

OECD TEST GUIDELINES PROGRAMME

Standard Project Submission Form

If you require further information please contact the OECD Secretariat

Return completed forms to:

env.tgcontact@oecd.org

PROJECT TITLE

Comet Assay
in Genotoxicity Testing

SUBMITTED BY (Country / European Commission / Secretariat)

Japan(Dr. , Japan National Coordinator for the OECD Test Guidelines Program)

DATE OF SUBMISSION TO THE SECRETARIAT

January, **,2008

DETAILS OF LEAD COUNTRY/CONSORTIUM

Country /Organisation:	Japan
Agency/ministry/Other:	Lead Institute: Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), National Institute of Health Sciences (NIHS) Supporting Ministry: Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW), Japan
Mail Address:	National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-5801, Japan Kasumigaseki 1-2-2, Chiyoda-ku Tokyo, Japan
Phone/fax:	Phone: +81-3-3700-9874 (Kojima); +81-3-3700-9872(Hayashi) Fax: +81-3-3700-9874
Email:	h-kojima@nihs.go.jp (Hajime Kojima, Director, JaCVAM, NIHS) hayashi@nihs.go.jp (Makoto Hayashi, Head, Div. of Genotoxicity, NIHS)

PROJECT OUTCOMES

- | | |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> New Test Guideline | <input type="checkbox"/> Guidance document |
| <input type="checkbox"/> Revised Test Guideline | <input type="checkbox"/> Detailed Review Paper |
| <input type="checkbox"/> Deletion of an existing Test Guideline | <input type="checkbox"/> Other, please specify below |

--

PROPOSED WORK PLAN and RESOURCE NEEDS:

1. Draft workplan for development of the proposal, including any need to establish Ad Hoc Expert Group and mode of meetings (face-to-face, teleconference; electronic discussion group). Indicate key milestones, including first and subsequent drafts of documents and timing of meetings.

JaCVAM, ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) and ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) are currently managing an international validation study of the comet assay to detect the first stage for genotoxicity in both *in vitro* and *in vivo* test systems. The validation study incorporates essential test method protocol and more than 40 reference chemicals based on recommendation from the members of international validation management team. The Phase I *in vivo* validation study using three chemicals was finalized in winter 2007. If necessary, we can submit these data in spring 2008. The *in vitro* validation study follows from the *in vivo* study. The final validation study is scheduled for completion in autumn 2010. A draft test guideline is scheduled for submission to the OECD secretariat in early 2011.

2. Will additional information, including generation or collection of data, be required? If yes, please describe the anticipated process and timelines.

The ongoing validation study for the comet assay is scheduled for completion in autumn 2010 and a DRP summarizing the results of this study and any other relevant data and information will be completed shortly thereafter. The results of the validation study, accompanied with a draft test guideline, are scheduled for submission to the OECD secretariat in early 2011. The standardized test method protocol currently being used in the validation study is available as Attachments 2 and 3 .

3. Indicate the estimated overall resource need (time/money) for member country / consortium and Secretariat

Funding for the validation study, the costs associated with the meeting and travel expenses associated with the international validation management meeting is being provided by JaCVAM. JaCVAM resources will be used for study management and development of the BRD.

4. Is this proposal intended to replace an existing Test Guideline or lead to the deletion of an existing Test Guideline?

This project is for the development of a new Test Guideline. We would like to evaluate the use of the *in vitro* and *in vivo* comet assay (multiple tissues) for the assessment of DNA damage by chemicals in order to investigate the correlation with carcinogenicity data at the target organs. The *in vivo* comet assay may be validated as an alternative follow-up assay to the more commonly used *in vivo* liver UDS assay.

ESSENTIAL INFORMATION

In this section, please provide the information required by the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Programme to assess the suitability of the project for the workplan of the Test Guidelines Programme

1. What is the existing or expected regulatory need/data requirement that will be met by the proposed outcome of the project? Please provide details below or as an attachment.

The proposed Test Guideline will be used to meet the regulatory needs to evaluate genotoxicity of chemicals, .
or as attachment No. __

2. How will the work contribute to further international harmonisation of hazard and risk assessment? Please provide details below or as an attachment.

It is proposed that the comet assay be adopted as a second *in vivo* genotoxicity test in the revised ICH-S2 draft guidance. A flow chart for the *in vivo* comet assay for genotoxicity is provided in Attachment 1.
or as attachment No. _1_

3. How will the proposed project address issues and /or endpoints which are of major human health or environmental concerns? Please provide details below or as an attachment.

The *in vitro* assay will provide a measure of the ability of a test chemical to directly interact with DNA to cause the first step of genotoxicity. The *in vivo* assay can be applied to any tissues in the body regardless of the mitogenic activity, which is required for the cytogenetic assays. This advantage of the method is essential for evaluating the mechanism of carcinogenicity at the target site.
or as attachment No. __

4. Will the project have general support from OECD member countries or is the outcome relevant for just one or a few member countries / stakeholders? Provide details of the countries and the rationale for this view below.

Many countries A few countries Only for the submitting country

The method has already been used in many countries for chemical safety assessment. It is, however, not authorized for regulatory use, because the standardized protocol has not been established. Our international validation trial will establish a standard protocol that has been anticipated by many member countries.

5. If the Test Guideline is not intended for general use, indicate if the Test Guideline would be intended for:

- Specific (limited) applications such as pesticide usage, or
 for specific classes of chemicals (e.g. surfactants) rather than for chemicals in general.

6. If the expected outcome of this proposal is a Test Guideline or a Guidance Document, provide information on the intended use, applicability and limitations of the test method.

The test method is applicable to, as a rule, any kinds of chemical requiring an *in vivo* screen for genotoxicity as well as *in vivo* assays. In the *in vivo* assay, generally it is applicable to any species and any tissues regardless of its karyotype and mitotic activity. The method is rather simple and does not require any sophisticated equipment, but needs electrophoresis equipment and preferably an image analyzer with image capture unit.

7. Provide supporting information on the validation status (i.e. relevance and reliability) of the method. Principles for validation of test methods for OECD Test Guidelines are described in Guidance Document 34.

Provide justification and rationale for the test, including data.

If there are no or limited data available to support the reliability and relevance of the proposed test, indicate if validation work is included in the project.

If there is no need for validation provide a detailed justification.

JaCVAM, ECVAM, and ICCVAM are currently managing an international validation study of the comet assay to detect DNA damage *in vitro* and *in vivo* and the validation study is conducted in accordance with the OECD Guidance Document 34. The validation study is scheduled for completion in autumn 2010. At the moment, we are ready to provide the data of phase 1 study at any time on request.

ADDITIONAL INFORMATION

In this section please provide further information to allow the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Programme to assess the suitability of the project for the workplan of the Test Guidelines Programme

1. If the expected outcome of the project proposal is a Test Guideline and is based on existing, regional or international documents such as guidelines, protocols or guidance material, please provide that information here or as an attachment.

JaCVAM, ECVAM and ICCVAM are currently managing an international validation study of the *in vivo* and *in vitro* comet assays. The standardized comet assay protocol for the validation study proposed by the validation management team is attached as attachment No. 2 and No. 3, for *in vivo* and *in vitro* methods, respectively.

or as attachment No. 2

2. If Animal Welfare considerations are addressed in the project proposal, provide details below or as an attachment. Explain if the project is aimed at refining, reducing and/or replacing the use of animals.

If the project is not specifically developed for animal welfare purposes, indicate if the animal welfare considerations have been a component of the project proposal.

Indicate if animal welfare considerations are irrelevant to the project, for example for physico-chemical properties.

The *in vitro* comet assay, as an alternative to the *in vivo* comet assay, can provide information of the direct interaction with DNA as a characteristic of the chemical tested, which is the first step of genotoxicity. The positive result of the *in vitro* comet assay might give important information to indicate the relevancy of any positive outcomes from the other *in vitro/in vivo* genotoxicity assays. This reduces the unnecessary follow-up *in vivo* assays for the chemical safety evaluation. For the *in vivo* assay, it is expected to obtain the essential information of whether carcinogens are genotoxic or non-genotoxic at the target site. The standard test protocol aims to use the minimum number of animals to obtain results with reasonable statistical power.

or as attachment No. __

3. Provide information on expected or possible resource savings in member countries as a result of this project.

The proposed test method enables efficient *in vitro* genotoxicity screening of large numbers of chemicals. In addition, results from this method can be used in weight-of-evidence approach to reduce the number of *in vivo* tests required, especially with the mechanistic analysis for carcinogens, which would also result in resource savings.

4. If the expected outcome of the proposed project is a Guidance Document or Detailed Review Paper, will it be directly linked to the development of a particular Test Guideline or a series of Test Guidelines?

- Yes, it is the initial step in the development of a new or revision of existing Guidelines.
- Yes, additional guidance is needed for the most appropriate selection of the Guidelines on the subject.
- No, the guidance is on issues related to testing or the development of Test Guidelines in general.

There are 3 attachments added to this form.

ASSESSMENT OF PROJECT PROPOSAL

(To be completed by all member countries /stakeholders except the submitter)

Country / Organisation:	
--------------------------------	--

Representative: (Preferably NC):	
---------------------------------------------	--

Taking into account the project information, requested above, does this project meet the needs of the member countries for addition to the workplan of the Test Guidelines Programme

Yes No Further information needed

If the response is "No" or "Further information needed", please provide justification:

Remarks as appropriate, including further information needs, if any:

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小島肇夫	感作性・刺激性試験		現場レベルでの皮膚測定・評価～トラブル事例・対策～	サイエンス&テクノロジー	東京	2007	268-273
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	東京	2007	63-71
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	東京	2007	75-84
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	東京	2007	267-273
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	東京	2007	308-314
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	東京	2007	1-5

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
大野泰雄	動物実験代替法の国際動向	Fragrance Journal	10	20-28	2007
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
大野泰雄	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

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
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
小島肇夫	急がれる動物実験代替法の開発－皮膚モデルの現状	New Drug Discovery	23	4	2007
小島肇夫	動物実験代替法の現状と展望	日本薬理学会誌	130	505-509	2008
小島肇夫	EUにおける動物実験代替法の現況とREACH対策	日皮協ジャーナル	30 (2)	156-162	2008
小島肇夫	皮膚感作性試験代替法の現状	Visual Dermatology	7 (3)	328-331	2008
小島肇夫	Perspectives on validation and regulatory acceptance of animal alternative testings in Japan	P&G Actives Risk Communication	2 (1)	1-4	2008
小島肇夫	Validation of human skin models for skin corrosivity tests in Japan	AATEX	13	36-44	2008
小島肇夫	JaCVAM: An organization supporting the validation and peer review of new alternative to animal testing	WC6		483-485	2008
小島肇夫	アレルギーVSトキシコロジー	皮膚アレルギーの旅	7 (1)	1-7	2008

第22章 感作性・刺激性試験／安全性評価のトラブル時の対応

国立医薬品食品衛生研究所 小島 肇夫

1. トラブル発覚までの経路

感作性・刺激性という皮膚トラブルが発生しやすい製品は、化粧品や医薬品が多いと考えられる。これらのトラブルの発覚に至るまでにはいろいろな経路がある。主に思いつくだけでも、以下のものが挙げられる。

- 1) ホームページやメール、電話、手紙などによるお客様からの苦情
- 2) 本社、支店などの営業担当者へお客様または営業店からの直接的な苦情
- 3) 医療機関からの連絡
- 4) 保健所、中毒センター、消費者センターなどの公的機関からの連絡
- 5) マスコミからの問い合わせ、または報道

2. トラブルへの対処

2.1 トラブルの把握

いつ、どこで、誰が、どのように(トラブルが通常使用で起こったのか、誤使用で起こったのか)、使用時の皮膚の状態、その健康被害がどの程度であったかで対応も異なろう。ともかく、子供に重篤な被害が生じたとか、アナフィラキシーショックなどを含め生命の危険性がある場合には、被害者には早急に医療機関を受診して頂き、治療をお願いしなければならない。再発防止のため、販売中止および回収、原因究明を早急を実施すべきである。

それ以外の場合では、被害者には早めに医療機関を受診して頂くようにお勧めするべきである。皮膚トラブルによる痛みやかゆみなどを軽減して頂かねばならない。症状が中々改善しない場合もあるので、ともかく疑われる製品の使用を止めて頂くべきである。トラブル報告を受けた企業は、通常、1件だけの緊急性のない皮膚トラブル発覚では紫外線、物理的刺激などの別の要因や持病のアトピー素因、蕁麻疹が悪化したことによる場合もあり、状況把握に留める場合が多い。数件、そのような症例が発覚して、品質、処方成分や容器などの製品の不備に気づくことになる。その場合の対策としては、ともかく、安全性に自信がある製品であり、かつこれまで何もトラブルがなかったとしても、自社製品に皮膚トラブルが起こりうる可能性を十分に頭に入れ、原因究明および製品の改善、場合によっては販売中止および回収のために真摯

に対応すべきである。

2.2 お客様からの苦情への対応

被害者であるお客様の所に、すぐに営業担当者に向かわせて、誠意ある態度で接しさせることである。次に状況を詳しくお聞きするとともに、その症状の改善のために誠意を尽くさせることである。その地域毎に日頃から接触皮膚炎に詳しい皮膚科医を把握しておき、すぐにその病院を紹介し、一日でも早く症状を改善して頂くべきである。治療費の問題や、精神的な保障については本章の趣旨から外れることからここでは述べないでおく。さらにお客様の要望によっては、企画担当者、処方担当責任者や安全性の担当責任者をご説明に伺う必要もでてこよう。この場合も、誠意ある態度で接することを忘れてはならない。本社や研究所から来た偉い方々でありお高く留まっているという意識で見られることが多いので、感情的な苦言を受けても冷静に頭を低く接しなければならない。一方、品質、安全性を担保すべき担当者がすべきことは、症状発覚までの経緯を詳しく聞き取る、原因となった製品を引き取る、持ち帰って官能評価を行う、自社分析または受託機関に分析を依頼する、症状を再現できるか試してみるなどで原因を探るべきである。その製品に関して所有する分析、安全性、工場における生産記録などすべての記録を調べる必要もあろう。昨今、簡単に動物実験を行って成分に関する原因を探るということができにくくなりつつある。その場合にはある程度の動物実験代替法(通常、安全性を評価している試験管外試験、例えば培養細胞や培養皮膚モデルの利用や、マウスを用いる方法であるが、Local Lymph node assay等)を用いて評価することをまずお勧めする。動物実験代替法というものは、強く反応が出すぎるきらいはあるが、既存製品と比較しながら試験を行うと差が明確になる場合もありうる。次にその結果を参考に、ボランティアに重篤な健康障害を起こす可能性が低いと判断した場合には、予知的パッチテストや使用状況を再現した試験などで試してみる事が重要である。

2.3 医療機関への対応

一方、医療機関からのトラブル報告については、製品に非がないに関わらず、社会を騒がしたことは確かなので、真摯な態度で接し、原因追求に協力を願い出ることが肝要である。被害者である患者様の同意が得られたならば、担当医に診断パッチテストのために処方成分を送付して、パッチテストの実施をお願いする。患者様の皮膚状態などにより、必ずしも原因を追究できるわけではないが、ともかく、倫理的な問題さえクリアできれば診断パッチテストを実施しておくべきである。その際に問題となるのは、製品に記された成分をすべてお送りするのか、あるいはキャリーオーバーのような表側に現れていない成分までお送りするのか、担当

医とコンセンサスをよく取ることである。さらに、もっとも重要な問題は、処方配合濃度を開示できない場合において、成分のみをそのまま送付せず、ある程度の濃度で調整した成分を送付すべきことである。私の聞いたところによると、pH調整剤である水酸化カリウムをそのままお送りして、担当医がそれをほとんど薄めずに貼付して皮膚傷害を起こしてしまった例もあるようである。このような事故を起こさないためには、配合成分濃度を開示すべきであるが、全成分表示に加え、処方を丸裸にすることは企業秘密に関わる。できないならば、処方配合成分の5～10倍で皮膚刺激性を起こさない濃度に溶媒あるいは分散媒を用い、雑菌汚染による皮膚障害も配慮して調整すべきである。溶媒中で固まってしまう成分においては、貼付時の適用方法を記載した注意事項を添付して診断パッチの際にミスが起こりにくいような配慮をすべきである。また、香料や染毛剤のように、アレルギー反応の可能性が高い成分に関しては、情報を添付し、まず開放塗布試験から実施して頂くことも肝要である。できれば、診断パッチテストの際には、日本接触皮膚炎・皮膚アレルギー学会が推奨するアレルゲンの貼付も同時にお願いできれば、患者様のアレルゲン同定に寄与しやすいと考えている。

2.4 公的機関、マスコミへの対応

公的機関、マスコミからの問い合わせについては、製品に非があるないに関わらず、社会を騒がしたことは確かなので、真摯な態度で接し、原因を明らかにすると明言した後、できるだけ早急に原因追求を進めるべきである。場合によっては、経験に基づく助言を受けることも必要となろう。そして、原因が明らかになった暁には、問い合わせを受けた先に原因究明の結果や再発はないように改善した点などを報告して、誠意を尽くすことが肝要であろう。

3. 安全性評価の経緯

ひと昔前の黒皮症事件以来¹⁾、化粧品会社は、安全性試験の専門家の協力を得て、新規化粧品原料の安全性評価ガイドライン(案)を作成し²⁾、安全性の確保に務めてきた。現在では、表1に示すように多くの既知のアレルゲン(アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性接触蕁麻疹誘起物質)も明確になっているし、構造活性相関ソフトも販売されており、純粋な成分であれば、ある程度はその感作性や刺激性を予測できる時代である。分析技術も進歩し、不純物でさえ、明確にしやすい時代となっている。

表1 アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性接触蕁麻疹の原因となる主な化学物質^{3,4)}

分類	物質名
医薬品類	ネオマイシン、スルホンアミド、ベンゾカイン
金属	ニッケル、クロム、コバルト、金、水銀
植物成分	ペルーバルサム、ロジン、ペンタデシルカテコール、アピエチン酸
殺虫剤	ヘキサクロロフェン、チロメサール
工業薬品	ホルムアルデヒド、エポキシレジン、芳香族アミン、硫化テトラメチルチラウム、2,4-ジニトロベンゼン、メルカプトベンゾチアゾール、ジフェニルフグアジニン、エチレンジアミン
医薬部外品	p-フェニレンジアミン
化粧品	香料、色素
外用剤添加剤	ラノリン、ラノリンアルコール、セタノール、ステアリルアルコール、プロピレングリコール、ポリオキシエチレングリコール、ポリオキシソルビタン脂肪酸エステル、ミツロウ、1,3-ブチレングリコール、亜硫酸塩類、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、グルクロン酸クロルヘキシジン、パラベン、ベンジルアルコール、メントール、ゼラチン、エタノール、安息香酸

法規の改正もあり、ここ数年で業界内におけるリスク評価の考え方も大きく変わった。全成分表示による化粧品の届出免除という規制緩和およびPL法の導入を経て⁵⁾、企業による自己責任の考え方が定着しつつある⁶⁾。一方、平成17年4月に実施となった薬事法の改正により、医薬品、医薬部外品、化粧品、医療機器の製造、輸入が許可・認可制度に変わった。これに伴い、品質管理、製造販売後の安全管理の責任は製造販売業者が主体的に行うことになり、GVP (Good Vigilance Practice: 市販後安全管理) およびGQP (Good Quality Practice: 製造の品質保障管理) が制度化され⁷⁾、業界の対応事項がより厳しくなった。厚生労働省のHPによると⁸⁾、化粧品や医薬部外品による重篤な皮膚障害も増加しておらず、表2に示すように、2004年～2006年の3年間、年間23件ほどの回収で推移している。海外では許可されているが、日本では使用できないホルマリン関連防腐剤などの使用による回収は残るであろうが、昨今の化粧品または医薬部外品の皮膚トラブルは起こりにくくなっている状況には違いない。皮膚科医と研究者の連携で、昨今もK社の抗菌デスクマットが回収となるなど⁹⁾、抗菌剤による文具、日用品のトラブル検出システムもできつつある。

ただし、2009年までに動物実験を用いた化粧製品を販売できない、原料の試験を実施できないというEU 7次改正に従うため¹⁰⁾、欧州化粧品工業会 (COLIPA) で検討が進んでいる。国際協調や海外での製造販売、海外ブランドの進出が進んでいる昨今、日本においても安全性は

かりでなく、有用性評価でさえ、動物実験を用いず代替法を利用せざるを得ない状況である。代替法の開発は、安全性のレベルを下げないことが大前提であるが、試験管内試験のみで本当に安全性を担保できるのか不安が無い訳ではない。また、動物実験を安全性評価に使えなくなるからといって、ヒトの試験を安易に行って良いことではない。ヒト試験で安全性を評価することは倫理的には許されない場合が多い。ヒト試験実施の際には、施設毎に計画を倫理委員会に答申しなければならず、試験実施の際にはインフォームドコンセンサスが必要など、ヒト試験実施には厳しいハードルが待っている。バリデーションや第三者の専門家で評価され、公的に認められた動物実験代替法で安全性のスクリーニングを行い、ヒトによる確認試験を確実に行うというスタイルが今後の安全性評価に望まれることになるだろう。

表2 2004年～2006年における化粧品および医薬部外品の回収数⁶⁾

年	回収数		
	総数*	化粧品	医薬部外品
2004	24	19	5
2005	24	23	1
2006	23	17	6

*：その製品の使用等が、一時的な若しくは医学的に治癒可能な健康被害の原因となるか又は重篤な健康被害のおそれはまず考えられない状況であるクラスⅡの数を示す。ちなみに、クラスⅠ：重篤な健康被害又は死亡の原因となりうる状況にあたる製品はなかった。

4. まとめ

上記した規制やシステム、そしてマスコミの厳しい目から、現代は、種々のトラブルに早急に対応しなければならない時代になっている。場合によっては、販売中止および回収もありうる。さらに、原因究明も早急かつ正確に行うべく尽力しなければならない。ただ、原因究明も容易にできるかは別問題である。被害者の肌質、皮膚状態が一定ではないことに加え、心理面、経済的な面も絡む社会的な問題でもあり、科学的に原因究明できるものばかりではない。仮にそうであったとしても、我々研究者に求められることは、自社製品にトラブルが起こりうる可能性を十分に頭に入れ、原因究明および製品の改善のために真摯に対応することにつきて。

参 考 文 献

- 1) 小塚雄民, 「タール系色素による女子顔面黒皮症」, 高瀬吉雄「皮膚と化粧品科学」, 南山堂, 1982, pp.267-274.
- 2) 「化粧品の安全性評価試験法概略」, 日本化粧品工業連合会編「化粧品の安全性評価に関する指針2001」, 薬事日報社, 2001, pp.1-33.
- 3) 土井邦雄, 「臓器毒性・毒性試験」, 日本トキシコロジー学会教育委員会編集, 「トキシコロジー」, 朝倉書店, 2002, pp.217-218.
- 4) 松永佳世子, 「皮膚外用剤の添加物 接触皮膚炎を中心に」, 薬局, 53(11), 2002, 71-75.
- 5) 増田光輝, 「製品企画・設計におけるPL対策」, フレグランスジャーナル, 1995-3, 1995, 17-24.
- 6) 笠井裕, 「化粧品の安全性を取り巻く状況-パブリック・リレーションの重要性-」, 香粧会誌, 28(4), 2004, 292-298.
- 7) 風間成孔, 「改正薬事法対応～化粧品・医薬部外品薬事申請業務の留意点」, 「化粧品大全」, 情報機構, 2006, pp.509-522.
- 8) 医薬品医療機器情報ホームページ (www.info.pmda.go.jp).
- 9) 国民生活センター (www.kokusen.go.jp/recall/data/s-20061011_1.html).
- 10) Commission Staff Working Documents "Time Tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC)", EN, SEC82004), 2004, 1210.

1. 試験の進め方, 決定樹

腐食/皮膚刺激性の評価スキームは 1998 年, OECD から発表されている¹⁾。その後, 2009 年までに動物実験を用いた化粧品を販売できない, 原料の試験を実施できないという EU7 次改正に従うために欧州化粧品工業会 (COLIPA) で検討が進み, 複数の評価スキームの検討が進んでいる。これまで OECD スキームを含め, 文献上で主なものとして 3 提案がなされている。僭越ながら, 私の提案までいれると 4 案がある。それらを以後に示すが, この項では腐食性が無いと判断された場合以降に絞ってスキームを改良した。

in vitro 皮膚刺激性試験は, 皮膚刺激性代替法のバリデーションは最終段階にあり, 数年後にはバリデーションが終了した方法が明らかになると思われる。そこで今後の試験案について記載した。ただし, 現状では皮膚刺激試験代替法のバリデーションが終了したとしても, 専門家による評価が済むまでには時間を要する。よって, 現在開発中の原料をお持ちの方は, 刺激性の有無または強弱を動物実験で評価して頂きたい。

まず, OECD スキームを基本とした Worth の案を図 1 に示す²⁾。ほとんど, 腐食性と同時に皮膚刺激性の有無を判断するものである。以後のすべての案の基本とも言えるスキームである。図 2 に示すように, Botham がこの OECD 案をもとに評価スキームを示している³⁾。ただ, このスキームには OECD に 1997 年に提案されたヒト 4 時間貼付パッチのガイドライン案が組み込まれているものの⁴⁾, これらは保留状態にあり, 現実的ではない。刺激性が不明確な場合には動物試験またはヒト試験となるが, 倫理的に許可が下りるか疑問なスキームである。

次に, 図 3 に示す Robinson の案は化粧品の安全性評価を想定しており⁵⁾, これは現実的な内容である。ただし, 蓄積性・慢性毒性の *in vitro* 試験はまだ検討段階であること, ヒト試験の例が 4 時間パッチテストであり⁶⁾, 日本での化粧品評価にはそぐわない点などの問題が多い。

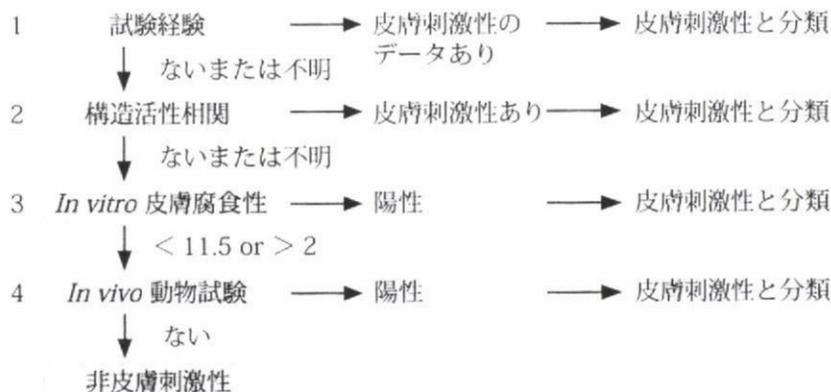


図 1 OECD による皮膚刺激性評価の現状^{1,2 改良)}

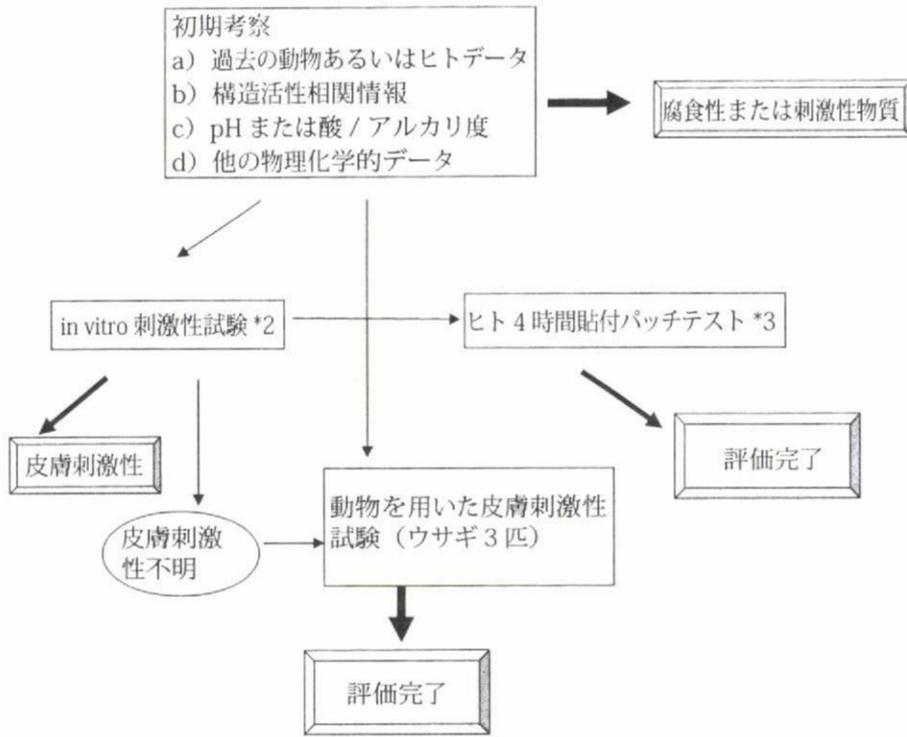


図2 Botham スキーム^{3改良}

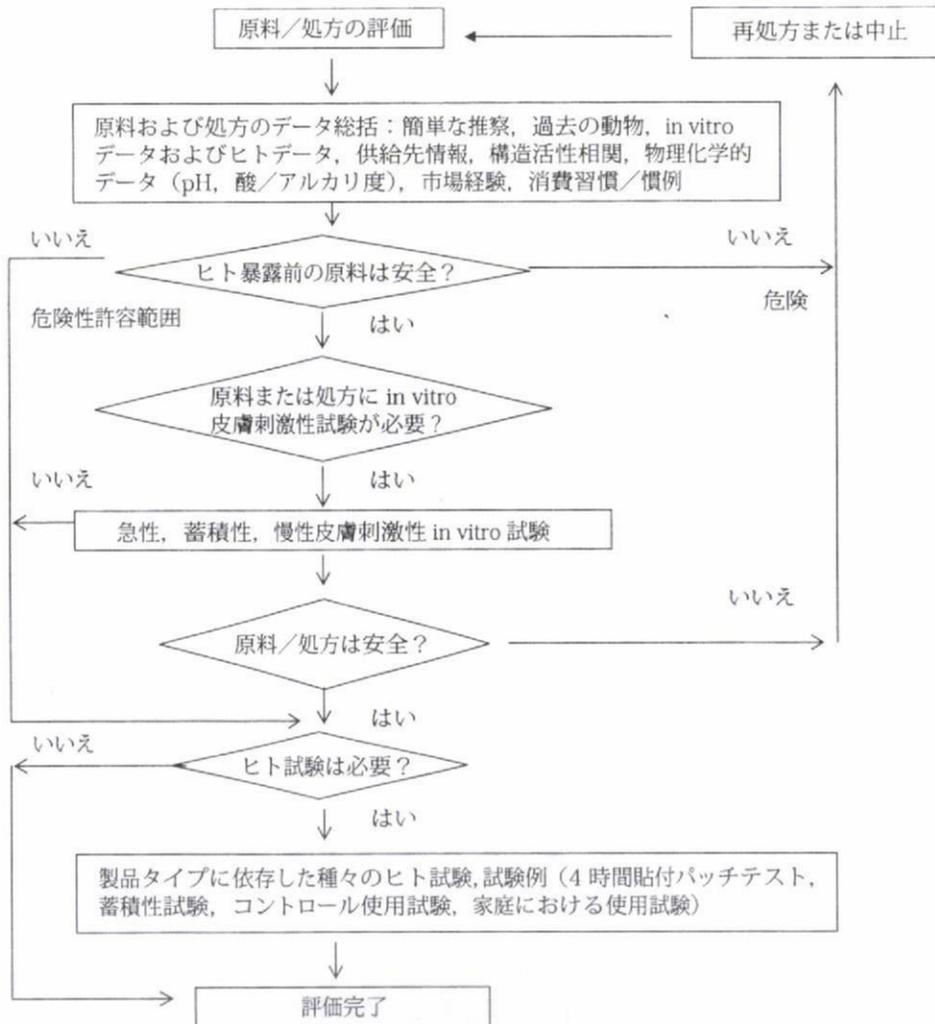


図3 Robinson スキーム^{5改良}

図4に小島の案も示すが⁷⁾、腐食性の危害性は同定されているという前提で、培養皮膚モデルを用いて用量反応性を評価した後、さらに24～48時間閉塞貼布ヒトパッチテストを組み合わせ、総合的に皮膚刺激性を評価すべき提案となっている。ただし、培養皮膚モデルで用量反応性を評価できるというバリデーションはまだ実施されていない。

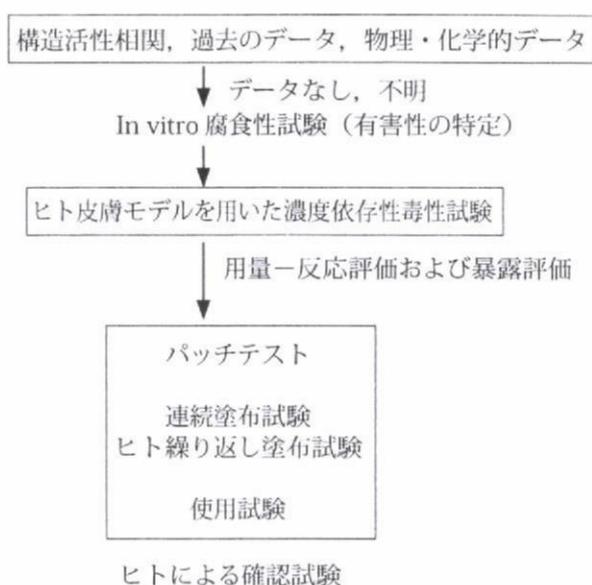


図4 小島スキーム^{7)改良)}

2. 定量的構造活性相関 QSAR

眼刺激性も合わせ、刺激性を構造活性相関 (QSAR) で予測する多くの検討がなされ、総説がまとめられている⁸⁻¹¹⁾。その結果として、TOPKATやDERECKなどの構造により皮膚刺激性を予測するソフトが紹介され、良い予測性が報告されている。ただし、これらの検索結果は疑陽性が多いという印象を持っている。スクリーニングとして、陽性となった物質の開発を中止するのではなく、注意深く以後の試験に用いるならば有用な検討材料であると考え。ただし、構造活性相関もバリデーションに関するガイドライン文書が検討されており、将来的には判断の根拠が必要となる。

3. 再構築培養ヒト皮膚モデル (ヒト皮膚モデル) を用いる方法

欧米ではヒト皮膚モデルとしてEPISKINおよびEpiDremを用いた試験結果が報告されている。これ以外に、PREDISKINも検討されたが、一次バリデーション終了後、次の段階に進めなかった¹²⁾。現在上記の二つのモデルは欧米で汎用されている有力なヒト皮膚モデルである。日本で使用されているものを含め、表1に私の知る限りのヒト皮膚モデルを示す。また、日本で市販されているヒト皮膚モデルの病理写真を図5に示す。ヒト皮膚の病理写真と比較して、角化細胞と比較して、角質層の厚さ、角化細胞数など完成度は遠く及ばないが、各社モデルに大差はない。よって、正常皮膚と比較して経皮吸収も早く、毒性を起こしやすいようである。処理方法などである程度付加を減少させれば、皮膚刺激性の評価は可能と考えている。

表1 日欧米で市販されている主なヒト皮膚モデル

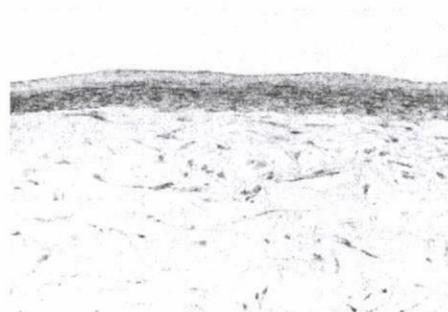
キット名	販売先	国名
Apiligraf	Organogenesis Inc.	米国
EpiDerm	Matek クラボウ	米国 日本
EPISKIN	EPISKIN	フランス
Neoderm-ED		韓国
Lab-Cyte	J-TEC	日本
SkinEthic	SkinEthic	フランス
TESTSKIN	東洋紡	日本
Vitrolife-Skin	ゲンゼ	日本



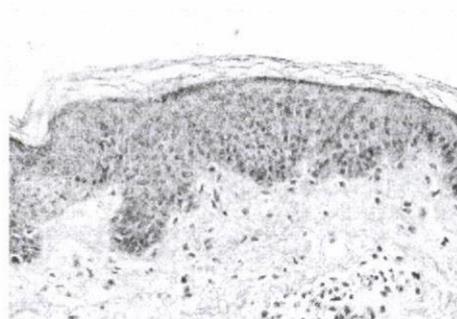
(a) Neoderm-ED (J-TEC)



(b) EpiDerm (クラボウ)



(c) Vitrolife-Skin (ゲンゼ)



(d) ヒト皮膚

図5 ヒト皮膚モデルとヒト皮膚の病理写真の比較

当初、処理時間 18 時間の細胞生存率 50%が境界であったり、被験物質の ET50 (溶媒対照に対して 50%の細胞毒性を示す処理時間) を分母として SLS20%水溶液の ET50 を割り、その値が 0.8 以下なら陽性として *in vivo* 結果を比較する手段が取られた。しかし、これらの方法ではマネージメントチームの設定した感度、特異性、正確性のそれぞれの基準値 60%をクリアできず、処理方法の改定が行われた。

まず、15 分間被験物質処理後、18 時間培養後の細胞生存率を指標とした検討が行われ^{13,14)}、さらに 42 時間培養後の細胞毒性を指標とし、50%細胞毒性が認められる場合を陽性と判断する方法がもっとも良いと報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。