

- 73) 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）、日本薬理学会シンポジウム S17 (2006. 3. 9)
- 74) T. Ashikaga, H. Sakaguchi, K. Okamoto, M. Mizuno, J. Sato, T. Yamada, M. Yoshida<sup>7</sup> and Y. Ohno. Results of a Japanese ring study of a human cell line activation test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential. SOT 2006. 3,
- 75) Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Kosaka, N., Sono, S., Itagaki, H., and Suzuki, H., "Predicting and classification of allergic potential using an in vitro skin sensitization test: Human cell line activation test (H-CLAT)", Society of toxicology 45th annual meeting, 2006.
- 76) Suzuki, M., Hirota, M., Hagino, S., Aiba, S., and Itagaki, H., "Evaluation of changes of cell surface thiols as a new biomarker for in vitro sensitization", Society of toxicology 45th annual meeting, 2006.
- 77) 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、大野泰雄、日本における in vitro 皮膚感作性試験：h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の共同研究。第30回日本化粧品学会 (2006. 6. 2-3) 東京ヤクルトホール
- 58)
- 78) Noriho Tanaka: Current activities of alternative research in Japan, 1st International Forum on Laboratory Animal Science and Technology, Beijing (China), November 2006
- 79) 菌さき子、足利太可雄、萩野滋延、板垣宏、"THP-1 細胞を用いた CD86 および CD54 発現を指標とした感作性試験代替法における蛍光標識抗体の検討", 第16回日本サイトメトリー学会, 2006.
- 80) 坂口斉, 足利太可雄, 小坂七重, 宮澤正明, 吉田雪子, 伊藤勇一, 菌さき子, 石川牧恵, 廣田衛彦, 萩野滋延, 板垣宏, 鈴木尋之, "ヒト細胞株を用いた皮膚感作性試験代替法; human cell line activation test (h-CLAT) の開発", 第36回日本皮膚アレルギー学会 (JSDA) 総会 第31回日本接触皮膚炎学会 (JSCD) 総会合同学術大会, 2006.
- 81) 石川牧恵, 足利太可雄, 萩野滋延, 板垣宏, "難水溶性物質の評価を目的とした THP-1 細胞の三次元培養ゲルモデルの開発", 第20回日本動物実験代替法学会, 2006.
- 82) 穂谷昌利, 廣田衛彦, 鈴木美絵, 萩野滋延, 板垣宏, "ヒト単球由来細胞株を用いた光感作性試験代替法の開発", 第20回日本動物実験代替法学会, 2006.
- 83) 鈴木美絵, 廣田衛彦, 萩野滋延, 板垣宏, 相場節也, "細胞表面-SH 基を指標とした感作性試験代替法 (SH-Test) の試験判断基準の構築化", 第20回日本動物実験代替法学会, 2006.
- 84) 廣田衛彦, 鈴木美絵, 萩野滋延, 板垣宏, 相場節也, "細胞表面-SH 基を指標とした感作性試験代替法 (SH-Test) の試験条件検討", 第20回日本動物実験代替法学会, 2006.
- 85) 廣田衛彦, 鈴木美絵, 加賀谷早織, 佐々木喜教, 水芦政人, 萩野滋延, 相場節也, 板垣宏, "ハプテンによる細胞表面チオール基の減少—その生物学意義と応用(II): 感作性試験代替法への応用を目的とした細胞腫の選択", 日本研究皮膚科学科学会第31回年次学術大会・総会, 2006.
- 86) 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、大野 泰雄、"日本における in vitro 皮膚感作性試験:h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の共同研究"、第31回日本化粧品学会学術要旨集、53、2006.
- 87) 足利 太可雄、"皮膚感作性試験代替法 (h-CLATを中心に)"、第33回日本トキシコロジー学会要旨集、S69、2006.
- 88) Ashikaga T, "Development of an in vitro skin sensitization test named h-CLAT (human cell line activation test)", abstract of the 19<sup>th</sup> annual and international meeting of the Japanese association for animal cell technology, P75, 2006.
- 89) 小坂 七重、岡本 賢二、桑原 裕史、水野誠、岡本 裕子、菌 さき子、山田 貴亮、長谷川 靖司、吉田 真由美、太田 尚子、児玉 達治、佐藤 淳、坂口 斉、足利 太可雄、大野 泰雄、"In vitro 皮膚感作性試験: h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の日本における共同研究 (第2報) —適切な THP-1 細胞の選択基準

- の検討一”、日本動物実験代替法学会第20回大会要旨集、89、2006.
- 90) 菌 さき子、山田 貴亮、長谷川 靖司、小坂 七重、岡本 賢二、桑原 裕史、水野 誠、岡本 裕子、吉田 真由美、太田尚子、児玉 達治、佐藤 淳、坂口 斉、足利 太可雄、大野 泰雄、“In vitro 皮膚感作性試験：h-CLAT (human Cell Line Activation Test)の日本における共同研究(第3報)―血清の影響―”、日本動物実験代替法学会第20回大会要旨集、91、2006.
- 91) 水野 誠、吉田 真由美、児玉 達治、佐藤 淳、太田 尚子、岡本 裕子、小坂七重、岡本 賢二、桑原 裕史、菌 さき子、山田 貴亮、長谷川 靖司、坂口 斉、足利 太可雄、大野 泰雄、“In vitro 皮膚感作性試験：h-CLAT (human Cell Line Activation Test)の日本における共同研究(第4報)―前培養に関する条件検討―”、日本動物実験代替法学会第20回大会要旨集、93、2006.
- 92) 田中憲穂：化学物質の安全性評価と動物実験代替法の動向について(欧米の動向を中心として)高機能簡易型有害性評価手法開発ワークショップ  
主催：NEDO、2006年2月、東京
- 93) Yoshimura I, Idehara K, Omori T, et al. Validation of LLNA-DA assay for assessing skin sensitization potential. SOT2007, March 25-29, Charlotte, USA.
- 94) 寒水孝司、白石亜矢子、兵頭洋平、浜田知久馬、吉村功。(2006) 皮膚刺激性試験代替法におけるET50推定法。日本動物実験代替法学会第20回大会、2006年12月8日、東京。
- 95) 高沼正幸、寒水孝司、大森崇、浜田知久馬、吉村功、動物実験代替法バリデーション研究における被験物質割付の最適性に関する検討、第20回日本動物実験代替法学会(2006.12.8)
- 96) 兵頭洋平、寒水孝司、大森崇、浜田知久馬、吉村功、動物実験代替法のバリデーションにおけるtransferabilityの統計的評価に関する研究、第20回日本動物実験代替法学会(2006.12.8)
- 97) 大森崇、出原賢治、小島肇、寒水孝司、有馬和範、後藤浩彦、花田智彦、五十嵐良明、猪田健人、金澤由基子、小坂忠司、牧栄二、森本隆史、篠田伸介、篠田直樹、武吉正博、田中正志、浦谷衛、宇佐美雅仁、山中淳、米田知史、吉村功、湯浅敦子、皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA法)バリデーション研究、第20回日本動物実験代替法学会(2006.12.8)
- 98) 平川晃弘、佐藤泰憲、寒水孝司、浜田知久馬、吉村功。(2006) マイクロアレイデータにおけるFDRに基づくカットオフ値の選定方法に関する検討。2006年度統計関連学会連合大会、2006年9月7日、仙台、東北大学。
- 99) 吉村功。(2006) 統計科学と医・薬・生物・健康科学との相互寄与を未来に向けて思量する。2006年度統計関連学会連合大会、2006年9月7日、仙台、東北大学。
- 100) Sato Y, Hirose M, Ando H, Suganami H, Hamada C, Yoshimura I. (2006) Modified multifactor dimensionality reduction method for detecting Gene-Gene interaction for an unbalanced sample size. 27<sup>th</sup> Annual Conference of the International Society for Clinical Biostatistics, August 28, 2006, Geneva, Switzerland.
- 101) Sato Y, Suganami H, Hamada C, Yoshimura I, Sakamoto H, Yoshida T, Yoshimura K. (2006) The confidence interval of allelic odds ratios under the Hardy-Weinberg disequilibrium. International Biometric Conference 2006, June 17, 2006, Montreal, Canada.
- 102) Aoki Y, Hamada C, Yoshimura I. (2006) Estimation of Drug-Receptor Model Parameters; Comparing the Performances of Traditional Methods with a Nonlinear Least Square Method. (2006) International Biometric Conference, June 17, 2006, Montreal, Canada.
- 103) 大森崇、寒水孝司、Stimulation Indexの施設間再現性を評価する指標、第20回日本動物実験代替法学会(2006.12.8)
- 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、およびそれぞれに属する委員および職員の方々のお世話になっ

た。ここに感謝申し上げます。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年	出版年	ページ
戸倉新樹	光線過敏症	玉置邦彦、塩原哲夫編	皮膚免疫ハンドブック改訂2版	中外医学社	新宿区東 京都	2004	215-224
戸倉新樹	光線過敏型薬疹	玉置邦彦編	最新皮膚科学体系	中山書店	文京区東 京都	2004	75-82
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
戸倉新樹	内服テストと内服照射テスト	宮地良樹、瀧川雅浩編	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
戸倉新樹	後天性光線過敏症の病態	斎田俊明、飯塚一編	先端医療シリーズ 38 皮膚疾患の最新医療	先端医療技術研究所	東京	2007	221-224

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	動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受け入れの現状	国立医薬品食品衛生研究所報告 122	122号	1-10	2004
大野泰雄	日本における動物実験代替法の開発と活動状況	Fragrance Journal	2月号	1-14	2005
Hongo T, Kajikawa M, Ishida S, Ozawa S, <u>Ohno Y</u> , Sawada J, Umezawa A, Ishikawa S, Kobayashi T, and Honda H	Thee-Dimensional High-Density Culture of Hep G2 Cells in a 5-ml Radial-flow Bioreactor for Construction of Artificial Liver	J, Bioscience and Bioengineering,	Vol 99, No 3	237-244	2005
K. Toda, S. Ishida, K. Nakata, R. Matsuda, S. Ozawa, J. Sawada, <u>Y. Ohno</u> , K. Inoue, K. Shudo and Y. Hayashi:	Improvement in reliability of probabilistic test of significant differences in GeneChip experiments	Anal. Sci.,	Vol 20	731-733	2004
Sugita K, T Shimauchi, Tokura Y	Chronic actinic dermatitis associated with adult T-cell leukemia	J Am Acad Dermatol	52	S38-40	2005
Orimo H, Mei N, Boiteux S, Tokura Y, Kasai H	Analysis of 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua) released from DNA by the formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) protein: a reliable method to estimate cellular oxidative stress.	J Radia Res	45	455-460	2004
戸倉新樹	薬剤光線過敏症	MB Derma	96	12-19	2004

Kiyomi Ohmori, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, <u>Noriho Tanaka</u> and Makoto Umeda	An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells	Mutation Res.	557	191-202	2004
田中憲徳	医療用具の製品化を目的とした前臨床試験	バイオマテリアル-生体材料-	22	320-327	2004
田中憲徳	照射食品の遺伝的安全性試験	食品照射	39	13-27	2004
豊田英一	動物実験代替法の国際動向とハーモナイゼーション	FRAGRANCE JOURNL	33(2)	15-21	2005
豊田英一	化粧品リスクアセスメントに関するグローバル動向と課題	日本化粧品科学会誌	28(4)	288-291	2004
西山智, 吉村功	複合最大対比法の提案とその毒性試験データ解析への応用	計量生物学	25	1--18	2004
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、籾内桃子	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
<u>Tokura Y</u>	Photocontact dermatitis: from basic photobiology to clinical relevance	J Environ Dermatol	12	71-77	2005
Misawa J, Moriwaki 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	J Dermatol Sci	40	59-61	2005

	lines.				
Sayama K, Kobayashi Y, Fujita H, Ito A, Tokura Y, 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, Ikeshi yama K, Tokura Y	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, Tokura Y, Hino R, 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, Shimauchi T, Kobayashi M, Kabashima K, Tokura Y	Induction of keratinocyte apoptosis by photosensitizing chemicals plus UVA.				投稿中
Ryo Kurihara, Fujio Shiraishi, Noriho Tanaka, Shina Hashimoto	Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastals japanese waters	Environmental Toxicology and Chemistry	24	1984-1993	2005
Agneta Posengre, Linda Faxius, Noriho Tanaka, Mika Watanabe, 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, Noriho Tanaka, 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
Kiyomi Ohmori, Makoto Umeda, Noriho Tanaka, 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,	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	ATLA	33	619-639	2005



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) Ryo Kurihara, Fujio Shiraishi, <u>Noriho Tanaka</u> , <u>Shinya Hashimoto</u>					
Chiba Y, Matsuyama Y, Sato T, Yoshimura I	A simulation study for a linear measurement error model when error variances vary between measurements.	J. Agricultural, Biolo gical, and Environmental Statistic	10, 1	118-130	2005
Imai S, Atarashi K, Ikesue K, Akiyama K, Tokura Y.	Establishment of murine model of allergic photocontact dermatitis to ketoprofen and characterization of pathogenic T cells.	J Dermatol Sci	41	127-13 6	2006
Orimo H, Tokura Y, 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
Kabashima K, Nagamachi M, Honda T, Nishigori C, Miyachi Y, Tokura Y,	Prostaglandin E(2) is required for ultraviolet B-induced skin	Lab Invest	87	49-55	2007

Narumiya S.	inflammation via EP2 and EP4 receptors.				
Hino R, Kobayashi M, Mori T, Orimo H, Shimauchi T, Kabashima K, Tokura Y.	Inhibition of T helper 2 chemokine production by narrowband ultraviolet B in cultured keratinocytes.	Br J Dermatol	In press		2007
戸倉新樹	光アレルギーの発症機序と対策	アレルギー	55	1382-1389	2006
戸倉新樹	薬剤性光線過敏症	臨床と研究	83	87-90	2006
Takashi Omori	A measure evaluating relevance of a validation study of alternatives to animal testing	AATEX	12	25-31	2006
Seok KJ, Wanibuchi H, Morimura K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Yoshimura I, Fukushima S.	Existence of a no effect level for MelQx hepatocarcinogenicity on a background of thioacetamide-induced liver damage in rats	Cancer Science,	37	453-458	2006
Sato Y, Suganami H, Hamada C, Yoshimura I, Sakamoto H, Yoshida T, Yoshimura K.	The confidence interval of allelic odds ratios under the Hardy-Weinberg disequilibrium	Journal of Human Genetics	51	772-780	2006
Moore MM, Honma M, Clements J, Bolcsfoldi J, Burlinson B, Cifone M, Clarke J, Delongchamp R, Durward R, Fellows M, Gollapudi B, Hou S, Jenkinson P, Lloyd M, Majeska J, Myhr B, O'Donovan M, Omori T, Riach C, San R, Stankowski LF, Thakur AK, Van Goethem F, Wakuri S, Yoshimura I.	Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Follow-up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests-Aberdeen, Scotland, 2003	Environmental and Molecular Mutagenesis	47	1-5	2006
Negoro T, Orihara K, Irahara T, Nishiyama H, Hagiwara K,	Influence of SNPs in cytokine-related genes on	Pediatric Allergy and Immunology,	17	583-590	2006

Nishida R, Takagi H, Satoh K, Yamamoto Y, Shimizu S, Hagiwara T, Ishii M, Tanioka T, Nakano Y, Takeda K, Yoshimura I, Iikura Y, Tobe T.	the severity of food allergy and atopic eczema in children.				
吉村功.	医薬統計の原理原則.	医薬安全性研究会第110回定例会資料,	1-10	23-28	2007
Sozu T, Shiraishi A, Hyodo Y, Hamada C, Yoshimura I.	Interval estimation of the 50% effective time in small sample assay data.	Alternatives to Animal Testing and Experimentation			(Accepted).
荒川京子、田中憲穂、高鳥浩介、澤田拓士	飼料から分離した代謝産物の遺伝毒性	Mycotoxins,	56 ( 2 )	7-64	2006
Ayako Sakai, Chihiro Suzuki, Yasuhiko Masui, Kousuke Takatori and <u>Noriho Tanaka</u>	: The activities of Mycotoxins derived from Fusarium and related substances in a short-term transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/3T3 cells (Bhas 42 cells	Mutation Res			In press
Yoshitaka HIGA, Mayumi KAWABE, Kyoko NABAE, Yosuke TODA, Sachiko KITAMOTO, Takumi HARA, <u>Noriho TANAKA</u> , Kimio KARIYA and Michihito TAKAHASHI	Kojic acid - absence of tumor -initiating activity in rat liver, and of carcinogenic and photo-genotoxic potential in mouse skin	The Journal of Toxicological Sciences			In press
Takumi Hara, Takashi Nishikawa, Hajime Sui, Kumiko Kawakami Hiroataka Matsumoto and Noriho Tanaka	In vivo photo skin micronucleus test using a sunlight simulator: Detection of 8-methoxypsoralen and benzo[a]pyrene	Mutation Res			In press

Hayashi, K., Sasaki, K., Asada, S., Tsuchiya, T., <u>Tanaka, N.</u>	Umeda, M.: Detection of initiating and promoting activities of chemicals by two-stage model of Balb/c 3T3 cell transformation assay with optimized protocol.	ATLA			In press
Hirota, M., Kitagaki, M., <u>Itagaki, H.</u> , and Aiba, S.	Quantitative measurement of spliced XBPI mRNA as an indicator of endoplasmic reticulum stress.	J. Toxicol. Sci.		149-156	2006
Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., <u>Itagaki, H.</u> , 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,		767-773	2006
Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., <u>Itagaki, H.</u> , 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		774-784	2006
Ohtake E, Kakihara F, Matsumoto N, <u>Ozawa S</u> , Ohno Y, Hasegawa S, Suzuki H, Kubota T.	Frequency distribution of phenol sulfotransferase 1A1 activity in platelet cells from healthy Japanese subjects	<i>Eur. J. Pharm. Sci.</i> ,			In press
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

# 動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受け入れの現状

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 大野泰雄

Validation and regulatory acceptance of alternative  
methods for toxicity evaluation.

Yasuo Ohno  
Division of Pharmacology, Center for Biological Safety and Research,  
National Institute of Health Sciences

## 動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受け入れの現状

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 大野泰雄

Validation and regulatory acceptance of alternative  
methods for toxicity evaluation.

Yasuo Ohno

Division of Pharmacology, Center for Biological Safety and Research,  
National Institute of Health Sciences

For regulatory acceptance of alternative methods (AMs) to animal toxicity tests, their reproducibility and relevance should be determined by intra- and inter-laboratory validation. Appropriate procedures of the validation and regulatory acceptance of AMs were recommended by OECD in 1996. According to those principles, several *in vitro* methods like skin corrosivity tests and phototoxicity tests were evaluated and accepted by ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods), ICCVAM (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), and OECD. Because of the difficulties in conducting inter-laboratory validation and relatively short period remained until EU's ban of animal experiments for safety evaluation of cosmetics, ECVAM and ICCVAM have recently started cooperation in validation and evaluation of AMs. It is also necessary to establish JaCVAM (Japanese Center for the Validation of AM) to contribute the issue and for the evaluation of new toxicity tests originated in Japan.

## 1. 序

動物実験代替法(代替法)とは科学研究や教育、毒性試験、生産等の目的のための動物を用いる方法を動物を用いない方法に置き換えること(Replacement)であり、動物使用数の削減(Reduction)や動物使用に伴う苦痛の削減等(Refinement)を含むものである(Russel and Burch 1959)<sup>1)</sup>。代替法開発はもともと動物愛護の精神に根ざすものであるが、同時に無駄な動物実験の廃止や多数の新規化学物質の安全性の経済的な評価、毒性の極めて強い化学物質の毒性を動物実験で調べることに伴う危険の回避、また、ヒトへの外挿のために必要な毒性発現機序に関する情報の確保のためにも有効である。

代替法の研究は欧米では早くから行われており、イギリスでは医学分野における実験動物を他のものに置き換えるための基金(FRAME)が1969年に、米国では1981年にジョンズホプキンス大学に代替法センターが開設された。日本では1982年に現在の日本動物実験代替法学会の前身となる研究会が設立された。これらの研究を通じて多くの方法が開発された。一方、EU議会は動物愛護運動と動物実験に対する反対運動の高まりに対応して、代替法開発の拠点とし、代替法バリデーションの調整や代替法についてのデータベースを構築・維持するため、また、行政、産業、生物・医学分野の科学者、消費者、および動物愛護運動グループの対話を促進することを目的に1991年に代替法バリデーションセンター(European Center for the Validation of Alternative Methods: ECVAM)を設立した(1994年開所)。米国は毒性試験法の開

発、バリデーション、受入、及び国内及び国際レベルでのハーモナイゼーションに関する問題を連邦政府内で調整するためにNICEATM (NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)の下にNIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences)を含む14の行政機関及び研究機関によりICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)が1993年に設置した。現在欧米の行政機関においては、新たに開発された動物実験代替法を科学的に評価し、可能なものについては取り入れていこうという作業が行われている。また、内分泌かく乱化学物質検索のような新たな毒性評価の要請やトキシコゲノミクスのような新しい技術も導入されつつある。これらの新試験法を行政試験として、取り入れるための検討も視野に入れている。

本稿では新しい試験法を取り入れる為に必要なバリデーションと評価体制のあり方について述べるとともに、動物実験代替法を巡る国際情勢について述べる。

## 2. 動物実験代替法のバリデーションと代替法を行政的に受け入れるための基準

### 2-1) バリデーションとは

動物を用いる安全性試験の結果はヒトに外挿できるという前提の基で利用されているが、常に、薬物の体内動態や標的臓器の薬物感受性における種差を考慮しなくてはならない。一方、*in vitro* 安全性試験代替法では、ヒト由来の組織

を用いることにより、ヒト特異的な反応を観察することが可能であるが、in vivoにあった時とは細胞の特性が変化していることが多い。また、適用可能な被験物質や得られる情報の範囲に動物実験以上に多くの限界がある。例えば、培養細胞を用いる試験法の多くは揮発性物質や不溶性物質、また、毒性発現に代謝活性化を要する物質などの評価が苦手である。色素は毒性指標の測定を妨害する事がある。また、in vivo法とは異なり、吸収・分布・排泄の過程が欠如している。これらの特徴を認識せずに利用すると大きな過ちを犯す可能性がある。従って、国レベルで、或いは国際的な方法として、新たな代替試験法を取り入れるためには、適正に行われたバリデーションに基づいて、その妥当性と限界が明確に示

される必要がある。

バリデーションのあり方については、Scala (1987)<sup>2)</sup>、Frazier (1990)<sup>3)</sup>、及びBallら(1999)<sup>4)</sup>により提示されている。また、小野(1994)<sup>5)</sup>及び大野(1997)<sup>6)</sup>により要約されている。バリデーションとは「候補試験法について試験結果の信頼性(reliability)と再現性(reproducibility)とを証明し、それが特定の毒性試験の目的に使用できるだけの確実性(credibility)があることを確認する手順である」とされている。

バリデーションの過程は 1) 施設内バリデーション、2) 多施設バリデーション、3) データベース構築の三段階に分けられる(図1)。

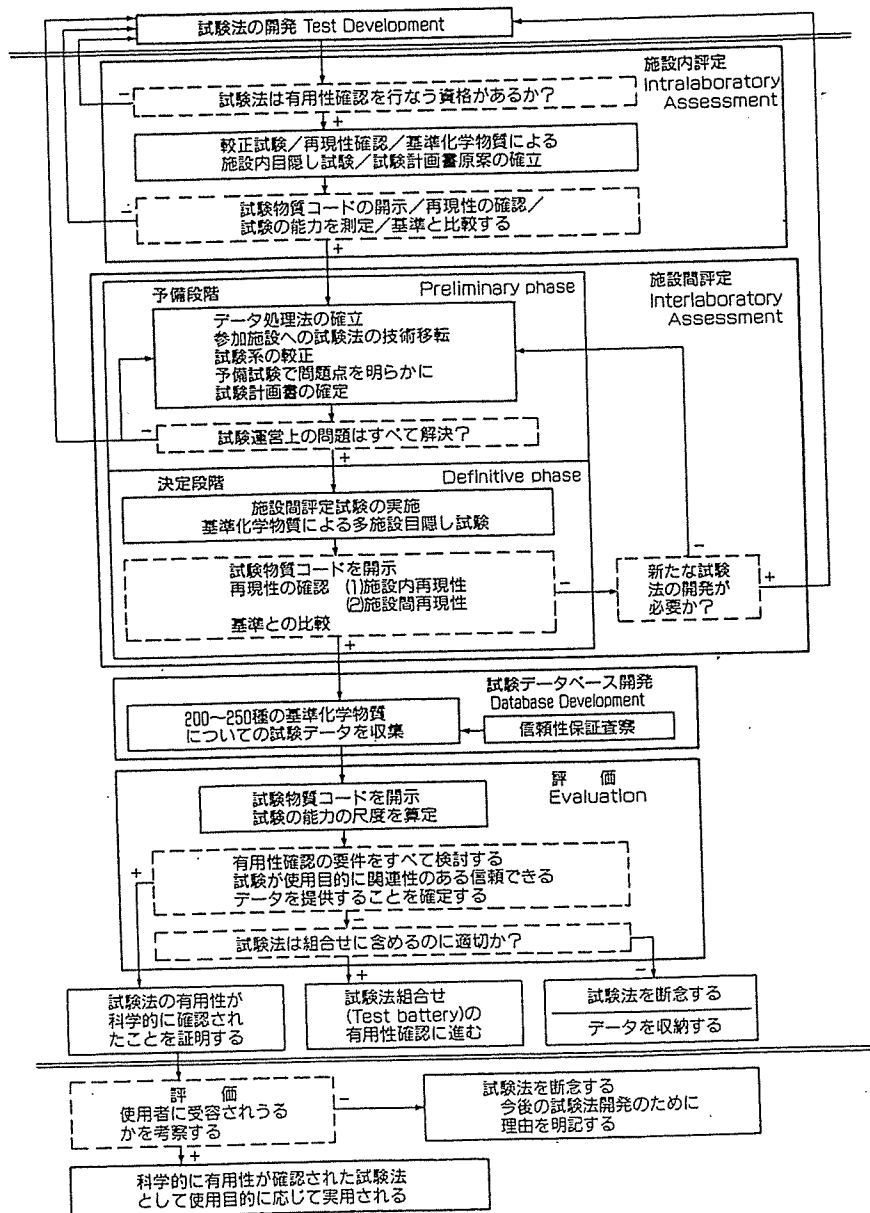


図1:試験法バリデーションの作業過程(小野1994)

施設内バリデーションは、通常、当該試験法を開発した施設で行われるものであり、試験法の特徴を明らかにし、次に行われる多施設バリデーションのためのプロトコル、標準操作法、および結果の判定基準を作成する過程である。

多施設バリデーションは同一のプロトコルと標準操作法に従って、複数の施設（3-5施設）で試験を実施した場合の試験法の特徴、つまり感度、特異性、予知能力および施設内・外の再現性を確認する過程である。バリデーションにおいては試験結果の信頼性を高めるために被験物質名とその毒性を明らかにせず、目隠し試験でおこなうとともに、GLP基準に従って実施することが望ましい。

バリデーションに際しては、1) 試験の目的、2) 試験法の選定、3) 被験物質の選定、4) 比較基準とするデータの特定、5) 結果の判定方法とその基準(Prediction Model, Data Interpretation Procedure)が明確に設定されていることが必要である。一方、施設内および多施設バリデーションは必ずしも一回のみで終了するわけではなく、それを繰り返すことにより、プロトコルやSOPの最適化や判定基準の見直しが行われることが多い。原則として、最終段階の多施設バリデーションでは判定基準の妥当性が確認されねばならない。この過程で、検討した被験物質数が増加し、広い範囲の被験物質への適用性を判断するための資料が得られる。

通常、被験物質数は施設内バリデーションにおいては10-20物質、施設間バリデーションでは20-40物質で実施されるが、行政的に利用できるか否かを判定するには不十分とされており、更に文献調査等に基づき200-250物質のデータが必要とされている(Frazier 1992)。

## 2-2) バリデーションの実行

多施設バリデーションは多くの者が参加する複雑な過程であることから、適切な組織を構築し、適正かつ効率良く運営されねばならない。また、多大な時間と経費のかかる過程であることから、施設内バリデーションの結果を詳細に検討・評価し、適切と予想された試験法についてのみ実施されるべきものである。

多施設バリデーションにおいては、参加者間のコミュニケーションを密にし、トラブルを未然に防止あるいは早期に発見し、対策を講じることが、ボランティアで参加している協力者たちの志気の維持と質の高いデータを得るために極めて重要である。

一方、バリデーションに技術的に劣る施設が参加していると、試験法のperformanceが不当に低く評価される可能性がある。そこで、参加者の技術レベル向上の為に技術移転と予備試験が欠かせない。これはプロトコルやSOPを参加者が正確に理解し、実行しているか、また、それらに不備が無いことを確認するために必須である。実際に多施設バリデーションを行っている時、同じプロトコルとSOPを用いているにも関わらず、施設により実験操作に思いがけない差が

あることに驚く事がある。この多施設バリデーションにより、試験施設を評価し、次に行われる多施設バリデーションの参加施設を選択することが適当である。

被験物質は代替しようとしている既存の試験法における作用についての信頼性の高い情報があり、かつ、試験法のperformanceを適切に示しうる物でなくてはならない。また、品質が均一で化学的に安定なものが望ましい。毒性を段階的に評価する試験においては、それぞれの段階に適切な数の被験物質が配分されなければならない。毒性の有無のみを判定する試験においては、明確に有無を判定できると予想される物質だけでなく、境界領域の物質も適切な数配分されなければならない。また、試験の使用目的に応じて適切な種類の物質群を選択されねばならない。信頼できるデータを得るためには、被験物質は試験実施施設とは別の施設によりコード化され、配布されねばならない。

多施設バリデーションの実行組織の一例を図2に示した<sup>7)</sup>。これは日本化粧品工業連合会とともに化粧品原料の眼刺激性を評価するための9種のドレイズ眼刺激性試験代替法(16プロトコル)を検討した時の組織であり、バリデーション全体を運営する運営委員会とバリデーションの実行組織である実行委員会、被験物質を選択・管理し、コード化して配布する被験物質管理委員会、及び得られた結果と比較するためのin vivo試験を計画・実施するin vivo試験委託担当委員会が組織された。個々の代替法に経験の深い者が試験責任者となり、当該代替法のプロトコルとSOP案を作成するとともに、参加機関に技術指導を行った。また、試験責任者と参加機関の代表はバリデーション実行委員会の一員となって連絡・調整を密にした。

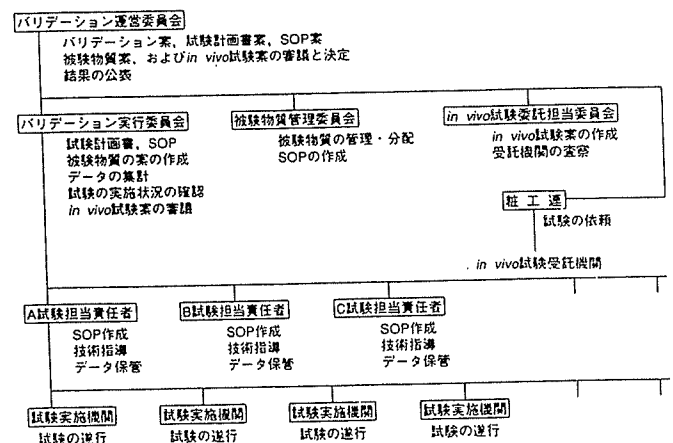


図2：バリデーション組織

## 2-3) 簡便なバリデーション法

新しい試験法が既に承認された代替法と同一の原理に基づくものであり、変更内容がminorな場合においては、少数の被験物質によるバリデーション(catch up validation)により評価することが可能である。



従来のバリデーションデザイン											不適切なバリデーションデザイン											無駄の無いバリデーションデザイン										
被験物質	試験施設										被験物質	試験施設										被験物質	試験施設									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	■	■	■								1	■	■	■							1	■	■	■								
2	■	■	■								2	■	■	■							2	■	■	■								
3	■	■	■								3	■	■	■							3	■	■	■								
4	■	■	■								4	■	■	■							4	■	■	■								
5	■	■	■								5	■	■	■							5	■	■	■								
6	■	■	■								6	■	■	■							6	■	■	■								
7	■	■	■								7	■	■	■							7	■	■	■								
8	■	■	■								8	■	■	■							8	■	■	■								
9	■	■	■								9	■	■	■							9	■	■	■								
10	■	■	■								10	■	■	■							10	■	■	■								
11	■	■	■								11	■	■	■							11	■	■	■								
12	■	■	■								12	■	■	■							12	■	■	■								
13	■	■	■								13	■	■	■							13	■	■	■								
14	■	■	■								14	■	■	■							14	■	■	■								
15	■	■	■								15	■	■	■							15	■	■	■								
16	■	■	■								16	■	■	■							16	■	■	■								
17	■	■	■								17	■	■	■							17	■	■	■								
18	■	■	■								18	■	■	■							18	■	■	■								
19	■	■	■								19	■	■	■							19	■	■	■								
20	■	■	■								20	■	■	■							20	■	■	■								

施設毎の担当物質を灰色に塗った。  
被験物質を毒性強度に応じて適切に分類し、それを適切な数と割合で配分することが試験法の妥当性を示すのに必要。

図 3 : ECVAM のバリデーションデザイン (Hartung 2004)

また、2004年のOECD会議ではECVAMのDr Hartung所長により、図3のような簡易バリデーション法が提案された<sup>9)</sup>。これはそれまでのバリデーションの経験に基づいて考えられたものであり、技術力が高く信頼性の高いデータを作成できる少数の施設で実行することが前提とされている。少数の物質と少数の施設により当該試験法の施設間の再現性が検討される。また、適用できる被験物質の範囲を調べるために、数多くの物質を1施設ずつで検討する方法である。即ち、再現性を見るためのバリデーションと予知能力を見るバリデーションを分離したものである。なお、施設間再現性を見るための被験物質としては当該試験法での判定が容易な物のみを選ばないようにする必要がある。

#### 2-4) バリデーション結果の判定

代替法の予知能力(または的中率 predictive value)を判定する基準としては感度(sensitivity)と特異性(specificity)が重要である。表1に示したように、感度とは毒性物質(刺激性試験であれば刺激性物質)を陽性とする比率であり、特異性とは毒性の無い物質を陰性とする比率である。陽性予知能力とは陽性結果が得られたものが真に毒性物質である比率であり、陰性予知能力とは陰性結果が得られたものが真に無毒性物質である比率である。

試験法の有用性はその感度、特異性、予知能力、再現性を総合して評価される。一方、この結果はバリデーションに使用された毒性物質の比率(混合率)により影響される。また、被験物質の選択によっても強く影響される。即ち、当該試験法の得意な範疇の被験物質のみ選べば成績は良くなる。プロトコルやSOPが適切に作成されていなかったり、適切な技術を持たない者が参加すれば、試験結果の再現性は低くなる。

表 1 : 試験法の感度と特異性

試験結果	試験物質		計
	陽性	陰性	
陽性	A	B	A+C
陰性	C	D	C+D
計	A+C	B+D	N

A: 代替法で陽性を示した陽性物質数, B: 代替法で偽陽性を示した陰性物質数, C: 代替法で偽陰性を示した陽性物質数, D: 代替法で陰性を示した陰性物質数. A+C: 試験に供した陽性物質数, B+D: 試験に供した陰性物質数, N=A+B+C+D: 全試験物質数. (A+C)/N: 混合率(prevalence). 感度(sensitivity)=A/(A+C), 特異性(specificity)=D/(B+D), 予知能力(positive predictive value)=A/(A+B), 陰性予知能力(negative predictive value)=D/(C+D).

#### 2-5) 代替法を行政的に受け入れるための基準

現在の毒性試験法を新たな方法に置き換えるためには、新しい方法が現在の方法と比べ少なくとも同等あるいはそれ以上の有用性を持つものであることが、適切なバリデーションで示されなくてはならない。1995年に開催されたICCVAM会議の結果<sup>9)</sup>を受け、1996年に開催されたOECDの会議では行政目的のための動物実験代替法が適切と判定されるための基準及びそれを行政的に受け入れるための基準を作成した(表2および表3)<sup>10)</sup>。個々の企業で代替法の受け入れを検討する場合においてもこれらの基準が参考になる。また、2002年3月においてそのfollow up会議がストックホルムで開催された。現在、そのup to dateの作業が進行

している。

表 2：安全性評価のための動物実験代替法の最低基準の要約 (OECD 1996)<sup>10)</sup>

- 1) 試験法の適切性に関する情報がある (科学的な必要性, 行政的目的を含む)
- 2) 測定される指標と in vivo での作用との関係や毒性との関係について記述されている。代謝能のような試験法の限界について記述されている。
- 3) 正式かつ詳細なプロトコルがあり, 一般のものが入手可能である。プロトコルは試験が正確に実施できるように詳細に記述されている。また, データの分析法や意志決定基準が示されている。
- 4) 試験法とその結果は独立した査読された出版物として得られることが望ましい。結果は独立した科学者により査読されることが望ましい。
- 5) 試験施設内外における反復性や再現性が示されている。
- 6) コード化された被験物質を用いて試験法の performance が示されている。
- 7) 既存の毒性試験結果と対応する標的動物種からの情報との関係において試験法の performance が示されている。
- 8) 試験法の妥当性を評価するため全データが査読可能である。
- 9) 理想的にはデータは GLP principle に則って得られたものである。

表 3：安全性評価のための動物実験代替法の行政的受け入れ基準の要約 (OECD 1996)<sup>10)</sup>

- 1) 関心のある毒性指標を十分に predict できるデータが提示されている。また, 新しい方法と既存の方法との間の関係や, 新しい方法と標的動物種との関係について示されている。
- 2) リスクアセスメントの目的のために, 既存の方法と比較し同等以上, 望むらくはそれ以上の価値を有するデータが得られる。
- 3) 行政的に取り扱われる化学物質や製品の代表例についての十分なデータがある。
- 4) 試験法は堅牢なものであり, 移転可能である。高度に特異化された機器や物質, 専門的知識が必要な場合は, 移転性を高める努力がなされている。
- 5) 経済的であり, 使用される可能性が高い。
- 6) 既存の方法と比較し, 科学的, 倫理的, 経済的である。

### 3. 動物実験代替法を巡る国際状況

#### 3-1) EUにおける代替法の検討と受け入れ状況

ECVAMの諮問委員会であるESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)は1997年には3T3 NRU 光毒性試験,1998年には皮膚腐食性試験としてEPISKIN™とラット Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER 法),2000年には皮膚感作性のためのLocal Lymph Node Assay (LLNA), EpiDerm™皮膚腐食性試験, CORROSITEX™皮膚腐食性試験,2002年には胎児毒性のための胚性幹細胞試験,胎児毒性のための全胚培養試験,胎児毒性のためのマイクロマス試験を確立された代替試験法として承認した。このESACの結論を受けてEUはこれらの代替試験から得られたデータを化粧品安全性評価に用いることに合意した。EUの化粧品および非食品に関する健康および消費者保護担当機関であるSCCNFP (Scientific Committee for Cosmetic Products, and Non-food Products intended for Consumers)は光毒性試験試験(3T3 NRU PT法)および皮膚腐食性試験(TER, EPISKIN™, EpiDerm™法)を公的に validation された試験法として認めた。また, 経皮吸収試験(ヒトあるいはブタ皮膚を用いる in vitro Skin Absorption 法)および皮膚感作性試験(LLNA 法)を認めた<sup>11)</sup> (2002.6.4)。なお, LLNA法はモルモットのMaximization法を完全に代替するものではない。一方, フランスは眼刺激試験法としてアガロースゲル拡散細胞毒性試験法とウサギ角膜繊維芽細胞法(NR)を公示した(1999.12.30)。

一方, EUでは1993年の時点で化粧品の安全性評価に関する指令<sup>12)</sup>において, 適切な代替法があればとの前提つきではあるが,1998年までには実験動物を用いて安全性を評価した化粧品原料および最終製品の販売を禁止することを決めた。しかし, 代替法の開発・バリデーションが充分でなかったことから, その施行を2000年6月30日まで延期した。その後,2002年6月末まで再度延期された。その再延長に関する調停会議での合意結果を踏まえ,化粧品およびその原料の安全性評価に関する化粧品指令第7次改正がEU政府及び議会で認められ,2003年3月11日付けで公布された<sup>13)</sup>。その内容は①ECVAMやOECDで承認された代替法があるものはすべて即時禁止,②2009年までに動物を用いる全ての安全性試験を全面的に禁止,及び動物実験を行った化粧品の販売禁止,但し,③薬物動態試験や生殖発生毒性,反復投与毒性試験などの全身的な作用を検討する試験については2013年まで猶予する,というものである。

この後の動きとして,フランス政府および欧州化粧品原料連合会(European Federation for Cosmetic Ingredients)は,第7次改正の該当規制が不明瞭で,加盟国批准の際に実施される自国法規制への取り込みは解釈の異なったものとなり,通商上の混乱を引き起こすとして,EU議会およびEU理事会を提訴した<sup>14)</sup>。現在,この提訴に対する判決はまだなされていない。また,EU委員会は2004年9月11日までに具体的な試験禁止に向けた活動計画を策定するため,行政,学

識経験者、産業界代表、動物愛護団体代表による Stakeholder Meeting を開催している。

また、上記第七改正が成立したことを受け、ECVAMは、今後の重点課題を以下の11項目に整理した<sup>15)</sup>。1) 全身毒性(単回投与毒性、反復投与毒性、神経毒性、肺毒性、腎毒性、肝毒性、免疫毒性、血液毒性)、2) 局所毒性(光毒性、皮膚腐食性、皮膚刺激性、眼刺激性)、3) 感作性(皮膚感作性、吸入感作性)、4) 発ガン性、5) 生殖毒性、6) トキシコキネティクス、7) 環境毒性、8) 科学的な情報サービス、9) 定量的構造活性相関、10) 生物学材料(発熱性物質試験)、11) 戦略開発(in vitro 毒性試験やバリデーションにおけるGLP, Good Cell Culture Practice (GCCP)のガイドライン、トキシコゲノミクス)。これらの内、光毒性試験、皮膚腐食性試験、及び経皮吸収試験についてはOECDレベルでのガイドライン或いはその案が存在する。また、生殖毒性試験としては、胚性幹細胞試験、全胚培養試験、及びマイクロマス試験などを胎児毒性試験代替法として合意している。一方、単回投与毒性試験と皮膚刺激性試験、及び眼刺激性試験についてはバリデーション中、或いはその準備中である。また、in vitro 胎児毒性試験、皮膚刺激性試験、急性毒性試験、免疫毒性試験、トキシコゲノミクスについてECVAM主催のWorkshopを開催し、検討を進めている。

### 3-2) 米国の状況

ICCVAMは代替法を受け入れるための基準に基づいて、米国内外から提供されたバリデーションデータのPeer Reviewによる代替法評価を行っている。まず、1998年に皮膚腐食性試験法としてのCorrositex<sup>®</sup>について資料のPeer Reviewを行い、本方法が動物愛護の点で問題無いこと、また、全ての化学物質に有用とは言えないが、Department of Transport (DOT)で必要とされる状況においては有用であると評価した<sup>16)</sup>。なお、DOTが適当とする被験物質の範囲とICCVAMの専門家が適当と評価した物質の範囲との間で若干食い違いがある。本試験で陰性の場合には皮膚刺激性試験により確認の必要があるが、false positiveを許容するならば陽性の場合の動物試験は不要とした。同様のpeer reviewにより、感作性試験法としてのLLNA法を完全な代替法ではないが、妥当な方法であるとして認知した<sup>17)</sup>。また、皮膚腐食性試験としてEpiDerm<sup>™</sup>、およびEPISKIN<sup>™</sup>法の評価が終了している。このように米国ではICCVAMの設立以来、着々と代替法の評価と行政への取り入れを進めている。

一方、ICCVAMはECVAMと密接な協力関係を結び、お互いが承認した試験法については、簡易の評価促進プロセスを採用している<sup>18)</sup>。また、急性全身毒性を評価するための細胞毒性試験についての共同バリデーションを実施中であり、Phase Ia試験およびPhase Ib試験結果を踏まえて再現性向上の観点からプロトコルを修正したPhase II試験が2003年11月に完了した。現在、最適化されたプロトコルを使用

した試験Phase IIIの段階にある。更に、4種の眼刺激性試験代替法(BCOP法、HET-CAM法、ICE (Isolated Chicken Eye Test)法及びIRE (Isolated Rabbit Eye Test)法)のプレバリデーションを計画しており<sup>19)</sup>、各国に情報提供を求めている。特に良質なin vivo試験結果を求めており、我々の行ったin vivo眼刺激性試験結果を提供した。なお、ICCVAMでの評価には日本の専門家も協力している。

### 3-3) 最近のOECDの状況

OECDでは安全性試験法ガイドラインの策定にあたって、動物福祉の問題を重視しており、安全性試験法専門家会議にInternational Council on Animal Protection in OECD Programmes (ICAPO)のような動物福祉団体代表の参加を許容している。

動物実験代替法関連のガイドラインとしては、これまでに急性経口投与毒性試験法として、動物使用数の少ない固定用量法(420: Fixed Dose Method, Updated 2001.12.20)、毒性クラス分け法(423: Acute Toxic Class Method, 2001.12.20)及びUp-and-Down法(425: Up-and-Down Procedure, 2001.12.20)を受け入れるとともに、多数の動物を用いる従来のガイドライン(401)を廃止した(2002.12.20)。また、旧ガイドラインに基づくデータの受け入れ拒否を求めた。また、安全性試験における倫理的な実験法についてのガイドライン案(1998)を作成した。皮膚感作性試験ガイドライン429 (LLNA法)が正式にガイドライン化した(2003)。また、光毒性試験ガイドライン432 (In Vitro 3T3 NRU phototoxicity test)、皮膚腐食性試験ガイドライン430 (In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER))、皮膚腐食性試験ガイドライン431 (In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test, EPISKIN<sup>™</sup>, EpiDerm<sup>™</sup>法)、経皮吸収試験ガイドライン428 (Skin Absorption: in vitro Method)が2002年5月のNational Coordinator会議で合意された。しかし、ガイドラインとしての正式な通知はまだなされていない。

### 2-4) 日本における代替法の受入状況

日本にはECVAMやICCVAMのような安全性試験評価のための常設組織は存在せず、事例ごとに研究班が組織され、検討されてきた。in vitroの安全性試験法としては、従来より実施されている遺伝毒性試験以外のin vitro試験法として医療用プラスチック容器抽出物の安全性評価のための細胞毒性試験法や注射用水の微生物性発熱物質評価のためのin vitroエンドトキシン試験法(リムラステスト)が承認され、日本薬局方に組み入れられている。また、OECD加盟国としてOECD承認試験法で得られた結果の受け入れ義務がある。一方、ICHでは表4に示したような安全性試験法ガイドラインの変更がなされ、我が国のガイドラインにも導入されたが、それらも前記の3Rの原則に合致するものである。

表4：代替法に関連したICH（医薬品の承認申請に必要な試験についての国際的なハーモナイゼーションのための会議）での検討

- 1) 単回投与毒性試験において統計学的に厳密なLD50値を要求しない。非齧歯類では必ずしも死亡するまで用量を上げなくとも良い。  
⇒使用動物数の削減，動物の苦痛の削減
- 2) 反復投与毒性試験において12ヶ月試験を要求しない。  
⇒毒性試験期間の短縮，動物使用数の削減
- 3) 雄性生殖臓器毒性検出系としての詳細な病理観察を供う2週間反復投与毒性試験結果を受け入れる。  
⇒早期の臨床試験 無駄な動物実験の削減
- 4) 発癌性試験における動物種数を1種に削減し，代替法で補足する。  
⇒使用動物数の削減
- 5) 臨床試験との関係における非臨床試験実施タイミングについて合意  
⇒科学的・倫理的に妥当な医薬品開発の促進  
⇒無駄に終わる動物試験実施の減少

ウサギの眼を用いる化粧品眼刺激性試験については、適切な方法があればとの留保つきではあるが、代替法を受入れることが厚生省により表明されている<sup>20)</sup>。しかし、どの試験法が適切な方法であるのか不明であった。そこで、我々は日本化粧品工業連合会と協力し、眼刺激性試験代替法のバリデーションを実行し、血清を添加した培養液を用いる細胞毒性試験法など、いくつかの方法が従来のウサギを用いるドレイズ試験結果との対応が良いことを示した<sup>21)</sup>。

また、代替法を用いて化粧品原料の眼刺激性を評価するためのガイドライン案を作成した。<sup>22)</sup>

一方、代替法を国際的な基準に基づいたバリデーションによって評価するには、準備と実施および結果の解析、さらにはガイドラインの作成等に多額の費用と時間、及び労力を要する。そこで我々は「動物実験代替法の使用を促進するための研究」のもとで、日本動物実験代替法学会と協力し、文献やバリデーション結果を客観的・科学的に評価し、試験法の長所や短所、限界などを明らかにし、その妥当性検討プロジェクトを平成13年度より開始した。本研究班は、代替法やバリデーションの専門家から構成され、①代替法に関する情報を収集して一次的な解析・評価を行う評価委員会、②その報告をもとに、より広い視野で評価するための（臨床医師、毒性学者、行政担当者等からなる）評価会議、の二段階で評価するスキームを構築した。今までに、光毒性試験代替法について広く調査し、施設間比較の出来るバリデーション結果の存在する3T3細胞を用いてneutral red (NU)取り込みを指標とする方法(3T3-NRU光毒性試験法)を評価した<sup>23)</sup>。また、難水溶性物質に使用できる可能性の高い光毒性試験法と

して、酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験法を組み合わせた試験法バッテリーについて文献的評価を基に多施設バリデーションを実施している。また、放射性同位元素を用いない皮膚感作性試験(LLNA試験法の改良法)の評価を計画している。

### 3-5) その他の国際的状況

第3回国際動物実験代替法会議（イタリア、ボローニア）において、動物実験と代替法についての「ボローニア宣言」が採択された。これはRusselとBurch（1959）が1954年に提案した3Rを再確認するとともに、それを更に促進するためのものである。それを以下に要約した。

- ① 全ての国が全ての研究・試験・教育に3Rの原則を積極的に組み入れるための法的な枠組みを作るべきである。
- ② いずれの動物実験においても、関係する科学者や行政官の全てに教育や訓練を行う公式あるいは非公式の機構が無くてはならない。
- ③ 全ての動物実験は事前に専門家により科学および倫理の両面について、独立した審査を受けなくてはならない。
- ④ 動物実験の結果得られる利益と想定される動物の苦痛の両方を評価し、計ることが審査委員会の重要な機能の一部である。
- ⑤ どのような状況においても許されるべきでない動物の苦痛のレベルについての国際的な合意があるべきである。
- ⑥ より厳しい実験動物に対する規制を避けるために動物実験を他の国に依頼することを受け入れるべきではない。

### 4. 我が国における代替法研究・評価センターの必要性

今まで述べたように、欧米では1990年代の半ばよりEUはECVAM、米国はICCVAMという新規安全性試験法の開発とバリデーション、或いは評価のための専門機関を設置し、検討を進めてきた。しかし、日本においてはECVAMやICCVAMに相当する組織はなく、試験法毎に当該専門家が対応しているのが現状である。また、我が国独自の試験法のバリデーションや評価が遅れている。そこで、in vitro新試験法の開発研究と、それによって得た専門的知見を基礎に新規代替法のバリデーションと評価、及び国際対応を行う日本における代替法研究の中心、JaCVAM (Japanese Center for Validation of Alternative Methods)を設立する必要がある。しかし、欧米並の予算と人員の確保は不可能であり、関連学会や業界との協力体制が望ましい（図4）。これにより、1) JaCVAM主催による国際レベルのバリデーションにより新しい試験法の利点と限界が明確化されることにより、医薬品や化粧品、農薬、その他の化学物質の安全性評価のレベルが向上する、2) 適切に評価された、経済的に有利な方法が利用できることにより、安全性評価がスピードアップされる、3) トキシコゲノミクスやプロテオミクスなどの新しい手法や考えを利用した安全性評価手法を適切に評価するこ