

- 84) 小島 肇 : in vitro 遺伝毒性試験—光と影—、第 37 回日本環境変異原学会、沖縄 (2008)
- 85) 小島 肇 : 毒性試験における培養細胞の利用、安全性評価研究会 2008 年冬のセミナー、東京 (2008)
- 86) 小島 肇 : 動物実験適正化のグローバルな動き—代替法の動きを中心に—、日本制約工業協会医薬品評価委員会 第 102 回基礎研究部会総会、京都 (2009)
- 87) Kojima, H. , Current aspects of LLNA-DA and LLNA-BrdU as alternatives for skin sensitizer classification in Japan, 2009 Winter Conference of Korean Society of Alternatives to Animal Experiments, Seoul (February, 2009)
- 88) R Tice, F Deal, P Ceger, D Allen, J Gordon, J DeLange, S Bremer, M Nakamura, H Kojima, A Ono, W Stokes : Establishing a Historical Database for a Multi-phased International Validation Study of a Stably-Transfected Estrogen Receptor (ER) Transcriptional Activation (TA) Test Method, 48<sup>th</sup> Annual SOT meeting, Baltimore (2008)
- 89) J Strickland, M Paris, D Allen, R Tice, H Kojima, P Prieto, M Wind, W Stokes : ICCVAM/NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Acute Systemic Toxicity Evaluations, 48<sup>th</sup> Annual SOT meeting, Baltimore (2008)
- 90) 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)
- 91) 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)
- 92) 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)
- 93) 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)
- 94) 小島 肇 : バリデーション試験の今後の予定について、コメン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)
- 95) 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)
- 96) 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)
- 97) Kojima, H. : 3D comet assay, JaCVAM experience, 5<sup>th</sup> International Workshop on Genotoxicity Testing, Basel (2009)
- 98) Kojima, H., Yamakage, K., Burlinson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Corvi, R., Uno, Y., Schechtman, L., Tice, R. and Honma, M. : International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 8<sup>th</sup> International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
- 99) 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)
- 100) 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)
- 101) 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)
- 102) 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)

- 103) 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)
- 104) 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)
- 105) 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)
- 106) 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)
- 107) 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)
- 108) 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)
- 109) 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)
- 110) 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)
- 111) 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)
- 112) Hayashi, M., Uno, Y., Honma, M., Schectmann, L., Tice, R., Corvi, R., Morita, T., Asano, N. and Kojima, H.: In vivo Comet Assay: Update on the on-Going international validation study, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 113) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schectman, L. and Hayashi, M.: International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 114) 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)
- 115) 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)
- 116) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schechtman, L. and Hayashi, M.: International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 25<sup>th</sup> ICEM, Florence (2009)
- 117) Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Schechtman, L., Tice, R., Corvi, R.,

- Morita, T., Asano, N. and Hayashi, M., : In vivo Comet Assay: Update on the on-Going international validation study, 25<sup>th</sup> ICEM, Florence (2009)
- 118) 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)
- 119) 小島 肇 : In vitro 安全性・機能性評価および作用メカニズム・新規物質探索研究の最前線、第 22 回動物細胞工学シンポジウム、東京 (2009)
- 120) 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)
- 121) Kojima, H. : Japanese views in the 3Rs in the 21st century, ZEBET's 20th Anniversary Symposium, Berlin, Germany (2009)
- 122) Kojima, H. : Organization of JaCVAM and its activity, KoCVAM International Symposium and 6th Congress of KSAAE, Seoul (2009)
- 123) 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)
- 124) 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)
- 125) 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)
- 126) 小島 肇、飯島正文、松永佳世子、佐々 斉、板垣 宏、岡本裕子、西山直宏、小野寺博志、見田 活、鷺田 淳、益山光一、増田光輝、大野泰雄 : 医薬部外品の承認申請における安全性に関わる資料のあり方検討委員会報告、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 127) 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)
- 128) 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)
- 129) 本間正充、山影康次、Burlinson, B.、Escobar, P.、Pant, K.、Kraynak, A.、林 真、中嶋圓、鈴木雅也、Corvi, R.、宇野芳文、Schechtman, L.、Tice, R.、小島 肇 : In vitro アルカリコメットアッセイ国際バリデーション研究、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 130) 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)
- 131) 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)
- 132) 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)
- 133) 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)
- 134) 伊藤正俊、関東裕美、鷺崎久美子、松永佳世子、矢上晶子、中川真実子、加藤則人、河合敬一、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 年 11 月 6 日-8 日
- 135) 中村昌文、半田洋士、小野 敦、小島 肇 : Lumi-cell ER アッセイ法の国際バリデーション(第二報)、第 12 回環境ホルモン学会研究発表会、東京 (2009)
- 136) 小島 肇、飯島正文、松永佳世子、佐々 斉、板垣 宏、岡本裕子、西山直宏、小野寺博志、見田 活、鷺田 淳、益山光一、増田光輝、大野泰雄 : あり方検討会設立の経緯および動物実験代替法の現状、医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わる資料のあり方検討委員会報告、東京 (2009)

- 137) 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)
- 138) 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)
- 139) 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)
- 140) JaCVAM第3回ワークショップにおける講演発表)
- 坂口 斉 “試験の原理と概要”
- 足利 太可雄 “具体的試験法”
- 太田 尚子 “施設間再現性”
- 岡本 賢二 “細胞選択条件”
- 藪 さき子 “血清選択条件”
- 中村 恒彰 “細胞培養条件”
- 水野 誠 “香料の評価”
- 小坂 七重 “防腐剤の評価”
- 加藤 義直 “染毛剤の評価”
- 小島 肇 “今後の展望”

H. 特許情報  
なし

## 分担研究年度終了報告書

### 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

研究分担者 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所  
協力研究者 新井晶子 国立医薬品食品衛生研究所

#### 研究要旨

【背景と目的】 化学物質のヒト皮膚への刺激性を予測する試験法として、ウサギやモルモットを使用した皮膚一次刺激性試験が行われている。ウサギ等の皮膚表面に被験物質を塗布し、紅斑および浮腫を指標として被験物質の刺激性を評価する方法は、ドレイズ試験法と呼ばれ、OECD テストガイドライン 404 にも認証されている。しかしながら、多くの動物を犠牲にしなければいけないことから、ドレイズ試験を代替するための、ヒト由来の材料を使用した *in vitro* の皮膚一次刺激性評価法が必要であると考えられた。そこで開発されたのが、再構築されたヒト表皮モデルである。EPISKIN というヒト表皮モデルを使用する試験法（Post Incubation : PI 法）は、ドレイズ試験との一致率が高いことが実証されており、唯一、国際的な評価を得ている。わが国においても、いくつかのヒト表皮モデルが販売されているが、それらを用いた皮膚一次刺激性の評価方法は確立されていない。そこで、本研究では、2008 年度に EPISKIN で定められた 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。その結果、EPISKIN で定められた PI 法とは異なる最適なプロトコールを検討した。さらに、2009 年度はすべての国産表皮および皮膚モデルにおける結果を求め、比較検証した。

【方法】 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。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、国産のヒト表皮モデルとしては、*LabCyte* EPI-MODEL、EPISKIN、EpiDerm を選択した。国産のヒト皮膚モデルとしては、*Vitrolife-Skin* および *TESTSKIN* を選択した。EPISKIN のバリデーション研究で用いられた 48 種類の被験物質のなかから、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。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。

【結果】 *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。

EPISKIN の PI 法のプロトコールを用いて、国産表皮および皮膚モデルの細胞毒性を求めた。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。

【結論】 EPISKIN を用いた PI 法の評価結果が、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。*LabCyte* EPI-MODEL の場合、後培養時間を短縮した方が *in vivo* データとの一致率が高いと考察された。EPISKIN を用いた PI 法のプロトコールが、全ての皮膚モデルで再現可能とは限らないことが明らかになった。そのため、各モデルに適した科学的に立証され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。

## A. 研究目的

皮膚一次刺激性を予測する方法には、ウサギを使用したドレイズ試験法がある(1)。ドレイズ試験法は、OECDのテストガイドラインにも定められており(2)、現在まで、医薬品、医薬部外品およびそれらの原材料等の安全性を評価する方法として、最も多く利用されてきた試験法といえる。しかしながら、動物愛護法の改定に伴い、わが国においても動物実験の削減が重要課題となっている。また、ウサギとヒトとでは動物種が異なるため、ヒトにおいては刺激陽性物質であっても、ドレイズ試験では偽陰性と判定されてしまう危険性も考えられる。そのため、動物実験を介さない、かつヒト由来の試験材料を用いた *in vitro* の安全性評価方法の確立が求められるようになった。

そこで開発されたのが、再構築されたヒト表皮モデル(ヒト表皮モデル)である。EPISKIN、SkinEthics および EpiDerm というヒト表皮モデルを使用して、被験物質処理後、後培養する試験法(Post Incubation:PI法)のドレイズ試験との一致率が高いことが報告された(3)。さらに、2007年にECVAM(欧州代替法センター)の顧問会議であるESACにより、皮膚一次刺激性を評価する *in vitro* 試験法として承認された(4)。2008年には同様にESACでヒト表皮モデルSkinEthics および EpiDermを用いたMTTアッセイも認証された。

一方、わが国においては、安価で安定供給が可能ないくつかのヒト表皮または皮膚モデル(表皮層の下に真皮層を併せ持つモデル)が販売されている。しかし、それらを用いた皮膚一次刺激性の評価方法は統一されていない。そこで、2007年度の本研究では、EPISKINで定められたPI法とは異なる最適なプロトコルを検討した。2008年度はすべての国産表皮および皮膚モデルにおける結果をPI法で求め、比較検証した。

## B. 研究方法

### B-1) 試験に用いた国産培養表皮および皮膚モデル

国産とは、日本国内で購入可能な培養ヒト表皮モデルまたは培養ヒト皮膚モデルと定義した。

培養表皮モデルとしては、SKinEthic社よりEPISKIN、倉敷紡績株式会社からEpiDerm、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングからLabCyte EPI-MODELを購入した。

培養皮膚モデルとしては、グンゼ株式会社

からVitrolife-Skin および東洋紡株式会社からTESTSKINを購入した。

実験は、モデル到着日またはその翌日から開始した。実験開始までの間、モデルはそれぞれに決められた温度状態で保管した。

LabCyte EPI-MODELは、正常ヒト角化細胞をフィーダー細胞とともにフィルターメンブレン上に播種し、培養液中に含まれる分化誘導因子およびエアリフト培養によって、分化および重層化させたヒト表皮モデルである。特性の異なる層構造をとり、ヒト表皮組織における、基底層、有棘層、顆粒層、角質層の病理学的所見に類似している(図1-a)。また、ヒト表皮組織に特異的な分化マーカーであるサイトケラチン-14の発現も確認されている(図1-b)。以上より、LabCyte EPI-MODELは表皮組織様に分化したヒト由来の試験材料といえる。また、これらの特性は、EPISKINとも類似していることから、LabCyte EPI-MODELはEPISKINに代わる表皮モデルとして利用可能ではないかと考えられた。



図 1-a

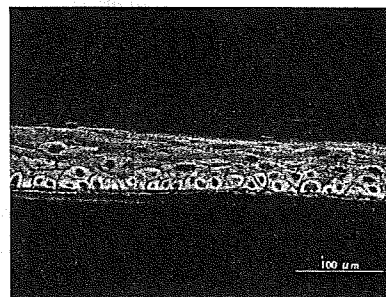


図 1-b

図 1-a; LabCyte EPI-MODEL のパラフィン切片のヘマトキシリン・エオジン染色像。基底細胞から上層にいくにつれて扁平な形態へと変化している。最上層の濃いピンク色の部分が角質層である。図 1-b; LabCyte EPI-MODEL のパラフィン切片のサイトケラチン-14を用いた免疫組織化学染色像(サイトケラチン-14:緑, DAPI:青)。

### B-2) 被験物質

EPISKINを用いたPI法<sup>15min-42hour</sup>のプレバリデーション報告によると、48種類の化学物質(既にドレイズ試験で刺激性が評価されたも

の)について皮膚一次刺激性評価を行い、ドレイズ試験との一致率を求めている(4)。

本研究を始めるにあたり、上記のプレバリデーション結果の再現性を、我々でも確認する必要があった。そのため、プレバリデーションで評価された48物質の中から、入手可能な45物質を用いた(Table 1-1)。モデル間の検討のためには、Table 1-2に示すように、LabCyteで予測率の低かった14物質(刺激陽性物質7種類、刺激陰性物質7種類)を選択した。

### B-3) EPISKINを用いたPI法<sub>15min-42hour</sub>の概要

三次元ヒト培養表皮モデルを使用した皮膚一次刺激性評価方法のなかで、唯一、国際的な承認が得られているものは、EPISKINを用いたPost Incubation (PI)法である。PI法とは、表皮モデルの表面に被験物質を15分間暴露し、丁寧に洗浄した後、42時間の後培養を行うものである(以後、PI法<sub>15min-42hour</sub>と記述する)。評価指標には、細胞毒性試験およびサイトカイン測定試験を行うとされている。PI法についてのプレバリデーション報告は2005年に発表され(4)、2006年から2007年にかけてバリデーションが実施された。その結果、ドレイズ試験との一致率が良好であることが証明され、2007年にECVAM(欧州代替法センター)の顧問会議であるESACにより、皮膚一次刺激性を評価する*in vitro*試験法として承認された(4)。一方、わが国においてEPISKINを使用した安全性評価試験を行うためには、いくつかの障害がある。第一に、24ウェルタイプ1キットあたり約23万円(輸送費含む)と、非常に高額であること。第二に、国内に製造元がなく、フランスより空輸されてくるため、モデルへのストレスが懸念されること。第三に、現在のところ、輸出時の制限により海外への供給が安定していないことがある。そのため、安価で安定供給が可能な国産モデルEPISKINに代わる表皮モデルの選択と、それを用いたPI法<sub>15min-42hour</sub>の再現性について検討することにした。

### B-4) 細胞毒性試験およびサイトカイン測定試験

細胞毒性試験には、MTTアッセイを用いた。MTTアッセイは、細胞内のミトコンドリアにおける酵素活性を測定することで、コントロールに対するサンプルの細胞生存率を求める手法である。酵素活性の測定には、MTT

(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)が細胞内に取り込まれ、ミトコンドリア内の脱水素酵素によってホルマザンに置換される反応を利用している。ホルマザンは青色の非水溶性の結晶で、有機溶媒(イソプロパノール等)によって抽出することができ、570nmの波長において吸光度を測定することができる。本研究においては、後培養ののちに、MTTアッセイを行った。その際、蒸留水のみを処理したもの(コントロール)の吸光度を、100%生存率とした。また、サイトカイン測定試験には、インターロイキン(IL)-1 $\alpha$ アッセイを用いた。IL-1 $\alpha$ は、免疫応答のトリガーであり、刺激応答とも深く関与していることが報告されている(5)。さらに、皮膚一次刺激性の検出にIL-1 $\alpha$ アッセイが有用であることも知られている(6)。試験プロトコルとしては、後培養後のアッセイ培地を採取し、IL-1 $\alpha$ のELISA測定キット(JIMRO, Japan)を使用して、アッセイ培地中に分泌されたIL-1 $\alpha$ の濃度を測定するものである。MTTアッセイと同様に、蒸留水のみを処理したもの(コントロール)のIL-1 $\alpha$ 濃度を基準値とした。

### B-5) 刺激の評価方法

本研究において行われた試験方法および判定方法は、前述のECVAMプレバリデーション報告を参考にしている(4)。本研究の開始が2006年であったため、2007年に行われたバリデーション報告を参考にすることはできなかった(7)。しかしながら、バリデーションは、プレバリデーション報告に準じて実施されたことを言及しておく。

PI法<sub>15min-42hour</sub>では、二段階の評価を行うことになっている(図2)。一次評価は、細胞毒性試験の結果から、細胞生存率が50%以下であれば「刺激性あり」とみなされる。反対に、細胞生存率が50%以上の場合は、二次評価へと進む。二次評価では、サイトカイン測定試験の結果から判定される。細胞生存率が50%以上であっても、IL-1 $\alpha$ の濃度が、コントロールの値に対して5倍以上であれば「刺激性あり」とみなされる。したがって、「刺激性なし」と判定されるのは、細胞毒性試験において細胞生存率が50%以上であり、かつ、サイトカイン測定試験においてIL-1 $\alpha$ の濃度がコントロールの値の5倍以下の場合である。

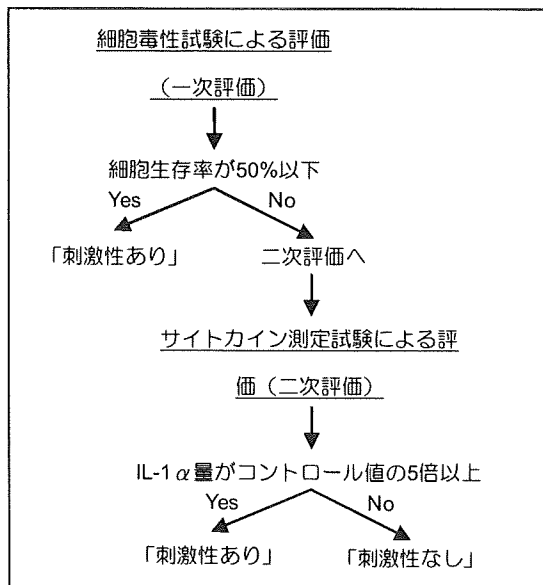


図 2 ; 刺激性評価のフローチャート

なお、PI 法<sub>15min-42hour</sub>では、二段階の評価を行うことになっているが、モデル間の比較のためには、一次評価の MTT アッセイのみで評価した。細胞毒性試験の結果から、細胞生存率が 50%以下であれば「刺激性あり」とみなされる。反対に、細胞生存率が 50%以上の場合は、「刺激性なし」と判定される。

### C. 研究結果

#### C-1) EPISKIN を用いた PI 法<sub>15min-42hour</sub>の再現性

EPISKIN を用いた PI 法<sub>15min-42hour</sub>のプレバリデーション報告によると、48 種類の化学物質（既にドレイズ試験で刺激性が評価されたもの）について皮膚一次刺激性評価を行い、ドレイズ試験との一致率を求めている。その結果、刺激陽性物質を予測できる確率（以下、陽性一致率と記す）は 95%、刺激陰性物質を予測できる確率（以下、陰性一致率と記す）は 78.6%であった。この結果は、*in vitro*の皮膚一次刺激性評価法としては、非常に高い一致率をマークしたと評価されている(4)。

本研究を始めるにあたり、上記のプレバリデーション結果の再現性を、確認する必要があった。そのため、プレバリデーションで評価された 48 物質の中から、無作為に 14 物質（刺激陽性物質 7 種類、刺激陰性物質 7 種類）を選択し、EPISKIN を用いて PI 法<sub>15min-42hour</sub>を行った。その結果、刺激陽性物質および刺激陰性物質、いずれにおいても 100%の確率で再現性を認めることができ、EPISKIN を用いた PI 法<sub>15min-42hour</sub>は信頼性のある評価法であると考えられた。

#### C-2) LabCyte EPI-MODEL を用いた PI 法<sub>15min-42hour</sub>の有用性

LabCyte EPI-MODEL を使用しても、PI 法<sub>15min-42hour</sub>を行えば、EPISKIN と同様の結果を得ることが可能か検討した。プレバリデーションで評価された 48 物質の中から、入手可能であった 45 物質（刺激陽性物質 19 種類、刺激陰性物質 26 種類）について、PI 法を用いた皮膚一次刺激性評価を行った。その結果、陽性一致率は 95%となり、EPISKIN の結果と等しいことが明らかとなった。しかしながら、陰性一致率は 42.3%と低いことから、LabCyte EPI-MODEL に PI 法<sub>15min-42hour</sub>を応用することは表 1 に示すように、不可能なことが示された（付録 1 を参照のこと）。したがって、LabCyte EPI-MODEL に最適な試験プロトコルが必要であると考えられた。

表 1 ; LabCyte EPI-MODEL を用いた PI 法<sub>15min-42hour</sub>の結果

	陽性一致率 (%)	陰性一致率 (%)
LabCyte EPI-MODEL	95	42.3
EPISKIN	95	78.6

#### C-3) LabCyte EPI-MODEL に最適な試験プロトコルの検討

被験物質の暴露時間あるいは後培養時間を変更して、PI 法<sub>15min-42hour</sub>の改変を行った。まず、無作為に 11 種類の被験物質を選択した（陽性物質 5 種類、および、誤判定をしまった陰性物質 6 種類、詳細は付録 2 を参照のこと）。暴露時間を従来の 15 分から 1、3 および 5 分に変更したところ、3 分以上の暴露では、陰性一致率が急激に減少することが明らかとなった（表 2-a）。続いて、後培養時間を 42 時間から 1、6 および 12 時間に変更したところ、後培養を 6 時間以上行くと、陰性一致率が減少することが示された（表 2-b）。したがって、両一致率が最も高くなるのは、後培養時間を 1 時間へと短縮した場合であることが明らかとなった（このプロトコルを PI 法<sub>15min-1hour</sub>とする）。

表 2-a ; 後培養時間は 42 時間とし暴露時間を



変更した場合の一致率。

	陽性一致率 (%)	陰性一致率 (%)
1min	60	66.7
3min	100	33.3
5min	100	16.7

表 2-b ; 暴露時間は 15 分とし後培養時間を変更した場合の一致率。

	陽性一致率 (%)	陰性一致率 (%)
1h	60	83.3
6h	100	0
12h	100	0

#### C-4) PI 法<sub>15min-1hour</sub>による 45 化学物質の評価結果

PI 法<sub>15min-1hour</sub>を用いて、45 化学物質の皮膚一次刺激性を再評価した。その結果、陰性一致率を 46.2%から 76.9%に高めることができた。一方、陽性一致率は 73.7%となり、EPISKIN を用いる PI 法<sub>15min-42hour</sub>に比べると、低い結果となった(表 3, 全被験物質についての詳細な結果は、付録 3 を参照のこと)。

表 3 ; 各モデルに最適な PI 法を用いた評価結果

	陽性一致率 (%)	陰性一致率 (%)
LabCyte EPI-MODEL (PI 法 <sub>15min-1hour</sub> )	73.7	76.9
EPISKIN (PI 法 <sub>15min-42hour</sub> )	95	78.6

#### C-5) LabCyte を用いた PI 法<sub>15min-42hour</sub> および PI 法<sub>15min-1hour</sub> の比較

LabCyte を用いて PI 法<sub>15min-42hour</sub> および昨年検討した PI 法<sub>15min-1hour</sub> の比較検証を実施した。

その結果、Table2 に示すように、後処理時間を短くすることにより、陽性と判断される物質が減り、陰性と判断される物質が増えた。Specificity (特異度) が 65.4%から 80.8%に増し、逆に Sensitivity (感度) が 84.2%から 57.9%まで減った。これらの結果を合わせると、Accuracy (一致度) に大きな差はない(後短時間で 71.1%、長時間で 73.3%)と考えられた。よって、PI 法<sub>15min-42hour</sub> を以後他のモデルの処理に用いることとした。

#### C-6) 他のモデルを用いた PI 法<sub>15min-42hour</sub> の検討

LabCyte で間違いの多かった 14 物質を用いて、他のモデルを用いて PI 法<sub>15min-42hour</sub> を行うことにより、EPISKIN と同様の結果を得ることが可能か検討した。EPISKIN の結果は文献値を元にしたが、実験者による測定値が大きくなることを考慮して、結果を求めた。その結果、Table3 に示すように、EPISKIN の結果は、1 物質のみずれたが、ほぼ文献値通りであったと判断した。しかし、得られた結果はモデル毎に異なり、14 物質中 No. 1 のみしか同じ結果が得られなかった。他物質において、モデル間で同じ判定結果が得られた物質はなかった。他のモデルの結果はいずれも EPISKIN の一致度に及ばなかった。したがって、15 分処理、42 時間の後培養という処理方法は、EPISKIN に適した方法であり、モデル毎に最適な試験プロトコールが必要であると考えられた。

#### D. 考察

EPISKIN 用いた PI 法<sub>15min-42hour</sub> のプレバリデーション報告に従い、LabCyte EPI-MODEL を用いて化学物質の皮膚一次刺激性評価を行ったところ、陽性一致率は 95%と高い結果となった。この結果は、PI 法<sub>15min-42hour</sub> のプレバリデーション報告とも一致しており、*in vitro* の安全性評価試験法としては有用であると判断される(付録 1 に、PI 法<sub>15min-42hour</sub> を用いた際の、両モデルにおける評価結果を列挙した)。興味深いことに、どちらのモデルを使用した場合も、メチルパルミテートを偽陰性と誤判定している。そこで、メチルパルミテートの物性を調べたところ、他の被験物質と比較して融点が低いことがわかった。SIGMA-ALDRICH の MSDS によると、メチルパルミテートの融点は 37 度となっており、室温条件化での暴露では、固化してしまうものと予測される。そのため、刺激性の検出が不可能なのではないだ

表4. LabCyte, EPISLIN, EpiDerm, Vitrolife-skin および LSE-highの刺激性評価の比較

No.	Chemical name	in vivo classification	LabCyte	EPISKIN		EpiDerm	Vitrolife-Skin	LSE-high
				文献値	再現性			
1	Lilestralis/lilial	I	I	I	I	I	I	I
2	1-Bromopentane	I	I	I	I	NI	I	NI
3	1-Bromohexane	I	I	I	I	NI	I	NI
4	Methyl laurate	I	I	I	I	NI	NI	NI
5	Linalyl acetate	I	NI	I	I	NI	NI	I
6	d-Limonene	I	NI	I	I	NI	I	NI
7	Linalool	I	I	I	I	I	I	I
8	Benzyl alcohol	NI	I	NI	NI	I	I	NI
9	Cis-Cyclooctene	NI	NI	I	I	I	I	I
10	Benzyl acetate	NI	I	I	I	NI	NI	NI
11	Sodium metasilicate (10%)	NI	I	NI	NI	I	I	I
12	Hydroxycitronellal	NI	I	NI	NI	I	I	I
13	n-Butyl propionate	NI	I	NI	I	NI	NI	NI
14	1,6 Dibromohexane	NI	I	I	I	I	NI	I
	Specificity(%)		14.3	57.1	42.9	28.6	42.9	42.9
	Sensitivity(%)		71.4	100	100	28.6	71.4	42.9
	Accuracy(%)		42.8	78.6	71.4	28.6	57.1	42.9

Specificity = CN/(CN+FP)

Sensitivity = CP/(CP+FN)

Accuracy = (CP+CN)/(CP+CN; FN+FP)

Treatment: 15min + 42h post incubation

Endpoint: MTT assay

ろうか。また、*in vivo* で刺激性がみられるのは、ウサギの体温が高く、メチルパルミテートが液体の状態を維持できるからではないかと考えられる。したがって、今後、融点の低い物質の評価には、高温条件下での暴露あるいは洗浄といった注意が必要ではないかと考えられる。

しかしながら、*LabCyte* EPI-MODEL を用いた PI 法<sup>15min-42hour</sup>では、EPISKIN を用いた場合に比べ、陰性一致率が低い結果となった。このことから、全ての皮膚モデルに PI 法<sup>15min-42hour</sup>が適応できるわけではないことが明らかとなった。また、ラボサイトは EPISKIN よりも、刺激に対して弱いモデルではないかと予測された。そのため、PI 法<sup>15min-42hour</sup>の改変を行う際には、EPISKIN の場合よりもマイルドな細胞毒性を与えるために、暴露時間の短縮および、後培養時間の短縮を試みた。その結果、後培養時間を 42 時間から 1 時間に短縮する方法が、*LabCyte* EPI-MODEL には適していることが明らかになった。また、暴露 1 時間後でもサイトカイン量に有意な差がみられたことから、少なくとも、*LabCyte* EPI-MODEL においては、刺激に対する応答は 1 時間以内に起こり始めていると考えられる。また、暴露 1 時間後において、細胞毒性試験では検出することのできない弱い刺激でさえ、サイトカイン測定試験では評価が可能であった。このことは、皮膚が刺激を受けると、サイトカインの産生にともなって細胞死が誘導されるというこれまでの報告と合致している。

最後に、*in vitro* の試験系を開発する目的は、動物実験数を削減するためだけではない。皮膚一次刺激にともなう細胞および分子レベルの変化を追うためにも、作用機構の解明を行う必要があると考えられる。今後は、これらの利点を生かして、刺激応答機構の詳細を明らかにしていくことも、*in vitro* 試験法に課せられた使命であると考えている。

EPISKIN 用いた PI 法<sup>15min-42hour</sup>のプレバリデーション報告に従い、*LabCyte* EPI-MODEL で一致性の低かった 14 物質を用い、日本で市販されている培養表皮および皮膚モデルを用いて細胞毒性を比較検証した。

その結果、EPISKIN と同程度の予測性を示すモデルは存在しなかった。これは各モデルに適したプロトコールが必要であることを示している。現在、*in vitro* 皮膚刺激性試験の OECD ガイドライン候補モデルとして検討されている *EpiDerm* および *SkinEthics* においても、EPISKIN performance standard に基づいた

20 物質を用い同様の検討がなされた結果として、それぞれ 60 分間および 43 分間の処理時間を選択している。日本の他のモデルにおいても、EPISKIN performance standard 処理時間の検討を行い、モデル毎に適切な処理時間を求める必要がある。その結果を受け、バリデーション研究を実施し、適切な予測率が得られるまで、EPISKIN、*EpiDerm* および *SkinEthics* 以外のモデルを皮膚刺激性試験の代替法として使うべきではないと考える。

## E. 結論

*LabCyte* EPI-MODEL を用いて PI 法<sup>15min-42hour</sup>を行ったが、EPISKIN と同様の一致率を得ることはできなかった。そこで、*LabCyte* EPI-MODEL に最適な試験プロトコールを検討したところ、PI 法<sup>15min-1hour</sup>であることを明らかとした。しかしながら、一致率は EPISKIN を下回る結果となった。

これらの結果から、EPISKIN を用いた PI 法のプロトコールが、全ての皮膚モデルで再現可能とは限らないことが明らかになった。そのため、各モデルに適した科学的に立証され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。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## H. 研究発表

### 誌上発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
  - 7) 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)
  - 8) 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)
  - 9) 小島 肇、急がれる動物実験代替法の開発－皮膚モデルの現状、New Drug Discovery, 023号, p4, (2007)
  - 10) 小島 肇、アレルゴロジ－VSトキシコロジ－、皮膚アレルギーの旅 Vol. 7, No. 1, p1-7, (2008)
  - 11) 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)
  - 12) Kojima, H., JaCVAM: An organization supporting the validation and peer review of new alternatives to animal testing, WC6 proceedings, accepted (2008)
  - 13) 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)
  - 14) 小島肇夫、皮膚感作性試験代替法の現状、Visual Dermatology、7(3)、328-331 (2008)
  - 15) Kojima, H., Perspectives on validation and regulatory acceptance of animal alternative testings in Japan, P&G Actives Risk Communication, 2(1), 1-4 (2008)
  - 16) Hajime Kojima, Tomoko Ando, Katsuhiro Inagaki, Mahito Ohhira, Tadashi Kosaka, Yosuke Nakamura, Hisashi Torishima, Noriyuki Morikawa, Jun Kanno, Mami Kuboki, Michiru Genno, Masaru Nokata, Takanori Harada, Takashi Morimoto, Isao Yoshimura, Yasuo Ohno, Validation of human skin models for skin corrosivity tests in Japan, *Altern. Animal Test. EXperiment*, accepted (2008)
  - 17) 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 an alternative endpoint for the local lymph node assay (LLNA-DA): Importance of study management, WC6 proceedings, accepted (2008)
  - 18) 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)
  - 19) 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)
  - 20) 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)
  - 21) 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)
  - 22) 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)
  - 23) 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)
  - 24) 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)
  - 25) Hajime Kojima, Tomoko Ando, Katsuhiro Inagaki, Mahito Ohhira, Tadashi Kosaka, Yosuke Nakamura, Hisashi Torishima, Noriyuki Morikawa, Jun Kanno, Mami Kuboki, Michiru Genno, Masaru Nokata, Takanori Harada, Takashi Morimoto, Isao Yoshimura, Yasuo Ohno, Validation of human skin models for skin corrosivity tests in Japan, *Altern. Animal Test. EXperiment*, 13(1), 36-44 (2008)
  - 26) Takashi Omori, Kenji Idehara, Hajime Kojima, Takashi Sozu, Kazunori Arima, Hirohiko Goto, Tomohiko Hanada, Taketo Inoda, Yoshiaki Ikarashi, Taketo Inoda, Yukiko Kanazawa, Tadashi Kosaka, Eiji Maki, Takashi Morimoto, Shinsuke Shinoda, Naoki Shinoda, Masahiro Takeyoshi, Masashi Tanaka, Mamoru Uratani, Masahito Usami, Atsushi Yamanaka, Tomofumi Yoneda, Isao Yoshimura, Atsuko Yuasa, 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)
- 27) 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)
- 28) 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)
- 29) 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)
- 30) 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)
- 31) 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)
- 32) 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)
- 33) 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)
- 34) 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)
- 35) 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)
- 学会発表
- 1) Kojima, H. JaCVAM Update, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.119, Tokyo (2007)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) Yamamoto, N., Kojima, H., Tanikawa, A. and Horiguchi, M., A study of retinal regulative medicine by human iris tissue cells, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.103, Tokyo (2007)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)

- 11) Kojima, H., International Validation Study of Non Animal Screening Assay for Endocrine Disrupter, 2007 National Institute of Toxicological Research International Symposium, Korea (2007)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 小島 肇, EUにおける動物実験代替法の現況と REACH 対策、日皮協・会員研究会、京都 (2007)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) 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, Kitakyusyu (2007)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 小島 肇, 国内外の規制動向、WC6フォロー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)
- 22) Kojima, H., et al., Panel Discussion, ICCVAM Ten-Year Anniversary Symposium, Washington DC (2008)
- 23) Kojima, H., Opening remark, Workshop on Acute chemical safety testing: Advancing in vitro approaches and Humane Endpoints for systemic Toxicity Evaluation, Washington, DC (2008)
- 24) 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)
- 25) 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)
- 26) 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)
- 27) Kojima, H., Japanese Collaboration on Alternative to Animal Toxicology Testing, World Congress on in Vitro Biology, Tucson (2008)
- 28) 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)
- 29) 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)
- 30) 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)
- 31) Kojima, H., International Current of 3Rs International Symposium on the 3Rs Promotion in Asia, Saitama (2008)
- 32) 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)
- 33) 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す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)
- 34) 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す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)
- 35) 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)
  - 36) 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)
  - 37) 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)
  - 38) 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)
  - 39) 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)
  - 40) 小島 肇：in vitro 遺伝毒性試験—光と影—、第 37 回日本環境変異原学会、沖縄 (2008)
  - 41) 小島 肇：毒性試験における培養細胞の利用、安全性評価研究会 2008 年冬のセミナー、東京 (2008)
  - 42) 小島 肇：動物実験適正化のグローバルな動き—代替法の動きを中心に—、日本制約工業協会医薬品評価委員会 第 102 回基礎研究部会総会、京都 (2009)
  - 43) Kojima, H., Current aspects of LLNA-DA and LLNA-BrdU as alternatives for skin sensitizer classification in Japan, 2009 Winter Conference of Korean Society of Alternatives to Animal Experiments, Seoul (February, 2009)
  - 44) 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)
  - 45) 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)
  - 46) 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)
  - 47) 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)
  - 48) 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)
  - 49) 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)
  - 50) 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)
  - 51) Kojima, H. : 3D comet assay, JaCVAM experience, 5<sup>th</sup> International Workshop on Genotoxicity Testing, Basel (2009)
  - 52) Kojima, H., Yamakage, K., Burlinson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Corvi, R., Uno, Y., Schechtman, L., Tice, R. and Honma, M.: International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 8<sup>th</sup> International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
  - 53) 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)
  - 54) 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)
  - 55) 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)

- 56) 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)
- 57) 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)
- 58) 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)
- 59) 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)
- 60) 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)
- 61) 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)
- 62) 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)
- 63) 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)
- 64) 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)
- 65) 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)
- 66) 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)
- 67) 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)
- 68) Hayashi, M., Uno, Y., Honma, M., Schectmann, L., Tice, R., Corvi, R., Morita, T., Asano, N. and Kojima, H.: In vivo Comet Assay: Update on the on-Going international validation study, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 69) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schectman, L. and Hayashi, M.: International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 70) 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)
- 71) 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)
- 72) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schechtman, L. and Hayashi, M.: International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 25<sup>th</sup> ICEM , Florence (2009)



- 73) Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Schechtman, L., Tice, R., Corvi, R., Morita, T., Asano, N. and Hayashi, M.: In vivo Comet Assay: Update on the on-Going international validation study, 25<sup>th</sup> ICEM, Florence (2009)
- 74) 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)
- 75) 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)
- 76) 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)
- 77) Kojima, H.: Japanese views in the 3Rs in the 21st century, ZEBET's 20th Anniversary Symposium, Berlin, Germany (2009)
- 78) Kojima, H.: Organization of JaCVAM and its activity, KoCVAM International Symposium and 6th Congress of KSAAE, Seoul (2009)
- 79) 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)
- 80) 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)
- 81) 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)
- 82) 小島 肇、飯島正文、松永佳世子、佐々斉、板垣 宏、岡本裕子、西山直宏、小野寺博志、見田 活、鷺田 淳、益山光一、増田光輝、大野泰雄: 医薬部外品の承認申請における安全性に関わる資料のあり方検討委員会報告、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 83) 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)
- 84) 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)
- 85) 本間正充、山影康次、Burlinson, B.、Escobar, P.、Pant, K.、Kraynak, A.、林 真、中嶋圓、鈴木雅也、Corvi, R.、宇野芳文、Schechtman, L.、Tice, R.、小島 肇: In vitro アルカリコメットアッセイ国際バリデーション研究、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 86) 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)
- 87) 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)
- 88) 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)
- 89) 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)
- 90) 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)
- 91) 中村昌文、半田洋士、小野 敦、小島 肇: Lumi-cell ER アッセイ法の国際バリデーション(第二報)、第 12 回環境ホルモン学会研究発表会、東京 (2009)
- 92) 小島 肇、飯島正文、松永佳世子、佐々斉、板垣 宏、岡本裕子、西山直宏、小野寺博志、見田 活、鷺田 淳、益山光一、増田光輝、大野泰雄: 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）

- 93) 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）
- 94) 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）
- 95) 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）
- 96) 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)
- 97) W Stokes, M Wind, D Blakey, J Kreysa, H Kojima, E Anklam: 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)
- 98) P Ceger, F Deal, D Allen, G Clark, P Pazos, J de Lange, S Bremer, M Nakamura, H Kojima, A Ono, R Tice, W Stokes, 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)

## 参考文献

- 1) Draize, J.H., Woodard, G. and Calvery, H.O. (1994) Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 82, 377-390.
- 2) Organization for Economic Cooperation and Development. (2002) OECD Guidelines for Testing of Chemicals; Test Guideline 404, Acute Dermal Irritation/Corrosion.
- 3) ECVAM statement
- 4) Cotovio, J., Grandidier, M., Portes, P., Roguet, R. and Rubinstenn, G. (2005) The in vitro acute skin irritation of chemicals: Optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, *Alternatives To Laboratory Animals*, 33, 329-349.
- 5) Gunasekar, PG., Rogers, JV., Kabbur, MB., Garrett, CM., Brinkley, WW. and McDougal JN. (2003) Molecular and histological responses in rat skin exposed to m-xylene, 17, 2, 92-94.
- 6) Ponec, M. and Kempenaar, J. (1995) Use of human skin recombinants as an in vitro model for testing the irritation potential of cutaneous irritants, *Skin pharmacology*, 8, 1-2, 49-59.
- 7) European Centre for the Validation of Alternative Method. (2007) Performance standards for applying human skin models to in vitro skin irritation testing. Final draft performance standards version.

## I. 添付資料

資料1 実験結果

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

### 分担研究年度終了報告書

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

研究分担者 山本 直樹 藤田保健衛生大学

#### 研究要旨

【背景と目的】本研究では、化粧品や医薬部外品・医薬品等の安全性評価のために用いられている試験法の中で重要な位置付けを占める眼（角膜）の局所毒性に着目し、新規の眼刺激性試験・眼毒性試験代替法の開発に必須のヒト角膜上皮由来不死化細胞株を作出することを目的とした。

【材料と方法】新規の眼刺激性試験・眼毒性試験代替法の開発・検討を行うため、市販のヒト角膜上皮細胞株（HCEC-2、EHXV）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。

【結果】HCEC-2とEHXVは、継代維持することが困難であった。一方、HCEは継代培養することが可能であり、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ことから、分化能（重層化）を回復することに成功した。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法よりも薄い濃度で細胞への障害を検出することができた。

【展開】HCE-NY、およびHCE-T hTERTのクローニング、分子細胞生物学的な検証などを行い、新しい眼刺激性試験代替法の試験細胞株としての有用性を評価する。

## A. 研究目的

現在の眼刺激性試験のガイドラインは、ウサギの眼結膜嚢に被験物質を暴露させた後の角膜、虹彩および結膜に対する刺激性について細隙灯顕微鏡などを用いて肉眼的に判定する方法（ウサギを用いた*in vivo*眼刺激性試験法：Draize法）である。このDraize法は、被験物質の刺激性を検出する感度としては非常に優れているが、試験施設間での再現性に乏しく、動物に激しい苦痛とストレスを与えることが社会的に問題となり、昨今、試験目的のために動物を使用しない代替法の開発が進められている。

本研究では、化粧品や医薬部外品・医薬品等の安全性評価のために用いられている試験法の中でも、重要な位置付けを占める眼（角膜）の局所毒性に着目し、以下の評価基準モデルの検討を行った。

第1の検討は、強度刺激性物質を同定するために欧州で限定的に認められているウシ角膜組織を用いた不透明性および透過性アッセイ試験（Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay：BCOP）の問題点と日本国内でも実施可能な試験法についての検討である。具体的な問題点として、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する。さらに常時新鮮で、品質が統一された角膜組織を様々な機関・企業で入手・維持し、代替法として実現化するために克服しなくてはならない課題などを検討する。

第2の検討としては、継代培養しても角膜上皮細胞の特性を保持したヒト角膜上皮由来の細胞株を作成し、新規眼刺激性試験・毒性試験代替法の開発に結びつく細胞株を樹立することを目的とした。

具体的な研究課題は、以下のとおりである。

1. 角膜上皮細胞の安定した分離方法の新規開発。
2. 角膜上皮細胞の継代・維持培養法の新規開発。
3. 角膜上皮細胞への遺伝子導入・選択分離法の新規開発。
4. 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。

## B. 研究材料・方法

### B-1. ブタ角膜組織を用いた試験法の開発

ブタ角膜組織を用いた検討では、食肉処理場から入手したブタ眼球組織を用いて検討した。検討用ブタ角膜組織片の作製方法は、ブタ眼球赤道部を手術用メスを用いて5mmの幅で切開し、眼科手術用尖刀にて眼軸に平行に角結膜接合部近縁まで切開した後、角膜に沿って円形に切開を続け、ごく僅かな角結膜組織を含む角膜組織片を作製した。次に角膜組織片の中心部を6mmの生検パンチで打ち抜き、検討用のブタ角膜組織片とした。この新鮮状態のまま様々な被検薬剤を用いて評価するということが理想であるが、角膜組織片の作成にはある程度の技術が必要であること、様々な施設で多くの検討を行うには現実的ではないこと、一律の品質での角膜組織の管理・維持が難しいことなどの観点から、