

評価法として、新規試験提案書⁹⁾が作成され、国内の行政関連部署及び海外の代替法関連機関へ配布された。

③光毒性の代替試験法の状況

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 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。また、この方法に修正を加えた方法が、OECD でも化学物質光毒性試験法ガイドライン「*In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test」(Original Guideline, adopted 13th April 2004) として受け入れられている。これらについて、日本でも、審議され報告書が提出され検証済みである。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、三次元ヒト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¹⁰⁾。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^{11)~13)} 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。三次元皮膚モデルを用いた代替法では、EPISKIN を用いた方法については論文掲載されており¹⁴⁾、現在 ECVAM において評価中である。

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る。眼刺激性試験はヒトが眼に単回適用、あるいは誤って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 らの

基準¹¹⁾等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。

米国及び欧州においては、眼腐食性及び強度眼刺激性の代替試験法として、ICCVAM 及び ESAC が BCOP と ICE を承認しているが、弱度眼刺激性の公的な受け入れには至っていない。

欧州化粧品指令第 7 次改正に関連して、2009 年 3 月からの欧州域内での動物実験禁止に、眼刺激性試験も含まれている。弱度眼刺激性の代替試験法として、2008 年 10 月 ECVAM は回顧的なバリデーション研究により、ニュートラルレッド放出試験 Neutral Red Release (NRR) Assay、蛍光色素放出試験 Fluorescein Leakage (FL) Assay を推奨した。これらの方法は 2009 年 3 月の ESAC 会議において認証される可能性がある。

日本においては、本年度 JaCVAM により、BCOP と ICE の第三者評価が実施されている。また、2007 年度からの「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」で眼刺激性分科会が動物実験代替法の利用等を含め具体的な議論を進めている。

OECD は、BCOP 及び ICE の腐食性・強眼刺激性試験法としてのガイドライン化を進めている。

②状況

ICCVAM、NIEHS、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、4 種類 (BCOP、ICE、The Isolated Rabbit Eye (IRE) test (ウサギの摘出眼球試験)、The Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) (受精鶏卵の漿尿膜試験) 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 月にこの 4 種の眼刺激性試験代替法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 と ICE が挙げられること、(3) HET-CAM 及び IRE については、現時点では推奨できず、眼腐食性及び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²⁾とBRD³⁾⁻⁶⁾が省庁に送られた。

2008年4月にNICEATMはEPAからの要請を受け、抗菌洗浄剤を対象とする眼刺激性試験代替法のバリデーション状況の評価を計画した。その活動の一環として、NICEATMは代替試験法のピアレビューを担当する専門家を公募するとともに、バリデーションに必要なヒト試験あるいはヒトにおける事故情報、ウサギを用いた眼刺激性試験(Low Volume法を含む)、BCOPをはじめとする*in vitro*眼刺激性試験などから得られた情報などの提供を求めた⁷⁾。

2008年6月、米国の国立衛生研究所(NIH)・国立環境衛生研究所(NIEHS)は、米国消費者製品安全委員会(CPSC)、EPA、及び米国医薬品食品局(FDA)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にBCOPとICEの適用を了承したことを発表⁸⁾した。BCOP又はICEのどちらかの試験の結果が陽性となった場合、その化学物質を眼腐食性・強眼刺激性に分類することができるというものである。

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:現SCCP)が、化粧品成分の安全性確認のため実施する毒性試験について、ガイドラインを策定している。その中で、眼刺激性試験には、従来のDraize *in vivo*眼刺激試験⁹⁾の代わりになるような代替法は存在しないが、中性の有機化学物質に関してBCOPが、界面活性剤の評価には、赤血球溶血試験(RBC-haemolysis (RBC) test)およびニュートラルレッド取込試験(Neutral Red Uptake (NRU) assay)が有用であるとしている¹⁰⁾。

ESACは承認したBCOP又はICEのいずれかを実施し、陽性結果が得られた場合には、その化学物質をR41(強度眼刺激性)に区分することを受け入れている。

HET-CAM¹¹⁾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。

一方、弱度眼刺激性の検出に関して、2008年10月ECVAMはNRR、FL、Cytosensor Microphysiometer (CM)及び赤血球試験(RBC)

について回顧的なバリデーション研究を実施し、その結果NRR及びFLを推奨した。この2試験については2009年3月に予定されるESAC会議での認証に向けた動きが出ている。

米国及び欧州の化粧品工業会における眼刺激性代替法については、次の通りである。

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 Guidelines¹²⁾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) 漿液膜血管アッセイ、EpiOcular Human Construct Model (OCL-200)、Reconstituted Human Corneal Epithelium Model、NRU、NRR、FLが挙げられている。

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、産官学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¹³⁾。1999年、厚生科学研究班は培養細胞を用いる試験に関する指針案を公表した。

2008年度、JaCVAM第三者評価会議(眼刺激性試験代替法評価委員会)ではBCOP及びICEの第三者評価を実施している。また、2007年度から「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-眼刺激性分科会」が実施され動物実験代替法の利用等を含め、医薬部外品申請の安全性の眼刺激性に関する資料のあり方について具体的な議論が進められている。

2008年、日本動物実験代替法学会はウサギ角膜由来のSIRC細胞を用いたSTE法(Short

time exposure) のバリデーションを実施し、その中間結果が学会で発表された¹⁴⁾。

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¹⁵⁾、培養細胞を用いた方法^{16)~19)}、赤血球を用いた方法²⁰⁾、三次元モデルを用いた方法²¹⁾、無生物を用いた方法²²⁾、²³⁾、IRE²¹⁾、²⁴⁾、ICE²¹⁾、²⁵⁾、HET-CAM²¹⁾、²⁶⁾、BCOP²¹⁾、²⁷⁾を紹介する「化粧品の安全性評価に関する指針 2001」の改訂を行い、2008年9月に「化粧品の安全性評価に関する指針 2008」²⁸⁾を発行した。

OECDでは、BCOP及びICEのガイドライン案^{29)~31)}が2008年8月に提出されており、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の代替法としてのガイドライン化が行なわれている。また、専門家会合においてProficiency Standard(熟練標準)を追加することが合意され検討されている。

C-5-4 皮膚アレルギー性

①概要

2008年度に、ピアレビューあるいは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)¹¹⁾、¹²⁾、2)THP-1細胞を用いた皮膚感作性試験代替法(human Cell Line Activation Test; h-CLAT)³⁾、⁴⁾が挙げられる。

②状況

放射性LLNA⁵⁾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。このLLNAは、放射性物質の³H-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(LLNA-DA法¹⁾およびLLNA-BrdU法²⁾)の開発が進められている。LLNA-DA法は、被験物質投与における改良に加え³H-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。本試験法に関しては、日本動物実験代替法学会でバリデーションが行なわれ、その結果が日本動物実験代替法学会で組織された評価委員会でピアレビューされた。そして、その内容に関してJaCVAM評価会議において、「本試験法は定められた方法で適切に利用すれば、化学物質の皮膚感作性を科学的に評価できる」と提案がなされた⁶⁾。一方、LLNA-BrdU

法は、³H-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方法であり、同様に日本動物実験代替法学会にてバリデーションが実施され、第21回日本動物実験代替法学会にてバリデーションの結果が報告された⁷⁾。両試験法はICCVAMの第三者科学専門家委員会によってピアレビューされ、2008年5月にハザード評価法として不十分であると結論付けられた⁸⁾。その後、日本動物実験代替法学会のバリデーション委員会は日本で行われたバリデーションの結果をICCVAMに提供している⁹⁾。その他、従来のLLNAで使用動物数が削減されたReduced Local Lymph Node Assay(rLLNA)は、ESACによって代替法として承認された(2007年4月)¹⁰⁾。ICCVAMの第三者科学専門家委員会もrLLNAをハザード評価法として使用可能であると報告した(2008年5月)⁹⁾。また、LLNAのPerformance Standards(PSs)が2008年10月にECVAMから発表され¹¹⁾、このPSsに対して2008年11月にESACからStatementが出されている¹²⁾。

THP-1細胞を用いた皮膚感作性試験代替法(h-CLAT)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と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、日本の花王株式会社と株式会社資生堂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、100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84%であることが、ヨーロッパ毒学会及び日本動物実験代替法学会にて報告されている¹³⁾、¹⁴⁾。また、化粧品や香粧品の原料である防腐剤、染料および香料の評価におけるh-CLATの有用性を検証するため評価が、日本化粧品工業連合会加盟企業において行なわれ、日本動物実験代替法学会にて発表された¹⁵⁾、¹⁶⁾、¹⁷⁾。このTHP-1細胞を用いたh-CLATに加え、別のヒト単球由来細胞株であるU937細胞を用いたMyeloid U937 Skin Sensitisation Test(MUSST)¹⁸⁾、さらに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(PRA)¹⁹⁾を加えた3つの試験法に関して、2009年第一四半期からECVAMにてプレバリデーションが開始される事が、COLIPAのホームページ上で表記されている²⁰⁾。

ECVAMは2005年に皮膚感作性物質のリスクアセスメントに用いる*in vitro*試験法の開発

を目的としたプロジェクト (Sens-it-iv) を組織した²¹⁾。Sens-it-ivの活動は10のWork package (WP)に分けられており、WP8(In vitro assay development)では、現在、3種類の樹状細胞様細胞株 (MUTZ-3、U937 および THP-1) と2種類のバイオマーカー (CD86 発現と IL-8 産生) を用いた代替法の施設間共同研究が始められ、4つの化学物質 (非感作物質として SDS とサリチル酸、感作物質として DNCB とシンナミックアルデヒド) を用いた施設間再現性評価が進められている²²⁾。

また、光感作性試験においては、2008年度には、代替試験法に関するバリデーショ、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¹⁾。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、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、偽陽性の割合が少ない事、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²⁾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³⁾。

一方、欧州化粧品工業会 (COLIPA) においても、化粧品原料について独自の*in vitro*遺伝毒性評価アプローチを検討しており、多くの化粧品が適用される部位である皮膚に着目した各種3Dヒト皮膚モデルを活用した遺伝毒性試験 (評価指標は小核とコメット)の開発に取り組んでいる。

現在、日米欧医薬品規制調和国際会議 (ICH)では非臨床の安全性試験において、3Rsを促進するICHの義務に従い、ICH S2 遺伝毒性ガイドラインの改定が行われている。改定案では、試験動物数削減のための推奨がなされた内容となっている。昨年(2007)の11月にブリュッセルにて会合⁴⁾が行われ、現在ガイドラインはSTEP3まで進んでいる。

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である¹⁾。ECVAMが取り上げた13のKey Areaで、全身毒性 (Systemic toxicity)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、神経毒性 (Neurotoxicity)、慢性毒性 (Chronic Toxicity)、急性毒性 (Acute Toxicity)及び免疫毒性 (Immunotoxicity)の各領域で代替法の検討が進められている。ECVAMによりFP6(第6次EU枠組み計画)の一つとして2004年9月より推進されたSTREP projectのPREDICTOMICSは、2007年12月に終了した。プロジェクトのウェブサイトにおいて、薬物、外来異物による肝臓と腎臓の慢性毒性を予測するための基盤技術などに関する成果が公開されている⁵⁾。これに引き続きECVAMはFP7(第7次EU枠組み計画)として2008年5月よりPredict-IVというプロジェクトを5年間の予定で開始した⁶⁾。プロジェクトの開始にあたっては、2008年4月28~29日にEPAAの主催した「安全性に関する新しい展望」と題するWorkshopで、反復投与毒性試験の分野において規制試験法を作るために科学的な基盤を再考することが重要であるとの方向が示され、毒性学、生化学、数学分野の関連への資金提供が推薦された⁵⁾。このプロジェクトは、動物によらない試験系、細胞生物学、機能毒

性学及び *in silico* を統合することによって、迅速かつ安価に薬物の安全性を評価する戦略を作ることを目標としている。

②状況

反復投与毒性は化学物質の長期暴露により細胞、組織、多くの臓器に進行的に誘発される機能障害であり、動物を用いた反復投与毒性試験では広範なエンドポイントが評価されている。そのため、*in vitro* モデルにおいても各臓器モデルにおいて障害を予測する試験系、毒性指標の研究が行われている。

肝臓と腎臓をターゲットとした研究は、ECVAM の STREP project の PREDICTOMICS において、毒性物質による細胞の初期変化で特異的に発現する機能的な指標の確認が行われた^{2),3)}。肝臓においては、Histone deacetylases (HDAC) 阻害剤処理ラット初代培養肝細胞が、培養中に表現型を維持しており、適切なモデルとなることが確認された。また、ヒト肝がん由来の HepG2 細胞において CYP 群の遺伝子発現の欠除に、転写因子 (HNF4)、並びに補助活性化因子と補助抑制因子 (SRC1, SRC2, PGC1 α , PCAF) が役割を担っていることが確認された。さらには、薬剤性脂肪肝を再現する *in vitro* 実験操作が開発され、遺伝子、プロテオーム、細胞レベルでの解析により様々な指標物質が確認され、これらを統合した戦略によりこの種の肝毒性物質を同定できることが明らかになった。

腎臓においては、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) が確立された。また、多数の Cytomic 分析が *in vitro* の毒性を試験するために有用であることが確認され、適用の容易さ、毒性的妥当性、感受性に基づき LDH 遊離 (細胞毒性)、BrdU 取り込み (DNA 合成) 及び Resazurin 還元 (相対的生存細胞数) が有望な指標として選択された。さらには、無血清単層培養した HK-2 細胞 (ヒト近位尿管上皮細胞) を致死濃度以下の被験物質で 12 または 48 時間処理し、遺伝子表現型を分析することにより、多くの既知腎毒性物質による細胞障害と関連していると考えられる多数の遺伝子が同定された。

血液・免疫毒性に関しては、2006 年 3 月に Colony Forming Unit-Granulocyte / Macrophage assay (CFU-GM 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) が二次的な動物種 (イヌ) の試験

の代替法という限定つきながらもヒト急性好中球減少症を予測する代替法として ESAC (24 回会議) による承認を受けた¹⁾。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ある。マウス最大耐量データの有用性に依存するところがあり、完全な置換法では無いが動物数を削減できるとされている。その他の血液・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⁶⁾ に詳しいが、バリデーション段階に進んだものはない。

その他、神経毒性については、Centre for Alternatives to Animal Testing (Johns Hopkins 大学代替法センター、CAAT) が中心となり、TestSmart プログラムにおいて発達神経毒性の代替法の開発研究を進めている^{7),8)}。肺毒性については、Marie Curie Research Training Network project の PULMO-NET において急性、慢性の肺毒性の *in vitro* エンドポイント指標の研究が行われている⁹⁾。ただし、バリデーション段階に進んだものはない。

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、バリデーション段階には進んだ試験は無い。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 (NOAEL) 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ピニオンとして採択している¹⁰⁾。

C-5-7 生殖発生毒性

①概要

生殖発生毒性試験を代替する試験法は、出生前発生に関する代替法である胚性幹細胞試験 (Embryonic stem cell test for embryotoxicity, EST)、マイクロマス試験 (Micromass embryotoxicity assay, MM) 及び全胚培養試験 (Whole rat embryo embryotoxicity assay, WEC) の3試験が ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) により 2001 年 10 月に承認された¹⁾。その後、バリデーションに進んだ試験法は無い。

ECVAM による FP6 (第 6 次 EU 枠組み計画) のプロジェクトである ReProTect^{2), 3)} は、2004 年 7 月から 5 年間の計画で進められている。ReProTect は哺乳類の生殖発生過程を Fertilization (受精・授胎能)、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指している。しかしながら、生殖発生毒性代替法の開発及び戦略の構築については困難な情勢が続いている。

②状況

生殖発生毒性代替法である胚性幹細胞試験、マイクロマス試験、全胚培養試験は、広い範囲の生殖発生毒性をカバーする方法でなく、いずれも胎児毒性に限定された試験法である⁴⁾。胚性幹細胞試験は最初の段階で動物から胚性幹細胞を採取するが、その後は全く動物を使用することがないため *in vitro* 試験といえるが、胎児から未分化細胞を取り出し増殖能を確認するマイクロマス試験や母胎から胎児を取り出して培養する全胚培養試験は動物を用いるため、動物数削減という意味での代替といえる⁵⁾。現在の検討の方向性は、これら 3 種の代替法のデータを用いて総合的に胎児毒性を判断していくことにある。なお、3 種の試験法はいずれも ESAC により承認されたものの、ECB (European Chemicals Bureau) のマニュアル並びに OECD 試験法ガイドラインに掲載されていない。

ReProTect プロジェクトからは、公的なバ

リデーションに移行しそうな代替法が開発されている。ウシ精子細胞毒性試験は、被験物質のウシ精子の運動性への影響を Computer assisted sperm analysis (CASA) により調べる方法である。35 物質を用い 2 施設でプレバリデーションが行われた結果、信頼性、技術移転性が認められ、さらには外挿モデルが開発されていることから、公式バリデーションへ進む方向である。また、ライディヒ細胞毒性試験は、雄の生殖機能に重要な細胞である男性ステロイドホルモンを産生するライディヒ細胞 (マウスの BLT1 ライディヒ細胞) を用い、ヒトコリン作働性ゴナドトロピンを処置した時のステロイドホルモン放出に与える被験物質の影響、並びに細胞毒性を調べる方法である。統計学的評価が行われており、良好な結果が得られれば公式バリデーションへ進む予定である。

このほか、内分泌攪乱化学物質のスクリーニング法のバリデーション研究が進んでいる⁶⁾。HeLa-9903 細胞を用い、エンドクラインレセプター α への結合を指標とするレポーター遺伝子アッセイは、OECD による第三者評価がなされ、OECD ガイドライン案が検討されている。この第三者評価の際、アンタゴニストについての検討がなされていないという指摘があり、それに対応するために 5 施設によるバリデーション研究が実施されている。また、BG-1Luc4E2 細胞を用い、エンドクラインレセプター α への結合を指標とするレポーター遺伝子アッセイである Lumi-cell 法は、国際バリデーション研究が実施されており、JaCVAM がこれに参加している。日本での実験は株式会社日吉が担当している。

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局の認知が十分ではないとしている。そのため、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に、2008 年 11 月 6 日、7 日にドイツのベルリン自由大学は、胚性幹細胞試験などに関する講習会を実施した。そして、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技術トレーニングが行われた。

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 ESAC の承認が得られ、またバリデーションが間近い方法が認められるものの、生殖発生毒性の検討項目の多さ、複雑さを考えた時、EU 化粧品指令第 7 次改正の期限である 2013

年の達成は非常に困難であると言わざるを得ない。2007年6月に採択されたSCCPのオピニオンではおそらくプロジェクトは延長されるだろうとしている。

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の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)¹⁾ 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)²⁾ 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³⁾。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、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。ドイツではバリデーショナル準備の為にドナー溶解、レセプター溶液の系統的な分析が実施され、水溶性物質については生理食塩水、親油性物質については可溶化剤の添加が適している事が報告された⁴⁾。そして商業的に有用な再構築ヒト表皮モデルである EPIKIN、EpiDerm、SkinEthic を用いてバリデーショナルスタディが行われ、施設内・施設間再現性は良く、再構築ヒト表皮モデルはヒトあるいはブタ皮膚に比べて浸透性は高いものの代替材料として適していると結論されている⁵⁾。

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⁶⁾。その他、皮膚分配性を予測する方法としてシリコン膜を用いた方法⁷⁾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、分配・拡散パラメーターを用いたコンピュータ予測^{8), 9)}ならびに自由エネルギー関に基づく QSAR モデル¹⁰⁾が報告されている。また、OECD の Principles for the Validation of (Q) SAR Models から選ばれた1つの QSAR モデルから良い経皮吸収性の予測ができたとの報告がされている¹¹⁾。

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¹²⁾。

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取りまとめた。その結果、本年度の特筆すべき動きは、ESAC が皮膚刺激性試験代替法として EpiDerm SIT、SkinEthic RHE を承認したことが挙げられる。そして昨年度に承認された EPIKIN 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ナルが実施された Neutral Red Release、Fluorescein Leakage 等の細胞毒性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。

今後の代替法開発と評価において注目される試験法は、反復投与による全身毒性試験、並びに感作性試験であろう。すなわち、化粧品指令第7次改正で2009年に禁止される試験法から2013年の試験法へと力点が移りつつある。ECVAM の FP7 (第7次 EU 枠組み計画) として2008年5月より5年の予定で反復投与毒性試験代替法のための Predict-IV プロジェクトが開始されたことや、2009年から ECVAM にて日本の h-CLAT を含む3種の感作性試験代替法のプレバリデーショナルが開始されること等にその傾向が表れている。

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 EpiDerm SIT、SkinEthic RHE を承認したことが挙げられる。昨年度に承認された EPIKIN 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ナルが実施された 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。

代替法開発体制の観点からは、ICATM(International Cooperation on Alternative Test Methods)が設立されたことが挙げられる。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。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。

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。

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における動物実験禁止と代替法開発の動向(C-1) 関連

- 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
- 5) <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- 6) <http://www.predict-iv.toxi.uni-wuerzburg.de/>
- 7) <http://projects=2008.jrc.ec.europa.eu>

/show.gx?Object.object_id=PROJECTS000000003016D09

- 8) JSAE Newsletter No. 36, 2008.
- 9) http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_08.pdf
- 10) http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index_en.htm
- 11) http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm
- 12) http://ec.europa.eu/enterprise/reach/index_en.htm
- 13) <http://ecb.jrc.it/reach/>
- 14) <http://www.nikkakyo.org/reach/>
- 15) <http://ecb.jrc.it/testing-methods/>
- 16) De Silva, O. et al., The COLIPA research programme. Abstracts 6th World Congress 2007, 279, 2007
- 17) 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
- 18) 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
- 19) Pfuhler, S. et al., Towards animal-free genotoxicity testing: the COLIPA strategy. Abstracts 6th World Congress 2007, 66, 2007
- 20) 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
- 21) Ovigone, 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
- 22) Price, B. et al., Evaluation of a peptide reactivity assay for screening skin allergens: an interlaboratory study. Abstracts 6th World Congress 2007, 238, 2007
- 23) <http://www.bfr.bund.de/cd/1591>
- 24) <http://www.nc3rs.co.uk/>
- 25) <http://www.frame.org.uk/index.php>

- 26) <http://www.forschung3r.ch/en/information/>
 27) <http://www.nca-nl.org/>
 28) <http://www.aimgroup.eu/2009/WC7/index.html>
 29) <http://www.estiv.org/>
 30) <http://www.altex.ch/en/index.html?id=12>

米国における代替法開発の動向 (C-2) 関連

- 1) ICCVAM Test Method Evaluation Report: *In vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Severe Irritants and Corrosives, NIH Publication No. 07-4517, November 2006
 2) 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
 3) 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
 4) 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
 5) 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
 6) <http://www.niehs.nih.gov/news/releases/2008/ocular.cfm>
 7) 米国官報: Vol. 73, No. 66 / Tuesday, April 4, 2008 / Notices, 18535-18536
<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/FR/FR-E8-6969.pdf>
 8) http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna_PerfStds.htm
 9) http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRRept2008.pdf
 10) <http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/>

AcuteToxWksp08/ToxWkspAgenda.pdf

- 11) http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/FR/FR-E8_5936.pdf
 12) <http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/10thAnnivSymp/10thAnnivSymp.htm>
 13) 米国官報: Vol. 73, No. 89 / Wednesday, May 7, 2008 / Notices, 25754-25755
http://ntp.niehs.nih.gov/files/73_FR_89_7May2008_508.pdf
 14) http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRRept2008.pdf 関連の米国官報: Vol. 73, No. 98 / Tuesday, May 20, 2008 / Notices, 29136-29137
http://ntp.niehs.nih.gov/files/ICCVAM_73_FR_98_508.pdf
 15) <http://iccvam.niehs.nih.gov/about/ICCVAMrpts.htm> 米国官報: Vol. 73, No. 206/Oct 23, 2008 / Notices, 63150
<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/FR/FR-E8-25223.pdf>
 16) The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, CTFA Safety Evaluation Guidelines, 2007
 17) 化粧品安全性評価に関する指針 2008, 日本化粧品工業連合会編、薬事日報社

その他の国際的な代替法開発の動向 (C-3) 関連

- 1) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html
 2) http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC_Statement_SkinEthnic+EpiDerm%20FINAL%200812-01.pdf
 3) <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/08/h0814-1.html>

日本における代替法開発の動向 (C-4) の動向

- 1) 小坂七重ら, *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 - 第21回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 108, 2008.
 2) 岡本賢二ら, *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 -

- 第21回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 110, 2008.
- 3) 藪さき子ら, *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 - 第21回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 112, 2008.
 - 4) Kosaka N. et al., 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
 - 5) Sono S. et al., 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
 - 6) Mizuno M. et al., Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results: Results of the Forth Japanese inter-laboratory Study, AATEX 13 (2), 70-82, 2008
 - 7) 松永佳世子, 皮膚臨床医代替法に期待すること, 第21回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 136, 2008.
 - 8) 新規試験提案書: 腐食性試験代替法, 国立医薬品食品衛生研究所, 2008.
 - 9) 新規試験提案書: 皮膚感作性試験代替法 (LLNA-DA 法), 国立医薬品食品衛生研究所, 2008.
 - 10) ECVAM, Statement of the ECVAM Science Advisory Committee (ESAC) on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, 2007 <http://ecvam.jrc.it/>
 - 11) OECD, Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation: Human Skin Model Test, 2008 http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html
 - 12) ECVAM, Statement of the ECVAM Science Advisory Committee (ESAC) on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, 2008 <http://ecvam.jrc.it/>
 - 13) 武吉正博ら, LLNA-BrdU法の施設間バリデーション研究, 第21回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 102, 2008.
 - 14) 小島肇ら, 培養皮膚モデル LacCyte 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, 第21回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 104, 2008.
 - 15) 坂口斉ら, 眼刺激性試験代替法 (STE 試験) バリデーション研究, 第21回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 106, 2008.
 - 16) 吉山友二ら, 国際交流に向けた日韓動物実験代替法学会合同協議, 第21回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 130, 2008.
 - 17) 「化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2008」, 薬事日報社, 2008.
 - 18) 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」, 薬事日報社, 2008.
- 単回投与毒性 (C-5-1) 関連
- 1) 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.html)
 - 2) <http://www.bfr.bund.de/cd/1591>
 - 3) Report of the International Workshop on *In vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity, NIH Publication No. 01-4499, August 2001
 - 4) Clemenson, 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
 - 5) 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
 - 6) ACuteTox - Research Project For Alternative Testing. Welcome to ACuteTox. (<http://www.acutetox.org/>)
 - 7) 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
- 8) AcuteTox Newsletter, June 2007 (http://www.acutetox.org/docs/Newsletter/ACuteTox_Newsletter_2.pdf)
 - 9) AcuteTox Newsletter, February 2008 (http://www.acutetox.org/docs/Newsletter/acutetox_newsletter_3.pdf)
 - 10) AcuteTox (<http://www.acutetox.org/acutetox-news/index.php>)
 - 11) Federal Register, 69, 61504, 2004
 - 12) 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
 - 13) 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
 - 14) 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
 - 15) Background Review Document: *In vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity, NIH Publication No. 07-4518, November 2006
 - 16) 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
 - 17) http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/FR/FR_E8_5936.pdf
 - 18) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/acutetox.htm>
 - 19) 医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請に添付する資料に関する質疑応答集 (Q&A) について
- 皮膚毒性 (C-5-2) 関連
- 1) Basketter, D. A. et al., Predictive testing in contact dermatitis: irritant dermatitis. Clinics in Dermatology, 15, 637, 1999
 - 2) York, M. et al., Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential, Contact Dermatitis, 34, 204, 1996
 - 3) Van de Sandt, J. et al., The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation, ATLA, 27, 723 1999
 - 4) ECVAM, Statement of the ECVAM Science Advisory Committee (ESAC) on the Validity of *in Vitro* Tests for Skin Irritation, 2007 <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
 - 5) SCCP/1145/07, Memorandum on the *in vitro* test episkin™ for skin irritation testing, adopted by the SCCP during the 14th plenary meeting on 18 December 2007
 - 6) ECVAM, Statement of the ECVAM Science Advisory Committee (ESAC) on the Validity of *in Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, 2008 <http://ecvam.jrc.it/>
 - 7) OECD, Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation: Human Skin Model Test, 2008 http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html
 - 8) 小島肇ら, 培養皮膚モデル LacCyte 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, 第 21 回日本実験動物代替法学会要旨集, 104, 2008
 - 9) 新規試験提案書: 腐食性試験代替法, 国立医薬品食品衛生研究所, 2008
 - 10) Spielmann, H. et al., *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2., ATLA, 22, 314, 1994
 - 11) 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

- 12) 田中憲徳ら, 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
- 13) 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
- 14) Lelievre 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 (C-5-3) 関連

- 1) Kay, J. H. and Calandra, I. C.,
Interpretation of eye irritation tests,
J. Soc. Cosmetic Chem., 13, 281, 1962
- 2) ICCVAM Test Method Evaluation Report:
In vitro Ocular Toxicity Test Methods
for Identifying Severe Irritants and
Corrosives, NIH Publication No. 07-4517,
November 2006
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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

- 7) 米国官報: Vol. 73, No. 66 / Tuesday,
April 4, 2008 / Notices, 18535-18536
[http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/
FedDocs/FR/FR-E8-6969.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/FR/FR-E8-6969.pdf)
- 8) [http://www.niehs.nih.gov/news/releas
es/2008/ocular.cfm](http://www.niehs.nih.gov/news/releases/2008/ocular.cfm)
- 9) [http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Testing-
Methods/ANNEXV/B05web2004.pdf](http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Testing-Methods/ANNEXV/B05web2004.pdf)
- 10) [http://europa.eu.int/comm/health/ph_r
isk/committees/sccp/documents/out173_
en.pdf](http://europa.eu.int/comm/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out173_en.pdf)
- 11) Gilleron, L. et al., Evaluation of a
modified HET-CAM assay as a screening
test for eye irritation, *Toxicol. in
vitro*, 10, 431, 1996
- 12) The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance
Association, CFTA Safety Evaluation
Guidelines, 2007
- 13) 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
- 14) 坂口齊ら, 眼刺激性試験代替法 (STE 試
験) バリデーション研究, 第 21 回日本動
物実験代替法学会学術大会講演要旨集,
106, 2008
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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

- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) Burton, P. et al., The *in vitro* assessment of severe eye irritants. *Food. Chem. Toxicol.*, 19, 471, 1981
- 25) 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
- 26) Luepke, N. P., Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food. Chem. Toxicol.*, 23, 287, 1985
- 27) Gautheron, P. et al., Bovine corneal opacity and permeability test: an *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, 442, 1992
- 28) 化粧品の安全性評価に関する指針 2008、日本化粧品工業連合会編、薬事日報社
- 29) <http://www.oecd.org/dataoecd/60/7/41198406.pdf>
- 30) <http://www.oecd.org/dataoecd/60/104/41198465.pdf>
- 31) http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html
- 皮膚アレルギー性 (C-5-4) 関連
- 1) Yamashita, K. et al., (2005) Development of a modified local lymph node assay using ATP measurement as an endpoint. *AATEX* 11, 136-144.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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
- 5) OECD guidelines for testing of chemicals, 429, Paris, OECD, 2002.
- 6) 新規試験法提案書 皮膚感作性試験代替法 (LLNA-DA法) 平成20年11月 国立医薬品食品衛生研究所
- 7) 武吉正博ら, (2008) LLNA-BrdU法の施設間バリデーション研究. 第21日本動物実験代替法学会 要旨集P30, 102.
- 8) http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRRept2008.pdf
- 9) 日本動物実験代替法学会 NEWS LETTER No. 36, 2008.
- 10) http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525_C.pdf
- 11) http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ECVAM%20LLNA%20Performance%20Standards-Sec.pdf
- 12) http://ecvam.jrc.it/ft_doc/LLNA%20PSS

- %20ESAC%20Statement.pdf
- 13) Ashikaga T. et al., (2008) Database of h-CLAT (cell-based skin sensitization test) for clarification of applicability domain. Toxicological letters, 180, Suppl 1, S95.
- 14) 足利太可雄ら 既知化合物(100品)による皮膚感作性試験 h-CLAT の有用性評価, 第21回日本動物実験代替法学会要旨集, 114-115.
- 15) 小坂七重ら *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 -, 第21回日本動物実験代替法学会要旨集, 108-109.
- 16) 岡本賢二ら *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 -, 第21回日本動物実験代替法学会要旨集, 110-111.
- 17) 藺さき子ら *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 -, 第21回日本動物実験代替法学会要旨集, 112-113.
- 18) Ovigne J-M. et al., (2008) The MUSST for *in vitro* skin sensitization prediction: Applicability domains and complementary protocols to adapt to the physico-chemical diversity of chemicals. Toxicological letters, 180, Suppl 1, S216.
- 19) Gerberick, G.F. et al., (2007) Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. Toxicological Sciences, 97, 417-427.
- 20) <http://www.colipa.eu/priorities.html>
- 21) <http://www.sens-it-iv.eu/index.php?id=100>
- 22) <http://www.sens-it-iv.eu/index.php?id=701>
- GUIDELINE 487: *In vitro* Micronucleus Test
<http://www.oecd.org/dataoecd/33/22/37865944.pdf>
- 2) Fairbairn DW. et al., (1995) The comet assay: a comprehensive review., *Mutat Res.*, 339(1):37-59.
- 3) 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.
- 4) Public ICH Meeting, 14 November 2008 Brussels, Belgium, Radisson SAS Hotel
- 反復投与毒性 (C-5-6) 関連
- 1) <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- 2) <http://ecvam.jrc.it/publication/ECVAM%20Technical%20Report%202006-2007%20final.pdf>
- 3) <http://www.predictomics.com/>
- 4) <http://www.predict-iv.toxi.uni-wuerzburg.de/>
- 5) http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/4_3_workshops.htm
- 6) Alessandra Gennari ; Masarin Ban ; Armin Braun ; Silvia Casati ; Emanuela Corsini ; Jaroslaw Dastych ; Jacques Descotes ; Thomas Hartung ; Robert Hooghe-Peters ; Robert House ; Marc Pallardy ; Raymond Pieters ; Lynnda 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
- 7) <http://caat.jhsph.edu/programs/workshops/testsmart/index.htm>
- 8) <http://www.ehponline.org/docs/2007/9841/abstract.html>
- 9) <http://www.elegantweb.at/d103-b1375d38/>
- 10) http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_06.pdf#search='sccp, 19 june 2007, opinion, alternative'

変異原性 (C-5-5) 関連

- 1) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS DRAFT PROPOSAL FOR A NEW

生殖発生毒性 (C-5-7) 関連

- 1) <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- 2) <http://www.reprotect.eu>

- 3) <http://ecvam.jrc.it/publication/ECVA%20Technical%20Report%202006-2007%20final.pdf>
- 4) http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_06.pdf #search='sccp. 19 june 2007. opinion. alternative'
- 5) Akita, M. (2008). Current status and future progress of reproductive/developmental toxicity test. *Yakugaku Zasshi* 128 (5), 765-772.
- 6) 小島肇. 動物実験代替法に関する2008年の国際動向. *フレグランスジャーナル* 1月号, 65-69, 2009.

経皮吸収性 (C-5-8) 関連

- 1) OECD guidelines for testing chemicals, 427, Paris, OECD (2004)
- 2) OECD guidelines for testing chemicals, 428, Paris, OECD (2004)
- 3) http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_02j.pdf
- 4) Kaca M. et al., The physicochemical parameters of marker compounds and vehicles for use in *in vitro* percutaneous absorption studies, *ATLA*, 36 (2), 189-200, 2008
- 5) Schafer-Kortling M. et al., The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study, *ATLA*, 36 (2), 161-87, 2008
- 6) 杉林堅次, 化粧品の有効成分の経皮吸収と化粧品評価を目的とした三次元培養皮膚モデルを用いた経皮吸収測定法, *ファルマシア*, 44 (5), 431, 2008
- 7) 大和田容子ら, シリコーン膜を用いた医薬品および化粧品の皮膚分配性試験代替法の確立, *日本薬学会年会要旨集-4*, 138, #28PE-pm174, 2008
- 8) 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 (2), 368-79, 2008
- 9) Naegel A., et al., In-silico model of skin penetration based on experimentally determined input parameters. Part II: mathematical modelling of in-vitro diffusion experiments. Identification of critical input parameters, *Eur J Pharm Biopharm*, 68 (2), 352-67, 2008
- 10) Luo W. et al., Predicting human skin absorption of chemicals: development of a novel quantitative structure activity relationship, *Toxicol Ind Health*, 23 (1), 39-45, 2008
- 11) Bouwman T. et al., Improving the applicability of (Q) SARs for percutaneous penetration in regulatory risk assessment, *Hum Exp Toxicol*, 27 (4), 269-276, 2008
- 12) 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) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

G-2 学会発表 (講演及び学会発表)

- 1) 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.
- 2) 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.

- 3) 足利太可雄, 坂口齊, 額田祐子, 小坂七重, 伊藤勇一, 蘭さき子, 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

ヒト接触皮膚炎評価の見直し

分担研究者 松永佳世子 藤田保健衛生大学医学部皮膚科

研究要旨

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。その結果、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い。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、アレルギーの過去の結果と比較した。過去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。

A. 研究目的

年齢や性別を問わず、清潔、保湿、紫外線防除などのスキンケアには、さまざまな化粧品や医薬部外品が使用されている。魅力を増すメイクアップ化粧品やヘアダイ、パーマ液などの医薬部外品は我々の生活の質（Quality of Life: QOL）を向上させ、活力を増すことができる。

このような化粧品や医薬部外品、あるいは外用医薬品の安全性や有効性は、これまで動物実験などを経て、ヒトのパッチテストあるいは使用試験によって評価されてきた。

これらの安全性においては、黒皮症が多発した1970年代の状況から比べると、2008年現在、明らかに改善されている。しかし、安全性が評価されて市場に広く販売されているこれらの製品においても、現在でも刺激性接触皮膚炎、あるいはアレルギー性接触皮膚炎を少なからず診療し、また発熱やリンパ節腫脹などの全身症状を伴う接触皮膚炎、あるいは化粧品の使用によって、血圧低下、意識消失をきたすアナフィラキシーなどの重篤な有害事象を含むさまざまな障害例を経験している。

この現状を認識する目的において、これまで、1992～1994年、1995年～1998年の当科における化粧品による接触皮膚炎をまとめ報告してきた。今年度は、2006年および2007年に当科で化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを施行した症例についてまとめ、過去の結果と比較した。

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し、解析した。日本接

触皮膚炎学会において、1994年に標準アレルギーが決定され、以後、協力施設にアレルギーを配布し、陽性率を報告してきた。しかしながら、諸事情により学会からの配布が不可能となったところから、その報告は2000年以降されていなかった。2005年より、Brial社において標準アレルギーと同じ濃度のアレルギーが作られることになったことから、海外技術交易を通じて入手できるようになり、日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会における共同研究が再開されている。

B. 研究方法

B.1. 藤田保健衛生大学皮膚科におけるパッチテスト症例

2006年および2007年の藤田保健衛生大学医学部皮膚科のパッチテスト施行症例を解析した。また、1992～1994年、1995年～1998年の当科における化粧品による接触皮膚炎のパッチテスト施行症例と比較した。

具体的な方法を以下に示す。

対象期間：2006年1月～2007年12月

対象者：当科で化粧品による接触皮膚炎、および口唇炎を疑ってパッチテストを施行した症例 2006年 56例（男性2例、女性54例）、2007年 61例（男性6例、女性55例）、年齢3歳～79歳

方法：Finn-Chamber on Scapor tapeを用いて、患者の背部または上腕内側に試料を48時間閉塞貼付した。シャンプー、リンス、トリートメント、ボディソープは1%水溶液を用い、その他の製品はそのまま貼付した。

染毛剤、パーマ剤は開放塗布で試験した。判定：ユニット除去1時間後に1回目の判定(48時間後の判定)を行い、その24時間後に2回目の判定(72時間の判定)、1週間後に3回目の測定を行った。判定には、国際接触皮膚炎研究班(ICDRG)基準を用い、72時間または1週間後に+以上であったものを陽性とした。

B. 2. パッチテスト共同研究

2008年に複数の施設で実施されたパッチテストを集計し、過去の分布との比較検証を行った。

対象期間：2005年4月～2008年3月(3年間)
協力施設：青山皮膚科クリニック、池田回生病院、大阪回生病院、大阪市立大学、鹿児島大学、刈谷整形外科、刈谷豊田総合病院、九州大学、京都府立医科大学、久留米大学、第一クリニック、東邦大学、東京医科歯科大学、独協医科大学、名古屋市立大学、新潟大学、西さっぽろ皮膚科、福井大学、藤田保健衛生大学、横浜市立大学、横浜市立総合医療センター

方法：Brial社のジャパニーズスタンダードアレルギー(添付資料参照)を購入した施設に協力を依頼し、送付されてきたパッチテスト結果を集計した。

総数：1,669例

C. 結果

C. 1. 藤田保健衛生大学皮膚科におけるパッチテスト結果

2年間のパッチテストの結果、陽性となった製品を以下に示す。

シャンプー4例、保湿クリーム(クリーム)4例、UVクリーム(日焼け止め)4例、口紅4例、染毛剤4例、美容液3例、ファンデーション2例、化粧水1例、リップペンシル1例、マスカラ1例、整髪料1例、ヘアトリートメント1例であった。過去の結果との比較を図1にまとめた。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。

個々の症例において、ヒト接触皮膚炎は、顔面でしか再現されないものがあつた。本症例は、シルクパウダーの顔面への繰り返し塗布により膨疹を発症した例であり、ヒト背部のパッチテストや前腕でのブリックテストで再現性を認めず、原因を明確にできなかった。しかし、顔面への塗布による使用試験では、

症状の再現性を確認でき、接触蕁麻疹と診断した。

その他の症例としては、刺激性接触皮膚炎が多いが、最近アレルギー性蕁麻疹の貴重な症例を経験した。

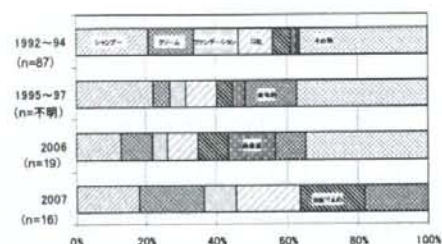


図1. 藤田保健衛生大学における陽性製品の推移

C. 2. パッチテスト共同研究

10年間順位の変動はあるものの、表1に示すように、陽性率の高いアレルゲン10種は同様であった。主なアレルゲンの推移を図2に示したが、同様の傾向を示した。

ただし、金属アレルギーの陽性率は徐々に低下していた。特に金と水銀の陽性率が低下していた。

外用剤に含有されている Fradiomycin sulfate の陽性率が高くなってきているように思われた。Urushio, p-Phenylenediamine, Thiromesal, Ammoniated mercuric chloride, potassium dichromate は Brial社からの入手が不可能であり、特に p-phenylenediamine のパッチテスト用アレルゲンは市販されておらず、自家製のアレルゲンを貼付している現状である。

表1. パッチテスト陽性物質トップ10

	1998	1999	2000	2005-2007
1	Cobalt chloride: 17.2%	Cobalt chloride: 14.3%	Nickel sulfate: 15.0%	Nickel sulfate: 12.4%
2	Nickel sulfate: 16.2%	Nickel sulfate: 12.4%	Cobalt chloride: 14.0%	Cobalt chloride: 8.7%
3	Potassium dichromate: 13.7%	Urushiol: 9.8%	Potassium dichromate: 10.6%	Fradiomycin sulfate: 6.8%
4	Urushiol: 8.5%	Potassium dichromate: 9.7%	Urushiol: 9.9%	Urushiol: 6.4%
5	Ammoniated mercuric chloride: 7.4%	Ammoniated mercuric chloride: 6.8%	Ammoniated mercuric chloride: 8.0%	Potassium dichromate: 6.3%
6	Fradiomycin sulfate: 5.9%	Fradiomycin sulfate: 6.0%	PPD: 5.7%	Fragrance mix: 5.7%
7	Thiromesal: 5.6%	Fragrance mix: 5.0%	Fragrance mix: 5.8%	PPD: 5.7%
8	PPD: 4.8%	Thiromesal: 4.6%	Fradiomycin sulfate: 5.0%	Balsam of Peru: 4.2%
9	Fragrance mix: 4.8%	PPD: 4.5%	Thiromesal: 4.8%	Thiromesal: 4.0%
10	Formaldehyde: 4.0%	Balsam of Peru: 4.0%	Balsam of Peru: 4.0%	Ammoniated mercuric chloride: 3.2%
	Balsam of Peru: 4.0%			
	Gold sodium thiosulfate: 3.3%	Gold sodium thiosulfate: 6.9%	Gold sodium thiosulfate: 7.0%	Gold sodium thiosulfate: 4.5%

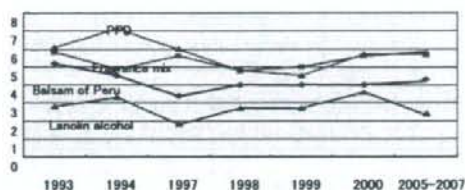


図2. 主なアレルゲンの推移

D. 考察

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い。

今回の研究において、動物実験や動物実験代替法でも、さらにヒト背部のパッチテストや前腕でのプリックテストでも再現されない部位特有の顔面反応を認めた。この症例が示すように、ヒトの部位差のある反応は、最終的には使用試験以外に安全性を担保するものはないと考える。化粧品や医薬部外品、あるいは外用医薬品の安全性確保のためには、まず、パッチテストを行い、次に使用試験を行うことが妥当と考える。

使用試験については、倫理的問題やその手順が十分に検討されていない。しかし、パッチテストについては過去の文献や、共同研究から試験法の改良が期待される。

来年度、共同研究成果を踏まえたパッチテストに関する新たな提言を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(論文)

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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、山崎真男：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)

- 4) 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)
- 5) 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 Dermatol* 7 (6) : 655-656 (2008)
- 6) 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 Allergy* 2 (3) (Serial No. 6) : 167-172 (2008)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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】頭頸部顔部、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 Dermatol* 7 (6) : 635-636 (2008)
- 11) 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)
- 12) 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 Allergy* 13 (1) : 32-41 (2009)
- 13) 松永佳世子：よき伝統の継承・そして新たななる出発、*マルホ皮膚科セミナー* 放送内容集 197 : 4-6 (2009)
- 14) 稲葉弥寿子、松永佳世子：吉草酸プレドニゾロンによる接触皮膚炎、*J Visual Dermatol* 8 (2) : 152-153 (2009)

- 15) 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
Dermatol 8 (2) : 154-155 (2009)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

添付資料

- 1) 松永佳世子：皮膚科臨床から代替法に期待すること、第21回日本動物実験代替法学会発表原稿
- 2) 松永佳世子：パッチテストによる皮膚一次刺激性評価 共同研究委員会、第38回皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 総会 学術大会共同研究シンポジウム