

厚生労働科学研究費補助金

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

平成19年～平成21年度 総合研究報告書

研究代表者 小島 肇

平成22(2010)年 4月

研究代表者

小島肇(国立医薬品食品衛生研究所 薬理部)

研究分担者

大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所)

松永佳世子(藤田保健衛生大学 医学部 皮膚科)

板垣宏(日本化粧品工業連合会 技術委員会)

山本直樹(藤田保健衛生大学 共同利用研究施設)

大森崇(京都大学大学院 医学研究科)

## 目 次

### I 総合研究報告

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 小島 肇	1
--	---

### II. 分担研究年度終了報告

1. 三次元ヒト培養表皮モデルを用いた皮膚一次刺激性評価に関する研究 小島 肇	23
2. 分子生物学的・組織化学的手法を用いた新規眼刺激性試験・ 眼毒性試験代替法の開発 山本直樹	37
3. 感作性試験代替法の開発 大野泰雄	91
4. バリデーショナルデータの統計解析 大森 崇	105
5. 代替法についての国際情勢の調査 板垣 宏	115
6. ヒト接触皮膚炎評価の見直し 松永佳世子	147
7. 動物実験代替法のバリデーショナルと第三者評価 小島 肇	153
1) 酵母成育阻害試験と赤血球溶血性試験を組み合わせた光毒性 試験代替法のバリデーショナル	161
2) 皮膚感作性試験 LLNA-BrdU法のバリデーショナル	191
3) 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ナル	253
4) 皮膚感作性試験 LLNA-DA法の第三者評価	335
5) 皮膚感作性試験 LLNA-BrdU法の第三者評価	365
6) 皮膚刺激性試験代替法の第三者評価	405
7) 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 試験代替法の専門家による第三者評価	457
8) 眼刺激性試験代替法の第三者評価	459
9) <i>In vitro</i> 発熱性物質試験の専門家による第三者評価	497
10) 皮膚腐食性試験代替法の行政的な受入れのための評価	499
11) 皮膚感作性試験 LLNA-DA法の行政的な受入れのための評価法	501

1 2)	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入れのための評価	-----	503
1 3)	眼刺激性試験代替法であるウシ摘出角膜の混濁および 透過性試験の行政的な受入れのための評価	-----	505
1 4)	ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法の 行政的な受け入れのための評価	-----	508
8.	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 小島 肇	-----	511

総合研究報告

研究代表者 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

動物実験については欧米を中心に動物愛護団体等からの反対運動が活発に行われており、動物を用いない安全性試験法の開発が迫られている。そこで、本研究では動物実験代替法（以下、代替法と記す）に関する国際情勢を考慮しながら、化粧品や医薬品の安全性評価のために用いられている皮膚刺激性、眼刺激性および感作性試験代替法の開発を目指した。また、バリデーション研究および専門家による第三者評価（以下、第三者評価と記す）により開発された試験法の行政的な適性を評価した。

皮膚刺激性試験代替法の開発においては、欧州で3次元培養表皮モデル EPISKIN が承認されたものの、わが国において販売されているいくつかのヒト表皮モデルは皮膚一次刺激性の評価方法は確立されていない。本研究では、EPISKIN で定められたプロトコールに準拠して、国産のヒト表皮モデルを用いた皮膚一次刺激性試験を試みた。その結果、EPISKIN を用いたプロトコールの評価結果が、全ての皮膚モデルで再現可能とは限らなかった。そのため、各モデルに適したプロトコールの検討が必要であると考察された。

眼刺激性試験代替法の開発においては、リポフェクション法とエレクトロポレーション法による新規角膜上皮不死化細胞株の作出を試み、さらに新規眼刺激性試験・毒性試験代替法で使用する角膜上皮細胞の特異的マーカーの検索を行った。その結果、ウイルスベクターを用いることなくSV40の遺伝子導入に成功し、不死化ヒト角膜上皮細胞（HCE-NY）の作出および本細胞を用いた三次元角膜培養モデルを構築に成功した。また、角膜上皮細胞の特異的マーカーであるkeratin-3を新たな眼刺激性評価の指標とできることが明らかになった。

感作性試験代替法の開発においては、ヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞の CD86 および CD54 の発現亢進を指標にした感作性試験代替法 (human Cell Line Activation Test: h-CLAT) の試験法確立に向けた有用性を検証した。施設間再現性の検討結果や既知化合物の評価結果より、いくつか改良すべきと考えられる点が見出された。

Draize 眼刺激性試験代替法のデータ利用という観点から、細胞毒性値で最大平均評価点 (MAS) 値も定量的な予測について検討した。5 物質の検討では、予測結果はガイダンスで提示されている刺激のカテゴリーの範囲を超えることはなかった。よって、この方法は定量的な予測に利用可能であると思われた。また、バリデーション研究によって認められた代替法が、未知の被験物質とともに同時に 3 つの程度の陽性対照物質の実験を行うことを想定し、ベイズ統計学の視点から統計的較正法の観点から提案法を導出することにした。また、バリデーションで用いられたドレイズ眼刺激性試験の各個体のデータを入手し、ドレイズ眼刺激性試験の刺激性のスコアである MAS の標準誤差を推定した。その結果、代替法を用いて動物実験のスコア予測を行う際、予測の適性評価には対象となる動物実験のスコアのばらつきも考慮する必要があると結論された。

代替法に関する国際情勢の調査における特筆すべき動きとしては、日米欧にカナダを加えた4極における化粧品規制協力国際会議 (ICCR) が設立された。国際貿易への障壁を最小化しつつ、消費者保護を維持する目的で、化粧品関連の問題について議論された。ICCRにおいて、JaCVAM、ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)、ECVAM (European Center for the Validation to Alternative Methods) およびカナダ政府の担当者は、代替試験のデザインや、実施、評価についての協力を進めていくための方向性を示すよう要請された。また、ICATM (代替法試験協力国際会議) が2009年4月27日に調印式を終え、正式に始動した。代替法に関する国際情勢の調査において、国内外の代替法に関する情勢は急速に変化しており、関連情報を継続的に収集分析し、その結果を公表していくことは、本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するうえで必要とされた。

日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会の代表および臨床医の立場からの情報収集として、欧州5カ国を訪問し化粧品をはじめとする接触皮膚炎の研究実態を調査し、欧州において皮膚科医、化学研究者、化粧品企業の密な連携がなされていた。また、国内の情報収集として、黒皮症が多発した1970年代の状況から比べると、2008年現在、化粧品や医薬部外品、あるいは外用医薬品の安全性は明らかに改善されていた。しかしながら、接触皮膚炎を引き起こしてしまう症例も少なくなかった。化粧品や医薬部外品の皮膚一次刺激のパッチテストについては、日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 皮膚刺激研究グループにて、一次刺激性評価のためのパッチテスト貼布時間の検討がなされた。その結果、24時間および48時間貼布の皮膚刺激反応には差を認めず、皮膚一次刺激性のパッチテストによる評価は、24時間貼布および48時間貼布の何れでも可能であることが明らかになった。

新規試験法の行政試験法としての適性評価については、新規に開発されたか、あるいは欧米で承認された試験法のバリデーション研究と第三者評価および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についての検討も行った。具体的には、バリデーション研究として、1) 資生堂から提案された酵母成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のバリデーション研究の総括を行うとともに、2) 皮膚感作性を調べるためのLLNA法の代替法であるLLNA-BrdU法の2次にわたるバリデーション研究、3) 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2次にわたるバリデーション研究を行った。

第三者評価については、1) 皮膚感作性試験としてLLNA-BrdU およびLLNA-DA法の評価、2) 酵母成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を行い、また欧米で開発された方法として、3) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、4) 牛摘出角膜試験および鶏摘出眼球試験による眼刺激性試験代替法、5) *in vitro* パイロジェン試験について適切な評価が実施された。

行政的な受入れのために、JaCVAM 評価会議において、1) ヒト皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法、2) 皮膚感作性試験としてLLNA-DA法の評価を行った。さらに、3) 酵母成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、4) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、5) 皮膚感作性試験 LLNA-BrdU、6) 牛摘出角膜試験による眼刺激性試験代替法および7) 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。

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。

## 分担研究者

板垣 宏 (日本化粧品工業連合会  
技術委員会)

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

大森 崇 (京都大学大学院 医学研究科)

松永佳世子 (藤田保健衛生大学医学部皮膚科)

山本直樹 (藤田保健衛生大学共同利用研究施設)

## A. 研究目的

動物実験については欧米を中心に動物愛護団体等からの反対運動が活発に行われており、動物を用いない安全性試験法の開発が迫られている。そこで、本研究では動物実験代替法(以下、代替法と記す)に関する国際情勢を考慮しながら、化粧品や医薬品の安全性評価のために用いられている代替法を開発する。また、開発された試験法の行政試験法としての適性を評価するものである。

具体的には、

- 1) 化粧品や医薬品の安全性評価のために用いられている皮膚刺激性、眼刺激性および感作性試験の代替法、代替法を用いた統計手法の開発を目指す。
- 2) 代替法に関する国際情報を収集する。
- 3) ヒト接触皮膚炎の見直しについては、国際外の情報収集およびパッチテスト貼布時間の検討がなされた。
- 4) 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、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について検討した。

## B. 研究方法

### B-1) 試験法の開発

#### B-1-1) 皮膚刺激性試験

欧州で3次元培養表皮モデル EPISKIN が承認されたものの、我が国において販売されているいくつかのヒト表皮モデルは皮膚一次刺激性の評価方法は確立されていない。本研究では、EPISKIN で定められた Post Incubation (PI) 法のプロトコールに準拠して、国産のヒト表皮モデルを用いた皮膚一次刺激性試験を試みた。国産のヒト表皮モデルとしては、取り扱いや価格を考慮した上で、*LabCyte* EPI-MODEL を選択した。EPISKIN を使用する PI 法のバリデーションで用いられた 48 種類の被験物質の中から、入手可能であった 45 種類の被験物質について、*LabCyte* EPI-MODEL を使用した PI 法を試みた。皮膚刺激性の検出には、細胞毒性試験およびサイトカイン測定試験を行い、EPISKIN の結果と比較した。また、*LabCyte* EPI-MODEL に最適な PI

法のプロトコールについても検討した。

また、国内で市販されているヒト表皮モデルとしては、*LabCyte* EPI-MODEL、EPISKIN、EpiDerm を、国産のヒト皮膚モデルとしては、*Vitrolife-Skin* および *TESTSKIN* を用い、EPISKIN のバリデーション研究で用いられた 48 種類の被験物質の中から、無作為に選んだ 14 種類の被験物質をすべてのモデルに供した。皮膚刺激性の指標としては、細胞毒性試験およびサイトカイン測定試験を行い、EPISKIN の結果と比較した。

#### B-1-2) 眼刺激性試験

BSE問題の発生以降、日本国内においてウシの眼球組織は研究機関でも入手することが禁止されていることから、日本国内での BCOP 試験を実施することは不可能である。そこで、ブタ角膜組織での代用が可能かどうかを検討した。

第2の検討として、新規の眼刺激性試験・眼毒性試験代替法を開発を行うため、市販のヒト角膜上皮細胞株 (HCEC-2) と正常角膜輪部組織から分離培養したヒト角膜上皮細胞 (HCE)、および既存の不死化ヒト角膜上皮細胞株 (HCE-T) を用いた。不死化細胞株作出のための遺伝子 (SV40) と細胞増殖・分化に影響する遺伝子 (hTERT) が角膜上皮細胞で働くことができるベクターの構築、および作成したベクターの角膜上皮細胞へのエレクトロポレーション法による遺伝子導入を行い、新規角膜上皮不死化細胞株と細胞分化を試みた。さらに新規眼刺激性試験・毒性試験代替法で使用する角膜上皮細胞の特異的マーカーの検索を行った。

#### B-1-3) 感作性試験

ヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞の CD86 および CD54 の発現亢進を指標にした感作性試験代替法 (human Cell Line Activation Test: h-CLAT) が日本において開発され、試験法確立に向けた有用性を検証した。施設間再現性の検討結果や既知化合物の評価結果より、いくつか改良すべきと考えられる点が見出され、検討を行った。具体的には、予測モデル、陽性対照物質の適用濃度、および CD86/CD54 発現亢進最小濃度 (EC150, 200) の算出方法を改良した。

また、主に化粧品原料として用いられている防腐剤、香料、染毛剤などの 30 化合物を h-CLAT により評価した。

さらに、防腐剤の検討細胞選択時に用いる Ni、SLS の固定濃度の検討、細胞培養条件の検討、フローサイトメーターの精度管理に関する検討を行った。

#### B-1-4) バリデーションデータの統計解析

また、IC50 から MAS を予測する方法の提案に

ついては、対数 IC50 と平均最大評価点 (MAS) との間に直線的な関係があることを前提とした。事前情報としてバリデーション研究の結果から直線のパラメータを求めた。次に、未知の被験物質を評価する施設での 3 つの陽性対照物質によりベイズ回帰によって直線を推定し、予測分布のパラメータを推定する方法を検討した

また、バリデーション研究で用いられたドレイズ眼刺激性試験の各個体のデータを入手し、ドレイズ眼刺激性試験の刺激性のスコアである MAS (最大平均評価点) の標準誤差をモデルとして用いて推定することにした。

## B-2) 情報収集

### B-2-1) 代替法情報の調査

情報収集は、過去の本研究による経験から、いくつかのホームページ (SCCP、OECD、ECVAM、ICCVAM、EPAA など) を定期的に検索すると共に EU については同地域の化粧品工業会との連繋を通じて実施した。この他、代替法の承認状況等については、専門学会の会誌やニュースレターも参考とした。

### B-2-2) ヒト接触皮膚炎の見直し

国際接触皮膚炎研究班 (International Contact Dermatitis Research Group:ICDRG) 班員として、本研究に関連した化粧品をはじめとする接触皮膚炎の欧州の情報を得るために ICDRG の班員であるフィンランドの Kristiina Turjanmaa 博士、スウェーデンの Magnus Bruze 教授、英国の Ian R White 教授および John MacFadden 博士、ベルギーの An Goossense 教授のクリニックと研究施設を訪問した。また、欧州接触皮膚炎学会 (European Society of Contact Dermatitis:ESCD) 理事長の Jean-Pierre Lepoittvin 教授の皮膚化学研究室を訪問し、化粧品に関わる接触皮膚炎の情報を国際的な立場で収集した。

2006~2007 年の藤田保健衛生大学皮膚科における化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを施行した症例についてまとめ、1992~1994 年、1995 年~1998 年の当科の結果と比較した。

また、2008 年に複数の施設で実施されたパッチテスト結果を集計・解析し、過去のアレルゲンの結果と比較した。

パッチテスト方法の検討として、被験者はテスト実施部位 (上背部傍脊椎部) に異常所見のない者に、パッチテストや動物試験にて刺激性が有るとされている物質および化粧品原料として汎用されている物質を貼布した。48時間貼布、24時間貼布、4時間貼布を施行した。

## B-3) 新規代替法の評価

日本で新規に開発されたか、あるいは欧米で承認された試験法のバリデーション研究と第三者評価、行政的受入れの評価および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について検討した。

### B-3-1) バリデーション研究

1) 資生堂から提案された酵母成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のバリデーション結果を総括するとともに、2) 皮膚感作性試験として LLNA-BrdU 法の 2 次にわたるバリデーション、3) 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 2 次にわたるバリデーションを行った。

### B-3-2) 第三者評価

1) 皮膚感作性試験 LLNA-DA 法、2) 皮膚感作性試験 LLNA-BrdU 法、3) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、4) 牛摘出角膜試験および鶏摘出眼球試験による眼刺激性試験代替法、5) 酵母成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、6) *in vitro* 発熱性物質試験、7) 細胞毒性試験による急性毒性試験代替法、8) 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。

### B-3-3) 行政的な受入れ評価

JaCVAM 評価会議において、ヒト皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法の評価を行った。1) ヒト皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法および 2) 皮膚感作性試験として LLNA-DA 法、3) 酵母成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、4) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、5) 皮膚感作性試験 LLNA-BrdU 法、6) 牛摘出角膜試験による眼刺激性試験代替法および 7) 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。

### B-3-4) 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

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を検討するための議論を行い、下部組織である 6 つの分科会 (皮膚刺激性、皮膚感作性、眼刺激性、光関連、遺伝毒性、経皮吸収・皮膚透過性) で検討を行った。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

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. 研究結果および考察

### C-1) 試験法の開発

#### C-1-1) 皮膚刺激性試験

LabCyte EPI-MODEL を用いた場合、既存の PI 法のプロトコールでは、陽性一致率は高いものの、陰性一致率は非常に低いことが明らかとなった。そこで、LabCyte EPI-MODEL に適した PI 法のプロトコールについて検討した結果、後培養時間を従来よりも短縮することで、陰性一致率を高めることが可能であった。一方、EPISKIN の PI 法のプロトコールを用いて、国内で入手可能なヒト表皮および皮膚モデルの細胞毒性を比較した。その結果、得られた結果はモデル毎に異なり、14 物質中すべてのモデルで同じ判定結果が得られた物質はなかった。これらの結果から、各モデルに適したプロトコールにおけるバリデーション研究が必要であることが明らかになった。

#### C-1-2) 眼刺激性試験

##### C-1-2-1) 凍結ブタ角膜組織片での評価

牛角膜組織片と同様にフルオレセインを用いた浸透性を評価した。結果として、標準物質の無刺激と MAS25、および MAS50 の間での違いは検出されたが、無刺激でのフルオレセインの浸透性が予想よりも高かったため、ベース値が高いものとなっており、有意差を出すことは出来なかった。

##### C-1-2-2) HCEC-2とHCEの継代培養と分析

角膜輪部組織から分離培養したHCEは、4継代目までは上皮細胞様の多角形の細胞形態を呈しており、p63、Integrin  $\beta$ 1およびp75NTR等の角膜上皮幹/前駆細胞マーカーを発現していた。

##### C-1-2-3) HCEへの遺伝子導入

新しく開発した電気泳動手法を用いることで、世界で初めてウイルスベクターを用いることなく、角膜上皮細胞へ高効率で遺伝子が導入できた。

結果として、SYN-2245-1とSYN-2245-2のい

れかの遺伝子を導入して選択分離した細胞（HCE-NY）は、現在までに30回以上の継代を行っているが、細胞増殖は衰えることなく、増え続けている。なお、このHCE-NYでは、keratin-3を全ての細胞で発現していることから、角膜上皮細胞としての特性の一部は保持できていた。C-1-2-4) keratin-3 mRNAを指標とした被験物質による細胞障害の評価

ヒト不死化角膜上皮細胞株（HCE-NY）を用いて、Triton X-100を被験物質（24時間反応）として、角膜上皮細胞特異的マーカーのkeratin-3 mRNAの発現量の変化について、リアルタイムPCR法を用いて検討した。

Triton X-100（24時間反応）において、従来のNeutral Red法でのIC<sub>50</sub>（約50  $\mu$ g/mL）よりも遥かに低濃度（3.1  $\mu$ g/mL）において、細胞への障害を検出することができた。

#### C-1-3) 感作性試験

陽性対照物質である DNCB の適用推奨濃度を、過去の試験結果に基づき 5.0  $\mu$ g/mL から 4.0  $\mu$ g/mL に変更し、高い安定性を確認した。さらに、従来の平均値による予測モデルを、生物反応をより適切に捉えられると考えられる個別評価に改良し、偽陰性が減少することを見出した。次に予測モデルの変更に伴い、CD86/CD54 発現亢進最小濃度（EC150, 200）の算出方法も、平均値から中央値へ変更し、同時に外挿法も加えることで効率と精度の両立を可能とする算出スキームを作成した。以上の改良により、h-CLAT 法の有用性が向上した。

防腐剤、香料、染毛剤の範囲では、自家蛍光を有する物質や揮発性物質を含む化粧品原料の感作性評価に有用であると考えられた。しかし、難溶性物質評価時の分散状態の違いが細胞毒性結果に与える影響など、今後実用化に当たっての課題も見出された。

防腐剤の検討細胞選択時に用いる Ni、SLS の固定濃度の検討では、Ni の 100  $\mu$ g/mL そして SLS の 55  $\mu$ g/mL を細胞の反応性確認時の適用濃度を決定できた。細胞培養条件の検討では、遠心分離による方法あるいは希釈による方法の違いについて、施設間の再現性が得られなかったため明確に結論づけることはできなかった。しかしながら、施設内で継代方法を統一することで試験結果のバラつきを最小限に抑えることは可能であった。フローサイトメーターの精度管理に関する検討から、h-CLAT の結果のばらつきは、機器によるものではなく、評価される細胞の違いに起因している可能性が高いことが示唆された。

#### C-1-4) バリデーションデータの統計解析



IC50 から MAS を予測する方法については、報告されているウサギ角膜由来細胞株を用いたクリスタルバイオレット試験 (SIRC-CVS) 法のバリデーション研究のデータを用いて、MAS の予測を行った。バリデーション研究で 27 物質を実験した施設のデータを用いて直線を求め、同じバリデーション研究に参加した他の施設のデータを用いて、直線の更新を行った。この施設の陽性対照ではない 5 物質について、MAS の予測値を求め、実測値との乖離を調べた。その結果、MAS の標準誤差は、MAS が 5 のときは少なくとも 1 程度、10 では少なくとも 2 程度の大きさがあることを考慮すべきであることがわかった。また、適用結果からは、事前情報と陽性対照の物質数の比をどの程度取るべきか基準が必要であった。予測が適切に行えているかの評価には対象となる動物実験のスコアのばらつきを考慮する必要があった。

## C-2) 情報収集

### C-2-1) 海外における代替法情報の調査

EU において ECVAM (European Center for the Validation to Alternative Methods) Scientific Advisory Committee (ESAC) が皮膚刺激性試験代替法として EPISKIN、EpiDerm SIT および SkinEthic RHE を、腐食性および強刺激性物質を検出するための眼刺激性試験代替法として Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay (BCOP) および Isolated Chicken Eye Test (ICE) を、REACH のための皮膚感作性試験として Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA)、水溶性物質の眼腐食性と強刺激性並びに水溶性の界面活性剤の無刺激性を確認するための試験法として Cytosensor Microphysiometer を、水溶性物質の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法として Fluorescein Leakage を承認した。

米国では、ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) が腐食性および強刺激性物質を検出する眼刺激性試験代替法の Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) と Isolated Chicken Eye (ICE) が、米国危険物質法 (Federal Hazardous Substance Act) の下で実施されるラベル表示のための分類に適用されることが了承された。また、NICEATM が急性経口毒性試験の投与開始用量の推定に用いる *in vitro* 細胞毒性試験に関する評価報告書を公表した。感作性試験代替法について、従来の LLNA から動物数を削減した rLLNA 並びに非 RI-LLNA (LLNA:DA および LLNA:BrDU-ELISA) が制限付で感作性、非感作性物質の識別に利用可であると ICCVAM の第三者科学専門家委員会で結論づけた。

また、Personal Care Products Council (PCPC)

(2007 年 11 月に CTFA から改称) から、従来の動物を用いた試験法に加え代替法を盛り込んだ Safety Evaluation Guidelines の改訂版が発行された。

2008 年度はさらに、日米欧にカナダを加えた 4 極における化粧品規制協力国際会議 (ICCR) が初めて開催された。ICCR において、JaCVAM、ICCVAM、ECVAM およびカナダ政府の担当者は、代替試験のデザインや、実施、評価についての協力を進めていくための方向性を示すよう要請された。一方、ICATM (International Cooperation on Alternative Test Methods) が 2009 年 4 月 27 日に調印式を終え、正式に始動した。

このように代替法に関する情勢は急速に変化しており、関連情報を継続的に収集分析し、その結果を公表していくことは、本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するうえで必要と考えられた。

### C-2-2) ヒト接触皮膚炎の見直しについて

欧州においては、パッチテスト試料が市販されて容易に入手できる。接触皮膚炎クリニックに化学分析のできる充実した皮膚科、職業皮膚科が存在する。特にベルギーでは化粧品企業と皮膚科医、化学者が協力して、CDESKPRO というコンピューターによるオンラインシステムを立ち上げており、化粧品の成分の登録、パッチテスト結果の登録、ネガティブリストの公開、パッチテストの支援システムなどが機能しており、アレルゲンの陽性率など、有用なデータがリアルタイムでだせる優れたネットワークを構築していた。

2006~2007 年の藤田保健衛生大学皮膚科における化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを施行した症例についてまとめ、1992~1994 年、1995 年~1998 年の当科の結果と比較した結果、シャンプー、クリーム、日焼け止め、口紅、染毛剤、美容液、ファンデーションが上位を占める傾向に変化はなかった。症例としては、刺激性接触皮膚炎が多かった。個々の症例において、ヒト接触皮膚炎が顔面でしか再現されないものがあった。

また、2008 年に複数の施設で実施されたパッチテスト結果を集計・解析し、過去のアレルゲンの結果と比較したところ、10 年間順位の変動はあるものの、陽性率の高いアレルゲン 10 種は同様であった。

パッチテスト貼布時間の検討では、刺激性が認められる成分では、24 時間貼付および 48 時間貼布は刺激性が評価可能であったが、4 時間貼布では刺激反応の発生は少なかった。48 時間貼布・24 時間貼布・4 時間貼布の 3 群間では刺激反応の出現率に有意差 ( $\chi^2$  2n×m 検定) が認められた。一方、48 時間貼布・24 時間貼布の 2 群では、

刺激反応の出現率に有意差 ( $\chi^2$  2n×m検定) は認められなかった。刺激反応の判定は、48時間貼布・24時間貼布では試料除去後0日、1日が刺激反応のピークとなっており、2日判定では低減していた。

48時間貼布では補強用の絆創膏(サージカルテープ)によるカブレの発生が多かった。「新判定基準」は「本邦基準」より被験物質の刺激性の差を検出し易い結果を得た

### C-3) 新規代替法の評価

#### C-3-1) バリデーショナル研究

##### 1) 資生堂から提案された酵母成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

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーのうち、2回のバリデーショナルを日本動物実験代替法学会に依頼し、学会バリデーショナル委員会下部組織としてバリデーショナル実行委員会を組織して実施された。両報告書提出後に補足された議論も含めて、最終的なバリデーショナル報告書としてまとめた。

##### 2) 皮膚感作性を調べるための LLNA 法の代替法である LLNA-BrdU 法のバリデーショナル研究

皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA) の放射性同位元素 (RI) 標識化合物を用いない代替法 (LLNA-BrdU法) の多施設バリデーショナル研究を日本動物実験代替法学会に依頼し、学会バリデーショナル委員会下部組織としてバリデーショナル実行委員会を組織して実施された。このバリデーショナル研究の結果、12 の被験物質の濃度範囲で得られた結果から、LLNA-BrdU法は LLNA法と比較してバラツキが大きく、試験法の改良が必要であると結論された。

これを受け、プロトコルを改良して第二次バリデーショナルを実施した。その結果、LLNA-BrdU法は施設間再現性がよく、LLNA法と同程度に代替可能性が高い試験法であるとされた。

##### 3) 皮膚刺激性を調べるための LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーショナル研究

皮膚刺激性を調べるための 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ナルを日本動物実験代替法学会に依頼し、学会バリデーショナル委員会下部組織としてバリデーショナル実行委員会を組織して実施された。このバリデーショナルの結果、25 被験物質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は全体として施設間再現性は良好であったとされた。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結論された。

#### C-3-2) 第三者評価

##### 1) 皮膚感作性試験 LLNA-DA 法の評価

ダイセル化学工業(株)から提案のあった皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA) の放射性同位元素 (RI) 標識化合物を用いない代替法 (LLNA-DA 法) は、欧米に比較し RI の管理に厳しい本邦でも容易に実施できることから LLNA 法に比較して利点があると判断された。また、LLNA-DA 法は施設内再現性および施設間再現性が高く、LLNA 法との結果の対応性が高く、皮膚感作性を評価する LLNA 法の代替として有用であると判断された。

##### 2) 皮膚感作性試験 LLNA-BrdU 法の評価

皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA) の放射性同位元素 (RI) 標識化合物を用いない代替法 (LLNA-BrdU 法) について、専門家による第三者評価が終了し、有用性や限界を確認した。

##### 3) 皮膚刺激性試験代替法

皮膚刺激性試験代替法として欧州で認証されている EPISKIN について、専門家による第三者評価が終了し、欧米の評価内容を確認した。

##### 4) 眼刺激性試験代替法

眼刺激性試験代替法として欧米で認証されている BCOP や ICE について、専門家による第三者評価が終了し、欧米の評価内容を確認した。

##### 5) 酵母成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

専門家による第三者評価が終了した。

##### 6) in vitro 発熱性物質試験

専門家による第三者評価が終了した。

また、7) 細胞毒性試験による急性毒性試験代替法、8) 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。

#### C-3-3) 行政的な受入れ評価

##### 1) ヒト皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法

皮膚腐食性試験代替法としての皮膚三次元モデル (Vitrolife-Skin™) においては、多施設バリデーショナルにおいて、国際的に承認されている EpiDerm™ と同等の識別能力を有するものと判断された。

##### 2) LLNA-DA 法の評価

ダイセル化学工業(株)から提案のあった皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA) の放射性同位元素 (RI) 標識化合物を用いない代替法 (LLNA-DA 法) は、欧米に比較し RI の管理に厳しい本邦でも容易に実施できることから

LLNA 法に比較して利点があると判断された。また、LLNA-DA 法は施設内再現性および施設間再現性が高く、LLNA 法との結果の対応性が高く、皮膚感作性を評価する LLNA 法の代替として有用であると判断された。

また、3) 酵母成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、4) 培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、5) 皮膚感作性試験として LLNA-BrdU 法、6) 牛摘出角膜試験による眼刺激性試験、7) 鶏摘出眼球試験による眼刺激性試験の評価を行い、1) 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。

#### B-3-4) 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

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」の下部機関である皮膚刺激性、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分科会であり方検討会の示す方向性に従い、代替法の長短所をまとめる作業を進めた。

その結果、各試験の主な結論が確認された。

##### 1) 皮膚刺激性分科会

EPISKIN からヒトパッチに至る問題点を検討している。

##### 2) 感作性分科会

LLNA に関しては、使用にあたり系統差、溶媒の問題に注意することを明記する。

##### 3) 眼刺激性分科会

代替法の受け入れについては、来年度から本格化する予定である。

##### 4) 光関連毒性分科会

代替法である 3T3-NRU の受け入れについては、ほぼ議論が終了した。

##### 5) 遺伝毒性分科会

*in vivo* 試験の扱いについての議論が今後必要である（あり方検討会は不要と判断した）。

##### 6) 経皮吸収・皮膚透過性分科会

*In vitro* 試験の受け入れに関する条件などを整理できた。

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 (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 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

1) 皮膚刺激性試験代替法の開発では、EPISKIN を用いた方法が、全ての皮膚モデルで再現可能とは限らない。そのため、各モデルに適したプロトコールの検討が必要であることが明らかになった。

2) 新規眼刺激性試験代替法の開発のため、ウイルスベクターを用いることなく SV40 の遺伝子導入に成功し、不死化ヒト角膜上皮細胞 (HCE-NY) を作出することに成功した。HCE-T に hTERT を導入した細胞では、三次元角膜培養モデルを構築することができた。角膜上皮細胞の特異的マーカーである keratin-3 を指標にすることで、従来の Neutral Red 法よりも低濃度で細胞への障害を検出することができた。

4) 感作性試験代替法の開発においては、ヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞の CD86 および CD54 の発現亢進を指標にした感作性試験代替法 (human Cell Line Activation Test: h-CLAT) の試験法確立に向けた有用性を検証した。施設間再現性の検討結果や既知化合物の評価結果より、いくつか改良すべきと考えられる点が見出され、検討を行った。

5) 眼刺激性試験における IC50 から動物実験結果を予測する方法においては、代替法のバリデーション研究のデータを事前情報として利用して、ベイズ回帰によって直線を推定し、予測分布のパラメータの推定する方法論の構築をほぼ確立できた。

6) 日米欧にカナダを加えた 4 極における化粧

品規制協力国際会議 (ICCR) が設立された。ICCR において、JaCVAM、ICCVAM、ECVAM およびカナダ政府の担当者により、国際貿易への障壁を最小化しつつ、消費者保護を維持する目的で、化粧品関連の問題が議論される。これを受け、代替法開発体制の観点からは、ICATM (International Cooperation on Alternative Test Methods) が設立された。ICATM が 2009 年 4 月 27 日に調印式を終え、正式に始動した。

- 7) 皮膚感作性試験については今後さらなるデータを集積して評価する必要がある。欧州の化粧品アレルゲン登録制度システムと同様なシステムの構築が待たれる。黒皮症が多発した 1970 年代の状況から比べると、2008 年現在、化粧品や医薬部外品、あるいは外用医薬品の安全性は明らかに改善されている。しかしながら、直接肌に触れる製品のため、接触皮膚炎を引き起こしてしまう症例も少なくなかった。皮膚一次刺激性のパッチテストによる評価は、24 時間貼布および 48 時間貼布の何れでも可能である。
- 8) 皮膚腐食性試験代替法としての皮膚三次元モデル (Vitrolife-Skin™) においては、多施設バリデーションにおいて、国際的に承認されている EpiDerm™ と同等の識別能力を有するものと判断された。
- 9) ダイセル化学工業 (株) から提案のあった皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA) の放射性同位元素 (RI) 標識化合物を用いない代替法 (LLNA-DA 法) は、は施設内再現性および施設間再現性が高く、LLNA 法との結果の対応性が高く、皮膚感作性を評価する LLNA 法の代替として有用であると判断された。
- 10) 行政的な受入れ評価として、JaCVAM 評価会議において、①培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法、②皮膚感作性試験 LLNA-BrdU、③牛摘出角膜試験による眼刺激性試験代替法および④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、行政的な受け入れを推奨することになった。
- 11) 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 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。

## F. 引用文献

なし

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

- 1) 大野泰雄：動物福祉と動物実験代替法への考慮の必要性について、*Biophilia* 3, 4-5 (2007)
- 2) 大野泰雄：日本薬理学会の奨める動物実験－苦痛の評価と軽減－「はじめに」および日本薬理学会の心動物実験指針、*日薬理誌*, 129, 5-9 (2007)
- 3) 大野泰雄：動物実験代替法の国際動向、*Fragrance Journal* 10, 20-28 (2007)
- 4) 大野泰雄：薬学研究における動物実験代替法研究の重要性とその問題点、*薬学雑誌*, 128 (5) 735-740 (2007)
- 5) 大野泰雄：WC6 (第 6 回国際動物実験代替法会議) を終えて、*日本動物実験代替法学会 News Letter*, 34, 2-4. (2007)
- 6) Ashikaga T., Sakaguchi H., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yamada T., Yoshida M., Ota N., Hasegawa S., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Kosaka N., Sono S and Ohno Y., "Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study", *AATEX*, 13 (1), 27-35, 2008.
- 7) Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Yamada T., Yoshida M., Kodama T., Sono S., Ashikaga T., Sato J., Ohta N., Hasegawa S., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H. and Ohno Y.: "A study of the criteria for THP-1 cells selection in the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) : Results of 2<sup>nd</sup> Japanese Inter-laboratory Study", *AATEX*, 13 (2), 55-62, 2008.
- 8) Sono S., Yamada T., Kosaka N., Okamoto K.,

- Mizuno M., Sato J., Yoshida M., Ota N., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H., Hasegawa S., Ashikaga T. and Ohno Yasuo : “A study on serum difference on test results in the human Cell Line Activation Test (h-CLAT): Results of 3<sup>rd</sup> Japanese inter-laboratory study”, *AATEX*, 13 (2), 63-69, 2008.
- 9) Mizuno M., Yoshida M., Kodama T., Kosaka N., Okamoto K., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Ashikaga T., Kuwahara H., Sakaguchi H., Sato J., Ota N., Okamoto Y. and Ohno Y. : “Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results: Results of the 4<sup>th</sup> Japanese inter-laboratory Study”, *AATEX*, 13 (2), 70-82, 2008.
- 10) 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. 11. “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”, in submitting.
- 11) 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., “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”, in submitting.
- 12) 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., “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”, in submitting.
- 13) 廣田衛彦, 鈴木美絵, 板垣宏, 相場節也, 細胞表面-SH 基を指標とした感作性試験代替法 (SH test). フレグランスジャーナル 10 月号, 49-54, 2007.
- 14) Hagino, S., Okazaki, Y., and Itagaki, H. : An *in vitro* tier evaluation for the identification of cosmetic ingredients which are not ocular irritants. *Altern Lab. Anim.* 36, 641-652, 2008.
- 15) 板垣宏, 萩野滋延: 動物実験代替法への化粧品企業における取り組み. *ファルマシア* 44, 863-868, 2008.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) Hirota, M., Suzuki, M., Hagino, S., Kagatani, S., Sasaki, Y., Aiba, S. and Itagaki, H. Modification of cell-surface thiols elicits the activation of human monocytic cell line: Possible mechanism involved in the effect of hapetens, 2,4-dinitrochlorobenzene and nickel sulfate. *J Toxicol Sci.*, 34, 139-150, 2009.
- 19) 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.
- 20) 矢上晶子, 松永佳世子: 皮膚アレルギーテストの結果をどう活かすか? *Visual Dermatol* 7:258-263, 2008
- 21) 曾和順子, 鈴木加余子, 鷺見康子, 松永佳世子: 口紅, *Visual Dermatol* 7:304-306, 2008
- 22) 矢上晶子, 松永佳世子: 皮膚アレルギーテストの結果をどう活かすか?, *Visual Dermatology* 7 (3) : 258-263 (2008)
- 23) 曾和順子, 鈴木加余子, 鷺見康子, 松永佳世子: アレルギー性接触皮膚炎 口紅, *Visual Dermatology* 7 (3) : 304-306 (2008)
- 24) 松永佳世子, 早川律子, 板見 智, 石井正光, 伊藤正俊, 安永千尋, 庄司昭伸, 藤本美穂, 鈴木真理, 流田妙子, 西井貴美子, 杉浦真理子, 矢上晶子, 乾 重樹, 小林裕美, 関東裕美, 岩佐明子, 田水智子, 加藤敦子, 高橋晴人, 山崎貞男: 接触皮膚炎の既往ならびにアトピー性皮膚炎を対象とした敏感肌用化粧品の使用試験, 皮膚の科学

- 7(1) : 61-74 (2008)
- 25) 松永佳世子: 顔の毛穴が目立つのはなぜ?、解体新ショー NHK 出版 東京 (2008)
- 26) 山北高志、中川真実子、松永佳世子: Q: 利用性の両手、主関節部に生じた湿疹病変 A: ヘアダイ皮膚炎、J Visual Dermatol 7(6) : 655-656 (2008)
- 27) 古田加奈子、亀山梨奈、鈴木加余子、松永佳世子: パッチテストで多種の外用剤に陽性であった皮膚潰瘍の 1 例、Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology 2(3) (Serial No. 6) : 167-172 (2008)
- 28) 松永佳世子、矢上晶子: ラテックスアレルギー、アナフィラキシーショック、克誠堂出版 東京 pp218-230 (2008)
- 29) 松永佳世子: ②接触皮膚炎、皮膚科典型アトラス 560 日本医事新報社 東京 23-28 (2008)
- 30) 松永佳世子: 皮膚アレルギー検査の実際について教えてください、Oral allergy syndrome の診断のコツと原因検索法について教えてください、食餌性アレルギーなどに伴うアナフィラキシーショックへの対応について教えてください、皮膚科診療こんなときどうする Q&A 中外医学社 東京 8-14 (2008)
- 31) 稲葉弥寿子、秋田浩孝、松永佳世子: 知らないとはずかしい 皮膚疾患】頭頸部 頬部、顎部の網目状の色素沈着 色素沈着性接触皮膚炎 (pigmented contact dermatitis, Riehl 黒皮症)、J Visual Dermatol 7(6)、635-636 (2008)
- 32) 松永佳世子: いつまでも若々しく、美しい肌でいるために、まいんど 9-11 (2009)
- 33) 松永佳世子: インプラント中の金属アレルギーによる皮膚障害が疑われた 10 症例の検討、J Environ Dermatol Cutan Allergol 3(1)、32-41 (2009)
- 34) 松永佳世子: よき伝統の継承・そして新たな出発、マルホ皮膚科セミナー 放送内容集 197 : 4-6 (2009)
- 35) 稲葉弥寿子、松永佳世子: 吉草酸プレドニゾロンによる接触皮膚炎、J Visual Dermatol 8(2) : 152-153 (2009)
- 36) 稲葉弥寿子、中川真実子、松永佳世子: 配合剤による接触皮膚炎、J Visual Dermatol 8(2) : 154-155 (2009)
- 37) 矢上晶子、松永佳世子: 日用品による接触皮膚炎、アレルギー・免疫 16 : 1344-6932、2009
- 38) 田中紅、稲葉弥寿子、中川真実子、鈴木加余子、松永佳世子: イソステアリン酸グリセリルによる接触口唇炎の 1 例、J Environ Dermatology & Cuban Allegro 3:163-169、2009
- 39) 中川真実子、松永佳世子: アロマオイルが原因の湿疹遷延例、J Visual Dermatology 8:468-469、2009
- 40) 佐野晶代、矢上晶子、山北高志、中川真実子、井上智子、鈴木加余子、松永佳世子: 2006 年に当科で化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを行った症例のまとめ、J Environ Dermatol & Cutan Allergol 3:94-100、2009
- 41) 松永佳世子、矢上晶子: 接触皮膚炎の臨床症状と検査、アレルギー・免疫 16 : 20-26、2009
- 42) 松永佳世子: 接触皮膚炎、皮膚臨床 51 : 特 : 49 : 1323-1331、2009
- 43) 松永佳世子: 疾患別: アレルギー診療のポイント 接触皮膚炎、medicina 47:272-275、2010
- 44) 松永佳世子: アレルギー診療のスキルアップ パッチテストの実際、medicina 47:287-290、2010
- 45) Yamamoto N., Hirano K., Kojima H., Sumitomo M., Yamashita H., Ayaki M., Taniguchi K., Tanikawa A., and Horiguchi M.: A study of cultured human corneal epithelial stem/progenitor cells derived from the corneal limbus. In vitro Cell. Dev. Biol. (under submitted)
- 46) Omori. T., Idehara. K., Kojima H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I., Yuasa, A. : Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 58 11-26 (2008)
- 47) Omori. T., Ikarashi, Y., Kanazawa, Y., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I., Yuasa, A., Validation studies on an alternative endpoint for the

- local lymph node assay (LLNA-DA):  
Importance of study management, WC6  
proceedings, 429-432 (2008)
- 48) 小島肇夫、感作性・刺激性試験／安全性評価のトラブル時の対応、現場レベルでの皮膚測定・評価～トラブル事例・対策～、pp. 268-273、サイエンス&テクノロジー (2007)
- 49) 小島肇夫、皮膚刺激性試験について、最新動物実験代替法、技術情報協会 pp. 63-71 (2007)
- 50) 小島肇夫、皮膚腐食性試験について、最新動物実験代替法、技術情報協会 pp. 75-84 (2007)
- 51) 小島肇夫、バリデーションについて、最新動物実験代替法、技術情報協会 pp. 267-273 (2007)
- 52) 小島肇夫、皮膚一次刺激性評価法、機能性化粧品素材開発のための *in vitro*／細胞／組織培養評価法ハンドブック、シーエムシー出版 pp. 308-314 (2007)
- 53) 小島肇夫、日本における動物実験代替法の開発動向、Fragrance Journal 10, 29-34 (2007)
- 54) 小島肇夫、動物実験代替法のバリデーション、COSMETIC STAGE, 8, 54-56 (2007)
- 55) 小島肇夫、代替法国際動向から見た新技術導入の可能性、動物実験代替法のためのバイオマテリアル・デバイス、シーエムシー出版 pp. 1-5 (2007)
- 56) 小島肇、急がれる動物実験代替法の開発ー皮膚モデルの現状、New Drug Discovery, 023号、p4、(2007)
- 57) 小島肇、アレルゴロジーVSトキシコロジー、皮膚アレルギーの旅 Vol. 7, No. 1, p1-7、(2008)
- 58) 小島肇夫、動物実験代替法の現状と展望、日本薬理学会会誌、130、505-509 (2008)
- 59) Kojima, H., JaCVAM: An organization supporting the validation and peer review of new alternatives to animal testing, WC6 proceedings, 483-485 (2008)
- 60) 小島肇夫、EUにおける動物実験代替法の現状と REACH 対策、日皮協ジャーナル、30 (2) 156-162 (2008)
- 61) 小島肇夫、皮膚感作性試験代替法の現状、Visual Dermatology, 7 (3)、328-331 (2008)
- 62) Kojima, H., Perspectives on validation and regulatory acceptance of animal alternative testings in Japan, P&G Actives Risk Communication, 2 (1), 1-4 (2008)
- 63) Kojima, H., Ando, T., Inagaki, K., Ohhira, M., Kosaka, T., Nakamura, Y., Torishima, H., Morikawa, N., Kanno, J., Kuboki, M., Genno, M., Nokata, M., Harada, T., Morimoto, T., Yoshimura, I., Ohno, Y.: Validation of human skin models for skin corrosivity tests in Japan, *Altern. Animal Test. Experiment*, 13, 36-44 (2008)
- 64) 小島肇夫: *in vivo* 経皮吸収試験法、最新・経皮吸収剤～開発と基礎から申請のポイントまで～、株式会社情報機構、東京、pp. 95-103 (2008)
- 65) 小島肇夫: *in vitro* 経皮吸収試験法、最新・経皮吸収剤～開発と基礎から申請のポイントまで～、株式会社情報機構、東京、pp. 104-113 (2008)
- 66) 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)
- 67) 小島肇夫: 動物実験の3Rsにおける国内外の動向、ファルマシア、44 (9)、857-861 (2008)
- 68) 小島肇夫: REACH 対応に必要な動物実験代替法の現状、コスメティックステージ、2 (5)、1-4 (2008)
- 69) 小島肇夫: 動物実験代替法に関する 2008 年の国際動向、Fragrance Journal、2009-1、65-69 (2009)
- 70) 小島肇夫: 動物実験代替法の現状と展望、J. Environ Dermatol Cutan Allergol, 3 (1)、1-6 (2009)
- 71) Arai, S., Yamamoto, N., Kato M., and Kojima, H.: An *in vitro* evaluation methods to test ocular irritation using a human corneal epithelium model, *Altern. Animal Test. Experiment*, 13 (2), 83-90 (2008)
- 72) 小島肇夫: 動物実験の3Rsにおける国内外の動向、城西大学生命科学研究センター報告第7号、p37-50 (2009)
- 73) 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?、B10 INDUSTRY, 26 (8) 42-49 (2009)
- 74) 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)
- 75) 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)
- 76) 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)
- 77) 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)

- 78) 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)
- 79) 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)
- 80) 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)

#### G-2) 学会発表

- 1) 大野泰雄：第6回国際動物実験代替法会議開催報告。日本動物実験代替法学会総会 (2007. 11. 20) 東京
- 2) 金子晃久、加藤基浩、橋本博幸、山田泰弘、長谷川真絹、中村明生、神山佳輝、森田繁道、大野泰雄：中空糸3次元培養ヒト凍結肝細胞を用いたCYP3A酵素誘導評価と施設間バリデーション。日本薬学会第128年会 (2008. 3. 28)
- 3) Ashikaga T., Sakaguchi H., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yamada T., Yoshida M., Ota N., Hasegawa S., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Kosaka N., Sono S. and Ohno Y., "Results of a Japanese Ring Study of a Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting Skin Sensitization Potential (1st report): Inter-laboratory Reproducibility", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.
- 4) Okamoto K., Kosaka N., Kuwahara H., Mizuno M., Okamoto Y., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Yoshida M., Ohta N., Kodama T., Sato J., Sakaguchi H., Ashikaga T. and Ohno Y., "Results of a Japanese Ring Study of a Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting Skin Sensitization Potential (2nd report): A study of the Criteria for THP-1 Cell Selection", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.
- 5) Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Yoshida M., Kodama T., Sato J., Ota N., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H., Ashikaga T. and Ohno Yasuo., "Results of a Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (3rd Report): Effect of Serum

Difference", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.

- 6) Mizuno M., Yoshida M., Kodama T., Sato J., Ota N., Okamoto Y., Kosaka N., Okamoto K., Kuwahara H., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Sakaguchi H., Ashikaga T. and Ohno Y., "Results of a Japanese Ring Study of a Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Predicting Skin sensitization Potential (4th report): Effects of pre-culture conditions", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.
- 7) Wakuri, S., Kitagaki, M., Itagaki, H., Ohno, Y., and Tanaka, N., "Application of cytotoxicity assays as alternatives to acute oral systemic toxicity tests", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007.
- 8) 小坂七重、稲葉宏幸、岡本賢二、水野誠、菌さき子、加藤義直、岸正孝、足利太可雄、岡本裕子、桑原裕史、中村恒彰、坂口斉、大野泰雄：In vitro 皮膚感作性試験：h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の日本における共同研究 (第5報) - 防腐剤の評価におけるh-CLATの有用性検討一、日本動物実験代替法学会 21回大会、ポスター番号33、2008.
- 9) 岡本賢二、加藤義直、岸正孝、桑原裕史、菌さき子、小坂七重、水野誠、稲葉宏幸、中村恒彰、岡本裕子、坂口斉、足利太可雄、大野泰雄：In vitro 皮膚感作性試験：h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の日本における共同研究 (第6報) - 染毛剤の評価におけるh-CLATの有用性検討一、日本動物実験代替法学会 21回大会、ポスター番号34、2008.
- 10) 菌さき子、水野誠、小坂七重、岡本賢二、加藤義直、稲葉宏幸、中村恒彰、岸正孝、桑原裕史、坂口斉、岡本裕子、足利太可雄、大野泰雄：In vitro 皮膚感作性試験：h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の日本における共同研究 (第7報) - 香料成分の評価におけるh-CLATの有用性検討一、日本動物実験代替法学会 21回大会、ポスター番号35、2008.
- 11) Inoue, T., Masuda, M., Akita, M., Kojima, H. and Ohno, Y.: JaCVAM statement on new alternative to animal testing, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 12) Hagino, S., Hoya, M., Sono, S., Ishikawa,



- M., Ashikaga, T., and Itagaki, H., "Effect of antibiotic-antimycotic on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT)", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007.
- 13) Hirota, M., Suzuki, M., Hagino, S., Kagatani, S., Sasaki, Y., Aiba, S., and Itagaki, H., "Role of cell-surface thiols in activation of hapten-treated THP-1 cells", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007a.
- 14) Hirota, M., Suzuki, M., Hagino, S., Kagatani, S., Sasaki, Y., Aiba, S., and Itagaki, H., "Role of cell-surface thiols in activation of hapten-treated THP-1 cells and evaluation as a biomarker for *in vitro* sensitization test." Society of Toxicology 46th annual meeting, 2007b.
- 15) Hoya, M., Hirota, M., Suzuki, M., Hagino, S., and Itagaki, H., "Development of alternative photosensitization assay using human monocyte-derived cells", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007.
- 16) Ishikawa, M., Ashikaga, T., Hagino, S., and Itagaki, H., "Development of 3D-culture model of THP-1 cells for evaluating skin sensitization potential of insoluble test samples", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences - Beijing satellite symposium, 2007.
- 17) Itagaki, H., "Alternatives for eye irritation testing: History and present status in Japan", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007.
- 18) Itagaki, H., "Current Status of Alternative Methods & Activities of the JSAAE (The Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments)", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences - Beijing satellite symposium, 2007.
- 19) Kagatani, S., Sasaki, Y., Mizuashi, M., Hirota, M., Suzuki, M., Itagaki, H., and Aiba, S., "Role of cell-surface thiols in activation of hapten-treated dendritic cells", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007.
- 20) Kosaka, N., Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Itagaki, H., and Nishiyama, N., "Evaluation of the *in vitro* skin sensitization test; Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) using the modified prediction model", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007.
- 21) Suzuki, M., Hirota, M., Hagino, S., Itagaki, H., and Aiba, S., "Construction of decision tree of *in vitro* sensitization assay using changes of cell surface thiols as a biomarker (SH test)", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007.
- 22) 鈴木美絵, 廣田衛彦, 萩野滋延, 板垣宏, 相場節也, "細胞表面-SH 基を指標とした感作性試験代替法 (SH test) の開発 (2) : 試験条件の確立", 日本トキシコロジー学会学術年会, 2007.
- 23) 廣田衛彦, 鈴木美絵, 萩野滋延, 加賀谷早織, 佐々木喜教, 板垣宏, 相場節也, "細胞表面-SH 基を指標とした感作性試験代替法 (SH test) の開発 (1) ~感作性処理した THP-1 細胞の活性化における細胞表面-SH 基の役割~", 日本トキシコロジー学会学術年会, 2007.
- 24) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Nukada, Y., Kosaka, N., Sono, S., Nishiyama, N., and Itagaki, H. : Database of h-CLAT (cell-based skin sensitization test) for clarification of applicability domain, 45th Congress of the European Societies of Toxicology, 2008.
- 25) 萩野滋延, 岡崎有羽子, 北垣雅人, 板垣宏 : SIRC 細胞毒性試験と3次元培養真皮モデルを用いる試験の組合せによる眼刺激性評価法の検討", 日本動物実験代替法学会第 21 回大会, 2008.
- 26) 足利太可雄, 坂口斉, 額田祐子, 小坂七重, 伊藤勇一, 藪さき子, 西山直宏, 板垣宏 : 既知化合物 (100 品) による皮膚感作代替法試験 h-CLAT の有用性評価, 日本動物実験代替法学会第 21 回大会, 2008.
- 27) 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.
- 28) 佐野晶代, 矢上晶子, 中川真美子, 井上智子, 安部正通, 稲葉弥寿子, 中澤有里, 山北高志, 鈴木加余子, 松永佳世子 : 化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを行った症例 2006. 第32回日本化粧品学会, 東京, 2007年6月7-8日
- 29) Matsunaga K. : How should we evaluate skin irritancy by human patch test?

- International Symposium on Contact Dermatitis, The 25<sup>th</sup> Anniversary of the Korean Contact Dermatitis Research Group, Seoul, Korea, June 14-17, 2007
- 30) 稲葉弥寿子、秋田浩孝、鷺見康子、中澤有里、菅谷直樹、加藤佳美、松永佳世子: ハイドロ器ノン軟膏による色素沈着性接触皮膚炎の1例. 第25回日本美容皮膚科学会、横浜、2007年8月18-19日
- 31) 山田 貴亮、長谷川靖司、赤松浩彦、山本直樹、山口弘毅、石井 泉、松永佳世子、中田悟: マイクロアレイによる新規感作性マーカーの探索. 第37回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会、名古屋、2007年 12月14-16日
- 32) 佐野晶代、矢上晶子、中川真美子、井上智子、安部正通、稲葉弥寿子、中澤有里、山北高志、鈴木加余子、松永佳世子: 2006年に当科で化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを行った症例のまとめ. 第37回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会、名古屋、2007年 12月14-16日
- 33) 関東裕美、日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会皮膚刺激研究グループ: 皮膚一次刺激性評価としてのクローズドパッチテスト貼布時間の検討、第37回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会、名古屋、2007年 12月14-16日
- 34) Kayoko Matsunaga: International Workshop on Skin Safety Evaluation of Cosmetics and Chemicals: From Genetics, Alternatives and Human Testing Japanese collaboration on human patch testing. The 17th International Contact Dermatitis Symposium and the 11th Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium Kyoto International Conference Center Nov 5-8 2009
- 35) Tamie Suzuki, Shoko Matsukuma, Akiko Yagami, Mamiko Nakagawa, Kayoko Matsunaga: Benefits of a topical moisturizer containing a novel oligomer ester for barrier-damaged skin. The 17th International Contact Dermatitis Symposium and the 11th Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium Kyoto International Conference Center Nov 5-8 2009
- 36) Beni Tanaka, Mamiko Nakagawa, Yasuko Inaba, Keiko Hirokawa, Kayoko Suzuki, Akiko Yagami, Kayoko Matsunaga: Patch test results of cosmetics and related allergens over the 3 years from 2006 to 2008 at the Department of Dermatology, Fujita Health University Hospital. The 17th International Contact Dermatitis Symposium and the 11th Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium Kyoto International Conference Center Nov 5-8 2009
- 37) 伊佐見真実子、矢上晶子、亀山梨奈、美浦麻衣子、稲葉弥寿子、松永佳世子: 眼瞼の接触皮膚炎を疑いパッチテストを行った症例のまとめ. 第251回日本皮膚科学会東海地方会 名古屋市、2010年3月7日
- 38) 田中 紅、中川真実子、稲葉弥寿子、廣川景子、安部正通、山北高志、鈴木加余子、松永佳世子: 化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを行った症例2008年のまとめ. 第34回日本化粧品学会 東京 2009年6月11日12日
- 39) Yamamoto N., Kojima H., Tanikawa A., Horiguchi M. Abstracts of 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.
- 40) 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)
- 41) 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)
- 42) 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 4 1 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、神戸 (2009)
- 43) 山本直樹、平野耕治、谷口孝喜. ヒト角膜上皮細胞の分離培養法と不死化細胞株の樹立. 第41回藤田学園医学会総会、2009. (愛知・豊明)
- 44) Yoshiaki Ikarashi, Takashi Omori, Yukiko Kanazawa, Kenji Idehara, Hajime Kojima, Takashi Sozu, Kazunori Arima, Hirohiko Goto, Tomohiko Hanada, Taketo Inoda, Tadashi Kosaka, Eiji Maki, Takashi Morimoto, Shinsuke Shinoda, Naoki Shinoda, Masahiro Takeyoshi, Masashi Tanaka, Mamoru Uratani,

- Masahito Usami, Atsushi Yamanaka, Tomofumi Yoneda, Isao Yoshimura and Atsuko Yuasa, First Inter-laboratory validation study on LLNA-DA, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.254, Tokyo (2007)
- 45) Yukiko Kanazawa, Takashi Omori, Yoshiaki Ikarashi, Kenji Idehara, Hajime Kojima, Takashi Sozu, Kazunori Arima, Hirohiko Goto, Tomohiko Hanada, Taketo Inoda, Tadashi Kosaka, Eiji Maki, Takashi Morimoto, Shinsuke Shinoda, Naoki Shinoda, Masahiro Takeyoshi, Masashi Tanaka, Mamoru Uratani, Masahito Usami, Atsushi Yamanaka, Tomofumi Yoneda, Isao Yoshimura and Atsuko Yuasa, Second Inter-laboratory validation study on LLNA-DA, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.255, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, Tokyo (2007)
- 46) Takashi Omori, Yoshiaki Ikarashi, Yukiko Kanazawa, Kenji Idehara, Hajime Kojima, Takashi Sozu, Kazunori Arima, Hirohiko Goto, Tomohiko Hanada, Taketo Inoda, Tadashi Kosaka, Eiji Maki, Takashi Morimoto, Shinsuke Shinoda, Naoki Shinoda, Masahiro Takeyoshi, Masashi Tanaka, Mamoru Uratani, Masahito Usami, Atsushi Yamanaka, Tomofumi Yoneda, Isao Yoshimura and Atsuko Yuasa, Validation studies on LLNA: Importance of study management, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.264, Tokyo (2007)
- 47) Omori T. (2009). Prediction of the toxicity score by in vitro test: an application of Bayesian linear regression. *ALTEX* 26, Spec. Issue 181.
- 48) Omori T. (2009). Prediction of the toxicity score by in vitro test: an application of Bayesian linear regression. *AATEX* 14, Supplement 1060.
- 49) Kojima, H. JaCVAM Update, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.119, Tokyo (2007)
- 50) Kojima, H. JaCVAM Process to Validate and Peer Review of New Alternative Methods, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.82, Tokyo (2007)
- 51) Kojima, H. Validation study using Japanese models, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.64, Tokyo (2007)
- 52) Arai, S., Yamamoto, N. and Kojima, H., Safety evaluation test using a human cultured epidermal model- with the ECVAM validation proposal and chemicals-, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.224, Tokyo (2007)
- 53) Kojima, H., Arai, S., Kubo, K. and Kato M., Dose-response evaluation using a corneal model, an alternative to Draize eye irritation testing, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.223, Tokyo (2007)
- 54) Stokes, W. S., Bremer, S., Jacobs, M., Ono A., Kojima, H., Ceger, P., Deal F. and Tice, R., NICVEATM/ECVAM/JaCVAM Multi-phase International validation study of an in vitro estrogen receptor transcriptional activation assay to detect agonist and antagonist activity, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.265, Tokyo (2007)
- 55) Kojima, H., International Validation Study of Non Animal Screening Assay for Endocrine Disrupter, 2007 National Institute of Toxicological Research International Symposium, Korea (2007)
- 56) 小島 肇, 代替法を取り巻く内外の動きと今後の方向性、皮膚基礎研究クラスターフォーラム第2回教育セミナー、東京 (2007)
- 57) 小島 肇, 動物実験と代替法の現状、城西大学生命科学研究センター講演会、城西大学 (2007)
- 58) 小島 肇, EUにおける動物実験代替法の現状と REACH 対策、日皮協・会員研究会、京都 (2007)
- 59) 小島 肇, 3次元培養皮膚モデルを用いた皮膚毒性の評価、化粧品の安全性・機能性評価の最前線、第17回動物細胞工学会シンポジウム、東京 (2007)
- 60) 小島 肇, 3次元培養皮膚モデルを用いた皮膚毒性の評価-REACHの現状と将来-, 日本動物実験代替法学会 技術講習会「3次元培養皮膚モデルの活用」、東京 (2007)
- 61) 小島 肇, 動物実験代替法を用いて皮膚刺激性をどう評価するか、シンポジウム「化粧品・化学物質の皮膚安全性(刺激性・感作性)をどう評価するか、第37回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、名古屋 (2007)
- 62) Arai, S., Saitou, M., Takashima, Y. Honma, M. and Kojima, H., A new trial for in vitro Comet assay using a 3-dimensional human epidermal model, 36<sup>th</sup> Annual Meetings of the

- Japanese Environmental Mutagen Society, Kitakyusu (2007)
- 63) Kojima, H., et al, Validation and implementation, Round table on International aspects of validation & accept, Regulatory Acceptance and Implementation of 3R approach, Annual Conference 2007 EPAA, Brussels (2007)
- 64) Kojima, H., The Importance of the in vivo comet assay in genotoxicity testing, Predictive Human Toxicity and ADME/TOX studies, 3<sup>rd</sup> Annual conference of Mondial Research Presentation, Brussels (2008)
- 65) 小島 肇, 国内外の規制動向、WC6 フォロアアップシンポジウム 3Rs に基づく動物実験の規制と第三者認証、東京 (2008)
- 66) Kojima, H., et al., Panel Discussion, ICCVAM Ten-Year Anniversary Symposium, Washington DC (2008)
- 67) Kojima, H., Opening remark, Workshop on Acute chemical safety testing: Advancing in vitro approaches and Humane Endpoints for systemic Toxicity Evaluation, Washington, DC (2008)
- 68) Hajime Kojima, Masahiro Takeyoshi Takashi Omori, Takashi Sozu, Kazunori Arima, Kenji Idehara, Yoshiaki Ikarashi, Yukiko Kanazawa, Eiji Maki, Naoto Nakagiri, Masashi Tanaka, Atsuko Yuasa, and Isao Yoshimura, Inter-laboratory validation study on LLNA-BrdU, 47<sup>th</sup> Annual SOT meeting, Seattle (2008)
- 69) 小島 肇, 日本の動向と JaCVAM の活動、JaCVAM 第 1 回ワークショップ「昨今の試験法ガイドラインを巡る国際動向」、東京 (2008)
- 70) 小島肇夫, REACH 対応と動物実験代替法、第 128 回 FJ セミナー、東京 (2008)
- 71) Kojima, H., Japanese Collaboration on Alternative to Animal Toxicology Testing, World Congress on in Vitro Biology, Tucson (2008)
- 72) 小島肇, 武吉正博、大森崇、寒水孝司、有馬和範、出原賢治、金澤由基子、牧栄二、中桐直人、五十嵐良明、田中正志、吉村功、湯浅敦子: LLNA-BrdU 法の施設間バリデーション研究、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、東京 (2008)
- 73) 小島肇, 武吉正博、出原賢治: 非 RI 法による皮膚感作性試験代替法 (LLNA 法) のバリデーション研究—試験法概要—、第 15 回日本免疫毒性学会学術大会、東京 (2008)
- 74) 出原賢治、小島肇、武吉正博: 非 RI 法による LLNA 法の比較、第 38 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、大阪 (2008)
- 75) Kojima, H., International Current of 3Rs International Symposium on the 3Rs Promotion in Asia, Saitama (2008)
- 76) 小島 肇: 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、日本動物実験代替法学会第 21 回大会、埼玉 (2008)
- 77) 杉山真理子、河合敬一、小島 肇、寒水孝司、辰見寿、夏秋優、森福義: 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あり方検討委員会報告 皮膚刺激性分科会からの報告、日本動物実験代替法学会第 21 回大会、埼玉 (2008)
- 78) 金澤由基子、横関博雄、中田土起丈、坂口斉、大野泰雄、小島 肇: 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あり方検討委員会報告 感作性試験分科会からの報告、日本動物実験代替法学会第 21 回大会、埼玉 (2008)
- 79) 瀬戸 洋一、萩野 滋延、畠 賢一郎、森田 正道、平野 耕治、金子 豊蔵、小島 肇: 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あり方検討委員会報告 眼刺激性分科会からの報告、日本動物実験代替法学会第 21 回大会、埼玉 (2008)
- 80) 藤井まき子、小島 肇、杉林堅次、上月裕一、桑原裕史: 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あり方検討委員会報告 皮膚透過・経皮吸収試験分科会からの報告、日本動物実験代替法学会第 21 回大会、埼玉 (2008)
- 81) 笠松俊夫、江幡真也、林 真、能美建彦、本間正充、小島 肇: 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あり方検討委員会報告 遺伝毒性分科会からの報告、日本動物実験代替法学会第 21 回大会、埼玉 (2008)
- 82) 武吉正博、小島 肇、大森崇、寒水孝司、有馬和範、出原賢治、金澤由基子、牧栄二、中桐直人、五十嵐良明、田中正志、吉村功、湯浅敦子: LLNA-BrdU 法の施設間バリデーション研究、日本動物実験代替法学会第 21 回大会、埼玉 (2008)
- 83) 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 予備試験結果、日本動物実験代替法学会第 21 回大会、埼玉 (2008)