

Evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells.

Toxicology in Vitro, 13, 175-187.

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

「動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究」

「感作性試験代替法の開発」

分担研究者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者 足利太可雄、坂口斉、岡本賢二、水野誠、山田貴亮、稲葉宏幸、中村恒彰、

岸 正孝、岡本裕子、桑原裕史、小坂七重、藺さき子

研究要旨

ヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞の CD86 及び 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) が日本において開発され、試験法確立に向けた有用性の検証が行われている。

施設間再現性の検討結果や既知化合物の評価結果より、いくつか改良すべきと考えられる点が見出され、検討を行った。具体的には、予測モデル、陽性対照物質の適用濃度、及び CD86/CD54 発現亢進最小濃度 (EC150, 200) の算出方法の改良を行い、試験法の信頼性が向上した。本試験法を日本発の国際的な試験法として提案することを目標に、今後は化粧品原料の評価など、より実用化を見据えた研究を行っていきたい。

A. 研究目的

感作反応は免疫応答に基づく全身系の反応であり、複雑な発現機序に基づくこうした反応を *in vitro* 試験法で置き換えることは非常に困難と考えられてきた。しかし近年 Replacement を目的とした *in vitro* 試験法として、感作性物質が皮膚に暴露された際に生じるランゲルハンス細胞の変化に着目した試験法がいくつか提案されている。我々は、ランゲルハンス細胞の代わりに、ヒト単球細胞株である THP-1 細胞を用いた、表面抗原である CD86 や CD54 の発現亢進を指標とした試験法 (h-CLAT) の有用性を明らかにしてきた^{1, 2, 3)}。

さらに前年度までの厚生労働科学研究において、国内 7 施設による共同研究を実施した結果、本試験法は技術移転が容易であり、基本的に施設間再現性が良好であると考えられた⁴⁾。また本試験法の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及び前培養条件に関する検討を行った^{5, 6, 7)}。その結果、試験に供する細胞及び血清の選択基準と前培養時の注意事項を定めた。

本年度はこれまでの研究により明らかになった問題点を解決するために、試験法の改良を行った。具体的には、予測モデル、陽性

対照物質 (DNCB) の適用濃度、及び CD86/CD54 発現亢進最小濃度 (EC150, 200) の算出方法の見直しを行った。こうした研究により本試験法の頑強性、信頼性が向上し、将来の目標である公的バリデーションに向けた有用なデータが得られるものと期待できる。なお、本研究において東京理科大学名誉教授吉村功先生の多大なるご指導をいただいた。

B. 研究方法

試験方法: 細胞は、ヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞を ATCC より購入して使用した。CD86 及び CD54 の発現は、上記の細胞に被験物質を 24 時間処理し、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。細胞株、血清、抗体については各施設同一のロットを使用した。適用濃度は、予め予備試験として細胞毒性試験を行い、生存率が 75% に相当する濃度 (CV75 (=IC25) と定義) を基準に、公比 1.2 で 8 濃度 (1.2x, 1x, 1/1.2x, 1/1.2²x, 1/1.2³x, 1/1.2⁴x, 1/1.2⁵x 及び 1/1.2⁶ x CV75) 設定した。コントロールと比較して CD86/CD54 の発現量がそれぞれ 1 濃度でも 150, 200% を超えた場合を陽性とした。

解析に用いた試験データ: 過去に学会等で

発表したものから、同一プロトコルにより評価したものを選択して解析に用いた。予測モデルの見直しについては、10施設における施設間再現性の検討結果と、2施設で取得した既知化合物の評価結果を合わせた144試験のデータを用い解析した。陽性対照物質(DNCB)の適用濃度の検討には10施設における施設間再現性の検討結果のデータを用いた。さらにCD86/CD54発現亢進最小濃度(EC150, 200)算出法の検討には、2施設で取得した既知陽性化合物41品の結果を用いた。(倫理面への配慮)

本研究は感作性試験代替法を開発することにより、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 予測モデルの改良

C-1-1 イントロダクション

これまでCD86あるいはCD54の発現量は、独立した3回の試験データの平均値を適用濃度ごとに算出し、いずれかの平均値がカットオフ値(CD86は150%、CD54は200%)を超えれば陽性と判断していた。しかし、本予測モデルでは、たとえ3回の試験でカットオフ値を超えても、超えた時の濃度が試験ごとに異なれば、平均値としては全ての濃度でカットオフ値を超えない場合もあり得る。また、用量-反応性が試験ごとに異なる可能性のある生物反応を指標とするアッセイ系において、同一濃度で平均値を求めることが果たして適切かどうかという問題点も指摘されていた。こうしたことから、予測モデルを改良するため、これまでに同一プロトコルで評価された144試験のデータを解析した。

C-1-2 結果及び考察

今回は4つのポイント(①平均値か個別値か、②偽陰性を可能な限り減少させる、③用量依存性考慮の必要性、④グレーゾーン設定の必要性)について検討を行った。

その結果、本試験系のような生物反応では、試験ごとに陽性となる濃度が異なることは十分に考えられるため、試験ごとに1濃度でもカットオフ値を超えるかどうかを判定し、3回の試験のうち2回以上カットオフ値を超えた場合を陽性とする、「個別値評価の多数決」で判定することとした。また用量依存性の考慮は、定義が困難で統計的手法を用いる必要があるなど実用性の観点から採用しな

いこととした。さらに、stand aloneの試験法として、グレーゾーンの設定はせず、陽性か陰性のどちらかに判定すべきと考えた。

以上のポイントから、144試験について従来の平均値による評価(平均データ解析)と個別値評価の多数決(個別データ解析)との比較を行った。表1に示すように、in vivoとの一致率は、平均データ解析の87.5%と比べて個別データ解析の88.2%のほうがわずかに高かった。しかし最も注目すべき点は、個別データ解析により偽陰性の数が16から12と大きく減少したことである。本結果より、従来の平均データ解析では誤って陰性と判断される試験を個別データ解析により正しく評価できる可能性が高まると考えられた。一方、表2に示すように、特異性(specificity)の値は個別データ解析に変更することで若干減少した。以上より、本改良により偽陰性が減少し、偽陽性が増加する可能性が考えられたが、本試験系の安全性試験としての目的を考えると、偽陽性は増えても偽陰性を減少させる改良は適当と考えられた。

以上の解析により、予測モデルを個別データ解析に変更することとした。

C-2 陽性対照物質(DNCB)の適用濃度

C-2-1 イントロダクション

本試験法では、試験ごとに代表的感作物質であるDNCB(Dinitrochlorobenzene)を陽性対照として設定し、陽性対照のCD86/54のいずれもがカットオフ値を超えず、しかも生存率が50-90%の間に入らなかった試験は、正しく実施できなかったと判断し、その結果を採用しないこととしている。DNCBはTHP-1細胞のCD86/CD54の発現を共に強く亢進させるが、その濃度の範囲は約2-6 μ g/mLの間と比較的狭いことがわかっている。従来の試験法では、DNCBの濃度をやや細胞生存率の低下が認められる5 μ g/mLと設定してきたが、試験条件(細胞の調子やロットなど)のわずかな違いにより細胞生存率が50%を下回り、結果的に試験が不成立になる事例が散見された。そこで、過去の多施設間共同研究の結果より、DNCBが安定して陽性となる濃度を見直すこととした。さらに1施設において、新たに見出した適用濃度の有用性を確認することとした。

C-2-2 結果及び考察

まず、これまでのべ12施設で行ったDNCB

の評価結果を表3にまとめた。1施設あたり3回の試験を実施しているため、試験の合計回数は36回となる。CD86/CD54がどちらも陽性と評価された試験をグレーで示す。低濃度側の2 μ g/mLでは多くの施設で陰性と評価されたが、この時の細胞生存率はほぼ90%以上であり、DNCBの適用濃度としては低すぎると考えられた。一方、高濃度側の6 μ g/mLでも同様に陰性と評価された場合が多かったが、こちらの場合細胞生存率は50-60%と低く、細胞毒性によりタンパクの発現が抑制された可能性が考えられたため、6 μ g/mLはDNCBの適用濃度として高すぎると考えられた。さらに従来の設定濃度である5 μ g/mLでも陰性となる例が散見され、必ずしも適用濃度としては適切でない可能性が示された。施設間の評価結果をまとめると、4.2 μ g/mLにおいて陽性となる確率が最も高く(35/36)、その次が3.5 μ g/mLであった(34/36)。以上の解析より、陽性対照であるDNCBの適用濃度として、4.0 μ g/mLが最適であると判断した。

次に、設定濃度としての4.0 μ g/mLの試験結果の安定性を検証するために、1施設においてDNCBを4.0 μ g/mLと5.0 μ g/mLの2濃度設定し、17回試験を実施した。表4に示すように、4.0 μ g/mLでは実施した全ての試験でDNCBのCD86とCD54の値がカットオフ値を超え、陽性と判断された。一方、5.0 μ g/mLでは17回の試験のうち1回が陰性となった。さらにばらつきを示すCV値も、4.0 μ g/mLは5.0 μ g/mLの場合と比較して小さく、安定性は良好と判断された。

以上の検討より、今後陽性対照であるDNCBの適用濃度を4.0 μ g/mLと変更することとした。ただし、試験条件によっては4.0 μ g/mLでは不適當の場合も考えられるため、そうした場合には各施設でCV75を決定し、陽性対照の適用濃度としてその濃度を用いることも可能とした。なお現在のプロトコールでは、細胞や血清の新しいロットを選択する際、DNCBだけでなくNi (Nickel sulfate hexahydrate) 及び陰性対照としてSLS (Sodium lauryl sulfate)を用いて反応性を確認することにしており、今後Ni及びSLSの推奨適用濃度も決定する予定である。

C-3 CD86/CD54 発現亢進最小濃度 (EC150, 200)

C-3-1 イントロダクション

これまで我々はCD86/CD54の発現がそれぞれのカットオフ値 (CD86は150%、CD54は200%)を超えるのに必要な最小濃度をそれぞれEC150, EC200と定義し、LLNAにおける感作性強度の指標であるEC3との対応性を検討してきた。従来は各濃度におけるCD86/CD54発現量の平均値を基にEC150/200を計算してきたが、予測モデルを個別データ解析に変更することに伴い、EC150/200の値の算出方法も見直すこととした。

C-3-2 結果及び考察

算出値の候補としては、試験ごとに算出したEC150/200の平均値、最高値、中央値、最低値が考えられ、それぞれについて算出可能な化合物数及び値の妥当性を検証することとした。まず既知感作性物質41品の結果について、個別に評価した場合どの程度EC150/200が算出可能かを検討した。CD86が陽性であった化合物は31品あり、そのうち23品が3回の試験ともいずれかの濃度において150%のカットオフ値を超えていたが、この23品のうち3回ともEC150を算出できたのはわずかに8品のみであった。その8品以外の15品については、最低濃度でもカットオフ値を超えているなどの理由で、EC150を算出できない試験があった。CD54についても、陽性は29品あったが、そのうち3回ともEC150を算出できたのは17品のみであった。したがって個別にEC150/200を算出しても、EC150/200の3回の個別値が揃わず、平均値を算出できないケースが多々あることが明らかとなった。予測モデルを個別データ解析にした理由の1つは、ばらつきのある生物反応は平均値よりも個別に評価すべきとの考え方であった。そこでばらつきへの配慮から、3回の値の中央値がより適当と考え、平均値の代わりに中央値によりEC150/200を求めたところ、算出可能な化合物の数は増加した。これは3回の試験のうち1回が陰性となった場合は、その試験は設定した8濃度より高い濃度で陽性になると考え、陽性となった2回のうち高い方を中央値と定義することで、算出可能な化合物の数を増やすことができたためである。さらに、中央値により算出したEC150/200とLLNAのEC3との対応性は、従来の平均値により算出したEC150/200とEC3の対応性と大きな違いは認められなかった(表5)。以上の結果より、算出方法の変更によるin vivoとの対応性に変化がなく、より多くの化合物の

EC150/200 を算出できる中央値を EC150/200 算出に用いることとした。なお、表中では 3 回の試験の最高値及び最低値を EC150/200 とした場合の結果も記載しているが、生物反応のばらつきを考慮できるという観点から、今回は中央値を選択すべきと考えた。

また、中央値を用いる場合にしても、3 回の試験結果だけでは EC150/200 が算出できない場合がある。例えば 3 回の試験のうち最低濃度においてもカットオフ値を下回らない場合が 2 回以上の場合である。こうした場合、従来はより低濃度で追加試験を行い、EC150/200 を算出することとしていた。しかし LLNA の場合では、用量-反応性から外挿法により追加試験を行わずに EC3 を算出しており、h-CLAT においても同様の手法を用いることが可能と考えられた。そこで中央値としての EC150/200 が算出できない場合、まず外挿法により EC150/200 を算出することとし、濃度依存性がないなど外挿法による算出が不可能な場合のみ追加濃度による再試験を実施することとした。以上の算出フローにより算出した EC150/200 それぞれの EC3 との相関係数は、0.800/0.531 と従来の平均値による算出の相関係数である 0.785/0.428 とほぼ同程度であり、予測モデルの変更にとまなう算出方法のこのような変更は妥当と考えられた。

D. 結論

ヒト細胞株 THP-1 細胞の CD86 及び CD54 の発現亢進を指標にした感作性試験代替法である h-CLAT の改良を行った。まず従来の平均値による予測モデルを、生物反応をより適切に捉えられると考えられる個別評価に改良し、偽陰性が減少することを見出した。次に陽性対照物質である DNCB の適用推奨濃度を、過去の試験結果に基づき 5.0 µg/mL から 4.0 µg/mL に変更し、高い安定性を確認した。さらに、予測モデルの変更に伴い、CD86/CD54 発現亢進最小濃度 (EC150, 200) の算出方法も、平均値から中央値へ変更し、同時に外挿法も加えることで効率と精度の両立を可能とする算出スキームを作成した。以上の改良により、h-CLAT 法の有用性が向上した。

E. 謝辞

本研究において東京理科大学名誉教授吉村功先生の多大なるご指導をいただきました。

た。ここに感謝の意を表します。

F. 参考文献

- 1) Ashikaga T., Yoshida Y., Hirota M., Yoneyama K., Itagaki H., Sakaguchi H., Miyazawa Y., Ito Y., Suzuki H., Toyoda H., "Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol", *Toxicology in Vitro*, 20, 767-773, 2006.
- 2) Sakaguchi H., Ashikaga T., Miyazawa Y., Yoshida Y., Ito Y., Yoneyama K., Hirota M., Itagaki H., Toyoda H., 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", *Toxicology in Vitro*, 20, 774-784, 2006.
- 3) 足利太可雄, 坂口齊, "ヒト細胞株 (THP-1) を用いた皮膚感作性試験代替法の開発と 2 施設間バリデーション", フレグランスジャーナル, 8, 108-111, 2004.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 4) Ashikaga T., Sakaguchi H., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yamada T., Yoshida M., Ota N., Hasegawa S., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Kosaka N., Sono S and Ohno Y., "Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study", *AATEX*, 13 (1), 27-35, 2008.
- 5) Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Yamada T., Yoshida M., Kodama T., Sono S., Ashikaga T., Sato J., Ohta N., Hasegawa S., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H. and Ohno Y., "A study of the criteria for THP-1 cells selection in the human Cell Line Activation Test (h-CLAT)" submitted.
- 6) Sono S., Yamada T., Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yoshida M., Ota N., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H., Hasegawa S., Ashikaga T.

and Ohno Yasuo. "Results of a Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (3rd Report): Effect of serum difference" submitted.

- 7) Mizuno M., Yoshida M., Kodama T., Kosaka N., Okamoto K., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Ashikaga T., Kuwahara H., Sakaguchi H., Sato J., Ota N., Okamoto Y. and Ohno Y., "Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results: Results of the Forth Japanese inter-laboratory Study", submitted.

2. 学会発表 (講演及び学会発表)

1) Ashikaga T. and Sakaguchi H., "Evaluation of Dendritic Cell-based Assays for Predicting Skin Sensitization", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.

2) Ashikaga T., Sakaguchi H., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yamada T., Yoshida M., Ota N., Hasegawa S., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Kosaka N., Sono S. and Ohno Y., "Results of a Japanese Ring Study of a Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting Skin Sensitization Potential (1st report): Inter-laboratory Reproducibility", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.

3) Okamoto K., Kosaka N., Kuwahara H., Mizuno M., Okamoto Y., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Yoshida M., Ohta N., Kodama T., Sato J., Sakaguchi H., Ashikaga T. and Ohno Y., "Results of a Japanese Ring Study of a Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting Skin Sensitization Potential (2nd report): A study of the Criteria for THP-1 Cell Serection", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.

4) 4) Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M.,

Yoshida M., Kodama T., Sato J., Ota N., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H., Ashikaga T. and Ohno Yasuo., "Results of a Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (3rd Report): Effect of Serum Difference", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.

- 5) Mizuno M., Yoshida M., Kodama T., Sato J., Ota N., Okamoto Y., Kosaka N., Okamoto K., Kuwahara H., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Sakaguchi H., Ashikaga T. and Ohno Y., "Results of a Japanese Ring Study of a Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Predicting Skin sensitization Potential (4th report): Effects of pre-culture conditions", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表1 予測モデル変更によるin vivo (LLNA)との対応性の変化

	陽性	陰性	偽陰性	偽陽性	一致率
in vivoデータ	103	41			
従来予測モデル (平均データ解析)	87	39	16	2	87.5
新予測モデル (個別データ解析)	91	36	12	5	88.2

過去に同一プロトコールにて行われた試験のべ144回について、予測モデルを従来 of 平均値から個別試験ごとの評価に変更した場合の、in vivoとの対応性を検証した。一致率は大きな違いはなかったものの、偽陽性は増加し、偽陰性は減少した。

表2 In vivo (LLNA)との対応性の変化(詳細)

	平均データ解析	個別データ解析
感度	84.4%	88.3%
特異性	95.1%	87.3%
予測値(+)	97.8%	94.8%
予測値(-)	70.9%	75.0%

一致率以外の対応性についてもそれぞれについて算出し比較を行ったところ、感度は上昇し、特異性は減少した。

表3 各施設におけるDNCBの用量—反応性

DNCB (µg/ml)		2.0	2.4	2.9	3.5	4.2	5.0	6.0														
A	CD86	557	453	664	703	507	771	689	448	649	511	534	548	383	272	383	146	45	166	76	56	35
	CD54	390	382	550	467	482	619	518	818	600	510	700	688	613	784	625	148	156	263	76	110	8
	Cell viability	84	83	82	81	80	79	78	77	76	75	74	73	72	71	70	69	68	67	66	65	64
B	CD86	157	175	60	186	101	0	357	350	10	371	425	420	388	680	400	114	375	320	229	288	120
	CD54	149	200	50	101	100	100	233	300	50	300	700	400	467	680	400	267	950	600	667	1000	600
	Cell viability	84	83	82	81	80	79	78	77	76	75	74	73	72	71	70	69	68	67	66	65	64
C	CD86	257	307	245	245	374	393	557	646	351	756	730	352	298	1959	279	350	608	221	112	169	155
	CD54	148	221	164	200	277	297	319	484	284	367	675	306	383	987	318	412	1231	260	132	84	113
	Cell viability	84	83	82	81	80	79	78	77	76	75	74	73	72	71	70	69	68	67	66	65	64
D	CD86	166	116	173	296	112	289	214	128	363	303	234	391	264	386	362	206	332	305	119	278	249
	CD54	152	152	163	315	113	239	342	118	302	345	216	372	348	276	412	447	379	470	385	541	522
	Cell viability	84	83	82	81	80	79	78	77	76	75	74	73	72	71	70	69	68	67	66	65	64
E	CD86	210	127	154	285	175	164	383	278	285	404	301	309	428	362	370	287	330	271	129	227	248
	CD54	158	119	102	216	125	126	253	177	227	297	195	273	278	222	375	307	234	481	137	274	444
	Cell viability	80	83	81	87	85	85	84	87	81	84	81	77	80	80	76	71	78	74	66	67	35
F	CD86	172	728	315	4	384	785	209	707	727	340	817	841	430	933	642	320	798	217	213	482	-
	CD54	132	133	327	13	13	607	129	275	864	304	425	1182	271	278	1362	266	605	478	297	260	-
	Cell viability	84	83	82	81	80	79	78	77	76	75	74	73	72	71	70	69	68	67	66	65	64
G	CD86	131	132	327	13	13	607	129	275	864	304	425	1182	271	278	1362	266	605	478	297	260	-
	CD54	131	132	327	13	13	607	129	275	864	304	425	1182	271	278	1362	266	605	478	297	260	-
	Cell viability	84	83	82	81	80	79	78	77	76	75	74	73	72	71	70	69	68	67	66	65	64
H	CD86	175	207	157	290	361	351	375	392	420	376	428	426	327	425	456	279	438	431	297	330	360
	CD54	224	175	145	474	264	340	719	285	446	724	307	413	602	296	407	466	345	422	288	486	228
	Cell viability	84	83	82	81	80	79	78	77	76	75	74	73	72	71	70	69	68	67	66	65	64
I	CD86	187	277	151	301	497	242	447	617	407	461	525	388	371	226	380	637	387	543	308	128	288
	CD54	127	155	144	41	261	151	120	207	234	371	280	305	436	340	500	618	347	582	431	199	200
	Cell viability	84	83	82	81	80	79	78	77	76	75	74	73	72	71	70	69	68	67	66	65	64
J	CD86	141	469	578	41	370	460	700	304	520	1028	207	508	656	240	364	241	35	251	355	15	221
	CD54	141	469	578	41	370	460	700	304	520	1028	207	508	656	240	364	241	35	251	355	15	221
	Cell viability	84	83	82	81	80	79	78	77	76	75	74	73	72	71	70	69	68	67	66	65	64
K	CD86	138	124	141	145	263	174	382	172	327	383	220	240	328	280	462	292	212	240	249	394	14
	CD54	138	124	141	145	263	174	382	172	327	383	220	240	328	280	462	292	212	240	249	394	14
	Cell viability	84	83	82	81	80	79	78	77	76	75	74	73	72	71	70	69	68	67	66	65	64
L	CD86	138	124	141	145	263	174	382	172	327	383	220	240	328	280	462	292	212	240	249	394	14
	CD54	138	124	141	145	263	174	382	172	327	383	220	240	328	280	462	292	212	240	249	394	14
	Cell viability	84	83	82	81	80	79	78	77	76	75	74	73	72	71	70	69	68	67	66	65	64

それぞれの施設における3回の試験結果を示す。CD86/CD54の陽性になった回を太字、どちらも陽性となった回をグレーで示した。

表4 DNCB(陽性対照)の濃度比較

DNCB (µg/mL)	4.0		5.0	
陽性となった回数/ 総試験回数	17/17		16/17	
	平均	CV (%)	平均	CV (%)
CD86	279	21	214	81
CD54	456	33	489	7
生存率(%)	86	2.6	81	8.5

表5 EC150/200の算出方法によるin vivo感
作性強度 (LLNA EC3)との相関係数の違い

	LLNA EC3との相関係数	
	EC150 (CD86)	EC200 (CD54)
平均値	0.83	0.627
中央値	0.808	0.638
最低値	0.836	0.615
最高値	0.636	0.602

EC150/200をそれぞれの値と定義した場合のEC3との相関係数を算出した。従来の平均値から、中央値に変更しても相関係数に大きな違いはなかった。

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及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、江幡 真也、太田 尚子、金森 健之、川上 幸治、岸 正孝、
桑原 裕史、坂口 育代、坂口 斉、瀬戸 洋一、萩野 滋延、森 辰実、矢作 彰一

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 2007 年 6 月 1 日に発効した「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。近年、代替法の開発と評価はグローバル化が加速し、相互の協力体制もさらに拡充されるものと考えられ、本邦における対応案策定にはこれら国際情勢の調査・把握は重要である。

本年度の特筆すべき動きは EU において ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) が皮膚刺激性試験代替法として EPISKIN を、腐食性及び強刺激性物質を検出するための眼刺激性試験代替法として Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay (BCOP) 及び Isolated Chicken Eye Test (ICE) を、REACH のための皮膚感作性試験として Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA) を承認したことが挙げられる。米国では、ICCVAM が腐食性及び強刺激性物質を検出する眼粘膜刺激性試験代替法である BCOP、ICE を、急性経口毒性の開始濃度を予測する *in vitro* 細胞毒性試験を承認したことが挙げられる。また、Personal Care Products Council (PCPC) (2007 年 11 月に CTFA から改称) から、従来の動物を用いた試験法に加え代替法を盛り込んだ Safety Evaluation Guidelines の改訂版が発行された。国内では、第 6 回国際動物実験代替法会議が開催され、代替法開発の促進、3Rs のグローバルイゼーション、科学者と動物福祉活動者との相互理解に重要な役割を果たした。また、2005 年 11 月に発足した JaCVAM はその役割の明確化、国内外の学会、関係機関との調整、国際協調へ向けた取り組みが進み、本格的な稼動となった。

本年度はさらに、日米欧にカナダを加えた 4 極における化粧品規制協力国際会議 (ICCR) が初めて開催された。ICCR において、JaCVAM、ICCVAM、ECVAM およびカナダ政府の担当者は、代替試験のデザインや、実施、評価についての協力を進めていくための方向性を示すよう要請された。その対応は将来の代替法開発に大きく影響してくる可能性があり、2008 年に行われる次回の会議を注目する必要がある。

このように国内外の代替法に関する情勢は急速に変化しており、関連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られる。

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 2007 年 6 月 1 日に発効した「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共に 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 PCPC との連繋を通じて実施した。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スレターも参考とした。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験代替法に関する情報を収集することにより、実験動物の福祉向上を目指すものであり、ヒトや動物の権利や福祉に抵触するところはない。

C. 研究結果及び考察

C-1 EU における動物実験禁止と代替法開発の動向

C-1-1 化粧品指令第7次改正

化粧品指令第7次改正が2003年3月11日付けで公布された¹⁾。この化粧品指令第7次改正の基本的骨子は、以下の通りである¹⁾⁻³⁾。

- ・化粧品及び化粧品原料の EU 域内の動物実験禁止
- ・化粧品：加盟国の国内法施行後に即時禁止
※猶予期間は最大18ヶ月(2004年9月)
- ・原料：代替法がある場合は加盟国の国内法施行後に即時禁止、完全な動物実験禁止はEU化粧品指令発効の6年後(2009年3月)。
- ・EU委員会は、OECDのバリデーシヨ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のバリデーシヨ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⁴⁾。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⁵⁾。

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* 試験の開発、戦略の最適化、プレバリデーシヨンのデータベースの作成等を実施している。現在9つのWork packageで検討が進められている。

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して研究が進められている。

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 Work package 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バックグラウンドレビュー文書 (BRD) ならびに ICCVAM による試験法評価報告書が公表された。

ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) は 2007 年 4 月、皮膚刺激性試験代替法として EPISKIN を、腐食性及び強刺激性物質を検出するための眼粘膜刺激性試験代替法として Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay (BCOP)、Isolated Chicken Eye Test (ICE) を、並びに REACH のための皮膚感作性試験として Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA) を承認した。

皮膚刺激性試験代替法に関しては、ECVAM によるバリデーションを終えたヒト培養皮膚モデル EPISKIN 及び EpiDerm が ESAC において評価され、予測性 (Predictivity) が良好であった EPISKIN のみが承認された。

眼刺激性試験代替法については、ESAC により器官型培養系 BCOP、ICE は腐食性及び強刺激性物質の検出に限定のうえ承認された。一方、弱い眼刺激性の検出に関して ECVAM は、細胞を用いた方法 (Neutral Red Release: NRR、Red Blood Cell: RBC、Fluorescein Leakage: FL、Cytosensor Microphysiometer: CM)、3D 培養モデル (SkinEthic Human Corneal Epithelial Model、EpiOcular OCL-200 Model) 並びに器官型培養系 (Isolated Rabbit Eye Test: IRE、Hen's Egg Test -Chorioallantoic Membrane: HET-CAM) の検討を、過去のバリデーションの再評価を含め、進めている。

皮膚感作性試験代替法に関しては、LLNA がすでにガイドライン化 (OECD TG429) されているが、ESAC による peer review において LLNA より動物数を削減した rLLNA が REACH のための試験法として承認された。LLNA は陰性、及び陽性コントロール群及び 3 濃度 (高、中、低) の被験物質群が必要であるが、rLLNA は陰性コントロール群と被験物質群 (高) のみの試験である。LLNA と比較すると偽陽性はないが、偽陰性はあるとされており、rLLNA の結果だけでは感作性物質のポテンシャルの決定はできず、あくまでもスクリーニング試験として位置づけている。

C-1-3 SCCP の状況

2007 年 6 月 19 日に SCCP はメモランダムとして「EU での化粧品原料の安全性評価における動物実験代替法開発の現状」を発表した⁶⁾。本メモランダムでは、現時点での化粧品の安全性試験に適した代替法についての現状をまとめている。代替法としてバリデートされた試験としては、皮膚腐食性、経皮吸収性、光毒性、変異原性。Reduction/Refinement の代替法としてバリデートされた試験として急性毒性、皮膚感作性。代替法としてまだバリデートされていない試験として眼刺激性、反復毒性、発ガン性、生殖毒性、トキシコキネティクスが挙げられている。これらの大多数の代替法は有害性の有無の評価はできるが、リスク評価はできないという点も指摘されている。

SCCP は 2007 年 12 月 18 日の第 14 回総会において、「皮膚刺激性試験の *in vitro* 試験 EPISKINTM に関するメモランダム」を採択した⁷⁾。SCCP は EPISKIN 法に対し、化粧品原料の皮膚刺激性を動物を用いずに評価する代替法として必要性が高く、歓迎することを表明する一方、色素や染毛剤のような化粧品指令アネックスの成分の安全性評価を完全に行うことができないことを指摘した。具体的には色素や染毛剤は MTT 比色法に影響を与える可能性がある。そのため、アネックス成分の評価には追加のデータが必要であることを指摘すると共に、これらの化粧品原料に対しては更なる研究が必要であると述べている。

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⁹⁾。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(欧州農業工業会)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35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3Rs(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、及び遂行
- ・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、関連業界、企業からなり、レビューワークプラン、戦略、タイムラインを提案する。
- ・ワーキンググループ：欧州委員会、企業、適切な専門家のサポートで個々のテーマを扱う小ワーキンググループ。
- ・ステークホルダーのミラーグループ：学界、動物福祉団体、患者団体、消費者保

護グループ、他のステークホルダーからなり、より広い見地で運営委員会にアドバイスする。

2007年11月5日にBrusselsで第2回の年次大会(Annual Conference 2007)が開催された。内容はEPAAのこの1年間での活動成果や今後の活動内容に加え、今年度のテーマとして掲げられた「規制への受け入れ及び3Rアプローチの実施」についてであった。活動としては、代替法に関する情報の共有化ならびに再検討すべき代替法を同定することを目的に、各企業に対するアンケート調査結果(①現在の企業アプローチに関するデータベース、②個々の代替法のポテンシャルリサーチ；開発下ならびに社内活用している代替法、3Rsに対する取り組みに関して)が実施された。また、今後の活動に向けては、3Rs及び代替法のRegulatory acceptanceの国際化について推進していくとしている。

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日から発効された⁹⁾⁻¹³⁾。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、2007 年度に新たな試験法の掲載はなかった¹⁴⁾。

C-1-6 COLIPA の状況

COLIPA (欧州化粧品工業連合会) は動物試験代替法の開発と受け入れに向けたコーディネートを目的に、1992 年に SCAAT (Steering Committee on Alternatives to Animal testing) を常設の委員会として設置した。COLIPA は 2007 年に一部組織改革を行い、SCAAT は PC Research と統合された。その PCR の基には 2007 年に 2 つの新たな Task Force が加えられ、現在、以下の 6 つの Task Force があり、それぞれ積極的に活動が進められて

おり、いくつかの活動内容は第 6 回国際動物実験代替法会議にて発表された¹⁵⁾⁻¹⁹⁾。

- ① PT SCAAT Eye Irritation (眼刺激性試験代替法の検討)
- ② PT SCAAT Skin Tolerance (感作性・皮膚刺激性試験代替法の検討)
- ③ PT SCAAT UV- Induced Toxic Effects TF (光毒性試験代替法の検討)
- ④ PT SCAAT Genotoxicity (変異原性・遺伝毒性の検討)
- ⑤ PT SCAAT Systemic Toxicity (全身毒性試験代替法の検討)
- ⑥ PT SCAAT Safety Assessment 2009-2013 (化粧品原料のリスクアセスメントのストラテジーを作成)

このうち PT SCAAT Skin Tolerance 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 6 回国際動物実験代替法会議にて発表された。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合成システインペプチド及びリジンペプチドとの結合性を評価する peptide reactivity assay などが PT SCAAT Skin Tolerance 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^{20), 21)}。

また、EU 化粧品指令第 7 次改正で定められているそれぞれの試験法における 2009 年/2013 年のデッドラインに向け、現時点で汎用、ガイドライン化されている代替法ならびに開発下にある代替法を組み合わせることによって、化粧品原料のリスクアセスメントのストラテジーを作成することを目的に 2007 年に PT SCAAT Safety Assessment 2009-2013 (PT-SA) が発足した。PT-SA ではこれまでの PT-SCAAT の Task Force ならびに新たに設立された PT SCAAT Systemic Toxicity 等と共同しながらストラテジーを作成していくとしている。

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)²²⁾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)²³⁾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)、The Wellcome Trust 及び製薬・化学企業などより資金が提供されている。

・FRAME

FRAME (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments)²⁴⁾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「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 Foundation²⁵⁾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)²⁶⁾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*)²⁷⁾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。執行委員長はベルリン自由大学のH. Spielmann教授であり、*in vitro*毒物学の情報交換を推進するために、INVITOXワークショップを開催、また、6ヵ月ごとにニュースレターを発行している。INVITOX2006 (第14回*in vitro*毒物学に関する国際ワークショップ)は2006年10月2日～5日にベルギーのオステンドで開催された。第15回は、2008年10月スウェーデンのストックホルムで開催される予定。

・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。学会長はベルリン自由大学の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²⁸⁾。2007年9月28日～30日にオーストリアのリンツ大学で第14回動物試験代替法会議が開催された²⁹⁾。

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、2007年4月にESACが皮膚刺激性試験代替法としてEPISKINを、腐食性及び強刺激性物質を検出するための眼刺激性試験代替法としてBovine Corneal Opacity and Permeability Assay (BCOP)及びIsolated Chicken Eye Test (ICE)を、REACHのための皮膚感作性試験としてReduced Local Lymph Node Assay (rLLNA)を承認したことが挙げられる。また、EPAAに

については第2回の年次大会が開催され、今後の方向性について3Rs及び代替法の国際化について推進していくとしている。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種の眼刺激性試験代替法の評価、感作性試験代替法 Local Lymph Node Assay (LLNA) の評価および急性経口毒性試験の開始濃度を予測するための細胞毒性試験の評価に大別される。

2006年11月、NTP代替試験法省庁間センター (The NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods :NICEATM) は4種の眼刺激性試験代替法 Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP)、the Isolated Rabbit Eye (IRE)、the Isolated Chicken Eye (ICE) および Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane test (HET-CAM) の最終試験法評価報告書³⁰⁾を公表した。本文書では、①4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、②ICCVAMが推奨する限定的に使用でき、眼腐食性及び強度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、③HET-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と報告された。

2007年10月にはこれらの方法の法的受け入れについて検討するため最終試験法評価報告書³⁰⁾とバックグラウンドレビュー文書³¹⁾⁻³⁴⁾ (BRD) が連邦政府機関へ送られた。なお、省庁からの返答の期限は2008年4月である。

また、感作性試験代替法であるLLNAについ

て、NICEATM および ICCVAM は米国消費者製品安全委員会 (U. S. Consumer Product Safety Commission: CPSC) から、その適用範囲やいくつかの変法に関するバリデーション状況を評価するよう要請された。これを受け、ICCVAM は、2007年9月にLLNAのPerformance Standards案³⁵⁾を公表した。非放射性物質によるLLNA変法の適切性、信頼性を評価するための基準を国際的にハーモナイズすることを最終的な目的とするこのPerformance Standards案の作成は、草案に対するパブリックコメント募集を終了し、修正案について2008年3月のピアレビューパネル会議で検討が行われる予定である。

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た。この検討に関しては、2006年3月の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11月にBRD³⁶⁾ならびにICCVAMによる試験法評価報告書³⁷⁾が最終化された。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 (2008年~2012年) を発表、パブリックコメント募集を終了し、最終化を進めている。この5ヵ年計画では、(1) 連邦政府機関の試験計画に、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あるいはそれら試験法の組み合わせに関する最優先分野の確

認の2点に取り組むとした。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・発生毒性、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、NTP 代替試験法に関する科学諮問委員会（SACATM: Scientific Committee on Alternative Toxicological Methods）は2007年6月12日に開催され、上記のNICEATM-ICCVAM 5ヵ年計画やECVAM およびJaCVAM が提供する最新情報等について議論がなされた。

2008年2月5日、ICCVAM は10周年記念シンポジウムを開催した³⁸⁾。10年間の歩みや今後の見通し、戦略などが議題となった。その中で「試験法の研究、開発、移転、バリデーション: ICCVAM とそのステークホルダーのための今後の進め方」と題するパネルディスカッションが行われ、日本からJaCVAM の小島室長が8人のパネリストの1人として加わった。

2008年2月6日及び7日、NICEATM と ICCVAM は、急性全身毒性の *in vitro* アプローチとヒトにおけるエンドポイントに関するワークショップを、JaCVAM と ECVAM も加えて開催した³⁹⁾。急性全身毒性で鍵となる *in vivo* の知見やメカニズムに基づく *in vitro* 試験システムについて検討された。

C-2-2 米国化粧品工業会の状況

米国化粧品工業会（CTFA: Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association）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を提供するものである。CTFA は、これまでの1991年版ガイドラインに広範な改訂を行い、動物実験代替法を盛り込んだ改訂版 Safety Evaluation Guidelines⁴⁰⁾を2007年8月に発行した。前臨床試験には、規制上のガイドラインに通例従う動物試験と共に、細胞、組織、器官培養を用いる *in vitro* 代替法が併記されており、その手法と併せて各試験法の長所・短所やバリデート状況等についても論述されている。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* 法の部分的な使用の可能性についても一部言及されて

いる。

なお、CTFA は2007年11月に Personal Care Products Council (PCPC) と改称された。

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、まず、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、2007年10月にはバックグラウンドレビュー文書及び最終試験法評価報告書が規制当局へ送られたことが挙げられる。また、急性毒性試験代替法については、ICCVAM と ECVAM が共同して行った細胞毒性試験に関するバリデーション研究の結果について、2006年11月、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最終化された。

感作性試験代替法に関しては、NICEATM および ICCVAM が CPSC からの要請を受け、LLNA について、その適用範囲やいくつかの変法に関するバリデーション状況を評価し、それに基づいて2007年9月に LLNA の Performance Standards 案を公表した。

さらに、NICEATM と ICCVAM は、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（2008年～2012年）を策定中である。

PCPC（2007年11月にCTFAから改称）関連のトピックスとしては、前臨床試験の手法としての従来の動物を用いた試験法に加え、動物実験代替法を盛り込んだ改訂版 Safety Evaluation Guidelines が2007年8月に発行されたことが挙げられる。

C-3 その他の国際的な代替法開発（OECD等）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⁴¹⁾。2007年度に以下の試験法が記載されたが、*in vitro* 試験ではない。

426 神経発生毒性試験（2007年10月16日収載）

2007年度に以下の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。

- 4** 安定的にトランスフェクトさせたヒトエストロジェン受容体- α 転写活性試験⁴²⁾
(化学物質のエストロジェンアゴニスト活性の検出) (2008年2月8日)
487 *In vitro*小核試験 (2008年2月1日)
407 齧歯類における28日間反復経口投与毒性試験(内分泌効果のパラメーターのアップデート) (2008年2月8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 急性吸入毒性一固定用量法の改定 (2004年7月30日)
434 急性経皮毒性一固定用量法の改定 (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。

C-3-2 化粧品規制協力国際会議(ICCR)の動向

日本の厚生労働省、米国医薬品食品庁(FDA)、カナダ厚生省(Health Canada)および欧州委員会企業産業総局が2007年9月26~28日にブリュッセルで化粧品に関する規制を議論する会議を行った⁴³⁾。これは International Cooperation on Cosmetics Regulations (化

粧品規制協力国際会議、ICCR)の最初の会議であり、化粧品の安全性を国際協力を通じて確保するための情報交換の場とされている。この会議において、「化粧品成分の安全性評価と動物代替試験法」についての話し合いが持たれ、ICCRは動物実験の削減(動物使用数を削減したり、有効な情報をより多く得られるようにすること)、洗練(動物への非人道的な取り扱いを減らしたり、苦痛や残酷さを減らすこと)および代替(動物を使用する方法を使用しない方法に置き換えること)の重要性を認識した、と報告した。なお、ICCRはICCVAM、ECVAM、JaCVAMおよびカナダ政府の担当者に、代替試験のデザインや、実施、評価についての協力を進めていくための方向性を示すよう要請した。次のICCR会議は2008年に米国で行われる予定である。

C-3-3 小括

本年度は、OECDに関しては特筆すべき変化はなかった。一方、日米欧にカナダを加えた4極で話し合われた化粧品規制協力国際会議(ICCR)において、ICCVAM、ECVAM、JaCVAMおよびカナダ政府の担当者に、代替試験のデザインや、実施、評価についての協力を進めていくための方向性を示すようICCRからの要請があったことは、これからの代替法開発に大きく影響してくる可能性があり、次回以降の会議を注目する必要がある。

C-4 日本における代替法開発の動向

C-4-1 厚生労働科学研究班の活動

本厚生労働科学研究班「動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究」(予定期間3ヵ年)が、国立医薬品食品衛生研究所、新規試験法評価室(JaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)の小島肇室長を班長として平成19年度に開始され、現在進行中である。

本研究では、①動物実験代替法をめぐる国際情報を調査する。②動物実験代替法が十分に開発されていないにも係わらず、2009年の禁止対象となっている試験法のうち、眼刺激性試験、皮膚刺激性試験、感作性試験代替法の開発を検討する。③皮膚刺激性試験、感作性試験代替法のバリデーション・評価およびそれらの統計解析手法の研究を行う。④必要ならば、皮膚接触皮膚炎検出の立場から現在のヒト臨床試験を見直す。⑤この研究期間

に実施されているもしくは新たに実施されるバリデーション研究において、そのバリデーション研究を意識した検討を行い、具体的な解決策を探る。また、統計手法の検討は、実データに基づいた理論的な検討やコンピュータシミュレーションを行う。⑥国際協調として、海外で予定されているバリデーション、評価に参加する、情報を提供する、専門家を推薦するなど協力する。⑦研究班／評価会議／評価委員会という代替法評価体制を更に強化し、代替法を組み込み、動物実験を行わない場合における皮膚毒性の安全性評価手順を固める。即ち、開発された代替法についてOECD基準を考慮し、新規安全性試験法を一次評価する。妥当な方法について多施設バリデーションがかけている場合には、それを実施する。これらの結果を総合的に判断し、当該試験法の有効性と限界を明らかにし、化粧品や医薬部外品、医薬品等のスクリーニング法として、或いは行政が受け入れる試験法としての妥当性を評価すると共に、動物実験を用いない場合における総合的な安全性評価の手順・手段について検討する。』ことを研究の方針としている。

本研究班は、主に6名の分担研究者が分担して研究実施される。その中で、班研究の方針である代替法評価の体制づくりに関し、その中心となるJaCVAMの活動の本格化、役割の明確化と関連組織との連携スキームが明確にされたことが、今年度の特筆すべき点である。平成19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、バリデーション最終報告書作成中であり、次年度にpeer reviewが計画されている。「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、peer reviewが実施され、現在、JaCVAM評価会議での最終審議の段階にある。マウスを用いる皮膚感作性試験代替法である「LLNA-DA法」についてはバリデーションが終了し、その結果が国際学会で報告された^{44), 45)}。また、これについてのpeer review報告書作成中である。

「LLNA-BrdU法」については、バリデーションが終了し、バリデーション報告書作成中である。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、今年度の多施設での共同研究結果について国際学会で報告された⁴⁶⁾⁻⁴⁹⁾。また、新規評価として、豚角膜組織を

用いた代替法開発の検討を開始した。

また、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」で実施されている、内分泌攪乱物質の評価法と変異原性試験のコメントアッセイについては、国際バリデーションが実施中である。

C-4-2 第6回国際動物実験代替法会議(WC6) 動物実験代替法研究にかかわる特筆事項として、2007年8月21日から25日に東京のホテルイースト21東京において開催された第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)が挙げられる。この会議は、生命科学研究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)の進展を図ることを目的として開催される国際会議であり、1993年の第1回開催以来、欧米のみで開催されてきたが、第6回会議はアジアで初めて日本で開催された。また、アジアの国々における3Rsの展開を示す試みとして、本会議前に中国(北京:8月19日~20日)と韓国(ソウル:8月20日)で、本会議後に京都で(8月26日)サテライトシンポジウムが開催された。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、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(ベルリン自由大学、ドイツ)が務めた。日本化粧品工業連合会は、欧州化粧品工業会などの業界団体や、国内外の医薬、化学、化粧品企業等と共に人的貢献と経済的支援を行った。本会議には、国内外より、動物実験代替に関係する政府機関や代替法公的評価機関(ECVAM、ICCVAM、ZEBET、他)、国内外の医薬、化学、化粧品企業及び動物愛護団体のメンバーら1000名以上が参加する大規模な会議であり、これまでの5回の会議と同等かそれ以上に大変盛況であった。

EUの化粧品指令第7次改正のポイントとなる2009年、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のグローバルゼーションに対する議論が注目された。そこで、各分野の専門家によるレクチャーや10項目のテーマが設

定されたシンポジウムが開かれた。日本化粧品工業連合会では、中村技術委員長より「The Present Status of Alternatives to Animal Experiments in JCIA」のタイトルで発表を行った。特に Toxicology / バリデーシヨンのテーマにおいて各毒性分野における動物実験代替法開発の状況およびバリデーシヨンに関する発表が数多く見受けられた。中でも、皮膚刺激性試験代替法での、EPISKIN を含む 3次元モデルを用いた発表は多く、従来からの皮膚刺激性の評価だけでなく、皮膚感作性、光毒性、変異原性、経皮吸収性の評価に応用した発表が見受けられた。

また、皮膚感作性代替法に関しても、マウスを用いた LLNA 法の発表に加え、*in vitro* 評価法としてタンパク結合性評価法やヒト単球由来細胞株を用いた評価法等多くの発表がなされた。中でも日本で開発された THP-1 細胞を用いた h-CLAT に関しては、国内外での施設間再現性評価結果や試験法確立に向けた基礎的条件の検討、データベースの構築など多くの発表があり、国内外の研究者から高い関心が寄せられた。次回は、2009 年イタリアで開催される予定である。EU では 2009 年に化粧品評価における動物を用いた多くの毒性試験が禁止されるため、今回同様大いに活発な議論が行われるものと期待される。

2008 年 2 月 23 日、WC6 の成功を受け、さらに科学者と市民の対話を充実するため、日本学術会議と日本動物実験代替法学会の主催により WC6 フォローアップシンポジウム「3Rs に基づく動物実験の規制と第三者認証」が開催された。国内外の規制の動向、動物実験の第三者認証について、理解を深める機会となった。

C-4-3 日本動物実験代替法学会の動向

今年度の日本動物実験代替法学会の活動としては WC6 への全面的な協力があげられる。人的金銭的なサポートを実施し、国際学会に集中することとし、国内大会は開催しなかった。また、代替法学会主催の技術講習会「3次元培養皮膚モデルの活用」が 2007 年 11 月 20 日に東京で開催され、多数の参加者が集まり、3次元皮膚モデルへの関心の深さを示す結果となった。

また、厚生労働研究班から委託された「酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法」、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」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「3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が実施された。

バリデーシヨン委員会は、「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」について報告書作成を実施した。

今後、評価委員会は JaCVAM の評価スキームに組み込まれる形となるが、バリデーシヨン委員会は、JaCVAM とは独立して存続する。

C-4-4 その他の国内動向

その他の国内動向では、JaCVAM の役割の明確化と活動の活性化が挙げられる。

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が、今年度は、JaCVAM の本格稼働に伴い、その役割・国内外の学会・関係機関との調整がさらに進み、また、国際協調も進化している。さらに関連組織との役割分担等について改正変更や修正が加えられ、代替法評価の仕組みが明確になりつつある。主たる組織は、顧問会議、評価会議（代替法の受け入れの評価）、評価委員会 (peer review 担当 ad hoc) である。なお、バリデーシヨンは代替法学会等の学会へ委託となり、必要に応じてワーキンググループが召集される。今年度は、評価会議が 3 回開催され、代替法の評価組織のあり方を中心に議論された。また、厚生労働科学研究班研究の一環として、代替法の利用を検討する「医薬部外品の製造承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会」は、日本化粧品工業連合会及び代替法学会の参画を要請し、実質的な活動に入った。

C-4-5 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 の本格稼働、第 6 回国際代替法会議 (WC6) の日本開催が挙げられる。WC6 は代替法開発の促進、3Rs のグローバルゼーション、科学者と動物福祉活動者との相互理解に重要な役割を果たした。また、JaCVAM は平成 17 年 11 月に発足した後、その役割の明確化、国内外の学会、関係機関との調整、国際協調へ向けた取り組みが進み、本格的な稼働となった。

C-5 化粧品の安全性評価に関連する代替法の状況