

200838021A

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

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小島 肇

平成21(2009)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 小島 肇	1
II. 分担研究報告	
1. 動物実験代替法のバリデーショと第三者評価、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	11
小島 肇	
1) 皮膚感作性試験LLNA-BrdU法のバリデーショ研究	15
2) 皮膚刺激性を調べるためのLabCyte EPI-MODEL24を用いた 皮膚刺激性試験代替法のバリデーショ研究	103
3) 皮膚感作性試験代替法LLNA-BrdU法の第三者評価	177
4) 皮膚刺激性試験代替法の第三者評価	215
5) 眼刺激性試験代替法の第三者評価	251
6) 酵母生育阻害試験と赤血球溶血性試験を組み合わせた 光毒性試験代替法の専門家による第三者評価	291
7) <i>in vitro</i> バイロジェン試験の専門家による第三者評価	293
8) 皮膚腐食性試験代替法の行政的な受入れのための評価	295
9) 皮膚感作性試験LLNA-DA法の行政的な受入れのための評価	299
10) 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	303
2. 三次元ヒト培養表皮モデルを用いた皮膚一次刺激性評価に関する研究 小島 肇	413
3. 分子生物学的・組織化学的手法を用いた新規眼刺激性試験・ 眼毒性試験代替法の開発	423
山本直樹	
4. バリデーショデータの統計解析（平成20年度研究）報告	459
大森 崇	
5. 感作性試験代替法の開発	469
大野泰雄	
6. 代替法についての国際情勢の調査	475
板垣 宏	
7. ヒト接触皮膚炎評価の見直し	507
松永佳世子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	525
IV. 研究成果の刊行物・別刷	529

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、ある培養表皮モデルのプロトコルが、全てのヒト表皮または皮膚モデルで再現可能とは限らないことが明らかになった。そのため、各モデルに適したプロトコルにおけるバリデーション研究が必要であることが明らかになった。

眼刺激性試験代替法の開発においては、リポフェクション法とエレクトロポレーション法による角膜上皮細胞株への遺伝子導入・不死化細胞株の樹立は、まだ成功していない。クロニングした HCE-T 細胞株は、継代を行っても Keratin-3 と Integrin-β1 を発現し続ける細胞であることを確認した。

感作性試験代替法の開発においては、ヒト細胞株 THP-1 細胞の CD86 および CD54 の発現亢進を指標とした代替法である h-CLAT の化粧品原料における有用性と適用限界を明らかにすべく検討を行った。防腐剤、染毛剤および香料 30 品の検討により、自家蛍光を有する物質や揮発性物質を含む化粧品原料評価における h-CLAT の有用性が示された。

バリデーション研究によって認められた代替法が、未知の被験物質とともに同時に 3 つの程度の陽性対照物質の実験を行うことを想定した。その代替法のバリデーション研究のデータを事前情報として利用して、ベイズ回帰によって直線を推定し、予測分布のパラメータの推定する方法を検討した。

代替法に関する国際情勢の調査において、国内外の代替法に関する情勢は急速に変化しており、関連情報を継続的に収集分析し、その結果を公表していくことは、本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するうえで必要とされた。

臨床医の立場からの情報収集として、黒皮症が多発した 1970 年代の状況から比べると、2008 年現在、化粧品や医薬部外品、あるいは外用医薬品の安全性は明らかに改善されている。しかしながら、接触皮膚炎を引き起こしてしまう症例も少なくなかった。

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) 皮膚感作性試験として LLNA-BrdU 法の 2 次バリデーション研究、2) 皮膚刺激性を調べるための LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替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) 皮膚感作性試験として LLNA-BrdU 法、2) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、3) 牛摘出角膜試験および鶏摘出眼球試験による眼刺激性試験代替法、4) 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、5) *in vitro* パイロジェン試験の評価を行った。

行政的な受入れのために、JaCVAM 評価会議において、1) ヒト皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法および 2) 皮膚感作性試験として LLNA-DA 法の評価を行った。

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議論を行い、下部組織である 6 分科会が検討作業を進め、提案が出揃った。

分担研究者

- 板垣 宏 (日本化粧品工業連合会
技術委員会)
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、ヒト接触皮膚炎の現状を把握し、評価法の見直しを行う。
- 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

EPISKIN、SkinEthics および EpiDerm という再構築されたヒト表皮モデルを使用して、被験物質処理後、後培養する試験法 (Post Incubation: PI 法) とドレイズ試験との一致率が高いことが実証されており、欧州にて認証を得ている。わが国においても、いくつかのヒト表皮モデルが販売されているが、それらを用いたバリデーション研究や専門家による第三者評価は終了していない。そこで、国内で市販されているヒト表皮モデルとしては、LabCyte EPI-MODEL、EPISKIN、EpiDerm を、国産のヒト皮膚モデルとしては、Vitrolife-Skin および TESTSKIN を用い、

EPISKIN のバリデーション研究で用いられた 48 種類の被験物質のなかから、無作為に選んだ 14 種類の被験物質をすべてのモデルに供した。皮膚刺激性の指標としては、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

新規の眼刺激性試験・眼毒性試験代替法の開発を行うため、2 種類のヒト角膜上皮細胞株 (HCEC2、EHXV) と 1 種類の不死化ヒト角膜上皮細胞株 (HCE-T) を用いた。眼刺激性試験・眼毒性試験代替法で使用する細胞は、安定性・再現性が確保された細胞であることが必要である。そこで、ヒト角膜上皮細胞の特性を保持したまま、増殖させることができる遺伝子 (SV40、hTERT) の発現ベクターの作成、および作成したベクターの角膜上皮細胞への遺伝子導入として、リポフェクション法とエレクトロポレーション法による検討を行い、新規角膜上皮不死化細胞株の作成を試みた。一方、ウイルスベクターを用いて SV40 が導入された不死化ヒト角膜上皮細胞株 (HCE-T 細胞) のクローニングを行い、角膜上皮細胞としての細胞特性の維持について検討した。

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検証が行われている。これまでの検討により、一般の既知化合物に関する *in vivo* との対応性や、施設間再現性が良好であることが明らかとなってきた。

本年度は主に化粧品原料として用いられている防腐剤、香料、染毛剤などの 30 化合物を h-CLAT により評価した。

B-1-4) バリデーションデータの統計解析

バリデーション研究によって認められた代替法が、未知の被験物質とともに同時に 3 つの程度の陽性対照物質の実験を行うことを想定した。その代替法のバリデーション研究のデータを事前情報として利用して、ベイズ回帰によって直線を推定し、予測分布のパラメータを推定する方法を検討した。

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) ヒト接触皮膚炎評価の見直し

2006~2007 年の藤田保健衛生大学皮膚科における化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを施行した症例についてまとめ、1992~1994 年、1995 年~1998 年の当科の結果と比較した。

また、2008 年に複数の施設で実施されたパッチテスト結果を集計・解析し、過去のアレルギーの結果と比較した。

B-3) 新規代替法の評価

日本で新規に開発された試験法のバリデーション研究、日本あるいは欧米で承認された試験法の第三者評価、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

バリデーション研究として、1) 皮膚感作性試験として LLNA-BrdU 法の 2 次バリデーション研究、2) 皮膚刺激性を調べるための LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究を行った。

B-3-2) 第三者評価

1) 皮膚感作性試験として LLNA-BrdU 法、2) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、3) 牛摘出角膜試験および鶏摘出眼球試験による眼刺激性試験代替法、4) 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、5) in vitro パイロジェン試験の評価を行った。

B-3-3) 行政的な受入れ評価

JaCVAM 評価会議において、1) ヒト皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法および 2) 皮膚感作性試験として LLNA-DA 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

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議論を行い、下部組織である 6 つの分科

会で検討を行った。

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

EPISKIN の PI 法のプロトコルを用いて、国内で入手可能なヒト表皮および皮膚モデルの細胞毒性を比較した。その結果、得られた結果はモデル毎に異なり、14 物質中すべてのモデルで同じ判定結果が得られた物質はなかった。各モデルに適したプロトコルにおけるバリデーション研究が必要であることが明らかになった。

C-1-2) 眼刺激性試験

SV40 と hTERT の発現ベクターを構築し、全シーケンスの解析を完了した。リポフェクション法とエレクトロポレーション法による角膜上皮細胞株への遺伝子導入・不死化細胞株の樹立は、平成 20 年度の研究段階においては、まだ成功していない。

クローニングした HCE-T 細胞株は、継代を行っても Keratin-3 と Integrin-β1 を発現し続ける細胞であった。

C-1-3) 感作性試験

今回検討した防腐剤、香料、染毛剤の範囲では、自家蛍光を有する物質や揮発性物質を含む化粧品原料の感作性評価に有用であると考えられた。しかし、難溶性物質評価時の分散状態の違いが細胞毒性結果に与える影響など、今後実用化に当たっての課題も見出された。

B-1-4) バリデーションデータの統計解析

わが国で実施されたドレイズ眼刺激性試験代替法のバリデーション研究で報告された細胞毒性試験の一つである SIRC-CV のデータを利用して、そのデータ解析を行うことで提案する方法を適用した。適用結果からは、事前情報と陽性対照の物質数の比をどの程度取るべきか基準が必要である、信頼区間の幅は広く適用したままの結果を実用するのは十分ではない、ことが明らかになった。

C-2) 情報収集

C-2-1) 海外における代替法情報の調査

EU では、2003 年 3 月 11 日に公布された「化粧品指令第 7 次改正」と 2007 年 6 月 1 日に発効した「化学物質の登録と規制 (REACH)」の

ため、ECVAM を中心に動物実験代替法の開発と評価は非常に進展している。一方、米国においては ICCVAM が中心となって代替法の評価が進行している。近年、代替法の開発と評価はグローバル化が加速し、国際的な協力体制が整いつつあり、本邦における対応案策定にはこれら国際情勢の調査・把握は重要である。

本年度の特筆すべき動きは、ICATM(International Cooperation on Alternative Test Methods)の設立である。この組織は、国際的なバリデーション研究を推進し、専門家による第三者評価を合同で行い、行政への受け入れを加速させることを目的としている。

EUにおいては、皮膚刺激性試験代替法である EpiDerm SIT と SkinEthic RHE が ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) により承認されたことが挙げられる。昨年度に承認された EPISKIN を含めて、ヒト皮膚モデル試験が OECD ドラフトガイドラインとして提案されている。眼刺激性試験代替法については、過去にバリデーションが実施された Neutral Red Release、Fluorescein Leakage 等の試験法の再評価が進められ、2009年3月の ESAC において認証される可能性がある。

米国においては、眼刺激性試験代替法の Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) と Isolated Chicken Eye (ICE) が、米国危険物質法 (Federal Hazardous Substance Act) の下で実施されるラベル表示のための分類に適用されることが了承された。また、NICEATM が急性経口毒性試験の投与開始用量の推定に用いる *in vitro* 細胞毒性試験に関する評価報告書を公表したことが挙げられる。

日本においては、JaCVAM の活動本格化、厚生労働科学研究班における「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」活動の進展、さらに HS 財団の動物実験実施施設認証センターの発足があげられる。化粧品業界では、日本化粧品工業連合会より「化粧品の安全性評価に関する指針 2008」が発行され、業界における安全性評価に関する考え方が改めて示された。

このように国内外の代替法に関する情勢は急速に変化しており、関連情報を継続的に収集分析し、その結果を公表していくことは、本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するうえで必要と考えられた。

C-2-2) ヒト接触皮膚炎評価の見直し

2006~2007年の藤田保健衛生大学皮膚科における化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを施行した症例についてまとめ、1992~1994年、1995年~1998年の当科の結果と比較した結果、シャンプー、クリーム、日焼け止め、口紅、染毛剤、美容液、ファンデーションが上位を占める傾向に変化はなかった。症例としては、刺激性接触皮膚炎が多かった。個々の症例において、ヒト接触皮膚炎が顔面でしか再現されないものがあった。

また、2008年に複数の施設で実施されたパッチテスト結果を集計・解析し、過去のアレルギーの結果と比較したところ、10年間順位の変動はあるものの、陽性率の高いアレルギー10種は同様であった。

C-3) 新規代替法の評価

C-3-1) バリデーション研究

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

皮膚感受性試験 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。第一次バリデーションの結果、試験法の改良が必要であると結論されたため、プロトコルを改良して第二次バリデーションを実施した。

その結果、LLNA-BrdU 法は施設間再現性がよく、LLNA 法と同程度に代替可能性が高い試験法であるとされた。

2) 皮膚刺激性を調べるための LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究

皮膚刺激性を調べるための LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法の多施設バリデーション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、19被験物質で得られた結果から、LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法は全体として施設間再現性は良好であったとされた。代替の可能性は J-TEC が提唱した結果とほぼ同程度であり、再現性が高いと考察された。EPISKIN との同等性については、特異度は同程度であるが、感度がやや劣る可

能性があると結論された。

C-3-2) 第三者評価

1) 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) について、専門家による第三者評価が終了し、有用性や限界を確認した。

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が終了し、欧米の評価内容を確認した。

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 BOP や ICE について、専門家による第三者評価が終了し、欧米の評価内容を確認した。

4) 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
評価継続中である。

5) *in vitro* バイロジェン試験
評価継続中である。

C-3-3) 行政的な受入れ評価

1) 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判断された。

2) 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。

C-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」の下部機関である皮膚刺激性、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分科会であり方検討会の示す方向性に従い、代替法の長短所をまとめる作業を進めた。

その結果、各試験の主な進捗が確認された。

1) 皮膚刺激性分科会

EPISKIN からヒトバッチに至る問題点を検討している。

2) 感作性分科会

LLNA に関しては、使用にあたり系統差、溶媒の問題に注意することを明記するなど、ほぼ議論は終了した。

3) 眼刺激性分科会

代替法の受け入れについては、来年度から本格化する予定である。

4) 光関連毒性分科会

代替法の受け入れについては、ほぼ議論が終了した。

5) 遺伝毒性分科会

in vivo 試験の扱いについての議論が今後必要である (あり方検討会は不要と判断した)。

6) 経皮吸収・皮膚透過性分科会

In vitro 試験の受け入れに関する条件などを整理できた。

まだ検討中のものを含め、分科会からの報告内容をもとに、来年度にあり方検討会としての最終的な結論をまとめることが確認された。

D. 結論

1) 皮膚刺激性試験代替法の開発では、EPISKIN を用いた PI 法のプロトコールが、全ての皮膚モデルで再現可能とは限らないことが明らかになった。そのため、各モデルに適したプロトコールにおけるバリデーション研究が必要である。

2) 眼刺激性試験代替法の開発では、リポフエクション法とエレクトロポレーション法による角膜上皮細胞株への遺伝子導入・不死化細胞株の樹立は、まだ成功していない。

3) 眼刺激性試験代替法の開発では、クローニングした HCE-T 細胞株は、継代を行っても Keratin-3 と Integrin-β1 を発現し続ける細胞であることを確認した。

4) 感作性試験代替法の開発では、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代替法である h-CLAT の化粧品原料における有用性と適用限界を明らかにすべく検討を行った。防腐剤、染毛剤および香料 30 品の検討により、自家蛍光を有する物質や揮発性物質を含む化粧品原料評価における h-CLAT の有用性が示された。一方、適切に評価できなかつた原料に関する考察より、感作性ポテンシャルが非常に弱い物質や難溶性物質に関する課題も明らかとなった。
- 5) 代替法のバリデーション研究のデータを事前情報として利用して、ベイズ回帰によって直線を推定し、予測分布のパラメータの推定する方法論の構築をほぼ確立できた。
 - 6) ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) が皮膚刺激性試験代替法として EpiDerm SIT、SkinEthic RHE を承認した。昨年度に承認された EPISKIN を含めて、ヒト皮膚モデル試験が OECD ドラフトガイドラインとして提案されている。
 - 7) 眼刺激性試験代替法については、過去にバリデーションが実施された Neutral Red Release、Fluorescein Leakage 等の試験法の再評価が進められ、2009 年 3 月の ESAC において認証される可能性がある。
 - 8) 代替法開発体制の観点からは、ICATM (International Cooperation on Alternative Test Methods) が設立された。これにより、バリデーション研究の推進や専門家による第三者評価が国際的に実施され、行政への受け入れが加速することが期待される。
 - 9) 国内では JaCVAM による代替法の評価とその活用に向けた体制が本格稼働してきており、3Rs の促進に向けて更なる進展が期待される。
 - 10) 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 年となり、2013 年に向けての動きも見られている。全身毒性試験における ECVAM の Predict-IV プロジェクト、並びに 3 種の感作性試験代替法の ECVAM によるプレバリデーションである。これら難易度の高い代替法に関しては、本分野において圧倒的パワーを有する EU の動きは特に注目される。
 - 11) 黒皮症が多発した 1970 年代の状況から比べると、2008 年現在、化粧品や医薬部外品、あるいは外用医薬品の安全性は明らかに改

- 善されている。しかしながら、直接肌に触れる製品のため、接触皮膚炎を引き起こしてしまう症例も少なくなかった。
- 12) 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プロトコルを改良して第二次バリデーションを実施した。その結果、LLNA-BrdU 法は施設間再現性がよく、LLNA 法と同程度に代替可能性が高い試験法であるとされた。
 - 13) LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法は全体として施設間再現性は良好であったとされた。代替の可能性は J-TEC が提唱した結果とほぼ同程度であり、再現性が高いと考察された。
 - 14) 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) について、専門家による第三者評価が終了し、有用性や限界を確認した。
 - 15) 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が終了し、欧米の評価内容を確認した。
 - 16) 眼刺激性試験代替法として欧米で認証されている BCOP (ウシ摘出角膜試験) や ICE (鶏の摘出眼球試験) について、専門家による第三者評価が終了し、欧米の評価内容を確認した。
 - 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判断された。
 - 18) 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、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。
 - 19) 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の下部機関である皮膚刺激性、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分科会が検討作業を進め、提案が出揃った。

F. 引用文献

なし

G. 研究発表

G-1) 論文発表

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小島肇夫: in vivo 経皮吸収試験法、最新・経皮吸収剤～開発と基礎から申請のポイントまで～、株式会社情報機構、東京、pp. 95-103 (2008)
- 2) 小島肇夫: in vitro 経皮吸収試験法、最新・経皮吸収剤～開発と基礎から申請のポイントまで～、株式会社情報機構、東京、pp. 104-113 (2008)
- 3) 小島肇夫: 安全性評価と動物実験代替法の現状、薬学雑誌、128 (5) 747-752. (2008)
- 4) 小島肇夫: 動物実験の3Rsにおける国内外の動向、ファルマシア、44 (9)、857-861 (2008)
- 5) 小島肇夫: REACH 対応に必要な動物実験代替法の現状、コスメティックステージ、2 (5)、1-4 (2008)
- 6) 小島肇夫: 動物実験代替法に関する2008年の国際動向、Fragrance Journal、2009-1、65-69 (2009)
- 7) 小島肇夫: 動物実験代替法の現状と展望、J. Environ Dermatol Cutan Allergol、3 (1)、1-6 (2009)
- 8) Omori, T., Idehara, K., Kojima H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I., Yuasa, A.: Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement, Journal of

Pharmacological and Toxicological Methods 58 11-26 (2008)

- 9) Arai, S., Yamamoto, N., Kato M., and Kojima, H.: An *in vitro* evaluation methods to test ocular irritation using a human corneal epithelium model, *Altern. Animal Test. Experiment.*, 13 (2), 83-90 (2008)
- 10) 小島肇夫: 動物実験の3Rsにおける国内外の動向、城西大学生命科学研究センター報告第7号、p37-50 (2009)
- 11) 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): Results of 2nd Japanese Inter-laboratory Study", *AATEX*, 13 (2), 55-62, 2008.
- 12) 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: "A study on serum difference on test results in the human Cell Line Activation Test (h-CLAT): Results of 3rd Japanese inter-laboratory study", *AATEX*, 13 (2), 63-69, 2008.
- 13) 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. and Ohno Y.: "Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results: Results of the 4th Japanese inter-laboratory Study", *AATEX*, 13 (2), 70-82, 2008.
- 14) Hagino, S., Okazaki, Y., and Itagaki, H.: An *in vitro* tier evaluation for the identification of cosmetic ingredients which are not ocular irritants. *Altern Lab. Anim.* 36, 641-652, 2008.
- 15) Hirota, M., Suzuki, M., Hagino, S., Kagatani, S., Sasaki, Y., Aiba, S., and Itagaki, H.: Modification of cell-surface thiols elicits the

- activation of human monocytic cell line: Possible mechanism involved in the effect of hapetens, 2,4-dinitrochlorobenzene and nickel sulfate. Accepted, J Toxicol. Sci., 2009.
- 16) 板垣宏, 萩野滋延: 動物実験代替法への化粧品企業における取り組み, ファルマシア 44, 863-868, 2008.
- 17) 矢上晶子, 松永佳世子: 皮膚アレルギーテストの結果をどう活かすか?, Visual Dermatology 7 (3): 258-263 (2008)
- 18) 曾和順子 (大阪市立), 鈴木加余子 (刈谷豊田), 鷺見康子, 松永佳世子: アレルギー性接触皮膚炎 口紅, Visual Dermatology 7 (3): 304-306 (2008)
- 19) 松永佳世子, 早川律子, 板見 智, 石井正光, 伊藤正俊, 安永千尋, 庄司昭伸, 藤本美穂, 鈴木真理, 流田妙子, 西井貴美子, 杉浦真理子, 矢上晶子, 乾 重樹, 小林裕美, 関東裕美, 岩佐明子, 田水智子, 加藤敦子, 高橋晴人, 山崎貞男: 接触皮膚炎の既往ならびにアトピー性皮膚炎を対象とした敏感肌用化粧品の使用試験, 皮膚の科学 7 (1): 61-74 (2008)
- 20) 松永佳世子: 顔の毛穴が目立つのはなぜ?, 解体新ショー NHK 出版 東京 (2008)
- 21) 山北高志, 中川真実子, 松永佳世子: Q: 利用性の両手, 主関節部に生じた湿疹病変 A: ヘアダイ皮膚炎, J Visual Dermatology 7 (6): 655-656 (2008)
- 22) 古田加奈子, 亀山梨奈, 鈴木加余子, 松永佳世子: パッチテストで多種の外用剤に陽性であった皮膚潰瘍の1例, Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology 2 (3) (Serial No. 6): 167-172 (2008)
- 23) 松永佳世子, 矢上晶子: ラテックスアレルギー, アナフィラキシーショック, 克誠堂出版 東京 pp218-230 (2008)
- 24) 松永佳世子: ②接触皮膚炎, 皮膚科典型アトラス 560 日本医事新報社 東京 23-28 (2008)
- 25) 松永佳世子: 皮膚アレルギー検査の実際について教えてください, Oral allergy syndrome の診断のコツと原因検査法について教えてください, 食餌性アレルギーなどに伴うアナフィラキシーショックへの対応について教えてください, 皮膚科診療こんなときどうする Q&A 中外医学社 東京 8-14 (2008)
- 26) 稲葉弥寿子, 秋田浩孝, 松永佳世子: 知らないとはずかしい 皮膚疾患】頭頸部頰部, 顎部の網目状の色素沈着 色素沈着性接触皮膚炎 (pigmented contact dermatitis, Riehl 黒皮症), J Visual Dermatology 7 (6): 635-636 (2008)
- 27) 松永佳世子: いつまでも若々しく, 美しい肌でいるために, まいんど 9-11 (2009)
- 28) 松永佳世子: インプラント中の金属アレルギーによる皮膚障害が疑われた10症例の検討, J Environ Dermatol Cutan Allergol 13 (1): 32-41 (2009)
- 29) 松永佳世子: よき伝統の継承・そして新たな出発, マルホ皮膚科セミナー 放送内容集 197: 4-6 (2009)
- 30) 稲葉弥寿子, 松永佳世子: 吉草酸ブレドニゾロンによる接触皮膚炎, J Visual Dermatology 8 (2): 152-153 (2009)
- 31) 稲葉弥寿子, 中川真実子, 松永佳世子: 配合剤による接触皮膚炎, J Visual Dermatology 8 (2): 154-155 (2009)
2. 学会発表
- 1) Kojima, H., Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (May, 2008)
- 2) 小島肇夫, REACH 対応と動物実験代替法, 第128回 FJ セミナー, 東京 (2008)
- 3) Kojima, H., Japanese Collaboration on Alternative to Animal Toxicology Testing, World Congress on in Vitro Biology, Tucson (2008)
- 4) Kojima, H., JaCVAM Update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, Bethesda, (June, 2008)
- 5) 小島肇, 武吉正博, 大森崇, 寒水孝司, 有馬和範, 出原賢治, 金澤由基子, 牧栄二, 中桐直人, 五十嵐良明, 田中正志, 吉村功, 湯浅敦子: LLNA-BrdU 法の施設間バリデーション研究, 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, 東京 (2008)
- 6) 小島肇, 武吉正博, 出原賢治: 非 RI 法による皮膚感作性試験代替法 (LLNA 法) のバリデーション研究-試験法概要-, 第15回日本免疫毒性学会学術大会, 東京 (2008)

- 7) 出原賢治, 小島肇, 武吉正博: 非 RI 法による LLNA 法の比較, 第 38 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 大阪 (2008)
- 8) Kojima, H., Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Brussels (November, 2008)
- 9) Kojima, H., International Current of 3Rs International Symposium on the 3Rs Promotion in Asia, Saitama (2008)
- 10) 小島 肇: 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委員会報告, 日本動物実験代替法学会第 21 回大会, 埼玉 (2008)
- 11) 杉山真理子, 河合敬一, 小島 肇, 寒水孝司, 辰見寿, 夏秋優, 森福義: 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 皮膚刺激性分科会からの報告, 日本動物実験代替法学会第 21 回大会, 埼玉 (2008)
- 12) 金澤由基子, 横関博雄, 中田土起丈, 坂口斉, 大野泰雄, 小島 肇: 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 感作性試験分科会からの報告, 日本動物実験代替法学会第 21 回大会, 埼玉 (2008)
- 13) 瀬戸 洋一, 萩野 滋延, 畠 賢一郎, 森田 正道, 平野 耕治, 金子 豊蔵, 小島 肇: 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 眼刺激性分科会からの報告, 日本動物実験代替法学会第 21 回大会, 埼玉 (2008)
- 14) 藤井まき子, 小島 肇, 杉林堅次, 上月裕一, 桑原裕史: 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 皮膚透過・経皮吸収試験分科会からの報告, 日本動物実験代替法学会第 21 回大会, 埼玉 (2008)
- 15) 笠松俊夫, 江幡真也, 林 真, 能美建彦, 本間正充, 小島 肇: 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 遺伝毒性分科会からの報告, 日本動物実験代替法学会第 21 回大会, 埼玉 (2008)
- 16) 武吉正博, 小島 肇, 大森崇, 寒水孝司, 有馬和範, 出原賢治, 金澤由基子, 牧栄二, 中桐直人, 五十嵐良明, 田中正志, 吉村功, 湯浅敦子: LLNA-BrdU 法の施設間バリデーション研究, 日本動物実験代替法学会第 21 回大会, 埼玉 (2008)
- 17) 小島 肇, 安藤洋子, 山口能宏, 小坂忠司, 鈴木民恵, 湯浅敦子, 渡邊幸彦, 篠田伸介, 出原賢治, 吉村 功, 宮岡悦良, 石山賢也, 加藤雅一, 大森 崇: 培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究 予備試験結果, 日本動物実験代替法学会第 21 回大会, 埼玉 (2008)
- 18) 小島 肇: in vitro 遺伝毒性試験—光と影—, 第 37 回日本環境変異原学会, 沖縄 (2008)
- 19) 小島 肇: 毒性試験における培養細胞の利用, 安全性評価研究会 2008 年冬のセミナー, 東京 (2008)
- 20) 小島 肇: 動物実験適正化のグローバルな動き—代替法の動きを中心に—, 日本制約工業協会医薬品評価委員会 第 102 回基礎研究部会総会, 京都 (2009)
- 21) Kojima, H., Current aspects of LLNA-DA and LLNA-BrdU as alternatives for skin sensitizer classification in Japan, 2009 Winter Conference of Korean Society of Alternatives to Animal Experiments, Seoul (February, 2009)
- 22) Kojima, H., Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (March, 2009)
- 23) R Tice, F Deal, P Ceger, D Allen, J Gordon, J DeLange, S Bremer, M Nakamura, H Kojima, A Ono, W Stokes: Establishing a Historical Database for a Multi-phased International Validation Study of a Stably-Transfected Estrogen Receptor (ER) Transcriptional Activation (TA) Test Method, 48th Annual SOT meeting, Baltimore (2008)

- 24) J Strickland, M Paris, D Allen, R Tice, H Kojima, P Prieto, M Wind, W Stokes : ICCVAM/NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Acute Systemic Toxicity Evaluations, 48th Annual SOT meeting, Baltimore (2008)
- 25) 小坂七重, 稲葉宏幸, 岡本賢二, 水野誠, 菌さき子, 加藤義直, 岸正孝, 足利太可雄, 岡本裕子, 桑原裕史, 中村恒彰, 坂口斉, 大野泰雄 : In vitro 皮膚感作性試験 : h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の日本における共同研究 (第5報) - 防腐剤の評価におけるh-CLATの有用性検討 -, 日本動物実験代替法学会 21 回大会, ポスター番号33, 2008.
- 26) 岡本賢二, 加藤義直, 岸正孝, 桑原裕史, 菌さき子, 小坂七重, 水野誠, 稲葉宏幸, 中村恒彰, 岡本裕子, 坂口斉, 足利太可雄, 大野泰雄 : In vitro 皮膚感作性試験 : h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の日本における共同研究 (第6報) - 染毛剤の評価における h-CLAT の有用性検討 -, 日本動物実験代替法学会 21回大会, ポスター番号34, 2008.
- 27) 菌さき子, 水野誠, 小坂七重, 岡本賢二, 加藤義直, 稲葉宏幸, 中村恒彰, 岸正孝, 桑原裕史, 坂口斉, 岡本裕子, 足利太可雄, 大野泰雄 : In vitro 皮膚感作性試験 : h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の日本における共同研究 (第7報) - 香料成分の評価における h-CLAT の有用性検討 -, 日本動物実験代替法学会 21 回大会, ポスター番号 35, 2008.
- 28) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Nukada, Y., Kosaka, N., Sono, S., Nishiyama, N., and Itagaki, H. : Database of h-CLAT (cell-based skin sensitization test) for clarification of applicability domain, 45th Congress of the European Societies of Toxicology, 2008.
- 29) 萩野滋延, 岡崎有羽子, 北垣雅人, 板垣宏 : SIRC 細胞毒性試験と3次元培養真皮モデルを用いる試験の組合せによる眼刺

激性評価法の検討*, 日本動物実験代替法学会第21回大会, 2008.

- 30) 足利太可雄, 坂口斉, 額田祐子, 小坂七重, 伊藤勇一, 菌さき子, 西山直宏, 板垣宏 : 既知化合物 (100 品) による皮膚感作代替法試験 h-CLAT の有用性評価, 日本動物実験代替法学会第21回大会, 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

日本で開発された新規試験法のバリデーション研究、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専門家による第三者評価、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行った。

具体的には、バリデーション研究として、1) 皮膚感作性試験としてLLNA-BrdU法の2次バリデーション研究、2) 皮膚刺激性を調べるためのLabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激性試験代替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) 皮膚感作性試験としてLLNA-BrdU法、2) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、3) 牛摘出角膜試験および鶏摘出眼球試験による眼刺激性試験代替法を評価した。

行政的な受入れ評価として、JaCVAM評価会議において、1) ヒト皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法および2) 皮膚感作性試験としてLLNA-DA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議論を行い、下部組織である6つの分科会から見解を得た。

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。

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20年度は、バリデーション研究として、1) 皮膚感作性試験としてLLNA-BrdU法の2次バリデーション研究、2) 皮膚刺激性を調べるためのLabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究を行った。

専門家による第三者評価には、1) 皮膚感作性試験としてLLNA-BrdU法、2) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、3) 牛摘

出角膜試験および鶏摘出眼球試験による眼刺激性試験代替法を評価した。

また、資生堂から提案された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、in vitroパイロジェン試験の評価を開始した。

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および皮膚感作性試験としてLLNA-DA法の評価を行った。

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議論を行うとともに、下部組織である6つの分科会（皮膚刺激性、眼刺激性、感作性、光関連毒性、経皮吸収・皮膚透過性、遺伝毒性）から報告書を得た。

これらの研究報告および議事録を以下に順に示す。

C. 健康危険情報

なし

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小島肇夫: *in vivo* 経皮吸収試験法, 最新・経皮吸収剤～開発と基礎から申請のポイントまで～, 株式会社情報機構, 東京, pp. 95-103 (2008)
- 2) 小島肇夫: *in vitro* 経皮吸収試験法, 最新・経皮吸収剤～開発と基礎から申請のポイントまで～, 株式会社情報機構, 東京, pp. 104-113 (2008)
- 3) 小島肇夫: 安全性評価と動物実験代替法の現状, 薬学雑誌, 128 (5) 747-752. (2008)
- 4) 小島肇夫: 動物実験の3Rsにおける国内外の動向, ファルマシア, 44 (9), 857-861 (2008)
- 5) 小島肇夫: REACH 対応に必要な動物実験代替法の現状, コスメティックステージ, 2 (5), 1-4 (2008)
- 6) 小島肇夫: 動物実験代替法に関する2008年の国際動向, *Fragrance Journal*, 2009-1, 65-69 (2009)
- 7) 小島肇夫: 動物実験代替法の現状と展望, *J. Environ Dermatol Cutan Allergol*, 3 (1), 1-6 (2009)
- 8) Omori, T., Idehara, K., Kojima H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I., Yuasa, A.: Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 58 11-26 (2008)
- 9) Arai, S., Yamamoto, N., Kato M., and Kojima, H.: An *in vitro* evaluation methods to test ocular irritation using a human corneal epithelium model, *Altern. Animal Test. Experiment*, 13 (2), 83-90 (2008)
- 10) 小島肇夫: 動物実験の3Rsにおける国内外の動向, 城西大学生命科学研究センター報告第7号, p37-50 (2009)
- 1) Kojima, H., Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (May, 2008)
- 2) 小島肇夫, REACH 対応と動物実験代替法, 第128回FJセミナー, 東京 (2008)
- 3) Kojima, H., Japanese Collaboration on Alternative to Animal Toxicology Testing, World Congress on *in Vitro* Biology, Tucson (2008)
- 4) Kojima, H., JaCVAM Update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, Bethesda, (June, 2008)
- 5) 小島肇, 武吉正博, 大森崇, 寒水孝司, 有馬和範, 出原賢治, 金澤由基子, 牧栄二, 中桐直人, 五十嵐良明, 田中正志, 吉村功, 湯浅敦子: LLNA-BrdU 法の施設間バリデーション研究, 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, 東京 (2008)
- 6) 小島肇, 武吉正博, 出原賢治: 非RI法による皮膚感作性試験代替法 (LLNA法) のバリデーション研究-試験法概要-, 第15回日本免疫毒性学会学術大会, 東京 (2008)
- 7) 出原賢治, 小島肇, 武吉正博: 非RI法によるLLNA法の比較, 第38回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 大阪 (2008)
- 8) Kojima, H., Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Brussels (November, 2008)
- 9) Kojima, H., International Current of 3Rs International Symposium on the 3Rs Promotion in Asia, Saitama (2008)
- 10) 小島肇: 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報告, 日本動物実験代替法学会第21回大会, 埼玉 (2008)
- 11) 杉山真理子, 河合敬一, 小島肇, 寒水孝司, 辰見寿, 夏秋優, 森福義: 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あり方検討委員会報告 皮膚刺激性分科会からの報告, 日本動物実験代替法学会第21回大会, 埼玉 (2008)
- 12) 金澤由基子, 横関博雄, 中田土起丈, 坂口斉, 大野泰雄, 小島肇: 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あり方検討委員会報告 感作性試験分科会からの報告, 日本動物実験代替法学会第21回大会, 埼玉 (2008)

2. 学会発表

- 13) 瀬戸 洋一、萩野 滋延、畠 賢一郎、森田 正道、平野 耕治、金子 豊蔵、小島 肇：医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 眼刺激性分科会からの報告、日本動物実験代替法学会第21回大会、埼玉 (2008)
- 14) 藤井まき子、小島 肇、杉林堅次、上月裕一、桑原裕史：医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 皮膚透過・経皮吸収試験分科会からの報告、日本動物実験代替法学会第21回大会、埼玉 (2008)
- 15) 笠松俊夫、江幡真也、林 真、能美建彦、本間正充、小島 肇：医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 遺伝毒性分科会からの報告、日本動物実験代替法学会第21回大会、埼玉 (2008)
- 16) 武吉正博、小島 肇、大森崇、寒水孝司、有馬和範、出原賢治、金澤由基子、牧栄二、中桐直人、五十嵐良明、田中正志、吉村功、湯浅敦子：LLNA-BrdU法の施設間バリデーション研究、日本動物実験代替法学会第21回大会、埼玉 (2008)
- 17) 小島 肇、安藤洋子、山口能宏、小坂忠司、鈴木木恵、湯浅敦子、渡邊幸彦、篠田伸介、出原賢治、吉村 功、宮岡悦良、石山賢也、加藤雅一、大森 崇：培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究 予備試験結果、日本動物実験代替法学会第21回大会、埼玉 (2008)
- 18) 小島 肇：in vitro 遺伝毒性試験－光と影－、第37回日本環境変異原学会、沖縄 (2008)
- 19) 小島 肇：毒性試験における培養細胞の利用、安全性評価研究会2008年冬のセミナー、東京 (2008)
- 20) 小島 肇：動物実験適正化のグローバルな動き－代替法の動きを中心に－、日本制約工業協会医薬品評価委員会 第102回基礎研究部会総会、京都 (2009)
- 21) Kojima, H., Current aspects of LLNA-DA and LLNA-BrdU as alternatives for skin sensitizer classification in Japan, 2009 Winter Conference of Korean Society of Alternatives to Animal Experiments, Seoul (February, 2009)
- 22) Kojima, H., Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (March, 2009)
- 23) R Tice, F Deal, P Ceger, D Allen, J Gordon, J DeLange, S Bremer, M Nakamura, H Kojima, A Ono, W Stokes :Establishing a Historical Database for a Multi-phased International Validation Study of a Stably-Transfected Estrogen Receptor (ER) Transcriptional Activation (TA) Test Method, 48th Annual SOT meeting, Baltimore (2008)
- 24) J Strickland, M Paris, D Allen, R Tice, H Kojima, P Prieto, M Wind, W Stokes : ICCVAM/NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Acute Systemic Toxicity Evaluations, 48th Annual SOT meeting, Baltimore (2008)

F. 知的財産権の出願、登録状況
なし

1) 皮膚感作性試験 LLNA-BrdU 法のバリデーション研究

研究要旨

昨年、皮膚感作性試験 LLNA-BrdU 法の多施設バリデーション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が組織され、バリデーション研究が実施された。このバリデーション研究の結果、12 被験物質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。そこで、本年はプロトコルを改良して第2次バリデーション研究を実施した。その結果、LLNA-BrdU 法は施設間再現性がよく、LLNA 法と同程度に代替可能性が高い試験法であることが明らかになった。

A. 研究目的

Local lymph node assay (LLNA 法) はマウスのリンパ節細胞増殖反応により皮膚感作性を評価する試験法であり、モルモットを用いた試験法 (Guinea-pig maximization test および Buehler test) の代替法として広く知られている。LLNA 法は感作誘導期のリンパ節細胞増殖反応を ^3H で標識されたチミジン

(^3H -thymidine) の DNA への取り込みを指標として皮膚感作性を評価する。しかしながら、我が国では RI (Radioactive isotope) の取り扱い規制が厳しく、LLNA 法の普及は十分ではない。LLNA-BrdU 法は、 ^3H -thymidine の取り込み量の代わりに bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込み量を指標として判定する方法であり、RI の管理に厳しい本邦でも容易に実施できるという利点がある。我々は過去に、施設間再現性と代替可能性の検討を主目的とし、9 施設で 12 被験物質を用いて LLNA-BrdU 法のキャッチアップバリデーション研究を実施した。その結果、実施した LLNA 法と比較して陽性対照物質のバラツキが大きく、試験法の改良が必要であると結論された。そこで、本年はプロトコルを改訂し、7 施設で 10 被験物質を用いて第2次バリデーション実験を行った。

B. 研究方法

本研究は LLNA-BrdU 法の改訂 SOP に基づいて実施した。陽性対照物質 (50% hexyl cinnamic aldehyde : HCA) 以外の 10 の被験物質のうち、3 物質は全 7 施設で、残りの 7 物質は 3 施設毎に評価した。各被験物質をコード化し、3 用量を秤量し各実験施設に送付した。各実験施設において、溶媒にて用事調製した被験物質を用いて実験がなされた。溶媒対照群の BrdU と取り込み量に対する被験物質群の BrdU 取り込み量の比 (Stimulation index, SI 値) が 2 を超えた場合、陽性と判定した。

C. 結果と考察

改訂プロトコルで規定していた実験の成立条件は厳しすぎたため、その遵守は難しかった。このため、より広く LLNA-BrdU 法が使用できるようにするために成立条件を緩和した解析結果に基づき検討を行った。その結果、全施設で評価した陽性対照物質 HCA の SI 値のバラツキは小さく、施設内再現性も高かった。この結果により、緩和した実験成立条件下でプロトコルの改良を確認できたといえる (詳細は資料 1-2 参照)。実験に用いたすべての被験物質の結果を解析した結果、濃度依存性および施設間再現性も高く、LLNA 法との結果とほとんど一致した。

D. 結論

本研究で得られた結果から、最終的な成立条件において、LLNA-BrdU 法は施設間再現性がよく、LLNA 法と同程度に代替可能性が高い試験法であるといえる。

E. 資料

- 資料 1-1 LLNA-BrdU バリデーション研究二次報告書
- 資料 1-2 LLNA-BrdU バリデーション一次報告書
- 資料 1-3 LLNA-BrdU 法バリデーション研究実行委員名簿
- 資料 1-4 LLNA-BrdU 法バリデーション研究実験担当者名簿
- 資料 1-5 皮膚感作性試験代替法 (LLNA-BrdU 法) バリデーション研究計画書 (第2次バリデーション研究計画書) (Version 1.0)
- 資料 1-6 LLNA-DA 法バリデーション研究候補物質リスト
- 資料 1-7 LLNA-BrdU 法実験 SOP (Version 1.01)

- 資料 1-8 LLNA-BrdU 法バリデーション研究 (第 2 期) 本実験実施日程希望調査表
- 資料 1-9 データシート
- 資料 1-10 LLNA-BrdU 法データシート入力の手引き
- 資料 1-11 SI 値とその 95%信頼区間の計算法
- 資料 1-12 希釈・再実験の実施状況

LLNA-BrdU 法バリデーション研究 (第 2 実験)

報告書

報告書作成日 : 2008 年 6 月 9 日

改訂日 : 2008 年 7 月 24 日

改訂日 : 2008 年 8 月 6 日

改定日 : 2009 年 1 月 17 日

報告書作成責任者 : 小島 肇

LLNA-BrdU 法バリデーション研究実行委員会

委員長

小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部)

委員

大森 崇 (京都大学大学院医学研究科医療統計学分野)

寒水孝司 (大阪大学臨床医工学融合研究教育センター)

吉村 功 (東京理科大学工学部経営工学科)

出原賢治 (ダイセル化学工業株式会社 評価・解析センター)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部)

金澤由基子 (財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 医療用具試験室)

武吉正博 (財団法人 化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所研究第一部)

青儀 巧 (大塚製薬株式会社 徳島研究所 安全性研究センター 第2研究室)

田中正志 (明治製菓株式会社 医薬開発部門 動態安全性研究所)

有馬和範 (大正製薬株式会社 安全性研究所)

湯浅敦子 (富士フイルム株式会社 CSR 推進部 環境・品質マネジメント部素材試験センター)

牧 栄二 (財団法人食品農医薬品安全性評価センター)

略号の原語または意味

ACD: Allergic contact dermatitis

AOO: Acetone/Olive oil

BrdU: Bromodeoxyuridine

BT: Buehler test

EC3: The estimated concentration that yields a stimulation index of three

FCA: Freund's complete adjuvant

GLP: Good laboratory practice

GPMT: Guinea pig maximization test

HCA: Hexyl cinnamic aldehyde

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

LLNA: Local lymph node assay

OECD: Organization for Economic Cooperation and Development

PBS: Phosphate buffered saline

RI: Radioactive isotope

SI: Stimulation index

SOP: Standard operating procedure

目次	
はじめに.....	5
要約.....	5
1. 背景および目的.....	6
1.1 皮膚感受性.....	6
1.2 モルモットを用いた試験法.....	6
1.3 LLNA 法.....	6
1.4 LLNA-BrdU 法.....	6
1.5 本研究にいたるまでの過程.....	6
1.6 本研究の目的.....	7
2. 方法.....	8
2.1 組織と役割.....	8
2.1.1 研究の組織	
2.1.2 各組織の役割	
2.2 LLNA-BrdU の操作法.....	8
2.3 操作法の普及と改良.....	9
2.3.1 技術研修会	
2.3.2 予備試験	
2.3.3 第1次バリ実験によって生じたプロトコールの問題点	
2.4 被験物質および溶媒.....	10
2.4.1 割付	
2.4.2 試料等の配布	
2.5 実験実施のスケジュール.....	12
2.6 データの管理.....	12
2.7 データ解析の方法.....	13
2.7.1 体重, リンパ節重量, ATP 発光量	
2.7.2 SI 値とその95%信頼区間の算出	
2.7.3 SI値に基づく判定	
2.7.4 施設内再現性, 施設間再現性の評価	
2.7.5 代替可能性の検討	
3. 結果.....	14
3.1 選択された被験物質と割付け結果.....	14
3.2 研究の質について.....	14
3.3 データの取り扱いについて.....	14
3.3.1 析出, 沈殿等について	
3.3.2 採用基準の遵守と解析データセット	
3.3.3 解析の方針	
3.4 背景基礎データ.....	17
3.4.1 体重	
3.4.2 リンパ節重量	