

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²⁴⁾、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²⁵⁾。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して炎症を惹起すること(皮膚刺激性)やそれら外用した物質と紫外線とが作用して皮膚炎を惹起すること(光毒性)など、化粧品等の物質を皮膚に適用する際には、皮膚に対する安全性を評価することは重要である。従来、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、皮膚腐食性や皮膚刺激性、光毒性の分野に関しても動物実験代替法の評価開発が進められており、*in vitro*試験法がOECDテストガイドラインなどの国際的なガイドラインとしても採用されている。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 Method (TER)」(Original Guideline, adopted 13th April 2004)、「*In vitro*

Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method」(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テスト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至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、再構築ヒト表皮モデルを用いた方法、マウスの摘出皮膚を用いた方法、非生物の膜モデルを使用した方法などが挙げられる。再構築ヒト表皮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: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method」としてOECD TG 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性を指標として、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 Method (TER)」としてOECD TG 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 TG 435にそれぞれ収載されている。

2012年5月に再構築ヒト表皮モデルを使用した方法と、マウス摘出皮膚を用いる方法につ

いて改定案が提示され、意見募集が行われた。これは、2011年の改定案が正式化されないままに行われた改定であったが、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として類似した、もしくは部分的に修正した試験法の妥当性を評価するためのPERFORMANCE STANDARDSが追加された。もともと試験条件設定に使うために用意されていたリファレンスケミカルのリスト(12物質)を変更し、24化学物質からなるリストとし、改変試験法を用いる際の、リファレンスケミカルを用いた試験法の妥当性評価の手順を新たに示したものとなっている。

これらの改定の結果、OECD TG 430は「*In vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER)」へ、OECD TG 439は「*In vitro* Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method」へと名称変更され、2013年7月26日付けでOECDテストガイドラインとして新たに採用された。

OECD TG 431についても同様にPERFORMANCE STANDARDSをANNEX1として追記した改定案が2013年10月に提示され、「*In Vitro* Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method」として2014年9月26日付けで採択された。

③皮膚刺激性の代替試験法

皮膚刺激性の代替試験法としては、現在再構築ヒト表皮モデルを用いた方法が主流である。

再構築ヒト表皮モデルを用いた方法は、OECD TG 439に記載されており、2010年当初、使用可能なモデルとしてEPISKINTM (SM)とEpiDermTM SIT (EPI-200)、SkinEthicTM RhEの3種が記載され、その後2012年10月に4つ目のモデルとして「LabCyte EPI-MODEL24 SIT」を追加するガイドライン改定案が提案され、2013年7月26日付けで新たに「*In vitro* Skin Irritation – Reconstructed Human Epidermis Test Method」⁴⁾として採用された。

この再構築ヒト表皮モデルを使用した試験

法に対し、2010年にSCCSは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⁵⁾。

日本国内では、2009年に動物実験代替法学会バリデーション委員会により、国産再構築ヒト表皮モデルであるLabCyte EPI-MODEL24を用いた多施設バリデーションが実施され⁶⁾、JaCVAM第三者評価委員会およびOECD第三者評価委員会にて、その結果に不十分な点があることを指摘されたものの、追加バリデーションの実施⁷⁾、改訂プロトコールによる報告書の再提出を経て、OECDのレビューの結果⁸⁾、前述した2013年7月のTG 439改定となった。

また、2010年にはJaCVAM評価会議において「EPISKINTM」を用いた皮膚刺激性試験法が、「化学物質の刺激性を評価できる試験法」として承認され、新規試験法提案書として行政当局に提出された⁹⁾。

しかしながら、本試験法は4時間曝露の皮膚刺激性試験結果を予測する方法であり、24時間曝露による皮膚刺激性評価が求められている日本の化粧品や医薬部外品の薬事申請に関しては、評価会議の報告書にも「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。」との記載にとどまっている¹⁰⁾。

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刺激性試験の代替法開発を依頼し、学会は皮膚刺激性試験代替法ワーキンググループ(WG)を設置して対応している。WGは2010年の設立以来、粧工連の協力を受け、代替法開発の基盤とするため、汎用化粧品原料のウサギ皮膚刺激性試験(24時間閉塞)データおよび、ヒト24時間パッチテストデータを収載した被験物質リストを作成し¹¹⁾¹²⁾日本動物実験代替法学会で報告している。2014年度には、数社の皮膚モデルサプライヤーもWGに参加し、それぞれの再構築ヒト表皮モデルを使用してリストにある被験物質の評価を行った。2014年の日本動物実験代替法学会第

27 回大会では、EpiDerm™ SIT (EPI-200)、EPISKIN™ (SM)および LabCyte EPI-MODEL24 の3種のモデルによる評価結果を提示した¹³⁾。その結果、再構築ヒト表皮モデルを利用した評価は、ウサギの皮膚刺激性試験結果よりも、ヒトパッチテストデータとの一致性の方が高い傾向にあるが、界面活性剤の評価には、課題が残る形となった。皮膚刺激 WG は、2015 年度も継続して活動していくことが決定している。

再構築ヒト表皮モデルを用いた試験法の薬事申請への応用に関しては、ガイダンス検討会において、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に関する検討の必要性が、行政当局も含めて共通認識として持たれた。しかし、ヒトパッチテストを最終的な拠り所とする評価体系の構築に対し疑問が提示され棚上げとなった。

複数の試験法の組み合わせによる評価体系に関しては、2014 年 7 月に OECD より皮膚腐食性と皮膚刺激性に関する評価体系「Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation」¹⁴⁾が公開された。これは複数の代替法、ヒト評価法、構造活性相関などを組み合わせて、体系的に皮膚腐食性および皮膚刺激性のアセスメントを行い、GHS や EU CLP に対応したクラス分けを行うためのデシジョンツリーである。

皮膚腐食性および皮膚刺激性のクラス分けの実施フローは3つのパートからなっている。

Part1 は、既存データの収集と物性情報、構造活性相関や類似物質のデータからの予測からなり、この段階では試験などは行わない。

確定的な情報が得られず Part1 でクラス分け出来なかった場合、Part2 にて収集したデータに対し Weight of Evidence (WoE) に基づき判断する。

データ不足などから WoE に基づく判断が出来ない場合は、Part3 にて追加のデータ取得を行う。この場合も収集した情報と WoE によりハザードを予測し、Top Down Approach と

Bottom Up Approach の適切な方法を選択すべきであると述べている。

これら3つの Part からなるフローを構成する各ステップはガイダンスの中で Module という形で説明されており、3つの Part は以下に示す8つの Module から構成されている。

Module1: Existing human data

Module2: *In vivo* skin irritation and corrosion data (TG404)

Module3: *In vitro* skin corrosion data (TG430, TG431, TG435)

Module4: *In vitro* skin irritation data (TG439)

Module5: Other *in vivo* and *in vitro* data

Module6: Physico-chemical properties (e.g., acid/alkaline reserve)

Module7: Non-testing methods

Module8: WoE approaches

このように複数の *in vitro*、*in vivo* データの他、Human data や Non-testing methods (QSAR や Read across) の情報も活用した総合的なフローとなっている。

また、Human Data に関する Module1 においては、a)Local Skin Effect と b)Human Patch Test に分かれているが、これまで OECD のテストガイドライン化がなされなかったヒトパッチテストについて詳細に記述されている。ここでは、Hill Top Chamber の 25mm を使用した 4 時間パッチテストについてのみ Human Patch Test として記載されており、他の条件によるデータはおそらく Local Skin Effect としての扱いになるものと思われる。

この他 Module5 では OECD に採択されていない方法によって得られた *in vivo*、*in vitro* データの活用についても言及されている。

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* 試験および *in chemico* 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(3T3 NRU-PT)が、EUの危険物指令の Annex Vに取り入れられ、この方法に修正を加えた方法が、OECD TG 432「*In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test」¹⁵⁾として受け入れられている。日本でも、JaCVAM 評価委員会、部外品申請のあり方検討委員会で検証済みである。

3T3 NRU-PT は、ガイダンス検討会においても議論され、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¹⁶⁾。

本法について EU では、3T3 NRU-PT に関する EURL ECVAM-EFPIA の workshop が 2010 年 10 月 25-27 日に開催された¹⁷⁾。その中で、本試験法の経皮投与以外での動物実験や臨床試験との整合性の低さから、医薬品の開発候補品に対し、偽陽性となる確率が高いことを問題視し、試験法や試験実施の判断基準について議論された。その結果、「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¹⁷⁾を 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、再構築ヒト表皮モデルを用いた光毒性試験代替法については、EpiDermTM や EPISKINTM を用いた方法が論文掲載されている^{18,19)}。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、再構築ヒト表皮

モデルを用いた試験法等が報告されている^{20,21)}が、2000 年頃にプレバリデーションが実施されて以降、進捗に関する情報は無い。

また、日本では、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、行政への提案には、確定したプロトコルでの追加検証が必要という結論が出された^{25,26)}。

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 は国際バリデーションおよび第三者評価が終了した。ROS assay はその予測性、再現性などが評価され、ICH の光安全性評価にも使用可能であり、光安全性評価体系の第一層の評価系として適切であると結論づけられた²⁷⁾。

医薬品においては、光安全性評価のための国際協調ガイドライン (ICH S10) の作成が検討され、2013 年 11 月の ICH Japan Symposium 2013 (大阪会議)において Step4 に到達、2014 年 5 月に Step5 として厚生労働省より正式にガイドラインとして通知された²⁸⁾。ガイドラインでは、組織分布や動態についての検討の重要性を述べつつ、代替法の短所として議論されることの多い代謝については、「代謝により親化合物と大幅に異なるクロモフォアが生じることは通常ないことから、一般的に代謝物について別途光安全性評価を行う必要はない」としている。また、試験法については、ROS アッセイ、3T3 NRU-PT、皮膚モデルを用いた方法などについて触れ、ROS アッセイや 3T3 NRU-PT で光毒性陰性と判断される場合は、ヒトで光毒性を示すリスクは非常に低いと考えてよいとしている。

C-6-3. 眼刺激性

①概要

眼刺激性は、被験物質を眼に直接接触させることにより生じる結膜の発赤・浮腫・分泌物、虹彩の変化及び角膜の混濁など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 または 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、更に2013年7月、両試験法は強度の眼傷害を誘発させる化学物質、及び眼刺激性あるいは強度の眼傷害の分類を要しない化学物質を同定するための方法として改訂された^{4,5)}。このうち、改訂 BCOP 法は2013年10月に JaCVAM 評価会議報告書において①UN GHS 区分1（重篤な眼の傷害を起こす）及び②UN GHS 区分外（眼の傷害を引き起こさない）の範囲において、行政的な利用が可能であることが示された⁶⁾。この改訂 BCOP 法は化粧品・医薬部外品のためのガイダンス化がガイダンス検討会で検討され、2014年2月4日付で「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ダンス」として厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知として発出された⁷⁾。同様に改訂 ICE 法についても化粧品・医薬部外品のためのガイダンス化がガイダンス検討会で検討されている。

なお、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 についても検討され、留意点として事務連絡が発出された。

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)}。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 は UN GHS 区分で無刺激性の化学物質あるいは混合物を同定する上で有用であることについて検証され、2012年9月に改訂案が公開され意見募集が行われた。2013年7月には i) 強度の眼傷害を誘発させる化学物質、及び ii) 眼刺激あるいは強度の眼傷害の分類を要しない化学物質を同定するための方法として改訂 TG437 及び改訂 TG438 が採択された^{4,5)}。このうち改訂 TG437 (BCOP 法) は、2013年10月に JaCVAM 評価会議報告書において①UN GHS 区分1（重篤な眼の傷害を起こす）及び②UN GHS 区分外（眼の傷害を引き起こさない）の範囲において行政的な利用が可能であることが示された⁶⁾。この改訂 BCOP 法は2014年2月4日付で「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ダンス」として厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知として発出された⁷⁾。

一方、改訂 TG438 (ICE 法) についてもボトムアップアプローチでの眼の傷害を引き起こさない化学物質の同定を行うための試験法として、行政上の利用の可能性について JaCVAM 評価会議による検討が行われ、2014年12月11日から評価会議報告書⁹⁾及び評価報告書¹⁰⁾への

パブリックコメントが実施され。また、ガイダンス検討会でも改訂 ICE 法を化粧品・医薬部外品の眼刺激性試験に活用するためのガイダンス化が進められている。

細胞毒性または 3 次元培養モデルを用いた眼刺激性試験法：

OECD は細胞毒性に基づく 3 種類の眼刺激性試験法、Cytosensor Microphysometer™(CM)、Fluorescein Leakage(FL)及び Short time exposure (STE) 及び 1 種類の 3 次元培養モデル RhCE-TEST 法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”）』としてガイドライン化した¹¹⁾。

FL 法： 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。

CM 法： 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。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たが、2014 年 1 月の時点で CM 法はドラフトテストガイドラインの状態である¹²⁾。

STE 法： 単層培養細胞に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 STE 法 (Short time exposure) は、2010 年にバリデーションが終了し、2011 年に OECD において SPSF が承認された¹³⁾。NICEATM は、2013 年 6 月に化学物質や最終製品の眼傷害性ポテンシャルを同定するための *in vitro* 法として提案された STE 法のサマリーレビュードキュメント (Summary Review Document; SRD) を公開し

た^{14),15)}。SRD は NTP の 4 名の外部評価者に示され、SRD 作成に用いられた化学物質のデータベースは全般的に十分であるとされた。OECD は 2013 年にドラフトテストガイドラインを示し¹⁶⁾、2015 年 1 月 30 日を期限とした意見募集を終了した。

RhCE-TEST 法： EURL ECVAM と Cosmetics Europe により 3 次元培養モデル (EpiOcular™ EIT 及び SkinEthic™ HCE) のバリデーションが実施された^{17),18),19)}。EpiOcular™ EIT の固体化学物質用プロトコールは一部の合格基準を満たさなかったため、プロトコールの最適化及び追加バリデーションが実施され、2014 年に EpiOcular™ EIT の SPSF が承認された²⁰⁾。OECD は 2014 年にドラフトテストガイドラインを示し、2015 年 2 月 5 日を期限とした意見募集を終了した²¹⁾。

SIRC細胞毒性及び3次元培養真皮モデル

MATREX試験： JaCVAM第三者評価会議は SIRC細胞毒性試験/SIRC-CVS及び3次元培養真皮モデルMATREXを用いる試験に関する評価を実施し、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^{22),23),24)}。その後、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。

その他の 3 次元培養モデルを用いた試験法：

独立行政法人農業生物資源研究所等は、コーゲンビトリゲル膜チャンバーにヒト角膜上皮細胞株 (HCE-T 細胞) を三次元培養し構築したヒト角膜上皮モデルによる眼刺激性試験法 Vitrigel-EIT (Vitrigel-eye irritation test) について、国立医薬品食品衛生研究所、関東化学株式会社と共同で開発され^{25),26)}、バリデーションが進行中である。

従来のウサギを用いた眼刺激性試験の改訂：

有害性分類決定において3匹の動物を用いる修正 OECD TG405 を活用するため、米国連邦有害性物質法 (U.S. Federal Hazardous Substance Act; FHSA) の修正を目的として ICCVAM は眼有害性を分類するための動物利用数低減の推奨案を 2011 年 8 月に告示した²⁷⁾。改訂された基準では使用される動物数が 3 匹となるため、最大で 83%、少なくとも 50% の動物数の削減となる。NICEATM は 2012 年 10 月に評価報告書と推薦書が利用可能であり、関係政府機関に送られたことを発表した²⁸⁾。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。この推薦書に対しては 2013 年 3 月までに合意表明、あるいは関連試験研究が行われていない旨等の報告が複数の機関から ICCVAM に対して行われた^{29),30)}。

また、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^{31),32)}。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³³⁾。この TG405 改訂は、2013 年 10 月 25 日の JaCVAM 評価会議報告書にて行政上の利用が可能であることが示された³⁴⁾。2014 年 10 月 10 日から 31 日までのパブリックコメント募集を行い、2015 年 2 月 27 日に留意点として事務連絡が発出された。

C-6-4. 皮膚感作性

①概要

2014 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。

In chemico 及び *in vitro* 感作性試験代替法として DPRA¹⁾ と ARE-Nrf2 luciferase test²⁾ は 2015 年 2 月 5 日に OECD テストガイドラインとして採択された。h-CLAT³⁻⁵⁾ は EURL ECVAM のドラフトレコメンデーションが公開され⁶⁾、OECD ドラフトテストガイドラインも公開されている⁷⁾。

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。OECD では、2012 年に皮膚感作性の AOP に関するドキュメントが発表された⁸⁾。国際的にも AOP に基づいた、IATA (Integrated Approach on Testing and Assessment) が提案されており、近年、これまでに開発された複数の試験法を組み合わせた評価体系が報告されている⁹⁻¹²⁾。

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に企画された代替法ガイダンス検討会の活動については、第 27 回日本動物実験代替法学会の粧工連シンポジウムで報告した¹³⁾

②各試験法の状況

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。ARE-Nrf2 luciferase test は化学物質の曝露による Nrf2-ARE 経路の誘導に着目した試験法である²⁾。h-CLAT³⁻⁵⁾ 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。DPRA 及び ARE-Nrf2 luciferase test は、EURL ECVAM において承認され¹⁴⁾、OECD

ガイドラインとして収載された (TG442C、TG442D) ^{7, 15, 16)}。h-CLAT については、EURL ECVAM のドラフトレコメンデーションが公開され ⁶⁾、OECD ドラフトテストガイドラインも公開されている ⁷⁾。

IL-8 の転写活性を指標とした IL-8 Luc assay については、JaCVAM 主導のバリデーションが実施されている ¹⁷⁾。2014 年 12 月に行われた第 27 回日本動物実験代替法学会において、化学物質についての評価結果が報告された ¹⁸⁾。

その他、THP-1 細胞を用い、化学物質の曝露による細胞表面 SH 基の変化量に着目した SHtest¹⁹⁾や、3 次元培養皮膚モデルを用い、発現するストレス関連遺伝子を指標とした EpiSensA²⁰⁾、ナフタレン環を導入した 2 つのアミノ酸誘導体と化学物質との結合性を指標とした ADRA (Amino acid Derivative Reactivity Assay) 法 ²¹⁾などが報告されている。

近年、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。生体で起こる毒性発現における各段階のメカニズムを考慮して毒性全体を考えること (Adverse Outcome Pathway ; AOP) が提唱されている ²²⁾。OECD では、2012 年に皮膚感作性の AOP に関するドキュメントが発表された ⁸⁾。国際的にも AOP に基づいた、IATA (Integrated Approach on Testing and Assessment) が提案されており、近年、これまでに開発された複数の試験法を組み合わせた評価体系が報告されている ⁹⁻¹²⁾。

日本では、2012 年に JaCVAM と日本動物実験代替法学会の合同ワークショップが開催された ²³⁾。粧工連では、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、*in silico* システムや *in vitro* 試験ならびにこれらを組み合わせた評価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 ²⁴⁾。2013 年には Cosmetic Europe と第 52 回米国毒性学会 ²⁵⁾で報告した。

LLNA は、マウスを用いた *in vivo* 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、2002 年に OECD でテストガイドラインに収載された ²⁶⁾。このガイドラインは、その後、ハザード評価に使用するため使用動物数を削減した reduced LLNA (rLLNA) が追加され、2010 年に改訂されている ²⁷⁾。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 ²⁸⁾。日本では、医薬部外品の申請の際に審査側、申請側双方の代替法の利用促進につなげるため、代替法ガイダンス検討会が厚生労働省主導により企画された。この検討会では、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」の添付資料として発出された ²⁹⁾。また、OECD テストガイドラインとして収載されている放射性物質を用いない LLNA:DA ³⁰⁾ と LLNA:BrdU-ELISA ³¹⁾ についても同様にガイダンスが作成され、2013 年 5 月 30 日付で事務連絡「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ダンスについて」として発出された ³²⁾。これら LLNA3 種のガイダンス検討会での活動については第 27 回日本動物実験代替法学会の粧工連シンポジウムで報告した ¹³⁾。

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。2012年9月に日米欧医薬品規制調和国际会議（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⁾が定められた。その中で、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。

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。OECDガイドライン487については、2013年7月にアップデートが提案され、2014年9月に改訂が行われた³⁾。

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⁴⁾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⁵⁾。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。

Cosmetics Europeでは遺伝毒性試験に関するタスクフォースを設置し、3つのプロジェクトを行ってきた。“False Positives”プロジェクトは試験に使用するヒト由来細胞と感度の高い毒性測定法を組み合わせることにより、*in vitro*小核試験の予見性が劇的に改善できることを示して終了した。“3D Skin Model”プロジェクトは継続中であるが、ヒト再構築皮膚モデルを用いた小核試験はバリデーションが終了し、結果の分析中であり、コメットアッセイは2015年にバリデーション終了の予定である⁶⁾。どちらの方法も、施設内、施設間において高い再現性を示した。試験物質の数を増やし、さらなる再現性の評価を行っている。“Metabolism”プロジェクトでは皮膚に存在する異物代謝酵素（xenobiotic metabolizing enzymes）についての研究をプロテオミクス及びLC-MS/MSによる代謝物測定手法で行った。ヒト再構築皮膚モデルはヒト皮膚と同様の異物代謝酵素活性プロフィールを示し、遺伝毒性試験においてヒト再構築皮膚モデルを用いることの妥当性を確認して終了した。これらの結果は *Toxicology in vitro* 誌で発表されている⁷⁾。

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、更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 または 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。

EURL ECVAM は 2013 年に遺伝毒性試験における動物使用の削減のための戦略を公表しており、以下の2つの目標が掲げられている。1) *in vivo*でのフォローアップ試験を低減させるための*in vitro*試験バッテリーの性能の向上 2) *in vivo*試験での動物の使用の削減と最適化。

*in vitro*試験バッテリーの性能を向上させるための方法として、既存*in vitro*試験の改良、哺乳動物細胞を用いた*in vitro*試験の高い偽陽性の低減化、*in vitro*試験の組み合わせの最適化、現在開発中のある*in vitro*試験の評価、遺伝毒性データベースの作成、データ解釈のためのトレーニング、重みづけ評価のためのQSARツールの使用などが述べられている⁸⁾。

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、①SCR&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)、②HeMiBio(マイクロ流路を備えた肝臓型バイオリクター研究)、③DETECTIVE(*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)、④COSMOS(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)、⑤NOTOX(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)、⑥ToxBank(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)、⑦COACH(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ToxCast(Tox21)²⁾が進行しており、多数の*in vitro*ハイスループットアッセイとQSARを組み合わせた毒性評価法の構築が進められている。

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 委員会及び 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 ヶ年プログラムは、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)、VOL 2(2012)、VOL 3(2013)及び VOL 4(2014)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。2013 年の報告書では細胞機能をモニタリングするための測定システムに焦点が当てられた。ヒト心筋細胞クラスターにおける電気生理学

的機能を記録するシステムの最適化がなされた。更に、高度に成熟し、電気生理学的に活性のある神経ネットワークが微小電気配列に基づくシステムでモニターされ、確立された。このシステムは電極を用いて数日あるいは数週間以上も神経細胞をモニターが可能である。2014 年の報告書では、毒性試験に用いるための多能性幹細胞由来の神経モデルの開発に焦点が当てられた。分化のプロトコールを開発し、更に幹細胞由来の神経細胞の性質を十分に明らかにし、ベンチマークとなる神経細胞モデルと比較した。現在、この新しい幹細胞由来の神経細胞モデルは、反復投与毒性の研究に用いられている。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、更に *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 ヶ月以上生存するデバイスの開発を進めている。これまでは、バイオリアクターに取り入れられる細胞の表現型を評価する研究に進展が認められた。2014 年の報告書では、肝星細胞の性質の解析に進展が認められた。星細胞の活性化を制御するメカニズムが研究され、活性化を示したヒト精製、非培養の幹細胞型において第一の遺伝子と微小の RNA の発現プロファイル及び第一の遺伝子外の様相が得られた。更に、3 次元でオーバーフローさせたバイオリアクターを開発し、肝毒性の *in vitro* 高感度分析において 28 日間以上の細胞生存率のモニタリングを可能とした。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及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。これまでは、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞、初代ヒト肝細胞及び腎臓上皮細胞を含む種々の細胞モデルのデータが標準操作手順書を最適化し取得した。心筋細胞は 14

日まで良好な培養条件を維持可能であり、長期反復投与毒性試験の研究に展望が開けた。毒性を示す濃度のアセトアミノフェンを曝露した初代培養肝細胞のトランスクリプトーム及びプロテオーム解析で、数百の遺伝子及びタンパクが強く影響を受けることを示した。また、バイオマーカーとして多くのストレス応答経路に焦点をあて、GFP にタグをつけた HepG2 受容体細胞系を構築した。2014 年の報告書では、化学物質の肝毒性能を評価するための人皮膚由来前駆細胞に焦点が当てられた。肝由来の成長因子に基づく分化プロトコルを用いて皮膚前駆細胞へ肝前駆細胞の特性を獲得させた。この細胞はアセトアミノフェン曝露に対し、ヒト初代培養肝細胞と同等の応答を示した。一般的に上方制御の遺伝子は肝毒性の分子バイオマーカーとなる可能性があると考えられた。

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、及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。これまで、受容体結合の作用機序に対する分子モデリング技術を開発してきた。構造活性相関データ及び肝臓の X 受容体(LXR) の三次元モデルの実験情報が、LXR へ結合する親和性をモデル化するための基盤として検索、解析された。2013 年 12 月、COSMOS データベース ver1.0 がウェブで公開された。このデータベースは 4 万以上の単一構造をもつ 8 万以上の化学物質、及び 1600 以上の化学物質について 27 のエンドポイントによる 1 万 2000 以上の毒性研究のデータからなり、無料で利用可能である。これは、一般の安全性評価者だけでなく、SEURAT-1 パートナーをサポートする化学物質及び毒性データの中心システムでもある。データの質が評価され、データベースは使いやすいウェブインターフェースを通して検索可能である。検

索は化学物質、毒性又は両方のデータ、AOP フレームワーク内の分類によっても可能である。本活動の第二の重要な点は、化粧品への TTC アプローチの適用性の評価である。この目的に対して非発癌性物質のデータベースが企画され、決定樹のアプローチが化粧品の経皮曝露後の全身での生物学的利用率を評価するための指針として開発された。評価の際、毒性データの無い場合に経口での TTC を適用している。

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。2013 年の報告書では *in vitro* 毒性試験の手法として HepaRG の三次元器官培養の特性評価に焦点が当てられた。この器官培養は 3 週間以上、肝細胞特異的な機能 (アルブミン、尿素、ブドウ糖の生成並びに I、II、III 相酵素の活性) を維持していた。また、薬物で誘導される肝臓毒性を研究するための試験システムとして適切であることが示された。2014 年の報告書では、長期反復投与毒性研究のための HepaRG の *in vitro* 三次元器官培養に焦点が当てられた。種々の培養条件が試験され、細胞内流動が代謝的流動分析によって測定された。無血清及び血清補充条件が二次元培養及び三次元スフェロイドの長期培養 (30 日まで) に対して適切であった。三次元器官共培養の性質も確認された。これらの結果に基づいて、長期反復投与毒性スクリーニング研究が選択された化合物で実施された。その際、*in vitro* から *in vivo* への外挿のために経口での同等量の概念が用いられた。

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。ToxBank のデータ・ウェアハウスの暫定版が提供され、実験過程のデータ及びプロトコールが入手可能である。2014 年の報告書では SEURAT-1 の標準参照物質の統合的 omics 解析に焦点が当てられた。ToxBank のデータ・ウェアハウスにおいて新しいツールが実行に移された。「生データと加工データの容易な書き出し」、解析、視覚化、モデル化に加えて「分析と改良のための一般の生物情報学のツールとの統合」、「結果の把握とメタ分析の実施を支援するデータマイニングツール」が可能となっている。これに加えて、リードアクロス及び情報検索を支援するための化学構造の正確な検索法が加えられている。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。2014 年の報告書では、集団レベルでの調整活動、プロジェクト間の情報交換の促進及び集団レベルでの研究活動の普及について示されている。

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事長であった。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または最適化され、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、意見を募集したり。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。更に、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-βGlob-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及び雌雄前核の形成)

⑩マウス胚周圏着床試験

(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、心筋細胞及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。本試験法は未分化ES細胞から心筋細胞へ分化する過程で発現変動する遺伝子の中からHand1遺伝子の発現量をルシフェラーゼの発光量で簡便に測定可能な組み換えES細胞(Hand1-ES細胞)を用いたHand1-Luc Embryonic Stem Cell Test (Hand1-Luc EST)として、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いる。Hand1-Luc EST は、2013年2月にバリデーション試験が開始され、第27回日本動物実験代替法学会において、有用性の検証および進捗状況に関して報告された¹⁵⁾。この測定キットは、DSファーマバイオメディカルから、POCA Hand1-ESTの商品名で2015年1月から販売されている。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。

更に、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 -リボ酸、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場所である。

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⁾。ヒト副腎皮質由来の H295R 細胞のエストラジオールおよびテストステロン量を測定する H295R Steroidogenesis Assay は、2011年7月28日に OECD ガイドライン 456 として採択された²¹⁾。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 及び米国 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⁾。BG1Luc Estrogen Receptor

Transactivation (BG1Luc ER TA)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²²⁾。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ったが¹⁹⁾、中断されたようである。また、MELN アッセイは EURL ECVAM にてバリデート中、AR-Ecoscreen 法はバリデート中である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、ここ数年での代替法の承認は難しいと思われる。

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、皮膚代謝の有無、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^{4,5)}。

さらに「経皮吸収に関するガイダンス注記」⁶⁾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⁷⁾。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、人工脂質膜と再構築皮膚モデルが最も研究されており、EURO ECVAM の代替法の non-standard methods に関する包括レビュー⁸⁾、EURO ECVAM データベースに掲載されている^{9,10)}。

人工脂質膜を用いた皮膚人工膜透過性測定法 (PAMPA) は2012年にEURL ECVAM に申請された。1998年に開発された皮膚PAMPAは、ADME 及び経細胞透過性 (主として受動的透過) のスクリーニングに用いる *in vitro* 試験法である¹¹⁾。この方法は、この種の *in vitro* 透過性試験法としては最新の方法である。ヒト/動物皮膚組織を必要としない皮膚PAMPAには、皮膚の主な障壁であるヒト角質層 (SC) を再現するように特別に設計された人工膜が使用されている。この人工膜には、皮膚脂質基質の構成要素であるセラミドに構造的に類似した合成物質が含まれている。他の主要な脂質基質構成要素 (コレステロール及び遊離脂肪酸) もこの人工膜に含まれている¹²⁾。

SEURAT-1 プロジェクトのひとつであるCOSMOS の枠組みの中で、現在、経口から経皮への外挿に関連する皮膚PAMPAデータの解析が化粧品販売に対する法規制を背景として実施されている。透過性ないし浸透率は、一定時間インキュベーションした後にレシーバー側に含まれる被験化合物の割合を紫外/可視分光光度法、HPLC、LC/MS などの適切な分析法を用いて定量化して求める。*In vitro* ヒト皮膚透過性試験法と比較して皮膚PAMPAでは処理量が高く受動的透過性のみが測定されることも利点である。EURL ECVAMはこの試験法の予備申請の評価を行っている¹³⁾。

その他、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¹⁴⁾や薬物皮膚吸収の *in silico* 予測^{15,16)}、QSAR モデルについても報告されている^{17,18)}。

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¹⁹⁾。

COSMOS プロジェクトの枠内で、反復投与曝露下におけるヒト標的器官への作用を予測するために *in vitro* 法と *in silico* 法をどのように組み合わせて使用できるかを例示するケーススタディとして、特定の化学物質の研究が行われている。この研究には、皮膚透過性 QSAR モデルの開発のほか、投与経路間の外挿や IVIVE (*in vitro/in vivo* 外挿法) に用いる数学的モデルの開発が含まれる。細胞ベース試験法における化合物の動態及び動力学をシミュレートするために、バーチャル細胞ベース試験法モデルが開発された²⁰⁾。平行して、動態と動力学をシミュレートするラット/ヒトモデルが器官レベル (バーチャル肝臓) 及び全生物体レベル (PBTK) で開発された。さらに、これらのモデルを統合したマルチスケールモデリングを使用することで、肝細胞をバーチャル肝臓を介して生物体全体が結び付けることができる²¹⁾。

しかし、現在使用できる方法では、定量的安全性評価に必要なすべての情報を収集することはできない。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²²⁾。

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、単回投与毒性について、JaCVAM が急性毒性試験資料編纂委員会を組織し、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

の同定についての評価を開始したことである。本法は化粧品原料の評価への応用が期待されている。

眼刺激性については、改訂 ICE 法について化粧品・医薬部外品のためのガイダンス化が検討されていることが挙げられる。本法は先にガイダンス化がなされた BCOP よりも偽陽性率が低いという特長がある。また、STE 法および RhCE-TEST 法の OECD ドラフトガイドラインが公開された。

感作性については、DPRA と ARE-Nrf2 luciferase test が OECD テストガイドラインとして収載され、h-CLAT は OECD ドラフトテストガイドラインが公開されたことが挙げられる。

反復投与毒性については、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 が 4 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。

以上のように代替法の開発、標準化は、動物愛護及びそれに関わる規制への対応のために精力的に進められているが、結果的には高まるニーズを満たせない状況が続いている。

D. 結論

本年度の特筆すべき動きは、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える AOP (Adverse Outcome Pathway、有害機構経路)、総合的な試験戦略を考える ITS(Integrated Testing Strategies)および複数の試験法の組み合わせにより評価体系を構築する IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) の考え方にに基づき、OECD、EURL ECVAM、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)を初め様々な代替法関連活動において多数の報告、文書の発出がなされたことである。米国では動物実験代替法を盛り込んだ改訂版 PCPC 2014 Safety Evaluation Guidelines が発行された。

国内においては、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。また、日本化粧品工業連合会の安全性部会、動物実験代替専門部会を中心に「化粧品の安全性評価に関する指針」の改訂作業が開始されたことも挙げられる。

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、更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://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:EN:PDF>
- 4) http://europa.eu/rapid/press-release_IP-13-210_en.htm
- 5) http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/regulatory-framework/index_en.htm
- 6) <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2013:0135:FIN:EN:PDF>
- 7) http://www.effci.org/assets/files/EFFCI_PS/CO_LIPA-EFFCI.pdf
- 8) CTPA News update, February 6, 2003.
- 9) CTPA News update, March 3, 2003.
- 10) <http://bookshop.europa.eu/en/eurl-ecvam-status->

- report-on-the-development-validation-and-regulatory-acceptance-of-alternative-methods-and-approaches-2013-april-2014--pbLBNA26702/downloads/LB-NA-26702-EN-N/LBNA26702ENN_002.pdf;pgid=Iq1Ekni0.11SR0OOK4MycO9B0000QcrJi0v-;sid=BrpJSWqZId5JSD43kejX7gi8S9IXO21KAGk=?FileName=LBNA26702ENN_002.pdf&SKU=LBNA26702ENN_PDF&CatalogueNumber=LB-NA-26702-EN-N
- 11) http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/32662/1/echa_jrc_sla_report_public_05-09-14_withcover%20ipo.pdf
 - 12) https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/news/acute-mammalian-systemic-toxicity-testing-eurl-ecvam-releases-its-strategy/at_download/file1
 - 13) <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation>
 - 14) https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/public-comments/comments-h-CLAT/at_download/file1
 - 15) <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/>
 - 16) http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_002.pdf
 - 17) http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_003.pdf
 - 18) http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_156.pdf
 - 19) http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/1_3_partners.htm
 - 20) http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/1_about_epaa/1_2_governance/action_programme_2011-2015.pdf
 - 21) http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/news-events/index_en.htm
 - 22) <https://circabc.europa.eu/sd/a/223d7eac-ae99-4689-a16d-ae0b2c7ecc48/Stem%20Cells%20Forum%20Programme%203-4%20Sept%202014.pdf>
 - 23) http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/news-events/conferences/2014_en.htm
 - 24) http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm
 - 25) http://ec.europa.eu/enterprise/reach/index_en.htm
 - 26) <http://ecb.jrc.it/reach/>
 - 27) <http://www.nikkakyo.org/reach/>
 - 28) <http://www.seurat-1.eu/pages/library/seurat-1-annual-report.php>
 - 29) De Silva, O. et al., The COLIPA research programme. Abstracts 6th World Congress 2007, 279, 2007
 - 30) 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
 - 31) 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
 - 32) Pfuhrer, S. et al., Towards animal-free genotoxicity testing: the COLIPA strategy. Abstracts 6th World Congress 2007, 66, 2007
 - 33) 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
 - 34) 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
 - 35) 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)
 - 36) <http://chemicalwatch.com/20148/>
 - 37) <http://www.bfr.bund.de/>
 - 38) http://www.bfr.bund.de/en/publication/annual_reports-62595.html

- 39)<http://www.nc3rs.org.uk/>
- 40)<http://www.nc3rs.org.uk/news/minimising-and-improving-animal-use-next-decade>
- 41)<http://www.frame.org.uk/>
- 42)<http://www.forschung3r.ch/en/>
- 43)<http://www.forschung3r.ch/en/information/jb13.html>
- 44)ec.europa.eu/enterprise/epaa/
- 45)http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/news-events/conferences/2014_en.htm
- 46)<http://www.estiv.org/>
- 47)<http://www.estiv2014.org/satellite.html>
- 48)<http://www.estiv2014.org/satellite.html>
- 49)<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 79(134)/July 14, 2014/p40764-40765
- 2)<http://ntp.niehs.nih.gov/about/org/sacatm/meetings/docs/2014/september/index-3.html>
- 3)<http://ntp.niehs.nih.gov/about/org/sacatm/meetings/past/index.html#2014>
- 4)http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/about_ntp/sacatm/2014/september/presentations/02epa_508.pdf
- 5)http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/about_ntp/sacatm/2014/september/presentations/04askin_508.pdf
- 6)http://ntp.niehs.nih.gov/NTP/About_NTP/SACATM/2013/September/Presentations/02SACATM_ICCVAMNewVision_508.pdf
- 7)http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/about_ntp/sacatm/2014/september/presentations/04casey_508.pdf
- 8)<http://www.nature.com/srep/2014/140711/srep05664/pdf/srep05664.pdf>
- 9)http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/about_ntp/sacatm/2014/september/presentations/11vision_508.pdf
- 10)Federal Register 79(92)/May 13, 2014/p27323-27324
- 11)<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2014-05-13/pdf/2014-10892.pdf>
- 12)Federal Register 79(238)/December 11, 2014/p73603-73604
- 13)<http://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/3rs-meetings/commprac-2015/index.html>
- 14)<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2012-06-13/pdf/2012-14435.pdf>
- 15)Federal Register/77(114)/June 13, 2012/p353954-35396
- 16) <http://www.personalcarecouncil.org/>
- 17)<http://www.ascctox.org/meetings.cfm>
- 18)<http://events.r20.constantcontact.com/register/event?llr=pbddrfdab&oeidk=a07e7bvucyjcef2bdf>
- 19)<http://archive.constantcontact.com/fs120/1102918552623/archive/1114795632805.html>
- 20)<http://archive.constantcontact.com/fs120/1102918552623/archive/1119001020958.html>
- 21)<http://bd2k.nih.gov/#sthash.8ntq3vPn.dpbs>
- 22)<http://www.lincproject.org/>
- 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/46.pdf>
- 5)<http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/SOT11/ICATM/SOTsessionKoCVAM.pdf>
- 6)<http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/SOT11/ICATM/StokesICATM-OverviewV4.pdf>
- 7)<http://www.asas.or.jp/jsaae/pdf/CAMSEC.pdf>
- 8)<http://www.reach24h.com/jp/newcenter/256-korea-functional-cosmetics.html>
- 9)<http://indiatoday.intoday.in/story/taking-the-lead-india-becomes-first-south-asian-country-to-ban-animal-testing-for-cosmetics/1/285891.html>
- 10)<http://www.business-standard.com/article/news-ians/government-bans-import-of-animal-tested-cos>