

第3節 *In Vitro* 経皮吸収試験法

要約

in vitro 経皮吸収試験法として、OECD、EU、COLIPA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association)、SCCP (Scientific Committee on Consumer Products)、EPA (US. Environmental Protection Agency) などにおいてガイドラインやガイダンス、提案などが発行されている。それらの概要に大きな差があるとはいえないが、最新の OECD ガイドラインおよび SCCP 基準を比較してそれぞれの留意点をまとめた。

1. 序論

動物実験の3Rs (Replacement, Refinement, Replacement) の普及を受け^{1,2)}、欧米では化粧品規制や REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) に対応するため、動物実験代替法の利用が推奨されている。よって、欧米では安全性評価における経皮吸収試験や皮膚透過性は *in vitro* 試験が中心である³⁾。

本稿の目的は *in vitro* 経皮吸収試験法の紹介であるが、*in vitro* で評価できるものは経皮吸収 (percutaneous absorption) ではなく、皮膚透過性 (skin permeation) であることから、これら試験の実施上の留意点についてまとめてみた。

2. 試験法

公的な *in vitro* ガイドラインとして、OECD⁴⁾、COLIPA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association)⁵⁾、SCCP (Scientific Committee on Consumer Products)⁶⁾、EU⁷⁾、EPA (US. Environmental Protection Agency)^{8,9)}、ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)¹⁰⁾ などからガイドラインやガイダンス、提案がなされ、ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) モノグラフィーにもまとめられている¹¹⁾。表1にこれらに記載されている必要な情報をまとめた。それらの概要にあえて比較するほど大きな差があるとはいえないが、コアとなる OECD と SCCP のガイドラインの主要な相違点を表2にまとめた。記載されていない拡散セルや被験物質の適用量、適用時間、測定方法などはほぼ同様に記載がある。特に、SCCP 基準は OECD ガイドライン 428 を受け、化粧品の評価に実験動物の使用を極力避けるためか、ヒトまたはブタの摘出皮膚が推奨され、他の動物の使

用は認めていない。

表1 *in vitro* 経皮吸収の評価に必要な情報

項目	パラメーター
被験物質	純度 分子量
溶媒	n-オクタノール/水分配係数 溶媒の種類、または処方構成 溶解性 揮発性 経皮吸収促進剤の有無
チャンバー	pH 種類 レセプター液の循環の有無
レセプター	溶液の種類 被験物質の溶解性
皮膚	種、系統 年齢、性別 部位 温度 保管状態（温度、期間、損傷の有無） 調整方法（厚さ、洗浄、ストリッピング方法）
適用	適用面積 適用量/cm ² 適用期間 閉塞性の有無
サンプリング	回数 時間 量 ドナー側の残存量 皮膚中量 洗浄液中の量

表2 OECDガイドラインとSCCP基準の主な相違点

項目	OECDガイドライン 428	SCCP基準
摘出皮膚 種 部位 厚さ 強度	ヒトまたは動物 なし 200-400 μm なし	ヒトまたはブタ ヒト：腹、脚、胸 ブタ：腹、胸、背、側部、耳 ヒト：200-500 μm ブタ：500-1000 μm トリチウム水、カフェイン、ショ糖 TER、TEWLで確認
レセプター液	被験物質が溶解する 摘出皮膚に無影響 代謝試験では活性必要	親水性：生理食塩水、緩衝液 脂溶性：アルブミン、乳化剤使用 (摘出皮膚に無影響)
N数	最低 4	> 6
回収量	100 \pm 10%	100 \pm 15%
適用時間	24	24 ただし、酸化染毛剤の場合 10-60 分
算出値	非流出系 洗い流し量 (μg) 皮膚内量 レセプター (量、速度、%) 流出系 透過係数	絶対量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 吸収率 (%)

3. 試験実施上の留意点

in vitro 法の長所は再現性が良く、簡便であり、物理化学的な測定因子を求めることができる点である。これらの内容を OECD ガイドラインおよび SCCP 基準を中心に記載し^{4,6)}、試験法を構築する上で留意する点をまとめてみた。

3.1 摘出皮膚

ヒトまたは動物起源が使われるが、ヒトの選択がベストである。ヒト皮膚はいつでも利用できるわけではなく、国内や国際的な倫理規定に従わなければならない。ヒトの皮膚では部位、保管状態によりばらつきがでる¹²⁾。

(1) 種差

ヘアレスマウス、ヘアレスラット、モルモット、ブタなどの摘出皮膚が使われる。ラットやウサギの透過速度が速く、ブタ、モルモット、イヌ、ヒトの透過速度は遅いといわれている（ラットはヒトやブタの2~10倍¹¹⁻¹³⁾）。これらの表皮の付着密度、角質層の特性、生体内変換速度などの違いをしっかりと認識しなければいけない¹³⁾。マウス、モルモット、ウサギはヒトに比較してバリエーション機能が適切でない⁶⁾。ブタはヒトと本質的な経皮吸収特性が似ているので、代替品として推奨される。

(2) 厚さ

ブタでも同様であるが、表皮をはがす際に真皮の部分まではがす必要があり、角質層から200-500 μm の厚みで摘出皮膚 (Split-thickness skin) を採集する必要がある^{4,6)}。1 mm以上の摘出皮膚は避けるべきであるが、ブタでは Split-thickness skin を得ることは難しく、full-thickness skin (500-1000 μm) の利用が適している。さらに、角質層を取り除いたストリップスキンを用いると特に親水性物質の皮膚透過性が著しく高くなる¹⁴⁾。

(3) 部位

ヒトでは腹、足、胸、ブタでは腹、胸、背、側部、耳がよい^{4,6)}。

(4) 性と年齢

重要な因子ではないが、記録に残す。

(5) サイズ

最小面積は0.64 cm^2 、記録に残す⁶⁾。直径5 cmが妥当である⁵⁾。

(6) n数

最低4、6以上との記載がある^{4,6)}。

(7) 活性

皮膚の状態が保たれていれば、活性のない皮膚も利用できる。新鮮か、生きた状態が保たれた皮膚を透過実験に使用すると代謝も測定できる^{4,6)}。24時間以内であれば、新鮮といえるが、酵素処理や保管温度によって変わりうる。

(8) 温度

皮膚透過性と温度とは関連性があるので、実験中は皮膚上部の温度をコントロールする必要がある^{4,6)}。32±1℃が妥当である。

(9) 保管

摘出後すぐに-20℃以下でアルミホイルに包んで保管する。3ヶ月以内に用いる⁵⁾。使用時には室温で解凍30分後に用いる。活性を見る場合には4℃で保管する。この場合には24時間以内に用いる。保管状態によりバリエーションが異なることから、これらは重要なポイントである

(10) バリエーション

不十分な操作で角質層が損傷を受ける。よって、試験に先立ち、これらを確認しなければならない。そのために、トリチウム水やカフェイン、ショ糖などが利用される。トリチウム水の使用では0.58±0.17% (n=60)という結果が例示されている⁵⁾。その他、TER(電気伝導度)やTEWL(角質水分蒸散量)の測定でもよい⁶⁾。

昨今、シリコン膜、3次元培養皮膚または表皮モデル(以下、培養皮膚モデルと記す)等も利用されている^{6,15)}。皮膚透過性を評価する上で培養皮膚モデルは有用であり、摘出皮膚との相関性が高いという報告もある¹⁵⁾。ただし、培養皮膚モデルの透過性は摘出皮膚と比べて10倍高い¹⁴⁾。ヒトと同じ透過性の皮膚を捜すことが重要ではなく、早く確実にヒト透過性を予測できるモデルを探すことが重要であり¹⁵⁾、現在の培養皮膚モデルはその目的にかなっているようである¹⁶⁾。ただし、すべてのガイドラインではまだこれらのモデルの使用を認めていない。

3.2 器材

(1) 拡散セル

非流出系として、並行型(side by sideセル、2チャンバーセル)および図1に示すような垂直型の拡散セル(フランツ型セル)が汎用されている^{4,6,17)}。並行型は薬物透過の基礎研究、垂直型は応用研究に用いられることが多い¹⁸⁾。セルの材質はガラスであるが、物質により吸着への配慮が必要である¹⁸⁾。角質層をドナー側におき、正しく*in vitro*皮膚透過性実験を行えば^{4,6)}、*in vivo*皮膚透過性と十分な相関が得られる^{19,20)}。レセプター液を攪拌してサンプリングする。感度はよい。また、これら非流出型以外にフロースルー型拡散セルもある。この型では生理状態を維持するため、必要な栄養素を継続的に取り替える機能を備えているため、皮膚の活性を維持できる¹⁸⁾。どちらも経時的なサンプリングが可能である。

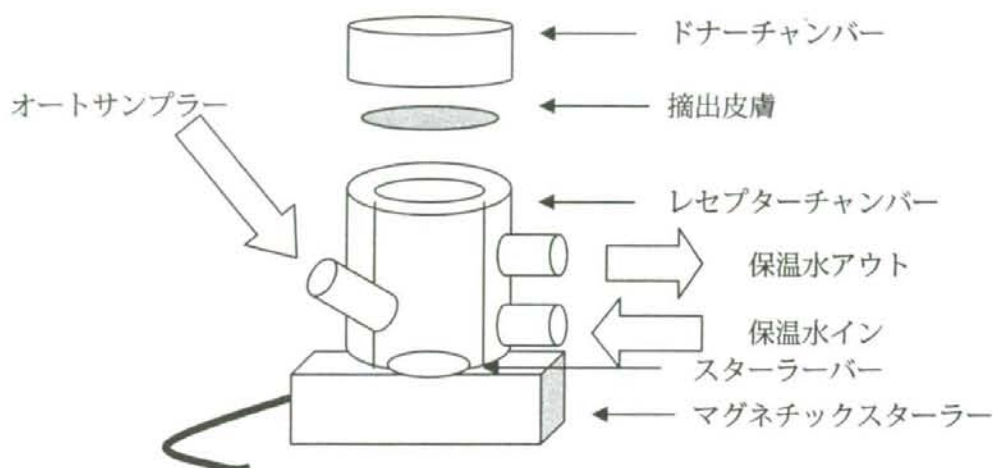


図1 非流出系の拡散チャンバー

(2) レセプター液

レセプター液の組成は被験物質の溶解性、安定性、拡散を妨げないように選択されなければならない。生理食塩水、緩衝液は親水性物質の場合には適切である。脂溶性物質の場合には血清アルブミンや適切な溶解剤（非イオン系界面活性剤）が使われるが、これらによって皮膚強度（バリア）に影響がないように選択する^{4,6)}。スターラーは150 prmで回して溶液を攪拌する⁵⁾。レセプター中の被験物質の総量が10%を越えないようにサンプリングする⁶⁾。適正なpHも重要である。容量は最少として多くなりすぎないようにする。泡が入らないようにも注意する。期間中安定性を保つことが重要である。吸収特性と目的により、非流出型かフロースルー型拡散セルを選択する。

3.3 被験物質

放射性同位元素 (^{14}C , ^3H) などを組み込んだ被験物質が理想的である^{4,6)}。ただし、放射性同位元素の純度や組み込まれた位置により分子形が変化し、若干異なる挙動を示す場合があるので注意が必要である。放射性同位元素の活性は0.4 MBq/mgがよいという記載もある⁵⁾。

(1) 物性

in vivo 試験の皮膚透過部位の項でも触れたが、皮膚からの吸収には脂溶性、イオン化、分子量、安定性、溶解性、純度などの影響が大きい。親水性物質の評価は容易であり、脂溶性物質の評価は難しい⁷⁾。皮膚透過性はn-オクタノール/水分配係数が大きいほど高くなる²¹⁾。ニトログリセリンなどは脂溶性で分子量が小さく、極めて経皮吸収が高い²²⁾。このような被験物質の物性

を考慮に入れた実験系の構築が重要である。

溶媒による溶解度も大きな影響因子である。溶解度限界近辺の被験物質を適用すれば最大の皮膚透過性となる。それ以上に可溶化剤を加えても溶解度が加えた薬剤量を上回ると経皮吸収は減少していくことから、可溶化剤による皮膚透過性の増加はない¹⁵⁾。

(2) 溶媒

適用されるものと同じ溶媒を用いる^{4,6)}。原体、希釈、製剤などケースバイケースである。安定性を確保できる溶媒とする。

(3) 濃度

1 濃度以上とする^{4,6)}。できれば、直線性を検討できる複数濃度の結果があるとよい。

(4) 適用量

固体なら 1-5 mg/cm²、液体なら 10 μL/cm²、酸化染毛剤の場合⁶⁾、20 mg/cm² とする。

(5) 温湿度

実験中は皮膚上部の温度をコントロールする必要がある^{4,6)}。32 ± 1 °C、湿度 30-70% が妥当である。

(6) 暴露時間とサンプリング

洗い流さないものであれば、24 時間適用する。サンプリングは 24 時間以内に数回行う。24 時間を越えてのサンプリングは不適である^{4,6)}。酸化染毛剤のような洗い流す場合には、15-45 分間処理し⁶⁾、その後よく被験物質を洗い流し、24 時間までサンプリングを続ける^{6,9)}。農薬では 6-8 時間処理が推奨される⁷⁾。

サンプリングは最初の 30 分後にまず 1 回目を行い、少なくとも 6 回必要である。

3.4 分析

(1) 回収

ドナーチャンバー、皮膚表面の洗浄液、摘出皮膚、レセプター液およびチャンバーに含まれるまたは付着するすべての被験物質を回収する^{4,6)}。

(2) 測定指標

シンチレーションカウンター、HPLC (高速液体クロマトグラフィー)、GC (ガスクロマトグラフィー) などを用いる^{4,6)}。マイクロオートラジオグラフィーを用いれば、定量的な解析や分布を確認できる。

(3) 回収率

100 ± 10 ~ 15%^{4,6)}。

(4) 算出値

非流出系の場合、洗い流し量 (μg)、皮膚内量 (μg)、レセプター (量、速度、%) を求める。絶対量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)、吸収率 (%) との記載もある⁶⁾。流出系の場合には透過係数 (K_p) を求める⁶⁾。

3.5 記録

実験報告書には、GLP に従い、以下の項目を残す。

- | | |
|---------------|--|
| ① 被験物質 | 起源、メーカー、純度 (放射性化合物としての純度)、ロット、物理化学的性質 (pH、揮発性、溶解度、安定性、分子量、 <i>n</i> -オクタノール/水分配係数) |
| ② 被験物質の調整方法 | 溶媒の選択、処方内容とその理由、濃度、安定性、溶解状態 (溶解、分散、懸濁) |
| ③ チャンバー、レセプター | 種類、レセプター液の循環の有無、溶液の種類、被験物質の溶解性 |
| ④ 摘出皮膚 | 種、系統、年齢、性別、部位、温度、保管状態、調整法 (厚さ、洗浄、テープストリッピング方法) |
| ⑤ 適用状態 | 適用面積、適用時間、閉塞性、適用量、操作方法およびこれらの記録 |
| ⑥ 結果 | サンプリング回数、時間毎の回収量、ドナー側の残存量、皮膚中量、洗浄液中の量、結果の解釈 |
| ⑦ 考察、結論 | |

4. 結語

皮膚透過性がなければ、有効性も毒性も引き起こされない。ただ、例えば皮膚刺激性物質がどれくらい皮膚透過されれば皮膚反応となるかの閾値はわかっていない。よって、世界共通の試験法で実施された適切な皮膚透過性結果が得られ、データベースが構築されれば、基準値が定められるかもしれない。さらに *in vivo* 実験や皮膚刺激性や皮膚感作性試験などを減らすことができる可能性も高い。培養皮膚モデルでのデータ蓄積が進めば、ヒトやブタの摘出皮膚を使うことも可能性も考えられる。本分野で取り組むテーマはまだ多く、完全な動物実験代替法の確立を目指すには多くの研究者の協力が必要である。

文 献

- 1) 動物の愛護及び管理に関する法律
http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend_law2/law.pdf
- 2) 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準
http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law_series/nt_h180428_88.html
- 3) 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, SEC 82004, 1210
- 4) OECD (2002) Guideline 428 : *In vitro* skin absorption. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 5) COLIPA (1995) Guideliens for percutaneous absorption, Brussels
- 6) SCCFNP (2000) Guidelines for *in vitro* methods to assess percutaneous absorption of cosmetic ingredients" in "Notes of Guidance for testing of cosmetic ingredients for their safety evaluation", SCCNFP/0321/00 Final
- 7) EC Guidance document on dermal absorption, Sanco/222/2000 rev. 7, 19/03/2004. European Commission, Health and consumer protection
- 8) EPA (United States Environmental Protection Agency) (1999) Proposed rule for *in vitro* dermal absorption rate testing of certain chemicals of interest to occupational safety and health administration. Federal Register, Volume 64, Number 110, June 9, 1999.
- 9) Recommended protocol for *in vitro* percutaneous absorption rate studies (1996). Federal Register, Vol 61, No. 65.
- 10) Howes D., et al (1996). Methods for assessing percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 2481-106.
- 11) ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals), (1993). Percutaneous absorption. Monograph n° 20, ECETOC, Brussels, Belgium.
- 12) 杉林堅次 (2007) 経皮吸収, 化粧品大全, 株式会社 情報機構, 東京, pp.389-395.
- 13) Cohen, D. E. and Rice R. H. (2004) 皮膚の毒性反応, キャサレット&ドール編, トキシコロジー第6版, サイエンティスト社, 東京, pp.751-772.
- 14) Watanabe, T., et al. (2001) Altern Animal Text EXperiment, 8, 1-14.
- 15) 杉林堅次 (2007) 薬剤学 67 (2), 89-95.
- 16) 杉林堅次 (2007) 芋川玄爾編, 機能性化粧品素材開発のための実験法, シーエムシー出版, 東京, pp.347-354.

- 17) 杉林堅次 (2006) 日本化粧品学会誌, 30(4), 261-265.
- 18) Bronaugh, R. L., et al (2005) *in vitro* 法による経皮吸収の測定, 化粧品・医薬品の経皮吸収, ロバート L. ブロナーおよびハワード I. メイバック編著, 杉林堅次監訳, フレグランスジャーナル社, 東京, pp.163-168
- 19) Sato, K. et al. (1988) Chem. Pharm. Bull., 36, 2232-2238.
- 20) Sato, K. et al. (1988) Chem. Pharm. Bull., 37, 2624-2636.
- 21) Portts, R. O. and Guy, R. H. (1995) Pharm. Res., 12, 1628-1633.
- 22) 杉林堅次 (2006) 日皮協ジャーナル 56, 51-57.

日本薬理学会の奨める動物実験 —苦痛の評価と軽減— 「はじめに」および日本薬理学会の新動物実験指針

大野 泰雄

特集

動物実験指針 1

要約：動物実験に対する社会の関心の高まりに伴い、平成 17 年 6 月に「動物の愛護及び管理に関する法律」が改正され、動物実験における 3R の原則を組み込まれた。また、文部科学省等の関連指針が改訂された。これらを考慮し、日本薬理学会は倫理的な動物実験を推進するために動物実験指針を作成した。本稿ではこれを紹介した。

最近の薬理学では細胞株等を用いる *in vitro* 研究が多くなっている。しかし、依然として、動物実験や実験動物から採取した試料を用いた研究は薬理学研究に不可欠である (表 1)。しかし、動物福祉や権利に対する社会の関心が高まり、動物実験への反対運動もたびたび報道されている。一方、現在の科学研究には多額の費用が必要であり、公的な資金なしに研究を進めることはできない。日本薬理学会はこのような状況に

表 1 第 77 回日本薬理学会でのポスター発表で用いられた試験系

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

(2005 年 3 月 8 日および 9 日に発表されたものについての調査結果)

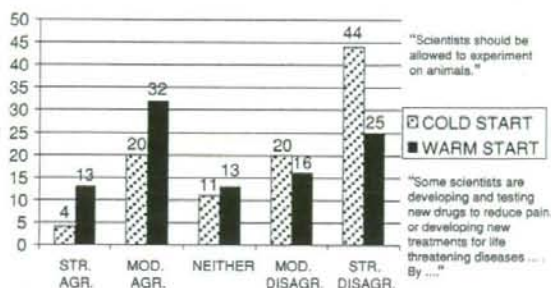


図 1 動物実験への一般人の反応

(New Scientist, 22 May, 1999, pp. 26-31, 1999 年英国での調査結果)

Cold Start: "Scientists should be allowed to experiment on animals." と説明した場合の反応

Warm Start: "Some scientists are developing and testing new drugs to reduce pain or developing new treatments for life-threatening diseases... By..." と説明した場合の反応

STR.AGR.: Strong Agreement

MOD.AGR.: Moderate Agreement, NEITHER: Neither

MOD.DISAGR.: Moderate Disagreement

STR.DISAGR.: Strong Disagreement

適切に対応しなければならない。即ち、薬理学研究における動物実験の意義を社会に示し、科学的に必要なかつ倫理的に妥当な実験を行うことにより、我々の研究への社会の支持を得ることが不可欠である。図 1 に示したように、動物実験の必要性についての説明が十分になされることにより、科学的に必要な動物実験に賛同する者が確実に増加する。

日本薬理学会企画教育委員会では平成 16 年度より谷山絃太郎委員長の基、著者と昭和大学医学部の安原一教授および東京大学農学部の尾崎博教授からなるワーキンググループ (WG) が組織された。WG では、

キーワード：動物実験, 薬理学会動物実験指針

国立医薬品食品衛生研究所 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

e-mail: ohno@nihs.go.jp 原稿受領日: 2006 年 10 月 2 日, 会誌編集委員会依頼原稿

Title: Animal experiments recommended by the Japanese Pharmacological Society (evaluation and decrease of pain): introduction and new guidelines for animal experiments for the Japanese Pharmacological Society. Author: Yasuo Ohno

適宜、企画教育委員会の意見を求めながら、Bologna宣言（表2）で代表されるような動物実験に関する外国の状況や国内外の指針等を参考に、学会の動物実験指針の見直しを進めてきた。

一方、平成17年6月動物実験に関する3Rの原則が「動物の愛護及び管理に関する法律」（動愛法）に組み込まれ、薬理実験においても、研究や教育、生産などに使用される動物を用いる方法を他のものに置き換え、当初の目的を達すること（replacement）、特定の量と質を有するデータを得るために使用する動物を必要最小限にすること、また、同じ数の動物からより多くの情報をうること（reduction）、また、避けられない動物実験にあっては痛みや苦痛、および不快感を最低限にし、動物の福祉を向上させること（refinement）、が法的に義務づけられた（表3）。

更に、文部科学省、厚生労働省、および環境省ではそれぞれ所管する分野を対象に動物実験指針を作成し、平成18年4月-6月に通知した（環境省：「実験動物の飼育および保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年4月28日、環境省告示第88号）」、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（平成18年6月1日、文部科学省告示第71号）」、厚生労働省：「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（平成18年6月1日、厚生労働省通知科発0601002号）」が示された。また、日本学術会議も動物実験に関する詳細指針を作成し、通知した（平成18年6月1日、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」）。日本薬理学会ではこれらを踏まえて、従来の動物実験指針を改訂した。平成18年3月の薬理学会総会では、平成17年12月13日の理

表2 ポロニア宣言

動物実験の削減、純化、および置き換え
代替法および実験動物法

第三回生命科学における代替法と動物使用に関する世界会議
において採択（1999, 8, 31 イタリア, ポロニア）

Russell and Burch の「三つのR」、即ち削減（Reduction）、純化（Refinement）、および置き換え（Replacement）の源は1954年に開始された動物福祉のための大学連合（University Federation of Animal Welfare: UFAW）の活動にある。これが1959年にW.M.S. Russell and R.L. Burch (1) による「人道的な実験技術の原則（The Principles of Humane Experimental Technique）」の公刊につながっている。1978年にDavid Smyth が代替法を三つのRとして定義して使用した (2)。

著書の中で、RussellとBurchは「科学における最も偉大な業績は常に最も人道的であり、かつ最も美的に引きつけるものであり、最も成功した時には科学の要である美しさと優雅さを感じさせるものである」と述べている。彼らは以下のように定義している。

代替法における削減（Reduction Alternatives）とは科学的な手法においてより少ない動物から同等の情報を得るための方法、あるいは同じ数の動物からより多くの情報を得るための方法である。

代替法における純化（Refinement Alternatives）とは痛みや苦痛、および不快感を弱めたり、最少限にし、動物の福祉を向上させるものである。

代替法における置き換え（Replacement Alternatives）とは動物を用いた実験や他の科学的な手段を用いずに当初の目的を達成するものである。

1. Russell WMS & Burch RL (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. p.238. London: Methuen.
2. Smyth D (1978). Alternatives to Animal Experiments. p. 218. London: Scolar Press.

第三回生命科学における代替法と動物使用に関する世界会議の参加者は1959年にRussell & Burchにより提起された原則を承認するとともに再確認するものである。人道的な科学とは普なる科学のための前提であり、かつ実験動物手法に関しては、三つのRを強力に推進し、適用することにより達成されるものである。

三つのRは、全ての種類の科学、経済および人道主義的な便益を得るに際しての統一概念として、挑戦目標として、また、それらを得る機会として役立てるべきである。

表3 改訂「動物の愛護及び管理に関する法律」抜粋

第41条 動物を教育、試験研究又は生物学的製剤の製造の用その他の科学上の利用に供する場合には、科学上の利用の目的を達することができる範囲において、できる限り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。

2 科学上の利用に供する場合には、その利用の必要な限度において、できる限りその動物に苦痛を与えない方法によってしなければならない。

3 動物が科学上の利用に供された後において回復の見込みのない状態に陥っている場合には、その科学上の利用に供した者は、直ちに、できる限り苦痛を与えない方法によってその動物を処分しなければならない。

事会で承認を受けた案をもとに説明したが、今回、各省庁の通知を踏まえて、新指針を作成したので、ここに紹介する。旧指針との対象を表4に示したが、大きなところは以下のとおり。

- 1) 薬理学研究における動物実験の意義を明示した。
- 2) 薬理学研究が社会に受け入れられるためには、科学的・倫理的に適正な動物実験を行う環境を醸成し、実施することが不可欠であることを明示した。
- 3) 「動物が命あるものであることにかんがみ、何人も動物をみだりに殺し、傷つけ、又は苦しめることのないようにするのみでなく、人と動物の共生に配慮しつつ、その習性を考慮して適正に取り扱うようにしなければならない」という動愛法第2条に示された基本原則を明記した。
- 4) 3Rの原則を明示した。
- 5) 日本薬理学会は本指針に反する研究の成果は本会の刊行する学術雑誌から排除することを明示した。
- 6) 動物実験を適切に行うために必要な研究機関の責任者や実験動物の専門家等の役割を明示した。
- 7) 動物実験委員会の役割を明示した。

なお、平成18年3月のシンポジウムではこの動物実験指針改訂案を示すとともに、適切な実験を行うための参考とするために、奈良先端科学技術大学院大学の佐藤公道先生（現：安田女子大学）に苦痛の薬理学と薬理実験法について、秋田大学医学部実験動物施設松田幸久先生に痛み・苦痛・安楽死の評価と基準について、昭和大学医学部第二薬理安原一先生と倉田知光先生に動物実験倫理委員会での審査の状況について、最後に大阪大学医学部動物実験施設黒澤努先生に欧米で一般化してきている動物実験施設の第三者による査察について報告していただいた。

著者プロフィール

大野 泰雄（おおの やすお）

◇東京大学薬学系大学院博士過程修了、
国立医薬品食品衛生研究所副所長、第六
回国際動物実験代替法会議会長。
◇専門：薬物代謝と毒性、動物実験代替
法、◇薬剤師、日本トキシコロジー学会
認定トキシコロジスト。



表4 日本薬理学会動物実験指針新旧比較

	旧指針	新指針
前 文		<p>生命科学の急速な発展と社会に与える影響の著しい拡大により、一般社会にとっても、生命科学がより身近なものになっている。また、研究は多額の公的資金によって支えられており、薬理学を含む生命科学の推進において社会の支持が不可欠の要素となっている。</p> <p>一方、動物を用いた研究は薬理学の発展に大きな役割を果たして来たとし、今後もその意義が失われることはないと考えられる。しかし、動物実験については、社会に様々な考え方が存在することも事実である。薬理学研究が社会に受け入れられるためには、科学的・倫理的に適正な動物実験を行う環境を醸成し、実施することが不可欠である。</p> <p>そこで、日本薬理学会では「動物実験ガイドラインの策定に関する勧告」（昭和55年11月5日総学庶第1513号日本学術会議会長）および「大学等における動物実験について（通知）」（昭和62年5月25日学情第141号文部省学術国際局長）に定められている事項のほか、日本薬理学会員（以下、会員という）が動物実験を計画、実施する際に、遵守すべき基本的事項を定め、平成4年と13年に「動物実験に関する日本薬理学会指針」を学会員に通知し、科学的・倫理的観点から適正な実験動物の飼養と動物実験の実施に努めてきた。一方、動物福祉への社会の関心が更に高まり、平成17年6月15日に「動物の愛護及び管理に関する法律（動愛法）」が改正され、動物実験に関する3Rの原則*の尊重が盛り込まれた。また、平成18年4月28日に「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（環境省告示第88号）」が、平成18年6月1日に「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省告示第71号）」、「厚生労働省の所管する動物実験等の実施に関する基本指針（厚生労働省通知 科発0601002号）」、並びに日本学術会議から「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」が示されたことなど、わが国内外の動向も鑑み、指針を刷新することとした。</p> <p>日本薬理学会は本指針に従った動物実験が行われることを期待するとともに、これに反する研究の成果は本会の刊行する学術雑誌から排除する所存である。</p> <p>なお、遺伝子組換え動物に関しては、自然界への拡散を防止するため、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号）」ならびに「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律施行規則（平成15年財務・文部科学・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省令第1号）」が定められているが、これらの規制に関わる事項は対象外とした。</p> <p>*：十分な倫理的配慮を行った上、科学上の利用の目的を達する事が出来る範囲において、動物に与える苦痛を最小限にし（refinement）、動物使用数を削減し（reduction）、また、動物を用いない代替法がある場合にはそれを利用すること（replacement）。</p>

	旧 指 針	新 指 針
目 的	動物実験に関する日本薬理学会指針(以下、指針という)は、日本薬理学会員(以下、会員という)が動物実験を計画、実施する際に、「動物実験ガイドラインの策定に関する通告」(昭和55年11月5日 総学庶第1513号日本学術会議会長)および「大学等における動物実験について(通知)」(昭和62年5月25日 文学情第141号文部省学術国際局長)に定められている事項のほか、遵守すべき基本的事項を定め、科学的、倫理的観点から適正な実験動物の飼養と動物実験を実施することを目的とする。	この指針は、大学およびその他の研究機関において行われる薬理学研究のための動物実験を計画し、実施する際に遵守すべき事項を示すことにより、科学的にはもとより、動物福祉の観点からも適正な動物実験の実施を促すことを目的とする。
適用範囲	この指針は、会員によって行なわれる実験動物を用いるすべての動物実験に適用されるものとする。	この指針は、会員によって行なわれる実験動物*を用いるすべての動物実験に適用されるものとする。 *：考慮の対象とする実験動物の範囲は基本的に生命を有する脊椎動物とその胚であるが、無脊椎動物が含まれることもある。また、これら以外も本指針を参考にする。
基本原則		会員は「動物が命あるものであることにかんがみ、何人も動物をみだりに殺し、傷つけ、又は苦しめることのないようにするのみでなく、人と動物の共生に配慮しつつ、その習性を考慮して適正に取り扱うようにしなければならない」という動物愛法第2条に示された基本原則を深く胸に刻み、ここに定められた事項を遵守するよう努めるとともに、動物実験に対する社会の動向や規制の移り変わりに留意し、常に適切な動物実験を実施するよう努めなくてはならない。 会員はヘルシンキ宣言のヒトを対象とする医学研究の倫理的原則(2002年追加)第12項に示された「研究に使用される動物の健康を維持し、または生育を助けるためにも配慮」や動物愛法に示された動物実験に関する3Rの原則を尊重しなくてはならない。 薬理学研究を行う研究機関の責任者は、動物が適正に飼養され、適正な動物実験が行われるよう、施設を整備するとともに、研究機関毎の動物実験指針を策定し、研究者を教育しなければならない。また、動物実験委員会を設置し、研究機関内で行われる動物実験の法令や機関の定めた指針への適合性や科学的・倫理的妥当性を審査させるとともに、動物実験の実施結果の報告を受け、必要に応じて適正な動物実験実施のための改善措置をとらなければならない。 本指針の目的を達成することは、会員のみでの努力では困難である。研究機関の責任者や実験動物の専門家等の協力を得るよう努めなければならない。
実験者		動物実験を行おうとする研究者は動物実験を行うに際しての法令や規制・基準、倫理、麻酔法、鎮痛法、動物実験代替法についての教育、また、動物実験手技について訓練を受けていなければならない。
動物実験委員会		会員の属する研究機関においては、平成18年6月1日に示された文部科学省および厚生労働省の動物実験の実施に関する基本指針により、動物実験委員会を設置しなければならない。この委員会は動物実験が関係法令や機関の定めた指針に従い、科学的かつ倫理的に実施されるために動物実験計画を審査し、必要な助言を与え、また、適正な実施の監視を行う組織である。委員会は倫理的かつ科学的に妥当な動物実験を行う上で必要な知識と経験を有する実験動物の専門家、動物実験に関して優れた識見を有する者、その他必要と思われる者によって構成しなければならない。
動物実験場所	動物実験は、適正に整備、管理された施設において、必要な設備のもとで行なわなければならない。	動物実験は、動物実験委員会が承認した、適正に整備、管理された施設において、必要な設備のもとで行なわなければならない。
実験動物飼育と管理	実験動物の取り扱いにあたっては、実験動物の生理、生態、習性ならびに飼育、管理方法に関する知識を十分にもたなければならない。	実験動物の入荷の際の検疫とその後の飼養については、そのための専門的な知識を有する動物管理責任者の協力を得て、適切な実験動物を確保すべきである。 動物実験の際の実験動物の取り扱いにあたっては、実験者自身も実験動物の生理、生態、習性ならびに飼育、管理方法に関する知識をもたなければならないが、それらの知識を十分にもつ専門家の助言を得ることも重要である。疾患モデル動物の作成や使用の場合においても同様である。

	旧指針	新指針
実験計画の立案	動物実験計画の立案にあたっては、その研究目的の達成に必要な最小限の実験にとどめ、適正な動物の選択および実験方法についての十分な配慮が必要である。また、適切な飼育環境（ケージの大きさ、収容動物数、温湿度、照明など）のもとに実験が実施できるような実験計画を立案しなければならない。	動物実験計画の立案にあたっては、動物を用いないで、その研究目的を達成できる代替法の有無を考慮しなければならない。動物を用いる場合は、適正な動物種や系統を選択し、使用動物数と動物に与える苦痛を必要最小限にとどめるよう、実験方法についての十分な配慮が必要である。また、適切な飼育環境（ケージの大きさ、収容動物数、温湿度、照明など）のもとに実験が実施できるような実験計画を立案しなければならない。 なお、実験計画は研究機関内の動物実験委員会による審査と承認を受けなければならない。
実験実施上の配慮	実験実施にあたっては、動物福祉の立場から、動物の不安や苦痛を、極力軽減するように努めなければならない。	動物実験は動物実験に熟達した者により、あるいはその指導のもとに行うべきである。また、動愛法および関連する規制・基準を遵守し、動物福祉の立場から、動物の不安や苦痛を、極力軽減するように努めなければならない。この際、国立大学法人動物実験施設協議会、NIHあるいはOECDの作成した安全性試験における人道的な指標に関するガイドラインが良い参考となる。 実験終了後の動物の取り扱いについては、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」（昭和55年3月27日総理府告示第6号 平成14年5月28日一部改正）に従い、動物をすみやかに苦痛から解放するように努めなければならない。実験途中であっても、研究目的達成上不適切な強い苦痛が現れた場合には、動物をすみやかに苦痛から解放するように努めなければならない。 安楽死の方法については、国立大学法人動物実験施設協議会（2004）や日本獣医師会の解説（2000）を参照されたい。 動物実験および本指針遵守に関わる記録は適切に保管されなければならない。
実験終了後の処置	実験終了後の動物の取り扱いについては、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」（昭和55年3月27日総理府告示第6号）に従い、動物をすみやかに苦痛から解放するように努めなければならない。	
安全管理上の配慮	物理的、化学的に注意を要する試料、または病原体を用いた動物実験を実施する場合には、施設管理者と協力し、一般留意事項、関係規則等を遵守して、安全の確保および環境汚染の防止のため十分な処置を講じなければならない。	物理的、化学的に注意を要する試料、または病原体を用いた動物実験を実施する場合には、施設管理者と協力し、一般留意事項、関係規則等を遵守して、安全の確保および環境汚染の防止のため十分な処置を講じなければならない。
その他	この指針に示されていない必要事項については、会員の所属する各研究機関における動物実験に関する諸規定、および「大学等における動物実験について（通知）」（昭和62年5月25日文学情第141号 文部省学術国際局長）を遵守するものとする。	この指針に示されていない必要事項については、会員の所属する研究機関における動物実験に関する諸規定、および「大学等における動物実験について（通知）」（昭和62年5月25日文学情第141号 文部省学術国際局長）を遵守するものとする。 日本学術会議第7部は2004年に「動物実験・施設の第三者評価機構の設置について」の提言を行っており、動物の飼育や管理、また、動物実験が適正に行われていることについて、第三者による認証を得ることも考慮しておく必要がある。 なお、動愛法の改正に伴い、文部科学省において動物実験指針の検討が始まった。それが完成した場合においては、必要に応じて本指針も改正しなければならない。
引用文献		国立大学法人動物実験施設協議会：動物実験処置の苦痛分類に関する解説、平成16年6月4日（ http://www.med.akita-u.ac.jp/~doubutu/kokudou/rinri/pain.pdf ） NIH：Guide for the Care and Use of Laboratory Animals（ http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/ ） OECD：Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19（2000.11）。 日本実験動物環境研究会：「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」についての日本実験動物環境研究会改正案、実験動物と環境 Vol.12（1）、71-74、2004。 鈴木真、黒澤努：日本獣医師会雑誌、一解説・報告—米獣医師会：安楽死に関する研究報告 Vol.58（5）301-304、（6）357-359、（7）443-446、（8）521-524、（9）581-583、（10）649-651、（11）719-721、2000。

動物福祉と動物実験代替法への考慮の必要性について



大野 泰雄

国立医薬品食品衛生研究所 副所長

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

社会へ向けて 実験の意義を示さなければならない

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

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

これからの取り組みに向けて

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

表1 第77回日本薬理学会で用いられた試験系*

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

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

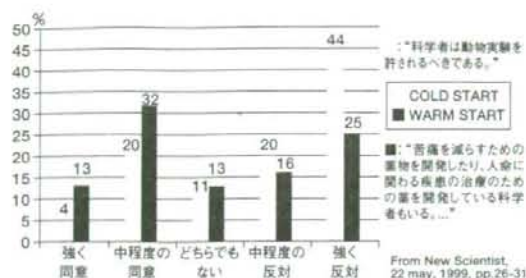


図1 動物実験への反応

表2 動物実験倫理に関する薬学系大学の教育内容

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

*「苦痛を減らすための薬物を開発したり、人命に関わる疾患の治療のための薬を開発している科学者もいる。」
From New Scientist, 22 May, 1999, pp.26-31

文部科学省等の指針から教えることが望ましいと思われるもの。

平成19年2-3月にアンケート調査した結果の集計(回答数29、回答施設数24)。

表3 第6回国際動物実験代替法会議での特別講演等

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

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

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

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

表4 第6回国際動物実験代替法会議でのシンポジウムテーマ

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

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

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

動物実験代替法の国際動向

大野 泰雄

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

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

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

1. はじめに

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

欧米ではこのような認識は古くからあり、

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



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

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

1954年にはRusselとBurchにより動物実験代替法(代替法)についての3Rsの原則が提案された¹⁾。また、イギリスでは医学分野における実験動物を他のものに置き換えるための基金(FRAME)が1969年に、米国では1981年にジョンズホプキンス大学に代替法センターが開設され代替法の開発や評価が行われてきた。新たに開発された動物実験代替法を科学的に評価し、可能なものについては取り入れていこうという考えの下、EUは代替法開発の拠点とし、代替法についてのデータベースを設置・維持するため、また、行政、産業、生物・医学分野の科学者、消費者、および動物愛護運動グループの対話を促進することを目的に1991年に代替法バリデーションセンター(European Center for the Validation of Alternative Methods: ECVAM)を設立した。米国は毒性試験法の開発、バリデーション、受け入

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

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

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

本稿では代替法の受け入れ状況と、それを巡る最近の国際情勢について述べる。

2. 動物実験代替法を巡る最近の国際状況

2-1. OECDの状況

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

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

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

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

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

括弧の中はそれぞれの機関で承認された年を示した。

EDQM: European Directorate of the Quality of Medicines & HealthCare

2-2. EUにおける状況

2-2-1. EUにおける化粧品の安全性評価と代替法の受け入れ状況

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

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

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

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