

それらと同等に評価された方法」とはバリデーション研究と第三者評価を経て代替法として確認された試験法が該当する。バリデーション研究だけが一人歩きする場合が見受けられるが、本来、代替法のバリデーション研究とは適切な数と種類の被験物質をコード化し、3施設以上で実施された共同研究で、プロトコルの妥当性を施設間再現性と動物実験結果との正確性で確認することである。その結果も第三者評価で確認されなければならない¹⁶⁾。バリデーション研究が終了していることが、試験法の認証基準ではなく、その後の評価が重要である。よって、各施設で開発され、バリデーション研究を経ていないスクリーニング試験は作用機構、*in vivo*結果との一致性の面から有用性が認められたとしても試験法としては相応しくない。さらに代替法を用いた絶対評価はすべきでなく、類似成分や陽性対照物質との相対的な比較検討やその成分を配合する製品の使用方法や適応部位などの種々の情報を総合的に勘案して最終結論を求めるべきである¹⁷⁾。代替法は有害性の同定には有用であるが、リスク評価には向いてい

ない。加えて現状では局所毒性に限定されており、反復適用を行う代替法は開発されておらず、その使用範囲は限定的である。

余談ではあるが、化粧品の評価法としてCTFAガイドライン¹⁸⁾や日本化粧品工業連合会¹⁹⁾が化粧品の安全性評価方法を列記している。スクリーニング法の記載とはいえ、バリデーション研究にて認証されなかった方法まで列挙する姿勢には疑問を感じている。

4. 欧米およびOECDで認められている動物実験代替法

OECD等で認められた遺伝毒性試験を除く代替法を表3に示す。この中で挙げられている腐食性試験²⁰⁻²²⁾や眼刺激性試験^{23,24)}の代替法単独で用いるものではない。皮膚刺激性を評価するガイドライン404²⁵⁾、眼刺激性を評価するガイドライン405²⁶⁾の中で記載されているフローチャートの一部に過ぎない試験法であり、これらの方法単独では動物実験の置き換えには使えない。これらの中で単独で有害性の同定評価に使える試験法は3T3

表3 OECDガイドラインになっている動物実験代替法

No.	試験名	採択日
428	<i>In vitro</i> Skin absorption	Updated Guideline, adopted 24th April 2002
429	Skin Sensitisation : Local Lymph Node Assay (LLNA)	Updated Guideline, adopted 24th April 2002
430	<i>In Vitro</i> Skin Corrosion : Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)	Original Guideline, adopted 13th April 2004
431	<i>In Vitro</i> Skin Corrosion : Human Skin Model Test	Original Guideline, adopted 13th April 2004
432	<i>In Vitro</i> 3T3 NRU Phototoxicity Test (3T3 NRU)	Original Guideline, adopted 13th April 2004
未定	Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants	Original Guideline, adopted 1th April 2009
未定	Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants	Original Guideline, adopted 1th April 2009
455	Stably Transfected Human Estrogen Receptor- α Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist-Activity of Chemicals	Original Guideline, adopted 1th April 2009

表 4 欧米の機関で認証された医薬部外品の許認可に関係した試験法

No.	試験名	認証先
1	Micronucleus test as an alternative to <i>in vitro</i> chromosome aberration assay for genotoxicity testing	ECVAM OECD で検討中
2	Reduced Local Lymph Node Assay	ECVAM, ICCVAM OECD で検討開始
3	Artificial skin model (EPISKIN) for skin irritation testing	ECVAM OECD で検討中
4	Two <i>in vitro</i> skin irritation test : EpiDerm SIT and SkinEthics RHE Assay	ECVAM OECD で検討中
5	<i>In vitro</i> cytotoxicity test for estimating starting dose for acute oral systemic testing	ICCVAM OECD で検討開始

NRU²⁷⁾, モルモットを用いる試験法²⁸⁾の代替法である Local Lymph Node Assay : LLNA²⁹⁾のみである。*in vitro* 経皮吸収試験³⁰⁾, 内分泌かく乱物質のスクリーニング法である THE STABLY TRANSFECTED HUMAN ESTROGEN RECEPTOR- α TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION ASSAY FOR DETECTION OF ESTROGENIC AGONIST-ACTIVITY OF CHEMICALS³¹⁾は動物実験と組み合わせて用いられる。また、動物数の削減を考慮した単回投与毒性の進め方^{32~34)}がガイドライン化されている。

なお、ガイドラインではないが、表 4 に示すように 2009 年 4 月現在、欧米で認められた培養表皮モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験、急性毒性試験の適用濃度を細胞毒性で評価する方法³⁵⁾, LLNA を 1 濃度で実施して有害性を同定する方法^{35, 36)}に加え、JaCVAM (日本動物実験検証センター) で認められた LLNA の非 RI 法である LLNA-DA (リンパ節の ATP 量の増加を測定) も挙げておく³⁷⁾。

5. 代替法を用いる場合の注意点およびシミュレーション

代替法を選択する前に、被験物質の物性、適切な溶媒の選択とその溶解性 (水溶性, 皮膚吸着性) を把握するとともに、ICCVAM (米国動物実験代替法に関する省庁間連絡委員会)³⁵⁾, ECVAM

(欧州動物実験検証センター)³⁶⁾, JaCVAM^{38, 39)}で評価が終了した代替法の第三者評価報告書など³⁷⁾を参考に、代替法に向き不向きな化学物質の分類などを考慮して、代替法か動物実験かの選択を行うべきである。仮に代替法が利用できると判断された場合のシミュレーションを以下に示す。

5.1 OECD で承認された代替法のみ使用

まず、2009 年 5 月現在、OECD で認められている代替法のみで、新規の医薬部外品添加剤および防腐剤、紫外線吸収剤におけるもっとも動物実験が少なく済む申請資料の内容について考えてみたい。なお、動物実験を行う場合でも、動物実験の 3Rs (削減, 苦痛の軽減, 置き換え) のうち、削減や苦痛の軽減に配慮したプロトコルの作成が望まれる。ガイドラインやガイダンスとは最小限の必要資料であり、実施された資料の中に疑わしい結果が存在すれば、追加資料が必要となることから動物数の使用も増える。

- ①モルモットを用いる皮膚一次刺激性試験を実施し、皮膚刺激性がなく、パッチテストで刺激性が弱い。
- ②腐食性や強い眼刺激性を同定するための眼刺激性試験代替法で強い刺激性がないことを確認してからウサギを用いる眼刺激性試験を実施し、眼刺激性が弱い。
- ③紫外部に吸収がなく、光毒性および光皮膚感

作性を実施する必要がないと判断した。

*紫外部に吸収があった場合、

- ③-i) 3T3-NRUにて細胞毒性がない。
- ③-ii) モルモットを用いる光皮膚感作性試験：1群複数濃度の適用を実施し、光皮膚感作性が弱い。
- ④遺伝毒性試験として、エイムス試験および哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験がいずれも陰性である。
- ⑤単回投与毒性試験：2 g/kgの1濃度試験を実施し、いずれの動物にも何の異常がない。
- ⑥マウスを用いる皮膚感作性試験 (Local Lymph Node Assay ; LLNA)：実験可能な最高適用を含む3濃度の試験を実施し、感作性が弱い。
- ⑦モルモットを用いる連続皮膚刺激性試験：1群複数濃度適用を実施し、連続皮膚刺激性が弱い。
- ⑧*in vitro* 経皮吸収 (皮膚透過性) 試験：摘出皮膚 (ラットまたはヒト由来) で吸収が極めて少ないことが証明される。
- ⑧-i) 吸収・分布・代謝・排泄試験：*in vitro* 経皮吸収試験で証明不可の場合、実施する。
- ⑨反復投与毒性試験：代替法なし。
- ⑩生殖毒性試験：代替法なし。

5.2 欧米や日本で認証された代替法や見解も加味する場合

さらに、これ以上動物数を減らすために、欧米や日本で認証されている代替法も含めれば、以下の項目においてさらに動物実験が少なくて済む。

①培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験で皮膚刺激性がない。モルモットを用いる連続皮膚刺激性試験後にパッチテストで確認する。

③-iii) 紫外部に吸収があった場合、3T3-NRUにて細胞毒性がない場合、光毒性も光感作性もなしと判断する (光感作性については、SCCNFP 安全性ガイダンスで光感作性を検出するための *in vitro* 手法はない。しかし、光アレルギー特性を示す化学物質は3T3-NRUで陽性

を示す可能性があると予想されている⁴⁰⁾。

⑤-i) 単回投与毒性試験：細胞毒性試験結果から³⁵⁾、2 g/kgではLD50が求まらないと判断する。

⑥-i) マウスを用いる皮膚感作性試験 (LLNA)：実験可能な最高適用1濃度の試験を実施し^{35,36)}、感作性が弱い。なお、この試験法は放射線同位物質を用いることから開発されたLLNA-DA法でも可³⁷⁾。

この場合、新規医薬部外品の添加剤で毒性が低いと考えられれば、用いる動物は最低で、ウサギを用いる眼刺激性試験でウサギ3匹LLNAでマウス3群 (陰性および陽性対照群を含み合計12匹：4匹/1群) と連続皮膚刺激性試験のモルモット1群 (3匹/群) となり、少数の動物を使用するだけで申請が可能である。⑥皮膚感作性試験については、培養細胞を用いた試験やペプチド結合試験などが開発されている。しかし、いずれもバリデーション研究が終了しておらず、その認証には3年以上の歳月を待たねばならないと考えられる。⑦連続皮膚刺激性試験の代替法は開発されておらず、ヒト連続塗布または貼付試験や使用試験で置き換えられるかの検討が必要であろう。

ただし、これらの代替法も適用可能な条件が限られ問題は多い。これらを検討するため、厚生労働科学研究補助金事業「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 (主任研究者：小島肇夫)」において、医薬部外品の許認可申請における資料のあり方検討会を皮膚科医、毒性学者、化粧品工業連合会、行政の代表の協力を得て組織し、代替法を用いた安全性評価のあり方を検討している。この下部組織として、皮膚刺激性、皮膚感作性、眼刺激性、光毒性等、遺伝毒性および皮膚透過性・経皮吸収の各試験の分科会を設立して以下に示すような各代替法を扱う場合の問題点の検討を続けている。

(A)皮膚刺激性：代替法は4時間貼付試験の置き換えである。代替法と24時間貼付パッチテストの間を埋めるための条件や解釈が検討されている。

(B)眼刺激性：本来、弱刺激性の評価を目的に使われてきた。代替法は強い刺激性しか判断できない。中程度以下の眼刺激性を判断できる代替法の公定化が待たれる。

(C)光毒性：3T3-NRUで光感作性を予測するための第三者評価は世界的にもなされていない。

(D)単回投与毒性：細胞毒性試験で単回投与毒性を予測するための第三者評価は日本ではなされていない。

(E)感作性：LLNAの1濃度で感作性を予測するための第三者評価は日本ではなされていない。

なお、JaCVAMでは、皮膚刺激性、感作性、眼刺激性、光毒性などの試験法について第三者評価を進めている⁴¹⁾。

6. おわりに

動物実験データなしで、例えば、類似物質による過去のデータベース、構造活性相関、代替法によって新規医薬部外品の申請を行うことは可能である。ただ、代替法として認められた方法はまだまだ少なく、代替法を用いた安全性評価のあり方についての検証が進んでいる現状において、申請された結果が医薬品医療機器総合調査機構に認められるかといえば、難しいかもしれない。代替法や動物実験の結果を申請すればいいのではなく、適切な計画の立案や事前調査が必要であるとの認識を持って頂きたいと考えている。

文 献

- 1) 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2006, 薬事日報社, 東京 (2006)
- 2) 厚生労働省医薬食品局審査管理課, 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 (2006)
- 3) 医薬品毒性試験法ガイドライン (1989年薬審1第24号)
- 4) 反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正 (1999年医薬審655号)
- 5) 遺伝毒性試験ガイドライン (1999年医薬審第1604号)
- 6) ポジティブリストの記載要領について (2001年医薬審発第325号)
- 7) 非臨床薬物動態試験ガイドライン (1998年医薬審第496号)
- 8) 医薬品の生殖発生毒性試験についてのガイドラインの改正について (2000年医薬審第1834号)
- 9) 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 (http://www.jhsf.or.jp/project/dobutu_TOP/html) (2009)
- 10) 化粧品の安全性評価について, 化粧品大全, (株)情報機構, 東京, pp.381-388 (2006)
- 11) 鈴木尋之, 化粧品素材の安全性評価における基本的な考え方と全般技術背景, 機能性化粧品素材開発のための実験法 - *in vitro*/細胞/組織培養 -, 芋川玄爾監修, シーエムシー出版, 東京 (2007)
- 12) 規制を踏まえ, どう試験法を選択すればよいか - 化粧品・医薬部外品 -, 最新 動物実験代替法, (株)技術情報協会, 東京 (2007)
- 13) Commission Staff Working Documents : 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 (2004)
- 14) 笠井裕, 化粧品規制をめぐる国際動向, 正木仁監修, 機能性化粧品IV, シーエムシー出版, 東京, p.9 (2006)
- 15) Rogiers, V. and Pauwels, M., Safety assessment of cosmetic in Europe, Karger, Basel, Switzerland (2008)
- 16) 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
- 17) 日本化粧品学会編集委員会・安全性評価ワーキンググループ, 化粧品成分の安全性評価講座 I, 日本化粧品学会誌, 30 (3), 170-175 (2006)
- 18) Loretz, L. J. and Bailey, J. E., CTFA safety evaluation guidelines, The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Washington, D. C., USA (2007)
- 19) 日本化粧品工業連合会, 化粧品の安全性評価に関

- する指針 2008, 薬事日報社, 東京 (2008)
- 20) OECD guideline for the testing of chemicals, No.431, *in vitro* skin corrosion : Human skin model test, Paris, France (2004)
 - 21) OECD guideline for the testing of chemicals, No.430, *in vitro* skin corrosion : Transcutaneous electrical resistance test (TER), Paris, France (2004)
 - 22) OECD guideline for the testing of chemicals, No.435, *in vitro* membrane barrier test method for skin corrosion, Paris, France (2004)
 - 23) OECD draft test guideline for the testing of chemicals, Bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test method for identifying ocular corrosives and severe irritants, Paris, France (2009)
 - 24) OECD draft test guideline for the testing of chemicals, Isolated chicken eye (ICE) test method for identifying ocular corrosives and severe irritants, Paris, France (2009)
 - 25) OECD guideline for the testing of chemicals, No.404, Acute dermal irritation/corrosion, Paris, France (2002)
 - 26) OECD guideline for the testing of chemicals, No.405, Acute eye irritation/corrosion, Paris, France (2002)
 - 27) OECD guideline for the testing of chemicals, No.432 : *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity testing, Paris, France (2002)
 - 28) OECD guideline for the testing of chemicals, No.406 : Skin sensitisation, Paris, France (1992)
 - 29) OECD guideline for the testing of chemicals, No.429 : Skin sensitization : Local lymph node assay, Paris, France (2002)
 - 30) OECD guideline for the testing of chemicals, No.428 : *In vitro* skin absorption, Paris, France (2002)
 - 31) OECD draft test guideline for the testing of chemicals, Stably transfected human estrogen receptor- α transcriptional activation assay for detection of estrogenic agonist-activity of chemicals, Paris, France (2009)
 - 32) OECD Guideline for the Testing of Chemicals No.420 : Acute oral toxicity-Fixed dose procedure, Paris, France (2001)
 - 33) OECD Guideline for the Testing of Chemicals No.423 : Acute oral toxicity-Acute toxic class method, Paris, France (2001)
 - 34) OECD Guideline for the Testing of Chemicals No.425 : Acute oral toxicity-Modified up and down procedure, Paris, France (2001)
 - 35) ICCVAM (http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/EPReport/ocu_report.html) (2009)
 - 36) ECVAM statement (<http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.html>) (2009)
 - 37) JaCVAM (<http://jacva.jp/index.html>) (2009)
 - 38) 大野泰雄, 動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受入れの現状, 国立衛研報, 122, 1-10 (2004)
 - 39) 小島肇夫, 安全性評価と動物実験代替法の現状, 薬学雑誌, 128 (5), 747-752 (2008)
 - 40) SCCP'S notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation 6TH revision, [http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_04.pdf#search='SCCP guidance'](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_04.pdf#search='SCCP%20guidance') (2006)
 - 41) 小島肇ら, 第 21 回日本動物実験代替法学会大会要旨集 (2008)



再構築培養表皮モデルを用いた遺伝毒性の評価

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 薬理部新規試験法評価室

小島 肇夫、新井 晶子、北條 麻紀

[Objective] To evaluate a risk assessment of genotoxicity when human skin is affected by chemicals, we tried to perform a Comet assay using a 3-dimensional human epidermal model (LabCyte EPI-MODEL, Japan).

[Materials & Methods] Mitomycin C, methylmethanesulfonate (MMS) and 4-NQO (4-Nitroquinoline 1-Oxide) were utilized as test chemicals. Each test chemical solution was applied directly to the surface of the models and treated for 4 hours, then washed off and incubated for 20 hours after the treatment and maximal dosage was calculated according to the cytotoxicity. As to the Comet assay, each test chemical solution refer to the cytotoxicity was applied to them and treated for 4hr. Cells were detached by Liberase solution (Roche) or Trypsin solution (GIBCO), and an adequate cell suspension was obtained.

[Results] More single cells could be efficiently retrieved using Trypsin solution, especially with treatment for 25min, than using Liberase solution. Comet signals mediated by Mitomycin C (150 μ M<) and 4-NQO were shown by our protocol. However, those by MMS were not clear response.

[Discussion] We established a practical, rapid and easy Comet assay protocol using a 3-dimensional human epidermal model. To define the difference in genotoxical action between the epidermal model and *in vivo*, it is necessary to perform additional researches for minimal dosage of unknown chemicals that show genotoxicity to the human epidermis.

1. 緒言

安全性試験の中でも大きな比重を占める遺伝毒性試験には、遺伝子突然変異を評価する微生物を用いるエイムス試験や哺乳類の培養細胞を用いるマウスリンフォーマアッセイがある。また、染色体突然変異の評価には、分裂中期の染色体構造を観察する哺乳類の培養細胞や実験動物を用いる染色体異常試験や小核試験がある。これらの試験の中から、医薬品の安全性評価には、微生物を用いる復帰突然変異試験、哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験やマウスリンフォーマ試験ならびにげっ歯類を用いる小核試験の三試験が必須と定められている¹⁾。

一方、医薬部外品の有効成分又は添加剤については、遺伝子突然変異および染色体異常の有無の確認を目的とした微生物および哺乳類の培養細胞を用いる *in vitro* 試験が求められる。ただし、これらの試験で遺伝毒性が疑われた場合には、各々の目的に応じ動物の個体を用いる *in vivo* 試験の提出が求められるとされている^{2,3)}。しかし、*in vitro* 試験の中で特に、哺乳類の培養細胞を用いるマウスリンフォーマ試験および染色体異常試験は発がん性試験と比較して疑陽性が検出されやすい⁴⁾。今後、EUにおける化粧品規制第7次改正により⁵⁾、動物実験代替法が開発された

試験法は2009年以降、化粧品原料の開発に実験動物を用いた小核試験が利用できなくなる。その場合、多数検出される *in vitro* 試験の結果を受け入れ、新成分の開発を断念するならともかく、その検証を行うには、より実験動物に近いモデルを用いてリスクを評価する必要がある。

そこで、より実験動物に近いモデルとして化粧品の安全性を考慮した場合、成分が皮膚に直接暴露した際の遺伝毒性の検出を、3次元培養表皮モデルを用いて調べられれば、リスクを評価できると考えた。評価系としては、作用機構が明確なコメットアッセイを用いることとした。コメットアッセイとは、培養細胞や動物組織をシングルセルに分散し、アガロースゲルに包埋してアルカリ電気泳動にかけることにより、個々の細胞が受けたDNA初期傷害を検出する手法である。図1に示すように、障害を受けたDNAの電気泳動像によりすい星が流れるように見えることから、コメットアッセイと名づけられた。この試験法では、非分裂細胞に対する遺伝毒性が評価できることや、感受性の異なる細胞が混在する細胞集団でも細胞レベルで評価可能なこと、また、近年では、Honmaら⁶⁾により培養細胞を用いた簡便な *in vitro* コメットアッセイが考案されるなど、



Evaluation of genotoxicity using 3-dimensional human epidermal model

Hajime Kojima, Ph.D.

Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), National Center for Biological Safety and Research National Institute of Health Sciences (NIHS)



図1 細胞に生じたコメット

有用な遺伝毒性試験として注目を集めている。

本研究では、3次元培養ヒト表皮モデルを用いたコメットアッセイの試験法開発を目的として、実験を行った。

2. 材料および方法

2.1 材料

2.1.1 3次元培養表皮モデル

ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (J-TEC) 株式会社が製造販売している3次元培養ヒト表皮モデル LabCyte EPI-MODEL12 または 24 を実験に用いた。図 2 に示すように、本モデルは表皮構造を呈しており、培養液と合わせキットとなっている。

本キット到着日あるいはその翌日から実験を開始した。

2.1.2 被験物質

マイトマイシン C (和光純薬株式会社)、メチルメタン sulfonate (MMS: 和光純薬株式会社) および 4-ニトロキノリン N オキシド (4-NQO: 和光純薬株式会社) を溶媒に溶解してモデルに供した。

MMC および MMS の溶媒としては蒸留水、4-NQO の溶媒としてはエタノール溶液を用いた。

2.2 試験法

2.2.1 コメットアッセイ基本操作

6 ウェルプレート (Falcon) の各ウェルの中に、キットに付いている培養液を加え、LabCyte EPI-MODEL12 を置いた後、37°C の CO₂ インキュベーター中で 1 時間培養した。培養後、すぐに酵素処理してセルストレイナー (Falcon) を通して単一細胞を得た。1 × 10⁶ 細胞/mL に PBS で調整した細胞懸濁液 10 μL を寒天 0.5% 液 80 μL とともに、スライドガラス (マツナミ) にのせ、Lysis 緩衝液中で 1 時間処理後に電気泳動を行った。電気泳動条件は、pH 13 の泳動液 (4°C) で 15 分放置した後、300 mA/90V で 15 分間とした。得られた細胞を 70% エタノール溶液で洗浄し、乾燥後、SYBR gold (1:10000) で染色し、スライド当り 100 個観察した。コメットシグナルの検出には、『COMET ASSAY IV (PERCEPTIVE, UK)』という解析ソフトを使用し、% Tail Intensity (コメット部分の蛍光強度 / 1 細胞あたりの DNA 蛍光強度) を求めた。つまり、

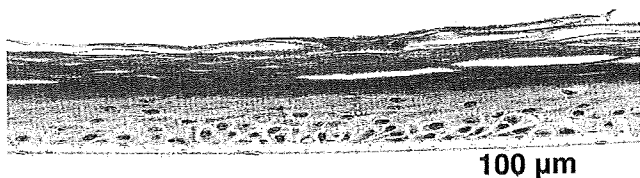


図 2 Labcyte EPI-MODEL24 の HE 染色

% Tail Intensity の値が高いほど遺伝毒性が強いことになる。

2.2.2 条件検討

2.2.2.1 細胞解離条件の検討

培養皮膚モデルにリベラーゼ (Roche) で 30 分間処理すればコメットを検出できるとの報告がある⁷⁾。

一方、培養皮膚モデルからの小核誘発の検出にはトリプシンが使われている⁸⁾。どちらの条件がラボサイトに適しているのか、リベラーゼ (0.28 Wunch Unit/HBSS) およびトリプシン (0.25%/0.02% EDTA リン酸緩衝液: PBS) 溶液で 30 ~ 50 分処理後の①得られる細胞数、②解離溶液が細胞に及ぼす遺伝毒性の有無を調べた。

次に、それぞれの解離条件から得られた細胞を用いてコメットアッセイを行い、解離溶液がモデルに及ぼすコメット出現頻度を調べた。

2.2.2.2 溶媒濃度の検討

非水溶性物質の溶媒として用いるエタノールの細胞毒性およびコメットアッセイに及ぼす影響を検討した。細胞毒性試験の条件を 2.3.3 に示す。エタノール溶液の濃度 3、6、12.5 および 25% で 4 時間処理した場合の条件を検討した。

2.2.2.3 被験物質を用いた細胞毒性の検出

LabCyte EPI-MODEL24 を 37°C の CO₂ インキュベーター中で 1 時間培養した後、溶媒および被験物質溶液 100 μL を加え、4 時間処理後さらに 20 時間培養した。

マイトマイシン C においては、限界溶解度である 1500 μM を最高濃度として、10 倍希釈系列を調整して細胞毒性を検出した。MMS においては、1800 μM を最高濃度として、10 倍希釈系列を調整した。4-NQO においては、100% エタノールに溶解した 10 mM 溶液をエタノールの最終濃度が 2% になるように加え (最高処理濃度 200 μM)、10 倍希釈系列を調整した。

PBS で LabCyte EPI-MODEL24 を 4 回洗浄し、MTT (sigma) 0.5 mg/mL を含む培養液で 3 時間処理した後、モデルをイソプロパノールで抽出した。溶媒および被験物質の抽出液 0.2 mL を 96 ウェルに移し、OD570 および OD650 における吸光度を測定し、以下の式から細胞生存率を求めた。

$$OD = [570nm \text{ OD}_{\text{被験物質}} - 570nm \text{ OD}_{\text{フランク}}] \\ - [650nm \text{ OD}_{\text{被験物質}} - 650nm \text{ OD}_{\text{フランク}}]$$

$$\text{細胞生存率 (\%)} = \frac{OD_{\text{被験物質}}}{OD_{\text{溶媒}}} \times 100$$

2.2.2.4 被験物質を用いたコメットの検出

図 3 に試験法の概略を示す。LabCyte EPI-MODEL12 に溶媒および被験物質溶液 200 μL ウェルを加え、4 時間処理した後、PBS で 3 回洗浄した。細胞毒性で得られた

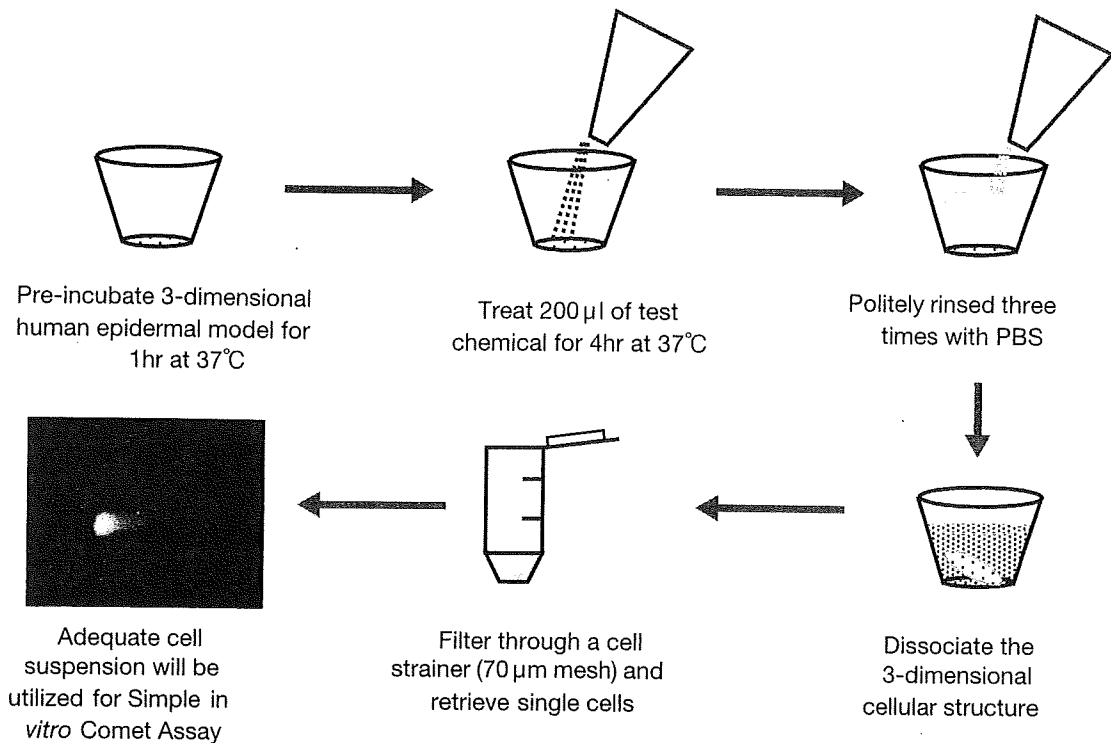


図3 試験方法概略

結果から最高適用濃度を決定し、それぞれ10倍希釈系列を調整してコメットアッセイを実施した。

3. 結果

3・1 解離条件の検討

それぞれの解離条件でラボサイトを処理し、1ウェルから回収することのできた細胞数をカウントした。その結果、図4に示すように、トリプシン処理によりリベラーゼよりも20倍以上多くの単一細胞を得ることができた。また、トリプシンの処理時間を35分、50分と延長しても得られる細胞数に差はなかった。また、リベラーゼ、トリプシン共に細胞毒性を誘導することはなかった。しかし、図5に示すように、トリプシンの処理時間を50分に延長するとコメットシグナルが検出されるようになった。

以上の結果から、ラボサイトの細胞解離には、トリプシンの短時間(25分)処理が適していることが明らかとなった。

3・2 溶媒濃度の検討

エタノールの細胞毒性は25%まで検出されなかった(データは示していない)。しかし、図6に示すように、12.5%以上の濃度で中央値に変化はないものの、コメットを引き起こす細胞を認めた。以上の結果から、溶媒の最適濃度は6%以下、可能な限り薄くすることを目指し、2%と設定した。

ちなみに、箱ひげ図は、最小値、第1四分位点、中央値、第3四分位点と最大値を示している。母集団は実際には

様々なタイプの確率分布に従うわけだが、箱ひげ図はそのような仮定に関係なく、データの分布を表現している。箱の各部分の間隔から分散や歪度の程度、また外れ値を示している。

3・3 被験物質を用いた細胞毒性の検出

図7～9に3物質の細胞生存率の結果を示した。

図7に示すように、マイトマイシンCの限界溶解度は1500 µMであり、4時間暴露後、20時間培養しても細胞毒性は全く検出されなかった。よって、コメットアッセイでは1500 µMを最高濃度として、10倍希釈系列を調整して検出することにした。

MMSは180 µM以上の濃度において、図8に示すように強い細胞毒性を認めた。よって、18 µMを最高濃度として、10倍希釈系列を調整してコメットアッセイを行うこととした。

4-NQOは最高濃度200 µMのみにおいて、図9に示すように細胞毒性を認めた。よって、20 µMを最高濃度として、10倍希釈系列を調整してコメットアッセイを行うこととした。

3・4 被験物質を用いたコメットの検出試験

コメットアッセイを実施する被験物質の最高処理濃度は、4時間処理後、さらに20時間培養した場合、細胞が50%以上生存している濃度でなければいけないと設定した。その最高濃度から公比10で希釈して得られた3被験物質に

おけるコメットアッセイの結果を求めた。その結果、図10に示すようにマイトマイシンCでは150 μ M以上の濃度で濃度依存的なコメット出現頻度の増加が明らかとなっ

た。一方、図11に示すように、MMSのコメット出現頻度の増加は検出されなかった。また、図12に示すように、4-NQOのコメット出現頻度は20 μ Mでわずかに増加した。

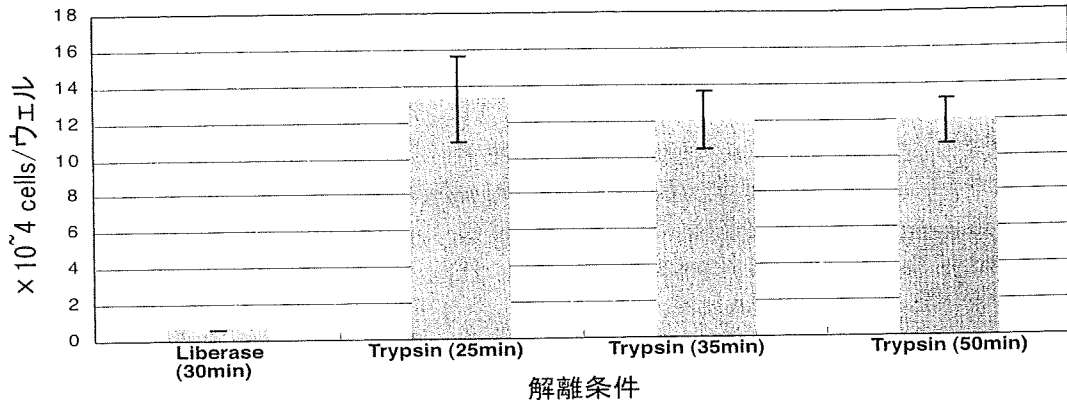


図4 解離条件の検討 酵素処理による単一細胞出現頻度

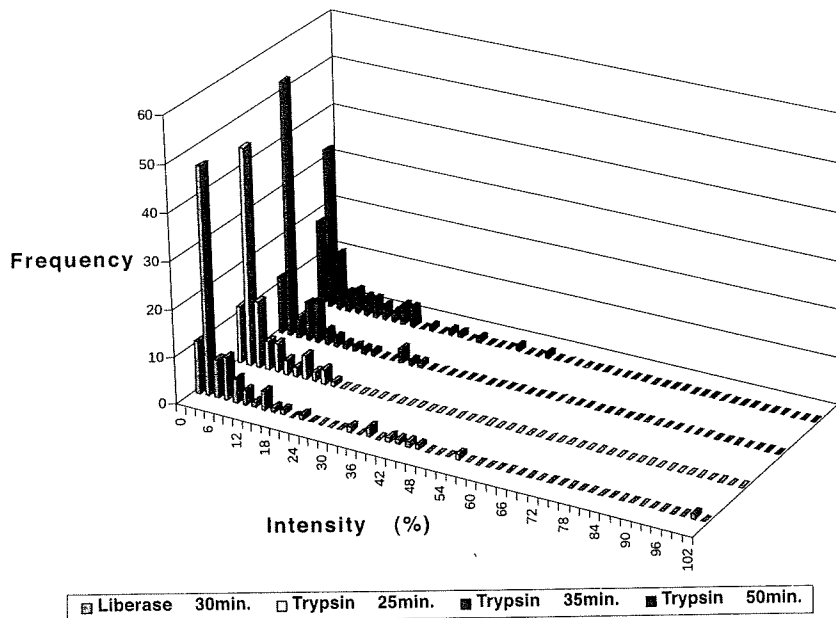


図5 解離条件の検討 酵素処理によるコメット出現頻度

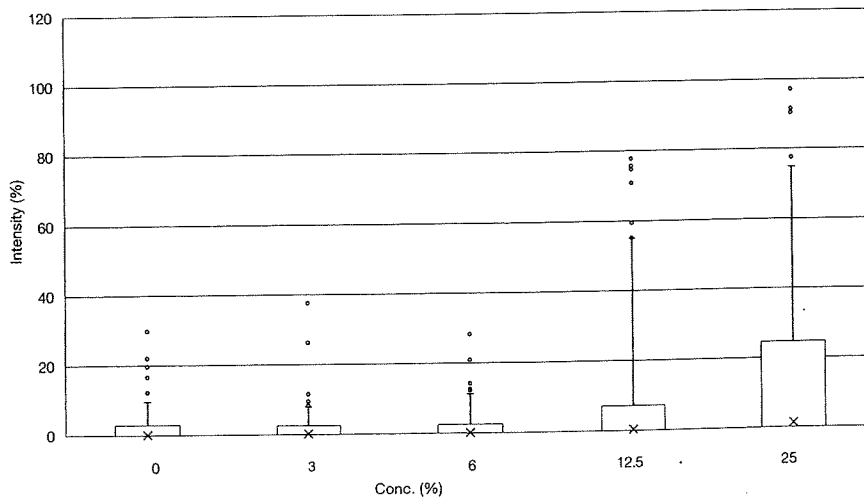


図6 エタノールのコメット出現頻度

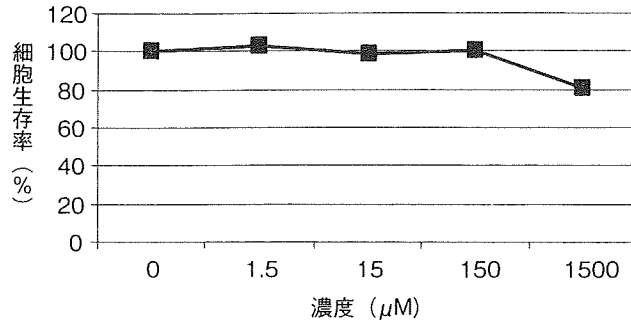


図7 マイトマイシン C の細胞毒性試験結果

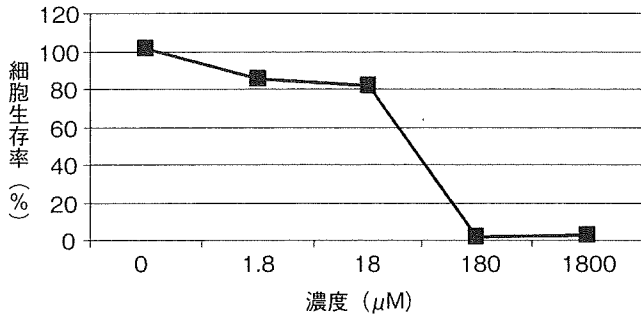


図8 MMS の細胞毒性試験結果

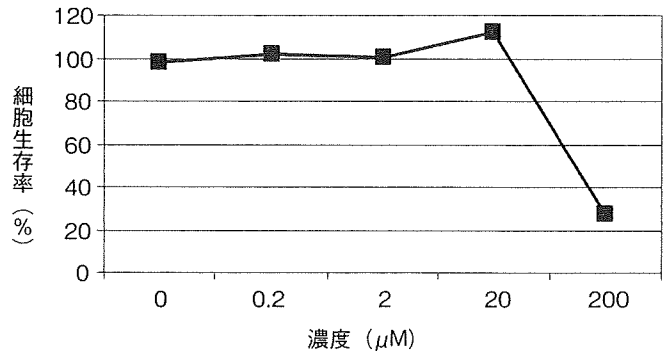


図9 4-NQO の細胞毒性試験結果

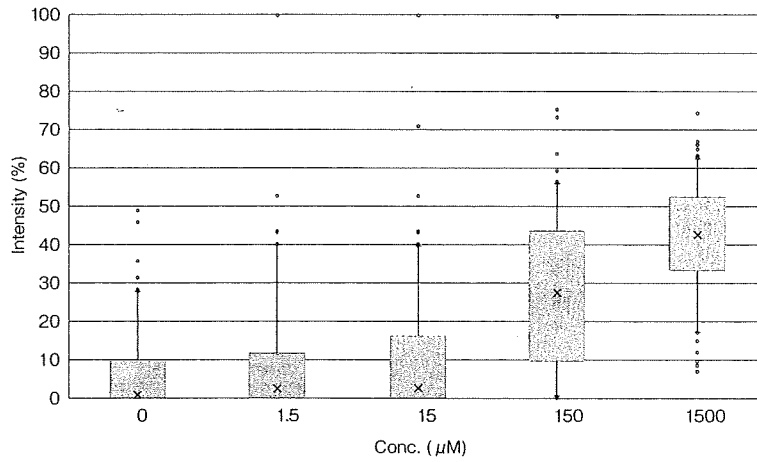


図10 マイトマイシンCによるコメット出現頻度

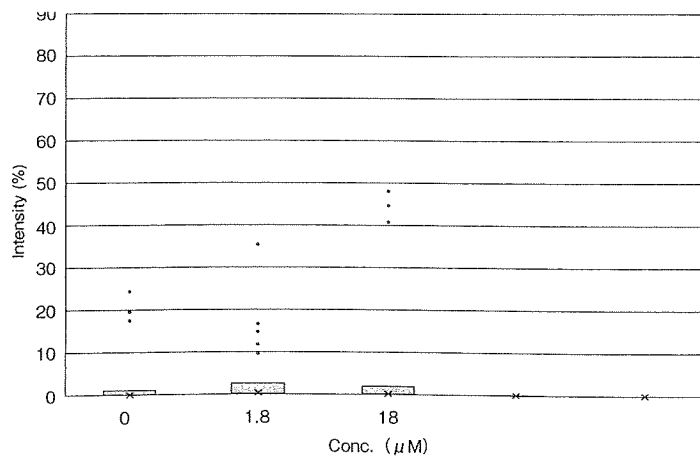


図11 MMSによるコメット出現頻度

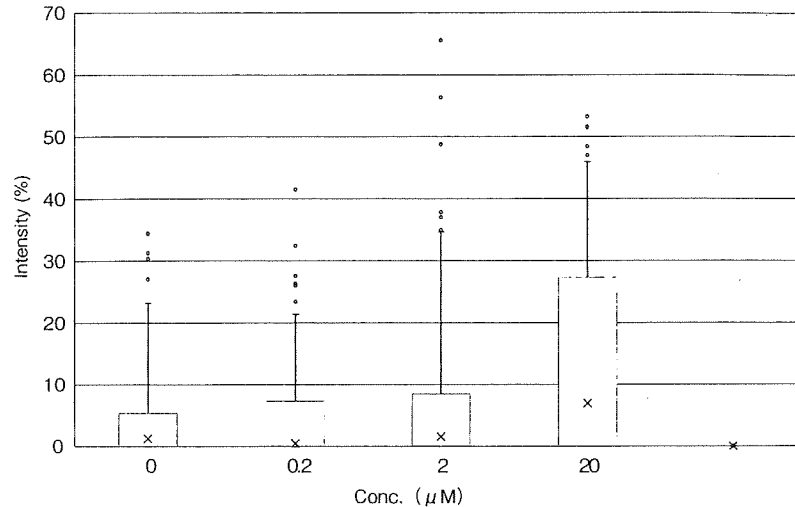


図 12 4-NQO によるコメット出現頻度

4. 考 察

酵素処理条件、最適な溶媒濃度を決定でき、3次元培養表皮モデルを用いたコメットアッセイの試験法開発という目的を達成できた。マイトマイシンCはDNAのクロスリンカーとして遺伝毒性を起こし、MMSや4-NQOはDNAをアルキル化して遺伝毒性を引き起こす著名な遺伝毒性物質である。しかし、得られた結果からマイトマイシンCおよび4-NQOはコメット出現頻度を増加させるが、MMSはその強い細胞毒性からコメットを明確に引き起こさないと判断した。

以上の結果から、遺伝毒性物質の検出感度における課題も明らかになった。今後は、マイトマイシンC、MMS、4-NQO以外の遺伝毒性物質についても、同様の検討を行うとともに、小核の検出を行う予定である。得られたデータベースからを他の *in vitro* および *in vivo* データと比較して、遺伝毒性に対する感受性にどの程度違いがあるのかを明らかにする予定である。

なお、これらの成果の一部は日本環境変異原学会第36回年次大会(2007年11月、北九州)にて発表した⁹⁾。

(参考文献)

- 1) 医薬品非臨床試験研究会監修(2002) 医薬品非臨床試験ガイドライン解説、薬事日報社
- 2) 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック2008、薬事日報社
- 3) 厚生労働省医薬食品局審査管理課(2006) 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
- 4) Kirkland D, Pfuhler S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, Elhajouji A, Glatt H, Hastwell P, Hayashi M, Kasper P, Kirchner S, Lynch A, Marzin D,

Maurici D, Meunier JR, Müller L, Nohynek G, Parry J, Parry E, Thybaud V, Tice R, van Benthem J, Vanparrys P, White P.(2007) How to reduce false positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutat Res.* 628 (1) : 31-55

- 5) 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, SEC (2004) 1210
- 6) Honma M. (2007) A Multi-endpoints *in vitro* Genotoxicity Test SAYsystem Consisting of Comet, Micronuclei and Gene Mutation Test, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, abstract pp.88.
- 7) Flamand N, Marrot L, Belaidi JP, Bourouf L, Dourille E, Feltes M, Meunier JR. (2006) Development of genotoxicity test procedures with Episkin, a reconstructed human skin model: towards new tools for *in vitro* risk assessment of dermally applied compounds? *Mutat Res.* 606 (1-2) : 39-51.
- 8) Curren RD, Mun GC, Gibson DP, Aardema MJ. (2006) Development of a method for assessing micronucleus induction in a 3D human skin model (EpiDerm). *Mutat Res.* 607 (2) : 192-204.
- 9) Arai S, Saitoh M, Tajashima Y, Honma M, Kojima H (2007) A new trial for *in vitro* Comet assay using 3-dimensional human epidermal model, 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, Abstracts, p111.



現在の動物実験代替法の 状況について

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 新規試験法評価室
室長 小島 肇夫

1. はじめに

世界的な規模で、動物福祉および動物実験の3Rs (Reduction, RefinementおよびReplacement) 推進が叫ばれている。しかし、Replacementを意味する動物実験代替法 (以下、代替法と記す) の普及はほとんど進んでいない。in silicoと言われるコンピュータを用いた予測システムや、代替法と言われるin vitroトキシコロジー試験の研究・開発の多くはまだ道半ばである。ただし、in silicoやin vitroの進歩だけでなく、-omicsや幹細胞研究の結果から劇的な変化が生まれないとはいえない。Replacementはともかく、少しずつ動物実験の3Rsのうち、ReductionやRefinementの方向に向かって行くことは間違いない。21世紀は動物実験を減らしていくという米国ナショナルアカデミー協会の方針に従い¹⁾、使用動物数は確実に減っていくであろう。

2. 国際的な動向

欧米では動物愛護問題が盛んであり、社会的にもその必要性が問われ、規制も掛けられている。主な動物実験の規制問題は、化粧品およびREACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) である。化粧品の規

制に関しては、2003年に化粧品指令7次改正が公布され、2009年3月に代替法が確立されている試験がある場合には、①EU域内での動物実験の完全禁止、②動物実験した製品、動物実験をした原料を含む製品の販売禁止が決められている²⁾。これに間に合わせるべく、EUでは欧州化粧品工業会 (COLIPA) とECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) が共同で試験法の開発、バリデーション (検証) および第三者評価を進めてきた。ただし、2009年時点で開発された代替法は少なく、各社が自主的に動物実験を中止して限られた代替法で安全性を担保するとともに、規制対象となる新原料の開発を中止している段階である。

一方、REACHとはすでにEU市場に流通している既存化学物質に関し、その製造・輸入を行う事業者は、その安全性データなどを揃え、登録が義務つけられる規制を指す。登録、評価、認可、制限の総称である^{3,4)}。この安全性評価はハザードベースでなく、リスクベース (ハザードと曝露評価) が中心である。2009年までに事前登録が期待される180,000物質における70%の試験を2011~2017年に実施しなければならない。製造/輸入量に応じ

て実施すべき試験法が決まっており、1t以上の製造/輸入物質には代替法による有害性の同定が必要とされる。さらに製造量が増えるにつれて、曝露評価まで求められており、動物実験を有効に使っていかねばならない⁵⁾。

これらの問題に対応するため、欧州ではEPA (European Partnership on Alternative Approaches to Animal Testing) という政府機関と業界団体の協調組織が設けられ、動物実験の3Rsに向け、着実に実現を積んでいる。さらなる代替法開発のため、300以上のパートナーと17の研究プロジェクト (予算110 million €以上) を通して⁶⁾、REACHのために“適した”100の試験法を確立する予定である。現在125のINVITTOXによるプロトコルが用意されており、2009年までに40試験法を検証するとされている。これにより、代替法で50%、in silicoで20%の動物数を削減できると専門家が分析している⁷⁾。

ただし、新規試験法が開発されても、「試験法の公定化」となると国際的な相互承認という厚い壁が立ちただけで、検証や第三者評価に時間と経費が掛かる。これまで通りの方法では2011年までに多くの試験法を用意できない。そこで、OECDやECVAM、

米国のICCVAM(Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) 中心に検証研究の短期化、検証が終了したものと同等のものを揃えるために適切な方法の選択をする方策が検討されている⁸⁾。

3. 日本の動向

日本でも欧米の影響を受けてはいるが、動物実験の3Rsに関しては社会的には問題化されていない。経済のグローバル化もあり、国際企業は対応に苦慮しているが、経済産業省が国際調整に乗り出す程ではない。一部の愛護団体が特定企業を攻撃しているが、それは本当に適切な行

為とは言えない。国民のニーズがないこと、すなわち、行政に関心がないことを認識すべきである。

2005年にはJaCVAM(日本代替法検証センター)が設立された。しかし、厚生労働省が認めた部署は国立医薬品食品衛生研究所の中の新規試験法評価室であり、JaCVAMではない。JaCVAMとは新規試験法評価室の業務の一環として、この部屋を中心とする任意の協力者による活動である⁹⁻¹¹⁾。この活動グループが2006年に組織されたのであり、JaCVAMという公的な機関は日本では存在しない。欧米では、法的にその活動が規定されているようなICCVAM¹²⁾、

ECVAM¹³⁾という行政機関が存在するが、その規模、予算の違いは公的な認知の違いによる。よって、JaCVAMの活動は限定的にならざるを得ない。

4. 国内外の状況への対応

さて、もう一度、試験法の公定化について考えてみたい。化学物質等の安全性を確認するための試験法は国民の安全・安心の土台である。国際社会で生きていく以上、その試験法は国際的に統一されたものがなければならないことは議論の必要がない。その代表がOECDテストガイドラインである¹⁴⁾。OECDテストガイドラインには昨今、大きな二つの流れがある。一つが動物福祉の

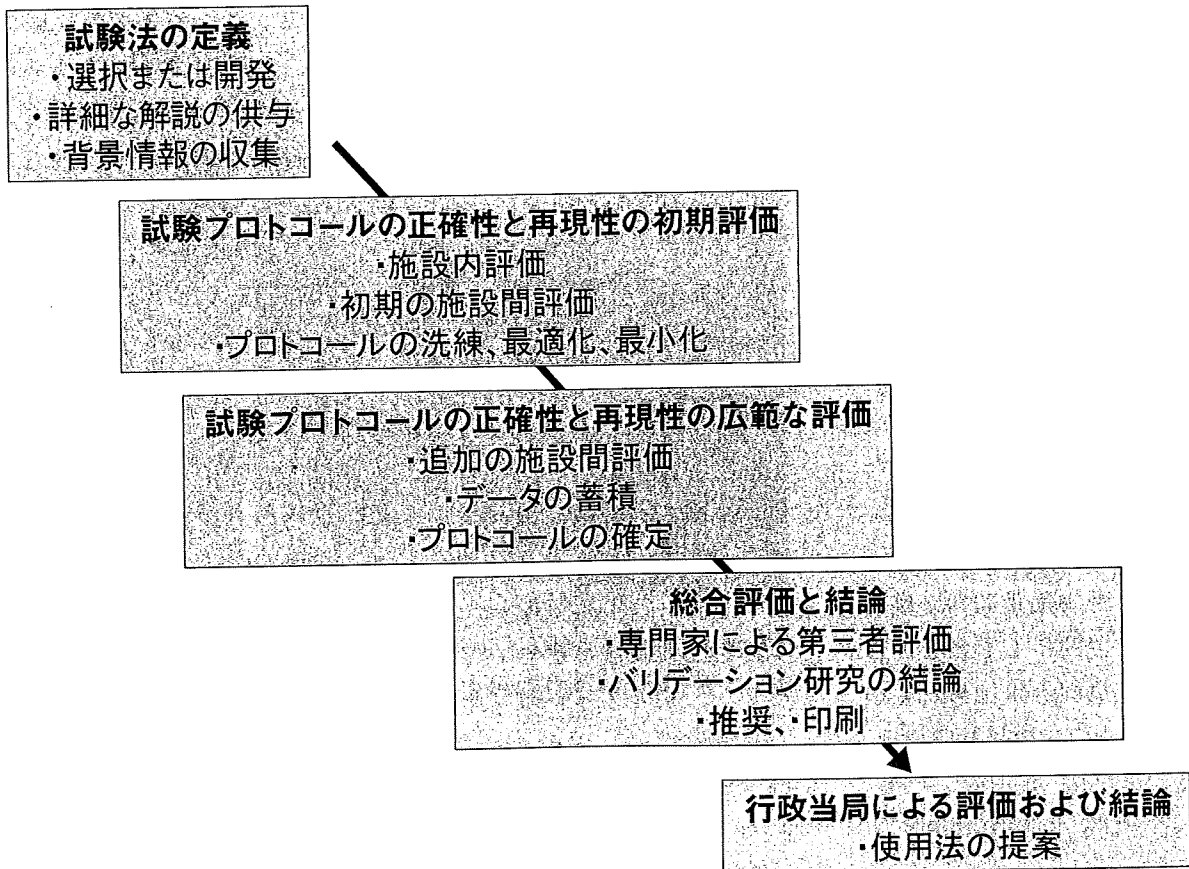


図1. 新規毒性試験法におけるバリデーションおよび行政受け入れの過程

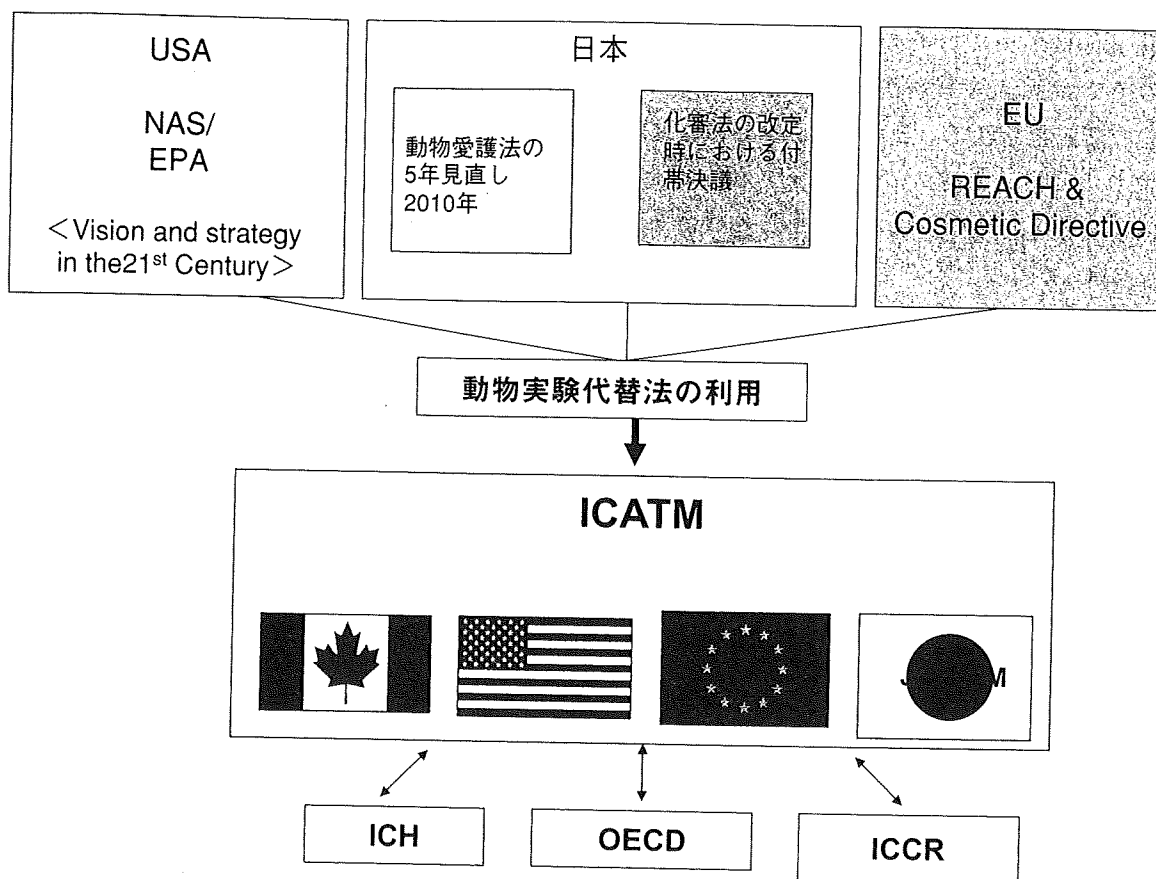


図2. 昨今の国際組織

影響を受けた試験法の見直しである。動物実験の3Rsに配慮して試験法の統合（慢性毒性試験と発がん性試験の統合など）や代替法がガイドラインに提案される場合が多くなっている。二つ目がOECDガイダンス文書No.34に示されている試験法の検証・評価である¹⁵⁾。試験法公定化までの道程を図1に示すが、動物実験も含め、新たに開発される試験法は検証研究や第三者評価を受けなければならないと、この文書は謳っている。このOECDテストガイドラインの潮流に沿って試験法が開発されるとすれば、代替法中心に検証研究や第三者評価が行われることは必然である。

日本ではこの試験法の公定化のために、新規試験法評価室に予算が付き、JaCVAMの種ができたことは評価して頂きたい。ただし、日本の活動が限定的であることから、このままでは欧米で開発され検証・評価された“特許で守られた代替法”を受入れるばかりとなる。

そのような動向の中、本年4月にICATM (International Cooperation on Alternative Test Methods) が設立された¹⁶⁾。国際的な代替法の協力組織として、NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) /ICCVAM、ECVAM/ESAC

(ECVAM Scientific Advisory Committee)、Health CanadaそしてJaCVAM合わせて4局の上部組織が合意した。この組織の目的は国際的な検証研究の推進、専門家による第三者評価の合同開催、さらに行政的な試験法の受入れの加速である。簡単に言えば、代替法のOECDテストガイドラインの早期成立である。JaCVAMは過去に検討された代替法も含め、日本で開発された試験法の公定化を進めているが、図2に示すように、今後、このICATM組織の中で、国際的な協調を図りながら、広範な試験法において、迅速な公定化に向け努力することとなる。

さらに、日本では本年に改定

された化審法において、その付帯決議の中でin silicoや代替法の活用について記載されている¹⁷⁾。欧米の流れを受け、わずかながら社会的なニーズが増している。2010年に見直しがなされると言われている「動物の愛護及び管理に関する法律」で実験動物に関する動向が注目されている^{18,19)}。

このような状況に鑑み、新規試験法評価室として組織の見直しや人員増、予算の増額を厚生労働省および総務省、財務省に求めている一方、経済産業省、環境省、農林水産省などの他省庁との連携や、トキシコロジー学会、日本動物実験代替法学会、日本環境変異原学界等の学会および関連した業界団体との協力

関係をこれまで以上に深めていきたい。この機会にJaCVAMを中心に、オールジャパンで対応する体制を整える必要がある。この機会を逃せば、試験法の確立という応用研究でも我々は世界に歯が立たなくなってしまうと考えている。

5. 終わりに

2009年秋に韓国およびブラジルに代替法検証センターの設立が決まった。ますます代替法の国際化が進むとともに、試験法の公定化を巡って混沌とした状況が続く可能性がある。ICATMができた理由を前述したが、実は代替法を巡る国際間の無駄な労力を緩和することが本音部分の

理由である。このICATMを通して、我々は欧米カナダに加え、韓国、ブラジルとも良好な関係を築いていきたい。さらにOECD加盟国との調整を円滑に進め、JaCVAMのそして、オールジャパンの存在感を国際的に示していきたいと考えている。

参考文献

- 1) National Academy Science (2007) Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy
<http://www.cof.orst.edu/cof/teach/agbiotox/Readings%202008/Toxicology-21stCentury-NAS-2007.pdf#search='NAS%20toxicology%20vision%20strategy'>
- 2) 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
- 3) ECB(2009)
<http://ecb.jrc.ir/REACH/>
- 4) ECH (2009)
http://ec.europa.eu/echa/home_en.html
- 5) EPAA (2009)
<http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/brochure.htm>
- 6) EC (2009) Alternative Testing Strategies, EUR22846
- 7) Hartung, T.(2006)
<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsaae/20kai.html>
- 8) JRC (2009)
<http://www.vet.uu.nl/nca/userfiles/other/ REACH>
- 9) 大野泰雄 (2004) 動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受入れの現状、国立衛研報、122、1-10
- 10) 小島肇夫 (2006) 動物実験代替に関する最近の動向、化粧品技術者会誌、40(4)263-268.
- 11) 小島肇夫 (2008) 安全性評価と動物実験代替法の現状、薬学雑誌、128 (5) 747-752.
- 12) ICCVAM(2009)
http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/EPreport/ocu_report.htm
- 13) ECVAM (2009)
<http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>
- 14) OECD (2009)
http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_100.html
- 15) 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
- 16) ICATM (2009)
<http://www.niehs.nih.gov/news/releases/2009/pttw.cfm>
- 17) 化審法改正法案に対する附帯決議 (2009)
<http://www.env.go.jp/chemi/kagaku/kaisei21/futai21.pdf>
- 18) 動物の愛護及び管理に関する法律 (2008)
http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend_law2/law.pdf
- 19) 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準(2008)
http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law_series/nt_h180428_88.html

医薬部外品の製造販売承認申請における 安全性の資料に関するあり方検討会報告

小島 肇 夫

要旨

医薬部外品の製造販売承認申請における安全性の資料に動物実験代替法（以下代替法と記す）を用いる場合のあり方を検討するため、皮膚科専門医や業界団体の意見を加えた組織を構築した。この下部組織として試験法毎に皮膚刺激性、感作性、皮膚透過性・経皮吸収性、眼刺激性、光関連毒性及び遺伝毒性の6分科会を設けた。これらの会にて代替法を積極的に導入しながら、医薬部外品における安全性評価の質の維持を基本に協議した。

その結果、動物福祉や動物実験の3Rs（Reduction、Refinement and Replacement）は尊重しなければならないが、医薬部外品の安全性レベルを維持することがより重要である。単純に、動物実験を実施しない、代替法のみという選択肢はありえない。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にてバリデーション研究や第三者評価が実施されたものしか認めない。代替法を利用する際には、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どの結論を得た。

キーワード：

医薬部外品、安全性評価、動物実験代替法

1. 医薬部外品とその安全性評価

医薬部外品とは、薬事法第二条第2項の規定により、“人体に対する作用が緩和なもの”とされている¹⁾。また、医薬部外品のうち、いわゆる薬用化粧品等については、治療を目的としているものではなく（医薬品ではない）、主な使用目的は“防止”であり、毎日使用することが想定されている日常品であるとされている。平成17年に改正された薬事法では、その責務は製造販売業者に求められることになり、製造販売承認申請（以下承認申請と記す）時に品質、有効性および安全性の評価のための資料を提出する必要がある。また、市販後においても安全性を確保するための情報提供や、有害事象等の情報収集等の責務が製造販売業者に求められている。

医薬部外品の承認申請にあたっては²⁾、申請品目の該当する申請区分によって、承認申請の際に添付すべき資料の範囲が異なってくる。例えば、申請区分1（新有効成分含有医薬部外品等：既に製造販売承認を受けている医薬部外品とその有効成分又は適用方法等が明らかに異なる医薬部外品）や申請区分3（新添加物含有医薬部外品等：申請区分1および申請区分2（既承認の医薬部外品と同一



Hajime KOJIMA, Ph.D.

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 新規試験法評価室室長
Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM),
National Institute of Health Sciences (NIHS), Japan

性が認められるもの) 以外の場合は、新規性の高い物質等に関連した安全性、有効性および品質に係る評価が必要である。

この安全性の確保のために、臨床試験成績の提出が求められている。臨床試験の実施に際しては、倫理的観点からその安全性を確保するために動物実験等の非臨床試験の実施が不可欠となっている。しかしながら、動物愛護・動物福祉の観点からは、動物実験において使用する実験動物数の削減や動物に対する苦痛の軽減が求められており、特に、人体に対する作用が緩和なものとしてされている医薬部外品においては、動物実験の回避が求められている。安全性資料の中で動物を用いる試験としては、第1表に示すように^{2,3)}、申請内容に応じて、単回投与毒性(急性毒性)に関する資料、反復投与毒性(亜急性毒性、慢性毒性)に関する資料、生殖発生毒性に関する資料、抗原性(皮膚感作性試験、光感作性試験

等)に関する資料、変異原性に関する資料、局所刺激(皮膚刺激試験、粘膜刺激試験等)に関する資料、吸収・分布・代謝・排泄に関する資料等あるいはガイドブック中の参考例の資料等の添付が必要であり、臨床試験にあたる試験としては、ヒトパッチに関する資料が該当する。これらの申請者から提出された資料に基づいて、PMDA(医薬品医療機器総合機構)の審査員が慎重に審査を行っている。

2. 欧米の動向

2003年にEUにおいて、化粧品指令7次改正が公布され、2009年3月に動物実験代替法(以下、代替法と記す)が確立されている試験がある場合には、①EU域内での動物実験の完全禁止、②動物実験した製品、動物実験をした原料を含む製品の販売禁止が決められている⁴⁾。さらに、EU委員会は、期限内の

第1表 医薬部外品および化粧品の安全性評価に求められている試験法

	【新医薬部外品】		【化粧品】 JCIA 安全性評価指針 (2008改訂)
	薬審1第24号 医薬審発第325号	参考例	
試 験 法	単回投与毒性	単回投与毒性	単回投与毒性
	反復投与毒性(亜急性毒性、慢性毒性)	反復投与毒性	-
	生殖発生毒性	生殖発生毒性	-
	局所刺激(皮膚刺激性)	皮膚一次刺激性	皮膚一次刺激性
		連続皮膚刺激性	連続皮膚刺激性
		光毒性	光毒性
	抗原性(皮膚感作性)	皮膚感作性	皮膚感作性
	抗原性(光感作性)	光感作性	光感作性
	局所刺激(粘膜刺激性)	眼刺激性	眼刺激性
	変異原性	遺伝毒性	遺伝毒性
	ヒトパッチテスト	ヒトパッチテスト	ヒトパッチテスト
吸収・分布・代謝・排泄	吸収・分布・代謝・排泄	-	

第2表 あり方検討会および各分科会委員

表2-1. あり方検討会

氏名	分類	所属
飯島 正文	皮膚科医	昭和大学病院
松永 佳世子	皮膚科医	藤田保健衛生大学医学部皮膚科
大野 泰雄	専門家	国立医薬品食品衛生研究所
増田 光輝	専門家	国立医薬品食品衛生研究所
小島 肇	専門家	国立医薬品食品衛生研究所
板垣 宏	業界代表	株式会社 資生堂
佐々 斉	業界代表	株式会社 資生堂
岡本 裕子	業界代表	コーセー株式会社
西山 直宏	業界代表	花王株式会社
見田 活	行政	医薬品医療機器総合機構
小野寺 博志	行政	医薬品医療機器総合機構
鷺田 淳	行政	厚生労働省審査管理課

表2-2. 皮膚刺激性試験分科会

氏名	分類	所属
河合 敬一	皮膚科医	河合敬一皮膚科医院
夏秋 優	皮膚科医	兵庫医科大学皮膚科
寒水 孝司	専門家	大阪大学
杉山 真理子	専門家	株式会社 資生堂
森 福義	業界代表	株式会社 ポーラ
辰見 寿	業界代表	サンスター株式会社
小島 肇	事務局	国立医薬品食品衛生研究所
オブザーバー 實川 節子	EPISKIN 開発元	日本ロレアル株式会社

表2-3. 眼刺激性試験分科会

氏名	分類	所属
平野 耕治	眼科医	藤田保健衛生大学
畠 賢一郎	専門家	株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング
森田 正道	獣医	アイリス動物医療センター
金子 豊蔵	専門家	国立医薬品食品衛生研究所
萩野 滋延	専門家	株式会社 資生堂
瀬戸 洋一	業界代表	プロクター・アンド・ギャンブル・ジャパン株式会社
小島 肇	事務局	国立医薬品食品衛生研究所

表2-4. 皮膚感作性試験分科会

氏名	分類	所属
横関 博雄	皮膚科医	東京医科歯科大学
中田 土起丈	皮膚科医	昭和大学医学部
大野 泰雄	専門家	国立医薬品食品衛生研究所
金澤 由基子	専門家	医薬品医療機器総合機構
坂口 斉	業界代表	花王株式会社
小島 肇	事務局	国立医薬品食品衛生研究所

表2-5. 光関連毒性試験分科会

氏名	分類	所属
上出 良一	皮膚科医	慈恵会医科大学
田中 憲穂	専門家	(財)食品薬品安全センター
森 辰実	業界代表	株式会社ノエビア
今井 教安	専門家	コーセー株式会社
小島 肇	事務局	国立医薬品食品衛生研究所

表2-6. 遺伝毒性試験分科会

氏名	分類	所属
林 真	専門家	(財)食品農医薬品安全性評価センター
能美 健彦	専門家	国立医薬品食品衛生研究所
本間 正充	専門家	国立医薬品食品衛生研究所
江幡 真也	業界代表	ライオン株式会社
笠松 俊夫	専門家	花王株式会社
小島 肇	事務局	国立医薬品食品衛生研究所

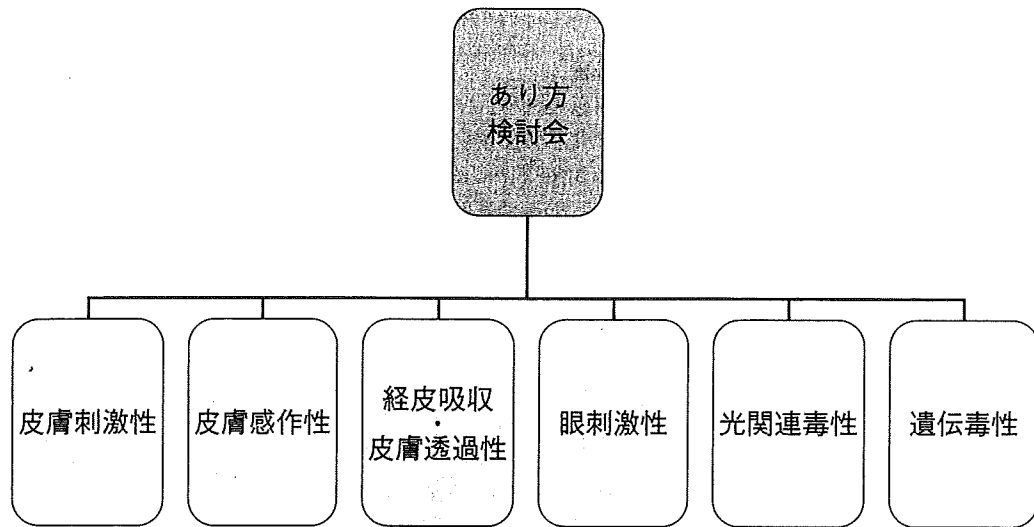
表2-7. 経皮吸収・皮膚透過性試験分科会

氏名	分類	所属
藤井 まき子	専門家	昭和薬科大学
杉林 堅次	専門家	城西大薬学部
桑原 裕史	業界代表	カネボウ化粧品株式会社
上月 裕一	専門家	株式会社 資生堂
小島 肇	事務局	国立医薬品食品衛生研究所

開発が困難と判断された試験法の場合には、2013年まで延長するとしている。これらに対応すべく、EUではCOLIPA（欧州化粧品工業会）およびECVAM（欧州代替法検証センター）が共同で試験法の開発、バリデーション研究および第三者評価を進めている。

本問題は日本で化粧品を輸出入する企業において大きな問題であるが、さらに本邦における特徴的な制度である医薬部外品における承認申請が問題を複雑化している。本問題を解決する糸口を見つけるため、代替法を用いる場合、その有効性と限界を明らかにし、化粧品や医薬部外品、医薬品等のスクリーニング法として、或いは行政が受入れる試験法としての妥当性を評価するとともに、動物実験を用いない場合における総合的な医薬部外品の安全性評価の手順・手段について検討す

る組織を厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「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：代表研究者 小島 肇」の中に構築した。この組織をあり方検討会と呼び、第1図に示すように、平成19年度に皮膚科医、化粧品業界代表者、安全性試験法や代替法の専門家の協力を受けて本会を設立し、さらに詳細な試験法毎の検討を行う分科会を設けた。これらの分科会は、試験法毎に皮膚刺激性、感作性、皮膚透過性・経皮吸収性、眼刺激性、光関連毒性および遺伝毒性の6つである。まず、これら分科会で議論を進め、この分科会の結論を受け、あり方検討会で議論を行った。上記検討会および分科会のメンバーを第2表に示す。



第1図 あり方検討会の組織

3. あり方検討会および各分科会の活動

あり方検討会では、以下のような活動方針を、分科会に示した。

- ①動物福祉や動物実験の3Rs (Reduction, Refinement and Replacement) を尊重する。
- ②代替法の第三者評価を行う委員会ではない。代替法を取り入れて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 (経済協力開発機構) 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) 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)。

以下にこの方針をもとに行われた各分科会の活動内容およびその結論を明記する。

1) 皮膚刺激性分科会

本分科会では、皮膚一次刺激性の評価に代替法を利用することが可能であるかについて検討し、代替法を取り入れて評価する場合の限界や注意点について検討した。

現在、医薬部外品の承認申請において、皮膚刺激性の評価項目として「皮膚一次刺激性試験」、「連続皮膚刺激性試験」および「ヒトパッチ試験」が設定されている。今回の検討においては、2007年4月27日付けで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™」を唯一の皮膚一次刺激性を評価する代替法として溯上に上げ⁵⁾、医薬部外品の申請における利用方法として検討した。検討中に、他のモデルであるEpiDerm™SIT (EPI-200) およびSkinEthic™RHEについても2008年11月5日にESACの追加承認を受けた⁵⁾。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⁶⁾、これら対象試験法を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