

表2 被験物質分類ごとの GHS 分類基準と比較した場合の一致度・偽陽性率・偽陰性率

	一致度	偽陽性率	偽陰性率
全体	83% (120/144)	8% (9/114)	50% (15/30)
化学物質区分 ^{注1)}			
アルコール類	50% (6/12)	50% (5/10)	50% (1/ 2)
アミド・アミジン類	80% (4/ 5)	0% (0/ 2)	33% (1/ 3)
カルボン酸類	70% (7/10)	0% (0/ 3)	43% (3/ 7)
エステル類	89% (8/ 9)	13% (1/ 8)	0% (0/ 1)
複素環類	78% (7/ 9)	0% (0/ 3)	33% (2/ 6)
オニウム化合物	75% (6/ 8)	0% (0/ 2)	33% (2/ 6)
物質の特性 (形状)			
液体	84% (91/108)	10% (9/90)	44% (8/18)
固体	81% (29/36)	0% (0/24)	58% (7/12)
製品区分 ^{注2)}			
界面活性剤	76% (16/21)	0% (0/12)	56% (5/ 9)
農薬	73% (8/11)	0% (0/ 6)	60% (3/ 5)

注1) 5例以上の被験物質がある化学物質区分のみのデータを抽出した

注2) 主な製品のみ

7 試験法の信頼性

施設内変動 (Intralaboratory repeatability, Intralaboratory reproducibility) :

施設内変動では、4物質 (界面活性剤2物質、Siloxane2物質) について、同一施設内で4~5回試験を繰り返し、角膜の厚さ、角膜の腫脹、角膜混濁および角膜のフルオレセイン染色性の各項目において、施設内の反復性と再現性が検討された (Prinsen, 2000)。供試物質は、EU分類で非刺激性1物質、刺激性 (R36) 2物質および強度刺激性 (R41) 1物質の4物質であった。

反復性解析において実験内で比較した場合、角膜の厚さの CV 値は 0.9~6.1%の範囲であった。角膜混濁の CV 値は 0~86.6% (最高値は非刺激性物質データ)、その他の角膜の腫脹およびフルオレセイン染色性においても非刺激性物質データの変動が大きかったが、非刺激性物質を除いた場合の CV 値はいずれにおいても低下した (表3)。

表3 ICE法の施設内変動 (反復性: Intralaboratory repeatability)

被験物質	4物質での CV 値	3物質での CV 値 (非刺激性物質を除く)
角膜の厚さ	0.9 ~ 6.1	1.5 ~ 6.1
角膜の腫脹	- 86.6 ~ 346.4	9.5 ~ 49.5
角膜の混濁	0 ~ 86.6	0 ~ 43.3
角膜の染色性	0 または 86.6	0

実験間での再現性について比較した場合、角膜の厚さの CV 値は 1.8~6.3%の範囲であった。角膜混濁の CV 値は 8.7~95.8% (最高値は非刺激性物質データ) の範囲であり、その他の角膜の腫脹およびフルオレセイン染色性においても非刺激性物質データの変動が大きく、非刺激性物質を除いた場合の CV 値はいずれにおいても低下した(表4)。

表4 ICE法の施設内変動(再現性: Intralaboratory reproducibility)

被験物質	4物質での CV 値	3物質での CV 値 (非刺激性物質を除く)
角膜の厚さ	1.8 ~ 6.3	4.0 ~ 6.3
角膜の腫脹	15.2 ~ 138.7	15.2 ~ 22.4
角膜の混濁	8.7 ~ 95.8	8.7 ~ 18.1
角膜の染色性	0 または 141.4	0

施設間変動 (Interlaboratory reproducibility) :

59の被験物質について、4施設による施設間バリデーション試験を実施した(Balls et al., 1995)。Draize法にて陽性と判定された物質は22物質であり、そのうち11物質はICE法で陽性と判断され、4施設で一致した陽性物質は7物質(64%)、3施設以上で一致した物質は10物質(91%)となった。同様に、偽陰性において4施設で一致した偽陰性物質は11物質中9物質(82%)、3施設以上で一致した偽陰性物質は11物質中11物質(100%)であった。次に、Draize法にて陰性と判定された物質において、4施設で一致した陰性物質は26物質中22物質(85%)であり、3施設以上で一致した陰性物質は26物質(100%)であった。

表5 ICE法の施設間検証

(GHS分類を用いた眼に対する腐食性・強刺激性あるいは非刺激性の *in vivo* データの比較)

眼刺激性分類 (<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>)	被験物質数	試験施設数	4施設で一致した物質数 (%)	3施設以上で一致した物質数 (%)
+ / +	11	4	7 (64%)	10 (91%)
+ / -	11	4	9 (82%)	11 (100%)
- / +	6	4	1 (17%)	1 (17%)
- / -	26	4	22 (85%)	26 (100%)
n. d. / +	3	4	3 (100%)	(-)
n. d. / -	2	4	2 (100%)	(-)
総数	59	4	44 (75%)	53 (90%)

(n. d. : データ無し)

ICE試験データのみを用いて陽性(腐食性・強刺激性)および陰性(腐食性・強刺激性以外)判定の施設間における一致度の比較を行った(表6)。75~76%の被験物質が、

4 施設間で一致した。また、88%の被験物質が、4 施設中 3 施設以上で一致した。一致度が低いものは、アルコール、エステルおよびケトン類であった。

表6 腐食性・強刺激性物質の予見に関する ICE 法の施設間一致度のばらつき
(GHS、EPA、EU 分類を用いた眼に対する腐食性・強刺激性判定の一致度比較)

	試験施設数	4 施設で一致 (一致度:100%)		3 施設で一致 (一致度:75%)		2 施設で一致 (一致度:50%)	
		n	%	n	%	n	%
GHS分類	4	44	75	8	14	7	12
EU 分類	4	44	75	8	14	7	12
EPA分類	4	45	76	7	12	7	12

(被験物質総数:59、 n ; 該当する被験物質数)

以上の結果から、施設内変動では角膜腫脹の指標(角膜の厚さ)がいずれの物質でも CV 値が低く、再現性が認められた。その他の指標では非刺激性物質データに変動が大きかった。非刺激性物質のデータを除いた場合の CV 値は低下したが、わずか4被験物質で実施された施設内変動についての検討は不十分であった。

施設間変動では、4 施設中 3 施設以上で陽性、偽陰性、陰性の再現性が確認され、Draize 法との比較で 91%、ICE 法のみでの比較でも 88%を示し、良好な結果が得られていると判断された。

8 試験法のデータの質

バリデーション試験に用いられた以下の報告について、ICE 法と Draize 法の試験の GLP 準拠を示す。

- Prinsen and Koeter. (1993)

ICE 法は GLP 準拠、Draize 法は GLP 準拠の宣誓は無い。被験物質はコード化されていない。

- Balls et al. (1995)

ICE 法は GLP 準拠、Draize 法は GLP 準拠で OECD の試験ガイドライン TG405 に従い実施された。被験物質はコード化された。

- Prinsen. (1996)

ICE 法および Draize 法とも GLP 準拠で実施された。被験物質はコード化されていない。

- Prinsen. (2000)

ICE 法および Draize 法とも GLP 準拠で実施された。被験物質はコード化されていない。

い。

- Prinsen. (2005)

ICE 法および Draize 法とも GLP 準拠で実施された。被験物質はコード化された。

9 試験法の科学的な報告

バリデーション試験に用いられた 5 試験以外にも ICE 法による報告がされているが、被験物質情報の無記載、数字データの無記載、個体データの欠如など、バリデーション試験としては不適當な報告も見られた。

以下の 3 試験では *in vitro* の ICE 法と *in vivo* の Draize 法との関連性を検討し、ピアソンの相関解析法にて相関係数 (r) が評価されている。

- Balls et al. (1995)

ICE 法の Index Score において、全被験物質で相関係数は 0.490~0.599 であり、特に界面活性剤では相関性は 0.724~0.833 と良好であった。

- Chamberlain et al. (1997)

角膜、虹彩、結膜などの採点における相関係数は 0.89~0.97 であった。

- Prinsen. (1996)

角膜、虹彩、結膜などの採点で相関係数は 0.86~0.92 であった。

Procter and Gamble (P&G) 社より、28 物質について TNO Nutrition and Food Institute で実施された資料が提供され、*in vitro* の ICE 法と *in vivo* LVET (Low Volume Eye Irritation Test: 少容量法) の Draize 法において、EU 分類での評価が検討された。5% SLS (ラウリル硫酸ナトリウム) ではいずれも非刺激性、10% 塩化ベンザルコニウムではいずれも R41 (強刺激性) と判定され、その他の物質 (界面活性剤、洗剤など) では 10 物質で ICE 法と Draize 法のデータが一致、5 物質で不一致であった。

10 3Rs への関与 (動物福祉面としての妥当性)

ICE 法で使用されている眼球試料は、試験目的ではなく食用として屠殺されたニワトリの眼球を用いているため、試験目的だけの実験動物の使用を抑えることができる (reduction)。また、従来の Draize 法と比較して、試験操作による動物への苦痛は無い (refinement)。加えて、ICE 法で陽性と判断された場合には追加の動物試験を行う必要がなくなることから、化学物質の眼刺激性評価全体において不必要な動物試験を回避できる (reduction) など、眼刺激試験のためにウサギを用いる従来の Draize 法と比較して動物福祉面からも評価できる。この意味では、動物が受ける苦痛の除去 (refinement)、使用動物数の削減 (reduction) および不必要な動物試験の回避 (reduction) が達成できる。

1 1 試験法の有用性と限界

ICE法の評価項目において、Corneal Swelling（角膜の腫脹）については光学的厚度計を用いた客観的な指標であることから、Draize法と比較しても、試験実施施設間での誤差を軽減することができると考えられる。眼刺激性強度カテゴリーの境界線上の判断が要求される際には、Morphological effects（組織学的変化）を参考にすることも可能である。

試験法の移転性については、機器の特殊性、汎用性および試験技術の修得から、現時点では日本国内での日常的な実施は困難である。ただし、国外にはICE法による眼刺激性試験を実施する受託機関（1施設）があり、日本の科学者や企業からの委託が可能である。

ICE法の限界として、アルコール類に対する偽陽性率と偽陰性率が高いこと、また固体、界面活性剤および農薬に対する偽陰性率も高いことから、これらの物質を評価する際には注意が必要である。

費用面では、従来のDraize法と大きな違いはない。しかし、病理組織学的観察を考えた場合は、更なる出費が予想される。

試験期間については観察期間は短縮されるが、病理組織学的観察を行う場合は、従来のDraize法と大きな違いはない。

1 2 結 論

ICCVAMで実施されたICE法の第三者評価はバリデーション試験に必要な項目、プロセス、データが検討されている。ESACの評価と同様、ICCVAMのバリデーション試験の結果を受け入れることに問題はないと判断される。

特定の化学物質（アルコール類、固体、界面活性剤）ではその精度が十分ではない等の試験の限界を考慮に入れた上で、適切なプロトコールに基づき試験を実施すれば、ICE法は、化学物質の眼刺激性の段階的評価の1つとして、腐食性・強刺激性物質をスクリーニングすることが可能であると判断される。

現在、EUではICE法の陽性結果をもって化学物質をR41に区分することを既に受け入れている。また、米国では、FDA・EPAが化学物質の眼刺激性評価において、腐食性・強刺激性物質の判断にICE法の結果を受け入れることを公式に発表している。

わが国においても、GHSに準拠する化学物質に関わる法規制において、ICE法による腐食性・強刺激性物質の眼刺激性を評価することが可能である。

1 3 文献

Balls, M., Botham, P. A., Bruner, L. H. and Spielmann, H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol In Vitro* 9:871-929.

Butscher, P. (1953). Beitrag zur therapie von augenschadigunen durch thioglykolsaur bei der herstellung der sogenannten kaltwelle. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 122:349-350.

Chamberlain, M., Gad, S. C., Gautheron, P. and Prinsen, M. K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem Toxicol* 35:23-37.

ESAC (2007). ESAC statement on the conclusions of the ICCVAM retrospective study on Organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants as determined by US EPA, EU (R41) and UN GHS classifications in a tiered testing strategy, as part of a weight of evidence approach.

EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U. S. Environmental Protection Agency.

EU (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 adapting to technical progress for the 28th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. Official Journal of the European Communities L255:1-333.

Grant, W. M. (1974). Toxicology of the eye. 2nd ed. Springfield, IL: Charles C. Thomas.

ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No. : 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program.

McDonald, T. O., Seabaugh, V., Shaddock, J. A. and Edelhauser, H. F. (1987). Eye

irritation. In *Dermatotoxicology* (Marzulli, F.N. and Maibach H. I., eds). Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 641-696.

Nakano, M. (1958). Effect of various antifungal preparations on the conjunctiva and cornea of rabbits. *Yakuzaigaku* 18:94-99.

Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem Toxicol* 34:291-296.

Prinsen, M.K. (2000). Chicken enucleated eye test with reference surfactants and siloxane polymers in Phase II of the reference standard validation project; an ex vivo alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. TNO Report V99.521b. Unpublished report provided directly to NICEATM by M Prinsen, TNO Nutrition and Food Research Institute.

Prinsen, M.K. (2005). *In vitro* and *in vivo* data for 94 substances tested in the isolated chicken eye test. Unpublished data provided directly to NICEATM by M Prinsen, TNO Nutrition and Food Research Institute.

Prinsen, M.K. and Koeter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Food Chem Toxicol* 31:69-76.

UN (2003). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). New York & Geneva: United Nations Publications.

附表 1
定義 (Definitions)

Accuracy: (a) The closeness of agreement between a test method result and an accepted reference value. (b) The proportion of correct outcomes (positive and negative) of a test method. It is a measure of test method performance and one aspect of relevance. The term is often used interchangeably with concordance (see also two-by-two table). Accuracy is highly dependent on the prevalence of positives in the population being examined.

Coded substances: Substances labeled by code rather than name so that they can be tested and evaluated without knowledge of their identity or anticipation of test results. Coded substances are used to avoid intentional or unintentional bias when evaluating laboratory or test method performance.

Coefficient of variation (CV): A statistical representation of the precision of a test. It is expressed as a percentage and is calculated as follows:

$$\left(\frac{\textit{standard deviation}}{\textit{mean}} \right) \times 100\%$$

Corneal Opacity: A subjective measurement of the extent of opaqueness of the cornea following exposure to a test substance. Increased corneal opacity is indicative of damage to the cornea.

Corneal Swelling: An objective measurement in the ICE test of the extent of distention of the cornea following exposure to a test substance. It is expressed as a percentage and is calculated from corneal thickness measurements that are recorded at regular intervals during the ICE test. Increased corneal swelling is indicative of damage to the corneal epithelium.

False negative rate: The proportion of all positive substances falsely identified by a test method as negative (see two-by-two table). It is one indicator of test method accuracy.

False positive rate: The proportion of all negative substances that are falsely identified by a test method as positive. It is one indicator of test method accuracy.

Fluorescein retention: A subjective measurement in the ICE test of the extent of fluorescein sodium that is retained by epithelial cells in the cornea following exposure to a test substance. Increased fluorescein retention is indicative of damage to the corneal epithelium.

Globally Harmonized System (GHS) : A classification system presented by the United Nations that provides (a) a harmonized criteria for classifying substances and mixtures according to their health, environmental and physical hazards, and (b) harmonized hazard communication elements, including requirements for labeling and safety data sheets.

Good Laboratory Practices (GLP) : Regulations promulgated by the U. S. Food and Drug Administration and the U. S. Environmental Protection Agency, and principles and procedures adopted by the Organization for Economic Cooperation and Development and Japanese authorities that describe record keeping and quality assurance procedures for laboratory records that will be the basis for data submissions to national regulatory agencies.

Interlaboratory reproducibility: A measure of whether different qualified laboratories using the same protocol and test substances can produce qualitatively and quantitatively similar results. Interlaboratory reproducibility is determined during the prevalidation and validation processes and indicates the extent to which a test method can be transferred successfully among laboratories.

Intralaboratory repeatability: The closeness of agreement between test results obtained within a single laboratory, when the procedure is performed on the same substance under identical conditions within a given time period.

Intralaboratory reproducibility: The first stage of validation; a determination of whether qualified people within the same laboratory can successfully replicate results using a specific test protocol at different times.

Negative control: An untreated sample containing all components of a test system, except the test substance solvent, which is replaced with a known non-reactive material, such as water. This sample is processed with test substance-treated samples and other control samples to determine whether the solvent interacts with

the test system.

Negative predictivity: The proportion of correct negative responses among substances testing negative by a test method (see two-by-two table). It is one indicator of test method accuracy. Negative predictivity is a function of the sensitivity of the test method and the prevalence of negatives among the substances tested.

Positive control: A sample containing all components of a test system and treated with a substance known to induce a positive response, which is processed with the test substance treated and other control samples to demonstrate the sensitivity of each experiment and to allow for an assessment of variability in the conduct of the assay over time.

Positive predictivity: The proportion of correct positive responses among substances testing positive by a test method (see two-by-two table). It is one indicator of test method accuracy. Positive predictivity is a function of the sensitivity of the test method and the prevalence of positives among the substances tested.

Sensitivity: The proportion of all positive substances that are classified correctly as positive in a test method. It is a measure of test method accuracy (see two-by-two table).

Specificity: The proportion of all negative substances that are classified correctly as negative in a test method. It is a measure of test method accuracy

Tiered testing: A stepwise testing strategy where all existing information on a test substance is reviewed, in a specified order, using a weight of evidence process at each tier to determine if sufficient information is available for a hazard classification decision, prior to progression to the next tier. If the irritancy potential of a test substance can be assigned based on the existing information, no additional testing is required. If the irritancy potential of a test substance cannot be assigned based on the existing information, a step-wise sequential animal testing procedure is performed until an unequivocal classification can be made.

9) *In vitro* 発熱性物質試験の専門家による第三者評価

研究要旨

従来の発熱性物質試験に代わるとされる *in vitro* 発熱性物質試験法であり、採取したヒト末梢血単核細胞 (PBMC) から分泌されるサイトカイン (インターロイキン; IL) の量を指標とする 5 種の試験法に関する欧米の報告書等をもとに、専門家による第三者評価を進めた。今回提案された *in vitro* 発熱性物質試験は、ウサギの使用数を削減可能とし、また、作用機序に立脚した発熱性物質試験の新たな方向性として評価でき、さらに、バリデーションでのデータの扱いに関しても納得のできる基準を満たしていると考えられる。しかし、ウサギを用いた発熱性物質試験との互換性については不明な点が多く、この試験法の代替法とするには、問題があるとされた。

A. 研究目的

In vitro 発熱性物質試験に関する欧米の報告書等をもとに、専門家による第三者評価を進めた。試験法の公定化のために、この結果を含め、第三者の専門家により確認するために、パイロジェン評価委員会を設立した。

B. 研究方法

B-1) 光毒性評価委員会委員 委員長

小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所)

委員

中澤憲一 (国立医薬品食品衛生研究所)

吉村 功 (東京理科大学)

篠田和俊 (医薬品医療機器総合機構)

西岡吾朗 (扶桑薬品工業)

石井 健 (大阪大学)

B-2) 方法

欧米の評価で用いられた以下の資料を用いた。

① ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) Test Method Evaluation Report

② ICCVAM Background Review Document (BRD)

③ EC STATEMENT ON THE VALIDITY OF IN-VITRO PYROGEN TESTS

④ ECVAM (European Center for the Validation of Alternative methods) BRD

In vitro 発熱性物質試験として、ボランティアから供与を受けた全血を用い、採血後 4 時間以内に実施すべき試験が 2 種、保存血 (凍結保存) を用いる試験が 1 種、全血から取り出した PBMC (末梢血単核細胞) を用いる試験が 1 種、細胞株を用いる試験が 1 種以下のように記載されている。

1) 全血 (Whole Blood: WB) /IL-1

2) 保存血 CryoWB/IL-1

3) WB/IL-6

4) PBMC/IL-6

5) 単球細胞株 MM6/IL-6

C. 結果および考察

今回提案された *in vitro* 発熱性物質試験は、ウサギの使用数を削減可能とし、また、作用機序に立脚した発熱性物質試験の新たな方向性として評価でき、さらに、バリデーションでのデータの扱いに関しても納得のできる基準を満たしていると考えられる。しかし、ウサギを用いた発熱性物質試験との互換性については不明な点が多く、この試験法の代替法とするには、問題がある。国内ではウサギ発熱性物質試験からエンドトキシン試験への移行の問題も残されており、これに優先して独立した代替法とすることには無理がある。しかしながら、エンドトキシン試験が使用できないような特殊な状況やウサギとヒトでの発熱性に関する種差が想定されるような状況においてウサギ発熱性物質試験と併用するなど、限定的な使用については推奨できよう。このような *in vitro* 発熱性物質試験が科学的根拠に基づいた研究により、さらに広範囲な状況で使用可能となることが望まれる。

D. 結論

本試験法は、ウサギの使用数を削減可能とし、また、作用機序に立脚した発熱性物質試験の新たな方向性として評価でき、さらに、バリデーションでのデータの扱いに関しても納得のできる基準を満たしていると考えられる。しかし、ウサギを用いた発熱性物質試験との互換性については不明な点が多く、この試験法の代替法とするには、問題があるとされた。

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

研究要旨

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より、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考えられたことから、JaCVAM 評価会議において行政的受入れを提案した。

A. 研究目的

皮膚に対する直接的な傷害の有無の判定は化学物質の安全性評価において重要である。即ち、不可逆的な傷害である皮膚腐食性を示すものは劇物と判定され、その取り扱いについて厳しい規制を受ける。また、皮膚腐食性を示す物質を経口投与等で毒性試験することは動物に大きな苦痛を与えるとともに、適正な毒性試験遂行に支障を来す。そこで、従来よりウサギを用いる *in vivo* 皮膚刺激/腐食性試験法 (Draize et al, Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. JPET 82: 377-390, 1944, OECD guideline 404) により皮膚腐食性の有無が評価されてきた。しかし、この方法は動物に激しい苦痛とストレスを与える。そこで、*in vitro* 皮膚腐食性試験代替法が開発されてきた。OECD はガイドライン 430 と 431、435 でそれぞれ TER 法と EPISKIN™ と EpiDerm™ 法、Corrositex を承認している。一方、我が国では OECD で承認された方法で得られた結果は基本的に受け入れるとの姿勢ではあるが、実際に腐食性試験代替法で得られたデータを基に評価された例は見あたらなかった。また、皮膚刺激性試験代替法としての皮膚モデルは日本でも VitroLife Skin™ を始めとして、いくつか開発されているが、皮膚腐食性試験代替法としてのバリデーションは不十分であった。そこで、わが国発の皮膚モデルが既に OECD 等で承認されたものと同様の能力を有するのかが判定することを主目的とし、わが国で開発された VitroLife Skin™ と国際的に承認されている EpiDerm™ 法との比較バリデーションを行うこととし、三次元培養皮膚モデル Vitrolife-Skin™ に関する日本のバリデーションを平成 16 年度に実施した。その結果、Vitrolife-Skin™ は腐食性試験代替法として EpiDerm™ と同等の識別能力を有するものと考えられた。平成 17 年度は、このバリデーション結果を組み込んだ評価文書が作成された。

平成 17 年度の報告書はバリデーションに関係した委員が作成したものであった。これは専門家による第三者評価という点ではやや客観性に欠けると判断された。そこで、以下のメンバーで評価文書を再構築し、平成 20 年度報告書が完成した。

委員長

小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)

委員

岡本裕子 (日本化粧品工業連合会)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)

B. 研究方法

B-1. メンバー

平成 18 年度から、以下のメンバーを 2007-2008 年評価会議委員として要請し、平成 20 年度の報告書内容を資料として用いて第三者評価を行った。

(委員長)

井上 達 (国立医薬品食品衛生研究所)

(委員)

田中憲法 (日本動物実験代替法学会)

林 真 (国立医薬品食品衛生研究所)

吉田武美 (日本トキシコロジー学会)

吉村 功 (東京理科大学)

溝口昌子 (聖マリアンナ医科大学)

佐神文郎 (日本製薬工業協会)

岡本裕子 (日本化粧品工業連合会)

小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)

B-2. 評価方法

3 次元培養ヒト皮膚モデル (以下、皮膚モデルと記す、Vitrolife-Skin™) を用いた腐食性試験の動物実験代替法について、皮膚腐食性試験代替法の第三者評価委員会からの報告を受け、以下の 7 項目について審議した。本項目は OECD ガイダンス文書 No. 34 に示さ

れた検討項目である。

C. 結果および考察

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

- ・当該試験法は論文に発表されており、透明性は高い。バリデーションデータは、透明性の高い独立した第三者評価を受けている。

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

- ・ *in vivo* と *in vitro* の一致率は 83.3% であった。乳酸や 5% 水酸化カリウム水溶液で不適合があった。一致しなかった物質については、必ずしも *in vivo* の表示が適切でないとの指摘があり、調査が必要であるとされた。ヒトの腐食性を予測できていると考えられる。
- ・ OECD のガイドライン 431 に掲載されている既存の試験法 EpiDerm™ と比べて、基本的に同じ作用機構を持ち、かつ同等の性能を持つという評価がなされた。
- ・ 腐食性を細胞毒性で予測することの妥当性について、腐食性物質が接触すると角質層に吸収、拡散して通過後、下層の細胞に障害を及ぼし、障害の程度は表皮細胞の生死を指標とするので、この方法は腐食性を予測する条件を満たしているとの見解が示された。

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

- ・ハザードの同定には有効である。

4. 当該試験法とその妥当性を示すデータ

- ・その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件および適用できない条件が明確であるか。今回のバリデーションでは、毒劇法の対象となる被験物質と判定基準物質が使われている。

腐食性の作用機構を判断するに足る必要最小限のデータが得られている。被験物質が強アルカリ性の場合、培養細胞の基盤であるコラーゲンマトリックスを溶解する。着色性物質や吸着性が強い物質は適用が困難である。

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

- ・習得について大きな問題はない。実施においても特別な技術は必要ない。なお、測定キットであることからプロトコールに大きな変更の余地はない。

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

- ・効果的である。

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

- ・正当化されている。

D. 結論

動物実験代替法である皮膚モデル (Vitrolife-Skin™) を用いた腐食性試験を定められた方法で適切に利用すれば、化学物質の腐食性を科学的に評価できると結論し、行政への提案書をまとめた。

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

研究要旨

皮膚感作性試験 LLNA-DA 法においては、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 LLNA と同等の識別能力を有するものと考えられたことから、JaCVAM 評価会議において行政的な受入れを提案した。

A. 研究目的

医薬品等の皮膚感作性は主に Guinea Pig Maximization Test 法 (GPMT 法)、Buehler Test 法 (BT 法) やその変法などで評価されてきたが、試験期間が GPMT 法で 24 日、BT 法で 38 日程度と長く、作業負荷やコストが多いためである面や長時間の閉塞貼付や Freund's Complete Adjuvant の使用など動物にストレスを与えることによる動物愛護の面で問題もあり、新しい方法が求められてきた。最近、これらの点を解消する試験法として Kimber ら (1986) や Basketter ら (1996) によりマウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA) が提案され、欧米を中心にバリデーションが行われ、広く使用されるようになった。OECD の安全性試験法ガイドラインとしても 2002 年に承認された (OECD Guideline 429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, adopted 24th April 2002)。しかし、この方法は ^3H で標識されたチミジンの DNA への取り込みを指標とする方法であるため、RI の取扱い規制の厳しい日本での普及は不十分であった。RI を用いない方法として Bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みをみる方法 (Takeyoshi et al, 2003) も報告されているが、まだ、十分にバリデートされていない。一方、ダイセル化学工業 (株) の山下と出原は ATP 含量を測定する方法 (LLNA-DA 法) を独自に開発し、代替法に関する厚生労働科学研究班 (主任研究者: 大野泰雄) に新しい動物実験代替法として応募した。研究班ではこの方法が RI を用いないという利点以外にも簡便で、かつ比較的短期間の方法であり、評価に値する方法であると考え、日本動物実験代替法学会 (代替法学会) に評価を依頼した。これを受け、代替法学会では評価委員会において、平成 16 年度より検討を行った。その結果、本試験法は原法である LLNA 法とほぼ同様の原理による方法であること、ほとんど同一の識別能力を持つこと、RI を用いないこと、簡便であり、比較的短期間で結果が得られるといった利点があると判断した。しかし、

行政試験法として評価する為には、更にデータの信頼性や施設間再現性についての情報を得る必要があることから、多施設バリデーションの実施を代替法学会に依頼した。代替法学会のバリデーション委員会はこの依頼を受け、LLNA-DA 法バリデーション実行委員会を組織し、バリデーションを行った。本二次評価は、このバリデーション報告書並びに関連して収集した情報に基づき、LLNA-DA 法が LLNA 法の代替法として妥当であるか否かを評価した報告書を受けて、最終的な行政的な受け入れについて評価した。

B. 研究方法

B-1. メンバー

平成 18 年度から、以下のメンバーを 2007-2008 年評価会議委員として要請し、平成 20 年度の報告書内容を資料として用いて第三者評価を行った。

(委員長)

井上 達 (国立医薬品食品衛生研究所)

(委員)

田中憲法 (日本動物実験代替法学会)

林 真 (国立医薬品食品衛生研究所)

吉田武美 (日本トキシコロジー学会)

吉村 功 (東京理科大学)

溝口昌子 (聖マリアンナ医科大学)

佐神文郎 (日本製薬工業協会)

岡本裕子 (日本化粧品工業連合会)

小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)

B-2. 評価方法

皮膚感作性試験代替法 (LLNA: Local Lymph Node Assay -DA 法) について、第三者評価委員会からの報告を受け、以下の 7 項目について審議した。本項目は OECD ガイダンス文書 No. 34 に示された検討項目である。

C. 結果および考察

1. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデ

- ータは、透明で独立な評価を受けているか。
- ・バリデーション結果は、論文としてアカデミックに公表されている。独立した専門家による第三者評価機関によって評価されている。
2. 当該試験法で得られるデータは、対象毒性を十分に評価あるいは予測できるものであるか。データは、当該試験法と従来の試験法の、代替法としての繋がりを示しているか。あるいは（同時に）そのデータは、当該試験法と、対象としているあるいはモデルとしている動物種についての影響との繋がりを示しているか。
- ・ゴールドスタンダードは LLNA で評価されている対照毒性について、感度、特異度が高い。従来の毒性試験と比較して十分である。GPMT (Guinean Pig Maximization Test) と原理が違う。
 - ・免疫毒性の皮膚感作性の代替法として国際的に認められている LLNA の機能に匹敵（相当）する。
3. 当該試験法は、ハザードあるいはリスク、あるいはその両方を評価するのに有用であるか。
- ・ハザード評価に有用である。
4. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件および適用できない条件が明確であるか。
- ・純度の高い化学物質は十分に広くカバーされている。
 - ・感作性の同定に有用である。
 - ・感作性物質の評価において、LLNA と同等程度の評価が可能である。
 - ・可溶性物質を対象とし、固体は適用できない。
 - ・感作性の評価は 31 物質（提案施設）で実施されている。
- ・施設間差の評価は、14 物質で実施されているなど十分広く対象とされたものとなっている。
5. 当該試験法は、プロトコールの微細な変更に対して十分頑健で、適切な訓練経験を持つ担当者と適切な設備のある施設において、技術習得が容易なものであるか。
- ・プロトコールに忠実であることが求められる。試験法実施上に際して、投与回数を減らしたり、SLS（ラウリル硫酸ナトリウム）の適用がない場合に偽陰性が多くなる可能性があるので注意が必要である。
 - ・系統、ATP測定までの時間を注意することにより、プロトコールの頑健性が維持される。
 - ・技術習得が容易である。
6. 当該試験法は、時間的経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。
- ・LLNA 原法と比べて、RIを使わないことを含めて、操作時間と経費が軽減され、有用性がある。また、施設が限定されない。従って、行政的に用いられやすい。
7. 当該試験法は、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に、新しい試験法あるいは改訂試験法であることが正当化されているか。
- ・RIを使わないことにより、実施施設・試験実施者に制限がなく、廃棄物処理や環境汚染対策上の負担の低減に資するところが大きく、倫理的・経済的に大きな利点がある。
 - ・静脈注射をしないことにより、作業と動物への苦痛レベルを軽減できる。
- D. 結論
- 皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA 法)を定められた方法で注意点を適切に守って利用すれば、化学物質の皮膚感作性を科学的に評価できると結論し、行政への提案書をまとめた。

12) 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

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

B-1. メンバー

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

議長

井上 達 (国立医薬品食品衛生研究所)

委員

田中憲徳 (食品薬品安全センター 秦野研究所)

吉田武美 (昭和大学薬学部)

横関博雄 (東京医科歯科大学)

中村和希 (日本製薬工業協会)

小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)

吉田 緑 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部)

吉村 功 (東京理科大学) *

岡本裕子 (日本化粧品工業連合会) *

* : バリデーション関係者のため、本評価に関してはオブザーバー

B-2. 評価方法

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

C. 結果および考察

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

- ・ バリデーション結果は、厚生労働科学研究報告書には掲載されており、すでに公表されている。開発者の報告は論文になっているが、バリデーションの論文はない。
- ・ 本評価は、独立した専門家による第三者評価機関によってなされた。

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

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

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

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

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

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

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

において、技術習得が容易なものであるか。

- ・ 技術習得は容易である。
 - ・ プロトコルの微細な変更に対する頑健性は不明である。
 - ・ 特殊な機器は必要ない（ソーラシミュレーターを除く）。
6. 当該試験法は、時間的・経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。
- ・ 時間と手間が掛かる。
 - ・ 経済的にはメリットがある。
 - ・ 偽陰性が少ない点で行政的な利点がある。
7. 当該試験法は、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に、新しい試験法あるいは改訂試験法であることが正当化されているか。
- ・ 科学的には異なる指標を組み合わせることで、偽陰性が少なくなることから妥当である。
 - ・ 動物実験と比較して、倫理的に妥当である。
 - ・ 経済的には安価になる。
8. 試験法への推奨
- ・ バリデーション結果が不足している。
 - ・ 確定したプロトコルで多数の被験物質を用いた検証が必要である。

- ・ 難水溶性物質に有用であることを示す必要がある。

D. 結論

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

参考文献

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

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

研究要旨

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

A. 研究目的

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

C. 研究方法

B-1. メンバー

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

(議長)

井上 達 (国立医薬品食品衛生研究所)

(委員)

田中憲穂 (食品薬品安全センター 秦野研究所)

吉田武美 (昭和大学薬学部)

横関博雄 (東京医科歯科大学)

中村和市 (日本製薬工業協会)

小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)

吉田 緑 (国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 病理部)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所
環境衛生化学部)

吉村 功 (東京理科大学)

岡本裕子 (日本化粧品工業連合会)

B-2. 評価方法

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

C. 結果および考察

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

- 当該試験法は、従来の眼刺激性評価法である Draize 試験法に替わり、ウシ眼球から摘出した角膜に、被験物質を暴露し、角膜に生じる物理的特性の変化から被験物質の眼刺激性を評価する方法である。
 - 当該試験法では、角膜の濁濁度 (測定値)、角膜透過性 (測定値) を基に眼の腐食性・強刺激性を評価する。
 - 独立した委員会 (ICCVAM) ^{注釈1}、国際的に公表された論文を集め、妥当性が認められた 8 報告 (計 161 物質) を用いた評価が公表されているので ³⁻¹⁰、透明で独立した評価がなされていると判断できる。
 - この評価データをもとに、「JaCVAM 眼刺激性試験代替法評価委員会」によって評価された。
2. 当該試験法で得られるデータは、対象毒性を十分に評価あるいは予測できるものであるか。データは、当該試験法と従来の試験法の、代替法としての繋がりを示しているか。あるいは (同時に) そのデータは、当該試験法と、対象としているあるいはモデルとしている動物種についての影響との繋がりを示しているか。
- Draize 試験法は、角膜評価 (肉眼判定) に重みを置いており、角膜を評価する当該試験法で眼の腐食性・強刺激性を予測することは妥当である。
 - すなわち、動物種により角膜の解剖学および生理学的な違いがあるが、現在のウサギを用いた Draize 法でヒト眼への重篤な傷害を予測できると考えられていることから、ウシ角膜を用いた当該試験法でも予測できる。
 - 当該試験法の結果の一致性については、Draize 法試験結果を基にして GHS 分類 ^{注釈2}、US EPA 分類 ^{注釈3} および EU 分類毎に確認したところ、その間に差はなく、GHS 分類の結果と比較して、一致度が概ね 80% であ

ったことから、本試験法は高い予測性をもち、

3. 当該試験法は、ハザードあるいはリスク、あるいはその両方を評価するのに有用であるか。
 - ・ 当該試験法は、危険有害性の識別区分への対応を目的として開発された試験法であり、ハザード評価に有用であるが、リスク評価には不適當である。
 - ・ 当該試験法は、暴露直後の角膜の変化を評価する方法であり、その後の回復等の評価はできない。
4. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件および適用できない条件が明確であるか。
 - ・ 当該試験法の妥当性を示すデータは、合計 161 の化学物質または製品が試験され、単一の化学物質や市販品あるいは製剤など混合物で行われている。様々な化学構造、性質、性状の物質、かつ種々の刺激性強度のものが対象となっており、適用できる物質の範囲が明確である。
 - ・ 当該試験法は対象とする物質の腐食性・強刺激性を多くの対象物質で評価できる。ただし、アルコール類、ケトン類、性状が固体のものについての予測性能は不十分である。
 - ・ 当該試験法は、暴露直後の角膜の変化を評価する方法であり、その後の回復等の評価はできない。
5. 当該試験法は、プロトコルの微細な変更に対して十分頑健で、適切な訓練経験を持つ担当者や適切な設備のある施設において、技術習得が容易なものであるか。
 - ・ 当該試験法は、評価されたバリデーション試験におけるプロトコルに微細な違いにも係わらず、結果の再現性は良好であったので十分頑健であると判断される。
 - ・ 当該試験法は簡便であり、適切な設備と訓練により、技術の習得が容易である。
6. 当該試験法は、時間的経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。

るか。

- ・ 試験費用面では Draize 法と大きな違いはないが、試験期間は短縮される。
 - ・ ウサギを用いる試験では 1-21 日かかるが、本試験法では、眼球が入手できれば、5-7 時間で終了する。しかし、病理組織学的検査を実施すると時間的な差はほぼ同じである (評価報告書¹⁾ p11)。
 - ・ 試験法の有用性の観点から、病理組織学的観察を組み入れることで、角膜の損傷程度についてさらに詳細に評価することが提案されているが、組織形態レベルの影響を判定できる明確な基準の設定が必要である。なお、腐食性・強刺激性物質を判定するという目的で BCOP 法を実施する場合は、病理組織学的観察は必ずしも必要ではない。
 - ・ 現時点では日本国内での日常的な実施は困難であるが、国外には受託機関 (1 施設) があり、委託が可能である。
7. 当該試験法は、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に、新しい試験法あるいは改訂試験法であることが正当化されているか。
 - ・ 当該試験法は、既存の方法を踏襲し、かつ角膜に焦点を当てた簡便で適切な評価法であり、腐食性・強刺激性を評価する上で、科学的には既存の方法とほぼ同等である。
 - ・ 当該試験法は、Draize 法と比較して倫理的に優れている。
 - ・ 当該試験法は、経済的な動物実験代替法となる可能性があるが、日本では、ウシ眼球の日常的な入手が困難であることから、現状では海外への委託対応となる。

D. 結論

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

注釈

1. ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, USA
2. GHS: Global Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals

3. US EPA: United States Environmental Protection Agency.

参考文献

- 1) 眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書
ウシ摘出角膜の混濁および透過性試験
- 2) OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard

- assessment, ENJ/JM/MONO (2005) 14
- 3) Gautheron et al. (1994)
- 4) Balls et al. (1995)
- 5) Swanson et al. (1995)
- 6) Gettings et al. (1996)
- 7) Casterton et al. (1996)
- 8) Southee (1998)
- 9) Swanson and Harbell (2000)
- 10) Bailey et al. (2004)