

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 年度分担研究報告書

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－

研究分担者 小島 肇
国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

動物試験代替法の開発または改良に関して、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の改良を検討した。また、安価で簡便かつ、弱い眼刺激性を評価できる3次元角膜再構築モデルを用いた眼刺激性代替法の開発を目指した。

本年度は、BCOPについては弱い眼刺激性および無刺激性物質をリストアップし、共同研究機関である化合物安全性研究所にてデータが求められた。3次元構築ヒト角膜モデルを用いた眼刺激性試験代替法については、被験物質の適用および評価法に関するプロトコルを固めることができた。

キーワード：眼刺激性試験、バリデーション、動物実験代替法

研究協力者

山本直樹 藤田保健衛生大学
共同利用研究施設 准教授
加藤義直 日本メナード化粧品株式会社
研究員
佐藤 淳 日本メナード化粧品株式会社
主幹研究員
古川正敏 株式会社化合物安全性研究所
研究員
伊藤浩太 株式会社化合物安全性研究所
研究員

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、昨年と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、眼刺激性試験代替法の開発、改良を検討するものである。具体的には、1)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の改良を行った。2)安価で簡易に弱い眼刺激性を評価できる3次元角膜再構築モデルを用いた眼刺激性試験代替法の開発を実施した。この理由として、現行の眼刺激性試験代替法では、強眼刺激性または無眼刺激性の分類にしか評価できず、弱眼刺激性を有するものの強さを分類できず、これらの代替法の開発が必要なことによる。

B. 研究方法

B-1. 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¹⁾。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、共同研究機関である化合物安全性研究所にてデータが求められた。

B-2. ヒト角膜由来細胞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²⁾。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³⁾、この細胞を用いた3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要が提示された。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要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、以下の点で被験物質の適用および評価法に関するプロトコルの改良を実施した。

B-2.1. 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-2.2. 洗浄方法の検討

Tween20を十分に除去する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回実施した。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 50μL から 25 μL 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-2.3. 後培養期間の検討

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 (25μL)、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-2.4. 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。

(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. 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(表 1)。さらに、平成 26 年 9 月には無刺激性の 15 物質を送付した(表 2)。

表 1. BCOP データのない弱い眼刺激性物質のリスト

| NO. | Chemical Name | CAS | GHS | EPA |
|-----|---|------------|-----|-----|
| 1 | 1-(2-propoxy-1-methylethoxy)-2-propanol | 29911-27-1 | 2B | III |
| 2 | 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone | 83-72-7 | 2B | III |
| 3 | 2-methyl-1-pentanol | 105-30-6 | 2B | III |
| 4 | 3,3-dithiodipropionic acid | 1119-62-6 | 2B | II |
| 5 | 3-chloropropionitrile | 542-76-7 | 2B | III |
| 6 | 4-nitrobenzoic acid | 62-23-7 | 2B | III |
| 7 | Cyclopentanol | 96-41-3 | 2B | II |
| 8 | Camphene | 79-92-5 | 2B | III |
| 9 | diethyl toluamide | 134-62-3 | 2B | III |
| 10 | ethyl 2,6-dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropionate | 96568-04-6 | 2B | III |
| 11 | glycolic acid | 79-14-1 | 2B | III |
| 12 | Isobutyraldehyde | 78-84-2 | 2B | III |
| 13 | isopropyl acetoacetate | 542-08-5 | 2B | III |
| 14 | monoethanolamine | 141-43-5 | 2B | III |
| 15 | n-butanal | 123-72-8 | 2B | III |
| 16 | propylene glycol propyl ether | 1569-01-3 | 2B | III |
| 17 | sodium chloroacetate | 3926-62-3 | 2B | III |

表 1 に示す物質を実験した結果、17 物質の中で No.10: Ethyl 2,6-dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropionate の IVIS (In vitro irritancy score)*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。

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

表 2. BCOP データのない無眼刺激性物質リスト

| NO. | Chemical Name | CAS | GHS | EPA |
|-----|---|-------------|-----|-----|
| 18 | 1-(9H-carbozol-4-yloxy)-3-[[2-(2-methoxy phenoxy)ethyl] amino]-2-propanol | 72956-09-3 | No | IV |
| 19 | 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate | 342573-75-5 | No | III |
| 20 | 2-(2-hydroxy-3-(trimethylammonio)propoxy) ethyl ether chloride | 68610-92-4 | No | III |
| 21 | 2,2'-methylene-bis-(6-(2Hbenzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol) | 103597-45-1 | No | IV |
| 22 | 2,4-dimethyl-3-pentanol | 3970-62-5 | No | III |
| 23 | 3,3-dimethylpentane | 562-49-2 | No | IV |
| 24 | 3,4-dimethoxy benzaldehyde | 120-14-9 | No | III |
| 25 | 3-methyl-1,5-di(2,4-xylyl)-1,3,5-Triazapenta-1,4-dien | 33089-61-1 | No | IV |
| 26 | 4,4'-methylenebis(2,6-di-tert-butylphenol) | 118-82-1 | No | IV |
| 27 | glycidyl methacrylate | 106-91-2 | No | III |
| 28 | isopropyl myristate | 110-27-0 | No | IV |
| 29 | methyl amyl ketone (2-heptanol) | 110-43-0 | No | III |
| 30 | n,n-dimethylguanidine sulfate | 598-65-2 | No | III |
| 31 | polyethylene hydrogenated caster oil (40E.O.) | 61788-85-0 | No | IV |
| 32 | sodium hydrogensulfite | 7631-90-5 | No | III |

表 2 に示す無刺激性物質の検討も現在進行中である。

C-2. ヒト角膜由来細胞を用いた眼刺激性試験代替法の開発

C-2.1. 被験物質適用条件や前処理方法の検討

表3に示すように、検討した条件の中では、希

釈ではなく、直接適用が実用的かつ有用であった。

表 3. 被験物質適用条件や前処理方法の検討

| No. | 適用条件 | 結果 |
|-----|-----------------------------------|---|
| 1 | 直接適用 (これまでの方法) | Tween 20が正しく評価できない。エタノールは後培養することにより回復する可能性がある。 |
| 2a | 生理食塩水を適用した後、同量の被験物質を適用 | Tween 20は後培養する事により正しく評価できる可能性あるが、エタノールは正しく評価できていない。生理食塩水とPBSに大きな差は無い。 |
| 2b | PBSを適用した後、同量の被験物質を適用 | |
| 3 | 50%被験物質水溶液を適用 | Tween 20は後培養によって正しく評価できる可能性あるが、エタノールは正しく評価できていない。 |
| 4a | 培養液 (牛血清無) を1時間適用後、培養液除去後に被験物質を適用 | Tween 20が正しく評価できない。エタノールは後培養する事により回復する可能性がある。血清 (5% FBS) の有無による違いは感じられない。 |
| 4b | 培養液 (牛血清有) を1時間適用後、培養液除去後に被験物質を適用 | |

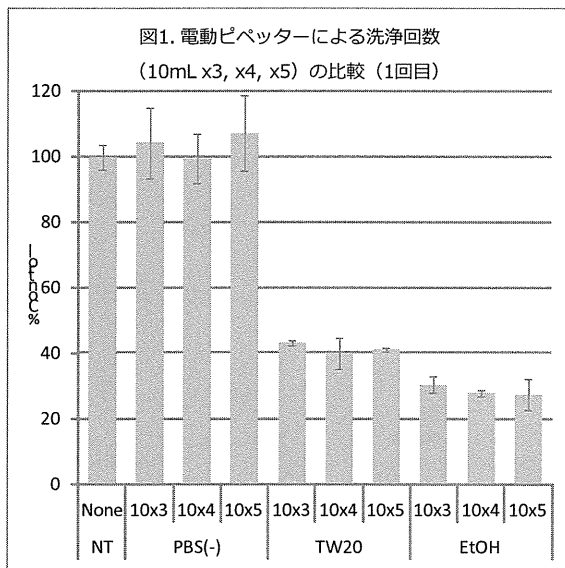
C-2.2. 洗浄方法の検討

洗浄回数を1回から3回と増やすと、Tween20の生存率が上昇した。エタノールについては変化がなかった。

吐出強度 (強・弱) は生存率に大きな違いはなかった。エタノール適用後の強い洗浄において、細胞の剥れを生じる場合があった。

以上の結果から、図1に示すように、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。

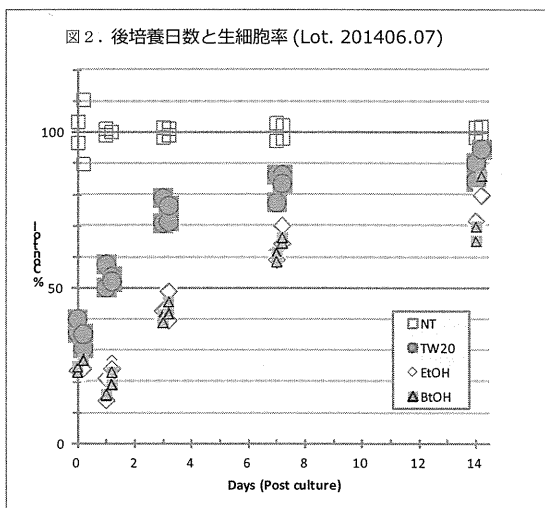


C-2.3. 後培養期間の検討

図2に示すように、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(データなし)。

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-2.4. 画像処理による生細胞面積率検出方法の検討

図3に示すように、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)。画像処理面積25%と50%では、見た目を極端に二値化していた。

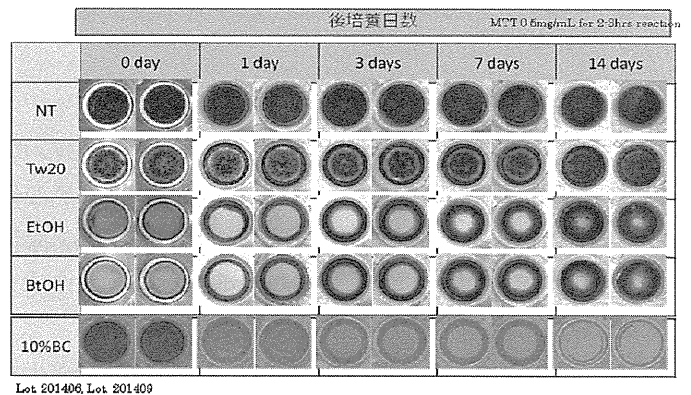


図3. MTT試験後のホルマザン呈色状態

一方、図4に示すように、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。

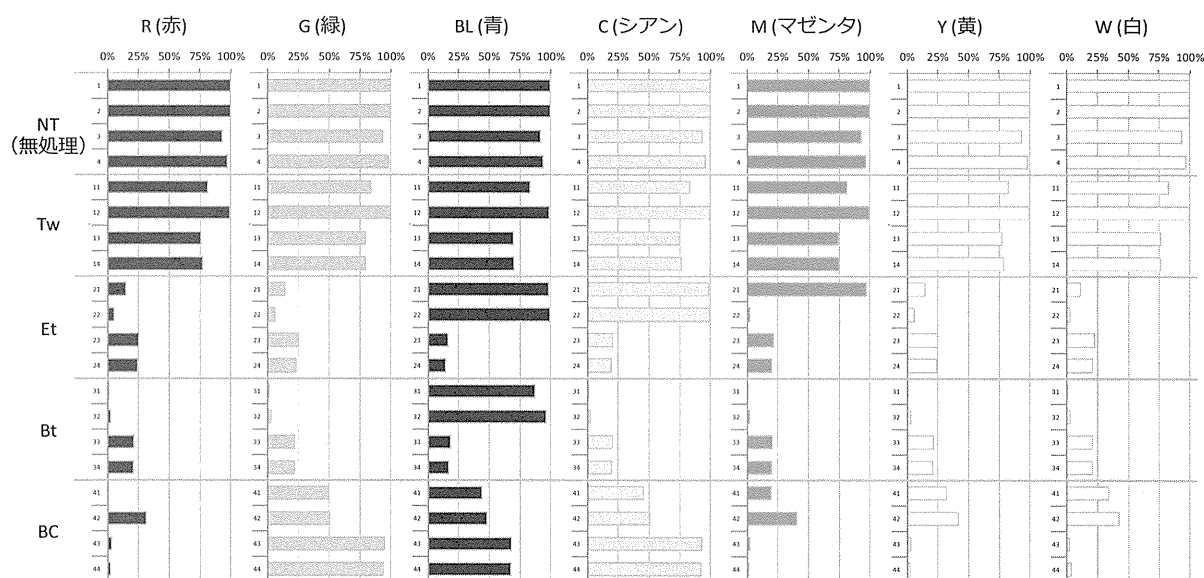


図4. モデルに各被験物質を適用し、MITアッセイを行った後の呈色状態画像から7色成分に分けて二値化処理を行って得られた面積率

D. 考察

BCOPの実験はまだすべてが終了しておらず、結果の解析は済んでいない。病理組織学的な検討と組合せにより、偽陽性が少なく弱い眼刺激性が検出できる手法の検討を進めていく予定である。

ヒト角膜由来細胞を用いた眼刺激性試験代替法においては、被験物質の適用法、洗浄方法の改良、後培養の実施、画像処理法の追加によって、被験物質の適用および評価法に関するプロトコルの種々の条件を固めることができた。今後本プロトコルを用いて、強・弱・無眼刺激性物質数を追加していく予定である。

E. 結論

E-1. 代替法の開発、改良

E-1-1. BCOP の改良

BCOP に病理学的な解析を組合せ、弱い眼刺激性および無刺激性物質の評価を継続している。

E-1-2. ヒト角膜由来細胞を用いた眼刺激性試験代替法の開発

3次元構築ヒト角膜モデルを用いた眼刺激性試験代替法のプロトコルを固めることができた。

F. 参考文献

- 1) OECD test guideline (2014) 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)
- 2) Yamamoto N, Kojima H *et al.* In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal. 46, 774-780, 2010.
- 3) 厚生労働科学研究成果データベース 文献番号201235001B

G. 研究発表

G-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、エマルジ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)

G-2. 口頭発表

- 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, 中村和希, 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粧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 quai 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－ガイダンス検討会活動の紹介－」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－安心・安全に向けた化学業界の取り組み－」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, 小林眞弓, 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, 中島芳浩, 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)

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. 添付文書

特になし

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 年度分担研究報告書

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－

研究分担者 小島 肇
国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

動物試験代替法のバリデーションおよび第三者評価に関して、眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS : TEA法のバリデーション報告書をまとめた。この報告書とともに、バリデーションが終了した皮膚感作性試験代替法IL-8 Lucアッセイのバリデーション報告書の国際的な専門家による第三者評価が実施された。

一方、3次元角膜モデルLabCyte CORNEA-MODEL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ばらつきに関する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。

また、試験法の普及として、眼刺激性試験および眼刺激性試験代替法ニワトリ摘出眼球試験 (Isolated Chickine Eye: ICE) のガイダンスを作成した。

キーワード：眼刺激性試験、バリデーション、動物実験代替法

研究協力者

加藤雅一 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (J-TEC) 株式会社
研究開発部 ラボサイトクラスター 主幹研究員
簾内桃子 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
薬理部 主任研究員
大森 崇 同志社大学文化情報学部
准教授
杉山真理子 日本化粧品工業連合会
動物実験代替法部会長
長 由美子 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 一般薬等審査部

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を目的とし、バリデーショおよび第三者評価を実施するものである。具体的には、1) 眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS:TEA 法のバリデーショおよび第三者評価を実施した、2) 皮膚感作性試験代替法 IL-8 Luc アッセイの第三者評価を実施した、3) ヒト角膜モデル LabCyte CORNEA-MODEL を用いた眼刺激性試験代替法のプレバリデーショを実施した。また、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。これらを通して、代替法を用いた安全性評価が普及・促進することを目指した。

B. 研究方法

B-1. SIRC-CVS: TEA法のバリデーショ

B-1-1. バリデーショ実行委員会

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
（NTP Interagency Center for the
Evaluation of Alternative Toxicological
Methods:NICEATM/Interagency
Coordinating Committee on the Validation
of Alternative Methods: ICCVAM）

B-1-2. 試験責任者（参加施設）

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

B-1-3. 試験法

SIRC-CVS:TEA法は被験物質の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を測定する方法である。Crystal Violet Staining法（CVS）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（TEA）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。

B-1-4. バリデーショの経緯

昨年度までに実施されたPhase IIIバリデーショは平成25年3月～7月に終了し、平成25年9月に実験の終了がバリデーショ実行委員会宣言された。その後、バリデーショ報告書がまとめられた。

B-2. SIRC-CVS：TEA法の第三者評価

B-2-1. 第三者評価委員

委員リストを表1に示す。

表1. SIRC-CVS:TEA法の第三者評価委員リスト

| No. | Name | Affiliation | Country |
|-----|--------------------|--|-------------------|
| 1 | Sebastian Hoffmann | seh consulting + services | Germany |
| 2 | Chantra Eskes | Services & Consultation on Alternative Methods | Switzerland |
| 3 | Tae Cheon Jeong | Yeungnam University | Republic of Korea |
| 4 | Tadashi Kosaka | The Institute of Environmental Toxicology | Japan |
| 5 | Sanae Takeuchi | P&G Innovation Godo Kaisha | Japan |
| 6 | Jill Merrill | U.S. Food and Drug Administration | USA |

B-2-2. スケジュール

平成27年2月にバリデーショ報告書が各委員に配布され、第三者評価が開始された。第一回対面会議を3月3～5日に神戸で開催した。

B-2-3. 第三者評価のために用意した質問

OECD ガイダンス文書 No.34 には以下のような記載がある³⁾。

評価のために、提案されている個々の用途に関し、試験法の有用性や限界についての新たな見解を引き出すような問題点を提起するものでなければならない。すべてのバリデーション基準を考察するとともに、プロトコルや判定基準に関する見解を提示する必要がある。第三者評価委員会は本来の用途における試験法の性能（すなわち、正確性と信頼性）の適性について見解を提示する。評価は完全かつ客観的であり、信頼性の高いものでなければならない。

- 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

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 the human effect, a clear statement of scientific need and regulatory application (試験法の科学的、規制の上での妥当性)

質問 2 : The toxicological mechanisms and the relationship between the test method endpoint(s) with the biological effect as well as 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 : 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 peer 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)

質問 13 : Completeness of all data and documents supporting the assessment of the validity of the test method should be available for peer review (すべてのデータおよび書類は第三者評価のために有用であったか)

質問 14 : Validation Study Management and conduct (バリデーション試験の管理と実施)

質問 15 : Other consideration (その他)

B-3. IL-8 Lucアッセイの第三者評価

B-3-1. 第三者評価委員

委員リストを表2に示す。

表2. IL-8 Luc アッセイ第三者評価委員リスト

| No. | Name | Affiliation | Country |
|-----|-----------------------|--|----------------------|
| 1 | David Basketter | DABMEB Consultancy Ltd | UK |
| 2 | Sebastian Hoffmann | seh consulting + services | Germany |
| 3 | Chantra Eskes | Services & Consultation on Alternative Methods | Switzerland |
| 4 | Kyung-Min Lim | College of Pharmacy, Ewha Womans University | Republic of Korea |
| 5 | Naohisa Tsutsui | Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation | Japan |
| 6 | Masahiro Takeyoshi | Chemicals Evaluation and Research Institute | Japan |
| 7 | Joanna Matheson | Consumer Product Safety Commission (CPSC) | USA |
| 8 | Darrell Boverhof | Dow Chemical Company | USA |

B-3-2. スケジュール

平成27年2月にバリデーション報告書が各委員に配布され、第三者評価が開始された。第一回対面会議を3月5~7日に神戸で開催した。

B-3-3. 第三者評価のために用意した質問

B-2-3と同様であることから割愛した。

B-4. LabCyte CORNEA-MODELを用いた眼刺激性試験代替法の共同研究

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くなっていること、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として評価基準を変更し（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追加共同研究（プレバリデーション）を実

施した。

B-4-1. 参加施設

以下に示す3施設が参加した。

- 1) 池田 英史（日本コルマー株式会社）
- 2) 篠田伸介、萩原沙織（株式会社薬物安全性試験センター）
- 3) 笠原利彦、田原春菜（富士フイルム株式会社）

B-4-2. 試験法

3次元培養角膜モデル LabCyte CORNEA-MODELに対し、

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、後培養する。

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する。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する。

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 ≤ 吸光度測定値（平均） ≤ 2.0
- ✓ 陽性対照が刺激性の判定
生細胞率平均 ≤ 40%
- ✓ 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 ≤ 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40%以下の場合に「眼刺激性」、それ以外の場合には「非眼刺激性」と判定した。

3) 前回からの主なプロトコル改訂点および達成目標

- WST-8の反応条件を振とう培養と明記し、設定例を例示した。
- 陰性対照の吸光度がOD0.7以上となること

- ・陰性対照のばらつきを改善すること

B-4-3. 被験物質

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被験物質を使用した。表3に物質名を示す。

表3 使用した物質

| NC(L) | 液体陰性対照(PBS) | NC(S) | 固体陰性対照(無処置) |
|----------|---------------------------|---------|--------------------------|
| PC(L) | 液体陽性対照(Ethanol) | PC(S) | 固体陽性対照(Lauric acid) |
| Liquid B | 3-Methoxy-1,2-propanediol | Solid H | Sucrose Fatty Acid Ester |
| Liquid D | Glycerol | Solid I | Silicic acid |

B-4-4. 実施期間

実験は平成26年4月～7月の間に実施された。

結果は同志社大学に集められ、コードを開示して解析がなされた。

すべての記録は国立医薬品食品衛生研究所に集められ、実験が妥当に実施されたかを確認した。

B-5. ガイダンス

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摘出眼球試験 (Isolated Chicken Eye: ICE) のガイダンス案について検討した。本ガイダ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ダンスとした。

(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. SIRC-CVS : TEA 法のバリデーション

バリデーション報告書は平成27年2月に完成した(添付資料1)。結論を以下に示す。

眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS 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 (TEA) 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。UN GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) および US EPA (United States Environmental Protection Agency) 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 物質で行い、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) UN GHS 基準と比較したところ、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。なお、UN EPA カテゴリーの場合もほぼ同様の結果が得られた。

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-2. SIRC-CVS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、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。具体的な質問および回答を添付資料2に示した。

第三者評価者の主な質問が開発者およびバリデーション実行委員会にあった主な指摘内容を以下に記す。

- 1) バリデーション報告書の大幅な改訂が必要である。
- 2) プロトコルの改訂が必要である。
- 3) 予測性を向上させるために、分子量180以上を適用限界とする科学的な根拠を明確にすべきである。
- 4) その上で開発者の結果とバリデーション結果を用い、予測性を再解析すべきである。

結論は、改訂されたバリデーション報告書やプロトコルをまとめてまとめられることになった。

C-3. 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、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。第三者評価者の主な質問が開発者およびバリデーション実行委員会にあった主な指摘事項を以下に記す（添付資料3）。

- 1) バリデーション報告書の記載内容がやや不十分である。
- 2) 成功基準を盛り込んだプロトコルの改訂が必要である。
- 3) 施設内再現性結果が不十分である。追加実験を考慮してほしい。
- 4) 強い感作性物質を評価できていない物質がある。適用限界を明確にしてほしい。
- 5) 適用限界を改善できる培養液人口添加物を用いた追加試験結果を要求する。

結論は、改訂されたバリデーション報告書やプロトコルを待つてまとめられることになった。

C-4. LabCyte CORNEA-MODELを用いた眼刺激性試験代替法の共同研究

図1~6に示すように、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（添付資料4）。

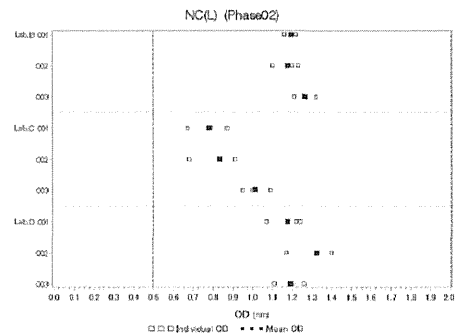


図 1：液体の陰性対照の吸光度測定値と吸光度測定値平均

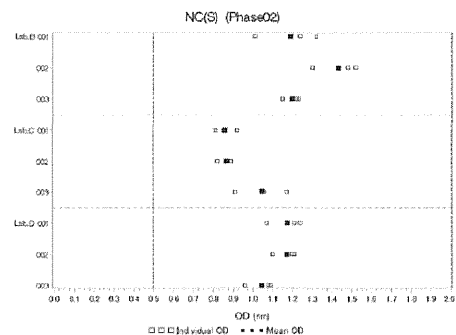


図 2：固体の陰性対照の測定値と吸光度測定値平均

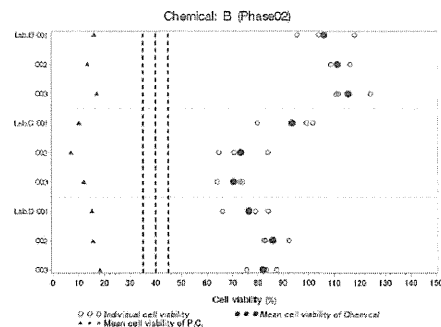


図 3：Liquid B の 1 組織生細胞率と生細胞率平均、および陽性対照の生細胞率平均

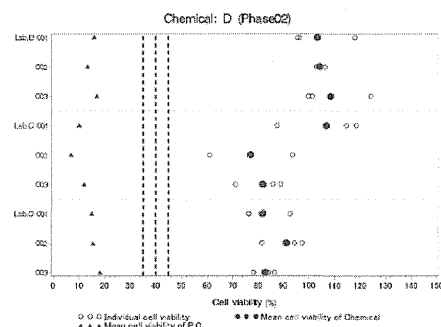


図 4：Liquid D の 1 組織生細胞率と生細胞率平均、および陽性対照の生細胞率平均

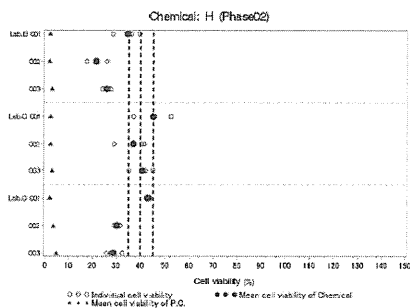


図 5 Solid H の 1 組織生細胞率と生細胞率平均、および陽性対照の生細胞率平均

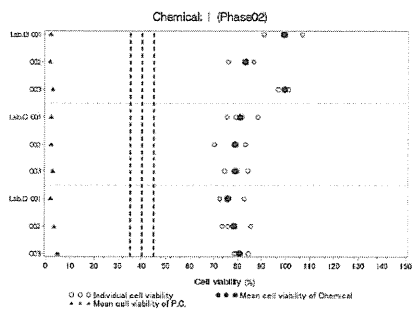


図 6 : Solid I の 1 組織生細胞率と生細胞率平均、および陽性対照の生細胞率平均

C-5. ガイダンスの検討

眼刺激性試験および眼刺激性試験代替法摘出眼球試験 ICE のガイダンスを作成した（添付資料 5 および 6 参照）。

D. 考察

今回の国際的な第三者評価会議を経て、SIRC-CVS：TEA法およびIL-8 Lucアッセイ評価報告書の第一稿をまとめることができた。ただ、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の改訂が求められており、改訂版の作成が必要である。これらが出来上がり次第、修正内容を盛り込んだ第三者評価報告書の改訂がなされる。第二稿の作成は7月末になることが今回の会議で合意された。

特に、IL-8Lucアッセイに関しては、OECDに試験法ガイドラインの申請をしていることもあり、10月にはバリデーション報告書とともに、最終報告書をOECDに提出することを目指している。

化粧品・医薬部外品の安全性評価に資するためのガイダンスも継続的に2編をまとめることができた。今後も継続し、試験法の普及に努めていきたい。

E. 結論

E-1. 試験法の評価

SIRC-CVS：TEA法およびIL-8Lucアッセイのバリデーション報告書を受け、第三者評価をQ&A形式で進めた。国際的な専門家による適切な評価がなされた第三者評価報告書（第一稿）をまとめることができた。

E-2. 眼刺激性試験代替法 ヒト角膜モデル

LabCyte CORNEA-MODEL 共同研究

昨年度の共同研究の結果を受けて、プロトコルを改訂し、プレバリデーションでばらつきを改良できた。

E-3. 普及

眼刺激性試験および眼刺激性試験代替法摘出眼球試験ICEのガイダンスを作成した

F. 参考文献

- 1) OECD (2005) OECD 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
- 2) LabCyte CORNEA-MODEL, available at:http://www.jppe.co.jp/business/LabCyte/CORNEA_MODEL.html (2013)

G. 研究発表

G-1. 論文発表

省略

G-2. 学会発表

省略

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. 添付文書

- 1) SIRC-CVS:TEA 法バリデーション報告書
- 2)SIRC-CVS : TEA assay peer review evaluation
- 3) IL-8 Luc assay peer review evaluation
- 4) LabCyte CORNEA-MODEL 眼刺激性試験
バリデーション研究 Phase02 集計報告書
- 5) 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
- 6) 眼刺激性試験代替法ニワトリ摘出眼球試験
(ICE) を化粧品・医薬部外品の安全性評価
に資するためのガイダンス

1 Validation Study for the Statens Serum Institut Rabbit Cornea–Crystal Violet Staining Cytotoxicity
2 Test Method with Triethanolamine (SIRC-CVS:TEA Test Method)
3 as an Alternative to Eye Irritation Test Draft)

4
5
6
7
8 **Study Report**

9
10 **Version 7.7**

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23 February 23, 2015

24
25
26
27
28
29
30
31
32 SIRC-CVS:TEA Validation Management Team (VMT)

Contents

| | |
|----|--|
| 36 | |
| 37 | |
| 38 | List of Tables |
| 39 | List of Figures |
| 40 | List of Abbreviation and Acronyms |
| 41 | |
| 42 | 1 Abstract |
| 43 | 2 Introduction |
| 44 | 3 Methods |
| 45 | 3.1 Study plan |
| 46 | 3.1.1 Project plan |
| 47 | 3.1.2 Organization |
| 48 | 3.1.2.1 Chairperson |
| 49 | 3.1.2.2 Chemical management group |
| 50 | 3.1.2.3 Data analysis group |
| 51 | 3.1.2.4 Record management group |
| 52 | 3.1.2.5 Research laboratories |
| 53 | 3.1.3 Study design |
| 54 | 3.1.3.1 Training of participating personnel |
| 55 | 3.1.3.2 Phase I study |
| 56 | 3.1.3.3 Phase II study |
| 57 | 3.1.3.4 Phase III study |
| 58 | 3.1.3.5 Test substances |
| 59 | 3.1.3.6 Study duration |
| 60 | 3.1.4 Success criteria |
| 61 | 3.2 Summary of protocol |
| 62 | 3.2.1 Cells |
| 63 | 3.2.2 Stability of the test substance in the medium |
| 64 | 3.2.3 Preparation of the test substances |
| 65 | 3.2.4 Application of the test substances |
| 66 | 3.2.5 Crystal violet staining |
| 67 | 3.2.6 Calculation of IC50 |
| 68 | 3.2.7 Evaluation |
| 69 | 3.2.8 Quality control |
| 70 | 3.3 Test substances |
| 71 | 3.3.1 Selection of test substances for phase I ,II and III studies |
| 72 | 3.3.1.1 The substances for phase I study |
| 73 | 3.3.1.2 The substances for phase II study |
| 74 | 3.3.1.3 The substances for phase III study |
| 75 | 3.3.2 Test substances selected for the validation study |
| 76 | 3.3.3 Purchase, coding and distribution of test substances |