

Fig. 8. A typical concentration-distance profile of hydrophilic compound in hairless rat skin and EpiDerm.

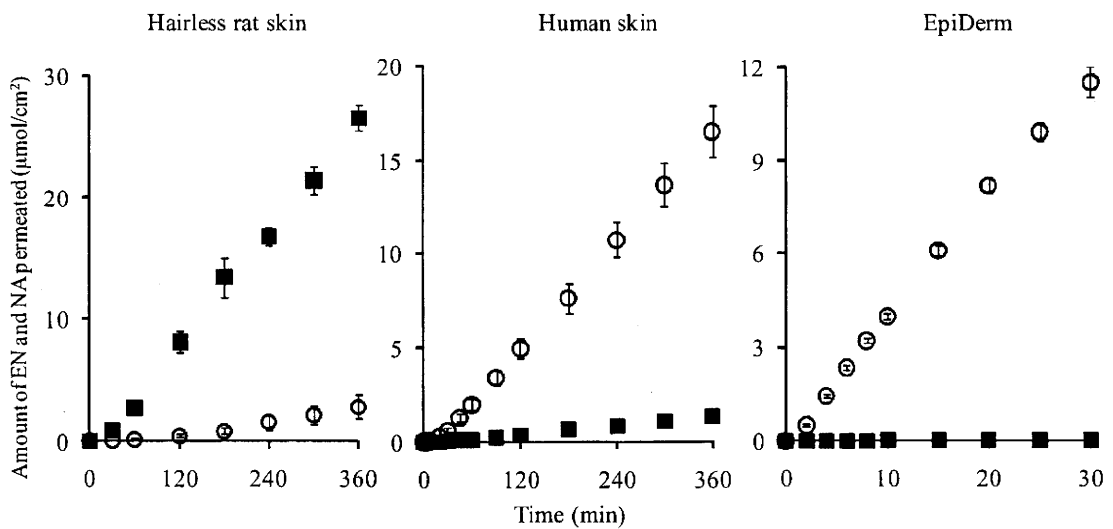


Fig. 9. Time course of the cumulative amount of EN and NA that permeated through hairless rat skin, human skin and EpiDerm. Symbols:  $\circ$ ; EN,  $\blacksquare$ ; NA. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$  or 4).

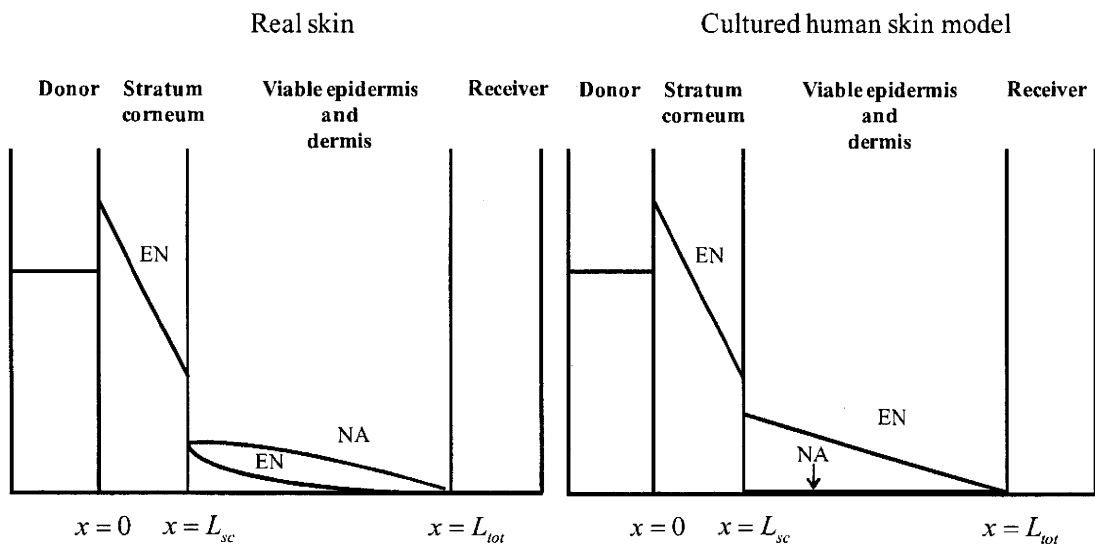


Fig. 10. A typical concentration-distance profile of EN and NA in excised human skin and cultured human skin models.

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
分担研究報告書

代替法についての国際情勢の調査

研究分担者 板垣 宏 日本化粧品工業連合会、技術委員会動物実験代替専門委員会委員長  
研究協力者 岡本 裕子、青木 摩利男、荒木 大作、荒島 雅樹、加藤 義直、金森 健之、  
川上 幸治、坂口 育代、坂口 眞由美、實川 節子、瀬戸 洋一、萩野 滋延、  
宮澤 正明、矢作 彰一、加賀 光明

研究要旨

本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するためには、関連する国際情勢の調査は必要不可欠な研究活動である。特に EU では、2003 年 3 月に公布され 2009 年 3 月 11 日に発効した「化粧品指令第 7 次改正」と 2007 年 6 月 1 日に発効した「化学物質の登録と規制 (REACH)」のため、ECVAM を中心に動物実験代替法の開発と評価は非常に進展している。一方、米国においては ICCVAM が中心となって代替法の評価が進行している。近年、代替法の開発と評価はグローバル化が加速し、国際的な協力体制が整いつつあり、本邦における対応案策定にはこれら国際情勢の調査・把握は重要である。

本年度の特筆すべき動きは、2010 年 7 月に再構築ヒト表皮試験が OECD テストガイドライン 439 として、LLNA : DA が 442A として、LLNA : BrdU-ELISA が 442B として、*in vitro* 哺乳類細胞小核試験が 487 として採択されたことが挙げられる。

欧州においては、欧州委員会の保健・消費者保護総局 (DG SANCO) は 2013 年に禁止される試験について、各試験の専門家の意見というレポートをウェブに掲載し、意見募集した。このレポートでは、動物試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 2013 年に禁止される反復投与毒性、感作性、発癌性、毒物動態、生殖毒性について、2013 年までにこれらの試験の代替法の確立は困難と記述されている。2011 年に欧州委員会はこれらの 2013 年に禁止される試験について（禁止を延期するかどうか）の最終報告書を公表予定である。

米国においては、北米初の代替法関連学会である American Society for Cellular and Computational Toxicology (ASCCT) の設立が挙げられる。コンピューターによる毒性予測研究の更なる進展が期待される。

また、日本においては 2007 年より検討してきた「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」の総括を実施したこと、2010 年度より新たな厚生労働科学研究費補助金研究（予定期間 3 年）が開始されたこと、JaCVAM 評価会議が皮膚感作性試験代替法である LLNA-BrdU 法の新規試験提案書を 2010 年 5 月に行政に向けて提案したことが挙げられる。さらに、ICCR 等の国際協調の流れを受けて、平成 23 年 2 月 4 日付で厚生労働省医薬食品局審査管理課から事務連絡「医薬部外品の承認申請資料作成時における動物実験代替法の利用と JaCVAM の活用について」が通知され、日本における代替法の活用に向けた具体的な取り組みの推進が急務となってきた。

このように国内外の代替法に関する情勢は急速に変化しており、関連情報を継続的に収集分析し、その結果を公表していくことは、本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するうえで必要と考えられる。

A. 研究目的

本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するためには、関連する国際情勢の調査は必要不可欠な研究活動である。特に EU では、2003 年 3 月 11 日に公布され、2009 年

3 月 11 日に発効した「化粧品指令第 7 次改正」(2003/15/EC) と 2007 年 6 月 1 日に発効した「化学物質の登録と規制」(Registration Evaluation and Authorization of Chemicals; REACH) のため、欧州代替法検証センター

(European Centre for the Validation of Alternative Methods; ECVAM) を中心に動物実験代替法開発と評価は非常に進展している。

一方、米国においては代替法検証省庁間連絡委員会 (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods; ICCVAM) が中心となって代替法の評価が進行している。最近、代替法試験協力国際会議 (International Cooperation on Alternative Test Methods; ICATM) の設立に見られるように国際的なバリデーションや専門家による第三者評価の体制が整いつつあり、今後、代替法の開発と評価はグローバル化が加速するものと考えられ、本邦における対応案策定にはこれら国際情勢の調査・把握は重要である。

本研究においては、以前よりこれらの欧米の動向をより密接な情報収集活動により把握し、適切な対応を講じることで、動物実験代替法の開発と利用を促進することを目標に調査研究を推進してきた。

## B. 研究方法

### B-1 情報収集

情報収集は、過去の本研究による経験から、いくつかのホームページ (SCCS, OECD, ECVAM, ICCVAM, EPAA など) を定期的に検索すると共に EU については同地域の化粧品工業会である欧州化粧品工業会 (COLIPA)、米国については米国化粧品工業会 (Personal Care Products Council; PCPC、旧称 CTFA: Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association) との連繋を通じて実施した。この他、代替法の承認状況等については、専門学会の会誌やニュースレターも参考とした。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験代替法に関する情報を収集することにより、実験動物の福祉向上を目指すものであり、ヒトや動物の権利や福祉に抵触するところはない。

## C. 研究結果及び考察

### C-1 EU における動物実験禁止と代替法開発の動向

#### C-1-1 化粧品指令第7次改正

化粧品指令第7次改正が2003年3月11日付けで公布され<sup>1)</sup>、公布から6年を経て、欧州域内での動物実験禁止が2009年3月に施行された。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域内での販売も禁止された。欧州委員会が採択した段階的廃止スケジュールでは、皮膚感受性、亜急性及び亜慢性毒性、UV 誘導毒性、光アレルギー (感作) 及び発がん性についても2013年3月を禁止期限として挙げている。これらを「反復毒性」として分類した理由は、毒性が反復投与の結果として生じるという事実にあるとしている。2010年7月に、欧州委員会の保健・消費者保護総局 (DG SANCO) が2013年に禁止される試験について、各試験の専門家の意見というレポートをウェブに掲載し、それに対する意見募集を実施した。このレポートでは、動物試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2013年に禁止される反復投与毒性、感作性、発癌性、毒物動態、生殖毒性について、2013年までにこれらの試験の代替法の確立は困難と記述されている<sup>2)</sup>。2011年に欧州委員会は2013年に禁止される試験について (禁止を延期するかどうか) の最終報告書を公表予定である。

化粧品指令第7次改正は、2009年12月に再編され、新化粧品規則 (1223/2009/EC) として告示された<sup>3)</sup>。同化粧品規則では、既存化粧品の安全性に関して重大な懸念が生じる場合、加盟国は欧州委員会に動物実験禁止の適用除外を認めることができることが、以下の条件付で定められている。

- ・当該成分が広く使用されており、同様の機能を果たすことのできる別の成分に置き換えられることができない場合
- ・ヒトの健康に対して問題のあることが実証されており、動物実験を行うことが正当化され、かつ評価のための詳細な研究プロトコル提案がある場合

2010年5月には、欧州化粧品原料連盟 (EFfCI; the European Federation for Cosmetic Ingredients) が化粧品指令第7次改正の動物試験条項に対応するための技術的ガイダンスを公表した<sup>4)</sup>。このガイダンスでは化粧品指令の法解釈を確定しておらず、法律遵守の判断の責任は化粧品会社にあるとしている。

化粧品指令第7次改正の基本的骨子は、以下の通りである<sup>1), 5), 6)</sup>。

- ・化粧品及び化粧品原料のEU域内の動物実験禁止
- ・化粧品: 加盟国の国内法施行後に即時禁止

※猶予期間は最大18ヵ月 (2004年9月)

- ・原料：代替法がある場合は加盟国の国内法施行後に即時禁止、完全な動物実験禁止は化粧品指令発効の6年後(2009年3月)。
- ・EU委員会は、Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)のバリデーションの進展を考慮した上で、SCCNFP及びECVAMと協議して、種々の試験の段階的廃止に関する期限などの予定を立案する。
- ・動物実験を実施した製品又は動物実験を実施した原料を含む製品のEU域内の販売禁止 (EU域外での動物実験がなされた製品及び原料も含む)
- ・代替法がある場合は、加盟国の国内法施行後に即時禁止  
※猶予期間は最大18ヵ月(2004年9月)
- ・完全な販売禁止は、化粧品指令発効の6年後(2009年3月)以降  
例外：反復毒性、生殖毒性、薬物動態試験については2013年3月からの販売禁止
- ・EU委員会は、OECDのバリデーションの進展を考慮した上で、SCCNFP及びECVAMと協議して、種々の試験の段階的廃止に関する期限などの予定を立案する。

#### C-1-2 ECVAMにおける代替法開発状況

化粧品指令第7次改正では種々の動物試験の段階的廃止に関する timetable 作成が要求されている。本件に関しては、2004年4月30日に、“Report for establishing the timetable for phasing out animal testing for the purpose of the Cosmetic Directive”をECVAMが報告している<sup>7)</sup>。このECVAMの報告書では、皮膚腐食性、皮膚刺激性、光毒性、光遺伝毒性を除く多くの試験法は、化粧品指令第7次改正の禁止年には完全代替は困難と予測されている。

このため、ECVAMは、第6次 Framework Programme on Research and Development (FP6)として、① A-Cute-Tox Project (急性毒性試験)、② ReProTect Project (生殖発生毒性試験)、③ Sens-it-iv (感作性試験)を組織した<sup>8)</sup>。

A-Cute-Tox Projectは実験動物を使用しない急性毒性試験の開発を目的に2005年1月1日に開始された5年間のプロジェクトである。35名の共同研究者、総予算1560万ユーロ、そのうちEUから900万ユーロの予算を受けて、

ヒトにおける急性毒性を予測する *in vitro* 試験の開発、戦略の最適化、プレバリデーション、データベースの作成等を実施している。9つの Work package で検討が進められ、2010年6月30日でプロジェクト終了となった<sup>9)</sup>。

ReProTect Projectは *in vitro* 生殖発生毒性試験の開発と最適化の促進を目的に、35の大学、行政機関、企業などの共同研究者、約910万ユーロの資金を受けて進められている。正式には2004年7月から5年間の予定で開始され、現在3つの大きな研究テーマ(受精、着床、生前発育)そしてそれら研究の横断的技術に関して研究が進められた。

Sens-it-iv プロジェクトは30名の共同研究者、1100万ユーロの資金を受けて、2005年10月から5年間の予定で開始された。プロジェクトの目的は、皮膚及び吸入における感作性物質を同定する *in vitro* 試験法による動物試験の代替である。現在このプロジェクトには28のグループ(9つの企業、15の大学や研究機関、4つの業界団体)が参加しており、プロジェクト活動は10の Work package で進められた。2010年3月でプロジェクトは終了し、今後、2011年春に白書が作成される予定である<sup>10)</sup>。

ECVAMは第7次 Framework Programme on Research and Development (FP7)として2008年5月より Predict-IV というプロジェクトを5年間の予定で開始した<sup>11)</sup>。このプロジェクトは、動物によらない試験系、細胞生物学、機能毒性学及び *in silico* を統合することによって、迅速かつ安価に薬物の安全性を評価する戦略を作ることを目標としている。

FUB (Freie Universität Berlin)、HSI-UK (Humane Society International-UK)、CARDAM-VITO (Centre for Advanced R&D on Alternative Methods at the Flemish Institute for Technological Research)は、第7次 Framework Programme on Research and Development (FP7)として2010年1月より AXLR8 (accelerate) という共同活動を開始した<sup>12)</sup>。AXLR8は、ヨーロッパ及び国際研究内容をまとめ、議論することで、毒性経路 (TP) を基盤としたパラダイムへの転換を促進するプログラムである。2010年3月に第一回会議が開催され、2010年のコンソーシアムレポートが作成された<sup>13)</sup>。

皮膚刺激性試験代替法に関しては、ECVAM 科学諮問委員会 (ECVAM Scientific Advisory Committee; ESAC) が、2007年に EPISKIN、2008

年にEpiDerm SITとSkinEthic Reconstructed Human Epidermis (RhE)を承認した。これらの試験法は、無皮膚刺激性物質 (EUにおけるノンラベル区分)と皮膚刺激性物質 (R38の注意表示をする区分)を判別できる試験法であることから、化粧品原料の評価にも活用されることが考えられる。これら3種の試験法は、2010年7月にOECDテストガイドライン439として採択された<sup>14)</sup>。

眼刺激性試験代替法に関しては、ECVAMにおいて弱い眼刺激性を検出するために細胞を用いた方法 (Neutral Red Release;NRR, Red Blood Cell;RBC, Fluorescein Leakage;FL, Cytosensor Microphysiometer;CM)が再評価され、2009年7月7、8日の第31回ESAC会議において、CMが水溶性物質 (及び混合物)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及び水溶性の界面活性剤配合の混合物に対して無刺激性を確認するための試験法として承認された。さらに、FLは水溶性物質 (及び混合物)の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法として承認された<sup>15)</sup>。これら試験法は、2009年9月に公開されたドラフトOECDテストガイドラインに収載された<sup>16)</sup>。また、3D培養モデル (SkinEthic Human Corneal Epithelial Model, EpiOcular OCL-200 Model)のバリデーションが実施されている。

皮膚感作性試験代替法に関しては、Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)、human Cell Line Activation Test (h-CLAT)、Myeloid U937 Skin Sensitisation Test (MUSST)の3試験のプレバリデーションが実施されている<sup>17)</sup>。

ECVAMはESACの再編と専門家集団 (EcvamExpertPool:EEP)設置を告知し、また新たに、ECVAMの活動に対する意見を求めるためのECVAM Stakeholder Forum (ESTAF)を設置した<sup>18)</sup>。年1回の会議が予定されており、第1回会議が2011年春に行われる予定である。

#### 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。

2010年6月の第7回SCCS総会で「化粧品

成分の皮膚吸収の*in vitro*評価のための基本的規準」が採択された<sup>19)</sup>。これによると、サンプリングされた皮膚は変動が大きいため最低4人、最低8つの評価可能なサンプルが必要であり、質量収支は85%以上であること、明確に皮膚吸収係数の相対標準偏差が言及されることが必要であるとされた。また、大きな変動性を考慮してMargin of Safetyの算出には平均値ではなく平均値+1SDを用い、場合によっては平均値+2SDが使用されるとされた。その他、皮膚吸収に関する情報が不十分である場合には100%の吸収率が用いられていたが、分子量が500以上でかつ、 $\log P_{ow}$ が-1より小さいか4より大きい場合には10%の値が使用されることが記述された。

2010年12月の第9回SCCS総会では「皮膚刺激性試験のためのEPISKIN™ *in vitro*試験についての覚書」が採択された<sup>20)</sup>。この中でSCCSは工業会から提出されたデータを評価しており、15の紫外線吸収剤・防腐剤・皮膚調整剤についてはEPISKIN™での結果と*in vivo*の結果に良好な相関性があるとした。一方、26の色素については妨害を除くために修正EPISKIN法を用いたデータが提出されたが、SCCSは手法に多くの欠陥があり有用性は十分に証明されていないとした。これらの色素については、HPLC/UPLCによるホルマザン定量などの光学密度測定以外の他のエンドポイントが考慮されるべきと述べている。

#### 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>21)</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 (石鹼洗剤協会)、ECPA (欧州農業工業会)

など7団体が参加しており、企業からは医薬品、化粧品、化学品メーカーなど40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を。

2006年5月に今後5カ年の活動計画が公表され、2009年にはこの計画の見直しが行われた。

2010年は5カ年計画の最終年に該当し、これまでのEPAA活動の主な成果としては以下のことが挙げられる<sup>22)</sup>。

- ・3Rsに関する研究のマッピング、ならびに in-house活用状況に関するデータベースの構築
- ・業種間を越えた技術移転の可能性調査
- ・バリテーションの障害を克服する為のプロセス開発
- ・規制上要求される試験に対して新規アプローチが可能な技術分野の特定
- ・Marketplace conceptによる3Rsの普及

2010年11月30日にBrusselsで第6回の年次大会(Annual Conference 2010)が開催された。内容としては「Reduction & Refinement: combining excellence in science and animal welfare」を主題としており、EPAAが2010年にフォーカスした2Rsのさらなる活用の可能性に関するテーマの進捗が数多く報告された。同時に、2011年から2015年を対象とした新規5カ年活動計画が公表された。この活動計画は初期5カ年の成果ならびに2009年に実施した、より効率的、且つ資源を最大限に活用するための構造改革が反映されている。活動計画は以下の3つの主題で構成される。

・Platform on Science; コンピューター/システムサイエンスに関する知識と科学上のギャップの同定、ならびに今後、さらなる研究が必要とされる分野の特定、研究促進

・Platform on 3Rs in Regulation; 規制上要求される試験への3Rsの活用、ならびにIntegrated testing strategyの信頼性向上

・Platform on Dissemination & Communication; 規制当局ならびに動物実験従事者に3Rsを普及させる為のコミュニケーションツールの開発と改善

その他、2010年に開催されたEPAA Workshopは以下のとおりである。

- ・2Rsに関するワークショップ：科学と動物愛護における長所を合わせたReductionとRefinement
- ・計算化学とシステム生物学：「生命化学の利用」に関するワークショップ
- ・急性毒性試験に関するワークショップ：発信事項のレビュー
- ・ワクチンに関するワークショップ：一貫したアプローチ

REACH<sup>23)-26)</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、年間1000トン以上の製造/輸入量のある物質の登録は2010年11月30日に締め切られた。

また、年間1000トン以下に該当する物質の登録期限は以下のとおりである。

- ・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 ヶ月) 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<sup>27)</sup>。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 において 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。研究の公募は 2009 年 7 月～2010 年 2 月 3 日に実施され、公募対象の研究内容は以下の 7 分野から成る。

- ・ ヒトベースの標的細胞 *in vitro* で機能分化させる現在の方法論の最適化と新規方法の開発
- ・ 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人ベースの標的細胞におけるエンドポイントおよ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を開発する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

2010 年 4 月には 7 分野から各々の研究テーマが選出され、研究助成金該当者と EU 委員会との間で契約内容に関する交渉が進められた。各研究テーマは 2011 年 1 月より開始される予定である。

#### 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>24)</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。2009 年の組織改革によって、SPT (Strategic Project Team) の下 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>28) - 31)</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>32)</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<sup>31)</sup> の ring study など実施された。この結果は 2010 年 9 月、Toxicol. *In Vitro* に発表された<sup>32)</sup>。この結果を受けて ECVAM でのプレバリデーションが行われている。

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、遺伝毒性についてそれぞれ Regulatory Toxicology and Pharmacology 誌に発表した<sup>35) - 37)</sup>。

COLIPA は Skin Tolerance Task Force のワークショップを 2010 年 6 月 21、22 日にブリュッセルで行った。この会議では、*in vitro* 皮膚感作性試験確立のための生物学的メカニズムの理解、および評価法、プレバリデーション、試験ストラテジーを中心に議論された。<sup>38)</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>39)</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>40)</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>41)</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* 法のプロトコールを収集した「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>42)</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>43)</sup> は、オランダにおける動物実験代替法の開発、バリデーション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

### ・IUTOX 2010

International Congress of Toxicology はヒトおよび環境に関する毒性学の学術・産業・法制界の専門家間の意見交換を目的とし、3年ごとに開催されている。2010年の12回大会は7月19日から23日にかけてスペインのバルセロナで開催された<sup>44)</sup>。プレ会議として「AXLR8-21世紀の毒性学へのアプローチ」と題した一般公開フォーラムが開かれ、欧州枠組みプログラムによるプロジェクトであるAXLR8、VITROCELLOMICS、Sens-it-iv、PREDICT-IVおよび米国のプログラムToxCastとTox21が紹介された。動物実験代替法関連では分子・細胞生物学研究から*in vitro*代替法による長期にわたる影響の予測、また「オミクス」戦略による*in vitro*試験法、あるいはより合理的な動物試験法などが議論の対象となった。

### ・ESTIV

European Society of Toxicology *in vitro* (ESTIV)<sup>45)</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。

2010年はEUSAAT (European Society for Alternatives to Animal Testing)と共同で9月2日から4日にかけて、オーストリアのリンツで会議が行われた。動物実験代替法に関しては皮膚および皮膚感受性および眼刺激性試験、急性および慢性毒性についてのセッションがあった。さらにナノ毒性の*in vitro*試験法に関するセッションがスイスの動物愛護団体であるAnimalfree Research (Zurich)の後援を得て行われた。

### ・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ン、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>46)</sup>を無料

でメンバーに発行している。

## C-1-8 小括

2009年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から、EUにおいては代替法開発が一層緊急性を帯びてきた。

皮膚刺激性試験代替法に関しては再構築表皮モデル (EPISKIN, EpiDerm SIT, SkinEthic RHE) を用いる*in vitro*法が3種、2010年7月にOECDテストガイドライン439として採択された<sup>14)</sup>。2010年12月の第9回SCCS総会では「採択された皮膚刺激性試験のためのEPISKIN™ *in vitro*試験についての覚書」によれば色素については光学密度測定以外の他のエンドポイントが考慮されるべきと述べている。

眼刺激法に関しては、Cytosensor Microphysiometer (CM)、およびFluorescein Leakage (FL)による*in vitro*試験法が、2009年9月に公開されたドラフトOECDテストガイドラインに収載され<sup>16)</sup>、3D培養モデル (SkinEthic Human Corneal Epithelial Model, EpiOcular OCL-200 Model) のバリデーションが実施されている。

また、EPAAは代替法のターゲットとして単回、反復の全身毒性を重要視しており、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ン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。①Non-radioisotopic Local Lymph Node Assay (非RI-LLNA)であるLLNA:DA及びLLNA:BrdU-ELISAが連邦機関に推薦されたこと<sup>2)</sup>。②眼刺激性試験に関連し、in vivo眼刺激性試験における局所麻酔及び全身性鎮痛剤の常用と人道的観点、Cytosensor microphysiometer (CM)を水溶性物質や製品を対象として重篤な眼刺激性ポテンシャルを同定することや水溶性界面活性剤や界面活性剤を含む製品の無刺激性の選定に用いること等が連邦機関に推薦されたこと<sup>3)</sup>。③NICEATMとICCVAMは「レギュラトリー安全性試験の最善策」と題する一連のワークショップを2011年1月に開催し、眼刺激性及びアレルギー性接触皮膚炎の評価における代替試験法の戦略等の情報が提供されたこと<sup>4)</sup>。

・LLNA:DA及びLLNA:BrdU-ELISAを連邦機関に推薦

ICCVAMは放射性物質を用いない2種類のLLNA(LLNA:BrdU-ELISA及びLLNA:DA)を2010年6月に連邦機関に推薦し、このICCVAMの推薦は各省庁によって承認され、受入れに向けた評価のとりまとめが行われている。推薦書では、一般財団法人 化学物質評価研究機構によって開発されたLLNA:BrdU-ELISAは、放射性標識の代わりに、塩基の類縁化合物であるプロモデオキシウリジン(BrdU)をリンパ細胞の増殖評価に用いており、ダイセル株式会社によって開発されたLLNA:DAはアデノシン三リン酸を放射性標識の代わりに用いるもので、両法はJaCVAMのコーディネーションのもと、バリデーションが完了していること等が示されている。これらの方法の利点として、推薦書でICCVAMは放射性同位体が不要であ

るため、より多くの試験機関でLLNAの使用が可能になると述べている。

LLNA:DA及びLLNA:BrdU-ELISAの2試験法は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、非RIの改変法の中で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された<sup>5)</sup>。また、2009年9月にはNICEATMが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)を公表していた。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が示された<sup>6)</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ていた<sup>7)</sup>。これらに基づき、OECD TG429 LLNA法のアップデートがされており、従来法に比べて20%の動物使用の削減とReduced LLNA法を利用した場合にはさらに40%の動物使用の削減となる<sup>8)</sup>。

・眼刺激性試験に関する連邦機関への推薦

2010年9月にICCVAMは眼刺激性に関する推薦を連邦機関に送付した。推薦の内容としては、in vivo眼刺激性試験における局所麻酔及び全身性鎮痛剤の常用と人道的観点、Cytosensor microphysiometer (CM)を水溶性物質や製品を対象として重篤な眼刺激性ポテンシャルを同定することや水溶性界面活性剤や界面活性剤を含む製品の無刺激性の選定に用いること等が含まれている。

CM法については、重篤な眼刺激を引き起こす可能性を持ったある種の水溶性物質の同定のスクリーニング試験として用いることができる。水溶性の物質や混合物についてはCM法で陽性となった場合は動物を用いた追加試験を行うことなく、重篤な眼刺激性を有すると分類することができる。CM法はまた、水溶性界面活性剤及びいくつかの化粧品やパーソナルケア製品のような界面活性剤を含む処方についてそれらの成分や製品が眼のハザードを表示する必要があるような眼の損傷を引き起こすものではないことを判断することに用いることができる。ただし、CM法は抗菌剤への適応を可能とするにはデータが不十分とさ

れている<sup>9)</sup>。

・NICEATMとICCVAMのワークショップ「レギュラトリー安全性試験の最善策」

上述の通り、皮膚感作性及び眼刺激性については連邦機関での受入れが進められており、NICEATMとICCVAMは「レギュラトリー安全性試験への最善策」(“Best practices for Regulatory Safety Testing”)と題する一連のワークショップを2011年1月に開催した。これらのワークショップでは安全性試験での動物の使用を減らし、または動物の苦痛を除去し、化学物質や製品のハザード評価を実施するために利用可能な代替試験法に関する情報を提供するものである。2011年1月19日には化学物質により誘導される眼刺激の評価に関するワークショップが、翌1月20日には化学物質により誘導されるアレルギー性接触皮膚炎の評価に関するワークショップが開催された。

ワークショップには、関連する機関を代表して専門家が参加し、眼刺激及びアレルギー性接触皮膚炎の安全性とハザード評価のための代替試験法と戦略が議論された。参加者は利用可能な代替試験法の長所と短所、データの種類、リスクアセスメント等におけるそれらデータの使用に関する知識を得ることができる。ワークショップの発表者は米国における規制上の要件、代替試験法の受入れ状況等について議論した。

・その他の動向

ICCVAMは2008-2009年の隔年報告(2008-2009 Biennial Report)を2010年6月に発表した<sup>10)</sup>。報告書の中では以下の点が挙げられている。①化学物質や製品が重篤な眼刺激性を呈するかどうかを決定するための2つの*in vitro*安全性試験を推奨した。ICCVAMの評価に基づき、それらの方法は2008年に米国の連邦機関に採用され、国際的な試験ガイドラインとして2009年に採用された。それらは初めての科学的に有効な代替試験法で、眼の安全性試験において生きた動物を用いることのない方法として規制上の受け入れが得られたものである。②2つの*in vitro*試験法を急性経口毒性の評価法として推薦した。それらの方法は最大50%まで動物の使用を減らすことができる。連邦機関はこの推薦を2008年に受入れている。③化学物質と製品がアレルギー性の皮膚反応を起こすかどうかを

評価するためのLLNAについて、使用動物数を減らしたreduced LLNAを推薦した。rLLNAでは動物の使用を20%から50%まで減らすことができる。連邦機関は従来のLLNAについては、1999年に採用しており、アップデートされた方法は2010年初旬に受け入れられている。④2009年に米国は欧州、カナダ、及び日本とともに、ICATM(International Cooperation on Alternative Test Methods)に合意した。ICATMは国際協力と各国のバリデーション機関連携のコーディネーションを促進するものである。この合意によりNICEATMとICCVAMは科学的バリデーションと新規安全性試験方法の採用を加速させるための枠組みとなり、消費者、動物、及び環境を保護しながら動物使用の更なる削減、苦痛の除去、および代替を推進する。

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。現在、*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)の評価が進められている<sup>11)</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>11)</sup>。

米国における代替法関連学会 American Society for Cellular and Computational Toxicologyが2010年に設立された<sup>12)</sup>。この新しい学会は北米における代替法関連の初めての学会となる。細胞およびコンピューターによる方法の開発、受け入れ、活用を促進することを目的としている。

化学物質管理の強化が各国で進められているが、米国議会では有害物質規制法(TSCA)の改正に関する議論が進められている。2010

年7月に提出されている上院及び下院の改定案の中で、化学物質の試験において動物の使用を減らすことが盛り込まれている<sup>13)</sup>。

#### C-2-2 米国化粧品工業会の状況

PCPC(旧CTFA)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>14)</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。

#### C-2-3 小括

本年度の代替法に関する米国の主な動向として、以下のことがあげられる。①Non-radioisotopic Local Lymph Node Assay(非RI-LLNA)であるLLNA:DA及びLLNA:BrdU-ELISAが連邦機関に推薦されたこと<sup>2)</sup>。②眼刺激性試験に関連し、*in vivo*眼刺激性試験における局所麻酔及び全身性鎮痛剤の常用と人道的観点、Cytosensor microphysiometer(CM)を水溶性物質や製品を対象として重篤な眼刺激性ポテンシャルを同定することや水溶性界面活性剤や界面活性剤を含む製品の無刺激性の選定に用いること等が連邦機関に推薦されたこと<sup>3)</sup>。これらの推薦書については各省庁からコメントが出されており、それらの方法が国内の規制において利用可能な状況となることが予想される。

#### 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。これらテストガイドライン(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>。

2010年7月22日に新規/改訂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4新規試験法および2改訂試験法が採択された。

##### ・新規試験法ガイドライン

TG 439 *in vitro*皮膚刺激性：再構築ヒト表皮法

TG 442A 皮膚感作性：LLNA：DA法

TG 442B 皮膚感作性：LLNA：BrdU-ELISA法

TG 487 *in vitro*哺乳動物細胞小核試験

##### ・改訂試験法ガイドライン

TG 417 毒性動態

TG 429 皮膚感作性：LLNA法

皮膚刺激性試験に関しては、再構築ヒト表皮(RhE)を用いた3法(EPISKIN<sup>TM</sup>法、改良EpiDerm<sup>TM</sup>法およびSkinEthic<sup>TM</sup> RHE法)が記載されている<sup>3)</sup>。これら3法について、性能基準の更新、データ統合の経緯と状況、ならびにUN GHS適合性などが検討された。詳細は、*in vitro*皮膚刺激性試験背景解説<sup>4)</sup>を参照されたい。なお、日本発の表皮モデルLabCyte EPI-MODEL<sup>TM</sup>は記載されなかった。

感作性試験に関しては2種の非RI法(LLNA：DA法(TG 442A)、LLNA：BrdU-ELISA法(TG 442B))が新たに採択された。両試験法は、それぞれ、リンパ球の増殖をATP量<sup>5)</sup>および核酸の合成量<sup>6)</sup>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>7)</sup>。本邦においてもJaCVAMにおいて両試験法のバリデーションならびに評価が行われ、LLNA：DA法・LLNA：BrdU-ELISA法ともに行政試験法として提案されている<sup>8)</sup>。また、皮膚感作性LLNA法(TG 429)の改訂がなされた。改訂後において、ハザード評価に使用するための動物数を削減したreduced LLNAを認めており、また、別表にはPerformance standardsの22物質が示された<sup>9)</sup>。

新たにTG 487として採択された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<sup>10)</sup>。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、被験物質の潜在的がん原性をスクリーニングする。

一方、4種の新規試験法ドラフトガイドラ

インおよび2種の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  
刺激性/強刺激性/腐食性に分類されない物質同定 Cytosensor Microphysiometer 法 (意見募集締切日: 2011年2月5日)  
腐食性/強刺激性同定蛍光漏出 (Fluorescein Leakage; FL) 試験法 (意見募集締切日: 2011年2月5日)  
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: 2011年2月5日)  
延長1世代生殖毒性試験 (理事会未承認)  
トランスジェニックげっ歯類変異原性アッセイ (意見募集締切日: 2010年11月19日)
- ・改訂試験法ガイドライン  
TG 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)  
TG 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)

Cytosensor Microphysiometer (CM) 試験はマウス L929 細胞を用いた眼刺激性を評価する *in vitro* 試験法であり<sup>11)</sup>、水溶性物質(および混合物)の眼腐食性と強刺激性の確認、ならびに水溶性の界面活性剤および水溶性の界面活性剤配合の混合物における無刺激性の確認を目的とする。一方、Fluorescein Leakage (FL) 試験は Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞株を用いた眼刺激性を評価する *in vitro* 試験法であり<sup>12)</sup>、水溶性物質(および混合物)の眼腐食性と強刺激性を確認することを目的とする。しかしながら、いずれの試験法も、眼腐食性および強度刺激性に限定された試験法であり、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識別は行えない。

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、被験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<sup>13)</sup>。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。

延長1世代生殖毒性試験は、被験物質の生殖毒性を評価する試験法の一つとして提案された試験法であるが、従来の二世世代試験における F1 の交配を原則として行わず、F1 の成熟までの各種の観察によって生殖機能の異常を検査する評価法である<sup>14)</sup>。そのため使用動物数を削減することができる。

トランスジェニックげっ歯類変異原性アッセイは、遺伝子突然変異検出のための指標として、各種レポーター遺伝子(*lacZ*, *gpt*, *red/gam*, *lacI*, *cII*)のいずれかが組み込まれたげっ歯類を用い、物質の変異原性を評価するための試験法である<sup>15)</sup>。被験物質を投与後、対象となる組織におけるレポーター遺伝子の突然変異頻度を、ラムダファージのコロニー形成能の変化や呈色法、あるいはシークエンスによる直接的な配列解析にて評価する。

2種の皮膚腐食性試験(*in vitro* 皮膚腐食性試験 TER 法(TG 430)、*in vitro* 皮膚腐食性ヒト再構築表皮法(TG 431))については、Performance standards の追加修正を中心に改訂が進められている<sup>16)</sup>、<sup>17)</sup>。

最後に、代替法に係るドラフトガイダンスに関する状況として、単回投与毒性試験および眼刺激性試験法について述べる。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」のガイダンスが2010年7月23日に採択され<sup>18)</sup>、また「急性吸入毒性参照濃度(ARFC)算出」に関するガイダンスの二次草案<sup>19)</sup>が公開された(2010年8月6日)。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。眼刺激性試験の状況としては、眼腐食性/強刺激性物質同定 BCOP 試験(TG 437)、眼腐食性/強刺激性物質同定 ICE 試験(TG 438)の補充に関するドラフトガイダンスドキュメントの意見募集が行われた<sup>20)</sup>。これは、無眼刺激性物質を選定するための BCOP、ICE 試験における組織病理学的評価とデータ収集のために作成されたドラフトガイダンスである。

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、動物を用いた試験における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

2010年7月13日～15日に第4回化粧品規制協力国際会議 (ICCR-4) がトロント (カナダ) で開催され、日本からは厚生労働省の担当官および医薬品医療機器総合機構の審査官らが出席した<sup>21, 22)</sup>。この会議の目的は、国際貿易への障壁を最小化しつつ、最高レベルの世界的な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。規制当局は代替試験法協力国際会議 (International Cooperation on Alternative Test Methods : 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5回化粧品規制協力国際会議 (ICCR-5) は2011年に欧州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試験法としては TG 439 (皮膚刺激性/再構築ヒト表皮法)、TG 442A (皮膚感作性/LLNA : DA 法)、TG 442B (皮膚感作性/LLNA : BrdU-ELISA 法) 及び TG 487 (*in vitro* 哺乳動物細胞小核試験) の4法が採択された。また改定試験法として TG 417 (毒性動態) 及び TG 429 (皮膚感作性/LLNA 法) の2法が採択された。また、4種の新規試験法ドラフトガイドラインが、受け入れのための意見募集の段階にあり、今後の動向に注目したい。

一方、ICCR のトピックスとしては、ICCR-4 が開催され、昨年同様動物実験代替法に関する議論がなされた。ICATM との関わりが注目される中、ICATM は設立当初の目的<sup>23)</sup>を達成するため、バリデーション研究の推進や専門家による第三者評価を国際的に実施しており、動物実験代替法の行政への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

2010年度に開始された厚生労働科学研究班研究「国際協調を重視した化粧品・医薬部外品における安全性試験法の再評価に関する研究」(予定期間3ヵ年)が進行中である。

本研究班の主な目的は、動物実験代替法が開発されていない分野の *in vitro* 試験法の開発、代替法を用いたリスク評価の検討、使用試験における安全性の指標の検討、国際的な動物実験代替法の情報収集、医薬部外品・化粧品の安全性評価のあり方検討における議論の継続である。

本研究は7名の研究者が分担して実施されている。各担当者のテーマは、①研究の総括、代替法の第三者評価、安全性評価のあり方検討およびリスク評価に用いる代替法の開発、②光毒性・光感作性試験代替法に関する諸検討、③ヒトパッチテストの再検討と使用試験、④代替法に関する国際情勢の調査および安全性評価のあり方検討、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化粧品原料の経皮吸収に関する研究、⑦活性酸素種産生能を指標とした光毒性リスク評価方法の開発である。

①安全性評価のあり方検討については、昨年度からの継続事項であり、新たな試験法について適用範囲と限界を明確にして行くことになる。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に、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ている。

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

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働している。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。特に OECD 等で提案された代替試験法に関するパブリックコメント作成を担当した。

JaCVAM における国内の試験法評価では、5回の評価会議計画があり、新規試験法の評価が実施された。この会議には2010年度より経済産業省からもオブザーバーとして委員が正式に参画し、また厚生労働省からも従来の委員に加えて、調整窓口担当が参画した。評価会議では以下の事項が議論された。皮膚感作性試験代替法では、「LLNA-BrdU 法」について、評価会議での審議が終了し、新規試験法提案書を作成中である。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。試験法に関する指摘事項について明確にする必要性を付記した形で評価報告書が作成された。眼刺激性試験代替法については、BCOP、ICE の評価会議での審議が終了し、新規試験法提案書を行政当局に提出した。また SIRC、MATREX などの細胞毒性による試験について第3者評価を実施中である。皮膚刺激性試験代替法においては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>1)</sup>について、審議が終了し、新規試験法提案書を行政当局に提出した。そのほかにも日本で開発され、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、OECD テストガイドラインへの掲載を目指して提出したが、一部評価が不十分であったことから、改訂プロトコルを用いた追加バリデーションを実施中である。急性経口毒性試験代替法について、ICCVAM が評価した「*in vitro*細胞毒性試験による急性毒性試験の初回投与量設定試験」については評価会議での検討を終了した。また発熱性物質試験代替法についても評価会議での検討を終了した。

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、コメントアッセイ、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23回学術大会は、北里大学の吉山友二教授が大会長で2010年12月3～5日に東京で開催された。大会は、『動物実験代替法の基礎と実践』をテーマとして、特別講演、教育講演、市民講演のほかに5つのシンポジウム（動物の愛護及び管理に関する法律（動愛法）の改訂に向けて、動物実験代替のためのバイオエンジニアリング、代替法に有用な細胞培養システムへの生物学的アプローチ、皮膚刺激性代替法の動向、化学物質の有害性評価に関する代替試験法開発）や一般口演（ポスター55題）で構成された。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改訂プロトコルを用いた追加バリデーション<sup>2)</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」の被験物質を追加した試験結果が学会で発表された<sup>3)</sup>。また化学物質の発がん性の代替法として、Bhas42 細胞形質転換試験 (Bhas42CTA) に関する国際バリデーション研究<sup>4)6)</sup>なども発表された。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、中国、韓国の研究者を招いた国際シンポジウムも開催された。

#### C-4-4 その他の国内動向

ICCR等の国際協調の流れを受けて、厚生労働省医薬食品局審査管理課から事務連絡「医薬部外品の承認申請資料作成時における動物実験代替法の利用とJaVCAMの活用について」（平成23年2月4日付）<sup>7)</sup>が通知された。ここには、2006年に通知された事務連絡「医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請に添付する資料に関する質疑応答集 (Q&A) について」掲載の代替法利用記載の再確認とJaVCAMでの評価の活用の周知が示されており、代替法の活用の推進を促す姿勢がうかがえる。また、動物愛護法改正に関して、見直しに向けて検討が始められている<sup>8)</sup>。環境省の中央環境審議会動物愛護部会で制度見直しのための「あり方検討小委員会」が9回開催され、その中では、今まで議員立法で実施されてきた法改正について、政府の要請を受け、環境省として、平成24年度の通常国



会に提出できる準備としてこの委員会を位置づけて議論している。現状では飼育業者関連の飼養と愛護の改善が中心となった議論が展開されている。動物実験（倫理面）に関してはここでは議論できないが、実験動物の管理については管轄であり、施設の登録は盛り込みたいという議論がなされている。また、独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）ではバイオテクノロジー・医療技術開発部において、「高機能簡易型有害性評価手法の開発に関する研究」として培養細胞を用いた有害性評価手法の開発が2006年から5年計画で実施されている。発がん性、催奇形性及び免疫毒性の3つの試験法のOECDガイドライン化を目指して進められており、発がん性については、国際バリデーション研究が実施されている<sup>9)</sup>。その他、2011年2月に日本動物実験代替法学会とJaVCAMの合同ワークショップ「動物実験の3Rにおける国際動向」が開催され、日本の関連業界の取り組みについて講演され、化粧品工業会からも、現在までの業界の3Rの推進に対する取り組みについて総括的な内容の講演がなされた。

#### 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、2010年度より新たな厚生労働科学研究費補助金研究が開始されたこと、また JaVCAM 評価会議が新規試験提案書を行政に向けて提案したことが挙げられる。

厚生労働科学研究では新たな研究テーマのもと、更なる代替法の開発や既存代替法の利用の利点と限界を明確にしていくことになる。また JaVCAM 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を継続している。特に厚生労働省医薬食品局審査管理課からの事務連絡「医薬部外品の承認申請資料作成時における動物実験代替法の利用と JaVCAM の活用について」（平成23年2月4日付）が通知されたことは注目すべき点であり、日本における代替法の活用に向けた具体的な取り組みの推進が急務となる。

#### C-5 化粧品の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 (TG) では、経口投与毒性、吸入毒性およ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 (TG420, fixed dose procedure; FDP 法)、急性経口毒性・等級法 (TG423, acute toxic class method; ATC 法) 及び上げ下げ法 (TG425, up-and-down procedure; UDP 法) 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 (OECD 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)、急性吸入毒性 (TG 403) および急性吸入毒性・等級法 (TG436, acute toxic class testing method) の3試験法が採択されている。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>1)</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* 試験法の検討が行われている。

##### 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 Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments (ZEBET)<sup>3)</sup> では、急性毒性を予測するための *in vitro* 試験の最も良い組合せについて検討され、予測精度を向上させるため、細胞毒性に加えて、代謝やトキシコカインテイクス、あるいは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

重要性が指摘された<sup>4),5)</sup>。2005年1月1日より2010年までの5ヵ年を期限として発足したACuteTox - Research Project<sup>6)</sup>では、*in vivo*における経口急性毒性と近似した分類が得られる*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が進められている。第一フェーズでは、57の参照物質について評価が行われ、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解析あるいはRandom Forest model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、1) BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いたNRU法(3T3/NRU) (WP 2)、2) ヒト血液を用いた各種サイトカイン放出試験(IL-1、IL-6、TNF-alpha) (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(GFAP、HSP-32、MBP、NF-H) (WP 7.1)、5) ラット初代脳培養組織を用いたウリジン取り込み法によるmRNA生合成試験(WP 7.1)、6) 各種臓器由来細胞(HepG2、SH-SY5Y、A.704)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(HepG2、SH-SY5Y、A.704)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>7)</sup>。本年(2010年1月~5月)に実施されたプレバリデーションフェーズでは、これら選択された評価法について、さらに32の参照物質の追加評価が実施された<sup>7)</sup>。その結果、Random Forest modelを用いた9試験法(白血球系前駆細胞(CBC/CFU-GM)を用いた細胞分化試験、BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いたNRU法(3T3/NRU)、ラット初代脳培養組織を用いたウリジン取り込み法によるmRNA生合成試験、SH-SY5Y細胞を用いた細胞内過酸化物質試験、HepG2細胞を用いた細胞内カルシウム量測定、ラット初代培養肝細胞を用いたMTT試験、ヒト血液を用いたIL-1放出試験)の組み合わせにて最も高い相関(69.26%)が得られた。しかしながら、これら試験のエンドポイントの結果の組み合わせは、3T3/NRU単独の結果を有意に改善させるものではなかったと報告されている。その一方、LD<sub>50</sub>>2000 mg/kgの物質については、

高い一致性が得られた。以上の結果を受けて、これらの*in vitro*試験は、予測精度の有意な向上は得られなかったものの、経口急性毒性を予測するための段階的な*in vitro*評価の最初のステップの試験法、あるいはEU CLP分類に準じたLD<sub>50</sub>>2000 mg/kgの物質を同定するための試験法としての利用が期待されている。

また、the European Centre for the Validation of Alternative Methods (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およ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>8)</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The NTP Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (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>9)</sup>が実施された。このプロジェクトでは、Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (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>10)-12)</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>13)</sup>及びICCVAMによる試験法評価報告書<sup>14)</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、上げ下げ法(TG425、up-and-down procedure; UDP法)、等級法(TG423、acute toxic class method; 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>15)</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*細胞毒性試験のいずれかを用いるようにとの勧告が記載されている。

急性毒性試験開始用量の設定のための細胞毒性試験(NRU法)の利用については、本邦においても専門家による評価が行われており、2010年5月に急性毒性試験代替法の第三者評価報告書の草案が纏められた<sup>16)</sup>。1) GHSの急性経口毒性の分類(5区分に加えてLD<sub>50</sub>値>5000 mg/kgの未分類化合物)にげつ菌類LD<sub>50</sub>値が12物質ずつ分類できること、2) 構造と使用用途が広範囲に渡ること、3) ヒトの毒性データを備えたものであること、の3つの基準より選択された化合物について評価された。その結果、本報告書草案では、GHS区分において低毒性の化合物については高い予測性があるが、強毒性に分類される化合物の予測性は低いことや、揮発性、溶解度が低い物質は試験の実施が困難であることより、急性毒性試験の実施に際して、一律にNRU法を実施して初回投与量を決定することは合理的ではなく、化合物の物性、類縁化合物の情報などと並んで、初回投与量決定の一助として位置付けることが望ましい、と述べられている<sup>16)</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」のガイダンスが2010年7月23日に採択され<sup>17)</sup>、また「急性吸入毒性参照濃度(ARFC)算出」に関するガイダンスの二次草案<sup>18)</sup>が公開された(2010年8月6日)。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) *in vitro*試験のみの組み合わせで代替(Replacement)できる*in vitro*試験ストラテジー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>19)</sup>、米国におけるCTFA(現PCPC)安全性評価ガイドラインでは半致死量(LD<sub>50</sub>)を点予測または範囲予測のいずれかに用いることが示されている<sup>20)</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、ミニプタ)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>11, 21)</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、皮膚一次刺激性試験法として、「*In Vitro* Skin Irritation Reconstructed Human Epidermis Test Method」(Original Guideline, adopted 22nd July 2010)、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。

さらに、2010年にこれら「EPISKIN™、EpiDerm SIT、SkinEthic RhE」を含む三次元ヒト皮膚モデルは、「OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS :*In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method」<sup>7)</sup>としてOECDガイドライン439に記載された。また、2007年にSCCPより提出された「皮膚刺激性試験の *in vitro* 試験メモランダム」の指摘に対して提出された追加検討に対する見解として、2010年12月にSCCSより、「皮膚刺激性試験のための *in vitro* EPISKIN™ 試験法に関する補遺」<sup>8)</sup>が提出された。この中で、前回指摘された色素の評価におけるMTT比色法の利用について、追加データ審査の結果から、比色法以外の判定を考慮するべきであると指摘している。

一方、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<sup>9)</sup>。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、結果として施設間再現性、EPISKINとの同等性、動物実験結果との一致性が確認された。なお、本試験法についてJaCVAM第三者評価委員会、OECD第三者評価委員会に提出されたが、評価結果の一部に不十分な点があることを指摘されたことから、改訂されたプロトコルにより再度バリデーションが実施された。結果は2010年12月に開催された第23回日本動物実験代替法学会において報告された<sup>10)</sup>。今後バリデーション報告書が作成されOECDへ提出予定である。

また JaCVAM 評価会議においては「EPISKIN™」を用いた皮膚刺激性試験法について、化学物質の刺激性を評価できる試験法として日本における受け入れの審議が行われた。結果、評価会議で承認され、新規試験法