

1/1.2³x, 1/1.2⁴x, 1/1.2⁵x 及び 1/1.2⁶x (CV75) 設定した。試験は3回行い、コントロールと比較して CD86/CD54 どちらかの発現量がそれぞれ1濃度でも 150, 200%を超えた試験が2回以上あった場合を陽性とした。

被験物質: In vivo 感作性試験結果のある化粧品原料として、防腐剤、香料及び染毛剤の中から30品を選択し、試験を行った。

施設間再現性を確認する目的で、防腐剤、香料及び染毛剤それぞれについて2施設で試験を行った。さらに溶媒の影響、超音波処理による被験物質の分散状態の影響や、原体と三量体との比較など、h-CLAT の実用化に向けた追加検討も行った。

(倫理面への配慮)

本研究は感作性試験代替法を開発することで実験動物の福祉向上を目指すものであるため in vitro の実験のみを行っており、ヒトや動物の権利や福祉に抵触するところはない。

C. 研究結果及び考察

C-1 防腐剤の検討

C-1-1 イントロダクション

化粧品原料として使用される防腐剤の感作性評価における h-CLAT の有用性を調べるために、防腐剤16品(動物試験において感作性が陽性の物質13品と陰性の物質3品)を評価し、動物試験結果との対応性を検証した。また、現在のところ h-CLAT で使用可能な2種類の溶媒である生理食塩水(Saline)と DMSO (dimethyl sulfoxide)の違いが試験結果に与える影響についても検討した。さらに、h-CLAT の結果から in vivo 感作性強度を予測することができるかを調べるために、イソチアゾリン系骨格を有する防腐剤の in vivo 感作性強度と h-CLAT の結果を比較した。試験は施設間再現性を評価するために、2施設において同様に実施した。

C-1-2 結果及び考察

防腐剤16品の評価結果を表1に示した。動物試験結果との一致率については、施設Aが81%、施設Bは75%であった。陽性物質の検出率は施設Aが92%、施設Bは85%と良好であった。一方、陰性物質の検出率は施設A、Bとも33%であった。また、施設間再現性については16品のうち15品で一致し、良好と考えられた。

偽陰性物質は2品存在した。Clotrimazole (2施設ともに陰性)には、物質自身の蛍光

が測定結果に影響を与えた可能性が考えられた。Chlorhexidine digluconate (1施設で偽陰性)については、モルモットで陰性の報告⁹やヒトにおける陽性率の低さ⁹から、感作性ポテンシャルは弱いと考えられ、感度の観点から h-CLAT では正しく評価できなかった可能性が考えられた。一方、偽陽性も2品存在した。Benzyl alcohol はヒトによる試験である HRIPT (Human Repeat Insult Patch Testing) では陽性であるとの報告¹⁰もあり、ヒトにおける感作性ポテンシャルを h-CLAT は捉えている可能性が考えられた。Phenol が2施設共に陽性になった原因は現時点では不明である。

以上、防腐剤の評価について、偽陽性率が高い傾向があるものの、動物試験結果との一致率、陽性の検出率及び施設間再現性は良好であったことから、in vitro の試験系として h-CLAT は有用であると考えられた。

次に、溶媒の違いが試験の結果に与える影響について検討した。2施設共に感作陽性を正しく評価できた防腐剤5品について、被験物質を培地に溶解させるために調製する stock solution を Saline と DMSO それぞれで調製し、試験を行った。結果を表2に示した。まず、細胞毒性試験により求めた CV75 について見ると、いずれの溶媒を用いても結果はほぼ同様であった。また、細胞毒性試験の結果に基づいて実施した本試験についても、2施設共に、溶媒の違いによる判定結果の差はなかった。以上より、h-CLAT において stock solution 調製の際の溶媒の違いが結果に影響する可能性は低いと考えられた。このことは、溶媒選択の判断により h-CLAT の結果が異なる可能性が低いこと、すなわち本試験法の再現性が高いことを示唆するものである。しかし評価する物質の物性によっては、溶媒への溶解性が著しく異なることも考えられ、そうした場合についての検討が今後必要と考えられる。

最後に、イソチアゾリン骨格を有する防腐剤の感作性強度と h-CLAT の結果の比較を行った(図1)。MCIとMIの構造の違いは、置換基としての塩素を含んでいるかどうかのみである。まず in vivo における感作性強度では、LLNA と HRIPT の閾値(いずれも値が低いほど感作性ポテンシャルが高い)のどちらの結果も MCI/MI (4:1の混合物)がMIより強い感作性ポテンシャルを有していることを示していた。ここで、h-CLAT の結果

では CD86 の閾値である EC150 の値が MCI/MI より MI のそれより数倍高く *in vivo* の感作性ポテンシャルと対応していたことから h-CLAT は分子内塩素原子の有無により生じた感作性ポテンシャルの差を検出できた可能性が考えられた。今後は、さらに感作性物質の *in vivo* 感作性ポテンシャルと h-CLAT の結果の対応性を解析することで、h-CLAT が感作陽性・陰性の区別だけでなくポテンシャルまで予測可能であるかを検討する必要があると考える。

C-2 染毛剤の評価

C-2-1 イントロダクション

化粧品原料として使用される染毛剤の感作性評価における h-CLAT の有用性を調べるために、染毛剤 7 品 (全て LLNA による感作陽性物質) を評価し、LLNA 結果との対応性を検討した。また、染毛剤のうち PPD (p-Phenylene diamine) は自身で蛍光を発することが知られている。このような自身の蛍光を有する化合物の非特異的な細胞膜への結合は、蛍光抗体により特異的な蛋白発現量を測定するフローサイトメトリー解析の結果に影響を与える可能性があるため、フローサイトメトリーの励起波長 488nm により励起させた PPD の蛍光スペクトルを測定した。さらに、細胞に PPD を 24 時間適用したアイソタイプコントロール (測定時に CD86 または CD54 抗体処理を行わないコントロール) の蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定し、測定結果に自家蛍光が影響するかどうかを検討した。最後に、PPD の 3 量体であり、LLNA において感作性ポテンシャルが高いとされる Bandrowski's Base¹¹⁾ についても h-CLAT による評価を行い、PPD との比較を行った。

C-2-2 結果及び考察

染毛剤 7 品の結果を表 3 に示した。施設 C、D とともに評価可能であった 6 品全て陽性となり、LLNA との一致率は、100% と非常に良好であった。また細胞毒性試験についても 2 施設でほぼ同様の結果が得られた。ただし、2, 5-Diaminotoluene sulfate については、指定溶媒 (Saline あるいは DMSO) に対する溶解性が非常に悪く、h-CLAT では評価不可能と判断した。

次に PPD について、フローサイトメトリー

のレーザー光 (励起波長 488nm) と同じ励起波長による蛍光スペクトルを測定したところ、フローサイトメトリーの検出波長である 530nm 付近において蛍光が認められた (図 2-a)。このことは、PPD を処理した細胞のアイソタイプコントロールの蛍光の濃度依存的増加が PPD 自身の蛍光によるものであることを示すものと考えられる (図 2-b)。このような自家蛍光を有する PPD でも、h-CLAT は陽性と評価しており (表 4)、これは CD86 および CD54 の相対発現量を計算する際抗体処理サンプルの平均蛍光強度からアイソタイプ抗体処理サンプルの平均蛍光強度を引くことで補正が可能であるためと考えられた。

以上より、染毛剤において、LLNA との一致率および施設間再現性は非常に良好であったことから、*in vitro* の試験系として h-CLAT は有用であると考えられた。一方で、溶解性の悪い物質についての評価は、適切な溶媒の選択など今後の課題と考えられた。

最後に、PPD の 3 量体である Bandrowski's Base (以下 BB) を h-CLAT で評価し、PPD との比較を行った (図 3)。細胞毒性については、BB は PPD よりも強かった。BB はその subtoxic な濃度において CD86/CD54 の発現をともに亢進させたが、その発現亢進の程度は PPD よりも強かった。特に CD54 については PPD が cut off point である 200% を超えなかったのに対して、BB は最大 3000% を超える大幅な発現亢進があった。PPD の酸化物である BB は LLNA における感作性ポテンシャルが高いことが知られており、h-CLAT のこうした結果は *in vivo* における感作性ポテンシャルの違いを裏付けるものと考えられた。

C-3 香料の検討

C-3-1 イントロダクション

化粧品原料として使用される香料の感作性評価における h-CLAT の有用性を調べるために、香料 7 品 (LLNA による感作陽性物質 4 品と感作陰性物質 3 品) を評価し、LLNA 結果との対応性を検討した。また香料は揮発性であり、細胞に適用後に揮発してコントロールなど他の測定サンプルに影響を与える可能性がある。そこで培養プレートをシールすることで揮発を防ぎ、結果に違いがあるかどうか調べた。さらに、被験物質を培地にけん濁させた状態での超音波処理 (ソニケーショ

ン)条件が結果に影響を与えるかどうかを検討した。試験は施設間再現性を評価するために、2施設において同様に実施した。

C-3-2 結果及び考察

香料7品の結果を表4に示した。LLNAとの一致率については、施設E、Fともに86%であった。陽性物質の検出率は施設E、Fともに100%非常に良好であり、陰性の検出率は施設E、Fとも67%であった。また、施設間再現性については検討した7品全てについて一致し、非常に良好と考えられた。

今回検討した感作性陽性の4品のうち、偽陰性となった物質は存在しなかった。偽陽性物質は、2施設ともDiethylphthalateのみであった。Diethylphthalateはヒトにおいてパッチテスト陽性との報告¹³⁾が複数あることから、h-CLATはLLNAでは捉えられなかったヒトにおける感作性ポテンシャルを捉えている可能性が考えられた。

さらに、揮発物質である香料の他のwellへの影響をなくすために被験物質適用時に培養プレートにシールした場合でも、結果は通常の場合と同じであった(表5)。また濃度設定のための細胞毒性試験においてもシールの有無は結果に殆ど影響しなかった(データ省略)。揮発性物質を細胞に適用した場合、培養の間に揮発してCO₂インキュベーターなどの培養環境に影響を与える可能性がある。今回の結果より、揮発性物質を評価する場合はプレート表面をシールすることで結果に影響を与えずに培養環境への影響をなくすことが可能であることが明らかとなった。

また、細胞毒性試験について見た場合、特に溶解性が悪かったMethyl-2-nonynoateとDiethylphthalateの2品の施設による違いが大きかった(表5)。この結果の違いは、施設Eが被験物質を培地に懸濁させるためにソニケーションを行ったのに対し、施設Fはしていなかったためと考えられた。そこでMethyl-2-nonynoateを培地に加えた後、ソニケーションの時間により濁度と細胞毒性がどのように変化するかを検討した。図4に示したように、ソニケーション10秒後より濁度は増加し、細胞毒性も強くなっていた。この結果から、ソニケーションにより被験物質の分散状態が良くなることで細胞との接触機会が増加した結果毒性が強まったと考えられた。さらにMethyl-2-nonynoateについてソニケーションの時間を変化させ、濁度

とCD86およびCD54の発現量が変化するかどうか検討した。図5に示すように、ソニケーション時間が長くなるにつれて濁度が上昇したが、CD86およびCD54の発現量には大きな変化は見られなかった。したがって、難溶性物質を培地に懸濁させる場合、分散状態によって細胞毒性試験の結果に違いが生じる可能性があるが、それに応じて濃度を設定すればh-CLATは陰性・陽性を適切に評価可能と考えられた。

以上揮発性や難溶性などの特徴を有するものが多い香料において、LLNAとの一致率および施設間再現性は良好であったことから、in vitroの試験系としてh-CLATは有用であると考えられた。

D. 結論

ヒト細胞株THP-1細胞のCD86及びCD54の発現亢進を指標にした感作性試験代替法であるh-CLATの化粧品原料における有用性と適用限界を明らかにすべく検討を行った。防腐剤、染毛剤および香料30品の検討により、自家蛍光を有する物質や揮発性物質を含む化粧品原料評価におけるh-CLATの有用性が示された。一方、適切に評価できなかった原料に関する考察より、感作性ポテンシャルが非常に弱い物質や難溶性物質に関する課題も明らかとなった。また、構造が類似している感作性物質のh-CLAT結果の考察より、こうしたin vitroのモデル評価系がin vivoにおける感作性ポテンシャルの予測に有用である可能性が示された。今後化粧品原料をより正確に評価するための試験法の改良や、試験法の信頼性を高める研究を行うことで、本試験法の公的認知につなげていきたい。

4) E. 参考文献

- 1) Ashikaga T., Yoshida Y., Hirota M., Yoneyama K., Itagaki H., Sakaguchi H., Miyazawa Y., Ito Y., Suzuki H., Toyoda H., "Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol", *Toxicology in Vitro*, 20, 767-773, 2006.
- 2) Sakaguchi H., Ashikaga T., Miyazawa Y., Yoshida Y., Ito Y., Yoneyama K.,

Hirota M., Itagaki H., Toyoda H., Suzuki H., "Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT", *Toxicology in Vitro*, 20, 774-784, 2006.

- 3) 足利太可雄, 坂口斉, "ヒト細胞株 (THP-1) を用いた皮膚感作性試験代替法の開発と 2 施設間バリデーション", フレグランスジャーナル, 8, 108-111, 2004.
- 4) Ashikaga T., Sakaguchi H., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yamada T., Yoshida M., Ota N., Hasegawa S., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Kosaka N. Sono S and Ohno Y., "Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study", *AATEX* 13 (1), 27-35, 2008

F. 研究発表

1. 論文発表

- 5) Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Yamada T., Yoshida M., Kodama T., Sono S., Ashikaga T., Sato J., Ohta N., Hasegawa S., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H. and Ohno Y., "A study of the criteria for THP-1 cells selection in the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) : Results of 2nd Japanese Inter-laboratory Study", *AATEX*, 13 (2), 55-62, 2008.
- 6) Sono S., Yamada T., Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yoshida M., Ota N., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H., Hasegawa S., Ashikaga T. and Ohno Yasuo, "A study on serum difference on test results in the human Cell Line Activation Test (h-CLAT): Results of 3rd Japanese inter-laboratory study", *AATEX*, 13 (2), 63-69, 2008.
- 7) Mizuno M., Yoshida M., Kodama T., Kosaka N., Okamoto K., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Ashikaga T., Kuwahara H., Sakaguchi H., Sato J., Ota N., Okamoto Y. and Ohno Y., "Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT)

results: Results of the 4th Japanese inter-laboratory Study", *AATEX*, 13 (2), 70-82, 2008.

2. 学会発表 (講演及び学会発表)

- 1) 小坂七重, 稲葉宏幸, 岡本賢二, 水野誠, 蘭さき子, 加藤義直, 岸正孝, 足利太可雄, 岡本裕子, 桑原裕史, 中村恒彰, 坂口斉, 大野泰雄 "In vitro 皮膚感作性試験 : h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の日本における共同研究 (第5報) - 防腐剤の評価における h-CLAT の有用性検討 -" 日本動物実験代替法学会 21 回大会, ポスター番号 33, 2008.
- 2) 岡本賢二, 加藤義直, 岸正孝, 桑原裕史, 蘭さき子, 小坂七重, 水野誠, 稲葉宏幸, 中村恒彰, 岡本裕子, 坂口斉, 足利太可雄, 大野泰雄, "In vitro 皮膚感作性試験 : h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の日本における共同研究 (第6報) - 染毛剤の評価における h-CLAT の有用性検討 -" 日本動物実験代替法学会 21 回大会, ポスター番号 34, 2008.
- 3) 蘭さき子, 水野誠, 小坂七重, 岡本賢二, 加藤義直, 稲葉宏幸, 中村恒彰, 岸正孝, 桑原裕史, 坂口斉, 岡本裕子, 足利太可雄, 大野泰雄, "In vitro 皮膚感作性試験 : h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の日本における共同研究 (第7報) - 香料成分の評価における h-CLAT の有用性検討 -" 日本動物実験代替法学会 21 回大会, ポスター番号 35, 2008.

G. 参考文献

- 8) Frankild S., Volund A., Wahlberg J., and Andersen K., "Comparison of the Sensitivities of the Buehler Test and the Guinea Pig Maximization Test for Predictive Testing of Contact Allergy", *Acta Derm Venereol*, 80 256-262, 2008
- 9) Goon A. T., White I. R., Rycroft R. J. G., and McFadden J. P., "Allergic contact dermatitis from chlorhexidine", *Dermatitis*, 15 (1): 45-47, 2004
- 10) Harrison, L. B. and Stolman L. P., "Repeated insult patch test (RIPT)

with benzyl alcohol” RIFM-FEMA database. Reference Location Number 44246-44247, 2002-2003.

- 11) J. M. L. White, P. Kullavanijaya, I. Duangdeeden, R. Zazzeroni, N. J. Gilmour, D. A. Basketter and J. P. McFadden. “p-Phenylenediamine allergy: the role of Bandrowski’s base”, *Clinical and Experimental Allergy*, **36** (10), 1289-1293, 2006.
- 12) Kanerva L., Jolanki R., and Estlander T., “Allergic and irritant patch test reactions to plastic and glue allergens”. *Contact Dermatitis*, **37** (6), 301-302, 1997.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書
「安全性評価のための動物実験代替法の開発及び評価体制の確立に関する研究」
「代替法についての国際情勢の調査」

分担研究者 板垣 宏 日本化粧品工業連合会、技術委員会動物実験代替専門委員会委員長
研究協力者 岡本 裕子、太田 尚子、金森 健之、川上 幸治、桑原 裕史、坂口 育代、
坂口 斉、佐藤 淳、實川 節子、瀬戸 洋一、中村 恒彰、萩野 滋延、
森 辰実、矢作 彰一

研究要旨

本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するためには、関連する国際情勢の調査は必要不可欠な研究活動である。特に EU では、2003 年 3 月 11 日に公布された「化粧品指令第 7 次改正」と 2007 年 6 月 1 日に発効した「化学物質の登録と規制 (REACH)」のため、ECVAM を中心に動物実験代替法の開発と評価は非常に進展している。一方、米国においては ICCVAM が中心となって代替法の評価が進行している。近年、代替法の開発と評価はグローバル化が加速し、国際的な協力体制が整いつつあり、本邦における対応策策定にはこれら国際情勢の調査・把握は重要である。

本年度の特筆すべき動きは、ICATM (International Cooperation on Alternative Test Methods) の設立である。この組織は、国際的なバリデーション研究を推進し、専門家による第三者評価を合同で行い、行政への受け入れを加速させることを目的としている。

EU においては、皮膚刺激性試験代替法である EpiDerm SIT と SkinEthic RHE が ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) により承認されたことが挙げられる。昨年度に承認された EPI SKIN を含めて、ヒト皮膚モデル試験が OECD ドラフトガイドラインとして提案されている。眼刺激性試験代替法については、過去にバリデーションが実施された Neutral Red Release、Fluorescein Leakage 等の試験法の再評価が進められ、2009 年 3 月の ESAC において認証される可能性がある。

米国においては、眼刺激性試験代替法の Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) と Isolated Chicken Eye (ICE) が、米国危険物質法 (Federal Hazardous Substance Act) の下で実施されるラベル表示のための分類に適用されることが了承された。また、NICEATM が急性経口毒性試験の投与開始用量の推定に用いる *in vitro* 細胞毒性試験に関する評価報告書を公表したことが挙げられる。

日本においては、JaCVAM の活動本格化、厚生労働科学研究班における「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会」活動の進展、さらに HS 財団の動物実験実施施設認証センターの発足があげられる。化粧品業界では、日本化粧品工業連合会より「化粧品の安全性評価に関する指針 2008」が発行され、業界における安全性評価に関する考え方が改めて示された。

このように国内外の代替法に関する情勢は急速に変化しており、関連情報を継続的に収集分析し、その結果を公表していくことは、本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するうえで必要と考えられる。

A. 研究目的

本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するためには、関連する国際情勢の調査は必要不可欠な研究活動である。特に EU では、2003 年 3 月 11 日に公布された「化粧品指令第 7 次改正」と 2007 年 6 月 1 日に発効した「化学物質の登録と規制 (REACH)」のため、ECVAM を中心に動物実験代替法開発と評

価は非常に進展している。

一方、米国においては ICCVAM が中心となって代替法の評価が進行している。最近では、ICATM の設立に見られるように国際的なバリデーションや専門家による第三者評価の体制が整いつつあり、今後、代替法の開発と評価はグローバル化が加速するものと考えられ、本邦における対応策策定にはこれら国際情勢

の調査・把握は重要である。

本研究においては、以前よりこれらの欧米の動向をより密接な情報収集活動により把握し、適切な対応を講じることで、動物実験代替法の開発と利用を促進することを目標に調査研究を推進してきた。

B. 研究方法

B-1 情報収集

情報収集は、過去の本研究による経験から、いくつかのホームページ(SCCP, OECD, ECVAM, ICCVAM, EPAA など)を定期的に検索すると共に EU については同地域の化粧品工業会である COLIPA、米国については PCPC との連繫を通じて実施した。その他、代替法の承認状況等については、専門学会の会誌やニュースレターも参考とした。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果及び考察

C-1 EU における動物実験禁止と代替法開発の動向

C-1-1 化粧品指令第7次改正

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

- ・化粧品及び化粧品原料の EU 域内の動物実験禁止
 - ・化粧品：加盟国の国内法施行後に即時禁止
 - ※猶予期間は最大18ヶ月(2004年9月)
 - ・原料：代替法がある場合は加盟国の国内法施行後に即時禁止、完全な動物実験禁止はEU化粧品指令発効の6年後(2009年3月)。
 - ・EU委員会は、OECDのバリデーションの進展を考慮した上で、SCCNFP(現、SCCP)及びECVAMと協議して、種々の試験の段階的廃止に関する期限などの予定を立案する。
- ・動物実験を実施した製品または動物実験を実施した原料を含む製品のEU域内の販売禁止(EU域外での動物実験がなされた製品及び原料も含む)
 - ・代替法がある場合は、加盟国の国内法施行後に即時禁止

※猶予期間は最大18ヶ月(2004年9月)

- ・完全な販売禁止は、化粧品指令発効の6年後(2009年3月)以降
- 例外：反復毒性、生殖毒性、薬物動態試験については2013年3月からの販売禁止
- ・EU委員会は、OECDのバリデーションの進展を考慮した上で、SCCNFP(現、SCCP)及びECVAMと協議して、種々の試験の段階的廃止に関する期限などの予定を立案する。

C-1-2 ECVAMにおける代替法開発状況

化粧品指令第7次改正では種々の動物試験の段階的廃止に関する timetable 作成が要求されている。本件に関しては、2004年4月30日に、“Report for establishing the timetable for phasing out animal testing for the purpose of the Cosmetic Directive”をECVAMが報告している⁴⁾。このECVAMの報告書では、皮膚腐食性、皮膚刺激性、光毒性、光遺伝毒性を除く多くの試験法は、化粧品指令第7次改正の禁止年には完全代替は困難と予測されている。

このため、ECVAM⁵⁾は、第6次 Framework Programme on Research and Development として、① A-Cute-Tox Project(急性毒性試験)、② ReProTect Project(生殖発生毒性試験)、③ Sens-it-iv(感作性試験)を組織している。

A-Cute-Tox Projectは実験動物を使用しない急性毒性試験の開発を目的に2005年1月1日に開始された5年間のプロジェクトである。35名の共同研究者、総予算1560万ユーロ、そのうちEUから900万ユーロの予算を受けて、ヒトにおける急性毒性を予測する *in vitro* 試験の開発、戦略的最適化、プレバリデーション、データベースの作成等を実施している。現在9つの Work package で検討が進められている。

ReProTect Projectは *in vitro* 生殖発生毒性試験の開発と最適化の促進を目的に、35の大学、行政機関、企業などの共同研究者、約910万ユーロの資金を受けて進められている。正式には2004年7月から5年間の予定で開始され、現在3つの大きな研究テーマ(受精、着床、生前発育)そしてそれら研究の横断的技術に関して研究が進められている。

Sens-it-iv プロジェクトは30名の共同研究者、1100万ユーロの資金を受けて、2005

年10月から5年間の予定で開始された。プロジェクトの目的は、皮膚及び吸入における感受性物質を同定する *in vitro* 試験法による動物試験の置換である。現在このプロジェクトには28のグループ(9つの企業、15の大学や研究機関、4つの業界団体)が参加しており、プロジェクト活動は10のWork packageで進められている。

ECVAMは第7次Framework Programme on Research and Developmentとして2008年5月よりPredict-IVというプロジェクトを5年間の予定で開始した^{6),7)}。このプロジェクトは、動物によらない試験系、細胞生物学、機能毒性学及び*in silico*を統合することによって、迅速かつ安価に薬物の安全性を評価する戦略を作ることを目標としている。

皮膚刺激性試験代替法に関しては、ESACが、2008年11月5日の第29回会議において、皮膚刺激性試験代替法としてEpiDerm SITとSkinEthic RHEを承認した。これらの試験法は、無皮膚刺激性物質(EUにおけるノンラベル区分)と皮膚刺激性物質(R38の注意表示をする区分)を判別できる試験法であり、無～弱い皮膚刺激性を評価できることから、化粧品原料の評価にも活用されると考えられる。このように化粧品原料の皮膚刺激性を評価できると考えられる*in vitro*法は、昨年ESACで承認されたEPISKINと合わせて3種となり、試験法の選択肢が広まった。

眼刺激性試験代替法に関しては、ECVAMにおいて弱い眼刺激性を検出するために細胞を用いた方法(Neutral Red Release: NRR, Red Blood Cell: RBC, Fluorescein Leakage: FL, Cytosensor Microphysiometer: CM)が再評価されている。また、3D培養モデル(SkinEthic Human Corneal Epithelial Model, EpiOcular OCL-200 Model)のバリデーションが実施されている。

2008年5月7,8日に行われたESACの第28回会議において、牛胎児血清FCSや他の動物由来の栄養補充品の使用に関するステートメントが承認された。これは新しい*in vitro*培養試験法は可能な限り無血清とすることを推奨するものであり、これにより、ECVAMでバリデーションまたはプレバリデーションをする方法は無血清代替物についての検討が必要である。この背景には、再現性の欠如、混入物のリスク、バッチでの変動、高価といった事がある。

2008年4月30日にECVAMのHeadであった

Thomas Hartung氏が辞任し、約半年間後任が決まらなかったが、11月1日にJoachim Kreysa氏が就任した⁸⁾。

C-1-3 SCCPの状況

2008年7月2日付けで欧州委員会は「化粧品業界における動物試験代替法の開発、バリデーション及び法的な受け入れに関するレポート(2007)」を発行した。この中で、代替法の開発状況については皮膚刺激性のEpiskinを除き2005年と大差なしと述べている。また、EU域内で実施された動物実験に言及し、毒性試験の割合は8%で、そのうち、化粧品に関したものは0.5%と報告している⁹⁾。

2009年1月21日の第19回SCCP総会で「化粧品原料の動物実験を用いない遺伝毒性/変異原性試験に関する状況報告」が採択された⁹⁾。これによると、現在の*in vitro*試験は非常に感度が高いとしている。そして、*In vitro*試験の組合せで陰性の場合、変異原性は陰性とできるが、陽性を示した場合、動物実験をしないで陽性を覆すことの可能な代替法は現時点で無いとしている。したがって、2009年3月11日以降、化粧品原料の変異原性を科学的に評価できない場合が多くなり、化粧品原料の毒性評価の重要な一部分を果たすことができなくなると述べている。

C-1-4 EU委員会の状況

2005年11月7日に行われた欧州委員会主催のワークショップ「EU goes Alternatives」において3Rs宣言が発表され、今後、EUの各産業分野において、効果と安全性の両面に関する代替法の開発を促進することが宣言された。EPAA(European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing)は欧州委員会、工業会(化学品、医薬品、化粧品)、様々な産業分野における会社の共同のパートナーシップである¹⁰⁾。欧州委員会からは企業(DG Enterprise)、研究(DG Research)、健康と消費者保護(DG Health and Consumer Protection)、環境(DG Environment)、共同研究センター(DG Joint Research Centre)の常任理事会及びECVAM(European Centre for the Validation of Alternative Methods)の6団体が参加している。工業会はCEFIC(欧州化学品工業会)、EFPIA(欧州製薬団体連合会)、COLIPA(欧州化粧品工業会)、Euro BIO(欧州バイオテクノロジー工業会)、AISE(石鹼洗剤協会)、ECPA(欧州農業工業

会) など7団体が参加している。企業からは医薬品、化粧品、化学品メーカーなど37社が参加している。その目的は、動物を用いる安全性試験の代替のアプローチとしての新しい3Rs (refine, reduce, replace) の推進である。

パートナーシップの構造は以下の通りである。

- ・年次大会：ヨーロッパとグローバルにおける進歩を再検討する、年に一度の3Rイベント。
- ・パートナーシップ運営委員会：欧州委員会、関連業界、企業からなり、レビューワークプラン、戦略、タイムラインを提案する。
- ・ワーキンググループ：欧州委員会、企業、適切な専門家のサポートで個々のテーマを扱う小ワーキンググループ。
- ・ステークホルダーのミラーグループ：学界、動物福祉団体、患者団体、消費者保護グループ、他のステークホルダーからなり、より広い見地で運営委員会にアドバイスする。

2006年5月に公表されたアクションプログラムは以下の5つのメインテーマからなっている。

- ・その後のアクションの計画と優先順位の情報を提供するための現在と過去の3Rsのマッピング
- ・3Rsのアプリケーションに基づく、今後の研究の優先順位付け、促進、及び遂行
- ・3Rsの使用におけるベストプラクティスの同定、普及、遂行
- ・規制と政策決定における、3Rsの実現
- ・3Rsに基づくバリデーションと承認

2008年に入って、アクションプログラムの中間修正が確定された。分野横断的な交流、ワーキンググループ間の相乗効果、明確な成果の得られる活動を強化する方向が示された。

2008年4月28～29日にEPAAは「安全性に関する新しい展望」と題するWorkshopを開催した。反復投与毒性試験の分野において規制試験法を作るために科学的な基盤を再考することが重要であるとの方向が示され、毒性学、生化学、数学分野の関連への資金提供が推薦された。具体的には、コンピューター化学、数学的モデリング、幹細胞生物学、omics技術、システム生物学、バイオエンジニアリングの各領域であった。

2008年5月19～20日にEPAAは「3Rsのバリデーションへの障害の克服」と題する

Workshopを開催した。共同研究時やバリデーション過程におけるコミュニケーションの強化等についての提言がなされた。ECVAMとの密接な協調、バリデーション過程の最適化、規制との関連度による優先順位の決定、統合的な試験戦略 (Integrated Testing Strategies; ITS) の検証などの方向が示された。バリデーション過程における初期段階でICCVAMやJaCVAMと協議することも示された。

2008年11月3日にBrusselsで第4回の年次大会 (Annual Conference 2008) が開催された。内容はEPAAのこの1年間での活動成果や今後の活動内容に加え、2008年度のテーマとして掲げられた「3Rsへの研究」についてであった。4月に開催した「安全性に関する新しい展望」のWorkshopが、成果として新規のフレームワーク研究プログラム (FP7) の提案に結びつき、研究を促進したことが示された。これにより、反復投与毒性試験代替法に関する研究の進展が期待される。また、5月に開催した「3Rsのバリデーションへの障害の克服」のWorkshopにより、ECVAMとの協調のための新しい構想を明確にしたことが示された。2009年度の計画は、2006～2010アクションプログラムの継続実施である。

このようなEPAAの活動に対し、ミラーグループは、3Rsへの直接的、間接的な貢献を認めながらも、一方でその効果を測る指標を明確にすべきであるとの意見を表明している。

化学物質の登録と規制^{11)~14)} (Registration Evaluation and Authorization of Chemicals; REACH) については、EU域内で年間1トン以上製造・輸入されるすべての化学物質の登録を既存物質と新規物質を区別せずに義務付けるものであり、2007年6月1日に施行され、2008年6月1日に新官庁である欧州化学物質庁 (European Chemicals Agency; ECHA) が発足した。それと同時に年間1トン以上製造/輸入されている既存化学物質の予備登録が開始され、2008年12月1日に締め切られた。約6万5千社から約260万件の予備登録がなされた。既存物質の登録期限は物質の製造・輸入量や有害性への懸念によって分けられ、2018年までに以下に示すように段階的に設けられている。

- ・年間1000トン以上の製造/輸入量のあるもの等：2010年11月30日
- ・年間100～1000トンの製造/輸入量のあるもの：2013年5月31日
- ・年間1～100トンの製造/輸入量のあるもの

の：2018年6月1日

年間1トン以上の物質の登録には、製造・輸入量に応じて物理化学的性状、ヒトの健康への有害性、生態毒性の情報が必要となる。動物試験が行われる場合、重複を避けるために関係書類の審査が義務づけられる。ヒトに対する毒性に関する情報は、可能なら代替手段によって脊椎動物以外の方法を用いて入手する。これらの代替手段はEU委員会によって確認され、さらに欧州化学物質庁または国際的な機関によって認定されなくてはならない。EU委員会は代替法の使用に関し3年毎に報告書を提出し、必要なら新たな法的提案を行うことになっている。

以下に製造・輸入量ごとに実施すべき毒性試験に関して記載する。

- ・ *in vitro* 皮膚刺激性または皮膚腐食性：
 >1 t/年
- ・ *in vivo* 皮膚刺激性試験：>10 t/年
- ・ *in vitro* 眼刺激性試験：>1 t/年
- ・ *in vivo* 眼刺激性試験：>10 t/年
- ・ 皮膚感作性：>1 t/年
- ・ 変異原性：>1 t/年
 - ・ バクテリアを用いる *in vitro* 試験：>1 t/年
 - ・ 哺乳類細胞を用いる *in vitro* 細胞遺伝学試験または *in vitro* 小核試験：>10 t/年
 - ・ 哺乳類細胞を用いる *in vitro* 遺伝子突然変異試験：>10 t/年（ただし、バクテリアを用いる *in vitro* 試験と哺乳類細胞を用いる *in vitro* 細胞遺伝学試験または *in vitro* 小核試験が陰性の場合）
- ・ 急性毒性：>1 t/年
 - ・ 経口経路：>1 t/年
 - ・ 吸入または皮膚経路：>10 t/年
- ・ 反復投与毒性：>10 t/年
 - ・ 短期反復投与毒性試験（28日間）：>10 t/年
 - ・ 慢性毒性（90日）：>100 t/年（>10 t/年の場合も有り）
 - ・ 慢性毒性（12ヶ月）や追加評価：>1000 t/年（必要な場合有り）
- ・ 生殖毒性：>10 t/年
 - ・ 生殖/発生毒性に関するスクリーニング：>10 t/年
 - ・ 出生前発生毒性試験：>100 t/年
 - ・ 二世代生殖毒性試験：>100 t/年
- ・ トキシコキネティクス：>10 t/年
- ・ アセスメント：>10 t/年

・ 発がん性試験：>1000 t/年

C-1-5 EU危険物質指令の状況

欧州化学薬品局 (European Chemicals Bureau; ECB) が更新しているEU危険物質指令の「物理化学的性質、毒性、環境毒性の測定法」のリストであるAnnex Vにおいて、2007年度に新たな試験法の収載はなかった¹⁵⁾。

C-1-6 COLIPA の状況

COLIPA (欧州化粧品工業連合会) は動物試験代替法の開発と受け入れに向けたコーディネートを目的に、1992年にSCAAT (Steering Committee on Alternatives to Animal testing) を常設の委員会として設置した。COLIPAは2007年に一部組織改革を行い、SCAATはPC Research (PCR) と統合された。そのPCRの基には2007年に2つの新たなTask Forceが加えられ、現在、以下の6つのTask Forceがある^{16)~20)}。

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

このうちPT SCAAT Skin Toleranceにおいて、日本企業により開発されたヒト単球由来細胞株であるTHP-1細胞を用いた*in vitro* 皮膚感作性試験h-CLAT (human Cell Line Activation Test) のring studyが2004年6月から開始され、2008年9月に終了した。この試験法以外にも、別のヒト単球由来細胞株であるU937細胞を用いた試験法や合成システインペプチド及びリジンペプチドとの結合性を評価するpeptide reactivity assayのring studyなども実施された^{21)~22)}。

C-1-7 その他の状況

EUにおけるその他の状況を、公的機関等の組織的活動と学会等に分けて以下にその概要を記載する。

- ①公的機関等の組織的活動の状況

・ ZEBET

ZEBET (Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments)²³⁾は、代替法の文書化、評価、推奨あるいは国内外での承認を推進することを目的に1989年にドイツの連邦リスク評価研究所に設立された組織である。業務の範囲は、代替法に係わる文書化と情報提供、バリデーション及び研究である。ZEBET業務の一つとして動物実験代替法のデータベースがあり、2000年2月からウェブにより無料で公開している。

・ NC3Rs

NC3Rs (National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research)²⁴⁾は動物試験、研究における3Rの推進、開発、実施を目的に2004年5月にイギリスに設立された。質の高い3Rs研究に資金を提供し、3Rsを広めるためのセミナーやシンポジウムを組織し、また、3Rsの情報源やガイドラインを開発している。独立した組織であり、英国内務省、MRC (Medical Research Council)、BBSRC (Biotechnology and Biological Sciences Research Council)、ABPI (The Association of the British Pharmaceutical Industry)、The Wellcome Trust及び製薬・化学企業などより資金が提供されている。

・ FRAME

FRAME (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments)²⁵⁾は医学における動物実験に関して3Rを促進するために、1969年に設立されたイギリスの機関である。国際的科学雑誌ATLA (Alternatives To Laboratory Animals)を年6回発行している。また、FRAME Newsを発行し、FRAMEの活動及び3Rsに関するニュースを会員へ伝えている。毒物学における*in vitro*法のプロトコルを収集した「INVITOX」は、FRAMEによって1989年に確立され、現在、ECVAMのScientific Information Serviceの一部になっている。

・ 3R Research Foundation

3R Research Foundation²⁶⁾は、動物実験の質問をする会派、スイス製薬協会の「インターファルマ」(Novartis Pharma Ltd, F. Hoffman-La Roche Ltd, Serono Ltd)、動物解放研究財団の共同で1987年にスイスに設置された。3R Research Foundationの目的は、研究プロジェクトのための補助金によって動物実験代替研究を促進することである。

・ NCA

NCA (Netherlands Centre for Alternatives to Animal Use)²⁷⁾は、オランダにおける動物実験代替法の開発、バリデーション及び応用を促進することを目的としており、ユトレヒト大学獣医学部の動物、科学&社会部門の一部分である。動物実験代替法に関する研究をコーディネートし、情報を広めており、この領域におけるオランダの中心として活動している。年2回ニュースレターを発行し、ウェブ上で公開している。

②学会等の状況

・ WC7

WC7 (the 7th World Congress on alternatives and animal use in the life sciences)²⁸⁾は、ライフサイエンス分野における3Rsの国際的な促進を目的に2年に1度開催される国際会議である。2007年にアジアで初めて開催された東京(WC6)に引き続き、2009年8月30日から9月3日にかけてイタリアのローマにおいて開催される。テーマとしては、「革新的な技術、概念とアプローチ」、「動物の使用領域」、「ライフサイエンス分野における進歩」などが予定されており、ホームページで紹介されている。

・ ESTIV

ESTIV (European Society of Toxicology *in vitro*)²⁹⁾は、*in vitro*毒物学を促進することを目的とする学会である。ESTIVの公式雑誌は「Toxicology *in vitro*」である。執行委員長はベルリン自由大学のH. Spielmann教授であり、*in vitro*毒物学の情報交換を推進するために、INVITOXワークショップを開催、また、6ヵ月ごとにニュースレターを発行している。

・ MEGAT

MEGAT (Middle European Society for Alternative Methods to Animal Testing)は、動物実験代替法の普及とバリデーション、3Rの分野での研究の推進、メディアへの情報提供などを目的とする学会である。学会長はベルリン自由大学のH. Spielmann教授であり、使用言語はドイツ語、年4回科学雑誌「ALTEX」(Alternatives to Animal Testing)を無料でメンバーに発行している³⁰⁾。

C-1-8 小括

本年度のEUにおける代替法開発の動向に関して特筆すべき事項としては、皮膚刺激性試験代替法であるEpiDerm SITとSkinEthic

RHEがESACにより承認されたことが挙げられる。弱い皮膚刺激性物質を評価できる *in vitro*法は、昨年ESACで承認されたEPISKINと合わせて3種となり、試験法の選択肢が広まった。そして、ヒト皮膚モデル試験がOECDドラフトガイドラインとして提案されている。眼刺激性試験代替法についても、過去にバリデーションが実施されたNeutral Red Release、Fluorescein Leakage等の試験法の再評価が進められている。また、EPAAは今後、代替するターゲットとして単回、反復の全身毒性を重要視していることが注目される。これらは化粧品評価だけでなくREACHへの対応のためでもある。今後ますます代替法開発と活用が促進されるものと考えられる。

C-2 米国における代替法開発の動向

C-2-1 ICCVAMにおける代替法評価状況

ICCVAMは、米国官庁間の調整を図り共通の目標である代替法のバリデーションを統括する委員会として機能してきており、現在はNIEHSの恒久的委員会として位置づけられている。現在、ICCVAMは9省庁の15研究機関からの委員で構成されている。

2006年11月にICCVAMとNTP代替試験法省庁間センター(The NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods :NICEATM)は代替法の5ヵ年計画(2008年~2012年)を発表した。この5ヵ年計画では、(1)適切で信頼性のある新規および改良された非動物及び他の代替試験を連邦政府機関の試験計画に統合するための研究開発、解釈及び検証、(2)3R推進のための新規および改良された非動物及び他の代替試験あるいはそれら試験法の組み合わせに関する最優先分野の確認がもたらされた。試験開発の優先分野としては、①急性眼刺激性、腐食性、②Biologics/vaccines、③急性皮膚毒性(刺激性・腐食性、感作性と吸収を含む)、④急性全身毒性(経口、経皮、吸入)、⑤慢性毒性・発がん性、⑥生殖・発生毒性、⑦内分泌攪乱物質、⑧神経毒性、⑨免疫毒性の9項目を挙げている。

本年度の動向としては、以下のことが挙げられる。①米国危険物質法(Federal Hazardous Substance Act)の下で実施されるラベル表示のための分類に用いる眼刺激性試験代替法としてBCOPとICEが了承されたこと。②NICEATMが急性経口毒性試験の投与開始用量の推定に用いる*in vitro*細胞毒性試験に関

する評価報告書を公表したこと。③ICCVAM第三者科学専門家委員会によって、非放射性LLNA(LLNA-DA法およびLLNA-BrdU法)がピアレビューされ、ハザード評価法として不十分であると結論付けられたが、使用動物数を削減されたrLLNAについてはハザード評価法として使用可能であると報告したこと。

眼刺激性試験の代替法に関しては、2007年10月に4種の眼刺激性試験代替法BCOP、ICE、the Isolated Rabbit Eye (IRE) およびHen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane test (HET-CAM)の法的受け入れについて検討するため最終試験法評価報告書¹⁾とバックグラウンドレビュー文書²⁾⁻⁵⁾(BRD)がNICEATMから連邦政府機関へ送られた。2008年6月、米国では、国立衛生研究所(NIH)・国立環境衛生研究所(NIEHS)は、米国消費者製品安全委員会(CPSC)、米国環境保護庁(EPA)、及び米国医薬品食品局(FDA)が米国危険物質法(Federal Hazardous Substance Act)の下で実施されるラベル表示にBCOPとICEの適用を了承したことを発表⁶⁾した。

EPAからの要請を受けてNICEATMは2008年4月、抗菌洗剤を対象とする眼刺激性試験代替法のバリデーション状況の評価を行うため、代替試験法のピアレビューを担当する専門家を公募するとともに、バリデーションに必要なヒト試験あるいはヒトにおける事故情報、ウサギを用いた眼刺激性試験(Low Volume法を含む)、BCOPをはじめとする*in vitro*眼刺激性試験などから得られた情報などの提供を募集⁷⁾した。

感作性試験代替法であるLLNAについては、NICEATMおよびICCVAMは、米国消費者製品安全委員会(CPSC)からその適用範囲やいくつかの変法に関するバリデーション状況の評価するよう要請された。

ICCVAMは、LLNAの適切性と信頼性を評価するための基準(Performance Standards)案⁸⁾を2007年9月に公表し、パブリックコメントの募集を経た後、改訂案を2008年1月に公開した。ICCVAMの第三者科学専門家委員会は、2008年5月に公開した報告書⁹⁾において、陰性対照群と最高試験濃度群のみで評価するrLLNA(reduced version of the LLNA)がハザード評価法として使用可能であるが、非放射性LLNA(LLNA-DA法およびLLNA-BrdU法)はいずれもハザード評価法として十分ではないと結論付けている。

急性全身毒性を評価するための細胞毒性試

験の評価に関しては、2008年2月、NICEATMとICCVAMは、急性全身毒性の*in vitro*アプローチとヒトにおけるエンドポイントに関するワークショップを、JaCVAMとECVAMも加えて開催した¹⁰。急性全身毒性で鍵となる*in vivo*の知見やメカニズムに基づく*in vitro*試験システムについて検討された。2008年3月にNICEATMは*in vitro*細胞毒性試験に関する評価報告書¹¹を公表した。本報告書では、急性経口全身毒性試験 [Up-and-Down Procedure (UDP)、Acute Toxic Class (ATC)法]の投与開始用量を決定する際には、“証拠の重み付け”アプローチに基づいてBALB/c 3T3細胞または正常ヒト角化細胞 (NHK)を用いるNeutral Red 取り込み (NRU) 試験を実施するようにとの勧告が記載されている。

2008年2月、ICCVAMは10周年記念シンポジウムを開催し¹²、JaCVAMとECVAMからの参加も含めて行われ、国際協力体制が強化された。ICCVAM-NICEATMの過去10年間の活動報告が行なわれ、また、今後5年間の戦略などについて議論され、その中で国際的協力体制など関連する組織・機関とのパートナーシップの確立、代替法の行政的受入の促進、新たな科学・技術の確認と推進などが示された。

NTPは2008年6月、毒性試験代替法に関する科学諮問委員会(SACATM)の会合を行った。議題¹³としては、NICEATM-ICCVAMの5ヵ年計画における研究活動状況の報告、LLNAのバリデーション状況に関するICCVAM-NICEATMのIndependent Scientific Peer Review会合の報告、急性毒性試験に関するICCVAM-NICEATM-ECVAM-JaCVAMのワークショップの報告などがあった。上記議題のうち、LLNAのバリデーション状況に関する報告書¹⁴が公開されている。

2008年10月、NTPはICCVAMの隔年経過報告書¹⁵を公開した。この報告書では次の点を挙げている：①強眼刺激を引き起こす物質を同定するための動物を用いない眼刺激性試験を推奨したこと。②化学物質や製品の急性毒性を評価するために用いられ、動物数を減らすことができる細胞毒性に基づく試験法を決定したこと。③NICEATMとICCVAMはバリデーションと第三者評価において欧州(ESAC)、及び日本(JaCVAM)の機関との協力関係を強化したこと。

C-2-2 米国化粧品工業会の状況

米国化粧品工業会(PCPC: Personal Care

Products Council、旧称CTFA: Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association)のSafety Evaluation Guidelineは、化粧品の原料および最終製品について、安全性を立証する方法としての前臨床試験および臨床試験の使用に関するガイダンスを事業者に提供するものである。PCPCは、これまでの1991年版ガイドラインに広範な改訂を行い、動物実験代替法を盛り込んだ改訂版Safety Evaluation Guidelines¹⁶を2007年8月に発行した。前臨床試験には、規制上のガイドラインに通常従う動物試験と共に、細胞、組織、器官培養を用いる*in vitro*代替法が併記され、その手法と併せて各試験法の長所・短所やバリデーション状況等についても論述されている。また、構造活性相関を用いてコンピュータによる予測を行う*in silico*法の部分的な使用の可能性についても一部言及されている。尚、本改訂版は、化粧品工業連合会の安全性部会と動物実験代替専門委員会が協力して改訂、薬事日報社より発行した「化粧品の安全性評価に関する指針2008」¹⁷に日本語訳が掲載されている。

C-2-3 小括

本年度の代替法に関する主な動向としては、以下のことが挙げられる。眼刺激性試験代替法に関して、米国危険物質法の下で実施されるラベル表示のための分類にICCVAM推奨の代替法BCOPとICEを適用することが了承されたこと。NICEATMが急性経口全身毒性試験の投与開始用量の推定に用いる*in vitro*細胞毒性試験に関する評価報告書を公表したこと。ICCVAM第三者科学専門家委員会によって、非放射性LLNA(LLNA-DA法およびLLNA-BrdU法)はハザード評価法として不十分であると結論付けられたが、一方、使用動物数を削減したrLLNAはハザード評価法として使用可能であると報告したこと。

C-3 その他の国際的な代替法開発の動向

C-3-1 OECDガイドラインの動向

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)では、国際的活動の一環として、化学物質の環境やヒトの健康に対する影響を考慮することを目的とした各種安全性試験のガイドライン化が行われている。これらテストガイドラインは、検討中のものも含め、「Chemicals Testing - Guidelines (化学物質のテストガイドライ

ン)の「Section 4: Health Effects」に集約・公開されている¹⁾。

2008年度に採択された試験法はないが、下記に抜粋する試験法は、新規に提案された *in vitro* 代替試験法のドラフトガイドラインである。

皮膚刺激性試験：ヒト皮膚モデル試験

(2008年8月15日)

ウシ摘出角膜の混濁及び透過性試験

(第1回：2008年9月4日)

(第2回：2009年2月6日)

鶏の摘出眼球試験

(第1回：2008年9月4日)

(第2回：2009年2月6日)

ヒトエストロゲンレセプター α 転写活性化試験(エストロゲン様作用)

(未定)

※()内はパブリックコメントの募集締切日を示す。

ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法に関しては、欧州における、危険物指令R38(皮膚刺激性と非刺激物質の識別)表示のためのTG404の代替法として行政的な受け入れを経て、その後ドラフトガイドライン化された。現在公開されているドラフトガイドラインでは、モデルケースとしてEPISKIN法を中心に記載されている。しかし、その後の再評価において、EpiDermおよびSkinEthic RHEを用いた試験においてもEPISKIN法と同等の予測率が得られることが示された。²⁾

一方、眼刺激性試験代替法ではウシ摘出角膜の混濁及び透過性試験(BCOP)および鶏の摘出眼球試験(ICE)がそれぞれドラフトガイドライン化されているが、いずれも米国国立衛生研究所(NIH)においてラベル表示のための代替法として承認されており、いわゆる行政試験法としての承認経緯を経ている。ただ、いずれの試験法も、眼腐食性および強度刺激性に限定された試験方法であり、化粧品原料の刺激性を評価する上で重要であると考えられる軽度刺激性の評価は行えない。また、摘出眼球を用いることから、厳密には完全な *in vitro* 試験法とは言いがたく、BSE(牛海綿状脳症)や鳥インフルエンザに対する安全性の面からも課題が多い。

ヒトエストロゲンレセプター α 転写活性化試験は、化学物質の内分泌攪乱作用を予測する新規 *in vitro* 試験法であり、作用のスク

リーニングおよび順位付けを目的とした試験法である。本試験では、ヒトエストロゲンレセプター α の発現プラスミドおよびエストロゲン応答配列を含むレポータープラスミド(ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ)をHeLa-9903細胞に導入した安定形質転換株を用いる。化学物質を細胞株に曝露した後の、レセプターの転写活性化の程度をレポーターアッセイにより比較検討し、エストロゲン様作用を予測する。ただ、公開から現在までパブリックコメントは公募されておらず、今後順次行われると思われる。

最後に、*in vivo* 試験法ではあるが、2008年度にコメント募集期間中または募集期間を終え、修正、最終段階に入っている試験法を以下に記載する。

403 急性吸入毒性

(2009年1月23日)

412 反復吸入毒性修正ガイドライン

(2008年11月28日)

413 亜慢性吸入毒性修正ガイドライン

(2008年11月28日)

417 薬物動態(トキシコキネティクス)

(2009年1月30日)

436 急性吸入毒性-急性毒性等級(ATC)法

(2009年1月23日)

451 発癌性試験

(2009年1月23日)

452 慢性毒性試験

(2009年1月23日)

453 慢性毒性/発癌性組み合わせ試験

(2009年1月16日)

*** (新規) Hershberger Bioassay (抗雄性ホルモン様作用)

(2009年1月16日)

*** (新規) 拡大1世代生殖毒性試験

(2008年9月4日)

※()内はパブリックコメントの募集締切日を示す。

上記はいずれも動物を使用する試験法ではあるが、化学物質の曝露時間短縮、既知腐食性、強刺激性物質の試験不要、他の試験との組合せによる開始濃度の予測や瀕死動物の取り扱いなど、動物愛護の観点が多く盛り込まれている。

C-3-2 化粧品規制協力国際会議(ICCR)の動向

日本の厚生労働省、米国医薬品食品庁 (FDA)、カナダ厚生省 (Health Canada) および欧州委員会企業産業総局による第2回化粧品規制協力国際会議 (ICCR: International Cooperation on Cosmetics Regulations) が2008年7月30日～8月1日に米国メリーランド州ロックビルで開催された³⁾。この会議の目的は、国際貿易への障壁を最小化しつつ、世界的に最高レベルでの消費者保護を維持することであり、それぞれの地域の化粧品業界団体と対話しつつ、化粧品関連の問題について議論することである。会議の中では昨年引き続き動物実験代替法に関する議論もなされ、この中で動物実験の削減、洗練、代替についての協力を推進するためのワーキンググループとして代替試験法協力国際会議 (ICATM: International Cooperation on Alternative Test) が設立された。ICCRの規制当局はICATMの枠組みとして、(1)検証研究、(2)試験法の科学的妥当性についての独立したピアレビュー、(3)動物代替試験法に関する正式な試験法の推奨、の3点を協力重要分野とした文書案を作成し、各国の上部組織がこれに合意した。次回のICCR会議は2009年9月に日本で開催される予定である。

C-3-3 小括

OECDガイドラインに関しては、皮膚刺激性試験の代替法としてEPISKIN法の評価をもとにしたヒト皮膚モデル試験が、また、眼刺激性試験の代替法として、ウシ摘出角膜の混濁及び透過性試験 (BCOP) および鶏の摘出眼球試験 (ICE) がそれぞれドラフトテストガイドラインとして提案された。さらにその後の評価でEpiDermおよびSkinEthic RHEがEPISKIN法と同等の予測率を有することが示された。今後はEU規制を前にこれら試験法のガイドライン化に向けた動向が注目される。

一方、日米欧にカナダを加えた4極で話し合われた化粧品規制協力国際会議 (ICCR) のトピックスは、代替試験法協力国際会議 (ICATM) を設立したことである。この組織は国際的なバリデーション研究を推進し、専門家による第三者評価を共同で行うことで、行政的な試験法の受け入れを加速させることになり、代替試験法開発の進展が期待される。

C-4 日本における代替法開発の動向

C-4-1 厚生労働科学研究班の活動

2007年に開始された厚生労働科学研究班

研究「動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究」(予定期間3ヵ年)が進行中である。本研究では、『①動物実験代替法をめぐる国際情報を調査する。②動物実験代替法が十分に開発されていないにも関わらず、2009年の禁止対象となっている試験法のうち、眼刺激性試験、皮膚刺激性試験、感作性試験代替法の開発を検討する。③皮膚刺激性試験、感作性試験代替法のバリデーション・評価およびそれらの統計解析手法の研究を行う。④必要ならば、皮膚接触皮膚炎検出の立場から現在のヒト臨床試験を見直す。⑤この研究期間に実施されているもしくは新たに実施されるバリデーション研究において、そのバリデーション研究を意識した検討を行い、具体的な解決策を探る。また、統計手法の検討は、実データに基づいた理論的な検討やコンピューターシミュレーションを行う。⑥国際協調として、海外で予定されているバリデーション、評価に参加する、情報を提供する、専門家を推薦するなど協力する。⑦研究班/評価会議/評価委員会という代替法評価体制を更に強化し、代替法を組み込み、動物実験を行わない場合における皮膚毒性の安全性評価手順を固める。即ち、開発された代替法についてOECD基準を考慮し、新規安全性試験法を一次評価する。妥当な方法について多施設バリデーションがかけられている場合には、それを実施する。これらの結果を総合的に判断し、当該試験法の有効性と限界を明らかにし、化粧品や医薬部外品、医薬品等のスクリーニング法として、或いは行政が受け入れる試験法としての妥当性を評価すると共に、動物実験を用いない場合における総合的な安全性評価の手順・手段について検討する。』ことを研究の方針としている。

本研究は、6名の分担研究者が分担して研究実施されている。テーマは、①研究の総括、代替法の評価とバリデーション、及び皮膚刺激性、感作性試験の開発、②感作性試験代替法の開発、③ヒト接触皮膚炎評価の見直し、④代替法に関する国際情勢の調査、⑤分子生物学的・組織化学的手法を用いた眼刺激性試験・眼毒性試験代替法の開発、⑥バリデーションデータの統計解析である。

2008年では、①研究の総括、代替法の評価とバリデーション及び皮膚刺激性、感作性試験の開発において、「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会(あり方検討会)」の検討が本格稼

動し、皮膚一次刺激性、眼刺激性、皮膚感作性、皮膚透過性、光毒性及び遺伝毒性の各試験項目における分科会が召集され、動物実験代替法の利用等を含め、医薬部外品申請の安全性に関する資料のあり方について具体的な議論が展開されたことが特記事項として挙げられる。各分科会は中間報告を提出し、次年度は、あり方検討会でそれらの詳細な検討を開始する計画である。②感作性試験代替法の開発では、ヒト単球由来細胞株を用いた試験法であるh-CLATに関して、今年度の多施設での共同研究結果について学会で報告された¹¹⁻¹³⁾。また、論文投稿された¹⁴⁻¹⁶⁾。現在の6社による共同研究は、現在までの結果をまとめ、2009年3月には厚生労働科学研究としては終了し、その後は国際開催となるプレバリデーションへの参画を検討する。③ヒト接触皮膚炎評価の見直しでは、藤田保健衛生大学の松永先生が、皮膚科臨床から代替法に期待することというテーマでヒト評価と皮膚刺激代替法との関連について学会で、講演した⁷⁾。その他、各テーマについて2008年の活動をまとめる予定である。

C-4-2 JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) の活動

2008年のJaCVAMの活動の状況を以下に記載する。国際的な活動では、コメットアッセイ、LUMI-CELL Estrogen Receptor Assay、STTA assay、Bhras細胞を用いたTransformation Assayについて、バリデーション実施およびその評価に参画した。

国内の活動では、3回の評価会議が開催され、新規試験法の評価が実施された。

「三次元皮膚モデル Vitrolife-SkinTMを用いる皮膚腐食性試験代替法」については、JaCVAM評価会議での最終審議が終了し、OECDテストガイドラインNo.431に準じ、化学物質の腐食性を科学的に評価できる点でその有用性が確認されたことから、行政当局の安全性評価法として、新規試験提案書⁹⁾が作成され、国内の行政関連部署及び海外の代替法関連機関へ配布された。

皮膚感作性試験代替法では、マウスを用いる皮膚感作性試験代替法である「LLNA-DA法」について、第三者評価が終了し、JaCVAM評価会議での最終審議を経て、OECDテストガイドラインNo.429(Skin sensitization: Local Lymph Node Assay)に準じて用いることにより、注意点を適切に守って利用すれば、

化学物質の皮膚感作性を科学的に評価できる点でその有用性が確認されたことから、行政当局の安全性評価法として、新規試験提案書⁹⁾が作成され、国内の行政関連部署及び海外の代替法関連機関へ配布された。同じく皮膚感作性試験代替法である「LLNA-BrdU法」についてもバリデーションが終了したことから、第三者評価を実施中である。また、使用動物数の削減を目的としてEUで提案された「rLLNA法」についても第三者評価実施を計画中である。

光毒性試験代替法では、「酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法」に関して、バリデーション最終報告書の第三者評価が進行中である。

皮膚刺激性試験代替法では、2007年ESACで認証された3次元ヒト皮膚モデルである「EPISKIN[®]を用いた皮膚刺激試験法」¹⁰⁾について、ESACの文書の翻訳および内容の第三者評価が終了し、今年度内に、JaCVAM評価会議の審議される予定である。また、OECDのから提出されているドラフトガイドライン「*In Vitro* Skin Irritation: Human Skin Model Test」¹¹⁾、2008年にESACより追加認証された「EpiDerm SIT法とSkinEthic RHE法」¹²⁾についても評価する計画である。厚生労働科学研究班からの依頼で実施された日本製培養皮膚モデル「LabCyte EPI-MODEL24」を用いた皮膚刺激性試験代替法についてもバリデーション報告書が提出され次第、評価実施予定である。

眼刺激性試験代替法について、摘出眼球試験、摘出角膜試験BCOP法およびICE法について第三者評価が進行中である。

また、Pyrogen screeningについても第三者評価を実施する予定である。

C-4-3 日本動物実験代替法学会の動向

日本動物実験代替法学会のバリデーション委員会では、厚生労働科学研究班から委託された皮膚感作性試験代替法である「皮膚感作性試験代替法: LLNA-DA法」及び「皮膚感作性試験代替法: LLNA-BrdU法」のバリデーションが終了した。LLNA-BrdU法のバリデーション結果については学会で発表された¹³⁾。厚生労働科学研究班から委託された試験として本年度は、皮膚刺激性試験代替法として2007年ESACで認証されたEPISKINのプロトコルに従った日本製培養皮膚モデル「LabCyte EPI-MODEL24」を用いた皮膚刺激性試験代替

法」のバリデーションが実施され、中間結果が学会で発表された¹⁴⁾。また、これとは別に、眼刺激性試験代替法としてウサギ角膜由来のSIRC細胞を用いた「STE (Short Time Exposure) 試験」のバリデーションが、日本動物実験代替学会で実施されており、同じく中間結果が学会で発表された¹⁵⁾。

また国際交流委員会を中心に、第6回国際動物実験代替法会議(WC6)で構築されたアジアの関連学会としてのネットワーク維持、今後の関係強化に向けた国際協調の推進の為、韓国動物実験代替法学会の研究者と日韓動物実験代替法学会合同協議が開始されている¹⁶⁾。

第21回学術大会は、城西大学の杉林堅次先生が大会長で2008年11月13～14日にさいたま市で開催された。大会は、藤田保健衛生大学の松永先生による「皮膚科医の立場からの動物代替への期待」と題した特別講演、「代替臓器の開発と代替実験法」、「化粧品開発のための代替実験法」、「3Rsを目的とした実験計画とデータ解析」の3つのシンポジウム、一般演題は45題、特別企画として、「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討委員会報告」、さらに市民講座「生活者の安全を考える一代替法からのアプローチ」という内容であった。

C-4-4 その他の国内動向

その他の国内動向では、ヒューマンサイエンス振興財団(HS財団)の動物実験実施施設認証センターが2008年4月に発足した点が上げられる。HS財団の動物実験実施施設認証センターは、厚生労働省の所管する動物実験実施機関における動物実験等の実施に関して、動物実験等の自主管理の促進とともに動物愛護の観点に配慮しつつ、科学的観点に基づく適正な動物実験等が実施されているかの外部評価・検証事業を行う。

2005年に改正された動物愛護管理法において、動物実験について、3Rsの理念が明文文化されたが、同時にこの改正では、日本における動物実験の自主管理体制が支持された点も重要な要点であったことから、この法律の趣旨を生かすためには、自主管理とその検証が重要な役割を持つ。これを補完するものとして日本における第三者評価機関として発足したものである。

また、薬事日報社から化粧品・医薬部外品製造販売及び輸入販売業者のための許可、承

認申請等の手引書である『化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2008』¹⁷⁾が発刊された。2008年3月以降に厚生労働省から発出された化粧品・医薬部外品に関する通知、事務連絡等を反映した改訂で、2006年版と比較すると動物実験代替法に関する記述が追加されている。医薬部外品承認申請の際の添付資料における安全性に関する資料において、動物実験代替法による試験成績については、OECD等により採用された代替試験法あるいは適切なバリデーションでそれらと同等と評価された方法に従った試験成績であれば差し支えないという記載や、具体的な代替試験法例として、皮膚一次刺激性試験については、Transcutaneous Electrical Resistance Test (OECD Test Guideline 430、但し皮膚腐食性)、光毒性試験については、3T3-NRU法(OECD Test Guideline 432)、皮膚感作性試験についてはLLNA法(OECD Test Guideline 429)が追記された。

また同じく薬事日報社から日本化粧品工業連合会の編集により「化粧品の安全性評価に関する指針 2008」¹⁸⁾が発刊された。これは、2001年発行以来の改訂であり、化粧品の安全性評価に関する標準的な考え方を共有化し、その拠りどころを業界として確立し、維持することが必要との考えから安全性部会と動物実験代替専門委員会の協力により編集された。動物実験代替法に関しては、皮膚刺激性、光毒性、皮膚感作性などについてOECDガイドラインへ採択された試験法や現在欧米各局で検討されている試験法について最新の状況が反映されている。

C-4-5 小括

本年度における代替法の開発・評価において特筆すべきことは、JaCVAMの活動本格化、厚生労働科学研究班における「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会」活動の進展、さらにHS財団の動物実験実施施設認証センターの発足が挙げられる。

JaCVAMでは、国際動向への対応、試験法の評価とその活用に向けた作業が国内外の学会、業界、関係各機関の協力を得て進行し、試験法評価とその活用に向けた活動が本格化した。「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会」では、動物実験代替法の利用等を含め、医薬部外品申請の安全性に関する資料のあり方について具

体的な議論が展開された。

HS 財団の動物実験実施施設認証センターの発足は、日本の改正動物愛護管理法の趣旨を生かし、補完する点で大きな意義がある。

化粧品業界では、日本化粧品工業連合会より「化粧品の安全性評価に関する指針 2008」が発行され、業界における安全性評価に関する考え方が改めて示された。

C-5 化粧品の安全性評価に関連する代替法の状況

各安全性試験代替法の現状については、日本化粧品工業連合会 技術委員会 動物実験代替専門委員会が毎年、広範に調査している。本年度も情報の更新を行った。一部は日本化粧品工業連合会が編集した「化粧品の安全性評価に関する指針 2008」の情報として活用した。以下にその調査結果を記述する。

C-5-1 単回投与毒性

①概要

単回投与毒性試験は、様々な物質によって引き起こされる急性毒性を、質的及び量的にとらえる試験法として広く用いられている。殊に、ヒトが被験物質を誤飲・誤食した際に引き起こされる全身毒性については経口投与により毒性ポテンシャルの評価が行われ、医薬品、農薬、一般化学物質などにおいてそれぞれの公定法が定められている。

OECD テストガイドラインでは、現在、固定用量法 (OECD 420)、up-and-down 法 (OECD 425) 及び急性毒性クラス法 (OECD 423) などの単回経口投与毒性試験があり、これらの試験法は旧試験法の急性経口毒性試験 (OECD 401) の代替法として 2001 年に採択された。一方、経口摂取以外の曝露経路を想定した全身毒性予測試験法としては、吸入経路 (OECD 403) 及び経皮吸収経路 (OECD 402) が OECD テストガイドラインに記載されているが、経口毒性試験と同様に代替法として吸入毒性試験・固定用量法 (OECD 433)、吸入毒性試験・クラス法 (OECD 434)、経皮膚毒性試験・固定用量法がドラフト化されている。詳細は OECD テストガイドラインを参照されたい¹⁾。

しかしながら、上記の試験法はいずれもげっ歯類を用いた試験法であることから、*in vivo* 試験を完全に代替 (Replacement) する *in vitro* 試験法の早急な開発が望まれている。次項にこれらの取り組みに関する現在の状況について述べたい。

②状況

基礎的な細胞毒性が *in vivo* における毒性影響の大部分に関与するものであり、*in vitro* 細胞培養系が *in vivo* 経口急性毒性のモデルに使用できるという仮定のもと、急性毒性を予測する細胞ベースの試験法が検討されてきた。Multicenter Evaluation of *In vitro* Cytotoxicity (MEIC) プログラム²⁾ 及び ZEBET³⁾ における検討を先駆けとして、急性毒性を予測するための *in vitro* 細胞試験の最も良い組合せについての検討が継続されてきた。それに伴い、代謝、トキシコカインेटクスや臓器特異的毒性に関連する試験法との組み合わせの重要性が指摘され、予測精度を向上させる試みがなされている^{4), 5)}。

特に欧州では、化粧品指令第 7 次改正の遵守と化学物質管理のための規制を進めているため、*in vitro* での予測試験法の開発が急務である。これを受けて、A-Cute-Tox Project⁶⁾ と称する全身急性毒性を検出する *in vitro* 試験ストラテジーを開発するためのプロジェクトが、2005 年 1 月 1 日より 2010 年までの 5 ヶ年を期限として発足した。このプロジェクトの目的は、化学物質の急性毒性に関する *in vivo* 試験を完全に代替するに足る *in vitro* 試験ストラテジーを開発するという意欲的なものである。本プロジェクトでは、作業テーマ別に設定された 9 つの Work package (WP) から成る 11 のグループが連携しながら作業を進めている。各 WP からは、97 種に及ぶ参照物質の急性毒性に関する *in vivo* (動物及びヒト)、*in vitro* データを含む高品質なデータベースの開発や商業利用可能なスクリーニングロボット基盤に適合できる細胞モデルの獲得に加え⁸⁾、各種臓器由来細胞 (HepG2; rat primary hepatocytes with non-metabolising cells, SH-SY5Y; human neuroblastoma) を用いた代謝試験や臓器特異的毒性試験結果の組み合わせによる予測精度向上に関する報告がなされている⁹⁾。2009 年現在、A-Cute-Tox Project の各作業は終了し、最良の予測結果が得られる各試験の組み合わせを見出すために、PSL 回帰分析にて各データの相関解析を実施している¹⁰⁾。その後、A-Cute-Tox Management and Advisory Board (A-Cute-Tox 管理諮問委員会) により最大で 10 種類の試験方法が選択され、これら試験法の組み合わせによる少なくとも 3 種類の *in vitro* 試験ストラテジーが提案され、バリデ

ーションを経て最終化される見通しである。

米国では、2002年よりNICEATMとECVAMの共同によって、急性経口毒性を評価するための*in vitro*細胞毒性試験をバリデーションするための複数施設による研究¹¹⁾が実施された。このプロジェクトでは、ICCVAMによって推奨された2つの*in vitro*細胞毒性試験を、*in vivo*急性経口全身毒性試験の試験開始用量の設定に用いようとしており、*in vivo*試験に用いられる動物数を削減することを目的としている。検討された試験法は、BALB/c 3T3マウス繊維芽細胞(3T3)及び正常ヒト表皮ケラチノサイト(NHK)を用いた2つのニュートラルレッド取り込み(NRU)試験であり、72の参照物質を用いたバリデーション試験がPhase I～IIIまでの3段階に分けて実施された^{12)~14)}。その後、本バリデーション研究の結果を報告するバックグラウンドレビュー文書(BRD)¹⁵⁾及びICCVAMによる試験法評価報告書¹⁶⁾が2006年11月に最終化された。BRDには、両試験法の精度及び信頼性(再現性)、また、これらの*in vitro*試験データを用いて*in vivo*試験の開始用量を設定することによって削減される動物数あるいは死亡動物数に関するコンピューターシミュレーションによる評価結果等が報告されている。一方、ICCVAMによる試験法評価報告書では、「これら2種類の細胞毒性試験は法規制におけるハザード分類という目的には精度は十分ではないが、現在の急性毒性プロトコル[即ち、up-and-down法(UDP法)、Acute Toxic Class(ATC)法]の開始用量を設定するために使用することができる」と勧告した。その後2008年2月に、NICEATM及びICCVAMは、急性全身毒性の*in vitro*アプローチとヒトにおけるエンドポイントに関するワークショップを、JaCVAM及びECVAMを加えて開催した。また、2008年3月には、NICEATMが急性経口全身毒性試験の投与開始用量の推定に用いる*in vitro*細胞毒性試験に関する評価報告書を公表した¹⁷⁾。投与開始用量推定のための*in vitro*細胞毒性試験として、上記2種類のNRU試験が検討され、本報告書では、急性経口全身毒性試験の投与開始用量決定に際して、“証拠の重み付け”アプローチに基づいてこれらの*in vitro*細胞毒性試験を用いるようにとの勧告が記載されている。なお、*in vitro*細胞毒性データの使用に関する情報も入手可能である¹⁸⁾。

以上のように、急性毒性試験の代替法につ

いては、従来の*in vivo*試験を改良して使用動物数を削減(Reduction)あるいは苦痛の軽減(Refinement)を図る試みと、動物試験を減らすために*in vitro*試験の利点をできるだけ活用しようとする試みが進められている。その傍ら、国際的な判断基準の相違も懸念されており、例えば、本邦では2002年12月17日以降に実施された単回投与毒性試験の判断基準は全て最小致死量(LDL₀)で示すことが義務付けられている一方で¹⁹⁾、米国におけるCTFA安全性評価ガイドラインでは半致死量(LD₅₀)を点予測または範囲予測のいずれかに用いることが示されている。つまり、*in vitro*代替試験法を開発していく上で、参照すべき基準が異なることは今後大きな障害になりうる可能性もあり、国際的な判断基準のハーモナイゼーションが一層望まれる。こうした国際的な協力関係の進展も含め、これからの研究成果と行政・業界動向を注視していく必要がある。

C-5-2 皮膚毒性

①概要

化粧品等の化学物質が皮膚に接触することによる皮膚炎(皮膚刺激性)やそれに紫外線が関与したときにおこる皮膚炎(光毒性)などに対して安全性を確保するための評価が必要である。従来から、ヒトに対する危害予測のため、動物の皮膚が用いられている。現在使用されている皮膚一次刺激性試験及び皮膚腐食性試験の国際的なガイドラインは、Draizeらの方法を基礎としている。このガイドラインでは、動物としてウサギが推奨されているが、その他の動物種(モルモット、ミニブタ)等も利用されている。ウサギはmildからmoderateな刺激物に対してヒトより感度が高いと考えられているが、その一方、動物結果とヒトでの結果が一致していないという報告もある^{11,2)}。これに加え、動物愛護や倫理的観点から、動物実験の代替法の評価開発が進められている。これらの代替法開発はECVAMを中心に展開されている。ECVAMにおける動物試験の代替法開発に対する基本的な考え方は、構造活性相関、*in vitro*試験法とヒトパッチテストを基に評価スキームを構築することにある²⁰⁾。

現在の*in vitro*皮膚刺激性試験法開発の取り組みは、皮膚腐食性、皮膚一次刺激性のポテンシャルが評価できる代替法開発にとどまっている。現在までに、皮膚腐食性試験法と

して「*In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)」(Original Guideline, adopted 13th April 2004)、「*In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test」(Original Guideline, adopted 13th April 2004)の2種、光毒性試験法として「*In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test」(Original Guideline, adopted 13th April 2004)が化学物質の*in vitro*試験法としてOECDガイドラインに採用されている。

②皮膚刺激性の代替試験法の状況

試験法としては、三次元ヒト皮膚モデルを用いた方法やマウスの摘出皮膚を用いた器官培養法などが挙げられる。ECVAMは三次元ヒト皮膚モデルを中心にバリデーション研究を推進し、結果が良好であったEPISKIN、EpiDermについて代替法として有用と判断したが、2007年4月のESACによるStatementにおいて、皮膚刺激性の表示(irritant: R38, non-irritant: no-label)の目的で使用されるウサギを用いたドレイズ法の代替法として「EPISKIN皮膚刺激試験法」のみが承認され、EpiDermについては、プロトコルの改善が要求された⁴⁾。EPISKINによる試験法は、MTT assayとIL-1 α の放出量を組み合わせて評価している。このStatementに対し、同年12月にSCCPが「皮膚刺激性試験の*in vitro*試験メモランダム」を提出した⁵⁾。この中でSCCPは代替法として必要性が高く、歓迎する一方で、色素や染毛剤の評価においてはMTT比色法に影響を与える可能性を指摘し、また、試験対象品にポジティブリスト原料(防腐剤、紫外線吸収剤等)が少なかったことから、化粧品原料に関しては更なる研究が必要と述べている。

EpiDermに関してはその後、被験物質の曝露時間を15分から60分に変更するなどプロトコルの改善が実施され、2008年11月4～5日に開催されたESAC第29回会議で「EpiDerm SIT」として他の三次元ヒト皮膚モデルである「SkinEthic RHE assay」とともに、皮膚刺激性の予知として十分に精度と信頼性がある方法であると承認された⁶⁾。「EpiDerm SIT」はMTT assayのみで評価する試験法であり、前回のバリデーション結果を補完したことで承認された。「SkinEthic RHE assay」は、EPISKINの評価のキャッチアップバリデーションとして評価され、承認された。

一方、OECDでは、2008年に新規*In Vitro*皮

膚刺激性試験ドラフトテストガイドラインとして「*In Vitro* Skin Irritation: Human Skin Model Test」⁷⁾が提案された。これはESACにおけるEPISKINの評価をもとにしている。現在、このドラフト案についてOECD専門家会議において審議中である。

国内ではこれまでにEpiDerm、TESTSKIN、Vitrolife-Skinなどの「市販キットである三次元皮膚モデルを用いる皮膚刺激性代替法」のバリデーションが実施されてきた。

2008年9月には日本動物実験代替法学会バリデーション委員会により、国内で販売されているヒト三次元培養表皮モデルLabCyte EPI-MODEL24を用いた多施設バリデーションが実施されている⁸⁾。このバリデーションはEPISKINと同様の検討及び検証を行うことを目的とし、EPISKINプロトコルに従い評価された。なお、このバリデーションの経過については、2008年10月に開催されたOECD専門家会議においてもJaCVAM小島先生より報告されている。

また、EPISKINについては、JaCVAM評価会議においても審議中である。また、ESACから追加承認された2種の試験法についても審議予定である。

今後これらの試験は、三次元ヒト皮膚モデルを用いた*in vitro*皮膚刺激性試験として、OECDのガイドライン化に向けて検討されることとなり、2009年3月の欧州化粧品指令第7次改正に伴うEU規制の発効を前に今後の動向が注目される。

なお、刺激性とは違い、皮膚へ不可逆的な影響を及ぼすような化学物質の危険性把握(Hazard identification)のための重要な試験として位置づけられている皮膚腐食性代替試験法については、三次元皮膚モデルを用いた試験法がOECDガイドラインとして採用されているが、日本でも、厚生労働科学研究として皮膚三次元ヒト皮膚モデルを用いた皮膚腐食性の多施設バリデーションが実施された。その結果、国内で評価された三次元皮膚モデルは、腐食性試験代替法として国際的に承認されている三次元ヒト皮膚モデルと同等の識別能力を有するものであるという評価が得られた。「三次元皮膚モデル Vitrolife-Skin」を用いる皮膚腐食性試験代替法については、JaCVAM評価会議での最終審議が終了し、OECDテストガイドラインNo. 431に準じ、化学物質の腐食性を科学的に評価できる点でその有用性が確認されたことから、行政当局の安全性