

20123500/B

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22年度～平成24年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

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. 資料： 分担総合研究報告

1. 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）-----	37
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-----	57
山本直樹	
3. 光毒性・光感作性試験代替法に関する諸検討 -----	101
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--	107
尾上誠良	
5. 皮膚刺激性および眼刺激性試験代替法のバリデーションに関する研究-----	115
小島 肇	
6. ヒトパッチテストの再検討と使用試験 -----	129
松永佳世子	
7. 使用試験の情報管理統括に関する研究 -----	141
杉浦 伸一	
8. 代替法についての国際情勢の調査 -----	151
杉山真理子	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	193
---------------------------	-----

平成22-25年度総合研究報告書

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、皮膚刺激性試験代替法として、培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた試験法のバリデーションを実施し、バリデーション報告書 OECD 事務局に提出した。その報告書に対する OECD の第三者評価の指示に従い、バラツキを少なくする試験法の改良を行い、追加バリデーションを実施し、この報告書を OECD に再提出した。3 次元培養ヒト皮膚モデルは、ヒト摘出皮膚や動物摘出皮膚と異なり、角層バリア能が脆弱であり、また、皮内カルボキシエステラーゼ活性が低いことが明らかとなった。さらに、これらを考慮した 3 次元培養ヒト皮膚モデル内の concentration-distance profile はヒト摘出皮膚や動物摘出皮膚と大きく異なることが推察された。更に、薬物の皮膚中濃度を調べた結果、ラット摘出皮膚と 3 次元培養皮膚モデル間には平均皮膚中濃度が大きく異なることがわかった。これらの結果より、皮膚中濃度の違いが、化学物質の皮膚刺激性試験にて偽陽性および偽陰性反応を生じる原因の一つであることが明らかとなった。

眼刺激性試験代替法として、短時間暴露 (STE) 法のバリデーションを実施し、バリデーション報告書を OECD 事務局に提出した。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、phase I ~ II のバリデーションを実施し、高い施設内および施設間再現性を確認できた。3 次元角膜モデル 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。

また、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、NOAEL（無作用量）の検出を含めた試験法（二次元培養モデルと三次元角膜再構築モデル）を検討し、新しい眼刺激性試験・眼毒性試験代替法を開発した。山本が作出した不死化ヒト角膜上皮細胞 (iHCE-NY) のクローニング、Karyotype、マイクロアレイ、プロテオミクスなどの解析結果をまとめた。これらの解析結果を基に、iHCE-NY を用いた二次元培養における曝露実験プロトコル（前培養 1 日、後培養 1 日、曝露時間 5 分、播種細胞数： $2.5 \times 10^4$  cells / well）を確立した。さらに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の概案を提示した。

光毒性に関しては、薬剤性光線過敏症は近年注目を集める副作用の一つであり、その回避のために効果的な予測方法の開発が急務の課題となっている。本研究では光化学的試験方法である reactive oxygen species (ROS) ROS アッセイの信頼性ならびに頑健性を精査するため、他施設間バリデーションにより使用する 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、陽性コントロールおよび陰性コントロールを置いた健康人の予知パッチテストを施行し、パネル間の易被刺激性の指標に有用である可能性が示唆された。使用試験については、新規成分を含む医薬部外品の使用試験における安全性について合理的な使用試験を行うための、携帯電話を利用した管理システムを試作した。その有用性・実用性をハイドロキノン4%含有する美容液を用いた *in vitro* 共焦点レーザー顕微鏡を用いた R1110 の色素沈着症に対する使用試験において、毎日、日誌メールが送信され試験品使用のコンプライアンスを高める働きがあった。市販の外用医薬品を用いて、被験者集団を変えてパッチテスト結果の再現性を確認するとともに、実使用を想定した連続塗布試験を実施し、その関係性よりパッチテストが皮膚安全性の予測に有用であるか検討した。その結果、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得ることが示唆された。

情報管理統括の観点から、インターネットを用いた情報収集・共有、管理の可能性を検討した。2種類 (Google AppsおよびOffice365) のwebアプリケーションを用いて優位性を調査したところ、セキュリティ面、サイトの構成、拡張性においてOffice 365が優位であると判断した。続いてOffice365を用いて茶のしずくによる副作用情報収集サイトを構築し、運用状況を調査した。その結果、短期間で全国から情報を収集でき、データの加工・公表もスムーズに行うことができた。

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

#### 研究分担者

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 化粧品  
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

欧州にて、2009年より化粧品成分に対する動物実験禁止、及び化粧品の販売禁止が適用されている。さらに、2013年よりその拡大が予定されており、わが国で販売される新規化粧品や医薬部外品(薬用化粧品等)等においても、動物実験代替法(以下、代替法と記す)を用いた安全性評価に関する国際協調を急がねばならない。この状況に対応すべく、平成21年度までの厚生労働科学研究において、代替法を用いた医薬部外品の安全性評価のあり方について、皮膚科医、毒性試験の専門家、業界代表者及び行政サイドとともに検討してきた。この検討会では、動物愛護の昨今の世界情勢を考慮に入れながら、安全性評価の質の維持を優先して議

#### A. 研究目的

論を重ねた。その結果、①開発されている代替法 (*in vitro*試験) が少ない。②OECDガイドラインや公的な機関で認証された試験法については、その適用範囲と限界を加味すれば、積極的に利用できるとの見解を明らかにした。ただし、国際的な状況を鑑み、医薬部外品の評価に必要な *in vitro*試験の開発を後押しするとともに、開発が進んでいる代替法に対処するため、本あり方検討会での継続審議が必要であると結論された。

以上のような状況に鑑み、本研究では、欧米で開発される試験法の情報収集を入手しながら、国際協調を重視し、医薬部外品・化粧品の安全性評価試験法について検討した。次に、化粧品・医薬部外品における安全性試験の中で、まだ代替法の開発が不十分な分野を中心に *in vitro*試験の開発を進めた。例えば、①培養表皮または皮膚モデルを用いた皮膚透過性試験については、透過パラメータと適用物質の物理化学的性質との関係について調べた。②光毒性試験に関しては、活性酸素種産生能を指標とした試験(ROS アッセイ)のプロトコル整備を行った。③眼刺激性試験においては、遺伝子導入で得られた角膜形質発現細胞を用い、測定指標の検討及び三次元角膜再構築モデルの構築を検討した。さらに、以前、日本動物実験代替法学会でバリデーションが実施された培養表皮モデルを用いた *in vitro*皮膚刺激性試験の追加バリデーション、眼刺激性試験代替法である SIRC アッセイ、及び ROS アッセイのバリデーションを実施した。

一方、ヒト試験については、現在はパッチテストだけが活用されているが、欧米では汎用されている使用試験の指標について、携帯電話を用いた有害性情報の入手に関する適切な対処ができるシステムを検討した。

## 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) を定期的に見ると共に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) 培養表皮モデル ( LabCyte EPI-MODEL24) のバリデーション

B-2-1-1) phaseIVバリデーション

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method内のperformance standardに記載されている20物質をコード化して参加3施設に配布し、改訂プロトコルを用いたバリデーションを実施した。

1)バリデーション実行委員会

委員長：小島 肇 (国立衛研)、

委員：加藤雅一 (J-TEC)、大森 崇 (同志社大学)

2)参加施設

小林製薬株式会社、ファンケル、DSTC(薬物安全性試験センター)

3)トレーニング

2010年(平成22年)7月27日に国立衛研にて、改良プロトコルを用い、J-TECより技術指導がなされた。

4)予備試験

各施設において、1-bromohexaneが陽性になるよう改良プロトコルのマスターのための予備試験が数回実施された。

5)実施期間

バリデーションは2010年(平成22年)9月～11月の間に実施された。

6)改良プロトコルの概要

本研究は、先回のバリデーションで用いた同一の試験プロトコルに基づいて実施された。コード化された20被験物質をモデルに15分間処理した後、42時間後培養を行い、MTTアッセイで細胞生存率を求めた。50%細胞毒性を基準に陰陽性の判定を実施した。

改訂の主な点は、被験物質の洗い流し方である。洗う回数などに変更はないが、モデルの底面に水流を当てない、洗浄毎に洗浄液を切ることを徹底しない、水分除去に利用していたコットンパッドを利用しないなどが改良された。

## B-2-1-2) phase Vバリデーション

### 1)バリデーション実行委員会

委員長：小島 肇 (国立衛研)、

委員：加藤雅一 (J-TEC)

### 2)参加施設

小林製薬株式会社、薬物安全性試験センター、富士フィルム株式会社

### 3)トレーニング

平成23年(2011年)6月10日にJ-TEC株式会社にて、改定SOP(標準作業手順書)を用いた技術指導がJ-TEC研究員によりなされた。

### 4)実施期間

検討は平成23年(2011年)8月~9月の間に実施された。

### 5)使用モデル

LabCyte EPI-MODEL24は、ヒト表皮細胞を用いて培養された3次元培養表皮モデルである。

ヒト表皮細胞を培養増殖させた後、気液層界面で培養して、角質層を形成させて、ヒト表皮組織に類似した組織構造を再現している

### 6)改定SOPの概要

本研究は、平成22年度のバリデーションで用いたSOPver.8.2の洗浄方法を明確化したSOPver.8.3を用いて実施した。被験物質をモデルに15分間処理した後、42時間後培養を行い、MTTアッセイで細胞生存率を求めた。50%細胞毒性を基準に陰陽性の判定を実施した。被験物質除去の際に、PBS(リン酸緩衝液)を多量に用いることは主な改定点である。

### 7)被験物質

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Methodのperformance standardに記載されている20物質のうち、昨年度のバリデーションでばらつきの大きかった5被験物質を含む6物質をコード化して参加3施設に配布し、改定SOPを用いたバリデーションを実施した。

コード化された6被験物質は、昨年度のバリデーションにおいて、SD $\geq$ 18%となり、逸脱が多数発生した5被験物質とした。また、performance standardに記載されているものの、昨年度バリデーションにおいて試験されなかった被験物質tetrachloroethyleneで

ある。

## B-2-2) 皮膚透過性試験

### B-2-2-1) *In vitro* 皮膚透過試験

ヘアレスラット摘出皮膚は、ペント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 $\mu$ mol/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。また、透過抵抗を評価するため、stripped skinを用いた試験を行った。ヘアレスラットの場合はセロハンテープ(セロテープ®、ニチバン株式会社、埼玉)を用いて20回テープストリッピングしたもの、EpiDermの場合はスタンドライトを用いて15分照射後、乾燥させた角層を剥がしたものをstripped skinとした。

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 $\mu$ LをHPLCに注入し、定量した。

### B-2-2-2)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をキムワイプで拭いた。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回テープストリッピ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 適用時)、2.7  $\mu\text{mol/L}$  DFP in PBS (EN 適用時)、2.7  $\mu\text{mol/L}$  DFP in acetonitrile (HS 適用時) 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  $\mu\text{mol/L}$  DFP in PBS、または 2.7  $\mu\text{mol/L}$  DFP in acetonitrile を加え、ホモジネート溶液を作製した。攪拌および遠心分離後、上清中化学物質濃度を測定した。

前処理後のヘアレスラット腹部皮膚および EpiDerm をハサミで細断し、既知濃度の各薬物溶液を加え、皮膚中濃度測定と同条件でホモジネート溶液を作製した。なお、EpiDerm は前処理後、ポリカーボネート膜を剥がしたものを使用した。上清中薬物濃度を皮膚中濃度測定と同条件で測定した。抽出率は抽出された化学物質濃度を適用した既知の薬物濃度で除して算出した。

#### B-2-2-3)種々皮膚ホモジネートを用いた代謝実験

ヘアレスラット皮膚、ヒト摘出皮膚および EpiDerm をハサミにて細断した後、ホモジナイザーを用いてホモジナイズし、PBS を用いて 10%皮膚懸濁液を調製した。調製した懸濁液を遠心分離 (9000 g、20 min、4°C) した後、その上清を採り酵素溶液とした。種々濃度に調製した EN 溶液に酵素溶液を適用し、37°C でインキュベートをしながら経時的にサンプリングを行った。サンプリングにより得られた試料は、アセトニトリル溶液と等量混合後、攪拌した。サンプル中の EN および NA は HPLC を用いて定量し、NA の生成速度を代謝速度として酵素パラメータ ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ) を Hanes-Woolf plot を用いて算出した。Hanes-Woolf plot は (5) 式で示され、 $C_{EN}$  は適用した EN 濃度、 $V$  は

代謝速度を表す。なお、ホモジネート中のタンパク量は Lowry 法を用いて測定した。

$$\frac{C_{EN}}{V} = \left( \frac{1}{V_{max}} \right) C_{EN} + \frac{K_m}{V_{max}} \quad (5)$$

#### B-2-3) STE法のバリデーション

##### 1)バリデーション実行委員会

小島 肇 (国立衛研)、林和彦、坂口斉 (花王)、森本隆史 (住友化学株式会社)、ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) 代表、ECVAM代表

##### ・データ解析チーム

大森 崇、音泉 卓 (同志社大学)、寒水孝司 (京都大学)

##### ・被験物質管理チーム

小島 肇 (国立衛研)、林和彦 (花王)、森本隆史 (住友化学株式会社)

##### 2)参加施設

株式会社カネボウ化粧品、ポーラ化成工業株式会社、ライオン株式会社

##### 3)実施期間

バリデーションは平成22年 (2010年) 8月~10月の間に実施された。

##### 4)プロトコル概要

本研究は、先のSTE法バリデーションで用いた同一の試験プロトコルに基づいて実施した。コード化された40被験物質を用い、それぞれの試料の溶解性に基づき、生理食塩水、5%DMSO含有生理食塩水、およびミネラルオイルのいずれかを溶媒として選択し、5%、0.05%溶液を作成し、SIRC細胞に5分間暴露した後、MTTアッセイにより細胞生存率を求めた。計3回の実験を行い、平均値を求めた。

まず、5%試料液で評価し、STE法における非刺激物、刺激物の刺激区分を行い、その刺激区分とGHS区分 (非刺激物、刺激物) との一致性を評価した。次にSTE試験の予測モデルを用いた眼刺激ランクとGHSカテゴリー分類 (非刺激物、刺激物: Category2 および刺激物: Category1) との一致性を評価した。

##### 5)追加実験

一部物質で施設間の結果が食い違った。その原因を明らかにするため、各施設で追加実験が実施された。

#### B-2-4) SIRC-CVSアッセイのバリデーション

##### 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）

##### 2)参加施設

（株）ボゾリサーチセンター、日本コルマー株式会社、バイオトクステック：韓国

##### 3) トレーニング

平成23年（2011年）11月10日に仙台にて、ビデオを用いた技術指導が萩野委員によりなされた。

##### 4)試験法

SIRC-CVSアッセイは被験物質の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<sup>7)</sup>。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<sup>9)</sup>。

##### 5)phase I

###### (1)実施期間

平成24年1月～3月の間に実施された。

###### (2)被験物質

コード化されていない4被験物質を用い、施設のトレーニングにあたるtransfeabilityを確認する目的でphase Iが実施された。

##### 6)phase II

###### (1)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。phase II aで良好な結果が得られた場合のみ、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。

###### (2)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。

###### (3)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物質の試験実施がなされた。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-2-5) LabCyte CORNEA-MODEL24を用いた眼刺激性試験代替法の共同研究

##### 1)参加施設

24施設（J-TECを含む）が参加した。

##### 2)実施期間

実験は、平成24年10月～11月に実施された。

##### 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—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—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。

#### 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。

#### 5) 計画

各施設の結果を、平成24年（2012年）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。

### B-2-6) 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。

#### B-2-6-1) 供試細胞

今回の研究に使用した細胞は、ヒト角膜輪部組織から分離・培養した正常ヒト角膜上皮幹/前駆細胞（HCE）とHCEに不死化遺伝子を導入して作製した不死化ヒト角膜上皮細胞（iHCE-NY）を用いた。HCEは、米国アイバンク（Northwest Lions Eye Bank）より眼球を購入し、研究に用いた。なお生ウイルスを用いてSV40を導入したが、分化能が減衰している不死化ヒト角膜上皮細胞株（HCE-T；理化学研究所 筑波研究所 バイオリソースセンター）を不死化細胞の対照として用いた。

一方、対照としてHCE-Tを山本が細胞表面マーカーによるクローニングを行い、分離樹立した細胞（nHCE-T）を用いた。

さらに、近年二次元培養法による細胞を用いた眼刺激性試験代替法で使用されているウサギ角膜上皮由来細胞のSIRCも併せて対照として使用した。

正常ヒト角膜上皮細胞（HCE）、初回の細胞選択において薬剤選択を行った代表的なクローン（iHCE-NY 090409）と薬剤選択を行わなかった代表的なクローン（iHCE-NY 090502）および対照の不死化角膜上皮細胞（HCE-T）を用いて、核型解析（Karyotype）とプロテオミクスを行い、比較検証した。

#### B-2-6-2) 核型解析（Karyotype）

カリオタイプは種ごとに一定であり、ヒトの2倍体細胞は22対の常染色体と1対の性染色体、計46本の染色体を持つ。不死化

遺伝子の導入により正常の染色体の状態ではないが、出来る限り正常の染色体数に近い細胞クローンを選出することが望ましい。そこで、得られたクローンについての核型解析を行った。

#### B-2-6-3) プロテオミクス（プロテオーム解析）

プロテオーム（Proteome）とは、ある組織や細胞に存在しているタンパク質の総体である。複数の組織や細胞の間でプロテオームを比較することにより、生命現象を総合的に理解することが可能となる。プロテオームを扱う解析をプロテオミクスと言う。

#### B-2-6-4) マイクロアレイ解析

正常ヒト角膜上皮培養細胞、山本が作製した不死化角膜上皮細胞（iHCE-NY細胞）および理化学研究所から分譲されている不死化角膜上皮細胞（HCE-T）を山本がクローニングした細胞（nHCE-T）のそれぞれの遺伝子発現解析を行い、不死化による正常細胞との違いを検証した。

#### B-2-6-5) 二次元培養系曝露実験プロトコル

平成23年度の実験結果を基に、播種細胞数、曝露前培養時間、被験物質の曝露時間を検討した。播種細胞数は $1.0E+06$  cells/mlに調製し、曝露前培養時間（前培養）は、0日（0時間）、1日（24時間）、2日（48時間）を、曝露後培養時間（後培養）は、0日（0時間）、1日（24時間）、2日（48時間）を比較した。被験物質の曝露時間は、1分、5分、30分を比較検討した。

#### B-2-6-6) 高感度指標遺伝子の選出

データベースを基にBLASTサーチを行い、先に実施したmicroarray上にスポットしてある54,841遺伝子から角膜上皮細胞に比較的特化して発現している遺伝子、microarrayの結果を基にした細胞周期関連遺伝子、細胞死の関連遺伝子などの候補遺伝子（28 gene + 2 Endogenous Control）を以下のように絞り込んだ。

##### 1) 角膜上皮細胞マーカー

- p63
- Mucin-1
- Mucin-16
- Keratin-3
- Keratin-12

##### 2) 細胞接着因子

- ZO-1
  - E-cadherin
  - Desmoglein-3
  - Occcludin
  - Involucrin
  - CD29
  - CD44
  - Trk-A
- 3) 細胞周期マーカー
- Ki-67
  - PCNA
  - Cyclin-D1
  - p15
  - p21
  - p27
- 4) アポトーシス関連因子
- Caspase-3
  - Caspase-7
  - Bcl-2
  - BAX
  - Snail-1
  - Snail-2
- 5) 細胞内タンパク質
- Type-1 collagen
  - MMP-9
  - Beta-catenin
- 6) Endogenous Control
- GAPDH
  - 18S rRNA

上記の候補遺伝子の発現について iHCE-NY 細胞に SLS と EtOH の各濃度を曝露して遺伝子発現量の変化を調査した。

#### B-2-6-7) 三次元角膜再構築モデルの作製

三次元培養角膜再構築モデルの作製プロトコルは、3種類の供試細胞を用いて、培養条件の検討を行った。

#### B-2-6-8) 三次元角膜再構築モデルの曝露プロトコル作製

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の基礎検討を実施した。

#### B-2-7) 光毒性試験

##### B-2-7-1) バリデーション

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, sulisobenzon), 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, avobenzone, 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, bumetizole, camphor sulfonic acid, chlorhexidine, cinnamic acid, drometizole, 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 Atlas Suntest CPS series を有する 3 施設 (Lab#1-3) と Seric SXL-2500 を有する 4 施設 (Lab#4-7) 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 (200  $\mu$ 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  $mW/cm^2$ ), 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。

##### B-2-7-2) 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  $\mu$ 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  $mW/cm^2$ ), ROS 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。

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

B-3-1-1) ヒトパッチテスト

ヒトパッチテストについては、陽性コントロールおよび陰性コントロールを置いた健康人の予知パッチテストを施行し、陽性コントロールの妥当性について検討した。

B-3-1-2) 既存の使用試験の検討

新規成分を含む医薬部外品の使用試験について企業より情報提供を受け、検討を加えた。

B-3-1-3) 携帯電話を利用した使用試験安全管理システム

安全性について合理的な使用試験を行うための、携帯電話を利用した管理システムを試作した。

B-3-2) 携帯電話を利用した使用試験

In vivo 共焦点レーザー顕微鏡を用いた R1110 の色素沈着症に対する効果の検討  
肝斑：単盲検（被験者盲検）基剤対照左右比較試験

日光黒子：オープン試験（対照設定なし）  
投与製剤：R1110（ハイドロキノン4%含有する美容液）；プラセボ（R1110からハイドロキノンを除いた製剤）

投与期間と方法：12週間、1日2回、朝・夕 疾患部位のみに塗布、朝使用時には日焼け止め製品を併用

対象：日光黒子または肝斑を顔面に有する者（女性）症例数：10例（肝斑6例、日光黒子4例）

被験者：被験者募集会社パネルより募集。研究担当医師による適格性を診断後、組入れ。

実施施設：藤田保健衛生大学病院、皮膚科外来

実施期間：疫学・臨床研究倫理審査委員会承認：2011年3月17日、臨床試験登録：2011年4月13日

使用期間：2011年4月13日～2011年7月20日のうち12週間

評価は0、4、8、12週の4回（肝斑2グループ、日光黒子1グループ）、14時

～17時頃実施

評価項目：

- ・共焦点レーザー顕微鏡による撮影
- ・ダーモスコピーによる皮膚診断
- ・スキントーンカラースケールによる判定

- ・皮膚所見（安全性評価）

- ・メグザメーター、色差計による測定

- ・VISIAによる評価

患者管理：

患者様 Web 日誌

<https://pms.quickletter.net/ql/rohto/login.asp>

HPにて管理

B-3-3) パッチテストの再現性

B-3-3-1) 対象および試験内容

試験実施に先立ち、対象者に対して説明文書を用いて試験内容を十分に説明した後、被験者の自由意思に基づく試験参加の同意を文書により得た。なお、本研究は藤田保健衛生大学治験審査委員会およびヒューマ R&D 試験審査委員会の承認を得て実施されている。異なる2集団においてパッチテストを実施した。被験者はいずれも、愛知県近隣在住の健康人で、各年代および男女比がほぼ均等になるように割り付けた。なお、2試験の試験間は6ヶ月以内である。

B-3-3-2) 試験薬

日本国内で市販されている外用医薬品55種

対照薬：皮膚刺激性の陽性薬5種および陰性薬2種

B-3-3-3) 方法

アルミフィンチャンバー (Finn Chamber on Scanpor (株) スマートプラクティスジャパン) を用いて、背部皮膚に試験薬を as is で閉塞貼付した。軟膏・クリーム・ローション剤はアルミ皿に直接20mgのせ、液剤はフィンチャンバー専用ろ紙に15μL滴下した。試験薬貼付部位は、被験者ごとに10～12検体単位でローテーションさせた。

閉塞貼付24時間後（試験①）または48時間後（試験②）にチャンバーを除去し、除去2時間後および24時間後に皮膚反応を表4に従い判定し、6段階にスコア付した。

B-3-3-4) 判定

得られたスコアに評点を設け、各被験者で判定2時点のうち反応の強い方の評点を採用し、各試験品の評点総和を被験者総数で除した商の百分率を試験品の皮膚刺激指数とした。なお、アレルギー反応と確認された被験者の該当する試験品データは、除外して評点に加えなかった。

#### B-3-4)連続塗布試験方法

##### B-3-4-1)対象

試験実施に先立ち、対象者に対して説明文書を用いて試験内容を十分に説明した後、被験者の自由意思に基づく試験参加の同意を文書により得た。なお、本研究は藤田保健衛生大学治験審査委員会の承認を得て実施されている。

被験者はいずれも健常人で24～60歳の22例（男性10例、女性12例）であった。

##### B-3-4-2)試験薬

被験薬のうち、算出された皮膚刺激指数を分類し、指数60～の範囲から1試験品、指数30～60の範囲から4試験品、指数30以下の範囲から1試験品の計6試験品とした。

##### B-3-4-3)方法

被験者の左右上腕内側部それぞれ3箇所ずつ（計6箇所）に、被験薬を1日2回（朝夕）、3週間連続的に単純塗布した。なお入浴した際は、入浴後に塗布した。

##### B-3-4-4)判定

試験期間中、被験者自身で「乾燥」「赤み」「ぶつぶつ」「はれ」「ヒリヒリ」「ほてり」「かゆみ」について、3：とてもある 2：ある 1：ややある 0：ない の4段階で評価してもらった。また、その他観察される症状においても記録してもらった。

#### B-3-5)使用試験の情報管理統括に関する研究

##### B-3-5-1)副作用情報共有サイトに用いるアプリケーションの検討

インターネットを用いて副作用情報を収集するために必要な要素として、セキュリティ、アクセサビリティおよび操作性の観点から評価する必要がある。また、これらの要求事項に適合する具体的なシステムとして①新規プログラムを構築する方法、②

既存のサービスを利用する方法および③既存のwebアプリケーション上に構築する方法がある。①については汎用性が乏しく構築コストが莫大になる。また②については、様々な状況に対応できるサービスが提供されていない。したがって本研究では、クラウドコンピュータ上に提供されているwebアプリケーションを用いた副作用情報収集サイトについて検討した。

現在提供されているwebアプリケーションはGoogle社によるGoogle AppsとMicrosoft社により提供されるOffice365が利用可能である。

今回我々は、これらの両システムによる化粧品および医薬部外品の副作用症例の収集サイトについてクセサビリティ、セキュリティおよび保存性の観点から評価した。

##### B-3-5-2)副作用情報共有サイトの構築と運営

サービスを利用し症例情報収集システムを構築した。グループウェアはShare point 2010を用い、症例登録用のポータルサイトを作成した。データ入力、手書きの症例登録用紙と同形式のテンプレートを作成した。データは全て匿名化し、必要に応じてSSL通信を利用した。入力者自身の登録情報以外の閲覧ができないような権限管理を行い、2名のID取得者のみが全てのデータを閲覧およびダウンロード可能とした。事務局では毎月全ての報告結果をエクセルファイルにダウンロードして集計し、Share Point上に作成された一般公開サイトにて公表した。さらに、日本アレルギー学会のホームページ（HP）からもリンクし情報を開示した。

ID管理は、既存のフリーメールアドレス（ホットメール）を利用することで、IDおよびパスワードの管理を簡略化した。サイト入力に困難な施設に対しては、メールもしくはFaxを利用し、事務局でシステムに入力した。

調査対象：日本アレルギー学会の会員の内、「旧茶のしずく」石鹼に含まれる加水分解小麦による皮膚アレルギーおよび小麦関連アレルギー疾患患者の診療を経験した医師とした。

診断基準：日本アレルギー学会に設置された特別委員会において診断基準を策定し

HP 上で公開した。

#### B-3-5-3)サーベイランスへの応用

日本アレルギー・接触皮膚炎学会との協働により行う予定である接触皮膚炎症例の調査として、接触皮膚炎症例調査サイトを試験的に作成した。従来は手書きで作成した用紙を回収し、事務局で入力作業をしていたが、インターネット上に設置した入力フォームから直接入力できる様に設定した。

また、鈴鹿医療科学大学との協働により Cardio Toco Gram (CTG:胎児心拍陣痛図)の判定について、既に臨床応用が始まっている GE 社製自動判読装置 Trium®と医師による判読、評価との乖離について、インターネットを用いた多施設共同研究にてその可能性を検討した。具体的には 38~41 週の正常産婦 28 人の分娩経過中の胎児心拍数波形記録 (CTG 図) をサイト内にリスト化した。医師が判別結果を回答する場合、web システムからすべての症例の CTG 図を呼び出し、結果のみを入力できるよう操作性に配慮した。結果は 5 段階レベル分類判読とし、多施設の評価者間での回答の一致率および機械判定との差を検討した。

#### (倫理面への配慮)

本研究で使用したヒト正常角膜上皮細胞は、市販されている細胞、研究用で販売・分譲されている細胞、および研究用として購入した眼球 (角膜) 組織から分離培養した細胞を用いているため、特別な倫理面への配慮は必要ないと考えている。

### C. 結果

#### C-1) 情報収集

##### C-1-1) 欧州

2009 年 3 月 11 日に化粧品指令第 7 次改正が施行され、反復投与毒性、生殖毒性、毒物動態以外の動物実験を実施した原料を配合した化粧品の EU 域内での販売が禁止されたことから、EU においては代替法開発が一層緊急性を帯びてきた。また、反復投与毒性、生殖毒性、毒物動態の 3 項目についても 2013 年 3 月 11 日に禁止の期限を迎えることになっており、欧州委員会から 2011 年 9 月に出示された欧州議会・閣僚理事会の報告では、上記 3 項目については 2013 年までに完全代替不可であることが指摘されて

いる<sup>3)</sup>。一方で、2012 年 11 月に欧州委員会保健衛生担当理事候補である Tonio Borg 氏 (11 月 28 日に就任) は「科学的現状および消費者の意向にかかわらず 2013 年 3 月の化粧品に関する動物試験禁止令を施行する」という意思表明を行っており<sup>4)</sup>、変更がない見込みである。

欧州委員会 FP7 の下で 2011 年 1 月から開始された共同研究プログラム Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing (SEURAT)-1 は動物実験の代替法、特に反復投与毒性の開発促進を目的として進められており、各々のプロジェクトについて進展もみられる<sup>33)</sup>。これらは化粧品評価だけでなく REACH への対応のためでもある。今後ますます代替法開発と活用が促進されるものと考えられる。

##### C-1-2) 米国

代替法に関する米国の主な動向として、以下のことがあげられる。

(A) NICEATM は ICCVAM と共同して化学物質や製品による眼障害性ポテンシャルを同定するための *in vitro* 試験法及び動物を用いない試験法を組み合わせた試験戦略のバリデーション評価に向けた準備を開始、

(B) 修正 OECD TG405 活用のための評価書及び推薦書公表、(C) 米国消費者製品安全委員会における代替試験法扱いに関する方針と連邦有害性物質法での動物試験に関する規制を改正する最終規則を発行、(D) ヒトアレルギー性接触皮膚炎誘発性化学物質分類のための LLNA の利用性と限界に関する報告及び推奨に対する連邦政府機関からの合意回答、(E) 内分泌攪乱物質を同定するための LUMI-CELL®ER 試験法の評価報告書と推薦書の公表と連邦政府機関からの合意回答、(F) 上げ下げ法による急性経皮全身毒性の評価に向けた準備が進められたこと、

(G) ICCVAM と NICEATM は代替法の 2013 年~2017 年の 5 年計画案を発表したこと。

##### C-1-3) アジア

中国では中国実験動物学会内、北京実験動物学会内に動物実験代替法に関する委員会が設立されている。2011 年には中国動物実験代替法フォーラムの開催、2012 年には SFDA が 3T3 NRU 法の草案を作成し、意見募集を行った。これは、昨今の代替法開発に関する国際動向、法規制の整合性等に配慮した動きと捉えられる。

韓国では、KoCVAM が 2011 年に、ICATM に加わり、新しい動物試験代替法の国際的な検証研究と専門家による評価報告書の作成、およびガイドラインの開発等を推進することになった。

#### C-1-4) その他の国際的な代替法開発の動向

2012 年、OECD の安全性試験ガイドラインにおいて 2 つの新規試験法（TG460 眼腐食性及び重度刺激性を特定するためのフルオレセイン漏出試験方法、TG457 エストロゲン受容体アゴニストおよびアンタゴニストを特定するための BG1Luc エストロゲン受容体転写活性化試験）と 3 つの更新試験法（TG455 エストロゲンアゴニスト活性を検出する安定的に形質転換した細胞を用いるヒト ER $\alpha$  を介した転写活性化試験、TG443 拡張一世代生殖毒性試験、TG405 急性眼刺激性/腐食性試験）が採択された。

また、2 種の新規試験法ドラフトガイドラインおよび 9 種の改訂試験法ガイドラインが、受け入れのための意見募集の段階にある。TG439 改定試験法ドラフトガイドラインには、日本発の *in vitro* 表皮モデルとして、LabCyte EPI-MODEL24 が追加されている。OECD では安全性試験のテストガイドライン策定、新規試験法あるいは改訂試験法における代替法採択の動向からも、動物愛護に対する積極的な取り組みが伺える。

ICCR のトピックスとしては、ICCR-6 が開催され、昨年同様動物実験代替法に関する議論がなされ、規制当局は ICATM からその活動について最新の報告を受けた。新たに、構造活性相関（QSAR）予測モデルの可能性追求のため、ワーキンググループの設立が合意された。

ICH においては、各種試験や提出書類などのガイドラインの標準化や改訂作業が進められており、動物福祉・愛護（3R）の観点についても重視されている。光安全性試験 [S10] ではガイドライン（案）に対する意見聴取の段階にあり、非臨床光安全性試験項目には動物実験代替法として化学的評価法の ROS アッセイ、*in vitro* 評価の 3T3 NRU-PT やヒト皮膚再構築モデルを用いる評価について記述されている。これら非臨床の *in vitro* 及び *in vivo* 試験並びに臨床的な試験の一つでも陰性結果が得られれば、追加的な検討は推奨されなくなり、動物リソースの削減が可能となる。

#### C-1-5) 日本における代替法開発の動向

日本における代替法の開発・評価においては、平成 24 年 4 月 26 日に厚労省から事務連絡「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」が通知され、公式に代替法利用の促進が示された。また、粧工連動物実験代替専門委員会内に *in vitro* を補完する位置づけとして 2011 年に発足した「*in silico* ワーキンググループ」の継続的な活動とともに、2012 年に同じく「感作性試験代替法ワーキンググループ」も設立され、今後新たな評価手法の開発が望まれる。

#### C-1-6) 化粧品の安全性評価に関連する代替法の状況

代替法の開発と評価に関する状況を安全性評価項目ごとに取りまとめた。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、これにより代替法の公的な利用が実質的に示された。

感作性試験代替法について、EURL ECVAM では *in vitro* 感作性試験代替法として DPRA、h-CLAT 及び MUSST のプレバリデーションが進められている。DPRA についてはすでに評価が終了し、ESAC による Peer Review が開始された。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た。

反復投与毒性試験代替法では、2011 年 1 月から開始された EU における研究プログラム SEURAT-1 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。

#### C-2) 試験法の開発、評価

##### C-2-1) 培養表皮モデル（LabCyte EPI-MODEL24）のバリデーション

Phase IV バリデーションの結果、すべての施設で、1-bromo-hexane は陽性となった。他の物質の判定結果に変更はなかった。

しかし、3 回の SD が 18% を超えた場合もすべての施設で見られた。なお、陰性、陽性対照物質は、すべての場合に基準を満た

していた。

3 参加施設の内、1 施設 (Lab a) がコード番号 4 を陽性と判定したため、specificity が、わずかに performance standard の基準 (acceptance criteria および success criteria) を達成できなかった。その他の結果は、すべて基準を満たしていた。

上記の大きな改善点である洗浄方法を改訂したプロトコルを用いた phase V バリデーシヨンの結果、表 1 に示すように、SD  $\geq$  18% となったデータ数 (逸脱数) は、昨年のバリデーシヨンでは 5 物質において 15 データ / 56 データも存在したが、同物質数で 1 データ / 46 データに激減した。洗浄法の改良により、著しくバラツキが少なくデータの安定性は改良された。また、di-n-propyl disulphide を除く 5 被験物質の判定結果も、全施設で一致した。tetrachloroethylene は、全試験で刺激性物質と判定された。

## C-2-2) 皮膚透過性試験

### C-2-2-1) in vitro 透過性試験

ヘアレスラット摘出皮膚および EpiDerm を介した化学物質において、水溶性の ISMN および中間の ISDN では、ヘアレスラット摘出皮膚と EpiDerm で角層バリア比 ( $R_{sc}/R_{tot}$ ) に違いが認められた。一方で、脂溶性物質である FP では両皮膚間で差が認められなかった。したがって、EpiDerm は水溶性および中間の極性の化学物質に対する角層バリア能が低いことが示された。これは EpiDerm の組織構造、特に角層の脂質ラメラ構造が実皮膚と比較して不完全であることが原因として考えられた。得られた角層バリア能の結果より、3 次元培養皮膚モデルでは、適用した化学物質の皮膚中濃度が著しく増大する可能性があることが示唆された。

### C-2-2-2) 代謝活性について

EpiDerm, LSE-high, Episkin, Vitrolife-skin および LabCyte Epimodel の  $K_m$  および  $V_{max}$  に差は認められなかったものの、それらの活性はヘアレスラットおよびヒト摘出皮膚よりも著しく低かった。 $K_m$  は発現酵素種と関係していると考えられ、Imai らはヒト皮膚にエステラーゼ 1 およびエステラーゼ 2 が発現していることを報告している。3 次元培養ヒト皮膚モデルはヒト表皮ケラチノ

サイトを再構成させたものであり、摘出ヒト皮膚を同一の  $K_m$  値を示すと思われたが本実験では  $K_m$  値が異なっていた。ヒト皮膚での  $V_{max}$  はヘアレスラット皮膚に比べおよそ 10 倍低く、3 次元培養ヒト皮膚モデルでは、さらに 10 倍低かった。そのため、3 次元培養ヒト皮膚モデルでは酵素発現量が著しく低いことが考えられた。これらの結果から、 $K_m/V_{max}$  が著しく低い 3 次元培養皮膚では適用物質の代謝されにくいことが示唆された。これらの結果から、3 次元培養皮膚モデルにエステル化合物を適用した場合には、代謝物の皮膚中濃度が 3 次元培養皮膚では著しく低下すると考えられた。

### C-2-2-3) 皮膚中濃度

ヘアレスラットおよび EpiDerm 中の FP および ANP 濃度は共に、EpiDerm の全層中濃度および生きた表皮・真皮中濃度は、対応するヘアレスラット皮膚より高値を示した。刺激性と強く関係する生きた表皮・真皮中濃度は、FP では 15.1 倍、ANP では 86.2 倍のヘアレスラット皮膚より高値を示し、水溶性物質の ANP の方が脂溶性の FP よりも高値を示した。これは、EpiDerm の皮膚角層バリアの脆弱さが皮膚中濃度の違いに起因していると考えられた。

EN を適用した時のヘアレスラットおよび EpiDerm の生きた表皮・真皮中濃度が示すように、EN は皮内エステラーゼにより NA を代謝産物として生じる。NA の EpiDerm 中濃度は、ヘアレスラット皮膚の 0.05 倍の値を示した。先行研究の結果より EpiDerm の皮内カルボキシエステラーゼ活性はヘアレスラット皮膚と比べて著しく低いことが明らかである。また、EpiDerm の角層は脆弱で化学物質の透過速度がヘアレスラット皮膚よりも高い。これらが EN および NA の EpiDerm の生きた表皮・真皮中濃度がヘアレスラット皮膚と異なる理由と考えられた。

EpiDerm を用いた皮膚刺激性試験で false negative を示した HS のヘアレスラットおよび EpiDerm の生きた表皮・真皮中濃度において、HS は皮内エステラーゼにより salicylic acid (SA) を代謝産物として生じる。SA の生きた表皮・真皮中濃度は NA とは異なり、EpiDerm 中濃度がヘアレスラット皮膚よりも高値を示した。EpiDerm を用いた

皮膚刺激性試験で HS は false negative を生じるため、本結果は仮説と一致しなかった。これは HS の皮膚刺激性評価に用いている家兎と EpiDerm の皮内カルボキシエステラーゼファミリーの違いが考えられたため、今後家兎皮膚を用いたさらなる検討が必要であることが示唆された。

#### C-2-2-4)皮膚中濃度計算値

FP (a)、および (b)のヘアレスラット皮膚および EpiDerm の皮膚中濃度実測値および計算値から、いずれの物質も実測値と計算値は比較的近い値を示したが、実測値と計算値の差は EpiDermの方がヘアレスラット皮膚よりも小さかった。これは、適用した FP 溶液中のイオン型分率が大きかったことや ANP が親水性であることから、皮膚中濃度に及ぼす物質の毛嚢を介した透過ルートの寄与が大きいと考えられた。

EN を適用した時のヘアレスラット皮膚および EpiDerm の皮膚中濃度実測値および計算値から、EN および NA 共に実測値と計算値は比較的近い値を示した。

これらの結果より、皮膚透過性パラメータより薬物の皮膚中濃度が計算できる可能性が示された。

#### C-2-3) STE 法のバリデーション

コード化した被験物質については、3 施設がともに実施した 10 物質ではすべて同じ判定結果が得られ、先のバリデーション同様、施設間再現性が確認できた。

また、先のバリデーションでも用いられた 2 物質も同様の判定結果となり、バリデーション間の再現性が確認された。

40 物質の中で、GHS 区分との比較では、コード番号 01 および 25 の 2 物質の判定結果が異なった (GHS カテゴリー分類との比較では、コード番号 01、02 および 25 の 3 物質が異なった)。これらの物質の結果が異なった原因を明らかにするために行った追加実験で、コード番号 01 の原因は、溶媒の選択および被験物質の溶解状態の相違であることがわかった。その他の物質については、カットオフ値 (70%) 前後の細胞毒性による陰陽性結果の違いと判断した。

先のバリデーション結果と結果が確定した 60~61 物質により一致率を算出したところ、GHS 区分の一致率は 78%以上 (61

物質) と高かった (GHS カテゴリー分類との比較では 65% (60 物質) であった)。

#### C-2-4) SIRC-CVS アッセイのバリデーション

Phase Iバリデーションにおいて、Lab Cの習熟度がまだ低く、参照物質である triethanolamine、C03、C04の結果が他の施設と比較してばらついていた。そこで、Lab Cには実験を繰り返すように依頼した。その結果、Lab C(追加)の結果は、他の参加施設と同様な結果になった。

Phase IIバリデーションでは、参照物質 (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。Phase II a および II b バリデーションの結果から、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-2-5) 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った。

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%)。

#### C-2-6)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

##### C-2-6-1)iHCE-NY の選択分離と細胞特性

初回の細胞選択で薬剤選択を行い、その後はセルソーター (FACS Vantage SE ; BD) を用いて、GFP の蛍光で 9 回セルソーティングを行い、遺伝子導入細胞の選択を行った代表的なクローン (iHCE-NY 090409) と初回の細胞選択で薬剤選択を行わず、全てセルソーターを用いて GFP の蛍光で 10 回セルソーティングを行い遺伝子導入細胞の選択を行った代表的なクローン (iHCE-NY 090502) が作製された。

##### C-2-6-2)核型解析 (Karyotype)

HCE、HCE-T、iHCE-NYの核型解析を行い、HCEはMode=46、HCE-Tは、Mode=59、iHCE-NY(5 passage)のモードは46、iHCE-NY(80 passage)のモードは63~65であった。

#### C-2-6-3)プロテオミクス(プロテオーム解析)

角膜上皮組織(未培養)、ヒト正常角膜上皮細胞(HCE、培養細胞)、不死化角膜上皮細胞(HCE-T、培養細胞)、不死化ヒト角膜上皮細胞(iHCE-NY 090502、培養細胞)の二次元電気泳動を行ったところ、メジャーなスポットには相違はないものの、詳細なスポットでは違いがあることが明らかとなった。

#### C-2-6-4)高感度で簡便な試験評価系とマーカーの開発に関する予備実験

新しい手法を用いて、二次元培養の角膜上皮細胞で検出される候補マーカーの検出を試みた。

iHCE-NY 090502を用いて18S rRNAをEndogenous Control( $Ct = 13.9 \pm 0.5$ )として検証したところ、CD29( $Ct = 23.1 \pm 0.5$ )、CD44( $Ct = 26.7 \pm 0.4$ )、E-cadherin( $Ct = 35.1 \pm 0.8$ )、ZO-1( $Ct = 27.8 \pm 0.3$ )、Occludin( $Ct = 29.8 \pm 0.2$ )であった。

#### C-2-6-5)マイクロアレイ解析

HCEとiHCE-NYのマイクロアレイバースデータから、プローブ数(スポット数)54,841個のうち、HCEがiHCE-NYより発現が2倍上昇(2 up)しているスポット数は1965個、3倍上昇(3 up)しているスポット数は527個、4倍上昇(4 up)しているスポット数は220個であった。一方、発現が1/2に低下(2 down)しているスポット数は1758個、1/3に低下(3 down)しているスポット数は521個、1/4に低下(4 down)しているスポット数は264個であった。

GO Term Listを用いて、4 upおよび4 downの遺伝子機能解析の結果から、HCEと比べてiHCE-NYの方が4 upしている遺伝子は、細胞周期関連遺伝子が殆どであり、4 downしている遺伝子は、細胞接着に関連する遺伝子が多かった。

次にBioSystems Pathway Listを用いて遺伝子パスウェイ解析を行った。HCEよりもiHCE-NYの方が4 upしているパスウェイは、

Cell cycle, Mitoticを中心に25個であり、4 downしているパスウェイは、ECM-receptorやCell junctionなどを中心に48個であった。

また、iHCE-NYとnHCE-Tが共に4 upしているパスウェイは、Cell cycle, Mitoticなどを中心に8個であり、4 downしているパスウェイは、ECM-receptorやCell junctionを中心に19個であった。

#### C-2-6-6)二次元培養系曝露実験プロトコル

##### 1) 条件検討-①(播種数、後培養)

播種後に細胞の増殖を経時的に確認できる細胞濃度は、 $5.0E+04$  cells/well以下であった。また、後培養2日では、細胞がオーバーコンフルエントになったため、後培養は1日以下とした。

##### 2) 条件検討-②(前培養、曝露時間)

次にSLSの曝露時間を1分、5分、30分で検討した結果、1分と5分の曝露では、ほとんど差がなかったことから、曝露時間は実際の実験ハンドリングを考慮し、5分曝露を採用した。

上記の条件絞り込みを行い、以下のプロトコル①を設定した。

このプロトコル①に基づき、iHCE-NY、HCE-T、SIRCを用いて、SLS、X-100、EtOHの曝露実験を行ったところ、各細胞間に大差は認められなかった。

##### 3) 条件検討-③(前培養、曝露時間)

プロトコル②として、前培養1日、後培養1日として、播種細胞数を4濃度( $5.0E+04$ ,  $2.5E+04$ ,  $1.25E+04$ ,  $6.25E+03$  cells/well)で設定して検討した結果、このプロトコルにおいて再現性よく細胞の増殖を確認できる播種細胞数は、 $2.5E+04$  (25,000) cells/wellであった。

次にSLSの曝露時間を1分、5分、30分で検討した結果、1分と5分の曝露では、ほとんど差がなかったことから、曝露時間は実際の実験ハンドリングを考慮し、5分曝露を採用した。

上記の条件絞り込みを行い、以下のプロトコル②を設定した。

#### C-2-6-7)高感度指標遺伝子の選出

データベースを基にBLASTサーチを行い、先に実施したmicroarray上にスポットしてある54,841遺伝子から角膜上皮細胞に比較的特化して発現している遺伝子、

microarray の結果を基にした細胞周期関連遺伝子、細胞死の関連遺伝子などの候補遺伝子 (28 gene + 2 Endogenous Control) のうち、細胞生存率に影響のない濃度 (IC<sub>50</sub> の濃度よりも薄い被験物質濃度、細胞毒性が検出されない濃度) 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。

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、および参考までに 30 分曝露させた条件での遺伝子発現の推移の結果を表 3 にまとめた。検討の結果、*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。

#### C-2-6-8) 三次元角膜再構築モデルの作製

培養条件がわずかでも変わってしまうと、三次元角膜再構築の構造が変化することがわかった。

- MTT 法

SLS 曝露による iHCE-NY の三次元角膜再構築モデルに対する被験物質の曝露プロトコルの検討を行った。SLS の、濃度を 1%、曝露時間を 5 分に設定し、曝露量を 50 $\mu$ L/insert、洗浄は PBS を 800 $\mu$ L $\times$ 5 回実施した。MTT を用いて OD0.3 以上の適正な値を求めた。

- FL 法 (無処置)

THE FLUORESCENCE LEAKAGE TEST (INVITTOX Protocol No. 71) を基に FL 法の条件検討を行った結果、iHCE-NY の三次元角膜再構築モデルへの Fluorescein sodium の適用時間は、60 分とした。

- 電気抵抗 (無処置)

iHCE-NY の三次元角膜再構築モデルの無処置における電気抵抗 (ER [ $\Omega$ ]) は、300 $\Omega$  以上で再現性よく確認することができた。

- 組織標本 (無処置)

HCE-T、nHCE-T、iHCE-NY を用いて作製した三次元角膜再構築モデルは、SUPER FIX など固定した後、常法に基づきパラフィンブロックまたはクライオブロックを作製し、ミクロトームにて薄切切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H.E.染色) を行った。

HCE-T で作製した三次元角膜再構築モデルは、細胞層が 3~4 層までしか形成され

なかった。

nHCE-T で作製した三次元角膜再構築モデルは、細胞層が 5~6 層まで形成できるようになった。細胞形態的にも、表層に移動するほど扁平となり、細胞が分化していることがわかる。

iHCE-NY で作製した三次元角膜再構築モデルも、nHCE-T と同様に細胞層が 5~6 層まで形成されており、表層に移動するほど扁平となっていたことから、細胞が分化していることがわかる。

iHCE-NY の免疫染色結果から、ZO-1、Involucrin を検出することができた。

#### C-2-6-9) 三次元角膜再構築モデルの曝露プロトコル作製

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の基礎検討を実施した。

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、現状のモデルでは感度が良すぎるという結果となった。また、インサートの内部がエアリフトのまま後培養した場合、細胞生存率は回復せず、むしろ刺激や反応が強くなる傾向があったことから、後培養の条件を再検討する必要がある。

#### C-2-7) 光毒性試験

##### B-2-7-1) バリデーション

Atlas Suntest CPS plus ならびに Seric SXL-2500V2 からの放射光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。照射強度を適切に調整するという前提のもとで、両 solar simulator は疑似太陽光の適切な光源として使用することが出来るものと考えた。しかし、おそらくは UV フィルターの影響から、UVB 領域における僅かな差を認めた。

陽性標準物質 quinine と陰性標準物質 sulisobenzone を対象に、Atlas Suntest CPS series ならびに Seric SXL-2500V2 を用いて ROS assay を実施した。Atlas Suntest CPS series を利用した Lab#1-3 における singlet oxygen の日内変動係数 (CV) は 1.5~2.1% の範囲であり、superoxide の CV は 2.6~7.4% 程度であった。一方、Seric SXL-2500V2 を用いた Lab#4-7 における CV は singlet oxygen で 3.3~6.2%、

superoxide で 1.7-9.4% であった。日間変動係数についても両装置使用グループ間において大きな差を認めなかった。また、いずれの疑似太陽光を使用しても、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、あるいは検出不能であった。施設間の再現性については、quinine の singlet oxygen で CV が 15.4% (Lab#4-7), 13.2% (Lab#4-7) であり、superoxide では 17.0% (Lab#1-3), 7.1% (Lab#4-7) であった。すなわち、両光源使用下において ROS data は顕著な差を認めず、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。ROS assay の sensitivity は全施設において 100% であり、specificity は 41.7-81.8% (Lab#1-3), 46.2-63.6% (Lab#4-7) であった。光毒性陰性物質の positive predictivity は、施設により 75.9-91.7% (Lab#1-3), 75.0-84.0% (Lab#4-7) 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 negative predictivity は全施設とも 100% であった。

Atlas Suntest CPS series, Seric SXL-2500V2 を用いたバリデーション試験双方において、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が存在した。また、rose bengal は 559 nm 付近に極大吸収 ( $90,400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 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。これらのケースを除き、ROS assay と *in vitro/in vivo* 光毒性所見の間には良い関連性を示し、光安全性評価における初期スクリーニング法としての有用性を示唆した。今後さらなるデータの蓄積によって、適用限界に関するより詳細な情報が集まり、適切な使用方法に関する知見が得られることを期待する。

#### B-2-7-2)試験法改良

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。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 mM),  $2.0 \text{ mW/m}^2$  の照射強度で疑似太陽光を照射した際、methotrexate からは singlet oxygen ( $DA_{440 \text{ nm}}$

$\cdot 10^3$ : 200-240) と superoxide ( $DA_{560 \text{ nm}} \cdot 10^3$ : 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。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。

$$Z' = 1 - (3s_{c+} + 3s_{c-}) / |m_{c+} - m_{c-}|$$

ただし、 $s_{c+}$  と  $s_{c-}$  はそれぞれ methotrexate と erythromycin の標準偏差であり、 $m_{c+}$  と  $m_{c-}$  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、ROS assay ではそれぞれ 9.4%, 3.6% であり、mROS assay ではそれぞれ 9.9%, 2.5% と算出され、いずれの測定法でも優れた精度を認めた。

次に、モデル化合物 83 種類について ROS assay ならびに mROS assay を実施した。ROS assay においては、被験物質の溶解度の問題で 83 化合物のうち 23 化合物 (全体の 27.7%) が 200 mM で試験を実施することができなかった。その一方、mROS assay では 2 化合物のみが試験を実施することが出来なかった。すなわち全体の 97.6% が評価可能であった。これは 0.5% Tween 20 ミセルによる溶解補助効果が機能的に働いていることを明確に示唆するものである。先に Onoue らによって提案された threshold {(i) 25 ( $DA_{440 \text{ nm}} \cdot 10^3$ ) for singlet oxygen, and (ii) 20 ( $DA_{560 \text{ nm}} \cdot 10^3$ ) 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。

いずれの評価系においても光毒性物質は 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。ROS assay では 3 種の化合物で偽陽性判定がなされ、全体的な特異性は 70% であった。ROS assay の陽性ならびに陰性検出能はそれぞれ 94.1%, 100% 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。ROS assay では偽陰性判定がなかったが、mROS assay では光毒性化合物である ibuprofen と indomethacin が互いに陰性とみなされた。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り、mROS assay は適用範囲が広い反面、その判定には注意を必要とする。

ROS assay は光安全性評価の早期に使用されることが考えられるため、偽陰性を出さないシステムが求められる。そこで ROS assay を一次評価とし、溶解性の問題で評価不可能となった化合物に対して mROS assay を二次的に実施することを考案した。この場合、偽陰性を可能な限り抑制しつつ、化合物適合範囲を拡大することが可能と考えられる。このシステムに従って 83 種類のモデル化合物を評価したところ、結果となった。この方法で評価不可能な化合物は UV-571 の 1 種類のみであり、全体の特異性は 82.4% まで改善した。また、陽性ならびに陰性検出能はそれぞれ 95.6%, 100% と算出され、ROS/mROS assay の互いの欠点を補った有用なアプローチであると考えた。

### 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

##### C-3-1-1) ヒトパッチテスト

パネル間の易被刺激性の指標に有用である可能性が示唆された。

##### C-3-1-2) 既存の使用試験の検討

使用試験は 3 社より提供を受けた。使用試験の対象は 1 製品について 20 名から 50 名程度であり、安全性の検討項目も試験により異なっていた。

##### C-3-1-3) 携帯電話を利用した使用試験安全管理システム

安全性について合理的な使用試験を行うために、ユビキタス移動体インフラ、すなわち携帯電話等をモバイル端末として、インターネット上に新たなデータベースを構築する仕組みを利用した携帯電話による管理システムを試作した。

### C-3-2) 携帯電話を利用した使用試験集計結果

- ・期間及び人数：2011年6月22日～2011年7月20日、携帯6名・PC4名で運用
- ・回答率：91.5% (194/212)
- ・試験品使用(朝)：90.6% (192/212)
- ・日焼け止め使用：86.8% (184/212)
- ・試験品(夜)：89.6% (190/212)
- ・紫外線暴露の有無：44.3% (94/212)
- ・肌トラブル(自覚)の有無：5.2% (11/212)

かゆみ：0件

刺激感(ひりひり・チクチク)：0件

赤み：11件

皮膚にブツブツある：4件

- ・上記の赤み及び皮膚にブツブツがあると回答(延べ15件)した患者は同一の症例(No.1)であり、プラセボ塗布部(左)での症状であり、8週目及び12週目の医師による問診では異常がなかった。この症例以外に、かゆみや刺激感を伴い、赤みや皮疹のある症例はなかった。リマインドメールの送付されるレベルの有害事象はR1110塗布により起きなかった。
- ・日誌回答忘れについては、No.2：2回、No.6：1回、No.9：2回、No.10：7回の延べ12回(5.7%)であり、特定の症例で日誌忘れが生じた。

### C-3-3) ヒトパッチテストの再現性

各試験品間の皮膚刺激指数は、別集団のパッチテストにおいてほぼ同程度となった (Fig.1  $y=0.902x-0.5457$   $R=0.9073$   $P<0.01$ )。さらに、試験間で貼付時間が異なっても皮膚刺激指数が同程度であった。

対照薬の皮膚刺激指数は、陰性対照薬で 6.7～23.3、陽性対照薬で 24.1～93.1 で、陰性と陽性対照薬の指数範囲は明らかな差があった。また、各試験の 0.2%SLS 溶液の皮膚刺激指数は 53.4、56.7、0.1%SLS 溶液の皮膚刺激指数は 24.1、30 で、皮膚刺激指数に成分濃度依存性を認めた。

### C-3-4) 連続塗布試験の成績

22 例の被験者のうち、皮膚症状や感覚を観察した被験者出現者数、観察症状内訳および延べ件数、被験薬の皮膚刺激指数においては、試験品を指数 60 以上、指数 30～60、指数 30 以下で分けると、指数の低