

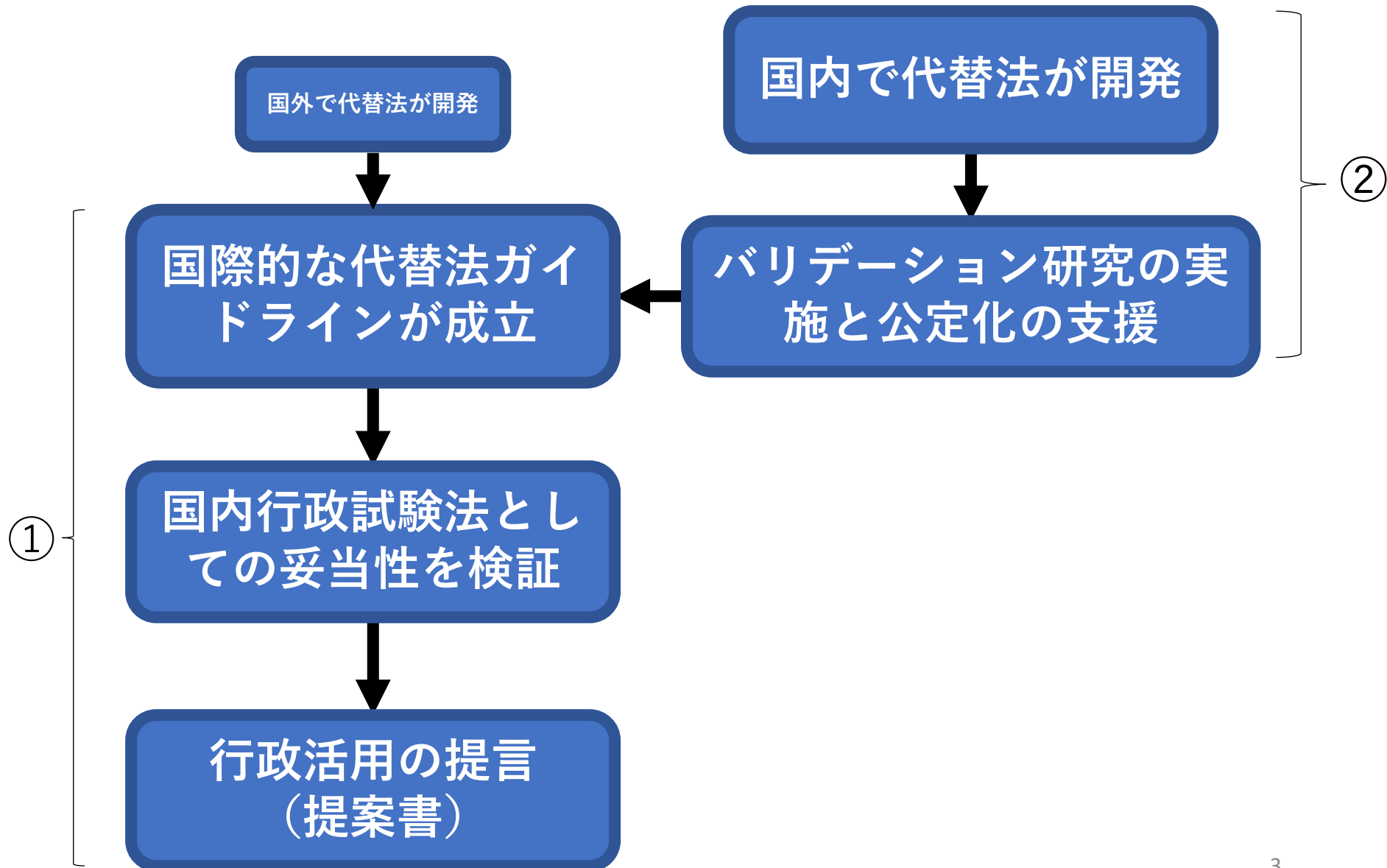
2021年度の活動について



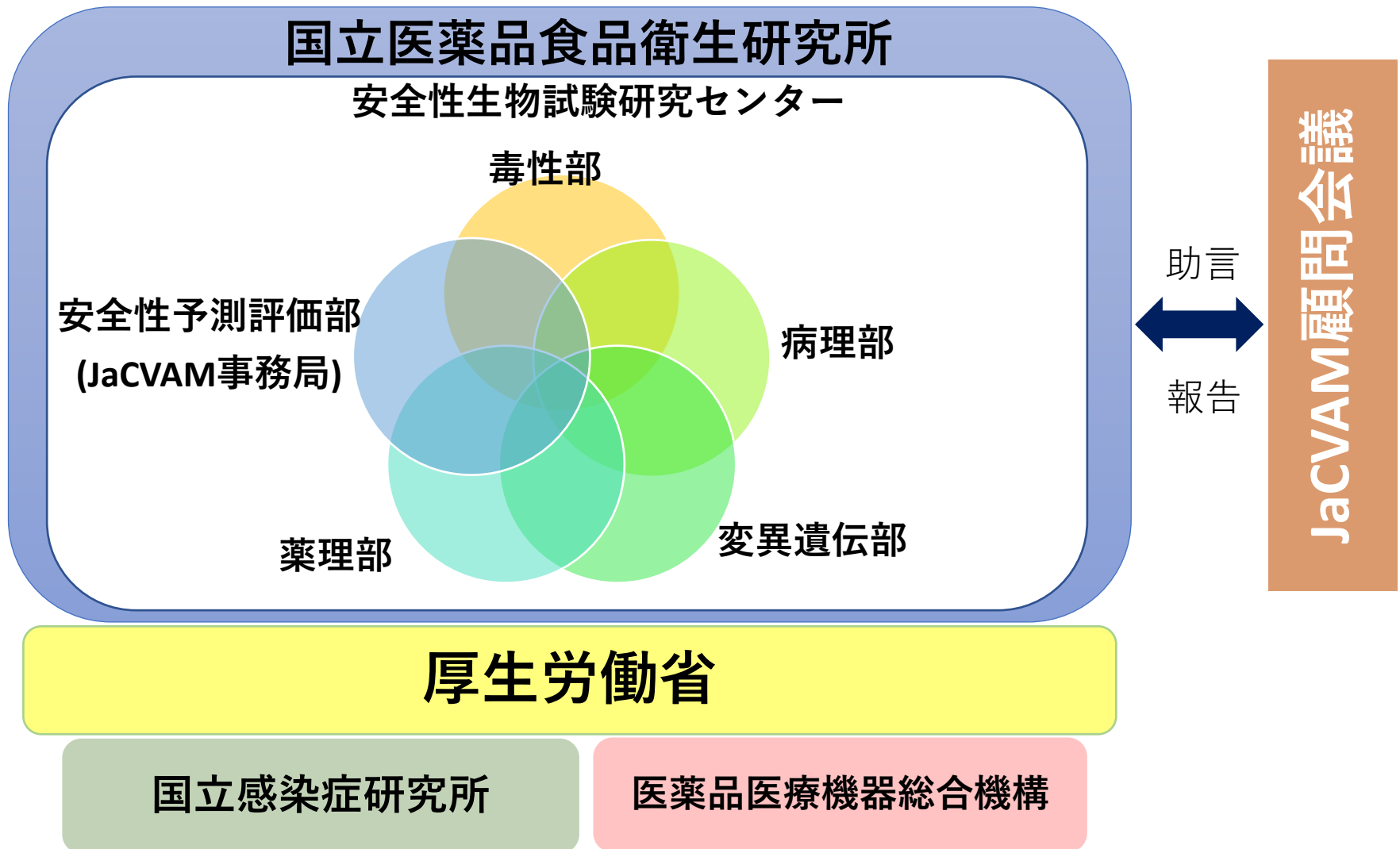
JaCVAMの目的

化学物質等の安全性評価のうち、国民の安全を確保しつつ、動物実験に関する 3 Rs（**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、化粧品基準の改正等並びに化学物質、農薬の適正な規制にも寄与する。

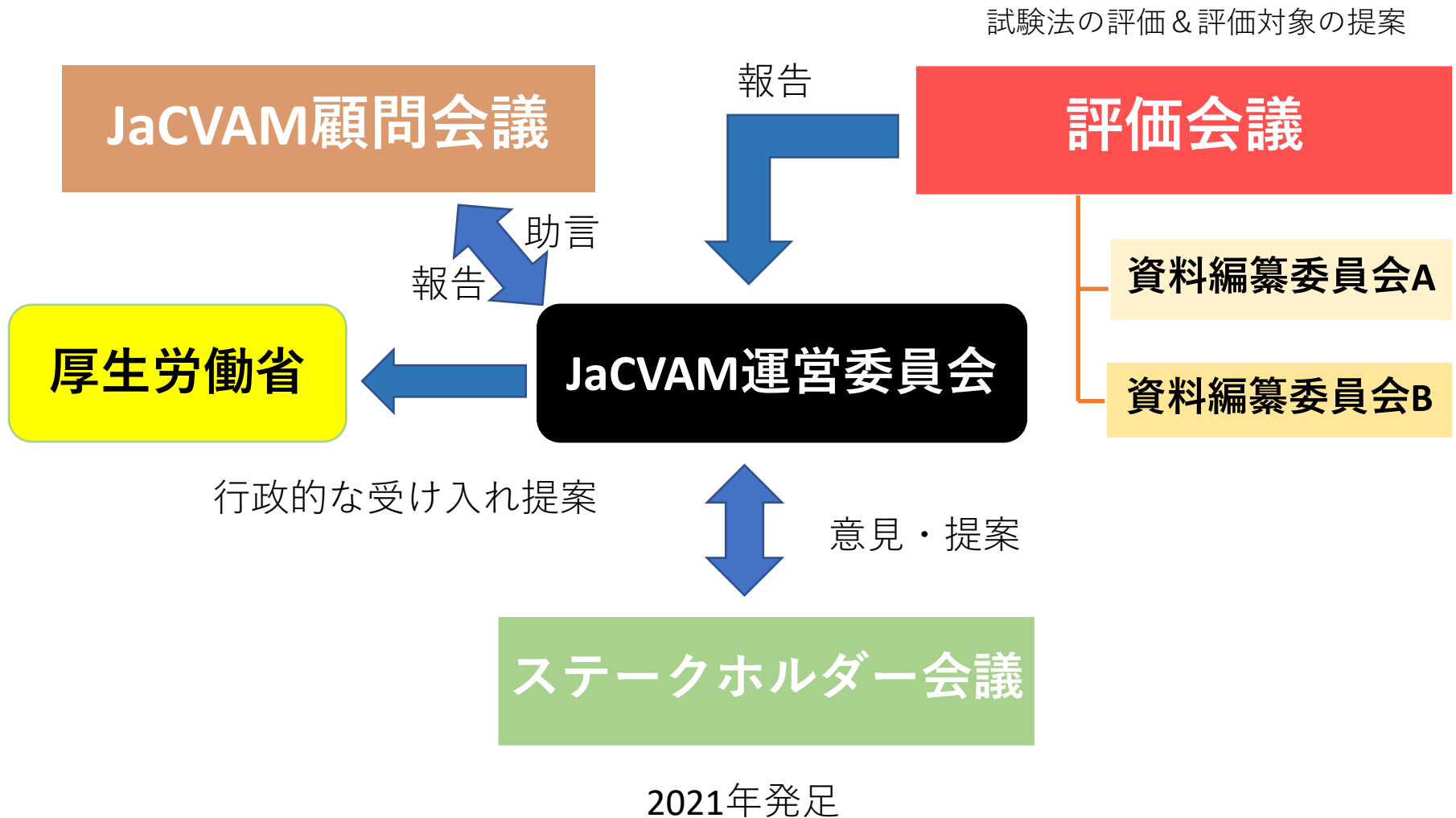
JaCVAMの活動の流れ



JaCVAM 運営組織



JaCVAM会議体制



運営委員会

第28回 令和3年 7 月 1 日（木）

第29回 令和3年12月22日（木）

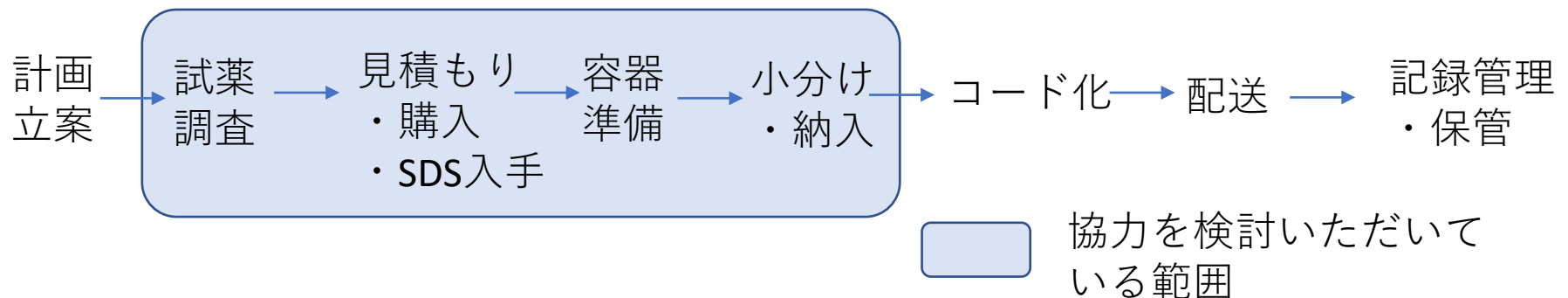
主な議題：

- ・ **第1回ステークホルダー会議開催**
- ・ **バリデーションに用いる試薬配布体制**
- ・ **製薬協との毒物劇物代替法に関する打ち合わせ**
- ・ **In vitro発熱性物質試験aMylc MAT試験のバリデーションについて**

バリデーションにおける試薬配布体制

被験物質の配給システムを見直すため、合田先生より富士フイルム和光純薬株式会社をご紹介いただき、バリデーション実行委員会に共同研究者としてご協力いただくこととなった。

バリデーションにおける試薬供給作業の流れ



製薬協との毒物劇物代替法に関する打ち合わせ

ステークホルダー会議に出席した製薬協様より、
「急性毒性試験を予測するためのin vitroの細胞
毒性試験」に関する要望提出

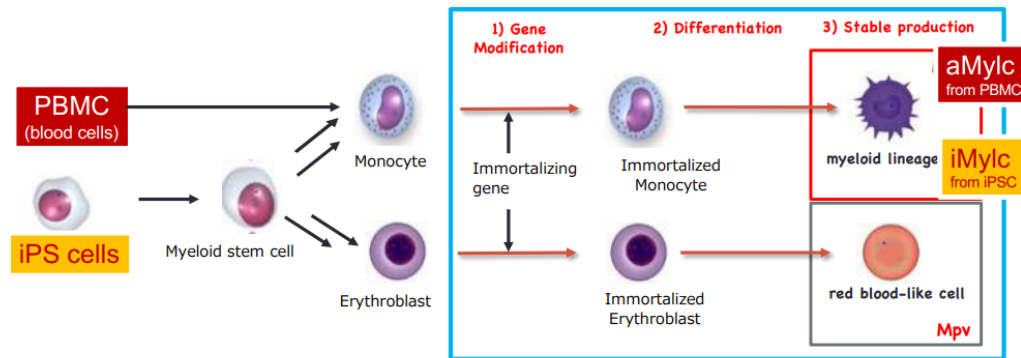
製薬協、JaCVAM事務局に厚労省医薬食品局審
査管理課化学物質安全対策室も加えて議論



製薬協より運営委員会に対し、「本件に関する
コンソーシアムなどを設置できるかを含め具
体的方針が提案できる場合、改めて相談させて
いただきたい」という回答

In vitro発熱性物質試験 aMylc MAT

aMylc細胞は、マイキャン・テクノロジーズ株式会社および日水製薬株式会社により開発された末梢血由来の細胞株であり、MAT試験への活用が検討されている。



	PBMC	Mylc	発熱物質試験	LAL
原料	ヒト献血血液	iPS細胞 / PBMC	ウサギ	カブトガニ血液
1ロット最大	100 ~ 800 個	>1,000 個	-	-
継続供給	X	○	-	-
価格(100回)	¥260,000	< ¥180,000	20 ~40万円*	¥20,000*

*ウサギ、カブトガニの試験は価格感を記載(直接比較できないため)

現在、運営委員会において継続審議中

JaCVAMにおける試験法評価組織の再編

旧JaCVAM評価会議



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



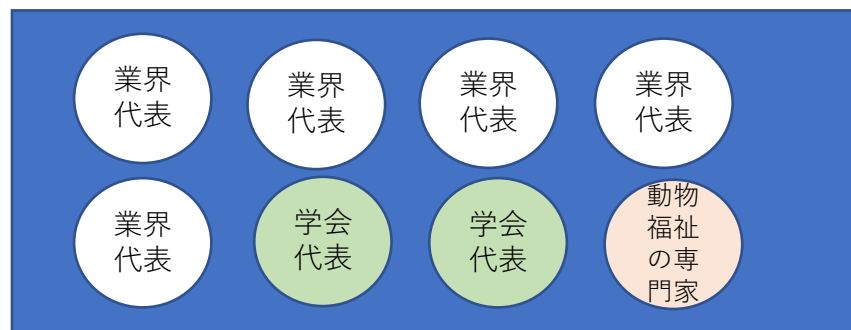
リニューアル2020年

新JaCVAM評価会議



同上 & 評価対象の提案

ステークホルダー会議（新設）



- ・ 試験法の行政利用 & 評価対象の周知と要望
- ・ 幅広い学会、業界団体、実験動物福祉協会などから約20機関

ステークホルダー会議

日時：令和3年6月 1 日（木）14:00-17:00

場 所：国立衛研 共用会議室及びweb

主な議題：

- ・ 2020年度に行政提案を行った試験法の説明
など活動実績報告
- ・ 代替法に関する国際情勢
- ・ 各参加機関から代替法に関する活動紹介および
意見（毒劇物に関する代替法の要望など）

資料5

JaCVAMの業務①

国際的な代替法ガイドラインが成立



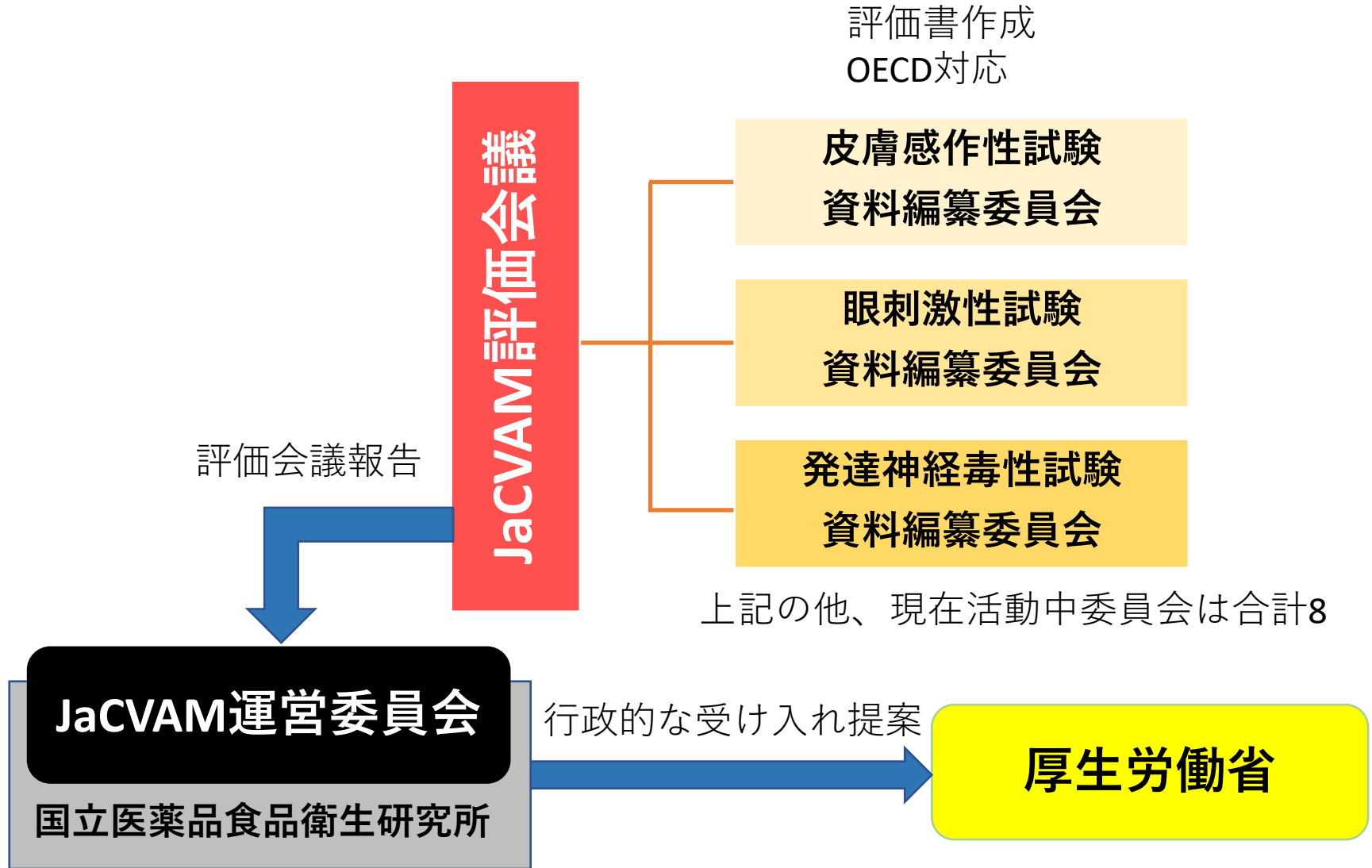
国内行政試験法としての妥当性を検証



行政活用の提言
(提案書)

化学物質等の安全性に係る試験法の有用性とその限界及び行政試験法としての妥当性について評価する。

JaCVAMの試験法評価業務



評価書および手引書作成

- ・ 眼刺激性試験 Vitrigel-EIT
 SkinEthics TTTおよびDA*（眼刺激性）
- ・ 腐食性試験 LabCyte EPI-MODEL SCT
- ・ 光毒性試験 3次元表皮モデルを用いた光毒性試験
- ・ 皮膚感作性試験 ADRAおよびDA*（皮膚感作性）

*: Defined Approach（確定方式）によるガイドライン

OECDプロジェクト対応

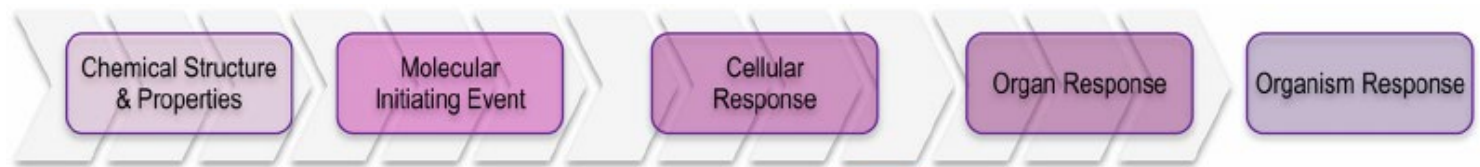
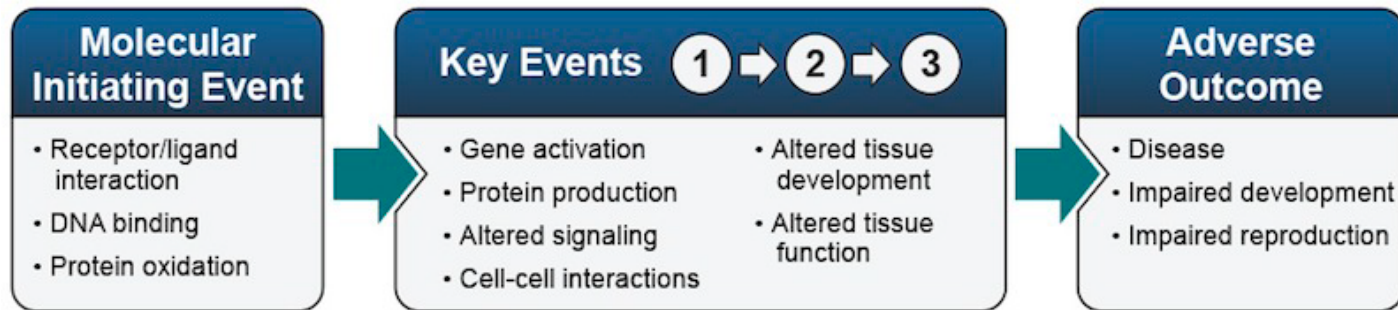
- ・ 発達神経毒性試験
- ・ In silico毒性学

DA（確定方式）とは？

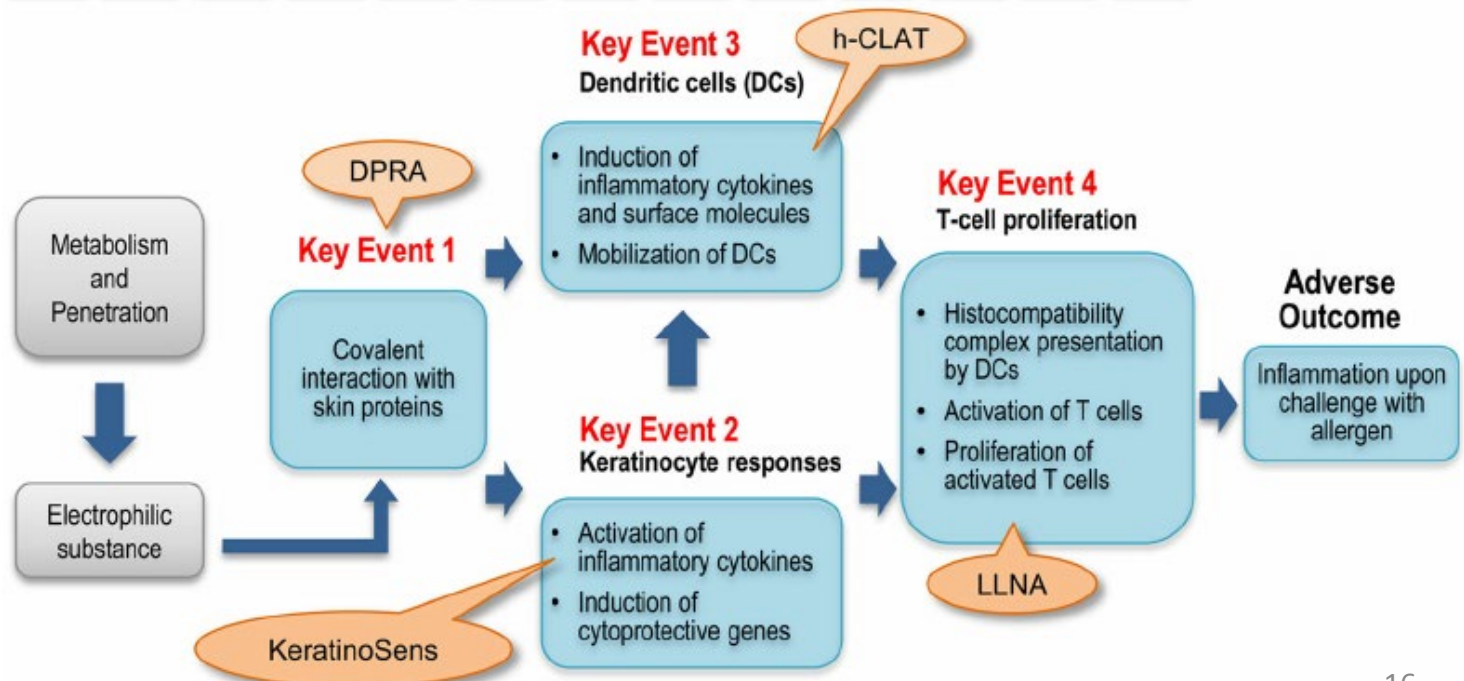
AOP（有害性発現経路）に基づいて構築される
IATA（戦略的統合方式）には、情報源の選択や重み付けといった専門家の判断の過程が必然的に含まれるため、標準化が必要である。

DAとは、一連の確かな情報源と、それらを用いて行われる確立されたデータ解釈作業からなる、標準化された評価手法である。

有害性発現経路(AOP)と戦略的統合方式IATA



皮膚感作
のAOPと
対応する
試験法



OECD Guideline No. 497

Defined Approaches for Skin Sensitisation

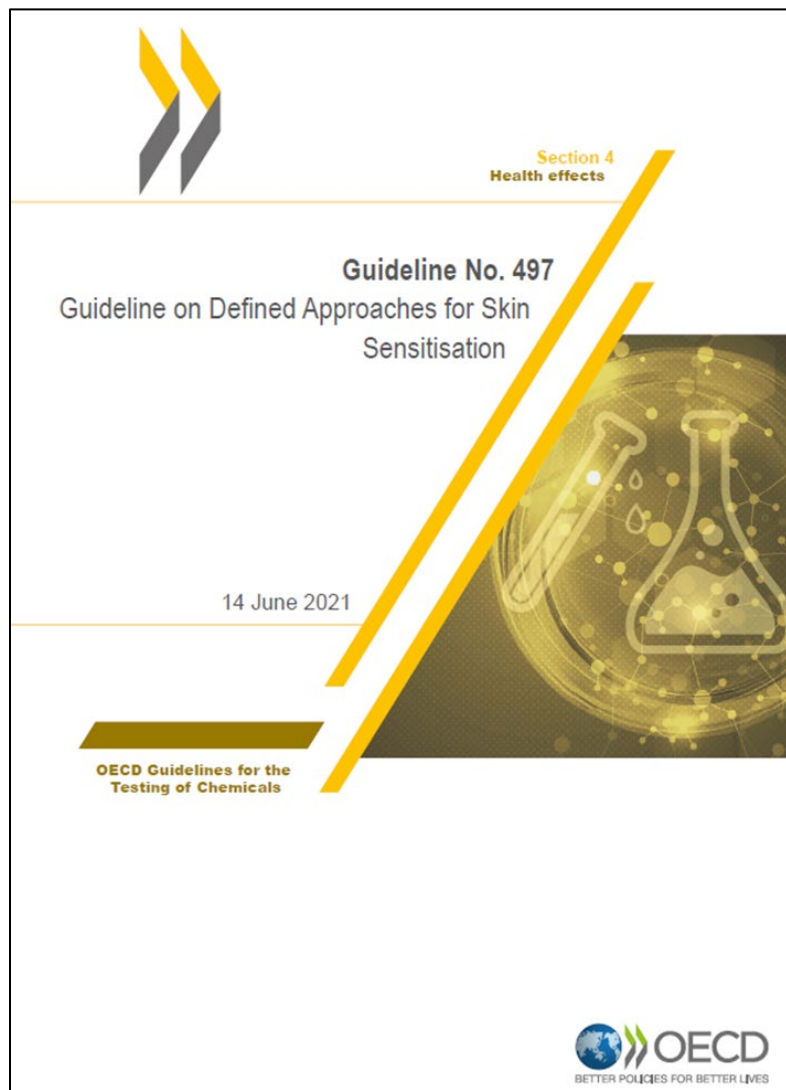


Figure 2.1. Decision tree to be used for the 2o3 DA, taking into account borderline results^{4J}

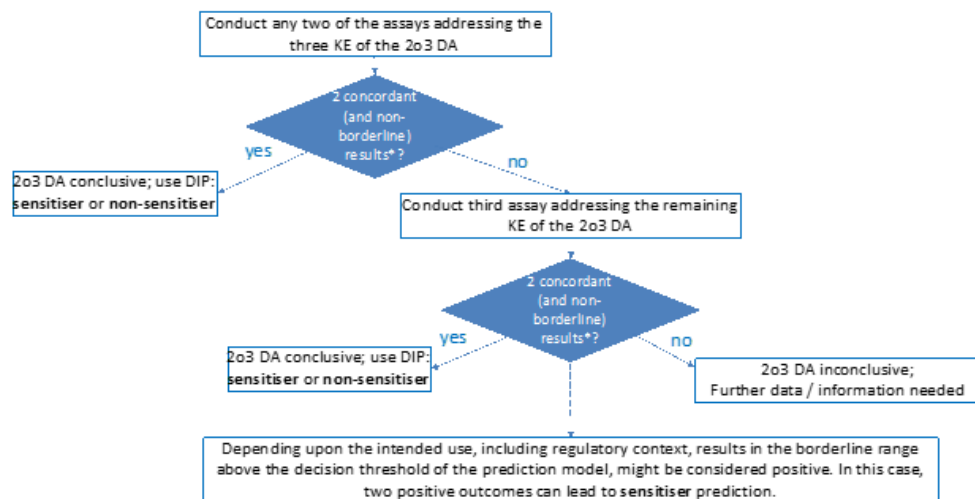


Table 3.1. Schematic of the ITS defined approach. The DA is a simple score-based system depending on assays from OECD TG 442E and 442C, and an *in silico* structure-based prediction, as shown.^{4J}

Score ^{4J}	h-CLAT ^{4J} MIT µg/mL ^{4J}	DPRA ^{4J} mean Cysteine and Lysine% depletion ^{4J}	DPRA ^{4J} Cysteine % depletion ^{4J}	<i>In silico</i> J. (ITSv1: DEREK; ITSv2: OECD TB) ^{4J}
3 ^{4J}	≤10 ^{4J}	≥42.47 ^{4J}	≥98.24 ^{4J}	
2 ^{4J}	>10, ≤150 ^{4J}	≥22.62, <42.47 ^{4J}	≥23.09, <98.24 ^{4J}	
1 ^{4J}	>150, ≤5000 ^{4J}	≥6.38, <22.62 ^{4J}	≥13.89, <23.09 ^{4J}	Positive ^{4J}
0 ^{4J}	not calculated ^{4J}	<6.38 ^{4J}	<13.89 ^{4J}	Negative ^{4J}
	Potency ^{4J}	Total Battery Score ^{4J}		
	UN GHS 1A ^{4J}	6-7 ^{4J}		
	UN GHS 1B ^{4J}	2-5 ^{4J}		
	Not classified ^{4J}	0-1 ^{4J}		

手引書とは？

これまでの試験法評価書とDA手引書の違い

項目	手引書	試験法評価書
試験法の原理	DA	TGまたはバリデーション報告書
試験手順	不要	プロトコル、バリデーション報告書
試験法の信頼性	不要	バリデーション報告書
試験法の正確性	DAおよび supporting documents	バリデーション報告書
試験法の限界	DAおよび各TG	TGまたはバリデーション、PRP報告書

In silico毒性学資料編纂委員会の設置

In silico毒性学は様々な毒性項目にまたがる研究領域であり、妥当性の検証法など様々な課題も指摘されていることから、OECDにおけるin silico毒性学の動き*等国際的な動向の窓口となる枠組みが必要と考える。

そこで、2021年度JaCVAMにin silico毒性学資料編纂委員会を設置した。

これまで3回の会議を開催し、OECDのプロジェクトで作成されるガイダンスの確認と事例研究の開発を検討している。

*：2021年3月より QSAR Assessment Framework projectが発足



進行中のJaCVAM第三者評価

- **口腔粘膜刺激性試験**

目標：医薬部外品

3次元培養口腔粘膜モデル

追加実験実施中

口腔製品用添加剤の承認

- **発熱性物質試験**

目標：日本薬局方

PyroMAT試験

非エンドトキシン作用の確認中

発熱性物質試験の代替

評価会議

本年度は4回開催され、主に以下の内容について議論した。

第58回 令和3年5月13日（木）

第59回 令和3年7月13日（火）

第60回 令和3年10月1日（金）

第61回 令和3年12月7日（火）

（第62回 令和4年2月24日（水）予定）

- ・ **眼刺激性試験代替法SIRC-CVS:TEA評価書について**
- ・ **腐食性試験代替法LabCyte EPI-MODEL SCT評価書について**
- ・ **眼刺激性試験代替法Vitrigel-EITの評価報告書**
- ・ **OECD DAの扱いについて**
- ・ **形質転換試験（CTA）SHEアッセイの評価会議評価書について**

2021年度に行政に提案する試験法

- 腐食性試験 LabCyte EPI-MODEL SCT

- 参考（評価のみ）

眼刺激性試験 SIRC-CVS:TEA

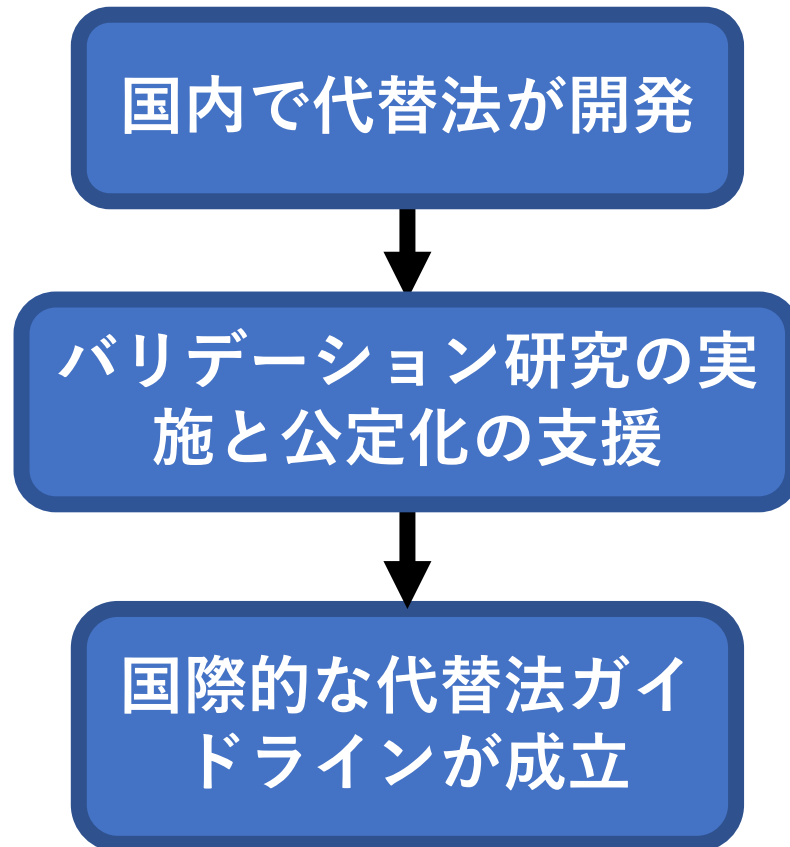
腐食性試験LabCyte EPI-MODEL SCT

提案内容：

LabCyte EPI-MODEL24 SCT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。国連GHS細区分を考慮した評価においても、LabCyte EPI-MODEL24 SCTは、EpiSkin™およびEpiDerm™ SCTと同様に評価できる試験法である。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。

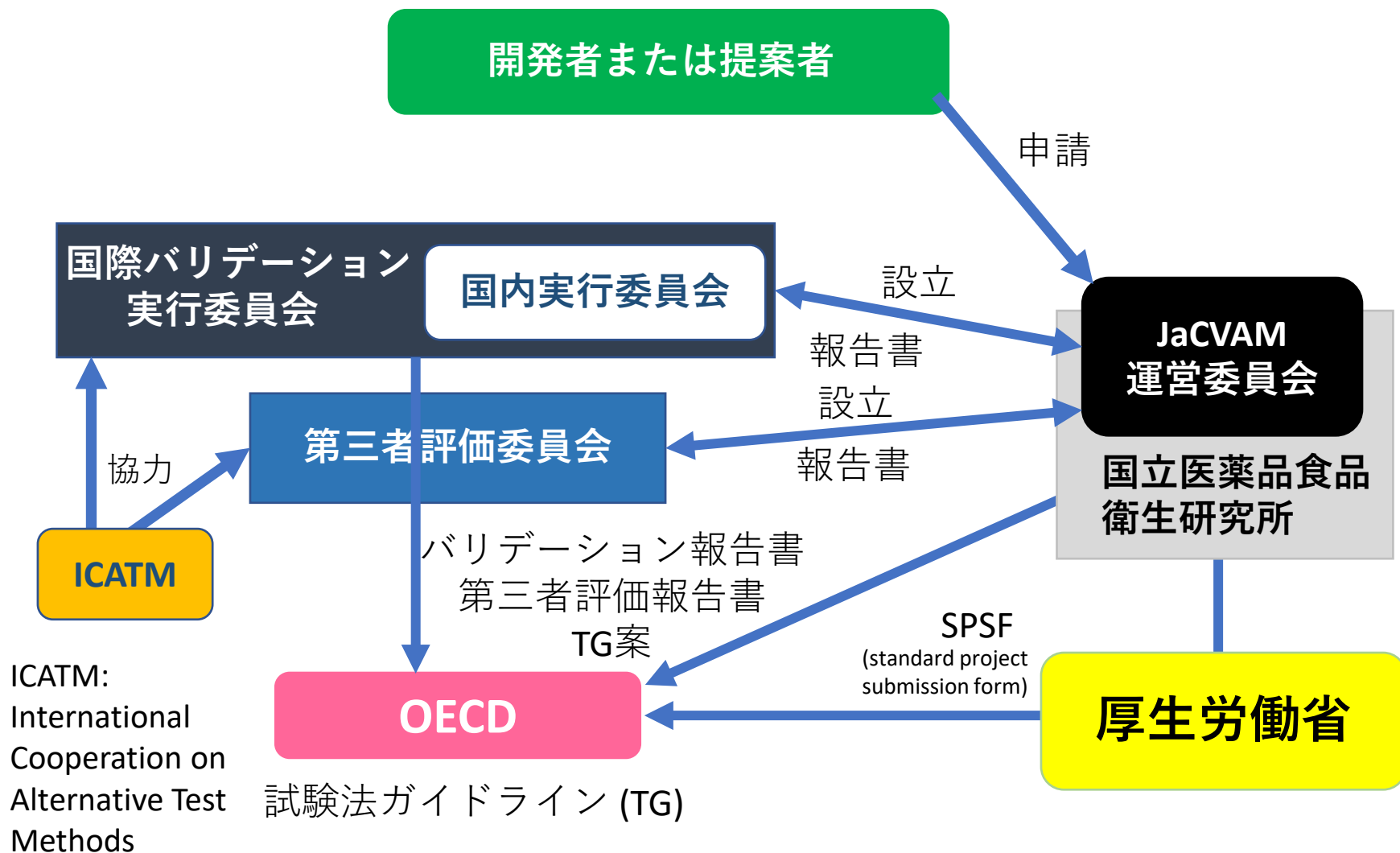
JaCVAM提案書 腐食性試験LabCyteEPI-MODEL24SCT

JaCVAMの業務②



必要なバリデーションを実施するとともに、関連分野における国内及び国際協力並びに国際対応に携わる。

JaCVAMのバリデーション業務



- 皮膚感作性試験 **EpiSensA**
バリデーション報告書作成中
- 皮膚感作性試験 **ADRA**
追加バリデーション実験終了
- 免疫毒性試験 **IL-1 β Luc assay**
バリデーション報告書作成中
- 免疫毒性試験 **IL-2 Luc LTT**
バリデーション報告書作成中
- In vitro発熱性物質試験 **aMylc MAT**
JaCVAM運営委員会の承認後開始

OECD作業計画にあるJaCVAM主導で 評価された試験法

- 皮膚刺激性試験 LbL 3D-Skin SIT TG439改定提案
- 皮膚感作性試験 ADRA TG442C改定提案
- 皮膚感作性試験 IL-8 Luc assay TG442E改定提案
- 免疫毒性試験 IL-2 Luc assay
- 生殖毒性試験 Hand-1 Luc EST

今年度は以下の2つのSPSFをOECDに提出

- 皮膚感作性試験 EpiSensA
- 免疫毒性スクリーニング試験 IL-2 Luc LTT

- ✓ Skin sensitization assay, LLNA : DA, TG 442A (2010)
- ✓ Skin sensitization assay, LLNA : BrdU-ELISA , TG 442B (2010)
- ✓ *In vivo* comet assay TG 489 (2014)
- ✓ Skin irritation assay with LabCyte EPI-MODEL 24, TG 439 (2013)
- ✓ Performance-based Test Guideline for stably transfected transactivation *in vitro* assays to detect estrogen receptor agonists and antagonist, Revised TG 455 (2015)
- ✓ Bhas 42 cell transformation assay (2016) Guidance document
- ✓ h-CLAT assay for skin sensitization testing, TG442E (2016)
- ✓ IL-8 Luc assay for skin sensitization testing, TG442E (2017)
- ✓ Eye irritation assay with LabCyte CORNEA-MODEL, TG492 (2018)
- ✓ LabCyte EPI-MODEL for skin corrosivity testing, OECD TG431 (2019)
- ✓ ROS assay for photosafety testing, TG495 (2019)
- ✓ Short time exposure (STE) assay for eye irritation testing, TG491 (2020)
- ✓ Stable transfected transcriptional activation (STTA) assay for androgen disruptor screening (AR-Ecoscreen), TG458 (2020)
- ✓ Vitrigel-EIT for eye irritation testing, TG494 (2021)
- ✓ ADRA for skin sensitisation testing, TG442C (2021)

赤字:2021年改定

AATEX-JaCVAM

日本動物実験代替法評価センター(JaCVAM)令和2年度報告書

足利 太可雄, 小島 肇夫, 平林 容子

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

令和2(2020)年, 日本動物実験代替法評価センター(Japanese Center for the Validation of Alternative Methods: JaCVAM)はその評価会議が認めた以下の3つの試験法を行政機関に提案した。

- 1) Bhas 42 細胞形質転換試験法 (Bhas 42 Cell Transformation Assay: CTA)
- 2) エストロゲン受容体 (Estrogen Receptor: ER) 結合親和性化学物質の検出のための、ヒト組み換えエストロゲン受容体 (hER) *in vitro* 試験法に関する性能基準試験法ガイドライン (Performance-Based Test Guideline: PBTG493)
- 3) 皮膚感受性試験代替法 Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay)

一方, JaCVAMは経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD) の試験法ガイドライン (Test Guideline: TG) として、以下の3試験の取組に寄与した。

- 1) Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals: TG458
- 2) Short Time Exposure *In Vitro* Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage: TG491
- 3) *In Chemico* Skin Sensitisation: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Covalent Binding to Proteins, the Amino Acid Derivative Reactivity Assay (ADRA): TG442C

この他, OECD の作業計画には、日本から提案された以下の7試験が含まれており、令和3(2021)年度以降の成立に向けて、JaCVAMもOECDにおけるTG案などの開発およびreview過程に協力している。

- 1) 皮膚刺激性試験 TG439 の改定: Layer by Layer (LbL) 3D-Skin Skin Irritation Test (SIT) の取組
- 2) 眼刺激性試験 TG437 の改定: 牛摘出角膜の混濁および透過性試験法 (Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test method) への病理学的評価の導入
- 3) 眼刺激性試験 TG494 の改定: Vitrigel-Eye Irritation Test (EIT) の適用範囲拡大
- 4) 皮膚感受性試験 TG442C の改定: ADRA の改良
- 5) 光安全性試験 Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) の開発
- 6) *In vitro* 免疫毒性試験 Detailed Review Paper (DRP) の開発
- 7) 多能性幹細胞を用いた *in vitro* 生殖発生毒性試験の DRP の開発

さらに, JaCVAM では国際協調を通して、複数の試験法のバリデーションや第三者評価を進めている。それらには、免疫毒性スクリーニング Multi-ImmunoTox assay (MITA) IL-2 Luc アッセイ、MITA IL-2 Leukocyte Toxicity Test (LTT) アッセイおよび MITA IL-1β Luc アッセイ、皮膚刺激性試験 LbL 3D-Skin SIT、皮膚感受性試験 EpiSensA および ADRA が含まれる。

新規試験法評価書

令和3年7月30日

No. 2021-01

眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS:TEA法に関する評価

令和3年7月23日に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）において以下の評価がなされた。

当該試験法は化学物質の SIRC 細胞に対する細胞生存率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、本試験法は安価であり、短時間で実施でき、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はない。したがって、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、技術移転性は高く、再現性も高い方法である。

しかし、当該試験法の予測性評価においては、適用除外物質の設定に科学的な根拠が乏しいことから、当該試験法は化学物質による眼刺激性をボトムアップ方式において国際連合化学品の分類および表示に関する世界調和システム (UN GHS) 区分に該当しない物質を検出する方法として、行政的に用いることは適切ではないと考える。

この評価書は、眼刺激性試験資料編纂委員会によりまとめられた文書を用いて、JaCVAM 評価会議が評価および検討した結果、その行政活用上の位置付けが確認されたことから作成された。

オープンジャーナルImpactにJaCVAM紹介記事が掲載



INNOVATIVE
EXPLORATORY
RESEARCH



RESEARCH INSIGHTS

PROFESSOR TAKESHI YAMADA <i>National Institute of Health Sciences</i>	PROFESSOR MASAHIRO GOTO <i>Osaka University</i>	PROFESSOR WOEICHYN CHU <i>National Tsinghua University</i>	PROFESSOR JAE-GOOK SHIN <i>Yonsei University College of Medicine</i>
---	---	--	--

Impact Objectives

- Contribute to efficient drug development and improved experimental animal welfare
- Explore opportunities where non-animal test methods can quickly evaluate whether new chemical substances are harmful to human health and all life on earth

Alternatives to animal testing

Director of the Center for Biological Safety and Research (CBSR), National Institute of Health Sciences (NIHS), Dr Yoko Hirabayashi envisions a world in which the use of non-animal methods can replace animal testing. She talks about her interrelated roles and important research



Could you first introduce the important work of the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) to replace, reduce or refine (the '3Rs') animal testing?

Working hand-in-hand with related international organisations, JaCVAM has contributed to the development of new alternative methods to animal testing, promoted the adoption of these new methods by regulatory agencies and also worked to further the development by Japanese researchers of the novel test methods. It has also contributed to the international standardisation of validation studies and the adoption of more than 15 test methods for the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Test Guidelines and International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidelines.

How are your roles linked to the 3Rs of animal welfare?

I am the Director of the CBSR, which was established in 1978 as a research facility to investigate the safety of chemical substances and their effects on living organisms, particularly from a neutral standpoint. Its mission is to research and test the safety of substances which are subject to our studies, such as chemical substances, food and medicinal products using biological resources (such as experimental animals and cells) and conduct comprehensive safety

methods based on scientific grounds. The JaCVAM was organised within the CBSR by the National Institute of Health Sciences (NIHS) to promote the use of alternatives to animal testing for regulatory studies. I am the Chair of the JaCVAM Steering Committee. This Committee determines which novel or revised test methods are to be selected and assessed by JaCVAM. It also allocates both the financial and human resources necessary to undertake the scientific validation and assessment of such test methods based on the spirit of the 3Rs of animal welfare, as well as to respond to international trends on how to conduct animal experiments appropriately.

We act as a contact point for international organisations supported by the Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW). We are proud of the Japanese researchers who have done these things and would like to take this opportunity to thank the Japanese developers and collaborators who have contributed.

Innovations to eliminate animal testing

The JaCVAM is leading the way to develop non-animal testing methods in immunotoxicity and reproductive toxicity

Animals have been used for centuries in scientific research and in predicting safety to humans. For example, they have been used to test the safety of candidate drugs before they are tested in people. However, there is now a keen focus by scientists to develop new and innovative methods that do not rely on animal testing. Takao Ashikaga, Hajime Kojima and Yoko Hirabayashi are exploring alternative methods to animal testing in JaCVAM. 'It's important to develop a new method that does not use test animals for the evaluation of the safety of chemical and other substances,' Hirabayashi highlights. They are all part of JaCVAM which works to promote the use of alternatives to animal testing. Ashikaga and Kojima share the role of secretary and Hirabayashi is the chair of the steering committee. 'JaCVAM contributes to replacing, reducing, or refining (3Rs) the use of animals wherever possible,' Hirabayashi explains.

IMPACTFUL RESEARCH

Hirabayashi is the representative of a research group that is funded by the AMED and the group's current work will contribute to drug development and experimental animal welfare. She is also the representative of a research group funded by the MHLW, and the group's current work will contribute to ensuring the safety of various chemicals, including new ones that will be developed in the future, and to the welfare of experimental animals. The study is focused on the development of non-animal testing methods in the areas of immunotoxicity and reproductive toxicity, and will proceed in collaboration with the OECD and the ICH.

Through their study, the researchers have identified the key challenges facing the conversion of animal testing into the use of non-animal methods. One such limitation is the lack of biomarkers to more accurately

testing, more costly and complex non-animal methods are required. 'Non-animal test methods have been developed with the intention of detecting specific biomarkers based on adverse endpoints in humans. Therefore, to understand toxicity at the individual level, it is currently necessary to combine the results of several non-animal test methods, even if the focus is on biomarkers that can cause serious damage,' Hirabayashi clarifies. 'The combinations are complicated and diverse, costly and the information is limited. This means there is a need to develop an easy way to obtain a lot of information. Without it, we believe that true non-animal testing will not take root in society,' she says.

AI NOT ANIMALS

One element of the research of Hirabayashi and the team involves the development of AI that can be used to evaluate the safety of new compounds, thereby eliminating the need for animal models. Towards realisation of the ultimate goal, the researchers are also developing a number of other non-animal methods. 'The methods we are developing include: in vitro assays such as ordinary 2-dimensional culture, 3-dimensional culture including organoids or spheroids, reporter gene assay and organ-on-a-chip; and in silico assays such as computer toxicology using QSAR and Read Across,' Hirabayashi reveals. 'The organ-on-a-chip construct that the team is developing is an original microphysiological system (MPS) that will allow the researchers to model human tissues and look at how different compounds affect the tissues,' she explains.

This innovative work has the potential to revolutionise approaches to scientific experiments and contribute to the 3Rs by helping to replace, reduce or refine the use of animals, profoundly benefiting

innovations emerging and advancing all the time, it makes sense to make use of these in the lab, where possible, to reduce animal testing,' observes Hirabayashi.

Project Insights

FUNDING

AMED Grant Number JP21rk0101188, MHLW Grant Number JPMH20K02003 and NIHS Research Grant (2020-2024)

ICATM PARTNER ORGANISATIONS

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, US (ICCVAM), European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVM), Health Canada, Canadian Centre for the Validation of Alternative Methods (CaCCVAM), Korean Centre for the Validation of Alternative Methods (KoCCVAM), Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods (BraCCVAM)

JACVAM STEERING COMMITTEE

Yoko Hirabayashi Chairperson

CONTACT

Dr Yoko Hirabayashi
T: +81 44 270 6600
E: dsr_nih@nih.go.jp
W: <https://www.jacvam.jp>





(資料10)