

\* 日局エンドトキシン試験の実施が不可能であった事例について

経験あり：8社

経験なし：24社

\* 日局エンドトキシン試験の実施が不可能であった事例の内訳

事例	要因	薬効分類等	事例を確認した試験法	日局発熱性物質試験法の適用可否
反応阻害	アルミニウムゲルのため	(非公開)	比色法	不明
反応阻害	リボソームのため	(非公開)	ゲル化法	試験可能
反応阻害	原薬の酵素阻害作用のため	蛋白分解酵素阻害剤	ゲル化法 比濁法	試験可能
反応阻害	エマルジョン製剤であり、水層と油層の分離が困難	中枢神経系用薬	ゲル化法	試験可能
反応阻害	原薬の酵素阻害作用のため	蛋白分解酵素阻害剤	ゲル化法 比濁法 比色法	試験可能
反応阻害	リボソームのため	(非公開)	ゲル化法 比濁法 比色法	試験可能
反応促進	タンパクのため	血漿分画製剤	ゲル化法	試験可能
反応阻害	リボソームのため	抗生物質製剤	不明	試験可能

\* 日局発熱性物質試験の実施が不可能であった事例について

経験あり：3社

経験なし：21社

\* 日局発熱性物質試験の実施が不可能であった事例の内訳

事例	薬効分類等	日局エンドトキシン試験法の適用可否
発熱作用あり	制癌剤	試験可能
ウイルスの性状に起因した発熱作用	生物学的製剤	試験可能
抗発熱作用(阻害)	アミノ酸	不明

\* *in vitro* 発熱性物質試験(エンドトキシン試験以外)の実施経験について

経験あり：0社

経験なし：36社

\* エンドトキシン試験, 発熱性物質試験, *in vitro* 発熱性物質試験についての意見

意見あり：17社

意見なし：19社

\* エンドトキシン試験, 発熱性物質試験, *in vitro* 発熱性物質試験についての意見

- ・ウサギを使った眼刺激性試験と同様, 可能であれば *in vitro* 試験に変更すべき.
- ・局方で発熱性物質試験を規定されていない限りは, (新たな開発品に対して) 発熱性物質試験規格は設定せず, エンドトキシン試験規格を設定する方針.
- ・実施経験がないが, 今後必要となった場合には *in vitro* 試験での評価系が確立されていれば有用と考える.
- ・*in vitro* 発熱性物質試験について検討を考えた. 具体的な手順等を教えて頂ければありがたい.

- ・輸液用ゴム栓以外の発熱性評価は、エンドトキシン試験で十分評価できると考える。  
また、動物愛護の観点から動物の使用を削減し代替法の導入が推奨されている。従って、輸液用ゴム栓以外の発熱性物質試験は必要ないと考える。
  - ・発熱性物質試験はゴム栓で外部へ試験委託を行ってきたが、ここ3年間は行っていない。
  - ・日局一般試験法、輸液用ゴム栓試験法および医薬品各条の一部に規定されている発熱性物質試験について、エンドトキシン試験への置き換えを要望する。
  - ・今回の趣旨とは異なるが、日・EU相互承認協定(MRA)締結内容に早期の無菌医薬品および生物学的製剤の追加を望む。
  - ・動物愛護と試験の効率化の観点から、発熱性物質試験からエンドトキシン試験への変更や、新規品目については開発当初からエンドトキシン試験を設定する事例が多いと考える。エンドトキシンは最も強力な発熱性物質に相違ないが、エンドトキシン試験では検出できない発熱性物質の存在を否定するために、エンドトキシン試験導入前に、発熱性物質試験においても問題ない結果が得られることを確認しておくことは重要と考える。
  - ・発熱性物質試験の早期国際調和(EP, USP, JP)を希望する。
  - ・エンドトキシン試験は、エンドトキシン以外の発熱性物質を検出できない課題がある一方、発熱性物質試験は感度が低く、動物愛護の面での問題も多い。よって、*in vitro* 発熱性物質試験が、将来にこれらの問題を解決する有力な手段であるならば、業界として積極的に導入することを期待する。
  - ・発熱性物質試験について、当施設では、日局準拠ではないが、ほぼ同等の手順による「医療機器の生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について(事務連絡 医療機器審査 No. 36)」に基づき、医療機器の中間・最終製品もしくは原料・部材の安全性を評価する目的でウサギを用いた発熱性物質試験を実施している。医療機器の安全性評価の一環として実施する発熱性物質試験は、医療機器または原材料から抽出した抽出液中に、エンドトキシンおよび非エンドトキシン性発熱性物質が存在しないことを確認することを目的としており、特に、ウサギを用いた試験は化学物質等による「非エンドトキシン性発熱性物質」を検出する方法として、医療機器の承認・認証申請において審査当局から試験実施が規定されている。現在、公知の代替方法がないために、当施設では医療機器の安全性評価においてウサギを使用しており、動物愛護の面からも *in vitro* 発熱性物質試験のような動物を使用しない代替方法が受け入れられ、選択肢の1つとして拡充することに期待する。
  - ・エンドトキシン試験は、比濁時間分析法で定量的にエンドトキシン濃度が判明するので、工程におけるエンドトキシン汚染の迅速管理に有効であることと、動物愛護的観点と動物飼育経費の削減に寄与してきた。また、発熱性物質試験は発熱増強活性<sup>(1)</sup>がない製剤に関しては、エンドトキシン試験に移行している。  
(<sup>(1)</sup>: 発熱性物質試験を実施したとき、製剤に0.5 EU/mLになるようにエンドトキシンを加えた液が、生理食塩液に0.5 EU/mLになるようにエンドトキシンを加えた対照液に比べて有意に発熱性を認めた場合、発熱増強活性があるものと判断。)
- in vitro* 発熱性物質試験の話題に変えると、ヒト単球を用いていることから、糖濃度が高いと、末梢血単球からのインターロイキン8(好中球、Tリンパ球に選択時に働く走化性因子である)の分泌が低下し、白血球の遊走能が低下することが知られている。このことから、製剤の成分が単球のサイトカインの分泌制御に影響し、*in vitro* 発熱性物質試験にも反応阻害などに対する反応干渉因子試験は必要なものと考えられる。
- また、*in vitro* 発熱性物質試験は、生きた単球の安定供給、バイオハザード的観点にも問題があり、工程管理のためのエンドトキシン試験も含めてすべての試験を *in vitro* 発熱性物質試験に切り替えるのは疑問である。
- 医療用具および医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドラインに記載されている発熱性物質試験は、医療用具又は医用材料から抽出した抽出液中に、材料に由来するエンドトキシン以外の発熱性物質が存在しないことを確認する試験と記載されている。(エンドトキシンを確認するには、エンドトキシン試験が別途必要)。この観点からすると、医療機器の発熱性物質試験をエンドトキシン試験に置き換えるには、生産している製品材料に文献的に既知の発熱性化学物質(例えば、ゴムの老化防止剤 *n*-phenyl- $\beta$ -naphthylamine, aldol- $\alpha$ -naphthylamine(現在は使用禁止)など)が含まれないことを確認して、試験法をエンドトキシン試験法に変更していく必要があると考える。よって、*in vitro* 発熱性物質試験が化学物質の発熱性を確認する手段となれば、医療用具の(材料に由来するエンドトキシン以外の発熱性物質が存在しないことの確認を目的とした)発熱性物質試験の有効な代替法になるものと考えます。
- ・有限かつ高価な天然物試薬であるライセート試薬の低減化として、日局規定の各種試験の試験回数規定を試験の信頼性を欠くことなく最小限での試験を認めて欲しい。  
(例えば)  
(ゲル化法予備試験のライセート試薬の表示感度試験)  
エンドトキシン標準原液を現行4濃度から3濃度以上とし、繰返し4回を3回以上とする。  
(ゲル化法予備試験の反応干渉因子試験)

添加エンドトキシン濃度を現行 4 濃度から 3 濃度以上とし、繰返し回数を現行 2 および 4 回をすべて 2 回以上とする。

(ゲル化法限度試験法) エンドトキシン無添加の陰性試験を現行 2 回から 1 回以上とする。

(ゲル化法定量試験法)

現行エンドトキシン希釈倍数を 4 条件から 3 条件以上とする。エンドトキシン無添加の陰性試験を現行 2 回から 1 回以上とする。

(比濁法の予備試験の反応干渉因子試験)

エンドトキシン添加濃度を現行 3 濃度から 2 濃度以上とする。

- 日局では発熱性物質試験よりもエンドトキシン試験が優先される規定になっているが、このような規定が出来る以前に製造販売承認を取得した注射剤には、未だに発熱性物質試験が設定された製品が多い。一般の注射剤等で考えられる微生物汚染は、製造工程での水棲菌(主にグラム陰性菌)によるものが殆どと考えられるため、原料等がエンドトキシン以外の発熱性物質で汚染される可能性があるもの以外は、速やかにエンドトキシン試験へ変更できるよう(変更申請時に必要とされるデータの簡略化を)考慮すべきと考える。発熱性物質試験も動物を使用しない方法が良いと思うが、日常試験として実施するには、今回のようなヒト血液を用いる方法では、その入手方法やバイオハザード対策等で不安がある。動物を使用せずに代替するのであれば、輸液用ゴム栓などでは(輸液用プラスチック容器試験法からプラスチック製医薬品容器試験法への改正時のように)発熱だけに絞ったものでなく、既に日局にも収載されている細胞毒性試験などで代替することは出来ないか。
- 発熱性物質試験からエンドトキシン試験へ試験法を代替する場合に過剰な実験動物データを必要とされるため代替が困難である。現在検討されている *in vitro* 発熱性物質試験には、どのようなものがあるかご教示ください。
- ライセート試薬を使用しているが、高価な試薬なので安価になれば良いと思う。比濁法で実施しているが、試験管も使い捨てのため Reuse できる洗浄方法などがあれば良いと思う。
- 輸液用ゴム栓試験での発熱性物質試験はエンドトキシン試験への代替が可能なのか？

以上

## 5) 酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験代替法の行政的な受け入れのための評価

### 研究要旨

JaCVAM 評価会議は、酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験代替法に関しては、評価会議が推奨した結果が得られるまで行政的な提案を行わないと結論した。

### A. 研究目的

光毒性試験代替法である酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験代替法について、第三者評価委員会からの報告を受け、審議した。

### B. 研究方法

#### B-1. メンバー

平成 20 年度から、以下のメンバーを 2009-2010 年評価会議委員として要請し、第三者評価報告書内容を資料として用い、行政的な受け入れについて評価した。

(議長)

井上 達 (国立医薬品食品衛生研究所)

(委員)

田中憲穂 (食品薬品安全センター 秦野研究所)

吉田武美 (昭和大学薬学部)

横関博雄 (東京医科歯科大学)

中村和市 (日本製薬工業協会)

小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)

吉田 緑 (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 病理部)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部)

吉村 功 (東京理科大学) \*

岡本裕子 (日本化粧品工業連合会) \*

\* : バリデーション関係者のため、本評価に関してはオブザーバー

#### B-2. 評価方法

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験代替法について、第三者評価委員会からの報告を受け、7 項目について審議した。

### C. 結果および考察

1. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデータは、透明で独立な評価を受けているか。

バリデーション結果は、厚生労働科学研究報告書には掲載されており、すでに公表されている。開発者の報告は論文になっているが、バリデーション研究の論文はない。

本評価は、独立した専門家による第三者評価機関によってなされた。

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

- ・ 難水溶性物質の評価が長所と挙げられているが、そのためのデータが少ない。一致度は 70% 程度である。
- ・ 3T3-NRU との直接的な比較はなされていない。

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

- ・ ハザード評価に有用である。リスク評価には利用できない。
- ・ 偽陰性が少なく、偽陽性が多い。

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

バリデーション研究に用いた被験物質が少ないので、適用条件の詳細を明記できない。

5. 当該試験法は、プロトコールの微細な変更に対して十分頑健で、適切な訓練経験を持つ担当者と適切な設備のある施設

において、技術習得が容易なものであるか。

- ・ 技術習得は容易である。
- ・ プロトコールの微細な変更に対する頑健性は不明である。
- ・ 特殊な機器は必要ない(ソーラシミュレーターを除く)。

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

- ・ 時間と手間が掛かる。
- ・ 経済的にはメリットがある。
- ・ 偽陰性が少ない点で行政的な利点がある。

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

- ・ 科学的には異なる指標を組み合わせることで、偽陰性が少なくなることから妥当である。
- ・ 動物実験と比較して、倫理的に妥当である。
- ・ 経済的には安価になる。

8. 試験法への推奨

- ・ バリデーション結果が不足している。
- ・ 確定したプロトコールで多数の被験

物質を用いた検証が必要である。

- ・ 難水溶性物質に有用であることを示す必要がある。

#### D. 結論

以上の審議の結果、JaCVAM 評価会議は、酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験代替法に関しては、評価会議が推奨した結果が得られるまで行政的な提案を行わないと結論した。

#### 参考文献

- 1) 酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる 光毒性試験代替法の第三者評価報告書
- 2) OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO (2005) 14

6) 眼刺激性試験代替法であるウシ摘出角膜の混濁および透過性試験 (BCOP 法 : Bovine Corneal Opacity and Permeability Test) の行政的な受け入れのための評価

研究要旨

JaCVAM 評価会議は、眼刺激性試験代替法であるウシ摘出角膜の混濁および透過性試験 (BCOP 法 : Bovine Corneal Opacity and Permeability Test) を定められた方法で注意点を適切に守って利用すれば、化学物質の眼に対する腐食性・強刺激性を科学的に評価できると結論した。

A. 研究目的

眼刺激性試験代替法であるウシ摘出角膜の混濁および透過性試験 (BCOP 法 : Bovine Corneal Opacity and Permeability Test) について、第三者評価委員会からの報告を受け、審議した。

B. 研究方法

B-1) メンバー

平成 20 年度から、以下のメンバーを 2009-2010 年評価会議委員として要請し、第三者評価報告書内容を資料として用い、行政的な受け入れについて評価した。

(議長)

井上 達 (国立医薬品食品衛生研究所)

(委員)

田中憲穂 (食品薬品安全センター 秦野研究所)

吉田武美 (昭和大学薬学部)

横関博雄 (東京医科歯科大学)

中村和市 (日本製薬工業協会)

小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)

吉田 緑 (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 病理部)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所  
環境衛生化学部)

吉村 功 (東京理科大学)

岡本裕子 (日本化粧品工業連合会)

B-2) 評価方法

眼刺激性試験代替法であるウシ摘出角膜の混濁および透過性試験 (BCOP 法) について、第三者評価委員会からの報告を受け、7 項目について審議した。

C. 結果および考察

1. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデータは、透明で独立な評価を受けているか。

当該試験法は、従来の眼刺激性評価法である Draize 試験法に替わり、ウシ眼球から摘出した角膜に、被験物質を暴露し、角膜に生じる物理的特性の変化から被験物質の眼刺激性を評価する方法である。

当該試験法では、角膜の濁濁度 (測定値)、角膜透過性 (測定値) を基に眼の腐食性・強刺激性を評価する。

独立した委員会 (ICCVAM)<sup>注釈1</sup>、国際的に公表された論文を集め、妥当性が認められた 8 報告 (計 161 物質) を用いた評価が公表されているので<sup>3-10)</sup>、透明で独立した評価がなされていると判断できる。

この評価データをもとに、「JaCVAM 眼刺激性試験代替法評価委員会」によって評価された。

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

Draize 試験法は、角膜評価 (肉眼判定) に重みを置いており、角膜を評価する当該試験法で眼の腐食性・強刺激性を予測することは妥当である。

すなわち、動物種により角膜の解剖学的および生理学的な違いがあるが、現在のウサギを用いた Draize 法でヒト眼への重篤な傷害を予測できると考えられていることから、ウシ角膜を用いた当該試験法でも予測できる。

当該試験法の結果の一致性については、Draize 法試験結果を基にして GHS 分類<sup>注釈2</sup>、US EPA 分類<sup>注釈3</sup>および EU 分類毎に確認したところ、その間に差はなく、GHS 分類の結果と比較して、一致度が概ね 80%であったことから、本試験法は高い予測性をもつ。

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

当該試験法は、危険有害性の識別区分への対応を目的として開発された試験法であり、ハザード評価に有用であるが、リスク評価には不適當である。

当該試験法は、暴露直後の角膜の変化を評価する方法であり、その後の回復等の評価はできない。

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

当該試験法の妥当性を示すデータとしては、合計 161 の化学物質または製品が試験され、単一の化学物質や市販品あるいは製剤など混合物が行われている。様々な化学構造、性質、性状の物質、かつ種々の刺激性強度のものが対象となっており、適用できる物質の範囲が明確である。

当該試験法は対象とする物質の腐食性・強刺激性を多くの対象物質で評価できる。ただし、アルコール類、ケトン類、性状が固体のものについての予測性能は不十分である。

当該試験法は、暴露直後の角膜の変化を評価する方法であり、その後の回復等の評価はできない。

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

当該試験法は、評価されたバリデーションにおけるプロトコールに微細な違いにも関わらず、結果の再現性は良好であったので十分頑健であると判断される。

当該試験法は簡便であり、適切な設備と訓練により、技術の習得が容易である。

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

試験費用面では Draize 法と大きな違いはないが、試験期間は短縮される。

ウサギを用いる試験では 1-21 日かかるが、本試験法では、眼球が入手できれば、5-7 時間で終了する。しかし、病理組織学的検査を実施すると時間的な差はほぼ同じである(評価報告書<sup>1)</sup> p 11)。

試験法の有用性の観点から、病理組織学的観察を組み入れることで、角膜の損傷程度についてさらに詳細に評価することが提案されているが、組織形態レベルでの影響を判定できる明確な基準の設定が必要である。なお、腐食性・強刺激性物質を判定するという目的で BCOP 法を実施する場合は、病理組織学的観察は必ずしも必要ではない。

現時点では日本国内での日常的な実施は困難であるが、国外には受託機関(2施設)があり、委託が可能である。

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

当該試験法は、既存の方法を踏襲し、かつ角膜に焦点を当てた簡便で適切な評価法であり、腐食性・強刺激性を評価する上で、科学的には既存の方法とほぼ同等である。

当該試験法は、Draize 法と比較して倫理的に優れている。

当該試験法は、経済的な動物実験代替法となる可能性があるが、日本では、ウシ眼球の日常的な入手が困難であることから、現状では海外への委託対応となる。

以上の審議の結果、JaCVAM 評価会議は、眼刺激性試験代替法(BCOP 法)を定められた方法で注意点を適切に守って利用すれば、化学物質の眼に対する腐食性・強刺激性を科学的に評価できると結論した。

#### 注釈

1. ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, USA
2. GHS: Global Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals
3. US EPA: United States Environmental Protection Agency

#### 参考文献

- 1) 眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書  
ウシ摘出角膜の混濁および透過性試験



- 2) OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO (2005) 14
- 3) Gautheron et al. (1994)
- 4) Balls et al. (1995)
- 5) Swanson et al. (1995)
- 6) Gettings et al. (1996)
- 7) Casterton et al. (1996)
- 8) Southee (1998)
- 9) Swanson and Harbell (2000)
- 10) Bailey et al. (2004)

## 7) ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法（ICE 法）の行政的な受け入れのための評価

### 研究要旨

JaCVAM 評価会議は、ニワトリ摘出眼球を用いる眼刺激性試験（ICE 法：Isolated Chicken Eye Test）を定められた方法で注意点を適切に守って利用すれば、化学物質の眼に対する腐食性・強刺激性を科学的に評価できると結論した。

### A. 研究目的

ニワトリ摘出眼球を用いる眼刺激性試験（ICE：Isolated Chicken Eye Test）について、第三者評価委員会からの報告を受け、審議した。

### B. 研究方法

#### B-1) メンバー

平成 20 年度から、以下のメンバーを 2009-2010 年評価会議委員として要請し、第三者評価報告書内容を資料として用い、行政的な受け入れを評価した。

（議長）

井上 達（国立医薬品食品衛生研究所）

（委員）

田中憲穂（食品薬品安全センター 秦野研究所）

吉田武美（昭和大学薬学部）

横関博雄（東京医科歯科大学）

中村和市（日本製薬工業協会）

小野寺博志（医薬品医療機器総合機構）

吉田 緑（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 病理部）

五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所  
環境衛生化学部）

吉村 功（東京理科大学）

岡本裕子（日本化粧品工業連合会）

#### B-2) 評価方法

ニワトリ摘出眼球を用いる眼刺激性試験（ICE 法）について、第三者評価委員会からの報告を受け、7 項目について審議した。

### C. 結果および考察

1. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデータは、透明で独立な評価を受けているか。

Prinsen らおよび Balls らのグループによって GLP に準拠して行われ、論文として公開された 5 つのバリデーション試験の結果が<sup>3-7)</sup>、動物実験代替法に関する独立した機関である ICCVAM<sup>注釈1)</sup>において評価された。

上記 5 試験のデータ以外にも ICE 法による報告がされているが、被験物質情報の無記載、数字データの無記載、個体データの欠如などがあり、検討対象として取り上げなかった。

この評価データをもとに、「JaCVAM 眼刺激性試験代替法評価委員会」によって評価された。

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

当該試験法は、ヒトの眼刺激性に対する毒性評価に用いられているウサギを用いた Draize 法のうち、腐食性・強刺激性評価の代替法として、ニワトリの摘出眼球に生じる角膜の傷害（腫脹、混濁、蛍光色素染色性）を判定するものである。

当該試験法は、Draize 法による化学物質の眼に対する腐食性・強刺激性分類との一致度が十分である。これらの指標の変化は眼に対する非可逆的影響を現わすものであり、化学物質の眼に対する腐食性・強刺激性の判定に利用できる。

なお、ウサギとニワトリの角膜は解剖学のおよび生理学的な違いがあり、かつ、当該試験法では摘出眼球を用いているため、腐食性・強刺激性以外の予測には限界がある。

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

化学物質の眼に対する腐食性および強刺激性（ハザード）を評価するのに有用である。リスク評価を目的とした判定基準でなく、濃度反応性の解析も行われていない。

4. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、

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

当該試験法の妥当性を示すデータは、合計175の化学物質または製品が試験され、うち90は単一の化学物質で、85は市販品あるいは製剤など混合物で行われている。様々な化学構造、性質、性状の物質、かつ種々の刺激性強度のものが対象となっており、適用できる物質の範囲が明確である。

当該試験法は、対象とする物質の腐食性・強刺激性を多くの対象物質で評価できる。ただし、アルコール類、界面活性剤、性状が固体のものについての予測性能は不十分である。

当該試験法は、暴露直後の角膜の変化を評価する方法であり、その後の回復等の評価はできない。

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

当該試験法は適切な訓練経験を持つ担当者と設備のある施設で実施可能である。しかし、機器の特殊性、汎用性および試験技術の修得から、現時点で日本国内への試験法の移転は困難である。

本プロトコールでの判定は、十分頑健性が確保されている。

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

試験費用面では Draize 法と大きな違いはないが、試験期間は短縮される。

EU では ICE 法の陽性結果をもって化学物質を R41 に区分することを既に受け入れている。米国では、US EPA <sup>注2</sup>が化学物質の眼刺激性評価において、腐食性・強刺激性物質の判断に本試験の受け入れを表明している。

当該試験法は眼刺激性試験法として、GHS <sup>注3</sup>に準拠する腐食性・強刺激性物質の判定に有用と判断されており、上記状況から考えて、我が国でも法規制の試験法として受け入れられる。

現時点では日本国内での日常的な実施は困難であるが、国外には受託機関（1施設）があり、委託が可能である。

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

当該試験法は、化学物質による不可逆的角膜傷害を捉えており、眼の腐食性・強刺激性を判定する試験法として科学的に正当である。

当該試験法は、Draize 法と比較して倫理的に優れている。

当該試験法は、経済的な動物実験代替法となる可能性がある。

以上の審議の結果、JaCVAM 評価会議は、眼刺激性試験代替法 (ICE 法) を定められた方法で注意点を適切に守って利用すれば、化学物質の眼に対する腐食性・強刺激性を科学的に評価できると結論した。

#### 注釈

1. ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, USA
2. US EPA: United States Environmental Protection Agency
3. GHS: Global Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals

#### 参考文献

- 1) 眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書 ニワトリ摘出眼球を用いる眼刺激性試験
- 2) OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO (2005) 14
- 3) Prinsen and Koeter. (1993)
- 4) Balls et al. (1995)
- 5) Prinsen. (1996)
- 6) Prinsen. (2000)
- 7) Prinsen. (2005)

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュレーション総合研究事業）  
動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究

分担研究報告書

「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」

研究分担者 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

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

すべての各分科会からの報告を受け、あり方検討会では各分科会の意見に合意し、さらに以下のような提言を行った。

- ①動物福祉や動物実験の3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) は尊重されなければならない。
- ②ただし、医薬部外品の安全性レベルを維持することを前提に、動物実験の要否、代替法の選択を判断すべきである。
- ③代替法はOECD（経済協力開発機構）テストガイドラインや公的な機関でバリデーション研究や第三者評価が実施されたものを用いる。
- ④代替法は、その適用範囲や限界を理解した上で実施されるべきである。

A. 研究目的

化粧品の2009年問題<sup>1)</sup>、動物実験代替法（以下、代替法と記す）の利用が進む国際情勢や動物愛護団体の活動を勘案して、医薬部外品（薬用化粧品）の安全性評価ガイドラインの中で代替法をどう使いこなしていくか検討が必要となってきた。その理由として、厚生労働省の許認可申請のための安全性試験の添付資料としては、OECD等により採用された代替試験法あるいは適切なバリデーションでそれらと同等と評価された方法に従った試験成績であれば差し支えないとされている<sup>2)</sup>。しかし、OECD（経済協力開発機構）ガイドラインはプロトコールではなく、具体的な方法が抜けている。また、OECDガイドラインは化学物質の安全性評価のためのものであり、化粧品や医薬部外品の安全性評価のために適しているとはいえない。

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

会）と記す」を設立した。

B. 研究方法

B-1) 組織

B-1-1) あり方検討会委員

委員長

小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所）

委員

飯島正文（昭和大学病院）

松永佳世子（日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会理事長：藤田保健衛生大学医学部皮膚科）

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所）

増田光輝（国立医薬品食品衛生研究所）

佐々 斉（日本化粧品工業連合会 安全性部会 部会長）

西山直宏（日本化粧品工業連合会 安全性部会）

岡本裕子（日本化粧品工業会 代替法専門委員会 副委員長）

板垣 宏（日本動物実験代替法学会）

見田 活（医薬品医療機器総合機構）

鷺田 淳 (厚生労働省)

#### B-1-2)分科会

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

#### B-2) 方法

あり方検討会では、その活動方針を明確にし、分科会には以下の課題を課した。

- ①動物福祉や動物実験の3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) を尊重する。
- ②代替法の第三者評価委員会ではない。代替法を取り入れて医薬部外品の安全性評価をどう担保するか、代替法の行政的な受け入れを検討する委員会である。
- ③扱うべき代替法は OECD で認められているか、公的な研究機関にてバリデーション研究が終了し、第三者評価も済んでいるものである。
- ④時間の関係で、国内外で進行している第三者評価を並行して実施する場合もある。
- ⑤代替法を用いる場合の長短所 (限界と適用範囲) をまとめる。
- ⑥分担毎に代替法を用いた医薬部外品 (薬用化粧品が対象) の安全性評価のあり方案を作る (必要なら評価フローチャートを作成する)。

以上の課題をもとに、各分科会で議論が進んだ。

#### C. 結果および考察

本年度は、あり方検討会からの皮膚刺激性試験分科会へのコメントもあり (第5回議事録: 添付資料1)、皮膚刺激試験分科会が4回の会議を開催し、十分な議論を行った。その他の委員会は、1回のみで開催またはメールでの意見交換に留まり、昨年度までの中間報告からの大きな変更はなされなかった。

各分科会の中で、中間報告から大きな変更のあった皮膚刺激性分科会のみ結論を以下に示す。

##### C-1) 皮膚刺激性試験分科会

ESAC (ECVAM 科学的認証会議) の承認を

受けた三次元培養表皮モデル EpiSkin™、EpiDerm™SIT (EPI-200) および SkinEthic™RHE の皮膚一次刺激性を評価する代替法として湖上に上げ、医薬部外品の申請における利用方法について検討した。これらすべてを収載した OECD テストガイドライン案が提案されているため、これらの対象試験法を Reconstructed Human Epidermis (RhE) として取り扱った。

RhE の特長は、Globally Harmonized System of Classification and Labeling (GHS) における「刺激性 (Category 2)」と「非刺激性 (No-Category)」を識別できることである<sup>4)</sup>。GHS による評価は、ウサギによる4時間暴露の皮膚一次刺激性試験結果に従って行われる。しかし、医薬部外品の申請において、皮膚一次刺激性試験に求められているものは、24時間暴露における刺激性強度の把握およびパッチテストを実施する場合の倫理面の情報の取得である。よって、RhE は GHS で「刺激性」に分類される程度の強度に関する情報は得られるものの、暴露時間の違いもあり、ヒトでパッチテスト (24時間閉塞貼付) を安全に実施できることを保証する情報が不足していると考えた。

上記の検討を経て、以下の結論を得た。

「医薬部外品の申請における皮膚一次刺激性評価資料として、現時点 (2009年9月) で推奨されている代替法単独では予測性が十分とはいえない。しかし、評価が可能な場合は、動物愛護の観点から代替法の利用を望ましいとする。動物実験と代替法のどちらを利用するかについての判断は申請者に委ねることとする。ただし、代替法で非刺激性と評価された場合でも、ヒトパッチテストを実施する際には、倫理的に問題がないことが確認されている必要がある。」

##### C-2) あり方検討会

2009年末までにすべての各分科会からの報告を受け、あり方検討会では各分科会の意見に合意し、さらに以下のような提言を行った。

- ①動物福祉や動物実験の3Rsは尊重されなければならない。
- ②ただし、医薬部外品の安全性レベルを維持することを前提に、動物実験の要否、代替法の選択を判断すべきである。
- ③代替法は OECD テストガイドラインや公的な機関でバリデーション研究や第三者評価が実施されたものを用いる。
- ④代替法は、その適用範囲や限界を理解した

上で実施されるべきである。

なお、他の利用可能な情報（物性、既存化学物質からの毒性予測、構造活性相関、他の動物実験結果）を用いて、動物実験および代替法で得られた結果を慎重に評価すべきである。

結果として、現状では使用可能な代替法が少なく、代替法の研究・開発に国や業界などからの積極的な財政支援の必要性が明らかになった。現在も多くの代替法が評価されているが、これらの中から医薬部外品の安全性評価に用いる公的に認証された代替法の適用範囲と限界を、あり方検討会で今後も審議していくべきであると考えている。

#### D. 結論

約2年間のあり方検討会において、試験法の行政的な受け入れについて検討するグループを組織し、代替法を積極的に導入しながら、安全性評価の質を維持することを念頭において協議した。動物愛護の点はもちろんのこと、安全性評価の現状について皮膚科医、化粧品業界代表および毒性試験法や代替法の専門家が同じ場所で意見交換できる仕組みを構築でき、現状での提言をまとめることができた。

#### 参考資料

- 1) Commission Staff Working Documents (2004) Time Tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7<sup>th</sup> Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC); EN, SEC82004, 1210
- 2) 厚生労働省医薬食品局審査管理課 (2008) 化粧品・医薬部外品 製造販売ガイドブック 2008、薬事日報社

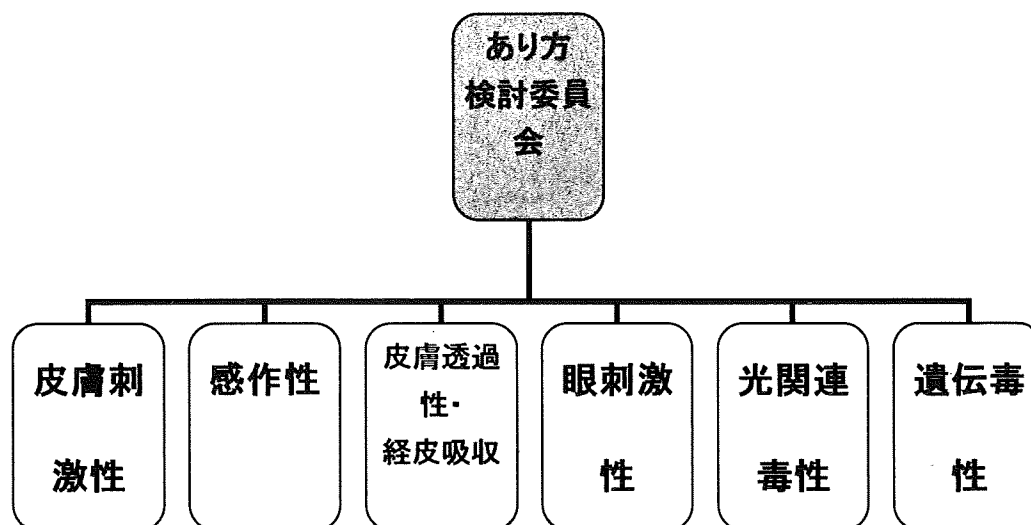


図1. あり方検討会組織図

表1. あり方検討会分科会リスト

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

E. 健康危険情報  
なし

F. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

G. 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., Krainak, 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 maker 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., Schechtmann, 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., Schechtmann, 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., Schechtmann, 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., Schechtmann, 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・機能性評価及び作用メカニズム・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 KSAEE, 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：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 回環境ホルモンの学会研究発表会、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及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、畠賢一郎、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)

#### H. 資料

- 資料1 あり方検討会第5回会議議事録
- 資料2 あり方検討会第6回会議議事録
- 資料3 あり方検討会皮膚刺激性分科会第8回会議議事録
- 資料4 あり方検討会皮膚刺激性分科会第9回会議議事録
- 資料5 あり方検討会皮膚刺激性分科会第10回会議議事録
- 資料6 あり方検討会皮膚刺激性分科会第11回会議議事録
- 資料7 あり方検討会感作性分科会第7回議事録
- 資料8 あり方検討会眼刺激性分科会

#### 第9回会議議事録

- 資料9 あり方報告会プログラム&要旨集
- 資料10 質疑応答集
- 資料11 あり方検討会 総括報告書
- 資料12 あり方検討会 皮膚刺激性試験分科会報告書
- 資料13 あり方検討会 皮膚感作性試験分科会報告書
- 資料14 あり方検討会 眼刺激性試験分科会報告書
- 資料15 あり方検討会 光関連毒性試験分科会報告書
- 資料16 あり方検討会 遺伝毒性試験分科会報告書
- 資料17 あり方検討会 皮膚透過性・経皮吸収試験分科会報告書

医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討委員会  
第 5 回会議議事録(案)

日 時：平成 21 年 8 月 6 日（木）9：00-11：30

場 所：デスカット品川

委 員：飯島正文（昭和大学）、松永佳世子（藤田保健衛生大学）、  
佐々 斉（資生堂：粧工連）、西山直宏（花王：粧工連）、岡本裕子（コーセー：粧工連）、  
板垣 宏（資生堂：日本動物実験代替法学会）、荒木康弘、鷺田 淳（以上、厚生労働省）、  
小野寺博志、池田 眞、前田さゆり（以上、医薬品医療機器総合機構）、大野泰雄、増田光輝、小島  
肇（以上、国立衛研）

以上順不同、敬称略

## 議事

### 1. 先回議事録確認

新たに出席される委員が増えたこともあり、全員が自己紹介を行った。以後、小島委員が司会を務め議事を進めた。半年振りの開催であることから、資料 1 に示す前回議事録を小島委員が通読した。どの委員からも質問はなかった。

### 2. 昨今の動物実験代替法に関する国際動向

資料 10 を用いて小島委員が昨今の国際動向の中における日本（JaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods）の活動について報告した。特に質問はなかった。

### 3. 分科会報告

前回会議以降、活動を行った分科会は皮膚刺激性、感作性および眼刺激性であると小島委員より説明された。

#### 1) 眼刺激性分科会

OECD で承認された牛摘出角膜試験（BCOP）および鶏摘出眼球試験（ICE）はいずれも眼腐食性または強い刺激性を評価する試験法である。資料 6 に議事録を示すように、医薬部外品の評価においては、弱い刺激性を評価できる試験法を求めていることから、これらの代替法は使用には向いていないと判断された。よって、現状では動物実験に代わる代替法はないと結論付けられていると小島委員より説明された。

#### 2) 感作性分科会

資料 5 に議事録を示すように、LLNA を条件付で認めていると説明された。これに対して、OECD テストガイドライン 429 は感作性物質の判断ができると記載されているだけであり、陰性が判断できるとは言っていない。厳密に言えば、その試験条件で陽性でなかっただけである。陰性が判断できるという考え方は公的には世界中にないが、「日本が世界に先駆けて、LLNA の結果だけで陰性と決めるならば、OECD が有している懸念を払拭できる説明をしておく必要があるのではないか」という問題が提起された。

この問題提起を受け、全員で議論を行った。①LLNA は 10 年以上の歴史があり、評価が不得手な分類も明確になってきている。特定の物質を除けば単独でも陰性を評価可能である、②感作強度の評価はできないことが peer review で明らかになっているが、感作性の有無は評価できると考える、③10% という濃度を閾値にしてはどうか、④原体または適用可能な濃度での結果が必要である、⑤GPMT とほぼ同様の予測性を持つ。

以上の議論の結果として、LLNA で評価ができないまたは評価しづらい物質の分類を明確にし、「懸念物質は適用できないことを条件に、LLNA は GPMT と同程度の評価ができる」とする本検討会の結論案が固まった。この条件に関しては、さらに分科会に明確に列記させることになった。

別件であるが、医薬品医療機器総合機構（以下、機構と記す）への質問として、昨今発行された機構のパンフレットには「GPMT で陽性の場合、その原料は使うべきではない」と記載されている。これは言い過ぎではないか？ GPMT が陽性でも Buehler 試験で安全率を求めることは可能であるとの質問があった。この回答は今回の会議までの機構の宿題となった。

#### 3) 皮膚刺激性分科会

資料 2~4 に示す議事録を参考に、資料 7 を用いて分科会の最終結論が小島委員より報告された。

In vitro 皮膚刺激性試験が公的に認められた場合、確認試験であるパッチテストの前に、皮膚一次刺激性のリスク評価のためにボランティアによる予備試験を行うとの提案が明示された。この予備試験結果は申請データとして添付しないと説明された。