

oral administration of different fluoroquinolones and 8-methoxypsoralen in combination with exposure to UVA. Mutation Res. 609, 1-10, 2006

ワークショップ3

医薬品の光安全性評価

座長 小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)
中村和市 (塩野義製薬 (株))

W3-1 はじめに

中村和市 (日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会, 塩野義製薬 (株))

W3-2 医薬品の光安全性評価の国際的動向

Christopher SAMBUCCO
(チャールス・リバー・ラボラトリーズ ペンシルベニア研究所)

W3-3 In vitro 及び in vivo 光毒性試験

尾上誠良 (静岡県立大学 薬学部薬物動態学分野)

W3-4 光安全性評価手順の検討を目的とした基礎データの収集

○細井一弘, 小林章男, 日浦政則, 久田 茂, 古川浩美, 水間秀行, 河野茂生,
加藤直樹, 高木広憲, 西田 仁, 安木大策, 佐村恵治, 木村 敬, 永山 隆,
山口俊哉, 木幡信彦, 村木由起子, 中村和市, 佐神文郎, 三分一所厚司
(日本製薬工業会 医薬品評価委員会 基礎研究部会)

W3-5 医薬品の光安全性評価における課題

小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)

W3-6 〈総合討論〉

W3-1

はじめに

Introduction for Workshop "Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals"○中村 和市^{1,2}¹日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会, ²塩野義製薬(株)○Kazuichi NAKAMURA^{1,2}¹Non-clinical Evaluation Subcommittee, Drug Evaluation Committee, Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, ²Shionogi & Co., Ltd.

医薬品の光安全性評価については、ガイダンスが欧州医薬品審査庁(EMA)および米国食品医薬品局(FDA)によって2002年、2003年に相次いで制定された。日本においては、これらの欧米のガイダンスを参考に光毒性試験が行われてきた。しかし、現在のEMAおよびFDAガイダンスにおける試験実施基準に関する「290～700 nmの波長に吸収があり、皮膚あるいは眼に分布する場合」の記載に誤りはないが、実際にはほとんどすべての化合物が評価対象となるため実施各社には戸惑いがみられる。また、現在のEMAガイダンスでは「3T3細胞を用いたin vitro光毒性試験の結果が十分な情報を提供すると考えられ、in vivo光毒性試験は通常は必要とされない」としているが、in vitro光毒性試験の感受性は高すぎるのではないかと指摘もある。これらin vitro, in vivo光毒性試験を含めた非臨床試験のヒトへの外挿性については未解決の問題と言える。

これら問題点を検討すべく、2007年には欧州製薬工業協会が光毒性試験データの収集にのりだし、Drug Information Associationは「Photosafety Evaluation of Drugs」と題するワークショップを開催している。日本でも2007年には厚労省光毒性班会議が立ち上がった。また日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会においても同年独自に光毒性試験の検討を開始し、2007年12月からは厚労省光毒性班会議にも参加するに至っている。

本ワークショップでは、非臨床試験の実施要件、各試験法の妥当性、臨床との相関性などについて問題点を整理し、医薬品の光安全性評価手順について検討を加えたい。

W3-2

医薬品の光安全性評価の国際的動向

**Photosafety in Drug Development:
How to Address International Safety and Regulatory Concerns**

○クリストファー サンブコ

チャールス・リバー・ラボラトリーズ ペンシルベニア研究所

○Christopher SAMBUKO

Charles River Laboratories, Pennsylvania

In the process of developing drugs, photosafety (the assessment of adverse effects elicited by drug and light interactions) can be important to ensure the well being of patients and to meet regulatory requirements. In general, photosafety encompasses three categories of photobiological phenomena: phototoxicity, photoallergy and photocarcinogenesis. Understanding when and how to conduct studies to assess photosafety can be a daunting task. Both the USA FDA and the EMA have guidance documents in place to help address the issues, and in 2007 a workshop was held in Amsterdam to address related issues. Furthermore, there are some guidelines in place that include specific methodologies for the conduct of photosafety testing. However, there are inconsistencies among the guidance documents and methods employed to assess photosafety are variable and can produce results that are difficult to interpret and ambiguous with respect to clinical relevance.

Clearly, what is needed is a simplification in the process of photosafety testing. The process should include realistic criteria that define the need to conduct such studies, including timing, and adequate methodologies to assess photosafety. Current regulatory issues and photosafety methodologies will be discussed and a simplified process for addressing photosafety will be presented.

W3-3**In vitro 及び in vivo 光毒性試験****In vitro and in vivo phototoxicity screening strategies**

○尾上 誠良

静岡県立大学 薬学部 薬物動態学分野

○Satomi ONOUE

Department of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

薬剤性光線過敏症は、ニューキノロン系抗菌剤、非ステロイド性抗炎症剤、サイアザイド系利尿薬等をはじめとする特定の薬剤の投与後に、太陽等に露光することによって誘起される皮膚の異常反応（紅斑、小水疱、丘疹、色素沈着等）である。近年、この薬剤性光線過敏症の報告例が増加し、創薬初期過程において光線過敏症のリスクを回避したドラッグデザインを行うことは安全な医薬品創製のうえで重要な課題の一つとなっている。そのため、本副作用の特性を回避しうる創薬手法とともに、副作用発現の可能性を予測しうるリサーチツール開発が望まれており、薬剤による光毒性リスクを予測するために様々な評価方法がこれまでに提案されてきた。Regulatory Sciences の観点からは、(1) 光暴露に伴う分子の励起の可能性を示唆するために UV 吸収測定、ならびに (2) *in vitro* の評価ツールである 3T3 neutral red uptake phototoxicity test (3T3 NRU PT) が Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) のガイドラインなどで推奨されている。また、我々は先に、医薬品候補化合物の光化学的特性、特に singlet oxygen と superoxide の活性酸素種産生をモニタリングすることによって、光線過敏症誘発の可能性を創薬初期過程においても予測し得る可能性を明らかにするとともに、キャピラリー電気泳動を用いたハイスループットな光遺伝毒性評価システムをそれぞれ提案した。本発表ではこれらのツールに加えて、これまでに報告されている *in vitro* ならびに *in vivo* 光毒性評価系についても併せて紹介するとともに、各ツールが抱える課題についても議論する。

W3-4**光安全性評価手順の検討を目的とした基礎データの収集****Questionnaire Survey for Establishment of Photosafety Evaluation Procedures**

○細井 一弘, 小林 章男, 日浦 政則, 久田 茂, 古川 浩美, 水間 秀行, 河野 茂生, 加藤 直樹, 高木 広憲, 西田 仁, 安木 大策, 佐村 恵治, 木村 敬, 永山 隆, 山口 俊哉, 木幡 信彦, 村木 由起子, 中村 和市, 佐神 文郎, 三分一 厚司
日本製薬工業会 医薬品評価委員会 基礎研究部会

○Kazuhiro HOSOI, Akio KOBAYASHI, Masanori HIURA, Shigeru HISADA, Hiromi FURUKAWA, Hideyuki MIZUMA, Shigeo KAWANO, Naoki KATO, Hironori TAKAGI, Hitoshi NISHIDA, Daisaku YASUGI, Keiji SAMURA, Takashi KIMURA, Takashi NAGAYAMA, Toshiya YAMAGUCHI, Nobuhiko KOWATA, Yukiko MURAKI, Kazuichi NAKAMURA, Fumio SAGAMI, Atsushi SANBUISHO
Non-clinical Evaluation Subcommittee, Drug Evaluation Committee, Japan Pharmaceutical Manufacturers Association

日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会 一般毒性課題対応チームでは、光安全性評価方法の確立に向けた基礎データを収集する目的で調査を実施した。加盟 68 社に調査票を送付し、38 社（国内企業 30 社、米国系 2 社、欧州系 6 社）から 84 化合物の光安全性に関するデータを得た。

その結果、*in vitro* および *in vivo* 光毒性試験結果とモル吸光係数の大きさや 290 ~ 700 nm の範囲での化合物の極大吸収の有無との間に関連性は認められなかった。また、*in vivo* 光毒性試験の陽性率が 10% であったのに対して、*in vitro* 光毒性試験および光染色体異常試験の陽性率はそれぞれ 46% および 71% と高かった。*in vitro* 光毒性試験が陰性で *in vivo* 光毒性試験が陽性となった化合物はなかった。*in vitro* 光毒性試験が陰性で臨床において明確な光毒性を示した化合物はなかった (0/14 化合物) が、*in vivo* 光毒性試験が陰性であっても臨床で陽性となるものが 5/22 化合物認められた。一方、*in vitro*, *in vivo* 光毒性試験が陽性的場合、臨床での陽性例はそれぞれ 2/14, 1/2 化合物であった。

以上、モル吸光係数の大きさや 290 ~ 700 nm の極大吸収から光安全性評価の実施根拠を求めることはできなかった。*in vitro* 光毒性試験の感度は高く、陰性であれば臨床において光毒性を発現する可能性は低いと言えるが、陽性となった場合には *in vivo* 光毒性試験あるいは臨床試験の結果等を考慮してリスク評価を行うことが重要と考える。また、光染色体異常試験については陽性率が極めて高く、実施意義については再考すべきと言える。化合物の特性（適応経路、類似薬剤情報、ラジカル形成等）を考慮した非臨床試験の実施要件の策定が必要であり、より臨床への外挿性が高い評価系の構築が望まれる。

W3-5

医薬品の光安全性評価における課題

Regulatory issues on photosafety evaluation of pharmaceuticals

○小野寺 博志

医薬品医療機器総合機構

○Hiroshi ONODERA

Pharmaceuticals and Medical Devices Agency

医薬品の承認申請のための非臨床試験は、ICHガイドラインに準拠した方法で実施され安全性が評価される。しかし、光安全性に関するICHガイドラインは合意されておらず各局が独自の指針によって判断し安全性を評価している。一般に光毒性とはUVの照射により励起活性化された物質が原因となり、光刺激性、光遺伝毒性、光アレルギー等の反応を示す事である。光毒性は予測することが難しく、光毒性を評価する適切な動物試験系は確立されているとは言えない。医薬品の光毒性は皮膚へ直接塗布する場合や貼付する適応のみならず、経口摂取においても危惧され、重篤度の差はあるもののヒトで多くの報告がある。本邦において光毒性試験に関するガイドラインは毒性試験ガイドライン（平成元年9月11日）のなかで「皮膚光感作性試験」として収載されているのみである。そのため諸外国でのガイダンス（EMEA：2002，FDA：2003）を参照に評価が行われている。しかし、これらのガイダンスは必ずしも医薬品のみを対象として策定されたものではなく、リスク&ベネフィットの観点から考慮すべき問題も多いことより、H19年度より厚労科研究「光毒性試験に関する国内外の現状とガイドライン策定についての調査研究」が進められている。動物愛護の観点から代替法の検討や動物試験での有用性および限界と問題点を明らかにし、ヒトにおける光毒性のリスクをいかに予測し適切に対応するかが重要となる。

本ワークショップでは、非臨床試験の現状から今後、本邦で有用な医薬品の光安全性評価について広く意見を求めたい。

光安全性評価の現状

平成21年度班会議総会
平成22年1月19日
小野寺博志
医薬品医療機器総合機構

医薬品の光安全性評価に関する現状

世界の流れ

- 2002年: 欧州医薬品審査庁 (EMA)
- 2003年: 米国食品医薬品局 (FDA)
- 2008年: ガイダンス改訂の必要性に関するコンセプトペーパー
- 2009年: ICH(セントルイス)で次のトピック候補

日本の現状

- 1989年: 皮膚光感作性ガイドライン
- 2007年: 厚生科学研究班で検討開始

医薬品の光安全性評価に関する課題

- 光安全性評価の実施基準
- 光安全性評価の毒性試験法
- 光毒性試験の検出感度
- 非臨床試験結果からヒトへの外挿性
- 臨床試験および承認時における対応と予防
- 代替法、新規マーカーの開発と応用

光安全性評価を実施する判断基準

	EMA	FDA
対象化合物の範囲	• 化学物質全般 • バイオテクノロジー医薬品	• 原薬および製剤成分 • 外用薬は製剤で実施(推奨)
吸収波長領域	290~700nm	290~700nm
吸収スペクトル(最大吸収)	記載なし	吸収スペクトルの情報を重視(極大吸収を示すだけでは不十分)
体内経路と分布	• 局所適応 • 皮膚/眼に到達・蓄積	• 皮膚/眼に適応もしくは分布 • 皮膚/眼の状態に影響を与えるもの
対象外	記載なし	• 太陽光に曝露されない疾病患者 • 曝露されない箇所に適応(外用剤) • 曝露される部位に分布しない • 光毒性が既知の物質

光安全性評価を実施する判断基準

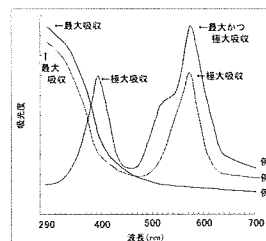
ICH-M3(R2)

- ヒト光安全性評価の必要性または評価時期を判断する要因
 - 光化学的特性(光吸収性・光安定性)
 - 関連化合物の光毒性に関する情報
 - 臓器・組織への分布
 - 臨床または非臨床試験で光毒性を示唆する所見
- 光安全性の初期評価
 - 光化学的特性や薬理学/化学的分類に基づき決定

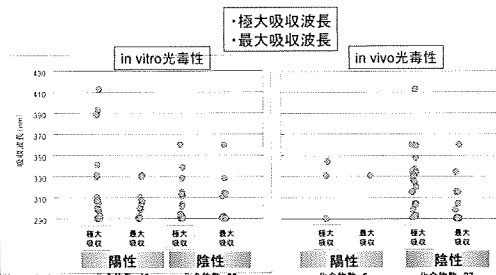
光安全性評価を判断する要件は示されているが、具体的な実施基準については記載がない

化合物の光吸収性と光毒性

- 最大吸収と極大吸収との関係

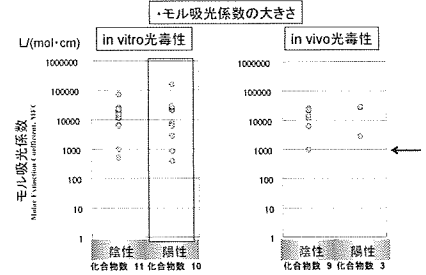


化合物の光吸収性と光毒性



290-700nmにおける極大/最大吸収波長の大きさはin vitro/in vivo両試験とも、関連性を裏付ける特定の傾向はなかった

化合物の光吸収性と光毒性



モル吸収係数とin vitro, in vivo光毒性試験結果との間に関連性はみられないが、通常、MECが1000 L mol⁻¹ cm⁻¹未満の医薬品については、光安全性評価を実施する必要性は低いと思われる

化合物の光安定性と光毒性

- ・ 欧米ガイドラインでは、光安全性評価実施要件の一つとなっているが、測定条件や光分解性に関する基準は示されていない
- ・ 光分解速度は特定波長の光子数に依存、分解の波長依存性は薬物により異なる。さらに光源の違いによっても各波長に対する光子数の分布が異なる等から、薬物の分解速度に及ぼす光の影響について定量的に解析することは困難
- ・ 光安定性は、原薬および製剤で実施(ICH-Q1B)
- ・ 分解成分による光毒性発生機序も考慮
- ・ 光毒性物質の約70%が照射により50%以上分解
- ・ しかし、10%以内しか分解しない光毒性物質もある

化合物の光安定性のみの結果で、光毒性試験の実施要否および光毒性物質の検出には限界がある

新手法による光毒性評価

ROSアッセイ法

- ・ 化合物に照射後、光毒性反応のトリガーとなる活性酸素(ROS:一重項酸素及びスーパーオキシド)の生成を測定する試験法
- ・ 医薬品39種類及び開発化合物210種類を用い、ROS生成能と3T3-NRU試験結果を比較検討したところ、ほとんどの光毒性物質では、タイプIまたはIIの光化学的反応が誘発され一重項酸素及びスーパーオキシドの生成が認められる
- ・ 光吸収性試験や光安定性試験と同様、医薬品の光化学的特性を位置づける試験としての可能性
- ・ 今後、光毒性リスクと判別しうる基準値の設定やバリデーション等による確認と国際的な認知が必要

HOMO-LUMOギャップ法

(Highest Occupied - Lowest Unoccupied Molecular Orbital)

- ・ 光励起されやすい化合物は光過敏症のリスクが高いと考えられる
- ・ 3T3-NRU試験の結果とHOMO-LUMOギャップ値(ΔE)には相関性がある報告
- ・ 計算手法により値が異なり、実施施設における条件設定を検討する必要

照射部位における組織分布と光毒性評価

- ・ 体内に吸収された化合物あるいは代謝物が照射部位に到達・蓄積することが光毒性を惹起させる重要な条件
- ・ 欧米ガイドライン
 - 眼・皮膚など光線に曝露される可能性がある箇所に直接適用
 - 投与後、眼・皮膚に移行し分布
 - 眼・皮膚で投与による影響が認められる

- ・ 光吸収性の低い薬剤でも投与局所に高濃度に分布する皮膚外用剤及び点眼剤は、すべて光安全性評価が必要
- ・ 外用剤では組成の違い、あるいは貼付部位の状態により吸収・分布が異なる、組織分布に関する情報は重要で、早期に検討することが必要
- ・ メラニンと親和性を有する化合物は局所における薬物濃度が高値となる可能性があり、血漿中濃度推移、組織への到達時間、並びに消失速度等から総合的に判断する必要がある

光安全性評価の試験法

光照射条件

- ・ 欧米ガイドラインでは、UVB、UVAおよび可視光領域を含む290~700 nmの波長に吸収する化合物全てを評価対象
- ・ 疑似太陽光を推奨、しかし具体的な照射条件は記載なし
- ・ OECDガイドライン432 (in vitro 3T3-NRU試験)の、バリデーション試験では光源としてSOL500(水銀蒸着メタルハライドランプ、Dr. K. Hönle, ドイツ)を使用
- ・ 本邦では皮膚光感作性試験ガイドラインに「キセノンランプ、ソーラーシミュレーター、紫外線ランプなどが使用されている」と記載
- ・ 疑似太陽光源と標榜しても自然太陽光とは異なる波長特性
- ・ 同一光源で照射された同一部位の紫外線強度でも、機種特性により測定値が異なる、さらにランプ、測定器も定期的な校正が必要

陽性対照を用い、実施施設での背景データを得ることが必要

光安全性評価の試験法

*in vitro*光毒性試験

- OECDテストガイドライン432 3T3-NRU試験は感度が高く、擬陽性と陽性の結果が多い
- 赤血球光溶血試験法及び酵母光生育阻害試験法の、光毒性試験代替法バリデーションが終了しJaCVAMIに報告書が提出された
- 赤血球光溶血試験は血球膜への直接障害
- 酵母光生育阻害試験は細胞膜及び細胞内への障害を反映
- 作用機序及び特徴を理解し、被験物質の特性も考慮して試験法を選定することが重要
- ヒト三次元培養皮膚モデルに照射する試験系は有用である。しかし、難水溶性物質あるいは製剤での評価系として確立が必要

光安全性評価の試験法

*in vivo*光毒性試験

- モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ヘアレスマウスが一般的に使用されている
- メラニン結合性がある場合は、有色動物の使用も考慮
- 経口投与などによる全身暴露の場合、被験物質の分布や代謝特性により、使用可能な動物種が限定
- 照射単独で皮膚反応を惹起する限界量は動物種により異なり、試験ごとに条件を調整する必要
- 陽性対照物質を用いたバリデーション試験の実施が必要

光安全性評価の試験法

*in vitro*光アレルギー試験

- 国際的にバリデートされ確立された評価系はない
- THP-1細胞 (human monocytic leukemia cell line)を用いたphoto-h-CLAT (photo human Cell Line Activation Test, 光ヒト細胞株活性化試験)が現在検討されている

*in vivo*光アレルギー試験

- 皮膚光感作性試験ガイドラインがあるのみ
- FDAガイドラインでは非臨床試験結果から臨床での光アレルギーを予測することは困難
- EMEAでは、モルモットを用いた動物試験の実施は可能としている一方、3Rsの観点から代替法の開発を積極的に推進
- Photo-LLNA (Local Lymph Node Assay)は、OECDガイドライン429として認証されているLLNA法にUV照射を加えた方法

光安全性評価の試験法

*in vitro*光遺伝毒性試験

- DNA損傷を指標とした光染色体異常(小核)試験が推奨
- しかし、ほ乳類培養細胞は照射単独で染色体異常が誘発
- 光Ames試験のエンドポイントはMutationで、発がん性を予測することは困難。検出感度は高くない。キノロン系抗菌剤などは、その薬理作用から光遺伝毒性試験評価が困難な場合がある

*in vivo*光遺伝毒性試験

- *in vitro*と同様DNA損傷を指標とする皮膚小核試験
- 皮膚組織の単細胞ゲル電気泳動法(コメットアッセイ)に照射を組み合わせた光皮膚小核試験
- 光皮膚コメットアッセイ
- いずれの試験系も細胞毒性に関連した間接的なDNA損傷による陽性結果に注意が必要
- 将来有望の可能性はあるが、現時点は限られたデータで通常用いる試験系ではない(IWGT,2009)

光安全性評価の試験法

*in vivo*光がん原性試験

- M3(R2)ガイドラインで、げっ歯類(ヘアレス動物など)を用いた有用性については推奨していない
- 他の代替評価法を用いて、がん原性を評価することを推奨、しかし具体的な記載はない
- 光発がん性に対するリスクが疑われる場合、治験実施計画書や添付文書等でリスクを周知し、服用中における光曝露を回避する方策が現実的

まとめ

- 本研究班は医薬品の光安全性評価に関する考え方や技術的課題などに関する現状と問題点をまとめた
- 今後、ガイドライン策定にあたって
 - 光安全性評価の実施に際し判断基準を具体化
 - *in vitro*光毒性試験(3T3 NRU試験)結果の評価
 - *in vivo*試験の必要性と試験法の選択
 - 光アレルギー性の予測性への懸念
 - 動物福祉
 - 光遺伝毒性/光がん原性のヒトへの外挿性

本資料作成に協力して頂いた方々

- 分担研究者: 小野寺博志
 - 協力研究者: 篠田和俊(総合機構)
 - 協力研究者: 小島 肇(国立衛研)
 - 協力研究者: 中村和市(塩野義製薬)
 - 協力研究者: 細井一弘(参天製薬)
 - 協力研究者: 尾上誠良(静岡県大)
 - 協力研究者: 込山則行(総合機構)
 - 協力研究者: 田中恵穂(食薬センター)
- 「医薬品の光安全性評価に関する資料」
岩瀬裕美子、白菊敬之、高木広憲、山下博久、
水間秀行

Ⅲ. 分担研究報告（非臨床安全性部門2）

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業）
平成21年度小括研究報告書

－非臨床試験の国際的ハーモナイゼーションに関する研究－

研究分担者：大野 泰雄（国立医薬品食品衛生研究所 副所長）
佐藤 薫（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）
小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）

研究要旨

本研究は非臨床試験の医薬品等国際ハーモナイゼーション会議（ICH）における「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン」（ICH M3）の修正のために必要な科学的根拠に関する調査・研究および動物実験代替法をICHガイドラインに反映させるために必要な調査・研究を行った。ICH M3ガイドラインについては、昨年度において達成されたStep 2のガイドラインに対するパブリックコメントの検討を進め、平成21年6月に「医薬品の臨床試験及び販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」として、Step 4の国際的ハーモナイゼーションを達成した。その後、合意文書の翻訳を行うとともに、寄せられたコメントを49項目に整理し、それらに対する対応をまとめた。また、厚生労働省より同指針を通知するために必要なQ&Aを作成した。動物実験代替法（以後、代替法と記す）に関しては、2009年4月日米欧カナダの4極による協力のため、代替法協力国際会議（International Cooperation on Alternative Test Methods：ICATM）を設立した。

キーワード：非臨床試験、臨床試験、ガイドライン、国際的ハーモナイゼーション、タイミング

研究協力者

伊藤 眞紀（塩野義製薬・日本製薬工業協会）
井上 達（国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・センター長）
岩崎 甫（グラクソ・スミスクライン）
大橋 京一（大分大学医学部）
小野寺博志（医薬品医療機器総合機構）
佐神 文郎（エーザイ・日本製薬工業協会）
篠田 和俊（医薬品医療機器総合機構）
高橋 道人（病理ピアレビューセンター）
中澤 憲一（国立医薬品食品衛生研究所）
馬屋原 宏（国際医薬品臨床開発研究所）
三浦 慎一（第一三共・日本製薬工業協会）

吉田 緑（国立医薬品食品衛生研究所）
山本 恵司（武田薬品工業・日本製薬工業協会）

A. 研究目的

本研究グループは国際的にハーモナイズした医薬品の臨床試験との関係における非臨床試験実施タイミングおよび承認申請に必要な非臨床試験に関するガイドラインを作成することとその根拠を作成するための調査研究を行うことにより、臨床試験協力者の安全を確保しながら医薬品開発を効率化し、促進すること、および動物実験代替法を考慮したガイドラインを作成するための調査を目的とした。

臨床試験実施との関係における非臨床試験実施時

期については、既に、ICHにおいて検討され、1997年にICH M3として合意文書が作成され、翌年、我が国の指針に反映された。その後、2000年には、男性生殖臓器の評価が2週間の反復投与毒性試験で可能であるという我が国で行ったバリデーション結果を反映させた修正がなされた(ICH M3 (R1))。一方、医薬品開発をさらに促進させるためには、国際的なハーモナイゼーションを更に進めるとともに、マイクロドーズ臨床試験を含む早期探索的臨床試験という新たな開発手法の導入等が必要とされ、2007年より具体的な検討が開始された。その結果、上記課題だけでなく、小児用医薬品や乱用性、光毒性、免疫毒性、配合剤、初回投与量の設定など、多くの新規課題が組み込まれたガイドラインが2008年6月にICHの専門家による検討グループ(EWG)で合意に達した(Step 2)。今年度はこのStep 2ガイドライン案について、各界から寄せられたコメントを検討し、修正作業を行い、最終合意を成し遂げるとともに、それを我が国の指針に反映させることを目的とした。

一方、EUでは化粧品における動物実験の規制¹⁾により国際市場における化粧品の製造販売に混乱が生じている。また、REACH(Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of CHemicals)への対応のための安全性評価においては、*in vitro*試験の利用が明示された²⁾。このような状況に対応するため、厚生労働省、米国医薬食品庁(FDA)、カナダ厚生省、欧州(EU)委員会企業産業総局により2007年9月に設立された「化粧品規制協力国際会議」(International Cooperation on Cosmetics Regulations:ICCR)の中で、その具体的な議題の一つとして、「化粧品成分の安全性評価と代替法」が挙げられた³⁾。2008年、ICCRは、動物実験の3Rs(削減、洗練、代替)についての協力を推進するためのワーキンググループである代替試験法協力国際会議(International Cooperation on Alternative Test Methods:ICATM)の設立を提案した⁴⁾。ICATMの設立により、化粧品の安全性確保のための代替法確立という各国の枠を超えた国際協調が進むと予想される。そこで、本研究では、動物実験代替法を国際的なガイドラインに組み込むための参考とするため、ICATMの設立に関する活動につ

て紹介するとともに、本年度におけるICCRへの関与について言及する。

B. 研究方法

B-1) ICH M3ガイドラインについての検討

研究協力者とともに、ガイドライン案へのコメントを検討し、我が国としての対応を検討し、ICHのEWG会議に臨んだ。このEWGには日本の行政側のメンバーとして国立医薬品食品衛生研究所より大野が、医薬品医療機器総合機構から研究協力者の篠田が参加した。日本製薬工業協会(製薬協)からは研究協力者の佐神、山本、伊藤、および三浦が参画した。今年度も欧米のメンバーとともに国際的な会合を持ち、ガイドラインに関する協議を行った。さらに、ガイドライン修正をスムーズに進めることを目的とし、この分野に関わる国内の専門家である上記研究協力者とともに国際的会合に向けての班会議を開催し意見を交換した。

B-2) 催奇形性試験について

催奇形性試験の用量設定試験の予測性に関する検討として、製薬協の作業グループが過去10年間に実施された試験について、傘下の72企業に2回にわたるアンケート調査を行った(2007年4月と2007年10月から2008年1月の間に実施)。その結果24社から回答を得、その結果を解析した。

B-3) 動物実験代替法についての検討

動物実験代替法の開発と受け入れを促進するため、米国NICEATM(National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)/ICCVAM(Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)、EUのECVAM(European Center for the Validation of Alternative Methods)/ESAC(ECVAM Scientific Advisory Committee)、カナダ厚生省及び新規試験法評価室を中心とする活動団体JaCVAM(Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)が2009年4月27日、米国衛生研究所(メリーランド州ベセズダ、米国)にて、ICATMを設立し

た。その後、会議を四回にわたり開催し、その枠組み構築のための検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験については、施設毎の規定にしたがい、動物福祉に考慮して実施した。

C. 研究結果

C-1) 医薬品の臨床試験と販売申請に必要な非臨床試験に関する研究

臨床試験との関係で非臨床試験の実施タイミングについてのガイドラインを改訂するための検討を行ってきた。昨年度までに検討され、ステップ2の合意文書に盛り込まれた主な改訂点は以下のとおり。1) 3Rの原則(使用動物数の削減/代替法の利用/実験の洗練化)の明記、2) 光毒性、免疫毒性、幼弱動物における毒性、薬物乱用、及び配合剤に関する項の追加、3) 単回投与毒性試験を、急性毒性試験とし、第三相までに実施すれば良いとした、4) 探索型臨床試験を導入、5) 生殖毒性試験の内容について変更した。

Step 2文書の修正のための検討

ステップ2以後の検討として昨年度の報告に盛り込まれた主な修正箇所は以下の通り。

- 1) 固定用量配合剤についての表現が全面的に改定された。
- 2) 一般毒性試験における用量設定と最高用量、初期PD試験、また、安全性評価すべき代謝物についての考えが示された。
- 3) 臨床投与期間が長いというだけでは発ガン実験を行うべき懸念とは言えない、との表現が追加された。
- 4) 不純物や分解物についての試験は、特に理由がなければ、Phase 3前までに実施すれば良い、との表現が追記された。

昨年度報告を提出した以後に行った検討では、ICH専門家グループ会議を平成21年3月11日～3月13日にワシントン郊外のロックビルで、本研究班会

議を平成21年6月1日(月曜日)に国立医薬品食品衛生研究所で、ICH専門家グループ会議を平成21年6月7日～11日に横浜で開催し、最終的に6月11日にStep 4の合意に到達した。これらの会議における具体的な、検討過程については、大野らの分担報告を参照されたい。

Step 4合意文書の内容を以下に要約する。

- 1) 急性毒性については、反復投与毒性試験における投与開始後短期間中に現れる用量制限的な毒性で検出できることから、急性毒性試験として独立して行う必要性は少なくなった。ただし、過剰用量による毒性を推測するため、急性毒性に関する情報は通常第三相試験開始前までに得ておく。
- 2) 一般毒性試験における最高用量は、ヒトでの用量が1 g/day以下かつ臨床暴露との間に10倍の差があれば、1 g/kg/dayでよい。また、ヒトでの最高用量の50倍あれば良い。ただし、米国では、用量制限的な毒性が認められない場合は、少なくとも1つの1ヶ月試験でMFDあるいはMTDを最高用量とする試験を第三相試験の前までに実施しておくことが推奨される。
- 3) 約150物質のデータについて調査した結果、非げっ歯類における反復投与毒性試験については、常にということではないが、通常、6ヶ月試験で十分であるとされた。また、9ヶ月試験で不十分との結果は得られなかった。従って、ヒトでの低分子化合物の慢性投与をサポートする非げっ歯類の慢性毒性試験データとしては9ヶ月で十分である。また、6ヶ月試験で十分な状況について、明記された。
- 4) 探索的臨床試験を治療や診断およびMTD探索という目的を持たないものとし、それを以下の5つのオプションに分類した。アプローチ1：投与量100µg以下のマイクロドーズ試験(総投与量を100µg以下の反復投与を許容)、アプローチ2：投与量100µg以下を5回までの投与を許容するマイクロドーズ試験(総投与量500µg以下)、アプローチ3：治療量以下の用量での単回投与試験、アプローチ4：2週間の反復投与毒性試験に基づく反

復投与試験（げっ歯類及び非げっ歯類）、アプローチ5：げっ歯類での2週間反復投与毒性試験と非げっ歯類での確認試験に基づく反復投与試験。それぞれの試験の詳細と、その実施に必要な非臨床試験の範囲については、添付資料2の表を参照されたい。

- 5) 遺伝毒性試験については、単回投与臨床試験のためには遺伝子変異を調べる試験のみで良く、染色体異常試験は不要とした。
- 6) 生殖毒性試験については、臨床試験の内容に応じて必要な生殖毒性試験の種類と実施タイミングについて定めた。また、催奇形性試験の用量設定試験のみで3ヶ月以内で避妊処置を徹底した150人以内の妊娠可能女性についての第2相までの臨床試験に組み込むことができるとした。
- 7) このほか、小児試験を行うために必要な毒性試験、免疫毒性試験、光毒性試験、非臨床依存性試験、固定用量配合剤のための非臨床試験について、定めた。

C-2) 催奇形性試験の用量設定試験の予測性についての検討（製薬協による検討）

72社の製薬協傘下企業にアンケートを配布し、24社から回答を得た（回答率33%）。げっ歯類では、108物質について、非げっ歯類では、85物質についての試験結果が集まった。いずれの物質についても用量設定試験と本試験結果が含まれており、本試験ではいずれの胚胎仔発生毒性が観察されていた。

用量設定試験における動物数は、用量設定試験ではげっ歯類、非げっ歯類を問わず、一群当たり6匹が一般的であった。観察項目は、致死性のみを見る場合から胚胎仔試験に要求される全項目を観察するものと多様であったが、げっ歯類試験では外形検査のみが44%で、51%の試験では外形、内臓及び骨格検査を行っていた。非げっ歯類では、それぞれ53%と41%であった。また、母動物の死亡が見られた試験は用量設定試験の方が本試験より多く、用量設定試験では相対的に高い用量が使用されていると思われる。

用量設定試験で何らかの胚胎仔発生毒性が認めら

れた被験物質は、げっ歯類では83%、非げっ歯類では80%であった。また、本試験と比較した場合の用量設定試験の感度は、奇形と変異を合わせた場合は、げっ歯類では83%（108例中90例で検出）、非げっ歯類では80%（85例中68例で検出）であった。奇形のみに絞った場合の感度は、げっ歯類では53%（34例中18例で検出）、非げっ歯類では57%（21例中12例検出）であった。胎児死亡や体重減少を含む、全ての胚胎仔発生毒性を合わせた結果では、げっ歯類では91%（34例中31例で検出）、非げっ歯類では100%（21例全てで検出）であった。一方、げっ歯類および非げっ歯類の試験結果を合わせた場合の感度は、胚胎仔発生毒性全般では96%（56例中54例で検出）、奇形については100%（23例全例で検出）であった。これらの結果から、通常のげっ歯類および非げっ歯類での用量設定試験のみで妊娠可能女性を臨床試験に組み込んだ場合に、被験者が胚胎仔毒性物質に暴露されるリスクを計算することができた。結果として、用量設定試験のみで、3ヶ月の臨床試験で150人までの妊娠可能女性を組み込むことが可能となった。

C-3) 動物実験代替法についての検討

C-3-1) ICATMの設立と合意

ICATMの設立に当たり、調印された合意書（小島分担報告の添付資料2～4）には、それぞれのバリデーション組織間の国際的な協力、共同研究、交流を促進するため、次の重要な分野の協力が言及されている。

- 1) 適切な計画を立案し、バリデーション研究を運営
行政の規制試験として提案される代替法の国内及び国際規制の決定事項を支援する。
- 2) 科学的な第三者評価システムの確立
透明性及び利害関係者のための機会を供給する。
- 3) 代替法の正式な試験法勧告の策定
代替法の迅速な国際的採択及び多大なる努力と手段により成される資源に限定された成果及び影響力の重複を避ける。

この合意以降、4回の会議が開催され、より詳細

な国際協調について意見交換がなされた。また、9月に開催された第7回国際動物実験代替法会議においては、ICATMのセッションが企画され、幅広く協力内容が公表された⁵⁾。ただし、検討されている内容は新しい加入メンバー選定基準、情報交換の場としてのweb siteの立ち上げに過ぎず、国際協調の具体的な手順については明確にされていない。そのような状況の中、ECVAMが主催する眼刺激性試験、皮膚感作性試験、トキシコキネティクスに関するバリデーション研究実行委員会にICATMメンバーが参画するなどの具体的な協力が始まっている。

C-3-2) ICCRへの報告

ICCRからの要請を受け、化粧品の安全性評価に関係した各代替法の進捗報告書を作成した。まず、JaCVAMでたたき台を作成し、ICCVAM及びECVAMの代表が加筆し、ICCR-3までにAlternative Test Methods Update (小島分担報告の添付資料6)を提出した。報告書には、組織毎の皮膚刺激性、皮膚感作性、眼刺激性、急性毒性、遺伝毒性、発癌性、トキシコキネティクス及び生殖毒性試験それぞれの代替法開発の進捗状況を記載した。

D. 考 察

M3のガイドライン改訂のための検討は平成18年6月のbrain stormingから数え、平成21年6月までの3年の検討の結果、三極の合意を達成することができた。その後、合意文書の翻訳とQ&Aを作成し、厚生労働省の担当官に提出した。このガイドラインが我が国の指針として通知されることにより、国際的に合意された基準に従い、被験者の安全を十分に確保した上での効率的な医薬品開発が可能となり、我が国における医薬品開発が促進されるものと考えられる。また、様々なオプションを持つ早期探索的臨床試験が導入されたことは、医薬品の特性や企業の状況に応じた最適開発ステップを選択することを可能とするものであり、我が国における今後の医薬品開発に極めて重要である。医薬品開発に必要な非臨床試験が最小限となり、動物使用数が削減されると考えられる。

なお、現在、ガイドライン解説書の作成をおこなっている。解説書案が完成したところで、その要点を英訳し、他極の専門家の意見も確認した後、確定する予定である。

動物実験代替法に関しては、2008年にICCRがICATMの設立を提案した。しかし、2009年に設立されたICATMの合意書には化粧品の安全性確保における代替法の利用という目的は記載されておらず、ICATMは化学物質全般の安全性評価を意識とした組織になりつつある。これらの事情から、ICCRではICATMからの報告を受け、その活動への協力、調整、支援を継続することを約束した。ICCRとICATMのメンバー間で相互に意見交換がなされ、本分野における行政的な国際協調が進むことを期待したい。ICATMにおいても枠組みの議論が中心で、具体的な手順の確立に関する議論が始まっていない。今後予定されているICATM会議において、細部の枠組みに関する議論及びOECDガイドラインとの位置付けに関する意見交換がなされないとICATMは形骸化する恐れがある。一方で、情報の共有化という点で、種々の試験法において具体的な国際的な協調が進みつつあり、日本への協力要請数も増している。

E. 結 論

本年度は医薬品の臨床試験および販売申請に必要な非臨床試験に関する改正ガイドライン案(M3R2)の作成において、最終的なStep 4の合意に達した。現在、国内通知を行うための翻訳とQ&Aの作成および通知文書案の作成作業が終了し、厚生労働省からの発出を待っている。

代替法における国際協力組織として、2009年日米欧カナダの4極により、ICATMが設立された。具体的な試験法開発において、協力関係が進んでいる。

F. 健康危機情報

なし

G. 参考文献

- 1) Commission Staff Working Documents (2004) Time

Tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC); EN, SEC82004,1210

2) ECB, [http://ecb.jrc.ir/REACH/\(2007\)](http://ecb.jrc.ir/REACH/(2007))

3) 厚生労働省 ホームページ, <http://www-bm.mhlw.go.jp/bunya/iyakuhin/keshouhin/iccr03.html>

4) ICCVAM, <http://iccvam.niehs.nih.gov/about/icatm.htm>

5) Status report on ICATM, ALTEX, 26, Special Issue, 171-173.

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida M, Watanabe G, Suzuki T, Inoue K, Takahashi M, Maekawa A, Taya K, Nishikawa A.: Long-Term Treatment with Bromocriptine Inhibits Endometrial Adenocarcinoma Development in Rats. *J Reprod. Develop.* 55, 105-109, 2009. (昨年度業績にin pressで掲載)
- 2) Atsushi Sanbuissho, Midori Yoshida, Shigeru Hisada, Fumio Sagami, Satoshi Kudo, Toshihiko Kumazawa, Masayuki Ube, Shin) Atsushi Sanbuissho, Midori Yoshida, Shigeru Hisada, Fumio Sagami, Satoshi Kudo, Toshihiko Kumazawa, Masayuki Ube, Shinichi Komatsu and Yasuo Ohno, Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity by repeated-dose and fertility studies in female rats. *J. Toxicol. Sci.* 34 Special Issue I, SP1-22, 2009. (昨年度業績にin pressで掲載)
- 3) Midori Yoshida, Atsushi Sanbuissho, Shigeru Hisada, Michihito Takahashi, Yasuo Ohno and Akiyoshi Nishikawa, Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *J. Toxicol. Sci.* 34 Special Issue I, SP189-197, 2009. (昨年度業績にin pressで掲載)
- 4) Sachiyo Ohtake, Motoko Fukui and Shigeru Hisada, Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity.
 - 1) Effects of 2- or 4-week repeated-dose administration and fertility studies with medroxyprogesterone acetate in female rats. *ibid* SP23-29.
 - 2) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of mifepristone in female rats. *Ibid* SP31-SP42.
 - 3) Effects of 2- or 4- week repeated-dose toxicity and fertility studies with tamoxifen in female rats. *Ibid* SP43-SP51.
 - 4) Two- or four-week repeated dose study of 4-vinylcyclohexene diepoxide in female rats. *Ibid* SP53-SP58.
 - 5) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of busulfan in female rats. *Ibid* SP65-SP72.
 - 6) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of cisplatin in female rats. *Ibid.* SP73-SP81.
- 5) Toru Tamura, Ryohei Yokoi, Yuji Okuhara, Chiho Harada, Yukari Terashima, Morimichi Hayashi, Tatsuya Nagasawa, Tomoya Onozato, Kazuo Kobayashi, Junji Kuroda and Hiroshi Kusama. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity.
 - 1) Effects of 2- or 4- week repeated-dose toxicity and fertility studies with tamoxifen in female rats. *Ibid* SP43-SP51.
 - 2) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of mifepristone in female rats. *Ibid* SP31-SP42.
 - 3) Effects of 2- or 4- week repeated-dose toxicity and fertility studies with tamoxifen in female rats. *Ibid* SP43-SP51.
 - 4) Two- or four-week repeated dose study of 4-vinylcyclohexene diepoxide in female rats. *Ibid* SP53-SP58.
 - 5) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of busulfan in female rats. *Ibid* SP65-SP72.
 - 6) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of cisplatin in female rats. *Ibid.* SP73-SP81.
- 6) Shigeharu Tsujioka, Yoshiki Ban, L. David Wise, Takayuki Tsuchiya, Takahiro Sato, Kenta Matsue, Takanori Ikeda, Minoru Sasaki and Masaru Nishikibe. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity.
 - 1) Effects of 2- or 4- week repeated-dose toxicity and fertility studies with tamoxifen in female rats. *Ibid* SP43-SP51.
 - 2) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of mifepristone in female rats. *Ibid* SP31-SP42.
 - 3) Effects of 2- or 4- week repeated-dose toxicity and fertility studies with tamoxifen in female rats. *Ibid* SP43-SP51.
 - 4) Two- or four-week repeated dose study of 4-vinylcyclohexene diepoxide in female rats. *Ibid* SP53-SP58.
 - 5) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of busulfan in female rats. *Ibid* SP65-SP72.
 - 6) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of cisplatin in female rats. *Ibid.* SP73-SP81.
- 7) Atsushi Ito, Naomi Mafune and Takashi Kimura. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity.
 - 1) Effects of 2- or 4- week repeated-dose toxicity and fertility studies with tamoxifen in female rats. *Ibid* SP43-SP51.
 - 2) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of mifepristone in female rats. *Ibid* SP31-SP42.
 - 3) Effects of 2- or 4- week repeated-dose toxicity and fertility studies with tamoxifen in female rats. *Ibid* SP43-SP51.
 - 4) Two- or four-week repeated dose study of 4-vinylcyclohexene diepoxide in female rats. *Ibid* SP53-SP58.
 - 5) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of busulfan in female rats. *Ibid* SP65-SP72.
 - 6) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of cisplatin in female rats. *Ibid.* SP73-SP81.
- 8) Terutaka Kodama, Junichi Yoshida, Tadashi Miwa, Daiki Hasegawa and Takeshi Masuyama. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity.
 - 1) Effects of 2- or 4- week repeated-dose toxicity and fertility studies with tamoxifen in female rats. *Ibid* SP43-SP51.
 - 2) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of mifepristone in female rats. *Ibid* SP31-SP42.
 - 3) Effects of 2- or 4- week repeated-dose toxicity and fertility studies with tamoxifen in female rats. *Ibid* SP43-SP51.
 - 4) Effects of fertility study of 4-vinylcyclohexene diepoxide in female rats. *Ibid* SP59-SP63.
 - 5) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of busulfan in female rats. *Ibid* SP65-SP72.
 - 6) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of cisplatin in female rats. *Ibid.* SP73-SP81.
- 9) Yosuke Sakurada, Satoshi Kudo, Shogo Iwasaki, Yuki Miyata, Miyuki Nishi and Yoshihiro Masumoto. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity.
 - 1) Effects of 2- or 4- week repeated-dose toxicity and fertility studies with tamoxifen in female rats. *Ibid* SP43-SP51.
 - 2) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of mifepristone in female rats. *Ibid* SP31-SP42.
 - 3) Effects of 2- or 4- week repeated-dose toxicity and fertility studies with tamoxifen in female rats. *Ibid* SP43-SP51.
 - 4) Effects of fertility study of 4-vinylcyclohexene diepoxide in female rats. *Ibid* SP59-SP63.
 - 5) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of busulfan in female rats. *Ibid* SP65-SP72.
 - 6) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of cisplatin in female rats. *Ibid.* SP73-SP81.
- 10) Yusuke Nozaki, Eiko Furubo, Takayuki Matsuno, Rie Fukui, Kazuo Kizawa, Tsukasa Kozaki and Takahiro Sanzen. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity.
 - 1) Effects of 2- or 4- week repeated-dose toxicity and fertility studies with tamoxifen in female rats. *Ibid* SP43-SP51.
 - 2) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of mifepristone in female rats. *Ibid* SP31-SP42.
 - 3) Effects of 2- or 4- week repeated-dose toxicity and fertility studies with tamoxifen in female rats. *Ibid* SP43-SP51.
 - 4) Two- or four-week repeated dose study of 4-vinylcyclohexene diepoxide in female rats. *Ibid* SP53-SP58.
 - 5) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of busulfan in female rats. *Ibid* SP65-SP72.
 - 6) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of cisplatin in female rats. *Ibid.* SP73-SP81.

- 11) Makoto Sato, Kei Shiozawa, Toru Uesugi, Riki Hiromatsu, Meiko Fukuda, Keisuke Kitaura, Takanori Minami and Satoshi Matsumoto. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 7) Effects of 2- or 4- week repeated dose studies and fertility study of cyclophosphamide in female rats. Ibid SP83-SP89.
- 12) Makoto Shirai, Ken Sakurai, Wataru Saitoh, Takuya Matsuyama, Munehiro Teranishi, Tadashi Furukawa, Atsushi Sanbuissho and Sunao Manabe. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 8) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of Anastrozole in female rats. Ibid SP91-SP99.
- 13) Eiji Wato, Masato Asahiyama, Ai Suzuki, Shino Funyu and Yukinori Amano. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 9) Effects of 2- or 4-week repeated dose studies and fertility study of di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) in female rats. Ibid SP101-SP109.
- 14) Ryo Takai, Shuji Hayashi, Junpei Kiyokawa, Yoshika Iwata, Saori Matsuo, Masami Suzuki, Keiji Mizoguchi, Shuichi Chiba and Toshiaki Deki. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 10) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in female rats. Ibid SP111-SP119.
- 15) Tetsushi Dodo, Yoshikazu Taketa, Mayumi Sugiyama, Akira Inomata, Jiro Sonoda, Yasuyuki Okuda, Hiroshi Mineshima, Satoru Hosokawa and Toyohiko Aoki. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 11) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of ethylene glycol monomethyl ether in female rats. Ibid SP121-SP128.
- 16) Kenjiro Tsubota, Kiyoshi Kushima, Kenji Yamauchi, Seiki Matsuo, Tadashi Saegusa, Shin Ito, Michio Fujiwara, Masahiro Matsumoto, Shunji Nakatsuji, Jiro Seki and Yuji Oishi. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 12) Effects of 2- or 4-week repeated dose studies and fertility study of indomethacin in female rats. Ibid SP129-SP136.
- 17) Norihiro Sato, Keisuke Uchida, Mikio Nakajima, Atsushi Watanabe and Terutomo Kohira. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 13) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of PPAR α/γ dual agonist in female rats. Ibid SP137-SP146.
- 18) Hiroshi Shibayama, Takashi Kotera, Yasuhiko Shinoda, Tomohiko Hanada, Tsutomu Kajihara, Makoto Ueda, Hideyuki Tamura, Seitarou Ishibashi, Yasuhiro Yamashita and Seishi Ochi. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 14) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of atrazine in female rats. Ibid SP147-SP155.
- 19) Toshihiko Kumazawa, Atsushi Nakajima, Tsukasa Ishiguro, Zhu Jiuxin, Takashi Tanaharu, Hiromi Nishitani, Yukiko Inoue, Satoko Harada, Ikuo Hayasaka and Yoshiaki Tagawa. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 15) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of bromocriptine in female rats. Ibid SP157-SP165.
- 20) Yuko Izumi, Takeshi Watanabe, Naoko Awasaki, Kenji Hikawa, Takashi Minagi and Fumio Chatani. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 16) Effects of 2 or 4 weeks repeated dose studies and fertility study of Chlorpromazine hydrochloride in rats. Ibid SP167-SP174.
- 21) Shun-ichiro Ishii, Masayuki Ube, Miyoko Okada, Tamiko Adachi, Jiro Sugimoto, Yoshimi Inoue, Yoshifumi Uno and Mamoru Mutai. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 17) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of sulpiride in female rats. Ibid SP175-SP188.
- 22) 大野泰雄、マイクロドーズ臨床試験指針と早期探索的臨床試験への期待。臨床薬理 40, 89S-90S, 2009.
- 23) 大野泰雄、治験における新しい手法 (マイクロドーズ臨床試験)、GCPハンドブック、渡邊裕司監修、じほう社、pp22-32, 2009.

- 24) 大野泰雄：非臨床試験をめぐる新たな流れ -JaCVAMの活動を中心に- “医薬品GLPガイドブック 2009” p6-31, (財)日本薬剤師研修センター編集、薬事日報社 (2009.9.14)
- 25) Noriko Okahashi, Takashi Ikeda, Shuichi Kai, Shinichi Komatsu, Hajime Matsui, Yasuhiro Yamashita, Keiji Yamamoto and Fumio Sagami. The predictivity of preliminary embryo-fetal development (EFD) studies: results of a retrospective survey in Japanese pharmaceutical companies. *J. Toxicol. Sci.* 35:21-31, 2010.
- 26) 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)
- 27) 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)
- 28) 小島肇夫：動物実験データなしで新規医薬部外品の申請はどこまで可能か？、*BIO INDUSTRY*, 26 (8) 42-49 (2009)
- 29) 小島肇夫：皮膚・粘膜毒性、新版 トキシコロジー、日本トキシコロジー学会教育委員会編集、pp.246-254 (2009)
- 30) 小島肇夫：医薬部外品と化粧品、GLP/非GLP試験の具体的実施ポイント、技術情報、東京、pp.425-433 (2009)
- 31) 小島肇夫：REACHにおける環境影響試験、*フレグランスジャーナル* 2009-8、46-51 (2009)
- 32) 小島肇夫、新井晶子、北條麻紀：再構築培養表皮モデルを用いた遺伝毒性の評価、*コスメトロジー研究報告*、17、57-62 (2009)
- 33) 小島肇夫：現在の動物実験代替法の状況について、*LABIO21*、38、17-20 (2009)
2. 学会発表
- 1) 大野泰雄、マイクロドーズ臨床試験の安全性に関する考察、平成20年度福島学術講演会 (2009.3.4) 福島市、福島医大病院講堂
- 2) 大野泰雄、マイクロドーズ臨床試験の現状：ICH M3を視野に、日本薬物動態学会ワークショップ (2009.4.24) 東京、慶應大学
- 3) Kojima, H., Iijima, M., Matsunaga, K., Sasa, H., Itagaki, H., Okamoto, Y., Nishiyama, N., Mita I., Washida, J., Masuyama, K., Onodera, H., Masuda, M., Ohno, Y., Review of an alternative to animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients containing Quasi-drug. 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (2009.8-9) (Rome, Italy)
- 4) Inoue, T., Masuda, M., Akita, M., Kojima, H., Ohno, Y., JaCVAM statement on new alternative to animal testing. 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (2009.8-9) (Rome, Italy)
- 5) Ohno Y., Introduction of JSAAE and JaCVAM and its international cooperation with the other VAMs. ASIATOX-V. (2009.9.10) 教育講演会9:00-10:20 中华民国台湾省台北市退役軍人病院
- 6) Ohno Y., Introduction of JSAAE and JaCVAM and its international cooperation with the other VAMs. ASIATOX-V. (2009.9.11) 学会シンポジウム 11:55-12:20 中华民国台湾省台北市退役軍人病院 (前日の教育講演の内容を要約するとともに、動物実験の第三者評価を加えて講演した。)
- 7) 大野泰雄、「ICHガイドラインと安全性試験」(2) ICH-M3ガイドラインにおける主な改訂の根拠について。第三回応用トキシコロジーリカレント講座 (2009.10.1) (昭和大学薬学部吉田教授主催)
- 8) 大野泰雄、動物実験の第三者認証：動物実験代替と薬学、日本薬学会関東支部会 (2009.10.3) 城西大学坂戸校舎
- 9) 大野泰雄、ICH-M3 (臨床試験の開始に必要な前臨床試験について) の解説、ICR臨床研究入門中級編 講義 医療技術実用化総合研究事業「臨床研究ポータルサイトICRwebを用いた研究者、倫理審査委員、臨床研究専門職、市民の教育と啓発」(研究代表者 山本精一郎) (2009.10.14) 国立がんセンター、特別講義室
- 10) 大野泰雄、ICHの動物実験代替法への貢献、第

- 22回日本動物実験代替法学会 (2009.11.15) 大阪
- 11) 小島 肇: バリデーション研究とは何か? & 国際動向、JaCVAM第2回ワークショップ、東京 (2009)
 - 12) 小島 肇: 培養皮膚モデルバリデーション研究、JaCVAM第2回ワークショップ、東京 (2009)
 - 13) 小島 肇: 動物実験代替法に関する国内外の動向、JALAMシンポジウム
「安全性試験における動物実験代替法—国内外の動向と代替法開発の現状—」、大宮 (2009)
 - 14) 小島 肇: 動物実験代替法における培養細胞の利用: 合同追悼シンポジウム「黒田行昭先生を偲んで」、日本組織培養学会第82回大会、栃木 (2009)
 - 15) 小島 肇: バリデーション試験の今後の予定について、コメットアッセイ国際バリデーション試験進捗報告、日本環境変異原学会 MMS研究会 第54回定例会、熱川 (2009)
 - 16) 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、第36回日本トキシコロジー学会学術年会、盛岡 (2009)
 - 17) 小島 肇: OECD Test Guideline収載モデルとしてのLabCyte EPI-MODLの可能性、皮膚基礎研究クラスターフォーラム、東京 (2009)
 - 18) Kojima, H.: 3D comet assay, JaCVAM experience, 5th International Workshop on Genotoxicity Testing, Basel (2009)
 - 19) Kojima, H., Yamakage, K., Burlinson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Corvi, R., Uno, Y., Schechtman, L., Tice, R. and Honma, M.: International validation study of the *in vitro* alkaline comet assay, 8th International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
 - 20) Nakajima, M., Masumori, S., Tanaka, J., Hayashi, M., Uno, Y., Kojima, H. and Tice, R.: An atlas of comet images: JaCVAM initiative International Validation trial for the *in vivo* comet assay, 8th International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
 - 21) Kojima, H.: Validation of innovative methods for safety testing: drawbacks and advantages of Japanese validation studies, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 22) Kojima, H., Matsui, T., Kohara, A., Yoshida, A. and Nakamura, Y.: GCCP initiatives in Japan, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 23) Ono, A., Takeyoshi, M., Bremer, S., Jacob, M., Laws, S., Sozu, T. and Kojima, H.: The International validation study for the ER alpha STTA antagonist assay using HeLa9903, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 24) Allen, D., Deal, F., Ceger, P., Gordon, J., Pazos, P., deLange, L., Bremer, S., Nakamura, M., Kojima, H., Ono, A., Tice, R. and Stokes W.: Testing of coded substances for a multi-phases international validation study of an estrogen receptor (ER) transcriptional activation (TA) assay, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 25) Kojima, H., Iijima, M., Matsunaga, K., Sasa, H., Itagaki, H., Okamoto, Y., Nishiyama, N., Mita I., Washida, J., Masuyama, K., Onodera, H., Masuda, M., Ohno, Y.: Review of an alternative to animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients using Quasi-drug, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 26) Wind, M., Blakey, D., Kojima, H., Kreysa, J. and Stokes, W.: What is the international cooperation on alternative test methods (ICATM) and what is its role?, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 27) Kojima, H.: JaCVAM's role in the 3Rs and ICATM,

- 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 28) Kojima, H. : Recent progress and future directions at JaCVAM, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 29) Inoue, T., Masuda, M., Akita, M., Kojima, H. and Ohno, Y.: JaCVAM statement on new alternative to animal testing, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 30) Takeyoshi, M., Kojima, H., Omori, T., Sozu, T. and Yoshimura, I.: Validation study for non-radioisotopic local lymph node assay based on BrdU incorporation (LLNA-BrdU), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 31) Kojima, H., Ando Y., Yamaguchi Y., Kosaka T., Suzuki T., Yuasa A., Watanabe Y., Shinoda S., Idehara K., Yoshimura I., Miyaoka E., Ishiyama K., Kato M., Omori T. : Validation of LabCyte EPI-MODEL24, an *In Vitro* Assay for Detecting Skin Irritants, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 32) Yamamoto, N., Hirano, K., Kato, M., Hata, K., Horiguchi, M., Taniguchi, K. and Kojima, H.: Cell surface marker of corneal epithelium stem cells and culture, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 33) Lowther, D., Wind, M., Stokes, W., Barroso, J., Zuang, V., Amcoff, P., Kojima, H., Prinsen, M., Tice, R., Allen, D. and McCall, D.: International acceptance of *in vitro* alternative ocular safety testing methods: the isolated chicken eye (ICE) test method (Draft OECD TG 438), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 34) Merrill, J., Wind, M., Stokes, W., Barroso, J., Zuang, V., Amcoff, P., Kojima, H., Jacobs, A., McCall, D. Allen D. and Tice, R.,: International acceptance of *in vitro* alternative ocular safety testing methods: bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test method (Draft OECD TG 437), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 35) Hayashi, M., Uno, Y., Honma, M., Schectmann, L., Tice, R., Corvi, R., Morita, T., Asano, N. and Kojima, H.: *In vivo* Comet Assay: Update on the on-Going international validation study, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 36) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schectman, L. and Hayashi, M.: International validation study of the *in vitro* alkaline comet assay, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 37) Kojima, H., Arai S. and Hojo M.: Adequate conditions for performance of comet assay using 3-dimensional human epidermal model, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 38) Stokes, W., Wind, M., Matheson, J., Jacob, A., Casati, S., Kojima, H., Allen, D., Burns, T., Salicru, E., Strickland, J. and Tice, R., Internationally harmonized performance standards (PS) for the murine local lymph node assay (LLNA), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 39) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schechtman, L. and Hayashi, M.: International validation study of the *in vitro* alkaline comet assay, 25th ICEM, Florence (2009)
- 40) Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Schechtman, L., Tice, R., Corvi, R., Morita, T., Asano, N. and Hayashi, M.,: *In vivo* Comet Assay: Update on the on-Going international validation study, 25th ICEM, Florence (2009)
- 41) 小島 肇 : 動物実験代替法における国内外の動向、日本薬学会関東支部大会、埼玉 (2009)
- 42) 小島 肇 : *In vitro*安全性・機能的評価及び作用メ