

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(hrER) *in vitro* 試験法に関する性能準拠試験法ガイドライン(Performance-Based Test Guideline: PBTG493)
- 3) 皮膚感作性試験代替法 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試験の収載に寄与した。

- 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案やなどの開発および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) の収載
- 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) 皮膚感作性試験 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-1 β Luc アッセイ, 皮膚刺激性試験 LbL 3D-Skin SIT, 皮膚感作性試験 EpiSensA および ADRA が含まれる。

Annual report on the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) in 2020

Takao Ashikaga, Hajime Kojima and Yoko Hirabayashi

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

Abstract

In 2020, 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) Bhas 42 Cell Transformation Assay: CTA, 2) Performance-Based Test Guideline (PBTG493) for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) *In Vitro* Assays to Detect Chemicals with Estrogen Receptor (ER) Binding Affinity, 3) Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay) for skin sensitization.

Furthermore, JaCVAM contributed to approve OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) three Test Guidelines (TGs) showing below, 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 .

In the OECD Work plan, Japan has proposed seven test methods: 1) Amendment of TG439: Including Layer by Layer (LbL) 3D-Skin Skin Irritation Test (SIT), 2) Amendment of TG437: Including of histopathological examination on Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test method, 3) Amendment of TG494: Expansion of the applicability domain of Vitrigel-Eye Irritation Test (EIT), 4) Amendment of TG442C: Modification of ADRA for skin sensitisation, 5) Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for photosafety test, 6) Detailed Review Paper (DRP) for *in vitro* immunotoxicity test and 7) DRP for *in vitro* reproductive and developmental toxicity test using pluripotent stem cell. JaCVAM is cooperating with OECD in the development and review process regarding TGs and Guidance Documents (GDs) for their approval after 2021.

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, MITA IL-2 Leukocyte Toxicity Test (LTT) assay and MITA IL-1 β Luc assay for immunotoxicity, EpiSensA for skin sensitisation, LbL 3D- SIT and ADRA.

1. 緒言

JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) の令和 2 (2020) 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、経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD) 等の試験法ガイドライン (Test Guideline: TG) 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 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) 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、ヒト組換えエストロゲン受容体 (hrER) *in vitro* 試験法に関する性能準拠試験法ガイドライン (Performance-Based Test Guideline : PBTG493)
- 3) 皮膚感作性試験代替法 Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay)

3-2. OECD TG

令和 2 (2020) 年 OECD はヒト健康に関する 5 本の TG (400 番台の TG)²⁾ を採択した。JaCVAM は、このうち日本で開発された以下の

3 試験の第三者評価や改定作業に協力し、その採択に深く関与した。

- 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、令和2 (2020) 年の OECD 作業計画³⁾ には、日本から標準プロジェクト提出様式 (Standard Project Submission Form: SPSF) を提出し、承認された以下の7試験の提案が含まれている⁴⁾。なおTGの開発や改定などのプロジェクトが OECD にて作業計画として承認された場合、試験法開発者はTG案を作成し、各国の専門家委員会が review する。JaCVAM は開発者を助け、令和3 (2021) 年度以降のTG案の成立に向けて協力している。

- 1) 皮膚刺激性試験 TG439 の改定: Layer by Layer (LbL) 3D-Skin Skin Irritation Test (SIT) の収載
- 2) 眼刺激性試験代替法 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) 眼刺激性試験代替法 TG494 の改定: Vitrigel-Eye Irritation Test (EIT) の適用範囲拡大
- 4) 皮膚感作性試験 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) 多能性幹細胞細胞を用いた *in vitro* 生殖発生毒性試験の DRP の開発 (本プロジェクトは、発生毒性スクリーニング Hand1-Luc EST (Embryonic Stem Cell Test) 開発の前段階として実施しているものである。)

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, 報告書が JaCVAM にて公開された¹⁾.

- 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皮膚刺激性試験 LbL 3D- SIT

3-4. 国際的なバリデーション

以下の試験法について, JaCVAM がバリデーション運営委員会を主催することにより, 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) 東北大学にて開発された MITA IL-2 Leukocyte Toxicity Test (LTT)アッセイ
- 3) 花王株式会社にて開発された皮膚感作性試験代替法 EpiSensA
- 4) 富士フイルム株式会社にて開発された皮膚感作試験代替法 ADRA

3-5. ICATM および SACATM 対応

令和2(2020)年10月9日にJaCVAM主催によりリモート形式でICATM会議を開催した. 合田所長, 平林, 小島および足利が参加し, 今後のバリデーションと公定化の在り方やDRP作成に関する国際協力について議論がなされた. また, 令和2(2020)年9月2, 3日にリモート形式で開催された Annual meeting of the Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods (SACATM) において, 足利よりJaCVAMの活動報告を行うとともに, Computational Toxicologyなど最新技術の行政的受け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

「医薬部外品・化粧品の単回投与毒性評価のための複数の安全性データを組み合わせた評価体系に関するガイダンスについて」および「医薬部外品・化粧品の安全性評価における皮膚刺激性評価体系に関するガイダンスについて」の作成に向け資料を提供したⁱⁱ⁾.

4. JaCVAM の外部評価

1年に1回以上の頻度で, 顧問会議(16名の

外部有識者と国立衛研所長および安全性生物試験研究センター長で構成)に対して, JaCVAMの運営方針とその計画及び成果について報告を行い, 評価および助言を受けている.

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, 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「医薬品等規制行政に直結する政策研究費:安全性評価の高度化と迅速化に資する新規代替試験法の開発と国際標準化に関する研究」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 (2020) Available at: https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/Test_Guidelines_Workplan_2020.pdf

ⁱ⁾ なお, 3)と 4)の試験法は令和3(2021)年6月14日にTGとして採択されている.

ⁱⁱ⁾ なお, 「医薬部外品・化粧品の単回投与毒性評価のための複数の安全性データを組み合わせた評価体系に関するガイダンスについて」(薬生薬審発0422第1号)および「医薬部外品・化粧品の安全性評価における皮膚刺激性評価体系に関するガイダンスについて」(薬生薬審発0422第3号)は令和3(2021)年4月23日に厚生労働省から発出された.

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 <i>In vitro</i> 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	01 ヒト表皮試験 (EpiSkin™, EpiDerm™ SIT, SkinEthics™ RHE)	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	OECD TG No. 439 ●	2013年1月 ●	
	02 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 皮膚感作性試験	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 ●	2020年12月 ●
	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 ●	2020年12月 ●
	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 ●	2020年12月 ●
	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