

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⁸⁾。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⁹⁾。

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¹⁰⁾。提出されたデータは integrated testing and decision strategy の開発に利用される。

(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

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¹¹⁾。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^{12,13)}。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¹⁴⁾。2012 年 8 月、連邦政府機関は ICCVAM の推薦に合意した¹⁵⁾。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¹⁶⁾。

(F) 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¹⁷⁾。

(G) 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¹⁸⁾。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た。そして2012年5月に2013年～2017年の5ヵ年計画案を発表した¹⁹⁾。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ヵ年計画で優先付けた分野と2013年～2017年の5ヵ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ヵ年としては、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²⁰⁾。

米国における代替法関連学会 American Society for Cellular and Computational Toxicology (ASCCT)が2010年に設立された²¹⁾。この新しい学会は、北米における代替法関連の初めての学会となり、細胞およびコンピューターによる方法の開発、受け入れ、活用を促進することを目的としている。ASCCTはニュースレターにより活動等の報告を行っている。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²¹⁾。

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 Guidelines²²⁾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

2012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®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、(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。

C-3 アジア(国外)における代替法開発の動向

C-3-1 中国における代替法開発の動向

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

2011年4月11日および12日に、北京において中国動物実験代替法フォーラム (International Forum on Cosmetic Technology and Applications - Alternatives to Animal Experimentation for Cosmetics) が開催された²⁾。中国では、2010年よりSFDA (中国国家食品薬品监督管理局) が中国での新原料について動物実験を含む安全性試験データの提出を要求するなど、動物実験を増やす動きがみられ、国際的な非難の高まりも予想される。また、このような動きは欧州の化粧品企業からは喫緊に対応すべき課題と受け止められている。このような背景のもと、SFDAでは、動物愛護の観点から代替法に関する各国の検討および導入状況を把握するため、北京工商大学の主催により、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³⁾。このガイドラインは化粧品衛生監督条例およびその実施細則の規定に基づき、化粧品新原料の定義、安全性要求、行政登録の申請資料に関する要求、審査原則及び省略語などについて明確にしている。その中で行政登録の申請資料に対する要求が述べられているが、代替法は認められていない。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⁴⁾。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3T3NRU法の草案を作成し、意見募集を行った⁵⁾。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 Biotoxtech 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⁶⁾。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 Biotoxtech 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⁷⁾。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⁸⁾。

C-3-3 小括

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。2011年には中国動物実験代替法フォーラムの開催、2012年にはSFDAが3T3NRU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¹⁾。

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²⁾、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³⁾
- 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 BGI Luc エストロゲン受容体転写活性化試験⁴⁾

・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 α を介した転写活性化試験⁵⁾
- TG 443 拡張世代生殖毒性試験⁶⁾
- TG 405 急性眼刺激性/腐食性試験⁷⁾

フルオ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 BGI Luc 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^{8,9)}
(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¹⁰⁾
(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¹¹⁾
(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¹²⁾
(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¹³⁾
(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¹⁴⁾
(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¹⁵⁾
(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¹⁶⁾
(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)¹⁷⁾
(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¹⁸⁾
(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¹⁹⁾
(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、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²⁰⁾」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²¹⁾がホームページに掲載された。

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^{22, 23)}。

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、他にオプザーバーとして 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²⁴⁾。

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²⁵⁾。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²⁶⁾。

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²⁷⁾。

C-4-4 小括

2012 年、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 BGLuc 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 α 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 カ年）を行った。

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動している。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し、第3者評価に進行中である。

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¹⁾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 ～機構に

基づいた予測～』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・化粧品を経粘膜・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』²⁾、『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』³⁾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⁴⁾、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⁵⁾。

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³⁾」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²⁾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⁶⁾。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

日本における代替法の開発・評価においては、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。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。

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。2012年度に情報の更新を行った77調査結果を記述する。

C-6-1 単回投与毒性

①概要

単回投与毒性試験とは、医薬品、農薬、一般化学物質、生物学的物質もしくはそれらを使用した製剤などの被験物質を単回投与し、その毒性を量的及び質的に明らかにする試験法である。殊に、ヒトが被験物質を誤飲・誤食した際に引き起こされる全身毒性については経口投与により毒性ポテンシャルの評価が行われ、医薬品、農薬、一般化学物質などにおいてそれぞれの公定法が定められている。

OECDテストガイドライン(TG)では、経口投与毒性、吸入毒性および経皮毒性の試験法が公開されている。経口投与毒性に関しては、急性経口毒性・固定用量法(TG420、fixed dose procedure; FDP法)、急性経口毒性・等級法(TG423、acute toxic class method; ATC法)及び上げ下げ法(TG425、up-and-down procedure; UDP法)の推奨される3試験法があり、これらの試験法は旧試験法の急性経口毒性試験(OECD 401)の代替法として採択された。一方、経口摂取以外の曝露経路を想定した全身毒性予測試験法としては、急性経皮毒性(TG 402)、急性吸入毒性(TG 403)および急性吸入毒性・等級法(TG436、acute toxic class testing method)の3試験法が採択されている。詳細はOrganisation for Economic Co-operation and Development(OECD)のホームページを参照されたい¹⁾。

しかしながら、上記の試験法はいずれもげっ歯類等を用いた試験法である。そのため、*in vivo*試験を完全に代替 (Replacement) する *in vitro*試験法の検討が行われている。

②状況

欧州では経口急性毒性を予測する細胞ベースの試験法が検討されている。Multicenter Evaluation of *In vitro* Cytotoxicity (MEIC) プログラム²⁾ 及び Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments (ZEBET)³⁾ では、急性毒性を予測するための *in vitro*試験の最も良い組合せについて検討され、予測精度を向上させるため、細胞毒性に加えて、代謝やトキシコカインテイクス、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^{4,5)}。2005年1月1日より2010年までの5カ年を期限として発足した ACuteTox - Research Project⁶⁾ では、*in vivo*における経口急性毒性と近似した分類が得られる *in vitro*試験ストラテジーの開発が推進されている。本プロジェクトでは、作業テーマ別に設定された9つの Work package (WP) から成る11のグループが連携しながら作業が進められている。第一フェーズでは、57の参照物質について評価が行われ、再現性、信頼性及び GHS/EU カテゴリーとの一致性の観点から、多変量 CART 解析あるいは Random Forest model にて最良の予測結果が得られる各試験の選定が行われた。その結果、1) BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた NRU 法 (3T3/NRU) (WP 2)、2) ヒト血液を用いた各種サイトカイン放出試験 (IL-1、IL-6、TNF-alpha) (WP 4)、3) 白血球系前駆細胞 (CBC/CFU-GM) を用いた細胞分化試験 (WP 4)、4) ラット初代脳培養組織を用いた各種遺伝子発現試験 (GFAP、HSP-32、MBP、NF-H) (WP 7.1)、5) ラット初代脳培養組織を用いたウリジン取り込み法による mRNA 生合成試験 (WP 7.1)、6) 各種臓器由来細胞 (HepG2、SH-SY5Y、A.704) を用いた細胞内過酸化物質試験 (WP 4)、7) 各種臓器由来細胞 (HepG2、SH-SY5Y、A.704) を用いた細胞内カルシウム量測定 (WP 4)、8) ラット初代培養肝細胞を用いた MTT 試験 (WP 6)、9) 開始容量を予測するための薬物動態関連パラメータ評価 (WP 5)、10) 神経回路網を用いた化合物の血液脳関門透過予測 (WP 5)、の10試験法が候補として選択された⁷⁾。2010年1月~5月に実施されたプレバリデーションフェーズでは、これら選択された評価法に

ついて、さらに32の参照物質の追加評価が実施された⁷⁾。その結果、Random Forest model を用いた9試験法 (白血球系前駆細胞 (CBC/CFU-GM) を用いた細胞分化試験、BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた NRU 法 (3T3/NRU)、ラット初代脳培養組織を用いたウリジン取り込み法による mRNA 生合成試験、SH-SY5Y 細胞を用いた細胞内過酸化物質試験、HepG2 細胞を用いた細胞内カルシウム量測定、ラット初代培養肝細胞を用いた MTT 試験、ヒト血液を用いた IL-1 放出試験) の組み合わせにて最も高い相関 (69.26%) が得られた。しかしながら、これら試験のエンドポイントの結果の組み合わせは、3T3/NRU 単独の結果を有意に改善させるものではなかったと報告されている。その一方、LD₅₀>2000 mg/kg の物質については、高い一致性が得られた。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 LD₅₀>2000 mg/kg の物質を同定するための試験法としての利用が期待されている。

また、the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) では、ToxRTool (Toxicological data Reliability Assessment Tool) が公開された¹¹⁾。REACH では、試験データの信頼性の評価に Klimisch コードと呼ばれる危険有害性データの信頼性評価指標を用いることを推奨しており、ToxRTool では化学物質の有害性評価を実施した際の採用した試験法および試験環境などの情報から Klimisch コードに基づくカテゴリーが得られる⁸⁾。信頼性の高いものから順に1~4のカテゴリーがあり、“証拠の重み付け”の基準の一つとして用いられる。*In vitro* 評価法が確立されていない単回投与毒性評価に関しては、使用動物数の削減の観点から、こうしたツールの開示や活用が特に重要であると考えられる。

米国では、2002年より The NTP Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) と ECVAM の共同によって、*in vivo* 急性経口全身毒性試験の試験開始用量を設定するための *in vitro* 細胞毒性試験に関するバリデーション研究⁹⁾ が実施された。このプロジェクトでは、Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

(ICCVAM) によって推奨された 2 つの *in vitro* 細胞毒性試験 (BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞 (3T3) NRU 法及び正常ヒト表皮ケラチノサイト (NHK) NRU 法) を対象として 72 種の参照化学物質が評価された¹⁰⁻¹²⁾。その後、本バリデーション研究の結果を報告するバックグラウンドレビュー文書 (BRD)¹³⁾ 及び ICCVAM による試験法評価報告書¹⁴⁾ が 2006 年 11 月に最終化された。BRD には、両試験法の精度及び信頼性 (再現性)、また、これらの *in vitro* 試験データを用いて *in vivo* 試験の開始用量を設定することによって削減される動物数あるいは死亡動物数に関するコンピューターシミュレーションによる評価結果等が報告されている。一方、ICCVAM による試験法評価報告書では、「これら 2 種の細胞毒性試験は法規制におけるハザード分類という目的には精度は十分ではないが、現在の急性毒性プロトコール [即ち、上げ下げ法 (TG425、up-and-down procedure; UDP 法)、等級法 (TG423、acute toxic class method; ATC 法)] の開始用量を設定するために使用することができる」と勧告した。その後 2008 年 2 月に、NICEATM 及び ICCVAM は、急性全身毒性の *in vitro* アプローチとヒトにおけるエンドポイントに関するワークショップを、JaCVAM 及び ECVAM を加えて開催した。また、2008 年 3 月には、NICEATM が急性経口全身毒性試験の投与開始用量の推定に用いる *in vitro* 細胞毒性試験に関する評価報告書を公表した¹⁵⁾。本報告書では、急性経口全身毒性試験の投与開始用量決定に際して、“証拠の重み付け” アプローチに基づいて上記 2 種の *in vitro* 細胞毒性試験のいずれかを用いるようにとの勧告が記載されている。

急性毒性試験開始用量の設定のための細胞毒性試験 (NRU 法) の利用については、本邦においても専門家による評価が行われており、2010 年 5 月に急性毒性試験代替法の第三者評価報告書の草案が纏められ¹⁶⁾、2011 年 6 月には行政への提案が行われている。1) GHS の急性経口毒性の分類 (5 区分に加えて LD₅₀ 値 > 5000 mg/kg の未分類化合物) に基づく歯類 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 に記載されている。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ケミカルリスト(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、EPISKINTMとEpiDermTMの2モデルを使用しての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、「EPISKINTM皮膚刺激試験法」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、EpiDermTMについては、プロトコルの改善が要求された⁴⁾。

EpiDermTM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「EpiDermTM SIT」として「SkinEthicTM 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*

*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 EPISKIN™ 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*試験法に関し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MATREXTM）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¹⁰⁾。

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。日本では精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収載の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、さらに非臨床の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

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 カ年プログラムは、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。

① SCR&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。② HeMiBio 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 カ

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ヵ月間、2009年12月まで進められた。20以上の代替法が開発又は最適化され、再現性や技術移転性が研究された。全体で100以上の物質がピアレビューのために検討され、統計解析がなされた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⁸⁾。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ことであった。

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⁹⁾。

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。

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

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