

Fig. 2. Relationship between calculated and observed C_{ss} in hairless rat skin (a, b) or pig ear skin (c, d). Two-layered diffusion membrane model was used to obtain calculated steady-state skin concentration of chemical compounds. Full-thickness skin (a, c) and viable epidermis and dermis (b, d).

Data range: $122.12 < M.W. < 234.30$, $-5.54 < \text{Clog}P < 3.57$. Dotted lines show the 95% confidence interval. Each data point represents the mean \pm S.E. ($n = 4$).

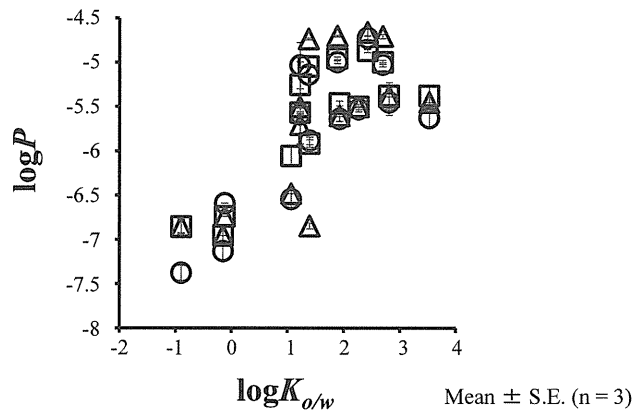


Fig. 3 Relationship between $\log K_{o/w}$ and permeability coefficient through Strat-M™, human skin and hairless rat full-thickness skin. Symbols: \square ; Strat-M™, Δ ; human skin, \circ ; hairless rat full-thickness skin. Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3$).

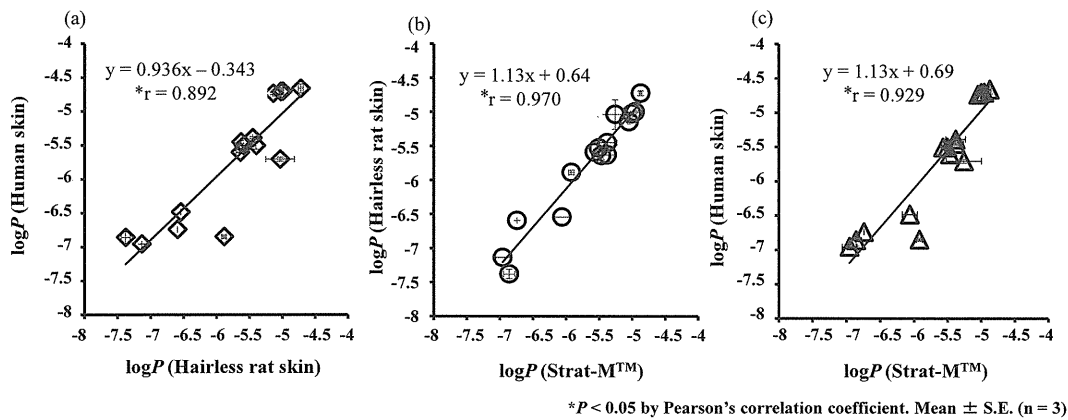


Fig. 4 Relationships between $\log P$ values of human skin and hairless rat skin or Strat-M™. All results are expressed as the means \pm S.E. ($n = 3$). Pearson's correlation coefficient showed significance ($P < 0.05$).

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

ATP バイオセンサーを用いた皮膚刺激性評価

研究分担者 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

研究要旨

表皮細胞から放出される細胞外 ATP (アデノシン三リン酸) は、一次刺激性接触皮膚炎およびアレルギー性接触皮膚炎のいずれの皮膚炎症反応においても初期メディエーターとして重要な役割を果たす。*in vitro* で特定の物質を曝露した培養表皮ケラチノサイト(KCs)から産生・誘導される細胞外 ATP 放出を即時にバイオセンサーにて検知することで、皮膚刺激物質・皮膚感作物質の検出が可能であるかを検証した。KCs からの ATP 放出を比較的多量に誘導する皮膚刺激物質はバイオセンサーにて検知可能であったが、ATP 放出量が少ない刺激物質は検知不可能であった。より幅広い化粧品・医薬部外品の安全性評価が行えるよう、同検知システムの更なる改良が必要である。

A. 研究目的

化粧品・医薬部外品による皮膚障害は、主に一次刺激性接触皮膚炎 (Irritant contact dermatitis, ICD) とアレルギー性接触皮膚炎 (allergic contact dermatitis, ACD) に大別されるが、最近 ICD および ACD において、皮膚一次刺激物質・皮膚感作物質の曝露により表皮角化細胞 (keratinocytes, KCs) から放出される ATP (アデノシン三リン酸) が両皮膚炎の発症に必要なメディエーターであることが明らかとなった。このことから、KCs からの ATP 産生誘導物質をスクリーニングすることによって ICD/ACD の発症原因となる皮膚一次刺激物質・皮膚感作物質の網羅的な探索が可能である

ことは容易に理解されるが、現状の ATP 測定法 (standard luciferin-luciferase assay) は煩雑であり、さらにこの測定を行う際に要する時間 (サンプリングや遠心分離に必要な約数十分) の間に ATP が容易に加水分解されて失活してしまうことが知られており、より正確かつ簡便な新たな ATP 測定法の開発が求められている。

本分担研究の目的は、化粧品・医薬部外品の安全性評価のための皮膚刺激 (感作) 性物質検知システムを確立することを最終目標として、ATP バイオセンサーを皮膚刺激性・感作性評価に応用したシステムを樹立することにある。昨年度の研究成果により、ATP バイオセンサーを用いた検知システムが概ね確立され、培養液中

の ATP 量を即時的に、すなわち ATP の加水分解による失活を回避して、より簡便に ATP を検出することが可能となった。しかし、恒常的に安定した波形の検出が得られず、センサーの波形と刺激物質の濃度の相関性（検出感度）も知ることができなかった。本年度の研究目的は、細胞培養条件、センサーの設置条件および検査対象物質の調整法・至適条件などの様々な条件設定を行い、同システムの実用化に向けて、上記システムの検出感度をさらに向上させることにある。

B. 研究方法

ATP バイオセンサー (sarissaprobe® ATP、Sarissa 社) 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 ATP を H_2O_2 と glycerone phosphate に変換し、 H_2O_2 を介した電気信号として ATP (細胞外 ATP) をリアルタイムで感知する。この ATP バイオセンサーはこれまで様々な臓器・組織あるいは培養細胞系で応用されているが、未だ皮膚あるいは KCs に応用した報告はない。そこで培養 KCs (keratinocyte cell line Pam212) を用いた皮膚刺激物質による ATP 産生誘導実験系に同センサーの応用を試みた。

まず、培養液中の ATP をより厳密に測定するため、ATP センサーに上述の酵素 (Glycerol kinase、Glycerol-3-phosphate oxidase) がコートされていない null プローブをコントロール電極として ATP バイオセンサーとともに同じ培養液中に設置し、さらに両プローブの電位的差をオンタイムで描出するシステムを確立した (図 1)。電位測定および電位制御・電流制御にはマルチチャンネルポテンショスタットを用いた。

皮膚刺激物質として 2-tert-Butylphenol、Carvacrol、1,2-Diaminopropane、n-Heptylamine、3-Methoxypropylamine、N,N-Dimethylisopropylamine、N,N-Dimethyl-n-dodecylamine、Octanoic Acid、

Cetyltrimethylammonium Bromide、Potassium Hydroxide、Eugenol、Benzalkonium chloride、Laurylimonium chloride、Steartrimonium chloride、TEA-laureth sukfate、Cetypyridinium chloride、Sodium lauryl sulfate、Croton oil、N,N-Dimethylglycine、1-(2-Aminoethyl) piperazine、Methacrolein、1-Decanol、ethyl phenylpropiolate、Xanthan Gum、Lactic Acid、Isopropanol、Phenethyl bromide、Propylene glycol、2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid、Oxazolone Gum を用いた。マウス KCs (Pam212 cell line) を 6 穴プレートに培養し、ほぼコンフルエントとなった状態で上記皮膚刺激物質を添加し (各刺激物濃度: 0.01%、0.1%、1%、2.5%)、KCs からの細胞外 ATP (extracellular ATP: eATP) 産生を既存の standard luciferin-luciferase assay および ATP センサーにて定量・検出した (各刺激物添加後 5 min. および 10 min.)。

C. 研究結果

まず、不活化を受けにくい γ ATP を陽性コントロールとして培養液中に添加した。図 1 A,B に示す如く、ATP バイオセンサーによって添加した γ ATP が濃度依存性に 10~30 秒後をピークとした波形として感知された (赤線)。また、同一培養液中に設置した null プローブでは波形が全く観察されず (緑線)、ATP バイオセンサーによって検出された波形が eATP 特異的な反応であることが示された。さらに、両プローブの電位的差が γ ATP の濃度依存性に 10~30 秒後をピークとした波形としてオンタイムでびょうしゅつ検出された (青線)。

我々は、マウス KCs に *in vitro* で一次刺激物質を添加すると、KCs からの eATP が培養液中に産生・放出されることを報告しているが (Kawamura T, et al. J Clin Invest. 2012, 1;122:722-32)、培養液中に検出される eATP 量は皮膚刺激物質の種類によって大きく異なる。そこで、既知の 29 種類の皮膚刺激物質を Pam212 に曝露した際の eATP 誘導能を網羅的に standard luciferin-luciferase assay にて解析し、

これらの実験結果に基づいて各皮膚刺激物質を表1の如く Group I (eATP ; 1-10 μ M, 11 物質), Group II (eATP ; 0.1-1 μ M, 10 物質)、 Group III (eATP ; <0.1 μ M, 8 物質)に分類した(各刺激物濃度 1%、刺激後 10 min.)。

次に、上記 KCs 培養系における培養液中の eATP が ATP バイオセンサーによって感知されるかについて検討した。上記検知システムを用いて、ATP バイオセンサーの検出限界域に近い eATP 産生が得られた Group II の Benzalkonium chloride (BAC): 1%について検討したところ、不安定ではあるが図 2 A に示す如く微弱な波形が検出された。また、濃度を 2.5%に上げると添加 20-30 秒後より明瞭な波形(第一波)が観察され、約 1 分後からは第一波と比べてより緩徐で大きな第二波が観察された(図 2 A)。一方、他の Group II の他の刺激物質群 (Laurtyimonium chloride, TEA-laureth sulfate, Cetypyridinium chloride, Sodium lauryl sulfate, Cetypyridinium chloride) および Group III の Ethyl phenylpropiolate では有意な波形が観察されなかった(図 2 B)。尚、これらの実験を繰り返し行ったところ、実験によっては同一刺激物・同一条件でも波形が検出されないケースがあり、また KCs 細胞数(6 well plate \rightarrow 24 well plate)や培養液量(4 mL \rightarrow 1mL)を変化させた条件でも検討したが、有意な波形は観察されなかった。

D. 考察

本年度の研究成果により、1) KCs からの eATP 誘導能に基づいて種々の皮膚刺激物質が大きく 3 群(Group I~III)に分類され得ること、2) 現行の ATP バイオセンサーを用いた皮膚刺激物質検知システムでは、BAC や Croton oil などの一部の Group II 皮膚刺激物質のみが検知できるが、他の Group II および Group III 皮膚刺激物質は検知できないことが明らかとなった。本システムを化粧品・医薬部外品の安全性評価の第一スクリーニングとして使用可能にするためには、すべての Group II および III

の皮膚刺激物質でも安定した波形が得られるようなさらなる条件設定の改善が求められる。今後、実用化に向けて検出感度をさらに高めるために、細胞培養条件(3D culture system の導入や培養液量をさらに少なくするなど)および検査対象物質の調整法(ATP 加水分解阻害剤の添加や刺激物質濃度をさらに高める工夫など)を改良して至適検出条件を探る必要がある。

E. 結論

皮膚刺激物質によって培養 KCs から誘導される eATP を ATP バイオセンサーにて検知するシステムを確立した。より幅広い化粧品・医薬部外品の安全性評価が行えるよう、同システムの更なる改良が必要である。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

- 1) Kawamura T, Ogawa Y, Aoki R, Shimada S: Innate and intrinsic antiviral immunity in skin. *J Dermatol Sci.* 75(3):159-66. 2014
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) Ahmed Z, Kawamura T, Shimada S, Piguet V: The role of human dendritic cells in HIV-1 infection, *J Invest Dermatol.* In press.
- F-2. 学会発表
- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 川村龍吉：ヘルペス感染症 Up-to-date 第5回 Tokyo skin seminar、東京、2014
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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

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

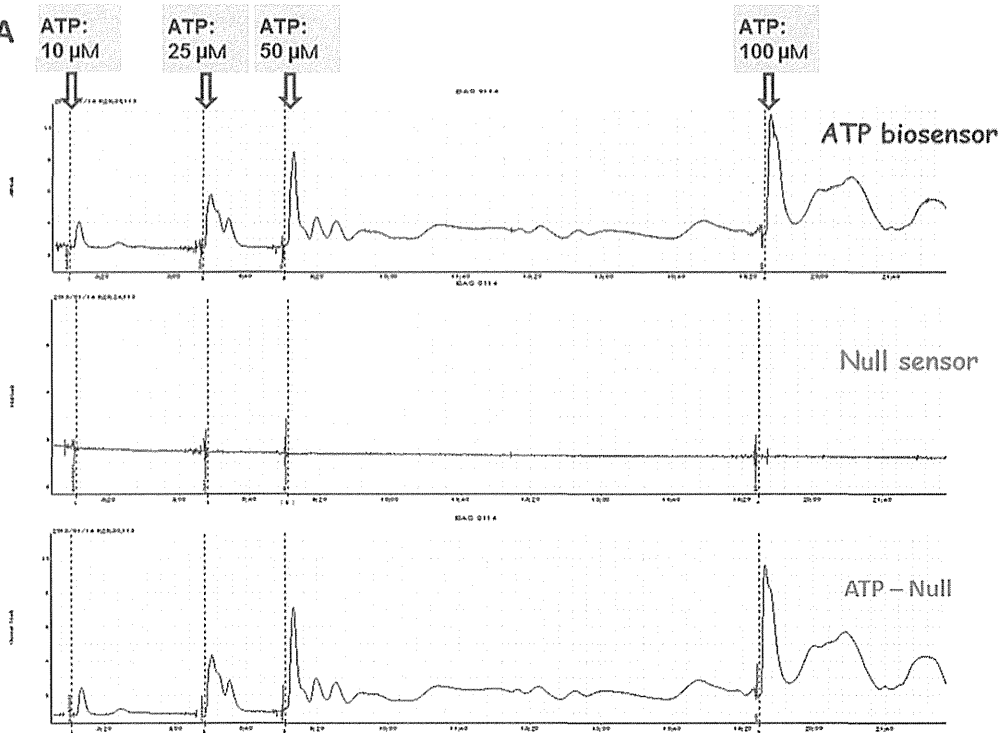
2. 実用新案登録

なし

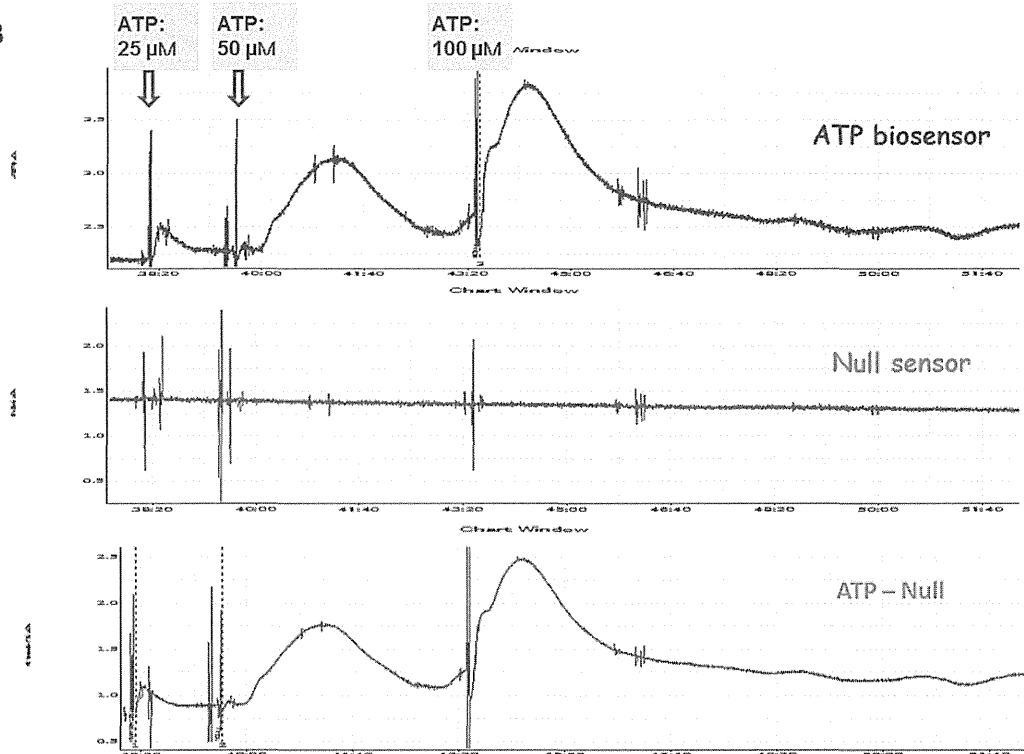
3. その他

なし

1A

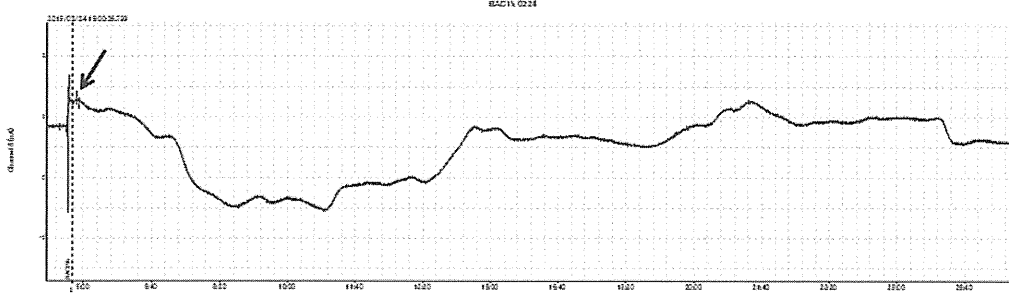


1B

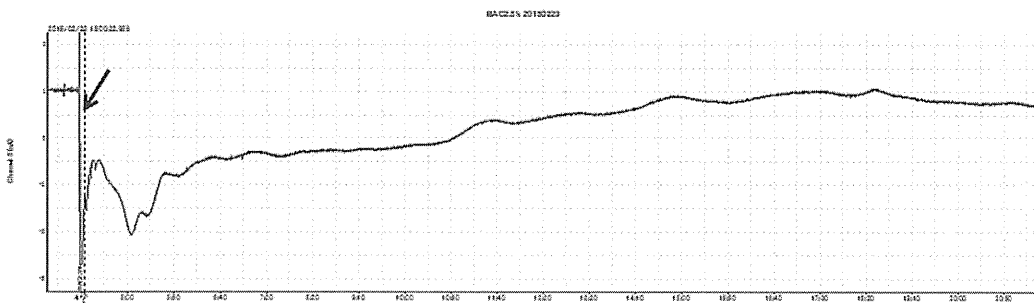


☒ 2A

Group II; Benzalkonium chloride (BAC) 1%

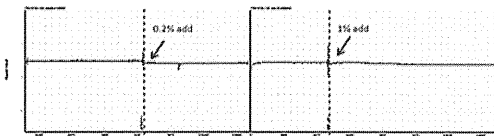


Group II; Benzalkonium chloride (BAC) 2.5%

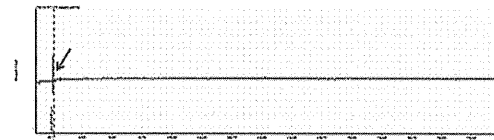


☒ 2B

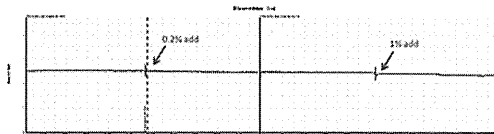
Group II; Laurtyimonium chloride



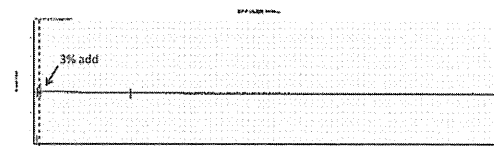
Group II; TEA-laureth sukfat



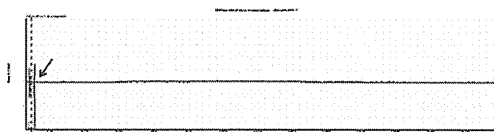
Group II; Cetypyridinium chloride



Group II; Sodium lauryl sulfate



Group II; Cetypyridinium chloride



Group III; Ethyl phenylpropiolate

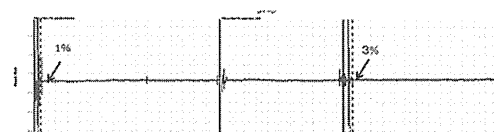


表 1

keratinocyte cell line Pam212 曝露 (10min, 1%) による
extracellular ATP (eATP) 誘導能に基づく皮膚刺激物質の分類

Group I (eATP ; 1.0-10.0 μ M) *2-tert-Butylphenol, *Carvacrol, *1,2-Diaminopropane, *n-Heptylamine, *Potassium Hydroxide, *3-Methoxypropylamine, *N,N-Dimethylisopropylamine, *Octanoic Acid, Cetyltrimethylammonium Bromide, Eugenol, N,N-Dimethyl-n-dodecylamine
Group II (eATP ; 0.1-1.0 μ M) *1-(2-Aminoethyl)piperazine, *Methacrolein, Benzalkonium chloride, 1-Decanol, Laurylimonium chloride, Steartrimonium chloride, TEA-laureth sukfate, Croton oil, Cetypyridinium chloride, Sodium lauryl sulfate, N,N-Dimethylglycine,
Group III (eATP ; <0.1 μ M) Ethyl phenylpropiolate, Lactic Acid, Isopropanol, Propylene glycol, Xanthan Gum, Phenethyl bromide, #2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid, #Oxazon Gum

* 国連分類による腐蝕性物質、# ハブテン

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

ヒトのパッチテスト、使用テストのガイダンス作成

研究分担者 松永佳世子
藤田保健衛生大学 医学部 皮膚科学 教授

研究要旨

【背景・目的】医薬部外品の薬事申請において義務付けられている新規成分の連続皮膚刺激性試験は、現在動物を用いる方法が採られている。本試験の動物実験代替法への置換えが叫ばれているが、そのような方法は開発されていない。そこで、ヒトにおけるリスク評価を考慮して、ヒトによる連続刺激性の評価を行い、ヒト開放塗布試験法の推奨プロトコルを開発することを目的とした。

【方法】昨年度に開発されたヒト開放塗布試験法を用い、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。

【結果】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。

【結論】本年度に実施したヒト開放塗布試験法は機能しなかったが、その後の予備試験の結果から、プロトコルの改良案を確立できた。

研究協力者

矢上晶子 藤田保健衛生大学医学部皮膚科
杉浦伸一 名古屋大学大学院医学系研究科
附属医学教育研究支援センター
特任研究部門 医療行政学
佐々 齊 化粧品工業連合会安全性部会
株式会社資生堂
杉山真理子 株式会社資生堂
今井教安 株式会社コーセー

佐藤 淳 日本メナード化粧品株式会社
金森健之 サンスター株式会社

A. 研究目的

化粧品・医薬部外品の安全性評価および医薬部外品の薬事申請に動物実験代替法 (代替法) を用いるため、代替法の国際標準化および普及が進んでいる。しかし、動物実験を用いずに安全性を評価する場合、代替法は有害性の同定に

しか利用できないにも関わらず、薬事申請ではリスク評価（濃度依存のおよび連続適用により皮膚刺激反応）を求めていることを忘れてはならない。動物実験を持ちいない場合、皮膚一次刺激性試験、連続皮膚刺激性試験などのリスク評価はヒトによる試験で実施せざるを得ない。ただし、ヒト試験に至る場合、代替法で陽性でもパッチテストに進んでよいのか、どの代替法が実施されていればヒト試験に進んでよいのか等の科学的および倫理的なコンセンサスが取れておらず、勝手な解釈でヒト試験が実施された場合、被験者に被害を与えかねない。

また、使用試験に至る前のヒト試験として、パッチテストしかこれまで実績がなく、より広範なヒト試験の導入は不可欠である。

そこで、本研究では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。昨年度は、ヒトのリスク評価を考慮してヒト開放塗布試験法の推奨プロトコルを開発した。昨年度に開発されたヒト開放塗布試験法を用い、開放塗布試験を実施した。これらの過程を経て、最終年度には代替法のみでしか安全性を担保されていない成分におけるヒトパッチおよび繰り返し貼付試験に至るまでの倫理的なガイダンスを作成することを目指す。

B. 研究方法

B-1. 推奨プロトコルを用いたヒト開放塗布試験法

1. 対象

健常成人 男女 20名

2. 被験者の選択基準

- 1) 20歳以上 65歳以下の健常人 男女
- 2) 試験に先立ち本試験の目的および内容を説明し、被験者本人から文書同意が得られた者

下記のいずれかに抵触する者を除外する。

- ① 被験部位の皮膚に判定に影響する皮膚症状を有する方

- ② アトピー性皮膚炎、皮膚湿疹等、皮膚の疾患を有する方。皮膚過敏症の方。
- ③ 試験開始前 7 日以内に本試験に影響があると考えられる薬剤を服用あるいは被験部位に塗布した方。
- ④ 妊娠中または妊娠している可能性のある方、および授乳中の方。
- ⑤ 試験開始前 2 ヶ月以内に他の治験や臨床試験に参加された方。
- ⑥ その他、試験責任医師が不適格と判断した方。

3. 試験試料

被験試料：ラウリル硫酸ナトリウム 0.1%、0.3%、0.5%水溶液

皮膚一次刺激性試験にて、刺激性（刺激指数>15）となる濃度を含む、それ以下の濃度を含む 3 濃度

対照試料：蒸留水

4. 試料適用期間

21 日間連続（試験期間：平成 26 年 5 月 26 日～6 月 16 日）

5. 試料適用部位および方法

前腕屈側部

6. 試験方法

試験開始日に、説明文書を用いて試験方法を口頭で説明し、同意を確認した。

被験部位として、きき腕でない前腕屈側部を定め、医師が被験部位の皮膚状態に問題がないことを確認の上、皮膚板を用い、適用部位（2×2cm）を決め、各区画の四方に油性マジックなどを用いて明示した。

被験物質を、一日一回 綿棒を用いて適用部位（2×2cm）に塗布する適用量は縦・横 3 回ずつ塗布すると約 10μL 程度となる）。

一日一回および適用部位に異常が認められた場合には、携帯電話を用いて適用部位の写真をデータ管理責任者に送った。

試験開始日、7日後、14日後、21日後に、試験担当者（皮膚科専門医）による判定および皮膚生理指標として、角質水分量、TEWL（経皮水分蒸散量/経表皮水分喪失量）を測定した。

被験者が中止を求めた場合およびデータを確認した医師が膨疹を確認した場合、またはそれ以外の症状から中止すべきと判断した場合には、試験を中止した。試験を中止した場合、必要に応じて試験担当者が処置を指示した。

試験最終日には、複数の試験担当者が適用部位を確認し、本邦基準で適用部位を判定する。判定後、皮膚刺激性を起こした部位があれば、その部位を治療した。また、終了後にはアンケートを行い、被験者の意見を集めた。

判定基準

本邦基準	
判定	反応
—	反応なし
±	かるい紅斑
+	紅斑
++	紅斑+浮腫
+++	紅斑+浮腫+丘疹, 漿液性丘疹, 小水疱
++++	大水疱

試験終了日の医師による判定用と、写真判定用（浮腫が判定不可のため）を用意した。

7. 中止基準

1) 中止

試験担当医師及び試験実施機関の判断にて、以下に該当する場合、当該被験者にかかる試験を中止する。

- ①被験者から辞退の申し出があった場合
- ✓ 有害事象*の発現など、試験継続が困難と判断された場合
 - ✓ 試験開始後、被験者が対象外であることが判明した場合
 - ✓ その他、試験担当医師の判断により中止する場合

2) 脱落

上記中止基準に該当せず、被験者の都合により試験が中断され、以下に該当する場合を脱落とする。

- ✓ 試験開始日および試験終了日に実施会場に来場せず
- ✓ 被験者が試験担当医師、試験実施機関の指示に従わない場合
- ✓ その他、被験者の都合により中断された場合

3) 試験計画の中止

試験依頼者は、重大な安全性上の問題発生など、本試験を継続することが困難となった場合、試験責任者と協議の上、本試験を中止または中断する。試験依頼者は試験中止を決定後、試験担当医師及び試験実施機関に伝達し、安全性上の必要な全ての処置を取る。

8. データの集計

- 1) 試験最終日の医師の判定に基づいた皮膚刺激指数の算出
- 2) 初日の写真判定と最終判定日の違いの確認
- 3) 判定可能な写真枚数の確認

B-2. 予備検討

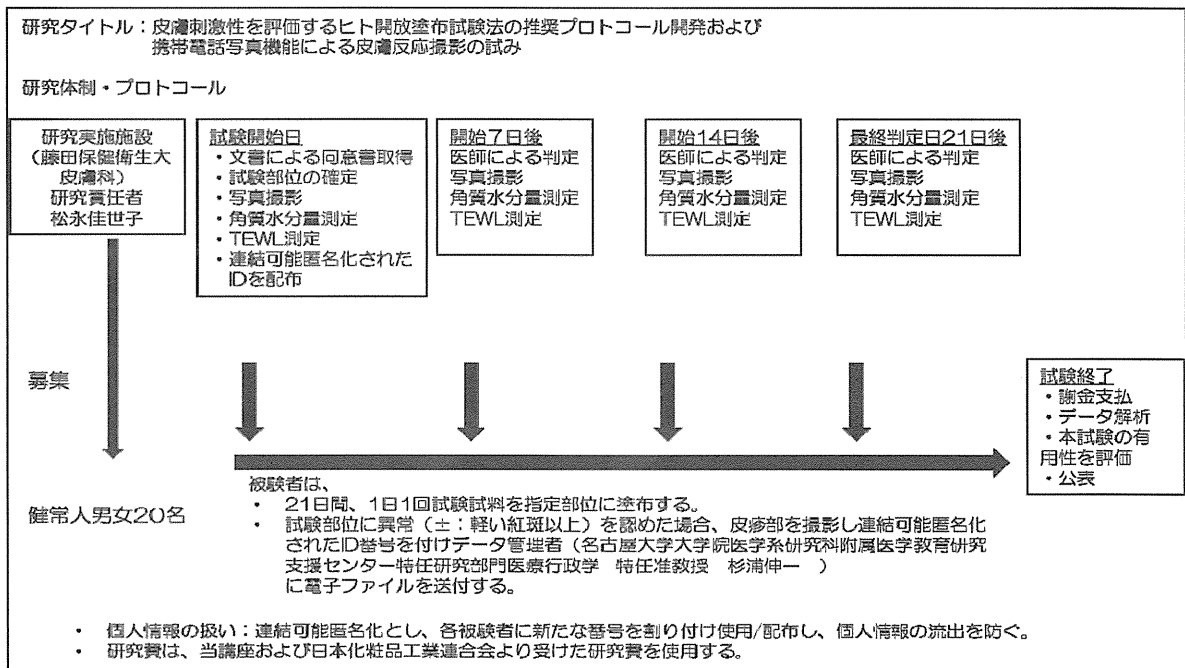
B-1 の検討後、以下の予備検討が協力研究者により実施された。

試験条件：被験試料 SLS 5%水溶液（4名）、SLS 1%水溶液(7名) SLS 1%, 0.5%水溶液（3名）

塗布面積：3×5 cm

塗布方法：綿棒で塗布およびろ紙に浸み込ませ 10分保持する方法（ろ紙2枚を並べて適用）

試験期間：2週間



C. 結果

C-1. 推奨プロトコルを用いたヒト開放塗布試験法

試験の結果、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（水分量およびTEWL）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。

皮膚刺激指数はSLS0.5%で50程度と予測される刺激であるため（Kanto,2013）、ある程度の皮膚反応が検出されることが望ましいが、本方法では検出されなかった。

添付資料に示すように、アンケート結果から本検討の問題点も提起された。次回以降に参考となる意見を以下に示す。

- 1) 被験物質の滴下量および塗布時間が変動して、不安だった。
- 2) 塗布位置を決める皮膚板は不要の意見が多かった。
- 3) 皮膚生理指標の測定者が毎週異なり、測定の方法にブレがあった。

C-2. 予備検討

その後に実施した予備検討結果から、以下の結果が得られた。

- 1) SLS 5%水溶液（ろ紙法）塗布部位は、4名全員に紅斑、丘疹、浮腫、乾燥、痒み等が認められ、全員途中で中止
- 2) SLS 5%水溶液（綿棒法）塗布部位は、4名全員に皮膚反応は出現したが、全員が継続
- 3) SLS 1%水溶液（ろ紙法）塗布部位は、7名中5名が紅斑、丘疹、乾燥、痒み等が認められ、途中で中止。2名は反応が認められたが継続（綿棒法）
- 4) SLS 1%水溶液塗布部位は、7名全員が皮膚反応は認められなかった。
- 5) SLS 0.5%水溶液（ろ紙法）塗布部位、（綿棒法）塗布部位ともに、3名全員、皮膚反応は認められなかった。

D. 考察

本試験で用いたSLS0.5%濃度までは皮膚刺激性を観察できず、携帯電話の写真機能を用いたモニタリングシステムも有用に活用されていなかった。

ただし、その後の予備試験の結果から、以下のような試験条件を提案できた。本条件をもとに実施された連続塗布試験により、プロトコルの開発が進むことを期待したい。

試験条件：被験物質 SLS 0.5%および1%水溶

媒体：蒸留水

塗布面積：26×31 mm (Whatman 標準定性ろ紙

角型：グレード 1、26×31 mm、コード 1001-813)

塗布方法：ろ紙に被験試料を浸み込ませ(ドブ付け)、皮膚に貼付し10分保持後剥離する。10分経過したらろ紙は除去する

試験期間：3週間、昼と夜の2回/日適用(なお、皮膚生理指標の測定は皮膚反応が確認でき、条件も定まった後、外部依頼にて実施する)

E. 結論

ヒト開放塗布試験法の推奨プロトコルを協力研究者と開発し、開放塗布試験を20名で実施した。

その結果、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(水分量およびTEWL)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。

ただし、その後の予備試験の結果から、改訂プロトコルを提案できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 参考文献

Kanto, H., et al, Optimal patch application time in the evaluation of skin irritation, *Journal of Dermatology*, 2013, 40, 363-369.

H. 研究発表

H-1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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.

- 3) 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.
- 4) 松永佳世子. 化粧品による皮膚障害. 現代医学. 2014;62(1): 101 -105.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.

- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 矢上 晶子, 松永 佳世子. 皮膚のアレルギ一のトピックス. *皮膚と美容.* 2014;46(2).

H-2.学会発表

<国外学会>

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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, Al-

lergy and Immunology Annual Meeting 2015, Feb. 20-24, 2015.

<国内学会>

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.

- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
すべてなし

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

動物実験代替法に関する国際情勢の調査

研究分担者 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

研究要旨

本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するためには、関連する国際情勢の調査は必要不可欠な研究活動である。特に EU では、2003 年 3 月に公布された「化粧品指令第 7 次改正」と 2006 年 12 月に公布された「化学物質の登録と規制(REACH)」のため、EURL ECVAM を中心に動物実験代替法の開発と評価は進展している。一方、米国においては ICCVAM が中心となって代替法の評価が進行している。近年、代替法の開発と評価はグローバル化が加速し、代替試験法協力国際会議(ICATM)など国際的な協力体制が整いつつあり、本邦における対応案策定にはこれら国際情勢の調査・把握は重要である。

本年度の特筆すべき動きは、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 AOP (Adverse Outcome Pathway、有害機構経路)、総合的な試験戦略を考える ITS(Integrated Testing Strategies)および複数の試験法の組み合わせにより評価体系を構築する IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) の考え方に基づき、OECD、EURL ECVAM、2014 年 8 月にプラハで行われた第 9 回国際動物実験代替法会議 (WC9)を初め様々な代替法関連活動において多数の報告、文書の発出がなされたことである。米国では動物実験代替法を盛り込んだ改訂版 PCPC 2014 Safety Evaluation Guidelines が発行された。

国内においては、医薬部外品の承認申請を行う場合に代替法の利用を促すべく、注意点も含めたガイダンスを作成するための「ガイダンス検討会」について、その活動の有用性がアンケートにより認められた。また、日本化粧品工業連合会の安全性部会、動物実験代替専門部会を中心に「化粧品の安全性評価に関する指針」の改訂作業が開始されたことも挙げられる。

このように国内外の代替法に関する情勢は急速に変化しており、関連情報を継続的に収集分析し、その結果を公表していくことは、本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するうえで必要と考えられる。

研究協力者

荒木 大作、池田 英史、今井 教安、
笠原 利彦、加藤 義直、金森 健之、
川上 幸治、京谷 大毅、坂口 育代、
佐野敦子、實川 節子、瀬戸 洋一、
高野 憲一、豊田 明美、萩野 滋延、
宮澤 正明、山本 裕、渡辺 真一、
加賀 光明

A. 研究目的

本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するためには、関連する国際情勢の調査は必要不可欠な研究活動である。特に EU では、2003 年 3 月 11 日に公布され、2009 年 3 月 11 日に発効した「化粧品指令第 7 次改正」(2003/15/EC)と 2006 年 12 月 30 日に公布され、2007 年 6 月 1 日に発効した「化学物質の登録と規制」(Registration Evaluation and Authorization of Chemicals; REACH)のため、欧州代替法検証センター (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing ; EURL ECVAM) を中心に動物実験代替法開発と評価は非常に進展している。

一方、米国においては代替法検証省庁間連絡委員会 (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods ; ICCVAM) が中心となって代替法の評価が進行している。最近では、代替法試験協力国際会議(International Cooperation on Alternative Test Methods; ICATM) による国際的な代替法検証の体制が整いつつあり、今後、代替法の開発と評価はグローバル化が加速するものと考えられる。したがって、本邦における対応案策定にはこれら国際情勢の調査・把握は重要である。

本研究においては、以前よりこれらの欧米の動向を中心に情報収集活動により把握してきた。本年度も動物実験代替法の開発と利用を促進することを目標に調査研究を推進した。

B. 研究方法

B-1. 情報収集

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) を定期的に閲覧すると共に 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。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験代替法に関する情報を収集することにより、実験動物の福祉向上を目指すものであり、ヒトや動物の権利や福祉に抵触するところはない。

C. 研究結果及び考察

C-1. EU における動物実験禁止と代替法開発の動向

C-1-1. 化粧品指令第 7 次改正

化粧品指令第 7 次改正が 2003 年 3 月 11 日付けで公布され^り、公布から 6 年を経て、欧州域内での動物実験禁止が 2009 年 3 月に施行された。また、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含む化粧品の EU 域内での販売も禁止された。欧州委員会が採択した段階的廃止スケジュールでは、皮膚感作性、亜急性及び亜慢性毒性、UV 誘導毒性、光アレルギー (感作) 及び発がん性についても 2013 年 3 月を禁止期限としていた。これらを「反復毒性」として分類した理由は、毒性が反復投与の結果として生じるという事実にあるとしている。2010 年 7 月に、欧州委員会の保健・消費者保護総局(DG SANCO)が 2013 年に禁止される試験について、各試験の専門家の意見というレポートをウェブに掲載し、それに対する意見募集を実施した。このレポートでは、動

物実験を実施した原料を含む化粧品の EU 域内における販売が 2013 年に禁止される反復投与毒性、感作性、発癌性、毒物動態、生殖毒性について、2013 年までにこれらの試験の代替法の確立は困難と記述していた²⁾。

化粧品指令第7次改正は、2009年12月に再編され、新化粧品規則 (1223/2009/EC) として公布された³⁾。このような状況の中、欧州委員会は2013年3月11日付けで、動物実験を実施した原料を含む化粧品の販売を全面的に禁止し、化粧品指令を発効した⁴⁾。更に化粧品指令

(76/768/EEC) は、2013年7月11日をもって無効化され新化粧品規則 (1223/2009/EC) に置き換えられ、発効された⁵⁾。また、欧州委員会は欧州議会及び理事会へのコミュニケーションにおいて、動物実験、販売禁止及び化粧品分野における代替試験法の状況を報告している⁶⁾。新化粧品規則では、既存化粧品の安全性に関して重大な懸念が生じる場合、加盟国は欧州委員会に動物実験禁止の適用除外を認められることが、以下の条件付で定められている。

- ・当該成分が広く使用されており、同様の機能を果たすことのできる別の成分に置き換えることができない場合
- ・ヒトの健康に対して問題のあることが実証されており、動物実験を行うことが正当化され、かつ評価のための詳細な研究プロトコル提案がある場合

2010年5月には、欧州化粧品原料連盟

(EFfCI ; the European Federation for Cosmetic Ingredients) が化粧品指令第7次改正の動物試験条項に対応するための技術的ガイダンスを公表した⁷⁾。このガイダンスでは化粧品指令の法解釈を確定しておらず、法律遵守の判断の責任は化粧品会社にあるとしている。

化粧品指令第7次改正及び新化粧品規則 (1223/2009/EC) の基本的骨子は、以下の通りである^{1,3,8,9)}。

- 化粧品及び化粧品原料のEU域内の動物実験禁止

- ・化粧品：加盟国の国内法施行後に即時禁止
※猶予期間は最大18ヵ月 (2004年9月)

- ・原料：代替法がある場合は加盟国の国内法施行後に即時禁止、完全な動物実験禁止は化粧品指令発効の6年後(2009年3月)

- 動物実験を実施した製品または動物実験を実施した原料を含む製品のEU域内の販売禁止(EU域外での動物実験がなされた製品及び原料も含む)

- ・代替法がある場合は、加盟国の国内法施行後に即時禁止

- ※猶予期間は最大18ヵ月 (2004年9月)

- ・完全な販売禁止は、化粧品指令発効の6年後(2009年3月)以降

例外：反復毒性、生殖毒性、薬物動態試験については2013年3月からの販売禁止

C-1-2. EURL ECVAMにおける代替法開発状況

EURL ECVAM は 2014 年 4 月に 2013 年から 2014 年における代替試験法の開発、バリデーション及び法規制上の受入れの進捗報告を発表した¹⁰⁾。また、9月に代替法の非標準化法を含めた包括レビューを発表した¹¹⁾。AOP (Adverse Outcome Pathway : 有害機構経路) や ITS(Integrated Testing Strategies:総合的な試験戦略)等の考え方も挙げられており、欧州化粧品庁 (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。

急性毒性に関しては、2014年12月に代替法を用いた評価戦略を発表した¹²⁾。

眼刺激性試験代替法に関しては、3D 培養モデル (SkinEthic Human Corneal Epithelial Model、EpiOcular OCL-200 Model) のバリデーションが終了し、ESAC による Peer Review 中である。

皮膚感作性試験代替法に関しては、KeratinoSens について2014年2月に勧告を行っ