

- 試験法の開発研究、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 21) 浅田晋、佐々木澄志、田中憲穂、梅田誠：
Bhas 42 細胞を用いるイニシエーター/
プロモーターの検出、日本動物実験代
替法学会、2005年12月、伊勢原
- 22) 梅田誠、佐々木澄志、田中憲穂、：発ガ
ン性試験の代替法:ECVAM で Prevalidation
Study の現状、日本動物実験代替法学会、
2005年12月、伊勢原
- 23) 大森清美、梅田誠、田中憲穂、高木弘毅、
吉村功、佐々木澄志、浅田晋、酒井綾
子、浅倉真澄、馬場博、伏脇裕一、浜
田修一、鬼頭暢子、中村哲、中村好志、
大石英俊、佐々木聡、嶋田佐和子、土
屋敏行、宇野芳文、鷲塚昌隆、矢嶋聡、
山下康人、山村英二、八城友子：発ガ
ン性プロモーター検出のための Bhas
42 細胞を用いた細胞形質転換試験に
関する共同研究結果のついて、日本動
物実験代替法学会、2005年12月、伊
勢原
- 24) 中川ゆづき、田中憲穂、：ラット FRSK 細胞
を用いた in vitro 小核試験法、日本動物実
験代替法学会、2005年12月 伊勢原
- 25) 和田昌憲、本郷有克、若栗忍、石川陽一、梅
田誠、田中憲穂：培地中グルコースの消費
を指標とする毒性評価法の応用、日本動物
実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 26) 山影康次、高橋俊孝、浅田晋、田中憲穂：
In vitro 光染色体異常試験における各種照
射条件とその影響、日本動物実験代替法学
会、2005年12月、伊勢原
- 27) 北垣雅人、若栗忍、田中憲穂、板垣宏：
急性毒性試験代替法の検討（3）：2 施設
間における Collagen Gel Assay を用いた毒
性試験予測性の評価、日本動物実験代替
法学会、2005年12月、伊勢原
- 28) 若栗忍、大野泰雄、田中憲穂：細胞毒性
による in vivo 全身毒性の予測につい
て-代謝活性化の導入および処理条件
の検討-、日本動物実験代替法学会、
2005年12月、伊勢原
- 29) Noriho Tanaka: The Activity of JSAAE
-past,present and future, 5th World Congress
on Alternatives & Animal Use in the Life
Sciences, August, Berlin (Germany) 2005
- 30) Isao Yoshimura, Takashi Omori, Yasuo Ohno,
Masatoshi Hoya, Masaki Mori, Takaaki
Doi, Yuriko Fujita, Hiroshi Itagaki, Rumi
Kawabata, Hajime Kojima, Seiji
Hasegawa, Yuko
- 31) Okamoto, Noriho Tanaka, Kouko Tanigawa
and Shinobu Wakuri: Validation study on the
battery system for prediction of phototoxicity in
Japan: The overview of the results, 5th World
Congress on Alternatives & Animal Use in the
Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005.
- 32) Shinobu Wakuri, Yutaka Matsumoto, Makoto
Hayashi and Noriho Tanaka: Application of in
vitro alternative methods to ecotoxicology, 5th
World
Congress on Alternatives & Animal Use in
the Life Sciences, August, Berlin (Germany)
2005
- 34) Kiyomi Omori, Makoto Umeda, Noriho
Tanaka, Hiroki Takagi, Isao Yoshimura,
Kiyoshi Sasaki, Ayako Sakai, Harumi Araki,
Masumori Asakura, Hiroshi Baba, Yuichi
Fushiwaki, Shuichi Hamada, Nobuko Kitou,
Tetsu Nakamura Yoshiyuki Nakamura,
Hidetoshi Oishi, Satoshi Sasaki, Sawako
Shimada, Toshiyuki Tsuchiya, Yoshifumi Uno,
Masataka Washizuka, Satoshi
Yajima, Yasuhito Yamamoto, Eiji Yamamura
and Tomoko Yatsushiro: Inter-laboratory
collaborative study of cell transformation
assay for tumour promoters using Bhas 42
cells by non-genotoxic carcinogen study group
in Japan, 5th World Congress on Alternatives
& Animal Use in the Life Sciences, August,
Berlin (Germany) 2005.
- 35) Makoto Umeda, Noriho Tanaka, Shin Asada,
Kiyoshi Sasaki and Kumiko Hayashi: Detection
of non-genotoxic carcinogens using ras-
transfected Bhas 42 cells, 5th World Congress
on Alternatives & Animal Use in the Life
Sciences, August, Berlin (Germany) 2005
- 36) Noriho Tanaka: Current activities of
alternative research in Japan, Ist International
Forum on Laboratory Animal Science and
Technology, Beijing (China), November 2006
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし
- J. 謝辞
本研究の遂行にあたっては日本動物実験代
替法学会の評価委員会（田中憲穂委員長）と
バリデーション委員会（吉村 功委員長）、
バリデーション参加機関、及びそれぞれに属
する委員及び職員の方々のお世話になった。
ここに感謝申し上げる。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
戸倉新樹	光科学療法	「光科学研究の最前線」編集委員会編	光科学研究の最前線	強光子場科学研究懇談会出版	東京	2005	366-367
戸倉新樹	後天性光線過敏症の病態	斎田俊明, 飯塚一編	皮膚疾患の最新医療	先端医療技術研究所	東京	2006	221-224
戸倉新樹	新・皮膚悪性リンパ腫アトラス	瀧川雅浩他編.	光化学療法	文光堂	東京	2006	185-187
戸倉新樹	内服テストと内服照射テスト・皮膚科診療プラクティス. 19.		薬疹を極める	文光堂	東京	2006	125-127

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
大野泰雄	動物実験代替法研究の重要性とその課題—薬理学会における動物実験の問題点—	日薬理誌	125	325-329	2005
大野泰雄、酒見和枝、簾内桃子	ヒト組織の研究利用体制の構築と研究応用、4. 手術摘出肝組織からの肝細胞調製とヒト肝細胞を用いた試験系のバリデーション.	臨床薬理	36	127-128	2005
Hirota, M., Kitagaki, M., Itagaki, H., and Aiba, S	Quantitative measurement of spliced XBP1 mRNA as an indicator of endoplasmic reticulum stress	J. Toxicol. Sci	accepted		2006
Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., and Toyoda, H	Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol	Toxicol In Vitro	accepted		2006

Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., and Suzuki, H	Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT	Toxicol In Vitro	accepted		2006
<u>Tokura Y</u>	Photocontact dermatitis: from basic photobiology to clinical relevance	J Environ Dermatol	12	71-77	2005
Misawa J, Moriwaiki SI, Kohno E, Hirano T, <u>Tokura Y</u> , Takigawa M	The role of low-density lipoprotein receptors in sensitivity to killing by Photofrin-mediated photodynamic therapy in cultured human tumor cell lines.	J Dermatol Sci	40	59-61	2005
Sayama K, Kobayashi Y, Fujita H, Ito A, <u>Tokura Y</u> , Sasaki M	Determination of action spectrum for sparfloxacin-photosensitized single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA.	Photodermatol Photoimmunol Photomed	21	287-292	2005
Imai S, Atarashi K, Ikesue K, Akiyama K, <u>Tokura Y</u>	Establishment of murine model of allergic photocontact dermatitis to ketoprofen and characterization of pathogenic T cells.	J Dermatol Sci	41	127-36	2006
Orimo H, <u>Tokura Y</u> , Hino R, Kasai H.	Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the DNA of cultured human keratinocytes by clinically used doses of narrowband and broadband ultraviolet B and psoralen plus ultraviolet A.	Cancer Sci	97	99-105	2006
戸倉新樹	光線過敏症における光アレルギーの位置	皮膚アレルギーフロンティア	3	7-10	2005
戸倉新樹	光アレルギーの臨床をどうするか	皮膚アレルギーフロンティア	3	32-40	2005
戸倉新樹	薬剤性光線過敏症	MB Derma	96	13-19	2005
戸倉新樹	後天性の光線過敏症はなぜ起こる？	マルホ皮膚科セミナー	174	28-32	2005
戸倉新樹	内服薬で起きる皮膚炎：薬剤性光線過敏症	毎日ライフ	6	52-55	2005
西尾大介, 戸倉新樹	薬剤性光線過敏症	アレルギーの臨床	25	774-778	2005

杉田和成, 戸倉新樹	慢性光線性皮膚炎と免疫抑制状態	アレルギーの臨床	25	784-788	2005
戸倉新樹	抗生剤・抗菌薬による光線過敏症	Topics in Atopy	4	44	2005
Kurita M, Shimachi T, Kobayashi M, Kabashima K, Tokura Y	Induction of keratinocyte apoptosis by photosensitizing chemicals plus UVA.				投稿中
Ryo Kurihara, Fujio Shiraishi, Norihiko Tanaka, Shina Hashimoto	Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastal Japanese waters	Environmental Toxicology and Chemistry	24	1984-1993	2005
Agneta Posengre, Linda Faxius, Noriho Tanaka, Mikawanabe, LarsMagnus Bjursten	Comparison of implantation and cytotoxicity testing for initial toxic biomaterials	Journal of Biomedical Materials Research	75A Issue 1	115-122	2005
Shin Asada, Kiyoshi Sasaki, <u>Norihiko Tanaka</u> , Ken Takeda, Makoto Hayashi and Makoto Umeda	Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 Cells (Bhas 42 Cells)	Mutation Res	588	7-12	2005

<p>Kiyomi Ohmori, Makoto Umeda, <u>Noriho Tanaka</u>, Hiroki Takagi, Isao Yoshimura, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Ayako Sakai, Harumi Araki, Masumi Asakura, Hiroshi Baba, Youichi Fushiwaki, Shuichi Hamada, Nobuyui Kitou, Tetsuo Nakamura, Yoshiyuki Nakamura, Hidetoshi Oishi, Satoshi Sasaki, Sawako Ahimada, Toshiyuki Tsuchiya, Yoshifumi Uno, Masataka Washizuka, Satoshi Yajima, Yasuhito Yamamoto, Eiji Yamaura and Tomoko Yatsushiro: An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on ATLA 33, 619-639 (2005)</p> <p>Ryo Kurihara, Fujio Shiraishi, <u>Noriho Tanaka</u>, Shinya Hashimoto</p>	<p>An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells</p>	<p>ATLA</p>	<p>33</p>	<p>619-639</p>	<p>2005</p>
<p>吉村功</p>	<p>統計家からの疑問: In Vitro 試験のデータから定量的結論を導くのは邪道か?</p>	<p>環境変異原研究</p>	<p>27</p>	<p>57-60</p>	<p>2005</p>
<p>Chiba Y, Matsuyama Y, Sato T, Yoshimura I</p>	<p>A simulation study for a linear measurement error model when error variances vary between measurements.</p>	<p>J. Agricultural, Biological, and Environmental Statistics</p>	<p>10, 1</p>	<p>118-130</p>	<p>2005</p>

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書
「安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究」
「代替法についての国際情勢の調査」

分担研究者 板垣 宏 日本化粧品工業連合会、技術委員会動物実験代替専門委員長
研究協力者 岡本裕子、森福義、金森健之、川上幸治、栗原浩司、桑原裕史、合田真季、
坂口育代、坂口斉、瀬戸洋一、中村恒彰、萩野滋延、長谷川靖司、森辰実

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 11 日に公布された『化粧品指令第 7 次改正』と『化学物質の登録と規制 (REACH) 』のため、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 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、ECVAM と ICCVAM でそれぞれに評価された試験法の相互認証のみならず、共同バリデーションも進行しており、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、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。

本年度の代替法の開発と評価に関する進展を概観すると、『代替法の 3Rs』がグローバルに認知された年、さらには新規代替法の行政的な受け入れがグローバルレベルで一歩前進した年として結論付けられる。

『代替法の 3Rs』のグローバルな認知に関しては、本邦においては 2005 年 6 月 22 日に改正・動物愛護管理法が公布され、実験動物の福祉の原則等として『3Rs の原則』が第 41 条中に明確に記載された。一方、EU では、2005 年 11 月 7 日に、EU 委員会主催のワークショップが開催され、その結果『3Rs 宣言』が公表された。『3Rs 宣言』は、今後、EU においては各産業分野において、効果と安全性の両面に関する代替法の開発を促進することを宣言している。この『3Rs 宣言』に基づき EU 委員会は、今後、代替法開発に莫大な資金を投下することを明言し、さらに動物愛護団体及び各種業界代表が 3Rs 宣言の Partnership とし、協力（資金と人的面で）することを宣言した。

また、新規代替法の行政的な受け入れに関しては、OECD が Guidance document “OECD series on testing and assessment number 34: on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment” を 2005 年 8 月 18 日付けで公表した。この Guidance document は、試験法の定義、バリデーションの企画と実施、第三者による評価 (peer review)、国際的な受け入れ、新規試験法提案のための資料等で構成されている。今後、この Guidance document により新規代替法のグローバルな承認が加速するものと考えられる。本邦においても 2005 年 11 月に JaCVAM が発足した。今後、代替法の評価と行政的受け入れがグローバルレベルで加速することを期待したい。

なお、代替法の開発と評価に関する状況を安全性評価項目ごとにとりまとめたが、本年度は特筆すべき変化はなかったものと考えられた。

今後も、国内外の代替法に関する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る。

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 日に公布された『化粧品指令第 7 次改正』と『化学物質の登録と規制 (REACH) 』のため、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 ICCVAM が中心となって代替法の評価が進行している。最近は、ECVAM と ICCVAM でそれぞれに評価された試験法の相互認証のみならず、共同バリデーションも進行しており、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、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より密接な情報収集活動により把握し、適切な対応を講じることで、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てきた。

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 (SCCP, OECD, ECVAM, ICCVAM など) を定期的に検索するとともに EU については同地域の化粧品工業会である COLIPA、米国については CTFA との連繋を通じて実施した。その他、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 日付けで公布された¹⁾。この化粧品指令第 7 次改正の基本的骨子は、以下の通りである¹⁾⁻³⁾。

●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 ヶ月 (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 EU 化粧品指令発効の 6 年後 (2009 年 3 月)。
- ・EU 委員会は、OECD のバリデーションの進展を考慮した上で、SCCNFP (現、SCCP) 及び ECVAM と協議して、種々の試験の段階的廃止に関する期限などの予定を立案する。
- 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 ヶ月 (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

- ・EU 委員会は、OECD のバリデーションの進展を考慮した上で、SCCNFP (現、SCCP) 及び ECVAM と協議して、種々の試験の段階的廃止に関する期限などの予定を立案する。

この化粧品指令第 7 次改正では、2004 年 9 月 11 日までに各国の国内法を整備し、施行することが要求されている。2005 年 11 月 7 時点で国内法の作成状況は以下のとおりである。なお、化粧品指令第 7 次改正では、動物実験の禁止は全体の項目であるため、各国の国内法に動物実験禁止がどのように取り入れられたかは不明である。

- ・国内法を作成した国 (23 カ国)
Austria, Belgium, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France (動物試験の条項を除く), Germany, Greece, Hungary, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, Netherlands, Poland, Portugal, Slovakia, Slovenia, Spain, United Kingdom
- ・国内法を作成中の国 (1 カ国)
Sweden
- ・国内法作成の情報がない国 (1 カ国)
Cyprus

欧州司法裁判所は 2005 年 5 月 24 日のプレスリリースで、EU 化粧品指令に関する仏政府の提訴を棄却したことを報じた。フランス政府は EU 化粧品指令第 7 次改正中の動物実験の段階的禁止条項は、タイムテーブルが不明確で、実践の上でも法律的にも問題があるということで、2003 年 6 月に提訴し無効化を求めていた。しかし、化粧品評価のための動物実験を廃止する目標が追求される必要性があるとし、フランスの不服申し立てを棄却した判決が下された。

2004 年 9 月 15 日付けで化粧品指令修正として公表された「バリデートされた動物試験代替法のリスト」である ANNEX IX について、2005 年度は新たな代替法の記載は認められ

なかった⁴⁾。

C-1-2 ECVAMにおける代替法開発状況

化粧品指令第7次改正では種々の動物試験の段階的廃止に関する timetable (案) 作成が要求されている。本件に関しては、2004年4月30日に、“Report for establishing the timetable for phasing out animal testing for the purpose of the Cosmetic Directive”をECVAMが報告している⁵⁾。このECVAMの報告書では、皮膚腐食性、皮膚刺激性、光毒性、光遺伝毒性を除く多くの試験法は、化粧品指令第7次改正の禁止年には完全代替は困難と予測されている。

このため、ECVAMは、第6次 Framework Programme on Research and Developmentとして、① A-Cute-Tox Project (急性毒性試験)、② ReProTect Project (生殖発生毒性試験)、③ Sens-it-iv (感作性試験)を組織している⁶⁾。

A-Cute-Tox Projectは実験動物を使用しない急性毒性試験の開発を目的に2005年1月1日に開始された5年間のプロジェクトである。35名の共同研究者、総予算1560万ユーロ、そのうちEUから900万ユーロの予算を受けて、ヒトにおける急性毒性を予測する *in vitro* 試験の戦略の最適化とプレバリデーションを実施している。現在評価されている試験は、以下の5試験である。

- ・HepG2細胞/タンパク質含量
- ・HL-60/ATP含量
- ・BALB/c3T3 NRU
- ・正常ヒト角化細胞 NRU
- ・腎細胞系におけるTER及びPCP測定

ReProTect Projectは *in vitro* 生殖発生毒性試験の開発と最適化の促進を目的に26名の共同研究者(追加する計画がある)、約910万ユーロの資金を受けて進められている。

Sens-it-iv Projectは皮膚及び吸入における感作性物質を同定する *in vitro* 試験法の開発を目的としている。このプロジェクトは30名の共同研究者、1100万ユーロの資金を受けて、正式には2005年10月から5年間の予定で開始された。このプロジェクトの活動は一方で動物数のさらなる削減も進めている。この活動には、過去のLLNAデータベースの解析や放射性物質を使用しない別のエンドポイントを用いるLLNA変法の評価も含まれている。

ECVAMはまた、2002年よりNICEATM(The NTP Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)と共同で急性経口毒

性を評価するための *in vitro* 細胞毒性試験のバリデーション研究を実施している。この研究は、NIEHS(National Institute of Health Sciences)、U.S.EPA(U.S. Environmental Protection Agency)及びECVAMの補助を受けており、アメリカの2研究機関及びヨーロッパの1研究機関が参加した。現在、バリデーション研究の背景、方法および結果を記録したBRD(background review document)を作成している。2006年5月には、*in vitro* 細胞毒性試験のバリデーション状況を評価するためのピアレビューパネルが招集されており、パネルミーティングにおいて試験法開発に関するまとめと勧告が行われる予定である。

本年度ECVAMにより開催されたWorkshopは、Marine Toxin Testingにおける3Rsアプローチ(2005年1月)⁷⁾、Invalidationの概念(2005年9月)⁸⁾、生理学的速度論モデル(2005年10月)⁹⁾であった。

C-1-3 SCCPの状況

SCCP(Scientific Committee on Consumer Products)はEU委員会の科学諮問機関であり、代替法に関するOpinionの発表についても担当している。2005年9月20日に皮膚感作性物質の分類及び試験の反応の評価についての覚書を採択し、皮膚感作性物質として表示すべき物質「R43」の分類基準を示した¹⁰⁾。この中でLLNAは、用量反応性を考慮に入れて、媒体対照の3倍の増殖を示した場合を陽性と分類している。

C-1-4 EU委員会の状況

EU委員会における本年の特筆すべき事項としては2005年11月7日に公表された“European partnership to promote alternative approaches to animal testing; 3Rs Declaration”という3Rs宣言が挙げられる¹¹⁾。3Rs宣言は、化粧品指令第7次改正による動物実験の禁止と化学物質の登録と規制(REACH; Registration Evaluation and Authorization of Chemicals)による動物実験の増加に関して、代替法開発の促進と活用の観点から提案されたものである。よって、以下に3Rs宣言とREACHの状況を記述する。

3Rs宣言に関して、11月7日、ベルギーのブリュッセルにおいてEU委員会主催のワークショップ「EU goes Alternatives」が開催された。主催はEU委員会(行政)であり、行政、議員、企業、動物愛護団体などの関係者

が約 250 名参加した。この会議では、最終的に 3Rs 宣言が発表され、EU 委員会は、今後、代替法開発に莫大な資金を投下することを明言し、さらに動物愛護団体及び各種業界代表が 3Rs 宣言の Partnership として、協力（資金と人的面で）することを宣言した。宣言した業界団体は、EWLA (EU 動物愛護団体)、CEFIC (EU 化学品工業会)、EPIA (EU 製薬工業会)、EUROBIO (EU バイオテクノロジー工業会)、CIE (EU 石鹼洗剤工業会)、COLIPA (EU 化粧品工業会)、ECPA (EU 農薬工業会) であった。ここで発表された 3Rs 宣言は、これまでの EU における動物実験と代替法開発の経緯を述べた後、今後、EU においては上記の各産業分野において、効果と安全性の両面に関する代替法 (in vitro のみではないが) 開発を促進することを宣言し、Partner として協力を求めたものである。以下は今後のアクションプランである。

①Partnership への参加者は、短期、中期、長期と認定されたアクションプログラムに貢献すること。アクションプログラムは、進展の障害となるバリアを見出すように、そして代替法の開発、バリデーション及び行政の承認を加速するための適切な解決法を提案するように計画されなくてはならない。例えば、以下の項目は優先的に取り組まなければならない。

- ・研究のアクティビティと現時点における戦略のマップ化
- ・パートナーと他の関連する stakeholder との間の現在のアクティビティを強化・拡大するための研究における協調
- ・intelligent な試験戦略を含む代替法の開発
- ・適切な動物データと参照化学物質の用意を含む、バリデーション過程を改善するための現実的な機構
- ・代替法の行政的な承認を促進するための現実的な機構
- ・Stakeholder との対話と教育の拡大

②アクションプログラムは、異なる優先分野に対して技術的なワーキンググループをセットアップして、プログラムの実行に関して適切な機構とタイムテーブルを見出しかつ確立すべきである。

③全ての必要なステップは、アクションプログラムが 2006 年の四半期までに作成できるように保証されなければならない。

④アクションプログラムの実施に関する Partnership からの年度報告書は、理事会、

EU 議会、その他の関連する stakeholder の注目を引くため公表しなければならない。公表はインターネットでなれるべきである。実施に関する最初の報告は、2006 年 12 月までになされるべきである。

一方、REACH は、欧州における化学物質の規制であり、化学物質の安全性確認義務を企業や業界が負うことになるが、その適用範囲やどのような安全性試験が必要になるのかが注目されている¹²⁾。2005 年 8 月 21~25 日にドイツのベルリンで開催された第 5 回国際動物実験代替法会議 (5th world congress on alternatives & animal use in the life science) において、ドイツの環境・自然保護・原子力安全省の Uwe Lahl 博士により「REACH における動物試験を最少にする戦略」が提示された¹³⁾。2005 年における状況として、「Reduction (動物数の削減) と Refinement (苦痛の軽減等) は満足いくものになろう」と予測しているが、Replacement (置換) については、「in vitro も in silico も不満足であろう」と予測している。2010/2025 年に向けては、Reduction (動物数の削減) と Refinement (苦痛の軽減等) は「さらなる推進が期待される」としているが、Replacement (置換) については、「より一層の努力をしなければならない」としている。動物試験数の削減は既に開発された代替法がいかに確実なものであるか、そしてさらなる代替法の開発とバリデーションにかかっていると結論している。この講演の中で、製造・輸入量ごとに実施すべき試験案が提示された。

- ・1 トン/年を超える場合：皮膚刺激性、眼刺激性、皮膚感作性、変異原性 in vitro Ames 試験、ミジンコの短期毒性。
- ・10 トン/年を超える場合：in vivo 皮膚刺激性試験、in vivo 眼刺激性試験、in vitro 哺乳類遺伝子変異、in vitro 細胞遺伝子、急性毒性、28 日間試験、生殖に関する毒性のスクリーニング、藻類の成長阻害試験、魚類の短期毒性、吸収/排泄スクリーニング試験。
- ・100 トン/年を超える場合：1 種の動物種の生殖に関する毒性、ミジンコの長期毒性、魚類の長期毒性、追加吸収/排泄試験、魚類における蓄積、ミミズの短期毒性、植物に対する短期毒性。
- ・1000 トン/年を超える場合：12 ヶ月を超え、できる限りの長期毒性、2 世代生殖毒性、ミミズの長期毒性、無脊椎動物の長期毒性、鳥類の長期毒性、植物の長期

毒性。

また、動物数の削減に関してバリデーションを終え、認められた試験法として以下が提示された。

- ・急性経口毒性・固定用量法—FDP (OECD TG420)
- ・急性経口毒性・急性毒性クラス法—ATP (OECD TG423)
- ・急性経口毒性・UP and Down 法—UDP (OECD TG425)

さらに、in vitro 法及び in silico について以下のようにまとめられた。

①Replacement (置換) について

- ・バリデーションを終え、受け入れられた試験法
 - ・経皮吸収性 (OECD TG428、2004年4月13日受理)
 - ・皮膚腐食性、in vitro ラット皮膚モデル (OECD TG430、2004年4月13日受理)
 - ・皮膚腐食性、in vitro ヒト皮膚モデル (OECD TG431、2004年4月13日受理)
 - ・in vitro 光毒性、3T3 NRU 光毒性試験 (OECD TG432、2004年4月13日受理)
- ・開発中の試験法
 - ・急性吸入毒性固定濃度操作法—FCP (OECD TG433、第2次ドラフト、2004年12月8日)
 - ・in vitro 皮膚刺激性 (ECVAM バリデーション研究中、2003–2005)
 - ・眼刺激性、急性眼刺激性/腐食性 (OECD TG405、ECVAM/ICCVAM 共同プロジェクト)
 - ・化学物質発癌性、SHE 細胞変異試験 (OECD ドラフト TG、ECVAM バリデーション申請中)
- ・計画されている試験法
 - ・急性経皮毒性固定用量法—FDP (OECD TG434、第1次ドラフト、2004年12月8日)
 - ・in vitro 小核試験 (OECD TG487、第1次ドラフト、2004年6月14日)

②in silico 法について

- ・良好な方法
 - ・急性魚毒性
 - ・生物蓄積
 - ・生分解性
- ・限定的に良好な方法
 - ・変異原性
- ・限定的な方法
 - ・急性経口毒性
 - ・藻類への急性毒性
 - ・細菌への急性毒性

- ・哺乳類への急性毒性
- ・眼刺激性
- ・加水分解性
- ・光分解性
- ・皮膚刺激性
- ・皮膚感作性
- ・非常に限定的な方法
 - ・癌原性
 - ・慢性毒性
 - ・催奇形性

2005年11月17日、フランスのストラスブールで開かれた REACH 案に関する欧州議会第一読会で、欧州議員の圧倒的多数 (賛成 407 票、反対 155 票、棄権 41 票) により REACH 欧州議会案が可決された。可決された REACH 欧州議会案では、企業 (化学物質製造・輸入業者等) は EU で上市する化学物質を登録することが義務付けられることになった (化粧品成分も対象となっている)。これらの物質はヒトの健康および環境への安全性に基づいて評価を受け、場合によっては使用が禁止されることもあり得るという案である。そして、発ガン性、変異原性、生殖毒性を有すると分類されている特定の危険物質 (CMR) を段階的に廃止し、これらより安全な代替物質に切り替える方針案も可決された。一方で、製造・輸入量が少ない化学物質 (年間 1–10 トン) の登録プロセスを簡素化するという、大きな負荷軽減案も含まれた。

2005年12月13日、ベルギーのブリュッセルで開かれた EU 理事会では、発ガン性、変異原性、生殖毒性を有すると分類されている特定の危険物質 (CMR) を段階的に廃止し、代替物質に切り替えるという欧州議会が採択した方針案は受け入れなかった。この案が維持されるかどうかも含め、今後の審議においてまだまだ流動的な面がある。

このまま進むと欧州議会と EU 理事会による最終決定に到達するのは 2006 年秋と予想され、欧州委員会は 2007 年春の REACH 発効を期待している。その後、欧州化学品機構が運営可能な状態になるには約 1 年かかるとみられており、REACH の要件の実施開始は 2008 年からになると予想される。

C-1-5 EU 危険物質指令の状況

ECB (European Chemicals Bureau) が更新している EU 危険物質指令の「物理化学的性質、毒性、環境毒性の測定法」のリストである Annex V において、2005 年度に新たな試験法

の収載はなかった¹⁴⁾。

C-1-6 COLIPA の状況

COLIPA (欧州化粧品工業連合会) は動物試験代替法の開発と受け入れに向けたコーディネートを目的に、1992年に SCAAT (Steering Committee on Alternatives to Animal testing) を常設の委員会として設置している。現在、以下の4 Task Force があり、それぞれ積極的に活動が進められている¹⁵⁾⁻¹⁶⁾。

- ① Eye Irritation Task Force (眼刺激性試験代替法の検討)
- ② Skin Tolerance TF (感作性・皮膚刺激性試験代替法の検討)
- ③ UV- Induced Toxic Effects TF (光毒性試験代替法の検討)
- ④ Mutagenicity/Genotoxicity TF (変異原性・遺伝毒性の検討)

このうち Skin Tolerance TF において、日本発の皮膚感作性試験代替法 h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の ring study が2004年6月から開始され、その結果に関しては第5回国際動物実験代替法会議にて発表された¹⁷⁾。

C-1-7 その他の状況

EUにおけるその他の状況を、公的機関等の組織的活動と学会等に分けて以下にその概要を記載する。

①公的機関等の組織的活動の状況

・ ZEBET

ZEBET (Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments)¹⁵⁾ は、代替法の文書化、評価、推奨あるいは国内外での承認を推進することを目的に1989年にドイツの連邦リスク評価研究所に設立された組織である。業務の範囲は、代替法に係わる文書化と情報提供、バリデーション及び研究である。ZEBET 業務の一つとして動物実験代替法のデータベースがあり、2000年2月からウェブにより無料で公開している¹⁸⁾。

・ NC3Rs

NC3Rs (National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research)¹⁹⁾ は動物試験、研究における3Rの推進、開発、実施を目的に2004年5月にイギリスに設立された。質の高い3Rs研究に資金を提供し、3Rsを広めるためのセミナーやシンポジウムを組織し、また、3Rsの情報源やガイドラインを開発している。独

立した組織であり、英国内務省、MRC (Medical Research Council)、BBSRC (Biotechnology and Biological Sciences Research Council)、ABPI (The Association of the British Pharmaceutical Industry) 及び The Wellcome Trust より資金が提供されている。2006年の研究補助金は100万ポンドである。

・ FRAME

FRAME (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments)²⁰⁾ は医学における動物実験に関して3Rを促進するために、1969年に設立されたイギリスの機関である。国際的科学雑誌 ATLA (Alternatives To Laboratory Animals) を年6回発行している。また、FRAME News を発行し、FRAME の活動及び3Rsに関するニュースを会員へ伝えている。毒物学における *in vitro* 法のプロトコルを収集した「INVITTOX」は、FRAME によって1989年に確立され、現在、ECVAM の Scientific Information Service の一部になっている。

・ 3R Research Foundation

3R Research Foundation²¹⁾ は、動物実験の質問をする会派、スイス製薬協会の「インターファルマ」(Novartis Pharma Ltd、F. Hoffman-La Roche Ltd、Serono Ltd)、動物解放研究財団の共同で1987年にスイスに設置された。3R Research Foundation の目的は、研究プロジェクトのための補助金によって動物実験代替研究を促進することである。この財団は創設以来、約294の申請を受け、96のプロジェクトに研究補助をしている。補助金はおおよそ年間70万スイスフランである。

・ NCA

NCA (Netherlands Centre for Alternatives to Animal Use)²²⁾ は、オランダにおける動物実験代替法の開発、バリデーション及び応用を促進することを目的としており、ユトレヒト大学獣医学部の動物、科学&社会部門の一部分である。動物実験代替法に関する研究をコーディネートし、情報を広めており、この領域におけるオランダの中心として活動している。年2回ニュースレターを発行し、ウェブ上で公開している。

②学会等の状況

・ 第5回国際動物実験代替法会議

第5回国際動物実験代替法会議 (5th world congress on alternatives & animal use in the life science)²³⁾ は、2005年8月21~25日にドイツのベルリンで開催された。主催者は ZEBET の Dr. H. Spielmann と Human Society of USA の Dr. A. Rowan であり、参加者は約

860名（日本からの参加者は約60名）であった。登録演題数は口頭とポスター発表を合計すると600題を越える数となった。これは、化粧品指令第7次改正とREACHという動物実験に関する大きな課題を抱えているEUでの開催であったためと考えられる。この会議では“Meeting the Challenge of the 7th Amendment of the EU Cosmetics Directive”というワークショップが開催され、そのfollow-up Meetingとして、11月7日にEU委員会主催のワークショップ「EU goes Alternatives」が開催され、3Rs宣言が提案されたという経緯がある。なお、次の第6回国際動物実験代替法会議は2007年8月に、本厚労科学研究班の主任研究者である大野泰雄先生の主催のもとに日本で開催される予定である。

・ESTIV

ESTIV (European Society of Toxicology in Vitro)²⁴⁾ は、in vitro 毒物学を促進することを目的とする学会である。ESTIVの公式雑誌は「Toxicology in Vitro」である。執行委員長はZEBETのH. Spielmann教授であり、in vitro 毒物学の情報交換を推進するために、INVITOXワークショップを開催、また、6ヵ月ごとにニュースレターを発行している。INVITOX2006(第14回in vitro毒物学に関する国際ワークショップ)は2006年10月2日～5日にベルギーのオステンドで開催される。

・MEGAT

MEGAT (Middle European Society for Alternative Methods to Animal Testing)²⁵⁾ は、動物試験代替法の普及とバリデーション、3Rの分野での研究の推進、メディアへの情報提供などを目的とする学会である。学会長はZEBETのH. Spielmann教授であり、使用言語はドイツ語、年4回科学雑誌「ALTEX」(Alternatives to Animal Testing)を無料でメンバーに発行している。2006年6月2日～4日にオーストリアのリンツ大学で第13回動物試験代替法会議を予定している。

C-1-8 小括

本年度のEUにおける代替法開発の動向に関して特筆すべき事項としては、2005年11月7日に公表された3Rs宣言が挙げられる¹¹⁾。3Rs宣言は、化粧品指令第7次改正による動物実験の禁止と化学物質の登録と規制(REACH)による動物実験の増加に関して、代替法開発の促進と活用の観点から提案されたものである。

化粧品指令第7次改正では動物実験の禁止が規定されているが、3Rs宣言では動物を用いる試験法も代替法として考えられるため、2006年12月に公表されるアクションプランの内容を注視する必要がある。また、この3Rs宣言は代替法の必要性と生命科学の複雑さのギャップを考慮すると、科学的に納得性の高い進め方であり、グローバルに普及する可能性がある。今後もEU情勢に関しては引き続き正確に調査して行く必要がある。

C-2 米国における代替法開発の動向

C-2-1 ICCVAMにおける代替法評価状況

ICCVAMは、米国官庁間の調整を図り共通の目標である代替法のバリデーションを統括する委員会として機能してきており、現在はNIEHSの恒久的委員会として位置づけられている。現在、ICCVAMは9省庁の15研究機関からの委員で構成されている。

本年度の動向は、4種眼刺激性試験代替法の評価と急性全身毒性を評価するための細胞毒性試験の評価に大別される。

4種眼刺激性試験代替法の専門家による評価会議が2005年1月11～12日、米国で開催された。なお、この専門家会議には、日本から本厚労科学研究班主任研究者の大野泰雄先生と分担研究者である板垣が招聘されており、眼刺激性試験代替法のバリデーション研究のために実施されたin vivoデータ(過去の厚生科学研究班で実施)の有用性が再認識された。評価された代替法及び現時点における評価結果の概要は以下の通りである。

①BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay) : いくつかの条件つきで、段階的評価手段として腐食性/強刺激性物質の識別に十分な精度と信頼性がある。

②HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane Test) : 段階的評価手段として腐食性/強刺激性物質の識別に十分な精度と信頼性がある。

③ICE test (Isolated Chicken Eye Test) : ICCVAMバリデーション評価基準に達していないが、ごく限られた状況において段階的評価手段として腐食性/強刺激性物質の識別に適用可能。

④IRE test (Isolated Rabbit Eye Test) : より多くの被験物質情報により試験法の精度が確認され、補足データにより信頼性評価が行われた場合に、段階的評価手段として腐食性/強刺激性物質の識別に適用可能。

なお、この専門家による評価会議の結果に対

するコメントの募集は2005年12月2日まであった。

またICCVAMは2005年5月11～13日に「眼刺激性のシンポジウム」を開催した。そのテーマは①科学物質による眼の傷害と回復の機構と②眼刺激性試験における苦痛の緩和、であった。この他、眼刺激性試験関係では、抗菌性クレンジング製品の皮膚及び眼刺激性を評価するための非動物試験に関するデータ及びピアレビューパネルの募集があった（応募期日：2005年5月5日）。

一方、急性全身毒性を評価するための細胞毒性試験の評価に関しては、ECVAMと共同のバリデーションを実施した2種の細胞毒性試験（BALB/c 3T3または正常ヒト角化細胞を用いる2種のNeutral Red取り込みアッセイ）の結果の評価が実施されており、2006年5月に専門家会議が開催される予定である。この他、急性毒性試験の代替法に関連するものとして、ボツリヌス毒素を評価するマウスのLD50法の代替法が、今後評価すべき試験法としてノミネートされた。

C-2-2 小括

本年度の米国における代替法開発の動向としては、ICCVAMにおいて、4種眼刺激性試験代替法に関して専門家による評価が実施され、さらにそのfollow-upのなされたことが挙げられる。これまでに、ICCVAMとECVAMは、急性毒性試験代替法としての細胞毒性試験の共同バリデーションを実施し、その結果を解析中である。今後、今回ICCVAMにおいて評価された眼刺激性試験代替法についてもECVAMとの相互認証が想定される。

C-3 OECDの動向

C-3-1 OECDガイドラインの動向

本年度は、OECD series on testing and assessment number 34: on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessmentが2005年8月18日付けで公表された。このGuidance documentは、試験法の定義、バリデーションの企画と実施、第三者による評価（peer review）、国際的な受け入れ、新規試験法提案のための資料等で構成されている。今後、このGuidance documentにより新規代替法のグローバルな承認が加速するものと考えられる。

一方、本年度、新規試験法でOECDガイドラインとして採択されたものはなかった。なお、

コメント募集期間を終え、修正、最終段階に入っている試験法（パブリックコメントの締切日）は以下の通りである。

- 426 神経発生毒性試験（記載なし）
- 433 急性吸入毒性試験
（2003年1月20日）
- 433 急性吸入毒性—固定用量法
（2004年7月30日）
- 434 急性経皮毒性—固定用量法
（2004年7月16日）
- 435 皮膚腐食性のためのIn vitro膜バリアー試験法（2004年7月16日）
- 436 急性吸入毒性—急性毒性クラス（ATC）方法（2005年1月28日）
- 487 In vitro小核試験
（2004年7月26日）

C-3-2 小括

本年度は、新規代替法のバリデーションと行政的な受け入れに関するGuidance documentが公表されたことから、今後、グローバルな承認が加速することが考えられる。本邦においては、新規代替法のバリデーションや行政における受け入れに関して、行政を中心とした産官学による組織的かつ積極的な対応が必要と考えられる。

C-4 日本における代替法開発の動向

C-4-1 厚生労働科学研究班における代替法の評価

本厚生労働科学研究班『安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究』は平成16年度に設置された。この研究班の目的の一つは、本邦における代替法評価体制を構築することである。

この評価体制については、平成13年度に設置された前厚生労働科学研究班『動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究』において既に検討されてきた。この概要は、広く評価すべき試験法を公募して、提案された試験法があった場合には、評価委員会や評価会議により評価を行う。また施設間バリデーションが必要な場合は、日本動物実験代替学会に施設間バリデーションの実施を委託するという体制となっている。

平成17年度の本厚生労働科学研究班における代替法の評価に係わる活動の状況を以下に記載する。『酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法』に関しては、施設間バリデーション及びその解析が終了し、現在、バリデーションで感度が低かった原因の究明と対応

の検討がなされている。『三次元皮膚モデルを用いる皮膚腐食性試験代替法』については施設間バリデーション結果の評価がなされている。マウスを用いる皮膚感作性試験代替法に関して、『LLNA-DA 法』については提案資料の評価が終了し、施設間バリデーションの準備がなされている。『LLNA-BrdU 法』については、提案資料の評価終了後に、施設間バリデーションが実施される予定である。

その他、動向としては、『化学物質リスク評価法の国際的バリデーションに関する研究』が平成18年度厚生労働科学研究として提案される予定である。本研究班では、内分泌攪乱物質の評価法と変異原性試験のコメットアッセイの国際バリデーションが主要な課題であり、今後、安全性評価に係わる試験法のグローバルな認知が加速することが期待される。

C-4-2 日本動物実験代替法学会における動向

日本動物実験代替法学会には、評価委員会とバリデーション委員会とが組織として設置されている。

評価委員会は、本厚生労働研究班から委託された試験法の一次評価を担当し、試験法の種類により個別に編成されている。現在は、光毒性評価ワーキンググループが『酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法』を、皮膚感作性試験評価ワーキンググループが『皮膚感作性試験代替法：LLNA-DA 法』及び『皮膚感作性試験代替法：LLNA-BrdU 法』を、皮膚腐食性試験評価ワーキンググループが『三次元皮膚モデルを用いる皮膚腐食性試験代替法』を担当している。

一方、バリデーション委員会は、バリデーションに関する実務を担当する委員会として、本厚生労働研究班から依頼された『酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法』^{26)・28)}及び『皮膚感作性試験代替法：LLNA-DA 法』²⁹⁾の施設間バリデーションを実施している。この皮膚感作性試験代替法である2種類のLLNA法のバリデーションには、製品ジャンルの異なる多くの化学企業や安全性試験受託機関が参加する予定である。このことは、化粧品以外の産業においても代替法について関心を持たれつつあることを示唆しており、今後、化粧品以外の産業における代替法の開発と評価の加速を期待したい。

本邦においては、その他の試験法に関して、行政や学会が関与したバリデーションや評価

に関する報告は見あたらない。

C-4-3 その他の国内動向

その他の国内動向では、代替法の開発と評価に係わる本年度の特筆すべき事項としては、JaCVAMの発足、改正・動物愛護管理法の公布、代替法の現状を幅広く取りまとめたNEDOの調査報告書等が挙げられる。

JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) は平成17年11月に国立医薬品食品衛生研究所の薬理部新規試験法評価室として発足した。初代室長には、代替法の開発と評価については非常に実績がある小島肇博士が就任した³⁰⁾。JaCVAMの必要性については、本厚生労働科学研究班の分担研究報告書において、これまで繰り返し記述してきたことであり、小島博士のこれからの活躍に期待したい。

改正・動物愛護管理法は平成17年6月22日に公布された³¹⁾。代替法に関連する事項として、実験動物の福祉の原則等として『3Rsの原則』が改正法の第41条中に明確に記載された。現在、この改正・動物愛護管理法を受け、動物実験の適正化のためのガイドライン作成が、関係行政機関や団体等において進行中である。

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)は『ヒト等の細胞を利用した化学物質の影響評価試験手法の現状と課題に関する調査(バイオ分野)』と題する調査報告書を公表した³²⁾。これは、新規化学物質の影響評価のための試験手法を更に優れた手法に高度化していく趣旨で、ヒト等の細胞を使用する試験手法に関して考慮すべき諸点を明らかにし、必要な場合に政府の政策の一環として更なる研究開発を促進していく政策を展開する上での基礎的な知見を収集・整理することを目的に調査が実施され、さらにそれをまとめたものである。代替法の開発と活用の現状、さらには今後の課題を取りまとめたものとして注目される。

C-4-4 小括

本邦における代替法の開発・評価において本年度の特筆すべきことは、まず、本邦独自の代替法の評価機関であるJaCVAM発足したことであり、さらに改正・動物愛護管理法に『3Rsの原則』が記載されたことである。この『3Rsの原則』は、動物実験の適正化、さらには代替法開発を促進することが期待される。またJaCVAMの発足により、本邦におい

て開発された代替法の評価が加速することが期待される。

代替法の開発と評価に関して日本における今後の課題は、JaCVAMを通じた評価のグローバルハーモナイゼーションと、評価された試験法のガイドライン化への道筋作成であり、JaCVAMの活躍を大いに期待したい。

C-5 化粧品安全性評価に関連する代替法の状況

各安全性試験代替法の現状については、日本化粧品工業連合会 技術委員会動物実験代替専門委員会が平成 17 年度に広範に調査している。この調査結果の一部を日本化粧品工業連合会が編集した『化粧品安全性評価に関する指針 2001』の記載を参考に、以下に記述する。

C-5-1 単回投与毒性

①動物を用いる代替試験法の状況

従来の試験法をベースに動物数を削減 (Reduction)、あるいは苦痛を軽減 (Refinement) するための修正が行われた *in vivo* 代替試験法が開発されている^{33,34)}。現在、公定法化された試験法は急性経口投与試験のみであり、すでに OECD の化学物質テストガイドラインに収載され³⁵⁾、化学物質分類のための試験法として国際的にも認知されている。経口以外の暴露経路の試験法として、吸入経路および経皮経路の試験法が OECD テストガイドラインでドラフト化されている³⁵⁾。

②動物を用いない代替試験法の状況

MEIC (Multicenter Evaluation of *In vitro* Cytotoxicity) プログラム³⁶⁾ (1989-1996) の結果を受けて、急性毒性を予測するための *in vitro* 細胞試験の最も良い組合せについて検討するため、the Evaluation-guided Development of New *In Vitro* Test Batteries (EDIT) programme³⁷⁾⁻³⁸⁾ が 1998 年より 6 年間の計画で進められている。このプロジェクトは、MEIC で提唱された基礎細胞毒性を求める組合せ試験 (test battery) に、さらに代謝、トキシコカインテイクスや臓器特異的毒性に関連する試験法を組み合わせ、精度の高い急性毒性および慢性毒性を試験する代替試験法の確立を目指している。

欧州では、化学物質管理のための規制が急速に進められており、化学物質の安全性担保を目的に全身急性毒性を検出する *in vitro* 試験ストラテジーを開発するため、A

-Cute-Tox プロジェクト³⁹⁾⁻⁴⁰⁾ が 2005 年 1 月よりスタートした。このプロジェクトは、EU の 6FP (The sixth framework program) に基づき、欧州化学品局 (ECB) 等の規制当局の保障を受けて 900 万ユーロの予算を受けて進められている。このプロジェクトの目的は、*in vitro* 試験の結果とヒトの急性毒性との相関性を正確に捉えることができるレベルに改善しようとするにあり、その目標レベルは動物試験に替わる試験法を開発することではなく、*in vitro* の手法を用いて急性毒性の予測方法を高めることにあり、急性毒性が正確に予測できない化合物についてはさらに試験が必要であるとの警報を鳴らす方法を開発することにある。

米国では、2002 年より The NTP Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) と the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) の共同によって、急性経口毒性を評価するための *in vitro* 細胞毒性試験をバリデーションするための複数施設による研究⁴¹⁾⁻⁴²⁾ が進行中である。このプロジェクトでは、Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) によって推奨された 2 つの *in vitro* 細胞毒性試験を、*in vivo* 急性経口全身毒性試験の試験開始用量の設定に用いようとしており、*in vivo* 試験に用いられる動物数を削減することを目的としている。評価された試験は、基礎細胞毒性 (Basal Cytotoxicity) を評価できるとされているニュートラルレッド取り込みアッセイ (Neutral Red Uptake assays) であり、BALB/c 3T3 ファイブロブラスト (マウス細胞株)⁴³⁾ および正常ヒトケラチノサイト (ヒトプライマリー細胞)⁴⁴⁾ を用いた 2 つの試験法であり、Phase I ~ III までの 3 段階に分けて実施された。すでに Phase III まで終了し、2005 年国際代替法学会 (ベルリン、ドイツ、2005) においてその結果が報告された⁴⁵⁾⁻⁴⁸⁾。

以上のように、急性毒性試験の代替法については、従来の *in vivo* 試験を改良して使用動物数を削減 (Reduction) あるいは苦痛の軽減 (Refinement) を図る試みと、一方で動物試験を減らすために *in vitro* 試験の利点をできるだけ活用しようとする試みが進められている。今後、化学物質管理の規制強化などを背景にした大掛かりなプロジェクトの研究成果と行政・業会動向を注視していく必要がある。

C-5-2 皮膚毒性

①概要

化粧品等の化学物質が皮膚に接触することによる皮膚炎（皮膚刺激性）やそれに紫外線が関与したときにおこる皮膚炎（光毒性）などに対して安全性を確保するための評価が必要である。

従来から、ヒトに対する危害予測のため、動物の皮膚が用いられている。現在使用されている皮膚一次刺激性試験及び皮膚腐食性試験の国際的なガイドラインは、Draize らの方法を基礎としている。このガイドラインでは、動物としてウサギが推奨されているが、その他の動物種（モルモット、ミニブタ）等も利用されている。ウサギは mild から moderate な刺激物に対してヒトより感度が高いと考えられているが、その一方、動物結果とヒトでの結果が一致していないという報告もある⁴⁹⁾⁻⁵⁰⁾。これに加え、動物愛護や倫理的観点から、動物実験の代替法の評価開発が進められている。これらの代替法開発は ECVAM を中心に展開されている。ECVAM における動物試験の代替法開発に対する基本的な考え方は、構造活性相関、in vitro 試験法とヒトパッチテストを基に評価スキームを構築することにある⁵¹⁾。

現在の in vitro 皮膚刺激性試験法開発の取り組みは、皮膚腐食性、皮膚一次刺激性（化学物質の危険性把握：Hazard identification）のポテンシャルが評価できる代替法開発にとどまっている。具体的には、三次元皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験法や、培養細胞を用いた光毒性試験法が化学物質の in vitro 試験法として OECD ガイドラインに採用されている。

②皮膚刺激性の代替試験法

試験法としては、三次元ヒト皮膚モデル⁵²⁾⁻⁵³⁾を用いた方法やマウスの摘出皮膚を用いた器官培養法⁵⁴⁾などが挙げられる。現在、これらの試験法は公的には受け入れられる段階には至っていないが、バリデーションが実施され、皮膚刺激性物質のスクリーニング、または生じる刺激の程度予測が一部適用可能であることを示すデータが集まりつつある。国内では動物実験代替法学会において 2001 年より EpiDerm、TESTSKIN、Vitrolife-Skin などの『市販キットである三次元皮膚モデル用いる皮膚刺激性代替法』のバリデーションが実施されている。また代替法学会研究助成として『3次元ヒト皮膚モデルで皮膚刺激性を評価するための統計的に最適な実験デザインとデ

ータ解析法の研究』も行われている。海外においても Epiderm、EPISKIN、PREDISKIN など 3次元皮膚モデルを用いたバリデーションが ECVAM で進行している。なお、刺激性とは違い、皮膚へ不可逆的な影響を及ぼすような化学物質の危険性把握（Hazard identification）のための重要な試験として位置づけられている皮膚腐食性代替試験法については、3次元皮膚モデルを用いた試験法が OECD ガイドラインとして 2004 年に採用されている⁵⁵⁾。日本でも、厚生労働科学研究班研究として皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性の多施設バリデーションを実施し、評価委員会で評価中である。その他にも in vitro の代替法として Transepidermal Electrical Resistance (TER) 試験法⁵⁶⁾、蛋白変性検出法⁵⁷⁾⁻⁵⁸⁾などが OECD ガイドライン案となっている。

③光毒性の代替試験法

試験法としては紫外線光照射下において被験物質を各種の生体細胞や人工皮膚モデル、または化学物質と接触させることにより生じる細胞の生存率の変化または化学物質の光変性を指標とするインビトロ試験がある。これらの中で、光毒性物質のスクリーニング法として、Balb/c 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド取り込み法が 1998 年に EU の ECVAM で承認され、EU の危険物指令の Annex V に取り入れられており、化学物質のクラス分けに利用されている⁵⁹⁾。また、この方法に修正を加えた方法が、2004 年に OECD でも化学物質光毒性試験法ガイドラインとして受け入れられている⁶⁰⁾。

OECD ガイドライン収載の試験法について、日本では、2002 年に厚生労働科学研究班による調査研究が実施され、報告書が提出されている⁶¹⁾。その他、ECVAM でバリデーションが実施されている試験法として 3次元皮膚モデルを用いた試験法、赤血球を用いた方法等が報告されている⁶²⁾。また、日本では、異なった指標による試験法を組み合わせた評価法として酵母光生育阻害試験法と赤血球を用いた光溶血性試験法のバッテリー試験法²⁶⁾⁻²⁸⁾について厚生労働科学研究班研究としてバリデーションが実施されている。

C-5-3 眼刺激性

①概要

眼刺激性は、被験物質を眼に直接接触させることにより生じる結膜の発赤・浮腫・分泌物、虹彩の変化や角膜の混濁度などの変化を

指標とする刺激反応であり、眼刺激性試験はヒトが被験物質を粘膜に単回適用、あるいは誤って眼に入れた場合に生じる粘膜刺激性、結膜、虹彩、及び角膜に対する刺激性を予測するために実施される。今日まで、眼刺激性試験の方法としては、成熟白ウサギを用い、0.1g 又は 0.1mL の被験物質をその結膜嚢内に投与し、Draize 採点法によりその刺激性を判定し、Kay ら⁶³⁾の基準で評価を行うものである。

眼粘膜刺激性代替法試験には、受精鶏卵、各種生体細胞、及び人工組織モデル系に被験物質を適用し、その結果生じる組織変化や細胞の生存率を指標とする *in vitro* 試験がある。4 種類 Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test (ウシ摘出角膜の混濁及び透過性試験)、The Hen's Egg Test - Chorion Allantoic Membrane (HET-CAM) (受精鶏卵の漿尿膜試験)、The Isolated Chicken Eye (ICE) test (鶏の摘出眼球試験)、The Isolated Rabbit Eye (IRE) test (ウサギの摘出眼球試験) については米国環境保護局 (EPA) が *in vitro* 試験法として眼刺激性又は腐食性をスクリーニングできる方法として推薦している。また、これらの試験法は、米国官庁間代替法バリデーション委員会 (ICCVAM)、国立環境衛生科学研究所 (NIEHS)、NTP 代替試験法省庁間センター (NICEATM) が 2005 年に *in vitro* 眼刺激性試験法バリデーション評価のための専門家委員会を開催し、それらの眼刺激性試験代替法の評価 (peer review) を実施している。

②眼刺激性の代替法試験法

これまでのところ、規制当局によって公的に受け入れられた試験法はないものの、複数の代替法についてはバリデーションが実施され、ヒト又は動物における眼粘膜刺激性の有無、及びその程度 (分類) を予測するために用いることが出来る。

米国環境保護局 (EPA) は 2003 年 10 月に 4 種類 Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test (ウシ摘出角膜の混濁及び透過性試験)、The Hen's Egg Test - Chorion Allantoic Membrane (HET-CAM) (受精鶏卵の漿尿膜試験)、The Isolated Chicken Eye (ICE) test (鶏の摘出眼球試験)、The Isolated Rabbit Eye (IRE) test (ウサギの摘出眼球試験) を *in vitro* 試験法として眼刺激性又は腐食性をスクリーニングできる方法として推薦している。また、米国官庁間代替法バリデーション委員会 (ICCVAM)、国立環

境衛生科学研究所 (NIEHS)、NTP 代替試験法省庁間センター (NICEATM) は 2005 年に *in vitro* 眼刺激性試験法バリデーション評価のための専門家委員会を開催し、*in vitro* 試験法として、上記 4 種類の試験法を提案し、それらの眼刺激性試験代替法の評価 (peer review) を実施している。

これらの方法については、以下のような見解がまとめられている。BCOP test (ウシ摘出角膜の混濁及び透過性試験) に関して、いくつかの条件つきで、段階的評価手段として腐食性/強刺激性物質の識別に十分な精度と信頼性がある。HET-CAM (受精鶏卵の漿尿膜試験) に関して、段階的評価手段として腐食性/強刺激性物質の識別に十分な精度と信頼性がある。ICE test (鶏の摘出眼球試験) に関して、ICCVAM バリデーション評価基準に達していないが、ごく限られた状況において段階的評価手段として腐食性/強刺激性物質の識別に適用可能。IRE test (ウサギの摘出眼球試験) に関して、より多くの被験物質情報により試験法の精度が確認され、補足データにより信頼性評価が行われた場合に、段階的評価手段として腐食性/強刺激性物質の識別に適用可能とされた。

欧州においては、消費者向けの化粧品および非食品に関する科学委員会 (SCCNFP) は化粧品成分の安全性を確認するために実施される毒性試験について、ガイドラインを策定しており、その第 5 版が第 25 回総会 (2003 年 10 月 20 日) で採択されている。その中で、眼刺激性試験は、今のところ、従来の Draize *in vivo* 眼刺激試験⁶⁴⁾の代わりになるようなバリデーションが完了した代替法は存在しないが、BCOP 試験 (ウシ角膜混濁および透過性試験) が中性の有機化学物質に関して適当とされている⁶⁵⁾。RBC (赤血球) 試験および NRU (中性赤摂取) 試験は界面活性剤の評価に有用であるとしている。また、HET-CAM 試験 (受精鶏卵の漿尿膜試験)⁶⁶⁾は、化粧品最終製品のスクリーニング試験にしばしば使用される有効な代替法であり、正式なバリデーションは行われていないが、フランスなどでは法律でも取り上げられている。

REACH (Registration Evaluation and Authorization of Chemicals) における代替法の検討としては、Replacement (置換) については、開発中の試験法として、眼刺激性、急性眼刺激/腐食 (OECD TG405, ECVAM/ICCVAM 共同プロジェクト)。また、*in silico* 法について、限定的な方法に眼刺激性が挙げられ

ている。SCAAT (The COLIPA Steering Committee on Alternatives to Animal testing) では、現在、4つのTask Forceがあり、Eye Irritation Task Force も含まれている。その分科会では、1) 生理的な機能と *in vitro* 試験での角膜から遊離される損傷のシグナルにおける変化のキネティクスが、回復性も含めた眼刺激を予測できるか、2) ヒトの不死化細胞や3次元ヒト角膜・結膜を用いた場合の損傷の度合と回復性に関する指標の同定、及び、3) ゲノミクスプロジェクトの眼刺激性における検討を実施している。

わが国における代替法のバリデーションについては、1990年、厚生省(当時)が新規原料配合化粧品の安全性評価のための研究を発足、その後、産学官が参加して眼刺激性試験の *in vitro* 試験に関する評価が行われた⁶⁷⁾。前述した、米国、欧州などの状況も踏まえ、現在、化粧品工業連合会では受精鶏卵を用いた方法⁶⁸⁾、培養細胞を用いた方法⁶⁹⁾⁻⁷²⁾、赤血球血球を用いた方法⁷³⁾、三次元モデルを用いた方法⁷⁴⁾、無生物を用いた方法⁷⁵⁾⁻⁷⁶⁾、the Isolated Rabbit Eye (IRE) Test Method⁷⁷⁾⁻⁷⁸⁾、the Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method^{77), 79)}、the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method^{77), 80)}、the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method^{77), 81)}を紹介する「化粧品の安全性評価に関する指針」の改訂作業を進めている。

C-5-4 皮膚アレルギー性

①概要

2005年度に、複数の施設によるバリデーション、ならびに共同研究の成果が報告された感作性試験の代替試験法としては、非放射性 LLNA (Non-Radioactive Endpoint Local Lymph Node Assay)⁸²⁾⁻⁸³⁾、THP-1細胞を用いた皮膚感作性試験代替法 (human Cell Line Activation Test; h-CLAT)^{17), 84)-86)}、ならびに U937細胞を用いた皮膚感作性試験代替法⁸⁷⁾が挙げられる。

②各試験法の状況

非放射性 LLNA は、マウスを用いる *in vivo* 試験であり、いわゆる Reduction および Refinement を意図した代替法と位置づけられる。本試験法においては、耳介リンパ節重量、耳介リンパ節細胞数などを評価指標とした方法について、ヨーロッパの研究機関においてバリデーション研究⁸²⁾⁻⁸³⁾が実施されている。

THP-1細胞を用いた皮膚感作性試験代替法 (h-CLAT)、および U937細胞を用いた試験法は、ヒト単球由来細胞株を用いる *in vitro* 試験で、フローサイトメトリーによる細胞表面の CD86 や CD54 の発現量変化を評価指標とする試験法である。h-CLAT は、日本企業である株式会社資生堂ならびに花王株式会社の共同研究により開発された試験法であり⁸⁴⁾⁻⁸⁵⁾、その試験法のさらなる有用性を把握する目的で、COLIPA 参加企業や国内の企業と Ring Study が実施され、その研究成果が WC5¹⁷⁾ および日本動物実験代替法学会⁸⁶⁾にて報告されている。また、U937細胞を用いた皮膚感作性試験代替法については、L'Oreal が WELLA、LVMH との共同研究成果を WC5 にて発表した⁸⁷⁾。

なお、現時点でバリデーションの段階まで達していないものの、今後、注目に値すると考えられるいくつかの研究が報告されている。そのひとつは、非放射性 LLNA であり、BrdU を用いる方法⁸⁸⁾と、暴露されたマウスのリンパ節細胞浮遊液中の ATP を測定する方法⁸⁹⁾について、日本動物実験代替法学会においてバリデーションへ進める準備が行われている。この他には、アミノ基やシステイン基などを有する市販または合成ペプチドと評価化合物との結合性を評価する *in vitro* 試験法である、タンパク結合性評価法 (Protein binding assay) について、結合物を LC-MS⁹⁰⁾ や HPLC⁹¹⁾ で分析する方法や、評価化合物とペプチドとの結合によるペプチドの減少を分析する方法⁹²⁾の検討結果が報告されている。これらの研究以外にも、細胞表面のチオール基の変化を指標とした試験法、シグナル伝達系の評価法なども、国内あるいは海外の学会で発表されており、今後の研究の進展が期待される。

なお、光感作性試験においては、2005年度には、代替試験法に関するバリデーション、共同研究成果の報告、新規試験法に関する研究の論文発表といった、特筆すべき動向は認められなかった。

C-5-5 反復投与毒性

①概要

反復投与毒性は化学物質の長期暴露により細胞、組織あるいは多臓器に進行的に誘発される機能障害の結果であり、そのため動物を用いた反復投与毒性試験では広範なエンドポイントが評価されている。ECVAM では反復投与毒性試験の代替法について *in vitro* モデルとして五つの主要臓器 (肝臓、腎臓、中枢神経系、肺および造血系) を標的とする試験系

が利用可能と報告している⁹³⁾。肝毒性に関しては3次元培養モデル(コラーゲンを用いたサンドイッチカルチャーモデル(sandwich culture)およびコラーゲングルに細胞を固定させたモデル)が、また腎毒性に関しては灌流培養モデル(perfusion culture)の最適化が2004年9月に開始されたSTREP project PREDICTOMICSにより進められている⁹⁴⁾。コラーゲンを用いたサンドイッチカルチャーモデルはラットあるいはヒトの肝細胞を用いており、肝細胞内酵素の逸脱が有望な指標とされている。また、灌流培養モデルではヒト近位尿管細胞株を用い、機能的指標を含めた多面的指標の最適化が試みられている⁹⁵⁾。さらに、肺毒性に関しては肺上皮細胞の気液界面培養モデル(air-liquid interface culture)を含む肺毒性評価方法の開発がMarie Curie Research Training NetworkのプロジェクトであるPULMO-NET(pathogenesis of pulmonary diseases)により2005年4月から進められている⁹⁶⁾。気液界面培養モデルではII型肺上皮細胞株が使用されており、界面活性物質の分泌が指標とされている。これら標的臓器毒性を対象とした代替法の開発が進む一方で、各試験の最適化、新試験法の開発およびin vitro試験による無毒性量(NOEL)予測法の確立などが課題として指摘されている⁹³⁾。最終的にはQSAR的アプローチなどを含めたbatteryあるいはtier方式による代替を目指すとしているが、完全な代替までには10年以上が必要と考えられている⁹⁵⁾。

C-5-6 生殖毒性

①概要

生殖発生毒性試験の代替法開発はSpielmann教授を中心としたECVAMのタスクフォースによりすすめられており、現在はReProTect Project(EU委員会の第6次Framework Programme on Research and Developmentによる生殖発生毒性試験のプロジェクト)がECVAM主導で進行中である⁹⁶⁾⁻⁹⁷⁾。複雑な哺乳類の生殖発生の過程を単一試験により代替することは困難であることから、プロジェクトでは生殖発生の過程を分割し、各過程に適した評価法の開発を試みている⁹⁵⁾。目的のひとつは、代替法に基づくbatteryあるいはtier方式により生殖発生毒性を評価する試験戦略を開発し実行することであり⁹⁸⁾、胎児毒性試験の代替法として、すでに胚性幹細胞試験(embryonic stem cell test, EST)、

小塊培養法(micromass test, MM test)および全胚培養法(whole-embryo culture test, WEC test)がECVAM Scientific Advisory Committee(ESAC)により採りあげられている⁹⁸⁾。ESTはマウスES細胞株(D3)およびマウス線維芽細胞株(3T3)を用いる。エンドポイントは、ES細胞の心筋細胞への分化抑制、3T3細胞における細胞毒性およびES細胞における細胞毒性の3項目である。MM testは器官形成期中期のマウス胎児脳および肢芽から分離した細胞を用い、それぞれが神経細胞および軟骨細胞へ分化する能力をエンドポイントとしている。WEC testには妊娠マウス、ラットおよびウサギから摘出した頭ヒダ期(head fold stage)あるいは初期体節期(early somite stage)胎児が用いられる。形態形成、発育、分化、卵黄囊循環および血管形成ならびに造血への影響等が指標となる⁹⁸⁾。ESTについては代謝活性化の導入およびマウス胚性幹細胞からヒト胚性幹細胞の利用を視野に入れた研究が期待されているが⁹⁷⁾、MM testおよびWEC testについてはその有用性の一方で、いずれの方法もドナー動物を必要とすることから完全な代替法とはなりえない点や、将来の規制(EU Directive 86/609/EEC)が胚および胎児の保護に及ぶ可能性も指摘されている⁹⁸⁾。また、米国環境庁(US EPA)および日本の(財)化学物質評価研究機構(CERI)を加えた共同研究として(抗)エストロゲンおよび(抗)アンドロゲン作用物質を検出するin vitro法のプレバリデーションが進行中である⁹⁷⁾。(抗)エストロゲン作用についてはラット子宮サイトゾル由来あるいはヒトリコンビナントエストロゲン受容体への結合能あるいはレポーター遺伝子を導入したMCF-7およびT47D等の細胞株を用いた転写能が検討されている。(抗)アンドロゲン作用についてはラット前立腺サイトゾル由来アンドロゲン受容体への結合能あるいはレポーター遺伝子を導入したMDA-kb2等の細胞株を用いた転写能が検討されている⁹⁸⁾。動物を用いる生殖発生毒性試験についてin vitroモデルを開発、最適化、集約して適切な試験戦略に結びつけることで、動物数削減が可能となる。さらに、各種標的組織における毒性メカニズムの詳細解明に繋がることが期待されている⁹⁹⁾。しかしながら、催奇形性の予測を主眼とした胎児毒性の研究が進展する一方で、他分野(受胎能、着床および胎盤毒性など)に関する研究の遅れが指摘されている⁹⁸⁾。さらに、繁殖行動、分娩あるいは出生後の機

能的発達の評価方法については、現時点の *in vitro* 試験で代替できる可能性が乏しい点も指摘されている⁹⁸⁾。

C-5-7 経皮吸収性

①概要

経皮吸収試験の代替法については OECD TG428 が 2004 年に承認されており、国際的に標準化されている。現在、妥当性を評価する状況にある新たな経皮吸収代替法はない。むしろ、文献等において、このガイドラインの問題点の改良についていくつか提案されており、当面、このガイドラインが経皮吸収試験代替法の中心となると予想される。また、標準化された反復局所投与において利用できる *in vitro* 試験法ならびに代謝を組み込んだ皮膚吸収と透過に利用できる *in vitro* 試験法はなく、定量的構造活性相関 (QSAR) 等による経皮透過予測モデルについても研究段階であり、実用化に至っていない。

②各試験法の状況

経皮吸収試験は化粧品、医薬部外品および医薬品等の皮膚への適用による角質、表皮および真皮への透過ならびに全身的暴露を評価するために行われる試験である。経皮吸収試験は実験動物を用いた *in vivo* 試験が一般的であり、2004 年に OECD TG427 に記載された¹⁰⁰⁾。また、経皮吸収試験の代替法も *in vivo* 経皮吸収試験と同時に OECD TG428 として記載され、動物およびヒト摘出皮膚を用いた透過拡散セルによる *in vitro* 試験法が標準化されている¹⁰¹⁾。

反復投与による経皮吸収試験については限られた試験期間以内の反復投与でデザインされたいくつかの試験法はあるが、現在、標準化された反復局所投与に利用できる *in vitro* 試験法はなく、代謝を組み込んだ皮膚吸収/透過に利用できる *in vitro* 試験法もない。また、ヒトボランティアによる皮膚吸収試験は、化粧品原料や化粧品製品の低い毒性の場合において行うことができるが、利用できるヒトのデータはほとんどないのが実情である⁹⁹⁾。

OECD TG 428 は標準化された経皮吸収試験代替法であるが、いくつか問題点が指摘されている¹⁰³⁾。大きな問題点としては①試験に用いる皮膚の供給と②皮膚膜の完全性を確認するトリチウム水の利用が挙げられる。

・試験に用いる皮膚の供給

ヒト摘出皮膚については現在、日本において供給面や倫理面から、試験に汎用できる状況にない。動物摘出皮膚については動物の犠

性が避けられないことから動物実験代替という観点から望ましくないことや、動物から表皮の剥離技術に熟練を要することから、均一な皮膚膜を得ることが困難である。これらの問題点を解決するために、摘出皮膚からヒト 3 次元再構築皮膚や人工皮膚 (膜) への代替利用が提案されている。ヒト 3 次元再構築皮膚を用いる経皮吸収試験については試験法の諸条件の検討が行われ、現在、プレバリデーションの準備が進められている¹⁰⁴⁾。一方、人工膜についてはシリコンラバーを用いる経皮透過性試験の施設間・施設内バリデーションが行われたが、この方法は施設間および施設内誤差が大きく、実用化されるまでには多くの改良の余地を残している¹⁰⁵⁾。

・皮膚膜の完全性を確認するトリチウム水の利用

トリチウム水により皮膚膜の完全性を確認する場合には RI 施設が必要であり、試験実施施設が制限される。この問題点を改善することを目的として、電気抵抗性による皮膚膜の完全性の確認方法が各種皮膚を用いて検討され、良好な結果が得られている¹⁰⁶⁾。

拡散透過セルを用いない経皮吸収試験代替法の試みとしては構造活性相関による経皮吸収予測に関する方法等が提案されている。複雑な因果関係を説明する方法として注目される人工ニューラルネットワークを利用した化学構造に基づく経皮吸収予測¹⁰⁷⁾や、透過剤、溶媒および添加剤の複合的な条件において経皮透過性を予測する複合型定量的構造透過関係¹⁰⁸⁾などが学会や文献で報告されている。

C-5-8 小括

本年度の代替法の開発と評価に関する状況を安全性評価項目ごとにとりまとめた。その結果、本年度は特筆すべき変化はなかったものと考えられた。

D. 結論

本年度の代替法の開発と評価に関する進展を概観すると、『代替法の 3 Rs』がグローバルに認知された年、さらには新規代替法の行政的な受け入れがグローバルレベルで一歩前進した年として結論付けられる。

『代替法の 3 Rs』のグローバルな認知に関しては、本邦においては 2005 年 6 月 22 日に改正・動物愛護管理法が公布され、実験動物の福祉の原則等として『3Rs の原則』が第 41 条中に明確に記載された。現在、この改正・