

日本動物実験代替法学会技術講習会
平成30年8月2日
東京大学工学部

OECDのTGと JaCVAM提案書の現状

国立医薬品食品衛生研究所 小島 肇

内容

- OECD TG
- JaCVAM評価書と提案書
- 毒物劇物の基準と代替法



[OECD Home](#)

[About](#)

[Countries](#)

[Topics](#)

[OECD Home](#) › [About the OECD](#)

About the OECD

- › [Who does what](#)
- › [What we do and how](#)
- › [Members and partners](#)
- › [History](#)
- › [Budget](#)
- › [Publishing](#)
- › [Careers at the OECD](#)



OECD Test Guideline数 (2017)

Section	Project	Numbers
1	Physical-Chemical properties	24
2	Effects on Biotic Systems	44
3	Degradation and Accumulation	20
4	Health Effects	67 (in vitro 23)
5	Other Test Guidelines	10
Total		165

動物実験代替法に関するTGは31 (約46%)

Non-animal alternative test methods in the OECD TG(2017)

Class	Test methods
Corrosion	<i>In vitro</i> Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER) :TG430
	<i>In vitro</i> Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) test method :TG431
	CORROSITEX Skin Corrosivity Test :TG435
Skin irritation	<i>In vitro</i> Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test methods, EpiDerm, EPISKIN, SkinEthic, LabCyte EPI-Model: TG439
Phototoxicity	3T3 NRU Phototoxicity Test :TG432
Eye irritation	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: TG437
	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: TG438
	Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants : TG460
	Short Time Exposure <i>In Vitro</i> Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage : TG491
	Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage : TG492
Skin sensitisation	<i>In Chemico</i> Skin Sensitisation, Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) :TG442C
	<i>In Vitro</i> Skin Sensitisation, ARE-Nrf2 Luciferase Test Method :TG442D
	<i>In Vitro</i> Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation: TG442E
Endocrine disrupter screening	Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation <i>In Vitro</i> Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists : TG455
	H295R Steroidogenesis Assay :TG456
	Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals: TG458
	Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) <i>In Vitro</i> Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity : TG493
Genotoxicity	Bacterial Reverse Mutation Test : TG471
	<i>In vitro</i> Mammalian Chromosome Aberration Test : TG473
	<i>In Vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xpRT genes : TG476
	<i>In vitro</i> Micronucleus Test : TG487
	<i>In Vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene : TG490
Skin absorption	Skin Absorption: <i>In vitro</i> Method :TG428

JaCVAMの歴史

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薬理部 新規試験法評価室内
に臨時の組織が設立

2011年4月 設置規則の成立

JaCVAMの目的

1. 国際的な協力の下、日本で開発された方法をOECDのガイドラインとする。
2. バリデーションや第三者評価を通じて評価された代替法について、行政的受入れの適否及びその適用可能な範囲を明確にし、公表する。



JaCVAMの目的（行政的受入れ及び公表）

資料編纂委員会



JaCVAM評価会議

- ・ ICATM、OECDからの提案のreview →日本での概要と論点作成
- ・ 評価書の作成

評価書の行政試験としての有用性確認

公表・行政への提案

JaCVAM運営委員会

承認

再構築ヒト角膜様上皮モデル法
(Reconstructed Human Cornea-like Epithelium Test Method: RhCE 法)

眼刺激性代替法資料編纂委員会

小坂 忠司 (一般財団法人 残留農薬研究所)

佐々木 正治 (アヅヴィ合同会社)

竹内 小苗 (P&G イノベーション合同会社)

森村 智美 (一般財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所)

吉村 功 (東京理科大学名誉教授)

再構築ヒト角膜様上皮モデル法 (Reconstructed Human Cornea-like Epithelium Test Method : RhCE 法) は、化学物質の RhCE 組織に対する細胞毒性を指標に用い、その物質の眼刺激性を評価する試験法である。UN GHS 区分外物質を検出する方法として EURL ECVAM と CE の共同バリデーションを経て 2015 年に OECD によりテストガイドライン TG 492 として採択された。JaCVAM 眼刺激性代替法資料編纂委員会は、TG 492 で示された RhCE 法の 1 つである EpiOcular™ を用いた眼刺激性試験について、バリデーション報告書、第三者評価報告書、関連論文などをもとに試験法の概要および委員会の意見をまとめた。

従来のウサギを用いた Draize 法の結果を基準として正確を評価したとき、一致度は 79.7%、偽陽性率は 37.0%、偽陰性率は 4.3%であった。技術移転性に関して懸念される結果は得られておらず、施設内再現性および施設間再現性はどちらも 90%以上であった。これらの値は、バリデーション運営委員会が定めた基準を満たしていた。

本委員会は、RhCE 法はボトムアップ方式で UN GHS 区分外物質を検出する方法として用いることができる結論した。

眼刺激性試験代替法の評価会議報告書

再構築ヒト角膜様上皮モデル法

(Reconstructed Human Cornea-like Epithelium Test Method: RhCE 法)

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れおよび行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性：

本試験法は RhCE 組織に対する化学物質の細胞毒性を指標に用いて眼刺激性を評価する試験法であり、生きた動物を用いないという点で、3Rs の精神に合致している。また、EpiOcular™ の入手は容易で、短時間で安価に実施でき、特殊な機材や試薬を必要とせず、必要な手技も複雑なものでない。したがって、入手した EpiOcular™ が品質基準の許容範囲にあり、かつ実施する試験施設の技術習得がガイドラインの熟達度確認物質で確かめられていれば、基本的な細胞培養の技術と設備を有する施設であれば実施可能であり、技術移転性は高い。以上より、本試験法の社会的受け入れ性は高い。

行政上の利用性：

本試験法は、化学物質による眼刺激性を評価でき、ボトムアップ方式において UN GHS 区分外を検出する方法として、行政的利用が可能であると考えられる。

なお、EpiOcular™ EIT 以外の RhCE 法を用いる場合には、OECD TG492 の性能標準に記載された物質を用いて⁶⁾、その妥当性を確認しておく必要がある。

JaCVAM 評価会議

大野泰雄 (運営委員会推薦) : 座長
飯塚尚文 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)
石井雄二 (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)
岩瀬裕美子 (日本製薬工業協会)
金子和弘 (日本化学工業協会)
篠田和俊 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
杉山真理子 (日本化粧品工業連合会)
谷川浩子 (日本動物実験代替法学会)
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)
牧 栄二 (日本免疫毒性学会)
森田 健 (日本環境変異原学会)
山田隆志 (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
横関博雄 (日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会)
吉田武美 (日本毒性学会)
吉村 功 (座長推薦)

任期：平成 26 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

JaCVAM 評価会議

大野泰雄 (運営委員会推薦) : 座長
飯塚尚文 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)
石井雄二 (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)
井上智彰 (日本免疫毒性学会)
今井教安 (日本動物実験代替法学会)
岩瀬裕美子 (日本製薬工業協会)
篠田和俊 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
杉山真理子 (日本化粧品工業連合会)
仲井俊司 (日本化学工業協会)
中村りこ (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
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)
沼澤 聡 (日本毒性学会)
森田 健 (日本環境変異原学会)
横関博雄 (日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会)

任期：平成 28 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

新規試験法提案書

平成 29 年 1 月 6 日

No. 2016-02

眼刺激性試験代替法 再構築ヒト角膜様上皮モデル法 (Reconstructed Human Cornea-like Epithelium Test Method: RhCE法) に関する提案

平成 28 年 7 月 5 日に東京、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：再構築ヒト角膜様上皮モデル法（Reconstructed human Cornea-like Epithelium Test Method: RhCE 法）は、化学物質による眼刺激性を評価でき、ボトムアップ方式において UN GHS 区分外を検出する方法として、行政的利用が可能であると考えられる。

この提案書は、Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Test Guideline (TG) 492 “Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage” をもとに、眼刺激性試験資料編纂委員会により作成された「再構築ヒト角膜様上皮モデル法評価報告書」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再構築ヒト角膜様上皮モデル法の使用を提案するものである。



大野泰雄

大野泰雄

JaCVAM 評価会議 議長



西川秋佳

西川秋佳

JaCVAM 運営委員会 委員長

**JaCVAM statement on
the Reconstructed human Cornea-like Epithelium Eye Irritation Test Method**

At a meeting held on 5 July 2016 at the National Institute of Health Sciences (NIHS) in Tokyo, Japan, the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) Regulatory Acceptance Board unanimously endorsed the following statement:

Proposal: The Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method is a suitable method for assessing ocular irritation potential in a regulatory context as part of a bottom-up approach for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage (No Category) under the United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (UN GHS).

This statement was prepared following a review of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Test Guideline 492 “Reconstructed human Cornea-like Epithelium test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage” as well as a validation report on the RhCE test method prepared by the Ocular Irritation Testing JaCVAM Editorial Committee to acknowledge that the results of a review and study by the JaCVAM Regulatory Acceptance Board have confirmed the usefulness of this assay.

Based on the above, we propose the RhCE test method as a useful means for safety assessment by regulatory agencies.



Yasuo Ohno
Chairperson
JaCVAM Regulatory Acceptance Board



Akiyoshi Nishikawa
Chairperson
JaCVAM Steering Committee

6 January 2017

JaCVAMが厚生労働省に受入れを提案した試験法

No.	試験法
1	皮膚腐食性試験代替法 Vitrolife-Skin, EpiDerm, Episkin, SKinEthics, EpiCS
2	皮膚刺激性試験代替法 Episkin, EpiDerm, SkinEthcs, LabCyte EPI-MODEL
3	眼刺激性試験代替法 牛摘出角膜の混濁および透過性試験(BCOP)
4	眼刺激性試験代替法 ニワトリの摘出眼球試験(ICE)
5	眼刺激性試験代替法 フルオレセイン (FL)漏出試験法
6	眼刺激性試験 代替法 <i>In vitro</i> 短時間曝露法 (STE法)
7	眼刺激性試験代替法 再構築ヒト角膜様上皮モデル法 (RhCE法)
8	改訂OECD TG 405:ウサギを用いる眼刺激性試験
9	光安全性試験法 活性酸素種 (ROS) アッセイ
10	皮膚感作性試験代替法 LLNA : DA
11	皮膚感作性試験代替法 LLNA : BrdU-ELISA
12	皮膚感作性試験代替法 rLLNA
13	皮膚感作性試験代替法 ペプチド結合試験(DPRA)
14	皮膚感作性試験代替法 角化細胞レポーターアッセイ
15	皮膚感作性試験代替法 ヒト細胞活性化試験 (h-CLAT)
16	<i>In vitro</i> 皮膚透過性試験
17	単回投与毒性試験代替法
18	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
19	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転写活性化試験法

Update on JaCVAM (15.June / 2009 updated)

Classification	Test name	Validation study	Peer review	Regulatory acceptance	Recommendation to government	OECD	Collaboration
01 Corrosivity test	(1)Reconstructed human tissue test made in Japan: Vitrolife-Skin	Feb-09 	Jun-08 	Jun-08 	Aug-08 	Guideline No.431 	JSAAE
02 Phototoxicity test	(1)3T3-NRU	BfR 	Nov-04 			Guideline No.432 	
	(2)Yeast growth inhibition phototoxicity assay and the red blood cell photohemolysis assay	Jan-09 	May-09 	on going 			JSAAE
03 Skin sensitization test	(1)LLNA-DA	Jun-07 	Feb-08 	Oct-08 	Nov-08 		JSAAE
	(2)LLNA-BrdU	Aug-08 	Feb-09 	on going 			JSAAE
	(3)h-CLAT	start in 2009 					
	(4)LLNA						
	(5)rLLNA	ECVAM, ICCVAM 	start in 2009 				ICCVAM
04 Skin irritation test	(1)Reconstructed human tissue test	ECVAM ^c 	Nov-08 	on going 		Draft test guideline 	ECVAM
	(2)Reconstructed human tissue test made in Japan	May-09 					JSAAE

薬生薬審発 0111 第 1 号
平成 30 年 1 月 11 日

各都道府県衛生主管部（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 ）

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ダンスについて

今般、「医薬品等の安全性評価に関する in vitro 試験（代替法）の開発、国際標準化及び普及促進に関する研究」（平成 29 年度日本医療研究開発機構研究費（医薬品等規制調和・評価研究事業、代表研究者 小島肇））において、医薬部外品・化粧品の安全性評価に皮膚感作性試験代替法の活用促進を図るため、その活用事例を解説するとともに、留意点等を取りまとめたガイダンスを別添のとおり作成されたので、貴管下関係業者に対して周知願います。

代替法普及のため発出したガイダンス

- 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ダンス
- 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ダンス
- 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ダンス
- 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ダンス
- 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ダンス
- 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ダンス
- 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ダンス

厚生労働省、化粧品業界、国立衛研、皮膚科医のメンバーでより代替法の活用を促すガイダンスを作成。

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）

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は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。

毒物劇物の判定基準（案）

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、当該物質の物性、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

吸入 毒物：LC₅₀が0.5mg/L(4hr)以下のもの
(ダスト、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は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 ≥ 3 または虹彩炎 > 1.5 で陽性応答が見られる場合。

眼等の粘膜に対する重篤な損傷を評価する代替法

- ・ OECD TG 437 : 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摘出角膜を用いる混濁度及び透過性試験 (Bovine Corneal Opacity and Permeability Test : BCOP)
- ・ OECD TG 438 : 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)
- ・ OECD TG 460 : 眼腐食性及び強度刺激性物質を同定するためのフルオレセイン漏出試験 (Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants : FL)
- ・ OECD TG 491 : 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)

対象外の眼刺激性試験代替試験法

OECD TG492:眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性に分類する必要のない化学品を同定するための、再構築角膜様上皮モデル法

EpiOcular-EIT, SkinEthics HCE EIT, LabCyte Cornea-model-EIT

ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法

(ICE 法：Isolated Chicken Eye Test) の評価会議報告書

4. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件及び適用できない条件が明確であるか。

当該試験法の妥当性を示すデータは、合計 175 の化学物質または製品が試験され、うち 90 は単一の化学物質で、85 は市販品あるいは製剤など混合物で行われている。様々な化学構造、性質、性状の物質、かつ種々の刺激性強度のものが対象となっており、適用できる物質の範囲が明確である。

当該試験法は、対象とする物質の腐食性・強刺激性を多くの対象物質で評価できる。ただし、アルコール類、界面活性剤、性状が固体のものについての予測性能は不十分である。

当該試験法は、暴露直後の角膜の変化を評価する方法であり、その後の回復等の評価はできない。

6. 当該試験法は、時間的経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。

試験費用面では Draize 法と大きな違いはないが、試験期間は短縮される。

EU では ICE 法の陽性結果をもって化学物質を R41 に区分することを既に受け入れている。米国では、US EPA ^{注釈²} が化学物質の眼刺激性評価において、腐食性・強刺激性物質の判断に本試験の受け入れを表明している。

当該試験法は眼刺激性試験法として、GHS ^{注釈³} に準拠する腐食性・強刺激性物質の判定に有用と判断されており、上記状況から考えて、我が国でも法規制の試験法として受け入れられる。

現時点では日本国内での日常的な実施は困難であるが、国外には受託機関（1 施設）があり、委託が可能である。

牛摘出角膜を用いた眼刺激性試験代替法

(BCOP法：Bovine Corneal Opacity and Permeability Test)の評価会議報告書

4. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件及び適用できない条件が明確であるか。

当該試験法の妥当性を示すデータは、合計 161 の化学物質または製品が試験され、単一の化学物質や市販品あるいは製剤など混合物で行われており、また様々な化学構造、性質、性状の物質、かつ種々の刺激性強度のものが対象となっており、適用できる物質の範囲が明確である。

当該試験法は対象とする物質の腐食性・強刺激性を多くの対象物質で評価できる。ただし、アルコール類、ケトン類、性状が固体のものについての予測性能は不十分である。

当該試験法は、暴露直後の角膜の変化を評価する方法であり、その後の回復等の評価はできない。

6. 当該試験法は、時間的経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。

試験費用面では Draize 法と大きな違いはない。

試験費用面では Draize 法と大きな違いはないが試験期間は短縮される。

ウサギを用いる試験では 1-21 日かかるが、本試験法では、眼球が入手できれば、5-7 時間で終了する。しかし、病理組織学的検査を実施すると時間的な差はほぼ同じである(評価報告書¹⁾ p 11)。

試験法の有用性の観点から、病理組織学的観察を組み入れることで、角膜の損傷程度についてさらに詳細に評価することが提案されているが、組織形態レベルでの影響を判定できる明確な基準の設定が必要である。なお、腐食性・強刺激性物質を判定するという目的で BCOP 法を実施する場合は、

病理組織学的観察は必ずしも必要ではない。

現時点では日本国内での日常的な実施は困難であるが、国外には受託機関(1施設)があり、委託が可能である。

眼刺激性評価のためのフルオレセイン漏出試験法の評価会議報告

6. 当該試験法は、目的とする物質又は製品の毒性を評価できるか。その場合、当該試験法の適用条件が明確になっているか。

当該試験法は、強度眼刺激性あるいは眼腐食性をトップダウン方式で検出する際に、最初の段階で実施される試験法である。

当該試験法で陽性の場合、毒性があると判断できるが、陰性の場合には、毒性がないと判断することはできない。陰性の場合に、その毒性がないことを確かめるには、他の試験法でさらに検討をすることが必要である。

適用可能な物質は水溶性物質に限られている。強酸、強塩基、組織固定液、強揮発性物質は適用外である。

10. 当該試験法は、動物福祉の観点及び科学的見地から、目的とする物質又は製品の毒性を評価する代替法として、行政上利用することは可能か。

当該試験法は、動物を用いずに強度眼刺激性・眼腐食性を評価できるので、動物福祉の観点から有用である。

目的とする物質又は製品の毒性を評価する代替法として、科学的見地から行政上利用することが可能である。

しかし、トップダウン方式でのみ利用可能であること、水溶性物質のみが適用可能であること、からその有用性は限定的である。

眼刺激性試験代替法の評価会議報告書

In vitro 短時間曝露法

(The Short Time Exposure *In Vitro* Test Method: STE 法)

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れおよび行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性：

本試験法はウサギ角膜由来の上皮細胞株（SIRC 細胞）に対する化学物質の細胞毒性を指標に用いて眼刺激性を評価する試験法であり、生きた動物を用いないという点で、3Rs の精神に合致している。また、短時間で安価に実施でき、使用細胞の入手は容易であり、特殊な機材や試薬を必要としないことから、基本的な細胞培養の技術と設備を持っている施設であれば実施可能であり、技術移転性は高い。以上より、本試験法は社会的受け入れ性が高い。

行政上の利用性：

本試験法は、化学物質による眼刺激性を評価でき、トップダウン方式において重篤な眼の傷害を起こす物質（UN GHS 区分 1）物質を検出する方法、ならびにボトムアップ方式において眼刺激性物質とは分類されない物質（UN GHS 区分外）を検出する方法として、行政的利用が可能である。

経済協力開発機構（OECD）のウサギを用いた眼刺激性試験改訂ガイドライン（TG405） の評価会議報告書

本ガイドラインは過去にも動物福祉の観点から改訂が行われているが、今回の改訂で動物福祉の更なる充実が図られた。ウサギを用いた眼刺激性試験における動物の痛みと苦痛を軽減するために、局所麻酔薬及び全身的鎮痛薬による定常的処置、痛みと苦痛症状及びすべての眼傷害の観察についての具体的方法、並びに、人道的エンドポイントの設定とその判断の際の実験動物獣医師などの関与が規定された。

6. 当該試験法は、目的とする物質又は製品の毒性を評価できるか。その場合、当該試験法の適用条件が明確になっているか。

従来試験法と同様、目的とする物質又は製品の毒性（眼刺激性）を評価可能であり、適用条件も明確である。

10. 当該試験法は、動物福祉の観点及び科学的見地から、目的とする物質又は製品の毒性を評価する代替法として、行政上利用することは可能か。

麻酔薬の使用および人道的エンドポイントの設定等を行っても、評価結果が基本的には変わらないことから、行政上での利用の可能性は、従来試験法の場合と同様に可能である。

皮膚腐食性

- 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)
- OECD TG 435 (*in vitro*膜バリア試験)

評価会議報告書

ヒト表皮モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れ性及び行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性：

本試験法は、通常の培養技術を習熟した施設であれば実施できる試験法であり、OECD TG431 に承認された表皮モデルは市販されている。また、生きた動物を用いないという点で、3Rs の精神に合致しており、社会的受け入れ性は高い。

行政上の利用性：

本試験法において陽性の結果が得られた場合、被験物質を腐食性物質（国連 GHS 分類における区分 1）と判定することは可能であるが、UN GHS 分類の細区分のためには EpiSkin™ のみ利用可能である。なお、本試験法の利用にあたっては、適用範囲を十分に配慮した上で使用されるべきである。

評価会議報告書

経皮電気抵抗試験を用いた皮膚腐食性試験代替法

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れ性及び行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性：

本試験法は、ラットの摘出皮膚を用いているため完全な置き換え試験ではない。しかしながら、本試験法を用いることで動物数の削減が可能であり、また、腐食性物質による動物へのストレスを与えることは無いことから、動物実験代替法の3Rsの原則に適った試験法である。本試験法は、必要な技術が複雑ではなく、適切な訓練によって容易に習得できると考えられる。

以上の観点から、本試験法は社会的に受け入れられるものであると判断する。

行政上の利用性：

本試験法は、種々の化学物質に適用でき、腐食性および非腐食性を分類するための代替法として、行政的利用が可能であると考えられる。また、EUでは動物実験を行った化粧品等の販売を禁止していることから、化粧品等の評価への本試験方法の適用は問題が生じる懸念がある。

評価会議報告書

*In vitro*膜バリア試験を用いた皮膚腐食性試験代替法

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れ性及び行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性：

本試験法は、特別な手技が必要でない試験法であり、本試験法のシステムは市販されている。また、生きた動物を用いないという点で、3Rsの精神に合致しており、社会的受け入れ性は高い。

行政上の利用性：

Corrositex[®]法は適用可能物質にCDS使用上の制約があり、偽陰性が多いことから、多数の物質をスクリーニング評価する目的には適していないと考えられる。ただし、本試験法によって陽性と判定されたものを陽性物質として識別することに限定すれば、利用可能と判断する。

Corrositex[®]以外の*in vitro*膜バリア試験法については知られていないが、開発された場合には十分なバリデーション結果に基づいて、その行政的利用性の評価を行うべきである。

皮膚腐食性

- 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)
- OECD TG 435 (*in vitro*膜バリア試験)

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）

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とした。

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

本試験ガイドラインに含めた試験法

TG439

番号	試験法の名称	バリデーション試験の種類	参考文献
1	EpiSkin™	完全な前向きバリデーション試験 (2003~2007)。この試験法の構成要素は、オリジナルおよび更新された ECVAM の性能標準に不可欠な試験法の構成要素を定義するのに用いられた(8) (9) (22)*。また、未分類の物質と分類済みの物質の同定に関連する試験法のデータは、オリジナルの性能標準*の特異度と感度を定義するための最も重要な根拠となっている。	(2) (8) (9) (11) (12) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (24) (27)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (オリジナル) : 2003~2007 年に、1 番の試験とともに、最初の完全な前向きバリデーション試験が行われた試験法。この試験法の構成要素は、オリジナルおよび最新の ECVAM の性能標準に不可欠な試験法の構成要素を定義するのに用いられた(8) (9) (22)*。 EpiDerm™ SIT (EPI-200) : オリジナルの EpiDerm™ の変法が、オリジナルの ECVAM の性能標準を用いて 2008 年にバリデートされた(22)*。	(2) (8) (9) (11) (13) (14) (16) (17) (18) (19) (21) (22) (24) (28) (2) (22) (23) (24) (28)
3	SkinEthic™ RHE	2008 年に策定されたオリジナルの ECVAM の性能標準に基づいたバリデーション試験(22)*。	(2) (22) (23) (24) (29)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	OECD TG 439 の性能標準に基づいた 2011~2012 年のバリデーション試験。TG 439 の性能標準は、更新された最新の ECVAM の性能標準に基づいている(8) (9)*。	(8) (9) (35) (36) (37) (38) (39) (40)、 および本試験ガイドラインの性能標準*

LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法の評価会議報告書

6. 当該試験法は、目的とする物質又は製品の毒性を評価できるか。その場合、当該試験法の適用条件が明確になっているか。

当該試験法は、UNGHS CLP 規制に基づく分類を目的としているため、4 で示した物質を評価することは可能である。

当該試験法の適用条件は明確になっている。MIT 還元法により細胞生存率を求めて評価に用いることから、着色による影響や還元物質による影響を受ける。また、開放適用により評価を行うため、エアロゾルやガスは適用外となる。

10. 当該試験法は、動物福祉の観点及び科学的見地から、目的とする物質又は製品の毒性を評価する代替法として、行政上利用することは可能か。

当該試験法は、動物を用いずに皮膚刺激性を評価できるので、動物福祉の観点から有用である。また、当該試験法は化学物質の4時間適用による皮膚刺激性を評価する方法である。その範囲（薬事法、農薬取締法、労働安全衛生法）において行政的な利用は可能であるが、我が国の医薬部外品、化粧品に必要とされる24時間適用による皮膚刺激性への応用の可能性については評価されていない。

4時間適用にて認められる皮膚刺激性は、24時間適用した場合、増強することが知られている¹⁰⁾。したがって、当該試験法で刺激性なし（GHS 刺激性区分にて無刺激性）と評価されても、24時間適用では刺激性ありと評価される場合がある。しかしながら、4時間適用で検出可能な強い皮膚刺激性（GHS 刺激性区分にて刺激性）を評価可能であることから、スクリーニング法として利用できる可能性がある。

まとめ

- ・ 国立医薬品食品衛生研究所は、引き続き、日本で開発された試験法の国際標準化に貢献する。
- ・ JaCVAMは、レギュラトリーサイエンスの一環としてOECDやICH等で公定化された試験法の評価を行い、試験法の普及・利用促進に貢献する。



About JaCVAM



Update on JaCVAM



Academic activities



Submission of Alternative
Methods to JaCVAM



International Cooperation

御静聴ありがとうございました

Policy and Mission: JaCVAM's policy and mission is to promote the 3Rs in animal experiments for the evaluation of chemical substance safety in Japan and establish guidelines for new alternative experimental methods through international collaboration.

the 3Rs in animal experiments—Reduction (of animal use)

Refinement (to lessen pain or distress and to enhance animal well-being)

Replacement (of an animal test with one that uses non-animal systems or phylo-genetically lower species)

(OECD GD34)

News

☞【NEW】news texts dummy texts news texts dummy texts
news texts dummy texts(2009.7.16)

☞news texts dummy texts news texts (2009.7.3)

☞news texts dummy texts news texts dummy texts news
texts dummy texts (2009.7.3)

Contents

☞About JaCVAM

Message from JaCVAM / Policy and Mission of JaCVAM /

Organization of JaCVAM / Glossary /

Proposal for Engagement Rules

☞JaCVAM Activities