

日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 令和元年度報告書

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

2019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) 急性経口毒性を予測するための *In Vitro* 細胞毒性試験
- 2) ニワトリ眼球を用いた眼刺激性試験 (Isolated Chicken Eye Test: ICE 法)
- 3) *In vitro* 皮膚感作性試験: ARE-Nrf2 Luciferase LuSens Test Method (LuSens 法)

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4試験を収載させることに寄与した.

- 1) LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method: TG431
- 2) Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labeling for Eye Irritation or Serious Eye Damage: TG494
- 3) Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) for *In Chemico* Skin Sensitisation Assays Addressing The Adverse Outcome Pathway Key Event On Covalent Binding To Proteins: TG442C
- 4) Reactive Oxygen Species (Ros) Assay for Photoreactivity: TG495

この他, OECDの作業計画では, 日本は以下の5試験法を提案しており, 2020年度以降の成立を目指している.

- 1) 発生毒性スクリーニング Hand1-Luc EST (Embryonic Stem Cell Test) の開発
- 2) 眼刺激性試験代替法 TG437 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) Androgen Receptor (AR)-EcoScreen™法 TG458 の Performance-Based Test Guideline (PBTG) 改定
- 4) 眼刺激性試験代替法 TG 491 改定: Short Time Exposure (STE)法
- 5) *In Vitro* 免疫毒性試験 Detailed Review Paper (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 アッセイおよび IL-1 β Luc アッセイ, 皮膚刺激性試験 LbL-3D Skin Skin Irritation Test (SIT) および皮膚感作性試験代替法 EpiSensA が該当する.

Annual report on the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) in 2019

Takao Ashikaga, Hajime Kojima and Yoko Hirabayashi

JaCVAM, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences (NIHS)

Abstract

In 2019, JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) proposed three test methods accepted by the JaCVAM Regulatory Acceptance Board to the regulatory agency, including: 1) *In Vitro* Cytotoxicity Assay for Estimating Acute Oral Toxicity, 2) *In Vitro* Test Method Predicting Ocular Irritation Potential: Isolated Chicken Eye (ICE) Test, 3) *In Vitro* Test Method Predicting Skin Sensitization Potential: ARE-Nrf2 Luciferase LuSens Test Method (LuSens Test Method).

Furthermore, JaCVAM contributed to approve OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) four Test Guidelines (TGs) showing below, 1) LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method: TG431, 2) Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage: TG494, 3) Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) for *in Chemico* Skin Sensitisation Assays Addressing The Adverse Outcome Pathway Key Event On Covalent Binding To Proteins: TG442C, 4) Reactive Oxygen Species (ROS) Assay for Photoreactivity: TG495.

In the OECD Work plan, Japan has proposed five test methods: 1) Hand1-Luc EST (Embryonic Stem Cell Test) for the Developmental Toxicity Screening, 2) Amendment of TG437: Including of Histopathological Examination on Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method, 3) Amendment of TG458 : Androgen Receptor (AR)-EcoScreen™ Test Method to Performance-Based Test Guideline (PBTG) , 4) Amendment of TG491: Short Time Exposure (STE) Test Method for Eye Irritation and 5) De-tailed Review Paper (DRP) for *In Vitro* Immunotoxicity Test.

Additionally, JaCVAM is coordinating, along with several other international collaborators, in ongoing validation studies and peer reviews, which include Multi-ImmunoTox assay (MITA) IL-2 Luc Assay and IL-1 β Luc Assay for Immunotoxicity, LbL-3D Skin Skin Irritation Test (SIT) and EpiSensA for Skin Sensitisation Testing.

1. 緒言

JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)の令和元年度の成果を年次報告としてまとめた。

2. 人事異動

特になし。

3. 成果

JaCVAM では、国際的に評価された代替試験法について、行政的受入れの適否およびその適用可能な範囲を明確にし、公表している。一方で、日本で開発された眼刺激性、皮膚感作性試験などの代替試験法について、代替法国際協調(International Cooperation on Alternative Test Methods : ICATM)の協力を得て、OECD等の試験法ガイドラインとして採択されるための国際バリデーション研究やその結果の第三者評価を担ってきた。これまでにJaCVAMが公定化に値すると認証した試験法および検討中の試験を表1にまとめた。これらの情報は2020年4月にリニューアルされたJaCVAMホームページで逐次更新しており、最新情報が入手可能である¹⁾。

3-1 JaCVAM 評価会議報告書¹⁾

JaCVAM 評価会議において、以下の試験法の評価を実施し、その結果を評価書としてとりまとめ、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提案書として提出した。

- 1) 急性経口毒性を予測するための *In Vitro* 細胞毒性試験
- 2) ニワトリ 眼球を用いた眼刺激性試験 (Isolated Chicken Eye Test: ICE 法)
- 3) *In vitro* 皮膚感作性試験: ARE-Nrf2 Luciferase LuSens Test Method (LuSens test method)

3-2 OECD 試験法ガイドライン (TG: Test Guideline)

2019年 OECD はヒト健康に関する7本のTGを採択した(400番台のTG)²⁾。JaCVAMは、このうち以下の日本で開発された4試験の新規TGの採択に深く関与した。

- 1) Test No. 431: *In Vitro* Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method
- 2) Test No. 494: Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Re-

quiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage

- 3) Test No. 442C: *In Chemico* Skin Sensitisation
- 4) Test No. 495: Ros (Reactive Oxygen Species) Assay for Photoreactivity

この他、2019年のOECD作業計画には、日本から以下の5試験法の提案が含まれている¹⁾。

- 1) 発生毒性スクリーニング Hand1-Luc EST (Embryonic Stem Cell Test)
- 2) 眼刺激性試験代替法TG437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) TG458のPBTG改定
- 4) 眼刺激性試験代替法TG 491改定: Short Time Exposure (STE)法
- 5) *In Vitro* 免疫毒性試験 Detailed Review Paper (DRP)の開発

3-3 国際的な第三者評価

以下の試験法について、JaCVAMの主導による国際的な第三者評価が実施された。

- 1) 東北大学にて開発された免疫毒性スクリーニング Multi-ImmunoTox Assay (MITA) IL-2 Luc アッセイ
- 2) 大阪大学にて開発された LbL モデルを用いた皮膚刺激性試験

3-4 国際的なバリデーション

以下の試験法について、JaCVAMの支援により、国際的なバリデーションが実施された。

- 1) 東北大学にて開発された MITA IL-1 β アッセイ
- 2) 花王株式会社にて開発された皮膚感作性試験代替法 EpiSensA

3-5 ICATM および SACATM 対応

2019年10月22日にイスプラ(イタリア)で開催された ICATM Workshop “The future of alternative methods for regulatory testing and their contribution to public health” および同日に開催されたICATM会議に平林と小島が参加し、今後のバリデーションや公定化の在り方について議論がなされた。また、2019年9月18, 19日にワシントンDCで開催されたAnnual meeting of the Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods (SACATM)において足利がJaCVAMの活動報告を行うとともに、

MicroPhysiological System(MPS)など最新技術の行政的受入れに関する動向について情報収集を行った。

3-6 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⁾

「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再構築ヒト角膜様上皮モデル法(RhCE 法)に関するガイダンスについて」(薬生薬審発 0624 第1号 令和元年 6 月 24日)の作成に向け資料を提供した。

4. 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。

5. 総括

本年度は、JaCVAM 評価会議にて 3 つの試験法の評価を終了するとともに、JaCVAM が主導で評価を進めてきた試験法の中で、OECD にて TG の採択に貢献することができた。今後も本年度のような成果を継続していく予定である。

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します。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 HP Available at: <http://jacvam.jp/>
- 2) OECD test guideline Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788
- 3) OECD WORK PLAN FOR THE TEST GUIDELINES PROGRAMME (2019) Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/ENV_JM_WRP_2019_TGP-work-plan.pdf
- 4) 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 Available at: <https://www.pmda.go.jp/review-services/drug-reviews/about-reviews/q-drugs/0002.html>

ⁱ なお、2)と5)の試験法は2020年6月末の時点でTGとして採択されている。

表1. JaCVAMが認証した試験法および検討中の試験一覧

分類	試験名	バリデーション研究	専門家による第三者評価	テストガイドライン	行政への提案	
01 腐食性試験	01 経皮電気抵抗試験	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM & ICCVAM ●	OECD TG No. 430 ●	2017年10月 ●	
	02 ヒト表皮試験 (EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthics™ RHE, epiCS®)	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM & ICCVAM ●	OECD TG No. 431 ●	2017年6月 ●	
	03 ヒト表皮試験 (LabCyte EPI- MODEL24 SCT)	JaCVAM ●	JaCVAM ●		●	
	04 In vitro 膜バリア試験	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM & ICCVAM ●	OECD TG No. 435 ●	2017年10月 ●	
	05 ヒト表皮試験 (Vitrolife-skin™)	JSAAE ●	JaCVAM ●	●	2008年8月 ●	
02 皮膚刺激性試験	02 ヒト表皮試験 (EpiSkin™, EpiDerm™ SIT, SkinEthics™ RHE)	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	OECD TG No. 439 ●	2013年1月 ●	
	01 ヒト表皮試験 (LabCyte EPI-MODEL24 SIT)	JaCVAM ●	OECD ●		2013年11月 ●	
	03 ヒト皮膚試験LbL法 (LbL-3D Skin SIT)	JaCVAM ●	●	●	●	
03 光毒性試験	01 3T3-NRU法	Cosmetic Europe/ EURL ECVAM ●	●	OECD TG No. 432 ●	●	
	02 ROSアッセイ	JaCVAM ●	JaCVAM ●	ICH S10 ●	OECD TG No. 495 ●	2016年1月 ●
	03 酵母-赤血球試験	JSAAE ●	JaCVAM ●	●	●	●
	04 ヒト表皮試験	BfR ●	EURL ECVAM ●	OECD ●	●	●
04 眼刺激性試験	01 OECD TG No.405 (2012)	●	ICCVAM ●	OECD TG No. 405 ●	2014年1月 ●	
	02 BCOP法	EURL ECVAM & ICCVAM ●	EURL ECVAM & ICCVAM ●	OECD TG No. 437 ●	2014年1月 ●	
	03 ICE法	EURL ECVAM & ICCVAM ●	EURL ECVAM & ICCVAM ●	OECD TG438 ●	2019年11月 ●	
	04 FL法	EURL ECVAM & ICCVAM ●	EURL ECVAM ●	OECD TG No. 460 ●	2013年1月 ●	
	05 STE法	JaCVAM ●	ICCVAM ●	OECD TG No. 491 ●	2016年3月 ●	
	06 ヒト角膜試験 (EpiOcular™ EIT, SkinEthics™ HCE EIT)	Cosmetic Europe/ EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	OECD TG No. 492 ●	2018年3月 ●	
	07 ヒト角膜試験 (LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT)	JaCVAM ●	JaCVAM ●		2019年2月 ●	
	08 ヒト角膜試験 (MCTT)	KoCVAM ●	OECD ●		●	
	09 Vitrigel-EIT法	JaCVAM ●	JaCVAM ●	OECD TG No. 494 ●	●	
	10 CM法	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	OECD ●	●	
	11 マクロモレキュラアッセイ	InVitro International ●	EURL ECVAM ●	OECD TG496 ●	●	
	12 SIRC-CVS:TEA法	JaCVAM ●	JaCVAM ●	●	●	
	13 ヒト表皮試験 (MATREX法)	JaCVAM ●	●	●	●	

● 終了 ● 進行中 ● 保留または中断 ● 未着手

分類	試験名	バリデーション 研究	専門家による 第三者評価	テスト ガイドライン	行政への 提案
05 皮膚感受性試験	01 LLNA	EURL ECVAM ●	ICCVAM ●	OECD TG No. 429 ●	●
	02 rLLNA	EURL ECVAM & ICCVAM ●	ICCVAM ●	●	2013年1月 ●
	03 LLNA:DA	JSAAE ●	JaCVAM or ICCVAM ●	OECD TG No. 442A ●	2013年1月 ●
	04 LLNA:BrdU-ELISA	JSAAE ●	JaCVAM or ICCVAM ●	OECD TG No. 442B ●	2013年1月 ●
	05 LLNA:BrdU-FCM	KoCVAM ●	OECD ●	●	●
	06 DPRA	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	OECD TG No. 442C ●	2015年3月 ●
	07 ADRA	JaCVAM ●	JaCVAM ●	●	●
	08 KeratinoSense法	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	OECD TG No. 442D ●	2015年8月 ●
	09 LuSens法	BASF ●	EURL ECVAM ●	●	2019年11月 ●
	10 h-CLAT	JaCVAM & EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	●	2017年3月 ●
	11 IL-8 Luc アッセイ	JaCVAM ●	JaCVAM ●	OECD TG No. 442E ●	●
	12 U-SENS™法	Loreal ●	EURL ECVAM ●	●	2018年11月 ●
	13 SENS-IS法	ImmunoSearch ●	EURL ECVAM ●	OECD ●	●
	14 GARDskin法	3RsMC ●	EURL ECVAM ●	OECD ●	●
	15 KDPRA	BASF ●	EURL ECVAM ●	OECD ●	●
	16 EpiSensA	JaCVAM ●	●	●	●
06 皮膚透過性試験	01 <i>In vitro</i> 皮膚透過試験	●	OECD ●	OECD TG No. 428 ●	2014年1月 ●
07 急性毒性試験	01 細胞毒性試験 (初回投与量設定試験)	EURL ECVAM & ICCVAM ●	ICCVAM ●	OECD GD No. 129 ●	2011年6月 ●
	02 細胞毒性試験 (急性経口毒性の予測)	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM recommendation ●	2019年4月 ●
08 遺伝毒性試験	01 <i>In vitro</i> 染色体異常試験、小核試験、 遺伝子突然変異試験	●	OECD ●	OECD TG No. 473, 476, 487, 490 ●	●
	02 <i>In vivo</i> コメットアッセイ	JaCVAM ●	OECD ●	OECD TG No. 489 ●	●
	03 Pig-aアッセイ	US FDA ●	●	OECD ●	●
	04 ヒト表皮モデル(EpiDerm™) を用いる小核試験	Cosmetic Europe/ EURL ECVAM ●	●	●	●
	05 <i>In vitro</i> コメットアッセイ	JaCVAM ●	●	●	●

● 終了 ● 進行中 ● 保留または中断 ● 未着手

分類	試験名	バリデーション 研究	専門家による 第三者評価	テスト ガイドライン	行政への 提案
09 内分泌かく乱物質 スクリーニング	01 VM7 Luc ER TAアッセイ	ICCVAM ●	ICCVAM ●		2014年1月 ●
	02 ER-STTAアッセイ	NIHS & CERi ●	OECD ●	OECD TG No. 455 ●	2016年12月 ●
	03 ER-CALUX法	●	●		●
	04 AR-Ecoscreen法	NIHS & CERi ●	OECD ●		2019年2月 ●
	05 AR-CALUX法	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	OECD TG No. 458 ●	●
	06 22Rv1/MMTV法	Korea ●	Korea ●		●
	07 ヒト組換えエストロゲン受容体 (hrER) <i>in vitro</i> 試験	EPA, CERi ●	OECD ●	OECD TG No. 493 ●	●
	08 CCIアッセイ	ICCVAM ●			●
	09 MELNアッセイ	EURL ECVAM ●			●
10 発生毒性予測試験	01 胚性幹細胞法 (EST)	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●		●
	02 Hand1-Luc EST	JaCVAM ●	JaCVAM ●	OECD ●	●
11 代謝・薬物動態	01 CYP誘導法	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	OECD ●	●
	02 PBKモデル法			OECD ●	●
12 免疫毒性試験	01 IL-2 Lucアッセイ	JaCVAM ●	JaCVAM ●		●
	02 IL-1β Lucアッセイ	JaCVAM ●			●
13 形質転換試験	01 SHEアッセイ	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	OECD GD ●	2018年3月 ●
	02 Bhas 42アッセイ	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	OECD GD ●	●
	03 Balbアッセイ	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	OECD ●	●
14 発熱性物質試験	01 <i>In vitro</i> PBMC法	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM or ICCVAM ●	Ph. Eur. ●	●
15 口腔粘膜刺激性試験	01 EpiOral法		●		●

● 終了 ● 進行中 ● 保留または中断 ● 未着手