

図3 試験方法概略

結果から最高適用濃度を決定し、それぞれ10倍希釈系列を調整してコメットアッセイを実施した。

### 3. 結果

#### 3・1 解離条件の検討

それぞれの解離条件でラボサイトを処理し、1ウェルから回収することのできた細胞数をカウントした。その結果、図4に示すように、トリプシン処理によりリベラーゼよりも20倍以上多くの単一細胞を得ることができた。また、トリプシンの処理時間を35分、50分と延長しても得られる細胞数に差はなかった。また、リベラーゼ、トリプシン共に細胞毒性を誘導することはなかった。しかし、図5に示すように、トリプシンの処理時間を50分に延長するとコメットシグナルが検出されるようになった。

以上の結果から、ラボサイトの細胞解離には、トリプシンの短時間(25分)処理が適していることが明らかとなった。

#### 3・2 溶媒濃度の検討

エタノールの細胞毒性は25%まで検出されなかった(データは示していない)。しかし、図6に示すように、12.5%以上の濃度で中央値に変化はないものの、コメットを引き起こす細胞を認めた。以上の結果から、溶媒の最適濃度は6%以下、可能な限り薄くすることを目指し、2%と設定した。

ちなみに、箱ひげ図は、最小値、第1四分位点、中央値、第3四分位点と最大値を示している。母集団は実際には

様々なタイプの確率分布に従うわけだが、箱ひげ図はそのような仮定に関係なく、データの分布を表現している。箱の各部分の間隔から分散や歪度の程度、また外れ値を示している。

#### 3・3 被験物質を用いた細胞毒性の検出

図7～9に3物質の細胞生存率の結果を示した。

図7に示すように、マイトマイシンCの限界溶解度は1500 µMであり、4時間暴露後、20時間培養しても細胞毒性は全く検出されなかった。よって、コメットアッセイでは1500 µMを最高濃度として、10倍希釈系列を調整して検出することにした。

MMSは180 µM以上の濃度において、図8に示すように強い細胞毒性を認めた。よって、18 µMを最高濃度として、10倍希釈系列を調整してコメットアッセイを行うこととした。

4-NQOは最高濃度200 µMのみにおいて、図9に示すように細胞毒性を認めた。よって、20 µMを最高濃度として、10倍希釈系列を調整してコメットアッセイを行うこととした。

#### 3・4 被験物質を用いたコメットの検出試験

コメットアッセイを実施する被験物質の最高処理濃度は、4時間処理後、さらに20時間培養した場合、細胞が50%以上生存している濃度でなければいけないと設定した。その最高濃度から公比10で希釈して得られた3被験物質に

おけるコメットアッセイの結果を求めた。その結果、図10に示すようにマイトマイシンCでは150  $\mu$ M以上の濃度で濃度依存的なコメット出現頻度の増加が明らかとなっ

た。一方、図11に示すように、MMSのコメット出現頻度の増加は検出されなかった。また、図12に示すように、4-NQOのコメット出現頻度は20  $\mu$ Mでわずかに増加した。

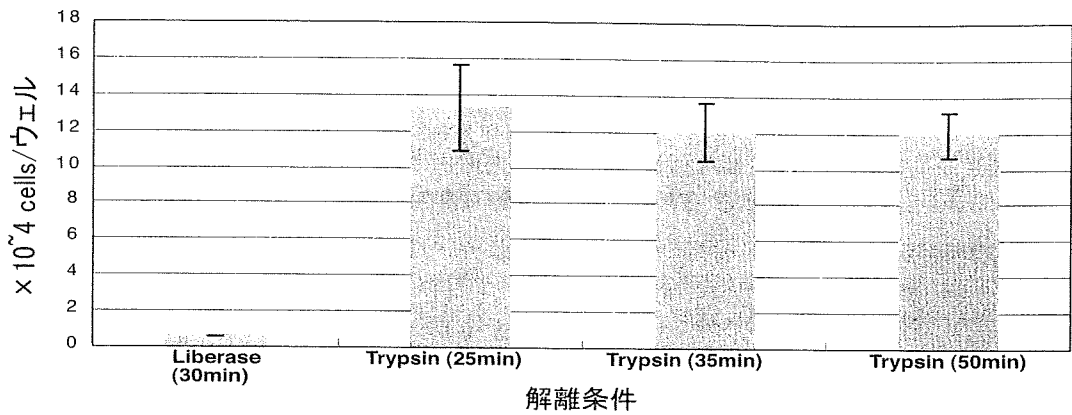


図4 解離条件の検討 酵素処理による単一細胞出現頻度

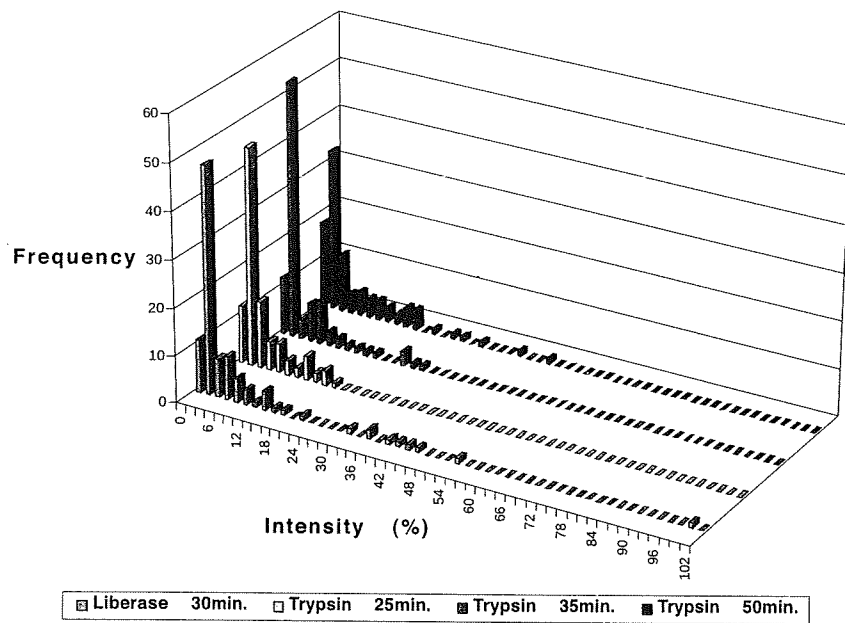


図5 解離条件の検討 酵素処理によるコメット出現頻度

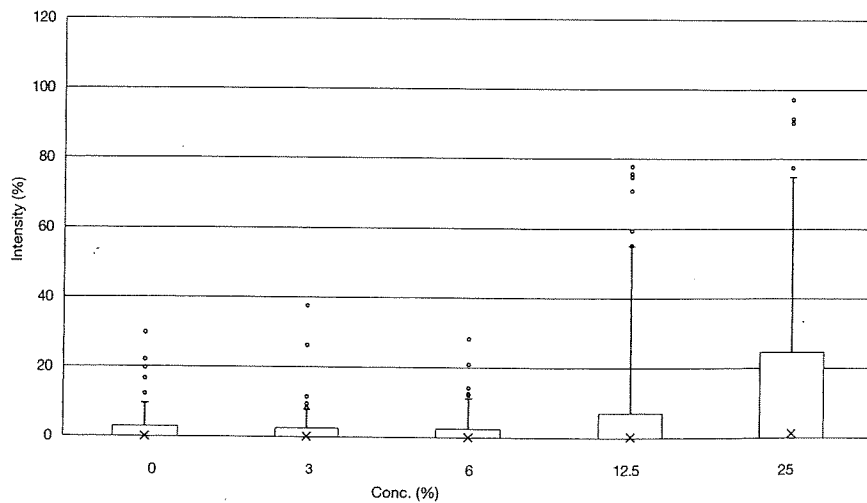


図6 エタノールのコメット出現頻度

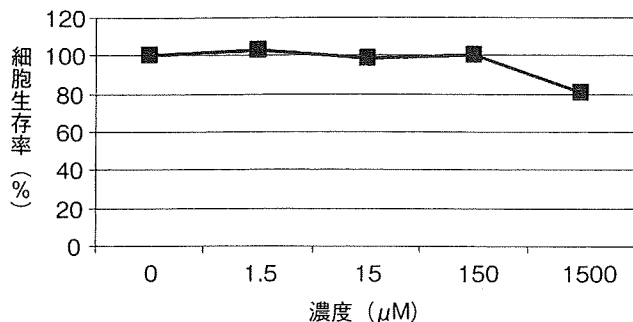


図7 マイトマイシン C の細胞毒性試験結果

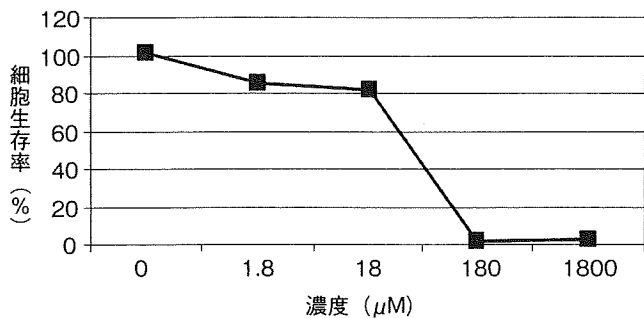


図8 MMS の細胞毒性試験結果

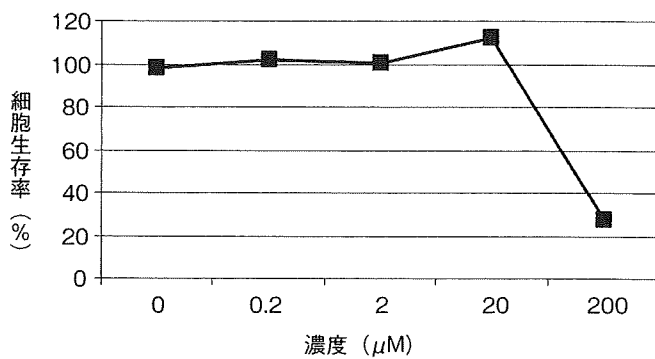


図9 4-NQO の細胞毒性試験結果

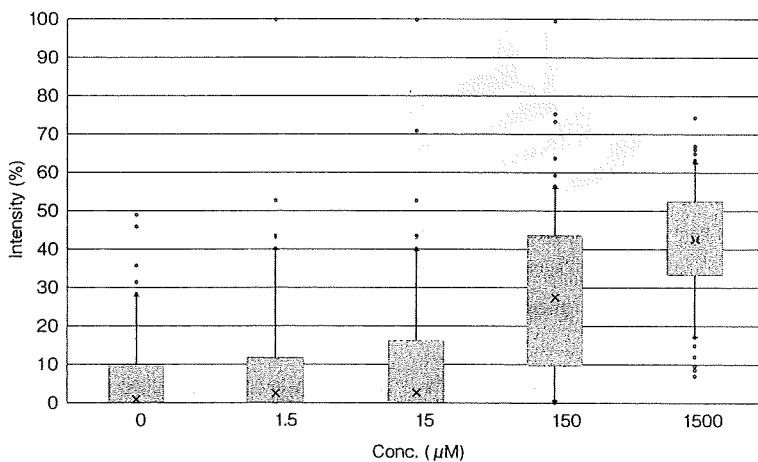


図10 マイトマイシンCによるコメット出現頻度

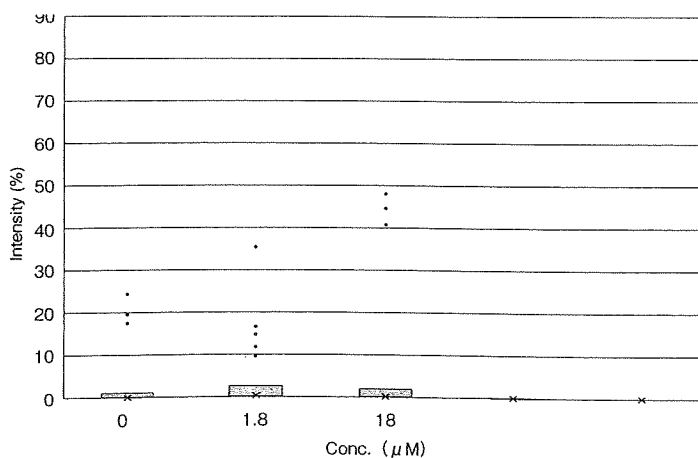


図11 MMSによるコメット出現頻度

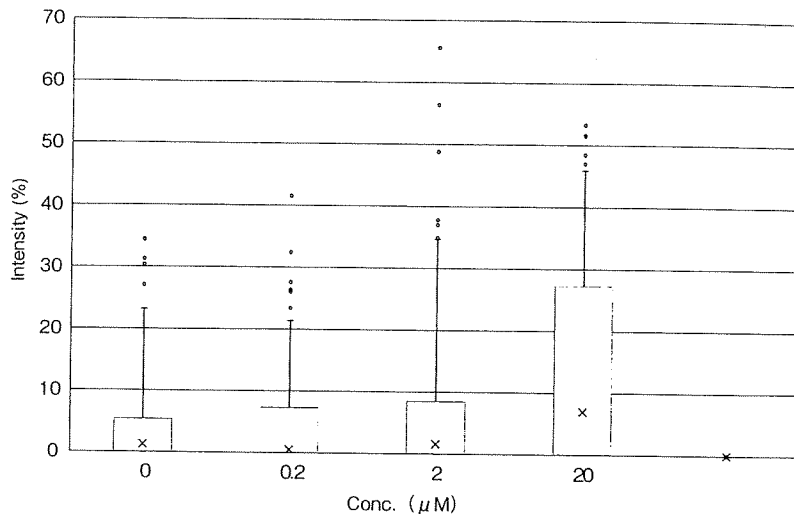


図 12 4-NQO によるコメット出現頻度

#### 4. 考 察

酵素処理条件、最適な溶媒濃度を決定でき、3次元培養表皮モデルを用いたコメットアッセイの試験法開発という目的を達成できた。マイトマイシンCはDNAのクロスリンカーとして遺伝毒性を起し、MMSや4-NQOはDNAをアルキル化して遺伝毒性を引き起こす著名な遺伝毒性物質である。しかし、得られた結果からマイトマイシンCおよび4-NQOはコメット出現頻度を増加させるが、MMSはその強い細胞毒性からコメットを明確に引き起こさないと判断した。

以上の結果から、遺伝毒性物質の検出感度における課題も明らかになった。今後は、マイトマイシンC、MMS、4-NQO以外の遺伝毒性物質についても、同様の検討を行うとともに、小核の検出を行う予定である。得られたデータベースからを他の *in vitro* および *in vivo* データと比較して、遺伝毒性に対する感受性にどの程度違いがあるのかを明らかにする予定である。

なお、これらの成果の一部は日本環境変異原学会第36回年次大会(2007年11月、北九州)にて発表した<sup>9)</sup>。

#### (参考文献)

- 1) 医薬品非臨床試験研究会監修(2002) 医薬品非臨床試験ガイドライン解説、薬事日報社
- 2) 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック2008、薬事日報社
- 3) 厚生労働省医薬食品局審査管理課(2006) 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
- 4) Kirkland D, Pfuhler S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, Elhajouji A, Glatt H, Hastwell P, Hayashi M, Kasper P, Kirchner S, Lynch A, Marzin D,

Maurici D, Meunier JR, Müller L, Nohynek G, Parry J, Parry E, Thybaud V, Tice R, van Benthem J, Vanparys P, White P.(2007) How to reduce false positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutat Res.* 628 (1) : 31-55

- 5) Commission Staff Working Documents (2004) ; Time Tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7<sup>th</sup> Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC) ; EN, SEC (2004) 1210

6) Honma M. (2007) A Multi-endpoints *in vitro* Genotoxicity Test SAYstem Consisting of Comet, Micronuclei and Gene Mutation Test, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, abstract pp.88.

- 7) Flamand N, Marrot L, Belaidi JP, Bourouf L, Dourille E, Feltes M, Meunier JR. (2006) Development of genotoxicity test procedures with EpiSkin, a reconstructed human skin model: towards new tools for *in vitro* risk assessment of dermally applied compounds? *Mutat Res.* 606 (1-2) : 39-51.

8) Curren RD, Mun GC, Gibson DP, Aardema MJ. (2006) Development of a method for assessing micronucleus induction in a 3D human skin model (EpiDerm). *Mutat Res.* 607 (2) : 192-204.

- 9) Arai S, Saitoh M, Tajashima Y, Honma M, Kojima H (2007) A new trial for *in vitro* Comet assay using 3-dimensional human epidermal model, 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, Abstracts, p111.



# 現在の動物実験代替法の 状況について

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 小島 肇夫

## 1. はじめに

世界的な規模で、動物福祉および動物実験の3Rs (Reduction, RefinementおよびReplacement) 推進が叫ばれている。しかし、Replacementを意味する動物実験代替法 (以下、代替法と記す) の普及はほとんど進んでいない。in silicoと言われるコンピュータを用いた予測システムや、代替法と言われるin vitroトキシコロジー試験の研究・開発の多くはまだ道半ばである。ただし、in silicoやin vitroの進歩だけでなく、-omicsや幹細胞研究の結果から劇的な変化が生まれないとはいえない。Replacementはともかく、少しずつ動物実験の3Rsのうち、ReductionやRefinementの方向に向かって行くことは間違いない。21世紀は動物実験を減らしていくという米国ナショナルアカデミー協会の方針に従い<sup>1)</sup>、使用動物数は確実に減っていくであろう。

## 2. 国際的な動向

欧米では動物愛護問題が盛んであり、社会的にもその必要性が問われ、規制も掛けられている。主な動物実験の規制問題は、化粧品およびREACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) である。化粧品の規

制に関しては、2003年に化粧品指令7次改正が公布され、2009年3月に代替法が確立されている試験がある場合には、①EU域内での動物実験の完全禁止、②動物実験した製品、動物実験をした原料を含む製品の販売禁止が決められている<sup>2)</sup>。これに間に合わせるべく、EUでは欧州化粧品工業会 (COLIPA) とECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) が共同で試験法の開発、バリデーション (検証) および第三者評価を進めてきた。ただし、2009年時点で開発された代替法は少なく、各社が自主的に動物実験を中止して限られた代替法で安全性を担保するとともに、規制対象となる新原料の開発を中止している段階である。

一方、REACHとはすでにEU市場に流通している既存化学物質に関し、その製造・輸入を行う事業者は、その安全性データなどを揃え、登録が義務つけられる規制を指す。登録、評価、認可、制限の総称である<sup>3,4)</sup>。この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) が中心である。2009年までに事前登録が期待される180,000物質における70%の試験を2011~2017年に実施しなければならない。製造/輸入量に応じ

て実施すべき試験法が決まっており、1t以上の製造/輸入物質には代替法による有害性の同定が必要とされる。さらに製造量が増えるにつれて、曝露評価まで求められており、動物実験を有効に使っていかねばならない<sup>5)</sup>。

これらの問題に対応するため、欧州ではEPA A (European Partnership on Alternative Approaches to Animal Testing) という政府機関と業界団体の協調組織が設けられ、動物実験の3Rsに向け、着実に実現を積んでいる。さらなる代替法開発のため、300以上のパートナーと17の研究プロジェクト (予算110 million €以上) を通して<sup>6)</sup>、REACHのために“適した”100の試験法を確立する予定である。現在125のINVITTOXによるプロトコールが用意されており、2009年までに40試験法を検証するとされている。これにより、代替法で50%、in silicoで20%の動物数を削減できると専門家が分析している<sup>7)</sup>。

ただし、新規試験法が開発されても、「試験法の公定化」となると国際的な相互承認という厚い壁が立ち上がり、検証や第三者評価に時間と経費が掛かる。これまで通りの方法では2011年までに多くの試験法を用意できない。そこで、OECDやECVAM、

米国のICCVAM(Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) 中心に検証研究の短期化、検証が終了したものと同等のものを揃えるために適切な方法の選択をする方策が検討されている<sup>8)</sup>。

### 3. 日本の動向

日本でも欧米の影響を受けてはいるが、動物実験の3Rsに関しては社会的には問題化されていない。経済のグローバル化もあり、国際企業は対応に苦慮しているが、経済産業省が国際調整に乗り出す程ではない。一部の愛護団体が特定企業を攻撃しているが、それは本当に適切な行

為とは言えない。国民のニーズがないこと、すなわち、行政に関心がないことを認識すべきである。

2005年にはJaCVAM(日本代替法検証センター)が設立された。しかし、厚生労働省が認めた部署は国立医薬品食品衛生研究所の中の新規試験法評価室であり、JaCVAMではない。JaCVAMとは新規試験法評価室の業務の一環として、この部屋を中心とする任意の協力者による活動である<sup>9-11)</sup>。この活動グループが2006年に組織されたのであり、JaCVAMという公的な機関は日本では存在しない。欧米では、法的にその活動が規定されているようなICCVAM<sup>12)</sup>、

ECVAM<sup>13)</sup>という行政機関が存在するが、その規模、予算の違いは公的な認知の違いによる。よって、JaCVAMの活動は限定的にならざるを得ない。

### 4. 国内外の状況への対応

さて、もう一度、試験法の公定化について考えてみたい。化学物質等の安全性を確認するための試験法は国民の安全・安心の土台である。国際社会で生きていく以上、その試験法は国際的に統一されたものが必要であることは議論の必要がない。その代表がOECDテストガイドラインである<sup>14)</sup>。OECDテストガイドラインには昨今、大きな二つの流れがある。一つが動物福祉の

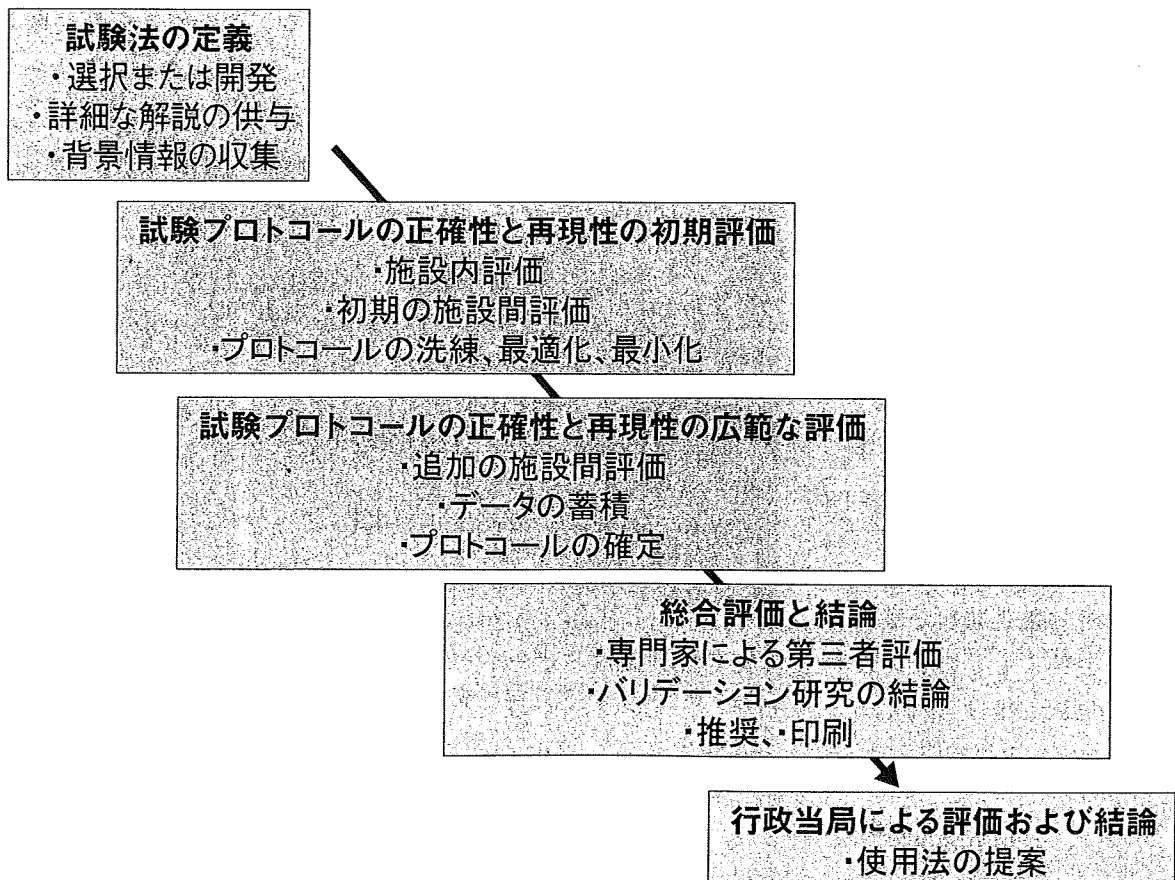


図1. 新規毒性試験法におけるバリデーションおよび行政受け入れの過程

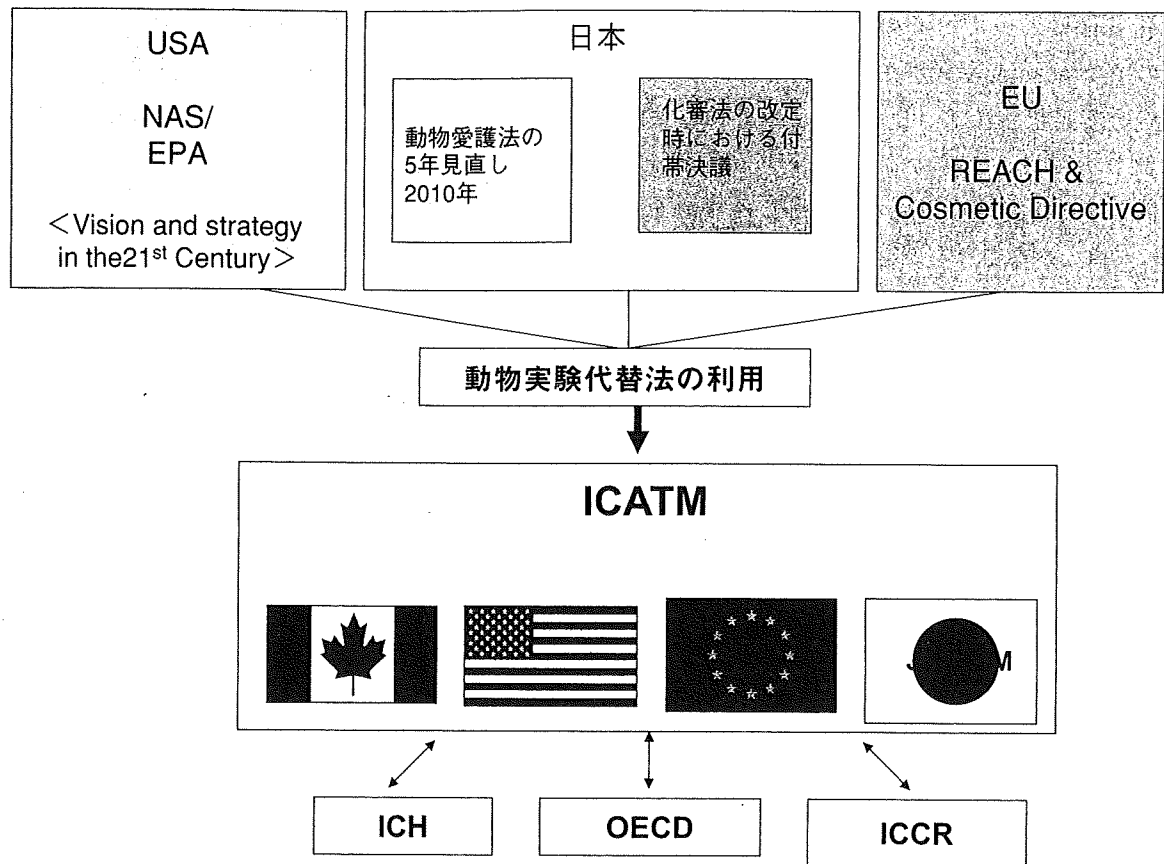


図2. 昨今の国際組織

影響を受けた試験法の見直しである。動物実験の3Rsに配慮して試験法の統合（慢性毒性試験と発がん性試験の統合など）や代替法がガイドラインに提案される場合が多くなっている。二つ目がOECDガイダンス文書No.34に示されている試験法の検証・評価である<sup>15)</sup>。試験法公定化までの道程を図1に示すが、動物実験も含め、新たに開発される試験法は検証研究や第三者評価を受けなければならないと、この文書は謳っている。このOECDテストガイドラインの潮流に沿って試験法が開発されるとすれば、代替法中心に検証研究や第三者評価が行われることは必然である。

日本ではこの試験法の公定化のために、新規試験法評価室に予算が付き、JaCVAMの種ができたことは評価して頂きたい。ただし、日本の活動が限定的であることから、このままでは欧米で開発され検証・評価された“特許で守られた代替法”を受入れるばかりとなる。

そのような動向の中、本年4月にICATM (International Cooperation on Alternative Test Methods) が設立された<sup>16)</sup>。国際的な代替法の協力組織として、NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) /ICCVAM、ECVAM/ESAC

(ECVAM Scientific Advisory Committee)、Health CanadaそしてJaCVAM合わせて4局の上部組織が合意した。この組織の目的は国際的な検証研究の推進、専門家による第三者評価の合同開催、さらに行政的な試験法の受入れの加速である。簡単に言えば、代替法のOECDテストガイドラインの早期成立である。JaCVAMは過去に検討された代替法も含め、日本で開発された試験法の公定化を進めているが、図2に示すように、今後、このICATM組織の中で、国際的な協調を図りながら、広範な試験法において、迅速な公定化に向け努力することとなる。

さらに、日本では本年に改定

された化審法において、その付帯決議の中でin silicoや代替法の活用について記載されている<sup>17)</sup>。欧米の流れを受け、わずかながら社会的なニーズが増している。2010年に見直しがなされると言われている「動物の愛護及び管理に関する法律」で実験動物に関する動向が注目されている<sup>18,19)</sup>。

このような状況に鑑み、新規試験法評価室として組織の見直しや人員増、予算の増額を厚生労働省および総務省、財務省に求めている一方、経済産業省、環境省、農林水産省などの他省庁との連携や、トキシコロジー学会、日本動物実験代替法学会、日本環境変異原学等々の学会および関連した業界団体との協力

関係をこれまで以上に深めていきたい。この機会にJaCVAMを中心に、オールジャパンで対応する体制を整える必要がある。この機会を逃せば、試験法の確立という応用研究でも我々は世界に歯が立たなくなってしまうと考えている。

## 5. 終わりに

2009年秋に韓国およびブラジルに代替法検証センターの設立が決まった。ますます代替法の国際化が進むとともに、試験法の公定化を巡って混沌とした状況が続く可能性がある。ICATMができた理由を前述したが、実は代替法を巡る国際間の無駄な労力を緩和することが本音部分の

理由である。このICATMを通して、我々は欧米カナダに加え、韓国、ブラジルとも良好な関係を築いていきたい。さらにOECD加盟国との調整を円滑に進め、JaCVAMのそして、オールジャパンの存在感を国際的に示していきたいと考えている。

## 参考文献

- 1) National Academy Science (2007) Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy  
<http://www.cof.orst.edu/cof/teach/agbiotox/Readings%202008/Toxicology-21stCentury-NAS-2007.pdf#search='NAS%20toxicology%20vision%20strategy'>
- 2) Commission Staff Working Documents(2004) 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
- 3) ECB(2009)  
<http://ecb.jrc.ir/REACH/>
- 4) ECH (2009)  
[http://ec.europa.eu/echa/home\\_en.html](http://ec.europa.eu/echa/home_en.html)
- 5) EPAA (2009)  
<http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/brochure.htm>
- 6) EC (2009) Alternative Testing Strategies, EUR22846
- 7) Hartung, T.(2006)  
<http://www.soc.nii.ac.jp/jsaae/20kai.html>
- 8) JRC (2009)  
<http://www.vet.uu.nl/nca/userfiles/other/REACH>
- 9) 大野泰雄 (2004) 動物実験代替法のバリテーション方法と行政的受入れの現状、国立衛研報、122、1-10
- 10) 小島肇夫 (2006) 動物実験代替に関する最近の動向、化粧品技術者会誌、40(4)263-268.
- 11) 小島肇夫 (2008) 安全性評価と動物実験代替法の現状、薬学雑誌、128 (5) 747-752.
- 12) ICCVAM(2009)  
[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox\\_docs/EPreport/ocu\\_report.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/EPreport/ocu_report.htm)
- 13) ECVAM (2009)  
<http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>
- 14) OECD (2009)  
[http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en\\_2649\\_34377\\_2349687\\_1\\_1\\_1\\_1\\_00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1_00.html)
- 15) 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
- 16) ICATM (2009)  
<http://www.niehs.nih.gov/news/releases/2009/pttw.cfm>
- 17) 化審法改正法案に対する附帯決議 (2009)  
<http://www.env.go.jp/chemi/kagaku/kaisei21/futai21.pdf>
- 18) 動物の愛護及び管理に関する法律 (2008)  
[http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend\\_law2/law.pdf](http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend_law2/law.pdf)
- 19) 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準(2008)  
[http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law\\_series/nt\\_h180428\\_88.html](http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law_series/nt_h180428_88.html)



## 医薬部外品の製造販売承認申請における 安全性の資料に関するあり方検討会報告

小島 肇 夫

### 要旨

医薬部外品の製造販売承認申請における安全性の資料に動物実験代替法（以下代替法と記す）を用いる場合のあり方を検討するため、皮膚科専門医や業界団体の意見を加えた組織を構築した。この下部組織として試験法毎に皮膚刺激性、感作性、皮膚透過性・経皮吸収性、眼刺激性、光関連毒性及び遺伝毒性の6分科会を設けた。これらの会にて代替法を積極的に導入しながら、医薬部外品における安全性評価の質の維持を基本に協議した。

その結果、動物福祉や動物実験の3Rs（Reduction、Refinement and Replacement）は尊重しなければならないが、医薬部外品の安全性レベルを維持することがより重要である。単純に、動物実験を実施しない、代替法のみという選択肢はありえない。代替法はOECD（経済協力開発機構）テストガイドラインや公的な機関にてバリデーション研究や第三者評価が実施されたものしか認めない。代替法を利用するには、その適用範囲や限界を理解した上で実施されるべきであるなどの結論を得た。

キーワード：

医薬部外品、安全性評価、動物実験代替法

### 1. 医薬部外品とその安全性評価

医薬部外品とは、薬事法第二条第2項の規定により、“人体に対する作用が緩和なもの”とされている<sup>1)</sup>。また、医薬部外品のうち、いわゆる薬用化粧品等については、治療を目的としているものではなく（医薬品ではない）、主な使用目的は“防止”であり、毎日使用することが想定されている日常品であるとされている。平成17年に改正された薬事法では、その責務は製造販売業者に求められることになり、製造販売承認申請（以下承認申請と記す）時に品質、有効性および安全性の評価のための資料を提出する必要がある。また、市販後においても安全性を確保するための情報提供や、有害事象等の情報収集等の責務が製造販売業者に求められている。

医薬部外品の承認申請にあたっては<sup>2)</sup>、申請品目の該当する申請区分によって、承認申請の際に添付すべき資料の範囲が異なってくる。例えば、申請区分1（新有効成分含有医薬部外品等：既に製造販売承認を受けている医薬部外品とその有効成分又は適用方法等が明らかに異なる医薬部外品）や申請区分3（新添加物含有医薬部外品等：申請区分1および申請区分2（既承認の医薬部外品と同一



Hajime KOJIMA, Ph.D.

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  
Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM),  
National Institute of Health Sciences (NIHS), Japan

性が認められるもの) 以外の場合は、新規性の高い物質等に関連した安全性、有効性および品質に係る評価が必要である。

この安全性の確保のために、臨床試験成績の提出が求められている。臨床試験の実施に際しては、倫理的観点からその安全性を確保するために動物実験等の非臨床試験の実施が不可欠となっている。しかしながら、動物愛護・動物福祉の観点からは、動物実験において使用する実験動物数の削減や動物に対する苦痛の軽減が求められており、特に、人体に対する作用が緩和なものとされている医薬部外品においては、動物実験の回避が求められている。安全性資料の中で動物を用いる試験としては、第1表に示すように<sup>2,3)</sup>、申請内容に応じて、単回投与毒性(急性毒性)に関する資料、反復投与毒性(亜急性毒性、慢性毒性)に関する資料、生殖発生毒性に関する資料、抗原性(皮膚感作性試験、光感作性試験

等)に関する資料、変異原性に関する資料、局所刺激(皮膚刺激試験、粘膜刺激試験等)に関する資料、吸収・分布・代謝・排泄に関する資料等あるいはガイドブック中の参考例の資料等の添付が必要であり、臨床試験にあたる試験としては、ヒトパッチに関する資料が該当する。これらの申請者から提出された資料に基づいて、PMDA(医薬品医療機器総合機構)の審査員が慎重に審査を行っている。

## 2. 欧米の動向

2003年にEUにおいて、化粧品指令7次改正が公布され、2009年3月に動物実験代替法(以下、代替法と記す)が確立されている試験がある場合には、①EU域内での動物実験の完全禁止、②動物実験した製品、動物実験をした原料を含む製品の販売禁止が決められている<sup>4)</sup>。さらに、EU委員会は、期限内の

第1表 医薬部外品および化粧品の安全性評価に求められている試験法

|             | 【新医薬部外品】             |             | 【化粧品】                    |
|-------------|----------------------|-------------|--------------------------|
|             | 薬審1第24号<br>医薬審発第325号 | 参考例         | JCIA 安全性評価指針<br>(2008改訂) |
| 試<br>験<br>法 | 単回投与毒性               | 単回投与毒性      | 単回投与毒性                   |
|             | 反復投与毒性(亜急性毒性、慢性毒性)   | 反復投与毒性      | -                        |
|             | 生殖発生毒性               | 生殖発生毒性      | -                        |
|             | 局所刺激(皮膚刺激性)          | 皮膚一次刺激性     | 皮膚一次刺激性                  |
|             |                      | 連続皮膚刺激性     | 連続皮膚刺激性                  |
|             |                      | 光毒性         | 光毒性                      |
|             | 抗原性(皮膚感作性)           | 皮膚感作性       | 皮膚感作性                    |
|             | 抗原性(光感作性)            | 光感作性        | 光感作性                     |
|             | 局所刺激(粘膜刺激性)          | 眼刺激性        | 眼刺激性                     |
|             | 変異原性                 | 遺伝毒性        | 遺伝毒性                     |
|             | ヒトパッチテスト             | ヒトパッチテスト    | ヒトパッチテスト                 |
|             | 吸収・分布・代謝・排泄          | 吸収・分布・代謝・排泄 | -                        |

## 第2表 あり方検討会および各分科会委員

表2-1. あり方検討会

| 氏名     | 分類   | 所属             |
|--------|------|----------------|
| 飯島 正文  | 皮膚科医 | 昭和大学病院         |
| 松永 佳世子 | 皮膚科医 | 藤田保健衛生大学医学部皮膚科 |
| 大野 泰雄  | 専門家  | 国立医薬品食品衛生研究所   |
| 増田 光輝  | 専門家  | 国立医薬品食品衛生研究所   |
| 小島 肇   | 専門家  | 国立医薬品食品衛生研究所   |
| 板垣 宏   | 業界代表 | 株式会社 資生堂       |
| 佐々 斉   | 業界代表 | 株式会社 資生堂       |
| 岡本 裕子  | 業界代表 | コーセー株式会社       |
| 西山 直宏  | 業界代表 | 花王株式会社         |
| 見田 活   | 行政   | 医薬品医療機器総合機構    |
| 小野寺 博志 | 行政   | 医薬品医療機器総合機構    |
| 鷲田 淳   | 行政   | 厚生労働省審査管理課     |

表2-2. 皮膚刺激性試験分科会

| 氏名              | 分類          | 所属           |
|-----------------|-------------|--------------|
| 河合 敬一           | 皮膚科医        | 河合敬一皮膚科医院    |
| 夏秋 優            | 皮膚科医        | 兵庫医科大学皮膚科    |
| 寒水 孝司           | 専門家         | 大阪大学         |
| 杉山 真理子          | 専門家         | 株式会社 資生堂     |
| 森 福義            | 業界代表        | 株式会社 ポーラ     |
| 辰見 寿            | 業界代表        | サンスター株式会社    |
| 小島 肇            | 事務局         | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| オブザーバー<br>實川 節子 | EPISKIN 開発元 | 日本ロレアル株式会社   |

表2-3. 眼刺激性試験分科会

| 氏名    | 分類   | 所属                       |
|-------|------|--------------------------|
| 平野 耕治 | 眼科医  | 藤田保健衛生大学                 |
| 島 賢一郎 | 専門家  | 株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング |
| 森田 正道 | 獣医   | アイリス動物医療センター             |
| 金子 豊蔵 | 専門家  | 国立医薬品食品衛生研究所             |
| 萩野 滋延 | 専門家  | 株式会社 資生堂                 |
| 瀬戸 洋一 | 業界代表 | プロクター・アンド・ギャンブル・ジャパン株式会社 |
| 小島 肇  | 事務局  | 国立医薬品食品衛生研究所             |

表2-4. 皮膚感作性試験分科会

| 氏名     | 分類   | 所属           |
|--------|------|--------------|
| 横関 博雄  | 皮膚科医 | 東京医科歯科大学     |
| 中田 土起丈 | 皮膚科医 | 昭和大学医学部      |
| 大野 泰雄  | 専門家  | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 金澤 由基子 | 専門家  | 医薬品医療機器総合機構  |
| 坂口 斉   | 業界代表 | 花王株式会社       |
| 小島 肇   | 事務局  | 国立医薬品食品衛生研究所 |

表2-5. 光関連毒性試験分科会

| 氏名    | 分類   | 所属            |
|-------|------|---------------|
| 上出 良一 | 皮膚科医 | 慈恵会医科大学       |
| 田中 憲穂 | 専門家  | (財)食品薬品安全センター |
| 森 辰実  | 業界代表 | 株式会社ノエビア      |
| 今井 教安 | 専門家  | コーセー株式会社      |
| 小島 肇  | 事務局  | 国立医薬品食品衛生研究所  |

表2-6. 遺伝毒性試験分科会

| 氏名    | 分類   | 所属                 |
|-------|------|--------------------|
| 林 真   | 専門家  | (財)食品農医薬品安全性評価センター |
| 能美 健彦 | 専門家  | 国立医薬品食品衛生研究所       |
| 本間 正充 | 専門家  | 国立医薬品食品衛生研究所       |
| 江幡 真也 | 業界代表 | ライオン株式会社           |
| 笠松 俊夫 | 専門家  | 花王株式会社             |
| 小島 肇  | 事務局  | 国立医薬品食品衛生研究所       |

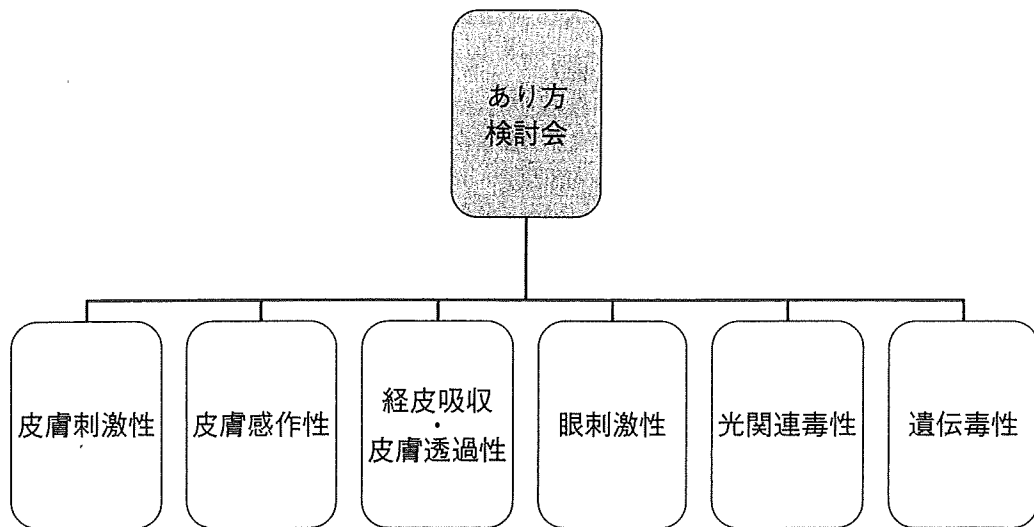
表2-7. 経皮吸収・皮膚透過性試験分科会

| 氏名     | 分類   | 所属           |
|--------|------|--------------|
| 藤井 まき子 | 専門家  | 昭和薬科大学       |
| 杉林 堅次  | 専門家  | 城西大薬学部       |
| 桑原 裕史  | 業界代表 | カネボウ化粧品株式会社  |
| 上月 裕一  | 専門家  | 株式会社 資生堂     |
| 小島 肇   | 事務局  | 国立医薬品食品衛生研究所 |

開発が困難と判断された試験法の場合には、2013年まで延長するとしている。これらに対応すべく、EUではCOLIPA（欧州化粧品工業会）およびECVAM（欧州代替法検証センター）が共同で試験法の開発、バリデーション研究および第三者評価を進めている。

本問題は日本で化粧品を輸出入する企業において大きな問題であるが、さらに本邦における特徴的な制度である医薬部外品における承認可申請が問題を複雑化している。本問題を解決する糸口を見つけるため、代替法を用いる場合、その有効性と限界を明らかにし、化粧品や医薬部外品、医薬品等のスクリーニング法として、或いは行政が受入れる試験法としての妥当性を評価するとともに、動物実験を用いない場合における総合的な医薬部外品の安全性評価の手順・手段について検討す

る組織を厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究：代表研究者 小島 肇」の中に構築した。この組織をあり方検討会と呼び、第1図に示すように、平成19年度に皮膚科医、化粧品業界代表者、安全性試験法や代替法の専門家の協力を受けて本会を設立し、さらに詳細な試験法毎の検討を行う分科会を設けた。これらの分科会は、試験法毎に皮膚刺激性、感作性、皮膚透過性・経皮吸収性、眼刺激性、光関連毒性および遺伝毒性の6つである。まず、これら分科会で議論を進め、この分科会の結論を受け、あり方検討会で議論を行った。上記検討会および分科会のメンバーを第2表に示す。



第1図 あり方検討会の組織

### 3. あり方検討会および各分科会の活動

あり方検討会では、以下のような活動方針を、分科会に示した。

- ①動物福祉や動物実験の3Rs (Reduction, Refinement and Replacement) を尊重する。
- ②代替法の第三者評価を行う委員会ではない。代替法を取り入れて安全性評価をどう担保するか、代替法の行政的な受け入れを検討する委員会である。
- ③扱うべき代替法はOECD (経済協力開発機構) で認められているか、公的な研究機関にてバリデーション研究が終了し、第三者評価も済んでいるものである。
- ④時間の関係で、国内外で進行している第三者評価を並行して実施する場合もある。
- ⑤代替法を用いる場合の長短所 (限界と適用範囲) をまとめる。
- ⑥分担毎に代替法を用いた医薬部外品 (薬用化粧品) の安全性評価のあり方案を作る (必要なら評価フローチャートを作成する)。

以下にこの方針をもとに行われた各分科会の活動内容およびその結論を明記する。

#### 1) 皮膚刺激性分科会

(150)

本分科会では、皮膚一次刺激性の評価に代替法を利用することが可能であるかについて検討し、代替法を取り入れて評価する場合の限界や注意点について検討した。

現在、医薬部外品の承認申請において、皮膚刺激性の評価項目として「皮膚一次刺激性試験」、「連続皮膚刺激性試験」および「ヒトパッチ試験」が設定されている。今回の検討においては、2007年4月27日付けでESAC (ECVAM科学的認証会議) の承認を受けた「三次元培養表皮モデルEpiSkin™」を唯一の皮膚一次刺激性を評価する代替法として溯上に上げ<sup>5)</sup>、医薬部外品の申請における利用方法として検討した。検討中に、他のモデルであるEpiDerm™SIT (EPI-200) およびSkinEthic™RHEについても2008年11月5日にESACの追加承認を受けた<sup>5)</sup>。これらすべてを収載したOECDテストガイドライン案が提案されているため<sup>6)</sup>、これら対象試験法をReconstructed Human Epidermis (RhE) として取り扱った。

RhEの特長は、Globally Harmonized System of Classification and Labeling (GHS) における「刺激性 (Category 2)」と「非刺激性 (No-Category)」を識別できる

日皮協ジャーナル

ことである<sup>7)</sup>。GHSによる評価は、ウサギによる4時間暴露の皮膚一次刺激性試験結果にしたがって行われ<sup>8)</sup>、医薬部外品の申請において求められているウサギによる24時間暴露の皮膚一次刺激性試験結果に基づいた区分ではない<sup>2)</sup>。医薬部外品の申請において、皮膚一次刺激性試験に求められていることは、刺激性強度の把握およびパッチテストを実施する場合における倫理面の情報取得である。したがって、R h EはGHSで「刺激性」に分類される程度の強度に関する情報は得られるものの、暴露時間の違い（暴露時間に伴い、皮膚反応は強まる傾向がある）と種差（ウサギ>ヒト）を考慮する必要があり、ヒトでパッチテスト（24時間閉塞貼付）を安全に実施できることを保証する情報としては不足していると考えた。

上記の検討を経て、以下の結論を得た。

「医薬部外品の承認申請資料の皮膚一次刺激性評価において、現時点（2009年9月）で推奨されている代替法単独では予測性が十分とはいえない。しかし、評価が可能な場合は、動物愛護の観点から代替法の利用が望ましい。動物実験と代替法のどちらを利用するかについての判断は申請者に委ねる。ただし、代替法で非刺激性と評価された場合でも、ヒトパッチテストを実施する際には、倫理的に問題ないことが確認されている必要がある。」

## 2) 皮膚感作性試験分科会

皮膚感作性とは遅延型アレルギーの一種であり、化学物質に繰り返し接触することによって感作が成立し、その後再び同じ物質や類似物質に触れることで皮膚等の接触部位に紅斑や浮腫といった炎症反応を起こす毒性を言う。本分科会では、これまでと同様のヒトへの安全性を担保しつつ動物愛護の観点を踏まえて、現時点で社会的に認知されている皮膚感作性試験の代替法が医薬部外品の申請において有用であるかを検討した。

現在の医薬部外品の承認申請において要求されている皮膚感作性試験法として、モルモットを用いるいわゆるMaximization法（GPM T）あるいはBuehler法が最も広く行われている<sup>2,9)</sup>。また近年マウスを用いる局所リンパ節試験（Local Lymph Node Assay : L L N A）が代替法の一つとしてO E C Dガイドラインに収載され（TG429）<sup>10)</sup>、化学物質等の申請に用いられるようになってきた。この現状を把握した上で、以下の方針で検討を進めた。

- ・代替法としてのL L N Aの方法確認
- ・医薬部外品を対象とした場合のL L N Aの長短所
- ・L L N Aを用いたリスク評価法の確認
- ・海外の第三者評価の動向を意識したリスク評価の妥当性

L L N Aに関してこれまで報告された多くの論文での評価結果や報告書、さらにO E C Dテストガイドラインを精査した。その結果、染毛剤などの医薬部外品、香料や防腐剤を含む原料を評価した論文等の報告から、L L N Aが医薬部外品の皮膚感作性の有無の判定に有用であろうと判断した。ただし、L L N Aにおいては、マウスの系統により異なる反応性が報告されており、O E C Dテストガイドラインにも記載されているC B Aマウスを用いた評価が重要である。また、用いる溶媒により評価化合物の溶解性は異なり、そのため適切な溶媒を用いないと、感作性の有無だけでなく、その強さのランク分類にも影響することが確認された。今後はL L N Aで適切な評価結果を得るためにも、上記2点に関して、十分に注意を払う必要がある。

なお、近年L L N Aを用いたリスク評価の手法も提案されているが、製品毎にどの程度の不確定因子を設定するかという点がまだ十分に検討がなされておらず、現在報告されている不確定係数の妥当性も含めて、L L N Aを用いたリスク評価の実用化にはまだ課題が

ある。また、LLNAはマウスを用いる試験法であることから、動物実験の完全な置き換えとなる代替法ではない。そのため、世界的な動物愛護の関心の高まりや、欧州での動物実験の禁止を含む法律の施行などから、動物を用いない皮膚感作性試験の開発は今後の課題であると結論された。

### 3) 眼刺激性分科会

眼刺激性は、被験物質を眼に直接接触させることにより生じる結膜の発赤・浮腫・分泌物、虹彩の変化や角膜の混濁等を指標とする刺激反応であり、眼刺激性試験はヒトが被験物質を粘膜に単回適用、あるいは誤って眼に入れた場合に生じる結膜、虹彩および角膜に対する刺激性を予測するために実施される<sup>2)</sup>。

ウサギを用いるDraize試験は、化学物質の眼に対する刺激性を評価することが可能であり、ヒトの眼に対する安全性を担保する試験法として多くの規制当局に受け入れられている<sup>2,11)</sup>。一方、この試験法は動物愛護の観点で強い批判を受けており、他の試験法に比べて早い時期から代替法の開発やバリデーション研究が進められてきた。

このような状況下において本分科会では、まずDraize試験に関する情報を過去の厚生科学研究報告資料等に基づいて確認した<sup>12)</sup>。その際、*in vivo*で得られる毒性情報と*in vitro*の測定指標との関係、および医薬部外品の眼刺激性を評価するための判断基準等について確認した。また、国内外の眼刺激性試験代替法の研究開発動向を調査し、バリデーション研究や第三者評価の状況から有力と考えられる方法を対象として、その利用の可能性について検討した。その中には、第三者評価は未実施ではあるが、厚生科学研究でバリデーションが終了している細胞毒性試験も含まれている<sup>12)</sup>。

最終的には、本年9月に、OECDテストガイドラインに採択された2種類の試験法、

「ウシ摘出角膜試験」<sup>13)</sup>と「ニワトリの摘出眼球試験」<sup>14)</sup>について、医薬部外品申請への利用について検討した。その結果、両法は化学物質の腐食性、および強刺激性を確認できるものの、医薬部外品に求められる弱刺激性、無刺激性を確認できる情報が不足しており、医薬部外品の眼刺激性試験として受入れるためには更なるデータに基づく科学的評価が必要と判断した。

### 4) 光関連毒性分科会

「光関連毒性」とは、ある化合物が光（主に紫外線）の照射を受けて、毒性を発揮もしくは増強させる現象を言い、主なものとしては、皮膚に刺激作用を起こす「光毒性」、アレルギー性の反応を起こす「光感作性」そして遺伝毒性を誘発する「光遺伝毒性」が知られている<sup>2)</sup>。

現在、動物を用いない試験法としては、「光毒性」を評価するための3T3ニュートラルレッド取り込み法（以下、3T3 NRU-PT法と記す）がOECDテストガイドラインNo.432に収載されている<sup>15)</sup>。

そこで、本分科会としては、3T3 NRU-PT法の医薬部外品に関する安全性評価への利用について検証した。検証の際には、同試験法のEUにおけるバリデーションに関する論文ならびに、厚生労働科学研究にて同試験法について評価を行った際の結果報告書等を参考にした<sup>16)</sup>。

その結果、3T3 NRU-PT法は被験物質の光毒性の有無について評価するのに適した試験法であるが、同時にいくつかの短所があることも確認し、長短所を理解した上で、適切に用いる必要があると判断した。光感作性、光遺伝毒性試験法については、適切な代替法が認証されておらず、検討できないと判断した。

### 5) 遺伝毒性分科会

遺伝毒性は遺伝情報を司る物質（DNAあるいは染色体）に損傷を与える性質をいい、

発がんや次世代における奇形の出現あるいは遺伝病につながる可能性があることから、安全性の重要な評価項目となっている。医薬部外品の遺伝毒性の評価は単一の試験で評価するのではなく、*in vitro*試験と*in vivo*試験から成る複数の試験を組み合わせて評価する。このような組み合わせは、日本と欧州で取り上げる試験法が異なれば、同じ物質を評価するために不必要な試験を実施する可能性がある。そこで本分科会では、日本の医薬部外品申請で要求されている遺伝毒性試験の組み合わせと、欧州の化粧品安全性評価の指針で示されている遺伝毒性試験の組み合わせについて状況の違いをまとめ、相互のデータ受け入れ可能性について議論した。

日本の医薬部外品申請で要求されている遺伝毒性試験の組み合わせは、*in vitro*試験である(1) Ames試験、(2) 染色体異常試験あるいはマウスリンフォーマ試験、そして動物実験の(3) *in vivo*小核試験である<sup>2)</sup>。

一方、欧州のSCCP(消費者製品科学委員会:現SCCS)による化粧品原料評価指針(Notes of guidance 6<sup>th</sup> version)で示されている遺伝毒性試験の組み合わせ(酸化染料を除く)は<sup>17)</sup>、まず*in vitro*試験の(1) Ames試験、(2) マウスリンフォーマ試験、(3) *in vitro*小核試験を実施した上で、これらの試験で陽性結果が得られた場合には適切な動物実験(多くの場合、*in vivo*小核試験)を実施することとなっている。ただし、2009年3月から*in vitro*試験陽性結果の動物実験によるフォローアップは出来なくなっている。

本分科会では上記の指針の比較から、特に*in vitro*小核試験の日本での受け入れを中心に議論した。日本の指針のベースとなるICH(日米EU医薬品規制調和国際会議)ガイドラインの改訂作業が進行中であり、*in vitro*小核試験がほ乳類動物細胞を用いた遺伝毒性試験の一つとして組み入れることが提

案されている。現行案のまま改訂されれば、*in vitro*試験の組み合わせについては日本・欧州間の相互受け入れは特に問題ないと判断した。

#### 6) 経皮吸収・皮膚透過性試験分科会

本分科会では、*in vitro*経皮吸収試験について各種ガイドラインの比較を行い、信頼性や長短所等について議論し、採否を検討した。

検討した代替法は以下の4つである。

- ・ OECD guideline for the testing of chemicals, skin absorption: *in vitro* method (2004)<sup>18)</sup>
- ・ SCCFNP 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 (2000)<sup>19)</sup>
- ・ SCCP opinion on basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients (2006)<sup>20)</sup>
- ・ Colipa regulatory, Test guidelines for *in vitro* assessment of dermal absorption and percutaneous absorption of cosmetic ingredients (1999)<sup>21)</sup>

*In vivo*条件下では、皮膚(組織)から微少循環系(血管およびリンパ管)に取り込まれた化学物質が体循環コンパートメントに移行(吸収)するが、その様な吸収は*in vitro*では評価できない。化学物質が表皮に不可逆的に結合することがあるが、これは*in vivo*においては皮膚表面の落屑によって除去される。この作用が示唆された場合には、別の試験により実証しなければならないと適用限界を明確にした。

さらに、各種*in vitro*試験法についての長短所を議論した。いずれの試験も適用限界を理解した上で、ガイドラインやガイダンスに準拠した正しい試験で行った*in vitro*試験か



ら、*in vivo*の結果を推定することが可能であると考えられた。正しい方法というのは皮膚の選定、レセプター相の選定、皮膚代謝の有無、試験物質の物性等を十分に考慮することである。適用限界を十分に理解した上で評価すれば、化学物質のリスク評価および効能評価の一つの評価系として十分に活用できると判断した。

#### 7) あり方検討会の結論

以上のような分科会からの報告を受け、あり方検討会では各分科会の意見に合意し、さらに以下のような提言を行った。

(1) 動物福祉や動物実験の3Rsを尊重しなければならない。

(2) 医薬部外品の安全性レベルを維持することがより重要である。単純に、動物実験を実施しない、代替法のみという選択肢はありえない。

(3) 代替法はOECDテストガイドラインや公的な機関にてバリデーション研究や第三者評価が実施されたものしか認めない。

(4) 代替法を利用するには、その適用範囲や限界を理解した上で実施されるべきである。

(5) 申請者は、他の利用可能な情報（物性、既存化学物質からの毒性予測、構造活性相関、他の動物実験結果）を用いて、動物実験または代替法の実施の必要性を判断し、得られた結果解釈を慎重に行うべきである。

#### 4. 結語

約2年間のあり方検討会において、皮膚科専門医や業界団体の意見を加えた行政的な組織を構築でき、代替法を積極的に導入しながら、安全性評価の質の維持を念頭において協議した。動物愛護の点はもちろんのこと、安全性評価の現状について皮膚科医、毒性の専門家、業界代表者が意見交換できた仕組みは高く評価できると考えている。

結果として、現状では、J a CVAM (日

本代替法検証センター)も示しているように使用可能な代替法が少ないことが明らかになり<sup>22)</sup>、代替法の研究・開発に国や業界などから積極的な財政的な支援が必要であることが明らかになった。

また、現在も多くの代替法が開発・評価されている<sup>23)</sup>。これらの中で医薬部外品の評価に用いるための公的に認証された試験法の適用範囲と限界が、今後もあり方検討会にて継続して審議されるべきと考えている。

#### 参考文献

- 1) 薬事法, <http://www.houko.com/00/01/S35/145.HTM> (2009)
- 2) 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック2008、薬事日報社、東京 (2008)
- 3) 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)
- 4) Commission Staff Working Documents : Time tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7<sup>th</sup> Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC), EN, SEC82004,1210 (2004)
- 5) ECVAM statement, <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.html> (2009)
- 6) OECD draft test guideline, [http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en\\_2649\\_34377\\_2349687\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html) (2009)
- 7) GHS分類, <http://www.env.go.jp/chemi/ghs/kariyaku2/annex08.pdf#search='ghs分類 区分'> (2009)
- 8) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 404 : Acute dermal irritation/corrosion, Paris, France (2002)
- 9) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 406 : Skin sensitisation, Paris, France, (1992)
- 10) OECD guideline for the testing of

- chemicals, No. 429 : Skin sensitization: Local lymph node assay, Paris, France (2002)
- 11) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 405 : Acute eye irritation/corrosion, Paris, France (2002)
- 12) Ohno, Y., *Fragrance Journal*, 1999-7, 21-26 (1999)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 432 : *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity testing, Paris, France (2002)
- 16) 大野泰雄ら, *AATEX* ,10 (2) , 54-157 (2005)
- 17) SCCP'S notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation 6<sup>TH</sup> revision, [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_s\\_04.pdf#search='SCCP guidance'](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_04.pdf#search='SCCP guidance') (2006)
- 18) OECD guideline for the testing of chemicals, No. 428: *In vitro* skin absorption. Paris, France (2004)
- 19) SCCFNP, 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 (2000)
- 20) SCCP, <http://www.ciba.com/cosmetic-sccp.pdf#search='SCCP opinion 2006 vitro dermal'> (2006)
- 21) COLIPA, Guidelines for percutaneous absorption, Brussels (1999)
- 22) JaCVAM, <http://jacva.jp/index.html> (2009)

