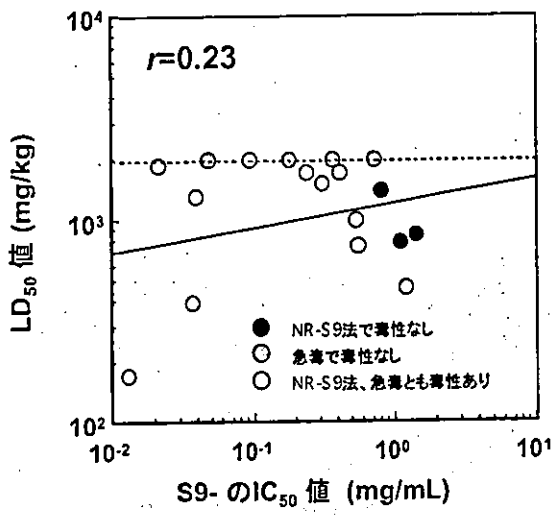


Fig. 5 NR-S9 法と in vivo 急性毒性の結果の相関

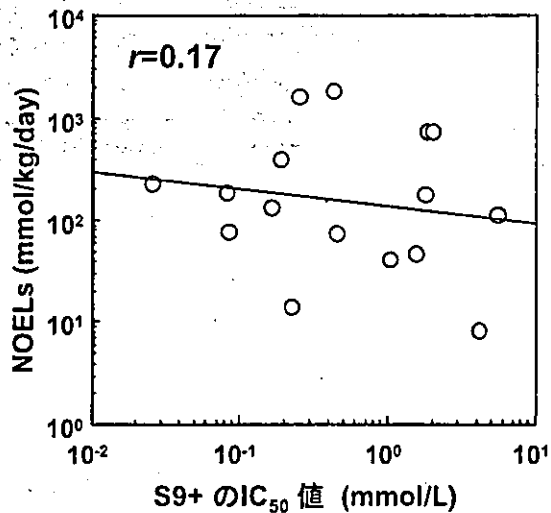
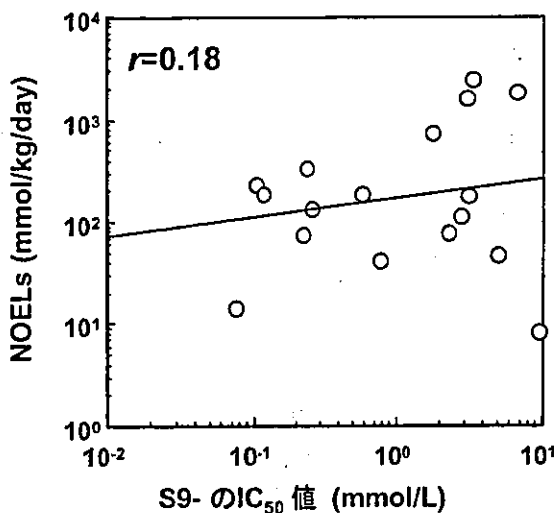
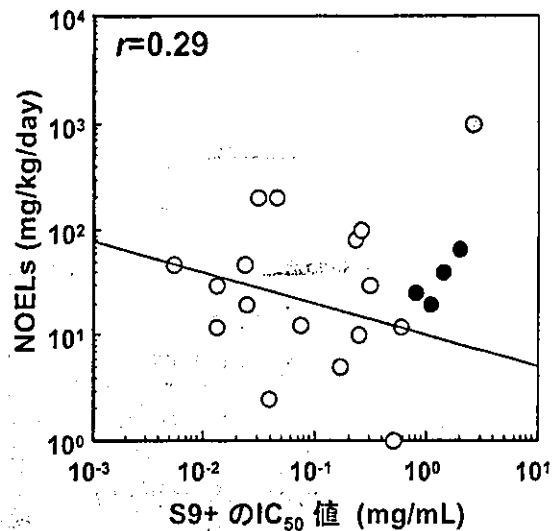
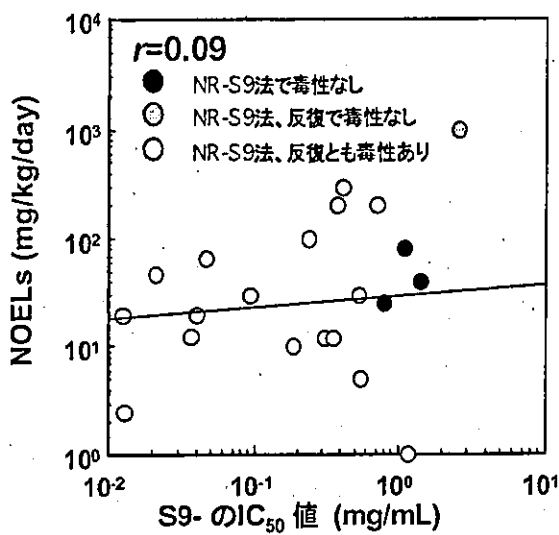


Fig. 6 NR-S9 法と *in vivo* 反復経口投与毒性無影響量の結果の相関

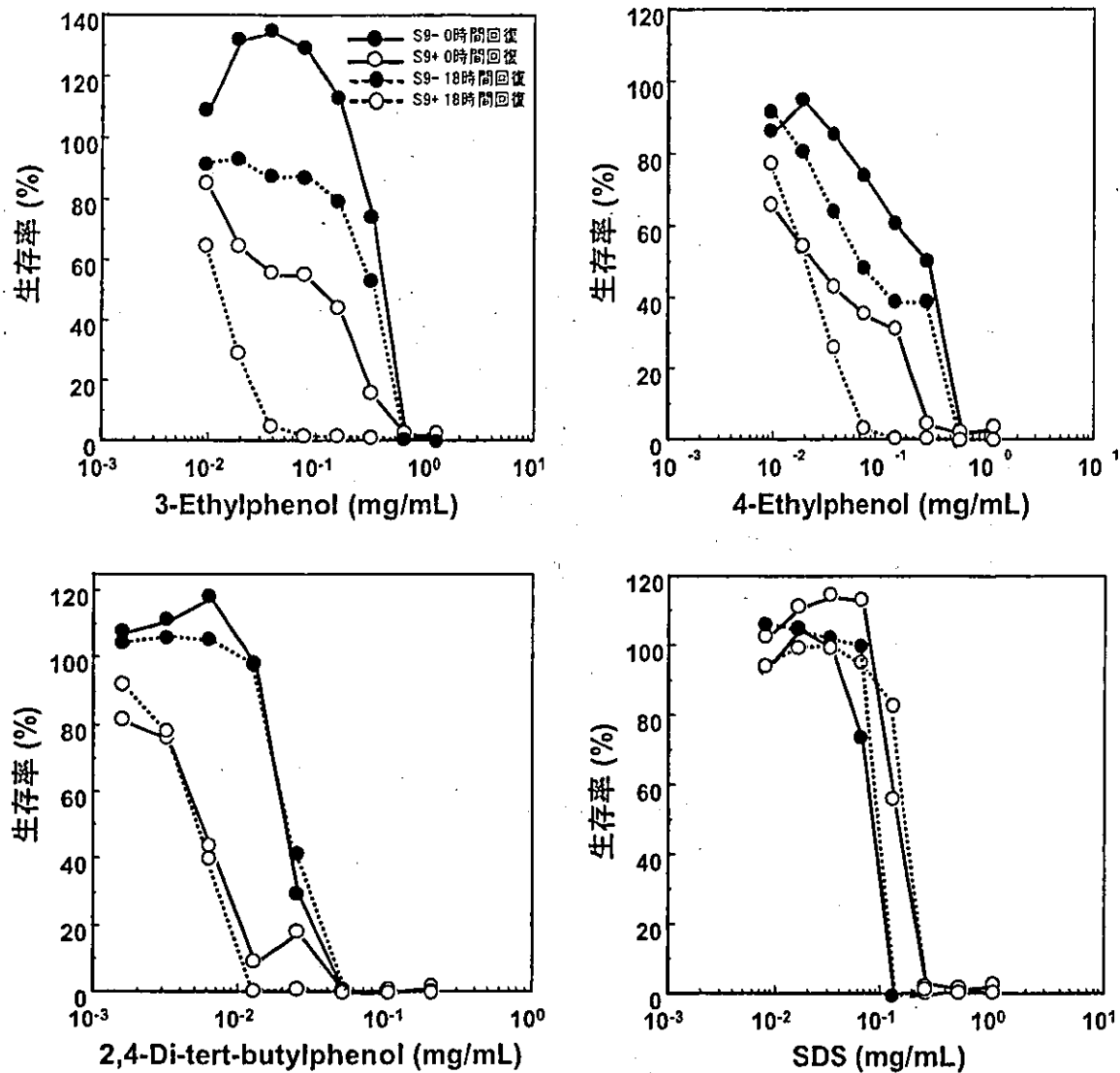


Fig. 7 4種の化学物質における処理後の回復時間の違いによる毒性

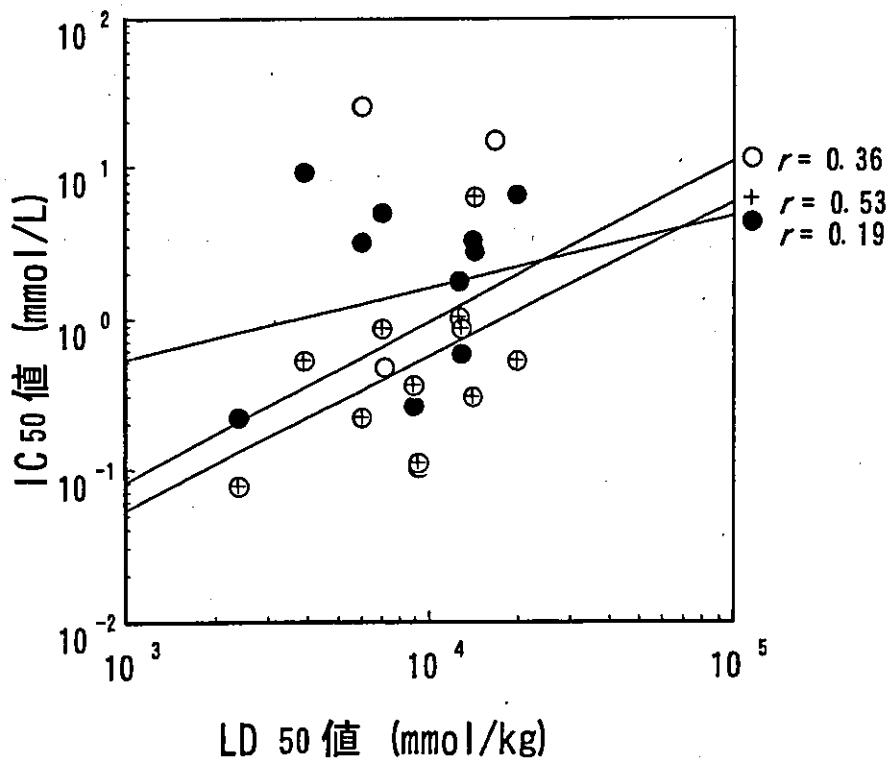
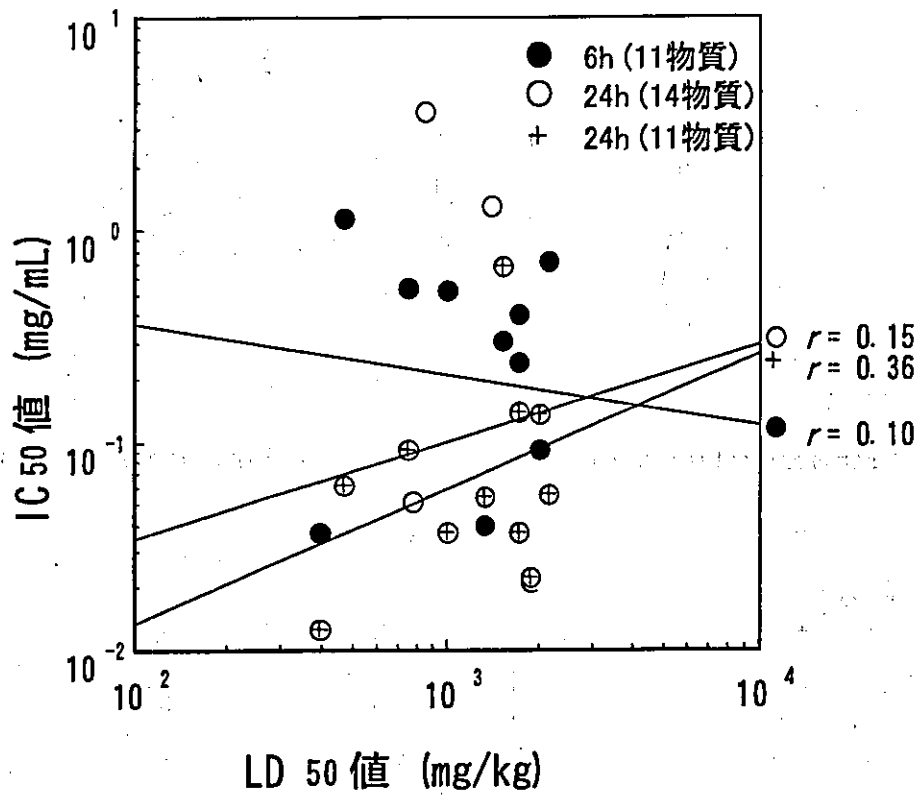


Fig 8 S9-条件下での6時間処理および24時間処理でのIC₅₀値とin vivo急性毒性との相関

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」

「代替法についての国際情勢の調査」

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会長

研究要旨

本年度は、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。

EU各国における国内法の整備状況であるが、2005年3月初旬においても約7割の国が国内法を整備した状況に留まっている。また、EU委員会の動物試験の段階的廃止に関する timetable 案において、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。

米国における代替法開発の動向としては、試験法についての4種眼刺激性試験代替法の評価がICCVAMより実施されたことが挙げられる。現在、ICCVAMとECVAMは、急性毒性試験代替法としての細胞毒性試験の共同バリデーションを実施中であるが、今後、今回評価している眼刺激性試験代替法についてもECVAMとの相互協力が想定される

OECDでは、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)が、2004年4月の各国コーディネーター会議により採択された。

本邦における代替法の開発・評価において本年度の特筆すべきことは、本邦独自の代替法の評価機関(仮称:JaCVAM)の構築を目指す本厚生労働科学研究班が新たに設置されたことである。今後の課題は、これから設置される代替法評価機関(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と考える。今後開発が必要な試験法に関しては、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。本邦が代替法開発においてグローバルに貢献するためには、これらの代替法の開発や評価を総合的に推進すべく、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、代替法評価機関(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と考えられる。

以上のことを総合的に推進することにより、ECVAMやICCVAMとのグローバルハーモナイゼーションが構築され、さらには本邦発のグローバルスタンダードが作成されると考えるものである。

A. 研究目的

本年度は、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。

この新しい動きはEUのみならず米国や本邦にも影響を及ぼすと見られ、今後、本邦において開発・評価すべき代替法の方向性を検討する上で、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との連携を通じて実施した。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ことにより、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¹⁾。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¹⁾³⁾。

●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。

この化粧品指令第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。2005年3月2日時点で国内法の作成状況は以下の通り。

●国内法を作成した国（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（7カ国）

Austria, Denmark, Finland, Greece, Italy, Portugal, Sweden

●国内法作成の情報がない国（1カ国）

Cyprus

化粧品指令第7次改正では、動物実験の禁止は全体の項目であるため、各国の国内法に動物実験禁止がどのように取り入れられたかは不明である。

C-1-2 ECVAMにおける代替法開発状況

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) 作成が要求されている。本件に関しては、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ECVAMが報告している⁴⁾。その記載内容としては、検討されている代替法、ECVAMの諮問委員会であるESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)の承認が得られると予測されるまでの期間、代替法がまだない分野や指標、推奨事項、EU域内での完全代替が予測される時期及び今後の展望が記載されている。詳細は引用文献を参照されたいが、以下にECVAMの報告書に記載されているEU域内における完全代替が予測される時期を記述する。

- ①急性毒性（2014年を越える）、②皮膚腐食性（2004年内）/皮膚刺激性（Hazard identification: 2008～2009年、Risk Assessment: 2010年を越える）、③眼刺激性（2010年を越える）、④皮膚感作性（2016～2018年）、⑤経皮吸収/皮膚透過性（2005年以内）、⑥亜急性/亜慢性毒性（予測不能）、⑦遺伝毒性/変異原性（2016年を越える）、⑧急性光毒性（2004年内）/光遺伝毒性（2009年）/光感作性（2019年を越える）、⑨トキシコキネティクス/代謝（排泄を考慮しない場合：2014年、排泄が含まれる場合：2016年を越える）、⑩発癌性（予測不能）、⑪生殖毒性/発生毒性（予測不能）。

この ECVAM の報告書では、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⁹⁾。

本年度 ECVAM により開催された Workshop は、代謝:in vitro 毒性試験の開発における障害(2004年1月)⁵⁾、皮膚感作性試験予測手段としての樹状細胞の使用(2004年4月)⁶⁾、バリデーションのための重み付けアプローチ(2004年5月)⁶⁾、受精に対する化学物質の影響(2003年6月)⁷⁾、慢性毒性試験(2004年9月)⁸⁾、定量的構造活性相関(2004年9月)⁸⁾であった。

C-1-3 SCCNFP による代替法開発の見通し

上記の ECVAM が4月30日付けでまとめた報告書についての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)による意見が、7月1日付けで公開された⁹⁾⁻¹⁰⁾。この意見書には、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記載されている。

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 の意見書に記載された代替法開発の見通しを以下に記述する⁹⁾⁻¹⁰⁾。

①急性毒性(完全代替:2014年を越える、部分代替:予測不能)、②皮膚腐食性(完全代替:2004年内)/皮膚刺激性(完全代替:2014年を越える、部分代替:2007~2008年)、③眼刺激性(完全代替:2010年を越える、部分代替:2006~2010年)、④皮膚感作性(完全代替:2019年を越える、部分代替:2016~2018年)、⑤経皮吸収/皮膚透過性(完全代替:2006年を越える)、⑥亜急性/亜慢性毒性(完全代替:予測不能・2014年を越える、部分代替:予測不能)、⑦遺伝毒性/変異原性(完全代替:2016年を越える、部分代替:2004年内)、⑧紫外線による影響(完全代替:予測不能・2019年を越える)/光毒性(部分代替:2004年以内)、光遺伝毒性(部分代替:2004~2010年)、光感作性(部分代替:2012~2019年)、⑨トキシコキネティクス/代謝(完全代替:予測不能・2014年を越える)、肺吸収(部分代替:2011~2012年)、経口投与・分布・排泄・代謝(部分代替:2014年を越える)⑩発癌性(完全代替:予測不能・2014年を越える、部分代替:予測不能)、⑪生殖毒性/発生毒性(完全代替:予測不能・2014年を越える)、胎児毒性(部分代替:2004年

内)、発生毒性(部分代替:予測不能)。

以上のように、SCCNFP の意見書では、化粧品指令第7次改正の定めた動物試験の禁止年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。

また、EU委員会に対し、in vitro 試験は、細胞、組織、培地、S9等を用いるため、必ずしも完全な非動物試験ではないことを指摘して、3R概念を中心に代替法の定義を再度明確化すべきであると答申している。

C-1-4 EU委員会の状況

EU委員会は2004年10月1日付けで、“Timetable for the phasing-out animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetic Directive”という答申を公表した¹¹⁾。この答申では、これまで公表された ECVAM 案⁹⁾や SCCNFP の意見⁹⁾⁻¹⁰⁾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記述している。この答申には、化粧品指令の第4a条が規定する期日以前に代替法が存在すると予測される毒性試験と、期日までに代替法がないと予測される毒性試験がそれぞれ表を分けて記載されている¹¹⁾。この答申によると、皮膚腐食性(Annex V)、紫外線による影響(急性光毒性:Annex V)、皮膚刺激性(Hazard identification:2007~2008年)、眼刺激性(2009年)、経皮吸収/皮膚透過性(2006年)及び紫外線による影響(光遺伝毒性:2008年)については、化粧品指令の第4a条が規定する期日以前に代替法が存在すると予測されている。その他の試験については、期日までに代替法がないと予測されている。

化粧品指令第7次改正の第4a条のI(d)には、動物実験の禁止に係わるものとして、危険物質指令 Annex V並びにEU委員会とSCCNFPが協議して新たに作成する Annex IX が記述されている。2004年9月15日付けでこの Annex IX が化粧品指令修正として公表された¹²⁾。ただし、提案された Annex IX 案は表の項目名(通しNo.、認証された試験法名、完全代替か部分代替の記載)の欄のみであり、具体的な代替試験法は記載されていない。

C-1-5 EU危険物質指令関連試験法

前記の危険物質指令 Annex V に係わるのが欧州化学局(ECB; European Chemicals Bureau)である。ECBは、2003年6月10日にEU危険物質指令に関係する試験法の状況を更新しているが

13)、本年は特に新しい動きはなかった。

C-1-5 小括

本年度は、2003年3月11日に公布された化粧品指令第7次改正において、2004年9月11日を期限とする①国内法の整備及び②動物試験の段階的廃止の timetable 案作成が求められている実質的な動きが認められる年であった。

まず、国内法の整備状況であるが、2005年3月初旬においても約7割の国が国内法を整備した状況に留まっている。次に、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 案は、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。今後も EU 情勢に関しては引き続き正確に調査して行く必要がある。

C-2 米国における代替法開発の動向

C-2-1 ICCVAM における代替法評価状況

ICCVAM は、米国官庁間の調整を図り共通の目標である代替法のバリデーションを統括する委員会として機能してきており、現在は NIEHS の恒久的委員会として位置付けられている。現在、ICCVAM は9省庁の15研究機関からの委員で構成されている。

本年度の代替法評価に関連するものとして、急性全身毒性を評価するための細胞毒性試験があり、これについては ECVAM と共同のバリデーションを実施中であるが、2004年10月19日付け官報に、2種の細胞毒性試験 (BALB/c 3T3 または正常ヒト角化細胞を用いる2種の Neutral Red 取り込みアッセイ) のプロトコールの最新版が告示された¹⁴⁾。同時に、既に実施された in vivo および in vitro 試験データの提出要請、形式も告示されたが、期限は明示されていないが、9か月以内に提出されたデータは2005年後半に予定されているバリデーション研究評価の際に考慮されるとしている。

また2004年5月28日付け官報に、ICCVAM は皮膚腐食性試験代替法の推薦された実施基準が入手可能であることを公表した¹⁵⁾。これは2003年公表された実施基準の改訂版となる。実

施基準は、皮膚腐食性能 (Corrositex, EPISKIN, EpiDermTM 及びラット皮膚経皮性電気抵抗評価) を評価するために、以前に評価され推薦された試験法と同様な試験法を評価するために使用することができる。

2004年11月3日付け官報に、ICCVAM で進行中の4種眼刺激性試験代替法バリデーション研究状況評価に関する専門家会議 (2005年1月11~12日) 開催と背景資料について公表された¹⁶⁾。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。これらの代替法は、眼に対する強刺激性物質や腐食性物質を評価するものであり、化粧品等に用いられるマイルドなものの評価には適用できないという問題点を有する。なお、2005年1月11~12日に開催された ICCVAM の専門家会議には、日本から本厚生労働科学研究班主任研究者の大野泰雄先生と資生堂の板垣宏博士が招聘されており、眼刺激性試験代替法のバリデーション研究のために実施された in vivo データ (過去の厚生科学研究班で実施) の有用性が再認識されたとのことである。EPA もこれら4種試験を推奨しており、その背景資料が ICCVAM/NICEATM web site (<http://iccvam.niehs.nih.gov>) に公開された。なお、コメントは2004年12月30日までとされている。

C-2-2 小括

本年度の米国における代替法開発の動向としては、試験法についての4種眼刺激性試験代替法の評価が ICCVAM より実施されたことが挙げられる。現在、ICCVAM と ECVAM は、急性毒性試験代替法としての細胞毒性試験の共同バリデーションを実施中であるが、今後、今回評価している眼刺激性試験代替法についても ECVAM との相互協力が想定される。

C-3 OECD の動向

C-3-1 OECD ガイドラインの動向

本年度は、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、各国コーデイナーによる第16回ワーキンググルー