

Fig. 1. Agreement on Animal Experiments (Difference Caused by Explanation)

(Aldhous P. *et al.*, New Scientist, 22 May, 1999, pp. 26-31), Light blue column: Explained as "Scientists should be allowed to experiment on animals." Blue column: Explained as "Some scientists are developing and testing new drugs to reduce pain or developing new treatments for life-threatening diseases... by...". Ordinate: Answer (%), Abscissa: STR. AGR.: strong agreement, MOD. AGR.: moderate agreement, NEITHER: neither, MOD. DISAGR.: moderate disagreement, STR. DISAGR.: strong disagreement.

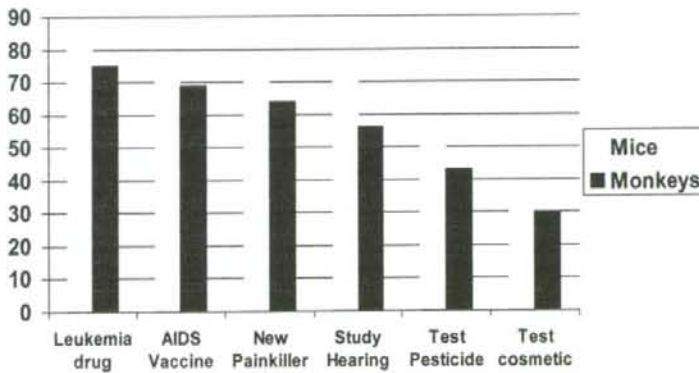


Fig. 2. Response to Animal Experiments (Difference Caused by Animalspecies and Object of Research)

(Aldhous P. *et al.*, New Scientist, 22 May, 1999, pp. 26-31), Yellow column: mouse, Blue column: monkey, Ordinate: Rate of agreement (%), Abscissa: Object of research.

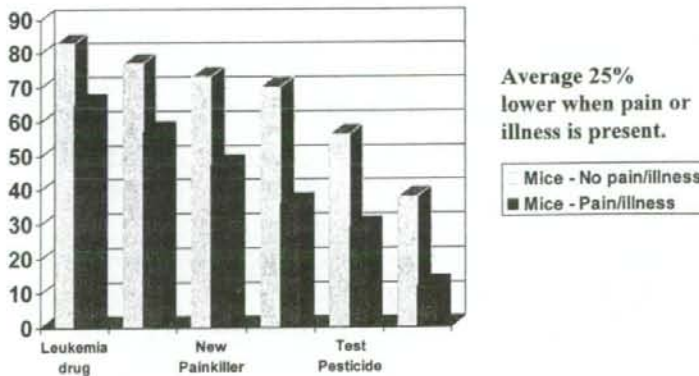


Fig. 3. Response to animal experiments (Difference by pain and illness)

(Aldhous P. *et al.*, New Scientist, 22 May, 1999, pp. 26-31), Yellow green column: Research without pain and illness, Red column: Research with pain and illness, Ordinate: Rate of agreement (%), Abscissa: Object of research.

の活動が社会の同意により許容され、支持されることにより、初めて可能となっていることを認識し、このような社会の動静に敏感に対応し、科学的・法的・倫理的に適切な研究を行わなくてはならない。

2. 動物実験の実施に関する指針

わが国においても科学研究においても動物福祉の尊重の必要性が認識され、平成17年6月の「動物の愛護及び管理に関する法律」(動愛法)の改定¹⁾で動物実験代替法に関する3R(Replacement, Reduction, Refinement)の原則が法に組み込まれた。また、平成18年6月までに、法令の目的を達成するため、環境省(環境省告示第88号「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」)²⁾、文部科学省(文部科学省告示第71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」)³⁾、厚生労働省(厚生労働省通知科発0601002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」)⁴⁾及び農林水産省(農林水産省通知「農林水産省の所管する研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針」)⁵⁾から実験動物の飼育・管理や動物実験についての指針が示された。日本学術会議から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」⁶⁾が示された。

3Rの達成は一研究者の努力だけでは不可能であり、研究機関全体としての対応が不可欠である。そこで、上記指針には実施機関(研究機関)の長の責任が明確に示された(文部科学省告示第71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」)。すなわち、実施機関の長は当該機関における動物実験等の実施に関する最終的な責任を有し、本指針に定める措置その他動物実験等の適正な実施のために必要な措置を講じること、と定められている。必要な措置とは、1)動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号、以下「動物愛護管理法」という)や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(平成18年環境省告示第88号以下「飼養保管基準」という。)並びに各省庁からの指針その他の動物実験等に関する法令等の規定を踏まえ、動物実験等の施設等の整備及び管理の方法並びに動物実験等の具体的な実施方法を定めた規程を策定すること、2)動物実験委員会の設置、3)動物実験計画の承認、4)動物実験計画

の実施結果の把握、5)教育訓練等の実施、6)自己点検及び評価、並びに7)適切な方法で動物実験等に関する情報公開を行うこと、と定められている。動物実験委員会は実施機関の長の諮問を受け、動物実験計画が本指針及び機関内規程等に適合しているか否かの審査を行い、その結果を実施機関の長に報告するものであり、また、動物実験計画の実施結果について、必要に応じ助言を行うものとされている。この委員会は1)動物実験等に関して優れた識見を有する者、2)実験動物に関して優れた識見を有する者、3)その他学識経験を有する者で構成される。また、動物実験実施に際しては、科学的合理性を確保し、目的を達成するために必要な適正な動物実験等の方法の選択や代替法の選択、苦痛の軽減について考慮するとともに、適切に維持管理された施設及び設備において動物実験等を実施するよう定められている。

3. 薬学会及び薬学系研究機関における動物実験への対応

日本薬理学会では以前より動物実験を巡る社会状況に対応するために動物実験指針の改訂作業を行い、法や通知の改訂の結果も取り入れ、これに反する研究結果を学会誌から排除することが明示された(大野泰雄2007)⁷⁾。しかしながら、薬学会では薬学雑誌の投稿規定に「ヒトならびに動物実験に関する倫理基準として、——、動物実験に関する報告も所属機関の定める動物実験ガイドラインに基づいて行われるのみならず、文部省(現文部省科学省)の策定したガイドライン、No.141、1987年：“大学などにおける動物実験”に従って下さい」と古い指針を引用している。J. Health Sci.の投稿規定では「2)動物を対象とした論文は、所属機関の定める動物実験ガイドラインのみならず文部科学省など公的機関の策定したガイドラインに従って実施されたものに限り投稿を受け付けます。なお、当該論文はこれらのことを本文中に明記してください」とされているのみである。

一方、平成17年の日本薬理学会で動物実験結果をポスター発表した研究者にインタビューした結果では、医学部関係者の多くが、動物実験についての教育や動物実験委員会での審議について、明確に回答したのに対し、薬学系大学からの発表者の中には曖昧な回答者が多くいた。中には動物実験委員会が

Table 2. Survey on the Existence of Committee for Animal Experiment in 2004

Institution	Exist	Not exist	%
Medical school	9	0	100
Pharmaceutical school	4	2	67
Agricultural school	1	0	100
CRO	1	0	100
Research institute	1	0	100
Private company	59	10	86

* Result of question to young scientists presenting posters at the annual meeting of The Japanese Pharmacological Society in 2004. ** Mutai *et al* (2004) *Iyakuhin Kenkyu* 35, 196-201.

存在しないとの回答もあった (Table 2: 大野泰雄 2005).⁸⁾ 平成 6 年に改訂された文部科学省の通知「大学等における動物実験について (文部省国際学術局長通知)」⁹⁾ では動物実験委員会の設置が明確に求められていたことから、動物実験委員会が存在しないとは考えられない。実際は存在しているが、適切に機能していないか、あるいは動物実験についての教育が若手研究者に十分に行われていないと推定された。今回、新たな動物愛護と管理に関する法令が改正され、省レベルの動物実験指針が示されたことから、薬学部における動物実験がどのように変わる

Table 3. Results of Survey on Animal Experiments in Pharmaceutical Schools

Number of answers		29			
Number of Institutes		24			
1) Type of Institutes					
State university	Yes	Number of answers	%		
with Medical School	9	24	37.50		
with veterinary School	2	24	100.00		
Private University	Yes	Number of answers	%		
with Medical School	3	24	20.00		
with veterinary School	0	24	0.00		
Pharmaceutical College	7	24	29.17		
2) Position in the Pharmaceutical School					
students	0	29	0.00		
Research assistant	3	29	9.66		
Associate professor	7	29	24.14		
Professor	20	29	68.07		
3) Does your school conduct animal experiments?					
Yes	Number of answers	%			
20	20	100.0			
4) Approximate number of animals used in a year					
Mean	Number of answers	Mean			
Mouse 11932	17	7049			
Rat 39610	18	2201			
Hamster 72	12	8.0			
Rabbit 424	14	30.3			
Dog 20	13	1.5			
Monkey 0	13	0.0			
Others 810	10	81.0			
5) Do you conduct animal experiment?					
Did you conduct animal experiment recently?					
Yes	Number of answers	%			
27	29	93.1			
6) Do you know guideline notified by the Ministry?					
Yes	Number of answers	%			
27	29	93.1			
If you know,	Yes	Number of answers	%		
7) Do you have the guideline?	23	28	82.1		
8) Can you access the guideline?	24	28	85.7		
9) Do you know the guideline issued by Japanese Science Council?					
Yes	Number of answers	%			
27	29	93.1			
If you know,	Yes	Number of answers	%		
10) Do you have the guideline?	21	27	77.8		
11) Can you access the guideline?	23	27	85.2		
12) Does your institute have institutional guideline on animal experiments?					
Yes	Number of answers	%			
28	29	96.6			
If there is,	Yes	Number of answers	%		
13) Do you have the guideline	24	27	88.9		
14) Can you access the guideline?	24	28	92.9		
15) Is there Animal Experiment Committee in your institute?					
Yes	Number of answers	%			
29	29	100.0			
If there is,	Sum	Number of answers/Numbers/Committee			
16) number of committee members	289	27	9.59		
members from own institute	216	26	8.31		
17) Members?	Sum	Number of answers/施設数/総人数			
General public	20	16	1.25		
Veterinarian	6	12	0.42		
Expert of animal care*	10	14	0.71		
Expert of animal experiment*	117	21	5.37		
Expert of alternatives	3	10	0.30		
Others	71	18	2.94		
*: Other than veterinarian					
18) How often do the committee meeting held?	Sum	Number of answers	平均		
Number of times in a year	68.5	21	2.83		
19) How often do you submit application of animal experiment to the committee?	Yes	Number of answers	%		
At each purchase	3	23	13.0		
At each planning	18	23	82.6		
Once in a year	13	23	56.5		
twice in a year	1	23	4.35		
20) Descriptions of application form	Yes	Number of answers	%		
Purpose of experiments	27	28	96.4		
Study director	28	28	100.0		
Study practitioner	28	28	100.0		
Animal species	28	28	100.0		
Animal number	28	28	100.0		
Alternatives	20	28	71.4		
Pain	21	28	75.0		
Method to decrease pain	25	28	89.3		
Reason not to decrease pain	21	28	75.0		
21) Does your institute educate ethics on animal experiment?	Yes	Number of answers	%*1		
26	29	92.96			
If education is conducted,	Total hours	Number of answers/average (h)	target of education (h)*2		
22) To whom and how many hours do you educate?	Students	60	24	1.50	82.3
Post graduate students	41.5	22	1.89	84.6	
Research staffs	27.5	17	1.62	65.4	
Others	2.5	2	1.28	7.7	
23) Curriculum?	Yes	Number of answers	%*3		
Animal protection law	21	24	87.5		
Physiology of experimental animals	17	24	70.8		
Methods of animal care	22	24	91.7		
2Rs principles	18	23	78.3		
Evaluation of pain	18	23	78.3		
Methods to decrease pain	19	23	80.9		
Method of euthanasia	21	23	91.3		
Alternative methods	16	23	69.6		
Others	11	17	64.7		
24) Have your institute received inspection on animal experiments by third party.	Yes	Number of answers	%		
3	28	0.11			
If you have,	Sum	Number of answers	%*4		
25) By whom the inspection was conducted?	Staff	2	0.67		
Outsiders	1	0.33			

*1: calculated on the number of institutes that conducted animal experiments.

*2: calculated on the total number of answers (26).

*3: calculated on the number of institutes that conducted education on animal experiments.

*4: calculated on the number of inspected institutes.

ったかを知るため、平成19年の2-3月にかけてe-mailによるアンケート調査を行った。その結果は平成19年の薬学会年会でのシンポジウムで発表した。以下はその結果を示したものである。

アンケート調査の内容はTable 3に回答とともに示した。アンケートは筆者の友人である薬学部職員に直接e-mailで行い、29人(重複があったため24施設)から回答を得た。その結果をTable 3に示す。

動物実験委員会の設置状況を示したものである

が、今回はすべての動物実験実施施設に設置されていた。委員の数は6-10人が最も多かったが、16-20人というのも2施設あった。なお、委員の構成は動物実験の専門家が中心で一般人とその他が加わっているところが多く、獣医師や動物飼育及び動物実験代替法の専門家を委員としているところは少なかった。また、動物実験届けが年に1回のみ施設が56.5%を占めており、包括的な内容での審議が行われているものと推定される。一方、動物実験届けへ

Table 4. Classification of Pain and Distress Caused by Biomedical Experiments

Category A: Experiments involving either no living materials or use of plants, bacteria, protozoa, or invertebrate animal species.	Biochemical, botanical, bacteriological, microbiological, or invertebrate animal studies, tissue cultures, studies on tissues obtained from autopsy or from slaughterhouse, studies on embryonated eggs. Invertebrate animals have nervous systems and respond to noxious stimuli, and therefore must also be treated humanely.
Category B: Experiments on vertebrate animal species that are expected to produce little or no discomfort.	Mere holding of animals captive for experimental purposes; simple procedures such as injections of relatively harmless substances and blood sampling; physical examinations; experiments on completely anesthetized animals which do not regain consciousness; food/water deprivation for short periods (a few hours); standard methods of euthanasia that induce rapid unconsciousness, such as anesthetic overdose or decapitation preceded by sedation or light anesthesia.
Category C: Experiments that involve some minor stress or pain (short-duration pain) to vertebrate animal species.	Exposure of blood vessels or implantation of chronic catheters with anesthesia; behavioral experiments on awake animals that involve short-term stressful restraint; immunization employing Freund's adjuvant; noxious stimuli from which escape is possible; surgical procedures under anesthesia that may result in some minor post-surgical discomfort. Category C procedures incur additional concern in proportion to the degree and duration of unavoidable stress or discomfort.
Category D: Experiments that involve significant but unavoidable stress or pain to vertebrate animal species.	Deliberate induction of behavioral stress in order to test its effect; major surgical procedures under anesthesia that result in significant post-operative discomfort; induction of an anatomical or physiological deficit that will result in pain or distress; application of noxious stimuli from which escape is impossible; prolonged periods (up to several hours or more) of physical restraint; maternal deprivation with substitution of punitive surrogates; induction of aggressive behavior leading to self-mutilation or intra-species aggression; procedures that produce pain in which anesthetics are not used, such as toxicity testing with death as an end point; production of radiation sickness, certain injections, and stress and shock research that would result in pain approaching the pain tolerance threshold, i.e. the point at which intense emotional reactions occur. Category D experiments present an explicit responsibility on the investigator to explore alternative designs to ensure that animal distress is minimized or eliminated.
Category E: Procedures that involve inflicting severe pain near, at, or above the pain tolerance threshold of unanesthetized, conscious animals.	Use of muscle relaxants or paralytic drugs such as succinyl choline or other curariform drugs used alone for surgical restraint without the use of anesthetics; severe burn or trauma infliction on unanesthetized animals; attempts to induce psychotic-like behavior; killing by use of microwave ovens designed for domestic kitchens or by strychnine; inescapably severe stress or terminal stress. Category E experiments are considered highly questionable or unacceptable irrespective of the significance of anticipated results. Many of these procedures are specifically prohibited in national policies and therefore may result in withdrawal of federal funds and/or institutional USDA registration.

From guidance on the classification of pain and distress (2004) by The Japanese Association of Laboratory Animal Facilities of National University Cooperations (<http://www.med.akita-u.ac.jp/~doubutu/kokudou/rinri/pain.pdf>)

Table 5. Methods of Euthanasia (US Assoc. Veterinarians)

Species	Acceptable	Conditional acceptable
Cat	Barbiturates, inhalant anesthetics, CO ₂ , CO, potassium chloride in conjunction with general anesthesia.	N ₂ , Ar.
Dog	Same as above.	N ₂ , Ar, penetrating captive bolt, electrocution.
Non-human primates	Barbiturates.	Inhalant anesthetics, CO ₂ , CO, N ₂ , Ar.
Rabbit	Barbiturates, inhalant anesthetics, CO ₂ , CO, potassium chloride in conjunction with general anesthesia.	N ₂ , Ar, cervical dislocation (<1 kg), decapitation, penetrating captive bolt.
Rodents and other small mammals	Barbiturates, inhalant anesthetics, CO ₂ , CO, potassium chloride in conjunction with general anesthesia, microwave irradiation.	Methoxyflurane, ether, N ₂ , Ar, cervical dislocation (rats <200 g), decapitation.
Ruminants	Barbiturates, inhalant anesthetics, potassium chloride in conjunction with general anesthesia, penetrating captive bolt.	Chloral hydrate (IV, after sedation), gunshot, electrocution.
Swine	Barbiturates, CO ₂ , potassium chloride in conjunction with general anesthesia, penetrating captive bolt.	Inhalant anesthetics, CO, chloral hydrate (IV, after sedation), gunshot, electrocution, blow to the head (<3 weeks of age).

AVMA Guidelines on Euthanasia (2007).

の記載内容については、代替法の有無、動物に与える苦痛の程度、及び苦痛軽減措置を取らない理由について記載しないところが25%以上あった。また、実験の目的そのものを記載しないとする回答が1件あった。動物実験倫理に関する教育については、92%の施設で行っており、行っていないところは29件の回答の内2件であった。教育内容については、3Rの原則や動物の苦痛の評価、苦痛の軽減方法、安楽死の方法、また、動物実験代替法について教えていないところが多くあった。なお、第3者による査察・調査が行われている施設が3施設あり、

その内2施設では外部の者に依頼していた。

4. 結論

薬学部における動物実験実施状況と教育に関する今回のアンケート調査結果はすべての薬学部を網羅しているものではないが、大まかな傾向はつかめたものと思われる。動愛法の改定により3Rの原則が盛り込まれ、それを実行あるものとするため、指針が文部科学省をはじめとする行政機関から通知され、多くの施設で指針に基づき適正に行われていた。しかし、指針に示された動物実験委員会での適正な審議や研究者教育の内容に不十分なところもあると考えられた。それらの施設では今後の改善が望まれる。なお、倫理的な動物実験を行うための参考として、国立大学法人動物実験施設協議会が作成した苦痛の分類と米国獣医師会編が作成した安楽死の方法について、それぞれTable 4とTable 5に示した。

REFERENCES

- 1) Animal protection law, revised in June 2005
- 2) Ministry of Environment: Criteria on the housing, care, and reduction of pain of experimental animals. Notification No. 88, April, 2006.
- 3) Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Basic principles of animal experiments in research institutes. Notification No 71, 1 June 2006.
- 4) Ministry of Health, Labor, and Welfare, Basic principles of animal experiments in research institutes that are administered by MHLW. Notification Kahatu 0601002, 1 June 2006.
- 5) Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries, Basic principles of animal experiments in research institutes that are administered by MAFF. 1 June 2006.
- 6) Science Council of Japan, Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiments. 1 June, 2006.
- 7) Ohno Y., *Folia Pharmacol. Jpn.*, **129**, 5-9 (2007).
- 8) Ohno Y., *Folia Pharmacol. Jpn.*, **125**, 325-329 (2005).
- 9) Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Animal Experiments in Universities. Revised in 1994.

安全性評価と動物実験代替法の現状

小島 肇 夫

Current Status of Safety Evaluation and Alternative to Animal Testings in Japan

Hajime KOJIMA

Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), National Institute of Health Sciences (NIHS), Japan, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received January 11, 2008)

In November 2005, the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) was established as a part of the Division of Pharmacology at the National Center for Biological Safety and Research affiliated with Japan's National Institute of Health Sciences (NIHS). JaCVAM facilitates the validation, peer-review, and international harmonization of alternative to animals testing. Key objectives of JaCVAM are: 1) facilitate 3R's*, prioritizing Reduction and Replacement, and 2) to ensure new test methods are validated, peer reviewed, officially accepted by the regulatory agencies, and made internationally compatible. In this paper, JaCVAM's current activities and future directions are shown in the validation and peer review of alternatives to testing for skin irritation, eye irritation, phototoxicity, skin sensitization, acute toxicity, genotoxicity and endocrine disruptor screening.

* 3R's for animal testing (Reduction, Refinement, Replacement)

Key words—validation, peer review; alternative

1. はじめに

2005年にOECDにて正式に認められたOECD Guidance Document 34 (GD34)¹⁾には、健康や環境を守るために開発される新たな試験法において、Fig. 1に示すような、バリデーション、専門家による第三者評価（以後、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載されている。²⁾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)がある。これらと同様の業務を行う機関として、2005年11月に国立医薬品食品衛生研究所、安全性生物試験研究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や第三者評価を担当している。JaCVAMの活動目的としては、化学物質等の安全性評価における①動物実験の3Rs (Reduction: 実験動物の削減, Refinement: 実験動物の苦痛の軽減, Replacement: 動物実験の置き換え)の促進、特に削減や置き換えの促進、②国際協調を重視した新規の動物実験代替法(以下、代替法と記す)の公定化である。そのために、以下の主な業務を実施している。

- 1) 新規試験法又は既存試験法の改訂法(新規・改訂試験法)の第三者評価及び公定化
- 2) 新規・改訂試験法のバリデーション
- 3) 3Rsの普及
- 4) 国際協調

この業務を果たすため、JaCVAMは支援組織である運営委員会及び顧問会議の協力を得て、Fig. 2に示すような手順で新規試験法の第三者評価を企画し、行政的な受け入れのための評価会議を開催し、その結果が良好であれば行政機関(厚生労働省)に提案書を送るシステムを構築した。³⁻⁵⁾

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(〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-11)

e-mail: h-kojima@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウムS40で発表したものを中心に記述したものである。

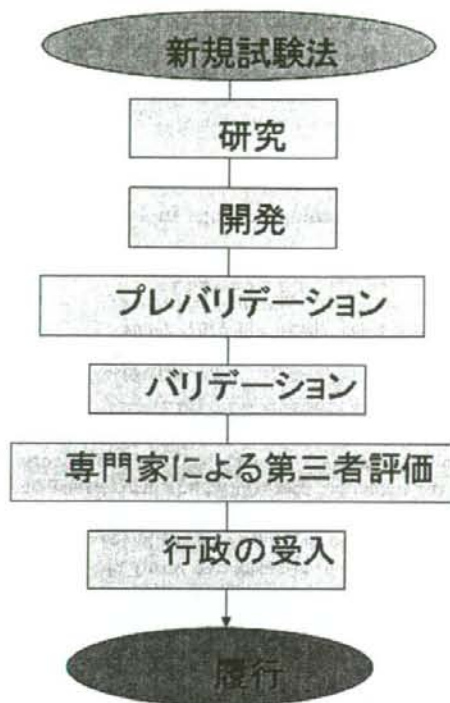


Fig. 1. Stages in the Development of New Toxicological Testing Methods

2. 具体的な試験法の進捗

欧州における化粧品規制⁶⁾及び REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals)⁷⁾に対応した代替法のバリデーション、第3者評価は最も大きな JaCVAM の業務である。Table 1 に示すように、OECD で認められた代替法はまだ少ないが、欧米では多くの代替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が、化粧品の安全性評価を主眼としたバリデーション及び第3者評価が多い。

Table 1. OECD Guidelines for Alternative Methods

No.	試験名	採択日
429	Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay	Updated Guideline, adopted 24th April 2002
430	<i>In Vitro</i> Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)	Original Guideline, adopted 13th April 2004
431	<i>In Vitro</i> Skin Corrosion: Human Skin Model Test	Original Guideline, adopted 13th April 2004
432	<i>In Vitro</i> 3T3 NRU Phototoxicity Test	Original Guideline, adopted 13th April 2004
435	<i>In Vitro</i> membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion	Original Guideline, adopted 19th July 2004

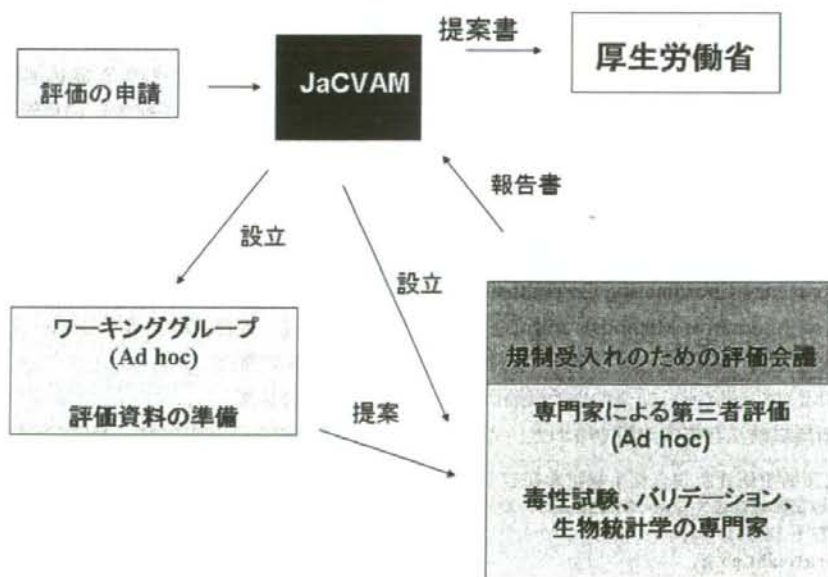


Fig. 2. Framework for Peer Review and Regulatory Acceptance of Alternative Methods

Table 2. Current Validation and Peer Review Correlated by JaCVAM

No.	試験法	試験法の概要	欧米の動向	目 標	現 状	会議の開催	バリ委託先
1	腐食性試験	培養皮膚モデルを用いた方法	代替法を用いた腐食性評価が終了(OECDガイドライン 430 又は 431, 435)	化学物質の腐食性評価に代替法を利用するための公定化	評価会議で最終評価	2008年4月開催	
2	光毒性試験	酵母膜破壊と赤血球の溶血試験	Balb3T3細胞を用いた細胞毒性試験がOECDにてガイドライン導入済み	日本の医薬部外品ガイドラインへの取載	評価委員会(Peer Review Panel)にて評価中	2008年4月開催	
3	LLNA-DA	マウスリンパ節中のATP量の変化を指標とする方法	ICCVAM 評価中	OECD ガイドライン 現行法の改変	バリデーション終了, 評価委員会にて評価中	2008年3月終了	
4	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	ICCVAM 評価中	OECD ガイドライン 現行法の改変	バリデーション終了, 評価委員会にて評価開始	2008年8月開催	日本動物実験代替法学会
5	LLNA	reduced LLNA	ESAC で評価終了	化学物質の感作性評価への利用促進	評価委員会にて検証	2008年5月開催	
6	皮膚刺激性試験	培養皮膚モデルを用いた方法	ESAC で評価終了	日本の医薬部外品ガイドラインへの取載	ワーキンググループにて評価のための資料を作成, 評価委員会にてEPISKIN法の検証, 日本のバリデーション結果の評価開始.	2008年2月開催	
7	眼刺激性試験	細胞毒性試験, 摘出眼球試験, 摘出角膜試験, 受精鶏卵試験	ICCVAM, ESAC で評価終了	日本の医薬部外品ガイドラインへの取載	評価委員会にて摘出眼球, 摘出角膜試験の検証, 細胞毒性試験の評価開始.	2008年2月開催	
8	コメットアッセイ	<i>in vitro</i> 試験法	日本を中心にバリデーション進行中	OECD ガイドライン	Phase I バリデーション実施中		日本環境変異原学会
9	コメットアッセイ	<i>in vivo</i> 試験法	日本を中心にバリデーション進行中	OECD ガイドライン	バリデーション Phase II 結果解析中		日本環境変異原学会
10	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	OECD で評価終了	OECD ガイドライン	antagonist バリデーション計画中, 2008年6月開始の予定.		化学物質評価研究機構(CERI)
11	内分泌かく乱物質スクリーニング	Lumi-cell アッセイ	NICEATM を中心に国際バリデーション実施中	OECD ガイドライン	Phase I 終了.		轉日吉
12	h-CLAT	培養細胞を用いた感作性物質のスクリーニング	JCIA, COLIPA を中心に共同研究実施中	OECD ガイドライン	ECVAM との共同バリデーション決定	2008年9月ワークショップ開催	

以後に JaCVAM が検討かつ国際協力しているバリデーション及び第三者評価に限局して, その現状及び展望にふれておきたい.

2-1. 皮膚刺激性試験 2007年4月, ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) が皮膚刺激性試験代替法として, 培養表皮モデル EPISKIN を認証した.⁸⁾ 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 1α を評価指標として測定するものである.

日本でもこれまで培養皮膚や表皮モデルの利用について手をこまねいていた訳ではない, これらモデルが日本で製造・販売されており, 多くのユーザーがいる. 2000-2002年にかけて東洋紡績特製の TESTSKIN, グンゼ特製の Vitrolife-Skin, MatTek 製でクラボウ特製が販売している EpiDerm を用い

て、ブレバリデーションを実施し、良好な結果を得ている。⁹⁾ さらに、化粧品原料の使用濃度における皮膚刺激性試験代替を目的に、2002-2004年にかけてTESTSKIN¹⁰⁾及びVitrolife-Skinでバリデーションを実施した。^{11,12)} 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試験における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3者評価に至っておらず、国内でのコンセンサスは得られていない。一方、EPISKINのESACによる認証を受け、国内モデルにおいても補完バリデーションを行う希望があり、2008年春からのバリデーション研究の動きが進んでいる。EPISKINと比較し、化学物質の皮膚刺激性試験代替法として日本製のモデルが有用かを、日本動物実験代替法学会とともに検討する予定である。

2-2. 眼刺激性試験 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ダンス」は日本においても中々普及していない。¹³⁾ もう一度、JaCVAMとして第3者評価を行い、細胞毒性試験における眼刺激性試験代替法の有用性を検討する予定である。この資料には日本動物実験代替法学会で実施された細胞毒性試験や、¹⁴⁾ 厚生労働科学研究の細胞毒性試験に加え、¹⁵⁾ 最近ECVAMで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、フルオレッセン放出、サイトセンサーマイクロフィジオメーター試験)やバリデーションが計画されているEpiOcularというヒト再構築モデルの結果が用いられることになろう。

一方、欧米では摘出眼球試験、摘出角膜試験、受精鶏卵試験等の第3者評価が終了し、^{7,16)} スクリーニングとしての有用性が指摘されている。前述したJaCVAMが計画している第3者評価において、これら試験に加え、ESACで評価された少量法⁷⁾の評価を実施する予定である。

2-3. 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については、¹⁷⁾ 日本でも独自に第3者評価を行い、代替法としての有用性を評価した。¹⁸⁾ 一方、資生堂は酵母膜破壊試験と赤血球溶血試験のバッテリーを用いる光毒性試験の検討を進め、厚生労働科学研究に第3者評価を依頼した。¹⁹⁻²¹⁾ 評価の

過程でバリデーション結果が不足しているとの指摘を受け、2期に渡るバリデーション研究が実施された。これらのバリデーション結果を用いた第3者評価は最終段階にある。

2-4. 感作性試験 OECDガイドライン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従来の試験の代替法として利用されている。²²⁾ ただし、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、ATPの量の変化を指標としたLLNA-DA法、²³⁾ BrdUの取り込みを指標としたLLNA-BrdU法のバリデーション及び第3者評価が進んでいる。²⁴⁾ LLNA-DA法のバリデーションは良好な結果を得て終了し、現在、第3者評価を実施中である。一方、LLNA-BrdU法に関しては、第1期のバリデーション結果を受け、改良したプロトコルを用いた第2期バリデーションを終了した。これらが将来的には日本で汎用される日は近いと考えている。LLNAに関しては1濃度のみで評価するreduced-LLNAがESACの認証を得るとともに⁷⁾改良試験法の評価基準が欧米で検討されるなど現在、議論が盛んな分野である。

ただし、化粧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。国際的にも新たに種々の*in vitro*試験法の開発が進んでおり、日本としては株式会社資生堂及び花王株式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ヒト細胞株活性化試験(human Cell Line Activation Test; h-CLAT)に注目し、^{25,26)} バリデーションを計画している。ただし、この分野は構造活性相関のプログラム、²⁷⁾ ペプチド結合試験の開発、²⁸⁾ h-CLAT以外のヒト細胞株を用いた試験法などの開発・検討が盛んな分野であり、これらを使いこなして感作性を評価するシステムの検討が必要である。

2-5. 急性毒性試験 OECDに掲載されている評価法²⁹⁻³¹⁾で動物数の削減が一般的になっている昨今、さらに2005年ICCVAMにて細胞毒性試験を用いた代替法の第3者評価が行われた。¹⁶⁾ この評価の結果、3T3ニュートラルレッド法を用いて、非毒物質の検出が可能とされている。さらに、「Human endpoint」に配慮した新たなワークショップも2008年2月に開かれ、JaCVAMとしてもIC-

CVAM の第 3 者評価に協力している状況である。

2-6. 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³²⁾を補う試験法である肝臓の不定期 DNA 合成の代替法として、日本環境変異原学会 哺乳類変異原性試験研究グループを中心に、ECVAM, NICEATM の協力を得たコメットアッセイ³³⁾の国際バリデーション研究が実施されている。このバリデーションでは *in vivo* 試験だけでなく、*in vitro* 試験も併行しても進めている。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、方法の統一化がこの国際バリデーションの課題である。

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 5 施設による陽性対照物質エチルメタンサルフォネートを用いた Phase I バリデーションが 2007 年 2 月に終了し、ブラインド化した被験物質を用いた Phase II のバリデーションが終了した。本バリデーションは、最終的なプロトコルを確定するための実験であり、2008 年中からプロトコルの微小な修正を経て、Phase III のバリデーションが開始される。

一方、*in vitro* 試験のバリデーションはやや遅れて、Phase I バリデーションを開始した。まだプロトコルが固まっている訳ではないことから、ブラインド化していない 5 物質を用いプロトコル確定のためのバリデーションを実施中である。

2-7. 内分泌かく乱物質のスクリーニング

熱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 に当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。³⁴⁾ 2003 年 3 月第 1 回 OECD の Validation Management Group-Non Animal (VMG-NA) 会議にてプレバリデーションが終了し、他施設のバリデーションを進めるむねが日本より報告された。2004 年 11 月の第 2 回 VMG-NA では他施設バリデーション結果を報告し、バリデーション報告書及び標準化プロトコルを OECD に提出した。第 3 回 VMG-NA (2005 年 12 月) 後 “Validated” といえる試験系かを審議・アドバイスする目的で、Preliminary Validation Assessment Panel (PVAP) が設立された。PVAP メンバーによる第 3 者評価によりバリデーションとし

ての認証を得て、次に Peer Review Panel (PRP) による第 3 者評価が実施された。

2007 年 8 月に示された PRP の報告では、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、antagonist について検討がなされていないのが指摘あった。そこで、JaCVAM では CERI に予備試験によるプロトコルの改良を依頼し、ECVAM の協力を得て、2008 年春よりバリデーション研究を開始する予定である。

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 アッセイについても、³⁵⁾ 国際バリデーション研究が進めている。このバリデーション研究は ICCVAM が主催する ECVAM, JaCVAM との共同バリデーションである。日本では日吉穂が実験を担当しており、agonist 及び antagonist の試験結果を求めている。2007 年末までに Phase I が終了し、2008 年から II 及び III に入る予定である。この試験法も OECD ガイドラインを目指している。

3. おわりに

代替法研究は欧米主導で進んでいることは明確である。日本ではそのニーズが低く、JaCVAM ができ、ICCVAM, ECVAM と並ぶ 3 極になったということですら、認知度が低い。予算や人員の確保も難しく、国際協調と一口に言っても各国の思惑の中で右往左往するので手一杯である。このような状況の中ではあるが、日本で開発されている試験法を中心にバリデーションや第 3 者評価を進め、代替法を用いた場合でも化学物質等の安全性を担保するとともに、国益に適う仕事をするのが JaCVAM の使命であると考えている。

REFERENCES

- 1) OECD series on testing and assessment, Number 34, ENJ/JM/MONO, 14(2005).
- 2) ICCVAM, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), NIH Publication No: 97-3981 (1997).
- 3) Ohno Y., *Frageance J.*, 2005-2, 30-35 (2005).
- 4) Kojima H., *Soc. Cosmet. Chem. J.*, 40(4), 263-268 (2006).
- 5) Kojima H., *J. J. Soc. Cutan. Health*, 57, 129-134 (2007).

- 6) ECB, <http://ecb.jrc.ir/REACH/> (2007).
- 7) Commission Staff Working Documents, EN, SEC82004) 1210 (2004).
- 8) ECVAM statement, <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm> (2007).
- 9) Sonoda I., et al, *Altern. Animal Test. Exp.*, **8**, 91-106 (2002).
- 10) Kojima H., et al., Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin, 2005, p.159.
- 11) Kojima H., et al. Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin, 2005, p.160.
- 12) Kojima H., et al. Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin, 2005, p.161.
- 13) Ohno Y., *Frageance J.*, **1999-7**, 21-26 (1999).
- 14) Ohno T., et al., *Altern. Anim. Test. Exp.*, **5**(1-2), 1-38 (1998).
- 15) Ohno Y., et al., *Toxicol. in Vitro*, **13**, 73-98 (1999).
- 16) ICCVAM, (http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/EPReport/ocu_report.htm (2007)).
- 17) "OECD Guideline 432: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Testing," OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France (2002).
- 18) Ohno Y., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **10** (2), 50-157 (2004).
- 19) Sugiyama M., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **2**, 183-191 (1994).
- 20) Sugiyama M., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **2**, 193-202 (1994).
- 21) Mori M., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **10** (1), 1-17 (2003).
- 22) "OECD Guideline 429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay," OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2002).
- 23) Yamashita K., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **11**(2) 136-144 (2005).
- 24) Takeyoshi M., et al., *Toxicol. Lett.*, **119**, 203-208 (2001).
- 25) Ashikaga T., et al., *Toxicol. in Vitro*, 767-773 (2006).
- 26) Sakaguchi H., et al., *Toxicol in Vitro*, 774-784 (2006).
- 27) Apula, A.O., et al, *Chemical Research in Toxicol*, **18**, 1420-1426 (2005).
- 28) Gerberic, G. F., et al, *Toxicol. Science*, **81**, 332-343 (2004).
- 29) "OECD Guideline 420: Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure," OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2001).
- 30) "OECD Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method," OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2001).
- 31) "OECD Guideline 425: Acute Oral Toxicity-Modified Up and Down Procedure," OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2001).
- 32) "Guide to Qusai-drug and Cosmetic Regulations in Japan," Yakuji Nippo Ltd., 2006, pp.141-147.
- 33) Mitchelmore, C. L., Chipman J. K., *Mutat. Res.*, **399**, 135-147 (1998).
- 34) Akahori, Y., et al., *Toxicol. in Vitro*, **22**, 225-231 (2008).
- 35) ICCVAM, (<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine/endodocs/xdseval2.pdf> (2007)).

電子スピン共鳴 (Electron Spin Resonance; ESR) 法による生物医学応用 —医薬品開発のための抗酸化能評価—

李 昌一

Biomedical Application of Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy —Assessment of Antioxidant Property for Development of Drugs—

Masaichi-Chang-il LEE

Department of Clinical Care Medicine, Division of Pharmacology and ESR Laboratories,
Kanagawa Dental College, 82 Inaoka-cho Yokosuka City 238-8580, Japan

(Received January 11, 2008)

Reactive oxygen species (ROS) are associated with oxidative stress-mediated alterations under pathophysiological conditions, and particularly brain ischemia, brain tumor, and neurodegenerative diseases. Electron spin resonance (ESR) is recognized as one of the most powerful techniques available for the detection of ROS in tissues and cells. We previously developed an *in vitro* ESR-based technique for the detection of free radical reactions in biological systems. In addition, significant advances in the field of *in vivo* ESR techniques over recent years have now made it possible to visualize the distribution and metabolism of oxidative stress, and the degree of tissue oxygenation *in vivo*. Nitroxyl radicals are very useful as exogenous spin probes for measuring free radical distribution, oxygen concentration, and redox metabolism by *in vivo* ESR in biological systems, using a combination of these ESR methods collectively focused on animal models of disease such as spontaneously hypertensive rat (SHR) or stroke-prone SHR (SHRSP) for the assessment of antioxidant property of drugs. Our results suggest that ESR could be applied to the assessment of antioxidant property on oxidative stress in target organs, especially brain, using animal disease models, SHR or SHRSP. After screening drugs for antioxidant property using such as *in vitro* or *in vivo* ESR assessment, we'll be able to develop and find novel antioxidant drugs for ROS-induced brain disease in the near future.

Key words—electron spin resonance; reactive oxygen species; oxidative stress; antioxidant property

1. はじめに

フリーラジカル、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS)、活性窒素種 (Reactive Nitrogen Species; RNS) による酸化ストレス (Oxidative Stress) は様々な疾患あるいは病的な加齢の原因として知られている。¹⁾ 特に、糖尿病、動脈硬化、高血圧症などの生活習慣病だけではなく、脳梗塞、認知症、神経変性疾患などの脳疾患との関連性が注目されている。²⁻⁴⁾ したがって、これら疾患の予防あるいは発症を防ぐためにフリーラジカル、ROS、及び RNS の酸化ストレスを減弱させる抗酸化治療への期待は大きい。しかしながら、抗酸化治療の現状において

かならずしも現在抗酸化薬剤の開発が期待通りの成果が得られているとはいえない。それは酸化ストレスを惹き起こすフリーラジカル、ROS、及び RNS の測定方法が抗酸化薬剤、抗酸化物質の抗酸化能を評価、さらにスクリーニングするには様々な問題を含むからである。実際、測定対象である大半のフリーラジカル、ROS、及び RNS の寿命が短く、*in vivo* 測定、特にヒトにおける測定は困難である。これまで行われてきた研究から、これらのフリーラジカル、ROS、及び RNS の測定における方法論としては大きく 2 つに大別される。1) フリーラジカル、ROS、及び RNS 種をトラップし、トラップした分子を測定する方法と 2) フリーラジカル、ROS、及び RNS 種によって酸化損傷を受けたレベルを測定する方法である。⁵⁾ この稿では 1) の方法論として知られている電子スピン共鳴 (ESR) 法の生物学的応用としてのこれらのフリーラジカル、

神奈川歯科大学学生体管理医学講座薬理学分野・ESR 研究室 (〒238-8580 横須賀市稲岡町 82 番地)
e-mail: ieeman@kdcnet.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S40 で発表したものを中心に記述したものである。

動物実験の3Rsにおける国内外の動向

小島肇夫

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長

「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の中でも苦痛の軽減については、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。この部署の活動を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。

1 「動物愛護及び管理に関する法律の改訂」及び関連指針

1973年に制定された「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を徹底するために、適正な飼養及び保管並びに科学上の利用に努めることが記載されている。

これを受け、同時期に文部科学省,³⁾ 厚生労働省,⁴⁾ 農林水産省,⁵⁾ が「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、適切な動物実験方法の選択、動物実験等の施設及び設備を踏まえて動物実験計画を立案し、適正に実施することが記載されている。実験方法の選択には動物実験代替法(以下、代替法と記す)の利用、実験動物の選択、苦痛の軽減への配慮が明記されている。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⁾ 動愛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。このほかにも、日本実験動物学会、日本薬理学会、日本トキシコロジー学会、日本生理学会、日本神経科学学会、日本実験動物協会などがそれぞれに指針を示している。⁷⁾

2 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・評価および検証並びに情報公開に関する記述がある。⁸⁾ 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) が国際認証組織としてよく知られているが、⁹⁾ 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、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、⁹⁾ 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と考える。

3 動物実験の置き換えのための国際機関

置き換え試験法の開発の中で、化学物質等の安全性試験の公定化には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GD 34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バリデ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えない。ところが、バリデーションや第三者評価を実施するといっても大変な労力を要する。ましてバリデーションの実施やバリデーション実行委員会の構築にはノウハウが多く、評価においても種々の専門家への要請、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、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置き換えや動物数の削減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月に当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1つが新規、または改良試験法の評価である。この活動を我々はJaCVAM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。

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、捕鯨反対問題ばかりが日本では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及び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

Wentley

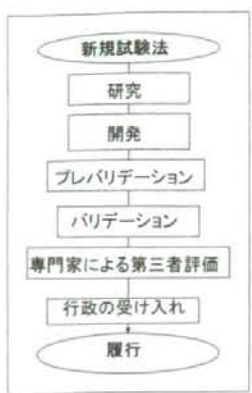


図1 試験法公定化までの手順

表1 REACHで製造量毎に要求される試験名

	健康	環境
1~10 t 優先物質	<i>In vitro</i> 眼刺激性, <i>in vitro</i> 皮膚刺激性/ 腐食性, 皮膚感作性, 遺伝毒性(Ames), 急性毒性(1つの投与経路)	急性水生毒性—ミジンコ, 生物分解性, 急性水生毒性—藻類
10~100 t	<i>In vivo</i> 眼刺激性, <i>in vivo</i> 皮膚刺激性, 遺 伝毒性(マウスリンフォーマまたは遺伝 子突然変異), 遺伝毒性(染色体異常また は <i>in vitro</i> 小核), 急性吸入/皮膚毒性, 亜 急性毒性(28日間), 生殖毒性スクリー ニング, トキシコキネティクス評価	急性水生毒性—魚類, 活性汚泥, 吸着・ 脱離スクリーニング, 更なる生物分解性, 加水分解試験
100~1,000 t	遺伝毒性(<i>in vivo</i> 小核), 亜慢性毒性(28 日または90日間), 更なる生殖毒性試験 (出産前生殖毒性及び2世代試験)	長期的水生毒性—ミジンコ及び魚類, 更 なる分解及び環境中運命・挙動の研究, 陸生生物(植物, 無脊椎動物)への短期的 影響, 更なる吸着・脱離スクリーニング, 魚貯留性, 汚泥微生物への影響
1,000 t 超	遺伝毒性(<i>in vivo</i>), 発がん性, 慢性毒性 (12か月以上), 更なる生殖毒性試験	更なる分解及び環境中運命・挙動の研 究, 陸生生物への長期的影響

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、バリデーション及び第三者評価を進めている。

一方、REACHとは既に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5.9兆ユーロ)あり、170万人の従業員、国際市場の33%を占めている事情がある一方、職業性皮膚炎の治療費に300万ユーロ/日、約6億ユーロ/年が必要であるとともに、既存化学物質86%の毒性データが不足している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(ハザードと暴露評価)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暴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では更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1.1億ユーロ以上)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、代替法で50%及び*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年もかかるといわれており、これまで通りの方法では2011年までに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CORRELATE(community reference laboratory for alternative testing)という方策が検討されている。

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1/1	60
ARTEMIS	<i>In vitro</i> neural tissue system for replacement of transgenic animals with memory/learning deficiencies	1,984,900	2007年3/1	36
CarcinoGENO MICS	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11/1	60
COMICS	Comet assay and cell array for fast and efficient genotoxicity testing	3,189,385	2007年1/1	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10/1	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1/1	36
LINTOP	Optimization of liver and intestine <i>in vitro</i> models for pharmacokinetics and pharmacodynamics studies	2,933,291	2007年1/1	36
MEMTRANS	Membrane transporters : <i>in vitro</i> models for their role in drug fate	1,900,000	2006年4/1	36
PREDICTOMICS	Short-term <i>in vitro</i> assays for long-term toxicity	2,259,754	2004年9/1	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7/1	60
Sens-it-iv	Novel testing strategies for <i>in vitro</i> assessment of allergens	10,999,700	2005年10/1	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1/1	24
VITROCELLOM ICS	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1/1	36
新規プロジェクト				
ENATS	Embryonic stem cell-based novel alternative testing strategies	11,895,577	2008年4/1	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4/1	42
OPENTOX	Promotion, development, acceptance and implementation of QSARs for toxicology	2,975,360	2008年4/1	36
PREDICT-IV	Profiling the toxicity of new drugs : a non-animal based approach integrating toxico-dynamics and biokinetics	11,330,907	2008年4/1	60

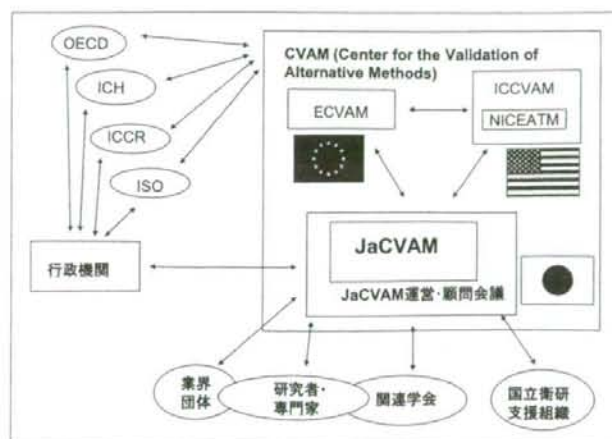


図2 JaCVAMの国際協力概要

5 日本の動向

これまで、日本でも眼刺激性、皮膚刺激性、感作性、光毒性試験などの代替法において日本動物実験代替法学会を中心にバリテーションや第三者評価が行われてきた。²⁰⁾ しかし、内容的に優れているものの、国際的には認知度が低かった。

幸い、昨年8月に第6回国際動物実験代替法会議(WC6)、²¹⁾ 本年2月にWC6フォローアップがいずれも東京で開催され、²²⁾ 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。また図2に示すように、JaCVAMを中心に日本でも、OECD、ICH(日米EU医薬品規制調和国際会議)、ICCR(化粧品国際規制会議)、ISO(国際標準化機構)などにおいて動物実験の3Rs問題に対する国際協力体制が整うとともに、一昨年から遺伝毒性、内分泌かく乱物質スクリーニングなどの分野で国際的な共同研究も始まっている。

6 おわりに

動愛法の動物愛護管理基本指針には、毎年度達成状況を点検しその結果を施策に反映させることや、策定5年後に当たる2010年度をめぐりとした見直しが記載されている。また、本年から始まった第三者認証システムの普及など、実験動物の福祉問題ははまだ完成された仕組みではない。代替法においてもJaCVAMを中心に、当面は化粧品や化学物質の安全性確保のため、国際協調を進めていくことになると考えている。

参考文献

- 1) 動物の愛護及び管理に関する法律(2008) http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend_law2/law.pdf
- 2) 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準(2008) http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law_series/nt_h180428_88.html
- 3) 文科省、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(2008) 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(2008) <http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/t-kenkyu/dobutsu/0606sisin.html>
- 5) 農水省、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(2008) http://www.maff.go.jp/www/press/2006/20060601_press_2b.pdf
- 6) 日本学術会議、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(2008) <http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-20-k16-2.pdf>
- 7) 重茂浩美、科学技術動向、5月号、10-20(2006)。
- 8) AAALAC International Association(2008) <http://www.aaalac.org/>
- 9) 佐々木弥生(2008) http://www.soc.nii.ac.jp/jsae/WC6_followup/WC6_Follow_Sasaki.pdf
- 10) 動物実験施設協議会(2008) <http://www.kokudoukyou.org/annai/>
- 11) 日本動物実験協同組合(2008) <http://www.labanimal.org/freme.html>
- 12) 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.
- 13) ICCVAM, NIH Publication No. 97-3981, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (1997).
- 14) 大野泰雄、国立衛研報、122、1-10(2004)。
- 15) 小島肇夫、化粧品技術者会誌、40、263-268(2006)。
- 16) 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, SEC(2004)1210.
- 17) ECH(2008) http://ec.europa.eu/echa/home_en.html
- 18) Hartung T. (2006) <http://www.soc.nii.ac.jp/jsae/20kai.html>
- 19) 化学物質評価研究機構編「EU新化学品規則 REACHが分かる本」工業調査会、東京、2007。
- 20) JRC(2008) http://www.vet.uu.nl/nca/userfiles/other/REACH_and_the_need_for_intelligent_testing_strategies.pdf#search=Integrated%20Testing%20Strategies%20REACH
- 21) EC(2008) Alternative Testing Strategies. EUR 22846.
- 22) 小島肇夫、薬学雑誌、128、747-752(2008)。
- 23) 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Abstracts. (2007).
- 24) 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」抄録集、2008。

REACH 対応に必要な動物実験代替法の現状

小島 肇夫 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, Tel 03-3700-1141, Fax 03-3700-7874, E-mail: h-kojima@nihs.go.jp

1 要約

2006 年から施行された REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals) とは、すでに EU 市場に流通している約 3 万の化学物質および新規化学物質に関し、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ものである。この安全性の規制には動物実験代替法の促進が謳われており、種々の試験法において、REACH のための戦略が練られている。

2 REACH とは？

REACH (Registration, Evaluation and Authorization of CHemicals) とはすでに EU 市場に流通している約 3 万の化学物質および新規の化学物質に対し、その製造・輸入を行う事業者は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¹⁻⁴⁾。登録、評価、認可、制限の総称であり、2007 年より施行が開始され、2008 年 6 月より運用が開始される。その後のスケジュールを図 1 に示すが、2018 年を目標にすべての既存化学物質の登録と安全性データの収集を終えようというものである。REACH の特徴を確認しておく、責任は産業界におく、既存または新規化学物質を区別しない、ライフサイクル（製造、加工、使用、廃棄）を通して評価する、特定条件に合致する成形品中の化学物質も規制する、サプライチェーンにおけるすべての関係者（製造・輸入業者だけでなく、川下企業、流通業者）が関与するものであるとされている。

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現状に対応するものである⁵⁾。本来なら、EU 域内での問題ではあるが、経済的にも安全性評価の面でも国際化が進む昨今、日本でも無関心ではいられない問題であるとの認識は大きく産業界にも広がっている。



図1 既存物質の登録期限^{6)改定)}

3 REACH の求める安全性資料

以降に、REACH の求める安全性資料についてその概要をまとめた。

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)が求められる。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%の安全性試験を2011～2018年に実施しなければならない。図1に示すように製造/輸入量に応じてその期限が決められている^{3,4,6)}。もし、現行の動物実験を用いて安全性を評価するとすると、2002年では化学物質の安全性評価に1.3万匹しか使われていなかったのに対し、今後11年間で390万匹の実験動物が必要となり、24億€の経費が掛かる⁷⁾。これは産業界にとって痛手であると同時に、動物愛護団体が納得しない数字である。そこで、1t以上の生産物質すべてを動物実験代替法(以下、代替法と記す)で評価することにより、有害性の同定を可能にする提案がなされている。

実施すべき試験法のリストを表1に示すが⁶⁾、実験を行う場合には、REACHのために定められた総合的な試

験戦略(ITS: Integrated Testing Strategies)に基づき対応する⁷⁾。図2にも示すが、まずRead-acrossという化学物質の総合的な情報(過去の実験データと類似構造物から影響を予測すること)の解析が求められる。次に構造活性相関などのin silicoの利用、その後にはハザード評価のために代替法を優先的に使用する。生産量が多い物には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が、その場合でも動物数の削減や動物の苦痛の軽減を考慮しなければならない。



図2 試験実施までに踏むべき段階^{5(改)}

表1 REACHで製造量毎に要求される試験名^{6(改)}

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

4 代替法の現状

では、REACH が求める代替法は現在、どれくらい検討が進んでいるのか。REACH のために表 1 に示すような試験法が記載されているが、各施設独自の方法で評価してよいという訳ではない。バリデーションや第三者評価が終了した試験法でなければならず、今後、欧州代替法バリデーションセンター (ECVAM: European Center for the Validation of Alternative Methods) において 300 のパートナーと 17 の研究プロジェクト (予算 100 million €) を通して、REACH のために“適切な” 100 の試験法が確立される予定である。現在 125 の INVITTOX による プロトコールが用意されている。2006 ~ 2007 年に 14 の試験法バリデーションが終了したが、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⁵⁾。種々の試験法において、REACH のための戦略が練られており⁷⁾、これによる影響分析において、代替法で 50% および (Q) SAR で 20% の動物数削減を専門家が分析している。

ただし、例えば、よく知られている OECD ガイドラインの場合、新規試験法が開発され、行政的に受け入れられるためには 10 年以上かかると言われており、これまで通りの方法では 2011 年までに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試験法を揃える、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 CORRELATE (Commission Reference Laboratory for Alternative Tests) という方策が検討されている。ただし、この CORRELATE の検討はまだ始まったばかりであり、誰がどのような基準で同等と判断するのか、何を持って“適切な”方法と判断するのか決まっていない。

一方、適切な資金・資源の提供を通して、代替法の開発やバリデーションを加速し、安全性評価のための代替法の行政による承認の迅速化を目指すため、欧州では EPAA (European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing) が設立され¹²⁾、Enterprise, Research, Health & Consumer Protection, Environment, Joint Research Centre などの省庁、AISE (石鹼洗剤協会)、

CEFIC (欧州化学品工業会)、COLIPA (欧州化粧品工業会)、ECPA (欧州農業工業会)、EFPIA (欧州製薬団体連合会)、EuropaBIO (欧州バイオテクノロジー工業会)、IFAH (欧州動物愛護協会) などの産業界が協力している。さらに、REACH のための ITS を開発するために、OSIRIS (Optimized Strategies for Risk Assessment of Industrial Chemicals through Integration of Non-Test and Test Information) という産官学の組織も組織され¹³⁾、欧州では多くの資金が代替法の開発に使われている状況である。

以下に 1t 以上の製造量で要求される主な代替法の進捗状況について説明する。

1) 皮膚刺激性

ウサギを用いる Draize 試験が約 60 年に渡り使われてきた。培養皮膚モデルや抽出皮膚などを用いた代替法のバリデーション研究が ECVAM により 2003 年以降実施され、その結果として、2007 年 4 月、ECVAM 顧問会議 (ESAC: ECVAM Scientific Advisory Committee) が培養表皮モデル EPISKIN を用いる方法を皮膚刺激性試験代替法として認証した⁸⁾。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した値で動物実験を置き換えようというものである。

2) 眼刺激性試験

米国動物実験代替法バリデーション省庁間調整委員会 (ICCVAM: Interagency coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) ではニワトリ抽出眼球試験および牛抽出角膜試験の第三者評価が終了し⁹⁾、強刺激物質のスクリーニングとしての有用性が指摘されている。ESAC でもこれらを評価し、同様の結論を導いている⁸⁾。さらに ESAC でウサギへの少容量法の検討が行われており、また ECVAM では過去バリデーションが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、フルオレッセン放出、サイトセンサーマイクロフィジオメーター試験) の回顧的な評価が始まるとともに、ヒト角膜再構築モデルにおいてバリデーション研究が進行している。