

アレルギーが一般的である。免疫が関与しないヒスタミンの放出促進薬剤には、クラレー、アスピリン、アゾ染料、安息香塩および昆虫、植物や動物性トキシンなどがある。医療機関を訪れた蕁麻疹患者の中で、この症例が占める割合は1.1%という報告がある。

本アレルギーの評価方法としては、IgE抗体量検出試験が一般的である。

8) 痤瘡⁷⁴⁾ 痤瘡 (acne) の中でもっとも代表的な疾患である尋常性痤瘡は脂腺性毛包をおかす慢性炎症性疾患で、一般に痤瘡といえは“尋常性痤瘡”，すなわち“ニキビ”のことを指す。痤瘡は毛包の角化細胞の過剰増殖を特徴とする病変であり、毛包内にケラチン栓の形成あるいは皮脂の貯留が起こり、毛包腔の拡張が起こる。痤瘡には多くの疾患が含まれており、その原因もきわめて多岐にわたっている。もっとも一般的な病変は顔、背中、および胸に生じる。痤瘡を引き起こす化学物質は、面皰(めんぼう)形成性コメドと呼ばれる。コールタールや切削油、リノレン酸などの化粧品原料が著名である。このほかにもっともひどい形態を示す疾患が、ハロゲン化芳香族炭化水素によって引き起こされる塩素痤瘡である。ポリ塩化ビフェニル、ヘキサクロロベンゼン、ダイオキシンで引き起こされる。比較的に稀な疾病であるが、職業病および環境に起因する疾患として重要である。

試験法としては、ウサギの外耳道に化学物質を最低2週間塗布し、毛包中の過角化の程度を肉眼(マイクロスコープなど)、組織学的に評価する方法が一般的である。動物愛護運動の高まりの中、この方法を代替するためにはヒトボランティアの協力を得て、背中の毛包が使われることもあるが、他の皮膚毒性がないことを確認したうえで実施すべきである。

9) 色素沈着異常⁷⁵⁾ 色素過剰沈着および色素沈着減少が含まれる。色素過剰沈着は、接触皮膚炎や光毒性によって認められることが多い。直接的または間接的に下垂体ホルモンを介してメラノサイトを活性化させる化学物質(エストロゲン、ヒダントイン、コルチコトロピン)、またはメラニン非依存性に皮膚成分と結合して色素沈着を引き起こす化学物質であるクロロキン、クロルプロマジン、フェノチアジン、テトラサイクリン、プスルファン、ピスマス、水銀、ソラレン類、タール色素、防腐剤、香

料もある。

メラノサイトに選択的な毒性を示し、メラニンの主要な生成過程を阻害することで白皮を引き起こすヒドロキノン、フェノール類、カテコール類、プチルヒドロキシトルエン、メルカプトアミンなども知られている。

10) 腫瘍 皮膚発がんを引き起こす物質としては、放射線、紫外線、ヒ素、タールおよびその関連物質、ベンゾピレンなどの多環式芳香族炭化水素、ベンゾアクリジンなどの複素環式化合物、発がんプロモーターであるオカダ酸やクロトン油のホルボールエステルが知られている。

評価法として、皮膚への連続塗布による発がん性試験または中期発がん性試験などが有用である。

6.9.2 粘膜毒性

粘膜といっても、口腔、眼、泌尿生殖器、直腸などそれぞれ組織、透過性、分泌物などに大きな相違がある。粘膜に皮膚科外用剤や眼薬、口腔内洗浄剤、生理用品、下剤などを用いる場合には、刺激性の評価は必須である。しかし、眼刺激性以外、定められた方法はない。

a. 眼毒性

1) 眼構造と機能^{76~78)} 化学物質に暴露される眼球前部の構造は、主に角膜、虹彩、結膜から成っている。角膜は上皮および内皮の間に間質を有しているが、間質には血管がなく、水和膠原線維が薄層状に配列している。角膜上皮の細胞毒性や細胞間結合障害により角膜は混濁する。損傷が強い場合にはこの混濁は戻らなかつたり、角膜が薄くなつたり、溶けてしまう。間質では水和の程度を増強させるような化学物質によって角膜水腫が起こり、角膜は混濁する。

結膜は、血管に富む間質を支持組織とする非角化扁平上皮からなる粘膜で、眼瞼の内部表面と前眼球の外側縁を覆っている。虹彩は眼球内部の膜構造であり、血管に富み、眼房水中に位置している。

2) 毒性の種類、毒物、検出法^{22, 24, 76~83)} 強酸や強アルカリは角膜の浸潤性傷害を起し、浮腫に始まり、ついで損傷部への炎症細胞の浸潤、さらに角膜辺縁からの血管および線維芽細胞の侵入が起こる。ブタノールやアリルアルコールの暴露による角膜傷害、溶剤や洗剤などの飛沫あるいは点眼薬の長期反復投与においては刺激性結膜炎が多い。化学物

質による結膜傷害の機序や反応は皮膚の場合と同様である。ある種の化学物質によるI型あるいはIV型アレルギー性結膜炎も多い。アンモニアなどのある種の刺激物はすみやかに角膜を透過して眼房水や虹彩にも影響を及ぼす。虹彩は刺激性化学物質に反応して充血と浮腫を起こす。高度の場合にはタンパクに富む浸出液による眼房水の混濁が起こる。

眼刺激性の評価方法には、ウサギが一般に用いられてきた。ウサギの眼はヒトと比較して、角膜およびボーマン氏膜が薄く、角膜上皮の新生が遅い、眼瞼が緩い、瞬膜がよく発達している、角膜における血管増殖がしばしば起こる、眼房水のpHが異なることから、ウサギのほうが人間より刺激性に対して感度が高いといわれている。これをもとに、ドレイズ試験が汎用され⁸⁴⁾、角膜、結膜、虹彩を点数化して評価されてきた。しかし、本試験も動物に苦痛や痛みを与えるという動物愛護の関係から動物実験代替法の検討が増えている。この背景として、研究室間での変動が大きいことや、スコア化が主観的、ヒトの刺激性を評価するには予測性が乏しいことなどが挙げられている。

そこで、代替法による評価が進んでおり、強度の角膜損傷を捕らえる目的で牛の摘出角膜試験や鶏の摘出眼球試験がOECDガイドライン案として承認された⁴⁷⁾。また、日本では培養細胞を用いる細胞毒性試験が水溶液の角膜損傷を代替する試験として検討され、ガイダンス案が作成されている⁸⁵⁾。

腐食性物質は皮膚や粘膜にかかわらず毒性を示すが、刺激性の強度によっては皮膚と同等の障害を起こすとは限らない。したがって、評価の際には注意が必要である。

b. その他粘膜毒性^{22, 79, 86)}

1) 口腔粘膜刺激性 一般的な口腔粘膜毒性物質としては、誤飲による刺激性物質のほかに、歯牙に対するフッ素イオンおよびテトラサイクリン系抗生物質が有名である。PCPC (The Personal Care Products Council; 米国パーソナルケア製品協議会。最近CTFAからPCPCへ改名された) のCTFAガイドラインが示す試験法として、歯磨きや口腔洗浄剤のような衛生用品の評価をハムスターやラットの口腔に多数回適用後 (FDAでは4回/日、28日間)、目視および組織評価が挙げられている。

ヒトの口腔モデルを用い、細胞毒性やインターロイキンの放出を測定し、組織学的検査を行う *in vitro* 試験やヒトの臨床試験などもPCPCでは推奨している。

2) 腔粘膜刺激性 ウサギを用いる試験法がPCPCガイドラインに記載されている。5-10日間連続適用により、腔粘膜への毒性 (潰瘍、炎症浸潤、紅斑、浮腫) を肉眼および組織学的に観察する。

3) 陰茎粘膜刺激性 衛生製品の評価のため、ウサギを用いる試験法がPCPCガイドラインに記載されている。1回適用後に、紅斑や浮腫を肉眼で観察する。 [小島肇夫]

文 献

- 1) 成澤 寛 (2006): 皮膚科学 (片山一朗, 土田哲也, 橋本隆, 古江増隆, 渡辺晋一編), 文光堂, pp.8-25.
- 2) 上野賢一, 大塚藤男 (2006): 皮膚科学第8版, 金芳堂, pp.1-44.
- 3) 西川武二 (2007): 標準皮膚科学第8版, 医学書院, pp.5-29.
- 4) Bronaugh, R.L., et al. (2005): 化粧品・医薬品の経皮吸収, (ロバートL.プロナーおよびハワードI.メイバック編著, 杉林堅次監訳) フレグランスジャーナル社, pp.163-168.
- 5) 杉林堅次 (2007): 化粧品大全, 情報機構, pp.389-395.
- 6) 杉林堅次 (2007): 機能性化粧品素材開発のための実験法 (芋川玄爾編) シーエムシー出版, pp.347-354.
- 7) 島村剛史, 夏目秀祝, 森本雍憲 (2007): 最新動物実験代替法, 技術情報協会, pp.221-238.
- 8) Haw-Yueh Thong, Hongbo Zhai and Haward I. Maibach (2007): Dermatotoxicology 7th Eds. (Zhai, Hongbo, Wilhelm Klaus-Peter, and Maibach, I. Howard) pp.51-61, CRC Press, New York.
- 9) Roberts, S. M. and Walters, A. K. (2007): Dermatol absorption and Toxicity Assessment 2nd Eds., (Roberts, S. Michael and Walters, A. eds.) pp.1-15, Kenneth, Informa healthcare, New York.
- 10) Monterio-riviere, A. Nancy, Baynes, E. Ronald and Riviere, E. Jim (2007): Dermatol absorption and Toxicity Assessment 2nd Eds. (Roberts, S. Michael and Walters, A.) pp.17-35, Kenneth, Informa healthcare, New York.
- 11) 小島肇夫 (2008): 最新・経皮吸収剤一開発の基礎から申請までのポイントまで一, 情報機構, pp.95-113.
- 12) 薬食審査発第0707001号 (2003): 局所皮膚的適用製剤の後発医薬品のための生物学的同毒性試験ガイドライン.
- 13) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 427 (2002): In vivo Skin absorption. Paris.
- 14) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 428 (2002): In vitro Skin absorption. Paris.
- 15) COLIPA (1995): Guidelines for percutaneous absorption, Brussels.
- 16) SCCFNP (2002): Guidelines for in vitro methods to assess percutaneous absorption of cosmetic ingredients" in "Notes of Guidance for testing of cosmetic ingredients"

- for their safety evaluation", SCCNFP/0321/00 Final.
- 17) EC (2004) : Guidance document on dermal absorption, Sanco/222/2000 rev.7, 19/03/2004. European Commission, Health and consumer protection.
 - 18) EPA (United States Environmental Protection Agency) (1999) : Proposed rule for in vitro dermal absorption rate testing of certain chemicals of interest to occupational safety and health administration. Federal Register, Volume 64, Number 110, June 9.
 - 19) Recommended Protocol for In vitro Percutaneous Absorption Rate Studies (1996) : Federal Register, Vol 61, No. 65.
 - 20) Howes D., et al. (1996) : Methods for Assessing Percutaneous Absorption. The report and recommendations of ECVAM workshop 13, ATLA 24, 81-106.
 - 21) Kielhorn, Janet, et al. (2006) : Dermal Absorption, Environmental Health Criteria Series, No. 235, WHO.
 - 22) 小林敏明, 市川秀之, 板垣 宏 (1989) : 毒性試験講座7, 機能毒性学, (福原武彦・小野 宏編) 地人書館, pp.268-302.
 - 23) 日本化粧品工業連合会 (2001) : 化粧品の安全性評価に関する指針, pp.8-14 & 18-24, 薬事日報社.
 - 24) 杉山真理子 (2001) : 非臨床試験マニュアル, pp.173-181 エル・アイ・シー.
 - 25) Cohen, E. David and Rice H. Robert (2001) : Casarett & Doull's Toxicology 6th Eds. (Klaassen D. Curtis eds.) pp.653-671, McGraw Hill, New York.
 - 26) 土井邦雄 (2002) : トキシコロジー (日本トキシコロジー学会教育委員会編) 朝倉書店, pp.216-221.
 - 27) 小島肇夫 (2006) : 化粧品大全, pp.407-416, 情報機構.
 - 28) 化粧品・医薬品部外品 (2006) : 製造販売ガイドブック 2006, 薬事日報社, pp.141-147.
 - 29) THE SCCP'S NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION 6TH REVISION (2006) : http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_04.pdf#search='SCCP guidance'.
 - 30) CTFA (2007) : Safety Evaluation Guidelines, CTFA, pp.13-24, Washington, D.C.
 - 31) 義澤克彦 (2008) : 日薬理誌, 13 : 285-290.
 - 32) Hayes, B. B., Patrick, E. and Maibach, I. H. (2008) : Toxicology (Hayes, A. W. ed.) pp.1359-1405, CRC Press, New York.
 - 33) 松永佳世子 (2002) : 薬局, 53 (11) : 71-75.
 - 34) 片山一朗, 土田哲也, 橋本 隆, 古江増隆, 渡辺晋一編 (2006) : 皮膚科学, 文光堂, pp.198-204.
 - 35) 小島肇夫 (2007) : 最新動物実験代替法, 技術情報協会, pp.75-84.
 - 36) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 431 (2004) : in vitro Skin Corrosion : Human skin model test. Paris.
 - 37) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 430 (2004) : in vitro Skin Corrosion : Transcutaneous electrical resistance test (TER). Paris.
 - 38) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 435 (2004) : in vitro membrane barrier test method for Skin Corrosion. Paris.
 - 39) 岡田稯伸 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 技術情報協会, pp.21-24.
 - 40) 小島肇夫 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 技術情報協会, pp.95-106.
 - 41) 板垣 宏 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, pp.107-116, 技術情報協会.
 - 42) Weltfreind and Maibach, I. Howard (2007) : Dermatotoxicology 7th Eds. (Zhai, H., Wilhelm Klaus-Peter, and Maibach, I.) pp.125-138, Howard, CRC Press, New York.
 - 43) Levin, Y. C. and Maibach, I. H. (2007) : Dermatotoxicology 7th Eds. (Zhai, H., Wilhelm, K.P., and Maibach, I.) pp.383-389, Howard, CRC Press, New York.
 - 44) 小島肇夫 (2007) : 最新動物実験代替法, 技術情報協会, pp.63-71.
 - 45) 小島肇夫 (2007) : 機能性化粧品素材開発のための実験法 (芋川玄爾編) シーエムシー出版, pp.308-314.
 - 46) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 404, (2002) : Acute Dermal Irritation/Corrosion. Paris.
 - 47) ECVAM statement (2008) : <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>
 - 48) 森 福義 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 技術情報協会, pp.29-33.
 - 49) 河合敬一 (2001) : Environ. Dermatol, 8 (suppl.1) : 90.
 - 50) 小島肇夫 (2003) : 皮膚の測定・評価マニュアル, 技術情報協会, pp.305-326.
 - 51) 森 福義 (2006) : 化粧品大全, pp.396-406, 情報機構.
 - 52) 岡田稯伸 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 技術情報協会, pp.25-27.
 - 53) 森 福義 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 技術情報協会, pp.35-36.
 - 54) 森 福義 (2006) : 化粧品大全, 株式会社情報機構, pp.417-430.
 - 55) 佐藤 淳 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 技術情報協会, pp.63-67.
 - 56) 大野泰雄 (2005) : Altern. Animal Test Experiment, 10 (2), 54-157.
 - 57) 楠原寛子, 桑原裕史 (2007) : 機能性化粧品素材開発のための実験法 (芋川玄爾編) シーエムシー出版, pp.326-331.
 - 58) 楠原寛子 (2007) : 最新動物実験代替法, 技術情報協会, pp.148-158.
 - 59) Moulton, M. Natalie and Maibach, I. Howard, (2007) : Dermatotoxicology 7th Eds. (Zhai, H., Wilhelm Klaus-Peter, and Maibach, I. eds.) pp.209-214, Howard, CRC Press, New York.
 - 60) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 432 (2004) : in vitro 3T3 NRU phototoxicity testing. Paris.
 - 61) 柿島 博 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 技術情報協会, pp.39-43.
 - 62) 医薬品非臨床試験研究会 (2002) : 医薬品非臨床試験ガイドライン 2002, 薬事日報社, pp.71-75.
 - 63) 宮澤正明, 坂口 斉 (2007) : 機能性化粧品素材開発のための実験法 (芋川玄爾編) シーエムシー出版, pp.332-339.
 - 64) 金澤由基子他 (2007) : 最新動物実験代替法, 技術情報協会, pp.107-134.
 - 65) Sterilling, W. and Vohr Hans-Werner, (2007) : Dermatol absorption and Toxicity Assessment 2nd Eds. (Roberts, S. Michael and Walters, A. Kenneth eds.) pp.523-535, Informa healthcare, New York.
 - 66) Klerck, Geroge (2007) : Dermatotoxicology 7th Eds. (Zhai, H., Wilhelm Klaus-Peter, and Maibach, I. eds.) pp.443-

- 462, Howard, CRC Press, New York.
- 67) Kimber, I. et al. (2007) : Dermatotoxicology 7th Eds. (Zhai, H., Wilhelm Klaus-Peter, and Maibach, I. H. eds.) pp.505-516, CRC Press, New York.
- 68) 小島肇夫 (2008) : Visual Dermatology, 7 (3), 328-331.
- 69) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 406 (1992) : Skin Sensitisation, Paris.
- 70) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 429 (2002) : Skin Sensitization : Local Lymph Node Assay, Paris.
- 71) 佐藤 淳 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, pp.69-72, 技術情報協会.
- 72) 医薬品非臨床試験研究会 (2002) : 医薬品非臨床試験ガイドライン2002, pp.77-81 薬事日報社.
- 73) 秀 道広 (2005) : Visual Dermatology, 4 (7).
- 74) 赤松浩彦 (2003) : Visual Dermatology, 2 (3).
- 75) 三橋善比古 (2006) : Visual Dermatology, 5 (6).
- 76) 土井邦雄 (2002) : トキシコロジー (日本トキシコロジー学会教育委員会編) pp.220-221, 朝倉書店.
- 77) Fox, A. D. and Boyes, K. W. (2001) : Casarett & Doull's Toxicology 6th Eds. (Klaassen D. Curtis) pp.565-595, McGraw Hill, New York.
- 78) Blazka, E. M. and Hayes, A. W. (2008) : Toxicology (Hayes, A. W. ed.) pp.1131-1178, CRC Press, New York.
- 79) 聳城 豊 (1999) : 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, pp.75-80, 技術情報協会.
- 80) 日本化粧品工業連合会 (2001) : 化粧品の安全性評価に関する指針, pp.15-17, 薬事日報社.
- 81) CTFA (2007) : Safety Evaluation Guidelines, CTFA, pp.25-40, Washington, D.C..
- 82) 高橋 豊 (2007) : 機能性化粧品素材開発のための実験法 (芋川玄爾編) pp.315-325, シーエムシー出版.
- 83) 大野泰雄 (2007) : 最新動物実験代替法, pp.63-71, 技術情報協会.
- 84) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 405, (2002) : Acute Eye Irritation/Corrosion, Paris.
- 85) 大野泰雄 (2004) : 国立衛研報, 122, 1-10.
- 86) CTFA (2007) : Safety Evaluation Guidelines, CTFA, pp. 41-47, Washington, D.C..

6.10 血液毒性

血液細胞は主に骨髄でつくられて血液中へ入り全身をくまなく循環して、組織への酸素、栄養、ホルモン、水、熱などの輸送、血管の統合性維持、生体防御としての免疫・止血機能など、生体機能の恒常性維持のために様々な役割を演じている。血液毒性とは、医薬品など種々の化学物質がもたらす血液および造血臓器に対する悪影響（副作用）をいい、血液成分とくに前駆細胞を含めた血球が直接影響を受ける場合（一次性）と組織障害や全身障害の結果生じる場合（二次性）がある。前者は医薬品などの化学物質によることが多く、後者は局所あるいは全身

性の造血器以外の臓器、たとえば肝臓、腎臓、脾臓などに対する影響に反応するか、あるいは代償性変化として認められる。造血臓器は腸粘膜や生殖腺と同様に細胞分裂が活発なため、癌、感染症、免疫疾患の治療に用いる抗腫瘍剤、分裂抑制剤および放射線の標的となる。また、鉄など栄養素の供給、毒素や代謝物の排除（尿素）、エリスロポエチンおよび顆粒球コロニー刺激因子（granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF）など生理活性物質に影響する毒性物質の二次的影響を受けやすい。

6.10.1 造血器とその異常

造血臓器としては、骨髄、脾臓およびリンパ組織がある。骨髄は骨髄系およびリンパ球系細胞の産生においてもっとも重要な臓器である。脾臓は造血としてよりもむしろ障害を受けたり老化した赤血球や血小板の処理、血液の貯蔵（プール）ならびにリンパ装置の1つとして機能する。ヒト胎児における造血は、肝、脾、骨髄、胸腺、リンパ節などで認められるが、胎生期後半には骨髄がもっぱら造血を行うようになる。出生時にはすべての骨髄で活発な造血（赤色髄）がみられるが、小児期以降の造血は椎骨、肋骨、胸骨、骨盤など体幹部の骨に限られるようになる。長骨における造血は成長とともに低下して上腕骨や大腿骨では近位側および骨端の海綿質腔に赤色髄がみられるにすぎず、長骨の中央や遠位端は脂肪に置き換わって黄色髄になる。何らかの要因で造血の要求が高まると脂肪髄が再活性化されて造血細胞に置き換わり、さらに極限状態では胎児期にみられるような髄外造血像を呈するようになる。髄外造血は通常、肝臓や脾臓でみられるが、リンパ節、副腎、腎臓、軟骨、靭帯、脂肪組織で認められる場合もある。正常なヒトでは血球（赤血球、白血球、血小板）は毎秒 $1\sim 3\times 10^6$ 個つくられているが、溶血性貧血や化膿性炎症の場合は産生量がこの数倍に増加する。黄色髄は造血の予備能であり、骨髄の貯蔵血球（プール）とともに異常時の生体防御の対応として重要である。骨髄のもう1つの役割として肝臓、肺、腹腔内、脾臓、腎臓、皮膚などに移行して組織マクロファージとなる単球の産生がある。

骨髄は造血細胞と間質からなる。造血幹細胞（CD34⁺）は様々な液性因子によって分化・増殖して、赤血球、白血球、血小板となって血中に入る。間質は造血細胞を取り巻く間質細胞（stromal cell）

REACH における環境影響試験法

小島 肇 夫

Abstract : REACH is a new European Community Regulation on chemicals and their safe use. It deals with the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances. The aim of REACH is to improve the protection of human health and the environment through the better and earlier identification of the intrinsic properties of chemical substances. The REACH Regulation gives greater responsibility to industry to manage the risks from chemicals and to provide safety information on the substances. In this report, the testings for biotic systems and degradation and accumulation of the environment assessment on REACH were summarized.

Key words : REACH, environment, assessment, OECD テストガイドライン

1. REACH

REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) とは、すでに EU 市場に流通している既存化学物質および新規の化学物質に対し、その製造・輸入を行う事業者は安全性データなどを揃え、登録が義務づけられる規制を指す¹⁾。登録、評価、認可、制限の総称であり、2007年より施行され、2008年6月より運用が開始されている。2018年を目標にすべての既存化学物質の登録と試験を終えようというものである。本来なら、EU域内での問題ではあるが、経

"Testings for the environmental assessment on REACH."

Hajime Kojima (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods : JaCVAM, Div. of Pharmacology, National Center for Biological Safety Research, National Institute of Health Sciences, 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部新規試験法評価室—158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)



1982年岐阜大学農学部農芸化学科卒業、同年日本メナード化粧品(株)入社、1983~1985年国立遺伝学研究所留学、1996年長崎大学薬学部博士号取得、現在国立医薬品食品衛生研究所、安全性生物試験研究センター、薬理部新規試験法評価室室長、藤田保健衛生大学医学部客員講師、薬学博士。

済的にも安全性評価の面でもグローバル化が進む昨今、日本でも無関心ではいられない問題であり、産業界においても対策が進んでいる。この詳細は成書を参照されたい^{2)~6)}。

2. REACH の求める安全性資料

安全性評価はハザードベースでなく、リスクベース(ハザードと曝露評価)が基本である。2009年までに事前登録が行われた約180,000物質については、70%の試験を2011~2017年に実施しなければならない⁷⁾。

製造/輸入量に応じた実施すべき試験法のリストを表1³⁾⁴⁾に示す。これらの試験法の中で、少量生産の場合には有害性の同定だけでも構わないが、10t以上の新規化学物質の生産となると曝露評価まで求められる。これらの試験の結果を届け出ねばならないことから、試験法への精通は重要である。

そこで、本稿では、これらの中でも環境影響評価に関する試験法に絞り、以下に解説する。

3. 環境影響評価試験法の選択

環境影響評価といっても、大別すると4つに分

表1 REACHで製造量毎に要求される試験名³⁾⁴⁾改変

	健康	環境
1~10 t 優先物質	in vitro 眼刺激性試験 in vitro 皮膚刺激性 / 腐食性試験 皮膚感作性試験 遺伝毒性試験 (Ames) 急性毒性試験 (一つの投与経路)	無脊椎動物 (ミジンコ) 急性毒性 水生生物 (藻類) 生長阻害試験 生物的分解性
10~100 t	in vivo 眼刺激性試験 in vivo 皮膚刺激性試験 遺伝毒性試験 (マウスリンフォーマまたは遺伝子突然変異) 遺伝毒性試験 (染色体異常または in vitro 小核) 急性吸入 / 皮膚毒性試験 亜急性毒性試験 (28 日間) 生殖毒性スクリーニング トキシコキネティックス評価	魚類急性毒性試験 活性汚泥呼吸阻害 吸着・脱離スクリーニング 非生物的分解性・pH に伴う加水分解
100~ 1000 t	遺伝毒性試験 (in vivo 小核) 亜慢性毒性試験 (28 日または 90 日間) 更なる生殖毒性試験 (出産前生殖毒性および 2 世代試験)	無脊椎動物 (ミジンコ) 長期毒性試験 魚類長期毒性試験 さらなる生物的分解性 (表層水, 土壌, 底質シミュレーション試験) 陸生生物 (植物, 無脊椎動物, 土壌) 短期毒性試験 さらなる吸着・脱離試験 水生種 (魚) 生物濃縮度 分解生成物の特定
1000 t 超	遺伝毒性試験 (in vivo) 発癌性試験 慢性毒性試験 (12 カ月以上) 更なる生殖毒性試験	底生生物の長期毒性試験 さらなる環境運命, 分解生成物に関する挙動の研究 陸生生物 (植物, 無脊椎動物) 長期毒性試験 鳥類への長期毒性または生殖毒性試験

けられる。

- 1) 水生生物への影響試験
- 2) 活性汚泥呼吸阻害
- 3) 環境中運命および挙動
- 4) 陸生生物への影響

これらの中で、水生生物についての主な影響試験法一覧を表2に示す⁸⁾⁹⁾。1tを越える新規物質の場合、無脊椎動物を用いる急性毒性試験および水生生物を用いた生長阻害試験が必要となる。10tを越えると魚類を用いた急性毒性試験が必要となる。ただし、対象物質の溶解性が重要な指標であり、これが低い場合、急性毒性試験よりは長期の毒性試験が必要となる。この場合および100t以上となると、無脊椎動物および魚類を用いた長期毒性試験が必要となる。REACHに関する試験法では、生態系の機能に着目して生物群を選定し、その中で取り扱いが容易でかつ感受性が

比較的高いものを供試生物種として用いた試験がOECDテストガイドラインで推奨されている。関連するOECDテストガイドラインを表2に示すが、それだけでなく、表3に示すガイダンス文書も重要である⁸⁾⁹⁾。

4. 環境影響評価試験法の概要³⁾⁸⁾¹⁰⁾¹¹⁾

4-1. 水生生物への影響試験

無脊椎動物、藻類、魚類を用いた毒性試験結果から水生生物への影響を評価する。急性毒性試験としては、無脊椎動物、藻類、魚類などに対する死亡または有害な影響が引き起こされる濃度であるEC (Effect Concentration) やLC (Leathal Concentration) が指標となる。一方、慢性毒性試験としては、致死のほか成長や繁殖などが指標として用いられる。

表2 OECDガイドラインに記載された生態影響に関するテストガイドライン⁸⁾⁹⁾

No.	ガイドライン名	改定/採択日
201	藻類生長阻害試験	2006/3/23
202	ミジンコ類急性遊泳阻害試験	2004/4/13
203	魚類急性毒性試験	1992/7/17
204	魚類延長毒性試験 - 14日試験	1984/4/4
205	鳥類摂餌毒性試験	1984/4/4
206	鳥類繁殖試験	1984/4/4
207	ミミズ急性毒性試験	1984/4/4
208	陸生植物生長試験	1984/4/4
209	活性汚泥呼吸阻害試験	1984/4/4
210	魚類初期生活段階毒性試験	1992/7/17
211	オオミジンコ繁殖阻害試験	1989/9/21
212	魚類胚・仔魚期短期毒性試験	1989/9/21
213	ミツバチ急性経口毒性試験	1989/9/21
214	ミツバチ急性接触毒性試験	1989/9/21
215	魚類稚魚成長毒性試験	2000/1/21
216	土壤微生物窒素無機化試験	2000/1/21
217	土壤微生物炭素無機化試験	2000/1/21
218	土壤中ユスリカ毒性試験	2004/4/13
219	水中ユスリカ毒性試験	2004/4/13
220	ヒメミミズ繁殖試験	2004/4/13
221	ウキクサ生長阻害試験	2006/3/23
222	ミミズ繁殖毒性試験	2004/4/13
227	陸生植物活性試験	2006/7/19

4-1-1. 無脊椎動物を用いた急性毒性試験

OECDテストガイドライン202では、オオミジンコ (*Daphnia magna*) を用いた急性遊泳阻害試験が推奨されている。化学物質に対する感受性が高いと言われているミジンコを用い、化学物質に48時間曝露した際のミジンコの遊泳（容器を動かしても15秒静止している状態）に及ぼす影響を調べる。段階的な濃度の化学物質を含む水中に、生後24時間以内のミジンコ幼体を入れ、24および48時間後の行動、致死、外見の変化を観察し、半数遊泳阻害影響濃度 (EC50) を求める。

4-1-2. 水生生物を用いた生長阻害試験

OECDテストガイドライン201では、藻類を用いた生長阻害試験が推奨されている。藻類としては、セリナストラ属やクロレラ属が多く用いられる。藻類は寿命が短く、短期間で急性および慢性毒性のどちらをも評価できると言われている。この藻類を用い、化学物質に72時間曝露した際の藻類の生長に及ぼす影響を調べる。段階的な濃度の化学物質を含む水中に、指数関数的に生長す

表3 OECDガイドラインに記載された生態影響に関するガイダンス文書等⁸⁾⁹⁾

No.	ガイダンス文書名
1	OECDテストガイドラインの作成のためのガイダンス文書
3	水生環境影響評価のためのガイダンス文書
5	鳥類毒性に関するSETAC/OECDワークショップ報告書
6	オオミジンコ繁殖毒性の最終リングテスト報告書
10	水生環境毒性データの統計解析に関するワークショップ報告書
11	農薬及び工業化学品の水生環境試験法に関する詳細レビュー文書
23	試験困難物質の水生環境毒性試験に関するガイダンス文書
27	水生環境に有害な化学物質の分類のための調和システムの利用のためのガイダンス文書
29	金属及び金属化合物の水媒体における溶解・変態に関するガイダンス文書
33	化学物質及び混合物の健康・環境有害性に関する調和された分類システム
34	有害性評価のための新規又は改正試験法の検証及び国際的な受け入れに関するガイダンス文書
44	化学物質の有害性・リスク評価に用いられる主要用語の解説
46	甲状腺活性物質の検出のための両生類変態試験に関する詳細レビュー文書
47	内分泌活性物質の検出のための魚類スクリーニング試験に関する詳細レビュー文書
49	(定量的)構造活性相関の検証のための原則に関する専門グループ報告
50	トキシコゲノミクスに関するOECD/IPCSワークショップ報告書
53	淡水静水フィールドシミュレーション試験(屋外マイクロコズム・メゾコズム)試験に関するガイダンス文書
54	生態毒性データの統計解析の現行のアプローチ:適用のためのガイダンス
55	発生、生殖、内分泌かく乱作用に重点を置いた水生節足動物のライフサイクル毒性試験に関する詳細レビュー文書
58	OECD加盟国における新規・既存化学物質の評価における(定量的)構造活性相関の規制的使用及び適用に関する報告書
60	内分泌活性物質の検出のための魚類21日間スクリーニング試験の検証のための初期作業報告書(フェーズ1A)
61	内分泌活性物質の検出のための魚類21日間スクリーニング試験の検証報告書(フェーズ1B)

る藻類を入れ、光照射下にて72時間培養する。24時間毎に生物量または細胞数を測定し、得られた結果から半数生長阻害影響濃度 (EC50) または無影響濃度 (Non Observed Effect Concentration : NOEC) を求める。

4-1-3. 魚類急性毒性試験

OECD テストガイドライン 203 に代表される魚類を用いた急性毒性試験が実施されている。ヒメダカ (*Oryzias latipes*), ゼブラフィッシュ, ファットヘッドミノー, コイ, グッピー, プルーギル, ニジマスを用い、化学物質に96時間曝露した際の魚類に及ぼす影響を調べる。段階的な濃度の化学物質を含む水中に、稚魚 (0.1~5g) を入れ、96時間後まで死亡数を測定し、半数致死濃度 (LC50) を求める。

4-1-4. 無脊椎動物長期毒性試験

OECD テストガイドライン 211 に代表されるミジンコを用いた繁殖阻害試験が実施されている。化学物質に21日間曝露した際のミジンコの繁殖に及ぼす影響を調べる。比較的簡便に行える試験法であり、有害性の評価に多く用いられる。親ミジンコの毒性症状や初産日、仔虫産出数、死亡数、産仔幼体の生存および死亡数などを観察し、半数繁殖阻害影響濃度 (EC50) または NOEC を求める。

4-1-5. 魚類長期毒性試験

3つの試験法があり、REACH ではそのいずれかが必要である。

4-1-5-1. 魚類初期生活段階毒性

OECD テストガイドライン 210 に代表される受精卵からふ化して稚魚へ成長するまでの初期生活段階にて、化学物質を30日まで曝露し、慢性的な影響を評価する試験法である。ヒメダカ、ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノー、シーブスヘッドミノー、ニジマスの受精卵を水槽に入れ、対照区のすべての魚が自由に摂取するまで続ける。ふ化数、生存数、体型異常、行動阻害、体長・体重を測定または観察し、最少影響濃度 (Low Observed Effect Concentration : LOEC) または NOEC を求める。

4-1-5-2. 胚・仔魚段階における短期毒性

OECD テストガイドライン 212 に代表される

受精直後の卵からふ化して仔魚期の終わりまでに化学物質を曝露する試験法である。ヒメダカ、ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノー、ニジマスの受精卵を水槽に入れ、いずれかの仔魚の卵黄が完全になくなるか、対照区で飢餓による死亡が出る直前まで行い、累積死亡率、健康な仔魚の数、ふ化開始までの日数、ふ化数、成長などを測定または観察し、LOEC または NOEC を求める。

4-1-5-3. 稚魚成長

OECD テストガイドライン 215 に代表される稚魚に化学物質を曝露する試験法である。ニジマスを用い、28日間化学物質を曝露し、体重を測定し、成長率に及ぼす影響から、LOEC または NOEC を求める。

ところで、魚類を言っても実験動物である。そこで、ECVAM (欧州動物実験代替法検証センター) では段階的な評価手順 (図1) を示し、極力魚類の使用を少なくするよう提言している¹²⁾。すなわち、第一段階として、ミジンコおよび藻類試験を実施し、そのECを参考にして、どちらか低い濃度を用いて第二段階で魚類を用いる限度試験を行い、その結果次第で、LCを求めるという提案である。

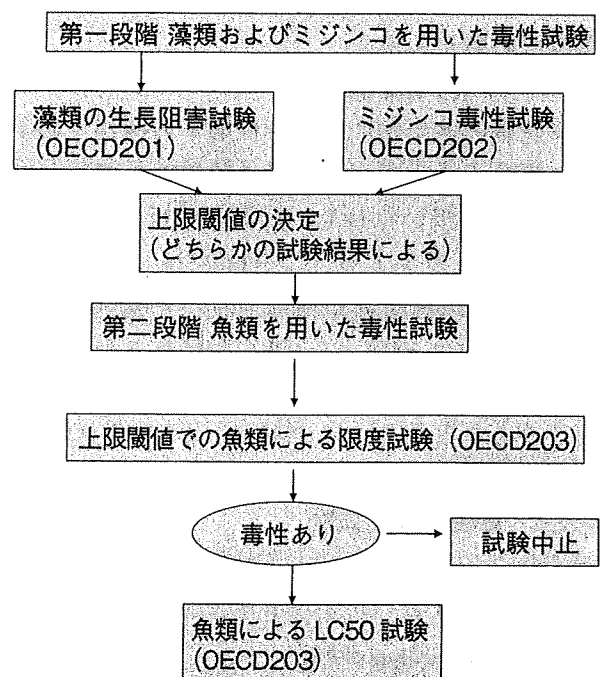


図1 ECVAM 環境毒性タスクフォース推奨するアプローチ¹²⁾

さらに、魚類細胞株を用いた細胞毒性試験や魚類胎児を用いた試験での置き換えを検討中である。

4-2. 活性汚泥呼吸阻害

活性汚泥を用い、化学物質の種々の濃度下で呼吸率（好気性汚泥または排水中の微生物の酸素消費量）を測定し、化学物質の微生物に与える影響を評価する試験法である。

下水処理場の活性汚泥を用い、30分および3時間後の酸素消費量を測定し、半数呼吸阻害濃度（EC50）を求める。なお、生分解性試験（OECDガイドライン301A-F）は、活性汚泥に対するEC50の1/10濃度で実施される。このため生分解性試験の濃度は、活性汚泥呼吸阻害試験のNOECとしても利用できる。

4-3. 環境中運命および挙動

化学物質の環境中における分解性、蓄積性などの環境運命に関するデータは、環境影響評価において長期にわたる影響を引き起こすかを判断する際や、PBT(Persistent, Bioaccumulative and Toxic chemical substances)/vPvB (Very Persistent and very Bioaccumulative) 評価するために重要である。非生物的分解の一つである加水分解試験、生物的分解性を調べる易分解性試験および生物濃縮係数（Bio Concentration Factor：BCF）を求める濃縮度試験がある。

4-3-1. 加水分解試験

化学物質の非生物的分解性に関する情報を得るため、環境中の表層水における残留性や運命を判断するために用いられる。加水分解はpHに依存する。OECDガイドライン111では、緩衝液のpH毎の加水分解速度を測定する。予備試験において、50℃にてpH4, 7, 9における5日間の反応が10%以下の場合に安定であると判断する。不安定であると判断された場合、0~40℃の間で選択した温度においてpH4, 7, 9にて試験する。

4-3-2. 易分解性試験

OECDガイドライン301は易分解性スクリーニング試験であり、以下の6方法がある。

- A) DOC Die-Away 試験
- B) CO₂ 発生試験
- C) 修正 MITI 試験 (I)

D) Closed-Bottle 試験

E) 修正 OECD スクリーニング試験

F) Manometric Respirometry 試験

28日間曝露におけるDOCによる試験では70%以上、BODによる試験では理論的最高値の60%以上の生分解性が達成された場合、易分解性があると判断される。

4-3-3. 濃縮度試験

魚類を用い、化学物質が魚体内への濃縮度を調べる試験である。OECDガイドライン305では、コイまたはヒメダカが推奨されている。流水条件下で、少なくとも2濃度（魚類急性毒性試験で得られたLC50値の1/100~1/10000のうち分析可能な低い2濃度）を曝露する。適用期間は28日間または定常状態に達するまでとする。濃縮倍率を測定定数から求める場合には、取り込み期間終了後、排泄期間を設ける。

4-4. 陸生生物への影響

底性生物への影響として、ユスリカ毒性試験がOECDガイドライン218および219に定められている。底質に化学物質を添加後、セスジユスリカ（*Chironomus yoshimatsui*）を孵化後一齢幼虫から羽化まで化学物質に曝露した際の成長に及ぼす影響を羽化率等にて測定する。

また、鳥類を対象として、化学物質を20週間以上投与した際の親鳥および雛鳥への影響を把握するための鳥類繁殖試験がOECDガイドライン206として定められている。試験には1種またはそれ以上の種を用い、マガモ、コリンウズラ、ウズラが推奨されている。死亡、中毒症、親鳥および雛鳥の体重・摂餌量を測定またはNOECを観察するとともに病理検査を行い、LOECまたはNOECを求める。

4-5. その他

土壌に対する吸着を調べる試験として、10t以上の場合、吸着/脱着スクリーニング試験（OECDガイドライン121：高速液体クロマトグラフィ法によって土壌吸着係数）および、100t以上では吸着/脱着の追加試験（OECDガイドライン106：バッチ平衡吸着/脱着法）を実施する。

一方、100t以上では、表層水中での究極分解シミュレーション試験（OECDガイドライン

309), 土壤シミュレーション試験 (OECD ガイドライン 308) および底質シミュレーション試験 (OECD ガイドライン 307) がある。

5. おわりに

REACH の評価法として、環境影響はその中心である環境省や国立環境研究所では OECD に対する国際貢献の一環として、以下のような試験法の開発を支援している。

- ・魚類 21 日スクリーニング試験に関するテストガイドラインの作成
- ・ミジンコを用いた試験法の開発
- ・魚類培養細胞を用いた試験管内試験法のレビュー
- ・両生類に関する検討への協力

このような状況下、多くの試験法がガイドライン化の途上にあり、関係者においては継続的な動向の把握をお願いしたいものである。

参 考 文 献

- 1) ECH, http://ec.europa.eu/echa/home_en.html (2008)
- 2) 風間良英 編, “REACH と欧州新化学品規則体制”, 化学工業日報社, 東京 (2007)
- 3) 財団法人 化学物質評価研究機構編, “EU 新化学品規則”, REACH が分かる本, 工業調査会, 東京 (2007)
- 4) 経済産業省 http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/int/081104kaisetusyo.pdf (2009)
- 5) 環境省 <http://www.env.go.jp/chemi/reach/reach.html> (2009)
- 6) 日本化学工業協会 <http://www.nikkakyo.org/reach/> (2009)
- 7) Hartung T., <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsaae/20kai.html> (2006)
- 8) Chemicals Testing : OECD Guidelines for the Testing of Chemicals - Sections 2&3 : http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html (2009)
- 9) 戸田栄作 <http://www.nies.go.jp/risk/seminar/h190119/H190119text02.pdf#search> (2009)
- 10) 住野公昭, “環境化学物質の評価法および環境基準, 毒性試験講座 18, 産業化学物質”, 環境化学物質, 和田攻編集, 地人書館, 東京, p.23~38 (1991)
- 11) 石塚真由美, 岩田久人, 環境毒性, 日本トキシコロジー学会教育委員会編集, “トキシコロジー”, 朝倉書店, 東京, p.330~342 (2009)
- 12) ECVAM statement <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm> (2008)

PMMAマイクロパウダー

マイクロフェア Mシリーズ 真球マイクロビーズ

マイクロフェア Sシリーズ ソフトタイプ球状・真球マイクロビーズ

マイクロフェア UVシリーズ 紫外線吸収剤カプセルビーズ

感触改良

機能付与

性能改善

製造元 松本油脂製薬株式会社

販売元 岩瀬コスファ株式会社

大阪 : Tel.06-6231-3456 東京 : Tel.03-6202-2345

IWASE
COSFA
<http://www.cosfa.co.jp>

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？

Necessity of Animal Data on an Application of a Quasi-drug

小島肇夫*

医薬部外品の許認可申請に求められる安全性試験において、動物実験データなしで、例えば、類似物質による過去のデータベース、構造活性相関、動物実験代替法（以下、代替法と記す）によって新規医薬部外品の申請および認可が行われるかをシミュレーションした。代替法として認められた公的な方法はまだ少なく、国内で医薬部外品の安全性評価における代替法の使い方についての検証が進んでいる現状において、代替法で申請された結果がどれほど認可されるかは断言できない。

1. 医薬部外品

薬事法では、医薬部外品は次のように定義されている。①法律で規定されている人体に対する作用が緩和なものであって、機器器具等でないものおよび②これらに準じる物で厚生労働大臣の指定する物をいう¹⁾。ただし、これらの使用目的のほかに、医薬品で規定されている用途に使用されることも併せて目的とされている物を除く。

(1) 法律の規定

- ①吐きけその他の不快感、または口臭若しくは体臭の防止
- ②あせも、ただれ等の防止
- ③脱毛の防止、育毛または除毛
- ④人または動物の保健のためにするねずみ、はえ、蚊、のみ等の駆除または防止

(2) 厚生労働大臣の指定

- ①衛生上の用に供されることが目的とされてい

る綿類

- ②人体に対する作用が緩和なもの

この中で、法律で規定する使用目的のほかに、にきび、肌荒れ、かぶれ、しもやけ等の防止または皮膚若しくは口腔の殺菌消毒に使用されることもあわせて目的とされている物を薬用化粧品、薬用はみがき類という。

平成11年3月の規制緩和により、15製品群が医薬品から医薬部外品に移行し、一般小売店での販売可能な新規指定医薬部外品が増えた。さらに、平成16年7月には、整腸剤や殺菌消毒剤など15品目371品目が医薬品から医薬部外品に移行し、一般小売店での販売が可能な新範囲医薬部外品として取り扱われている。

2. 医薬部外品の許認可申請に必要な安全性試験

医薬部外品の許認可に求められる安全性試験の

*Hajime Kojima 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部 新規試験法評価室 室長

表1 医薬部外品新添加剤の安全性資料

試験項目	添加物	製品
1) 単回投与毒性	○	△ ^{注1)}
2) 皮膚一次刺激性	○	
3) 連続皮膚刺激性	○	
4) 感作性	○	
5) 光毒性	○ ^{注2)}	
6) 光感作性	○ ^{注3)}	
7) 眼刺激性	○	△ ^{注4)}
8) 遺伝毒性	○	
9) ヒトパッチ	○	○

注1) 経口投与における概略の致死量が2 g/kg 以下の場合には、製剤についても実施すること。ただし、配合量等から考慮して安全と推定される場合には省略できる。

注2), 注3) 紫外部吸収スペクトル (290~400nm) の範囲で吸収極大が認められない場合には省略できるが、280~450nm の範囲で吸収極大の有無を確認すること。

注4) 角膜、虹彩の刺激反応が認められた場合または粘膜に使用されることがある製剤で、眼に入る可能性のあるものについては、製剤でも試験を実施すること。なお、最大配合濃度ではこれらの反応が認められないことを確認すれば、製剤についての試験は省略してよい。

*毒性についてより慎重に扱う必要があるものについては反復投与毒性試験等の資料が必要である。

一覧を表1に示す^{1,2)}。項目としては、医薬品に求められる試験種類より少ない。新規医薬部外品製剤には効能効果を訴求するための添加剤が必要であり、医薬品程の高い効能効果を必要としないが、明確な薬効が求められる。新規である添加剤には、単回投与毒性、皮膚一次刺激性、連続皮膚刺激性、感作性、光毒性、光感作性、眼刺激性、遺伝毒性、パッチテストに加え、毒性を慎重に取り扱う場合、反復投与毒性に関する資料が求められる。さらに、単回投与毒性、眼刺激性、ヒトパッチについては、原則として当該成分のほかに試験製剤についても試験が求められている。これらは毒性試験法ガイドラインおよび化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック2006の安全性試験の例に定められた試験方法に準拠して実施しなければならない¹⁻⁵⁾。

また、新たな防腐剤、紫外線吸収剤等にあたる成分を配合するためには、医薬部外品の添加剤に

表2 ポジティブリスト掲載要領

No.	資料の範囲
1	単回投与毒性に関する資料 ^{注1)}
2	反復投与毒性に関する資料
3	生殖発生毒性に関する資料
4	皮膚一次刺激性に関する資料
5	連続皮膚刺激性に関する資料
6	感作性に関する資料
7	光毒性に関する資料 ^{注2)}
8	光感作性に関する資料 ^{注3)}
9	眼刺激性に関する資料 ^{注4)}
10	遺伝毒性に関する資料
11	ヒトパッチに関する資料
12	吸収・分布・代謝・排泄に関する資料

注1) 当該成分の経口LD₅₀値が2 g/kg 以下の場合には、製剤についても実施すること。ただし、配合量等から考慮して安全と推定される場合には省略できる。

注2), 注3) 吸光度測定によって紫外部に吸収がない場合には省略できる。

注4) 角膜、虹彩の刺激反応が認められた場合または粘膜に使用されることがある商品に配合する場合には、試験製剤についても実施すること。

求められる以下の安全性試験を実施し、改正を厚生労働省に要請しなければならない⁶⁾。化粧品基準に、ポジティブリストとして掲載される防腐剤、紫外線吸収剤およびタール系色素、ネガティブリストに掲載されるポジティブリスト以外の配合禁止または制限成分がこれらに該当し、医薬部外品に限ったことではなく化粧品にも該当する。

その場合には、表2に示すような単回投与毒性、皮膚一次刺激性、連続皮膚刺激性、感作性、光毒性、光感作性、眼刺激性、遺伝毒性、パッチテストに加え、反復投与毒性、生殖発生毒性、吸収・分布・代謝・排泄に関する資料が求められる。さらに、単回投与毒性、眼刺激性、ヒトパッチについては、原則として当該成分のほかに試験製剤についても試験が求められている。これらは毒性試験法ガイドライン、各種毒性試験ガイドラインおよび化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック2006の安全性試験の例に定められた試験方法に準拠して実施しなければならない¹⁻⁸⁾。

3. 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？

以上の医薬部外品の許認可申請に必要な安全性試験に対応するため、動物実験データなしで新規医薬部外品の添加剤および防腐剤、紫外線吸収剤等の申請はどこまで可能か考えてみたい。

まず、安全性の評価とは「実験ありき」ではない。昨今、ヒューマンサイエンス財団が実施している動物実験施設の第三者評価では⁹⁾、実験計画に事前調査や、動物実験代替法（以後、代替法と記す）の有無の明記が必要とされている。事前調査として、インターネットやソフトの発達で関連情報のデータベースは検索しやすくなった。これに加え、構造活性相関配合する製品の使用量、頻度、期間、曝露状況、通常使用の他に誤使用を想定した安全性確保など種々の情報を総合的に勘案して最終的な結論を出す必要がある^{10~12)}。申請ガイドブックの安全性試験の例に試験法があるからという「実験ありき」ではなく、調査が重要な時代であり、これにより無駄な実験を省けると考

える。

さて、では実験を行う必要性が明確になった場合、代替法はどこまで使用できるのか？ 2009年からのEUにおける化粧品規制を受け¹³⁾、日米欧中心にグローバルコンセンサスが安全性確保の考え方に確立されている昨今¹⁴⁾、欧州の化粧品規制や安全性評価の考え方は無視できず¹⁵⁾、代替法の導入は必須である。日本の対応の一環として、2006年に厚生労働省から通達があった「医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請に添付する資料に関する質疑応答集(Q&A)」の中で、OECD等により採用された代替試験法あるいは適切なバリデーションでそれらと同等に評価された方法に従った試験成績であれば申請資料として用いることは差し支えないとされている²⁾。

図1に示すように、バリデーション研究とは、その後で実施される専門家による第三者評価（以後、第三者評価と記す）を含むのであり、本来その後に行行政的な受け入れの検討が必要である。OECD等のガイドライン成立ではこの過程を経て公定化されており、「適切なバリデーションで

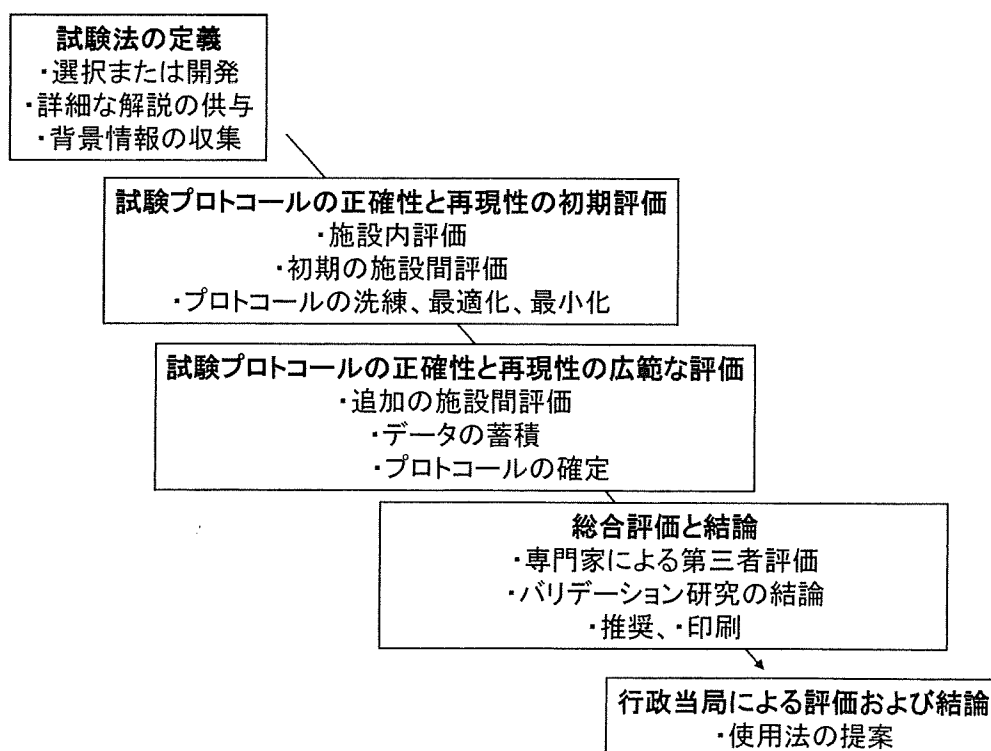


図1 新規毒性試験法におけるバリデーションおよび行政受け入れの過程

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

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

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

4. 欧米およびOECDで認められている動物実験代替法

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

表3 OECDガイドラインになっている動物実験代替法

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

表4 欧米の機関で認証された医薬部外品の許認可に関係した試験法

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

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

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

5. 代替法を用いる場合の注意点およびシミュレーション

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

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

5.1 OECDで承認された代替法のみ使用

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

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

作性を実施する必要がないと判断した。

*紫外部に吸収があった場合、

③-i) 3T3-NRUにて細胞毒性がない。

③-ii) モルモットを用いる光皮膚感作性試験：1群複数濃度の適用を実施し、光皮膚感作性が弱い。

④遺伝毒性試験として、エイムス試験および哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験がいずれも陰性である。

⑤単回投与毒性試験：2 g/kgの1濃度試験を実施し、いずれの動物にも何の異常がない。

⑥マウスを用いる皮膚感作性試験 (Local Lymph Node Assay ; LLNA) : 実験可能な最高適用を含む3濃度の試験を実施し、感作性が弱い。

⑦モルモットを用いる連続皮膚刺激性試験：1群複数濃度適用を実施し、連続皮膚刺激性が弱い。

⑧*in vitro* 経皮吸収 (皮膚透過性) 試験：摘出皮膚 (ラットまたはヒト由来) で吸収が極めて少ないことが証明される。

⑧-i) 吸収・分布・代謝・排泄試験：*in vitro* 経皮吸収試験で証明不可の場合、実施する。

⑨反復投与毒性試験：代替法なし。

⑩生殖毒性試験：代替法なし。

5.2 欧米や日本で認証された代替法や見解も加味する場合

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

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

③-iii) 紫外部に吸収があった場合、

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

を示す可能性があると予想されている⁴⁰⁾。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. おわりに

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

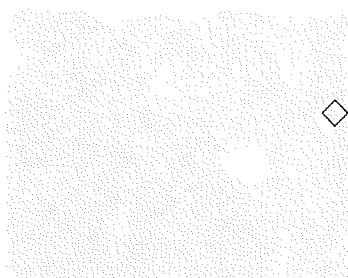
文 献

- 1) 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2006, 薬事日報社, 東京 (2006)
- 2) 厚生労働省医薬食品局審査管理課, 医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請に添付する資料に関する質疑応答集 (Q & A) について (2006)
- 3) 医薬品毒性試験法ガイドライン (1989年薬審1第

24号)

- 4) 反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正 (1999年医薬審655号)
- 5) 遺伝毒性試験ガイドライン (1999年医薬審第1604号)
- 6) ポジティブリストの記載要領について (2001年医薬審第325号)
- 7) 非臨床薬物動態試験ガイドライン (1998年医薬審第496号)
- 8) 医薬品の生殖発生毒性試験についてのガイドラインの改正について (2000年医薬審第1834号)
- 9) 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 (http://www.jhsf.or.jp/project/dobutu_TOP/html) (2009)
- 10) 化粧品の安全性評価について, 化粧品大全, (株)情報機構, 東京, pp.381-388 (2006)
- 11) 鈴木尋之, 化粧品素材の安全性評価における基本的な考え方と全般技術背景, 機能性化粧品素材開発のための実験法 - *in vitro* / 細胞 / 組織培養 -, 芋川玄爾監修, シーエムシー出版, 東京 (2007)
- 12) 規制を踏まえ, どう試験法を選択すればよいのか - 化粧品・医薬部外品 -, 最新 動物実験代替法, (株)技術情報協会, 東京 (2007)
- 13) Commission Staff Working Documents : Time tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC) ; EN, SEC82004, 1210 (2004)
- 14) 笠井裕, 化粧品規制をめぐる国際動向, 正木仁監修, 機能性化粧品IV, シーエムシー出版, 東京, p.9 (2006)
- 15) Rogiers, V. and Pauwels, M., Safety assessment of cosmetic in Europe, Karger, Basel, Switzerland (2008)
- 16) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO (2005) 14
- 17) 日本化粧品学会編集委員会・安全性評価ワーキンググループ, 化粧品成分の安全性評価講座 I, 日本化粧品学会誌, 30 (3), 170-175 (2006)
- 18) Loretz, L. J. and Bailey, J. E., CTFA safety evaluation guidelines, The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Washington, D. C., USA (2007)
- 19) 日本化粧品工業連合会, 化粧品の安全性評価に関

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



再構築培養表皮モデルを用いた遺伝毒性の評価

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部新規試験法評価室

小島 肇夫、新井 晶子、北條 麻紀

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

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

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

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

1. 緒言

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

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

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

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



Evaluation of genotoxicity using 3-dimensional human epidermal model

Hajime Kojima, Ph.D.

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

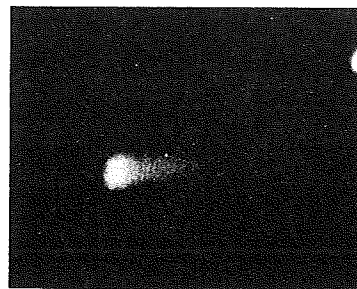


図1 細胞に生じたコメット

有用な遺伝毒性試験として注目を集めている。

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

2. 材料および方法

2.1 材料

2.1.1 3次元培養表皮モデル

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

本キット到着日あるいはその翌日から実験を開始した。

2.1.2 被験物質

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

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

2.2 試験法

2.2.1 コメットアッセイ基本操作

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

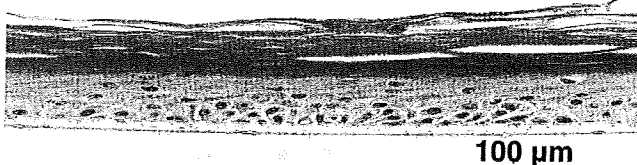


図2 Labcyte EPI-MODEL24 の HE 染色

% Tail Intensity の値が高いほど遺伝毒性が強いことになる。

2.2.2 条件検討

2.2.2.1 細胞解離条件の検討

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

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

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

2.2.2.2 溶媒濃度の検討

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

2.2.2.3 被験物質を用いた細胞毒性の検出

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

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

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

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

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

2.2.2.4 被験物質を用いたコメットの検出

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