

日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 平成 23 年度報告書

小島 肇^{1,2)}西川秋佳^{1,2)}

1) 日本動物実験代替法評価センター運営委員会

2) 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

Summary

In November 2005, the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) was established at the National Center for Biological Safety and Research affiliated with the National Institute of Health Sciences (NIHS) in Japan. The JaCVAM's mission is to facilitate the 3Rs (Reduction, Refinement and Replacement) with regard to animal testing, with special priority in Japan given to reduction and replacement. Specifically, the key objectives of JaCVAM are:

- 1) To ensure that new or revised tests are validated through comparison with domestically developed or internationally certified standard tests, peer reviewed, and officially accepted by the regulatory agencies.
- 2) To work towards harmonization of international alternatives to animal testing. Each validation center has signed a Memorandum of Cooperation with the International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM). Countries and regions participating in ICATM include JaCVAM; the European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM); the United States NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods/Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (NICEATM/ICCVAM); Health Canada; and, as of March 2011, the Korean Center for the Validation of Alternative Methods (KoCVAM). Under the ICATM framework, JaCVAM expects to experience more efficient test validation and review, as well as more rapid national and international acceptance of scientifically valid methods.

In the six years that JaCVAM has been active, seven methods have been accepted by the JaCVAM regulatory acceptance board, including: 1) the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test for identifying ocular corrosives and severe irritants; 2) the isolated chicken eye (ICE) test for identifying ocular corrosives and severe irritants, 3) the local lymph node assay (LLNA): DA, a non-radioactive modification to the LLNA, which quantifies adenosine triphosphate (ATP) content via bio-luminescence as an indicator of lymphocyte proliferation; 4) the LLNA:BrdU-enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), a non-radioactive modification to the LLNA test method, which utilizes non-radiolabelled 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) in an ELISA-based test system to measure lymphocyte proliferation; 5) the Reconstructed Human Epidermis Test Method, EPISKIN for *in vitro* skin irritation testing; 6) the Human Skin Model Test, Vitrolife-Skin, EpiDerm for *in vitro* skin corrosion testing; and 7) an *in vitro* cytotoxicity test for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity tests.

In February 4, 2011, the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan was notified that data obtained with alternative testing methods approved by the JaCVAM Steering Committee could be used for the submission of quasi-drug applications or for petitions to include ingredients in the Standards for Cosmetics. Therefore, JaCVAM decided to accelerate new *in vitro* testing methods to take advantage of this opportunity to strongly impact testing throughout Japan. Accordingly, JaCVAM is currently coordinating the validation studies and peer review of several

tests Most of the tests are for the safety assessment of cosmetic ingredients and/or products. The methods currently undergoing national or international peer review include the Bhas cell transformation assay and the short time exposure (STE) assay for eye irritation testing. Additionally, JaCVAM is participating, along with several other international collaborators, in ongoing validation studies, which include the human cell line activation test (h-CLAT), *in vivo/in vitro* Comet assays, the stably transfected transactivation assay (STTA) antagonist test for screening of endocrine disruptors, and an a reactive oxygen species (ROS) assay for phototoxicity.

Furthermore, we started the validation study on the IL-8 Luc assay for the skin sensitization and SIRC-CVS for the eye irritatiion under the ICATM framework this year.

1. 序論

2005年（平成17年）11月に国立医薬品食品衛生研究所（以下、国立衛研と記す）安全性生物試験研究センター（以下、安全センターと記す）薬理部内に新規試験法評価室が設けられた。この部屋を中心に、国立衛研内の専門家、日本動物実験代替法学会代表をメンバーで構成される合議体としてJaCVAM（Japanese Center for the Validation of Alternative Methods）はスタートした。

なお、このJaCVAMは、2011年（平成23年）4月より、国立衛研の内部組織として、業務内容及び責務を明確にした組織に変更され（JaCVAM設置規則¹⁾）、JaCVAMの日本語の正式な名称である「日本動物実験代替法評価センター」として活動を始めた。このJaCVAMの設置規則では、JaCVAMの目的を「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、並びに化粧品基準の改正等にも寄与する。」としている。今年度より、毎年の成果を年次報告としてまとめていきたい。

2. JaCVAMの組織と機能

JaCVAMは、化学物質等の安全性評価の試験法に関する科学的妥当性及びそれに必要なバリデーション、行政的利用の妥当性や社会的受け入れの可能性について審議を実施している組織であり、その運営の責任は、運営委員会が負っている。

運営委員会のメンバーは、国立衛研所長、安全センター運営会議構成員（安全センター長、毒性部長、病理部長、薬理部長、変異遺伝部長、総合評価研究室長及び毒性部動物管理室長）、新規試験法評価室長、厚生労働省医薬局担当課室及び独立行政法人医薬品医療機器総合機構の代表者である。事務局を新規試験法評価室が務める。提案者から新規試験法がJaCVAMに提出されると、①運営委員会は、試験法毎にその分野の専門家による評価委員会を設置する。評価委員会は新規・改訂試験法の科学的な評価を行い、第一次評価報告書を作成する。②運営委員会は、この第一次評価委員会報告書の報告を基にバリデーションを行うことが適当か検討を行い、バリデーションを行うことが適当な場合には、バリデーション実行委員会を設置する。③バリデーション実行委員会は、バリデーションの計画を立て、実行する。また、バリデーションの結果を踏まえ、推奨できるプロトコルを含むバリデーション報告書をまとめる。④評価委員会は、バリデーション結果を踏まえて、審議を行い、評価委員会としての第二次評価委員会報告書をまとめ、パブリックコメントに供する。⑤評価委員会報告書及び背景情報並びにパブリックコメントで得られた意見は、国立衛研及び外部の毒性学・統計学者、医

薬品医療機器総合機構の審査担当者等で構成される評価会議において、申請試験法の科学的妥当性、その行政的利用及び社会的受け入れ可能性の観点から審議され、評価会議報告書が作成される。⑥評価会議の報告書は、運営委員会による承認後、評価委員会の評価報告書等とともに公表され、行政的利用の妥当性がある試験法は新規試験法提案書として関連行政部局に伝達される。

なお、厚生労働省では、平成23年2月4日医薬部外品の承認申請等において、JaCVAMの評価結果等を参考に適切な資料を作成する旨の事務連絡を発出し²⁾、積極的に動物試験代替法の促進に務めている。これらはJaCVAMホームページで掲載される¹⁾。これにより、医薬部外品の承認申請資料の作成や化粧品のポジティブリスト改正要望等への活用が促進されることが期待されている。

さらに、平成24年4月26日付けで、厚生労働省医薬食品局審査管理課より³⁾、2つの代替法について利用に関するガイダンスが公表された。これらのガイダンスもJaCVAMのホームページに掲載されており、これらのJaCVAM関連資料は代替法の利用に大きな影響を及ぼすと考えている。

3. 評価活動

JaCVAMでは、主にOECD TG (Test Guideline) として公表されている眼刺激性、皮膚刺激性、感作性、光毒性試験などの代替法の利用促進のため、国内での行政的利用等の妥当性に関する評価を実施した。また、国内外の機関と協力してバリデーションや国際的な第三者評価を実施した。これまでの情報は、JaCVAM ホームページで逐次更新しており、興味のある方は最新情報を入手してほしい¹⁾。

3-1 評価会議での評価活動

2010年までに、腐食性試験の代替法として、①日本製の培養皮膚モデル Vitrolife-Skin が皮膚刺激性試験の代替法として②OECD TG439 (*in vitro* skin irritation assay) に掲載された培養表皮モデル EPISKIN が⁴⁾、強眼刺激性を評価する試験法として③OECD TG437 として掲載された BCOP (Bovine Corneal Opacity/Permeability assay)⁴⁾ や④OECD TG438 として掲載された ICE (Isolated Chicken Eye assay) が⁴⁾、皮膚感作性試験の代替法として⑤OECD TG442A として掲載され、日本が提案したリンパ節中の ATP 量の変化を指標とした LLNA (Local Lymph Node Assay) : DA や⁴⁾ ⑥OECD TG442B として掲載され、BrdU (Bromodeoxyuridine)の取り込みを指標とした LLNA : BrdU-ELISA が⁴⁾、評価された。なお、これらの評価会議での評価結果は、今年度、再評価して改訂した。

また、新たに本年度、OECD ガイダンス文書 129 として成立した⑦急性毒性試験の最高適用濃度を定めるための細胞毒性試験 ((3T3NRU: Neutral Red Uptake)が⁵⁾、行政的利用等が可能であると判断された。OECD TG に収載されている皮膚刺激性試験代替法 EpiDerm 及び SkinEthics、皮膚感作性代替法 reduced LLNA についても、現時点 (2012 年 7 月時点) で行政的利用等が可能であると判断されている。なお、TG428 である *in vitro* 皮膚透過性試験、2012 年に OECD TG (テストガイドライン) への収載が決まった皮膚刺激性試験代替法 LabCyte EPI-MODEL、眼刺激性試験代替法ドレイズ試験への麻酔利用、眼刺激性試験代替法フルオレセイン漏出法、日本もバリデーションに協力した内分泌かく乱スクリーニング エストロジェンアゴニスト&アンタゴニスト法 BG1Luc アッセイ¹⁰⁾、OECD の作業計画に載っている眼刺激性試験代替法サイトセンサーマイクロフィジオメーター法及び遺伝毒性試験 哺乳類培養細胞を用いる試験法が順次、評価される予定である。

3-2 国際的な第三者評価

株式会社花王で開発された眼刺激性試験代替法 細胞毒性試験 STE (Short Time Exposure) については、2008-2009 年に日本動物実験代替法学会⁶⁾ で実施されたバリデーション及び 2010 年の JaCVAM 追

加バリデーションを経て、OECD に TG 申請を行っている⁷⁾。現在、NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) – ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) の協力を得て⁸⁾、国際的な第三者評価の準備を進めている。イニシエーションに加え、プロモーターも検出できる形質転換試験法 Bhas 42 アッセイについては、独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) プロジェクトでバリデートされ、OECD に TG として申請された⁷⁾。現在、ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods, 2011 年より現 EURL ECVAM : European Union Reference Laboratory for Alternative Methods to Animal Testing に変更⁹⁾) の協力を得て、国際的な第三者評価の準備を進めている。

3-3 バリデーション

h-CLAT (Human Cell Line Activation Test) のバリデーション研究を EURL ECVAM とともに実施する一方、東北大 相場らの開発した IL-8 Luc アッセイについて、経済産業省の主導のバリデーションを支援している。

ROS (Reactive Oxygen Species) を指標とした光毒性試験について、日本製薬工業協会の支援を受け、JaCVAM でバリデーションを実施した。

眼刺激性試験代替法 細胞毒性試験 SIRC-CVS (Crystal Violet Staining assay) については、国立衛研主導のバリデーションを 2011 年より開始した。

コメットアッセイについては、日本環境変異原学会/哺乳類変異原性(MMS)研究会¹¹⁾、欧米の研究機関と協力して国際的なバリデーションを進めた。*In vivo* 試験に関しては、実験が終了し、バリデーション報告書を作成中である。

安定にトランスフェクトされたヒトエストロゲン受容体- α の転写活性化アッセイ アゴニスト法 TG455 は⁴⁾、化学物質評価研究機構 (CERI) によって開発された。現在では、このテストガイドラインにアンタゴニストの評価系も加えるべく、バリデーションを実施している。

4. 国際協調

4-1 ICATM

2009 年 4 月には ECVAM や NICEATM-ICCVAM 及び Health Canada とともに ICATM (International Collaboration on Alternative Test Methods) が設立され¹²⁾、国立衛研の所長が覚書に調印した。この会議は、化粧品規制協力国際会議 (ICCR: International Cooperation on Cosmetic Regulation) の提案で設立されたものである¹³⁾。この会議の 3 つの重要な領域における協力の枠組みを以下に示す。特に重要な点は、これまでバリデーションセンターで取り組んでいる課題・試験法に多くの重複があった。そこで、この会議を中心に国際的な協調及び共同研究を進め、限られた資源 (資金や人材) を生かすことである。

- 1) バリデーション研究
- 2) 科学的妥当性についての第三者評価
- 3) 代替法における公式な試験法勧告の推奨

2011 年 3 月には、さらに KoCVAM (Korean Center for the Validation of Alternative Methods)¹⁴⁾ も参画し、新たな覚書が交わされ、国際協調が拡大している (写真 1)。ICATM はその設立経緯により、毎年 ICCR に報告書を提出している。

しかしながら、各国の代替法評価センターは化粧品の安全性評価のための代替法のみを対象にしておらず、ICATM での協力の枠組みも化粧品に制限されているものではない。ICATM は化学物質規制と関

係の深い OECD⁷⁾ や医薬品規制と関連の深い日米欧の医薬品規制調和会議 (ICH : International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)¹⁵⁾、JIS と関連の深い ISO (International Organization for Standardization)¹⁶⁾ などが進める施策と協調し、代替法の確立を進めるための国際協力の枠組みである。

4-2 ICATM への協力

ICATM に協力して実施している試験法のバリデーション及び第三者評価の表 1 に示す。EURL ECVAM のバリデーションが中心であり、①眼刺激性試験として、培養角膜モデルを用いた試験法、②皮膚感作性試験として、*in vitro* 試験 h-CLAT 及び MUSST、③トキシコキネティック試験として、*in vitro* 肝生体内変化 – CYP 誘導 – Hepa RG 凍結ヒト肝細胞、④遺伝毒性試験として、培養表皮モデルを用いた小核試験のバリデーション、⑤内分泌かく乱スクリーニングとして、MELN[®] : 安定にトランスフェクトされたヒトエストロゲン転写活性化アッセイ、アゴニスト&アンタゴニスト法のバリデーションが進んでいる。なお、NICEATM-ICCVAM では⑥アゴニスト&アンタゴニスト法 CCI アッセイ : MCF-7 細胞増殖試験のバリデーションを進め、⑦*in vitro* パイロジェン試験の追加バリデーションを計画している。

さらに、皮膚感作性試験として、⑧*in vitro* の DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay) 及び⑨Keratinosense、急性経口毒性試験として、⑨*in vitro* 細胞毒性試験 (3T3NRU)、⑩急性経口毒性試験として、ゼブラフィッシュ試験の第三者評価がなされている。

5. JaCVAM の外部評価

JaCVAM では、EURL ECVAM 又は ICCVAM と同様、顧問会議を設置し、JaCVAM の運営とその計画及び成果について、1 年に 1 回以上の頻度で審議を行い、その助言に基づき運用の改善に取り組んでいる。

6. 総括

昨年、2011 年 4 月より、国立衛研の内部組織として、業務内容及び責務を明確にした組織に変更され、「日本動物実験代替法評価センター」として活動を始めた。JaCVAM 活動の開始から数えて、6 年半が立ち、行政組織上の位置づけの明確な組織となった。JaCVAM は欧米に比べて小さいが、この設置規則により欧米と肩を並べる存在となった。これからも引き続き、ICATM や OECD と協力して代替法の評価活動を進め、代替法の導入及び普及に尽力していきたいと考えている。

謝辞

JaCVAM 活動に参加されている方々及び当該活動に貴重な御意見をいただいた全ての皆様にこの場をお借りして感謝致します。

参考文献

- 1) JaCVAM (2012) Available at: <http://jacvam.jp/>
- 2) 厚生労働省事務連絡 「医薬部外品の承認申請資料作成等における動物実験代替法の利用と JaCVAM の活用促進について」 (平成23年2月4日)
- 3) 厚生労働省事務連絡 「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」 (平成24年4月26日)

4) OECD test guideline (2012) Available at:

http://www.oecd.org/document/40/0,3746,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html

5) OECD Series on Testing and Assessment / Adopted Guidance and Review Documents (2012) available at :

http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html

6) 日本動物実験代替法学会 (2012) Available at: <http://www.asas.or.jp/jsaa/>

7) OECD WORK PLAN FOR THE TEST GUIDELINES PROGRAMME (2011) Available at:

[http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/TG\(2011\)47&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/TG(2011)47&doclanguage=en)

8) ICCVAM (2012) Available at : http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/EPreport/ocu_report.htm

9) ECVAM (2012) Available at : <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>

10) OECD draft test guideline (2012) Available at:

http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

11) 日本環境変異原学会 MMS 研究会 (2012) Available at: <http://www.j-ems.org/groups/mms.html>

12) 厚生労働省 (2012) Available at: <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/08/h0814-1.html>

13) 厚生労働省 (2012) Available at: <http://www.mhlw.go.jp/bunya/iyakuhin/keshouhin/iccr04.html>

14) KFDA(2012) Available at: <http://www.nifds.go.kr/en/inter/kocvam.jsp>

15) 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 (2012) Available at: http://www.pmda.go.jp/ich/ich_index.html

16) 日本工業標準調査会 (2012) Available at: <http://www.jisc.go.jp/international/isoiec.html>