

1. Phase A, for the training of the participating laboratories, for test method transferability and for confirmation of the test method protocols.
2. Phase B, for the assessment of the protocol performance by testing, under blind conditions in all the laboratories, the 24 chemicals that are selected, coded and distributed independently (15 of which being tested three times at each site).

Phase A

Phase A covers the training of the laboratory personnel at the lead laboratories, Procter & Gamble for the DPRA, L'Oréal for the MUSST, Shiseido and Kao for the h-CLAT (Stage I), and the testing of # a specified number of specified chemicals in their own laboratory (Stage II).

Stage A Stage I: The lead laboratories will be responsible for issuing a definitive test SOP and, a training study plan, for training personnel from the other testing sites, and for releasing a training report (Phase A Stage I Training Report) on the outcome of the training.

Stage A Stage II: The trained personnel will transfer the test method to their own laboratories. The contractors will have to successfully perform the method procedures, and test in house by testing a number of chemicals specified by the lead laboratories' transfer study plans. The lead laboratories will be responsible for issuing a transfer study plan, acceptable to the VMT, as well as a final statement on the outcome of the transfer. The laboratories to which the method is transferred, will be responsible for submitting a transfer report (Phase A Stage II Transfer Report) on the outcome of the transfer to the VMT.

Chemicals to be used for Phase A Stage II will not be tested coded and will have to be purchased by the laboratories to which the method is being transferred.

Results of Phase A Stage II will be reviewed by the Validation Management Team before a decision is taken to proceed to Phase B. If the Stage Phase A Stage II data do not meet test acceptance criteria, the Management Team will work with the contractor and the lead laboratory to identify the problems and determine what further action is to be taken. The Phase III Pre-validation Study for each method will advance to phase B once all the participating laboratories performing the method have submitted Transfer Reports acceptable to the VMT.

Phase B

During Phase B, the laboratories will generate data to evaluate the test methods' reproducibility, as well as a preliminary assessment of their predictive capacities. 24 coded chemicals will be tested by each laboratory. The test items will include sensitizers and non-sensitizers. For the evaluation of the between-laboratory reproducibility the 24 chemicals will be tested once in each laboratory. For the evaluation of the within laboratory reproducibility 15 chemicals will be tested two further times in each laboratory.

Stage I: During this stage, the test methods will be evaluated with a preliminary set of 59 coded compounds/chemicals tested once (1 experiment). It is the responsibility of the laboratories to release a Phase B Stage I study plan, and a study report upon completion of testing. Progression to Phase B Stage II is dependent upon decision of the Validation Management Team following review of the submitted data.

Results of Phase B Stage I will be reviewed by the Validation Management Team before progression. If the Stage I data do not meet test acceptance criteria, the Management Team will work with the contractor and the lead laboratory to identify the problems to determine what further action shall be taken. The Pre-validation Study for each method will advance to Stage II once all the participating laboratories for this method have submitted a Stage I Report acceptable to the VMT.

Stage II: During this stage, the test methods will be evaluated with an additional set of #15 coded compounds/chemicals tested 3 times (3 independent experiments). It is the responsibility of the laboratories to release a Phase B Stage II study plan, and a Stage II Report acceptable to the VMT upon completion of testing. At this point, the Study Directors shall prepare a Final Study Report to be sent to the Validation Management Team.

The within- and between-laboratory reproducibility will be evaluated according to the objectives of the study determined beforehand by the Validation Management Team. Data generated during Phase B will also be used for the preliminary assessment of the predictive capacity of the test methods.

All the chemicals tested in Phases A Stage II and BB (Stage I and Stage II) will be purchased, coded and distributed to the participating laboratories by the IVM unit of the IHCP..

Reports

All reports shall be provided to the designated contact(s) of the Validation Management Group in electronic format (i.e. e-mails with attachments)

VMG Contact:

Alexandre Angers
Silvia Casati

Monthly reports

Each testing facility will provide a monthly progress report, on the first Monday of each calendar month. These reports will include interim information as of the study progress, and should follow the template shown in Annex I.es

Phase A Stage I Report; *Training Report*

The training report shall document all the experimental procedure steps that have been performed and the critical points that are discussed during the training session including conclusions regarding the outcome of the training.

Phase A Stage II Report: *Transferability Report-1st Interim Report*

The transferability report shall include the transfer SOP, the transfer acceptance criteria and the transfer results.

Phase B Stage I Report: *Preliminary Study Report*

At the conclusion of Phase B Stage I a report shall be provided by each Study Directors to the Biostatistician of the ECVAM contact (Alexandre Angers) Management Team. The report shall follow the structure suggested in Annex IX Y II and shall be submitted in electronic format accompanied by four paper copies.

Phase B Stage II Report: Final Study Report

At the conclusion of Phase B Stage II a report shall be provided by each Study Directors to the Biostatistician of the Management Team ECVAM contact person (Alexandre Angers). The report shall follow the structure suggested in Annex III and shall be submitted in electronic format accompanied by four paper copies..

Deliverables

The following table summarises the reports to be compiled for the purpose of this study and the estimated completion timelines. Timelines might need to be reviewed during the study.

PHASE	REPORT	FINAL Estimated due Dates		
End of Phase A Stage I (lead laboratories)	Training Report	March 31 st , 2010		
End of Phase A Stage II (trained laboratories)	Transfer Report	June 30 th , 2010		
		DPRA	h-CLAT	MUSST
End of Phase B Stage I (all laboratories)	Phase B Stage I Report Preliminary Study Report	July 31 st , 2010	September 30 th , 2010	October 15 th , 2010
End of Phase B Stage II (all laboratories)	Phase B Stage II Report Final Study Report	September 15 th , 2010	July 31 st , 2011	June 30 th , 2011
Data Analysis (ECVAM biostatistician)	Biostatistical Report	November 30 th , 2010	September 31 st , 2011	September 31 st , 2011
Final Report Draft (ECVAM and VMG)	Pre-validation Report	March 31 st , 2011	February 29 th , 2012	February 29 th , 2012

Final Report (ECVAM and VMG)	Pre-validation Report	May 31 st , 2011	April 30 th 2012	April 30 th 2012
---	--------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------

Data Analysis

The Study Director of each lab is responsible for the collection, storage, interpretation, analysis and reporting of data and documentation relating to all pre-validation study aspects; and the production and submission of draft pre-validation study reports.

The assessment of the validity of the results to advance from Phase A stage II to Phase B Stage I and from Phase B Stage I to Phase B Stage II, the generation of the final reports (Phase A Stages I and II and Phase B Stages I and II) and the recommendation on how to proceed is the responsibility of the Validation Management Team.

Pre-validation Report

The pre-validation report will be drafted by ECVAM with the support of the VMG and will include the results of the study and the VMG conclusions/recommendations on the outcome of the study. The draft study report shall be circulated to every participating laboratory for review and comments prior to finalisation. The VMG shall review all comments received and make revisions if deemed appropriate.

Note: All the documentation sent to the VMG (text documents, spreadsheets, presentations etc..) should be compatible with Microsoft Office 2003 programmes.

Experimental Design and Methodology

To be completed once the Experimental Design and SOPs have been approved by the VMG

Test chemicals

Chemical Distribution Organisation

The In-House Validation and Training Laboratory of the In-Vitro Methods Unit/ECVAM (IHCP, JRC, European Commission) will be responsible for the purchase, independent coding and shipping of the chemicals to the participating laboratories. The personnel involved in the chemical coding and distribution shall be independent from the personnel involved in the conduct of the pre-validation study.

Responsible: Thomas Cole (IVM-IHCP- European Commission)

Chemical Coding

All test chemicals, with the exception of the positive/negative controls, will be randomly coded. Each chemical shall have a code that is unique for each Testing Facility and unique for each independent replicate experiment to be performed (double-blinded for each laboratory).

The chemicals codes will be provided by the ECVAM biostatisticians.

Health and Safety

Each Testing Facility shall conform to all local, state, and federal statutes in effect at the time of this pre-validation study. The designated Safety Officer shall be the point of contact for health and safety issues.

Receipt of Chemicals

Test chemicals will be packaged so as to minimize damage and risk to handlers during transit and will be shipped to the Testing Facility in accordance with relevant regulatory procedures. Chemicals are to be packaged and shipped so as to conceal their identities. The Testing Facility shall be notified by the shipping Organisation when the test chemicals are shipped, shall make proper provision for their receipt, and promptly acknowledge that they have been received.

The coded test chemicals together with the Material Safety Data Sheets (MSDS) and a sealed health and safety information package will be shipped to the Safety Officer. Upon receipt at the facility, the test chemicals shall be stored in appropriate storage conditions as indicated in the unsealed accompanying documentation.

The Each MSDS related to a specific chemical will be sealed in a single envelope health and safety information package that will include a disclosure key for identifying test chemicals by code. At the end of the pre-validation study, the Safety Officer shall return the unopened health and safety package MSDSs to the Management Team. If any of the health and safety package must sealed envelopes containing the MSDS be is opened by the laboratory, the Safety Officer shall immediately notify the Management Team designated contacts.

The Study Director of each Testing Facility shall receive essential information about test chemical (physical state, weight or volume of sample, specific density for liquid test chemicals, and storage instructions). Upon receipt, each testing facility must complete and return Test Chemical Receipt Reporting Template (Addendum Annex II).

Handling of Test Chemicals

Appropriate routine safety procedures shall be followed in handling the test chemicals unless otherwise specified in the unsealed documentation supplied at the time of chemical distribution. Test Facility personnel shall be instructed to treat all coded test chemicals as **very hazardous and potential sensitizers** and to dispose of laboratory wastes as toxic wastes. The health and safety information package provided to the Testing Facility Safety Officer shall be opened by the Testing Facility only in an emergency/need-to-know situation.

Preparation and Solubilisation of Test Chemicals

Laboratories participating in the study will not be communicated instructed which specific solvents to use to solubilise the chemicals. Each laboratory shall determine the most appropriate solvent for a particular chemical following the solubilisation procedures described in the relevant test method SOP.

Data Collection, handling and analysis

The ECVAM biostatisticians contact person (Alexandre Angers) will collect the data, and organise it in specific data collection software (e.g. MS EXCEL spreadsheets). Data will be analysed after decoding. The ECVAM biostatisticians will be responsible for the do a quality control of the processes of data collection, handling and analysis, as well as of the final biostatistical report. The data management procedure is to be approved by the VMT.

Data will be analysed according to the statistical approaches approved and described in the experimental design document by the VMG.

Records and Archives

At the end of the Pre-validation study, the original raw and processed data shall be submitted to ECVAM for storing and archiving (under the direction of the Management Team). In addition, other data relevant to this Pre-validation study (instrument logs, calibration records, facility logs, etc.) should be made available for inspection upon request by the VMT.

Copies of all raw and derived data shall be stored and archived at the participating Testing Facility for at least five years after completion of the pre-validation study. The derived assay data that are stored electronically shall be periodically copied, and backup files shall be produced and maintained.

Alterations of the Study Plan

No changes in the Study Plan shall be made without the knowledge and consent of the Validation Management TeamGroup.

Study Timeline

The following table summarises the critical phases of the study and the estimated completion timelines. Timelines might need to be reviewed during the study.

TASK	Estimated completion timelines		
Chemical Selection	January 13 th , 2010		
Experimental Design	January 13 th , 2010		
Study Plan	End of January 31 st , 2010		
Finalised SOPs	February 15 th , 2010		
Chemicals coding and distribution	End of March 31 st , 2010		
End Phase A Stage I (training)- Lead Labs	March 31 st , 2010 End of March 2010		
End Phase A Stage II (transferability) -Trained Labs	June 15 th June 30 th , , 2010		
Updated SOPs (if necessary)	June 30 th , 2010		
	DPRA	h-CLAT	MUSST
End of Phase B Stage I (testing) – All Labs	July 31 st , 2010	September 30 th , 2010	October 15 th , 2010

End of Phase B Stage II (testing) – All Labs	September 15 th , 2010	July 31 st , 2011	June 30 th , 2011
--	-----------------------------------	------------------------------	------------------------------

Documents and Data

1. ECVAM after consultation with the VMT supplies prevalidation study documentation 'in confidence' to participating laboratories. Unless and until ECVAM places these documents in the public domain, they may not be published or communicated/distributed to other third parties without the knowledge and consent of ECVAM after consultation with the VMT.

2. All study data generated by the contracted laboratories is the property of the European Commission/ECVAM. It may not be published communicated/distributed to other third parties without the knowledge and consent of the European Commission/ECVAM, and the knowledge of the VMT.

3. Study data generated by the lead laboratory are co-owned by the European Commission/ECVAM and the concerned laboratory. Until the validation study has been concluded and the outcomes published by ECVAM and the VMT, this data may not be published or circulated/distributed to third parties without the knowledge and consent of ECVAM after consultation with the VMT.

4. ECVAM reserves the right to be the first to promptly publish and communicate the outcomes of the validation process". Intellectual Property Agreement

The parties agree that the experimental work described in the present study plan cannot be published or presented, even in part, without the official approval by ECVAM. The results produced will be the property of the European Commission. The name of the Commission has to be quoted on all publications.

References

OECD (1992). *OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 406: Skin Sensitisation*, 9pp. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development.

EU (2008a) Commission Regulation (EC) No 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). *Official Journal No L 142, 31/05/2008, p. 0001-0739*.

OECD (2002). *OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, 7pp. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development.

OECD (2005). *OECD Series on Testing and Assessment No. 34. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, 96pp. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development.

Hartung, T., Bremer, S., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Fortaner, S., Gribaldo, L., Halder, M., Hoffmann, S., Roi A.J., Prieto, P., Sabbioni, E., Scott, L., Worth, A. and Zuang, V. (2004) A Modular Approach to the ECVAM Principles on Test Validity. *ATLA* **32**, 467-72.

Anon. (2003). *Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Part 3: Health and Environmental Hazards*, pp. 151-158. New York, NY, USA, and Geneva, Switzerland: United Nations Organisation.

EU (2008b) Regulation (EC) No 1272/2008 (16 December 2008) of the European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. *Official Journal of the European Union* **L 353**, (31/12/2008) p. 1-1355.

OECD (1999) *OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring No 5, Compliance of Laboratory Suppliers with GLP Principles*. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development.

Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H. & Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. ECVAM Workshop Report 5. *ATLA* 23, 129–147

Annex I –

Monthly Report Template

Testing Facility:

Author of Report:

Date:

Status of Activities:

Problems Encountered/Resolutions:

Projected Testing Schedule:

Annex II –

Test Chemicals Receipt Report Template

Test Facility:

Test Chemicals Received by:

Test Chemicals Receipt Date:

General Comments:

Test Chemical Code	Storage Conditions	Comments

Annex III – Phase B reporting template

To be added

研究課題名：国際協調により公的な試験法を確立するための手順に関する研究

分担研究課題名：バリデーションと第三者評価を円滑に行うための研究
－バリデーションにおける被験物質の選択法に関する研究－

研究分担者： 森田 健 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部
研究協力者： 福島久美子 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部
森川 馨 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

研究要旨

バリデーションの手順に関する研究として、本年度はバリデーションに用いる被験物質の選定に関する手順について検討した。本年度に被験物質の選定が行われた遺伝毒性試験 コメットアッセイ、*in vitro*皮膚感作性試験、Bhas 形質転換試験および 3 次元培養角膜モデルを用いた眼刺激性試験について国際的なバリデーション実行委員会にて議論した。

その結果、試験法の再現性については少数の被験物質を用いて確認し、*in vivo*あるいはヒトでの結果との対応性は相対的に多数の被験物質を用いて確認するべきとされた。

A. 研究目的

安全性試験の新規開発あるいは改良にあたっては、OECD Guidance Document No. 34 (GD34)¹⁾により規定されたバリデーションおよび専門家による第三者評価を経なければ、一般的には行政的には受け入れられない。バリデーションとは、当該試験法について、その信頼性および対応性を確立するためのプロセスのことであり、バリデーションはそのための科学的活動と理解される。

本年度は、主に、このバリデーションの手順に関する研究の中で、大きな比重を占める被験物質の選択に関する研究を行った。バリデーションの目的である再現性と対応性を求めるための条件を考慮すれば、40～50 物質を用いて、複数の施設 (3 施設以上) が、3 回の実験を行うことが望ましい。しかし、予算の限度や動物実験を用いる場合にはこの基準を満たせないことが多い。そこで、科学的に妥当な範囲でいかに削減するかが重要である。

本年度は、以下の国際バリデーションにおいて被験物質の選定が行われたことから、それぞれについて、バリデーション実行委員会のメンバーと意見交換の末、試験法毎にまとまった手順に関する研究成果を示す。

・ 遺伝毒性試験 コメットアッセイ

・ *in vitro*皮膚感作性試験
・ Bhas 形質転換試験
・ 3 次元培養角膜モデルを用いた眼刺激性試験

遺伝毒性試験については、安全性試験の主要な試験項目の 1 つであり、医薬品や工業化学物質など、基本的にはすべての新規化学物質に対して試験を実施し、その有無 (特性) を評価する必要がある。遺伝毒性試験は、その用いる試験系に応じ、*in vitro*試験と *in vivo*試験に分けられるが、*in vivo*試験は *in vitro*での知見の生体内での確認ならびにリスク評価の観点から極めて重要であり、重みが高い。しかしながら、従来の *in vivo* 遺伝毒性試験は、試験対象臓器が主に血液系、ならびに一部の試験で肝臓に限られていた。また、*in vivo*試験の感受性の低さならびに試験手法の複雑性/煩雑性/経済性などの観点からの問題点もあった。昨今、単細胞に分離可能な組織/臓器の全てを評価対象とすることができ、かつ方法が簡便な *in vivo*試験法としてコメットアッセイが開発され、その利用価値が注目されている。特に、小核試験に次ぐ第二の *in vivo*試験として不定期 DNA 合成 (UDS) 試験の代替としての利用が考慮されている。しかしながら、コメットアッセイを行政的に受け入れ可能な試験とするためには、先に述べたバリデーションを実施し、その信頼性および

対応性を評価して受け入れ可能なものと確認されなければならない。遺伝毒性試験の目的の1つは発がん物質の検出であり、当該遺伝毒性試験で発がん物質を試験した場合に陽性結果を示す割合（感受性）が高いのが望ましい一方で、非発がん物質では陰性結果を示す割合（特異性）も高いのが理想的である。そのため、遺伝毒性試験のバリデーションでは、発がん物質および非発がん物質の両者を用いて、試験法の対応性を検証する必要がある。そこで、コメットアッセイのバリデーションには、どのような物質を被験物質として選択すれば効果的かを検討した。

皮膚感作性試験については、化学物質の接触皮膚感作性を明らかにするため、長年、白色モルモットを用いた Maximization 法あるいは、Buehler 法が使われてきた。1990 年代より、動物愛護に関する議論が盛んになり、本分野においても代替法の開発あるいは、より小動物を用いた検討が行われ、2002 年、マウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA) が OECD テストガイドライン No. 429 として認証された。昨年度からこのテストガイドラインの改定が検討されており、その中に類似試験法のバリデーションを簡易にするための被験物質リスト (performance standard) の設定も進んでいる。一方、本方法はマウスを用いることから、完全な動物実験代替法ではない。そこで、米国のグループはペプチドが感作性物質との結合により構造を変えることに着目し、ペプチド結合試験を開発した。日本では、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皮膚感作性試験代替法 (human Cell Line Activation Test: h-CLAT) が株式会社 資生堂および花王株式会社の共同で開発された。さらに、フランスでは、ロレアルでも、ヒト単球由来の細胞株 U-937 細胞を用いた MUSST 試験を開発した。

これらの試験法のバリデーションが ECVAM (欧州動物実験代替法バリデーションセンター) により 2009 年から計画され、被験物質数、その種類について検討がなされた。

形質転換試験については、SHE 法および Balb 3T3 法が一般的であり、OECD テストガイドラインへの検討が進んでいる。新たに、佐々木らが開発した ras 遺伝子を導入した Balb 3T3 細胞を用いる *in vitro* 発がん性試験法について検討した。この方法は、イニシエーションとプロモーションを検出できる利点があるとともに、これまでの方法と比較して、短時間で簡便に評価できる。6 ウェルプレートによるバリデーションはすでに終了しており、本年度、96 ウェルプレートを用いたバリデーションの phase I が終了した。さらに、phase II のための被験物質が検討さ

れた。

眼刺激性試験代替法は、動物実験代替法開発において象徴的な試験法であり、これまで多くの試験法が開発されてきた。しかし、現在でも弱い眼刺激性を検出できるとして認められた方法は、欧州で承認されたフィジオロメーター試験のみである。ただし、本方法では界面活性剤のみしか予想できないと判断されている。よって、広範な化学物質を評価できる試験法として、3 次元培養角膜モデルを用いた眼刺激性試験の開発が待望されていた。2009 年より、ECVAM が本バリデーションを開始するための実行委員会を組織し、議論を重ねてきた。

B. 研究方法

B-1 コメットアッセイ

コメットアッセイには、遺伝毒性試験において肝 UDS 試験に代わる第 2 の *in vivo* 試験としての役割が求められていることから、被験物質の選択に関しては、発がん性、GHS 分類、遺伝毒性、化学物質特性、急性毒性および入手可能性を考慮する必要がある。日本主導で被験物質の選定を行ったことから、以下、各項目について調べた。

B-1-1) 発がん性

発がん性については、動物ならびにヒトについて考慮する必要があり IARC 評価²⁾に基づいた。IARC で評価されていない物質については、動物における発がん性試験結果報告に基づいた。また、Kirkland ら³⁾は、*in vitro* 遺伝毒性試験の実効性を評価するための遺伝毒性物質ならびに非遺伝毒性物質のリストを報告しており、当リストに準じ、遺伝毒性発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性発がん物質および非遺伝毒性非発がん物質の 4 種に分類することとした。なお、ここで「遺伝毒性物質」とは、Ames 試験陽性あるいは標準的 *in vivo* 試験陽性の物質とした。

B-1-2) GHS 分類

化学物質の GHS 分類は、国連勧告に基づく新たなハザード分類である。EU では、従来の Annex I による EU 危険物分類から、REACH 施行にあわせ GHS 分類に転換してきており、2008 年 12 月にリストが発表された⁴⁾。当該リストに記載されている物質については、EU による GHS 分類 (発がん性および生殖細胞変異原性) を調査した。

B-1-3) 遺伝毒性

遺伝毒性は、原則的には *in vitro* 試験および *in vivo* 試験を組み合わせたバッテリー試験で評価する。そこで、標準的バッテリーの構成試

験である Ames 試験、in vitro 染色体異常試験および in vivo 小核試験（血液系細胞）の結果を調査した^{2,3,5)}。加えて、UDS 試験の代替法としての位置づけから、肝 UDS 試験^{2,6,7,8)}、既存のコメットアッセイ^{8,9)}ならびに最近の in vivo 遺伝毒性試験の評価結果¹⁰⁾について調査した。

B-1-4) 化学物質特性

発がん物質は、遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質に大別される。遺伝毒性試験の目的の1つは、遺伝毒性発がん物質の検出にあるが、遺伝毒性発がん物質は、その化学物質クラスあるいは作用様式 (Mode of Action: MOA) が多種多様である。コメットアッセイが種々の遺伝毒性発がん物質に広く適用化可能か否かを検証するために、被験物質のクラスや発がんの MOA など、関連する特性を、主に Kirkland らの報告^{3,10)}、Morita らの報告⁵⁾および HSDB¹¹⁾を利用して調査した。

B-1-5) 急性毒性

コメットアッセイのバリデーションにおける使用動物種はラットである。コメットアッセイの実施において、提供する被験物質質量ならびにその投与量の設定は重要である。それらの一助とするために、経口投与によるラット急性毒性 (LD₅₀) 値を、原則として RTECS¹²⁾を、また、必要に応じ ChemIDPlus¹³⁾等を利用して調査した。

B-1-6) 入手可能性

科学的に妥当であり、被験物質として必要と考えられても、必要量の市販品の有無、取り扱いや輸送の規制、高価格による経費的制限などの観点から、国際的バリデーションへの使用には適当ではなく、結果として被験物質として採用できないものがある。そこで、一般的試薬メーカーにおける市販品の有無、包装量、ならびに価格を調査した。

B-1-7) バリデーション実行委員会での議論

本バリデーションでは、1物質を試験する期間が3ヶ月程掛かる。最終的に13施設が参加を表明しているが、実験期間を9-10ヶ月と設定した場合、3物質/施設しか実験できない。すべてボランティアでの参加をお願いしていることから、無理なスケジュールは強要できない。これらの条件を考慮の上、実行委員長より、以下の3案が提案され、委員間で議論を交わした。

- ・Plan A 1物質を2施設が実施、20物質のデータ（施設間再現性を重視）
- ・Plan B 1物質を1施設のみで実施、40物質のデータ（他の in vivo 結果との比較を重視）

- ・Plan C 1物質を2施設が実施、結果が割れた場合に1施設を追加する。30物質のデータ（折衷案）

B-2) in vitro 皮膚感作性試験

ECVAM が用意した ECETOC データベースから GHS による刺激性の強度⁴⁾、物性、分類などを考慮して選びだされた物質に加え、OECD テストガイドラインで検討されている LLNA performance standard の参照物質を考慮した¹⁴⁾。予算と繰り返し回数も考慮に入れ、被験物質の数と被験物質を検討した。（大野：「名称を検討した」とすると名前そのものを検討したと読めます。）

B-3) Bhas 形質転換試験

食品薬品安全センター秦野研究所において、6ウェルプレートによるバリデーションが実施され、すでに終了している^{15,16)}。この研究で持いられた化学物質を中心に被験物質を選択することが実行委員会で決定した。過去の実験結果から、遺伝毒性の予測性、物性、分類などを考慮し、さらに予算を考慮に入れ、被験物質の数と被験物質を検討した。

B-4) 3次元培養角膜モデルを用いた眼刺激性試験

3次元培養角膜モデルとして、EpiOcular (MaTeK) および SkinEthics HCE (ロレアル) の2種のモデルを用いた細胞毒性試験のバリデーション実施が検討されている。そのための実行委員会では、ECVAM が用意した ECATOC データベースを用いて、GHS による刺激性の強度⁴⁾、物性、分類、選定基準¹⁷⁾などを考慮して104物質を選び出した。（大野：「粗上にあがっている」という意味が分からないこと、また、誰が「104物質を選び出した」かわからないので修正しましたが、修正が正しいかどうかわかりません。なお、選び出された104物質を用いてバリデーションするのでしょうか。それともその前段階としてリストアップしたという意味でしょうか？）

C. 研究結果

C-1) コメットアッセイ

コメットアッセイのバリデーション 4th phase では、最大43物質の使用が計画されているため、まず第1次選択として、約2倍の88物質を選択した。

遺伝毒性発がん物質として40物質を選択し、そのうち Ames 試験陽性が31物質、陰性 (equivocal を含む) が9物質、UDS 試験では陽

性が14物質、陰性が12物質、データなしが14物質であった。遺伝毒性非発がん物質として13物質を選択し、そのうちAmes試験陽性が11物質、陰性が2物質、UDS試験では陽性が2物質、陰性が2物質、データなしが9物質であった。非遺伝毒性発がん物質として19物質（すべてAmes試験陰性）を選択し、UDS試験について陽性が0物質、陰性が8物質、データなしが11物質であった。本バリデーションでは、評価対象臓器を肝および胃としている。肝臓における評価を検証するために、3種の非遺伝毒性肝発がん性物質を含めた。非遺伝毒性非発がん物質として15物質（すべてAmes試験陰性）を選択し、そのうちUDS試験陽性が0物質、陰性が2物質、データなしが13物質であった。前項の肝毒性物質の場合と同様、胃における評価を検証するために1種の非遺伝毒性非発がん性胃毒性物質（Sodium chloride）を含めた。また、コメントアッセイの陽性対照物質（遺伝毒性発がん物質）として、1st phaseから始まったこれまでの研究同様、Ethyl methanesulfonateを選択した。

これらの暫定候補被験物質の中から、第2次選択として、入手の可能性を検討した。すなわち、4th phaseでは、1物質で1実施機関あたり、1群5匹のラットを用い、用量設定試験で1回ならびに本試験で3回の計4回の経口投与が予定されている。被験物質必要量は、急性毒性値に基づく試験最高用量により異なってくるが、最高用量を100 mg/kgとした場合の最低必要量は次のようになる：100 mg/kgは、ラット体重200 gとして20 mg/匹に相当する。1実施機関あたりの実消費量は、20 mg/匹 x 5匹 x 2（2倍希釈系列作成）x 4（投与回数）= 800 mgとなる。これに加え、実際は、溶媒検討あるいはより高用量からの用量設定試験の開始が考えられ、1 gは最低必要と考えられる。試験最高用量が2000 mg/kgの場合、実消費量は16 g、最低必要量は20 gとなる。したがって、経費的観点から価格が¥10000/gを超えるものは、原則として除くこととした。

さらに、本邦の大手試薬メーカーによる取扱がないもの、在庫切れ、重複した類似の化学物質クラスならびに適切な既存情報のあるものなどを除き、最終的にAmes陽性発がん物質16、Ames陽性非発がん物質5、Ames陰性発がん物質15、Ames陰性非発がん物質9および陽性対照物質1の計46物質を選択した。

これらの検討で候補となった46被験物質から、何を主な目的として、何物質を用いるか委員間でメールやface to face会議により討論を繰り返した。委員長から、以下に示す3案が提示され、各委員が、A、BおよびC案それぞれを押しつけてコンセンサスが中々取れない状況が続いた。

- Plan A 1物質を2施設が実施、20物質のデータ
- Plan B 1物質を1施設のみで実施、40物質のデータ
- Plan C 1物質を2施設が実施、結果が割れた場合に1施設を追加。30物質のデータ

そこで、委員長より代案としてD案が提示された。

- Plan D 1物質を1施設のみで実施、もし予想できないデータが得られた場合、2施設を追加。40物質のデータとなる。

結局、施設間再現性については、phase IV-1までの試験で得られているとされ、本バリデーションでは、in vivoとの対応性に関するデータを得ることとされた。

C-2 *in vitro*皮膚感作性試験

バリデーション実行委員会では、ECETOCデータベースやOECDの指針に示されたLLNAのperformance standardを参考に、陽性物質16、陰性物質8が選ばれた。さらに、

- ・施設間再現性を求めるために、24物質/施設×4施設 1回のみ
- ・そのうちの15物質/施設×4施設では、施設内再現性を求めるためにさらに2回の実験を追加することになった。

24物質を3回繰り返す提案もあったが、予算と時間の関係で実施できないことになった。一方、本バリデーションの位置付けが、プレバリデーションであることから、15物質を3回実施するという提案も示されたが、不十分と実行委員会で結論された。（大野：「不十分」ということは、より多くの物質を用いた3回繰り返しの本バリデーションで結論を出すべき、ということでしょうか？）

また、日本からの強い要望として、LLNAのperformance standardの中の参照物質を中心に選択すべきであると主張した。

C-3 Bhas 形質転換試験

6ウェルプレートの結果を考慮して、以下の案が実行委員会で採択された。

- Phase I 7物質/施設を4施設で実施（終了）
施設間再現性が良いと判断された。
- Phase II 16物質/リード施設
8物質/A施設
残り8物質/B施設

施設間再現性にも配慮しながら、23物質で予

測性の確認を実施する。Phase II では、2 施設で施設間再現性を比較することになっており、結果がばらついた際の対処に慎重な判断が必要であるとされている。

C-4 3次元培養角膜モデルを用いた眼刺激性試験

本バリデーションでは、両培養モデルの施設間再現性および対応性を求めるために理想的な計画が立てられた。

・EpiOcular

2 培養モデル／濃度×1濃度×3回／施設を3施設で実施、104物質のデータ

・SkinEthics HCE

3 培養モデル／濃度×2濃度×3回／施設を3施設で実施、104物質のデータ

(大野：上の省略の意味が分かりません。)

日本や米国からのコメントとして、膨大な実験となってしまう、実現可能とは思えないことから、104物質が必要な理由の説明を何度も要求した。しかし、ECVAMの統計学者が判断したとの回答しか得られておらず、メールや電話会議のみの出席の限界を感じている。まだ本バリデーションは開始されておらず、2010年3月末にECVAMにおいて計画に関する結論が出る予定である。

D. 考察

バリデーションには、ある程度の被験物質を用いて、施設内・間再現性および対応性を調べる目的がある。しかし、予算や時間の関係で、十分な数の被験物質での試験を繰り返し実施できない場合、施設間再現性を重視すべきか、対応性を重視すべきか、本年度取り組んだ大きな課題である。(大野：施設間再現性を求めるために使用すべき被験物質数を決めるための基本的な考えについては議論されなかったのでしょうか？ 以前、Hartung が書いた論文では数種の被験物質で施設間再現性をみることで良いとの考えでしたが、陽性・陰性や刺激強度等に応じて、いくつかの被験物質があれば施設間再現性を判断できる、とする考えはプラグマティックで良いと、私は考えています。)

4種のバリデーション実行委員会に参画して、予算や期限の問題から、二つの条件を満たせるバリデーションは稀であることを認識できた。ではどちらを重視するか、この場合の委員間の意見が割れた。代替法バリデーションセンターである ECVAM、JaCVAM は施設内・施設間再現性に関する情報を多くの物質について求めるべきと主張したが、米国の NICEATM は対応性を重視する姿勢を強調した。

結局、4種の内、コメットアッセイと *in vitro* 皮膚感作性試験についての2種のバリデーションでは、施設間再現性よりも、対応性に重きをおくべきであるとの主張が強い傾向となった。限られた条件における選択は難しく、その適切性は試験終了後でないとは判断できないが、今回のこの選択が適切であることを望む。

(大野：日本主導と言いながら、日本の意見が通らないと書くのはまずいと思います。)

E. 結論

バリデーションの手順に関する研究として、本年はバリデーションに用いる被験物質の選定に関する手順について検討した。本年度に被験物質の選定について検討がなされた遺伝毒性試験コメットアッセイ、*in vitro* 皮膚感作性試験、Bhas 形質転換試験および3次元培養角膜モデルを用いた眼刺激性試験について国際的なバリデーション実行委員会で議論した。

その結果、十分な被験物質を繰り返し実施できない場合、施設間再現性よりも対応性を重視する傾向が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

- 1) 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, 14 2005. <[http://appli1.oecd.org/olis/2005doc.nsf/linkto/env-jm-mono\(2005\)14](http://appli1.oecd.org/olis/2005doc.nsf/linkto/env-jm-mono(2005)14)> OR <[http://www.olis.oecd.org/dlis/2005doc.nsf/LinkTo/NT00002EAE/\\$FILE/JT0018829_1.PDF](http://www.olis.oecd.org/dlis/2005doc.nsf/LinkTo/NT00002EAE/$FILE/JT0018829_1.PDF)>
- 2) International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. <<http://monographs.iarc.fr/>>
- 3) Kirkland, D., Kasper, P., Muller, L., Corvi, R., Speit, G., Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: A follow-up to an ECVAM workshop, Mutat. Res., 653, 99-108, 2008.
- 4) European Union, REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on

- classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006, Official Journal of the European Union, L 353/1, 31.12.2008. <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:353:0001:135:en:PDF>>
- 5) Morita, T., N. Asano, T. Awogi, Y.F. Sasaki, S. Sato, H. Shimada, S. Sutou, T. Suzuki, A. Wakata, T. Sofuni and M. Hayashi: Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Groups 1, 2A, and 2B), The summary report of the 6th collaboration study by CSGMT/JEMS·MMS, *Mutation Res.*, 389, 3-122, 1997 [Erratum, *Mutation res.*, 391, 259-267, 1997].
- 6) S. Madle, S.W. Dean, U. Andae, G. Brambilla, B. Burlinson, D.J. Doolittle, C. Furihata, T. Hertner, C.A. McQueen, H. Mori, Recommendations for the performance of UDS tests in vitro and in vivo, *Mutat Res.*, 312, 263-285, 1994.
- 7) COM (Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment), A comparison of the sensitivities of the in vivo rat liver UDS assay with the in vivo COMET assay, 2006. <http://www.iacom.org.uk/papers/documents/mut063_000.pdf>
- 8) Sasaki, Yu F., K. Sekihashi, F. Izumiyama, E. Nishidate, A. Saga, K. Ishida, S. Tsuda, The comet assay with multiple mouse organs: Comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP carcinogenicity database, *Crit. Rev. Toxicol.*, 30, 629-799, 2000.
- 9) K. Sekihashi, A. Yamamoto, Y. Matsumura, S. Ueno, M. Watanabe-Akanuma, F. Kassie, S. Knasmuller, S. Tsuda, Y.F. Sasaki, Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay, *Mutat Res.*, 517, 53-74, 2002.
- 10) Kirkland, D., G. Speit, Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens, III. Appropriate follow-up testing in vivo, *Mutat Res.*, 654, 114-132, 2008.
- 11) HSDB: Hazardous Substance Data Bank, Micromedex. <<http://csi.micromedex.com/fraMain.asp?Mnu=&Restore=Y>> OR TOXNET, NLM <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CHEM>>
- 12) RTECS: Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, Micromedex. <<http://csi.micromedex.com/fraMain.asp?Mnu=&Restore=Y>>
- 13) ChemIDPlus: TOXNET, NLM <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CHEM>>
- 14)) <<http://www.oecd.org/dataoecd/33/57/44279511.pdf>>
- 15) Ohmori K, Umeda M, Tanaka N, Takagi H, Yoshimura I, Sasaki K, Asasda S, Sakai A, Araki H, Asakura M, Baba H, Fushiwaki Y, Hamada S, Kitou N, Nakamura T, Nakamura Y, Oishi H, Sasaki S, Shimada S, Tsuchiya T, Uno Y, Washizuka M, Yajima S, Yamamoto Y, Yamamura E, Yatsushiro T; Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in the Environmental Mutagen Society of Japan. : An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells. *Altern Lab Anim.* (2005) 33:619-639.
- 16) Tanaka N, Sasaki K, Hayashi K, Sakai A, Asada S, Muramatsu D, Kudora S, Mizuhashi F, Nagai M, Suzuki H, Imamura T, Asakura M, Satoh H, Sakamoto A, Nakao R, Hirose H, Ishii N, Umeda M: An interlaboratory collaborative study on a cell transformation assay using Bhas 42 cells. *AATEX* (2009) 14:831-848.
- 17) Scotte, L. et al., A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Borttom-up and Top-Down approaches, *Toxicol in Vitro*, 24, 1-10, 2010

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小島肇夫：動物実験データなしで新規医薬部外品の申請はどこまで可能か？、*BIO INDUSTRY*, 26 (8) 42-49 (2009)
- 2) 小島肇夫：皮膚・粘膜毒性、新版 トキシコロジー、日本トキシコロジー学会教育委員会編集、pp. 246-254 (2009)

- 3) 小島肇夫: 医薬部外品と化粧品、GLP/非 GLP 試験の具体的実施ポイント、技術情報、東京、pp. 425-433 (2009)
 - 4) 小島肇夫: REACH における環境影響試験、フレグランスジャーナル 2009-8、46-51 (2009)
 - 5) 小島肇夫、新井晶子、北條麻紀: 再構築培養表皮モデルを用いた遺伝毒性の評価、コスメトロジー研究報告、17、57-62 (2009)
 - 6) 小島肇夫: 現在の動物実験代替法の状況について、LABIO21、38、17-20 (2009)
 - 7) Takeshi Morita, Makoto Hayashi, Madoka Nakajima, Noriho Tanaka, David J. Tweats, Kaoru Morikawa and Toshio Sofuni: Practical Issues on the Application of the GHS Classification Criteria for Germ Cell Mutagens, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 55, 52-68, 2009.
 - 8) Tetsuo Sato and Takeshi Morita: Chapter 95, Japan, In *Information Resources in Toxicology*, 4th Edition (Ed. Philip Wexler), pp. 991-1011, Academic Press (Elsevier), ISBN 978-0-12-373593-5, pp. 991-1011, 2009.
 - 9) 森田 健: GHS 分類のための健康有害性評価基準、毒性情報の種類とデータの質の評価、化学経済、2009年5月号、62-67.
 - 10) 森田 健: GHS 分類のための健康有害性評価基準、毒性データ評価の要点、Part 1、化学経済、2009年6月号、69-75.
 - 11) 森田 健: GHS 分類のための健康有害性評価基準、毒性データ評価の要点、Part 2、化学経済、2009年7月号、88-93.
 - 12) 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)
 - 13) 小島肇夫: 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性試験の資料に関するあり方検討会報告、日皮協ジャーナル、32、82-91 (2010)
2. 学会発表
- 1) 小島 肇: バリデーションとは何か? & 国際動向、JaCVAM第2回ワークショップ、東京 (2009)
 - 2) 小島 肇: 培養皮膚モデルバリデーション、JaCVAM第2回ワークショップ、東京 (2009)
 - 3) 小島 肇: 動物実験代替法に関する国内外の動向、JALAMシンポジウム「安全性試験における動物実験代替法－国内外の動向と代替法開発の現状－」、大宮 (2009)
 - 4) 小島 肇: 動物実験代替法における培養細胞の利用: 合同追悼シンポジウム「黒田行昭先生を偲んで」、日本組織培養学会第82回大会、栃木 (2009)
 - 5) 小島 肇: バリデーション試験の今後の予定について、コメットアッセイ国際バリデーション試験進捗報告、日本環境変異原学会MMS研究会 第54回定例会、熱川 (2009)
 - 6) 小島 肇、安藤洋子、山口能宏、小坂忠司、鈴木民恵、湯浅敦子、渡邊幸彦、篠田伸介、出原賢治、吉村 功、宮岡悦良、石山賢也、加藤雅一、大森 崇: 培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション、第36回日本トキシコロジー学会学術年会、盛岡 (2009)
 - 7) 小島 肇: OECD Test Guideline 記載モデルとしての LabCyte EPI-MODL の可能性、皮膚基礎研究クラスターフォーラム、東京 (2009)
 - 8) Kojima, H.: 3D comet assay, JaCVAM experience, 5th International Workshop on Genotoxicity Testing, Basel (2009)
 - 9) 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, 8th International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
 - 10) Nakajima, M., Masumori, S., Tanaka, J., Hayashi, M., Uno, Y., Kojima, H. and Tice, R.: An atlas of comet images: JaCVAM initiative International Validation trial for the in vivo comet assay, 8th International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
 - 11) Kojima, H.: Validation of innovative methods for safety testing: drawbacks and advantages of Japanese validation studies, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 12) Kojima, H., Matsui, T., Kohara, A., Yoshida, A. and Nakamura, Y.: GCCP initiatives in Japan, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 13) Ono, A., Takeyoshi, M., Bremer, S., Jacob, M., Laws, S., Sozu, T. and Kojima, H.: The International validation study for the ER alpha STTA antagonist assay using HeLa9903, 7th World Congress on

- Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 14) Allen, D., Deal, F., Ceger, P., Gordon, J., Pazos, P., deLange, L., Bremer, S., Nakamura, M., Kojima, H., Ono, A., Tice, R. and Stokes W.: Testing of coded substances for a multi-phases international validation study of an estrogen receptor (ER) transcriptional activation (TA) assay, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 15) Kojima, H., Iijima, M., Matsunaga, K., Sasa, H., Itagaki, H., Okamoto, Y., Nishiyama, N., Mita I., Washida, J., Masuyama, K., Onodera, H., Masuda, M., Ohno, Y.: Review of an alternative to animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients using Quasi-drug, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 16) Wind, M., Blakey, D., Kojima, H., Kreysa, J. and Stokes, W.: What is the international cooperation on alternative test methods (ICATM) and what is its role?, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 17) Kojima, H.: JaCVAM' s role in the 3Rs and ICATM, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 18) Kojima, H.: Recent progress and future directions at JaCVAM, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 19) Inoue, T., Masuda, M., Akita, M., Kojima, H. and Ohno, Y.: JaCVAM statement on new alternative to animal testing, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 20) Takeyoshi, M., Kojima, H., Omori, T., Sozu, T. and Yoshimura, I.: Validation study for non-radioisotopic local lymph node assay based on BrdU incorporation (LLNA-BrdU), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 21) Kojima, H., Ando Y., Yamaguchi Y., Kosaka T., Suzuki T., Yuasa A., Watanabe Y., Shinoda S., Idehara K., Yoshimura I., Miyaoka E., Ishiyama K., Kato M., Omori T.: Validation of LabCyte EPI-MODEL24, an *In Vitro* Assay for Detecting Skin Irritants, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 22) Yamamoto, N., Hirano, K., Kato, M., Hata, K., Horiguchi, M., Taniguchi, K. and Kojima, H.: Cell surface marker of corneal epithelium stem cells and culture, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 23) Lowther, D., Wind, M., Stokes, W., Barroso, J., Zuang, V., Amcoff, P., Kojima, H., Prinsen, M., Tice, R., Allen, D. and McCall, D.: International acceptance of in vitro alternative ocular safety testing methods: the isolated chicken eye (ICE) test method (Draft OECD TG 438), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 24) Merrill, J., Wind, M., Stokes, W., Barroso, J., Zuang, V., Amcoff, P., Kojima, H., Jacobs, A., McCall, D. Allen D. and Tice, R.: International acceptance of in vitro alternative ocular safety testing methods: bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test method (Draft OECD TG 437), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 25) 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, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 26) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schectman, L. and Hayashi, M.: International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 27) Kojima, H., Arai S. and Hojo M.: Adequate conditions for performance of comet assay using 3-dimensional human epidermal model, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 28) Stokes, W., Wind, M., Matheson, J., Jacob., A., Casati, S., Kojima, H., Allen, D., Burns, T., Salicru, E., Strickland, J. and Tice, R., Internationally harmonized

- performance standards (PS) for the murine local lymph node assay (LLNA), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 29) Honma, M., Yamakage, K., Burlinson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Nakajima, M., Suzuki, M., Corvi, R., Uno, Y., Szechtmann, L., Tice, R. and Kojima, H.: International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 10th ICEM, Florence (2009)
- 30) Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Tice, R., Corvi, R., Schechtman, L. and Hayashi, M.: In vivo Comet Assay: Update on on-going international validation coordinated by JaCVAM, 10th ICEM, Florence (2009)
- 31) 小島 肇: 動物実験代替法における国内外の動向、日本薬学会関東支部大会、埼玉 (2009)
- 32) 小島 肇: In vitro 安全性・機能性評価及び作用メカニズム・新規物質探索研究の最前線、第 22 回動物細胞工学シンポジウム、東京 (2009)
- 33) 小島 肇: 医薬部外品の承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会、日本産業皮膚衛生協会 秋季研修会、京都 (2009)
- 34) Kojima, H.: Japanese views in the 3Rs in the 21st century, ZEBET's 20th Anniversary Symposium, Berlin, Germany (2009)
- 35) Kojima, H.: Organization of JaCVAM and its activity, KoCVAM International Symposium and 6th Congress of KSAAE, Seoul (2009)
- 36) Kojima, H.: Utilization of an alternative to animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients using Quasi-drug, The 17th ICDS (International Contact Dermatitis Symposium) and the 10th APEODS (Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium), Kyoto (2009)
- 37) Kojima, H.: Japanese approach to regulatory acceptance of new skin sensitization testings with considerations to animal welfare and 3Rs, The 17th ICDS (International Contact Dermatitis Symposium) and the 10th APEODS (Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium), Kyoto (2009)
- 38) 小島 肇、安藤洋子、山口能宏、小坂忠司、鈴木民恵、湯浅敦子、渡邊幸彦、篠田伸介、出原賢治、吉村 功、宮岡悦良、石山賢也、加藤雅一、大森崇: 培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 39) 小島 肇、飯島正文、松永佳世子、佐々 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)
- 40) 小島 肇、井上 達、増田光輝、秋田正治、大野泰雄: 動物実験代替法公定化のための JaCVAM 提案書、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 41) 小野 敦、武吉正博、Susanne Bremer、Miriam Jacob、Susan C. Laws、寒水孝司、小島 肇: HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体転写活性化試験によるアンタゴニスト検出法の国際バリデーション、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 42) 本間正充、山影康次、Burlinson, B.、Escobar, P.、Pant, K.、Kraynak, A.、林 真、中嶋圓、鈴木雅也、Corvi, R.、宇野芳文、Schechtman, L.、Tice, R.、小島 肇: In vitro アルカリコメットアッセイ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)
- 43) 小島 肇、笠松俊夫: IWGT 報告 トピックス 3: 予測性の高い in vitro 試験の提案、日本環境変異原学会第 38 回大会、清水・静岡 (2009)
- 44) 中嶋圓、小島 肇、宇野芳文、本間正充、林 真: コメットアッセイの国際バリデーション、日本環境変異原学会第 38 回大会、清水・静岡 (2009)
- 45) 小島 肇、北條麻紀、新井晶子: 3次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイと細胞毒性の関係、日本環境変異原学会第 38 回大会、清水・静岡 (2009)
- 46) JaCVAM: コメットアッセイ国際バリデーションプロジェクトチーム: インビボコメットアッセイ: JaCVAM 国際バリデーション試験の進捗状況報告、日本環境変異原学会第 38 回大会、清水・静岡 (2009)
- 47) 伊藤正俊、関東裕美、鷺崎久美子、松永佳世子、矢上晶子、中川真美子、加藤則人、河合恵一、滝脇弘嗣、吉村 功、小島 肇: パッチテストによる皮膚一次刺激性評価 (2)、第 39 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、京都 (2009)