



相場 節也

あいは せつや

Profile

1980年東北大学医学部卒業後、同大学皮膚科入局。1983年同科助手。1987～1990年米国国立癌研究所 皮膚科部門留学。1991年東北大学医学部皮膚科講師。1998年同科助教授。2003年東北大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態学皮膚科学分野教授。

専門領域

乾癬、アトピー性皮膚炎、皮膚免疫、接触皮膚炎ならびに炎症性皮膚疾患の発生機序の解析、皮膚ランゲルハンス細胞の免疫学的解析

私たちが知らずに触れている化学物質が私たちの免疫系にどの程度影響を与えているかは全く未知なのです。

重要な意義を持っていることから最近ではマスクミでも取り上げられる機会が多くなってきました。

松永——私は2007年7～8月の2週間EUを訪れ、接触皮膚炎や食物アレルギーあるいはトキシコロジーを専門にしている臨床現場を視察してきました。そのなかで特に驚いたことは、スウェーデンのMalmö大学病院の皮膚科クリニックです(図1)。外来には20以上の診察室、診療室があり、下腿潰瘍などが洗える足洗い場のある部屋、narrow band UVBあるいはbroad band UVBなどのレーザー治療専用の部屋などが複数ある。そのクリニックとは別にoccupational dermatology(職業性皮膚科学)を主とするクリニックが研究所とともに併設されており、職場で問題になった化学物質を持っていくと直ちに分析・抽出して薄膜クロマトグラフとして検査・診断・治療あるいは予防対策に直結できるようになっている。つまり、アレルギーおよびトキシコロジーに研究所が併設され、皮膚科医に有機化学の研究者が付いて、そこでスウェーデンの職場の問題が即座に解決できるようになっているのです。そのような施設の存在もさることながら、そこで実験を行っている人や周囲の人たちの健康を守るためのリスク管理が徹底されていることにも驚かされました。その点ではわが国は立ち遅れており、現実的には複数の施設が連携を組むしかないのでしょうか、早急にできることから取りかからなければならぬと考えさせられました。現在はインターネットもあれば航空便で簡単にものを送ることもできますので、国際的な連携を考えることも可能でしょう。



図1 Malmö大学病院

薄膜クロマトグラフで分析し、プラスチックの上にスポットを作り、そのものを患者さんの背中でパッチテストできるようにしている。左から松永教授、Magnus Bruze教授、有機化学者

免疫領域の研究あるいは
トキシコロジーの領域は、
今後新しい知見が明らかとなる
伸びゆく分野です



トキシコロジーと免疫毒性 および代替法

松永—わが国の皮膚科領域では、アレルギーについては多くの医師が十分認識して取り組んできましたが、トキシコロジーに関しては取り組まなければならない重要分野であるという認識が足りなかったように思います。今後これを啓発する場として「日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会」が相応しいのではないかと考えていますが、先生方はこの問題についてどのようにお考えでしょうか？

相場—現在は動物愛護に関する社会の関心が高く、2007年の「日本動物実験代替法学会」においても動物実験ができなくなることが大きな話題となっていました。ネズミなどの動物が自由に使えた状況では、仮に接触皮膚炎のメカニズムがわからなくても感作性試験は可能でしたし、ウサギの眼を使って刺激反応をみることも可能でした。ところが、動物実験の代替として *in vitro* あるいはハイスループットスクリーニングで何かを検証しようとするれば、対象であるメカニズムがわからないことには何も進まないのです。しかし、人間というのは障害が現れて進歩するもので、動物実験ができなくなると決まった途端にメカニズム解明に取り組み解決策を探ろうと研究努力を重ねる。ここが代替法学会の非常におもしろいところです。トキシコロジーについては、毒物の毒性をみるだけではなく、毒性を発揮するメカニズムを真剣に探求するレベルにきていると思います。

小島—同感です。実験動物は、人間と同じ生物だからそれで反応がみえたというブラックボックス型で評価するのですが、代替法の場合は作用機序やすでに明らかになっている知見に基づいて特性を評価しなければなりません。免疫領域の研究あるいはトキシコロジーの領域は、その作用機構の解明が重要な分野であり、今後新しい知見が得られればさらに伸びゆく分野です。「日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会」においては、トキシコロジーの分野、特に皮膚トキシコロジーにおける病態・診断・治療・予防などの研究をぜひとも行っていただきたいと思います。

動物実験をやめた場合に代替法を組み込んで、
はたしてどれだけ国民の安全・安心を担保できるかが問題です。



小島 肇

こじま けいじ

Profile

1983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株式会社入社。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年国立医薬品食品衛生研究所入所。
学会活動：日本動物実験代替法学会 評議員（庶務・総務、理事、評議員）
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、広報委員

専門分野

毒性学、変異毒性、組織培養、バリデーション

相場—皮膚というのは大きな問題を含んでおり、アレルギー性の接触皮膚炎はもちろんのこと一次刺激性の接触皮膚炎ですらそのメカニズムは明らかではありません。“刺激性”には多様な要因があり、発症機序も異なれば産生されるサイトカイン・ケモカインのレベルも異なります。単にIL-1 α の測定やMTTアッセイ法で細胞増殖活性をみるだけでは解明し得ないところがあり、これから一次刺激性接触皮膚炎に取り組むのも案外おもしろいかもしれませんね。

松永—相場先生は、どうして免疫毒性の研究に深く

関わられるようになったのですか？

相場——最初に樹状細胞に関わったことでしょうか。接触皮膚炎における樹状細胞の動態を調べるに際して、まず蛍光顕微鏡を使って染めた表皮を観察した時にランゲルハンス細胞の美しさに胸を打たれ、また、化学物質を加えた時に*in vivo*で活性化化する樹状細胞が意外とハプテン特異的であったことに関心が高まりました。やがて*in vitro*でも樹状細胞の研究ができるようになり、接触皮膚炎の発症機序を樹状細胞を使って解析してきました。一方、ディーゼルエンジン廃棄微粒子やホルマリンが免疫系のT細胞およびT細胞の転写因子におよぼす影響についても解析してきました。その解析方法がh-CLAT (human Cell Line Activation Test)の開発につながったのです。(図2)。

考えてみれば、私たちが知らずに触れている化学物質が私たちの免疫系にどの程度影響を与えているかは全く未知といっている。ディーゼルエンジン廃棄微粒子の影響を科学的に解析した例は少なく、私たちの環境を取り巻くほかの多くの化学物質が大丈夫なのかを調べてすらいない。免疫毒性物質は野放しになっている。ではなぜ野放しになっているのかといえば、多くの感作があるにもかかわらずそれを簡易的に測定するアッセイ法がないのです。そのアッセイ法を開発するためには、免疫毒性の起こってくる機序を考えなければなりません。免疫毒性の基本形は、ある化学物質が加わった時に惹き起こされる細胞のstress responseが免疫系に影響を与えることです。1つひとつの化学物質により特殊性はありますが、基本的にはそのような細胞のstress responseを抑制することで免疫反応および免疫毒性が捉えられるのではないかと考えています。

松永——ありがとうございます。続いて、小島先生が代替法の研究に関わられた経緯および現状についてご紹介ください。

小島——代替法とは実験動物の福祉を目的とした3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) のなかのReplacementにあたる「動物実験代替法」のことで、化粧品業界では特に注目されています。欧米では代替法を扱う専門行政機関が1991～1997年に設立されました。さらにEUでは、「化粧品の安全性評価のための動物実験を原則として2009年までに全廃するとともに、動物実験を行った化粧品の販売を禁止する」と法制化されたのです。化粧品は輸出入されていますし、国際ハーモナイゼーションの流れからもわが国として対策を講じないわけにはいかず、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内にJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) が設立され、代

替法の評価を進めていくことになりました。私は20年ほど一般企業に在籍していましたが、JaCVAM設立と同時に招かれ、現在は国内各学会や企業および国際的機関であるOECDやICHなどとの連携を図りながら、代替法に関する情報センターの役割を担って活動しています(図3)。

毒性のある物質が シグナル伝達分子に作用するか 否かがアレルギー反応の惹起に 関わってきます

3 トキシコロジーとアレルコロジー の接点と今後の課題

松永——アレルコロジーとトキシコロジーのメカニズムを考えた場合、両者には類似点と相違点がみられますが、相場先生はどのようにお考えですか？

相場——トキシコロジーの領域である毒性物質について、この物質がsignal transductionの分子に作用するか否かがアレルギー反応の惹起に関わってきます。例えば、樹状細胞が活性化されるために必要なシグナル分子としてNFκBやMAPキナーゼp38があります。接触皮膚炎を起こすハプテンなどの毒性物質がたまたまこれらのシグナル分子に作用を及ぼすことが考えられ、この時点でトキシコロジーとアレルコロジーとは接点を持つことになります。ただ、毒性物質のどのような特性が皮膚刺激に関連しているかについては、現在のところ全く未知だと思います。

小島——例えば皮膚が赤くなる症状があるとします。その原因がわからなければまた症状を繰り返すことになりますから、それぞれの物質の皮膚刺激やアレルギーに対する反応を検討しなければなりません。ところが、アレルギーや皮膚刺激などで皮膚が赤くなる程度の研究には国からの支援がほとんど望めませんし、研究者も予算の少ない分野には寄り付きません。皮膚に何か症状を起こす物質は生体にもよからぬ影響を及ぼすかもしれませんが、実際に肝障害や腎障害が起こってからキャッチしていたのでは、本当の意味での安全性の担保はできません。

相場——皮膚科の臨床現場においては、医療費および人や材料の問題からバッチテストひとつ満足に行うことができません。病院経営からすればバッチテストよりも手術が求められ、厚生労働省ですら採算の

合わないものについては切り捨てる方針です。採算優先で臨床研究は疎かにならざるを得ず、医療に携わる人にとっても患者にとっても望ましい医療とは程遠い状況に陥りつつあります。

松永—このような状況の中では、アレルギーやトキシコロジーに関する有用なシステムを単独施設で組み立てることは難しく、行政と臨床が協力して全国ネットを組むしかありません。できれば1箇所集中してセンター化すれば、困った患者や情報、ものなどが集まり、先述したスウェーデンの皮膚科クリニックのような施設に近づくとと思いますが、問題は予算です。

小島—わが国の分析技術などは決してスウェーデンなどに劣っているわけではありませんし、企業内や受託で分析に携わっておられる方の中には優秀な研究者が大勢おられます。「日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会」が日本化学工業協会やコスメトロジー研究振興財団などと予算およびマンパワーの面でタイアップしていくことで、システム作りの可能性が

みえてくるのではないのでしょうか。

松永—小島先生は、このような現状においてわが国がどのような役割を果たせるとお考えですか？

小島—代替法に関してはEU主体で展開されていますので、世界のバランスの中でわが国の果たすべき役割を模索しているところです。例えば、相場先生が開発された*in vitro*感作性試験法 (h-CLAT) は世界の先端技術の1つですから、この試験系でわが国が世界をリードできれば刺激やアレルギー反応の原因探求面において重要な役割を担っていただけるのではないのでしょうか。ただ、化粧品の場合はアレルギー物質を含有させないという考え方でいいのですが、問題は医薬品です。薬効のあるものにアレルギーがあったとしても、それが有用であれば使わないわけにはいかない。動物実験ができなければ代替法によるわけですが、h-CLATだけではリスクアセスメントとしての曝露評価や濃度依存性評価をできませんので、その点を解決する方法を次に開発していかなければなりません。例えば、樹状細胞を取り込んだ皮膚

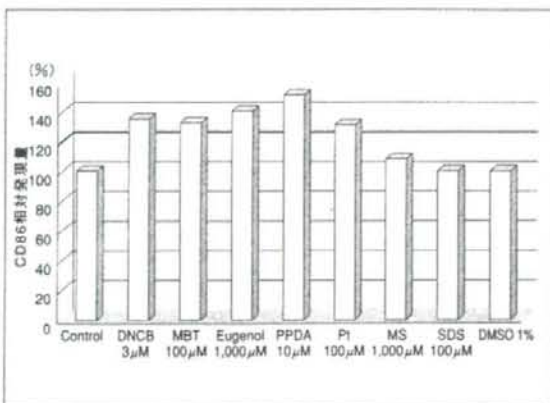


図2 化合物のTHP-1細胞CD86発現に対する影響 (h-CLAT)

それぞれの化合物 (カッコ内はLLNAによる感作性評価) をTHP-1細胞に24時間処理し、CD86の発現量をフローサイトメトリーにより測定してコントロールと比較した。その結果感作性物質により120%以上の発現亢進を示した。

DNCB: 2,4-Dinitrochlorobenzene (extreme), MBT: 2-Mercaptobenzo-thiazole (moderate), Eugenol (weak), PPDA: 1,4-Phenylenediamine (strong), PT: Ammonium tetrachloroplantate (sensitizer), MS: Methyl salicylate (non-sensitizer), SDS: Sodium dodecyl sulfate (non-sensitizer), DMSO (non-sensitizer, vehicle)

(Ashikaga T, et al: Toxicology in Vitro 16: 711-716, 2002より改変)

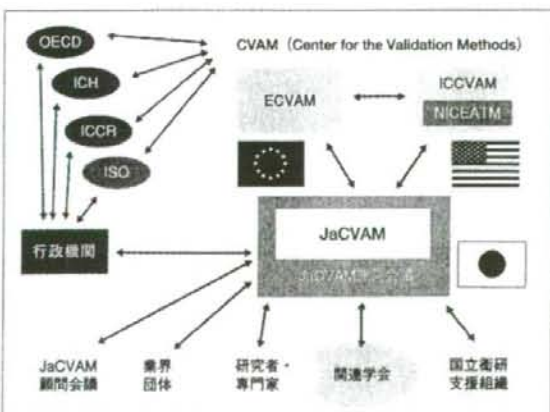


図3 JaCVAM運営組織図

ECVAM: European Center for the Validation of Alternative Methods
 ICCR: International Cooperation on Cosmetics Regulations
 ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
 ICH: International Conference on Harmonization
 ISO: International Organization for Standardization
 JaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods
 NICEATM: National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods
 OECD: Organization for Economic Co-operation and Development

モデルであれば、アレルギー物質のリスクアセスメントができますから、これをいかに作製するかというサイエンスの発展が重要になってきます。そのため、幹細胞研究の成果を皮膚モデルの構築につなげるような研究を継続して行わないことには、医薬品業界あるいは医療全体のリスクアセスメントにつながる議論にならないのです。

松永——最後になりましたが、2008年年頭にあたり、先生方の課題あるいは抱負をお聞かせください。

小島——動物実験をやめた場合に代替法を組み込んで、はたしてどれだけ国民の安全・安心を担保できるかが問題です。医薬部外品には安全性試験のガイドラインがあり、医薬品にも免疫毒性試験といったガイドラインがありますが、それに動物実験の3Rsをどのように加味して現在の安全性の質を保つかということ、多面的、根本的に議論しながら長期的な方向性を見定めていかなければなりません。その議論が盛んになり成熟していくという意味で、2008年は非常に重要な年であると思っています。

相場——最近、皮膚科に「環境」を冠したenvironmental dermatology（環境皮膚科学）が話題になっています。皮膚というものは常に環境の影響を受けている臓器であり、環境が細胞にどのような影響を与えるのかという研究にはまだ多くの未解決の問題が残されています。私は、その中でも特に免疫を柱としてもう少し免疫毒性のメカニズムに迫ってみたいと思っています。

松永——私は、socio-dermatology（社会皮膚科学）として、もっと外に開かれた皮膚科を目指したいと考えています。その魁として、臨床で接触皮膚炎に取り組んできた経験を活かし、今回話題に上ったアレルギーロジーあるいはトキシコロジーの分野におけるネットワークあるいはオンラインシステム作成の準備に取り掛かりたいと思います。本日は、貴重なご意見をいただきありがとうございます。

(2007年9月1日収録)

座談会を振り返って



松永佳世子

EUでは、接触皮膚炎などの健康被害制御のために世界に先駆けて化学物質の安全性を見据えた対策がとられている。今回の座談会では、相場先生、小島先生とともにわが国における免疫毒性、毒性学領域の現状と展望について率直に語り、今後、化学物質の毒性・感作性制御には産学官のネットワーク作りが急務と再確認した。



相場節也

今回、松永先生には、アレルギーロジー vs トキシコロジーというおもしろいテーマで座談会を企画していただき感謝いたしております。皮膚は、外界に直接接触する数少ない臓器の一つであり、同時に発達した免疫器官でもあります。したがって、皮膚では、化学物質による毒性が免疫担当細胞の働きを加味して現れます。その意味では、この両者は、これからも皮膚科研究の大きなターゲットで有り続けると思います。



小島 肇

本座談会は、自分自身の仕事やトキシコロジーを見つめ直すよい機会でした。この機会をお与え頂きました松永先生に感謝しています。動物愛護はもちろん大切ですが、国民の安全・安心を守ること、国益を求めて国際協調を進めることも重要です。その意を汲み取って頂ければ幸いと思っています。

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

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。

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⁾

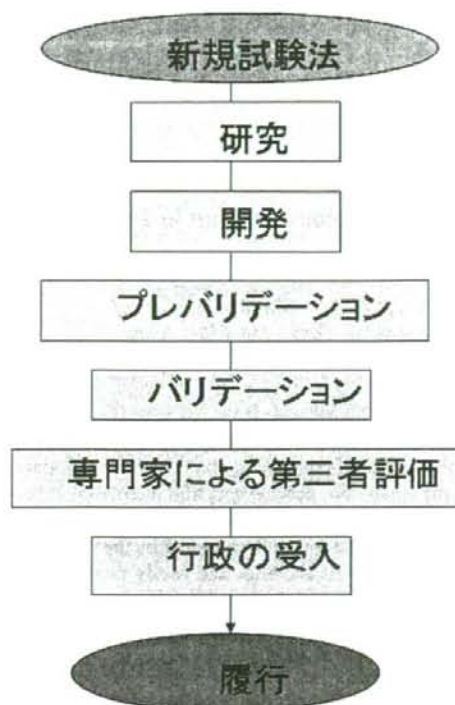


Fig. 1. Stages in the Development of New Toxicological Testing Methods

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

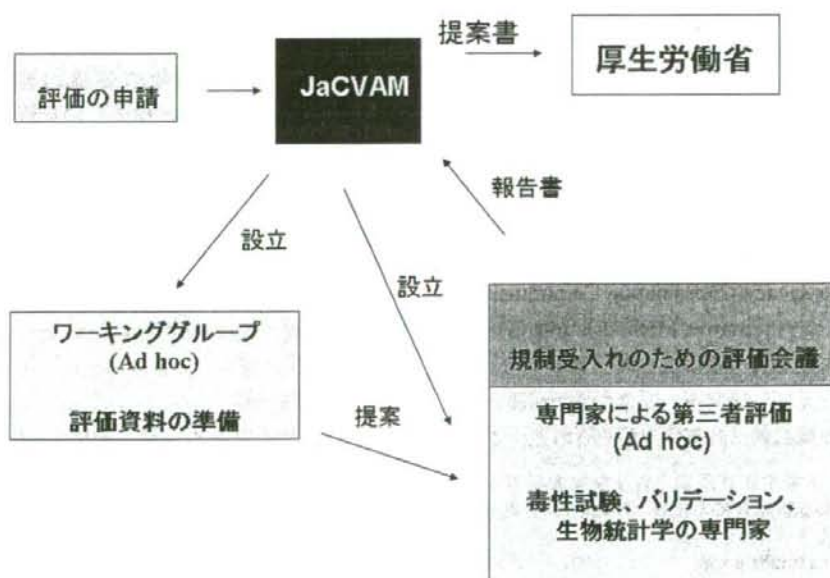


Fig. 2. Framework for Peer Review and Regulatory Acceptance of Alternative Methods

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.		朝日吉
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 3 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 1 α 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、プ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充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となる。

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で評価された少容量法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、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が限られる。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、日本としては資生堂及び花王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、非毒性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ス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 物質を用いて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

助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。日本では日吉暢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から, 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, 国益に適用仕事をすることが 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、

神奈川県立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、バリデーショナルな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。



「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

日本学会協議の「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。⁴⁾ 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、⁵⁾ 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、⁶⁾ 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、⁷⁾ 日本動物実験協同組合⁸⁾ 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。⁹⁾ 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、¹⁰⁾ 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いけない。ところが、バリデーションや第三者評価を実施すると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。¹¹⁾ 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。¹²⁾ 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

W. W. W.

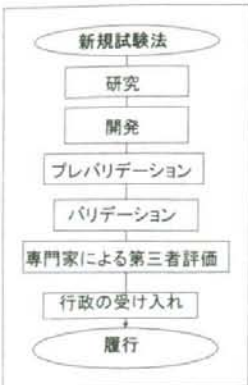


図1 試験法公定化までの手順

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, 皮膚感受性, 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。¹⁴⁾

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

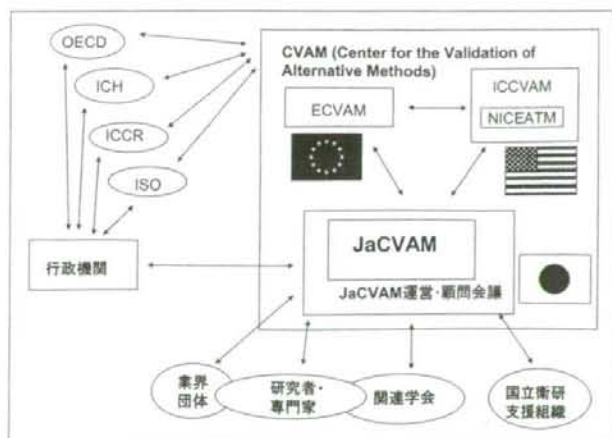


図2 JaCVAMの国際協力概要

Wada

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デーションや第三者評価が行われてきた。²¹⁾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)、²²⁾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、²⁴⁾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年度をめど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://echa.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) (R6)}

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^{3,4,5)}。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^{5,8,9)}

表1 REACHで製造量毎に要求される試験名^{6,10)}

	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 皮膚感作性 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言う訳ではない。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 (石鹸洗剤協会)、

CEFIC (欧州化学品工業会)、COLIPA (欧州化粧品工業会)、ECPA (欧州農薬工業会)、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*) ではニワトリ摘出眼球試験および牛摘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 でもこれら进行评估し、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。