

提案書として行政当局に提出された¹¹⁾。

③光毒性の代替試験法

試験法としては紫外線光照射下において被験物質を各種の生体細胞や人工皮膚モデル、又は化学物質と接触させることにより生じる細胞の生存率の変化又は化学物質の光変性を指標とする *in vitro* 試験がある。これらの中で、光毒性物質のスクリーニング法として、Balb/c 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド取り込み法が EU の ECVAM で承認され、EU の危険物指令の Annex V に取り入れられており、化学物質のクラス分けに利用されている。また、この方法に修正を加えた方法が、OECD でも化学物質光毒性試験法ガイドライン「*In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test」(Original Guideline, adopted 13th April 2004)¹²⁾として受け入れられている。これらについて、日本でも、審議され報告書が提出され検証済みである。その他、ECVAM でバリデーションが実施されている試験法として、三次元ヒト皮膚モデルを用いた試験法等が報告されている¹³⁾。また、日本では、厚生労働科学研究班研究として実施した酵母光生育阻害試験法と赤血球を用いた光溶血性試験法のバッテリー試験法¹³⁾⁻¹⁶⁾について、JaCVAM での第三者評価が終了し、評価会議にて第三者評価報告書の報告内容について吟味した結果、行政への提案書作成には、追加情報として、確定したプロトコールでの検証が必要という結論から、それらを記載した評価報告書が提出された¹⁷⁾。

三次元皮膚モデルを用いた代替法では、EPISKIN を用いた方法については論文掲載されており¹⁸⁾、現在 ECVAM において評価継続中である。

C-5-3 眼刺激性

①概要

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、虹彩の変化及び角膜の混濁度を指標とする刺激反応である。眼刺激性試験はヒトが眼に単回適用、あるいは誤って入れた場合に生じるこれらの反応を予測するために実施される。今日まで、眼刺激性試験としては、成熟白ウサギを用い、0.1g 又は 0.1mL の被験物質をその結膜嚢内に投与し、Draize 採点法によりその刺激性を判定し、Kay ら¹⁾の基準で評価する方法が用いられてきた。

眼刺激性試験代替法には、受精鶏卵、各種生体細胞及び人工組織モデル系に被験物質を適用し、その結果生じる組織変化や細胞の生存率を指標とする *in vitro* 試験等がある。これら試験法のうち、2009 年 9 月に腐食性及び強度眼刺激性物質を検出するための眼刺激性試験の代替法である BCOP 及び ICE はそれぞれ TG 437 及び 438 としてガイドライン化^{2, 3)}されているが、2010 年には BCOP 及び ICE 試験の補充に関するドラフトガイダンスドキュメントに対する意見募集が行われた⁴⁾。また、2010 年には Cytosensor Microphysiometer™ (CM) と Fluorescein Leakage (FL) の OECD ドラフトテストガイドラインの意見募集も行われている⁵⁾。ECVAM は 3 次元培養モデルでのバリデーションを実施している。

②眼刺激性試験代替法の状況

2009 年 9 月に腐食性及び強度眼刺激性物質を検出するための眼刺激性試験代替法である BCOP 及び ICE はそれぞれ TG 437 及び 438 としてガイドライン化された^{2, 3)}。2009 年 11 月に ICCVAM は OECD へ BCOP、ICE 試験の補充に関するドラフトガイダンスドキュメントを送付した。これは、無眼刺激性物質を選定するための BCOP、ICE 試験における組織病理学的評価とデータ収集のために作成されたドラフトガイダンスである。

このドラフトガイダンスドキュメントについては 2010 年 4 月 23 日までの期限で意見募集がされた⁴⁾。

OECD は細胞毒性に基づく 2 種類の眼刺激性試験法、Cytosensor Microphysiometer™ (CM) と Fluorescein Leakage (FL) のドラフトテストガイドラインについて 2010 年 9 月 3 日を期限とする意見募集を行った。Cytosensor Microphysiometer™ (CM) については、その後、2011 年 2 月 5 日を期限とする意見募集が行われた⁵⁾。CM 試験は水溶性の物質と混合物の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法、及び水溶性の界面活性剤と水溶性の界面活性剤配合の混合物に対して無刺激性を確認するための試験法である⁶⁾。FL 試験は水溶性物質と混合物の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法である⁷⁾。

米国、欧州及び日本における眼刺激性試験代替法の受け入れ状況は以下のとおりである。

米国では、2010 年 9 月に ICCVAM の最終推薦書が連邦機関に送付された⁸⁾。この中で、

眼刺激試験に動物を使用するときは必ず麻酔を用い、人道的配慮をすることを推薦している。また、ICCVAMはCMを重篤な眼刺激を引き起こす可能性を持ったある種の水溶性物質の同定のスクリーニング試験として用いることができることを推薦している。限られた範囲の特定の被験物質（すなわち、水溶性物質と混合物）はCM試験で陽性となった場合は動物を用いた追加試験を行うことなく、重篤な眼刺激性を有すると分類することができる。CM試験はいくつかの物質（水溶性界面活性剤および、いくつかの化粧品やパーソナルケア製品のような界面活性剤を含む処方）について物質や製品が眼のハザードを表示する必要があるような眼の損傷を引き起こすものではないことを判断することに用いることができる。連邦機関により受け入れられた場合、CM試験は米国においてこの目的での初めての*in vitro*試験となる。CM試験において反応する化学物質は分類するために追加的な試験（*in vitro*あるいは/または*in vivo*）が必要である。CM試験は軽度または中等度の眼刺激物を同定する目的としては適当であるとは考えられていない。その他、ICCVAMは米国EPAの規制として、殺菌剤として用いられる製品の眼刺激性ハザードの同定に提案された*in vitro*眼刺激性試験の戦略を評価し推薦も行っているが、EPAの眼刺激ハザード分類を行う上では、データ不十分であり、更なる研究が必要であることを推奨している。

欧州では、ECVAMにより3次元培養モデル（SkinEthic™ Human Corneal Epithelial Model、EpiOcular™ OCL-200 Model）のバリデーションが実施されている。

ESACは腐食性及び強刺激性物質の検出する眼刺激性試験代替法としてBCOPとICEを承認した。BCOP又はICEを実施し、いずれかで陽性結果が得られた場合には、その化学物質を強度眼刺激性（R41）に区分することを受け入れている⁹⁾。

2009年7月にESACは水溶性物質（及びこれらの混合物）の眼腐食性と強刺激性並びに水溶性の界面活性剤（及びこれらの混合物）の無刺激性を確認するための試験法としてCMを、水溶性物質（及びこれらの混合物）の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法としてFLを承認した¹⁰⁾。

ESACのステートメントにおいては、一般に単独の*in vitro*眼刺激性試験ですべての眼刺激性分類を行うことはできないが、いくつか

の試験法の組み合わせによる段階的方法（Tiered approach）によりDraize試験を代替することができるかもしれないことも示された。その段階的方法に関する枠組みとしてはECVAMワークショップで議論され、強刺激性から検出するトップダウンアプローチ又は無刺激の同定から始めるボトムアップアプローチ、これらによって刺激性の全体を明らかにしようとするものである¹¹⁾。

日本では、2008年度に日本代替法検証センター（JaCVAM）の第三者評価会議（眼刺激性試験代替法評価委員会）においてBCOP及びICEの第三者評価がおこなわれ、2009年9月に報告書が提出されている^{12) 13)}。報告書では、BCOPとICEはわが国のGlobally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals（GHS）に準拠する化学物質に関わる法規制において、腐食性・強刺激性物質を評価できるとの考えが示された。2010年度には、第三者評価会議は細胞毒性試験及び3次元培養真皮モデルを用いる試験に関する評価を実施している¹⁴⁾。

2007年度から実施されてきた厚生労働科学研究（H19-医薬一般-003）「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会」が2009年度末に終了する。このことを受けて、検討会で組織された眼刺激性分科会は、2009年12月に、眼腐食性・強刺激性物質の評価法と位置づけられているBCOP及びICEの医薬部外品申請における眼刺激性試験代替法としての受入れについて、無刺激・低刺激性物質を評価可能であることを検討する必要と考えられること等を報告した¹⁴⁾。また、厚生科学研究などの報告に基づく検討等から、医薬部外品に用いられる眼刺激性試験法としては、Draize試験法の評価点MAS（最大平均評価点）として15点を境界線として弱刺激を判断する考え方も示されている¹⁵⁾。

2009年に日本動物実験代替法学会で実施された単層培養細胞に直接被験物質を短時間接触させることにより眼刺激性を評価する代替法であるSTE法（Short time exposure）のバリデーションが終了した¹⁴⁾。国際的なバリデーション評価に向けた準備が進められている。

C-5-4 皮膚アレルギー性

①概要

2010年度の感作性試験の代替試験法の動

向として以下の3点があげられる。

1) 2010年7月に、非RI-LLNA (LLNA:DA¹¹ 及び LLNA:BrdU-ELISA²¹) が OECD テストガイドラインに収載され、rLLNA³⁾ が OECD テストガイドライン Test No. 429 に加えられた。

2) *in vitro* 感作性試験代替法である DPRA⁴⁾、h-CLAT^{5), 6)} 及び MUSST⁷⁾ のプレバリデーションが進められている。

3) ハイスループット型の *in vitro* 感作性試験代替法として、ヒト細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ系の開発が進められている^{8), 9)}。

②各試験法の状況

放射性の LLNA³⁾ は、マウス *in vivo* 試験であり、いわゆる Reduction 及び Refinement を意図した代替法と位置づけられる。この LLNA は、放射性物質の ³H-thymidine を用いて細胞の増殖性を測定するためのラジオアイソトープ施設を必要とする試験法であるため、より簡便な非放射性の LLNA (LLNA:DA¹⁰⁾ 及び LLNA:BrdU-ELISA¹¹⁾ の開発が進められてきた。LLNA:DA は、被験物質の投与方法の改良に加え、³H-thymidine の代わりに ATP 量でリンパ節細胞の増殖性を測定する。この試験法は、JaCVAM 評価会議において承認され、2008年11月に新規試験法として行政に提案された¹²⁾。LLNA:BrdU-ELISA は、³H-thymidine の代わりに BrdU を用いてリンパ節細胞の増殖を測定する。この試験法は JaCVAM 評価会議において承認され、2010年5月に新規試験法として行政に提案された¹³⁾。また、両試験法は、ICCVAM において第三者科学専門家委員会によってピアレビューされ、2009年6月に制限付で感作性、非感作性物質の識別に利用可と結論づけられた¹⁴⁾。2010年7月には OECD テストガイドラインに収載された^{11), 21)}。従来の LLNA で使用動物数が削減された rLLNA は、2009年に ICCVAM で承認され¹⁵⁾、LLNA の試験法のプロトコールと実施基準が2009年9月にアップデートされた¹⁵⁾。2010年7月には OECD テストガイドライン Test No. 429 に加えられた³⁾。

in vitro 感作性試験代替法として DPRA、h-CLAT 及び MUSST が提案されている。DPRA⁴⁾ は、P&G によって開発された試験法で、システインあるいはリジンを含む合成ペプチドと化学物質をインキュベーションした後のペプチドの残存量(化合物とペプチドが反応すれば、ペプチドは減る)を指標とする。

h-CLAT^{5), 6)} は、花王株式会社と株式会社資生堂によって開発された試験法であり、ヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞を用いて化学物質曝露時における細胞表面 (CD86 と CD54) 発現量の変化をフローサイトメトリーで評価する。この試験法の有用性を確認するため、100 化合物に関して評価した結果、LLNA の結果との一致率は 84% であることが報告されている¹⁵⁾。また、本試験の概要と応用について、2010年1月20日に JaCVAM 第3回ワークショップ(h-CLAT シンポジウム)が開催された¹⁷⁾。MUSST⁷⁾ は、ロレアルによって開発された試験法で、ヒト単球由来細胞株である U937 細胞を用い、化学物質曝露時の細胞表面の CD86 の発現量変化をフローサイトメトリーで評価する。これら3つの試験法は2009年から ECVAM においてプレバリデーションが進められている。

さらに、ハイスループット型の *in vitro* 感作性試験代替法として、レポーター遺伝子アッセイ系の KeratinoSens が提案された⁸⁾。antioxidant response element (ARE) 配列を組み込んだルシフェラーゼレポーター遺伝子をヒト角化細胞株の HaCaT に定常的に導入し、本試験系を用いて 67 化合物を評価した結果、LLNA との良好な一致性が得られた⁸⁾。また、「NEDO 高機能簡易型有害性評価手法の開発プロジェクト」の1つとして、ヒト細胞株を用いたレポーター遺伝子アッセイ系が報告された⁹⁾。IL-8 のプロモーターを組み込んだルシフェラーゼレポーター遺伝子を THP-1 細胞に定常的に導入したクローン細胞を用いて、多くの化合物を評価した結果、LLNA との良好な一致性が得られた⁹⁾。

光感作性試験については、現在、バリデーションに進んでいる代替法はないが、THP-1 細胞の CD86 と CD54 や末梢血単球由来樹状細胞の CD86 の発現量変化を指標とした試験法が報告されている^{18), 19)}。

C-5-5 変異原性

①概要

変異原性試験はその種類も多く、*in vivo*、*in vitro* 法などさまざまなものがある。本年度の特筆すべき動きは、2010年7月に *in vitro* 哺乳類細胞小核試験が OECD ガイドライン 487 として採択されたことが挙げられる¹⁾。また、感度の高い DNA 損傷の検出法としてコメットアッセイの開発や、変異原性試験ではないが長期発がん性試験の代替法として、形質転換試験の開発も進められている。

②状況

in vitro 哺乳類細胞小核試験は CHL/IU などの細胞に化学物質を処理したのち培養し、その培養細胞における小核形成の存在を調べることにより、化学物質の染色体異常誘発性をみるための試験である。染色体異常試験と比較して、偽陽性の割合が少ない事、標本作成や観察が容易で熟練を要しないこと、染色体構造異常誘発性だけではなく、異数性も検出できることから注目されている。2010年7月に本法はOECDガイドライン487として採択された。

コメットアッセイは細胞をシングルセルに分散し、アガロースゲル中に包埋して電気泳動にかけることにより、個々の細胞のDNA損傷を検出する方法である。電気泳動した際の様子からコメットアッセイと呼ばれる。テイルに傷害されたDNAが存在し、テイルの量、長さなどからDNA損傷程度がわかる。既存の変異原性試験と比較して、労力の少ないこと、高感度であること、標本観察などに熟練を要しないこと、非分裂細胞に対する変異原性を評価できること²⁾など、さまざまな利点から近年注目されている試験系である。本法の国際バリデーション研究が日本環境変異原学会、哺乳類動物試験研究会を中心に、ECVAM、NICEATMの協力を得て実施されている³⁾。In vivo 試験と *in vitro* 試験のバリデーション研究が進められている。

一方、COLIPA等においても、化粧品原料について独自の *in vitro* 遺伝毒性評価アプローチを検討しており、多くの化粧品が適用される部位である皮膚に着目した各種3Dヒト皮膚モデルを活用した遺伝毒性試験(評価指標は小核とコメット)の開発に取り組んでいる。

現在、日米欧医薬品規制調和国際会議(ICH)では非臨床の安全性試験において、3Rsを促進するICHの義務に従い、ICH S2 遺伝毒性ガイドラインの改定が行われている。改定案では、試験動物数削減のための推奨がなされた内容となっている。2009年6月に東京にて会合が行われ⁴⁾、現在ガイドラインはSTEP3まで進んでいる。

C-5-6 反復投与毒性

①概要

欧州委員会とCOLIPAは反復投与全身毒性の分野での動物実験代替法開発に関する戦略開発を狙いとして、2500万ユーロずつ合計

5000万ユーロの出資を決め、研究のための提案募集が2009年7月30日~2010年2月3日に実施された¹⁾。このプロジェクトは欧州第7次枠組みプログラム(FP7)における調整活動であるAXLR8の傘下に入って進められる²⁾。

欧州委員会の保健・消費者保護総局DG SANCOは2010年7月23日~10月15日に、2013年に禁止される試験について、各試験法のドラフトレポートを貼り付け、意見を募集した³⁾。そのレポートの第1章が反復投与毒性である。参画した専門家の結論は、規制に受け入れられる試験/戦略を伴った動物試験の完全置換法は2013年までに出来ないであろうとの評価であった。反復投与毒性の完全置換は非常に困難であり、目的を達成するために必要となる時間は、研究開発の進展と優先順位付け、資金調達、取り組みの調整によるであろうとしている⁴⁾。

②状況

反復投与毒性は化学物質の長期暴露により細胞、組織、多くの臓器に進行的に誘発される機能障害であり、動物を用いた反復投与毒性試験では広範なエンドポイント(一般状態、体重、摂餌量、臨床検査、血液・血液化学的検査、尿検査、病理組織学的検査など)が評価されている。そのため、代替法としては各 *in vitro* 臓器モデルについて障害を予測する試験系、毒性指標の研究が行われている。

肝臓と腎臓をターゲットとした研究は、ECVAMのSTREP projectのPREDICTOMICSにおいて、毒性物質による細胞の初期変化で特異的に発現する機能的な指標の確認が行われた。PREDICTOMICSは、2007年12月に終了し、プロジェクトのウェブサイトにおいて、薬物、外来異物による肝臓と腎臓の慢性毒性を予測するための基盤技術などに関する成果が公開されている⁵⁾。

肝臓においては、Histone deacetylases (HDAC) 阻害剤処理ラット初代培養肝細胞が、培養中に表現型を維持しており、適切なモデルとなることが確認された。また、ヒト肝がん由来のHepG2細胞においてCYP群の遺伝子発現の欠除に、転写因子(HNF4)、並びに補助活性化因子と補助抑制因子(SRC1, SRC2, PGC1 α , PCAF)が役割を担っていることが確認された。さらには、薬剤性脂肪肝を再現する *in vitro* 実験操作が開発され、遺伝子、プロテオーム、細胞レベルでの解析により様々な指標物質が確認され、これらを統合し

た戦略によりこの種の肝毒性物質を同定できることが明らかになった。

腎臓においては、最適化、安定化、特性確認された *in vitro* 腎毒性検出法（単及び共培養法）が確立された。また、多数の Cytomic 分析が *in vitro* の毒性を試験するために有用であることが確認され、適用の容易さ、毒性的妥当性、感受性に基つき LDH 遊離（細胞毒性）、BrdU 取り込み（DNA 合成）及び Resazurin 還元（相対的生存細胞数）が有望な指標として選択された。さらには、無血清単層培養した HK-2 細胞（ヒト近位尿管上皮細胞）を致死濃度以下の被験物質で 12 又は 48 時間処理し、遺伝子表現型を分析することにより、多くの既知腎毒性物質による細胞障害と関連していると考えられる多数の遺伝子が同定された。

一方、血液・免疫毒性に関しては、2006 年 3 月に Colony Forming Unit-Granulocyte/Macrophage assay (CFU-GM assay; 顆粒球・マクロファージ系前駆細胞を用いたコロニー形成試験) が二次的な動物種（イヌ）の試験の代替法という限定つきながらもヒト急性好中球減少症を予測する代替法として ESAC (24 回会議) による承認を受けた⁶⁾。CFU-GM assay はマウス骨髄及びヒト臍帯血中の単核細胞を培養し、その増殖（コロニー形成能）を指標とする試験である。マウス最大耐量データの有用性に依存するところがあり、完全な置換法では無いが動物数を削減できるとされている。

このように主要な臓器を標的とした毒性を予測するための *in vitro* 試験法の開発が進められているが、更なる研究の進展、戦略の開発が望まれている。

欧州委員会がヒトでの安全性評価における反復投与全身毒性の Replacement に向けて研究の提案を募集した内容は以下の 7 項目である。

- ・ヒトベースの標的細胞へと *in vitro* で機能分化させる現在の方法論の最適化と新奇方法の開発
- ・慢性毒性試験の代替としての器官をシミュレートする細胞デバイスの開発
- ・反復投与全身毒性試験に関連したヒトベースの標的細胞におけるエンドポイント及び媒介マーカーの確立
- ・コンピューターモデル化と評価技術
- ・外挿の要因となるコンピューターモデルの開発のためのシステム生物学

- ・統合的データ解析とサービス
- ・プロジェクトの調整

それぞれの項目は 3、4 のサブ項目が設定された。

反復投与毒性の代替法開発に関する現状は一部の主要臓器で極めて限定的に検討されている。異なった組織やシステム間の相互作用を考慮した統合的な研究はまだ始まったばかりである。既存の手法の多くは有害性確認には有効かもしれないが化粧品のリスク評価には不向きである。今後、欧州における多額の資金投入と AXLR8 による調整活動によりこの分野の研究が進展すると予測されるが、2013 年までの代替法の受け入れは不可能と思われる。

C-5-7 生殖発生毒性

①概要

生殖発生毒性試験を代替する試験法は、出生前発生に関する代替法である胚性幹細胞試験 (Embryonic stem cell test for embryotoxicity, EST)、マイクロマス試験 (Micromass embryotoxicity assay, MM) 及び全胚培養試験 (Whole rat embryo embryotoxicity assay, WEC) の 3 試験が ESAC により 2001 年 10 月に承認された¹⁾。

欧州第 6 次枠組みプログラム (FP6) におけるプロジェクトである ReProTect^{2), 3)} は、2004 年 7 月から 5 年 6 ヶ月間、2009 年 12 月まで進められた。20 以上の代替法が開発又は最適化され、再現性や技術移転性が研究された。全体で 100 以上の物質がピアレビューのために検討され、統計解析がなされた⁴⁾。最終年には、開発された 14 の *in vitro* 試験のリングトライアルが、ブラインド化された 10 物質を用いて行われた。In vitro 試験による予測の結果は良好であり、ここで用いた証拠の重み付けを伴う解析は将来の活動へ向けての可能性を感じさせた⁵⁾。

欧州委員会の保健・消費者保護総局 DG SANCO は 2010 年 7 月 23 日～10 月 15 日に、2013 年に禁止される試験について、各試験法のドラフトレポートを貼り付け、意見を募集した¹⁾。そのレポートの第 5 章が生殖発生毒性である。参画した専門家の結論は、最も高感度なエンドポイントを検出するための *in vivo* データの解析、代替法のツールボックスの明確化、戦略上の不足部分をカバーするための代替法追加開発の必要性の最終化には 10 年以上を要するとするというものであった。

②状況

生殖発生毒性代替法である胚性幹細胞試験、マイクロマス試験、全胚培養試験は、広い範囲の生殖発生毒性をカバーする方法でなく、いずれも胎児毒性に限定された試験法である⁶⁾。胚性幹細胞試験は最初の段階で動物から胚性幹細胞を採取するが、その後は全く動物を使用することがないため *in vitro* 試験といえるが、胎児から未分化細胞を取り出し増殖能を確認するマイクロマス試験や母胎から胎児を取り出して培養する全胚培養試験は動物を用いるため、動物数削減という意味での代替といえる。現在の検討の方向性は、これら3種の代替法のデータを用いて総合的に胎児毒性を判断していくことにある。なお、3種の試験法はいずれも ESAC により承認されたものの、ECB (European Chemicals Bureau) のマニュアル並びに OECD 試験法ガイドラインに掲載されていない。

ReProTect は哺乳類の生殖発生過程を Fertilization (受(授)精・受胎能)、Implantation (着床) 及び Prenatal development (出生前発生) の3研究領域に分割し、これらを繋ぐ Cross-cutting technologies (横断研究) を各 W.P. (Work package) として、20以上の試験法の開発が進められた。

最終的に、14の試験法のバッテリーにより、「実現可能性研究 (Feasibility Study)」と称されるリングトライアルが行われた。プラインド化された10物質を用いて、EC₅₀ またはそれと同等のエンドポイントが測定され、証拠の重み付けを伴う解析がなされた。その結果、*In vitro* 試験による予測の結果は良好であった。ここで用いた証拠の重み付けを伴う解析は将来の活動へ向けての可能性を感じさせた⁷⁾。

選定された試験法を以下に示した。括弧内はエンドポイントである。

・内分泌かく乱

- ①アンドロゲンレセプター結合試験
(アンドロゲンレセプターへのラベルしたリガンドの結合)
- ②アンドロゲンレセプター化学的活性化・ルシフェラーゼ発現試験
(レセプタープラスミドに作動するアンドロゲンレセプター成分-プロモーターのルシフェラーゼ活性)
- ③PC-3-アンドロゲンレセプター-ルシフェラーゼ-MMTV 試験

(レセプタープラスミドに作動するアンドロゲンレセプター成分-プロモーターのルシフェラーゼ活性)

- ④エストロゲン結合試験
(エストロゲンレセプターへのラベルしたリガンドの結合)
- ⑤エストロゲンレセプター化学的活性化・ルシフェラーゼ発現試験
(レセプタープラスミドに作動するエストロゲンレセプター成分-プロモーターのルシフェラーゼ活性)
- ⑥ERE-β Glob-Luc-SVNeo を安定導入した MCF-7 細胞 (ER+) 試験
(レセプタープラスミドに作動するエストロゲンレセプター成分-プロモーターのルシフェラーゼ活性)

・受胎能

- ⑦卵胞バイオアッセイ (マウス)
(卵巣の機能、卵形性、排卵刺激における13日目の極体卵母細胞)
- ⑧ウシ *in vitro* 成熟試験
(成熟段階中期 II の良好な成果; 中期 II への減数分裂の終了)
- ⑨ウシ *in vitro* 受精試験
(ウシ精子の成熟卵母細胞への透過および雌雄前核の形成)
- ⑩マウス胚周囲着床試験
(未分化胚芽細胞段階における8日目の生存)
- ⑪イシカワ細胞試験
(プロゲステロン受容体の mRNA レベル)

・胚発生

- ⑫全胚培養
(ラット胎仔の成長と形態)
- ⑬胚性幹細胞試験
(マウス胎児の心筋細胞を拍動させる分化の50%阻害濃度)
- ⑭ReProGlo 試験
(マウス胎性幹細胞のレセプタープラスミドを作動させる Tcf/Lef プロモーターのルシフェラーゼ活性)

日本においても NEDO のプロジェクトのなかで発生毒性試験の開発が進められた⁸⁾⁻¹⁰⁾ ウス ES 細胞を用いた簡便で汎用性の高いレポータージーンアッセイが構築された。複数の化合物を用いて有用性を検証し、既存 EST 法と同等以上の予測率を示すことを明らかにしている。また、全胚培養試験を更に *in vivo* の結果に近づけるために、母体の代謝能力を

組み入れる手法として、培養液中にラット S-9mix を加えた方法の検討が行われた。さらに、使用動物数削減のため、培養液のラット血清量を減らしても正常に培養ができるような培養装置の改良も行われた。

このほか、内分泌攪乱化学物質のスクリーニング法の研究が進められている¹¹⁾。HeLa-9903 細胞を用い、エンドクラインレセプター α への結合を指標とするレポーター遺伝子アッセイは、2009年9月7日に OECD ガイドライン 455 として採択された¹²⁾。一方、アンタゴニストの検討については 5 施設によるバリデーション研究が実施されている¹³⁾。また、BG-1Luc4E2 細胞を用い、エンドクラインレセプター α への結合を指標とするレポーター遺伝子アッセイである Lumi-cell 法は、国際バリデーション研究を終え、専門家による第三者評価の準備をしている段階である¹³⁾。

以上、生殖発生毒性を予測するための *in vitro* 試験法の開発が進められ、一部においては ESAC の承認が得られ、領域毎に有望な方法が開発されつつあるが、生殖発生毒性の検討項目の多さ、複雑さを考えた時、化粧品指令第 7 次改正の期限である 2013 年までに規制に用いることのできる代替法の承認は不可能であると思われる。

C-5-8 経皮吸収性

経皮吸収試験は化粧品、医薬部外品及び医薬品等の皮膚への適用による角質、表皮及び真皮への透過ならびに全身的暴露を評価するために行われる。経皮吸収試験代替法については、実験動物を用いた *in vivo* 試験法 (TG 427)¹⁾ と同時に、動物 (主にラット及びブタ) 又はヒト摘出皮膚を用いた透過拡散セルによる *in vitro* 試験法 (TG 428)²⁾ が標準化されている。現在、このガイドラインが経皮吸収試験代替法の中心的な役割を担っている。2006 年 3 月アップデートされた SCCP の“化粧品成分の皮膚吸収における *in vitro* 評価基準”においても、原則的に TG 428 の遵守が求められている³⁾。TG 428 を含めた *in vitro* 試験法において、皮膚の選定、難溶性物質のレセプター相の選択、試験物質の物性など、幾つかの考慮すべき点も報告されている⁴⁾。

OECD は「経皮吸収に関するガイダンス注記」ドラフト⁵⁾について 2010 年 12 月 20 日期限で意見募集をしており、*in vivo/in vitro* 実験データ評価における課題解説、*in*

vivo/in vitro 動物、*in vivo* ヒトデータの組み合わせ (トリプルバック) アプローチの推奨、実験データ不在の場合の経皮吸収予測に関する解説が示されている。

SCCS は、2010 年 6 月の第 7 回 SCCS 総会で「化粧品成分の皮膚吸収の *in vitro* 評価のための基本的規準」を採択した⁶⁾。内容として、経皮吸収に用いる皮膚のサンプル必要数、皮膚質量、経皮吸収係数の相対標準偏差に関する項目などが記載されている。

TG 428 の改良として、代替材料については、再構築ヒト皮膚モデルが最も研究されている。6 種の再構築皮膚モデルを用いた透過性が比較され、再構築皮膚モデルの透過性はそれぞれ異なっている事、ヒト皮膚とは代謝能が異なる事が報告されている^{7,8,9)}。

その他、角層モデルとしてのシリコーン人工膜¹⁰⁾ やこれを用いた揮発性物質の透過性評価法も検討されている¹¹⁾。皮膚モデルとしてのラミネート透析膜を用いて、BSA を内包したモデルが炎症モデルとして検討されている^{12,13)}。合成高分子膜を用いたモデルとして、PMDS (ポリジメチルシロキサノクロスポリマー) / PEG6000 を用いたモデルがヒト皮膚との透過係数が近く、代替物としての可能性が検討されている^{14,15)}。

シミュレータによる検討も近年なされており、*in silico* モデルである ADME SimulatorTM (Simcyp) を用いて動物試験を代替する検討をおこない、良い相関を示したことが報告されている¹⁶⁾。

反復投与による経皮吸収試験については限られた試験期間以内の反復投与でデザインされたいくつかの試験法はあるが、現在、標準化された反復局所投与に利用できる *in vitro* 試験法はなく、代謝を組み込んだ皮膚吸収/透過に利用できる *in vitro* 試験法もない。また、ヒトボランティアによる皮膚吸収試験は、化粧品原料や化粧品製品の低い毒性の場合において行うことができるが、利用できるヒトのデータはほとんどないのが実情である¹⁷⁾。

C-5-9 小括

本年度の代替法の開発と評価に関する状況を安全性評価項目ごとに取りまとめた。その結果、本年度の特筆すべき動きは、2010 年 7 月に再構築ヒト表皮試験が OECD テストガイドライン 439 として、LLNA : DA が 442A として、LLNA : BrdU-ELISA が 442B として、*in vitro* 哺乳類細胞小核試験が 487 として採択された

ことが挙げられる。また、OECD テストガイドライン 429 が改訂され rLLNA が加えられたことも挙げられる。

今後の代替法開発と評価において注目される試験法は、反復投与による全身毒性試験、並びに感作性試験であろう。すなわち、化粧品指令第7次改正で2009年に禁止される試験法から2013年の試験法へと力点が移りつつある。欧州委員会及びCOLIPAは、5000万ユーロの投入して反復投与全身毒性の分野での動物実験代替法開発に関する戦略開発を行っている。このプロジェクトは第7次Framework Programme on Research and Development (FP7)における調整活動であるAXLR8の傘下に入って進められている。また、ECVAMにおいて3種の*in vitro*感作性試験代替法、DPRA、MUSST及びh-CLATのプレバリデーションが開始されたこと等にその傾向が表れている。

D. 結論

本年度の代替法の開発と評価に関する進展を概観すると、新規試験法のガイドライン化の観点では、2010年7月に再構築ヒト表皮試験がOECDテストガイドライン439として、LLNA:DAが442Aとして、LLNA:BrDU-ELISAが442Bとして、*in vitro*哺乳類細胞小核試験が487として採択されたことが挙げられる。また、OECDテストガイドライン429が改訂されrLLNAが加えられた。日本では、JaCVAM評価会議が皮膚感作性試験代替法であるLLNA-BrDU法の新規試験提案書を2010年5月に行政に向けて提案したことが挙げられる。

代替法の活用の観点では、ICCR等の国際協調の流れを受けて、平成23年2月4日付で厚生労働省医薬食品局審査管理課から事務連絡「医薬部外品の承認申請資料作成時における動物実験代替法の利用とJaCVAMの活用について」が通知されたことが挙げられる。ここには、2006年に通知された事務連絡「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」収載の代替法利用記載の再確認とJaCVAMでの評価の活用の周知が示された。

代替法開発体制の観点からは、EUにおいて第7次Framework Programme on Research and Development (FP7)として2010年1月よりAXLR8 (accelerate)という代替法開発の調整活動が動き出したことが挙げられる。米国においては、北米初の代替法関連学会である

American Society for Cellular and Computational Toxicology (ASCCT) の設立が挙げられる。コンピューターによる毒性予測研究の更なる進展が期待される。また、2010年7月13日～15日に第4回化粧品規制協力国際会議 (ICCR-4) がトロント (カナダ) で開催され、規制当局はICATMから日米欧各国の化粧品に関する代替法の問題点や進捗状況について報告を受け、確認し、ICATMの活動への協力、調整、支援を継続することについて合意したことも挙げられる。日本では、2010年度より新たな厚生労働科学研究費補助金研究 (予定期間3年) が開始されたことが挙げられる。

代替法関連の法規制の観点からは、欧州において、欧州委員会の保健・消費者保護総局DG SANCOは2013年に禁止される試験について、各試験の専門家の意見というレポートをウェブに掲載し、意見募集したことが挙げられる。このレポートでは、動物試験を実施した原料を配合した化粧品のEU域内での販売が2013年に禁止される反復投与毒性、感作性、発癌性、毒物動態、生殖毒性について、2013年までにこれらの試験の代替法の確立は困難と記述されている。2011年に欧州委員会はこれらの2013年に禁止される試験について(禁止を延期するかどうか)の最終報告書を公表予定である。

代替法の開発と評価は、非常に長い年月を要するためガイドラインとして文書化された場合は別として、単年度では明確にその全貌を捉えることは困難である。したがって、本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進し、さらには今後の国際協調への参考情報とするためには、関連する国際情勢の調査と解析を継続して実施し、積み重ねていく必要があると考える。

E. 健康危険情報

なし

F. 参考文献

EUにおける動物実験禁止と代替法開発の動向 (C-1) 関連

- 1) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003, Official Journal of the European Union, L66/26, 2003
- 2) http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/documents/public_consultat

- ion/index_en.htm
- 3) <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:EN:PDF>
 - 4) http://www.effci.org/assets/files/EFFCI_PS/COLIPA-EffCI.pdf
 - 5) CTPA News update, February 6, 2003.
 - 6) CTPA News update, March 3, 2003.
 - 7) http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/html/cosm_animal_test.htm
 - 8) <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
 - 9) <http://www.acutetox.eu>
 - 10) <http://www.sens-it-iv.eu/content/newsletter.php>
 - 11) <http://www.predict-iv.toxi.uni-wuerzburg.de/>
 - 12) <http://axlr8.eu/overview/>
 - 13) <http://axlr8.eu/axlr8-2010-progress-report.pdf>
 - 14) http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-439-in-vitro-skin-irritation_9789264090958-en
 - 15) http://ecvam.jrc.it/f_home.cfm?voce=m&idvoce=6
 - 16) <http://www.oecd.org/dataoecd/29/57/45584550.pdf>
 - 17) <http://web.jrc.ec.europa.eu/callsfortender/index.cfm?action=app.showdoc&id=3634>
 - 18) <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/page.cfm?voce=s&idvoce=130&idmm=1&idsm=130>
 - 19) http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sces_s_002.pdf
 - 20) http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sces_s_003.pdf
 - 21) http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index_en.htm
 - 22) http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/3_2_conf_2010.htm
 - 23) http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm
 - 24) http://ec.europa.eu/enterprise/reach/index_en.htm
 - 25) <http://ecb.jrc.it/reach/>
 - 26) <http://www.nikkakyo.org/reach/>
 - 27) <http://www.healthncpnet.eu/jahia/Jahia/site/health-ncp-net/lang/en/pid/153>
 - 28) De Silva, O. et al., The COLIPA research programme. Abstracts 6th World Congress 2007, 279, 2007
 - 29) McNamme, P. et al., Update on the COLIPA research programme for development of *in vitro* methods for eye irritation. Abstracts 6th World Congress 2007, 61, 2007
 - 30) Aeby, P. et al., The COLIPA strategy for developing and pre-validating *in vitro* alternatives for skin sensitization testing. Abstracts 6th World Congress 2007, 70, 2007
 - 31) Pfuhrer, S. et al., Towards animal-free genotoxicity testing: the COLIPA strategy. Abstracts 6th World Congress 2007, 66, 2007
 - 32) Ryan, C. et al., Further examination of a human cell line activation test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential. Abstracts 6th World Congress 2007, 253, 2007
 - 33) Ovigne, J-M. et al., The U937/CD86 harmonized *in vitro* assay protocol for the prediction of skin sensitization potential moving forwards a COLIPA ring study. Abstracts 6th World Congress 2007, 247, 2007
 - 34) Aeby, P., et al. "Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program". *Toxicol. in Vitro*, 24, 1465-1473 (2010)
 - 35) *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2009, 54, 188-196.
 - 36) *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2009, 54, 197-209.
 - 37) *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2010, 57, 315-324.
 - 38) Press release of COLIPA, June 22, 2010, "Researchers share their findings at Colipa Skin Tolerance Workshop@"
 - 39) <http://www.bfr.bund.de/>
 - 40) <http://www.nc3rs.org.uk/>
 - 41) <http://www.frame.org.uk/>
 - 42) <http://www.forschung3r.ch/en/>
 - 43) <http://www.nca-nl.org/>
 - 44) <http://www.setox.eu/IUTOX2010.pdf>
 - 45) <http://www.estiv.org/>
 - 46) <http://www.altex.ch/en/>

米国における代替法開発の動向 (C-2) 関連

- 1) Draft Implementation Plan for the 2008-2012 NICEATM-ICCVAM Five Year Plan, June 2009, <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/5yearplan.htm>
- 2) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-app.htm>
- 3) Federal Register /Vol. 75, No. 180 / Friday, September 17, 2010 /Notices, 57027-57029, <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2010-09-17/pdf/2010-23262.pdf>
- 4) <http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/Implement-2011/ImplmntWksp.htm>
- 5) http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPanelWebSum.pdf
- 6) http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNA-LD/TMER.pdf
- 7) http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRRept2009.pdf
- 8) <http://titania.sourceoecd.org/vl=83705122/cl=18/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/vln4/s29/pl>
- 9) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/Transmit-2010.htm>
- 10) <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/annrpt/BiennialRpt2010-508r.pdf>
- 11) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine/endocrine.htm>
- 12) <http://www.asccto.org/index.cfm>
- 13) H. R. 5820, Toxic Chemicals Safety Act of 2010 <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/BILLS-111hr5820ih/pdf/BILLS-111hr5820ih.pdf>
- 14) The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, CTFA Safety Evaluation Guidelines, 2007

その他の国際的な代替法開発の動向 (C-3) 関連

- 1) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html
- 2) http://puck.sourceoecd.org/vl=5308736/cl=11/nw=1/rpsv/periodical/p15_about.htm?jnlissn=1607310x
- 3) Test No. 439: *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test

Method

- (http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-439-in-vitro-skin-irritation_9789264090958-en)
- 4) Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *in vitro* Skin Irritation Testing (<http://www.oecd.org/dataoecd/19/36/43670220.pdf>)
- 5) Test No. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA (http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442a-skin-sensitization_9789264090972-en)
- 6) Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA (http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442b-skin-sensitization_9789264090996-en)
- 7) http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna_PeerPanel.htm
- 8) <http://jacvam.jp/effort/index.html>
- 9) Test No. 429: Skin Sensitisation Local Lymph Node Assay (http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en)
- 10) Test No. 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test (http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264091016-en)
- 11) The Cytosensor Microphysiometer Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying Chemicals Not Classified as Irritant, as well as Ocular Corrosive and Severe Irritant Chemicals (<http://www.oecd.org/dataoecd/17/43/46784020.pdf>)
- 12) Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants (<http://www.oecd.org/dataoecd/17/44/46784112.pdf>)
- 13) The H295R Steroidogenesis Assay (<http://www.oecd.org/dataoecd/40/25/46667710.pdf>)
- 14) Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study

- (<http://www.oecd.org/dataoecd/23/10/46466062.pdf>)
- 15) Transgenic Rodent Gene Mutation Assays (<http://www.oecd.org/dataoecd/15/27/46777174.pdf>)
 - 16) *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER) (<http://www.oecd.org/dataoecd/14/2/43295353.pdf>)
 - 17) *In Vitro* Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method (<http://www.oecd.org/dataoecd/63/6/43302385.pdf>)
 - 18) Guidance Document on using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests ([http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2010\)20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)20&doclanguage=en))
 - 19) Draft Guidance Document for the Derivation of an Acute Reference concentration (ARfC) (<http://www.oecd.org/dataoecd/13/49/45799595.pdf>)
 - 20) Draft Guidance Document: Supplement to Test Guidelines 437 and 438: The Bovine Corneal Opacity and Permeability and Isolated Chicken Eye Test Methods: Collection of Tissues for Histopathological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants (<http://www.oecd.org/dataoecd/21/14/44743444.pdf>)
 - 21) <http://www.mhlw.go.jp/bunya/iyakuhin/keshouhin/iccr04.html>
 - 22) http://www.pmda.go.jp/english/international/pdf/update/updates_20100805.pdf
 - 23) http://jacvam.jp/files/news/090427_icatm_e.pdf

日本における代替法開発の動向 (C-4) の動向

- 1) ECVAM, Statement of the ECVAM Science Advisory Committee (ESAC) on the Validity of *in Vitro* Tests for Skin Irritation, 2007 <http://ecvam.jrc.it/>
- 2) 小島肇ら, 培養皮膚モデル LacCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究 追加試験, 第23回日本動物実験代替法学会学術大会講演

要旨集, 105, 2010.

- 3) 小島肇ら, 眼刺激性試験代替法 (STE 試験) バリデーション研究 第3報, 第23回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 104, 2010.
- 4) 酒井ら, 化学物質の発がん性予測のための6-ウエルプレートを用いる Bhas42 細胞形質転換試験の国際バリデーション研究, 第23回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 119, 2010.
- 5) <http://www.env.go.jp/council/14animal/y140-25/mat05.pdf>
- 6) <http://www.nedo.go.jp/kankobutsu/pamphlets/23seika/seika/all.pdf>
- 7) <http://www.hourei.mhlw.go.jp/hourei/doc/tsuchi/T20110207E0020.pdf>

単回投与毒性 (C-5-1) 関連

- 1) Organisation for Economic Co-operation and Development. Chemicals Testing-Guidelines. (http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_t1_t1_t1,00.html)
- 2) ZEBET - Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments (<http://www.bfr.bund.de/cd/1591>)
- 3) Report of the International Workshop on *In vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity, NIH Publication No. 01-4499, August 2001
- 4) Clemedson, C. et al., Development of an *in vitro* test battery for the estimation of acute human systemic toxicity: An outline of the EDIT project. Evaluation-guided Development of New *In vitro* Test Batteries. ATLA, 30, 313, 2002
- 5) Ekwall, B. et al., EDIT - a New International Multicenter Programme to Develop and Evaluate Batteries of *In vitro* Tests for Acute and Chronic Systemic Toxicity. ATLA, 27, 339, 1999
- 6) ACuteTox - Research Project For Alternative Testing. Welcome to ACuteTox. (<http://www.acutetox.eu/>)
- 7) ACuteTox Final Newsletter October 2010. ACuteTox: Prevalidation, Highlights and Main Achievements of the Project

- (http://www.acutetox.eu/Final_newsletter_Oct_2010.pdf)
- 8) ToxRTool - Toxicological data Reliability Assessment Tool (<http://ecvam.jrc.it/index.htm>)
 - 9) H. J. Klimisch, et. Al., A systematic Approach for Evaluating the Quality of Experimental Toxicology and Ecotoxicological Data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 25, 1-5, 1997
 - 10) Federal Register, 69, 61504, 2004
 - 11) Casati, S. et al, Preliminary (Phase I) Results of a Validation Study to Evaluate the Reliability and Relevance of Two In vitro Cytotoxicity Assays for Predicting Rodent and Human Acute Systemic Toxicity, 41st Congress of the European Societies of Toxicology EUROTOX 2003, 2003
 - 12) Strickland, J. A. et al., Data Collection and Analysis Systems for an In vitro Cytotoxicity Validation Study, Society of Toxicology 43rd Annual Meeting, *The Toxicologist*, 50, 2004
 - 13) Stokes, W. S. et al., Results of the final phase of a validation study to evaluate in vitro cytotoxicity assays for estimating rodent acute systemic toxicity, *ALTEX*, 22, Special Issue, Abstracts 5th World Congress 2005, 196, 2005
 - 14) Background Review Document: In vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity, NIH Publication No. 07-4518, November 2006
 - 15) ICCVAM Test Method Evaluation Report: In vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Testing, NIH Publication No. 07-4519, November 2006
 - 16) JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods), 急性毒性試験代替法の第三者報告書 (http://www.jacvam.jp/files/news/2010_0601_news_public_acute_tox.pdf)
 - 17) Guidance Document on using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests ([http://www.oecd.org/officialdocument/s/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2010\)20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocument/s/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)20&doclanguage=en))
 - 18) Draft Guidance Document for the Derivation of an Acute Reference concentration (ARfC) (<http://www.oecd.org/dataoecd/13/49/45799595.pdf>)
 - 19) 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 (<http://www.pmda.go.jp/operations/notice/2006/file/jimu20060719.pdf>)
 - 20) The CTFA Safety Evaluation Guidelines, 2007
- 皮膚毒性 (C-5-2) 関連
- 1) Basketter, D. A. et al., Predictive testing in contact dermatitis: irritant dermatitis, *Clinics in Dermatology*, 15, 637, 1999
 - 2) York, M. et al., Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential, *Contact Dermatitis*, 34, 204, 1996
 - 3) Van de Sandt, J. et al., The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation, *ATLA*, 27, 723 1999
 - 4) ECVAM, Statement of the ECVAM Science Advisory Committee (ESAC) on the Validity of *in Vitro* Tests for Skin Irritation, 2007 <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
 - 5) SCCP/1145/07, Memorandum on the *in vitro* test episkin™ for skin irritation testing, adopted by the SCCP during the 14th plenary meeting on 18 December 2007
 - 6) ECVAM, Statement of the ECVAM Science Advisory Committee (ESAC) on the Validity of *in Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, 2008 <http://ecvam.jrc.it/>
 - 7) OECD, OECD test guideline 439; GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD-TG439.pdf>

- 8) SCCP/1392/10, Memorandum (addendum) on the *in vitro* test episkin™ for skin irritation testing, adopted by the SCCS during the 9th plenary meeting on 14 December 2010
- 9) Katoh M. et al., Assessment of human epidermal model LacCyte EPI-MODEL for *in vitro* skin irritation testing according to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) -validation protocol, The Journal of Toxicological Sciences, 34, 327, 2009
- 10) 小島肇ら, 培養皮膚モデル LacCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究 追加試験, 第23回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 105, 2010.
- 11) 医薬品食品衛生研究所, 新規試験法提案書「ヒト皮膚モデル(3次元皮膚モデル EPISKIN)を用いた皮膚刺激性試験代替法」JACVAM 評価会議, 平成22年3月4日
- 12) OECD, OECD test guideline 432; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test, <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg432.pdf>
- 13) Spielmann, H. et al., *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2., ATLA, 22, 314, 1994
- 14) 森眞輝ら, *In vitro* 光毒性試験の動物実験代替法としてのYeast-RBCアッセイの開発の提案, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 84, 2004
- 15) 田中憲穂ら, 酵母光生育阻害試験及び赤血球光溶血試験を用いた光毒性: バッテリーのバリデーション及び評価委員会での検討中間報告, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 85, 2004
- 16) 吉村功ら, 酵母-赤血球試験の光毒性試験代替法としてのバリデーション研究, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 86, 2004
- 17) 医薬品食品衛生研究所, 評価報告書「酵母光生育阻害試験法と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験代替法」JACVAM 評価会議, 平成22年1月
- 18) Lelièvre D. et al., The Episkin Phototoxicity Assay (EPA): Development of an *in vitro* Tiered Strategy using 17 Reference Chemicals to Predict Phototoxic Potency, Toxicol. *in vitro*, 21, 977, 2007
- 眼刺激性 (C-5-3) 関連
- 1) Kay, J. H. and Calandra, I. C., Interpretation of eye irritation tests, J. Soc. Cosmetic Chem., 13, 281, 1962
- 2) OECD Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, <http://www.oecdilibrary.org/oecd/content/book/9789264076303-en>
- 3) OECD Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, <http://www.oecdilibrary.org/oecd/content/book/9789264076310-en>
- 4) Draft Guidance Document on the Supplement to Test Guidelines 437 and 438: The Bovine Corneal Opacity and Permeability and Isolated Chicken Eye Test Methods: Collection of Tissues for Histopathological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants http://www.oecd.org/document/12/0,3746,en_2649_34377_1898188_1_1_1_1,00.html
- 5) Draft Test Guideline on the Cytosensor Microphysiometer Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying Chemicals Not Classified as Irritant as well as Ocular Corrosive and Severe Irritant Chemicals http://www.oecd.org/document/55/0,3746,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html
- 6) <http://www.oecd.org/dataoecd/17/43/46784020.pdf>
- 7) <http://www.oecd.org/dataoecd/29/37/45584293.pdf>
- 8) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/cutox/Transmit-2010.htm>
- 9) SCCS Memorandum on Alternative Test

Methods in Human Health Safety Assessment of Cosmetic Ingredients in the European Union
http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_001.pdf

- 10) Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell function based *in vitro* assays for eye irritation testing
http://ecvam.jrc.it/publication/ESAC31_CBA_eye-irritation_20091005.pdf
- 11) Scott, L. et al., A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. in vitro*, 24, 1, 2010
- 12) 眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書 評価対象試験：眼に対する腐食性及び強刺激性評価のためのウシ摘出角膜の混濁及び透過性試験法
- 13) 眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書 評価対象試験：眼に対する腐食性及び強刺激性評価のためのニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法
- 14) <http://www.jacvam.jp/effort/index.htm>
- 15) 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会報告要旨集

皮膚アレルギー性 (C-5-4) 関連

- 1) OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No. 442A: Skin Sensitization Local Lymph Node Assay: DA.
http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442a-skin-sensitization_9789264090972-en
- 2) OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No. 442B: Skin Sensitization Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA.
http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442b-skin-sensitization_9789264090996-en
- 3) OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No. 429: Skin Sensitisation Local Lymph Node Assay.
http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation_97

89264071100-en

- 4) Gerberick, G.F. et al., (2007) Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicological sciences*, 97, 417-427.
- 5) Ashikaga, T. et al., (2006) Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicology in vitro*, 20, 763-773.
- 6) Sakaguchi, H. et al., (2006) Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicology in vitro*, 20, 774-784.
- 7) Ovigne, J.M. et al., (2007) The U937/CD86 harmonized *in vitro* assay protocol for the prediction of skin sensitization potential moving towards a COLIPA ring study. 6th World Congress on Alternatives to Animal Testing, 247.
- 8) Emter, E. et al., (2010) Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 245, 281-290.
- 9) 相場節也ら, 免疫毒性評価用細胞、並びに免疫評価システムを開発, 日本動物実験代替法学会 第23回大会, プログラム/講演要旨集, 72, 2010.
- 10) Yamashita, K. et al., (2005) Development of a modified local lymph node assay using ATP measurement as an endpoint. *AATEX* 11, 136-144.
- 11) Takeyoshi, M. et al., (2001) Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol. Lett.* 119, 203-208.
- 12) 新規試験法提案書 皮膚感作性試験代替法 (LLNA-BrdU法) 平成22年5月 国立医薬品食品衛生研究所
- 13) 新規試験法提案書 皮膚感作性試験代替法 (LLNA-DA法) 平成20年11月 国立医

薬品食品衛生研究所

- 14) http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immuno_tox_docs/LLNAPRRept2009.pdf
- 15) <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/FR/FR-E9-23534.pdf>
- 16) Ashikaga, T. et al., (2010) A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: The human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern Lab Anim*, 38, 275-284.
- 17) <http://www.asas.or.jp/jsaae/info/20100120ws.html>
- 18) Hoya, M. et al., (2009) Development of an *in vitro* photosensitization assay using human monocyte-derived cells. *Toxicology in vitro*, 23, 911-918.
- 19) Karschuk N, et al., (2010) A novel in vitro method for the detection and characterization of photosensitizers. *PLoS One*, 5, e15221.

変異原性 (C-5-5) 関連

- 1) <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9748701e.pdf?expires=1298007432&id=0000&accname=freeContent&checksum=2E65B5700F2E10A8EE886FFC8A5665C2>
- 2) Fairbairn DW. et al., (1995) The comet assay: a comprehensive review., *Mutat Res.*, 339 (1) :37-59.
- 3) 小島 肇 (2009), *Fragrance Journal*, 1月号, 65-69.
- 4) ICH Public Conference, ICH Japan Symposium, Tokyo, Japan, June 12, 2009

反復投与毒性 (C-5-6) 関連

- 1) <http://www.healthncpnet.eu/jahia/Jahia/site/health-ncp-net/lang/en/pid/153>
- 2) <http://axlr8.eu/>
- 3) http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal_testing/introduction_public_consultation_at_en.pdf
- 4) Creton, S., Prieto, P., Boobis, A., Dekant, W., Kleinjans, J., Komulainen, H., Mazzatorta, P., Price, A, Rogiers, V. 8, Schoeters, G. Vinken, M. (2010) Draft Report on Alternative (Non-Animal) Methods for Cosmetics

Testing:current status and future prospects - 2010: Chapter 1 Repeated dose toxicity, 1-42.

- 5) <http://www.predictomics.com/>
- 6) <http://ecvam.jrc.it/index.htm>

生殖発生毒性 (C-5-7) 関連

- 1) <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- 2) <http://www.reprotect.eu>
- 3) <http://ecvam.jrc.it/publication/ECVAM%20Technical%20Report%202006-2007%20final.pdf>
- 4) Schwarz, M., Dencker, L., Lazzari, G., Mantovani, A. And Spielmann, H. (2009) The PeProTect project, *ALTEX*, 26, Spec. Issue, 175.
- 5) Schenk, B., Weimer, M., Bremer, S., van der Burg, B., Cortvrindt, R., Freyberger, A., Lazzari, G., Pellizzer, C., Piersma, A., Schafer, W. R., Seiler, A., Witters, H. and Schwarz, M. (2010) The ReProTect Feasibility Study, a novel comprehensive in vitro approach to detect reproductive toxicants. *Reprod Toxicol* 30, 200-218.
- 6) Akita, M. (2008). Current status and future progress of reproductive/developmental toxicity test. *Yakugaku Zasshi* 128 (5), 765-772.
- 7) Schenk B, Weimer M, Bremer S, van der Burg B, Cortvrindt R, Freyberger A, Lazzari G, Pellizzer C, Piersma A, Schafer WR, Seiler A, Witters H, and Schwarz M. (2010) The ReProTect Feasibility Study, a novel comprehensive in vitro approach to detect reproductive toxicants. *Reproductive Toxicology* 30, 200-218.
- 8) 斎藤幸一, 鈴木紀之, 安藤覚, 堀江宣行 (2009) 発生毒性試験の代替法開発: 1) ES細胞を用いたレポータージーンアッセイの開発, *日本動物実験代替法学会第22回大会要旨集*, 大阪, 50, 51.
- 9) 秋田正治, 石塚典子, 横山篤 (2009) 胎児培養法の改良, *日本動物実験代替法学会第22回大会*, 大阪, 52, 53.
- 10) 鈴木紀之, 斎藤幸一, 秋田正治 (2010) 発生毒性試験の代替法開発-ES細胞を用いたレポータージーンアッセイの開発とラ

- ット胎児培養法の改良ー, 日本動物実験代替法学会第23回大会要旨集, 東京, 71.
- 11) 小島肇, 動物実験代替法に関する2008年の国際動向. フレグランスジャーナル 1月号, 65-69, 2009.
 - 12) <http://lysander.sourceoecd.org/vl=14067300/cl=35/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/vln4/s58/pl>
 - 13) <http://jacvam.jp/effort/index.html>

経皮吸収性 (C-5-8) 関連

- 1) OECD guidelines for testing chemicals, 427, Paris, OECD (2004)
- 2) OECD guidelines for testing chemicals, 428, Paris, OECD (2004)
- 3) http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_02j.pdf
- 4) Fujii M. et al., Review of an alternative to animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients using Quasi-drug -Skin permeation and absorption test task force-. AATEX, Suppl. 13, 235, 2008
- 5) <http://www.oecd.org/dataoecd/0/1/46257610.pdf>
- 6) http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_002.pdf
- 7) 杉江謙一ら, 種々3次元培養皮膚モデルの物質透過性試験の代替材料としての有用性に関する検討: ヒト皮膚及びヘアレスラット皮膚との物質透過性及び皮膚組織の比較, 日本薬学会年会要旨集-4, 288, # 28Q-pm048, 2009
- 8) 杉林堅次ら, 三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた透過性試験の有用性評価, 日本動物実験代替法学会総会・学術大会要旨集, 156, 2009
- 9) S. Kano et al. Utilization of reconstructed cultured human skin models as an alternative skin for permeation studies of chemical compounds, AATEX, 15, 61-70, 2010
- 10) 杉林堅次ら, 化粧品の新しい経皮吸収研究の展望, フレグランスジャーナル, 38, 53, 2010
- 11) 須釜猛ら, 揮発性物質の皮膚透過性評価: 代替膜を用いた評価法の確立、日本動物実験代替法学会第23回大会講演要旨集, 131, 2010

- 12) Seki T. et al, Novel experimental system as an alternative to animal experiments to study the skin permeation of drugs, AATEX, 14, 887-897, 2009
- 13) S. Oshima et al, Study of a drug interaction involving the permeation process using an artificial skin model as an alternative to animal skin, AATEX, 15, 97-105, 2010
- 14) 三木涼太郎ら, *in vitro* 経皮吸収試験の為のヒト皮膚代替人工膜に用いる合成高分子の評価, 日本薬学会年会要旨集-4, 189, # 26P-pm029, 2009
- 15) 三木涼太郎ら, *in vitro* 経皮吸収試験におけるヒト皮膚代替物としての PDMS/PEG 共重合体含浸膜の検討, 日本動物実験代替法学会第23回大会講演要旨集, 130, 2010
- 16) Polak S. et al., Prediction of human pharmacokinetics following dermal administration: integration of a skin absorption module to the simcyp population-based ADME simulator™, ALTEX, 26, 137-138, Special Issue: 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, abstract ABS:769, 2009
- 17) Diembeck W. et al., Skin absorption and penetration. ATLA, 33, Suppl. 1, 105, 2005

G. 研究発表

G-1 論文発表

- 1) Hagino, S., Okazaki, Y., Kitagaki, M. and Itagaki, H. Further verification of an *in vitro* tier system for the identification of cosmetic ingredients that are not ocular irritants. Altern Lab Anim 38, 139-152, 2010.
- 2) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N. and Itagaki, H. A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern Lab Anim 38, 275-284, 2010.
- 3) Hirota, M., Motoyama, A., Suzuki, M., Yanagi, M., Kitagaki, M., Kouzuki, H.,

Hagino, S., Itagaki, H., Sasa, H., Kagatani, S. and Aiba, S. Changes of cell-surface thiols and intracellular signaling in human monocytic cell line THP-1 treated with diphenylcyclopropenone. J Toxicol Sci 35, 871-879, 2010.

4) Kagatani, S., Sasaki, Y., Hirota, M., Mizuashi, M., Suzuki, M., Ohtani, T., Itagaki, H. and Aiba, S. Oxidation of cell surface thiol groups by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. The Journal of Investigative Dermatology, 130, 175-183, 2010.

G-2 学会発表（講演及び学会発表）

1) 廣田衛彦, 本山晃, 萩野滋延, 上月裕一, 板垣宏, 佐々齊, 相場節也, "細胞表面-SH基を指標とした感作性試験代替法（SH test）に関する基礎検討", 日本トキシコロジー学会第37回学術年会, 2010

2) 萩野滋延, 松元有羽子, 北垣雅人, 吉田剛, 板垣宏, "細胞毒性試験による眼刺激性のリスク評価", 日本動物実験代替法学会第23回大会, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

活性酸素種産生能を指標とした光毒性リスク評価方法に関する研究

研究分担者 尾上 誠良 静岡県立大学 薬学部

研究要旨

薬剤性光線過敏症は近年注目を集める副作用の一つであり、その回避のために効果的な予測方法の開発が急務の課題となっている。本研究では光化学的試験方法と体内動態精査を組み合わせることで予測精度の高いスクリーニング方法の開発を試みる。

A. 研究目的

薬剤性光線過敏症は薬剤投与後、露光により引き起こされる副作用の一つであり、創薬段階における毒性リスク回避が強く望まれている。以前、我々は化合物を照射する際に発生する reactive oxygen species (ROS) 量を指標とした光化学的反応性評価によって薬剤性光線過敏症リスクを予測出来る可能性を示唆した。しかし、より正確な毒性リスク評価の為には薬物の体内動態も併せて精査する必要がある。そこで、ROS assay をはじめとする各種 *in vitro* 光毒性評価と薬物動態学的評価を組み合わせることで医薬品化合物の網羅的な光毒性リスク評価を試みた。今回の研究では、複数の化合物を同時に投与するカセットドージング法を薬物動態学的評価に用い、創薬初期段階により適したスループットの高い光毒性評価方法を開発した。

B. 研究方法

本研究ではモデル化合物群として fluoroquinolone (FQ, 6 種)を用い、これらの光化学的特性を UV 吸収測定ならびに

ROS assay にて評価した。なお、ROS assay に用いる擬似太陽光は Suntest CPS plus (250 W/m²) を用い、96 well microplate 上でアッセイを実施した。

また、光毒性について、3T3 neutral red uptake phototoxicity test (NRU PT) ならびに先に我々が開発した *in vitro* 光遺伝毒性評価方法である intercalator-based phototoxicity (IBP) assay を用いて評価を行った。さらに、カセットドージング法により皮膚移行性に焦点を当てて、UPLC/ESI-MS を用いて各種薬物動態学的特性を評価した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は静岡県立大学実験動物倫理委員会ガイドラインに準じて行なった。

C. 研究結果

各種光科学的特性評価の結果、6 種の FQ (norfloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, lomefloxacin, sparfloxacin)はすべて強い UV を吸収し、さらに ROS assay においても gatifloxacin を除く多くの FQ は強い ROS を産生したため、これらの化合

物は顕著な光反応性を有することを示唆した。次に、*in vitro* 光毒性リスク評価を行ったところ、すべての FQ は光刺激性や光遺伝毒性等の光毒性リスクを示したが、gatifloxacin は他の 5 種の FQ より比較的弱い毒性であった。カセットドージング法を用いた薬物動態学的評価の結果から皮膚移行性について評価したところ、levofloxacin, gatifloxacin および lomefloxacin は高い皮膚中濃度を示した。以上の結果をあわせて、decision matrix を構築したところ、今回試験した FQ では lomefloxacin が最も強い光毒性リスクを有していることを示唆し、その他の FQ についてもこれまでの臨床報告と良い関連性を示した。

D. 考察

光毒性のプロセスにおいて、光吸収とそれに伴う ROS 産生はいわばトリガーとして認識されている。ROS assay の結果では gatifloxacin の光毒性リスクが少ないという臨床のデータと矛盾しない結果が得られたが、それ以外の FQ の *in vitro* 光毒性リスクの強弱は臨床データと必ずしも完全には一致していなかった。これら *in vitro* データと臨床データをよりリンクさせるために、本研究では新たにカセットドージングによる薬物動態学的解析を実施し、*in vitro* と *in vivo* データによる decision matrix の構築を試みた。本検討では特に薬物の皮膚移行特性に着目し、ROS assay データと併せて考察することでヒトでの光毒性予測精度をより高めることに成功した。

E. 結論

今回開発した光毒性評価方法はスループ

ットならびに臨床との関連性も高く、創薬初期段階で複数の化合物の光毒性リスク評価に有用なスクリーニング系であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Onoue, S., Takahashi, H., Kawabata, Y., Seto, Y., Hatanaka, J., Timmermann, B., Yamada, S.: Formulation design and photochemical studies on nanocrystal solid dispersion of curcumin with improved oral bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **99**: 1871-1881 (2010).

(2) Kawabata, Y., Yamamoto, K., Debari, K., Onoue, S., Yamada, S.: Novel crystalline solid dispersion of tranilast with high photostability and improved oral bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **39**: 256-262 (2010).

(3) Onoue, S., Ochi, M., Gandy, G., Seto, Y., Igarashi, N., Yamauchi, Y., Yamada, S.: High-throughput screening system for identifying phototoxic potential of drug candidates based on derivatives of reactive oxygen metabolites. *Pharmaceutical Research*, **27**: 1610-1619 (2010)

(4) Seto, Y., Ochi, M., Onoue, S., Yamada, S.: High-throughput screening strategy for photogenotoxic potential of pharmaceutical substances using fluorescent intercalating dye. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **52**: 781-786 (2010)

(5) Seto, Y., Ochi, M., Igarashi, N., Inoue, R., Oishi, A., Toida, T., Yamada, S., Onoue, S.: *In Vitro* Photobiochemical Characterization of Sulfobutylether- β -cyclodextrin Formulation of Bufexamac. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **55**: 591-596 (2011)

(6) 尾上 誠良「最前線：薬剤性光線過敏症」*ファルマシア* (日本薬学会), **47**: 295-300.

2. 学会発表

(1) 世戸孝樹, 越智幹訓, 尾上誠良, 山田静雄: 創薬支援のための光線過敏症リスク評価に関する薬剤科学的研究 (8) -新規 *in vitro* 光遺伝毒性リスク評価ツールの開発-, 日本薬剤学会第 25 年会 (徳島), 要旨集 p.233, 2010 年 5 月 14 日

(2) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Tyo Inoue, Graham Gandy, Satomi Onoue and Shizuo Yamada: Combined use of photobiochemical and cassette dosing pharmacokinetic data for predicting phototoxic potential of pharmaceutical chemicals., 25th JSSX Annual Meeting in Tokyo. (Tokyo), Abstr. P.238, Oct7-9, 2010

(3) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Hideyuki Ito, Tsutomu Hatano, Satomi Onoue and Shizuo Yamada: Safety assessments on nutraceuticals: Phototoxic potential of St. John's Wort.

3. その他

特になし

3rd International Conference on Health and Longevity Sciences. (Shizuoka), Abstr. p. 34, Oct 16, 2010

(4) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Gandy Graham, Satomi Onoue, and Shizuo Yamada: New screening strategy for predicting *in vivo* phototoxic risk of fluoroquinolones using photobiochemical and cassette dosing pharmacokinetic data, FIP PSWC 2010/AAPS Annual Meeting and Exposition (New Orleans, US), Nov 14-18, 2010

(5) 井上僚, 世戸孝樹, 越智幹訓, 尾上誠良, 山田静雄: 光毒性リスク回避を指向した Bufexamac のサイクロデキストリン製剤開発, 日本薬学会東海支部例会 (静岡), 講演要旨集 p.93, 2010年11月28日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし