

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。

③ICE 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。なお、この専門家による評価会議の結果に対するコメントの募集は2005年12月2日までであった。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。

2006年3月に4種の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が公表された。本文書では、(1)4法はいずれも *in vivo* 試験法を代替する方法とはならないこと、

(2) ICCVAM が推奨する限定的に使用でき、眼腐食性など強い眼刺激性物質のスクリーニングに使用できる方法として BCOP 試験および ICE 試験が挙げられること、(3) HET-CAM 試験および IRE 試験については、現時点では推奨できず、眼腐食性や強い眼刺激性物質を同定するためにはプロトコルや判断基準の最適化、追加バリデーションが必要であることを報告している。

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 (NHK) を用いる Neutral Red 取り込み (NRU) 試験法] の結果の評価が実施されてきた。この検討に関しては、2006年3月のバックグラウンドレビュー文書 (以下、「BRD」) のドラフト公表に続いて、ピアレビューパネルの召集 (5月)、ピアレビューパネル報告書の公表 (7月) を経て、2006年10月にほぼ最終化された BRD ならびに ICCVAM による試験法評価報告書が公表された。本報告書で ICCVAM は、「これら2種の細胞毒性試験は法規制におけるハザード分類という目的には精度は十分ではないが、現在の急性毒性プロトコル [即ち、Up-and-Down Procedure (UDP)、Acute Toxic

Class (ATC) 法] の開始用量を設定するために使用することができる」と勧告した。また、ICCVAM は、急性経口毒性を予測するための代替試験法の使用を今後さらに進めていくために、*in vitro*、*in vivo* の両面で質の高いデータベースを拡張していくこと、メカニズムに基づいた *in vitro* 試験法の開発を支援するため、致死メカニズムの理解を深めるための標準化されたプロトコルを *in vivo* 試験に盛り込むことなどを推奨している。

2006年11月に NICEATM と ICCVAM は代替法の5ヵ年計画を発表し、これに関するパブリックコメントを求めた。この5ヵ年計画では、

(1) 連邦政府機関試験計画に、適切で信頼性のある方法を統合するための、新規および改良された非動物および他の代替試験の研究開発、解釈および検証、(2) 3R 推進のための新規および改良された非動物試験と代替試験に関する最優先分野の確認の2点に取り組むとした。また、試験開発の優先分野としては、①急性眼刺激性、腐食性、②Biologics/vaccines、③急性皮膚毒性 (刺激性・腐食性、感作性と吸収を含む)、④急性全身毒性 (経口、経皮、吸入)、⑤慢性毒性・発がん性、⑥生殖・発達毒性、⑦内分泌攪乱物質、⑧神経毒性、⑨免疫毒性の9項目を挙げている。

また、2006年11月30日に SACATM 会議が開催され、NTP ハイスクリーン・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 および JaCVAM の取り組みに関する報告がされた。

#### C-2-2 CTFA の状況

CTFA (米国化粧品工業会) の Safety Evaluation Guideline は、化粧品の原料および最終製品について、安全性を立証する方法としての前臨床試験および臨床試験の使用に関するガイダンスを事業者を提供するものである。CTFA では、現在、本ガイドライン (1991年版) の広範な改訂作業に取り組んでいるところであり、現行ガイドラインとの大きな相違点の一つが動物実験代替法の追加である。前臨床試験には、規制上のガイドラインに通常従う動物試験とともに、細胞、組織、器官培養を用いる *in vitro* 代替法、また、構造活性相関を用いてコンピュータによる予測を行う *in silico* 法も含まれる可能性がある。なお、本ガイドラインを含む新しい CTFA

Technical Guideline Series は、2007 年に入手可能となる見込みである。

### C-2-3 小括

本年度の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 ハイスクリーン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 および JaCVAM の取り組みに関する報告がされた。

### C-3 OECD の動向

#### C-3-1 OECD ガイドラインの動向

OECD では、日常生活に影響を与える化学物質について、人と環境に対する安全性を考慮し、協力と開発の国際的活動を行っている。化学物質の安全性に関する活動の 1 項目として「化学物質のテストガイドライン」がある。これは 5 つのセクションからなるが、その中の「Section4: Health Effects」の中に各種安全性試験のガイドラインが含まれる。2006 年度に以下の試験法が掲載された。

435 皮膚腐食性のための In vitro 膜バリア試験法 (2006 年 7 月 19 日収載)

2006 年度に以下の 2 つドラフトテストガイドラインに関してコメント募集が行われた。

426 神経発生毒性試験 (2006 年 12 月 15 日)

487 In vitro 小核試験 (2007 年 2 月 15 日)

※ ( ) 内はパブリックコメントの締切日を示している。

コメント募集期間中または募集期間を終え、修正、最終段階に入っている試験法は以下の通りである。

412 吸入反復投与試験-14/28 日間の改定 (2006 年 2 月 16 日)

\*\*\* 急性吸入毒性の新ガイドライン (2003 年 1 月 20 日)

433 急性吸入毒性—固定用量法の改定 (2004 年 7 月 30 日)

434 急性経皮毒性—固定用量法の改定 (2004 年 7 月 16 日)

436 急性吸入毒性 - 急性毒性等級(ATC)法の新ガイドライン (2005 年 1 月 28 日)

※ ( ) 内はパブリックコメントの締切日を示している。

試験法ガイドライン 412「吸入反復投与試験-14/28 日間」は、化学物質障害特性、国連化学物質国際調和分類・表示 (GHS) に関する情報提供を目的としている。既知腐食性、強刺激性物質の試験不要、瀕死動物の取り扱いなど動物愛護の観点が多く盛り込まれている。ただし、瀕死状態と人道的死の決定基準、予想し得る死亡・切迫死認証に関するガイダンスは別途課題とされている。

また、生殖発生毒性試験の hER-HeLa-9903 Cell Line を用いた Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay もドラフトテストガイドラインとして収載されている。

#### C-2) 新規代替法の評価

##### 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

資生堂から提案された「酵母—赤血球試験」は平成 15 年度に開催された評価委員会で適切な方法であると評価されたが、多施設でのバリデーションの結果が無かったことから、施設間のばらつきを評価するための多施設バリデーションが実施された。バリデーション委員会の報告書に基づいて行った評価委員会で多施設バリデーション結果の評価結果を以下に要約する。

##### ①施設内・施設間再現性

実験条件に問題があった b 施設を除けば、施設内での再現性は良かった。また、施設間の違いは陽性と擬陽性、擬陽性と陰性の範囲に収まっていた。適切な設備を備えた施設で

訓練を受けた者が行えば再現性は悪くないとされた。

## ②酵母-赤血球試験の妥当性

本研究の結果は1施設を除き、擬陽性を陽性と判定した場合、感度が100%、特異度が47%となる。擬陽性を陽性とすれば、陽性物質を誤って陰性と判定しないという意味で、酵母-赤血球試験の有用性が示されたことになる。

## ③カットオフ値

赤血球光溶血試験のカットオフ値については特に問題は認められなかったが、酵母試験の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。その上で、カットオフ値を適切に定めることによって感度を高めることができると思われる。

## ④吸光度の測定波長

溶血はヘモグロビン変性の影響を受けにくい525nmで検出する方がばらつきが少ないことから、SOPでも波長を525nmに変更すべきである。

## ⑤判定方法の改善

酵母-赤血球試験での総合判定には、2回の実験の再現性吟味に加えて、複数濃度の試験による用量反応関係を利用する方が良いと思われる。特に非照射下での結果に用量反応関係がある物質の場合は慎重な判定を行うべきである。この場合、3T3-NR法でも利用されているように、光照射と非照射で明らかに差のある用量反応関係が得られた場合は光毒性ありと判断しても差し支えないと考えるが、用量作用関係をきちんととれなかった時には、再試験を行うべきとした方が良いとの意見があった。

## ⑥3T3-NRU法との比較

in vivoとの対応性については、3T3-NRU法より優れているとの証拠は無いが、擬陽性も陽性と判断すると、感度はほぼ同等と考えられる。

## ⑦GLP遵守

かなり大幅なデータクリーニングが必要であった。GLP遵守を徹底すべきである。または、データの信頼性確保のためのシステムを作っておくべきである。

## ⑧その他

- i) 6-MethylcoumarinとBithionolはモルモットでは陰性であったが、他の動物種において陽性反応が確認されていることから、光毒性陽性物質として判断して良い。

chlorhexidineについては光毒性は弱いと陽性との報告もある。

- ii) Rose Bengalの様には可視光で活性化されるものはランプによる影響を受けやすい可能性がある。
- iii) 太陽光シミュレータでは培養液の温度上昇による影響に留意する必要がある。
- iv) 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の幅を決め、試験の成立を判断すべき。
- v) 酵母試験による非水溶性物質の評価については更に検討が必要である。
- vi) 被験物質を増やして更に多施設でのバリデーションが必要であるか否かについては今後の検討課題である。

この検討課題を受け、申請者が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。この操作法改良を受け、酵母試験のみに5施設が参加し、9物質を用いてバリデーション研究を実施した。その結果、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となった。この面ではSOP改訂の妥当性はあったと考えられる。

バッテリーシステムでの判定は、感度I、感度II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。SOP改訂の一つの結果と考えられる。

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。これもSOP改訂の結果である。

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。

## C-2-2) 皮膚感作試験代替法の評価

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法およびLLNA-BrdU法)を一次評価した。本試験法はLLNA法における<sup>3</sup>H-Methyl thymidineのDNAへの取り込みの代わりに、ATP量の増加および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

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、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。

そこで、代替法学会に両試験のバリデーションを依頼した。

その結果、LLNA-DA試験について10施設で評価した3 被験物質および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として推察された。

GPMT/BT 法に対する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法と同程度であり、キャッチアップバリデーション研究として受け入れられるものであると思われる。

一方、LLNA-BrdUバリデーション試験については、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™) 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。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終了を受け、JaCVAM 主催で第三者評価が実施されている。

#### C-2-4) in vitro 感作性試験法の検討

資生堂と花王の両社が独自に開発してきた試験プロトコルを共有化し、より精度が高く、汎用性も高い試験方法の開発を目指しプロトコルの最適化を行った。具体的に我々が検討した点は、①前培養時間、②被験物質処理時間、③播種する細胞数、④細胞毒性試験 (MTT 法) による濃度設定、⑤抗体の種類、⑥抗体の処理濃度、⑦非特異的染色を防ぐための Fc レセプターブロックとアイソタイプコントロールの導入などである。これらの項目について、感作性物質と非感作性物質の違いを明確に捉える条件を設定した。その結果、本試験法における曝露時間は 24 時間あるいは 48 時間、播種する細胞数は  $1 \times 10^6$  個/ML が適切であるとした。なお、一般に細胞の活性化はその増殖性と関係があると言われていたが、高密度で細胞を播種し、ある程度増殖が抑制されている方が感作性物質による活性化が生じやすい可能性が考えられた。これらの条件検討結果に、これまでの知見も加味して以下のような試験プロトコルを策定した。

- 細胞株：THP-1
- 測定指標：CD86、CD54
- 被験物質処理時間：24 時間
- 被験物質：9 品 (感作性物質 6 品、非感作性物質 3 品)
- 処理濃度：MTT 法により求めた IC50 ( $\mu$ g/mL) の 0.1 倍、0.5 倍、1 倍および 2 倍の 4 濃度
- 感作性物質：DNFB、*p*-phenylenediamine

(pPD)、2-mercaptobenzothiazole (20-MBT)、nickel sulfate hexahydrate、cobalt sulfate heptahydrate、ammonium tetrachloroplatinate

・非感作性物質：SLS、Tween 80、DMSO

なお、フローサイトメトリーはFACSCalibur (Becton Dickinson) および EPICS XL-MCL system II (Beckman Coulter) を用いた。

この試験プロトコールに基づいて行ったバリデーション結果、相対発現量が150%以上を陽性とした場合、CD86 では2-MBTが2施設とも陰性となった以外は全ての感作性物質において2施設で陽性となり、逆に非感作性物質で陽性となる化合物は認められなかった。一方、CD54 では、相対発現量が150%以上を陽性とした場合、pPD 以外は全ての感作性物質において2施設とも陽性となったが、非感作性物質である Tween80 が陽性となる場合もあった。CD86 と CD54 を組み合わせた場合、各指標単独では捉えられなかった2-MBT や pPD が陽性となり、*in vivo* 試験結果との対応性は2施設とも良好であった。相対発現量が200%以上を陽性とした場合には、感作性物質において150%以上陽性とする判断基準に較べて検出率は下がるが、非感作性物質はいずれにおいても陰性と判断された。CD86 と CD54 を組み合わせた場合には、今回評価した9サンプルでは *in vivo* 試験の結果とすべて一致した。また、2施設間再現性は、本試験結果では良好と判断された。

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。

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 ともに陽性となり、SLS の CV75 では CD86、CD54 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  $1 \times 10^6$  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) UVB 誘導性のヒト表皮角化細胞のアポトーシス解析

UVB 誘導性ヒト表皮角化細胞において、Broadband-UVB および Narrowband-UVB を照射した後のアポトーシス、ネクローシスの推移を解析した結果、紫外線照射量、時間依存性にアポトーシス、ネクローシスが增加し、Broadband-UVB では、照射12時間をピークに、そして、 $60 \text{ mJ/cm}^2$  をピークにアポトーシスを生じていた。一方、Narrowband-UVB では照射後24時間をピークに、そして、 $300$ 、 $600 \text{ mJ/cm}^2$  をピークにアポトーシスが現れることが分かった。

TCSA を  $10^{-4} \text{ M}$  でインキュベーションし、UVA  $4 \text{ J/cm}^2$  照射したものは、TCSA が HaCaT 細胞の細胞表面、細胞質内、また核内にと広く局在していることが確認され、TCSA 光修飾表皮細胞を作製できていることが確認できた。これに UVA 1、2、 $4 \text{ J/cm}^2$  照射し、フローサイトメトリーでアポトーシス、ネクローシスを解析した。TCSA  $10^{-4} \text{ M}$  の濃度では、UVA 非照射群では40%程がネクローシスを生じてい

たが、UVA 照射群は 90 % 以上でネクローシスを生じていた。10<sup>-5</sup> M の非照射群でネクローシス細胞はほとんど認めなかった。つまり、TCSA の細胞毒性は 10<sup>-5</sup> M 以下であれば、ほとんどないと思われた。次に細胞毒性のない 10<sup>-5</sup> M で UVA 4 J/cm<sup>2</sup> 照射したところ 40% 近くがネクローシスを生じていた。一方、アポトーシスについては UVA 非照射群、また UVA 1、2 J/cm<sup>2</sup> 照射群ではほとんど認められなかった。しかし、UVA 4 J/cm<sup>2</sup> 照射群では 10<sup>-5</sup> M の濃度で約 20 % 近くがアポトーシスを生じていた。

ヒト表皮角化細胞において Broadband-UVB 0、30、60、100 mJ/cm<sup>2</sup> 照射範囲内、および Narrowband-UVB 0、300、600、1000 mJ/cm<sup>2</sup> 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/cm<sup>2</sup> 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、spafloxacin (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<sup>-4</sup> または 10<sup>-5</sup> M の濃度で観察された。ネクローシスはこれらの化学物質で 10<sup>-4</sup> 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-3-2) 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/cm<sup>2</sup> 照射範囲内、および Narrowband-UVB 0、100、1000 mJ/cm<sup>2</sup> 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。

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 照射群および 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- $\gamma$  刺激による放出量が MDC および 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 $\alpha$ 、GM-CSF および TNF- $\alpha$  は放出量の変化が確認されなかった。

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 (+) および 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

C-4-1) 代謝

今回試験した 21 種の既存化学物質について得られた S9 +/- の 6 時間処理の条件下における細胞毒性 (IC<sub>50</sub> 値) は、in vivo 急性毒性や反復投与毒性の NOEL 値との間に良い相関が得られなかった。過去に我々の実施した MEIC の共同研究では、処理時間を 24 時間とした場合、in vivo 毒性との比較においてより相関の高いデータが得られた事から、24 時間処理の追加の実験をおこなった。その結果、6 時間処理よりも 24 時間処理することによって、in vivo 毒性に近似したデータが得られる事が分った。本研究において実施した、6 時間処理直後と、更にその後 18 時間培養経過後では毒性の発現が異なり、更に、24 時間処理した場合は in vivo 毒性により近似してくる事から、処理時間は極めて大きな要因と

なる事が明らかとなった。

#### C-4-2) タンパク結合

牛血清アルブミンを培地 (CS 10%) に 0.01、0.1、1.0、2.0、5.0 mg/mL 添加した場合の SDS の細胞毒性について検討した。その結果、0.01~1.0 mg/mL では SDS のみを処理したときとほぼ同じ細胞毒性 (IC50 値 : 0.094~0.097 mg/mL) を示したが、2.0 mg/mL および 5.0 mg/mL においては毒性の軽減が認められた (IC50 値 : 0.19~0.20 mg/mL)。この細胞毒性は S9+処理の時の IC50 値とほぼ同じ値で、SDS の S9+による毒性の軽減は代謝活性化によるものではなく、タンパク質との相互作用によるものであると考えられた。アルブミンの毒性に及ぼす効果は SDS や 6-*tert*-butyl-*m*-cresol、N-phenylmaleimide の結果から、S9-の場合の毒性と比較して IC50 値の 2 倍程度の軽減作用になると考えられた。またこれらの毒性発現は、タンパク質の大きさや濃度によって、また化学物質により反応性が違う可能性が示唆された。このように、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、タンパク結合による変化も関与している事が示唆された。

#### C-4-3) 臓器特異的毒性

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

皮膚細胞に発現している薬物代謝酵素分子種を同定した。その結果、ヒト初代ランゲルハンス細胞では CYP1A1、CYP1B1、CYP2E1、CYP3A5、CYP3A7、ヒトケラチノサイトでは CYP1A1、CYP1B1、CYP2C、CYP2E1、CYP3A5、CYP4B1、ヒト繊維芽細胞では CYP1A1、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A5、CYP3A7、ヒトメラノサイトでは CYP1A1、CYP1B1、CYP2A6、CYP2E1 の発現が検出された。これらのうち、CYP2A6、CYP2A6、CYP2E1、CYP3A5、CYP4B1 はヒト肝にも発現が認められていることが知られているのでヒト肝 polyA+RNA (Clontech) を購入し、Reverse transcriptase-PCR 法で全長 cDNA を単離した。その他の CYP1B1、CYP2C (CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2C19)、CYP2D6 は Genecopoeia 社から購入した。これらについては、今後、塩基配列の確認の上、使用する予定である。

今回、CYP1A2 単独あるいは CYP1A2 とアリルアミン N-アセチル転移酵素 NAT2 を組み込んだチャイニーズハムスター細胞について、ヘテロサイクリックアミンの障害性を比較した。その結果、IQ については NAT2 の影響が出ているが、NAT2 をさらに組み込んでも細胞毒性が強くなるはならなかった。それに対し、PhIP については NAT2 を発現した細胞で、CYP1A2 単独より細胞毒性が強くなり発現した。このことより、これらヘテロサイクリックアミンについては、細胞障害性が代謝活性化酵素の導入により確認された。

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。

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。□-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

##### C-6-1) 閾値の検討のための統計解析法

閾値を実験的に求めるには、用量  $d$  を複数の水準  $d_1$ 、 $d_2$ 、 $\dots$ 、 $d_a$  に設定して、反応  $Y_1$ 、 $Y_2$ 、 $\dots$ 、 $Y_a$  を観測する実験を行うのが標準である。このデータで閾値の有無を検討するには、まず、用量反応関係を表す関数  $y=f(d; \square)$  を想定する。この関数の中に閾値を表すパラメータを入れる。たとえば直線回帰であれば、勾配が正で切片が負であることが閾値の存在を意味する。問題の定式化においては、このように、閾値を表すパラメータを入れたモデルを想定するのが統計学的接近法である。

このように問題を設定したとき、統計学的に閾値の有無を判定することは、パラメータについての帰無仮説を、ある対立仮説において十分な検出力で棄却する問題となる。この問題は、対立仮説を限定しない限り有限のサンプルサイズでは解答できない。したがって、

閾値の有無を統計的方法で判定するには、用量反応関係を生物学的に限定することが必要になる。たとえば、平林ら(2003)は、このような限定したモデルでの選択を通して、閾値の存在についての主張を行っている。

本研究では、このやり方で問題に接近するのが統計的に閾値問題を扱う一つの方法論であるということを、*in vivo* 実験データに即して明らかにした。

##### C-6-2) MLA の統計解析法

###### C-6-2-1) シミュレーションデータでの検討

第 1 種の過誤 (実質有意水準) を 1% に共通に設定したときの検出力は、用量反応パターンに依存して変わるが、 $2 \times 4 = 8$  パターンの全体に対して比較的共通に高い検出力を保っていたのは、2 次回帰検定で、以下が、大森法、Dunnett 型検定、1 次回帰検定の順であった。

###### C-6-2-2) 実データに基づく検討

一致度を評価指標にした場合、性能の良さは、大森法、Dunnett 型検定、1 次回帰検定、2 次回帰検定の順であった。実質有意水準は 0.3%~0.1% が最良であった。

用量変数は用量そのままでも順位変換をしたものでも、大差なかった。反応変数は MF そのままでも、対数を取った LMF でも、大差なかった。

マイクロウェル MLA の方が、一般にアガール MLA より高い検出力を保持していた。

###### C-6-2-3) アガール MLA 法の性能評価

アガール法での変異強度 MF は  $(cm/cs) \times (fs/fm)$  で与えられる。 $cm$  は変異を観測するプレートにおけるコロニー数、 $cs$  は生存を観測するプレートにおけるコロニー数、 $fm$ 、 $fs$  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、 $(\pi m / \pi s)^2 (1/(f_m \pi m) + (1/(f_s \pi s)))$  となる。 $\pi m$ 、 $\pi s$  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、マイクロウェ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-6-3) 3次元皮膚モデルにおける ET50 推定 C-6-3-1) 区間推定法

用量反応関係として、吸光度に対するロジスティックモデルを想定し、最小二乗法で推定したとき、実際に信頼区間が得られるのは、全体の 63%程度であり、他の場合には信頼区間が得られないことが分かった。そこで、ロジスティック回帰法で推定値が求まらないときは、対数時間直線法を用いるという方法を考案したところ、信頼区間が得られる場合が、97%まで上昇した。

### C-6-3-2) 実験時点の設定

ここで対象としている Vitrolife Skin を用いた試験は、実験の進め方や費用・労力の関係で、ET50 が推定可能という範囲で、選択する時点数をなるべく小さくしたい。そのために必要な時点数と測定時点の検討を行ったところ、時点数としては少なくとも 4 時点、できれば最低でも 5 時点が望ましい、という結果になった。

測定時点が 4 時点の場合は、測定時点として、1 時間後と 24 時間後という両端の他に、予想される ET50 値の前後に 2 時間外れたところで測定を行うことが望ましい。もし、5 時点の測定が可能であれば、予想 ET50 の時点でも測定を行うのが精度上望ましい。

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時間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-6-3-3) 簡便な ET50 推定法

現実のバリデーション研究の実験データおよびそれを模したシミュレーションデータについての検討によって、(1) 予備実験の結果皮膚刺激性が強いと判定されて本実験を行ったところ時間反応関係が明瞭でなかった場合は、時点を皮膚刺激性が中程度とした 5 時点の再実験を行う、(2) 予備実験の結果皮膚刺激性が中程度と判定されて本実験を行ったところ時間反応関係が明瞭で無かった場合は、実験時点を新しい 5 時点として再実験を行う、(3) 予備実験の結果皮膚刺激性が弱と判定されて本実験を行った結果細胞生存率が 50%以下となった場合は、皮膚刺激性が中程度として再実験を行う、(4) それ以外の場合は対数時間直線法を採用して皮膚刺激性を評価する、という手順を考案した。その適用可能性を実際のバリデーションデータとそれを模したシミュレーションデータに適用したところ、その性能は、昨年の研究で提案した 2 段階法とほぼ同等であった。

### C-6-4) 光毒性試験代替法の吟味

バリデーション研究に参加した 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。

### C-6-5) 最適割付法

前記の研究方法に基づいて、全列挙算法を計算機プログラムとして作成した。そのプログラムを用いて、全列挙を行い、D-最適化規準値を計算した。その結果、各施設に割り付

けられた被験物質の組み合わせのパターンがなるべく異なっている、という性質の割付計画が最適であることが分かった。実事例のバリデーション研究で用いられた割付は、きわめて最適割付に近い性能を持っていることが分かった。

#### C-6-6) 技術易移転性の評価法

試験法提案施設では、5~10回の反復実験のデータが背景データとして存在することを前提とした。技術易移転性を評価するのに、1段階目で能力が格段に劣る外れ施設を検出する方法を取り入れた。これには背景データにおける施設内ばらつきを標準的変動とした3シグマ法を用いた。3シグマ法で限界値を超えた外れ施設が少数(2割以下)であった場合、その施設を技術水準の低い施設とし、その施設のデータを施設間再現性の評価に用いないという方法を考案した。もし、外れ施設が多い場合は、無条件に、技術易移転性が低いと評価することとした。第2段階目では、混合モデルで施設間再現性を評価する方法を考案した。多数の場合は試験法の問題とした。指標としては、次式で定義される分散成分比  $r$  を用いることとした。

$$r = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_b^2 + \sigma_e^2}$$

添え字の  $a$ ,  $b$ ,  $e$  はそれぞれ、施設間変動、実験間変動、誤差変動を表している。すなわち、 $r$  は、総分散(施設間分散成分、実験間分散成分、繰り返し誤差)に占める施設間分散成分の割合である。

実際の LLNA-DA 法バリデーション研究に即したシミュレーション実験を設定して、 $r$  とその 95% 信頼区間を算出した。 $r$  は 0 から 1 までの値をとり、値が小さいことが、技術易移転性の高さを意味している。

$r$  がどの程度であれば技術易移転性が十分であるかを調べるために、 $r$  のいろいろな値について、シミュレーションデータを作成し、実験家の目での評価を試みた。その結果、 $r$  が 0.5 以下であれば、技術易移転性が高いとは判断できると考えられた。

#### C-7) バリデーションデータの管理と解析

##### C-7-1) 代替可能性の指標

表3は、表1に示されているデータを2×2分割表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4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% (8/20)、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78.1% (3.13/4)、47.5% (2.37/5)、63.9% (5.75/9) となる。提案法では、分母の数が物質数になっている点が大きく異なる点となる。

表4 2×2分割表

		動物験	
		陽性	陰性
代替	陽性	15 (P:10, E5)	12 (P9, E3)
	陰性	1	8
		16	20

P: 代替陽性 E: 代替陰性

##### C-7-2) 施設間差の指標の検討

表5に表4のデータにもとづく各物質各濃度の  $\exp(\tau^2)$  の値を示す。

表5 各濃度の  $\exp(\tau^2)$

Dinitrochlorobenzene		Isoeugenol		pABA	
Conc. (%)	$\exp(\tau^2)$	Conc. (%)	$\exp(\tau^2)$	Conc. (%)	$\exp(\tau^2)$
0.01	1.10	0.25	1.60	0.5	1.01
0.025	1.07	0.5	1.26	1	1.00
0.05	1.00	1	1.38	2.5	1.00
0.1	1.02	2.5	1.07	5	1.04
0.25	1.29	5	1.00	10	1.00

表5の中で、 $\exp(\tau^2)$ の最大値は Isoeugenol の0.25%の1.60である。表2から3施設のSI (Var(SI))は、それぞれ2.90 (0.24)、0.73 (0.03)、1.23 (0.18)であり、分散が小さい割にSIのばらつきが大きいことがわかる。Dinitrochlorobenzeneの0.25%ではSI (Var(SI))は38.16(75.38)、78.61(128.18)、24.58 (112.59)であり、 $\exp(\tau^2)$ の値は1.29と1.60よりも小さい。SIの値のみをみると施設間のばらつきは大きいように見えるが、個々のSIのばらつきであるVar(SI)を考慮した場合、SI間のばらつきはIsoeugenolの0.25%ほどは大きくないということになる。 $\exp(\tau^2)$ は1より小さな値をとりえない。1.00くらいの値をとっているところでは、SI値のばらつきはそれほど大きくなっていないことがわかる。

##### C-7-3) データ入力ファイルの成果

データ入力ファイルを導入することでの効

果を調べるために以前に実施されたバリデーション研究と同一の項目で、データクリーニングに要した項目を調べた。表6は「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システム」での問い合わせの結果である。「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システム」のバリデーション研究で集められたデータファイル数は合計420ファイルであり、問合せをしたのベデータファイル数(表中II)が222ファイルであった。

以前の研究で集められたファイル数に比べ問い合わせのベファイル数が上回っていたことと比べると問い合わせの数は減らしていることがわかる。また、特に以前に実施されたバリデーション研究で問題となった項目は少なくなっており質的に問い合わせの内容が異なった結果となっていたと考えられる。

表4 各データクリーニング項目における問合せ回数と該当データファイル数

問合せ内容の項目	I: 問合せ回数、II: 該当ファイル数	
	I	II
(1) 何かしらの必要なデータが入力されていない	1	16
(2) 規定したフォーマット形式にデータが入力されていない	1	1
(3) プロトコールや事前に決められたルールに適合していない	2	48
(4) 単純な入力ミス	3	6
(5) 試験実施施設からの誤りであるとの報告	1	3
(6) 紙媒体で提出されたデータと入力された結果が一致しない	14	54
(7) その他	9	94
合計	31	222

#### C-7-4) バリデーション研究の遂行計画

図2に、LLNA-DA法バリデーション研究で行われたことをもとに作成した研究の遂行プランを示す。

この図は、これから行うバリデーション研究を計画する場合に、いつどのようなことを行うのかを把握する上で参考になるであろう。個々のバリデーション研究において、計画時にこのようなシートを作成し、大まかな日程と責任をもつ担当を決めておくことが研究のマネジメントという観点からも、研究者間の理解の上でも役に立つであろう。

研究参加者が決まるまでの準備		
・実験手順書の案の作成		
・研究計画書の案の作成		
・研究にかかる費用の試算		
参加施設の公募→研究参加者の決定		
・参加研究者の決定		
・実験実施施設の公募と決定		
・実験条件の確認		
・スケジュールの確認		
・実験手順書案の確認		
・研究計画書案の確認		
技術研修までの準備		
・試料の準備		
・被験物質の選定		
・技術研修会の準備		
・被験物質の割付		
・実験記録用紙の作成		
・データ入力ファイルの作成		
・実験期間スケジュールの調整		
・データ解析の計画		
技術研修		
・研究計画書、実験手順書、記録用紙、データ入力ファイルの確認		
・技術研修会の実施		
・技術研修を通じて生じた疑問の確認		
予備実験までの準備		
・試料の配布		
・実験に使用する機器の準備(校正等)		
・(予備実験用)記録用紙の配布		
・(予備実験用)データ入力ファイルの配布		
予備実験		
・予備実験の実施		
・記録用紙への記入と提出		
・データ入力ファイルへの記入と提出		
・予備実験のデータ解析		
予備実験結果の検討		
・予備実験結果の確認		
・実験手順書の改訂に関する検討		
・本実験を行うか否かの決定		
・スケジュールの再確認		
・研究計画の確認		
・実験手順書の確認		
本実験まで		
・研究計画書の固定		
・実験手順書の固定		
・試料の配布		
・(本実験用)記録用紙の配布		
・(本実験用)データ入力ファイルの配布		
本実験		
・本実験の実施		
・記録用紙への記入と提出		
・データ入力シートへの記入と提出		
本実験後		
・記録用紙の記入内容の確認		
・データクリーニング		
・データ解析		
本実験の結果の検討		
・本実験の結果の検討		
報告書の作成		
・報告書の作成		

図2 バリデーション研究の研究遂行プラン

#### D. 結論

- 1) 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のために支出することが決まった。
- 2) EEUの化粧品指令第7次改正に関し、2004年3月初旬までに約7割の加盟国が国内法を整備した。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年および2013年が迫りつつある。
- 3) 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。
  - 4) 米国では4種の眼刺激性試験代替法がICCVAMにより評価された。
  - 5) OECDではin vitroの光毒性試験、経皮吸収試験、皮膚腐食性試験(Transcutaneous Electrical Resistance TestおよびHuman Skin Model Test)がコーディネーター会議で採択された。2006年には、さらに「皮膚腐食性のためのIn vitro膜バリアー試験法(435)」が記載された。
  - 6) 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。
  - 7) 酵母光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バッテリーの多施設バリデーション報告を評価委員会で評価し再現性の良い方法であると認めた。しかし、酵母試験の反応ダイナミックレンジを大きくする必要があった。そこで、プロトコルを改善し、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。よって、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。
  - 8) 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法およびLLNA-BrdU法)を一次評価した。両試験とも良好な評価が得られたものの、バリデーション結果が不十分であった。実施したバリデーション研究では、LLNA-DA法において、12の被験物質の濃度範囲で得られた結果はLLNA法と同程度であり、キャッチアップバリデーション研究として受け入れられるものである。
 

一方、LLNA-BrdUバリデーション試験については、現在実施中であり、まだ結論は得られていない。
  - 8) 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。これらモデルについて、第三者評価を実施している。
  - 9) ヒト由来細胞株(THP-1、U-937)を用い、CD86やCD54発現亢進を指標にした感作性試験代替法を開発した。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。さらに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。
  - 10) 光感作性試験代替法の開発においては、ヒト表皮角化細胞を用い、アポトーシス誘導を指標とするIn vitro光アレルギー性試験を検討し、フローサイトメトリー法で解析する方法を確立し、非常に簡便でかつ鋭敏な方法であることを示した。また、in vitro光アレルギー性試験で光感作性物質がHaCaT細胞に対し、ネクローシスより10倍低い濃度でアポトーシスを起こした。さらに、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およびIP-10の産生の変化を確認した。
  - 11) 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、S9mix存在および非存在下で21化学物質の細胞毒性のIC<sub>50</sub>値を求め、LD<sub>50</sub>値および反復投与毒性の無影響量との相関を調べたが、6時間処理では良い相関は得られなかったが、24時間処理では相関は著しく改善された。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が毒性発現に大きく関与していることが推測された。
  - 12) 代謝活性化能を含む細胞の開発においては、皮膚構成細胞に発現するP450分子種を明らかにした。また、CYP1A2を組み込んだ細胞系を用いてヘテロサイクリックアミン2種の代謝活性化による殺細胞作用を検討したが、皮膚腐食性評価の指標としては不十分であった。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。さらに、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) 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ndataの統計解析においては、遺伝毒性や発がん性における閾値存在について、*in vitro* 試験で用量反応関係がある閾値に限定できる場合は、統計学的な判断が可能であるということを論証した。マウスリンフォーマ試験の解析には大森法が最良であることを示した。ヒト皮膚 3 次元モデルを用いた皮膚刺激性試験においてミスが起こりにくいデータ入力フォーマットを作成するとともに、データクリーニングの手順書を作成した。

- 14) ET50 の推定法についてロジスティックモデルと対数線形モデルの併用が有効であることを確かめた。

ET50 の区間推定法、アガール MLA 法の性能評価、およ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。

- 15) 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のできる数々の知見を得た。

## F. 引用文献

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 大野泰雄、動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受け入れの現状. 国立医薬品食品衛生研究所報告 122, 1-10, 2004
- 2) 豊田英一、 “香粧品リスクアセスメントに関するグローバル動向と課題”、日本香

粧品科学会誌、28, 288-291, 2004.

- 3) 田中憲穂：医療用具の製品化を目的とした前臨床試験、バイオマテリアル-生体材料- 22:320-327(2004)
- 4) 田中憲穂：照射食品の遺伝的安全性試験、食品照射 39:13-27(2004)
- 5) 西山 智, 吉村 功. 複合最大対比法の提案とその毒性試験データ解析への応用. 計量生物学, 25, 1--8, 2004.
- 6) K. Toda, S. Ishida, K. Nakata, R. Matsuda, S. Ozawa, J. Sawada, Y. Ohno, K. Inoue, K. Shudo and Y. Hayashi: Improvement in reliability of probabilistic test of significant differences in GeneChip experiments. Anal. Sci., 20, 731-733, 2004.
- 7) 大野泰雄、日本における動物実験代替法の開発と活動状況. Fragrance J. 33, 1-14, 2005.
- 8) 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)
- 9) 大野泰雄、酒見和枝、籾内桃子、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)
- 10) 豊田英一、 “動物実験代替法の国際動向とハーモナイゼーション”、Fragrance J. 33, 15-21, 2005.
- 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) Hongo T, Kajikawa M, Ishida S, Ozawa S, Ohno Y, Sawada J, Umezawa A, Ishikawa S, Kobayashi T, and Honda H: Three-Dimensional High-Density Culture of Hep G2 Cells in a 5-ml Radial-flow Bioreactor for Construction of Artificial Liver. J, Bioscience and Bioengineering, 99, No 3, 237-244, 2005
- 24) 31) Chiba Y., Matsuyama Y., Sato T., Yoshimura I. A simulation study for a linear measurement error model when error variances varied between measurements. Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics (To appear), 2005.
- 25) Tokura Y: Photocontact dermatitis: from basic photobiology to clinical relevance. J Environ Dermatol 12: 71-77, 2005.
- 26) 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
- 27) 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.
- 28) 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
- 29) 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.
- 30) Urita M, Shimauchi T, Kobayashi M, Kabashima K, Tokura Y: Induction of keratinocyte apoptosis by photosensitizing chemicals plus UVA. (投稿中)
- 31) 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)
- 32) 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)
- 33) 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)
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) 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.
- 37) 戸倉新樹: 薬剤性光線過敏症. 臨床と研究 83: 87-90, 2006.
- 38) 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.
- 39) 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 齋田俊明, 飯塚一編 221-224, 2007.
- 40) 荒川京子, 田中憲徳, 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
- 41) 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., 149-156, 2006.
- 42) 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, 767-773, 2006.
- 43) 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, 774-784, 2006.
- 44) 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
- 45) 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. 53
- 46) 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)
- 47) Seok KJ, Wanibuchi H, Morimura K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Yoshimura I, Fukushima S. Existence of a no effect level for MelQx hepatocarcinogenicity on a background of thioacetamide-induced liver damage in rats, Cancer Science, 37, 453-458, 2006.
- 48) 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.
- 49) 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.
- 50) 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.
- 51) 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.
- 52) 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).
- 53) 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.
- 54) Omori, T. (2006) A measure evaluating relevance of a validation study of alternatives to animal testing, AATEX, 12, 25-31.
- 55) 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).
- 56) 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)
- 57) 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)
- 58) Takumi Hara, Takashi Nishikawa, Hajime Sui, Kumiko Kawakami Hirofumi Matsumoto 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)
- 59) 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)

## 2. 学会発表

- 1) Yasuo Ohno, GLP regulation in Japan, Korea and China and Its Contribution to Animal Welfare, "Balancing Animal Welfare and Regulatory Compliance Issues in Preclinical Studies" supported by FDA, NIH, USDA, AALAC. Detroit Metropolitan Airport Westin Hotel, June 29-30, 2004.
- 2) 本郷有克、梶河真理子、石田誠一、小澤正吾、大野泰雄、澤田純一、梅沢 彰、石川陽一: 高密度3次元培養時におけるヒト肝ガン由来細胞 HepG2 の機能評価 第三回日本再生医療学会総会 (2004. 3)
- 3) 本郷有克、梶河真理子、石田誠一、小澤正吾、大野泰雄、澤田純一、梅沢 彰、石川陽一: 高密度3次元培養時におけるヒト肝ガン由来細胞 HepG2 の機能評価 日本生物工学会平成16年度大会 名古屋(2004)
- 4) 豊田英一、"動物実験代替法に関する国際動向と開発の現状"、大阪化粧品技術者会セミナー、2004.
- 5) 豊田英一、"EUにおける動物実験の規制"、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、2004.
- 6) 森 眞輝、穂谷昌利、杉山真理子、板垣 宏、豊田英一、"In vivo 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、2004.
- 7) 上月裕一、山下富義、市川秀之、板垣 宏、橋田 充、豊田英一、“包括的経皮吸収評価法の開発”、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、2004.
- 8) 北垣雅人、若栗 忍、板垣 宏、田中憲徳、豊田英一、“急性毒性試験代替法の開発(2) II. 2施設間における急性毒性試験を予測するための2種の細胞毒性試験の評価”、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、2004.
- 9) 若栗 忍、北垣雅人、板垣 宏、豊田英一、田中憲徳、“急性毒性試験代替法の開発(2) 1. 2施設間における2種の細胞毒性試験の安定性”、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、2004.
- 10) 豊田英一、“化粧品リスクアセスメントに関するグローバル動向と課題”、日本化粧品科学会第29回学術大会、2004.
- 11) 田中憲徳：生殖細胞および培養細胞を用いた遺伝毒性試験法の開発と国際標準化への貢献(学会賞講演)、日本環境変異原学会、2004年11月、長崎
- 12) 浅田晋、佐々木澄志、山影康次、田中憲徳、梅田誠：Bhas42細胞を用いた抗形質転換作用検出系の確立とその応用、日本環境変異原学会、2004年11月、長崎
- 13) 中川ゆづき、田中憲徳：In vitro小核試験およびプラスミドDNA切断性試験を用いたコウジ酸の光遺伝作用の検討、日本環境変異原学会、2004年11月、長崎
- 14) 田中憲徳、板垣宏、今井弘一、大野泰雄、大森 崇、岡本裕子、川端留美、小島肇夫、土肥孝彰、藤田百合子、畑尾正人、笛木修、若栗忍、吉村 功：酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験を用いた光阻害試験：バッテリーのバリデーションおよび評価委員会での検討中間報告、日本動物実験代替法学会、2004年11月、長崎
- 15) 吉村 功、板垣 宏、大野泰雄、大森 崇、岡本裕子、川端留美、小島肇夫、田中憲徳、谷川浩子、土肥孝彰、長谷川靖司、藤田百合子、穂谷昌利、森 真輝、若栗 忍、：酵母-赤血球試験の光毒性試験代替法としてのバリデーション研究、日本動物実験代替法学会、2004年11月、長崎
- 16) 本郷有克、若栗 忍、石川陽一、梅田 誠、田中憲徳：基礎代謝としてのグルコース取り込みを指標とする細胞毒性試験、日本動物実験代替法学会、2004年11月、長崎
- 17) 渡辺美香、小林美和子、若栗忍、佐々木澄志、山陰康次、倉田信弘、田中憲徳：試験法および細胞種の違いによる細胞毒性試験結果の検討、日本動物実験代替法学会、2004年11月、長崎
- 18) 北垣雅人、若栗忍、板垣宏、田中憲徳、豊田英一：急性毒性試験代替法の検討(2) II. 2施設間における急性毒性試験を予測するための2種の細胞毒性試験の評価、日本動物実験代替法学会、2004年11月、長崎
- 19) 若栗忍、北垣雅人、板垣宏、田中憲徳、豊田英一：急性毒性試験代替法の検討(2) I. 2施設間における2種の細胞毒性試験の安定性、日本動物実験代替法学会、2004年11月、長崎
- 20) 吉村功. 生物統計の視点から考えられる閾値問題. 第31回日本トキシコロジー学会学術年会, 大阪国際会議場, 大阪, 2004. 7. 6-8.
- 21) 吉村功. 統計家からの疑問- インビトロ試験のデータから定量的結論を導く音は邪道か?. 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, 長崎ブリックホール, 長崎, 2004. 11. 30- 12. 2.
- 22) 白石亜矢子他. 皮膚刺激性試験代替法としての Vitrolife-skin 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, 長崎ブリックホール, 長崎, 2004. 11. 30- 12. 2.
- 23) 大野泰雄他. 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. 日本代替法学会学術年会, 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, 長崎ブリックホール, 長崎, 2004. 11. 30- 12. 2.
- 24) 田中憲徳他. 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バリデーションおよび評価委員会での検討中間報告. 日本代替法学会学術年

- 会, 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, 長崎ブリックホール, 長崎, 2004.11.30-12.2.
- 25) 吉村功他. 酵母赤血球試験の光毒性試験代替法としてのバリデーション研究. 日本代替法学会学術年会, 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, 長崎ブリックホール, 長崎, 2004.11.30-12.2.
- 26) 宮島敦子, 小澤正吾, 何晋徳, 田中宏昌, 仲井健也, 簾内桃子, 上川雄一郎, 窪田敬一, 緒方宏泰, 大野泰雄. ヒト肝におけるCYP1A, 2B, 2C, 3A 遺伝子および関連核内受容体遺伝子の発現量の個体差. 日本薬学会第125年会(横浜)2005年3月
- 27) 足利太可雄, 坂口 斉, 米山桂子, 菌 さき子, 宮澤正明, 吉田雪子, 伊藤勇一, 鈴木尋之, 板垣 宏, 豊田英一, “Relationship between CD86/CD54 expression and cell viability in in vitro skin sensitization test of water-soluble chemicals using THP-1 cells”, Society of Toxicology 44th annual meeting, 2005.
- 28) 坂口 斉, 足利太可雄, 宮澤正明, 吉田雪子, 伊藤勇一, 米山桂子, 菌 さき子, 板垣宏, 豊田英一, 鈴木尋之, “The relationship between CD86/CD54 expression and cell viability on in vitro skin sensitization test using THP-1 cells, in the case of water-insoluble chemical”, Society of Toxicology 44th annual meeting, 2005.
- 29) 島内隆寿他. Narrowband-UVB によるケラチノサイトのアポトーシス誘導は broadband-UVB より遅延する. 第34回 UV-ABCub, 幕張プリンスホテル, 千葉, 2005. 3.19-20.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) Ashikaga T. and Sakaguchi H., “The optimization of h-CLAT (human Cell Line Activation Test) protocol and inter-laboratory validation study”, Proceeding of 5<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 105, 2005.
- 33) Sakaguchi H. and Ashikaga T., Results of a Ring Trial of a Human Cell Line Activation Test for Predicting Skin Sensitization Potential, Proceeding of 5<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 108, 2005.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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)
- 38) 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)
- 39) 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)
- 40) Noriho Tanaka: The Activity of JSAAE -past, present and future, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005
- 41) Okamoto, Noriho Tanaka, Kouko Tanigawa and Shinobu Wakuri: 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, August, Berlin (Germany) 2005.
- 42) Shinobu Wakuri, Yutaka Matsumoto, Makoto Hayashi and Noriho Tanaka: Application of in vitro alternative methods to ecotoxicology, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005
- 43) Kiyomi Omori, Makoto Umeda, Noriho Tanaka, Hiroki Takagi, Isao Yoshimura, Kiyoshi Sasaki, Ayako Sakai, Harumi Araki, Masumori Asakura, Hiroshi Baba, Yuichi Fushiwaki, Shuichi Hamada, Nobuko Kitou, Tetsu Nakamura Yoshiyuki Nakamura, Hidetoshi Oishi, Satoshi Sasaki, Sawako Shimada, Toshiyuki Tsuchiya, Yoshifumi Uno, Masataka Washizuka, Satoshi Yajima, Yasuhito Yamamoto, Eiji Yamamura and Tomoko Yatsushiro: Inter-laboratory collaborative study of cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells by non-genotoxic carcinogen study group in Japan, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005.
- 44) Makoto Umeda, Noriho Tanaka, Shin Asada, Kiyoshi Sasaki and Kumiko Hayashi: Detection of non-genotoxic carcinogens using ras-transfected Bhas 42 cells, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005 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.
- 45) 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.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) 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.
- 49) 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.
- 50) 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-ABCclub, 幕張プリンスホテル, 千葉, 2006. 3. 4.
- 51) 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試験法の開発研究、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 52) 浅田晋、佐々木澄志、田中憲穂、梅田誠: Bhas 42 細胞を用いるイニシエーター/プロモーターの検出、日本動物実験代替法学会、

- 2005年12月、伊勢原
- 53) 梅田誠、佐々木澄志、田中憲穂、：発ガン性試験の代替法:ECVAMでPrevalidation Studyの現状、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 54) 大森清美、梅田誠、田中憲穂、高木弘毅、吉村功、佐々木澄志、浅田晋、酒井綾子、浅倉真澄、馬場博、伏脇裕一、浜田修一、鬼頭暢子、中村哲、中村好志、大石英俊、佐々木聡、嶋田佐和子、土屋敏行、宇野芳文、鷲塚昌隆、矢嶋聡、山下康人、山村英二、八城友子：発ガン性プロモーター検出のためのBhas 42細胞を用いた細胞形質転換試験に関する共同研究結果について、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 55) 中川ゆづき、田中憲穂、：ラットFRSK細胞を用いたin vitro小核試験法、日本動物実験代替法学会、2005年12月 伊勢原
- 56) 和田昌憲、本郷有克、若栗忍、石川陽一、梅田誠、田中憲穂：培地中グルコースの消費を指標とする毒性評価法の応用、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 57) 山影康次、高橋俊孝、浅田晋、田中憲穂：In vitro光染色体異常試験における各種照射条件とその影響、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 58) 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を用いた毒性試験予測性の評価、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 59) 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-、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 60) 菌さき子、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.
- 61) 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.
- 62) 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.
- 63) 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.
- 64) 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.
- 65) 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.
- 66) 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およ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.
- 67) 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.
- 68) 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.
- 69) 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.
- 70) 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)
- 71) 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)
- 72) 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)