

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とのことである。

一方、EUでは、2005年11月7日に、EU委員会主催のワークショップが開催され、その結果『3Rs宣言』が公表された。『3Rs宣言』は、今後、EUにおいては各産業分野において、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ている。この『3Rs宣言』に基づき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。『3Rs宣言』では動物を用いる試験法も代替法として考えられるため、2006年12月に公表されるアクションプランの内容を注視する必要がある。また、この『3Rs宣言』は代替法の必要性和生命科学の複雑さのギャップを考慮すると、科学的に納得性の高い進め方であり、グローバルに普及する可能性がある。

次に、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。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のものと考えられる。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を期待したい。

なお、代替法の開発と評価に関する状況を安全性評価項目ごとにとりまとめたが、本年度は特筆すべき変化はなかったものと考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 参考文献

- 1) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003, Official Journal of the European Union, L66/26, 2003
- 2) CTPA News update, February 6, 2003.
- 3) CTPA News update, March 3, 2003.
- 4) http://europa.eu.int/comm/enterprise/cosmetics/doc/2004_94/en.pdf
- 5) <http://pharmacos.eudra.org/F3/cosmetic/AnimalTest.html>
- 6) <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- 7) ATLA, 33, 7, 2005
- 8) ATLA, 33, 559, 2005
- 9) ATLA, 33, 559, 2005
- 10) http://europa.eu.int/comm/health/ph_risk/committees/04_sccp/04_sccp_en.htm
- 11) http://europa.eu.int/comm/enterprise/events/animal_tests/conference/3rs_declaration.pdf
- 12) <http://europa.eu.int/comm/environment/chemicals/reach.htm>
- 13) Lahl, U., Animal testing will be minimised. REACH - the new EU chemicals policy and the German position, ALTEX, 22, Special Issue, Abstracts 5th World Congress 2005, 124, 2005
- 14) <http://ecb.jrc.it/testing-methods/>
- 15) De Silva, O. et al., The COLIPA strategy for the development of in vitro alternatives, ALTEX, 22, Special Issue, Abstracts 5th World Congress 2005, 255, 2005
- 16) Basketter, D. et al., The COLIPA strategy for the development of in vitro alternatives: Skin sensitization, ALTEX, 22, Special Issue, Abstracts 5th World Congress 2005, 139, 2005
- 17) Ryan, C. et al., Results of a ring trial of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitisation potential, ALTEX, 22, Special Issue, Abstracts 5th World Congress 2005, 146, 2005
- 18) <http://www.bfr.bund.de/cd/1591>
- 19) <http://www.nc3rs.co.uk/>
- 20) <http://www.frame.org.uk/index.htm>
- 21) <http://www.forschung3r.ch/en/information/>
- 22) <http://www.nca-nl.org/>
- 23) <http://www.ctw-congress.de/act2005/>
- 24) <http://www.estiv.org/>
- 25) <http://www.zet.or.at/MEGAT/english/introenglish.htm>

- 26) 森眞輝ら, In vitro 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講演要旨集, 84, 2004
- 27) 田中憲穂ら, 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: 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, 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講演要旨集, 85, 2004
- 28) 吉村功ら, 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, 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講演要旨集, 86, 2004
- 29) 小島肇夫ら, 皮膚感作性試験の代替法-LLNA-DA 法と他の代替試験法について-, 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講演要旨集, 95, 2004
- 30) 第 19 回日本動物実験代替法学会要旨集, 18, 2005
- 31) <http://www.env.go.jp/>
- 32) <http://www.nedo.go.jp/>
- 33) Gribaldo, L. et al., Ruhdel 3.1. Acute toxicity. Alternative (Non-Animal) Method for Cosmetics Testing: Current Status and Future Prospects, ATLA, 33, Suppl. 1, 27, 2005
- 34) Gennari, A. et al., ECVAM Workshop 50. Strategies to replace in vivo acute systemic toxicity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 50., ATLA, 32, 437, 2004
- 35) Cytotoxicity (MEIC). Summary. September 2000. National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) (<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invidocs/MEICSumm.pdf>)
- 36) Organisation for Economic Co-operation and Development. Chemicals Testing-Guidelines. (http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.htm)
- 37) Clemedson, C. et al., Development of an in vitro test battery for the estimation of acute human systemic toxicity: An outline of the EDIT project. Evaluation-guided Development of New In Vitro Test Batteries. ATLA, 30, 313, 2002
- 38) Ekwall, B. et al., EDIT - a New International Multicenter Programme to Develop and Evaluate Batteries of In Vitro Tests for Acute and Chronic Systemic Toxicity. ATLA, 27, 339, 1999
- 39) ACuteTox - Research Project For Alternative Testing. Welcome to ACuteTox. (<http://www.acutetox.org/>)
- 40) A-Cute-Tox project an Integrated Project under the EU 6FP with the aim to optimize and pre-validate an in vitro test strategy for predicting human acute toxicity. European Society of Toxicology in vitro (ESTIV) Newsletter 18, 2005
- 41) Federal Register, 69, 61504, 2004
- 42) In Vitro Cytotoxicity Validation Study (<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ivcytoval.htm>)
- 43) TEST METHOD PROTOCOL for the BALB/c 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Test. A Test for Basal Cytotoxicity for an In Vitro Validation Study Phase III. November 4, 2003 (<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invidocs/phIIIprot/3t3phIII.pdf>)
- 44) TEST METHOD PROTOCOL for the Normal Human Keratinocyte (NHK) Neutral Red Uptake Cytotoxicity Test. A Test for Basal Cytotoxicity for an In Vitro Validation Study Phase III. November 4, 2003 (<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invidocs/phIIIprot/nhkphIII.pdf>)
- 45) ICCVAM-NICEATM Workshop Lectures and Poster Presentations at the 5th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Berlin, Germany, August 21-25, 2005 (<http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/5wcprsnt.htm>)
- 46) Casati, S. et al, Preliminary (Phase I) Results of a Validation Study to Evaluate the Reliability and Relevance of Two In Vitro Cytotoxicity Assays for Predicting Rodent and Human Acute Systemic Toxicity, 41st Congress of the European Societies of Toxicology EUROTOX 2003, 2003
- 47) Strickland, J. A. et al., Data

- Collection and Analysis Systems for an In Vitro Cytotoxicity Validation Study, Society of Toxicology 43rd Annual Meeting, The Toxicologist, 50, 2004
- 48) Stokes, W. S. et al., Results of the final phase of a validation study to evaluate in vitro cytotoxicity assays for estimating rodent acute systemic toxicity, ALTEX, 22, Special Issue, Abstracts 5th World Congress 2005, 196, 2005
- 49) Basketter, D. A. et al., Predictive testing in contact dermatitis: irritant dermatitis, Clinics in Dermatology, 15, 637, 1999
- 50) York, M. et al., Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential, Contact Dermatitis, 34, 204, 1996
- 51) Van de Sandt, J. et al., The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation, ATLA, 27, 723 1999
- 52) Sonoda, I. et al., A prevalidation study for three-dimensional cultured human skin models as alternatives to skin irritation testing, Altern. Animal Test. Experiment., 8, 91, 2002
- 53) Botham, P. A., The validation of in vitro methods for skin irritation, Toxicol. Letters, 149, 387, 2004
- 54) Fentem, J. H. et al., Update on the validation and regulatory acceptance of alternative tests for skin corrosion and irritation, ATLA, 32, Suppl. 1, 683, 2004
- 55) OECD guidelines for testing of chemicals, 431, Paris, OECD, 2004
- 56) OECD guidelines for testing of chemicals, 430, Paris, OECD, 2004
- 57) NIEHS, IH publication, No. 99-4495, 1999
- 58) OECD guidelines for testing of chemicals, Proposal for a draft new guideline 435, 2004
- 59) Directive 2001/59/EC of 6 August 2001, Official Journal of the European Union, L225/1, 2001
- 60) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 432, Paris, OECD, 2004
- 61) 大野 泰雄ら, Balb/c 3T3 細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価結果報告, Altern. Animal Test. Experiment., 10, 50, 2004
- 62) Spielmann, H. et al., In vitro phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2., ATLA, 22, 314, 1994
- 63) Kay, J. H. and Calandra, I. C., Interpretation of eye irritation tests, J. Soc. Cosmetic Chem., 13, 281, 1962
- 64) <http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Testing-Methods/ANNEXV/B05web2004.pdf>
- 65) http://europa.eu.int/comm/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out173_en.pdf
- 66) Gilleron, L. et al., Evaluation of a modified HET-CAM assay as a screening test for eye irritancy, Toxicol. in Vitro, 10, 431, 1996
- 67) Ohno, Y. et al., Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests, Toxicol. in Vitro, 13, 73, 1999
- 68) Hagino, S. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (2) Chorioallantoic membrane (CAM) test, Toxicol. in Vitro, 13, 99, 1999
- 69) Tani, N. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (8) Evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells, Toxicol. in Vitro, 13, 175, 1999
- 70) Chiba, K. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (9) Evaluation of cytotoxicity test on HeLa cells, Toxicol. in Vitro, 13, 189, 1999
- 71) Okumura, H. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (10) Evaluation of cytotoxicity test on CHL cells, Toxicol. in Vitro, 13, 199, 1999
- 72) Uchiyama, T. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (7) Evaluation of cytotoxicity test by Corneal PackR, Toxicol. in Vitro, 13, 163, 1999
- 73) Okamoto, Y. et al., Interlaboratory

- validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (3) Evaluation of the haemolysis test, *Toxicol. in Vitro*, 13, 115, 1999
- 74) Ohuchi, J. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (6) Evaluation of MATREXTM, *Toxicol. in Vitro*, 13, 153, 1999
- 75) Matsukawa, K. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (11) Evaluation of EYETEXTM, *Toxicol. in Vitro*, 13, 209, 1999
- 76) Hatao, M. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (4) Evaluation of haemoglobin denaturation test, *Toxicol. in Vitro*, 13, 125, 1999
- 77) Expert Panel Evaluation of the Current Validation Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocudocs/EPreport/ocureport.htm>
- 78) Burton, P. et al., The in vitro assessment of severe eye irritants, *Food. Chem. Toxicol.*, 19, 471, 1981
- 79) Weil, C. S. and Scala, R. A., Study of intra-and inter-laboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 19, 276, 1971
- 80) Luepke, N. P., Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential, *Food. Chem. Toxicol.*, 23, 287, 1985
- 81) Gautheron, P. et al., Bovine corneal opacity and permeability test: an in vitro assay of ocular irritancy, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, 442, 1992
- 82) Ehling, G. et al., An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: First round, *Toxicology*, 212, 60, 2005
- 83) Ehling, G. et al., An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay 2nd round, *Toxicology*, 212, 69, 2005
- 84) Ashikaga, T. et al., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol, *Toxicol. in Vitro*, in press
- 85) Sakaguchi, H. et al., 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*, in press
- 86) 足利太可雄ら, 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1報), 第19回日本動物実験代替法学会要旨集, 104, 2005
- 87) Ovigne J. M. et al., Collaborative study for the preparation of a test protocol based on the U937 human cell line for predicting skin sensitization potential, *Altern. Animal Test. Experiment.*, 22, Special Issue, 145, 2005
- 88) Takeyoshi, M. et al., Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation, *Toxicol. Letters*, 119, 203, 2001
- 89) 出原賢治ら, 非-RI LLNA 試験法の検討, 第17回日本動物実験代替法学会要旨集, 72, 2003
- 90) Kato, H. et al., Peptide-binding assessment using mass spectrometry as a new screening method for skin sensitization, *J. Toxicol. Sci.*, 28, 19, 2003
- 91) 穂谷昌利ら, 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要旨集, 114, 2005
- 92) Gerberick, G. F. et al., Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens, *Toxicol. Sci.*, 81, 332, 2004
- 93) Prieto, P. et al., Subacute and subchronic toxicity, *ATLA*, 33, Suppl. 1, 109, 2005
- 94) Cosmetics technical report ECVAM contribution, Subacute and subchronic

- toxicity, 5, 2005
- 95) ES.3.6. Subacute and subchronic toxicity, ATLA, 33, Suppl. 1, 10, 2005
- 96) Prieto, P. et al., Subacute and subchronic toxicity, ATLA, 33, Suppl. 1, 109, 2005
- 97) Subacute and subchronic toxicity, Cosmetics technical report ECVAM contribution, 5, 2005
- 98) Cronin, M. T. D. et al., Cross-cutting technologies in the ReProTect project: Objectives and early achievements, ALTEX, 22, Special Issue, Abstracts 5th World Congress 2005, 266, 2005
- 99) Hareng, L. et al., ECVAM Key Area Reproductive Toxicity: Summary of ongoing activities, ALTEX, 22, Special Issue, Abstracts 5th World Congress 2005, 267, 2005
- 100) OECD guidelines for testing chemicals, 427, Paris, OECD, 2004
- 101) OECD guidelines for testing chemicals, 428, Paris, OECD, 2004
- 102) Diembeck, W. et al., Skin absorption and penetration, ATLA, 33, Suppl. 1, 105, 2005
- 103) 上月裕一ら, 化粧品の動物実験代替法の動向 日本における経皮吸収性試験代替法の動向, フレグランスジャーナル, 33, 60, 65, 2005
- 104) Schreiber, S. et al., Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies, Toxicol. in Vitro, 19, 813, 2005
- 105) Chilcott, R. P. et al., Inter- and intralaboratory variation of in vitro diffusion cell measurements: an international multicenter study using quasi-standardized methods and materials, J. Pharm. Sci., 94, 632, 2005
- 106) Davies, D. J. et al., Multi-species assessment of electrical resistance as a skin integrity marker for in vitro percutaneous absorption studies, Toxicol. in Vitro, 18, 351, 2004
- 107) 山下富義ら, 化学構造に基づく経皮吸収の予測, 日本動物代替法学会第19回大会(要旨集), 54, 2005
- 108) Riviere, J. E. et al., Predicting skin permeability from complex chemical mixtures, Toxicol. Appl. Pharmacol., 208, 99, 2005
- G. 研究発表
- G-1 論文発表
- 1) Hirota, M., Kitagaki, M., Itagaki, H., and Aiba, S., Quantitative measurement of spliced XBP1 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.
- G-2 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 のブレー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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
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

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および感作性試験代替法の開発」

分担研究者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

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。

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、プロトコー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。

皮膚腐食性試験代替法としての皮膚三次元モデル (EpiDermTM と Vitrolife-SkinTM) 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) を使い、6 施設によって行った。その結果、EpiDermTM 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 EpiDermTM 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-SkinTM 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。EpiDermTM 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、EpiDermTM と Vitrolife-SkinTM 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-SkinTM は腐食性試験代替法として国際的に承認されている EpiDermTM と同等の識別能力を有するものと考えられた。

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。

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。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、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するとともに、バリデーションも実施している。OECD でも代替試験法の 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 はお互いの評価結果を相互に受け入れている。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らば化粧品や医薬品等の評価のために動物実験代替法を導入することを目的に、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った。

主任研究者である大野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17年度は1) 資生堂から提案された酵母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代替法の評価を継続して行うとともに、2) 皮膚感作性を調べるための LLNA法の代替法である LLNA-BrdU法の評価を行い、3) ヒト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と評価を行い、更に4) 感作性試験代替法の開発研究を行った。

これらの研究報告を以下に、順に示す。なお、研究発表については、最後にまとめて記載した。

B. 研究方法

後に項目毎に示した。

C. 研究結果

後に項目毎に示した。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

研究協力者である足利、坂口の関連発表を含む。

誌上発表

- 1) 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一、日薬理誌 125, 325-329 (2005)
- 2) 大野泰雄、酒見和枝、簾内桃子、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)
- 3) Ashikaga T. et al., "Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol", (accepted in Toxicology in Vitro)
- 4) Sakaguchi H. et al., "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", (accepted in Toxicology in Vitro).

学会発表

- 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, Katsuhiro 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 斉、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、菌さき子、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、坂口斉、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、菌さき子、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 斉、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 斉、"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 斉、"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.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし
- I. 健康危険情報
なし

1) 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

研究要旨

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。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。

A. 研究目的

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）」は平成15年度に「false negative が少なく、水難溶性の被験物質にも適応可能な方法であると評価され、多施設バリデーションを実施する価値があると判定された」。そこで、平成16年度に多施設バリデーションが行われた。その結果、3T3-NRU 光毒性試験法とほぼ同等の結果が得られることが確認されたが、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た。即ち、酵母法の 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と考へ、提案者にプロトコルの修正を求めた。評価委員会では、これができたところで、他施設での確認試験が必要であると考えている。今年度は提案者による改善されたプロトコルの審議を行った。

B. 研究方法

光毒性試験代替法の評価は日本動物実験代替法学会に委託した。学会では、評価委員会の中に前年度に述べたような光毒性試験代替法評価のためのワーキンググループ(WG)を組織し、引き続き評価にあたった。

WG では提案者より提出された修正案について審議した（添付資料1, 2）。

C. 研究結果

1) グレーゾーンの必要性について

最適な毒性判定基準に関する検討の結果、酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験の判定基準はそれぞれ 4mm または 5mm、2% または 3% とする組み合わせが最適であった。この解析結果から、グレーゾーンの設定については疑問という問題提起があった。評価委員会では、グレーゾーンに入ったら、再試験を行うという程度ならともかく、曖昧な数値を残しては代替法を用いた安全性評価できないとの意見が示された。一方、グレーゾーンは意味があるとの意見も示された。

その理由として、グレーゾーンに入った場合は他の試験結果を参考にすればよい、データのぶれの範囲としてグレーゾーンは必要であり、カットオフ値のみの設定は判断を誤る可能性が出る、他の in vivo 試験法でもグレーゾーンは設定されているなどが挙げられた。

今回のバリデーション報告書ではグレーゾーンの有無で解析を行っており、試験法の検出力を考慮してこの問題は更に検討が必要とされた。

2) プロトコル修正について

この一年間資生堂において以下の評価委員会の指摘事項を解決すべく検討してきた。

- ① 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に幅を決め、試験の成立を判断すべき。
- ② 酵母法の dynamic range が陽性対照で常に 10mm 位の値を示す検出力を高める条件を資生堂に確立してもらう必要がある。これらについて提案者が検討した結果、以下の条件が提案された。

- ① 照射量 20J/cm²（照射時間 199 分：以前のプロトコルでは照射量は 8.5J/cm²、照射時間 83 分）
- ② プレインキュベーション（事前暴露時間）5 時間
- ③ 陽性対照物質 8-MOP 適用濃度 1mg/mL（以前の濃度は 0.1mg/mL）

一方、別途検討した結果、8-MOP の濃度は 1mg/mL でよいが、7 時間を最長の暴露時間（50J/cm² 相当）とした実験で、同一の照射量において、照射時間のみの暴露時間と 7 時間のトータル暴露時間による阻止円の差は 3 時間以下では大きかったが、3-7 時間で大きな差がなくなることから、照射量を 25J/cm² とした場合、照射時間は 199 分（照射強度：2.1Mw/cm²）となり、暴露時間は試料の拡散時間として妥当との見解が示された。今までのプロトコルでは照射量は少なく、その結果、照射時間も短かったことから、試

料の寒天中での拡散が不十分であったとされた。

評価委員会は、提案者の新プロトコル案では、試験開始から終了までの作業時間が10時間にも及び、試料数を多くこなせないとした。そこで、評価委員会と提案者で審議し、作業時間が5時間になるように訂正された。

以上、今までの方法では陽性対照の検出力が低く、equivocalが多いという欠点を持っていたが、その改良に目処がたった。今後、酵母光生育阻害試験のみのバリデーションを追加で行うべく、平成18年度において、提案者ととともにプロトコルを再検討し、確認のためのバリデーションを行うことになった。

D. 資料

添付資料 1-1：(株)資生堂 安全性・分析センター、光毒性評価会議報告資料 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ル修正について

添付資料 1-2：平成17年度光毒性試験代替法第一回評価委員会議事録（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評価）

2) 皮膚感作性試験代替法の評価

研究要旨

平成16年度の厚生科学研究班の決定により、(財)化学物質評価研究機構から提案のあった皮膚感作性試験 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)を評価した。この方法は先に評価したダイセルから提案されたATP含量の変化を指標とする方法(LLNA-DA法)と極めて類似していることから、評価委員会ではLLNA-DA法を評価するために組織した感作性試験評価ワーキンググループ(WG)で評価することとした。WGは申請者データに基づいて一次評価を行い、本試験法は原法であるLLNA法における³H-Methyl thymidineのDNAへの取り込みの代わりにBromodeoxyuridine (BrdU)取り込みを細胞増殖の指標にしたものであり、ほとんど同じ原理による方法であること、指標の増加率は若干原法より小さいが、ほとんど同一の識別能力を持つこと、RIを用いないこと、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よう日本動物実験代替法学会バリデーション委員会に依頼することとした。

A. 研究目的

昨年度一次評価を行ったRIを用いない皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA)法については、多施設バリデーションを実施する準備をしている。今年度はLLNA-DAと同様にRIを用いない皮膚感作性試験代替法であるLLNA-BrdU法が提案された(添付資料2-1)。この方法は化学物質評価研究機構の武吉正博博士より提案されたものであり、研究班ではこの方法がLLNA-DA法と同等であると推定したが、評価のために使用するエンドポイントが異なっていること、実験者にとっては選択肢が多いことが望ましいと考えられたことから、LLNA-DAの場合と同様に評価した(添付資料2-2,2-3)。

B. 研究方法

評価方法は昨年報告したLLNA-DA法と同様であり、その時に作成した様式に従って、申請書が作成された。一次評価は日本動物実験代替法学会(代替法学会)に依頼した。代替法学会ではLLNA-DA評価のために構築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)が引き続いて、評価を担当した。評価にあたった委員は以下に示した。第一回のWGでは申請書を慎重に検討し、提案者に質問を出した。第二回会議以後はこの回答をもとに、メールで意見交換を行い、一次評価報告書をまとめた。一次評価の結果多施設で再度バリデーションする価値があるとされた場合には代替法学会にそれを依頼す

る。その際、評価委員会の審議によりプロトコル等が若干修飾される可能性があるが、その際は提案者の意向を尊重することとした。

感作性試験評価ワーキンググループ(WG) 評価委員会委員長

大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所)

感作性試験評価WG担当副委員長

金澤由基子(食品薬品安全センター 秦野研究所・毒性部)

委員

五十嵐良明(国立衛研・環境衛生化学部)

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((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((財)食品農医薬品安全性評価センター)

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)

C. 研究結果

C-1) LLNA-BrdU法の原理

LLNA法はマウス耳介から吸収された被験物質(ハプテン)による抗原特異的Tリンパ球の増殖を、耳介リンパ節(標的臓器)にお

ける RI 標識化合物(³H-Methyl thymidine)の核酸成分への取り込みを指標として検出する方法である。一方、申請された LLNA-BrdU 法は細胞増殖を検出する指標を BrdU の DNA への取り込み量に変更したものであり、基本的な原理は LLNA 法と変わらないと考えられる。即ち、LLNA-BrdU 法は感作誘導については LLNA 原法と同一であるが、BrdU を腹腔内投与し、リンパ球増殖の指標としての BrdU の取り込み量を ELISA で測定するところが LLNA 原法と異なっている。結果の解析手法として LLNA 法は ³H-Methyl thymidine の取り込みが 3 倍以上となることを、陽性と判断する識別値としているが、提案された LLNA-BrdU 法ではいくつかの指標について、記載されており、それらの妥当性が評価委員会で特に審議した。

C-2) LLNA-BrdU 法のプロトコール

LLNA-BrdU 法のプロトコールの概要は以下のとおり。

使用動物：未妊娠、未経産の 8-12 週令の雌性 CBA/JN マウス。

投与群設定：陰性対照群と陽性対照群および 3 用量以上の被験物質群を設ける。

群あたり動物数：1 群あたり 5 匹以上

試験操作の概要：

- 1) 感作：毎日ほぼ一定の時刻に、マウスの両耳介にマイクロピペッター等を用いて 1 耳介当たり 25 μ L を塗布する。感作は初日を Day 0 として Day 2 までの 3 日間連続塗布する。
- 2) BrdU の投与：最終感作の 2 日後 (Day 4) に BrdU 生理食塩液溶液 (10mg/ml) を 1 匹当たり 0.5 ml 腹腔内投与する。
- 3) リンパ節の採取：BrdU 投与の 24 時間後 (Day 5) に動物を安楽死させた後、頸部を切開し耳の直下にある耳介リンパ節を採取する。
- 4) BrdU 取り込み量の測定：耳介リンパ節を 1 匹分毎にマイクロチューブ内で少量の生理食塩液と共にすりつぶし、ナイロンメッシュで濾過した後、生理食塩液に分散し、BrdU 取り込み量を市販の BrdU 測定キットを用いて測定する。
- 5) 結果の判定：対照群の BrdU 取り込み量に対して化学物質を投与した群の取り込み量の比、Stimulation index (SI) を求めた。

C-3) 提案者の行ったバリデーシヨンの種類

提案者の施設で LLNA-BrdU 法のバリデーシヨンが行われ、再現性や識別性について LLNA 法と比較された。また、提案施設以外にも石原産業、日本新薬 (株) および富士写真フィルム (株) において検討されたが、多施設バリデーシヨンとしては被験物質が少ないこと、また、コード化した被験物質が配布されていないことから、OECD(1996)が示した多施設バリデーシヨンの基準を満たしていないと考えられた。提案法について、公平な評価を行う上では更に多施設バリデーシヨンの結果が必要であると思われた。なお、今回の申請では LLNA-DA 法の場合とは異なり、多施設によるバリデーシヨン結果が提出されていたが、OECD 基準で示されたコード化された被験物質を用いて行ったものでは無かったことから、最終評価は行えなかった。

C-4) *In vivo* データとの対応性

In vivo データと比較し、多くの物質について LLNA-BrdU 法は LLNA 法と同程度の対応性が得られた。LLNA-BrdU 法と LLNA 法との間の判定の一致率は識別値を 95%信頼区間 (CI) とした時は 83%、3 標準偏差 (SD) とした時は 91%、SI 値 3 以上とした時は 87%、SI 値 2 以上とした時は 87%であった。

C-5) データの信頼性

LLNA-BrdU 法は提案者が独自に開発したものであり、十分な技術蓄積があるものと思われた。方法自体も尾静脈でなく腹腔内投与を採用し、さらに ELISA 法での BrdU 取り込み量の測定は市販のキットを用いるなど技術面で困難と思われる所はない。プロトコールに関しては全体として具体的かつ丁寧に記述されており、施設内バリデーシヨンの結果も適切にまとめられていた。個別データも提出され、施設内バリデーシヨン結果を確認できた。提案者以外の施設における試験の信頼性についての情報は無かったが、提出された個別データにより、データを確認できた。これらの結果から、得られたデータの信頼性は高いと思われた。

C-6) 施設内再現性

提案者は陽性対照物質である 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)、Isoeugenol、 α -Hexylcinnamaldehyde (HCA) の 3 物質の繰り返し実験を行った。その結果、いずれも SI 値は 3 を上回り、陰性対照群の SI 値+3SD を基準とした判定で全て陽性と判定された。な

お、平均 SI 値は 15.2、変動係数は 16.8%であった。Isoeugenol では 3 回繰り返し実験の結果、いずれも SI 値は 3 を上回り、陰性対照群の SI 値+3SD を基準とした判定で全て陽性と判定された。なお、平均 SI 値は 8.02、変動係数は 28.0%であった。HCA では Acetone/olive oil または Methyl ethyl ketone の 2 種類の媒体を用いてそれぞれ 5 回繰り返し実験を行った。その結果、いずれの媒体を用いた場合も SI 値は 3 を上回り、陰性対照群の SI 値+3SD を基準とした判定で全て陽性と判定された。

これらの結果から、LLNA-BrdU 法の再現性は LLNA 法と概ね同等もしくは良いと推察された。

C-7) 施設間再現性

提案施設以外に、4 施設において検討され、陽性物質の判定の施設間再現性は良いと思われた。非感作性物質については検討されていなかった。

C-8) 試験法の頑健性

我が国で入手可能なマウスとして CBA/JN、BALB/c、CD-1 (いずれも日本チャールスリバー) を用いて、ヒトに対してアレルギー性を有する p-Benzoquinone に対する応答性を比較した。その結果、これらの 3 系統の応答性に関しては CBA/JN が最も応答性が良いことが確認された。マウスは系統によって感作性物質に対する反応が異なることから、適切な系統のマウスを用いるとともに、常に陰性および陽性対照を用い、その反応性を確認することが必要である。

C-9) 動物福祉面からの妥当性

LLNA-BrdU 法は *in vivo* 試験法であり、完全な代替試験法ではない。しかし、LLNA 法と同様に FCA 処置を行わず、また感作成立後に抗原を投与し、抗原・抗体反応を惹起させるステップが無いことから、モルモットを用いたマキシマイゼーション試験(GPMT)などの他の感作性試験と比較して動物に与えるストレスが少ない。使用動物数は LLNA 法が 1 群 5 匹以上であるが、LLNA-BrdU 法も同様である。GPMT 法も 1 群 5 匹以上が要求されている。これらのことから、LLNA-BrdU 法は LLNA 法と同等であり、GPMT よりも優れているところがあると考えられる。

C-10) コストからの妥当性

コストの面については RI を使用する LLNA 原法に比べて、特にコストパフォーマンスが悪いとは思われない。LLNA-BrdU 法では RI 施設は必要なく、測定機器は通常のマイクロプレートリーダーなので、通常の実験設備で実施可能であり、1 物質を評価するのに必要な ELISA キットの値段は約 7,000 円である。

C-11) 判定の識別値について

評価委員会では識別値の妥当性について、特に検討した。LLNA 原法と同じ SI 値を指標にし、感度が低いことを考慮して SI 値 1.5 を判定基準とする案について検討したが、媒体対照を用いた試験群内の動物間で SI 値が 1.5 程度のばらつきが認められていることもあり、SI 値単独での基準設定は問題があるように思えた。このような判定基準についての問題に対し評価委員会は統計学的有意差が認められ、しかも SI が一定の基準値を超える場合を陽性とするような組み合わせによる判定基準の設定へ改良案を提示した。その結果を示したものである。これによれば、 $SI \geq 1.5$ という条件をつけ、さらに対照群との統計的有意差がある場合、および SI が 3SD 以上であるとした場合、いずれも偽陰性率は 6.7% であり、カップ係数が 0.808 と最も大きい値を示した。したがって、SI 値と統計的手法の組み合わせによる判定が妥当であることが示された。

これらの結果から、最終的な判定基準については、SI 値と統計的手法の組み合わせによる判定とすることに加え、対照群の 95% 信頼限界が平均値比で 1.5 以下の時に試験が成立するとし、被験物質群の SI 値が 1.5 以上でかつ統計的有意差が認められるときに陽性と判定することが適当であると考えられたが、これについてはバリデーションの結果に基づいて、確認する必要がある。

表 2-1: SI \geq 1.5 および各種エンドポイントを組み合わせた場合の識別性

	Statistics ^{*1}	\geq 95% C.I. ^{*2}	\geq 2SD ^{*3}	\geq 3SD ^{*3}	SI \geq 3 ^{*4}	SI \geq 2.5 ^{*4}	SI \geq 2 ^{*4}	SI \geq 1.5 ^{*4}
Concordance	91.3	87.0	87.0	91.3	82.6	78.3	87.0	87.0
Negative Predictivity	87.5	85.7	85.7	87.5	66.7	63.6	77.8	85.7
Positive Predictivity	93.3	87.5	87.5	93.3	100.0	91.7	92.9	87.5
Prevalence	65.2	65.2	65.2	65.2	65.2	65.2	65.2	65.2
Sensitivity	93.3	93.3	93.3	93.3	73.3	73.3	86.7	93.3
Specificity	87.5	75.0	75.0	87.5	100.0	87.5	87.5	75.0
False positive rate	12.5	25.0	25.0	12.5	0.0	12.5	12.5	25.0
False negative rate	6.7	6.7	6.7	6.7	26.7	26.7	13.3	6.7
kappa coefficient	0.808	0.704	0.704	0.808	0.657	0.559	0.559	0.704

*1: SI $>$ 1.5 であり、且つ対照群の SI 値と被験物質群の SI 値とが統計学的に有意差がある時に陽性と判定

*2: SI $>$ 1.5 であり、且つ被験物質の SI 値の平均値が対照群の 95%信頼限界の外にある時に陽性と判定

*3: SI $>$ 1.5 であり、且つ被験物質の SI 値の平均値が対照群の標準偏差の 2 倍あるいは 3 倍以上であるときに陽性と判定

*4: 被験物質の SI 値の平均値が対照群の値の平均値の 3, 2.5, 2, あるいは 1.5 倍以上であるときに陽性と判定

D. LLNA-BrdU 法のまとめ

LLNA 法と比較し、LLNA-BrdU 法の特徴は以下のように要約される。

- 1) LLNA 法はリンパ細胞増殖の指標として ³H-Methyl thymidine の DNA への取り込みを測定するが LLNA-BrdU 法では BrdU の取り込み量増加を指標としたものであり、原理的に LLNA 法に極めて近い。また、日本で使用しにくい RI 標識化合物を用いない方法である。
 - 2) 被験物質の投与方法、スケジュールは LLNA 原法と同一である。
 - 3) 再現性については、データを単純に比較することができないため明確に述べることはできないが、概ね LLNA 法と同等もしくはそれより良いと推察された。
 - 4) 感作性の有無の判断基準は「対照群の 95% 信頼限界が平均値比で 1.5 以下の時に試験が成立するとし、被験物質群の SI 値が 1.5 以上でかつ統計的有意差が認められるときに陽性と判定する」ことが適当であると考えられた。
 - 5) RI 標識化合物を静脈内投与しないことから実験操作や廃棄物処理が容易である。
- 1) なお、多施設バリデーションの実施に際しては、考慮すべき点が多々指摘された。それらについては省略した。添付書類 3-4 を参照されたい。

E. 評価委員会での評価のまとめ

- 1) 評価委員の質問に適切な回答が行われた。

この回答に沿ってプロトコルや判定基準が適正に変更されることを条件に、多施設バリデーションへの移行は問題ないと思える。

- 2) 申請法は原理的に既に OECD で承認された LLNA 法とほとんど変わらないことから、バリデーションにおいては、LLNA 法との類似性を示すための簡易バリデーションで良いと思われる。
- 3) Core laboratory は化学物質評価研究機構に務めてもらい、プロトコルを作成してもらおう。また、技術トランスファーを実施してもらおう。
- 4) すでに技術移管の完了している 4 施設を中心に新規施設を 2~3 施設加えて、実施してみてもどうかという案がある。
- 5) バリデーションを行う施設は LLNA 法の試験経験または LLNA 変法の研究経験を有する施設が良いと思う。
- 6) 評価方法として対照物質を用いる方法（相対的評価）をうまく取り入れた方が吸光度の数値を用いる場合よりも多施設バリデーションに向いているのではないかという意見を含め、検討する。
- 7) 試験期間を 1 月程度としたとき、1 機関で実施可能な被験物質数はプロトコルの内容によって異なるが、陽性対照、陰性対照、被験物質 2 個（1 用量）を 1 セットとした場合、1 週間で実施可能であることから、これを 3 回繰り返すとして、6 検体まで可能と思われる。

- 8) 用量段階は、LLNA 法で用いられている濃度から 3 用量を選定するのが良いと思われる。
- 9) 被験物質候補リストは、提案者の協力を得て作成するのが良いと思われる。なお、LLNA 法で false positive となることが知られている刺激性物質（例：Benzalkonium chloride, Sodium lauryl sulfate）についての評価も考慮する必要がある。
- 10) 初めはバイアスがなるべく少なくなるように、条件を揃えて実施するのが良い。

D. 資料

添付資料 2-1：LLNA-BrdU 法提案書（化学物質評価研究機構武吉正博博士）

添付資料 2-2：第 4 回 LLNA-DA 評価委員会および第一回 LLNA-BrdU 評価委員会合同委員会議事録

添付資料 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

3, 皮膚腐食性試験代替法のバリデーションと評価

要旨

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 EpiDerm™ と Vitrolife-Skin™ との比較バリデーションを行った。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(sensitivity)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(specificity)は 66.7%であった。なお、偽陽性と判定したのは、5% Potassium hydroxide と Lactic acid であり、いずれの施設でも腐食性物質と判定した。腐食性との結果が得られたもののうち、真に腐食性である割合、即ち陽性予知能力(positive predictivity)は 74.4%であった。非腐食性との結果が得られたもののうち、真に非腐食性である割合、即ち陰性予知能力(negative predictivity)は 95.2%であった。正しい判定結果が得られた割合、即ち一致率は 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% Potassium hydroxide と Lactic acid であり、いずれの施設でも腐食性物質と判定した。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。また、EpiDerm™ のような表皮モデルと Vitrolife-Skin™ のような皮膚モデルの結果にはほとんど差がないことが明らかになった。

A. 研究目的

皮膚に対する直接的な傷害の有無の判定は化学物質の安全性評価において重要である。即ち、不可逆的な傷害である皮膚腐食性を示すものは劇物と判定され、その取り扱いについて厳しい規制を受ける。また、皮膚腐食性を示す物質を経口投与等で毒性試験することは動物に大きな苦痛を与えるとともに、適正な毒性試験遂行に支障を来す。そこで、従来よりウサギを用いる in vivo 皮膚刺激/腐食性試験法(Draize et al, Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. JPET 82: 377-390, 1944, OECD guideline 404)により皮膚腐食性の有無が評価されてきた。しかし、この方法は動物に激しい苦痛とストレスを与える。そこで、in vitro 皮膚腐食性試験代替法が開発されてきた。OECD はガイドライン 430 と 431 でそれぞれ TER 法と EPISKIN™ と EpiDerm™ 法を承認している。一方、我が国では OECD で承認された方法で得られた結果は基本的に受け入れるとの姿勢ではあるが、実際に腐食性試験代替法で得られたデー

タを基に評価された例は見あたらなかった。また、皮膚刺激性試験代替法としての皮膚モデルは日本でも VitroLife Skin™ を始めとして、いくつか開発されているが、皮膚腐食性試験代替法としてのバリデーションは不十分であった。そこで、わが国発の皮膚モデルが既に OECD 等で承認されたものと同様の能力を有するのかが判定することを主目的とし、わが国で開発された VitroLife Skin™ と EpiDerm™ 法との比較バリデーションを行うこととした。三次元培養皮膚モデル Vitrolife-Skin™ に関する日本のバリデーション結果を以下の点に留意し評価した。なお、EpiDerm™ はクラボウが販売権を持つ角質層を持つ表皮からなる皮膚三次元モデルであり、Vitrolife-Skin™ はゲンゼが作成した線維芽細胞を含むコラーゲンを真皮層の上に角質層を持つ表皮層が重層化されている皮膚三次元皮膚モデルである。

B. 方法

バリデーションの実施と評価はそれぞれ日本動物実験代替法学会のバリデーション委員会と評価委員会に依頼した。バリデーション

委員会の構成は下記に示した。評価委員会の構成は前に示した光毒性試験代替法評価の時と同じである。

バリデーション委員会

委員長

吉村 功：東京理科大学工学部経営工学科

委員

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（当時）

大森 崇：京都大学大学院医学研究科

川端 留美：大鵬薬品工業(株) 安全性研究所

バリデーション協力者及び協力施設

バリデーションには下に示す施設および研究者が協力した。なお、○印は実験責任者および実験補助者、△印はキット提供者、◇印は施設担当者である。

- 安東 朋子：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 毒性部
- 稲垣 勝裕：日本農薬（株）総合研究所 安全性・医薬研究センター
- 久保木 真美：日本曹達（株）小田原研究所 安全性研究部
- 小島 肇夫：日本メナード化粧品(株)総合研究所 研究技術部門第二部
- 中村 洋介：住友化学工業（株）生物環境科学研究所 生化学グループ
- 小坂 忠司：(財)残留農薬研究所 毒性部 免疫・急性毒性研究室
- 石嶺 さやか：(財)残留農薬研究所 毒性部 神経毒性研究室
- 森本 隆史：住友化学工業（株）生物環境科学研究所 生化学グループ
- △鳥島 久：倉敷紡績（株）バイオメディカル部
- △元野 満：倉敷紡績（株）バイオメディカル部

△森川 訓行：グンゼ(株)研究開発センター 第5研究室

◇磯部 直彦：住友化学工業株式会社、生物環境科学研究所

◇金口 幸裕：日本曹達（株）農業化学品事業部 農業化学品登録グループ

◇菅野 純：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 毒性部

◇原田 孝則：(財)残留農薬研究所 毒性部

◇野方 勝：日本農薬（株）総合研究所 安全性・医薬研究センター

◇服部 光雄：日本曹達株式会社、農業化学品事業部、農業化学品登録グループ

◇藤井 義修：日本曹達（株）小田原研究所 安全性研究部

試験実施に関する操作手順は添付資料 3-1 に示した。

被験物質のブラインド化、配送は国立衛研・薬理部の大野泰雄が、記録用紙の準備およびデータの収集、解析は東京理科大学工学部の吉村が担当した。なお、実験部分担当者は技術移転の会に出席した参加施設のうち、本試験開始までにキットを使用した経験のある者に限った。また、陽性対照物質などを用いた予備試験を実施した者に限った。

今回、使用した被験物質数は下の表 3-1 に示すように、12種でブラインド化され、陽性対照物質とともに各施設に配布された。なお、配布された被験物質の管理はGLPに準じ、使用記録の作成や保管などについて、使用時の注意を徹底した。また、被験物質は表 3-2 のように各施設に割り当てた。この割り当て表は全ての実験データが回収されたことが確認された後に、大野より開示された。

表 3-1: 被験物質一覧

番号	被験物質名	腐食性*	コメント	規制	物性
1	Potassium hydroxide (10%)	C	陽性対照物質	劇物	液体
2	Sodium lauryl sulfate (20%)	NC	陰性対照物質		液体
3	Sulfuric acid (10%)	C	劇物判定薬	非劇物	液体
4	Octanoic (Caprylic) acid	C		非劇物	液体 bp 239.7°C
5	Sodium hydroxide(4.88%)	C	劇物判定薬	非劇物	液体
6	Phenol	C	劇物判定薬	劇物	固体 mp 40-43°C
7	Chromium trioxide	C		劇物	固体 mp 197°C
8	Phosphoric acid	C		非劇物	固体 mp 42.3°C
9	Sodium perborate	NC		非劇物	粉末 60°Cで分解
10	Tetrachloroethylene	NC		非劇物	液体 bp 121°C
11	Potassium hydroxide (5%)	NC			液体
12	4-Amino-1,2,4-triazole	NC		非劇物	粉末 mp159°C
13	L-Lactic acid	NC		非劇物	固体 mp 52.8°C
14	Isopropanol (2-propanol)	NC		非劇物	液体 bp 82.5°C

C: corrosive, NC: non-corrosive

表 3-2: 被験物質割り当て表

番号	被験物質名	腐食性*	施設					
			1	2	3	4	5	6
1	Potassium hydroxide (10%)	C	1	2	3	4	5	6
2	Sodium lauryl sulfate (20%)	NC	7	8	9	10	11	12
3	Sulfuric acid (10%)	C	13	14	15	16	17	×
9	Tetrachloroethylene	NC	18	19	20	21	✓	22
4	Octanoic (Caprylic) acid	C	23	24	25	26	✓	27
10	Potassium hydroxide (5%)	NC	28	29	30	×	31	32
5	Sodium hydroxide (4.88%)	C	33	34	35	✓	36	37
11	4-Amino-1,2,4-triazole	NC	38	39	×	40	41	42
13	Phosphoric acid	C	×	43	44	45	46	47
12	L-Lactic acid	NC	48	✓	49	50	51	52
14	Isopropanol (2-propanol)	NC	×	53	54	55	56	57
6	Phenol	C	58	59	×	60	61	62
8	Sodium perborate	NC	63	64	65	66	67	×
7	Chromium trioxide	C	68	✓	69	70	71	72

* C: corrosive, NC: non-corrosive