

分担研究報告書

光毒性・光感作性試験代替法に関する諸検討

研究分担者 大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ROS assay は被験物質の光化学的特性を指標とした光毒性評価ツールである。本評価系は難水溶性薬物への適合性が低いが、この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。また、本研究では 83 種のモデル化合物を用いて、予測精度ならびに頑健性についても併せて評価を行った。

研究協力者

尾上誠良：静岡県立大学薬学部

A. 研究目的

ヒトに投薬された医薬品が体内で光と相互作用を起こした結果、主に皮膚において誘発される有害反応を薬剤性光線過敏症という。2009 年度の本邦における売り上げ上位 5 製品のうち 4 品目において光線過敏症の副作用が認められている興味深い事実は、多くの患者が潜在的に本副作用に直面している可能性を示唆するものであろう。光線過敏症には内因性ならびに外因性の光毒性反応があり、その臨床像も (i) 光曝露中の発赤、(ii) 遅延型皮膚炎、(iii) 異常な皮膚角質化ならびに細胞の空胞化、(iv) 皮膚の落屑をはじめとして多岐に渡る。外因性光線過敏症の原因となる化合物は非常に多く、特に一部の抗菌剤、抗ヒスタミン薬、向精神薬、利尿薬、消炎鎮痛薬において顕著な光毒性が認められる。光線過敏症リスク回避を考える上で光線過敏症を誘発しやすい chemical series や chromophore に

ついてはしばしば議論の対象となり、創薬においても活発な構造-毒性相関研究が展開されている。さて、薬剤による光毒性は光刺激性、光遺伝毒性及び光アレルギー性の 3 種に大別され、発症機序の上流では活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の関与が報告されている。この ROS 産生を指標とする ROS assay は *in vitro* 光毒性リスク評価ツールとして高いスループットと予測性を有する。しかし、難水溶性化合物の評価は ROS assay では難しいことが多く、それ故、被験物質の溶解性を改善した新たな評価系が必要となる。そこで本研究では界面活性剤を用いた micellar ROS (mROS) assay を新規に構築し、難水溶性薬物への適用性拡大を試みた。

B. 研究方法

難水溶性薬物として、65 種類の光毒性陽性物質 (Drugs: acridine, acridine HCl, amiodarone HCl, amlodipine, amlodipine besylate, atorvastatin, benidipine HCl, benzbromarone, bezafibrate, bufexamac,

candesartan cilexetil, chlorpromazine HCl, cilnidipine, ciprofloxacin, clofibrate, diclofenac Na, doxycycline HCl, enoxacin, fenofibrate, fluphenazine 2HCl, fluvastatin Na, furosemide, glibenclamide, gliclazide, griseofulvin, hydrochlorothiazide, ibuprofen, levofloxacin, lomefloxacin HCl, losartan K, lovastatin, manidipine HCl, meloxicam, methotrexate, 8-methoxypsoralen, 6-methylcoumarin, mequitazine, nalidixic acid, naproxen, nifedipine HCl, nitrendipine, norfloxacin, ofloxacin, omeprazole, perphenazine, pirfenidone, piroxicam, pitavastatin Ca, pravastatin Na, prochlorperazine dimaleate, promethazine HCl, quinine HCl, rosiglitazone, sparfloxacin, tamoxifen, tetracycline HCl, thioridazine HCl, trifluoperazine, valsartan; Chemicals: anthracene, avobenzone, bithionol, hexachlorophene) と 18 種類の光毒性陰性物質 (Drugs: aspirin, benzocaine, erythromycin, penicillin G, phenytoin, sulisobenzonate; Chemicals: bumetizole, chlorhexidine, cinnamic acid, drometizole, L-histidine, 4-methylbenzylidene camphor, octrizole, octyl methoxycinnamate, octyl salicylate, PABA, SDS, UV-571) を選択した。先に確立した ROS assay プロトコールに従い, 被験物質 (200 μM) 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 mW/cm^2), ROS (Singlet oxygen と Superoxide) の産生量をそれぞれ測定した。実験は 3 回繰り返し, 各化合物の光毒性リスクを評価した。

(倫理面への配慮)

本研究において動物実験は行なわない。

C. 研究結果

Methotrexate と erythromycin をそれぞれ光毒性陽性ならびに陰性標準物質とし, 20 回連続して mROS assay を行った (Fig. 1). いずれの化合物も 0.5% Tween 20 ミセル溶液に容易に溶解し (終濃度: 200 μM), 2.0 mW/m^2 の照射強度で擬似太陽光を照射した際, methotrexate からは singlet oxygen ($\Delta A_{440\text{nm}} \cdot 10^3$: 200–240) と superoxide ($\Delta A_{560\text{nm}} \cdot 10^3$: 880–930) の産生を認め, 一方, erythromycin からは極めて限定的な ROS の産生のみが認められた。

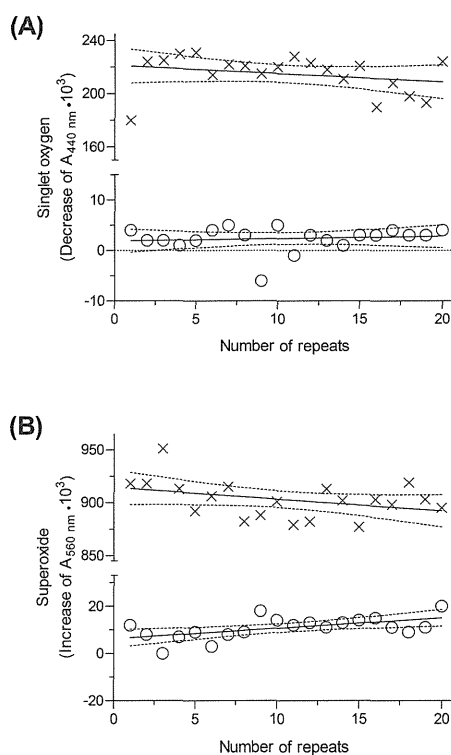


Fig. 1 Multiple measurement of singlet oxygen (A) and superoxide (B) to calculate the Z'-factor for the mROS assay. ×, Methotrexate (200 μM); and ○, erythromycin (200 μM). Solid and dashed lines represent mean and 95% confidence interval, respectively.

各測定データから以下の式に従って, singlet oxygen ならびに superoxide 測定における Z'-factor を算出した.

$$Z' = 1 - (3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-}) / |\mu_{c+} - \mu_{c-}|$$

ただし, σ_{c+} と σ_{c-} はそれぞれ methotrexate と erythromycin の標準偏差であり, μ_{c+} と μ_{c-} は methotrexate と erythromycin の平均値である. 一般に, Z'-factor が 0.5 以上であれば識別性の高い優れた評価系と見なされる. 本評価系においては singlet oxygen と superoxide 測定の Z'-factor はそれぞれ 0.58, 0.95 と算出され, すなわち, 本評価系は陽性と陰性の差を明瞭に示すことが可能と考えられる. また, methotrexate からの singlet oxygen ならびに superoxide 測定について日内・日間変動係数 (coefficient of variation) を求めたところ, それぞれ 9.9%, 2.5% と算出され, 優れた精度を認めた.

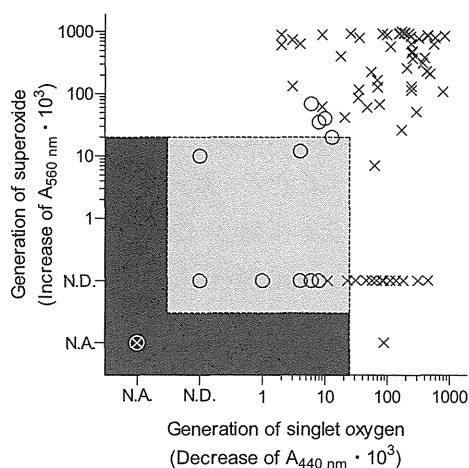


Fig. 2 2D plots of singlet oxygen data versus superoxide data for 83 compounds obtained from mROS assay. ○: Non-phototoxic drugs/chemicals; and ×: phototoxins. N.D.: Not detected; and N.A.: not available due to limited solubility. Gray and white regions are indicative of less photoreactive and photoreactive, respectively. The black region indicates that compounds could not be rated due to their poor solubility.

次に, モデル化合物 83 種類について mROS assay を実施した (Fig. 2). なお, 本検討では, 先に Onoue らによって提案された threshold {(i) 25 ($\Delta A_{440 \text{ nm}} \cdot 10^3$) for singlet oxygen, and (ii) 20 ($\Delta A_{560 \text{ nm}} \cdot 10^3$) for superoxide} を用いて各被験物質の光毒性リスクをそれぞれ評価した (Fig. 3). 0.5% Tween 20 ミセルによる溶解補助効果が機能的に働くことにより, 多くの難溶性化合物は 200 μM の濃度で評価を行うことが出来たが, 全体のうち 2 化合物 (anthracene, UV-571) のみが溶解性の問題で実施不可能であった. しかし, anthracene, UV-571 はそれぞれ 50 μM , 100 μM まで希釈することによって本評価系への適用が可能となった. このうち anthracene は光照射下で著しい ROS 産生を認め, 光毒性リスクが疑われた. 一方, UV-571 は ROS 産生を認めなかったが, 希釈下で実施していることもあり陰性判定は難しい.

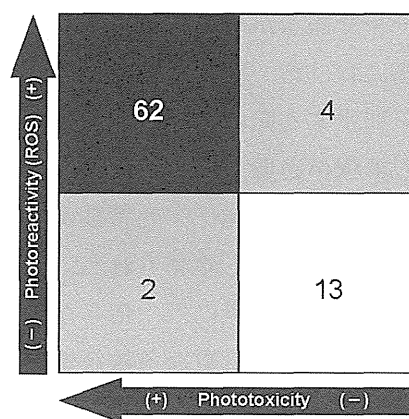


Fig. 3 Positive and negative predictivity of mROS assay as compared to the *in vitro/in vivo* photosafety.

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る。すなわち、mROS assay は適用範囲が広い反面、その判定には注意が必要であろう。

D. 考察

mROS アッセイは難水溶性医薬品の光化学的反応性を迅速かつ簡便に測定できるが、その反面、得られるデータからは光安全性だけではなく、光安定性などに問題がある化合物も含めて陽性と判別することがある。これは mROS アッセイが光毒性反応のきわめて初期に起こる光化学的反応性を評価するツールであるが故の課題であり、光安全性評価における一次スクリーニングとして本法を利用する際にはこの点を熟考の上データの解釈が必要である。また、一部の薬物において、その光化学的特性がミセルによって変わることも確認された。光毒性リスクの判定を行う際には、何らかのフォローアップ試験による更なる検証が望まれる。

E. 結論

本結果より、mROS 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ものと期待する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Onoue S, 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.*, in press.

2. 学会発表

- 1) 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. 30)
- 2) 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. 7)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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

薬剤投与後に露光によって惹起される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、本副作用リスク回避のために効果的な予測方法の開発が国内外で急務の課題となっている。本研究では光化学的試験方法である ROS アッセイに注目し、本試験法の多施設バリデーションスタディを実施した。

A. 研究目的

薬剤性光線過敏症はその投与方法にかかわらず薬剤摂取後、露光により引き起こされる副作用である。創薬段階における本副作用リスクの回避が強く望まれており、これまでに多くの *in vitro* ならびに *in vivo* 評価方法が開発されている。*In vitro* 評価法として UV 吸収測定が広く実施されているが、より実質的な光化学的反応性を評価するために我々は reactive oxygen species (ROS) assay を開発した。本試験法は被験物質を光照射する際に発生する ROS 量をモニタリングすることを特徴とする光化学反応性評価法であり、種々のモデル化合物を用いた検討におい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。昨年度は ROS assay の有用性を検証するために 3 施設にて ROS assay に関する多施設バリデーションスタディを行い、その transferability ならびに信頼性を精査することが出来た。しかし、本試験は Atlas 社の solar simulator である Suntest CPS series を

用いたものであり、他の solar simulator を利用した際の頑健性ならびに信頼性については十分に明らかになっていない。そこで、本研究では、Serico 社の SXL-2500 を所有する 4 施設における多施設バリデーションスタディを実施した。

B. 研究方法

日本動物実験代替法検証センター (JaCVAM) 主催のバリデーション運営委員会 (VMT) の下、ROS assay プロトコルを確立した。Dr. Manfred Liebsch (International Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments, ZEBET), Europe Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), and Korean Center for the Validation of Alternative Methods (KoCVAM) の協力の下、VMT 主導で化合物選択を実施し、最終的に 2 種の標準物質 (quinine, sulisobenzone), 23

種の光毒性陽性化合物 (acridine, acridine HCl, amiodarone HCl, chlorpromazine HCl, doxycycline HCl, fenofibrate, furosemide, ketoprofen, 6-methylcoumarine, 8-methoxy psoralen, nalidixic acid, nalidixic acid Na, norfloxacin, ofloxacin, piroxicam, promethazine HCl, rosiglitazone, tetracycline, anthracene, avobenzene, bithionol, hexachlorophene, rose bengal) ならびに 19 種の光毒性陰性化合物 (aspirin, benzocaine, erythromycin, phenytoin, penicillin G, bumetrizole, camphor sulfonic acid, chlorhexidine, cinnamic acid, drometrizole, histidine, methylbenzylidene camphor, octrizole, octyl methacrylate, octyl methoxycinnamate, octyl salicylate, PABA, SDS, UV-571) を選定した。バリデーションスタディには Seric 社の SXL-2500 を有する製薬協加盟企業が参加し、GLP の精神にのっとり各種検討を実施した。ROS assay プロトコールに従い、コード化された 42 種類の被験物質 (200 μ M) 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 mW/cm²), ROS (Singlet oxygen と Superoxide) の産生量をそれぞれ測定した。実験は 3 回繰り返し、各化合物の光毒性リスクを評価した。

(倫理面への配慮)

本研究において動物実験は発生しない。

C. 研究結果

Seric SXL-2500V2 からの疑似太陽光はほぼ Atlas Suntest CPS plus からの放射光と同様であり、また、これらは共に地球に到達する太陽光のスペクトルと良い対応を示し

た (Fig. 1)。すなわち、放射光のスペクトル上は Seric SXL-2500V2 が Atlas Suntest SPC plus の同等品であると考えられる。

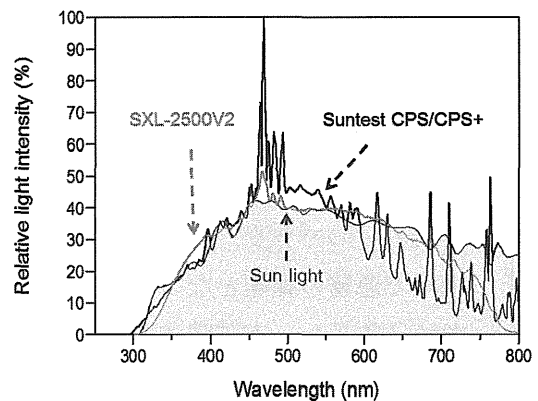


Fig. 1 Spectral patterns of sunlight and emitted light from Atlas Suntest CPS plus and Seric SXL-2500V2.

本試験に参加した 4 施設において ROS assay を実施し、光毒性陽性標準物質である quinine のデータに注目すると、singlet oxygen の変動係数 (CV) は 3.3–6.2% の範囲であり、また superoxide の CV は 1.7–9.4% 程度であった。本データは Atlas Suntest CPS plus を用いた検討時とほぼ同様の結果であった。一方、光毒性陰性標準物質である sulisobenzone からの ROS 産生は極めて小さいか、検出不能であった。施設間の再現性については、quinine の singlet oxygen で CV が 13.2% であり、superoxide では 7.1% であった。すなわち、本結果から 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。

また、選定した 42 化合物の被験物質についても各施設で併せて ROS assay を実施したところ、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 (Table 1).

Table 1 ROS data for 42 test chemicals

Chemical	Phototoxicity			ROS (Lab No.)			
	3T3	Animal	Human	S1	S2	S3	S4
<i>Phototoxic drugs</i>							
Acridine	+	+	+	+	+	+	+
Acridine HCl	+	+	+	+	+	+	+
Amiodarone HCl	+	+	+	+	+	+	+
Chlorpromazine HCl	+	+	+	+	+	+	+
Doxycycline HCl	+	+	+	+	+	+	+
Fenofibrate	+	ND	+	+	+	+	+
Furosemide	+/-	ND	+	+	+	+	+
Ketoprofen	+	-	+	+	+	+	+
6-methylcoumarine	+	+	+	+	+	+	+
8-Methoxy psoralen	+	+	+	+	+	+	+
Nalidixic acid free-acid	+	+	+	+	+	+	+
Nalidixic acid Na	+	+	+	+	+	+	+
Norflouxacin	+	+	+	+	+	+	+
Ofloxacin	+	+	+	+	+	+	+
Piroxicam	-	-	+	+	+	+	+
Promethazine HCl	+	ND	ND	+	+	+	+
Rosiglitazone	+	ND	ND	+	+	+	+
Tetracycline	+	+	+	+	+	+	+
<i>Phototoxic chemicals</i>							
Anthracene	+	+	+	+	+	+	+
Avobenzone	+	-	+	+	+	+	+
Bithionol	+	+	+	+	+	+	+
Hexachlorophene	-	-	+	+	+	+	+
Rose Bengal	+	-	+	+	+	+	+
<i>Non-phototoxic drugs</i>							
Aspirin	-	ND	ND	-	-	-	-
Benzocaine	-	ND	ND	-	-	-	-
Erythromycin	-	ND	ND	-	-	-	-
Phenytoin	-	ND	ND	+	+	+	+
Penicillin G	-	ND	ND	+	+	+	+
<i>Non-phototoxic chemicals</i>							
Bumetrizole	-	ND	ND	+	+	+	+
Camphor sulfonic acid	-	ND	ND	-	-	-	-
Chlorhexidine	-	ND	-	-	+	-	+
Cinnamic acid	-	ND	ND	-	+	+	+
Drometrizole	-	ND	ND	+	+	+	+
L-histidine	-	ND	ND	+	+	+	+
Methylbenzylidene camphor	-	-	-	+	+	+	+
Octrizole	-	ND	ND	+	+	+	+
Octyl methacrylate	-	ND	ND	+	+	+	+
Octyl methoxycinnamate	-	-	-	+	+	+	+
Octyl salicylate	-	-	-	+	+	+	+
PABA	-	-	ND	-	-	-	-
SDS	-	ND	ND	+	-	+	+
UV-571	-	ND	ND	+	+	+	+

+: positive, -: negative, I: inconclusive, ND: no data

Atlas Suntest CPS plus を用いたバリデーション試験と同様に、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。また、rose bengal は 559 nm 付近に極大吸収 (90,400 M⁻¹cm⁻¹) を持つため、測定上の干渉が起こって superoxide の測定は不可能であった。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。

D. 考察

Seric SXL-2500V2 を用いた ROS assay の多施設バリデーションスタディの結果、transferability と predictive capacity については共に問題がなかったが、幾つかの limitation が再確認できた。それは、幾つかの擬陽性と溶解性の問題であり、既に Atlas Suntest CPS plus を用いた試験においても同様に認められた。化合物の溶解性に関する問題点は、現在の創薬において創製される候補化合物の大半が難水溶性であることを考慮すれば解決すべき課題の一つであり、何らかの方策が必要と考える。

E. 結論

本結果より、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ものとする。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 論文発表
- 1) 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.
- 2) 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.

- 3) 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.
- 4) 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.*, in press.
- 5) Seto Y, Hosoi K, Takagi H, Nakamura K, Kojima H, Yamada S, Onoue S, Exploratory and regulatory assessments on photosafety of new drug entities, *Current Drug Safety*, **7 (2)**: 140–8 (2012)

2. 学会発表

- 1) 尾上 誠良, 細井 一弘, 若栗 忍, 岩瀬 由美子, 山本 敏誠, 松岡 奈央子, 中村 和希, 戸田 嗣人, 高木 広憲, 大崎 尚人, 松本 康浩, 世戸 孝樹, 加藤 尚視, 山田 静雄, 大野 泰雄, 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), 要旨集 p.213, 2012 年 5 月 24–26 日
- 2) 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 24–26 日

- 3) 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 17 日–18 日
- 4) 松本 康浩, 尾上 誠良, 細井 一弘, 若栗 忍, 岩瀬 由美子, 山本 敏誠, 松岡 奈央子, 中村 和希, 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 回日本毒性学会学術年会 (仙台), 要旨集 p 258, 2012 年 7 月 17 日–19 日
- 5) 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 14–18, 2011
- 6) Masashi Kato, Ryo Inoue, Yoshiki Seto, Satomi Onoue, Shizuo Yamada: Strategic phototoxic risk assessment on phenothiazine derivatives based on photochemical and pharmacokinetic properties. 27th JSSX Annual Meeting (Chiba), Abstr. P.237, Nov 20–22, 2012
- 7) 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 7–9 日
- 8) 岩瀬 由美子, 山本 敏誠, 若栗 忍, 尾上 誠良, 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-日本動物実験代替法学会 第 25 回大会 (東京) 要旨集, p.

167, 2012年12月7-9日

- 9) 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7-9日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

眼刺激性試験代替法のバリデーションおよび共同研究

研究分担者 小島 肇
国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

眼刺激性試験代替法 SIRC 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。

キーワード：眼刺激性試験、バリデーション、動物実験代替法

協力研究者

簾内桃子 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
薬理部 主任研究員
大森 崇 同志社大学文化情報学部
准教授
加藤雅一 ジャパン・ティッシュ・エン
지니어リング (J-TEC) 株式会
社 研究開発部 主幹研究員

外品の許認可に必要な眼刺激性の情報を得られる代替試験法として SIRC-CVS アッセイの再現性、予測性をバリデーションで確認することを目的として、3施設によるバリデーション研究が実施されることになった。今年度は昨年度に実施された transfeability を確認する目的の phase I を経て、phase II として施設内および施設間再現性を確認した。

一方、ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (J-TEC) 株式会社は、3次元培養角膜モデル LabCyte CORNEA-MODEL24 を用いる眼刺激性試験代替法を開発した⁴⁾。バリデーションの前段階として、J-TEC で開発されたプロトコルの技術移転性を他施設で検証するための共同研究を、24施設 (J-TEC を含む) の協力を得て実施した。

A. 研究目的

眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS アッセイは、ウサギ角膜由来の SIRC 細胞に被験物質を種々の濃度で 72 時間曝露した際の細胞生存率をエンドポイントとした簡便な眼刺激性試験代替法である。本試験法は、資生堂で開発され¹⁾、1990 年代には厚生労働科学研究 (班長：大野泰雄) でバリデーションされた方法を²⁾、資生堂が改良したものである³⁾。2010-2011 年に、JaCVAM (日本動物実験代替法評価センター) 眼刺激性評価委員会で評価され、バリデーションが必要と判断された。そこで、JaCVAM が化粧品・医薬部

B. 研究方法

B-1) SIRC-CVS アッセイのバリデーション
B-1-1) バリデーション実行委員会
委員長：簾内桃子 (国立衛研)
委員：萩野滋延 (資生堂)、大森 崇 (同

志社大学)、山影康次(食薬センター秦野研究所)、小島肇(国立衛研)およびWarren Casey(NICEATM/ICCVAM)、Michael Oelgeschlaeger(BfR/ZEBET)

(図1参照)

B-1-2) 試験責任者(参加施設)

- 1) 福田隆之(株)ボゾリサーチセンター)
- 2) 池田 英史(日本コルマー株式会社)
- 3) 韓 美珍(バイオトクステック:韓国)

B-1-3) 実施期間

phase IIバリデーションは、予定された20物質を一度に実施した場合の時間的経費的な損失を考慮して、2回に分けて実施された。phase II aで良好な結果が得られた場合にのみ、phase II bに進む計画とした。

Phase II aは平成24年6月~8月の間に実施された。

Phase II bは平成24年11月~2013年1月の間に実施された。

B-1-4) 試験法

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¹⁾。試験法の概要を表1に示した。Crystal violet染色法は多くの細胞に適用でき、得られる結果も比較的安定しているため、細胞毒性の簡易試験法として用いられている。また、操作が簡便で、標本の資料保管が可能であることは本試験法の優位性を示すものである。参照物質としてtriethanolamineを用い、その細胞毒性と比較してIC50値が3回の結果の多数決により小さい場合に、その物質は眼刺激性物質と判定される³⁾。

B-1-5) 被験物質

phase IIバリデーションのため、眼刺激性や物理学的な性質が異なる20被験物質を選択し、phase II aでは5物質を、phase II bでは15物質をコード化してバリデーション実行委員会から各施設に配布した。

B-1-6) 計画

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。施設間・施設内再現性が目的のため、解析のためのコード開示はな

されなかった。

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

B-2-1) 参加施設

表2に示す24施設(J-TECを含む)が参加した。

B-2-2) 実施期間

実験は、平成24年10月~11月に実施された。

B-2-3) 試験法

培養角膜モデル LabCyte CORNEA-MODEL24に対し、

(1)被験物質が液体一培養角膜上皮表面に被験物質を1分間適用する。適用後、被験物質を除去、培養角膜上皮を洗浄した後、新しい培地を用いて24時間後培養を行った。

(2)被験物質が固体一培養角膜上皮表面に被験物質を24時間適用する。適用後、被験物質を除去、培養角膜上皮を洗浄した。後培養は行わない。

指標としては、WST-8アッセイ(吸光度:450nm/650nm)による細胞毒性を用いる。3ウェル3回繰り返し実施し、3回の生細胞率の平均から各被験物質の眼刺激性を判定した。

(1) 試験適合基準

下記の全ての基準に適合する場合のみ、試験が成立したと判断した。

陰性対照の生細胞数

$0.5 \leq \text{吸光度測定値(平均)} \leq 2.0$

陽性対照が刺激性の判定

生細胞率平均 $\leq 50\%$

SD

3個の培養角膜上皮モデルの生細胞率(陽性対照、および陰性対照)のSD $\leq 20\%$

(2) 被験物質の判定方法

(1)で試験が成立した各試験における被験物質の生細胞率平均が50%以下の場合に「眼刺激性」、それ以外の場合には「眼非刺激性」と判定した。

B-2-4) 被験物質

参加施設を4グループに分け、各グループに表3に示す被験物質をコード化して、各施設4物質ずつ配布した。

B-2-5) 計画

各施設の結果を、11月初旬を締め切りとして集め、J-TECにおいてコードを開示して解析がなされた。

(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。

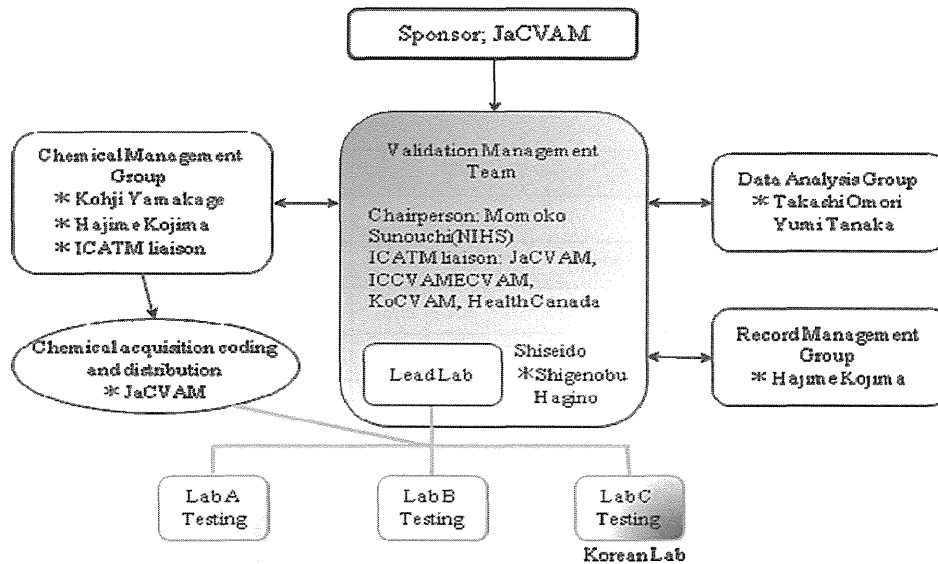


Fig.1 SIRC test Validation Management Team (VMT)

図 1. SIRCアッセイバリデーション実行委員会

表 1. 試験法の概要

SIRC細胞	ATCC, No. CCL-60
培養液	MEM培地 (10% FCS, 抗生物質含有)
マイクロプレート	96-well microplates
播種時の細胞濃度	1×10^4 cells/well
溶媒	培養液に溶解しない場合は、DMSO (終濃度 $\leq 0.5\%$) あるいはEthanol(終濃度 $\leq 0.5\%$)にて溶解する。
陽性対照物質	SDS (終濃度: Max. 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
比較対照物質	Triethanolamine (終濃度: Max. 5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
被験物質	終濃度: Max. $\leq 5,000$ $\mu\text{g}/\text{mL}$
調製液の段階希釈	陽性対照物質溶液、比較対照物質および被験物質溶液の 濃度段階は、公比2で8段階とする。
染色液	0.4% Crystal Violet-methanol溶液

表 2. LabCyte CORNEA-MODEL24 を用いた眼刺激性試験代替法共同研究における参加施設および試験責任者一覧

施設番号	参加試験施設	試験責任者
1	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所	渡辺美香
2	日本コルマー(株)	池田英史
3	石原産業(株)	土屋成一朗
4	(株)薬物安全性試験センター	篠田伸介
5	富士フィルム(株)	笠原利彦
6	(一財)化学物質評価研究機構	鈴木克
7	東洋ビューティ(株)	久間將義
8	(株)化合物安全性研究所	嶋谷亘
9	(財)日本食品分析センター	稲垣愛美
10	ロート製薬(株)	倉田隼人
11	オッペン化粧品(株)	吉武裕一郎
12	大正製薬(株)	坂本興嗣
13	日本農薬(株)	棟近由記美
14	(株)アイビー化粧品	安中希
15	花王(株)	許睿 (KyoEi)
16	ライオン(株)	渡辺真一
17	小林製薬(株)	中村牧
18	(株)マンダム	仲原聡
19	株式会社 ノエビア	山本裕
20	DRC(株)	竹田竜嗣
21	(株)ボゾリサーチセンター	福田隆之
22	(株)鎌倉テクノサイエンス	梶田明美
23	(公財)食品農医薬品安全性評価センター	坪井優
24	(株)ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング	加藤雅一

表3. LabCyte CORNEA-MODEL24 を用いた眼刺激性試験代替法共同研究における被験物質一覧

物質 No.	物質名	CAS no.	性状	GHS class
L0101-L0601	Sucrose fatty acid ester	-	固体	2
L0102-L0602	4,4'-Methylenebis(2,6-di-tert-butylphenol)	118-82-1	固体	NC
L0103-L0603	1-Butanol	71-36-3	液体	1
L0104-L0604	Sodium hydroxide (1%)	1310-73-2	液体	2B
L0701-L1201	1-Naphtalen acetic acid	86-87-3	固体	2
L0702-L1202	Sodium salicylate	54-21-7	固体	1
L0703-L1203	Tween 20	9005-64-5	液体	NC
L0704-L1204	Isopropylalcohol	67-63-0	液体	2A
L1301-L1801	2,5-dimethyl-2,5-hexanediol	110-03-2	固体	1
L1302-L1802	2-Methyl -1-pentanol	105-30-6	液体	2B
L1303-L1803	Triton X-100 (5%)	57-09-0	液体	2
L1304-L1804	Silic acid (Silicon Dioxide n-Hydrate)	7699-41-4	固体	NC
L1901-L2401	Glycolic acid	79-14-1	固体	2
L1902-L2402	3,3-Dithiodipropionic Acid	1119-62-6	固体	2B
L1903-L2403	Benzalkonium chloride (10%)	8001-54-5	液体	1
L1904-L2404	3-Methoxy-1,2-propanediol	623-39-2	液体	NC
Positive control	Ethanol	64-17-5	液体	2A
Positive control	Lauric acid	143-07-7	固体	1

C. 結果

C-1) SIRC-CVS アッセイのバリデーション

表4および表5に示すように、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。

表6および7にSIRC-CVSアッセイにおけるPhase II aおよびbの陽性および陰性の結果を示した。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。

これらの統計学的な解析結果は、添付資料

1および2にまとめられている。

C-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、表8に示すように、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、表9に示すように、平均細胞生存率が4施設の4データで一致しなかった。詳細なデータを添付資料3にまとめている。

D. 考察

SIRC-CVSアッセイについては、極めて施設内・施設間の再現性は高い試験法であると判断された。この結果を受け、予測性を評価するためのphase IIIに進むことになった。結果は示していないが、phase IIの結果から眼刺激性との一致度は高くないと考えられる。そこで、適用限界を明確にするため、できるだけ多くの被験物質を適用すべきであるとのバリデーション実行委員会の見解を受け、phase IIIでは3施設が同時に行う被験物質は10に留め、残りの30物質は施設毎に別の物質を用いることにより、合計100物質を実験する計画となった。

一方、LabCyte CORNEA-MODEL24を用いた眼刺激性試験代替法は、施設内、施設間の再現性が高い試験法であると判断された。偽陰性が生じにくい試験法であることが明らかになったが、偽陽性(19/72試験:26.4%)が多かった。この原因は、固体の適用方法、粘性の高い被験物質の洗浄法にあるとみられ、プロトコルの改良が必要であるとの意見が参加施設よりあった。

これまでの結果から、無刺激性の評価には有用かもしれないが、眼刺激性強度を判別できないと思われる。

これらの結果を受け、JaCVAMにバリデーションを打診することになった。

E. 結論

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。これを受け、SIRC-CVSアッセイにおいては、予測性評価のためのphase IIIバリデーションに進むことになった。一方、LabCyte CORNEA-MODEL24を用いた眼刺激性試験代替法については、この結果をJaCVAMに送り、バリデーションの必要性を打診することになった。

F. 参考文献

- 1) Itagaki H, Hagino S, Kato S, Kobayashi T, Umeda M.: An in vitro alternative to the Draize eye-irritation test: Evaluation of the crystal violet staining method. *Toxicol In Vitro*. 5(2), 139-43(1991)
- 2) 大野泰雄ら (2005) *Altern. Animal Test. Experiment*, 10(2), 54-157.
- 3) Hagino S, Okazaki Y, Kitagaki M, 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(2), 139-5.(2010)
- 4) LabCyte CORNEA-MODEL, available at: http://www.jppte.co.jp/business/LabCyte/CORNEA_MODEL.html (2013)

表 4. SIRC-CVS アッセイの phase II a における比較対照物質の平均 IC50 の平均値と標準偏差

	N	Mean of Averaged IC50	SD of Averaged IC50
Lab.A	15	1423.8	113.4
Lab.B	15	1305.4	68.9
Lab.C	15	1496.3	191.4

表 5. SIRC-CVS アッセイの phase II b における比較対照物質の平均 IC50 の平均値と標準偏差

	N	Mean of Averaged IC50	SD of Averaged IC50
A	45	1332.7	95.1
B	45	1207.6	74.491
C	45	1641.3	122.522

表 6. SIRC-CVS アッセイにおける Phase II a 5 物質の結果

Chemical	Set Number	Lab.			3 Labs.
		A	B	C	
01	1	Positive	Positive	Positive	Positive
	2	Positive	Positive	Positive	
	3	Positive	Positive	Positive	
02	1	Negative	Negative	Negative	Negative
	2	Negative	Negative	Negative	
	3	Negative	Negative	Negative	
03	1	Negative	Negative	Negative	Negative
	2	Negative	Negative	Negative	
	3	Negative	Negative	Negative	
04	1	Positive	Positive	Positive	Positive
	2	Positive	Positive	Positive	
	3	Positive	Positive	Positive	
05	1	Negative	Negative	Negative	Negative
	2	Negative	Negative	Negative	
	3	Negative	Negative	Negative	

表 7. SIRC-CVS アッセイにおける Phase II b 15 物質の結果

Chemical	Set Number	Lab.		
		A	B	C
6	1	Positive	Positive	Positive
	2	Positive	Positive	Positive
	3	Positive	Positive	Positive
7	1	Positive	Positive	Positive
	2	Positive	Positive	Positive
	3	Positive	Positive	Positive
8	1	Negative	Negative	Negative
	2	Negative	Negative	Negative
	3	Negative	Negative	Negative
9	1	Negative	Negative	Negative
	2	Negative	Negative	Negative
	3	Negative	Negative	Negative
10	1	Positive	Positive	Positive
	2	Positive	Positive	Positive
	3	Positive	Positive	Positive
11	1	Positive	Positive	Positive
	2	Positive	Positive	Positive
	3	Positive	Positive	Positive
12	1	Negative	Negative	Negative
	2	Negative	Negative	Negative
	3	Negative	Negative	Negative
13	1	Positive	Positive	Positive
	2	Positive	Positive	Positive
	3	Positive	Positive	Positive
14	1	Positive	Positive	Positive
	2	Positive	Positive	Positive
	3	Positive	Positive	Positive
15	1	Positive	Positive	Positive
	2	Positive	Positive	Positive
	3	Positive	Positive	Positive
16	1	Positive	Positive	Positive
	2	Positive	Positive	Positive
	3	Positive	Positive	Positive
17	1	Positive	Positive	Positive
	2	Positive	Positive	Positive
	3	Positive	Positive	Positive
18	1	Positive	Positive	Positive
	2	Positive	Positive	Positive
	3	Positive	Positive	Positive
19	1	Positive	Positive	Positive
	2	Positive	Positive	Positive
	3	Positive	Positive	Positive
20	1	Negative	Negative	Negative
	2	Negative	Negative	Negative
	3	Negative	Negative	Negative

表 8. LabCyte CORNEA-MODEL24 を用いた眼刺激性試験代替法のまとめ

Lab No.		Cell viability (%)											
		Liquid						Solid					
		1-Butanol			Sodium hydroxide (1%)			Sucrose fatty acid ester			4,4'-Methylenebis(2,6-di-tert-butylphenol)		
Mean	SD	Judge	Mean	SD	Judge	Mean	SD	Judge	Mean	SD	Judge		
1	R1	4.5	2.4	I	2.6	1.3	I	13.9	2.4	I	97.0	2.7	NI
	R2	6.8	2.3	I	3.8	2.0	I	11.3	3.6	I	77.4	3.9	NI
	R3	7.2	7.4	I	7.6	11.0	I	16.0	1.2	I	108.8	13.3	NI
2	R1	6.2	2.6	I	4.1	0.3	I	13.7	1.0	I	91.4	10.7	NI
	R2	11.4	3.3	I	3.6	0.6	I	15.8	1.7	I	92.3	3.4	NI
	R3	13.3	5.2	I	7.1	3.7	I	24.1	1.9	I	76.7	2.0	NI
3	R1/R2	11.9	2.8	I	2.0	1.1	I	13.6	3.8	I	32.9	4.2	I
	R2/R3	11.3	4.4	I	4.2	1.8	I	16.3	1.1	I	51.0	7.3	NI
	R3/R4	11.6	2.8	I	7.5	0.3	I	9.0	3.1	I	73.4	9.6	NI
4	R1	5.1	3.9	I	1.0	0.3	I	17.2	2.1	I	106.1	6.4	NI
	R2	15.4	9.1	I	2.4	1.6	I	18.3	9.0	I	90.2	15.2	NI
	R3	12.6	4.9	I	1.9	0.6	I	19.2	2.9	I	108.4	2.8	NI
5	R1	6.5	2.8	I	1.6	0.2	I	20.4	5.7	I	110.5	5.6	NI
	R2	4.9	1.2	I	1.3	0.7	I	15.0	4.9	I	110.2	0.9	NI
	R3	9.0	1.0	I	1.2	0.0	I	13.1	4.1	I	89.1	11.1	NI
6	R1	10.6	7.0	I	2.9	1.6	I	14.3	4.6	I	97.2	4.3	NI
	R2	14.7	1.6	I	5.0	3.6	I	21.6	1.8	I	102.3	6.7	NI
	R3	11.8	2.6	I	4.4	3.1	I	10.6	1.6	I	77.7	4.0	NI
Lab No.		Tween 20			Isopropylalcohol			1-Naphtalen acetic acid			Sodium salicylate		
		Mean	SD	Judge	Mean	SD	Judge	Mean	SD	Judge	Mean	SD	Judge
		7	R1	87.9	0.8	NI	9.0	0.8	I	6.6	0.2	I	4.3
	R2	82.8	0.9	NI	6.3	0.4	I	7.1	0.8	I	5.6	0.7	I
	R3	82.6	2.3	NI	5.6	0.4	I	8.0	0.5	I	6.2	0.5	I
8	R1	4.6	1.1	I	3.9	4.5	I	7.1	9.3	I	0.7	0.1	I
	R2	92.2	2.8	NI	10.8	4.1	I	10.7	5.7	I	0.8	0.1	I
	R3	94.3	4.0	NI	9.2	1.8	I	11.1	6.1	I	0.7	0.1	I
9	R1	86.9	6.3	NI	6.5	0.9	I	1.8	0.5	I	1.3	0.1	I
	R2	115.5	14.7	NI	8.7	3.0	I	2.6	0.3	I	1.5	0.1	I
	R3	111.1	1.9	NI	5.2	2.7	I	2.4	1.0	I	1.0	0.0	I
10	R1	95.5	18.8	NI	3.0	2.2	I	6.2	5.1	I	1.4	0.1	I
	R2	65.2	2.7	NI	6.0	0.8	I	4.2	2.0	I	2.0	0.1	I
	R3	83.5	18.0	NI	8.3	4.3	I	2.7	0.7	I	1.3	0.1	I
11	R1	30.7	10.6	I	7.8	3.9	I	1.5	0.7	I	0.9	0.1	I
	R2	117.4	10.2	NI	4.5	1.1	I	1.3	0.3	I	0.7	0.4	I
	R3	110.3	13.3	NI	11.3	1.4	I	2.7	0.8	I	1.5	0.5	I
12	R1	78.6	62.8	NI	7.1	3.7	I	5.4	2.4	I	0.7	0.0	I
	R2	96.3	22.0	NI	2.7	1.5	I	1.4	0.1	I	0.8	0.1	I
	R3	117.2	9.7	NI	21.9	9.1	I	4.7	1.0	I	0.7	0.0	I
Lab No.		2-Methyl-1-pentanol			Triton X-100(5%)			2,5-dimethyl-2,5-hexanediol			Silic acid		
		Mean	SD	Judge	Mean	SD	Judge	Mean	SD	Judge	Mean	SD	Judge
		13	R1	34.3	3.9	I	4.5	0.2	I	4.7	0.4	I	67.2
	R2	30.0	5.9	I	4.3	0.7	I	3.2	0.2	I	53.2	1.5	NI
	R3	30.0	7.9	I	4.2	1.3	I	2.7	0.3	I	63.4	13.4	NI
14	R1	28.0	8.9	I	23.5	3.4	I	1.4	0.5	I	35.6	7.6	I
	R2	36.5	6.9	I	21.3	2.7	I	1.0	0.4	I	47.0	3.5	I
	R3	43.8	6.3	I	21.8	2.3	I	0.7	0.0	I	41.5	9.2	I
15	R1	23.8	3.7	I	3.3	1.4	I	4.0	0.2	I	44.0	15.7	I
	R2	8.7	9.3	I	7.4	7.7	I	7.2	6.3	I	35.8	5.1	I
	R3	29.4	5.4	I	2.4	0.3	I	3.5	0.3	I	47.6	3.2	I
16	R1	21.7	4.4	I	1.6	0.5	I	1.4	0.1	I	51.0	8.2	NI
	R2	24.0	10.0	I	1.1	1.1	I	1.7	0.1	I	45.4	8.3	I
	R3	21.0	2.1	I	1.5	0.4	I	1.4	0.1	I	61.4	7.6	NI
17	R1	27.2	9.0	I	1.7	0.1	I	2.4	0.7	I	39.1	6.3	I
	R2	27.9	1.5	I	2.1	0.8	I	2.1	0.2	I	71.0	1.9	NI
	R3	25.1	4.2	I	1.8	0.1	I	1.5	0.0	I	42.0	2.7	I
18	R1	30.0	2.3	I	5.0	2.3	I	1.6	0.2	I	37.6	2.4	I
	R2	17.6	0.9	I	5.0	2.3	I	2.9	0.5	I	42.5	1.4	I
	R3	25.0	3.3	I	11.0	1.2	I	2.4	0.3	I	43.4	4.1	I
Lab No.		Benzalkonium chloride (10%)			3-Methoxy-1,2-propanediol			Glycolic acid			3,3-Dithiodipropionic acid		
		Mean	SD	Judge	Mean	SD	Judge	Mean	SD	Judge	Mean	SD	Judge
		19	R1	-0.8	0.3	I	47.9	6.6	I	-2.4	0.0	I	-0.2
	R2	1.4	0.2	I	40.0	3.0	I	-0.1	0.4	I	11.8	1.4	I
	R3	0.8	0.1	I	48.9	13.5	I	0.3	0.4	I	4.6	3.0	I
20	R1	0.7	0.2	I	54.5	4.0	NI	-0.1	0.5	I	2.6	1.4	I
	R2	1.1	0.5	I	62.1	17.1	NI	0.1	0.2	I	1.1	0.1	I
	R3	1.2	0.3	I	51.6	4.8	NI	0.0	0.2	I	3.5	1.1	I
21	R1	2.2	0.4	I	70.6	5.9	NI	1.0	0.1	I	32.0	5.0	I
	R2	2.5	1.2	I	95.2	3.6	NI	0.7	0.1	I	13.9	0.6	I
	R3	1.8	0.1	I	93.4	4.5	NI	0.6	0.1	I	14.2	2.2	I
22	R1	1.6	0.1	I	76.3	8.7	NI	0.4	0.1	I	5.3	4.8	I
	R2	1.5	0.0	I	81.6	39.4	NI	0.6	0.2	I	4.3	2.8	I
	R3	1.5	0.0	I	62.6	13.4	NI	0.6	0.2	I	13.4	2.1	I
23	R1	1.6	0.2	I	75.4	2.2	NI	1.2	0.7	I	1.8	0.2	I
	R2	0.7	0.1	I	50.1	6.2	NI	0.9	0.1	I	2.3	1.0	I
	R3	1.5	0.3	I	47.7	12.8	I	1.7	0.2	I	2.8	0.7	I
24	R1	0.7	0.2	I	85.7	9.0	NI	2.4	0.8	I	3.4	1.2	I
	R2	1.3	0.3	I	73.0	12.1	NI	2.2	1.6	I	4.1	1.1	I
	R3	0.6	0.2	I	82.0	8.0	NI	0.6	0.2	I	2.9	2.5	I

表 9. LabCyte CORNEA-MODEL24を用いた眼刺激性試験代替法の試験機関毎の各被験物質の平均細胞生存率

液体の場合

GHS	Test chemicals	Cell viability (%)							
		Lab						Mean	SD
		A	B	C	D	E	F		
NC	Tween 20	84.4	63.7	104.5	81.4	86.1	97.4	86.3	14.1
NC	3-Methoxy-1,2-propanediol	45.6	56.1	86.4	73.5	57.7	80.2	66.6	15.9
2B	2-Methyl-1-pentanol	31.4	36.1	20.6	22.2	26.7	24.2	26.9	5.9
2B	Sodium hydroxide (1%)	4.7	4.9	4.6	1.8	1.4	4.1	3.6	1.6
2	Triton X-100(5%)	4.3	22.2	4.4	1.4	1.9	7.0	6.9	7.8
2A	Isopropylalcohol	7.0	8.0	6.8	5.8	7.9	10.6	7.6	1.6
1	1-Butanol	6.2	10.3	11.6	11.0	6.8	12.4	9.7	2.6
1	Benzalkonium chloride (10%)	0.5	1.0	2.2	1.5	1.3	0.9	1.2	0.6

固体の場合

GHS	Test chemicals	Cell viability (%)							
		Lab						Mean	SD
		A	B	C	D	E	F		
NC	4,4'-Methylenebis(2,6-di-tert-butylphenol)	94.4	86.8	52.4	101.6	103.3	92.4	88.5	18.7
NC	Silic acid	61.3	41.4	42.5	52.6	50.7	41.2	48.3	8.1
2B	3,3-Dithiodipropionic acid	5.4	2.4	20.1	7.7	2.3	3.5	6.9	6.8
2	Sucrose fatty acid ester	13.7	17.9	13.0	18.3	16.2	15.5	15.7	2.1
2	1-Naphtalen acetic acid	7.3	9.6	2.3	4.3	1.8	3.8	4.9	3.0
2	Glycolic acid	-0.7	0.0	0.7	0.5	1.3	1.7	0.6	0.9
1	2,5-dimethyl-2,5-hexanediol	3.5	1.0	4.9	1.5	2.0	2.3	2.5	1.4
1	Sodium salicylate	5.3	0.8	1.3	1.6	1.0	0.7	1.8	1.8

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、田中憲徳、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)

2. 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 和市, 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 : コラ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、中村和市、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 2012Genetic 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、