

1. バリデーションとは

バリデーションという用語の理解はケースバイケースで異なる。そこでまず、本章で扱うバリデーションという言葉の定義から確認しておきたい。OECD ガイドライン GD34 には、以下のよう
に定義されている。

1.1 バリデーション (Validation) :個々の研究法, 方法, 製法, 評価の信頼性と適性を限定された目的のために確立する過程

動物実験代替法に限らず, 試験法のバリデーションとは, reliability (信頼性) と relevance (適性) を見極めることが目的である。つまり, OECD はこれからガイドラインとして認めようという安全性試験, 環境保全のための試験にはこのバリデーションを求めていくというものである。現在データ構築が進んでいるトキシコゲノミックスもプロテオミックスなどの新しい毒性評価の方法についても今後検討すると記載されている。

もちろん試験法がバリデーションをするに値するものかという成立基準が存在する

1. 作用機構および機能, 既存の標的臓器が明確
2. 最小限の対照物質が明確
3. 正確かつ信頼性がある

この成立基準を満たした試験法についてバリデーションで明らかにするべきものを GD34 から引用すると, 以下の3点が要素として挙げられる。

1. 施設内, 施設間の再現性 (信頼性)
2. データの質 (GLP 準拠) の確認
3. 感度, 特異度, 正確度, 陽性の予測性, 陰性の予測性, 有用性, 限界など

2. バリデーションに必要な要素

そこで, この3要素を満たすために行うバリデーションに必要なものを挙げ, これまでの経験をもとに説明を加える。

2.1 バリデーションマネジメントチーム

図1に示すように, 試験法の専門家, 生物統計家, バリデーションの専門家により構成される第三者組織。試験の成立基準を確認し, バリデーション実施の有無を決定した後, 試験計画, プロトコルの作成, 参加施設の決定や被験物質の選定, コード化, 得られた結果が適正に実施さ

れたことの検証，結果の解析，報告書の作成などを担当する。

被験物質の選定，コード化などを被験物質グループまたはデータの処理や評価を統計解析グループなどのコンサルタントグループに任せる場合もある。

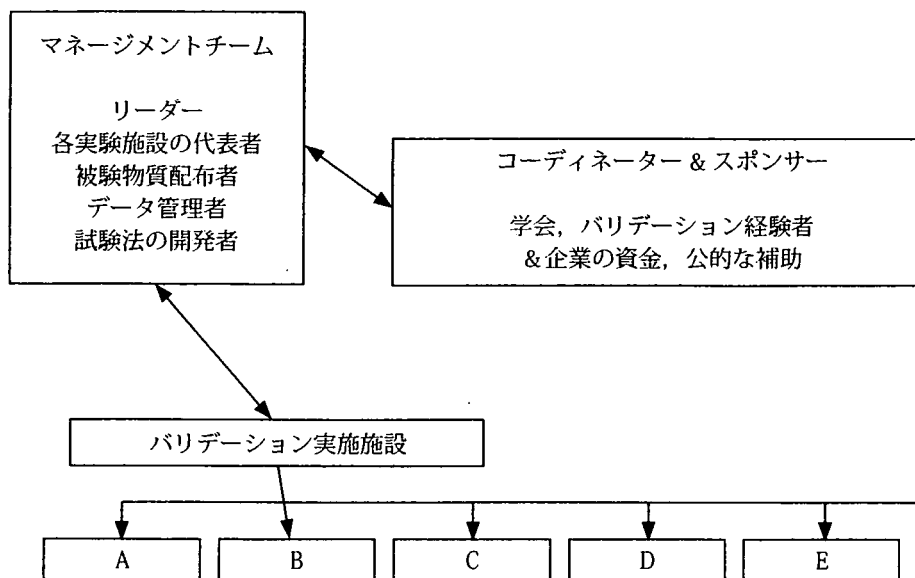


図1 バリデーション組織 (例)

2.2 参加施設

試験法や GLP 基準を把握している，またはそれらができる複数の参加施設。試験法の開発者や試験法に精通した施設をリード施設に認定して，技術講習の講師や SOP（標準操作手順書）の作成，トラブル対応を任せることが多い。参加施設の力量を客観的に評価するためには，技術講習会に試験関与者を必ず出席させる，およびその後に陽性対照物質を用いた予備試験を行い，データを確認して参加施設の適合条件をクリアできなければ参加を認めないという取り決めが，その後の混乱を回避するためにも重要である。

2.3 コーディネーターおよびスポンサー

バリデーションマネージメントチームを作り，参加者を公募して，バリデーションを開始する。すべてに費用がかかる。その企業のスポンサーまたは公的補助が大切であり，欠かせない。先立つ物がなければ残念ながら，そこに素晴らしい試験方法があってもバリデーションを実施できないからである。

そして，もっとも重要であるものは人材である。バリデーションマネージメントチームに優秀な専門家が必要である。そのために，学会や有識者の協力が必要となる。優秀な資金調達者がいれば，費用も賄える。

2.4 計画および公式プロトコール

試験スケジュールおよび目標の設定などが明確でありながら、ある程度の許容範囲を持ち、若干のSOP逸脱においても結果に大きな影響を与えないプロトコールが望まれる。科学的適合基準または予測モデルを含むものも設定する。

2.5 SOP（標準操作手順書）

試験法の手順を記載した手引き。試験に必要な資材なども記載する。試験方法の移転のしやすさを測る上でも、試験法の肝は詳細に書かねばならないが、結果に影響を与えにくい事項は書き込みすぎないことが望まれる。

2.6 プレバリデーション結果

最小限1施設における試験結果。この結果をもとに、公式バリデーションのプロトコール、SOP、被験物質が選定される。

2.7 適切な被験物質（陽性対照を含む）の選択と既存の毒性情報

既存の毒性情報の所在が明確な化学物質の中から、陽性・陰性物質の比、陽性物質の毒性強度、プレバリデーションで明らかになった判断不能な被験物質をバランスよく盛り込むこと、それらの被験物質を物性、溶解性、溶媒などを考慮して選択し、コード化することが重要である。

2.8 バリデーションの基準

さらに、信頼性と適性を評価するためには基準が必要である。ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) やOECDガイドラインの中では、以下のように記載されている。

規制の目的にてバリデーションする新しい試験方法、あるいは変法では以下のバリデーション基準を満たさねばならない。これらの基準はもちろん、方法や目的によりある程度かわりうる。しかし、その目的にあった試験法の評価とデータベースが一致しなければいけない。なぜなら、試験法は異なった目的、組織（規制当局）、物質の分類、ケースバイケースで異なるからである。よって、この基準は、試験法のバリデーションの受入れには欠くことができないものである。

1. 試験法の科学的および規制上の合理性
2. 試験法の指標の生物学的な関係
3. 詳細な試験計画
4. 試験法の再現性（施設内、施設間再現性）

5. 対照物質の存在
6. 適応性を見極められる情報とデータ
7. GLP (Good Laboratory Practical) に準拠したデータ
8. すべてのデータおよび詳細な試験計画が公開され、利用できること

2.9 規制受入れ基準

さらに、バリデーションされた試験法は自動的に行政に受入れられる訳ではない。規制受入れのためには、以下の基準を満たしている必要がある。

1. 専門家による科学的な評価を受けている
2. 試験計画や標準作業手順書がある
3. 既存の試験法との間に関係がある
4. 化学物質の十分なデータがある
5. 試験法がリスク評価に有用である
6. 試験法の限界が明確である
7. 頑強（若干の変更による影響を受けない）かつ習得が容易
8. 時間と経費の削減
9. 同様の試験と調和させやすい
10. 試験法が安定
11. 動物実験の 3Rs（reduction：削減，refinement：苦痛の緩和，replacement：置き換え）に合致

3. 試験法の確立プロセス

最近の国際的な試験法の確立プロセスにおいて、ある試験法が開発され、論文に掲載されただけではもちろんのこと、バリデーションも段階があり、プレだけではなく、公式なバリデーションが行われただけでは試験法として行政的な受入れはされない。その後、第三者の専門家による評価が必要である。図2に簡単なフローを示すように、このような厳しい基準をクリアして新規試験法は公的に認められるのである。

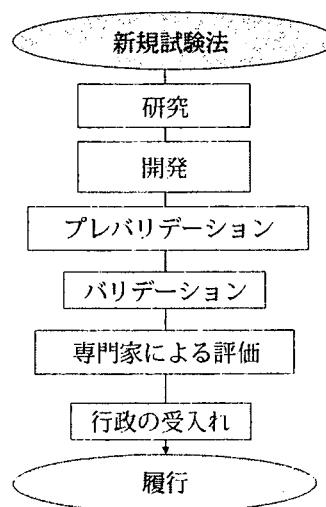


図2 試験法確率のプロセス²⁾

3.1 バリデーシヨンの種類

バリデーシヨン終了までにはこのような過程、資料の確認を経ることになる。上記したバリデーシヨンとは予測的なものであり、これから実験を行うものを前提としているが、回帰的なバリデーシヨンとして過去のデータを利用して、例えば、使用動物数を減らすなどの検討もバリデーシヨンの範疇に入る。また、すでにガイドライン化した方法を改良した場合や、類似の生物材料（例えば、皮膚腐食性試験の評価を新たな培養皮膚を用いた場合）を用いたバリデーシヨンを実施する場合に図3に示すようにキャッチアップバリデーシヨンというより小規模なバリデーシヨンで立証する場合も想定される。さらに、GD34によると、構造活性相関のバリデーシヨンは別の検討が進んでいる。

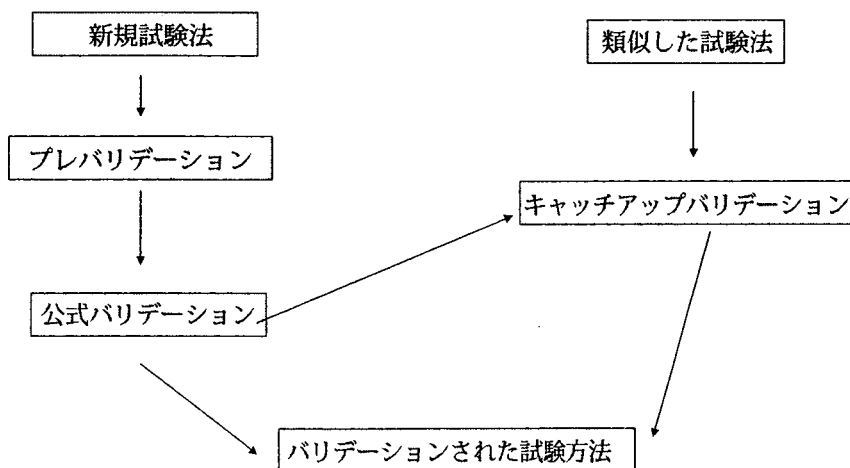


図3 バリデーシヨンの種類^{3改変)}

3.2 専門家による評価

規制受入れ基準の中にある専門家による評価（peer review）についても、その評価項目を以下にまとめておく。

1. 試験法が科学的、規制の上での妥当性
2. 試験プロトコールの構成の妥当性
3. バリデーシヨンに用いられた物質の分類
4. 試験法の正確性を評価する物質の in vitro および参照データ
5. データおよび結果の利用性
6. 試験法の正確性
7. 試験法の信頼性
8. データの質
9. 他の科学的な報告

10. 3Rs への関与
11. 試験法の有用性と限界
12. 文献
13. 別添資料

4. バリデーションや評価の組織

このように、バリデーションや評価を実施すると言っても大変な労力を要する。ましてバリデーションマネージメントチームの構築にはノウハウが多く、評価においても種々の専門家への要請が必要、公的な認証をも考慮する必要があることから、世界各地にバリデーションセンターが設立されている。米国には NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Method)、欧州には ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)、昨年 2005 年 11 月に、日本でも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内に JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) が設立された。

JaCVAM はその名の通り考えると、alternative のバリデーションを行う。Alternative test という用語の定義は GD34 では動物実験の 3Rs (Reduction: 削減, Refinement: 苦痛の緩和, Replacement: 置換え) に関与した試験すべてが該当する。決して、Replacement のみを指す用語ではない。よって、実験動物を用いた生物試験は遠からず alternative は関与しており、JaCVAM はすべての試験のバリデーションについて担当していると言えよう。

5. 最後に

以上、バリデーションとその後の規制の受入れまで、GD34 および ICCVAM ガイドラインに記載された内容の要点を中心に簡単にまとめた。

バリデーションおよび評価とは多くの研究者の協力を経て、大変な労力と時間を要する作業である。しかし、だからと言って決して良い結果、思うような結論が出るわけではなく場合によっては全く行政的な受入れの余地がない試験法と評価されてしまう場合もありうる。

表 1 に示すような、光毒性試験、腐食性試験、LLNA (Local Lymph Node Assay) など OECD で現在認められている動物実験代替法が正式に承認されるまで数年、試験法が開発されるまで遡ると十年を要すると言われている。そのような労力と時間をかけて新規試験法を開発するメリットはどこにあるのか企業としては難しい問題である。しかし、試験法とは生き物である。放置す

ればすぐにさび付く。仮に動物実験であろうと、これで良いという 100%満足のいく試験法はこの世にはない。目的に応じた試験法の規制にも合わせねばならない。よって、新しい試験法の開発や試験法の改良は企業としては必須なのである。

それをアシストするために JaCVAM が日本でも作られた。この機関をうまく利用して頂きたい。開発者の負担を減らしながら、素晴らしい試験方法が日本で開発されることを期待している。

表1 OECD ガイドラインになっている動物実験代替法

Guideline No.	Classification	Test method	Adopted
429	<i>Skin Sensitisation</i>	<i>Local Lymph Node Assay</i>	<i>Updated ,24th April 2002</i>
430	<i>In Vitro Skin Corrosion</i>	<i>Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)</i>	<i>Original ,13th April 2004</i>
431	<i>In Vitro Skin Corrosion</i>	<i>Human Skin Model Test</i>	<i>Original ,13th April 2004</i>
432	<i>Phototoxicity</i>	<i>In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test</i>	<i>Original ,13th April 2004</i>

文 献

- 1) OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO(2005) 14
- 2) ICCVAM (1997) Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods: a report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. NIH Publicatio No : 97-3981, 1997, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)
- 3) Worth, A. P. and Balls, M. (2001) The importance of the prediction model in the validation of alternative tests, ATLA 29, 135-143

第1章 皮膚一次刺激性試験

小島肇夫

1 皮膚一次刺激性評価の歴史

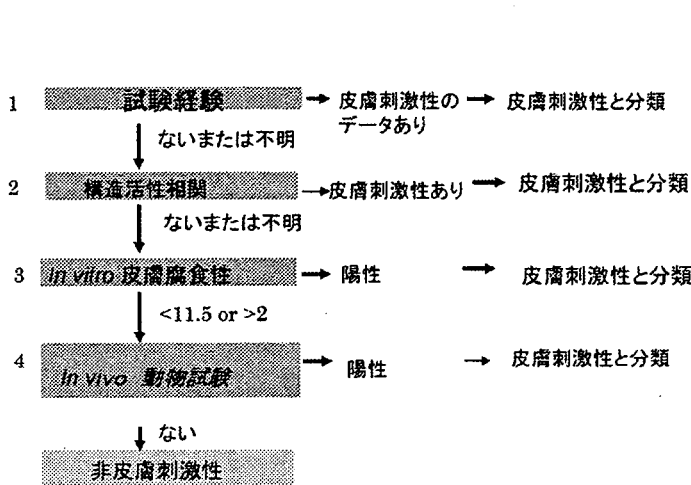
これまで、化粧品原料や製剤の皮膚刺激性の第一次安全性評価（スクリーニング）において、ウサギやモルモットが汎用されてきた¹⁻³⁾。現在も使用している施設もあると思うが、比較的簡便な試験法である。簡便といっても、動物に苦痛を与えず、かつ有用な皮膚状態を確保するためには、毛周期の把握や毛刈技術などに熟練する必要がある、それによって結果が異なることも知られている。実験者は得られた結果をもとに、皮膚一次刺激性の強度をスクリーニングしてきた。常識的に言えば、何十、何百万人の健常人、場合によっては皮膚疾患患者も使われるかもしれない化粧品の安全性を評価するのであるから、例えば、3例の動物を用いてスクリーニングする場合、1例でも皮膚刺激性が生じてはいけない。しかし、動物の皮膚はヒトと比較して、感度が高く、特に油性物質において強い皮膚刺激性を引き起こす⁴⁾。そのため現状汎用されている原料でさえ、1例も皮膚反応を引き起こさない物質であることはありえない。そこで、実験者側はヒトパッチテストとの比較や過去のデータベースと比較して、平均評価点が何点未満なら皮膚刺激性が弱い、中程度、強いなどの区分を独自で定めている。このように、本試験方法は、化粧品原料や製剤の皮膚刺激性におけるスクリーニングに汎用され、化粧品原料や製剤の安全性評価に利用されてきた有用なものである。

2 動物実験代替法評価の現状

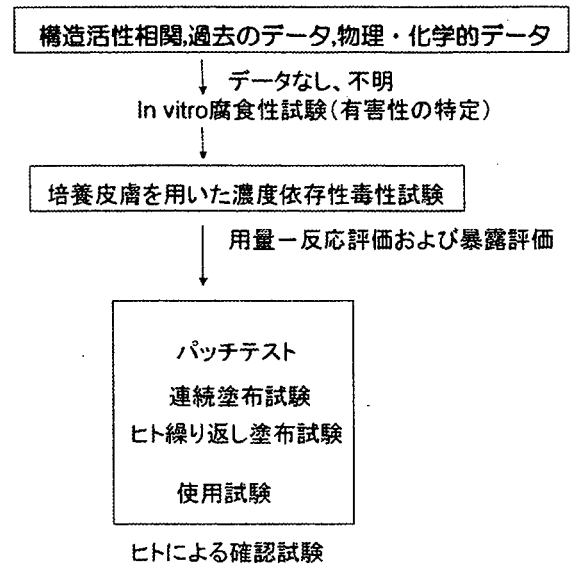
しかし、欧米を中心とする動物愛護の流れは押し留めようもなく、日本の化粧品業界にも波及してきた。2009年までに動物実験を用いた化粧製品を販売できない、原料の試験を実施できないというEU7次改正に従うため⁵⁾、欧州化粧品工業会（COLIPA）で検討が進んでおり、今後は代替法を利用せざるを得ない状況である。その場合でも、まず実験ありきではなく、過去のデータベースの利用、物理化学的な特性や構造活性相関で評価するなど、実験を行う前にすべきことは多い。

動物実験を減らすことを考慮した最初の提案として、腐食・皮膚刺激性の評価スキームが1998年、OECDから発表され⁶⁾、その後、複数の評価スキームの礎となった。このOECD案を基本としたWorthの案の抜粋をスキーム1に示す⁷⁾。腐食性と同時に皮膚刺激性の有無を判断するものである。過去のデータ、構造活性相関、pH、アルカリ度を調べた後、*in vitro*腐食性試験で評価し、次に動物実験を行うというものである。この動物実験にあたる試験が代替法に替わることになる。問題は、この方法をどの目的で

用いるかによる。化学物質の腐食性という Hazard identification (危害性同定) は OECD ガイドライン 430 および 431 に記された *in vitro* 腐食性試験で評価可能である^{8, 9)}。しかし、ヒトパッチやヒト連続塗布試験、使用試験まで進め、安全性の確保に努める前に、リスクを評価しなければならない。リスク評価を行うためには、危害性同定に加え、用量反応評価、暴露評価が必要である¹⁰⁾。



スキーム1 皮膚刺激性評価スキーム⁷⁾改良)



スキーム2 小島スキーム⁴⁾改良)

スキーム2に皮膚毒性のリスク評価に関する小島の案を示すが⁴⁾、腐食性の危害性同定されているという前提で、培養皮膚モデルを用いて用量反応性を評価する。その後、さらに24~48時間閉塞貼布ヒトパッチテストを組み合わせ、総合的に皮膚刺激性を評価すべき提案を考えている。ただし、培養皮膚モデルで用量反応を評価できるというバリデーションはまだ実施されていない。

3 代替試験法の使い方

3.1 定量的構造活性相関 QSAR

眼刺激性も合わせ、皮膚刺激性を構造活性相関 (QSAR) で予測する多くの検討がなされ、総説がまとめられている^{11~14)}。その結果として、TOPKAT や DERECK などの化学物質の構造により皮膚刺激性を予測するソフトが紹介され、良い予測性が報告されている。ただし、これらの検索結果は偽陽性が多いという印象を持っている。スクリーニングとして、陽性となった物質の開発を中止するのではなく、注意深く今後の試験に用いるならば有用な検討材料であると考え。ただし、構造活性相関もバリデーションに関するガイドライン文書が検討されており、将来的には利用にあたって判断の根拠が必要となる。

3.2 培養皮膚モデル

ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) のバリデーションでは、培養皮膚モデルとして EPISKIN および EpiDrem を用いた試験結果が報告されている。これ以外に、

PREDISKIN も検討されたが、一次バリデーション終了後、次の段階に進めなかった¹⁵⁾。現在上記の二つのモデルは欧米で汎用されている有力な培養表皮モデルである。日本で市販されている培養皮膚/表皮モデルを表1に示す。また、日本で市販されている培養表皮/皮膚モデルの一例の病理写真を図1および図2に示す。ヒト皮膚の病理写真と比較して、角質層の厚さ、角化細胞数などで完成度は及ばないが、各社モデルに大差はない。正常皮膚と比較して経皮吸収も早く、毒性を起こしやすいようである。処理方法などである程度付加を減少させれば、皮膚刺激性スクリーニングの利用は可能と考えている。

表1 日本で市販されている主な培養皮膚モデル

キット名	タイプ	販売先
EpiDerm	表皮モデル	クラボウ
Lab-Cyte	表皮モデル	J-TEC
TESTSKIN	皮膚モデル	東洋紡
Vitrolife-Skin	皮膚モデル	ゲンゼ

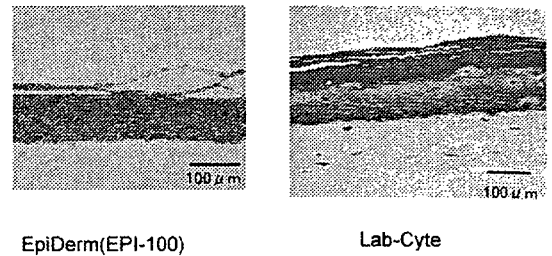


図1 培養表皮モデルの一例

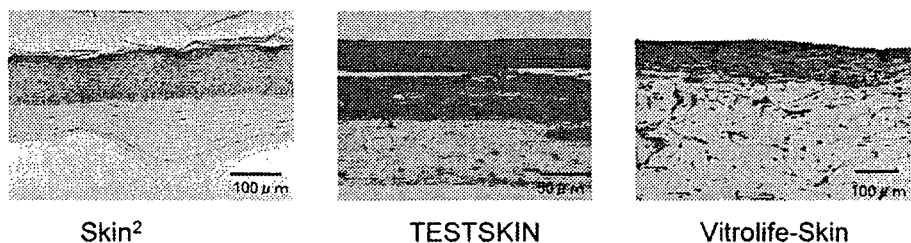


図2 培養皮膚モデルの一例

当初、ECVAM バリデーションでは、被験物質の処理時間 18 時間後の細胞生存率 50%が境界であったり、被験物質の ET50 (溶媒対照に対して 50%の細胞毒性を示す処理時間) を分母として SLS20%水溶液の ET50 を割り、その値が 0.8 以下なら陽性として *in vivo* 結果を比較する手段が取られた。しかし、これらの方法ではマネジメントチームの設定した感度、特異性、正確性のそれぞれの基準値 60%をクリアできず、処理方法の改定が行われた。

そこで、15 分間被験物質処理後、18 時間培養後の細胞生存率を指標とした検討が行われ^{16, 17)}、さらに 42 時間培養後の細胞毒性を指標とし、50%細胞毒性が認められる場合を陽性と判断する方法がもっとも良いと報告されている^{18~20)}。

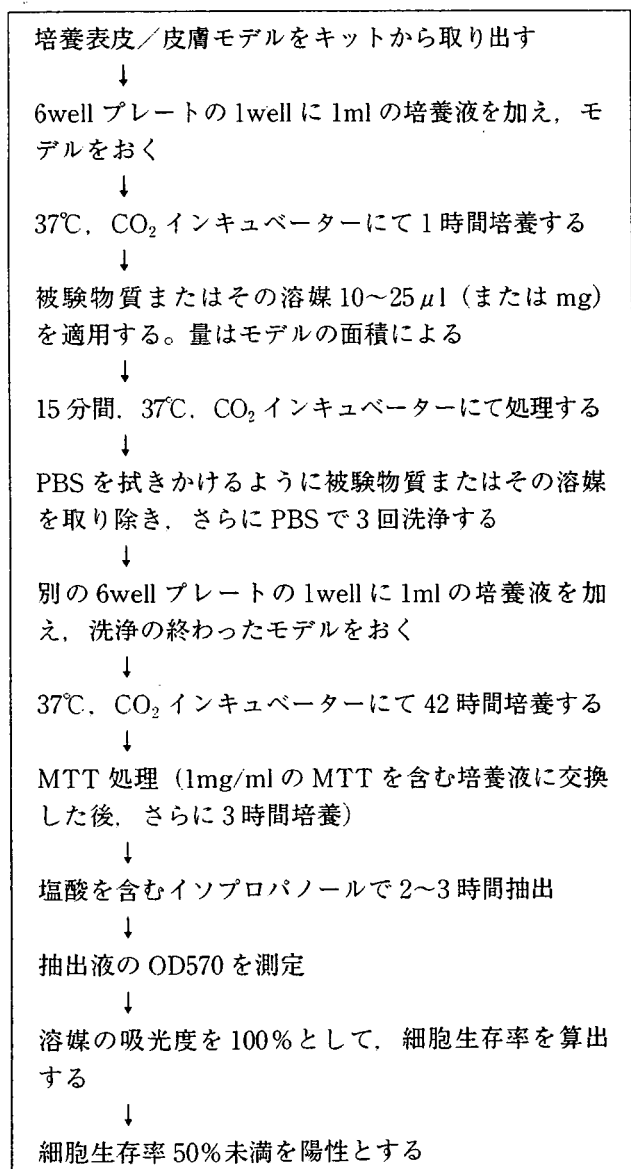
この方法で得られた結果では、EpiDerm および EPISKIN の正確性は 80%を超えていた。この値はバリデーションマネジメントチームの設定した基準値に対応できている。

日本で行ったバリデーションでは、培養皮膚モデル TESTSKIN および Vitrolife-skin を用いて ET50 を算出する方法でウサギ皮膚刺激性よりヒトパッチテスト結果とよく相関すると報告した^{21~23)}。皮膚一次刺激性試験の目的はヒトの刺激性の予測であり、ウサギの刺激性予測ではない。ウサギの結果がヒトとよく相関するならともかく、ウサギの予測率も 6 割程度であり、偽陽性が多い試験法である。その方法と

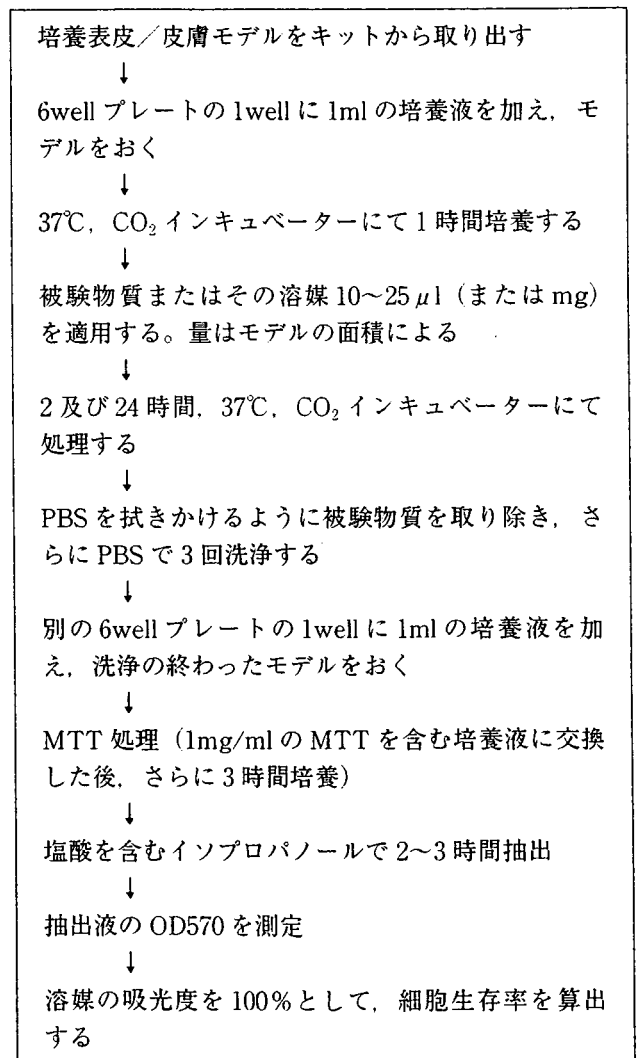
in vitro を比較してもずれは大きくなるばかりである。その結果でも偽陽性、偽陰性率は20%を超えていたが、ウサギの予測率と大差はなく、利用可能と考察した。

培養皮膚モデルも、製造先が違うモデルが存在する。この場合、バリデーションは必要となるのか。Worth 文献の中には、同様の方法を比較する場合、catch-up バリデーションが必要とされており²⁴⁾、よってモデル毎に catch-up バリデーションで十分であろう。3施設がブラインド化された10物質程度を共同研究で実施すればよいであろう²⁵⁾。得られた結果を過去のモデルと比較して再現性、予測性などに遜色ない結果が得られることが採用の条件である。

具体的方法として、良いバリデーション結果が報告されている試験手順として ECVAM バリデーションの方法と日本のバリデーション結果が報告されている試験手順として ET50 算出の方法を以下に示す。ここで得られた評価は、製品への安全性分類のための表示に使われるものである。



スキーム1 ECVAM バリデーションの方法



スキーム2 ET50 の算出方法

得られた結果から、皮膚刺激性を予測できる²⁶⁾。

- ①) 2 および 24 時間とも細胞生存率 50% 未満の場合、さらに、15、30、60 および 120 分処理を行い、ET50 を正確に算出する。または細胞毒性 < 2 時間として強い皮膚刺激性が予想される物質として分類する。
- ②) 2 時間に細胞毒性はないが、24 時間で細胞生存率 50% 未満の場合、さらに、2、4、8、および 24 時間処理を行い、ET50 を正確に算出する。または 2~24 時間の間に細胞毒性があるとして、中程度の皮膚刺激性が予想される物質として分類する。
- ③) 2 および 24 時間とも細胞生存率 50% 以上の場合、細胞毒性 > 24 時間として皮膚刺激性は極めて弱いと予想される物質として分類する。

この結果をもとに、配合濃度および安全係数を考慮しながら、被験物質およびその溶媒を用いてパッチテストを実施し安全性を確認する。お断りしておくが、この方法は最終的な評価に至っていないバリデーション委員会の私案である。

さらに、用量反応性評価を行う場合には、各種濃度の被験物質を 2 または 24 時間適用して、細胞生存率を求める。この用量反応曲線はパッチテストの反応曲線と比較して、感度が約 10~50 倍であった²⁷⁾。ただし、パッチテストでは水溶液での反応性が高いこともあり、水溶性物質による感度は数倍であった。使用時には、溶媒による注意が必要である。

3.3 摘出皮膚を用いる方法

COLIPA では、マウスの摘出皮膚を評価に用いる SIFT (the Skin Integrity Function Test) が最終的なバリデーションに移行する可能性が高い^{15, 16, 28)}。摘出した Pig Ear を用いる方法も当初提案されたが、次のバリデーション段階に進めていない¹⁵⁾。

SIFT は、ER (電気伝導度) および TEWL (角質水分蒸散量) を指標として、ER または TEWL いずれかの値が、事前測定値と比較して 5 倍以上または t 検定で 5% の危険率で有意な場合に陽性とするという予測モデルで評価する。その結果、t 検定においても偽評価の割合が高く、予測モデルの改良が必要という状況である。

日本では摘出皮膚を用いた研究は少ない。私達は摘出ウサギ皮膚を用いて皮膚刺激性を検討し、よい相関を報告しているが²⁹⁾、MTT による細胞毒性を指標としており、評価方法が SIFT と異なる。もちろん、バリデーションまでには到っていない。イメージとしても *in vitro* とはいえ、*Ex vivo* というイメージに取られ、動物の削減にはつながるが、代替法ではないという印象を持つ方が多い。確かに摘出皮膚の結果は培養皮膚モデルより予測性は高い。しかし、培養皮膚モデルの予測性が極めて悪いならともかく、ある程度培養皮膚モデルが利用できそうな昨今、摘出皮膚を用いる評価は使いにくい時代になってきたと感じている。

■ 文 献 ■

- 1) 小林敏明, 市川秀之, 板垣 宏, 皮膚毒性, 毒性試験講座7, 機能毒性学, 福原武彦・小野宏編, 地人書館, p. 268- (1989)
- 2) 「日本化粧品工業連合会編化粧品の安全性評価に関する指針2001」, 薬事日報社, pp. 1-33 (2001)
- 3) 薬事審査研究会監修, 「化粧品・医薬部外品製造申請ガイドブック第四版」, 薬事日報社 (2001)
- 4) 小島肇夫, 皮膚毒性の安全性評価, 「化粧品大全」, (株)情報機構, p. 407-416 (2006)
- 5) Commission Staff Working Documents, Time Tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC); EN, SEC82004) 1210 (2004)
- 6) OECD Revised proposal for the harmonization of hazard classification based on skin irritation/corrosion, ENV/MC/CHEM/HCL (98) 4, p. 12, Paris, OECD (1998)
- 7) Worth AP., Fentum JH., Balls M., Botham PA., Curren RD., Earl LK., Esdaile DJ. and Liebsch M., An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, *ATLA*, **26**, 709-720 (1998)
- 8) OECD guidelines for testing of chemicals, 430, Paris, OECD (2004)
- 9) OECD guidelines for testing of chemicals, 431, Paris, OECD (2004)
- 10) 山本 郁, 化学物質のハザード性と安全性評価, *ファルマシア*, **40**, 215-219 (2004)
- 11) Cronin MTD., Dearden JC., Walker JD. and Worth AP., Quantitative structure-activity relationships for human health effects: commonalities with other endpoints., *Environmental and Toxicological Chemistry*, **22**, 1829-1843 (2003)
- 12) Hulzebos EM., Maslankiewicz L. and Walker JD., Cerification of literature-derived SARs for skin irritation and corrosion, *QSAR and Combinatorial Science*, **22**, 351-363 (2003)
- 13) Patlewicz G., Rodfold R. and Walker JD., QSARs for predicting skin and eye irritation, *Environmental and Toxicological Chemistry*, **22**, 1862-1869 (2003)
- 14) Cronin MTD., Jaworska JS., Walker JD., Comber MHL., Watts CD. and Worth AP., Use of QSARs in international decision-making frameworks to predict health effects of chemical substances, *Environmental Health Perspectives*, **10**, 1391-1402 (2003)
- 15) Fentem JH., Archer GEB., Balls M., Botham PA., Curren RD., Earl LK., Esdaile DJ., Holzhutter HG. and Liebsch D., The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the management team, *Toxicol. in Vitro*, **12**, 483-524 (1998)
- 16) Zuang V., Balls M., Botham PA., Coquette A., Corsini E., Curren RD., Elliott GR., Fentem JH., Heyling JR., Liebsch M., Medina J., Rouget R., Sabdt, JJM., Wiemann C. and Worth AP., Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, *ATLA*, **30**, 109-129 (2002)
- 17) Portes P., MH. Grandidier, Cohen C. and Rouget R., Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, *Toxicol. in Vitro*, **16**, 765-770 (2002)
- 18) Kandarova H., Liebsch M., Genschow E., Gerner I., Traue D., Slawik B. and Spielmann H., Optimisation of EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation test, *ALTEX*, **21**, 107-114 (2004)
- 19) Cotovio J., Grandidier AH., Portes P., Rouget R. and Rubinstenn G., The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimization of the EPISKIN prediction model within the framework

- of the ECVAM validation process. *ATLA*, **33**, 329-349 (2005)
- 20) Kandarova H., Liebsch M., Gerner I., Elisabeth S., Genschow E. and Spielmann H. The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests- An assessment of the performance of the optimized test. *ATLA*, **33**, 351-367 (2004)
- 21) Kojima H., Shiraishi A., Andoh Y., Okazaki Y., Ozawa N., Kawabata R., Kadono K., Sozu T., Suzuki T., Tabata A., Nakano Y., Morikawa N., Horii M., Yamashita K., and Yoshimura I. Validation study for Vitrolife-Skin™, a three-dimensional cultured human skin model. I. as an alternative to skin irritation testing using ET₅₀ protocol. *Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science*, Berlin (2005)
- 22) Kojima H., Shiraishi A., Andoh Y., Okazaki Y., Ozawa N., Kawabata R., Kadono K., Sozu T., Suzuki T., Tabata A., Nakano Y., Morikawa N., Horii M., Yamashita K., and Yoshimura I. Validation study for Vitrolife-Skin™, a three-dimensional cultured human skin model. II. as an alternative to skin irritation testing using Post-Incubation (PI) protocol. *Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science*, Berlin (2005)
- 23) Kojima H., Sonoda I., Nishizawa A., Horii M., Kawabata R., Ozawa N., Suzuki T., Usami M., Ishibashi T. and Yoshimura I. Validation study for TESTSKIN™, a three-dimensional cultured human skin model. as alternatives to skin irritation testing applied to forty cosmetic substances. *Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science*, Berlin (2005)
- 24) Worth AP. and Balls M. The principles of validation and the ECVAM validation process. *ATLA*, **30** Suppl 2, 15-21 (2002)
- 25) Kandarova H., Liebsch M., Schmidt E., Genschow E., Traue D., Spielmann H., Meyer K., Steinhoff C., Tornier C., Wever B. and Rosdy M., Assessment of the skin irritation potential of chemicals by using the Skin Ethic reconstructed human epidermal model and the common skin irritation protocol evaluated in the ECVAM skin irritation validation study. *ATLA*, **34**, 393-406 (2006)
- 26) Kojima H., Considerations regarding the importance of *in vivo* data for the development of an alternative to conventional skin irritation testing. *AATEX*, **11**, 1, 31-38 (2005)
- 27) Kojima H., Ishii I., Nakata S. and Konishi H., Dose-response evaluation using an epidermal model. an alternative to skin irritation testing. *AATEX*, **11**, 3, 177-184 (2006)
- 28) Heyling JR., Diot S., Esdaile DJ., Fasano WJ., Manning LA. and Owen HM., A prevalidation study on the *in vitro* skin irritation function test (SIFT) for prediction of acute skin irritation *in vivo*: results and evaluation of ECVAM Phase III. *Toxicol. in vitro*, 123-138 (2003)
- 29) 小島肇夫, 森 栄治, 花村朝夫, 佐々木哲二, 真鍋幸子, 丹野和信, 堅田友則, 小西宏明. 抽出皮膚培養キットを用いた皮膚一次刺激性試験代替法. *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **30**, 402-409 (1996)

第1章 代替法における工学的新技術の可能性

1 代替法国際動向から見た新技術導入の可能性

小島肇夫*

1.1 動物実験代替法における新技術導入の目的

バイオマテリアルにかかわらず、動物実験代替のために新技術を開発する目的としては、薬効開発や安全性評価に動物実験ができなくなるという国際情勢への対応、動物飼育施設が手近でないこと、研究分野を極めるうちに特許を取った、あるいは安全性を極める方法を開発し、受託で商売を始めたい、学問を極めたいなどが挙げられる。これらの目的を適えるための試験法公定化までの道筋を、以降に説明していきたい。

1.2 試験法の公定化

試験法の特許が取れ、これを使えば薬効や安全性評価に有用という方法が開発できたとする。ところが、多くの研究者に使って頂く為、少なくとも安全性評価に用いる試験法には行政による認証、公定化が必要である。単なるスクリーニングであり、自施設のみで用いる場合もあるが、それでは安全性の評価を客観的に行っていることにはならない。施設内ではともかく、社会的には認証されない。

論文も複数あり、専門家の間では高く評価されていたとしても本当に優れた試験であることを保証するための第三者評価が必要となる。これがバリデーションや Peer Review（専門家による第三者評価）である。これまでの筆者の経験では優れた方法が開発されたとしても、バリデーション結果から、バラツキが大きかったり、施設間の再現性がないケースを数多く経験している。決められたプロトコルを用い、技術的に訓練された研究者が精度よく、再現性のある試験結果が求められる試験法が良い方法である。図1に示すように、国際的な新規安全性試験法の認証システムが OECD ガイダンス文書^{1,2)}で決められており、試験法が公定化されるためには、調査・研究開発から始まってバリデーション、専門家による第三者評価が必要である。一試験が評価を終え、ガイドラインに認められるためには順調に進んでも10年かかると言われており、多大な時間と経費が必要である。その過程を経てなおかつ開発時の輝きを失わない試験方法が公

* Hajime Kojima 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
新規試験法評価室 室長

定化される。

1.3 バリデーション

1.3.1 動物実験代替法センターの設立

社会的なニーズもあり、1990年代の後半、欧州に ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)、米国には NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) が設立され

た。いずれも動物実験代替法バリデーションセンター (Center for the Validation of Alternative Methods : CVAM) という。日本でも 2005 年に国立医薬品食品衛生研究所内に JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) が設立された。これらのセンターの業務は読んで字のごとく、動物実験代替法のバリデーションである。新規動物実験代替試験法の公定化のために必要なバリデーションの結果を求める機関である。JaCVAM を除く 2 機関は企業から試験法のバリデーション、第三者評価の依頼を受け、試験法マネジメントチームを立ち上げバリデーション研究を実施する。このようなシステムが国際的な試験法開発のルールとなりつつある。よって、試験法の公定化のためには、これらの CVAM にバリデーション、評価を依頼すればよい。一方、JaCVAM は厚生労働省の一研究所の一研究室であることから、企業からの委託研究を受けられない。バリデーション研究は日本動物実験代替法学会などの専門家集団に依頼している状況である。

1.3.2 バリデーションでの必須事項

試験法のバリデーション研究を実施するにあたり重要な問題、クリアしなければならない問題を列記しておきたい。

まず、試験法がバリデーションをするに値するものかという成立基準が存在する。

- ① 作用機構および機能、既存の標的臓器が明確
- ② 最小限の対照物質が明確
- ③ 適性かつ信頼性を確認できるデータの所在

この成立基準を満たした試験法についてバリデーションで明らかにすべきものを OCED の GD (Guideline Document) 34 から引用すると¹⁾、以下の 3 点が要素として挙げられる。

- ① 施設内、施設間の再現性 (信頼性)
- ② データの質

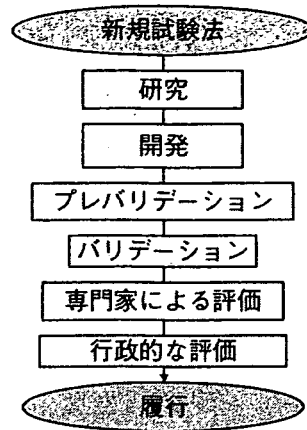


図1 試験法バリデーションのプロセス²⁾

③ 適性（感度，特異度，正確度，陽性の予測性，陰性の予測性，有用性，限界など）

そこで、この3要素を満たすために行うバリデーションに必要なものを挙げる。規制のためのリスクを評価する目的でバリデーションする新試験方法、あるいはこれまでの試験法の改良では以下のバリデーション基準を満たさねばならない。これらの基準はもちろん、方法や目的によりある程度変わる。しかし、その目的にあった試験法の評価とデータベースが一致しなければいけない。なぜなら、試験法は異なった目的、組織（規制当局）、物質の分類によりケースバイケースで異なるからである。よって、この基準は試験法バリデーションの規制の受入れのために欠くことができないものである。

<バリデーションの基準>

- ① 科学のおよび規制上の合理性
- ② 指標の生物学的な意義
- ③ 詳細な試験計画
- ④ 再現性（施設内，施設間再現性）
- ⑤ 対照物質の存在
- ⑥ 適性を見極められる情報とデータ
- ⑦ GLP（Good Laboratory Practical）に準拠したデータ
- ⑧ すべてのデータおよび詳細な試験計画が公開され、利用できること

1.4 第三者評価（Peer Review）

さらにバリデーションが終了しても、専門家による第三者評価（Peer Review）が必要となる。評価を実施するためには、試験法の開発やバリデーションに関与しない第三者の試験法、統計、バリデーションの専門家が必要である。表1に示すように、米国ではNICEATM、欧州ではECVAMがその専門家を集めて評価を委託する。日本にはJaCVAMがこれに当たっている。これら機関の仕事は評価に必要な資料を作成し、会議を運営し、評価文書を纏め上げることである。Peer Reviewの評価項目を以下にまとめておく。

- ① 科学的，規制の上での妥当性
- ② 試験プロトコルの構成の妥当性
- ③ バリデーションに用いられた物質の分類
- ④ 試験法の正確性を評価する物質の *in vitro* および参照データ
- ⑤ バリデーションデータと結果
- ⑥ 試験法の正確性
- ⑦ 試験法の信頼性

表1 日米欧の各段階における中心機関

	バリデーション	専門家による評価の世話役	行政受入れの評価
米国	NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)	NICEATM	ICCVAM (Interagency coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)
欧州	ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)	ECVAM	ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)
日本	学会 (日本動物実験代替法学会など)	JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)	JaCVAM 評価会議

- ⑧ データの質
- ⑨ 他の科学的な報告
- ⑩ 3Rs への関与
- ⑪ 試験法の有用性と限界
- ⑫ 文献
- ⑬ 別添資料

1.5 行政的な受入れ

バリデーションや専門家による第三者評価を経ても、試験法は自動的に行政に受入れられる訳ではない。規制受入れのためには、以下の基準を満たしている必要がある。この評価を欧州では ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee), 米国には ICCVAM (Interagency coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) が行っている²⁾。日本では JaCVAM 評価会議がこれに当たっている。

- ① 専門家による科学的な評価
- ② 試験計画や標準作業手順書
- ③ 既存の試験法との関係
- ④ 化学物質の十分なデータ
- ⑤ 試験法がリスク評価に有用
- ⑥ 試験法の限界が明確
- ⑦ 頑強 (若干の変更による影響を受けない) かつ習得が容易

- ⑧ 時間と経費の削減
- ⑨ 同様の試験と調和
- ⑩ 試験法が安定
- ⑪ 動物実験の3Rs (reduction : 削減, refinement : 苦痛の軽減, replacement : 置き換え) に合致

1.6 おわりに

以上のように、試験法が行政的に受け入れられるためにはある程度の段階を踏まねばならない。一つひとつの段階は一施設で実施できるような簡単なものではない。そこで繰り返しになるがそれらのまとめ役として国際的な機関、施設が作られた訳である。

人類の進歩のためには新技術の導入は不可欠である。バリデーションや専門家による第三者評価の検証システムを人類は考え出した。その点をよく理解頂き、CVAMを利用してバイオマテリアルの分野においても素晴らしい有益な試験法を開発して頂きたいと願うばかりである。

文 献

- 1) OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO(2005) 14
- 2) ICCVAM (1997) Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods : a report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. NIH Publication No: 97-3981, (1997), National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)

生命科学の未来を考える

Biophilia

季刊 ビオフィリア

10

Vol.3 No.2 2007

別刷

株式会社アドスリー

〒164-0003 東京都中野区東中野 4-27-37 TEL: 03-5925-2840 FAX: 03-5925-2913

E-Mail: info@adthree.com URL: <http://www.adthree.com>