

## 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

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  
薬理部 大野泰雄

Validation and regulatory acceptance of alternative  
methods for toxicity evaluation.

Yasuo Ohno

Division of Pharmacology, Center for Biological Safety and Research,  
National Institute of Health Sciences

For regulatory acceptance of alternative methods (AMs) to animal toxicity tests, their reproducibility and relevance should be determined by intra- and inter-laboratory validation. Appropriate procedures of the validation and regulatory acceptance of AMs were recommended by OECD in 1996. According to those principles, several *in vitro* methods like skin corrosivity tests and phototoxicity tests were evaluated and accepted by ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods), ICCVAM (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), and OECD. Because of the difficulties in conducting inter-laboratory validation and relatively short period remained until EU's ban of animal experiments for safety evaluation of cosmetics, ECVAM and ICCVAM have recently started cooperation in validation and evaluation of AMs. It is also necessary to establish JaCVAM (Japanese Center for the Validation of AM) to contribute the issue and for the evaluation of new toxicity tests originated in Japan.

### 1. 序

動物実験代替法(代替法)とは科学研究や教育,毒性試験,生産等の目的のための動物を用いる方法を動物を用いない方法に置き換えること(Replacement)であり,動物使用数の削減(Reduction)や動物使用に伴う苦痛の削減等(Refinement)を含むものである(Russel and Burch 1959)<sup>1)</sup>.代替法開発はもともと動物愛護の精神に根ざすものであるが,同時に無駄な動物実験の廃止や多数の新規化学物質の安全性の経済的な評価,毒性の極めて強い化学物質の毒性を動物実験で調べることに伴う危険の回避,また,ヒトへの外挿のために必要な毒性発現機序に関する情報の確保のためにも有効である.

代替法の研究は欧米では早くから行われており,イギリスでは医学分野における実験動物を他のものに置き換えるための基金(FRAME)が1969年に,米国では1981年にジョンズホプキンス大学に代替法センターが開設された.日本では1982年に現在の日本動物実験代替法学会の前身となる研究会が設立された.これらの研究を通じて多くの方法が開発された.一方,EU議会は動物愛護運動と動物実験に対する反対運動の高まりに対応して,代替法開発の拠点とし,代替法バリデーションの調整や代替法についてのデータベースを構築・維持するため,また,行政,産業,生物・医学分野の科学者,消費者,および動物愛護運動グループの対話を促進することを目的に1991年に代替法バリデーションセンター(European Center for the Validation of Alternative Methods: ECVAM)を設立した(1994年開所).米国は毒性試験法の開

発,バリデーション,受入,及び国内及び国際レベルでのハーモナイゼーションに関する問題を連邦政府内で調整するためにNICEATM(NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)の下にNIEHS(National Institute of Environmental Health Sciences)を含む14の行政機関及び研究機関によりICCVAM(Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)が1993年に設置した.現在欧米の行政機関においては,新たに開発された動物実験代替法を科学的に評価し,可能なものについては取り入れていこうという作業が行われている.また,内分泌かく乱化学物質検索のような新たな毒性評価の要請やトキシコゲノミクスのような新しい技術も導入されつつある.これらの新試験法を行政試験として,取り入れるための検討も視野に入れている.本稿では新しい試験法を取り入れるために必要なバリデーションと評価体制のあり方について述べるとともに,動物実験代替法を巡る国際情勢について述べる.

### 2. 動物実験代替法のバリデーションと代替法を行政的に受け入れるための基準

#### 2-1) 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。

バリデーションのあり方については、Scala (1987)<sup>2)</sup>、Frazier (1990)<sup>3)</sup>、及びBallら(1999)<sup>4)</sup>により提示されている。また、小野(1994)<sup>5)</sup>及び大野(1997)<sup>6)</sup>により要約されている。バリデーションとは「候補試験法について試験結果の信頼性(reliability)と再現性(reproducibility)とを証明し、それが特定の毒性試験の目的に使用できるだけの確実性(credibility)があることを確認する手順である」とされている。

バリデーションの過程は 1)施設内バリデーション、2)多施設バリデーション、3)データベース構築の三段階に分けられる(図1)。

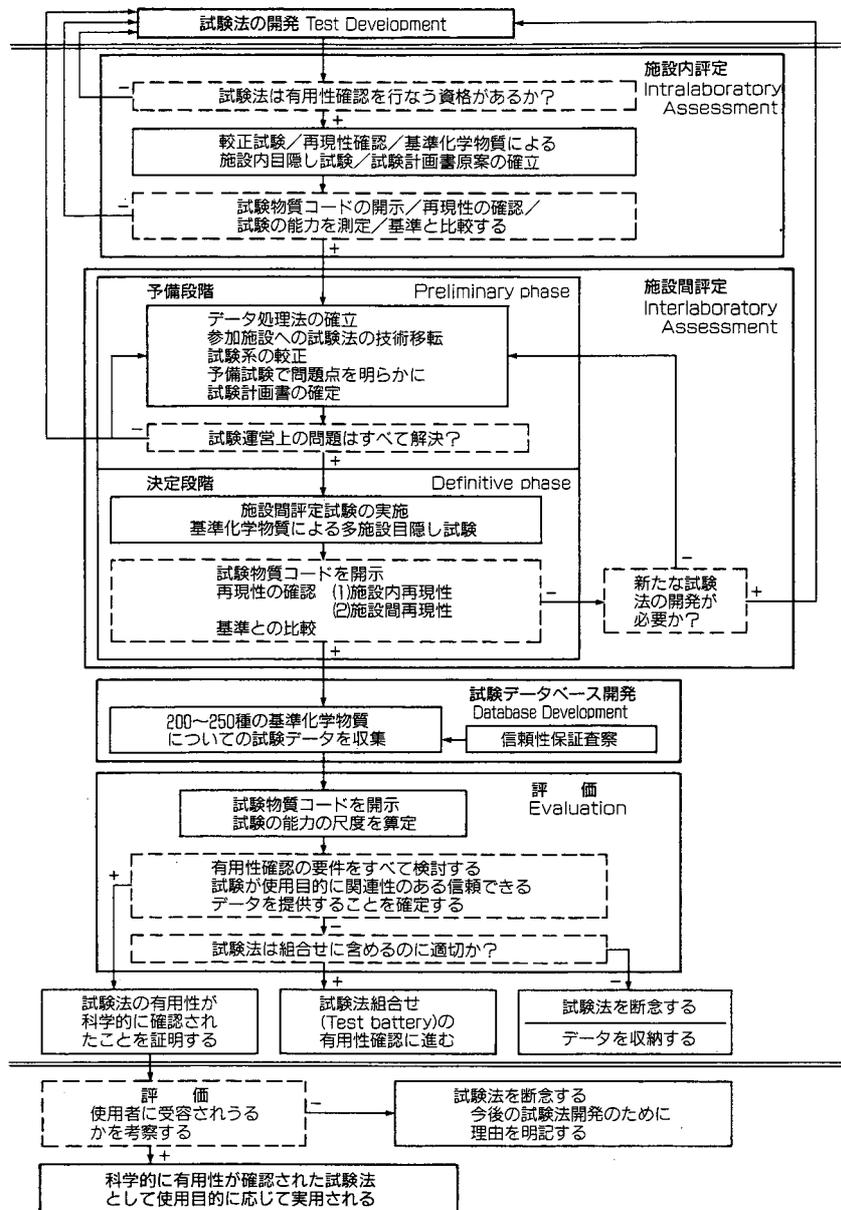


図1:試験法バリデーションの作業過程 (小野 1994)

施設内バリデーションは、通常、当該試験法を開発した施設で行われるものであり、試験法の特徴を明らかにし、次に行われる多施設バリデーションのためのプロトコール、標準操作法、および結果の判定基準を作成する過程である。多施設バリデーションは同一のプロトコールと標準操作法に従って、複数の施設（3-5施設）で試験を実施した場合の試験法の特徴、つまり感度、特異性、予知能力および施設内・外の再現性を確認する過程である。バリデーションにおいては試験結果の信頼性を高めるために被験物質名とその毒性を明らかにせず、目隠し試験でおこなうとともに、GLP基準に従って実施することが望ましい。

バリデーションに際しては、1) 試験の目的、2) 試験法の選定、3) 被験物質の選定、4) 比較基準とするデータの特定、5) 結果の判定方法とその基準(Prediction Model, Data Interpretation Procedure)が明確に設定されていることが必要である。一方、施設内および多施設バリデーションは必ずしも一回のみで終了するわけではなく、それを繰り返すことにより、プロトコールやSOPの最適化や判定基準の見直しが行われることが多い。原則として、最終段階の多施設バリデーションでは判定基準の妥当性が確認されねばならない。この過程で、検討した被験物質数が増加し、広い範囲の被験物質への適用性を判断するための資料が得られる。

通常、被験物質数は施設内バリデーションにおいては10-20物質、施設間バリデーションでは20-40物質で実施されるが、行政的に利用できるか否かを判定するには不十分とされており、更に文献調査等に基づき200-250物質のデータが必要とされている(Frazier 1992)。

## 2-2) バリデーションの実行

多施設バリデーションは多くの者が参加する複雑な過程であることから、適切な組織を構築し、適正かつ能率良く運営されねばならない。また、多大な時間と経費のかかる過程であることから、施設内バリデーションの結果を詳細に検討・評価し、適切と予想された試験法についてのみ実施されるべきものである。

多施設バリデーションにおいては、参加者間のコミュニケーションを密にし、トラブルを未然に防止あるいは早期に発見し、対策を講じることが、ボランティアで参加している協力者たちの志気の維持と質の高いデータを得るために極めて重要である。

一方、バリデーションに技術的に劣る施設が参加していると、試験法のperformanceが不当に低く評価される可能性がある。そこで、参加者の技術レベル向上の為に技術移転と予備試験が欠かせない。これはプロトコールやSOPを参加者が正確に理解し、実行しているか、また、それらに不備が無いことを確認するために必須である。実際に多施設バリデーションを行っていると同様プロトコールとSOPを用いているにも関わらず、施設により実験操作に思いがけない差が

あることに驚く事がある。この多施設バリデーションにより、試験施設を評価し、次に行われる多施設バリデーションの参加施設を選択することが適当である。

被験物質は代替しようとしている既存の試験法における作用についての信頼性の高い情報があり、かつ、試験法のperformanceを適切に示しうる物でなくてはならない。また、品質が均一で化学的に安定なものが望ましい。毒性を段階的に評価する試験においては、それぞれの段階に適切な数の被験物質が配分されなければならない。毒性の有無のみを判定する試験においては、明確に有無を判定できると予想される物質だけでなく、境界領域の物質も適切な数配分されなければならない。また、試験の使用目的に応じて適切な種類の物質群を選択されねばならない。信頼できるデータを得るためには、被験物質は試験実施施設とは別の施設によりコード化され、配布されねばならない。

多施設バリデーションの実行組織の一例を図2に示した<sup>7)</sup>。これは日本化粧品工業連合会とともに化粧品原料の眼刺激性を評価するための9種のドレイズ眼刺激性試験代替法(16プロトコール)を検討した時の組織であり、バリデーション全体を運営する運営委員会とバリデーションの実行組織である実行委員会、被験物質を選択・管理し、コード化して配布する被験物質管理委員会、及び得られた結果と比較するためのin vivo試験を計画・実施するin vivo試験委託担当委員会が組織された。個々の代替法に経験の深い者が試験責任者となり、当該代替法のプロトコールとSOP案を作成するとともに、参加機関に技術指導を行った。また、試験責任者と参加機関の代表はバリデーション実行委員会の一員となって連絡・調整を密にした。

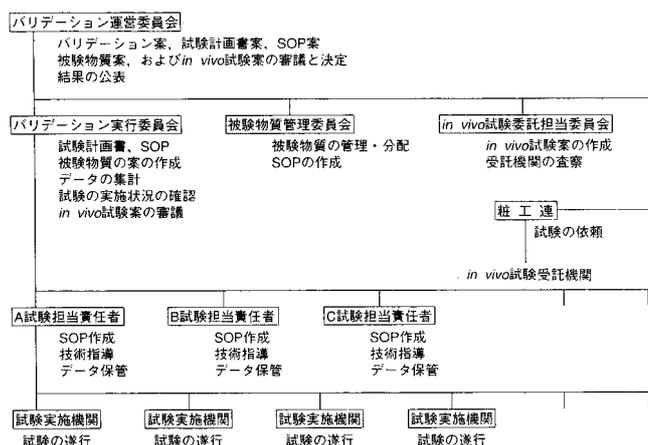


図2：バリデーション組織

## 2-3) 簡便なバリデーション法

新しい試験法が既に承認された代替法と同一の原理に基づくものであり、変更内容がminorな場合においては、少数の被験物質によるバリデーション(catch up validation)により評価することが可能である。

従来のバリデーションデザイン											不適切なバリデーションデザイン											無駄の無いバリデーションデザイン										
被験物質	試験施設										被験物質	試験施設										被験物質	試験施設									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	■										1	■									1	■										
2	■										2	■									2	■										
3	■										3	■									3	■										
4	■										4	■									4	■										
5	■										5	■									5	■										
6	■										6	■									6	■										
7	■										7	■									7	■										
8	■										8	■									8	■										
9	■										9	■									9	■										
10	■										10	■									10	■										
11	■										11	■									11	■										
12	■										12	■									12	■										
13	■										13	■									13	■										
14	■										14	■									14	■										
15	■										15	■									15	■										
16	■										16	■									16	■										
17	■										17	■									17	■										
18	■										18	■									18	■										
19	■										19	■									19	■										
20	■										20	■									20	■										

施設毎の担当物質を灰色に塗った。  
被験物質を毒性強度に応じて適切に分類し、それを適切な数と割合で配分することが試験法の妥当性を示すのに必要。

図 3 : ECVAM のバリデーションデザイン (Hartung 2004)

また 2004 年の OECD 会議では ECVAM の Dr Hartung 所長により、図 3 のような簡易バリデーション法が提案された<sup>8)</sup>。これはそれまでのバリデーションの経験に基づいて考えられたものであり、技術力が高く信頼性の高いデータを作成できる少数の施設で実行することが前提とされている。少数の物質と少数の施設により当該試験法の施設間の再現性が検討される。また、適用できる被験物質の範囲を調べるために、数多くの物質を 1 施設づつで検討する方法である。即ち、再現性を見るためのバリデーションと予知能力を見るバリデーションを分離したものである。なお、施設間再現性を見るための被験物質としては当該試験法での判定が容易な物のみを選ばないようにする必要がある。

#### 2-4) バリデーション結果の判定

代替法の予知能力(または的中率 predictive value)を判定する基準としては感度(sensitivity)と特異性(specificity)が重要である。表 1 に示したように、感度とは毒性物質(刺激性試験であれば刺激性物質)を陽性とする比率であり、特異性とは毒性の無い物質を陰性とする比率である。陽性予知能力とは陽性結果が得られたものが真に毒性物質である比率であり、陰性予知能力とは陰性結果が得られたものが真に無毒性物質である比率である。

試験法の有用性はその感度、特異性、予知能力、再現性を総合して評価される。一方、この結果はバリデーションに使用された毒性物質の比率(混合率)により影響される。また、被験物質の選択によっても強く影響される。即ち、当該試験法の得意な範疇の被験物質のみ選べば成績は良くなる。プロトコルや SOP が適切に作成されていなかったり、適切な技術を持たない者が参加すれば、試験結果の再現性は低くなる。

表 1 : 試験法の感度と特異性

試験結果	試験物質		計
	陽性	陰性	
陽性	A	B	A + C
陰性	C	D	C + D
計	A + C	B + D	N

A: 代替法で陽性を示した陽性物質数, B: 代替法で偽陽性を示した陰性物質数, C: 代替法で偽陰性を示した陽性物質数, D: 代替法で陰性を示した陰性物質数。A+C: 試験に供した陽性物質数, B+D: 試験に供した陰性物質数, N=A+B+C+D: 全試験物質数。(A+C)/N: 混合率(prevalence)。感度(sensitivity)=A/(A+C), 特異性(specificity)=D/(B+D), 予知能力(positive predictive value)=A/(A+B), 陰性予知能力(negative predictive value)=D/(C+D)。

#### 2-5) 代替法を行政的に受け入れるための基準

現在の毒性試験法を新たな方法に置き換えるためには、新しい方法が現在の方法と比べ少なくとも同等あるいはそれ以上の有用性を持つものであることが、適切なバリデーションで示されなくてはならない。1995 年に開催された ICCVAM 会議の結果<sup>9)</sup>を受け、1996 年に開催された OECD の会議では行政目的のための動物実験代替法が適切と判定されるための基準及びそれを行政的に受け入れるための基準を作成した(表 2 および表 3)<sup>10)</sup>。個々の企業で代替法の受け入れを検討する場合においてもこれらの基準が参考になろう。また 2002 年 3 月においてその follow up 会議がストックホルムで開催された。現在、その up to date の作業が進行

している。

表 2：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)<sup>10)</sup>

- 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)
- 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。代謝能のような試験法の限界について記述されている。
- 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, データの分析法や意志決定基準が示されている。
- 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。
- 5) 試験施設内外における反復性や再現性が示されている。
- 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。
- 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の performance が示されている。
- 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。
- 9) 理想的にはデータは GLP principle に則って得られたものである。

表 3：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)<sup>10)</sup>

- 1) 関心のある毒性指標を十分に predict 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。
- 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。
- 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。
- 4) 試験法は堅牢なものであり, 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。
- 5) 経済的であり, 使用される可能性が高い。
- 6) 既存の方法と比較し, 科学的, 倫理的, 経済的である。

### 3. 動物実験代替法を巡る国際状況

#### 3-1) EU における代替法の検討と受け入れ状況

ECVAMの諮問委員会であるESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)は1997年には3T3 NRU 光毒性試験, 1998年には皮膚腐食性試験としてEPISKIN™とラット Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER 法), 2000年には皮膚感作性のためのLocal Lymph Node Assay (LLNA), EpiDerm™ 皮膚腐食性試験, CORROSITEX™ 皮膚腐食性試験, 2002年には胎児毒性のための胚性幹細胞試験, 胎児毒性のための全胚培養試験, 胎児毒性のためのマイクロマス試験を確立された代替試験法として承認した。このESACの結論を受けてEUはこれらの代替試験から得られたデータを化粧品 of 安全性評価に用いることに合意した。EUの化粧品および非食品に関する健康および消費者保護担当機関である SCCNFP (Scientific Committee for Cosmetic Products, and Non-food Products intended for Consumers)は光毒性試験試験 (3T3 NRU PT 法) および皮膚腐食性試験 (TER, EPISKIN™, EpiDerm™ 法) を公的に validation された試験法として認めた。また, 経皮吸収試験 (ヒトあるいはブタ皮膚を用いる in vitro Skin Absorption 法) および皮膚感作性試験 (LLNA 法) を認めた<sup>11)</sup> (2002.6.4)。なお, LLNA法はモルモットのMaximization法を完全に代替するものではない。一方, フランスは眼刺激性試験法としてアガロースゲル拡散細胞毒性試験法とウサギ角膜繊維芽細胞法 (NR) を公示した (1999.12.30)。

一方, EU では1993年の時点で化粧品の安全性評価に関する指令<sup>12)</sup>において, 適切な代替法があればとの前提つきではあるが, 1998年までには実験動物を用いて安全性を評価した化粧品原料および最終製品の販売を禁止することを決めた。しかし, 代替法の開発・バリデーションが充分でなかったことから, その施行を2000年6月30日まで延期した。その後, 2002年6月末まで再度延期された。その再再延長に関する調停会議での合意結果を踏まえ, 化粧品およびその原料の安全性評価に関する化粧品指令第7次改正がEU政府及び議会で認められ, 2003年3月11日付けで公布された<sup>13)</sup>。その内容は ECVAM や OECD で承認された代替法があるものはすべて即時禁止, 2009年までに動物を用いる全ての安全性試験を全面的に禁止, 及び動物実験を行った化粧品の販売禁止, 但し, 薬物動態試験や生殖発生毒性, 反復投与毒性試験などの全身的な作用を検討する試験については2013年まで猶予する, というものである。

この後の動きとして, フランス政府および欧州化粧品原料連合会 (European Federation for Cosmetic Ingredients) は, 第7次改正の該当規制が不明瞭で, 加盟国批准の際に実施される自国法規制への取り込みは解釈の異なったものとなり, 通商上の混乱を引き起こすとして, EU 議会およびEU 理事会を提訴した<sup>14)</sup>。現在, この提訴に対する判決はまだなされていない。また, EU 委員会は2004年9月11日までに具体的な試験禁止に向けた活動計画を策定するため, 行政, 学

識経験者、産業界代表、動物愛護団体代表によるStakeholder Meetingを開催している。

また、上記第七改正が成立したことを受け、ECVAMは、今後の重点課題を以下の11項目に整理した<sup>15)</sup>。1) 全身毒性(単回投与毒性、反復投与毒性、神経毒性、肺毒性、腎毒性、肝毒性、免疫毒性、血液毒性)、2) 局所毒性(光毒性、皮膚腐食性、皮膚刺激性、眼刺激性)、3) 感作性(皮膚感作性、吸入感作性)、4) 発ガン性、5) 生殖毒性、6) トキシコキネティクス、7) 環境毒性、8) 科学的な情報サービス、9) 定量的構造活性相関、10) 生物学材料(発熱性物質試験)、11) 戦略開発(in vitro 毒性試験やバリデーションにおけるGLP、Good Cell Culture Practice (GCCP)のガイドライン、トキシコゲノミクス)。これらの内、光毒性試験、皮膚腐食性試験、及び経皮吸収試験についてはOECDレベルでのガイドライン或いはその案が存在する。また、生殖毒性試験としては、胚性幹細胞試験、全胚培養試験、及びマイクロマス試験などを胎児毒性試験代替法として合意している。一方、単回投与毒性試験と皮膚刺激性試験、及び眼刺激性試験についてはバリデーション中、或いはその準備中である。また、in vitro 胎児毒性試験、皮膚刺激性試験、急性毒性試験、免疫毒性試験、トキシコゲノミクスについてECVAM主催のWorkshopを開催し、検討を進めている。

### 3-2) 米国の状況

ICCVAMは代替法を受け入れるための基準に基づいて、米国内外から提供されたバリデーションデータのPeer Reviewによる代替法評価を行っている。まず、1998年に皮膚腐食性試験法としてのCorrositex<sup>®</sup>について資料のPeer Reviewを行い、本方法が動物愛護の点で問題無いこと、また、全ての化学物質に有用とは言えないが、Department of Transport (DOT)で必要とされる状況においては有用であると評価した<sup>16)</sup>。なお、DOTが適当とする被験物質の範囲とICCVAMの専門家が適当と評価した物質の範囲との間で若干食い違いがある。本試験で陰性の場合には皮膚刺激性試験により確認の必要があるが、false positiveを許容するならば陽性の場合の動物試験は不要とした。同様のpeer reviewにより、感作性試験法としてのLLNA法を完全な代替法ではないが、妥当な方法であるとして認知した<sup>17)</sup>。また、皮膚腐食性試験としてEpiDerm<sup>™</sup>、およびEPISKIN<sup>™</sup>法の評価が終了している。このように米国ではICCVAMの設立以来、着々と代替法の評価と行政への取り入れを進めている。

一方、ICCVAMはECVAMと密接な協力関係を結び、お互いが承認した試験法については、簡易の評価促進プロセスを採用している<sup>18)</sup>。また、急性全身毒性を評価するための細胞毒性試験についての共同バリデーションを実施中であり、Phase Ia試験およびPhase Ib試験結果を踏まえて再現性向上の観点からプロトコルを修正したPhase II試験が2003年11月に完了した。現在、最適化されたプロトコルを使用

した試験Phase の段階にある。更に、4種の眼刺激性試験代替法(BCOP法、HET-CAM法、ICE (Isolated Chicken Eye Test)法及びIRE (Isolated Rabbit Eye Test)法)のバリデーションを計画しており<sup>19)</sup>、各国に情報提供を求めている。特に良質なin vivo試験結果を求めており、我々の行ったin vivo眼刺激性試験結果を提供した。なお、ICCVAMでの評価には日本の専門家も協力している。

### 3-3) 最近のOECDの状況

OECDでは安全性試験法ガイドラインの策定にあたって、動物福祉の問題を重視しており、安全性試験法専門家会議にInternational Council on Animal Protection in OECD Programmes (ICAPO)のような動物福祉団体代表の参加を許容している。

動物実験代替法関連のガイドラインとしては、これまでに急性経口投与毒性試験法として、動物使用数の少ない固定用量法(420: Fixed Dose Method, Updated 2001.12.20)、毒性クラス分け法(423: Acute Toxic Class Method, 2001.12.20)及びUp-and-Down法(425: Up-and-Down Procedure, 2001.12.20)を受け入れるとともに、多数の動物を用いる従来のガイドライン(401)を廃止した(2002.12.20)。また、旧ガイドラインに基づくデータの受け入れ拒否を求めた。また、安全性試験における倫理的な実験法についてのガイドライン案(1998)を作成した。皮膚感作性試験ガイドライン429(LLNA法)が正式にガイドライン化した(2003)。また、光毒性試験ガイドライン432(In Vitro 3T3 NRU phototoxicity test)、皮膚腐食性試験ガイドライン430(In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER))、皮膚腐食性試験ガイドライン431(In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test, EPISKIN<sup>™</sup>, EpiDerm<sup>™</sup>法)、経皮吸収試験ガイドライン428(Skin Absorption: in vitro Method)が2002年5月のNational Coordinator会議で合意された。しかし、ガイドラインとしての正式な通知はまだなされていない。

### 2-4) 日本における代替法の受入状況

日本にはECVAMやICCVAMのような安全性試験評価のための常設組織は存在せず、事例ごとに研究班が組織され、検討されてきた。in vitroの安全性試験法としては、従来より実施されている遺伝毒性試験以外のin vitro試験法として医療用プラスチック容器抽出物の安全性評価のための細胞毒性試験法や注射用水の微生物性発熱物質評価のためのin vitroエンドトキシン試験法(リムラステスト)が承認され、日本薬局方に組み入れられている。また、OECD加盟国としてOECD承認試験法で得られた結果の受け入れ義務がある。一方、ICHでは表4に示したような安全性試験法ガイドラインの変更がなされ、我が国のガイドラインにも導入されたが、それらも前記の3Rの原則に合致するものである。

表4：代替法に関連したICH（医薬品の承認申請に必要な試験についての国際的なハーモナイゼーションのための会議）での検討

- 1) 単回投与毒性試験において統計学的に厳密なLD50値を要求しない。非齧歯類では必ずしも死亡するまで用量を上げなくとも良い。  
使用動物数の削減、動物の苦痛の削減
- 2) 反復投与毒性試験において12ヶ月試験を要求しない。  
毒性試験期間の短縮、動物使用数の削減
- 3) 雄性生殖臓器毒性検出系としての詳細な病理観察を供  
う2週間反復投与毒性試験結果を受け入れる。  
早期の臨床試験 無駄な動物実験の削減
- 4) 発癌性試験における動物種数を1種に削減し、代替法  
で補足する。  
使用動物数の削減
- 5) 臨床試験との関係における非臨床試験実施タイミング  
について合意  
科学的・倫理的に妥当な医薬品開発の促進  
無駄に終わる動物試験実施の減少

ウサギの眼を用いる化粧品の眼刺激性試験については、適切な方法があればとの留保つきではあるが、代替法を受け入れることが厚生省により表明されている<sup>20)</sup>。しかし、どの試験法が適切な方法であるのか不明であった。そこで、我々は日本化粧品工業連合会と協力し、眼刺激性試験代替法のバリデーションを実行し、血清を添加した培養液を用いる細胞毒性試験法など、いくつかの方法が従来のウサギを用いるドレイズ試験結果との対応が良いことを示した<sup>21)</sup>。

また、代替法を用いて化粧品原料の眼刺激性を評価するためのガイドライン案を作成した<sup>22)</sup>。

一方、代替法を国際的な基準に基づいたバリデーションによって評価するには、準備と実施および結果の解析、さらにはガイドラインの作成等に多額の費用と時間、及び労力を要する。そこで我々は「動物実験代替法の使用を促進するための研究」のもとで、日本動物実験代替法学会と協力し、文献やバリデーション結果を客観的・科学的に評価し、試験法の長所や短所、限界などを明らかにし、その妥当性検討プロジェクトを平成13年度より開始した。本研究班は、代替法やバリデーションの専門家から構成され、代替法に関する情報を収集して一次的な解析・評価を行う評価委員会、その報告をもとに、より広い視野で評価するための（臨床医師、毒性学者、行政担当者等からなる）評価会議、の二段階で評価するスキームを構築した。今までに、光毒性試験代替法について広く調査し、施設間比較の出来るバリデーション結果の存在する3T3細胞を用いてneutral red (NU)取り込みを指標とする方法(3T3-NRU光毒性試験法)を評価した<sup>23)</sup>。また、難水溶性物質に使用できる可能性の高い光毒性試験法と

して、酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験法を組み合わせた試験法バッテリーについて文献的評価を基に多施設バリデーションを実施している。また、放射性同位元素を用いない皮膚感作性試験(LLNA試験法の改良法)の評価を計画している。

### 3-5) その他の国際的状況

第3回国際動物実験代替法会議(イタリア、ポロニア)において、動物実験と代替法についての「ポロニア宣言」が採択された。これはRusselとBurch(1959)が1954年に提案した3Rを再確認するとともに、それを更に促進するためのものである。それを以下に要約した。

全ての国が全ての研究・試験・教育に3Rの原則を積極的に組み入れるための法的な枠組みを作るべきである。

いずれの動物実験においても、関係する科学者や行政官の全てに教育や訓練を行う公式あるいは非公式の機構が無くてはならない。

全ての動物実験は事前に専門家により科学および倫理の両面について、独立した審査を受けなくてはならない。動物実験の結果得られる利益と想定される動物の苦痛の両方を評価し、計ることが審査委員会の重要な機能の一部である。

どのような状況においても許されるべきでない動物の苦痛のレベルについての国際的な合意があるべきである。より厳しい実験動物に対する規制を避けるために動物実験を他の国に依頼することを受け入れるべきではない。

### 4. 我が国における代替法研究・評価センターの必要性

今まで述べたように、欧米では1990年代の半ばよりEUはECVAM、米国はICCVAMという新規安全性試験法の開発とバリデーション、或いは評価のための専門機関を設置し、検討を進めてきた。しかし、日本においてはECVAMやICCVAMに相当する組織はなく、試験法毎に当該専門家が対応しているのが現状である。また、我が国独自の試験法のバリデーションや評価が遅れている。そこで、in vitro 新試験法の開発研究と、それによって得た専門的知見を基礎に新規代替法のバリデーションと評価、及び国際対応を行う日本における代替法研究の中心、JaCVAM (Japanese Center for Validation of Alternative Methods)を設立する必要がある。しかし、欧米並の予算と人員の確保は不可能であり、関連学会や業界との協力体制が望ましい(図4)。これにより、1) JaCVAM主催による国際レベルのバリデーションにより新しい試験法の利点と限界が明確化されることにより、医薬品や化粧品、農薬、その他の化学物質の安全性評価のレベルが向上する、2) 適切に評価された、経済的に有利な方法が利用できることにより、安全性評価がスピードアップされる、3) トキシコゲノミクスやプロテオミクスなどの新しい手法や考えを利用した安全性評価手法を適切に評価するこ

とにより ,利用を図ることができる ,4) ECVAM や ICCVAM と協力して代替試験法を開発することにより ,新しい試験法開発についての国際貢献ができる ,更に ,5) 動物実験代替法開発に関する我が国の姿勢と貢献を印象づけることができる ,と考える .

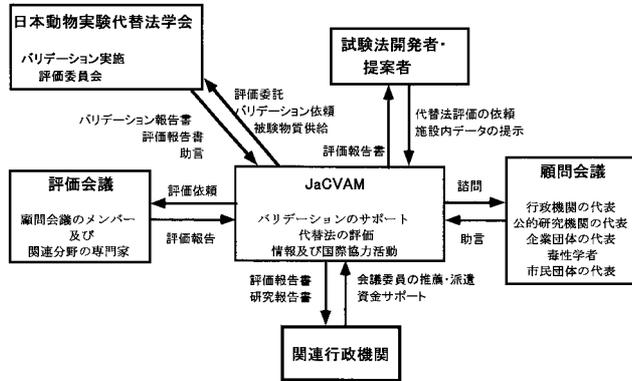


図 4 : JaCVAM 構想案

## 5. まとめ

安全性試験法の改良は科学の進歩とともに継続して進めなくてはならない .欧米では ECVAM や ICCVAM の様に代替法や新しい安全性試験法について専門的に取り扱う組織があり ,代替法の研究やバリデーションおよびその支援 ,および科学的評価を行っている .日本においても同様な組織が作られることが望ましい .

## 6. 参考文献

- Russel W.M.S. and Burtch R.L. (1959) The principles of Human Experimental Technique (Methuen,London).
- Scala R.: Theoretical approaches to validation. In Approaches to validation (ed. A.M.Goldberg), Alternative Methods in Toxicology, 5, 1-10, 1987.
- Frazier J.M.: Scientific criteria for validation of in vitro toxicity tests. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Environmental Mono graph, No.36, 1990.
- Balls M., et al: Report and recommendations of the CAAT/ ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. ATLA, 18, 318-338, 1990.
- 小野 宏 ,動物実験代替法開発過程における評価試験—特に毒性試験代替法の有用性確認(バリデーション)について— 大野忠夫編著「動物実験代替法マニュアル」共立出版 ,東京 (1994) p123-133.
- 大野泰雄 ,リスクアセスメントの問題点ととの科学的対応 4 . in vitro 研究 . 科学物質のリスクアセスメント—現状と問題点— ,厚生省生活衛生局企画課生活科学安全対策室監修 ,国立医薬品食品衛生研究所「化学物質のリスクアセスメント」編集委員会編集 .薬業時報社 p 157-184, 1997.
- Ohno, Y., Kaneko, T, Kobayashi, T., Inoue, T.,Kuroiwa, Y., Yoshida, T., Momma, J., Hayashi, M.,Akiyama, J., Atsumi, T., Chiba, K., Endou, T., Fujii,A., Kakishima, H., Kojima, H., Masamoto, Y., Masuda,M., Matsukawa, K., Ohkoshi, K., Okada, J., Sakamoto,K., Takano, K., Suzuki, T, Takanaka, A.: First phase inter-laboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients: (1) Overview, organization, and results of the validation study. Alternatives to Animal Testing and Experimentation 3, 123-136, 1995.
- Hartung T. & ECVAM Team, New concepts for validation, OECD Workshop on Data Interpretation Procedures (DIP'S), BERLIN 1st-2nd JULY, 2004
- ICCVAM: Validation and regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. A Report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods; P105, Research Triangle Park: NIEHS (1997).
- OECD; Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test methods; ENV/MC/CHEM/TG(96)9, 1996.
- SCCNFP/0546/02, final June 4, 2003, Memorandum concerning of the actual status of alternative methods to the use of animals in the safety testing of cosmetic ingredients. 2002.6.4
- EU, Council Directive 93/35/EEC
- Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council, February 27, 2003; Official Journal of the European Union, L66, 11/03/2003, P0026-0035 B
- The Rose Sheet Vol.24 No.34, p.7 (2003)
- Hartung T. et al, ECVAM's response to the changing political environment for alternatives: Consequences of the european Union chemicals and cosmetics policies. ATLA, 31, 473-481 (2003)
- ICCVAM: CorrositexR: An in vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) in teragency center for the evaluation of alternative toxicological methods (NICEATM). NIH Publication No: 99-4495 (1999).
- ICCVAM: The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program

- Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), National Toxicology Program, NIH Publication No. 99-4494 (1999)
- 18) Federal Register Vol.67, No.147, 31/07/2002, p49706-49707
- 19) In vitro screening test methods for severe eye irritants (<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/eyeirrit.htm>)
- 20) 厚生省「化粧品・医薬部外品製造承認ガイドブック第三版」,厚生省薬務局審査課監修,日本公定書協会編集,薬事日報社 p164 (1996)
- 21) Ohno, Y. et al: Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients 1) Overview of the validation of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicol. in Vitro*, 13, 73-98 (1999)
- 22) 大野泰雄,化粧品的眼刺激性試験代替法に関する調査研究.平成9年度厚生科学研究費報告費
- 23) Ohno, Y. et al (2004) Balb/c 3T3細胞を用いたNeutral red取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価結果 AATEX in print.