

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)にげっ歯類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 EURL 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、3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月に引き続き、2012年5月にも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。

2011年の改定案が正式化されないまま、2012年の改定となり、主たる改定の要旨としては2011年の改定から変化はなく、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キュールのリスト (12物質) を変更し、24化学物質からなる化合物リストとし、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手順を示した点に変わりはない。

③皮膚刺激性の代替試験法

試験法としては、3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。

3次元ヒト皮膚モデルを用いた方法については、EPISKIN™とEpiDerm™の2モデルを使用しているバリデーション研究がECVAMにより推進され良好な結果を示した。しかしESACは2007年4月のStatementにおいて、「EPISKIN™皮膚刺激性試験法」のみを皮膚刺激性の表示(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試験法として承認し、EpiDerm™については、プロトコルの改善が要求された⁴⁾。

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年に欧州委員会会議で「EpiDerm™ SIT」として「SkinEthic™ RhE assay」とともに、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⁵⁾。

3次元ヒト皮膚モデルを使用した試験法に対し、SCCPは2007年に「皮膚刺激性試験の*in vitro*試験メモランダム」を提出し⁶⁾、この中で本試験法を歓迎する一方で、色素や染毛剤の評価ではMTT比色法が影響を受ける可能性や、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)が少なかったことを指摘し、化粧品原料に関しては更なる研究が必要と述べている。この指摘に対して追加検討結果が提出され、SCCSはこれに対する見解として、2010年に「皮膚刺激性試験のための*in vitro* EPISKIN™試験法に関する補遺」⁷⁾を提出し、追加データ審査の結果から色素の評価においてはMTT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。

これら「EPISKIN™」、「EpiDerm™ SIT」および「SkinEthic™ RhE」を用いた試験法は、2010年に「OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS :*In vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method」⁸⁾としてOECD TG439に収載され、2012年10月には4つ目の3次元ヒト皮膚モデルとして「LabCyte EPI-MODEL24」を追加するガイドライン改定案が提案され、意見募集が行われた。

日本国内ではこれまでにEpiDerm™、TESTSKIN™、Vitrolife-Skin™などの「市販キットである3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3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¹⁰⁾、改訂されたプロトコールによる報告書をOECDに再提出し、レビューを受けた¹¹⁾。その結果、前述した2012年10月のOECD TG439ガイドライン改定案の提案となった。

一方で、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、日本動物実験代替法学会にて報告した¹⁴⁾。皮膚刺激性試験代替法ワーキンググループは、2012年から皮膚一次刺激性試験代替法特別委員会となり、活動を継続し2011年に作成した被験物質リストのデータに対してCIRデータとの照合を行った。

3次元ヒト皮膚モデルの薬事申請への応用に関しては、医薬部外品承認申請に代替法の利用促進を目的として組織された「ガイダンス検討会」において、ガイダンス作成の是非が検討されたが、先のJaCVAM評価会議において、「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。」とされたことから、ガイダンス作成は見送ることと

された。その一方で、将来的に動物を用いない皮膚刺激性評価のために、複数の代替法やヒト評価法を組み合わせる皮膚刺激評価体系の構築の必要性について議論され、その検討の必要性について、行政当局も含めて共通認識とされた。

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。

本試験法は、ガイダンス検討会においても議論され、平成 24 年 1 月に JaCVAM HP にて「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)」¹⁶⁾に対してパブリックコメントが募集された後、平成 24 年 4 月 26 日付で、厚生労働省医薬食品局審査管理課より事務連絡「皮膚感作性試験代替法及び光毒性試験代替法を化粧品・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」が発出され、その中に「光毒性試験代替法としての *in vitro* 3T3 NRU 光毒性試験を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス」が示された¹⁷⁾。

一方で、2010 年 10 月 25-27 日に開催された 3T3NRU 光毒性試験法に関する EURL ECVAM-EFPIA の workshop に関するレポートが 2012 年に発行された¹⁸⁾。その内容によると、本試験法は、臨床投与経路や体内動態が加味されていない試験法であるため、経皮投与以外での動物実験や臨床試験との整合性が悪く、医薬品の開発候補品に対し、本試験法の結果が偽陽性となる確率が高い。この課題に対し、3T3 NRU 光毒性試験法の改良や光毒性試験実

施の判断基準の再考などが対策案として議論された。議論の結果として、「3T3 NRU 光毒性試験法の特異度の向上のために感度の高さを損なうべきではない」としながらも、経皮投与以外の物質に対するプロトコルや予測モデルの開発の必要性についての指摘や、最高試験用量の変更、現在モル吸光係数 (MEC) $>10 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ となっている光毒性試験実施判断基準¹⁵⁾を $\text{MEC} > 1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ とする提言などが記されている。

その他、3 次元皮膚モデルを用いた光毒性試験代替法については、最近では EPISKINTM を用いた方法が論文掲載されている¹⁹⁾。EURL ECVAM でバリデーションが実施されている試験法としても、3 次元ヒト皮膚モデルを用いた試験法等が報告されており^{20, 21)}、現在も評価継続中である。

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^{22, 23, 24)}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^{25, 26)}。

JaCVAM では、被験物質に光を照射した時の活性酸素種の発生を検出し光反応性の有無を予測する ROS assay についてもバリデーションを実施しており、現在バリデーションが終了し、第三者評価が行われている²⁷⁾。

さらに、現在、医薬品の光安全性評価のための国際協調ガイドライン (ICH S10) 作成のためのワーキンググループが組織され、2013 年 11 月の Step4 到達へ向けて活動している。2012 年 12 月 28 日には、「ICH S10: 医薬品の光安全性評価ガイドライン(案)」が示され、厚生労働省よりガイドライン案に関する意見募集が 2013 年 2 月 28 日を期限に行われる²⁸⁾。

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。医薬部外品の申請等では今日まで、

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^{2,3)}されているが、2012年9月と12月に改訂案が示され、その中で従来のトップダウンアプローチに加えてボトムアップアプローチとしての利用が示された^{4,5)}。また、OECD は 2012年10月に従来の Draize 法の改訂ガイドライン (TG405) と眼腐食性を同定する Fluorescein Leakage (FL) を新たなガイドライン (TG460) として採択したことを発表した^{6,7)}。

②眼刺激性試験代替法の状況

生体組織を用いる試験：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^{2,3)}。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。2011年11月に NICEATM 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⁸⁾。 *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。

TG 437 及び 438 については改訂案が 2012年9月と12月に公開され意見募集が行われている。改訂案での主たる変更点としては、従来のトップダウンアプローチとしての利用に加え、ボトムアップアプローチとしての利用も示したことが挙げられる。2012年12月の改

訂案によれば、Scott, L. らの文献を引用し、強度眼刺激性や眼刺激性とならない GHS 分類の No Category として判定される基準が示されている⁹⁾。また、BCOP についてはアルコール、ケトンや固体の化学物質や混合物といった適用可能範囲、界面活性剤とそれを含む混合物に関する試験方法、陽性対照、判定基準等に関する改訂についても示されている。改訂案では BCOP 及び ICE 両法において、動物を用いた眼刺激性試験の完全代替とはならないが、強度眼刺激性及び眼刺激性に分類されない被験物質の最初の評価段階での利用を推奨している^{10,11)}。

細胞毒性に基づく眼刺激性試験法：OECD は細胞毒性に基づく2種類の眼刺激性試験法、Cytosensor Microphysometer™ (CM) 及び Fluorescein Leakage (FL) のドラフトテストガイドラインを示し、FL 法については、2012年10月に TG460：『眼腐食性及び強刺激性同定のためのフルオレセイン漏出試験法 (“Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants”)』のガイドラインが採択された¹²⁾。

FL 法は動物試験の完全代替とはならないが、水溶性物質のうち眼腐食性・強刺激性ポテンシャルを有するものを同定する段階的な方法の一つとして用いることが出来るとしている。

一方、CM 法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が、2012年12月にも 2013年2月11日を期限とする意見募集を行っている¹³⁾。

2012年8月に EURL ECVAM が CM 法のパフォーマンススタンダードに関するピアレビューを開始した。このパフォーマンススタンダードは将来開発される類似の方法のための標準物質を設定することを目的として当初検討されたものであるが、ESAC での評価が進めば、CM 法のガイドライン案に含むことも提案される¹⁴⁾。

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が承認され、NICEATM-ICCVAMによるピアレビューが進められている^{15,16)}。

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) のバリデーション状況の評価を行うため、第三者専門家委員会 (Panel) の招集を計画した¹⁷⁾。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。その他の*in vitro*試験法についてもデータ提供は有益であり、BCOP、ICE、受精鶏卵の漿尿膜試験 (HET-CAM)、CM法、FL法、SkinEthic™ ヒト角膜上皮及びEpiOcular™法についても求めている。さらに、関連する*in vivo*データについても、入手可能であれば提出を求めた。

従来のウサギを用いた眼刺激性試験の改訂：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^{18,19)}。そして2012年10月にはTG405改訂がOECDにより正式に採択された。これにより、規制上の必要性などからウサギを用いた眼刺激性試験を実施する際には、局所麻酔剤の常用と全身性鎮痛剤の常用及び人道的エンドポイントの設定が求められる²⁰⁾。

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：2010年9月にICCVAMの最終推薦書が連邦機関に送付された²¹⁾。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。

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²²⁾。

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^{23,24)}。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。そしてNICEATMは2012年10月に動物数削減に関する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²⁵⁾。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。政府機関との意見応答については2013年に行われる予定である。

2012年10月には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「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が公開され、眼刺激性試験についても受け入れ可能な代替法としてBCOP法、ICE法、CM法、及びDraize試験における麻酔や人道的配慮が示された²⁶⁾。

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²⁷⁾。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。眼刺激性の評価においては、既存データの活用を第一とし、weight of evidenceが不十分である場合にはCPSCが承認した*in vitro*試験や*in silico*の活用を薦めている。なお、具体的な試験方法はウェブページを参照することとされている。

EURL ECVAM と Cosmetics Europe 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おり、追ってピアレビューが進むものと考えられる^{28, 29)}。

ESAC は腐食性及び強刺激性物質を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³⁰⁾。

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 EURL 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⁹⁾。

2012 年 10 月に採択された OECD TG460 FL 法については、2009 年 7 月の ECVAM と ESAC の” Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell function based *in vitro* assays for eye irritation testing” の見解の中で、トップダウンアプローチとしての利用を述べている³¹⁾。

日本：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^{32, 33)}。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)』として公開された^{34, 35)}。

眼刺激性試験代替法 (SIRC細胞毒性試験/SIRC-CVS) 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-CVS 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) はピアレビューが進められている¹⁶⁾。

C-6-4 皮膚アレルギー性

①概要

2012 年度の感作性試験代替法の動向としては、以下の 3 点があげられる。

EURL ECVAM において *in vitro* 感作性試験代替法として DPRA¹⁾、h-CLAT²⁻⁴⁾ 及び MUSST⁵⁾ のプレバリデーションが進められている。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。

動物を用いた感作性試験を代替するためには単一の *in vitro* 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取り組みが行われている。日本では粧工連加盟企業による感作性試験代替法ワーキンググループが組織され、2012 年 5 月より活動を開始した。2012 年に開催された第 25 回日本動物実験代替法学会では、活動内容などについてシンポジウム 1 題とポスター 3 題を発表した⁶⁾。

OECD でテストガイドライン記載の LLNA^{7, 8)}

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」が当局より事務連絡として公表された⁹⁾。このことを受けて、LLNA が医薬部外品の製造承認申請において正式に利用可能となった

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 EURL ECVAM で実施されている。DPRA¹⁾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-CLAT²⁻⁴⁾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。2012 年 9 月の SACATM meeting において、その進捗状況に関して EURL ECVAM から発表がなされた。それによると、DPRA は 2012 年に評価が終了し、現在 Peer Review が行われている。h-CLAT と MUSST については 2013 年より Peer Review が開始される予定である¹⁰⁾。

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¹¹⁾。日本では、部外品等申請の際に審査側、申請側双方の代替法の利用促進につなげるため、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、LLNA と *in vitro* 3T3 NRU 光毒性試験の実施方法等をまとめたガイダンスを作成した。そして、厚生労働省医薬食品局審査管理課から 2012 年 4

月 26 日付で事務連絡「皮膚感作性試験代替法及び光毒性試験代替法を化粧品・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」の添付資料として公表された⁹⁾。今後は、放射性物質を用いない LLNA:DA¹²⁾ と LLNA:BrdU-ELISA¹³⁾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ことから、これらのガイダンスに関する議論がなされる見込みである。

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、日米欧医薬品規制調和国際会議 (ICH) における合意に基づき、新たに S2「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」¹⁾ が 2012 年 9 月に実施されたことであり、2010 年 7 月に OECD ガイドライン 487²⁾ として採択された *in vitro* 哺乳類細胞小核試験が *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より、化学物質の染色体異常誘発性をみるための試験である。染色体異常試験と比較して、偽陽性の割合が少ない事、標本作成や観察が容易で熟練を要しないこと、染色体構造異常誘発性だけではなく、異数性も検出できることから注目されている。本法は、2010 年 7 月に OECD ガイドライン 487 として採択されたことに続き、ICH の S2「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」¹⁾ においても、*in vitro* 染色体異常試験やマウスリンフォーマー 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³⁾など、さまざまな利点から検討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、EURL ECVAM、NICEATM の協力を得て実施されている⁴⁾。また ICH の S2「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」¹⁾においても、DNA 傷害性を評価するための第 2 の *in vivo* 試験として推奨されている。

一方、CE (Cosmetics Europe) 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。

ICH では、ヒトに対するリスクを予測するための遺伝毒性試験の標準的組合せを最適化すること、及び結果の解釈のためのガイダンスを提供するため、遺伝子の変化に基づく発がん性のリスク評価の精度向上を最終的な目的として、さらに非臨床的安全性試験において、3Rs を促進する ICH の義務に従い、S2「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」¹⁾ が新たに定められた。新ガイダンス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。要点は以下のとおりである。1) S2A ガイダンス及び S2B ガイダンスを一つにまとめたこと。2) 遺伝毒性試験の標準的組合せについて、2 つのオプションを提示したこと (*in vitro* ほ乳類細胞試験を含むものと、含まないもの)。3) *in vitro* ほ乳類細胞試験において、最高濃度の上限を 1 mM 又は 0.5 mg/mL のいずれか低い濃度としたこと。4) *in vitro* ほ乳類細胞試験として *in vitro* 小核試験の利用を認めたこと。5) 条件によっては、*in vivo* 遺伝毒性試験を反復投与毒性試験に組み込んでもよいこととしたこと。6) 第 2 の *in vivo* 試験として DNA 傷害性を評価できるコメット試験を推奨することとしたこと。7) 条件によっては、細菌を用いる復帰突然変異試験を 1 試験だけでもよいこととしたこと。

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 年の計画で進められている¹⁾。研究内容は 7 項目に分けられ、① SCR&Tox (効果に関連し、広範かつ標準化された毒性学のための幹細胞研究)、② HeMiBio (マイクロ流路を備えた肝臓型バイオリアクター研究)、③ 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)、④ 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)、⑤ 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)、⑥ 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)、⑦ COACH (SEURAT-1 プロジェクト間の調整、連携促進)、である。

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、独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) のプロジェクト「構造活性相関手法による有害性評価手法開発」が 2007～2011 年度に行われ、終了した³⁾。反復投与毒性を対象とした世界初の予測システムである有害性評価支援システム統合プラットフォーム HESS (Hazard Evaluation Support System Integrated Platform) とこれに付属するデータベースシステム (HESS DB) が開発、公開された。

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⁴⁾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、代替法としては古くから各臓器の障害を予測する *in vitro* 試験

系、毒性指標の研究が行われてきた。2010年以前には肝臓、腎臓、中枢神経、肺、心臓血管、造血系についての *in vitro* 試験法の開発⁴⁾が進められたが、反復毒性はそれらの相互作用を含め総合的な研究が必要であり、戦略的な計画、進行が望まれていた。

2009年8月、WC7（第7回国際動物実験代替法会議）において、EU委員会およびCOLIPA（現在のCosmetics Europe；以下、CE）が2500万ユーロずつ出資し、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）研究プログラムを行うことを発表した。この5ヵ年プログラムは、2011年1月から開始されており、70のヨーロッパの大学、研究機関、企業が参加している。この計画は6つのプロジェクトとそれらを調整、連携を促進するプロジェクト、合計7つのプロジェクトから構成されている。その進捗に関しては、現在までに SEURAT-1 Annual Report VOL 1(2011)及びVOL 2(2012)として、WEBサイトで公開されている。

①SCR&Tox は多能性幹細胞に基づく毒性研究における品質の標準化を目的としている。未分化の多能性幹細胞の評価のために、細胞/コロニー形態解析、アルカリフォスファターゼ活性の分析、多能性関連遺伝子のqPCR解析、多能性関連マーカー発現解析が行われている。②HeMiBio は複雑な構造と機能を持つヒトの肝臓を模倣したデバイスを作ることを目的としている。肝実質細胞と非実質細胞（肝星細胞、類洞内皮細胞、クッパー細胞）の相互作用を再現し、さらに *in vivo* 様の代謝、トランスポート機能、生理機能を兼ね備え、1ヵ月以上生存するデバイスの開発が進められている。③DETECTIVE は *In vitro* 系において反復投与毒性を評価するためのエンドポイントおよびバイオマーカーの発見を目的としている。選択した化学物質を用いて肝毒性、心毒性、神経毒性に関係する毒性経路を明確にする検討が進められている。④COSMOS は化学構造から化粧品原料の安全性情報を得るための *in silico* を含む統合的なモデルを構築することを目的としている。代替法開発の根幹となる毒性情報データベースの開発、およびそれに基づいたヒトの反復投与毒性に関するエンドポイントの毒性学的懸念の閾値(TTC)手法の確立が進められている。⑤NOTOX は反復投与毒性を予測するための分子、細胞、組織データの取得とそれらを取り入れたマルチス

ケールのコンピューターモデルを作ることを目的としている。ヒト肝の樹立細胞や初代培養細胞を用いて化学物質の作用をオミックス技術で捉えることが初期段階として進められている。データのバイオインフォーマティクスによる解析がなされ、外挿モデルの基礎とする検討が進められている。⑥ToxBank は毒性データ管理とモデル化、選択された物質のデータ蓄積、Seurat-1における *in vitro* 全身毒性研究に関わった細胞や組織の参照リソースなどを目的としている。作用機序にもとづいた毒性試験の参照物質の選択が進められている。⑦Coach は化粧品原料と化学物質の反復投与毒性試験を置換するための SEURAT-1 内の6つのプロジェクトの調整、連携推進を行っている。

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。

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)のプロジェクト「構造活性相関手法による有害性評価手法開発」が2007～2011年度に行われ、終了した。プロジェクトリーダーは財団法人食品農医薬品安全性評価センターの林真理理事長であった。2012年10月5日と31日にそれぞれ大阪と東京で成果の発表が行われた。本プロジェクトの目標は、化学物質の既知の反復投与毒性試験データや関連する毒性作用機序、代謝等を体系的に整理した情報に基づき、肝臓等への毒性を化学構造から評価するための判断材料となる情報や、代謝物、代謝経路の情報、小影響量の範囲等の予測情報を利用者が効率よく参照可能な機能を備えた有害性評価支援システム統合プラットフォームを開発し、公開することであった。また、開発に当たってはOECD(Q)SARプログラムへ提供するなど国際活動への貢献を行うとともに、OECD(Q)SAR Application Toolboxへの統合も念頭に置いた汎用性の高いものとすると言われた。成果としては、反復投与毒性を対象とした世界初の予測システム

である有害性評価支援システム統合プラットフォーム HESS (Hazard Evaluation Support System Integrated Platform) とこれに付属するデータベースシステム (HESS DB) が開発、公開された。HESS は、OECD (Q) SAR Toolbox Management Group と連携しつつ開発が進められ、HESS の一部は OECD からの要望により OECD (Q) SAR Toolbox へ統合された。また、カテゴリーアプローチの手法確立に関する OECD のワークショップにおいて、反復投与毒性のカテゴリー化の実例をケーススタディとして提供し、高い評価を受け、当該活動の発展に貢献した。欧州化学品庁 (ECHA) に HESS 試用版のトライアルユースのモニターを依頼し、その評価結果を基に HESS 正式版を完成させた。現在 HESS は、ECHA により REACH 届出物質の評価に活用されている。

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⁾。また、ECHA はある条件下で実施された本テストガイドラインに基づくデータは、REACH 規則における二世代生殖毒性試験の要件を満たすことを発表した³⁾。

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^{4,5)} は、2004 年 7 月から 5 年 6 ヶ月間、2009 年 12 月まで進められた。20 以上の代替法が開発又は最適化され、再現性や技術移転性が研究された。全体で 100 以上の物質がピアレビューのために検討され、統計解析がなされた⁶⁾。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⁷⁾。

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¹⁾。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⁸⁾。

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⁹⁾。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。

ReProTest 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 以上の試験法の開発が進められた。

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¹⁰⁾。

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エスト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)
- ⑥ERE-β Glob-Luc-SVNeo を安定導入した MCF-7 細胞 (ER+) 試験
(レセプタープラスミドに作動するエスト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)

・受胎能

- ⑦卵胞バイオアッセイ (マウス)
(卵巣の機能、卵形性、排卵刺激における 13 日目の極体卵母細胞)
 - ⑧ウシ *in vitro* 成熟試験
(成熟段階中期 II の良好な成果；中期 II への減数分裂の終了)
 - ⑨ウシ *in vitro* 受精試験
(ウシ精子の成熟卵母細胞への透過および雌雄前核の形成)
 - ⑩マウス胚周囲着床試験
(未分化胚芽細胞段階における 8 日目の生存)
 - ⑪イシカワ細胞試験
(プロゲステロン受容体の mRNA レベル)
- ・胚発生
- ⑫全胚培養
(ラット胎仔の成長と形態)
 - ⑬胚性幹細胞試験
(マウス胎児の心筋細胞を拍動させる分化の 50% 阻害濃度)
 - ⑭ReProGlo 試験
(マウス胎性幹細胞のレセプタープラスミドを作動させる Tcf/Lef プロモーターのルシフェラーゼ活性)

日本では、EST 法の課題を克服する研究が NEDO プロジェクト「高機能簡易型有害性評価手法の開発」として平成 18 年から平成 22 年の 5 カ年で研究が進められた¹¹⁻¹⁴⁾。本研究により、心筋細胞、神経細胞、筋・骨格系細胞への分化誘導法を確定し、心筋細胞および神経細胞について発光細胞株が樹立され、基本プロトコールが作成された。本試験法は EST を発展・改良させた位置づけとなり、化学物質のリスクアセスメントや催奇形性のスクリーニングとして活用できる価値があるとされており、第 25 回日本動物実験代替法学会において、有用性の検証に関して報告された¹⁵⁾。また、ヒト ES 細胞を用いた検討を行い、マウス ES 細胞で選定したマーカー遺伝子群のヒトにおける有効性も明らかにされた。

さらに、ラット全胚培養法にラット代謝酵素 (S-9 mix) を組み合わせ、代謝による被験物質の変化を考慮した催奇形性予測試験法も開発され、24 穴プレートと酸素透過フィルムを用いた培養装置を開発し、培養用の血清を採取する動物数の削減とハイスループット化が達成された。第 25 回日本動物実験代替法学

会においても、ラット全胚培養法を用いてフォルスコリン、 α -リポ酸、ルテインの研究結果が報告された¹⁶⁻¹⁸⁾。

OECD テストガイドライン提案に向けてプレバリデーションも計画され、今後のガイドライン化に向けての動きが注目されるところである。

この他、内分泌かく乱物質スクリーニングに関しても試験が進んでいる¹⁹⁾。ER α レポーターアッセイ法である HeLa レポーター遺伝子アッセイ (アゴニスト) (STTA 法) は、2009 年 9 月 7 日に OECD ガイドライン 455 として採択、2012 年 10 月に更新された²⁰⁾。一方、HeLa レポーター遺伝子アッセイ (アンタゴニスト) は現在 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試験中である¹⁹⁾。Lumi-cell アッセイに関しては、2012 年 10 月に OECD テストガイドライン 457 として採択された²¹⁾。Cci アッセイは、バリデーションが終了し専門家による第三者評価への準備段階である¹⁹⁾。また、MELN アッセイは EURL ECVAM にてバリデート中、AR-Ecoscreen および Hand1-Luc 試験法はバリデート準備中である¹⁹⁾。

以上、生殖発生毒性を予測するための *in vitro* 試験法の開発が進められ、一部においては ESAC の承認が得られ、領域毎に有望な方法が開発されつつあるが、生殖発生毒性の検討項目の多さ、複雑さを考えた時、化粧品指令第 7 次改正の期限である 2013 年までに規制に用いることのできる代替法の承認は不可能であると思われる。

C-6-8 経皮吸収性

経皮吸収試験は化粧品、医薬部外品及び医薬品等の皮膚への適用による角質、表皮及び真皮への透過ならびに全身的曝露を評価するために行われる。経皮吸収試験代替法については、実験動物を用いた *in vivo* 試験法 (TG 427)¹⁾ と同時に、動物 (主にラット及びブタ) 又はヒト摘出皮膚を用いた透過拡散セルによる *in vitro* 試験法 (TG 428)²⁾ が標準化されている。現在、このガイドラインが経皮吸収試験代替法の中心的な役割を担っている。2006 年 3 月アップデートされた SCCP の“化粧品成分の皮膚吸収における *in vitro* 評価基準”においても、原則的に TG 428 の遵守が求められている³⁾。TG 428 を含めた *in vitro*

試験法において、皮膚の選定、難溶性物質のレセプター相の選択、試験物質の物性など、幾つかの考慮すべき点も報告されている⁴⁾。

さらに「経皮吸収に関するガイダンス注記」⁵⁾ が 2011 年 8 月 18 日公表されており、*in vivo/in vitro* 実験データ評価における課題解説、*in vivo/in vitro* 動物、*in vivo* ヒトデータの組み合わせ (トリプルパック) アプローチの推奨、実験データ不在の場合の経皮吸収予測に関する解説が示されている。

SCCS は、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」を採択した⁶⁾。内容として、経皮吸収に用いる皮膚のサンプル必要数、皮膚質量、経皮吸収係数の相対標準偏差に関する項目などが記載されている。

TG 428 の改良として、代替材料については、再構築ヒト皮膚モデルが最も研究されている。6 種の再構築皮膚モデルを用いた透過性が比較され、再構築皮膚モデルの透過性はそれぞれ異なっている事⁷⁾、バリア寄与率や皮内エステラーゼ活性が異なっている事が報告されている⁸⁾。また、親油性物質を用いた再構築皮膚モデルとヘアレスマウスの皮膚浸透性⁹⁾ や再構築皮膚モデルとヒト摘出皮膚の皮膚透過性についても検討されている¹⁰⁾。

その他、人工脂質膜や PVDF (ポリフッ化ビニリデン)、PDMS (ジメチルポリシロキサン) などの人工膜を用いた評価^{11,12)}、リポソームを用いた評価方法も検討されている¹³⁾。さらにダーマトーム皮膚を使用し、評価時間を短縮した方法についても検討されている¹⁴⁾。

シミュレータによる検討もなされており、*in silico* 手法を用いた化粧品の安全性リスク評価¹⁵⁾ や薬物皮膚吸収の *in silico* 予測¹⁶⁾、QSAR モデルについても報告されている¹⁷⁾。

また Reduction を考慮した透過性試験における多検体評価用セルについても検討されている¹⁸⁾。

反復投与による経皮吸収試験については限られた試験期間以内の反復投与でデザインされたいくつかの試験法はあるが、現在、標準化された反復局所投与に利用できる *in vitro* 試験法はなく、代謝を組み込んだ皮膚吸収/透過に利用できる *in vitro* 試験法もない。また、ヒトボランティアによる皮膚吸収試験は、化粧品原料や化粧品製品の低い毒性の場合において行うことができるが、利用できるヒトのデータはほとんどないのが実情である¹⁹⁾。

C-6-9 小括

本年度の代替法の開発と評価に関する状況を安全性評価項目ごとに取りまとめた。その結果、本年度の特筆すべき動きは、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」の事務連絡が発出されたことが第一に挙げられる。これにより代替法の公的な利用が実質的に示された。

感作性試験代替法について、EURL ECVAMでは *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進められている。DPRA についてはすでに評価が終了し、ESAC による Peer Review が開始された。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た。

反復投与毒性試験代替法では、2011年1月から開始された EU における研究プログラム SEURAT-1 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。

D. 結論

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。本問題は決着の時期が近づいている。

国際協調の観点からは、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当てられ、ワーキンググループが設立されたことである。

代替法の開発と評価の観点からは、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ダンスについて」の事務連絡が発出されたことが第一に挙げられる。これにより代替法の公的な利用が実質的に示された。

感作性試験代替法について、EURL ECVAM では *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進められている。DPRA についてはすでに評価が終了し、ESAC による Peer Review が開始された。一方、日本では複数の *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た。

反復投与毒性試験代替法については、2011年1月から開始された EU における研究プログラム SEURAT-1 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。

代替法の開発と評価は、非常に長い年月を要するためガイドラインとして文書化された場合は別として、単年度では明確にその全貌を捉えることは困難である。したがって、本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進し、さらには今後の国際協調への参考情報とするためには、関連する国際情勢の調査と解析を継続して実施し、積み重ねていく必要があると考える。

E. 健康危険情報

なし

F. 参考文献

EU における動物実験禁止と代替法開発の動向 (C-1) 関連

- 1) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003, Official Journal of the European Union, L66/26, 2003
- 2) http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/documents/public_consultation/index_en.htm
- 3) http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal_testing/annual_report2009.pdf
- 4) <https://cosmeticseurope.eu/downloads/5212.html>
- 5) <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:EN:PDF>
- 6) http://www.effci.org/assets/files/EFFCI_PS/COLIPA-EFFCI.pdf
- 7) CTPA News update, February 6, 2003.
- 8) CTPA News update, March 3, 2003.
- 9) [http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/antest/\(4\)_chapter_2_en.pdf](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/antest/(4)_chapter_2_en.pdf)
- 10) <http://www.predict-iv.toxi.uni-wuerz>

- burg.de/
- 11) http://www.predict-iv.toxi.uni-wuerzburg.de/periodic_reports/4th_annual_report/
 - 12) <http://axlr8.eu/overview/>
 - 13) <http://axlr8.eu/assets/axlr8-progress-report-2012.pdf>
 - 14) http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-launch-of-two-esac-peer-reviews-in-august-2012
 - 15) <http://web.jrc.ec.europa.eu/callsfortender/index.cfm?action=app.showdoc&id=3634>
 - 16) http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/EURL-ECVAM%20-Recommendation.pdf
 - 17) http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/now-available-ecvam-search-guide-on-alternatives-to-animal-testing/?searchterm=DATA RETRIEVAL PROCEDURES
 - 18) <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
 - 19) http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/protocols-in-vitro-methods-skin-irritation-genotoxicity-pyrogenicity
 - 20) http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_002.pdf
 - 21) http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_003.pdf
 - 22) http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/1_3_partners.htm
 - 23) http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/1_about_epaa/1_2_governance/action_programme_2011-2015.pdf
 - 24) http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/2_activities/2_4_progress_reports/epaa-report-final-2012.pdf
 - 25) http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/2_activities/2_3_comm_and_dissem/comp-chem-flash-report.pdf
 - 26) http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/2_activities/2_3_comm_and_dissem/adme-flash-report.pdf
 - 27) <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.06.00>
 - 28) http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm
 - 29) http://ec.europa.eu/enterprise/reach/index_en.htm
 - 30) <http://ecb.jrc.it/reach/>
 - 31) <http://www.nikkakyo.org/reach/>
 - 32) COLIPA Statement, 1 March, 2011
 - 33) <http://www.seurat-1.eu/pages/library/seurat-1-annual-report.php>
 - 34) <http://www.seurat-1.eu/pages/posts/launch-of-the-seurat-1-second-annual-report-at-esof-67.php>
 - 35) <http://www.cosmostox.eu/home/symposium-2012-09-12/>
 - 36) De Silva, O. et al., The COLIPA research programme. Abstracts 6th World Congress 2007, 279, 2007
 - 37) McNamme, P. et al., Update on the COLIPA research programme for development of *in vitro* methods for eye irritation. Abstracts 6th World Congress 2007, 61, 2007
 - 38) Aeby, P. et al., The COLIPA strategy for developing and pre-validating *in vitro* alternatives for skin sensitization testing. Abstracts 6th World Congress 2007, 70, 2007
 - 39) Pfuhler, S. et al., Towards animal-free genotoxicity testing: the COLIPA strategy. Abstracts 6th World Congress 2007, 66, 2007
 - 40) Ryan, C. et al., Further examination of a human cell line activation test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential. Abstracts 6th World Congress 2007, 253, 2007
 - 41) Ovigne, J.-M. et al., The U937/CD86 harmonized *in vitro* assay protocol for the prediction of skin sensitization potential moving forwards a COLIPA ring study. Abstracts 6th World Congress 2007, 247, 2007
 - 42) Aeby, P., et al. "Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program", *Toxicol. in vitro*, 24, 1465-1473 (2010)
 - 43) www.seurat-1.eu/media/users/Downloads/2nd_Annual_Meeting_8-9_February_Short_summary.pdf
 - 44) www.seurat-1.eu/pages/library/events/

- 2nd-annual-meeting.php
- 45) ec.europa.eu/enterprise/epaa/3_events/ann-conf-2012/3-heerink.pdf
- 46) <http://www.bfr.bund.de/>
- 47) <http://www.nc3rs.org.uk/>
- 48) www.nc3rs.org.uk/news.asp?id=1850
- 49) <http://www.frame.org.uk/>
- 50) <http://www.forschung3r.ch/en/>
- 51) <http://www.nca-nl.org/>
- 52) ec.europa.eu/enterprise/epaa/
- 53) ec.europa.eu/enterprise/epaa/3_events/ann-conf-2012/mou-epaa_iivs.pdf
- 54) ec.europa.eu/enterprise/epaa/3_events/ann-conf/2012/press-release.pdf
- 55) ec.europa.eu/enterprise/epaa/3_2_conf_2012.htm
- 56) <http://www.setox.eu/IUTOX2010.pdf>
- 57) <http://www.estiv.org/>
- 58) www.estiv.org/docs/Report%20ESTIV2012.pdf
- 59) <http://www.altex.ch/en/>
- 米国における代替法開発の動向 (C-2) 関連
- 1) Federal Register/Vol. 77, No. 135 / Friday, July 13, 2012 / Notices / 41406-41408
- 2) Federal Register / Vol. 76, No. 156 / Friday, August 12, 2011 / Notices / 50220-50221
- 3) Federal Register / Vol. 77, No. 196 / Wednesday, October 10, 2012 / Notices / 61610-61611
- 4) <http://www.cpsc.gov/BUSINFO/animaltesting.html>
- 5) <http://www.cpsc.gov/library/animaltesting.html>
- 6) Federal Register/Vol. 77, No. 237 / Monday, December 10, 2012 / Rules and Regulations / 73286-73288
<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/CPSC/CPSC-FR-2012-29260.pdf>
<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/CPSC/CPSC-FR-2012-29258.pdf>
- 7) Federal Register / Vol. 76, No. 145 / Thursday, July 28, 2011 / Notices / 45254-45256
- 8) Federal Register / Vol. 77, No. 38 / Monday, February 27, 2012 / Notices / 11536-11538
- 9) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/LLNApotency.htm#agencyresponses>
- 10) Federal Register /Vol. 77, No. 141 /Monday, July 23, 2012 /Notices/43087-43089
- 11) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine/endocrine.htm>
- 12) <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/endodocs/EDPRPrept2011.pdf>
- 13) <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/endodocs/EDPRP-Correction.pdf>
- 14) Federal Register/Vol. 77, No. 30/Tuesday, February 14, 2012/Notices/8258-8260
- 15) Federal Register/Vol. 77, No. 162/Tuesday, August 21, 2012/Notices/50510-50511
- 16) http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine/end_eval.htm
- 17) Federal Register /Vol. 77, No. 141 /Monday, July 23, 2012 /Notices 43089-43090
- 18) The NICEATM-ICCVAM Five-Year Plan (2008-2012), NIH Publication No. 08-6410, January 2008
- 19) Federal Register/Vol. 77, No. 114 / Wednesday, June 13, 2012 / Notices / 35395-35396
<http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/5yearplan.htm>
- 20) Federal Register /Vol. 77, No. 114 /Wednesday, June 13, 2012 /Notices/35393-35394
<http://iccvam.niehs.nih.gov/about/ICCVAMrpts.htm>
<http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/annrpt/Biennial2012-508.pdf>
- 21) <http://www.ascctox.org/meetings.cfm>
- 22) The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, CTFA Safety Evaluation Guidelines, 2007
- アジアにおける代替法開発の動向 (C-3) 関連
- 1) 黒澤努, アジアにおける動物実験代替法の現状, 日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 138, 108~111, 2011
- 2) China Cosmetic Research Center, The First International Symposium on Cosmetic Alternatives to Animal Experimentation for Cosmetics, Supplement, 2011.

- 3) <http://www.crdp.jp/content/view/1273/1218/>
- 4) <http://www.asas.or.jp/jsaae/news/41.pdf>
- 5) <http://www.reach24h.com/en/news-a-events/item/487-china-consults-on-3t3-nru-phototoxicity-test.html>
- 6) <http://www.asas.or.jp/jsaae/news/42.pdf>
- 7) <http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/SOT11/ICATM/SOTsessionKoCVAM.pdf>
- 8) <http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/SOT11/ICATM/StokesICATM-OverviewV4.pdf>

その他の国際的な代替法開発の動向 (C-4) 関連

- 1) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html
- 2) http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals_chem_guide_pkg-en
- 3) http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-460-fluorescein-leakage-test-method-for-identifying-ocular-corrosives-and-severe-irritants_9789264185401-en
- 4) http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-457-bgluc-estrogen-receptor-transactivation-test-method-for-identifying-estrogen-receptor-agonists-and-antagonists_9789264185395-en
- 5) http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-455-performance-based-test-guideline-for-stably-transfected-transactivation-in-vitro-assays-to-detect-estrogen-receptor-agonists_9789264185388-en
- 6) http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-443-extended-one-generation-reproductive-toxicity-study_9789264185371-en
- 7) http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-405-acute-eye-irritation-corrosion_9789264185333-en
- 8) [http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/DRAFT%20Cytosensor%20TG%20\(V9\)%2021%20Dec%2012_clean.pdf](http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/DRAFT%20Cytosensor%20TG%20(V9)%2021%20Dec%2012_clean.pdf)
- 9) http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/CM%20SD%2020%20Dec%2012_clean.pdf
- 10) <http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/Draft%2017%20October%202012.pdf>
- 11) http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/BCOP%20TG%20437%202012-12-21_clean.pdf
- 12) http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/Draft_ICE_TG438_clean_21%20Dec%202012.pdf
- 13) http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/REV%20%20TG431%2020%20Dec%202012_clean.pdf
- 14) <http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/TG473%20Oct2012%20updated%2029oct.pdf>
- 15) <http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/TG487%20Oct%202012%20updated%2029oct.pdf>
- 16) <http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/Clean%20Draft%20Updated%20TG%20439%2018%20September%202012.pdf>
- 17) <http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/Clean%20TG%20430%2020%20September%202012.pdf>
- 18) <http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/Draft%20TG%20474.pdf>
- 19) <http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/Draft%20TG%20475.pdf>
- 20) ICATM Current Alternative Test Method Validation and Regulatory Acceptance Status Report for ICCR. (http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing/alt_test_cosmetics/ICATM%20Table%20of%20Assays%2021%20June%202012.pdf)
- 21) Applicability of Animal Testing Alternatives in Regulatory Frameworks within ICCR Regions. (<http://www.fda.gov/downloads/Cosmetics/InternationalActivities/ConferencesMeetingsWorkshops/InternationalCooperationonCosmeticsRegulationsICCR/UCM320464.pdf>)
- 22) 化粧品規制協力国際会議 (ICCR) 第 6 回

結果概要

(<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000002fz06.html>)

23) <http://www.fda.gov/Cosmetics/InternationalActivities/ConferencesMeetingsWorkshops/InternationalCooperationonCosmeticsRegulationsICCR/default.htm>

24) http://www.pmda.go.jp/ich/ich_index.html

25) 「ICH S10 : 医薬品の光安全性評価ガイドライン (案)」に関する御意見・情報の募集について

(http://www.pmda.go.jp/ich/s/step3_sl0_12_12_28.pdf)

26) http://www.jpma.or.jp/about/board/ich/sokuji/pdf/06_ich121214.pdf

27) http://www.jpma.or.jp/about/board/ich/sokuji/pdf/07_ich121214.pdf

日本における代替法開発の動向 (C-5) の動向

1) <http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/Clean%20Draft%20Updated%20TG%20439%2018%20September%202012.pdf>

2) 宮澤正明, 日本化粧品工業連合会 感作性試験代替法ワーキンググループ, 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, 第25回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 58, 2012.

3) 井上周, 日本化粧品工業連合会 *in silico* 研究ワーキンググループ, 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, 第25回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 59, 2012.

4) <http://www.pmda.go.jp/regulatory/file/guideline/generic/hifu.pdf>

5) <http://www.pref.ibaraki.jp/bukyoku/hoken/dobutsu/toriatukai/2011/2012kaisei%20date/tuchi%2020120521.pdf>

6) 萩野滋延, 動物実験代替法をめぐる最新動向, フレグランスジャーナル, 6月号, 7-11, 2012.

単回投与毒性 (C-6-1) 関連

1) Organisation for Economic Co-operation and Development. Chemicals Testing-Guidelines.

(http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html)

2) ZEBET - Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments

(<http://www.bfr.bund.de/cd/1591>)

3) Report of the International Workshop on *In vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity, NIH Publication No. 01-4499, August 2001

4) Clemedson, C. et al., Development of an *in vitro* test battery for the estimation of acute human systemic toxicity: An outline of the EDIT project. Evaluation-guided Development of New *In vitro* Test Batteries. ATLA, 30, 313, 2002

5) Ekwall, B. et al., EDIT - a New International Multicenter Programme to Develop and Evaluate Batteries of *In vitro* Tests for Acute and Chronic Systemic Toxicity. ATLA, 27, 339, 1999

6) ACuteTox - Research Project For Alternative Testing. Welcome to ACuteTox. (<http://www.acutetox.eu/>)

7) ACuteTox Final Newsletter October 2010, ACuteTox: Prevalidation, Highlights and Main Achievements of the Project (http://www.acutetox.eu/Final_newsletter_Oct_2010.pdf)

8) ToxRTool - Toxicological data Reliability Assessment Tool (<http://ecvam.jrc.it/index.htm>)

9) H. J. Klimisch, et. Al., A systematic Approach for Evaluating the Quality of Experimental Toxicology and Ecotoxicological Data. Regulatory Toxicology and Pharmacology 25, 1-5, 1997

10) Federal Register, 69, 61504, 2004

11) Casati, S. et al, Preliminary (Phase I) Results of a Validation Study to Evaluate the Reliability and Relevance of Two *In vitro* Cytotoxicity Assays for Predicting Rodent and Human Acute Systemic Toxicity, 41st Congress of the European Societies of Toxicology EUROTOX 2003, 2003

12) Strickland, J. A. et al., Data Collection and Analysis Systems for an *In vitro* Cytotoxicity Validation Study, Society of Toxicology 43rd Annual Meeting, The Toxicologist, 50, 2004

13) Stokes, W. S. et al., Results of the

- final phase of a validation study to evaluate *in vitro* cytotoxicity assays for estimating rodent acute systemic toxicity, ALTEX, 22, Special Issue, Abstracts 5th World Congress 2005, 196, 2005
- 14) Background Review Document: *In vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity, NIH Publication No. 07-4518, November 2006
 - 15) ICCVAM Test Method Evaluation Report: *In vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Testing, NIH Publication No. 07-4519, November 2006
 - 16) JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods), 急性毒性試験代替法の第三者報告書 (http://www.jacvam.jp/files/news/2010_0601_news_public_acute_tox.pdf)
 - 17) Guidance Document on using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests ([http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2010\)20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)20&doclanguage=en))
 - 18) Draft Guidance Document for the Derivation of an Acute Reference concentration (ARfC) (<http://www.oecd.org/dataoecd/13/49/45799595.pdf>)
 - 19) 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 (<http://www.pmda.go.jp/operations/notice/2006/file/jimu20060719.pdf>)
 - 20) The CTFA Safety Evaluation Guidelines, 2007
- 皮膚毒性 (C-6-2) 関連
- 1) Basketter, D. A. et al., Predictive testing in contact dermatitis: irritant dermatitis, *Clinics in Dermatology*, 15, 637, 1999
 - 2) York, M. et al., Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential, *Contact Dermatitis*, 34, 204, 1996
 - 3) Van de Sandt, J. et al., The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation, *ATLA*, 27, 723 1999
 - 4) ECVAM, Statement of the ECVAM Science Advisory Committee (ESAC) on the Validity of *in vitro* Tests for Skin Irritation, 2007 <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
 - 5) ECVAM, Statement of the ECVAM Science Advisory Committee (ESAC) on the Validity of *in vitro* Tests for Skin Irritation Testing, 2008 <http://ecvam.jrc.it/>
 - 6) SCCP/1145/07, Memorandum on the *in vitro* test episkin™ for skin irritation testing, adopted by the SCCP during the 14th plenary meeting on 18 December 2007
 - 7) SCCP/1392/10, Memorandum (addendum) on the *in vitro* test episkin™ for skin irritation testing, adopted by the SCCS during the 9th plenary meeting on 14 December 2010
 - 8) OECD, OECD test guideline 439; GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: *In vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD-TG439.pdf>
 - 9) Katoh M. et al., Assessment of human epidermal model LacCyte EPI-MODEL for *in vitro* skin irritation testing according to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-validation protocol, *The Journal of Toxicological Sciences*, 34, 327, 2009
 - 10) 小島肇ら, 培養皮膚モデル LacCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究 追加試験, 第23回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 105, 2010.
 - 11) Peer reviews of ecotoxicity and human health test methods. (http://www.oecd.org/document/58/0,3746,en_2649_34377_44493498_1_1_1_1,00.html)
 - 12) 医薬品食品衛生研究所、新規試験法提案書「ヒト皮膚モデル (3次元皮膚モデル EPISKIN) を用いた皮膚刺激性試験代替法」JACVAM 評価会議、平成22年3月4日
 - 13) 医薬品食品衛生研究所、「ヒト皮膚モデル

- (3 次元皮膚モデル EPISKIN) を用いた皮膚刺激性試験代替法の評価会議報告書」
JaCVAM 評価会議、平成 22 年 3 月 4 日、平成 23 年 4 月 20 日 (改定)
- 14) 大野泰雄ら, 24 時間閉塞による皮膚刺激性試験の代替法開発のための被験物質リストの作成, 日本動物実験代替法学会第 24 回大会講演要旨集, 116, 2011
- 15) OECD, OECD test guideline 432; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: *In vitro* 3T3 NRU phototoxicity test, (<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg432.pdf>)
- 16) <http://jacvam.jp/files/news/20111208-1.pdf>
- 17) 厚生労働省医薬食品局審査管理課, 皮膚感作性試験代替法及び光毒性試験代替法を化粧品・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, 事務連絡, 平成 24 年 4 月 26 日
(<http://www.pmda.go.jp/regulatory/file/guideline/generic/hifu.pdf>)
- 18) Ceridono M. et al., The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test: Practical experience and implications for phototoxicity testing - The report an ECVAM-EPPIA workshop, Regul Toxicol Pharmacol., 63, 480, 2012
- 19) Lelièvre D. et al., The Episkin Phototoxicity Assay (EPA): Development of an *in vitro* Tiered Strategy using 17 Reference Chemicals to Predict Phototoxic Potency, Toxicol. *in vitro*, 21, 977, 2007
- 20) Spielmann, H. et al., *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2., ATLA, 22, 314, 1994
(<http://ecvam.jrc.it/publication/WorkshopReport2.pdf>)
- 21) Spielmann, H. et al., The Second ECVAM Workshop on Phototoxicity Testing: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 42., ATLA, 28, 777, 2000.
(<http://ecvam.jrc.it/publication/WorkshopReport42.pdf>)
- 22) 森眞輝ら, *In vitro* 光毒性試験の動物実験代替法としての Yeast-RBC アッセイの開発の提案, 第 33 回日本環境変異原学会第 18 回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 84, 2004
- 23) 田中憲穂ら, 酵母光生育阻害試験及び赤血球光溶血試験を用いた光毒性: バッテリーのバリデーション及び評価委員会での検討中間報告, 第 33 回日本環境変異原学会第 18 回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 85, 2004
- 24) 吉村功ら, 酵母-赤血球試験の光毒性試験代替法としてのバリデーション研究, 第 33 回日本環境変異原学会第 18 回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 86, 2004
- 25) 医薬品食品衛生研究所, 評価報告書「酵母光生育阻害試験法と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験代替法」
JACVAM 評価会議、平成 22 年 1 月
- 26) 笛木修ら, 光毒性試験代替法の第三者評価報告書 評価対象: 酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験の組み合わせ, AATEX-JaCVAM, J1(1), 45, 2012
- 27) JaCVAM, 進行中の試験一覧マップ (2012 年 12 月 20 日更新)
(<http://jacvam.jp/effort/index.html>)
- 28) 厚生労働省医薬食品審査管理課, 「ICH S10: 医薬品の光安全性評価ガイドライン (案)」に関する御意見・情報の募集について, 平成 24 年 12 月 28 日,
<http://search.e-gov.go.jp/servlet/Public?CLASSNAME=PCMMSTDETAIL&id=495120309&Mode=0>
- 眼刺激性 (C-6-3) 関連
- 1) Kay, J. H. and Calandra, I. C., Interpretation of eye irritation tests, J. Soc. Cosmetic Chem., 13, 281, 1962
- 2) OECD Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants,
<http://www.oecdilibrary.org/oecd/content/book/9789264076303-en>
- 3) OECD Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants,
<http://www.oecdilibrary.org/oecd/content/book/9789264076310-en>
- 4) http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/BCOP%20TG%20437%202012-12-21_clean.pdf
- 5) <http://www.oecd.org/env/chemicalsafety>