

安全性評価と動物実験代替法の現状

小島肇夫

Current Status of Safety Evaluation and Alternative to Animal Testings in Japan

Hajime KOJIMA

Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), National Institute of Health Sciences (NIHS), Japan, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received January 11, 2008)

In November 2005, the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) was established as a part of the Division of Pharmacology at the National Center for Biological Safety and Research affiliated with Japan's National Institute of Health Sciences (NIHS). JaCVAM facilitates the validation, peer-review, and international harmonization of alternative to animals testing. Key objectives of JaCVAM are: 1) facilitate 3R's*, prioritizing Reduction and Replacement, and 2) to ensure new test methods are validated, peer reviewed, officially accepted by the regulatory agencies, and made internationally compatible. In this paper, JaCVAM's current activities and future directions are shown in the validation and peer review of alternatives to testing for skin irritation, eye irritation, phototoxicity, skin sensitization, acute toxicity, genotoxicity and endocrine disruptor screening.

* 3R's for animal testing (Reduction, Refinement, Replacement)

Key words—validation, peer review; alternative

1. はじめに

2005年にOECDにて正式に認められたOECD Guidance Document 34 (GD34)¹⁾には、健康や環境を守るために開発される新たな試験法において、Fig. 1に示すような、バリデーション、専門家による第三者評価（以後、第三者評価と記す）を経ないと行政的には受け入れられないと記載されている。²⁾ この手順に対応できる機関として、欧州ではECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)、米国にはNICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)-ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)がある。これらと同様の業務を行う機関として、2005年11月に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内に新規試験法評価室が設立された。この

部署は国際的にはJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)と名乗り、国際協調の窓口として、また新規試験法のバリデーションや第三者評価を担当している。JaCVAMの活動目的としては、化学物質等の安全性評価における①動物実験の3Rs (Reduction: 実験動物の削減, Refinement: 実験動物の苦痛の軽減, Replacement: 動物実験の置き換え)の促進、特に削減や置き換えの促進、②国際協調を重視した新規の動物実験代替法(以下、代替法と記す)の公定化である。そのために、以下の主な業務を実施している。

- 1) 新規試験法又は既存試験法の改訂法(新規・改訂試験法)の第三者評価及び公定化
- 2) 新規・改訂試験法のバリデーション
- 3) 3Rsの普及
- 4) 国際協調

この業務を果たすため、JaCVAMは支援組織である運営委員会及び顧問会議の協力を得て、Fig. 2に示すような手順で新規試験法の第三者評価を企画し、行政的な受け入れのための評価会議を開催し、その結果が良好であれば行政機関(厚生労働省)に提案書を送るシステムを構築した。³⁻⁵⁾

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新規試験法評価室室長 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-11)

e-mail: h-kojima@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウムS40で発表したものを中心に記述したものである。

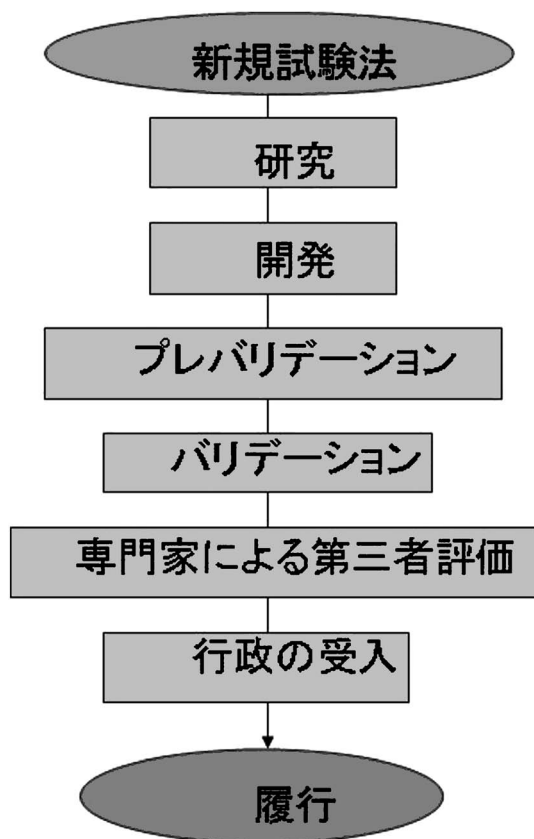


Fig. 1. Stages in the Development of New Toxicological Testing Methods

2. 具体的な試験法の進捗

欧州における化粧品規制⁶⁾及び REACH (Registration, Evaluation and Authorization of CHemicals)⁷⁾に対応した代替法のバリデーション, 第3者評価は最も大きな JaCVAM の業務である. Table 1 に示すように, OECD で認められた代替法はまだ少ないが, 欧米では多くの代替法が検討されている. JaCVAM でも Table 2 に示すような安全性試験の代替法に取り組んでいるが, 化粧品の安全性評価を主眼としたバリデーション及び第3者評価が多い.

Table 1. OECD Guidelines for Alternative Methods

No.	試験名	採択日
429	Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay	Updated Guideline, adopted 24th April 2002
430	<i>In Vitro</i> Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)	Original Guideline, adopted 13th April 2004
431	<i>In Vitro</i> Skin Corrosion: Human Skin Model Test	Original Guideline, adopted 13th April 2004
432	<i>In Vitro</i> 3T3 NRU Phototoxicity Test	Original Guideline, adopted 13th April 2004
435	<i>In Vitro</i> membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion	Original Guideline, adopted 19th July 2004

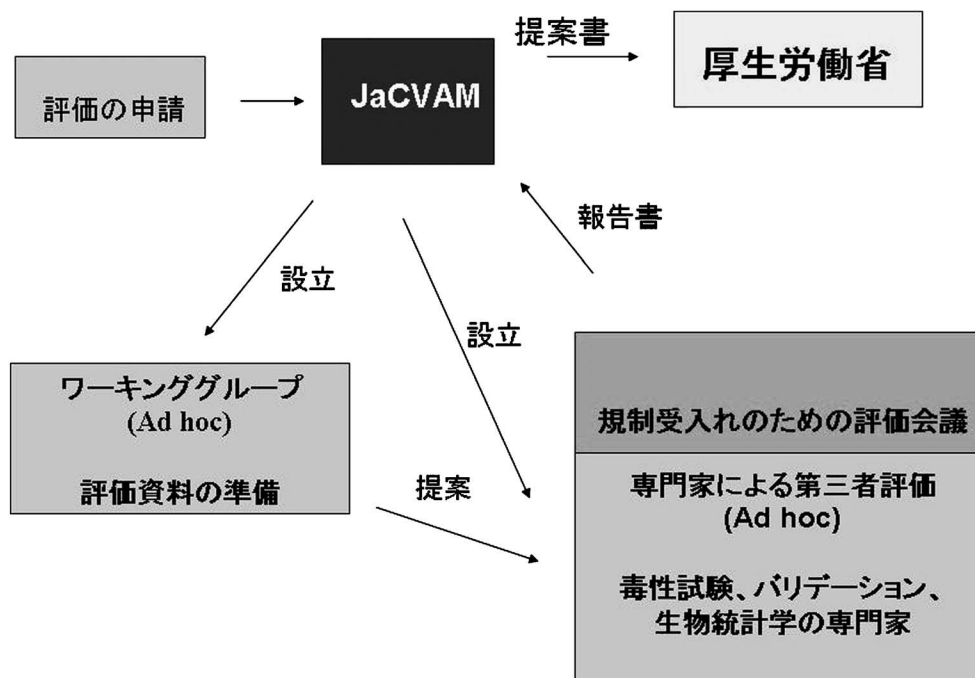


Fig. 2. Framework for Peer Review and Regulatory Acceptance of Alternative Methods

Table 2. Current Validation and Peer Review Correlated by JaCVAM

No.	試験法	試験法の概要	欧米の動向	目 標	現 状	会議の開催	バリ委託先
1	腐食性試験	培養皮膚モデルを用いた方法	代替法を用いた腐食性評価が終了 (OECD ガイドライン 430 又は 431, 435)	化学物質の腐食性評価に代替法を利用するための公定化	評価会議で最終評価	2008 年 4 月開催	
2	光毒性試験	酵母膜破壊と赤血球の溶血試験	Balb3T3 細胞を用いた細胞毒性試験が OECD にてガイドライン導入済み	日本の医薬部外品ガイドラインへの収載	評価委員会 (Peer Review Panel) にて評価中	2008 年 4 月開催	
3	LLNA-DA	マウスリンパ節中の ATP 量の変化を指標とする方法	ICCVAM 評価中	OECD ガイドライン現行法の改変	バリデーション終了, 評価委員会にて評価中	2008 年 3 月終了	
4	LLNA-BrdU	マウスリンパ節中の BrdU の取り込みを指標とする方法	ICCVAM 評価中	OECD ガイドライン現行法の改変	バリデーション終了, 評価委員会にて評価開始	2008 年 8 月開催	日本動物実験代替法学会
5	LLNA	reduced LLNA	ESAC で評価終了	化学物質の感作性評価への利用促進	評価委員会にて検証	2008 年 5 月開催	
6	皮膚刺激性試験	培養皮膚モデルを用いた方法	ESAC で評価終了	日本の医薬部外品ガイドラインへの収載	ワーキンググループにて評価のための資料を作成, 評価委員会にて EPISKIN 法の検証, 日本のバリデーション結果の評価開始.	2008 年 2 月開催	
7	眼刺激性試験	細胞毒性試験, 摘出眼球試験, 摘出角膜試験, 受精鶏卵試験	ICCVAM, ESAC で評価終了	日本の医薬部外品ガイドラインへの収載	評価委員会にて摘出眼球, 摘出角膜試験の検証, 細胞毒性試験の評価開始.	2008 年 2 月開催	
8	コメットアッセイ	<i>in vitro</i> 試験法	日本を中心にバリデーション進行中	OECD ガイドライン	Phase I バリデーション実施中		日本環境変異原学会
9	コメットアッセイ	<i>in vivo</i> 試験法	日本を中心にバリデーション進行中	OECD ガイドライン	バリデーション Phase II 結果解析中		日本環境変異原学会
10	内分分泌かく乱物質スクリーニング	HeLa レポーター遺伝子アッセイ	OECD で評価終了	OECD ガイドライン	antagonist バリデーション計画中, 2008 年 6 月開始の予定.		化学物質評価研究機構 (CERI)
11	内分分泌かく乱物質スクリーニング	Lumi-cell アッセイ	NICEATM を中心に国際バリデーション実施中	OECD ガイドライン	Phase I 終了.		㈱日吉
12	h-CLAT	培養細胞を用いた感作性物質のスクリーニング	JCIA, COLIPA を中心に共同研究実施中	OECD ガイドライン	ECVAM との共同バリデーション決定	2008 年 9 月ワークショップ開催	

以後に JaCVAM が検討かつ国際協力しているバリデーション及び第 3 者評価に限局して, その現状及び展望にふれておきたい。

2-1. 皮膚刺激性試験 2007 年 4 月, ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) が皮膚刺激性試験代替法として, 培養表皮モデル EPISKIN を認証した.⁸⁾ EPISKIN に被験物質を 15 分間処理し, 48 時間後に MTT 法による細胞毒性とイン

ターロイキン 1 α を評価指標として測定するものである。

日本でもこれまで培養皮膚や表皮モデルの利用について手をこまねいていた訳ではない, これらモデルが日本で製造・販売されており, 多くのユーザーがいる。2000-2002 年にかけて東洋紡績(株)製の TESTSKIN, グンゼ(株)製の Vitrolife-Skin, MatTek 製でクラボウ(株)が販売している EpiDerm を用い

て、プレバリデーションを実施し、良好な結果を得ている。⁹⁾ さらに、化粧品原料の使用濃度における皮膚刺激性試験代替を目的に、2002–2004年にかけて TESTSKIN¹⁰⁾ 及び Vitrolife-Skin でバリデーションを実施した。^{11,12)} 得られた結果が、当初からの評価基準であるパッチテストと動物試験における皮膚刺激性の予測率と同程度であったことから、バリデーションとしてはある程度の成果を残したと考えている。ただし、まだ第3者評価に至っておらず、国内でのコンセンサスは得られていない。一方、EPISKIN の ESAC による認証を受け、国内モデルにおいても補完バリデーションを行う希望があり、2008年春からのバリデーション研究の動きが進んでいる。EPISKIN と比較し、化学物質の皮膚刺激性試験代替法として日本製のモデルが有用かを、日本動物実験代替法学会とともに検討する予定である。

2-2. 眼刺激性試験 1998年に厚生労働科学研究補助金を得て作成された「細胞毒性試験による眼刺激性試験代替法のガイダンス」は日本においても中々普及していない。¹³⁾ もう一度、JaCVAM として第3者評価を行い、細胞毒性試験における眼刺激性試験代替法の有用性を検討する予定である。この資料には日本動物実験代替法学会で実施された細胞毒性試験や、¹⁴⁾ 厚生労働科学研究の細胞毒性試験に加え、¹⁵⁾ 最近 ECVAM で実施された細胞毒性試験（ニュートラルレッド放出試験、赤血球試験、フルオレッセン放出、サイトセンサーマイクロフィジオメーター試験）やバリデーションが計画されている EpiOcular というヒト再構築モデルの結果が用いられることになる。

一方、欧米では摘出眼球試験、摘出角膜試験、受精鶏卵試験等の第3者評価が終了し、^{7,16)} スクリーニングとしての有用性が指摘されている。前述した JaCVAM が計画している第3者評価において、これら試験に加え、ESAC で評価された少容量法⁷⁾ の評価を実施する予定である。

2-3. 光毒性試験 OECD ガイドラインとして認証されているニュートラルレッド取り込みによる細胞毒性試験については、¹⁷⁾ 日本でも独自に第3者評価を行い、代替法としての有用性を評価した。¹⁸⁾ 一方、資生堂は酵母膜破壊試験と赤血球溶血試験のバッテリーを用いる光毒性試験の検討を進め、厚生労働科学研究に第3者評価を依頼した。^{19–21)} 評価の

過程でバリデーション結果が不足しているとの指摘を受け、2期に渡るバリデーション研究が実施された。これらのバリデーション結果を用いた第3者評価は最終段階にある。

2-4. 感作性試験 OECD ガイドラインとして認証されている Local Lymph Node Assay (LLNA) がモルモットを用いた従来の試験の代替法として利用されている。²²⁾ ただ、この試験法は放射線同元素を用いることから日本では実施できる施設に限られる。そこで、ATP の量の変化を指標とした LLNA-DA 法、²³⁾ BrdU の取り込みを指標とした LLNA-BrdU 法のバリデーション及び第3者評価が進んでいる。²⁴⁾ LLNA-DA 法のバリデーションは良好な結果を得て終了し、現在、第3者評価を実施中である。一方、LLNA-BrdU 法に関しては、第1期のバリデーション結果を受け、改良したプロトコルを用いた第2期バリデーションを終了した。これらが将来的には日本で汎用される日は近いと考えている。LLNA に関しては1濃度のみで評価する reduced-LLNA が ESAC の認証を得るとともに⁷⁾ 改良試験法の評価基準が欧米で検討されるなど現在、議論が盛んな分野である。

ただし、化粧品の安全性評価のためにマウスを用いる本試験を使い続けることは、完全な代替法とはいえない。国際的にも新たに種々の *in vitro* 試験法の開発が進んでおり、日本としては資生堂及び花王が日本化粧品工業連合会の有志や欧州化粧品工業会 (COLIPA) の協力を得て開発を進めているヒト細胞株活性化試験 (human Cell Line Activation Test; h-CLAT) に注目し、^{25,26)} バリデーションを計画している。ただし、この分野は構造活性相関のプログラム、²⁷⁾ ペプチド結合試験の開発、²⁸⁾ h-CLAT 以外のヒト細胞株を用いた試験法などの開発・検討が盛んな分野であり、これらを使いこなして感作性を評価するシステムの検討が必要である。

2-5. 急性毒性試験 OECD に掲載されている評価法^{29–31)} で動物数の削減が一般的になっている昨今、さらに 2005年 ICCVAM にて細胞毒性試験を用いた代替法の第3者評価が行われた。¹⁶⁾ この評価の結果、3T3 ニュートラルレッド法を用いて、非毒性物質の検出が可能とされている。さらに、「Human endpoint」に配慮した新たなワークショップも 2008年2月に開かれ、JaCVAM としても IC-

CVAM の第 3 者評価に協力している状況である。

2-6. 変異原性試験 エイムス試験, 染色体異常試験, 動物を用いた小核試験という 3 点セット³²⁾を補う試験法である肝臓の不定期 DNA 合成の代替法として, 日本環境変異原学会 哺乳類変異原性試験研究グループを中心に, ECVAM, NICEATM の協力を得たコメットアッセイ³³⁾の国際バリデーション研究が実施されている。このバリデーションでは *in vivo* 試験だけでなく, *in vitro* 試験も併行しても進めている。本試験法は開発からかなりの時間がたっていることもあり, 方法の統一化がこの国際バリデーションの課題である。

In vivo 試験としては, マウスの肝臓, 胃を標的臓器として, 日米欧 5 施設による陽性対照物質エチルメタンサルフォネートを用いた Phase I バリデーションが 2007 年 2 月に終了し, ブラインド化した被験物質を用いた Phase II のバリデーションが終了した。本バリデーションは, 最終的なプロトコルを確定するための実験であり, 2008 年中からプロトコルの微小な修正を経て, Phase III のバリデーションが開始される。

一方, *in vitro* 試験のバリデーションはやや遅れて, Phase I バリデーションを開始した。まだプロトコルが固まっている訳ではないことから, ブラインド化していない 5 物質を用いプロトコル確定のためのバリデーションを実施中である。

2-7. 内分泌かく乱物質のスクリーニング

勅化学物質評価研究機構 (CERI) の開発した HeLa-9903 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイは, OECD の定める内分泌かく乱物質評価のレベル 2 に当たるエンドクラインレセプター α への結合を評価指標とする試験法である。³⁴⁾ 2003 年 3 月第 1 回 OECD の Validation Management Group-Non Animal (VMG-NA) 会議にてプレバリデーションが終了し, 他施設のバリデーションを進めるむねが日本より報告された。2004 年 11 月の第 2 回 VMG-NA では他施設バリデーション結果を報告し, バリデーション報告書及び標準化プロトコルを OECD に提出した。第 3 回 VMG-NA (2005 年 12 月) 後 “Validated” といえる試験系かを審議・アドバイスする目的で, Preliminary Validation Assessment Panel (PVAP) が設立された。PVAP メンバーによる第 3 者評価によりバリデーションとし

ての認証を得て, 次に Peer Review Panel (PRP) による第 3 者評価が実施された。

2007 年 8 月に示された PRP の報告では, 評価基準の明確化などでプロトコルの改訂が求められるとともに, antagonist について検討がなされていないのが指摘あった。そこで, JaCVAM では CERI に予備試験によるプロトコルの改良を依頼し, ECVAM の協力を得て, 2008 年春よりバリデーション研究を開始する予定である。

一方, 米国 XDS 社で開発されたエンドクラインレセプター α への結合を評価指標とするレポーター遺伝子アッセイ Lumi-cell アッセイについても,³⁵⁾ 国際バリデーション研究が進めている。このバリデーション研究は ICCVAM が主催する ECVAM, JaCVAM との共同バリデーションである。日本では日吉株が実験を担当しており, agonist 及び antagonist の試験結果を求めている。2007 年末までに Phase I が終了し, 2008 年から II 及び III に入る予定である。この試験法も OECD ガイドラインを目指している。

3. おわりに

代替法研究は欧米主導で進んでいることは明確である。日本ではそのニーズが低く, JaCVAM ができ, ICCVAM, ECVAM と並ぶ 3 極になったということですら, 認知度が低い。予算や人員の確保も難しく, 国際協調と一口に言っても各国の思惑の中で右往左往するので手一杯である。このような状況の中ではあるが, 日本で開発されている試験法を中心にバリデーションや第 3 者評価を進め, 代替法を用いた場合でも化学物質等の安全性を担保するとともに, 国益に適う仕事をすることが JaCVAM の使命であると考えている。

REFERENCES

- 1) OECD series on testing and assessment, Number 34, ENJ/JM/MONO, 14 (2005).
- 2) ICCVAM, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), NIH Publication No: 97-3981 (1997).
- 3) Ohno Y., *Frageance J.*, **2005-2**, 30-35 (2005).
- 4) Kojima H., *Soc. Cosmet. Chem. J.*, **40** (4), 263-268 (2006).
- 5) Kojima H., *J. J. Soc. Cutan. Health*, **57**, 129-134 (2007).

- 6) ECB, <http://ecb.jrc.ir/REACH/> (2007).
- 7) Commission Staff Working Documents, EN, SEC82004) 1210 (2004).
- 8) ECVAM statement, <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm> (2007).
- 9) Sonoda I., et al, *Altern. Animal Test. Exp.*, **8**, 91–106 (2002).
- 10) Kojima H., et al., Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin, 2005, p.159.
- 11) Kojima H., et al. Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin, 2005, p.160.
- 12) Kojima H., et al. Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin, 2005, p.161.
- 13) Ohno Y., *Frageance J.*, **1999–7**, 21–26 (1999).
- 14) Ohno T., et al., *Altern. Anim. Test. Exp.*, **5** (1–2), 1–38 (1998).
- 15) Ohno Y., et al., *Toxicol. in Vitro*, **13**, 73–98 (1999).
- 16) ICCVAM, (http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/EPreport/ocu_report.htm (2007)).
- 17) “OECD Guideline 432: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Testing,” OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France (2002).
- 18) Ohno Y., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **10** (2), 50–157 (2004).
- 19) Sugiyama M., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **2**, 183–191 (1994).
- 20) Sugiyama M., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **2**, 193–202 (1994).
- 21) Mori M., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **10** (1), 1–17 (2003).
- 22) “OECD Guideline 429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay,” OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2002).
- 23) Yamashita K., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **11**(2) 136–144 (2005).
- 24) Takeyoshi M., et al., *Toxicol. Lett.*, **119**, 203–208 (2001).
- 25) Ashikaga T., et al., *Toxicol. in Vitro*, 767–773 (2006).
- 26) Sakaguchi H., et al., *Toxicol in Vitro*, 774–784 (2006).
- 27) Apula, A.O., et al, *Chemical Research in Toxicol*, **18**, 1420–1426 (2005).
- 28) Gerberic, G. F., et al, *Toxicol. Science*, **81**, 332–343 (2004).
- 29) “OECD Guideline 420: Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure,” OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2001).
- 30) “OECD Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method,” OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2001).
- 31) “OECD Guideline 425: Acute Oral Toxicity-Modified Up and Down Procedure,” OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2001).
- 32) “Guide to Qusai-drug and Cosmetic Regulations in Japan,” Yakuji Nippo Ltd., 2006, pp.141–147.
- 33) Mitchelmore, C. L., Chipman J. K., *Mutat. Res.*, **399**, 135–147 (1998).
- 34) Akahori, Y., et al., *Toxicol. in Vitro*, **22**, 225–231 (2008).
- 35) ICCVAM, (<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine/endodocs/xdseval2.pdf> (2007)).