動物実験を用いない代替法の新しい胎動

小島 肇夫

要約：動物実験を用いない代替法については、遺伝毒性・内分泌かく乱・局所毒性試験の *in vitro* 試験法の開発が一段落し、化学物質、農薬、医薬品および化粧品安全性評価において行政的な利用が進んでいる。日本も経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) 等における試験法開発で貢献してきた。世界の潮流は全身毒性 (反復投与毒性、発がん性、免疫毒性、生殖毒性等) 代替法の開発に向かっている。特に生理学的薬物動態 PBPK (physiologically based pharmacokinetic) モデル、トキシコキネティクスが開発が盛んである。日本においても全身毒性試験の *in vitro* 試験法、*in silico* の利用検討が始まった。

1. 序論

動物実験の 3Rs(1) は、昨今、動物実験の種々の国際規制に関与し、例えば、EU においては動物実験代替法の開発、評価および履行を推進する規制 2010/63/EU が発効されている(2)。EU の化粧品に関しては、2009 年の製品における動物実験の禁止に続き (marketing ban)、2013 年 3 月より、化粧品に配合される新規成分の動物実験禁止が施行された (testing ban)(3)。この状況は EU に留まらず、トルコやインド、ニュージーランドが追随するなど世界的に波及しつつある(4)。国際的なボーダーレスが言われている昨今、日本においてもこの問題は無関心ではいられない。日本の化粧品企業においても、化粧品開発への動物実験の禁止を次々と表明している。

化学物質に関しては、欧州化学品庁 (ECHA: European Chemicals Agency) は、化学物質の登録、評価、認可および制限 (REACH: Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) において年間 10t 以上の登録の場合、化学物質安全性報告書の

提出を求めているが(5)、2016 年 7 月に REACH 規則の情報要件を満たす動物試験代替法の使用方法を、欧州 CLP 規則 (分類表示包装規則: EU Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures) に関する実践ガイドリストの中に示した(6)。この中には、不必要な動物試験を避けることを周知するとともに、代替手法の使用や報告方法についての登録やその評価に基づく推奨事項等を説明している。中国や韓国でも同様の法律を施行しつつあり、動物実験の使用が制限されつつある。

一方、米国では「有害物質の生産及びアメリカへの輸入に関する法規制である有害物質規制 (TSCA: Toxic Substances Control Act)」が、2016 年に改訂された。動物実験を最小限にとどめ、場合によっては代替するための規定が盛り込まれ、新たな試験方法の研究開発を優先し、評価 (バリデート) された動物実験の代替法がある場合には、それを使うことを義務付けた(7)。

この動きは化学物質に留まらず、医薬品にも広がっており、医薬品規制調和国際会議 (ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) においても動物試験法の改善と代替法の利用を求めている(8)。動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力会議 (VICH: International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products) においても 2007 年に 3Rs の宣言を示し、各地域間の *in vitro* 試験の採択に障壁がなくなり、試験の繰り返しを避けることが期待されている(9)。国際標準化機構 (ISO: International Organization for Standardization) においても、動物福祉のガイダンスが作成されるなど、医療機器の標準化に 3Rs は普及しつつある(10)。

これらの背景には、米国科学アカデミーが 2007 年

キーワード: 動物実験代替法, *in vitro* 試験法, 局所毒性, 全身毒性, 薬物動態

国立医薬品食品衛生研究所 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

E-mail: h-kojima@nihs.go.jp 原稿受領日: 2017 年 10 月 6 日, 依頼原稿

に示した「21 世紀の毒性学」が起因している(11)。今世紀は、これまでの動物実験主体の安全性評価から、作用機構に依存した in vitro 試験法、in silico の利用に切り替えていくべきとの指摘である。この方針を受け、米国国立予防衛生研究所（NIH：National Institutes of Health）は、哺乳動物を用いない試験法開発に関する予算配分を増やし、この十年、body-on-a-chip やヒト幹細胞の利用などで着実に研究が進んでいる。

2. 公定化された試験法の有用性と限界

化学物質等の安全性評価法として、経済協力開発機構（OECD：Organisation for Economic Co-operation and Development）の試験法ガイドライン（TG：Test Guideline）が著名である。これらの中で、ヒト健康に

関わる in chemico または in vitro 試験法を表 1 に示す。2017 年 10 月現在、23 の TG、33 試験法が採択されている(12)。これらの in vitro 試験法は化学物質の有害性同定には有用であるが、化学物質のリスク評価や他の物質の安全性評価のような広範囲な対応を目的とはしていない。その多くは、欧州では化学物質のリスク表示識別等に利用され、特に昨今では国連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：United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals）分類に寄与している(13)。日本でも医薬部外品のガイダンス(14)や毒劇法の評価法により(15)、in vitro 試験法を用いた評価が可能になるなど普及しつつある。

ただし、これまでに TG として採択された試験法は、

表 1 OECD Test Guideline (In vitro 試験)

分類	試験法
腐食性	In vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER): TG430
	In vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) test method: TG431
	CORROSITEX Skin Corrosivity Test: TG435
皮膚刺激性	In vitro Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test methods, EpiDerm, EPISKIN, SkinEthic, LabCyte EPI-Model: TG439
光毒性	3T3 NRU Phototoxicity Test: TG432
眼刺激性	Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage: TG437
	Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage: TG438
	Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: TG460
	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
	Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage, EpiOculer and SkinEthic: TG492
皮膚感受性	In chemico Skin Sensitisation, Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA): TG442C
	In vitro Skin Sensitisation, ARE-Nrf2 Luciferase Test Method: TG442D
	Performance-Based Test Guideline for in vitro Skin Sensitisation, TG442E, Human Cell Line Activation Test (h-CLAT), U-SENS, IL-8 Luc assay: TG442E
内分泌かく乱スクリーニング	Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, the Stably Transfected TA (STTA) assay using the (h) ER α -HeLa-9903 cell line; and the VM7Luc ER TA assay using the VM7Luc4E2 cell line1 which predominately expresses hER α with some contribution from hER: TG455
	H295R Steroidogenesis Assay: TG456
	Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals: TG458
	Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) In Vitro Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity, the Freyberger-Wilson (FW) In Vitro Estrogen Receptor (ER) Binding Assay Using a Full Length Human Recombinant ER α , and the Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) In Vitro Estrogen Receptor Binding Assay Using a Human Recombinant Ligand Binding Domain Protein: TG493
遺伝毒性	Bacterial Reverse Mutation Test: TG471
	In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test: TG473
	In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xpvt genes: TG476
	In vitro Micronucleus Test: TG487
	In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene: TG490
経皮吸収	Skin Absorption: In vitro Method: TG428

表1に示すように、腐食性、皮膚刺激性、光毒性、眼刺激性、皮膚感作性、内分泌かく乱、および遺伝毒性試験等に限定されている。安全性評価項目のそれぞれに必要な試験法、例えば、トキシコキネティクス、反復投与毒性試験、生殖毒性試験、発がん性試験などの全身毒性試験においては、ほとんど動物実験代替法が開発されていない(16)。

3. 全身毒性試験の代替開発への取り組み

1) 欧州の動向

EUでは2010年から、進んできた反復投与毒性試験の代替法を検討するSEURAT-1プロジェクトが2016年に終了し(17)、その継承プロジェクトとして、EU研究と開発の枠組みHorizon 2020プログラムにより設立された21世紀における作用機構に基づく毒性試験およびリスク評価を目指したEU-ToxRiskが始まった(18)。2016年の1月から3億ユーロを越える予算により、大規模な共同研究を進める6年間のプロジェクトである。EU規制2010/63/EUによる動物実験の3Rs原則をもとに、新規アプローチ法(NAM: New Approach Methods)のみを基に、ヒト健康評価を曝露に依存した評価戦略を開発する必要がある。EUにおいて必須である反復投与毒性や生殖発生毒性に関する情報を提供できるNAMが必要である。in vitro 試験法の有用性はハイスループットアプローチに導く試験法である。これらの試験法は、大量の化合物ライブラリーをスクリーニングするための迅速で経済的な手段であり、分子レベルの新規の見通しを供給してくれる。これに加えハイコンテンツイメージおよびハイスループットトキシコゲノミクススクリーニングがEU-ToxRiskの特徴である。

2) 米国の動向

米国環境保護庁(US EPA: United States Environmental Protection Agency)において、6バック研究として、農薬の安全性評価に必要な急性経口、急性経皮、急性吸入、眼刺激性、皮膚刺激性、皮膚感作性のデータをin silicoで評価する、情報量を拡大しながら動物実験の削減に取り組む、曝露評価を予測する非動物実験を開発するための毒性経路の開発を目指すプロジェクトが開始された(19)。

一方、健康環境科学研究所(HESI: Health and Environmental Sciences Institute)とは、地球規模の健康と学究的な世界、政府からの科学者の取り組みを通じて環境課題の解決に貢献する非営利機関である。HELIではRISK21(Risk Assessment in the 21st Century)という枠組みを作り、化学物質のヒト健康リスクにおける

科学的、明確かつ効果的な評価法の開発を目指している(20)。ヒト健康リスクが判断できる情報を製品レベル、曝露評価、段階的に集めるというものであり、ケースレポートを作成している。

3) OECDの動向

OECDにおいては、全身毒性試験を開発する手始めに有害性発現経路(AOP: adverse outcome pathway)の確立が盛んになりつつある(21)。AOPとは、毒性経路を初期の分子的反応から始まり、細胞レベル、組織レベルで考え、動物実験を経てヒトや環境への影響を毒性作用機構のレベルで把握しようというものである。欧州における化学物質の規制であるREACHにおいても、この考え方の利用が進みつつある。開発されたAOPから主要因子(KE: key element)すなわち、バイオマーカーを見つけ、in silicoやin vitro試験法の開発を促すことを目指している。それらの試験結果と吸入・分布・代謝・排泄(ADME: Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion)の曝露評価を合わせ、証拠の重みづけ(WE: weight of evidence)を網羅した統合的に化学物質の安全性を評価するアプローチ(IATA: Integrated Approaches to Testing and Assessment)(22)主導のリスク評価を推奨する計画を示している。

4) 日本の動向

経済産業省のプロジェクトにおいて、平成19年より、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(平成19~22年度)および経済産業省のプロジェクト(平成23年度)にて、有害性評価支援システム統合プラットフォーム(HESS: Hazard Evaluation Support System Integrated Platform)が開発された(23)。ラットを対象とした化学物質の反復投与毒性試験データおよび毒性にかかわる作用機序情報などを集積した毒性知識情報データベースおよびラットやヒトなどのほ乳類における化学物質の代謝情報から構成される知識情報データベースの2つのデータベース(HESS DB)を備えたシステムである。これら2つのデータベースから必要な情報を抽出し、各化学物質間のデータの比較や化学物質の分子構造、物理化学的性質などによる化学物質の分類(カテゴリー化)を行うことを支援し、カテゴリーアプローチによる未試験化学物質の反復投与毒性の評価を支援することが可能であるとされている。一方、同時期にin vitro試験法として、発がん性スクリーニング(形質転換試験)、皮膚感作性試験、生殖毒性試験の代替法開発が進み、一部はOECDのTGとして採択されている(24)。また、新たに平成23年度から反復投与毒性のうち、肝・腎・神経毒性に関する

in vitro 試験法の開発が進んだ(25)。本年度からは、肝毒性をAIで評価しようというプロジェクトも始まっている。

一方、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED : Japan Agency for Medical Research and Development) において、iPS細胞を用いた心毒性、神経毒性、肝毒性試験の開発が進む一方、本年度から生理学的薬物動態PBPK (physiologically based pharmacokinetic (PBPK) モデル) の一環として、body-on-a-chip のプロジェクトが進むなど、遅ればせながら日本でも試験法開発体制が整いつつある。

4. おわりに

局所毒性試験の代替法は、有害性の同定法に過ぎず、リスク評価のためには全く完成された訳ではない。曝露評価やIATAなどの今後も課題も多い。しかし、これらよりも、世界の潮流は全身毒性の代替法開発、特にPBPKモデル、そしてトキシコキネティクスの開発に突き進んでいる。その有用なツールであるbody-on-a-chipにより、ADMEをin vitro 試験法で把握しようとする動きが加速度的に進んでいる。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Russell WMS, et al. The Principles of Humane Experimental Technique. Available at: http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc (2017)
- 2) Council Directive. 2010/63/EU (2010)
- 3) Commission Staff Working Documents. Council Directive (76/768/EEC; EN, SEC82004)1210. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1976L0768:20100301:en:PDF> (2017)
- 4) JAVA. JAVA News. 92, 6-7. (2014)
- 5) REACH. Available at: <http://www.env.go.jp/chemi/reach/reach.html> (2017)
- 6) CLP. Available at: http://www.nikkakyo.org/reach/_userdata/V1/_documents/CLP_Notification_Points.pdf (2017)
- 7) H.R.2576: Frank R. Lautenberg Chemical Safety for the 21st Century Act. Available at: <https://www.govtrack.us/congress/bills/114/hr2576/text> (2017)
- 8) 医薬品医療機器総合機構. ICH. Available at: <https://www.pmda.go.jp/int-activities/int-harmony/ich/0014.html> (2017)
- 9) VICH. Available at: <http://slideplayer.com/slide/10583916/> (2017)
- 10) ISO 10993-2:2006 Biological evaluation of medical devices -- Part 2: Animal welfare requirements. Available at: http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=36405 (2017)
- 11) Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. The National Academies Press; 2007.
- 12) OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm> (2017)
- 13) 国連GHS. Available at: http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/int/files/ghs/GHS_rev5_jp_document.pdf (2017)
- 14) 医薬品医療機器総合機構. 動物実験代替法. Available at: <https://www.pmda.go.jp/review-services/drug-reviews/about-reviews/q-drugs/0002.html> (2017)
- 15) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課. 薬生薬審発0613第1号毒物劇物の判定基準の改定について. Available at: <http://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/doku/tuuti/H290613/20170613tuuti.pdf> (2017)
- 16) Adler S, et al. Arch Toxicol. 2011;85:367-485.
- 17) SEURAT-1. Available at: <http://www.seurat-1.eu/> (2017)
- 18) EU-ToxRisk. Available at: <http://www.eu-toxrisk.eu/> (2017)
- 19) US EPA. Available at: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-04/documents/session-3-2st-century-toxicology-update.pdf> (2017)
- 20) RISK21. Available at: <http://risk21.org/> (2017)
- 21) OECD Series on Adverse Outcome Pathways. Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-series-on-adverse-outcome-pathways_2415170x (2017)
- 22) Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). Available at: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm> (2017)
- 23) NITE. Available at: <http://www.nite.go.jp/chem/qsar/hess.html> (2017)
- 24) NEDO. Available at: http://www.nedo.go.jp/activities/ZZ_00157.html (2017)
- 25) 経済産業省. Available at: http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/other/kenkyu_kaihatsu/sekiyu.html (2017)

New trends on alternative to animal testings in Japan

Hajime Kojima

National Institute of Health Sciences

Abstract. Non-animal alternative test methods have developed in the field of genotoxicity, endocrine disrupter, irritation and skin sensitization, and these are used the safety evaluation of chemical, pesticide, pharmaceutical and cosmetic for regulatory use. For the systemic toxicological endpoints of repeated dose toxicity, carcinogenicity, immunotoxicity and reproductive toxicity, new test methods are expected to be developed in the future worldwide. I believe Japan will make a significant contribution to these developments.