

②PBSによる洗浄方法としては、3分処理時と同じ。その後、MTT培養液につける。

17:20 60分処理用の24wellプレートをインキュベーターに入れる。

↓24wellプレート各キット2枚ずつ、4枚準備。イソプロパノールをEPIは2mL、Vitrolife-Skinは1mL加える。蓋に被験物質番号を記載。

17:30 EPIのMTT処理終了。モデルを吸わないように、MTT培養液を吸引除去した後、PBS2mLを静かに加える。モデルをピンセットで掴み、PBSをペーパータオルでよく切って、イソプロパノール液中加入する。

18:00 蓋とプレート下部をシールして冷蔵庫に入れる。

19:20 Vitrolife-SkinのMTT処理終了。MTT培養液を吸引除去した後、PBS2mLを静かに加える。モデルをピンセットで掴み、PBSをペーパータオルでよく切って、移す前に直径6mmのポンチで適用部をくり貫き、イソプロパノール液中加入する。

19:50 蓋とプレート下部をシールして冷蔵庫に入れる。

20:00 一日目終了。

第二日目
時刻

操作内容

9:30 ①96wellプレート2枚準備。プレートの蓋にキット記号、被験物質番号、ブランクの位置を記載。

②ブランクにイソプロパノールを加え、次に冷蔵庫から24wellプレートを取り出し、各200 μ Lを移す。

10:00 マイクロプレートリーダーを用いてOD540または570で測定。生データとして記録を印字。

10:30 結果をシートに入力。生存率算出、判定。

終了

<注意事項>

1. これはあくまでも一例です。この通りにする必要はありません。事前に経験がなく、イメージトレーニングができていないと、試験中に不足物が見つかって予定が狂います。
2. 被験物質の適用を10秒毎、PBS洗浄処理を20秒毎でできると感じた場合には、2つのモデルの同時処理を進めることも可能です。一物質の2キットにおける処理を5分未満で実施できれば、18:00以前に実験を終了できるかもしれません。

皮膚腐食性試験代替法バリデーション会議議事録

日時：平成16年5月24日 午後2時半—4時半

場所：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会議室

参加者：稲垣勝裕（日本農薬）、久保木真美（日本曹達）、小島肇夫（日本メナード化粧品）、中村洋介（住友化学）、小坂忠司（残農研）、鳥島 久（クラボウ）、森川訓行（ゲンゼ）、原田孝則（残農研）、藤井義修（日本曹達）、吉村 功（理科大）、大野泰雄（国立衛研・薬理）

欠席者：安東朋子（国立衛研・毒性）

配布資料

- 1) 名簿（会議参加者一覧）
- 2) 皮膚腐食性試験研究計画書(第4稿、2004.1.27版)
- 3) 試験に用いる被験物質物質数
- 4) 皮膚腐食性試験バリデーションSOP（第五稿 2004.1.27）
- 5) 被験物質一覧
- 6) 被験物質とコード一覧
- 7) バリデーション結果のまとめ一覧（大野作成）
- 8) 評価結果一覧
- 9) メールで送られてきたコメント等
- 10) 腐食性試験吸光度データシート（一部乱丁）

1-7)は大野が配布、8-10)は吉村が配布

議事

1) 資料の確認

試験計画書、SOP等の最終版として、配布資料の2-4)が説明された。過ちがあれば、指摘してもらおうこととした。

2) 薬物コードの開示

各施設よりデータが提出されたので、薬物コードが開示された。

3) 腐食性の判定結果について

○false positive が2検体あったが、false negative が無く、in vivo データとの対応が良かった。

○ false positive となった 5% 水酸化カリウムと乳酸についてはデータを詳細に検討する必要がある。

○ 判定結果の再現性は悪くない。

4) 個別データの検討

○ 溶媒対照のウェルをプレート周辺部においたことによるばらつきの可能性を参加施設で検討するとされた。

○ 転記ミスが多く見つかった。また、被験物質添加のミスが被験物質残量測定の結果から判明し、GLP 基準に則ってやることの意義が確認された。

5) SOP について

○ コラーゲンが完全に溶けてしまうような場合の判定は腐食性ありとするように、SOP を改訂する。

○ PH 変化による色の変化への対応は洗うことにより解消できる。

○ 着色物質は OD 測定の際に妨害する可能性があることから、その取り扱いを注意するように明記すべきである。

○ VitroLife Skin においてポンチの大きさが膨潤率により変化する可能性があり、注意を喚起する必要がある。

6) その他

○ in vivo での腐食性情報について、大野と小島が再度文献で確認することとされた。

○ 生存率に基づくカットオフ値の妥当性について吉村が検討するとされた。

○ 両方のキットにおいて、溶媒対照におけるばらつきを比較検討するとされた。

○ 残留農薬研究所では分光光度計を用いて測定した結果も持っているとのことであったことから、それを大野に送付してもらい、マイクロプレートリーダーでの結果と比較検討し、波長特性について検討するとされた。

7) 質疑

○ OECD ガイドラインとの関係について質問があり、今回の結果についての審議の結果、適切な方法であるとの結論がでたら、その結果を報告として公開することにより、OECD のガイドラインに示された方法と同様にそれを用いた試験結果が受け入れられると大野より回答された。

○ 化学物質審査法との関係について質問があり、腐食性試験は化審法の目的には合致しない試

験であることから、直接の関係は無いと大野より回答された。

○毒劇物との関係については、OECD の腐食性試験で腐食性とされた物質を劇物と判定するよう申し入れていると大野より回答された。

8) 今後のスケジュール

6 月中に報告書原案を作成する（オオノ、吉村、小島）→全員に送付してコメントを求める。

7 月中に最終案を評価委員会に提出する。

8 月に代替法学会へ演題申し込み

12 月学会発表

この間、結果が良ければ評価会議を開催する。また、公開シンポジウムを開催し、意見を求め、その結果に基づいて最終報告を作成する。

皮膚腐食性試験バリデーション結果報告

日本動物実験代替法学会バリデーション委員会
委員長 吉村 功

実行委員会委員

吉村 功 (東京理科大学 工学研究科 経営工学)
大森 崇 (京都大学大学院 医学研究科 社会健康医学系専攻
医療統計学部門)
大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所 安全生物研 薬理部)
小島 肇夫 (日本メナード化粧品(株) 総合研究所)
川端留美 (大鵬薬品工業(株) 安全性研究所 細胞毒性担当)

実験責任者

安東朋子 (国立医薬品食品衛生研究所 安全生物研 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、
安全性グループ)
久保木真美 (日本曹達(株) 小田原研究所 安全性研究部)
小坂忠司 ((財) 残留農薬研究所 毒性第二部 免疫毒性研究室)
小島 肇 (日本メナード化粧品(株) 総合研究所 研究技術部門
第二部安全性評価研究室)
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)

皮膚三次元モデル提供者

鳥島 久 (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)

序

動物福祉への関心の高まりに応ずるため、多くの動物実験代替法が開発されて来た。それらの内、皮膚への直接作用としての強い障害性を調べる試験法の代替法（皮膚腐食性試験代替法）としては、EU の ECVAM Scientific Advisory Committee は 1998 年に EPISKIN™ とラット Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER) を、2000 年には EpiDerm™ と CORROSITEX™ を適切な皮膚腐食性試験法として認めた。米国では 1998 年に CORROSITEX™ が全ての化学物質に有用とは言えないが、Department of Transport (DOT) で必要とされる状況においては有用であると評価した¹⁾。OECD においても、TER 法と EPISKIN™, EpiDerm™ 法を皮膚腐食性試験として専門家会議で 2002 年 5 月に承認され（それぞれガイドライン 430 と 431）、正式な通知が待たれている。TER 法を除き、これらの方法はいずれもヒト皮膚三次元モデルを利用した試験法である。しかし、これらの試験法について、我が国でバリデーションされた例が無く、手技や評価に関わる問題点が不明である。

我が国においても VitroLife Skin™（グンゼ）や TESTSKIN™（東洋紡）のような皮膚三次元モデルが開発され、皮膚刺激性等を評価するために市販されている。しかし、これらヒト皮膚三次元モデルを皮膚腐食性試験代替法として利用することについては多施設バリデーションとして検討された例がない。

一方、10%水酸化カリウムやフェノールのように、わが国では皮膚への直接作用で強い皮膚障害性を有する化学物質は劇物と分類される。しかし、その pH や化学構造から容易に強い皮膚障害性が予想される物質を実験動物を用いて検討することは、動物福祉の立場から問題がある。また、上記のように国際的に認められた適切な *in vitro* の皮膚腐食性試験代替法もあり、可能ならば、それらを利用することにより、動物使用数を最小限に留めることが望まれる。

以上の状況を鑑み、日本でヒト皮膚三次元モデルとして開発された VitroLife Skin とすでに ECVAM にてバリデーションが終了している EpiDerm の特性を評価するために、多施設間での小規模バリデーションを実施した。

方法

1) バリデーシオン組織

わが国で皮膚三次元モデルを販売している企業に基本計画を示し、バリデーシオンへの協力を求めたところ、クラボウ社 (EpiDerm) およびグンゼ社 (VitroLife Skin) より協力が得られた。そこで、日本動物実験代替法学会及び厚生労働省医薬食品局化学物質安全対策室を通じて、バリデーシオンへの参加施設を募集した。その結果、国立医薬品食品衛生研究所 (毒性部)、日本農薬 (株)、日本曹達 (株)、(財) 残留農薬研究所、日本メナード化粧品 (株) 及び住友化学工業 (株) より参加の申し入れがあった。そこで、日本動物実験代替法学会バリデーシオン委員会を中心に少数の被験物質を用いた多施設バリデーシオンを実施するとし、バリデーシオン実行組織を構築した (添付資料 1)。

2) 被験物質および器材

バリデーシオン実行委員会では被験物質は今までの皮膚腐食性試験のバリデーシオンで用いられた被験物質とその腐食性を調査した (添付資料 4)。実行委員会ではそれらの中から陽性対照物質として 10%水酸化カリウム水溶液、20% Sodium lauryl sulfate 水溶液および塩化ベンザルコニウムを、また、実験に直接関与しない国立医薬品食品衛生研究所薬理部の大野が被験物質として 12 物質を選考した (表 1)。被験物質は大野がコード化し、実験実施施設に配布した。各施設には陽性対照物質とともに、腐食性物質と非腐食性物質をそれぞれ 5 物質ずつ配布した (表 2)。なお、配布された被験物質はすべて劇物として扱うこと、冷暗所に保管すること、また、GLP に準じて、使用・保管記録をとるよう指示された。

ヒト皮膚三次元モデル EpiDerm および VitroLife Skin はそれぞれクラボウ社とグンゼ社より購入し、実験スケジュールに従い、実験施設に直接配布した。配布数は予備試験を 1 回及び本試験を 2 回とし、それぞれ 2 キットずつ使用することから、6 キット配布するとしたが、追加試験を行う場合は、追加のキットを配布した。

3) バリデーシオンの試験計画書の作成と技術移転

バリデーシオン実行委員会ではバリデーシオン実施に際しての詳細を検討し、試験計画書 (添付資料 2) および標準操作手順書 (SOP, 添付資料 3) を作成し、それに基づいて、陽性対照物質を用いて技術移転を行った。

4) バリデーション実験の実施

適正な技術を持った者により実験が行われるよう、三次元モデルを用いた実験を行う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試験担当者に限るとした。試験期間は平成16年2月～3月とした。

なお、実験は予備試験を1回、本試験を2回行い、2回の本試験で最終判定が食い違った物質、および技術的な問題で1例のみしか結果が得られなかった物質については、追加試験を行うこととした。腐食性の最終判定は、2～3回の試験のうち判定結果が一致した2回の試験結果を採用するとした。

5) 腐食性の判定

2～3例の結果のうち、同一の判定の得られた2例の結果を最終判定結果とする。しかし、追加試験のためのキット提供の都合から、4月末に実験が終了した。

試験の実施に際してはGLPの原則を尊重し、試験計画書およびSOPに従って実施された。また、試験記録および修正記録を明確にとることとされた。大きな逸脱があった場合には、結果を採用しないこともあるとされた。

6) データ解析

試験結果は実行委員長の吉村に提供するとされた。そこで、すべてのデータが提出されたことが確認されたところで、大野より被験物質コードと参加施設への割付表が開示された。これに基づいて、大森がデータクリーニングを行い、参加企業に確認したのち、解析した。

結果

1) 試験結果の再現性 (表3)

2回の本試験で異なる結果が出たのは、EpiDermにおいては、66試験の内sulfuric acidで2施設、Lactic acidで2施設であり、発生率4/66、即ち、6.06%であった。VitroLife Skinにおいては、sulfuric acidで1施設、Octanoic acidで1施設であり、発生率2/66、即ち、3.03%であった。

2) 予知能力 (表3, 4)

2回の試験で異なる結果が得られた場合の判定については、3回目の試験を実施

し、その結果を合わせ、3回の試験結果を基に多数決で判定するとされている。そこで、これに従って判定された結果を基に、被験物質の腐食性を判定した。

EpiDerm で腐食性物質を正しく腐食性と判定した事例は6被験物質30試験中、29試験であり、感度(sensitivity)は29/30、即ち、96.6%であった。一方、陰性物質を正しく陰性を判定した事例は6被験物質30試験中、20試験であり、特異性(specificity)は20/30、即ち73.3%であった。なお、非腐食性物質を誤って腐食性物質と判定したのは、5% KOH と乳酸であり、この場合、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者の内真に腐食性である割合、陽性予知能力(positive predictivity)は29/39即ち、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、陰性予知能力(negative predictivity)は20/21、即ち、95.2%であった。正しい判定結果が得られた割合、一致率は49/60即ち、81.6%であった。

VitroLife Skin では感度は30/30、即ち100%であり、特異性は20/30、即ち73.3%、陽性予知能力は30/40、即ち75%、陰性予知能力は20/20、即ち100%、一致率は50/60、即ち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% KOH と乳酸であり、いずれの施設でも腐食性物質と判定した。

これらのように、いずれの場合も、EpiDerm と VitroLife Skin によりほとんど同じ結果が得られた。また、判断を誤る物質もほとんど同じであった。

考察

OECD や EU, 米国で皮膚腐食性試験代替法として承認されている EpiDerm と我が国開発の VitroLife Skin の2種のヒト皮膚三次元モデルについて、OECD のバリデーション基準に準じて、多施設バリデーションを実施した。その結果、前者では false negative が30試験のうち1例出たが、後者では false negative は認められなかった。一方、両皮膚三次元モデルの試験法とも5% 水酸化カリウムと乳酸で false positive となった。結果としては、false negative 及び false positive の発現については、両皮膚三次元モデルともほとんど同じ結果が得られた。

今回、使用した被験物質数は陽性対照物質を除き、12物質であり、従来のバリデ

ーションと比べ、少ないが、OECD で適切なガイドラインとして専門家会議で承認されている、皮膚三次元モデルと同等のものであり、完全に新規の方法と比べてより小数の被験物質でのバリデーション(catch up validation)でその妥当性を判断できると考えたものである。

一方、硫酸、水酸化ナトリウム、及びフェノールは我が国の毒劇物判定において、皮膚粘膜刺激性において、これと同等以上の物質は劇物と判定するとされているものであるが、それぞれ 10%硫酸, 5%水酸化ナトリウム, 5%水酸化カリウム、及び 5%フェノールと同等以下の刺激性を有する物質については劇物から除外されているものである。一方、5%水酸化カリウムを除き、10%硫酸や 5%水酸化ナトリウムは腐食性物質として取り扱われているものであり、今回の試験においても腐食性との結果が得られた。これらを考えると、本試験を日本で採用する場合においては、皮膚粘膜刺激性の観点からの劇物の判定基準を見直す必要があると考えられる。

VitroLife Skin において、強度のアルカリにより本皮膚三次元モデルの支持組織のコラーゲンが完全に溶けてしまい、腐食性の判定に支障を来した。今回の判定においては、強度のアルカリ性物質は強い刺激性を有するものであるとして、腐食性と判定したが、SOP 上もそのように改定する必要がある。なお、酸やアルカリ検体については、その他の障害は認められておらず、pH 変化による viability 測定のための色素の発色への影響は洗滌などの操作により解消できたと考えられる。一方、着色物質の内には、細胞や培養基材への吸着の強いものがあることも考えられることから、それら被験物質の場合には取り扱いには注意する必要がある。また、ポンチの大きさが膨潤率により変化する可能性があり、注意を喚起する必要があるとされた。

引用文献

- 1) ICCVAM: Corrositex[®]: An in vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National

Toxicology Program (NTP) interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods (NICEATM). NIH Publication No: 99-4495 (1999).

表1：被験物質

番号	被験物質名	腐食性*	コメント		
1	Potassium hydroxide(10%)	C	陽性対照物質	劇物	液体
2	Sodium lauryl sulfate(20%)	NC	陽性対照物質		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℃
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℃
7	Chromium trioxide	C		劇物	固体 mp 197℃
8	Phosphoric acid	C		非劇物	固体 mp 42.3℃
9	Sodium perborate	NC		非劇物	粉末 60℃で分解
10	Tetrachloroethylene	NC		非劇物	液体 bp 121℃
11	Potassium hydroxide (5%)	NC			液体
12	4-Amino-1,2,4-triazole	NC		非劇物	粉末 mp159℃
13	L-Lactic acid	NC		非劇物	固体 mp 52.8℃
14	Isopropanol (2-propanol)	NC		非劇物	液体 bp 82.5℃

C: corrosive, NC: non-corrosive

表2：被験物質の各施設への配布表

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

C: corrosive, NC: non-corrosive

表 4-1 : EpiDerm

	Vitro	Corrosive	Non-Corrosive
Vivo			
Corrosive		29	1
Non-Corrosive		10 (5% KOH, Lactic Acid)	20

表 4-2 : VitroLife Skin

	Vitro	Corrosive	Non-Corrosive
Vivo			
Corrosive		30	0
Non-Corrosive		10 (5% KOH, Lactic Acid)	20

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

日本動物実験代替法学会 評価委員会

委員長

田中憲穂（平成16年12月まで）：食品薬品安全センター 秦野研究所
大野泰雄（平成17年1月より）：国立医薬品食品衛生研究所

副委員長

若栗 忍：食品薬品安全センター 秦野研究所

委員

板垣 宏：資生堂 安全性・分析センター 代替法開発プロジェクト室
今井弘一：大阪歯科大学
大森 崇：京都大学大学院医学研究科
岡本裕子：コーセー 基礎研究所
小島肇夫：日本メナード化粧品 総合研究所
（平成17年11月より国立医薬品食品衛生研究所 薬理部）
畑尾正人：資生堂 基盤研究センター 薬剤開発研究所

目次

要旨	1
はじめに	2
代替法評価の考え方について	2
厚生労働科学研究班との協力による代替法の評価の手順について	2
第1章 評価対象、その選択理由・経緯および委員会の構成	4
1-1) 評価対象および評価の目的	4
1-2) 皮膚腐食性試験代替法としての VitroLife Skin™ を選択した理由と経緯	4
1-3) バリデーション委員会の構成	5
1-4) 評価委員会の構成	5
1-5) 評価資料	5
第2章 皮膚腐食性について	9
2-1) 皮膚腐食性の定義と分類	9
2-2) 皮膚腐食性発現機序	10
2-3) 皮膚腐食性誘発薬物	10
第3章 In vivo 皮膚腐食性試験法について	18
3-1) ドレイズ皮膚腐食性試験法	18
3-2) Draize 試験の信頼性	19
第4章 ヒト皮膚モデルの適用範囲とパフォーマンス	24
4-1) 原理	24
4-2) ヒト皮膚モデルのバリデーション経緯	24
4-2-1) Skin ² ™ ZK1350 の評価	24
4-2-2) EPISKIN の評価	28
4-2-3) EpiDerm™ の評価	30

4-3) ICCVAM による評価	3 2
第 5 章 ヒト皮膚モデルの日本における評価	3 5
5-1) 評価したヒト皮膚モデル	3 5
5-2) バリデーシヨンの組織と実行 (添付資料:バリデーシヨン評価 ¹⁾)	3 5
5-2-1) 組織	3 5
5-2-2) 試験実施期間	3 5
5-2-3) 技術講習会と予備試験	3 5
5-3) 被験物質	3 6
5-4) プロトコール	3 8
5-5) バリデーシヨンの結果について	4 0
5-5-1) データの信頼性	4 0
5-5-2) In vivo データとの対応性	4 0
5-5-3) 施設内再現性	4 1
5-5-4) 施設間再現性	4 2
5-5-5) in vivo データの対応性	4 2
5-5-6) その他の面からの考察	4 3
第 6 章 その他の情報	4 4
6-1) 試験法の頑健性および容易性	4 4
6-2) 動物福祉面からの妥当性	4 4
6-3) 他の方法の紹介と比較	4 4
6-4) コスト、時間からの妥当性	4 7
第 7 章 まとめ	5 0

要約

皮膚腐食性評価のための in vivo の試験法ガイドラインはいずれも Draize ら(1944)が開発したウサギを用いる方法に基礎をおいている。この方法は肉眼的観察に依存する方法であり、施設間での再現性が低いところがあるが、刺激性物質を非刺激性と評価してしまう可能性は極めて低い方法と評価されている。少数の被験物質を用いた Catch up validation において、わが国で開発されたヒト皮膚モデルである Vitrolife-Skin™ は OECD により皮膚腐食性試験代替法として採用されている EpiDerm™ とほとんど同じ識別能力を有するが明らかになった。また、判断を誤る物質も同じであった。なお、Vitrolife-Skin™ で解決すべき問題点も残されているが、他の方法と比較しても偽陰性率が低く、有望な試験法であると考えられた。今後、評価会議において、Vitrolife-Skin™ を皮膚腐食性試験代替法としての評価を行う必要がある。

はじめに

医薬品や医薬部外品の安全性評価においては、単回・反復投与毒性試験、発がん性試験、生殖発生毒性試験、特殊毒性試験などの結果が必要により要求されている。一方、動物愛護の立場からは、これらの安全性試験をなるべく実験動物を使用しない試験法に置き換えることが要求されている。平成17年6月に改正された「動物の愛護及び管理に関する法律」においても、動物実験に関する3Rの原則が組み込まれた。しかし、既存の安全性試験法を新しい方法に置き換えることにより臨床試験志願者や患者、また、一般消費者に不必要なリスクを負わせることは許されない。当該試験法の信頼性（施設内および施設間での再現性の程度）と正確性（目的とする生物反応を正しく予測あるいは測定する能力）がバリデーションで明らかにされるとともに、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バリデーションを行っている。同様に、米国では代替法のバリデーションと評価のためにICCVAMを設立した。また、日本においても2005年10月に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内に新規試験法評価室(JaCVAM)が設立され、日本動物実験代替法学会や企業との協力のもとで、代替法のバリデーションと評価のための作業を開始した。

日本動物実験代替法学会では、大野泰雄を班長とする厚生労働科学研究班に協力し、化粧品や医薬品等の安全性評価のための動物実験代替法として提案された方法について、行政的に取り入れることが可能か否か科学的根拠に基づいて検討するために、評価委員会を設置した。また、必要と判断した代替法については、バリデーション委員会で多施設バリデーションを行って来た。

代替法評価の考え方について

全ての非臨床安全性試験法には限界があり、その結果をもとにヒトでの安全性を評価する際にはそれを十分にわきまえておく必要がある。特に、安全性評価のための動物実験代替法を既存の方法に置きかえて導入する場合においては広い範囲の被験物質についてバリデーションを行い、それから得られる情報の種類や適用可能物質などについて、可能な限り明らかにしておくことが、その適正利用に必要である。一方、OECDで定められたような、国際的な基準に従った公式なバリデーションを行うには多くの研究者の協力と多大な費用および時間がかかることから、全ての試験法についてわが国で独自に公式なバリデーションを実行することは必ずしも適切ではない。事前に各種の文献情報やバリデーション情報を収集するとともに、代替法の使用目的も考慮し、総合的に評価し、可能かつ必要な場合においては、わが国独自にあるいは欧米と協力し公式なバリデーションを行うべきである。場合によっては簡易な追加バリデーションを行うことにより評価に必要な資料を作成するとするのが、効率的である。この資料を関連科学分野の専門家と行政担当者を含めた会議により総合的に評価し、行政目的のための妥当性を最終判断することが望ましい。なお、欧米あるいはOECDで承認された代替法についても、必要に応じて評価し、利点・欠点を明らかにし、それらの採用の可否の決定することが、適正利用に資すると考える。

厚生労働科学研究班との協力による代替法の評価の手順について

安全性評価のための動物実験代替法として報告されている試験法を客観的、科学的に評価することにより、その利点と問題点、限界および試験法としての妥当性の範囲を明らかにし、認定することに

より、動物実験代替法の使用を促進する。この目的のために日本動物実験代替法学会では評価委員会とバリデーション委員会を設置した。また、大野泰雄を班長とする厚生労働科学研究班では評価会議を設置した。評価委員会は代替法について具体的に調査し、評価するための機関であり、代替法の評価および評価の対象となる試験法の専門家から構成する。一方、評価会議はより広い知識・経験・視野のもとで代替法を行政的な目的のための使用における妥当性について評価する。評価会議は臨床医師、統計の専門家、行政官、および厚生労働科学研究の班員、班友により構成されている。

日本動物実験代替法学会では評価希望の動物実験代替法を公募し、提案された代替法を検討し、更に必要があると考えた場合に、評価委員会にその一次評価を依頼するとしている。評価委員会は提出された代替法の申請書を精査・評価し、評価文書を作成し、試験法が特定の目的のために妥当とされた場合には厚生労働科学研究班に設置された評価会議に上げ、更に評価する。評価する試験法については、バリデーションデータの蓄積、国際的な受け入れあるいは受け入れ見込みの状況、および我が国における必要性等を勘案して決定する。なお、評価委員会での審議で評価に十分なデータは得られていないが、更にバリデーションの実施により代替法として受け入れられる可能性があるかと判断した場合には、厚生労働科学研究班および日本動物実験代替法学会長を通じて、バリデーション委員会にバリデーションの実施を依頼し、その結果を合わせて、評価委員会で再度審議し、適切と判断された場合には評価会議に上げる。評価会議で申請された代替法が妥当とされた場合には公開のシンポジウムを開催し、広く意見を求め、その結果に基づいて最終評価を行う。

第1章 評価対象、その選択理由・経緯および委員会の構成

1-1) 評価対象および評価の目的

ヒト皮膚モデルである VitroLife Skin™ が皮膚腐食性試験代替法として有用であるか否かについて、既に、OECD で承認されている EpiDerm™ と比較の上で評価する。

1-2) 皮膚腐食性試験代替法としての VitroLife Skin™ を選択した理由と経緯

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部では化学物質の安全性評価の一環として動物を用いた毒性試験を行ってきたが、その内には化学構造等から投与局所にて強い毒性を現すことが予想されるものがある。このような物質では経口投与での毒性試験を行う前に、投与局所での毒性の有無を確認し、皮膚腐食性が示された物質については、投与液の濃度を下げたり、場合によっては中和等の処置が必要となる。しかし、従来のウサギを用いる in vivo 皮膚刺激/腐食性試験法^{1,2)}では動物に激しい苦痛とストレスを与える。そこで、2003年に毒性部 菅野 純部長より、この Draize 法に替わる in vitro の動物実験代替法で皮膚腐食性を評価したいと、厚生労働科学研究班の班長である大野が相談を受けた。

in vitro の皮膚腐食性試験代替法として EU はヒト皮膚モデルである EPISKIN™、EpiDerm™ および CORROSITEX™、また、ラット Transcutaneous Electrical Resistance Test(TER 法)を承認している。米国は Corrositex^R を、全ての化学物質に有用とは言えないが、Department of Transport (DOT) で必要とされる状況においては有用であると評価した³⁾。EpiDerm™ および EPISKIN™ 法⁴⁾の評価も行い、承認している。OECD は皮膚腐食性試験としてガイドライン 430⁵⁾ と 431⁶⁾ でそれぞれ TER とヒト皮膚モデル試験 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応用に対するバリデーションは不十分であった。

そこで、厚生労働科学研究班(大野班)で審議した結果、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否かを判定することを目的とするバリデーションの実施が認められた。そこで、皮膚モデルを生産している企業に協力を求めたところ、VitroLife Skin™ を生産・販売しているグンゼ(株)の協力が得られた。また、日本動物実験代替法学会の協力も得られた。そこで、日本動物実験代替法学会のバリデーション委員会にバリデーションの実施を依頼した。また、バリデーション結果が得られた時点で、評価委員会に評価を依頼した。

今までの代替法の評価においては、提案者により作成された詳細な提案書を評価委員会で審議し、有望な方法であると一次評価された方法について、バリデーションを実施したが、今回は、化学物質の安全性評価における皮膚腐食性試験の代替に関して、国内での使用例が少ないことから調査に利用できる一次審査資料の提出が望めないこと、国際的な視点からも早急な対応が要求されていること、OECD ガイドライン 431 では、皮膚モデルを用いるとされており、OECD ガイドライン 431 の追試として位置付けることも可能である等の理由から、評価委員会での審議の前にバリデーションが実施