

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. バリデーシオンや評価の組織

このように、バリデーシオンや評価を実施すると言っても大変な労力を要する。ましてバリデーシオンマネ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オ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 のバリデーシオンを行う。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オンについて担当していると言えよう。

5. 最後に

以上、バリデーシオ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。

バリデーシオ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

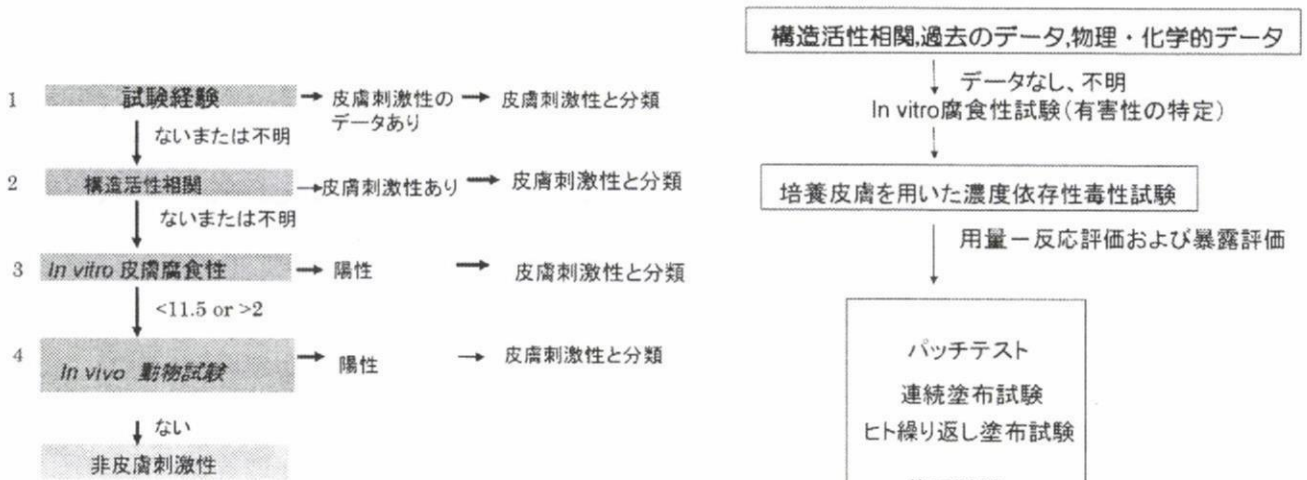
これまで、化粧品原料や製剤の皮膚刺激性の第一次安全性評価（スクリーニング）において、ウサギやモルモットが汎用されてきた¹⁻³⁾。現在も使用している施設もあると思うが、比較的簡便な試験法である。簡便といっても、動物に苦痛を与えず、かつ有用な皮膚状態を確保するためには、毛周期の把握や毛刈技術などに熟練する必要がある、それによって結果が異なることも知られている。実験者は得られた結果をもとに、皮膚一次刺激性の強度をスクリーニングしてきた。常識的に言えば、何十、何百万人の健常人、場合によっては皮膚疾患患者も使われるかもしれない化粧品の安全性を評価するのであるから、例えば、3例の動物を用いてスクリーニングする場合、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、特に油溶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改訂)}

スキーム2 小島スキーム^{4改訂)}

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られる。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	グンゼ

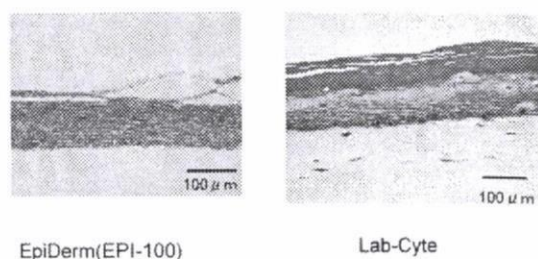


図1 培養表皮モデルの一例



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ー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ージメントチームの設定した基準値に対応できている。

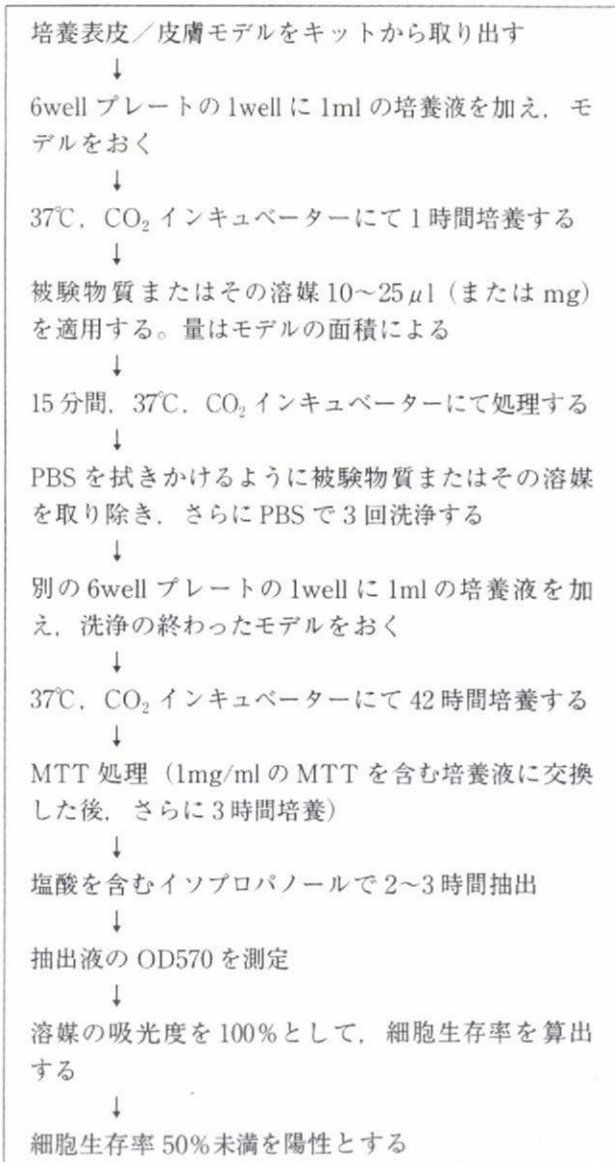
日本で行ったバリデーションでは、培養皮膚モデル TESTSKIN および Vitrolife-skin を用いて ET50 を算出する方法でウサギ皮膚刺激性よりヒトパッチテスト結果とよく相関すると報告した^{21~23)}。皮膚一次刺激性試験の目的はヒトの刺激性の予測であり、ウサギの刺激性予測ではない。ウサギの結果がヒトとよく相関するならともかく、ウサギの予測率も 6 割程度であり、偽陽性が多い試験法である。その方法と

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。

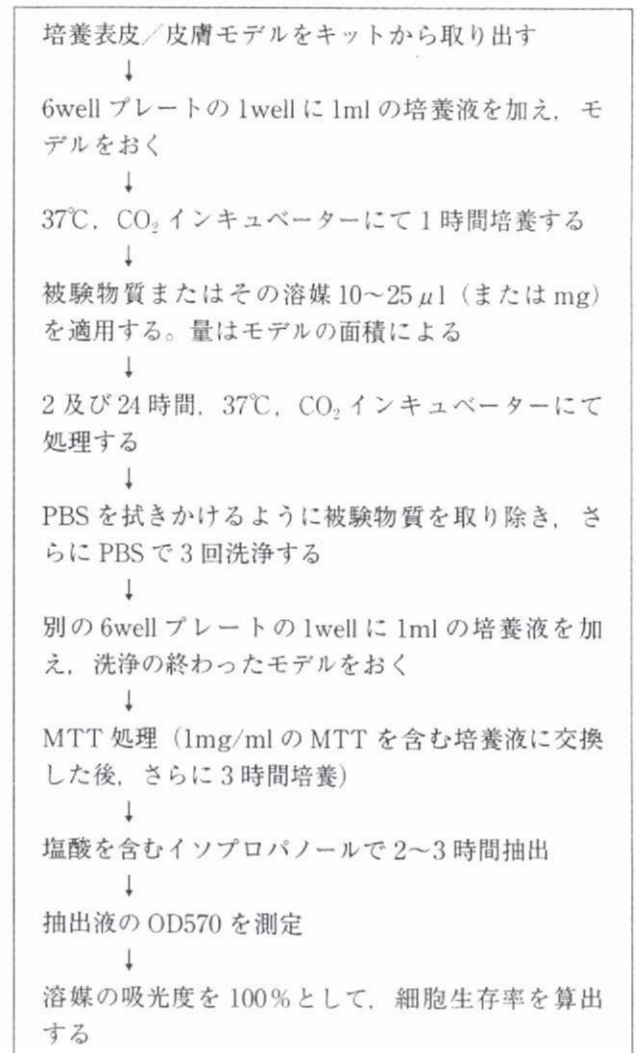
培養皮膚モデルも、製造先が違うモデルが存在する。この場合、バリデーションは必要となるのか。Worth 文献の中には、同様の方法を比較する場合、catch-up バリデーションが必要とされており²⁴⁾、よってモデル毎に catch-up バリデーションで十分であろう。3施設がブラインド化された10物質程度を共同研究で実施すればよいであろう²⁵⁾。得られた結果を過去のモデルと比較して再現性、予測性などに遜色ない結果が得られることが採用の条件である。

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., Fentem 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., Certification 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 P.A., Coquette A., Corsini E., Curren RD., Elliott GR., Fentem JH., Heyling JR., Liebsch M., Medina J., Rouget R., Sabdt, J.J.M., 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., Hori 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., Hori 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., Hori 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, 摘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、試験法マネー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るべきものを 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

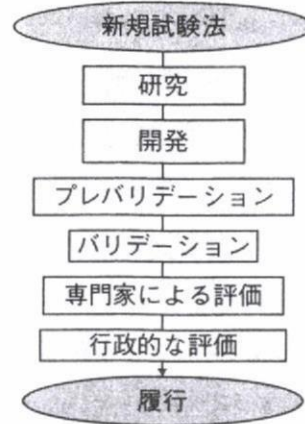


図1 試験法バリデーションのプロセス²⁾

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>

動物福祉と動物実験代替法への 考慮の必要性について



大野 泰雄

国立医薬品食品衛生研究所 副所長

東京大学薬学系大学院博士課程修了(薬害作用部門)。薬学博士。薬剤師。日本トキシコロジー学会認定トキシコロジスト。国立衛生試験所薬理部厚生技官、国立衛生試験所安全性生物試験研究センター薬理部長を経て、2005年より現職。おもに、薬物代謝と肝腎毒性に関する研究、動物実験代替法に関する研究、ヒト組織を用いた薬物動態研究を進めている。この間、カロリンスカ研究所法医学教室(Prof. Sten Orrenius)に1年間留学し、肝腎遊離細胞を用いた毒性学的研究を取得。日本薬理学会評議員、日本トキシコロジー学会生涯教育小委員会委員長、日本動物実験代替法学会理事、HAB研究機構評議員、全国衛生化学技術者協議会副会長、薬事・食品衛生審議会委員、食品安全委員会専門委員を歴任。また、2007年8月に開催予定の第6回国際動物実験代替法学会議長を務める。

社会へ向けて 実験の意義を示さなければならない

生命科学の研究や教育、医薬品等の有効性及び安全性評価において、培養細胞等を用いるin vitro研究が増加している。しかし、さまざまな生体機構の統合としての個体への科学的理解を深め、それへの化学物質等の作用を明らかにするためには、依然として、動物実験や実験動物から採取した試料を用いた研究は不可欠である(表1)、近未来において、動物実験が不要となるとは思われない。一方、動物福祉や権利に対する社会の関心が高まり、動物実験への反対運動も度々報道されている。欧米には、Humane Society of the US(HSUS)のように、毎年100億円以上の寄付を集める動物福祉団体もあり、大きな政治力を持っている。

現在の科学研究には多額の費用が必要であり、公的な資金なしに研究を進めることできない。科学者はこのような状況に適切に対応しなければならない。すなわち、生命科学の研究における動物実験の意義を社会に示し、科学的に必要なかつ倫理的に妥当な実験を行うことにより、我々の研究への社会の支持を得ることが不可欠である。図1に示したように、動物実験の必要性についての説明が十分になされることにより、科学的に必要な動物実験に賛同する者が確実に増加する。動物実験を計画する際は、研究の目的とそれに必要な方法を精査し、不必要な動物実験を避け、やむを得ず行う動物実験においても、使用する動物数と動物に与える苦痛を最少限にしなければならない。これは動物実験における3つの原則(3R: Replacement, Reduction, Refinement)として、平成17年6月に改訂された「動物の愛護及び管理に関する法律」(動愛法)に組み込まれた法的な義務である。この法を補足するため、文部科学省、厚生労働省、および環境省は、それぞれ所管する分野を対象に動物実験指針を作成し、平成18年4月から6月にかけて通知した(「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(環境省告示 第88号)」、「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(文部科学省告示 第71号)」、「厚生労働省の所管する動物実験等の実施に関する基本指針(厚生労働省通知 科発0601002号)」。日本学術会議も動物実験に関する詳細指針「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を作成し、通知した。

これからの取り組みに向けて

研究者が「動物が命あるものであることにかんがみ、何人も動物をみだりに殺し、傷つけ、又は苦しめることのないようにするのみでなく、人と動物の共生に配慮しつつ、その習性を考慮して適正に取り扱うようにしなければならない」という動愛法第2条に示された基本原則を理解し、前記の3Rの原則を満たし、倫理的に妥当な動物実験を行う上で、施設を運営管理す

表1 第77回日本薬理学会で用いられた試験系*

試験系の種類	例数		
in vivo実験	185	335	69.6%
薬物等で処理した動物から組織試料を採取して研究	32		
動物から摘出した試料を用いて研究	118		
in vitro研究(細胞株等を用いた研究)	95	138	28.7%
屠殺場から入手した試料を用いた研究	17		
ヒト試料を用いた研究	19		
アフリカツメガエル卵母細胞を用いた研究	7		
その他(臨床試験、情報研究等)	8	8	1.7%
合計	481	481	

*: 第77回日本薬理学会でのポスター発表(2005年3月8日及び9日)の調査結果

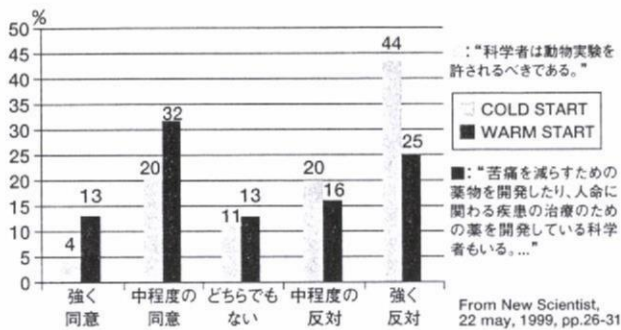


図1 動物実験への反応

表2 動物実験倫理に関する薬学系大学の教育内容

教育内容*	教えている大学の割合
動愛法	80.8 %
実験動物の生理、生態、習性	65.4 %
実験動物の飼育、管理方法	84.6 %
動物実験における3Rの原則	69.2 %
動物の苦痛の評価	69.2 %
苦痛の軽減方法	73.1 %
安楽死の方法	80.8 %
動物実験代替法	57.7 %
その他	42.3 %

文部科学省等の指針から教えることが望ましいと思われるもの。平成19年2-3月にアンケート調査した結果の集計(回答数29、回答施設数24)。

表3 第6回国際動物実験代替法会議での特別講演等

Plenary lecture Judy MacArthur Clark, IACLAM, USA	Alternative research and practice supported by international veterinary professionals such as IACLAM
Julia Fentem, Unilever, UK Paul Flecknell, Newcastle Univ., UK Makoto Hayashi, NIHS, Japan	Exploring new approaches to assess safety without animal testing Assessment and alleviation of pain and distress of laboratory animals 3Rs in Mutation Research--from in vivo to in silico evaluation
Special Lecture Alan Goldberg, Johns Hopkins Univ., USA Baroness Perry of Southwark, House of Lord, UK	The Science of Alternatives - The last 25 years and tomorrow A British Example of Balanced Inquiry into the Ethics of Animal Experiment
Next President Special Lecture Herman Koeter, EFSA, Italy	Globalization of animal welfare concepts integrated in the scientific agenda of international agencies for regulatory risk assessment
Animal Welfare Memorial Lecture Michael Balls, FRAME, UK	Professor William Russell (1925-2006): Doyen of the Three Rs

る者の責任は重い。適正な動物実験施設を確保するとともに、動物実験委員会を適正に運用し、適正な動物実験を行うための教育を行なうことにより、研究者の動物福祉に関する意識と関連技術を高めなければならない。しかし、平成19年2月-3月に行った薬学系大学について行った調査においては、動物実験における3Rの原則や動物実験代替法(代替法)や苦痛の削減方法に関する教育(表2)や動物実験委員会の委員構成に不十分と思われるところがあり、今後の改善が望まれる。

なお、代替法や動物福祉に関する情報を得るよい機会がある。すなわち、第6回国際動物実験代替法会議が2007年8月21日から25日にかけて、東京都江東区のホテルイースト21東京で開催される。この会議は日本動物実験代替法学会と日本学会会議、および国際動物実験代替法会議信託基金(The Alternative Congress Trust: ACT)の主催で、1)教育・研究・試験のための動物実験における3Rの進展を概観し、代替法についての現実的な理解を醸成する、2)科学の進展や生物や疾患への理解を深めるとともに、そのために動物実験が必要であるとの認識を醸成する、また、3)科学者と社会とのコミュニケーションを促進することを目的で開催される。国際トキシコロジー連合、日本環境変異原学会、日本実験動物医学会、日本実験動物学会、日本組織培養学会、日本実験動物環境研究会、日本トキシコロジー学会など、多くの学会が協賛している。

この会議では、動物実験や代替法、また、in vitroトキシコロジー分野で著名な科学者8名によるプレナリーレクチャーや特別講演等が行われる(表3)。また、10の主テーマ(表4)のも

表4 第6回国際動物実験代替法会議でのシンポジウムテーマ

テーマ 1: 動物福祉
テーマ 2: 動物使用におけるモラル・倫理・文化
テーマ 3: 教育と訓練における3R
テーマ 4: 知識管理と情報サービス
テーマ 5: トキシコロジー/バリデーション
テーマ 6: 環境トキシコロジー
テーマ 7: バイオロジクスの開発・生産・品質管理における3R
テーマ 8: 3Rへの新科学技術の応用
テーマ 9: 3Rのグローバル化
テーマ10: リスクアセスメントとリスク管理

と、約40のシンポジウムが行われ、それぞれの分野で著名な実績のある講演者が招待されている。ポスター発表と若手を中心の口頭発表も行われる。現在、500近くの要旨が集まっている。なお、小グループの議論の場も提供される予定である。

2009年にはEU化粧品指令第7次改正により、化粧品の安全性評価のための動物実験が原則禁止される。これに対応するためには、今回の会議で代替法開発の現状を十分に議論し、理解を深めておく必要がある。また、今回の会議は欧米における関連分野における欧米の状況を知るよい機会であるが、中国や韓国、インド、その他のアジア諸国から多くの講師を招待しており、アジア諸国における動物福祉や代替法開発についても、情報を集めるよい機会である。また、動物福祉活動家との対話を目的としてシンポジウムや市民を対象にした公開シンポジウムも開催される。会議の公用語は英語であるが、公開シンポジウムは通訳が付く。詳細は日本動物実験代替法学会のホームページ(<http://www.soc.nii.ac.jp/jsaae/>)および国際代替法会議のホームページ(<http://www.ech.co.jp/wc6/>)に記載されている。

動物実験代替法の国際動向

大野 泰雄

Abstract : There were several international and national institutes for the promotion of 3Rs. Those were ECVAM, ICCVAM, NCA, ZEBET, JaCVAM and etc. FRAME, 3R Research Foundation, and NC3Rs are agencies that support research on alternatives. This article introduced those institutes and agencies outside Japan and explained situation of regulatory acceptance of alternatives by OECD, EU, and US. Scientific association for the promotion of 3Rs were also established in Europe, Japan, and Korea. 6th World Congress on Alternatives and Animal Use gathered more than 1000 attendants from every continents. 3Rs is now globally accepted to harmonize the need of life science and ethical requirement to respect life.

3Rs declaration was agreed by EU governments and industries in 2005. They promised to establish partnership among them to promote 3Rs. REACH project was accepted in 2006 to improve the protection of human health and the environment while maintaining competitiveness. About 30,000 chemicals, produced more than 1 ton/year, are to be registered with some kinds of safety data. This implies conduct of a lot of animal experiments. Therefore, the use of alternative methods are recommended where appropriate methods are available.

Key words : alternatives, ECVAM, ICCVAM, 3Rs declaration, REACH

1. はじめに

動物を用いる生命科学研究が社会に受け入れられ、その支持を得、意味のない摩擦を避けるためには、不必要な動物実験を止め、やむを得ず行う動物実験においては適切な手続きに従い、動物使用数と動物に与える苦痛を最小限にする必要がある。

欧米ではこのような認識は古くからあり、

“Current situation of alternatives to animal experiments outside Japan.”



Yasuo Ohno (National Institute of Health Sciences, 国立医薬品食品衛生研究所—158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

1976年国立衛生試験所入所。現在、国立医薬品食品衛生研究所副所長、日本薬理学会評議員、日本動物実験代替法学会評議員、HAB協議会評議員、日本薬物動態学会監事。薬学博士。

1954年にはRusselとBurchにより動物実験代替法(代替法)についての3Rsの原則が提案された。また、イギリスでは医学分野における実験動物を他のものに置き換えるための基金(FRAME)が1969年に、米国では1981年にジョンスホプキンス大学に代替法センターが開設され代替法の開発や評価が行われてきた。新たに開発された動物実験代替法を科学的に評価し、可能なものについては取り入れていこうという考えの下、EUは代替法開発の拠点とし、代替法についてのデータベースを設置・維持するため、また、行政、産業、生物・医学分野の科学者、消費者、および動物愛護運動グループの対話を促進することを目的に1991年に代替法バリデーションセンター(European Center for the Validation of Alternative Methods: ECVAM)を設立した。米国は毒性試験法の開発、バリデーション、受け入

れ、および国内・国際レベルでのハーモナイゼーションに関する問題を連邦政府内で調整するためにNICEATM (NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) の下にNIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) の機関としてICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) を1993年に設置した。ICCVAMは15の行政機関および研究機関からの代表により構成され、米国内外から提供されたバリデーションデータのPeer Reviewによる代替法評価を行っている。

1996年には安全性評価のための動物実験代替法のバリデーションと行政的受け入れに関するOECDの会議が開催され、それらの基準が示された²⁾。その要点については、先に解説した³⁾。要約すると、代替法はリスクアセスメントの目的のために、既存の方法と比較し同等以上、望むらくはそれ以上の価値を有するデータが得られ、堅牢かつ経済的であり、科学的、倫理的に妥当なものでなくてはならない。また、それらが、code化された被験物質を用い、GLP原則に準じて行われた適切なバリデーションに基づく公開データで裏付けられたものでなくてはならない。また、施設内外での反復性や再現性についての情報が提供されなければならない。

なお、ECVAMやICCVAMでは従来の安全性試験の代替法のみならず、定量的構造活性相関や内分泌かく乱化学物質検索のような新たな毒性評価の要請やトキシコゲノミクスのような新しい技術を取り入れるための検討も行っている。また、ECVAMとICCVAMは評価結果の相互承認や共同バリデーションの実施などの協力を行っている。

本稿では代替法の受け入れ状況と、それを巡る最近の国際情勢について述べる。

2. 動物実験代替法を巡る最近の国際状況

2-1. OECDの状況

医薬品や農薬、化学物質の安全性評価においては、行政やOECDのような国際機関の定めた毒性試験法ガイドラインに基づいて各種の試験が実施されることが多い。これらの試験法についても、

動物福祉への配慮が求められ、2002年よりOECD安全性試験法専門家会議に動物福祉団体代表で構築されたInternational Council on Animal Protection in OECD Programmes (ICAPO) の代表が参加するようになった。最近承認された動物福祉を考慮した試験法ガイドラインを表1に示した。皮膚感作性試験法 (OECDガイドライン429: Local Lymph Node Assay (LLNA)) が1998年に採用された。これはモルモットを用いるMaximization法に完全に替わるものではないが、動物の使用数や動物に与える苦痛が少ない方法である。2000年には動物実験に関する人道的なエンドポイントに関するガイドライン⁵⁾を通知した。また、単回投与毒性試験においては統計的に厳密なLD50値を求めないとし、従来の多数の動物を用いてLD50値を求める試験法(401)を廃止し、10匹程度の動物でLD50を推定する試験法(420: Fixed Dose Method, 423: Acute Toxic Class Method, 425: Up-and-Down Procedure)を採用した(2001)。また、2002年には皮膚腐食性試験として皮膚の導電度を測定する方法(TER法)や培養細胞を用いて作成した皮膚三次元モデルを用いる試験法(430: Transcutaneous Electrical Resistance Test, 431: Human Skin Model Test)が、2004年には皮膚吸収性試験のためのヒトやブタの皮膚を用いた試験法(同428: Skin Absorption: *in vitro* Method)や光毒性試験ガイドライン(432: *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test)が採用された。これらの試験法については別に解説した⁴⁾。

最近の動きとして、2006年には皮膚腐食性のための*In vitro*膜バリアー試験法(435: *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion)が掲載された。また、ガイドライン案として、2006年度に*In vitro*小核試験(Draft Proposal for 487: *In Vitro* Micronucleus Test)、並びに、hER-HeLa-9903 Cell Lineを用いたStably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assayがエストロゲン様作用の検出試験法として掲載された⁶⁾。今後も*in vitro*の眼刺激性試験や皮膚刺激性試験、感作性試験などの開発が期待されている。

表1 代替法の行政的受け入れ状況 (http://ecvam.jrc.it/index.htmに一部追加)

- 1) EpiSkin™ skin corrosivity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
- 2) 3T3 NRU phototoxicity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
- 3) EpiDerm™ skin corrosivity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
- 4) Rat TER skin corrosivity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
- 5) In vitro tests for percutaneous absorption (OECD 2002)
- 6) Deletion of the acute oral toxicity test, Lethal Dose (LD50) (67/548/EEC 2001, OECD 2001)
- 7) Local Lymph Node Assay for skin sensitisation (LLNA) (OECD 1998, updated 2002, U.S. EPA OPPTS 1998)
- 8) ELISA test for batch potency testing of erysipelas vaccines (EDQM/European Pharmacopoeia 2004)
- 9) ELISA test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use (EDQM/European Pharmacopoeia 2003)
- 10) Toxin Binding Inhibition (ToBI) test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use (EDQM/European Pharmacopoeia, 2003)
- 11) In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion (OECD 2006)

括弧の中はそれぞれの機関で承認された年を示した。

EDQM: European Directorate of the Quality of Medicines & HealthCare

2-2. EUにおける状況

2-2-1. EUにおける化粧品の安全性評価と代替法の受け入れ状況

EUでは1993年の化粧品の安全性評価に関する指令⁷⁾において、適切な代替法があればとの前提つきではあるが、1998年までには実験動物を用いて安全性を評価した化粧品原料および最終製品の販売を禁止することを決めた。しかし、代替法の開発・バリデーションが充分でなかったことから、その施行を2000年6月30日まで延期した。その後、2002年6月末まで再度延期された。その再再延長に関する調停会議での合意結果を踏まえ、化粧品およびその原料の安全性評価に関する化粧品指令第7次改正がEU政府および議会で認められ、2003年3月11日付けで公布された⁸⁾。その内容は①ECVAMやOECDで承認された代替法があるものはすべて即時禁止、②2009年までに動物を用いるすべての安全性試験を全面的に禁止、および動物実験を行った化粧品の販売禁止、また、動物を用いて安全性評価を行った化粧品のEU域内への輸入を禁止、ただし、③薬物動態試験や生殖発生毒性、反復投与毒性試験などの全身的な作用を検討する試験については2013年まで猶予する、というものである。

第七改正が成立したことを受け、ECVAMは重点課題を以下の11項目に整理した⁹⁾。1) 全身毒

性(単回投与毒性、反復投与毒性、神経毒性、肺毒性、腎毒性、肝毒性、免疫毒性、血液毒性)、2) 局所毒性(光毒性、皮膚腐食性、皮膚刺激性、眼刺激性)、3) 感作性(皮膚感作性、吸入感作性)、4) 発がん性、5) 生殖毒性、6) トキシコキネティクス、7) 環境毒性、8) 科学的な情報サービス、9) 定量的構造活性相関、10) 生物学材料(発熱性物質試験)、11) 戦略開発(*in vitro* 毒性試験やバリデーションにおけるGLP, Good Cell Culture Practice (GCCP) のガイドライン、トキシコゲノミクス)。

これらのうち、光毒性試験、皮膚腐食性試験、皮膚感作性試験、および経皮吸収試験についてはOECDレベルあるいはEUレベルでのガイドラインあるいはその案が存在する(表1)。また、ECVAMの諮問委員会であるESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) は1997年には3T3 NRU 光毒性試験、1998年には皮膚腐食性試験としてヒト皮膚三次元モデルであるEPISKIN™とTER法を、2000年には皮膚感作性のためのLLNA試験、EpiDerm™皮膚腐食性試験、CORROSITEX™皮膚腐食性試験を確立された代替試験法として承認した(表2)。生殖毒性試験については2002年には生殖発生毒性評価のための胚性幹細胞試験、全胚培養試験、マイクロマス試験を科学的にバリデーションされた方法として