

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

2011 年 1 月から欧州委員会の研究プログラム Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing (SEURAT)-1 が開始された²⁷⁾。この 5 カ年プログラムは以下の 6 つの研究プロジェクトからなり、70 のヨーロッパの大学、研究機関、企業が参加する。

- SCR&Tox: 今日的で効果的、広範かつ標準化された毒性学のための幹細胞研究
- HeMiBio: マイクロ流路を備えた肝臓型バイオリアクター研究
- DETECTIVE: *In vitro* 系を用いる反復毒性試験のためのエンドポイントおよびバイオマーカーの研究
- COSMOS: 最適化された化粧品の安全性におけるヒト反復毒性予測のための *in*

silico モデルの研究

- NOTOX: 組織培養の性質に基づいたコンピューターモデルを用いた長期毒性の予測に関する研究
- ToxBank: 毒性学における代替法に関する総合的なデータ分析サポートシステムの開発

また、これらの研究のコーディネートを行う COACH プロジェクトが設定されている。

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記載はなかった。

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²⁸⁾⁻³¹⁾。

- 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-CLAT³²⁾ 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、MUSST³¹⁾ の ring study なども実施された。この結果は 2010 年 9 月、Toxicol. *In Vitro* に発表された³²⁾。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、2011 年 1 月から欧州委員会の研究プログラム Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing (SEURAT)-1 が開始された。2009 年 8 月 WC 7 で発表されたように、COLIPA はその予算額の半分の 2500 万ユーロを分担している。

8月にモンテリオールで行われたWC8において、COLIPAはSPT AAT TFの活動に基づいた16の口頭発表およびポスター展示を行った³³⁾。

- 眼刺激性試験:BCOP バリデーシヨンの進行状況および再構築ヒト角膜モデルなど試験法の検討に関する報告など
- 感作性・皮膚刺激性試験:研究、ヒトT細胞プライミングアッセイなど方法の開発、およびペプチド反応試験(DPRA)、骨髄系細胞U937を用いた皮膚感作性試験(MUSSET)およびヒト細胞株活性化試験(h-CLAT)の評価に関する報告など
- 変異原性・遺伝毒性:ヒト再構築表皮モデルを用いた小核試験法の最終的検討に関する報告など
- 全身毒性試験代替法:欧州委員会との共同プロジェクトCOSMOS開始の報告など
- 化粧品原料のリスクアセスメントのストラテジー:評価データの安全性評価アプローチへの統合など

9月19-20日にブリュッセルで開かれたEPAAの皮膚感作性ワークショップで、COLIPAは感作性試験の代替法開発の現状について報告した³⁴⁾。すなわち、物質の感作性リスク評価に関しては主としてマウスLLNAのデータが用いられている。多くの非動物試験が開発され、評価されているが、リスクを公式に判定するためには、潜在的感作性/用量反応に関する情報が必要であるとされている。

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)³⁵⁾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、バリデーシヨン及び研究である。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)³⁶⁾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)³⁷⁾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 Foundation³⁸⁾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)³⁹⁾は、オランダにおける動物実験代替法の開発、バリデーシヨ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回ニューズレターを発行し、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⁴⁰⁾。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、VITROCELLMICS、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)⁴¹⁾ 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 ヶ月ごとにニュースレターを発行している。

2011 年 4 月にはモナコで IVTIP (*In Vitro* Testing Industrial Platform) および CAAT (Center for Alternatives to Animal Testing) と共同ミーティングを開催した。その中で、産業界での利用の推進および法規制への採用を目指して ESTIV、IVTIP、CAAT の 3 者が協力して学術界、規制当局、産業界間の情報交換を緊密にするための連携を行うことが発表された⁴²⁾。

・MEGAT

Middle European Society for Alternative Methods to Animal Testing (MEGAT) は、動物試験代替法の普及とバリデーショ、3R の分野での研究の推進、メディアへの情報提供などを目的とする学会である。学会長はベルリン自由大学の H. Spielmann 教授であり、使用言語はドイツ語、年 4 回科学雑誌「ALTEX」(Alternatives to Animal Testing)⁴³⁾ 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。

2011 年 9 月に欧州委員会から出された欧州議会・閣僚理事会の報告では、2013 年禁止の 3 項目(反復投与毒性、生殖毒性、薬物動態)については 2013 年までに完全代替不可であることが指摘されている³⁾。欧州委員会 FP7 の下で 2011 年 1 月から開始された共同研究プログラム Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing (SEURAT)-1 は動物実験の代替法、特に反復投与毒性、の開発を促進することを目的としている。

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 (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) は、米国官庁間の調整を図り共通の目標である代替法のバリデーショを統括する委員会として機能し、国立環境衛生科学研究所 (National Institute of Environmental Health Sciences; 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 ヶ年計画 (2008 年~2012 年) を発表した¹⁾。その後、2009 年 6 月には実施計画案が公開された²⁾。この 5 ヶ年計画では、(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。この 5 ヶ年計画が最終の 2012 年を迎えるに当たり、次の 5 ヶ年計画への更新が進められている³⁾。

本年度の主要な動向としては、以下のことが挙げられる。(A) 連邦機関は ICCVAM が推奨する *in vitro* 眼刺激性試験法、及び *in vivo* 試験における局所麻酔、全身性鎮痛剤の常用と人道的観点に関して合意の回答を公表したこと⁴⁾。(B) ICCVAM が米国連邦有害性物質法における眼刺激性/腐食性に用いる動物数低減のための推奨案を告示したこと⁵⁾。(C) NICEATM がヒトアレルギー性接触皮膚炎誘発性化学物質分類のための LLNA の利用性と限界に関して報告及び推奨したこと⁶⁾。(D) ICCVAM の第三者科学専門家委員会が内分泌攪乱物質を同定するための新規試験法に関するピアレビューの報告書を公開したこと⁷⁾。

(E) ICCVAM が推奨した LLNA:DA 及び LLNA:Brdu-ELISA の活用を連邦機関が受け入れ、もしくは支持したこと (F) 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」が開催されたこと

(A) ICCVAM が推奨する *in vitro* 眼刺激性試験法、及び *in vivo* 試験における局所麻酔や全身鎮痛剤の常用等に関する連邦機関の合意

ICCVAM は 2010 年 9 月、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の同定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⁸⁾。

各機関は ICCVAM Authorization Act に基づき、推薦内容を検証し、180 日以内の文書による回答を行い、それらの回答書が 2011 年 4 月に公開された。連邦機関は *in vitro* 眼刺激性試験法と戦略、及び *in vivo* 眼刺激性試験において局所麻酔、全身麻酔及び人道的観点を常に適用することを支持し関係者に伝え適切に活用するよう推奨した⁴⁾。

(B) 眼有害性分類に対する動物利用数低減の推薦案

ICCVAM は眼有害性を分類するための動物利用数低減の推奨案を 2011 年 8 月に告示した⁹⁾。有害性分類決定のために 3 匹の動物を用いる修正 OECD テストガイドライン 405 を活用するため、米国連邦有害性物質法 (U. S. Federal Hazardous Substance Act; FHSA) を修正することを目的としている。J. K. Haseman らの解析の結論として、3 匹の動物のうち、少なくとも 1 匹の陽性反応により、これまでの FHSA が要求する眼有害性の分類と同等以上の基準であると報告されている¹⁰⁾。現在の方法は最低 6 匹の動物が必要であり、ハザード分類の決定のために最大 18 匹の動物使用が求められている。改訂された基準により 3 匹の動物の使用となるため、最大で 83%、少なくとも 50% の動物数の削減となる。

(C) ヒトアレルギー性接触皮膚炎誘発性化学物質分類のための LLNA の利用性と限界に関する報告及び推奨

NICEATM は強い皮膚感作性物質としてのアレルギー性接触皮膚炎 (Allergic contact dermatitis; ACD) を誘発する可能性を伴う化学物質を分類するための LLNA の利用性と限界に関する推薦を含む ICCVAM 試験法評価報告書 (test method evaluation report; TMER) を 2011 年 7 月に公表した¹¹⁾。LLNA による ACD 安全性試験から得られた陽性の結果について、化学物質や製品をさらに強い皮膚感作性を有するものとして分類することができる特定の基準を ICCVAM は推薦した。強い感作性物質とは GHS 基準において区分 1A に分類されるものである。一方で、この

基準が強いヒト皮膚感作性物質のおよそ半分程度を同定するものであることから、物質が強い皮膚感作性物質ではないことを判断する基本情報として用いる基準にはならないと結論している。このことから、この基準は化学物質が強い皮膚感作性物質として分類されうる基準を満たしているかどうかのスクリーニングとして用いられるべきであるが、基準に合わない化学物質が強い皮膚感作性物質ではないと決定するためには追加的な試験の実施または情報を求めるものである。

(D) 内分泌攪乱物質を同定するための新規試験法に関する ICCVAM の第三者科学専門家委員会

NICEATM は 2009 年 11 月に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。その後、*in vitro* エストロジェン受容体転写活性化試験 (LULMI-CELL[®]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た¹²⁾。

NICEATM は 2011 年 3 月に公開会議を開催し、国際的な第三者科学専門家委員会が *in vitro* エストロジェン受容体転写活性化試験 (LULMI-CELL[®]ER assay、*in vitro* stably-transfected estrogen receptor transcriptional activation assay) の正確性と信頼性について評価した。委員会は *in vitro* 試験法がエストロジェン受容体の活性を亢進または阻害する可能性を有する物質の初期のスクリーニングに利用可能とする ICCVAM の推薦に同意した。このピアレビュー会議の報告書は 2011 年 5 月に公開され^{13) 14)}、パブリックコメントの募集が行われた¹⁵⁾。

(E) LLNA:DA 及び LLNA:BrdU-ELISA を連邦機関に推薦

ICCVAM は OECD テストガイドラインに収載された放射性同位元素を使用しない 2 種類の LLNA (LLNA:BrdU-ELISA 及び LLNA:DA)^{16) 17)} が、特定の限界はあるものの、皮膚感作物質または非感作物質と特定するのに利用できることを連邦機関に推薦した。連邦機関はこの推薦を 2011 年に受け入れ、もしくは支持した¹⁸⁾。

(F) 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」

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取除き、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。NIACETAM-ICCVAMはこのワークショップの発表資料を公開している¹⁹⁾。

(G) その他の動向

2006年11月にICCVAMとNICEATMは代替法の5ヵ年計画(2008年～2012年)を発表した¹⁾。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。5ヵ年計画が最終の2012年を迎えるに当たり、NICEATMとICCVAMは、2013年～2017年の5ヵ年計画として更新するため、意見の募集を2011年11月から2012年1月に行った³⁾。これまでの優先分野に関する意見、今後5年間、及び長期的に影響のある利用可能な科学技術の研究開発、さらに優先分野において代替法の推進における適切な評価観点について求めている。なお、2012年までの5ヵ年計画に関連する各連邦機関の研究開発評価の動向は2011年5月に発表されている²⁰⁾。

米国における代替法関連学会 American Society for Cellular and Computational Toxicology (ASCCT) が2010年に設立された²¹⁾。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り、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。ASCCTはニュースレターにより活動等の報告を行っている。

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た²²⁾。2011年4月には修正案 Safe Chemicals Act of 2011 が上院に提出され、11月には公聴会が行われた²³⁾。

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 Guidelines²⁴⁾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。

(A)連邦機関はICCVAMが推奨する *in vitro* 眼刺激性試験法、及び *in vivo* 試験における局所麻酔、全身性鎮痛剤の常用と人道的観点に関して合意の回答を公表したこと⁴⁾。

(B)ICCVAMが米国連邦有害性物質法における眼刺激性/腐食性に用いる動物数低減のための推奨案を告示したこと⁵⁾。

(C)NICEATMがヒトアレルギー性接触皮膚炎誘発性化学物質分類のためのLLNAの利用性と限界に関して報告及び推奨したこと⁶⁾。

(D)ICCVAMの第三者科学専門家委員会が内分泌攪乱物質を同定するための新規試験法に関するピアレビューの報告書を公開したこと⁷⁾。

(E)ICCVAMが推薦したLLNA:DA及びLLNA:Brdu-ELISAの活用を連邦機関が受け入れ、もしくは支持したこと

(F)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」が開催されたこと

また、5ヵ年計画(2008年～2012年)の更新に向けてNICEATMとICCVAMが2011年11月に意見の募集を行っており、2013年～2017年の5ヵ年計画に向けた動向にも今後注視していく。

C-3 アジア(国外)における代替法開発の動向

C-3-1 中国における代替法開発の動向

中国では、中国実験動物学会内、北京実験動物学会内に動物実験代替法に関する委員会が設立されている¹⁾。

2011年4月11日および12日に、北京において中国動物実験代替法フォーラム(International Forum on Cosmetic Technology and Applications - Alternatives to Animal Experimentation for Cosmetics)が開催された²⁾。中国では、2010年よりSFDA(中国国家食品薬品监督管理局)が中国での新原料について動物実験を含む安全性試験データの提出を要求するなど、動物実験を増やす動きがみられ、国際的な非難の高まりも予想される。また、このような動きは欧州の化粧品企業からは喫緊に対応すべき課題と受け止められている。このような背景のもと、SFDAでは、動物愛護の観点から代替法に関する各国の検討および導入状況を把握するため、北京工商大学の主催により、本会を開催した。講演に際し、COLIPA、日本化粧品工業連合会(以下、粧工連)、PCPCに打診があり、COLIPAと粧工連が受諾した。講演は動物実験代替専門委員長が担当し、日本における代替法検討の経緯、日本国内法規制への対応の困難性について「日本における動物実験代替法の開発と活用への取り組み」との標題で報告した。COLIPAからは“Alternative approaches in cosmetic safety assessment - the road from development to application”と題してひとつの*in vitro*法による評価には限界があり、試験法の組み合わせなどの必要性やWoEに基づいた安全性評価の導入(物理化学的特性、QSAR、ヒトによる評価も考慮する)も検討する必要があること、新規試験法のバリデーションには時間がかかるので、ECVAM、ICCVAM、JaCVAMで協力体制が必要となることについて講演された。これらの他、スポンサー企業における取り組みや、北京工商大および中国公的機関からの報告があり、講演数18題、参加人数約130名程度(9カ国)の開催となった。後日、北京工商大からSFDAに動物実験代替法導入の提案をする際のコメントを求められ、粧工連として「日本化粧品工業連合会(JCIA)は、SFDAが動物試験代替法の行政的受け入れに積極的に取り組むよう要望致します。受け入れにあたっては、適切なバリデーションと第三者評価が実施されている試験法(例えばOECDテストガイドライン)であったとしても、行政責任範囲を勘案のうえ適用可能な物質の範囲や試験法の限界を更に確認し、申請側と審査側へ周知徹底させるべきと考えます。」とのコメントを4月14日付にて提出した。

SFDAは5月12日付けで、化粧品新原料登録の

申請に関する「化粧品新原料申請と審査ガイドライン」を公布した³⁾。このガイドラインは化粧品衛生監督条例およびその実施細則の規定に基づき、化粧品新原料の定義、安全性要求、行政登録の申請資料に関する要求、審査原則及び省略語などについて明確にしている。その中で行政登録の申請資料に対する要求が述べられているが、代替法は認められていない。

C-3-2 韓国における代替法開発の動向

韓国では2007年に韓国動物実験代替法学会が設立された。2011年7月8日にHoseo大学で第8回の会議が開催された⁴⁾。一方、2009年11月には、KoCVAM(The Korean Center for the Validation of Alternative Methods)がKFDA(Korea Food and Drug Administration)内に設立された⁵⁾。国立食品医薬品安全性評価研究所の毒性評価および研究部門に置かれている。KoCVAMの目標はRegulatory Scienceに基づく動物愛護と高度技術の開発である。KoCVAMは2011年3月に、ICATMに加わり、新しい動物試験代替法の国際的な検証研究と専門家による評価報告書の作成、およびガイドラインの開発等を推進することになった⁶⁾。

C-3-3 小括

中国では2011年4月11日および12日に、北京工商大学の主催により、北京において中国動物実験代替法フォーラムが開催された。中国のSFDAは、動物愛護の観点から代替法に関する各国の検討および導入状況を把握しようと動いている。

韓国では、KoCVAMが2011年に、ICATMに加わり、新しい動物試験代替法の国際的な検証研究と専門家による評価報告書の作成、およびガイドラインの開発等を推進することになった。

C-4 その他の国際的な代替法開発の動向

C-4-1 OECDガイドラインの動向

OECD(Organization for Economic Co-operation and Development:経済協力開発機構)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¹⁾。

2011年7月28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²⁾、同「Section 4: Health Effects」においては、下記の3新規試験法が採択された。

- ・新規試験法ガイドライン

- TG 443 拡張1世代生殖毒性試験
- TG 456 H295R ステロイド合成アッセイ
- TG 488 トランスジェニックげっ歯類体細胞
および胚細胞遺伝子変異アッセイ

拡張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2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³⁾。そのため使用動物数を削減することができる。

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⁴⁾。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。

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⁵⁾。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、あるいはシーケンスによる直接的な配列解析にて評価する。

一方、2種の新規試験法ドラフトガイドラインおよび4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
エストロゲン受容体作動・拮抗作用同定のためのBG1Lucエストロゲン受容体転写活性化試験法
(意見募集締切日：2012年1月30日)

眼腐食性・強刺激性同定蛍光漏出
(Fluorescein Leakage ; FL) 試験法
(意見募集締切日：2012年1月15日)

- ・改訂試験法ガイドライン
TG 455 性能基準(PS)基盤エストロゲン受容体作動作用検出のための安定トランスフェクトトランス活性化 *in vitro* 試験法⁶⁾
(意見募集締切日：2012年2月10日)

TG 431 *in vitro* 皮膚腐食性試験再構築ヒト表皮(RhE)法⁷⁾
(意見募集締切日：2011年12月19日)

TG 430 *in vitro* 皮膚腐食性試験 TER 法⁸⁾
(意見募集締切日：2011年12月19日)

TG 405 急性眼刺激性・腐食性試験法⁹⁾
(意見募集締切日：2011年11月21日)

新規試験法ドラフトガイドラインについて、エストロゲン受容体作動・拮抗作用同定のためのBG1Lucエストロゲン受容体転写活性化試験は、被験物質が特定の受容体に結合した後、下流に存在する遺伝子の転写を活性化することによって誘導されたレポーター遺伝子発現量を測定する試験法である¹⁰⁾。

また、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¹¹⁾、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、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。

2011年9月8日、OECDはLabCyte EPI-MODEL24を用いる皮膚刺激性試験のバリデーションレポート(No. 159)を作成した。これは、皮膚刺激性を評価する *in vitro* 表皮モデルとして、日本で行われたバリデーションの結果を要約したものである¹²⁾。

2011年10月25日、OECDは「牛角膜混濁および透過性(BCOP)、並びに摘出鶏眼(ICE)試験法：組織学的評価のための組織の収集および非強刺激性物質のデータ収集」に関するガイダンスドキュメント(No. 160)を作成した。これは、眼に対する安全性試験のための組織病理学的データを収集するためのガイダンスである¹²⁾。

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-4-2 化粧品規制協力国際会議(ICCR : International Cooperation on Cosmetics Regulations)の動向

ICCRは、カナダ、欧州連合、日本及び米国の化粧品規制当局からなる国際的グループである。2011年6月28日~7月1日に第5回化粧品規制協力国際会議(ICCR-5)がパリ(フランス)で

開催され、日本からは厚生労働省や化粧品業界団体の担当者らが出席した。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、

「ICCR 参加地域内の規制フレームワークにおける動物試験代替法の受け入れ可能性」についての文書を受領した。今回は新たに、参加団体間の議論をより活発なものとするため、化粧品の規制に関係する消費者団体、業界団体、学術関係者が参加し、オープンセッションが開催された。動物実験代替法、ナノテクノロジー、微量汚染物質や化粧品安全性のトピック等の ICCR における議論プロセスが情報提供され、ICCR が将来取り上げるトピックについて議論がなされた (6月30日)。次回、第6回化粧品規制協力国際会議 (ICCR-6) は2012年に米国で開催される予定である^{13, 14, 15)}。

C-4-3 代替試験法協力国際会議 (ICATM: International Cooperation on Alternative Test Methods) の動向

代替試験法協力国際会議 (ICATM) は、動物実験の3Rs (削減、洗練、代替) についての協力を推進するため ICCR によって設立されたワーキンググループである。ICATM の枠組には、(1) 検証研究、(2) 試験法の科学的妥当性についての独立したピアレビュー、(3) 動物代替試験法の正式な試験法勧告の策定についての重要な分野での協力が示されている¹⁶⁾。

2011年3月8日、ICATM に関わる「協力覚書」の修正文書への署名式が行われた。この修正文書は2009年4月27日に署名された ICATM 協力覚書を修正するもので、これにより ICATM への韓国の加盟が認められた。現在の組織としては、Health Canada (カナダ)、ECVAM (欧州)、JaCVAM (日本)、KoCVAM (韓国)、NICEATM、ICCVAM (アメリカ) となった¹⁷⁾。

3月6日～10日に開催された第50回毒性学会大会 (ワシントン) において、ICATM のセッションが生まれ、ICATM の概説や各組織から ICATM への貢献と今後の計画について報告があった (3月7日)¹⁸⁾。

C-4-4 日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH: International Conference on Harmonisation of

Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) の動向

ICH は、日本・米国・EU それぞれの医薬品規制当局と産業界代表で構成され、他にオブザーバーとして3組織 (世界保健機関 [WHO]、カナダ保健省 [Health Canada]、欧州自由貿易連合 [EFTA]) が参加している。

ICH の目的は、各地域の規制当局による新薬承認審査の基準を国際的に統一し、各種試験や提出書類などのガイドラインを標準化することによって開発および申請の効率化を図り、よりよい医薬品をより早く患者のもとへ届けることにある。

ICH で取り扱うガイドラインは4つのカテゴリー (品質 [Q]、安全性 [S]、有効性 [E]、複合領域 [M]) に分類されている。これらガイドラインの改定においては、必要性の少ない独立した試験や繰り返し試験の削減、実施時期の見直しによる開発中止時に無駄になる試験の排除、適切な最高用量の明記による無用な苦痛の軽減といった動物福祉・愛護 (3R) の観点についても重視されている¹⁹⁾。

光安全性ガイドライン [S10] では、2010年に EWG (Expert Working Group: 専門家作業部会) が発足し、ガイドライン策定作業が進められている。その目的の一つに「不要な試験を省き、医薬品開発において、コストおよび動物リソースを削減すること」と記載されている。取り上げられている *in vitro* 試験法としては 3T3 NRU アッセイがあり、その評価法に関する最大用量、陽性判定基準、*in vivo* 光毒性物質を見落とす可能性についての情報収集が行われている²⁰⁾。

Step4 として、ガイドラインの最終合意に向けて進行している遺伝毒性試験 [S2] およびバイオ医薬品の安全性試験 [S6] においても代替法の使用や動物の削減について記載されている。遺伝毒性試験 (見直し) ガイドライン [S2(R1)] においては、(1) 遺伝毒性試験の標準バッテリー試験にオプション2が追加される。この内容は、Ames 試験と2つの異なる標的臓器の *in vivo* 試験であるが、2種類の *in vivo* 遺伝毒性試験 (例えば、小核試験とコメットアッセイ) を1個体の別々の組織で実施できることになり、単独で行なっていた *in vivo* 遺伝毒性試験のための動物が削減できること、(2) 試験ごとの陽性対照処理動物は必ずしも含める必要がなくなること (定期的な陽性反応の確認は必要)、(3) *in vivo* での遺伝毒性評価は、曝露条件が適切であれば現行の反復投与毒性試験に組み入れることができるため、単独で行なっていた *in vivo* 遺伝毒性試験のための動物が削減できること、(4) 哺乳類細胞を用いた *in vitro* 遺伝毒性試験において最高濃度を 10mM から 1mM に低減し、不適切も

しくは偽陽性となる結果を少なくすることで、フォローアップとしての動物試験を削減できることが盛り込まれ、使用する動物を削減する提案となっている^{21, 22)}。

バイオ医薬品の安全性試験（補遺）ガイドライン [S6(R1)] においては、適用条件はあるものの胚胎児発生試験（EFD: Embryo-Fetal Development）と出生前及び出生後の発生試験（PPND: Pre/Post-Natal Development）を単一の拡充型出生前及び出生後の発生毒性試験（ePPND: Enhanced pre- and post-natal development）で補うことが可能となること、反復投与試験に受胎能に関する試験を組み込むことができること、投与群や試験数を減らすことなど、使用動物数の削減に関していくつかの改訂が盛り込まれる。また代替法の活用においては具体的な試験は記載されないが、規制当局が受け入れられる *in vitro* 試験が提案できれば、代替法として利用可能と明記される^{23, 24)}。

C-4-5 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、TG 443 拡張 1 世代生殖毒性試験、TG 456 H295R ステロイド合成アッセイ及び TG 488 トランスジェニックげっ歯類体細胞および胚細胞遺伝子変異アッセイの 3 法が採択された。また、2 種の新規試験法ドラフトガイドラインおよび 4 種の改訂試験法ガイドラインが、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。OECD では安全性試験のテストガイドライン策定、新規試験法あるいは改訂試験法における代替法採択の動向からも、動物愛護に対する積極的な取り組みが伺える。

ICCR のトピックスとしては、ICCR-5 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。今回は新たに、参加団体間の議論を活発なものとするためにオープンセッションが開催され、各種トピック等の ICCR における議論プロセスが情報提供された。

ICATM では 2009 年に署名された協力覚書の修正が行われ、韓国の加盟が認められた。毒性学会大会においては、ICATM の概説や各組織から ICATM への貢献と今後の計画についてのセッションが生まれ、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いる状況や、動物実験代替法の行政への受け入れを加速するための活動が報告された。

ICH においては、新薬承認審査の基準を国際的に統一し、各種試験や提出書類などのガイドラインの標準化や改訂作業が進められている。これらガイドラインの改定においては、動物福祉・愛護（3R）の観点についても重視されている。ガイドラインの最終合意に向けて進行している

遺伝毒性試験 [S2] およびバイオ医薬品の安全性試験 [S6] においても使用動物数の削減に向けた具体的内容が記載されており、早期の標準化を期待したい。

C-5 日本における代替法開発の動向

C-5-1 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 ヶ年）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。

C-5-2 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。JaCVAM では、組織等の変更があり、その位置づけが明確にされた。JaCVAM は日本動物実験代替法評価センターであってその長は、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長とすることが確定された。また、その役割は、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し、これら新規代替試験法を行政試験法として導入するために貢献することとなっている。JaCVAM では運営委員会の委嘱により評価委員会等が設定されており、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。2011年度は、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。JaVCAMにおける国内の試験法評価では、4回の評価会議計画があり、新規試験法等の評価が実施された。評価会議では以下の事項が議論された。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審議が終了した。また、現在までにすでに審議が終了した試験法について、それらの行政試験法としての利用の可能性について再確認を実施している。またSIRC、MATREXなどの細胞毒性による試験について第3者評価報告において要求されたバリデーションを準備中である。そのほか、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、改訂プロトコルを用いた追加バリデーションを終了し、OECDに再提出している。

国際的な活動では、ICCRとICATMへの関与が挙げられる。国際的なバリデーション研究では、コメントアッセイ、LUMI-CELL Estrogen Receptor Assay、STTA assay、Bhras細胞を用いたTransformation Assay、感作性試験代替法として、h-CLATのECVAMとの共同プレバリデーションが継続している。

C-5-3 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24回学術大会は、東北大学の相場節也教授が大会長で2011年11月10～12日に仙台で開催された。大会は、『動物実験代替法の新たな展開』をテーマとして、特別講演、教育講演、一般口演（ポスター50題）のほかに6つのシンポジウム（①*in vitro/in silico*による化学物質、化粧品原料の安全性予測、②動物実験代替法センターの国際協調、③マテリアル・デバイス・ロボティクスの最先端から見る細胞アッセイ、④感作性試験代替法の現状と課題、⑤日本における代替法研究の新しい胎動、⑥ナノ・バイオテクノロジーと*in vitro*試験法および国際シンポジウムで構成された。シンポジウムの中では、「①*in vitro/in silico*による化学物質、化粧品原料の安全性予測」として後述する「粧工連における*in silico*評価への取り組み」¹⁾が報告された。また「⑤日本における代替法研究の新しい胎動」では、厚生労働省の新規対応としてJaVCAM小島肇氏より最新の動向について報告があった他、経済産業省、農林水産省からも取り組みについて説明がなされた。また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」の追加研究の報告²⁾、粧工連から日本動物実験代替法学会への委託により結成された皮膚刺激性試験代替法ワーキンググループにおいて、代替法開発のための被験物質リスト40物質³⁾などが報告された。

C-5-4 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）⁴⁾が通知されており、ここには、JaVCAMで評価された試験法の国内での有効活用を図ることが示されている。これを受けて、具体的に医薬部外品の承認申請を行う場合に代替法の利用を促すべく、注意点も含めたガイダンスを作成するために「ガイダンス検討会」が組織された。

すでにJaVCAMにおいて評価が終了している光毒性試験法および感作性試験法について、「化粧品・医薬部外品の安全性評価に光毒性試験代替法（3T3 NRU PT）を活用するためのガイダンス（案）」⁵⁾および「化粧品・医薬部外品の安全性評価に感作性試験代替法としてのLLNAを活用するためのガイダンス（案）」⁶⁾が作成され、2012年1月13日期限でJaVCAM HPにおいてパブリックコメントが募集された。

また動物愛護管理法の見直しが行われており、「動物愛護管理のあり方について（案）」⁷⁾が環境省のHPで公開され、この中には実験動物の取り扱いに関する項目が含まれている。2011年12月7日期限でパブリックコメントが募集され、その集計結果が公開された⁸⁾。これをもとに2012年1月20日に「動物の愛護及び管理に関する法律施行規則の一部を改正する省令等」が公布されたが実験動物の取り扱いに関しては特に触れられていない⁹⁾。

その他、最近の社会的動向を鑑み、*in vitro*を補完する位置づけとして*in silico*による評価を議論する目的で「*in silico*ワーキンググループ」が粧工連動物実験代替専門委員会内に2011年8月に組織された。そして、2011年11月に開催された第24回日本動物実験代替法学会にて「粧工連における*in silico*評価への取り組み」¹⁾として報告された。本会は①化粧品業界における*in silico*の理解を深め、普及、活用を目指す。②*in vitro*を補う位置づけの*in silico*手法を用いた化粧品の安全性保証のあり方に関して議論し、業界としての姿勢と取り組みを社会に発信する。③OECD Toolboxの化粧品での利用を検討することを目的として活動している。

C-5-5 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、平成23年2月4日に厚労省から事務連絡「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」が通知されたことを受けてJaCVAMにおいて行政試験法としての代替法受け入れに配慮した評価法提案のために「ガイダンス検討会」が組織されたことが挙げられる。光毒性試験代替法(3T3 NRU PT)や感作性試験代替法(LLNA)についてガイダンス案が作成された。また、*in vitro*を補完する位置づけとして*in silico*による評価を議論する目的で「*in silico*ワーキンググループ」が粧工連動物実験代替専門委員会内に設立され、今後新たな評価手法の開発が望まれる。

C-6 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-6-1 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¹⁾。

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²⁾及びCentre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments (ZEBET)³⁾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ンेट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^{4),5)}。2005年1月1日より2010年までの5カ年を期限として発足したACuteTox-Research Project⁶⁾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定された⁷⁾。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、これら選定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⁷⁾。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、LD₅₀>2000 mg/kg の物質については、高い一貫性が得られた。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 (Classification Labeling and Packaging of substances and mixtures) に準じた LD₅₀>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¹¹⁾。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⁸⁾。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⁹⁾ 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¹⁰⁾⁻¹²⁾。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)¹³⁾ 及び ICCVAM による試験法評価報告書¹⁴⁾ 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¹⁵⁾。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¹⁶⁾、2011 年 6 月には行政への提案が行われている。1) GHS の急性経口毒性の分類 (5 区分に加えて LD₅₀ 値>5000 mg/kg の未分類化合物) に基づく LD₅₀ 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¹⁶⁾。

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¹⁷⁾、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¹⁸⁾ 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 (LDL₀) で示すことが義務付けられている一方で¹⁹⁾、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 (LD₅₀) 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²⁰⁾。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-6-2 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。今日まで、ヒトに対する危害予測のための皮膚一次刺激性試験、皮膚腐食性試験および光毒性試験法は、Draize らの方法を基礎とした動物を使用した方法が主体であったが、その一方で、動物での結果とヒトでの結果が一致していないという報告もあった^{1), 2)}。近年、動物愛護や倫理的観点から、皮膚刺激性や皮膚腐食性、光毒性の分野に関しても動物実験の代替法の評価開発が進められており、動物実験に替わる *in vitro* 試験法が国際的なガイドラインとして採用され始めている。これらの代替法開発は ECVAM を中心に展開されており、その基本的な考え方は、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³⁾。

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)、「*In Vitro Membrane Barrier Test Method for*

Skin Corrosion」 (Original Guideline, adopted 19th July 2006) の 3 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。しかしながら、これらの *in vitro* 試験法は、皮膚腐食性、皮膚一次刺激性および光毒性のポテンシャルが評価できる代替法にとどまっており、リスクアセスメントを可能とした代替法の開発にはいたっていないのが現状である。

②皮膚腐食性の代替試験法

試験法としては、マウスの摘出皮膚を用いた方法、三次元ヒト皮膚モデルを用いた方法、非生物の膜モデルを使用した方法などが挙げられる。皮膚モデルを使用した方法は、細胞毒性を指標として皮膚に対する障害性を評価する方法であり、「*In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test*」として OECD テストガイドライン 431 に収載されている。また、マウスの摘出皮膚を用いた方法ならびに非生物の膜モデルを使用した方法は、電気抵抗の変化や化学物質の透過を指標として、被験物質による膜バリアの破壊を評価する方法であり、マウス摘出皮膚を用いた方法は「*In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)*」として OECD テストガイドライン 430 に、非生物膜モデルを用いた方法は「*In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion*」として OECD ガイドライン 435 にそれぞれ収載されている。

2011 年 11 月に、皮膚腐食性の代替試験法の 2 つ「*In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)*」と「*In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test*」の改定について、意見募集が行われた。

どちらのガイドラインも、ANNEX1 として「PERFORMANCE STANDARDS FOR ASSESSMENT OF PROPOSED SIMILAR OR MODIFIED IN VITRO TER TEST METHODS」が追加され、もともと試験条件設定に使うために用意されていたリファレンスケミカルのリスト (12 物質) を変更し、24 化学物質からなる化合物リストとしている。テストガイドラインをベースとして改変試験法を用いる際には、このリストの化合物セットを用いて、試験法の妥当性を評価することができる内容となっている。

③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、プロトコールの改善が要求された⁴⁾。EPISKIN™ による試験法は、MTT assay と IL-1 α の放出量を組み合わせることで評価している。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⁵⁾。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ー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⁶⁾。「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」⁷⁾としてOECDガイドライン439に収載された。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」⁸⁾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年に動物実験代替法学会バリデーション委員会から、国内で製造販売されているヒト三次元培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いて、EPISKIN™ と同様の検討及び検証を行うことを目的として実施された多施設バリデーションは⁹⁾、JaCVAM 第三者評価委員会およびOECD 第三者評価委員会にて、評価結果の一部に不十分な点があることを指摘され、追加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¹⁰⁾、現在は、改訂されたプロトコールによる報告書をOECDに再提出し、ピアレビューの段階にある¹¹⁾。

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、新規試験法提案書として行政当局に提出された¹²⁾。

しかしながら、本試験法は、ウサギによる4時間曝露の皮膚一次刺激性試験結果を予測する方法である。一方、日本の化粧品や医薬部外品の薬事申請においてはウサギによる24時間曝露の皮膚一次刺激性試験が求められており、JaCVAM 評価会議報告書にも、本試験法の「医薬部外品、化粧品に必要とされている24時間適用による皮膚刺激性への応用可能性については評価されていない。」と記されている¹³⁾。そこで、粧工連は、日本動物実験代替法学会に対し、24時間曝露による皮膚一次刺激性試験の代替法開発を依頼した。代替法学会は皮膚刺激性試験代替法ワーキンググループを設置し、粧工連傘下の企業から匿名による *in vivo* 皮膚刺激性試験のデータ提供を要請し、代替法開発の基盤となる40の汎用化粧品原料による被験物質リストを作成した。作成したリストは2011年11月10-12日に開催された第24回日本動物実験代替法学会にて報告された¹⁴⁾。

④光毒性の代替試験法

試験法としては紫外線光照射下において被験物質を各種の生体細胞や人工皮膚モデル、又は化学物質と接触させることにより生じる細胞の生存率の変化又は化学物質の光変性を指標とする *in vitro* 試験がある。これらの中で、光毒性物質のスクリーニング法として、Balb/c 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド取り込み法がEUのECVAMで承認され、EUの危険物指令のAnnex Vに取り入れられており、化学物質のクラス分けに利用されている。また、この方法に修正を加えた方法が、OECDでも化学物質光毒性試験法ガイドライン「*In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity

Test」 (Original Guideline, adopted 13th April 2004)¹⁵⁾として受け入れられている。これらについて、日本でも、JaCVAM 評価委員会にて審議・報告書が提出され、部外品申請のあり方検討委員会で検証済みである。

医薬部外品承認申請において代替法の利用促進を目的として、ガイダンス作成のための「ガイダンス検討会」が組織された。この検討会の中で、本試験法について議論され、「化粧品・医薬部外品の安全性評価に光毒性試験代替法 (3T3 NRU PT) を活用するためのガイダンス (案)」¹⁶⁾が作成され、平成24年1月13日期限で JaCVAM HP にてパブリックコメントが募集された。

その他、ECVAM でバリデーションが実施されている試験法として、三次元ヒト皮膚モデルを用いた試験法等が報告されている^{17, 18)}。また、日本では、厚生労働科学研究班研究として実施した酵母光生育阻害試験法と赤血球を用いた光溶血性試験法のバッテリー試験法^{19, 20, 21)}について、JaCVAM での第三者評価が終了し、評価会議にて第三者評価報告書の報告内容について吟味した結果、行政への提案書作成には、追加情報として、確定したプロトコールでの検証が必要という結論から、それらを記載した評価報告書が提出された²²⁾。

三次元皮膚モデルを用いた代替法では、EPISKIN™ を用いた方法については論文掲載されており²³⁾、現在 ECVAM において評価継続中である。

C-6-3 眼刺激性

①概要

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

眼刺激性試験代替法には、受精鶏卵、各種生体細胞及び人工組織モデル系に被験物質を適用し、その結果生じる組織変化や細胞の生存率を指標とする *in vitro* 試験等がある。これら試験法のうち、2009年9月に腐食性及び強度眼刺激性物質を検出するための眼刺激性試験の代替法である BCOP 及び ICE はそれぞれ TG 437 及び 438 としてガイドライン化²³⁾されているが、2010年には BCOP 及び ICE 試験の補充に関するドラフト

ガイダンスドキュメントに対する意見募集が行われた⁴⁾。2010年7月に Cytosensor Microphysiometer™ (CM) と Fluorescein Leakage (FL) の OECD ドラフトテストガイドラインが公開され、その後、意見募集が行われている。また、ECVAM では3次元培養モデルでのバリデーションを実施している⁶⁾。

②眼刺激性試験代替法の状況

2009年9月に腐食性及び強度眼刺激性物質を検出するための眼刺激性試験代替法である BCOP 及び ICE はそれぞれ TG 437 及び 438 としてガイドライン化された²³⁾。2009年11月に ICCVAM は OECD へ BCOP、ICE 試験の補充に関するドラフトガイダンスドキュメントを送付した。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。

このドラフトガイダンスドキュメントについては2010年4月23日までの期限で意見募集がされた⁴⁾。2011年11月に NIACETM は *in vitro* 眼有害性試験法における追加的なエンドポイントとしての組織病理学的評価の現状について概要を示した⁷⁾。これまでの組織病理学的データに基づくと、BCOP や ICE においては有用な技術であることは示されていない。一方、*in vitro* 試験による眼刺激性の分類や表示の正確性を向上させるためにそれらの方法が有用であるかを明確にするためには追加的な組織病理学的データや他の定量的なアプローチによるデータの収集と分析が役立つものであるとまとめている。

OECD は細胞毒性に基づく2種類の眼刺激性試験法、Cytosensor Microphysiometer™ (CM) と Fluorescein Leakage (FL) のドラフトテストガイドラインについて2010年9月3日を期限とする意見募集を行った⁸⁾⁹⁾。その後、2011年2月5日を期限とする意見募集が行われた¹⁰⁾¹¹⁾。更に、FL については、2012年1月15日を期限とする意見募集が行われた¹²⁾。

CM 試験は水溶性の物質と混合物の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法、及び水溶性の界面活性剤と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である。FL 試験は水溶性物質と混合物の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法である。

ICCVAM と国際的な第三者科学専門家委員会による評価の結果を反映し、急性眼刺激性/腐食性 TG405 については眼刺激試験に動物を使用するときは麻酔の常用と人道的配慮をすることを盛り込んだ改訂案を策定し、2011年7月18日、11月21日を期限とする意見募集を行った¹³⁾¹⁴⁾。

米国、欧州及び日本における眼刺激性試験代

替法の受け入れ状況等は以下のとおりである。

米国では、2010年9月にICCVAMの最終推薦書が連邦機関に送付された¹⁵⁾。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。また、CM法は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。

各機関はICCVAM Authorization Actに基づき、推薦内容を検証し、180日以内の文書による回答を行い、それらの回答書が2011年4月に公開された。連邦機関は*in vitro* 眼刺激性試験法と戦略、及び*in vivo* 眼刺激性試験において局所麻酔、全身麻酔及び人道的観点を常に適用することを支持し、適切に活用するよう推奨した¹⁶⁾。

使用動物数の削減 (Reduce) に関して、ICCVAMは使用する動物数を50%から83%減らした試験を実施しながらも、現在の米国連邦有害性物質法 (U.S. Federal Hazardous Substance Act; FHSA) における眼刺激性ハザード分類と同等にするための改訂基準を提案した¹⁷⁾¹⁸⁾。現在の方法は最低6匹の動物が必要であり、ハザード分類の決定のために最大18匹の動物使用が求められている。改訂された基準では、3匹の動物のうち1匹で眼刺激性・眼腐食性の陽性を示した場合には、現在のFHSAにおける眼刺激性ハザードと同等またはそれ以上のハザードとの結果に相当する。なお、2002年にOECD TG405 眼刺激性/腐食性は使用動物数を最大6匹から3匹とする改訂を採択している。

欧州では、ECVAMとColipaにより3次元培養モデル (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¹⁹⁾。2012年の第3四半期でのESACのステートメントを目指している。

ESACは腐食性及び強刺激性物質の検出する眼刺激性試験代替法としてBCOPとICEを承認した。BCOP又はICEを実施し、いずれかで陽性結果が

得られた場合には、その化学物質を強度眼刺激性 (R41) に区分することを受け入れている²⁰⁾。

ESACのステートメントにおいては、一般に単独の*in vitro* 眼刺激性試験ですべての眼刺激性分類を行うことはできないが、いくつかの試験法の組み合わせによる段階的方法 (Tiered approach) によりDraize試験を代替することができるかもしれないことも示された。その段階的方法に関する枠組みとしてはECVAMワークショップで議論され、強刺激性から検出するトップダウンアプローチ又は無刺激の同定から始めるボトムアップアプローチ、これらによって刺激性の全体を明らかにしようとするものである²¹⁾。

日本では、2008年度に日本代替法検証センター (JaCVAM) の第三者評価会議 (眼刺激性試験代替法評価委員会) においてBCOP及びICEの第三者評価がおこなわれ、2009年9月に報告書が提出されている²²⁾²³⁾。報告書では、BCOPとICEはわが国のGlobally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) に準拠する化学物質に関わる法規制において、腐食性・強刺激性物質を評価できるとの考えが示された。2010年度には、第三者評価会議は細胞毒性試験及び3次元培養真皮モデルを用いる試験に関する評価を実施した²⁴⁾。それら評価の結果は『眼刺激性試験代替法 (SIRC細胞毒性試験) 第三者評価報告書』及び『眼刺激性試験代替法第三者評価資料 (MATREX)』として公開され、それぞれ2011年6月20日、6月27日を期限として意見募集が行われた²⁵⁾²⁶⁾。

眼刺激性試験代替法 (SIRC細胞毒性試験) はウサギ角膜上皮由来細胞 (SIRC細胞) に被験物質を曝露した後、72時間培養後のSIRC細胞の細胞生存率を評価指標として、眼の非刺激性を判定する方法である。3次元培養真皮モデルを用いる試験 (MATREX) は非刺激性物質を検出する目的でDraize法の代替法として開発され、ヒト由来の線維芽細胞を包埋培養した三次元培養真皮モデル (東洋紡績株式会社製MATREX™) に被験物質適用した後、24時間後に細胞生存率を評価指標として、眼の非刺激性を判定する方法である。

第三者評価の報告を受け、SIRC細胞毒性試験及び3次元培養真皮モデルを用いる試験は国際的な試験法確立を目指してバリデーションが進行中である。

2009年に日本動物実験代替法学会で実施された単層培養細胞に直接被験物質を短時間接触させることにより眼刺激性を評価する代替法であるSTE法 (Short time exposure) は2010年にバリデーションが終了し、2011年OECDにおいてSPSFが受理された²⁸⁾。

C-6-4 皮膚アレルギー性

①概要

2011年度の感作性試験代替法の動向としては、第8回国際動物実験代替法会議(WC8)が8月にカナダ、モントリオールで行われ、バリデーション中の試験法や現在開発段階にある様々な試験法の発表がなされた¹⁾。現在、*in vitro*感作性試験代替法としてDPRA²⁾、h-CLAT^{3),4)}及びMUSST⁵⁾のプレバリデーションが進められているが、WC8において、DPRAは2011年後半、h-CLAT、MUSSTは2012年中に終了する予定であることがECVAMより示された。一方、動物試験を代替するためには単一の試験法だけでは難しいことから、これまでに開発された複数の試験法を組み合わせ、高精度に皮膚感作性を評価するTest batteryに関する発表も数多くなされた。

OECDでテストガイドライン収載のLLNA^{6),7)}については、日本における化粧品・医薬部外品申請の際に審査側、申請側双方の代替法の利用促進につなげるため、「化粧品・医薬部外品の安全性評価に感作性試験代替法としてのLLNAを活用するためのガイダンス(案)」がまとめられ、パブリックコメントの募集がJaCVAMのHP上で行われた。

②各試験法の状況

現在、*in vitro*感作性試験代替法としてDPRA、h-CLAT及びMUSSTのプレバリデーションがECVAMで実施されている。DPRA²⁾は、P&Gによって開発された試験法で、システインあるいはリジンを含む合成ペプチドと化学物質をインキュベーションした後のペプチドの残存量(化合物とペプチドが反応すれば、ペプチドは減る)を指標とする。h-CLAT^{3),4)}は、花王株式会社と株式会社資生堂によって開発された試験法であり、ヒト単球由来細胞株であるTHP-1細胞を用いて化学物質曝露時における細胞表面(CD86とCD54)発現量の変化をフローサイトメトリーで評価する。MUSST⁵⁾は、ロレアルによって開発された試験法で、ヒト単球由来細胞株であるU937細胞を用い、化学物質曝露時の細胞表面のCD86の発現量変化をフローサイトメトリーで評価する。2011年8月のWC8では、その進捗状況に関してECVAMから発表がなされた¹⁾。それによると、DPRAは2011年後半、h-CLAT、MUSSTは2012年中に評価が終了予定であることが示された。

WC8では、バリデーション中の試験法だけでなく、新規に開発された様々な試験法についても発表がなされた。特に、2005～2011年まで欧州委員会が資金サポートをして行われたプロジェクトのSens-it-ivに関する成果発表が数多くなされた¹⁾。数多くの試験法が開発される一方で、

動物試験を代替するためには単一の試験法だけでは難しいことから、これまでに開発された複数の試験法を組み合わせ、高精度に皮膚感作性を評価するTest batteryが重要と考えられる。実際に、WC8でも、Test batteryに関する発表が数多くなされた¹⁾。COLIPAもまた、WC8の中で、加盟する企業5社のTest batteryに関するオンラインセッションを主催し、活発な議論が行われた¹⁾。2013年の欧州におけるMarketing banを見据えて、代替法の運用に向けた動きが進展していくと思われる。

LLNAは、マウスを用いた試験法で、放射性物質の³H-thymidine等を用いてリンパ節細胞の増殖性を測定する。実験動物に関するReduction及びRefinementを考慮していることから、代替法と位置づけられ、OECDでテストガイドライン収載の試験法として承認されている。米国では2011年6月に「ヒト接触皮膚炎原因化学物質の感作性分類のためのLLNAの有用性と限界」に関する試験法評価報告書がICCVAMから公表された⁹⁾。日本では、部外品等申請の際に審査側、申請側双方の利用促進につなげるため、厚生労働省主導により企画された代替法ガイダンス検討会において、粧工連が中心となり、「化粧品・医薬部外品の安全性評価に感作性試験代替法としてのLLNAを活用するためのガイダンス(案)」がまとめられ¹⁰⁾、2011年12月から2012年1月には、そのパブリックコメントの募集がJaCVAMのHP上で行われた。他にも、試験濃度を1濃度のみにして、使用動物数が削減されたreduced LLNA(rLLNA)⁷⁾、放射性物質を用いないLLNA:DA¹¹⁾とLLNA:BrdU-ELISA¹²⁾が、OECDでテストガイドライン収載の試験法として承認されているが、JaCVAM評価会議において未承認のため、現時点で本ガイダンスの対象にはなっていない。

C-6-5 変異原性

①概要

変異原性試験はその種類も多く、*in vivo*、*in vitro*法などさまざまなものがある。本年度の特筆すべき動きは、2010年7月にOECDガイドライン487¹⁾として採択された*in vitro*哺乳類細胞小核試験は2011年11月にstep4に昇格した日米欧医薬品規制調和国際会議(ICH)のS2遺伝毒性ガイドライン改訂においても、*in vitro*哺乳類細胞遺伝毒性試験の一候補として挙げられている。また、感度の高いDNA損傷の検出法としてコメットアッセイの開発や、変異原性試験ではないが長期発がん性試験の代替法として、形質転換試験の開発も進められている。

②状況

*in vitro*哺乳類細胞小核試験はCHL/IUなどの

細胞に化学物質を処理したのち培養し、その培養細胞における小核形成の存在を調べることに、化学物質の染色体異常誘発性をみるための試験である。染色体異常試験と比較して、偽陽性の割合が少ない事、標本作成や観察が容易で熟練を要しないこと、染色体構造異常誘発性だけではなく、異数性も検出できることから注目されている。本法は、2010年7月に本法はOECDガイドライン487¹⁾として採択されたことに続き、ICHのS2遺伝毒性ガイドラインの改定(2011年11月、step4昇格)においても、*in vitro*染色体異常試験やマウスリンフォーマTK試験(MLA)と同程度の検出能力を持つとして、*in vitro*哺乳類細胞遺伝毒性試験の一候補として挙げられている。

コメットアッセイは細胞をシングルセルに分散し、アガロースゲル中に包埋して電気泳動にかけることにより、個々の細胞のDNA損傷を検出する方法である。電気泳動した際の様子からコメットアッセイと呼ばれる。テイルに傷害されたDNAが存在し、テイルの量、長さなどからDNA損傷程度がわかる。既存の変異原性試験と比較して、労力の少ないこと、高感度であること、標本観察などに熟練を要しないこと、非分裂細胞に対する変異原性を評価できること²⁾など、さまざまな利点から近年注目されている試験系である。本法の国際バリデーション研究が日本環境変異原学会、哺乳類動物試験研究会を中心に、ECVAM、NICEATMの協力を得て実施されている³⁾。*in vivo*試験と*in vitro*試験のバリデーション研究が進められている。

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

現在、ICHでは非臨床の安全性試験において、3Rsを促進するICHの義務に従い、ICH S2遺伝毒性ガイドラインの改定が進められている。改定案では、試験動物数削減のための推奨がなされた内容となっている一方で、ヒトの安全性を最終的に評価するのは*in vivo*試験である、ともしている。2011年11月にセビリア(スペイン)にて会合が行われ⁴⁾、最終合意が得られ、ガイドラインはstep4に昇格した。主な変更点には、標準バッテリーに*in vitro*哺乳類細胞小核試験が加わったこと、*in vitro*細胞試験の最高用量が1 mMまたは0.5 mg/mLのいずれか低いほうとなったこと、細胞増殖が約50%以上抑制される用量の評価は必要無いこと、といった*in vitro*細胞試験の偽陽性を減少させる目的のものと、他に*in vivo*小核試験の陽性対照群を試験毎に設

ける必要はないこと(定期的に設ける)、*in vivo*小核試験などの一般毒性試験である反復投与試験への組み込み、使用動物の削減を目的としたものがある。

C-6-6 反復投与毒性

①概要

反復投与全身毒性試験の代替に焦点をあてたSEURAT-1(Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal testing)研究イニシアチブが2011年1月から5年の計画で開始された¹⁾。この計画は6つのプロジェクトから構成され、欧州委員会のFP7健康プログラムとCOLIPAの資金援助を受けて進められる。

米国では、NTP、NCGC(NIH Chemical Genomics Center)、EPAによるTox21²⁾が進行しており、毒性経路を特徴づける革新的な試験法の研究、開発、検証、変換が進められている。

日本では反復投与毒性の予兆的情報を得る手法の開発を目指す新規経済産業省のプロジェクト「遺伝子プロジェクト」が計画され、第24回の日本動物実験代替法学会において紹介された^{3), 4)}。

このように、反復投与毒性試験代替法に関する研究、戦略は進展しているが、2010年に公表された欧州委員会の保健・消費者保護総局DG SANCOによるレポート⁵⁾に記載されている「反復投与毒性の完全置換は非常に困難である」という状況に変わりはない。

②状況

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

肝臓と腎臓をターゲットとした研究は、ECVAMのSTREP projectのPREDICTOMICSにおいて、毒性物質による細胞の初期変化で特異的に発現する機能的な指標の確認が行われた。PREDICTOMICSは、2007年12月に終了し、プロジェクトのウェブサイトにおいて、薬物、外来異物による肝臓と腎臓の慢性毒性を予測するための基盤技術などに関する成果が公開されている⁶⁾。

肝臓においては、Histone deacetylases(HDAC)阻害剤処理ラット初代培養肝細胞が、培養中に表現型を維持しており、適切なモデルと

なることが確認された。また、ヒト肝がん由来の HepG2 細胞において CYP 群の遺伝子発現の欠除に、転写因子 (HNF4)、並びに補助活性化因子と補助抑制因子 (SRC1、SRC2、PGC1 α 、PCAF) が役割を担っていることが確認された。さらには、薬剤性脂肪肝を再現する *in vitro* 実験操作が開発され、遺伝子、プロテオーム、細胞レベルでの解析により様々な指標物質が確認され、これらを統合した戦略によりこの種の肝毒性物質を同定できることが明らかになった。

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

一方、血液・免疫毒性に関しては、2006 年 3 月に Colony Forming Unit-Granulocyte/Macrophage assay (CFU-GM assay; 顆粒球・マクロファージ系前駆細胞を用いたコロニー形成試験) が二次的な動物種 (イヌ) の試験の代替法という限定つきながらもヒト急性好中球減少症を予測する代替法として ESAC (24 回会議) による承認を受けた⁷⁾。CFU-GM assay はマウス骨髄及びヒト臍帯血中の単核細胞を培養し、その増殖 (コロニー形成能) を指標とする試験である。マウス最大耐量データの有用性に依存するところがあり、完全な置換法では無いが動物数を削減できるとされている。

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

2009 年、欧州委員会と COLIPA は反復投与全身毒性の分野での動物実験代替法開発に関する戦略開発を狙いとして、2500 万ユーロずつ合計 5000 万ユーロの出資を決め、研究のための提案募集が 2009 年 7 月 30 日～2010 年 2 月 3 日に実施された。

そして、反復投与全身毒性試験の代替に焦点をあてた SEURAT-1 (Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal testing) 研究イニシアチブのキックオフミーティングが 2011 年 3 月 1～3 日にポルトガルのリスボン近郊で開催された。SEURAT-1 は 2011 年 1 月 1 日から 5 年間

継続し、以下の 6 つのプロジェクトで構成されている。

- ①幹細胞
- ②肝微小流動バイオリアクター
- ③エンドポイントとバイオマーカーの検出
- ④In silico モデル
- ⑤器官培養における特性に基づくコンピューターモデル
- ⑥統合型データ解析

反復投与毒性の代替法開発はこれまで一部の主要臓器で極めて限定的に検討されていたが、異なった組織やシステムの間での相互作用を考慮した統合的な研究が始まったといえる。

米国では、NTP、NCGC (NIH Chemical Genomics Center)、EPA による Tox21 が進行しており、毒性経路を特徴づける革新的な試験法の研究、開発、検証、変換が進められている。このプログラムは、化学物質により誘導される生物活性のメカニズムを確認する事、広範な毒性評価のための化学物質の優先順位を決める事、*in vivo* (ヒト) での生物応答の更なる外挿モデルを開発する事をゴールとしている。最終的には、新しい手法で得たデータによりヒトの健康や環境の保護のためのリスク評価を行う目標である。

一方、日本では反復投与毒性の予兆的情報を得る手法の開発を目指す新規経済産業省のプロジェクト「遺伝子プロジェクト」が計画され、第 24 回の日本動物実験代替法学会において紹介された。これは 28 日間反復投与毒性試験後の実験動物の臓器等を生体サンプルとして遺伝子発現変動データを解析し、発癌性、主要臓器における一般毒性、免疫毒性、神経毒性について有害性に関する予兆的情報を得るという計画である。この開発は人工染色体ベクターと多色・多様発光システムを融合させた遺伝子技術を応用し、新たな試験法への展開が期待される。

このように、反復投与毒性試験代替法に関する研究、戦略は進展しているが、2010 年に公表された欧州委員会の保健・消費者保護総局 DG SANCO によるレポート⁸⁾にあるように、反復投与毒性の完全置換は非常に困難である」という状況に変わりはない。2013 年までの代替法の受け入れは不可能と思われる。

C-6-7 生殖発生毒性

①概要

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

認された¹⁾。

2011年7月に拡張された一世代生殖発生毒性試験がOECDテストガイドライン443として採択された。本試験法は二世代生殖発生毒性試験の置換えにて、大幅な動物数の削減が期待されている²⁾。

欧州第6次枠組みプログラム(FP6)におけるプロジェクトであるReProTect^{3),4)}は、2004年7月から5年6ヵ月間、2009年12月まで進められた。20以上の代替法が開発又は最適化され、再現性や技術移転性が研究された。全体で100以上の物質がピアレビューのために検討され、統計解析がなされた⁵⁾。最終年には、開発された14の*in vitro*試験のリングトライアルが、ブラインド化された10物質を用いて行われた。*In vitro*試験による予測の結果は良好であり、ここで用いた証拠の重み付けを伴う解析は将来の活動へ向けての可能性を感じさせた⁶⁾。

欧州委員会の保健・消費者保護総局DG SANCOは2010年7月23日～10月15日に、2013年に禁止される試験について、各試験法のドラフトレポートを貼り付け、意見を募集した⁷⁾。そのレポートの第5章が生殖発生毒性である。参画した専門家の結論は、最も高感度なエンドポイントを検出するための*in vivo*データの解析、代替法のツールボックスの明確化、戦略上の不足部分をカバーするための代替法追加開発の必要性の最終化には10年以上を要するとするというものであった。

また、EPAAは2011年1月にドイツ研究機関FoBiGと共同で実施した生殖毒性代替法調査に関する進捗最終報告により、DB-ALMの雄・雌繁殖性、発生毒性などのカテゴリーの再編成と最新情報の追加、アンケート調査結果の総括を報告した⁷⁾。

②状況

生殖発生毒性代替法である胚性幹細胞試験、マイクロマス試験、全胚培養試験は、広い範囲の生殖発生毒性をカバーする方法でなく、いずれも胎児毒性に限定された試験法である⁸⁾。胚性幹細胞試験は最初の段階で動物から胚性幹細胞を採取するが、その後は全く動物を使用することがないため*in vitro*試験といえるが、胎児から未分化細胞を取り出し増殖能を確認するマイクロマス試験や母胎から胎児を取り出して培養する全胚培養試験は動物を用いるため、動物数削減という意味での代替といえる。

この3種の試験の中でも、胚性幹細胞試験は、汎用性の高い代替法として注目されているが、2003年に開かれたECVAMのワークショップにおいて課題が指摘され、精度向上のための予測式改良、医薬品以外の化合物の検証、様々な毒性

メカニズムをもつ被験物質の検証、神経や骨など心筋以外の細胞への分化誘導系の導入、代謝活性化の評価の導入等が課題としてあげられた。さらに、胚性幹細胞試験の大きな問題は、心筋分化に対する影響の評価方法が心筋細胞の拍動の有無を顕微鏡下で観察するため、煩雑かつ熟練した技術・ノウハウが必要とし汎用性に欠ける点がある。しかし、本方法に対する期待は大きく、第8回国際動物実験代替法会議(WC8)においてもヒト由来細胞を用いたEST法に関する発表もあり、今後の応用研究が期待される。

このように、現在の検討の方向性は、これら3種の代替法のデータを用いて総合的に胎児毒性を判断していくことにある。なお、3種の試験法はいずれもESACにより承認されたものの、ECB(European Chemicals Bureau)のマニュアル並びにOECD試験法ガイドラインに掲載されていない。

ReProTectは哺乳類の生殖発生過程をFertilization(受(授)精・受胎能)、Implantation(着床)及びPrenatal development(出生前発生)の3研究領域に分割し、これらを繋ぐCross-cutting technologies(横断研究)を各W.P.(Work package)として、20以上の試験法が開発が進められた。

最終的に、14の試験法のバッテリーにより、「実現可能性研究(Feasibility Study)」と称されるリングトライアルが行われた。ブラインド化された10物質を用いて、EC₅₀またはそれと同等のエンドポイントが測定され、証拠の重み付けを伴う解析がなされた。その結果、*In vitro*試験による予測の結果は良好であった。ここで用いた証拠の重み付けを伴う解析は将来の活動へ向けての可能性を感じさせた⁹⁾。

選定された試験法を以下に示した。括弧内はエンドポイントである。

・内分泌かく乱

①アンドロゲンレセプター結合試験

(アンドロゲンレセプターへのラベルしたリガンドの結合)

②アンドロゲンレセプター化学的活性化・ルシフェラーゼ発現試験

(レセプタープラスミドに作動するアンドロゲンレセプター成分-プロモーターのルシフェラーゼ活性)

③PC-3-アンドロゲンレセプター-ルシフェラーゼ-MMTV試験

(レセプタープラスミドに作動するアンドロゲンレセプター成分-プロモーターのルシフェラーゼ活性)

④エストロゲン結合試験

(エストロゲンレセプターへのラベルしたリガンドの結合)

⑤エストロゲンレセプター化学的活性化・ル