

スクリーニングパッチテスト陽性所見 (72時間判定)

3種類の口紅 (口紅 A, B, C), およびエステルガム 2%pet. が陽性であった。

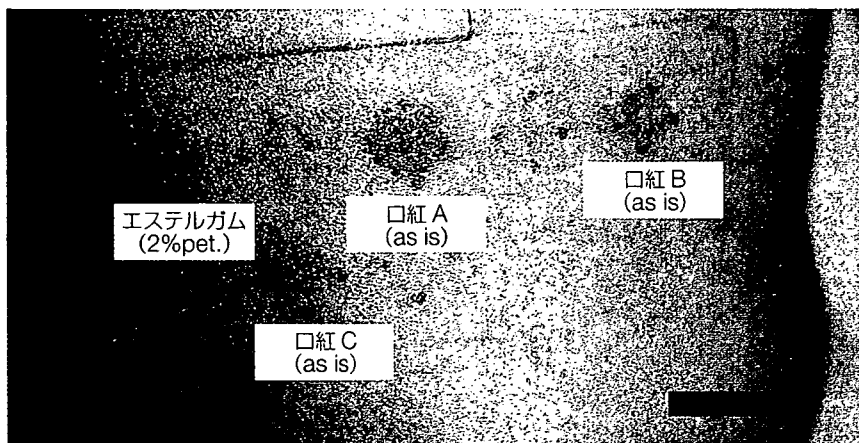


表1 スクリーニングパッチテスト結果

試料	濃度 / 基剤	48 時間	72 時間	1 週間
口紅 A	as is	+?	++	++
口紅 B	as is	-	+	+
口紅 C	as is	-	+	+
エステルガム	2%pet.	+?	+	+

(ICDRG 基準)

口紅 A, B の成分パッチテスト陽性所見 (1週間判定)

リンゴ酸ジイソステアリル (30%pet.), エステルガム・ミリスチン酸オクチルドデシル 混合 (1%pet.) が陽性であった。

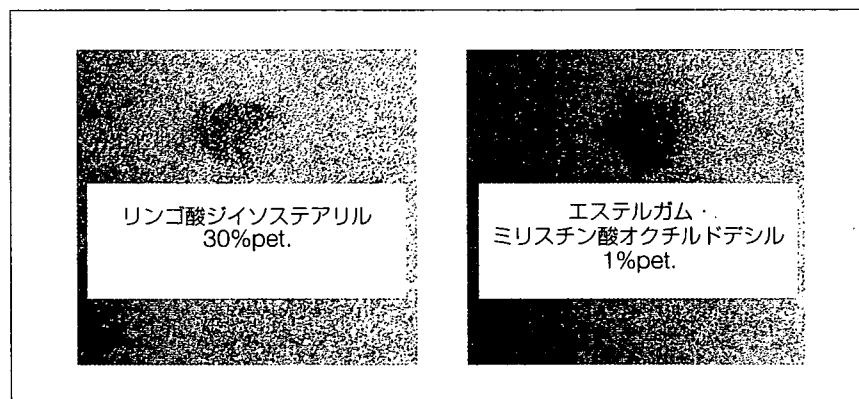
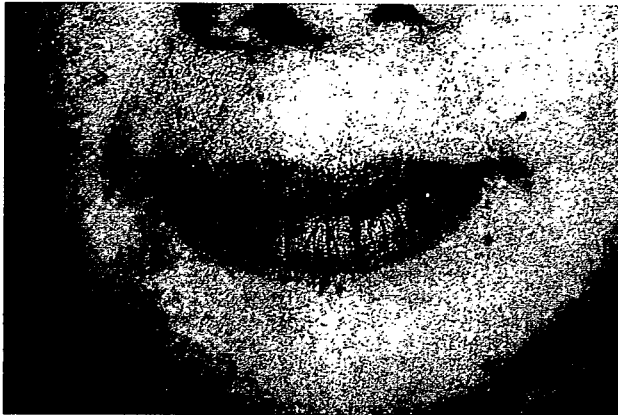


表2 成分パッチテスト結果

試料	濃度 / 基剤	48 時間	72 時間	1 週間	
口紅 A・B	リンゴ酸ジイソステアリル	30%pet.	-	+	+
	エステルガム・ミリスチン酸オクチルドデシル	1%pet.	-	+	++
	//	0.1%pet.	-	+	+
	そのほかの成分		-	-	-
口紅 C	リンゴ酸ジイソステアリル	30%pet.	-	+	++
	そのほかの成分		-	-	-

(ICDRG 基準)

## case 15 口紅



軽快時の臨床所見  
軽度の色素斑を残し、症状は軽快している。

## 生活指導

口紅の主な成分は油性基剤、着色料、香料、酸化防止剤である。油性基剤として、ヒマシ油が汎用されていたが、ヒマシ油に含まれるリシノール酸が感作性を有することが報告された<sup>2)</sup>。そこで、ヒマシ油の代替原料として、合成分岐脂肪酸エステルが使用されるようになった<sup>2)</sup>。

リンゴ酸ジイソステアリルは、イソステアリルアルコールとリンゴ酸のジエステルであり、口紅のようなスティック状製品、ファンデーション、クリームなどに使用される<sup>3)</sup>。これまでに、口紅、リップクリームなどに含まれたリンゴ酸ジイソステアリルによる接触皮膚炎が報告されている<sup>4)</sup>。

エステルガムは、主にアビエチン酸のトリグリセリドで構成される<sup>5)</sup>。膜の耐水性を強化するために、ニスやラッカーなどに配合され、また、チューインガムの基剤として用いられている<sup>5)</sup>。口紅にはつやだし成分として配合されており<sup>6)</sup>、これまでに、口紅<sup>6)</sup>、ファンデーション、プラスター剤、絆創膏などに含まれるエステルガムによる接触皮膚炎が報告されている<sup>7)</sup>。

本症例は、ステロイド外用薬にて加療後、リンゴ酸ジイソステアリル、エステルガムを含まない口紅の使用を指導したところ、軽度の色素斑を残し症状は軽快し、再発を認めていない。

2001年から日本では、化粧品は全成分表示になっているため<sup>8)</sup>、原因アレルゲンを確定できた場合は、成分表示を確認し、化粧品を選択することが可能である。代替品を安全に選択するために、成分パッチテストは有用であると考えた。

本例は第25回日本接触皮膚炎学会総会・学術大会(2000年、名古屋市)において報告した。

## 文献

- 1) De Groot AC: Patch testing: Test concentrations and vehicles for 3700 chemicals, 2<sup>nd</sup> ed., Elsevier Science, Netherlands, 1994
- 2) 関永博人ほか: 香粧会誌 16: 1, 1992
- 3) 光井武夫ほか: 新化粧品学 第2版, 南山堂, 東京, p.144, 2001
- 4) Sugiura M et al: Environ Dermatol 8: 6, 2001
- 5) (財)日本公定書協会編: 化粧品原料基準 第2版 注解I, 薬事日報社, 東京, p.123, 1984
- 6) 荻野泰子ほか: 皮膚 31 (増6): 180, 1989
- 7) 日本接触皮膚炎学会研究班: 皮膚 33 (増11): 177, 1991
- 8) 光井武夫ほか: 新化粧品学 第2版, 南山堂, 東京, p.331, 2001

## Key words

口紅, リンゴ酸ジイソステアリル, エステルガム

## 曾和 順子 Sowa, Junko

大阪市立大学大学院医学研究科皮膚病態学  
〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3  
E-mail: jsowa@med.osaka-cu.ac.jp

## 鈴木 加余子 Suzuki, Kayoko

刈谷豊田総合病院皮膚科  
〒448-8505 刈谷市住吉町5-15

## 鷺見 康子 Washimi, Yasuko

藤田保健衛生大学医学部皮膚科  
〒470-1192 豊明市沓掛町田楽ヶ窪1-98

## 松永 佳世子 Matsunaga, Kayoko

藤田保健衛生大学医学部皮膚科

# 日本における動物実験代替法の開発動向

小島 肇 夫

**Abstract** : Considering international trend to safety testing of cosmetic ingredients and finished products, I surmised about a present alternative to animal testing such as skin irritation, skin sensitization, ocular irritation, phototoxicity, acute oral toxicity and genotoxicity. The validation studies of any method in these tests are over or in progress, and various tests may be replaced *in vitro* test in future. However, test methods are not at all much under development. I expect much basic or applied works on alternative to animal testing by a lot of researchers.

**Key words** : alternative, validation, safety testing, *in vitro*

## 1. はじめに

国際的な試験法公定化の合意事項により、動物実験代替法の開発に係らず、新規試験法を確立するためには図1に示すような試験法の研究・開発後、バリデーション、第三者評価、行政的な受入れという段階を経なければならない<sup>2)</sup>。よって、試験法を開発して論文、特許を作成したとしても、その時点ではこの試験法を用いた安全性評価は公的には何の意味もない。試験法の公定化には10年の時間と多くの経費を要するとも言われており、極めて骨の折れる作業である。この評価にあたる作業を実施する部署として、2005年11月に国立医薬品食品衛生研究所、安全性生物試験研究

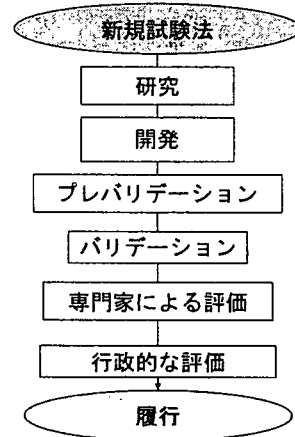


図1 試験法バリデーションのプロセス<sup>2)</sup>

センター内に新規試験法評価室が設立された。この部署は国際的にはJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) と名乗り、図2に示すような国際協調の窓口として、新規試験法のバリデーションや第三者評価を担当している<sup>3)~6)</sup>。

バリデーションや第三者評価はシステム化されつつあるが<sup>7)</sup>、研究・開発される試験法のパイには限りがあるという大きな問題点がある。現在、確立された動物実験代替試験法の数は少なく、検討されている試験法も多くはない。もっと多くの試験法が研究・開発されなければならないし、仮

“Development for Japanese alternative to animal testing.”  
 Hajime Kojima (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), Div. of Pharmacology, National Center for Biological Safety Research, National Institute of Health Sciences, 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-158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)



1982年岐阜大学農学部農芸化学科卒業、同年日本メナード化粧品(株)入社、1983~1985年国立遺伝学研究所留学、1996年長崎大学薬学部博士号取得、現在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。

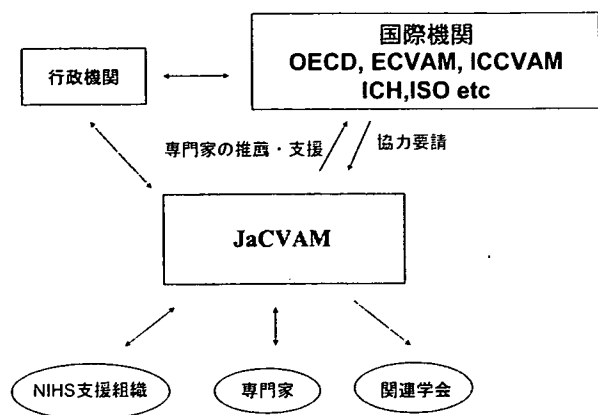


図2 JaCVAMの国際協調

に確立された試験法でも見直しや改良が必要である。このような視点で、化粧品の安全性評価における各試験法について現在の進捗を列記して、新規試験法開発の可能性を以下に挙げていきたい。

## 2. 皮膚刺激性試験

### 2-1. 現状

欧州では3次元培養皮膚モデルなどを用いた皮膚刺激性試験代替法への取り組み、主にバリデーション研究が長年に渡り実施されてきた。その結果として、2007年4月、ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) は3次元培養表皮モデルであるEPISKINを用いた皮膚刺激性の評価を承認した<sup>9)</sup>。ESACとは欧州動物実験代替法センター：ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) のアドバイ

ザー機関であるとともに、ECVAMでバリデーションが終了した試験法の第三者評価を行う機関である<sup>9)</sup>。約10年に渡り、欧州で行われてきた皮膚刺激性試験代替法バリデーションおよび試験法改良の成果が第三者専門家により評価されたことになる<sup>10)・16)</sup>。頭の整理のために、日米欧のバリデーションや第三者評価の世話役、行政的受け入れの評価機関、それぞれの顧問会議を表1にまとめた。以下、ICCVAM (Interagency coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) という用語も出てくるが<sup>2)</sup>、表1でこの何を行う機関であるかを確認してほしい。

### 2-2. 問題点

ECVAMでバリデーションされた3次元培養皮膚モデルはEPISKINのみではない。EpiDermもバリデーションされたが<sup>14)・15)</sup>、残念ながらESACの基準をクリアできなかった。さらに、マウス摘出皮膚を用いた方法もバリデーションされたが<sup>13)</sup>、途中段階で脱落している。

日本でも日本製の3次元培養皮膚モデルTEST-SKINやVitrolife-Skinを用いて2002～2003年に皮膚刺激性試験代替法のためにバリデーション研究が実施された<sup>17)・19)</sup>。残念ながらその結果が論文にされていないこともあり、日本のバリデーション結果は国際的には評価されていない。しかし、化粧品の2009年問題という化粧品の開発・販売に動物実験を使えなくなるというEUの規制は日本でも他人事ではなく、日本製モデルを用いたバ

表1 日米欧の各段階における中心機関

	バリデーション	第三者評価の世話役	行政受入れの評価	顧問会議
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)	SACATM (Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods)
欧州	ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)	ECVAM	ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)	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	JaCVAM顧問会議

リレーションや、動物実験代替法を用いた安全性評価のあり方を検討しなければいけない時期になってきている。

### 2-3. 新規試験法の開発

急いで検討すべき点は日本で市販されている3次元培養皮膚モデルのバリデーションである。これを実施しなければ、これから数年は日本で皮膚刺激性の評価に利用できるモデルはEPISKINのみに絞られる。

3次元培養皮膚モデルはヒトの皮膚を用いている点、濃度依存的な反応も評価できるという報告もあることから<sup>20)</sup>、今後も皮膚刺激性評価の中心であり続けると思われる。しかし、EPISKINの評価法は細胞毒性の評価に加えて、インターロイキン-1 $\alpha$ の増加を加味して評価するという点で<sup>8)</sup>、その組み合わせ理由が不明確であり、数字合わせの意図も汲み取れる。よって、より作用機構に立脚した評価手法の開発も急務と考えられる。さらに、3次元培養皮膚モデルも皮膚や表皮の構造は呈しているものの、病理学的および経皮吸収的にも未熟であり改良の余地が多い。他の細胞を組み込んだモデルの検討や、より頑強で寿命の長いモデルの開発など課題は山積している。

残念ながら、その他試験法で3次元培養皮膚モデルを上回る試験材料は見当たらないが、摘出皮膚などの利用だけでなく、視点を変えた方法の出現を期待したい。

## 3. 皮膚感作性試験

### 3-1. 現状

表2に示すように、すでにOECDガイドラインに掲載されており、汎用されてきたモルモットを

用いたMaximization testに変わる方法としては、Local Lymph Node Assay (LLNA)がある<sup>21)</sup>。この方法は放射性物質を使用することから、放射性物質を用いない方法の開発が期待されている。現在日本などでバリデーションが終了しているLLNA-DA (ATPの取り込みを指標とする)<sup>22)</sup>、または進行中であるLLNA-BrdU (BrdUの取り込みを指標とする)<sup>23)</sup>のバリデーション結果が第三者評価で認められればさらに使用が広がる可能性が高い。

ヒトリンパ球細胞株THP-1細胞を用いて特定抗原の挙動を追うh-CLAT<sup>24)</sup>、<sup>25)</sup>、ペプチド結合試験<sup>26)</sup>、構造活性相関なども多くの研究やプレバリデーションが実施されており、今後に期待のできる試験法が多い。

### 3-2. 問題点

*In vitro*試験法を利用して感作性を評価する場合に、関係者間で合意を得ておかねばならない問題点は、有害性の同定に絞ることである。動物試験では感作性の成立、確認までには種々の段階を経ることから、代替法ではその過程でみられる暴露評価、濃度依存性などのリスク評価は考慮しないというコンセンサスが重要である。どのような薬効の高い化粧品原料であっても、陽性と判断された場合には以後の開発を断念するのであれば、今後実施されるバリデーションを経て*in vitro*試験法が公定化される日は遠くないであろう。

ただし、これは化粧品原料に限定される話であり、明確な効果と毒性に関連性が高い医薬品、農薬や抗菌剤には該当されない。LLNAのさらなる改良、データベースの構築が重要であろう。

表2 OECDガイドラインになっている動物実験代替法<sup>20)</sup>

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

### 3-3. 新規試験法の開発

将来のリスク評価のために、ランゲルハンス細胞を組み込んだ3次元培養皮膚モデルの検討も進んでいる。まだ試験法の輪郭さえ明確でない状態であるが、幹細胞研究の進歩やさらなる培養液の改良の末、よい評価モデルが発表されることを期待している。

## 4. 眼刺激性試験

### 4-1. 現状

厚生労働科学研究班と日本化粧品工業連合会のバリデーション研究の結果、培養細胞を用いた試験法がガイダンス提案されてから10年になるうとしている<sup>27)</sup>。ICCVAMやESACでウサギやニワトリの摘出眼球試験、牛の摘出角膜試験、受精鶏卵試験などが第三者評価され、スクリーニングとして有用とされている<sup>28)</sup>。培養細胞系の評価もESACで始まろうとしている。

### 4-2. 問題点

培養細胞を用いた試験法は、10%水溶液の化粧品原料の眼刺激性を予測できるという点で、有害性の同定試験法であると考えられる。しかし、化粧品原料に求められる安全性は事故による暴露評価、濃度依存性などのリスク評価であり、有害性の同定ではない。この食い違いが試験法の普及の妨げになっている。他の摘出試験により濃度依存的な評価は可能であるが、日本で研究者が少なく、データの蓄積がない。受精鶏卵試験は厚生労働科学研究班と日本化粧品工業連合会のバリデーションでやや評価が低かった<sup>27)</sup>。スクリーニングとしてどこまで優秀か検討の余地があると考えている。

### 4-3. 新規試験法の開発

3次元培養ヒト角膜モデルを用いた評価、摘出角膜モデルや培養細胞への短時間処理などの開発が進んでいる。目的は濃度依存的な毒性の検出である。さらに、これらを用いて、傷害の回復までも評価できればそのモデル利用の可能性は広がると思われる。この視点を明確にした方法の開発が進むことを期待している。

## 5. 光毒性試験

### 5-1. 現状

表2に示すように、Balb 3T3細胞を用いるニュートラルレッド取り込み試験がOECDガイドラインにも掲載されている<sup>29)</sup>。日本でも評価を行い検証したが<sup>29)</sup>、この試験法は有害性の同定に有用であると判断された。しかし、非水溶性物質の評価がしづらいという問題点もあることから、資生堂グループは酵母膜破壊試験および赤血球溶血試験を組み合わせた方法の提案をしている<sup>30)~32)</sup>。これら方法のバッテリーのバリデーションが日本動物実験代替法学会により終了し、現在、JaCVAMで評価を実施している。

### 5-2. 問題点

*In vitro* 試験法を利用して光毒性を評価する場合に関係者間で合意を得ておかねばならない問題点は、有害性の同定に絞ることである。紫外部に吸収のある原料のみ試験を実施し、光毒性の過程でみられる暴露評価、濃度依存性などのリスク評価は考慮しないという業界内でのコンセンサスが重要である。どのような薬効の高い化粧品原料であっても、陽性と判断された場合には以後の開発を断念するのであれば、現在の試験法で当面は十分である。

ただし、これは化粧品原料に限定される話であり、明確な効果と毒性に関連性が高い医薬品、農薬や抗菌剤には該当されない。培養皮膚モデルの利用や改良など、濃度依存性を評価できる試験法の開発が望まれる。

## 6. 単回投与毒性試験

### 6-1. 現状

欧米などによるバリデーション研究を経て、2006年、細胞毒性試験における第三者評価がICCVAMで実施された<sup>33)</sup>。細胞毒性のIC50(50%の細胞が死滅する薬剤の濃度)で単回の経口投与による毒性を予想できるというものである。

### 6-2. 問題点

培養細胞を用いた試験法は、単回投与毒性を予測できるという点で、有害性の同定試験法である

と考えられる。化粧品原料に求められる安全性は事故による暴露評価であり、有害性の同定ではない。これらの評価は、化学物質全般に当てはめるべきであり、化粧品に特定すべきではない。まず化学物質の有害性同定に細胞毒性試験が有用であるか否かを評価しなければいけないと考えている。

## 7. 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験についてはすでにエイムス試験、染色体異常試験という *in vitro* 試験で問題があった場合にのみ、*in vivo* 小核試験が行われてきた<sup>34)</sup>。現在でも私の知る限り、どちらかで陽性の場合には開発を断念する企業が多いと聞いている。よって、*in vivo* 小核試験の代替の必要があるかはなはだ疑問である。むしろ、擬陽性がでやすいと言われる染色体異常試験の再検討が必要であろう。マウスリンフォーマ試験や *in vitro* 小核試験<sup>21)</sup> の利用は古くて新しい問題であり、OECDやICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: 日米EU医薬品規制調和国際会議) などで検討が進んでいる。どのような試験法の選択やバッテリーの可能性に対応できる準備をして頂きたいものである。

## 8. おわりに

以上、試験法ごとに現状、問題点、新規試験法の開発状況についてまとめた。「はじめに」にまとめたように、我々が利用できる動物実験代替試

験法のパイは多くない。バリデーションや第三者評価も大切であるが、もっとも大切なことは新規試験法の開発、既存試験法の見直しである。もっと多くの研究者にこのフィールドに参画して頂きたいと考える。

安全性評価グループのスタッフはどの企業も多くないことは十分に承知している。しかし、既存試験法を用いて原料や製品を評価するだけでは、毎日がいかにも味気ない。研究者の質も上がらない、モチベーションを維持できない。企業として、ルーチンワークにプラスオンして、新規試験法の開発や既存試験法の改良に取り組みせることが安全性評価グループの質の向上につながると信じている。企業の研究所や安全性評価グループ統括者には是非、そのようなゆとりを彼らに与えて頂きたい。そして新規試験法の開発や既存試験法の改良に挑戦させてほしい。その後の支援はJaCVAMが行う。必ず、その取り組みは企業の安全・安心担保に帰っていくと信じてやまない。

## 参考文献

- 1) 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 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)

## 植物性スクワラン オリーブスクワラン

皮膚にやさしい・さっぱり感・相溶性親和性良

安定性良・無色・無臭・透明油

IWASE  
COSFA

<http://www.cosfa.co.jp>

輸入発売元 **岩瀬コスファ株式会社**

大阪: Tel.06-6231-3456 東京: Tel.03-6202-2345

- (1997)
- 3) 大野泰雄, 国立衛研報, **122**, 1~10 (2004)
  - 4) 大野泰雄, *Fragrance Journal*, **33**(2), 30~35 (2005)
  - 5) 小島肇夫, *J. SCCJ*, **40**(4), 263~268 (2006)
  - 6) 小島肇夫, 日皮協ジャーナル, **57**, 129~134 (2007)
  - 7) 小島肇夫; *Cosmetic Stage*, **1**(6), 1~3 (2007)
  - 8) ECVAM statement, <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>
  - 9) Worth, A.P., Balls, M., *ATLA*, **29**(5), 525~535 (2001)
  - 10) Botham, P.A. et al., *ATLA*, **26**, 195~211 (1998)
  - 11) Fentem, J.H. et al., *Toxicology in vitro*, **15**, 57~93 (2001)
  - 12) Zuang, V. et al., *ATLA*, **30**, 109~129(2002)
  - 13) Heylings J.R. et al., *Toxicology in Vitro*, **17**, 123~138 (2003)
  - 14) Kandárová, H. et al., *ALTEX*, **21**, 107~114 (2004)
  - 15) Kandárová, H. et al., *ATLA*, **33**, 351~367 (2005)
  - 16) Cotovió, J. et al., *ATLA*, **33**, 329~349 (2005)
  - 17) Kojima H. et al., Validation study for Vitrolife-Skin™, a three-dimensional cultured human skin model, I, as an alternative to skin irritation testing using ET<sub>50</sub> protocol, Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin (2005)
  - 18) Kojima H. et al., Validation study for Vitrolife-Skin™, a three-dimensional cultured human skin model, II, as a alternative to skin irritation testing using Post-Incubation (PI) protocol, Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin (2005)
  - 19) Kojima H. et al., Validation study for TEST-SKIN™, 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)
  - 20) Kojima H. et al., *AATEX*, **11**(3), 177~184 (2006)
  - 21) Chemicals Testing: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals - Sections 4: [http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en\\_2649\\_34377\\_2\\_349687\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2_349687_1_1_1_1,00.html)
  - 22) Yamashita K. et al., *AATEX*, **11**(2) 136~144 (2005)
  - 23) Takeyoshi M. et al., *Toxicol. Lett.*, **119**, 203~208 (2001)
  - 24) Ashikaga, T. et al., *Toxicology in Vitro*, **20**, 767~773 (2006)
  - 25) Sakaguchi, H. et al., *Toxicology in Vitro*, **20**, 774~784 (2006)
  - 26) Kato H et al., *J Toxicol Sci.*, **28**(1), 19~24 (2003)
  - 27) Ohno Y. et al., *Toxicology in Vitro*, **13**, 73~98 (1999)
  - 28) [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox\\_docs/EPreport/ocu\\_report.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/EPreport/ocu_report.htm)
  - 29) Ohno Y., *AATEX*, **10**(2), 54~157 (2005)
  - 30) Sugiyama M. et al., *AATEX*, **2**, 183~191 (1994)
  - 31) Sugiyama M. et al., *AATEX*, **2**, 193~202 (1994)
  - 32) Mori M. et al., *AATEX*, **10**(1), 1~17 (2003)
  - 33) [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv\\_nru\\_tmer.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_tmer.htm)
  - 34) 厚生省薬務局審査課監修医薬品非臨床試験ガイドライン解説1997, 薬事日報社 (1997)

# SANYO

信頼される原料総合商社を目指して!

- ◇水溶性コラーゲン(魚由来)
- ◇高機能天然ケイ酸アルミニウム
- ◇植物・海藻由来成分
- ◇天然油脂                   ...etc

**株式会社 三陽商会**

〒103-0023 東京都中央区日本橋本町3-6-11アイケビル

Tel: 03-3663-2060 Fax: 03-3663-2075

<http://www.k-sanyo.com/>



## 動物実験代替法のバリデーション

Validation for the Alternative Methods

小島 肇夫 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 新規試験法評価室 室長

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1, Tel & Fax 03-3700-9874, E-mail : h-kojima@nihs.go.jp

### 1 動物実験代替法確立のプロセス

昨今、動物実験代替法に関わらず、新規試験法を確立するためには国際的な合意が得られているプロセスを踏まねばならない。まず、ある試験法が開発され、論文に掲載されただけでなく、バリデーションが必要である。バリデーションも段階があり、プレだけではなく、正式なバリデーションが求められる。この後に第三者の専門家による評価および、行政的受入れのための評価が必要である。簡単なフローを図1に示すが、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。

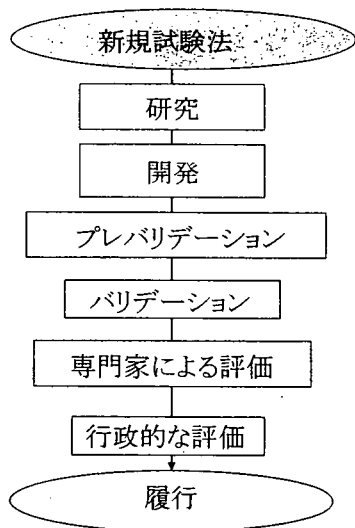


図1 試験法バリデーションのプロセス<sup>2)</sup>

試験法の確立のためには、3つの試験法の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、図2に示す組織を作り、バリデーションを実施する。

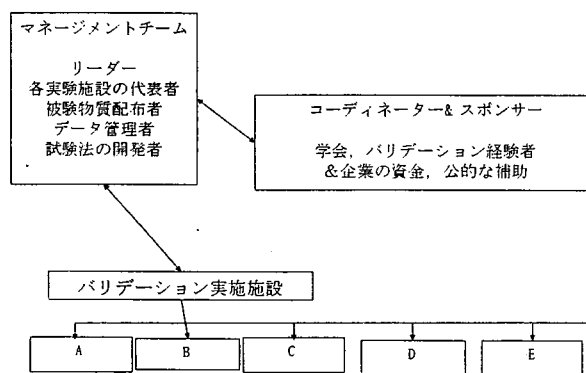


図2 バリデーション組織(例)

バリデーションで明らかにするべきものを OECD のガイダンス文書 GD34 から引用すると<sup>1)</sup>、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
- 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)

### 2 バリデーションに必要な要素

上記の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以下に挙げ、これまでの経験をもとに説明を加えたい。

## 2.1 バリデーションマネジメントチーム

図2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である。この組織には優秀な専門家を揃えなければならない。試験の成立基準を確認し、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。参加施設の代表を加える場合もあるが、その場合には以下のコンサルタントグループを別個に作る必要がある。

被験物質の選定、コード化、配布などを行う被験物質グループ、データの処理や評価を行う統計解析グループなどがコンサルタントグループである。

## 2.2 参加施設

試験法やGLP基準を把握している研究者がいる、またはGLP対応試験ができる複数の参加施設である(最低3施設)。GLP適合施設での実施が望ましいが、試験をGLP準拠で行えなくとも、GLP基準の精神や内容を把握している施設であれば参加できる。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られることが多い。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、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ジメントチームを作り、参加施設を公募して、バリデーションを開始する前にすべきことがある。資金の確保である。バリデーションの実施には費用がかかる。企業のスポンサー、参加施設の資金的な協力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思うようにならない。

## 2.4 計画および公式プロトコール

試験スケジュールの明確化、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、若干の試験法からの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。このプロトコールが最も重要な書類である。

## 2.5 SOP(標準操作手順書)

試験法の手順を記載した手引きである。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、すべてに詳細にという訳ではない。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を指す。この結果をもとに、正式な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。バリデーションによっては、プレ、正式なバリデーションをフェーズに分けて実施する場合もある。

## 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。正式なバリデーションでは被験物質として40物質以上が必要と考えられているが、類似した試験法を小規模なバリデーションで立証する場合は、10物質前後で実施される。

## 2.8 バリデーションの基準

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)<sup>2)</sup>やOECDのGD34<sup>1)</sup>の中では、以下のように記載されている。

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しい試験方法、あるいは改良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は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

### 3 バリデーションの種類

バリデーション終了までにはこのような過程を経ることになる。上記したバリデーショ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ョ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ョンの範疇に入る。また、図3に示すように、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ョンを実施する場合にキャッチアップバリデーションという、より小規模なバリデーションで立証する場合も想定される<sup>3)</sup>。

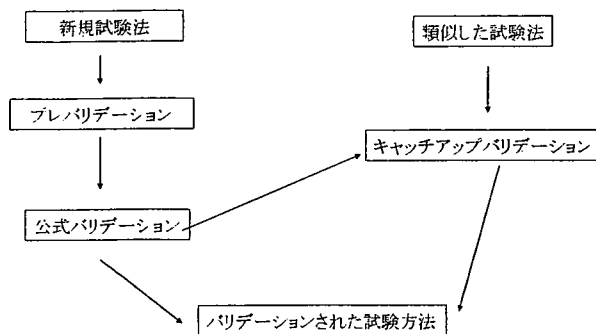


図3 バリデーションの種類<sup>3)改変)</sup>

### 4 まとめ

以上、バリデーションについて、OECDの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。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試験法として評価されない場合もありうる。しかし、動物実験をこれまでのように実施できない以上、化粧品の安全性確保のために動物実験代替法の開発は必須である。多くの研究者が動物実験代替法の開発に真摯に取り組んで頂けることを節に願っている。

#### 参考文献

- 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

# 取れ取れトレンド バイオ プロダクツ

## 第III回 急がれる動物実験代替法の開発—皮膚モデルの現状

解説 小島 聖子  
(国立医薬品食品衛生研究所)

### 動物愛護法の改正

動物愛護の立場から動物実験に対する反対の気運は世界的な高まりを見せ、研究や安全性の確認実験に対していろいろな法的規制が立法化されつつあります。

EUでは2009年より、一部の安全性試験で動物を使った化粧品製造・輸入が禁止されます(化粧品規制の2009年問題といわれる)。さらに全化学物質の安全性を再評価することになり、これには動物をなるべく用いないで進めることが決まっています(REACH)。わが国でも動物愛護法が2007年6月に改正施行され、3Rs(reduction:削減、refinement:純化、replacement:置き換え)の徹底が謳われました。これらに対処するために動物実験代替法の確立が急務となっています。

### 国際動物実験代替法会議

「3つのR(3Rs)」は1954年にRussellとBurchが提唱したもので、1999年8月にイタリアのボロニアで開催された「第3回生命科学における代替法と動物使用に関する世界会議」にて、ボロニア宣言として採択されました。これはすべての研究者に動物実験を用いる手法を可能な限り削減、純化、置き換えることを課するものです。

今年8月21～25日、第6回国際動物実験代替法会議(6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences)が、ホテルイースト21東京にて開催されました。日本学術会議、日本動物実験代替法会議、動物実験代替法会議基金等の協力を得て開催された本会議には、34カ国、1地域から1000名を超える参加者が東京に集い、過去最大の盛況な会議となりました。参加者は、一般のシンポジウムや演題の他に、愛護団体との対話を基調とした特別シンポジウム、市民公開講座、動物慰霊祭などを含む多彩な科学プログラムで研鑽を積みました。また、アジアで初めて開催された会議ということもあり、中国、韓国、京都でもサテライトシンポジウムが開催され、総勢300名以上が集まりました。

本会議は、3Rsのアジアにおける普及のためにも極めて有意義なものとなり、本分野における日本の立場は揺るぎないものになりました。

### 代替法の評価組織

削減や置き換えのための代替法は早くから様々な開発や提案がされてきましたが、公定化されるためにはこれを多くの人の協力によるバリデーションおよび、第3者によって科学的に評価せねばなりません。

このための組織として、EUでは1991年にECVAMが行政機構として設立され、提案された各種の代替法の解析評価に当たっています。アメリカでは1997年に関係省庁を網羅したICCVAMが設置されました。日本では一昨年(2005年11月)、当新規試験法評価室が事務局となってJaCVAMが設立されました。国際的にはこの3組織が共同して公定法を作るべく緊密な情報交換を実施しています。

### JaCVAMの活動

JaCVAMの活動目的は、①動物実験の3Rsの促進と②国際協調を重視した新規動物実験代替法の公定化で、目的達成のために各種の既存・新規試験法を日本動物実験代替法学会などの関連学会にバリデーションを委託し、その報告を評価会議にかけて公定化を図ります。

評価会議は関連学会のみでなく生物統計学者、臨床医、化粧品工業連合会や製薬工業協会の推薦者などで構成されます。

### 皮膚モデルの現状と問題点

EUでは最近、培養表皮モデルEPISKINを用いた皮膚刺激性評価の妥当性が確認されました。EUではいずれも角質細胞を用いたEpiDerm、EPISKIN、PREDISKINが汎用されています。

植物タンパクの変性を用いた皮膚刺激性を評価する製品や動物から抽出した皮膚を用いる方法は、バリデーションの段階で脱落しました。EpiDermはクラボウが輸入販売していますが、他の2製品はいまだ輸入元が決まっています。そのほか、わが国では3社が製造販売しています(表①)。いずれもオリジンはヒト由来包皮細胞で、約100人分がプールされており、ロット間差が生ずるのを防いでいます。

角質層のみの表皮モデルと真皮を含む皮膚モデルとがあり、しっかりとした層構造の構築を確認できます。いずれも可使用時間が短く数日しかありませんので、あらかじめ実験日を決めて発注する必要があります。輸入品も国産品も納期は約1ヵ月ほどかかるようです。生体でのターンオーバーは角質細胞は28日ですが、これらの培養皮膚の可使用時間は1週間程度しかありません。ウシ血清を無血清に切り替えることを含めて、培地に改良の余地があります。基底層に幹細胞がないことも可使用時間が短い大きな原因でしょう。また、培養細胞は一般に水の透過性が生体に比べ高すぎますが、この欠点が改良されたものも出てきました。価格が高いのも難点ですが、メーカーも相当苦しいようで、早く公定法になって消費が増えれば価格も下がるでしょうが、それまで待たなくてはならないところも出ています。

化粧品業界では皮膚刺激性試験のみならず、経皮吸収試験や代謝試験への応用の用途が広がり、また美白剤の検討にメラノサイト混合表皮、老化の研究にフィブロブラストを含む皮膚などが検討されています。

### 広範囲の代替に向けて

EUや米国では腐食性試験、光毒性試験、感作性試験に関してはすでに各種の試験法の評価を終了し、OECDのガイドラインに導入されています。腐食性試験においては培養皮膚モデルや抽出皮膚を使った方法、光毒性試験はBalb3T3細胞を用いる方法が採用されました。

EUでは皮膚とともに眼に対する刺激試験について、ウサギの眼を使うドレーズ法の代替法の制定を2009年に間に合わせるべく急いでおり、欧米ではウサギやニワトリの眼球やウシの角膜などを使うことが検討されています。わが国では培養細胞を用いたガイドランスがすでに示されています。

創薬では肝毒性、腎毒性、神経毒性の検討に動物に代わる培養細胞が検討されています。将来は薬物動態試験なども一部は培養細胞に代替されるようになるでしょうが、現状では薬の安全性の確保には動物実験が不可欠だと思います。

連絡先: 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  
TEL:03-3700-9874 E-mail: h-kojima@nih.go.jp

表① 国内で販売されている皮膚モデル

製造/輸入元	ブランド	構造	細胞	最短期	可使用時間	サイズ(mm)	セールスポイント
MatTek/ クラボウ	EPI-200, 606X	表皮	角化細胞	1ヵ月	48時間 (納品後 冷蔵保存 可能時間)	8, 22	海外ではEpiDermとして安全性試験実績豊富
	MEL-300, 312	表皮	メラノサイト・角化細胞	1ヵ月		8	長期培養(最長3週間)により黒化観察可能
	OCL-200, 606	角膜	角化細胞	1ヵ月		8, 22	眼粘膜刺激性試験の海外実績増加しており注目のモデル
	EFT-200, 212	皮膚	角化細胞・線維芽細胞	1ヵ月		12	2005年発売、基底層マーカー類の発現確認済み
グンゼ	Vitrolife-Skin	皮膚	角化細胞・線維芽細胞	2週間	4日	8	短期納期。表皮・真皮の二層構造。独自技術にて製造
	Vitrolife-Dermis	真皮	線維芽細胞	2週間	4日	8	短期納期
J-TEC	LabCyte EPI	表皮	角化細胞	1週間	4日	6, 10	無料講習会、特注品対応などの技術サポート
	LabCyte MELANO	表皮	メラノサイト・角化細胞	1週間	2日	6	美白評価、皮膚基礎研究、技術サポート
東洋紡	TESTSKIN LSE-d	皮膚	角化細胞・線維芽細胞	1ヵ月	4日	12	多様体に対応した12穴タイプ
	TESTSKIN LSE-high	皮膚	角化細胞・線維芽細胞	1ヵ月	4日	24	バリア機能に優れた経皮吸収用モデル
	MATREX LDM	真皮	線維芽細胞	3週間	4日	24	生体内と類似した二重化した紡錘形状を保つ真皮モデル

## トランスレーショナルリサーチを支援する 遺伝子医学MOOK 好評発売中

### 7号

# 最新創薬学2007

—薬物動態学特性の解析は創薬のキーワード

編集: 杉山雄一 (東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室教授)

定価: 5,250円 (本体価格 5,000円+税)、送料別、B5判

#### 主な内容

- 序文: 新しい創薬パラダイムの中心である薬物動態特性の最適化に注目!
- 概論: 前臨床における薬物動態研究の役割
- 第1章: 薬物吸収の予測
- 第2章: 薬物クリアランス(代謝・取り込み、排泄)および組織移行特性の予測
- 第3章: 薬物動態研究と毒性の評価・予測
- 第4章: 薬物動態・製剤研究者と、医薬品化学研究者のフィードバック
- 第5章: 前臨床から臨床へのトランスレーション

### 8号

# ペプチドと創薬

編集: 寒川賢治 (国立循環器病センター研究所所長)

南野直人 (国立循環器病センター研究所薬理部部長)

定価: 5,600円 (本体価格 5,333円+税)、送料別、B5判

#### 主な内容

- 序文: ペプチド研究の新時代
- 序章: 「創薬」昨日・今日・明日
- 第1章: 創薬候補ペプチドの探索
- 第2章: ペプチド疾患マーカー探索
- 第3章: 新規機能と創薬ターゲット
- 第4章: 医薬品化の問題点と解決法
- 第5章: ペプチド医薬の開発実例

発行・直接のご注文は 株式会社 メディカルドゥ

TEL:06-6441-2231 FAX:06-6441-3227

E-mail: home@medicaldo.co.jp

URL <http://www.medicaldo.co.jp>



## 動物実験代替法の現状と展望

小島 肇夫

要約：「動物の愛護及び管理に関する法律」が2006年6月に施行され、さらに、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」が環境省より告示された。この基本的な考え方は、3Rs (Reduction: 実験動物の削減, Refinement: 実験動物の苦痛の軽減, Replacement: 実験動物の置き換え) の徹底である。しかし、削減や置き換え試験法の確立のためにはバリデーションや第三者専門家による評価が必要である。この試験法評価の使命を果たすために、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新規試験法評価室が2005年11月に設立された。この部門の活動を JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) と呼ぶ。

### 1. 「動物愛護及び管理に関する法律」の改訂および関連指針

昭和48年(1973)に制定された「動物の愛護及び管理に関する法律」が2006年6月、環境省より施行され、第41条 動物を科学上の利用に供する場合の方法、事後措置等が改訂された(1)。できる限りその動物に苦痛を与えない方法によって動物実験をしなければならないことに加え、できる限り動物を供する方法に代わり得るものを利用すること、できる限りその利用に供される動物の数を少なくすること等により動物を適切に利用することに配慮するものとするのが付記された。さらに、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」が環境省より告示された(2)。その基本的な考え方には、動物を科学上の利用に供することは必要不可欠であるので、3Rs (Reduction: 実験動物の削減, Refinement: 実験動物の苦痛の軽減, Replacement: 実験動物の置き換え) を徹底するために、

適正な飼養及び保管並びに科学上の利用に努めることが記載されている。

これを受け、同時期に文部科学省(3)、厚生労働省(4)、農林水産省(5)が「関連研究機関等における動物実験の実施に関する基本指針」を告示した。動物実験責任者の責務、動物実験委員会の設置、機関内規定の策定、動物実験計画の承認、データの信頼性を確保する観点から、適切な動物実験等の方法の選択、動物実験等の施設及び設備を踏まえて動物実験計画を立案し、適正に実施することが記載されている。実験方法の選択には以下の事項への配慮が明記されている。

#### ①動物実験代替法(以下、代替法と記す)の利用

科学上の利用の目的を達することができる範囲において、できる限り実験動物を供する方法に代わり得るものを利用すること等により実験動物を適切に利用することに配慮すること。

②実験動物の選択 実験動物の選択に当たっては、科学上の利用の目的を達することができる範囲において、できる限りその利用に供される実験動物の数を少なくすること等により実験動物を適切に利用することに配慮すること。この場合において、動物実験等の目的に適した実験動物種の選定、動物実験成績の精度や再現性を左右する実験動物の数、遺伝学的及び微生物学的品質、飼養条件を考慮する必要があること。

③苦痛の軽減 科学上の利用に必要な限度において、できる限りその実験動物に苦痛を与えない方法によってすること。

さらに、同時期に日本学術会議は「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を示している(6)。これは各省の告示した基本指針を踏まえて各研究機関が

キーワード：動物実験代替法、バリデーション、3Rs  
 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  
 (〒158-0098 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)  
 e-mail: h-kojima@nihs.go.jp 原稿受領日：2007年8月20日、依頼原稿  
 Title: Current status and view of the alternative to animal testing. Author: Hajime Kojima

動物実験等に関する規定等を整備するに際してモデルとなる共通ガイドラインである。この他にも、日本実験動物学会、日本薬理学会、日本トキシコロジー学会、日本生理学会、日本神経科学学会、日本実験動物協会などがそれぞれに指針を示している(7)。

## 2. 3Rs をどのように成し遂げるか？

さて、問題はこの3Rsへの対処である。「研究機関等における動物実験の実施に関する基本指針」には動物実験委員会が3Rsを念頭に審査することと記載されているが、果たして各施設の動物実験委員会委員はどれくらいこの3Rsを科学的に理解しているのか、なんとなく、動物数は少なくすればよいとか、この方法はストレスが多そうだとか、この方法は置き換えになるかなどを配慮すればよいと考えてはいないであろうか。

削減に関していえば、単に1群あたりの動物数を減らせばよいとか、群数を減らせばよいというものではない。6匹/群でこれまで実験を行ってきたとすれば、仮に5匹に減らすという提言を行うだけでも大変な労力を要する問題である。また4群を3群にすることにより濃度または時間依存的な反応が読み取れなくなるかもしれない。削減により実施する試験の安全性や薬効評価の精度を落としてはならない。統計学的な裏付けを取るとか、回顧的なバリデーションを実施して検証しなければならない。使用動物数を減らしたことにより、計画を適切に施行できなくなり追加試験を行う必要が生じれば、より使用動物が増え、経済的・時間の浪費であるとともに愛護の面からも問題である。

苦痛の軽減に関して、仮にストレスを負荷している実験を行ったとして、よりストレスが少ない方法を選択しなさいという提言を受け、新たに立案した実験で結果がでなければ正しく計画を施行できない。だからといって過激なストレス負荷を課してもよいとは限らないのであり、適切な方法の選択に関して動物実験委員会委員はコメントできるのであろうか。実験において麻酔を使う場合も注意が必要である。適切な麻酔薬を選択し、適切な量を処方するためには獣医師の指導が必要である。とすれば、疾病予防などの実験動物の健康管理業務も含め、各施設に適切な指導を行える獣医師が必須であることになる。適切な指導を行える獣医師は各施設で本当に機能しているのであろうか。

そして、今回議題にしたい置き換え試験法はどうであろうか。作用機構が明確である *in vitro* 試験法があるとしても、それが動物実験を用いる代替法として妥当とはいえない。その試験法はある生物反応の一部を

捉えているからに過ぎないからである。これを代替法、置き換え試験法としてもよいのか。この置き換えや動物数の削減につながる新規または改良試験法の開発・評価のために、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新規試験法評価室が2005年11月に設立された(8-10)。この部門の業務の一つが新規または改良試験法の評価である。この活動を我々はJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) と呼んでいる。JaCVAMができるに至った経緯としては大きく2つのことが挙げられる。

## 3. JaCVAM の設立理由

### 1) CVAM (Center for the Validation of Alternative Methods) の設立

後述するように、バリデーションや第三者専門家による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の実施やバリデーション実行委員会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。そこで、世界各地にバリデーションセンターが設立されている。1990年代に米国ではICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)、欧州にはECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) が設立された。これらのセンターは動物実験の代替法バリデーションを実施するセンターである。このような世界的な動向の中で、日本でも新規試験法の開発が進んでおり、日本のCVAMが必要とされつつあった。

### 2) OECD ガイダンス文書 GD34

2001年にOECDガイダンス文書GD (Guidance Document) 34が発行された(11)。この文書の中には今後新規試験法が開発される場合のバリデーションや評価に関する手順、手法が記載されている。このバリデーションや評価は、これまで日本動物実験代替法学会内に設立されたバリデーション委員会や評価委員会で実施されてきた。しかし、この委員会はあくまでボランティアによる *ad hoc* な委員会であることから責任の所在が曖昧であり、評価後の行政への対応も不確実であった。そこで、専門の担当者が取りまとめ、行政機関に提言をできるような公的機関の設立が望まれていた。

## 4. JaCVAM の活動方針と組織

以上の目的を適えるために設立されたJaCVAMはその活動目的としては、化学物質等の安全性評価における

- 1) 動物実験の3Rsの促進, 特に削減や置き換えの促進
- 2) 国際協調を重視した新規動物実験代替法の公定化を目指す。

そのために, 以下の主な業務を実施する

- 1) 新規試験法または既存試験法の改訂法(新規・改訂試験法)の評価および公定化
- 2) 新規・改訂試験法バリデーションの委託
- 3) 3Rsの普及と国際協調

## 5. バリデーションの実施

ところで, 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, 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(11)。

**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ことがGD34には書かれている。現在データ構築が進んでいるトキシコゲノミクスもプロテオミ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

これらのバリデーションを成し遂げるための組織を図1に示す。バリデーション実行委員会の設立, 資金, 参加施設, 被験物質の適切なin vivoデータ, その選択とコード化, データの統計学的な処理などが必要となる。その詳細については成書を参考にされたい(12)。

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しい試験方法, あるいは改良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, 試験法の規制受け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〉(11)

- 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

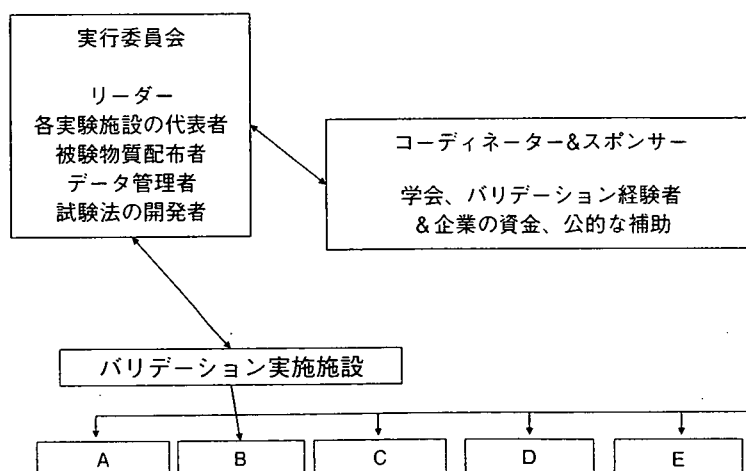


図1 バリデーション組織(例)

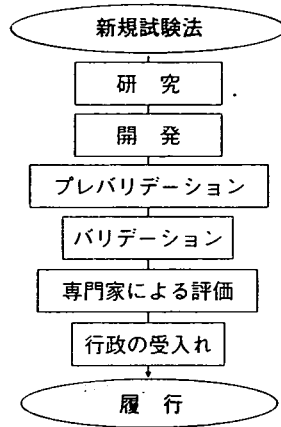


図2 試験法バリデーションのプロセス (文献13改変)

上記のバリデーショ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ョ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ョンの範疇に入る。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ョンを実施する場合にキャッチアップバリデーションというより小規模なバリデーションで

立証する場合も想定される。

## 6. 第三者専門家および行政的受入れにおける評価

バリデーション後には、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(13)、厳しい基準をクリアした後、新規試験法は公的に認められるのである。ただし、バリデーションや第三者専門家により評価された試験法が自動的に行政に受け入れられる訳ではない。規制受け入れのためには、行政的な受け入れに関する評価が必要である(11)。

試験法の専門家による評価はそれぞれの動物実験代替法センターが中心となって行い、さらに、行政的な受け入れを評価する機関として、米国には ICCVAM、欧州には ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)、日本にも JaCVAM 評価会議が設立されている。

## 7. 代替法の現状

実験動物の3Rsを成し遂げるために必要な新規または改良試験法のために必要なバリデーションと評価、その後の規制の受入れまでについて、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。

表1 OECDガイドラインになっている動物実験代替法 (文献14改変)

No.	試験名	採択日
429	Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay	Updated Guideline, adopted 24th April 2002
430	In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)	Original Guideline, adopted 13th April 2004
431	In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test	Original Guideline, adopted 13th April 2004
432	In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test	Original Guideline, adopted 13th April 2004

表2 JaCVAMが関与している日本で行われているバリデーションの現状

試験法	試験名	現状
光毒性試験	酵母-赤血球試験	第三者評価中
皮膚感作性試験	LLNA-DA	第三者評価中
	LLNA-BrdU	バリデーション実施中
	h-CLAT	共同研究実施中
皮膚腐食性試験	培養皮膚モデル	行政的受け入れ評価中
皮膚一次刺激性試験	培養皮膚モデル	評価計画中
内分泌かく乱物質スクリーニング	Lumi-cell, HeLa Reporter Gene Assay	バリデーション実施中
変異原性試験	コメットアッセイ	バリデーション実施中
パッチテスト	貼布時間再検討	共同研究終了



## 文 献

バリデーションと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。このような過程を経て、表1に示すような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(14)。これらの試験法は腐食性、光毒性、感作性試験の代替法による評価に限定されている。JaCVAMではさらに表2に示すような広範な分野における試験法を公定化すべく、バリデーション、第三者専門家における評価、行政的な受入れ評価を進めている。今後、徐々にこれらの成果を公表していくとともに、評価の対象試験法を広げていきたいと考えている。

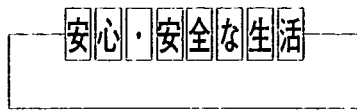
以上、実験動物の削減、置き換えと言っても科学的な裏づけが必要であることを理解して頂けたと考えている。JaCVAMの課題は、バリデーション、評価の効率的な実施システムの構築である。これらの実現に向けて継続的な努力をしていきたいと考えている。

- 1) 動物の愛護及び管理に関する法律。  
[http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend\\_law2/law.pdf](http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend_law2/law.pdf)
- 2) 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準。  
[http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law\\_series/nt\\_h180428\\_88.html](http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law_series/nt_h180428_88.html)
- 3) 文部科学省 研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針。  
[http://www.mext.go.jp/b\\_menu/hakusho/nc/06060904.htm](http://www.mext.go.jp/b_menu/hakusho/nc/06060904.htm)
- 4) 厚生労働省 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針。  
<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/dobutsu/0606sisin.html>
- 5) 農林水産省 農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針。  
[http://www.maff.go.jp/www/press/2006/20060601press\\_2b.pdf](http://www.maff.go.jp/www/press/2006/20060601press_2b.pdf)
- 6) 日本学術会議 動物実験の適正な実施に向けたガイドライン。  
<http://www.sci.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-20-k16-2.pdf>
- 7) 重茂浩美. 科学技術動向. 2006;5:10-20.
- 8) 大野泰雄. 国立衛研報. 2004;122:1-10.
- 9) 小島肇夫. 化粧品技術者会誌. 2006;40(4):263-268.
- 10) 小島肇夫. 日皮協ジャーナル. 2007;57:129-134.
- 11) 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
- 12) 小島肇夫. COSMETIC STAGE. 2007;1(6):1-3.
- 13) 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)
- 14) Chemicals Testing: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals-Sections 4:  
[http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en\\_2649\\_34377\\_2349687\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html)



X.H

弓を引くヘラクレス



## EUにおける動物実験代替法の現況と REACH 対策

小 島 肇 夫

・ 2007年から欧州にて施行されたREACH (Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals) とは、すでに市場に流通している約3万の化学物質に関し、その製造・輸入を行う事業者がその安全性データなどを揃え、登録することを義務つける規制を指すものである。この既存化学物質の安全性再評価には動物実験代替法の促進が目的に記載されている。以下にREACHに対応すべく目処がたった動物実験代替試験法について説明するとともに、日本の対応状況をまとめた。  
キーワード：REACH、動物実験代替法、化学物質

欧州 (EU) における安全性評価のもっとも大きな関心事項は2007年から施行されたREACH (Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals) 問題である。REACHの詳細な説明は成書に任せるが<sup>1-4)</sup>、本書ではREACHの概要を説明した後、既存化学物質の安全性再評価と動物実験代替法(以後、代替法と記す)の利用という観点からまとめていきたい。

### 1. REACHとなにか?

REACHとはすでにEU市場に流通している約3万の化学物質に関し、その製造・輸入を行う事業者は、その安全性データなどを揃え、登録することが義務つけられる規制を指す。登録、評価、認可、制限の総称である。

EUにおける法律はRegulation (規制：すべての加盟国にそのまま適用されるもので、国内法と同様の拘束力を持つ)、Directive (指令：加盟国を拘束するものの、方式・手段については加盟国に委ねる)、Decision (決定：



Hajime KOJIMA, Ph.D.

1960年4月生まれ  
1983年3月 岐阜大学農学部農芸化学科卒業  
同年4月 日本メナード化粧品(株)入社  
1984～1986年 国立遺伝学研究所・形質遺伝部留学  
1996年 長崎大学薬学部にて博士号取得  
2005年 日本メナード化粧品(株)退社  
2005年～ 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(JaCVAM)室長  
現在に至る  
藤田保健衛生大学医学部皮膚科 客員講師

専門：毒性学、変異原性、組織培養、バリデーション  
対外活動：

- ・ 日本動物実験代替法学会 評議員、庶務・総務理事
- ・ 日本トキシコロジー学会 編集委員
- ・ 日本接触皮膚炎学会 評議員、広報および共同研究委員
- ・ ICCVAM Peer Review Panel "Corrositex" member (2001)
- ・ JICA 中国における毒性試験技術指導(2004、2005) 受賞：
- ・ 日本動物実験代替法学会第6回大会ゴールデンプレゼンテーション賞受賞
- ・ 日本動物実験代替法学会 1998年・2000年・2003年論文賞受賞

その対象となるものに対してのみ、特定の義務を課す)、Recommendation (勧告：法的な拘束力はない) などに分かれるが、規制とはそのもっとも上位にあたる法律である<sup>3)</sup>。よく知られている既存化学物質のリスク評価と管理に関する理事会規制793/93と同等であるととも、危険な物質の分類、包装、表示に関する理事会指令67/548/EEC、安全性データシートに関する委員会指令91/155/EEC、化粧品指令第7次改正などよりも厳しい法律であるといえる。

REACHに至る簡単な経緯を以下に振り返っておく。1992年にリオデジャネイロで開催された「環境と開発に関する国連会議」で採択された「アジェンダ21」および「環境と開発に関するリオ宣言」に端を発する環境問題への国際社会での先鞭をつけるものであり、画期的な内容である<sup>3)</sup>。これまでEUや米国、日本でもOECD高生産量既存化学物質点検プログラム (1,000 t 以上製造されている既存化学物質の安全性点検)、米国チャレンジプログラム (450 t 以上の製造・輸入物質の企業による自発的な安全性点検)、日本でも2005年からJapanチャレンジプログラムが進められてきたが、中々達成しそうな既存化学物質の安全性再評価に画期的な変換点を与える法律である。この背景にはEUで化学品会社が27,000社 (売上額590billionユーロ) あり、170万人の従業員、国際市場の33%を占めている事情がある一方、職業性皮膚炎の治療費に3millionユーロ/日、約600millionユーロ/年が必要であるとともに、既存化学物質86%の毒性データが不足している現状に起因している<sup>5)</sup>。

本来なら、EU域内での問題を国際社会に押し付けるものではあるが、経済的にも安全性評価の面でもグローバリゼーションが進む昨今、日本でも経済的な影響が大きく無関心ではいられない問題であるとの認識は大きく産業界にも広がっている。

REACHの特徴を確認しておく、責任は産業界におく、既存・新規化学物質を区別しない、ライフサイクル (製造、加工、使用、廃棄) を通して評価する、特定条件に合致する成形品中の化学物質も規制する、サプライチェーンにおけるすべての関係者 (製造・輸入業者だけでなく、川下企業、流通業者) が関与するものである<sup>3)</sup>。

## 2. REACHの求める安全性資料

REACHの求める安全性評価はハザードベースでなく、リスクベース (ハザードと曝露評価) である。2009年までに事前登録が期待される180,000物質については、70%の試験を2011～2017年に実施しなければならない。

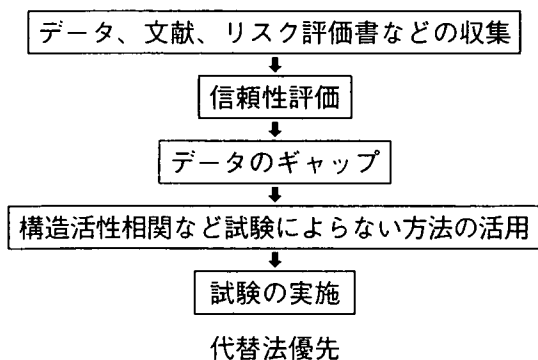
製造/輸入量に応じた実施すべき有害性情報および環境影響評価を得るための試験法リストを第1表および第2表<sup>3)</sup>に示す。この試験法の中で、特に代替法による試験をただ行うのであれば有害性の同定でしかないが、曝露評価まで求められており、動物実験を有効に使っていかなければならない。ただし、条文の第1条1項には、以下の記載がある<sup>1)</sup>。「この規制の目的は、ヒト健康および環境の高いレベルでの保護を確保すること、これには代替法の促進や、物質のEU市場内での自由な移動を促進すると同時に、欧州企業の競争力の強化や技術革新を促進することである。」この中で注目すべきは「代替法の促進」と記載されていることである。確かに代替法の促進は社会情勢から見れば必須とは考えるが、目的にまで書かれている。欧州での代替法の普及は日本人が予想している以上に進んでいることを意味しており、REACHを意識する際には代替法を無視できないと考えるべきである。

よって、第1図にデータ収集の手順を示すが、実験を行う場合にはまず構造活性相関などの*in silico*の利用、代替法を優先せざるを得ない。

第1表 製造/輸入量に応じた有害性情報<sup>3</sup>改変)

番号	試験項目	製造/輸入量 (t/年)			
		1 - 10	10 - 100	100 - 1000	1000 以上
8.1	皮膚刺激性または皮膚腐食性 ( <i>in vitro</i> )	○	○	○	○
8.1.1	皮膚刺激性 ( <i>in vitro</i> )		○	○	○
8.2	眼刺激性 ( <i>in vitro</i> )	●	○	○	○
8.2.1	眼刺激性 ( <i>in vitro</i> )		○	○	○
8.3	皮膚感作性	○	○	○	○
8.4	遺伝毒性				
8.4.1	エイムス試験	○	○	○	○
8.4.2	染色体異常試験または小核試験 ( <i>in vitro</i> )		○	○	○
8.4.3	哺乳類動物細胞における突然変異試験 ( <i>in vitro</i> )				
8.5	急性毒性試験				
8.5.1	経口	○	○	○	○
8.5.2	吸入		○	○	○
8.5.3	経皮		○	○	○
8.6	反復投与毒性				
8.6.1	短期 (28 日間)		○	○	○
8.6.2	短期 (90 日間)			○	○
8.6.3	長期 (1 年以上)				○
8.6.4	追加試験				○
8.7	生殖毒性試験				
8.7.1	スクリーニング		○	○	○
8.7.2	出生前発生毒性試験			○	○
8.7.3	二世代繁殖性試験			○	○
8.8	トキシコキネティクス		○	○	○
8.9	発がん性試験				○

●：まだ認証された代替法はない

第1図 データ収集の手順<sup>1)</sup>

### 3. 代替法の現状

REACHが求める代替法にて現在、どれくらい安全性を担保できるのでしょうか。欧州代替法バリデーションセンター (ECVAM: European Center for the Validation of Alternative Methods) では264のパートナーと13の研究プロジェクト (予算80millionユーロ) を通して、REACHのために“適切な”100の試験法を確立する予定である。現在125のINVITOXによるプロトコルが用意されており、2006～2007年に14の試験法バリデーションが終了しているが、2009年までに40試験法のバリデーションが予定されている。