

**Table 12: A comparison of the classification based on the LabCyte MTT assay data with the actual GHS classifications, in the second and third phases of the study**

Index	Laboratory					
	A	B	C	D	F	G
Sensitivity	10/12 83.3%	10/12 83.3%	10/12 83.3%	11/12 91.6%	9/12 75%	10/12 83.3%
Specificity	9/13 69.2%	9/13 69.2%	9/13 69.2%	10/13 76.9%	10/13 76.9%	10/13 76.9%
Accuracy	19/25 76%	19/25 76%	19/25 76%	21/25 84%	19/25 76%	20/25 80%

A total of 25 substances were tested.

**Reliability**

All the negative control data from the LabCyte MTT assay showed high repeatability, as well as within-laboratory and between-laboratory reproducibility (data for the first phase is shown in Table 4). The same was true for the positive control data — high repeatability, within-laboratory and between-laboratory reproducibility were reported throughout the study (Tables 5–7).

When we conducted this study, we referred to the original ECVAM performance standards (18). In this document, one of the defined acceptance criteria was that the data range should have a standard deviation  $\leq 18\%$ . After the first phase of the study, the VMT discussed the topic in relation to the LabCyte assay. Ultimately, the VMT decided that this particular criterion (i.e. standard deviation  $\leq 18\%$ ) was not appropriate, because, at the time, the amount of data was not enough to set this kind of range. Instead of this criterion, the VMT set another indicator of within-laboratory reproducibility — the agreement between three independent viability measurements. In order to evaluate between-laboratory reproducibility, majority classification for each chemical was used. As a result, the ratio of within-laboratory repro-

ducibility was 93.5%, and for between-laboratory reproducibility it was 96.5%. Based on these values, the VMT decided that the LabCyte MTT assay showed high within-laboratory and between-laboratory reproducibility. As shown in the next section, the reliability of the model was high. Therefore, the criteria with regard to the range may not be required for this *in vitro* tissue model, even though the variation should be assessed.

For three of the test chemicals, the classifications based on the LabCyte MTT assay were not consistent among all seven laboratories. These chemicals were No. 12 (terpinyl acetate), No. 16 (1-bromohexane) and No. 19 (butyl methacrylate), as shown in Table 9. We consider this a peculiarity of viability measurements close to the threshold, since when chemical treatment results in a tissue viability of about 50%, laboratory-dependent discrepancies might occur. Chemicals that elicit this sort of response might not be suitable for this type of validation study. It should be noted that chemicals No. 12 and No. 19 have been eliminated from the list of chemicals in the revised ECVAM performance standards (19).

On the other hand, the other 22 chemicals exhibited consistent classifications between the laboratories (Table 9), while chemical No. 18 (di-*n*-propyl

**Table 13: The mean and range of sensitivity, specificity and accuracy of the LabCyte MTT assay classifications versus UN GHS classifications, in the second and third phases of the study**

	<i>n</i>	Mean	Minimum	Maximum	ECVAM criterion
Sensitivity (%)	6	83.3	75.0	91.6	80.0
Specificity (%)	6	73.1	69.2	76.9	70.0
Accuracy (%)	6	78.0	76.0	84.0	75.0

A total of 25 substances were tested.

disulphide) exhibited large variation. These results indicate that the model is highly reliable.

### Predictivity

The mean sensitivity, specificity and accuracy of this prediction model are 83.3%, 73.1% and 78.0%, respectively (Table 13). The ESAC statement proposed that the performance of a skin irritation model should be as follows: sensitivity 80%, specificity 70% and accuracy 75% (18, 19). Therefore, our results satisfied these values.

The VMT detected four false positives: chemicals No. 1 (1-bromo-4-chlorobutane), No. 7 (4-methylthio-benzaldehyde), No. 12 (terpinyl acetate) and No. 21 (cinnamaldehyde) were among the 13 chemicals classified as non-irritant. Furthermore, there were three false negatives: chemicals No. 16 (1-bromohexane), No. 18 (di-*n*-propyl disulphide) and No. 19 (butyl methacrylate), which were among the 12 chemicals classified as irritant. In order for this model to be of use in regulatory assessment, it is important to determine the causes of false-negative or false-positive results. Although chemical No. 18 is an irritant in rabbits, it is a non-irritant chemical with human tissue. We propose that chemical No. 18, like chemical No. 16, was scored as a false negative because its viability was around 50%, which caused different results to be obtained in different laboratories for these two coded chemicals.

### The necessity of IL-1 $\alpha$ release measurement

IL-1 $\alpha$  is a cytokine produced by keratinocytes, and is a well-known irritation marker. It is a key player when the mode of action of skin irritation is considered (30). Previously, Coquette *et al.* reported that the up-regulation of IL-1 $\alpha$  mRNA was observed after topical application of sensitizers and irritants, but only the latter significantly increased extracellular IL-1 $\alpha$  (31). The determination of IL-1 $\alpha$  release levels, in association with MTT conversion to formazan, is necessary to discriminate and classify between irritant and sensitising agents in a single assay, and thus represents a potential *in vitro* alternative to two classical *in vivo* assays. Spielmann *et al.* (16) reported the necessity of these endpoints with EpiSkin. For the MTT assay only, the sensitivity was 75% and the specificity was 81%. When the MTT and IL-1 $\alpha$  release assays were combined, the sensitivity increased to 91% and the specificity was 79% (16). The ESAC has also made recommendations on the same combination of assays, MTT and IL-1 $\alpha$  release, when using EpiSkin (6).

In contrast, our data show that IL-1 $\alpha$  release determination changed the classification only for

chemicals No. 5 (allyl phenoxyacetate) in Laboratory F, No. 16 (1-bromohexane) in Laboratory A and No. 18 (di-*n*-propyl disulphide) in Laboratory D, as shown in Tables 10 and 11. The effect of IL-1 $\alpha$  release data on the reliability of these results was small. Therefore, the VMT considered the IL-1 $\alpha$  release measurement in the LabCyte assay to be unnecessary for this protocol, although additional validation studies involving IL-1 $\alpha$  release will be required to confirm this decision. Spielmann *et al.* have also reported the sensitivity of the EpiDerm assay (MTT data only) to be 57% and the specificity 85%, while the predictive capacity of the EpiDerm assay did not improve by the measurement of IL-1 $\alpha$  release (16). In addition, OECD Test Guideline No. 439 has not approved the use of IL-1 $\alpha$  release determination in the *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method (22).

### Conclusion

The LabCyte MTT assay demonstrated high reliability, both within-laboratory and between-laboratory, and good reliability for the positive control (100%). In addition, the data showed acceptable relevance (77.5% overall accuracy, 82.3% overall sensitivity and 72.6% overall specificity) by using solely the MTT assay. Therefore, we found the assay to be suitable for use as a stand-alone method to distinguish between skin irritants and non-irritants. However, these results were based on, at most, 25 chemicals. Since this model demonstrated high reliability, we plan further investigations with additional chemicals, which will be conducted by the lead laboratory.

### Acknowledgements

This validation study was supported by the JSAAE (Japanese Society for the Alternative to Animal Experiments) and a Health and Labour Sciences Research Grant, from the WHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare), Japan.

Received 24.05.11; received in final form 22.12.11; accepted for publication 05.01.12.

### References

1. Draize, J.H., Woodard, G. & Calvery, H.O. (1944). Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* **82**, 377–390.
2. OECD (2002). *OECD Guideline for the Testing of Chemicals. No. 404. Acute Dermal Irritation/Corrosion*, 13pp. Paris, France: Organisation for

- Economic Co-operation and Development. Available at: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740401e.pdf?expires=1326212784&id=id&accname=freeContent&checksum=479E6FD0B64BAE98FE63C079EB226F82> (Accessed 10.01.12).
3. Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J. & Klausner, M. (1994). New epidermal model for dermal irritancy testing. *Toxicology in Vitro* **8**, 889–891.
  4. Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Bouwstra, J. & Mommaas, M. (2000). Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *International Journal of Pharmaceutics* **203**, 211–225.
  5. ECVAM (2007). *Statement on the Validity of In-vitro Tests for Skin Irritation*, 7pp. Ispra, Italy: European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, Scientific Advisory Committee. Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/dermal/epiderm/ESAC26-SkinIrritation.pdf> (Accessed 10.01.12).
  6. ECVAM (2008). *Statement on the Scientific Validity of In-vitro Tests for Skin Irritation Testing*, 7pp. Ispra, Italy: European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, Scientific Advisory Committee. Available at: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/> (Accessed 10.01.12).
  7. ECVAM (2009). *Statement on the Performance Under UN GHS of Three In-vitro Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards*, 8pp. Ispra, Italy: European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, Scientific Advisory Committee. Available at <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/> (Accessed 10.01.12).
  8. UN (2007). *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition*, 555pp. Geneva, Switzerland: United Nations. Available at: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev02/English/00e\\_intro.pdf](http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/English/00e_intro.pdf) (Accessed 11.01.12).
  9. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliott, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. & Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* **15**, 57–93.
  10. Portes, P., Grandidier, M-H., Cohen, C. & Roguet, R. (2002). Refinement of the Episkin protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: Follow-up to the ECVAM prevalidation study. *Toxicology in Vitro* **16**, 765–770.
  11. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliott, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van de Sandt, J.J., Wiemann, C. & Worth, A.P. (2002). Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2. *ATLA* **30**, 109–129.
  12. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. & Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. *ALTEX* **21**, 107–114.
  13. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. & Spielmann, H. (2005). The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests — An assessment of the performance of the optimised test. *ATLA* **33**, 351–367.
  14. Cotovio, J., Grandidier, M-H., Portes, P., Roguet, R. & Rubinstenn, G. (2005). The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: Optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process. *ATLA* **33**, 329–349.
  15. Hoffmann, S. (2006). *ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL-1α*, 190pp. Ispra, Italy: European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods. Available at: [http://ecvam.jrc.it/ft\\_doc/ATF00042\\_s.pdf](http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ATF00042_s.pdf) (Accessed 11.01.12).
  16. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J.H., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang, V. (2007). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test. *ATLA* **35**, 559–601.
  17. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang, V. (2007). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Selection of test chemicals. *ATLA* **35**, 603–619.
  18. Griesinger, C., Barroso, J., Zuan, V., Cole, T., Genschow, E. & Liebsch, M. (2010). *Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on In Vitro Skin Irritation Testing*, 209pp. Ispra, Italy: European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods.
  19. ECVAM (2009). *ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for In Vitro Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis*, 7pp. Ispra, Italy: European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, Scientific Advisory Committee. Available at: [http://ecvam.jrc.it/publication/ESAC31\\_statement\\_updated-skin-irritation-PS\\_200909-22.pdf](http://ecvam.jrc.it/publication/ESAC31_statement_updated-skin-irritation-PS_200909-22.pdf) (Accessed 20.01.12).
  20. ECH (2010). *European Chemicals Agency*. Helsinki, Finland: European Chemicals Agency. Available at: [http://ec.europa.eu/echa/home\\_en.html](http://ec.europa.eu/echa/home_en.html) (Accessed 23.01.12).
  21. Anon. (2004). *Commission Staff Working Document. Timetables for the Phasing-out of Animal Testing in the Framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC)*, 8pp. Brussels, Belgium: Commission of the European Communities. Available at: [http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/antest/sec\\_2004\\_1210\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/antest/sec_2004_1210_en.pdf) (Accessed 23.01.12).
  22. OECD (2010). *OECD Guideline for the Testing of*

- Chemicals. No. 439. In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method*, 18pp. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development. Available at: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9743901e.pdf?expires=1326721637&id=id&accname=freeContent&checksum=DE7DC6821D95D80CB715E855076DACF8> (Accessed 16.01.12).
23. Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. & Hata, K-I. (2009). Assessment of the human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for *in vitro* skin irritation testing according to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-validated protocol. *Journal of Toxicological Science* **34**, 327–334.
  24. OECD (2005). *OECD Series on Testing and Assessment. No. 34. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, 96pp. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2005\)14&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2005)14&doclanguage=en) (Accessed 16.01.12).
  25. Hartung, T., Bremer, S., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Fortaner, S., Gribaldo, L., Halder, M., Hoffmann, S., Roi, A.J., Prieto, P., Sabbioni, E., Scott, L., Worth, A. & Zuang, V. (2004). A modular approach to the ECVAM principles on test validity. *ATLA* **32**, 467–472.
  26. Rheinwald, J.G. & Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331–344.
  27. Green, H. (1978). Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: New view. *Cell* **15**, 801–811.
  28. OECD (1999). *OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No 5. Compliance of Laboratory Suppliers with GLP Principles*, 8pp. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(99\)21&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(99)21&docLanguage=En) (Accessed 16.01.12).
  29. ECVAM (2009). *ECVAM Skin Irritation Validation Study. Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min–42 hours for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals*, 43pp. Ispra, Italy: European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods. Available at: [http://ecvam.jrc.it/ft\\_doc/EPISKIN-SIT-SOP%20JC%20V13-23%2002%2009.pdf](http://ecvam.jrc.it/ft_doc/EPISKIN-SIT-SOP%20JC%20V13-23%2002%2009.pdf) (Accessed 20.01.12).
  30. Ale, I.S. & Maibach, H.I. (2008). Mechanisms in irritant and allergic contact dermatitis. In *Dermatotoxicology* (ed. H. Zhai, K-P. Wilhelm & H.I. Maibach), 7th edn, pp. 159–167. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
  31. Coquette, A., Berna, N., Vandenbosch, A., Rosdy, M., De Wever, B. & Poumay, Y. (2003). Analysis of interleukin-1alpha (IL-1alpha) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in *in vitro* reconstructed human epidermis for the prediction of *in vivo* skin irritation and/or sensitization. *Toxicology in Vitro* **17**, 311–321.



# The Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM): Recent ICATM Contributions and Future Plans

Hajime Kojima

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

## Summary

In November 2005, the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) was established at the National Center for Biological Safety and Research affiliated with the National Institute of Health Sciences (NIHS) in Japan. JaCVAM's mission is: 1) to ensure that new or revised tests are validated, peer reviewed, and officially accepted by the regulatory agencies; and 2) to harmonize international alternatives to animal testing through participation in the International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM). Here, JaCVAM is making steady progress in validation and peer reviewed studies under the ICATM framework.

**Keywords:** validation, peer review, alternative, Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)

In November 2005, the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)<sup>1</sup> was established at the National Center for Biological Safety and Research affiliated with the National Institute of Health Sciences (NIHS) in Japan. JaCVAM's mission is to facilitate the 3Rs (Reduction, Refinement and Replacement) with regard to animal testing, with special priority in Japan given to reduction and replacement. Specifically, the key objectives of JaCVAM are:

- 1) To ensure that new or revised tests are validated through comparison with domestically developed or internationally certified standard tests, peer reviewed, and officially accepted by the regulatory agencies.
- 2) To work towards harmonization of international alternatives to animal testing. Each validation center has signed a Memorandum of Cooperation with the International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM<sup>2</sup>). Countries and regions participating in ICATM include JaCVAM; the European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM<sup>3</sup>); the United States NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods/Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (NICEATM/ICCVAM<sup>4</sup>); Health Canada; and, as of March 2011, the Korean Center for the Validation of Alternative Methods (KoCVAM<sup>5</sup>). Under the ICATM framework, JaCVAM expects to experience more efficient test validation and review, as well as more rapid national and international acceptance of scientifically valid methods.

In the six years that JaCVAM has been active, seven methods have been accepted by the JaCVAM regulatory acceptance board, including: 1) the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test for identifying ocular corrosives and severe irritants; 2) the isolated chicken eye (ICE) test for identifying ocular corrosives and severe irritants; 3) the local lymph node assay (LLNA): DA, a non-radioactive modification to the LLNA, which quantifies adenosine triphosphate (ATP) content via bioluminescence as an indicator of lymphocyte proliferation; 4) the LLNA:BrDU-enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), a non-radioactive modification to the LLNA test method, which utilizes non-radiolabelled 5-bromo-2-deoxyuridine (BrDU) in an ELISA-based test system to measure lymphocyte proliferation; 5) the Reconstructed Human Epidermis Test Method, EPISKIN for *in vitro* skin irritation testing; 6) the Human Skin Model Test, Vitrolife-Skin, EpiDerm for *in vitro* skin corrosion testing; and 7) an *in vitro* cytotoxicity test for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity tests.

In February 4, 2011, the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan was notified that data obtained with alternative testing methods approved by the JaCVAM Steering Committee could be used for the submission of quasi-drug applications or for petitions to include ingredients in the Standards for Cosmetics. Therefore, JaCVAM decided to accelerate new *in vitro* testing methods to take advantage of this opportunity to strongly impact testing throughout Japan. Accordingly, JaCVAM is currently coordinating the validation studies and peer review of several tests

<sup>1</sup> <http://jacvam.jp/>

<sup>2</sup> <http://iccvam.niehs.nih.gov/about/icatm.htm>

<sup>3</sup> <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>

<sup>4</sup> <http://iccvam.niehs.nih.gov/>

<sup>5</sup> <http://www.nifds.go.kr/nitr/contents/m91100/view.do>



Tab. 1: On-going test methods at JaCVAM under the ICATM framework

No.	Test method	Stage		
		Validation	Peer review	Regulatory acceptance
1	Comet assay ( <i>in vivo</i> & <i>in vitro</i> )	On-going		
2	Stably Transfected Transactivation Assay (STTA)	On-going		
3	human Cell Line Activation Test (hCLAT)	ECVAM on-going		
4	Phototoxicity testing, ROS (Reactive Oxygen Species) assay	On-going		
5	Eye irritation testing, SIRC assay	On-going		
6	IL-8 Luc assay	On-going		
7	Balb 3T3 cell transformation assay	Pre-validation finished	ESAC finished	
8	Bhas cell transformation assay	Validation finished	JaCVAM (in preparation)	
9	Eye irritation testing, STE (Short Time Exposure) assay	Validation finished	ICCVAM (in preparation)	
10	<i>In vitro</i> Skin irritation assay LabCyte EPI-Model	Validation finished		OECD on-going

(Tab. 1). Most of the tests are for the safety assessment of cosmetic ingredients and/or products. The methods currently undergoing national or international peer review include the Bhas cell transformation assay and the short time exposure (STE) assay for eye irritation testing. Additionally, JaCVAM is participating, along with several other international collaborators, in ongoing validation studies, which include the human cell line activation test (h-CLAT), *in vivo/in vitro* Comet assays, the stably transfected transactivation assay (STTA) antagonist test for screening of endocrine disruptors, and an assay for phototoxicity.

Particularly notable are JaCVAM's efforts towards the validation, nearly complete, of the *in vivo/in vitro* Comet assay, which has been in development since 2006. The last International Validation Management Team meeting took place in September 2011 in Kyoto. JaCVAM is also working on validation studies of the STTA antagonist assay and a reactive oxygen species (ROS) assay for phototoxicity testing, which is based on the hypothesis that ROS may induce photochemical or toxic reactions. It is expected that the STTA antagonist assay will be included as an additional element in OECD TG 455: the Stably Transfected Human Estrogen Receptor-alpha Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist-Activity of Chemicals (OECD, 2005). The high throughput ROS assay is under development, and the corresponding validation study is projected to be completed by

December 2011. JaCVAM has also begun validation studies of *in vitro* immunotoxicity assays.

To facilitate regulatory acceptance of the skin sensitization assay IL-8 Luc assays, JaCVAM is making steady progress in validation and peer reviewed studies under the ICATM framework.

#### Reference

OECD (2005) 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 Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS).

#### Correspondence to

Hajime Kojima, PhD  
Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)  
National Institute of Health Sciences (NIHS), Japan  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku  
158-8501 Tokyo, Japan  
Phone/Fax: +81 3 3700 9874  
e-mail: h-kojima@nihs.go.jp

## 日本動物実験代替法評価センター(JaCVAM) 平成23年度報告書

小島 肇<sup>1,2</sup>, 西川 秋佳<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 日本動物実験代替法評価センター運営委員会

<sup>2</sup> 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

### Summary

In November 2005, the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) was established at the Biological Safety and Research[0] Center affiliated with the National Institute of Health Sciences (NIHS) in Japan. The JaCVAM's mission is to facilitate the 3Rs (Reduction, Refinement and Replacement) with regard to animal testing, with special priority in Japan given to reduction and replacement. Specifically, the key objectives of JaCVAM are:

1) To ensure that new or revised tests are validated through comparison with domestically developed or internationally certified standard tests, peer reviewed, and officially accepted by the regulatory agencies.  
2) To work towards harmonization of international alternatives to animal testing. Each validation center has signed a Memorandum of Cooperation with the International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM). Countries and regions participating in ICATM include JaCVAM; the European Union Reference Laboratory for Alternative Methods to Animal Testing (ECVAM)[0]; the United States NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods/Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (NICEATM/ICCVAM); Health Canada; and, as of March 2011, the Korean Center for the Validation of Alternative Methods (KoCVAM). Under the ICATM framework, JaCVAM expects to experience more efficient test validation and review, as well as more rapid national and international acceptance of scientifically valid methods.

In the six years that JaCVAM has been active, seven methods have been accepted by the JaCVAM regulatory acceptance board, including: 1) the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test for identifying ocular corrosives and severe irritants; 2) the isolated chicken eye (ICE) test for identifying ocular corrosives and severe irritants, 3) the local lymph node assay (LLNA): DA, a non-radioactive modification to the LLNA, which quantifies adenosine triphosphate (ATP) content via bio-luminescence as an indicator of lymphocyte proliferation; 4) the LLNA:BrdU-enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), a non-radioactive modification to the LLNA test method, which utilizes non-radiolabelled 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) in an ELISA-based test system to measure lymphocyte proliferation; 5) the Reconstructed Human Epidermis Test Method, EPISKIN for *in vitro* skin irritation testing; 6) the Human Skin Model Test, Vitrolife-Skin, EpiDerm for *in vitro* skin corrosion testing; and 7) an *in vitro* cytotoxicity test for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity tests.

In February 4, 2011, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan was notified that data obtained with alternative testing methods approved by the JaCVAM Steering Committee could be used for the submission of quasi-drug applications or for petitions to include ingredients in the Standards for Cosmetics. Therefore, JaCVAM decided to accelerate new *in vitro* testing methods to take advantage of this opportunity to strongly impact testing throughout Japan. Accordingly, JaCVAM is currently coordinating the validation studies and peer review of several tests. Most of the tests are for the safety assessment of cosmetic ingredients and/or products. The methods currently undergoing national or international peer review include the Bhas cell transformation assay and the short time exposure (STE) assay for eye irritation testing. Additionally, JaCVAM is participating, along with several other international collaborators, in ongoing validation studies, which include the human cell line activation test (h-CLAT), *in vivo/in vitro* Comet assays, the stably transfected transactivation assay (STTA) antagonist test for screening of endocrine disruptors, and an a reactive oxygen species (ROS) assay for phototoxicity.

Furthermore, we started the validation study on the IL-8 Luc assay for the skin sensitization and SIRC-CVS for the eye irritation under the ICATM framework this year.

## 1. 序論

2005年(平成17年)11月に国立医薬品食品衛生研究所(以下、国立衛研と記す)安全性生物試験研究センター(以下、安全センターと記す)薬理部内に新規試験法評価室が設けられた。この部屋を中心に、国立衛研内の専門家、日本動物実験代替法学会代表をメンバーで構成される合議体としてJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)はスタートした。

なお、このJaCVAMは、2011年(平成23年)4月より、国立衛研の内部組織として、業務内容及び責務を明確にした組織に変更され(JaCVAM設置規則)<sup>1)</sup>、JaCVAMの日本語の正式な名称である「日本動物実験代替法評価センター」として活動を始めた。このJaCVAMの設置規則では、JaCVAMの目的を「化学物質等の業務関連物質の安全性評価において、国民の安全を確保しつつ、動物実験に関する3Rs (Reduction: 削減、Refinement: 苦痛の軽減、Replacement: 置き換え)の促進に資する新規動物実験代替法を行政試験法として、可能な範囲での導入に貢献することである。これにより、我が国の医薬品等の製造販売承認申請資料の作成及び審査、並びに化粧品基準の改正等にも寄与する。」としている。

今年度より、毎年の成果を年次報告としてまとめていきたい。

## 2. JaCVAMの組織と機能

JaCVAMは、化学物質等の安全性評価の試験法に関する科学的妥当性及びそれに必要なバリデーション、行政的利用の妥当性や社会的受け入れの可能性について審議を実施している組織であり、その運営の責任は、運営委員会が負っている。

運営委員会のメンバーは、国立衛研所長、安全センター運営会議構成員(安全センター長、毒性部長、薬理部長、病理部長、変異遺伝部長、総合評価研究室長及び毒性部動物管理室長)、新規試験法評価室長、厚生労働省医薬局担当課室及び独立行政法人医薬品医療機器総合機構の代表者である。事務局を新規試験法評価室が務める。提案者から新規試験法がJaCVAMに

提出されると、①運営委員会は、試験法毎にその分野の専門家による評価委員会を設置する。評価委員会は新規・改訂試験法の科学的な評価を行い、第一次評価報告書を作成する。②運営委員会は、この第一次評価報告書を基にバリデーションを行うことが適当か検討を行い、バリデーションを行うことが適当な場合には、バリデーション実行委員会を設置する。③バリデーション実行委員会は、バリデーションの計画を立て、実行する。また、バリデーションの結果を踏まえ、推奨できるプロトコルを含むバリデーション報告書をまとめる。④評価委員会は、バリデーション結果を踏まえて、審議を行い、評価委員会としての第二次評価報告書をまとめ、パブリックコメントに供する。⑤評価委員会報告書及び背景情報並びにパブリックコメントで得られた意見は、国立衛研及び外部の毒性学・統計学者、医薬品医療機器総合機構の審査担当者等で構成される評価会議において、申請試験法の科学的妥当性、その行政的利用及び社会的受け入れ可能性の観点から審議され、評価会議報告書が作成される。⑥評価会議の報告書は、運営委員会による承認後、評価委員会の評価報告書等とともに公表され、行政的利用の妥当性がある試験法は新規試験法提案書として関連行政部局に伝達される。

なお、厚生労働省では、平成23年2月4日医薬部外品の承認申請等において、JaCVAMの評価結果等を参考に適切な資料を作成する旨の事務連絡を发出し<sup>2)</sup>、積極的に動物試験代替法の促進に務めている(添付資料1)。これらはJaCVAMホームページに掲載される<sup>1)</sup>。これにより、医薬部外品の承認申請資料の作成や化粧品のポジティブリスト改正要望等への活用が促進されることが期待されている。

さらに、平成24年4月26日付けで、厚生労働省医薬食品局審査管理課より<sup>3)</sup>、2つの代替法の利用に関するガイダンスが公表された(添付資料2)。これらのガイダンスもJaCVAMのホームページに掲載されており、これらのJaCVAM関連資料は代替法の利用に大きな影響を及ぼすと考えている。



表1 対象毒性分類毎の2011年度 代替法進捗状況

NO.	試験法名	対象毒性	日本におけるステータス	国際対応
1	Vitrollic-skin	腐食性	評価会議再評価	
2	Episkin	皮膚刺激性	評価会議再評価	
3	EpiDerm		評価会議評価中	OECD TG439
4	SkinEthics		評価会議評価中	OECD TG439
5	LabCyteEPI-MODEL		追加バリ実施	OECD TG439 記載承認
6	LLNA:DA		評価会議再評価	OECD TG442A
7	LLNA:BrdU-ELISA	皮膚感受性	評価会議再評価	OECD TG442B
8	reduced LLNA		評価会議評価中	OECD TG429
9	DPRA(ペプチド結合試験)			ESAC 第三者評価
10	Keratinosense			ESAC 第三者評価
11	h-CLAT		バリデーション中	ECVAM バリデーション中
12	MUSST			ECVAM バリデーション中
13	IL-8 Luc アッセイ		バリデーション中	
14	ROS アッセイ	光毒性	バリデーション終了(2012)	ICH S10
15	BCOP	眼刺激性	評価会議再評価	
16	ICE		評価会議再評価	
17	ドレイズ試験 TG405 改定		評価会議評価中	OECD TG 改正承認
18	フルオレセイン漏出法		評価会議評価中	OECD TG 承認
19	サイトセンサーマイクロフィジオメーター法		評価会議評価中	OECD work plan
20	培養角膜モデルを用いた試験法			ECVAM バリデーション中
21	STE		バリデーション終了(2011)	ICCVAM 第三者評価
22	SIRC-CVS	バリデーション中		
23	in vivo コメットアッセイ	遺伝毒性	バリデーション終了(2012)	OECD work plan
24	哺乳類培養細胞を用いる試験		評価会議評価中	OECD work plan
25	培養表皮モデルを用いた小核試験			ECVAM バリデーション中
26	形質転換試験 Bhas 42 アッセイ	発癌性	バリデーション終了(2010)	EURL ECVAM 第三者評価
27	BG1Luc アッセイ	内分泌かく乱スクリーニング	評価会議評価中	OECD TG 承認
28	STTA エストラジェン アンタゴニスト法		バリデーション中	OECD work plan
29	CCi アッセイ			ICCVAM バリエーション中
30	MELN			ECVAM バリデーション中
31	3T3NRU	急性毒性	評価会議承認	OECD GD129
32	3T3NRU			EURL ECVAM 第三者評価
33	ゼブラフィッシュ試験			EURL ECVAM 第三者評価
34	in vitro 試験	パイロジェン	追加バリ検討中	ICCVAM バリデーション計画
35	in vitro 皮膚透過性試験	経皮吸収	評価会議評価中	TG428
36	In vitro 肝生体内変化 - CYP 誘導 - Hepa RG 凍結ヒト肝細胞	トキシコキネティクス		ECVAM バリデーション中

### 3. 評価活動

JaCVAM では、主に OECD TG (Test Guideline)として公表されている眼刺激性、皮膚刺激性、感作性、光毒性試験などの代替法の利用促進のため、国内での行政的利用等の妥当性に関する評価を実施した。また、国内外の機関と協力してバリデーションや国際的な第三者評価を実施した。本年度の活動を表1にまとめた。これまでの情報は、JaCVAM ホームページで逐次更新しており、興味のある方は最新情報を入手してほしい<sup>1)</sup>。

#### 3-1 評価会議での評価活動

2010年までに、腐食性試験の代替法として、①日本製の培養皮膚モデル Vitrolife-Skin が皮膚刺激性試験の代替法として、②OECD TG439 (*in vitro* skin irritation assay)に掲載された培養表皮モデル EPISKIN が<sup>4)</sup>、強眼刺激性を評価する試験法として、③OECD TG437 として掲載された BCOP (Bovine Corneal Opacity/Permeability assay)<sup>4)</sup>や④OECD TG438 として掲載された ICE (Isolated Chicken Eye assay)が<sup>4)</sup>、皮膚感作性試験の代替法として、⑤OECD TG442A として掲載され、日本が提案したリンパ節中の ATP 量の変化を指標とした LLNA (Local Lymph Node Assay):DA や<sup>4)</sup>⑥OECD TG442B として掲載され、BrdU (Bromodeoxyuridine)の取り込みを指標とした LLNA:BrdU-ELISA が<sup>4)</sup>、評価された。なお、これらの評価会議での評価結果は、今年度、再評価して改訂した。

また、新たに本年度、OECD ガイダンス文書 129 として成立した⑦急性毒性試験の最高適用濃度を定めるための細胞毒性試験(3T3NRU: Neutral Red Uptake)が<sup>5)</sup>、行政的利用等が可能であると判断された。OECD TG に収載されている皮膚刺激性試験代替法 EpiDerm 及び SkinEthics、皮膚感作性代替法 reduced LLNA についても、現時点(2012年7月時点)で行政的利用等が可能であると判断されている。なお、TG428 である *in vitro* 皮膚透過性試験、2012年に OECD TG への収載が決まった皮膚刺激性試験代替法 LabCyte EPI-MODEL、眼刺激性試験代替法ドレイズ試験への麻酔利用、眼刺激性試験代替法フルオレセイン漏出法、日本もバリデーションに協力した内分泌かく乱スクリーニング エストロジェンアゴニスト&アンタゴニスト法 BG1Luc アッセイ<sup>10)</sup>、OECD の作業計画に載っている眼刺激性試験代替法サイトセンサーマイクロフィジ

オメーター法及び遺伝毒性試験 哺乳類培養細胞を用いる試験法が順次、評価される予定である。

#### 3-2 国際的な第三者評価

株式会社花王で開発された眼刺激性試験代替法 細胞毒性試験 STE (Short Time Exposure)については、2008-2009年に日本動物実験代替法学会<sup>6)</sup>で実施されたバリデーション及び2010年の JaCVAM 追加バリデーションを経て、OECD に TG 申請を行っている<sup>7)</sup>。現在、NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) - ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)の協力を得て<sup>8)</sup>、国際的な第三者評価の準備を進めている。イニシエーションに加え、プロモーターも検出できる形質転換試験法 Bhas 42 アッセイについては、独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) プロジェクトでバリデートされ、OECD に TG として申請された<sup>7)</sup>。現在、ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods, 2011年より現 EURL ECVAM: European Union Reference Laboratory for Alternative Methods to Animal Testing に変更<sup>9)</sup>)の協力を得て、国際的な第三者評価の準備を進めている。

#### 3-3 バリデーション

h-CLAT (Human Cell Line Activation Test)のバリデーション研究を EURL ECVAM とともに実施する一方、東北大 相場らの開発した IL-8 Luc アッセイについて、経済産業省の主導のバリデーションを支援している。

ROS (Reactive Oxygen Species)を指標とした光毒性試験について、日本製薬工業協会の支援を受け、JaCVAM でバリデーションを実施した。

眼刺激性試験代替法 細胞毒性試験 SIRC-CVS (Crystal Violet Staining assay)については、国立衛研主導のバリデーションを2011年より開始した。

コメットアッセイについては、日本環境変異原学会/哺乳類変異原性(MMS)研究会<sup>11)</sup>、欧米の研究機関と協力して国際的なバリデーションを進めた。*In vivo* 試験に関しては、実験が終了し、バリデーション報告書を作成中である。

安定にトランスフェクトされたヒトエストロゲン受容体- $\alpha$  の転写活性化アッセイ アゴニスト法 TG455 は<sup>4)</sup>、化学物質評価研究機構 (CERI) によって開発された。現在では、このテストガイドライ

ンにアンタゴニストの評価系も加えるべく、バリデーションを実施している。

#### 4. 国際協調

##### 4-1 ICATM

2009年4月には ECVAM や NICEATM-ICCVAM 及び Health Canada とともに ICATM(International Collaboration on Alternative Test Methods)が設立され<sup>12)</sup>、国立衛研の所長が覚書に調印した。この会議は、化粧品規制協力国際会議(ICCR: International Cooperation on Cosmetic Regulation)の提案で設立されたものである<sup>13)</sup>。この会議の3つの重要な領域における協力の枠組みを以下に示す。特に重要な点は、これまでバリデーションセンターで取り組んでいる課題・試験法に多くの重複があった。そこで、この会議を中心に国際的な協調及び共同研究を進め、限られた資源(資金や人材)を生かすことである。

- 1) バリデーション研究
- 2) 科学的妥当性についての第三者評価
- 3) 代替法における公式な試験法勧告の推奨

2011年3月には、さらに KoCVAM(Korean Center for the Validation of Alternative Methods)<sup>14)</sup>も参画し、新たな覚書が交わされ、国際協調が拡大している(写真1)。ICATM はその設立経緯により、毎年 ICCR に報告書を提出している。

しかしながら、各国の代替法評価センターは化粧品の安全性評価のための代替法のみを対象にしておらず、ICATM での協力の枠組みも化粧品に制限されているものではない。ICATM は化学物質規制と関係の深い OECD<sup>7)</sup>や医薬品規制と関連の深い日米欧の医薬品規制調和会議(ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)<sup>15)</sup>、JIS と関連の深い ISO(International Organization for Standardization)<sup>16)</sup>などが進める施策と協調し、代替法の確立を進めるための国際協力の枠組みである。

##### 4-2 ICATM への協力

ICATM に協力して実施している試験法のバリデーション及び第三者評価の表1に示す。EURL ECVAM のバリデーションが中心であり、①眼刺激性試験として、培養角膜モデルを用いた試験法、②皮膚感作性試験として、*in vitro* 試験 h-CLAT 及び MUSST、③トキシコキネティック試験として、*in vitro* 肝生体内変化 - CYP 誘導 - Hepa RG 凍結ヒト肝細胞、④遺伝毒性試験とし

て、培養表皮モデルを用いた小核試験のバリデーション、⑤内分泌かく乱スクリーニングとして、MELN<sup>®</sup>: 安定にトランスフェクトされたヒトエストロゲン転写活性化アッセイ、アゴニスト&アンタゴニスト法のバリデーションが進んでいる。なお、NICEATM-ICCVAM では⑥アゴニスト&アンタゴニスト法 CCI アッセイ: MCF-7 細胞増殖試験のバリデーションを進め、⑦*in vitro* パイロジェン試験の追加バリデーションを計画している。

さらに、皮膚感作性試験として、⑧*in vitro* の DPRA(Direct Peptide Reactivity Assay)及び⑨ Keratinosense、急性経口毒性試験として、⑩*in vitro* 細胞毒性試験(3T3NRU)、⑪急性経口毒性試験として、ゼブラフィッシュ試験の第三者評価がなされている。

#### 5. JaCVAM の外部評価

JaCVAMでは、EURL ECVAM又はICCVAMと同様、顧問会議を設置し、JaCVAMの運営とその計画及び成果について、1年に1回以上の頻度で審議を行い、その助言に基づき運用の改善に取り組んでいる。

今年度の顧問会議議事録を添付資料3とする。

#### 6. 総括

昨年、2011年4月より、国立衛研の内部組織として、業務内容及び責務を明確にした組織に変更され、「日本動物実験代替法評価センター」として活動を始めた。JaCVAM 活動の開始から数えて、6年半が立ち、行政組織上の位置づけの明確な組織となった。JaCVAM は欧米に比べて小さいが、この設置規則により欧米と肩を並べる存在となった。これからも引き続き、ICATM や OECD と協力して代替法の評価活動を進め、代替法の導入及び普及に尽力していきたいと考えている。

#### 謝辞

JaCVAM 活動に参加されている方々及び当該活動に貴重な御意見をいただいた全ての皆様にこの場をお借りして感謝致します。

#### 参考文献

- 1) JaCVAM(2012) Available at: <http://jacvam.jp/>
- 2) 厚生労働省事務連絡「医薬部外品の承認申請資料作成等における動物実験代替法の利用とJaCVAMの促進について」(平成23年2月4日)
- 3) 厚生労働省事務連絡「皮膚感作性試験代替法及び光毒性試験代替法を化粧品・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」(平成24年4月26日)
- 4) OECD test guideline (2012) Available at: [http://www.oecd.org/document/40/0,3746,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,3746,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)
  - 5) OECD Series on Testing and Assessment / Adopted Guidance and Review Documents (2012) available at : [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en\\_2649\\_34377\\_1916638\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html)
  - 6) 日本動物実験代替法学会(2012) Available at: <http://www.asas.or.jp/jsaae/>
  - 7) OECD WORK PLAN FOR THE TEST GUIDELINES PROGRAMME (2011) Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/TG\(2011\)47&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/TG(2011)47&doclanguage=en)
  - 8) ICCVAM (2012) Available at : [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox\\_docs/EPreport/ocu\\_report.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/EPreport/ocu_report.htm)
  - 9) ECVAM (2012) Available at : <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>
  - 10) OECD draft test guideline (2012) Available at: [http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en\\_2649\\_34377\\_2349687\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html)
  - 11) 日本環境変異原学会 MMS研究会(2012) Available at: <http://www.j-ems.org/groups/mms.html>
  - 12) 厚生労働省(2012) Available at: <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/08/h0814-1.html>
  - 13) 厚生労働省(2012) Available at: <http://www.mhlw.go.jp/bunya/iyakuhin/keshouhin/iccr04.html>
  - 14) 14)KFDA(2012) Available at: <http://www.nifds.go.kr/en/inter/kocvam.jsp>
  - 15) 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構(2012) Available at: [http://www.pmda.go.jp/ich/ich\\_index.html](http://www.pmda.go.jp/ich/ich_index.html)
  - 16) 日本工業標準調査会(2012) Available at: <http://www.jisc.go.jp/international/isoiec.html>



写真1: International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM)

事務連絡  
平成23年2月4日

各都道府県衛生主管部（局）薬務主管課 御中

厚生労働省医薬食品局審査管理課

医薬部外品の承認申請資料作成等における動物実験代替法の利用と  
JaCVAMの活用促進について

医薬部外品の製造販売承認申請等に添付する資料については、平成18年7月19日付医薬食品局審査管理課事務連絡「医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請に添付する資料に関する質疑応答集(Q&A)について」において、動物実験代替試験法等の利用に関してOECD等により採用された代替試験法あるいは適切なバリデーションでそれらと同等と評価された方法に従った試験成績であれば、当該品目の申請資料として差し支えない旨を示しているところです。

一方、国内ではJaCVAM : Japanese Center for the Validation of Alternative Methods（日本動物実験代替法検証センター）が、国際的な動物実験代替法開発の取組みであるICATM : International Cooperation on Alternative Test Methods（代替試験法協力国際会議）と連携し、動物実験代替法に関する情報を取りまとめ、また、新規開発及び改定された動物実験代替試験法の妥当性評価を行い、その評価結果等を公表しています。

医薬部外品の承認申請資料の作成においては、下記に示すJaCVAMのホームページに掲載されている情報も参考の上、適切な資料を作成し、また化粧品のポジティブリスト改正要望等においても活用が図られるよう、貴管下関係業者に対し周知をお願いします。

記

JaCVAMホームページ : <http://jacvam.jp/>

以上

事務連絡  
平成23年2月4日

(別記1) 御中

厚生労働省医薬食品局審査管理課

医薬部外品の承認申請資料作成等における動物実験代替法の利用と  
JaCVAMの活用促進について

標記について、別紙のとおり各都道府県衛生主管部（局）薬務主管課あて連絡いたしましたので、御了知の上、貴会会員への周知方よろしくお願いいたします。

※ JaCVAM : 日本動物実験代替法検証センター (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)

事務連絡

平成23年2月4日

(別記2) 御中

厚生労働省医薬食品局審査管理課

医薬部外品の承認申請資料作成等における動物実験代替法の利用と  
JaCVAMの活用促進について

標記につきまして、別紙のとおり各都道府県衛生主管部(局)薬務主管課あて連絡いたしましたので、その写しを送付いたします。

※ JaCVAM : 日本動物実験代替法検証センター (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)

(別記1)

日本化粧品工業連合会  
在日米国商工会議所  
欧州ビジネス協会

(別記2)

国立医薬品食品衛生研究所  
(独) 医薬品医療機器総合機構

事務連絡

平成24年4月26日

各都道府県衛生主管部(局)

薬務主管課 御中

厚生労働省医薬食品局審査管理課

皮膚感作性試験代替法及び光毒性試験代替法を化粧品・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

今般、皮膚感作性試験代替法及び光毒性試験代替法について、その利用促進を図るため、平成23年度レギュラトリーサイエンス総合研究事業(研究代表者 小島肇)において、それぞれ化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンスを作成したので、貴管下関係業者に対して周知願います。

なお、その他の代替法に関するガイダンスについては、順次、作成する予定です。

(添付資料)

- ① 皮膚感作性試験代替法としてのLLNA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
- ② 光毒性試験代替法としての*in vitro* 3T3 NRU光毒性試験を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス

※ JaCVAM : 日本動物実験代替法検証センター (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)

## 皮膚感作性試験代替法としての LLNA 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

医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請では、化学物質の感作性を評価するために、従来から、モルモットを用いた皮膚感作性試験が最も一般的に用いられてきている。OECD テストガイドラインに記載されている試験法としては、Maximization Test と Buehler Test がある<sup>1)</sup>。これらの試験法は、感作成立後の惹起時における皮膚反応を判定することにより、化学物質の感作性を評価できる。

一方、1986年にKimberらにより提案<sup>2)</sup>された、局所リンパ節アッセイ(Local Lymph Node Assay: LLNA)は、感作誘導期における局所リンパ節中の細胞増殖反応を指標とした、マウスを用いる皮膚感作性試験法である。本試験法は、これまでに、欧米の公的機関で評価され<sup>3,4)</sup>、2002年にOECD テストガイドライン429(OECD Guideline for Testing of Chemicals, 429 : Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay)として採択され、2010年に改訂がなされている<sup>5)</sup>。本試験法は、長年広く使われてきたMaximization TestやBuehler Testに比べ、動物に与える苦痛の低減や評価に用いる動物数の低減という点で意義ある代替法の一つと考えられている。また、従来のモルモットを用いた試験法は、惹起時の皮膚反応を肉眼判定するが、LLNAでは細胞増殖反応を放射性同位元素の取り込みで測定しているため、より客観的な試験となっている。

本ガイダンスは、OECDテストガイドライン429(reduced LLNA: rLLNAは除く。)として採択されているLLNAについて、化粧品・医薬部外品の安全性評価への活用促進を図るため、その実施方法についてわかりやすく解説するとともに、必要な留意点等をガイダンスとしてとりまとめたものである。

### 1. 試験法の概要

#### 1-1. 原理

感作性を有する低分子量の化学物質は、経皮に浸透し、そのまま又は生体のタンパク質と結合した後、皮膚中の樹状細胞に取り込まれるものと考えられている。その後、活性化した樹状細胞は皮膚から所属リンパ節へ遊走し、そこで抗原提示を介して抗原特異的な(感作性物質に特異的に

反応する)T細胞の増殖を誘導し、次いで特異的なT細胞(感作T細胞)は全身に分布する。この一連の生体応答が感作と呼ばれている。LLNAでは、感作誘導期のリンパ節における抗原特異的なT細胞の増殖(DNA合成)を、放射性ヌクレオシドのDNAへの取り込みを指標として評価する。

#### 1-2. 試験手順及び判定

##### 1-2-1. 試験手順

詳細は、OECDテストガイドライン429を参照する(図1)。

8~12週齢のCBA/CaあるいはCBA/J系の雌マウスを使用し、個々の動物の体重が試験に供する全動物の平均体重値の±20%を超えないようにする。試験群としては、溶媒対照群(陰性対照群)の他3群以上の被験物質用量群を設定し、通常、陽性対照群を加える。1群当り最低4匹を用いる。全ての投与群で、マウスの両耳の耳介に被験物質を25μLを3日間繰り返し塗布し、その3日後に<sup>3</sup>H-Methyl]-thymidine(<sup>3</sup>H-TdR)(又は<sup>125</sup>I-iododeoxyuridine(<sup>125</sup>I-IUdR)及びfluorodeoxyuridine)を尾静脈投与する。その5時間後に耳介リンパ節を摘出し、その中に取り込まれた<sup>3</sup>H-TdR(又は<sup>125</sup>I-IUdR)の放射活性を測定する。

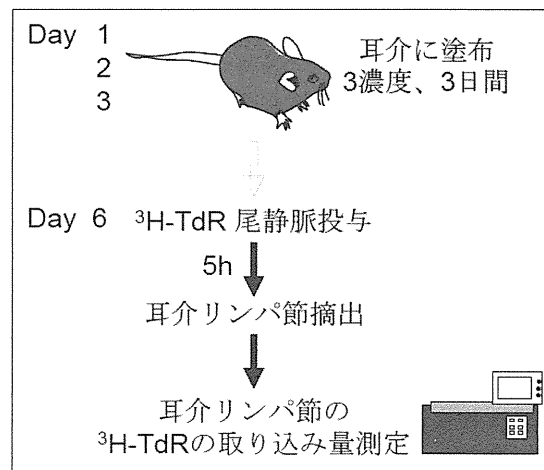


図1 LLNAの概略( <sup>3</sup>H-TdRを用いた場合)

TdR (又は<sup>125</sup>I-IuDR)の取り込み量の比(Stimulation index : SI)が3倍を超えた際に、陽性と判定する。ただし、結果が明確でない場合は、用量相関性の強さ、統計学的有意差、陰性対照群及び陽性対照群の反応も考慮する<sup>8, 9, 10, 11</sup>。

### 1-3. 試験実施上の留意点

#### 1-3-1. 試験実施における各種条件及び注意事項

##### ① 溶媒の選択

使用溶媒は被験物質の溶解性を考慮し、溶液又は懸濁液として最も高濃度で適用可能な溶媒を選択する。皮膚への適用性からacetone:olive oil (4:1, v/v; AOO)、*N,N*-dimethylformamide (DMF)、methyl ethyl ketone、propylene glycol、dimethylsulfoxide等が推奨される。また、エタノール溶液(例えば、70%エタノール)も使用可能である。水溶性の被験物質の場合、適切な溶媒(例えば、Pluronic<sup>®</sup> L92を1%含む溶液)を用い、皮膚を濡らし、直ちに流れ落ちないように注意すべきである。十分な科学的根拠があればその他の溶媒でも使用可能であるが、皮膚に対する付着性が悪い水溶液の使用は避ける。

##### ② 塗布濃度設定の方法

被験物質の塗布濃度は、100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%等、OECDテストガイドライン429で既定された濃度系列から、連続した少なくとも3用量を用いる。

最高塗布濃度には、全身毒性や強度の皮膚刺激性を生じない最も高い濃度を用いる。全身毒性や強度の皮膚刺激性を生じない濃度は、急性毒性、皮膚刺激性等の毒性情報や類似構造を含む物質や物理化学的特性情報等、利用可能な全ての情報を参照して決定する。これら既存情報から当該濃度を推察できない場合は、以下に示す予備スクリーニング試験を実施して設定する。

#### 【予備スクリーニング試験】

1濃度につき1~2匹の動物を用い、本試験と同様に被験物質による塗布を行う。ただし、放射性同位元素の尾静脈投与は行わない。塗布濃度は、原則として被験物質の性状が液体である場合は100%、固形物、懸濁物の場合は調製可能な最高濃度とする。他の動物種(モルモット等)で得られた情報のうち、類似条件で行われた利用可能な情報がある場合はその条件を参考にする。全身毒性は、試験期間中の一般状態の変化とDay1(被験物質処置前)及びDay6(最終処置3日

後)の体重変化率を指標として評価する。皮膚刺激性は、Day1(被験物質処置前)、Day3、Day6に、塗布部位の皮膚所見の観察と、耳介の厚さを測定して評価する。すなわち、投与期間中(Day1~Day6)に神経機能の変化(立毛、運動失調、振戦、痙攣等)、行動変化、行動量変化、呼吸パターンの変化、傾眠、無反応症状、摂食量変化、ストレス症状等の一般状態の異常を認める場合、あるいはDay1からDay6の間で5%を超えた体重減少を生じる場合は、全身毒性があると判定する。また、Day3及びDay6に実施した刺激性評価において、2回の測定の両方、又はどちらかの耳介で、中等度以上の紅斑を示す所見を認める場合や、耳介厚の増減率が+25%以上となる場合は、過度の刺激性があると判断する5)。

以上の結果を踏まえ、100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%等、OECDテストガイドライン429で既定された濃度系列の中から、原則として、全身毒性反応や過度の刺激性反応が認められなかった最高濃度を本試験の最高用量に設定する。

##### ③ その他

- ・ ある種の金属化合物では、感作性物質を識別できないことがある。
- ・ ある種の皮膚刺激性物質(界面活性剤等)で偽陽性反応を生じることがある。

#### 1-3-2. 試験成立条件について

試験が適正に実施されたことは、反応強度が明らかかな陽性対照物質を用いて、SI値が34を超えることを確認する。試験毎に陽性対照群として25%ヘキシルシナミックアルデヒドや5%メルカプトベンゾチアゾール等を投与する群を設定する。ただし、LLNAを定常的に実施し、陽性対照物質の背景データより試験結果の再現性や正確性を確認できる実験施設の場合には、陽性対照物質を試験に供するのは一定期間毎(例えば、6箇月毎)でもよい。

#### 2. 本試験法の運用方法に関する留意点

本試験法は、動物を使用した試験法であるが、従来の動物を用いた試験法(Maximization Test等)と比較して、動物に与える苦痛の低減や評価に用いる動物数の低減が図ることができ、試験結果の定量性においても同程度の精度を有している。

- ① 製剤の試験には利用できない。
- ② 適正に実施されたLLNAで陰性と判定された場合には、当該物質の皮膚感作性は陰性と、陽性と判定された場合には皮膚感作性は陽性と結



論し、原則としてそれ以上の追加試験は必要とされない。

③ ただし、適正に実施されたLLNAで、陽性と判断された場合でも、既に十分に使用実績のあることが知られている類縁物質の皮膚感作性データとの比較あるいは従来のアジュバントを用いないモルモット皮膚感作性試験による追加データ等から総合的に、皮膚感作性の安全性を担保できることがある。

④ LLNAが適正に実施できなかつたと判断された場合、あるいは、LLNAの利用が適切でないと考えられる被験物質の場合、従来のモルモットを用いる皮膚感作性試験を実施する。

### 3. 資料の信頼性の確保

適正な試験実施の信頼性を確保するため、LLNAを定常的に実施する施設において、陽性対照物質を試験に供さない場合、その施設における陽性対照物質の背景データについて整理しておく必要がある。

### 4. 引用文献

- 1) OECD, 1992, OECD test guideline 406; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Skin Sensitization: <<http://oberon.sourceoecd.org/vl=28459316/cl=11/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s6/pl>>
- 2) Kimber I. et al., 1986, Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food Chem Toxicol*, 24, 585-586.
- 3) ICCVAM – Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, 1999. The Murine Local Lymph Node Assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds. The results of an independent peer review evaluation coordinated by the ICCVAM and the NICEATM. NIH publication No. 99-4494. National Institute of Environmental Health Sciences. <<http://www.iccvam.niehs.nih.gov>>
- 4) Balls M. and Hellsten E., 2000, Statement on the validity of the local lymph node assay for skin sensitization testing. ECVAM Joint Research Centre, European Commission, Ispra, Italy. *ATLA* 28, 366-367.
- 5) OECD, 2010, OECD test guideline 429; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD-TG429-2010.pdf>
- 6) 医薬品非臨床試験法ガイドライン研究会編、医薬品非臨床試験法ガイドライン解説2010(薬事日報社)、2-7 皮膚感作性試験、p.71-76
- 7) 感作性分科会、医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会最終報告書—感作性分科会報告—、平成21年度厚生労働科学研究 動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究(平成22年4月)
- 8) Basketter D.A. et al., 1999, A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *J Appl Toxicol*, 19(4), 261-266.
- 9) Boussiquet-Leroux C. et al., 1995, Evaluation of lymphocyte proliferation by immunohistochemistry in the local lymph node assay. *J Appl Toxicol*, 15(6), 465-475.
- 10) Angers-Loustau A. et al., 2011, The regulation use of the local lymph node assay for the notification of new chemicals in Europe. *Reg Toxicol Pharm*, 60, 300-307.
- 11) Kimber I and Dearmann RJ., 2010, The local lymph node assay and skin sensitization testing. In “Immunotoxicity Testing. Methods and Principles. Methods in Molecular Biology, vol.598”, ed by Diertert RR, Humana Press, p.221-231

## 光毒性試験代替法としての*in vitro* 3T3 NRU光毒性試験を 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

光毒性は、皮膚に化学物質を適用した場合、光(紫外線または紫外線及び可視光)照射が加わることで生ずる皮膚刺激反応である。光毒性の評価には、従来から、動物を用いた試験法が用いられている。すなわち、動物の皮膚に被験物質を塗布し、照射部位と非照射部位を設定し、照射後に生じた皮膚反応を非照射部位の反応と比較することで光毒性の有無を判定する試験法である。

光毒性試験に関する*in vitro*の試験法では、培養細胞を用いた試験法がEUにおいて研究開発され<sup>1-4)</sup>、2004年にOECDテストガイドライン432(OECD Guideline for Testing of Chemicals, 432: *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test)<sup>5)</sup>として採択された。現在、本試験法は、化学物質の光毒性の有無を検出する試験法として世界的に広く受け入れられ、特に感受性(Sensitivity)の高い試験法としても認識されている。

本試験法は、平成14年度厚生労働科学研究班「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」において検討され光毒性の有無を検出するための*in vitro*光毒性試験としての妥当性が検証されている<sup>6)</sup>。

本ガイダンスは、OECDテストガイドライン432として採択されている*in vitro* 3T3 NRU光毒性試験について、化粧品・医薬部外品の安全性評価への活用促進を図るため、その実施方法についてわかりやすく解説するとともに、必要な留意点等をガイダンスとしてとりまとめたものである。

### 1. 試験法の概要

#### 1-1. 原理

光毒性反応は、光が当たることにより励起された化学物質が定常状態に戻る際、エネルギーが何らかの形で放出されるが、その作用を契機として細胞全体が傷害されることで発現すると考えられている。本試験法は、この原理を利用し、マウス由来の線維芽細胞の単層培養系を用い、被験物質の照射時と非照射時における用量-細胞生存率曲線を描き、照射によって細胞毒性の増強が見られるか否かで被験物質の光毒性の有無を判定する方法である。生細胞の判別には

Neutral Red (NR)を用いる。NRは弱カチオン性の色素で、細胞膜を能動輸送により透過してリソゾームに蓄積される性質を持つ。細胞傷害や、細胞死により、細胞膜の輸送能の低下やリソゾームの脆弱化が起こるとNRが蓄積されなくなる。そのため、生細胞と傷害を受けた細胞又は死細胞とを区別することが可能である。その原理を応用し、吸光度により色素の取り込み量を測定し、その違いから照射による細胞傷害性を評価する。

#### 1-2. 試験手順及び判定

##### 1-2-1. 試験手順

詳細は、OECDテストガイドライン432(OECD Guideline for Testing of Chemicals, 432: *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test)や成書8)を参照する。96穴のアッセイプレート2枚を用い、BALB/c 3T3細胞を24時間培養し、24時間後、96穴のアッセイプレート2枚から培養液を除去し、8段階に緩衝液(EBSS、HANKS液等)で希釈した試験試料及び溶媒を含む緩衝液(溶媒対照)を培養液と交換し1時間培養する。被験物質の緩衝液に対する溶解性に問題がある場合は、良好な溶解性が得られる溶媒(水、エタノール、DMSO等)に溶解した後、緩衝液をもちいて8段階に希釈し、試験試料を作製する。1時間培養後、アッセイプレートの一方は光を照射し、もう一方は遮光して放置する。照射光は、UVAと可視光領域を持つ光が推奨されており、照射量はUVA領域での計測で5J/cm<sup>2</sup>とする。照射後、試験試料を除去し、培養液に交換した後、18-22時間培養する。培養後、NRを含む培養液を3時間培養してNRを取り込ませる。その後、細胞内に取り込まれたNRを抽出し、測定した吸光度を用いて、溶媒対照を細胞生存率100%として試験試料の各処理濃度における細胞生存率(%)を算出し、用量-細胞生存率曲線を得る。

##### 1-2-2. 判定

結果の評価法としては、Photo Irritant Factor (PIF)を求める方法とMean Photo Effect (MPE)を求める方法と2つの評価法が、OECDテストガイドライン432において記されている。PIFは照射時

と非照射時の細胞50%生存濃度(IC<sub>50</sub>)の比であり、以下の式で求められる。

$$PIF = IC_{50}(UV-) / IC_{50}(UV+)$$

MPEは光非照射時から照射時への用量－細胞生存率曲線のシフトを評価する数値で、各濃度における生存率方向の移動率(response effect)と、濃度方向における移動率(dose effect)を掛け合わせた値(photo effect)の平均値である。それぞれの値を用いたときの判断基準を次頁の表に示した。

どちらの評価軸を用いても評価結果に差はないことが確認されている。これらの判定基準により、光毒性ポテンシャルの有無を判断する。

### 1-3. 試験実施上の留意点

#### 1-3-1. 試験実施における各種条件及び注意事項

##### ①培養細胞について

OECDテストガイドラインにおいて、BALB/c 3T3 clone A31 (CCL-163 ; ATCC 又は 86110401 ; ECACC)を推奨している。他の細胞の使用は可能であるが、同等性を示す必要がある。

##### ②光源及び照射光について

・照射光については、UVAと可視光領域の光を照射することとし、光源としては、ソーラーシミュレーターとして、キセノンランプ若しくは水銀メタルハライドランプが記載されている。

太陽光との近似性はキセノンランプの方が高いとしているが、水銀メタルハライドランプは放熱が少ないこと、安価である点がメリットとして挙げられている。

・光源の種類によって波長特性が異なることや、照射装置の照射野のUV強度の差異が生じることにより化学物質との光化学反応や毒性として発現する生物学的な反応も変わってくる。そのため、光源の波長特性を予め把握しておくとともに、その試験条件下での細胞毒性の発現について十分な背景データを得ておく必要がある<sup>9)</sup>。

・UV強度測定器計のメーカーによって、検出す

るUV波長域が異なるため、光源の波長特性に合致したUV強度測定器を選択することが重要である<sup>6)</sup>。

##### ③その他

・溶解性の低い被験物質については、正確なデータが得にくい<sup>6,9)</sup>。

・光毒性の有無を定性的に判断するための試験系であり、光毒性の強弱の程度、生体における用量・濃度反応関係については必ずしも評価できない<sup>6,9)</sup>。

・被験物質の代謝などによる間接的な光毒性を検出できない<sup>9)</sup>。

#### 1-3-2. 試験成立条件について

本試験法によるデータの質を維持する為に、試験施設ごとの背景データをとり、試験が適正に実施されたことを確認する。

試験成立を確認する参考としてOECDテストガイドラインで推奨されている数値を以下に示す。

・溶媒対照の細胞生存率:光照射条件下および非照射条件下の各プレートの溶媒対照の平均吸光度の値。OECDテストガイドラインでは0.4(溶媒による背景データの約20倍)以上が推奨されている。

・光照射に対する細胞の感受性:非照射条件下の陰性(溶媒)対照群に対する、光照射条件下の溶媒対照群の細胞生存率。OECDテストガイドラインでは80%以上であることが推奨されている。

・陽性対照に対する感受性:陽性対照物質のPIF値が試験施設の背景データから逸脱していないこと。OECDテストガイドラインでは、塩酸クロロプロマジン陽性対照とした場合のPIF値は6以上であることが推奨されている。

その他、OECDテストガイドラインのTABLE 1(添付資料)に挙げられている化合物を対照物質として、そのPIF値若しくはMPE値を比較することにより、条件設定を検討する必要がある。

OECDテストガイドラインにて推奨されている以外の条件下においても、評価が適正に実施できる可能性はあるが、その場合には、試験条件の妥

表 PIF 及び MPE による光毒性判定基準

Classification	PIF	MPE
No phototoxicity	PIF < 2	MPE < 0.1
Probable phototoxicity	2 ≤ PIF < 5	0.1 ≤ MPE < 0.15
Phototoxicity	5 ≤ PIF	0.15 ≤ MPE

当性を評価し、科学的に説明する必要がある。

2. 本試験法の運用方法に関する留意点

- ① 本試験は、製剤の試験には利用できない。
- ② 化学物質の紫外外部吸収スペクトルを、波長290~400nmの範囲で測定し、光毒性試験を実施する必要があると判断された場合は、第一選択試験法として本試験法を推奨する。
- ③ 適正に実施された本試験法でNo phototoxicityと判定された場合には、陰性と判断する。
- ④ 本試験法にて判定結果がNo phototoxicity以外の場合、従来の動物を用いた試験法を含めた他の試験法にて確認し、陰性と判定された場合には、光毒性は陰性と判断することもできる。
- ⑤ 本試験法は、単層細胞培養系を使用した評価システムであり、溶解性に問題がある(緩衝液と均一に混合しない)もの、著しく培養系に影響を与える(例えば、緩衝液のpH変化をもたらす)ものは適正に評価できない。物性等から、明らかに本試験法への適用が困難であると判断された被験物質については、本試験法を適用できない。被験物質の物性等により、本試験法が適正に実施できていないと判断された場合、動物試験を含めた他の試験法にて確認する。

3. 資料の信頼性の確保

適正な試験実施の信頼性を確保するため、以下の情報についても整理しておく必要がある。

- ・光照射機器購入時のスペクトラム分布情報
- ・UV強度測定器に関する情報(メーカー、機種、型番、校正記録)
- ・陽性対照物質の背景データ

添付資料 OECD TG 432

Chemical and CAS No	PIF	MPE	Absorption Peak	Solvent <sup>1</sup>
Amiodarone HCL [19774-82-4]	>3.25	0.27-0.54	242 nm 300 nm (shoulder)	ethanol
Chlorpromazine HCL [69-09-0]	>14.4	0.33-0.63	309 nm	ethanol
Norfloxacin [70458-96-7]	>71.6	0.34-0.90	316 nm	acetonitrile
Anthracene [120-12-7]	>18.5	0.19-0.81	356 nm	acetonitrile
Protoporphyrin IX, Disodium [50865-01-5]	>45.3	0.54-0.74	402 nm	ethanol
L - Histidine [7006-35-1]	no PIF	0.05-0.10	211 nm	water
Hexachlorophene [70-30-4]	1.1-1.7	0.00-0.05	299 nm 317 nm (shoulder)	ethanol
Sodium lauryl sulfate [151-21-3]	1.0-1.9	0.00-0.05	no absorption	water

4. 引用文献

- 1) Spielmann H., *et al.*, *In vitro* Phototoxicity testing, the report and recommendation of ECVAM workshop 2, ATLA, 22, 314-348, 1994.
- 2) Spielmann H., *et al.*, EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: first results obtained with Balb/3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicol. In Vitro*, 8, 793-796, 1994.
- 3) Spielmann H., *et al.*, The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (Blind Trial). part1: The 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicol. In Vitro* 12, 305-327, 1998.
- 4) Spielmann H., *et al.*, A Study on UV Filter Chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test, ATLA 26, 679-708, 1998.
- 5) OECD, OECD test guideline 432; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test, <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg432.pdf>
- 6) 大野泰雄ら, Balb/c 3T3 細胞を用いNeutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価結果報告, 平成14年度厚生労働科学研究 動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究 (H13-医薬-024)
- 7) 光関連毒性分科会, 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会最終報告書—光関連毒性分科会報告—, 平成21年度厚生労働科学研究 動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究 (平成22年4月)
- 8) 最新 動物実験代替法の技法ノウハウ(技術情報協会発行, 2011)
- 9) CTFA Safety Evaluation Guidelines, Evaluation of Photoirritation and photoallergy potential