

た¹³⁾。human Cell Line Activation Test(h-CLAT)については、EUAL ECVAM のバリデーションおよび ESAC による Peer Review が終了し勸告案の段階である¹⁴⁾。

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

また、EURL ECVAM 代替法データベース(DB-ALM)を改訂¹⁵⁾し、眼刺激性、発がん性、皮膚感作性に関する以下代替法試験のプロトコルを追加収載した。

- Bhas 42 cell transformation assay in 6- and 96-well plates (Method Summary and Protocol No. 156)
- In vitro BALB/c 3T3 Cell Transformation Assay (BALB/c 3T3 CTA) (Method Summary and Protocol No. 137)
- Ocular Irritation® Assay System (Protocol No. 157)
- Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) (Protocol No. 158)

C-1-3. SCCS の状況

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS)は欧州委員会のもとにある化粧品の安全性に係わる科学委員会である。その前身は Scientific Committee on Consumer Products (SCCP)であり、また Scientific Committee on Cosmetic products and Non-Food Products intended for consumers(SCCNFP)である。

2010 年度においては代替法関連のステートメントとして「化粧品成分の皮膚吸収の *in vitro* 評価のための基本的規準」「皮膚刺激性試験のための EPISKIN™ *in vitro* 試験についての覚書」が採択されるなどの進捗があった^{16,17)}。

また、2014 年 10 月には化粧品原料安全性評価に関するテストガイドラインの遺伝毒性および発がん性部分を改訂¹⁸⁾し、それぞれの毒性試験について代替試験法の利用が示されている。

C-1-4. EU 委員会の状況

2005 年 11 月 7 日に行われた欧州委員会主催のワークショップ「EU goes Alternatives」において 3Rs 宣言が発表され、以後、EU の各産業分野において、効果と安全性の両面に関する代替法の開発を促進することが宣言された。EPAA (European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing) は欧州委員会、工業会(化学品、医薬品、化粧品)、様々な産業分野における会社の共同のパートナーシップである¹⁹⁾。欧州委員会からは企業 (DG Enterprise)、研究 (DG Research)、健康と消費者保護 (DG Health and Consumer Protection)、環境 (DG Environment)、共同研究センター (DG Joint Research Centre) の 5 つの総局が参加している。工業会は CEFIC (欧州化学品工業会)、EFPIA(欧州製薬団体連合会)、COLIPA、IFAH-Europe (欧州動物愛護協会)、AISE (石鹼洗剤協会)、ECPA (欧州農薬工業会) などの団体が参加しており、企業からは医薬品、化粧品、化学品メーカーなど 35 社が参加している。その目的は、動物を用いる安全性試験の代替のアプローチとしての新しい 3Rs(refine、reduce、replace)の推進である。

パートナーシップの構造は以下の通りである。

- 年次大会：ヨーロッパとグローバルにおける進歩を再検討する、年に一度の"3Rs"イベント。
- パートナーシップ運営委員会：欧州委員会、関連業界、企業からなり、レビューワークプラン、戦略、タイムラインを提案する。
- ワーキンググループ：欧州委員会、企業、適切な専門家のサポートで個々のテーマを扱う小ワーキンググループ。
- ステークホルダーのミラーグループ：学界、動物福祉団体、患者団体、消費者保護グループ、他のステークホルダーからなり、より広い見地で運営委員会にアドバイスする。

2006年5月に今後5カ年の活動計画が公表さ

れ、2009年にはこの計画の見直しが行われた。2010年11月30日での第6回年次大会（Annual Conference 2010）にて2011年から2015年を対象とした新規5ヵ年活動計画が公表された。この活動計画は初期5ヵ年の成果ならびに2009年に実施した、より効率的、且つ資源を最大限に活用するための構造改革が反映されている。活動計画は以下の3つの主題で構成される²⁰⁾。

- Platform on Science; コンピューター/システムサイエンスに関する知識と科学上のギャップの同定、ならびに今後、さらなる研究が必要とされる分野の特定、研究促進
- Platform on 3Rs in Regulation ; 規制上要求される試験への 3Rs の活用、ならびに Integrated testing strategy の信頼性向上
- Platform on Communication & Dissemination; 規制当局ならびに動物実験従事者に 3Rs を普及させる為のコミュニケーションツールの開発と改善

2014 年の主な活動報告及びワークショップの公表状況については以下のとおりである²¹⁾。

- EPAA/CDSS 幹細胞フォーラム²²⁾
- 2014 年 EPAA 年次大会²³⁾
- テーマワークショップ“規制当局の意思決定を助ける知識の共有”

REACH²⁴⁻²⁷⁾については、EU 域内で年間 1 トン

以上製造・輸入されるすべての化学物質の登録を既存物質と新規物質を区別せずに義務付けるものであり、2007年6月1日に施行され、2008年6月1日に新官庁である欧州化学物質庁（European Chemicals Agency; ECHA）が発足した。それと同時に年間1トン以上製造/輸入されている既存化学物質の予備登録が開始され、2008年12月1日に締め切られた。約6万5千社から約260万件の予備登録がなされた。既存物質の登録期限は物質の製造・輸入量や有害性への懸念によって分けられ、年間1000トン以上の製造/輸入量のある物質の登録は2010年11月30日に締め切られた。

また、年間1000トン以下に該当する物質の登録期限は以下のとおりである。

- 年間100～1000トンの製造/輸入量のあるもの：2013年5月31日
- 年間1～100トンの製造/輸入量のあるもの：2018年6月1日

年間1トン以上の物質の登録には、製造・輸入量に応じて物理化学的性状、ヒトの健康への有害性、生態毒性の情報が必要となる。動物試験が行われる場合、重複を避けるために関係書類の審査が義務づけられる。ヒトに対する毒性に関する情報は、可能なら代替手段によって脊椎動物以外の方法を用いて入手する。これらの代替手段はEU委員会によって確認され、更に欧州化学物質庁または国際的な機関によって認定されなくてはならない。EU委員会は代替法の使用に関し3年毎に報告書を提出し、必要なら新たな法的提案を行うことになっている。

以下に製造・輸入量ごとに実施すべき毒性試験に関して記載する。

- *in vitro* 皮膚刺激性または皮膚腐食性：
>1 t/年
- *in vivo* 皮膚刺激性試験：>10 t/年
- *in vitro* 眼刺激性：>1 t/年
- *in vivo* 眼刺激性試験：>10 t/年
- 皮膚感作性：>1 t/年
- 変異原性：>1 t/年
- バクテリアを用いる *in vitro* 試験：>1 t/年
- 哺乳類細胞を用いる *in vitro* 細胞遺伝学試験または *in vitro* 小核試験：>10 t/年
- 哺乳類細胞を用いる *in vitro* 遺伝子突然変異試験：>10 t/年（ただし、バクテリアを用いる *in vitro* 試験と哺乳類細胞を用いる *in vitro* 細胞遺伝学試験または *in vitro* 小核試験が陰性の場合）
- 急性毒性：>1 t/年
- 経口経路：>1 t/年
- 吸入または皮膚経路：>10 t/年
- 反復投与毒性：>10 t/年
- 短期反復投与毒性試験(28日間)：>10 t/年

- ・亜慢性毒性(90日): >100 t/年 (>10 t/年の場合も有り)
- ・慢性毒性(>12 ヶ月)や追加評価: >1000 t/年(必要な場合有り)
- ・生殖毒性: >10 t/年
 - ・生殖/発生毒性に関するスクリーニング: >10 t/年
 - ・出生前発生毒性試験: >100 t/年
 - ・二世帯生殖毒性試験: >100 t/年
- ・トキシコキネティクス: >10 t/年
 - ・アセスメント: >10 t/年
- ・発がん性試験: >1000 t/年

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

- SCR&Tox: 今日的で効果的、広範かつ標準化された毒性学のための幹細胞研究
- HeMiBio: マイクロ流路を備えた肝臓型バイオリアクター研究
- DETECTIVE: *In vitro* 系を用いる反復毒性試験のためのエンドポイント及びバイオマーカーの研究
- COSMOS: 最適化された化粧品の安全性におけるヒト反復毒性予測のための *in silico* モデルの研究
- NOTOX: 組織培養の性質に基づいたコンピューターモデルを用いた長期毒性の予測に関する研究
- ToxBank: 毒性学における代替法に関する総合的なデータ分析サポートシステムの開発

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

2014年も年會が開催され、年次報告書が公表されている²⁸⁾。

C-1-5. EU 危険物質指令の状況

欧州化学製品局(European Chemicals Bureau; ECB)が更新している EU 危険物質指令の「物理化学的性質、毒性、環境毒性の測定法」のリストである Annex V において、2013年に新たな代替法の記載はなかった。

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

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

Cosmetics Europe は COLIPA の時代(1992年)に動物試験代替法の開発と受け入れに向けたコーディネートを目的に、動物試験の代替法に関する運営委員会(Steering Committee on Alternatives to Animal testing; SCAAT)を常設の委員会として設置した。2009年の組織改革によって、SPT (Strategic Project Team) の下 AAT(Alternatives to Animal Testing)が設けられ、現在、以下の5つの Task Force(TF)が設置されている²⁹⁻³²⁾。

- ① SPT AAT TF Eye Irritation (眼刺激性試験代替法の検討)
- ② SPT AAT TF Skin Tolerance (感作性・皮膚刺激性試験代替法の検討)
- ③ SPT AAT TF Genotoxicity (変異原性・遺伝毒性の検討)
- ④ SPT AAT TF Systemic Toxicity(全身毒性試験代替法の検討)
- ⑤ SPT AAT TF Safety Assessment (化粧品原料のリスクアセスメントのストラテジーを作成)

このうち SPT AAT TF Skin Tolerance において、日本企業により開発されたヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞を用いた *in vitro* 皮膚感作性試験 h-CLAT³³⁾ の ring study が2004年6月から開始され、2008年9月に終了した。この試験法以外にも、DPRA、MUSST³⁴⁾ の ring study なども実施された。この結果は2010年9月、Toxicol. *In vitro* に発表された³⁵⁾。この結果を受

けて EURL ECVAM でのプレバリデーションが行われた。

2011 年 1 月から欧州委員会の研究プログラム Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing (SEURAT)-1 が開始された。2009 年 8 月 WC 7 で発表されたように、Cosmetics Europe (旧 COLIPA) はその予算額の半分の 2500 万ユーロを分担している。

2014 年 6 月 10 日、11 日にベルギーのブリュッセルで Cosmetics Europe Conference 2014 が Cosmetics at the Crossroads of Science and Regulation というテーマで行われた。動物実験代替法に関しては、欧州化粧品規制第 7 次改正に基づき、動物実験を実施した製品または動物実験を実施した原料を含む製品の EU 域内の販売禁止が 2013 年 3 月 11 日に最終的に発効されたことで、動物実験代替法の開発は欧州の化粧品会社にとって最優先課題になってきているが、開発を推進するためにコストの官民を含めた公平な分担が担保される必要があるとされた。また、欧州化粧品規制に関しては、動物実験代替法を含むいくつかの点については、今後数年の間により常識的なアプローチ (common sense approach) に基づいた、何らかの改正措置が必要となるとされた³⁶⁾。

C-1-7. その他の状況

EU におけるその他の状況を、公的機関等の組織的活動と学会等に分けて以下にその概要を記載する。

①公的機関等の組織的活動の状況

・ZEBET

Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments (ZEBET)³⁷⁾ は、代替法の文書化、評価、推奨あるいは国内外での承認を推進することを目的に 1989 年にドイツの連邦リスク評価研究所に設立された組織である。業務の範囲は、代替法に係わる文書化と情報提供、バリデーション及び研究である。ZEBET 業務の一つとして動物実験代替法

のデータベースがあり、2000 年 2 月からウェブにより無料で公開している。

2010 年 4 月から 2013 年 3 月にかけてナノ物質の遺伝毒性に関するプロジェクトに欧州の 15 の研究施設と共に参加し、ヒト肺細胞や再構築皮膚モデルを用いた in vitro 試験を開発した。また、小腸細胞を用いた in vitro 遺伝毒性試験の多施設間試験にも参加している³⁸⁾。

・NC3Rs

National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs)³⁹⁾ は動物試験、研究における 3R の推進、開発、実施を目的に 2004 年 5 月にイギリスに設立された。質の高い 3Rs 研究に資金を提供し、3Rs を広めるためのセミナーやシンポジウムを組織し、また、3Rs の情報源やガイドラインを開発している。独立した組織であり、英国内務省、Medical Research Council (MRC)、Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC)、The Association of the British Pharmaceutical Industry (ABPI)、The Wellcome Trust 及び製薬・化学企業などより資金が提供されている。

2014 年 10 月に NC3Rs は Our Vision 2015-2025 と題するパンフレットを出版した。この中では、生物科学における実際の活動、動物取扱に関する手法、生物科学に携わる人材育成、動物実験が行われる場所、動物研究に関する指針、以上 5 つの面において 2025 年に向けてのビジョンが示されている。2015 年春には、これらのビジョンを実現させるための戦略が出版される予定である⁴⁰⁾。

・FRAME

Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments (FRAME)⁴¹⁾ は医学における動物実験に関して 3R を促進するために、1969 年に設立されたイギリスの機関である。国際的科学雑誌 ATLA (Alternatives To Laboratory Animals)

を年 6 回発行している。また、FRAME News を発行し、FRAME の活動及び 3Rs に関するニュースを会員へ伝えている。毒物学における *in vitro* 法のプロトコールを収集した「INVITOX」は、FRAME によって 1989 年に確立され、現在、EURL ECVAM の Scientific Information Service の一部になっている。

・ 3R Research Foundation

3R Research Foundation⁴²⁾は、動物実験の質問をする会派、スイス製薬協会の「インターファルマ」(Novartis Pharma Ltd, F. Hoffman-La Roche Ltd, Serono Ltd)、動物解放研究財団の共同で 1987 年にスイスに設置された。3R Research Foundation の目的は、研究プロジェクトのための補助金によって動物実験代替研究を促進することである。

2014 年 6 月に出版された年報によれば、2013 年には 15 のプロジェクトに 505,725 スイスフランの補助が行われた。そのうち新規は 4 プロジェクトで、ヒト細胞を用いた動脈硬化モデルの開発、*in vitro* ワクチン評価試験の開発、ヒトミクログリア *in vitro* モデルの開発、神経毒性評価のための神経細胞様リポソームモデルの開発に関するものである⁴³⁾。

・ EPAA

The European Partnership for Alternative Approach to Animal Testing (EPAA) は動物実験の 3R 推進のアプローチに関する知識の集積と共有を目的とし、欧州委員会、7 つの欧州企業連合体及び企業が 2005 年に自発的に設立した連携活動である⁴⁴⁾。

2014 年 11 月 19 日にベルギーのブリュッセルで行われた第 10 回年会では、How to facilitate the use of alternative methods by regulators? というテーマの下に、EPAA の活動状況、各種規制における 3R の受け入れ状況、研究から法制への移行のための安全性予測科学の必要性、等についてのセッションが行われた⁴⁵⁾。

②学会等の状況

・WC9

第 9 回国際動物実験代替法会議 (WC9) が、2014 年 8 月 24～28 日にプラハ (チェコ) で開催された。この会議は、生命科学研究における動物福祉、動物実験代替法開発の促進および教育、研究、試験分野における 3Rs (replacement, reduction, refinement) の進展を図ることを目的として開催された国際会議である。

本会議には、国内外より動物実験代替法に関係する政府機関や代替法公的評価機関 (ECVAM、ICCVAM、JaCVAM、他)、国内外の医薬、化学、化粧品企業及び動物愛護団体のメンバーが参加し、オーラルセッションおよび 400 件以上のポスター発表が行われた。動物実験を代替する試験法の開発が進んでいるが、*in vitro* 試験法や *in silico* 試験法など単独では複雑な生体機能を完全に代替することが難しいことから、昨今国際的にも AOP や ITS および IATA が提案されている。皮膚感作性評価に関する発表も数多くされており、今後も注目される。次回の、第 10 回国際動物実験代替法会議 (WC10) は、2017 年に米国で開催予定である。

・ ESTIV

European Society of Toxicology *in vitro* (ESTIV)⁴⁶⁾は、*in vitro* 毒物学を促進することを目的とする学会である。ESTIV の公式雑誌は「Toxicology *in vitro*」である。執行委員長はベルリン自由大学の H. Spielmann 教授であり、*in vitro* 毒物学の情報交換を推進するために、INVITOX ワークショップを開催、また、6 カ月ごとにニュースレターを発行している。

第 18 回 ESTIV はオランダのエグモント・アアン・ゼーで 2014 年 6 月 10 から 13 日にかけて "Making sense of *in vitro* methods" というスローガンを掲げて行われた。

6 月 10 日のサテライトシンポジウム ESTIV-CAAT-IVTIP Pre-congress Workshop では、

in vitro、in silico および in chemico 試験に基づく皮膚感さ性試験の危険性とリスクを評価する方法について、ITS(Integrated Testing Strategy)の定義と規制的枠組みへの受け入れについて、皮膚感さ性予測に適用可能な新しい試験戦略についての議論が行われた⁴⁷⁾。

同時に開催された NOTOX Satellite Meeting では新規な医薬品の毒性を予測する3次元モデルや肝組織の時空間的モデリング、およびNOTOX プロジェクトの下で開発された予測モデルが紹介された⁴⁸⁾。

・MEGAT

Middle European Society for Alternative Methods to Animal Testing (MEGAT)は、動物試験代替法の普及とバリデーション、3R の分野での研究の推進、メディアへの情報提供などを目的とする学会である。学会長はベルリン自由大学の H. Spielmann 教授であり、使用言語はドイツ語、年4回科学雑誌「ALTEX」(Alternatives to Animal Testing)⁴⁹⁾を無料でメンバーに発行している。

C-1-8. 小括

2013年3月11日付けの化粧品指令発効により、動物実験を実施した原料を含む化粧品の販売が全面的に禁止となり、代替法の開発は欧州の化粧品会社にとって最優先課題になっている⁴⁾。これらの背景を受けて、EUにおいて2014年の活動が活発化しており、2014年の主な動向としては、近年、特に注目されているAOP(Adverse Outcome Pathway:有害機構経路)やITS(Integrated Testing Strategies:総合的な試験戦略)およびIATA(Integrated Approaches to Testing and Assessment)の考え方をもとにしたアプローチに関して、EURL ECVAMにおける検討および2014年8月にプラハで行われた第9回国際動物実験代替法会議(WC9)においても多数の研究報告がなされている。また、毒性項目ごとの主な進捗としては、EURL ECVAMにおけ

る急性毒性代替法に関する評価戦略の発表、皮膚感作用性代替法 KeratinoSens に関する勧告や human Cell Line Activation Test(h-CLAT)のESACによるPeer Reviewの終了、および眼刺激性、発がん性、皮膚感作用性に関する代替法試験のプロトコール収載等が挙げられる。また、ナノ物質に対する代替法開発に関しても、検討が開始されており、今後ますます代替法開発と活用が促進されるものと考えられる。

C-2. 米国における代替法開発の動向

C-2-1. ICCVAMにおける代替法評価状況

9省庁の15研究機関からの委員で構成されているICCVAM(Intergency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)は、米国官庁間の調整を図り共通の目標である代替法のバリデーションを統括する委員会として機能し、国立環境衛生科学研究所(National Institute of Environmental Health Sciences; NIEHS)の恒久的委員会として位置づけられている。

本年度の主要な動向としては以下のことが挙げられる。

(1)代替毒性試験法に関する科学諮問委員会

(SACATM; Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods)が会議を開催し、ICCVAMビジョンの元でのこれまでの活動や今後の活動予定が示されたこと。

(2)動物実験代替法を盛り込んだ改訂版PCPC 2014 Safety Evaluation Guidelinesが2014年に発行されたこと。

(3)NICEATMはエストロゲン受容体(ERs)やアンドロゲン受容体(ARs)との相互作用ポテンシャルを伴うin vitro代謝システムのバリデーションに使用できる参照化学物質の推薦をサポートデータとともに要求したこと。

(A)代替毒性試験法に関する科学諮問委員会の開催

代替毒性試験法に関する科学諮問委員会 (SACATM; Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods) が 2014 年 9 月に会議を開催した^{1),2),3)}。

ICCVAM 活動のアップデートでは、3 つの短期間のプロジェクトとして、①急性経口及び経皮毒性試験、②生物製剤 (レプトスピラワクチンの力価評価)、③皮膚感作性試験が挙げられている。

このうち、①急性毒性については、US EPA が NICEATM と協働して、殺虫剤のハザード表示等に関する情報提示における経口及び経皮毒性試験の相対的な貢献度についての評価を行っており、この領域における動物使用を大幅に減らすことを期待している。プロジェクトは 3 段階からなり、(1)経口及び経皮 LD₅₀ 試験データの編集、(2)試験結果の比較解析、及び(3)経口と経皮 LD₅₀ の両方が表示のために必要であるかどうかの検討についてである。原料製品と処方試験が進行中であるが、特に処方においては動物試験を減らすことができる非常に大きな可能性を有している。また、プロジェクトは第 2 段階であり、経口及び経皮 LD₅₀ 試験の結果比較が行われた⁴⁾。

また、③皮膚感作性試験に関しては、皮膚感作性ワーキンググループの活動のアップデートが行われた。グループはこれまでに以下の項目を中心に取り組んでいる。(1)ECVAM がバリデーションした皮膚感作性試験の ICCVAM の受け入れにおける基準の検討、(2)ECVAM がバリデーションした試験法と *in silico* 法のバッテリーを統計手法に基づいて設計し、また予測性の検証を行うこと、(3)Cosmetics Europe によって推奨された皮膚感作性のバッテリーのレビュー、及び(4)米国労働安全衛生研究所 (The National Institute for Occupational Safety and Health:NIOSH) の Electrophilic Allergen Screening Assay (EASA) の推薦について⁵⁾。

2013 年 9 月に開催された代替毒性試験法に関する科学諮問委員会では利害関係者や社会一

般とのコミュニケーションの改善が議題に挙げられていたが、ステークホルダーとの会合等において明確な目的を示すといったこの課題に関する活動が紹介された⁶⁾。ICCVAM ビジョンには ICCVAM と NICEATM のウェブサイトとアーカイブの改善計画が含まれており、NTP のウェブサイトと統合し、SACATM 会議の議事録掲載、対話形式のページを追加するなど実施している⁷⁾。

また、コミュニケーションに関しては、ICCVAM によって実施された 4 回のワークショップと 2015 年に予定されている 3 回のワークショップの計画が示されている。Tox21 プログラムの内分泌かく乱物質に関連し、エストロゲン受容体 α (ER α) に対するアゴニスト、アンタゴニスト活性のスクリーニングを 1 万種の化学物質に実施したことについて、*nature* 誌上のサイエンティフィックレポートに掲載されたこと等、最近の代表的な論文発表についても紹介された⁸⁾。

2015 年度の ICCVAM ゴールにおいては、3 つの優先事項が示されている：(1)急性毒性、(2)皮膚感作性、及び(3)有害転帰経路 (Adverse Outcome Pathways; AOP)⁹⁾。

急性毒性に関しては、前述の急性経口及び経皮毒性試験から得られたデータの殺虫剤のハザード分類と表示における相対的な傾向について統計的な解析を終了させることである。また、急性経口毒性評価にゼブラフィッシュの胚や線虫 (*C.elegans*) をモデルに用いることを検討すること等が挙げられている。

感作性に関しては、バリデーションされた方法により得られたデータの回顧的解析により、米国政府機関の規制要件に合った統合的な試験及び意思決定戦略の開発が挙げられている。

AOP に関しては、データ共有やコミュニケーションのツールとしての AOP 活用の有用性の理解を省庁間で検討するコーディネーションを行い、特に、ヒ素に関連した健康影響、肺がん、虚血性心疾患について検討することを挙げて

いる。

(B)NICEATM が参照化学物質の推薦を要求

2014年5月にNICEATMはエストロゲン受容体(ERs)やアンドロゲン受容体(ARs)との相互作用ポテンシャルを伴う *in vitro* 代謝システムのバリデーションに使用できる参照化学物質の推薦をサポートデータとともに要求した^{10),11)}。ER や AR 転写促進試験法で併用することで *in vitro* 代謝システムの有用性と制限を同定するための化学物質リストを必要としている。

(C)ICCVAM の公開オンラインセミナー

ICCVAM は『リバーストキシコキネティクス : *in vivo* で有害な影響を及ぼしうる曝露量を推定するための *in vitro* データ利用』と題する公開オンラインセミナーを2015年1月27日に開催することを発表した^{12),13)}。市場あるいは環境中にある化学物質の多くは使用者やリスク評価者が十分に情報を得た上で健康への影響を判断するための毒性データが無い状態にある。ハイスループットな *in vitro* の細胞生物学や生化学に基づく試験法はより早く、比較的安価であり、ヒト由来細胞や細胞組織を用いる場合、ヒト健康への関連性がより高い可能性がある。一方、*in vitro* で影響を及ぼす化学物質の濃度と *in vivo* での影響の相関性については複雑である。リバーストキシコキネティクスとして知られている数学的モデルはそうした相関性に対する枠組みを提供するものであり、そのモデルは *in vitro* での有害性を発揮する化学物質の濃度と等価の血中濃度を推定するものである。

(D) 2013年～2017年の5ヵ年計画

NICEATM と ICCVAM は、2012年に2013年～2017年の5ヵ年計画を発表している^{14),15)}。計画案は以下の4つの広範な戦略的機會を挙げている。

(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 AOP の課題に取り組むトランスレー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した分野と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、科学的にバリデーション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。

C-2-2. その他の米国における状況

米国化粧品工業会の状況:

PCPC(旧 CTFA) の Safety Evaluation Guideline は、化粧品の原料及び最終製品について、安全性を立証する方法としての前臨床試験及び臨床試験の使用に関するガイダンスを事業者に提供するものである。

動物実験代替法を盛り込んだ改訂版 PCPC 2014 Safety Evaluation Guidelines を2014年に発

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¹⁶⁾。また、Computational safety の章が設けられており、*in silico* アプローチについても論述されている。

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¹⁷⁾。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、細胞及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 はニューズレターにより活動等の報告を行っている。2012 年 9 月 21 日の第 1 回年次会議の開催に続き、2013 年 10 月 31 日に第 2 回年次会議、そして 2014 年 11 月 12 日に第 3 回年次会議が開催された。第 2 回の議題は動物試験代替としてのチップ上のヒト器官組織、バーチャル胚システム：毒性予測における課題等があり、FDA 等の政府機関、業界、及び NGO による『新規ツールの活用』と題するパネルディスカッションが含まれていたが^{18),19)}、第 3 回の議題では AOP：科学的発見から規制上の意思決定、NIH ビッグデータから知識への構想(NIH Big Data to Knowledge initiative; BD2K)と細胞に化合物を曝露した際に生じる遺伝子発現やそのほかの細胞応答変化をネットワークでとらえる LINCS プロジェクト (Library of Integrated Network-Based Cellular Signatures Project)、肝毒性に関する有害転帰経路 (Adverse Outcome Pathways; AOP) に基づく新規計算機毒性学的方法の開発と題する発表がそれぞれ、EPA、NIH 及び大学研究者によって行われた。また今回は日本動物実験代替法学会とのコーディネーションにより AOP に基づく反復投与毒性予測のツールとして、独立行政法人 製品評価技術基盤機構が有害性評価支援システム

統合プラットフォーム (Hazard Evaluation Support System Integrated Platform; HESS) に関する発表もあった^{20),21),22)}。

C-2-3. 小括

代替毒性試験法に関する科学諮問委員会

(SACATM; Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods) は会議を開催し、ICCVAM ビジョンの元でのこれまでの活動や今後の活動予定を示した。

動物実験代替法を盛り込んだ改訂版 PCPC 2014 Safety Evaluation Guidelines が 2014 年に発行された。

また、NICEATM はエストロゲン受容体 (ERs) やアンドロゲン受容体 (ARs) との相互作用ポテンシャルを伴う *in vitro* 代謝システムのバリデーションに使用できる参照化学物質の推薦をサポートデータとともに要求した。

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 日及び 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及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及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、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含まれていない。なお、2013 年 3 月に SFDA は CFDA (中国国家食品薬品監督管理総局) に組み替えられた。

2014 年 6 月 30 日から中国国内で製造・販売される一般化粧品の動物試験データの提出を必須としなくなった。しかし、特殊化粧品および輸入化粧品は従来通り動物試験が必要である。

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。2013 年 11 月 6 日に韓国ソウル・中央大学で韓国動物実験代替法学会第 10 回大会が開催された⁴⁾。参加者は 100 名程であり、「韓国における動物実験代替法の現状」、「動物実験代替法研究における国際活動」、「GLP と動物実験代替法」の 3 つのセッションで講演が行われた。日本からは国立医薬品食品衛生研究所の小島肇先生が参加され、2 番目のセッションにおいて、将来の化学物質管理方針についての経済産業省のプロジェクト“ARCH-Tox”に関して講演された。

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⁵⁾。国立食品医薬品安全性評価研究所の毒性評価及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、及びガイドラインの開発等を推進することになった⁶⁾。

2013 年、韓国において KoCVAM に加え、代替法による化粧品の安全性評価センター CAMSEC (The Center of Alternative Methods for Safety Evaluation of Cosmetics) が新たに設立された⁷⁾。KoCVAM とともに、CAMSEC は 3Rs の原則を達成するための代替試験法の科学領域において主導的な組織となる目標を掲げている。2013 年 7 月 2 日に CAMSEC のオープニングセレモニーとして「代替試験法の国際バリデーションにおける重要な考慮点」と題する国際講演会が、ICCVAM、Eurl ECVAM、JaCVAM 等の代表を招待して開催された。

産業通商資源省 (MOTI) の「産業融合研究基盤構築事業」で、2016 年までに、全南道の生物医薬産業団地内に 166 億ウォンの予算で、動物実験代替試験認証センターを設立するという韓国化学融合試験研究所 (KTR) と全南道の協同プロジェクトが発表された。

韓国食品医薬品安全処 (MFDS) は 2013 年 12 月 31 日、「機能性化粧品審査等に関する規定」改定告示案 (告示第 2013-263 号) を発表し、動物試験代替法を機能性化粧品の安全性評価で使用することを正式に承認した。この改定案は発表日の 12 月 31 日より施行された⁸⁾。

C-3-3. その他のアジア諸国における動向

2013 年 6 月、インドは南アジアの国で初めて化粧品のための動物実験禁止の決定を下した⁹⁾。2014 年 5 月、インド政府機関の保健家族省より官報通知が発出され、10 月には動物実験を行った化粧品の輸入禁止に関する官報通知が発出された¹⁰⁾。

C-3-4. 小括

中国で行政登録の申請資料に代替法が認められていないことはこれまで通りである。

韓国では、食品医薬品安全処 (MFDS) が 2013 年 12 月 31 日に「機能性化粧品審査等に関する規定」改定告示案を発表し、動物試験代替法を機能性化粧品の安全性評価で使用することを正式に承認した。インドでは、2014 年 5 月、政府機関の保健家族省より官報通知が発出され、10 月には動物実験を行った化粧品の輸入禁止に関する官報通知が発出された

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⁾。

2014 年 9 月 26 日及び 2015 年 2 月 5 日に改訂試験法及び新規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 8 試験法が承認公開された。

TG 431 *in vitro* 皮膚腐食性:再構築ヒト表皮試験法 (RHE)³⁾

TG 442C *in chemico* 皮膚感作性: DPRA 法⁴⁾

TG 442D *in vitro* 皮膚感作性: ARE-Nrf2 luciferase test 法⁵⁾

TG 473 哺乳類の *in vitro* 染色体異常試験⁶⁾

TG 474 哺乳類赤血球小核試験⁷⁾

TG 475 哺乳類骨髄染色体異常試験⁸⁾

TG 487 哺乳類細胞を用いた *in vitro* 小核試験⁹⁾

TG 489 *in vivo* 哺乳類アルカリコメット試

験¹⁰⁾

なお今年度、以下に示す新規試験法ドラフトガイドライン及び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 (2015 年 2 月 16 日現在)¹¹⁾。

・新規試験法ドラフトガイドライン

Draft PBTG on human recombinant Estrogen Receptor alpha binding assays¹²⁾

(意見募集締切日: 2015 年 2 月 5 日)

Revised Draft Test Guideline on RhCE Test Method (EpiOcular) for the Detection of Chemicals not Requiring, Classification for Eye Irritation/Serious Eye Damage¹³⁾

(意見募集締切日: 2015 年 1 月 30 日)

Draft Test Guideline on the Short-Time Exposure test method for identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage¹⁴⁾

(意見募集締切日: 2015 年 1 月 30 日)

Draft TG TK *in vitro* mammalian cell gene mutation test using the Thymidine kinase gene¹⁵⁾

(意見募集締切日: 2015 年 1 月 9 日)

Draft Proposal for a New Performance Based TG - Human Cytochrome P450 (CYP) n-fold Induction *in vitro* Test Method¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾

(意見募集締切日: 2014 年 10 月 21 日)

Draft Proposal for a new Test Guideline on *in vitro* Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT)¹⁹⁾

(意見募集締切日: 2014 年 10 月 13 日)

in Vitro Carcinogenicity: Bhas 42 Cell Transformation Assay²⁰⁾

(意見募集締切日：2013年12月9日)

in vitro Carcinogenicity: Syrian Hamster Embryo (SHE) Cell Transformation Assay²¹⁾

(意見募集締切日：2013年2月11日)

Draft Test Guideline on the Cytosensor Microphysiometer Test Method: An *in vitro* Method for Identifying Ocular 3 Corrosive and Severe Irritant Chemicals as well as Chemicals not Classified as Ocular Irritants²²⁾

(意見募集締切日：2013年2月11日)

・改訂試験法ガイドライン

TG 421 生殖／発生毒性スクリーニング試験²³⁾

(意見募集締切日：2015年2月5日)

TG 422 反復投与毒性試験と生殖発生毒性スクリーニング試験の複合試験²⁴⁾

(意見募集締切日：2015年2月5日)

TG 404 急性皮膚刺激性／腐食性²⁵⁾

(意見募集締切日：2015年1月30日)

TG 430 *in vitro* 皮膚腐食性：経皮電気抵抗試験 (TER)²⁶⁾

(意見募集締切日：2015年1月30日)

TG 431 *in vitro* 皮膚腐食性：再構築ヒト表皮試験²⁷⁾

(意見募集締切日：2015年1月30日)

TG 435 皮膚腐食性評価のための *in vitro* 膜バリア試験法²⁸⁾

(意見募集締切日：2015年1月30日)

TG 439 *in vitro* 皮膚刺激性：再構築ヒト表皮試験²⁹⁾

(意見募集締切日：2015年1月30日)

TG 476 哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験³⁰⁾

(意見募集締切日：2015年1月9日)

TG 478 遺伝毒性：げっ歯類を用いる優性致死試験³¹⁾

(意見募集締切日：2014年10月10日)

TG 483 哺乳類の精原細胞を用いる染色体異常試験³²⁾

(意見募集締切日：2014年10月10日)

TG 455 化学物質のエストロゲンアゴニスト活性の検出を目的とした、安定に形質移入されたヒトエストロゲン受容体- α の転写活性化試験³³⁾

(意見募集締切日：2014年9月1日)

皮膚腐食・刺激性の試験及び評価の統合的アプローチ (IATA) ガイドランスが2014年7月に公開されている³⁴⁾。また毒性発現における各段階のメカニズムを考慮し、毒性全体を考慮することが提唱されており (AOP)³⁵⁾、AOPを考慮した評価法の開発や評価のためのガイドランスも発出されている^{36、37)}。更に、ガイドライン化されていない *in vitro* 評価法を記述するためのガイドランスが同年12月に公開されている³⁸⁾。*In silico* モデルである(Q)SAR Application Toolboxに関する情報もアップデートされ、QSAR ツールボックスのバージョン3.2を公開した。このバージョンでは、IUCLID 5.5における「read across」のためのp値を計算する機能が加わり、インターフェースとデータベースのパフォーマンスが向上した。2014年12月現在、最新版はバージョン3.3となっている³⁹⁾。

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、ブラジル、カナダ、欧州連合、日本及び米国の化粧品規制当局をメンバーとする国際的グループである。2014年7月8日～10日に第8回化粧品規制協力国際会議 (ICCR-8) がオタワ (カナダ) で開催された^{40,41)}。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。2013年より、中国及びブラジルの規制当局である AQSIQ (中国国家質量監督検閲検疫局) 及び ANVISA (国家衛生監督局) もオブザーバーとして参加している。なお、ANVISA は2014年8月15日に ICCR のメンバーとなっている⁴²⁾。

会合の結果、動物実験代替法に係わることとして、①規制当局は、動物試験代替法国際協力 (ICATM : International Cooperation on Alternative Test Methods) の活動報告を受理した。②報告書「ICCR 地域下の化粧品及び原材料に適用可能な動物試験代替法 (ICATM 提案)」の添付書類であるリストは ICATM の報告を受け、アップデートされることとなった。

また、安全性評価のためのコンピューター予測モデルに係わることとして、報告書「化粧品原料の安全性評価におけるコンピューター予測モデルの利用」が受理され、ICCR ウェブサイト (<http://www.iccrnet.org/topics/>) に「*In-silico* Approaches for Cosmetic Product Safety Assessments」として公開されている。

次回、第9回化粧品規制協力国際会議 (ICCR-9) は2015年にローマ (イタリア) で開催される予定である。

C-4-3. 日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH : International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) の動向

ICH は、日本・米国・EU それぞれの医薬品

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

ICH の目的は、各地域の規制当局による新薬承認審査の基準を国際的に統一し、各種試験や提出書類などのガイドラインを標準化することによって開発及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 (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訂においては、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⁴³⁾。

2013年12月からの1年間でガイドラインの合意までのステップ (1~5) に進捗のあった代替法に関わるトピックとして、[S10 : 光安全性試験] が Step4 (ICH 調和ガイドライン最終合意) から Step5 (各極における国内規制への取入れ) へ、[M7 : 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) 不純物の評価及び管理] が Step3 (各極におけるガイドライン案に対する意見聴取、寄せられた意見に基づくガイドライン案の修正) から Step4 (ICH 調和ガイドライン最終合意) のプロセスに進んだ。またステップ1 (トピックの選定・問題点の分析、EWG の設置、ICH 調和ガイドライン案の起草) で進捗は無かったものの、[S1 : 医薬品のがん原性試験] ではガイダンス改訂のための検証作業が開始されている^{44,45,46)}。

[S5 : 医薬品の生殖毒性試験法] については、すでに Step5 (各極における国内規制への取入れ) にあるものの、生殖発生毒性試験ガイドラインの改訂に向けた準備が進められている。

[S10 : 光安全性試験] は、2010年11月に

EWG (Expert Working Group: 専門家作業部会) が発足、2012年11月にガイドライン案が運営委員会で承認 (Step2 到達)、2013年3月からパブリックコメントに対する専門家作業部会の協議を開始、同年11月の大阪会議において修正ガイドライン案が運営委員会の規制当局代表者によって採択され (Step4 到達)⁴⁷⁾、2014年5月に厚生労働省医薬食品局審査管理課より「医薬品の光安全性評価ガイドラインについて (別添 医薬品の光安全性評価ガイドライン)」が発出された (Step5 到達)⁴⁸⁾。

本ガイドラインの目的の一つに、「3R (代替法の利用/使用動物数の削減/苦痛の軽減) の原則に従って使用動物数を削減するために、動物を使わない方法あるいは臨床データの活用による光安全性評価を考慮すべきである。」と記載されている。本ガイドライン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、再構築ヒト皮膚モデルを用いる試験法がある。これらの試験法から陰性結果が得られた場合、一般にさらなる光安全性評価 (*in vivo* 試験法や臨床的な評価) を必要としないと記載されている。

[M7: 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)不純物の評価及び管理] では、2010年6月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。2013年3月から日米欧3極でパブリックコメントの収集が開始され、同年8月から11月にかけてパブリックコメントに対する対応協議を実施 (Step3 到達)⁴⁹⁾、日米 EU 3 極で調和したガイドラインの説明会が2014年9月に開催され、国内通知発出に向けた作業が進められている (Step4 到達)^{50)、51)}。

本ガイドラインにおける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、一日曝露量の制限はあるものの「2つの相補的な(Q)SAR(ルールベース、統計ベース)により警告構造が示されない限りは不純物に変異原性の懸念が無いと結論可能」とされている。

[S1] 医薬品のがん原性試験では、証拠の重み付け要素 (ラット6カ月反復投与毒性試験における病理組織学的評価、ラット6カ月反復投与毒性試験における安全域など、数種評価結果) からラットがん原性試験結果やヒトでの発がんリスクの予測が可能かを検証し、試験方法の改定是非を判断する作業が開始された⁵²⁾。その計画の一つとして、2013年10月25日に厚生労働省医薬食品局審査管理課より「医薬品のがん原性試験に関するガイダンスの改正に係る前向き評価への参加について (協力依頼)」の事務連絡が発出されている⁵³⁾。

この改訂の提案が前向き評価結果に基づき検証され、改訂が将来実現された場合、ヒトにおける発がんリスクのカテゴリー分類によっては2年間ラットがん原性試験を含む全てのがん原性試験が免除できる可能性がある。事務連絡には「この提案によって開始される検討は、患者の安全性を損なうことなく、医薬品のがん原性評価を改善し、3R (使用動物数の削減/苦痛の軽減/代替法の利用) の原則に従って動物の使用を抑え、医薬品開発リソースの使用を減少させ、ときには市販承認までの時間を短縮することも期待される。」とある。現在進行中のものも含め、これからのがん原性試験の結果との検証が必要であることから長期的な計画となっている。

[S5: 医薬品の生殖毒性試験法] では、本ガイドライン作成以降に作成された他のガイドライン (M3: 非臨床試験の実施時期、S6: バイオ医薬品の安全性試験、S9: 抗がん剤の非臨床安全性試験) との整合性を図るため、また欧州における代替法開発の活発化と動物福祉(3Rs)

の潮流に対応するため生殖発生毒性試験ガイドラインの改定に向けた準備が進められている⁵⁴⁾。生殖試験以外の試験の利用や試験の組み合わせ利用が可能になれば動物実験の削減につながる可能性がある。

C-4-4. 小括

OECDの安全性試験ガイドラインでは、8つの改訂試験法ガイドラインが採択・公開された(2014年9月26日及び2015年2月5日)。*in vitro*皮膚腐食性試験として再構築ヒト表皮試験法[TG 431]、*in chemico/in vitro*皮膚感作性試験としてDPRA法[TG 442C]及びARE-Nrf2 luciferase test法[TG 442D]、また遺伝毒性に関連する複数の試験法(哺乳類の*in vitro*染色体異常試験[TG 473]、哺乳類赤血球小核試験[TG 474]、哺乳類骨髄染色体異常試験[TG 475]、哺乳類細胞を用いた*in vitro*小核試験[TG 487]、*in vivo*哺乳類アルカリコメット試験[TG 489])の改訂がなされた。

内分泌かく乱物質検出を目的とした*in vitro*エストロゲン受容体結合性試験、薬物相互作用の予測を目的とした*in vitro*CYP誘導能試験、再構築ヒト角膜様モデルやウサギ角膜細胞を用いた眼刺激に関する試験法、*in chemico*および*in vitro*皮膚感作性、*in vitro*遺伝子突然変異試験、*in vitro*発がん性などを含む9種の新規試験法ドラフトガイドライン及び11種(TG 404、TG 421、TG 422、TG 430、TG 431、TG 435、TG 439、TG 455、TG 476、TG 478、TG 483)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(2015年2月16日現在)。更に毒性発現における各段階のメカニズムを考慮し、毒性全体を考慮ことの提唱(AOP: Adverse Outcome Pathway)や複数の試験法の組み合わせによる評価体系「Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation」の提案も行われている。

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、3Rs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-8が開催された。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からその活動報告を受け、ICCR地域下の化粧品及び原材料に適用可能な動物代替法リストについてアップデートされることとなった。また、安全性評価のためのコンピューター予測モデルに係わることとして、報告書「化粧品原料の安全性評価におけるコンピューター予測モデルの利用」が受理された。

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、[S10: 光安全性試験]が国内規制へ取り入れられた(Step5到達)。*[M7: 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)不純物の評価及び管理]*は、国内通知発出に向けた作業が進められている(Step4到達)。*[S1: 医薬品のがん原性試験]*ではガイダンス改訂のための検証作業が実施されている。これらガイドラインの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や*in silico*(Q)SARについて記述されている。

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

2013年度から厚生労働科学研究費補助金研究(地球規模保健課題推進研究事業)「新規動物試験代替法の開発、国際標準化及び普及促進に関する研究」(予定期間3年)が開始され進行中である。

本研究班の主な目的は、化粧品・医薬部外品の安全性評価に用いる代替法の国際標準化及びその普及促進であり、必要な調査研究、代替法の開発、改良及びバリデーション、代替法を用いたリスク評価の検討、代替法で評価された成分のヒト試験の利用ガイダンスなどを検討

するものである。

本研究は5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化粧品のための動物実験代替法の国際標準化に関する研究、②動物実験代替法と皮膚透過性に関するリスク評価手法の構築、③ATP バイオセンサーを用いた皮膚刺激性評価、④代替法に関する国際情勢の調査及び安全性評価のあり方検討、⑤ヒトのパッチテスト、使用テストのガイダンス作成、⑥動物実験代替法に関する国際情勢の調査である。これらを通して、代替法を用いた安全性評価が普及・促進する事を目指している。

C-5-2. JaCVAM (Japanese Center for the

Validation of Alternative Methods) の活動

JaCVAM では、2008 年度から代替試験法の日本での受け入れに関する試験法評価システムが稼働している。運営委員会の委嘱により評価委員会等が設定されており、各評価委員会には、専門の研究者、生物統計学者、皮膚科医及び粧工連代表の他、日本製薬工業協会や日本化学工業協会の代表が参加している。これらの会議からの情報を共有化し、業界としての意見を取りまとめるため、粧工連においては安全性部会及び動物実験代替専門委員会の関係会社から皮膚一次刺激性、眼刺激性、皮膚感作性及び単回毒性の専門家を公募し、2009 年度より各分野のタスクフォースを設置し活動が開始されている。

2014年度は、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メーター試験および細胞毒性試験（STE）が第三者評価を終了し、SIRC細胞毒性試験はバリデーションの評価報告書作成中である。急性眼刺激/腐食性試験において麻酔薬使用による苦痛軽減等が規定されたTG 405及び改訂されたTG 437（眼刺激性；BCOP）はJaCVAM第三者評価、評価会議を終了し、行政に提案された。またTG405については眼刺激性試験を化粧品・医薬部外品の安全性評価に資するためのガイダンスに対する

パブリックコメントを実施した。TG438（ICE）については評価会議が進行しており、評価会議報告書、評価報告書に対するパブリックコメントを実施した。

急性毒性試験に関しては急性毒性試験資料編纂委員会による3T3NRU細胞毒性試験の評価が進行中である。

皮膚透過性試験に関しては、*in vitro* 皮膚透過性試験、内分泌かく乱物質スクリーニング試験法に関しては、ヒトエストロゲン受容体結合による活性化・拮抗作用物質を検出するBG1LucERTA法が行政に提案された。

遺伝毒性試験に関しては、*in vitro* コメットアッセイがバリデーション中、*in vivo* コメットアッセイはバリデーションを終了している。

皮膚感作性試験に関しては、h-CLATがバリデーション終了、IL-8 Luc assayがバリデート中である。また、DPRa、KeratinSenseについては、評価報告書作成中である。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及び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、評価会議が終了し、行政へ提案済である。

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27回学術大会は、横浜国立大学の板垣宏教授が大会長で2014年12月5～7日に横浜で開催された。大会は、『過去からの脱却と未来へのキックオフ』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95題)のほかに10のシンポジウム(①日本化粧品工業連合会/医薬部外品申請において動物実験代替法を活用するために、②化学物質の安全性保証について、③動物実験代替試験法における適用限界への挑戦、④動物実験における3Rsの実践と課題、⑤資生堂シンポジウム/資生堂における代替法開発とその実践、⑥毒

性発現メカニズムを遺伝子レベルで考える、⑦細胞培養デバイスの開発と創薬への応用、⑧生命倫理・研究倫理を考える、⑨ヒトIPS細胞を用いた創薬の新たな展開、⑩*In Silico*は安全性保証に活用できるか?)で構成された。

シンポジウムの中で「医薬部外品申請において動物実験代替法を活用するために」では、日本化粧品工業連合会が2011年よりレギュラトリーサイエンス研究事業の一環として化粧品、医薬部外品での動物実験代替法の利用促進を目的としたガイドンス作成についての取り組みが紹介された¹⁾。また特別講演として藤田保健衛生大学皮膚科の松永佳世子教授から最近の化粧品に関する安全性の問題事例について解説され、代替法の限界や、代替法は安全性評価の一部であるという認識をもつべきとの報告がなされた²⁾。

日本動物実験代替法学会は、粧工連からの24時間曝露による皮膚刺激性試験の代替法開発の依頼に対し、皮膚一次刺激性試験代替法特別委員会を設置し対応中である。2011年、2013年に引き続き、2014年の学術大会において、24時間曝露ウサギ皮膚一次刺激性試験、ヒト24時間閉塞パッチテストと3次元培養皮膚モデルとの比較検討した結果が報告された。OECD TG439では、24時間曝露ウサギ皮膚一次刺激性試験の予測性が不十分であったが、ヒトパッチテスト結果については予測可能な感度を持ち合わせている可能性が示唆された³⁾。

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⁴⁾、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

めたガイドンスを作成するために「ガイドンス検討会」が組織された。

現在までに「皮膚感作性試験代替法及び光毒性代替法を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイドンスについて」⁵⁾、「皮膚感作性試験代替法(LLNA:DA、LLNA:BrdU-ELISA)を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイドンスについて」⁶⁾、「眼刺激性試験代替法としての牛摘出角膜の混濁及び透過性試験法(BCOP)を化粧品・医薬部外品の安全性評価に資するためのガイドンス」⁷⁾の3試験について厚生労働省より事務連絡や通知として発出されている。またニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験(ICE)は、ガイドンス案を検討会にて協議中である。急性眼刺激/腐食性試験において麻酔薬使用による苦痛軽減等が規定されたTG405については「眼刺激性試験を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するための留意事項について」が事務連絡として発出された。

また、これらのガイドンス検討会活動の有用性確認と今後の活動拡大の参考にするために粧工連技術委員会参加企業44社に対してガイドンス検討会の活動に対するアンケートを実施した。調査結果からは化粧品・医薬部外品の安全性評価に動物実験代替法を活用するための代替法ガイドンス検討会に対する強い期待が寄せられた⁸⁾。この他にも前述の日本動物実験代替法学会第27回学術大会において粧工連の冠シンポジウムとして「ガイドンス検討会活動の紹介」を実施している。

また、「化粧品の安全性評価に関する指針2008(薬事日報社)」の策定から7年が過ぎ、動物実験代替法の開発や規制等の社会的環境が変化していることから新たな「化粧品の安全性評価に関する指針2015」の策定を粧工連安全性部会、動物実験代替専門部会を中心に実施している。

C-5-5. 小括

本年度における代替法の開発・評価において特筆すべきことは、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の「ガイダンス検討会」について、その活動の有用性がアンケートにより認められたこと、また粧工連安全性部会、動物実験代替専門部会を中心に7年ぶりとなる「化粧品の安全性評価に関する指針」の改訂作業が着手されたことである。

C-6. 化粧品の安全性評価に関連する代替法の状況

各安全性試験代替法の現状については、粧工連動物実験代替専門委員会が毎年、広範に調査している。本年度も情報の更新を行った。以下にその調査結果を記述する。

C-6-1. 単回投与毒性

①概要

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

OECD テストガイドライン (TG) では、経口投与毒性、吸入毒性及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) 及び急性吸入毒性・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。2013年4月、EURL ECVAMは3T3 NRU細胞毒性試験による急性経口毒性のLD50が2000mg/kgを超える物質の同定について承認し、勧告書を公表した。このため、JaCVAMは2014年7月に急性毒性試験資料編纂委員会を組織し、評価を開始した。

②状況

欧州では経口急性毒性を予測する細胞ベースの試験法が検討されている。Multicenter Evaluation of *In vitro* Cytotoxicity (MEIC) プログラム²⁾ 及び Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments (ZEBET)³⁾では、急性毒性を予測するための *in vitro* 試験の最も良い組合せについて検討され、予測精度を向上させるため、細胞毒性に加えて、代謝やトキシコカインेटィクス、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た。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、更に 32 の参照物質の追加評価が実施された⁷⁾。その結果、Random Forest model を用いた 9 試験法(白血球系前駆細胞(CBC/CFU-GM)を用いた細胞分化試験、BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた NRU 法 (3T3/NRU)、ラット初代脳培養組織を用いたウリジン取り込み法による mRNA 生合成試験、SH-SY5Y 細胞を用いた細胞内過酸化物質試験、HepG2 細胞を用いた細胞内カルシウム量測定、ラット初代培養肝細胞を用いた MTT 試験、ヒト血液を用いた IL-1 放出試験)の組み合わせにて最も高い相関(69.26%)が得られた。しかしながら、これら試験のエンドポイントの結果の組み合わせは、3T3/NRU 単独の結果を有意に改善させるものではなかったと報告されている。その一方、LD₅₀>2000 mg/kg の物質については、高い一貫性が得られた。以上の結果を受けて、これらの *in vitro* 試験は、予測精度の有意な向上は得られなかったものの、経口急性毒性を予測するための段階的な *in*

vitro 評価の最初のステップの試験法、あるいは EU CLP 分類 (Classification Labeling and Packaging of substances and mixtures) に準じた LD₅₀>2000 mg/kg の物質を同定するための試験法としての利用が期待されている。

また、the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)では、ToxRTool (Toxicological data Reliability Assessment Tool)が公開された。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及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。また、2013年4月に EURL-ECVAMより、急性経口毒性試験に向けた分類なし物質の同定として、*in vitro*細胞

(3T3) 毒性ニュートラルレッド取り込みアッセイ法に関する勧告がなされた^{9,10)}。2014年12月に、欧州委員会JRCの欧州動物実験代替法評価センターは、少数の動物で急性全身毒性を評価する手法の改善に関する戦略を公表した¹¹⁾。

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¹²⁾ 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¹³⁻¹⁵⁾。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)¹⁶⁾及び ICCVAM による試験法評価報告書¹⁷⁾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¹⁸⁾。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¹⁹⁾、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^{19,20)}。

2013 年、EURL ECVAM は 3T3 NRU 細胞毒性試験による急性経口毒性の LD₅₀ が 2000mg/kg を超える物質の同定について承認し、勧告書を公表した²¹⁾。使用にあたっては適用範囲の考慮が必要としている。本邦では JaCVAM において 2014 年 7 月に急性毒性試験資料編纂委員会が組織され、評価を開始している。本法は化粧品原料の評価への応用が期待されている。OECD における単回投与毒性に関する *in vitro* 試験法の状況としては、「急性経口毒性試験の投与開始用量の推定に用いる *in vitro* 細胞毒性試験」のガイダンスが 2010 年 7 月 23 日に採択され²²⁾、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²³⁾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