

### C-1-3 SCCS の状況

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) は欧州委員会のもとにある化粧品の安全性に係わる科学委員会であり、その前身は Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) であり、また、Scientific Committee on Cosmetic products and Non-Food Products intended for consumers (SCCNFP) である。2008年7月2日付けで欧州委員会は「化粧品業界における動物試験代替法の開発、バリデーション及び法的な受け入れに関するレポート(2007)」を発行した。この中で、代替法の開発状況については皮膚刺激性の Episkin を除き 2005 年と大差なしと述べている。また、EU 域内で実施された動物実験に言及し、毒性試験の割合は 8% で、そのうち、化粧品に関したものは 0.5% と報告している<sup>16)</sup>。

2009年1月の第19回 SCCP 総会で「化粧品原料の動物実験を用いない遺伝毒性/変異原性試験に関する状況報告」が採択された。これによると、*in vitro* 試験は非常に感度が高く *in vitro* 試験の組合せで陰性の場合変異原性は陰性と判定できる。しかしながら、陽性を示した場合は動物実験をせずに陽性判定を覆すことができる代替法が存在しないため、動物試験を実施できない場合に化粧品原料の毒性評価の一部を果たすことができなくなるとしている。なお、欧州科学委員会 (SCHER/SCCP/SCENIHR) は、2009年1月に「遺伝毒性とがん原性物質のためのリスク評価の方法論とアプローチ」についてオピニオンを公表し、がん原性リスクの定量的評価は *in vitro* と *in vivo* の遺伝毒性試験の結果だけを基に行うことはできないため、動物を用いた適切な試験が必要であると述べている。

SCCS は 2009年12月8日付の「EU 域内における化粧品原料のヒト健康に関する安全性評価における代替法」に関する意見書を公開した。この意見書によると代替法の承認状況は昨年度の本報告書に記載した内容と大差はなかった。しかし、変異原性遺伝毒性では、細胞を用いる復帰突然変異試験 (TG 471)、哺乳類の培養細胞を用いる *in vitro* 遺伝子突然変異試験 (TG 476) 及び *in vitro* 小核試験 (TG 487) の3点セットが要求されることを示した。もし、これらの試験で陽性の結果が得られた場合は、動物を用いる試験で陰性であることを証明す

る必要があるため化粧品指令を遵守すると開発は不可能となることが示された。また *in vitro* 小核試験 (TG 487) は哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験 (TG 473) でも可であることも記述されている。

### C-1-4 EU 委員会の状況

2005年11月7日に行われた欧州委員会主催のワークショップ「EU goes Alternatives」において 3Rs 宣言が発表され、今後、EU の各産業分野において、効果と安全性の両面に関する代替法の開発を促進することが宣言された。EPAA (European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing) は欧州委員会、工業会 (化学品、医薬品、化粧品)、様々な産業分野における会社の共同のパートナーシップである<sup>17)</sup>。欧州委員会からは企業 (DG Enterprise)、研究 (DG Research)、健康と消費者保護 (DG Health and Consumer Protection)、環境 (DG Environment)、共同研究センター (DG Joint Research Centre) の常任理事会及び ECVAM の6団体が参加している。工業会は CEFIC (欧州化学品工業会)、EFPIA (欧州製薬団体連合会)、COLIPA、Euro BIO (欧州バイオテクノロジー工業会)、AISE (石鹸洗剤協会)、ECPA (欧州農業工業会) など7団体が参加している。企業からは医薬品、化粧品、化学品メーカーなど37社が参加している。その目的は、動物を用いる安全性試験の代替のアプローチとしての新しい 3Rs (refine, reduce, replace) の推進である。

パートナーシップの構造は以下の通りである。

- ・年次大会：ヨーロッパとグローバルにおける進歩を再検討する、年に一度の“3R”イベント。
- ・パートナーシップ運営委員会：欧州委員会、関連業界、企業からなり、レビューワークプラン、戦略、タイムラインを提案する。
- ・ワーキンググループ：欧州委員会、企業、適切な専門家のサポートで個々のテーマを扱う小ワーキンググループ。
- ・ステークホルダーのミラーグループ：学界、動物福祉団体、患者団体、消費者保護グループ、他のステークホルダーからなり、より広い見地で運営委員会にアドバイスする。

2006年5月に公表されたアクションプログ

ラムは以下の5つのメインテーマからなっている。

- ・その後のアクションの計画と優先順位の情報を提供するための現在と過去の3Rsのマッピング
- ・3Rsのアプリケーションに基づく、今後の研究の優先順位付け、促進及び遂行
- ・3Rsの使用におけるベストプラクティスの同定、普及、遂行
- ・規制と政策決定における、3Rsの実現
- ・3Rsに基づくバリデーションと承認

2009年11月6日にBrusselsで第5回の年次大会(Annual Conference 2009)が開催された。内容としては「Dissemination of 3Rs Information」を主題としており、2009年のEPPA活動状況ならびに3Rsが実際、研究者の間でどの程度正しく理解され実施されているか、特に若手研究者への教育や3Rsを普及させていく上での問題点や障害等についての報告がなされた。また、企業・大学・EU委員会・代替法評価機関従事者で構成されるパネルディスカッションを設け、3Rsについて様々な観点(研究・教育・代替法開発・規制の観点)で今後の展望について議論がなされた。

REACH<sup>19-21)</sup>については、EU域内で年間1トン以上製造・輸入されるすべての化学物質の登録を既存物質と新規物質を区別せずに義務付けるものであり、2007年6月1日に施行され、2008年6月1日に新官庁である欧州化学物質庁(European Chemicals Agency; ECHA)が発足した。それと同時に年間1トン以上製造/輸入されている既存化学物質の予備登録が開始され、2008年12月1日に締め切られた。約6万5千社から約260万件の予備登録がなされた。既存物質の登録期限は物質の製造・輸入量や有害性への懸念によって分けられ、2018年までに以下に示すように段階的に設けられている。

- ・年間1000トン以上の製造/輸入量のあるもの等：2010年11月30日
- ・年間100～1000トンの製造/輸入量のあるもの：2013年5月31日
- ・年間1～100トンの製造/輸入量のあるもの：2018年6月1日

年間1トン以上の物質の登録には、製造・輸入量に応じて物理化学的性状、ヒトの健康への有害性、生態毒性の情報が必要となる。動物試験が行われる場合、重複を避けるために関係書類の審査が義務づけられる。ヒトに対す

る毒性に関する情報は、可能なら代替手段によって脊椎動物以外の方法を用いて入手する。これらの代替手段はEU委員会によって確認され、さらに欧州化学物質庁又は国際的な機関によって認定されなくてはならない。EU委員会は代替法の使用に関し3年毎に報告書を提出し、必要なら新たな法的提案を行うことになっている。

以下に製造・輸入量ごとに実施すべき毒性試験に関して記載する。

- ・ *in vitro*皮膚刺激性又は皮膚腐食性：>1 t/年
- ・ *in vivo*皮膚刺激性試験：>10 t/年
- ・ *in vitro*眼刺激性：>1 t/年
- ・ *in vivo*眼刺激性試験：>10 t/年
- ・ 皮膚感作性：>1 t/年
- ・ 変異原性：>1 t/年
- ・ バクテリアを用いる *in vitro* 試験：>1 t/年
- ・ 哺乳類細胞を用いる *in vitro* 細胞遺伝学試験又は *in vitro* 小核試験：>10 t/年
- ・ 哺乳類細胞を用いる *in vitro* 遺伝子突然変異試験：>10 t/年 (ただし、バクテリアを用いる *in vitro* 試験と哺乳類細胞を用いる *in vitro* 細胞遺伝学試験又は *in vitro* 小核試験が陰性の場合)
- ・ 急性毒性：>1 t/年
- ・ 経口経路：>1 t/年
- ・ 吸入又は皮膚経路：>10 t/年
- ・ 反復投与毒性：>10 t/年
- ・ 短期反復投与毒性試験(28日間)：>10 t/年
- ・ 亜慢性毒性(90日)：>100 t/年 (>10 t/年の場合も有り)
- ・ 慢性毒性(>12ヵ月)や追加評価：>1000 t/年 (必要な場合有り)
- ・ 生殖毒性：>10 t/年
- ・ 生殖/発生毒性に関するスクリーニング：>10 t/年
- ・ 出生前発生毒性試験：>100 t/年
- ・ 二世代生殖毒性試験：>100 t/年
- ・ トキシコキネティクス：>10 t/年
- ・ アセスメント：>10 t/年
- ・ 発がん性試験：>1000 t/年

2009年8月のWC7において、EU委員会及びCOLIPAにより、反復全身毒性の代替法研究に関する共同出資プロジェクトが発表された。既に2009年7月30日にはEU委員会より2500万ユーロの研究プロジェクトの公募が開始されており、世界中から専門家が集まるWC7に

て COLIPA から同額の出資を行なう旨の表明がなされた。これにより、総額 5000 万ユーロが反復全身毒性の代替法開発に費やされることになる。公募の締め切りは、2010 年 2 月 3 日であり、2010 年春にはプロジェクト内容が公表される予定である。

#### C-1-5 EU 危険物質指令の状況

欧州化学薬品局 (European Chemicals Bureau; ECB) が更新している EU 危険物質指令の「物理化学的性質、毒性、環境毒性の測定法」のリストである Annex V において、2009 年に新たな代替法の収載はなかった。<sup>22)</sup>

#### C-1-6 COLIPA の状況

COLIPA は動物試験代替法の開発と受け入れに向けたコーディネートを目的に、1992 年に COLIPA の動物試験の代替法に関する運営委員会 (Steering Committee on Alternatives to Animal testing; SCAAT) を常設の委員会として設置した。COLIPA は 2009 年に組織改革を行い、SPT (Strategic Project Team) の下に AAT (Alternatives to Animal Testing) が設けられ、現在、以下の 5 つの Task Force (TF) がある<sup>23)-26)</sup>。

- ① SPT AAT TF Eye Irritation (眼刺激性試験代替法の検討)
- ② SPT AAT TF Skin Tolerance (感作性・皮膚刺激性試験代替法の検討)
- ③ SPT AAT TF Genotoxicity (変異原性・遺伝毒性の検討)
- ④ SPT AAT TF Systemic Toxicity (全身毒性試験代替法の検討)
- ⑤ SPT AAT TF Safety Assessment (化粧品原料のリスクアセスメントのストラテジーを作成)

このうち SPT AAT TF Skin Tolerance において、日本企業により開発されたヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞を用いた *in vitro* 皮膚感作性試験 h-CLAT<sup>27)</sup> の ring study が 2004 年 6 月から開始され、2008 年 9 月に終了した。この試験法以外にも、DPRA、MUSST の ring study など実施された。

先にも述べたように、COLIPA は EU 委員会が FP7 の中で行われる反復全身毒性の代替法研究に協力し、その予算額の半分の 2500 万ユーロを分担することを決定した。

また、2009 年 3 月 11 日の化粧品指令第 7 次改正の施行を踏まえ、動物実験代替法による化粧品原料及び化粧品のハザード評価及び

安全性評価のための指針を、皮膚腐食性-皮膚刺激性、眼腐食性-眼刺激性についてそれぞれ Regulatory Toxicology and Pharmacology 誌に発表した<sup>29)、30)</sup>。

#### C-1-7 その他の状況

EU におけるその他の状況を、公的機関等の組織的活動と学会等に分けて以下にその概要を記載する。

##### ① 公的機関等の組織的活動の状況

###### ・ ZEBET

Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments (ZEBET)<sup>31)</sup> は、代替法の文書化、評価、推奨あるいは国内外での承認を推進することを目的に 1989 年にドイツの連邦リスク評価研究所に設立された組織である。業務の範囲は、代替法に係わる文書化と情報提供、バリデーション及び研究である。ZEBET 業務の一つとして動物実験代替法のデータベースがあり、2000 年 2 月からウェブにより無料で公開している。

###### ・ NC3Rs

National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs)<sup>32)</sup> は動物試験、研究における 3R の推進、開発、実施を目的に 2004 年 5 月にイギリスに設立された。質の高い 3Rs 研究に資金を提供し、3Rs を広めるためのセミナーやシンポジウムを組織し、また、3Rs の情報源やガイドラインを開発している。独立した組織であり、英国内務省、Medical Research Council (MRC)、Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC)、The Association of the British Pharmaceutical Industry (ABPI)、The Wellcome Trust 及び製薬・化学企業などより資金が提供されている。

###### ・ FRAME

Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments (FRAME)<sup>33)</sup> は医学における動物実験に関して 3R を促進するために、1969 年に設立されたイギリスの機関である。国際的科学雑誌 ATLA (Alternatives To Laboratory Animals) を年 6 回発行している。また、FRAME News を発行し、FRAME の活動及び 3Rs に関するニュースを会員へ伝えている。毒物学における *in vitro* 法のプロトコルを収集した「INVITOX」は、FRAME によって 1989 年に確立され、現在、ECVAM の Scientific

Information Serviceの一部になっている。

・3R Research Foundation

3R Research Foundation<sup>34)</sup>は、動物実験の質問をする会派、スイス製薬協会の「インターファルマ」(Novartis Pharma Ltd, F. Hoffman-La Roche Ltd, Serono Ltd)、動物解放研究財団の共同で1987年にスイスに設置された。3R Research Foundationの目的は、研究プロジェクトのための補助金によって動物実験代替研究を促進することである。

・NCA

Netherlands Centre for Alternatives to Animal Use (NCA)<sup>35)</sup>は、オランダにおける動物実験代替法の開発、バリデーショ及び応用を促進することを目的としており、ユトレヒト大学獣医学部の動物、科学&社会部門の一部分である。動物実験代替法に関する研究をコーディネートし、情報を広めており、この領域におけるオランダの中心として活動している。年2回ニュースレターを発行し、ウェブ上で公開している。

②学会等の状況

・WC7

the 7th World Congress on alternatives and animal use in the life sciences (WC7)<sup>36)</sup>は、ライフサイエンス分野における3Rsの国際的な促進を目的に2年に1度開催される国際会議である。2007年にアジアで初めて開催された東京(WC6)に引き続き、2009年8月30日から9月3日にかけてイタリアのローマにおいて開催された。テーマとしては、「革新的な技術、概念とアプローチ」、「動物の使用領域」、「ライフサイエンス分野における進歩」などで、6つのセッション、約600題に上るポスター発表演題があった。

・ESTIV

European Society of Toxicology *in vitro* (ESTIV)<sup>37)</sup>は、*in vitro* 毒物学を促進することを目的とする学会である。ESTIVの公式雑誌は「Toxicology *in vitro*」である。執行委員長はベルリン自由大学のH. Spielmann教授であり、*in vitro* 毒物学の情報交換を推進するために、INVITOXワークショップを開催、また、6ヵ月ごとにニュースレターを発行している。

・MEGAT

Middle European Society for Alternative Methods to Animal Testing (MEGAT)は、動物試験代替法の普及とバリデーショ、3Rの分野での研究の推進、メディアへの情報提供な

どを目的とする学会である。学会長はベルリン自由大学のH. Spielmann教授であり、使用言語はドイツ語、年4回科学雑誌「ALTEX」(Alternatives to Animal Testing)<sup>38)</sup>を無料でメンバーに発行している。

C-1-8 小括

本年度のEUにおける代替法開発の動向に関して特筆すべき事項としては、3月11日に化粧品指令第7次改正が施行され、また、反復投与毒性、生殖毒性、毒物動態以外の動物実験を実施した原料を配合した化粧品のEU域内での販売が禁止されたことが挙げられる。皮膚刺激性試験代替法であるEpiDerm SITとSkinEthic RhEがESACにより承認されたことによって、弱い皮膚刺激性物質を評価できる*in vitro*法は、昨年ESACで承認されたEPISKINと合わせて3種となり、試験法の選択肢が広まった。これらヒト皮膚モデルを用いる*in vitro*皮膚刺激性試験法は9月に公開されたOECDドラフトテストガイドラインに収載され、GHS分類基準に対応した識別性も含めて検討中である。眼刺激性試験代替法についても、過去にバリデーショが実施されたNRR、FL等の試験法の再評価が進められ、2009年7月にESACは、CMを水溶性物質の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法として、また水溶性の界面活性剤の無刺激性を確認するための試験法として承認した。さらに、FLを水溶性物質の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法として承認した。一方3次元培養モデル(SkinEthic<sup>TM</sup> Human Corneal Epithelial Model, EpiOcular<sup>TM</sup> OCL-200 Model)のバリデーショが実施されている。また、EPAAは今後、代替するターゲットとして単回、反復の全身毒性を重要視していることが注目される。EU委員会及びCOLIPAも反復全身毒性の代替法開発を推進すべく、FP7の下で予算総額5000万ユーロの研究開発プログラムを決定した(COLIPA's statement on March 11<sup>th</sup>, 2009)。これらは化粧品評価だけでなくREACHへの対応のためでもある。今後ますます代替法開発と活用が促進されるものと考えられる。

C-2 米国における代替法開発の動向

C-2-1 ICCVAMにおける代替法評価状況

9省庁の15研究機関からの委員で構成されているICCVAMは、米国官庁間の調整を図り共通の目標である代替法のバリデーショを統

括する委員会として機能し、国立環境衛生科学研究所 (NIEHS) の恒久的委員会として位置づけられている。

2006年11月に ICCVAM と NTP 代替試験法省庁間センター (The NTP Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods; NICEATM) は代替法の5ヵ年計画 (2008年~2012年) を発表した<sup>1)</sup>。この5ヵ年計画では、(1) 適切で信頼性のある新規又は改良された非動物及び他の代替試験を連邦政府機関の試験計画に統合するための研究開発、解釈及び検証、(2) 3R 推進のための新規又は改良された非動物及び他の代替試験あるいはそれら試験法の組み合わせに関する最優先分野の確認がもり込まれた。試験開発の優先分野としては、①急性眼刺激性、腐食性、②Biologics/vaccines、③急性皮膚毒性 (刺激性・腐食性、感作性と吸収を含む)、④急性全身毒性 (経口、経皮、吸入)、⑤慢性毒性・発がん性、⑥生殖・発生毒性、⑦内分泌攪乱物質、⑧神経毒性、⑨免疫毒性の9項目を挙げている。

本年度の動向としては、以下のことが挙げられる。①第三者科学専門家委員会による眼刺激性試験代替法の利用に関する検討が行われたこと。②第三者科学専門家委員会による Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA) 並びに放射性物質を用いない Non-radioisotopic Local Lymph Node Assay (非 RI-LLNA) の検討が行われたこと。

・第三者科学専門家委員会による眼刺激性試験代替法の利用に関する検討

2009年5月に ICCVAM と NICEATM は第三者科学専門家委員会を開催し、ICCVAM が提案する眼刺激試験代替法について検討が行われ、専門家委員会は下記のように報告した<sup>2)</sup>。①牛摘出角膜試験 (Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay; BCOP) 及び CM は限定された条件で眼刺激のスクリーニング試験として利用できる。②抗菌洗浄剤の眼刺激性ポテンシャルを評価するために3種の *in vitro* 試験法 (BCOP、CM 及び EpiOcular™ (EO)) を使用した試験戦略は有望と思われるが、米国環境保護局 (Environmental Protection Agency; EPA) の4段階の眼有害性区分を正確に分類するにはデータが不十分である。③ *in vivo* 眼刺激性試験における痛みや苦痛を回避及び低減するために、試験の前に局所麻酔及び全身性鎮痛剤を常に使用するべきである。

この専門家委員会の会議報告へのコメント募集が行われ、パブリックコメントと動物実験代替法毒性試験顧問会議 (SACATM) の見解と合わせて検討した上で最終試験法の推薦を作成し連邦政府機関に送られる予定である。

・第三者科学専門家委員会による rLLNA 並びに非 RI-LLNA の検討

2009年4月に開催された LLNA に関する ICCVAM の第2回第三者科学専門家委員会の会議では、非 RI の改変法の中で LLNA: DA 及び LLNA: BrdU-ELISA の2試験法はある程度の制限付きで感作性物質と非感作性物質を識別するために利用できると結論した<sup>3)</sup>。

2009年9月に NICEATM は、ICCVAM の rLLNA に関する報告書 (ICCVAM Test Method Evaluation Report (TMER)) 及び推奨される試験法 Performance standards) を公表した。報告書には①rLLNA の限界と有用性②rLLNA の実施法を含む最新 LLNA 試験法③rLLNA の有用性と限界を明らかにするための将来の研究④rLLNA 試験法の Performance standards が示されている<sup>4)</sup>。両試験法は、ICCVAM の第三者科学専門家委員会によってピアレビューされ、2009年6月に制限付で感作性、非感作性物質の識別に利用可と結論づけられた<sup>3)</sup>。

・その他の動向

急性全身毒性を評価するための細胞毒性試験の評価に関しては、2008年2月に ICCVAM と NICEATM は、急性全身毒性の *in vitro* アプローチとヒトにおけるエンドポイントに関するワークショップを JaCVAM と ECVAM も加えて開催した<sup>5)</sup>。急性全身毒性で鍵となる *in vivo* の知見やメカニズムに基づく *in vitro* 試験システムについて検討された。なお、ワークショップ報告書が2009年3月にまとめられた<sup>6)</sup>。2008年3月に NICEATM は *in vitro* 細胞毒性試験に関する評価報告書<sup>7)</sup> を公表した。本報告書では、急性経口全身毒性試験 [Up-and-Down Procedure (UDP)、Acute Toxic Class (ATC) 法] の投与開始用量を決定する際には、“証拠の重み付け” アプローチに基づいて BALB/c 3T3 細胞又は正常ヒト角化細胞 (NHK) を用いる Neutral Red 取り込み (NRU) 試験を実施するようにとの勧告が記載されている。

2009年11月、NICEATM は内分泌攪乱物質スクリーニングのための2種類の *in vitro* 試験

法について評価するための第三者科学専門家委員会に専門家と関連するデータの募集を行った。今後 *in vitro* エストロゲン受容体転写活性化試験 (LULMI-CELL<sup>®</sup>ER assay、*in vitro* stably-transfected estrogen receptor transcriptional activation assay) と *in vitro* 細胞増殖試験 (MCF-7 細胞増殖試験) が評価される<sup>8)</sup>。

2008年11月にNICEATMはICCVAM試験法評価報告書：医薬品その他の製品の発熱性を評価する5種類の*in vitro*試験のバリデーション状況を各省庁に送られ、2009年5月までに各省庁からの見解が集められている<sup>9)</sup>。

2006年11月にICCVAMとNICEATMは代替法の5ヵ年計画(2008年~2012年)を発表し、2009年6月に実行計画案(Draft Implementation Plan for the 2008-2012 NICEATM-ICCVAM Five Year Plan)が発表されている。5ヵ年計画で示されている戦略をICCVAMとNICEATMがどのように実施していくか、①優先分野における代替試験法の実施と促進、②革新的な代替試験法を将来開発する助けとなることが期待される研究プロジェクトの確認と促進、③代替試験法の受入れと適切な活用への展開、④他の組織との連携強化について示されている<sup>1)</sup>。

#### C-2-2 米国化粧品工業会の状況

PCPCのSafety Evaluation Guidelineは、化粧品の原料及び最終製品について、安全性を立証する方法としての前臨床試験及び臨床試験の使用に関するガイダンスを事業者に提供するものである。動物実験代替法を盛り込んだ改訂版Safety Evaluation Guidelines<sup>10)</sup>を2007年8月に発行しており、前臨床試験には、規制上のガイドラインに通例従う動物試験と共に、細胞、組織、器官培養を用いる*in vitro*代替法などが併記され、その手法と併せて各試験法の長所・短所等についても論述されている。

2009年9月の第3回化粧品規制協力国際会議(ICCR-3)に先立ち、PCPCと日本化粧品工業連合会(粧工連)は動物実験代替試験法の動向に関する国際状況について意見交換を行っている。

#### C-2-2 小括

本年度の代替法に関する米国の主な動向として、以下の2点があげられる。①眼刺激性試験代替法について、ICCVAMの第三者科学専

門家委員会はBCOP及びCMが制限付で眼刺激のスクリーニング試験として利用できること、3種の*in vitro*試験法(BCOP、CM及びEO)を使用した試験戦略が抗菌洗浄剤の眼刺激性ポテンシャルを評価するために有望であるが、EPAの眼有害性区分を正確に分類するにはデータが不十分であること等の報告をしている。②感作性試験代替法について、ICCVAMの第三者科学専門家委員会は従来のLLNAから動物数を削減したrLLNA並びに非RI-LLNA

(LLNA:DA及びLLNA:BrDU-ELISA)が制限付で感作性、非感作性物質の識別に利用可と結論づけた。また、NICEATMが最新LLNA試験法、rLLNA試験法のPerformance standards等を示した。

現在、ICCVAM-NICEATMの動物実験代替試験の研究、開発及びバリデーション等の5ヵ年計画が進められている。本年度に実行計画案が発表されことから、今後、米国において代替法開発と評価が進められるものと予想される。

#### C-3 その他の国際的な代替法開発の動向

##### C-3-1 OECDガイドラインの動向

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)では、国際的活動の一環として、化学物質の環境やヒトの健康に対する影響を考慮することを目的とした各種安全性試験のガイドライン化が行われている。これらTGは、検討中のものも含め、「Chemicals Testing - Guidelines (化学物質のテストガイドライン)」の「Section 4: Health Effects」に集約・公開されている<sup>1)</sup>。

2009年9月8日に新規/改定試験法ガイドラインの採択案内が公開され<sup>2)</sup>、同「Section 4: Health Effects」においては、下記の5新試験法及び6改定試験法が採択された。

##### ・新規試験法ガイドライン

- TG 436 急性吸入毒性-急性毒性等級(ATC)法
- TG 437 眼腐食性/強刺激性物質同定ウシ角膜混濁/浸透性(BCOP)試験
- TG 438 眼腐食性/強刺激性物質同定単離ニワトリ眼球(ICE)試験
- TG 441 ラットHershberger Bioassay (抗)雄性ホルモン様作用
- TG 455 化学物質エストロゲン作動活性検出ヒトエストロゲン受容体- $\alpha$ 安定トランスフェクト転写活性ア

## ツセイ

### ・改定試験法ガイドライン

- TG 403 急性吸入毒性試験
- TG 412 亜急性吸入毒性 (28 日間試験)
- TG 413 亜急性吸入毒性 (90 日間試験)
- TG 451 発癌性試験
- TG 452 慢性毒性試験
- TG 453 慢性毒性/発癌性組み合わせ試験

上記試験法のうち、新規 *in vitro* 試験法としては TG 437、TG 438 及び TG 455 の 3 法が採択された。

BCOP 及び単離ニワトリ眼球試験 (Isolated Chicken Eye Test; ICE) は、いずれも摘出眼球を用い、混濁及び透過性を指標として眼腐食性及び強刺激性を評価する代替試験法として、ICCVAM 及び ESAC にて承認されている<sup>3), 4)</sup>。しかしながら、いずれの試験法も、眼腐食性及び強度刺激性に限定された試験方法であり、化粧品原料の刺激性を評価する上で重要であると考えられる軽度刺激性の評価は行えない。ヒトエストロゲンレセプター $\alpha$  転写活性化試験は、化学物質の内分分泌攪乱作用を予測する新規 *in vitro* 試験法であり、作用のスクリーニング及び順位付けを目的とした試験法である。本試験では、ヒトエストロゲンレセプター $\alpha$  を発現するプラスミド及びエストロゲン応答配列を含むレポータープラスミド (ルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ) を HeLa-9903 細胞に導入した安定形質転換株を用いる。化学物質を細胞株に曝露した後の、レセプターの転写活性化の程度をレポーターアッセイにより比較検討し、エストロゲン様作用を予測する。

一方、5 種の新規試験法ドラフトガイドライン及び 3 種の更新/改訂試験法ガイドラインが、現在受け入れのための意見募集の段階にある。

### ・新規試験法ドラフトガイドライン

- 内分泌かく乱物質：H295R ステロイド産生アッセイ  
(意見募集締切日：2010 年 2 月 15 日)
- 感作性試験：LLNA-DA  
(意見募集締切日：2010 年 1 月 27 日)
- 感作性試験：LLNA-BrdU-ELISA  
(意見募集締切日：2010 年 1 月 27 日)
- 皮膚刺激性試験：ヒト再構築表皮組織 (RhE) 法

(意見募集締切日：2010 年 1 月 26 日)

*in vitro* 哺乳動物細胞小核試験 (MNVIT) (TG 487)

(意見募集締切日：2010 年内)

### ・更新/改訂試験法ガイドライン

- 429 感作性試験：LLNA (更新)  
(意見募集締切日：2009 年 1 月 27 日)
- 430 *in vitro* 皮膚腐食性試験 TER 法  
(意見募集締切日：2009 年 8 月 21 日)
- 431 *in vitro* 皮膚腐食性ヒト再構築表皮法  
(意見募集締切日：2009 年 8 月 21 日)

感作性試験に関しては既に LLNA 法がガイドライン化されているが (TG 429)、同試験法の更新に加えて、2 種の非 RI 法 (LLNA-DA 法、LLNA-BrdU-ELISA 法) が新たに提案された。両方法は、それぞれ、リンパ球の増殖を ATP 量及び核酸の合成量で測定する評価法である。ICCVAM では、2 種の非 RI 法が制限付きで感作性物質の識別に利用できることが結論付けられている<sup>5)</sup>。本邦においても両試験法のバリデーションならびに評価が行われており、LLNA-DA 法は行政試験法としての提案の段階であり、一方の LLNA-BrdU-ELISA 法は JaCVAM における第 3 者評価が実施されている<sup>6)</sup>。皮膚刺激性試験に関しては、現在公開されているドラフトガイドラインには、RhE を用いた 3 法 (EPISKIN<sup>TM</sup> 法、改良 EpiDerm<sup>TM</sup> 法及び SkinEthic<sup>TM</sup> RhE 法) が収載されており、性能基準の更新、データ統合の経緯と状況ならびに UN GHS 適合性などが追加検討されている。詳細は、*in vitro* 皮膚刺激性試験背景解説書<sup>7)</sup> を参照されたい。新規内分泌かく乱物質識別法である H295R ステロイド産生アッセイは、性ホルモン合成に関与する酵素を発現しているヒト副腎皮質由来 H295R 細胞を用いて、化学物質が性ホルモン合成酵素群の活性に与える影響を評価する。具体的には、酵素反応後の生成物 (ステロイド代謝物) を液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) 法で定量する。また、新たに TG 487 として検討されている哺乳動物細胞小核試験 (MNVIT) は、ヒト末梢血リンパ球、あるいはげっ歯類の株化細胞 (CHO、V79、CHL/IU、L5178Y) を用いた *in vitro* 小核試験である。細胞に化学物質を処理し、その培養細胞における小核形成を調べることにより、化学物質の潜在的がん原性をスクリーニングする。



最後に、ドラフトガイダンスに関する状況として、「急性経口毒性試験の投与開始用量の推定に用いる *in vitro* 細胞毒性試験」（意見募集締切日：2009年9月4日）<sup>9)</sup>、ならびに「急性吸入毒性参照濃度（ACUTE REFERENCE CONCENTRATION; ARFC）算出」に関するガイダンス草案（意見募集締切日：2009年10月15日）<sup>9)</sup>が、それぞれ公開された。通常、急性経口毒性ならびに急性吸入毒性の評価にはラットが用いられるが、*in vivo* の試験において予備的な *in vitro* のハザード評価によるデータが利用可能になれば、使用する動物数を大きく削減することができる。

以上のように、OECDでは安全性試験のテストガイドライン策定において、強刺激性物質の試験不要、他の試験との組合せによる開始濃度の予測、あるいは化学物質の曝露時間短縮、既知腐食性や瀕死動物の取り扱いなどに関する新規試験法や改訂試験法が検討されており、また近年の *in vitro* 試験法の採択動向からも、OECDの動物愛護に対する積極的な取り組みが伺える。

#### C-3-2 化粧品規制協力国際会議 (ICCR : International Cooperation on Cosmetics Regulations) の動向

2008年に開催された第2回化粧品規制協力国際会議 (ICCR-2) の中で設立された、4カ国のバリデーション機関 (JaCVAM、NICEATM、ECVAM、Health Canada) による ICATM の調印式が2009年4月27日にアメリカ国立衛生研究所にて開催され、4カ国の化粧品に関する規制当局代表者が動物実験代替法の国際協同合意書に署名した<sup>10)</sup>。ICATMの協力内容としては、バリデーション研究、試験法の科学的妥当性についての第三者評価、動物実験代替法における公式な試験法勧告の推奨の3項目が示されている。

2009年9月9日～11日に第3回化粧品規制協力国際会議 (ICCR-3) が東京で開催された<sup>11)</sup>。この会議の目的は、国際貿易への障壁を最小化しつつ、世界的に最高レベルでの消費者保護を維持することであり、それぞれの地域の化粧品業界団体と対話しつつ、化粧品関連の問題について議論することである。会議の中では昨年に引き続き動物実験代替法に関する議論もなされた。規制当局は ICATM から日米欧各国の化粧品に関する代替法の問題点や進捗状況について報告を受け、確認した。また、規制当局は ICATM の活動への協力、調

整、支援を継続することを合意した。次回、第4回化粧品規制協力国際会議 (ICCR-4) は2010年にカナダで開催される予定である。

#### C-3-3 小括

OECDの安全性試験ガイドラインにおける新規 *in vitro* 試験法としては TG 437 (眼腐食性/強刺激性物質同定 BCOP 試験)、TG 438 (眼腐食性/強刺激性物質同定 ICE 試験) 及び TG 455 (エストロゲン様活性試験) の3法が採択された。BCOP 及び ICE は眼腐食性及び強刺激性を評価する試験法であるため、化粧品原料の刺激性を評価する上で重要であると考えられる軽度刺激性の評価は行えないという問題点もある。

一方、ICCRのトピックスとしては、昨年の ICCR の中で設立された ICATM の調印式が4極代表者によって取り交わされたことである。このことにより、今後代替試験法の開発に関する国際協力や法的な受け入れが加速することが期待される。

#### C-4 日本における代替法開発の動向

##### C-4-1 厚生労働科学研究班の活動

2007年に開始された厚生労働科学研究班研究「動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究」（予定期間3ヵ年）が進行中である。本研究では、『①動物実験代替法をめぐる国際情報を調査する。②動物実験代替法が十分に開発されていないにも係わらず、2009年の禁止対象となっている試験法のうち、眼刺激性試験、皮膚刺激性試験、感作性試験代替法の開発を検討する。③皮膚刺激性試験、感作性試験代替法のバリデーション・評価及びそれらの統計解析手法の研究を行う。④必要ならば、皮膚接触皮膚炎検出の立場から現在のヒト臨床試験を見直す。⑤この研究期間に実施されているもしくは新たに実施されるバリデーション研究において、そのバリデーション研究を意識した検討を行い、具体的な解決策を探る。また、統計手法の検討は、実データに基づいた理論的な検討やコンピューターシミュレーションを行う。⑥国際協調として、海外で予定されているバリデーション、評価に参加する、情報を提供する、専門家を推薦するなど協力する。⑦研究班/評価会議/評価委員会という代替法評価体制を更に強化し、代替法を組み込み、動物実験を行わない場合における皮膚毒性の安全性評価手順を固める。即ち、開発



された代替法について OECD 基準を考慮し、新規安全性試験法を一次評価する。妥当な方法について多施設バリデーションがかけられている場合には、それを実施する。これらの結果を総合的に判断し、当該試験法の有効性と限界を明らかにし、化粧品や医薬部外品、医薬品等のスクリーニング法として、或いは行政が受け入れる試験法としての妥当性を評価すると共に、動物実験を用いない場合における総合的な安全性評価の手順・手段について検討する。』ことを研究の方針としている。

本研究は、6名の分担研究者が分担して研究実施されている。テーマは、①研究の総括、代替法の評価とバリデーション及び皮膚刺激性、感作性試験の開発、②感作性試験代替法の開発、③ヒト接触皮膚炎評価の見直し、④代替法に関する国際情勢の調査、⑤分子生物学的・組織化学的手法を用いた眼刺激性試験・眼毒性試験代替法の開発、⑥バリデーションデータの統計解析である。

2009年では、①研究の総括、代替法の評価とバリデーション及び皮膚刺激性、感作性試験の開発において、「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会（あり方検討会）」が3回開催された。委員会では、皮膚一次刺激性、眼刺激性、皮膚感作性、皮膚透過性、光毒性及び遺伝毒性の各分科会から提出された動物実験代替法の利用等を含めた医薬部外品申請の安全性に関する資料のあり方についての分科会報告書について討議した。具体的には、皮膚刺激性分科会では EPISKIN™ を中心に検討された。また、眼刺激性試験分科会では、BCOP 及び ICE の利用について検討した。感作性試験分科会では、局所リンパ節試験 (LLNA) について、光関連毒性分科会では、3T3 NRU Phototoxicity test の利用について、皮膚透過性分科会では、*in vitro* 試験法について検討した。また、遺伝毒性分科会では、*in vivo* 試験法の有無について検討した。最終的には、代替法が一部活用できるとされたものは、皮膚刺激性試験、感作性試験、光毒性試験であった。これらの内容は、JaCVAM の小島室長より、9月に WC7 (イタリア)、11月に第17回国際接触皮膚炎シンポジウム (京都) 等で報告された後、あり方検討会の総括報告として、「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会報告」が12月に東京で開催された。ここでの質疑応答を含め、会議の内容は、JaCVAM のホームページに掲載され

た。これらの活動内容を報告書にまとめ、本研究班でのあり方検討会の作業は終了となる。なお、本検討会及び各分科会には、皮膚科医、国衛研、動物実験代替法学会の代表のほか、粧工連として安全性部会及び動物実験代替専門委員会の委員が参画した。②感作性試験代替法の開発では、ヒト単球由来細胞株を用いた試験法である h-CLAT に関して、最終年度となることから、多施設での実施した個別テーマの共同研究結果について論文投稿された<sup>1-3)</sup>。また現在までの7社による共同研究結果について、2010年1月、東京で、第3回 JaCVAM ワークショップとして公表した<sup>4)</sup>。本研究については報告書を作成し終了する。その後は JaCVAM、ECVAM 共同の国際プレバリデーションで検討される。その他、各テーマについて2009年の活動をまとめる予定である。

#### C-4-2 JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) の活動

2009年の JaCVAM の活動の状況を以下に記載する。JaCVAM における新規試験法評価のシステムが定着した。

JaCVAM では、2008年度から代替試験法の日本での受け入れに関する試験法評価システムが稼動している。これは、国際的に受け入れが検討されている試験法や、JaCVAM に提案された代替法を、論文やデータをもとに日本における受け入れを科学的に評価することを目的として、分科会形式で評価委員会が設定されており、各評価委員会には、専門の研究者、生物統計学者、皮膚科医及び粧工連代表の他、日本製薬工業協会や日本化学工業協会の代表が参加している。これらの会議からの情報を共有化し、業界としての意見を取りまとめるため、粧工連においては安全性部会及び動物実験代替専門委員会の関係会社から皮膚一次刺激性、眼刺激性、皮膚感作性及び単回毒性の専門家を公募し、2009年度より各分野のタスクフォースを設置し活動が開始されている。

JaCVAM における国内の試験法評価では、6回の評価会議計画があり、新規試験法の評価が実施され、以下の議論がなされた。皮膚感作性試験代替法では、「LLNA-BrdU 法」について、第三者評価を実施した。その中で、結果のばらつきやプロトコールの問題点が指摘され、それらについて提案者からの意見を聴いた後で決定することとなった。光毒性試験代替法では、「酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法」に関して、バリデーション

最終報告書の第三者評価が終了し、評価会議で議論されたが、最終確定プロトコルでの検証が必要と判断されている。また、眼刺激性試験代替法について、BCOP、ICE について第三者評価が終了し、腐食性・強い眼刺激性を識別する試験法として有用であると報告される予定である。皮膚刺激性試験代替法では、2007年 ESAC で認証された3次元ヒト皮膚モデルである「EPISKIN<sup>®</sup>を用いた皮膚刺激試験法」<sup>5)</sup>について、ESAC の文書の翻訳及び内容の第三者評価が終了し、報告書が評価会議に提出され、本試験法が R38 表示による化学物質の分類を予測する *in vitro* 試験として有用な方法であると報告される予定である。また、日本で開発され、厚生労働科学研究班からの依頼で実施された日本製培養皮膚モデル「LabCyte EPI-MODEL24」を用いた皮膚刺激性試験代替法について、第三者評価を実施し、報告書を提出した。これについては、日本の培養表皮モデルとして OECD テストガイドラインへの掲載を目指して第三者評価を実施し、英文翻訳後、OECD へ提出した。これらの評価会議への提出は次年度に実施予定である。また本試験法の OECD 評価会議に大阪大学の寒水准教授を評価委員として推薦した。その他にも、OECD のから提出されているドラフトガイドライン「OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS : *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Method」<sup>6)</sup> の案について、日本としての意見を提出した。本ガイドラインの2010年3月の承認を目指して OECD では、議論が継続している。

国際的な活動では、ICCR と ICATM への関与が挙げられる。国際的なバリデーション研究では、コメットアッセイ、LUMI-CELL Estrogen Receptor Assay、STTA assay、Bhras 細胞を用いた Transformation Assay について、バリデーション実施及びその評価が継続している。また、感作性試験代替法として、新たに h-CLAT の ECVAM との共同プレバリデーションが開始された。

#### C-4-3 日本動物実験代替法学会の動向

日本動物実験代替法学会の第22回学術大会は、大阪大学の黒澤准教授が大会長で2009年11月13～15日に大阪で開催された。大会は、special international session と4つのシンポジウム（新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）プロジェクトによる化学物

質の短期 *in vitro* 試験法の開発、ES、iPS 細胞を使用した代替法研究、医薬品開発と3Rs、実験動物協会からみた動物実験代替法）、一般口演8題、ポスター43題であった。その中には、厚生労働科学研究班から委託された試験として日本製培養皮膚モデル「LabCyte EPI-MODEL24」を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション結果のまとめ<sup>7)</sup>の報告や眼刺激性試験代替法としてウサギ角膜由来の SIRC 細胞を用いた「Short Time Exposure (STE) 試験」のバリデーション最終報告が提出され、学会で発表された<sup>8)</sup>。また発生毒性試験の代替法として、未分化な ES 細胞が種々の組織へと分化する過程に着目した Embryonic Stem Cell Test (EST) に関する多数発表された。

その他にも国際交流委員会によるアジアの関連学会とのネットワーク維持、今後の関係強化に向けた国際協調の推進として、日中韓国際ナショナルシンポジウムが学会期間中に開催された。

#### C-4-4 その他の国内動向

その他の国内動向では、ヒューマンサイエンス振興財団（HS 財団）の動物実験施設認証センターによる厚生労働省の所管する動物実験実施機関における動物実験等の実施に関し、科学的観点に基づく適正な動物実験等が実施されているかの外部評価・検証事業が本格稼動した。2009年5月の段階で web-site 上に5施設の認証が掲載されている<sup>9)</sup>。

#### C-4-5 小括

本年度における代替法の開発・評価において特筆すべきことは、JaCVAM の厚生労働科学研究班における「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会」の総括報告と ICATM の発足による代替法開発の国際協調の強化、代替法開発の進展、さらに HS 財団の動物実験施設認証センターの本格稼動が挙げられる。

JaCVAM では、国際動向への対応、試験法の評価とその活用に向けた作業の強化が求められ、国内外の学会、業界、関係各機関の一層の協力による試験法評価とその活用に向けた活動が本格化した。「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会」では、動物実験代替法の利用等を含め、医薬部外品申請の安全性に関する資料のあり方について具体的な議論が展開され、

現状における結果のまとめが公表された。

HS 財団の動物実験実施施設認証センターの本格稼働は、日本の改正動物愛護管理法の趣旨を生かし、補完する点で大きな意義がある。

#### C-5 化粧品安全性評価に関連する代替法の状況

各安全性試験代替法の現状については、粧工連 技術委員会 動物実験代替専門委員会が毎年、広範に調査している。本年度も情報の更新を行った。以下にその調査結果を記述する。

##### C-5-1 単回投与毒性

###### ①概要

単回投与毒性試験とは、医薬品、農薬、一般化学物質、生物学的物質もしくはそれらを使用した製剤などの被験物質を単回投与し、その毒性を量的及び質的に明らかにする試験法である。殊に、ヒトが被験物質を誤飲・誤食した際に引き起こされる全身毒性については経口投与により毒性ポテンシャルの評価が行われ、医薬品、農薬、一般化学物質などにおいてそれぞれの公定法が定められている。

OECD テストガイドラインでは、経口投与毒性、吸入毒性及び経皮毒性の試験法が公開されている。経口投与毒性に関しては、急性経口毒性・固定用量法 (TG 420)、急性経口毒性・クラス法 (TG 423) 及び Up-and-Down 法 (TG 425) の推奨される 3 試験法があり、これらの試験法は旧試験法の急性経口毒性試験 (TG 401) の代替法として採択された。一方、経口摂取以外の曝露経路を想定した全身毒性予測試験法としては、急性経皮毒性 (TG 402) 及び急性吸入毒性 (TG 403) の 2 試験法が TG に記載されており、TG 403 に関しては本年 (2009 年 9 月 7 日) に改訂テストガイドラインが採択された。また、経口毒性試験と同様に急性吸入毒性・クラス法 (TG 436) が本年 (2009 年 9 月 7 日) に新規採択され、急性吸入毒性・固定用量法 (TG 403) がドラフト化されている。詳細は Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) のホームページを参照されたい<sup>9)</sup>。

しかしながら、上記の試験法はいずれもげっ歯類等を用いた試験法である。そのため、*in vivo* 試験を完全に代替 (Replacement) する *in vitro* 試験法の早急な開発が望まれている。

###### ②状況

欧州では経口急性毒性を予測する細胞ベースの試験法が検討されている。Multicenter Evaluation of *In vitro* Cytotoxicity (MEIC) プログラム<sup>2)</sup>及び ZEBET<sup>3)</sup>における検討を先駆けとして、急性毒性を予測するための *in vitro* 細胞試験の最も良い組合せについて検討が継続されてきた。それに伴い、代謝、トキシコカインेटイクスや臓器特異的毒性などの薬物体内動態に関連する試験法との組み合わせの重要性が指摘され、予測精度を向上させる試みがなされている<sup>4), 5)</sup>。2005 年 1 月 1 日より 2010 年までの 5 ヶ年を期限として発足した A-Cute-Tox Project<sup>6), 7)</sup>では、*in vivo* における全身急性毒性を完全に予測するための *in vitro* 試験ストラテジーの開発が推進されている。本プロジェクトでは、作業テーマ別に設定された 9 つの Work package (WP) から成る 11 のグループが連携しながら作業を進めている。各 WP からは、97 種に及ぶ参照物質の急性毒性に関する *in vivo* (動物及びヒト)、*in vitro* データを含む高品質なデータベースの開発や商業利用可能なスクリーニングロボット基盤に適合できる細胞モデルの獲得に加え<sup>8)</sup>、各種臓器由来細胞 (HepG2; rat primary hepatocytes with non-metabolising cells, SH-SY5Y; human neuroblastoma) を用いた代謝試験や臓器特異的毒性試験結果の組み合わせによる予測精度向上に関する報告がなされた<sup>9)</sup>。2010 年現在、各 WP の検討は終了し、再現性、信頼性及び GHS/EU カテゴリーとの一致性の観点から、多変量 CART 解析にて最良の予測結果が得られる各試験の選定が行われた。その結果、①BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた NRU 法 (WP 2)、②ヒト血液を用いた各種サイトカイン放出試験 (WP 4)、③白血球系前駆細胞 (CBC/CFU-GM) を用いた細胞分化試験 (WP 4)、④ラット初代脳培養組織を用いた各種遺伝子発現試験 (WP 7.1)、⑤ラット初代脳培養組織を用いた mRNA 生合成試験 (WP 7.1)、⑥各種臓器由来細胞を用いた細胞内過酸化物質試験 (WP 4)、⑦各種臓器由来細胞を用いた細胞内カルシウム量測定 (WP 4)、⑧ラット初代培養肝細胞を用いた MTT 試験 (WP 6)、⑨開始容量を予測するための薬物動態関連パラメータ評価 (WP 5)、⑩神経回路網を用いた化合物の血液脳関門透過予測 (WP 5)、の 10 試験法が候補として選択された<sup>10)</sup>。これらの試験法について、2010 年 1 月から 5 月にかけて 33 種類の化学物質を

用いたプレバリデーションが実施され、最終予測モデルが提案される見通しである。

また、ECVAMでは、ToxRTool (Toxicological data Reliability Assessment Tool)が公開された<sup>11)</sup>。REACHでは、試験データの信頼性の評価に Klimisch コードと呼ばれる危険有害性データの信頼性評価指標を用いることを推奨しており、ToxRToolでは化学物質の有害性評価を実施した際の採用した試験法及び試験環境などの情報から Klimisch コードに基づくカテゴリーが得られる<sup>12)</sup>。信頼性の高いものから順に1~4のカテゴリーがあり、“証拠の重み付け”の基準の一つとして用いられる。*In vitro*評価法が確立されていない単回投与毒性評価に関しては、使用動物数の削減の観点から、こうしたツールの開示や活用が特に重要であると考えられる。

米国では、2002年よりNICEATMとECVAMの共同によって、*in vivo*急性経口全身毒性試験の試験開始用量を設定するための*in vitro*細胞毒性試験に関するバリデーション研究<sup>13)</sup>が実施された。このプロジェクトでは、ICCVAMによって推奨された2つの*in vitro*細胞毒性試験(BALB/c 3T3マウス線維芽細胞(3T3)NRU法及び正常ヒト表皮ケラチノサイト(NHK)NRU法)を対象として72種の参照化学物質が評価された<sup>14)-16)</sup>。その後、本バリデーション研究の結果を報告するバックグラウンドレビュー文書(BRD)<sup>17)</sup>及びICCVAMによる試験法評価報告書<sup>18)</sup>が2006年11月に最終化された。BRDには、両試験法の精度及び信頼性(再現性)、また、これらの*in vitro*試験データを用いて*in vivo*試験の開始用量を設定することによって削減される動物数あるいは死亡動物数に関するコンピューターシミュレーションによる評価結果等が報告されている。一方、ICCVAMによる試験法評価報告書では、「これら2種の細胞毒性試験は法規制におけるハザード分類という目的には精度は十分ではないが、現在の急性毒性プロトコール[即ち、UDP法、ATC法]の開始用量を設定するために使用することができる」と勧告した。その後2008年2月に、NICEATM及びICCVAMは、急性全身毒性の*in vitro*アプローチとヒトにおけるエンドポイントに関するワークショップを、JaCVAM及びECVAMを加えて開催した。また、2008年3月には、NICEATMが急性経口全身毒性試験の投与開始用量の推定に用いる*in vitro*細胞毒性試験に関する評価報告書を公表した<sup>19)</sup>。本報告書では、急性経口全

身毒性試験の投与開始用量決定に際して、“証拠の重み付け”アプローチに基づいて上記2種の*in vitro*細胞毒性試験を用いるようにとの勧告が記載されている。また、これらの経緯は、2009年3月に公開されたEPAによる「毒性試験及び危険性評価の将来戦略」においても触れられている<sup>20)</sup>。

OECDにおける単回投与毒性に関する*in vitro*試験法の状況としては、「急性経口毒性試験の投与開始用量の推定に用いる*in vitro*細胞毒性試験」<sup>21)</sup>、ならびに「ARFC算出」に関するガイダンス草案<sup>22)</sup>がそれぞれ公開され、意見募集の段階である。通常、急性経口毒性ならびに急性吸入毒性の評価にはラットが用いられるが、*in vivo*の試験において*in vitro*あるいは*in silico*のハザード評価によるデータが利用可能になれば、使用する動物数を大きく削減できる。

以上のように、単回投与毒性試験の代替法に係る動向は、1)従来の*in vivo*試験を改良して使用動物数を削減(Reduction)あるいは苦痛の軽減(Refinement)を図る試み、2)単独で代替(Replacement)できる*in vitro*新規試験法開発への積極的な取り組み、3)動物試験を減らすための既存データの複合的な利用や*in vitro*試験データの活用法の検討、の大きく3つに集約される。その傍ら、国際的な判断基準の相違も懸念されている。例えば、本邦では2002年12月17日以降に実施された単回投与毒性試験の判断基準は全て最小致死量(LDL<sub>0</sub>)で示すことが義務付けられている一方で<sup>23)</sup>、米国におけるCTFA安全性評価ガイドラインでは半致死量(LD<sub>50</sub>)を、予測又は範囲予測のいずれかに用いることが示されている<sup>24)</sup>。つまり、*in vitro*代替試験法を開発していく上で、参照すべき基準が異なることは今後大きな障害になりうる可能性もあり、国際的な判断基準のハーモナイゼーションが一層望まれる。

## C-5-2 皮膚毒性

### ①概要

化粧品等の化学物質が皮膚に接触することによる皮膚炎(皮膚刺激性)やそれに紫外線が関与したときにおこる皮膚炎(光毒性)などに対して安全性を確保するための評価が必要である。従来から、ヒトに対する危害予測のため、動物の皮膚が用いられている。現在使用されている皮膚一次刺激性試験及び皮膚腐食性試験の国際的なガイドラインは、

Draize らの方法を基礎としている。このガイドラインでは、動物としてウサギが推奨されているが、その他の動物種（モルモット、ミニブタ）等も利用されている。ウサギは mild から moderate な刺激物に対してヒトより感度が高いと考えられているが、その一方、動物結果とヒトでの結果が一致していないという報告もある<sup>1),2)</sup>。これに加え、動物愛護や倫理的観点から、動物実験の代替法の評価開発が進められている。これらの代替法開発は ECVAM を中心に展開されている。ECVAM における動物試験の代替法開発に対する基本的な考え方は、構造活性相関、*in vitro* 試験法とヒトパッチテストを基に評価スキームを構築することにある<sup>3)</sup>。

現在の *in vitro* 皮膚刺激性試験法開発の取り組みは、皮膚腐食性、皮膚一次刺激性のポテンシャルが評価できる代替法開発にとどまっている。現在までに、皮膚腐食性試験法として「*In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)」(Original Guideline, adopted 13th April 2004)、「*In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test」(Original Guideline, adopted 13th April 2004)の2種、光毒性試験法として「*In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test」(Original Guideline, adopted 13th April 2004)が化学物質の *in vitro* 試験法として OECD ガイドラインに採用されている。

## ②皮膚刺激性の代替試験法

試験法としては、三次元ヒト皮膚モデルを用いた方法やマウスの摘出皮膚を用いた器官培養法などが挙げられる。ECVAM は三次元ヒト皮膚モデルを中心にバリデーション研究を推進し、結果が良好であった EPISKIN、EpiDerm について代替法としての有用と判断したが、2007年4月のESACによるStatementにおいて、皮膚刺激性の表示(irritant:R38、non-irritant: no-label)の目的で使用されるウサギを用いたドレイズ法の代替法として「EPISKIN™ 皮膚刺激試験法」のみが承認され、EpiDerm については、プロトコルの改善が要求された<sup>4)</sup>。EPISKIN による試験法は、MTT assay と IL-1 $\alpha$  の放出量を組み合わせて評価している。この Statement に対し、同年12月にSCCPが「皮膚刺激性試験の *in vitro* 試験メモランダム」を提出した<sup>5)</sup>。この中でSCCPは代替法として必要性が高く、歓迎する一方で、色素や染毛剤の評価においては MTT 比色法に影響を与える可能性を指摘し、また、試

験対象品にポジティブリスト原料（防腐剤、紫外線吸収剤等）が少なかったことから、化粧品原料に関しては更なる研究が必要と述べている。

EpiDerm に関してはその後、被験物質の曝露時間を15分から60分に変更するなどプロトコルの改善が実施され、2008年11月4-5日に開催された欧州委員会第29回会議で「EpiDerm SIT」として他の三次元ヒト皮膚モデルである「SkinEthic RhE assay」とともに、ESAC により皮膚刺激性の予知として十分に精度と信頼性がある方法であると承認された<sup>6)</sup>。「EpiDerm SIT」は、MTT assay のみで評価する試験法であり、前回のバリデーション結果を補完したことで承認された。

「SkinEthic RhE assay」は、EPISKIN の評価のキャッチアップバリデーションとして評価され、承認された。

一方、2008年にESACより提案された *In Vitro* 皮膚刺激性試験ドラフトテストガイドラインについて、OECD では、2009年には、「OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS :*In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method」<sup>7)</sup>として検討している。これはESACにおいて実施されたEPISKINの化学物質の皮膚刺激に関するEUのリスクフレーズR38への適用研究を、化学物質の皮膚刺激性のGHS分類識別適応へと展開したもので、4度の修正案を経て、現在、OECD 専門家会議において最終審議中である。

国内ではこれまでに EpiDerm、TESTSKIN、Vitrolife-Skin などの「市販キットである三次元皮膚モデルを用いる皮膚刺激性代替法」のバリデーションが実施されてきた。

2009年には動物実験代替法学会バリデーション委員会から、国内で販売されているヒト三次元培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた多施設バリデーション結果が提出された。このバリデーションは EPISKIN と同様の検討及び検証を行うことを目的とし、EPISKIN プロトコルに従い評価された。なお、LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験法について JaCVAM 第三者評価委員会より報告書が提出された。この皮膚モデルを日本開発の皮膚モデルとして、OECD でガイドラン化が検討されている「*In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method」への収載を目指して、2009年9月に開催された OECD 専門

家会議において、このバリデーション結果が JaCVAM の小島室長より報告され、12 月には OECD へ評価関連書面が提出された。また、このバリデーション結果は 2009 年 11 月に開催された第 22 回日本動物実験代替法学会においても報告された<sup>8)</sup>。また、LabCyte EPI-MODEL24 を用いた関連論文も提出されている<sup>9)</sup>。現在、JaCVAM の評価会議で日本での受け入れについて審議中である。

また、ESAC から提案された EPISKIN の受け入れについては、JaCVAM 評価会議において最終受け入れ審議中である。

### ③光毒性の代替試験法

試験法としては紫外線光照射下において被験物質を各種の生体細胞や人工皮膚モデル、又は化学物質と接触させることにより生じる細胞の生存率の変化又は化学物質の光変性を指標とする *in vitro* 試験がある。これらの中で、光毒性物質のスクリーニング法として、Balb/c 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド取り込み法が EU の ECVAM で承認され、EU の危険物指令の Annex V に取り入れられており、化学物質のクラス分けに利用されている。また、この方法に修正を加えた方法が、OECD でも化学物質光毒性試験法ガイドライン「*In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test」(Original Guideline, adopted 13th April 2004) として受け入れられている。これらについて、日本でも、審議され報告書が提出され検証済みである。その他、ECVAM でバリデーションが実施されている試験法として、三次元ヒト皮膚モデルを用いた試験法、赤血球を用いた方法等が報告されている<sup>10)</sup>。また、日本では、異なった指標による試験法を組み合わせた評価法として酵母光生育阻害試験法と赤血球を用いた光溶血性試験法のバッテリー試験法<sup>11)-13)</sup>について厚生労働科学研究班研究としてバリデーションが実施され、その後、追加実験を経て、JaCVAM へ報告書が提出された。これについて第三者評価が実施され、評価会議へ報告書が提出された。評価会議においてこれらの報告内容について吟味した結果、追加情報として、最終 SOP での検証が必要と結論されている。

三次元皮膚モデルを用いた代替法では、EPISKIN を用いた方法については論文掲載されており<sup>14)</sup>、現在 ECVAM において評価継続中である。

## C-5-3 眼刺激性

### ①概要

眼刺激性は、被験物質を眼に直接接触させることにより生じる結膜の発赤・浮腫・分泌物、虹彩の変化及び角膜の混濁度を指標とする刺激反応である。眼刺激性試験はヒトが眼に単回適用、あるいは誤って入れた場合に生じるこれらの反応を予測するために実施される。今日まで、眼刺激性試験としては、成熟白ウサギを用い、0.1g 又は 0.1mL の被験物質をその結膜嚢内に投与し、Draize 採点法によりその刺激性を判定し、Kay ら<sup>1)</sup>の基準で評価する方法が用いられてきた。

眼刺激性試験代替法には、受精鶏卵、各種生体細胞及び人工組織モデル系に被験物質を適用し、その結果生じる組織変化や細胞の生存率を指標とする *in vitro* 試験がある。これら試験法のうち、2009 年 9 月に腐食性及び強度眼刺激性物質を検出するための眼刺激性試験の代替法である BCOP 及び ICE はそれぞれ TG 437 及び 438 としてガイドライン化された<sup>2, 3)</sup>。

### ②眼刺激性試験代替法の状況

2009 年 9 月に腐食性及び強度眼刺激性物質を検出するための眼刺激性試験代替法である BCOP 及び ICE はそれぞれ TG 437 及び 438 としてガイドライン化された<sup>2, 3)</sup>。

米国、欧州及び日本における眼刺激性試験代替法の受け入れ状況は以下のとおりである。

米国及び欧州では、眼腐食性及び強度眼刺激性評価法として、ICCVAM 及び ESAC が BCOP と ICE を承認しているが、弱い眼刺激性の評価も含めた眼刺激性試験代替の公的な受け入れには至らなかった<sup>4)</sup>。

米国では、2008 年より動物実験代替試験の研究、開発及びバリデーション等の 5 カ年計画を実施しているが、これに基づき、2009 年 5 月に第三者科学専門家委員会において ICCVAM が提案する眼刺激性試験法について検討が行われた。その結果、BCOP 及び CM は限定された条件で眼刺激性のスクリーニング試験として利用できること、抗菌洗浄剤の眼刺激性ポテンシャルを評価するために *in vitro* 試験法である BCOP、CM 及び EpiOcular<sup>TM</sup> は有望であるが、EPA の 4 段階の眼有害性区分を正確に分類するためにはデータが不十分であること、*in vivo* 眼刺激性試験においては苦痛を回避・低減するために、局所麻酔や全身性鎮痛剤を常に使用するべきであると報告されている<sup>5)</sup>。

欧州では、SCCPが、化粧品成分の安全性確認のため実施する毒性試験について、ガイドラインを策定している。その中で、眼刺激性試験は、従来のDraize *in vivo* 眼刺激性試験<sup>6)</sup>の代わりになるような代替法は存在しないが、BCOPが中性の有機化学物質に関して適当とされた<sup>7)</sup>。RBC-haemolysis (RBC) test及びNeutral Red Uptake (NRU) assayは界面活性剤の評価に有用であるとした。

Hen's Egg Test -Chorio allantoic Membrane (HET-CAM)<sup>8)</sup>は、化粧品最終製品のスクリーニング試験にしばしば使用される有効な代替法であり、正式なバリデーションは行われていないが、フランスなどでは法律でも取り上げられている。

ESACは腐食性及び強刺激性物質の検出する眼刺激性試験代替法としてBCOPとICEを承認した。BCOP又はICEを実施し、いずれかで陽性結果が得られた場合には、その化学物質を強度眼刺激性(R41)に区分することを受け入れている<sup>4)</sup>。

2009年7月にESACは水溶性物質(及びこれらの混合物)の眼腐食性と強刺激性並びに水溶性の界面活性剤(及びこれらの混合物)の無刺激性を確認するための試験法としてCMを、水溶性物質(及びこれらの混合物)の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法としてFLを承認した<sup>9)</sup>。また、3次元培養モデル(SkinEthic<sup>TM</sup> Human Corneal Epithelial Model, EpiOcular<sup>TM</sup> OCL-200 Model)のバリデーションが実施されている。

ESACのステートメントにおいては、一般に単独の*in vitro*眼刺激性試験ですべての眼刺激性分類を行うことはできないが、いくつかの試験法の組み合わせによる段階的方法(Tiered approach)によりDraize試験を代替することができるかもしれないことも示された。その段階的方法に関する枠組みとしてはECVAMワークショップで議論され、強刺激性から検出するトップダウンアプローチ又は無刺激の同定から始めるボトムアップアプローチ、これらによって刺激性の全体を明らかにしようとするものである<sup>10)</sup>。

日本では、2008年度に日本代替法検証センター(JaCVAM)の第三者評価会議(眼刺激性試験代替法評価委員会)においてBCOP及びICEの第三者評価がおこなわれ、2009年9月に報告書が提出されている<sup>11), 12)</sup>。報告書では、BCOPとICEはわが国のGlobally Harmonized System of Classification and Labelling of

Chemicals (GHS)に準拠する化学物質に関わる法規制において、腐食性・強刺激性物質を評価できるとの考えが示された。2009年度には、第三者評価会議は細胞毒性試験及び3次元培養真皮モデルを用いる試験に関する評価を実施している<sup>13)</sup>。

2007年度から実施されてきた厚生労働科学研究(H19-医薬-一般-003)「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会」が2009年度末に終了する。このことを受けて、検討会で組織された眼刺激性分科会は、2009年12月に、眼腐食性・強刺激性物質の評価法と位置づけられているBCOP及びICEの医薬部外品申請における眼刺激性試験代替法としての受入れについて、無刺激・低刺激性物質を評価可能であることを検討する必要と考えられること等を報告した<sup>14)</sup>。また、厚生科学研究などの報告に基づく検討等から、医薬部外品に用いられる眼刺激性試験法としては、Draize試験法の評価点MAS(最大平均評価点)として15点を境界線として弱刺激を判断する考え方も示されている<sup>14)</sup>。

2009年に日本動物実験代替法学会で実施された単層培養細胞に直接被験物質を短時間接触させることにより眼刺激性を評価する代替法であるSTE法(Short time exposure)のバリデーションが終了した<sup>13)</sup>。

③米国、欧州及び日本の化粧品工業会における眼刺激性試験代替法の動向

COLIPAにおいては2007年の組織改正でSCAATとPC Researchが合流してできた新しいPC Research内に、眼刺激性のタスクフォースも含まれている。その分科会では、1)生理的な機能と*in vitro*試験での角膜から遊離される損傷のシグナルにおける変化のキネティクスが、回復性も含めた眼刺激を予測できるか、2)ヒトの不死化細胞や3次元ヒト角膜・結膜を用いた場合の損傷の度合と回復性に関する指標の同定、3)ゲノミクスプロジェクトの眼刺激性における検討を実施している<sup>15)</sup>。

日本では、代替法のバリデーションとして、1990年、厚生省(当時)が新規原料配合化粧品の安全性評価のための研究を発足、その後、産官学が参加して眼刺激性試験の*in vitro*試験に関する評価が行われた<sup>16)-25)</sup>。1999年、厚生科学研究班は培養細胞を用いる試験に関



する指針案を公表している。

2008年度からのJaCVAMの第三者評価会議（眼刺激性試験代替法評価委員会）における各種試験法の第三者評価の活動や2007年度から実施されてきた厚生労働科学研究「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会」の活動についても粧工連から委員として参加協力している。

#### C-5-4 皮膚アレルギー性

##### ①概要

2009年度に、OECDのガイドライン化に向けて、ドラフトガイドラインが作成された感作性試験の代替試験法としては、1)非RI-LLNA<sup>1)</sup>、2) rLLNA<sup>3)</sup>が挙げられる。また公的機関でのプレバリデーションが進められた代替試験法としては、3) DPRA<sup>4)</sup>、4) h-CLAT<sup>5)・6)</sup>、5) MUSST<sup>7)</sup>が挙げられる。

また、「NEDOプロジェクトによる化学物質の短期 *in vitro* 試験法の開発」の1つとして、ヒト細胞を用いたレポータージーンアッセイ系による免疫毒性試験の開発が進められている<sup>8)</sup>。

##### ②各試験法の状況

放射性 LLNA<sup>9)</sup>は、マウス *in vivo* 試験であり、いわゆる Reduction 及び Refinement を意図した代替法と位置づけられる。この LLNA は、放射性物質の <sup>3</sup>H-thymidine を用いて細胞の増殖性を測定するためのラジオアイソトープの施設を必要とする試験法であることから、より簡便な非放射性 LLNA (LLNA-DA 法<sup>1)</sup> 及び LLNA-BrdU 法<sup>2)</sup>)の開発が進められている。LLNA-DA 法は、被験物質投与における改良に加え <sup>3</sup>H-thymidine の代わりに ATP 量でリンパ節細胞の増殖性を測定する方法であり、日本では、JaCVAM 評価委員会において承認され<sup>10)</sup>、2008年11月に行政当局への提案が行われた<sup>11)</sup>。一方、LLNA-BrdU 法は、<sup>3</sup>H-thymidine の代わりに BrdU を用いてリンパ節細胞の増殖を測定する方法であり、現在(2010年1月)、JaCVAM の専門家による第三者評価が行われている<sup>11)</sup>。両試験法は、ICCVAM の第三者科学専門家委員会によってピアレビューされ、2009年6月に制限付で感作性、非感作性物質の識別に利用可と結論づけられた<sup>12)</sup>。また、2009年12月にOECDからテストガイドライン(最終案)が提出され、ガイドライン化に向けた作業(意見募集締切日:2010年1月27日)が行われている<sup>13)</sup>。従来の LLNA で使用

動物数が削減された rLLNA は、ICCVAM において2009年に承認され<sup>14)</sup>、LLNA の試験法のプロトコルと実施基準が2009年9月にアップデートされた<sup>14)</sup>。また、OECD から rLLNA を含めたテストガイドライン429のアップデート(最終案)が2009年12月に提出され、ガイドライン化に向けた作業(意見募集締切日:2010年1月27日)が行われている<sup>13)</sup>。

ECVAM においてプレバリデーションが開始された *in vitro* 試験法としては DPRA、MUSST 及び h-CLAT がある。DPRA<sup>4)</sup>は、P&G が開発した試験法で、システインあるいはリジンを含む合成ペプチドと化学物質をインキュベーションした後のペプチドの残存量(化合物とペプチドが反応すれば、ペプチドは減る)を指標とする。h-CLAT は、ヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞を用いる試験法で、化学物質曝露時の細胞表面の CD86 と CD54 の発現量変化をフローサイトメトリーで評価する試験法である。h-CLAT<sup>5)・6)</sup>は、日本の花王株式会社と株式会社資生堂により開発された試験法である。試験法の有用性を確認するために、100個の化合物に関して評価した結果、LLNA の結果との一致率は84%であることが、第7回国際代替法会議にて報告されている<sup>16)</sup>。また、本試験の概要と応用について、2010年1月20日に JaCVAM 第3回ワークショップ(h-CLAT シンポジウム)が開催された<sup>17)</sup>。MUSST<sup>7)</sup>は、ロレアルが開発した試験法で、ヒト単球由来細胞株である U937 細胞を用い、化学物質曝露時の細胞表面の CD86 の発現量変化をフローサイトメトリーで評価する。

「NEDOプロジェクトによる化学物質の短期 *in vitro* 試験法の開発」の1つとして、第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会において、ヒト細胞株を用いたレポータージーンアッセイ系が報告された。表皮細胞としては HaCaT 細胞で HMOX1 に関する、樹状細胞としては U937 細胞に IL-1 $\beta$  に関する、T 細胞としては Jurkat 細胞に IL-4、IFN- $\gamma$  に関するレポーター細胞を作成し検討が進められていた。<sup>8)</sup>

光感作性に関しては、THP-1 細胞の CD86 及び CD54 の発現量変化を指標とした試験法を用いて18化合物について検討した結果、光感作性物質11化合物中7化合物を光感作性有りと評価できたと報告された<sup>18)</sup>。

#### C-5-5 変異原性

##### ①概要

変異原性試験はその種類も多く、*in vivo*、*in vitro*法などさまざまなものがある。近年、*in vitro*小核試験法が開発され、OECDドラフトガイドラインが提案されている<sup>1)</sup>。また、感度の高いDNA損傷の検出法としてコメットアッセイの開発や、変異原性試験ではないが長期発がん性試験の代替法として、形質転換試験の開発も進められている。

## ②状況

*in vitro*小核試験（哺乳類培養細胞を用いる小核試験）はCHL/IUなどの細胞に化学物質を処理したのち培養し、その培養細胞における小核形成の存在を調べることにより、化学物質の染色体異常誘発性をみるための試験である。染色体異常試験と比較して、偽陽性の割合が少ない事、標本作成や観察が容易で熟練を要しないこと、染色体構造異常誘発性だけではなく、異数性も検出できることから注目されている。

コメットアッセイは細胞をシングルセルに分散し、アガロースゲル中に包埋して電気泳動にかけることにより、個々の細胞のDNA損傷を検出する方法である。電気泳動した際の様子からコメットアッセイと呼ばれる。テイルに傷害されたDNAが存在し、テイルの量、長さなどからDNA損傷程度がわかる。既存の変異原性試験と比較して、労力の少ないこと、高感度であること、標本観察などに熟練を要しないこと、非分裂細胞に対する変異原性を評価できること<sup>2)</sup>など、さまざまな利点から近年注目されている試験系であり、環境変異原学会やJaCVAMでは試験法の標準化を検討中である<sup>3)</sup>。

一方、COLIPA等においても、化粧品原料について独自の*in vitro*遺伝毒性評価アプローチを検討しており、多くの化粧品が適用される部位である皮膚に着目した各種3Dヒト皮膚モデルを活用した遺伝毒性試験（評価指標は小核とコメット）の開発に取り組んでいる。

現在、日米欧医薬品規制調和国際会議（ICH）では非臨床の安全性試験において、3Rsを促進するICHの義務に従い、ICH S2 遺伝毒性ガイドラインの改定が行われている。改定案では、試験動物数削減のための推奨がなされた内容となっている。2009年6月に東京にて会合が行われ<sup>4)</sup>、現在ガイドラインはSTEP3まで進んでいる。

### C-5-6 反復投与毒性

## ①概要

欧州委員会は反復投与全身毒性の分野での動物実験代替法開発に関する戦略開発を狙いとして、2500万ユーロを助成することを決め、さらにCOLIPAも2500万ユーロの拠出を決め、出資額は合計5000万ユーロとなった。そして、研究のための提案募集が2009年7月30日～2010年2月3日に実施された<sup>1)</sup>。このプロジェクトの期間は、統合型プロジェクトに対して5年、調整活動に対して6年となっている。これにより、欧州における今後の代替法開発の重点領域の一つとして反復投与毒性が明確に位置づけられた。

## ②状況

反復投与毒性は化学物質の長期暴露により細胞、組織、多くの臓器に進行的に誘発される機能障害であり、動物を用いた反復投与毒性試験では広範なエンドポイント（一般状態、体重、摂餌量、臨床検査、血液・血液化学的検査、尿検査、病理組織学的検査など）が評価されている。そのため、代替法としては各*in vitro*臓器モデルについて障害を予測する試験系、毒性指標の研究が行われている。

肝臓と腎臓をターゲットとした研究は、ECVAMのSTREP projectのPREDICTOMICSにおいて、毒性物質による細胞の初期変化で特異的に発現する機能的な指標の確認が行われた<sup>2)</sup>。PREDICTOMICSは、2007年12月に終了し、プロジェクトのウェブサイトにおいて、薬物、外来異物による肝臓と腎臓の慢性毒性を予測するための基盤技術などに関する成果が公開されている<sup>3)</sup>。

肝臓においては、Histone deacetylases (HDAC) 阻害剤処理ラット初代培養肝細胞が、培養中に表現型を維持しており、適切なモデルとなることが確認された。また、ヒト肝がん由来のHepG2細胞においてCYP群の遺伝子発現の欠除に、転写因子(HNF4)、並びに補助活性化因子と補助抑制因子(SRC1, SRC2, PGC1 $\alpha$ , PCAF)が役割を担っていることが確認された。さらには、薬剤性脂肪肝を再現する*in vitro*実験操作が開発され、遺伝子、プロテオーム、細胞レベルでの解析により様々な指標物質が確認され、これらを統合した戦略によりこの種の肝毒性物質を同定できることが明らかになった。

腎臓においては、最適化、安定化、特性確認された*in vitro*腎毒性検出法（単及び共培養法）が確立された。また、多数のCytomic

分析が *in vitro* の毒性を試験するために有用であることが確認され、適用の容易さ、毒性的妥当性、感受性にに基づき LDH 遊離（細胞毒性）、BrdU 取り込み（DNA 合成）及び Resazurin 還元（相対的生存細胞数）が有望な指標として選択された。さらには、無血清単層培養した HK-2 細胞（ヒト近位尿細管上皮細胞）を致死濃度以下の被験物質で 12 又は 48 時間処理し、遺伝子表現型を分析することにより、多くの既知腎毒性物質による細胞障害と関連していると考えられる多数の遺伝子が同定された。

一方、血液・免疫毒性に関しては、2006 年 3 月に Colony Forming Unit-Granulocyte/Macrophage assay (CFU-GM assay; 顆粒球・マクロファージ系前駆細胞を用いたコロニー形成試験) が二次的な動物種（イヌ）の試験の代替法という限定つきながらもヒト急性好中球減少症を予測する代替法として ESAC (24 回会議) による承認を受けた<sup>4)</sup>。CFU-GM assay はマウス骨髄及びヒト臍帯血中の単核細胞を培養し、その増殖（コロニー形成能）を指標とする試験である。マウス最大耐量データの有用性に依存するところがあり、完全な置換法では無いが動物数を削減できるとされている。

このように主要な臓器を標的とした毒性を予測するための *in vitro* 試験法の開発が進められているが、更なる研究の進展、戦略の開発が望まれている。

今年度、欧州委員会がヒトでの安全性評価における反復投与全身毒性の Replacement に向けて研究の提案を募集した内容は以下の 7 項目である。

- ・ヒトベースの標的細胞へと *in vitro* で機能分化させる現在の的方法論の最適化と新奇方法の開発
- ・慢性毒性試験の代替としての器官をシミュレートする細胞デバイスの開発
- ・反復投与全身毒性試験に関連したヒトベースの標的細胞におけるエンドポイント及び媒介マーカーの確立
- ・コンピューターモデル化と評価技術
- ・外挿の要因となるコンピューターモデルの開発のためのシステム生物学
- ・統合的データ解析とサービス
- ・プロジェクトの調整

それぞれの項目は 3、4 のサブ項目が設定された。これを受けて、具体的にどのようなプロジェクトになるのかが注目される。

反復投与毒性の代替法開発に関する現状は一部の主要臓器で極めて限定的に検討されており、既存の手法の多くは有害性確認には有効かもしれないが化粧品のリスク評価には不向きである。今後、欧州における多額の資金投入によりこの分野の研究が進展すると予測されるが、2013 年までの代替法の受け入れは不可能と思われる。

## C-5-7 生殖発生毒性

### ①概要

生殖発生毒性試験を代替する試験法は、出生前発生に関する代替法である胚性幹細胞試験 (Embryonic stem cell test for embryotoxicity, EST)、マイクロマス試験 (Micromass embryotoxicity assay, MM) 及び全胚培養試験 (Whole rat embryo embryotoxicity assay, WEC) の 3 試験が ESAC により 2001 年 10 月に承認された<sup>1)</sup>。

ECVAM による FP6 のプロジェクトである ReProTect<sup>2), 3)</sup> は、2004 年 7 月から 5 年 6 ヶ月間、2009 年 12 月まで進められた。20 以上の代替法が開発又は最適化され、再現性や技術移転性が研究された。全体で 100 以上の物質がピアレビューのために検討され、統計解析がなされた<sup>4)</sup>。

### ②状況

生殖発生毒性代替法である胚性幹細胞試験、マイクロマス試験、全胚培養試験は、広い範囲の生殖発生毒性をカバーする方法でなく、いずれも胎児毒性に限定された試験法である<sup>5)</sup>。胚性幹細胞試験は最初の段階で動物から胚性幹細胞を採取するが、その後は全く動物を使用することがないため *in vitro* 試験といえるが、胎児から未分化細胞を取り出し増殖能を確認するマイクロマス試験や母胎から胎児を取り出して培養する全胚培養試験は動物を用いるため、動物数削減という意味での代替といえる。現在の検討の方向性は、これら 3 種の代替法のデータを用いて総合的に胎児毒性を判断していくことにある。なお、3 種の試験法はいずれも ESAC により承認されたものの、ECB (European Chemicals Bureau) のマニュアル並びに OECD 試験法ガイドラインに掲載されていない。

ReProTect は哺乳類の生殖発生過程を Fertilization (受(授)精・受胎能)、Implantation (着床) 及び Prenatal development (出生前発生) の 3 研究領域に分

割し、これらを繋ぐ Cross-cutting technologies (横断研究) を各 W.P. (Work package) として、試験法開発が進められた。ReProTect プロジェクトで開発又は最適化された試験法を以下に示す。カッコ内は検出する毒性等とした。

①「配偶子形成～受精能」の試験

- ・ウシ精子毒性試験  
(成熟精子への毒性)
- ・精子ニュートラルコメットアッセイ  
(精子 DNA の損傷)
- ・精子染色質構造アッセイ  
(精子染色質の変性)
- ・精巣間細胞毒性試験  
(精巣間細胞への毒性)
- ・精巣セルトリ細胞毒性試験  
(精巣セルトリ細胞への毒性)
- ・ウシ卵母細胞/胚を用いた代替法  
(ウシ卵母細胞/胚への毒性)
- ・マウス胚アッセイ  
(着床前胚発生への毒性)
- ・不死化マウス顆粒層細胞を用いた FSH シグナル伝達及びステロイド産生試験  
(雄の生殖発生への影響)

- ・卵胞バイオアッセイ  
(卵巣機能への毒性)

②「着床」の試験

- ・ヒト子宮内膜内皮細胞試験  
(雌受胎能への影響)
- ・ヒト子宮内膜移植培養  
(胚の受容性への影響)
- ・ヒト絨毛膜絨毛移植培養 (妊娠第一三半期)  
(ヒトトロポプラストの着床及び発育への影響)
- ・トロポプラスト由来培養細胞を用いた *in vitro* 試験  
(ヒト胎盤への影響)
- ・ヒト胎盤通過性 (両側灌流法)  
(ヒト胎盤透過性)

③「胚発生」の試験

- ・胚性幹細胞試験 (EST)  
(発生毒性)
- ・ラット全胚培養 (WEC)  
(代謝活性化を加味した発生毒性)

④「配偶子形成～胚発生」の試験

- ・マイクロアレイ電極  
(ES細胞のイオンチャネルにおける活動電位)
- ・QSAR

(QSAR ; 他の試験法へ寄与)

- ・代謝催奇形性試験  
(前催奇形性物質の代謝による催奇形性)
- ・内分泌かく乱作用を *in vitro* で検出するためのアレイ技術の適用  
(ハイスループットな内分泌かく乱作用のスクリーニング試験法開発のため核内受容体への作用で発現する遺伝子を同定)
- ・MELN 細胞を用いたエストロゲン受容体転写活性化アッセイ  
(エストロゲン・抗エストロゲン作用)
- ・PALM 細胞を用いたアンドロゲン受容体転写活性化アッセイ  
(アンドロゲン・抗アンドロゲン作用を検出)
- ・AR CALUX®  
(アンドロゲン・抗アンドロゲン作用の定量)
- ・ERalpha CALUX®  
(エストロゲン・抗エストロゲン活性の定量)
- ・リコンビナントヒトエストロゲン受容体 a 結合能アッセイ  
(エストロゲン・抗エストロゲン作用の検出)
- ・リコンビナントラットエストロゲン受容体結合能アッセイ  
(アンドロゲン・抗アンドロゲン作用の検出)

日本においても NEDO のプロジェクトのなかで発生毒性試験の開発が進められている<sup>6,7)</sup>。マウス ES 細胞を用いた簡便で汎用性の高いレポータージーンアッセイを開発中である。各種対照化合物を用いた試験結果に基づくプロトコルの改良が行われている。一方、全胚培養試験を更に *in vivo* の結果に近づけるために、母体の代謝能力を組み入れる手法として、培養液中にラット S-9mix を加えた方法の検討がなされている。使用動物数削減のため、培養液のラット血清量を減らしても性状に培養ができるような培養装置の改良も行われている。

このほか、内分泌攪乱化学物質のスクリーニング法で動きが認められた。HeLa-9903 細胞を用い、エンドクラインレセプター  $\alpha$  への結合を指標とするレポーター遺伝子アッセイは、2009 年 9 月 7 日に OECD ガイドライン 455

として採択された<sup>8)</sup>。一方、アンタゴニストの検討については5施設によるバリデーション研究が実施されている。また、BG-1Luc4E2細胞を用い、エンドクラインレセプター $\alpha$ への結合を指標とするレポーター遺伝子アッセイであるLumi-cell法は、国際バリデーション研究が実施されており、JaCVAMがこれに参加している。日本での実験は株式会社日吉が担当している<sup>9)</sup>。

以上、生殖発生毒性を予測するための*in vitro*試験法の開発が進められ、一部においてはESACの承認が得られ、またバリデーションが間近い方法が認められるものの、生殖発生毒性の検討項目の多さ、複雑さを考えた時、化粧品指令第7次改正の期限である2013年の達成は不可能であると思われる。

#### C-5-8 経皮吸収性

経皮吸収試験は化粧品、医薬部外品及び医薬品等の皮膚への適用による角質、表皮及び真皮への透過ならびに全身的暴露を評価するために行われる。経皮吸収試験代替法については、実験動物を用いた*in vivo*試験法(TG 427)<sup>1)</sup>と同時に、動物(主にラット及びブタ)又はヒト摘出皮膚を用いた透過拡散セルによる*in vitro*試験法(TG 428)<sup>2)</sup>が標準化されている。現在、このガイドラインが経皮吸収試験代替法の中心的な役割を担っている。SCCPの“化粧品成分の皮膚吸収における*in vitro*評価基準”(2006年3月アップデート)においても、原則的にTG 428の遵守が求められている<sup>3)</sup>。TG 428を含めた*in vitro*試験法において、皮膚の選定、難溶性物質のレセプター相の選択、試験物質の物性など、幾つかの考慮すべき点も報告されている<sup>4)</sup>。

TG 428の改良として、代替材料については、再構築ヒト皮膚モデルが最も研究されている。6種の再構築皮膚モデルを用いた透過性が比較され、再構築皮膚モデルの透過性はそれぞれ異なっている事、ヒト皮膚とは代謝能が異なる事が報告されている<sup>5,6)</sup>。その他、角層モデルとしてのシリコン人工膜<sup>7)</sup>や皮膚モデルとしてのラミネート透析膜<sup>8)</sup>、合成高分子膜を用いた研究もされている<sup>9)</sup>。

シミュレータによる検討も近年なされており、*in silico*モデルであるADME Simulator™(Simcyp)を用いて動物試験を代替する検討をおこない、良い相関を示したことが報告されている<sup>10)</sup>。

反復投与による経皮吸収試験については限

られた試験期間以内の反復投与でデザインされたいくつかの試験法はあるが、現在、標準化された反復局所投与に利用できる*in vitro*試験法はなく、代謝を組み込んだ皮膚吸収/透過に利用できる*in vitro*試験法もない。また、ヒトボランティアによる皮膚吸収試験は、化粧品原料や化粧品製品の低い毒性の場合において行うことができるが、利用できるヒトのデータはほとんどないのが実情である<sup>11)</sup>。

#### C-5-9 小括

本年度の代替法の開発と評価に関する状況を安全性評価項目ごとに取りまとめた。その結果、本年度の特筆すべき動きは、ESACが水溶性物質の眼腐食性と強刺激性並びに水溶性の界面活性剤の無刺激性を確認するための試験法としてCMを、水溶性物質の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法としてFLを承認したことが挙げられる。

今後の代替法開発と評価において注目される試験法は、反復投与による全身毒性試験、並びに感作性試験であろう。すなわち、化粧品指令第7次改正で2009年に禁止される試験法から2013年の試験法へと力点が移りつつある。欧州委員会及びCOLIPAは反復投与全身毒性の分野での動物実験代替法開発に関する戦略開発を狙いとして、5000万ユーロの投入を決めた。また、ECVAMにおいて3種の*in vitro*感作性試験代替法、DPRA、MUSST及びh-CLATのプレバリデーションが開始されたこと等にその傾向が表れている。

#### D. 結論

本年度の代替法の開発と評価に関する進展を概観すると、新規試験法のガイドライン化の観点では、ESACが水溶性物質の眼腐食性と強刺激性並びに水溶性の界面活性剤の無刺激性を確認するための試験法としてCMを、水溶性物質の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法としてFLを承認したことが挙げられる。

代替法開発体制の観点からは、ICATMが2009年4月27日に調印式を終え、正式に始動したことが挙げられる。

2009年9月9日~11日に第3回化粧品規制協力国際会議(ICCR-3)が東京で開催され、国際貿易への障壁を最小化しつつ、世界的に最高レベルでの消費者保護を維持する目的で、化粧品関連の問題について議論された。国内ではJaCVAMによる代替法の評価とその活用に向けた体制がさらに整備され、皮膚刺激性、