

## 医薬品の安全性評価のための*in vitro*毒性試験についての評価

研究分担者：小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所）

### 研究要旨

ICH光毒性試験ガイドライン(S10)に、日本で開発された光毒性スクリーニング法 ROS (Reactive Oxygen Species: 活性酸素種) アッセイを掲載させるため、バリデーションが日本製薬工業協会およびJaCVAM (日本動物実験代替法評価センター) の協力にて実施された。このバリデーション報告書に対する国際的な第三者評価会議が昨年度に開催され、バリデーション報告書や提案プロトコルの改訂が求められた。この要求に応じて改訂された書類を用いて、第三者評価委員会が再検討し、第三者評価報告書を完成した。結果として、ROSアッセイは光安全性評価のため、時間、経費、動物数の削減に有用であると結論された。

キーワード：*in vitro*、光毒性試験、医薬品、安全性評価、動物実験代替法

分担研究者および協力研究者の氏名・所属機関名および所属機関における職名

尾上 誠良（静岡県立大学 准教授）

細井 一弘（参天製薬株式会社、日本製薬工業協会）

高木 広憲（大正製薬株式会社、日本製薬工業協会）

中村 和市（塩野義製薬株式会社、日本製薬工業協会）

岩瀬裕美子（田辺三菱製薬株式会社、日本製薬工業協会）

### A. 研究目的

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: 日米EU医薬品規制調和国際会議) 光毒性試験ガイドライン (S10) への掲載を目指している光毒性スクリーニング法であるROS (Reactive Oxygen Species: 活性酸素種) アッセイは、尾上らによって開発され<sup>1)</sup>、日本製薬工業協会およびJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods: 日本動物実験代替法評価センター) にて、バリデーションが実施された<sup>2,3)</sup>。この結果をICH光毒性試験ガイドライン (S10) 検討グル

ープにて報告したところ、バリデーション報告書の第三者評価実施が要求された。そこで、光毒性およびバリデーションの国際的な専門家を招聘し、第三者評価会議が昨年度開催された。その会議にてバリデーション報告書や提案プロトコルの改訂が求められたことから、バリデーション実行委員会が改訂を検討した。本年度、改訂された書類を用いて、第二回第三者評価会議を開催し、報告書の完成を目指した。

### B. 研究方法

#### B-1) バリデーションの概要

コード化された42種類の被験物質 (200 μM) を含む反応液を96ウェルプレートに分注してソーラーシミュレーター (Atlas Suntest CPS series およびSeric) による1時間の擬似太陽光照射後 (1.9 ~ 5.0 mW/cm<sup>2</sup>)、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。

Atlas Suntest CPS seriesのバリデーションには3施

設が、Sericのバリデーションには4施設が参加した。それぞれの結果はバリデーション報告書としてまとめられた<sup>2,3</sup>。

#### B-2) 第三者評価組織

国際的な光毒性あるいはバリデーションの専門家を第三者評価委員として招聘した。

##### 1) Horst Spielmann (Berlin Free Univ.)

ZEBET (National Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments) の元リーダー、光毒性の専門家、OECD TG432 (光毒性試験代替法) の作成者

##### 2) William S. Stokes (Consultant)

獣医師、バリデーションの専門家、NICEATM (The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) の元リーダー

##### 3) Bae-Hwan Kim (Keimyung University)

獣医師、アモーレパシフィック化粧品の元研究員

##### 4) 堀井郁夫 (ファイザー)

毒性学者、ケンブリッジ大学客員教授、ファイザー日本研究所 元所長

#### B-3) 昨年度の動向

##### B-3-1) 第一回 第三者評価会議

平成25年2月27日～3月2日において、以下のスケジュールにより第三者評価会議が東京にて開催された。

2月27日 ICH S10におけるROSアッセイの位置づけ、試験法概要説明、バリデーション報告書説明

2月28日 提案プロトコルの紹介、評価手順の確認、B-3-2に示す質問への回答を作成する方式で第三者評価を進めた。

3月1日 同上

3月2日 総括

##### B-3-2) 第三者評価のために用意した質問

本評価委員会での議論を活発にするため、上記の項目に準じた以下の質問を用意した。

質問1 : A rationale for the test method should be available, including description of toxicological mechanisms, a clear statement of scientific need, and regulatory application (試験法の科学的、規制上での妥当性)

質問2 : The relationship between the test method endpoint(s) and the biological effect and to the toxicity of interest should be addressed, describing limitations of the test methods (試験法の定義)

質問3 : A detailed test method protocol should be available (プロトコルの構成の妥当性)

質問4 : Within- and between-laboratory reproducibility of the test method should be demonstrated (試験法の信頼性)

質問5 : Demonstration of the test method's performance should be based on testing of representative, preferably coded reference chemicals (バリデーションに用いられた物質の分類)

質問6 : Accuracy or predictive capacity should be demonstrated using representative chemicals. The performance of test methods should have been evaluated in relation to existing relevant toxicity data as well as information from the relevant target species (試験法の正確性)

質問7 : All data supporting the assessment of the validity of the test method should be available for expert review (データと結果の利用性)

質問8 : all data supporting the validity of a test method should have been obtained in accordance with the principles of Good Laboratory Practice (GLP) (データの質)

質問9 : Applicability domain of the validity of the test method should be defined for expert review (試験法の有用性と限界)

質問10 : Proficiency chemicals should be set up in the proposed protocol (習熟物質の選択)

質問11 : Performance standard should be set up with proposed protocol (性能標準の必要性)

質問12 : Advantages in terms of time, cost and animal welfare (時間的、コスト的な有利さと、3Rsへの

関与)

#### B-4) 本年度の動向

##### B-4-1) 第三者評価委員会からバリデーション実行委員会への提言

第一回第三者評価会議における提案を以下に示す。

- ・コード化した物質を用いた実験は、phase2研究のみであり、データは限定されている。これらのデータを用いて、感度、特異度、陽性予測率、陰性予測率、および正確度を評価する。このデータセットの範囲内で、陰性予測率は100%と高い。
- ・5-FUはヒト光毒性を引き起こすか疑わしい。5-FUのヒトデータは信頼性の高いヒトデータか再調査する。
- ・溶解性を考慮に入れてデータベースを拡大するためには、20 $\mu$ Mによる(陰性)結果を受け入れるべきである。
- ・特異度が低いことが問題である。可能なら、バリデーション結果の受入れ基準を再検討すべきである。

バリデーション実行委員会は本問題に真摯に対応し、バリデーション報告書およびプロトコルを改訂した。

##### B-4-2) 第二回 第三者評価会議

平成25年8月20日～8月21日において、以下のスケジュールにより評価会議が東京にて開催された。

8月20日 ICH S10の動向紹介、改訂バリデーション報告書およびプロトコルの説明、および質疑応答

8月21日 報告書案の改訂内容について

##### B-4-3) 最終報告書の完成

第二回会議終了後、メールで最終報告書案について意見交換がなされ、10月中旬に最終報告書が第三者評価委員会から提出された。

(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。

#### C. 研究結果

ROSアッセイのバリデーション報告書をもとに、第三者評価をB-3-2)に示す質問に回答する形式で進めた。それぞれの質問に対して、評価者より適切な回答を作成することができた。以下に示すような主な議論がなされた。

コード化した物質を用いて行われたphase2研究が再解析された。

バリデーション実行委員会のメンバーは、5-FUのヒト光毒性を再調査した。その結果、5-FUが光毒性を引き起こすヒト結果の信頼性は高くなかった。5-FUの光毒性は不明と判断した。

バリデーション実行委員会のメンバーは、ロシグリタゾンのヒト光毒性を再調査した。ロシグリタゾンのヒトデータの信頼性は高くなかった(3T3 NRU-PTは陽性だった)。ロシグリタゾンは解析から削除されることになった。データセットは42から41となった。

20 $\mu$ Mの陰性結果はバリデーション結果において偽陰性を引き起こさなかったため、データ再解析に取り入れることにした。推奨プロトコル(添付資料1)では、ROSアッセイは20および200 $\mu$ Mの濃度で実施される。

活性酸素のカットオフ値は20から70に変更すると、バリデーション結果で見られた偽陰性はなくなった。

一重項酸素および活性酸素のカットオフ値をそれぞれ25および70とすれば、アミオダロン、アモキサピン、プフェキサマックおよびハロペロドールはすべて基準値以下になる<sup>4)</sup>。これら医薬品の光毒性は顕著でなくなり、これら医薬品の光毒性の可能性に関する有害事象に配慮することはないと思われる。

表に示すように、一重項酸素および活性酸素のカットオフ値をそれぞれ25未満および20から70の間は、弱い光反応物質と判断することが適切と考察できる。

ROSアッセイの判定基準は、陽性および陰性から光反応物、弱い光反応物、非光反応物と変えることを提案したい。光反応物、弱い光反応物は追加試験が必要である。非光反応物は光毒性の可能性が低い

ことを示している。

以上のような議論を経た後、第三者評価委員会は、以下のように結論した。なお、詳細は添付資料2に示す評価報告書に記す。

ROSアッセイの再現性と予測性は、医薬品の研究開発における決定戦略および総合的な光安全性試験の一つとして十分な試験法であると結論できる。この総合的な戦略の中で、ROSアッセイで陰性の場合、動物実験や他の試験は不要である。一方、陽性、弱い陽性、結論が出ない場合には、3T3光毒性試験 (OECD Test Guideline 432<sup>5</sup>) のような *in vitro* 試験という次の試験に進むことになる。

ROSアッセイは光安全性評価のため、時間、経費、動物数の削減に有用である。さらに、光安全性試験戦略の中でROSアッセイは、追加試験である *in vitro* 3T3アッセイの試験物質数を減らすことができるとともに、引き続き、動物試験を実施する物質数を減らすことができる。

#### D. 考 察

今回の国際的な第三者評価会議を経て、ROSアッセイの評価報告書を完成することができた。同時に、第三者評価委員からの指摘でバリデーション報告書や提案プロトコルも改訂できた。これらを10月中旬にICH S10検討グループに送付した。これを受け、ICH S10検討グループはROSアッセイをガイドラインに掲載することを決めた。

#### E. 結 論

ROSアッセイのバリデーション報告書を受け、昨年度～本年度に掛け、国際的な第三者評価会議が実施された。この会議にて、バリデーション報告書や提案プロトコルの改訂が求められた。改訂されたROSアッセイは、光安全性評価のため、時間、経費、動物数の削減に有用であると結論された。

表 Revised judgment criteria

Judgment <sup>1)</sup>	Concentration	SO (mean value of 3 wells)	and	SA (mean value of 3 wells)
Photoreactive	20 and/or 200 μM <sup>2)</sup>	≥25	and	≥70
		<25 and/or P <sup>3)</sup>	and	≥70
		≥25	and	<70 and/or P <sup>3)</sup>
Weakly photoreactive	20 and/or 200 μM <sup>2)</sup>	<25	and	>20, <70
Non-photoreactive	20 and 200 μM <sup>2)</sup>	<25	and	<20
Inconclusive	The results do not meet the other criterion. <sup>4)</sup>			

#### Notes

- 1) It can be judged based on results of one experiment because the ROS assay shows good reproducibility in the validation studies.
- 2) It would be judged at 20 μM only when precipitation is observed at 200 μM.
- 3) Precipitation before irradiation.
- 4) When precipitation is observed at 20 and 200 μM before irradiation, the compound is regarded incompatible with the ROS assay.

## F . 参考文献

- 1) Onoue S, Tsuda Y.: Analytical studies on the prediction of photosensitive/phototoxic potential of pharmaceutical substances. *Pharm Res.* 23(1):156-64 (2006)
- 2) 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)
- 3) Onoue S, Hosoi K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Nakamura K, Ohno Y, Kojima H : Intra-/inter-laboratory validation study on reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation using two different solar simulators., *Toxicology In Vitro*, 28(4), 515-523 (2013)
- 4) Onoue S, Igarashi N, Yamada S, Tsuda Y. High-throughput reactive oxygen species (ROS) assay: An enabling technology for screening the phototoxic potential of pharmaceutical substances. *J Pharm Biomed Anal* 2008;46(1):187-93.
- 5) OECD test guideline 432; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. (2004)
- 6) 小島 肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 ( 20 ) 遺伝毒性試験 - 哺乳類の培養細胞を用いる試験、COSME TECH JAPAN, 3(6) 72-77 (2013)
- 7) Kojima H, Hayashi K, Sakaguchi H, Omori T, Otoizumi T, Sozu T, Kuwahara H, Hayashi T, Sakaguchi M, Toyoda A, Goto H, Watanabe S, Ahiko K, Nakamura T, Morimoto T. : Second-phase validation study of short time exposure test for assessment of eye irritation potency of chemicals., *Toxicology In Vitro*, 27(6), 1855-69 (2013)
- 8) 小島 肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 ( 21 ) 遺伝毒性試験 - げっ歯類を用いる小核試験、COSME TECH JAPAN, 3(7) 116-120 (2013)
- 9) 小島 肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 ( 22 ) ウサギを用いる眼刺激性試験、COSME TECH JAPAN, 3(8) 67-71 (2013)
- 10) 小島 肇夫 : 化粧品・医薬部外品およびその原料の安全性評価と規格・試験法設定、サイエンス&テクノロジー、29-65 (2013)
- 11) Yamaguchi H, Kojima H, Takezawa T : Vitrigel-Eye Irritation Test Method using HCE-T cells, *Toxicological Sciences*, 135(2), 347-55 (2013)
- 12) 小島 肇夫, 技術講座 安全性評価試験 ( 23 ) 実験動物を用いる皮膚刺激性試験、COSME TECH JAPAN、3(9) 81-84 (2013)
- 13) 小島 肇夫 : *In vitro* 毒性・動態評価の最前線、シーエムシー出版、1-7 (2013)
- 14) Kojima H, Katoh M, Shinoda S, Hagiwara S, Suzuki T, Izumi R, Yamaguchi Y, Nakamura M, Kasahawa T and Shibai A : A catch-up validation study of an *in vitro* skin irritation test method using reconstructed human epidermis LabCyte EPI-MODEL24, *Journal of Applied Toxicology*, (2013)
- 15) 小島 肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 ( 24 ) 実験動物を用いる連続皮膚刺激性試験、COSME TECH JAPAN, 3(10) 22-25 (2013)

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

- 1) 小島 肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 ( 18 ) 遺伝毒性試験 - 組合せ、COSME TECH JAPAN, 3(4)74-77 (2013)
- 2) 小島 肇夫 : 経皮吸収型製剤の安全性を考える、*ファルマシア*、49(5)、415-419 (2013)
- 3) 小島 肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 ( 19 ) 遺伝毒性試験 - エイムス試験、COSME TECH JAPAN, 3(5) 82-85 (2013)
- 4) 小島 肇夫 : 動物実験代替安全性試験プロトコ

- 16) 小島 肇夫：技術講座 安全性評価試験 (25) 実験動物を用いる皮膚一次刺激性試験、COSME TECH JAPAN, 3(11) 36-39 (2013)
- 17) 小島 肇夫：日本動物実験代替法学会バリデーション委員会とJaCVAM、日本動物実験代替法学会 第25回大会記念誌、27-34 (2013)
- 18) 小島 肇夫：経皮吸収性の試験法と評価法、株式会社 情報機構、1-54 (2013)
- 19) 小島 肇夫：技術講座 安全性評価試験 (26) 実験動物を用いない眼刺激性試験、COSME TECH JAPAN, 3(12) 44-48 (2013)
- 20) Stokes W, Srinivas G, McFarland R, Kulpa-Eddy J, Casey W, Walker A, Draayer H, Sebring R, Brown K, Balks E, Stirling C, Klaasen E, Hill R, Rippke B, Ruby K, Alt D, Mukhopadhyay S, Kojima H, Johnson N, Rinckel L, Doelling V, Jones B. : Report on the international workshop on alternative methods for Leptospira vaccine potency testing: state of the science and the way forward., Biologicals, 41 (5), 279-94 (2013)
- 21) Onoue S, Hosoi K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Nakamura K, Ohno Y, Kojima H : Intra-/inter-laboratory validation study on reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation using two different solar simulators., Toxicology In Vitro, 28(4), 515-523 (2013)
- 22) Kojima H: Update from the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), Alternatives to Laboratory Animals, 41(6), 435-441 (2013)
- 23) 小島 肇夫：技術講座 安全性評価試験 (27) 生殖毒性試験、COSME TECH JAPAN, 4(1) 70-74 (2014)
- 24) 小島 肇夫：技術講座 安全性評価試験 (28) 動物実験代替法を巡る動向2013年、COSME TECH JAPAN, 4(2) 36-42 (2014)
- 25) 小島 肇夫：動物実験代替法を用いた「これからの化粧品・医薬部外品の安全性評価とその根拠の示し方」、COSMETIC STAGE、8(3) 1-8 (2014)
2. 口頭発表
- 1) 小島 肇：シンポジウム8：in vitroを用いた創薬安全性評価とその他の挿性、in vitroによるスクリーニング(総論) 第40回日本毒性学会 学術年会、2013年6月17-19日、幕張メッセ
- 2) 山口宏之、小島 肇、竹澤俊明：Vitrigel-EIT法：ヒト角膜上皮組織シート型培養モデルをもちいた高感度なin vitro眼刺激性試験、第40回日本毒性学会 学術年会、2013年6月17-19日、幕張メッセ
- 3) 川上哲、尾上誠良、松本康浩、戸田嗣人、大崎尚人、若栗忍、岩瀬裕美子、山本敏誠、高木広憲、中村和市、細井一弘、小島 肇：医薬品の光毒性ポテンシャル評価のためのROSアッセイバリデーション試験、第40回日本毒性学会 学術年会、2013年6月17-19日、幕張メッセ
- 4) 内野正、竹澤俊明、山下邦彦、小島 肇、清水久美子、秋山卓美、五十嵐良明：Vitrigel-EIT法：ヒト角膜上皮組織シート型培養モデルをもちいた高感度なin vitro眼刺激性試験、第40回日本毒性学会 学術年会、2013年6月17-19日、幕張メッセ
- 5) 小島 肇：日本での皮膚感作性代替法開発状況について、皮膚感作性試験ワークショップ、2013年7月12日、日本化学工業協会
- 6) Kojima H：Workshop: Alternative Test Methods and International Regulatory perspectives, JaCVAM: Recent Progress and Future Plans for the Validation and Acceptance of Alternative Testing in Japan, The XIII International Congress of Toxicology, June 30-July 4, 2013, COEX, Seoul, Korea
- 7) Morita T, Kojima H, Hayashi M : General Principles of Chemical Selection for in vivo, Validation Studies, The International Symposium of the Center of Alternative Methods for Safety Evaluation of Cosmetics, July 2, 2013, COEX, Seoul, Korea
- 8) Kojima H : Our Practical Examples of International Validation Studies for Establishing OECD Test Guidelines, The International Symposium of the

- Cneter of Alternative Methods for Safety Evaluation of Cosmetics, July 2, 2013, COEX, Seoul, Korea
- 9) 小島 肇：代替法の国内外の動向、皮膚基礎研究クラスターフォーラム、2013年8月1日、亀戸文化センター
  - 10) 小島 肇：動物実験代替法の国内外の動向と化粧品・医薬部外品の規制、日本化粧品技術者会大阪支部 勉強会、2013年8月30日、薬業年金会館
  - 11) 小島 肇：代替法の最新情報、動物実験についての知識を高めるための教育訓練 2013年9月11日、農研機構 中央農業総合研究センター
  - 12) Kojima H, Oshimura M, Saito K, Saito F and Imatanaka N : Japanese Project “ ARCH-Tox ” for the Future Chemicals Management Policy: Research and Development of *in vitro* and *in vivo* Assays for Internationally Leading Hazard Assessment and Test Methods, 15th Annual Congress of European Society for Alternative to Animal Testing, 2013年9月17日、リンツ ( オーストリア )
  - 13) Kojima H, Stokes W, Horii I, Hwan K.B and Spielmann H, Peer Review Panel Evaluation of the ROS Photosafety Assay, 15th Annual Congress of European Society for Alternative to Animal Testing, 2013年9月15日、リンツ ( オーストリア )
  - 14) 小島 肇：*in vitro*探索毒性試験の展望、日本薬物動態学会 第28回年会シンポジウム9、2013年10月10日、東京
  - 15) 小島 肇：三次元培養モデルの現状と可能性、株式会社ニコゲームリサーチ 創立10周年記念特別講演会
  - 16) 小島 肇：動物を用いないで医薬部外品の承認申請を取ることは可能か？、日皮協 会員研修会、2013年10月24日、京都
  - 17) Kojima H, Oshimura M and Imatanaka N : Japanese Project “ ARCH-Tox ” for alternative to 28-day repeated dose oral toxicity study), 10th annual Meeting of KSAAE (Korean Society of Alternative Animal Experiments), 2013年11月6日、韓国中央大学
  - 18) 小島 肇：昨今の皮膚毒性評価法の動向、安全性評価研究会 安全性評価研究会 2013年冬のセミナー、平成25年12月7日、住友ベークライト、東京
  - 19) 小島 肇：JaCVAM国際シンポジウム：日本動物実験代替法学会の活動、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
  - 20) 小島 肇：シンポジウム4：動物実験代替法の化粧品規制に関する現状、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
  - 21) 小島 肇：ランチョンセミナー：動物実験代替法開発における課題とカイコの可能性、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
  - 22) 内野 正、清水 久美子、竹澤 俊明、山下邦彦、小島 肇、秋山 卓美、五十嵐 良明：ピトリゲルチャンバーを用いた皮膚感作性試験代替モデル(下面暴露法)、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
  - 23) 木村 裕、藤村 千鶴、渡辺 美香、齋藤 るみ子、鈴木 紀之、岩城 知子、山影 康次、斎藤 幸一、中島 芳浩、近江谷 克裕、酒井 綾子、丸谷 あおい、大森 崇、山崎 晶次郎、小島 肇、田中 憲穂、相場 節也：IL-8 Luc assayの施設間差試験およびデータセットの作製、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
  - 24) 丸谷 あおい、相場 節也、木村 裕、渡辺 美香、鈴木 紀之、岩城 知子、山影 康次、斎藤 幸一、中島 芳浩、近江谷 克裕、山崎 晶次郎、小島 肇、田中 憲穂、小林眞弓、森 梓、大森 崇：IL-8 Luc assayにおけるばらつきを考慮した班手基準の提案、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
  - 25) Kojima H, Stokes W, Horii I, Hwan K.B. and Spielmann H : Peer Review Panel of the Japanese validation study of the ROS *in vitro* phototoxicity

- for ICH、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 26) 加藤 義直、山本 直樹、佐藤 淳、中田 悟、小島 肇：不死化ヒト角膜上皮細胞株(iHCE-NY)を用いた三次元角膜再構築モデルの作製、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 27) 古川 正敏、榊原 隆史、六川 潤美、伊藤浩太、佐々木 啓、平賀 武夫、小島 肇、松浦 正男：牛角膜を用いた混濁度および透過性試験法(BCOP法)における被験物質の濃度および曝露時間の影響、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 28) 大森 崇、簾内 桃子、池田 英史、中村 香織、鄭 美淑、山影 康次、萩野 滋延、小島 肇：SIRC-CVS試験を用いた眼刺激性評価代替法の国際バリデーション研究(II)、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 29) 小島 肇、Nicole Kleinstreuer、Chae-Hyung Lim、寒水 孝司、渡辺 美香、新妻 健、山下 邦彦、福田 隆之、山口 典子、藤原 聖、山口 宏、竹澤 俊明：Vitrigel-EIT (Eye Irritancy Test) 法のプレバリデーション研究、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 30) 成田和人、石原有人、小島 肇、板垣 宏：培養細胞を用いた試験における難水溶性物質の暴露方法の検討、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 31) 古川 正敏、榊原 隆史、六川 潤美、伊藤浩太、佐々木 啓、平賀 武夫、小島 肇、松浦 正男：牛角膜を用いた混濁度および透過性試験法(BCOP法)における病理組織学的検査、第30回日本毒性病理学会総会および学術集会、平成26年1月30、31日、あわぎんホール(徳島)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし
- I. 添付資料
- 1) Reactive Oxygen Species (ROS) assay to examine photoreactivity of chemicals
- 2) Peer Review Panel Evaluation of the Reactive Oxygen Species (ROS) Photosafety Assay