

201403019A

厚生労働科学研究費補助金  
地球規模保健課題推進研究事業  
(地球規模保健課題解決推進のための研究事業)

# 新規動物試験代替法の開発、国際標準化及び 普及促進に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

平成27 (2015) 年 4 月

研究代表者 小 島 肇  
(国立医薬品食品衛生研究所 薬理部)

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 新規動物試験代替法の開発、国際標準化及び普及促進に関する研究-----1  
小島 肇

### II. 分担研究報告

1. 化粧品のための動物実験代替法の国際標準化に関する研究  
—試験法の開発— -----19  
小島 肇
2. 化粧品のための動物実験代替法の国際標準化に関する研究  
—試験法の評価— -----29  
小島 肇
3. 動物実験代替法と皮膚透過性によるリスク評価手法の構築-----189  
杉林堅次
4. ATP バイオセンサーを用いた皮膚刺激性評価-----205  
川村 龍吉
5. ヒトのパッチテスト、使用テストのガイダンス作成-----213  
松永佳世子
6. 動物実験代替法に関する国際情勢の調査-----221  
杉山真理子

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----277

平成 26 年度総括研究報告書

新規動物試験代替法の開発、国際標準化及び普及促進に関する研究

H25-地球規模-指定-004

研究代表者 小島 肇  
国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

本研究では、化粧品・医薬部外品の安全性評価に用いる代替法の国際標準化およびその普及の促進を目的とし、必要な調査研究、代替法の開発、改良、バリデーションおよび第三者評価、代替法を用いたリスク評価の検討、代替法で評価された成分のヒト試験の利用ガイダンス等を検討するものである。

動物試験代替法(以下、代替法と記す)の開発または改良に関しては、1) 培養細胞に刺激物質を曝露することで産生・誘導される細胞外ATP (アデノシン三リン酸) 放出をバイオセンサーにて検知し、その物質の皮膚刺激性あるいは感作性を定量化するシステムを確立した。2) OECDテストガイドラインである眼刺激性試験代替法BCOP (牛摘出角膜混濁および透過性試験) に病理組織学的検討を組み合わせることで、弱い眼刺激性を評価するため、複数の化学物質において検討した。3) ヒト角膜由来細胞を用いた安価で簡便かつ、弱い眼刺激性を評価できる眼刺激性を検出する代替法の開発として、3次元ヒト角膜再構築モデルを用いた眼刺激性試験代替法については、プロトコルを固めることができた。

試験法のバリデーションとして、1) 眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS : TEA 法の国際バリデーション報告書を作成した。2) 3次元角膜モデル LabCyte CORNEA-MODEL24 を用いた眼刺激性試験代替法は以前の共同研究で問題となったプロトコルを改訂し、プレバリデーションを実施し、問題点を解決できた。

試験法の第三者評価として、1) 眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS : TEA 法および 2) 皮膚感作性試験代替法 IL-8Luc アッセイの国際的な専門家による第三者評価を開始した。

皮膚透過性を考慮したリスク評価手法の構築では、全層皮膚、生きた表皮・真皮中濃度は共にClogPの増加に伴い皮膚中濃度も増加する傾向が見られ、皮膚暴露・皮膚適用した化学物質の皮膚中濃度は、Chem Draw Ultra にて算出した化学物質のClogP (-1 < ClogP < 3.5)を用いて予測できる可能性が示唆された。

ヒト連続適用試験結果では、すべての被験者が最終日まで、皮膚反応を示さず、皮膚生理指標の測定結果も変化なかった。携帯電話の写真機能を用いたモニタリングシステムも活用されなかった。

「眼刺激性試験を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するための留意事項について」が厚生労働省より事務連絡として発表された。眼刺激性試験代替法摘出眼球試験 (Isolated Chicken Eye : ICE) のガイダンスを作成した。

キーワード：皮膚刺激性試験、眼刺激性試験、バリデーション、動物実験代替法、ヒト試験

#### 研究分担者

杉林 堅次 城西大学薬学部  
薬粧品動態制御学講座 教授  
川村 龍吉 山梨大学大学院総合研究部  
医学域 臨床医学系  
皮膚科学講座 准教授  
松永佳世子 藤田保健衛生大学医学部  
皮膚科学講座 教授  
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  
部会 部会長

#### A. 研究目的

EUの化粧品規制により、2013年3月から化粧品に関する動物実験の禁止が施行された。国際的な市場規模の拡大の中、我が国の化粧品企業にも大きな影響を与えつつある。一方、我が国でも動物愛護法の改正により動物実験の3Rs (Reduction、Refinement、Replacement) が義務づけられ、昨年の同法改正の際にも衆参付帯決議で動物試験代替法 (以下、代替法と記す) の開発の促進を政府が図るよう決議している。以上の状況の中、化粧品・医薬部外品の安全性評価のため、代替法による開発・評価、普及を進めねばならない状況である。しかし、①安全性評価項目のそれぞれにおいて動物を用いない代替法が開発されていない。②試験法が行政的に受け入れられるためには、バリデーションが必要であり、その為に多大なる時間と経費が掛かる。③これまで開発された動物を用いない代替法では有害性の同定はできても、毒性強度の把握やリスクの評価はできない。④偽陰性結果も少なからず存在するなどの問題点を抱えており、代替法だけでは適切な安全性評価がで

きないとされている。

このような状況に鑑み、本研究では、化粧品・医薬部外品の安全性評価に用いる代替法の国際標準化およびその普及の促進を目的とし、必要な調査研究、代替法の開発、改良、バリデーションおよび第三者評価、代替法を用いたリスク評価の検討、代替法で評価された成分のヒト試験の利用ガイダンス等を検討するものである。

具体的には、代替法の開発・改良に関しては、ATP (アデノシン三リン酸) バイオセンサーを用いた微弱な皮膚刺激性評価、眼刺激性試験代替法 BCOP (牛摘出角膜混濁および透過性試験) に病理組織学的検討を組み合わせることで、弱い刺激性を評価するための改良、3次元ヒト角膜再構築モデルを用いた弱い眼刺激性を検出する代替法の開発を行った。

バリデーションとしては、眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS : TEA 法のバリデーションおよびヒト角膜モデル LabCyte CORNEAL-MODEL のプレバリデーションを実施した。バリデーションが終了した代替法として、眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS : TEA 法および皮膚感作性試験代替法 IL-8Luc アッセイについては、第三者評価を実施した。

国際情勢を加味して、近年開発された代替法についてのガイダンスを作成した。

代替法と組み合わせたリスク評価の検討としては、局所毒性と皮膚透過性の相関関係に関する成果を盛り込み、安全係数を求めるリスク評価の手法を研究した。

代替法のみで評価された成分のヒト試験の利用ガイダンスを定めることを目的に、倫理的に支障のないようボランティアによる連続



皮膚刺激性試験の計画を立てた。

## B. 研究方法

### B-1. ATPバイオセンサーを用いた皮膚刺激性評価

ATP バイオセンサーは溶液に含まれる ATP (細胞外 ATP) をリアルタイムで感知する測定機器である。溶液中の ATP は、溶液に添加した glycerol とともにセンサーにコートされた Glycerol kinase および Glycerol-3-phosphate oxidase によって H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と glycerone phosphate に変換され、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を介した電気信号として定量化される。当教室で開発した皮膚刺激物質による細胞外 ATP 産生量を簡易に測定するシステムの確立を目指した。

*in vitro*として、マウスPam212 細胞株、ヒト HaCat 細胞株およびNHEK、 *ex vivo*として、耳介表皮およびsuction blister roofs、 *in vivo*としてマウス背部皮膚およびヒト背部皮膚を実験に用いた。被験物質としては、①CrO、②EPP、③Stearyltrimonium chloride、④Sodium lauryl sulfate、⑤TEA laureth sulfate、⑥Xanthane gum、⑦Lautyonium chloride、⑧Cethylpyridinium chloride、⑨BAC、⑩Oxazonolおよび⑪TNBSを適用した。

### B-2. BCOPの改良

牛摘出角膜を用いた混濁度および透過性試験 (BCOP) 法は、腐食性および強眼刺激性または、無眼刺激性を評価する試験法であり、2013年にOECD TG437として公表されている。ただし、本試験法では偽陽性が多く、さらに弱または中程度の眼刺激性を評価できない。そこで、病理組織学的な検討を組み合わせることで、弱い刺激性を予測できないかと考えた。

本年度は、化合物安全性研究所で保有するデータを再検討し、追加で行うべき弱い眼刺激性および無刺激性物質をリストアップしてBCOPの試験を実施した。

### B-3. 3次元ヒト角膜再構築モデルを用いた眼刺激性試験代替法の開発

山本らによって不死化遺伝子を導入した新規不死化角膜上皮細胞 (iHCE-NY) が作出されている。平成22-24年度に実施した厚生労働科学研究 (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) において、この細胞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が提示された。しかし、このプロトコルでは、無刺激性物質を含む被験物質の細胞生存率は全て50%以下となり、感度が高過ぎた。そこで、昨年度、セルカルチャーインサートの選定により、3-Methoxy-1,2-propanediol (GHS眼刺激性区分外) に対する細胞生存率を概案モデルよりも向上させることができた。しかし、GHS眼刺激性区分外のTween20の細胞生存率はいずれのインサートにおいても50%に満たさず、正確な判断ができなかった。

この点を改良するため、本年度は、Tween20やエタノール等を用い、以下の点でプロトコルの改良を実施した。

#### B-3-1. 被験物質適用条件や前処理方法の検討 以下の条件を検討した。

- 1) 直接適用 (これまでの方法)
- 2) 生理食塩水またはPBSを適用した後、同量の被験物質を適用
  - ・生理食塩水
  - ・PBS緩衝液
- 3) 50%被験物質水溶液を適用
- 4) 培養液(牛血清の有無)を1時間適用後、培養液除去後に被験物質を原体で適用
  - ・牛血清無
  - ・牛血清有
- 5) 上記条件において0, 1, 2日間の後培養期間を設定

#### B-3-2. 洗浄方法の検討

Tween20を十分に取り除くことを目的として検討した。

### 1) 洗浄方法の検討

- ✓ 吐出法
- ✓ 浸漬法

### 2) 洗浄液の比較

- ✓ 基本培地 (DMEM/F12)
- ✓ PBS緩衝液

後培養は行わず、各条件で2回実施。被験物質は、Tween 20、エタノールおよび対照 (PBS、培地) とし、適用時間は5分、適用濃度は原体とした (この検討から適用量を 50 $\mu$ L から 25  $\mu$ L に変更した)。 Tween 20 とエタノールの切り分けができる条件を見出し、再現性を確認した。

### B-3-3. 培養期間の検討

Tween20とエタノールの区別を明確にすることと生細胞率の回復を捉える可能性について、後培養の日数を2週間まで確認した。

1) モデル作製条件：試料適用量 (25 $\mu$ L)、適用時間 (5分) は変更しない。

2) 被験物質：

Tween20、エタノール、ブタノール、10%塩化ベンザルコニウムの4種

3) 後培養を0, 1, 3, 7, 14日間設定する。これら試験を2回繰り返す。

### B-3-4. 画像処理による生細胞面積率検出方法の検討

被験物質曝露直後のMTT試験によって得られた画像を解析した (後培養無しの条件)。

1) 被験物質： Tween20、エタノール、ブタノール、10%塩化ベンザルコニウムの4種

2) 画像処理するモデル表面積の領域 25~75%で検討した。

3) 二値化処理

色成分はRGBの組合せ7色

R (赤), G (緑), BL (青), C (シアン), M (マゼンタ), Y (黄), W (白)

感度 (閾値) [自動化に統一] 判別分析法 (大津の二値化) によって求めた。

### B-4. SIRC-CVS : TEA法のバリデーション

昨年度までに終了したバリデーション実験を受けて、バリデーション実行委員会は報告書を作成した。

### B-5. LabCyte CORNEA-MODEL24を用いた眼刺激性試験代替法の開発

LabCyte CORNEA-MODELはJ-TEC株式会社にて製造・販売されている眼刺激性評価モデルである。一昨年度に実施された共同研究において、24施設が参加し、16物質を用いて本試験系の技術移転性を確認した。その結果、偽陽性が多く再現性が悪いこと、および粘度の高い液体であるTween 20 にばらつきが認められ、被験物質適用方法の変更などのプロトコルの改良が指摘された。そこで、昨年度は偽陽性物質を減らす目的で評価基準を変更し (生細胞率40%)、ばらつきの減少を目的として被験物質が十分洗浄されるよう洗浄方法を追記した等の改訂プロトコルを用い、追加共同研究を実施した。本年度は、さらに陰性対照の吸光度の低下およびそのばらつきを小さくするための細胞生存率の指標であるWST-8の処理条件の改善に関する追加共同研究 (プレバリデーション) を、昨年度に用いた被験物質の中でばらつきの大きかった4被験物質を使用して実施した。

### B-6. SIRC-CVS:TEA法の第三者評価

バリデーションが終了した試験に国際的な専門家を招へいし、第三者評価を実施した。

以下の点について、評価を依頼した。

- 1) 試験法が科学的、規制の上での妥当性
- 2) 試験プロトコルの構成の妥当性
- 3) バリデーションに用いられた物質の分類
- 4) 試験法の正確性を評価する物質の *in vitro* および参照データ
- 5) データと結果の利用性
- 6) 試験法の正確性
- 7) 試験法の信頼性
- 8) データの質

- 9) 他の科学的な報告
- 10) 3Rsへの関与
- 11) 試験法の有用性と限界

#### B-7. IL-8 Lucアッセイの第三者評価

B-6と同上的ため割愛した。

#### B-8. 皮膚透過性を考慮したリスク評価手法の構築

皮膚透過性から皮膚中濃度が予測可能であれば、化学物質の物理化学的パラメータから安全性・有効性を評価できる。化学物質の皮膚透過パラメータおよび物理化学的パラメータを用いて皮膚中濃度の予測を行った。全層皮膚中濃度測定は、全層皮膚透過実験終了後、皮膚表面を buffer で洗浄し、有効透過面積中の皮膚を細かく細断した。そこに buffer を加えた後、ホモジネートを作製し、16%トリクロロ酢酸を加え攪拌、遠心分離後、上清をHPLCで測定した。

生きた表皮・真皮中濃度測定は、全層皮膚透過実験終了後、皮膚表面を buffer で洗浄し、セロテープを用いて20回テープストリッピングし角層を取り除き生きた表皮・真皮とした。

なお、種々の化学物質量は皮膚の重さで補正し、抽出率を考慮したものを実測皮膚中濃度とした。

#### B-9. ヒトのパッチテスト、使用テストのガイドランス作成

昨年度に開発されたヒト開放塗布試験法プロトコルを用い、開放塗布試験を20名で実施した。被験者はラウリル硫酸ナトリウム0.1%、0.3%、0.5%水溶液を21日間毎日、一日一回、前腕内側部に綿棒を用いて適用部位(2×2cm)に塗布した。その結果を携帯電話の写真機能を用いたモニタリングシステムで毎日確認するとともに、毎週、皮膚生理指標(水分量およびTEWL)を測定した。

#### B-10. 代替法についての国際情勢の調査

情報収集は、過去の本研究による経験から、いくつかのホームページ(SCCS、OECD、EURL ECVAM、ICCVAM、EPAAなど)を定期的に関連すると共にEUについては同地域の化粧品工業会である欧州化粧品工業会(Cosmetics Europe; CE、旧称COLIPA)、米国については米国化粧品工業会(Personal Care Products Council; PCPC、旧称CTFA: Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association)との連繋を通じて取得した。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。また、化粧品・医薬部外品のガイドランスについてアンケートを行い、調査結果をまとめた。

#### B-11. ガイドランス

皮膚科医、国立医薬品食品衛生研究所、医薬品医療機器総合機構、日本化粧品工業連合会の協力を得て、眼刺激性試験および眼刺激性試験代替法ICE(ニワトリ摘出眼球試験)のガイドランス案について検討した。本ガイドランス案をホームページにおいてパブリックコメントを求めた後に最終ガイドランスとした。

(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

##### C-1. ATPバイオセンサーを用いた皮膚刺激性評価

培養細胞に皮膚刺激物質や感作性物質を添加することで誘導される細胞外ATP放出を、ATPバイオセンサーを用いて検知し、皮膚刺激性・感作性を評価するシステムを確立できた。

まだ不十分な点も多々あり、今後さらに改良を重ねていく必要がある。

*ex vivo, in vivo*のシステムについてもさら

に検討を加えていく。

## C-2. BCOPの改良

化合物安全性研究所の協力研究者と相談して、実験すべき被験物質を決定した。平成26年6月に弱い眼刺激性物質として、17物質を送付した。さらに、平成26年9月には無刺激性の15物質を送付した。

弱刺激性 17 物質の中で、 Ethyl 2,6-dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropionate の IVIS\*のみが基準である 3 を下回る 2.4 であった、その他の 16 物質については、その強度の違いはあるものの、すべて IIVS が 3 以上となり、BCOP にて陽性であることを確認した。現在、病理組織学的な検討を実施している。無刺激性 15 物質の検討も現在進行中である。

\*:IVIS (In vitro irritancy score) = (Corrected final opacity) + 15 × (Corrected OD490 change)

## C-3. 3次元ヒト角膜再構築モデルを用いた眼刺激性試験代替法の開発 ✓

### C-3-1. 被験物質適用条件や前処理方法の検討

希釈ではなく、直接適用が実用的かつ有用であった。

### C-3-2. 洗浄方法の検討

洗浄液吐出法（弱い強度）でPBS(-)の10mLを用い、洗浄回数 3回が効率的であった。

### C-3-3. 後培養期間の検討

Tween20、エタノール、ブタノールを適用したモデルは後培養により生細胞率が回復した。しかしながら、7日目から14日目の回復はわずかであった。10%塩化ベンザルコニウムを適用したモデルは2週間の後培養を行っても生細胞率の回復は無かった。

後培養日数1日目と3日目は Tween20、エタノールおよびブタノールの生細胞率の差が開いた。

眼刺激性の強弱区別を判断する上では、後

培養日数1～3日間の条件が妥当と考えられた。

## C-3-4. 画像処理による生細胞面積率検出方法の検討

画像処理面積25%と50%では、外縁部が含まれないのでエタノールやブタノールが強刺激性と判断された。しかし、処理面積75%では外縁部が含まれ、吸光度から算出される生存率と同じ程度の数値となった。

Tween20適用モデルの解析において、画像処理面積25%と50%では、見た目以上の数値となっている（ほぼ100%の場合もある）。処理面積25%と50%では、見た目を極端に二値化していた。被験物質を適用したモデルの二値化処理では、赤・緑・黄・白成分の解析結果が呈色状態を反映していた。塩化ベンザルコニウムを適用したモデルの呈色はイソプロパノールによって抽出されていないことからMTT還元ホルマザンではないと考えられる。この呈色は、緑・青・シアン成分の二値化で検出され易かった。

以上の結果から、赤成分の解析結果がホルマザン呈色状態を良好に反映することが分かった。呈色状態の二値化処理によって得られる面積率を比色法から得られる生存率と合わせ用いることにより、被験物質の眼刺激性分類に利用できる可能性が示唆された。

## C-4. SIRC-CVS : TEA 法のバリデーション

バリデーション報告書の結論を以下に示す。

眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS:TEA 法は Draize 代替法として、化粧品原料および医薬部外品材料の非眼刺激性をスクリーニングするための簡便な方法として開発されてきた。本 SIRC-CVS:TEA 法は、1990 年代に厚生科学研究でバリデーションされた SIRC-CVS 方法を改良したもので、3 施設において試験の施設内・施設間再現性と、ボトムアップ方式での非眼刺激性の検出についての研究が GLP に準拠して実施された。

SIRC-CVS:TEA 法は、SIRC 細胞に被験物質



を72時間曝露した際に crystal violet により染色(CVS)した細胞生存率をエンドポイントとする眼刺激性試験代替法である。比較対照物質として Triethanolamine を用い、その細胞毒性と比較して被験物質の IC50 値がより小さい場合に、その物質を眼刺激性物質と判定した。GHS および EPA 基準に基づいて選択された被験物質は、コード化されバリデーション実施施設に配布された。

技術移転は Phase I における4物質で行い、施設内再現性は Phase II の20物質で行い、施設間再現性は Phase II および Phase III において3施設で実施された物質を合わせ30物質で、外挿性(Predictivity)は Phase II および Phase III の115物質で調べた。その結果、本試験法は、① 習熟により技術移転が可能/容易であること、②施設内再現性 (100%, 20/20)、施設間再現性 (90%, 3/30) とともに極めて良好であること、③正確度、感度、特異度はそれぞれ50%前後と良い結果ではなかった。しかし、分子量が180以上の化学物質に限定した場合、正確度、感度、特異度は、それぞれ71.4% (30/42)、95.2% (20/21)、および47.6% (10/21) を示し、偽陰性率は4.8% (1/21) と低い値を示した。一方、アルコール、エーテル、ケトン類の偽陰性率は高かった。以上の結果から、本試験法は施設内・施設間再現性に優れ、適用範囲を考慮した場合に非眼刺激性物質の検出が可能で、Draize 試験法の代替試験法として有用であると判断した。

#### C-5. LabCyte CORNEA-MODEL24を用いた眼刺激性試験代替法の開発

追加共同研究の結果、陰性対照の低値やばらつきが改善された。陽性対照も確実な結果であり、被験物質の値も施設間差はないと判断された。以上の理由から、プロトコルは適切に改訂されたと解された。

#### C-6. SIRC-CVS : TEA法の第三者評価

SIRC-CVS : TEA法のバリデーション報告書

をもとに、対面会議にて第三者評価をQ&A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得ることができた。本会議から半年以内で第三者評価報告書を完成させることで合意を得た。

#### B-7. IL-8 Lucアッセイの第三者評価

IL-8 Lucアッセイのバリデーション報告書をもとに、対面会議にて第三者評価をQ&A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得ることができた。本会議から半年以内で第三者評価報告書を完成させることで合意を得た。

#### C-8. 皮膚透過性を考慮したリスク評価手法の構築

全層皮膚および生きた表皮・真皮中濃度の実測値と ClogP の関係によれば、全層皮膚、生きた表皮・真皮中濃度は共に ClogP の増加に伴い皮膚中濃度も増加する傾向が見られた。

皮膚暴露・皮膚適用した化学物質の皮膚中濃度は、Chem Draw Ultra にて算出した化学物質の ClogP ( $-1 < \text{ClogP} < 3.5$ )を用いて予測できる可能性が示唆された。

この結果より、化学物質の皮膚暴露・皮膚塗布後の安全性評価試験の実施を決定するための皮膚中濃度予測が可能であると考えた。

#### C-9. ヒトのパッチテスト、使用テストのガイドランス作成

すべての被験者が最終日まで、皮膚反応を示さず、皮膚生理指標の測定結果も変化なかった。携帯電話の写真機能を用いたモニタリングシステムも活用されなかった。

#### C-10. 代替法についての国際情勢の調査

##### C-10-1. 行政関係の動向

##### 1)OECD

- ✓ 皮膚腐食性及び刺激性に関する複数の試験法の組み合わせ評価(IATA: Integrated Approach on Testing Assessment)に関するガイダンス文書を公表した(2014年7月)。
- ✓ *In silico*モデルである(Q) SAR Application Toolboxに関するアップデートした。最新版のバージョン3.2(2014年3月)
- ✓ 毒性発現における各段階のメカニズムを考慮し、毒性全体を考えることを提唱(AOP: Adverse Outcome Pathway)した。
- ✓ 遺伝毒性試験：ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験(TG473)及び*In vitro*小核試験(TG487)の改訂した(2014年9月)。

## 2) ICCR

### ・動物実験代替法

ICATMの活動について最新の報告書を受理した。ICCR地域内の化粧品及び原材料に適用可能な動物代替法リスト(ICATM提案)の改訂を決定した。

### ・安全性評価のためのコンピューター予測モデル

化粧品原料の安全性評価におけるコンピューター予測モデルの利用に関する報告書(*In silico* Approaches for Safety Assessment of Cosmetic Ingredients)が受理された。ICCRウェブサイト(<http://iccrnet.org/topics/>)に掲載した。

## C-10-2. 海外動向

### 1)欧州

#### 1-1) 欧州化学物質庁(ECHA)

- ✓ REACH規制に基づく登録データの解析による、事業者の非動物試験データの利用状況について発表した。

#### 1-2) EURL-ECVAM

- 欧州委員会共同研究センター(JRC)と共同で、代替法の非標準化法を含めた包括レビューを発表した。
- ✓ AOP(Adverse Outcome Pathway: 有害作用機序)やITS(Integrated Testing Strategies: 総合的な試験戦略)等を導入した。

◇ ECHAがREACH、CLP、BPR規則の代替法の判断に使用するほか、化粧品規制におけるガイドライン化されていない代替法の受け入れ性の目安として使われる公式な文書となっている。

- DPRA試験およびKeratinoSens<sup>TM</sup>法に関する見解をまとめた勧告文書を発表

◇ 皮膚感作性試験の1要素ではあるがスタンダードアローン試験としては使用できず、WoE(Weight of Evidence: 証拠の重み付け)やITSの一部として使用されるべき。

### 1-3) 第9回国際動物実験代替法会議(WC9)

日程: 2014年8月24~28日

場所: プラハ(チェコ)

目的: 生命科学研究における動物福祉、動物実験代替法開発の促進・教育・研究、試験分野における3Rs(Replacement, Reduction, Refinement)の進展を図る。

## 2)アジア

### 2-1)韓国

- ✓ 韓国化学融合試験研究所(KTR)は全南道と共同で産業通商資源省(MOTI)の「産業融合研究基盤構築事業」により、2016年までに全南道の生物医薬産業団地内に166億ウォンの予算で、動物実験代替試験認証センターを設立する予定した。

- ✓ 韓国食品医薬品安全処(MFDS)は、「機能性化粧品審査等に関する規定」改訂告示案(告示第2013-263号)を発表し、動物試験代替法を機能性化粧品の安全性評価で使用することを正式に承認した。(2013年12月31日)

### 2-2)インド

- ✓ 2014年5月インド政府機関の保健家族省より、化粧品のための動物実験禁止に関する官報が発出された。
- ✓ 2014年10月には動物実験を行った化粧品の輸入禁止に関する官報通知が発出された。

### 2-3)中国

- ✓ 2014年6月30日から国内で製造・販売される一般化粧品の動物試験データの提出を必須としなくなった。しかし、特殊化粧品及び輸入化粧品は従来通り動物試験が必須である。

### C-10-3. 国内動向

#### 1) ガイダンスアンケート

目的：本検討会の活動の有用性確認と今後の活動に活かすこと

主催：ガイダンス検討会（研究代表者：国立医薬品食品衛生研究所

安全性試験研究センター 薬理部 新規試験法評価室 小島肇）

期間：2013年12月－2014年1月（集計報告2014年6月30日）

対象：日本化粧品工業連合会 技術委員会参加会員企業44社（36社が回答）

まとめ：今回のアンケート調査から化粧品・医薬部外品の安全性評価に動物実験代替法を活用するための代替法ガイダンス検討会の活動に対して、強い期待が感じられた。

#### 2) 「化粧品の安全性評価に関する指針（2015年）」の策定

- ✓ 「化粧品の安全性評価に関する指針（2008年）」の策定後、約7年の間に、化粧品の安全性に関する関心の高まり、欧州から始まった動物実験禁止の世界的な広がり、動物実験代替法の開発等化粧品を取り巻く国内外の環境は大きく変化している
- ✓ 適切な試験方法により評価を実施するためには国内外の最新動向を踏まえていることが重要である
- ✓ 現在、粧工連安全性部会、動物実験代替専門部会を中心に現行指針の見直しと改訂を行っている

### C-11. ガイダンス

「眼刺激性試験を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するための留意事項について」が厚生労働省より事務連絡として発表された。

眼刺激性試験代替法摘出眼球試験（Isolated Chicken Eye : ICE）のガイダンスを作成した。

### D. 考察

本研究班では、化粧品・医薬部外品の安全性評価に用いる代替法の国際標準化およびその普及の促進を目的とし、必要な調査研究、代替法の開発、改良、バリデーションおよび第三者評価、代替法を用いたリスク評価の検討、代替法で評価された成分のヒト試験の利用ガイダンス等を検討した。

代替法の開発と評価は、非常に長い年月を要するためガイドラインとして文書化された場合は別として、単年度では明確にその全貌を捉えることは困難である。したがって、本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進し、更には今後の国際協調への参考情報とするためには、関連する国際情勢の調査と解析を継続して実施し、積み重ねていく必要があると考える。

### E. 結論

#### E-1. 代替法の開発、改良

##### E-1-1. ATPバイオセンサーを用いた皮膚刺激性評価

培養細胞に刺激物質を曝露することで産生・誘導される細胞外ATP放出をバイオセンサーにて検知し、その物質の皮膚刺激性あるいは感作性を定量化するシステムを確立した。

##### E-1-2. BCOP の改良

眼刺激性試験代替法 BCOP に病理組織学的検討を組み合わせることで、弱い刺激性を評価するため、複数の化学物質において検討した。

##### E-1-3. ヒト角膜由来細胞を用いた眼刺激性試験代替法の開発

ヒト角膜由来細胞を用いた安価で簡便かつ、正確な予測性を持つ眼刺激性を検出する代替法の開発として、自家製3次元構築ヒト

角膜モデルを用いた眼刺激性試験については、プロトコルを固めることができた。

## E-2. 代替法のバリデーションおよび評価

### E-2-1. 眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS : TEA法のバリデーション

SIRC-CVS : TEA 法のバリデーション報告書をまとめた。本試験法は分子量 180 未満の物質を除くと予測性が高まった。

### E-2-2. 眼刺激性試験代替法 ヒト角膜モデル LabCyte CORNEAL MODEL 共同研究

以前の共同研究で問題となったプロトコルを改訂し、プレバリデーションを実施し、問題点を解決できた。

### E-2-3. 眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS : TEA法および皮膚感作性試験代替法 IL-8Luc アッセイの専門家による第三者評価を開始した。

## E-3. 皮膚透過性を考慮したリスク評価手法の構築

皮膚透過性を考慮したリスク評価手法の構築では、全層皮膚、生きた表皮・真皮中濃度は共にClogPの増加に伴い皮膚中濃度も増加する傾向が見られ、皮膚暴露・皮膚適用した化学物質の皮膚中濃度は、*Chem Draw Ultra*にて算出した化学物質のClogP ( $-1 < \text{ClogP} < 3.5$ )を用いて予測できる可能性が示唆された。

## E-4. ヒトのパッチテスト、使用テストのガイダンス作成

ヒト連続適用試験結果では、すべての被験者が最終日まで、皮膚反応を示さず、皮膚生理指標の測定結果も変化なかった。携帯電話の写真機能を用いたモニタリングシステムも活用されなかった。

## E-5. ガイダンス

「眼刺激性試験を化粧品・医薬部外品の安

全性評価に活用するための留意事項について」が厚生労働省より事務連絡として発表された。

## F. 研究発表

### F-1. 論文発表

- 1) 小島肇夫：技術移転で整備すべき文章・報告書類，実験者／試験検査員の誤ったデータの取扱い・試験誤操作防止策，技術情報協会，東京，pp.57-58(2014)
- 2) 小島肇夫：動物実験代替法を取り入れた安全性保証の考え方，美肌化学の最前線，（株）シーエムシー出版，東京，pp.157-163(2014)
- 3) 小島肇夫：代替法における工学的新技術の可能性，動物実験代替のためのバイオマテリアル・デバイス，（株）シーエムシー出版，東京，pp.1-5(2014)
- 4) 小島肇夫：化粧品の安全性評価，エマルションの特性評価と新製品開発，品質管理への活用，（株）技術情報協会，東京，pp.326-331 (2014)
- 5) 小島肇夫：化粧品・医薬部外品 安全性評価試験法，（株）じほう，東京，pp.1-138(2014)
- 6) 小島肇夫：化粧品・医薬部外品の安全性評価のための動物実験代替法開発の現状と課題，フレグランスジャーナル，42(9)，pp.12-19 (2014)
- 7) 小島肇夫，西川秋佳：日本動物実験代替法評価センター（JaCVAM）平成 25 年度報告書. AATEX-JaCVAM, 3(2), pp.115-123(2014)
- 8) 中澤憲一，篠田和俊，小島 肇，吉村 功，西岡吾朗，石井 健: *in vitro* 発熱性物質試験の評価報告書, AATEX-JaCVAM, 3(2), 71-96 (2014)
- 9) Kawamura T, Ogawa Y, Aoki R, Shimada S: Innate and intrinsic antiviral immunity in skin. *J Dermatol Sci.* 75(3):159-66. 2014
- 10) Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, Moriishi K, Koyanagi Y,

- Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H: EFdA, a reverse transcriptase inhibitor, potently blocks HIV-1 ex vivo infection of Langerhans cells within epithelium. *J Invest Dermatol.* 134(4):1158-61, 2014
- 11) Ogawa Y, Kawamura T, Matsuzawa T, Aoki R, Shimada S: Recruitment of plasmacytoid dendritic cells to skin regulates treatment responsiveness of actinic keratosis to imiquimod. *J Dermatol Sci.* 76(1):67-9, 2014
  - 12) Yamamoto S, Harada K, Ando N, Kawamura T, Shibagaki N, Tanaka M, Shimada S: Nodular melanoma on the hyponychium: clinical and dermoscopic features. *J Dermatol.* 41(3):277-8, 2014
  - 13) Shimizu T, Harada K, Akazawa S, Yamaguchi M, Inozume T, Kawamura T, Shibagaki N, Momosawa A, Shimada S: Identification of the cause of severe skin infection by Fournier transform infrared spectroscopy: a case of Fournier's gangrene caused by fish bone. *J Dermatol.* 41(6):547-50, 2014
  - 14) Inozume T, Nakazawa R, Tanaka K, Harada K, Kawamura T, Shibagaki N, Shimada S: A case of oral mucosal fixed eruption caused by methacrylate. *Contact Dermatitis.* 70(6):387-8. 2014
  - 15) Takaki M, Inozume T, Matsuzawa T, Ando N, Yamaguchi M, Harada K, Kawamura T, Shibagaki N, Shimada S: Case of primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, with characteristics of follicular helper T cells. *J Dermatol.* 41(6):529-32. 2014
  - 16) Harada K, Yamaguchi M, Kawamura T, Shibagaki N, Shimada S: A case of IgG4-related syndrome presenting with a fibroma molle-like nodule. *Int J Dermatol* In press
  - 17) Ahmed Z, Kawamura T, Shimada S, Piguet V: The role of human dendritic cells in HIV-1 infection, *J Invest Dermatol.* In press.
  - 18) M. Sugino., *et al.*, Safety prediction of topically exposed biocides using permeability coefficients and the desquamation rate at the stratum corneum. *J. Toxicol. Sci.*, **39**(3), 474-485 (2014).
  - 19) T. Uchida *et al.*, Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™, *Eur J Pharm Sci*, 67, 113-118 (2015).
  - 20) 松永佳世子. ロドデノール誘発性脱色素斑. *皮膚病診療.* 2015;37(1):6-13
  - 21) Nishigori C, Aoyama Y, Ito A, Suzuki K, Suzuki T, Tanemura A, Ito M, Katayama I, Oiso N, Kagohashi Y, Sugiura S, Fukai K, Funasaka Y, Yamashita T, Matsunaga K. Guide for medical professionals (i.e. derma-tologists) for the management of Rhodo-denol-induced leukoderma. *J Dermatol.* 2015;42:113-128.
  - 22) Sasaki M, Kondo M, Sato K, Umeda M, Kawabata K, Takahashi Y, Suzuki T, Matsunaga K and Inoue D. Rhododendrol, a depigmentation-inducing phenolic compound, exerts melanocyte cytotoxicity via a tyrosinase-dependent mechanism. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27(5):754-63.
  - 23) 松永佳世子. 化粧品による皮膚障害. *現代医学.* 2014;62(1): 101 -105.
  - 24) Tatebayashi M, Oiso N, Wada T, Suzuki K, Matsunaga K, Kawada A. Possible allergic contact dermatitis with reticulate postinflammatory pigmentation caused by hydroquinone. *J Dermatol.* 2014;41(7):669–670.
  - 25) Nakamura M, Yagami A, Hara K, Sano A, Kobayashi T, Aihara M, Hide M, Chinuki Y, Morita E, Teshima R, Matsunaga K. A new

- reliable method for detecting specific IgE antibodies in the patients with immediate type wheat allergy due to hydrolyzed wheat protein: correlation of its titer and clinical severity. *Allergol Int.* 2014;63(2):243-9.
- 26) Horita K, Tanoue C, Yasoshima M, Ohtani T, Matsunaga K. Study of the usefulness of patch testing and use test to predict the safety of commercial topical drugs. *J Dermatol.* 2014;41(6):505-13.
- 27) 青山裕美, 伊藤明子, 鈴木加余子, 鈴木民夫, 種村篤, 錦織千佳子, 伊藤雅章, 片山一朗, 杉浦伸一, 松永佳世子. ロドデノール誘発性脱色素斑症例における一次全国疫学調査結果. *日皮会誌.* 2014;124(11):2095-2109.
- 28) Kasamatsu S, Hachiya A, Nakamura S, Yasuda Y, Fujimori T, Takano K, Moriwaki S, Hase T, Suzuki T, Matsunaga K. Depigmentation caused by application of the active brightening material, rhododendrol, is related to tyrosinase activity at a certain threshold. *J Dermatol Sci.* 2014;76(1):16-24.
- 29) Kuroda Y, Takahashi Y, Sakaguchi H, Matsunaga K, Suzuki T. Depigmentation of the skin induced by 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol is spontaneously re-pigmented in brown and black guinea pigs. *J Toxicol Sci.* 2014;39(4):615-23.
- 30) Yagami A, Suzuki K, Morita Y, Iwata Y, Sano A, Matsunaga K. Allergic contact dermatitis caused by 3-o-ethyl-L-ascorbic acid (vitamin C ethyl). *Contact Dermatitis.* 2014;70(6):376-7.
- 31) 矢上 晶子, 松永 佳世子. 皮膚のアレルギーのトピックス. *皮膚と美容.* 2014;46(2).
- 32) 杉山真理子, 低刺激性製剤の開発, 化粧品安全・安心の科学 (シーエムシー出版) 26-35, 2014
- F-2. 学会発表
- 1) 小島 肇: シンポジウム II 「iPS 細胞技術の発展と創薬・治療への応用」動物実験代替法への iPS 細胞の応用, 第 21 回 HAB 研究機構学術年会 (2014.5) (東京)
- 2) 小島 肇: シンポジウム III 「化粧品および製薬開発における動物実験の世界的動向」EU における化粧品開発の現状と今後の動向, 日本実験動物科学技術さっぽろ 2014 (第 61 回日本実験動物学会総会, 第 48 回日本実験動物技術者協会総会) (2014.5) (札幌)
- 3) 小島 肇: 海外レギュレーションの最近の動向, 平成 26 年度日本環境変異原学会公開シンポジウム「レギュラトリーサイエンス」(2014.5) (東京)
- 4) 小島 肇: シンポジウム 2 「創薬を支援する先端培養技術: PKPD 予測に有用なヒト細胞の培養モデル」新しい評価体系構築に関する欧州の動向と日本の寄与, 日本組織培養学会 第 87 回大会 (2014.5) (東京)
- 5) Kojima H, Kleinstreuer N, Lim C.H., Sozu T, Watanabe M, Niitsuma T, Yamashita K, Fukuda T, Yamaguchi N, Fujiwara S, Yamaguchi H, Takezawa T: Pre-validation study of Vitrigel-EIT (Eye Irritancy Test) method (Vitrigel-EIT: 眼刺激性試験) 法のプレバリデーション研究, 日本組織培養学会 第 87 回大会 (2014.5) (東京)
- 6) 内野 正, 竹澤俊明, 山下邦彦, 小島 肇, 押方 歩, 石田誠一, 清水 久美子, 秋山卓美, 五十嵐 良明: THP-1 細胞のビトリゲル薄膜への接着性について, 日本組織培養学会 第 87 回大会 (2014.5) (東京)
- 7) 小島 肇: Vitrigel-model を活用した ADME/Tox 試験法の実用化構想, NIAS シンポジウム「再生医療, 創薬および動物実験代替法の分野における実用化を指向したコラーゲンビトリゲルビトリゲルの開発状況 (2014.5) (東京)
- 8) 小島 肇: OECD テストガイドラインナ



- ショナルコーディネーター会合報告,  
JEMS/MMS 研究会第 64 回定例会 (2014.6)  
(熱海, 静岡)
- 9) 小島 肇: シンポジウム“*in vitro* 毒性試験としての iPS 細胞利用の有用性と留意点”序論, 第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7) (神戸)
- 10) 岩瀬裕美子, 細井一弘, 尾上誠良, 若栗忍, 山本敏誠, 川上 哲, 松本康浩, 戸田嗣人, 大崎尚人, 高木広憲, 中村和市, 小島 肇: Reactive Oxygen Species (ROS) アッセイ他施設バリデーション: 総括と推奨プロトコール, 第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7) (神戸)
- 11) 伊藤浩太, 榊原隆史, 六川潤美, 古川正敏, 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度および透過性試験法 (BCOP 法) による化粧品・医薬部外品の眼刺激性の検討, 第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7) (神戸)
- 12) 山口宏之, 小島 肇, 竹澤俊明: Vitrigel-EIT 法: 経上皮電気抵抗値を指標とした高感度な *in vitro* 眼刺激性試験法, 第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7) (神戸)
- 13) 小島 肇: 動物実験代替法を用いた安全性評価とその問題点, 第 3 回加計学園コスメティックサイエンスシンポジウム (2014.7) (千葉)
- 14) 山口宏之, 小島 肇, 竹澤俊明: 新しい眼刺激性試験法: Vitrigel-Eye Irritancy Test (EIT) method, 日本動物実験代替法学会ワークショップ「日本発の動物実験代替法の現状」(2014.8) (東京)
- 15) Kojima H: Activities of JSAAE, The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, (2014.8) (Prague, Czech)
- 16) Kojima H, Nishikawa A: The Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM): Update, The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, (2014.8) (Prague, Czech)
- 17) Kojima H, Oshimura M, 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, The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, (2014.8) (Prague, Czech)
- 18) Kojima H, Spielmann H, Onoue S: The ROS *in vitro* phototoxicity assay for ICH, The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, (2014.8) (Prague, Czech)
- 19) Kojima H: Regulatory science panel discussion Human-on-a-chip - Advancing regulatory science through innovation and world wide networking for alternative testing, The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, (2014.8) (Prague, Czech)
- 20) Maruya A, Aiba S, Kimura Y, Watanabe M, Suzuki N, Saito K, Nakajima Y, Ohmiya Y, Kojima H, Tanaka N: Comparison of 3 criteria incorporating variation of index for toxicity of the interleukin 8 luciferase Luc assay (IL-8 Luc assay) , The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, (2014.8) (Prague, Czech)
- 21) Ikeda H, Katoh M, Omori T, Yamashita A, Endo M, Shinoda S, Hagiwara S, Kasahara T, Tahara H, Nakahara S, Akiyama S, Yoshitake Y, Kojima H: Additional joint research on eye irritation alternative method with human corneal model; LabCyte CORNEA-MODEL24, The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, (2014.8) (Prague, Czech)
- 22) Yamaguchi H, Kojima H, Takezawa T: Advantage of “Vitrigel-EIT (eye irritancy

- test) method”: a brief eye irritation test utilizing changes of barrier function after exposing chemicals to a human corneal epithelium model as an indicator, The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, (2014.8) (Prague, Czech)
- 23) Ono A, Takeyoshi M, Maeda Y, Suzuki N, Kojima N, Takeuchi S, Hong J.H, Lee H.S, Vinggaard A.M, Odum J, Laws S, Kojima H: An inter-laboratory validation study of an androgen receptor stably transfected transcriptional activation (AR STTA) assay for a new OECD test guideline, The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, (2014.8) (Prague, Czech)
- 24) Kimura Y, Watanabe M, Suzuki N, Saito K, Nakajima Y, Ohmiya Y, Omori T, Kojima H, Tanaka N, Aiba S: An inter-laboratory validation study of IL-8 Luc assay using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8, The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, (2014.8) (Prague, Czech)
- 25) Narita K, Kojima H, Itagaki H: Investigation of the use of THP-1 cells and IL-8 release to assess water-insoluble chemicals with the short time exposure test method, The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, (2014.8) (Prague, Czech)
- 26) Uchino T, Miyazaki H, Yamashita K, Kojima H, Oshikata-Miyazaki A, Takezawa T, Shimizu K, Akiyama T, Ikarashi Y: Development of skin sensitization test method using THP-1 cells cultured on a collagen vitrigel membrane chamber for oily materials, The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, (2014.8) (Prague, Czech)
- 27) Watanabe M, Sozu T, Niitsma T, Yamashita K, Fukuda T, Yamaguchi N, Fujiwara S, Yamaguchi H, Takezawa T, Kojima H: Pre-validation study of Vitrigel-EIT (Eye Irritancy Test) method, The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, (2014.8) (Prague, Czech)
- 28) 小島 肇: 実験動物代替法の現状と化学品メーカーの取り組み, 新科学技術推進協会 ライフサイエンス技術部会 材料分科講演会 (2014.9) (東京)
- 29) 小島 肇: 動物実験代替法開発の国内外の動向と化粧品・医薬部外品への代替法活用の現状について, 皮膚基礎研究クラスターフォーラム (2014.9) (東京)
- 30) 小島 肇: 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”について, 化粧品原料協会 講演会 (2014.10) (東京)
- 31) 小島 肇: JaCVAM 資料編纂委員会からの提言, ROS アッセイ技術講習会 (2014.10) (東京)
- 32) Kojima H: The International collaboration on developing alternative to animal testing in Japan, 2014 International Symposium on Cosmetic regulations (2014.10) (台北,台湾)
- 33) 小島 肇: 「動物実験代替法に関する国内外の動向」～動物実験禁止の国際社会での広がりについて～, 新潟大学 慰霊祭特別講演 (2014.11) (新潟)
- 34) Kojima H: Cases of OECD Guideline development by JaCVAM, 11th Annual meeting of KSAAE (2014.11) (Cheongju, Korea)
- 35) Kojima H: Safety evaluation using alternative methods for quasi drug & cosmetic products in Japan, Progress on replacement of animals for cosmetic testing and other issues (2014.11) (Baltimore, USA)
- 36) 小島 肇: 三次元生体組織構築への期待と課題, 第三回三次元生体組織構築公開

シンポジウム (2014.12) (大阪)

- 37) 小島 肇: シンポジウム 1 「医薬部外品申請において動物実験代替法を活用するためにーガイダンス検討会活動の紹介ー」ガイダンス検討会発足の趣旨, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会 (2014.12) (横浜)
- 38) 山影康次, 鈴木紀之, 斎藤幸一, 渡部美香, 池田直弘, 柳 和則, 大森 崇, 小島肇, 田中憲穂: シンポジウム 2 「化学物質の「安全の保証」に向けてー安心・安全に向けた化学業界の取り組みー」産業利用促進を目指した新規 *in vitro* 発生毒性試験の応用研究, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会 (2014.12) (横浜)
- 39) 加藤義直, 山本直樹, 五十嵐敏夫, 佐藤淳, 中田 悟, 小島 肇: 不死化ヒト角膜細胞株 (iHCE-NY) を用いた三次元角膜再構築モデルにおける眼刺激性評価方法の検討 ~画像解析による判定法の開発~, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会 (2014.12) (横浜)
- 40) 山口宏之, 小島 肇, 竹澤俊明: Vitrigel-EIT 法 (経上皮電気抵抗値を指標とした高感度な *in vitro* 眼刺激性試験法) による予測性の特徴, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会 (2014.12) (横浜)
- 41) 遠藤麻衣, 加藤雅一, 大森 崇, 山下愛未, 小島 肇, 笠原利彦, 田原春菜, 篠田伸介, 萩原沙織, 池田英史, 吉武裕一郎: LabCyte CORNEA-MODEL 眼刺激性試験法における生細胞率測定方法の比較, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会 (2014.12) (横浜)
- 42) 渡辺美香, Kleinstreuer Nicole C., Schaeffer Michael, Kim Tae Sung, Chen Wannhsin, 寒水孝司, 新妻 健, 山下邦彦, 宮崎 洋, 福田隆之, 山口典子, 藤原 聖, 山口宏之, 竹澤俊明, 小島 肇: Vitrigel-EIT (Eye Irritancy Test) 法のバリデーション研究 (2), 日本動物実験代替法学会第 27 回大

会 (2014.12) (横浜)

- 43) 丸谷あおい, 相場節也, 木村 裕, 渡辺美香, 鈴木紀之, 山影康次, 斎藤幸一, 中島芳治, 近江谷克裕, 山崎晶次郎, 小島肇, 田中憲穂, 坂口 斉, 板垣 宏, 小林真弓, 森 梓, 大森 崇: IL-8 Luc assay におけるばらつきを考慮した 3 つの判定基準の検討, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会 (2014.12) (横浜)
- 44) 木村 裕, 渡辺美香, 鈴木紀之, 岩城知子, 山影康次, 斎藤幸一, 中島芳治, 藤村千鶴, 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 27 回大会 (2014.12) (横浜)
- 45) 成田和人, 小島 肇, 板垣 宏: *in vitro* 皮膚感作性試験における難水溶性物質短時間暴露の検討, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会 (2014.12) (横浜)
- 46) 内野 正, 宮崎 洋, 山下邦彦, 小島 肇, 竹澤俊明, 山口典子, 中村 牧, 高石雅之, 秋山卓美, 五十嵐良明: ビトリゲルチャンバーを用いた皮膚感作性試験代替法 (Vitirigel-SST 法) の改良, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会 (2014.12) (横浜)
- 47) 宮崎 洋, 山下邦彦, 内野 正, 小島 肇, 竹澤俊明: ビトリゲルチャンバーを用いた皮膚感作性試験代替法 (Vitirigel-SST 法) による感作性物質の評価, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会 (2014.12) (横浜)
- 48) 小島 肇, 西川秋佳: JaCVAM の昨今活動とその将来, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会 (2014.12) (横浜)
- 49) 小島 肇: Human/Organs-On-A-Chip 研究開発への期待と懸念, シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来 (2015.1) (東京)
- 50) 川村龍吉: トランスレーショナル・リサーチ in 山梨 第 30 回日本臨床皮膚科医会総会 横浜市, 2014

- 51) 川村龍吉:CCR5 阻害薬 Maraviroc 内服による表皮内ランゲルハンス細胞の HIV-1 感染性への影響 第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士吉田市、2014
- 52) 川村龍吉:教育講演 一次刺激性接触皮膚炎の臨床および病態 第 113 回日本皮膚科学会総会、京都市、2014
- 53) 川村龍吉:皮膚ヘルペス感染における宿主自然免疫応答の役割 第 113 回日本皮膚科学会総会、京都市、2014
- 54) 川村龍吉:日光角化症の基礎と臨床 日光角化症フォーラム、筑波市、2014
- 55) 川村龍吉:HIV 感染初期におけるランゲルハンス細胞の免疫学的役割 エイズ予防財団主催第 16 回白馬シンポジウム in 熊本、熊本市、2014
- 56) 川村龍吉:理研シンポジウム亜鉛欠乏による皮膚炎の発症メカニズム 第 25 回日本微量元素学会、岡山市、2014
- 57) 川村龍吉:亜鉛と皮膚 第 131 回浦安皮膚臨床懇話会、浦安市、2014
- 58) 川村龍吉:ヘルペス感染症の病態と治療の最前線 第 1 回西三河皮膚疾患トピックス 2014、三河市、2014
- 59) 川村龍吉:亜鉛欠乏による皮膚炎発症メカニズム 第 21 回日本免疫毒性学会、三河市、2014
- 60) 川村龍吉:教育講演 接触皮膚炎のトピックス 第 78 回日本皮膚科学会東部支部学会、青森市、2014
- 61) 川村龍吉:亜鉛と皮膚疾患—トランスレーショナルリサーチの実践— 東北 Skin Immunology Update、仙台市、2014
- 62) 川村龍吉:皮膚ウイルス感染と自然免疫 第 27 回多摩アレルギー懇話会、東京、2014
- 63) 川村龍吉:亜鉛と皮膚疾患 横浜市皮膚科医会 第 139 回例会、横浜、2014
- 64) 川村龍吉:ヘルペス感染症 Up-to-date 第 5 回 Tokyo skin seminar、東京、2014
- 65) 川村龍吉:亜鉛欠乏による皮膚炎の発症メカニズム 2014 年度 生理学研究所研究会、名古屋、2014
- 66) 川村龍吉:HIV 感染の予防とウイルスの除去を目指した戦略を考える Langerhans 細胞における感染 第 28 回日本 AIDS 学会、大阪、2014
- 67) 川村龍吉:JSID 賞受賞講演 The Role of Langerhans Cells in Acrodermatitis Enteropathica and HIV Infection 第 39 回日本研究皮膚科学会、大阪、2014
- 68) Sayumi Kanai<sup>1</sup>, Takashi Uchida<sup>2</sup>, Wesam R. Kadhum<sup>1</sup>, Hiroaki Todo<sup>1</sup>, Kenji Sugibayashi<sup>1</sup>, Usefulness of Strat-M<sup>TM</sup> for prediction of human skin permeation of chemical compounds, <sup>1</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Josai University, <sup>2</sup>Kao Corporation, 3<sup>rd</sup> International conference nutraceutical and cosmetic sciences, 2014 年 11 月, Shinjuku.
- 69) 金井 沙由美、Wesam R. Kadhum、Konstanty Wierzba、藤堂 浩明、杉林 堅次、化学物質のヒト皮膚透過予測における Strat-M<sup>TM</sup> の有用性、城西大学 薬学部、日本薬学会 第 135 年会、2015 年 3 月、神戸.
- 70) Matsunaga K. What we can learn and share about contact allergens from this session. EADC 2014 3rd Eastern Asia Dermatology Congress, International convention center Jeju. 2014.9.24-26. Korea.
- 71) Matsunaga K. Contact dermatitis in Asia-The Japanese experience. Focus session "Contact dermatitis, a global approach. Which is the status in different parts of the world". 12th Congress of the European Society of Contact Dermatitis (ESCD). PALAU DE CONGRESSOS DE CATALUNYA. Bar-celona. 2014.6.25-6-28. Barcelona, Spain.

- 72) Nakamura M, Yagami A, Matsunaga K. Antigen in Glupearl 19S were developed by acid-heat treatment. American Association of Asthma, Allergy and Immunology Annual Meeting 2015, Feb. 20-24, 2015.
- 73) Yagami A, Suzuki K, Nakamura M, Sano A, Arima M, Iwata Y, Kobayashi T, Hara K, Matsunaga K. Clinical analysis of immediate hypersensitivity to hydrolyzed wheat proteins in soap. American Association of Asthma, Allergy and Immunology Annual Meeting 2015, Feb. 20-24, 2015.
- 74) 松永佳世子. 女性医師支援を進める実践プログラム. 第 64 回日本泌尿器学会中部総会. アクトシティ浜松. 2014.10.17-10.19. 静岡.
- 75) 松永佳世子. 皮膚科医から見た化粧品安全性の現状と安全性確保のための提案. 日本化粧品学会. 第 39 回教育セミナー. ヤクルトホール. 2014.10.17. 東京.
- 76) 矢上晶子, 鈴木加余子, 佐野晶代, 森田雄介, 小林東, 岩田洋平, 松永佳世子. 別々の美白化粧品によりアレルギー性接触皮膚炎と脱色素斑を含有した一例. 第 269 回日本皮膚科学会 東海地方会. 大正製薬(株)名古屋支店. 2014.9.21. 愛知.
- 77) 伊藤紫, 村手和歌子, 佐々木良輔, 鈴木加余子, 松永佳世子. CPK の著明な高値を認めたマムシ咬症の 1 例. 第 269 回日本皮膚科学会 東海地方会. 大正製薬(株)名古屋支店. 2014.9.21. 愛知.
- 78) 松永佳世子. 産官学連携「化粧品等皮膚安全性症例情報ネット」. 第 44 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会 学術大会. 都市センターホテル. 2014.11.22. 東京.
- 79) 松永佳世子. エクオールと皮膚. 第 29 回日本女性医学学会学術集会. 都市センターホテル. 2014.11.1. 東京.
- 80) 佐野晶代, 矢上晶子, 山北高志, 小林東, 岩田洋平, 有馬豪, 鈴木加余子, 山田雅啓, 松永佳世子. 最近経験したラテックスアレルギーの 3 例. ラテックスアレルギー・OAS フォーラム 2014, 第 19 回日本ラテックスアレルギー研究会. 一橋大学一橋講堂. 2014.7.27. 東京.
- 81) 松永佳世子, 鈴木加余子, 矢上晶子, 秋田浩孝, 佐野晶代, 田中紅. ロドデノール誘発性脱色素斑 111 例と他の美白剤等による脱色素斑が疑われた 21 例の臨床像と治療経過. 第 32 回日本美容皮膚科学会学術大会. 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート. 2014.7.12-7.13. 千葉.
- 82) 松永佳世子, 矢上晶子, 中村政志, 佐野晶代, 小林東. グルパール 19S 経皮感作による全身性コムギアレルギーの全国調査小児例 35 例の疫学調査と免疫学的検査結果のまとめ. 第 38 回日本小児皮膚科学会. セルリアンタワー東急ホテル. 2014.7.5-7.6. 東京.
- 83) 鈴木加余子, 伊藤紫, 西和歌子, 佐々木良輔, 佐野晶代, 矢上晶子, 松永佳世子. 当院 ICU で入院治療を要したアナフィラキシー患者 (小児例を除く) のまとめ. 第 268 回日本皮膚科学会 東海地方会. 大正製薬名古屋支店. 2014.6.8. 愛知.
- 84) 齋藤健太, 矢上晶子, 山北高志, 佐野晶代, 小林東, 沼田茂樹, 安藤亜紀, 松永佳世子. 経皮感作による魚アレルギーの 1 例. 第 268 回日本皮膚科学会東海地方会. 大正製薬名古屋支店. 2014.6.8. 愛知.
- 85) 松永佳世子. 化粧品における最近の健康被害例と課題. 第 39 回日本化粧品学会. 有楽町朝日ホール. 2014.6.5-6. 東京.
- 86) 松永佳世子. 加水分解コムギ含有石鹼とロドデノール含有化粧品に学ぶ職業アレルギーの新たな課題. 第 87 回日本産業衛生学会. 岡山コンベンションセンター. 2014.05.23. 岡山.

- |  |   |
|--|---|
| <p>87) 矢上晶子, 松永佳世子. 経皮感作による食物アレルギーの病態と治療. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 国立京都国際会館. 2014.5.9-5.11. 京都.</p> <p>88) 佐野晶代, 矢上晶子, 小林東, 中村政志, 有馬豪, 岩田洋平, 松永佳世子. 小麦依存性運動誘発アナフィラキシー37 例の臨床経過と小麦関連 IgE の経時的変化. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 国立京都国際会館. 2014.5.9-5.11. 京都.</p> <p>89) 杉山真理子, 化粧品 (医薬部外品) の安全性評価に関するガイドランス作成活動について, 第 3 回株式会社化合物安全性研究所 学術講演会 生物学的安全性評価の新たな動向について, 2014/3/7.</p> <p>90) 中田美奈子, 稲田理恵, 杉山真理子, 武岡永里子, 鈴木 裕美子, 鷺崎久美子, 敏感肌の皮膚刺激感受性の検討, 第 39 回日本化粧品学会,2014/6/5.</p> <p>91) 杉山真理子, 化粧品、医薬部外品の安全性評価における皮膚刺激性試験代替法の課題と今後の展望, 皮膚基礎研究クラスターフォーラム, 2014/9/6.</p> <p>92) 杉山真理子, 今井教安, 大森崇, 藤堂浩明, 豊田明美, 杉林堅次, 萩野滋延, 皮膚刺激性代替法特別委員会検討経緯報告, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会, 2014/12/5.</p> <p>93) 杉山真理子, 皮膚刺激性試験代替法の課題と今後の展開, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会, 2014/12/5</p> <p>94) 今井教安, 岡本裕子, 杉山真理子, <i>in vitro</i>3T3 NRU 光毒性試験ガイドランス作成のポイント, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会, 2014/12/5</p> | <p>2. 実用新案登録<br/>なし</p> <p>3.その他<br/>なし</p> |
|--|---|

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし