



図 1. 試験法公定化の過程

表 1. 昨今の日本で行われている国際バリデーションの一覧

試験法	対象毒性	目的	被験物質数	備考
In vivo コメントアッセイ	遺伝毒性	OECD TG	40	
Balb アッセイ	発癌性スクリーニング	OECD TG	6	OECD 専門家よりプロトコルを見直し、6 物質の再バリデーションの要請
Bhas アッセイ	発癌性スクリーニング	OECD TG	16	
STTA antagonist	内分泌かく乱スクリーニング	OECD TG	20	
AREcoscreen	内分泌かく乱スクリーニング	OECD TG	5	OECD peer reviewより追加バリデーションの要請あり (+ 5 物質)
STE アッセイ	眼刺激性	OECD TG	63	
SIRC アッセイ	眼刺激性	医薬部外品許認可	60?	OECD TG を目指さないで化粧品成分に特化
ROS アッセイ	光毒性	医薬品許認可	44	OECD TG 化は未定
LabCyte EPI-MODEL24	皮膚刺激性	OECD TG	20	TG439 performance standard 準拠のため
h-CLAT	皮膚感作性	OECD TG	24	ECVAM 主導
IL-8 Luc assay	皮膚感作性	OECD TG	24?	

C. 研究結果および考察

C-1) バリデーション実行委員会

試験法の専門家、生物統計家、バリデーションの専門家および試験法の開発者（リード施設）により構成される第三者組織である。バリデーション開始にあたり、試験の成立基準を含むプロトコル、試験計画の作成、参加施設の決定や被験物質の選定、コード化、その他資材を含む配布を行う。バリデーション終了後には得られた結果が適正に実施されたことの検証、結果の解析、報告書の作成などを担当する。参加施設の代表は基本的にこの実行委員会のオブザーバーである。その他、被験物質の選定、コード化、配布などを行う被験物質管理グループ、データの処理や評価を行う統計解析グループなどをコンサルタントグループに任せる。

これまでの経験で明確になったことは、

1) 実行委員長の存在

委員長の強いリーダーシップが必要となる。当該試験法の専門家でなくてはいけないし、英語も堪能でないと、国際的なバリデーション実行委員会を仕切れない。可能な限りバリデーションの知識を有している必要がある。一方で、バリデーション実行委員会はボランティアな集まりでもあることから、委員長は独善的でなく、調整能力が高くないといけない。欧米では委託金を払い、バリデーションの運営を任せるという方式を取っている。厚生労働科学研究においても、海外の専門家も含め、専門家に委嘱できるシステム化が必要である。

2) 統計学者

国際的にも人材は乏しい分野ではあるが、統計学的な解析依頼というだけでなく、データ入力用紙の準備、集まったデータの管理など、実験結果の品質管理という点でもその存在感は大きい。

3) リード施設

試験法の開発者でもあり、もっとも試験法に精通していることから、リード施設の協力なくしてバリデーションは進まない。主な仕事はプロトコル、標準作業手順書の作成、技術講習の講師やトラブル対応を任せられる場合が多い。参加施設の一つとなってもよい。ただし、バリデーションは客観性を求める作業であることから、リード施設が実行委員長を兼ねることは適当ではない。

4) 毒性分野の専門家

特定された試験法のバリデーションではあることから、実行委員会がプロトコルの細かな問題にのめり込む場合がある。当該分野の他の試験法や国際機関で既存あるいは検討中のテストガイドラインとの関係などについて助言できる専門家が必要である。

5) 被験物質の専門家

被験物質に選定は、バリデーションの成否を占う。

当該分野の毒性物質に詳しく、データベースにも詳しい専門家が必要である。海外機関の協力がもっとも必要な分野でもある。

6) バリデーションの専門家

仲間意識を持つことはいいことであるが、バリデーションは共同研究ではない。参加施設には終了まで公開できないことも在りうる。OECD の GD34¹⁾ や ICCVAM (Interagency coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)²⁾ に精通し、方向性を補修できる専門家が必要である。

C-2) 参加施設

試験法や GLP (Good Laboratory Practical) 基準を把握している研究者がいる、または GLP 対応試験ができる複数の参加施設である (最低 3 施設)。GLP 適合施設での実施が望ましいが、試験を GLP 準拠で行えなくとも、GLP 基準や内容を把握している施設であれば参加できる。試験法の開発者や試験法に精通した施設をリード施設に認定して、参加施設の力量を客観的に評価するためには、技術講習会に試験関係者を必ず出席させ、その後トレーニングとして陽性対照物質等を用いた予備試験 (プレバリデーション phase I とする場合もある) を行い、データを確認して参加施設の適合条件をクリアできなければ参加を認めないことにする。

これまでの経験で明確になったことは、

1) 公募

参加施設の選定は、作為的ではいけない。国際テストガイドラインを目指すのであれば、できれば、海外の施設も含めて公募し、幅広い希望施設から最低 3 施設を実行委員会にて公正に選択すべきである。

2) 委託費の確保

参加にあたっては、予算は重要な問題である。日本のバリデーションの多くはボランティアの協力によるものが大きかった。その功績は高いが、海外あるいは経済産業省ではバリデーション全体予算として 3000 万円程の予算を実行委員会または事務局が確保し、その半分で参加施設に委託している。ボランティアでは、GLP 順守やデータ・報告書提出期限が守られず、バリデーション全体の進行が計画通りにならない経験をしている。

C-3) 計画

信頼性と適性を評価するためには基準が必要である。OECD の GD34¹⁾ や ICCVAM²⁾ 基準の中では、以下のように記載されている。

規制のためのリスクを評価する目的でバリデーションする新しい試験方法、あるいは変法では以下のバリデーション基準を満たさねばならない。これらの基準はもちろん、方法や目的によりある程度変わる。

りうる。その目的にあったデータベースを構築しなければいけない。なぜなら、試験法は異なる目的、組織（規制当局）、物質の分類によりケースバイケースで異なるからである。よって、この基準は、試験法バリデーションの規制の受入れのためには欠くことができないものである。

- ① 科学のおよび規制上の合理性
- ② 指標の生物学的な意義
- ③ 詳細な試験計画
- ④ 再現性（施設内、施設間再現性）
- ⑤ 対照物質の存在
- ⑥ 関連性を見極められる情報とデータ
- ⑦ GLPに準拠したデータ
- ⑧ すべてのデータおよび詳細な試験計画が公開され、利用できること

これらを盛り込んだ計画が必要である。これまでの経験で明確になったことは、

1) 立案

過去のバリデーションでは、計画の重要性が中々認識されなかった。全体計画（プロジェクト計画）と phase 毎のスケジュール（実験計画）が作られ、実行委員会全体で情報を共有化されねばならない。ある専門家はバリデーション開始前に実行委員会で計画の読み合わせをするべきと提案している。それ程、計画は重いものであると考えるべきである。

といって、決めた計画は必ず守らねばならないという力説するつもりはない。バリデーションの過程で何が起こるかかわからないことをよく認識し、計画は実行委員会の会議毎に見直すことでも構わない。ただ、実行委員会で合意した内容は守る、その改訂は実行委員長であろうと勝手に突然変えてはならない。バリデーション組織はボランティアであることから、委員に上下関係はないことを前提し情報を共有化して物事を決めていくべきである。

2) 改定

改定記録は明確にし、どの version が最新か絶えず確認できるシステムが必要である。

C-4) 成立基準を含むプロトコル

プロトコルには試験法を実施するすべての必要事項が記載されねばならない。

もっとも実行委員会が注意しなければならないことは、開発者がプロトコルに自信を持ち過ぎ、中々説明し難い技を必要としたり、狭い成立基準を設定する場合である。参加施設の助言に耳を貸さないことである。開発者はすでにデータベースを構築していることから、プロトコルの改良はデータベースの再作成を意味することになり、難しい問題であるが、試験法は誰のためにあるのか、なぜバリデーションするのかという原点に帰らねばならない。

C-5) 被験物質の選定

バリデーションに最も重要な問題点は、被験物質の数が十分で、種類がバラエティに富み、バランスが取れていることである。これが不完全であれば、試験法がどのように高い予測性を有していても評価に値しない。適用限界も明確にならないからである。

これまでの経験で明確になったことは、

1) 被験物質数

試験法毎の事情があり、決めることができない。動物実験によるバリデーションの場合には、多くの物質を用いることは不可能である。In vitro 試験によっても、一試験に3カ月を要するものから、2日もあれば終わるものまで様々であり、長期に渡り費用が掛かる試験法の被験物質数を増やすことは難しい。また、100物質以上のデータベースが存在すれば、プロトコルの施設内・施設間再現性を確認できればよいかもしれないが、データベースが少ない場合やプロトコルの改定によりデータベースが有用でなくなった場合には、バリデーションによって予測性を明確にしなければならない。その場合には、最低でも50-60物質は必要であろう。

バリデーションも段階があり、すでにガイドライン化した方法を改良した場合や、類似の生物材料（例えば、皮膚刺激性試験の評価を新たな培養皮膚モデルを用いて行う場合）を用いたバリデーションを実施する場合にキャッチアップ（me-too ともいう）バリデーションという、より小規模なバリデーションで立証する場合もある。その場合には性能標準に定められたリスト物質（20-30物質）を時実施するだけでよい。

2) 種類

対象毒性の参照動物および／またはヒト臨床試験結果が詳細に揃っていること、毒性強度（GHSなどのカテゴリー分類）、溶解度、物性および分類がバラエティに富み、バランスが取れていることが重要である。これらは、実験終了後、適用限界の決定に深く関与することになる。特に、動物実験結果が個々の動物のデータに戻れるかが重要である。さらに、価格や国内在庫の有無、有害性があまりに高い物質は除くなどの制限が掛けられる。詳細については、森田の報告書を参照されたい。

C-6) 報告書と論文

報告書が先か、論文が先か、その作成順で実行委員長と実行委員会で議論が分かれる。どちらも必要であることは明確であるが、可能であれば、バリデーション報告書をまず作成すべきである。バリデーション報告書は実行委員会の責任で揉まれなければならない。バリデーション報告書にはすべての解析結果が網羅されるが、論文では論点のみ掲載される場合が多い。

これまでの経験で明確になったことは、

1) 期限

初稿はバリデーション終了から、約3か月で作成

されるべきである。遅くとも、半年以内でないと実行委員が結果を忘れてしまう。その後、実行委員全員で文章を揉んでいくことになるのでさらに同様の期間が必要となる。委託の場合には、事前に提出期限の約束を文書で交わす必要があり、大きく遅れた場合には委託費は返上を促すべきである。

2) 内容

GD34に基づく構成で記述されるべきである。すべて英語で作成されるべきである。

D. 考察

日本人は試験法のバリデーションのような共同研究を好む民族のようであり、技術水準も高く、バリデーションは日本人に向いている作業である。ある程度の経費が補填されるバリデーションの公募をすれば、多くの希望者が関心を寄せる（もっとも、試験法のトレーニングと誤解している応募者も多いので注意が必要である）。また、昔から、日本人は物事の改良や発展を好む民族とも言われており、試験法の開発は日本人向きと言ってよいであろう。試験法の開発や改良、そしてバリデーションが実施しやすい環境に日本はあると思われる。

しかし、バリデーションを仕切る実行委員会は会社のような営利を求める団体が構築する組織ではない。ヒトを動かすに必要な人事権と給料であると言われており、それらが関与しないボランティアな活動である。このような活動は参加者のモチベーション維持に工夫が必要であり、私欲に走る参加者がいるだけで人心は離れていく。

できれば、欧米のようにバリデーションの資金を適切に確保でき、ビジネスとしてバリデーションが発展していくことを望むが、現状通り参加者の手弁当方式も継続していくのであれば、バリデーションを仕切る実行委員会のホスピタリティが重要になる。ノウハウや手順があっても結局、バリデーションはヒトが動かすという意識を持つことがもっとも重要な点かもしれない。

E. 結論

国際バリデーションを進めるにあたっての手順やノウハウをまとめた。バリデーションを進めるにあたり、踏まえておくべき点が多いが、もっとも重要な点は、バリデーション実行委員のモチベーション維持および数が十分で、種類がバラエティに富み、バランスが取れている被験物質の選択である。

F. 参考文献

1) 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

2) ICCVAM (1997) Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods: a report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. NIH Publication No: 97-3981, 1997, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小島肇夫：動物実験代替法の現状と展望、J. Environ Dermatol Cutan Allergol, 3 (1), 1-6 (2009)
- 2) 小島肇夫：動物実験の3Rsにおける国内外の動向、城西大学生命科学研究センター報告第7号、p37-50 (2009)
- 3) 小島肇夫：動物実験データなしで新規医薬部外品の申請はどこまで可能か？、BIO INDUSTRY, 26 (8) 42-49 (2009)
- 4) 小島肇夫：皮膚・粘膜毒性、新版 トキシコロジー、日本トキシコロジー学会教育委員会編集、pp. 246-254 (2009)
- 5) 小島肇夫：医薬部外品と化粧品、GLP/非 GLP試験の具体的実施ポイント、技術情報、東京、pp. 425-433 (2009)
- 6) 小島肇夫：REACHにおける環境影響試験、フレグランスジャーナル 2009-8、46-51 (2009)
- 7) 小島肇夫、新井晶子、北條麻紀：再構築培養表皮モデルを用いた遺伝毒性の評価、コスメトロジー研究報告、17、57-62 (2009)
- 8) 小島肇夫：現在の動物実験代替法の状況について、LABIO21、38、17-20 (2009)
- 9) 小島肇夫：薬用化粧品の承認取得における安全性試験をめぐる問題点、医薬部外品有効成分承認取得のための対策と課題、フレグランスジャーナル社、48-58 (2010)
- 10) 小島肇夫：医薬部外品の製造販売承認申請における安全性試験の資料に関するあり方検討会報告、日皮協ジャーナル、印刷中 (2010)
- 11) Kojima, H. : Commentary to the Discussion on Topics 3, " In Vitro Test Approaches with Better Predictivity" at the 5th International Workshop on Genotoxicity Testing, Genes and Environment, 32 (2), 40-42 (2010)
- 12) 小島肇夫：総合評価の方法、有用性化粧品の処方とその活用、鈴木正人監修、シーエムシー出版、東京、pp. 147-151 (2010)

- 13) Kojima, H, Takeyoshi, M, Sozu, T, Awogi, T, Arima, K, Idehara, K, Ikarashi, Y, Kanazawa, Y, Maki, E, Omori, T, Yuasa, A, Yoshimura, I. : Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. *J Appl Toxicol.* 31(1) 63-74 (2010)
 - 14) Yamamoto, N, Hirano, K, Kojima, H, Sumitomo, M, Yamashita, H, Ayaki, M, Taniguchi, K, Tanikawa, A, Horiguchi, M. : Cultured human corneal epithelial stem/progenitor cells derived from the corneal limbus. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 46(9) :774-80 (2010)
 - 15) Kojima, H. : 3Rs Activities in Japan, AVLR8 Alternative Testing strategies, Progress report 2010, 266 (2010)
 - 16) 小島肇夫 : パイロジェン試験、大阪医薬品協会 会報第745号 31-63 (2011)
 - 17) 小島肇夫 : 動物実験代替法の現状と展望、創薬研究のストラテジー、pp. 41-48、株式会社金芳堂、京都 (2011)
 - 18) 小島肇夫 : 動物実験の3Rにおける国内外の動向、ドージンニュース No. 138、1-9 (2011)
 - 19) 柘植英哉、森充生、大庭澄明、大内正、寺田三郎、五島隆志、田邊豊重、山影康次、田中憲穂、渡辺美香、畔上二郎、大向英夫、小島肇 : 平成21年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告、輸液用ゴム栓試験法の見直し(第3報) -細胞毒性試験法の検討-、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 42(3) 258-271 (2011)
 - 20) 小島肇夫 : 動物実験代替法における国際協調、日薬理誌、138、103-107 (2011)
 - 21) 小島肇夫 : 経皮吸収と安全性、次世代経皮吸収型製剤の開発と応用、pp.157-164、シーエムシー出版、東京 (2011)
 - 22) 小島肇夫 : 監修および序章、動物実験代替法と動物実験の住み分け、pp.3-9、第1章第2節 日本における各種承認申請に必要な安全性試験と代替法の受理の現状、pp.19-23、第1章第3節 REACH.GHSなどの各種規制との違い、pp.24-29、第2章 皮膚腐食性試験の実験手法、pp.33-43、第4章 眼刺激性試験代替法の実験手法、pp.71-87、最新 動物実験代替法の技法ノウハウ、技術情報協会、東京 (2011)
 - 23) 小島肇夫 : 第8回国際動物実験代替法会議参加記、COSME TECH JAPAN,1(5) : 29-33 (2011)
 - 24) 小島肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 (1)、COSME TECH JAPAN,1(6) : 10-13 (2011)
 - 25) Pfuhler S, Fellows M, van Benthem J, Corvi R, Curren R, Dearfield K, Fowler P, Frötschl R, Elhajouji A, Le Hégarat L, Kasamatsu T, Kojima H, Ouédraogo G, Scott A, Speit G: In vitro genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop, *Mutat. Res.*, 723(2):101-7 (2011)
 - 26) 小島肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 (2)、COSME TECH JAPAN,1(7) : 18-22 (2011)
 - 27) Kano, S., Todo, H., Furui, K., Sugie, K., Tokudome, Y., Hashimoto, F., Kojima, H., Sugibayashi, K.: Comparison of Several Reconstructed Cultured Human Skin Models by Microscopic Observation: Their Usefulness as an Alternative Membrane for Skin in Drug Permeation Experiments, *Altern. Animal Test. Experiment*, 16(2): 51-58 (2011)
 - 28) 小島肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 (3)、COSME TECH JAPAN, 2(1) : 73-77(2012)
 - 29) 小島肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 (4)、COSME TECH JAPAN, 2(2) : 65-69(2012)
 - 30) 小島肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 (5)、COSME TECH JAPAN, 2(3) : 44-49 (2012)
 - 31) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. : Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim.*, 40, 33-50 (2012)
2. 学会発表
- 1) 小島 肇 : バリデーション研究とは何か? & 国際動向、JaCVAM第2回ワークショップ、東京 (2009)
 - 2) 小島 肇 : 培養皮膚モデルバリデーション研究、JaCVAM第2回ワークショップ、東京 (2009)
 - 3) 小島 肇 : 動物実験代替法に関する国内外の動向、JALAMシンポジウム「安全性試験における動物実験代替法-国内外の動向と代替法開発の現状-」、大宮 (2009)
 - 4) 小島 肇 : 動物実験代替法における培養細胞の利用 : 合同追悼シンポジウム「黒田行昭先生を偲んで」、日本組織培養学会第82回大会、栃木 (2009)
 - 5) 小島 肇 : バリデーション試験の今後の予定について、コミットアッセイ国際バリデーション試験進捗報告、日本環境変異原学会 MMS研究会 第54回定例会、熱川 (2009)
 - 6) 小島 肇、安藤洋子、山口能宏、小坂忠司、鈴木民恵、湯浅敦子、渡邊幸彦、篠田伸介、出原賢治、吉村 功、宮岡悦良、石山賢也、加藤雅一、大森 崇 : 培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究、第36回日本トキシコロジー学会学術年会、盛岡 (2009)

- 7) 小島 肇 : OECD Test Guideline 収載モデルとしての LabCyte EPI-MODL の可能性、皮膚基礎研究 クラスタフォーラム、東京 (2009)
- 8) Kojima, H. : 3D comet assay, JaCVAM experience, 5th International Workshop on Genotoxicity Testing, Basel (2009)
- 9) Kojima, H., Yamakage, K., Burlinson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Corvi, R., Uno, Y., Schechtman, L., Tice, R. and Honma, M. : International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 8th International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
- 10) Nakajima, M., Masumori, S., Tanaka, J., Hayashi, M., Uno, Y., Kojima, H. and Tice, R. : An atlas of comet images: JaCVAM initiative International Validation trial for the in vivo comet assay, 8th International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
- 11) Kojima, H. : Validation of innovative methods for safety testing: drawbacks and advantages of Japanese validation studies, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 12) Kojima, H., Matsui, T., Kohara, A., Yoshida, A. and Nakamura, Y. : GCCP initiatives in Japan, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 13) Ono, A., Takeyoshi, M., Bremer, S., Jacob, M., Laws, S., Sozu, T. and Kojima, H. : The International validation study for the ER alpha STTA antagonist assay using HeLa9903, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 14) Allen, D., Deal, F., Ceger, P., Gordon, J., Pazos, P., deLange, L., Bremer, S., Nakamura, M., Kojima, H., Ono, A., Tice, R. and Stokes W. : Testing of coded substances for a multi-phases international validation study of an estrogen receptor (ER) transcriptional activation (TA) assay, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 15) Kojima, H., Iijima, M., Matsunaga, K., Sasa, H., Itagaki, H., Okamoto, Y., Nishiyama, N., Mita I., Washida, J., Masuyama, K., Onodera, H., Masuda, M., Ohno, Y. : Review of an alternative to animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients using Quasi-drug, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 16) Wind, M., Blakey, D., Kojima, H., Kreysa, J. and Stokes, W. : What is the international cooperation on alternative test methods (ICATM) and what is its role?, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 17) Kojima, H. : JaCVAM' s role in the 3Rs and ICATM, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 18) Kojima, H. : Recent progress and future directions at JaCVAM, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 19) Inoue, T., Masuda, M., Akita, M., Kojima, H. and Ohno, Y. : JaCVAM statement on new alternative to animal testing, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 20) Takeyoshi, M., Kojima, H., Omori, T., Sozu, T. and Yoshimura, I. : Validation study for non-radioisotopic local lymph node assay based on BrdU incorporation (LLNA-BrdU), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 21) Kojima, H., Ando Y., Yamaguchi Y., Kosaka T., Suzuki T., Yuasa A., Watanabe Y., Shinoda S., Idehara K., Yoshimura I., Miyaoka E., Ishiyama K., Kato M., Omori T. : Validation of LabCyte EPI-MODEL24, an *In Vitro* Assay for Detecting Skin Irritants, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 22) Yamamoto, N., Hirano, K., Kato, M., Hata, K., Horiguchi, M., Taniguchi, K. and Kojima, H. : Cell surface marker of corneal epithelium stem cells and culture, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 23) Lowther, D., Wind, M., Stokes, W., Barroso, J., Zuang, V., Amcoff, P., Kojima, H., Prinsen, M., Tice, R., Allen, D. and McCall, D. : International acceptance of in vitro alternative ocular safety testing methods: the isolated chicken eye (ICE) test method (Draft OECD TG 438), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 24) Merrill, J., Wind, M., Stokes, W., Barroso, J., Zuang, V., Amcoff, P., Kojima, H., Jacobs, A., McCall, D. Allen D. and Tice, R. : International acceptance of in vitro alternative ocular safety testing methods: bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test method (Draft OECD TG 437), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in

- the Life Sciences, Rome (2009)
- 25) Hayashi, M., Uno, Y., Honma, M., Schechtman, L., Tice, R., Corvi, R., Morita, T., Asano, N. and Kojima, H. : In vivo Comet Assay: Update on the on-Going international validation study, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 26) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schechtman, L. and Hayashi, M. : International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 27) Kojima, H., Arai S. and Hojo M. : Adequate conditions for performance of comet assay using 3-dimensional human epidermal model, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 28) Stokes, W., Wind, M., Matheson, J., Jacob., A., Casati, S., Kojima, H., Allen, D., Burns, T., Salicru, E., Strickland, J. and Tice, R., Internationally harmonized performance standards (PS) for the murine local lymph node assay (LLNA), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 29) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schechtman, L. and Hayashi, M. : International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 25th ICEM, Florence (2009)
 - 30) Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Schechtman, L., Tice, R., Corvi, R., Morita, T., Asano, N. and Hayashi, M., : In vivo Comet Assay: Update on the on-Going international validation study, 25th ICEM, Florence (2009)
 - 31) 小島 肇 : 動物実験代替法における国内外の動向、日本薬学会関東支部大会、埼玉 (2009)
 - 32) 小島 肇 : In vitro 安全性・機能性評価及び作用メカニズム・新規物質探索研究の最前線、第 22 回動物細胞工学シンポジウム、東京 (2009)
 - 33) 小島 肇 : 医薬部外品の承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会、日本産業皮膚衛生協会 秋季研修会、京都 (2009)
 - 34) Kojima, H. : Japanese views in the 3Rs in the 21st century, ZEBET's 20th Anniversary Symposium, Berlin, Germany (2009)
 - 35) Kojima, H. : Organization of JaCVAM and its activity, KoCVAM International Symposium and 6th Congress of KSAAE, Seoul (2009)
 - 36) Kojima, H. : Utilization of an alternative to animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients using Quasi-drug, The 17th ICDS (International Contact Dermatitis Symposium) and the 10th APEODS (Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium), Kyoto (2009)
 - 37) Kojima, H. : Japanese approach to regulatory acceptance of new skin sensitization testings with considerations to animal welfare and 3Rs, The 17th ICDS (International Contact Dermatitis Symposium) and the 10th APEODS (Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium), Kyoto (2009)
 - 38) 小島 肇、安藤洋子、山口能宏、小坂忠司、鈴木民恵、湯浅敦子、渡邊幸彦、篠田伸介、出原賢治、吉村 功、宮岡悦良、石山賢也、加藤雅一、大森崇 : 培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーショ ン研究、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
 - 39) 小島 肇、飯島正文、松永佳世子、佐々 斉、板垣 宏、岡本裕子、西山直宏、小野寺博志、見田 活、鷺田 淳、益山光一、増田光輝、大野泰雄 : 医薬部外品の承認申請における安全性に関わる資料のあり方検討委員会報告、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
 - 40) 小島 肇、井上 達、増田光輝、秋田正治、大野泰雄 : 動物実験代替法定化のための JaCVAM 提案書、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
 - 41) 小野 敦、武吉正博、Susanne Bremer, Miriam Jacob, Susan C. Laws, 寒水孝司、小島 肇 : HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体転写活性化試験によるアンタゴニスト検出法の国際バリデーショ ン、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
 - 42) 本間正充、山影康次、Burlinson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., 林 真、中嶋圓、鈴木雅也、Corvi, R., 宇野芳文、Schechtman, L., Tice, R., 小島 肇 : In vitro アルカリコメットアッセイ国際バリデーショ ン研究、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
 - 43) 小島 肇、笠松俊夫 : IWGT 報告 トピックス 3 : 予測性の高い in vitro 試験の提案、日本環境変異原学会第 38 回大会、清水・静岡 (2009)
 - 44) 中嶋圓、小島 肇、宇野芳文、本間正充、林 真 : コメットアッセイの国際バリデーショ ン、日本環境変異原学会第 38 回大会、清水・静岡 (2009)
 - 45) 小島 肇、北條麻紀、新井晶子 : 3 次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイと細胞毒性の関係、日本環境変異原学会第 38 回大会、清水・静岡 (2009)
 - 46) JaCVAM : コメットアッセイ国際バリデーショ ン

- プロジェクトチーム：インビボコメットアッセイ：JaCVAM 国際バリデーション試験の進捗状況報告、日本環境変異原学会第 38 回大会、清水・静岡（2009）
- 47) 伊藤正俊、関東裕美、鷺崎久美子、松永佳世子、矢上晶子、中川真美子、加藤則人、河合恵一、滝脇弘嗣、吉村 功、小島 肇：パッチテストによる皮膚一次刺激性評価（2）、第 39 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、京都（2009）
- 48) 中村昌文、半田洋士、小野 敦、小島 肇：Lumi-cell ER アッセイ法の国際バリデーション（第二報）、第 12 回環境ホルモン学会研究発表会、東京（2009）
- 49) 小島 肇、飯島正文、松永佳世子、佐々 齊、板垣 宏、岡本裕子、西山直宏、小野寺博志、見田 活、鷺田 淳、益山光一、増田光輝、大野泰雄：あり方検討会設立の経緯及び動物実験代替法の現状、医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わる資料のあり方検討委員会報告、東京（2009）
- 50) 山本直樹、平野耕治、谷川篤宏、加藤雅一、畠賢一郎、小島 肇、綾木雅彦、堀口正之、谷口孝喜：角膜上皮細胞における組織幹細胞マーカーの検索と初代分離培養法および遺伝子導入法の検討、日本組織培養学会第 82 回大会、栃木（2009）
- 51) 山本直樹、平野耕治、谷川篤宏、加藤雅一、畠賢一郎、小島 肇、綾木雅彦、堀口正之、谷口孝喜：角膜上皮細胞の組織幹細胞マーカーと初代分離培養法および遺伝子導入法の検討、第 41 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、神戸（2009）
- 52) 小島 肇：今後の展望、JaCVAM 第 3 回ワークショップ、h-CLAT シンポジウム、東京（2010）
- 53) Kojima, H., Arai, S. and Hojyo, M.: Adequate conditions for performance of comet assay using 3-dimensional human epidermal model, 49th Annual SOT meeting, Salt Lake City (2010)
- 54) W Stokes, M Wind, D Blakey, J Kreysa, H Kojima, E Anklam: Establishment of the International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM) and Its Role in the Validation and Regulatory Acceptance of Globally Harmonized Safety Assessment Methods, 49th Annual SOT meeting, Salt Lake City (2010)
- 55) P Ceger, F Deal, D Allen, G Clark, P Pazos, J de Lange, S Bremer, M Nakamura, H Kojima, A Ono, R Tice, W Stokes, Testing of Coded Substances in the NICEATM/ECVAM/JaCVAM LUMI-CELL[®] STTA Multiphase International Validation Study, 49th Annual SOT meeting, Salt Lake City (2010)
- 56) 山本直樹、谷川篤宏、内藤紘策、綾木雅彦、小島 肇、平野耕治、堀口正之：マウス水晶体上皮細胞の不死化細胞の作出、第 114 回 日本眼科学会総会（2010. 4）
- 57) 小島 肇：ヒト iPS 細胞を用いた新規 *in vitro* 毒性評価系の構築、日本製薬工業協会セミナー（2010. 5）
- 58) 小島 肇：パネルディスカッション 新しい感受性及び局所刺激性（皮膚・眼）試験法の OECD テストガイドライン、日本トキシコロジー学会学術年会、沖縄（2010. 6）
- 59) 小島 肇：医薬部外品、化粧品 of Regulatory Science の展望、第 11 回光老化研究会、東京慈恵会医科大学（2010. 7）
- 60) Kojima, H.: Global impact of 3'Rs on regulatory process: sharing experiences and future trends. XII International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010. 7)
- 61) Kojima, H., Inoue, T. and Ohno, Y.: JaCVAM's role of new alternatives to animal testing and international harmonization. XII International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010. 7)
- 62) 小島 肇：昨今の国際バリデーション研究の進捗、皮膚基礎研究クラスターフォーラム 第 5 回教育セミナー（2010. 8）
- 63) 小島 肇：皮膚感受性試験のインビトロ代替法の現状、日本免疫毒性学会学術大会、独立行政法人国立環境研究所 大山記念ホール（2010. 9）
- 64) Kojima, H., Arai, S. and Hojyo M.: Importance of each human model and the optimal protocol for regulatory use of skin irritation assay. The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Hokkaido University, Sapporo, Japan (2010. 9)
- 65) 小島 肇：パイロジェン試験、大阪医薬品協会技術研究委員会、大阪（2010）
- 66) 小島 肇、北條麻紀：3 次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイの条件検討 第 3 報、日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば（2010. 11）
- 67) 宇野芳文、小島 肇：インビボコメットアッセイ JaCVAM 国際バリデーション試験の進捗状況報告（第 2 報）、日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば（2010. 11）
- 68) 小島 肇、中村 牧、山口能宏、泉 瑠名、鈴木民恵、萩原沙織、篠田伸介、加藤雅一：培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究、日本動物実験代替法学会第 23 回大会、東京（2010. 12）
- 69) 小島 肇、桑原裕史、林卓巳、坂口眞由美、豊田明美、後藤 悠、中村恒彰、渡辺真一、阿彦恭子、大森 崇、音泉 卓、寒水孝¹⁾、森本隆史、林

- 和彦、坂口 齊：眼刺激性試験代替法（STE 試験）バリデーション研究 第3報、日本動物実験代替法学会第23回大会、東京（2010.12）
- 70) 小島 肇、北條麻紀：3次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイの条件検討日本動物実験代替法学会第23回大会、東京（2010.12）
- 71) 小島 肇：S5 化学物質の有害性評価に関する代替試験法開発—発癌性、発生毒性、免疫毒性—今後の展望、日本動物実験代替法学会第23回大会、東京（2010.12）
- 72) 小島 肇：培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価の現状、第10回ヒューマンサイエンス研究資源バンクセミナー、大阪（2011.1）
- 73) 小島 肇：動物実験代替法における国際動向、日本動物実験代替法学会・JaCVAM 合同ワークショップ 動物実験の3Rにおける国際動向、東京（2011.2）
- 74) 小島 肇：皮膚細胞研究の応用とその可能性、日本化粧品技術者会大阪支部 第15回勉強会ワークショップ、大阪（2011.2）
- 75) Kojima, H.: The Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM): Recent ICATM contributions and Future Plans, Information Session: The International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM): Translating Science to Provide Improved Public Health Safety Assessment Tools, 50th Annual SOT meeting, Washington D.C.(2011.3)
- 76) Kojima, H. and Hojyo, M.: Optimal conditions for performance of the comet assay using a three-dimensional human epidermal model, 50th Annual SOT meeting, Washington D.C.(2011.3)
- 77) W Casey, P Ceger, F Deal, D Allen, G Clark, P Pazos, E Grignard, J de Lange, S Bremer, M Nakamura, H Kojima, A Ono, W Stokes.: Final Results of an International Validation Study of an *In Vitro* ER TA Test Method in BG-1 cells, 50th Annual SOT meeting, Washington D.C.(2011.3)
- 78) F Deal, W Casey, P Ceger, D Allen, C Yang, M Nakamura, H Kojima, A Ono, HJ Yoon, SY Ha⁷, W Stokes: International Validation Study of an *In Vitro* Cell Proliferation Test Method for Screening Potential Estrogenic Agonists and Antagonists in MCF-7 cells, 50th Annual SOT meeting, Washington D.C.(2011.3)
- 79) J Kulpa-Eddy, R McFarland, R Isbrucker, M Halder, H Kojima, B Jones, NW Johnson, D Allen, E Lipscomb, S Morefield, W Casey, W Stokes: International Workshop on Alternative Methods to Reduce, Refine, and Replace the Use of Animals in Vaccine Potency and Safety Testing, 50th Annual SOT meeting, Washington D.C.(2011.3)
- 80) 小島 肇：日本における動物実験代替法の現状、シンポジウム S2H27 アジアにおける動物実験代替法の展開、第84回日本薬理学会年会、パシフィコ横浜（2011.3）
- 81) 小島 肇：動物実験代替法の行政的受け入れと国際協調、シンポジウム S30 レギュラトリーサイエンスは社会にどう役立っているか—薬学系人材の役割と活躍の場を知る—、日本薬学会第131回年会、静岡（2011.3）
- 82) Kojima, H.: Update of skin equivalent and its regulatory use, BIT's 4th Annual World Congress of Industrial Biotechnology-2011, Dalin, China（2011.4）
- 83) 小島 肇：安全性評価のための *in vitro* 試験法を確立するために何をなすべきか、日本組織培養学会第84回大会、成育医療センター（2011.5）
- 84) 山本直樹、平野耕治、小島 肇、住友万里子、山下宏美、中村政志、原 和宏、谷川篤宏、谷口考喜、堀口正之：ヒト角膜組織より分離した角膜上皮細胞への不死化遺伝子の導入と評価、日本組織培養学会第84回大会、成育医療センター（2011.5）
- 85) 小島 肇：医薬品・医療機器の許認可に求められる安全性試験、第7回大阪大学医工連携シンポジウム 第2回 MEI 産学官連携部門勉強会講演会 大阪大学銀杏会館（2011.6）
- 86) Yamamoto, N., Hirano, K., Sumitomo, M., Yamashita, H., Nakamura, M., Hara, K., Tanikawa, A., Horiguchi, M., Taniguchi K. and Kojima, H.: Generation and Analysis of a New Immortalized Human Corneal Epithelium Cell Line, 2011 In Vitro Biology Meeting, Raleigh, North Carolina, USA(2011.6)
- 87) Kojima, H.: Current and future of correlation with Japan and Korea on alternative to animal experiments, 8th Congress of Korean Society for Alternative to Animal Experiments, Korea (2011.7)
- 88) 小島 肇：代替法から *in vitro* toxicology への発想転換、第38回日本トキシコロジー学会学術年会、パシフィコ横浜（2011.7）
- 89) 小島 肇：動物実験代替法の申請資料への活用、皮膚基礎研究クラスターフォーラム第6回教育セミナー、タワーホール船堀（2011.7）
- 90) 小島 肇：欧米、日本における代替法の現状と化粧品の安全性評価における代替法、千葉科学大学コスメティックサイエンスシンポジウム(第4回)、化学会館・Fホール（2011.7）
- 91) Kojima, H.: Section II-11 The International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM), JaCVAM, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 92) Uno, Y., Kojima, H., Hayashi, M.: *In vivo* Comet assay: update on the ongoing international validation study coordinated by JaCVAM, 8th

- World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 93) Kojima, H., Yamakage, K., Oba, S., Tsuge, H., Aoki, M.: Preliminary study of the revision of Japanese Pharmacopoeia test for rubber closure for aqueous infusions, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 94) Ono, A., Takeyoshi, M., Bremer, S., Jacobs, M., Laws, S., Sozu, T. and Kojima, H.: Results of the validation study of the stably-transfected estrogen receptor alpha transcriptional activation antagonist assay using the HeLa9903 cell line, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 95) Hayashi, K., Hayashi, T., Sakaguchi, M., Watanabe, S. and Kojima, H.: Inter-laboratory phase II validation study of in vitro eye irritation test; Short Time Exposure (STE) test, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 96) Nakamura, M., Suzuki, T., Shinoda, S., Kato, M. and Kojima, H.: Additional validation of alternative skin irritation test method using LabCyte EPI-MODEL24 of cultured skin, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 97) McFarland, R., Kulpa-Eddy, J., Isbrucker, R., Halder, M., Kojima, H., Johnson, N., Jones, B., Allen, D., Casey, W. and Stokes, W.: International workshop on alternative methods to reduce, refine, and replace the use of animals in human vaccine potency and safety testing, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 98) Kulpa-Eddy, J., McFarland, R., Isbrucker, R., Halder, M., Kojima, H., Johnson, N., Jones, B., Allen, D., Casey, W. and Stokes, W.: International workshop on alternative methods to reduce, refine, and replace the use of animals in veterinary vaccine potency and safety testing, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 99) Stephens, M., Kojima, H., Patlewicz-Tier, G., Spielmann H. and Telley, L.: AltTox.org: communication platform for 21st century toxicology, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 100) Kojima, H.: Necessity of validation study of new or updated test methods for hazard assessment, Workshop on Validation of 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxic Test, Guangzhou, China (2011.11)
- 101) Kojima, H.: JaCVAM update, シンポジウム動物実験代替法センターの国際協調、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台(2011.11)
- 102) 小島 肇：厚生労働省の新規対応、シンポジウム日本における代替法研究の新しい胎動、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台(2011.11)
- 103) Kojima, H.: JaCVAM update、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台(2011.11)
- 104) 丸山 裕子、湯浅 敦子、日置孝徳、笠原 利彦、小島 肇：LLNA BrdU-ELISA におけるリンパ節細胞懸濁液調製方法の最適化に関する検討、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台(2011.11)
- 105) 篠田伸介、萩原沙織、山口能宏、中村 牧、笠原利彦、芝井亜弥、加藤雅一、小島 肇：培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 皮膚刺激性試験法の追加共同研究、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台(2011.11)
- 106) 内野 正、竹澤俊明、山下 邦彦、小島 肇、五十嵐良明、西村哲治：ビトリゲルチャンバーを用いた皮膚感作性試験代替法モデルの基礎的検討、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台(2011.11)
- 107) 山口宏之、竹澤俊明、小島 肇：コラーゲンビトリゲル膜チャンバー内に構築したヒト角膜上皮モデルの有用性：化学物質暴露後の経上皮電気抵抗値の経時変化を指標として眼刺激性を外挿する新しいアプローチ、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台(2011.11)
- 108) 加藤 義直、山本 直樹、山下 宏美、佐藤 淳、水谷 宏、中田 悟、小島 肇：新規不死化ヒト角膜上皮細胞株 (iHCE-NY) を用いた眼刺激性試験代替法への取り組み、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台(2011.11)
- 109) 濱田修一、高島理恵、嶋田圭祐、財前和代、川上哲、田中仁、松本浩孝、中井智博、鈴木洋、松村奨士、真田尚和、井上健司、武藤重治、萩尾宗一郎、林亜耶、高柳智美、萩原庸介、前田晃央、成見香瑞範、高沢博修、小川いづみ、大山ワカ子、中嶋圓、森田健、小島肇、林真、本間正充：反復投与肝臓小核試験法の有用性の検討 (MMS 共同研究)、日本環境変異原学会第40回大会、東京(2011.11)
- 110) 宇野芳文、小島 肇、林真：インビボコメントアッセイ：JaCVAM 国際バリデーション試験の進捗状況報告(第3報)、日本環境変異原学会第40回大会、東京(2011.11)
- 111) 中村 昌文、武吉 正博、小野 敦、小島 肇：国際的バリデーションの行われた三種類のエ

ストロゲン様活性測定法の比較検証、環境ホル
モン学会、東京(2011.12)

112) 小島 肇：動物実験代替法の国際的動向と
JaCVAM 活動について、日本輸入化粧品協会
技術部会、東京 (2011.12)

113) 小島 肇：毒性発現機序からみたりスク評価
の現実 「毒性試験の代替に病理が果たす役
割」、第 28 回日本毒性病理学会総会、東京
(2012.2)

114) 小島 肇：生物学的製剤基準とワクチンの品
質確保にどこまで動物実験は有用か、国際化時
代の生物学的製剤基準とワクチンの品質確保
のありかた、東京 (2012.2)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

バリデーション研究における被験物質の選択法に関する研究

研究分担者 森田 健 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部第四室室長

研究要旨

2 種類の遺伝毒性試験、すなわち、*in vivo* コメットアッセイならびに *in vitro* 細胞形質転換試験（CTA）のバリデーション研究をとおして、バリデーション研究における被験物質の選択法を検討した。その結果、被験物質選択のための一般原則として、以下の事項を段階的あるいは並行的に考慮することが必要かつ効果的であることが明らかとなった：①当該バリデーション研究の目的に応じた最小限の被験物質数の導出、②当該毒性分野で検討された十分な数の既知物質の収集（候補物質）および既存分類に基づく検証、③科学的絞込み（化学物質クラス、化学物質構造、作用機序・作用様式、物性や既存情報の充実性、など）、④実務的絞込（毒性値、入手可能性、取扱容易性、価格、など）。

A. 研究目的

国際的に認知された試験として行政的に受け入れられる安全性試験の新規開発あるいは改良には、OECD Guidance Document 34 により規定されたバリデーション研究および専門家による第三者評価を経る必要がある。したがって、バリデーション研究において用いる被験物質の選択は当該研究の成否に係わる重要な因子の一つである。

今般、*in vivo* 遺伝毒性試験のコメットアッセイおよび *in vitro* 発がん性試験の Bhas 細胞形質転換試験（CTA）の 2 つのバリデーション研究における被験物質の選択をとおし、バリデーション研究にはどのような物質を被験物質として選択すればよいか、その一般原則を検討した。

B. 研究方法

コメットアッセイのバリデーション研究の目的は、発がん性予測能（感受性・特異性）および付随的に肝 UDS 試験との代替性の検証であった。発がん性予測能の検証には、幅広く遺伝毒性発がん物質（ここでの“遺伝毒性”は、Ames 陽性あるいは標準的 *in vivo* 試験陽性とした）、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性発がん物質、および非遺伝

毒性非発がん物質について計 40 物質を検討する必要があると判断された。そこで、発がん性、遺伝毒性、発がんおよび遺伝毒性の作用機序・作用様式、化学物質クラスなどに基づき 88 候補物質を選出し、既存情報の充実性、化学物質特性、入手可能性、取扱容易性などに基づき、最終的に 40 物質を選択した。

一方、Bhas CTA のバリデーション研究の目的は、バリデーション済みの 6 ウェルプレート法と新規 96 ウェルプレート法とのブリッジングであり、施設間再現性、6 ウェルプレート法との同等性、ならびに非遺伝毒性発がん物質（ここでの“非遺伝毒性”は主に Ames 陰性の発がん物質あるいは Ames 陰性で発がんプロモーターとされるものとした）検出性、ならびに非発がん物質の陰性特異性の検証であった。そのためには、遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性発がん物質、および非発がん物質を含む計 16 物質を検討する必要があると判断された。そこで、6 ウェルプレート法で評価済みの 98 物質の中から、これまでのバリデーション研究での未検討物質、Ames 陰性の無機金属発がん物質、非高揮発性物質ならびに既存の遺伝毒性試験知見の充実性に基づき、最終的に 16 物質を選択

した。

C. 研究結果

上記2つの検討に基づき、バリデーション研究における被験物質の選択のための原則をまとめた (Table 1)。選択のフローとしては、最小被験物質数の導出、対象物質範囲の選択、候補物質の収集、科学的絞込みおよび実務的絞込みのプロセスをとる。

まず、当該バリデーション研究の主目的を達成するために必要と考えられる適切な最小限の被験物質数を導出する。この数は、研究目的、試験の種類、内容により異なってくる。次に、選択する対象物質範囲を明確とし、その妥当性を確保するために、利用する化学物質データベース (例えば、IARC での評価物質、GHS 分類された物質、NTP での評価物質、総説文書掲載物質など、複数選択も可能) を選定し、基本的にその中から被験物質を選択する。そして、バリデーション対象試験の毒性分野や種類に応じ、試験系の類似性 (in vitro/in vivo 試験、使用動物種、毒性項目など) を考慮して、当該毒性分野で検討されその知見を有する物質を選出する。以降の種々の制約 (絞込み) に対応できるよう十分な数ならびに種類の候補物質を収集する。続いて、候補物質の中から科学的絞込みを行う。これには、化学物質クラス、化学構造、毒性の作用機序・作用様式、物性や既存情報の充実性が含まれる。この科学的絞込みと並行的あるいは段階的に、実際に候補物質を用いてバリデーション研究の実施が可能か否かを検証する実務的絞込みを行う。これには、毒性値、入手可能性、取扱容易性、価格などが含まれる。これらの絞込み作業により、バリデーション研究に用いる最終被験物質を候補物質から選択する。

この一連のプロセスにより、当該バリデーション研究において最適な被験物質の選択が可能と考えられる。

D. 考察

バリデーション研究における被験物質の選択は、当該研究の成否に大きな影響を与える。バリデーション研究の目的に沿う特性を有する化学物質を適切な数で選択しなければならない。ここで示した原則は、in vivo 遺伝毒性試験および in vitro 発がん性試験のバリデーション研究のための被験物質選択から導かれたものではあるが、試験の毒性分野や種類、in vitro/in vivo 試験を問わず、被験物質選択の一般原則として活用できるものと思われる。

選択に際し最も重要な事項は、最小被験物質数の導出と候補物質の収集・検証であり、そのためには当該分野の幅広い情報・知識が必要となる。

この段階で、バリデーションマネージメントチームの大筋の理解を得ておくことが、適切な被験物質選択には必要であろう。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeshi Morita, Makoto Hayashi, Madoka Nakajima, Noriho Tanaka, David J. Tweats, Kaoru Morikawa and Toshio Sofuni: Practical Issues on the Application of the GHS Classification Criteria for Germ Cell Mutagens, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 55, 52-68, 2009.
- 2) Tetsuo Sato and Takeshi Morita: Chapter 95, Japan, In *Information Resources in Toxicology*, 4th Edition (Ed. Philip Wexler), pp.991-1011, Academic Press (Elsevier), ISBN 978-0-12-373593-5, pp. 991-1011, 2009.
- 3) 森田 健: GHS 分類のための健康有害性評価基準、毒性情報の種類とデータの質の評価、*化学経済*、2009年5月号、62-67.
- 4) 森田 健: GHS 分類のための健康有害性評価基準、毒性データ評価の要点、Part 1、*化学経済*、2009年6月号、69-75.
- 5) 森田 健: GHS 分類のための健康有害性評価基準、毒性データ評価の要点、Part 2、*化学経済*、2009年7月号、88-93.
- 6) Takeshi Morita, James T. MacGregor and Makoto Hayashi, Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow, *Mutagenesis*, 26, 223-230, 2011.
- 7) Sheila Galloway, Elisabeth Lorge, Marilyn J. Aardema, David Eastmond, Mick Fellows, Bob Heflich, David Kirkland, Dan D. Levy, Anthony Lynch, Daniel Marzin, Takeshi Morita, Maik Schuler, Günter Speit, Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research*, 723, 77-83, 2011.
- 8) Takeshi Morita and Kaoru Morikawa, Expert Review for GHS Classification of Chemicals on Health Effects, *Industrial Health*, 49, 559-565, 2011.
- 9) Takeshi Morita, Masamitsu Honma, Kaoru Morikawa, Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research*, 741, 32-56, 2012.

2. 学会発表

- 1) T Morita, M Hayashi, M Nakajima, N Tanaka, DJ Tweats, K Morikawa, T Sofuni, Practical decision tree for germ cell mutagens in GHS classification, 10th ICEM, Firenze, Italy, Aug. 2009.
 - 2) T Morita, Concentration: Considering the 1 mM Limit, Experience and Data from Japan, 5th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT), Aug.17-19, 2009.
 - 3) M Hayashi, Y Uno, M Honma, T Morita, N Asano, M Nakajima, R Corvi, R Tice, L Schectman, H Kojima, In vivo comet assay: Update on the on-going international validation study, 7th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Rome, Italy, 30 August – September 3, 2009
 - 4) M Hayashi, M Honma, Y Uno, T Morita, N Asano, M Nakajima, R Corvi, R Tice, L Schectman, H Kojima, In vitro comet assay: Update on the on-going international validation study, 7th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Rome, Italy, 30 August – September 3, 2009
 - 5) Masamitsu Honma, Takeshi Morita, Akihiro Wakata, Shigeki Sawada, and Makoto Hayashi, Appropriate top concentration and evaluation of cytotoxicity in in vitro mammalian cell genotoxicity tests, 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS), Shimizu, Symposium, 2009.11.
 - 6) 森田 健、森川 馨：GHS 分類における専門家判断の適用、第 37 回日本トキシコロジー学会、沖縄 (2010)
 - 7) 森田 健、本間正充、福島久美子、森川 馨：In vitro 染色体異常試験における 1 mM の上限濃度は一般化学物質においても許容できるか？第 39 回日本環境変異原学会、つくば (2010)
 - 8) 森田 健、本間正充、森川 馨：一般化学物質における哺乳類培養細胞を用いる遺伝毒性試験の最高濃度、日本薬学会第 131 年会、静岡 (2011)
 - 9) Takeshi Morita, Masamitsu Honma, Kaoru Morikawa, Analysis of *in vitro* chromosomal aberration test data with CHL cells for reducing top test concentration for industrial chemicals, 42nd EMS 2011 Annual Meeting, Montreal, Canada, October 2011.
 - 10) Shuichi Hamada, Rie Takashima, Keisuke Shimada, Kazuyo Zaizen, Satoru Kawakami, Jin Tanaka, Hirotaka Matsumoto, Tomohiro Nakai, Hiroshi Suzuki, Shoji Matsumura, Hisakazu Sanada, Kenji Inoue, Shigeharu Muto, Soichiro Hagio, Aya Hayashi, Tomomi Takayanagi, Yousuke Ogiwara, Akihisa Maeda, Kazunori Narumi, Hironao Takasawa, Izumi Ogawa, Wakako Ohyama, Madoka Nakajima, Takeshi Morita, Hajime Kojima, Makoto Hayashi, and Masa Honma, Evaluation of Repeated Dose Liver Micronucleus Assay in Rats- Summary of The Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS, 42nd EMS 2011 Annual Meeting, Montreal, Canada, October 2011.
 - 11) 濱田修一、高島理恵、嶋田圭祐、財前和代、川上哲、田中仁、松本浩孝、中井智博、鈴木洋、松村奨士、真田尚和、井上健司、武藤重治、萩尾宗一郎、林亜耶、高柳智美、萩原庸介、前田晃央、成見香瑞範、高沢博修、小川いづみ、大山ワカ子、中嶋圓、森田健、小島肇、林真、本間正充：反復投与肝臓小核試験法の有用性の検討 (MMS 共同研究)、第 40 回日本環境変異原学会、東京、2011.11
 - 12) 森田 健、生殖細胞変異原性に関する国際的規制動向、第 40 回日本環境変異原学会、シンポジウム、東京、2011.11
3. 公刊図書
- 1) 城内 博、宮川宗之、森田 健：英和对訳 最新 OECD 毒性試験ガイドライン、化学工業日報社、東京 (2010)
 - 2) 城内 博、宮川宗之、森田 健：英和对訳 最新 OECD 毒性試験ガイドライン、追録版、化学工業日報社、東京 (2011)
4. その他
- 1) 「OECD TG488 トランスジェニックげっ歯類の体細胞および生殖細胞を用いた遺伝子突然変異試験」の翻訳および当所 HP での公開
- F. 知的財産権の出願・登録状況
- なし。

Table 1 バリデーション研究における被験物質選択のための一般原則

検討項目	目的	概説
1 当該バリデーション研究の目的	最小被験物質数の導出	施設内・施設間再現性の他に、当該バリデーション研究の主目的に応じた必要とされる適切な最小限の被験物質数を導出する。
2 利用データベースの選定	対象物質範囲の選択	当該バリデーション研究の試験目的や項目に応じて、利用する化学物質データベース(複数可。例えば、IARCでの評価物質、GHS分類された物質、NTPでの評価物質、総説文書掲載物質など)を選定し、基本的にその中から被験物質を選択する。
3 バリデーション研究対象試験の毒性分野や種類	候補物質の収集	試験系の類似性(in vitro, in vivo, 動物種など)を考慮し、当該毒性分野にて検討され、その知見を有する物質について、以下の絞込みに対応できるよう十分な数の候補物質を収集する。
4 化学物質クラス	科学的絞込み	対象試験の種類にもよるが、特定の化学物質クラスに偏らないように広範囲なクラスから選択し、結果に普遍性をもたせる。
5 化学構造	科学的絞込み	必要に応じ、類似の化学構造を有する物質を増減させる。また、比較のために異性体を採用することもある。
6 毒性の作用機序・作用様式	科学的絞込み	対象試験における毒性発現の種々の作用機序あるいは作用様式をカバーする。
7 物性	科学的絞込み	対象試験に応じ、性状(気体、液体、固体)、蒸気圧(揮発性物質によるin vitro試験系への影響)、溶解性(試験系や溶媒/媒体の選択に影響)、色(測定系への影響)などを考慮し、試験実施に適切な物質を選択する。また、性状は取扱容易性にも関連する。
8 既存情報の充実性	科学的絞込み	必要に応じ、関連する毒性、代謝、安定性などに関する情報が豊富なものを選択する。
9 毒性値	実務的絞込み	通常、in vivo試験においては急性毒性(LD50)値、in vitro試験においては細胞毒性濃度や作用濃度が相当し、被験物質必要量の算出に利用。特にin vivo試験では、低毒性物質では必要量が多くなるため、メーカーやロットの同一性の確保が困難となりやすい。
10 入手可能性	実務的絞込み	当該物質が市販されているか、適切な純度のものはあるか、同一ロットによる必要量があるか、など入手の可否を検討する。
11 取扱容易性	実務的絞込み	当該物質の包装形態、容量、保管条件(室温、冷蔵など)、各国規制(輸出入/輸送制限など)等を検討し、ブラインド化やハンドリングの容易性や国内外への搬送可能性を検討する。
12 価格	実務的絞込み	当該バリデーション研究の予算内で対応可能なものを選択する。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
大野泰雄	非臨床試験法をめぐる新たな流れ-JaCVAMの活動を中心に-	(財) 日本薬剤師研修センター	医薬品GLPガイドブック2009	薬事日報社		2009年	6-31
大野泰雄	日本薬理学会の動物実験指針と動物実験の第三者評価について	(社) 日本薬理学会	実験薬理学実践行動薬理学	株式会社金芳堂	京都	2010年	337-347
小島肇夫	医薬部外品と化粧品		<改正省令を踏まえた>GLP/非GLP試験の具体的実施ポイント	株式会社情報機構	東京	2009年	425-433
小島肇夫	皮膚・粘膜毒性	日本トキシコロジー学会教育委員会	新版 トキシコロジー	株式会社朝倉書店	東京	2009年	246-254
小島肇夫	薬用化粧品の承認取得における安全性試験をめぐる問題点	Fragrance Journal 編集部	医薬部外品有効成分承認取得のための対策と課題	フレグランスジャーナル社	東京	2010年	48-58
小島肇夫	経皮吸収と安全性	杉林堅次	次世代経皮吸収型製剤の開発と応用	シーエムシー出版	東京	2011年	157-166
小島肇夫	序章、動物実験代替法と動物実験の住み分け 第1章第2節 日本における各種承認申請に必要な安全性試験と代替法の受理の現状 第1章第3節 REACH.GHSなどの各種規制との違い 第2章 皮膚腐食性試験の実験手法 第4章 眼刺激性試験代替法の実験手法	小島 肇夫	最新 動物実験代替法の技法ノウハウ	技術情報協会	東京	2011年	3-9 19-23 24-29 33-43 71-87

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
大野泰雄	薬理学における動物実験代替法研究の重要性	日本薬理学雑誌	138	99-102	2011
Uehara T, Minowa Y, Morikawa Y, Kondo C, Maruyama T, Kato I, Nakatsu N, Igarashi Y, Ono A, Hayashi H, Mitsumori K, Yamada H, <u>Ohno Y</u> , Urushidani T	Prediction model of potential hepatocarcinogenicity of rat hepatocarcinogens using a large-scale toxicogenomics database	Toxicol Appl Pharmacol.	255	297-306	2011
Yudate HT, Kai T, Aoki M, Minowa Y, Yamada T, Kimura T, Ono A, Yamada H, <u>Ohno Y</u> , Urushidani T	Identification of a novel set of biomarkers for evaluating phospholipidosis-inducing potential of compounds using rat liver microarray data measured 24-h after single dose administration	Toxicology	295	1-7,	2012
Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Dourson ML, Parker A, Sweeney LM, Nishikawa A, Yoshida M, <u>Ono A</u> , Hirose A.	Proposal of new uncertainty factor application to derive tolerable daily intake.	Regul Toxicol Pharmacol	58(2)	237-42	2010
小島肇夫	REACHにおける環境影響試験法	FRAGRANCE JOURNAL	Vol.37 No.8	46-51	2009
小島肇夫	実験動物データなしで新規医薬部外品の申請はどこまで可能か？	BIO INDUSTRY	Vol.26 No.8	42-49	2009
小島肇夫	再構築培養表皮モデルを用いた遺伝毒性の評価	コスメトロジー研究報告	Vol.17	57-62	2009
小島肇夫	現在の動物実験代替法の状況について	LABIO 21	No.38	17-20	2009
小島肇夫	医薬部外品の製造販売承認申請における安全性の資料に関するあり方検討会報告	日皮協ジャーナル	No.63	82-91	2010
Hajime Kojima	Commentary to the Discussion on Topic 3, “In Vitro Test Approaches with Better Predictivity” at the 5 th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT)	Genes and Environment	Vol.32 No.2	40-42	2010

<u>Hajime Kojima</u> , Masahiro Takeyoshi, Takashi Sozu, Takumi Awogi, Kazunori Arima, Kenji Idehara, Yoshiaki Ikarashi, Yukiko Kanazawa, Eiji Maki, Takashi Omori, Atsuko Yuasa and Isao Yoshimura	Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation	Journal of Applied Toxicology	Vol.31	63-74	2010
小島 肇夫	動物実験の3Rにおける国内外の動向	ドージンニュース	No.138	1-9	2011
小島 肇夫	動物実験代替法における国際協調	日薬理誌	No.138	103-7	2011
Satoshi Kano, Hiroaki Todo, Katsunori Furui, Kenichi Sugie, Yoshihiro Tokudome, Fumie Hashimoto, <u>Hajime Kojima</u> , Kenji Sugibayashi	Comparison of Several Reconstructed Cultured Human Skin Models by Microscopic Observation : Their Usefulness as an Alternative Membrane for Skin in Drug Permeation Experiments	AATEX	16(2)	51-8	2011
Stefan Pfuhrer, Mick Fellows, Jafn van Benthem, Raffaella Corvi, Rodger Curran, Kerry Dearfield, Pfaul Fowler, Roland Froetschl, Azeddine Elhajouji, Ludovic Le Hegarat, Toshio Kasamats, <u>Hajime Kojima</u> , Gladys Ouedraogo, Andrew Scott and Gunter Speit	<i>In vitro</i> genotoxicity test approaches with better predictivity : Summary of an IWGT workshop	Mutat Res.	723	101-7	2011
小島 肇夫	第8回国際動物実験代替法会議参加記	コスメックジャパン	Vol.1(5)	29-33	2011
小島 肇夫	技術講座 安全性評価試験(1) —安全性評価の考え方—	コスメックジャパン	Vol.1(6)	10-3	2011

小島 肇夫	技術講座 安全性評価試験(2) —安全性評価試験法—	コスメックジ ャパン	Vol.1(7)	18-22	2011
小島 肇夫	技術講座 安全性評価試験(3) —バリデーション—	コスメックジ ャパン	Vol.2(1)	73-7	2012
小島 肇夫	技術講座 安全性評価試験(4) —バリデーションセンター—	コスメックジ ャパン	Vol.2(2)	65-9	2012
小島 肇夫	技術講座 安全性評価試験(5) 動物実験代替法を巡る動向201 1~12年-1-	コスメックジ ャパン	Vol.2(3)	44-9	2012
Hajime Kojima, Yo ko Ando, Kenji Ide hara, Masakazu Kat oh, Tadashi Kosak a, Etsuyoshi Miyao ka, Shinsuke Shino da, Tamie Suzuki, Yoshihiro Yamaguc hi, Isao Yoshimura, Atsuko Yuasa, Yu kihiko Watanabe an d Takashi Omori	Validation Study of the <i>In Vitro</i> o Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24	ATLA	Vol.40	1-18	2012
Aoi Kimura, Naohiko Torigoe, AtsuroMiya ta, and Masamitsu H onma	Validation of a simple In Vitro co met assay method using CHL cell s	Genes and Environm ent	Vol.32 No.3	61-65	2010
Yasuyuki Saitoh, Y oshikazu Harata, Fu kutarō Mizuhashi, Madoka Nakajima and Nobuhiko Miw a	Biological safety of neutral-pH hydrogen- enriched electrolyzed water upon mutagenicity, geno toxicity and subchronic oral tox icity	Toxicol and Industr ial Health	Vol.26(4)	203-216	2010
Yoshihide Ueda, M asaru Tsuboi, Yasuf umi Ota, Maki Ma kita, Takuya Aoshi ma, Madoka Nakaji ma and Isao Naram a	Gastric mucosal changes induce d by polyethylene glycol 400 a dministered by gavage in rats	Toxicol. Sci.	Vol.36(6)	421-428	2011
Keiichi Itoh, Shoji Masumori, Madoka Nakajima, Makoto Hayashi, Hiroyuki Sakakibara, Kayok o Shimoi	Differences in micronucleus ind uction in peripheral blood reticu locytes of mice exposed to N-e thyl-N-nitrosourea at light and dark dosing times	Mutation Res	In press		

Madoka Nakajima, Maya Ueda, Kohji Yamakage, Yuzuki Nakagawa, Munehiro Nakagawa, Wako Ohyama, Takashi Omori, Norihide Asano, Makoto Hayashi and Yoshifumi Uno	Tissue Sample Preparation for <i>In Vivo</i> Rodent Alkaline Comet Assay	Gene & Environment	Vol.34(1)	50-54	2012
Masato Naya, Norihiro Kobayashi, Makoto Ema, Sawako Kasamoto, Masahito Fukumuro, Shigeaki Takami, Madoka Nakajima, Makoto Hayashi and Junko Nakanishi	<i>In vivo</i> genotoxicity study of nanosized titanium dioxide particles using comet assay following intratracheal instillation in rats	Regulatory Toxicology and Pharmacology	Vol.62	1-5	2012
Makoto Ema, Jin Tanaka, Norihiro Kobayashi, Masato Naya, Shigehisa Endo, Junko Maru, Masayo Hosoi, Miho Nagai, Madoka Nakajima, Makoto Hayashi, Junko Nakanishi	Genotoxicity evaluation of fullerene C ₆₀ nanoparticles in comet assay using lung cells of rats intratracheally instilled	Regulatory Toxicology and Pharmacology	Vol.62	419-424	2012
Alexander Sheh, Chung wei Lee, Kenichi Masumura, Barry H. Rickman, Takehiko Nohmi, Gerald N. Wogan, James G. Fox, and David B. Schauer	Mutagenic potency of <i>Helicobacter pylori</i> in the gastric mucosa of mice is determined by sex and duration of infection	Proc. Natl. Acad. Sci.	Vol.107 no.34	15217-15222	2010
Naomi Toyoda-Hokaiwado, Tomoki Inoue, Kenichi Masumura, Hiroyuki Hayashi, Yuji Kawamura, Yasushi Kurata, Makiko Takamune, Masami Yamada, Hisakazu Sanada, Takashi Umemura, Akiyoshi Nishikawa, and Takehiko Nohmi	Integration of <i>in vivo</i> genotoxicity and short-term carcinogenicity assays using F344 <i>gpt</i> delta transgenic rats: <i>in vivo</i> mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene structural isomers	Toxicol. Sci.	114(1)	71-78	2010