

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・倫理的・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

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

Number of answers	29			
Number of Institutes	24			
1) Type of Institutes	Yes	Number of answers	%	
State university	9	24	37.50	
with Medical School	9	24	100.00	
with veterinary School	2	24	58.33	
Private University	3	24	20.00	
with Medical School	0	24	0.00	
with veterinary School	7	24	29.17	
Pharmaceutical College	20	29	68.97	
2) Position in the Pharmaceutical School	Yes	Number of answers	%	
students	0	29	0.00	
Research assistant	2	29	6.90	
Associate professor	7	29	24.14	
Professor	20	29	68.97	
3) Does your school conduct animal experiments?	Yes	Number of answers	%	
	20	29	100.0	
4) Approximate number of animals used in a year	Sum	Number of answers	Mean	
Mouse	119035	17	7049	
Rat	39610	18	2201	
Hamster	72	12	6.0	
Rabbit	424	14	30.3	
Dog	20	13	1.3	
Monkey	0	13	0.0	
Others	810	10	81.0	
5) Do you conduct animal experiment?	Yes	Number of answers	%	
Did you conduct animal experiment recently?	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	%	
10) Do you have the guideline?	22	28	82.1	
11) 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	26	92.3	
15) Is there Animal Experiment Committee in your institute?	Yes	Number of answers	%	
	29	29	100.0	
If there is,	Sum	Number of answers	Members/Committee	
16) Number of committee members	289	27	9.59	
members from own institute	216	28	8.31	
17) Numbers?	Sum	Number of answers	人数当たりの人数	
General public	20	16	1.25	
Veterinarian	1	12	0.42	
Expert of animal care*	10	14	0.71	
Expert of animal experiment*	117	21	5.57	
Expert of alternatives*	3	10	0.30	
Others	71	18	3.94	
*: Other than veterinarian				
18) How often do the committee meeting held?	Sum	Number of answers	平均	
Number of times in a year	60.5	23	2.63	
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	19	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 practitioner	28	28	100.0	
Animal species	28	28	100.0	
Animal number	26	28	92.9	
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	92.89	
If education is conducted,				
22) To whom and how many hours do you educate?	Total hours	Number of answers	average (h)	target of education (%)**2
Students	60	24	2.50	92.3
Post graduate students	41.5	22	1.89	84.6
Research staffs	27.5	17	1.62	65.4
Others	2.5	2	1.25	7.7
23) Curriculum?	Yes	Number of answers	%*3	
Animal protection law	21	24	80.8	
Physiology of experimental animals	17	24	66.4	
Methods of animal care	22	24	84.6	
3Rs principles	18	23	69.2	
Evaluation of pain	18	23	69.2	
Methods to decrease pain	19	23	73.1	
Method of euthanasia	21	23	80.8	
Alternative methods	15	22	57.7	
Others	11	17	64.3	
24) Have your institute received inspection on animal experiments by third party.	Yes	Number of answers	%	
	3	28	0.11	
If you have,				
25) By whom the inspection was conducted?	Yes	Number of answers	%*4	
Staff	3	3	0.87	
Outsiders	2	2	0.87	

*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回だけの施設が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.

J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.
総 説
40(4) 263 - 268 (2006)

動物実験代替に関する最近の動向*

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**

動物実験における3Rs(削減, 苦痛の軽減, 置換)の推進のため, EUおよび米国は, 1990年代初頭, それぞれ代替法のバリデーションおよび評価を進めるため, European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) や Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) を設立した。これらの機関は, 試験法の行政的な受入れを目的に, 代替法の信頼性および適性をバリデーションや評価により確認することを目的としている。日本でも2005年に国立医薬品食品衛生研究所内に Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) が設立された。しかし, JaCVAM だけでことをなすには資金や人員もなく, 日本動物実験代替法学会や日本化粧品工業連合会などの団体の援助が必要である。JaCVAM が多くの支援のもとで, 日本における化粧品の安全性評価のための代替法研究のまとめ役として機能する日も近いと考えている。

1. 代替法とは

昨年11月, 国立医薬品食品衛生研究所(National Institute of Health Sciences: NIHS) 安全性生物試験研究センター, 薬理部内に新規試験法評価室という部署が設立された。この部署の英語名は(Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)である。通称をJaCVAMという。日本語と英語を比較された方から, 合っていないという意見をよく頂く。確かに英語を直訳したら, 日本代替法バリデーションセンターとでもなるのか。名前から受ける印象は, 組織構成も扱う範囲も別のように感じられるかもしれないが, Validation of Alternative Methods が主な仕事である。Alternative という言葉は英和中辞典(研究社)によると代わりのという意味なので, replacement という言葉の置き換えと同義語と勘違いされている方は多く, 英語名では動物実験を置き換えるための方

法, すなわち *in vitro* 試験による replacement を目的とする部署でしょうかと誤解される。しかし, OECD ガイドライン GD 34¹⁾によると, Alternative test とは以下のように定義されている。

Alternative test: A test that: reduces the numbers of animals required; refines procedures to lessen or eliminate pain or distress to animals, or enhance animal well-being; or uses non-sentient material in replacement for conscious living vertebrates

つまり, JaCVAM の主な使命は, 3Rs(Reduction, Refinement, Replacement) を強く意識し, *in vitro* 試験法の確立以外にも動物実験を削減したり, 苦痛やストレスを削減したり, 動物愛護の促進に関与するすべての試験, ガイドラインに関与したものでなければならぬと考えている。よって, 3Rsに関係した内容すべてに関与していくという姿勢がJaCVAMの仕事と考えている。

その考えでいけば, 化粧品の安全性に関する代替法の確立はその一部分でしかない。本年6月から施行された動物の愛護および管理に関する法律

* 2006. 7. 19 受理

** 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

の一部改正²⁾を、関与するすべての動物実験を対象として浸透させていく立場にもある。REACH (化学物質の登録, 評価, および認可のシステム) に代表される化学物質の安全性評価³⁾, 日米EU医薬品規制調和国際会議 ICH (International Conference of Harmonization)⁴⁾でも、動物福祉の面から考慮がなされている。これらの情報の供給を書籍やホームページで発信せねばならない。場合によっては動物実験を削減する代わりにヒトの臨床試験方法を整備するなども範疇に含まれるかもしれない。その守備範囲は大変広いと考えている。

動物実験を巡る世界の動向や新試験法の成立までの知識がなく、ここまで、読んでいただけた方には敬意を表したい。時計の軸を戻しながら、JaCVAM 設立の経緯からまず説明していきたい。

2. JaCVAM 設立の経緯と活動

動物実験代替法のブーム発端は、1980年代に化粧品品の誤使用を想定した眼刺激性試験 (ドレイズ試験) での化粧品の安全性評価において、ウサギの眼の使用が「残酷」というイメージが先行し、愛護団体が運動を強めたことによる。この盛り上がりを受け、欧米を中心にこの試験の代替法開発が進み、多くの論文が発表された。代替可能と読み取れるこれらの論文から、代替法が確立されたと錯覚させるような時代であった。しかし、実際は再現性に乏しかったり、被験物質が偏っていたりで思ったような良い試験法は少なかった。この反省から、施設内および施設間評価による信頼性、

再現性を重視した試験法のバリデーション、評価という検証システムが定着してきた^{5), 6)}。このシステムを Fig. -1 に示す⁶⁾。ある著名な毒性学者が新試験法を開発され、特許を取られたとしても、その試験法がそのまま普及して申請資料などに使える、企業化可能なものになる訳ではない。安全性確保のための行政的な受入れには、複数施設の協力により、ブラインド化したある程度の被験物質を用いたバリデーションが必要であり、さらにその後、その分野の専門家による評価を経て、行政的な受入れが決まる。このバリデーション、評価を専門に行う機関として、1990年初頭に欧州では ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)、米国では ICCVAM (Inter-agency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) が設立された。

欧米では動物愛護団体の力が強く、数も多い。その力は政治をも動かすこともあり、その結果 ECVAM や ICCVAM が設立されたと考えてもよい。また、特に化粧品のような嗜好性の高い商品の開発に動物実験を用いることへの風当たりは強く、2003年に採択された EU directive 7次改正において、2004年から EU 域内における最終製品の動物実験禁止が適用され、2009年をもって、最終製品および化粧品成分に対する動物実験禁止、および販売の禁止が適用される⁷⁾。ただし、代替法の開発と歩調をそろえなければならず、反復投与毒性、生殖毒性試験、トキシコキネクスなどの試験は 2013年が最終期限である。これに合わせるように、欧米の化粧品会社は試験法の開発のため共同研究を行ったり、国際会議や公的な機関に多くの資金を投入している現状である。もちろん、国際化が進む昨今、日本のメーカーも例外ではなく、歩調を合わせる必要が生じている。

このような状況の中、日本でも遅まきながら、バリデーションや評価の統括を専門に行う機関であり、かつ欧米の専門機関への窓口として昨年 JaCVAM が設立され、Fig. -2⁸⁾に示すように代替法評価のための3機関が確立された。お断りしておくが、この10年間まったくのブランクが日本にあった訳ではない。



Fig. -1 Test method validation process.⁶⁾

日本には3Rs(Reduction, Refinement および Replacement)の中でも、代替法(Replacement)に関わる研究、開発、教育、調査等を推進し、その成果の普及を行うことを目的としている日本動物実験代替法学会がある。これは設立当初からバリデーション研究に重きを置いてきた学術団体である。文部科学省の支援を受けながら、最初に取り組んだバリデーションが細胞毒性試験を用いた眼刺激性試験代替法の検討である⁹⁾。以降、厚生労働省の支援を受けた眼刺激性試験¹⁰⁾、皮膚刺激性試験¹¹⁾、皮膚腐食性試験を実施し、光毒性試験(酵母-赤血球溶血試験バッテリー評価)、皮膚感作性試験代替法 Local Lymph Node Assay (LLNA) の

非RI法である代替法、同じく皮膚感作性試験代替法であるリンパ球細胞株の表面抗原の変化を測定するh-CLATのバリデーションを、現在もTable-1に示すように継続中である。評価においても、Balb/3T3細胞を用いる光毒性試験を検討し¹²⁾、皮膚腐食性試験、光毒性試験(酵母-赤血球溶血試験バッテリー評価)をTable-1に示すように継続している。これらの成果は英語論文になっているものが少なく、欧米の評価は高くはないがその土壌はできていると考えている。

また、日本からも多くの研究者が眼刺激性、トランスフォーメーション、急性毒性、h-CLATなどの分野でECVAMやThe European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association (COLIPA)のバリデーション研究にも協力してきた。ICCVAMの専門家による評価にも、多くの専門家がLLNA、腐食性、急性毒性、眼刺激性で協力しており、これまでも存在感を示してきた。

3. 今後の展開

今後、JaCVAMがバリデーションや評価の中心にあり、欧米との交流の窓口を担っていくことになろう。ただし、今後すべてを任せてくださいという訳ではない。JaCVAMは厚生労働省の一試験所の一部署に過ぎない。代替法の化粧品依存体質から、一般化学物質や医薬品に守備範囲を広げねばならないわりに、正規職員も1名しかいない程小さく、予算も少ない。さらに、一番大事な

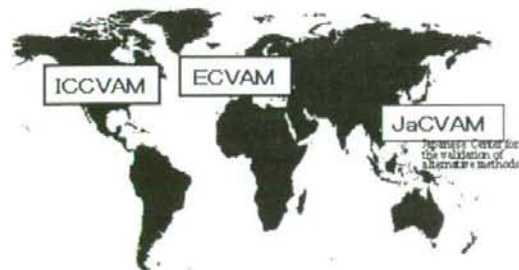


Fig.-2 Organization for the International validation.¹³⁾

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.
ECVAM: European Center for the Validation of Alternative Methods. JaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods.

Table-1 Testing methods supported by JaCVAM.

試験法	試験名	状況
光毒性試験	酵母-赤血球	一次評価終了、追加バリデーション計画
皮膚感作性試験	LLNA-DA	バリデーション中
	LLNA-BrdU	バリデーション中
	h-CLAT	プレバリデーション中
皮膚腐食性試験	培養皮膚モデル	専門家による評価中
皮膚刺激性試験	培養皮膚モデル	評価計画
内分泌かく乱物質スクリーニング	Lumi-cell, HeLa-エストロゲンレポーター遺伝子アッセイ	バリデーション計画
変異原性試験	コメットアッセイ	バリデーション計画

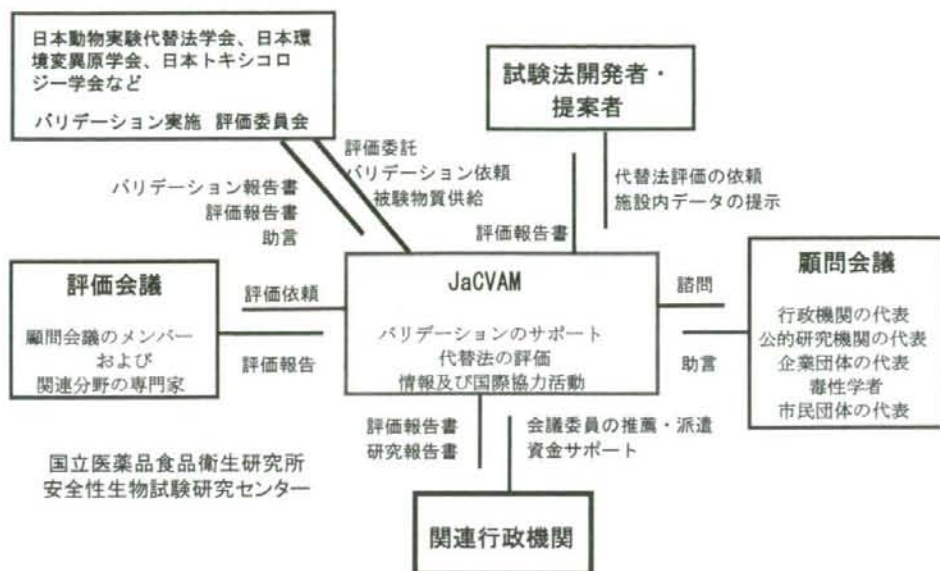


Fig.-3 Operating organization of JaCVAM.

点は、バリデーションや評価というものは多くの研究者の協力があって初めて可能となることである。しかも餅は餅屋というように、専門家の協力が必須である。国際協調というが、このような協力が円滑に進まねば、誰がファーストにある英語力の乏しい国に仕事を依頼などするものか。これらの協力者にいかに資金、人的パワーを供給していくかが重要である。JaCVAMの活動とは、時代のニーズを読み、研究者の声に応え、資金の確保に務めることである。よって、Fig.-3および4⁴⁾に示すように、JaCVAMは組織の中心にいて、試験法開発者、バリデーション協力者や専門家、関連行政機関の橋渡しとなり、少しでも流れを円滑にし、試験法の行政的な受入れへの貢献性を高めることである。そのために、Fig.-4に示すような、NIHS内に支援組織を設立頂き、安全性生物試験研究センターの各部門と密接な関係を構築しつつある。

ともかく、昨年末から船出したJaCVAMは、まだ組織、規約に思考錯誤の部分もあり、日本動物実験代替法学会だけでなく、幅広い学会との交流や業界団体との意見交換も済んでいないにもか

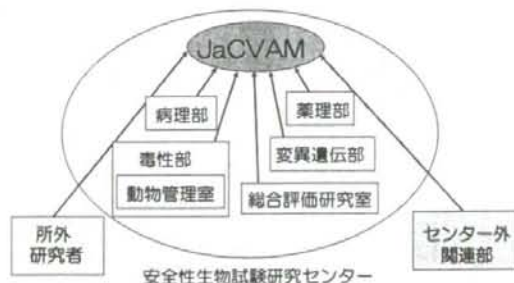


Fig.-4 Supporting organization of JaCVAM in NIHS.

かわらず、Table-1に示すようなJaCVAM設立前からのバリデーションや評価の課題とこれからのテーマをこなし、確実に成果を出していかなければならない状況である。

特に、本年から始まった国際的なバリデーションは重要な問題である。JaCVAMで評価した試験法の行政的な受入れの確証がない現在、国際的に評価されること、加えてOECDガイドラインへの受入れがもっとも確実で、かつ世界的な評価が得られやすいからである。現在、二つの国際バリデーションや評価を予定している。

一つのテーマが、内分泌かく乱物質スクリーニングの *in vitro* における国際的な評価であり、ECVAM, ICCVAM および JaCVAM 3 局の国際的なバリデーションである。米国が提案している Lumi-Cell アッセイはバリデーションが年内には開始される予定であり、すでにプロトコルも作成されている。日本で開発された方法であり、プレバリデーションが終了した遺伝子導入 HeLa 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ試験とともに、バリデーションが実施される。これら試験法の OECD ガイドラインへの掲載を目指していきたいと考えている。

もう一つのテーマが、*in vivo* および *in vitro* コメットアッセイである。本試験法は変異原性試験の一方法として DNA 損傷の検出に有用で、臓器特異性を検出できる。まだ国際的に統一された方法がないにもかかわらず、行政がデータ提出を求めることもある試験法である。主に reduction を目的とした本試験法の国際バリデーションを JaCVAM の主催、日本環境変異原学会 哺乳類変異原性試験 (MMS) 研究会の協賛で行うべく準備を進めている。来年には 3 局の国際的なバリデーション試験を開始する予定である。

これらの仕事を成し遂げるためには、皆様の協力が必須である。ECVAM および ICCVAM との差を、質量ともに、少しでも埋めていき、名実ともに 3 極の国際協調体制を早期に確立したいと考えている。どうか新規試験法を作られた場合やバリデーションの公募、評価の協力要請があった場合には、積極的なご支援、ご協力をお願いしたい。

引用文献

- 1) OECD Series on Testing and Assessment. No.34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, 2005
- 2) 環境省告示第 88 号, 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, 2006
- 3) http://www.ne.jp/asahi/kagaku/pico/eu/reach_seminar/2005/REACH_QA_050917.pdf
- 4) 大野泰雄, フレグランスジャーナル, 33 (2), 30-35 (2005)
- 5) OECD, Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Methods, ENV/MC/CHEM/TG 96 (9), Paris, France
- 6) NIH Publication No. 03-4508, ICCVAM Guidelines for the Nomination and Submission of New, Revised and Alternative Test Methods.
- 7) 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 82004, 1210, 2004
- 8) Y. Ohno, Altern. Animal Test. Experiment, 11 (1), 1-3 (2005)
- 9) T. Ohno, et al., Altern. Animal Test. Experiment, 5, 1-38 (1998)
- 10) Y. Ohno, et al., Toxicol. *in Vitro*, 13, 73-98 (1999)
- 11) I. Sonoda, et al., Altern. Animal Test. Experiment, 8 (3-4), 91-106 (2002)
- 12) 日本動物実験代替法学会 代替法専門委員会, Altern. Animal Test. Experiment, 10 (2), 50-157 (2004)

Trend on Alternative to Animal Testing*

Hajime Kojima

Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), Division of Pharmacology,
Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences**

For the promotion of 3R's (Reduction, Refinement, Replacement) principles of animal tests, the EU and US established the European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) and the Interagency Co-

ordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), respectively. The purpose of these centers is to detect reliability and relevance of alternative methods, which should be determined by intra- and inter-laboratory validation and peer review for their regulatory acceptance. A similar institute was established in Japan, the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) in the National Institute of Health Sciences (NIHS). However, there are not enough resources in Japan. It is necessary to cooperate with a Japanese science society like the Japanese Society of Alternatives to Animal Experiments (JSAAE) and a Japanese industry group like the Japanese Cosmetic Industry Association (JCIA). We are expecting JaCVAM to contribute to the validation and peer review of new alternative methods with supporters and international cooperation for the evaluation of the safety of cosmetic ingredients and products.

Key words : 3Rs, validation, alternative, peer review, regulatory acceptance, Japanese Society of Alternatives to Animal Experiments (JSAAE), European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Inter-agency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), Japanese Cosmetic Industry Association (JCIA), National Institute of Health Sciences (NIHS)

JaCVAM の設立と使命

小 島 肇 夫

2005年11月、国立医薬品食品衛生研究所内にJapanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) が設立された。JaCVAMの使命は、動物実験の3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) の推進、すなわち動物実験の削減、苦痛やストレスの軽減、*in vitro*試験法の確立という置き換えを推進しながら、新規の安全性試験の行政的受入を目指すことである。この使命達成のため、試験法の信頼性と適応性を確認する施設内、施設間バリデーションおよび専門家による第三者評価を実施している。

しかし、JaCVAMだけでことをなす、資金や人員もなく、日本動物実験代替法学会や日本化粧品工業連合会、日本皮膚産業協会などの学会・業界団体の援助が必要である。

JaCVAMが多くの支援者を得ながら、日本における安全性評価のための代替法研究および国際協調の中心機関として機能する日も近いと考えている。

Key words: 3Rs, Validation, Alternative, Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), National Institute of Health Sciences (NIHS)

1. 動物福祉の国際状況

動物実験に対する考え方が世界各国で異なることもあり、法令や管理方法は、日米欧の範囲内だけでも大きく異なる¹⁾。もっとも、愛護精神の強いEU (European Union) で

は各国で法令が整備されており、法規制によって動物実験が管理されている。米国では法令化はされていないが、動物福祉規則に基づき、第三者機関が検証を行っており、自主管理が基本である。日本では、2006年



Hajime KOJIMA, Ph.D.

1960年4月生まれ
1983年3月 岐阜大学農学部農芸化学科卒業
同年4月 日本メナード化粧品株式会社
1984～1986年 国立遺伝学研究所・形質遺伝部留学
1996年 長崎大学薬学部にて博士号取得
2005年 日本メナード化粧品株式会社
2005年～ 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 (JaCVAM) 室長

現在に至る

藤田保健衛生大学医学部皮膚科 客員講師

専門：毒性学、変異原性、組織培養、バリデーション
対外活動：

- ・日本動物実験代替法学会 評議員・理事・庶務・総務
- ・日本トキシコロジー学会 編集委員
- ・日本接触皮膚炎学会 評議員・共同研究委員
- ・ICCVAM Peer Review Panel "Corrositex" member (2001)

・JICA 中国における毒性試験技術指導 (2004、2005)

賞罰：

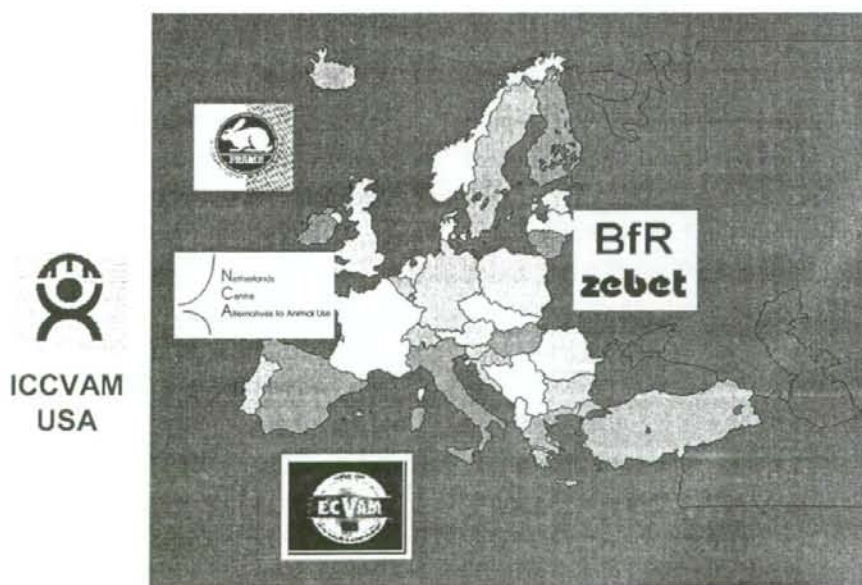
- ・日本動物実験代替法学会第6回大会ゴールドアンブレゼンテーション賞受賞
- ・日本動物実験代替法学会 1998年・2000年・2003年論文賞受賞

6月から施行された動物の愛護及び管理に関する法律の一部改正²⁾により、実験動物に対しても3Rs (Reduction、RefinementおよびReplacement) が義務事項となった。さらに、環境省は「実験動物の飼養及び保管に関する基準」を改正し、文部科学省および厚生労働省は、研究機関における動物実験等に関する基本指針を通知した。また、日本学術会議は、機関内規定策定の参考となるガイドラインの作成を進めるなど、急激な変化が進んでいるが、その基本は自主管理である。ただし、この自主管理も第三者機関による検証システムが確立されている訳でもなく、米国に比べて弱い。

一方、動物実験のAlternative test：代替法という用語が汎用されつつあるが、これは3RsをうたったRussell&Barth³⁾の動物福祉の精神を実現するものである。それを実現するため、1969年英国にFRAME (The Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments) が、1981年米国ジョンズホプキンス大学にCAAT (Center for

Alternatives to Animal Teesting) が設立された。さらに、バリデーション、専門家による第三者評価を行う機関として、1990年初頭に欧州ではECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)、米国ではICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) が設立された。ECVAMは代替法バリデーションの調整やデータベースの構築・維持を行うEUの専門機関である。ICCVAMはNICEATM (NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) という代替法専門機関を含むNIEHS (National Institute of Environmental Health Science) などの15の行政機関および研究機関からなる組織である。

これらのセンターの目的は、動物実験の3Rsに関与した代替試験法の確立である⁴⁾。これ以外にも欧州各国には国立の代替法センターがある。英国にはNC3Rs (National Center for the Replacement, Refinement and



第1図 動物実験代替のための国際機関



第2図 試験法バリデーションのプロセス

Reduction of Animal in Research)、ドイツにはBfR/ZEBET (Federal Institute for Risk Assessment/Centre for the Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments)、オランダにはNCA (Netherlands Centre for Alternatives to Animal Use)があり、それぞれECVAMに渡る前の国内における試験法の開発、プレバリデーションを担当している(第1図)。

これらセンターの活躍もあり、昨年、経済協力開発機構: OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) GD34「Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment」が発行され、新規試験法確立のために、施設内および施設間評価による信頼性、適応性を重視した試験法のバリデーション、専門家による第三者評価という検証システムが定着してきた⁵⁶⁾。このシステムを第2図に示す⁷⁾。ある著名な毒性学者が新試験法を開発され、仮に特許を取られたとしても、その試験法が普及して行政への申請資料などに使える、企業化可能という訳ではない。安全性確保のための行政的な受入には、複数施設の協力により、ブラインド化したあ

る程度の被験物質を用いたバリデーションが必要であり、さらにその後、専門家による第三者評価を経て、行政的な受入が決まる。この手順が、新規試験法確立のための標準的な国際ルールとなりつつある。

昨今のEUにおけるECVAMの大きな課題は、化粧品における動物実験禁止問題およびREACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) 化学物質の登録、評価、および、認可のシステム)に代表される化学物質の安全性評価である⁸⁾。化粧品における動物実験禁止問題では、2003年に採択されたEU directive 7次改正において、2004年からEU域内における最終製品の動物実験禁止が適用され、2009年を持って、最終製品および化粧品成分に対する動物実験禁止、および販売の禁止が適用される⁹⁾。もちろん、代替法の開発と歩調をそろえなければならず、反復投与毒性、生殖毒性試験、トキシコキネクスなどの試験は2013年が最終期限である。これに合わせるように、欧米の化粧品会社は試験法の開発のため共同研究を行い、国際会議や公的な機関に多くの資金を投入している現状である¹⁰⁾。REACHでは、2009年からの既存化学物質の安全性評価の見直しの際に、極力動物実験を用いなくて済むようにQASR (Quantitative Structure-Activity Relationships: 構造活性相関) や*in vitro*試験の開発、バリデーション、専門家による第三者評価が盛んに行われている。

2. JaCVAMの設立

これらの国際状況に対応するため、2005年11月、国立医薬品食品衛生研究所 (National Institute of Health Sciences: NIHS) 安全性生物試験研究センター、薬理部内に新規試験法評価室という部署が設立された(設立者: 大野泰雄、現副所長)。この部署の英語名は (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) である。通称を

JaCVAMという。日本語と英語を比較された方から、合っていないという意見をよく頂く。確かに英語を直訳したら、日本動物実験代替法バリデーションセンターとでもなる。名前から受ける印象は、組織構成も扱う範囲も別のように感じられるかもしれないが、Validation of Alternative Methodsが主な仕事である。仕事を具体的に述べると、以下のものが挙げられる。

- 1) *in vitro* 毒性試験の開発
- 2) 新規試験法のバリデーション
- 3) 新規試験法の専門家による第三者評価
- 4) 他の研究所、機関とともに国際共同研究への支援

これらをこなすJaCVAMの使命は、動物実験の3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) の推進、すなわち動物実験の削減、苦痛やストレスの軽減、*in vitro*試験法の確立という置き換えを推進しながら、新規の安全性試験の行政的受入を目指すことである。この使命達成のため、試験法の信頼性と適応性を確認する施設内、施設間バリデーションおよび第三者による評価を実施している。

3. 日本の代替法に関する活動

ただし、欧米と比較して、10年遅れたJaCVAM設立の間、日本の動物実験代替

法に対する取り組みに空白があった訳ではない。日本には3Rsの中でも、代替法 (Replacement) に関わる研究、開発、教育、調査等を推進し、その成果の普及を行うことを目的としている日本動物実験代替法学会があり、1982年の設立当初からバリデーション研究に重きを置いてきた。文部科学技術省の支援を受けながら、最初に取り組んだバリデーションが細胞毒性試験を用いた眼刺激性試験代替法の検討であり¹¹⁾、以降、厚生労働省の支援を受けた眼刺激性試験¹²⁾、皮膚腐食性試験¹³⁾の代替法バリデーションを実施し、独自で皮膚刺激性試験¹⁴⁾の代替法バリデーションを実施した。さらに、光毒性試験 (酵母-赤血球溶血試験バッテリー評価)、皮膚感作性試験代替法Local Lymph Node Assay (LLNA) の非RI法であるLLNA-DAやLLNA-BrdUの代替法バリデーションを現在も第1表に示すように継続中である。また、化粧品各社とともに皮膚感作性試験代替法であるリンパ球細胞株の表面抗原の変化を測定するh-CLATおよび日本接触皮膚炎学会に協力して、パッチテストの改良についても共同研究を支援している。専門家による第三者評価においても、Balb/3T3細胞を用いる光毒性試験を評価し¹⁵⁾、皮膚腐食性試験、光毒性試験 (酵母-赤血球溶血試験バッテリー

第1表 JaCVAM が関与している日本で行われているバリデーションの現状

試験法	試験名	現状
光毒性試験	酵母-赤血球試験	追加バリデーション終了、評価中
皮膚感作性試験	LLNA-DA	バリデーション実施中
	LLNA-BrdU	バリデーション実施中
	h-CLAT	共同研究実施中
皮膚腐食性試験	培養皮膚モデル	一次評価終了
皮膚一次刺激性試験	培養皮膚モデル	評価計画中
内分泌かく乱物質スクリーニング	Lumi-cell, HeLa reporter Gene Assay	プロトコール検討中
変異原性試験	コメットアッセイ	プロトコール共同研究中
パッチテスト	貼布時間再検討	プロトコール検討中

評価)を第1表に示すように継続している。これらの成果は英語論文になっているものが少なく、欧米の評価は高くないがその土壤はできていると考えている。

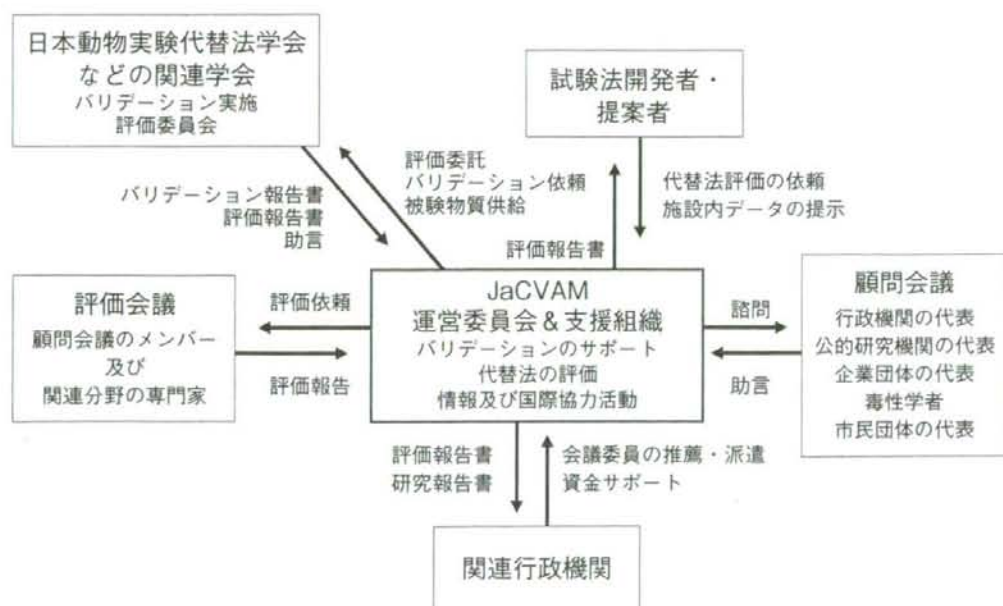
また、日本からも多くの研究者が眼刺激性、トランスフォーメーション、急性毒性、h-CLATなどの分野でECVAMや(COLI-PA) (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association)の代替法バリデーション研究にも協力しており、現在も継続中の試験もある。ICCVAMの専門家による第三者評価にも、数人の専門家がLLNA、腐食性、急性毒性および眼刺激性で協力しており、これまでも各分野において存在感を示している。

4. JaCVAMの組織と使命

今後、JaCVAMが日本における化粧品品の安全性を評価するための代替法研究および国際協調の中心機関となることになろう。ただし、JaCVAMは厚生労働省の一試験所の一部署に過ぎない。代替法の化粧品依存体質か

ら、一般化学物質や医薬品に守備範囲を広げねばならないわりに、正規職員も室長しかおらず、規模も小さく予算も少ない。よって、すべてにJaCVAMだけでは対応できない。さらに、一番大事な点は、バリデーションや専門家による第三者評価というものは多くの研究者の協力があって初めて可能となる。しかも餅屋は餅屋という試験法や毒性学者、生物統計学者、バリデーションの専門家、臨床医師や参加施設の協力が必須である。これらの協力者に資金、人的パワーを供給することが重要である。よって、JaCVAMの活動とは、時代のニーズに合った新規試験法のバリデーションや専門家による第三者評価のために、資金の確保に務めることである。第3図に示すように、組織の中心にいて、試験法開発者、バリデーション協力者や専門家、関連行政機関の橋渡しを行い、少しでもこの流れを円滑にし、試験法の行政的な受入への貢献性を高めることである。

ともかく、昨年末から船出したJaCVAMは、まだ組織、規約も思考錯誤の部分もあ



第3図 JaCVAMの運営組織

る。日本動物実験代替法学会だけでなく、幅広い学会との交流や、日本化粧品工業会、日本製薬工業会、日本皮膚産業衛生協会などの業界団体の協力を仰ぎ、第1表に示すような試験法のバリデーションや専門家による第三者評価の課題をこなし、確実に成果としていかなければならない状況である。

5. 終わりに

動物実験代替法に関するJaCVAMの仕事を成し遂げるためには、皆様の協力が必須である。ECVAMおよびICCVAMとの差を、質量ともに、少しでも埋め、名実ともに3極の国際協調体制を早期に確立したいと考えている。新規試験法を作られた場合はお問い合わせを頂きたい。また、新規試験法のバリデーションや専門家による第三者評価の協力要請があった場合には、積極的なご支援、ご協力をお願いしたい。

参考文献

- 1) 重茂浩美、動物実験に関する近年の動向 - 動物愛護管理法の改正・施行を迎えて -、科学技術動向、2006-5.10-21.2006
- 2) 環境省告示第88号 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
- 3) Russel W. M. S. and Burtch, R. L., The principle of Human Experimenta Technique (Muthuen, London)
- 4) 大野泰雄、日本における動物実験代替法の開発と活動状況、FRAGRANCE JOURNAL,2005-2,30-35,2005
- 5) OECD, Final report of the OECD Workshop on harmonization of validation and acceptance criteria for alternative toxicological methods, ENV/MC/CHEM/TG 96(9). Paris, France.
- 6) 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,2005
- 7) NIH Publication No. 03-4508, ICCVAM Guidelines for the nomination and submission of new, revised and alternative test methods.
- 8) http://www.ne.jp/asahi/kagaku/pico/eu/reach_seminar/2005/REACH_QA_050917.pdf
- 9) Commission Staff Working Documents: Time Tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC); EN, SEC82004)1210,2004
- 10) Ohno, Y., Significance of Japanese Center for the Validation on Alternative Methods (JaCVAM) establishment, AATEX, 11(1), 1-3,2005
- 11) Ohno, T., et al., Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE.I. Overview of study and analyses of variations of ED50 values,AATEX,5,1-38,1998
- 12) Ohno, Y., et al., Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validations tudy and Draize scores for the evaluation of the tests, Toxicology in Vitro, 13, 73-98,1999
- 13) Kojima, H. et al., AATEX submitted.
- 14) Sonoda, I et al., A prevalidation study for three-dimensional cultured human skin models as alternatives to skin irritation testing, AATEX, 8, 3-4, 91-106,2002
- 15) 日本動物実験代替法学会、代替法専門委員会、Balb/c3T3細胞を用いNeutral red取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価結果報告、AATEX,10(2), 50-157,2004

日本における動物実験代替法の開発動向

小島 肇夫

Abstract : Considering international trend to safety testing of cosmetic ingredients and finished products, I surmised about a present alternative to animal testing such as skin irritation, skin sensitization, ocular irritation, phototoxicity, acute oral toxicity and genotoxicity. The validation studies of any method in these tests are over or in progress, and various tests may be replaced *in vitro* test in future. However, test methods are not at all much under development. I expect much basic or applied works on alternative to animal testing by a lot of researchers.

Key words : alternative, validation, safety testing, *in vitro*

1. はじめに

国際的な試験法公定化の合意事項により¹⁾、動物実験代替法の開発に係らず、新規試験法を確立するためには図1に示すような試験法の研究・開発後、バリデーション、第三者評価、行政的な受入れという段階を経なければならない²⁾。よって、試験法を開発して論文、特許を作成したとしても、その時点ではこの試験法を用いた安全性評価は公的には何の意味もない。試験法の公定化には10年の時間と多くの経費を要するとも言われており、極めて骨の折れる作業である。この評価にあたる作業を実施する部署として、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

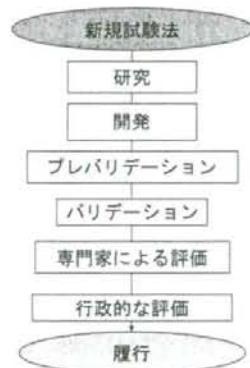


図1 試験法バリデーションのプロセス³⁾

“Development for Japanese alternative to animal testing.”

Hajime Kojima (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), Div. of Pharmacology, National Center for Biological Safety Research, National Institute of Health Sciences, 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)



1982年岐阜大学農学部農芸化学科卒業。同年日本メナード化粧品㈱入社、1983～1985年国立遺伝学研究所留学、1996年長崎大学薬学部博士号取得。現在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。

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、図2に示すような国際協調の窓口として、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^{3)~6)}。

バリデーションや第三者評価はシステム化されつつあるが⁷⁾、研究・開発される試験法のパイには限りがあるという大きな問題点がある。現在、確立された動物実験代替試験法の数は少なく、検討されている試験法も多くはない。もっと多くの試験法が研究・開発されなければならないし、仮

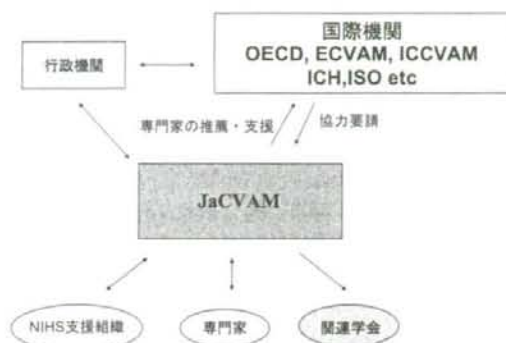


図2 JaCVAMの国際協調

に確立された試験法でも見直しや改良が必要である。このような視点で、化粧品の安全性評価における各試験法について現在の進捗を列記して、新規試験法開発の可能性を以下に挙げていきたい。

2. 皮膚刺激性試験

2-1. 現状

欧州では3次元培養皮膚モデルなどを用いた皮膚刺激性試験代替法への取り組み、主にバリデーション研究が長年に渡り実施されてきた。その結果として、2007年4月、ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) は3次元培養表皮モデルであるEPISKINを用いた皮膚刺激性の評価を承認した⁸⁾。ESACとは欧州動物実験代替法センター：ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) のアドバイ

ザー機関であるとともに、ECVAMでバリデーションが終了した試験法の第三者評価を行う機関である⁹⁾。約10年に渡り、欧州で行われてきた皮膚刺激性試験代替法バリデーションおよび試験法改良の成果が第三者専門家により評価されたことになる^{10)~16)}。頭の整理のために、日米欧のバリデーションや第三者評価の世話役、行政的受け入れの評価機関、それぞれの顧問会議を表1にまとめた。以下、ICCVAM (Interagency coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) という用語も出てくるが²⁾、表1でこの何を行う機関であるかを確認してほしい。

2-2. 問題点

ECVAMでバリデーションされた3次元培養皮膚モデルはEPISKINのみではない。EpiDermもバリデーションされたが^{14), 15)}、残念ながらESACの基準をクリアできなかった。さらに、マウス摘出皮膚を用いた方法もバリデーションされたが¹³⁾、途中段階で脱落している。

日本でも日本製の3次元培養皮膚モデルTEST-SKINやVitrolife-Skinを用いて2002~2003年に皮膚刺激性試験代替法のためにバリデーション研究が実施された^{17)~19)}。残念ながらその結果が論文にされていないこともあり、日本のバリデーション結果は国際的には評価されていない。しかし、化粧品の2009年問題という化粧品の開発・販売に動物実験を使えなくなるというEUの規制は日本でも他人事ではなく、日本製モデルを用いたバ

表1 日米欧の各段階における中心機関

	バリデーション	第三者評価の世話役	行政受け入れの評価	顧問会議
米国	NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)	NICEATM	ICCVAM (Interagency coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)	SACATM (Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods)
欧州	ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)	ECVAM	ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)	ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)
日本	学会 (日本動物実験代替法学会など)	JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)	JaCVAM評価会議	JaCVAM顧問会議

リレーションや、動物実験代替法を用いた安全性評価のあり方を検討しなければいけない時期になってきている。

2-3. 新規試験法の開発

急いで検討すべき点は日本で市販されている3次元培養皮膚モデルのバリデーションである。これを実施しなければ、これから数年は日本で皮膚刺激性の評価に利用できるモデルはEPISKINのみに絞られる。

3次元培養皮膚モデルはヒトの皮膚を用いている点、濃度依存的な反応も評価できるという報告もあることから²⁰、今後も皮膚刺激性評価の中心であり続けられると思われる。しかし、EPISKINの評価法は細胞毒性の評価に加えて、インターロイキン-1 α の増加を加味して評価するという点²¹、その組み合わせ理由が不明確であり、数字合わせの意図も汲み取れる。よって、より作用機構に立脚した評価手法の開発も急務と考えられる。さらに、3次元培養皮膚モデルも皮膚や表皮の構造は呈しているものの、病理学のおよび経皮吸収的にも未熟であり改良の余地が多い。他の細胞を組み込んだモデルの検討や、より頑強で寿命の長いモデルの開発など課題は山積している。

残念ながら、その他試験法で3次元培養皮膚モデルを上回る試験材料は見当たらないが、摘出皮膚などの利用だけでなく、視点を変えた方法の出現を期待したい。

3. 皮膚感作性試験

3-1. 現状

表2に示すように、すでにOECDガイドラインに掲載されており、汎用されてきたモルモットを

用いたMaximization testに変わる方法としては、Local Lymph Node Assay (LLNA)がある²²⁾。この方法は放射性物質を使用することから、放射性物質を用いない方法の開発が期待されている。現在日本などでバリデーションが終了しているLLNA-DA (ATPの取り込みを指標とする)²³⁾、または進行中であるLLNA-BrdU (BrdUの取り込みを指標とする)²⁴⁾のバリデーション結果が第三者評価で認められればさらに使用が広がる可能性が高い。

ヒトリンパ球細胞株THP-1細胞を用いて特定抗原の挙動を追うh-CLAT²⁵⁾、²⁶⁾、ペプチド結合試験²⁶⁾、構造活性相関なども多くの研究やプレバリデーションが実施されており、今後に期待のできる試験法が多い。

3-2. 問題点

*In vitro*試験法を利用して感作性を評価する場合に、関係者間で合意を得ておかねばならない問題点は、有害性の同定に絞ることである。動物試験では感作性の成立、確認までには種々の段階を経ることから、代替法ではその過程でみられる暴露評価、濃度依存性などのリスク評価は考慮しないというコンセンサスが重要である。どのような薬効の高い化粧品原料であっても、陽性と判断された場合には以後の開発を断念するのであれば、今後実施されるバリデーションを経て*in vitro*試験法が公定化される日は速くないであろう。

ただし、これは化粧品原料に限定される話であり、明確な効果と毒性に関連性が高い医薬品、農薬や抗菌剤には該当されない。LLNAのさらなる改良、データベースの構築が重要であろう。

表2 OECDガイドラインになっている動物実験代替法²⁰⁾

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

3-3. 新規試験法の開発

将来のリスク評価のために、ランゲルハンス細胞を組み込んだ3次元培養皮膚モデルの検討も進んでいる。また試験法の輪郭さえ明確でない状態であるが、幹細胞研究の進歩やさらなる培養液の改良の末、よい評価モデルが発表されることを期待している。

4. 眼刺激性試験

4-1. 現状

厚生労働科学研究班と日本化粧品工業連合会のバリデーション研究の結果、培養細胞を用いた試験法がガイダンス提案されてから10年になろうとしている²⁷⁾。ICCVAMやESACでウサギやニワトリの摘出眼球試験、牛の摘出角膜試験、受精鶏卵試験などが第三者評価され、スクリーニングとして有用とされている²⁸⁾。培養細胞系の評価もESACで始まろうとしている。

4-2. 問題点

培養細胞を用いた試験法は、10%水溶液の化粧品原料の眼刺激性を予測できるという点で、有害性の同定試験法であると考えられる。しかし、化粧品原料に求められる安全性は事故による暴露評価、濃度依存性などのリスク評価であり、有害性の同定ではない。この食い違いが試験法の普及の妨げになっている。他の摘出試験により濃度依存的な評価は可能であるが、日本で研究者が少なく、データの蓄積がない。受精鶏卵試験は厚生労働科学研究班と日本化粧品工業連合会のバリデーションでやや評価が低かった²⁹⁾。スクリーニングとしてどこまで優秀か検討の余地があると考えている。

4-3. 新規試験法の開発

3次元培養ヒト角膜モデルを用いた評価、摘出角膜モデルや培養細胞への短時間処理などの開発が進んでいる。目的は濃度依存的な毒性の検出である。さらに、これらを用いて、傷害の回復までも評価できればそのモデル利用の可能性は広がると思われる。この視点を明確にした方法の開発が進むことを期待している。

5. 光毒性試験

5-1. 現状

表2に示すように、Balb 3T3細胞を用いるニュートラルレッド取り込み試験がOECDガイドラインにも掲載されている²¹⁾。日本でも評価を行い検証したが²⁰⁾、この試験法は有害性の同定に有用であると判断された。しかし、非水溶性物質の評価がしづらいという問題点もあることから、資生堂グループは酵母膜破壊試験および赤血球溶血試験を組み合わせた方法の提案をしている³⁰⁾⁻³²⁾。これら方法のバッテリーのバリデーションが日本動物実験代替法学会により終了し、現在、JaCVAMで評価を実施している。

5-2. 問題点

*In vitro*試験法を利用して光毒性を評価する場合に関係者間で合意を得ておかねばならない問題点は、有害性の同定に絞ることである。紫外部に吸収のある原料のみ試験を実施し、光毒性の過程でみられる暴露評価、濃度依存性などのリスク評価は考慮しないという業界内でのコンセンサスが重要である。どのような薬効の高い化粧品原料であっても、陽性と判断された場合には以後の開発を断念するのであれば、現在の試験法で当面は十分である。

ただし、これは化粧品原料に限定される話であり、明確な効果と毒性に関連性が高い医薬品、農薬や抗菌剤には該当されない。培養皮膚モデルの利用や改良など、濃度依存性を評価できる試験法の開発が望まれる。

6. 単回投与毒性試験

6-1. 現状

欧米などによるバリデーション研究を経て、2006年、細胞毒性試験における第三者評価がICCVAMで実施された³³⁾。細胞毒性のIC50(50%の細胞が死滅する薬剤の濃度)で単回の経口投与による毒性を予想できるというものである。

6-2. 問題点

培養細胞を用いた試験法は、単回投与毒性を予測できるという点で、有害性の同定試験法である