

Fig. 5 The relationship between cytotoxicity and the Draize score
Chemical Number is shown in Table 1.

4. The cytotoxicity level is predictable using the corneal model

The relationship between cytotoxicity data, obtained in Figure 3 and 4, and the Draize score is shown in Figure 5. Each test chemical is displayed in order of the irritancy level as determined by the Draize eye test and the cytotoxicity data has been plotted individually. As a result, the cytotoxicity data and Draize score could be approximately correlated for all test chemicals. Therefore, our ocular irritation testing method using the corneal model predicts not only the existence or nonexistence of cytotoxicity potential but also the irritancy level.

Discussion

The current commercially available human corneal epithelium models include tests such as EpiOcular (MatTek Corporation, USA) and HCE (SkinEthic Laboratories, France). Both models have steric structures similar to human corneal epithelium using immortal human corneal cells. Previous reports have shown that the HCE model has an intermediate filament, desmosomal junction or hemidesmosomal junction and expresses cytokeratin-3, as confirmed by immunoblot analysis (Nguyen *et al.*, 2003). In this study, we demonstrated that MUC-1 and cytokeratin-3 were expressed in the corneal model prepared from the normal human corneal epidermis and localized to sites that were consistent with human corneal epithelium. This finding suggests that the corneal

model undergoes a similar differentiation as human corneal epithelium and is a potential alternative material for evaluating human ocular irritancy.

According to OECD guideline 405, it is recommended that the rabbit eyelid be closed for one second after applying the test chemicals and that damage to each eye section be observed for three days. In order to conduct our test under conditions similar to the Draize eye test, we established a particular test protocol that includes a short exposure period and a post-incubation period. To date, 20 test chemicals have been examined by ocular irritation testing using HCE and 80% of these tests were in concordance with the cytotoxicity assay results (Van Goethem *et al.*, 2006). Thus, we adopted the cytotoxicity assay as a preliminary evaluating indicator.

As a result, it was demonstrated that the optimal treatment condition for the corneal model was protocol "5-sec+24-h" and that dose-dependent cytotoxicity could be detected for liquid test chemicals. However, cytotoxicity could not be detected for powder test chemicals. We attributed this failure to the histological differences between the corneal model and a rabbit eye. Because corneal models have no eyelid, we inferred that cytotoxicity was not observed with powder test chemicals because of insufficient humidity or external eyelid-like pressure. For this reason, filter paper was applied and the cytotoxicity of powder test chemicals became detectable.

In this study, we illustrated that the corneal model can assess a range of ocular irritancy levels by a cytotoxicity assay alone using the same test chemicals concentrations as the Draize eye test. To further confirm the utility of our test protocol, more test chemicals should be evaluated in order to obtain a range of *in vitro* data with the corneal model. In addition, evaluation indicators other than cytotoxicity should be identified in case a novel chemical with unique properties other than cytotoxicity is discovered.

Acknowledgments

This study was funded by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, and by the Japanese Society Alternative to Animal Experiments. We are grateful to the Human & Animal Bridging Research Organization for kindly supplying the corneal epidermis.

References

- Chen, Z., De Paiva S.C., Luo, L., Kretzer, L.F., Pflugfelder, C.S., and Li, D. (2004) Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia, *Stem Cells*, 22, 355-366.
- Draize, J.H., Woodard, G., and Calvery, H.O. (1944) Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 82, 377-390.
- European Centre for the Validation of Alternative Method. (2007) ESAC peer review; Organotypic *in vitro* assays to identify severe eye irritants. (http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/ft_doc/Annex%20I.%20Guidance_document_ESAC_PR_P Organotypics.pdf)
- ICCVAM Background Review Document (2006a) Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method (NIH 06-4512) (http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/OTeval/II_bcop.pdf)
- ICCVAM Background Review Document (2006b) Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method (NIH 06-4513) (http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/OTeval/III_ice.pdf)
- Inatomi, T., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A.S., and Gipson, I.K. (1995) Human corneal and conjunctival epithelia express MUC1 mucin, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36, 9, 1818-1827.
- Kay, J.H., and Valandra, J.C. (1962) Interpretation of eye irritation tests, *J Soc. Cosm. Chem.*, 13, 281-289.

- Merrill, J., Hamernik, K., Schechtman, L.M., Stokes, W., and Wind, M. (2006) ICCVAM progress in evaluating *in vitro* test methods for identifying severe ocular irritants/corrosives, *Alternativen zu Tierexperimenten*, 23, 246-249.
- Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., and Rosdy, M. (2003) Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for *in vitro* toxicology, *Alternatives Toxicological Methods*, CRC Press, pp. 147-159.
- Nishi, O., Yamamoto, N., Nishi, K., and Nishi, Y. (2007) Contact inhibition of migrating lens epithelial cells at the capsular bend created by a sharp-edged intraocular lens after cataract surgery, *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 33, 6, 1065-1070.
- Organization for Economic Cooperation and Development. (2002) OECD Guidelines for Testing of Chemicals; Test Guideline 405, Acute Eye Irritation/Corrosion.
- Ohno, Y., Kaneko, T., Inoue, T., Morikawa, Y., Yoshida, T., Fujii, A., Masuda, M., Ohno, T., Hayashi, M., Momma, J., Uchiyama, T., Chiba, K., Ikeda, N., Imanishi, Y., Itagaki, H., Kakishima, H., Kasai, Y., Kurishita, A., Kojima, H., Matsukawa, K., Nakamura, T., Ohkoshi, K., Okumura, H., Saijo, K., Sakamoto, K., Suzuki, T., Takano, K., Tatsumi, H., Tani, N., Usami, M., and Watanabe, R. (1999) Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients, *Toxicology in Vitro*, 13, 73-98.
- Van Goethem, F., Adriaens, E., Alepee, N., Straube, F., De Wever, B., Cappadoro, M., Catoire, S., Hansen, E., Wolf, A., and Vanparys, P. (2006) Prevalidation of a new *in vitro* reconstituted human cornea model to assess the eye irritating potential of chemicals, *Toxicology in Vitro*, 20, 1-17.
- Vascotto G.S., and Griffith M. (2006) Localization of candidate stem and progenitor cell markers within the human cornea, limbus, and Bulbar conjunctiva *in vivo* and in cell culture, *The Anatomical Record*, 288A, 921-931.
- Yamamoto, N., Majima, K. and Marunouchi, T. (2008) A study of the proliferating activity in lens epithelium and the identification of tissue-type stem cells, *Medical Molecular Morphology*, 41, 2, 83-91.

(Received: June 25/
Accepted: September 25)

Corresponding author:

Dr. Hajime Kojima
Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM),
Div. of Pharmacology, National Center for Biological Safety and Research,
National Institute of Health Sciences
Tel: +81-3-3700-9874 or +81-3-3700-1141
e-mail: h-kojima@nihs.go.jp

特別寄稿

動物実験代替法に関する 2008年の国際動向

小島 肇

JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) の一員として国際的な交流機会が多い仕事柄、動物実験の3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) のうち、Replacementにあたる動物実験代替法に関する国際情報を入手しやすい立場にいる^{1)~3)}。そこで、私の知る限りではあるが、2008年の動物実験代替法(以後、代替法と記す)に関する国際的な動向についてまとめてみた。皆様の活動の参考にさせて頂ければ幸いである。

1. ICATMの設立

本年のもっとも大きなトピックスはICATM (International Cooperation on Alternative Test Methods) の設立である⁴⁾。国際的な代替法の協力組織として、米国のNICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) / ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), EU の ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) / ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee), Health CanadaそしてJaCVAMを合わせた4局の上部組織が設立に合意した。この組織の目的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、さらに行政的な試験法の受入れを加速させることである。

ICATMが設立された大きな理由は、2007年、皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA) の perfor-

mance standard を ICCVAM と ECVAM がほぼ同時に作り出してしまい、混乱が生じた反省が生かされている。この1年間、両者がそれぞれの立場を主張し合い、対立が深まった。よって、ICATMの設立には迅速な代替法の公定化に向け、余分な揉め事や仕事を避けようという意図が大きい。

2. 代替法に関する欧米の取り組み

化粧品の規制に関しては、代替法として確立されている試験法がある場合には、①EU域内での動物試験の完全禁止、②動物試験した製品、動物試験をした原料を含む製品の販売を禁止する期限がいよいよ近づいてきた⁵⁾。本問題に対応するため、2008年、3つの局所刺激性試験のガイドライン案がOECDに提出された⁶⁾。一つは培養表皮モデル EPIKIN を用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験である⁷⁾。ESACの認証を経て、EUからOECDに提出された。さらに、ESACは他の培養表皮モデル EpiDerm や SkinEthics をも認証し⁷⁾、ガイドラインへの掲載を希望している。ただし、OECDガイドライン化にあたり、MTT法による細胞毒性とインターロイキン1 α を評価指標としていた初期の内容が⁸⁾ MTT法のみに限定され、*in vivo* 結果の解釈の問題もあり、やや進行が遅れている。後の二つは眼刺激性試験代替法 BCOP (牛摘出角膜試験) および ICE (鶏摘出眼球試験) である。いずれも強い眼刺激性を検出できる方法としてICCVAMから提案された。これら代替法のOECDテストガイドライン化に向けて、ECVAMやICCVAM関係者は国際的な専門家と意見交換を進めている。

さらに、ECVAMでは眼刺激性試験の代替法として、過去に実施された細胞毒性試験(ニュートラルレッド放出試験、赤血球試験、蛍光物質放出およびマイクロフィジオロメーターの各試験)の回顧的なバリデーション研究(日本から大野泰雄氏; 国立衛研が参加)や EpiOcular などの培養角膜モデルのバリデーション研究が進捗中である。

ところで、代替法の次の大きなターゲットは急性毒性試験である。OECDに掲載されている評価法^{8)~10)}で動物数の削減が一般的になっているが、本年11月に開催されたEPAA (European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing) 年次大会においては¹¹⁾、REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals) 対応のため^{12)~13)}、反復投与毒性を視野に入れたこの試験法における代替法確立が極めて重要であるとされた。

ICCVAMにおいても、2005年、細胞毒性試験を用いた代替法の第三者評価が行われ¹⁴⁾、ヒト正常角質細胞や

¹⁾Current status of Alternative to animal testing in 2008.

Hajime Kojima, Ph.D., (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—158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

昭和58年、岐阜大学・農学部農芸科学科卒業。同年日本メナード化粧品株式会社入社、昭和59~61年 国立遺伝学研究所・形質遺伝部留学。平成8年 長崎大学薬学部にて博士号取得。平成17年 国立医薬品食品衛生研究所入所。現在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、藤田保健衛生大学 医学部客員講師、薬学博士。日本動物実験代替法学会評議員、日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会評議員、日本環境変異原学会評議員などを務める。

3T3細胞によるニュートラルレッド法を用いて、非毒性物質の検出が可能とされている。また、2008年2月にICCVAM主催にて急性毒性試験シンポジウムが開催された(JaCVAMおよびECVAM後援)¹⁰。このシンポジウムは*in vitro*で急性毒性を評価するに何が足りないかを掘り下げるものであり、その議論は極めて興味深かった。これらの動向から、2009年は急性毒性試験の代替法に関する議論がより活発になると予想される。

ところで、2008年、ICCVAMではLLNAの第三者評価が再実施され、非RI法の再評価も行われた¹⁰。日本から試験法の紹介者として武吉正博氏(化学物質評価研究機構)、出原賢治氏(ダイセル工業株式会社)が、第三者評価者として旭川医大の吉田貴彦教授が招待されている。

一方、REACHにおいては、2009年までに事前登録が期待される180,000物質について、2011~2017年に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)で安全性評価を実施しなければならない。実験を行う場合にはIntegrated Testing Strategies(ITS)という戦略に従い、Read-acrossという関連物質情報の調査、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と記されている。1t以上の製造/輸入物質には代替法を用いた有害性の同定が必須となる。さらに製造量が増えるにつれて、曝露評価が求められており、動物実験を有効に使っていかねばならない¹⁵。

EUではさらなる代替法の開発が盛んであり、300以上のパートナーと17の研究プロジェクト(予算110million€以上)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¹⁶。現在125のINVITTOXによるプロトコルが用意されており、2009年までに40試験法をバリデーションするとされている。これにより、代替法で50%、*in silico*で20%の動物数削減を専門家が予想している¹⁷。

ただし、新規試験法がOECDガイドラインなどに受け入れられるためには開発から10年が掛かると言われており、これまで通りの方法では2011年に多くの試験法を用意できない。そこで、バリデーション研究の短期化、バリデーション研究が終了したものと同等のものを捕え、バリデーション研究を実施せずにREACHのために“適切な”方法の選択をするCORRELA(COMmunity RefeREnce Laboratory for Alternative TEsting)という方策が検討されている。

3. JaCVAMの活動

2007年8月に第6回国際動物実験代替法会議(WC6)¹⁸、2008年2月にWC6フォローアップシンポジウムがいずれも東京で開催され¹⁹、日本国内での盛

り上がり以上に日本の活動に対する国際的な評価が高まっている。

これに応えるため、JaCVAMでは、眼刺激性、皮膚刺激性、感作性、光毒性試験などの代替法について、日本独自のバリデーション研究や第三者評価を実施している。試験法公定化までの道程を図1に、JaCVAMの進捗を表1にまとめた。これらを見比べながら、各試験の動向を把握して頂きたい。

1) 皮膚刺激性試験

皮膚刺激性試験の代替法としてESACにより認証された培養表皮モデルEPISKINについて、JaCVAM評価委員会を設立して国内の専門家に第三者評価を依頼した。10月に第三者評価が終了し、ESACの認証内容を確認した。一方、日本製の培養表皮モデルLabCyte(株式会社J-TEC)の補充バリデーション研究が日本動物実験代替法学会の主催で実施されている²¹。

2) 眼刺激性試験

BCOPやICEについても、JaCVAM評価委員会において、国内の専門家による評価が実施された。年末に第三者評価終了し、ICCVAMの認証内容を確認した。さらに、1998年に厚生労働科学研究補助金を得て作成された「細胞毒性試験による眼刺激性試験代替法のガイドライン」について²¹、欧米の動向を考慮に入れながら、JaCVAMとして見直しを開始する予定である。一方、花王株式会社で開発された細胞毒性試験STE(Short Time Exposure)²²のバリデーション研究が日本動物実験代替法学会の主催で実施されている²³。

3) 光毒性試験

OECDガイドラインとして認証されているニュートラルレッド取り込みによる細胞毒性試験の他に²⁴⁻²⁶、酵母膜破壊試験と赤血球溶血試験²⁵⁻²⁶のパッケージに

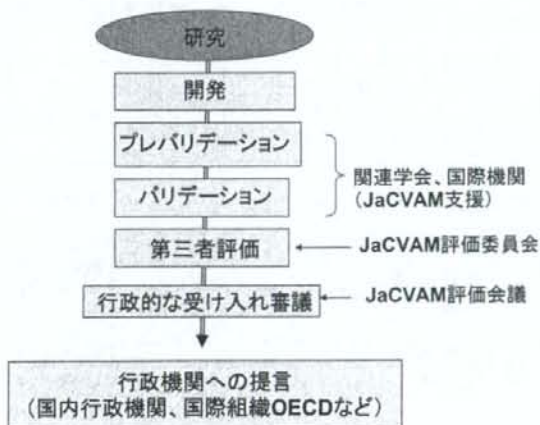


図1 試験法公定化までの道程

表1 JaCVAM の関与する試験法開発の進捗状況

No.	分類	試験名	バリデーション研究	JaCVAM 評価委員会	JaCVAM 評価会議	国内行政機関へ提案	OECD ガイドライン	協力 & 共同研究機関
1	腐食性試験	Vitrolife-Skin を用いた方法	2005年2月	2008年6月	2008年6月	2008年8月		日本動物実験代替法学会
2	皮膚刺激性試験	培養表皮モデル EPISKIN を用いた方法	ECVAM で終了	2008年10月終了	2009年開始		ガイドライン案	ECVAM
3		日本製の培養表皮モデル LabCyte を用いた方法	実施中					日本動物実験代替法学会
4	眼刺激性試験	牛摘出角膜試験, 鶏摘出眼球試験	ECVAM で終了	2008年12月終了	2009年開始		ガイドライン案	ICCVAM
5		細胞毒性試験	日本で終了	2009年開始				日本化粧品連合工業会
6		細胞毒性試験 (STE: Short Time Exposure)	実施中					日本動物実験代替法学会
7	光毒性試験	細胞毒性試験	ZEBET で終了	2004年11月			ガイドライン 432	
8		酵母膜破壊と赤血球溶血試験	2008年1月	評価中				日本動物実験代替法学会
9	皮膚感作性試験	LLNA-DA: マウスリンパ節中の ATP 量の変化を指標とする方法	2007年6月	2008年2月	2008年10月	2008年11月	提案予定	日本動物実験代替法学会
10		LLNA-BrdU: マウスリンパ節中の BrdU の取り込みを指標とする方法	2008年8月	評価中			提案予定	日本動物実験代替法学会
11		h-CLAT: ヒト細胞株活性化試験	2009年開始					ECVAM
12		LLNA 改良法	未実施	2009年開始				ICCVAM
13	急性毒性試験	細胞毒性試験	ECVAM で終了	2009年開始				ICCVAM & ECVAM
14	遺伝毒性試験: コメットアッセイ	<i>in vitro</i> 試験法	実施中					日本環境変異原学会/哺乳動物試験研究会
15		<i>in vivo</i> 試験法	実施中					日本環境変異原学会/哺乳動物試験研究会
16	内分泌かく乱物質スクリーニング	HeLa レポーター遺伝子アッセイ (アゴニスト)	日本で終了	OECD にて実施			最終ガイドライン案	OECD & ECVAM
17		HeLa レポーター遺伝子アッセイ (アンタゴニスト)	実施中					化学物質評価研究機構, 韓国食品薬品局 & ECVAM
18		Lumi-cell 法	実施中					NICEATM/ICCVAM & ECVAM
19	形質転換試験	Bhras assay	2008年10月開始					新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO 技術開発機構)
20	発熱性物質試験	<i>in vitro</i> 試験法	ECVAM で終了	評価中				ICCVAM

よる光毒性試験について、JaCVAM 評価委員会を設立して、国内の専門家に第三者評価をお願いしている。

4) 感作性試験

OECD ガイドライン No.429 として認証されている Local Lymph Node Assay (LLNA) がモルモットを用いた試験の代替法として利用されている³⁰⁾。ただ、この試験法は放射線同元素を用いることから日本では実施できる施設に限られる。そこで、リンパ節中の ATP 量の変化を指標とした LLNA-DA 法³⁰⁾ や BrdU の取り込みを指標とした LLNA-BrdU 法³¹⁾ の公定化を急いでいる。LLNA-DA 法についてはバリデーション研究および第三者評価が終了し、行政に受け入れ提案書を提出した³⁰⁾。LLNA-BrdU 法³¹⁾ についても、バリデーション研究が終了し、第三者評価を進めている。LLNA に関しては一濃度のみで評価する LLNA 改良法が ESAC にて認証され³²⁾、国内においても議論が必要と考えている。

ただし、化粧品品の安全性評価のためにマウスを用いる本試験を使い続けることは、完全な代替法とはいえない。そこで、開発が進んでいる *in vitro* 試験法のうち、株式会社資生堂および花王株式会社が日本化粧品工業連合会の有志や COLIPA の協力を得て開発を進めているヒト細胞株活性化試験 (human Cell Line Activation Test: h-CLAT)³³⁾³⁴⁾ のバリデーション研究を ECVAM とともに計画している。

5) 急性毒性試験

細胞毒性試験の利用に関して、ICCVAM の評価結果と ECVAM のバリデーション研究の動向を見据えながら、JaCVAM としてもこの第三者評価を急ぎたいと考えている。

6) 変異原性試験

エイムス試験、染色体異常試験、動物を用いた小核試験という 3 点セット³⁵⁾ を補う試験法である肝臓の不定期 DNA 合成試験の代替法として、コメットアッセイ³⁶⁾ の国際バリデーション研究が日本環境変異原学会 哺乳類動物試験研究会を中心に、ECVAM、NICEATM の協力を得て実施されている。*in vivo* 試験だけでなく、*in vitro* 試験のバリデーション研究をも進めている。本試験法は開発からかなりの時間がたっていることもあり、方法の統一化が課題である。

In vivo 試験としては、マウスの肝臓、胃を標的臓器として、日米欧 4 施設によるブラインド化した 3 物質を用いた Phase III のバリデーション研究が終了した。本バリデーション研究は、最終的なプロトコルを確定するための実験であり、2009 年からは、Phase IV のバリデーション研究が開始される。

一方、*in vitro* 試験についても、プロトコル確定のため、日米欧 5 施設によるブラインド化した 6 物質を用

いた Phase II バリデーション研究を実施中である。

7) 内分泌かく乱物質のスクリーニング

財団法人 化学物質評価研究機構 (CERI) の開発した HeLa-9903 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイは、OECD の定める内分泌かく乱物質評価のレベル 2 にあたるエンドクラインレセプター α への結合を評価指標とする試験法である³⁷⁾。バリデーション研究終了後、OECD による第三者評価がなされ、評価基準の明確化などでプロトコルの改訂が求められるとともに、アンタゴニストについて検討がなされていないのが指摘あった。そこで、ECVAM、韓国食品薬品局、CERI、大塚製薬株式会社およびカネカ株式会社の 5 施設の協力を得て、バリデーション研究を実施している。

一方、米国 XDS 社で開発されたエンドクラインレセプター α への結合を評価指標とするレポーター遺伝子アッセイ Lumi-cell 法についても³⁸⁾、NICEATM が主催する国際バリデーション研究に協力している。日本では株式会社日吉が実験を担当しており、アンタゴニストおよびアンタゴニストの実験を進めている。2009 年 3 月までに Phase III を終了する予定である。

4. WC7 (VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 2009)³⁹⁾

現在、シンポジウムやワークショップの構成や演者の人選が進んでいる。2009 年 4 月末までの一般演題の締切、6 月末までの早期参加登録など期限もホームページに明示されている。日本動物実験代替法学会としても渡航補助等が検討されており、是非、これを利用して多くの方にローマに向かい、発表して頂きたい。

代替法は 1 年毎、会議毎に大きく内容が変動する状況が続いている。情報収集に努めるとともに、日本で開発された方法を国際的に普及させるべく努力する所存である。

参 考 文 献

- 1) 大野泰雄 (2004) 動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受入れの現状、国立衛研報、122、1~10
- 2) 小島肇夫 (2006) 動物実験代替に関する最近の動向、化粧品技術者会誌、40 (4) 263~268.
- 3) 小島肇夫 (2008) 安全性評価と動物実験代替法の現状、薬学雑誌、128 (5) 747~752.
- 4) 厚生労働省 (2008) <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/08/h0814-1.html>
- 5) Commission Staff Working Documents (2004) 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
- 6) OECD (2008) http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html
 - 7) ECVAM statement (2007) <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>
 - 8) OECD Guideline 420 (2001) : Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France
 - 9) OECD Guideline 423 (2001) : Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France
 - 10) OECD Guideline 425 (2001) : Acute Oral Toxicity- Modified Up and Down Procedure OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France
 - 11) EPAA (2008) <http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/brochure.htm>
 - 12) ECB (2007) <http://ecb.jrc.ir/REACH/>
 - 13) ECH (2008) http://ec.europa.eu/echa/home_en.html
 - 14) ICCVAM (2008) http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/EPReport/ocu_report.htm
 - 15) EC (2008) Alternative Testing Strategies, EUR22846
 - 16) Hartung, T. (2006) <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsaae/20kai.html>
 - 17) JRC (2008) <http://www.vet.uu.nl/nca/userfiles/other/REACH>
 - 18) WC6 proceedings (2008) 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences
 - 19) 抄録集 (2008) WC6 フォローアップシンポジウム「3Rsに基づく動物実験の規制と第三者認証」
 - 20) 小島 肇ら (2008) 第21回日本動物実験代替法学会大会要旨集, 104~105.
 - 21) Ohno, Y. (1999) *Frageance Journal*, 1999-7, 21~26.
 - 22) Takahashi Y. et al. (2008) *Toxicol. in Vitro*, 22, 760~770.
 - 23) 坂口 齊ら (2008) 第21回日本動物実験代替法学会大会要旨集, 106~107.
 - 24) OECD Guideline 432: *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity testing (2002) OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France
 - 25) Ohno, Y., et al (2005) *Altern. Animal Test. EXperiment*, 10 (2), 54~157.
 - 26) Sugiyama M., et al (1994) *Altern. Animal Test. EXperiment*, 2, 183~191.
 - 27) Sugiyama M., et al (1994) *Altern. Animal Test. EXperiment*, 2, 193~202.
 - 28) Mori M., et al (2003) *Altern. Animal Test. EXperiment*, 10 (1), 1~17.
 - 29) OECD Guideline 429 (2002) : Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France
 - 30) Yamashita K., et al (2005) *Altern. Animal Test. EXperiment*, 11 (2) 136~144.
 - 31) Takeyoshi, M., et al (2001) *Toxicol. Lett.* 119, 203~208.
 - 32) Ohmori T. et al (2008) *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 58, 11~26.
 - 33) Ashikaga, T., et al (2006) *Toxicol. in Vitro*, 20, 767~773.
 - 34) Sakaguchi, H., et al (2006) *Toxicol in Vitro*, 20, 774~784.
 - 35) 厚生労働省医薬食品局審査管理課 (2006) 医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請に添付する資料に関する質疑応答集 (Q & A) について
 - 36) Mitchelmore, C.L. and Chipman, J.K. (1998) *Mutat. Res.*, 399, 135~147.
 - 37) Akahori, Y., et al (2008) *Toxicol. in Vitro*, 22, 225~231.
 - 38) WC7 (2008) <http://www.aimgroup.eu/2009/WC7/index.html>

動物実験代替法の現状と展望

小島 肇夫¹⁾

要 旨

「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: 実験動物の置換) の徹底である。しかし、削減や置換に用いる試験法の確立のためにはバリデーション研究や専門家による第三者評価が必要である。この使命を果たすために、2005年11月、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設立された。この部門の活動をJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) と呼び、JaCVAMでは、①新規または改訂試験法の評価および公定化、②新規または既存試験法の改訂試験法バリデーション研究の支援、③3Rsの普及、④国際協調を推進している。

本稿の中では、JaCVAMが行っている皮膚毒性に関するいくつかのバリデーション研究および専門家による第三者評価をまとめた。

(J Environ Dermatol Cutan Allergol, 3 (1) : 1-6, 2009)

キーワード: 動物実験代替法, バリデーション, 専門家による第三者評価

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⁾。これまで定められてきた、できる限りその動物に苦痛を与えない方法によって実験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ことが付記された。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、動物を科学上に利用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: 実験動物の置換) を徹底するために、適正

な飼養およ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⁾がそれぞれ「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」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、動物実験等の施設およ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

¹⁾ 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

連絡先: 小島 肇夫

掲載決定日: 2008年4月2日

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、遺伝学および微生物学的品質、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「実験動物の適正な実施に向けたガイドライン」を示している⁶⁾。基本指針を踏まえ、各研究機関が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を作成した。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⁾。

昨今、このガイドラインの中で必要とされている第三者認証のシステム化が日本学術会議を中心に行われている。このシステムは米国と同様、動物実験計画や報告書を第三者認証施設が評価するものである。米国ではAAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) などが有名であるが⁷⁾、この日本版組織が設立され、製薬業界を中心に評価が始まっている。次第に全国の大学や他の業種にも広がると考えられ、ますます動物実験の実施は制限が掛かると考えられる。すなわち、この流れは動物福祉の国際協調の一環である。欧米で定着しているシステムが日本でも作られつつあり、避けられないものであるという現実を、飼育担当者だけでなく、動物実験に係る者すべてが認識しなければならない。

代替法とは？

上記した第三者認証とは、不要な動物数の削減や飼養空間の快適性の追求、実験の際の苦痛軽減に関する配慮がなされているかが大きな審査の基準である。では、置換試験法はどうであろうか。ただ、作用機構が明確である *in vitro* 試験法があるとしても、それが動物実験の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に過ぎないからである。これを代替法、置換試験法としてもよいのか。

少なくとも、行政への申請に係る安全性試験に関しては、国際的な取り決めが必要である。そこで、



Fig. 1: Stages in the development of new toxicological testing methods

この置換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、2005年にOECDよりOECD Guidance Document 34 (GD34)⁸⁾が発行された。健康や環境を守るための新規試験法開発は、Fig. 1に示すような⁹⁾バリデーション研究、専門家による第三者評価（以下、第三者評価と記す）を経ないと行政的には受け入れられないと記されている。

この手順に対応できる機関として、欧州では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) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) が1990年代に設立された。日本では遅れること約10年、2005年11月、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、国際協調の窓口として、また新規試験法のバリデーション研究や第三者評価を担当している。

JaCVAMの活動目的は、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、特に削減や置換の促進、②国際協調を重視した新規代替法の公定化である。その役割として、①新規または改訂試験

Table 1: OECD guidelines for alternative methods

TG	Test Method	Adoption date
428	Skin Absorption: <i>in vitro</i> Method	Original Guideline, adopted 13th April 2004 ⁽⁴⁾
429	Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay	Updated Guideline, adopted 24th April 2002 ⁽⁵⁾
430	<i>In Vitro</i> Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)	Original Guideline, adopted 13th April 2004 ⁽⁶⁾
431	<i>In Vitro</i> Skin Corrosion: Human Skin Model Test	Original Guideline, adopted 13th April 2004 ⁽⁷⁾
432	<i>In Vitro</i> 3T3 NRU Phototoxicity Test	Original Guideline, adopted 13th April 2004 ⁽⁸⁾
435	<i>In Vitro</i> membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion	Original Guideline, adopted 19th July 2006 ⁽⁹⁾

Table 2: Current validation studies and peer reviews being correlated by JaCVAM

Division	Method	Current activities
Phototoxicity	Yeast-RBC	Peer review in progress
Skin sensitization	LLNA-DA	Regulatory acceptance
	LLNA-BrdU	Peer review in progress
	h-CLAT	Planning
Corrosivity	Culture model	Regulatory acceptance
Skin irritation	Culture model	Validation in progress
Endocrine disrupter	Lumi-cell, CER-estrogen reporter assay	Validation in progress
Mutagenicity	Comet assay (<i>in vivo</i> or <i>in vitro</i>)	Validation in progress

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研究の支援, ③3Rsの普及, ④国際協調を推進している。そのために, JaCVAMは独自の運営委員会での決議を経て, 新規試験法の公定化のためにバリデーション研究, 第三者評価, 行政的な受入れのための評価を行い, その結果が良好であれば行政に提案書を送る組織を構築している¹⁰⁻¹³⁾。

具体的な試験法の進捗

現在検討を行っている安全性評価におけるJaCVAMのバリデーション研究および第三者評価における具体的な役割, 現状および展望を以下に示す。Table 1⁽⁴⁻⁹⁾に示すように, OECDで認められた代替法はまだ少ないが, 欧米では多くの試験法が検討されている。JaCVAMでもTable 2に示すような安全性試験の代替法に取り組んでいる。主に, 化粧品の安全性評価を主眼としたバリデーション研究, 第三者評価が多い。以下に, JaCVAMが検討および国際協力している皮膚毒性に関する代替法バリデーション研究および第三者評価に限局して, その現状および展望にふれておきたい。

1. 皮膚刺激性

2007年4月, 欧州の代替法認証機関であるESAC

(ECVAM Scientific Advisory Committee)により, 培養表皮モデルEPISKINを皮膚刺激性試験代替法が認証された²⁰⁾。EPISKINに被験物質を15分間処理し, 48時間後にMTT法による細胞毒性とインターロイキン1 α を評価指標として測定するものである。これを受け, 他の培養表皮モデルであるEpiDermやSkinEthicsも認証されている。

日本でもこれまで本モデルの利用について手をこまねいていたわけではない。東洋紡株式会社製のTESTSKIN, グンゼ株式会社製のVitrolife-Skin, MatTek製でクラボウ(倉敷紡績株式会社)が販売しているEpiDermを用いて, プレバリデーション研究を実施し, 良好な結果を得ている²¹⁾。さらに, 化粧品原料の使用濃度における動物を用いた皮膚刺激性代替を目的に, TESTSKIN²²⁾およびVitrolife-Skinでバリデーション研究を実施した^{23,24)}。得られた結果が, 当初からの評価基準であるパッチテストと動物を用いた皮膚刺激性の予測率と同程度であったことから, バリデーション研究としてはある程度の成果を残したと考えている。ただし, まだ第三者評価に至っておらず, 日本の中でもコンセンサスは得られていない。

その他, EPISKINのESACによる認証を受け,

国内モデルにおいてもキャッチアップバリデーション研究が進んでいる。化粧品原料のための安全性評価の良し悪しは別として、日本製のモデルがEPISKINと比較して化学物質の安全性評価の試験法として認められるのか、見守っていききたい。

2. 感作性試験

OECDガイドライン429として認証されているLocal Lymph Node Assay (LLNA)が昨今、モルモットを用いる試験の代替法として利用されている^{15,25)}。LLNAに関しては一濃度のみで評価するreduced-LLNAがESACの認証を得るとともに²⁰⁾、試験法の実行基準が欧米で検討されるなど現在、もっとも議論が盛んな分野である。ところで、放射線同位元素 (RI) を用いる本方法は、日本では実施できる施設に限られる。そこで、RIを用いず、ATPの取り込みを指標としたLLNA-DA法²⁶⁾、BrdUの取り込みを指標としたLLNA-BrdU法のバリデーション研究および第三者評価が進んでいる²⁷⁾。LLNA-DA法のバリデーション研究、第三者評価については、行政的な受入れのための評価を経て提案書がまとめられている。一方、LLNA-BrdU法に関しては、バリデーション研究を経て第三者評価が実施されている。これらが将来的に日本で汎用される日は近いと考えている。

一方、日本では株式会社資生堂および花王株式会社が日本化粧品工業連合会の有志や欧州化粧品工業会 (COLIPA) の協力を得て開発を進めているh-CLAT (Human Cell Line Activation Test) の^{28,29)}バリデーション研究が計画されている。ただし、この分野は構造活性相関のプログラム開発³⁰⁾、ペプチド結合試験の開発^{31,32)}、h-CLAT以外の細胞を用いた試験法などの新規試験法の開発・検討が盛んな分野であり、これらの対応も必要である。

まとめ

以上、動物実験および代替法の最新動向をまとめた。代替法を巡る動向は環境問題と同様、人道的な精神から始まったが、今や経済的な問題になりつつある。日本がただ欧米の定めた基準に従うのみでなく、日本人として考え、どのように対応すべきか、その道を皆さんとともに見つけていきたいと考えている。

文 献

- 1) 環境省：動物の愛護及び管理に関する法律, <http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S48/S48H0105.html>
- 2) 環境省：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, http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/2_data/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
- 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.s.affrc.go.jp/docs/press/2006/0601/press_060601.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.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-20-k16-2.pdf>
- 7) 重茂浩美：動物実験に関する近年の動向, 科学技術動向, 2006-5 : 10-20, 2006
- 8) 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, 14, 2005
- 9) 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
- 10) 大野泰雄：動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受入れの現状, 国立衛研報, 122 : 1-10, 2004
- 11) 小島肇夫：動物実験代替に関する最近の動向, 化粧品技術者会誌, 40 : 263-268, 2006
- 12) 小島肇夫：JaCVAMの設立と使命, 日皮協ジャーナル, 57 : 129-134, 2007
- 13) 小島肇夫：動物実験代替法のバリデーション, COSMETIC STAGE, 1 : 1-3, 2007
- 14) OECD guideline 428 : *In vitro* Skin absorption, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Paris, France, 2002
- 15) OECD guideline 429 : Skin Sensitization : Local Lymph Node Assay, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Paris, France, 2002
- 16) OECD guideline 431 : *In vitro* Skin Corrosion :

1) 環境省：動物の愛護及び管理に関する法律, <http://>

- Human skin model test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Paris, France, 2004
- 17) OECD guideline 432 : *In vitro* 3T3 NRU phototoxicity testing, OECD Guideleine for the Testing of Chemicals, Paris, France, 2004
 - 18) OECD guideline 430: *In vitro* Skin Corrosion : Transcutaneous electrical resistance test (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Paris, France, 2004
 - 19) OECD guideline 435: *In vitro* membrane barrier test method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Paris, France, 2004
 - 20) ECVAM statement, <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>, 2007
 - 21) Sonoda I, Kojima H, Sato A, et al: A prevalidation study for three-dimensional cultured human skin models as alternatives to skin irritation testing, *Alternatives to Animal Testing and EXperimentation*, 8: 91-106, 2002
 - 22) Kojima H, Shiraishi A, Andoh Y, et al: Validation study for Vitrolife-Skin™, a three-dimensional cultured human skin model, I, as an alternative to skin irritation testing using ET₉ protocol, Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin, 2005
 - 23) Kojima H, Shiraishi A, Andoh Y, 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
 - 24) Kojima H, Sonoda I, Nishizawa M, et al: 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
 - 25) The murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds, NIH Publication No. 99-4494, 1999
 - 26) Yamashita K, Idehara K, Fukuda N, et al: Development of a modified local lymph node assay using atp measurement as an endpoint, *Alternatives to Animal Testing and EXperimentation*, 11: 136-144, 2005
 - 27) Takeyoshi M, Yamasaki K, Yakabe Y, et al: Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation, *Toxicol Lett*, 119: 203-208, 2001
 - 28) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, et al: Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol, *Toxicol In Vitro*, 20: 767-773, 2006
 - 29) Sakaguchi H, Ashikaga T, Miyazawa M, et al: 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, *Toxicol In Vitro*, 20: 774-784, 2006
 - 30) Aptula AO, Patlewicz G, Roberts DW: Skin sensitization: reaction mechanistic applicability domains for structure-activity relationships, *Chemical Research Toxicology*, 18: 1420-1426, 2005
 - 31) Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, et al: Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach, *Toxicology Science*, 97: 417-427, 2007
 - 32) 中村洋介: 最新動物実験代替法, アレルギー (感作性) について: 非細胞系試験-タンパク結合性評価法, 技術情報協会, 東京, pp.130-139, 2007

Current Status and Perspectives on an Alternative to Animal Testing

Hajime KOJIMA¹⁾

¹⁾ *JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods), Div. of Pharmacology, National Center for Safety Testing and Research, National Institute of Health Sciences (NIHS)
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, 158-8501 Tokyo, Japan*

In November 2005, the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) was established as part of the Division of Pharmacology at the National Center for Biological Safety and Research, affiliated with the National Institute of Health Sciences (NIHS) in Japan. The main activities of JaCVAM are focused on the following missions and objectives: 1) coordination of peer review and regulatory acceptance of new and revised test methods; 2) support of validation work for new and revised test methods; and 3) promotion of the 3Rs (Reduction, Refinement and Replacement) and 4) promotion of international partnerships promoting issues related to alternative methods.

JaCVAM is currently coordinating validation studies and peer reviews for several test methods examining skin toxicity.

(*J Environ Dermatol Cutan Allergol*, 3 (1): 1-6, 2009)

Key words : alternative, validation, peer review

第 23 回 生命科学センター講演会

動物実験の 3Rs における国内外の動向

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

小島 肇夫 先生

動物実験の3Rsにおける国内外の動向

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。この3Rsの中でもRefinementについては、実験動物の自己点検・評価として、当該機関以外の者による認証システムが日本で普及しつつある。

一方、削減や置き換えのために用いる試験法が公的な認証を受けるためには、バリデーションや専門家による第三者評価が必要である。この使命を果たすために、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センター内に新規試験法評価室が設立された。この部署を中心とした活動をJaCVAM(Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)と呼ぶ。JaCVAMは日本における3Rsの促進や動物実験代替法に関する国際協調のために活動している。

キーワード:動物実験代替法 バリデーション 3Rs

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(以後、動愛法と記す)」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⁾。これまでの、できる限り動物に苦痛を与えない方法によって実験を行わ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、動物を科学上に利用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、適正な飼養およ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実験動物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、適切な動物実験当の方法の選択、動物実験等の施設およ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敗因において、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「実験動物の適正な実施に向けたガイドライン」を示している⁶⁾。動物愛護法の基本指針を踏まえて、各研究機関が動物実験等に関する規定を整備するに際してモデルとなる共通ガイドラインを作成した。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. 動物実験施設の第三者認証機関

日本学術会議の「実験動物の適正な実施に向けたガイドライン」には、実験動物等の適正化に必要な教育訓練、自己点検・評価および検証ならびに情報公開に関する記述がある⁶⁾。この自己点検・評価には、「当該機関以外の者による検証を行うことを考慮する」と示されている。この検証機関として、米国では AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) が国際認証をできる組織としてよく知られている⁸⁾。一方、日本ではこれまで当該機関以外の者が評価する公的な仕組みがなかった。この当該機関以外の者による審査を担当する組織として、本年7月、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団が第三者認証機関を設立した⁹⁾。さらに、公私立大学実験動物施設協議会、国立大学法人動物実験施設協議会¹⁰⁾、日本動物実験協同組合¹¹⁾など複数の認証制度についても検討が進んでいる。日本においても、いよいよ本格的な当該機関以外の者による検証が始まったことを意味している。

3. 動物実験の置き換えのための国際機関

実験動物の削減や置き換え試験法の開発においては、化学物質等の安全性試験の公定化のために厳密な国際ルールが作られている。これが2001年に発行されたOECDガイダンス文書GD34である¹²⁾。この文書の中には、今後、新規試験法が開発される場合のパリテーションや専門家によ

る第三者評価(以後、第三者評価と記す)に関する手順、手法が記載されている。すなわち、図1に示すように¹³⁾、新規試験法が公定化されるにはバリデーションや第三者評価、行政的な受入れのための評価を経ないとはいけない。ところが、バリデーションや第三者評価を実施すると言っても大変な労力を要する。ましてや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、公的な認証までの手順をも考慮する必要がある。そこで、このガイダンスに先立ち、世界各地にバリデーションセンターが設立された。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。

欧米の組織と同様、日本においてもこの実験動物の削減や置き換えやにつながる新規または改良代替法の開発・評価のために、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センター内に新規試験法評価室が設立された^{14,15)}。この部署の業務の一つが新規または改良試験法の評価である。この部署を中心とした活動を我々はJaCVAM(Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)と呼んでいる。JaCVAMの活動目的は、1)日本における動物実験の3Rsの普及、2)国際協調を重視した新規代替法の公定化である。

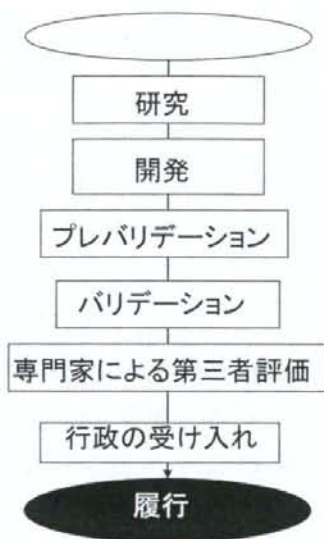


図.1 試験法公定化までの手順^{13)revised)}

4. EUの国際動向

これまで説明してきた動愛法や動物福祉問題はすべて欧米にその起源が遡る。欧米の動物愛護グループの活動として、日本では捕鯨反対問題ばかりがクローズアップされるが、この活動はすべての動物に該当する。このような欧米人の思想、感情的な問題が経済にまで波及した他の事例が、

化粧品開発における動物実験の規制問題および REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of CHemicals) 問題である。

化粧品の規制に関しては、2003年に化粧品指令7次改正が公布され、2009年3月に代替法として確立されている試験がある場合には、①EU域内での動物試験の完全禁止、②動物試験した製品、動物試験をした原料を含む製品の販売禁止が決められている¹⁶⁾。さらに、EU委員会は、期限内の開発が困難と判断された試験法の場合には、2013年まで延長する法案を提出するとされている。これに間に合わせるべく、EUでは欧州化粧品工業会(COLIPA)とECVAMが共同で試験法の開発、バリデーションおよび第三者評価を進めている。

一方、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づけられる規制を指す。登録、評価、認可、制限の総称である¹⁷⁾。この背景にはEUで化学品会社が27,000社(売上額590 billion €)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3 million€/日、約600 million €/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ことに端を発している¹⁸⁾。

この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)が中心である、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試験法のリストを表1¹⁹⁾に示す。実験を行う場合にはintegrated testing strategies (ITS)という戦略に従い、Read-acrossという関連物質情報の調査、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と記されている。1t以上の製造/輸入物質には代替法により有害性の同定を行う。さらに製造量が増えるにつれて、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ねばならない²⁰⁾。

EUではさらなる代替法の開発が盛んであり、300以上のパートナーと表2に示すような17の研究プロジェクト(予算110 million €以上)を通して、REACHのために“適した”100の試験法を確立する予定である²¹⁾。現在125のINVITTOXによるプロトコールが用意されており、2009年までに40試験法をバリデーションするとされている。これにより、代替法50%およびin silicoで20%の動物数削減を専門家が分析している¹⁸⁾。

ただし、新規試験法が開発されても、例えば、OECDガイドラインなどに受け入れられるためには10年が掛かると言われており、これまで通りの方法では2011年には多くの試験法を用意できない。そこで、バリデーションの短期化、バリデーションが終了したものと同等のものを揃え、バリデーションを実施せずにREACHのために“適切な”方法の選択をするCORRELA (COmmunity RefeREnce Laboratory for Alternative TESting)という方策が検討されている。

表1. REACH で製造量毎に要求される試験名

	健康	環境
1～10t 優先物質	<p><i>in vitro</i>眼刺激性</p> <p><i>in vitro</i>皮膚刺激性／腐食性</p> <p>皮膚感作性</p> <p>遺伝毒性(Ames)</p> <p>急性毒性(一つの投与経路)</p>	<p>急性水生毒性－ミジンコ</p> <p>生物分解性</p> <p>急性水生毒性－藻類</p>
10～100t	<p><i>in vivo</i>眼刺激性</p> <p><i>in vivo</i>皮膚刺激性</p> <p>遺伝毒性(マウスリンフォーマまたは遺伝子突然変異)</p> <p>遺伝毒性(染色体異常または<i>in vitro</i>小核)</p> <p>急性吸入／皮膚毒性</p> <p>亜急性毒性(28日間)</p> <p>生殖毒性スクリーニング</p> <p>トキシコキネティックス評価</p>	<p>急性水生毒性－魚類</p> <p>活性汚泥</p> <p>吸着・脱離スクリーニング</p> <p>更なる生物分解性</p> <p>加水分解試験</p>
100～1000t	<p>遺伝毒性(<i>in vivo</i>小核)</p> <p>亜慢性毒性(28日または90日間)</p> <p>更なる生殖毒性試験</p> <p>(出産前生殖毒性および2世代試験)</p>	<p>長期的水生毒性－ミジンコ及び魚類</p> <p>更なる分解及び環境中運命・挙動の研究</p> <p>陸生生物(植物、無脊椎動物)への短期的影響</p> <p>更なる吸着・脱離スクリーニング</p> <p>魚貯留性</p> <p>汚泥微生物への影響</p>
1000t超	<p>遺伝毒性(<i>in vivo</i>)</p> <p>発癌性</p> <p>慢性毒性(12ヶ月以上)</p> <p>更なる生殖毒性試験</p>	<p>更なる分解及び環境中運命・挙動の研究</p> <p>陸生生物への長期的影響</p>

表2. EU で行われている動物実験代替法開発に絡んだプロジェクト

プロジェクト名	概要	予算(ユーロ)	開始日	期間(月)
ACUTETOX	Optimization and pre-validation of <i>in vitro</i> test strategy of predicting human acute toxicity	9,000,000	2005年1月1日	60
ARTEMIS	<i>In vitro</i> neural tissue system for replacement of transgenic animals with memory/learning deficiencies	1,984,900	2007年3月1日	36
CarcinoGENOMICS	Development of a high throughput genomics-based test for assessing genotoxic and carcinogenic properties of chemical compounds <i>in vitro</i>	10,440,000	2006年11月1日	60
COMICS	Comet assay and cell array for fast and efficient genotoxicity testing	3,189,385	2007年1月1日	36
EXERA	Development of 3D <i>in vitro</i> model for estrogen-receptor mouse tissues for the pharmacotoxicological analysis of nuclear receptors-interacting compounds (NR-Ics)	2,173,492	2006年10月1日	36
Invitroheart	Reducing animal experimentation in drug testing by human cardiomyocyte <i>in vitro</i> models derived from embryonic stem cells	2,701,611	2007年1月1日	36
LINTOP	Optimization of liver and intestine <i>in vitro</i> models for pharmacokinetics and pharmacodynamics studies	2,933,291	2007年1月1日	36
MEMTRANS	Membrane transporters: <i>in vitro</i> models for their role in drug fate	1,900,000	2006年4月1日	36
PREDICTOMICS	Short-term <i>in vitro</i> assays for long-term toxicity	2,259,754	2004年9月1日	39
ReProTect	Development of a novel approach in hazard and risk assessment of reproductive toxicity by a combination and application of <i>in vitro</i> , tissue and sensor technologies	9,100,000	2004年7月1日	60
Sens-it-iv	Novel testing strategies for <i>in vitro</i> assessment of allergens	10,999,700	2005年10月1日	60
TOXDROP	Innovative cell on chip technology to screen chemicals for toxicity, using cultured cells within tiny nanodrops of culture fluid	1,615,888	2005年1月1日	24
VITROCELLOMICS	Reducing animal experimentation in preclinical predictive drug testing by human hepatic <i>in vitro</i> models derived from embryonic stem cells	2,942,000	2006年1月1日	36
新規プロジェクト				
ENATS	Embryonic stem cell-based novel alternative testing strategies	11,895,577	2008年4月1日	60
NANOTEST	Development of methodology for alternative testing strategies for the assessment of the toxicological profile of nano particles used in medical diagnostics	3,933,272	2008年4月1日	42
OPENTOX	Promotion, development, acceptance and implementation of QSARs for toxicology	2,975,360	2008年4月1日	36
PREDICT-IV	Profiling the toxicity of new drugs: a non-animal based approach integrating toxico-dynamics and biokinetics	11,330,907	2008年4月1日	60