



図 3.登録作業実施の割合

<接触皮膚炎症例調査用紙>



日本接触皮膚炎学会  
Japanese Society for Contact Dermatitis

施設名

施設内No.	年齢	性別	皮疹部位	診断名	施行した皮膚テスト
<input type="text"/>	選択...	選択...	<input type="text"/>	選択...	選択... その他

品名は詳細までご記入をお願いします。例リンデロンの場合：リンデロン-VG軟膏、リンデロン-VGローション、眼・耳科用リンデロンA軟膏、リンデロン点眼液、等々。  
\*化粧品の場合には商品名と化粧水・乳液・クリーム・美容液・ファンデーション、下地、口紅、香水、洗淨料、染毛剤、パーマ剤、スプレーなどという化粧品の種類を記載してください

原因製品の種類	原因製品名	製品の販売会社	成分提供への協力の有無
選択... その他	<input type="text"/>	<input type="text"/>	選択...

原因アレルゲン(判明している場合のみ)	他に陽性だったアレルゲン	職業との関連性	職業(職業と関連ある場合のみ)	備考
<input type="text"/>	<input type="text"/>	選択...	<input type="text"/>	<input type="text"/>

登録ボタン

登録ファイル名は右欄にでています。 2013-01-27

図 4. 日本アレルギー・接触皮膚炎学会と協働して作成した接触皮膚炎症例調査の登録画面

リスト  
判読レベルマスタ

CTG判読システムデータ判読入力

CTG図を判読し☑をつける。  
 すべてに回答したら「判読終了」  
 →自動的に次のNo(この場合、次はCase.1の  
 No.2)に変わるので担当範囲の回答を続ける。

Case	No.	OK
	戻る	次へ
基線細変動 <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> 正常</li> <li><input type="radio"/> 減少</li> <li><input type="radio"/> 消失</li> <li><input type="radio"/> 増加</li> <li><input type="radio"/> サイノソイダル</li> </ul>		
[クリア]		
基線 <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> 正常脈</li> <li><input type="radio"/> 頻脈</li> <li><input type="radio"/> 除脈</li> <li><input type="radio"/> 除脈(&lt; 80)</li> </ul>		
[クリア]		
一過性除脈 <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> なし</li> <li><input type="radio"/> 早発</li> <li><input type="radio"/> 軽度</li> <li><input type="radio"/> 高度</li> <li><input type="radio"/> 遅発</li> <li><input type="radio"/> 軽度</li> <li><input type="radio"/> 高度</li> <li><input type="radio"/> 遷延</li> <li><input type="radio"/> 軽度</li> <li><input type="radio"/> 高度</li> </ul>		
[クリア]		
LEVEL <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III		
IV <input type="checkbox"/> V <input type="checkbox"/> 判読不能		
コメント		
[判読終了]		

図 5. 鈴鹿医療科学大学と協働して作成した CTG 図の判読調査の画面

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)  
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

## 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 杉山 真理子 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 青木 摩利男、荒木 大作、池田 英史、井上 周、今井 教安、加藤 義直、  
金森 健之、川上 幸治、京谷 大毅、坂口 育代、實川 節子、瀬戸 洋一、  
豊田 明美、萩野 滋延、宮澤 正明、山本 裕、渡辺 真一、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、EURL 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、代替試験法協力国際会議 (ICATM) など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、動物実験を行った原料を配合する化粧品の EU における販売が禁止される 2013 年 3 月の延期問題に関連して、欧州委員会保健衛生担当理事や Cosmetics Europe の意見の公表など、様々な論議があったことである。本問題は決着の 때가近づいている。2012 年 7 月 10～13 日にワシントン DC (米国) で開催された第 6 回化粧品規制協力国際会議 (ICCR) において、動物実験代替法と共に安全性評価のためのコンピューター予測モデルに関するトピックにも焦点があてられ、ワーキンググループが設立されたことも注目される。2011 年 1 月から開始された EU における反復投与毒性代替法の研究プログラム SEURAT-1 (Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing) は 2 年目を迎え、プログラム内の各プロジェクトの研究に進展が認められた。

国内においては、2012 年 4 月 26 日付で厚生労働省医薬食品局審査管理課から、「皮膚感作性試験代替法及び光毒性代替法を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイドランスについて」の事務連絡が発出されたことが挙げられる。これにより代替法の公的な利用が実質的に示された。また、感作性試験代替法に関し、複数の *in vitro* 法を組み合わせた評価体系の構築を目指すワーキンググループが日本化粧品工業連合会の動物実験代替専門委員会内に組織されことも挙げられる。

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 Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing; EURL

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。最近では、代替法試験協力国際会議 (International Cooperation on Alternative Test Methods; ICATM) による国際的な代替法検証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る。したがって、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情報収集活動により把握してきた。本年度も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、EURL ECVAM、ICCVAM、EPAA など）を定期的に閲覧すると共に 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（Cosmetics Europe；CE、旧称 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）との連繋を通じて取得した。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、皮膚感作性、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、2009年禁止の7項目中5項目が終了し、眼刺激性、急性毒性の2項目が検討進行中であること、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報告されている<sup>3)</sup>。欧州委員会は今後の対応について、最終決定を2011年末までに公表予定としていたが、2012年11月に欧州委員会保健衛生担当理事候補であるTonio Borg氏（11月28日に就任）が、全ての項目について2013年3月以降の延命措置は取らない意向である旨のコメントを發した。これに対し、Cosmetics Europeは反発の意向を示し、コメントをウェブで公表した<sup>4)</sup>。2012年12月末日時点で最終結論には至っていない。

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>5)</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ール提案がある場合

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>6)</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>1,7,8)</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 EURL 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>9)</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。

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>10)</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。2012年6月に第4回年次報告が出され、各WPの進捗状況が示された<sup>11)</sup>。

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。2012年の報告書が作成され、進捗状況が示された<sup>13)</sup>。

眼刺激性試験代替法に関しては、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、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 Cytosensar Microphysiometer (CM) 法について、OECD TG 化に向け Performance Standards (PS)のESACによる評価を2012年8月に開始した<sup>14)</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>15)</sup>。DPRAについてはすでに評価が終了し、ESACによるPeer Reviewが開始されている。

生殖発生毒性代替法に関しては、内分泌かく乱物質スクリーニング法として、HeLa レポーター遺伝子アッセイ (アンタゴニスト) について EURL ECVAM および米国 EPA の共同のもと国内3施設、欧州、韓国の5施設における国際バリデーションが進行中である。また MELN アッセイについては、EURL ECVAMにてバリデーションが進行中である。

変異原性試験に関しては、コメットアッセイ、3D培養モデルを用いた小核試験についてバリデーション研究が進行中である。

発がん性試験に関しては、JaCVAM 主導の Bhas42 細胞形質転換アッセイ (CTA) バリデーション研究について ESAC による評価を2012年8月に開始した<sup>14)</sup>。また、細胞形質転換アッセイ3法 (SHE、マウス BALB/C3T3 線維芽細胞) については、SHE の pH6.7 及び 7.0 条件下プレバリデーション報告の OECD 追認を受け、これらアッセイについて勧告を行った<sup>16)</sup>。

その他、代替法に関する情報の増大から、適切な情報収集のための検索ガイドを提供している<sup>17)</sup>。また、EURL ECVAM 代替法データベース (DB-ALM)<sup>18)</sup>へ以下代替法試験のプロトコルを2012年6月に収載した<sup>19)</sup>。

- ・EpiSkin™ Skin Irritation Test 15min - 42 hours (No. 131)
- ・GreenScreen HC TM Genotoxicity Test (No. 132)
- ・Human Whole Blood/(IL)-1 β *In vitro* Pyrogenicity (No. 133)
- ・Human Cryopreserved Whole Blood/(IL)-1 β *In vitro* Pyrogenicity Test (No. 134)
- ・SKINETHIC™ Skin Irritation Test-42bis (No. 135)

#### 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年度においては代替法関連のステートメントとして「化粧品成分の皮膚吸収の *in vitro* 評価のための基本的規準」「皮膚刺激性試験のための EPISKIN™ *in vitro* 試験についての覚書」が採択されるなどの進捗があった<sup>20, 21)</sup>。しかし、それ以降、代替法に関して特筆すべき内容は見当たらない。

#### 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、以後、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>22)</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5つの総局が参加している。工業会はCEFIC(欧州化学品工業会)、EFPIA(欧州製薬団体連合会)、COLIPA、IFAH-Europe(欧州動物愛

護協会)、AISE(石鹸洗剤協会)、ECPA(欧州農薬工業会)などの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35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“3Rs”イベント。
- ・パートナーシップ運営委員会：欧州委員会、関連業界、企業からなり、レビューワークプラン、戦略、タイムラインを提案する。
- ・ワーキンググループ：欧州委員会、企業、適切な専門家のサポートで個々のテーマを扱う小ワーキンググループ。
- ・ステークホルダーのミラーグループ：学界、動物福祉団体、患者団体、消費者保護グループ、他のステークホルダーからなり、より広い見地で運営委員会にアドバイスする。

2006年5月に今後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、2010年11月30日での第6回年次大会(Annual Conference 2010)にて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<sup>23)</sup>。

- ・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 Communication & Dissemination; 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

2012年の主な活動およびワークショップレポートの公表状況については以下のとおりである<sup>24)</sup>。

- ・ 計算機化学を含む新しい毒性モデルに関するワークショップ開催<sup>25)</sup>
- ・ ADME に関する 2011 ECVAM/EPAA ワークショップレポートの公表<sup>26)</sup>
- ・ 皮膚感作性試験戦略の最適化に関するワークショップレポート<sup>27)</sup>
- ・ 2012 年 EPAA 年次大会

REACH<sup>28-31)</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

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<sup>27)</sup>。この 5 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。

2012 年の主な活動状況については以下のとおりである。

- ・年次報告書の公表<sup>33)</sup> 及びユーロサイエンスオープンフォーラムにおける年次報告<sup>34)</sup>
- ・COSMOS シンポジウム「データベースから Adverse Outcome Pathways へ進むためのロードマップ」の開催<sup>35)</sup>

#### 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掲載はなかった。

#### C-1-6 Cosmetics Europe-The Personal Care Association の状況

2012 年 1 月 The European Cosmetics Association (COLIPA) はその名称を Cosmetics Europe-The Personal Care Association に変更した (以下 Cosmetics Europe)。

Cosmetics Europe は COLIPA の時代 (1992 年) に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、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) が設置されている<sup>36-39)</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>40)</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>41)</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>42)</sup>。この結果を受けて EURL ECVAM でのプレバリデーションが行われている。

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、Cosmetics Europe (旧 COLIPA) はその予算額の半分の 2500 万ユーロを分担している。

2012 年 2 月 8-9 日にリスボンで行われた SEURAT-1 の年次総会では、幹細胞の特性評価と標準化、*in vitro* から *in vivo* へ外挿する際に必要な生体内動態、反復投与毒性の作用機序、代替法を用いた安全性評価法について 4 つのブレインストーミングセッションが行われた<sup>43)</sup>。また、クラスタープロジェクト (Scr&Tox, HeMiBio, DETECTIVE, COSMOS, NOTOX, ToxBank, COACH) からそれぞれの進展について 26 件のポスター発表が行われた<sup>44)</sup>。

11 月 13 日に行われた欧州委員会保健衛生担当理事候補である Tonio Borg 氏 (11 月 28 日に就任) の「科学的現状および消費者の意向にかかわらず 2013 年 3 月の化粧品に関する動物試験禁止令を施行する」という意思表示に対し、Cosmetics Europe は会長である Fabio Franchina 氏のコメントとして「動物愛護の進展を脅かすものであると同時に、欧州のイノベーション 2020 の戦略に反する」と公式に遺憾の意を示した<sup>4)</sup>。

11 月 16 日にベルギーのブリュッセルで行われた EPAA の年次総会においても、Cosmetics Europe の B. Heerink 氏は「多くの国際的な協調にもかかわらず現在の代替法開発の状況は目前に迫った動物実験廃止の期限に対応できておらず、欧州域外をも含めた更なる連携が必要である」と強調した<sup>45)</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>46)</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>47)</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。

2012 年 11 月、NC3Rs は動物実験の減少を目指す新規な *in silico* 法の開発に関する 4 プロジェクトを採択し、総額 75 万ポンドの助成を行った<sup>48)</sup>。

・FRAME

Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments (FRAME)<sup>49)</sup> は医学における動物実験に関して 3R を促進するために、1969 年に設立されたイギリスの機関である。国際的 科学雑誌 ATLA (Alternatives To Laboratory Animals) を年 6 回発行している。また、FRAME News を発行し、FRAME の活動及び 3Rs に関するニュースを会員へ伝えている。毒物学における *in vitro* 法のプロトコルを収集した「INVITOX」は、FRAME によって 1989 年に確立され、現在、EURL ECVAM の Scientific Information Service の一部になっている。

・3R Research Foundation

3R Research Foundation<sup>50)</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>51)</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。

・EPAA

The European Partnership for Alternative Approach to Animal Testing (EPAA) は動物実験の 3R 推進のアプローチに関する知識の集積と共有を目的とし、欧州委員会、7 つの欧州企業連合体および企業が 2005 年に自発的に設立した連携活動である<sup>52)</sup>。

2012 年、EPAA は米国の Institute for *In vitro* Sciences (IIVS) と安全性評価のための動物実験代替の普及活動に関する協力関係についての覚書を交わした<sup>53)</sup>。また、魚胚を用いる急性毒性試験の改善法について、Helmholtz Center for Environmental Research の Nils Klüver 博士に 10 万ユーロの助成を行った<sup>54)</sup>。

2012 年 11 月 16 日にベルギーのブリュッセルで行われた年会では、3R の現状と戦略的展望について、製薬業における国際協力について、化粧品産業における国際協力について、皮膚感作性代替試験法の確立を目指す世界的レベルの協調について、のセッションが開かれた<sup>55)</sup>。

## 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>56)</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*

*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>57)</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 ヶ月ごとにニュースレターを発行している。

2012年10月16日 - 20日にポルトガルのリスボンで ESTIV2012 が開催された<sup>58)</sup>。皮膚腐食性および刺激性に関しては、再構築皮膚モデルを用いる方法によって弱い腐食性・刺激性を識別するための試みについて、いくつかの報告がなされた。眼刺激性試験のセッションでは代替法の現状についての概要が紹介された。*in silico* 法については化合物の毒性と生体内動態を予測する方法に焦点が当てられた。皮膚感作性のセッションでは OECD の Adverse Outcome Pathway (AOP) for skin sensitization をいかにリスク評価に用いるか、および皮膚感作性予測のデータセットを統合する際の統計的手法の使い方についての発表があった。癌原性試験については、オミクスに基づく *in vitro* 法、化粧品原料の試験結果について、また、遺伝毒性と酸化ストレス検出のためのハイスループットリポーター遺伝子アッセイのプレバリデーションについての報告があった。発生毒性・生殖毒性のセッションでは新規に開発された試験法の技術および様々なモデルについてのレビューが行われ、バイオインフォマティクスと組み合わせた遺伝子発現プロファイリング、エピジェネティック分析、およびプロテオミク手法が紹介された。発生毒性・生殖毒性の予測において種差は重要な影響を及ぼすことが示唆された。全身毒性のセッションでは細胞毒性の分子プロセスを理解するためにオミクスの利用が有望であることが示唆された。しかしながら、急速に拡大する巨大で複雑なデータセットをどのように取り扱うのかについての問題点も浮き彫りになった。

・ 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>59)</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、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。また、反復投与毒性、生殖毒性、毒物動態の3項目についても2013年3月11日に禁止の期限を迎えることになっており、欧州委員会から2011年9月に出された欧州議会・閣僚理事会の報告では、上記3項目については2013年までに完全代替不可であることが指摘されている<sup>3)</sup>。一方で、2012年11月に欧州委員会保健衛生担当理事候補である Tonio Borg 氏(11月28日に就任)は「科学的現状および消費者の意向にかかわらず2013年3月の化粧品に関する動物試験禁止令を施行する」という意思表明を行なっているが<sup>4)</sup>、2012年12月末日時点では最終決定について公表されていない。

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促進を目的として進められており、各々のプロジェクトについて進展もみられる<sup>33)</sup>。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 (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。

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) 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 ICCVAM と共同して化学物質や製品による眼障害性ポテンシャルを同定するための *in vitro* 試験法及び動物を用いない試験法を組み合わせた試験戦略のバリデーション評価に向けた準備が進められたこと。(B) 修正 OECD TG405 活用のための評価書及び推薦書公表。(C) 米国消費者製品安全委員会における代替試験法扱いに関する方針と連邦有害性物質法での動物試験に関する規制を改正する最終規則を発行したこと。(D) 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に対する連邦政府機関からの合意回答が行われたこと。(E) 内分泌攪乱物質を同定するための LUMI-CELL®ER 試験法の評価報告書と推薦書の公表と連邦政府機関からの合意回答が行われたこと。(F) 上げ下げ法による急性経皮全身毒性の評価に向けた準備が進められたこと。(G) ICCVAM と NICEATM は代替法の 2013 年～2017 年の 5 ヵ年計画案を発表したこと。

(B) 眼刺激性評価に関する NICEATM-ICCVAM 動向

NICEATM は ICCVAM と共同して化学物質や製品による眼障害性ポテンシャルを同定するための *in vitro* 試験法及び動物を用いない試験法を組み合わせた試験戦略 (integrated non-animal testing strategies) のバリデーション評価を行うため、第三者専門家委員会の招集を計画した<sup>1)</sup>。NICEATM は委員を務める科学専門家の推薦と *in vitro* 試験データの提出を求めている。特に短時間暴露法 (STE) とウサギの摘出眼球試験 (IRE) を用いて取得されたデータ、及び二つ以上の *in vitro* 試験法を組み合わせる手法を用いて得られたデータに特に関心を持っているが、これに限らずそのほかの試験法に関するデータや入手可能であるならば *in vivo* 試験データについても提出を求めた。

(C) 修正 OECD TG405 活用のための評価書及び推薦書公表

有害性分類決定において 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) の修正を目的として 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<sup>2)</sup>。改訂された基準では使用される動物数が 3 匹となるため、最大で 83%、少なくとも 50% の動物数の削減となる。NICEATM は 2012 年 10 月に評価報告書と推薦書が利用可能であり、関係政府機関に送られたことを発表した<sup>3)</sup>。その中で ICCVAM は眼の安全性試験に動物を用いる前には常に *in vitro* 試験法を考慮することや、動物試験が必要となった場合に麻酔使用や人道的配慮による苦痛の低減を行うことも推奨している。

(D) 米国消費者製品安全委員会 (CPSC : Consumer Product Safety Commission) における代替試験法扱いについて

2012 年 10 月に CPSC は「CPSC の動物実験に対する方針に関して推奨される手続き」と題するウェブページを公開した<sup>4)</sup>。この中で、CPSC の動物実験に対する方針の要約が示され、既存の情報及び科学的に確認された動物実験代替法の有害性評価への利用を支持することが強調されている。また、急性毒性試験、眼刺激性試験、皮膚刺激性試験、皮膚感作性試験について受け入れ可能な代替法のリストや、動物実験の方針に関して CPSC が行った決議、承認事項へのリンク等も案内されている<sup>5)</sup>。

また、CPSC は 2012 年 12 月に連邦有害性物質法 (FHSA: Federal Hazardous Substances Act) での動物試験に関する規制を改正する最終規則を発行した<sup>6)</sup>。最終規則は ICCVAM の委員会によって承認された勧告及び試験法を含み、3R につながるとして科学的に受け入れられている新たな方法を反映したものとなっている。この規則は 2013 年 1 月 9 日より発効となる。

(E) 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<sup>7)</sup>。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。

この報告書と推薦については、連邦政府の 15 機関に送られ、2012 年 2 月には各機関からの回答が公表されている<sup>8)</sup>。化粧品成分での LLNA の利用に関しては FDA が「感作性の分類を行う上では LLNA 単独での評価は用いられず、ペプチド反応性、*in vitro* 試験データやヒト試験データ、あるいは類似化学物質に関する既存データを必要とする」との意見を提出している<sup>9)</sup>。

2012 年 7 月に NICEATM はアレルギー性接触皮膚炎の *in vitro* 試験法のバリデーション研究を実施するために、対象となる *in vitro* 試験法の選定に関する意見を募集した。バリデーション研究では、アレルギー性接触皮膚炎を引き起こすポテンシャルを有する求電子物質を同定する *in vitro* 試験法について、有用性と制限を決定するために提案された。また、アレルギー性接触皮膚炎を評価するために *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験の追加データの提出も求めている。モルモットを用いた試験、LLNA、DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay)、ヒト細胞株活性化試験、KeratinSense™法などが含まれる<sup>10)</sup>。提出されたデータは integrated testing and decision strategy の開発に利用される。

(F) 内分泌攪乱物質を同定するための LULMI-CELL®ER 試験法の評価報告書と推薦書の公表

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<sup>11)</sup>。2011 年 3 月には *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関する評価が行われ *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。その後、2011 年 5 月のパブリックコメント募集を経て<sup>12,13)</sup>。2012 年 2 月に LULMI-CELL®ER (BG1Luc ER TA) 試験法の評価報告書と推薦書が公表された<sup>14)</sup>。2012 年 8 月、連邦政府機関は ICCVAM の推薦に合意した<sup>15)</sup>。米国 EPA は EPA の内分泌攪乱物質スクリーニングプログラムにおいて BG1Luc ER TA を代替法とするとしている<sup>16)</sup>。

(G) 上げ下げ法による急性経皮全身毒性の評価のための第三者専門委員の推薦と関連データの募集

NICEATM と ICCVAM は上げ下げ法 (UDP: Up-and-down Procedure) による急性経皮全身毒性試験のバリデーション状況を評価する専門委員会の招集を計画しており、専門家の推薦及び経皮、経口の *in vivo* 急性全身毒性データを 2012 年 7 月に募集した<sup>17)</sup>。

(H) その他の動向

2006 年 11 月に ICCVAM と NICEATM は代替法の 5 ヶ年計画 (2008 年～2012 年) を発表し、(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<sup>18)</sup>。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

げていた。5 ヶ年計画が最終の 2012 年を迎えるに当たり、NICEATM と ICCVAM は、2013 年～2017 年の 5 ヶ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 月に行い、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。そして 2012 年 5 月に 2013 年～2017 年の 5 ヶ年計画案を発表した<sup>19)</sup>。この計画案では 4 つの広範な戦略的機会を挙げている。(1) 革新的な科学技術の応用とトランスレーションを促進することにより、予測性のある代替試験法、効果的で予測性のある組合せ試験と安全性判断の戦略開発をすること。ここでは、安全性試験と規制要件に関わる毒性学上の知識や有害転機経路 (Adverse Outcome Pathways, AOP) の課題に取り組むトランスレショナルサイエンスの分野や正確性と効率性を改善させるような革新的な試験戦略や技術の応用を促進することが挙げられている。

(2) 2008 年～2012 年の 5 ヶ年計画で優先付けた分野と 2013 年～2017 年の 5 ヶ年計画で選定する新たな優先分野に対して新たな評価活動を通じた代替試験法と試験戦略の進展。次の 5 ヶ年としては、①ワクチンやボツリヌス神経毒等のその他の生物活性剤の試験法、②急性全身毒性試験、③眼刺激性に関しては動物を用いた試験での苦痛の回避や低減、及び動物試験と同等又はそれ以上のハザード予測可能な代替法開発、④皮膚毒性、⑤その他の追加的領域として内分泌かく乱試験、生殖発生毒性、反復投与及び長期毒性試験/発がん性や発熱性試験が挙げられている。(3) 高い質の試験法評価と効果的な働きかけやコミュニケーションを通じた規制受け入れと代替法活用の促進として、米国内のあらゆる関係組織とのコミュニケーションの促進や ICATM との国際的な連携により引き続き代替試験法の速やかな受け入れを促進する。

(4) パートナーシップの確立と強化により、科学的にバリデートされた代替試験法を米国内外に認識、適合、及び実施を促進すること。

過去 2 年の成果については、2012 年 6 月に Biennial Progress Report 2010-2011 が公開され、OECD や米国連邦政府機関により採択された方法で、NICEATM/ICCVAM がガイダンス作成や推奨したものとして *in vivo* LD50 予測や

開始用量設定のための 3T3 または NHK 細胞を用いた細胞毒性試験、非 RI-LLNA 法、Draize 眼刺激性試験における麻酔の使用等を挙げている<sup>20)</sup>。

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<sup>21)</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。また、2012 年 9 月には当学会の第 1 回目となる年次会議が開催された<sup>21)</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を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>22)</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。

(A) NICEATM は ICCVAM と共同して化学物質や製品による眼障害性ポテンシャルを同定するための *in vitro* 試験法及び動物を用いない試験法を組み合わせた試験戦略のバリデーション評価に向けた準備を開始、(B) 修正 OECD TG405 活用のための評価書及び推薦書公表、

(C) 米国消費者製品安全委員会における代替試験法扱いに関する方針と連邦有害性物質法での動物試験に関する規制を改正する最終規則を発行、(D) 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に対する連邦政府機関からの合意回答、(E) 内分泌攪乱物質を同定するための LUMI-CELL<sup>ER</sup> 試験法の評価報告書と推薦書の公表と連邦政府機関からの合意回答、(F) 上げ下げ法による急性経皮全身毒性の評価に向けた準備が進められたこと、

(G) ICCVAM と NICEATM は代替法の 2013 年～2017 年の 5 カ年計画案を発表したこと。

### 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<sup>1)</sup>。

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<sup>2)</sup>。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、このフォーラムを開催した。

SFDA は 2011 年 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<sup>3)</sup>。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。また、現状、化粧品の完成品及び配合成分の光毒性評価は、「化粧品衛生規範」において要求される動物を用いた光毒性試験にて評価を行っており、*in vitro* 試験に関する基準はない。

2011 年 11 月 3 日、中国・広東疾病管理予防センター (GUANGDONG PROVINCIAL CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION: CDC) は、中国 広州市 NEW PEARL RIVER HOTEL にて「3T3 光毒性試験バリデーション」のシンポジウムを開催した<sup>4)</sup>。企画者は、DR. YANG XIHFEN (副部門長)、DR. YANG YING (トキシコロジー部門の副部長) および DR. XIONG XIKUN (トキシコロジー部門の副部長) であった。日本からは日本動物実験代替法学会の小島肇副会長が参加した。その他、海外から

Institute for *In vitro* Sciences (IIVS) の Roger Curren 博士、Brian C. Jones 博士、Mary Kay INC. の John W. Harbel 博士、LOREAL CHINA の Alice Cai 博士、Robert Zhao 博士らが参加し、それぞれの活動が報告された。また、中国における化粧品製剤の安全性を確保するための代替法のあり方を検討するために実施される光毒性試験代替法 3T3NRU (NEUTRAL RED UPTAKE) 法を用いたバリデーションの計画案が説明された。

2012 年 2 月 10 日、SFDA は、昨今の代替法開発に関する国際動向、法規制の整合性等に配慮し、中国における代替法の活用促進を目的に、国内における実験設備を考慮した、より実施可能な 3T3 NRU 法の草案を作成し、意見募集を行った<sup>5)</sup>。各国の化粧品工業会 (日本化粧品工業連合会、PCPC、CE) からコメントが提出され、意見募集は 2012 年 2 月末で締め切られた。

#### 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。2012 年 8 月 31 日に青州市 Biototech 社講堂において韓国動物実験代替法学会の大会が開催された<sup>6)</sup>。日本からは日本動物実験代替法学会の黒澤努会長が招待され、「Japanese effort for 3Rs」と題する講演を行った。また、JaCVAM により実施されている眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS 試験のバリデーションの報告が参加施設である Biototech 社の韓美珍 (Mi-Sook Jong) らにより行われた。

2009 年 11 月、KoCVAM (The Korean Center for the Validation of Alternative Methods) が KFDA (Korea Food and Drug Administration) 内に設立された<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>。

#### C-3-3 小括

中国では SFDA が 3T3 NRU 法の草案を作成し、意見募集を行った。これは、昨今の代替法開発に関する国際動向、法規制の整合性等に配慮した動きと捉えられる。

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、検討中のものを含め、「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>。

2012年10月2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2新規試験法、および3試験法の更新が採択された。

##### ・新規試験法ガイドライン

- TG 460 眼腐食性及び重度刺激性を特定するためのフルオレセイン漏出試験方法<sup>3)</sup>
- TG 457 エストロゲン受容体アゴニストおよびアンタゴニストを特定するためのBG1Luc エストロゲン受容体転写活性化試験<sup>4)</sup>

##### ・更新試験法ガイドライン

- TG 455 エストロゲン受容体アゴニスト活性を検出する安定的に形質転換した細胞を用いるヒトER $\alpha$ を介した転写活性化試験<sup>5)</sup>
- TG 443 拡張一世代生殖毒性試験<sup>6)</sup>
- TG 405 急性眼刺激性/腐食性試験<sup>7)</sup>

フルオイレセイン漏出試験は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、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。

また、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。

一方、2種の新規試験法ドラフトガイドラインおよび9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

サイトセンサーマイクロフィジオメーター試験:眼腐食性および強度刺激性物質を同定するための*in vitro*試験法<sup>8,9)</sup>

(意見募集締切日:2013年2月11日)

発がん性:SHE細胞を用いる形質転換試験<sup>10)</sup>

(意見募集締切日:2012年11月29日)

##### ・改訂試験法ガイドライン

TG 437 眼腐食性および強度刺激性物質を同定するためのウシ角膜を用いる混濁度および透過性試験法<sup>11)</sup>

(意見募集締切日:2013年2月11日)

TG 438 眼腐食性および強度刺激性物質を同定するためのニワトリ摘出眼球を用いる試験法<sup>12)</sup>

(意見募集締切日:2013年2月11日)

TG 431 *in vitro*皮膚腐食性:ヒト皮膚モデル試験<sup>13)</sup>

(意見募集締切日:2013年2月11日)

TG 473 哺乳類の*in vitro*染色体異常試験<sup>14)</sup>

(意見募集締切日:2013年1月10日)

TG 487 哺乳類細胞を用いた*in vitro*小核試験<sup>15)</sup>

(意見募集締切日:2013年1月10日)

TG 439 *In vitro*皮膚刺激性:再生ヒト表皮試験法<sup>16)</sup>

(意見募集締切日:2012年11月1日)

TG 430 *In vitro*皮膚腐食性:経皮電気抵抗試験(TER)<sup>17)</sup>

(意見募集締切日:2012年11月1日)



TG 474 哺乳類赤血球小核試験<sup>18)</sup>  
(意見募集締切日：2012年9月10日)

TG 475 哺乳類骨髄染色体異常試験<sup>19)</sup>  
(意見募集締切日：2012年9月10日)

新規試験法ドラフトガイドラインとして、サイトセンサーマイクロフィジオメーター試験：眼腐食性および強度刺激性物質を同定するための *in vitro* 試験法は、L929 (マウス線維芽) 細胞に被験物質を曝露した後の細胞外 pH の変動を検出する方法であり、水溶性の物質と混合物の眼腐食性と強刺激性の確認、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。

また、SHE (Syrian Hamster Embryo) 細胞のコロニーの形態変化を指標とした発がん性試験は、SHE の初代培養細胞に被験物質を7日間曝露した後に実体顕微鏡にて観察した形質転換コロニーの発生率によって評価する方法である。

改定試験法ドラフトガイドラインについて、TG 439 の改定試験法ドラフトガイドラインには、日本発の *in vitro* 表皮モデルとして、LabCyte EPI-MODEL24 が追加されている。

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-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。2012年7月10日～13日に第6回化粧品規制協力国際会議 (ICCR-6) がワシントン DC (米国) 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。

会議の中では昨年引き続き動物実験代替法に関する議論もなされ、規制当局は代替試験法協力国際会議 (ICATM: International Cooperation on Alternative Test Methods) からその活動について最新の報告を受けた。また、ICCR は、産業界における参照として、ICATM の「現在の動物実験代替法の検証と規制当局の受け入れ状況報告<sup>20)</sup>」の有用性を認めた。また、「ICCR 地域における規制枠組下の動物代替法の適用性」の最終報告書<sup>21)</sup> がホームページに掲載されることとなった (公開済み)。

新たに、化粧品原料の安全性評価のための構造活性相関 (QSAR) 予測モデルの適用性について説明がなされており、コンピューター予測モデルの更なる可能性追求のため、ワーキンググループの設立が合意された。

次回、第7回化粧品規制協力国際会議 (ICCR-7) は2013年に日本で開催される予定である<sup>22, 23)</sup>。

#### C-4-3 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<sup>24)</sup>。

光安全性試験 [S10] では、2010年にEWG (Expert Working Group : 専門家作業部会) が発足し、現在ガイドライン案に対する意見聴取の段階 (Step3) にある<sup>25)</sup>。本トピックの



目的の一つには「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。ガイドライン案の非臨床光安全性試験項目に記載されている動物実験代替法としては、JaCVAM 多施設バリデーションが実施された化学的評価法の ROS アッセイ、*in vitro* 評価の 3T3 NRU-PT、また皮膚外用剤で UVB のみに吸収をもつ医薬品については、UVB に耐性のある代替モデルによる *in vitro* 評価（ヒト皮膚再構築モデル等）がある。また評価ストラテジーの項目においては、「適切に実施されたこれら非臨床の *in vitro* 及び *in vivo* 試験並びに臨床的な試験の一つでも陰性結果が得られれば、その化合物は光毒性を発現しないものと考えられ、追加的な検討は一般的には推奨されない。」とあり、動物リソースの削減が可能となる<sup>26)</sup>。

潜在的発がんリスクを低減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 [M7] では、2010 年にトピックとして採り上げられ、2012 年 11 月に Step2（ICH 調和ガイドライン案の決定・承認）の文書が完成した。一日曝露量の制限はあるものの、ハザード評価の要件に関する内容では *in silico* (Q) SAR について言及があり、「2 つの相補的な (Q) SAR（ルールベース、統計ベース）により警告構造が無いことが指摘された場合は不純物に変異原性の懸念は無いと結論するのに十分であり、それ以上、試験は必要ない」とされている<sup>27)</sup>。

#### C-4-4 小括

OECD の安全性試験ガイドラインにおいて 2 つの新規試験法（TG460 眼腐食性及び重度刺激性を特定するためのフルオレセイン漏出試験方法、TG457 エストロゲン受容体アゴニストおよびアンタゴニストを特定するための BG1Luc エストロゲン受容体転写活性化試験）と 3 つの更新試験法（TG455 エストロゲンアゴニスト活性を検出する安定的に形質転換した細胞を用いるヒト ER $\alpha$  を介した転写活性化試験、TG443 拡張一世代生殖毒性試験、TG405 急性眼刺激性/腐食性試験）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 9 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る。TG439 改定試験法ドラフトガイドラインには、日本発の *in vitro* 表皮モデルとして、LabCyte EPI-MODEL24 が追加されている。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-6 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、規制当局は ICATM からその活動について最新の報告を受けた。新たに、構造活性相関 (QSAR) 予測モデルの可能性追求のため、ワーキンググループの設立が合意された。

ICH においては、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おり、動物福祉・愛護 (3R) の観点についても重視されている。光安全性試験 [S10] ではガイドライン (案) に対する意見聴取の段階にあり、非臨床光安全性試験項目には動物実験代替法として化学的評価法の ROS アッセイ、*in vitro* 評価の 3T3 NRU-PT やヒト皮膚再構築モデルを用いる評価について記述されている。これら非臨床の *in vitro* 及び *in vivo* 試験並びに臨床的な試験の一つでも陰性結果が得られれば、追加的な検討は推奨されなくなり、動物リソースの削減が可能となる。

#### 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。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。

2012 年度は、光毒性試験代替法に関して、活性酸素を指標にした光毒性試験 (ROS アッセイ) のバリデーションを実施中である。

眼刺激性試験代替法についてはサイトセンサーマイクロフィジオロメーター試験やフルオレセイン漏出試験が評価会議を終え、評価報告書の確定版を準備中である。また、SIRC 細胞毒性試験や、MATREX™ 試験などについてはバリデーション中および準備中である。さらに、細胞毒性試験 (STE) に関してはバリデーションを経て、第三者評価の準備中である。

遺伝毒性試験代替法に関しては、*in vitro* コメットアッセイがバリデーション中、*in vivo* コメットアッセイが本年バリデーションを終了している。

皮膚感作性試験代替法に関しては、h-CLAT および IL-8 Luc assay がバリデーション中である。また、皮膚感作性の有無のみを評価する目的で 1 用量のみの設定とした rLLNA、リンパ節細胞の増殖を検出する測定法が異なる LLNA BrdU-ELISA および LLNA-DA も、判定基準の変更に関する第三者評価委員会からの報告を受けて、評価会議が行われた。

皮膚刺激性試験代替法に関しては、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」を用いた試験法について、改訂プロトコルを用いた追加バリデーションの報告書を OECD へ提出し、2012 年 9 月の TG 439 の改定案<sup>1)</sup>には、日本発の表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 が追加された。

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、コメットアッセイ、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 EURL 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25回学術大会は、理化学研究所の杉山 雄一氏が大会長で2012年12月7～9日に東京で開催された。大会は、『動物実験代替法のサイエンス ー機構に基づいた予測ー』をテーマとして、特別講演、教育講演、一般口演、ポスター演題計70題)のほかに6つのシンポジウム(①化粧品原料の安全性評価法の動向、②代替法を指向した創薬を加速化する医薬品*in vitro*評価法の最前線、③培養工学の進歩を如何に細胞アッセイに活かすか?、④医薬品・化粧品品の経粘膜・経皮透過性の*in silico*予測、⑤ first-in-human試験の活用による医薬品の動態・薬効特性の早期把握、⑥コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを用いたADMET解析に有用な培養システム)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化粧品原料の安全性評価法の動向」として後述する『粧工連における代替法を用いた皮膚感作性評価への取り組み』<sup>2)</sup>、『化粧品原料の*in silico*安全性評価に向けた粧工連の取り組み』<sup>3)</sup>をはじめ、化粧品原料評価全般に関わる動向や、皮膚一次刺激性試験、眼刺激性試験、光毒性試験、単回投与毒性試験など各試験の動向も報告された。また25周年記念講演として、「眼刺激性試験代替法バリデーション」や「日本動物実験代替法学会バリデーション委員会とJaCVAM」など、これまでの動物実験代替法開発の歩みやバリデーションの難しさなども学会活動を中心に報告された。

粧工連から24時間曝露による皮膚一次刺激性試験代替法開発の委託により、代替法学会に組織された皮膚刺激性試験代替法ワーキンググループは、2012年より皮膚一次刺激性代替法特別委員会となり、昨年作成した代替法開発のための被験物質リストのフォローアップなど活動は継続されており、前述した第25回学術大会シンポジウムで活動内容の報告があった。また、代替法学会より、皮膚モデルメーカーを対象として、本特別委員会への参加要請も出された。

### 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JaCVAMの活用について」（平成23年2月4日付）が通知されており、ここには、JaCVAM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JaCVAM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、2012年4月26日付で厚生労働省医薬食品局審査管理課から、「皮膚感作性試験代替法及び光毒性代替法を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンスについて」の事務連絡として発出され<sup>4)</sup>、公式に代替法利用の促進が示された。

また動物愛護管理法の見直しが行われ、2012年6月1日から「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」が施行されたが、実験動物の取り扱いに関しては特に触れられていない<sup>5)</sup>。

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、2012年12月に開催された第25回日本動物実験代替法学会にて「化粧品原料の*in silico*安全性評価に向けた粧工連の取り組み」<sup>3)</sup>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。また同じく粧工連動物実験代替専門委員会内に、「感作性試験代替法ワーキンググループ」が2012年5月に組織された。これは複雑な感作性反応全てを単独の*in vitro*試験法だけで再現するには限界があるため、異なる作用機序に着目した*in vitro*試験を組み合わせた評価体系構築を目指している。本活動に関しても、12月の日本動物実験代替法学会にて、「粧工連における代替法を用いた皮膚感作性評価への取り組み」として報告され<sup>2)</sup>また、2013年1月にCosmetic Europe、3月10日～14

日に開催される第52回米国毒性学会でも報告（ポスター1演題）する予定である

フレグランスジャーナル2012年6月号に2011年度の本報告書（厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書「代替法についての国際情勢の調査」）を参考にして作成された総説「動物実験代替法をめぐる最新動向」が掲載された<sup>6)</sup>。日本動物実験代替法学会第24回大会の内容を中心に「メカニズムベースの代替法開発と標準化」、「*In silico*法の活用」及び「既存法のフォローアップ」について、従来からの研究の進展や将来につながる動きが紹介された。

#### 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24年4月26日に厚労省から事務連絡「皮膚感作性試験代替法及び光毒性代替法を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンスについて」が通知され、公式に代替法利用の促進が示されたことである。また、粧工連動物実験代替専門委員会内に*in vitro*を補完する位置づけとして2011年に発足した「*in silico*ワーキンググループ」の継続的な活動とともに、2012年に同じく「感作性試験代替法ワーキンググループ」も設立され、今後新たな評価手法の開発が望まれることである。

#### 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<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 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>。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 (Classification Labeling and Packaging of substances and mixtures) 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