

## Letter to the editor

# Commentary to the Discussion on Topic 3, “*In Vitro* Test Approaches with Better Predictivity” at the 5th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT)

Hajime Kojima<sup>1</sup>

Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

(Received March 17, 2010; Revised April 20, 2010; Accepted April 21, 2010)

The 5th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT) was held on August 17–19, 2009, at Biozentrum of the University of Basel, Switzerland, prior to the 2009 International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), Florence, Italy. In this workshop, approximately 200 participants from government, industry and academia, mainly from the USA, EU, Canada and Japan, discussed the following six topics: 1) suitable maximum concentrations for tests with mammalian cells (this group was divided into two subgroups: 1a) *in vitro* chromosome aberrations and micronuclei, and 1b) mammalian cell gene mutations); 2) photogenotoxicity testing requirements; 3) *in vitro* test approaches with better predictivity; 4) improvement of *in vivo* genotoxicity assessment, i.e., the link to standard toxicity testing; 5) use of historical control data in the interpretation of positive results; and 6) suitable follow-up risk assessment testing for *in vivo* positive results.

Dr. Toshio Kasamatsu (Kao Co.) and I were invited to the group on topic 3, “*In Vitro* Test Approaches with Better Predictivity”. Over the course of seven presentations within the group, we discussed new test methods based on the following background. In sharp contrast with other groups, a new subgroup (led by Stefan Pfuhrer, Procter & Gamble: P&G) was convened to develop consensus recommendations for choosing a better test systems to improve the predictivity of *in vitro* tests. This group reviewed current studies investigating whether certain cell types were more susceptible to give irrelevant positive results *in vitro*.

The background for the discussion is as follows:

- 1) The high rate of false positive results in the current battery of *in vitro* tests—as high as 80% when mammalian cell assays are combined (i.e., chromosome aberration assay and mouse lymphoma assay) (1);
- 2) Seventh Amendment to EU Cosmetics Directive: Marketing and testing ban on ingredients tested *in vivo*, which came into force March 2009 (2);
- 3) REACH (Registration, Evaluation, Authorization

and Restriction of Chemical) issue. The REACH Regulation gives greater responsibility to industry to manage the risks from chemicals and to provide safety information on the substances (3).

Particularly, the European testing ban resulting from the Seventh Amendment to the EU Cosmetics Directive may result in valuable compounds being unnecessarily discarded from European cosmetic markets. In the field of mutagenicity/genotoxicity, validated alternative methods are available, and *in vivo* studies were prohibited in EU territory after March 11, 2009 (2). In spite of the high rate of false positive results in the current battery of *in vitro* tests, the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) (4), a European regulatory agency, recommends a battery of three *in vitro* assays: a bacterial reverse mutation test; an *in vitro* mammalian cell gene mutation test; and either an *in vitro* micronucleus test or *in vitro* mammalian chromosome aberration test. False positive results may be due to experimental conditions that have no relevance to *in vivo* situations. It is hard to confirm or deny the genotoxicity potential of candidate cosmetic ingredients based on results of the current *in vitro* tests. Therefore, we hope to develop promising new approaches for *in vitro* testing that can be used in place of *in vivo* studies to reduce the high incidence of false positive results of existing *in vitro* testing.

First, the group addressed the following questions:

#### Choice of cell line:

- Are there restrictions on the choice of cells used for testing?
- Should there be recommendations about the choice of cell line? Can this recommendation be made now, or are more data needed?

<sup>1</sup>Correspondence to: Hajime Kojima, Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. Tel: +81-3-3700-9874, Fax: +81-3-3700-1145, E-mail: h-kojima@nih.go.jp

New approaches:

- How do we rate the status of the genotoxicity assays performed on 3-dimensional human skin equivalents (3-D skin)?
- What is the applicability domain of that assay?
- What kind of data would the team like to see before considering this as a valid assay?

Presentations

1) Which cell lines should we be using?

- ✓ Paul Fowler (Covance) presented “Reduction of false positives in *in vitro* genetic toxicology testing: Importance of cell selection”; the “false positives” project, which compares rates of false positives with V79, CHO, CHL, TK6, HepG2, L5178Y, and HuLy obtained from COLIPA; European trade association for cosmetic, toiletry and perfumery industry;
- ✓ Mick Fellows (AstraZeneca) presented “Data generated in conjunction with the *in vitro* micronucleus test (MNvit) OECD guideline finalisation”;
- ✓ Azeddine Elhajouji (Novartis) presented “Comparison of V79, L5178Y, TK6 and primary human lymphocytes for micronucleus induction”;
- ✓ Ludowig Le Hegarat (Agence Francaise De Securite Sanitaire Des Aliments) presented “The HepaRG cell line, a predictive model in genetic toxicology?”

2) Promising new approaches

- ✓ Rodger Curren (Institute for *In vitro* Science: IIVS) presented “A novel micronucleus assay conducted in reconstructed human skin”; micronucleus data generated in 3-D skins (COLIPA 3-D skin project);
- ✓ Gladys Ouédraogo (L’Oreal) presented “The comet assay on 3-D skins (COLIPA 3-D skin project)”;
- ✓ Hajime Kojima presented “Proposal of protocol for comet assay using a three-dimensional epidermal model”.

From these presentations, we reached a consensus, which were reflected in the following statements in the final IWGT comments:

1. Data were presented indicating that p53-compromised rodent cell lines over-estimate genotoxic potential in the micronucleus test. Therefore, IWGT suggests *in vitro* micronucleus or chromosome aberration assay using p53-competent cells.

The data presented at the IWGT from the OECD MNvit test showed that all cell types correctly identify clastogens and aneugens. However, the data of the compounds that gave false results in the MNvit test suggested that there was a great diversity of the responses of the various cell types. The group agreed, based on the similarity of MNvit and chromosome aberration assays, that

the diversity would also be observed in the chromosome aberration assay. HepaRG is a promising model, in that the cells appear to have better phase I and II metabolizing potential than the other cell lines. However, further evaluation is required in order to confirm the value of this model for genotoxicity testing.

2. It has been demonstrated that cell line stability and source can affect the outcome of genotoxicity assays. Therefore, IWGT recommends adhering to good cell culture practices, characterizing all new cells, checking regularly for drift, and working from low-passage stocks. It would be useful to compile a common genotoxicity cell bank with fully characterized stocks of all cells.
3. Genotoxicity testing in 3-D skins (micronucleus test and comet assay) is a promising new *in vitro* test for chemicals applied to the skin.

The advantage of the model is that it resembles the properties of human skin (barrier function, metabolism), and that the route of exposure is relevant for dermally applied chemicals (e.g., cosmetics). The data presented show that the micronucleus assay by 3-D skin is further advanced; furthermore, inter- and intra-lab reproducibility has been demonstrated. IWGT agreed that the comet assay should be further evaluated. The comet assay is seen as a valuable addition, as it is not dependent on cell proliferation and covers a wider spectrum of DNA damage. The metabolic capacity needs to be further evaluated (this work is ongoing). It would be valuable to capture the kinetics of penetration and toxicity in order to establish the ideal sampling time(s) for the comet assay. Recommendations on the use of appropriate vehicles should be established. It was agreed that 3-D skin, once validated, will be useful for following up on positive results from standard *in vitro* assays for dermally applied chemicals. The applicability domain will be established once the validation is completed.

Considering the EU situation and the international expansion of animal welfare laws, we must avoid progressively adopting *in vivo* genotoxicity testing. Therefore, I think that the consensus in this group was made “according to script”, at least with regard to European colleagues. Against European drastic transformation, my concern on the safety evaluation is that the trend may push out *in vivo* testing in the cosmetic field. We must send out a warning about the current trend to avoid all *in vivo* tests and emphasize importance of re-evaluating cell lines and validating studies on new approaches to testing *in vitro*. I think further discussion is needed to establish well-balanced *in vitro* and *in vivo* tests for evaluation of genotoxic risk of chemicals to human.

## References

- 1 Kirkland D, Kasper P, Muller L, Corvi R, Speit G. Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: A follow-up to an ECVAM workshop. *Mutat Res.* 2008; 653: 99–108.
- 2 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: 1–8.
- 3 JRC. 2008. <http://www.vet.uu.nl/nca/userfiles/other/REACH>
- 4 Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS)/1294/10, Memorandum on “Alternative test methods in human health safety assessment of cosmetic ingredients in the European Union”. 2009.

## 動物実験の3Rにおける国内外の動向

## National and International trends of 3Rs in animal experiments



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 室長

## 要約

There is slow, steadily progressing the movement of 3Rs (to Replace them with non-sentient alternatives, to Reduce to a minimum the number of animals used, and to Refine experiments which used animals so that they caused the minimum pain and distress) of animal experiments in Japan.

The Japan Health Sciences Foundation established the Center for Accreditation of Laboratory Animal Care and Use in 2007. With the purpose of assessing and verifying compliance with the "Basic Guidelines for Proper Conduct of Animal Testing and Related Activities in the Research Institutions under the Jurisdiction of the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW)", the objective of the center is to promote the optimum

enforcement of scientific animal testing. Other Jurisdiction systems have been established by successive in Japan.

On the other hand, MHLW created the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) at the National Institute of Health Sciences (NIHS) in 2005. JaCVAM has promoted the 3Rs in animal experiments for the evaluation of chemical substance safety and established guidelines for new alternative experimental methods through international collaboration for 5 years. Many Japanese colleagues have supported JaCVAM activities by performing validation studies and peer reviews and by providing regulatory acceptance for new alternative experimental methods. Furthermore, we must push forward with international harmonization efforts in accordance with the International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM) framework, which was organized in April, 2009. We think that developments and continued activities of these centers are key contributions in 3Rs.

We expect these Japanese activities may contribute to the International harmonization in 3Rs.

キーワード：

動物実験代替法、代替法、バリデーション、第三者評価、3R

## 1. 国内の動向 -1-

## 1.1 「動物愛護及び管理に関する法律の改訂」および関連指針

昭和48年(1973)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(平成18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<sup>1)</sup>。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」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<sup>2)</sup>。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、3R(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)を徹底するために、適正な飼養およ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。加えて、環境省は平成18年10月「動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針」を定めた<sup>3)</sup>。この中では、実験動物の適正な取扱いの推進について述べられている。

これらを受け、同時期に文部科学省<sup>4)</sup>、厚生労働省<sup>5)</sup>、農林水産省<sup>6)</sup>が関連「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、動物実験等の施設およ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「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を示している<sup>7)</sup>。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。この他にも、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<sup>8)</sup>。

さて、動愛法には附則第9条において、「政府は、この法律の施行5年後を目途として、新法の施行の状況について検討を加え、必要があると認めるときは、その結果に基づいて所要の措置を講ずるものとする」とされている。これに基づけば、平成23年度を目途として施行状況を検討し、必要であれば法改正を行うことになる。実際、中央環境審議会動物愛護部会において、動物愛護



管理法見直しに向けた議論が平成22年6月より進んでいる<sup>9)</sup>。この中で、実験動物の福祉が議題にあがっており、どのような追加記載がなされるのか注目していきたい。ただし、混同がないように、用語を正確に区別しておきたい。環境省が扱っているものは、「実験動物」であり、一方、その他省庁が扱っているのは、「動物実験」である。改訂が検討されているものは、「実験動物」であり、「動物実験」の規制が今後どう改正されるのか定かでない。

ところで、5年前の動愛法の改訂にあたり、3Rの原則が導入された理由について考えてみたい。これについては、鍵山が興味深い記述を残している<sup>10)</sup>。すなわち、3Rは国際原則であり、先進国で3Rを法令で謳っていない国は日本以外に見当たらなかったこと、研究論文のレフエリーの指摘事項の背景に3Rの原則の非明文化があったこと、我が国の製薬会社は欧米からアウトロー呼ばわりされ、国際展開に苦戦していたことがその理由であると記載している。日本の3Rの必要性は、動物福祉のためだけでなく、国際社会の中での生き残り、科学水準や国際経済力の維持のためのものである。今回の動愛法の改正によっても、この考え方が中心であろう。

## 1.2 動物実験施設の第三者認証機関

日本学術会議の「動物実験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・評価および検証ならびに情報公開に関する記述がある<sup>7)</sup>。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) が国際認証をできる組織としてよく知られているが<sup>11)</sup>、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、2007年、財団法人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<sup>12)</sup>、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<sup>13)</sup>、日本動物実験協同組合<sup>14)</sup>など複数の認証制度においても審査が進んでいる。日本においても本格的な当該機関以外の者による検証が始まったことを意味している。

## 2. 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。そこで、我が国の現状を客観的にみるため、欧米諸国の仕組みについて確認しておきたい。

### 2.1 EUの動向

欧米諸国には、前述した「実験動物」と「動物実験」の線引きはない。例えば、英国はAnimal Actで3つの免許制度を導入している<sup>15)</sup>。実験実施施設の指定、実験者の免許、実験計画の審査および免許の交付である。ところが、この法律はEUの法律と比べ表現が弱いとされており、2013年には改訂を予定している。このEUの法律とは、欧州議会が、EUの研究室で使用されている年間1200万以上の実験動物を規定するEU指令609-86に代わる新しいものであり、2010年9月に改正案の採用が決議され、ヨーロッパの多くの加盟国に、動物実験の水準向上を促した<sup>16)</sup>。以下が特記すべき事項である。

- チンパンジーなどの類人猿の使用禁止（一部の例外を除く）。
- 事前の倫理的・科学的な評価の権威化。

- 実験動物のすべてのブリーダー、サプライヤー、ユーザが、機器や動物のケージの選択およびトレーニング等に関する法令の順守。
- EUと加盟国レベルにおける医学研究や教育などを含むすべての分野での、非動物の方法の開発および推進。

このようなEUの思想、法律的な問題が経済にまで波及した事例が、化粧品開発における動物実験の規制問題<sup>17)</sup>およびリーチ法 (REACH: Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) 問題である<sup>18)</sup>。

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月に代替法が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<sup>17)</sup>。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している。これに対応すべく、EUでは欧州化粧品工業会 (COLIPA: European Trade Association for the Cosmetic, Toiletry and Perfumery Industry)<sup>19)</sup>と欧州代替法評価センター (ECVAM: European Centre for the Validation of Alternative Methods)<sup>20)</sup>が共同で試験法の開発、バリデーションおよび専門家による第三者評価（以後、第三者評価と記す）を進めている。

一方、REACHとはすでに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<sup>18)</sup>。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ことに端を発している<sup>21)</sup>。この安全性評価はハザードベースでなく、リスクベース（ハザードと曝露評価）が中心である、2009年までに事前登録された約18万の化学物質について、70%の試験を2017年までに実施しなければならない。実験を行う場合にはITS (Integrated Testing Strategies) 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 (QSAR: Quantitative Structure-Activity (または Affinity) Relationship) 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を同定する。さらに製造量が増えるにつれて、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<sup>22)</sup>。

ただし、新規代替法が開発されても、例えば、経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) テストガイドラインなどに<sup>23)</sup>、受け入れられるためには10年が掛かると言われており、これまで通りの方法では2017年までには多くの新規試験法を用意できない。新規試験法に求められるものは、化学物質等の安全・安心の確保であり、代替が第一優先ではない。新規試験法の採用においては、各分野の専門家により、適用範囲や再現性、正確性などの視点で慎重に議論されねばならないからである。そこで、類似した試験法については、既存試験法の性能標準 (performance standard) に基づいたバリデーションにより、REACHのために“適切な”方法を短期間で選択するme-tooバリデーションという方策が検討されている<sup>23)</sup>。

### 2.2 米国における動向

アメリカにおいては、実験動物はAnimal Welfare Act<sup>24)</sup>、動物

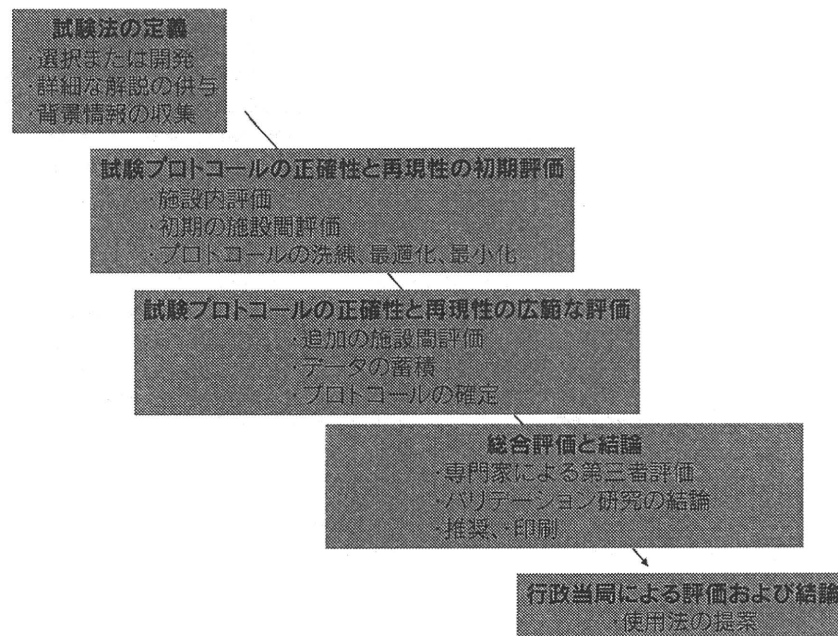


図1. 試験法の公定化の過程

実験は Health Research Extension Act で規制されている<sup>25)</sup>。これらを国立科学アカデミー (NAC: National Academy of Sciences) 傘下の実験動物研究協会 (ILAR: Institute for Laboratory Animal Research) が関係省庁の支援を受けて、実験動物の管理および使用に関する指針を編集し、実験動物および動物実験の倫理・科学的な自主管理を促している<sup>26)</sup>。以上のような状況は、日本に近い。ただし、その詳細は大きく異なっている。一番大きな相違点は、獣医師の役割である。日本学術会議のガイドラインでは、獣医師の役割は少ないが、ILAR の指針では、実験動物を専門とする獣医師が科学と動物福祉の推進役として定められている。また、前述した AAALAC の国際認証なども厳しいものであると聞いている。

### 2.3 国際協調機関

このような動物実験の 3R は欧米主導ということもあり、OECD、世界動物保健機関 (OIE: World Organisation for Animal Health)、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)、動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力会議 (MICH: International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products)、化粧品国際規制会議 (ICCR: International Cooperation on Cosmetics Regulations)、国際標準化機構 (ISO: International Organisation for Standardization) などの規制に関わる国際協調機関においても 3R に関する声明を出している。これらの中で、OECD では、今後提案されるテストガイドライン案には 3R の精神が盛り込まれることを望んでおり<sup>28)</sup>、代替法や動物実験でも複数の試験を組み合わせたガイドラインが増えている。OIE の実験動物福祉綱領では、

加盟国に実験動物福祉に関する法的整備を勧告している<sup>27)</sup>。ICH では、動物実験数削減の可能性もテーマの一つとしてあげられており、*in vitro* 試験の議論も少しずつではあるが、増えている<sup>28)</sup>。比較的知名度が低い ICCR とは、厚生労働省、米国医薬食品庁 (FDA: Food and Drug Administration)、カナダ厚生省 (Health Canada) および欧州委員会企業産業総局により 2007 年 9 月に設立された化粧品規制のための国際的な協力会議である。その具体的な議題の一つとして、EU の動物実験事情に国際的に対応するため、「化粧品成分の安全性評価と代替法」が挙げられている<sup>29)</sup>。

### 2.4 代替法のための国際機関

代替法の開発の中で、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 2005 年に発行された OECD ガイダンス文書 (Guidance Document: GD) No. 34 である<sup>30)</sup>。この文書の中には、今後、新規試験法が公定化される場合のバリデーションや第三者評価に関する手順、手法が記載されている。すなわち、図 2 に示すように<sup>31)</sup>、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ければいけない。ところが、図 1 に示すように、バリデーションや第三者評価を実施すると言っても、正確性や再現性の確認に種々の過程を要する。ましてやバリデーションの実施や実行委員会の構築にはノウハウが多い。第三者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、世界各地にバリデーションセンターが設立された。1990 年代に米国では NICEATM (The National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) / ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of

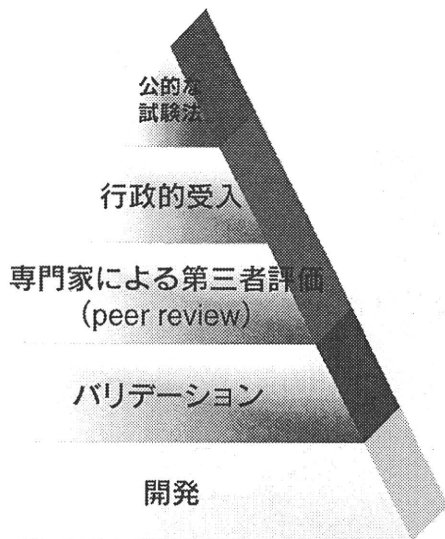


図 2. 公的な試験法ができるまで

Alternative Methods)<sup>32</sup>、欧州には ECVAM が設立された<sup>20</sup>。これらのセンターの役割はそれぞれ法律で規定されており、代替法への関与を肅々と進めている。さらに、遅れて 2009 年には韓国<sup>33</sup>とブラジル<sup>34</sup>にもバリデーションセンターが設立された。いよいよ国際的なバリデーションセンター時代の幕開けである。これらセンターの混乱を避ける理由もあり、2009 年 4 月には代替試験法協力国際会議 (ICATM : International Cooperation on Alternative Test Methods) が設立され<sup>35</sup>、代替法の開発に国際協調の重要性が謳われている。この ICATM が設立された理由は、限られた人的・物量的な資源の中、それぞれのセンターが重複した検討を避け、代替法研究を加速することにある。

ただ、欧米のセンターは米国の Alternative Research & Development Foundation<sup>36</sup>、CAAT (Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing)<sup>37</sup> や EU 内の各国の専門機関 FRAME (Fund for

the Replacement of Animals in Medical Experiments)<sup>38</sup>、NCA (Netherlands Center for Alternatives to animal use)<sup>39</sup>、NC3R (UK National Center for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research)<sup>40</sup> や ZEBET (German Center for the Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments)<sup>41</sup>、EPAA (European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing)<sup>42</sup> というような歴史ある助成機関や代替法専門研究機関を下地にしており、我が国と研究者の層が違うことを認識しておかねばならない。

## 2.5 代替法に関する欧米の取り組み

2004 年以降、多くの代替法が OECD でテストガイドラインとして認められるようになった。表 1 に示すように、2001 年以降に認められた動物実験の 3R に関する試験法を示す。光毒性試験<sup>43</sup>、腐食性試験<sup>44-46</sup> などである。

化粧品の規制を考慮に入れ、2008 年には、三つの局所刺激性試験のガイドライン案が OECD に提出された<sup>23</sup>。一つは培養表皮モデル EPISKIN を用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験である。ECVAM 科学諮問委員会 (ESAC : ECVAM Scientific Advisory Committee) の認証を経て<sup>47</sup>、EU から OECD に提出された。さらに、ESAC は他の培養表皮モデル EpiDerm や SkinEthics をも認証し<sup>48</sup>、これらを合わせ、2010 年にテストガイドライン No. 439 として承認されている<sup>49</sup>。

後の二つは眼刺激性試験代替法 BCOP (Bovine Corneal Opacity/Permeability Assay : 牛摘出角膜混濁試験) および ICE (Isolated Chicken Eye Assay : 鶏摘出眼球試験) である。いずれも腐食性・強い眼刺激性を検出できる方法として ICCVAM から提案され<sup>50</sup>、ECVAM も認証した<sup>51</sup>。これら代替法は異例の早さで 2009 年 9 月に OECD テストガイドラインとなった<sup>52,53</sup>。昨今では、これらの素材に病理学的な評価を組合せ、弱い刺激性を評価しようというガイダンスが検討中である<sup>23</sup>。さらに、ECVAM では眼刺激性試験の代替法として、過去に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、蛍光物質放出およびマイクロフィジオロメーターの各試験) の回顧的なバリデーションを行い、ESAC は 2009 年 7 月、蛍光物質放出試験およびマイクロフィジオロメーター試験を限定的な使用で認証した<sup>54</sup>。これらの試験法は、OECD テストガイドラインとして検討されること

表 1 2001 年以降成立した動物実験 3R に関する OECD テストガイドライン (TG)

Method	International Acceptance
CORROSITEX Skin Corrosivity Test	OECD TG 435 (2006)
EpiSkin Skin Corrosivity Test	OECD TG 431 (2004)
EpiDerm Skin Corrosivity Test	OECD TG 431 (2004)
SkinEthic RHE Skin Corrosivity Test	OECD TG 431 (2004)
EST-1000 Skin Corrosivity Test	OECD TG 431 (2004)
Rat TER Skin Corrosivity Test	OECD TG 431 (2004)
<i>In vitro</i> reconstructed human epidermis test methods EpiDerm, EPISKIN, SkinEthic RHE	OECD TG 439 (2010)
3T3 NRU Phototoxicity Test	OECD TG 432 (2004)
Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method	OECD TG 437 (2009)
Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method	OECD TG 438 (2009)

Method	International Acceptance
Updated Murine local lymph node assay (LLNA) for skin sensitization (20% reduction)	OECD TG 429 (2010)
Reduced LLNA (rLLNA)	OECD TG 429 (2010)
Nonradioactive LLNA protocol, LLNA : BrdU-ELISA	OECD TG 442B (2010)
Nonradioactive LLNA protocol, LLNA : DA	OECD TG 442A (2010)
Up and Down Procedure (UDP)	OECD TG 425 (2001)
<i>In vitro</i> micronucleus test	OECD TG 487 (2010)
Fixed Dose Procedure (FDP)	OECD TG 420 (2001)
Acute Toxic Class Method (ATC)	OECD TG 423 (2001)
Inhalation toxicity - acute toxic class method	OECD TG 436 (2009)
Stably transfected human estrogen receptor- $\alpha$ transcriptional activation assay for detection of estrogenic agonist-activity of chemicals	OECD TG 455 (2009)

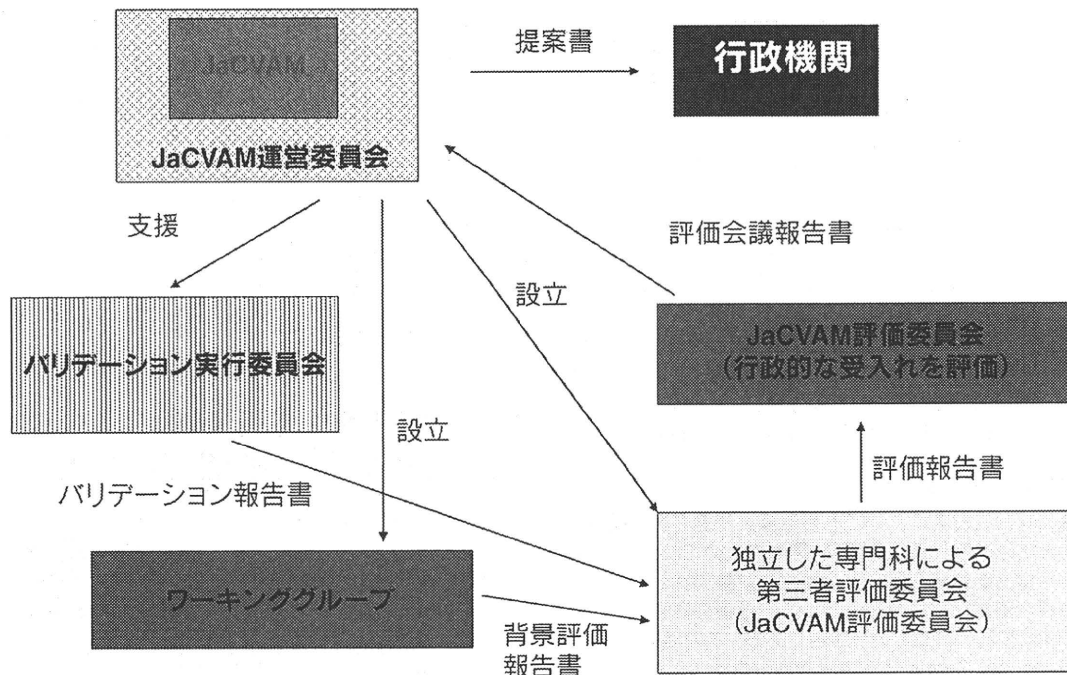


図3. JaCVAM の試験法評価システム

が2010年3月に決まっている<sup>23)</sup>。なお、次のステップとして、EpiOcular、SkinEthicsなどの培養角膜モデルのバリデーションが進捗中である。

もう一つの開発を急がねばならない代替法である急性毒性試験については、ICCVAMから細胞毒性試験で急性毒性試験の最高適用濃度を定めるという第三者評価報告書<sup>55)</sup>が2009年、OECDに提案され、2010年にガイダンスとして承認されている<sup>56)</sup>。

また、*in vitro*皮膚感受性試験代替法のプレバリデーションがECVAMで始まった<sup>20)</sup>。本試験の代替法として、ペプチド結合試験<sup>57)</sup>および細胞株を用いた試験が挙がっており<sup>58-60)</sup>、株式会社資生堂および花王株式会社が日本化粧品工業連合会の有志やCOLIPAの協力を得て開発を進めてきたヒト細胞株活性化試験(Human Cell Line Activation Test: h-CLAT)をも含めた検討が、2010年3月に開始された<sup>23)</sup>。

一方、10年以上前に問題となった環境ホルモンの検出(スクリーニング)を指標としたガイドラインがStably Transfected Human Estrogen Receptor-alpha Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist(STTA) NO.455が2009年に成立し<sup>61)</sup>、H295R Steroidogenesis Assayの成立が2011年に予定されている<sup>23)</sup>。

繰り返しになるが、これら試験法の開発を支えているものは、EUや米国における研究資金である。EPAAという政府と産業界が資金を出し合う団体にて、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している<sup>42)</sup>。また、動物愛護国際協会(Humane Society International)の支援も貢献度が高い<sup>62)</sup>。現在でも、これら団体等によりEUでの第7次の研究支援がな

されており、さらにAXLR8(accelerate)という第三者評価により、研究が推進されている<sup>63)</sup>。

一方、米国においても、NASは21世紀の毒性試験の中で、“包括的な*in vitro*試験の利用は、ヒトの生物学に基づいた細胞や分子システムと関連する生物学的挙動を明確にし、最終的には、作用機構を基にしたアプローチにより、動物実験の必要性を排除できるかもしれない”と述べている<sup>64)</sup>。

また、米国毒性プログラム(NTP: National Toxicology Program)により開発およびバリデートされた試験方法は動物実験の3Rを可能にする。NTPのロードマップの活動と試験法は、規制当局への価値を最大化するため、ICCVAMとの協力および協議を促すと述べている<sup>65)</sup>。さらに、米国環境省(EPA: Environmental Protection Agency)、米国環境健康科学研究所(NIEHS: National Institutes of Environmental Health Sciences)、米国衛生研究所(NIH: National Institutes of Health)/米国ヒトゲノム研究所(NCGC: NIH Chemical Genomics Center)およびFDAが進めているToxCastというプロジェクトでは<sup>66)</sup>、化学物質のリスク評価のためのツールとして、ハイスループットシステムを検討している。特に、EPAの戦略では、1) 将来の化学物質のスクリーニングや優先順位付けのための毒性経路情報の利用、2) リスク評価における毒性経路情報の利用、3) 技術移転を主眼としている。

### 3. 国内の動向 -2-

さて、欧米の状況から世界の潮流を理解して頂いたところで、もう一度、国内の動向、特に代替法に特化して説明していきたい。



### 3.1 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は<sup>67)</sup>、設立されて20年を越える世界で初めて設立された代替法に関する学会である。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ついてバリデーションや第三者評価を行ってきた<sup>68)</sup>。これらの内容はレベルの高いものであり、欧米での評価は高い。

2007年8月に第6回国際動物実験代替法会議(6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences: WC6)<sup>69)</sup>、2008年2月にWC6フォローアップをいずれも東京で開催し<sup>70)</sup>、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い。大会の内容も世界のトップレベルに近いものであったと感じている。ただし、残念ながら、日本は世界の代替法研究の中心にはいない。よって、その情報は欧米から遠く、高い代替法開発の技術を持ちながら、その技術を利用して、世界のニーズに対応させるという戦略が欠けているようである。

### 3.2 代替法のための機関

欧米の組織と同様、日本においても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<sup>71-74)</sup>。この部署の業務の一つが新規または改良試験法の評価という活動である。この活動を我々はJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)と呼んでいる<sup>75)</sup>。JaCVAMの活動目的は、1)日本における動物実験の3Rの普及、2)国際協調を重視した新規動物実験代替法の公定化である。その試験法検証のための組織を図3に示す。試験法毎にバリデーション、ワーキンググループ、第三者評価の組織を構築し、それらの報告書を受け、行政的な受入れ評価を行い、公定化に支障のない試験法を行政機関に提案している。残念ながら、JaCVAMは欧米のセンターのような法的な裏付けを持たず、永続的な活動ではない。しかし、ICATMの主要メンバーとして国際的な期待および、その評価は高い。これは、日本人の本分野における活躍への期待が大きいためと認識している。具体的に言えば、試験法の開発・改良、バリデーションへの参画は日本人に向けており、現時点では研究者層は薄くとも、代替法研究の加速を期待させるからと感じている。

### 3.3 JaCVAMの活動

3Rの国際動向に応えるため、JaCVAMでは、眼刺激性、皮膚刺激性、感作性、光毒性試験などの代替法について、日本独自のバリデーションや第三者評価を実施してきた。これまでJaCVAMが承認し、行政に提案した試験法を表2にまとめた。また、現在関与しているバリデーションを表3に記載した。これらの情報はJaCVAMホームページで逐次更新しており、最新情報を入手してほしい<sup>75)</sup>。以下には昨今、大きな進捗がある安全性試験法を紹介する。

#### 1) 腐食性、皮膚刺激性試験

腐食性試験の代替法として、日本製の培養皮膚モデル Vitrolife-Skinの正当性をJaCVAM評価会議が認証した<sup>76)</sup>。

また、皮膚刺激性試験の代替法としてESACにより認証された培養表皮モデル EPISKINについて<sup>47)</sup>、JaCVAM皮膚刺激性評価委員会がESACの認証内容を確認し、JaCVAM評価会議が認証した<sup>77)</sup>。一方、日本製の培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL (株式会社 J-TEC)については<sup>78)</sup>、2008-2009年に日本動物実験代替法学

表2 JaCVAM 評価会議によって認証された動物実験代替法

No.	Test Method
1	<i>In vitro</i> skin corrosion testing : Vitrolife-Skin, EpiDerm
2	The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants
3	The Isolated Chicken Eye (ICE) for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants
4	Skin sensitization assay, LLNA : DA
5	Skin sensitization assay, LLNA : BrdU-ELISA
6	<i>In vitro</i> skin irritation testing : EPISKIN

表3 JaCVAM が実験に参加している国際バリデーション研究

試験法	終了予定時期	参加施設	目標
遺伝毒性試験 <i>in vivo</i> コメットアッセイ	2011年秋	14施設(内、日本からは4施設)	OECDテストガイドライン
遺伝毒性試験 <i>in vitro</i> コメットアッセイ	不明	7施設(内、日本からは1施設)	OECDテストガイドライン
発癌性試験スクリーニング Bhas 形質転換試験	2010年10月終了	3施設(すべて国内)	OECDテストガイドライン
内分泌かく乱試験スクリーニング STTA-antagonist アッセイ	2011年3月	3施設(内、日本から2施設)	OECDテストガイドライン
内分泌かく乱試験スクリーニング CCI アッセイ	2011年1月	3施設(内、日本から1施設)	OECDテストガイドライン
皮膚刺激性試験 LabCyte EPI-MODEL	2010年12月終了	3施設(すべて国内)	OECDテストガイドライン
眼刺激性試験 STE法	2010年12月終了	3施設(すべて国内)	未定
光毒性試験 ROS アッセイ	2011年	未定(すべて国内)	ICHガイドライン
皮膚感作性試験 h-CLAT	2011年	4施設(内、日本から2施設)	EU認証

会で実施されたバリデーションおよび2010年のJaCVAM主導の追加バリデーションにおいて、EPISKINと同程度の予測性を持つことが検証された。LabCyte EPI-MODELについてはOECDガイドラインへの掲載を目指している。

#### 2) 眼刺激性試験

BCOPやICEについても、JaCVAM眼刺激性評価委員会がICCVAMの認証内容を確認し、JaCVAM評価会議が認証した<sup>50)</sup>。さらに、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」について<sup>79,80)</sup>、上記評価委員会にて第三者評価が進行している。また、株式会社花王で開発された細胞毒性試験STE(Short Time Exposure)<sup>81)</sup>のバリデーションが日本動物実験代替法学会およびJaCVAM主催で実施された。

#### 3) 感作性試験

日本が提案したリンパ節中のATP量の変化を指標としたLLNA-DA法<sup>82)</sup>やBrdUの取り込みを指標としたLLNA-BrdU ELISA法<sup>83)</sup>が、JaCVAM評価会議で認証されるとともに<sup>84,85)</sup>、2010年にOECDテストガイドラインとなった<sup>86,87)</sup>。一方、前述したよう

に、h-CLAT<sup>58,59)</sup>のバリテーション研究をECVAMとともに実施している。

#### 4) 光毒性試験

活性酸素種 (Reactive oxygen species : ROS) を指標とした光毒性試験が光毒性の予測に有用であるとの報告を受け<sup>60)</sup>、日本製薬工業会の支援を受け、バリテーションを実施している。なお、資生堂株式会社にて酵母・赤血球を用いた光毒性試験の組合せ法は<sup>61-63)</sup>、JaCVAM 評価会議でバリテーション結果が不十分と判断されている<sup>62)</sup>。

#### 5) 遺伝毒性試験

コメットアッセイについては<sup>64)</sup>、日本環境変異原学会/哺乳類変異原性 (MMS) 研究会、欧米の研究機関と協力して国際的なバリテーションを進めている。*in vivo* 試験に関しては、最終的なバリテーションの段階にある。*in vitro* 試験に関しては、プロトコルを固めるプレバリテーションの段階にある。

また、イニシエーションに加え、プロモーターも検出できる形質転換試験法 Bhas アッセイについては<sup>64)</sup>、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) プロジェクトでバリデートされ、OECD にテストガイドラインとしての申請を行っている<sup>23)</sup>。

#### 6) 内分泌かく乱物質スクリーニング

前述したテストガイドライン STTA 法は<sup>65)</sup>、化学物質評価研究機構 (CERI) によって開発された。現在では、このテストガイドラインにアンタゴニストの評価系も加えるべく、バリテーションを実施している。

また、同様に CERI および大塚製薬株式会社によって開発されたアンドロゲンの検出試験においても、テストガイドライン案を OECD に提出している<sup>23)</sup>。

#### 7) 急性毒性試験

日本薬局方には、プラスチック容器の品質管理のため、急性毒性試験に代わり、細胞毒性試験を推奨している<sup>66)</sup>。さらに、ゴム製品の品質管理のために細胞毒性試験の利用を検討している<sup>66)</sup>。

#### 8) 発熱性物質試験

欧州薬局方 (European Pharmacopoeia : EP) に掲載された主にヒト血液を用いる *in vitro* 試験に関しては<sup>67)</sup>、バリテーション結果が不十分と、ICCVAM<sup>68)</sup> および JaCVAM 評価会議で判断されている<sup>69)</sup>。

## 4. 終わりに

動物福祉問題イコール、3R である。ただ、実験動物に携わる方々とお話しして感じるのは、3R を持ち出せば、とりあえず既得権を確保できる、免罪符という発想である。確かに、獣医師も Refinement の面では福祉的な配慮をされているが、削減や置換えの知識やその方策を全くお持ちでないことに愕然とする。上記してきたように、公定な代替法の開発には多額の経費と長い時間が掛かることさえも知らない方が多い。欧米の追従でなく、「動物実験 3R は日本にとって得意芸に近い分野であり、国際的な信用を高め、ビジネスチャンスをつかむ好機である」というように発想を変えて頂きたいものである。欧米の期待を横目で見ながら、手を拱いている時間はない。既存の殻を破るため、皆さんの技術を世界に広めるために、今後も JaCVAM 活動に努めてきたいと考えている。

## 謝辞

バリテーションを進めるにあたり、日本動物実験代替法学会、厚生労働科学研究からの支援に感謝致します。また、試験法の評価に協力頂きましたすべての JaCVAM 関係者に感謝致します。

## [参考文献]

- 1) 動物の愛護及び管理に関する法律 (2010) Available at: [http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend\\_jaw2/law.pdf](http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend_jaw2/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 (2006) Available at: [http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law\\_series/nt\\_h180428\\_88.html](http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law_series/nt_h180428_88.html)
- 3) 動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針 (2006) Available at: [http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/2\\_data/laws/guideline\\_h181031.pdf](http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/2_data/laws/guideline_h181031.pdf)
- 4) 文部科学省 研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (2010) Available at: [http://www.mext.go.jp/b\\_menu/hakusho/nc/06060904.htm](http://www.mext.go.jp/b_menu/hakusho/nc/06060904.htm)
- 5) 厚生労働省 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (2010) Available at: <http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/dobutsu/0606sisin.html>
- 6) 農林水産省 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 (2010) Available at: [http://www.maff.go.jp/www/press/2006/20060601press\\_2b.pdf](http://www.maff.go.jp/www/press/2006/20060601press_2b.pdf)
- 7) 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 (2010) Available at: <http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-20-k16-2.pdf>
- 8) 重茂浩美, "動物実験に関する近年の動向、科学技術動向", 2006, 10-20.
- 9) 中央環境審議会動物愛護部会 (2010) Available at: <http://www.env.go.jp/council/14animal/yoshi14.html>
- 10) 鍵山直子, "動物愛護管理法における 3R 原則の明文化と実験動物の適正な飼養保管", 日獣会誌, 2010, 395-398.
- 11) AAALAC International Association (2010) Available at: <http://www.aaalac.org/>
- 12) 佐々木弥生 (2008) Available at: [http://www.soc.nii.ac.jp/jsaae/WC6\\_followup/WC6\\_Follow\\_Sasaki.pdf](http://www.soc.nii.ac.jp/jsaae/WC6_followup/WC6_Follow_Sasaki.pdf)
- 13) 大学法人動物実験施設協議会 (2010) Available at: <http://www.kokudoukyou.org/annai/>
- 14) 日本動物実験協同組合 (2010) Available at: <http://www.jabanimal.org/freme.html>
- 15) United Kingdom Protection of Animals Act (2000) Available at: <http://www.veggieglobal.com/protection-of-animals-act-uk.htm#2000>
- 16) Update on the revision of EU lab animal laws (2010) Available at: <http://www.rspca.org.uk/ImageLocator/LocateAsset?asset=document&assetId=1232720902775&mode=prd>
- 17) 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).
- 18) ECH (2008) Available at: [http://ec.europa.eu/echa/home\\_en.html](http://ec.europa.eu/echa/home_en.html)
- 19) COLIPA (2010) Available at: <http://www.colipa.eu/about-colipa-the-european-cosmetic-cosmetics-association.html>
- 20) ECVAM (2010) Available at: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>
- 21) T. Hartung, (2006) Available at: <http://www.soc.nii.ac.jp/jsaae/20kai.html>
- 22) JRC (2010) Available at: [http://www.vet.uu.nl/nca/userfiles/other/REACH\\_and\\_the\\_need\\_for\\_intelligent\\_testing\\_strategies.pdf#search=Integrated%20Testing%20Strategies%20REACH](http://www.vet.uu.nl/nca/userfiles/other/REACH_and_the_need_for_intelligent_testing_strategies.pdf#search=Integrated%20Testing%20Strategies%20REACH)
- 23) OECD (2010) Available at: [http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en\\_2649\\_34377\\_2349687\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html)



- 24) Animal Welfare Act, Available at: [http://awic.nal.usda.gov/nal\\_display/index.php?info\\_center=3&tax\\_level=3&tax\\_subject=182&topic\\_id=1118&level3\\_id=6735&level4\\_id=0&level5\\_id=0&placement\\_default=0](http://awic.nal.usda.gov/nal_display/index.php?info_center=3&tax_level=3&tax_subject=182&topic_id=1118&level3_id=6735&level4_id=0&level5_id=0&placement_default=0)
- 25) Health Research Extension Act, Available at: <http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/hrea1985.htm>
- 26) ILRA (2010) Available at: <http://dels.nas.edu/ilar/>
- 27) OIE (2010) Available at: [http://www.oie.int/eng/bien\\_etre/en\\_introduction.htm](http://www.oie.int/eng/bien_etre/en_introduction.htm)
- 28) Y. Ohno, *ILAR Journal*, **2002**, *43*, s95-98.
- 29) 厚生労働省 (2010) Available at: <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/08/h0814-1.html>
- 30) OECD (2005) 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
- 31) ICCVAM (1997) Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods: a report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. *NIH Publication No.* 97-3981, 1997, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)
- 32) ICCVAM (2010) Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox\\_docs/EPreport/ocu\\_report.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/EPreport/ocu_report.htm)
- 33) KoCVAM (2010) Available at: <http://www.nifds.go.kr/nitr/contents/m91100/view.do>
- 34) O. A. Presgrave, *Altern Lab Anim.*, **2008**, *36*(6), 705-8.
- 35) ICATM (2010) Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/about/icatm.htm>
- 36) Alternative Research & Development Foundation (2010) Available at: <http://www.ardf-online.org/>
- 37) CAAT (2010) Available at: <http://caat.jhsph.edu/>
- 38) FRAME (2010) Available at: <http://www.frame.org.uk/>
- 39) NCA (2010) Available at: <http://www.nca-nl.org/>
- 40) NC3R (2010) Available at: <http://www.nc3rs.org.uk/>
- 41) ZEBET (2010) Available at: <http://www.bfr.bund.de/cd/1591>
- 42) EPAA (2010) Available at: [http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index_en.htm)
- 43) OECD (2004) Test Guideline NO. 432: *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity testing. OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 44) OECD (2004) Test Guideline No. 430: *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER), OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 45) OECD (2004) Test Guideline No. 431: *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 46) OECD (2006) Test Guideline No. 435: *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 47) ECVAM (2007) Statement on the validity of *in-vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>
- 48) ECVAM (2008) Statement on the scientific validity of *in-vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Available at: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>
- 49) OECD (2010) Test Guideline No. 439: *In Vitro* Skin Irritation *Reconstructed Human Epidermis Test Method*, OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 50) ICCVAM (2010) Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ocutox.htm>
- 51) ESAC (2009) Statement on the Conclusions of the ICCVAM Retrospective Study on Organotypic *In Vitro* Assays as Screening Tests to Identify Potential Ocular Corrosives and Severe Irritants.
- 52) OECD (2010) Test Guideline No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 53) OECD (2010) Test Guideline No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 54) ESAC (2009) ESAC statement on the scientific validity of two *in vitro* eye irritation test methods.
- 55) ICCVAM (2010) Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acute/tox/acute.htm>
- 56) OECD (2010) No 129: Guidance Document on using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests, OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 57) G. F. Gerberic, J. D. Vassallo, R. E. Bailey, J. G. Chaney, S. W. Morral and J. P. Lepoittevin, *Toxicol. Science*, **2004**, *81*, 332-343.
- 58) T. Ashikaga, Y. Yoshida, M. Hirota, K. Yoneyama, H. Itagaki, H. Sakaguchi, M. Miyazawa, Y. Ito, H. Suzuki and Toyoda, *Toxicol in Vitro*, **2006**, 767-773.
- 59) H. Sakaguchi, T. Ashikaga, M. Miyazawa, Y. Yoshida, Y. Ito, K. Yoneyama, M. Hirota, H. Itagaki, H. Toyoda and H. Suzuki, *Toxicol in Vitro*, **2006**, 774-784.
- 60) P. Aeby, T. Ashikaga, S. Bessou-Touya, A. Schepky, F. Gerberick, P. Kern, M. Marrec-Fairley, G. Maxwell, J. M. Ovigne, H. Sakaguchi, K. Reisinger, M. Tailhardat, S. Martinuzzi-Teissier and P. Winkler, *Toxicol in Vitro*, **2010**, *24*(6), 1465-73.
- 61) OECD (2009) Test Guideline Test No. 455: The Stably Transfected Human Estrogen Receptor-alpha Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist-Activity of Chemicals, OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 62) Humane Society International (2010) Available at: <http://www.hsi.org.au/>
- 63) AXLR8 (2010) Available at: <http://www.axlr8.eu/workshops/>
- 64) National Research Council (2007) Toxicity Testing in the 21<sup>st</sup> century, A vision and a strategy, The National Academies Press, Washington, D.C., USA
- 65) A National Toxicology Program for the 21<sup>st</sup> century (2010) Available at: <http://ntp.niehs.nih.gov/files/NTPPrdmp.pdf>
- 66) ToxCast (2010) Available at: <http://www.epa.gov/ncct/toxcast/summit.html>
- 67) 日本動物実験代替法学会 (2010) Available at: <http://www.asas.or.jp/jsaae/>
- 68) 小島肇夫, *LABIO21*, **2009**, *38*, 17-20.
- 69) Proceedings of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, *Altern. Animal Test. Experiment*, **2008**, *14*, Special Issue.
- 70) 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).
- 71) 大野泰雄, 国立衛研報, **2004**, *122*, 1-10.
- 72) 小島肇夫, 化粧品技術者会誌, **2006**, *40*(4), 263-268.
- 73) 小島肇夫, 薬学雑誌, **2008**, *128*(5), 747-752.
- 74) 小島肇夫, コスメティックスステージ, **2010**, *4*(5), 56-61.
- 75) JaCVAM (2010) Available at: <http://jacvam.jp/>
- 76) JaCVAM 提案書 (2008) 腐食性試験代替法: 「3次元培養ヒト皮膚モデル (Vitrolife-skinTM) を用いた腐食性試験」.
- 77) JaCVAM 提案書 (2009) 皮膚刺激性試験代替法: 「ヒト皮膚モデル (三次元皮膚 EPISKIN) を用いた皮膚刺激性試験代替法」.
- 78) M. Katoh, F. Hamajima, T. Ogasawara and K. I. Hata, *Journal of Toxicological Science*, **2009**, *34*(3), 327-334.
- 79) Y. Ohno, et al., *Toxicology in Vitro*, **1999**, *13*, 73-98.
- 80) 大野泰雄 他, *Altern. Animal Test. Experiment*, **2005**, *10*(2), 54-157.
- 81) Y. Takahashi, M. Koike, H. Honda, Y. Ito, H. Sakaguchi, H. Suzuki and N. Nishiyama, (2008) *Toxicology in Vitro*, **2008**, *22*, 760-770.
- 82) K. Yamashita, K. Idehara, N. Fukuda, M. Yamagishi and N. Kawada,

- Altern. Animal Test. Experiment*, 2005, 11(2), 136-144.
- 83) M. Takeyoshi, K. Yamasaki, Y. Yakabe and I. Kimber, *Toxicol. Lett.*, 2001, 119, 203-208.
- 84) JaCVAM 提案書(2008)皮膚感作性試験代替法：「皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA法)」
- 85) JaCVAM 提案書(2009)皮膚感作性試験代替法：「皮膚感作性試験代替法(LLNA-BrdU)」
- 86) OECD (2010) Test Guideline Test No. 442A: Skin Sensitization *Local Lymph Node Assay: DA*, OECD Guideleline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 87) OECD (2010) Test Guideline Test No. Test No. 442B: Skin Sensitization *Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA*, OECD Guideleline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 88) S. Onoue, N. Igarashi, Y. Yamauchi, S. Yamada and Y. Tsuda, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 46(1), 187-93.
- 89) M. Sugiyama, H. Itagaki, T. Hariya, N. Murakami and S. Kato, *Altern. Animal Test. Experiment*, 1994, 2, 183-191.
- 90) M. Sugiyama, H. Itagaki and S. Kato, (1994) *Altern. Animal Test. Experiment*, 1994, 2, 193-202.
- 91) M. Mori, M. Hoya, M. Sugiyama and H. Itagaki, *Altern. Animal Test. Experiment*, 2003, 10(1), 1-17.
- 92) JaCVAM 評価報告書 (2010) 光毒性試験代替法：「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験代替法」
- 93) R. R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. C. Ryu, Y. F. Sasaki, *Environ Mol Mutagen.*, 2000, 35(3), 206-21.
- 94) A. Sakai, C. Suzuki, Y. Masui, A. Kuramashi, K. Takatori and N. Tanaka, *Mutat Res.*, 2007, 630(1-2), 103-11.
- 95) 柘植英哉, 森 充生, 大庭澄明, 大内 正, 寺田三郎, 五島隆志, 田邊豊重, 山影康次, 田中憲徳, 渡辺美香, 畔上二郎, 大向英夫, 小島 肇, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2011.
- 96) 厚生省薬務局医療機器開発課監修, “医療用具および医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン解説”, 薬事日報社, 東京, 1996.
- 97) Bacterial Endotoxin, *European Pharmacopoeia 5.0*, 2005, 161-168.
- 98) ICCVAM (2010) Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/pyrogen/pyrogen.htm>
- 99) JaCVAM 評価報告書 (2010) *in vitro* 発熱性物質試験.

略歴

名前：小島 肇(ペンネーム：小島 肇夫) Hajime Kojima, Ph.D.  
 学位：薬学博士  
 所属・役職：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  
 藤田保健衛生大学 医学部 客員講師  
 連絡先：〒 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1  
 TEL: 03-3700-9874 FAX: 03-3700-1145  
 e-mail: h-kojima@nihs.go.jp

生年月日：昭和 35 年 4 月 9 日生 (50 歳)

略歴：昭和 58 年 岐阜大学・農学部農芸科学科卒業  
 同年 日本メナード化粧品株式会社入社  
 昭和 59 ~ 61 年 国立遺伝学研究所・形質遺伝部留学  
 平成 8 年 長崎大学薬学部にて博士号取得  
 平成 17 年 国立医薬品食品衛生研究所 入所

専門：毒性学、変異原性、組織培養

学会活動：

- ・日本動物実験代替法学会 評議員、理事、副会長
- ・日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 評議員
- ・日本環境変異原学会 評議員
- ・日本トキシコロジー学会
- ・安全性評価研究会
- ・日本動物細胞工学会
- ・Society of Toxicology

国際協力

- ・ESAC (ECVAM: European Center for the Validation of Alternative Methods Scientific Advisory Committee), observer
- ・SACATM (Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, USA), observer
- ・ICH Center for the Validation Alternative Methods, observer
- ・ICCR Center for the Validation Alternative Methods, observer
- ・OECD Endocrine Disrupter Working Group, non-animal, observer
- ・OECD Test Guideline, National Coordinator

賞罰

- ・日本動物実験代替法学会 1998 年論文賞受賞
- ・日本動物実験代替法学会 2000 年論文賞受賞
- ・日本動物実験代替法学会 2003 年論文賞受賞

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）  
平成22年度分担研究報告書

## － 遺伝毒性不純物に関する研究 －

分担研究者：本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部）  
協力研究者：阿曾 幸男（国立医薬品食品衛生研究所・薬品部）  
                  澤田 繁樹（エーザイ(株)・安全性研究部）  
                  紺世 智徳（第一三共株式会社・分析評価研究所）  
                  小松 一聖（塩野義製薬株式会社・CMC技術研究所）  
                  吉富 真理（(独)医薬品医療機器総合機構）

### 研究要旨

2006年、欧州医薬品庁（EMA）は医薬品の遺伝毒性不純物に関するガイドラインを発表し、また米国FDAも2008年に同様のドラフトガイダンスを提出した。これを受けて日本、欧州、米国による国際ガイドライン（ICH-M7 guideline）の策定が2010年11月の福岡会議から開始された。ICHガイドラインはこれら欧米ガイドラインを参考に、臨床開発中および承認後の医薬品に含まれる遺伝毒性不純物に暴露された場合の治験者・患者の生涯発がんリスクの特徴を明らかにし、そのリスクの軽減と管理のための様々な方法を取り入れる。福岡会議の始めに、ガイドラインの性格を明らかにするためタイトルを「潜在的発がんリスクを低減化するための医薬品中DNA反応性（変異原性）不純物の評価および管理」に変更した。これは、遺伝毒性不純物の中で、DNAと直接反応する物質は低用量でもDNAに損傷を与え、突然変異を誘発する可能性があり、閾値の証拠が十分に確立されていないため、たとえ低用量でもがんを引き起こす可能性は否定できないとの論拠に基づく。このDNA反応性不純物の評価はエームス試験と構造活性相関（QSAR）によって行う。福岡会議ではまた、対象とする医薬品、成分、および対象としないものが論議された。これらの議論を基に現在ステップ1のドラフトガイダンスの作成作業が進行中である。

キーワード：ICHガイドライン、遺伝毒性不純物、変異原性、リスク管理

### A. 研究目的

医薬品中には、合成過程の試薬や反応中間体、副産物、もしくは分解物等が不純物として存在することがあり、これら不純物の安全にも注意を向ける必要がある。ICHのQ3ガイドラインでは医薬品（原薬および製剤）の不純物の規格限度値に関して、最大一日投与量に基づく安全性確認の閾値を規定し、それを超えるものについては、安全性を確認するための試験を求めている。しかしながら、それら不純物

に遺伝毒性が疑われた場合はやっかいである。一般に遺伝毒性物質には閾値がないとされているため、たとえその不純物が微量であったとしても、その暴露による突然変異や染色体異常等の影響は否定できない。従って、ICH-Q3ガイドラインでの不純物の規格限度値は遺伝毒性不純物には適応できない。また、このガイドラインは治験薬には適応されないため、臨床試験でのボランティアや、治験患者の安全性確認は考慮されていない。

2006年、欧州医薬品庁（EMA）は医薬品の遺伝毒性不純物に関するガイドラインを公表し、また米国FDAも2008年に同様のドラフトガイダンスを提出した。これを受けて2010年から日本、欧州、米国による国際ガイドライン（ICH-M7 guideline）の策定が開始された。このガイドラインには臨床開発中および承認後の医薬品に含まれる遺伝毒性不純物に暴露された場合の治験者・患者の生涯発がんリスクの特徴を明らかにし、そのリスクの軽減と管理のための様々な方法を取り入れる予定である。

本研究班は、国際ガイドライン策定のための専門家会議に参画し、医薬品の安全性と、国際的整合性が確保される遺伝毒性不純物の評価と管理のためのガイドラインを米国、欧州と歩調を共にして作成することを目的とする。また、そのための国内外のガイドラインの調査研究や、製薬企業の動向や、実態の調査も行う。

## B. 研究方法

本研究は規制側として国立衛研の本間、阿曾が、企業側からはJPMAの澤田、紺世、小松がICH-M7の専門家会議（EWG）に参画し、ガイドラインの策定に携わった。また、PMDAの吉富は専門的見地からアドバイスをを行った。また、本研究班ではEMAとFDAの遺伝毒性不純物に関するガイドラインを翻訳し、その特徴を検討した。

## C. 研究結果

### (1) EMAとFDAの遺伝毒性不純物に関するガイドラインの翻訳と調査研究

EMA2006年6月に医薬品の遺伝毒性不純物に関するガイドライン“Guideline on the limit of genotoxic impurities”を公表し、また、その後、ガイドラインに関するQ&Aを2010年9月まで数回発表した。その日本語訳をAppendix I、及びIIとして付す。米国FDAは2008年12月に医薬品の遺伝毒性不純物に関するドラフトガイダンス“Genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and product: recommended approach”を公表した。その日本語訳をAppendix IIIとして付す。

### (2) ICH-M7ドラフトガイドラインの策定

遺伝毒性不純物のICHガイドラインの策定は2010年5月にICH運営委員会で正式決定され、2010年11月の福岡会議からEWGが組織され議論と、ドラフトガイドラインの策定作業が開始された。福岡会議では始めに、ガイドラインの性格を明らかにするためタイトルを「潜在的発がんリスクを低減化するための医薬品中DNA反応性（変異原性）不純物の評価および管理」に変更することが提案され、運営委員会で承認された。また、本ガイドラインの一般原則としてDNA反応性物質（変異原性物質）のみを対象とし、染色体異常のみを誘発するような化学物質の不純物は対象としないこととした。従って、ここでの不純物の評価と管理はエームス試験で基本的に行う。また、近年のコンピュータトキシコロジーの進歩から、構造活性相関（QSAR）によりエームス試験の予測に利用することも提案された。

本ガイドラインの適用範囲は基本的にQ3A、Q3Bガイドラインの適応範囲を踏襲することとして、以下のように定めた。しかし、一部に関してはさらに議論が必要である。

#### (I) 対象とする医薬品、成分

- ・新原薬、新製剤（Q3A、Q3B）
- ・有効成分の合成経路の変更に伴い新規の不純物の発生、既存のDNA反応性不純物レベルの増加が懸念される既存医薬品
- ・承認後の追加申請（適応追加、用量追加等）により新たなDNA反応性不純物の発がんリスクが懸念される承認済医薬品
- ・臨床開発中の医薬品
- ・分解物\*

#### (II) 対象としない医薬品、成分

- ・溶出物
- ・添加物\*
- ・バイオ医薬品（S6）
- ・抗癌性腫瘍薬（S9）
- ・がん原性試験を必要としない有効成分\*

(\*対象としてさらなる議論が必要な医薬品、成分)  
また、本ガイドラインは上市医薬品だけでなく、臨床開発中の新規医薬品にも適用することが確認さ

れた。

#### D. 考 察

##### (1) EMAとFDAの遺伝毒性不純物に関するガイドラインの翻訳と調査研究

EMAとFDAの遺伝毒性のガイドラインは、これらに先んじて2006年に発表されたPHARMAのポジションペーパー “A rational for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity (Muller et al., Regul. Toxicol. Pharmacol., 44, 198-211, 2006) を参考にして作成されたため類似点が多い。いずれも臨床開発中および承認後に患者が遺伝毒性・発がん性不純物に暴露された場合の生涯発がんリスクの特徴を明らかにし、リスクを軽減するための様々なアプローチが記載されている。特徴的なものとして以下の内容が含まれている。

- ・ 関連不純物の生成を最小限に抑え、最大限除去するために合成経路および／または精製工程を変更する方法
- ・ 一般に市販品の関連不純物は1日最大暴露量1.5 $\mu$ gを目標値とするが、臨床開発中はこの値を超えてもよい。強い遺伝毒性・発がん性を示唆する警告部分構造を持つ不純物にこの一般の閾値アプローチを当てはめるのは不適切で、状況に応じた評価が必要である。
- ・ 作用機序や科学的根拠の重要度から遺伝毒性・発がん性リスクの特徴の詳細を明らかにする。あるいは不純物の規格に関する裏付けデータを取るための追加試験を行ってもよい。

これまで遺伝毒性（試験）はハザードの同定を目的とするものであったが、両ガイドラインは遺伝毒性不純物の暴露量評価、リスク評価を行うことを提案している。また、遺伝毒性には閾値がないという考えが常識であったが、毒性学的懸念の閾値（TTC）の導入や、作用機序から閾値が確立されれば、一日許容暴露量（PDE）を定めることができることが取り入れられている。これは遺伝毒性の考え方の大きな転換であり、パラダイムシフトともいえる。

一方、相違点としては臨床開発中の医薬品に関し

ては暴露期間に応じた段階的TTCを用いるが、両者のレベル、特に1ヶ月以下の短期間投与のレベルに相違があること、エームス試験の予測に用いるQSARモデルには多くの種類があるが、推奨されるモデルが異なること、FDAのガイダンスでは小児を対象とした医薬品の不純物に関してはさらなる安全性ファクターを適用することなどが挙げられる。いずれも重要な相違点とは考えられず、ICH-M7のガイドライン策定には大きな障害とはならないものと考えられる。

##### (2) ICH-M7ドラフトガイドラインの策定

ガイドラインのタイトルが「遺伝毒性不純物」から「潜在的発がんリスクを低減化するための医薬品中DNA反応性（変異原性）不純物の評価および管理」に変更された理由は、“M”の複合領域（Multidisciplinary）ガイドラインの性格上、その目的を明確にすること、対象とする遺伝毒性不純物の定義を明確にすることによる。後者に関しては、DNA反応性物質に限定した。DNA反応性物質は低用量でもDNAに損傷を与え、突然変異を誘発する可能性があり、閾値の証拠が十分に確立されていないため、医薬品に不純物として存在する場合、たとえ低用量でもがんを引き起こす可能性は否定できないことによる。概してDNA反応性発がん物質は、一般にエームス試験で検出することができる。一方、エームス試験陰性で、染色体異常試験や、MLAで陽性反応を示す遺伝毒性物質は、DNAと直接反応するとは考えにくく、閾値をもつと考えられ、不純物として存在する程度のレベルではヒトに対して発がんリスクを増加させるような脅威を与えるものではない。従って、遺伝毒性不純物の発がんリスクの低減にはエームス試験により変異原性の有無を立証し、管理に用いる。構造活性相関（QSAR）による評価はエームス陽性、もしくは陰性を示す化学構造を、これまでの立証された情報から予測するのに有用である。以上が本ガイドラインの一般原則である。

また、本ガイドラインの適用は、Q3ガイドラインの適用を踏襲し、新規医薬品申請の際に、DNA反応性不純物に関連した発がんリスクの管理のためのガ

イダンスを提供するものであり、上市されている既存の医薬品への適応を意図するものではなく、既存の不純物（原薬、製剤の品質）を再評価する必要はない。しかしながら、臨床適用や合成経路の大幅な変更があった場合には、既存品であっても適用される場合があるかもしれない。また、Q3と大きく異なる点は、このガイダンスは臨床開発中の新規医薬品にも適用されることである。しかしながら、臨床開発初期段階の不純物管理の手法は十分に開発されているとはいえず、患者の数が限られ、投与期間の短い臨床試験段階（たとえばPhase I）での適応にはさらに議論が必要である。

具体的な対象となる医薬品、成分に関しては1) 新原薬、新製剤 (Q3A、Q3B)、2) 有効成分の合成経路の変更に伴い新規の不純物の発生、既存のDNA反応性不純物レベルの増加が懸念される既存医薬品、3) 承認後の追加申請（適応追加、用量追加等）により新たなDNA反応性不純物の発がんリスクが懸念される承認済医薬品、4) 臨床開発中の医薬品、5) 分解物、としたが「分解物」に関しては、そのレベルや、分解物を同定するための各種試験法の選択に関して議論が必要と考える。

また、対象とならない医薬品、成分としては、1) 溶出物、2) 添加物、3) バイオ医薬品 (S6)、4) 抗悪性腫瘍薬 (S9)、5) がん原性試験を必要としない有効成分、とした。このうち「添加物」に関しては新規添加物に関しては対象とすべきとの意見がFDAから出された。また、「がん原性試験を必要としない有効成分」は、主として短期間投与の医薬品を対象とするが、がん原性試験は行っていないものの、遺伝毒性試験は実施し、安全性を担保しているため、その不純物に関しても対象とすべきとの意見もあり、これに関してもさらなる議論が必要である。

以上までが、福岡のEWGで議論され、一部確認された内容である。これら内容はステップ1のドラフトガイドラインに反映される予定である。数回のFace-to-FaceでのEWGで論議し、2012年でのステップ2、2013年でのステップ4を目指す。

## E. 結 論

EMEAとFDAの医薬品の遺伝毒性不純物に関するガイドラインの発表を受け、ICH EWGで国際ガイドライン (M7) の策定が2010年10月の福岡会議から開始された。ガイドラインの性格を明らかにするためタイトルを「潜在的発がんリスクを低減化するための医薬品中DNA反応性（変異原性）不純物の評価および管理」に変更した。医薬品中のDNA反応性不純物は、たとえそれが極微量レベルであったとしても、がんを引き起こす可能性は否定できない。DNA反応性不純物の評価はエームス試験と構造活性相関 (QSAR) によって行う。福岡会議ではまた、対象とする医薬品、成分、および対象としないものが論議された。これらの議論を基に現在ステップ1のドラフトガイダンスの作成作業が進行中である。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

本間正充 構造活性相関による遺伝毒性の予測  
国立医薬品食品研究所報告 128, 39-43 (2010)

黒川美佐夫、中村和市、細井一弘、本間秀行、上出良一、小野寺博志、吉田武美、下村和裕、笛木修、木村敬、成松鎮雄、永山隆、大野泰雄、影山明彦、Charles Humfrey、本間正充、岸本康弘、三分所厚司、庄司龍雲、津田雅之、原田寧、前田昭夫、望月正隆、西島正弘 第5回医薬品評価フォーラムー国際的に未解決な毒性試験の諸問題ー 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 41, 878-889 (2010)

### 2. 学会発表

本間正充 ; *In vitro* 遺伝毒性試験の問題点と将来  
第17回HAB研究機構学術年会 (2010.5)

Mekenyan, O., Ptkov, P., Todorov, M., Kotov, S., Stoeva, S., Dimitrov, S., Honma, M., Hayashi, M., Benigni, R.; Modeling *in vivo* micronucleus test by



simulating detoxification pathways QSAR2010, (2010.5)

第37回日本トキシコロジー学会学術年会 (2010.6)

本間正充；遺伝毒性試験とその科学的リレバンス  
第11回日本トキシコロジー学会生涯教育講演会  
(2010.6)

本間正充；医薬品における遺伝毒性不純物の管理  
と安全性評価  
日本環境変異原学会第39回大会 (2010.11)

本間正充；リスク評価における*in vitro*遺伝毒性試験の役割

H. 知的所有権の取得状況  
なし



欧州医薬品審査庁  
ヒト用医薬品の評価

2006年6月28日、ロンドン  
CPMP/SWP/5199/02  
EMA/CHMP/QWP/251344/2006

ヒト用医薬品委員会  
(CHMP)

遺伝毒性不純物の限度に関するガイドライン

安全性作業部会における審議	2002年6月-2002年10月
CPMPへの答申	2002年12月
協議のための公開	2002年12月
コメントの締め切り	2003年3月
安全性作業部会および品質作業部会における審議	2003年6月-2004年2月
CPMPへの答申	2004年3月
協議のための再公開	2004年6月
コメントの締め切り	2004年12月
安全性作業部会および品質作業部会における審議	2005年2月-2006年5月
CHMPによる採択	2006年6月28日
施行日	2007年1月1日

キーワード	不純物; 遺伝毒性; 毒性学的懸念閾値(TTC); 構造活性相関(SAR)
-------	--

7 Westferry Circus, Canary Wharf, London, E14 4HB, UK  
Tel. (44-20) 74 18 84 00 Fax (44-20) 74 18 86 13  
E-mail: mail@emea.eu.int http://www.emea.eu.int

©EMA 2006 Reproduction and/or distribution of this document is authorised for non commercial purposes only provided the EMA is acknowledged

## 遺伝毒性不純物の限度に関するガイドライン

### 目次

要旨 .....	3
1. はじめに.....	3
2. 適用範囲.....	3
3. 法的根拠.....	3
4. 毒性の背景 .....	4
5. 提言 .....	4
5.1 閾値関連 (threshold-related)メカニズムに対する十分なエビデンスがある遺伝毒性化合物 .....	5
5.2 閾値関連 (threshold-related)メカニズムに対する十分なエビデンスがない遺伝毒性化合物.....	5
5.3 遺伝毒性不純物の許容性評価のための決定木 .....	8
参考文献 .....	9

## 要旨

有効成分中の遺伝毒性不純物の毒性評価やそのような不純物の許容限度の設定は難しい課題であり、現行の ICH Q3X ガイドラインではその詳細について十分に取り上げられていない。通常、遺伝毒性不純物に利用できるデータセットにはかなりのばらつきがあり、また許容限度の評価に用いられる過程を決定づける主な要因となる。確立したリスク評価法のいずれかの適用に通常必要とされるデータ、すなわち発癌性に関する長期試験のデータや遺伝毒性閾値メカニズムのエビデンスとなるデータがない場合には、毒性学的懸念閾値(TTC)により定義される一般的に適用可能なアプローチの実施することが提案される。大部分の医薬品では、遺伝毒性不純物の摂取 TTC 値  $1.5 \mu\text{g}/\text{日}$  が許容リスク(生涯過剰発癌リスクが  $1/100,000$  未満)に関係すると考えられている。この閾値から、有効成分の許容濃度を予測 1 日量に基づいて算出することができる。曝露期間が短期であるなど、ある特定の条件下では、より高い限度の妥当性が示される可能性がある。

### 1. はじめに

不純物の安全性確認に関する一般概念は有効成分に関するガイドライン(Q3A、新有効成分中の不純物)または医薬品に関するガイドライン(Q3B、新医薬品中の不純物)に示されており、規定の濃度において個々の不純物あるいは所定の不純物プロファイルに関する生物学的安全性を確立するデータを入手および評価するプロセスとして安全性確認が定義されている。遺伝毒性を有する不純物の場合、許容投与量の設定は一般的に特に重要な課題とみなされているが、これは現行のガイドラインでは具体的に上げられていない。

### 2. 適用範囲

本ガイドラインには、新有効成分中の遺伝毒性不純物への対処に関する全般的枠組みと実際のアプローチが記載されている。また、既存の有効成分の新しい適用にも関連しており、合成ルートの評価、工程管理および不純物プロファイルからは、EU で現在認可されている同じ有効成分を含有する既存製品と比較して、新規またはより高濃度の遺伝毒性不純物を取り込まれていないことに関して合理性保証が得られない。同じことは、合成に関する既存の市販認可が多岐にわたっていることにも当てはまる。しかし、懸念に関して特定の原因がない限り、本ガイドラインを認可製品に遡及的に適用する必要はない。

この文脈では、化合物(不純物)の遺伝毒性という分類は全般的に、直接 DNA 損傷を与える可能性がある DNA 反応性物質に主に焦点を当てた *in vitro* または *in vivo* の遺伝毒性試験の結果が陽性であることを意味する。単離した *in vitro* での結果は、*in vivo* との関連性について適切なフォローアップ試験により評価する場合がある。このような情報がない場合には、*in vitro* における遺伝毒性物質を *in vivo* における変異原および発癌性物質と仮定して考える。

### 3. 法的根拠

本ガイドラインは、欧州連合理事会指令 [2001/83/EC](#)(改訂版)および関連する全ての CHMP ガイド