

日本動物実験代替法評価センター（JaCVAM）平成 25 年度報告書

小島肇夫、西川秋佳

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 日本動物実験代替法評価センター

要旨

Summary

In 2013, JaCVAM has been accepted five test methods by the JaCVAM regulatory acceptance board, including: 1) *In Vitro* Skin Irritation - Reconstructed Human Epidermis Test Method, 2) 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; 3) Acute Eye Irritation/Corrosion; 4) BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, and 5) Skin Absorption: *In Vitro* Method.

Furthermore, JaCVAM contributed to establish four OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) Test Guideline (TG). There is TG No. 439 *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. In the OECD Work plan, JaCVAM has proposed six test methods: 1) *in vivo* comet assay for genotoxicity testing, 2) the Bhas 42 cell transformation assay, 3) the short time exposure (STE) assay for eye irritation testing, 4) h-CLAT assay for skin sensitization assay, 5) Endocrine disruptor screening Stable transfected transcriptional activation (STTA) antagonist assay, and 6) Androgen disruptor screening Stable transfected transcriptional activation (STTA) assay (AR-Ecoscreen). Reactive Oxygen Species (ROS) assay for phototoxicity testing also described at the ICH S10 Guideline on Photosafety Evaluation. Additionally, JaCVAM is participating, along with several other international collaborators, in ongoing validation studies, which include STTA antagonist test, AR-Ecoscreen, Hand1-Luc EST for the development testing, the IL-8 Luc assay for the skin sensitization testing and SIRC-CVS, and Vitrigel-EIT for the eye irritation testing.

1. 序論

日本動物実験代替法評価センター(JaCVAM : Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) の平成 25 年度の成果を年次報告としてまとめた。

2. 設置規則

平成 25 年 4 月、JaCVAM の設置規則が改訂された¹⁾。主な改訂点を以下に挙げる。これにより、化学物質や農薬の規制への寄与が明記された。また、評価委員会が Independent peer review を行う組織であるとの誤解があったことから、資料編纂委員会と第三者評価委員会に分け、それぞれの役割が明記された。

1) JaCVAMの目的及び業務（第2条）

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、化粧品基準の改正等に加え、化学物質、農薬の適正な規制への寄与が追記された。

2) JaCVAM活動のための組織の設置（第3条）

これまでの評価委員会が、資料編纂委員会と第三者評価委員会に分けられ、運営委員会、顧問会議、評価会議、資料編纂委員会、バリデーション実行委員会及び第三者評価委員会となった。

3) 資料編纂委員会（第7条）

資料編纂委員会は、当該試験法に関するバリデーション報告書、第三者評価委員会の報告書及び当該試験法の背景情報を用い、必要に応じて当該試験法に対する意見・提案を国内外の機関に行うとともに、資料編纂委員会としての報告書をまとめる。

2 資料編纂委員会は、当該試験法毎に、当該分野に係る安全性や統計解析の専門家により構成される。運営委員会から指名された資料編纂委員会委員長が、事務局と相談の上、委員を指名する。

4) 第三者評価委員会（第9条）

第三者評価委員会は、バリデーション報告書及び当該試験法の背景情報を用い、第三者の専門家としての立場から当該試験法の信頼性と適正を科学的に評価する。必要に応じて追加バリデーションの実施とそこで検討すべき内容について提案する。これらの結果を踏まえて、審議を行い、第三者評価委員会としての報告書をまとめる。

2. 成果

JaCVAM では、ICATM (International Cooperation on Alternative Test Methods) の協力を得て、眼刺激性、皮膚刺激性、感作性、光毒性試験などの代替法について、バリデーションや第三者評価を実施している。これらの情報は 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⁾。

2-1 JaCVAM 評価会議報告書

以下の試験法の提案を厚生労働省医薬食品局審査管理課および医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室に報告した。

- 1) 新規試験法提案書 皮膚刺激性試験代替法 LabCyte EPI-MODEL24（平成 25 年 11 月）
- 2) 新規試験法提案書 *In vitro* 皮膚透過試験（平成 26 年 1 月）
- 3) 新規試験法提案書 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 BG1Luc ER TA 法（平成 26 年 1 月）
- 4) 新規試験法提案書 改訂 OECD TG No.405：ウサギを用いる眼刺激性試験法（平成 26 年 1 月）
- 5) 新規試験法提案書 改訂 OECD TG No.437 牛摘出角膜の混濁および透過性試験法 (BCOP 法: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test)（平成 26 年 1 月）

2-2 OECD&ICH テストガイドライン

2013 年 OECD はヒト健康に関する 6 つのテストガイドラインを成立させた（400 番台のテストガイドライン）²⁾。そのうち、JaCVAM は OECD Revised Test Guideline No. 439, *In Vitro* Skin Irritation（平成 25 年 7 月）の改訂に深く関与した。

活性酸素種（Reactive Oxygen Species : ROS）を指標とした光毒性試験については、平成 25 年 11 月、ICH S10 photosafety のテストガイドラインへの収載が決まった³⁾。

2-3 皮膚感作性試験代替法およ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⁴⁾

- 1) 厚生労働省医薬食品局審査管理課 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（平成25年5月30日）
- 2) 厚生労働省医薬食品局審査管理課 薬食審査発0204第1号：眼刺激性試験代替法としての牛摘出角膜の混濁および透過性試験法（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について（平成26年2月4日）

2-4 国際的な第三者評価

- 1) 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：STE）については、日本動物実験代替法学会および JaCVAM のバリデーションを経て⁴⁾、ICCVAM (the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)による国際的な第三者評価が終了した。
- 2) 皮膚感作性試験代替法 h-CLAT（Human Cell Line Activation Test）については、EURL ECVAM (the European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing)の「バリデーションを経て^{5,6)}、ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)による国際的な第三者評価が終了した。
- 3) 形質転換試験法 Bhas42 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⁶⁾、EURL ECVAM による国際的な第三者評価が終了した^{5,7)}。
- 4) 遺伝毒性試験 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、欧米の研究機関との国際的なバリデーションを経て、OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development)コメットアッセイ専門家グループによる国際的な第三者評価が終了した⁶⁾。
- 5) 活性酸素種（ROS: Reactive Oxygen Species）を指標とした光毒性試験については、日本製薬工業会とのバリデーションが実施され、JaCVAM での第三者評価が終了した¹⁾。

2-5 バリデーション

- 1) 東北大 相場らの開発した皮膚感作性試験代替法 IL-8 Luc アッセイについては、経済産業省主導で実施中のバリデーションを支援した。
- 2) 住友化学が開発した生殖発生毒性スクリーニング Hand1-Luc EST 法については、経済産業省主導で実施中のバリデーションを支援した。
- 3) 眼刺激性試験代替法 Vitrigel-EIT（Eye Irritation Test）については、農業生物資源研究所主導で開始されたバリデーションを支援した。
- 4) 眼刺激性試験代替法 細胞毒性試験 SIRC-CVS（Crystal Violet Staining）については、国立医薬品食品衛生研究所主導のバリデーション実験が終了した。
- 5) 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 にアンタゴニストの評価系も加えるべく、バリデーション報告書が作成された。
- 6) ヒトアンド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試験 AR-EcoScreen については、経済産業省主導でのバリデーション実験が終了した。

2-6 ICATM 対応試験

ICATM で協力している試験法のバリデーションおよび第三者評価の表 1 に示す。EURL ECVAM のバリデーションが中心であり、眼刺激性試験代替法である培養角膜モデル (EpiOcular) を用いた試験法、皮膚感作性試験代替法である h-CLAT、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、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、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 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。

さらに、EURL ECVAM において、皮膚感作性試験代替法として DPRA (Direct Peptide. Reactivity Assay) および KeratinoSense、急性経口毒性として、*in vitro* 細胞毒性試験 (3T3NRU: Neutral Red Uptake)、形質転換試験 Bhas42 アッセイの行政的な推奨がなされた⁷⁾。

3. JaCVAM の外部評価

JaCVAM の運営とその計画および成果について、1 年に 1 回以上の頻度で運営委員会から報告を受け、それらについて審議し、助言する顧問会議を持った。

4. 総括

本年度は、JaCVAM が主導で進めてきた OECD Revised Test Guideline No. 439, *In Vitro* Skin Irritation に関する OECD テストガイドライン改訂に貢献するとともに、JaCVAM 評価会議にて 5 つの試験法の評価を終了できた。今後も本年度のような成果を継続させていくことを意識していきたい。

謝辞

すべての JaCVAM 協力者の皆様にこの場をお借りして感謝致す。本活動は、厚生労働本省試験研究所試験研究費「健康安全確保のための研究費：国際的動向に対応する新規安全性試験法およびその評価手法の開発」の支援を受けて実施された。

参考文献

- 1) JaCVAM (2014) Available at: <http://jacvam.jp/>
- 2) OECD test guideline (2014) Available at:
http://www.oecd.org/document/40/0,3746,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html
- 3) 医薬品の光安全性評価ガイドライン (2014) http://www.pmda.go.jp/ich/s/s10_14_5_21.pdf
- 4) 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 (2014)
<http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/iyakubugai.html>
- 5) OECD WORK PLAN FOR THE TEST GUIDELINES PROGRAMME (2014) Available at:
[http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/TG\(2014\)47&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/TG(2014)47&doclanguage=en)
- 6) OECD Series on Testing and Assessment / Adopted Guidance and Review Documents (2014) available at :
http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html
- 7) EURL ECVAM recommendation (2014)
http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations