

厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
分担研究報告書

「代替法の利用」のための考え方の整理、提案

研究分担者 高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官
研究分担者 塩谷恭子 国立循環器病研究センター研究所 室長

研究要旨

「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」をふまえた動物実験の適正な実施を推進していくために、国内外の「代替法の利用」の現状、考え方や課題を整理した。現在の代替法の定義には **Russel** と **Burch** の定義と乖離があり、現在の定義について慎重な検討を求める意見があった。代替法はこれまでに皮膚刺激性、眼刺激性および皮膚感作性といった局所に対する毒性を中心に開発され、安全性評価に使用されているが、さらなる精度の向上や、より適用範囲の広い試験法が望まれた。また、全身毒性を評価する代替法はいまだ十分に確立されておらず、急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、発がん性、生殖発生毒性、呼吸器感作性等を評価できる代替法の開発が待たれる。有効性、安全性、及び毒性試験を行政的に受け入れる場合は、バリデーションされた代替法が重要である。国内においては日本動物実験代替法評価センター（**JaCVAM**）が中心となって研究を進めている。既存の代替法に関しては、感度や特異性がより高く、適用範囲がより広くなるべく改良を進めていく必要がある。一方、全身毒性のように複数の機序により生じる可能性のある毒性を単一の代替法により置き換えることは容易ではないと思われることから、用いる代替法の限界を正しく認識するとともに、複数の試験を統合した試験スキームの開発（フローチャート）やその評価及び最適化についての研究を進めていく必要がある。

A. 研究目的

厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（以下、基本指針とする。）をふまえた動物実験の適正な実施を推進していくために、「代替法の利用」の現状、考え方や課題を整理し、厚生労働省管轄の研究機関等が今後どのような考え方で代替法に対応すればよいかを提案していく。

B. 研究方法

文献等の調査により、国内外での代替法の利用に関する現状について把握するとともに国立医薬品食品衛生研究所内に設置された日本動物実験代替法評価センター（**JaCVAM**）や日本動物実験代替法学会等の取り組みについて広く把握する。また、代替試験法国際協力（**ICATM**）の取り組みや **OECD** ガイドライン、**ICH** 等の情報を収集し国内外の状況を整理する。得られた各種情報について、分析・整理することで、「今やるべきこと」を認識して、そこにたどり着

くための「考え方」をまとめる。

C. 研究結果

1. 代替法の定義等について

1) 代替法の対象となる動物

代替法に関しては、動物の愛護及び管理に関する法律の第四十一条「動物を教育、試験研究又は生物学的製剤の製造の用その他の科学上の利用に供する場合には、科学上の利用の目的を達することができる範囲において、できる限り動物を供する方法に代わり得るものを利用すること…」と記されている。ここで言う代替の対象となる動物は実験動物を想定しているが、実験動物の範疇については諸外国で若干相違があった。多くは、動物実験の対象動物種をすべての脊椎動物とするものであるが、英国などは脊椎動物に加えて頭足類(タコ、イカ等)を加えている。我が国の実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準の解説(環境省)では「この基準は、動物実験に使うすべての動物にあてはめるべきであるが、ここでは哺乳類、鳥類及び爬虫類に属する動物を対象としている。しかし、実験に使われる他の動物種が本基準に無関係であるということではない」とされており、哺乳類、鳥類及び爬虫類に加えて、両生類や昆虫等も広義には実験動物に包含される。

2) 代替法の分類

代替法の分類に関しては、同じく実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準の解説の中で「動物実験等の実施に際し、実験の目的を達成することができる範囲において、すなわち実験の精度や再現性を確保できる範囲で、できる限り生きた動物個体を利用する方法に代わる代替法の

利用を検討しなければならない。また、生きた動物を用いる場合でも、より侵襲性の低い方法、系統発生的に下位の動物種や苦痛を感じる神経系の発達が乏しい動物種への置換も広義の代替法と見なすことができる」と記載されている。すなわち、代替法には完全な代替(生きた動物を使用しない)と部分的な代替(生きた動物を使用する)の二つが存在することが明記されている。同様に **NC3Rs**(英国国立 **3Rs** 代替法センターも代替法を二つに分類している(資料 D1-表1))。

3) 代替法の定義

動物実験の代替法の定義に関しては日本動物実験代替法学会では「動物を用いる試験を、動物を用いない、あるいは系統発生的下位動物を用いる試験法により代替すること」としており、**OECD**、もほぼ同様である。一方、**3Rs**の提唱者である **Russel** と **Burch** は代替先として「高等植物、微生物、および神経系と感覚系がほとんど萎縮している、より退化した後生動物の内部寄生虫が含まれる」としており(資料 D1-表2)、現在の代替法の定義と乖離が見られる。すなわち **Russel** と **Burch** らが想定しているのは痛みや苦痛を感じない動物を使用することを想定しているのに対して、現在では系統発生的に下位動物を使用することになっているものが多い。

2. 「代替法の利用」のための考え方の整理、提案

「代替法の利用」の実現には、情報収集、毒性発現メカニズム研究の推進とそのメカニズムに立脚した新規代替法の開発、既存の代替法の改良、国際的なバリデーシヨンの実施、高い予測性、用いる代替法の限界に

ついで知識、適用範囲、コスト、再現性、技術的問題の解決、動物実験との組み合わせによる最適化、行政側の受け入れ等についての十分な検討が必要となる。さらに、動物を併用する場合には「使用動物数の削減」、「苦痛の軽減」など他の 3Rs の項目と三位一体となって推進する必要がある。

3. 代替法の種類と導入状況

1) 代替法の種類

代替法の種類に関しては多くの報告があるが、1999 年のボロニア宣言でまとめられたものを資料 D1-表 3 に示した。カテゴリーとしては、既知情報、数学モデル、培養細胞、非脊椎動物、非哺乳類動物、発生初期の脊椎動物、ヒトでの研究に大別されている。

2) 毒性試験の代替法

毒性試験の代替法としては、すでに OECD でいくつかの試験法がガイドライン化され各国で使用されている。分類としては、皮膚腐食性試験、皮膚刺激性試験、光毒性試験、眼刺激性試験、皮膚感作性試験、内分泌かく乱スクリーニング、遺伝毒性試験、経皮吸収試験などがある（資料 D1-表 4）。これらのテストガイドラインの内、我が国で開発されたものを資料 D1-表 5 に示した。また OECD への代替法の提案にあたっては国立医薬品食品衛生研究所内に設置された JaCVAM が大きな役割を果たしている。JaCVAM の設立経緯、目的、業務をまとめたものを資料 D1-表 6 に示した。また、JaCVAM と代替法に関係する海外の提携機関を資料 D1-表 7 に示した。さらに JaCVAM のこれまでの成果として、行政に受け入れを提案した試験法を資料 D1-表 8 に示した。最後に JaCVAM で現在進行中の試験法を資料 D1-表 9 に示す。

これまで毒性試験の代替法で行政に受け入れられたものは局所への影響を見る試験がほとんどであった。しかし、2019 年に急性経口毒性を予測するための *in vitro* 細胞毒性試験に関する提案がされた（資料 D2）。提案書に記載されているように、今後、本試験法の利用が想定されるのは、「毒物および劇物取締法」における劇物を含む製剤の除外申請、医薬部外品の製造販売承認申請および化粧品のポジティブリストの改正要請である。

- ・化粧品・医薬部外品における代替法の導入状況についてはガイダンスという形で厚生労働省からの通知で発出されているものを資料 D1-表 10 に示した。

- ・毒物劇物における代替法の導入状況については、判定基準の改定を資料 D3 から抜粋したものを資料 D1-表 11 にまとめた。

- ・農薬における代替法の導入状況に関しては農薬の登録申請において提出すべき資料について（平成 31 年 3 月 29 日付け 30 消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知）（資料 D4）の中で、皮膚刺激性、眼刺激性、皮膚感作性について代替法が提示されている。また、別添中に「動物愛護の観点から、実験動物を用いない代替法が確立している場合は、当該試験方法を積極的に採用する」と記載されており、今後農薬においても代替法の使用が進むと思われた。また、狭義での動物実験代替法とは言えないが、食品安全委員会が農薬の食品健康影響評価におけるイヌを用いた 1 年間反復経口投与毒性試験の取扱いについて（平成 29 年 12 月 21 日 農薬専門調査会決定）（資料 D5）で、イヌの亜急性毒性試験を含む既存のデータからイヌを用いた慢性毒性試験を省略

出来る条件をまとめたことは、動物数の削減であると同時に広義で代替法ととらえることが出来よう。

・医薬品における代替法の導入状況に関しては、ICH（医薬品規制調和国際会議）により医薬品規制に関するガイドラインが作成されている。代替法に関連するものとして ICS S1(医薬品のがん原性試験に関するガイドライン)での結果を反映して医薬品のがん原性試験に関するガイドラインの改正について（平成 20 年 11 月 27 日）が通知されている。その中で、「あまり頻回使用されない医薬品や適用が短時間に限られる医薬品（例えば麻酔薬や放射性造影剤など）は、がん原性が懸念されなければがん原性試験を必要としない」と記載している。これらも狭義には動物実験代替法ではないが、既存の情報を元にがん原性試験の実施を回避していることから、広義には代替法ととらえることが出来よう。また短期・中期 *in vivo* げっ歯類試験系の使用についても触れられている。生殖発生毒性に関しては、ICH S5（R3）（医薬品の生殖発生毒性試験ガイドライン）の改定が 2020 年 2 月になされた。その中で、代替法の発生毒性評価が限定された条件で認められた。具体的な代替法は提示されていないが、代替法を使用する際のフローチャートが示された（資料 D1-図 1）。この ICH S5（R3）の改定を受けて厚生労働省は 2021 年 3 月に「医薬品の生殖発生毒性評価に係るガイドライン」についての通知がなされた。その中では動物実験の 3R（使用動物数の削減／苦痛の軽減／代替試験法の利用）の原則に従って、生殖発生毒性評価に関する見直しを行ったこと、基本的な考え方（一般原則、ガイドライ

ンの適用範囲、生殖発生毒性評価に関する一般的考慮事項、哺乳類を用いた *in vivo* 試験のデザインと評価、試験系の選択、用量設定・投与経路・投与スケジュール、データの報告及び統計、リスク評価の原則など）をガイドライン本文に記載するとともに、哺乳類を用いた *in vivo* 試験のデザインや代替試験法の詳細を附属書に掲載されている。

3) その他の代替法

・ワクチンの代替法に関しては国立感染症研究所が中心となって力価試験の *in vivo* 試験から *in vitro* 試験への移行の研究が進められている。また、海外では VAC2VAC という団体が代替法の開発を推進している（資料 D1-表 12）。

・下痢性貝毒の試験法についてはマウスから機器を用いる試験法に代替することが平成 27 年に厚生労働省から通知された（麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取扱いについて：厚生労働省通知平成 27 年 3 月 6 日）。一方、麻痺性貝毒については代替法の研究開発途上である。

4.代替法のバリデーション方法

動物実験代替法を行政的に受け入れるためにはバリデーションが重要である。動物実験代替法のバリデーション方法については大野によりまとめられている（資料 D6）。その中で、「バリデーションとは動物を用いる安全性試験の結果はヒトに外挿できるという前提の基で利用されているが、常に、薬物の体内動態や標的臓器の薬物感受性における種差を考慮しなくてはならない。一方、*in vitro* 安全性試験代替法では、ヒト由来の組織を用いることにより、ヒト特異的な反応を観察することが可能であるが、*in*

vivo にあった時とは細胞の特性が変化していることが多い。また、適用可能な被験物質や得られる情報の範囲に動物実験以上に多くの限界がある。例えば、培養細胞を用いる試験法の多くは揮発性物質や不溶性物質、また、毒性発現に代謝活性化を要する物質などの評価が苦手である。色素は毒性指標の測定を妨害する事がある。また、in vivo 法とは異なり、吸収・分布・排泄の過程が欠如している。これらの特徴を認識せずに利用すると大きな過ちを犯す可能性がある。従って、国レベルで、或いは国際的な方法として、新たな代替試験法を取り入れるためには、適正に行われたバリデーションに基づいて、その妥当性と限界が明確に示される必要がある」と指摘している。また、OECD でまとめられた安全性評価のための動物実験代替法の最低基準の要約と安全性評価のための動物実験代替法の行政的受け入れ基準の要約をそれぞれ、資料 D1-表 13 と表 14 に示した。バリデーションの具体的な内容に関しては、JaCVAM でのバリデーション実行委員会が行う主な確認事項が小島によりまとめられている(資料 D1-表 15)。その中では、適切な化学物質の選択、施設内や施設間の良好な再現性が必要となる。また、一定以上感度や特異性も要求されている。なお、感度や特異性についての説明を資料 D1-表 16 に示した。感度とは陽性物質を陽性と判定する能力、特異性は陰性物質を陰性と判定する能力、精度とは総合判定能力である。それぞれ 100%であれば理想的であるが、現実的には完全な代替法は存在しない。最後に、JaCVAM の行政提案のための体制を資料 D7 に示した。

D. 考察

厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針をふまえた動物実験の適正な実施を推進していくために、「代替法の利用」に対する考え方や課題を整理し、厚生労働省管轄の研究機関等が今後どのような考え方で代替法に対応すればよいかを考察した。代替法の定義等について実験動物の範疇については諸外国で若干相違があった。多くは、動物実験の対象動物種をすべての脊椎動物とするものであった。動物実験の代替法の定義に関しては日本動物実験代替法学会や OECD では「動物を用いる試験を、動物を用いない、あるいは系統発生的下位動物を用いる試験法により代替すること」としている。一方、3Rs の提唱者である Russel と Burch は代替先として「高等植物、微生物、および神経系と感覚系がほとんど萎縮している、より退化した後生動物の内部寄生虫が含まれる」としており、現在の代替法の定義と乖離が見られた。すなわち Russel と Burch らが想定しているのは痛みや苦痛を感じない動物を使用することを想定しているのに対して、現在では系統発生的に下位動物を使用することになっている。そこでは無脊椎動物は苦痛や痛みを感じない、あるいは感じにくいということが前提となっていると思われる。しかしながら、最近の研究ではショウジョウバエで痛みを感じていることを示唆する論文が報告されており (Khuong TM et al., Sci Adv. 2019 Jul; 5(7): eaaw4099)、また、無脊椎動物は侵害受容器を有しており、侵害受容行動を起こすことが知られており (小山なつ等、日本生理誌、61、261-278, 1999)、無脊椎動物は苦痛や痛みを感じない、

あるいは感じにくいということを前提にしているとすれば問題である。このことに関連して、SCAW（北米の科学者の集まり；Scientists Center for Animal Welfare）の動物実験処置に関する苦痛分類の中に「無脊椎動物も神経系を持っており、刺激に反応する。従って無脊椎動物も人道的に扱われなければならない」と記載されており、少なくとも「系統発生的に下位動物を使用する」にあたっては人道的な扱い要求されることを理解しておく必要がある。また、極端な例をあげれば、系統発生的に下位動物という文言をそのままのみにしてしまうと、下顎を有するニホンウナギの代わりに下顎の無い（系統発生的に下位動物）ヤツメウナギを使うのが代替法ということになろう。Tannenbaum らは代替法を含む 3Rs の現在の定義が Russel と Burch の元の定義と乖離している場合、これらの定義は慎重に検討されるべきであると提唱している（J Am Assoc Lab Anim Sci. 2015 Mar;54(2):120-32.）。

「代替法の利用」の実現には、ボロニア宣言や OECD のレポート等を参考にし、情報収集、毒性発現メカニズム研究の推進とそのメカニズムに立脚した新規代替法の開発、既存の代替法の改良、国際的なバリデーションの実施、高い予測性、用いる代替法の限界についての知識、適用範囲、コスト、再現性、技術的問題の解決、動物実験との組み合わせによる最適化、行政側の受け入れ等についての十分な検討が必要となる。さらに、動物を併用する場合には「使用動物数の削減」、「苦痛の軽減」など他の 3Rs の項目と三位一体となって推進する必要がある。

毒性試験の代替法としては、すでに OECD でいくつかの試験法がガイドライン化され各国で使用されている。分類としては、皮膚腐食性試験、皮膚刺激性試験、光毒性試験、眼刺激性試験、皮膚感作性試験、内分泌かく乱スクリーニング、遺伝毒性試験、経皮吸収試験などがある。OECD への代替法の提案にあたってはわが国では JaCVAM が大きな役割を果たしていた。これまで毒性試験の代替法で行政に受け入れられたものは局所への影響を見る試験がほとんどであった。しかし、2019 年に急性経口毒性を予測するための *in vitro* 細胞毒性試験に関する提案がなされた。化粧品・医薬部外品では代替法は導入されていた。また、毒物劇物、農薬では代替法が導入されつつある。医薬品に関しても発がん性や生殖発生毒性の分野で検討が進められていた。下痢性貝毒の試験法については平成 27 年にマウスから機器を用いる試験法に代替された。一方、麻痺性貝毒については代替法の研究開発途上であった。このことに関して大城は「代表的成分であるサキシトキシン（STX）は、「化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律（平成 7 年 4 月 5 日法律第 65 号）」に規定される特定物質であり、使用や製造、所持が規制されており、これが機器分析移行のうえでの大きな障害となっている。また、STX 群は CODEX STAN 234-1999 に化学分析法の性能基準が規定されているものだけでも 15 物質と多く、標準品の安定的供給体制が大きな課題である。」と代替法導入における問題点を指摘している（JSM Mycotoxins 2018; 68 (1) :49-53）。

代替法の限界については大野により「毒

性発現に代謝活性化を要する物質などの評価が苦手である。色素は毒性指標の測定を妨害する事がある。また、**in vivo**法とは異なり、吸収・分布・排泄の過程が欠如している。これらの特徴を認識せずに利用すると大きな過ちを犯す可能性がある云々」と既に指摘されているとおりである。代替法の適用をさらに広げていくためには本来は陽性であるのに代替法で陰性となる、いわゆる偽陰性を少なくする必要がある。一つの手法としては複数の代替法を組み合わせることで改善が期待される。一方で、完全に偽陰性をなくすことは難しい。特に、医薬品のように代替法による見落としによりサリドマイドによる奇形発生のような薬害を引き起こすようでは代替法の普及は進められない。そのため **ICH S5** の生殖発生毒性(医薬品の生殖発生毒性試験ガイドライン)の改定が **2020** 年 **2** 月になされた。その中で、代替法の発生毒性評価が限定された条件で認められた。代替法を使用する際のフローチャートが示された。すなわち、代替法と動物実験を併用した試験系である。これにより、代替法の導入が容易となると考えられる。すなわち、代替法とともに(医薬品に限らないが)動物実験を行う、あるいは、行わない条件を決めておき、合意しておくことが動物実験を代替法に置き換えることを促進するためには有効である(資料 **D1**-表 **17**)。

E. 結論

1. 代替法はこれまでに皮膚刺激性、眼刺激性および皮膚感作性といった局所に対する毒性を中心に開発され、安全性評価に使用されているが、さらなる精度の向上やよ

り適用範囲の広い試験法が望まれる。

2. 全身毒性を評価する代替法はいまだ十分に確立されていない。急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性等を評価できる動物実験代替法の開発、発がん性、生殖発生毒性、呼吸器感作性を評価できる動物実験代替法の開発が待たれる。

3. 行政的な有効性、安全性、及び毒性試験の場合においては、バリデーションされた代替法を提供することを目指した研究が奨励される。

4. 現在の代替法の定義には **Russel** と **Burch** の定義と乖離があり、現在の定義について慎重な検討を求める意見があった。

5. 複数の機序により生じる可能性のある毒性を単一の代替法により置き換えることは容易ではないと思われることから、用いる代替法の限界を認識するとともに、段階的な試験戦略や複数の試験を統合した試験スキームの開発(フローチャート)やその評価及び最適化についての研究が推奨される。

6. 「代替法の利用」の実現には、情報収集、上記バリデーションの実施や動物実験との組み合わせによる最適化等についての十分な検討が必要となる。動物を併用する場合には「使用動物数の削減」、「苦痛の軽減」など他の **3Rs** の項目と三位一体となって推進する必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. その他

(予定を含む。)

該当なし

1. 特許取得

該当なし

参考資料

JaCVAM（日本動物実験代替法評価センター）のホームページ (<https://www.jacvam.jp/>)

日本動物実験代替法学会のホームページ (www.asas.or.jp/jsaae/)

英国 NC3Rs センターのホームページ (www.nc3rs.org.uk)

国立医薬品食品衛生研究所のホームページ (www.nihs.go.jp/index-j.html)

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構のホームページ (<https://pmda.go.jp>)

資料D-1

分担報告書「代替法の利用のための考え方の整理、提案（研究分担者：高木篤也、塩谷恭子）」に関連した図表（図1-1、2、表1～17）

図1-1

代替法の利用例1 ークラス、作用機序から催奇形性、胚・胎児致死性が高く予測される医薬品の場合 (ICH S5 (R3))

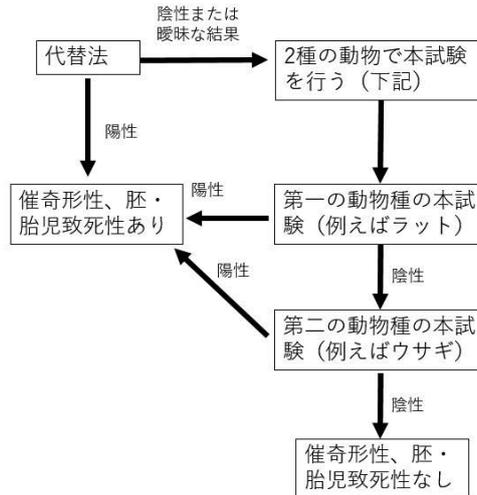


図1-2

代替法の利用例2 ー身体機能を著しく損なう、または生命を脅かす疾患あるいは高齢期に発症する疾患の治療を目的とした医薬品 (ICH S5 (R3))

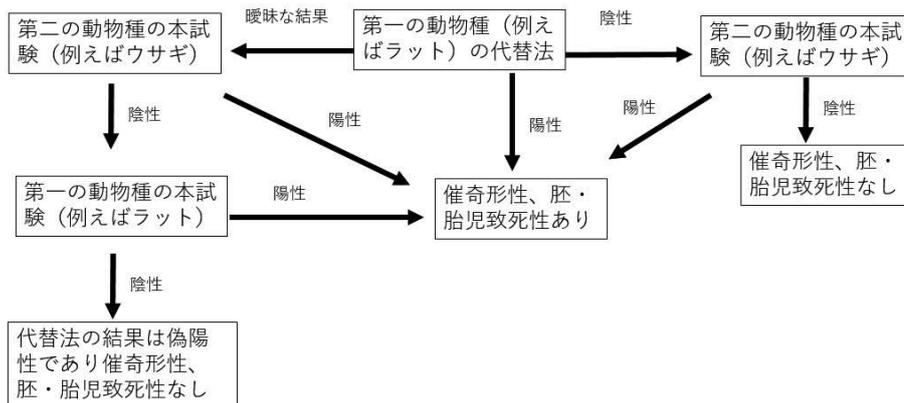


表1 代替法の分類

カテゴリー	説明
完全な代替	完全な代替は、いかなる実験動物の使用を回避する。これには、人間のボランティア、組織と細胞、数学的モデルとコンピューターモデル、および樹立された細胞株の使用が含まれる。
部分的な代替	部分的な代替には、現在の科学的思考に基づいて、苦痛を経験することができると考えられていないいくつかの動物の使用が含まれる。これには、ショウジョウバエ、線虫、細胞性粘菌などの無脊椎動物、および未成熟な形態の脊椎動物が含まれます。部分的な置換には、この目的のためだけに殺された動物から採取された初代細胞（および組織）の使用も含まれます（つまり、苦痛を引き起こす科学的手順で使用されていない）。

NC3Rs(英国国立3Rs代替法センター)ホームページより

表2 代替法の定義における置き換え先生物の比較

カテゴリー	説明
RussellとBurch	我々は、実験の歴史の中で、意識のある生きた脊椎動物を使用する方法に取って代わる可能性のある、非感覚的な材料を使用するあらゆる科学的方法に対して、「置換技術」という用語を使用するものとする。この非感覚物質の中には、高等植物、微生物、および神経系と感覚系がほとんど萎縮している、より退化した後生動物の内部寄生虫が含まれる。
英国3Rセンター	部分的な置換には、現在の科学的思考に基づいて、苦痛を経験することができると考えられていないいくつかの動物の使用が含まれる。これには、ショウジョウバエ、線虫、社会的アメーバ（細胞性粘菌）などの無脊椎動物、および未成熟な形態の脊椎動物が含まれます。部分的な置換には、この目的のためだけに殺された動物から採取された初代細胞（および組織）の使用も含まれる。
日本動物実験代替法学会	動物を用いる試験を、動物を用いない、あるいは系統発生的下位動物を用いる試験法により代替すること。
ポロニア宣言(1999)	知覚機能の乏しい、より低級動物の使用(例、無脊椎動物、植物、微生物)
OECD(2005)	動物実験を非動物系または系統発生的に低い種を使用するものに置き換えること。

表3 代替法の種類

カテゴリー	説明
既知情報、数学モデル等	<ul style="list-style-type: none"> ・すでに実施されている動物実験の情報の保存、交換、使用の改善。このため、不必要な実験の繰り返しを避けることができる。 ・物理的および化学的手法の使用、および分子の物理的および化学的特性に基づく予測の使用。 ・構造活性相関のモデリング、分子モデリングとコンピューターグラフィックスの使用、生化学的、薬理的、生理学的、毒物学的、行動学的プロセスのモデリングを含む、数学的およびコンピューターモデリングの使用。
培養細胞	<ul style="list-style-type: none"> ・短時間維持が可能な灌流臓器、組織スライスおよび細胞懸濁液、ならびに適切な細胞および組織培養を含む、インビトロ試験法の使用。ほとんどのinvitro研究では、避けられない倫理的、法的小および安全性の考慮事項が完全に満たされている場合、実験動物から分離されたものよりもヒトの細胞および組織を優先して使用する必要がある。
非脊椎動物	<ul style="list-style-type: none"> ・感覚が制限された「下等」生物（無脊椎動物、植物、微生物など）の使用。
非哺乳類動物	魚類（ゼブラフィッシュ等）、鳥類（ニワトリ胚等）
発生初期の脊椎動物	<ul style="list-style-type: none"> ・脊椎動物の実験的およびその他の科学的目的での使用が管理される段階に達する前の、脊椎動物の初期発生段階の使用。
ヒトでの研究	<ul style="list-style-type: none"> ・疫学、市販後調査、および倫理的に承認された人間のボランティアを含む人間の研究。

ポロニア宣言（1999）より抜粋

表4 動物実験代替法に関するOECDテストガイドライン

分類	試験法
皮膚腐食性試験	CORROSITEX Skin Corrosivity Test :TG435 In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method :TG431 In vitro skin corrosion : Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER) :TG430
	In vitro reconstructed human epidermis (RHE) test methods, EpiDerm, EpiSkin, SkinEthic LabCyte EPI Model : TG439
皮膚刺激性試験	3T3 NRU Phototoxicity Test :TG432 Reconstructed human Cornea like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage: TG492 Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying () Chemicals Inducing Serious Eye Damage and (i) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage: TG491 Fluorescein Leakage (FL) test method: TG460
	Fluorescein Leakage (FL) test method: TG460 Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method: TG438 Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method :TG437 Eye Irritation/ Corrosion TG405
眼刺激性試験	Nonradioactive LLNA protocol, LLNA:DA :TG429A Nonradioactive LLNA protocol (LLNA: BrdU ELISA) :TG442B In Chemico Skin Sensitisation Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) :TG442C
	In Vitro Skin Sensitisation ARE Nr2 Luciferase Test Method :TG442D In Vitro Skin Sensitisation h-CLAT :TG442E Updated Murine local lymph node assay (LLNA) for skin sensitization :TG429
単回投与毒性試験	Inhalation toxicity acute toxic class method : TG436 Up and Down Procedure (UDP): TG425 Acute Toxic Class Method (ATO) : TG423
	Fixed Dose Procedure (FDP) : TG420 Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Androgen Receptor Test Performance Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) In Vitro Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity :TG493
内分泌かく乱スクリーニング	H295R Steroidogenesis Assay :TG456 Performance Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists Test TG455
	In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene : TG490 In vitro micronucleus test : TG487 In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test : TG473 Bacterial Reverse Mutation Test : TG471 Skin Absorption: In Vitro Method : TG428
遺伝毒性試験	
経皮吸収試験	

JaCVAMホームページより引用

表5 日本で開発された代替法にかかわるOECDテストガイドライン

Test No.	試験法	年
TG442A	Skin sensitization: Local lymph node assay: DA, OECD TG442A, 2010	2010
TG442B	Skin sensitization: Local lymph node assay: BrdU-ELISA or -FCM.	2010
TG439	In vitro skin irritation: Reconstructed human epidermis test method, LabCyte EPI-Model24	2013
ICH S10	ROS (Reactive Oxygen Species) Assay for Photosafety	2013
TG489	In vivo mammalian alkaline comet assay.	2014
TG491	Short time exposure in vitro test method for identifying (i) chemicals inducing serious eye damage and (ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage.	2015
TG455	Performance-based test guideline for stably transfected transactivation in vitro assays to detect estrogen receptor agonists and antagonists, the stably transfected TA (STTA) assay using the (h) ER α -HeLa-9903 cell line.	2016
TG458	Stably transfected human androgen receptor transcriptional activation assay for detection of androgenic agonist and antagonist activity of chemicals, AR-Ecoscreen	2016
TG442E	In vitro skin sensitisation assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation, human cell line activation test (h-CLAT).	2016
GD231	In vitro Bhas 42 cell transformation assay (Bhas 42 CTA).	2016
TG442E	In vitro skin sensitisation assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation, IL-8 Luc assay.	2017
TG492	Reconstructed human cornea-like epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage, LabCyte Cornea-Model24.	2018
TG494	Vitri- eye irritancy test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage.	2019
TG431	In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method, LabCyte EPI-Model24.	2019
TG442C	In chemico skin sensitisation assays addressing the adverse outcome pathway key event on covalent binding to proteins, ADRA (amino acid derivative reactivity assay).	2019
TG495	ROS (reactive oxygen species) assay for photoreactivity.	2019

JaCVAMホームページより引用

表6 JaCVAM

経緯	平成17年(2005年)11月 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センターにJaCVAM(日本動物代替法評価センター)を設置。
目的	化学物質等の業務関連物質の安全性評価において、国民の安全を確保しつつ、動物実験に関する3Rs(Reduction: 削減、Refinement: 苦痛の軽減、Replacement: 置き換え)の促進に資する新規動物実験代替法を行政試験法として、可能な範囲での導入に貢献することである。これにより、我が国の医薬品等の製造販売承認申請資料の作成及び審査、化粧品基準の改正並びに化学物質、農薬の適正な規制策にも寄与する。
業務	1.業務関連物質の安全性に係る試験法の有用性とその限界及び行政試験法としての妥当性についての評価する。 2. それに必要なリレーションを実施するとともに、関連分野における国内及び国際協力並びに国際対応に携わる。

JaCVAMホームページより引用

表7 国内外の代替法評価機関

機関名	正式名	母体	成立年
JaCVAM	日本動物実験代替法評価センター(Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)	日本	2005
ECVAM	欧州動物実験代替法評価センター(European Center for the Validation of Alternative Methods)	EU	1991
ICCVAM	米国動物実験代替法検証省庁間連絡委員会(Intergency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)	米国	1994
KoCVAM	韓国動物代替法評価センター(Korean Center for the Validation of Alternative Methods)	韓国	2009
ICATM	代替試験法協力国際協力(International Cooperation on Alternative Test Methods)	日、米、欧、カナダ、韓国	2009

表8 JaCVAMが行政に受入れを提案した試験法

No.	試験法	年月
1	腐食性試験法 VitroLife-SkinTM	2008年6月
2	皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA法)	2008年11月
3	ニワトリ抽出眼球を用いた眼刺激性試験法(ICE法: Isolated Chicken Eye Test)	2009年12月
4	牛抽出角膜を用いた眼刺激性試験代替法(BCOP法: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test)	2009年12月
5	ヒト皮膚モデル(3次元皮膚モデルEPISKIN)を用いた皮膚刺激性試験代替法	2010年5月
6	皮膚感作性試験代替法(LLNA-BrdU法)	2010年5月
7	単回投与毒性試験代替法	2011年6月
8	皮膚刺激性試験代替法EpiDermおよびSkinEthics	2013年1月
9	皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA法)	2013年1月
10	皮膚感作性試験代替法(LLNA-BrdU-ELISA法)	2013年1月
11	皮膚感作性試験代替法(LLNA法)	2013年1月
12	眼刺激性試験代替法フルオレセイン漏出試験法	2013年1月
13	皮膚刺激性試験代替法LabCyte EPI-MODEL24	2013年11月
14	改訂OECD TG No.437牛抽出角膜の混濁および透過性試験法(BCOP)法: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test	2014年1月
15	改訂OECD TG405: ウサギを用いる眼刺激性試験法	2014年1月
16	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BG1 Luc ER TA 法	2014年1月
17	In vitro 皮膚透過試験	2014年1月
18	2013年改訂 OECD TG 438ニワトリの抽出眼球を用いた眼刺激性試験(ICE 法: Isolated Chicken Eye Test)	2015年1月
19	皮膚感作性試験代替法 Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA): ペプチド結合性試験	2015年3月
20	皮膚感作性試験代替法 角化細胞株レポーターアッセイ	2015年8月
21	光安全性評価法 ROSアッセイ	2016年1月
22	眼刺激性試験代替法 In vitro 短時間暴露法 (STE法)	2016年3月
23	ER STTA 法 (hER α -HeLa-9903 細胞を用いたエストロゲン受容体恒常発現系統写活性化試験法)	2016年12月
24	眼刺激性試験代替法 再構築ヒト角膜上皮モデル法 (Reconstructed Human Cornea-like Epithelium Test Method: RhCE法)	2017年1月
25	皮膚感作性試験代替法 human Cell Line Activation Test (h-CLAT)	2017年3月
26	皮膚腐食性試験代替法 ヒト表皮モデル法	2017年6月
27	経皮電気抵抗試験を用いた皮膚腐食性試験代替法	2017年10月
28	In vitro 膜バリア試験を用いた皮膚腐食性試験代替法	2017年10月
29	再構築ヒト角膜上皮モデル法 (RhCE法) SkinEthic TM HOE EIT	2018年3月
30	皮膚感作性試験代替法 U937 Cell Line Activation Test (U-SENS TM)	2018年11月
31	AR STTA法 (AR-EcoScreen TM 細胞を用いたアンドロゲン受容体恒常発現系統写活性化試験法)	2019年2月
32	眼刺激性試験代替法 再構築ヒト角膜上皮モデル法 (LabCyte CORNEA-MODEL24 Eye Irritation Test)	2019年2月
33	急性経口毒性を予測するための in vitro 細胞毒性試験	2019年6月
34	2018年改訂 OECD TG438 ニワトリ眼球を用いた眼刺激性試験(ICE法: Isolated Chicken Eye Test)	2019年11月
35	皮膚感作性試験代替法 ARE-Nr2 luciferase (LuSens) test method	2019年11月

JaCVAMホームページより引用

表9 JaOVAMで現在進行中の試験法

分類	試験名
皮膚刺激性試験	ヒト皮膚試験LbL法 (LbL-3D Sin SIT)
光毒性試験	表皮試験
眼刺激性試験	SIPC-CVS; TEA法 IL8 Lucアッセイ
皮膚感受性試験	SENS-IS法 GARDskin法 KDPPA
遺伝毒性試験	EpiSensaA Pig-aアッセイ ヒト表皮モデル(EpiDermTM)を用いる小核試験 ER-GALUX法
内分泌かく乱物質スクリーニング	ヒト細胞エストロゲン受容体(hrER) in vitro 試験
発生毒性予測試験	Hand1-Luc EST
代謝・薬物動態試験	CYP誘導法 PBKモデル法
免疫毒性試験	IL-1β Lucアッセイ
形質転換試験	Bhas 42アッセイ
発熱性物質試験	Balbアッセイ
口腔粘膜刺激性試験	In vitro PBMC法 EpiOral法™

JaOVAMホームページより引用改変

表10 厚生労働省から発出されている化粧品・医薬部外品の代替法ガイドランス

No.	ガイドランス名
1	化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る光毒性試験代替法(3T3 NRU)を活用するためのガイドランス
2	化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る感作性試験代替法(LLNA)を活用するためのガイドランス
3	化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る感作性試験代替法(LLNA:DA)を活用するためのガイドランス
4	化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る感作性試験代替法(LLNA: Brd-ELISA)を活用するためのガイドランス
5	化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る眼刺激性試験代替法(BCOP)を活用するためのガイドランス
6	化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る眼刺激性試験代替法(ICE)を活用するためのガイドランス
7	化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る皮膚透過性試験を活用するためのガイドランス
8	医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイドランスについて
9	医薬部外品・化粧品の安全性評価における眼刺激性試験代替法としてのウサギ角膜由来細胞を用いた短時間曝露法(STE法)に関するガイドランス
10	医薬部外品・化粧品の安全性評価における眼刺激性試験代替法としてのヒト角層様モデルを用いた細胞毒性試験に関するガイドランス

小島肇 国立医薬品食品衛生研究所報告138, 16-27(2020)より引用

表11 毒物劇物の判定基準の改定について(通知) (平成29年6月13日)で例示された有効な代替法

現行の試験方法	有効な代替法
急性経口毒性試験	信頼性、有用性等の評価が確立した代替法は存在しない。ただし、現在、3T3細胞を用いたNeutral Red Uptake cytotoxicity assay(3T3NRU)(OECD GD 129)によりLD50を予測する試験方法が、日本動物実験代替法評価センター(以下「JaOVAM」という。)で評価中であるため、その結論を以て代替法の導入を再度検討する。
急性経皮毒性試験	経皮特異的な吸収性と毒性を有する物質について、信頼性、有用性等の評価が確立した代替法は存在しない。ただし、試験物質について皮膚腐食性(in vitro)が陽性の場合、経皮特異的な吸収性と毒性を有すると想定されない限り、新たに急性経皮毒性試験を実施すべきではないとした。その場合は、経口投与又は吸入薬露による被験物質の毒性強度から毒物劇物としての判定が可能か考察する。
急性吸入毒性試験	現在のところ、代替法は開発されていない。
皮膚腐食性	以下に挙げる代替法は、皮膚腐食性物質を同定する試験として推奨される。・OECD TG 430(in vitro皮膚腐食性:経皮電気抵抗試験(TER))・OECD TG 431(in vitro皮膚腐食性:ヒト3次元培養表皮モデル)ただし、皮膚刺激性については、上記腐食性の2試験は用いることができないため、動物実験の代替法として再現度を上げるならばOECD TG 439(in vitro皮膚刺激性試験)の実施も考慮することができるとした。
眼などの粘膜に対する重篤な損傷	以下に挙げる代替法は、眼腐食性物質及び強度刺激性物質を同定する試験として推奨される。・OECD TG 437(ウシ角膜出血を用いる混濁度及び透過性試験(BCOP法)) ・OECD TG 438(ニワトリ角膜出血を用いる試験(ICE法)) ・OECD TG 460(フルオレセイン漏出試験(FL法))

表12 ワクチンの代替法開発例

プロジェクト名	目的	活動内容
VAC2VAC	VAC2VACは、Innovative Medicines Initiative 2(IMI 2)プログラムによって資金提供された幅広い共同研究プロジェクトであり、OMGL、規制当局、学界、ワクチン同盟、トランスレیشنナルリサーチ組織、などと協力して、獣医およびヒトワクチン業界の専門家に参加する官民コンソーシアムの22のパートナーによって形成された。VAC2VACは、動物以外の方法を使用して、ヒトと動物の両方のワクチンの品質テストアプローチを開発および検証することを目的としている。	現在、一連の獣医(狂犬病、犬のレプトスピラ、感染性ウシ鼻気管炎(IBV)、感染性ウシ鼻気管炎(IRR)、ネコ白血病ウイルス(FeLV)、C. 百日咳、C. チャウボエイ、破傷風)およびヒト(TBEV、二媒介性脳炎、および破傷風、ジフテリア、DTaP)の組み合わせにおける無細胞百日咳)ワクチンは、物理化学的、免疫化学的、および細胞ベース(特に、TBEVの単球活性化試験が狂犬病ハロゲン試験の代わりとして事前検証された)法で進行中。

VAC2VACホームページより

表 13 安全性評価のための動物実験代替法の行政的受け入れ基準の要約(OECD 1996)

<p>1) 関心のある毒性指標を十分に予測できるデータが提示されている。また、新しい方法と既存の方法との間の関係や、新しい方法と標的動物種との関係について示されている。</p> <p>2) リスクアセスメントの目的のために、既存の方法と比較し同等以上、望むらくはそれ以上の価値を有するデータが得られる。</p> <p>3) 行政的に取り扱われる化学物質や製品の代表例についての十分なデータがある。</p> <p>4) 試験法は堅牢なものであり、(技術) 移転可能である。高度に特異化された機器や物質、専門的知識が必要な場合は、移転性を高める努力がなされている。</p> <p>5) 経済的であり、使用される可能性が高い。</p> <p>6) 利用可能な既存の方法に関して、新しい方法の正当化(科学的、倫理的、経済的)を提供する必要がありません。この点で、3Rsを含む動物福祉に配慮が必要である。</p>

大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所報告 122, 1-10(2004)より引用

表 14 安全性評価のための動物実験代替法の最低基準の要約(OECD 1996)

<p>1) 試験法の適切性に関する情報がある(科学的な必要性、行政的目的を含む)</p> <p>2) 測定される指標と in vivo での作用との関係や毒性との関係について記述されている。代酬能のような試験法の限界について記述されている。</p> <p>3) 正式かつ詳細なプロトコルがあり、一般のものが入手可能である。プロトコルは試験が正確に実施できるように詳細に記述されている。また、データの分析法や判定基準が示されている。</p> <p>4) 試験法とその結果は独立した査読された出版物として得られることが望ましい。結果は独立した科学者により査読されることが望ましい。</p> <p>5) 試験施設内外におけるバラツキ、繰り返し精度や再現性が示されている。</p> <p>6) コード化された被験物質を用いて試験法の performance が示されている。</p> <p>7) 既存の毒性試験結果と対応する標的動物種からの情報との関係において試験法 performance が示されている。</p> <p>8) 試験法の妥当性を評価するため全データが査読可能である。</p> <p>9) 通常にはデータは GLP principle に則って得られたものである。</p>
--

大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所報告 122, 1-10(2004)より引用

表 15 バリデーション実行委員会が行う主な確認事項

基準	確認項目	確認時期
バリデーションの必要性確認	試験法の定義(目的、科学的根拠、行政的な)	バリデーション開始前
	試験法の指標の妥当性	
	開発者の背景情報	
	バリデートされるプロトコル	
バリデーション開始	予算確保	バリデーション開始時
	バリデーション実行委員会の設立	
	プロジェクト計画の作成	
	化学物質リストと in vivo データ	
施設間での技術移転性	データ入力フォーマットと記録用紙(原本の用意)	プレバリデーション
	参加施設の選別	
	プロトコルのデータ採用基準	
	プロトコルの技術的な問題点	
施設内再現性	参加施設の再選抜(基準を満たす施設)	バリデーション
	再現性80%基準を満たすデータ採用基準および予測モデル	
	プロトコルの技術的な問題点	
	データの信頼性確認	
施設間再現性	再現性80%基準を満たすデータ採用基準および予測モデル	バリデーション
	プロトコルの技術的な問題点	
	データの信頼性確認	
	基準を満たさない場合の原因解析	
予測性(正確度)	感度80%、特異度70%以上の予測モデル	バリデーション
	感度95%、特異度65%以上の基準を満たす化	
適用範囲	データの信頼性確認	バリデーション実施終了後
	学物質の範囲	
結論	習熟度確認物質の設定	バリデーション実施終了後 第三者評価
	バリデーション報告書	
	すべての記録	
	最終プロトコルの確定	

小島肇 国立医薬品食品衛生研究所報告 138, 16-27(2020)より引用

表16 予測性評価指標の説明

		試験物質		
		陽性	陰性	
代替法の試験結果	陽性	真陽性(A)	偽陽性(B)	陽性予測率(positive predictive value)=A/(A+B) 真陽性の数/代替法試験結果陽性の数
	陰性	偽陰性(C)	真陰性(D)	陰性予測率(negative predictive value)=D/(C+D) 真陰性の数/代替法試験結果陰性の数
		感度(sensitivity)=A/(A+C) 陽性物質を陽性と判定する能力	特異性(specificity)=D/(B+D) 陰性物質を陰性と判定する能力	

精度(accuracy)=(A+D)/(A+D+B+C); 総合判定能力

計算例:

皮膚刺激性陽性 60物質、皮膚刺激性陰性 40物質について代替法を実施した結果、
代替法で陽性60化合物中45化合物が陽性だった場合は、感度は45/60で75%と算出される。
代替法で陰性40化合物中20化合物が陰性だった場合は、特異性は20/40で50%と算出される。
精度は(20+45)/100で65%と算出される。

表17 医薬品への代替法導入法比較

代替法導入法	特徴
動物実験の完全な代替	副作用を見落とすリスクが存在するため、薬害の発生を恐れて却って代替法の普及が進まない。よって、動物実験の削減も進まない。
動物実験を行う場合もある代替(フローチャートの利用等)	副作用を見落とすリスクがより低くなるので代替法の導入が進む。そのため、動物実験の削減も進む。

新規試験法提案書

平成 31 年 4 月 24 日

No. 2019-01

急性経口毒性を予測するための in vitro 細胞毒性試験に関する提案

平成 31 年 4 月 24 日に国立医薬品食品衛生研究所にて開催された新規試験法評価会議（通称：JaCVAM 評価会議）において以下の提案がなされた。

提案内容： 本試験法の特性とその適用範囲を十分に考慮し、厳密にバリデーション時のプロトコルに従って利用されるならば、「急性経口毒性の LD50 値が 2,000 mg/kg 以下でない」ことの判別を目的として本試験法を行政的に利用できる可能性がある。本試験法を利用する場合は、「市場で既に使用実績があり、急性経口毒性が弱いことが示唆される豊富な情報がある物質」、「構造・物理化学的性質・体内挙動などの特性について、急性経口毒性が既知の物質との類似性が極めて高いことが説明できる物質」などを適用対象とし、信頼性の高い他の情報と組み合わせて **weight of evidence** による評価を行うことを推奨する。

また、このような本試験法の特性を踏まえると、本試験法の利用が想定されるのは「毒物および劇物取締法」における劇物を含む製剤の除外申請、医薬部外品の製造販売承認申請および化粧品のポジティブリストの改正要請である。

この提案書は、急性毒性試験資料編纂委員会によりまとめられた文書を用いて、JaCVAM 評価会議が評価および検討した結果、その有用性が確認されたことから作成された。

以上の理由により、行政当局の安全性評価方法として急性経口毒性を予測するための **in vitro** 細胞毒性試験を提案するものである。

大野泰雄

JaCVAM 評価会議 議長

平林容子

JaCVAM 運営委員会 委員長

JaCVAM ホームページより

薬生薬審発0613第1号
平成29年6月13日

各
都道府県
保健所設置市
特別区
衛生主管部(局)長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局
医薬品審査管理課長
(公印省略)

毒物劇物の判定基準の改定について(通知)

毒物及び劇物取締法(昭和25年法律第303号。以下「毒劇法」という。)における毒物又は劇物の指定等の判断に当たっては、「毒物劇物の判定基準」に基づき行ってきたところですが、今般、薬事・食品衛生審議会での検討を踏まえ、下記のとおり、当該基準を改定することといたしますので、御了知の上、貴管下、関係団体等に周知徹底方、お願いいたします。

なお、同旨の通知を一般社団法人日本化学工業協会会長、全国化学工業薬品団体連合会会長、日本製薬団体連合会会長、公益社団法人日本薬剤師会会長及び一般社団法人日本化学製品輸出入協会会長宛てに発出することとしている旨、申し添えます。

記

1. 毒物劇物の判定基準の改定の内容について

- (1) 有効な動物実験代替法による知見の活用について
毒劇法は、主として急性毒性等により毒物又は劇物に指定するなどの規制を行っており、指定に際し毒性評価を実施するに当たり、動物実験の知見を重要視してきた。しかしながら、近年では欧州を中心に動物愛護の観点から動物実験を廃止する動きがあり、国内でも動物実験を必要最小限に抑える方向にある。当該判定基準にも、動物実験を実施しない場合に動物実験代替法(以下「代替法」という。)による毒性評価を用いる考え方が既に取り込まれているが、具体的に有効な代替法の内容が十分に明確化されていないため、今般、毒物又は劇物の判定に用いることが出来る有効な代替法を例示し、当該判定基準に取入れることにより、明確にした。
また、例示した代替法を用いた知見については、毒物劇物の製剤の除外においても、活用可能とした。

1) 有効な代替法の例示について

各急性毒性試験及び皮膚腐食性、眼等の粘膜に対する重篤な損傷について、有効な代替法を用いることが可能かどうか検討し、また可能な場合はどの代替法を用いることができるか例示した。

① 急性経口毒性試験

信頼性、有用性等の評価が確立した代替法は存在しない。ただし、現在、3T3細胞を用いたNeutral Red Uptake cytotoxicity assay(3T3NRU)(OECD GD 129)によりLD₅₀を予測する試験方法が、日本動物実験代替評価センター(以下「JaCVAM」という。)で評価中であるため、その結論を以て代替法の導入を再度検討する。

② 急性経皮毒性試験

経皮特異的な吸収性と毒性を有する物質について、信頼性、有用性等の評価が確立した代替法は存在しない。ただし、試験物質について皮膚腐食性(*in vitro*)が陽性の場合、経皮特異的な吸収性と毒性を有すると想定されない限り、新たに急性経皮毒性試験を実施すべきではないとした。その場合は、経口投与又は吸入暴露による被験物質の毒性強度から毒物劇物としての判定が可能か考察する。

③ 急性吸入毒性試験

現在のところ、代替法は開発されていない。

④ 皮膚腐食性

以下に挙げる代替法は、皮膚腐食性物質を同定する試験として推奨されることとした。

- ・ OECD TG 430 (*in vitro* 皮膚腐食性：経皮電気抵抗試験(TER))
- ・ OECD TG 431 (*in vitro* 皮膚腐食性：ヒト3次元培養表皮モデル*1)

ただし、皮膚刺激性については、上記腐食性の2試験は用いることができないため、動物実験の代替法として再現度を上げるならば OECD TG 439 (*in vitro* 皮膚刺激性試験)の実施も考慮することができるとした。

⑤ 眼等の粘膜に対する重篤な損傷

以下に挙げる代替法は、眼腐食性物質及び強度刺激性物質を同定する試験として推奨されることとした。

- ・ OECD TG 437*2
- ・ OECD TG 438*3
- ・ OECD TG 460*4
- ・ OECD TG 491*5

*1：ヒト3次元培養表皮モデルとして、EpiSkin™、EpiDerm™、SkinEthics™、epiCS®が掲載。VitroLife-Skin は当該 TG には未掲載であるものの、バリテーションが行われJaCVAMにて評価済みである。

*2：i) 眼腐食性及び強度刺激性物質、ii) 眼腐食性及び強度刺激性物質を引き起さない物質を同定するためのウシ抽出角膜を用いる眼濁度及び透過性試験(Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: BCOP)

*3：i) 眼腐食性及び強度刺激性物質、ii) 眼腐食性及び強度刺激性物質を引き起さない物質を同定するためのニワトリ摘出眼球を用いる試験(Isolated Chicken Eye Test: ICE)

(別添)

- *4：眼腐食性及び強度刺激性物質を同定するためのフルオロセイン漏出試験 (Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants：FL)
- *5：i) 眼腐食性及び強度刺激性物質、ii) 眼腐食性及び強度刺激性物質を引き起さない物質を同定するための *in vitro* 短時間暴露法 (Short Time Exposure Assay for Eye Irritation Testing：STE)

- (2) その他既知見の活用について
急性毒性等の毒性評価を実施するに当たり、毒物又は劇物の新規指定に
おいては主に国立医薬品食品衛生研究所により、国内外の知見に関する文
献収集と評価書の作成が実施されている。一方、事業者が提出する製剤の
除外申請において既知見の試験データや有害性評価書の文献を活用する
ことについては、運用が明確ではなかったところであり、毒物劇物の指定
又は製剤の除外の効率化等のため、既知見の試験データや有害性評価書等
の文献の活用方法を明確にした。
2. 毒物劇物の判定基準の改定について
上記1. (1)及び(2)の事項を明確にするとともに所要の整備を行う
ため、別添のとおり「毒物劇物の判定基準」を改定した。

(別添)

毒物劇物の判定基準

最終改定：平成29年2月
※ 下線部改定部分

毒物劇物の判定基準

1. 毒物劇物の判定基準

毒物劇物の判定は、動物における知見、ヒトにおける知見、又はその他の
知見に基づき、当該物質の毒性、化学製品としての特質等をも勘案して行う
ものとし、その基準は、原則として次のとおりとする。

(1) 動物における知見

- ①急性毒性
原則として、得られる限り多様な暴露経路の急性毒性情報を評価し、ど
れか一つの暴露経路でも毒物と判定される場合には毒物に、一つも毒物と
判定される暴露経路がなく、どれか一つの暴露経路で劇物と判定される場
合には劇物と判定する。
(a) 経口 毒物：LD₅₀が50mg/kg以下のもの
劇物：LD₅₀が50mg/kgを越え300mg/kg以下のもの
(b) 経皮 毒物：LD₅₀が200mg/kg以下のもの
劇物：LD₅₀が200mg/kgを越え1,000mg/kg以下のもの
(c) 吸入 毒物：LC₅₀が500ppm(4hr)以下のもの
(ガス) 劇物：LC₅₀が500ppm(4hr)を越え2,500ppm(4hr)以下のもの
吸入 毒物：LC₅₀が2.0mg/L(4hr)以下のもの
(蒸気) 劇物：LC₅₀が2.0mg/L(4hr)を越え10mg/L(4hr)以下のもの
(ガス、ミスト) 劇物：LC₅₀が0.5mg/L(4hr)を越え1.0mg/L(4hr)以下のもの
(d) その他

②皮膚に対する腐食性

劇物：最高4時間までの暴露の後試験動物3匹中1匹以上に皮膚組織
の破壊、すなわち、表皮を貫通して真皮に至るような明らかなに
認められる壊死を生じる場合

③眼等の粘膜に対する重篤な損傷 眼の場合

劇物：ウサギを用いたDraize試験において、少なくとも1匹の動物で
角膜、虹彩又は結膜に対する、可逆的であると予測されない作
用が認められる、または、通常21日間の観察期間中に完全に
回復しない作用が認められる
または
試験動物3匹中少なくとも2匹で、被験物質滴下後24、48及び
72時間における評価の平均スコア計算値が角膜混濁 \geq 3または
虹彩炎 $>$ 1.5で陽性応答が見られる場合。

なお、上記のほか次に掲げる項目に関して知見が得られている場合は、当
該項目をも参考にして判定を行う。

イ 中毒徴候の発現時間、重篤度並びに器官、組織における障害の性質と程度
 ロ 吸入・分布・代謝・排泄動態・蓄積性及び生物学的半減期
 ニ 生体内代謝物の毒性と他の物質との相互作用
 ホ 感作の程度
 その他

- (2) ヒトにおける知見
 ヒトの事故例等を基礎として毒性の検討を行い、判定を行う。
- (3) その他の知見
 化学物質の反応性等の物理化学的性質、有効な *in vitro* 試験^{※1}等における知見により、毒性、刺激性の検討を行い、判定を行う。
- (4) 上記(1)・(2)又は(3)の判定に際しては次に掲げる項目に関する知見を考慮し、例えば、物性や製品形態から投与経路が限定されるものについては、想定しがたい暴露経路については判定を省略するなど現実的かつ効率的に判定するものとする。

イ 物性(蒸気圧、溶解度等)
 ロ 解毒法の有無
 ニ 通常の使用頻度
 ホ 製品形態

(5) 毒物のうちで毒性が極めて強く、当該物質が広く一般に使用されるか又は使用されると考えられるものなどで、危害発生恐れが著しいものは特定毒物とする。

2. 毒物劇物の製剤の除外に関する考え方

毒物又は劇物に判定された物の製剤について、普通物への除外を考慮する場合には、その判断は、概ね次に定めるところによるものとする。なお、製剤について何らかの知見がある場合には(1)を優先することとする。^{※2}
 ただし、毒物に判定された物の製剤は、原則として、除外は行わない。

(1) 製剤について知見が有る場合^{※3}
 ①急性毒性が強い^{※4}ため劇物に判定された物の製剤を除外する場合は、原則として、次の要件を満たす必要があること。

(a) 除外する製剤について、本基準で示された劇物の最も大きい急性毒性値(LD₅₀、LC₅₀)の10倍以上と考えられるものであること。この場合において投与量、投与濃度の限界において安全が確認されたものについては、当該経路における急性毒性は現実的な危害の恐れがないものと考えること。

(例) 経口 対象製剤 2,000mg/kg の投与量において使用した動物すべてに投与物質に起因する毒性徴候が観察されないこと。

(b) 経皮毒性、吸入毒性が特異的に強いものではないこと。

②皮膚・粘膜に対する刺激性が強い^{※5}ため劇物に判定された物の製剤を除外する場合は、当該製剤の刺激性は、劇物相当(皮膚に対する腐食性、眼に対する重篤な損傷性又は同等の刺激性)より弱いものであること。

(例) 10%硫酸、5%水酸化ナトリウム、5%フェノールなどと同程度の刺激性

③上記①及び②の規定にかかわらず、当該物の物理的・化学的性質、用途、使用量、製品形態等からみて、当該物の製剤による保健衛生上の危害発生の恐れがある場合には、製剤の除外は行わない。

(2) 製剤について知見が無い場合^{※6}

①急性毒性が強い^{※7}ため劇物に判定された物の製剤を除外する場合は、原則として、次の要件を満たす必要があること。

下記の式により、【判定基準2. (1)・①に相当する含有率】を算出した含有率(%)以下を含有するものについては劇物から除外する。

$$\text{【判定基準2. (1)・①に相当する含有率】} = \frac{\text{【原体の急性毒性値】}}{\text{【毒性の最も大きい急性毒性値の10倍の値】}} \times 100\%$$

(例えば、経口急性毒性の場合、LD₅₀=300mg/kg × 10)

②皮膚・粘膜に対する刺激性が強い^{※8}ため劇物に判定された物の製剤を除外する場合は、原則として、次の要件を満たす必要があること。^{※1, ※2}

2. (1)・②に相当する含有率(%)は、3%であり、3%未満を含有するものについては劇物から除外する。ただし、pH2以下の酸、又はpH11.5以上の塩基等については、1%未満を含有するものについて劇物から除外する。

③上記①及び②の規定にかかわらず、当該物の物理的・化学的性質、使用量、製品形態等からみて、当該物の製剤による保健衛生上の危害発生の恐れがある場合には、製剤の除外は行わない。

※1 皮膚に対する作用は皮膚腐食性試験(TG 430, TG 431)と皮膚刺激性試験(TG 439)の併用が推奨される。化学物質の皮膚腐食性又は皮膚刺激性が明確に分類され、皮膚刺激性を有するものと分類された場合は動物を用いた皮膚腐食性試験は不要であり、皮膚腐食性を有すると分類された場合は新たに急性経皮毒性試験は不要である。眼等の粘膜に対する作用は眼腐食性及び強度刺激性試験(TG 437, TG 438, TG 460, TG 491)が推奨される。上記の *in vitro* 試験の実施に際しては、各試験の適用限界に留意が必要である。(TG 数字)。

※2 OECD 毒性試験ガイドライン No. [数字]
 用途、物質濃度、製品形態等から、保健衛生上の危害発生の恐れが考えられない場合は、例外に除外している。

※3 国際機関や主要国等で作成され信頼性が認知されており、情報源を確認できる評価書等の知見が有る場合、当該知見を活用して製剤の除外を考慮しても差し支えない。

※4 試験の実施が技術的に困難な場合や、活用できる既知見が存在しない場合等に限られる。推定された含有率(%)以下において劇物相当以上の健康有害性を有するという知見、又は物性、拮抗作用等の毒理学的知見等より、劇物相当以上の健康有害性を示唆する知見がある場合は、この考え方は適用できない。

※5 この考え方は、国連勧告「化学品の分類および表示に関する世界調和システム(GHS)」3.1.3を参照している。

※6 具体的には、LD₅₀が1,000mg/kgの製剤を等容量の判定に影響のない物質(例えば水)で希釈すれば、希釈製剤のLD₅₀は2,000mg/kgとなるという考え方を元としている。

※7 判定に影響のない物質(例えば水)で希釈した場合を想定している。

※8 この考え方は、GHS3.2.3、GHS3.3を参照している。
 判定に影響のない物質(例えば水)で希釈した場合を想定している。

資料D-4

農薬の登録申請において提出すべき資料について
(平成31年3月29日付け30消安第6278号農林水産省消費・安全局長通知)

(中略)

皮膚刺激性

1. 目的

農薬の皮膚刺激性/腐食性に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時の安全な取扱方法を確立すること等。

2. 試験方法

OECD Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion

OECD Test No. 430: In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER)

OECD Test No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method

OECD Test No.435: In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion

OECD Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method

眼刺激性

1. 目的

農薬の眼及び眼粘膜への刺激性/腐食性に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時の安全な取扱方法を確立すること等。

2. 試験方法

OECD Test No.405: Acute Eye Irritation/Corrosion

OECD Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (BCOP)

OECD Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (ICE)

OECD Test No. 460: Fluorescein Leakage Test method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants

OECD Test No. 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage

OECD Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage

皮膚感作性

1. 目的

農薬の皮膚感作性に関する科学的知見を得ることにより、農薬使用時の安全な取扱方法を確立すること等。

2. 試験方法

OECD Test No. 406: Skin Sensitisation

OECD Test No. 429: Skin Sensitisation (Local Lymph Node Assay: LLNA)

OECD Test No. 442A: Skin Sensitization (LLNA: DA)

OECD Test No. 442B: Skin Sensitization (LLNA: BrdU-ELISA)

OECD Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitization (Direct Peptide Reactivity Assay: DPRA)

OECD Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitization (ARE-Nrf2 Luciferase Test Method)

OECD Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation

in vivo 試験法ではない試験法 (OECD Test No. 442C、442D 及び 442E) は、被験物質中の目的成分の純度が高く単一化学物質と考えられる被験物質 (例えば農薬原体) に対して用いることを想定している。

3. 留意事項

in vivo 試験法ではない試験法 (OECD Test No. 442C、442D 及び 442E) で試験を実施する場合は、OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.256: Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Sensitisation の Annex I, Case study I 又は X に示された手順を参照すること。

(後略)

農薬の食品健康影響評価における

イスを用いた1年間反復経口投与毒性試験の取扱いについて

(平成 29 年 12 月 21 日 農薬専門調査会決定)

1. 背景

農薬の食品健康影響評価における毒性の評価においては、ラット、マウス等のげっ歯類、ウサギ、イス等の非げっ歯類等を用いた各種毒性試験が実施されている。これらの試験のうち、長期投与による慢性毒性影響を評価するため、国内における農薬の登録等に当たっては、げっ歯類（通常はラット）に加えて、非げっ歯類（通常はイス）を用いた1年間反復経口投与毒性試験結果の提出が求められているが、イスを用いた同試験（以下「イス慢性毒性試験」という。）については、近年海外における農薬の登録等で必須とされていないことが多い。

食品安全委員会農薬専門調査会は、食品健康影響評価技術研究課題の報告結果を踏まえ、国際的動向等も考慮し、科学的な観点に基づいて、農薬の食品健康影響評価におけるイス慢性毒性試験の取扱いについて整理した。本取扱いは動物福祉（アニマルウェルフェア）にも資すると考えられる。

なお、本取扱いについては、現時点における科学的知見に基づき基本的考え方を整理したものであり、国際的な評価方法の動向、国内外での科学的知見等を勘案して、必要に応じて見直すこととする。

2. 食品健康影響評価におけるイス慢性毒性試験の取扱い

(1) 基本的考え方

原則として、イス慢性毒性試験結果がなくても食品健康影響評価は可能とする。ただし、イス慢性毒性試験結果が提出された評価データセットに含まれている場合には、評価対象情報として活用する。なお、イス慢性毒性試験結果の必要性に関しては(2)を参考にする。イス慢性毒性試験が実施されていない場合であって、農薬専門調査会の評価過程において当該情報が重要であると判断された場合、追加資料の提出を要求することもある。

(2) イス慢性毒性試験が必要であると考えられる場合

- ① 亜急性毒性試験で認められる毒性プロファイルがイスとげっ歯類で大きく異なる場合
- ② イス及びげっ歯類について、毒性標的臓器が同じでも明確な発現用量の差が認められ、イスの感受性が高いと考えられる場合
- ③ イスにおける農薬の蓄積性が懸念される場合

④ イスにおける薬物代謝（動態）について、①～③で示されるようなイス特有の毒性等に関与することが想定される場合

イス慢性毒性試験の要否については、ヒトへの外挿性も考慮した上で、慎重に判断する必要がある。

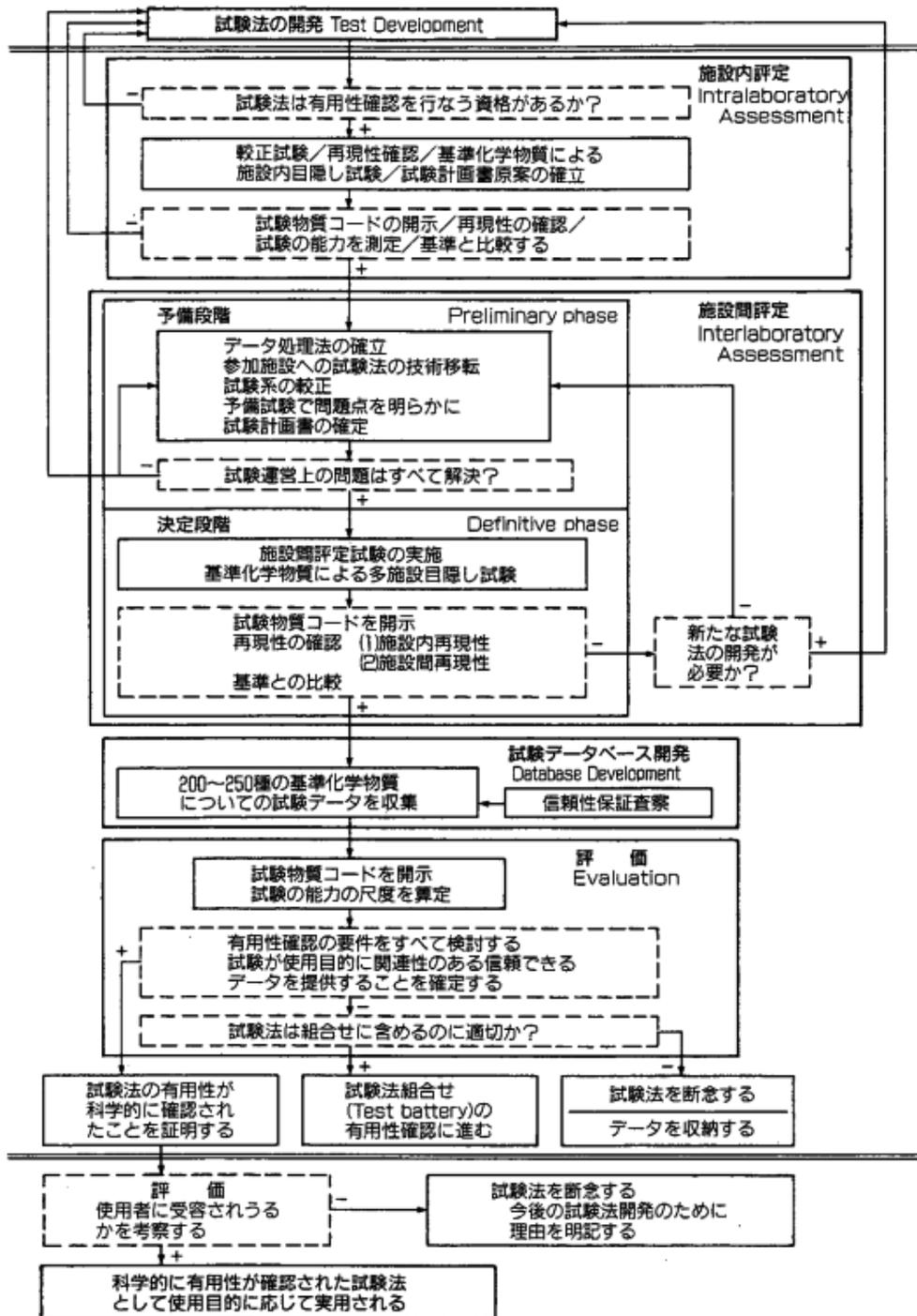
また、イス亜急性毒性試験で無毒性量が得られておらず、かつ、用量を低くして同試験が再実施されることにより上記①～④に該当することが想定される場合は、亜急性毒性試験が再実施されるのではなく慢性毒性試験が実施される方が望ましい。

・参考資料

- 1) 食品安全影響評価技術研究、農薬の毒性評価における「毒性プロファイル」と「毒性発現量」の種差を考慮した毒性試験の新たな段階的手法の提言—イス慢性毒性試験とマウス発がん性試験の必要性について—
- 2) Commission Regulation (EU) No 283/2013 of 1 March 2013, setting out the data requirements for active substances, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market
- 3) U.S.: Code of Federal Regulations Title 40, Chapter I, Subchapter E, Part 158, Subpart F – Toxicology

試験法バリデーションの作業過程 (模式図)

「大野泰雄, 動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受け入れの現状, Bull.Natl.Inst.Health Sci.,122, 1-10 (2004)」より引用



資料D-7

新規毒性試験法の評価と行政提案のための体制

小島 肇, 新規毒性試験法の評価と行政的提案, Bull. Natl Inst. Health Sci., 138, 16-27 (2020) より引用

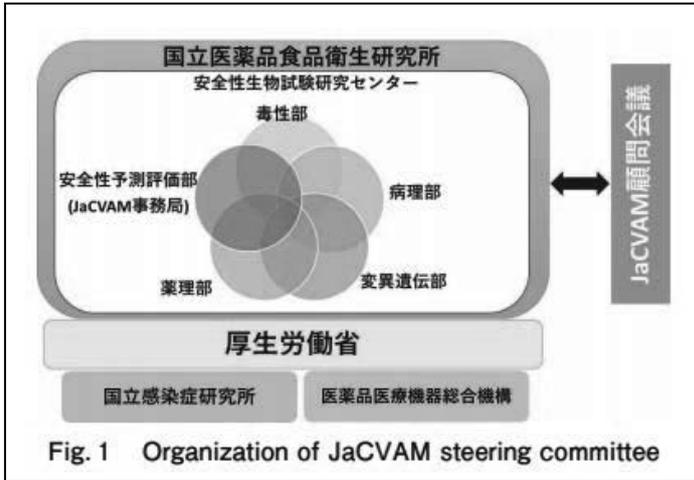


Fig. 1 Organization of JaCVAM steering committee

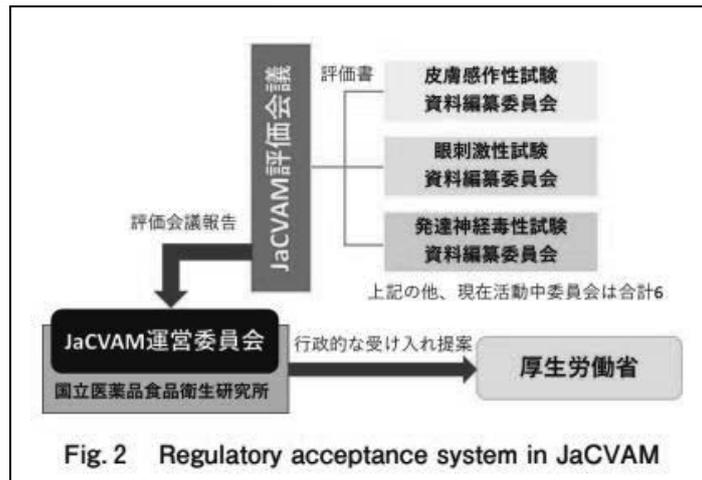


Fig. 2 Regulatory acceptance system in JaCVAM

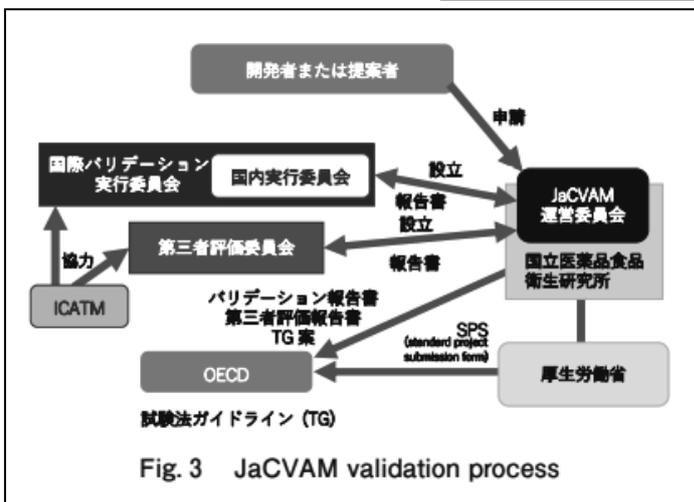


Fig. 3 JaCVAM validation process