

各安全性試験代替法の現状については、日本化粧品工業連合会 技術委員会動物実験代替専門委員会が 2006 年に広範に調査している。本年度はさらに見直しを行った。この調査結果の一部を日本化粧品工業連合会が編集した「化粧品の安全性評価に関する指針 2001」の記載を参考に情報を追加したので、以下に記述する。

#### C-5-1 単回投与毒性

##### ①動物を用いる代替試験法の状況

従来の動物を用いる試験法をベースに動物数を削減 (Reduction)、あるいは苦痛を軽減 (Refinement) させるための修正が行われ、さらに削減を進めるための *in vivo* 代替試験法が開発されている<sup>50), 51)</sup>。現在、公定法化された試験法は急性経口投与試験のみであり、すでに OECD の化学物質テストガイドラインに収載され<sup>52)</sup>、化学物質分類のための試験法として国際的にも認知されている。経口以外の暴露経路の試験法として、吸入経路および経皮経路の試験が OECD テストガイドラインでドラフト化されている<sup>53)</sup>。

##### ②動物を用いない代替試験法の状況

基礎的な細胞毒性が *in vivo* における毒性影響の大部分に関与するものであり、*in vitro* 細胞培養系が *in vivo* 経口急性毒性のモデルに使用できるという仮定のもと、急性毒性を予測する細胞ベースの試験法が検討されてきた。Cytotoxicity Laboratory, Uppsala (CTLU) の故 Bjorn Ekwall 博士の指揮の下、Scandinavian Society for Cell Toxicology (SSCT) により実施された MEIC (Multicenter Evaluation of *In vitro* Cytotoxicity) プログラム<sup>53)</sup> (1989-1996) はその端緒といえるものである。その後これらの研究結果を受けて、急性毒性を予測するための *in vitro* 細胞試験の最も良い組合せについて検討が継続されると共に、代謝、トキシコカインेटクスや臓器特異的毒性に関連する試験法を組み合わせることにより、予測精度を向上させる試みがなされている<sup>54), 55)</sup>。

欧州では、化学物質管理のための規制が急速に進められており、化学物質の安全性担保を目的に全身急性毒性を検出する *in vitro* 試験戦略を開発するため、A-Cute-Tox プロジェクト<sup>56), 57)</sup> が 2005 年 1 月よりスタートした。このプロジェクトは、2010 年までの計画で、EU の 6FP (The sixth

framework program) に基づき、欧州化学品局 (ECB) 等の規制当局と連携し、総予算 1560 万ユーロ、そのうち EU から 900 万ユーロの予算を受けて進められている。このプロジェクトの目的は、化学物質の急性毒性に関する *in vivo* 試験を完全に代替するに足る *in vitro* 試験戦略を開発するという意欲的なものである。本プロジェクトでは、作業テーマ別に設定された 9 つの Work package (WP) が連携しながら作業を進めており、各 WP から、97 種に及ぶ参照物質の急性毒性に関する *in vivo* (動物およびヒト)、*in vitro* データを含む高品質なデータベースの開発、商業利用可能なスクリーニングロボット基盤に適合できる細胞モデルの獲得、新たな特異的パラメータの使用による予測精度の向上等の成果が上がってきている<sup>58)</sup>。

米国では、2002 年より The NTP Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) と the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) の共同によって、急性経口毒性を評価するための *in vitro* 細胞毒性試験をバリデーションするための複数施設による研究<sup>59)</sup> が実施された。このプロジェクトでは、Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) によって推奨された 2 つの *in vitro* 細胞毒性試験を、*in vivo* 急性経口全身毒性試験の試験開始用量の設定に用いようとしており、*in vivo* 試験に用いられる動物数を削減することを目的としている。本バリデーション研究の結果を報告するバックグラウンドレビュー文書 (BRD)<sup>60)</sup> および ICCVAM による試験法評価報告書<sup>61)</sup> が 2006 年 11 月に最終化された。本研究では、基礎細胞毒性 (basal cytotoxicity) を評価できる試験法として、BALB/c 3T3 マウス繊維芽細胞 (3T3) および正常ヒト表皮ケラチノサイト (NHK) を用いた 2 つのニュートラルレッド取り込み (NRU) 試験について、72 の参照物質を用いたバリデーション試験が Phase I ~ III までの 3 段階に分けて実施された<sup>62) - 64)</sup>。BRD には、両試験法の精度および信頼性 (再現性)、また、これらの *in vitro* 試験データを用いて *in vivo* 試験の開始用量を設定することによって削減される動物数あるいは死亡動物数に関するコンピューターシミュレーションによる評価結果等が報告されている。これを踏まえた試験法評価報告書において、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十分な精度はないが、現在の急性毒性プロトコールである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できるとの勧告を行った。さらに 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ことを目的とした標準化されたプロトコールを *in vivo* 試験に盛り込むことなどを推奨している。

以上のように、急性毒性試験の代替法については、従来の *in vivo* 試験を改良して使用動物数を削減 (Reduction) あるいは苦痛の軽減 (Refinement) を図る試みと、一方で動物試験を減らすために *in vitro* 試験の利点をできるだけ活用しようとする試みが進められている。今後も、化学物質管理の規制強化などを背景にした大掛かりなプロジェクトの研究成果と行政・業会動向を注視していく必要がある。

## C-5-2 皮膚毒性

### ①概要

化粧品等の化学物質が皮膚に接触することによる皮膚炎 (皮膚刺激性) やそれに紫外線が関与したときにおこる皮膚炎 (光毒性) などに対して安全性を確保するための評価が必要である。従来から、ヒトに対する危害予測のため、動物の皮膚が用いられている。現在使用されている皮膚一次刺激性試験及び皮膚腐食性試験の国際的なガイドラインは、Draize らの方法を基礎としている。このガイドラインでは、動物としてウサギが推奨されているが、その他の動物種 (モルモット、ミニブタ) 等も利用されている。ウサギは mild から moderate な刺激物に対してヒトより感度が高いと考えられているが、その一方、動物結果とヒトでの結果が一致していないという報告もある<sup>65) 66)</sup>。これに加え、動物愛護や倫理的観点から、動物実験の代替法の評価開発が進められている。これらの代替法開発は ECVAM を中心に展開されている。ECVAM における動物試験の代替法開発に対する基本的な考え方は、構造活性相関、*in vitro* 試験法とヒトパッチテストを基に評価スキームを構築することにある<sup>67)</sup>。

現在の *in vitro* 皮膚刺激性試験法開発の取り組みは、皮膚腐食性、皮膚一次刺激性のポテンシャルが評価できる代替法開発にとどまっている。具体的には、三次元皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験法や、培養細胞を用いた光毒性試験法が化学物質の *in vitro* 試験法として OECD ガイドラインに採用されている。

### ②皮膚刺激性の代替試験法

試験法としては、三次元ヒト皮膚モデル<sup>68) 69)</sup>を用いた方法やマウスの摘出皮膚を用いた器官培養法<sup>70)</sup>などが挙げられる。現在、これらの試験法は OECD ガイドラインに受け入れられる段階には至っていないが、バリデーションが実施され、皮膚刺激性物質のスクリーニング、または生じる刺激の程度予測が一部適用可能であることを示すデータが集まりつつある。国内では動物実験代替法学会において平成13年より EpiDerm、TESTSKIN、Vitrolife-Skin などの「市販キットである三次元皮膚モデルを用いる皮膚刺激性代替法」のバリデーションが実施されている。海外では ECVAM がヒト皮膚モデルである EPISKIN、EpiDerm 等の検討を実施してきた<sup>71)</sup>。EPISKIN の評価項目は MTT アッセイ、および IL-1 $\alpha$ 、EpiDerm は MTT アッセイを用いている。バリデーションは終了し、EPISKIN に関しては、2007年4月の ESAC による peer review において、皮膚刺激性の表示 (irritant: R38、non-irritant: no-label) の目的で使用されるウサギを用いたドレイズ法の代替法として承認され、現在、regulatory acceptance に向けて検討を進めている状況である。EpiDerm に関しては ESAC による承認は得られなかったが、第6回国際動物実験代替法会議において、プロトコールの変更による評価結果を報告しており、今後再度バリデーションが実施される可能性がある。

なお、刺激性とは違い、皮膚へ不可逆的な影響を及ぼすような化学物質の危険性把握 (Hazard identification) のための重要な試験として位置づけられている皮膚腐食性代替試験法については、3次元皮膚モデルを用いた試験法が OECD ガイドラインとして平成16年に採用されている<sup>72)</sup>。日本でも、厚生労働科学研究として皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性の多施設バリデーションが実施された。その結果、国内で評価された3次元皮膚モデルは、腐食性試験代替法として国際的に承認されている3次元表皮モデルと同等の識別能力を有するものであるという評価が得ら

れた。この結果について JaCVAM 評価会議で審議中である。また、*in vitro* 皮膚腐食性試験結果を毒劇物の評価に用いることが、厚生労働省の毒劇物部会で承認<sup>73)</sup>されていることから本結果の評価が注目される。

その他 *in vitro* の皮膚腐食性試験代替法として Transepidermal Electrical Resistance (TER) 試験法<sup>74)</sup>、蛋白変性検出法<sup>75)、76)</sup>などが OECD ガイドライン案となっている。

### ③光毒性の代替試験法

試験法としては紫外線光照射下において被験物質を各種の生体細胞や人工皮膚モデル、または化学物質と接触させることにより生じる細胞の生存率の変化または化学物質の光変性を指標とする *in vitro* 試験がある。これらの中で、光毒性物質のスクリーニング法として、Balb/c 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド取り込み法が平成 10 年に EU の ECVAM で承認され、EU の危険物指令の Annex V に取り入れられており、化学物質のクラス分けに利用されている<sup>77)</sup>。また、この方法に修正を加えた方法が、平成 16 年に OECD でも化学物質光毒性試験法ガイドラインとして受け入れられている<sup>78)</sup>。

OECD ガイドライン収載の試験法について、日本では、平成 14 年に厚生労働科学研究班による調査研究が実施され、報告書が提出されている<sup>79)</sup>。その他、ECVAM でバリデーションが実施されている試験法として 3 次元皮膚モデルを用いた試験法、赤血球を用いた方法等が報告されている<sup>80)</sup>。また、日本では、異なった指標による試験法を組み合わせた評価法として酵母光生育阻害試験法と赤血球を用いた光溶血性試験法のバッテリー試験法<sup>81)-83)</sup>について厚生労働科学研究班研究としてバリデーションが実施され、その後、追加実験を経て、現在、報告書作成中あり、次年度から JaCVAM において peer review が開始される予定である。光毒性試験代替法の開発では、第 6 回国際動物実験代替法会議において、三次元皮膚モデルを用いた方法についての報<sup>84)-86)</sup>があった。この中で、皮膚刺激性を評価するモデルとして ESAC で承認された EPISKIN を用いた方法については論文掲載されており<sup>87)</sup>、今後の動向が注目される。

## C-5-3 眼刺激性

### ①概要

眼刺激性は、被験物質を眼に直接接触させることにより生じる結膜の発赤・浮腫・分泌物、

虹彩の変化や角膜の混濁度などの変化を指標とする刺激反応であり、眼刺激性試験はヒトが被験物質を粘膜に単回適用、あるいは誤って眼に入れた場合に生じる粘膜刺激性、結膜、虹彩、及び角膜に対する刺激性を予測するために実施される。今日まで、眼刺激性試験の方法としては、成熟白ウサギを用い、0.1g 又は 0.1mL の被験物質をその結膜嚢内に投与し、Draize 採点法によりその刺激性を判定し、Kay ら<sup>88)</sup>の基準で評価を行うものである。

眼粘膜刺激性代替法試験には、受精鶏卵、各種生体細胞、及び人工組織モデル系に被験物質を適用し、その結果生じる組織変化や細胞の生存率を指標とする *in vitro* 試験がある。4 種類 Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test (ウシ摘出角膜の混濁及び透過性試験)、The Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) (受精鶏卵の漿尿膜試験)、The Isolated Chicken Eye (ICE) test (鶏の摘出眼球試験)、The Isolated Rabbit Eye (IRE) test (ウサギの摘出眼球試験)については米国環境保護局 (EPA) が *in vitro* 試験法として眼刺激性又は腐食性をスクリーニングできる方法として推薦している。また、これらの試験法に関して、米国官庁間代替法バリデーション委員会 (ICCVAM)、国立環境衛生科学研究所 (NIEHS)、NTP 代替試験法省庁間センター (NICEATM) は 2006 年に最終試験法評価報告書<sup>89)</sup>を公表し、2007 年 10 月にバックグラウンドレビュー文書 (以下、「BRD」)<sup>90)-93)</sup>と共に連邦政府に送っている。この中で腐食性及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 と ICE が承認されたことが記載された。なお、BCOP と ICE については、欧州においても 2007 年 4 月の ESAC による peer review で腐食性及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承認された。

### ②眼刺激性の代替法試験法

米国及び欧州においては、眼腐食性及び強度眼刺激性評価法として、ICCVAM 及び ESAC が BCOP と ICE を承認しているが、弱い眼刺激性の評価も含めた眼刺激性試験の代替試験法の公的な受け入れには至っていない。

米国官庁間代替法バリデーション委員会 (ICCVAM) の the Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods (SACATM) は 2003 年 8 月に ICCVAM に眼刺激性物質の同定ができる *in vitro* 試験

法のバリデーション状況を評価することを推薦した。

米国環境保護局 (EPA) は 2003 年 10 月に 4 種類 Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test (ウシ摘出角膜の混濁及び透過性試験)、The Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) (受精鶏卵の漿尿膜試験)、The Isolated Chicken Eye (ICE) test (鶏の摘出眼球試験)、The Isolated Rabbit Eye (IRE) test (ウサギの摘出眼球試験) を眼刺激性又は腐食性をスクリーニングできる *in vitro* 試験法で ICCVAM によって評価される方法として推薦している。ICCVAM、国立環境衛生科学研究所 (NIEHS)、NTP 代替試験法省庁間センター (NICEATM) は 2005 年に *in vitro* 眼刺激性試験法バリデーション評価のための専門家委員会を開催し、*in vitro* 試験法として、上記 4 種類の試験法を提案し、それらの眼刺激性試験代替法の評価 (peer review) を実施した。NICEATM は 2006 年 11 月に 4 種の眼刺激性試験代替法 Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP)、the Isolated Rabbit Eye (IRE)、the Isolated Chicken Eye (ICE) および Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane test (HET-CAM) の最終試験法評価報告書 1) を公表した。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、眼腐食性及び強度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 試験及び ICE 試験が挙げられること、(3) HET-CAM 試験及び 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。2007 年 10 月には法的受け入れについて検討するため最終試験法評価報告書と BRD が省庁に送られており、省庁からの返答の期限は 2008 年 4 月となっている。

米国化粧品工業会 (PCPC : Personal Care Products Council、2007 年 11 月に旧 CTFA から改称) はこれまでの 1991 年版ガイドラインに広範な改訂を行い、動物実験代替法を盛り込んだ改訂版 Safety Evaluation Guidelines<sup>94)</sup> を 2007 年 8 月に発行した。前臨床試験には、動物試験と共に、代替法試験も紹介されており、具体的には、BCOP、Rabbit Enucleated Eye Test (REET) ウサギ摘出眼試験、HET-CAM、Chorioallantoic Membrane Vascular

Assay (CAMVA) 漿尿膜血管アッセイ、EpiOcular<sup>TM</sup> Human Construct Model (OCL-200)、Reconstituted Human Corneal Epithelium Model、Neutral Red Uptake (NRU)、Neutral Red Release (NRR) Assay、Fluorescein Leakage (FL) Assay が挙げられている。

欧州においては、消費者向けの化粧品および非食品に関する科学委員会 (SCCNFP) は化粧品成分の安全性を確認するために実施される毒性試験について、ガイドラインを策定しており、その第 5 版が第 25 回総会 (2003 年 10 月 20 日) で採択されている。その中で、眼刺激性試験は、従来の Draize *in vivo* 眼刺激試験<sup>95)</sup> の代わりになるようなバリデーションが完了した代替法は存在しないが、BCOP 試験 (ウシ角膜混濁および透過性試験) が中性の有機化学物質に関して適当とされている<sup>96)</sup>。RBC (赤血球) 試験および NRU 試験は界面活性剤の評価に有用であるとしている。また、HET-CAM 試験 (受精鶏卵の漿尿膜試験)<sup>97)</sup> は、化粧品最終製品のスクリーニング試験にしばしば使用される有効な代替法であり、正式なバリデーションは行われていないが、フランスなどでは法律でも取り上げられている。その後 SCCP は化粧品成分の試験及び評価に関するガイダンスの第 6 版を 2006 年 12 月に公表している。

The ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) は腐食性及び強刺激性物質の検出する眼粘膜刺激性試験代替法として Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay (BCOP) と Isolated Chicken Eye Test (ICE) を承認した。一方、弱い眼刺激性の検出に関しては、細胞を用いた方法 (Neutral Red Release : NRR、Red Blood Cell : RBC、Fluorescein Leakage : FL、Cytosensor Microphysiometer : CM)、3D 培養モデル (SkinEthic Human Corneal Epithelial Model、EpiOcular OCL-200 Model) 並びに器官型培養系 (Isolated Rabbit Eye Test : IRE、Hen's Egg Test -Chorio allantoic Membrane : HET-CAM) の検討を、過去のバリデーションの再評価を含め、進めている。

COLIPA においては 2007 年の組織改正で SCAAT と PC Research が合流してできた新しい PC Research 内に、6 つの Task Force があり、Eye Irritation の Task Force も含まれている。その分科会では、1) 生理的な機能と *in vitro* 試験での角膜から遊離される損傷のシグナル

における変化のキネティクスが、回復性も含めた眼刺激を予測できるか、2) ヒトの不死化細胞や3次元ヒト角膜・結膜を用いた場合の損傷の度合と回復性に関する指標の同定、及び、3) ゲノミクスプロジェクトの眼刺激性における検討を実施している。

わが国における代替法のバリデーションについては、1990年、厚生省(当時)が新規原料配合化粧品の安全性評価のための研究を発足、その後、産学官が参加して眼刺激性試験の *in vitro* 試験に関する評価が行われた<sup>98)</sup>。前述した、米国、欧州などの状況も踏まえ、現在、日本化粧品工業連合会では受精鶏卵を用いた方法<sup>99)</sup>、培養細胞を用いた方法<sup>100)-103)</sup>、赤血球を用いた方法<sup>104)</sup>、三次元モデルを用いた方法<sup>105)</sup>、無生物を用いた方法<sup>106)、107)</sup>、the Isolated Rabbit Eye (IRE) Test Method<sup>99)、108)</sup>、the Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method<sup>89)、109)</sup>、the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method<sup>89)、110)</sup>、the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method<sup>89)、111)</sup>を紹介する「化粧品の安全性評価に関する指針2001」の改訂作業を進めている。

#### C-5-4 皮膚アレルギー性

##### ①概要

2007年度に、複数の施設によるバリデーション、ならびに共同研究の成果が報告された感作性試験の代替試験法としては、①非放射性 LLNA (Non-radioisotopic Local Lymph Node Assay)<sup>112)、113)</sup>、②THP-1細胞を用いた皮膚感作性試験代替法 (human Cell Line Activation Test; h-CLAT)<sup>114)、115)</sup>、③U937細胞を用いた皮膚感作性試験代替法<sup>116)、117)</sup>、ならびに④ペプチド結合性評価法 (Peptide Reactivity Assay)<sup>118)</sup>が挙げられる。

##### ②各試験法の状況

放射性 LLNA は、マウス *in vivo* 試験であり、いわゆる Reduction 及び Refinement を意図した代替法と位置づけられる。しかし、従来の LLNA は、放射性物質の <sup>3</sup>H-thymidine を用いて細胞の増殖性を測定するためのラジオアイソトープの施設を必要とする試験法であることから、より簡便な非放射性 LLNA の開発が進められている。そのひとつの方法である LLNA-DA 法は、被験物質投与における改良に加え <sup>3</sup>H-thymidine の代わりに ATP 量でリンパ節細胞の増殖性を測定する方法である。2006年よ

り本格的な多施設バリデーション研究が開始され、本年度の第6回国際動物実験代替法会議にてバリデーションの第1実験と第2実験の結果が報告されている<sup>119)、120)</sup>。また、<sup>3</sup>H-thymidine の代わりに BrdU を用いてリンパ節細胞の増殖を測定する LLNA-BrdU 法についてもバリデーションが実施された。

THP-1細胞を用いた皮膚感作性試験代替法 (h-CLAT)、及び U937細胞を用いた試験法は、ヒト単球由来細胞株を用いる *in vitro* 試験で、化学物質曝露時の細胞表面の CD86 や CD54 の発現量変化をフローサイトメトリーで評価する試験法である。h-CLAT は、日本の株式会社資生堂と花王株式会社により開発された試験法である。試験法の有用性を確認するために、76個の化合物に関して評価した結果、LLNA の結果との一致率は約 86%であることが、ヨーロッパ毒性学会にて報告されている<sup>121)</sup>。また、その試験法の有用性を把握するための施設間再現性評価が、COLIPA 加盟企業並びに日本化粧品工業連合会加盟企業で実施された<sup>122)、123)</sup>。さらに、試験法を確立するために必要な基礎データとして、細胞及び血清の選択条件、前培養条件の違いによる結果への影響に関して第6回国際動物実験代替法会議<sup>124)-126)</sup>で発表された。一方、U937細胞を用いた皮膚感作性試験代替法については、L'Oréal が COLIPA 加盟企業4社で行った施設間再現性評価の結果を第6回国際動物実験代替法会議にて発表している<sup>127)</sup>。

これら以外の試験法として、アミノ基やシステイン基などを有する市販または合成ペプチドと評価化合物との結合性を評価する Peptide Reactivity Assay が検討されている。その1つとして P&G が開発した方法は、評価化合物とペプチドとの結合によるペプチドの減少率から評価化合物の結合性を分析する方法で、数種類のペプチドに対する結合性から感作性のランク分類の方法も提案されている。その試験法を COLIPA 加盟企業で行った施設間再現性評価の結果は、第6回国際動物実験代替法会議にて発表されている<sup>128)</sup>。

また、光感作性試験においては、2007年度には、代替試験法に関するバリデーション、共同研究成果の報告、新規試験法に関する研究の論文発表といった、特筆すべき動向は認められなかった。

#### C-5-5 変異原性

##### ①概要

変異原性試験はその種類も多く、*in vivo*、*in vitro*法などさまざまなものがある。近年、*in vitro*小核試験法が開発され、OECDドラフトガイドラインが提案されている<sup>129)</sup>。また、感度の高いDNA損傷の検出法としてコメットアッセイの開発や、変異原性試験ではないが長期発がん性試験の代替法として、形質転換試験の開発も進められている。

## ②各試験法の状況

*in vitro*小核試験（哺乳類培養細胞を用いる小核試験）はCHL/IUなどの細胞に化学物質を処理したのち培養し、その培養細胞における小核形成の存在を調べることにより、化学物質の染色体異常誘発性をみるための試験である。染色体異常試験と比較して、標本作成や観察が容易で熟練を要しないこと、染色体構造異常誘発性だけではなく、異数性も検出できることから注目されている。

コメットアッセイは細胞をシングルセルに分散し、アガロースゲル中に包埋して電気泳動にかけることにより、個々の細胞のDNA損傷を検出する方法である。電気泳動した際の様子からコメットアッセイと呼ばれる。テイルに傷害されたDNAが存在し、テイルの量、長さなどからDNA損傷程度がわかる。既存の変異原性試験と比較して、労力の少ないこと、高感度であること、標本観察などに熟練を要しないこと、非分裂細胞に対する変異原性を評価できること<sup>130)</sup>など、さまざまな利点から近年注目されている試験系であり、環境変異原学会やJaCVAMでは試験法の標準化を検討中である<sup>131)</sup>。

ECVAMは2003年4月に実務者会議を開き、細胞形質転換法をスクリーニング法として採用することを前提にシシリアンハムスター胎児(SHE cell)細胞によるコロニー形成法とBalb/c 3T3細胞によるフォーカス形成法のバリデーションスタディを行うことを決定した。また、2005年2月にも第二回会議が開催され、詳細な試験実施計画が話し合われた<sup>132)</sup>。この形質転換試験は、動物実験で観察される二段階発がんを*in vitro*で再現したものであり、イニシエーション作用とプロモーション作用の両方を調べることができたため、イニシエーター及びプロモーターを探索する系として有用である。

## C-5-6 反復投与毒性

### ①概要

反復投与毒性試験を代替する試験法の開発を牽引しているのはECVAM<sup>133)</sup>である。ECVAMが取り上げた12のKey Areaで、Systemic toxicity（全身毒性）はKey Area 1に掲げられている。全身毒性はさらに4つのタスクフォースに分かれており、Acute Toxicity（急性毒性）、及び反復投与毒性に強く関連しているNeurotoxicity（神経毒性）、Hematotoxicity and Immunotoxicity（血液・免疫毒性）、Chronic Toxicity（慢性毒性）の各領域で代替法開発が進められている。

### ②状況

神経毒性は、developmental（発達）とadult（成熟）で分割検討されている<sup>133)</sup>。Developmental neurotoxicity（発達神経毒性、DNT）は、将来神経系を構成する細胞の増殖・分化・成熟・遊走、樹状突起・軸索・シナプス形成、神経グリア回路網形成、アポトーシスなどに対する複雑多岐な影響を考える必要があることから<sup>134)</sup>、非哺乳類及び哺乳類から得られる多種多様な材料が検討対象となっている。ECVAMは、European Chemical Industry Council（欧州化学工業連盟、CEFIC）<sup>136)</sup>、Centre for Alternatives to Animal Testing（Johns Hopkins 大学代替法センター、CAAT）<sup>137)</sup>、EPA及びNTPとの共同で、TestSmartプログラムにて発達神経毒性代替法開発研究を進めている。いずれの試験法もバリデーションへは至っていないが、生殖発生毒性試験の代替法として開発されたマウスembryonic stem cell test（胚性幹細胞試験、EST）は、発達神経毒性代替法としての応用が期待されている<sup>134)</sup>。ESTは心筋細胞への分化を当初の指標としていたが、現在では神経系細胞への分化誘導が可能となっており、ヒト胚性幹細胞の利用も含めて発達神経毒性代替法への応用が検討されている。なお、somatic neural stem cell（体性神経幹細胞、sNSC）は神経細胞、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトへの分化誘導・三次元構造構築が可能であることから、発達神経毒性試験代替法への利用が期待されている<sup>134)</sup>。さらに、*in vivo*発達神経毒性試験では行動学的検査が欠かせないことから、非哺乳類の行動を指標とする代替法開発も進められている<sup>134)</sup>。行動と遺伝子機能との結びつけが可能であり、多産であることから、魚類（メダカ、ゼブラフィッシュ）あるいは*C. elegans*（線虫）の利用が有望視されている。TestSmartプログラムにおける研究成果は2006年3月の

一回目に引き続き、第二回目の会議 (DNT workshop, 2008 年 11 月) にて報告される予定である<sup>137)</sup>。一方、neurotoxicity (成熟期における神経毒性) 検出には、各種の初代及び株化神経あるいはグリア細胞の使用が試みられている。これらのうち、ラット初代培養細胞を用いた再凝集モデルでは、mass spectrometry (質量分析) による metabolomics (メタボロミクス) 解析<sup>138)</sup> 及び multi-electrode array (多数の電極の配列) による電気生理学的活動をエンドポイントとして組み込むこと<sup>139)</sup> が有用と報告された。また、human neuroblastoma (ヒト神経芽細胞腫細胞、SH-SY5Y) 培養では、細胞生理学的指標として protein synthesis (タンパク合成)、神経細胞特異的指標として intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration (細胞内遊離カルシウム濃度)、excitability (興奮性) の指標として voltage operated  $Ca^{2+}$  channel function (電位依存性カルシウムチャネル機能)、cholinergic signal transduction (コリン性シグナル伝達) の指標として acetylcholine receptor function (アセチルコリン受容体機能)、axonopathy (軸索変性) の指標として neurite degenerative effects (神経突起変性作用) を測定し、これらを physiologically-based biokinetic (生理学的バイオキネティクス、PBBK) モデルにより評価することで、細胞毒性誘発閾値以下の毒性検出かつ lowest neurotoxic level (最小神経毒性用量、LOEL) の予測が可能と報告されている<sup>140)</sup>。

血液・免疫毒性に関しては、Colony Forming Unit-Granulocyte/Macrophage assay (顆粒球・マクロファージ系前駆細胞を用いたコロニー形成試験、CFU-GM assay) が第二種動物試験の代替法という限定つきながらも ESAC (2006 年 3 月、24 回会議) による承認を受けた<sup>133)</sup>。CFU-GM assay はマウス骨髄及びヒト臍帯血中の単核細胞を培養し、その増殖 (コロニー形成能) を指標とする試験で、ヒト acute neutropenia (急性好中球減少症) を予見可能とされている。その他の有望な血液・免疫毒性代替法に関しては、2005 年に ECVAM が公表した既存試験法及び代替法開発戦略に関するレポート<sup>141)</sup> に詳しいが、いずれの試験法も引き続き検討されているもののバリデーション段階には進んでおらず、昨年の報告時点から特筆すべき進展はない。

慢性毒性に関しては、ECVAM による二つの

FP6 (第 6 次 EU 研究・技術開発枠組み計画) が進行中である<sup>133)</sup>。一方は STREP project の PREDICTOMICS<sup>142)</sup> であり、他方は Marie Curie Research Training Network project の PULMO-NET<sup>143)</sup> である。前者では肝臓及び腎臓を、後者では肺を標的臓器とし、これら臓器における慢性毒性の初期変化を検出する試みがなされている。PREDICTOMICS<sup>142)</sup> では、以下の 10 点を今年度の成果として挙げている。

- 1) 培養細胞としては histone deacetylases (HDAC) 阻害剤処理ラット初代培養肝細胞が表現系維持の観点でより優れていること、
- 2) human hepatoma HepG2 (ヒト肝がん由来細胞) 培養において、転写因子 PGC1 $\alpha$  が CYP をはじめた代謝酵素群の遺伝子を upregulate させることを明らかにしたこと、
- 3) ヒト肝臓から肝細胞の前駆細胞を分離し、肝細胞へ分化させる技術を確認したこと、
- 4) 薬剤性 steatosis (脂肪肝) の *in vitro* モデルを確認したこと、
- 5) 薬剤性の胆汁うっ滞性黄疸の *in vitro* モデルを確認したこと、
- 6) 最適化、安定化、特性確認された *in vitro* 腎毒性検出法 (単及び共培養法) を確認したこと、
- 7) 検討中であった多数の cytotoxic assays (サイトミックアッセイ) のうち、容易さの観点から LDH release (細胞毒性)、BrdU incorporation (DNA 合成) 及び resazurin reduction (相対的生存細胞数、relative viable cell number) が有望指標として採用されたこと、
- 8) 各種の培養モデルを用いて Ochratoxin A (OTA) による遺伝子発現プロファイルを各種検討した結果より、HK-2 細胞 (ヒト近位尿管上皮細胞) の無血清單層培養法が今後の検討対象として採用されたこと、
- 9) HK-2 細胞と既知腎毒物 (CsA, CdCl<sub>2</sub>, diquat dibromide, FK506, rapamycin) を用いて遺伝子発現プロファイルが検討された結果、腎毒物による細胞傷害との関連が疑われる遺伝子が同定されたこと、
- 10) 既知腎毒物 (CsA) を用いた proteomic analysis (プロテオーム解析) により多様なタンパク発現が示唆されたこと。

一方の PULMO-NET<sup>143)</sup> では、成果として、胎児型の II 型肺胞上皮細胞培養では lamellar body (層板小体) の分泌機能が成人型の II 型肺胞上皮細胞培養より長期間維持されることを明らかにしたこと、機械的伸展により誘導される反応を単一の細胞において電子顕微鏡により評価する手法を確認したこと、単一の II 型肺胞上皮細胞において patch clamp (パッチクランプ)、fluorescence

microscopy (蛍光顕微鏡) 及び atomic force microscopy (原子間力顕微鏡) による同時観察を可能とする手法を開発したこと、COPD(慢性閉塞性肺疾患) でみられる炎症メディエーターに反応するヒト粘液分泌細胞株を使用した検討が開始されたこと、を挙げている。

以上述べてきたように主要臓器・システムを標的とした毒性を予測するための *in vitro* 試験法の開発が進められているが、現時点では有望なモデルの探索段階であり、CFU-GM assay を除いてはいずれの試験法もバリデーション段階には進んでいない。反復投与毒性は化学物質の長期暴露により細胞、組織あるいは多臓器に進行的に誘発される機能障害の結果で表される。この検出のため *in vivo* の反復投与毒性試験では広範なエンドポイント(一般状態、体重、摂餌量、臨床検査、血液・血液化学的検査、尿検査、病理組織学的検査など)が評価されている。反復投与毒性試験で得られる標的臓器(識別・毒性)、用量関係、影響の可逆性・遅発性、無毒性量(NOEL)などの情報は、規制の立場からはリスク評価の基盤となる。SCCPでは反復投与毒性の代替法開発に関する現状を、一部の主要臓器で極めて限定的にしか検討されていない、化粧品において懸念案件とされているナノ素材を参照物質として用いていない、現在検討されている手法の多くは有害性確認には有効かもしれないが化粧品のリスク評価には不向きである、などとして、期限までの代替法開発・受け入れは困難であろうとの懸念をオビニオンとして採択している<sup>144)</sup>。

#### C-5-7 生殖毒性

##### ①概要

生殖発生毒性試験を代替する試験法の開発は、ReProTect(EU委員会の第6次Framework Programme on Research and Developmentによる生殖発生毒性試験のプロジェクト)<sup>145)</sup>により進められている。ReProTectは哺乳類の生殖発生過程をFertilization(受(授)精・受胎能)、Implantation(着床)及びPrenatal development(出生前発生)の3研究領域に分割し、これらを繋ぐCross-cutting technologies(横断研究)を各W.P.(Work package)として試験法開発を進めている。ECVAMはこれらの*in vitro/in silico*試験をバッテリー試験として組み合わせることで、一連の生殖発生過程における毒性影響を評価可能な代替法を開発することを目論んでいる

<sup>146)</sup>。2002年には、出生前発生に関する代替法であるEmbryonic stem cell test for embryotoxicity(胚性幹細胞試験、EST)、Micromass embryotoxicity assay(マイクロマス試験)及びWhole rat embryo embryotoxicity assay(全胚培養試験)の3試験がECVAM Scientific Advisory Committee(ESAC)によりバリデーション済みと報告された<sup>146)</sup>。しかし、EST及び全胚培養試験は引き続き改良が進められ、ReProTect<sup>14)</sup>でその結果が報告された。

##### ②状況

ReProTect<sup>145)</sup>で紹介されている試験法の概要・状況をWork package(W.P.)順に示す<sup>1)</sup>。

W.P.1 受(授)精・受胎能はさらにW.P.1.1~1.5に細分化される。W.P.1.1 Mature spermatozoa/Spermatogenesis(成熟精子/精子形成)に関しては、従来のNeutral comet assay in sperm(精子ニュートラルコメットアッセイ)が感度向上に向けてプロトコールが改良されmodified comet(ReProComet) assayとなった。本法では、修復酵素を含む細胞抽出液を培養系へ添加することにより、被験物質が精子DNAへ与える影響をDNA切断として検出することが可能になった。またBovine spermatozoa cytotoxicity test(ウシ精子毒性試験)では、凍結融解ウシ精子への影響がcomputer assisted sperm analysis(CASA)により、motility(運動性)とmembrane integrity(膜の完全性)を指標に検査される。2施設において35被験物質を用いてプレバリデーションが行われた結果、本法は精子に対する化学物質の影響を検出可能とされ公式バリデーションへ進むことが決定した。W.P.1.2 Leydig cells(精巣間細胞)では、Luteine Hormone(LH)及びhuman Chorionic Gonadotropin(hCG)への反応性が良好なBLTI-LI7がBLTI(マウス精巣間細胞)を用いる細胞毒性試験に最適な細胞として選択された。評価エンドポイントにはmethyltetrazolium test(MTT)法による細胞毒性とテストステロン産生量が採用された。15被験物質を用いた予備検討により、ステロイド産生・分泌への影響検出の可能性が示唆され、本法はバッテリーの一翼を担う試験として期待が持たれている。W.P.1.3 Sertoli cells(セルトリ細胞)では、ラットセルトリ細胞(初代培養及びSerW3株)を用い、細胞毒性とインヒピンB分泌量を指標に検討されている。15種の既知精巣毒性物質を検討した



結果、本法にて精巣毒性の有無を判定可能と考えられたため、さらに2施設において7被験物質を用いた再現性の確認がなされた。本法は、ステロイド産生・分泌への影響検出の可能性も示唆されている。なお、SerW3細胞株では、精巣毒性発現メカニズムの一要因として重要な血液精巣関門を形成する tight junction (密着結合) の integrity (完全性) を評価することも可能であった。さらに、rat testicular fragments in short term dynamic culture (ラット精巣断片の短期間動的培養) は、hCG 刺激によるテストステロン産生を検出可能であり、本法を用いることでステロイド産生に影響を及ぼす物質が識別可能であった。ただし、用量関係が認められない場合もあるなどの課題も認められている。W.P. 1.4 Meiotically competent oocytes (減数分裂を含めた卵形成) は、雌受胎能試験代替の一翼を担うことが目されている。マウス及びウシ成熟卵細胞を用いて、short term *in vitro* Micronuclear (IVM) assayにより減数分裂への影響が、*in vitro* Fertilization (IVF) experimentsにより卵細胞の質的变化及び着床過程への影響が検討されている。着床前発生への影響を検討する方法としては、接合子から透明帯脱出までの *in vitro* 培養法が有望である。ウシ卵母細胞と15被験物質を用いた予備検討では、卵細胞の成熟及び受精能獲得に対する化学物質の影響検出の可能性が示唆された。なお、bovine pre-implantation assay (ウシ着床前アッセイ) では初期胚発生抑制効果を検出するために、プロトコールの最適化が図られている。W.P. 1.5 Granulosa/Thecal cells (顆粒層細胞/莢膜細胞) 及び W.P. 1.6 Folliculogenesis (卵胞形成) では、トランスジェニックマウス卵巣腫瘍由来不死化 NT-1 granulosa cell を用いて検討されている。不死化顆粒膜細胞を用いることで、アロマトーゼ活性への影響に関する補足的データを得ることが可能である。本法では、ステロイド産生及び分泌に対する化学物質の影響を検出できる可能性が示唆されている。一方、Follicle bioassay (卵胞バイオアッセイ) では15以上の被験物質を用いて卵胞形成、ステロイド産生及び卵形成への影響が検討中である。

WP2 では着床への影響を扱うが、標的を子宮・卵管サイド (W.P. 2.1 Endometrium/implantation and oviduct studies) 及び胎盤サイド (W.P. 2.2

Placental toxicity) に分け、他の分野から遅れて2006年7月に開始した。このため、現段階では参照物質による試験へ到達しておらず、既存の候補試験法の改良に注力されている。W.P. 2.1 では Human endometrial explants (ヒト子宮内膜移植培養) が有望視されているが、外科的採取時点の性周期による差異及び喫煙の有無による代謝酵素活性の多寡が認められたことから、本法に用いるヒト子宮内膜の特性解明が課題とされている。*In vitro* test on chorionic villous explants from first trimester human placenta (ヒト妊娠第一三半期の絨毛膜絨毛移植培養) では、p-nonylphenol (p-NP) 及び陽性対照物質 (17beta-E2) がヒト胎盤発育へ与える影響が、beta-hCG, proinflammatory cytokine (炎症性サイトカイン) である macrophage migration inhibitory factor (MIF) 及び E2 受容体発現を指標として検討され、暫定的な測定ポイントにおける結果ではあるが、これらが有望な指標であることが示唆されている。W.P. 2.2 に関しては、dual re-circulating placental perfusion system (分娩直後のヒト胎盤を用いた両側再灌流法) により胎盤透過性を評価可能であることが示され、2施設において benzo(a)pyrene などを用いたプレバリデーションが予定されている。また、microvascular fragments (ヒト妊娠末期胎盤の毛細血管断片、MVs) を使い、血管周囲幹細胞の増殖及び線維芽細胞の成熟を指標に化学物質の影響を検出する試みが、カドミウムを参照物質として行われた。カドミウムが幹細胞へ毒性を示す一方で、成熟細胞には影響を示さないこと、また、採取母体により細胞増殖速度が異なることが報告されている。本 Work package は、ヒト由来材料(細胞・組織・器官など)を使用する点で他領域と一線を画している。ヒト由来材料より得られたデータと動物実験データとの比較情報を提供できるという点で代替法開発上極めて重要である。しかしながら、いずれの試験法も公式バリデーションへ進めるには時期尚早とされており、ヒトから採取した時点の性周期の影響、細胞増殖速度、細胞機能及び代謝能におけるヒト個体差の検討、胎盤還流に用いる最適な培地の開発、適切な陽性対照物質の選択が克服すべき課題として挙げられている。

W.P. 3 では出生前発生を、W.P. 3.1 Early prenatal development (初期発生) 及び W.P. 3.2 Late prenatal development (後期

発生)に分けて検討している。W.P. 3.1 初期発生に関しては、EST において従来の心筋系への分化に加え、神経系あるいは骨格系への分化を指標に加える改良研究が進められている。並行して、2 施設において心筋への分化を指標としてバリデートされたプロトコールと 12 の既知胚毒性物質を用いてデータ収集・データベース化が進行中である。さらに、本法では、より早期・客観的な指標を確立するために、既知催奇形性物質を用いて、プロテインバイオマーカーなどを対象に組織化学・分子生物学的手法を駆使した新規指標の探索が進められている。神経細胞のマーカーとしては MAP2、beta-III tubulin 及び alpha-internexin、グリア細胞のマーカーとしては GFAP 抗体による免疫蛍光染色が試みられており、各種神経細胞の同定法が検討されている。神経系への分化に関しては細胞の再播種をスキップ可能なプロトコール改良に成功し、迅速化に繋がった。また、マウス及びヒトの ES 細胞を用いた比較検討には、種差に関して有益な情報を提供することが期待されている。さらに、神経系細胞と心筋系細胞における感受性差は、数種の化合物を用いた予備検討段階である。なお、本法ではヒト ES 細胞利用による種差の克服も視野に入れている。ヒト ES 細胞の神経前駆細胞への分化に対するメチル水銀の影響が、神経細胞 mRNA マーカーの発現(低下)を指標に検討・報告された。神経前駆細胞への分化に加えて、神経系細胞への成熟に関するプロトコールが、最適化・標準化の段階である。なお、マウス幹細胞を用いた代替試験法とされる Reproductive Embryonic Toxicity (RETox) assay が開発者(テュフラインランド)から ESAC へ提出されたが、承認は拒否された<sup>147)</sup>。W.P. 3.2 後期発生では、全胚培養試験への代謝活性化導入に努力が払われている。Cyclophosphamide (CP) を参照物質として用いた検討により、ラット肝ミクロソームが代謝活性化法の材料として採用され、SOP へ追加された。代謝活性化の追加によりアップデートされたプロトコールは、プレバリデーションされたが、ReProTect の Metabolic Activation Group (代謝活性化グループ)の助言により選定した数種の代謝活性化物質を用いた試験が行われた結果、ミクロソームには存在しない細胞質内酵素による代謝が欠如していることなどの問題点も明らかになっている。遺伝毒性分野で汎用されている S9 分

画は本系において毒性を有することから現時点では使用できないが、より完全性の高い代謝活性化の導入が依然として残る課題である。

上記三領域(W.P. 1~3)における代替法開発をサポートする W.P. 4 横断研究はさらに W.P. 4.1~4.5 に分けられている。横断研究領域におけるメカニズムベースの先進的研究は、他領域において開発される試験法に組み込まれることにより、新規性と妥当性を高めると期待されている。W.P. 4.2 Quantitative Structure/Activity Relationships (構造活性相関、QSAR) に関して、ReProTect では血液胎盤関門の通過、血液精巣関門への影響及び hERa (ヒトエストロジェン受容体 $\alpha$ )との相互作用の観点から研究を進めている。血液胎盤関門の通過に関しては、化学物質の水素結合と疎水性に依存することが示され、hERa 結合能については 645 化学物質のデータを用いてモデル化された。代謝活性化モデルは文献情報により構築された。これらの QSAR 的アプローチと代謝活性化は TIMES モデルとして組み合わせられている。本モデルの有用性は 141 化学物質を用いて検討されており、毒性情報の weight of evidence approach (重み付け過程)において補助的な情報を提供することで、動物試験の代替及び削減へ効果を及ぼすことが期待されている。今後はさらにデータを追加することで、スクリーニングだけでなく、リスクアセスメント目的にも使用できるようになると期待されている。W.P. 4.3 Biotransformation (生体内変化)では、Metabolic teratogenicity test (代謝催奇形性試験)が検討されている。直接催奇形性物質の検出において、マウス悪性奇形腫 (F9) 細胞あるいは EST は有用であるが、代謝活性化を必要とする物質の検出が課題とされてきた。本問題の克服のために、これらの手法への肝細胞初代培養系あるいは肝 S9-mix の組み込みが検討されている。初期検討としてトレーニングセルラインである F9 システムへの肝細胞初代培養系適用が図られ、前駆催奇形性物質である valpromide (VPD) を検出可能なこと、3-methyl-colanthrene により誘導された肝細胞の方が活性が高いこと及びラットコラーゲンの方がヒトコラーゲンを用いるより肝細胞の代謝能維持に優れていることが報告されている。肝細胞は EST に使用する D3 培地で培養可能であることから EST への適用も期待できる。遺伝毒性分野で実績のある肝 S9-mix に関しては、それ自身に細胞毒性が知

られており、組み込むために毒性物質を除去する方法が検討されている。ヒト肝細胞の使用、各種培養細胞に特異的な代謝活性化方法の開発、最適化が課題である。W.P. 4.4 Array technologyの領域では、Application of array technology to *in vitro* identification of endocrine disruptors (*in vitro*で内分泌かく乱作用を検出するためのアレイテクノロジーの適用)が検討されている。(抗)アンドロゲン作用を検出するための tier アプローチとしてSOPが作成されたが、トキシコゲノミクスを組み込むためには functional marker (機能的マーカー)を用いて gene expression signature (遺伝子発現印章)を検索する必要があることが次の課題として挙げられている。W.P. 4.5 Receptor interaction (受容体相互作用)では、男性あるいは女性ホルモン応答エレメントとレポーター遺伝子を安定発現させた各種培養細胞を用い、受容体結合能あるいは転写活性化能が検討されている。ECVAMは、MELN細胞を用いた試験、Androgen receptor-mediated transactivation assay in PALM cells (PALM細胞を用いたアンドロゲン受容体転写活性化アッセイ)、AR CALUX<sup>®</sup>、PanVera's human recombinant ER $\alpha$  and rat recombinant AR for receptor binding 及び ER $\alpha$  CALUX<sup>®</sup>の各試験法をプレバリデーションへ進めるとしている。前3試験法については、複数施設による再現性・頑強性の検討を行うために、リード試験施設において培養・試験条件などのプロトコールが最適化され、データがレビューされた。SOPがECVAMへ提出されており、他施設へ提供可能な状況にある。なお、AR CALUX<sup>®</sup>では動物実験結果との比較が行われ、良好な相関が報告されている<sup>149)</sup>。ER $\alpha$  CALUX<sup>®</sup>では代謝物の受容体相互作用を検討するために、肝細胞初代培養系あるいは肝 S9-mix の組み込みが開発され、SOPが作成済みである。このほか、Recombinant human estrogen receptor- $\alpha$  binding assay (リコンビナントヒトエストロゲン受容体 $\alpha$ 結合能アッセイ)及びRecombinant rat androgen receptor binding assay (リコンビナントラットアンドロゲン受容体結合能アッセイ)のプロトコールが [3H]-estradiol 及び [3H]-methyltrienolone をそれぞれ ER 及び AR 結合性モデル化合物として開発された。ER 結合能については、12化合物を用いたプレバリデーションが行われ、プロトコールの最適

化が図られた。結果は既報と一致しており、良好な再現性も報告されている。これらエストロゲン及びアンドロゲン受容体との結合能及び転写活性化能に関する試験法開発は目覚ましい進展を遂げている。受容体結合能と転写活性化能を評価可能な試験系はプレバリデーション過程終了が見込まれており、アレイテクノロジー及び QSAR 的アプローチを含めて、内分泌かく乱作用に関して規制側への有力な情報提供となることが期待されている。

以上、生殖発生毒性を予測するための *in vitro* 試験法の開発が進められ、一部においては進展も認められるものの、出生前発生に関する3試験法を除いては、いずれの試験法もバリデーション段階には進んでいない。SCCP では生殖発生毒性試験代替法開発の現状を、バリデーション済みの出生前発生の3試験に関しても受け入れは時期尚早としている。さらに、現在の二世試験を一世試験で代替することも試みのひとつとして提案したうえで、いずれにしろ期限までの代替法開発は困難との懸念をオピニオンとして採択している<sup>149)</sup>。一方、ReProtectでは研究成果をホームページなどで公表しているが、産業界あるいは規制担当の認知が十分ではないとしている。このため、バリデーション済みの試験法の公知化・一般化を図ることを目的として、生殖発生毒性代替法を申請・審査などの現場で使用するためのサマースクールと題した技術トレーニングを2008年中に実施するとしている。ドイツのベルリン自由大学におけるESTに関する講習会も含めて、技術トランスファーの手立ても徐々に整備されつつある。

#### C-5-8 経皮吸収性

経皮吸収試験は化粧品、医薬部外品及び医薬品等の皮膚への適用による角質、表皮及び真皮への透過ならびに全身的暴露を評価するために行われる。経皮吸収試験代替法については、実験動物を用いた *in vivo* 試験 (OECD TG427)<sup>150)</sup> と同時に、動物 (主にラット及びブタ) またはヒト摘出皮膚を用いた透過拡散セルによる *in vitro* 試験法 (OECD TG428)<sup>151)</sup> が標準化されている。現在、このガイドラインが経皮吸収試験代替法の中心的な役割を担っている。Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) の“化粧品成分の皮膚吸収における *in vitro* 評価基準” (2006年3月アップデート) においても、原則的に TG428

の遵守が求められている<sup>152)</sup>。よって、経皮吸収試験における代替法研究はTG428をベースとした*in vitro*試験の改良、動物及びヒト摘出皮膚の代替材料の検討である。

TG428の改良として、長時間の皮膚透過性試験におけるレセプター溶液への防腐剤（アジ化ナトリウム）添加を推奨する結果が報告されている<sup>153)</sup>。代替材料については、再構築ヒト皮膚モデルが最も研究されている。ドイツで行われたプレバリデーションスタディでは、再構築ヒト表皮を用いた試験法が高い施設内・施設間再現性を示している<sup>154)</sup>。第6回国際動物実験代替法会議（WC6）では、スキンケア原料及び染毛剤の使用方法を考慮したプロトコールによるスクリーニング試験の結果が報告されている<sup>155)</sup>。わが国でも、動物実験代替法確立に向けて三次元培養ヒト皮膚モデルを利用した試験法の研究が行われている<sup>156)</sup>。その他、ウシ乳房皮膚<sup>157)</sup>、高分子人工膜<sup>158)</sup>、角質層代替物（SCS）<sup>159)</sup>が検討されている。

拡散透過セルを用いない経皮吸収試験代替法については、膜コートファイバー（MCF）アレイ<sup>160)</sup>やPAMPA<sup>161)</sup>などが開発されている。その他、バイオアベイラビリティ<sup>162)</sup>や分配・拡散パラメーター<sup>163)</sup>を用いたコンピュータ予測ならびに自由エネルギー関係に基づくQSPRモデル<sup>164)</sup>が報告されている。

反復投与による経皮吸収試験については限られた試験期間以内の反復投与でデザインされたいくつかの試験法はあるが、現在、標準化された反復局所投与に利用できる*in vitro*試験法はなく、代謝を組み込んだ皮膚吸収/透過に利用できる*in vitro*試験法もない。また、ヒトボランティアによる皮膚吸収試験は、化粧品原料や化粧品製品の低い毒性の場合において行うことができるが、利用できるヒトのデータはほとんどないのが実情である<sup>165)</sup>。

#### C-5-9 小括

本年度の代替法の開発と評価に関する状況を安全性評価項目ごとにとりまとめた。その結果、本年度の特筆すべき動きは、皮膚刺激性試験代替法としてEPISKINをECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC)が承認したこと、腐食性及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)及びIsolated Chicken Eye Test (ICE)をESAC及びICCVAMが承認したこと、

REACHのための皮膚感作性試験としてReduced Local Lymph Node Assay (rLLNA)をESACが承認したこと、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、ICCVAMが承認したことが挙げられた。

#### D. 結論

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、ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC)が皮膚刺激性試験代替法としてEPISKINを、腐食性及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)及び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た。また、ICCVAMが腐食性及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た。

代替法開発体制の観点からは、JaCVAMが平成17年11月に発足した後、その役割の明確化され、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ことが挙げられる。国際的には、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、国際的な協力体制が今後の課題となったことが挙げられる。

代替法に関する情報交流の観点からは、日本で第6回国際代替法会議が開かれ、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が進んだことが挙げられる。

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、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。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。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 参考文献

### EU 動向

- 1) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003, Official Journal of the European Union, L66/26, 2003
- 2) CTPA News update, February 6, 2003.
- 3) CTPA News update, March 3, 2003.
- 4) [http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/html/cosm\\_animal\\_test.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/html/cosm_animal_test.htm)
- 5) <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- 6) [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_s\\_06.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_06.pdf)
- 7) [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_s\\_07.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_07.pdf)
- 8) [http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index_en.htm)
- 9) [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach\\_intro.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm)
- 10) [http://ec.europa.eu/enterprise/reach/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/reach/index_en.htm)
- 11) <http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=MEMO/06/488&format=HTML&aged=0&language=EN&guiLanguage=fr>
- 12) [http://ec.europa.eu/enterprise/reach/docs/reach/reach\\_in\\_brief\\_revised\\_061212.pdf](http://ec.europa.eu/enterprise/reach/docs/reach/reach_in_brief_revised_061212.pdf)
- 13) <http://ecb.jrc.it/reach/>
- 14) <http://ecb.jrc.it/testing-methods/>
- 15) De Silva, O. et al., The COLIPA research programme. Abstracts 6th World Congress 2007, 279, 2007
- 16) McNamee, P. et al., Update on the COLIPA research programme for development of *in vitro* methods for eye irritation. Abstracts 6th World Congress 2007, 61, 2007
- 17) Aeby, P. et al., The COLIPA strategy for developing and pre-validating *in vitro* alternatives for skin sensitization testing. Abstracts 6th World Congress 2007, 70, 2007
- 18) Pfuhler, S. et al., Towards animal-free genotoxicity testing: the COLIPA strategy. Abstracts 6th World Congress

2007, 66, 2007

- 19) Ryan, C. et al., Further examination of a human cell line activation test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential. Abstracts 6th World Congress 2007, 253, 2007
- 20) Ovigune, J-M. et al., The U937/CD86 harmonized *in vitro* assay protocol for the prediction of skin sensitization potential moving forwards a COLIPA ring study. Abstracts 6th World Congress 2007, 247, 2007
- 21) Price, B. et al., Evaluation of a peptide reactivity assay for screening skin allergens: an interlaboratory study. Abstracts 6th World Congress 2007, 238, 2007
- 22) <http://www.bfr.bund.de/cd/1591>
- 23) <http://www.nc3rs.co.uk/>
- 24) <http://www.frame.org.uk/index.php>
- 25) <http://www.forschung3r.ch/en/information/>
- 26) <http://www.nca-nl.org/>
- 27) <http://www.estiv.org/>
- 28) <http://www.altex.ch/en/index.html?id=12>
- 29) <http://www.zet.or.at/subnode.3.121.de>, Congress\_2007, kongress.php

### 米国動向

- 30) ICCVAM Test Method Evaluation Report: *In vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Severe Irritants and Corrosives, NIH Publication No. 07-4517, November 2006
- 31) Background Review Document - Current Status of *In vitro* Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method, NIH Publication No. 06-4512, March 2006
- 32) Background Review Document - Current Status of *In vitro* Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method, NIH Publication No. 06-4513, March 2006
- 33) Background Review Document - Current Status of *In vitro* Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe

Irritants: Isolated Rabbit Eye Test Method, NIH Publication No. 06-4514, March 2006

- 34) Background Review Document - Current Status of *In vitro* Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane Test Method, NIH Publication No. 06-4515, March 2006
- 35) [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna\\_PerfStds.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna_PerfStds.htm)
- 36) Background Review Document: *In vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity, NIH Publication No. 07-4518, November 2006
- 37) ICCVAM Test Method Evaluation Report: *In vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Testing, NIH Publication No. 07-4519, November 2006
- 38) <http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/10thAnnivSymp/10thAnnivSymp.htm>
- 39) <http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/AcuteToxWksp08/AcuteToxWksp08.htm>
- 40) The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, CTFA Safety Evaluation Guidelines, 2007

#### その他の国際動向

- 41) [http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_2349687\\_1\\_1\\_1\\_1,00.htm](http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.htm)
- 42) <http://www.oecd.org/dataoecd/46/29/39821664.pdf>
- 43) <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2007/10/h1011-1.html>

#### 日本の動向

- 44) Ikarashi, Y. et al., (2007) First inter-laboratory validation study on LLNA-DA. 第6回国際代替法会議要旨集 P2-2082, 254.
- 45) Kanazawa, Y. et al., (2007) Second inter-laboratory validation study on LLNA-DA. 第6回国際代替法会議要旨集 P2-2083, 255.
- 46) Takao, Ashikaga et al.: Results of a Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (1st

Report): A study of the criteria for THP-1 cell selection, 6th World Congress on Alternative & Animal Use in the Life Sciences, abstract P241, P2-2056

- 47) Okamoto, Kenji et al.: 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, 6th World Congress on Alternative & Animal Use in the Life Sciences, abstract P242, P2-2057
- 48) Sakiko, Sono et al.: 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, 6th World Congress on Alternative & Animal Use in the Life Sciences, abstract P242, P2-2058
- 49) Mizuno, Makoto et al.: 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, 6th World Congress on Alternative & Animal Use in the Life Sciences, abstract P243, P2-2059

#### 単回投与毒性

- 50) Gribaldo, L. et al., Ruhdel 3.1. Acute toxicity. Alternative (Non-Animal) Method for Cosmetics Testing: Current Status and Future Prospects, ATLA, 33, Suppl. 1, 27, 2005
- 51) Gennari, A. et al., ECVAM Workshop 50. Strategies to replace *in vivo* acute systemic toxicity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 50. ATLA, 32, 437, 2004
- 52) Organisation for Economic Co-operation and Development. Chemicals Testing-Guidelines. ([http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_2349687\\_1\\_1\\_1\\_1,00.htm](http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.htm))
- 53) Report of the International Workshop on *In vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity, NIH Publication No. 01-4499, August 2001

- 54) Clemedson, C. et al., Development of an *in vitro* test battery for the estimation of acute human systemic toxicity: An outline of the EDIT project. Evaluation-guided Development of New *In vitro* Test Batteries. ATLA, 30, 313, 2002
- 55) Ekwall, B. et al., EDIT - a New International Multicenter Programme to Develop and Evaluate Batteries of *In vitro* Tests for Acute and Chronic Systemic Toxicity. ATLA, 27, 339, 1999
- 56) ACuteTox - Research Project For Alternative Testing. Welcome to ACuteTox. (<http://www.acutetox.org/>)
- 57) A-Cute-Tox project an Integrated Project under the EU 6FP with the aim to optimize and pre-validate an *in vitro* test strategy for predicting human acute toxicity. European Society of Toxicology *in vitro* (ESTIV) Newsletter 18, 2005
- 58) AcuteTox Newsletter, July 2007 ([http://www.acutetox.org/docs/ACuteTox\\_Newsletter\\_2.pdf](http://www.acutetox.org/docs/ACuteTox_Newsletter_2.pdf))
- 59) Federal Register, 69, 61504, 2004
- 60) Background Review Document: *In vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity, NIH Publication No. 07-4518, November 2006
- 61) ICCVAM Test Method Evaluation Report: *In vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Testing, NIH Publication No. 07-4519, November 2006
- 62) Casati, S. et al. Preliminary (Phase I) Results of a Validation Study to Evaluate the Reliability and Relevance of Two *In vitro* Cytotoxicity Assays for Predicting Rodent and Human Acute Systemic Toxicity, 41st Congress of the European Societies of Toxicology EUROTOX 2003, 2003
- 63) Strickland, J. A. et al., Data Collection and Analysis Systems for an *In vitro* Cytotoxicity Validation Study, Society of Toxicology 43rd Annual Meeting, The Toxicologist, 50, 2004
- 64) Stokes, W. S. et al., Results of the final phase of a validation study to evaluate *in vitro* cytotoxicity assays for estimating rodent acute systemic toxicity, ALTEX, 22, Special Issue, Abstracts 5th World Congress 2005, 196, 2005
- 皮膚毒性
- 65) Basketter, D. A. et al., Predictive testing in contact dermatitis: irritant dermatitis, Clinics in Dermatology, 15, 637, 1999
- 66) York, M. et al., Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential, Contact Dermatitis, 34, 204, 1996
- 67) Van de Sandt, J. et al., The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation, ATLA, 27, 723, 1999
- 68) Sonoda, I. et al., A prevalidation study for three-dimensional cultured human skin models as alternatives to skin irritation testing, Altern. Animal Test. Experiment., 8, 91, 2002
- 69) Botham, P. A., The validation of *in vitro* methods for skin irritation, Toxicol. Letters, 149, 387, 2004
- 70) Fentem, J. H. et al., Update on the validation and regulatory acceptance of alternative tests for skin corrosion and irritation, ATLA, 32, Suppl. 1, 683, 2004
- 71) Cotovio J., et al. (2005) The *in vitro* skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process. Alternatives To Laboratory Animals, 33 (4), 329-349.
- 72) OECD guidelines for testing of chemicals, 431, Paris, OECD, 2004
- 73) 薬事・食品衛生審議会・毒物劇物部会議事録 (<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2004/10/txt/s1005-1.txt>)
- 74) OECD guidelines for testing of chemicals, 430, Paris, OECD, 2004
- 75) NIEHS, IH publication, No. 99-4495, 1999
- 76) OECD guidelines for testing of chemicals, Proposal for a draft new guideline 435, 2004
- 77) Directive 2001/59/EC of 6 August 2001,

- Official Journal of the European Union, L225/1, 2001
- 78) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 432, Paris, OECD, 2004
- 79) 大野 泰雄ら, Balb/c 3T3 細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価結果報告, Altern. Animal Test. Experiment., 10, 50, 2004
- 80) Spielmann, H. et al., *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2., ATLA, 22, 314, 1994
- 81) 森眞輝ら, *In vitro* 光毒性試験の動物実験代替法としての Yeast-RBC アッセイの開発の提案, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 84, 2004
- 82) 田中憲穂ら, 酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験を用いた光毒性: バッテリーのバリデーション及び評価委員会での検討中間報告, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 85, 2004
- 83) 吉村功ら, 酵母-赤血球試験の光毒性試験代替法としてのバリデーション研究, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 86, 2004
- 84) Ying Yang et al., The Study on 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Assay in Cosmetic Products, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Lifesciences, Abstract, 226, P2-2025, 2007
- 85) Lelièvre D. et al., The Episkin Phototoxicity Assay (EPA): Development of an *in vitro* Tiered Strategy using 17 Reference Chemicals to Predict Phototoxic Potential, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Lifesciences, Abstract, 226, P2-2026, 2007
- 86) Imai N. et al., *In vitro* Phototoxicity Assay by 3-dimensional Skin model, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Lifesciences, Abstract, 227, P2-2027, 2007
- 87) Lelièvre D. et al., The Episkin Phototoxicity Assay (EPA): Development of an *in vitro* Tiered Strategy using 17 Reference Chemicals to Predict Phototoxic Potency, Toxicol. *in vitro*, 21, 977, 2007
- 眼刺激性
- 88) Kay, J. H. and Calandra, I. C., Interpretation of eye irritation tests, J. Soc. Cosmetic Chem., 13, 281, 1962
- 89) ICCVAM Test Method Evaluation Report: *In vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Severe Irritants and Corrosives, NIH Publication No. 07-4517, November 2006
- 90) Background Review Document - Current Status of *In vitro* Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method, NIH Publication No. 06-4512, March 2006
- 91) Background Review Document - Current Status of *In vitro* Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method, NIH Publication No. 06-4513, March 2006
- 92) Background Review Document - Current Status of *In vitro* Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Rabbit Eye Test Method, NIH Publication No. 06-4514, March 2006
- 93) Background Review Document - Current Status of *In vitro* Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane Test Method, NIH Publication No. 06-4515, March 2006
- 94) The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, CTFA Safety Evaluation Guidelines, 2007
- 95) <http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Testing-Methods/ANNEXV/B05web2004.pdf>
- 96) [http://europa.eu.int/comm/health/ph\\_risk/committees/sccp/documents/out173\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out173_en.pdf)
- 97) Gilleron, L. et al., Evaluation of a modified HET-CAM assay as a screening test for eye irritancy, Toxicol. *in vitro*, 10, 431, 1996
- 98) Ohno, Y. et al., Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1)



- Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicol. in vitro*, 13, 73, 1999
- 99) Hagino, S. et al., Interlaboratory validation of *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (2) Chorioallantoic membrane (CAM) test. *Toxicol. in vitro*, 13, 99, 1999
- 100) Tani, N. et al., Interlaboratory validation of *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (8) Evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells. *Toxicol. in vitro*, 13, 175, 1999
- 101) Chiba, K. et al., Interlaboratory validation of *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (9) Evaluation of cytotoxicity test on HeLa cells. *Toxicol. in vitro*, 13, 189, 1999
- 102) Okumura, H. et al., Interlaboratory validation of *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (10) Evaluation of cytotoxicity test on CHL cells. *Toxicol. in vitro*, 13, 199, 1999
- 103) Uchiyama, T. et al., Interlaboratory validation of *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (7) Evaluation of cytotoxicity test by Corneal PackR. *Toxicol. in vitro*, 13, 163, 1999
- 104) Okamoto, Y. et al., Interlaboratory validation of *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (3) Evaluation of the haemolysis test. *Toxicol. in vitro*, 13, 115, 1999
- 105) Ohuchi, J. et al., Interlaboratory validation of *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (6) Evaluation of MATREXTM. *Toxicol. in vitro*, 13, 153, 1999
- 106) Matsukawa, K. et al., Interlaboratory validation of *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (11) Evaluation of EYETEXTM. *Toxicol. in vitro*, 13, 209, 1999
- 107) Hatao, M. et al., Interlaboratory validation of *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (4) Evaluation of haemoglobin denaturation test. *Toxicol. in vitro*, 13, 125, 1999
- 108) Burton, P. et al., The *in vitro* assessment of severe eye irritants. *Food. Chem. Toxicol.*, 19, 471, 1981
- 109) Weil, C. S. and Scala, R. A., Study of intra-and inter-laboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 19, 276, 1971
- 110) Luepke, N. P., Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food. Chem. Toxicol.*, 23, 287, 1985
- 111) Gautheron, P. et al., Bovine corneal opacity and permeability test: an *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, 442, 1992
- 皮膚アレルギー性
- 112) Yamashita, K. et al., (2005) Development of a modified local lymph node assay using ATP measurement as an endpoint. *AATEX* 11, 136-144.
- 113) Takeyoshi, M. et al., (2001) Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol. Lett.* 119, 203-208.
- 114) Ashikaga, T. et al., (2006) Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicology in vitro*, 20, 763-773.
- 115) Sakaguchi, H. et al., (2006) 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. *Toxicology in vitro*, 20, 774-784
- 116) Ade N. et al., (2006) Activation of U937 cells by contact sensitizers: CD86 expression is independent of apoptosis. *Journal of Immunotoxicology*, 3, 189-197.
- 117) Python F. et al., (2007) Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol Appl Pharmacol*, 220, 113-24.
- 118) Gerberick, G.F. et al., (2004)

- Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological Sciences*, 81, 332-343.
- 119) Ikarashi, Y. et al., (2007) First inter-laboratory validation study on LLNA-DA. 第6回国際代替法会議要旨集 P2-2082, 254.
- 120) Kanazawa, Y. et al., (2007) Second inter-laboratory validation study on LLNA-DA. 第6回国際代替法会議要旨集 P2-2083, 255.
- 121) Sakaguchi, H. et al., (2007) The *in vitro* skin sensitization test; human cell line activation test (h-CLAT) using THP-1 cells. *Toxicology letters*, 172S, S93.
- 122) Ashikaga, T. et al., (2008) Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization: Results of the First Japanese inter-laboratory Study. AATEX (in press).
- 123) Ryan C. (2007) Further examination of a human cell line activation test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential. 第6回国際代替法会議要旨集 P2-2080, 253.
- 124) Okamoto, K. et al., (2007) Results of a Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (2<sup>nd</sup> report): a study of the criteria for THP-1 cell selection. 第6回国際代替法会議要旨集 P2-2057, 241.
- 125) Sono, S. et al., (2007) Results of a Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (3<sup>rd</sup> report): effect of serum difference. 第6回国際代替法会議要旨集 P2-2058, 241.
- 126) Mizuno, M. et al., (2007) Results of a Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (4<sup>th</sup> report): effects of pre-culture conditions. 第6回国際代替法会議要旨集 P2-2059, 242.
- 127) Jean-Marc Ovigne et al., (2007) The U937/CD86 harmonized *in vitro* assay protocol for the prediction of skin sensitization potential moving toward a COLIPA ring study. 第6回国際代替法会議要旨集 P2-2068, 247.
- 128) Price, B. B. et al., (2007) Evaluation of a peptide reactivity assay for screening skin allergens: an interlaboratory study. 第6回国際代替法会議要旨集 P2-2050, 238.
- 変異原性
- 129) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE 487: *In vitro* Micronucleus Test. <http://www.oecd.org/dataoecd/33/22/37865944.pdf>
- 130) Fairbairn DW. et al., (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 339(1):37-59.
- 131) 小島 肇 JaCVAMの昨今の動向, 第20回日本動物実験代替法学会要旨集, 41-42.
- 132) 梅田誠ら 発がん性試験の代替法: ECVAMでの prevalidation Studyの現状, 第19回日本動物実験代替法学会要旨集, 46-47.
- 反復投与毒性
- 133) <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- 134) Coecke S, Goldberg AM, Allen S, Buzanska L, Calamandrei G, Crofton K, Hareng L, Hartung T, Knaut H, Honegger P, Jacobs M, Lein P, Li A, Mundy W, Owen D, Schneider S, Silbergeld E, Reum T, Trnovec T, Monnet-Tschudi F, Bal-Price A. Workgroup report: incorporating *in vitro* alternative methods for developmental neurotoxicity into international hazard and risk assessment strategies. *Environ Health Perspect.* 2007 Jun;115(6):924-31.
- 135) Lein P, Locke P, Goldberg A. Meeting report: alternatives for developmental neurotoxicity testing. *Environ Health Perspect.* 2007 May;115(5):764-8.
- 136) <http://www.cefic.org/>
- 137) <http://caat.jhsph.edu/>
- 138) van Vliet E, Morath S, Eskes C, Linge J, Rappsilber J, Honegger P, Hartung T, Coecke S. A novel *in vitro* metabolomics approach for neurotoxicity testing, proof of principle for methyl mercury chloride and caffeine. *Neurotoxicology.* 2007 [Epub ahead of print: ページ数不明]
- 139) van Vliet E, Stoppini L, Balestrino M, Eskes C, Griesinger C, Sobanski T, Whelan

- M, Hartung T, Coecke S. Electrophysiological recording of re-aggregating brain cell cultures on multi-electrode arrays to detect acute neurotoxic effects. *Neurotoxicology*. 2007 Nov;28(6):1136-46.
- 140) Forsby A, Blaauboer B. Integration of *in vitro* neurotoxicity data with biokinetic modelling for the estimation of *in vivo* neurotoxicity. *Hum Exp Toxicol*. 2007 Apr;26(4):333-8.
- 141) Alessandra Gennari ; Masarin Ban ; Armin Braun ; Silvia Casati ; Emanuela Corsini ; Jaroslaw Dastyh ; Jacques Descotes ; Thomas Hartung ; Robert Hooghe-Peters ; Robert House ; Marc Pallardy ; Raymond Pieters ; Lynnnda Reid ; Helen Tryphonas ; Eric Tschirhart ; Helga Tuschl ; Rob Vandebriel ; Laura Gribaldo The use of *In vitro* Systems for Evaluating Immunotoxicity: The Report and Recommendations of an ECVAM Workshop *Journal of Immunotoxicology*, Volume 2, Issue 2, 2005, Pages 61 - 83
- 142) <http://www.predictomics.com/>
- 143) <http://www.elegantweb.at/d103-b1375d38/>
- 144) [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_s\\_06.pdf#search=sccp,19june2007,opinion,alternative](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_06.pdf#search=sccp,19june2007,opinion,alternative)

#### 生殖毒性

- 145) <http://www.reprotect.eu>
- 146) <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- 147) [http://ecvam.jrc.it/publication/ESAC27\\_statement\\_retox\\_20071214.pdf#search=ESACstatementontheretox](http://ecvam.jrc.it/publication/ESAC27_statement_retox_20071214.pdf#search=ESACstatementontheretox)
- 148) Sonnevold et al., Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89:173-87, 2006.
- 149) [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_s\\_06.pdf#search=sccp,19june2007,opinion,alternative](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_06.pdf#search=sccp,19june2007,opinion,alternative)

#### 経皮吸収性

- 150) OECD guidelines for testing chemicals, 427, Paris, OECD (2004)
- 151) OECD guidelines for testing chemicals, 428, Paris, OECD (2004)
- 152) [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_o\\_02j.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_02j.pdf)
- 153) Bodé, S. et al., Stability of the OECD model compound benzoic acid in receptor fluids of Franz diffusion cells, *Pharmazie*, 62, 470, 2007
- 154) Schäfer-Korting, M. et al., Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the German Prevalidation Study. *ATLA*, 34, 283, 2006
- 155) Alexia, G. M. et al. Reconstructed Skin Model as a Tool for Skin Penetration Screening Studies, WC6 ABSTRACTS, #P1-1103, 2007
- 156) 杉林堅次, 三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた薬物の皮膚透過性及び皮膚刺激性評価 -動物実験代替法確立に向けて-, *薬剤学*, 67, 89, 2007
- 157) Netzlaff, F. et al., Comparison of Bovineudder Skin with Human and Porcine Skin in Percutaneous Permeation Experiments, *ATLA*, 34, 499, 2006
- 158) 宮崎香織ら, 経皮吸収試験におけるヒト皮膚代替物としての高分子人工膜の有用性に関する検討, *日本薬学会年会要旨集*, 127, 111, #29P1-am204, 2007
- 159) De Jager M. et al., A novel *in vitro* percutaneous penetration model: evaluation of barrier properties with p-aminobenzoic acid and two of its derivatives, *Pharm Res*, 23, 951, 2006
- 160) Xia, X. R. et al., An experimentally based approach for predicting skin permeability of chemicals and drugs using a membrane-coated fiber array, *Toxicol Appl Pharmacol*, 22, 320, 2007
- 161) Ottaviani G. et al., Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability, *J Med Chem*, 29, 49, 3948, 2006
- 162) Gregoire S., et al, Prediction of skin penetration of cosmetic ingredient, WC6 ABSTRACTS, #P2-2092, 2007
- 163) Hansen S., et al, *In silico* model of

skin penetration based on experimentally determined input parameters. Part I: Experimental determination of partition and diffusion coefficients. Eur J Pharm Biopharm. 68, 352, 2007

164) Riviere J. E., et al, Prediction of dermal absorption from complex chemical mixtures: incorporation of vehicle effects and interactions into a QSPR framework. SAR QSAR Environ Res, 18, 31, 2007

165) Diembeck W. et al., Skin absorption and penetration. ATLA, 33, Suppl. 1, 105, 2005

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

1) 廣田衛彦, 鈴木美絵, 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). フレグランスジャーナル 10月号, 49-54, 2007.

### G-2 学会発表 (講演及び学会発表)

1) 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.

2) 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.

3) 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.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) Itagaki, H., "Current Status of Alternative Methods & Activities of the JSAAE (The Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments)", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences - Beijing satellite symposium, 2007.

8) 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.

9) 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.

10) 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.

11) 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.

12) 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