

動物実験代替法の 国内外の動向について

国立医薬品食品衛生研究所
安全性予測評価部
足利太可雄

本発表で述べられている見解は発表者の私見であって、国立医薬品食品衛生研究所および厚生労働省の公式な見解では必ずしもありません。また開示すべきCOIはありません。

本日の発表内容

1. はじめに ー動物実験代替法開発の方向性と課題ー
2. 皮膚感作性試験を例にした代替法開発の流れ
3. 代替法の行政的受け入れ（JaCVAMの役割）
と最新の代替法開発について
4. まとめ

はじめに ー動物実験代替法開発の方向性と課題ー

化粧品業界における動物実験廃止の流れ

- 1980年～ 安全性評価9項目とその動物試験法の確立
- 2003年 EU化粧品指令第7次改正公布
- 2006年 改正動愛法施行
- 2009年
 - ・ EU域内での化粧品原料の動物実験禁止
 - ・ 一部を除く動物実験を行った化粧品のEU域内での販売禁止
- 2013年 EU域内における動物実験を行った原料を配合するすべての化粧品の販売禁止
- 2013年～ 複数の国内化粧品メーカーが動物実験を廃止



世界的な
動物愛護
意識の高
まり

こうした動きを受け、動物実験代替法の現状はどうなっているのか？
またどのように開発されてきたのか？今後どうなるのか？

代替法開発の方向性①

1. 皮膚一次刺激性

3次元皮膚モデルを中心に複数の試験法が存在。ただしOECDガイドライン化されている方法は4時間パッチの予測であり、化粧品・医薬部外品で求められる24時間パッチや連続皮膚刺激性を予測する方法ではない。

2. 眼刺激性

眼は重要な器官であり、粘膜であるため刺激性評価は重要。摘出眼球モデル、単層培養モデル、3次元モデルなど多数存在

3. 光毒性

化学物質によっては光の存在下で皮膚刺激性を示すものもあるため、光毒性評価は重要。3T3 NRU assay, ROS assay、3次元皮膚モデルを用いた方法などが存在

4. 単回投与毒性

試験法の限界を十分考慮したうえで、細胞毒性試験による単回投与毒性による初回投与用量の推定に用いることが可能。

以上は基本的に細胞毒性試験による評価

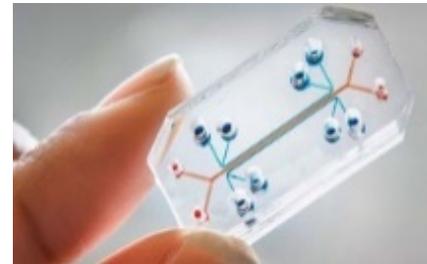
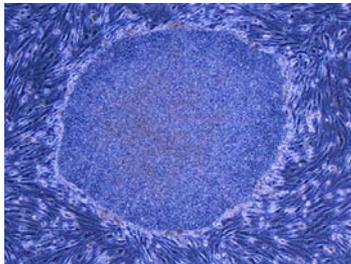
代替法開発の方向性②

5. 皮膚感作性・光感作性

生体にとって異物である化学物質を皮膚に適用した場合、アレルギー反応を生じる可能性がある。事実過去における化粧品による深刻な身体トラブルの多くがアレルギー性接触皮膚炎と考えられ、化粧品の安全性評価では極めて重要と考えられる。光が関与するものも存在する。

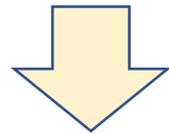
6. 反復投与毒性、生殖発生毒性、ADME

こうした全身毒性は極めて複雑であるため、代替法開発は活発に研究が行われているが、社会的に受け入れられる代替法が開発されるには多くの時間と労力が必要と考えられる。最先端の技術（iPS細胞やorgan-on-a-chipなど）の応用やin silico, read acrossも含めたIATA (integrated approaches to testing and assessment)の考え方が必須となっている。



代替法開発の課題

- 試験法の限界：適用範囲（代謝、難水溶性物質、揮発性物質、分子量不明素材、混合物、その他）の狭さ
- 偽陰性、偽陽性が存在する。
- リスク評価の困難さ（製品タイプごとに何%までなら安全？）
- 全ての毒性項目がカバーされている訳ではない。特に全身毒性に関して、公的に受け入れられる代替法の成立時期は目途がついていない状態。
- 医薬部外品申請に活用できる代替法はまだまだ少ない。
- 公定化、標準化まで膨大な労力と時間がかかる。



代替法開発はこれからが正念場

動物実験廃止後の安全性評価

1. 既存の情報による評価

- ・原料情報
- ・論文、CIRなど公開されている安全性情報の収集と解析
- ・社内データの活用
- ・市場実績



2. 原料の化学構造による評価(In silico)

- ・構造活性相関（毒性予測ソフトの活用）
- ・Read across



3. In vitro試験による評価

- ・ガイドラインなどに基づいた試験（主に局所毒性）
- ・独自試験



（上記検討を経てヒト試験実施の可否判断）



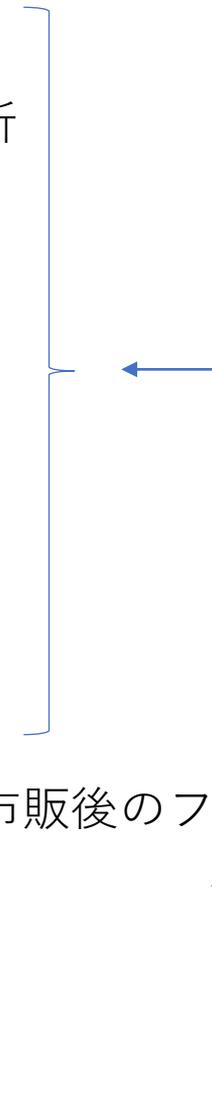
4. （ヒト試験）

- ・製剤系、適用期間など実使用に近い条件での評価



市販

市販後のフォローアップ



動物実験廃止後の安全性評価の課題

1. 既存の情報による評価

- ・原料情報
- ・論文、CIRなど公開されている安全性情報の収集と解析
- ・社内データの活用
- ・市場実績



2. 原料の化学構造による評価(In silico)

- ・構造活性相関（毒性予測ソフトの活用）
- ・Read across



3. In vitro試験による評価

- ・ガイドラインなどに基づいた試験（主に局所毒性）
- ・独自試験



（上記検討を経てヒト試験実施の可否判断）



4. （ヒト試験）

- ・製剤系、適用時間など実使用に近い条件での評価

- ・原料（銘柄）の多様化
- ・情報の限界（質と量）
- ・専門家の不足
（情報の解釈）

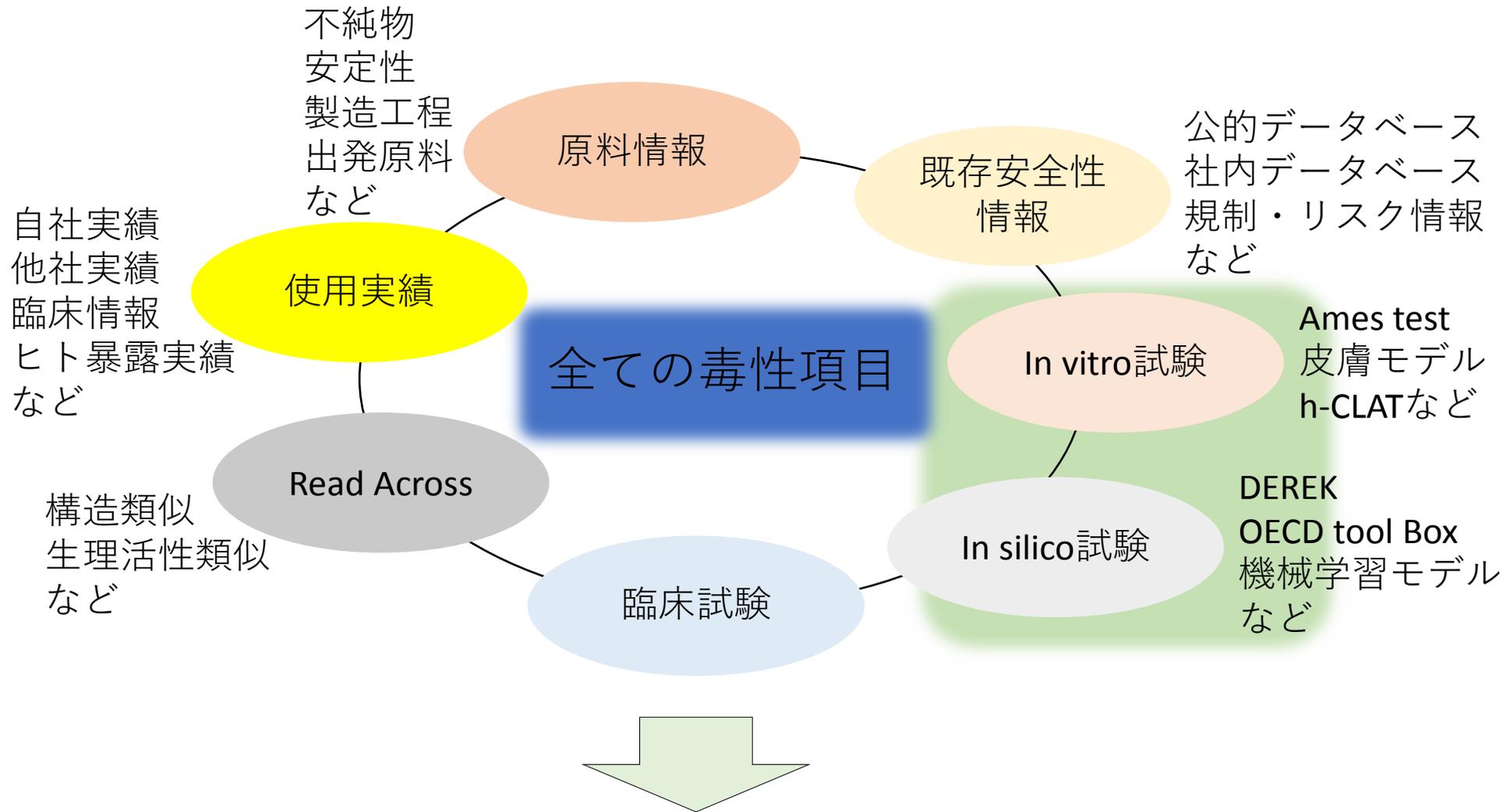
- ・天然物や不純物は不可能
- ・高価なソフト
- ・専門家の不足
（結果の解釈）

- ・適用限界
- ・偽陽性、偽陰性
- ・結果の解釈

- ・動物実験なしでヒト試験が可能か？

化学物質の安全性評価は大きな変化の最中にあり、多くの課題を抱えている

Weight of Evidenceの基本的考え

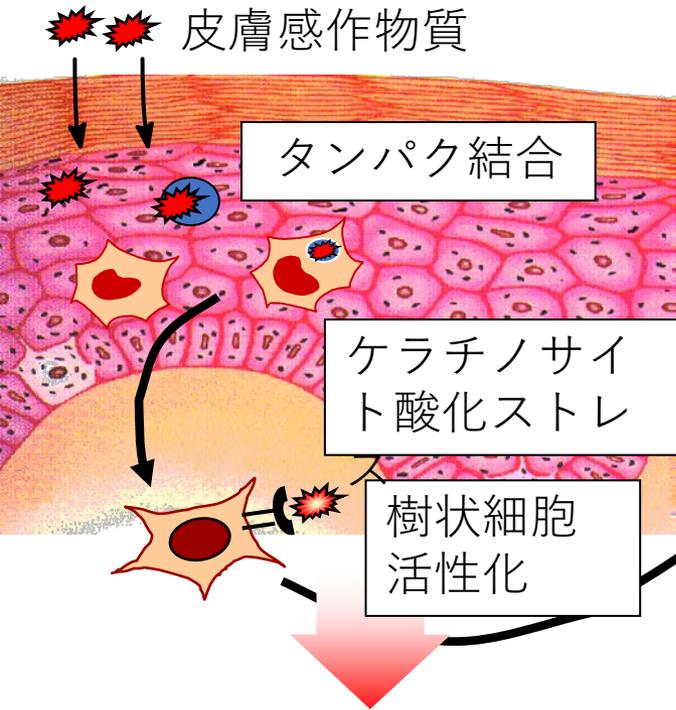


全ての情報の重みづけ(expert judge)による総合判断が大事であり、
動物実験代替法はその一部

皮膚感作性試験を例にした代替法開発の流れ

皮膚感作のメカニズムとh-CLATの着眼点

感作誘導過程

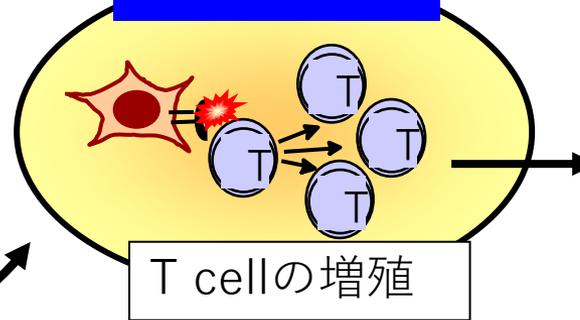


In vitro評価法

- タンパク結合性試験
- ケラチノサイト試験
- 樹状細胞活性化試験

所属リンパ節

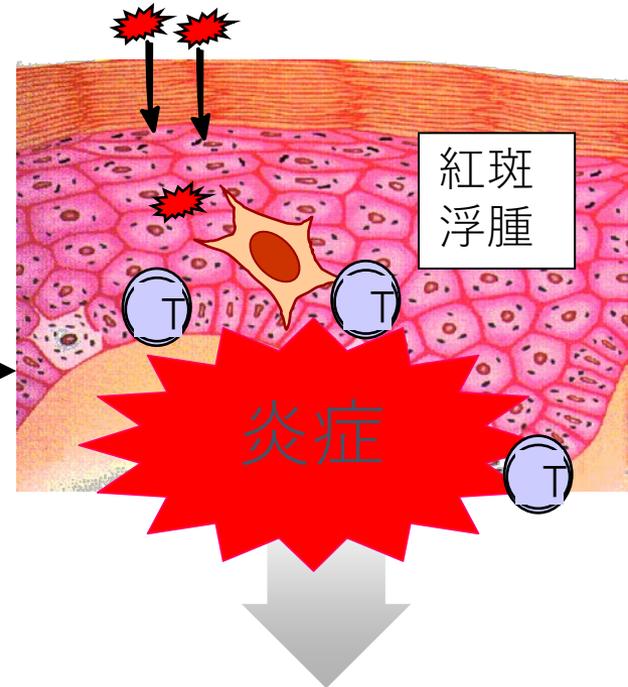
抗原提示



Ex vivo評価法

- マウス試験 (LLNA)

感作誘発過程



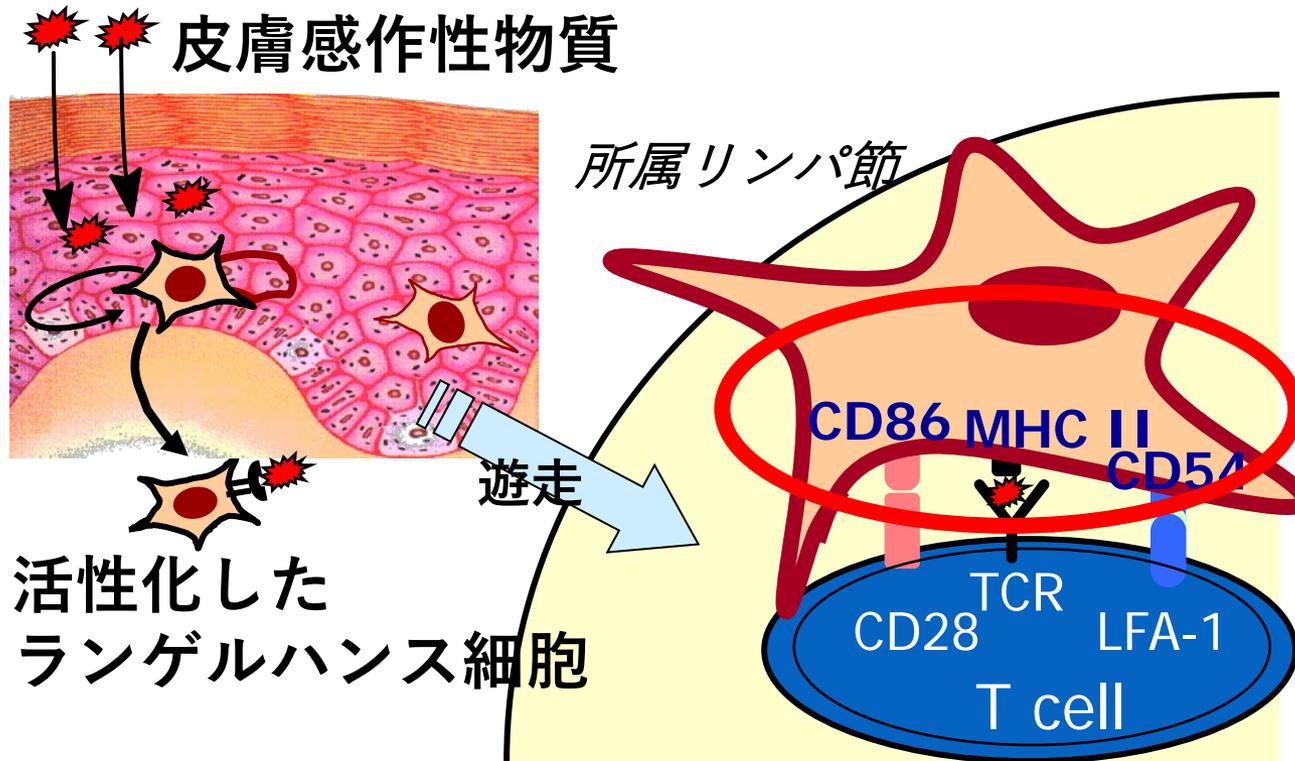
In vivo評価法

- モルモット試験
- ヒト試験

皮膚感作性試験h-CLATの原理

感作誘導過程

活性化に伴う発現変化



表面抗原

MHC class II
CD86, CD54,
CXCR4, CCR7等

サイトカイン

TNF- α , IL-1 β ,
CXCL8, MIP-1 β 等

その他

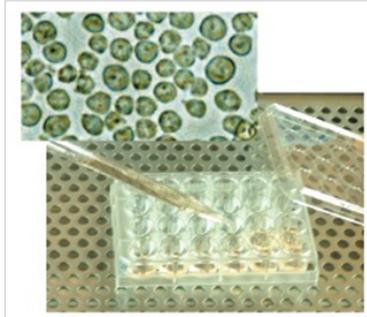
Notch3, SLAM,
BMP6等

測定指標として、抗原提示に関わる表面抗原である**CD86, CD54**の発現変化*に着目

*: S. Aiba, et al., Eur. J. Immunol., 27, 3031-3038, 1997.

皮膚感作性試験h-CLATの概要

● プロトコル*



THP-1

- 皮膚由来のランゲルハンス細胞や血液由来の樹状細胞の代わりにヒト単球細胞株を使用
- 花王と資生堂の共同開発

24h

被験物質暴露

↑
蛍光標識抗体染色
(**CD86 & CD54**)

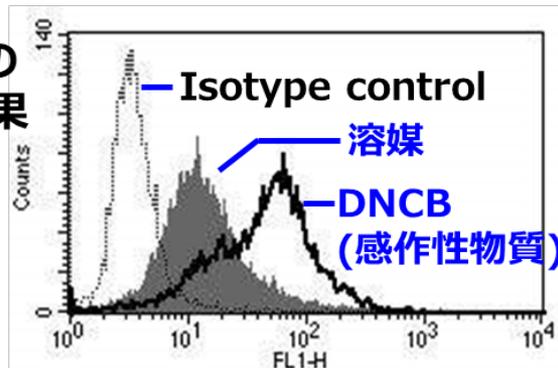


フローサイトメーター
による解析

*Ashikaga et al., 2006, *Toxicol. in Vitro* 20(5), 767-773.
Sakaguchi et al., 2006, *Toxicol. in Vitro* 20(5), 774-784.

● 結果と予測モデル

CD86の
解析結果



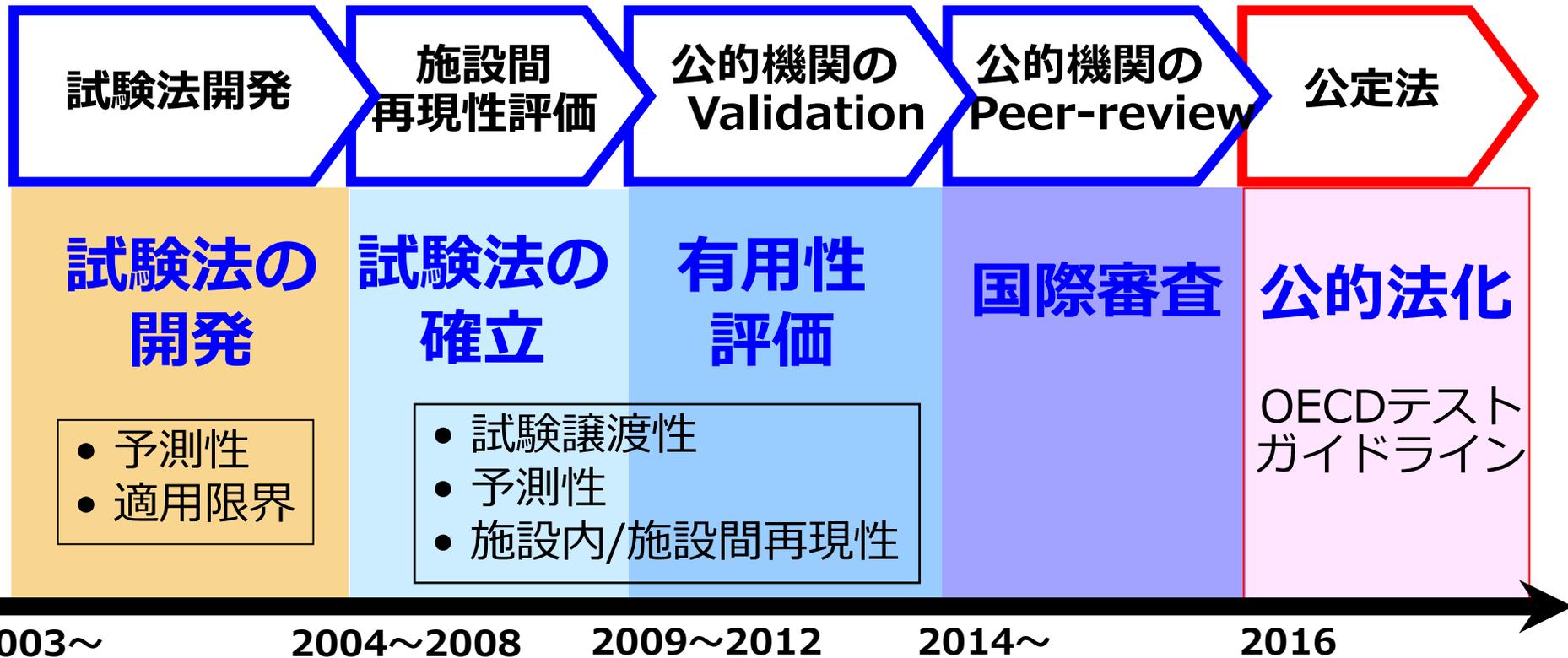
陽性判定基準値:

溶媒対照群に対する相対蛍光強度RFIを算出し
CD86 RFI \geq 150% or CD54 RFI \geq 200%

“h-CLAT”と命名

human Cell Line Activation Test, ヒト由来の培養細胞を用いた活性化試験

OECDテストガイドライン化プロセス



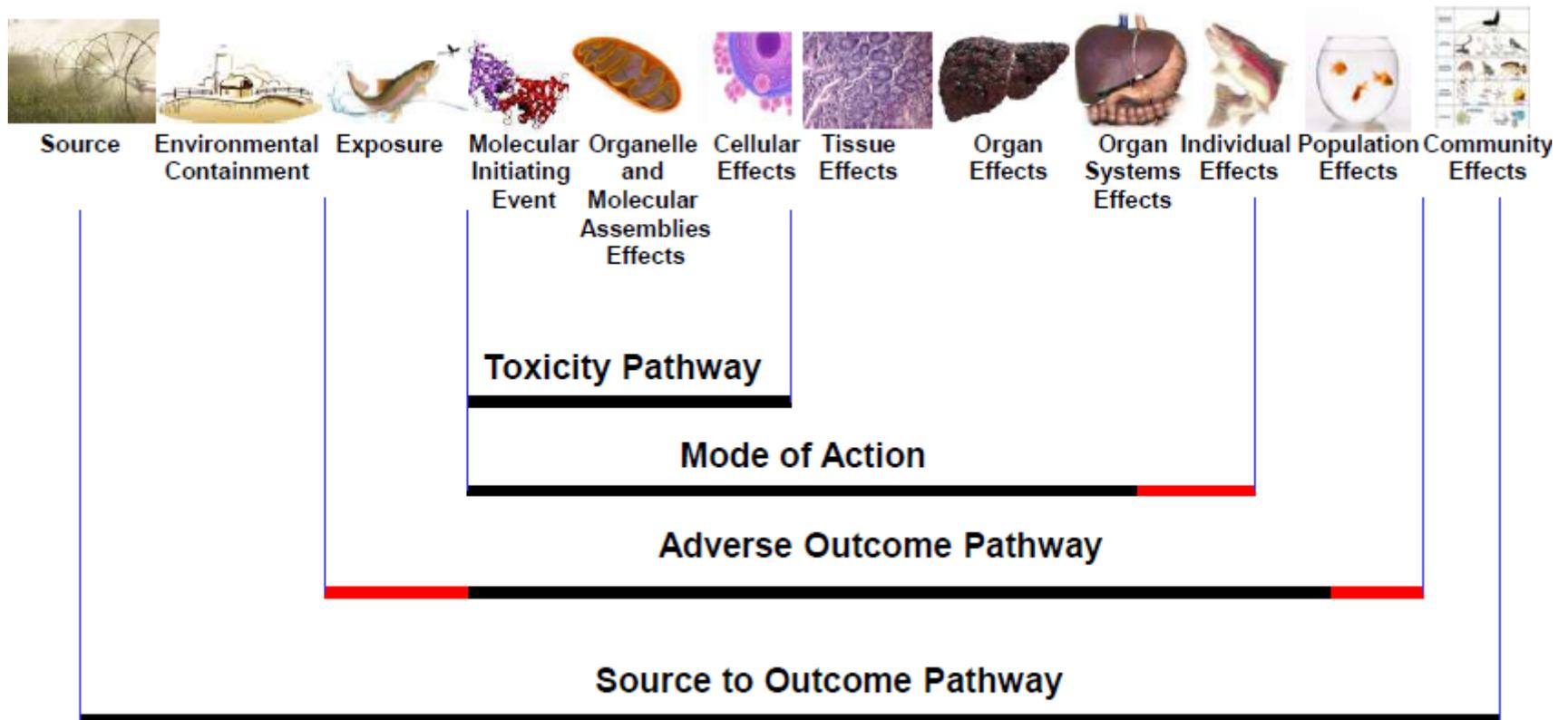
- 国内外の多くの化粧品企業、公的機関、専門家が関与
- 開発から公定化まで10年以上
- 皮膚感作の国際標準試験としてREACHや医薬部外品申請など公的申請への活用が期待

組み合わせ戦略(IATA)によるOECDガイダンス

皮膚感作性試験代替法について、すでにOECDはDPRA, Keratinosens, h-CLATの3試験法がガイドラインが収載されており、最近h-CLATと同じTG442EとしてU-SENS™とIL-8 Luc assayも収載された。ただしこうしたin vitro試験法単独での評価は不可能であるため、組み合わせ戦略(Integrated Approaches to Testing and Assessment; IATA)が必要である。

そこでOECDでは行政評価におけるIATAの活用を目指し、2013年7月にガイダンス作成グループを発足させ、2016年にガイダンスを発行した。

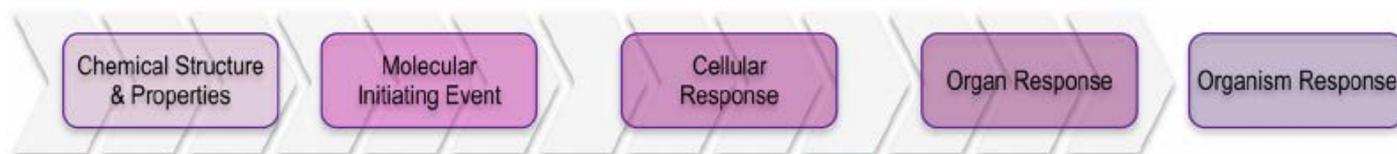
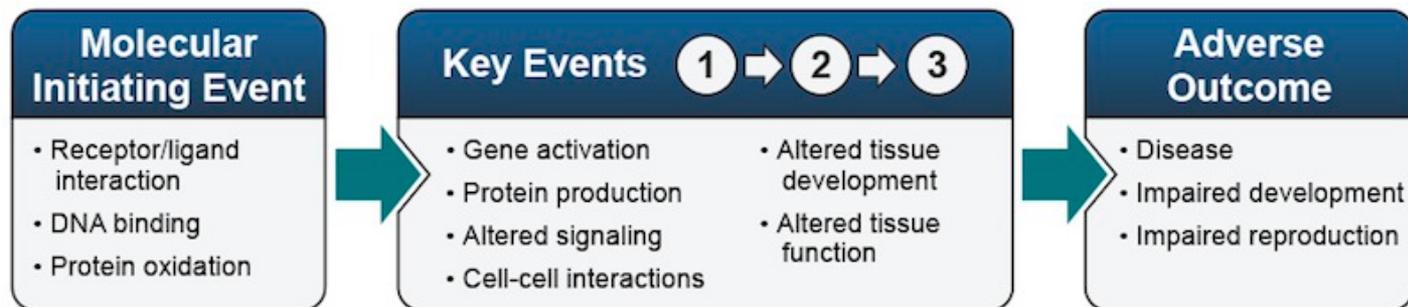
Adverse Outcome Pathway



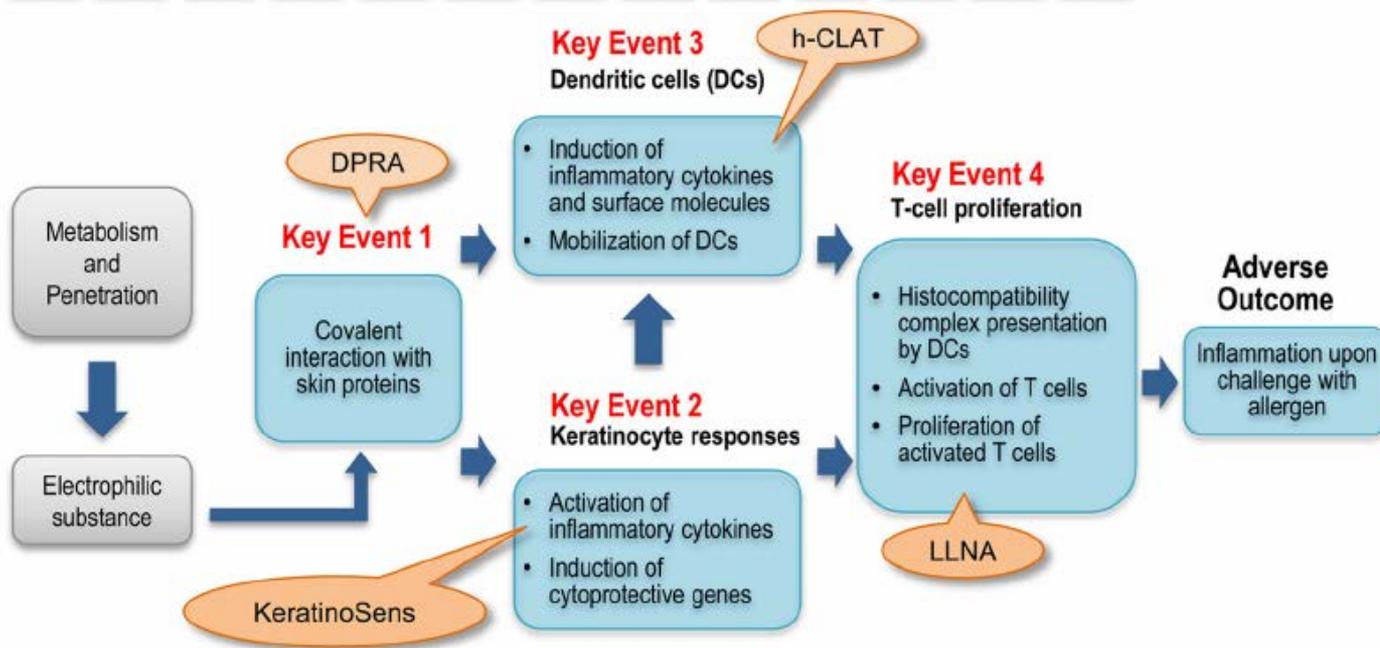
毒性評価には、暴露に加え、分子レベルから細胞・個体レベルまで、それぞれの評価を総合することが必要

皮膚感作におけるAOPの考え

Adverse 有害性
Outcome 発現
Pathway 経路



皮膚感作に関するAOP



タイトルと内容

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

TABLE OF CONTENTS

FOREWORD.....	6
1. INTRODUCTION.....	8
2. BACKGROUND.....	9
3. MAPPING OF INFORMATION SOURCES THAT CAN BE USED WITHIN DEFINED APPROACHES AND IATA FOR SKIN SENSITISATION BY APPLYING THE AOP AS A FRAMEWORK.....	11
4. DEFINED APPROACHES TO TESTING AND ASSESSMENT AND THEIR ROLE WITHIN IATA FOR SKIN SENSITISATION	17
REFERENCES.....	19

ANNEX I: CASE STUDIES

ANNEX II: INFORMATION SOURCES

- ・ 2016年10月27日 発行
- ・ Annexを含め、全部で317ページ

前言（一部抜粋）

With a view to assisting the evaluation of integrated approaches to testing and assessment (IATA) in regulatory decision-making within OECD Member Countries, this guidance document provides guidance on the reporting of defined approaches to testing and assessment. A **defined approach** consists of a **fixed data interpretation procedure** (DIP) (e.g. statistical, mathematical models) applied to data (e.g. in silico predictions, in chemico, in vitro data) generated with a **defined set of information sources** to derive a prediction.

Defined approachは、一連のdefined information sourcesから得られるデータに適用されるfixed data interpretation procedureからなる。

These defined approaches are proposed for **hazard and/or potency prediction**. It is **not the intent** of this document to seek for endorsement of **any specific defined approach** provided in the case studies

このdefined approachは、ハザードまたは強度予測のために提案されるが、case studyで提示される特定のアプローチの推奨を行うことは意図していない。

Defined approach (確定方式)

IATAには、情報源の選択や重み付けといった専門家の判断の過程が必然的に含まれるが、IATAにおけるいくつかの部分は、defined approachのように標準化され得る。

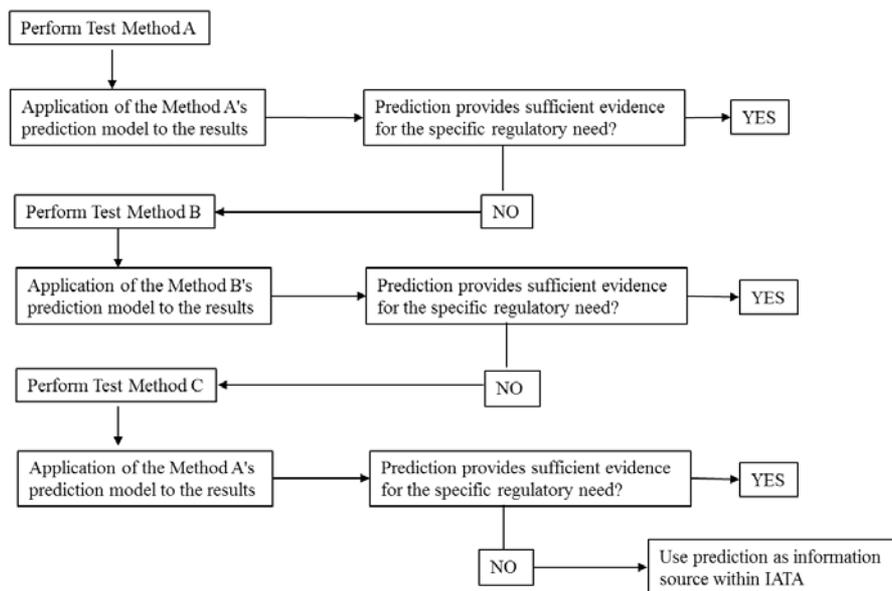
Defined approachとは、一連の確かな情報源(defined set of information sources)と、それらを用いて行われる確立されたデータ解釈作業(fixed data interpretation procedure)からなる客観的評価手法である。

一連の確かな情報源とは、ガイドライン化された試験法など客観的に有用性や妥当性が検証された方法のことである。

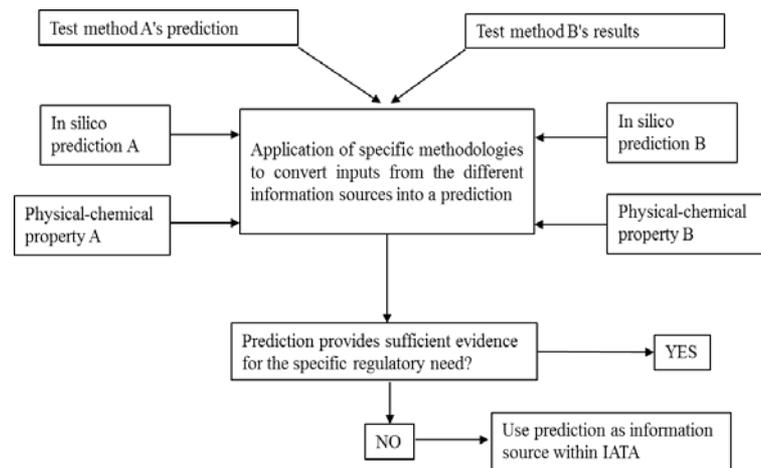
確立されたデータ解釈作業とは、明確なルールに基づいた組み合わせによる評価作業のことであり、その予測性能や限界などが明確になっていることも必要とされている。

Defined approachの例

Defined approachには、Sequential Testing Strategy (STS)やIntegrated Testing Strategy (ITS)を用いたさまざまな情報源の解釈により、さまざまな方法があり得る。



STSの例



ITSの例

Case studies(≠ defined approaches)

Case Study	Bioavailability	Phys-chem properties	In silico	Protein binding /reactivity	Events in Keratinocytes	Events in DC	Events in T cells	Adverse effect	Others
1 Sensitiser potency prediction Key event 1+2 (Givaudan)		X	TIMES SS	Cor1C420-assay	TG 442D				
2 The artificial neural network model for predicting LLNA EC3 (Shiseido)		X		TG442C SH Test	TG 442D AREc32 assay	TG442E			
3 ITS/DS for hazard and potency identification of skin sensitisers (P&G)	penetration (PBPK model)	X	TIMES SS	TG 442C	TG 442D	TG442E	TG 429		
4 Tiered system for predicting sensitising potential and potency of a substance (STS) (Kao Corporation)				TG 442C		TG442E			
5 Score-based battery system for predicting sensitising potential and potency of a substance (ITS) (Kao Corporation)			DEREK Nexus	TG 442C		TG442E			
6 IATA for skin sensitisation risk assessment (Unilever)	penetration modified OECD TG428			modified OECD TG428					
7 Weight of evidence in vitro ITS for skin hazard identification (BASF)				TG 442C	TG 442D LuSens	TG442E			
8 STS for hazard identification of skin sensitisers (RIVM)			Various	TG 442C	TG 442D HaCaT gene signature	TG442E			
9 IATA (Dupont)		X	Various	TG 442C glutathione depletion assay	TG 442D	TG442E	TG 429	TG 406	E.g. Skin Irr/Corr, Ames
10 Decision strategy (L'Oréal)		X	Various	TG 442C	TG 442D ARE-Nrf2 Assay	TG442E PGE2 Assay			
11 Integrated decision strategy for skin sensitisation hazard (ICCVAM)		X	OECD Toolbox			TG442E			
12 Consensus model for hazard identification (EC JRC)			TIMES SS Dragon			TG442E			

多くの事例で3種のin vitroガイドライン法が採用されているが、それ以外にin silicoやin vivoの活用もあり、information sourceは多様と言える。

EURL ECVAM OECD WNT報告資料
一部改変

"2 out of 3" integrated testing strategy approach

提案機関: BASF

目的: Hazard identification

用いる試験法・ソフトウェア・物化定数: DPRA (Key event 1), KeratinoSens or LuSens (Key event 2), h-CLAT (Key event 3)

予測モデル: Key event 1から3までの3種のin vitro試験のうち、少なくとも2つが陽性なら感作性ありと判断。

予測性能:

Chemical Set	A				B			
	LLNA data				human data			
Cooper statistics	Se	Sp	Ac	n	Se	Sp	Ac	n
"2-out-of-3" WoE	82	72	79	180	90	90	90	101
DPRA	76	72	75	194	84	84	84	102
KeratinoSens	77	63	73	188	82	84	82	102
h-CLAT	81	64	76	166	89	64	82	98

ヒトに対して、感度、特異度および一致率90% (101化合物)

Stacking meta-model for skin sensitisation hazard identification

提案機関: L'Oreal

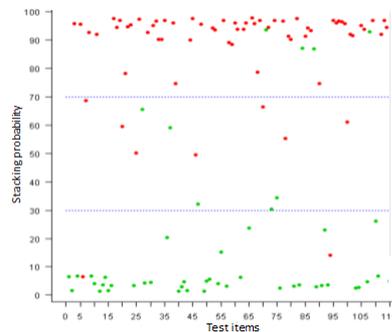
目的: Hazard identification

用いる試験法・ソフトウェア・物化定数: Toxtree, Derek nexus, TIMES-SS, DPRA (Key event 1), KeratinoSens (Key event 2), MUSST, PGE2 (Key event 3), pH, volatility.

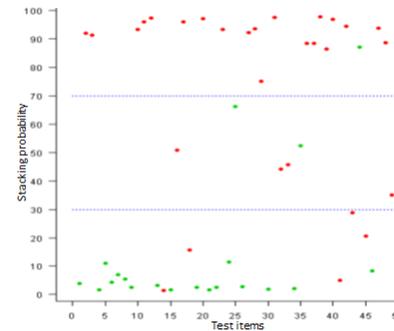
予測モデル: Boosting, Naïve Bayes, Support Vector Machine (SVM), Sparse PLS-DA and Expert ScoringからStacking meta-modelにより陽性の確率を計算。Expert judgmentも。

予測性能:

70%以上は陽性
30%未満は陰性
その間はexpert judge



Learning Set (n= 115)
Accuracy=94%
Sensibility=97%
Specificity=91%
Expert judgment = 11%



Validation Set (n =50)
Accuracy =86%
Sensibility=81%
Specificity=94%
Expert judgment = 12%

Integrated testing strategy (ITS) for sensitising potency classification

提案機関: 花王

目的: カテゴリー予測

用いる試験法・ソフトウェア・物化定数: DPRA (Key event 1), h-CLAT (Key event 3), DEREK (in silico)

予測モデル: In vitroおよびin silicoによりLLNAの陽性・陰性またはカテゴリー(GHS分類)を予測するIntegrated testing strategy (ITS)モデル。

Table 4. Conversion of the outcome in h-CLAT, DPRA and DEREK for integrated testing strategy

Score	h-CLAT MIT ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	DPRA depletion (%) (cysteine only)	DEREK Alert
0	Not calculated	<6.376 (<13.89)	No alert
1	>150, \leq 5000	\geq 6.376, < 22.62 (\geq 13.89, < 23.09)	Alert
2	>10, \leq 150	\geq 22.62, < 42.47 (\geq 23.09, < 98.24)	-
3	\leq 10	\geq 42.47 (\geq 98.24)	-

DPRA, direct peptide reactivity assay; h-CLAT, human cell line activation test; MIT, minimal induction threshold.

予測性能:

Table 6. (a) Predictive performance of ITS in determining sensitizing potential. (b) Predictive performance of ITS in determining sensitizing potency

Hazard identification		ITS		
		Positive	Negative	
102 sensitizers		91	11	
37 non-sensitizer		11	26	
Sensitivity (%)		89 (91/102)		
Specificity (%)		70 (26/37)		
Accuracy (%)		84 (117/139)		
Potency identification		ITS		
		Strong	Weak	Not classified
LLNA	Extreme/strong	15	14	0
	Moderate/weak	5	57	11
	Non-sensitizer	0	11	26
Overprediction rate (%)		12 (16/139)		
Underprediction rate (%)		18 (25/139)		
Accuracy (%)		71 (98/139)		

ITS, integrated testing strategy; LLNA, local lymph node assay.

Bayesian Network DIP (BN-ITS-3) for hazard and potency identification

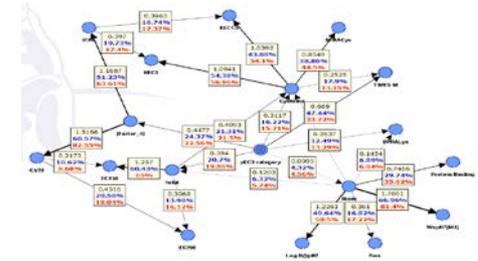
提案機関: P&G

目的: カテゴリー予測

用いる試験法・ソフトウェア・物化定数: Log Kow, Epidermal bioavailability (software), TIMES, DPRA (Key event 1), KeratinoSens (Key event 2), U-937 assay or h-CLAT (Key event 3)

予測モデル: In vitro, in silico, 物化定数によりLLNAのカテゴリーを予測する非線形モデル。Bayesian network解析により作成されたモデルにより予測を行う。全てのパラメーターが揃わなくても予測可能。

予測性能: カテゴリー一致率= 88%



GHS C&L	Observed ->									
	Training set n=147					Test set n=59				
	Class	NS(39)	W(39)	M(40)	S(29)	Class	NS(14)	W(18)	M(12)	S(15)
none	NS	36	2	1	0	NS	14	0	0	0
1B	W	2	32	3	3	W	0	16	3	0
	M	0	3	38	5	M	0	2	9	2
1A	S	1	2	8	21	S	0	0	0	13

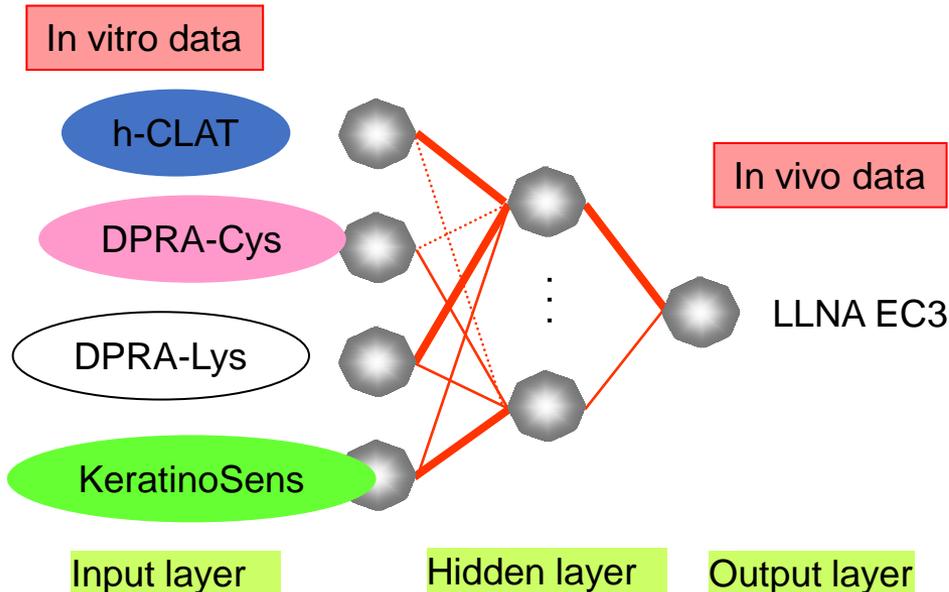
The artificial neural network model for predicting LLNA EC3

提案機関: Shiseido

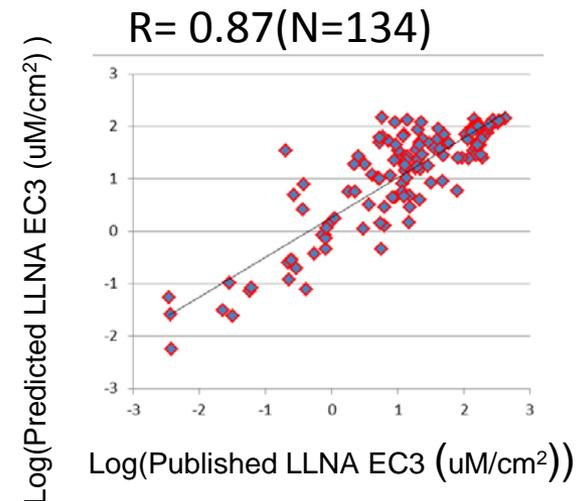
目的: 強度予測

用いる試験法・ソフトウェア・物化定数: DPRA or SH-test (Key event 1), KeratinoSens or ARE assay (Key event 2), h-CLAT (Key event 3), QwikNet Ver. 2. 23

予測モデル: In vitroによりLLNAのEC3を予測する非線形モデル。
Artificial neural network解析により作成されたモデルにより予測を行う。



予測性能:



医薬部外品申請への活用



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。

DPRA/Keratinosens/h-CLATを実施し、**全て陰性なら皮膚感作性なし**と判断できる、とするガイダンスが発行された。

皮膚感作性に関する公的申請に代替法が活用できる可能性が示されたことは大きな一歩と考えられる。ただし、これは医薬部外品に関してのみの話であり、他の公的申請への活用は未定である。

一方、適用範囲、他のモデルの活用、リスク評価、他の *in vitro* 法、*in silico* 法その他の *evidence* の活用、など多くの検討課題があり、**今後の進化**が不可欠と考えられる。

表. ボトムアップ 3 out of 3 の予測性

	vs human data			vs LLNA data			N
	感度	特異度	一致率	感度	特異度	一致率	
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	
LLNA	92	65	85	-	-	-	
ボトムアップ 3 out of 3	97	35	81	99	43	86	100

OECDガイドライン作成の動き

Non-animal methods to predict skin sensitization (II): an assessment of defined approaches**

Nicole C. Kleinstreuer^a, Sebastian Hoffmann^b, Nathalie Alépée^c, David Allen^d, Takao Ashikaga^{e*}, Warren Casey^a, Elodie Clouet^f, Magalie Cluzel^g, Bertrand Desprez^h, Nichola Gellatlyⁱ, Carsten Göbel^j, Petra S. Kern^k, Martina Klaric^h, Jochen Kühnl^l, Silvia Martinozzi-Teissier^c, Karsten Mewes^m, Masaaki Miyazawaⁿ, Judy Strickland^d, Erwin van Vliet^o, Qingda Zang^d and Dirk Petersohn^m

Table 3. Defined Approach (DA) performance in predicting human hazard (sensitizer/non-sensitizer).

Predicting Human Hazard									
Defined Approach:	BASF 2/3 (DKH)	Kao STS	Kao ITS	ICCVAM SVM (Human)	Shiseido ANN (D_hC)	Shiseido ANN (D_hC_KS)	P&G BN ITS-3	LLNA	
<i>N</i>	127	126	120	120	126	126	119	128	
Accuracy (%)*	77.2	80.2	85.0	81.7	78.6	78.6	75.6	74.2	
Sensitivity (%)	79.3	97.7	93.8	86.4	95.4	100	81.3	85.2	
Specificity (%)	72.5	41.0	66.7	71.8	41.0	30.8	64.1	50.0	
BA (%)	75.9	69.4	80.3	79.1	68.2	65.4	72.7	67.6	

*Performance is shown against the maximum subset (*N*) out of 128 substances with all necessary DA features.

BA: balanced accuracy; STS: sequential testing strategy; ITS: integrated testing strategy; SVM: support vector machine; ANN: artificial neural network; BN: Bayesian network; DKH and D_hC_KS: DPRA/h-CLAT/KeratinoSensTM; D_hC: DPRA/h-CLAT.

Table 5. Defined Approach (DA) performance in predicting human sensitizing potency.

Predicting Human Potency (Strong, Weak, Non-sensitizers)							
Defined approach:	Kao STS	Kao ITS	Shiseido ANN (D_hC)	Shiseido ANN (D_hC_KS)	P&G BN ITS-3	LLNA	
<i>N</i>	126	120	126	126	115	128	
Accuracy (%)*	63.5	69.2	61.1	62.7	54.8	59.4	
Over-predicted (%)	22.2	13.3	22.2	25.4	20.0	19.5	
Under-predicted (%)	14.3	17.5	16.7	11.9	25.2	21.1	

*Performance was assessed for prediction of three potency classes as described in the main text, and is shown against the maximum subset (*N*) out of 128 substances with all necessary DA features. With the exception of the P&G BN ITS-3, all misclassifications varied by one class only (i.e. no non-sensitizers were predicted as strong sensitizers or vice versa).

STS: sequential testing strategy; ITS: integrated testing strategy; SVM: support vector machine; ANN: artificial neural network; BN: Bayesian network; DKH and D_hC_KS: DPRA/h-CLAT/KeratinoSensTM; D_hC: DPRA/h-CLAT.

Hazard Identificationだけでなく、Hazard Characterizationにも有用

OECDガイドライン作成の動き

組み合わせ戦略(IATA defined approach)によるOECDガイダンスが2016年10月に発行されたが、より法的拘束力の強いガイドラインの作成が求められている。

そこでOECDでは現在DASS (Defined Approach Skin Sensitization)専門家グループを立ち上げ、検討を進めている。

- ✓ BASFの2 out of 3 modelと、花王のITSモデルを中心に検討
- ✓ ゴールデンスタンダードとなるLLNAおよびヒト試験(Human Maximization Test (HMT), Human Repeat Insult Patch Test(HRIPT))のデータの整理 (入力ミス、ばらつき、信頼性、濃度設定の妥当性等)
- ✓ In silicoモデル、機械学習モデル、他の試験法などの活用検討



2020年発行を目指して活動中だが、大変な作業量 (1000件以上のヒト試験報告書見直しなど)

OECDガイドライン作成の動き

DASS EG call 18 June 2019

14h00-17h00 (CET)

- 1) Reference Data curation
 - a. LLNA Data
 - i. Work to review the **extrapolated EC3** values – Canada (~20 min)
 1. Criteria and approach
 - ii. Review of **LLNA primary sources** – JRC (~15 min)
 1. Review of criteria (discussed/agreed on 2 April TC) and final database
 - iii. Final LLNA reference database including both analyses - Canada/JRC (~10 min)
 1. Identification of reference chemicals for HI/potency/quantitative with explanation
 - b. **Human data**
 - i. **Status of review** effort of NICEATM/CE DB + expansion with RIFM chemical - BfR (~20 min)
 - ii. Collaboration and cross-checks - Bfr/NICEATM (~10 min)
 - c. Request for regulatory input on in silico case studies – Secretariat (~5 min)
 - i. Ongoing/ expected to OECD by mid July
 - d. Next documents will include
 - i. Predictions of **2/3, ITSv1 and ITSv2 DAs** against LLNA and human subgroup data - LEADS
 1. Brief mention of keeping these reference datasets separate for this analysis for regulatory purposes – Secretariat (~5 min)
 - ii. Applicability domain according to approach presents at Dec 2019 (taking into account comments from EG)
 - iii. Uncertainty (taking into account comments from EG)
 1. Examination of FP/FN of each DA
 2. 3x3 contingency for potency
 3. Chemicals for which DAs and LLNA fail
 - 2) **Timeline** for revised documents and plan for remaining 2019 – (10 min)
 - a. Working backward:
 - i. WNT meeting – 21-24 **Apr 2020**
 - ii. Documents for WNT - week of 9 Mar 2020
 - iii. Written response to 2nd round comments/DASS EG TC - late Feb 2020
 - iv. Deadline for 2nd round comments – mid Jan 2020
 - v. Circulation of drafts for 2nd comments - early Dec 2019
 - vi. Written response to 1st round comments/DASS EG TC - mid Nov 2019
 - vii. Deadline for 1st round comments – mid Oct 2019
 - viii. Draft for comments/DASS EG TC – early Sep 2019

皮膚感作性代替法開発のまとめ

- 今から20年以上前に代替法開発が始まり、数年前にようやくいくつかの代替法がOECDガイドライン化された。
- In vitro皮膚感作性試験は単独では評価が不可能とされ、AOPに基づく組み合わせ戦略 (IATA) によるOECDガイダンスが2016年10月に発行された。確定方式(Defined Approach)によるガイドラインの開発も行われている。
- 今後より実用性を高めていくためには、リスク評価への適用や適用範囲の拡大が期待されるが、そのためには技術的ブレークスルーのみでなく社会的な議論が必要である。

このように代替法開発は長い時間と多くの労力が必要とされ、常に進化が求められるものと考えられる。

代替法の行政的受け入れと
最新の代替法開発について

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 正式な組織に昇格

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運営委員会

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

毒性部

病理部

動物管理室

薬理部

変異遺伝部

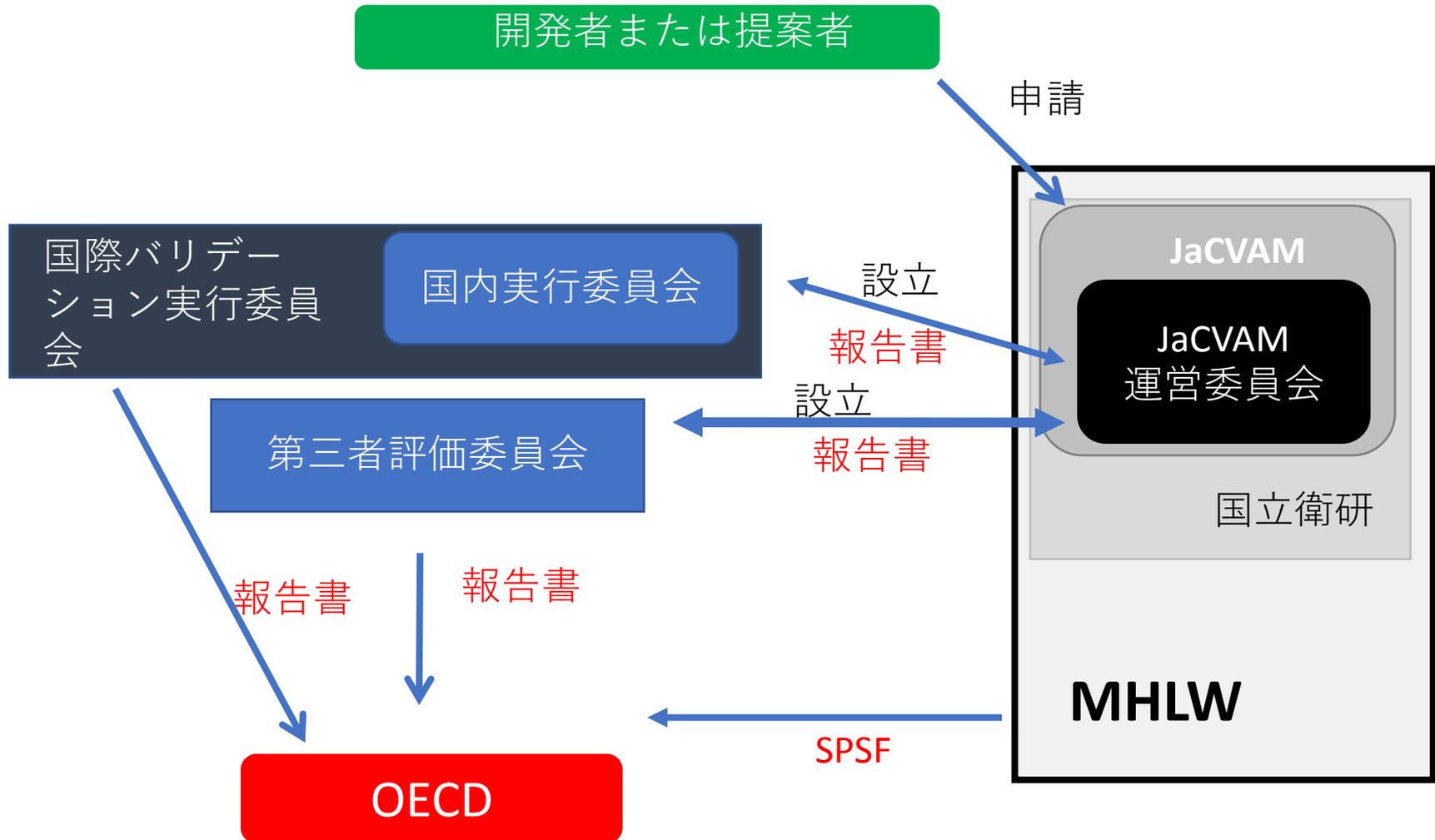
安全性予
測評価部

厚生労働省

国立感染症研究所

PMDA

JaCVAMの目的1 (テストガイドライン)



Test Guideline

JaCVAMの目的 2（行政的受入れ及び公表）

資料編纂委員会

- 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



JaCVAM評価会議

- 評価書の行政試験としての有用性確認
- 評価会議報告書



公表・行政への提案



About JaCVAM



Update on JaCVAM



Academic activities



Submission of Alternative
Methods to JaCVAM



International Cooperation

是非JaCVAMのHPをご覧ください。
皆様にお役に立つ情報を提供し続けられるよう努めています。

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

EU-ToxRisk – An Integrated European ‘Flagship’ Programme Driving Mechanism-based Toxicity Testing and Risk Assessment for the 21st century

- ✓ 欧州連合の研究開発の大規模プロジェクトであるHolizon2020により運営されている。
- ✓ 予算は30 million €、2016年1月から6年間の予定

- 以前のプロジェクトであるSEAURAT-1に続き、主に全身毒性について、よりメカニズムベースで行政が受け入れ可能な化学物質安全性評価戦略の確立を目指している。
- EU加盟国を中心に、40の研究機関（大学や民間企業）がコンソーシアムに参加
- In vitroはもちろん、in silico, Read acrossなど総合的に推進
- 対象臓器は、肝臓、腎臓、肺、神経系および生殖発生毒性



最終目標は、動物実験なしで信頼性の高い（行政的受け入れ可能な）化学物質の安全性評価戦略を確立すること

海外の代替法開発状況 米国Tox21

- ✓ 存在する数多くの化学物質で人に対する毒性を適切に評価されたものは多くはない。
- ✓ Tox21は、下記のいくつかの米国政府系研究機関の協力体制により、ヒト健康に影響を及ぼすかどうかを迅速に評価する新たな方法の開発を目指している。
- ✓ 対象化学物質は、一般化学品、農業用殺虫剤、食品添加物、医薬品など多岐にわたる

【参加機関】

- National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) / National Toxicology Program (NTP),
National Institutes of Health (NIH), U.S. Department of Health and Human Services
- National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS),
National Institutes of Health (NIH)
- U.S. Food and Drug Administration (FDA),
U.S. Department of Health and Human Services
- National Center for Computational Toxicology,
Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency (EPA)

代替法開発状況 眼刺激性

1. OECD TG438の改定（2018年）

ニワトリ眼球を用いた眼刺激性試験（ICE 法: Isolated Chicken Eye Test）

・ボトムアップ方式によるGHS区分に該当しない物質の判定基準の変更

⇒偽陽性率の改善

・トップダウン方式によるUN GHS区分1の判定において、病理組織学的検査の併用の検証⇒これまで偽陰性率の高かった界面活性剤の評価向上

2. OECD TG492の改定（2018年）

ボトムアップ方式でUN GHS区分に該当しない物質を検出できるEpiOcular™

眼刺激性試験（EpiOcular™ Eye Irritation Test: EpiOcular™ EIT）及び

SkinEthic™ヒト角膜上皮モデル眼刺激性試験（SkinEthic™ Human Corneal

Epithelium Eye Irritation Test: SkinEthic™ HCE EIT）が収載

LabCyte CORNEA-MODEL24を用いた眼刺激性試験（LabCyte CORNEA-

MODEL24 Eye Irritation Test: LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT）はme-too試験法

として新たに収載

詳細は、本モデルを製造・販売している株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングにお尋ねください。

ヒト3次元培養角膜上皮「LabCyte CORNEA-MODEL24」を用いた眼刺激性試験法が
経済協力開発機構テストガイドラインへ掲載
日用品などの安全性試験において、より信頼性の高い動物実験代替法として活用可能に

2018年7月17日

株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング

富士フイルムグループの株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング(本社:愛知県蒲郡市、代表取締役:島 賢一郎)は、ヒト3次元培養角膜上皮「LabCyte CORNEA-MODEL24」(以下、「ラボサイト 角膜モデル 24」)を用いた眼刺激性試験法が、このたび経済開発協力機構テストガイドライン492(OECD TG492)^{*}に掲載されましたので、お知らせします。

今後、日用品、医薬品、化粧品、化学品メーカーなど、広く化学物質を扱う企業向けに、より信頼性の高い動物実験代替法として「ラボサイト 角膜モデル 24」による安全性試験を提案していきます。

当社は、国内初の再生医療等製品である自家培養表皮などの製造・販売を行っています。また、これまで蓄積した細胞培養などに関する技術・ノウハウを活かして、研究用ヒト培養組織「LabCyte シリーズ」を展開しています。

「LabCyte シリーズ」は、ヒトの細胞を培養した研究用組織モデルで、皮膚モデル、角膜上皮モデルをラインアップしています。「LabCyte シリーズ」は、ヒト組織に極めて近い構造を再現し、化粧品や日用品の開発などでの安全性確認試験において動物実験の代替が可能であるため、幅広く使用されています。なかでも、角膜上皮モデルである「ラボサイト 角膜モデル 24」は、シャンプーや毛染剤といった日用品や点眼薬などに含まれる化学物質の眼刺激性試験に用いられています。

今回、「ラボサイト 角膜モデル24」を用いた眼刺激性試験法は、動物実験代替法学会および日本動物実験代替法評価センターによる検証研究や第三者評価を経て、眼に対する化学物質の刺激性を評価する方法として、OECD TG492の基準を満たしていることが認められました。

当社は、今後も「LabCyte シリーズ」の提供を通じて、日用品や点眼薬などの外用薬の開発をサポートするとともに、自社再生医療等製品の開発・提供による再生医療の普及を進めることで、患者の生活の質(QOL)の向上に寄与することを目指します。



ラボサイト 角膜モデル 24

代替法開発状況 眼刺激性

3. 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株化細胞を用いた短時間曝露法（STE法）に関するガイダンス（2018年）

花王が開発したSTE法は2015年にOECD TG491として採択された。本ガイダンスは、医薬部外品・化粧品の安全性評価に本試験法を利用するに当たって、必要な留意点等を取りまとめたものである。これにより、化粧品分野におけるSTE法の活用促進が期待される。

4. Vitrigel-EIT法のOECD TG化（2019年）

農研機構と関東化学が開発した、ビトリゲル上に作成したヒト角膜上皮モデルを用いる本試験法が、本年7月にOECD TG 494となった。関係者の皆様、おめでとうございます。

眼刺激性試験代替法の開発、改良、社会的受け入れが進んでおり、活用の拡大が期待されている（特に日本発の試験法）。

代替法開発状況 皮膚刺激性・皮膚腐食性

1. OECD TG493の改定（2019年）

ヒト3次元表皮モデルを用いる皮膚刺激性試験TG493にEpiSkin™やLabCyte EPI-MODEL24 SITを用いる試験法が収載されていたが、本年4月に開催されたOECD WNTにおいて、me tooバリデーションの結果、Skin+® および epiCS®が追加収載されることが承認された。

2. 皮膚腐食性試験OECD TG431の改定（2019年）

ヒト3次元表皮モデルを用いる皮膚刺激性試験TG431にEpiSkin™、EpiDerm™、SkinEthics™、epiCS®を用いる試験法が収載されていたが、本年7月に、Labcyte EPI-MODEL24が追加収載されることが承認された。詳細は、本モデルを製造・販売している株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングにお尋ねください。

ホームページに掲載されました

2017年 8月21日 [ラボサイト製品 送料変更のお知らせ](#)

2017年 7月21日 [計画生産分 ご注文受付期間変更のご案内\(PDF形式\)](#)

2017年 5月23日 [皮膚基礎研究クラスターフォーラム第12回教育セミナー 開催のご案内](#)

2017年 4月10日 [ラボサイト学術論文を更新しました](#)

トピックス「OECD TG431 皮膚腐食性試験ドラフト公開」

当社は、ラボサイト エピ・モデル24を用いた皮膚腐食性試験法のOECDテストガイドライン収載を目指しています。この度、ラボサイト エピ・モデル24を含むOECD TG431皮膚腐食性試験ドラフトがOECDホームページで公開され、コメント募集が開始されました。また、リビジョンレポート、及び第三者評価報告書も合わせて公開されております。

詳細は、以下のOECDホームページでご確認いただけます。

<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4-health-effects.htm> (外部サイトへリンクしています)

トピックス「日本動物実験代替法学会・学会賞受賞のお知らせ」

当社研究員(研究開発部 主席研究員 加藤 雅一)が、2018年日本動物実験代替法学会・学会賞※(Replacement分野)を受賞しました。加藤はこれまで、ヒト3次元培養表皮モデルおよびヒト3次元培養角膜モデルと、それらを用いた皮膚刺激性、皮膚腐食性および眼刺激性試験のプロトコルを開発しました。また、モデルの普及に努め、皮膚刺激性と眼刺激性試験の経済開発協力機構(OECD)試験法ガイドライン(TG)の公定化に貢献しました。現在、皮膚腐食性試験のためのもう一つのTGの公定化に向けて取り組んでいます。当社は今後も、動物実験代替法の発展のために尽力してまいります。



日本動物実験代替法学会にて

※日本動物実験代替法学会は、動物実験の適切な施行の国際原則である3Rs: Replacement (動物を用いない代替法への置換)、Reduction (動物数の削減)、Refinement(動物に対する苦痛軽減)の推進と普及を目的とし、研究、開発、教育、調査等を行う学術団体として活動しています。学会賞は、この3Rsの各部門において優れた功績を残した研究を学会として称えるものです。

(出典) 日本動物実験代替法学会Newsletter No.61 (11, 2018)より抜粋

→学会に関する情報はこちら(日本動物実験代替法学会のホームページへリンクしています)

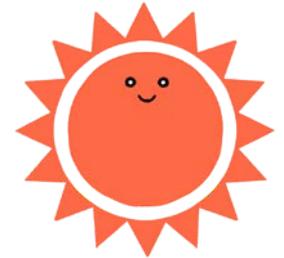
[このページのトップへ](#)

きめ細かいサポート

LabCyteは、開発から製造、販売まですべて自社で行っているため、お客様への幅広いサポートが可能です。技術担当者へのご相談・お問い合わせなど、きめ細かい対応させていただきます。

ラボサイトの製造に用いるヒト細胞は、米国でヒト細胞製品として培養加工されたものを使用しております。

関係者の皆様、
おめでとうございます。



1. OECD TG432の改定（2019年）

本年4月に開催されたOECD WNTにおいて、3T3 NRU光毒性試験の改訂が行われることが承認された。主な変更点としては、溶媒としてのDMSOは従来通り使用可能であること、21章のMECに関する記載が削除されたことなどである。

2. ROS assayのOECD TG化（2019年）

静岡県立大の尾上先生が開発されたROS assayが本年7月にOECD TG495として収載された。特に本文中の、「3T3 NRUは光感作性物質を特異的に検出する試験法ではない」という表現が注目される。

今後、UV吸収、ROS assay、3T3NRUなどを組み合わせて、光毒性をどのように評価していくかが注目される。

Test Guideline No. 495 Reactive Oxygen Species (ROS) Assay for Photoreactivity

関係者の皆様、おめでとうございます。

18 June 2019

OECD Guidelines for the
Testing of Chemicals



代替法開発状況 光毒性

OECD TG495: ROS assay for photoreactivity

Several classes of photoreactive chemicals could cause phototoxic reactions when activated by light at otherwise non-toxic doses. Phototoxicity can be categorized as **photoirritation, photoallergy, and photogenotoxicity**.

Although most of the photoirritant chemicals were correctly identified by the **3T3 NRU Phototoxicity Test**, it provided **false predictions for almost half** of the chemicals in the **photoallergens** group. However, the 3T3 NRU Phototoxicity Test was **not originally designed** for specific prediction of chemical **photoallergenicity** (2). The 3T3 NRU Phototoxicity Test seems to be **less reliable for photoallergenicity** prediction.

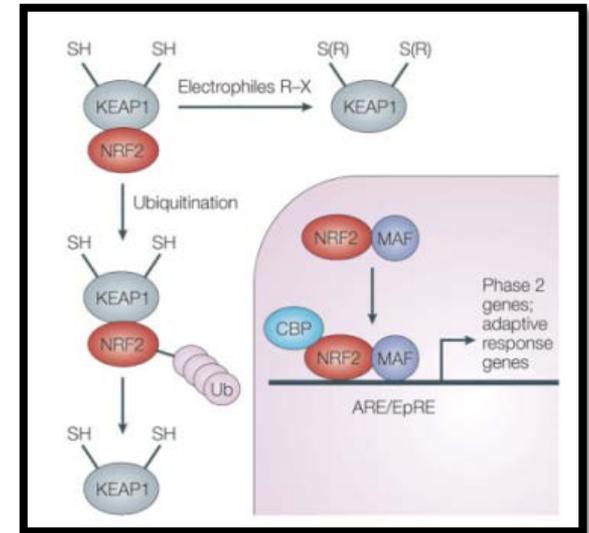
Onoue, S., Seto, Y., Sato, H., Nishida, H., Hirota, M., Ashikaga, T., Api, A. M., Basketter, D. and Tokura, Y. (2017). Chemical photoallergy: photobiochemical mechanisms, classification, and risk assessments. *J Dermatol Sci*, 85, 4-11

- ・ 光感作性物質のリスト作成 (73化合物)
- ・ ROS assay陽性かつ3T3 NRU陰性の光感作性物質の存在
- ・ 光毒性のAOP構築と、それに基づくIATA開発が望まれる。

代替法開発状況 皮膚感作性

1. OECD TG 442Dの改定（2018年）

ケラチノサイトのストレス応答というKey Event 2に基く皮膚感作性試験法のTG442DにはこれまでKeratinoSensが収載されていたが、me tooバリデーションの結果、LuSensが追加収載されることが承認された。本試験法に用いる細胞株はBASF社から入手可能である。



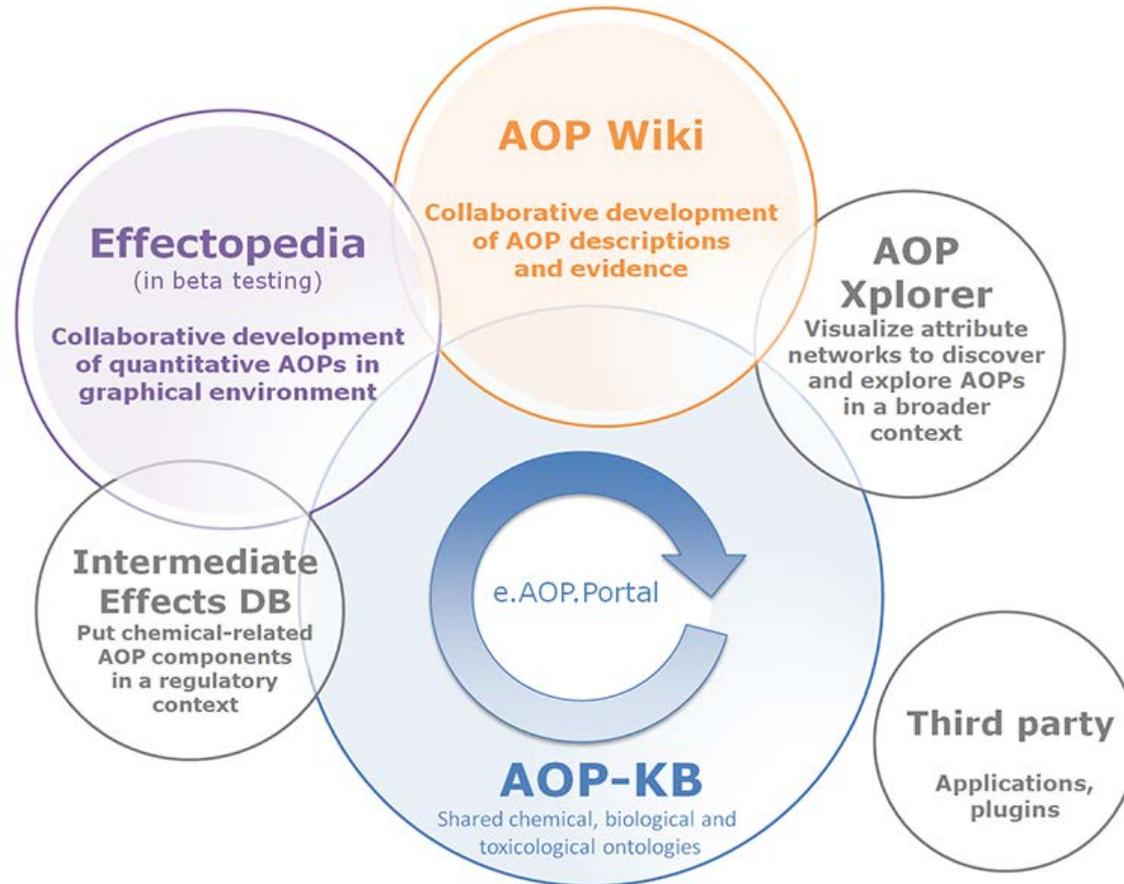
2. ADRAのOECD TG化（2019年）

タンパク結合というKey Event 1に基づく皮膚感作性試験法のTG442CにはこれまでDPRAが収載されていたが、me tooバリデーションの結果、本年7月に、富士フィルムが開発したADRAが追加収載されることが承認された。関係者の皆様、おめでとうございます。

3. 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（2018年）

IATA Defined Approachに基づく本ガイダンスにより、化粧品分野における皮膚感作性試験代替法の活用促進が期待される。

OECD AOP Development Programme



<https://aopkb.oecd.org>

- OECDでは、化学物質がどのようにして人間や野生生物に有害作用を引き起こすかという知見を加盟国に有効活用してもらうことを目的として、2012年からAOPを作成してデータベース (Knowledge Base, KB) を構築するAOP development programmeが進められている。

免疫毒性に関するAOP開発

免疫毒性学会AOP検討小委員会では、以下に示す新たな3種のAOPの開発を行い、SPSF（Standard Project Submission Form）をOECDに提出した。

1. Activation of TLR 7 leading to psoriatic skin disease

樹状細胞に存在するTLR (Toll-like receptor) 7の活性化が、Th17, Keratinocyteの関与を経て乾癬性の皮膚疾患を生じさせる。

2. Activation of estrogen receptors in immune cells exacerbates allergic responses

さまざまなタイプの免疫細胞に存在するERの活性化がTh2タイプのサイトカインの産生を促進し、アレルギー反応を増悪させる。

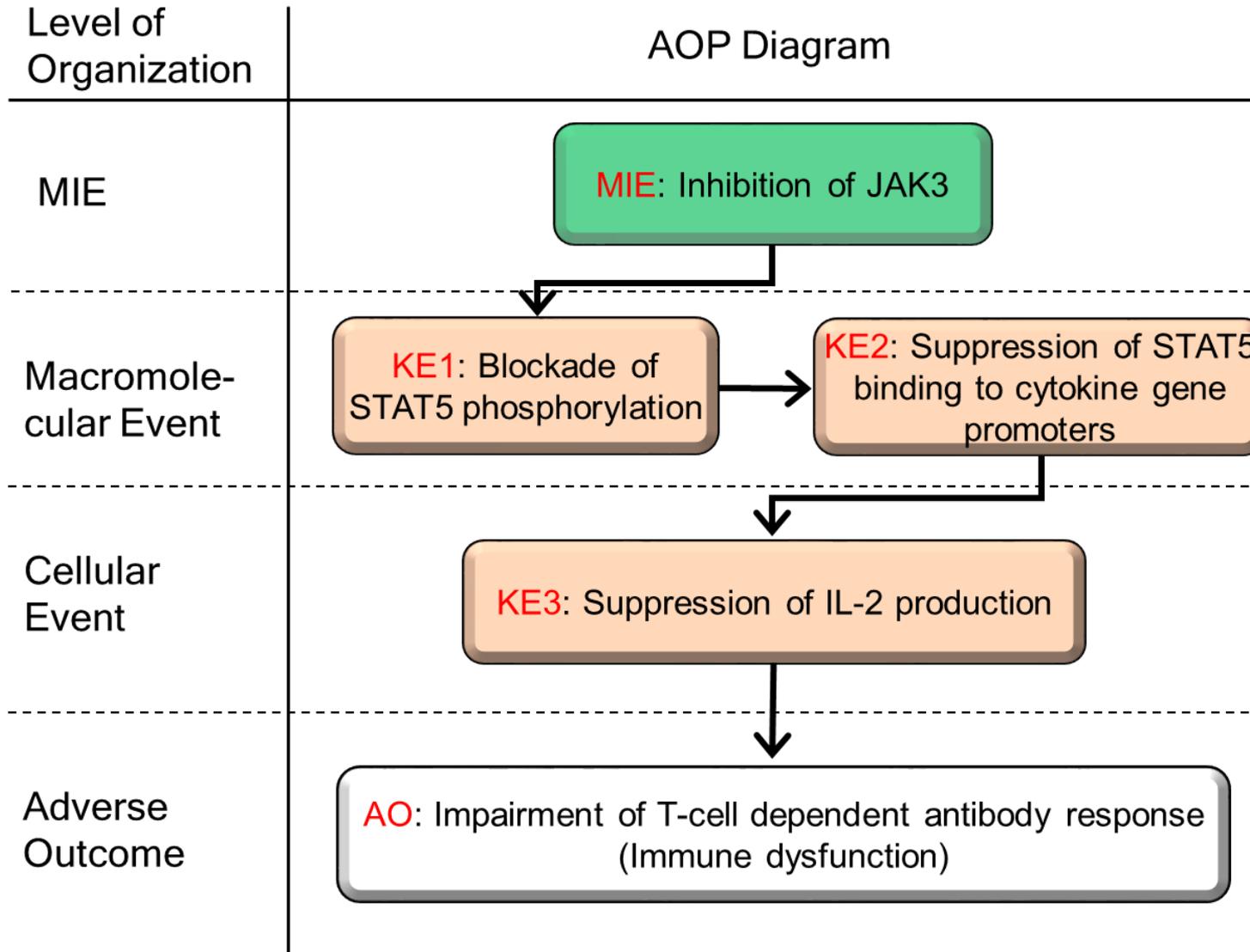
3. Inhibition of JAK3 leading to impairment of TDAR

細胞内シグナル伝達に関与するJAK3阻害により、IL-2, 4の産生が抑制される結果、TDAR (T-cell dependent antibody response)が障害される。

将来こうした複雑な毒性のAOPの開発が進み、ネットワーク化されることでIATA (integrated approaches to testing and assessment)の開発につながる事が期待される。

Project 1.74

Inhibition of JAK3 leading to suppression of TDAR



まとめ

- 動物実験代替法は社会的関心も高く、化粧品分野などでは実用化も進んでいるが、技術的課題も多く**WoE**の一部という位置づけである。
- 皮膚感作性に見られるように、代替法開発は多くの時間と労力を必要とする研究であるが、**AOP**とそれに基づく**IATA DA**による各種評価法の組み合わせによる評価法が開発が始まっているなど、実用化に向け進化が続いている。
- 欧米を中心に、全身毒性に関する代替法の開発研究が行われているが、実用化には時間がかかると思われる。また、その土台となる**AOP**の開発も**OECD**で行われている。
- 局所毒性（眼、皮膚）についても新たな**OECD TG**の開発が続いており、その多くが日本で開発された代替法である。

代替法の実用性を高めていくためには、技術的ブレークスルーだけでなくそのあり方について幅広い議論が必要

An aerial photograph of a modern, multi-story building complex. The building has a grey facade with many windows. A large brown banner is hanging from the side of the building. In the foreground, there is a road with a white dashed line, a green lawn, and some trees. The sky is blue with some clouds. The text "ご清聴ありがとうございました。" is overlaid on the image in white.

ご清聴ありがとうございました。