

データベースが固定され、一通りのデータ解析ができた段階で、実行委員長は、固定されたデータの確認と解析結果の検討を行うために、本実行委の委員と実験担当者が参加する中間報告会を開催する。

#### 14. 結果の公表

実行委員長は、中間報告会の討論結果をふまえた報告書を作成し、最終報告会を開催した後、最終報告書を本学会バリデーション委員会に提出する。

本実行委は、研究結果を厚生労働科学研究班報告書、学会報告、学术论文として公表する。公表の際の著者名は本実行委の委員とし、実験担当者名を報告書末尾に記載する。

#### 15. 各種問い合わせ先

実験技術とSOP：武吉正博「[takeyoshi-masahiro@ceri.jp](mailto:takeyoshi-masahiro@ceri.jp)」

被験物質，試料，共通消耗品：小島肇「[h-kojima@nihs.go.jp](mailto:h-kojima@nihs.go.jp)」

データシートとその送付：寒水孝司「[sozu@medstat.med.osaka-u.ac.jp](mailto:sozu@medstat.med.osaka-u.ac.jp)」

計画書，報告書，その他一般事項：小島肇「[h-kojima@nihs.go.jp](mailto:h-kojima@nihs.go.jp)」

実験動物の入荷等：出原賢治「[kn\\_idehara@daicel.co.jp](mailto:kn_idehara@daicel.co.jp)」

以上

## LLNA-BrdU 法実験 SOP

2006 年 7 月 3 日 LLNA-BrdU バリ実行委で確認後、改訂 060718

以下に、LLNA-BrdU 法バリレーション研究における、2 被験物質を単位とした実験の標準作業手順を示す。

被験物質数や動物数が変わるときは、この手順での関連部分を変更して適用する。

### § 0 実験前の機器・器具の準備

表 1 に示す実験機器・器具、試薬を用意する。

### § 1 マウス入荷のための準備

LLNA-BrdU バリ実行委と事前に協議・決定した入荷予定日までに、37 匹の CBA/JNCRlj マウスを入荷して馴化が開始できるように、自施設の規準に従った準備を行う。

馴化終了までに、4 匹同時飼育が可能なケージを 9 個準備し、それぞれのケージに以下の内容を表記しておく。

- 第 1 群：「AOO」
- 第 2 群：「陽性対照」
- 第 3 群：「溶媒」
- 第 4 群：「被験物質 Y 低濃度」
- 第 5 群：「被験物質 Y 中濃度」
- 第 6 群：「被験物質 Y 高濃度」
- 第 7 群：「被験物質 X 低濃度」
- 第 8 群：「被験物質 X 中濃度」
- 第 9 群：「被験物質 X 高濃度」

ここで被験物質の「X」あるいは「Y」という記号は配布された試料の記号のことである。データの記入ミスを防ぐために、群番号は原則としてこの順にする。実験は 2 回もしくは 3 回実施するので、実験番号「1」「2」「3」も表記しておく。

### § 2 入荷、馴化、群分け

37 匹のマウスが入荷されたら、施設の規準に従って直ちに馴化を開始する。馴化期間は 5 日以上 16 日以内とする。

馴化の後、耳介の損傷等の異常が認められない 36 匹を、乱数等を用いてランダムに 4 匹ずつの 9 群に分け、§ 1 で準備したケージに入れる。異常が認められないマウスが 36 匹に満たない場合は、群番号の大きい順に 1 群 3 匹とする。群に含めないマウスは処分する。

マウスには、油性インキによる尾へのマーキング等の方法で、群番号と 1~4 の個体識別番号を

記入する。

マウスは、入荷から本実験終了までの期間中、室温 22℃ (±3℃)、湿度 30~70%、12 時間明暗サイクルの条件下で飼育を行い、餌および水は自由に摂取させる。この飼育条件に逸脱が生じた場合は、その内容を記録しておくこと。

### § 3 機器・器具、試薬、試験液の確認と保管

LLNA-BrdU バリ実行委から試料がとどいたら、送付されている内容表と内容物が一致していることを確認する。

試験液 (AOO、陽性対照、溶媒、被験物質 Y 低濃度、被験物質 Y 中濃度、被験物質 Y 高濃度、被験物質 X 低濃度、被験物質 X 中濃度、被験物質 X 高濃度) に、それぞれ対応する群番号 1~9 を記入し、試験管立て等に順に並べ、速やかに冷蔵保管、すなわち 0℃~10℃ (より望ましくは 2℃~8℃) に維持して保管する。BrdU 溶液は -20℃ で凍結保存する。実験の際にはこれを取り出して使用する。BrdU は投与前に溶解して用いるが、析出が認められる場合は 37℃ のウォーターバス等で加温し完全に溶解した後に投与する。

試験液の内の AOO は Acetone/olive oil (4:1 v/v) であり、陽性対照は Hexylcinnamicaldehyde (HCA、CAS No: 101-86-0) の 50% AOO 溶液である。

### § 4 感作操作 (第 1,2,3 日目の操作)

- 4.1) 試験液を取り出し、凍結しているものは加温して溶液に戻す。沈殿、析出の見られるものは投与前の加温あるいは超音波処理などの前処理を行い、完全に溶解していることを確認する。保管時と比較して、形状が異なる場合には記録に残す。
- 4.2) 第 1 日目の投与前にマウスの体重を測定して所定の用紙に記録する (最小単位: 0.1g)。
- 4.3) 気道を確保する状態で、親指と人差し指で頭部を保定し、リングピンセット等を用いて耳介を保定し、(図 1 参照) マイクロピペッター等を用いて試験液を両耳介に塗布する。リングピンセットは試験物質毎に準備或いは媒体を用いて十分に洗浄した後に使用しても良いが、その場合は必ず低濃度群から高濃度群の順に投与を行うこととする。塗布量はそれぞれの耳介に 25µL と少量であるが、流れ落ちないように注意し、数回に分けて塗布を行う。投与時に麻酔は使わない。

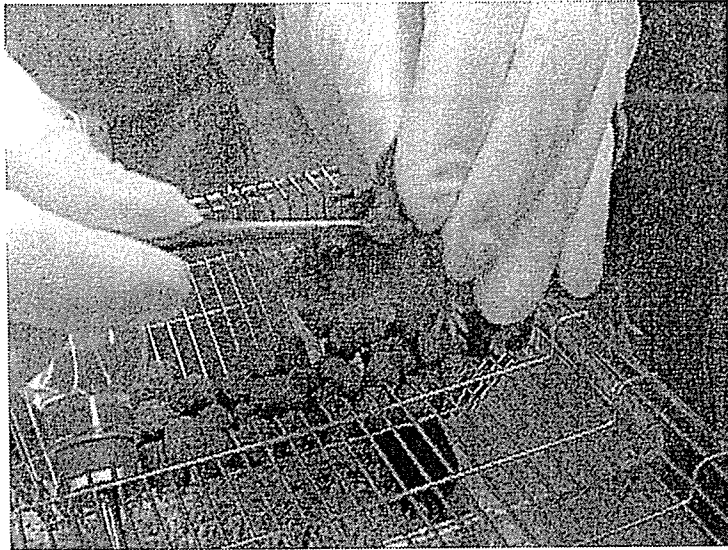


図1 マウスの保定と耳介の保持

- 4.4) 第1群の試験液塗布の開始時刻および第9群の試験液塗布の終了時刻を記録し、終了後に残った試料を速やかに冷蔵保管する。
- 4.4) この塗布を、1日1回、連続3日間、ほぼ同じ時刻に行う。
- 4.5) 操作中には、動物を注意深く観察し、異常所見が認められた場合は、その所見を所定用紙に記録する。

#### §5 BrdU 溶液の調製

BrdU 溶液は投与前に Bromodeoxyuridine を 10mg/mL となるように生理食塩液に溶解して調製し、BrdU 溶液はろ過フィルター(MILLEX<sup>®</sup>-HV、MILLIPORE 等)で濾過滅菌した後、投与前日まで-20℃以下のフリーザーで凍結保存する。

#### §6 BrdU の投与 (第5日目の操作)

最終感作の約48時間後に、注射針と注射筒を用いて、各マウスに BrdU 溶液 0.5 mL を1回腹腔内投与する。BrdU 溶液は事前に溶解し室温に戻しておく。その際、析出がみられる場合は37℃の水浴で加温し、析出物を完全に溶解した後に使用する。

#### §7 耳介リンパ節の採取

- 7.1) マウスの体重を測定して所定の用紙に記録する (最小単位: 0.1g)。
- 7.2) BrdU 投与の約24時間後に、マウスを頸椎脱臼 (またはエーテル過麻酔等) によって安楽死させる。
- 7.3) マウスを仰臥位にして下顎から頸部までを、70%エタノールで消毒する。
- 7.4) 下顎から頸部まで正中線に沿って切皮後、皮下組織を剥離し、耳介下までを露出させる。
- 7.5) 耳の直下の耳介リンパ節を採取する。リンパ節は左右それぞれに1~2個あるので見落とさないように注意する。(図2を参照)

Figure 1. Lateral Dissection

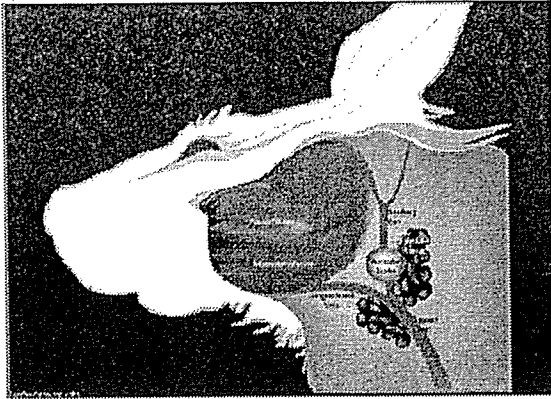


Figure 2. Ventral Masseter

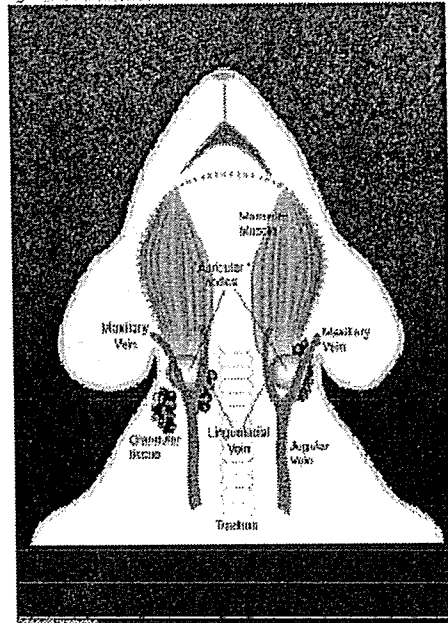


図2 耳介リンパ節の解剖学的位地

7.6) 耳介リンパ節から余分な脂肪組織を丁寧に取り除き、重量を測定した後、1.5 mL チューブに1個体分ずつ入れ、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下のフリーザー中で一晩以上凍結保存する。

#### § 8 BrdU 取り込み量の測定

##### 8.1) キット試薬の調製

###### 1) Anti-BrdU-POD 液

1バイアルの Anti-BrdU-POD に 1.1 mL の蒸留水を加え、10 分間放置後、十分に混ぜ、Antibody dilution solution で 100 倍希釈する。

###### 2) Washing solution 液

Washing buffer concentrate を蒸留水で 10 倍希釈する。

###### 3) 1M 硫酸

市販の濃硫酸を蒸留水で希釈し、1M 溶液を調製する。市販の 1M 硫酸を用いても良い。

##### 8.2) 細胞浮遊液の調製

1) プラスチック容器に生理食塩液を 15 mL 用意する。

2) リンパ節を 1.5 mL チューブに入れ、300-500  $\mu\text{L}$  生理食塩液を加え、ペレットペッスルでつぶしながらリンパ球を分散させ、浮遊液を作る。

3) 50 mL 遠心管にナイロンメッシュを取り付けて懸濁液を濾した後、パスツールピペット等を用い、残りの生理食塩液で 1.5 mL チューブを洗いこみ、最終容量 15 mL の細胞浮遊液を作る。

注 1: 2 枚のスライドガラスのスリ部分を利用して物理的に破碎・懸濁させてもよいが、その場合も細胞浮遊液の最終容量は 15 mL となるようにする。

注 2：リンパ節は、採取後凍結保存して 2 週間以内に解凍して測定を実施する。

### 8.3) 測定準備及び測定

- 1) 細胞浮遊液を均一に分散させた後、96 穴プレート中の 3 穴に、それぞれ 100  $\mu$ L を分注する。
- 2) 分注したプレートを 300 $\times$ G で、10 分間遠心する。
- 3) 上清を吸引除去する。その際、細胞まで吸引しないために、吸引量を全量の 3/4 程度とする。
- 4) 蓋をかぶせない状態で、温風式乾燥機でプレートを 20 分間乾燥させる。
- 5) プレート底面が完全に乾燥していることを確認した後、送られたキットに含まれている Fix Denat 200  $\mu$ L 添加し、30 分間静置する。
- 6) Fix Denat を捨て、ペーパータオルの上でタッピングを行い Fix Denat を十分に除去する。
- 7) プレートに Anti-BrdU-POD 液を 100  $\mu$ L 添加し室温で 1 時間放置する。
- 8) Anti-BrdU-POD 液を捨て、ペーパータオルの上でタッピングを行い Anti-BrdU-POD 液を十分に除去する。
- 9) Washing solution を 200  $\mu$ L 添加し、プレートの中でピペッティングを、1 穴当たり 10 回行い、液を捨てる操作を 3 回繰り返す。
- 10) Washing solution 液を捨て、ペーパータオルの上でタッピングを行い十分に Washing solution を除去する。
- 11) キットに含まれる TMB 発色基質を 100  $\mu$ L 添加し、机の引出し等の暗所に入れ、15 分間放置する。十分に呈色反応が進行する時間であれば、この時間を 5-30 分の間で変更しても差し支えない。
- 12) 放置後、マイクロプレートリーダーで、測定波長を 370nm、参照波長を 492nm とした 2 波長測定を行い、測定波長の吸光度から参照波長の吸光度を差し引いた数値を試料吸光度とする。フィルターの関係等で 450 nm を測定波長とする場合は、1M 硫酸の反応停止液を 1 穴当たり 25 $\mu$ L 添加した後、650 nm を参照波長として 2 波長測定を行う。

注：本実験時には原則として 1 枚目のプレート第 1 群 (AOO) 及び第 2 群 (陽性対照) を割り付け、2 枚目のプレートに第 3 群 (溶媒) とその他の群を割り付ける。3 物質以上の実験を行う場合は 3 物質目を 1 枚目のプレートに割り付ける。この場合には、1 枚目のプレートにも第 3 群 (溶媒) を同時に割り付ける。なお、3 回繰り返し実験の測定は同時には行わず、各回毎に実施する。

### 8.4) 測定に用いなかった細胞浮遊液の保管

測定に用いなかった細胞浮遊液は 24 時間冷蔵保管する。24 時間以内であれば再測定を行って差し支えない。

注：特に、AOO 群または溶媒群の平均吸光度が 0.2 を大きく超える場合には細胞液を更に希釈して測定を行う。

## § 9 データの入力及び担当者への送付

1 日目および 6 日目の体重測定値、リンパ節重量測定値、吸光度を所定のエクセルファイルに

記入し、データ管理解析担当者（寒水孝司「sozu@medstat.med.osaka-u.ac.jp」）に送付する。球光度が最大限度値の場合には、備考欄に記録を残す。

GLP 準拠で指定されているデータは紙ベースのコピーで、「〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2 大阪大学大学院医学系研究科 J6 寒水孝司」宛に送付する。

## § 10 参考文献

Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M. and Kimber, I. (2001). Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicology Letters* 119, 203—208

表 1 実験機器・器具、試薬リスト

本実験には以下の機器・器具、試薬を使用する。実行委からの送付物以外は自施設で準備する。

### 実行委からの送付物

機器・器具、試薬	必要数	メーカー	備考(商品名、品番、その他)
ペレットベッセル付 1.5 mL チューブ*	140 本	BEL-ART PRODUCTS 本試験はアズワンに変更	Pestles & Tubes, Cat No. 19923-0000)
ナイロンメッシュ*	140 個	FALCON	セルストーナ, Cat No.REF352350
20 mL プラスチック容器*	140 本	アシスト	No.60.9922.113
50 mL 遠心管	140 本	FALCON	セルストレーナーと合うものであれば可
96 well ELISA 用マイクロプレート (96 穴プレート)	8 枚	コーニング	3585 細胞培養用であれば特に指定はしない。
蒸留水	5 本	株式会社 大塚製薬工場	抗体調製用 滅菌済みのもの
生理食塩液	8 本	株式会社 大塚製薬工場	Cas.No. 03-172703-B、500mL
測定キット	1 セット	Roche Applied Science	Cell Proliferation ELISA, BrdU(colorimetric) 抗 BrdU 抗体、FIX DENAT 液、洗浄液、発色基質が含まれる
BrdU (5-Bromo-2'deoxyuridine)	1 本	ナカライテスク株式会社	05650-11 (1g)
濾過滅菌用フィルター	5 個	ミリポア	MILLEX-HV

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

該当なし

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	日本薬理学会の奨める動物実験-苦痛の評価と軽減-「はじめに」および日本薬理学会の新動物実験指針	日本薬理学雑誌	129	5-9	2007
ohtakeE, Kakihara F, Matsumoto N, Ozawa S, Ohno Y, Hasegawa S, Suzuki H, Kubota T.	Frequency distribution of phenol sulfotransferase 1A1 activity in platelet cells from healthy Japanese subjects.	Eur. J. Pharm. Sci			In press



厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

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、江幡 真也、金森 健之、川上 幸治、岸 正孝、

栗原 浩司、桑原 裕史、坂口 育代、坂口 斉、瀬戸 洋一、萩野 滋延、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。

本年度は、新規試験法のガイドライン化に関して OECD のガイドラインへ収載されたのは、「皮膚腐食性のための In vitro 膜バリアー試験法 (435)」だけであり、特筆すべき変化はなかった。しかし、代替法の開発と評価に関しては、EU では ECVAM において皮膚刺激性試験代替法と眼刺激性試験代替法の評価が着実に進行しており、さらに 2005 年の「3Rs 宣言」に基づき EPAA が 2006 年 5 月にアクションプログラムを公表し、12 月には年次大会を開催するなどその活動を開始している。米国においては、ICCVAM が、2006 年 3 月に 4 種眼刺激性試験代替法の最終バックグラウンドレビュー文書を公表している。さらに本邦においては、JaCVAM が活動を実質的に開始し、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をコーディネートしている。

上記の諸活動に加え、本邦における改正・動物愛護管理法の施行などもあり、本年度は「3Rs の原則」のグローバルな認知は着実に進化した年と考えられた。

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、EPAA 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 との連携を通じて実施した。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ズ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 日付で公布された<sup>1)</sup>。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<sup>1)-3)</sup>。

- ・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。

##### 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 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<sup>4),5)</sup>。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<sup>6)</sup>。

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 9 つのワーク・パッケージで評価が進められている。1 年間の研究成果は、100-140 化合物の *in vivo* と *in vitro* のデータベース作成、*in vitro* テストの選択と改良、そして *in vitro* テストストラテジーの確立に向けた取り組みであった。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、35 の大学、行政機関、企業などの共同研究者、約 910 万ユーロの資金を受けて進められている。正式には 2004 年 7 月から 5 年間の予定で開始され、現在大きく 3 つの大きな研究テーマ (受精、着床、生前発育) そしてそれら研究の横断的技術に関する研究について、7 つのワーク・パッケージで評価が進められている。エストロゲンレセプターに結合する活性を評価する hER-HeLa-9903 Cell Line を用いた Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay が OECD において pre-validation が進められている。

Sens-it-iv プロジェクトは 30 名の共同研

研究者、1100万ユーロの資金を受けて、2005年10月から5年間の予定で開始された。プロジェクトの目的は、皮膚及び吸入における感作性物質を同定する *in vitro* 試験法による動物試験の置換である。現在このプロジェクトには28のグループ(9つの企業、15の大学や研究機関、4つの業界団体)が参加しており、プロジェクト活動は10のワーク・パッケージで進められている。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た。この研究は、2006年10月にほぼ最終化された BRD ならびに ICCVAM による試験法評価報告書が公表された。

#### 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。2006年3月28日に「化粧品成分の皮膚吸収における *in vitro* 評価基準」を更新している。また、2006年12月19日に化粧品成分の試験と安全性評価のガイダンスの6次修正を発行している<sup>7)</sup>。代替法に関連した項目のうち、今回修正された主な項目は、①化粧品成分の適切な毒性試験、②皮膚刺激、③粘膜刺激、④経皮吸収、⑤変異原性/遺伝毒性、⑥光変異原性、であった。①については、信頼性の高いリスクアセスメントを実施するために動物試験が不可欠であることを示した SCCNFP の Opinion (SCCNFP/0834/04) が加えられた。②と③については、動物試験前に考慮すべきステップが列挙された。④については、経皮吸収試験において特に注意を要するポイントを記載した SCCP の Opinion (SCCP/0970/06) の「基本的な基準」が列挙された。⑤については、SCCNFP の Opinion (SCCNFP/0755/03) に従って、*in vitro* 試験として細菌の復帰変異試験、*In vitro* 哺乳類細胞の遺伝子変異試験、*In vitro* 小核試験の3つの試験法が明記されるなど、試験のアプローチに関する記載が修正された。⑥につい

ては、ドイツの GUM (環境変異研究学会) Task Force の報告書に基づく試験法の評価についての記述が加えられた。

#### C-1-4 EU 委員会の状況

2005年11月7日に行われた欧州委員会主催のワークショップ「EU goes Alternatives」において3Rs宣言が発表され、今後、EU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の開発を促進することが宣言された。EPAA (European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing) は欧州委員会、工業会(化学品、医薬品、化粧品)、様々な産業分野における会社の共同のパートナーシップである<sup>8)</sup>。欧州委員会からは企業 (DG Enterprise)、研究 (DG Research)、健康と消費者保護 (DG Health and Consumer Protection)、環境 (DG Environment)、共同研究センター (DG Joint Research Centre) の常任理事会及びECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) の6団体が参加している。工業会はCEFIC (欧州化学品工業会)、EFPIA (欧州製薬団体連合会)、COLIPA (欧州化粧品工業会)、Euro BIO (欧州バイオテクノロジー工業会)、AISE (石鹼洗剤協会)、ECPA (欧州農薬工業会) など7団体が参加している。企業からは医薬品、化粧品、化学品メーカーなど27社が参加している。その目的は、安全性試験の代替のアプローチとしての新しい3R(refine, reduce, replace)の推進である。2006年5月に公表されたアクションプログラムは以下の5つのメインテーマからなっている。

- ・その後のアクションの計画と優先順位の情報を提供するための現在と過去の3Rsのマッピング
- ・3Rsのアプリケーションに基づく、今後の研究の優先順位付け、促進、および遂行
- ・3Rsの使用におけるベストプラクティスの同定、普及、遂行
- ・規制と政策決定における、3Rsの実現
- ・3Rsに基づくバリデーションと承認

パートナーシップの構造は以下の通りである。

- ・年次大会：ヨーロッパとグローバルにおける進歩を再検討する、年に一度の“3R”イベント。
- ・パートナーシップ運営委員会：欧州委員

会サービス、企業団体、レビュー作業計画、戦略とスケジュールから成る。

- ・ワーキンググループ：欧州委員会サービスと産業から、特殊な専門家からのサポートを受けて特定の話題に取り組む小集団。
- ・利害関係者ミラーグループ：より広い社会の見地から委員会にアドバイスするために学界、動物福祉協会、患者団体、消費者保護グループ、他の利害関係者の代表から成る。

2006年12月18日、BrusselsでEPAA年次大会が開催された。

オープニングセッションに続き、EPAAの進捗が報告され、ステークホルダーの評価が報告された。年次進捗報告書が出され、5つのワーキンググループについても進捗が報告された。安全性試験における動物使用への代替のアプローチを促進する長期の方針については、詳細なマッピングから研究をはじめべきだとしている。3Rのプロモーションについても組織のリストをEPAAのウェブサイトで発行して、アップデートし、最終的にサイトでデータベースのフォームとして利用可能にするとしている。また、バリデーションとその受け入れについてもECVAMと協力し、ECVAMの経験に基づいてより効率的な仕組みをつくるとしている。ステークホルダーによる評価はZEBETのSpielmann教授、Vrije大学のRogiers教授、StratiCELLのSalmon博士、ECVAMのHartung博士により行われ、いずれも好意的であった。

一方、化学物質の登録と規制(REACH; Registration Evaluation and Authorization of Chemicals)は、2003年10月29日にEU委員会案の公表以降、議会と閣僚理事会での修正を経て、2006年12月18日に環境閣僚理事会で承認され、2007年6月1日から発効されることになった<sup>9)-13)</sup>。REACHは、EU域内で年間1トン以上製造・輸入されるすべての化学物質の登録を既存物質と新規物質を区別せずに義務付けるものであり、3万種の化学物質が対象となる。既存物質の登録期限は物質の製造・輸入量や有害性への懸念によって分けられ、2018年までに段階的に設けられている。年間1トン以上の物質の登録には、製造・輸入量に応じて物理化学的性状、ヒトの健康への有害性、生態毒性の情報が必要となる。動物試験が行われる場合、重複を避けるために関係

書類の審査が義務づけられる。ヒトに対する毒性に関する情報は、可能なら代替手段によって脊椎動物以外の方法を用いて入手する。これらの代替手段は欧州委員会によって確認され、さらに化学物質庁または国際的な機関によって認定されなくてはならない。EU委員会は代替法の使用に関し3年毎に報告書を提出し、必要なら新たな法的提案を行うことになっている。

以下に製造・輸入量ごとに実施すべき毒性試験に関して記載する。

- ・皮膚刺激性または皮膚腐食性：>1 t/年
  - ・ in vivo 皮膚刺激性試験：>10 t/年
- ・眼刺激性：>1 t/年
  - ・ in vivo 眼刺激性試験：>10 t/年
- ・皮膚感作性：>1 t/年
- ・変異原性：>1 t/年
  - ・バクテリアを用いる in vitro 試験：>1 t/年
  - ・哺乳類細胞を用いる in vitro 細胞遺伝学試験または in vitro 小核試験：>10 t/年
  - ・哺乳類細胞を用いる in vitro 遺伝子突然変異試験：>10 t/年 (ただし、バクテリアを用いる in vitro 試験と哺乳類細胞を用いる in vitro 細胞遺伝学試験または in vitro 小核試験が陰性の場合)
- ・急性毒性：>1 t/年
  - ・経口経路：>1 t/年
  - ・吸入または皮膚経路：>10 t/年
- ・反復投与毒性：>10 t/年
  - ・短期反復投与毒性試験(28日間)：>10 t/年
  - ・亜慢性毒性(90日)：>100 t/年 (>10 t/年の場合も有り)
  - ・慢性毒性(>12ヶ月)や追加評価：>1000 t/年(必要な場合有り)
- ・生殖毒性：>10 t/年
  - ・生殖/発生毒性に関するスクリーニング：>10 t/年
  - ・出生前発生毒性試験：>100 t/年
  - ・二世代生殖毒性試験：>100 t/年
- ・トキシコキネティクス：>10 t/年
  - ・アセスメント：>10 t/年
- ・発がん性試験：>1000 t/年

#### 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、2006年度に新たな試験法

の掲載はなかった<sup>14)</sup>。

#### 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<sup>15), 16)</sup>。

- 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、日本企業により開発されたヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞を用いた *in vitro* 皮膚感作性試験 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20回 European Research Group on Experimental Contact Dermatitis (ERGEDC)<sup>17)</sup>にて発表された。この試験法以外にも、別のヒト単球由来細胞株である U937 細胞を用いた試験法やグルタチオンや合成システインペプチドとの結合性を評価する peptide reactivity assay などが Skin Tolerance TF で評価されており、それらの成果が上記学会にて報告された。

#### 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)<sup>18)</sup>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。

・ NC3Rs

NC3Rs (National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research)<sup>19)</sup>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。

・ FRAME

FRAME (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments)<sup>20)</sup>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 Foundation<sup>21)</sup>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。

・ NCA

NCA (Netherlands Centre for Alternatives to Animal Use)<sup>22)</sup>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

・ ESTIV

ESTIV (European Society of Toxicology in Vitro)<sup>23)</sup>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 ヶ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た。

・MEGAT  
MEGAT (Middle European Society for Alternative Methods to Animal Testing)<sup>24)</sup>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が開催された。

#### 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 宣言に引き続いてアクションプランが決められたことである。このプランに基づいて 2 年目以降のように 3R が進展していくかが注目される。また、REACH が EU 委員会、EU 議会、閣僚理事会の 3 機関の調整に加え、動物愛護団体、経営者団体、市民団体の激しいロビー活動の中で激しく揺れ動いた末、2007 年 6 月 1 日から施行されることが決定した。REACH に伴い動物実験が増加することもあり、今後ますます代替法開発と活用が促進されるものと考えられる。

#### 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<sup>25)</sup>。

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、日本から本厚生労働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。

① BCOP (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。

② HET-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。

③ ICE 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。

④ IRE 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。

2006 年 3 月に 4 種の眼刺激性試験代替法の最終バックグラウンドレビュー文書が公表された。本文書では、(1) 4 法はいずれも in vivo 試験法を代替する方法とはならないこと、

(2) ICCVAM が推奨する限定的に使用でき、眼腐食性など強い眼刺激性物質のスクリーニングに使用できる方法として BCOP 試験及び ICE 試験が挙げられること、(3) HET-CAM 試験及び IRE 試験については、現時点では推奨できず、眼腐食性や強い眼刺激性物質を同定するためにはプロトコルや判断基準の最適化、追加バリデーションが必要であることを報告している。

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(NHK)を用いるNeutral Red 取り込み(NRU)試験法]の結果の評価が実施されてきた。この検討に関しては、2006年3月のバックグラウンドレビュー文書(以下、「BRD」)のドラフト公表に続いて、ピアレビューパネルの召集(5月)、ピアレビューパネル報告書の公表(7月)を経て、2006年10月にほぼ最終化されたBRDならびにICCVAMによる試験法評価報告書が公表された。本報告書でICCVAMは、「これら2種の細胞毒性試験は法規制におけるハザード分類という目的には精度は十分ではないが、現在の急性毒性プロトコール[即ち、Up-and-Down Procedure (UDP)、Acute Toxic Class (ATC)法]の開始用量を設定するために使用することができる」と勧告した。また、ICCVAMは、急性経口毒性を予測するための代替試験法の使用を今後さらに進めていくために、in vitro、in vivoの両面で質の高いデータベースを拡張していくこと、メカニズムに基づいたin vitro試験法の開発を支援するため、致死メカニズムの理解を深めるための標準化されたプロトコールをin vivo試験に盛り込むことなどを推奨している。

2006年11月にNICEATMとICCVAMは代替法の5ヵ年計画を発表し、これに関するパブリックコメントを求めた。この5ヵ年計画では、(1)連邦政府機関試験計画に、適切で信頼性のある方法を統合するための、新規および改良された非動物及び他の代替試験の研究開発、解釈及び検証、(2)3R推進のための新規および改良された非動物試験と代替試験に関する最優先分野の確認の2点に取り組むとした。また、試験開発の優先分野としては、①急性眼刺激性、腐食性、②Biologics/vaccines、③急性皮膚毒性(刺激性・腐食性、感作性と吸収を含む)、④急性全身毒性(経口、経皮、吸入)、⑤慢性毒性・発がん性、⑥生殖・発達毒性、⑦内分泌攪乱物質、⑧神経毒性、⑨免疫毒性の9項目を挙げている。

また、2006年11月30日にSACATM会議が開催され、NTPハイスループット・スクリーニングアッセイの現状に関する報告とともに、代替法のバリデーションに関するICCVAM、ECVAM及びJaCVAMの取り組みに関する報告がされた。

#### C-2-2 CTFA の状況

CTFA(米国化粧品工業会)のSafety

Evaluation Guidelineは、化粧品の原料および最終製品について、安全性を立証する方法としての前臨床試験および臨床試験の使用に関するガイダンスを事業者提供するものである。CTFAでは、現在、本ガイドライン(1991年版)の広範な改訂作業に取り組んでいるところであり、現行ガイドラインとの大きな相違点の一つが動物実験代替法の追加である。前臨床試験には、規制上のガイドラインに通常従う動物試験とともに、細胞、組織、器官培養を用いるin vitro代替法、また、構造活性相関を用いてコンピュータによる予測を行うin silico法も含まれる可能性がある。なお、本ガイドラインを含む新しいCTFA Technical Guideline Seriesは、2007年に入手可能となる見込みである<sup>26)</sup>。

#### C-2-3 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、2006年3月のパブリックコメントの募集を経た後、2006年8月に最終バックグラウンドレビュー文書が公表されたことが挙げられる。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。また、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、その結果を評価してきた。その内容について、2006年10月、ほぼ最終化されたバックグラウンドレビュー文書ならびにICCVAMの試験法評価報告書が公表された。NICEATMとICCVAMは2006年11月に、試験法開発に関する9つの優先項目の提案を含む代替法の5ヵ年計画を発表した。また、2006年11月30日にはSACATM会議が開催され、NTPハイスループット・スクリーニングアッセイの現状に関する報告とともに、代替法のバリデーションに関するICCVAM、ECVAM及びJaCVAMの取り組みに関する報告がされた。

#### C-3 OECD の動向

##### C-3-1 OECD ガイドラインの動向

OECDでは、日常生活に影響を与える化学物質について、人と環境に対する安全性を考慮し、協力と開発の国際的活動を行っている。化学物質の安全性に関する活動の1項目として「化学物質のテストガイドライン」がある。これは5つのセクションからなるが、その中

の「Section4: Health Effects」の中に各種安全性試験のガイドラインが含まれる<sup>27)</sup>。2006年度に以下の試験法が掲載された。

435 皮膚腐食性のための In vitro 膜バリアー試験法 (2006年7月19日掲載)

2006年度に以下の2つドラフトテストガイドラインに関してコメント募集が行われた。

426 神経発生毒性試験 (2006年12月15日)  
487 In vitro 小核試験 (2007年2月15日)  
※ ( ) 内はパブリックコメントの締切日を示している。

コメント募集期間中または募集期間を終え、修正、最終段階に入っている試験法は以下の通りである。

412 吸入反復投与試験-14/28日間の改定 (2006年2月16日)  
\*\*\* 急性吸入毒性の新ガイドライン (2003年1月20日)  
433 急性吸入毒性—固定用量法の改定 (2004年7月30日)  
434 急性経皮毒性—固定用量法の改定 (2004年7月16日)  
436 急性吸入毒性 - 急性毒性等級(ATC)法の新ガイドライン (2005年1月28日)  
※ ( ) 内はパブリックコメントの締切日を示している。

試験法ガイドライン412「吸入反復投与試験-14/28日間」は、化学物質障害特性、国連化学物質国際調和分類・表示(GHS)に関する情報提供を目的としている。既知腐食性、強刺激性物質の試験不要、瀕死動物の取り扱いなど動物愛護の観点が多く盛り込まれている。ただし、瀕死状態と人道的死の決定基準、予想し得る死亡・切迫死認証に関するガイダンスは別途課題とされている。

また、生殖発生毒性試験の hER-HeLa-9903 Cell Line を用いた Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay もドラフトテストガイドラインとして掲載されている<sup>28)</sup>。

#### C-3-2 小括

本年度は、「皮膚腐食性のための In vitro 膜バリアー試験法 (435)」のみがガイドライ

ンとして掲載されたことから、特筆すべき変化はなかったものと考えられた。

#### 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、日本動物実験代替法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18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のための追加試験が終了し、最終評価が実施されている。「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、日本で開発された3次元皮膚モデルが、腐食性試験代替法として国際的に承認されている3次元表皮モデルと同等の識別能力を有するものであるという評価結果が得られている。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が終了した。現在、結果解析中である。「LLNA-Br dU法」については、提案資料の評価を経て、現在バリデーション実施中である。また、「皮膚感作性試験の代替法研究」に関して、ヒト単球細胞を用いた試験法であるh-CLATに関して、多施設での共同研究を行い、その結果について報告された<sup>29)-31)</sup>。

本研究とは別に、平成18年度に申請された代替法関連の厚生労働科学研究として、「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」がある。これは、動物愛護の観点から、各種開発されている化学物質リス



ク評価のための代替試験に関して、国際的に試験の信頼性、正確性を保証するためのバリデーションに関する研究であり、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、この研究において、日本は主導的な役割を担っている。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、厚生労働研究班から委託された試験法ごとに個別に評価委員会を設定し対応している。現在は、光毒性試験代替法である「酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法」<sup>32)・34)</sup>、皮膚感作性試験代替法である「皮膚感作性試験代替法：LLNA-DA 法」<sup>7)</sup>及び「皮膚感作性試験代替法：LLNA-BrdU 法」、皮膚腐食性試験代替法「三次元皮膚モデルを用いる皮膚腐食性試験代替法」の3試験法について評価委員会が活動している。

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であり、現在は、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」及び「皮膚感作性試験代替法：LLNA-DA 法」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多数参加して実施された<sup>35)</sup>。このことは、化学物質等の安全性評価に対する代替法研究の認知と研究の必要性を示すものであり、今後、日本における化粧品以外の産業での代替法の開発と評価の加速を期待したい。

これとは別に、平成18年度の代替法学会研究助成として「培養角膜モデルを用いた眼刺激性作用機構の解明」も行われている。また、初めての試みとして、学術大会において、中高生を対象とした3Rsの普及を目的としたシンポジウムが開催され、代替法学会の裾野の拡大に努める姿勢が見られた。

#### C-4-3 その他の国内動向

その他の国内動向では、JaCVAMの稼働、改正・動物愛護管理法の施行等が挙げられる。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。本年よりJaCVAMが稼働し、その役割の確認や国内外の学会・関係機関との調整がなされつつある。今年度は、厚生労働科学研究と代替法学会バリデーションを中心に、各種学会等との共同研究を展開した<sup>36)</sup>。

改正・動物愛護管理法は平成17年6月22日に公布され<sup>37)</sup>、平成18年から施行された。ここには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ており、この改正・動物愛護管理法を受け、関連行政機関や団体等から動物実験の適正化のためのガイドラインが公表された<sup>38)・39)</sup>。

独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)ではバイオテクノロジー・医療技術開発部が、「高機能簡易型有害評価手法の開発に関する研究」として培養細胞を用いる有害物質評価手法の研究に着手した。さらに、化学物質総合評価管理プロジェクトの一環として、「構造活性相関手法による有害性評価手法開発」の事業計画の検討を開始している<sup>40)</sup>。これは、化学物質のリスク評価を実施する上で必要不可欠な有害性評価について、従来動物実験による反復投与毒性試験に対し、究極の代替法の一つである構造活性相関手法(化学物質の構造情報等から有害性を計算機上で予測評価する)による有害性評価手法を開発するもので、事業期間は5年間で検討されている。これらは化学物質のリスク管理や効率的な事業判断に寄与するものとして注目される。

また、第6回国際動物実験代替法会議(6th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Science Tokyo Japan: WC6)が、平成19年にアジアで初めて日本で開催されることから、その準備委員会が正式に発足し、活動を開始した。この会議は、生命科学における動物福祉と動物実験代替法開発の促進と、教育、研究、試験分野における3Rs(replacement, reduction, refinement)の進展をはかることを目的として開催される国際会議であり、平成5年の第1回開催以来、欧米のみで開催されてきた。第6回会議はアジアで初めて日本で開催される。また、アジアの国々における3Rsの展開を示す試みとして中国と韓国でサテライトシンポジウムが予定されている。主催は、国際動物実験代替法会議信託基金(The Alternative Congress

Trust: ACT)、日本動物実験代替法学会、日本学術会議であり、後援は、厚生労働省、環境省、経済産業省、文部科学省となっている。会議議長は、大野泰雄先生（国立医薬品食品衛生研究所 副所長）と Dr. H. Spielmann (Federal Institute for Risk Assessment: ドイツ)である。この会議では、EU の 7 次改正のポイントとなる平成 21(2009)年、平成 25(2013)年を控えた重要な時期にあたることから、EU の 3Rs 宣言等を踏まえた COLIPA の動向、3Rs のグローバルバージョンに対する議論が注目される。

#### C-4-4 小括

本年度における代替法の開発・評価において特筆すべきことは、JaCVAM の稼動、「3Rs の原則」が記載された改正・動物愛護管理法が施行されたことである。

これらは、日本における動物愛護のあり方と代替法開発の必要性を具体的に明示したという点で意義深いものがある。日本における今後の課題は、JaCVAM を通し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、今後の JaCVAM の活躍が期待される。

#### 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 18 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「化粧品の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<sup>41), 42)</sup>。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<sup>43)</sup>、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が OECD テストガイドラインでドラフト化されている<sup>43)</sup>。

###### 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<sup>44)</sup> (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) programme<sup>45), 46)</sup> が 1998 年より 6 年間の計画で開始された。複数の国際的な細胞毒性研究機関が協力するこのプロジェクトは、Cytotoxicity Laboratory, Uppsala (CTLU) の Dr. Bjorn Ekwall が中心になって創始したもので、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、トキシコカインेट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代替試験法の確立を目指している。本プログラムは、Scandinavian Society for Cell Toxicology (SSCT) をリーダーとして現在も継続されている。

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<sup>47), 48)</sup> 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ことにあり、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<sup>49), 50)</sup> が実施された。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。本バリデーション研究の結果を報告するバックグラウンドレビュー文書 (BRD) が2006年10月の時点でほぼ最終化され、同時に ICCVAM による試験法評価報告書の最終化が進行中である。本研究では、基礎細胞毒性 (basal cytotoxicity) を評価できる試験法として、BALB/c 3T3 マウス繊維芽細胞 (3T3)<sup>51)</sup> および正常ヒト表皮ケラチノサイト (NHK)<sup>52)</sup> を用いた2つのニュートラルレッド取り込み (NRU) 試験について、72の参照物質を用いたバリデーション試験が Phase I ~ III までの3段階に分けて実施された<sup>53)-56)</sup>。BRD には、両試験法の精度および信頼性 (再現性)、また、これらの *in vitro* 試験データを用いて *in vivo* 試験の開始用量を設定することによって削減される動物数あるいは死亡動物数に関するコンピュータシミュレーションによる評価結果等が報告されている。これを踏まえた試験法評価報告書において、ICCVAM は、これら2種の細胞毒性試験は法規制におけるハザード分類という目的には十分な精度はないが、現在の急性毒性プロトコールである Up-and-Down Procedure (UDP)、Acute Toxic Class (ATC) 法の開始用量を設定するために使用できるとの勧告を行った。さらに ICCVAM は、急性経口毒性を予測するための代替試験法の使用を今後さらに進めていくために、*in vitro*、*in vivo* の両面で質の高いデータベースを拡張していくこと、メカニズムに基づいた *in vitro* 試験法の開発を支援するため、致死メカニズムの理解を深めることを目的とした標準化されたプロトコールを *in vivo* 試験に盛り込むことなどを推奨している。

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。今後も、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<sup>57), 58)</sup>。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<sup>59)</sup>。

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<sup>60), 61)</sup> を用いた方法やマウスの摘出皮膚を用いた器官培養法<sup>62)</sup> 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平成13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。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、平成19年度中に承認される見込みが高い。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平成 16 年に採用されている<sup>63)</sup>。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が実施された。その結果、国内で評価された 3次元皮膚モデルは、腐食性試験代替法として国際的に承認されている 3次元表皮モデルと同等の識別能力を有するものであるという評価が得られた。この結果について評価会議で審議される予定である。また、in vitro 皮膚腐食性試験結果を毒劇物の評価に用いることが、厚生労働省の毒劇物部会で承認<sup>64)</sup>されていることから本結果の評価が注目される。

その他 in vitro の代替法として Transepidermal Electrical Resistance (TER) 試験法<sup>65)</sup>、蛋白変性検出法<sup>66), 67)</sup>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平成 10 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<sup>68)</sup>。また、この方法に修正を加えた方法が、平成 16 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<sup>69)</sup>。

OECD ガイドライン記載の試験法について、日本では、平成 14 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<sup>70)</sup>。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<sup>71)</sup>。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<sup>72)-74)</sup>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たが、バリデーション結果から、陽性対照の感度を高める必要がある

という評価委員会の見解を受け、検証のための追加試験が実施された。

皮膚刺激性に関する国内関連学会での発表は 9 件であった<sup>75)-83)</sup>。

## 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<sup>84)</sup>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 - Chorioallantoic 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。