

厚生労働科学研究研究費補助金

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

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

平成16年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者 大野泰雄

平成19(2007)年 4月

主任研究者

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所・副所長)

分担研究者

板垣宏 (日本化粧品工業連合会・技術委員会)

戸倉新樹 (産業医科大学・医学部 皮膚科)

田中憲穂 ((財)食品薬品安全センター秦野研究所)

小澤正吾 (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)

大森崇 (京都大学大学院・医学研究科)

吉村功 (東京理科大学・工学部経営工学科)

厚生労働科学研究研究費補助金

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

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

平成16年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者 大野泰雄

平成19（2007）年 4月

別紙 2

目 次

I. 総合研究報告	
安全評価のための度応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	----- 1
大野泰雄	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 41
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 51

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研究事業)

総合研究報告書

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
(H16-医薬-005)

主任研究者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

国際情勢の調査としては、EUでは行政と企業が協力して代替法研究を促進するため3Rs宣言を行い、科学研究費の4%を3Rsのために支出することが決まった。EUの化粧品指令第7次改正に関し、2004年3月初旬までに約7割の加盟国が国内法を整備した。但し、2009年3月に代替法が存在すると予測されたのは、皮膚腐食性、急性光毒性、皮膚刺激性、眼刺激性、経皮吸収/皮膚透過性および光遺伝毒性のみであった。米国では4種の眼刺激性試験代替法がICCVAMにより評価された。OECDではin vitroの光毒性試験、経皮吸収試験、皮膚腐食性試験(Transcutaneous Electrical Resistance TestおよびHuman Skin Model Test)がコーディネーター会議で採択された。2006年には、さらに「皮膚腐食性のためのin vitro膜バリアー試験法(435)」が記載された。ICCVAM、ECVAM代表者も参加し、JaCVAM設立記念シンポジウムが日本で開催された。韓国代替法学会が設立された。

代替法の評価とバリデーションにおいては、酵母光成育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーの多施設バリデーション報告を評価委員会で評価し再現性の良い方法であると認めた。しかし、酵母試験の反応幅を大きくする必要があると提案された。そこで、プロトコルを改善し、光照射量、プレインキュベーション時間を延長することにより酵母試験における濾紙上の光阻止円が広がった。この操作法改良の妥当性を検証するためのバリデーション研究を実施し、SOPの改正の妥当性が確認された。

皮膚感作性試験Local Lymph Node Assay (LLNA)の放射性同位元素(RI)標識化合物を用いない代替法(LLNA-DA法およびLLNA-BrdU法)を一次評価した。両試験とも良好な評価が得られたものの、バリデーション結果が不十分であった。そこでバリデーション研究を実施したところ、LLNA-DA法において、12の被験物質の濃度範囲で得られた結果はLLNA法と同程度であり、キャッチアップバリデーション研究として受け入れられるものであると考えられた。一方、LLNA-BrdUバリデーション試験については、現在実施中であり、まだ結論は得られていない。

日本で開発されたVitroLife SkinとOECDで承認されたEpiDermについて、皮膚腐食性試験系としてのバリデーションを実施し、両者が同様の能力を持つことを確認した。これらモデルについて、第三者評価を実施している。

ヒト由来細胞株(THP-1、U-937)を用い、CD86やCD54発現亢進を指標にした感作性試験代替法を開発した。プレバリデーションを行ったところ、多くの施設で感作性物質と非感作性物質を識別できた。本方法はin vitro感作性試験代替法として極めて有望である。さらに汎用性を向上させることを目的として、細胞と血清のロット差および前培養条件の検討を行った。その結果、試験に供する細胞および血清の選択基準と前培養時の注意事項を定めた。

光感作性試験代替法の開発においては、ヒト表皮角化細胞を用い、アポトーシス誘導を指標とするin vitro光アレルギー性試験を検討した。フローサイトメトリー法で解析する方法を確立し、非常に簡便でかつ鋭敏な方法であることを示した。また、

in vitro 光アレルギー性試験で光感作性物質が HaCaT 細胞に対し、ネクロシスより 10 倍低い濃度でアポトーシスを起こした。さらに、ケトプロフェン光接触皮膚炎発症時の Th 細胞誘引におけるケラチノサイトの役割を調べるため、ヒト培養ケラチノサイトに KP と UVA 処置を行い、Th1 ケモカインである Mig および IP-10 の産生の変化を確認した。

急性毒性予測のための細胞毒性試験法の開発においては、S9 mix 存在および非存在下で 21 化学物質の細胞毒性の IC₅₀ 値を求め、LD₅₀ 値および反復投与毒性の無影響量との相関を調べた。その結果、6 時間処理では良い相関は得られなかったが、24 時間処理では相関は著しく改善された。培養細胞の由来臓器と動物において臓器特異的な毒性発現が報告されている化学物質の間に関連性は見出せず、むしろ細胞種よりも代謝活性化や薬物の処理時間が毒性発現に大きく関与していることが推測された。

代謝活性化を含む細胞の開発においては、皮膚構成細胞に発現する P450 分子種を明らかにした。また、CYP1A2 を組み込んだ細胞系を用いてヘテロサイクリックアミン 2 種の代謝活性化による殺細胞作用を検討したが、皮膚腐食性評価の指標としては不十分であった。ヒト皮膚に存在する P450 分子種で被験物質をプレインキュベーションすると m-aminophenol について、CYP2E1 による代謝活性化による細胞増殖抑制作用が認められた。さらに、ヒト皮膚発現 CYP1A1、CYP1B1、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A5 のバキュロウィルス系リコンビナント酵素と、化学物質を代謝反応後、チャイニーズハムスター細胞 (CHO) 系に暴露し、細胞増殖抑制作用を指標にして代謝活性化、不活性化を検討し、有用と思われるスクリーニング系を構築した。

代替法開発のための統計解析手法の研究およびバリデーショナルデータの統計解析においては、遺伝毒性や発がん性における閾値の存在について、in vitro 試験で用量反応関係のある関数に限定できるときは、統計学的な判断が可能であるということを示した。マウスリンフォーマ試験の解析には大森法が最良であることを示した。ヒト皮膚 3 次元モデルを用いた皮膚刺激性試験においてミスの起こりにくいデータ入力フォーマットを作成するとともに、データクリーニングの手順書を作成した。また、ET50 の推定法についてロジスティックモデルと対数線形モデルの併用が有効であることを確かめた。

さらに、ET50 の区間推定法、アガール MLA 法の性能評価、および光毒性試験代替法を検討した。リスクの定量的評価において、統計学的な有意水準と実験者の評価が合わないことを実感された。バリデーショナル研究で算出される感度、特異度、一致度は被験物質と施設数に依存している。感度、特異度、一致度の割合を、被験物質のみに依存して計算する方法が提案された。

(1) 多施設バリデーショナル研究において統計的に最適な被験物質割り付け法の研究 (2) バリデーショナルにおける技術易移転性 (transferability) の評価法の研究 (3) 実験家が容易に ET50 の信頼区間を求められるような手順の考案 (4) LLNA-DA 法のバリデーショナル研究の定量的な評価について検討し、バリデーショナル研究で活用のできる数々の知見を得た。

分担研究者

板垣 宏 日本化粧品工業連合会
技術委員会
田中憲穂 食品薬品安全センター
秦野研究所
小澤正吾 (国立医薬品食品衛生研究所
薬理部)
吉村 功 (東京理科大学工学部
経営工学科)
大森 崇 (京都大学医学部)

戸倉新樹 (産業医科大学医学部皮膚科)

A. 研究目的

動物実験については欧米を中心に動物愛護団体等からの反対運動が活発であり、動物を用いない安全性試験の動物実験代替法 (以後、代替法と記す) の開発が迫られている。そこで、本研究では代替法に関する国際情勢を考慮しながら、化粧品や医薬品の安全性評価のために用いられている試験法で代替法の開発

が十分でないもののうち、単回投与毒性試験、感作性試験、光感作性試験の代替法および代謝活性化を介した毒性を評価する *in vitro* 試験系を開発する。また、開発された試験法が行政試験法として適切であるか評価する。また、代替法開発のための統計解析手法の研究を行う。

具体的には

- 1) 動物実験代替法に関する国際情報を収集する。
- 2) 開発された代替法については、行政試験法として受け入れても現在の安全性評価に支障を来さないか否か評価する。なお、開発者のみのデータではその評価に必要な情報が十分に得られないことから、必要に応じて独自に多施設バリデーションを行い、その再現性や *in vivo* 試験結果との対応性を明らかにする。
- 3) 皮膚に存在する代謝活性化酵素を恒常的に発現している細胞を用いた試験法を開発する。
- 4) 急性毒性を *in vitro* の細胞死で予測するために、化学物質の生体内での代謝因子を組み込んだ試験系を開発する。
- 5) *in vitro* 感作性を検討するために、免疫担当細胞を用い CD86 発現を指標とする試験系を開発する。
- 6) 光アレルギー性接触皮膚炎の原因となる物質の光感作能を *in vitro* の系で評価する。
- 7) 代替法実験データからの毒性の有無、インビボ結果との対応性を判定するために、どのような統計解析手法を用いるのが良いか、開発と性能評価の両面から検討する。

B. 研究方法

B-1) 海外における代替法情報の調査

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、同地域の化粧品工業会である EU の COLIPA、米国の 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。

B-2) 新規代替法の評価

研究班による新しい代替法の評価希望の募集は日本動物実験代替法学会ホームページおよび同ニュースレターで行った。研究班では

応募された試験法の概要を検討し、更に詳細な評価を行う価値があるか否か検討し、価値があると判定された方法については、日本動物実験代替法学会に当該分野の専門家や代替法専門家、統計専門家により総合的な評価を行うよう依頼する。この結果、代替法として可能性のある方法の場合はより広い専門家、臨床医師、行政担当者、業界代表者等からなる評価会議で最終的な評価を行う。評価会議の委員は昨年度報告した。

B-2-1) 光毒性試験代替法の評価

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーの評価方法については、平成 14-16 年度の報告に述べた。昨年度までに中間報告された多施設バリデーションの結果の最終報告を受け、さらに評価委員会で評価した。なお、評価委員会の組織・構成は以下のように変更した。

評価委員会委員長

田中憲穂 ((財)食薬センター・秦野研究所
2004 年 12 月まで)

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所・薬理部
2005 年 1 月より)

光毒性試験代替法評価 WG 担当副委員長

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所・薬理部
2005 年 12 月まで)

岡本裕子 ((株)コーセー基礎研究所)

光毒性試験代替法評価 WG 委員

今井弘一 (大阪歯科大学中央歯学研究所組織培養実験施設長)

板垣 宏 ((株)資生堂ライフサイエンス研究センター安全性研究所)

大森 崇 (京都大学大学院医学研究科社会健康医学系専攻医療統計学部門)

小島肇夫 (日本メナード化粧品(株)総合研究所)

畑尾正人 ((株)資生堂基盤研究センター)

若栗 忍 ((財)食品薬品安全センター秦野研究所)

オブザーバー

笛木 修 ((独)医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)

評価委員会で陽性対照物質での結果が擬陽性に近いという問題点が指摘を受けた点を提案者が改善してきたことから、それについて、審議した。

さらにこの操作法改良の妥当性検証のため

のバリデーション研究を実施した。

補完実験も前研究と同様な規模で行うべきであったが、(1) 今回の改訂は酵母試験に限定されていた、(2) 前回の規模で実験を行うことは実験施設の負担が大きすぎて実行不可能であった、という2つの理由から、実行委員は、本研究での実験を酵母試験のみで行うことにした。

5施設が参加し、9物質中6物質を担当して実験を行った。

参加施設

今井教安 ((株)コーセー研究本部品質保証センター)
石川牧恵 ((株)資生堂品質保証センター)
若栗忍 ((財)食品薬品安全センター秦野研究所)
松永康明 (日本メナード化粧品(株)総合研究所)
米澤理一郎 (マルホ(株)京都R&Dセンター)

B-2-2) 皮膚感作試験代替法の評価

RIを用いない皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA)法はダイセル化学工業より光毒性試験バッテリー申請の時に作成した様式に従って、申請書が作成された。研究班ではこの方法が行政試験法としての可能性の高い方法であると考え、日本動物実験代替法学会(代替法学会)に詳細な評価を依頼した。そこで、代替法学会では新たに感作性試験代替法評価のためのワーキンググループ(WG)を評価委員会に設置し、検討を行った。評価にあたった委員を以下に示した。第一回のWGでは申請書を慎重に検討し、18項目にわたる質問を出した。第二回会議ではそれに対する申請者の回答を検討し、試験の特徴を明らかにするため、更にリンパ球サブタイプの変動を調べる追加実験を求めた。第三回会議では申請者から提出されたフローサイトメトリーを用いた検討結果を検討し、一次評価報告書(案)をまとめた。

評価委員会委員長

田中憲穂 ((財)食薬センター・秦野研究所 2004年12月まで)

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所・薬理部 2005年1月より)

感作性試験代替法評価WG担当副委員長

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所・薬理部 2005年12月まで)

金澤由基子 ((財)食品薬品安全センター秦野研究所・毒性部 2005年1月より)

感作性試験代替法評価WG委員

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所・薬品部)

金澤由基子 ((財)食品薬品安全センター秦野研究所・毒性部)

高木弘毅 (アベンティスファーマ(株)研究開発本部・臨床研究センター・生物統計・データマネジメント部 統計グループ)

筒井尚久 (三菱ウェルファーマ(株)研究本部安全性研究所)

手島玲子 (国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部)

萩野滋延 ((株)資生堂ライフサイエンス研究センター安全性研究所)

牧 栄二 (ヤンセン協和(株)研究開発本部データ管理部)

オブザーバー

笛木 修 ((独)医薬品医療機器総合機構・新薬審査第一部)

RIを用いない皮膚感作性試験代替法(LLNA-BrdU)法は化学物質評価研究機構より光毒性試験バッテリー申請の時に作成した様式に従って、申請書が作成された。研究班ではこの方法が行政試験法としての可能性の高い方法であると考え、代替法学会に詳細な評価を依頼した。そこで、代替法学会では昨年度に設置した感作性試験代替法評価のためのワーキンググループ(WG)で引き続き評価を行った。第一回のWGでは申請書を慎重に検討し、質問を出した。それ以後はe-mailでのやりとりで一次評価報告書をまとめた。

RIを用いない皮膚感作性試験代替法

LLNA-DA法および同LLNA-BrdU法を評価し、いずれも簡便かつ識別性の高い方法であるとされたが、両試験ともバリデーション結果の不足が明らかになった。そこで代替法学会に多施設バリデーションを依頼した。

LLNA-DAバリデーションでは、10施設が参加して、12被験物質のうち、3物質は全10施設で、残りの9物質は3施設ごとに評価した。各被験物質をコード化し、3用量に調製して各実験施設に送付した。溶媒対照群の発光量に対する被験物質群の発光量の比(stimulation index、SI値)が3を超えた場合、陽性と判定した。LLNA-BrdUバリデーションでは、9施設が参加して、LLNA-DAバリデーションに準じて実施された。この試験の場合、SI値は2を超

えた場合に陽性となる。

LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員会

(委員長)

大森 崇 (京都大学大学院医学研究科医療統計学分野)

(委員)

小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部)

寒水孝司 (大阪大学臨床工学融合研究教育センター)

吉村 功 (東京理科大学工学部経営工学科)

出原賢治 (ダイセル化学工業株式会社 評価・解析センター)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部)

金澤由基子 (財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 医療用具試験室)

武吉正博 (財団法人 化学物質評価研究機構 安全性 評価技術研究所 研究第一部)

小坂忠司 (財団法人 残留農薬研究所 毒性部)

浦谷 衛 (石原産業株式会社 中央研究所 安全科学研究室 安全性グループ)

山中 淳 (ピアス株式会社 中央研究所 ARI 評価グループ)

篠田伸介 (株式会社 薬物安全性試験センター 埼玉研究所 第二毒性部)

中村洋介 (住友化学株式会社 情報電子化学業務室)

青儀 巧 (大塚製薬株式会社 徳島研究所 安全性研究センター 第2研究室)

米田知史 (トーアエイヨー株式会社 研究開発部 福島研究所)

花田智彦 (日本新薬株式会社 創薬研究所 安全性研究部)

猪田健人 (中野製薬株式会社 マーケティング本部研究)

田中正志 (明治製菓株式会社 医薬開発部門 動態安全性研究所)

有馬和範 (大正製薬株式会社 安全性研究所)

宇佐美雅仁 (ホーユー株式会社 総合研究所 基礎研究室)

篠田直樹 (参天製薬株式会社 奈良研究開発センター)

湯浅敦子 (富士フィルム株式会社 CSR 推進部 環境・品質マネジメント部)

素材試験センター)

牧 栄二 (財団法人食品農医薬品安全性評価センター)

B-2-3) 腐食性試験代替法の評価

バリデーションの実施と評価はそれぞれ日本動物実験代替法学会のバリデーション委員会と評価委員会に依頼した。バリデーション委員会の構成は下記に示した。評価委員会の構成は前に示した光毒性試験代替法の評価時と同じである。

バリデーション委員会

委員長

吉村功：東京理科大学工学部経営工学科

委員

大野泰雄：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 (当時)

大森 崇：京都大学大学院医学研究科

川端留美：大鵬薬品工業(株) 安全性研究所

バリデーション協力者および協力施設

バリデーションには下に示す施設および研究者が協力した。なお、○印は実験責任者および実験補助者、△印はキット提供者、◇印は施設担当者である。

○安東朋子：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部

○稲垣勝裕：日本農薬(株) 総合研究所 安全性・医薬研究センター

○久保木真美：日本曹達(株) 小田原研究所 安全性研究部

○小島肇夫：日本メナード化粧品(株) 総合研究所 研究技術部門 第二部

○中村洋介：住友化学工業(株) 生物環境科学研究所 生化学グループ

○小坂忠司：(財) 残留農薬研究所 毒性部 免疫・急性毒性研究室

○石嶺さやか：(財) 残留農薬研究所 毒性部 神経毒性研究室

○森本隆史：住友化学工業(株) 生物環境科学研究所 生化学グループ

△鳥島 久：倉敷紡績(株) バイオメディカル部

△元野 満：倉敷紡績(株) バイオメディカル部

△森川訓行：グンゼ(株) 研究開発センター 第5研究室

◇磯部直彦：住友化学工業株式会社、生物環境科学研究所

◇金口幸裕：日本曹達(株) 農業化学品事業部 農業化学品登録グループ

◇菅野 純：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 毒性部

- ◇原田孝則：(財) 残留農薬研究所 毒性部
- ◇野方 勝：日本農薬(株) 総合研究所 安全性・医薬研究センター
- ◇服部光雄：日本曹達株式会社、農業化学事業部、農業化学品登録グループ
- ◇藤井義修：日本曹達(株) 小田原研究所安全性研究部

日本製のモデルである VitroLife Skin と OECD で承認された EpiDerm について評価した。

被験物質のブラインド化、配送は国立衛研・薬理部の大野泰雄が、記録用紙の準備およびデータの収集、解析は東京理科大学工学部の吉村が担当した。なお、実験部分担当者は技術移転の会に出席した参加施設のうち、本試験開始までにキットを使用した経験のある者に限った。また、陽性対照物質などを用いた予備試験を実施した者に限った。

今回、使用した被験物質数は12種でブラインド化され、陽性対照物質とともに各施設に配布された。なお、配布された被験物質の管理はGLPに準じ、使用記録の作成や保管などについて、使用時の注意を徹底した。2回の試験を繰り返し、同一の判定が得られたときは、その判定を採用し、異なる判定結果が得られた場合は、3回目の試験を実施し、その結果を合わせ多数決で判定した。

このバリデーション結果が良好であったことから、Vitalife Skin と EpiDerm について、第三者評価を実施している。

B-2-4) in vitro 感作性試験法の検討

日本において開発された試験法である、ヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞の CD86 および CD54 の発現亢進を指標にした感作性試験代替法(human Cell Line Activation Test: h-CLAT)の施設間再現性の確認および試験法に関する基礎的データの取得を行った。

細胞は、THP-1 (ヒト単核球細胞株) および U-937 (ヒト組織球リンパ腫細胞株) を ATCC より購入して使用した。CD86 および CD54 の発現は、上記の細胞に被験物質を処理し、細胞生存率とともにフローサイトメトリーを用いて測定した。

まず本試験法の施設間再現性を検証するために、国内7施設によるプレバリデーションを実施した。また試験法に関する基礎的データの取得を目的とした、細胞のロット差、血清のロット差および前培養条件について検討

した。

研究協力者

日本化粧品工業連合会: 足利太可雄、坂口斉、岡本賢二、水野誠、山田貴亮、吉田真由美、佐藤淳、児玉達治、太田尚子、長谷川靖司、岡本裕子、桑原裕史、小坂七重、菌さき子

B-3) in vitro 光感作性試験代替法の検討

B-3-1) UVB 誘導性のヒト表皮角化細胞のアポトーシス解析

ヒト表皮角化細胞は cell line である HaCaT 細胞を用いて、紫外線照射装置を、Broadband-UVB 照射装置と Narrowband-UVB 照射装置の2種類を使用することで確認実験の幅を広げた。上記2種類の UVB を HaCaT 細胞に対して照射後、FITC-Annexin V と 7-AAD を使用し、それぞれフローサイトメトリーでアポトーシスとネクローシスを解析した。アポトーシスを生じた細胞ではなく細胞質内に発現しているフォスファチジルセリンが細胞外の細胞膜に発現する。このフォスファチジルセリンに FITC で蛍光標識した Annexin V と特異的に接着させ、その発現量を測定した。一方、ネクローシスを生じた細胞は細胞膜の透過性が亢進しており、そこに核染色剤である 7-AAD を投与することで核染色を行った。これら、Annexin V と 7-AAD の2重染色を行い、Annexin V、7-AAD のどちらにも染色されない細胞集団を生細胞群、Annexin V にのみ陽性である細胞集団をアポトーシス細胞群、それ以外を死細胞群として、% 表示した。

TCSA による光修飾表皮細胞への影響の確認は培養 HaCaT 細胞に対して各濃度勾配の TCSA 含 PBS で培養し、UVA を 4 J/cm² 照射し、TCSA が細胞膜、細胞質の蛋白に共有結合し、光修飾表皮細胞となっているかを蛍光顕微鏡下に観察した。また、TCSA 光修飾表皮細胞のアポトーシス、ネクローシスを先に述べた方法で解析した。

B-3-2) ヒト培養ケラチノサイトによる Th 細胞誘引におけるケラチノサイトの役割

ケトプロフェン光接触皮膚炎発症時の Th 細胞誘引におけるケラチノサイトの役割を調べるため、ヒト培養ケラチノサイトに KP と UVA 処置を行い、Th1 ケモカインである Mig および IP-10 の産生の変化を調べた。

B-4) 代謝活性化系を含む安全性試験代替法の開発

B-4-1) 代謝

代謝系導入における諸条件の検討をおこなった。試験法はマウス由来の BALB/c 3T3 clone A31 細胞を用い 96 ウェルプレートを用いたニュートラルレッド法に、ラット肝 S9 を用いる代謝系を組み合わせ、細胞毒性試験を行った。化学物質：21 種の化学物質を用いた。薬剤の処理時間は 6 時間とし、S9 の濃度は 5% とした。

本実験の基本プロトコールでは、S9 +/- 条件下での 6 時間処理後、新鮮培地に交換して更に 18 時間培養後の毒性発現をみた。更に、処理直後と 24 時間処理の実験も行った。

B-4-2) タンパク結合

細胞毒性試験として、BALB/3T3 clone A31 細胞を用いた 96 ウェルプレートによるニュートラルレッド法により、下記の試験を行った。

1. 界面活性剤である SDS とシクロフォスファミド (CP) を用い S9 の有無および加熱した S9 による毒性の変化

2. SDS を用いウシ血清アルブミンの濃度の違いによる毒性の変化

3. S9 存在下で毒性が発現する物質の、アルブミンの有無による毒性発現

4. 被験物質のアルブミン添加による毒性発現の変化について調べた。

B-4-3) 臓器特異的毒性

細胞毒性試験として 96 ウェルプレートによるニュートラルレッド法を行った。細胞は VERO 細胞 (アフリカミドリザル腎由来)、PC12 細胞 (ラット副腎髄質褐色細胞腫由来)、HepG2 細胞 (ヒト肝芽腫)、および BALB/3T3 clone A31 細胞 (マウス胎児由来) を用いた。

化学物質は、以下に示す 14 種の化学物質を用いた。

肝毒性を示すもの：5 種

Tetracycline HCl、carbon tetrachloride、coumarin、acetaminophene、thiophene

腎毒性を示すもの：3 種

Cyclosporin A、gentamycin sulfate、4-aminophenol

神経毒性を示すもの：3 種

Trichlorfon、*m*-cresol、2-hexanone

肝毒性と神経毒性を示すもの：1 種

Malathion

腎毒性、肝毒性と神経毒性を示すもの：1

種 Caffeine

対照物質：1 種

Sodium lauryl sulfate (SDS)

化学物質は 6 時間処理 (S9 0%、2%、5%) および 24 時間処理 (S9 0%) の 4 系列について行った。S9 mix の組成は以下の通りとし、S9 添加系では処理液中の S9 濃度が 2% または 5% となるように S9 mix を添加した。

B-5) 代謝活性化能を有する細胞を用いる試験系

皮膚細胞に発現している薬物代謝酵素分子種の同定するため、成人表皮ケラチノサイト、皮膚繊維芽細胞、胎児表皮メラノサイト、皮膚ランゲルハンス細胞から総 RNA を抽出し、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2A7、CYP2B6、CYP2C、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7、CYP4B1 の相対発現レベルを測定した。皮膚での発現が認められた CYP 分子種につき、cDNA を Genecopoeia 社から購入、または、全長を増幅可能なプライマーで増幅し、哺乳動物発現ベクター pCR3.1 に組み込んだ。

シトクロム P450 の一分子種、CYP1A2、およびアリルアミン N-アセチル転移酵素 NAT2 の両方を組み込んだチャイニーズハムスター卵巣由来細胞 CHO は Dr. J. S. Felton から供与された。これら細胞に種々の被験物質を 37°C、24 時間作用させ、その細胞死をコロニー形成率が 37% に減じる被験物質の濃度をもって被験物質の毒性の強度とした。ヒト皮膚に存在することが知られている CYP1A1、CYP1B1、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A5 発現昆虫細胞由来ミクロソーム (バキュロウィルス系、商品名 Supersome、GENTEST) と被験物質 (*m*-Aminophenol、*p*-Aminophenol、 β -Estradiol、Eugenol、Isoeugenol、Alizarin、and Quinizarin) を被験物質の終濃度 0.5 mM、0.17 mM、0.06 mM、0.02 mM とし、37°C、1 時間プレインキュベートして代謝反応させた (反応系液量 100 μ l)。CYP 発現細胞由来ミクロソームの対照群として、CYP を発現していない昆虫細胞由来のミクロソームを用いた。反応系に加えた CYP は 1 pmole に統一し、代謝活性化反応に電子伝達系として 0.3 mM NADPH を加えた。この反応を 24 ウェルプレートで行った。その後、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞亜株である CHO/UV5 細胞をウェルあたり 3000 個を播種した 96 ウェルプレートに前記反応液 100 μ l を加え、さらに 7 日間培養した。培養後、細胞内ミトコンドリア還元能力を生存細胞の指標とする Promega 社の CellTiter-Blue キットを

用いて細胞の生細胞数を測定した。この生細胞数測定結果から、前記5種のCYP分子種による代謝反応を通じて細胞増殖抑制作用が亢進するかあるいは低下するかにつき評価した。

種々の生体外異物の細胞増殖抑制作用を見やすい細胞系としてチャイニーズハムスター卵巣細胞を3種類用いた。すなわち、代謝活性化系なし(CHO)、シトクロム P450 1A2 (CYP1A2) による代謝活性化系のみ (CHO/1A2)、および CYP1A2+アрилアミン N-アセチル転移酵素 NAT2 を代謝活性化系として有している (CHO/1A2+NAT2) 細胞の増殖抑制作用を指標にして、これら細胞内に組み込まれた代謝活性化系の働きを *m*-aminophenol、vanillin を被験物質として、増殖抑制作用を代謝活性化系を有する細胞と有しない細胞間で比較した。細胞増殖抑制作用は細胞を 0.4% クリスタルバイオレット-50% エタノール溶液で固定・染色することにより算定した。

ヒト皮膚に存在することが知られている CYP1A1、CYP1B1、CYP2E1、CYP3A5 発現細胞由来マイクロソーム (GENTEST) と上記2種の被験物質を 37°C、1 時間プレインキュベートして代謝活性化させた後に前項の3種の CHO 細胞を用いて CYP1A1、CYP1B1、CYP2E1、CYP3A5 による代謝活性化を通じて細胞増殖抑制作用が亢進するかどうかを調べた。また、加えた CYP は 1 nmole に統一し、代謝活性化反応に電子伝達系として 1 mM NADPH を加えた。

B-6) 代替法実験結果の統計解析手法の検討

B-6-1) 閾値検討のための統計解析法

まず、過去に行われた議論、事例に基づいて閾値問題の定式化を行った。次に、発がん性に関する一つの事例を題材にして、閾値推定の方法についての考察を行った。その考察に基づいて、閾値モデルに関するモデル選択の一般的な方法を提案し、発がん性に関する動物実験に適用した。

B-6-2) MLA の統計解析法

B-6-2-1) 統計解析法の比較

比較する統計解析法として、1 次回帰検定、2 次回帰検定、ダネット型検定、大森法を対象にした。大森法は、ダネット型検定、Margolin 手順、1 次回帰検定を逐次適用する複合手法である。

各統計解析法を適用する際に、用量変数として被験物質用量をそのまま使うのと、用量順位 (rank) を使うのとを比較した。

反応変数として、変異頻度 (mutant frequency; MF) を用いるのと、その対数 (log(MF); LMF) を用いるのとを比較した。

各検定の有意水準を 5% ~ 0.1% までのどの値に設定するのがよいか比較した。

比較のためのデータを2種類用意した。1 つはシミュレーションモデルによって発生させた疑似データであり、他の1 つは外国の実験施設から提供された約 430 セットの実データである。

前者については、生存確率に用量依存性がない場合と用量と共に直線的に生存確率が減少する場合のそれぞれについて、4 種類の変異頻度パターンを想定し、用量は等間隔の7水準に設定して、1000 セットの疑似データを作成した。このデータセットに基づいて、4 解析法での第1種の過誤確率と、検出力を検討した。

後者については、アガール MLA の実験データ 143 セットとマイクロウェル MLA の実験データ 255 セットに対して、国際的にこの分野の熟達者として知られている3名の研究者の合議判定を真判定とした上で、4 解析法での一致率 (感度・特異度) を検討した。

B-6-2-2) アガール法とマイクロウェル法

MLA にはアガール MLA 法とマイクロウェル MLA 法の二つの方法がある。前者は、変異を起こした細胞のみが生存できるプレート寒天培地で細胞を培養し、生じるコロニー数で変異強度を測定するのに対し、後者は、96 ウェルエル中で細胞を培養し、コロニーが生じないウェル数で変異強度を測定するものである。

統計手法として性能が良い大森法を世界的な MLA ワーキンググループが集めたデータに適用して変異原性を評価したところ、マイクロウェル法に比べて、アガール法の方が実験家の考える判定との一致率が、約 94% に対する約 83% と低かった。この傾向はシミュレーションモデルを想定したモンテカルロ実験でも同じであった。

その原因を理論的吟味と実験データの吟味で検討した。すなわち、大森法を適用するときには、変異強度の推定値について分散を評価する必要があるが、その分散の評価式を理論的に吟味した。さらに、実験データから得られる分散の推定値が妥当であるかを統計的に吟味した。

B-6-3) 3次元皮膚モデルによる ET50 推定

B-6-3-1) 区間推定法の改善

3次元ヒト皮膚モデルで、50%の細胞損傷が起こるまでの時間（ET50）で皮膚刺激性を評価するという状況を対象として、測定時点がたかだか5時点の場合を想定した。反応は吸光度で、反応・時間関係をロジスティック関数としたシミュレーションモデルを設定した。測定値は、吸光度に正規誤差が加わると想定した。

推定のための提案法としては、第1段階でロジスティック回帰法での推定を行い、それで信頼区間が求まらなかったときに第2段階で対数時間直線法を用いることとした。

信頼区間を求める方法としては、デルタ法、フィーラー法、尤度比法を検討対象とした。従来のヒト皮膚モデルのキットメーカーが推奨している補間法が基本的に直線回帰法であるので、これを提案法の対照として、モンテカルロシミュレーションで性能評価を行った。

B-6-3-2) 実験時点の設計

推定精度をよくするには、どのように測定時点を配置するのがよいかを、シミュレーション実験を通して検討した。

B-6-3-3) 簡便法の検討

本研究で性能が良いと考えられた ET50 の区間推定法では、非線形最小二乗法が必要である。ところが実験家にはこれが使いこなせないという指摘が出された。より簡便な方法の提案が必要であることが分かった。

そこで、対数時間直線法を用いるだけでは不十分な場合には、再実験を行うという方針を考え、どのような場合に再実験を行うべきか、という課題を設定した。

この課題に答えるために、現実の3次元ヒト皮膚モデルのバリデーション研究のデータセットの中で、対数時間直線法では不十分でロジスティック回帰法が有効な場合がどのような場合であるか検討した。その検討結果に基づいて、再実験を組み込む ET50 区間推定法の手順を考案した。考案した手法を過去の実験データに適用して、その性能を評価した。

B-6-4) 光毒性試験代替法の吟味

酵母光生育阻害試験（酵母試験）と赤血球溶血性試験（赤血球試験）のバッテリー（酵母・赤血球試験）は、一応の性能があることが分かっていた。しかし、そのバリデーション研究の中で、施設間再現性を定量的に評価するにはどうすればよいか、酵母・赤血球試験でのカットオフ値は妥当であるか、という

二つの課題が残った。

前者に関しては、被験物質を固定効果、施設を変量効果とした混合モデルで各施設がどのように偏っているかを評価した。測定値としては、酵母試験では阻止帯の差 Z 、赤血球試験では溶血度の差 L を用いた。

後者に関しては、バリデーション研究でのカットオフ値として、表1の規準が用いられてきた。

表1 バリデーション研究での判定基準

記号	判定	酵母規準	赤血球規準
		mm	%
N	陰性	$Z < 2$	$L < 5$
E	擬陽性	$2 = Z < 5$	$5 = L < 10$
P	陽性	$5 = Z$	$10 < L$

本研究では、擬陽性という分類をせず、陽性と陰性を分けるカットオフ値のみを決定することとした。カットオフ値を変えることは、感度と特異度が取引関係で増減することである。そのバランスをどのようにするかでカットオフ値を変えなければならない。

本研究では、*in vivo* の結果に問題がある2物質を除外して感度と特異度を考え、特異度を横軸、感度を縦軸に取った ROC 曲線を描き、少なくとも特異度を60%以上にするという条件下で感度を大きくするカットオフ値を検討した。

B-6-5) 最適割付法

バリデーション研究の実験では、複数の施設が複数の被験物質を用いて、当該試験法で毒性を調べる。実験を通して知りたいことは、施設間再現性と予測性（代替可能性）である。

各施設では、実験の費用負担と利用可能装置・労力・時間について制約がある。その制約を満たすような条件下で、目的について最も効果的な被験物質割付がデザインとして求められる。

それを検討するために、施設と被験物質を母数効果とする線形モデルを想定した。各母数を推定することで、施設間再現性、代替可能性を評価することにした。推定量の分散共分散行列の行列式を最小にするという、D-最適化規準を用いた。シミュレーションモデルとして、LLNA-DA法のバリデーション研究で生じた制約と同様な制約を想定した。すなわち、各施設で実験可能な被験物質数がそれぞれ

れ与えられている、という条件を想定した。その条件下で可能な全割付を効率的に列挙し、D-最適なデザインを求めた。現実の LLNA-DA バリデーション研究で用いられた割付の D-最適性を評価した。D-最適性に優れた割り付け法の性質を考察した。

この後さらに、施設効果を変量効果とした混合効果モデルで解析したときの施設間再現性の推定精度を数値実験で検討した。

B-6-6) 技術易移転性の評価法

バリデーション研究の一つの焦点は、Transferability (技術易移転性) の評価である。実際、技術易移転性は、OECD 第 34 ガイダンス文書 (Guidance Document #34) のバリデーションの要点評価法 (Modular Approach to Assessing Validation Status) で 7 項目の 3 番目に、“inter-laboratory transferability” としてその必要性があげられている。しかし、それを評価する具体的な手法については過去に研究報告がない。

ECVAM (ECVAM-Glossary) では、技術易移転性を “The ability of a test method or of a procedure to be accurately and reliably performed in different, competent laboratories” と定義している。すなわち、技術易移転性は、あるレベル以上の施設で妥当な結果が出ることで評価されるべきである。

そこで評価法として、特に技術レベルの低い施設を外れ施設として検出し、それをパスした施設で施設間再現性を評価し、それが容認できるかどうか評価するのが良いと考えられた。そのような評価法を考案した上で、それを現実の LLNA-DA 法のバリデーション研究のデータに適用して、妥当な結果が得られるかどうか評価した。

B-7) バリデーションデータの管理とデータ解析

B-7-1) 代替可能性の指標の提案 (感度、特異度、一致割合の拡張)

動物実験とその対象となる代替法の判定がどちらも陽性、陰性という 2 つの分類の場合、感度、特異度、一致割合がよく用いられる。単独の施設の場合にはある被験物質に対応する代替法の判定はそれぞれ一つに要約されるが、施設間再現性の評価を目的としているバリデーション研究でのそれは複数になる。このとき、しばしば結果をあたかも別の物質であるとみなして感度、特異度、一致割合を計

算することが行われる。しかし、そのような方法は、物質数と施設数のバランスが変わると値の大きさが変わってしまう可能性がある。感度、特異度、一致割合は研究で用いた物質数のみに依存するようにすべきであろう。

表 2 は、実際に行われたある代替法のバリデーションの結果である。このバリデーション研究では 6 実験施設が 6 物質について代替法の実験を行った。

被験物質	動物実験	代替法					
		施設a	施設b	施設c	施設d	施設e	施設f
物質A	P	P	E	E	P		
物質B	P	P	N	P	E		
物質C	N	P	P	P	P		
物質D	P	P	E			E	P
物質E	N	P	P			P	P
物質F	N	N	P			N	N
物質G	P			P	P	P	P
物質H	N			N	E	E	E
物質I	N			N	N	N	N

P: 陽性, N: 陰性, E: 擬陽性

この代替法の特徴は陽性、陰性だけでなく、擬陽性という判定結果が生じる点も一つの特徴になっている。したがって、感度、特異度、一致割合を計算する場合に、擬陽性の扱いについても考慮する必要がある。

提案する方法は次のとおりである。第 i 物質における動物実験の判定スコアを x_i とする。このスコアは、もし動物実験の結果が陽性ならば 1 を、陰性ならば 0 をとることとする。第 i 物質における第 j 施設の代替法の判定スコアを y_{ij} とする。このスコアは、代替法の判定が陽性ならば 1、陰性ならば 0 をとることとする。擬陽性は、陽性でも陰性でもないということなので、ここではスコアを 0.5 とすることにする。また、第 i 物質の代替法の実験を行った物質数を m_i とし、すべての物質数を n とする。第 i 物質の陽性割合を以下のように定義して、 p_i と表現することにする。つまり

$$p_i = \sum_j y_{ij} / m_i$$

である。

これを用いて、以下の 3 つの指標、 P_{sn} 、 P_{sp} 、 P_{ac} を提案する。

$$P_{sn} = \sum_i x_i p_i / \sum_i x_i$$

$$P_{sp} = \sum_i (1 - x_i)(1 - p_i) / \sum_i (1 - x_i)$$

$$P_{ac} = \sum_i q_i / n = \sum_i (x_i p_i + (1 - x_i)(1 - p_i)) / n$$

もしも各被験物質について、すべての施設が陽性または陰性を示すなら、 p_i は 0 か 1 のどちらかのみをとる値となる。その場合にはこれらの指標はそれぞれ物質数に基づいた感度、特異度、一致割合に対応する。このような計算が、各結果をあたかも別の物質であるかのようにみなして計算した感度、得意度、一致割合とどのように異なるのかを検討した。ところで、 q_i を以下のように定義する。

$$q_i = x_i p_i + (1 - x_i)(1 - p_i)$$

と定義した場合、これは被験物質ごとの施設間再現性の指標として利用できる。もしもこの値が 0 に近ければその物質について施設間再現性は極めて悪いこと示すことになり、1 に近いほどこの指標は施設間再現性がよいことを示すことになる。

B-7-2) 施設間再現性の指標の提案

施設間差を評価する場合、表 2 のような代替法の判定が陽性と陰性（と擬陽性）というような判定結果を用いると、毒性が強いもしくは弱い物質については高い施設間再現性が得られるであるが、判定基準がカットオフ値に近い物質については施設間の判定結果の乖離は大きくなるであろう。この問題を回避するためには、毒性を判定する際に用いる値で施設間再現性を評価すればよいと思われる。たいていの場合、ひとつの物質について実験から得られる毒性評価の指標の値は、複数回の繰り返しにより得られることが多い。したがって、ある毒性の指標とその分散から施設間再現性を評価することにする。

第 i 施設の毒性の指標を z_i とし、その分散を $\text{Var}(z_i)$ とする。ここで、 z_i は連続値であるとする。今、 z_i が施設ごとに異なる正規分布 $N(\theta_i, \text{Var}(z_i))$ に従うとする。さらにその位置パラメータ θ_i が全施設共通に正規分布 $N(\theta, \tau^2)$ に従うことを仮定する。このとき、尺度パラメータである τ^2 は、施設間のばらつきを表しているため、その推定値を施設間再現性の指標として用いることができるであろう。この値の最小値は 0 となるので、0 に近いほど施設間差が小さいことになる。 τ^2 の推定法はいくつかの方法が考えられるが、例えば制限付き最尤法によって求めることができる。

表 3 は、モルモットを用いた皮膚感作性試験の代替法として広く知られている LLNA 法のある研究結果である。LLNA 法では、感作性の判定は Stimulation index (SI) という指

標に基づき行われる。SI の値は、溶媒群と被験物質群の測定量の比で定義され、値が大きいほど、強い物質であることになる。SI は連続値であるが、比であるために、負の値はとらない。一方、上記で仮定した z_i は、マイナス無限大からプラス無限までをとることを想定している。このため、このデータには対数変換を施した SI を z_i とすることにする。この場合、 τ^2 は SI ではなく、対数変換を施した SI のスケールになるので $\exp(\tau^2)$ は施設間差の指標として用いることができるであろう。この値は最小が 1 となるので、1 に近いほど施設間差小さいことになる。

表3 SIと分散

Concentration (%)	Lab. 1		Lab. 2		Lab. 3	
	SI	Var(SI)	SI	Var(SI)	SI	Var(SI)
<i>Dinitrochlorobenzene</i>						
0.01	1.55	0.17	1.00	0.03	2.50	1.33
0.025	1.84	0.56	1.19	0.05	2.92	2.69
0.05	2.35	0.45	2.79	0.47	3.15	2.03
0.1	8.89	5.40	12.83	6.76	7.08	9.75
0.25	38.16	75.38	78.61	218.18	24.58	112.59
<i>Isoeugenol</i>						
0.25	2.90	0.24	0.73	0.03	1.23	0.18
0.5	1.73	0.22	0.73	0.03	1.72	3.44
1	2.33	0.07	0.87	0.03	2.60	0.67
2.5	3.80	0.44	2.07	0.32	4.28	2.09
5	6.84	1.42	7.16	4.12	11.14	14.65
<i>pABA</i>						
0.5	1.12	0.05	1.60	0.10	1.14	0.12
1	1.09	0.04	0.83	0.02	0.63	0.06
2.5	1.16	0.06	0.87	0.03	0.66	0.07
5	1.11	0.09	0.65	0.01	0.78	0.07
10	0.96	0.05	0.70	0.01	0.59	0.04

表 3 のデータにもとづき、3 つの物質の各濃度別に $\exp(\tau^2)$ を推定し、この指標の特徴を調べた。

B-7-3) データ入力ファイルの作成

筆者が過去に経験したあるバリデーション研究では、実験データの記録方法の統一が不十分であったため、記載方法が統一されていない、必要なデータが記載されていないといった不備が多く表れた。その研究では、全部で 1,535 のデータファイルが集められたが、データクリーニングにより、何らかの間合せや訂正を行うこととなったファイル数は、のべ 1,742 となった。データクリーニングが必要となった主な理由は

- 1 細胞毒性の指標を計算するために必要なデータが入力されていない (44%)
- 2 規定したフォーマット形式にデータが入力されていない (19%)
- 3 プロトコルや事前に決められたルールに適合していない (17%)

であった。() 内のパーセントは、のべ間合

せ数についての割合を示している。これらの項目が多くなっている原因として、

- ・ 個々の試験法に適したデータファイルのフォーマットがきちんと定められていない、
- ・ データシートの入力方法に多くの誤解があった、
- ・ プロトコルで用いられた用語が誤解されやすく、試験によりその定義が異なっていた、

ことなどが考察されている。この研究では、データクリーニングを行い最終的な結果を導くためのデータベースを作成するために、2年以上作業を費やすことになった。この経験は、施設から集められるデータに誤りがなく、集められたデータからデータベースを作成するまでに実施するデータクリーニングをいかに効率よく実施するかが、バリデーション研究を実施する際の一つの課題であることを示しているといえる。

そこで、「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーシステム」のバリデーション研究では、入力書式を統一したデータ入力ファイルを Microsoft 社の Excel で作成し、各実験施設に配布し、実験結果を入力したものを集めることにした。この入力ファイルは、Excel の持つシートの保護、入力規制、表計算機能を生かし、

- ・ 試験実施者がデータ入力ファイルのどの位置に何を入力するのかということを理解しやすいようにする、
 - ・ 誤った入力や予期しない入力をなくすようにする、
 - ・ 各試験実施者による試験の結果の確認ができるようにする、
- という方針で作成した。

図 1 は酵母光生育阻害試験のために作成したデータ入力ファイルである。

このようなデータ入力ファイルの作成により、問い合わせ項目の内容とファイル数がどのように変化したのかを調べた。

図 1 酵母光生育阻害試験のデータ入力ファイル

B-7-4) 研究のマネジメント

バリデーション研究はひとつの研究である。研究を実施する際には、その目的を明確にすることが必要である。筆者は研究計画書と実験手順書の作成、技術研修と予備実験の実施が、バリデーション研究によってを遂行する上で重要であると考えている。

研究計画書

研究計画書は、そのバリデーション研究で何を目的としているか、どのような役割のものがどのような手順で実施するかを明確にするための文書である。

研究計画書として、文書化することの利点は、これを研究者が共有することで

- ・ すべての研究者が共通の目標に向かい研究を遂行できる、
- ・ だれが何について責任を持っているのかを明確にできる、
- ・ 現在この研究がどの段階であるかを把握できる

ということである。

実験手順書

実験手順書は、バリデーション研究の対象となる代替法の実験を実施するための手順を記載した文書である。

しばしば実験手順書は、より広範な施設環境に適用できるように一般化されたものが作成されることがある。しかし、筆者らは、バリデーション研究用の実験手順書を作成するようにしている。このことを利点は、施設ご

とに行なわれた異なる手順により生じる結果の乖離を、小さくすることができることである。

技術研修

技術研修は、開発された試験法の実験手順をバリデーション研究に参加する実験実施施設に正しく伝えるための実技の研修である。通常、この研修は、バリデーション研究の対象となる代替法の開発者によって行われる。

技術研修を実施する利点は、

- ・ 実験手順書に記載された内容を確認できる、
- ・ 実験手順書に記載するほどでもない事項についての詳細を確認できる、
- ・ 簡易な実験を通して、実験手順書に追記しなくてはいけない必要事項を知ることができる、

ということである。

予備実験

ここでの予備実験とは、バリデーション研究で計画している実験がうまくいくかどうかを調べるための多施設で実施する小規模な実験である。その目的は、バリデーション研究の本実験に入る前の実験手順の確認であったり、本実験で用いる用量を各施設で決定したりするためであったりする。

予備実験を行い、その結果を検討することの利点は

- ・ バリデーション研究を行う前にその実験手順で十分に施設間再現性を評価できるかどうかを調べることができる、
- ・ 実験手順書に記載すべきことを見直すことができる
- ・ 実験の手順や資料の配布、データの記入などの手順を見直すことができる、

ことである。

(倫理面への配慮)

本実験では動物を用いないこと、また倫理面で配慮が必要なヒト材料を用いる事は無かったことから、動物倫理およびヒト材料を用いる場合の安全性、ならびに倫理基準に該当する要件はないと判断した。

C. 研究結果および考察

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。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。

- ・ 化粧品および化粧品原料の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）および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および原料も含む）
- ・ 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）および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。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。

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 および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、皮膚およ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。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。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)の常任理事会および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。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収載はなかった。

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。

- 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(ERGED) 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) 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、バリデーションおよび研究である。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) 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) および 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) 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 の活動および 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「INVITOX」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 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) は、オランダにおける動物実験代替法の開発、バリデーションおよ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) 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) 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 回動物実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。

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。評価された代替法およ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-Chorio