

2006317007A

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18年度 総括・分担報告書

主任研究者 大野泰雄

平成19（2007）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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大野 泰雄

平成19(2007)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. 分担研究者報告

1, 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----- 12

大野泰雄

資料 1-1 : 酵母性生育阻害試験プロトコール

資料 1-2 : 光毒性試験代替法バリデーション研究補完実験報告書

資料 1-3 : 光毒性試験代替法補完実験計画書

資料 2-1 : LLNA-DA法バリデーション研究計画書

資料 2-2 : LLNA-BrdU法プロトコール

資料 2-3 : LLNA-DA法バリデーション研究の報告

資料 2-4 : LLNA-BrdU法バリデーション研究計画書

資料 2-5 : LLNA-BrdU法SOP

2, 代替法についての国際情勢の調査 ----- 125

板垣 宏

3, 光感作性試験代替法開発に関する研究----- 153

戸倉新樹

4, 細胞毒性によるin vivo全身毒性の予測について ----- 160

田中憲徳

5, バリデーションデータの統計解析 ----- 187

大森 崇

6, 代替法開発のための統計解析手法の研究 ----- 197

吉村 功

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----203

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷 -----207

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

代替法の評価とバリデーションにおいては、日本で開発された 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実施し、良好な結果を得た。また、同 LLNA-BrdU 法についてもバリデーションを実施している。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ための酵母光生育阻害試験について、操作法改良の妥当性検証のためのバリデーション研究を実施し、SOP の改正の妥当性が確認された。培養皮膚モデルを用いた腐食性試験代替法については、日本製のモデルである VitroLife Skin™ と OECD で承認された EpiDerm™ について、第三者評価を実施している。

感作性試験代替法の開発においては、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)の汎用性を向上させることを目的として、細胞と血清のロット差および前培養条件の検討を行った。その結果、試験に供する細胞および血清の選択基準と前培養時の注意事項を定めた。

代謝活性化を含む細胞の開発においては、ヒト皮膚発現 CYP1A1、CYP1B1、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A5 のバキュロウイルス系リコンビナント酵素と、化学物質を代謝反応後、チャイニーズハムスター細胞(CHO)系に暴露し、細胞増殖抑制作用を指標にして代謝活性化、不活性化を検討し、有用と思われるスクリーニング系を構築した。

光感作性試験代替法の開発においては、ケトプロフェン光接触皮膚炎発症時の Th 細胞誘引におけるケラチノサイトの役割を調べるため、ヒト培養ケラチノサイトに KP と UVA 処置を行い、Th1 ケモカインである Mig 及び IP-10 の産生の変化を確認した。

急性毒性予測のための細胞毒性試験法の開発においては、培養細胞の由来臓器と動物において臓器特異的な毒性発現が報告されている化学物質の間に関連性は見出せず、むしろ細胞種よりも代謝活性化や薬物の処理時間が毒性発現に大きく関与していることが推測された。

代替法開発のための統計解析手法の研究およびバリデーションデータの統計解析においては、(1)多施設バリデーション研究において統計的に最適な被験物質割り付け法の研究(2)バリデーションにおける技術易移転性(transferability)の評価法の研究(3)実験家が容易に ET50 の信頼区間を求められるような手順の考案(4)LLNA-DA 法のバリデーション研究の定量的な評価について検討し、バリデーション研究で活用ができる数々の知見を得た。

代替法に関する国際情勢の調査においては、新規試験法のガイドライン化に関して平成 18 年度に OECD のガイドラインへ収載されたのは、「皮膚腐食性のための In vitro 膜バリアー試験法(435)」だけであり、特筆すべき変化はなかった。

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 との連繋を通じて実施した。この他、代替法の承認状況等については、専門学会の会誌やニュースレターも参考とした。

B-2) 新規代替法の評価

研究班による新しい代替法の評価希望の募集は日本動物実験代替法学会ホームページ及び同ニュースレターで行った。研究班では応募された試験法の概要を検討し、更に詳細な評価を行う価値があるか否か検討し、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、業界代表者等で、かつ第三者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

酵母生育阻害および溶血を組み合わせた光毒性試験代替法バッテリーを評価したが、光感作性物質について擬陽性が比較的多く認められたことから、操作法を改良し、妥当性検証のためのバリデーション研究を実施した。なお、今回の改訂は酵母試験に限定されていたことから、補充実験は酵母試験のみで行うことにした。これには 5 施設が参加し、9 物質中 6 物質を担当して実験を行った。

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として提案され、主に提案者からの資料に基づく評価委員会での一次評価では、簡便かつ識別性の高い方法であるとされた LLNA-DA法および LLNA-BrdU法について、日本動物実験代替法学会 (代替法学会) に多施設バリデーションを

依頼した。

LLNA-DAバリデーションでは、10施設が参加して、12被験物質のうち、3物質は全10施設で、残りの9物質は3施設ごとに評価した、各被験物質をコード化し、3用量に調製して各実験施設に送付した。溶媒対照群の発光量に対する被験物質群の発光量の比

(stimulation index, SI 値) が3を超えた場合、陽性と判定した。LLNA-BrdU法のバリデーションでは、9施設が参加して、LLNA-DA法のバリデーションに準じて実施された。この試験の場合、SI値は2を超えた場合に陽性となる。

B-2-3) 腐食性試験代替法の評価

培養皮膚モデルを用いた腐食性試験代替法については、日本製のモデルである VitroLife Skin™ と OECD で承認された EpiDerm™ について昨年度に実施したバリデーション結果の第三者による評価を実施している。

B-2-4) in vitro 感作性試験法の検討

THP-1 細胞の CD54 および CD86 発現を指標とする感作性試験法の汎用性を向上させることを目的として、細胞と血清のロット差および前培養条件の検討を行った。

B-3) in vitro 光感作性試験代替法の検討

ケトプロフェン(KP)光接触皮膚炎発症時の Th 細胞誘引におけるケラチノサイトの役割を調べるため、ヒト培養ケラチノサイトに KP と UVA 処置を行い、Th1 ケモカインである Mig 及び IP-10 の産生の変化を調べた。

B-4) 代謝活性化系を含む安全性試験代替法の開発

細胞毒性試験としては 96 ウェルプレートを用いたニュートラルレッド取り込みを指標する方法を採用した。細胞は VERO 細胞(アフリカミドリザル腎由来)、PC12 細胞(ラット副腎髄質褐色細胞腫由来)、HepG2 細胞(ヒト肝芽腫)、および BALB/3T3 clone A31 細胞(マウス胎児由来)を用いた。化学物質は、以下に示す 14 種の化学物質を用いた。

肝毒性物質 : Tetracycline HCl、carbon tetrachloride、coumarin、acetaminophene、thiophene

腎毒性物質 : Cyclosporin A、gentamycin sulfate、4-aminophenol

神経毒性物質 : Trichlorfon、*m*-cresol、2-hexanone

肝毒性と神経毒性を示すもの : Malathion

腎毒性、肝毒性と神経毒性を示すもの : Caffeine

対照物質 : Sodium lauryl sulfate (SDS)

化学物質は 6 時間処理 (S9 0%、2%、5%) および 24 時間処理 (S9 0%) の 4 系列について行った。S9 添加系では処理液中の S9 濃度が 2%または 5%となるように S9 mix を添加した。

細胞播種 1 日後に化学物質を処理した。6 時間処理では S9 (2%または 5%) 存在下または非存在下で処理後、新鮮な培地に交換して更に 18 時間培養した。24 時間処理では連続で 24 時間処理を行った。処理開始から 24 時間後に、ニュートラルレッド含有培地と交換し、更に 3 時間ニュートラルレッドの取り込みを行うために培養後した。細胞に取り込まれたニュートラルレッドを抽出後、540 nm の吸光度で測定を行った。

B-5) 代謝活性化能を有する細胞を用いる試験系

ヒト皮膚に存在することが知られている CYP1A1、CYP1B1、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A5 (表 1) 発現昆虫細胞由来ミクロソーム (バキュロウィルス系、商品名 Supersome、GENTEST) と被験物質 (*m*-Aminophenol、*p*-Aminophenol、□-Estradiol、Eugenol、Isoeugenol、Alizarin、and Quinizarin) を被験物質の終濃度 0.5 mM、0.17 mM、0.06 mM、0.02 mM とし、37°C、1 時間ブレインキュベートして代謝反応させた (反応系液量 100 □l)。CYP 発現細胞由来ミクロソームの対照群として、CYP を発現していない昆虫細胞由来のミクロソームを用いた。反応系に加えた CYP は 1 pmole に統一し、代謝活性化反応に電子伝達系として 0.3 mM NADPH を加えた。この反応を 24 穴プレートで行った。その後、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞亜株である CHO/UV5 細胞をウェルあたり 3000 個を播種した 96 穴プレートに前記反応液 100 □l を加え、さらに 7 日間培養した。培養後、細胞内ミトコンドリア還元能力を生存細胞の指標とする Promega 社の Cell Titer-Blue キットを用いて細胞の生細胞数を測定した。この生細胞数測定結果から、前記 5 種の CYP 分子種による代謝反応を通じて細胞増殖抑制作用が亢進するかあるいは低下するかにつき評価した。

B-6) 代替法実験結果の統計解析手法の検討

(1) 多施設バリデーション研究において統計

的に最適な被験物質割り付け法の研究 (2) バリデーションにおける技術易移転性 (transferability) の評価法の研究 (3) 実験家が容易に ET50 の信頼区間を求められるような手順の考案について検討した。

B-7) バリデーションデータの管理とデータ解析

LLNA-DA 法のバリデーション研究の定量的な評価について検討した。

C. 研究結果および考察

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

EU における代替法開発の動向に関して特筆すべき事項としては、2005 年 11 月 7 日に公表された 3Rs 宣言に引き続いてアクションプランが決められたことである。このプランに基づいて 2 年目以降のように 3R が進展していくかが注目される。また、REACH が EU 委員会、EU 議会、閣僚理事会の 3 機関の調整に加え、動物愛護団体、経営者団体、市民団体の激しいロビー活動の中で激しく揺れ動いた末、2007 年 6 月 1 日から施行されることが決定した。REACH に伴い動物実験が増加することもあり、今後ますます代替法開発と活用が促進されるものと考えられる。

C-1-2) 米国における状況

米国における代替法開発の動向としては、ICCVAM において、4 種眼刺激性試験代替法に関して専門家による評価が実施され、2006 年 3 月のパブリックコメントの募集を経た後、2006 年 8 月に最終バックグラウンドレビュー文書が公表されたことが挙げられる。今後、今回 ICCVAM において評価された眼刺激性試験代替法についても ECVAM との相互認証が想定される。また、これまでに、ICCVAM と ECVAM は、急性毒性試験代替法としての細胞毒性試験の共同バリデーションを実施し、その結果を評価してきた。その内容について、2006 年 10 月、ほぼ最終化されたバックグラウンドレビュー文書ならびに ICCVAM の試験法評価報告書が公表された。NICEATM と ICCVAM は 2006 年 11 月に、試験法開発に関する 9 つの優先項目の提案を含む代替法の 5 年計画を発表した。また、2006 年 11 月 30 日には SACATM 会議が開催され、NTP ハイスループット・スクリーニングアッセイの現状に関する報告とと

もに、代替法のバリデーションに関する ICCVAM、ECVAM 及び JaCVAM の取り組みに関する報告がされた。

C-1-3) OECD の動向

皮膚腐食性のための *In vitro* 膜バリアー試験法 (435) のみがガイドラインとして記載されたことから、特筆すべき変化はなかったものと考えられた。

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。この操作法改良により、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となった。また、偽陽性が増えることは無かった。

前年度に報告した溶血性試験結果と組み合わせたバッテリーシステムでの判定は、感度 I、感度 II とともに 100%であった。SOP 改訂によって、前研究では擬陽性領域にあった物質に陽性判定が下されたためである。陽性物質の阻止帯の差の施設間差はやや大きくなった。

すべての施設 (3 または 4 施設) で、バッテリーシステムでの判定と *In vivo* の結果が一致したのは 9 物質中 4 物質で、前研究の 2 物質より多かった。

すべての施設 (3 または 4 施設) で判定が陽性となった陰性物質は 2 物質 (物質 C: クロルヘキシジン、物質 E: ビチオノール) で、前研究と同じであった。

これらの結果から酵母試験法のプロトコル改訂の妥当性が示されたと考えられる。

C-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である LLNA-DA 試験について 10 施設で評価した 3 被験物質及び 3 施設で評価したその他の 5 被験物質については、施設間のばらつきは小さく、すべての施設の判定が一致した。施設間で判定が一致しなかった 4 物質中 2 物質は明らかな用量反応関係がみられたが、残りの 2 物質はばらつきが大きかった。この原因にはこれら被験物質の溶媒や被験物質の物性が影響している可能性があるかと推察された。

モルモットを用いた皮膚感作性試験

(GPMT/BT 法)の結果と比較した場合の LLNA-DA 法の感度、特異度、一致割合はそれぞれ87.5% (7/8)、100% (3/3)、90.9% (10/11)であり、この結果は同じ被験物質の文献値で算出したGPMT/MT 法に対するLLNA-DA 法の感度、特異度、一致割合と同程度であった。

本研究で実施した12 の被験物質の濃度範囲で得られた結果はLLNA法と同程度であった。本研究はLLNAとLLNA-DA法がほとんど同じ原理に基づく試験法であることから、キャッチアップバリデーション研究として行ったものであり、比較的少数の被験物質で行った結果はLLNA法と同程度の結果であったことから、また、LLNA-DA法にはRIを用いないこと、及びより簡便な方法であることから、LLNA-DA法はLLNAの代替法として受け入れられるものであると思われた。

LLNA-BrdUバリデーションは、現在実施中であり、まだ結論は得られていない。

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™) については、第三者評価を実施中である。

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、h-CLAT の施設間再現性は 35 試験で偽陰性が 3 例という良好なものであることが示され、本試験法は基本的に施設間再現性が良好であると考えられた。

さらに本試験法の汎用性を向上させるために細胞と血清のロット差の確認および前培養条件の検討を行い、試験に供する細胞および血清の選択基準と前培養時の注意事項を定めた。

h-CLAT に適した細胞ロットの選択基準を以下のように定めた。

- ・ DNCB および Ni の CV75 で CD86、CD54 とともに陽性となり、SLS の CV75 では CD86、CD54 とともに陰性となる。
- ・ 被験物質無処理時の細胞生存率が 90%以上である。

血清の違いによる試験への影響は少ないとも考えられたが、一般的な細胞を用いる試験の場合と同様に、新しい血清ロットを使用す

る際は、本試験法に適した血清であるかどうかを確認する必要があると考えられた。そこで h-CLAT に適する血清ロットの採用基準を細胞ロットの場合と同等とすることとした。

反応性の低下を避けるために、前培養終了時の細胞濃度は 1×10^6 cells /mL 以上にならないようにするという条件をプロトコールに明記することとした。

C-3) in vitro 光感作性試験代替法の検討

C-3-1) ヒト表皮角化細胞における Broadband-UVB、Narrowband-UVB によるサイトカイン・ケモカイン産生への影響

Broadband-UVB 0、10、100 mJ/cm² 照射範囲内、および Narrowband-UVB 0、100、1000 mJ/cm² 照射範囲内において、紫外線照射による Th1 ケモカイン Mig の産生亢進、Th2 ケモカイン MDC、TARC のケラチノサイトからの産生低下が確認された。

C-3-2) 代表的な光アレルギー物質である KP のサイトカイン、ケモカイン産生に対する影響

Th1 ケモカインにおいて、Mig 放出の変化はなかったが、IP-10 は KP 処置により UVA 照射群及び UVA 非照射群共にケラチノサイトからの放出量が減少した。UVA 非照射群でも確認されたことからこの減少は KP の薬理作用による変化と考えられた。一方、Th2 ケモカインは Th1 ケモカインと比較して IFN- γ 刺激による放出量が MDC 及び TARC 共に少なく、KP 処置により放出量の変化も確認されなかった。ケラチノサイトは Th1 ケモカインを放出するが、Th2 ケモカインほとんど産生しないと考えられおり、今回の Th2 ケモカインの結果はそれに一致した。また、RANTES は IP-10 同様に KP 処置により UVA 非依存的に減少し、IL-8 は KP+UVA 処置のみで減少した。さらに IL-1 α 、GM-CSF 及び TNF- α は放出量の変化が確認されなかった。

C-3-3) Th1、Th2 細胞のケモタキシスアッセイ

Th1 細胞のケモタキシスアッセイにおいて、KP 処置群は無処置と比較して UVA (+) 及び UVA (-) 共に %input が減少した。また、併せて Th2 細胞についても確認したが顕著な遊走の変化はみられなかった。これらの結果はケモカイン放出量の結果に一致した。

C-4) 代謝活性化系を含む安全性試験代替法

の開発

用いた培養細胞の由来臓器と動物において臓器特異的な毒性発現が報告されている化学物質の間に関連性は見出せず、むしろ細胞種よりも代謝活性化や薬物の処理時間で細胞毒性は変動した。

この様に明らかに臓器特異性が認められるような結果は得られなかった。むしろ細胞種よりも、S9の有無および薬剤の処理時間が結果に影響を与えているようである。S9の添加による毒性の軽減については既に報告しているように、代謝とは関係のないアルブミン添加によって毒性軽減が起こり、薬物と蛋白結合が毒性発現にかかわることが示されている。また、全体の結果から見ると、これまで細胞毒性試験で汎用している BALB/3T3 細胞がほぼどの検体でもよい感受性を示した。臓器特異性を示す薬剤の毒性反応を見るために用いた細胞株は、いずれも樹立されて長期にわたり培養されていた細胞で、臓器機能を有した状態の細胞とは言いがたい。一方、毒性のエンドポイントについても細胞の生死により評価していることから、それぞれの臓器に特異的な毒性指標について検討すべきであろう。

C-5) 代謝活性化能を有する細胞を用いる試験系

Eugenol、Isoeugenol 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代謝活性化系は明瞭な結果が得られなかったが、*m*-Aminophenol については CYP1A1 や CYP1B1 による代謝活性化がおこると考えられた。*p*-Aminophenol については CYP1B1 による解毒的代謝が示唆された。Alizarin に対しては CYP2E1 による解毒的代謝が示唆された。 β -Estradiol について文献的に知られている CYP1A1、CYP1B1 による代謝活性化反応が再現され、現在の系は代謝活性化反応や解毒的代謝反応を細胞毒性等で観察することをできる系と思われた。

C-6) 代替法実験結果の統計解析手法の検討

課題(1)に関しては、施設のそれぞれに扱える物質数が定められているという制約と、被験物質数が一定であるという条件を設定したときの、可能な割付の全列挙手順を考案し、母数模型の下での最適化基準を D-最適化とした場合の算法を作成した。それに基づいて、既に行われていた LLNA-DA 法のバリデーション研究における割付の評価に用いたところ、

実際の割付は最適では無かったが、最適なものに近いことを確かめることができた。

課題(2)に関しては、用語の定義に基づいて、実験施設の基礎能力の確認という段階と、主導施設の能力との比較という 2 段階判定法を考案した。それを、既に行われていた LLNA-DA 法のバリデーション研究のデータに適用して、多くの実験参加者が容認できる判定を下すことを確かめた。

(3)に関しては、毒性試験の実験家が非線形最小二乗法を使いこなせていないことに配慮して、対数時間直線法が適用可能な条件を調べた。その調査結果に基づいて、非線形最小二乗法が必須という条件のときには再実験を行って対数時間直線法で信頼区間を求めることを提案することとした。今後はこれらの提案を他のバリデーション研究で活用できるものと思われる。

C-7) バリデーションデータの管理と解析

公表されている LLNA 法のデータを用いて検討した結果、OECD テストガイドラインで示唆されている方法を用いると過小評価になる可能性があることがわかった。一方、デルタ法を用いた方法では SI の値が大ききところで、極端に大きな値になる傾向があった。施設間差の指標は個々の SI の分散の値を考慮した施設間の変動を捕らえていた。第 2 の目的について、LLNA-DA 法のバリデーション研究での研究過程をもとにした研究遂行プランを示した。本研究の成果により、LLNA-DA 法のバリデーション研究の定量的な評価を可能にした。

D. 結論

- 1) 本年度の代替法の開発と評価に関する進展を概観すると、新規試験法のガイドライン化の観点では、特筆すべき変化はなかった。
- 2) 「代替法の 3 Rs」のグローバルな認知は着実に進行した年と考えられた。本邦においては、国立医薬品食品衛生研究所に代替法について研究する新規試験法評価室 (JaCVAM) が稼動した。また、「3Rs の原則」が記載された改正・動物愛護管理法が施行された。
- 3) EU では 2005 年の「3Rs 宣言」に基づき EPAA が 2006 年 5 月にアクションプログラムを公表し、さらに 12 月に年次大会を開催するなどその活動を開始している。ECVAM は皮膚

刺激性試験代替法と眼刺激性試験代替法の評価を着実に進行させている。

- 4) 米国における ICCVAM は、2006 年 3 月に 4 種眼刺激性試験代替法の最終バックグラウンドレビュー文書を公表した。
- 5) 2003 年 3 月 11 日に公布された「化粧品指令第 7 次改正」において段階的に設定されたタイムリミットである 2009 年及び 2013 年が迫りつつあり、さらに 2007 年 6 月 1 日からの REACH の施行もあり、今後ますます代替法開発、評価、活用が促進されるものと考えられる。
- 6) 代替法の開発と評価は、非常に長い年月を要するためガイドラインとして文書化された場合は別として、単年度では明確にその全貌を捉えることは困難である。したがって、本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進し、さらには今後の国際協調への参考情報とするためには、関連する国際情勢の調査と解析を継続して実施し、積み重ねていく必要があると考える。
- 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に関して、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ることを確認した。この操作法改良により、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となり、予測能力が向上する事を確認した。
- 7) LLNA-DA法は、12 の被験物質の濃度範囲で行ったキャッチアップバリデーションにおいて、得られた結果は原法である LLNA法と同程度であり、LLNA代替法として受け入れられるものであると思われた。
LLNA-BrdUのバリデーションは、現在実施中である。
- 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™) の第三者評価を実施中である。
- 9) ヒト細胞株 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である h-CLAT の施設間再現性の確認および試験法に関する基礎的データの取得を行った。その結果、本試験法は基本的に施設間再現性が良好であると考えられた。さらに本試験法の汎用性を向上させるために細胞と血清のロット差の確認および前培養条件の検討を行い、試験に供する細胞および血清の選択基準と前培養時の注意事項を定めた。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、さらに適用限界などを明らかとする研究も遂行して行きたい。

- 10) 光アレルギー物質であるケトプロフェンは Th1 ケモカイン IP-10 の産生を低下させ、Th1 細胞のケモタキシスを抑制した。また、RANTES も抑制した。UVA 処置によって IL-8 の産生も抑制した。
- 11) 用いた培養細胞の由来臓器と動物において臓器特異的な毒性発現が報告されている化学物質の間に関連性は見出せず、むしろ細胞種よりも代謝活性化や薬物の処理時間で細胞毒性は変動した。
- 12) ヒト皮膚に発現するチトクロム P450 分子種は、化粧品原料等の化学物質の代謝活性化に関与し、皮膚に対する障害性の一因となりうる。ヒト皮膚発現 CYP1A1、CYP1B1、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A5 のパキユロウィルス系リコンビナント酵素と、化学物質を代謝反応後、チャイニーズハムスター細胞 (CHO) 系に暴露し、細胞増殖抑制作用を指標にして代謝活性化、不活性化を検討し、有用と思われるスクリーニング系を構築した。
- 13) 最適割付法については、考案した全列挙算法を用いると、母数モデルの下で D-最適な割付が実現できる。定性的には、各施設に組み合わせの異なる被験物質を割り付けるという指針が D-最適な割り付け法をもたらしている。こうして得られる割付計画は混合モデルの下でも良い性質を持っている。
- 14) 技術易移転性の評価法については、試験法提案施設が十分な背景データを提供した場合には、第 1 段階で外れ施設を検出し、第 2 段階で施設間差を指標 r で評価する方法を提案して、実際のバリデーション研究のデータに適用したところ、実験家が容認できる結果が得られた。この評価法は実用可能と思われる。
- 15) 簡便な ET50 推定法については、対数時間直線法で ET50 の区間推定を行うために、それが困難な実験データについての考察を行い、その場合には再実験を行うという方法を提案した。モンテカルロシミュレーションの結果では、十分な性能が得られていた。簡便法としては実用可能と思われる。
- 16) LLNA-DA 法のバリデーション研究でのデータ解析の統計的側面として SI の分散の導出と施設感差の指標の提案を行った。こ

れにより、研究結果の定量的な評価が可能となる。本研究で示した方法論は実際に LLNA-DA 法のバリデーション研究で使用された。

- 17) 研究のマネジメントの重要性について論じた。バリデーション研究はさまざまな役割の研究者によって実施されるものである。各研究者の研究目的や役割に関する認識を共有することが必要である。

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 XBP1 mRNA as an indicator of endoplasmic reticulum stress. *J. Toxicol. Sci.*, 31, 149-156, 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*, 20, 767-773, 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*, 20, 774-784, 2006.
- 4) Imai S, Atarashi K, Ikesue K, Akiyama K, Tokura Y. Establishment of murine model of allergic photocontact dermatitis to ketoprofen and characterization of pathogenic T cells. *J Dermatol Sci* 41:127-36. 2006
- 5) 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.
- 6) Kabashima K, Nagamachi M, Honda T, Nishigori C, Miyachi Y, Tokura Y, Narumiya S. Prostaglandin E(2) is required for ultraviolet B-induced skin inflammation via EP2 and EP4 receptors. *Lab Invest* 87:49-55, 2007.
- 7) Hino R, Kobayashi M, Mori T, Orimo H, Shimauchi T, Kabashima K, Tokura Y. Inhibition of T helper 2 chemokine production by narrowband ultraviolet B in cultured keratinocytes. *Br J Dermatol*. 2007 (in press).
- 8) 戸倉新樹: 光アレルギーの発症機序と対策. *アレルギー* 55: 1382-1389, 2006.
- 9) 戸倉新樹: 薬剤性光線過敏症. *臨床と研究* 83: 87-90, 2006.
- 10) 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*. 19. 薬疹を極める. 文光堂, pp125-127, 2006.
- 11) 戸倉新樹: 後天性光線過敏症の病態. *先端医療シリーズ38 皮膚疾患の最新医療* 斎田俊明, 飯塚一編 221-224, 2007.
- 12) 荒川京子, 田中憲穂, 高鳥浩介, 澤田拓士: 飼料から分離した代謝産物の遺伝毒性. *Mycotoxins*, 56(2), 7-64, 2006
- 13) Ayako Sakai, Chihiro Suzuki, Yasuhiko Masui, Kousuke Takatori and Noriho Tanaka: The activities of Mycotoxins derived from *Fusarium* and related substances in a short-term transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/3T3 cells (Bhas 42 cells), *Mutation Res.*, (in press, 2007)
- 14) Yoshitaka HIGA, Mayumi KAWABE, Kyoko NABAE, Yosuke TODA, Sachiko KITAMOTO, Takumi HARA, Noriho TANAKA, Kimio KARIYA and Michihito TAKAHASHI: Kojic acid - absence of tumor - initiating activity in rat liver, and of carcinogenic and photo-genotoxic potential in mouse skin. *The Journal of Toxicological Sciences* (in press, 2007)
- 15) Takumi Hara, Takashi Nishikawa, Hajime Sui, Kumiko Kawakami Hirota, Takamoto and Noriho Tanaka: In vivo photo skin micronucleus test using a sunlight

- simulator: Detection of 8-methoxypsoralen and benzo[a]pyrene. *Mutation Res.* (in press, 2007)
- 16) Hayashi, K., Sasaki, K., Asada, S., Tsuchiya, T., Tanaka, N., Umeda, M.: Detection of initiating and promoting activities of chemicals by two-stage model of Balb/c 3T3 cell transformation assay with optimized protocol. *ATLA* (submitted, 2007)
- 17) Ohtake E, Kakihara F, Matsumoto N, Ozawa S, Ohno Y, Hasegawa S, Suzuki H, Kubota T., Frequency distribution of phenol sulfotransferase 1A1 activity in platelet cells from healthy Japanese subjects. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Epub ahead of print Apr 16 (2006)
- 18) Seok KJ, Wanibuchi H, Morimura K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Yoshimura I, Fukushima S. Existence of a no effect level for MeIQx hepatocarcinogenicity on a background of thioacetamide-induced liver damage in rats, *Cancer Science*, 37, 453-458, 2006.
- 19) Sato Y, Suganami H, Hamada C, Yoshimura I, Sakamoto H, Yoshida T, Yoshimura K. The confidence interval of allelic odds ratios under the Hardy-Weinberg disequilibrium. *Journal of Human Genetics*, 51, 772-780, 2006.
- 20) Moore MM, Honma M, Clements J, Bolcsfoldi J, Burlinson B, Cifone M, Clarke J, Delongchamp R, Durward R, Fellows M, Gollapudi B, Hou S, Jenkinson P, Lloyd M, Majeska J, Myhr B, O'Donovan M, Omori T, Riach C, San R, Stankowski LF, Thakur AK, Van Goethem F, Wakuri S, Yoshimura I. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Follow-up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests-Aberdeen, Scotland, 2003. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47, 1-5, 2006.
- 21) Negoro T, Orihara K, Irahara T, Nishiyama H, Hagiwara K, Nishida R, Takagi H, Satoh K, Yamamoto Y, Shimizu S, Hagiwara T, Ishii M, Tanioka T, Nakano Y, Takeda K, Yoshimura I, Iikura Y, Tobe T. Influence of SNPs in cytokine-related genes on the severity of food allergy and atopic eczema in children. *Pediatric Allergy and Immunology*, 17, 583-590, 2006.
- 22) 吉村功. (2007) 医薬統計の原理原則. 医薬安全性研究会第110回定例会資料, 1-10, 23-28, March 10, 2007.
- 23) Sozu T, Shiraishi A, Hyodo Y, Hamada C, Yoshimura I. (2007) Interval estimation of the 50% effective time in small sample assay data. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, (Accepted).
- 24) Omori, T. (2006) A measure evaluating relevance of a validation study of alternatives to animal testing, *AATEX*, 12, 25-31.
- 25) 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- 「はじめに」および日本薬理学会の新動物実験指針: 日本薬理学雑誌 129, 5-9, 2007.
- 26) ohtakeE, Kakihara F, Matsumoto N, Ozawa S, Ohno Y, Hasegawa S, Suzuki H, Kubota T. (2006) Frequency distribution of phenol sulfotransferase 1A1 activity in platelet cells from healthy Japanese subjects. *Eur. J. Pharm. Sci* in press

学会発表 (講演及び学会発表)

- 1) 藪さき子, 足利太可雄, 萩野滋延, 板垣宏, "THP-1細胞を用いたCD86およびCD54発現を指標とした感作性試験代替法における蛍光標識抗体の検討", 第16回日本サイトメトリー学会, 2006.
- 2) 坂口齊, 足利太可雄, 小坂七重, 宮澤正明, 吉田雪子, 伊藤勇一, 藪さき子, 石川牧恵, 廣田衛彦, 萩野滋延, 板垣宏, 鈴木尋之, "ヒト細胞株を用いた皮膚感作性試験代替法; human cell line activation test (h-CLAT)の開発", 第36回日本皮膚アレルギー学会 (JSDA) 総会 第31回日本接触皮膚炎学会 (JSCD) 総会合同学術大会, 2006.
- 3) 石川牧恵, 足利太可雄, 萩野滋延, 板垣宏, "難水溶性物質の評価を目的としたTHP-1細胞の三次元培養ゲルモデルの開発", 第20回日本動物実験代替法学会, 2006.
- 4) 穂谷昌利, 廣田衛彦, 鈴木美絵, 萩野滋延, 板垣宏, "ヒト単球由来細胞株を用いた光感作性試験代替法の開発", 第20回日本動物実験代替法学会, 2006.

- 5) 鈴木美絵, 廣田衛彦, 萩野滋延, 板垣宏, 相場節也, “細胞表面-SH 基を指標とした感作性試験代替法 (SH-Test) の試験判断基準の構築化”, 第 20 回日本動物実験代替法学会, 2006.
- 6) 廣田衛彦, 鈴木美絵, 萩野滋延, 板垣宏, 相場節也, “細胞表面-SH 基を指標とした感作性試験代替法 (SH-Test) の試験条件検討”, 第 20 回日本動物実験代替法学会, 2006.
- 7) 廣田衛彦, 鈴木美絵, 加賀谷早織, 佐々木喜教, 水芦政人, 萩野滋延, 相場節也, 板垣宏, “ハプテンによる細胞表面チオール基の減少—その生物学意義と応用(II): 感作性試験代替法への応用を目的とした細胞腫の選択”, 日本研究皮膚科学学会第 31 回年次学術大会・総会, 2006.
- 8) 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 31 回日本化粧品学会学術要旨集, 53, 2006.
- 9) 足利 太可雄, “皮膚感作性試験代替法 (h-CLAT を中心に)”, 第 33 回日本トキシコロジー学会要旨集, S69, 2006.
- 10) Ashikaga T, “Development of an in vitro skin sensitization test named h-CLAT (human cell line activation test)”, abstract of the 19th annual and international meeting of the Japanese association for animal cell technology, P75, 2006.
- 11) 小坂 七重, 岡本 賢二, 桑原 裕史, 水野誠, 岡本 裕子, 菌 さき子, 山田 貴亮, 長谷川 靖司, 吉田 真由美, 太田 尚子, 児玉 達治, 佐藤 淳, 坂口 斉, 足利 太可雄, 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 2 報) —適切な THP-1 細胞の選択基準の検討—”, 日本動物実験代替法学会第 20 回大会要旨集, 89, 2006.
- 12) 菌 さき子, 山田 貴亮, 長谷川 靖司, 小坂 七重, 岡本 賢二, 桑原 裕史, 水野 誠, 岡本 裕子, 吉田 真由美, 太田 尚子, 児玉 達治, 佐藤 淳, 坂口 斉, 足利 太可雄, 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 3 報) —血清の影響—”, 日本動物実験代替法学会第 20 回大会要旨集, 91, 2006.
- 13) 水野 誠, 吉田 真由美, 児玉 達治, 佐藤 淳, 太田 尚子, 岡本 裕子, 小坂 七重, 岡本 賢二, 桑原 裕史, 菌 さき子, 山田 貴亮, 長谷川 靖司, 坂口 斉, 足利 太可雄, 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 4 報) —前培養に関する条件検討—”, 日本動物実験代替法学会第 20 回大会要旨集, 93, 2006.
- 14) 田中憲穂: 化学物質の安全性評価と動物実験代替法の動向について (欧米の動向を中心として) 高機能簡易型有害性評価手法開発ワークショップ
主催: NEDO, 2006 年 2 月、東京
- 15) Yoshimura I, Idehara K, Omori T, et al. Validation of LLNA-DA assay for assessing skin sensitization potential. SOT2007, March 25-29, Charlotte, USA.
- 16) 寒水孝司, 白石亜矢子, 兵頭洋平, 浜田知久馬, 吉村功. (2006) 皮膚刺激性試験代替法における ET50 推定法. 日本動物実験代替法学会第 20 回大会, 2006 年 12 月 8 日, 東京.
- 17) 高沼正幸, 寒水孝司, 大森崇, 浜田知久馬, 吉村功, 動物実験代替法バリデーション研究における被験物質割付の最適性に関する検討, 第 20 回日本動物実験代替法学会 (2006. 12. 8)
- 18) 兵頭洋平, 寒水孝司, 大森崇, 浜田知久馬, 吉村功, 動物実験代替法のバリデーションにおける transferability の統計的評価に関する研究, 第 20 回日本動物実験代替法学会 (2006. 12. 8)
- 19) 大森崇, 出原賢治, 小島肇, 寒水孝司, 有馬和範, 後藤浩彦, 花田智彦, 五十嵐良明, 猪田健人, 金澤由基子, 小坂忠司, 牧栄二, 森本隆史, 篠田伸介, 篠田直樹, 武吉正博, 田中正志, 浦谷衛, 宇佐美雅仁, 山中淳, 米田知史, 吉村功, 湯浅敦子, 皮膚感作性試験代替法 (LLNA-DA 法) バリデーション研究, 第 20 回日本動物実験代替法学会 (2006. 12. 8)
- 20) 平川晃弘, 佐藤泰憲, 寒水孝司, 浜田知久馬, 吉村功. (2006) マイクロアレイデータにおける FDR に基づくカットオフ値の選定方法に関する検討. 2006 年度統計関

- 連学会連合大会, 2006年9月7日, 仙台, 東北大学.
- 21) 吉村功. (2006) 統計科学と医・薬・生物・健康科学との相互寄与を未来に向けて思量する. 2006年度統計関連学会連合大会, 2006年9月7日, 仙台, 東北大学.
- 22) Sato Y, Hirose M, Ando H, Suganami H, Hamada C, Yoshimura I. (2006) Modified multifactor dimensionality reduction method for detecting Gene-Gene interaction for an unbalanced sample size. 27th Annual Conference of the International Society for Clinical Biostatistics, August 28, 2006, Geneva, Switzerland.
- 23) Sato Y, Suganami H, Hamada C, Yoshimura I, Sakamoto H, Yoshida T, Yoshimura K. (2006) The confidence interval of allelic odds ratios under the Hardy-Weinberg disequilibrium. International Biometric Conference 2006, June 17, 2006, Montreal, Canada.
- 24) Aoki Y, Hamada C, Yoshimura I. (2006) Estimation of Drug-Receptor Model Parameters; Comparing the Performances of Traditional Methods with a Nonlinear Least Square Method. (2006) International Biometric Conference, June 17, 2006, Montreal, Canada.
- 25) 大森崇、寒水孝司、Stimulation Indexの施設間再現性を評価する指標、第20回日本動物実験代替法学会 (2006. 12. 8)
- 26) 大野泰雄、動物実験代替法 (動愛法に定められた3Rs原則の実現のために-動物実験代替法の最近の進歩-イントロダクション). 座長: 大野泰雄 (国立衛研)、田中憲徳 (食品薬品安全センター). 第33回日本トキシコロジー学会 (2006. 7. 4)
- 27) 大野泰雄、動物実験と代替法. 東邦大学薬学部オープンリサーチセンター(ORC) 第2回講演会 (2007. 3. 22)
- 28) 大野泰雄、薬学研究における動物実験代替法研究の重要性とその問題点、日本薬学会シンポジウム(2007. 3. 30)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし
- J. 謝辞
本研究の遂行にあたっては日本動物実験代替法学会の評価委員会 (田中憲徳委員長) とバリデーション委員会 (吉村 功委員長)、バリデーション参加機関、及びそれぞれに属する委員及び職員の方々のお世話になった。ここに感謝申し上げます。

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

動物実験代替法の評価とバリデーションについて継続的な検討を進めている。

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については、光感作性物質について擬陽性が比較的多く認められたことから、操作法を改良し、その妥当性検証のためのバリデーションを実施した。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り、前研究では擬陽性領域にあった物質に陽性判定が下されたが、偽陽性は増加せず、SOPの改正の妥当性が確認された。

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-DA法及びLLNA-BrdU法)については、前年度の文献的検討により、簡便かつ識別性の高い方法であると評価されたが、バリデーション結果が不足していたことから、多施設バリデーションを実施したところ、LLNA-DA法については良好な結果を得た。LLNA-BrdU法についてはバリデーションを実施中である。

前年度に行った多施設バリデーションにおいて、皮膚腐食性試験代替法として国際的に承認されている皮膚三次元モデル EpiDerm™と同等の識別能力を有するものと考えられた VitroLife-Skin™の、第三者評価を開始した。

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)のプロトコール最適化を目指し、7施設でプレバリデーションを実施した。その結果、施設間再現性は良好であると考えられた。次に、本試験法の汎用性を向上させることを目的として、細胞と血清のロット差および前培養条件について検討した。その結果、試験に供する細胞および血清の選択基準と前培養時の注意事項を定めた。

A. 研究目的

医薬品や化粧品の安全評価においては様々な動物実験結果が必要であるが、動物愛護の立場から、なるべく動物を使用しない試験法に置き換える事が要請されている。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では欧州動物実験代替法バリデーションセンター(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動物実験代替法バリデーション省庁間調整会議(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 およ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・評価およ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として新規試験法評価室(仮称：動物実験代替法バリデーションセンター JaCVAM)が設立された。

本研究班では科学的根拠に基づいて可能な限り化粧品や医薬品等の評価のために動物実験代替法を導入することを目的に、化粧品や医薬品の安全性評価のために用いられている

試験法で代替法の開発が十分でないものうち、単回投与毒性試験、感作性試験、光感作性試験の代替法およ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18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バリデーション研究を行うとともに、2) 皮膚感作性を調べるためのLLNA法の代替法であるLLNA-BrdU法およびLLNA-DA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評価を開始し、さらに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。

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、板垣の関連発表を含む。

論文

- 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.*, 31, 149-156, 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*, 20, 767-773, 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*, 20, 774-784, 2006.

- 4) 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-「はじめに」および日本薬理学会の新動物実験指針：日本薬理学雑誌 129, 5-9, 2007.

学会発表

- 1) 菌さき子、足利太可雄、萩野滋延、板垣宏、“THP-1細胞を用いたCD86およびCD54発現を指標とした感作性試験代替法における蛍光標識抗体の検討”、第16回日本サイトメトリー学会、2006.
- 2) 坂口斉、足利太可雄、小坂七重、宮澤正明、吉田雪子、伊藤勇一、菌さき子、石川牧恵、廣田衛彦、萩野滋延、板垣宏、鈴木美絵、“ヒト細胞株を用いた皮膚感作性試験代替法；human cell line activation test (h-CLAT) の開発”、第36回日本皮膚アレルギー学会 (JSDA) 総会 第31回日本接触皮膚炎学会 (JSCD) 総会合同学術大会、2006.
- 3) 石川牧恵、足利太可雄、萩野滋延、板垣宏、“難水溶性物質の評価を目的としたTHP-1細胞の三次元培養ゲルモデルの開発”、第20回日本動物実験代替法学会、2006.
- 4) 穂谷昌利、廣田衛彦、鈴木美絵、萩野滋延、板垣宏、“ヒト単球由来細胞株を用いた光感作性試験代替法の開発”、第20回日本動物実験代替法学会、2006.
- 5) 鈴木美絵、廣田衛彦、萩野滋延、板垣宏、相場節也、“細胞表面-SH基を指標とした感作性試験代替法 (SH-Test) の試験判断基準の構築化”、第20回日本動物実験代替法学会、2006.
- 6) 廣田衛彦、鈴木美絵、萩野滋延、板垣宏、相場節也、“細胞表面-SH基を指標とした感作性試験代替法 (SH-Test) の試験条件検討”、第20回日本動物実験代替法学会、2006.
- 7) 廣田衛彦、鈴木美絵、加賀谷早織、佐々木喜教、水芦政人、萩野滋延、相場節也、板垣宏、“ハプテンによる細胞表面チオール基の減少—その生物学意義と応用 (II)：感作性試験代替法への応用を目的とした細

- 胞腫の選択”、日本研究皮膚科学科学会第31回年次学術大会・総会、2006.
- 8) 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31回日本化粧品学会学術要旨集、53、2006.
- 9) 足利 太可雄、“皮膚感作性試験代替法(h-CLATを中心に)”、第33回日本トキシコロジー学会要旨集、S69、2006.
- 10) Ashikaga T, “Development of an in vitro skin sensitization test named h-CLAT (human cell line activation test)”, abstract of the 19th annual and international meeting of the Japanese association for animal cell technology, P75, 2006.
- 11) 小坂 七重、岡本 賢二、桑原 裕史、水野誠、岡本 裕子、菌 さき子、山田 貴亮、長谷川 靖司、吉田 真由美、太田 尚子、児玉 達治、佐藤 淳、坂口 斉、足利 太可雄、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2報)―適切な THP-1 細胞の選択基準の検討―”、日本動物実験代替法学会第20回大会要旨集、89、2006.
- 12) 菌 さき子、山田 貴亮、長谷川 靖司、小坂 七重、岡本 賢二、桑原 裕史、水野 誠、岡本 裕子、吉田 真由美、太田 尚子、児玉 達治、佐藤 淳、坂口 斉、足利 太可雄、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3報)―血清の影響―”、日本動物実験代替法学会第20回大会要旨集、91、2006.
- 13) 水野 誠、吉田 真由美、児玉 達治、佐藤 淳、太田 尚子、岡本 裕子、小坂 七重、岡本 賢二、桑原 裕史、菌 さき子、山田 貴亮、長谷川 靖司、坂口 斉、足利 太可雄、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4報)―前培養に関する条件検討―”、日本動物実験代替法学会第20回大会要旨集、93、2006.
- 14) 大野泰雄、動物実験代替法(動愛法に定められた3Rs原則の実現のために-動物実験代替法の最近の進歩-イントロダクション)、座長：大野泰雄(国立衛研)、田中憲穂(食品薬品安全センター)、第33回日本トキシコロジー学会(2006.7.4)
- 15) 大野泰雄、動物実験と代替法、東邦大学薬学部オープンリサーチセンター(ORC)第2回講演会(2007.3.22)
- 16) 大野泰雄、薬学研究における動物実験代替法研究の重要性とその問題点、日本薬学会シンポジウム(2007.3.30)
- F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

1) 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

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うち、酵母光生育阻害試験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。この操作法改良により、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となったが、偽陽性は増えず、SOP 改訂の妥当性はあったと考えられる。

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 が陽性対照で常に陽性指標を十分に超える 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え、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。平成 17 年度は提案者による改善されたプロトコルの審議を行い、平成 18 年度は改訂 SOP の妥当性検証のために、バリデーション研究を実施した。

B. 研究方法

1) 実験の方針

酵母-赤血球試験は 2 つの試験を併せて光毒性を評価する試験であるから、本来なら補完実験も前研究と同様な規模で行うべきであった。しかしながら (1) 今回の改訂は酵母試験に限定されていた、(2) 前回の規模で実験を行うことは実験施設の負担が大きすぎて実

行不可能であった、という 2 つの理由から、実行委員会は、本研究での実験を酵母試験のみで行うことにした。そのため、実験参加施設、被験物質共に前研究の赤血球光溶血試験（以下「赤血球試験」）のデータが存在するものに限定せざるを得なかった。すなわち、赤血球試験に関しては前研究のデータを用いることとなった。

2) 実験施設

実験を行った施設は、前研究に参加した 6 施設のうち、前実験の施設代表委員が当該施設を退職した 1 施設を除く、以下の 5 施設である。（括弧内は実験担当者）

(株) コーセー 研究本部品質保証センター
(今井教安)

(株) 資生堂 品質保証センター
(石川牧恵)

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所
(若栗忍)

日本メナード化粧品 (株) 総合研究所
(松永康明)

マルホ (株) 京都 R&D センター
(米澤理一郎)

3) 実験期間

平成 16 年 7 月～10 月

4) 被験物質とその割り当て

実験の方針上の制約から、被験物質とその割り当ては前研究と同じものとした（表 1）。被験物質のコードは、前回の研究と異なるものとした。

表 1 各施設で実験を行った物質（○印）表中の P は陽性、N は陰性

被験物質名	コード	in vivo 判定	施設コード				
			a	C	d	e	f
アントラセン	A	P	○	○	○	×	×
アミオダロン	B	P	○	○	○	×	×
クロルヘキシジン	C	N	○	○	○	×	×
クロルプロマジン	D	P	○	×	×	○	○
ピチオノール	E	N	○	×	×	○	○
SLS	F	N	○	×	×	○	○
アクリジン	G	P	×	○	○	○	○
6-メチルクマリン	H	N	×	○	○	○	○
Parsol 1789	I	N	×	○	○	○	○

5) 光源と強度計の校正

太陽光のシミュレーション光源はすべての施設で Dr. Hönle 社の SOL500 にした。光の強度計の校正を 2006 年 7 月 10 日に行ったところ、標準としている強度計と大きく異なった値を示すものが 2 台あった。この 2 台の施設には、標準としている強度計を送って自施設の実験の際に再度校正を行って換算係数を定め、実験を行うこととした。その換算係数はデータとして報告されている。

6) 結果の判定

酵母-赤血球試験の判定規則は前研究と同じとした。すなわち、2 試験のいずれかで陽性と判定された被験物質を「陽性」、擬陽性と陰性の組み合わせになった被験物質を「擬陽性」、両試験とも陰性と判定された被験物質を「陰性」とした。各試験の判定基準値と判定規則を表 2 に示す。

表 2 個々の試験と総合判定の規則

		赤血球試験		
		陽性 (10 ≤ L)	擬陽性 (5 ≤ L < 10)	陰性 (L < 5)
酵母 試験	陽性 (5 ≤ Z)	陽性	陽性	陽性
	擬陽性 (2 ≤ Z < 5)	陽性	擬陽性	擬陽性
	陰性 (Z < 2)	陽性	擬陽性	陰性

C. 研究結果

結果の詳細は添付資料 1-2 に示した。

- 1) SOP 改訂により、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となった。
- 2) バッテリーシステムでの判定は、感度 I、感度 II とともに 100% であった。SOP 改訂によって、前研究では擬陽性領域にあった物質に陽性判定が下されたためである。
- 3) 陽性物質の阻止帯の差の施設間差はやや大きくなった。
- 4) すべての施設 (3 または 4 施設) で、バッテリーシステムでの判定と in vivo の結果が一致したのは 9 物質中 4 物質で、前研究の 2 物質より多かった。
- 5) すべての施設 (3 または 4 施設) で判定が陽性となった陰性物質は 2 物質 (物質 C: クロルヘキシジン、物質 E: ピチオノール) であり、前研究と同じであった。

D. 結論

操作法の改良により、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となった。また、陰性物質を陽性と判定する偽陽性は増えなかった。これらのことから、SOP 改訂の妥当性はあったと考えられる。

E. 資料

- 添付資料 1-1: 酵母光生育阻害試験プロトコール
 添付資料 1-2: 光毒性試験代替法バリデーション研究補完実験報告書
 添付資料 1-3: 光毒性試験代替法補完実験計画書