

201235001A

厚生労働科学研究費補助金

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

# 国際協調を重視した化粧品・医薬部外品における 安全性試験法の再評価に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

平成25（2013）年4月

研究代表者 小 島 肇

（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部）

## 目 次

I. 総括研究報告		
国際協調を重視した化粧品・医薬部外品における安全性試験法の再評価に関する研究	-----	1
小島 肇		
II. 分担研究報告		
1. 化粧品原料の経皮吸収に関する研究	-----	13
(医薬部外品の安全性を動物実験の3Rsに配慮して評価するための試験法のあり方について)		
杉林堅次		
2. 分子生物学的・組織化学的手法を用いた眼刺激性試験・眼毒性試験 代替法の開発	-----	31
山本直樹		
3. 光毒性・光感作性試験代替法に関する諸検討	-----	61
大野泰雄		
4. 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	-	65
尾上誠良		
5. 眼刺激性試験代替法のバリデーションおよび共同研究	-----	71
小島 肇		
6. ヒトパッチテストの再検討と使用試験	-----	151
松永佳世子		
7. 使用試験の情報管理統括に関する研究	-----	161
杉浦 伸一		
8. 代替法についての国際情勢の調査	-----	167
杉山真理子		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	209
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	211

H24年度総括研究報告書

国際協調を重視した化粧品・医薬部外品における安全性試験法の再評価に関する研究

H22-医薬-一般-002

研究代表者 小島 肇

国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

国際協調を重視した化粧品・医薬部外品における安全性試験法の再評価に関する研究として、試験法の国際調査を行うとともに、研究開発、バリデーションを含む評価、ヒトパッチテストの再検討と使用試験および使用試験の情報管理統括に関する研究を行った。

試験法の調査においては、動物実験を行った原料を配合する化粧品の EU における販売が禁止される 2013 年 3 月の延期問題に関連した調査が中心となった。

試験法の開発および評価においては、皮膚刺激性に関しては、いくつかの化学物質の動物皮膚および 3 次元培養ヒト皮膚モデル中濃度を比較した結果、3 次元培養ヒト皮膚モデルの特徴を理解して用いる必要があると推定された。

眼刺激性に関しては、SIRC-CVS アッセイについては、国際バリデーション実行委員会を組織し、バリデーションを実施した。高い施設内および施設間再現性を確認できた。また、3 次元角膜モデルとして LabCyte CORNEA-MODEL24 を用いた眼刺激性試験代替法のプロトコルを検証するため、共同研究を実施し、プロトコルの問題点を確認できた。さらに、試験法の問題点を解決するため、不死化遺伝子を導入して作製した新規不死化角膜上皮細胞を用いて、細胞毒性試験よりも低濃度において細胞に対する影響を検出できる遺伝子 (*cyclin-D1*, *snail-1*, *keratin-3*) の選出および三次元角膜再構築モデルの作製法と曝露実験プロトコルの概案を確立した。光毒性に関しては、reactive oxygen species (ROS) ROS アッセイが他施設間バリデーションにより使用する solar simulator が異なったとしても、適切にキャリブレーションすることによって信頼性の高い光安全性評価法であることを確認できた。また、ROS アッセイの難水溶性薬物への適合性が低い問題を回避するために界面活性剤を加えた micellar ROS assay を構築した。83 種のモデル化合物を用いて、高い予測性ならびに頑健性を得られた。ヒトパッチテストの再検討と使用試験において、パッチテストは、再現性のある試験系であり、実使用を想定した連続塗布試験結果との間に相関性を認めることから、市販外用医薬品における皮膚安全性の予測手段になりうることが示唆された。使用試験の情報管理統括のため、Office365 を用いて茶のしずく石鹸による副作用の情報共有サイトを作成し、利用状況を調査した。またサーベイランスへの応用として接触皮膚炎症例調査サイト、CTG 図の判別調査サイトを作成し、使用試験の情報管理システムとしての有用性を確認した。

キーワード：眼刺激性試験、皮膚刺激性試験、光毒性試験、バリデーション、動物実験代替法、パッチテスト

協力研究者  
 大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所  
 尾上 誠良 静岡県立大学 薬学部  
 杉林 堅次 城西大学 薬学部 薬粧品  
 動態制御学研究室  
 山本 直樹 藤田保健衛生大学 共同利  
 用研究施設  
 松永佳世子 藤田保健衛生大学 医学部  
 皮膚科  
 杉浦伸一 名古屋大学  
 杉山真理子 杉山 真理子 日本化粧品  
 工業連合会、技術委員会動  
 物実験代替専門委員会委員  
 長

#### A. 研究目的

2013年3月のEUにおける製品および成分における動物実験の廃止により、安全性試験法の評価手法を動物中心から動物実験代替法（以下、代替法と記す）に見直さなければならない状況にある。本研究班では、国際協調を重視した化粧品・医薬部外品における安全性試験法の再評価を目的に、試験法の国際調査を行うとともに、研究開発、バリデーションを含む評価、使用試験および使用試験の情報管理統括に関する研究を行った。

試験法としては、皮膚透過性、眼刺激性、光毒性に注目し、それぞれバリデーションを行う一方で、既存試験法の問題点を克服すべく、試験法の開発を行った。

#### B. 研究方法

##### B-1) 情報収集

過去の本研究による経験から、いくつかのホームページ（SCCS、OECD、EURL ECVAM、ICCVAM、EPAAなど）を定期的に関連すると共にEUについては同地域の化粧品工業会である欧州化粧品工業会（Cosmetics Europe；CE、旧称COLIPA）、米国については米国化粧品工業会（Personal Care Products Council；PCPC、旧称CTFA：Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association）との連携を通じて取得した。この他、代替法の承認状況等については、専門学会の会誌やニュースレターも参考とした。

##### B-2) 試験法の開発、評価

###### B-2-1) 皮膚透過性試験

ヘアレスラット摘出皮膚および3次元培養ヒト皮膚モデル EpiDerm™ Epi606X（EpiDerm）を用いた *In vitro* 皮膚透過試験を実施した。さらに、生きた表皮・真皮中濃度の測定を実施した。

###### B-2-2) 眼刺激性試験

###### B-2-2-1) SIRC-CVSアッセイのバリデーション

SIRC-CVSアッセイは、96wellプレートに播種されたSIRC細胞への被験物質の72時間処理後において、Crystal violetが生細胞の細胞膜に入り込んで染色する性質を利用した方法で生細胞のみを測定する方法である。本試験法のバリデーション実行委員会を組織し、日本動物実験代替法検証センター（JaCVAM）主催にて、参加3施設の協力のもと、コード化した20物質を用いたphase IIバリデーションを実施した。このphaseのバリデーションにて施設内再現性を確認するため、各物質に3つのコード番号を付け、合計60物質の試験が実施された。

###### B-2-2-2) LabCyte CORNEA-MODEL24を用いた眼刺激性試験代替法の共同研究

培養角膜モデル LabCyte CORNEA-MODEL24を用いた細胞毒性試験のプロトコル検証のための共同研究を参加施設を4グループに分け、各グループにコード化した被験物質を4物質ずつ配布して実施した。

###### B-2-2-3) 分子生物学的・組織化学的手法を用いた眼刺激性・眼毒性試験代替法の開発

バリデーションが行われている方法は、非水溶性物質の評価ができない、中等度の眼刺激性が評価できない等の弱点をもつ。これらを解決すべく、以下の試験法開発を行った。

- 1) 不死化角膜上皮細胞（iHCE-NY）を用いた二次元培養系の曝露実験プロトコルを作成した。
- 2) 平成23年度に実施したマイクロアレイ遺伝子解析結果を基に、iHCE-NY細胞の二次元培養モデルを用いて、細胞毒性試験よりも低濃度被験物質でも細胞に与えるごくわずかな影響を検出できる高感度指標遺伝子を選出した。
- 3) iHCE-NYを用いて、再現性が高く、安定して三次元角膜再構築モデルが作製できる培養法の確立および三次元角膜再構築モ

デルを用いた曝露実験のプロトコルを検討した。

### B-2-3) 光毒性試験

#### B-2-3-1) バリデーション

JaCVAM 主催の国際バリデーション実行委員会の下、Seric 社の SXL-2500 を有する製薬協加盟 4 企業が参加し、GLP の精神にのっとり各種検討を実施した。ROS assay プロトコルに従い、コード化された 42 種類の被験物質 (23 種の光毒性陽性化合物ならびに 19 種の光毒性陰性化合物: 200  $\mu\text{M}$ ) を含む反応液を 96 ウェルプレートに分注して Seric 社の SXL-2500 による 1 時間の擬似太陽光照射後 (ca. 2.0  $\text{mW}/\text{cm}^2$ )、ROS (Singlet oxygen と Superoxide) の産生量をそれぞれ測定した。実験は 3 回繰り返す、各化合物の光毒性リスクを評価した。

#### B-2-3-2) 試験法改良

難水溶性薬物として、65 種類の光毒性陽性物質と 18 種類の光毒性陰性物質を選択した。先に確立した ROS assay プロトコルに従い、被験物質 (200  $\mu\text{M}$ ) と終濃度 0.5% Tween 20 を含む反応液を 96 ウェルプレートに分注して Atlas Suntest CPS series による 1 時間の擬似太陽光照射後 (ca. 2.0  $\text{mW}/\text{cm}^2$ )、ROS の産生量をそれぞれ測定した。実験は 3 回繰り返す、各化合物の光毒性リスクを評価した。

B-3) ヒトパッチテストの再検討と使用試験および使用試験の情報管理統括に関する研究

#### B-3-1) ヒトパッチテストの再検討と使用試験

ヒト背部皮膚において、日本国内で市販されている 55 の外用医薬品を異なる 2 集団に対して、24 時間あるいは 48 時間フィンチャンパーにて閉塞貼付し、除去後 2 時間と 24 時間の皮膚反応を評価し皮膚刺激指数を算出した。次いでパッチテスト皮膚刺激指数の範囲が異なる 6 検体を腕に 3 週間連続塗布し、出現する皮膚症状を観察した。

#### B-3-2) 使用試験の情報管理統括に関する研究

Office 365 により作成された茶のしずく石鹸の副作用情報共有サイトの運用を通じて、利用状況の詳細な調査、また他のサーベイランスに応用した際の拡張性の調査を

行った。

#### (倫理面への配慮)

倫理的な問題が生じる実験を実施しておらず、特に配慮すべき問題はない。

## C. 結果

### C-1) 情報収集

本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するためには、関連する国際情勢の調査は必要不可欠な研究活動である。特に EU では、2003 年 3 月に公布され 2009 年 3 月 11 日に発効した「化粧品指令第 7 次改正」と 2007 年 6 月 1 日に発効した「化学物質の登録と規制 (REACH)」のため、EURL ECVAM を中心に動物実験代替法の開発と評価は非常に進展している。一方、米国においては ICCVAM が中心となって代替法の評価が進行している。近年、代替法の開発と評価はグローバル化が加速し、代替試験法協力国際会議 (ICATM) など国際的な協力体制が整いつつあり、本邦における対応案策定にはこれら国際情勢の調査・把握は重要である。

本年度の特筆すべき動きは、動物実験を行った原料を配合する化粧品の EU における販売が禁止される 2013 年 3 月の延期問題に関連して、欧州委員会保健衛生担当理事や Cosmetics Europe の意見の公表など、様々な論議があったことである。本問題は決着の 때가近づいている。2012 年 7 月 10 ~ 13 日にワシントン DC (米国) で開催された第 6 回化粧品規制協力国際会議 (ICCR) において、動物実験代替法と共に安全性評価のためのコンピューター予測モデルに関するトピックにも焦点が当てられ、ワーキンググループが設立されたことも注目される。2011 年 1 月から開始された EU における反復投与毒性代替法の研究プログラム SEURAT-1 (Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing) は 2 年目を迎え、プログラム内の各プロジェクトの研究に進展が認められた。

国内においては、2012 年 4 月 26 日付で厚生労働省医薬食品局審査管理課から、「皮膚感作性試験代替法及び光毒性代替法を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンスについて」の事務連絡が発出されたことが挙げられる。これにより



代替法の公的な利用が実質的に示された。また、感作性試験代替法に関し、複数の *in vitro* 法を組み合わせた評価体系の構築を目指すワーキンググループが日本化粧品工業連合会の動物実験代替専門委員会内に組織されことも挙げられる。

## C-2) 試験法の開発、評価

### C-2-1) 皮膚透過性試験

水溶性物質の EpiDerm の生きた表皮・真皮中濃度はヘアレスラット皮膚より著しく高い値を示したことから、3次元培養ヒト皮膚モデルの脆弱な皮膚角層バリアの影響による動物皮膚との皮膚中濃度の違いが偽陽性の原因であることが確認された。

脂溶性エステル物質では、皮内代謝産物の生きた表皮・真皮中濃度が EpiDerm で低い値を示したことから、動物皮膚との皮内カルボキシエステラーゼ活性および化学物質の透過速度の違いによる皮膚中濃度の違いが偽陰性の一要因であると考えられた。

### C-2-2) 眼刺激性試験

#### C-2-2-1) SIRC-CVSアッセイのバリデーション

比較対照物質 (triethanolamine) の平均 IC50 の平均値と標準偏差 (SD) は、安定しており、再現性は高いと考えられた。

SIRC-CVSアッセイにおけるPhase II aおよび II bの陽性および陰性の結果から、20物質の3回の繰り返し、合計60データの判定結果がすべて揃い、施設内および施設間の再現性は極めて高いと判断された。

#### C-2-2-2) LabCyte CORNEA-MODEL24を用いた眼刺激性試験代替法の共同研究

技術移転性については、陽性対照および陰性対照結果より、本プロトコルの習得は容易であると考えられた。

施設内再現性については、3回の繰り返し試験で、判定が異なる結果となった試験は、6データ (発生率6/96試験セット: 6.3%) であった。これらは、いずれもGHS分類において、区分外 (非眼刺激性) に分類される物質であった (発生率6/24試験: 25%)。

施設間再現性においては、平均細胞生存率が4施設の4データで一致しなかった。

#### C-2-2-3) 分子生物学的・組織化学的手法を用いた眼刺激性・眼毒性試験代替法の開発

iHCE-NY を用いた二次元培養系曝露実験プロトコルとして、以下をまとめた。

- 前培養: 24時間
- 曝露時間: 5分
- 播種細胞数:  $2.5 \times 10^4$  cells / well
- 後培養: 24時間

SLSとEtOHを5分曝露させた条件での遺伝子発現の推移についての結果、*cyclin-D1*、*snail-1*、*keratin-3* が細胞毒性試験よりも低濃度において細胞に対する影響を検出できる遺伝子であることが分かった。

iHCE-NY を用いた三次元角膜再構築モデルの組織像から、非常に正常角膜上皮組織像に近いといえた。MTT法、FL法、電気抵抗など、近年の眼刺激性試験代替法で用いられている評価方法を検討し、いずれも良好な結果を得ることができた。

iHCE-NY を用いて作製した三次元角膜再構築モデルを用いた被験物質による曝露実験プロトコル (曝露時間: 5分) を考案し、実施した。

現状のモデルでは、結果として、NCの物質曝露でも細胞生存率が低かったため、感度が良すぎる (三次元角膜再構築モデルとしては脆弱) という結論に至った。

### C-2-3) 光毒性試験

#### C-2-3-1) バリデーション

本試験に参加した4施設において、ROS assay 結果の日内・日間変動は小さく、良好な施設間再現性を示した。選定した42化合物の被験物質についても、難溶性のため評価不能であった被験物質を除き、光毒性物質の陽性検出率は全施設とも100%であった。溶解度の問題で希釈を余儀なくされるケースや、評価そのものが出来ない被験物質も存在した。ROS assay の sensitivity は全施設において100%であり、specificity は46.2-63.6%であった。光毒性陰性物質の陽性検出率は施設により75.0-84.0%と異なるものの、いずれの施設においても偽陰性予測を認めず、初期スクリーニング法としての有用性を示唆した。

#### B-2-3-2) 試験法改良

mROS assay の結果から、殆どの光毒性物質はROS産生を示す傾向にあり、一方、

陰性化合物群からの ROS 産生は極めて限定的なものであった。mROS assay の特異性は 76.5% であり、陽性ならびに陰性検出能はそれぞれ 93.9%、86.7% であった。しかしながら、光毒性化合物である *ibuprofen* と *indomethacin* が互いに陰性とみなされた。本化合物群は以前実施した ROS assay においていずれも陽性と判定されており、これはミセル添加に伴う光反応性変化の可能性を示唆するものであった。

C-3) ヒトパッチテストの再検討と使用試験および使用試験の情報管理統括に関する研究

C-3-1) ヒトパッチテストの再検討と使用試験

別集団に対して実施したパッチテスト皮膚刺激指数は、同程度であった。さらに、パッチテスト皮膚刺激指数と連続塗布試験の皮膚症状出現頻度の間に正の相関関係が見いだされた。

C-3-2) 使用試験の情報管理統括に関する研究

Office365 を用いて茶のしずく石鹼による副作用の情報共有サイトを作成し、利用状況を調査した。またサーベイランスへの応用として接触皮膚炎症例調査サイト、CTG 図の判別調査サイトを作成し、使用試験の情報管理システムとしての有用性を確認した。

#### D. 考察

国内外の代替法に関する情勢は急速に変化しており、関連情報を継続的に収集分析し、その結果を公表していくことは、本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するうえで必要と考えられる。

本研究班で取り上げた皮膚透過性、眼刺激性、光毒性は試験法が開発され、バリデーションが実施されている。バリデーションによる試験法の評価を適切に実施することはもちろん重要であるが、その過程で得られた試験法の問題点を解決するために試験法を改良することも重要である。本研究班では、各分野の試験法の問題点を明確にし、解決につなげる研究を実施できた。

#### E. 結論

1) 動物実験を行った原料を配合する化

粧品のEUにおける販売が禁止される2013年3月の延期問題に関連して、欧州委員会保健衛生担当理事やCosmetics Europeの意見の公表など、様々な論議があった。

2) 3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価は、3次元培養ヒト皮膚モデルの特徴を理解して行う必要があると推定された。

3) 眼刺激性試験代替法SIRC-CVSアッセイおよびLabCyte CORNEA-MODEL24を用いた眼刺激性試験代替法とも施設内・施設間再現性の高い方法であることが確認できた。

4) 角膜上皮細胞の不死化細胞(iHCE-NY)を用いて、細胞毒性試験よりも低濃度において細胞に対する影響を検出できる遺伝子(*cyclin-D1*, *snail-1*, *keratin-3*)の選出およびiHCE-NYを用いた三次元角膜再構築モデルの作製法と曝露実験プロトコルを確立できた。

5) ROSアッセイは使用する solar simulator が異なっても、適切にキャリブレーションすることによって信頼性の高い光安全性評価に用いることができる。

6) micellar ROS assay は難水溶性医薬品への適用性が高く、これまでに ROS assay で評価が困難であった化合物の光毒性リスク評価を可能にすると期待される。

7) パッチテストは、再現性のある試験系であり、実使用を想定した連続塗布試験結果との間に相関性を認めることから、市販外用医薬品における皮膚安全性の予測手段になりうることを示唆された。

8) Office365を用いて茶のしずく石鹼による副作用の情報共有サイトを作成し、利用状況を調査した。またサーベイランスへの応用として接触皮膚炎症例調査サイト、CTG図の判別調査サイトを作成し、使用試験の情報管理システムとしての有用性を確認した。

F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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4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, 43(5), 473-482 (2012)
- 2) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (6), COSME TECH JAPAN, 2(4) : 59-63 (2012)
  - 3) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (7), COSME TECH JAPAN, 2(5) : 51-54 (2012)
  - 4) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (8), COSME TECH JAPAN, 2(6) : 60-63 (2012)
  - 5) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (9), COSME TECH JAPAN, 2(7) : 55-58 (2012)
  - 6) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (10), COSME TECH JAPAN, 2(8) : 50-53 (2012)
  - 7) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (11), COSME TECH JAPAN, 2(9) : 43-48 (2012)
  - 8) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (12), COSME TECH JAPAN, 2(10) : 48-51 (2012)
  - 9) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (13), COSME TECH JAPAN, 2(11) : 44-48 (2012)
  - 10) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (14), COSME TECH JAPAN, 2(12) : 39-42 (2012)
  - 11) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (15), COSME TECH JAPAN, 3(1) : 68-72 (2013)
  - 12) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (16), COSME TECH JAPAN, 3(2) : 51-57(2013)
  - 13) Kojima, H.: The Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM): Recent ICATM Contributions and Future Plans, ALTEX Proceeding, 1/12, Proceedings of WC8 (2012)
  - 14) Onoue S, Hosoi K, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Matsuoka N, Nakamura K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Seto Y, Kato M, Yamada S, Ohno Y, Kojima H.: Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standard protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation., J Appl Toxicol. (2012)
  - 15) Seto Y, Hosoi K, Takagi H, Nakamura K, Kojima H, Yamada S, Onoue S.: Exploratory and regulatory assessments on photosafety of new drug entities., Curr Drug Saf. 7(2):140-8 (2012)
  - 16) Stokes W, McFarland R, Kulpa-Eddy J, Gatewood D, Levis R, Halder M, Pulle G, Kojima H, Casey W, Gaydamaka A, Miller T, Brown K, Lewis C, Chapsal JM, Bruckner L, Gairola S, Kamphuis E, Rupprecht CE, Wunderli P, McElhinney L, De Mattia F, Gamoh K, Hill R, Reed D, Doelling V, Johnson N, Allen D, Rinckel L, Jones B.: Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: state of the science and planning the way forward. *Biologicals*. 40(5):369-81(2012)
  - 17) 小島肇、西川秋佳：日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 平成23年度報告書、AATEX-JaCVAM1(1), 88-103 (2012)\_
  - 18) Onoue S, Seto Y, Kato M, Aoki Y, Kojo Y, Yamada S, Inhalable Powder Formulation of Pirfenidone with Reduced Phototoxic Risk for Treatment of Pulmonary Fibrosis. *Pharm. Res.*, in press.
  - 19) Seto Y, Inoue R, Kato M, Yamada S, Onoue S, Photosafety assessments on pirfenidone: Photochemical, photobiological, and pharmacokinetic characterization. *J. Photochem. Photobiol. B*, in press.
  - 20) Onoue S, Kato M, Yamada S, Development of an albuminous reactive oxygen species assay for photosafety evaluation under experimental biomimetic conditions. *J. Appl. Toxicol.*, in press.
  - 21) KANTO, H., WASHIZAKI, K., ITO, M., MATSUNAGA, K., AKAMATSU, H., KAWAI, K., KATOH, N., NATSUAKI, M., YOSHIMURA, I., KOJIMA, H., OKAMOTO, Y., OKUDA, M., KUWAHARA, H., YOKOTA, T., SUGIYAMA, M., KINOSHITA, S., MORI, F., *J. Dermatol.*, in press.
  - 22) 鈴木加奈子、松永佳世子、矢上晶子、足立厚子、伊藤正俊、乾重樹、宇宿一成、海老原全、大磯直毅、岡恵子、河合敬一、鹿庭正昭、関東裕美、佐々木和実、杉浦真理子、杉山真理子、大迫順子、高山かおる、角田孝彦、尾藤利憲、中田土起丈、西岡和恵、堀川達弥、横関博雄、ジャパニーズスタンダードアレルゲン(1994)の2005年度～2007年度陽性



- 率とジャパニーズスタンダードアレルゲン(2008)の2009年度陽性率, J. Environ Dermatol Cutan Allergol, 6(2), 67-84, 2012
- 23) Suzuki K, Yagami A, Matsunaga K. Allergic contact dermatitis caused by a skin-lightening agent, 5,5'-dipropylbiphenyl-2,2'-diol., Contact Dermatitis 2012. 66(1):51-2.
- 24) Suzuki K, Hirokawa K, Yagami A, Matsunaga K. Allergic contact dermatitis from carmine in cosmetic blush. Dermatitis. Contact Dermatitis 2012. 66(1):51-2.
- 25) 西村 景子, 矢上 晶子, 松永 佳世子. 食物アレルギーupdate (case 05)カシューナッツアレルギーの1例. Visual Dermatology 2012. 11(3):302-303.
- 25) 西村 景子, 佐野 晶代, 松永 佳世子. 多種類の野菜・果物に症状を呈した花粉・食物アレルギー症候群の1例. Visual Dermatology 2012. 11(3):300-301.
- G-2 学会発表 (講演及び学会発表)
- 1) 山本直樹、平野耕治、山下宏美、加藤義直、佐藤淳、水谷宏、中村政志、原和宏、宇佐美雅仁、谷川篤宏、堀口正之、谷口孝喜、小島 肇：不死化角膜上皮細胞 (iHCE-NY) を用いた眼刺激性試験代替法に関する研究日本組織培養学会 第85回大会、京都大学、京都 (2012.5)
- 2) 小島 肇：動物実験代替法の国際的理解、日本実験動物科学・技術 九州2012、別府国際コンベンションセンター、大分 (2012.5)
- 3) 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、未来へのバイオ技術勉強会 月例会、(一財) バイオインダストリー協会、東京 (2012.5)
- 4) 尾上 誠良, 細井 一弘, 若栗 忍, 岩瀬裕美子, 山本 敏誠, 松岡 奈央子, 中村 和子, 戸田 嗣人, 高木 広憲, 大崎尚人, 松本 康浩, 川上 哲, 世戸 孝樹, 加藤 尚視, 山田 静雄, 大野 泰雄, 小島 肇：ROS アッセイ多施設バリデーション：物性からの光毒性リスク予測を目指して、日本薬剤学会第27年会、神戸国際会議場、兵庫 (2012.5)
- 5) Kojima, H. : Session: Regulatory Acceptance of Alternative Carcinogenicity tests (セッション：発癌性試験代替法の行政的な受入れ) OECD Activities on the Cell Transformation Assays, World Congress on in Vitro Biology, 2012, Bellevue, Washington, USA (2012.6)
- 6) Kojima, H., Tanaka, N., Oshimura, M., Saito, K., Saito, F. and Imatanaka, N. : New Research Projects in Japan for Alternative to Repeated Dose Oral Toxicity Studies, EUROTOX 2012, Stockholm, Sweden (2012.6)
- 7) 小島 肇：シンポジウム：in vitro 毒性試験法の探索毒性試験への展開、in vitro 探索毒性試験の展望、第39回日本毒性学学術年会、仙台国際センター (2012.7)
- 8) 山口宏之、小島 肇、竹澤俊明：コーゲンビトリゲル膜チャンバー内に再構築したヒト角膜上皮組織シート：化学物質の眼刺激性評価指標としての経皮電気抵抗値の重要性、第39回日本毒性学学術年会、仙台国際センター (2012.7)
- 9) 松本康浩、尾上誠良、細井一弘、若栗忍、岩瀬裕美子、山本敏誠、松岡奈央子、中村和子、戸田嗣人、高木広憲、大崎尚人、川上哲、世戸孝樹、加藤尚視、山田静雄、大野泰雄、小島肇：光安全性評価のためのROSアッセイ多施設バリデーション、第39回日本毒性学学術年会、仙台国際センター (2012.7)
- 10) 内野正、竹澤俊明、山下邦彦、小島肇、清水久美子、宮永裕子、五十嵐良明、西村哲司：ビトリゲルチャンバーを培養担体とする皮膚感作性試験代替モデルを構成する細胞のサイトカイン産生能について、第39回日本毒性学学術年会、仙台国際センター (2012.7)
- 11) 六川潤美、榊原隆史、伊藤浩太、河村公太郎、古川正敏、藤平司朗、市戸等、並木正人、平賀武夫、小島肇、松浦正男：眼刺激性評価のための牛角膜を用いた混濁度および透過性試験法 (BCOP 法)、第39回日本毒性学学術年会、仙台国際センター (2012.7)
- 12) 小島 肇：皮膚刺激性評価法の最新動向、皮膚基礎研究クラスターフォ

- ーラム、タワーホール船堀、東京(2012.7)
- 13) 伊藤浩太、榊原隆史、六川潤美、平賀武夫、小島 肇、松浦正男：牛摘出角膜を用いた眼刺激性試験代替法(BCOP法)、第32回比較眼科学会年次大会、名古屋国際会議場(2012.7)
- 14) 小島 肇：皮膚感作性試験代替法における最新動向、Workshop on the Adverse Outcome Pathways for skin sensitization assay,京都教育会館(2012.9)
- 15) Kojima, H., Tanaka, N., Oshimura, M., Saito, K., Saito, F. and Imatanaka, N. : Japanese New Project" ARCH-Tox" for the future Chemicals Management Policy: Research and Development of in vitro and in vivo Assay for Internationally Leading Hazard Assessment and Test Methods, 1st annual meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology (ASCCT), ベセズタ、米国(2012.9)
- 16) Yoshifumi Uno for JaCVAM Comet Assay International Validation Project Team : Update of the Status of the JaCVAM Organized International *In Vivo* Comet Assay Validation Study 2012 Genetic Toxicology Association (GTA) meeting, John M. Clayton Hall Conference Center, University of Delaware, Newark, DE (2012.10)
- 17) Kojima, H.: Historical background on the Japanese Validation Study, International Workshop on the HET-CAM Assay, ベルリン、ドイツ(2012.10)
- 18) 小島 肇：テストガイドラインの現状、三次元生体組織構築公開シンポジウム、化学会館ホール、東京(2012.11)
- 19) 小島 肇：今後の化学物質等の安全性評価の方法はどうなるのか、第16回コロイド・界面技術者フォーラム、KKR江の島ニュー向洋、神奈川(2012.11)
- 20) 濱田修一、高島理恵、嶋田圭祐、松本和美、川上哲、田中仁、松本浩孝、中井智博、今村匡志、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、寺島ゆかり、高沢博修、小川いづみ、大山ワカ子、涌生ゆみ、川迫一史、佐野正樹、大橋信之、森田健、小島 肇、林真、本間正充：反復投与による肝臓小核試験法の有用性の検討：MMS共同研究の報告、日本環境変異原学会第41回大会、グランシップ 静岡(2012.11)
- 21) 大山ワカ子、成見香瑞範、岡田恵美子、藤石洋平、高柳智美、堀妃佐子、松村奨士、池田直弘、夏目匡克、田中仁、高島理恵、松本浩孝、須井哉、浅野哲秀、森田健、小島 肇、本間正充、濱田修一、林 真：反復投与による消化管小核試験法の有用性の検討：MMS共同研究の報告、日本環境変異原学会第41回大会、グランシップ 静岡(2012.11)
- 22) 小島 肇：化粧品の安全性を考える、「化粧学のスズメ」、東京農業大学世田谷キャンパス(2012.12)
- 23) 小島 肇：25周年記念講演「日本動物実験代替法学会バリデーショナル委員会とJaCVAM」、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 24) 山口 宏之、小島 肇、竹澤 俊明：シンポジウム：コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを用いたAMET解析に有用な培養システム「コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを利用した眼刺激性試験法の開発現状」、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 25) 内野 正、清水久美子、竹澤俊明、山下邦彦、小島 肇、五十嵐良明、秋山卓美：シンポジウム：コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを用いたAMET解析に有用な培養システム「コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを利用した皮膚感作性試験法の開発現状」、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 26) 小島 肇、安中 希、土屋成一朗、吉武裕一郎、許 睿、鈴木 克、嶋谷 亘、梶田明美、中村 牧、渡辺美香、中嶋圓、坂本興嗣、竹田竜嗣、久間將義、池田英史、稲垣愛美、棟近由記美、山本 裕、笠原利彦、福田隆之、仲原 聡、渡辺真一、倉田隼人、篠田伸介、加藤雅一：培養角膜モデルLabCyte CORNEA-MODEL24を用いた眼刺激性

- 試験代替法共同研究、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 27) 木村 裕、渡辺 美香、斎藤 るみ子、鈴木 紀之、岩城 知子、金子 愛、高田 めぐみ、田中 裕美、渡辺 文、山影 康次、斎藤 幸一、中島 芳浩、近江谷 克裕、酒井 綾子、大森 崇、山崎 晶次郎、小島 肇、田中 憲徳、相場 節也：IL-8 Luc assayの施設間差試験-Phase I, Phase II aの結果ならびに今後の展望-、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 28) 簾内 桃子、福田 隆之、池田 英史、鄭 美淑、大森 崇、田中 裕美、山影 康次、萩野 滋延、小島 肇：SIRC-CVS試験を用いた眼刺激性評価代替法の国際バリデーション研究 (I)、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 29) 岩瀬 裕美子、山本 敏誠、若栗 忍、尾上 誠良、世戸 孝樹、大崎 尚人、高木 広憲、戸田 嗣人、中村 和希、松本 康浩、川上 哲、細井 一弘、小島 肇：医薬品の光安全性評価のための Reactive Oxygen Species (ROS)アッセイ-JaCVAM多施設バリデーション研究一、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 30) 榊原 隆史、六川 潤美、伊藤 浩太、河村 公太郎、古川 正敏、藤平 司郎、市戸等、並木 正人、平賀 武夫、小島 肇、松浦 正男：眼刺激性評価のための牛角膜を用いた混濁度および透過性試験法 (BCOP法)、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 31) 小島 肇：iPS細胞を用いた安全性評価試験が行政的に受け入れられるために、日本学術会議薬学委員会シンポジウム「iPS細胞研究の創薬への応用」、日本学術会議講堂、東京(2013.1)
- 32) 古川 正敏、六川 潤美、榊原 隆史、伊藤 浩太、藤平 司郎、平賀 武夫、小島 肇、松浦 正男：眼刺激性評価のための牛角膜を用いた混濁度および透過性試験法 (BCOP法) - 病理組織学的検査を中心に -、第29回日本毒性病理学会総会および学術集会、つくばフロンティアセンター(2013.1)
- 33) 小島 肇：最近の動物実験代替法の開発状況、革新的な医療機器の開発と動物実験代替法の最前線、富士ソフトアキバプラザ 5階富士ソフトアキバホール、東京(2013.2)
- 34) H Kojima, N Annaka, S Tsuchiya, Y Yoshitake, R Xu, M Suzuki, W Shimatani, A Kajita, M Nakamura, M Watanabe, M Nakajima, K Sakamoto, R Takeda, M Hisama, H Ikeda, M Inagaki, Y Munechika, Y Yamamoto, T Kasahara, T Fukuda, S Nakahara, S Watanabe, H Kurata, S Shinoda, M Katoh : Collaboration study on eye irritation alternative method with human corneal model; LabCyte CORNEA-MODEL24, 52th Society Of Toxicology, San Antonio, Texas (2013.3)
- 35) W Casey, P Ceger, J Strickland, L Rinckel, E Grignard, Susanne Bremer, H Kojima, SY Han, W Stokes: Regulatory Acceptance of the BGI Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method, 52th Society Of Toxicology, San Antonio, Texas (2013.3)
- 36) J Kulpa-Eddy, R McFarland, G Srinivas, A Walker, M Halder, H Kojima, K Brown, H Draayer, R Sebring, V Doelling, B Jones, N Johnson, L Rinckel, W Casey, W Stokes: International Workshop on Alternative Methods for Veterinary *Leptospira* Vaccine Potency Testing, 52th Society Of Toxicology, San Antonio, Texas (2013.3)
- 37) T Toda, S Onoue, Y Seto, H Takagi, N Osaki, S Kawakami, Y Matsumoto, Y Iwase, T Yamamoto, S Wakuri, K Hosoi, K Nakamura, and H Kojima : Intra- and inter-laboratory validation study on reactive oxygen species (ROS) assay for photosafety evaluation of pharmaceuticals, 52th Society Of Toxicology, San Antonio, Texas (2013.3)
- 38) 小島 肇：動物モデルの必要性、日本薬学会第 133年会、横浜(2013.3)
- 39) 平井 綾乃、藤堂 浩明、杉林 堅次：3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験における false positive および false negative の原因解明に関する研究、第 56 回日本薬学会関東支部大会、東京 (2012 年 10 月)

- 40) 杉林 堅次 : Evidence-Based Approach to Develop Functional Cosmetics: Skin Penetration and Concentration of Active Ingredient Candidates, International Conference on Nutraceutical and Cosmetic Science (ICNaCS2012)、マレーシア (2012年10月)
- 41) 杉林 堅次 : 培養皮膚を用いた薬剤評価の現状と課題、三次元生体組織構築公開シンポジウム、東京 (2012年11月)
- 42) 杉林 堅次 : 皮膚適用または暴露された化学物質の有効性および安全性評価のための in vitro および in silico アプローチ、日本薬学会第133年会、横浜 (2013年3月)
- 43) 平井 綾乃、藤堂 浩明、杉林 堅次 : 3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験における偽陽性反応および偽陰性の原因解明に関する研究、日本薬学会第133年会、横浜 (2013年3月)
- 44) 山本直樹 : 新規作出したヒト角膜不死化細胞を用いた眼刺激性試験評価系の確立。日本動物実験代替法学会第25回大会、東京 (2012年11月)
- 45) 加藤尚視、井上僚、世戸孝樹、尾上誠良、山田静雄 : Phenothiazine 誘導体をモデル薬物とした高効率光線過敏症リスク評価法の提案。日本薬剤学会第27年会(神戸)、要旨集 p.155, 2012年5月
- 46) 尾上 誠良 : 薬剤性光線過敏症リスク低減を指向した Pirfenidone 粉末吸入製剤。第15回間質性肺炎細胞分子病態研究会 (東京)、2012年8月
- 47) Satomi Onoue, Yoshiki Seto, Ryo Inoue, Masashi Kato, Yosuke Aoki, Yoshiki Kojo, Shizuo Yamada: Respirable Powder Formulation of Pirfenidone with Reduced Phototoxic Risk. The 2012 AAPS Annual Meeting and Exposition. (Chicago, US), Oct, 2011
- 48) Masashi Kato, Ryo Inoue, Yoshiki Seto, Satomi Onoue, Shizuo Yamada: Strategic phototoxic risk assessment on phenothiazine derivatives based on photochemical and pharmacokinetic properties. 27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting (Chiba), Abstr. P.237, Nov, 2012
- 49) 加藤尚視、井上僚、世戸孝樹、尾上誠良、山田静雄 : フェノチアジン誘導体をモデル薬物とした高効率光毒性リスク評価。日本動物実験代替法学会第25回大会(東京) 要旨集, p. 165, 2012年12月
- 50) 鈴木源、加藤尚視、尾上誠良、山田静雄 : 光毒性リスク評価のための改良型 ROS assay の開発。日本動物実験代替法学会第25回大会(東京) 要旨集, p. 195, 2012年12月
- 51) 大野泰雄、高橋光一、小林章男、池田孝則、日原太郎 : 早期臨床試験に関する最近の話題、非臨床データの臨床試験への外挿(バイオマーカー)、第33回日本臨床薬理学会学術総会 (2012.11)
- 52) 大野泰雄 : 眼刺激性試験代替法のバリデーション{バリデーション事始め}、日本動物実験代替法学会25周年記念講演会(2012.12)
- 53) 杉山真理子 : 化粧品の安全性、第44回化粧品技術基礎講習会、2012
- 54) Matsunaga K: immediate hypersensitivity to hydrolyzed wheat proteins in a soap. 11<sup>th</sup> Congress of the European Society of Contact Dermatitis. Malmo, Sweden. 2012.6.15
- 55) Akaza N, Akamatsu H, Sasaki Y, Takeoka S, Takahashi C, Mashima Y, Miyawaki M, Hirose O, Yamada S, Nakata S, Matsunaga K: Contorol factor of cutaneous Propionibacterium acnes. The 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Okinawa, Japan. 2012.12.7
- 56) 松永佳世子 : 男性皮膚科医必見! 日常診療に役立つスキンケアアイテムの正しい使い方。第28回日本臨床皮膚科医師会総会・臨床学術大会。2012.4.21
- 57) 中村政志、矢上晶子、太田理恵、松永佳世子 : 加水分解コムギ末による小麦アレルギーの原因解析。第37回日本化粧品学会。2012.6.7
- 58) 小林東、矢上晶子、太田理恵、佐野晶代、松永佳世子 : グルパール 231 含有ハムにより症状が誘発された加水分解小麦末含有石鹸使用者の一例。第260回日本皮膚科学会東海地方会。2012.6.24

- 59) 佐野昌代、矢上晶子、太田理會、小林東、西村景子、有馬豪、松永佳世子: 加水分解小麦含有石鹼により感作された小麦アレルギー103例の経時的変化の検討. 第260回日本皮膚科学会東海地方会. 2012.6.24
- 60) 松永佳世子: パッチテスト試薬2012共同研究中間報告. 第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2012.7.13
- 61) 中村政志、矢上晶子、原和宏、太田理會、佐野晶代、小林東、福富友馬、手島玲子、松永佳世子: 加水分解コムギ末感作により生じた小麦アレルギーの解析. 第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2012.7.13
- 62) 矢上晶子、中村政志、太田理會、佐野晶代、小林東、松永佳世子: 茶のしずく石鹼に含まれる加水分解コムギ末感作により生じた経口小麦アレルギーにおいて重要なアレルゲンはグルパール19Sである. 第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2012.7.13
- 63) 森田雄介、矢上晶子、鈴木加余子、西村景子、佐野晶代、松永佳世子: 藤田保健衛生大学におけるゴム関連アレルゲンおよびゴム製品陽性例. 第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2012.7.13
- 64) 安部正通、矢上晶子、佐野晶代、松永佳世子、立松茂登子: 最近経験したラテックスアレルギーの4例. 第17回ラテックスアレルギー研究会. 2012.7.29
- 65) 西村景子、矢上晶子、佐野晶代、松永佳世子: 皮膚の色調にトラブルを有する患者を対象にしたメディカルメイクアップ外来の有用性. 第30回日本美容皮膚科学会総会. 2012.8.18
- 66) 松永佳世子: 化粧品は安全か? -加水分解コムギ末含有石鹼によるコムギアレルギーに学ぶ-. 第30回日本美容皮膚科学会総会. 2012.8.18
- 67) 松永佳世子: 閉経後女性の肌の老化に対する大豆由来サプリメント エクオールの効果. 第30回日本美容皮膚科学会総会. 2012.8.18
- 68) 伊佐見真実子、鶴田京子、松永佳世子: 市販外用薬に含有されたクロタミトンによる接触皮膚炎の1例. 第261回日本皮膚科学会東海地方会. 2012.9.2
- 69) 高橋正幸、矢上晶子、森田雄介、佐野晶代、小島波尾、松永佳世子: パッチテストでヘアダイによる接触皮膚炎が明らかになった1例. 第261回日本皮膚科学会東海地方会. 2012.9.23
- 70) 安部正通、矢上晶子、佐野晶代、松永佳世子: ラテックスアレルギーの2例. 第261回日本皮膚科学会東海地方会. 2012.9.23
- 71) 中村政志、矢上晶子、佐野晶代、小林東、松永佳世子: 加水分解コムギ末感作により生じた小麦アレルギーの診断方法の構築と発症機序の解析. 藤田学園医学会 第44回総会. 2012.10.4
- 72) 矢上晶子、松永佳世子: 意外と多いかぶれとアレルギー. 第64回日本皮膚科学会西部支部学術大会. 2012.10.28
- 73) 松永佳世子: 加水分解小麦含有石鹼による小麦アレルギーから学んだこと. 第12回喘息 Early Intervention 研究会. 2012.11.10
- 74) 鈴木加余子、森田雄介、高橋正幸、田中紅、佐野晶代、有馬豪、矢上晶子、松永佳世子: 藤田保健衛生大学における金属パッチテスト結果. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012.11.29
- 75) 杉山晃子、岸川禮子、西江温子、下田照文、岩永知秋、西間三馨、島田清隆、古江増隆、田辺創一、千貫祐子、森田栄伸、福富友馬、中村政志、松永佳世子: 加水分解コムギにより生じたWDEIAにおける負荷検査の結果と有用性. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012.11.29
- 76) 北野高道、山下弘高、安達玲子、手島玲子、福富友馬、松永佳世子、稲垣直樹、田中宏幸: 加水分解小麦末による全身感作マウスに及ぼす抗原経口負荷の影響. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012.11.29
- 77) 合原みち、森田雄介、佐々木良輔、佐野晶代、矢上晶子、中村節子、稲垣とよみ、赤松眞木、鈴木加余子、松永佳世子: 当科で経験した連鎖販売による会員制化粧品シリーズによる接触皮膚炎の4例. 第262回日本皮膚科学会東



- 海地方会. 2012.12.2
- 78) 松永佳世子: アトピー性皮膚炎の治療～外用療法を中心に～. アトピー性皮膚炎学術講演会 in 弘前. 2012.4.7
- 79) 松永佳世子: 皮膚アレルギー茶のしずく石鹼による小麦アレルギーと化粧品による接触皮膚炎. 第9回高皮膚疾患診療懇話会. 2012.4.12
- 80) 松永佳世子: 化粧品はどこまで安全か～茶のしずく石鹼等に含まれた加水分解コムギによる即時型コムギアレルギーからわかったこと～. 日本産業皮膚衛生協会 特別講演会. 2012.5.18
- 81) 松永佳世子: 皮膚アレルギーテストの実際. 第37回和歌山県皮膚科医会学術講演会. 2012.6.23
- 82) 松永佳世子: プリックテスト・パッチテストの実際とその適応となる疾患. 第6回相模原臨床アレルギーセミナー. 2012.8.4
- 83) 松永佳世子: ラテックスアレルギー. 第6回相模原臨床アレルギーセミナー. 2012.8.
- 84) 松永佳世子: プロトピック軟膏の上手な使い方. プロトピック軟膏小児用発売10周年記念講演会. 2012.11.17
- 85) 松永佳世子: 加水分解小麦末含有石鹼による即時型小麦アレルギーから学んだこと. 皮膚アレルギーup date . 2013.1.19

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

厚生労働科学研究費補助金（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）  
国際協調を重視した化粧品・医薬部外品における安全性試験法の再評価に関する研究

## 分担研究報告書

### 化粧品原料の経皮吸収に関する研究

〔 医薬部外品の安全性を動物実験の 3Rs に配慮して評価するための  
試験法のあり方について 〕

研究分担者：杉林 堅次 城西大学 薬学部 薬粧品動態制御学研究室  
研究協力者：藤堂 浩明 城西大学 薬学部 薬粧品動態制御学研究室

化学物質の皮膚刺激性は皮膚中の生きた表皮・真皮中で引き起こされ、その強度は皮膚刺激部位での化学物質濃度に依存していると考えられる。したがって、皮膚刺激性の予測は皮膚中濃度に基づいて行うことが重要である。近年では、化学物質の皮膚刺激性試験は、3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた方法が用いられているが、家兎を用いる Draize 法に対して、いくつかの水溶性物質で偽陽性、また、いくつかの脂溶性エステル物質で偽陰性反応が認められている。これらの原因には動物皮膚と 3次元培養ヒト皮膚モデルの角層バリア比の違いによる化学物質の皮膚透過性の違いや皮内カルボキシエステラーゼ活性および化学物質の透過速度の違いによる脂溶性エステル物質の皮内代謝産物の concentration-distance profile の違いが考えられる。そこで本年度は、3次元培養ヒト皮膚モデルにおける偽陽性や偽陰性反応が生じる原因をより詳細に明らかにするため、いくつかの化学物質の動物皮膚および 3次元培養ヒト皮膚モデル中濃度を調査し比較した。

## A. 研究目的

化学物質の皮膚刺激は皮膚中の生きた表皮・真皮で引き起こされ、その強度は皮膚刺激部位での化学物質濃度に依存している<sup>1)</sup>。したがって、皮膚刺激性の予測は皮膚中濃度に基づいて行うことが重要である。

化学物質の皮膚刺激性を評価する際、これまでラットや家兎等を用いた動物実験が広く行われてきた。しかし、近年 3R に基づいた研究が盛んに行われている<sup>2)</sup>。

欧州連合 (EU) 内では、化粧品およびその原料の安全性に関する EU 化粧品指令第 7 次改正により、2009 年以降から動物実験を行った化粧品の製造・輸入が禁止されている<sup>3-5)</sup>。これに対応するため、3 次元培養皮膚モデルなどを用いた皮膚刺激性代替試験法への取り組み、主にバリデーション研究が行われてきた。その結果、European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) では 3 次元培養ヒト皮膚モデルである Episkin<sup>TM</sup> (SkinEthic) および EpiDerm<sup>TM</sup> (MatTec/Kurabo) を用いた皮膚刺激性試験の評価方法を承認した<sup>6-10)</sup>。すでに、3 次元培養ヒト皮膚モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験が行われているが、家兎を用いる Draize 法<sup>11)</sup>に対して、いくつかの水溶性物質で偽陽性、また、いくつかの脂溶性エステル物質で偽陰性反応が認められている<sup>12, 13)</sup>。昨年までの研究結果にて、これらの原因は動物皮膚と 3 次元培養ヒト皮膚モデルの角層バリア比の違いによる化学物質の皮膚透過性の違いや皮内カルボキシエステラーゼ活性および化学物質の透過速度の違いによる脂溶性

エステル物質の皮内代謝産物の concentration-distance profile (Figs. 1, 2) の違いが考えられると報告している<sup>14)</sup>。そこで、本年度は、3 次元培養ヒト皮膚モデルにおける偽陽性や偽陰性反応が生じる原因をより詳細に明らかにするため、いくつかの化学物質の動物皮膚および 3 次元培養ヒト皮膚モデル中濃度を調査し比較した。また、化学物質の皮膚透過試験から得られるパラメータより皮膚中濃度から予測を行い<sup>5, 16)</sup>、実測値と一致することを確認した。

## B. 実験方法

### 1. 理論

#### 1. 1 層膜モデル透過挙動の解析

種々化学物質の皮膚透過挙動から皮膚中濃度を解析するために、差分式<sup>16-19)</sup>を用いて解析を行った。まず、ヘアレスラット皮膚および EpiDerm の stripped skin を 1 層膜モデルと仮定した (Fig. 3 (a))。本実験ではレシーバー側のシンク条件が成立していると仮定したため、次に示す Fick の拡散第 2 法則で表すことができる。

$$\frac{\partial C_{ved}}{\partial t} = D_{ved} \frac{\partial^2 C_{ved}}{\partial x^2} \quad (1)$$

ここで、 $x$  は皮膚中の位置、 $t$  は時間、 $D_{ved}$  は生きた表皮・真皮中の薬物拡散係数を表す。初期条件および境界条件は以下のように仮定した。

$$\begin{aligned} t = 0 \quad 0 < x < L_{ved} \quad C_{ved} &= 0 \\ t > 0 \quad x = 0 \quad C_{ved} &= K_{ved} \cdot C_v \\ x = L_{ved} \quad C_{ved} &= 0 \end{aligned}$$

ここで、 $L_{ved}$  は生きた表皮・真皮の厚み、 $K_{ved}$  は基剤 - 生きた表皮・真皮間薬物分配係数、 $C_v$  は基剤中薬物濃度である。 $C_{ved}$

は初期条件と境界条件から Fick の拡散第 2 法則に従うので、差分式を用いて計算できる。さらに、レシーバー側への薬物の stripped skin 透過速度  $Flux_{st}$  は (2) 式より表すことができる。また、単位面積当たりの stripped skin 累積透過量  $Q_{st}$  は (3) 式で表すことができる。

$$Flux_{st} = -D_{ved} \left( \frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (2)$$

$$Q_{st} = -D_{ved} \int_0^{L_{ved}} \left( \frac{dC_{ved}}{dt} \right) dx \quad (3)$$

また、(1) 式は (4) 式および (5) 式に変換することができる。

$$\frac{dC_{ved,i,j+1}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{ved,i,j+1} - C_{ved,i,j}) \quad (4)$$

$$\frac{dC_{ved,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{ved,i-1,j} - 2C_{ved,i,j} + C_{ved,i+1,j}) \quad (5)$$

ここで、 $C_{ved,i,j}$  は  $i$  番目の位置の  $j$  時間目の薬物濃度を表す。 $\Delta x$  は  $x_{i+1} - x_i$  を、 $\Delta t$  は  $t_{j+1} - t_j$  を表す。

(4) 式と (5) 式を (1) 式に代入すると次式が得られる。

$$C_{ved,i,j+1} = rD_{ved}C_{ved,i-1,j} + (1-2rD_{ved})C_{ved,i,j} + rD_{ved}C_{ved,i+1,j} \quad (6)$$

ここで、 $r$  は  $\Delta t/\Delta x^2$  を表す。差分式を使うと (2) 式と (3) 式はそれぞれ (7) 式と (8) 式になる。

$$Flux_{st,j} = -D_{ved} \frac{C_{ved,n+1,j} - C_{ved,n,j}}{\Delta x} \quad (7)$$

$$Q_{st,j} = Q_{st,j-1} + J_{st,j} \cdot \Delta t \quad (8)$$

$n$  を皮膚の区分数とした。そこで、 $Flux_{st,j}$  は  $n=10$  にセットして Microsoft<sup>®</sup> Excel を用いて計算した。なお、この計算では、 $\Delta t$  は  $D_{ved} \Delta t/\Delta x^2$  に対して 0.5 未満となるようにセットした。 $Q_{st,j}$  は (8) 式を使って  $Flux_{st,j}$  から計算した。 $D_{ved}$  と  $K_{ved}$  は非線形最小二乗法を使って透過データにカーブフィ

ッティングして得られた。なお、最小二乗法は Microsoft<sup>®</sup> Excel Solver を使って行った。計算条件は制限時間 100 s、反復回数 100 回、精度 0.000001、基本公差 5%、収束 0.0001 とした。Pseudo-Newtonian method をアルゴリズムとして用いた。

## 1.2 2層膜モデル透過挙動の解析

ヘアレスラット full-thickness skin および EpiDerm を角層と生きた表皮・真皮からなる 2層膜モデルとして仮定した (Fig. 3 (b))。角層中薬物濃度  $C_{sc}$  と生きた表皮・真皮中薬物濃度  $C_{ved}$  は (9) 式と (1) 式で表される。

$$\frac{\partial C_{sc}}{\partial t} = D_{sc} \frac{\partial^2 C_{sc}}{\partial x^2} \quad (9)$$

$$\frac{\partial C_{ved}}{\partial t} = D_{ved} \frac{\partial^2 C_{ved}}{\partial x^2} \quad (1)$$

ここで、 $D_{sc}$  は角層中の薬物拡散係数を表す。初期条件および境界条件は以下のように仮定した。

$$t=0 \quad -L_{sc} < x < 0 \quad C_{sc} = 0$$

$$0 < x < L_{ved} \quad C_{ved} = 0$$

$$t > 0 \quad x = -L_{sc} \quad C_{sc} = K_{sc} \cdot C_v$$

$$x = 0 \quad C_{ved} = K_{ved/sc} \cdot C_{sc} \quad \text{および}$$

$$D_{sc} \frac{dC_{sc}}{dx} = D_{ved} \frac{dC_{ved}}{dx}$$

$$x = L_{ved} \quad C_{ved} = 0$$

ここで、 $L_{sc}$  は角層の厚み、 $K_{sc}$  は基剤 - 角層間薬物分配係数、 $K_{ved/sc}$  は角層 - 生きた表皮・真皮間薬物分配係数を表す。 $C_{sc}$  と  $C_{ved}$  は初期条件と境界条件から Fick の拡散第 2 法則に従って変化すると考えて、差分法を用いて計算できる。レシーバー側への full-thickness skin 透過速度  $Flux_{full}$  は (10) 式より、単位面積当たりの

full-thickness skin 累積透過量  $Q_{full}$  は (11) 式で表すことができる。

$$Flux_{full} = -D_{ved} \left( \frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (10)$$

$$Q_{full} = -D_{ved} \int_0^t \left( \frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} dt \quad (11)$$

また、(9) 式は (12) と (13) 式に、(1) 式は (4) と (5) 式に変換することができる。

$$\frac{dC_{sc,i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{sc,i,j+1} - C_{sc,i,j}) \quad (12)$$

$$\frac{d^2 C_{sc,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{sc,i-1,j} - 2C_{sc,i,j} + C_{sc,i+1,j}) \quad (13)$$

$$\frac{dC_{ved,i,j+1}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{ved,i,j+1} - C_{ved,i,j}) \quad (4)$$

$$\frac{d^2 C_{ved,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{ved,i-1,j} - 2C_{ved,i,j} + C_{ved,i+1,j}) \quad (5)$$

(12) 式と (13) 式を (9) 式に、(4) 式と (5) 式を (1) 式に代入すると (14) 式と (6) 式が得られる。

$$C_{sc,i,j+1} = rD_{sc} C_{sc,i-1,j} + (1-2rD_{sc}) C_{sc,i,j} + rD_{sc} C_{sc,i+1,j} \quad (14)$$

$$C_{ved,i,j+1} = rD_{ved} C_{ved,i-1,j} + (1-2rD_{ved}) C_{ved,i,j} + rD_{ved} C_{ved,i+1,j} \quad (6)$$

ここで、 $r$  は  $\Delta t/\Delta x^2$  を表す。差分式を使うと (10) 式、(11) 式はそれぞれ (15) 式、(16) 式になる。

$$Flux_{full,j} = -D_{ved} \frac{C_{ved,n+1,j} - C_{ved,n,j}}{\Delta x} \quad (15)$$

$$Q_{full,j} = Q_{full,j-1} + Flux_{full,j} \cdot \Delta t \quad (16)$$

$n$  を角層および生きた表皮・真皮の区分数とした。 $Flux_{full,j}$  は  $n=10$  にセットして Microsoft® Excel を用いて計算した。 $D_{sc}$  と  $K_{sc}$  は非線形最小二乗法を用いて透過実験データにカーブフィッティングして算出した。また、 $D_{ved}$  と  $K_{ved}$  には、stripped skin および stripped EpiDerm の 1 層膜モデルの透過挙動解析から算出した値を用い

た。なお、計算は 1 層膜モデルの透過挙動解析と同様の方法で行った。

### 1.3 皮内代謝化学物質の皮膚透過挙動の解析

EN は皮膚透過中に生きた表皮・真皮のエステラーゼによって NA に分解される。皮膚は代謝が生じない角層と代謝を生じる生きた表皮・真皮からなる 2 層膜モデルとして仮定した (Fig. 4)。角層中 EN 濃度  $C_{sc}$  は (9) 式で表される。

$$\frac{\partial C_{sc}}{\partial t} = D_{sc} \frac{\partial^2 C_{sc}}{\partial x^2} \quad (9)$$

ここで、 $D_{sc}$  は角層中における EN の拡散係数を表す。一方、生きた表皮・真皮での皮膚透過および代謝挙動は Fick の拡散第 2 法則に Michaelis-Menten 式を取り入れた式で表される。生きた表皮・真皮中 EN、NA 濃度  $C_{EN}$ 、 $C_{NA}$  は (17) 式と (18) 式で表される。

$$\frac{\partial C_{EN}}{\partial t} = D_{EN} \frac{\partial^2 C_{EN}}{\partial x^2} - \frac{V_{max} \cdot C_{EN}}{K_m + C_{EN}} \quad (17)$$

$$\frac{\partial C_{NA}}{\partial t} = D_{NA} \frac{\partial^2 C_{NA}}{\partial x^2} + \frac{V_{max} \cdot C_{EN}}{K_m + C_{EN}} \quad (18)$$

ここで、 $D_{EN}$ 、 $D_{NA}$  は生きた表皮・真皮中の EN および NA の拡散係数を表す。 $V_{max}$ 、 $K_m$  は最大代謝反応速度、ミカエリス定数を表す。初期条件および境界条件は以下のように仮定した。

$$t=0 \quad -L_{sc} < x < 0 \quad C_{sc} = 0$$

$$0 < x < L_{ved} \quad C_{EN} = C_{NA} = 0$$

$$t > 0 \quad x = -L_{sc} \quad C_{sc} = K_{sc} \cdot C_v$$

$$x = 0 \quad C_{EN} = K_{ved/sc} \cdot C_{sc} \quad \text{および}$$

$$D_{sc} \frac{dC_{sc}}{dx} = D_{EN} \frac{dC_{EN}}{dx}$$

$$x = L_{ved} \quad C_{EN} = C_{NA} = 0$$



ここで、 $L_{sc}$  は角層の厚み、 $L_{ved}$  は生きた表皮・真皮の厚み、 $K_{sc}$  は基剤 - 角層間の EN の分配係数、 $K_{ved/sc}$  は角層 - 生きた表皮・真皮間薬物分配係数を表す。 $C_{sc}$ 、 $C_{EN}$ 、 $C_{NA}$  は初期条件と境界条件から Fick の拡散第 2 法則に従って変化すると考えて、差分法を用いて計算できる。レシーバー側への透過速度  $Flux_{EN}$ 、 $Flux_{NA}$  は (19) 式および (20) 式で表される。

$$Flux_{EN} = -D_{EN} \left( \frac{dC_{EN}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (19)$$

$$Flux_{NA} = -D_{NA} \left( \frac{dC_{NA}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (20)$$

また、EN と NA の単位面積あたりの累積皮膚透過量  $Q_{EN}$ 、 $Q_{NA}$  は (21) 式および (22) 式で表される。

$$Q_{EN} = -D_{EN} \int_0^t \left( \frac{dC_{EN}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} dt \quad (21)$$

$$Q_{NA} = -D_{NA} \int_0^t \left( \frac{dC_{NA}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} dt \quad (22)$$

また、(9) 式は (12) と (13) 式に変換することができる。

$$\frac{dC_{sc,i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{sc,i,j+1} - C_{sc,i,j}) \quad (12)$$

$$\frac{d^2 C_{sc,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{sc,i-1,j} - 2C_{sc,i,j} + C_{sc,i+1,j}) \quad (13)$$

(12) 式と (13) 式を (9) 式、(17) 式、(18) 式に代入すると (14) 式、(23) 式、(24) 式が得られる。

$$C_{sc,i,j+1} = rD_{sc} C_{sc,i-1,j} + (1 - 2rD_{sc}) C_{sc,i,j} + rD_{sc} C_{sc,i+1,j} \quad (14)$$

$$C_{EN,i,j+1} = rD_{EN} C_{EN,i-1,j} + (1 - 2rD_{EN}) C_{EN,i,j} + rD_{EN} C_{EN,i+1,j} - \Delta t \cdot \frac{V_{max} \cdot C_{EN,i,j}}{K_m + C_{EN,i,j}} \quad (23)$$

$$C_{NA,i,j+1} = rD_{NA} C_{NA,i-1,j} + (1 - 2rD_{NA}) C_{NA,i,j} + rD_{NA} C_{NA,i+1,j} + \Delta t \cdot \frac{V_{max} \cdot C_{EN,i,j}}{K_m + C_{EN,i,j}} \quad (24)$$

ここで、 $r$  は  $\Delta t / \Delta x^2$  を表す。差分式を使うと (19) 式、(20) 式はそれぞれ (25) 式と (26) 式になる。

$$Flux_{EN,j} = -D_{EN} \frac{C_{EN,n+1,j} - C_{EN,n,j}}{\Delta x} \quad (25)$$

$$Flux_{NA,j} = -D_{NA} \frac{C_{NA,n+1,j} - C_{NA,n,j}}{\Delta x} \quad (26)$$

$n$  は生きた表皮・真皮の区分数とした。そこで、 $Flux_{EN,j}$  と  $Flux_{NA,j}$  は  $n=10$  にセットして Microsoft® Excel を用いて計算した。なお、この計算では、 $\Delta t$  は  $D_{ved} \cdot \Delta t / \Delta x^2$  に対して 0.5 未満となるようにセットした。 $Q_{EN,j}$ 、 $Q_{NA,j}$  は  $Flux_{EN,j}$ 、 $Flux_{NA,j}$  の和から計算した。各拡散係数と分配係数は非線形最小二乗法を使って透過データにカーブフィッティングして得られた。なお、計算は 1 層膜モデルの透過挙動解析と同様の方法で行った。

## 2. 試薬・実験材料

フルルビプロフェン (FP) はリードケミカル (富山、日本) から供与された。アンチピリン (ANP) は和光純薬工業株式会社 (東京、日本) から購入した。ニコチン酸エチル (EN) およびニコチン酸 (NA) は東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。サリチル酸ヘキシル (HS) は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。サリチル酸 (SA) は関東化学株式会社 (東京、日本) から購入した。その他の試薬および溶媒は精製せずにそのまま使用した。Table 1 に本研究で使用した種々化学物質の分子量、 $\text{Log}K_{o/w}$  を示す。

雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht 系、体重 200-240 g) は城西大学生命科学研究

センターから購入した。なお、動物実験は城西大学動物実験管理委員会の承諾を得た後、城西大学動物実験規定に従った。また、3次元培養皮膚モデル EpiDermTMEpi606X (EpiDerm) は倉敷紡績株式会社 (大阪、日本) より購入した。

### 3. *In vitro* 皮膚透過試験

ヘアレスラット摘出皮膚は、ペンタバルビタールナトリウム (50 mg/kg, *i.p.*) 麻酔下のヘアレスラット腹部を剃毛処理後、皮膚を摘出し、真皮側の脂肪を丁寧にハサミで取り除いたものを使用した。また、3次元培養ヒト皮膚モデル EpiDerm™ Epi606X (EpiDerm) は pH7.4 リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後、メスを用いてウェルプレートから取りはずし使用した。ヘアレスラット摘出皮膚、EpiDerm を side-by-side diffusion cell (有効透過面積 0.95 cm<sup>2</sup>) に挟み、PBS をドナーセルとレシーバーセルに適用し 1 時間水和させた後、ドナーセルからは PBS を除去した。レシーバーセルから 0 時間目のサンプリングを行い、同量の溶液を補充した。ドナーセルには、種々物質の飽和溶液、145 μmol/mL の EN 溶液および HS の原液を適用した。レシーバーセルから経時的にサンプリングし、その都度同量の溶液を補充した。採取した溶液をサンプル溶液とした。サンプル溶液中の化学物質濃度は HPLC を用いて測定した。

### 4. サンプル溶液の定量法

Table 2 に測定システムおよび機器、Table 3 に種々化学物質の定量条件を示す。透過試験より得られたサンプル溶液を内

部標準物質を含有したアセトニトリルとサンプル溶液を 1:1 で混和した。その溶液を遠心分離 (12,000 rpm、5 分、4° C) 後、その上清 20 μL を HPLC に注入し、定量した。

### 5. 皮膚中濃度測定

*In vitro* 皮膚透過試験終了後、適用した溶液を回収し、ヘアレスラット腹部皮膚の角層側および真皮側を PBS で洗浄した。表面に付着している PBS をキムワイプで拭った。生きた表皮・真皮中濃度評価の場合は、セロハンテープで 20 回テープストリップングを行い角層を除去した。有効透過面積部分をハサミを用いて切り取り、皮膚の重量を測定後、皮膚をハサミで細断し、PBS (FP, ANP)、2.7 μmol/L DFP in PBS (EN)、2.7 μmol/L DFP in acetonitrile (HS) を加え、電動ホモジナイザー (Polytron RT 1200, Kinematica Inc., Bohemia, NY, U.S.A.) を用いてホモジネート溶液を作製した (12,000 rpm、5 分、4°C)。その後 16% トリクロロ酢酸水溶液を加え 15 分攪拌し、遠心分離 (15,000 rpm、5 分、4°C) 後、上清中化学物質濃度を測定した。同様に *in vitro* 透過実験終了後、EpiDerm は角層側を PBS で洗浄し、支持体であるポリカーボネート膜を剥がした後、皮膚を横型拡散セルから取りはずし、表面に付着している PBS をキムワイプで拭った。生きた表皮・真皮中濃度評価の場合は、ピンセットを用いて角層を除去した。有効透過面積部分を切り取り、上記と同様に PBS、2.7 μmol/L DFP in PBS、または 2.7 μmol/L DFP in acetonitrile を加え、ホモジネート溶液を作製した。攪拌および遠