

皮膚感作性、眼刺激性、急性毒性を評価する第三者委員会が設立された。この作業に対応する目的で、粧工連内にタスクフォースが作られた。また、厚生労働科学研究班における「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会」活動が進展し、報告会が開催された。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3月が過ぎ、2013年に向けての動きが見られている。EUにおいて反復投与毒性試験代替法への多額の資金投入が決定され、また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が開始された。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) <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:EN:PDF>
- 3) <http://www.europarl.europa.eu/sides/getAllAnswers.do?reference=P-2009-1404&language=EN>
- 4) CTPA News update, February 6, 2003.
- 5) CTPA News update, March 3, 2003.
- 6) [http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/html/cosm\\_animal\\_test.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/html/cosm_animal_test.htm)
- 7) <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- 8) <http://www.acutetox.org/acutetox-news>

- 9) [http://www.sens-it-iv.eu/files/newsletter/Sens-it-iv\\_Newsletter\\_32.pdf](http://www.sens-it-iv.eu/files/newsletter/Sens-it-iv_Newsletter_32.pdf)
- 10) <http://www.predict-iv.toxi.uni-wuerzburg.de/>
- 11) [http://projects-2008.jrc.ec.europa.eu/show.gx?Object.object\\_id=PROJECTS000000003016D09](http://projects-2008.jrc.ec.europa.eu/show.gx?Object.object_id=PROJECTS000000003016D09)
- 12) [http://ecvam.jrc.it/ft\\_doc/ESAC30\\_statement\\_skin-irritation-methods-PS\\_20090409.pdf](http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC30_statement_skin-irritation-methods-PS_20090409.pdf)
- 13) [http://ecvam.jrc.it/f\\_home.cfm?voce=m&idvoce=6](http://ecvam.jrc.it/f_home.cfm?voce=m&idvoce=6)
- 14) <http://web.jrc.ec.europa.eu/callsfortender/index.cfm?action=app.showdoc&id=3634>
- 15) [http://ecvam.jrc.it/f\\_home.cfm?voce=s&idvoce=116&idmm=6&idsm=116&aperto=1](http://ecvam.jrc.it/f_home.cfm?voce=s&idvoce=116&idmm=6&idsm=116&aperto=1)
- 16) <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2008:0416:FIN:EN:PDF>
- 17) [http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index_en.htm)
- 18) [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach\\_intro.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm)
- 19) [http://ec.europa.eu/enterprise/reach/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/reach/index_en.htm)
- 20) <http://ecb.jrc.it/reach/>
- 21) <http://www.nikkakyo.org/reach/>
- 22) <http://ecb.jrc.it/testing-methods/>
- 23) De Silva, O. et al., The COLIPA research programme. Abstracts 6th World Congress 2007, 279, 2007
- 24) McNamme, 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
- 25) 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
- 26) Pfueller, S. et al., Towards animal-free genotoxicity testing: the COLIPA strategy. Abstracts 6th World Congress 2007, 66, 2007
- 27) 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
- 28) Ovigne, 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
- 29) Regul. Toxicol. Pharmacol., 2009, 54, 188-196.
- 30) Regul. Toxicol. Pharmacol., 2009, 54, 197-209.
- 31) <http://www.bfr.bund.de/>
- 32) <http://www.nc3rs.org.uk/>
- 33) <http://www.frame.org.uk/>
- 34) <http://www.forschung3r.ch/en/>
- 35) <http://www.nca-nl.org/>
- 36) <http://www.aimgroup.eu/2009/wc7/>
- 37) <http://www.estiv.org/>
- 38) <http://www.altex.ch/en/>

米国における代替法開発の動向 (C-2) 関連

- 1) Draft Implementation Plan for the 2008-2012 NICEATM-ICCVAM Five Year Plan, June 2009
- 2) [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox\\_docs/OcularPanelWebSum.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/OcularPanelWebSum.pdf), [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox\\_docs/OcularPRPRpt2009.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/OcularPRPRpt2009.pdf)
- 3) [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/LLNAPanelWebSum.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPanelWebSum.pdf), [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/LLNAPRPRpt2009.pdf#pagemode=bookmarks](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRpt2009.pdf#pagemode=bookmarks)
- 4) [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/LLNA-LD/TMER.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNA-LD/TMER.pdf)
- 5) <http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/AcuteToxWksp08/ToxWkspAgenda.pdf>
- 6) [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/acute\\_tox\\_docs/Workshop-Feb09/AcuteWkspRpt.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/acute_tox_docs/Workshop-Feb09/AcuteWkspRpt.pdf)
- 7) [http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/FR/FR\\_E8\\_5936.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/FR/FR_E8_5936.pdf)
- 8) 米国官報: Vol. 74, No. 227 /Friday, November 27, 2009 / Notices, 62317 <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/FR/FR-E9-28278.pdf>
- 9) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/pyrogen/pyrogen.htm>

10) The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, CTFA Safety Evaluation Guidelines, 2007

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](http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html)
- 2) [http://puck.sourceoecd.org/vl=5308736/cl=11/nw=1/rpsv/periodical/p15\\_about.htm?jnlissn=1607310x](http://puck.sourceoecd.org/vl=5308736/cl=11/nw=1/rpsv/periodical/p15_about.htm?jnlissn=1607310x)
- 3) <http://www.niehs.nih.gov/news/releases/2008/ocular.cfm>
- 4) [http://ecvam.jrc.it/f\\_home.cfm?voce=m&idvoce=7](http://ecvam.jrc.it/f_home.cfm?voce=m&idvoce=7)
- 5) [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna\\_PeerPanel.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna_PeerPanel.htm)
- 6) <http://jacvam.jp/effort/index.html>
- 7) <http://www.oecd.org/dataoecd/19/36/43670220.pdf>
- 8) <http://www.oecd.org/dataoecd/17/0/43325517.pdf>
- 9) <http://www.oecd.org/dataoecd/2/7/43505637.pdf>
- 10) <http://jacvam.jp/effort/icatm.html>
- 11) <http://www.mhlw.go.jp/bunya/iyakuhin/keshouhin/iccr03.html>

日本における代替法開発の動向 (C-4) の動向

- 1) Kosaka, N., Inaba, H., Okamoto, K., Mizuno, M., Sono, S., Kato, Y., Kishi, M., Ashikaga, T., Okamoto, Y., Kuwahara, H., Nakamura, T., Sakaguchi, H., and Ohno, Y. (2010) Results of the Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (5th Report): A study for evaluating preservative skin sensitization potential using h-CLAT. Alternatives to Animal Testing and Experimentation, in submitting
- 2) Okamoto, K., Kato, Y., Kosaka, N., Mizuno, M., Inaba, H., Sono, S., Ashikaga, T., Nakamura, T., Okamoto, Y., Sakaguchi, H., Kishi, M., Kuwahara, H., and Ohno, Y. (2010) Results of a Japanese ring study of human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization (6th Report): A Study for evaluating oxidative hair dye

- sensitization potential using h-CLAT.
- Alternatives to Animal Testing and Experimentation, in submitting
- 3) Sono, S., Mizuno, M., Kosaka, N., Okamoto, K., Kato, Y., Inaba, H., Nakamura, T., Kishi, M., Kuwahara, H., Sakaguchi, H., Okamoto, Y., Ashikaga, T. and Ohno, Y. (2010) A Results of a Japanese ring study of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th Report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. Alternatives to Animal Testing and Experimentation, in submitting
  - 4) <http://www.jacvam.jp/news/news091018.html>
  - 5) ECVAM, Statement of the ECVAM Science Advisory Committee (ESAC) on the Validity of *in Vitro* Tests for Skin Irritation, 2007 <http://ecvam.jrc.it/>
  - 6) OECD, OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Method, <http://www.oecd.org/dataoecd/1/59/43664841.pdf>
  - 7) 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, 第 22 回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 146, 2009.
  - 8) 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 22 回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 126, 2009.
  - 9) [http://www.jhsf.or.jp/project/doubutu\\_TOP.html](http://www.jhsf.or.jp/project/doubutu_TOP.html)
- 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](http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html))
  - 2) ZEBET - Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments (<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) Clemedson, 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](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](http://www.acutetox.org/docs/Newsletter/acutetox_newsletter_3.pdf))
  - 10) The best performing *in vitro* tests for estimation of acute oral systemic toxicity have been selected for pre-validation (<http://www.acutetox.org/acutetox-news/index.php>)
  - 11) ToxRTool - Toxicological data Reliability Assessment Tool (<http://ecvam.jrc.it/index.htm>)
  - 12) H. J. Klimisch, et. Al., A systematic Approach for Evaluating the Quality of Experimental Toxicology and

- Ecotoxicological Data. Regulatory Toxicology and Pharmacology 25, 1-5, 1997
- 13) Federal Register, 69, 61504, 2004
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) Background Review Document: *In vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity, NIH Publication No. 07-4518, November 2006
- 18) 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
- 19) [http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/FR/FR\\_E8\\_5936.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/FR/FR_E8_5936.pdf)
- 20) The U. S. Environmental Protection Agency's Strategic Plan for Evaluating the Toxicity of Chemicals (<http://www.epa.gov/osa/spc/toxicitytesting/>)
- 21) DRAFT GUIDANCE DOCUMENT ON USING CYTOTOXICITY TESTS TO ESTIMATE STARTING DOSES FOR ACUTE ORAL SYSTEMIC TOXICITY TESTS (<http://www.oecd.org/dataoecd/17/0/43325517.pdf>)
- 22) OECD GUIDANCE DOCUMENT FOR THE DERIVATION OF AN ACUTE REFERENCE CONCENTRATION (ARFC) (<http://www.oecd.org/dataoecd/2/7/43505637.pdf>)
- 23) 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 (<http://www.pmda.go.jp/operations/notice/2006/file/jimu20060719.pdf>)
- 24) The CTFA Safety Evaluation Guidelines, 2007
- 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 14<sup>th</sup> 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, OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Method, <http://www.oecd.org/dataoecd/1/59/43664841.pdf>
- 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, 第22回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 146,

- 2009.
- 9) Katoh M. et al., Assessment of human epidermal model LacCyte EPI-MODEL for *in vitro* skin irritation testing according to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-validation protocol, The Journal of Toxicological Sciences, 34, 327, 2009
  - 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) 田中憲穂ら, 酵母光生育阻害試験及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) Lelièvre 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) OECD Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, <http://www.oecdilibrary.org/oecd/content/book/9789264076303-en>
  - 3) OECD Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, <http://www.oecdilibrary.org/oecd/content/book/9789264076310-en>
  - 4) SCCS Memorandum on Alternative Test Methods in Human Health Safety Assessment of Cosmetic Ingredients in the European Union, [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/sccs\\_s\\_001.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_001.pdf)
  - 5) Independent Scientific Peer Review Panel Report: Evaluation of the Validations Status of Alternative Ocular Safety Testing Methods and Approaches, [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox\\_docs/OcularPRPRept2009.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/OcularPRPRept2009.pdf)
  - 6) <http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Testing-Methods/ANNEXV/B05web2004.pdf>
  - 7) [http://europa.eu.int/comm/health/ph\\_risk/committees/sccp/documents/out173\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out173_en.pdf)
  - 8) Gilleron, L. et al., Evaluation of a modified HET-CAM assay as a screening test for eye irritancy, Toxicol. *in vitro*, 10, 431, 1996
  - 9) Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell function based *in vitro* assays for eye irritation testing, [http://ecvam.jrc.it/publication/ESAC31\\_CBA\\_eye-irritation\\_20091005.pdf](http://ecvam.jrc.it/publication/ESAC31_CBA_eye-irritation_20091005.pdf)
  - 10) Scott, L. et al., A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, Toxicol. *in vitro*, 24, 1, 2010
  - 11) 眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書 評価対象試験: 眼に対する腐食性及び強刺激性評価のためのウシ摘出角膜の混濁及び透過性試験法
  - 12) 眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書 評価対象試験: 眼に対する腐食性及び強刺激性評価のためのニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法
  - 13) <http://www.jacvam.jp/effort/index.html>
  - 14) 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要旨集
  - 15) <http://www.colipa.eu/safety-a-science/alternative-methods-/priorities-for-research-on-alternative-methods-.html>
  - 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 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
- 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) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/rLLNA.htm>
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Ovigne, J. M. et al., (2007) The U937/CD86 harmonized *in vitro* assay protocol for the prediction of skin sensitization potential moving towards a COLIPA ring study. 6th World Congress on Alternatives to Animal Testing, 247.
- 8) 相場節也ら, 免疫毒性試験: ヒト細胞を用いたレポータージーンアッセイ系の開発, 第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会要旨集, 48-49, 2009.
- 9) OECD guidelines for testing of chemicals, 429, Paris, OECD, 2002.
- 10) 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

- 11) <http://www.jacvam.jp/effort/index.html>
- 12) [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/LLNAPRPrept2009.pdf#pagemode=bookmarks](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPrept2009.pdf#pagemode=bookmarks)
- 13) [http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en\\_2649\\_34377\\_2349687\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html)
- 14) <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/FR/FR-E9-23534.pdf>
- 15) <http://www.oecd.org/dataoecd/33/59/44279511.pdf>
- 16) Nukada Y. et al., (2009) Current database of the *in vitro* skin sensitization test; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). *Alternatives to animal experimentation*, 26, spec. issue, 351.
- 17) <http://www.asas.or.jp/jsaae/info/20100120ws.html>
- 18) Hoya, M. et al., (2009) Development of an *in vitro* photosensitization assay using human monocyte-derived cells. *Toxicology in vitro*, 23, 911-918.

#### 変異原性 (C-5-5) 関連

- 1) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS DRAFT PROPOSAL FOR A NEW 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) ICH Public Conference, ICH Japan Symposium, Tokyo, Japan, June 12, 2009

#### 反復投与毒性 (C-5-6) 関連

- 1) <http://www.healthncpnet.eu/jahia/Jahia/site/health-ncp-net/lang/en/pid/153>
- 2) <http://ecvam.jrc.it/publication/ECVAM%20Technical%20Report%202006-2007%20final.pdf>
- 3) <http://www.predictomics.com/>
- 4) <http://ecvam.jrc.it/index.htm>

#### 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/ECVAM%20Technical%20Report%202006-2007%20final.pdf>
- 4) Schwarz, M., Dencker, L., Lazzari, G., Mantovani, A. And Spielmann, H. (2009) The PeProTect project, ALTEX, 26, Spec. Issue, 175.
- 5) Akita, M. (2008). Current status and future progress of reproductive/developmental toxicity test. *Yakugaku Zasshi* 128 (5), 765-772.
- 6) 斎藤幸一, 鈴木紀之, 安藤覚, 堀江宣行 (2009) 発生毒性試験の代替法開発: 1) ES細胞を用いたレポータージーンアッセイの開発, 日本動物実験代替法学会第 22 回大会要旨集, 大阪, 50, 51.
- 7) 秋田正治, 石塚典子, 横山篤 (2009) 胎児培養法の改良, 日本動物実験代替法学会第 22 回大会, 大阪, 52, 53.
- 8) <http://lysander.sourceoecd.org/v1=14067300/cl=35/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s58/pl>
- 9) 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](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_02j.pdf)
- 4) Fujii M. et al., Review of an alternative to animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients using Quasi-drug-Skin permeation and absorption test task force-. AATEX, Suppl. 13, 235, 2008
- 5) 杉江謙一ら, 種々3次元培養皮膚モデルの物質透過性試験の代替材料としての有用性に関する検討: ヒト皮膚及びヘアレスラット皮膚との物質透過性及び皮膚組織の比較, 日本薬学会年会要旨集-4, 288, # 28Q-pm048, 2009
- 6) 杉林堅次ら, 三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた透過性試験の有用性評価, 日本動物実験代替法学会総会・学術大会要旨集,

- 156, 2009
- 7) 杉林堅次ら, 化粧品の新しい経皮吸収研究の展望, フレグランスジャーナル, 38, 53, 2010
- 8) Seki T. et al, Novel experimental system as an alternative to animal experiments to study the skin permeation of drugs, AATEX, 14, 887-897, 2009
- 9) 三木涼太郎ら, *in vitro* 経皮吸収試験の為にヒト皮膚代替人工膜に用いる合成高分子の評価, 日本薬学会年会要旨集-4, 189, # 26P-pm029, 2009
- 10) Polak S. et al., Prediction of human pharmacokinetics following dermal administration: integration of a skin absorption module to the simcyp population-based ADME simulator™, ALTEX, 26, 137-138, Special Issue: 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, abstract ABS:769, 2009
- 11) 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) Suzuki, M., Hirota, M., Hagino, S., Itagaki, H. and Aiba, S. Evaluation of changes of cell-surface thiols as a new biomarker for *in vitro* sensitization test. *Toxicol In Vitro* 23, 687-696, 2009.
- 2) Hoya, M., Hirota, M., Suzuki, M., Hagino, S., Itagaki, H. and Aiba, S. Development of an *in vitro* photosensitization assay using human monocyte-derived cells. *Toxicol In Vitro* 23, 911-918, 2009.
- 3) 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 haptens, 2, 4-dinitrochlorobenzene and nickel sulfate, *J Toxicol Sci.*, 34, 139-150, 2009.
- 4) Kagatani, S., Sasaki, Y., Hirota, M., Mizuashi, M., Suzuki, M., Ohtani, T.,

Itagaki, H. and Aiba, S. Oxidation of cell surface thiol groups by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J Invest Dermatol* 130, 175-83, 2009.

##### G-2 学会発表 (講演及び学会発表)

- 1) 小島肇, 飯島正文, 松永佳世子, 佐々齊, 板垣宏, 岡本裕子, 西山直弘, 小野寺博志, 見田活, 鷺田淳, 益山光一, 増田光輝, 大野泰雄, "医薬部外品の承認申請における安全性に関わる資料のあり方検討委員会報告", 日本動物実験代替法学会第21回大会, 2009.
- 2) Ishikawa, M., Ovigne, J-M., Ashikaga, T., Staropoli, A., Itagaki, H., Meunier, J. R. and Kohno, Y. Co-culture system between THP-1 and Episkin for a new idea of *in vitro* skin sensitization model. WC7.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし



## 分担研究報告書

### 「動物実験代替法のバリデーションと第三者評価」

研究分担者 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所

#### 研究要旨

日本で開発されたか、あるいは欧米で認証された新規動物実験代替法（以下、代替法と記す）のバリデーション研究、専門家による第三者評価および第三者評価が終了した試験法の行政的受け入れの評価について検討した。

具体的には、バリデーション研究として、培養表皮モデル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を行い、良好な結果を得た。

第三者評価については、1) 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、2) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、3) *in vitro*発熱性試験について適切な評価が実施された。

行政的な受け入れ評価として、JaCVAM 評価会議において、1) 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、2) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、3) 皮膚感作性試験 LLNA-BrdU、4) 牛摘出角膜試験による眼刺激性試験代替法および5) 鶏摘出眼球試験による眼刺激性試験代替法の評価を行い、光毒性試験を除く試験法の行政的な受け入れを推奨することになった。

#### A. 研究目的

医薬品や化粧品等の安全評価においては様々な動物実験結果が必要であるが、動物愛護の立場から、なるべく動物を使用しない試験法である動物実験代替法（以下、代替法と記す）の開発が期待されている。しかし、新しい方法への置き換えにより臨床試験志願者や患者、一般消費者に不必要なリスクを負わせることは許されない。安全性評価の観点から、新しい方法が少なくとも従来の方法と同等か、あるいはそれ以上の能力をもつことが客観的に示されてなくてはならない。

そこで、日本で開発されたか、あるいは欧米で認証された新規代替法のバリデーション研究、専門家による第三者評価および第三者評価が終了した試験法の行政的受け入れの評価について検討した。

#### B. 方法

バリデーション研究として、培養表皮モデル 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を行った。

第三者評価については、1) 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、2) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、3) *in vitro*発熱性試験 4) 細胞毒性試験による急性毒性試験代替法、5) 細胞毒性試験による眼刺激性試験代替法について評価した。

行政的な受け入れ評価として、JaCVAM 評価会議において、1) 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、2) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、3) 皮膚感作性試験 LLNA-BrdU、4) 牛摘出角膜試験による眼刺激性試験代替法および5) 鶏摘出眼球試験による眼刺激性試験代替法の評価を行った。

#### C. 結果および考察

平成21年度は、バリデーション研究として、LabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究を行い、良好な結果を得た。

専門家による第三者評価では、1) 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、2) 培養表皮モデルを用

いた皮膚刺激性試験代替法、3) in vitro発熱性物質試験評価を行い、適切な評価が実施された。また、4) 細胞毒性試験による急性毒性試験代替法、5) 細胞毒性試験による眼刺激性試験代替法の評価を実施中である。

行政的な受入れ評価として、JaCVAM評価会議において、1) 酵母生育阻害試験と赤血球光溶解性試験を組み合わせた光毒性試験代替法、2) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、3) 皮膚感作性試験としてLLNA-BrdU法、4) 牛摘出角膜試験による眼刺激性試験、5) 鶏摘出眼球試験による眼刺激性試験の評価を行い、光毒性試験を除く試験法の行政的な受入れを推奨することになった。

これらの研究報告を以下に順に示す。

#### C. 健康危険情報

なし

#### D. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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)
  - 2) 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)
  - 3) 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)
  - 4) 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)
  - 5) 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)
  - 6) 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)
  - 7) 小島肇夫：薬用化粧品の承認取得における安全性試験をめぐる問題点、医薬部外品有効成分承認取得のための対策と課題、*フレグランスジャーナル*社、48-58 (2010)
  - 8) 小島肇夫：医薬部外品の製造販売承認申請における安全性試験の資料に関するあり方検討会報告、*日皮協ジャーナル*、32、82-91 (2010)
2. 学会発表
  - 1) 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)
  - 2) 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)
  - 3) 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)
  - 4) 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)
  - 5) 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)
  - 6) 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)
  - 7) 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)
  - 8) Kojima, H. : 3D comet assay, JaCVAM experience, 5<sup>th</sup> International Workshop on Genotoxicity Testing, Basel (2009)
  - 9) 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, 8<sup>th</sup> International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
  - 10) 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, 8<sup>th</sup> International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
  - 11) Kojima, H. : Validation of innovative methods for safety testing: drawbacks

- and advantages of Japanese validation studies, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 12) Kojima, H., Matsui, T., Kohara, A., Yoshida, A. and Nakamura, Y.: GCCP initiatives in Japan, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
  - 13) 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, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
  - 14) 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, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
  - 15) 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, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
  - 16) 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?, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
  - 17) Kojima, H.: JaCVAM's role in the 3Rs and ICATM, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
  - 18) Kojima, H.: Recent progress and future directions at JaCVAM, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
  - 19) Inoue, T., Masuda, M., Akita, M., Kojima, H. and Ohno, Y.: JaCVAM statement on new alternative to animal testing, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
  - 20) 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), 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
  - 21) 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, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
  - 22) 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, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
  - 23) 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), 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
  - 24) 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), 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
  - 25) 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, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
  - 26) 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, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 27) Kojima, H., Arai S. and Hojo M.: Adequate conditions for performance of comet assay using 3-dimensional human epidermal model, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 28) 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), 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 29) 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, 25<sup>th</sup> ICEM, Florence (2009)
- 30) 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, 25<sup>th</sup> ICEM, Florence (2009)
- 31) 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)
- 32) 小島 肇: In vitro 安全性・機能性評価および作用メカニズム・新規物質探索研究の最前線、第 22 回動物細胞工学シンポジウム、東京 (2009)
- 33) 小島 肇: 医薬部外品の承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会、日本産業皮膚衛生協会 秋季研修会、京都 (2009)
- 34) Kojima, H.: Japanese views in the 3Rs in the 21st century, ZEBET's 20th Anniversary Symposium, Berlin, Germany (2009)
- 35) Kojima, H.: Organization of JaCVAM and its activity, KoCVAM International Symposium and 6th Congress of KSAEA, Seoul (2009)
- 36) Kojima, H.: Utilization of an alternative to animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients using Quasi-drug, The 17th ICDS (International Contact Dermatitis Symposium) and the 10th APEODS (Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium), Kyoto (2009)
- 37) Kojima, H.: Japanese approach to regulatory acceptance of new skin sensitization testings with considerations to animal welfare and 3Rs, The 17th ICDS (International Contact Dermatitis Symposium) and the 10th APEODS (Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium), Kyoto (2009)
- 38) 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 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 39) 小島 肇, 飯島正文, 松永佳世子, 佐々斉, 板垣 宏, 岡本裕子, 西山直宏, 小野寺博志, 見田 活, 鷺田 淳, 益山光一, 増田光輝, 大野泰雄: 医薬部外品の承認申請における安全性に関わる資料のあり方検討委員会報告、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 40) 小島 肇, 井上 達, 増田光輝, 秋田正治, 大野泰雄: 動物実験代替法公定化のための JaCVAM 提案書、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 41) 小野 敦, 武吉正博, Susanne Bremer, Miriam Jacob, Susan C. Laws, 寒水孝司, 小島 肇: HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体転写活性化試験によるアンタゴニスト検出法の国際バリデーション、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 42) 本間正充, 山影康次, Burlinson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., 林 真, 中嶋圓, 鈴木雅也, Corvi, R., 宇野芳文, Schechtman, L., Tice, R., 小島 肇: In vitro アルカリコメットアッセイ国際バリデーション研究、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 43) 小島 肇, 笠松俊夫: IWGT 報告 トピックス 3: 予測性の高い in vitro 試験の提案、日本環境変異原学会第 38 回大会、清

- 水・静岡 (2009)
- 44) 中嶋圓、小島 肇、宇野芳文、本間正充、林 真：コメットアッセイの国際バリデーション、日本環境変異原学会第38回大会、清水・静岡 (2009)
- 45) 小島 肇、北條麻紀、新井晶子：3次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイと細胞毒性の関係、日本環境変異原学会第38回大会、清水・静岡 (2009)
- 46) JaCVAM：コメットアッセイ国際バリデーションプロジェクトチーム：インビボコメットアッセイ：JaCVAM 国際バリデーション試験の進捗状況報告、日本環境変異原学会第38回大会、清水・静岡 (2009)
- 47) 伊藤正俊、関東裕美、鷺崎久美子、松永佳世子、矢上晶子、中川真美子、加藤則人、河合恵一、滝脇弘嗣、吉村 功、小島 肇：パッチテストによる皮膚一次刺激性評価 (2)、第39回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、京都 (2009)
- 48) 中村昌文、半田洋士、小野 敦、小島 肇：Lumi-cell ER アッセイ法の国際バリデーション (第二報)、第12回環境ホルモン学会研究発表会、東京 (2009)
- 49) 小島 肇、飯島正文、松永佳世子、佐々育、板垣 宏、岡本裕子、西山直宏、小野寺博志、見田 活、鷺田 淳、益山光一、増田光輝、大野泰雄：あり方検討会設立の経緯および動物実験代替法の現状、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資料のあり方検討委員会報告、東京 (2009)
- 50) 山本直樹、平野耕治、谷川篤宏、加藤雅一、嶋賢一郎、小島 肇、綾木雅彦、堀口正之、谷口孝喜：角膜上皮細胞における組織幹細胞マーカーの検索と初代分離培養法および遺伝子導入法の検討、日本組織培養学会第82回大会、栃木 (2009)
- 51) 山本直樹、平野耕治、谷川篤宏、加藤雅一、嶋賢一郎、小島 肇、綾木雅彦、堀口正之、谷口孝喜：角膜上皮細胞の組織幹細胞マーカーと初代分離培養法および遺伝子導入法の検討、第41回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、神戸 (2009)
- 52) 小島 肇：今後の展望、JaCVAM 第3回ワークショップ、h-CLAT シンポジウム、東京 (2010)
- 53) Kojima, H., Arai, S. and Hojyo, M. : Adequate conditions for performance of comet assay using 3-dimensional human epidermal model, 49<sup>th</sup> Annual SOT meeting, Salt Lake City (2010)
- 54) Stokes, W., Wind, M., Blakey, D., Kreysa, J., Kojima, H., Anklam E. : Establishment of the International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM) and Its Role in the Validation and Regulatory Acceptance of Globally Harmonized Safety Assessment Methods, 49<sup>th</sup> Annual SOT meeting, Salt Lake City (2010)
- 55) Ceger, P., Deal, F., Allen, D., Clark, G., Pazos, P., de Lange, J., Bremer, S., Nakamura, M., Kojima, H., Ono, A., Tice, R., Stokes, W. : Testing of Coded Substances in the NICEATM/ECVAM/JaCVAM LUMI-CELL<sup>®</sup> STTA Multiphase International Validation Study, 49<sup>th</sup> Annual SOT meeting, Salt Lake City (2010)

## 1) 培養表皮モデル 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

### 研究要旨

平成20年度、LabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激性試験代替法の多施設バリデーション研究が、日本動物実験代替法学会で組織されたバリデーション実行委員会にて実施された。本年度は、評価指標をMTTアッセイによる細胞毒性に絞り、6物質を用いた追加バリデーションを実施し、良い施設間再現性を得た。

### A. 研究目的

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 は、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (J-TEC) が開発したヒト 3 次元培養モデルである。このモデルを用いた皮膚刺激性試験代替法の開発が進められている。平成 20 年度、日本動物実験代替法学会では、バリデーション実行委員会を組織して、LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験で得られる皮膚刺激性の判定が、(1) 複数の施設間での程度一致するか (施設間再現性)、(2) 海外で先行して開発が進められた別の皮膚刺激性試験代替法である EPISKIN で得られた判定結果とどの程度一致するか (同等性)、(3) 動物実験結果とどの程度一致するか (代替可能性)、という 3 つの課題を検討するためにバリデーション研究を実施した。その結果、代替の可能性は J-TEC が提唱した結果とほぼ同程度であり、再現性が高いと考察された。EPISKIN との同等性については、特異度は同程度であるが、感度がやや劣る可能性があると考えられた。

本年度は、さらに ECVAM (欧州動物実験代替法検証センター) によってなされた皮膚刺激性試験代替法に関する performance standard の変更を受け、それらの基準に合わせるため新たな被験物質を用いた追加バリデーション (第二次) を実施した。

### B. 研究方法

第一次バリデーションに参加した7施設の協力を得て第二次バリデーションを行うことになった。皮膚刺激基準の変更に伴い改定された ECVAM performance standard に新たに記載された6被験物質をコード化して配布し、2009年4月より開始し、6月に終了した。被験物質処理後、細胞毒性の指標として MTT アッセイを用いた。

判定方法は、プロトコールに従い

(1)  $OD_{550}$  が 0.7 より小さい、または陽性対照の細胞生存率が 40% より大きい場合には「実

験不成立」、そうでなければ「実験が成立」として (2) へ

(2) (1) で実験が成立した場合に、被験物質の細胞生存率が 50% 以下の場合には「皮膚刺激性あり」と判定とした。

第一次バリデーション研究で用いた IL (インターロイキン) -1 $\alpha$  は測定指標としなかった。

### C. 結果と考察

7施設において、6物質により得られた結果では、すべての施設がすべての物質を皮膚刺激性ありと判断した。

第一次バリデーションで得られた結果から、IL-1 $\alpha$  で判定が覆るデータは 4 点しかなく、ばらつきを大きくするだけであるとの見解で一致をみた。25 物質中、22 物質は判定に食い違いがなく、全体として施設間再現性は良好であった。代替の可能性としては、平均感度が 83.3%、特異度が 73.1% であり、ECVAM が定めた基準を満たしていた (資料 1 参照)。

in vitro 皮膚刺激性試験に関する OECD ガイドラインの動向として、① EPISKIN の指標が MTT アッセイのみになった、② in vivo データの分類が EU 分類から GHS 基準となった、③ EPISKIN 以外にも EpiDerm や SkinEthics が提案されている (資料 2 および 3)。一方、本バリデーション研究の結果を受けた報告書 (資料 1) 等を日本動物実験代替法学会に委託して第三者評価が実施されるとともに、OECD (経済開発協力機構) にも提出した。現在、OECD 主催の第三者評価が進んでいる。

### D. 結論

本研究および第一次バリデーション研究で得られた結果から、LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法の施設間再現性は良好であった。代替の可能性としては、平均感度が 83.3%、特異度が 73.1% であり、ECVAM が定めた基準を満たしていた。

E. 資料

- 資料 1-1 VALIDATION STUDY OF IN VITRO SKIN IRRITATION TEST USING LABCYTE EPI-MODEL 24 ( FINAL REPORT)
- 資料 1-2 VALIDATION STUDY OF IN VITRO SKIN IRRITATION TEST USING LABCYTE EPI-MODEL 24 ( 2<sup>ND</sup> VALIDATION REPORT)
- 資料 1-3 Study Plan for a validation of the cytotoxicity test using 3-dimensional skin model, LabCyte as an alternative to the Draize skin irritation test
- 資料 1-4 VALIDATION OF THE SKIN IRRITATION TEST ASSAY USING THE RECONSTRUCTED HUMAN MODEL "LABCYTE EPI-MODEL24" . SOP

**JSAAE REPORT:**

**VALIDATION STUDY OF IN VITRO SKIN IRRITATION TEST  
USING LABCYTE EPI-MODEL 24 ( FINAL REPORT)**

**AUGUST 5, 2009**

**LABCYTE VALIDATION MANAGEMENT TEAM**



## MEMBERS OF LABCYTE VALIDATION MANAGEMENT TEAM

Mr. Hajime Kojima, JaCVAM: Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods  
Mr. Takashi Omori; Kyoto Univ.

Mr. Kenji Idehara; Daicel Chemical Co.

Mr. Isao Yoshimura; Tokyo University of Science

Mr. Etsuyoshi Miyaoka; Tokyo University of Science

Mr. Masakazu Kato; Japan Tissue Engineering Co. Ltd.

Mr. Toshiro Yokouchi; Japan Tissue Engineering Co. Ltd.

### **Participant laboratories**

- Aiken Co., Ltd. (Ms Yoko Ando and Ms Yui Asako)
- KOBAYASHI Pharmaceutical Co., Ltd. (Mr. Yoshihiro Yamaguchi and Ms Maki Nakamura)
- The Institute of Environmental Toxicology (Mr Tadashi Kosaka and Mr Koichi hayashi)
- Fancl Corp. (Ms. Tamie Suzuki and Ms Runa Izumi)
- FUJIFILM Corporation (Ms. Atsuko Yuasa, and Mr Shinichi Akimoto)
- Maruishi Pharmaceutical Co., Ltd. (Mr Yukihiro Watanabe and Mr Osamu Mitani)
- Drug Safety Testing Center Co., Ltd. (Mr Shinsuke Shinoda and Ms Saori Hagiwara)

## Contents

<b>1. Goal Statement</b>	<b>5</b>
<b>2. Objective</b>	<b>5</b>
<b>3. Test Methods</b>	<b>5</b>
3-1. Reconstructed human cultured dermal model	
3-2. Model supplier	
<b>4. Validation Management Structure</b>	<b>6</b>
4-1. Validation Management Team	
4-2. Chemical selection, acquisition, coding and distribution	
4-3. Independent biostatisticians	
4-4. Participating laboratories	
4-5. Sponsorship	
<b>5. Study Design</b>	<b>8</b>
<b>6. Test Chemicals</b>	<b>8</b>
6-1. Chemical selection	
6-2. Deficit chemical	
6-3. Chemical coding and distribution	
<b>7. Protocol</b>	<b>10</b>
7-1. Protocol of the skin irritation test with LabCyte EPI-MODEL24	
7-2. Prediction model of skin irritation	
7-3. Difference between LabCyte EPI-MODEL 24 protocol and EPISKIN protocol	
7-4. Data collection, handling, and analysis	
7-5. Quality assurance, GLP	
<b>8. Results</b>	<b>12</b>
8-1. 1 <sup>st</sup> Phase	
8-1-1. Negative Control	
8-1-2. Positive control and test chemicals	
8-2. 2 <sup>nd</sup> phase & 3 <sup>rd</sup> phase	<b>13</b>
8-2-1. Comments on the Datasheets	
8-2-2. Negative control	
8-2-3. Positive control	
8-2-4. Skin irritation test by cell viability	
8-2-5. IL-1 $\alpha$	
8-2-6. Classification of three independent viabilities at each laboratory	
<b>9. Discussion</b>	<b>31</b>
9-1. Reliability	
9-2. Predictivity	

10. Conclusions	-----	32
11. Acknowledgements	-----	32
12. References	-----	33

**Appendix:**

1. ESAC statement on the validity of in-vitro tests for skin irritation (2007)
2. ESAC STATEMENT ON THE SCIENTIFIC VALIDITY OF IN-VITRO TESTS FOR SKIN IRRITATION TESTING (2008)
3. ESAC STATEMENT ON THE PERFORMANCE UNDER UN GHS OF THREE IN-VITRO ASSAYS FOR SKIN IRRITATION TESTING AND THE ADAPTATION OF THE REFERENCE CHEMICALS AND DEFINED ACCURACY VALUES OF THE ECVAM SKIN IRRITATION PERFORMANCE STANDARDS (2009)
4. Masakazu Katoh, Fumiyasu Hamajima, Takahiro Ogasawara, and Ken-ichiro Hata (2009) Assessment of the Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to the ECVAM-Validated Protocol , Journal of Toxicological Science, 34(3) 327-334.
5. ECVAM SIVS: Performance standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing (2007)
6. Skin Irritation test protocol using the reconstructed human model "LabCyte EPI-MODEL24" (ver.6.1)
7. JSAAE REPORT: VALIDATION STUDY OF IN VITRO SKIN IRRITATION TEST USING LABCYTE EPI-MODEL 24 ( 1<sup>ST</sup> REPORT)
8. JSAAE REPORT: VALIDATION STUDY OF IN VITRO SKIN IRRITATION TEST USING LABCYTE EPI-MODEL 24 ( 2<sup>ND</sup> REPORT)

## 1. Goal statement

- The aim of this study was to validate *in vitro* skin irritation tests in a formal inter-laboratory study, the ultimate goal of the test strategy will be to replace the regulatory Draize skin irritation test according OECD TG 404 (OECD, 2002).
- The primary goal of this validation study was an evaluation of the ability of the *in vitro* tests to reliably discriminate skin irritant (I) from non-irritant (NI) chemicals, as defined according to the OECD and United Nations proposal for Globally Harmonised System (GHS) for the classification and labelling of skin irritation (category 1/category 2; no category; Anon., 2003).

## 2. Objective

The *in vitro* test system, employing reconstructed human epidermis model (RhE: LabCyte EPI-MODEL24), has progressed through protocol optimisation as *in vitro* skin irritation test. The multi-laboratory assessment of this system performed based on the a few ECVAM performance standards (ESAC statement, 2007, 2008, 2009: Appendix 1 to 3). This report shows the results of 3<sup>rd</sup> phase validation study in accordance with the revised reference chemicals described by the new ESAC statement 2009.

The present objective was to conduct a validation study to assess the reliability (reproducibility within and between laboratories) and relevance (predictive capacity) of this test system with a challenging set of coded 25 test chemicals for which high quality *in vivo* data were available. The validation study was undertaken in accordance with the principles and criteria documented in the OECD *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (No. 34, OECD, 2005) and according to the Modular Approach to validation (Hartung *et al.* 2004).

## 3. Test Method

### 3-1. Reconstructed human cultured epidermal model

LabCyte EPI-MODEL24 is a new, commercially available RhE model produced by Japan Tissue Engineering Co. Ltd. It consists of normal human epidermal keratinocytes whose biological origin is neonate foreskin. In order to expand human keratinocytes while maintaining their phenotype, they were cultured with 3T3-J2 cells as a feeder layer (Rheinwald and Green, 1975; Green, 1978). Reconstruction of human cultured epidermis is achieved by cultivating and proliferating keratinocytes on an inert filter substrate (surface 0.3 cm<sup>2</sup>) at the air-liquid interface for 13 days with an optimized medium containing 5% fetal bovine serum. It constructs a multilayer structure consisting of a fully differentiated epithelium with features of the normal human epidermis, including a stratum corneum. LabCyte EPI-MODEL24 is embedded in an agarose gel containing nutrient solution and shipped in 24-well plates at around 18°C (Kato, 2009: Appendix 4).

### 3-2. MODEL SUPPLIER

According to OECD GLP Consensus Document No.5 "*Compliance of Laboratory Suppliers with GLP Principles*" the responsibility for the quality and fitness for use of equipment and materials rests entirely with the management of the test facility (OECD, 1999).

The acceptability of equipment and materials in laboratories complying with GLP-like principles should therefore be guaranteed to any regulatory authority to which studies were submitted. In some countries where GLP has been implemented, suppliers belong to national regulatory or voluntary accreditation schemes (for laboratory animals) which can provide users with additional documentary evidence that they are using a test system of a defined quality.

The audits focused on the procedures established to guarantee a defined quality of the tissue models.