

Irritation Test: 少容量法)の Draize 法において、EU 分類での評価が検討された。5% SLS (ラウリル硫酸ナトリウム) ではないずれも非刺激性、10% 塩化ベンザルコニウムではないずれも R41 (強刺激性) と判定され、その他の物質 (界面活性剤、洗剤など) では 10 物質で ICE 法と Draize 法のデータが一致、5 物質で不一致であった。

10 3Rs への関与 (動物福祉面としての妥当性)

ICE 法で使用されている眼球試料は、試験目的ではなく食用として屠殺されたニワトリの眼球を用いているため、試験目的だけの実験動物の使用を抑えることができる (reduction)。また、従来の Draize 法と比較して、試験操作による動物への苦痛は無い (refinement)。また、ICE 法で陽性と判断された場合には追加の動物試験を行う必要がなくなることから、化学物質の眼刺激性評価全体において不必要な動物試験を回避できる (reduction) など、眼刺激試験のためにウサギを用いる従来の Draize 法よりも動物福祉面からも評価できる。この意味では、動物が受ける苦痛の除去 (refinement)、使用動物数の削減 (reduction) および不必要な動物試験の回避 (reduction) が達成できる。

11 試験法の有用性と限界

ICE 法の評価項目において、Corneal Swelling (角膜の腫脹) については光学的厚度計を用いた客観的な指標であることから、Draize 法と比較しても、試験実施施設間での誤差を軽減することができると考えられる。眼刺激性強度カテゴリーの境界線上の判断が要求される際には、Morphological effects (組織学的変化) を参考にすることも可能である。

試験法の移転性については、機器の特殊性、汎用性および試験技術の修得から、現時点における日本国内での日常的な実施は困難と考えられる。ただし、日本国外には ICE 法による眼刺激性試験を実施する受託機関 (1 施設) があり、日本の科学者や企業からの委託が可能である。

本バリデーションにおいては、施設内変動の検討が十分とはいえ、別施設での実施の場合には別途施設内変動に関する検討が必要である。一方、施設間変動については、4 施設中 3 施設以上で一致した被検物質は、Draize 法との比較で 91%、ICE 法のみと比較で 88% と高い値を示し、良好な結果が得られている。

ICE 法の限界として、アルコール類に対する偽陽性・偽陰性率が高く、界面活性剤、農薬および固形物に対する偽陰性率も高かったため、これらの物質の評価には試験法の改良が必要である。

費用面では、従来の Draize 法と大きな違いはない。しかし、病理組織学的観察を考

えた場合は、更なる出費が予想される。

試験期間については観察期間は短縮されるが、病理組織学的観察を行う場合には試験開始から最終報告書作成までの期間は、従来の Draize 法と大きな違いはない。

12. 結 論

ICCVAM で実施された ICE 法の第三者評価はバリデーションに必要な項目、プロセス、データが検討されている。ESAC の評価と同様、ICCVAM のバリデーションの結果を受け入れることに問題はないと判断される。

特定の化学物質（アルコール類、界面活性剤、固体等）ではその精度が十分ではない等の試験の限界を考慮に入れた上で、適切なプロトコールに基づき試験を実施すれば、ICE 法は、化学物質の眼刺激性の段階的評価の1つとして、腐食性・強刺激性物質をスクリーニングすることが可能であると判断される。

現在、EU では ICE 法の陽性結果をもって化学物質を R41 に区分することを既に受け入れている。また、米国では、FDA・EPA が化学物質の眼刺激性評価において、腐食性・強刺激性物質の判断に ICE 法の結果を受け入れることを公式に発表している。

わが国においても、GHS に準拠する化学物質に関わる法規制において、ICE 法による腐食性・強刺激性物質の眼刺激性を評価することが可能である。

1 3 文献

Balls, M., Botham, P. A., Bruner, L. H. and Spielmann, H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol In Vitro* 9:871-929.

Butscher, P. (1953). Beitrag zur therapie von augenschadigunen durch thio glykolsaur bei der herstellung der sogenannten kaltwelle. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 122:349-350.

Chamberlain, M., Gad, S. C., Gautheron, P. and Prinsen, M. K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem Toxicol* 35:23-37.

ESAC (2007). ESAC statement on the conclusions of the ICCVAM retrospective study on Organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants as determined by US EPA, EU (R41) and UN GHS classifications in a tiered testing strategy, as part of a weight of evidence approach.

EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U. S. Environmental Protection Agency.

EU (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 adapting to technical progress for the 28th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. Official Journal of the European Communities L255:1-333.

Grant, W. M. (1974). Toxicology of the eye. 2nd ed. Springfield, IL: Charles C. Thomas.

ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No. : 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program.

McDonald, T. O., Seabaugh, V., Shaddock, J. A. and Edelhauser, H. F. (1987). Eye irritation. In *Dermatotoxicology* (Marzulli, F. N. and Maibach H. I., eds). Washington: Hemisphere Publishing Corporation. 641-696.

Nakano, M. (1958). Effect of various antifungal preparations on the conjunctiva and cornea of rabbits. *Yakuzaigaku* 18:94-99.

Prinsen, M. K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem Toxicol* 34:291-296.

Prinsen, M. K. (2000). Chicken enucleated eye test with reference surfactants and siloxane polymers in Phase II of the reference standard validation project; an *ex vivo* alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. TNO Report V99.521b. Unpublished report provided directly to NICEATM by M Prinsen, TNO Nutrition and Food Research Institute.

Prinsen, M. K. (2005). *In vitro* and *in vivo* data for 94 substances tested in the isolated chicken eye test. Unpublished data provided directly to NICEATM by MK Prinsen, TNO Nutrition and Food Research Institute.

Prinsen, M. K. and Koeter, B. W. M. (1993). Justification of 419 the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Food Chem Toxicol* 31:69-76.

UN (2003). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). New York & Geneva: United Nations Publications.

附表 1
定義 (Definitions)

Accuracy: (a) The closeness of agreement between a test method result and an accepted reference value. (b) The proportion of correct outcomes (positive and negative) of a test method. It is a measure of test method performance and one aspect of relevance. The term is often used interchangeably with concordance (see also two-by-two table). Accuracy is highly dependent on the prevalence of positives in the population being examined.

Coded substances: Substances labeled by code rather than name so that they can be tested and evaluated without knowledge of their identity or anticipation of test results. Coded substances are used to avoid intentional or unintentional bias when evaluating laboratory or test method performance.

Coefficient of variation (CV): A statistical representation of the precision of a test. It is expressed as a percentage and is calculated as follows:

$$\left(\frac{\textit{standard deviation}}{\textit{mean}} \right) \times 100\%$$

Corneal Opacity: A subjective measurement of the extent of opaqueness of the cornea following exposure to a test substance. Increased corneal opacity is indicative of damage to the cornea.

Corneal Swelling: An objective measurement in the ICE test of the extent of distention of the cornea following exposure to a test substance. It is expressed as a percentage and is calculated from corneal thickness measurements that are recorded at regular intervals during the ICE test. Increased corneal swelling is indicative of damage to the corneal epithelium.

False negative rate: The proportion of all positive substances falsely identified by a test method as negative (see two-by-two table). It is one indicator of test method accuracy.

False positive rate: The proportion of all negative substances that are falsely identified by a test method as positive. It is one indicator of test method accuracy.

Fluorescein retention: A subjective measurement in the ICE test of the extent of fluorescein sodium that is retained by epithelial cells in the cornea following exposure to a test substance. Increased fluorescein retention is indicative of damage to the corneal epithelium.

Globally Harmonized System (GHS): A classification system presented by the United Nations that provides (a) a harmonized criteria for classifying substances and mixtures according to their health, environmental and physical hazards, and (b) harmonized hazard communication elements, including requirements for labeling and safety data sheets.

Good Laboratory Practices (GLP): Regulations promulgated by the U. S. Food and Drug Administration and the U. S. Environmental Protection Agency, and principles and procedures adopted by the Organization for Economic Cooperation and Development and Japanese authorities that describe record keeping and quality assurance procedures for laboratory records that will be the basis for data submissions to national regulatory agencies.

Interlaboratory reproducibility: A measure of whether different qualified laboratories using the same protocol and test substances can produce qualitatively and quantitatively similar results. Interlaboratory reproducibility is determined during the prevalidation and validation processes and indicates the extent to which a test method can be transferred successfully among laboratories.

Intralaboratory repeatability: The closeness of agreement between test results obtained within a single laboratory, when the procedure is performed on the same substance under identical conditions within a given time period.

Intralaboratory reproducibility: The first stage of validation; a determination of whether qualified people within the same laboratory can successfully replicate results using a specific test protocol at different times.

Negative control: An untreated sample containing all components of a test system, except the test substance solvent, which is replaced with a known non-reactive material, such as water. This sample is processed with test substance-treated

samples and other control samples to determine whether the solvent interacts with the test system.

Negative predictivity: The proportion of correct negative responses among substances testing negative by a test method (see two-by-two table). It is one indicator of test method accuracy. Negative predictivity is a function of the sensitivity of the test method and the prevalence of negatives among the substances tested.

Positive control: A sample containing all components of a test system and treated with a substance known to induce a positive response, which is processed with the test substance treated and other control samples to demonstrate the sensitivity of each experiment and to allow for an assessment of variability in the conduct of the assay over time.

Positive predictivity: The proportion of correct positive responses among substances testing positive by a test method (see two-by-two table). It is one indicator of test method accuracy. Positive predictivity is a function of the sensitivity of the test method and the prevalence of positives among the substances tested.

Sensitivity: The proportion of all positive substances that are classified correctly as positive in a test method. It is a measure of test method accuracy (see two-by-two table).

Specificity: The proportion of all negative substances that are classified correctly as negative in a test method. It is a measure of test method accuracy

Tiered testing: A stepwise testing strategy where all existing information on a test substance is reviewed, in a specified order, using a weight of evidence process at each tier to determine if sufficient information is available for a hazard classification decision, prior to progression to the next tier. If the irritancy potential of a test substance can be assigned based on the existing information, no additional testing is required. If the irritancy potential of a test substance cannot be assigned based on the existing information, a step-wise sequential animal testing procedure is performed until an unequivocal

classification can be made.

6) 酵母生育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた光毒性試験代替法の専門家による第三者評価

研究要旨

酵母光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バッテリーのバリデーション報告書等をもとに、専門家による第三者評価を進めている。

A. 研究目的

資生堂から提案された「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた光毒性試験バッテリー（酵母-赤血球試験）」は平成19年度に両報告書提出後に補足された議論も含めて、最終的なバリデーション報告書がまとまった。これを受け、試験法の公定化のために、第三者の専門家による光毒性評価委員会を設立した。

B. 研究方法

B-1) 光毒性評価委員会委員

委員長

笛木 修（医薬品医療機器総合機構）

委員

戸倉新樹（産業医科大学）

小野寺博志（国立衛研）

山田 弘（医薬基盤研究所）

今井弘一（大阪歯科大学）

細井一弘（参天製薬）

B-2) 方法

OECDガイダンス文書No.34に示された第三者評価の項目毎に確認していく。

C. 結果および考察

評価委員会にて内容を確認し、作業を進めている。

7) In vitro パイロジェン試験の専門家による第三者評価

研究要旨

In vitro パイロジェン試験に関する欧米の報告書等をもとに、専門家による第三者評価を進めている。

A. 研究目的

In vitro パイロジェン試験に関する欧米の報告書等をもとに、専門家による第三者評価を進めている。試験法の公定化のために、この結果を含め、第三者の専門家により確認するために、パイロジェン評価委員会を設立した。

B. 研究方法

B-1) 光毒性評価委員会委員

委員長

小島 肇(国立医薬品食品衛生研究所)

委員

中澤憲一(国立医薬品食品衛生研究所)

吉村 功(東京理科大学)

篠田和俊(医薬品医療機器総合機構)

西岡吾朗(扶桑薬品工業)

石井 健(大阪大学)

B-2) 方法

OECDガイダンス文書No.34に示された第三者評価の項目毎に確認していく。

C. 結果および考察

評価委員会にて内容を確認し、作業を進めている。

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

研究要旨

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より、国際的に承認されている EpiDerm™ と同等の識別能力を有するものと考えられたことから、JaCVAM 評価会議において行政的受入れを提案した。

A. 研究目的

皮膚に対する直接的な傷害の有無の判定は化学物質の安全性評価において重要である。即ち、不可逆的な傷害である皮膚腐食性を示すものは劇物と判定され、その取り扱いについて厳しい規制を受ける。また、皮膚腐食性を示す物質を経口投与等で毒性試験することは動物に大きな苦痛を与えると同時に、適正な毒性試験遂行に支障を来す。そこで、従来よりウサギを用いる *in vivo* 皮膚刺激/腐食性試験法 (Draize et al., Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. JPET 82: 377-390, 1944, OECD guideline 404) により皮膚腐食性の有無が評価されてきた。しかし、この方法は動物に激しい苦痛とストレスを与える。そこで、*in vitro* 皮膚腐食性試験代替法が開発されてきた。OECD はガイドライン 430 と 431、435 でそれぞれ TER 法と EPISKIN™ と EpiDerm™ 法、Corrositex を承認している。一方、我が国では OECD で承認された方法で得られた結果は基本的に受け入れるとの姿勢ではあるが、実際に腐食性試験代替法で得られたデータを基に評価された例は見あたらなかった。また、皮膚刺激性試験代替法としての皮膚モデルは日本でも VitroLife Skin™ を始めとして、いくつか開発されているが、皮膚腐食性試験代替法としてのバリデーションは不十分であった。そこで、わが国発の皮膚モデルが既に OECD 等で承認されたものと同様の能力を有するのかが判定することを主目的とし、わが国で開発された VitroLife Skin™ と国際的に承認されている EpiDerm™ 法との比較バリデーションを行うこととし、三次元培養皮膚モデル Vitrolife-Skin™ に関する日本のバリデーションを平成 16 年度に実施した。その結果、Vitrolife-Skin™ は腐食性試験代替法として EpiDerm™ と同等の識別能力を有するものと考えられた。平成 17 年度は、このバリデーション結果を組み込んだ評価文書が作成された。

平成 17 年度の報告書はバリデーションに関係した委員が作成したものであった。これは専門家による第三者評価という点ではやや客観性に欠けると判断された。そこで、以下のメンバーで評価文書を再構築し、平成 20 年度報告書が完成した。

委員長

小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)

委員

岡本裕子 (日本化粧品工業連合会)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)

B. 研究方法

B-1. メンバー

平成 18 年度から、以下のメンバーを 2007-2008 年評価会議委員として要請し、平成 20 年度の報告書内容を資料として用いて第三者評価を行った。

(委員長)

井上 達 (国立医薬品食品衛生研究所)

(委員)

田中憲法 (日本動物実験代替法学会)

林 真 (国立医薬品食品衛生研究所)

吉田武美 (日本トキシコロジー学会)

吉村 功 (東京理科大学)

溝口昌子 (聖マリアンナ医科大学)

佐神文郎 (日本製薬工業協会)

岡本裕子 (日本化粧品工業連合会)

小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)

B-2. 評価方法

3 次元培養ヒト皮膚モデル (以下、皮膚モデルと記す、Vitrolife-Skin™) を用いた腐食性試験の動物実験代替法について、皮膚腐食性試験代替法の第三者評価委員会からの報告を受け、以下の 7 項目について審議した。本項目は OECD ガイダンス文書 No. 34 に示さ

れた検討項目である。

<検討項目>

1. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデータは、透明で独立な評価を受けているか。
2. 当該試験法で得られるデータは、対象毒性を十分に評価あるいは予測できるものであるか。データは、当該試験法と従来の試験法の、代替法としての繋がりを示しているか。あるいは（同時に）そのデータは、当該試験法と、対象としているあるいはモデルとしている動物種についての影響との繋がりを示しているか。
3. 当該試験法は、ハザードあるいはリスク、あるいはその両方を評価するのに有用であるか。
4. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件及び適用できない条件が明確であるか。
5. 当該試験法は、プロトコルの微細な変更に対して十分頑健で、適切な訓練経験を持つ担当者と適切な設備のある施設において、技術習得が容易なものであるか。
6. 当該試験法は、時間的・経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。
7. 当該試験法は、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に、新しい試験法あるいは改訂試験法であることが正当化されているか。

C. 結果および考察

1. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデータは、透明で独立な評価を受けているか。
→当該試験法は論文に発表されており、透明性は高い。バリデーションデータは、透明性の高い独立した第三者評価を受けている。
2. 当該試験法で得られるデータは、対象毒性を十分に評価あるいは予測できるものであるか。データは、当該試験法と従来の試験法の、代替法としての繋がりを示しているか。あるいは（同時に）そのデータは、当該試験法と、対象としているあるいはモデルとしている動物種についての影響との繋がりを示しているか。

→ *in vivo* と *in vitro* の一致率は 83.3% であった。乳酸や 5% 水酸化カリウム水溶液で不適合があった。一致しなかった物質については、必ずしも *in vivo* の表示が適切でないとの指摘があり、調査が必要であるとされた。ヒトの腐食性を予測できていると考えられる。

OECD のガイドライン 431 に掲載されている既存の試験法 EpiDerm™ と比べて、基本的に同じ作用機構を持ち、かつ同等の性能を持つという評価がなされた。

腐食性を細胞毒性で予測することの妥当性について、腐食性物質が接触すると角質層に吸収、拡散して通過後、下層の細胞に障害を及ぼし、障害の程度は表皮細胞の生死を指標とするので、この方法は腐食性を予測する条件を満たしているとの見解が示された。

3. 当該試験法は、ハザードあるいはリスク、あるいはその両方を評価するのに有用であるか。

→ハザードの同定には有効である。

4. 当該試験法とその妥当性を示すデータ
→その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件及び適用できない条件が明確であるか。今回のバリデーションでは、毒劇法の対象となる被験物質と判定基準物質が使われている。腐食性の作用機構を判断するに足る必要最小限のデータが得られている。被験物質が強アルカリ性の場合、培養細胞の基盤であるコラーゲンマトリックスを溶解する。着色性物質や吸着性が強い物質は適用が困難である。

5. 当該試験法は、プロトコルの微細な変更に対して十分頑健で、適切な訓練経験を持つ担当者と適切な設備のある施設において、技術習得が容易なものであるか。

→習得について大きな問題はない。実施においても特別な技術は必要ない。なお、測定キットであることからプロトコルに大きな変更の余地はない。

6. 当該試験法は、時間的経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。
→効果的である。

7. 当該試験法は、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に、新しい試験法あるいは改訂試験法であることが正当化されているか。
→正当化されている。

D. 結論

動物実験代替法である皮膚モデル (Vitrolife-Skin™) を用いた腐食性試験を定められた方法で適切に利用すれば、化学物質の腐食性を科学的に評価できると結論し、行政への提案書をまとめた。

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

研究要旨

皮膚感作性試験 LLNA-DA 法においては、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 LLNA と同等の識別能力を有するものと考えられたことから、JaCVAM 評価会議において行政的な受入れを提案した。

A. 研究目的

医薬品等の皮膚感作性は主に Guinea Pig Maximization Test 法 (GPMT 法)、Buehler Test 法 (BT 法) やその変法などで評価されてきたが、試験期間が GPMT 法で 24 日、BT 法で 38 日程度と長く、作業負荷やコストが多々である面や長時間の閉塞貼付や Freund's Complete Adjuvant の使用など動物にストレスを与えることによる動物愛護の面で問題もあり、新しい方法が求められてきた。最近、これらの点を解消する試験法として Kimber ら (1986) や Basketter ら (1996) によりマウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA) が提案され、欧米を中心にバリデーションが行われ、広く使用されるようになった。OECD の安全性試験法ガイドラインとしても 2002 年に承認された (OECD Guideline 429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, adopted 24th April 2002)。しかし、この方法は³Hで標識されたチミジンの DNA への取り込みを指標とする方法であるため、RI の取扱い規制の厳しい日本での普及は不十分であった。RI を用いない方法として Bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みをみる方法 (Takeyoshi et al, 2003) も報告されているが、まだ、十分にバリデートされていない。一方、ダイセル化学工業 (株) の山下と出原は ATP 含量を測定する方法 (LLNA-DA 法) を独自に開発し、代替法に関する厚生労働科学研究班 (主任研究者: 大野泰雄) に新しい動物実験代替法として応募した。研究班ではこの方法が RI を用いないという利点以外にも簡便で、かつ比較的短期間の方法であり、評価に値する方法であると考え、日本動物実験代替法学会 (代替法学会) に評価を依頼した。これを受け、代替法学会では評価委員会において、平成 16 年度より検討を行った。その結果、本試験法は原法である LLNA 法とほぼ同様の原理による方法であること、ほとんど同一の識別能力を持つこと、RI を用いないこと、簡便であり、比較的短期間で結果が得られるといった利点があると判断した。しかし、行政試験法として評価する為には、更にデー

タの信頼性や施設間再現性についての情報を得る必要があることから、多施設バリデーションの実施を代替法学会に依頼した。代替法学会のバリデーション委員会はこの依頼を受け、LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員会を組織し、バリデーション研究を行った。本二次評価は、このバリデーション研究報告書並びに関連して収集した情報に基づき、LLNA-DA 法が LLNA 法の代替法として妥当であるか否かを評価した報告書を受けて、最終的な行政的な受け入れについて評価した。

C. 研究方法

B-1. メンバー

平成 18 年度から、以下のメンバーを 2007-2008 年評価会議委員として要請し、平成 20 年度の報告書内容を資料として用いて第三者評価を行った。

(委員長)

井上 達 (国立医薬品食品衛生研究所)

(委員)

田中憲法 (日本動物実験代替法学会)

林 真 (国立医薬品食品衛生研究所)

吉田武美 (日本トキシコロジー学会)

吉村 功 (東京理科大学)

溝口昌子 (聖マリアンナ医科大学)

佐神文郎 (日本製薬工業協会)

岡本裕子 (日本化粧品工業連合会)

小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)

B-2. 評価方法

皮膚感作性試験代替法 (LLNA: Local Lymph Node Assay -DA 法) について、第三者評価委員会からの報告を受け、以下の 7 項目について審議した。本項目は OECD ガイダンス文書 No. 34 に示された検討項目である。

<検討項目>

1. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデータは、透明で独立な評価を受けているか。
2. 当該試験法で得られるデータは、対象毒

性を十分に評価あるいは予測できるものであるか。データは、当該試験法と従来の試験法の、代替法としての繋がりを示しているか。あるいは（同時に）そのデータは、当該試験法と、対象としているあるいはモデルとしている動物種についての影響との繋がりを示しているか。

3. 当該試験法は、ハザードあるいはリスク、あるいはその両方を評価するのに有用であるか。
4. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件及び適用できない条件が明確であるか。
5. 当該試験法は、プロトコルの微細な変更に対して十分頑健で、適切な訓練経験を持つ担当者と適切な設備のある施設において、技術習得が容易なものであるか。
6. 当該試験法は、時間的経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。
7. 当該試験法は、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に、新しい試験法あるいは改訂試験法であることが正当化されているか。

C. 結果および考察

1. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデータは、透明で独立な評価を受けているか。
→バリデーション結果は、論文としてアカデミックに公表されている。独立した専門家による第三者評価機関によって評価されている。

2. 当該試験法で得られるデータは、対象毒性を十分に評価あるいは予測できるものであるか。データは、当該試験法と従来の試験法の、代替法としての繋がりを示しているか。あるいは（同時に）そのデータは、当該試験法と、対象としているあるいはモデルとしている動物種についての影響との繋がりを示しているか。

→ゴールドスタンダードは LLNA で評価されている対照毒性について、感度、特異度が高い。従来の毒性試験と比較して十分である。GPMT (Guinean Pig Maximization Test) と原理が違う。

免疫毒性の皮膚感作性の代替法として国際

的に認められている LLNA の機能に匹敵（相当）する。

3. 当該試験法は、ハザードあるいはリスク、あるいはその両方を評価するのに有用であるか。
→ハザード評価に有用である。

4. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件及び適用できない条件が明確であるか。

- 純度の高い化学物質は十分に広くカバーされている。
- ・ 感作性の同定に有用である。
- ・ 感作性物質の評価において、LLNA と同等程度の評価が可能である。
- ・ 可溶性物質を対象とし、固体は適用できない。
- ・ 感作性の評価は 31 物質（提案施設）で実施されている。
- ・ 施設間差の評価は、14 物質で実施されているなど十分広く対象とされたものとなっている。

5. 当該試験法は、プロトコルの微細な変更に対して十分頑健で、適切な訓練経験を持つ担当者と適切な設備のある施設において、技術習得が容易なものであるか。

- プロトコルに忠実であることが求められる。試験法実施上に際して、投与回数を減らしたり、SLS（ラウリル硫酸ナトリウム）の適用がない場合に偽陰性が多くなる可能性があるので注意が必要である。
- ・ 系統、ATP測定までの時間を注意することにより、プロトコルの頑健性が維持される。
- ・ 技術習得が容易である。

6. 当該試験法は、時間的経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。
→ LLNA 原法と比べて、RI を使わないことを含めて、操作時間と経費が軽減され、有用性がある。また、施設が限定されない。従って、行政的に用いられやすい。

7. 当該試験法は、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に、新しい試験法あるいは改訂試験法であることが正当化されているか。
- ・R Iを使わないことにより、実施施設・試験実施者に制限がなく、廃棄物処理や環境汚染対策上の負担の低減に資するところが大きく、倫理的・経済的に大きな利点がある。
- ・静脈注射をしないことにより、作業と動物

への苦痛レベルを軽減できる。

D. 結論

皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA法)を定められた方法で注意点を適切に守って利用すれば、化学物質の皮膚感作性を科学的に評価できると結論し、行政への提案書をまとめた。

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

研究要旨

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

その結果、分科会から、①バリデーション研究および第三者評価が終了した試験法毎に代替法の利用について言及した。②代替法がある場合、その利用を第一優先とする。③必要に応じてスキームまたはフローチャートを作成した報告書が提出された。

A. 研究目的

化粧品の2009年問題、動物実験代替法(以下、代替法と記す)の利用が進む国際情勢や動物愛護団体の活動を勘案して、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が必要となってきた。

そこで、この問題について検討するため、医薬部外品に関係の深い委員による「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会(以降、あり方検討会)と記す」を設立した。

B. 研究方法

B-1) あり方検討会委員

委員長

小島 肇(国立衛研)

委員

飯島正文(昭和大学)

松永佳世子(日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会理事長)

大野泰雄(国立衛研)

増田光輝(国立衛研)

佐々 育(日本化粧品工業連合会 安全性部会 部会長)

西山直宏(日本化粧品工業連合会 安全性部会)

岡本裕子(日本化粧品工業会 代替法専門委員会 副委員長)

板垣 宏(日本動物実験代替法学会)

濱本博幸(医薬品医療機器総合機構)

鷺田 淳(厚生労働省)

益山光一(厚生労働省)

B-2) 方法

検討の対象となる代替法はバリデーション研究や第三者評価が終了している試験法であること、代替法の結果からヒト試験に適合しているか、進んでよいかの判断を行う、代替法の蓄積データからどこまで代替法で安全性評価ができるかを検討するものである。代替法を取り入れて安全性評価をどう担保するかを検討するという基本方針のもと、代替法がある場合、その利用が第一優先、必要に応じてスキームまたはフローチャートを作成することを旨としたとされた。

ただし、本あり方検討委員会において、試験法の細かな議論をすることは時間的に難しいとの意見が多く、この検討委員会の下に試験法毎に分科会を設けて資料のとりまとめ、および試験法毎の原案作成をした。あり方検討会における議論の結果、図1に示すように、皮膚刺激性、感作性、皮膚透過性・経皮吸収、眼刺激性、光関連毒性、遺伝毒性の6分科会を設立し、議論を重ねた。

C. 結果および考察

あり方検討会および各分科会にて、会議を重ね、委員間のコンセンサスを取るとともに、あり方検討会の示す方向性に従い、代替法の長短所およびその使い方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 からヒトパッチに至る問題点を検討している。委員の中からは連続刺激性も含め、皮膚刺激性全体(9項目に拘らず、皮膚

刺激性という範疇)について議論を深めたいとの希望もあったが、あり方検討会がこの件は不要と判断した。

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。今後、非 RI の LLNA や米国の第三者評価の内容を考慮しながら議論を進める。

3) 眼刺激性分科会

摘出眼球試験、摘出角膜試験、細胞毒性試験などの代替法の受け入れについては、来年度から本格的に長短所をまとめる予定である。10年前に作られた大野ガイダンスの見直しまで進める。

4) 光関連毒性分科会

細胞毒性試験の受け入れについては、ほぼ議論が終了した。酵母赤血球試験の第三者評

価の終了を待っている。紫外部の吸収範囲についても議論した。

5) 遺伝毒性分科会

ICH との連動性などから *in vivo* 試験の扱いについての議論が今後必要であるとされたが、あり方検討会がこれ以上の議論は不要と判断した。

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。

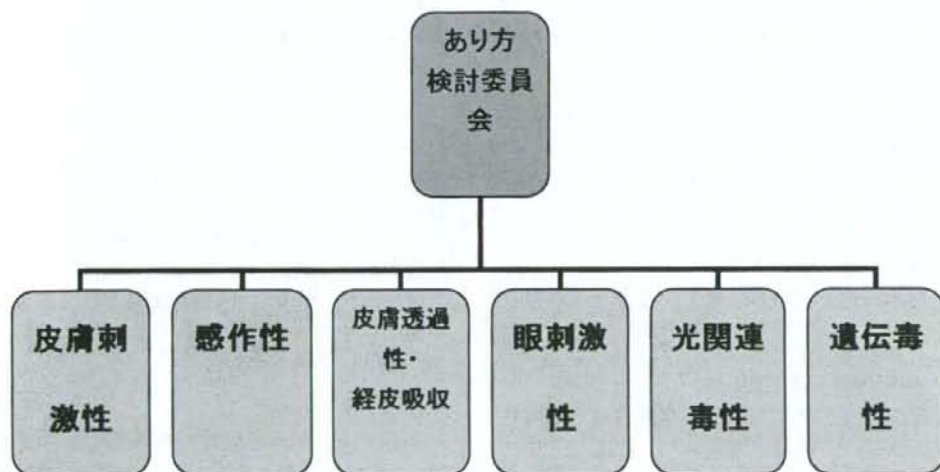


図1. あり方検討会組織図

表2. あり方検討会分科会リスト

	皮膚刺激性	皮膚感作性	光毒性
医師	河合敬一(河合敬一医院)	中田土起丈(昭和大)	上出良一(慈恵会医大)
学者	夏秋 優(兵庫医科大)	横関博雄(東京医科大)	田中憲穂(食薬センター)
業界推薦	寒水孝司(大阪大)	大野泰雄(国立衛研)	小島 肇(国立衛研)
学会推薦	小島 肇(国立衛研)	小島 肇(国立衛研)	森辰実(ノエビア)
	森福義(ポーラ)	坂口 斉(花王)	
	辰見寿(サンスター)		
	杉山真理子(資生堂)	金澤由紀子(食薬センター)	今井教安(コーセー)
	以上 7 名	以上 6 名	以上 5 名
	眼刺激性	皮膚透過性・経皮吸収	遺伝毒性
医師	平野耕治(藤田保健衛生大学)		
学者	畠 賢一郎(J-TEC)	藤井まき子(昭和薬科大)	林 真(国立衛研)
	金子豊蔵(国立衛研)	杉林堅次(城西大)	能美健彦(国立衛研)
	小島 肇(国立衛研)	小島 肇(国立衛研)	本間正充(国立衛研)
業界推薦	萩野滋延(資生堂)	桑原 裕史(カネボウ)	小島 肇(国立衛研)
学会推薦	瀬戸洋一(P&G)	上月 裕一(資生堂)	江幡真也(ライオン)
	以上 6 名	以上 5 名	笠松俊夫(花王)
			以上 6 名

D. 資料

- 資料10-1 班会議資料
資料10-2 あり方検討会第三回会議議事録
資料10-3 あり方検討会第四回会議議事録
資料10-4 あり方検討会皮膚刺激性分科会
第四回会議議事録
資料10-5 あり方検討会皮膚刺激性分科会
第五回会議議事録
資料10-6 あり方検討会皮膚刺激性分科会
第六回会議議事録
資料10-7 あり方検討会皮膚刺激性分科会
第七回会議議事録
資料10-8 あり方検討会感作性分科会第四
回議事録
資料10-9 あり方検討会感作性分科会第五
回会議議事録
資料10-10 あり方検討会感作性分科会
第六回会議議事録
資料10-11 あり方検討会眼刺激性分科会
第四回会議議事録
資料10-12 あり方検討会眼刺激性分科会
第五回会議議事録
資料10-13 あり方検討会眼刺激性分科会
第六回会議議事録
資料10-14 あり方検討会眼刺激性分科会
第七回会議議事録
資料10-15 あり方検討会眼刺激性分科会
第八回会議議事録
資料10-16 あり方検討会光関連毒性
分科会 第三回会議議事録
資料10-17 あり方検討会光関連毒性
分科会 第四回会議議事録
資料10-18 あり方検討会光関連毒性
分科会 第五回会議議事録
資料10-19 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）
資料10-20 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）
資料10-21 金澤由基子、横関博雄、中田土起
丈、坂口育、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）

- 資料10-22 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）
資料10-23 今井教安、上出 良一、
田中 憲穂、小島 肇、森 辰実：
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 光関
連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）
資料10-24 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）
資料10-25 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）
資料10-26 医薬部外品の安全性評価のあり方
検討委員会 皮膚刺激性分科会報告書
資料10-27 医薬部外品の安全性評価のあり方
検討委員会感作性試験分科会報告書
資料10-28 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
—眼刺激性分科会報告—
資料10-29 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—光関連毒性分科会報告—
資料10-30 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
—遺伝毒性分科会報告—
資料10-31 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 皮膚透過・経皮吸収試験分科
会
資料10-32 医薬部外品の申請における資料
のあり方検討会資料