

## 1) イントロダクションと代替法の現状

大野泰雄

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

## 1. 序

医薬品、化粧品、農薬、化学物質等の安全性評価は、主に各種ガイドラインに示された動物実験により行われている。しかし、近年、動物実験に対する反対運動が活発となり、欧米では動物実験を行っている化粧品会社の製品の不買運動が起きたり、極端な場合には研究機関の破壊などの実力行使が行われた。欧米の化粧品会社の一部では動物を用いた毒性試験を中止するところも出てきている。このような状況から多くの動物実験代替法が開発されてきた。

安全性試験法に関する代替法研究の目標は Replacement、Reduction、または Refinement の三つとされている。Replacement とは現行の試験を適切な代替法におきかえる事、Reduction とは現在の試験に用いられる動物数を減少させる事、Refinement とは現在の試験法を更に高度化、精緻化することにより化学物質の安全性評価をレベルアップする事である。

一方、急速な科学技術の進歩とともに医薬品、農薬、食品添加物、一般化学物質等、多くの新規化学物質が作成されている。それらは使用目的や使用状況に応じて、適切に安全性評価した上で使用すべきであるが、全てを丸ごと動物を用いて安全性評価を行うことは困難であり、簡便で感度が高く、特異性の高い *in vitro* の方法が求められてきた。また、TCDD のように意図せずに生成したものの内に非常に強い毒性を有するものもあり、これを直接通常の動物試験で評価することは環境汚染の恐れや試験実施者への危険の問題があることから、簡易な *in vitro* のスクリーニング法により、少量の物質で閉鎖的な環境で一次的な安全性評価を行うことが重要である。これらの理由からも、多くの動物実験代替法が開発されてきた。また、ヒトと動物との間には様々な形

の種差が存在し、思わぬ事態に直面することがある。そのような種差の問題を乗り越える為の手段の一つとしても、ヒトや実験動物由来の組織や標本、また、ヒト型の酵素や受容体等を組み込んだ *in vitro* 試験が威力を発揮することが期待される。

## 2. 動物実験代替法の行政的受け入れに関する現状

1986年に、OECDは急性毒性試験法に関する専門委員会を開催し、そのなかで急性経口毒性試験、急性経皮毒性試験、及び急性眼刺激性試験について検討した。その結果、使用動物数の削減や代替法の取り入れなどのガイドラインの変更が行われた。1989年には我が国の医薬品の単回投与毒性試験法ガイドラインにおいても、統計学的に厳密な意味でのLD<sub>50</sub>値は求めず、齧歯類では概略の致死量が求めれば良く、非齧歯類でも毒性徴候が明確に観察できる用量が設定できれば良い、と改定された。その他の試験法についてもICHで議論され、表に示したように、動物使用数の削減がなされている。

*In vitro* の安全性評価法としては、古くから化学物質等の遺伝子への影響を検討するために様々な変異原性試験や染色体異常試験法が開発され、遺伝毒性スクリーニング系として、また、遺伝毒性発現機序解明のために広く用いられ、各種安全性試験ガイドラインにも取り入れられている。それ以外にも、医療用具として用いられるプラスチック製容器抽出物の安全性評価のための細胞毒性試験法と注射用用水の微生物性発熱性評価のためのカプトガニの凝固成分を用いたエンドトキシン試験が薬局方に取り入れられている。また、厚生省では適切な方法があればとの留保つきではあるが、化粧品の眼刺激性評価法として代替法を受け

代替法に関連したICH（医薬品の承認申請に必要な試験についての国際的なハーモナイゼーションのための会議）での結論、および検討中の話題

- 1) 単回投与毒性試験において統計学的に厳密なLD50値を要求しない。  
非齧歯類では必ずしも死亡するまで用量を上げなくとも良い。  
⇒ 使用動物数の削減、動物の苦痛の削減
- 2) 反復投与毒性試験において12ヶ月試験を要求しないことを検討中  
⇒ 毒性試験期間の短縮、動物使用数の削減
- 3) 発癌性試験における動物種数を1種に削減し、代替法で補足する。  
⇒ 使用動物数の削減
- 4) 臨床試験との関係における非臨床試験実施タイミングについて合意  
⇒ 科学的・倫理的に妥当な医薬品開発の促進  
⇒ 無駄に終わる動物試験実施の減少

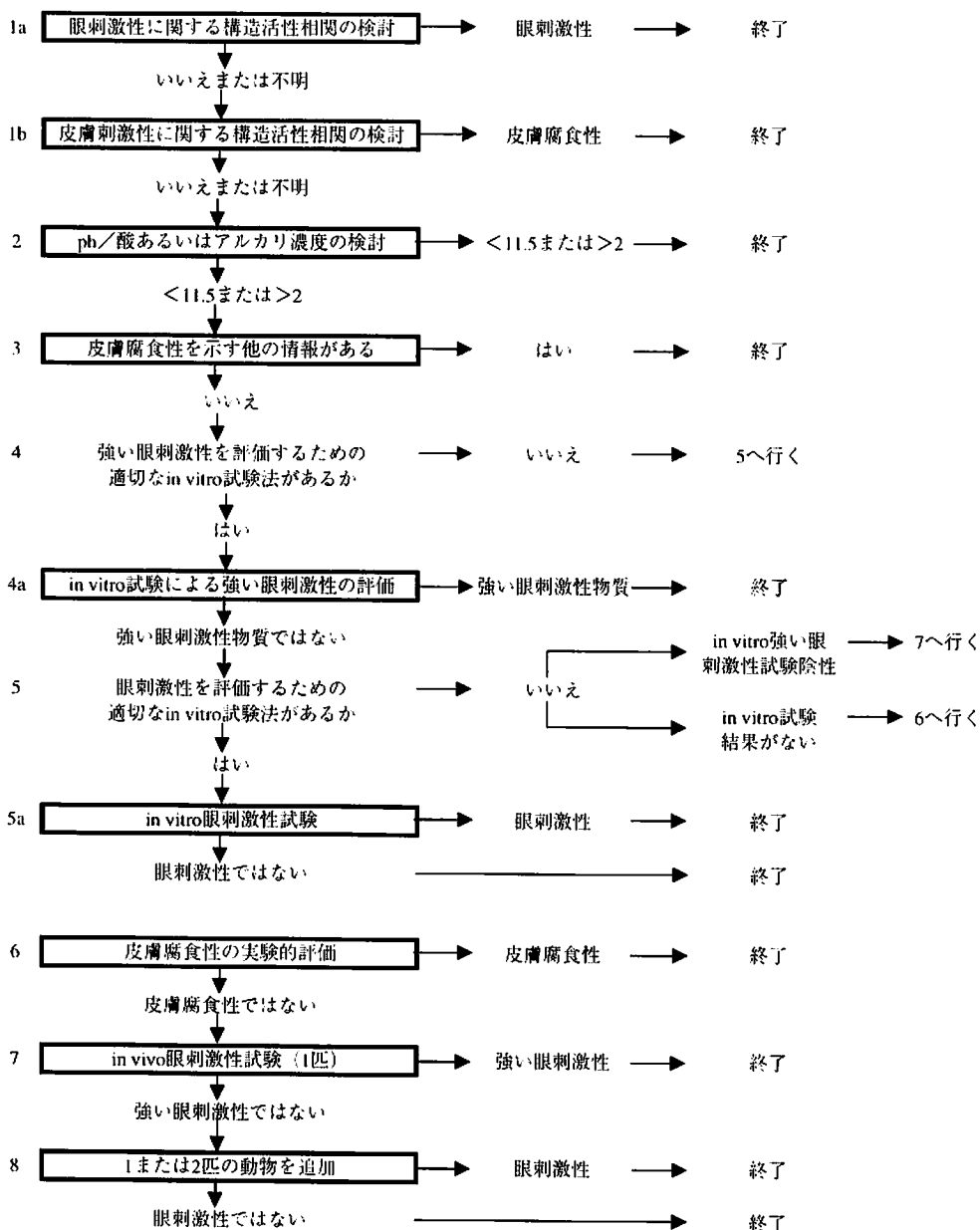
入れると表明している（化粧品・医薬部外品製造申請ガイドブック第3版、1996）。しかし、現在までのところ、どの方法が適切かについては不明確である。

EU議会は1991年に代替法のバリデーションのための組織としてEuropean Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)を設立した。また、適切な代替法が開発されればとの条件つきではあるが、1998年までに化粧品の安全性評価において動物実験を全廃するとの指示が出された(6th Amendment to the Cosmetics Directive, 93/35/EEC)。ECVAMではそれに向けて様々な毒性試験項目について検討作業を進めてきた。しかし、1997年1月にScientific Committee on Cosmetology (DGXXIV、厚生省)は「化粧品における安全性評価に対する動物代替法適用の可能性に関する上申書」をEC議会に提出、EC議会は上申書に従って、Article 4.1.iの化粧品原料および最終製品に対する適用を、2000年1月1日まで延期することをCommittee for Adaptation to Technical Progress (CATP)に勧告した。この勧告に基づいて関係15ヶ国の代表が討議、3月20日に勧告どおり延期が承認された。この決定の背景要因としては、1) COLIPAの共同研究の結果が思わしくないこと、2) EC政府内部でもDGI(国際経済関係)およびDGIII(産業)が、Article 4.1.iの域外適用がWTO合意違反となることに懸念を表明していることなどが上げられる。動物実験代替法の開発の

進行状況については、光毒性試験、皮膚適合性試験、皮膚透過性試験が開発最終段階にあり、近い将来に化粧品原料および最終製品の安全性評価に取り入れられる可能性が高い。

OECDでは、1996年1月に代替法を行政的に受け入れるための基準やバリデーションの行い方、また、代替法を用いた皮膚刺激性/腐食性、眼刺激性/腐食性、および局所光毒性試験を評価のためのストラテジーについて検討された。図はそこで示された代替法を用いて眼刺激性を評価するためのストラテジーである。しかし、個々の代替法について、どれが適切なものであるかについての議論は行われておらず、今後の課題として残されている。なお、*in vitro*の皮膚吸収試験法ガイドライン案が1997年にまとめられ、現在検討中である。眼刺激性試験代替法に関しては、多くの方法が開発され、それらの妥当性を示すためのバリデーションが、ECVAMやCOLIPA、SDA、日本動物実験代替法学会、また、日本化粧品工業連合会と国立衛研との協力により行われてきた。その結果については報告により大きな差が認められたことから、現在、ECVAMを中心に、これらの結果を国際的に検討している。わが国では、厚生科学研究班において、1995年度に終了した眼刺激性試験代替法のバリデーション結果を踏まえ、ガイドライン案を作成し、本年度末に報告する予定であるが、更に、海外の意見

OECDの眼刺激・腐食性評価ストラテジー



を聴取する予定である。

3. ワークショップの目的

本ワークショップにおいては、過去にOECDで取り上げられたもの、検討中のもの、及び今後取り上げられる可能性の高い

代替法について、具体的な方法に関する情報を整理するとともに、問題点を明らかにすることを目的に、わが国において先進的な研究を進めてきた学会及び企業の先生方に講演を依頼した。一つのテーマについて、学会及び企業の先生方に講演を依頼し、それぞれの立場及び経験に基づくお話を伺うこ

とにより、より具体的で、広い情報が得られることを期待した。なお、眼刺激性試験代替法に関しては、既に何度かワークショップが開催されていることから、今回は取り上げなかった。なお、それらの状況については(大野1997、及びOhno et al. 1998)を参考にされたい。

#### 4. 付録 (バリデーションについて)

動物実験代替法を既存の動物を用いた毒性試験に替えるものとして行政的に取り入れるためには、目的に応じて適切にバリデートされたものでなくてはならない。そこで、バリデーションに関して簡単に説明する。バリデーション(validation)は「有用性確認」と訳されており、「特定の目的についての試験法の信頼性(reliability)と適切性(relevance)を確立する過程」と定義される(Frazier, 1992)。また、バリデーションには様々な実験的過程や評価の過程が含まれることから「試験法が特定の目的を満足させるか否かを評価していく作業過程」とも定義される(小野 宏 1991)。具体的には、バリデーションとは対象とする試験法について研究室内、及び研究室間での感度、精度、再現性を確認することにより、その信頼性を確立するとともに、本来の目的に対する適切性を判定するものである。このいずれが欠けても新しい試験法としては不十分である。なお、安全性試験における適切性とは試験から得られるデータが毒性学的な決定過程に効果的に利用できることを意味する。なお、ガイドラインとして公的に受け入れられるためには、更に倫理性、経済性、国際性、技術的一般性に対する考慮が必要である。バリデーションには個々の試験に応じて様々な形態があり得るが、安全性評価

法として公的に採用できるか否かを評価するためのバリデーションのあり方については、上記のFrazier (1992)や小野(1991)が解説している。また、OECDでの議論の結果が報告されている(OECD 1996)。公的なガイドラインといった形で毒性試験を採用する場合におけるバリデーションの一般的な実施手順としては、1)施設内バリデーション、2)施設間バリデーション、3)データベースの構築とデータの蓄積、4)最終評価、の4段階が必要である。但し、目的や状況に応じて途中のステップが省略されることもありうる。

#### 5. 参考文献

- 大野泰雄 (1997) 動物実験代替法の行政的受け入れに関する状況について, *J. Toxicol. Sci.*, 22, 249-260.
- 大野泰雄 (1996) 眼刺激性試験代替法のバリデーション(validation of alternative methods to Draize eye irritation test), *細胞培養 (The tissue culture)*, 22, 211-2217.
- 小野 宏 (1991) 新毒性試験法の有用性確認 (Validation) の諸問題, *秦野研究所年報*, 14, 13-20.
- Frazier (1992) Validation of in vitro toxicity tests. In "In Vitro Toxicity Testing" Ed. by J.M. Frazier, 245-252, Marcel Dekker, Inc.
- Y. Ohno, T. Kaneko, T. Inoue, Y. Morikawa, T. Yoshida, A. Fujii, M. Masuda, T. Ohno, M. Hayashi, J. Momma, T. Uchiyama, K. Chiba, N. Ikeda, Y. Imanishi, H. Itagaki, H. Kakishima, Y. Kasai, A. Kurishita, H. Oojima, K. Matsukawa, T. Nakamura, K. Ohhoshi, H. Okumura, K. Saijo, K. Sakamoto, T. Suzuki, K. Takano, H. Tatsumi, N. Tani, M. Usami, R. Watanabe (1998) Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients 1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicology in vitro* in Print.
- OECD (1996) Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 22nd-24th January 1996, Solna, Sweden.