

200735040A

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19年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小島 肇

平成20(2008)年 4月

研究代表者

小島肇(国立医薬品食品衛生研究所 薬理部)

研究分担者

大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所)

松永佳世子(藤田保健衛生大学 医学部 皮膚科)

板垣宏(日本化粧品工業連合会 技術委員会)

山本直樹(藤田保健衛生大学 共同利用研究施設)

大森崇(京都大学大学院 医学研究科)

目 次

I. 総括研究報告	
動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と 国際協調に関する研究 -----	1
小島 肇	
II. 分担研究報告	
1. 動物実験代替法のバリデーションと第三者評価、および医薬部外品の 製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討 -----	13
小島 肇	
1) 酵母生育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた 光毒性試験代替法のバリデーション研究 -----	17
2) 皮膚感作性試験代替法LLNA-BrdU法のバリデーション -----	101
3) 皮膚感作性試験代替法LLNA-DA法の第三者評価 -----	157
4) 皮膚刺激性試験代替法試験の第三者評価 -----	327
5) 眼刺激性試験代替法の第三者評価 -----	335
6) 皮膚腐食性試験代替法の行政的な受け入れのための評価 -----	347
7) 医薬部外品の製造販売承認申請における 安全性に関する資料のあり方 -----	359
2. 三次元ヒト培養表皮モデル <i>LabCyte</i> EPI-MODELを用いた 皮膚一次刺激性評価に関する研究 -----	401
小島 肇	
3. 眼刺激性試験代替法の開発 -----	411
山本直樹	
4. バリデーションデータの統計解析（平成19年度研究）報告 -----	417
大森 崇	
5. 感作性試験代替法の開発 -----	425
大野泰雄	
6. 代替法についての国際情勢の調査 -----	433
板垣 宏	
7. ヒト接触皮膚炎評価の見直し -----	465
松永佳世子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	477
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	479

総括研究報告書

主任研究者 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

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法の開発が迫られている。そこで、本研究では動物実験代替法（以下、代替法と記す）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皮膚刺激性、眼刺激性および感作性試験の代替法の開発を目指した。また、バリデーション研究および専門家による第三者評価（以下、第三者評価と記す）により開発された試験法の行政試験法としての適性を評価した。

皮膚刺激性試験代替法の開発においては、欧州で3次元培養表皮モデル EPISKIN が承認されたものの、わが国において販売されているいくつかのヒト表皮モデルは皮膚一次刺激性の評価方法は確立されていない。本研究では、EPISKIN で定められたプロトコルに準拠して、国産のヒト表皮モデルを用いた皮膚一次刺激性試験を試みた。その結果、EPISKIN を用いたプロトコルの評価結果が、全ての皮膚モデルで再現可能とは限らない。そのため、各モデルに適したプロトコルの検討が必要であると考えられた。

眼刺激性試験代替法の開発においては、従来の眼刺激性試験代替評価法での問題点をほぼ解決できる試験系を開発するため、摘出モデルとしてブタ角膜組織片での課題を克服すること、および新規眼刺激性試験代替法としてヒト角膜由来細胞株の構築を試みた。

また、Draize 眼刺激性試験代替法のデータ利用という観点から、細胞毒性値で最大平均評価点（MAS）の値を定量的に予測できるかの検討を行った。5物質の検討では、予測結果はガイダンスで提示されている刺激のカテゴリーの範囲を超えることはなかった。よって、この方法は定量的な方法として利用可能であると思われる。

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）の試験法確立に向けた有用性を検証した。施設間再現性の検討結果や既知化合物の評価結果より、いくつか改良すべきと考えられる点が見出され、検討を行った。具体的には、予測モデル、陽性対照物質の適用濃度、および CD86/CD54 発現亢進最小濃度（EC150, 200）の算出方法の改良を行い、試験法の信頼性が向上した。

代替法に関する国際情勢の調査における本年度の特筆すべき動きとしては、EU において ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) が皮膚刺激性試験代替法として EPISKIN を、腐食性および強刺激性物質を検出するための眼刺激性試験代替法として Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay (BCOP) および Isolated Chicken Eye Test (ICE) を、REACH のための皮膚感作性試験として Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA) を承認したことが挙げられる。米国では、ICCVAM が腐食性および強刺激性物質を検出する眼粘膜刺激性試験代替法である BCOP、ICE を、急性経口毒性の開始濃度を予測する *in vitro* 細胞毒性試験を承認したことが挙げられる。また、Personal Care Products Council (PCPC)（2007年11月に CTFA から改称）から、従来の動物を用いた試験法に加え代替法を盛り込んだ Safety Evaluation Guidelines の改訂版が発行された。国内では、第6回国際動物実験代替法会議が開催され、代替法開発の促進、3Rs のグローバル化、科学者と動物福祉活動者との相互理解に重要な役割を果たした。また、2005年11月に発足した JaCVAM (Japanese Center for the Validation to Alternative Methods) はその役割の明確化し、国内外の学会、関係機関との調整、国際協調へ向けた取り組みが進み、本格的な稼動となった。

本年度はさらに、日米欧にカナダを加えた4極における化粧品規制協力国際会議 (ICCR) が初めて開催された。ICCR において、JaCVAM、ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)、ECVAM (European Center for the Validation to Alternative Methods) およびカナダ政府の担当者は、代替試験のデザインや、実施、評価についての協力を進めていくための方向性を示すよう要請された。その対応は将来の代替法開発に大きく影響してくる可能性があり、2008年に行われる次回の会議を注目する必要がある。

日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会の代表および臨床医の立場からの情報収集として、欧州5カ国を訪問し化粧品をはじめとする接触皮膚炎の研究実態を調査し、欧州において皮膚科医、化学研究者、化粧品企業の密な連携がなされていることを学び、日本においても同様なネットワーク構築が必要かつ可能であることが示された。

新規試験法の行政試験法としての適性評価については、新規に開発されたか、あるいは欧米で承認された試験法のバリデーション研究と第三者評価および医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方についての検討も行った。具体的には、バリデーション研究として、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の総括を行うとともに、2) 皮膚感作性を調べるためのLLNA法の代替法であるLLNA-BrdU法のバリデーション研究を行った。

第三者評価については、1) LLNA-DA法の評価を行い、また欧米で開発された方法における2) 皮膚刺激性試験代替法、3) 眼刺激性試験代替法の評価を開始した。

行政的な受入れのために、JaCVAM評価会議において、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行い、さらに医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方を検討するための検討組織を構築し、議論を開始した。

分担研究者

板垣 宏 (日本化粧品工業連合会
技術委員会)
大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)
大森 崇 (京都大学医学部)
松永佳世子 (藤田保健衛生大学医学部皮膚科)
山本直樹 (藤田保健衛生大学総合医学研究所)

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法の開発が迫られている。そこで、本研究では動物実験代替法(以下、代替法と記す)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代替法を開発する。また、開発された試験法の行政試験法としての適性を評価するものである。

具体的には

- 1) 化粧品や医薬品の安全性評価のために用いられている皮膚刺激性、眼刺激性および感作性試験の代替法の開発を目指す。
- 2) 代替法に関する国際情報を収集する。
- 3) 臨床医の立場から、皮膚刺激、皮膚感作性の安全性評価のデータを収集する一方、欧州5カ国を訪問し化粧品をはじめとする接触皮膚炎の研究実態を調査する。
- 4) 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をバリデーション研究および専門家による第三者評価(以下、第三者評価と記す)で確認する。

B. 研究方法

B-1) 試験法の開発

B-1-1) 皮膚刺激性試験

欧州で3次元培養表皮モデル EPISKIN が承認されたものの、わが国において販売されているいくつかのヒト表皮モデルは皮膚一次刺激性の評価方法は確立されていない。本研究では、EPISKIN で定められた Post Incubation (PI) 法のプロトコールに準拠して、国産のヒト表皮モデルを用いた皮膚一次刺激性試験を試みた。国産のヒト表皮モデルとしては、取り扱いや価格を考慮した上で、LabCyte EPI-MODEL を選択した。EPISKIN を使用する PI 法で用いられた 48 種類の被験物質のなかから、入手可能であった 45 種類の被験物質について、LabCyte EPI-MODEL を使用した PI 法を試みた。皮膚刺激性の検出には、細胞毒性試験およびサイトカイン測定試験を行い、EPISKIN の結果と比較した。また、LabCyte EPI-MODEL に最適な PI 法のプロトコールについても検討した。

B-1-2) 眼刺激性試験

BSE問題の発生以降、日本国内においてウシの眼球組織は研究機関でも入手することが禁止されていることから、日本国内でのBCOP試験を実施することは不可能である。そこで、ブタ角膜組織での代用が可能かどうかを検討した。

第2の検討として、正常ヒト角膜上皮細胞を宿主細胞として、クローン化遺伝子の発現と消失を細胞の培養環境を変化させることによって、クローン細胞にも正常細胞と同等な細胞にも可逆的に変化させることができるスタート&ストップのコントロールが可能なベクターの構築、および研究分担者が独自に開発した生細胞の状態での細胞質内標的タンパク質による細胞のソーティングを実施し、従来の眼刺激性試験代替法における課題を克

服することができる新規のヒト角膜由来細胞株法の構築を目指した。

また、IC50 から MAS を予測する方法の提案については、対数 IC50 と平均最大評価点 (MAS) との間に直線的な関係があることを前提とした。事前情報としてバリデーション研究の結果から直線のパラメータを求めた。次に、未知の被験物質を評価する施設での 3 つの同時陽性対照物質により直線を更新し、更新した直線より MAS を予測した。

B-1-3) 感作性試験

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) が日本において開発され、試験法確立に向けた有用性を検証した。施設間再現性の検討結果や既知化合物の評価結果より、いくつか改良すべきと考えられる点が見出され、検討を行った。具体的には、予測モデル、陽性対照物質の適用濃度、および CD86/CD54 発現亢進最小濃度 (EC150, 200) の算出方法を改良した。

B-2) 情報収集

B-2-1) 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, EPAA など) を定期的に検索すると共に EU については同地域の化粧品工業会との連繋を通じて実施した。その他、代替法の承認状況等については、専門学会の会誌やニュースレターも参考とした。

B-2-2) 臨床医の情報収集

平成 19 年度は、皮膚刺激、皮膚感作性試験に関わる代替法の資料を収集し検討すると同時に、ヒト臨床試験方法の資料収集と再検討を行った。

分担研究者は現在、国際接触皮膚炎研究班 (International Contact Dermatitis Research Group: ICDRG) 班員である。本研究に関連した化粧品をはじめとする接触皮膚炎の欧州の情報を得るために ICDRG の班員であるフィンランドの Kristiina Turjanmaa 博士、スウェーデンの Magnus Bruze 教授、英国の Ian R White 教授および John MacFadden 博士、ベルギーの An Goossense 教授のクリニックと研究施設を訪問した。また、欧州接触皮膚炎学会 (European Society of Contact Dermatitis: ESCD) 理事長の Jean-Pierre

Lepoittvin 教授の皮膚化学研究室を訪問し、化粧品に関わる接触皮膚炎の情報を国際的な立場で収集した。

B-3) 新規代替法の評価

日本で新規に開発されたか、あるいは欧米で承認された試験法のバリデーション研究と第三者評価、行政的受入れの評価および医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方について検討した。

B-3-1) バリデーション研究

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総括するとともに、2) 皮膚感作性を調べるための LLNA 法の代替法である LLNA-BrdU 法のバリデーション研究を行った。

B-3-2) 第三者評価

1) LLNA-DA 法の評価を行い、また 2) 皮膚刺激性試験代替法、3) 眼刺激性試験代替法の評価を開始した。

B-3-3) 行政的な受入れ評価

JaCVAM 評価会議において、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行った。

B-3-4) 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方

検討組織を構築し、議論を開始した。

C. 研究結果および考察

C-1) 試験法の開発

C-1-1) 皮膚刺激性試験

LabCyte EPI-MODEL を用いた場合、既存の PI 法のプロトコルでは、陽性一致率は高いものの、陰性一致率は非常に低いことが明らかとなった。そこで、LabCyte EPI-MODEL に適した PI 法のプロトコルについて検討した結果、後培養時間を従来よりも短縮することで、陰性一致率を高めることが可能であった。

C-1-2) 眼刺激性試験

凍結ブタ角膜組織片での評価では、牛角膜組織片と同様にフルオレセインを用いた浸透性を評価した。結果として、標準物質の無刺激と MAS25、および MAS50 の間での違いは検出されたが、無刺激でのフルオレセインの浸透性が予想よりも高かったため、ベース値が高いものとなっており、有意差を出すことは出来なかった

ヒト角膜上皮細胞株を用いた新規の眼刺激

性試験代替法用細胞の構築のため、目的遺伝子の切り出し、および約2.5kbpの特異的領域の一括での増幅について、目的遺伝子が導入されたベクターの構築に成功したといえる。次にベクターの大腸菌への選択的組み込み、および選択的大腸菌の増幅に成功した。現在、この増幅されたベクターの正常ヒト角膜上皮細胞へのトランスフェクション、および2ステップセレクションを実施するための予備検討を実施している状況である。

IC50 から MAS を予測する方法については、報告されているウサギ角膜由来細胞株を用いたクリスタルバイオレット試験 (SIRC-CVS) 法のバリデーション研究のデータを用いて、MAS の予測を行った。バリデーション研究で27物質を実験した施設のデータを用いて直線を求め、同じバリデーション研究に参加した他の施設のデータを用いて、直線の更新を行った。この施設の陽性対照ではない5物質について、MAS の予測値を求め、実測値との乖離を調べた。その結果、MAS の予測値と実測値の差の絶対値は0.9から14.4の間であった。

C-1-3) 感作性試験

従来の平均値による予測モデルを、生物反応をより適切に捉えられると考えられる個別評価に改良し、偽陰性が減少することを見出した。次に陽性対照物質である DNCB の適用推奨濃度を、過去の試験結果に基づき5.0 μ g/mL から4.0 μ g/mL に変更し、高い安定性を確認した。さらに、予測モデルの変更に伴い、CD86/CD54 発現亢進最小濃度 (EC150, 200) の算出方法も、平均値から中央値へ変更し、同時に外挿法も加えることで効率と精度の両立を可能とする算出スキームを作成した。以上の改良により、h-CLAT 法の有用性が向上した。

C-2) 情報収集

C-2-1) 海外における代替法情報の調査

EU において ECVAM (European Center for the Validation to Alternative Methods) Scientific Advisory Committee (ESAC) が皮膚刺激性試験代替法として EPISKIN を、腐食性および強刺激性物質を検出するための眼刺激性試験代替法として Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay (BCOP) および Isolated Chicken Eye Test (ICE) を、REACH のための皮膚感作性試験として Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA) を承認したことが挙げられる。米国では、

ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) が腐食性および強刺激性物質を検出する眼粘膜刺激性試験代替法である BCOP、ICE を、急性経口毒性の開始濃度を予測する *in vitro* 細胞毒性試験を承認したことが挙げられる。また、Personal Care Products Council (PCPC) (2007年11月にCTFAから改称) から、従来の動物を用いた試験法に加え代替法を盛り込んだ Safety Evaluation Guidelines の改訂版が発行された。国内では、第6回国際動物実験代替法会議が開催され、代替法開発の促進、3Rs のグローバル化、科学者と動物福祉活動者との相互理解に重要な役割を果たした。また、2005年11月に発足した JaCVAM (Japanese Center for the Validation to Alternative Methods) はその役割の明確化し、国内外の学会、関係機関との調整、国際協調へ向けた取り組みが進み、本格的な稼動となった。

本年度はさらに、日米欧にカナダを加えた4極における化粧品規制協力国際会議 (ICCR) が初めて開催された。ICCR において、JaCVAM、ICCVAM、ECVAM およびカナダ政府の担当者は、代替試験のデザインや、実施、評価についての協力を進めていくための方向性を示すよう要請された。その対応は将来の代替法開発に大きく影響してくる可能性があり、2008年に行われる次の会議を注目する必要がある。

C-2-2) 臨床医の立場から

欧州においては、パッチテスト試料が市販されて容易に入手できる。接触皮膚炎クリニックに化学分析のできる充実した皮膚科、職業皮膚科が存在する。特にベルギーでは化粧品企業と皮膚科医、化学者が協力して、CDESKPRO というコンピューターによるオンラインシステムを立ち上げており、化粧品の成分の登録、パッチテスト結果の登録、ネガティブリストの公開、パッチテストの支援システムなどが機能しており、アレルゲンの陽性率など、有用なデータがリアルタイムでだせる優れたネットワークを構築していた。

C-3) 新規代替法の評価

C-3-1) バリデーション研究

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

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、2

回のバリデーション研究を日本動物実験代替法学会に依頼し、学会バリデーション委員会の下部組織としてバリデーション実行委員会を組織して実施された。両報告書提出後に補足された議論も含めて、最終的なバリデーション報告書としてまとめた。

2) 皮膚感作性を調べるための LLNA 法の代替法である LLNA-BrdU 法のバリデーション研究

皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA) の放射性同位元素 (RI) 標識化合物を用いない代替法 (LLNA-BrdU 法) の多施設バリデーション研究を日本動物実験代替法学会に依頼し、学会バリデーション委員会の下部組織としてバリデーション実行委員会を組織して実施された。このバリデーション研究の結果、12 の被験物質の濃度範囲で得られた結果から、LLNA-BrdU 法は LLNA 法と比較してバラツキが大きく、試験法の改良が必要であると結論された。

C-3-2) 第三者評価

1) LLNA-DA 法の評価

ダイセル化学工業 (株) から提案のあった皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA) の放射性同位元素 (RI) 標識化合物を用いない代替法 (LLNA-DA 法) は、欧米に比較し RI の管理に厳しい本邦でも容易に実施できることから LLNA 法に比較して利点があると判断された。また、LLNA-DA 法は施設内再現性および施設間再現性が高く、LLNA 法との結果の対応性が高く、皮膚感作性を評価する LLNA 法の代替として有用であると判断された。

2) 皮膚刺激性試験代替法

皮膚刺激性試験代替法として欧州で認証されている EPISKIN について、専門家による第三者評価を実施している。

3) 眼刺激性試験代替法

眼刺激性試験代替法として欧米で認証されている BCOP や ICE について、専門家による第三者評価を実施している。

B-3-3) 行政的な受入れ評価

ヒト皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法

皮膚腐食性試験代替法としての皮膚三次元モデル (Vitrolife-Skin™) においては、多施設

バリデーションにおいて、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ことから、第三者評価を実施している。

B-3-4) 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方

医薬部外品 (薬用化粧品) の安全性評価ガイドラインの中で動物実験代替法をどう使いこなしていくか検討するため、医薬部外品に関係の深い委員による「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会 (以降、あり方検討会) と記す」を設立した。このあり方検討会の下に、さらに皮膚刺激性、感作性、皮膚透過性・経皮吸収、光関連毒性、遺伝毒性、眼刺激性の 6 分科会を設立し、検討作業を進めている。

D. 結論

- 1) 皮膚刺激性試験代替法の開発では、EPISKIN を用いた方法の評価結果が、全ての皮膚モデルで再現可能とは限らない。そのため、各モデルに適したプロトコルの検討が必要である。LabCyte EPI-MODEL の場合、後培養時間を短縮した方が *in vivo* データとの一致率が高いと考察された。
- 2) 眼刺激性試験代替法の開発では、凍結ブタ角膜組織片を、BCOP と同様にフルオレセインを用いた浸透性を評価した結果、標準物質の無刺激と MAS25、および MAS50 の間での違いは検出されたが、無刺激でのフルオレセインの浸透性が予想よりも高かったため、有意差を出すことは出来なかった。
- 3) 眼刺激性試験代替法の開発では、正常ヒト角膜上皮細胞を用いた新規の眼刺激性試験代替法用細胞の構築のため、目的遺伝子の切り出し、および約 2.5kbp の特異的領域の一括での増幅について、目的遺伝子が導入されたベクターの構築に成功した。
- 4) 眼刺激性試験における IC50 から MAS を予測する方法においては、5 物質の検討では、予測結果はガイダンスで提示されている刺激のカテゴリーの範囲を超えることはなかった。よって、この方法は定量的な方法として利用可能であると思われる。しかしながら、理論的な課題と方法論のさらなる評価が必要である。
- 5) 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 では、方法の改良を行った。

- まず予測モデルを個別評価に改良し、次に陽性対照物質である DNCB の適用推奨濃度を、4.0 µg/mL に変更し、CD86/CD54 発現亢進最小濃度 (EC150, 200) の算出方法を中央値へ変更した。以上の改良により、h-CLAT 法の有用性が向上した。
- 6) EU において ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) が皮膚刺激性試験代替法として EPISKIN を、腐食性および強刺激性物質を検出するための眼刺激性試験代替法として BCOP および ICE を、REACH のための皮膚感作性試験として rLLNA を承認した。
 - 7) ICCVAM が腐食性および強刺激性物質を検出する眼粘膜刺激性試験代替法である BCOP、ICE を、急性経口毒性の開始濃度を予測する *in vitro* 細胞毒性試験を承認した
 - 8) PCPC から、従来の動物を用いた試験法に加え代替法を盛り込んだ Safety Evaluation Guidelines の改訂版が発行された
 - 9) 第 6 回国際動物実験代替法会議が開催され、代替法開発の促進、3Rs のグローバル化、科学者と動物福祉活動者との相互理解に重要な役割を果たした。
 - 10) JaCVAM はその役割の明確化、国内外の学会、関係機関との調整、国際協調へ向けた取り組みが進み、本格的な稼動となった。
 - 11) 日米欧にカナダを加えた 4 極における化粧品規制協力国際会議 (ICCR) が初めて開催された。ICCR において、JaCVAM、ICCVAM、ECVAM およびカナダ政府の担当者は、代替試験のデザインや、実施、評価についての協力を進めていくための方向性を示すよう要請された。
 - 12) 皮膚感作性試験については今後さらなるデータを集積して評価する必要がある。欧州の化粧品アレルゲン登録制度システムと同様なシステムの構築が待たれる。
 - 13) 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、2 回のバリデーション研究を両報告書提出後に補足された議論も含めて、最終的なバリデーション報告書としてまとめた。
 - 14) 皮膚感作性試験 LLNA の放射性同位元素 (RI) 標識化合物を用いない代替法 (LLNA-BrdU 法) の多施設バリデーション研究が実施された。この結果、LLNA-BrdU 法は LLNA 法と比較してバラツキが大きく、試験法の改良が必要であると結論された。
 - 15) 皮膚感作性試験 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) は、施設内再現性および施設間再現性が高く、LLNA 法との結果の対応性が高く、皮膚感作性を評価する LLNA 法の代替として有用であると判断された。
 - 16) 皮膚刺激性試験代替法、眼刺激性試験代替法の評価を開始した。
 - 17) 皮膚腐食性試験代替法としての皮膚三次元モデル (Vitrolife-Skin™) においては、多施設バリデーションにおいて、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ことから、行政的な受入れのために第三者評価を実施している。
 - 18) 医薬部外品 (薬用化粧品) の安全性評価ガイドラインの中で動物実験代替法をどう使いこなしていくか検討するため、「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会」を設立した。このあり方検討会の下に、さらに皮膚刺激性、感作性、皮膚透過性・経皮吸収、光関連毒性、遺伝毒性、眼刺激性の 6 分科会を設立し、検討作業を進めている。
- F. 引用文献
なし
- G. 研究発表
G-1) 論文発表
- 1) 大野泰雄：動物福祉と動物実験代替法への考慮の必要性について。Biophilia 3, 4-5 (2007)
 - 2) 大野泰雄：動物実験代替法の国際動向。Fragrance Journal 10, 20-28 (2007)
 - 3) 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。日本薬理学雑誌 印刷中
 - 4) 大野泰雄：WC6 (第 6 回国際動物実験代替法会議) を終えて。日本動物実験代替法学会 News Letter. 34, 2-4. 2007.
 - 5) Ashikaga T., Sakaguchi H., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yamada T., Yoshida M., Ota N., Hasegawa S., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Kosaka N, Sono S and Ohno Y., "Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study", AATEX

ゼーション、科学者と動物福祉活動者との相互理解に重要な役割を果たした。

- 10) JaCVAM はその役割の明確化、国内外の学会、関係機関との調整、国際協調へ向けた取り組みが進み、本格的な稼動となった。
- 11) 日米欧にカナダを加えた 4 極における化粧品規制協力国際会議 (ICCR) が初めて開催された。ICCR において、JaCVAM、ICCVAM、ECVAM およびカナダ政府の担当者は、代替試験のデザインや、実施、評価についての協力を進めていくための方向性を示すよう要請された。
- 12) 皮膚感作性試験については今後さらなるデータを集積して評価する必要がある。欧州の化粧品アレルギー登録制度システムと同様なシステムの構築が待たれる。
- 13) 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、2 回のバリデーション研究を両報告書提出後に補足された議論も含めて、最終的なバリデーション報告書としてまとめた。
- 14) 皮膚感作性試験 LLNA の放射性同位元素 (RI) 標識化合物を用いない代替法 (LLNA-BrdU 法) の多施設バリデーション研究が実施された。この結果、LLNA-BrdU 法は LLNA 法と比較してバラツキが大きく、試験法の改良が必要であると結論された。
- 15) 皮膚感作性試験 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) は、施設内再現性および施設間再現性が高く、LLNA 法との結果の対応性が高く、皮膚感作性を評価する LLNA 法の代替として有用であると判断された。
- 16) 皮膚刺激性試験代替法、眼刺激性試験代替法の評価を開始した。
- 17) 皮膚腐食性試験代替法としての皮膚三次元モデル (Vitrolife-Skin™) においては、多施設バリデーションにおいて、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ことから、行政的な受入れのために第三者評価を実施している。
- 18) 医薬部外品 (薬用化粧品) の安全性評価ガイドラインの中で動物実験代替法をどう使いこなしていくか検討するため、「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会」を設立した。このあり方検討会の下に、さらに皮膚刺激性、感作性、皮膚透過性・経皮吸収、光関

連毒性、遺伝毒性、眼刺激性の 6 分科会を設立し、検討作業を進めている。

F. 引用文献

なし

G. 研究発表

G-1) 論文発表

- 1) 大野泰雄：動物福祉と動物実験代替法への考慮の必要性について、*Biophilia* 3, 4-5 (2007)
- 2) 大野泰雄：動物実験代替法の国際動向。*Fragrance Journal* 10, 20-28 (2007)
- 3) 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。日本薬理学雑誌 印刷中
- 4) 大野泰雄：WC6 (第 6 回国際動物実験代替法会議) を終えて。日本動物実験代替法学会 *News Letter*. 34, 2-4. 2007.
- 5) Ashikaga T., Sakaguchi H., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yamada T., Yoshida M., Ota N., Hasegawa S., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Kosaka N., Sono S and Ohno Y., "Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study", *AATEX* 13 (1), 27-35, 2008.
- 6) Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Yamada T., Yoshida M., Kodama T., Sono S., Ashikaga T., Sato J., Ohta N., Hasegawa S., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H. and Ohno Y., "A study of the criteria for THP-1 cells selection in the human Cell Line Activation Test (h-CLAT)" submitted.
- 7) Sono S., Yamada T., Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yoshida M., Ota N., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H., Hasegawa S., Ashikaga T. and Ohno Yasuo, "Results of a Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (3rd Report): Effect of serum difference" submitted.
- 8) Mizuno M., Yoshida M., Kodama T., Kosaka N., Okamoto K., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Ashikaga T., Kuwahara H., Sakaguchi H., Sato J., Ota N., Okamoto Y.

Hirohiko Goto, Tomohiko Hanada, Taketo Inoda, Tadashi Kosaka, Eiji Maki, Takashi Morimoto, Shinsuke Shinoda, Naoki Shinoda, Masahiro Takeyoshi, Masashi Tanaka, Mamoru Uratani, Masahito Usami, Atsushi Yamanaka, Tomofumi Yoneda, Isao Yoshimura and Atsuko Yuasa, Validation studies on an alternative endpoint for the local lymph node assay (LLNA-DA): Importance of study management, WC6 proceedings, accepted (2008)

G-2) 学会発表

- 1) 新井晶子、皮膚基礎研究クラスターフォーラム 第2回教育セミナー (2007年7月、於東京)
- 2) Yamamoto N., Kojima H., Tanikawa A., Horiguchi M. Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.
- 3) 大野泰雄: 第6回国際動物実験代替法会議開催報告. 日本動物実験代替法学会総会 (2007. 11. 20) 東京
- 4) 金子晃久、加藤基浩、橋本博幸、山田泰弘、長谷川真絹、中村明生、神山佳輝、森田繁道、大野泰雄: 中空糸3次元培養ヒト凍結肝細胞を用いた CYP3A 酵素誘導評価と施設間バリデーション. 日本薬学会第128年会 (2008. 3. 28)
- 5) Ashikaga T. and Sakaguchi H., Evaluation of Dendritic Cell-based Assays for Predicting Skin Sensitization", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.
- 6) Ashikaga T., Sakaguchi H., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yamada T., Yoshida M., Ota N., Hasegawa S., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Kosaka N., Sono S and Ohno Y., "Results of a Japanese Ring Study of a Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting Skin Sensitization Potential (1st report): Inter-laboratory Reproducibility", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.
- 7) Okamoto K., Kosaka N., Kuwahara H., Mizuno M., Okamoto Y., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Yoshida M., Ohta N., Kodama T., Sato J., Sakaguchi H., Ashikaga T. and Ohno Y., "Results of a Japanese Ring Study of a Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting Skin Sensitization Potential (2nd report): A study of the Criteria for THP-1 Cell Selection", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.
- 8) Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Yoshida M., Kodama T., Sato J., Ota N., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H., Ashikaga T. and Ohno Yasuo., "Results of a Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (3rd Report): Effect of Serum Difference", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.
- 9) Mizuno M., Yoshida M., Kodama T., Sato J., Ota N., Okamoto Y., Kosaka N., Okamoto K., Kuwahara H., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Sakaguchi H., Ashikaga T. and Ohno Y., "Results of a Japanese Ring Study of a Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Predicting Skin sensitization Potential (4th report): Effects of pre-culture conditions", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.
- 10) Hagino, S., Hoya, M., Sono, S., Ishikawa, M., Ashikaga, T., and Itagaki, H., "Effect of antibiotic-antimycotic on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT)", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007.
- 11) Hirota, M., Suzuki, M., Hagino, S., Kagatani, S., Sasaki, Y., Aiba, S., and Itagaki, H., "Role of cell-surface thiols in activation of hapten-treated THP-1 cells", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007a.
- 12) Hirota, M., Suzuki, M., Hagino, S., Kagatani, S., Sasaki, Y., Aiba, S., and Itagaki, H., "Role of cell-surface thiols

- in activation of hapten-treated THP-1 cells and evaluation as a biomarker for *in vitro* sensitization test." Society of Toxicology 46th annual meeting, 2007b.
- 13) Hoya, M., Hirota, M., Suzuki, M., Hagino, S., and Itagaki, H., "Development of alternative photosensitization assay using human monocyte-derived cells", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007.
- 14) Ishikawa, M., Ashikaga, T., Hagino, S., and Itagaki, H., "Development of 3D-culture model of THP-1 cells for evaluating skin sensitization potential of insoluble test samples", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences - Beijing satellite symposium, 2007.
- 15) Itagaki, H., "Alternatives for eye irritation testing: History and present status in Japan", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007.
- 16) Itagaki, H., "Current Status of Alternative Methods & Activities of the JSAE (The Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments)", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences - Beijing satellite symposium, 2007.
- 17) Kagatani, S., Sasaki, Y., Mizuashi, M., Hirota, M., Suzuki, M., Itagaki, H., and Aiba, S., "Role of cell-surface thiols in activation of hapten-treated dendritic cells", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007.
- 18) Kosaka, N., Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Itagaki, H., and Nishiyama, N., "Evaluation of the *in vitro* skin sensitization test: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) using the modified prediction model", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007.
- 19) Suzuki, M., Hirota, M., Hagino, S., Itagaki, H., and Aiba, S., "Construction of decision tree of *in vitro* sensitization assay using changes of cell surface thiols as a biomarker (SH test)", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007.
- 20) Wakuri, S., Kitagaki, M., Itagaki, H., Ohno, Y., and Tanaka, N., "Application of cytotoxicity assays as alternatives to acute oral systemic toxicity tests", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007.
- 21) 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) の開発 (2) : 試験条件の確立", 日本トキシコロジー学会学術年会, 2007.
- 22) 廣田衛彦, 鈴木美絵, 萩野滋延, 加賀谷早織, 佐々木喜教, 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) の開発 (1) ~感作性処理した THP-1 細胞の活性化における細胞表面-SH 基の役割~", 日本トキシコロジー学会学術年会, 2007.
- 23) 佐野晶代, 矢上晶子, 中川真美子, 井上智子, 安部正通, 稲葉弥寿子, 中澤有里, 山北高志, 鈴木加余子, 松永佳世子: 化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを行った症例2006. 第32回日本化粧品学会, 東京, 2007年6月7-8日
- 24) Matsunaga K: How should we evaluate skin irritancy by human patch test? International Symposium on Contact Dermatitis, The 25th Anniversary of the Korean Contact Dermatitis Research Group, Seoul, Korea, June 14-17, 2007
- 25) 稲葉弥寿子, 秋田浩孝, 鷺見康子, 中澤有里, 菅谷直樹, 加藤佳美, 松永佳世子: ハイドロ器ノン軟膏による色素沈着性接触皮膚炎の1例. 第25回日本美容皮膚科学会, 横浜, 2007年8月18-19日
- 26) 山田 貴亮, 長谷川靖司, 赤松浩彦, 山本直樹, 山口弘毅, 石井 泉, 松永佳世子, 中田 悟: マイクロアレイによる新規感作性マーカーの探索. 第37回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会, 名古屋, 2007年 12月14-16日
- 27) 佐野晶代, 矢上晶子, 中川真美子, 井上智子, 安部正通, 稲葉弥寿子, 中澤有里, 山北高志, 鈴木加余子, 松永佳世子: 2006年に当科で化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを行った症例のまとめ. 第37回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会, 名古屋, 2007年 12月14-16日

- 28) 関東裕美、日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会皮膚刺激研究グループ：皮膚一次刺激性評価としてのクローズドパッチテスト貼布時間の検討、第37回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会、名古屋、2007年12月14-16日
- 29) Kojima, H., JaCVAM Update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, Bethesda, (June, 2007)
- 30) Kojima, H., JaCVAM Update, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.119, Tokyo (2007)
- 31) Kojima, H., JaCVAM Process to Validate and Peer Review of New Alternative Methods, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.82, Tokyo (2007)
- 32) Kojima, H., Validation study using Japanese models, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.64, Tokyo (2007)
- 33) Arai, S., Yamamoto, N. and Kojima, H., Safety evaluation test using a human cultured epidermal model- with the ECVAM validation proposal and chemicals-, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.224, Tokyo (2007)
- 34) Kojima, H., Arai, S., Kubo, K. and Kato M., Dose-response evaluation using a coreal model, an alternative to Draize eye irritation testing, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.223, Tokyo (2007)
- 35) Yoshiaki Ikarashi, Takashi Omori, Yukiko Kanazawa, Kenji Idehara, Hajime Kojima, Takashi Sozu, Kazunori Arima, Hirohiko Goto, Tomohiko Hanada, Taketo Inoda, Tadashi Kosaka, Eiji Maki, Takashi Morimoto, Shinsuke Shinoda, Naoki Shinoda, Masahiro Takeyoshi, Masashi Tanaka, Mamoru Uratani, Masahito Usami, Atsushi Yamanaka, Tomofumi Yoneda, Isao Yoshimura and Atsuko Yuasa, First Inter-laboratory validation study on LLNA-DA, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.254, Tokyo (2007)
- 36) Yukiko Kanazawa, Takashi Omori, Yoshiaki Ikarashi, Kenji Idehara, Hajime Kojima, Takashi Sozu, Kazunori Arima, Hirohiko Goto, Tomohiko Hanada, Taketo Inoda, Tadashi Kosaka, Eiji Maki, Takashi Morimoto, Shinsuke Shinoda, Naoki Shinoda, Masahiro Takeyoshi, Masashi Tanaka, Mamoru Uratani, Masahito Usami, Atsushi Yamanaka, Tomofumi Yoneda, Isao Yoshimura and Atsuko Yuasa, Second Inter-laboratory validation study on LLNA-DA, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Tokyo (2007)
- 37) Takashi Omori, Yoshiaki Ikarashi, Yukiko Kanazawa, Kenji Idehara, Hajime Kojima, Takashi Sozu, Kazunori Arima, Hirohiko Goto, Tomohiko Hanada, Taketo Inoda, Tadashi Kosaka, Eiji Maki, Takashi Morimoto, Shinsuke Shinoda, Naoki Shinoda, Masahiro Takeyoshi, Masashi Tanaka, Mamoru Uratani, Masahito Usami, Atsushi Yamanaka, Tomofumi Yoneda, Isao Yoshimura and Atsuko Yuasa, Validation studies on LLNA: Importance of study management, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.264, Tokyo (2007)
- 38) Stokes, W. S., Bremer, S., Jacobs, M., Ono A., Kojima, H., Ceger, P., Deal F. and Tice, R., NICVEATM/ECVAM/JaCVAM Multi-phase International validation study of an in vitro estrogen receptor transcriptional activation assay to detect agonist and antagonist activity, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.265, Tokyo (2007)
- 39) Kojima, H., JaCVAM Update, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (November, 2007)
- 40) Kojima, H., International Validation Study of Non Animal Screening Assay for Endocrine Disrupter, 2007 National Institute of Toxicological Research International Symposium, Korea (2007)
- 41) 小島 肇, 代替法を取り巻く内外の動きと今後の方向性、皮膚基礎研究クラスターフォーラム第2回教育セミナー、東京(2007)

- 42) 小島 肇、動物実験と代替法の現状、城西大学生命科学研究センター講演会、城西大学 (2007)
- 43) 小島 肇、EUにおける動物実験代替法の現状と REACH 対策、日皮協・会員研究会、京都 (2007)
- 44) 小島 肇、3次元培養皮膚モデルを用いた皮膚毒性の評価、化粧品の安全性・機能性評価の最前線、第17回動物細胞工学会シンポジウム、東京 (2007)
- 45) 小島 肇、3次元培養皮膚モデルを用いた皮膚毒性の評価－REACHの現状と将来－、日本動物実験代替法学会 技術講習会「3次元培養皮膚モデルの活用」、東京 (2007)
- 46) 小島 肇、動物実験代替法を用いて皮膚刺激性をどう評価するか、シンポジウム「化粧品・化学物質の皮膚安全性（刺激性・感作性）をどう評価するか、第37回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、名古屋 (2007)
- 47) Arai, S., Saitou, M., Takashima, Y., Honma, M. and Kojima, H., A new trial for in vitro Comet assay using a 3-dimensional human epidermal model, 36th Annual Meetings of the Japanese Environmental Mutagen Society, Kitakyusu (2007)
- 48) Kojima, H., et al. Validation and implementation, Round table on International aspects of validation & accept, Regulatory Acceptance and Implementation of 3R approach, Annual Conference 2007 EPAA, Brussels (2007)
- 49) Kojima, H., The Importance of the in vivo comet assay in genotoxicity testing, Predictive Human Toxicity and ADME/TOX studies, 3rd Annual conference of Mondial Research Presentation, Brussels (2008)
- 50) 小島 肇、国内外の規制動向、WC6 フォローアップシンポジウム 3Rsに基づく動物実験の規制と第三者認証、東京 (2008)
- 51) Kojima, H., et al., Panel Discussion, ICCVAM Ten-Year Anniversary Symposium, Washington DC (2008)
- 52) Kojima, H., Opening remark, Workshop on Acute chemical safety testing: Advancing in vitro approaches and Humane Endpoints for systemic Toxicity Evaluation, Washington, DC (2008)
- 53) Hajime Kojima, Masahiro Takeyoshi Takashi Omori, Takashi Sozu, Kazunori Arima, Kenji Idehara, Yoshiaki Ikarashi, Yukiko Kanazawa, Eiji Maki, Naoto Nakagiri, Masashi Tanaka, Atsuko Yuasa, and Isao Yoshimura, Inter-laboratory validation study on LLNA-BrdU, 47th Annual SOT meeting, Seattle (2008)
- 54) 小島 肇、日本の動向と JaCVAM の活動、JaCVAM 第1回ワークショップ「昨今の試験法ガイドラインを巡る国際動向」、東京 (2008)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

分担研究報告書

「動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究」 「動物実験代替法のバリデーションと第三者評価、および医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討」

分担研究者 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

日本で開発されたもの、あるいは欧米で認証された新規試験法のバリデーションと第三者評価、行政的受入れの評価および医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討を検討した。具体的には、バリデーション研究として、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総括するとともに、2) 皮膚感作性を調べるためのLLNA法の代替法であるLLNA-BrdU法のバリデーション研究を行った。

第三者評価については、1) LLNA-DA法の評価を行い、また2) 皮膚刺激性試験代替法、3) 眼刺激性試験代替法の評価を開始した。

行政的な受入れ評価として、JaCVAM評価会議において、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行い、さらに医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方を検討するための検討組織を構築し、議論を開始した。

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、動物実験代替法（以下、代替法と記す）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はお互いの評価結果を相互に受け入れている。このように欧米では行政機関が中心となって、新しい安全性試験法の開発・評価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動物実験代替法バリデーション

センター（JaCVAM）が2005年に設立され、日米欧の代替法評価センターが揃った。

本研究班では科学的根拠に基づいて可能ならば化粧品、医薬部外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、医薬部外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EUでの規制上の問題で早急に対応すべき、皮膚刺激性試験、感作性試験および眼刺激性試験の開発を目指している。また、代替法開発のための統計解析手法を研究している。

主任研究者である小島は研究の総括と日本で新規に開発された代替試験法のバリデーション研究および、日本で開発されたか、あるいは欧米で認証された試験法の第三者評価および医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方について検討した。

B. 結論

平成19年度は、バリデーション研究として、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総括するとともに、2) 皮膚感作性を調べるためのLLNA法の代替法であるLLNA-BrdU法のバリデーション研究を行った。

第三者評価については、1) LLNA-DA法の評価

を行い、また2)皮膚刺激性試験代替法、3)眼刺激性試験代替法の評価を開始した。

行政的な受入れ評価として、JaCVAM評価会議において、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行い、さらに医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方を検討するための検討組織を構築し、議論を開始した。

これらの研究報告を以下に順に示す。

C. 健康危険情報

なし

D. 研究発表

誌上発表

- 1) 小島肇夫、感作性・刺激性試験／安全性評価のトラブル時の対応、現場レベルでの皮膚測定・評価～トラブル事例・対策～、pp. 268-273、サイエンス&テクノロジー (2007)
- 2) 小島肇夫、皮膚刺激性試験について、最新動物実験代替法、技術情報協会 pp. 63-71 (2007)
- 3) 小島肇夫、皮膚腐食性試験について、最新動物実験代替法、技術情報協会 pp. 75-84 (2007)
- 4) 小島肇夫、バリデーションについて、最新動物実験代替法、技術情報協会 pp. 267-273 (2007)
- 5) 小島肇夫、皮膚一次刺激性評価法、機能性化粧品素材開発のための in vitro／細胞／組織培養評価法ハンドブック、シーエムシー出版 pp. 308-314 (2007)
- 6) 小島肇夫、日本における動物実験代替法の開発動向、Fragrance Journal 10, 29-34 (2007)
- 7) 小島肇夫、動物実験代替法のバリデーション、COSMETIC STAGE, 8, 54-56 (2007)
- 8) 小島肇夫、代替法国際動向から見た新技術導入の可能性、動物実験代替法のためのバイオマテリアル・デバイス、シーエムシー出版 pp. 1-5 (2007)
- 9) 小島肇夫、急がれる動物実験代替法の開発ー皮膚モデルの現状、New Drug Discovery, 023号、p4、(2007)
- 10) 小島肇夫、アレルゴロジ-VSトキシコロジー、皮膚アレルギーの旅 Vol. 7, No. 1, p1-7, (2008)
- 11) 小島肇夫、動物実験代替法の現状と展望、日本薬理学会会誌、130、505-509 (2008)

- 12) Kojima, H., JaCVAM: An organization supporting the validation and peer review of new alternatives to animal testing, WC6 proceedings, accepted (2008)
- 13) 小島肇夫、EUにおける動物実験代替法の現状と REACH 対策、日皮協ジャーナル、30(2) 156-162 (2008)
- 14) 小島肇夫、皮膚感作性試験代替法の現状、Visual Dermatology、7(3)、328-331 (2008)
- 15) Kojima, H., Perspectives on validation and regulatory acceptance of animal alternative testings in Japan, P&G Actives Risk Communication, 2(1), 1-4 (2008)
- 16) Hajime Kojima, Tomoko Ando, Katsuhiko Inagaki, Mahito Ohhira, Tadashi Kosaka, Yosuke Nakamura, Hisashi Torishima, Noriyuki Morikawa, Jun Kanno, Mami Kuboki, Michiru Genno, Masaru Nokata, Takanori Harada, Takashi Morimoto, Isao Yoshimura, Yasuo Ohno, Validation of human skin models for skin corrosivity tests in Japan, *Altern. Animal Test. Experiment*, accepted (2008)
- 17) Takashi Omori, Yoshiaki Ikarashi, Yukiko Kanazawa, Kenji Idehara, Hajime Kojima, Takashi Sozu, Kazunori Arima, Hirohiko Goto, Tomohiko Hanada, Taketo Inoda, Tadashi Kosaka, Eiji Maki, Takashi Morimoto, Shinsuke Shinoda, Naoki Shinoda, Masahiro Takeyoshi, Masashi Tanaka, Mamoru Uratani, Masahito Usami, Atsushi Yamanaka, Tomofumi Yoneda, Isao Yoshimura and Atsuko Yuasa, Validation studies on an alternative endpoint for the local lymph node assay (LLNA-DA): Importance of study management, WC6 proceedings, accepted (2008)

学会発表

- 1) Kojima, H., JaCVAM Update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, Bethesda, (June, 2007)
- 2) Kojima, H. JaCVAM Update, 6th World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.119, Tokyo (2007)
- 3) Kojima, H. JaCVAM Process to Validate and Peer Review of New Alternative Methods, 6th World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.82, Tokyo (2007)
- 4) Kojima, H. Validation study using Japanese models, 6th World Congress on Alternatives 6

- Animal Use in the Life Sciences, p.64, Tokyo (2007)
- 5) Arai, S., Yamamoto, N. and Kojima, H., Safety evaluation test using a human cultured epidermal model- with the ECVAM validation proposal and chemicals-, 6th World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.224, Tokyo (2007)
 - 6) Kojima, H., Arai, S., Kubo, K. and Kato M., Dose-response evaluation using a coreal model, an alternative to Draize eye irritation testing, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.223, Tokyo (2007)
 - 7) Yamamoto, N, Kojima, H., Tanikawa, A. and Horiguchi, M., A study of retinal regulative medicine by human iris tissue cells, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.103, Tokyo (2007)
 - 8) Yoshiaki Ikarashi, Takashi Omori, Yukiko Kanazawa, Kenji Idehara, Hajime Kojima, Takashi Sozu, Kazunori Arima, Hirohiko Goto, Tomohiko Hanada, Taketo Inoda, Tadashi Kosaka, Eiji Maki, Takashi Morimoto, Shinsuke Shinoda, Naoki Shinoda, Masahiro Takeyoshi, Masashi Tanaka, Mamoru Uratani, Masahito Usami, Atsushi Yamanaka, Tomofumi Yoneda, Isao Yoshimura and Atsuko Yuasa, First Inter-laboratory validation study on LLNA-DA, 6th World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.254, Tokyo (2007)
 - 9) Yukiko Kanazawa, Takashi Omori, Yoshiaki Ikarashi, Kenji Idehara, Hajime Kojima, Takashi Sozu, Kazunori Arima, Hirohiko Goto, Tomohiko Hanada, Taketo Inoda, Tadashi Kosaka, Eiji Maki, Takashi Morimoto, Shinsuke Shinoda, Naoki Shinoda, Masahiro Takeyoshi, Masashi Tanaka, Mamoru Uratani, Masahito Usami, Atsushi Yamanaka, Tomofumi Yoneda, Isao Yoshimura and Atsuko Yuasa, Second Inter-laboratory validation study on LLNA-DA, 6th World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.255, 6th World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, Tokyo (2007)
 - 10) Takashi Omori, Yoshiaki Ikarashi, Yukiko Kanazawa, Kenji Idehara, Hajime Kojima, Takashi Sozu, Kazunori Arima, Hirohiko Goto, Tomohiko Hanada, Taketo Inoda, Tadashi Kosaka, Eiji Maki, Takashi Morimoto, Shinsuke Shinoda, Naoki Shinoda, Masahiro Takeyoshi, Masashi Tanaka, Mamoru Uratani, Masahito Usami, Atsushi Yamanaka, Tomofumi Yoneda, Isao Yoshimura and Atsuko Yuasa, Validation studies on LLNA: Importance of study management, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.264, Tokyo (2007)
 - 11) Stokes, W. S., Bremer, S., Jacobs, M., Ono A., Kojima, H., Ceger, P., Deal F. and Tice, R., NICVEATM/ECVAM/JaCVAM Multi-phase International validation study of an in vitro estrogen receptor transcriptional activation assay to detect agonist and antagonist activity, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.265, Tokyo (2007)
 - 12). Kojima, H., JaCVAM Update, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (November, 2007)
 - 13). Kojima, H., International Validation Study of Non Animal Screening Assay for Endocrine Disrupter, 2007 National Institute of Toxicological Research International Symposium, Korea (2007)
 - 14) 小島 肇, 代替法を取り巻く内外の動きと今後の方向性、皮膚基礎研究クラスタフォーラム第2回教育セミナー、東京(2007)
 - 15) 小島 肇, 動物実験と代替法の現状、城西大学生命科学研究センター講演会、城西大学 (2007)
 - 16). 小島 肇, EUにおける動物実験代替法の現状とREACH対策、日皮協・会員研究会、京都 (2007)
 - 17) 小島 肇, 3次元培養皮膚モデルを用いた皮膚毒性の評価、化粧品の安全性・機能性評価の最前線、第17回動物細胞工学会シンポジウム、東京 (2007)
 - 18) 小島 肇, 3次元培養皮膚モデルを用いた皮膚毒性の評価-REACHの現状と将来-、日本動物実験代替法学会 技術講習会「3次元培養皮膚モデルの活用」、東京 (2007)
 - 19) 小島 肇, 動物実験代替法を用いて皮膚刺激性をどう評価するか、シンポジウム「化粧品・化学物質の皮膚安全性(刺激性・感作性)をどう評価するか、第37回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、名古屋 (2007)
 - 20) Arai, S., Saitou, M., Takashima, Y. Honma, M. and Kojima, H., A new trial for in vitro Comet assay using a 3-dimensional human epidermal model, 36th Annual Meetings of the Japanese Environmental Mutagen Society, Kitakyusu (2007)
 - 21). Kojima, H., et al, Validation and implementation, Round table on International aspects of validation & accept, Regulatory Acceptance and Implementation of 3R approach, Annual Conference 2007 EPAA, Brussels (2007)

- 22) Kojima, H., The Importance of the in vivo comet assay in genotoxicity testing, Predictive Human Toxicity and ADME/TOX studies, 3rd Annual conference of Mondial Research Presentation, Brussels (2008)
- 23) 小島 肇, 国内外の規制動向、WC6 フォローアップシンポジウム 3Rs に基づく動物実験の規制と第三者認証、東京 (2008)
- 24) Kojima, H., et al., Panel Discussion, ICCVAM Ten-Year Anniversary Symposium, Washington DC (2008)
- 25) Kojima, H., Opening remark, Workshop on Acute chemical safety testing: Advancing in vitro approaches and Humane Endpoints for systemic Toxicity Evaluation, Washington, DC (2008)
- 26) Hajime Kojima, Masahiro Takeyoshi Takashi Omori, Takashi Sozu, Kazunori Arima, Kenji Idehara, Yoshiaki Ikarashi, Yukiko Kanazawa, Eiji Maki, Naoto Nakagiri, Masashi Tanaka, Atsuko Yuasa, and Isao Yoshimura, Inter-laboratory validation study on LLNA-BrdU, 47th Annual SOT meeting, Seattle (2008)
- 27) 小島 肇, 日本の動向と JaCVAM の活動、JaCVAM 第 1 回ワークショップ「昨今の試験法ガイドラインを巡る国際動向」、東京 (2008)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし
- I. 健康危険情報
なし

1) 酵母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

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、2回のバリデーション研究を日本動物実験代替法学会に依頼し、学会バリデーション委員会の下部組織としてバリデーション実行委員会を組織して実施された。両報告書提出後に補足された議論も含めて、最終的なバリデーション報告書としてまとめた。

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年度に日本動物実験代替法学会に依頼し、学会バリデーション委員会の下部組織としてバリデーション実行委員会を組織して、多施設バリデーション研究が実施された。その結果、3T3-NRU光毒性試験法とほぼ同等の結果が得られることが確認されたが、陽性対照物質での結果が擬陽性に近いという問題点が指摘された。即ち、酵母法のdynamic rangeが陽性対照で常に10mm位の値を示す条件を資生堂に確立してもらう必要があると考え、提案者にプロトコルの修正を求めた。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年度は改訂プロトコルの妥当性検証のために、補完バリデーション研究を実施した。平成19年度に両報告書提出後に補足された議論も含めて、バリデーション研究全体を最終報告書としてまとめた。

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り、酵母-赤血球試験の結果が施設間でどの程度変動するかを、多施設試験を行って把握することであり、副次課題は、多施設試験を行って試験結果の再現性を改善するプロトコル改訂の提案を行うことである。

C. 研究結果まとめ

C-1) 酵母-赤血球試験の妥当性

補完バリデーション研究で用意したプロト

コールによる実験結果は、感度が100%、特異度が42%、一致度60%であった。プロトコール改訂によって、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。擬陽性を陽性とすれば、陽性物質を誤って陰性とすることが少ないという意味で、酵母-赤血球試験の有用性が示されたことになる。

プロトコール改訂により、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となった。この面ではプロトコール改訂は妥当であったと考えられる。

C-2) 施設間差

実験技術に問題があつて施設を除けば、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。補完バリデーション研究で用意したプロトコールを用いたときの施設間差は小さいと思われる。

C-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目立った問題は見られなかったが、酵母光生育阻害試験のカットオフ値には再検討の余地が見出された。これ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かもしれない。

C-5) データマネージメント

主バリデーション研究では大幅なデータクリーニングが必要であったが、記入書式等を改善した補完バリデーション研究では修正すべきところのごくわずかになった。

C-6) プロトコール改訂の影響

陽性物質の阻止帯の差の施設間差はやや大きくなった。プロトコール改訂の一つの結果と考えられる。

D. 結論

バリデーション委員会として、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信頼性、再現性が確認で

きた。本報告書をもとに第三者評価の開始を望むものである。

E. 資料

添付資料

資料 1-1 光毒性試験代替法バリデーショ
ン研究報告書

資料 1-2 主実験研究計画書

資料 1-3 主実験研究報告書

資料 1-4 補完実験研究計画書

資料 1-5 補完実験研究報告書

資料 1-6 主実験プロトコール

資料 1-7 補完実験プロトコール

資料 1-8 酵母光生育阻害試験の最終改訂
プロトコール

光毒性試験代替法バリデーション研究 報告書

2008年1月7日

光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会、
及び、酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会
委員長 吉村 功

1. 経緯

日本動物実験代替法学会評価委員会（評価委員会）は、2003年7月、「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）の施設間差がどの程度であるか検討することを、日本動物実験代替法学会会長（学会会長）を経由して日本動物実験代替法学会バリデーション委員会（バリデーション委員会）に要請した。

バリデーション委員会は、光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会（主実験実行委員会）を組織し、2003年9月に研究を開始した。研究結果は2004年8月に主実験実行委員会からバリデーション委員会に、さらにバリデーション委員会から学会会長を経由して評価委員会に提出された。評価委員会は、この報告書を検討して、酵母光生育阻害試験の標準試験手順（standard operating procedure; SOP）に改善の余地があるという評価を行い、2006年6月、補完実験を通してSOP改訂を行うことを、学会会長を経由してバリデーション委員会に要請した。

バリデーション委員会は、2006年7月、新たに酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会（補完実験実行委員会）を組織して補完実験を開始した。研究結果は2006年12月にバリデーション委員会に報告され、さらに学会会長を経由して評価委員会に提出された。

評価委員会は、2007年1月に報告書を検討し、両報告書をまとめた報告書の作成を両実行委員会の委員長であった吉村に要請した。本報告書は、この要請の下で、両報告書提出後に補足された議論も含めて、バリデーション研究全体をまとめたものである。

2. 研究課題

本研究が結論を提出すべき主要課題は、酵母-赤血球試験の結果が施設間でどの程度変動するかを、多施設試験を行って把握することであり、副次課題は、多施設試験を行って試験結果の再現性を改善するSOP改訂の提案を行うことである。

3. 研究の遂行

研究は、施設間差に焦点を合わせて実験行ってその結果を総括したもの（主実験）と、SOP改訂の影響を確かめることに焦点を合わせて実験を行ってその結果を総括したもの（補完実験）の、2つに分けて行われた（資料1~4を参照）。

3-1) 実験参加施設

3-1-1) 主実験

実験を行ったのは、公募に応募した次の6施設である。

- (株)コーセー研究本部品質保証センター
- (株)資生堂安全性・分析センター
- (財)食品薬品安全センター秦野研究所
- 東洋ビューティ（株）中央研究所
- 日本メナード化粧品（株）総合研究所
- マルホ（株）京都 R&D センター

3-1-2) 補完実験

実験を行ったのは、上記6施設の内から実験参加が不可能になった1施設を除いた、次の5施設