

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17年度 総括・分担報告書

主任研究者 大野泰雄

平成18（2006）年 4月

主任研究者

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所・副所長）

分担研究者

板垣宏（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 皮膚科）

田中憲穂（(財)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・安全性生物試験研究センター・薬理部）

大森崇（京都大学大学院・医学研究科）

吉村功（東京理科大学・工学部経営工学科）

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

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大野 泰雄

平成18（2006）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. 代替法についての国際情勢の調査 ----- 23	
板垣 宏	
2. 代替法の評価とバリデーションおよび感作性試験代替法の開発----- 45	
大野泰雄	
資料 1-1 厚生労働科学研究の in vitro 光毒性試験バリデーションにおける酵母	
光生育阻害試験のプロトコール修正について	
資料 1-2 平成 17 年度光毒性試験代替法第 1 回評価委員会議事録	
資料 2-1 LLNA-BrdU 法提案書	
資料 2-2 第 4 回 LLNA-DA 評価委員会および第 1 回 LLNA-BrdU 評価委員会	
合同委員会議事録	
資料 2-3 (財) 化学物質評価研究機構より提案のあった皮膚感作性試験代替法	
(LLNA-BrdU 法) の一次評価報告書	
資料 3-1 皮膚腐食性試験バリデーション SOP	
資料 3-2 皮膚腐食性試験代替法バリデーション会議議事録	
資料 3-3 皮膚腐食性試験バリデーション結果報告	
資料 3-4 ヒト皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法の評価結果報告	
3. 光感作性試験代替法開発に関する研究 ----- 209	
戸倉新樹	
4. 急性毒性予測のための細胞性試験法の開発 ----- 217	
田中憲穂	
5. 代謝活性化能を含む細胞の開発 ----- 233	
小澤正吾	
6. バリデーションデータの統計解析 ----- 236	
大森 崇	
7. 代替法開発のための統計解析手法の研究 ----- 242	
吉村 功	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 247	
IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 251	

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

研究要旨 (赤字は平成16年度報告)

EUでは行政と企業が協力して代替法研究を促進するため 3Rs 宣言を行い、科学研究費の4%を3Rsのために支出する。ICCVAM, ECVAM 代表者も参加し、JaCVAM 設立記念シンポジウムが日本で開催された。韓国代替法学会が設立された。

日本で開発された VitroLife Skin と OECD で承認された EpiDerm について、皮膚腐食性試験系としてのバリデーションを実施し、両者が同様の能力を持つことを示した。RI を用いない皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA 法)の多施設バリデーションを開始した。また、同 LLNA-BrdU 法がバリデーションする価値があると思われた。

CD86 や CD54 発現亢進を指標にした感作性試験代替法(h-CLAT 法)のプレバリデーションを行ったところ、多くの施設で感作性物質と非感作性物質を識別できた。本方法は in vitro 感作性試験代替法として極めて有望である。in vitro 光アレルギー試験で光感作性物質が HaCaT 細胞に対し、ネクロシスより 10 倍低い濃度でアポトーシスを起こした。

代替法開発のための統計解析手法の研究では ET50 の区間推定法、アガール MLA 法の性能評価、及び 光毒性試験代替法を検討した。リスクの定量的評価において、統計学的な有意水準と実験者の評価が合わないことを実感された。バリデーション研究で算出される感度、特異度、一致度は被験物質と施設数に依存している。感度、特異度、一致度の割合を、被験物質のみに依存して計算する方法が提案された。

ヒト皮膚に存在する P450 分子種で被験物質をプレインキュベーションすると m-aminophenol について、CYP2E1 による代謝活性化による細胞増殖抑制作用が認められた。

分担研究者

板垣 宏 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)

A. 研究目的

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

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 (SCCP、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ズ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ズレターで行った。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。評価会議の委員は昨年度報告した。

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 14-16 年度の報告に述べた。今年度は昨年度に評価委員会で指摘を受けた点を提案者が改善してきたことから、そ

れについて、審議した。

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-BrdU) 法は化学物質評価研究機構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、代替法学会では昨年度に設置した感作性試験代替法評価のためのワーキンググループ (WG) で引き続き評価を行った。第一回の WG では申請書を慎重に検討し、質問を出した。それ以後は e-mail でのやりとりで一次評価報告書をまとめた。

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

ヒト表皮角化細胞は cell line である HaCaT 細胞を用いて、紫外線照射装置を、Broadband-UVB 照射装置と Narrowband-UVB 照射装置の 2 種類を使用することで確認実験の幅を広げた。上記 2 種類の UVB を HaCaT 細胞に対して照射後、FITC-Annexin V と 7-AAD を使用し、それぞれフローサイトメトリーでアポトーシスとネクローシスを解析した。アポトーシスを生じた細胞では、細胞質内に発現しているフォスファチジルセリンが細胞外の細胞膜に発現する。このフォスファチジルセリンに FITC で蛍光標識した Annexin V と特異的に接着させ、その発現量を測定した。一方、ネクローシスを生じた細胞は細胞膜の透過性が亢進しており、そこに核染色剤である 7-AAD を投与することで核染色を行った。これら、Annexin V と 7-AAD の 2 重染色を行い、Annexin V、7-AAD のどちらにも染色されない細胞集団を生細胞群、Annexin V にのみ陽性である細胞集団をアポトーシス細胞群、それ以外を死細胞群として、% 表示した。

TCSA による光修飾表皮細胞への影響の確認は培養 HaCaT 細胞に対して各濃度勾配の

TCSA 含 PBS で培養し、UVA を 4 J/cm^2 照射し、TCSA が細胞膜、細胞質の蛋白に共有結合し、光修飾表皮細胞となっているかを蛍光顕微鏡下に観察した。また、TCSA 光修飾表皮細胞のアポトーシス、ネクローシスを先に述べた方法で解析した。

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

細胞毒性試験として、BALB/3T3 clone A31 細胞を用いた 96 ウェルプレートによるニュートラルレッド法により、下記の試験を行った。

1. 界面活性剤である SDS とシクロフォスファミド (CP) を用い S9 の有無および加熱した S9 による毒性の変化
2. SDS を用いウシ血清アルブミンの濃度の違いによる毒性の変化
3. S9 存在下で毒性が発現する物質の、アルブミンの有無による毒性発現
4. 被験物質のアルブミン添加による毒性発現の変化

16 種の化学物質を用いた。細胞播種 1 日後に化学物質で 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。

B-5-2) 代謝活性化能を有する細胞を用いる試験系

種々の生体外異物の細胞増殖抑制作用を見やすい細胞系としてチャイニーズハムスター卵巣細胞を 3 種類用いた。すなわち、代謝活性化系なし(CHO)、シトクロム P450 1A2 (CYP1A2) による代謝活性化系のみ (CHO/1A2)、および CYP1A2+アシルアミン N-アセチル転移酵素 NAT2 を代謝活性化系として有している(CHO/1A2+NAT2)細胞の増殖抑制作用を指標にして、これら細胞内に組み込まれた代謝活性化系の働きを *m*-aminophenol, vanillin を被験物質として、増殖抑制作用を代謝活性化系を有する細胞と有しない細胞間で比較した。細胞増殖抑制作用は細胞を 0.4 %クリスタルバイオレット-50%エタノール溶液で固定・染色することにより算定した。

B-2) ヒト皮膚に存在することが知られている CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A5 発現細胞由来マイクロソーム (GENTEST) と上記 2 種の被験物質を 37°C 、1 時間プレインキュベ

ートして代謝活性化させた後に前項の 3 種の CHO 細胞を用いて CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A5 による代謝活性化を通じて細胞増殖抑制作用が亢進するかどうかを調べた。また、加えた CYP は 1 nmole に統一し、代謝活性化反応に電子伝達系として 1 mM NADPH を加えた。

B-6) バリデーションデータの管理とデータ解析

多施設共同バリデーション研究の主な目的は代替可能性と施設間再現性の検討である。このうち、代替可能性の評価では、感度、特異度、一致割合という指標が用いられることが多い。しかし、これらの指標が用いられる被験物質と参加施設の数に依存しており値の解釈が困難であるということはほとんど議論されていない。また、代替法の結果はしばしば擬陽性という判定がなされることがある。これらの指標を用いる場合には、擬陽性となるデータになんらかの処置を施す必要がある。本研究では、上記の点を考慮した新しい指標を提案することを目的としている。

提案する方法は、まず代替法で陽性と判定される割合を求め、次いで感度、特異度、一致度に対応する指標を計算という方法である。

議論をより明確にするために、ここでは通常用いられている感度、特異度、一致割合の定義を明記する。バリデーション研究で用いられた被験物質について、動物実験、代替法の判定を表 1 のような 2×2 分割表にまとめた場合を考える。

表B-6-1 2×2 分割表

		動物実験	
		陽性	陰性
代替法	陽性	a	c
	陰性	b	d
		a+b	c+d

感度は動物実験で陽性であると知られている被験物質数のうち代替法により陽性と判定された被験物質数の割合である ($a/(a+b)$)。特異度は動物実験で陰性であると知られている被験物質数のうち代替法により陽性と判定された被験物質数の割合である ($d/(c+d)$)。一致割合はすべての被験物質数のうち動物実験と代替法の結果が一致した被験物質数の割合である ($(a+d)/(a+b+c+d)$)。

提案する方法

上述した第一点目の注意点は、指標が被験

物質の選択に依存しているということであった。このことは、一つの被験物質を用いてバリデーション研究を行えば解決できる問題ではあるが、バリデーション研究の目的からは現実的ではないし、たとえそのような場合であっても得られた指標はその被験物質の場合の性能ということになる。そのため、指標はあくまでも研究に用いられた被験物質に基づく性能であるという点を注意して解釈すべきであり、どのような指標を用いても改善の余地はないであろう。しかしながら、第 2、3 点目の注意点については改善の余地がある。ここではこの 2 点を改善する方法を示す。

提案する方法は、2 段階に分かれている。

- ・ まず、代替法で陽性と判定される割合（陽性割合）を算出する、
- ・ 次に、算出された陽性割合を用いて、感度、特異度、一致割合に対応する指標を計算する

というものである。

第 i 物質における動物実験の判定スコアを x_i とする。このスコアは、もし動物実験の結果が陽性ならば 1 を、陰性ならば 0 をとることとする。第 i 物質における第 j 施設の代替法の判定スコアを y_{ij} とする。このスコアは、代替法の判定が陽性ならば 1、陰性ならば 0 をとることとする。擬陽性がある場合にはこのスコアを 0.5 とする。また、第 i 物質の代替法の実験を行った物質数を m_i とし、すべての物質数を n とする。第 i 物質の陽性割合を以下のように定義して、 p_i と表現することにする。

$$p_i = \sum_j y_{ij} / m_i$$

p_i を用いた指標 q_i を以下のように定義する。

$$q_i = x_i p_i + (1 - x_i)(1 - p_i)$$

q_i は、被験物質ごとの施設間再現性の指標として利用できる。もしもこの値が 0 に近づればその物質について施設間再現性は極めて悪いことを示すことになり、1 に近いほどこの指標は施設間再現性がよいことを示すことになる。

次に、本研究で提案する感度、特異度、一致割合を以下のように定義し、それぞれ P_{sn} 、 P_{sp} 、 P_{ac} と呼ぶことにする。

$$P_{sn} = \sum_i x_i p_i / \sum_i x_i$$

$$P_{sp} = \sum_i (1 - x_i)(1 - p_i) / \sum_i (1 - x_i)$$

$$P_{ac} = \sum_i q_i / n = \sum_i (x_i p_i + (1 - x_i)(1 - p_i)) / n$$

もしも、各被験物質について、すべての施設が陽性または陰性を示すなら、 p_i は 0 か 1 のどちらかのみをとる値となる。その場合にはこれらの指標はそれぞれ物質数に基づいた感度、特異度、一致割合に対応する。

B-7) 代替法実験結果の統計解析手法の検討

B-7-1) ET50 の区間推定法

3 次元ヒト皮膚モデルで、測定時点がただか 5 時点の場合を想定した。反応は吸光度で、反応・時間関係をロジスティック関数としたシミュレーションモデルを設定した。測定値は、吸光度に正規誤差が加わると想定した。推定のための提案法としては、第 1 段階でロジスティック回帰法での推定を行い、それで信頼区間が求まらなかったときに第 2 段階で対数直線法を用いることとした。信頼区間を求める方法としては、デルタ法、フィラー法、尤度比法を検討対象とした。従来のヒト皮膚モデルのキットメーカーが推奨している補間法が基本的に直線回帰法であるので、これを提案法の対照として、モンテカルロシミュレーションで性能評価を行った。

B-7-2) アガール MLA 法の性能評価

MLA にはアガール MLA 法とマイクロウエル MLA 法の二つの方法がある。前者は、変異を起こした細胞のみが生存できるプレート寒天培地で細胞を培養し、生じるコロニー数で変異強度を測定するのに対し、後者は、96 穴ウエル中で細胞を培養し、コロニーが生じないウエル数で変異強度を測定するものである。

これらの変異強度データから被験物質の遺伝毒性を評価する統計手法としては、昨年度の研究によって、大森法が良いことが分かっている。それを世界的な MLA ワーキンググループが集めたデータに適用して変異原性を評価したところ、マイクロウエル法に比べて、アガール法の方が実験家の考える判定との一致率が、約 94% に対する約 83% と低かった。この傾向はシミュレーションモデルを想定したモンテカルロ実験でも同じであった。

その原因を理論的吟味と実験データの吟味で検討した。すなわち、大森法を適用するときには、変異強度の推定値について分散を評

価する必要があるが、その分散の評価式を理論的に吟味した。さらに、実験データから得られる分散の推定値が妥当であるかを統計的に吟味した。

B-7-3) 光毒性試験代替法の吟味

昨年度の報告にあるように、酵母光生育阻害試験（酵母試験）と赤血球溶血性試験（赤血球試験）のバッテリー（酵母・赤血球試験）は、一応の性能があることが分かっている。しかし、そのバリデーション研究の中で、施設間再現性を定量的に評価するにはどうすればよいか、酵母・赤血球試験でのカットオフ値は妥当であるか、という二つの課題が残った。

すなわち、バリデーション研究では、表1のように、陽性、擬陽性、陰性の3段階で判定されたが、これを vivo の結果と対比するときは、擬陽性をどう扱うか、考え直す必要がある。また、施設間変動を3値で評価するのは定性的すぎるので、定量化の方が望ましい。その際は、施設の中の外れ値的存在を除外する必要がある。

実際、ECVAM (ECVAM-Glossary を参照) では、Transferability (易技術移転性) を、

「The ability of a test method or of a procedure to be accurately and reliably performed in different, competent laboratories.」と定義して、あるレベル以上の施設で妥当な結果を出せることを条件にしている。そういう意味での外れ施設検出には、定量的評価が不可避である。

表 B-7-1. 9物質への6施設での判定と vivo 判定. P:陽性, E:擬陽性, N:陰性

Chem Code	Laboratory						Vivo
	1	2	3	4	5	6	
A	P	E	E	P			P
B	P	N	P	E			P
C	P	P	P	P			N
D	P	E			E	P	P
E	P	P			P	P	N
F	E	P			N	N	N
G			P	P	P	P	P
H			N	E	E	E	N
I			N	N	N	N	N

その検出法として、本研究では陽性対照での分散を考えた。すなわち、酵母試験では、阻止帯の径が測られているので、これより分散を計算し、Cochran 検定で分散性が否定された施設を外れ施設とした。

次に、被験物質を固定効果、施設を変量効果とした混合モデルで各施設がどのように偏っているかを評価した。測定値としては、酵母試験では阻止帯の差 Z, 赤血球試験では溶血度の差 L を用いた。

バリデーション研究では、カットオフ値として、表2の規準が用いられてきた。

表 B-7-2 バリデーション研究での判定基準

記号	判定	酵母規準 mm	赤血球規準 %
N	陰性	Z<2	L<5
E	擬陽性	2=<Z<5	5=<L<10
P	陽性	5=<Z	10<L

本研究では、擬陽性という分類をせず、陽性と陰性を分けるカットオフ値のみを決定することとした。

カットオフ値を変えることは、感度と特異度が取引関係で増減することである。そのバランスをどのようにするかでカットオフ値を変えなければならない。その際問題になるのは、vivo の結果を真として良いかどうかである。昨年報告書で述べたように、被験物質 C と E では、vivo の結果と酵母・赤血球試験の結果が完全に逆になっている。その原因は、代替法の方ではなく、vivo のデータにあると考えられた。そこで、本研究では、この2物質を除外して感度と特異度を考え、“1-特異度”を横軸、感度を縦軸に取った ROC 曲線を描き、少なくとも特異度を60%以上にするという条件下で感度を大きくするカットオフ値を検討した。

(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 (板垣分担)

C-1-1) EU における状況

C-1-1-1) 化粧品指令第7次改正

化粧品及び化粧品原料のEU域内の動物実験禁止と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)に関する化粧品指令第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11月7時点で国内法の作成状況は以下のとおりである。なお、化粧品指令第7次改正では、動物実験の禁止は全体の一項目であるため、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。

・国内法を作成した国(23カ国)

Austria, Belgium, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France(動物実験の条項を除く), Germany, Greece, Hungary, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, Netherlands, Poland, Portugal, Slovakia, Slovenia, Spain, United Kingdom

・国内法を作成中の国(1カ国)

Sweden

・国内法作成の情報がない国(1カ国)

Cyprus

欧州司法裁判所は2005年5月24日のプレスリリースで、EU化粧品指令に関する仏政府の提訴を棄却したことを報じた。フランス政府はEU化粧品指令第7次改正中の動物実験の段階的禁止条項は、タイムテーブルが不明確で、実践の上でも法律的にも問題があるということで、2003年6月に提訴し無効化を求めていた。しかし、化粧品評価のための動物実験を廃止する目標が追求される必要性があるとし、フランスの不服申し立てを棄却した判決が下された。

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実験の段階的廃止に関する timetable (案) に関して、"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(2004.4.30)。この報告書では、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。

このため、ECVAM は、第6次 Framework Programme on Research and Development とし、① A-Cute-Tox Project (急性毒性試験)、② ReProTect Project (生殖発生毒性試験)、③ Sens-it-iv (感作性試験)を組織している。

A-Cute-Tox Project は実験動物を使用しない

急性毒性試験の開発を目的に2005年1月1日に開始された5年間のプロジェクトで、ヒトにおける急性毒性を予測する in vitro 試験の戦略の最適化とプレバリデーションを実施している。現在評価されている試験は、以下の5試験である。

- ・HepG2 細胞/タンパク質含量
- ・HL-60/ATP 含量
- ・BALB/c3T3 NRU
- ・正常ヒト角化細胞 NRU
- ・腎細胞系における TER 及び PCP 測定

ReProTect Project は in vitro 生殖発生毒性試験の開発と最適化の促進を目的に進められている。

Sens-it-iv Project は皮膚及び吸入における感作性物質を同定する in vitro 試験法の開発を目的としている。このプロジェクトは2005年10月から5年間の予定で開始された。このプロジェクトの活動は一方で動物数のさらなる削減も進めている。この活動には、過去の LLNA データベースの解析や放射性物質を使用しない別のエンドポイントを用いる LLNA 変法の評価も含まれている。

ECVAMはまた、2002年より NICEATM(The NTP Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) と共同で急性経口毒性を評価するための in vitro 細胞毒性試験のバリデーション研究を実施している。この研究は、NIEHS、EPA 及び ECVAM の補助を受けており、アメリカの2研究機関及びヨーロッパの1研究機関が参加した。現在、バリデーション研究の背景、方法および結果を記録した BRD (background review document) を作成している。2006年5月には in vitro 細胞毒性試験のバリデーション状況を評価するためのピアレビューパネルが招集される予定である。

本年度 ECVAM により開催された Workshop は、Marine Toxin Testing における 3Rs アプローチ(2005年1月)、Invalidation の概念(2005年9月)、生理学的速度論モデル(2005年10月)であった。

C-1-3 SCCP の状況

SCCP(Scientific Committee on Consumer Products)は EU 委員会の科学諮問機関であり、代替法に関する Opinion の発表についても担当している。2005年9月20日に皮膚感作性物質の分類及び試験の反応の評価についての覚書を採択し、皮膚感作性物質として表示す

べき物質「R43」の分類基準を示した。

C-1-4 EU 委員会の状況

EU 委員会における本年の特筆すべき事項としては“European partnership to promote alternative approaches to animal testing; 3 Rs Declaration”という 3Rs 宣言が挙げられる(2005.11.7 公表)。3Rs 宣言は、化粧品指令第 7 次改正による動物実験の禁止と化学物質の登録と規制(REACH; Registration Evaluation and Authorization of Chemicals)による動物実験の増加に関して、代替法開発の促進と活用の観点から提案されたものである。

3Rs 宣言はベルギーのブリュッセルにおいて EU 委員会主催で、行政、議員、企業、動物愛護団体などの関係者が約 250 名参加したワークショップ「EU goes Alternatives」で採択されたものであり、EU 委員会は、今後、代替法開発に莫大な資金を投下することを明言し、さらに動物愛護団体及び各種業界代表が 3Rs 宣言の Partnership として、協力(資金と人的面で)することを宣言したものである。宣言した業界団体は、EWLA(EU 動物愛護団体)、CEFIC(EU 化学品工業会)、EPIA(EU 製薬工業会)、EUROBIO(EU バイオテクノロジー工業会)、CIE (EU 石鹼洗剤工業会)、COLIPA(EU 化粧品工業会)、ECPA (EU 農薬工業会)であった。

以下は今後のアクションプランである。

- ①Partnership への参加者は、短期、中期、長期と認定されたアクションプログラムに貢献すること。アクションプログラムは、進展の障害となるバリアを見出すように、そして代替法の開発、バリデーション及び行政の承認を加速するための適切な解決法を提案するように計画されなくてはならない。
- ②アクションプログラムは、異なる優先分野に対して技術的なワーキンググループをセットアップして、プログラムの実行に関して適切な機構とタイムテーブルを見出しかつ確立すべきである。
- ③全ての必要なステップは、アクションプログラムが 2006 年の四半期までに作成できるように保証されなければならない。
- ④アクションプログラムの実施に関する Partnership からの年度報告書は、理事会、EU 議会、その他の関連する stakeholder の注目を引くため公表しなければならない。公表はインターネットでなされるべきである。実施に関する最初の報告は、2006 年 12 月までにな

されるべきである。

REACH は、欧州における化学物質の規制であり、化学物質の安全性確認義務を企業や業界が負うことになるが、その適用範囲やどのような安全性試験が必要になるのかが注目されている。2005 年 8 月 21~25 日にドイツのベルリンで開催された第 5 回国際動物実験代替法会議(5th world congress on alternatives & animal use in the life science)において、ドイツの環境・自然保護・原子力安全省の Uwe Lahl 博士により「REACH における動物試験を最少にする戦略」が提示された。2005 年における状況として、「Reduction (動物数の削減)と Refinement (苦痛の軽減等)は満足いくものになろう」と予測しているが、Replacement (置換)については、「in vitro も in silico も不満足であろう」と予測している。2010/2025 年に向けては、Reduction (動物数の削減)と Refinement (苦痛の軽減等)は「さらなる推進が期待される」としているが、Replacement (置換)については、「より一層の努力をしなければならぬ」としている。動物試験数の削減は既に開発された代替法がいかに確実なものであるか、そしてさらなる代替法の開発とバリデーションにかかっていると結論している。

2005 年 11 月 17 日、フランスのストラスブールで開かれた REACH 案に関する欧州議会第一読会で、欧州議員の圧倒的多数により REACH 欧州議会案が可決された。可決された REACH 欧州議会案では、企業(化学物質製造・輸入業者等)は EU で上市する化学物質を登録することが義務付けられることになった(化粧品成分も対象となっている)。これらの物質はヒトの健康および環境への安全性に基づいて評価を受け、場合によっては使用が禁止されることもあり得るという案である。そして、発ガン性、変異原性、生殖毒性を有すると分類されている特定の危険物質(CMR)を段階的に廃止し、これらより安全な代替物質に切り替える方針案も可決された。一方で、製造・輸入量が少ない化学物質(年間 1-10 トン)の登録プロセスを簡素化するという、大きな負荷軽減案も含まれた。

2005 年 12 月 13 日、ベルギーのブリュッセルで開かれた EU 理事会では、発ガン性、変異原性、生殖毒性を有すると分類されている特定の危険物質(CMR)を段階的に廃止し、代替物質に切り替えるという欧州議会が採択した方針案は受け入れられなかった。この案

が維持されるかどうかも含め、今後の審議においてまだ流動的である。

このまま進むと欧州議会と EU 理事会による最終決定に到達するのは 2006 年秋と予想され、欧州委員会は 2007 年春の REACH 発効を期待している。その後、欧州化学品機構が運営可能な状態になるには約 1 年かかるとみられており、REACH の要件の実施開始は 2008 年からになると予想される。

C-1-6 COLIPA の状況

COLIPA (欧州化粧品工業連合会) は動物試験代替法の開発と受け入れに向けたコーディネートを目的に、1992 年に SCAAT (Steering Committee on Alternatives to Animal testing) を常設の委員会として設置している。現在、以下の 4 Task Force があり、それぞれ積極的に活動が進められている。

- ① Eye Irritation Task Force (眼刺激性試験代替法の検討)
- ② Skin Tolerance TF (感作性・皮膚刺激性試験代替法の検討)
- ③ UV- Induced Toxic Effects TF (光毒性試験代替法の検討)
- ④ Mutagenicity/Genotoxicity TF (変異原性・遺伝毒性の検討)

このうち Skin Tolerance TF において、日本発の皮膚感作性試験代替法 h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の ring study が 2004 年 6 月から開始され、その結果に関しては第 5 回国際動物実験代替法会議にて発表された。

C-1-7 その他

第 5 回国際動物実験代替法会議 (5th world congress on alternatives & animal use in the life science) が 2005 年 8 月 21~25 日にドイツのベルリンで開催された。主催者は ZEBET の Dr. H. Spielmann と Human Society of USA の Dr. A. Rowan であり、参加者は約 860 名 (日本からの参加者は約 60 名) であった。登録演題数は口頭とポスター発表を合計すると 600 題を越える数となった。これは、化粧品指令第 7 次改正と REACH という動物実験に関する大きな課題を抱えている EU での開催であったためと考えられる。この会議では “Meeting the Challenge of the 7th Amendment of the EU Cosmetics Directive” というワークショップが開催され、その follow-up Meeting として、11 月 7 日に EU 委員会主催のワークショップ「EU goes Alternatives」が開催され、3Rs 宣

言が提案されたという経緯がある。なお、今回の第 6 回国際動物実験代替法会議は 2007 年 8 月に、本厚労科学研究班の主任研究者である大野泰雄の主催のもとに日本で開催される予定である。

ESTIV (European Society of Toxicology in Vitro) は、in vitro 毒物学を促進することを目的とする学会である。ESTIV の公式雑誌は「Toxicology in Vitro」である。執行委員長は ZEBET の H. Spielmann 教授であり、in vitro 毒物学の情報交換を推進するために、INVITOX ワークショップを開催、また、6 か月ごとにニュースレターを発行している。INVITOX2006 (第 14 回 in vitro 毒物学に関する国際ワークショップ) は 2006 年 10 月 2 日~5 日にベルギーのオステンドで開催される。

MEGAT (Middle European Society for Alternative Methods to Animal Testing) は、動物試験代替法の普及とバリデーション、3R の分野での研究の推進、メディアへの情報提供などを目的とする学会である。学会長は ZEBET の H. Spielmann 教授であり、使用言語はドイツ語、年 4 回科学雑誌「ALTEX」(Alternatives to Animal Testing) を無料でメンバーに発行している。2006 年 6 月 2 日~4 日にオーストリアのリンツ大学で第 13 回国際動物試験代替法会議を予定している。

C-1-2) 米国における状況

ICCVAM 主催で 4 種眼刺激性試験代替法の専門家による評価会議が 2005 年 1 月 11~12 日、米国で開催された。この専門家会議には、日本から本厚生労働科学研究班の大野と板垣が招聘された。また、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。評価された代替法及び現時点における評価結果の概要は以下の通り。

- ① BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay) : いくつかの条件つきで、段階的評価手段として腐食性/強刺激性物質の識別に十分な精度と信頼性がある。
- ② HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorio allantoic Membrane Test) : 段階的評価手段として腐食性/強刺激性物質の識別に十分な精度と信頼性がある。
- ③ ICE test (Isolated Chicken Eye Test) : ICCVAM バリデーション評価基準に達していないが、ごく限られた状況において段階的

評価手段として腐食性/強刺激性物質の識別に適用可能。

④IRE test (Isolated Rabbit Eye Test) : より多くの被験物質情報により試験法の精度が確認され、補足データにより信頼性評価が行われた場合に、段階的評価手段として腐食性/強刺激性物質の識別に適用可能。

また ICCVAM は 2005 年 5 月 11~13 日に「眼刺激性のシンポジウム」を開催した。そのテーマは①科学物質による眼の傷害と回復の機構と②眼刺激性試験における苦痛の緩和であった。この他、眼刺激性試験関係では、抗菌性クレンジング製品の皮膚及び眼刺激性を評価するための非動物試験に関するデータ及びピアレビューパネルの募集があった。一方、急性全身毒性を評価するための細胞毒性試験の評価に関しては、ECVAM と共同のバリデーションを実施した 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) の結果の評価が実施されており、2006 年 5 月に専門家会議が開催される予定である。この他、急性毒性試験の代替法に関連するものとして、ボツリヌス毒素を評価するマウスの LD50 法の代替法が、今後評価すべき試験法としてノミネートされた。

C-1-3) OECD の動向

OECD series on testing and assessment number 34: on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment が 2005 年 8 月 18 日付で公表された。この Guidance document は、試験法の定義、バリデーションの企画と実施、第三者による評価 (peer review)、国際的な受け入れ、新規試験法提案のための資料等で構成されている。今後、この Guidance document により新規代替法のグローバルな承認が加速するものと考えられる。本邦においては、新規代替法のバリデーションや行政における受け入れに関して、行政を中心とした産官学による組織的かつ積極的な対応が必要と考えられる。

本年度、新規試験法で OECD ガイドラインとして採択されたものはなかった。なお、コメント募集期間を終え、修正、最終段階に入っている試験法 (パブリックコメントの締切日) は以下の通りである。

426 神経発生毒性試験 (記載なし)

433 急性吸入毒性試験

(2003 年 1 月 20 日)

433 急性吸入毒性—固定用量法
(2004 年 7 月 30 日)

434 急性経皮毒性—固定用量法
(2004 年 7 月 16 日)

435 皮膚腐食性のための In vitro 膜バリア
—試験法 (2004 年 7 月 16 日)

436 急性吸入毒性-急性毒性クラス (ATC)
方法 (2005 年 1 月 28 日)

487 In vitro 小核試験
(2004 年 7 月 26 日)

C-2)新規代替法の評価 (大野分担)

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

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プロトコルを改善した。光照射量、プレインキュベーション時間を延長することにより酵母試験における濾紙上の光阻止円が広がった。今後、バリデーションを行い、結果の確認を行う予定である。

C-2-2)化学物質評価研究機構から提案された皮膚感作性試験について

皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA) の放射性同位元素 (RI) 標識化合物を用いない代替法 (LLNA-BrdU 法) を一次評価した。本試験法は LLNA 法における ³H-Methyl thymidine の DNA への取り込みの代わりに Bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みを細胞増殖の指標にしたものであり、原理はほとんど同じであること、指標の増加率は原法より小さいが、ほぼ同等の識別能力を持つこと、RI を用いないこと、また、操作が簡便であるといった利点があると判断した。しかし、行政試験法として評価する為には、更にデータの信頼性や施設間ばらつきについての情報を得る必要があることから、評価委員会からの指摘に対応し、プロトコルなどを修正した後に、多施設バリデーションを実施することが適切であると考えた。

C-2-3)皮膚腐食性試験代替法について

皮膚腐食性試験代替法としての皮膚三次元モデル (EpiDerm™ と Vitrolife-Skin™) の多施設バリデーションを実施した。陽性対象物質 2 品目、皮膚腐食性物質 6 品目、非腐食性物質 6 品目 (その内劇物 3、非劇物 9) を用い、6 施設によって行った。その結果、EpiDerm™ で腐食性物質を正しく腐食

性と判定する感度は 96.6%、非腐食性物質を正しく非腐食性と判定する特異性は 66.7%であった。なお、偽陽性と判定したのは、5%であった。陽性予知能力は 74.4%であった。陰性予知能力は 95.2%、一致率は 81.7%であった。即ち、ECVAM や ICCVAM, OECD で腐食性試験代替法として承認された EpiDerm™ は若干偽陽性があるが、腐食性物質を腐食性物質と判定する十分な能力を有することが確認された。一方、Vitrolife-Skin™ では感度は 100%、特異性は 66.7%、陽性予知能力は 75%、陰性予知能力は 100%、一致率は 83.3%であった。EpiDerm™ の場合と同様に、非腐食性物質を誤って腐食性物質と判定したのは、5%であった。即ち、EpiDerm™ と Vitrolife-Skin™ いずれにおいてもほとんど同じ成績が得られた。判断を誤る物質も同じであった。これらの結果から Vitrolife-Skin™ は腐食性試験代替法として国際的に承認されている EpiDerm™ と同等の識別能力を有するものと考えられた。

C-2-4) in vitro 感作性試験法の検討

わが国で開発されたヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞の CD86 および CD54 の発現亢進を指標にした感作性試験代替法(human Cell Line Activation Test: h-CLAT)の信頼性を評価するため、国内 7 施設による共同研究を実施した。その結果、本試験法は技術移転が容易であり、基本的に施設間再現性が良好であると考えられた。一方、施設間でばらつきの認められた化合物も存在し、今後その原因究明および対応策を検討することが必要と考えられた。本試験法を日本発の国際的な試験法として提案することを目標に、さらに基礎データの取得などの研究も遂行して行きたい。

C-4) in vitro 光感作性試験代替法の検討

ヒト表皮角化細胞において Broadband-UVB 0, 30, 60, 100 mJ/cm² 照射範囲内、および Narrowband-UVB 0, 300, 600, 1000 mJ/cm² 照射範囲内において、紫外線照射量、時間依存性にアポトーシス細胞、ネクローシス細胞が増加した。鋭敏に確実に両 UVB 波長域でアポトーシス、ネクローシスが誘導可能であった。

代表的な光感作物質 TCSA と表皮角化細胞との光結合の検討においては、HaCaT 角化細胞を TCSA 溶液に浸し、インキュベーションした後、UVA 4 J/cm² 照射し、TCSA の光産物の有無を蛍光顕微鏡下に確認したところ、

HaCaT 細胞の細胞表面、細胞質内に蛍光物質すなわち TCSA の光産物が結合していることが確認された。

TCSA と UVA によるアポトーシスとネクローシスの誘導を解析したところ、TCSA の濃度と UVA 照射の有無に応じてアポトーシスとネクローシス細胞が生成されることが明らかとなった。そこで、これにより他の光感作物質のアポトーシスとネクローシス能も占うことができるのか明らかにするため、bithionol、6-methylcoumarin、diphenhydramine、chlorpromazine、sparfloxacin (SPFX)、enoxacin (ENX)によるアポトーシス、ネクローシス解析したところ、bithionol、chlorpromazine、sparfloxacin、enoxacin において 10⁻⁴ または 10⁻⁵ M の濃度で観察された (Fig. 3)。ネクローシスはこれらの化学物質で 10⁻⁴ の濃度で認められた。diphenhydramine or 6-methylcoumarin はアポトーシスもネクローシスも示さなかった。TCSA と chlorpromazine はカスパーゼ-3 と PARP の活性化を示し、アポトーシス誘導性であることが確認された。

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

細胞毒性の発現に関わる要因として、生体内での薬物代謝による要因以外に、化学物質とタンパクとの結合による毒性変化が考えられる。そこで本研究では、19種の化学物質を用い、血清タンパクであるアルブミンとの結合で、どの程度毒性に変化がみられるかを調べた。その結果、lauryl sulfate sodium salt においてはアルブミン添加においても S9 添加系と同じように毒性の軽減が認められた。試験に用いた化学物質のうち 6-tert-butyl-m-cresol では S9 非添加系、アルブミン添加系、および S9 添加系で IC50 値がそれぞれ 0.036 mg/mL、0.053 mg/mL、0.068 mg/mL、また N-phenylmaleimide では IC50 値がそれぞれ 0.0048 mg/mL、0.0091 mg/mL、0.035 mg/mL となり、どちらの化学物質においても S9 と比較して 2 倍程度の IC50 値を示し、アルブミン添加による効果が認められ、化学物質とタンパクの作用による毒性の軽減が観察された。以上のように、S9 による代謝活性化試験での結果には、単に代謝能による毒性変化だけでなく、タンパクの作用による変化も関与している事が示唆された。

C-5-2) 代謝活性化能を有する細胞を用いる試験系

CHO 細胞内在性の CYP1A2、NAT2 による細胞増殖抑制作用の亢進について、*m*-Aminophenol、Vanillin を被験物質にして各種 CHO 細胞による増殖抑制作用を検討したところ、いずれも代謝活性化系を有しない CHO 細胞、CHO/1A2 および CHO/1A2+NAT2 に対して、最高濃度 0.5 mM でも細胞増殖抑制作用は認められなかった。従って、これら 2 物質は 0.5 mM でも細胞増殖を抑制せず、また、CYP1A2 や CYP1A2+NAT2 による代謝活性化で細胞増殖抑制作用を有する活性体に変換され、細胞増殖抑制を示すという当初の作業仮説も成立しなかった。*m*-Aminophenol は芳香族一級アミンなので、癌原性アリルアミンでよく認められる CYP1A2 により N-水酸化を受け、NAT2 による究極活性化体への変換により細胞毒性を示すという過程を想定したが、それを反映した細胞毒性は認められなかった。次に、CYP1A1、CYP1B1、CYP2E1、CYP3A5 と被験物質をプレインキュベートした後細胞に作用させることによる細胞増殖抑制作用を検討したところ、*m*-Aminophenol を CYP1A1、CYP1B1、CYP2E1、CYP3A5 とプレインキュベートした後、CHO、CHO/1A2、CHO/1A2+NAT2 の培養系に加えることで細胞増殖抑制作用が亢進するかどうかを検討した結果、上記 CYP 中で、CYP2E1 が 0.5 mM の *m*-Aminophenol 存在下で約 50%の細胞増殖抑制作用が 3 種の細胞いずれでも認められた。これに対し、Vanillin ではいずれの CYP でも細胞増殖抑制の亢進は認められなかった。

C-6) バリデーショndataの管理と解析

下の表 C-6-3 は、表 C-6-2 に示されているデータを方法の項の表 B-6-1 の形式にまとめたものである。ここでは、代替法の判定が擬陽性となった場合を陽性としている。

表C-6-2 ある代替法のバリデーション研究の結果

chemical	animal	alternative					
		a	b	c	d	e	f
A	P	P	F	F	P		
B	P	P	N	P	E		
C	N	P	P	P	F		
D	P	P	F			F	P
E	N	P	P			P	P
F	N	N	P			N	N
G	P			P	P	P	P
H	N			N	F	E	F
I	N			N	N	N	N

P.: 陽性、N.: 陰性、F.: 擬陽性

表C-6-3 2×2分割表へのまとめ
動物実験

		陽性	陰性
代替法	陽性	15 (P:10, F:5)	12 (P:9, F:3)
	陰性	1	8
		16	20

P: 代替法で陽性、E: 代替法で擬陽性

表 C-6-3 に基づいて感度、特異度、一致割合を計算するとそれぞれ、93.7% (15/16)、40.0% (8/12)、63.9% (23/36) となる。もしも感度と一致度の計算に擬陽性データは含まないというようにすれば、それぞれ 62.5% (10/16)、50% (18/36) となる。

一方、提案法を用いた場合、Psn、Psp、Pac はそれぞれ 84.4% (3.38/4)、47.5% (2.37/5)、63.9%(5.75/9)となる。

上記の計算結果の違いは擬陽性の扱いの違いによっている。しかし、それはすべての被験物質で施設の繰り返し数が同じ場合にのみになり立つことであり、より一般には異なることになる。

このように、提案する方法は、まず代替法で陽性と判定される割合を求め、次いで感度、特異度、一致度に対応する指標を計算という方法である。

C-7) 代替法実験結果の統計解析手法の検討

C-7-1) ET50 の区間推定法

シミュレーションモデルに基づいてモンテカルロ実験の結果、真値近くにデータがある場合には、直線法に比べて対数直線法を用いた方が真値からの偏りが小さかった。提案法では、真値からの偏りが 0.3 時間程度に収まっていた。区間推定法としては、デルタ法であれば区間推定可能な割合がほぼ 100%だったが、他の方法では区間推定ができない場合がある程度生じていた。しかし、被覆確率は目標信頼水準 95%に対して、最大で 4%程度小さくなる傾向があった。

C-7-2) アガール MLA 法の性能評価

アガール法での変異強度 MF は $(c_m/c_s) \times (f_s/f_m)$ で与えられる。 c_m は変異を観測するプレートにおけるコロニー数、 c_s は生存を観測するプレートにおけるコロニー数、 f_m 、 f_s はそれに対応する播種細胞数である。これにポアソン分布を仮定してデルタ法を適用して MF の漸近的分散を求めると、 $(p_m/p_s)^2 (1/(f_m p_m) + 1/(f_s p_s))$ となる。 p_m 、 p_s はそれぞれ真の変異確率、生存確率である。この式におい

て、変異に関するコロニー数にポアソン分布を仮定することには問題ないと思われるが、生存コロニー数にポアソン分布を仮定することは、必ずしも適当でないと考えられる。実際、播種細胞数は理論的には例えば 600 という定数であるが、現実には各プレートに正確に 600 の細胞を播種しているわけではない。誤差が生じている。実際、観測コロニー数が 600 を超えているデータが存在する。しかも変異確率は 1/100,000 というオーダーできわめて小さいのに対し、生存確率は 95%あるいはそれより大きいことが稀でない。このような条件での漸近分散の近似はかなり悪いと考えられる。実際、シミュレーションモデルで確認したところでも、その推定精度は、マイクロウエル法に比べてかなり悪かった。これらのことが、アガール法の性能を悪くしているものとするのが合理的であろう。

C-7-3) 光毒性試験代替法の吟味

6 施設のうち第 2 施設は陽性対照のばらつきが他の施設に比べて有意に大きかった。従って、この施設は最低必要な技術レベルに達していなかったと考えられた。第 2 施設を除いた 5 施設について、9 被験物質の主効果を混合モデルで推定した結果、おおむね合理的で安定した結果が得られた。施設間差は被験物質の主効果に比べて小さかった。

カットオフ値については、被験物質 C,E を含めて評価している限り、どのようにカットオフ値を定めても、特異度を 60%以上にすることができなかった。

そこで C,E を除いて特異度 60%以上を確保しようとしたところ、

酵母試験で、4mm または 5mm

赤血球試験で、2% または 3%

という値が最適という結果であった。ROC 曲線を吟味したところ、このときの特異度は約 92%、感度は約 94%であった。

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は、光感作物質+UVA で処理した細胞でも非常に簡便でかつ鋭敏に測定することができた。TCSA, bithionol, chlorpromazine, sparfloxacin, enoxacin において 10^{-4} または 10^{-5} M の濃度でアポトーシスを誘導し、ネクローシスはこれらの化学物質で 10^{-4} の濃度で認められた。diphenhydramine or 6-methylcoumarin はアポトーシスもネクロ

ーシスも示さなかった

本研究によって、少なくとも 4 種類の被験物質 10^{-4} M の濃度と UVA 4 J/cm² 照射することで、アポトーシスを多くの光感作性物質で誘導できることが明らかとなった。こうした物質は光毒性物質であるばかりでなく、光アレルギー性物質であることも臨床的に知られている。アポトーシスに陥った光抗原を担うケラチノサイトが cross priming によって、近傍の樹状細胞によって抗原提示されるのであれば、アポトーシス誘導能と光アレルギー性の間に関連が生まれる。今回の結果はこうしたことを裏付けている。また本検査は光毒性と光アレルギーの両者に対する代替法の一つになりうると考えられた。

ヒト皮膚に発現が認められると考えられるシトクロム P450 分子種、CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A5 による代謝活性化をチャイニーズハムスター卵巣由来細胞の増殖抑制作用の亢進を指標に *m*-Aminophenol および Vanillin を被験物質として検討した。その結果、Vanillin に対しては本実験のエンドポイントすなわち細胞増殖抑制に CYP 代謝活性化系はなんらの効果も示さなかったが、*m*-Aminophenol は CYP2E1 により代謝活性化されることにより細胞増殖抑制作用を示す物質に変換されている可能性が示された。代謝活性化系を工夫し、細胞増殖抑制などの毒性を観察する系とを組み合わせることが有望ではないかと思われた。現在の系をより簡便に組むことを目標に代謝活性化反応を細胞毒性等で観察することを本線に、ヒト皮膚の毒性を観察できる系を確立できる見通しが立った。

E. 結論

- 1) 本年度は『代替法の 3 Rs』がグローバルに認知され、新規代替法の行政的な受け入れがグローバルレベルで一步前進した年として結論付けられる。
- 2) 本邦においては 2005 年 6 月 22 日に改正・動物愛護管理法が公布され、実験動物の福祉の原則等として『3Rs の原則』が第 41 条中に明確に記載された。現在、この改正・動物愛護管理法を受け、動物実験の適正化のためのガイドライン作成が、関係行政機関や団体等において進行中である。
- 3) EU では、2005 年 11 月 7 日に、EU 委員会と産業界が『3Rs 宣言』を公表し、効果と安全性の両面に関する代替法の開発を

- 促進することを宣言した。EU 委員会は、今後、代替法開発に莫大な資金を投下することを明言し、さらに動物愛護団体及び各種業界代表が 3Rs 宣言の Partnership として、協力（資金と人的面で）することを宣言した。
- 4) 新規代替法の行政的な受け入れに関しては、OECD が Guidance document “OECD series on testing and assessment number 34: on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment” を 2005 年 8 月 18 日付けで公表した。
 - 5) 本邦においても 2005 年 11 月に JaCVAM が発足した。今後、代替法の評価と行政的受け入れがグローバルレベルで加速することが期待される。
 - 6) 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プロトコールに関し、光照射量、プレインキュベーション時間を延長することにより酵母試験における濾紙上の光阻止円が広がった。今後、バリデーションを行い、結果の確認を行う予定である。
 - 7) RI を用いない皮膚感作性試験代替法 (LLNA-BrdU 法) を一次評価した。本試験法は LLNA 法における ³H-Methyl thymidine の DNA への取り込みの代わりに Bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みを細胞増殖の指標にしたものであり、LLNA 法とほぼ同等の識別能力を持つと判断した。行政試験法として評価する為には、更にデータの信頼性や施設間ばらつきについての情報を得る必要がある。
 - 8) 皮膚腐食性試験代替法としての皮膚三次元モデル (EpiDerm™ と Vitrolife-Skin™) の多施設バリデーションを実施した。その結果、OECD で認められた EpiDerm™ と同等の識別能力を Vitrolife-Skin™ が有すると思われた。
 - 9) わが国で開発されたヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞の CD86 および CD54 の発現亢進を指標にした感作性試験代替法 (h-CLAT) の信頼性を評価するため、国内 7 施設による共同研究を実施した。その結果、本試験法は施設間再現性が良好であると考えられたが、施設間でばらつきの認められた化合物も存在し、今後その原因究明および対応策を検討することが必要と考えられた。
 - 10) ヒト皮膚に存在すると言われている CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A5 で m-aminophenol をプレインキュベーションすると、CYP2E1 による代謝活性化による細胞増殖抑制作用が現れた。ヒト皮膚に対する代謝活性化過程を組み込む試験系としては、生物活性の指標の問題や、代謝活性化系の共存方法の問題があるが、これらを克服しながら、in vivo に代替する試験法へ近づけていきたいと考える。
 - 11) 光アレルギーを生じる光感作性物質で代表的な TCSEA、bithionol、chlorpromazine、sparfloxacin、enoxacin において、アポトーシス誘導能があることが明らかとなった。
 - 12) 代替可能性の評価では、感度、特異度、一致割合という指標が用いられることが多い。しかし、これらの指標が用いられる被験物質と参加施設の数に依存しており値の解釈が困難であるという事はほとんど議論されていない。また、代替法の結果はしばしば擬陽性という判定がなされることがある。これらの指標を用いる場合には、擬陽性となるデータになんらかの処置を施す必要がある。本研究では、上記の点を考慮した新しい指標として、まず代替法で陽性と判定される割合を求め、次いで感度、特異度、一致度に対応する指標を計算という方法を提案する。日本で実施されたある代替法のバリデーション研究の結果を適用した場合、感度、特異度、一致割合はそれぞれ 93.7%、40.0%、63.9%であった。一方、提案法を用いた場合、対応する指標はそれぞれ 84.4%、47.5%、63.9%となった。提案する方法は、感度、特異度、一致割合に対応する指標であり、代替法での擬陽性データを扱うことができる。また指標は被験物質のみに依存しているという解釈ができる。
 - 13) 多施設で実施されるバリデーション研究で算出される感度、特異度、一致割合は被験物質と施設数に依存している。代替法の判定に擬陽性がある場合には何かしらの対処を行わなくてはならない。本研究では、被験物質のみに依存する感度、特異度、一致度を提案した。さらに、この提案では代替法の結果が擬陽性と判定されるデータも扱うことができる。
 - 14) 3 次元ヒト皮膚モデルの実験データに基

づく ET50 の区間推定法に関しては、時間-反応データが少量であるという条件下では、ロジスティック曲線を当てはめる非線形最小二乗法では、信頼区間が求まらないことがあることを示し、その場合について対数直線法を用いると信頼区間の被覆確率が名義信頼水準を少し下回ることを、シミュレーション実験で確かめた。その補正法は未解決の課題である。

- 15) アガール MLA 法の性能がマイクロウェル MLA 法より悪いことの理由の明確化に関して、欧米の実験施設からの過去の実験データから被験物質の遺伝毒性を評価した場合、有意水準を 0.3%程度に小さくした方が試験家の判定と似た統計学的判定が得られるが、その場合でもアガール MLA 法はマイクロウェル MLA 法より性能が悪いことを確かめた。その原因として、アガール法での変異強度の分散推定法に問題があることを理論とデータで示した。
- 16) 光毒性試験代替法のバリデーションにおける施設間差の評価法とカットオフ値の妥当性に関しては、陽性対照における測定値のばらつきを Cochran 検定で評価することで外れ施設を検出した。それを除外した場合の施設間差は、被験物質の主効果に比べて小さかった。カットオフ値は酵母試験について、4.5mm,赤血球試験で2,3% が妥当であった。

F. 引用文献 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirota, M., Kitagaki, M., Itagaki, H., and Aiba, S., Quantitative measurement of spliced XBPI mRNA as an indicator of endoplasmic reticulum stress. *J. Toxicol. Sci.*, accepted, 2006.
- 2) Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., and Toyoda, H., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol In Vitro*, accepted, 2006.
- 3) Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M.,

Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., and Suzuki, H., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol In Vitro*, accepted, 2006.

- 4) 大野泰雄 動物実験代替法研究の重要性とその課題—薬理学会における動物実験の問題点—、*日薬理誌* 125, 325-329 (2005)
- 5) 大野泰雄、酒見和枝、篠内桃子、ヒト組織の研究利用体制の構築と研究応用、4. 手術摘出肝組織からの肝細胞調製とヒト肝細胞を用いた試験系のバリデーション。 *臨床薬理*、36, 127-128 (2005)
- 6) Tokura Y: Photocontact dermatitis: from basic photobiology to clinical relevance. *J Environ Dermatol* 12: 71-77, 2005.
- 7) Misawa J, Moriwaki SI, Kohno E, Hirano T, Tokura Y, Takigawa M: The role of low-density lipoprotein receptors in sensitivity to killing by Photofrin-mediated photodynamic therapy in cultured human tumor cell lines. *J Dermatol Sci* 2005
- 8) Sayama K, Kobayashi Y, Fujita H, Ito A, Tokura Y, Sasaki M. Determination of action spectrum for sparfloxacin-photosensitized single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 21:287-292, 2005.
- 9) Imai S, Atarashi K, Ikesue K, Akiyama K, Tokura Y. Establishment of murine model of allergic photocontact dermatitis ketoprofen and characterization of pathogenic T cells. *J Dermatol Sci* 41:127-36. 2006
- 10) Orimo H, Tokura Y, Hino R, Kasai H. Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the DNA of cultured human keratinocytes by clinically used doses of narrowband and broadband

- ultraviolet B and psoralen plus ultraviolet A. *Cancer Sci* 97:99-105, 2006.
- 11) 戸倉新樹: 光化学療法. 光科学研究の最前線. 「光科学研究の最前線」編集委員会編. 強光子場科学研究懇談会出版. pp366-367. 2005.
- 12) 戸倉新樹: 後天性光線過敏症の病態. 皮膚疾患の最新医療. 斎田俊明, 飯塚一編. 先端医療技術研究所 2006, 221-224.
- 13) 戸倉新樹: 光化学療法. 新・皮膚悪性リンパ腫アトラス. 瀧川雅浩他編. 文光堂, 東京. 光化学療法, 185-187, 2006.
- 14) 戸倉新樹: 内服テストと内服照射テスト. 皮膚科診療プラクティス. 1. 薬疹を極める. 文光堂 125-127. 2006
- 15) 戸倉新樹: 光線過敏症における光アレルギーの位置. 皮膚アレルギーフロンティア. 3: 7-10, 2005.
- 16) 戸倉新樹: 光アレルギーの臨床をどうするか. 皮膚アレルギーフロンティア. 3: 32-40, 2005.
- 17) 戸倉新樹: 薬剤性光線過敏症. *MB Derma* 96: 13-19, 2005.
- 18) 戸倉新樹: 後天性の光線過敏症はなぜ起こる? マルホ皮膚科セミナー No. 174. pp28-32, 2005.
- 19) 戸倉新樹: 内服薬で起きる皮膚炎: 薬剤性光線過敏症. *毎日ライフ* 2005. 6: 号: 52-55.
- 20) 西尾大介, 戸倉新樹: 薬剤性光線過敏症. アレルギーの臨床 25: 774-778, 2005.
- 21) 杉田和成, 戸倉新樹: 慢性光線性皮膚炎と免疫抑制状態. アレルギーの臨床 25: 784-788 2005.
- 22) 戸倉新樹: 抗生剤・抗菌薬による光線過敏症. *Topics in Atopy* 4: 44, 2005.
- 23) urita M, Shimauchi T, Kobayashi M, Kabashima K, Tokura Y: Induction of keratinocyte apoptosis by photosensitizing chemicals plus UVA.(投稿中)
- 24) Kubo, S-R Kim, K Sai, Y Saito, T Nakajima, K Matsumoto, H Saito, K Shirao, N Yamamoto, H Minami, A Ohtsu, T Yoshida, N Saijo, Y Ohno, S Ozawa, and J Sawada: Functional characterization of three naturally occurring single nucleotide polymorphisms in the *CES2* gene encoding human carboxylesterase 2 (hCE-2). *Drug Metab Dispos* 33: 1482-1487 (2005)
- 25) Ryo Kurihara, Fujio Shiraishi, Noriho Tanaka, Shinya Hashimoto, Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastals Japanese waters, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1984-1993 (2005)
- 26) 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*, Vol. 75A Issue 1, 115-122 (2005)
- 27) 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.*, 588:7-21 (2005)
- 28) Kiyomi Ohmori, Makoto Umeda, Noriho Tanaka, Hiroki Takagi, Isao Yoshimura, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Ayako Sakai, Harumi Araki, Masumi Asakura, Hiroshi Baba, Youichi Fushiwaki, Shuichi Hamada, Nobuyui Kitou, Tetsuo Nakamura, Yoshiyuki Nakamura, Hidetoshi Oishi, Satoshi Sasaki, Sawako Ahimada, Toshiyuki Tsuchiya, Yoshifumi Uno, Masataka Washizuka, Satoshi Yajima, Yasuhito Yamamoto, Eiji Yamaura and Tomoko Yatsushiro: An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells, *ATLA* 33, 619-639 (2005)
- 学会発表 (講演及び学会発表)
- 1) Aeby, P., Basjetter, D., Diembeck, W., Gerberick, F., Itagaki, H., Kimber, I., Le Varlet, B., Manou, I., Paye, M., Rousset, F., Rowland, J., and Sakaguchi, H., "Colipa dendritic cell

- research projects", 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 2005.
- 2) Ashikaga, T., Sono, S., Yoneyama, K., and Itagaki, H., "Study on cytotoxicity assay and fluorescence probe on in vitro sensitisation assay using h-CLAT(human Cell Line)", 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 2005.
 - 3) Basketter, D., Aeby, P., Diembeck, W., Gerberick, F., Itagaki, H., Kimber, I., Manou, I., Paye, M., Rousset, F., Rowland, J., and Sakaguchi, H., "The COLIPA strategy for the development of in vitro alternatives: Skin irritation", 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 2005.
 - 4) Kouzuki, H., Yoamashita, F., Itagaki, H., and Hashida, M., "Prediction of human skin permeability of chemicals in various vehicles using artificial neural network", 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 2005.
 - 5) Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Kosaka, N., Sono, S., Itagaki, H., and Suzuki, H., "Predicting and classification of allergic potential using an in vitro skin sensitization test; Human cell line activation test (H-CLAT)", Society of toxicology 45th annual meeting, 2006.
 - 6) Suzuki, M., Hirota, M., Hagino, S., Aiba, S., and Itagaki, H., "Evaluation of changes of cell surface thiols as a new biomarker for in vitro sensitization", Society of toxicology 45th annual meeting, 2006.
 - 7) Yoshimura, I., Omori, T., Ohno, Y., Hoya, M., Mori, M., Doi, T., Fujita, Y., Itagaki, H., Kawabata, R., Kojima, H., Hasegawa, S., Okamoto, Y., Tanaka, N., Tanigawa, K., and Wakuri, S., "Validation study on the battery system for prediction of phototoxicity in Japan: The overview of the results", 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 2005a.
 - 8) Yoshimura, I., Omori, T., Ohno, Y., Hoya, M., Mori, M., Doi, T., Fujita, Y., Itagaki, H., Kawabata, R., Kojima, H., Hasegawa, S., Okamoto, Y., Tanaka, N., Tanigawa, K., and Wakuri, S., "Validation study on the battery system for prediction of phototoxicity in Japan: The overview of the results", 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 2005b.
 - 9) 藪さき子, 米山桂子, 足利太可雄, 板垣宏, "THP-1 細胞における CD86 および CD54 発現を指標とした感作性試験代替法の試験条件の最適化", 第 19 回日本動物実験代替法学会, 2005.
 - 10) 吉田武美, 芦野隆, 石川牧恵, 森眞輝, 萩野滋延, 板垣宏, 沼沢聡, "動物試験代替法に用いる細胞の薬物代謝能の評価: 感作性試験代替法を中心に", 第 19 回日本動物実験代替法学会, 2005.
 - 11) 佐々木喜教, 水芦政人, 廣田衛彦, 鈴木美絵, 板垣宏, 相場節也, "ハプテン刺激樹状細胞における細胞内レドックスの変化と細胞表面チオール基の変化との相関に関して", 第 19 回日本動物実験代替法学会, 2005.
 - 12) 佐藤温重, 板垣宏, "代替法最前線: In Vitro toxicology のブレイクスルーを目指して挨拶と主旨", 第 19 回日本動物実験代替法学会, 2005.
 - 13) 山下富義, 上月裕一, 板垣宏, 橋田充, "化学構造に基づく経皮吸収の予測", 第 19 回日本動物実験代替法学会, 2005.
 - 14) 上月裕一, 山下富義, 板垣宏, 橋田充, "包括的経皮吸収評価法の開発 III - 媒体を考慮した皮膚内濃度の予測 -", 第 19 回日本動物実験代替法学会, 2005.
 - 15) 田中憲穂, 板垣宏, 若栗忍, 中川ゆづき, "単回投与毒性試験代替法の開発研究及び皮膚モデルを用いる遺伝毒性試験法の開発研究", 第 19 回日本動物実験代替法学会, 2005.
 - 16) 穂谷昌利, 神田賢治, 上月裕一, 萩野滋延, 板垣宏, "ペプチド結合性を指標とした感作性試験代替法の開発", 第 19 回日本動物実験代替法学会, 2005.
 - 17) 北垣雅人, 若栗忍, 田中憲穂, 板垣宏, "急性毒性試験代替法の検討 (3) : 2 施設間における Collagen Gel assay を用いた急性毒性試験予測性の評価", 第 19 回日本動物実験代替法学会, 2005.
 - 18) 鈴木美絵, 廣田衛彦, 萩野滋延, 板垣宏, 相場節也, "細胞表面チオール基の変化を指標とした感作性試験代替法の開発 (I) : in vivo 試験法との対応性", 第 19 回日本動物実験代替法学会, 2005.
 - 19) 廣田衛彦, 鈴木美絵, 萩野滋延, 板垣宏, 相場節也, "細胞表面チオール基の変化を指標とした感作性試験代替法の開発 (II) : 細胞腫による反応性の違いについて", 第 19 回日本動物実験代替法学会, 2005.
 - 1) Yasuo Ohno, Japanese challenge to develop alternative methods for safety evaluation of cosmetics. 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life sciences. Berlin, August 21-25, 2005 (2005.8.22)
 - 2) Isao Yoshimura, Takashi Omori, Yasuo Ohno, Masatoshi Hoya, Masaki Mori, Takaaki Doi,

- Yuriko Fujita, Hiroshi Itagaki, Rumi Kawabata, Hajime Kojima, Seiji Hasegawa, Yuko Okamoto, Noriho Tanaka, Kouko Tanigawa, Shinobu Wakuri. Validation Study on the Battery System for Prediction of Phototoxicity in Japan: The Overview of the Result. 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life sciences. Berlin, August 21-25, 2005 (2005.8.25)
- 3) Yasuo Ohno, Tomoko Ando, Katsuhiko Inagaki, Mahito Ohhira, Tadashi Kosaka, Hajime Kojima, Yosuke Nakamura, Hisashi Torishima, Noriyuki Morikawa, Takashi Omori, Jun Kanno, Mami Kuboki, Michiru Genno, Masaru Nogata, Takanori Harada, Takashi Morimoto, Isao Yoshimura. Validation of human skin models for skin corrosivity tests in Japan. 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life sciences. Berlin, August 21-25, 2005 (2005.8.25)
 - 4) Yasuo Ohno, Establishment of JaCVAM and welcome to WC6 in 2007/Tokyo. 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life sciences. Berlin, August 21-25, 2005 (2005.8.25)
 - 5) 足利太可雄、坂口 齊、岡本賢二、水野誠、山田貴亮、吉田真由美、佐藤 淳、児玉達治、太田尚子、長谷川靖司、岡本裕子、桑原裕史、小坂七重、藺さき子、大野泰雄、*in vitro* 皮膚感作性試験:h-CLAT (human Cell Line Activation Test)の日本における共同研究(第一報)、第19回日本動物実験代替法学会(2005.12.1)
 - 6) 若栗 忍、大野泰雄、田中憲穂、細胞毒性による *in vivo* 全身毒性の予測について。—代謝活性化の導入および処理条件の検討—。第19回日本動物実験代替法学会(2005.12.1)
 - 7) Yasuo Ohno, 日本代替法評価センター(JaCVAM)設立記念講演 代替法の国際協調 Research on alternatives in Japan and JaCVAM, its role and future plan. 第19回日本動物実験代替法学会(2005.12.1)
 - 8) 大野泰雄、日本薬理学会の奨める動物実験(苦痛の評価と軽減)、日本薬理学会シンポジウム S17(2006.3.9)
 - 9) T. Ashikaga, H. Sakaguchi, K. Okamoto, M. Mizuno, J. Sato, T. Yamada, M. Yoshida and Y. Ohno. Results of a Japanese ring study of a human cell line activation test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential. SOT 2006.3,
 - 10) 足利太可雄、坂口齊、岡本賢二、水野誠、山田貴亮、吉田真由美、佐藤淳、児玉達治、太田尚子、長谷川靖司、岡本裕子、桑原裕史、小坂七重、藺さき子、大野泰雄、日本における *in vitro* 皮膚感作性試験:h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の共同研究。第30回日本化粧品学会(2006.6.2-3)東京ヤクルトホール
 - 11) Ashikaga T. and Sakaguchi H., “The optimization of h-CLAT (human Cell Line Activation Test) protocol and inter-laboratory validation study”, Proceeding of 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 105, 2005.
 - 12) Sakaguchi H. and Ashikaga T., Results of a Ring Trial of a Human Cell Line Activation Test for Predicting Skin Sensitization Potential, Proceeding of 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 108, 2005.
 - 13) 坂口 齊、足利 太可雄、“THP-1 細胞(ヒト単球由来株化細胞)を用いた *in vitro* 皮膚感作性試験法 I. プロトコールの最適化と2施設間のバリデーション”、第12回日本免疫毒性学会講演要旨集、43、2005.
 - 14) 足利 太可雄、坂口 齊、“THP-1 細胞(ヒト単球由来株化細胞)を用いた *in vitro* 皮膚感作性試験法 II. CD86/CD54 発現の用量反応性”、第12回日本免疫毒性学会講演要旨集、47、2005.
 - 15) 足利 太可雄、“THP-1 細胞(ヒト単球由来株化細胞)を用いた *in vitro* 皮膚感作性試験法(human Cell Line Activation Test; h-CLAT)の開発”、第19回日本動物実験代替法学会要旨集、60、2005.
 - 16) 坂口 齊、“細胞を用いた皮膚感作性試験代替法”、第19回日本動物実験代替法学会要旨集、82、2005.
 - 17) Ashikaga T., Sakaguchi H., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yamada T., Yoshida M., Ohno Y., Results of a Japanese ring study of a human cell line activation test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential, *The Toxicologist*, 90, 1, 466, 2005.
 - 18) 栗田晶子他: 光感作物質とUVA照射処理による表皮角化細胞へのアポトーシス誘導能の評価。日本光医学・光生物学会。2005.8.6.
 - 19) 栗田晶子他: 光感作物質とUVA照射処理による表皮角化細胞へのアポトーシス誘導能の評価。第35回 UV-ABCub, 幕張プリンスホテル, 千葉, 2006. 3.4.
 - 20) 田中憲穂、板垣宏、若栗忍、北垣雅人、中川ゆづき: 単回投与毒性試験代替法の開発研究および皮膚モデルを用いる遺伝毒性