

日本動物実験代替法評価センター(JaCVAM)令和3~4年報告書

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

令和 3(2021)年 4 月から令和 4(2022)年 6 月までに, 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皮膚腐食性試験代替法 LabCyteEPI-MODEL24SCT および眼刺激性試験代替法 Vitrigel®-EIT を行政機関に提案した.

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2試験の改定に寄与した.

- 1) Vitrigel®-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage: TG494
- 2) *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 4 (2022)年 7 月以降の成立に向けて, JaCVAM は OECD における TG 案などの開発に協力している.

- 1)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
- 2) 皮膚感作性試験 TG442E の改定: IL-8 Luc assay の改良
- 3) 皮膚感作性試験 EpiSensA の開発
- 4) 光安全性試験 Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) の開発
- 5) 免疫毒性試験 IL-2 Luc assay の開発
- 6) 免疫毒性試験 IL-2 Luc Leukocyte Toxicity Test (LTT) 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 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, 免疫毒性試験 Multi-ImmunoTox assay (MITA) IL-2 LucLTT および MITA IL-1 β Luc assay, 皮膚感作性試験 EpiSensA および発熱性物質試験代替法 MylcMAT が含まれる.

Annual report on the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) in 2021-2022

Takao Ashikaga, Hajime Kojima and Yoko Hirabayashi

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

Abstract

As domestic activities in 2021-2022 1Q, JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) proposed to the regulatory agency two test methods approved by the JaCVAM Regulatory Acceptance Board, i.e., “Alternative Method for Assessing Skin Corrosion Potential Using a Reconstructed Human Epidermis (RHE), LabCyte Epi-MODEL24” and “Alternative Method for Assessing Eye Irritation, Vitrigel®- EIT Method”.

As activities in OECD, first, JaCVAM contributed to review two Test Guidelines (TGs) and their approval by OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), i.e., 1) Vitrigel®-EIT Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage: TG494, 2) *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 .

The second, JaCVAM is cooperating with OECD to develop the TGs and Guidance Documents (GDs) for their approval after July 2022, in accordance with the OECD Work Plan. The Work Plan includes seven test methods proposed by Japan: 1) Amendment of TG437: Including of histopathological examination on Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test method, 2) Amendment of TG442E: Modification of IL-8 Luc assay for skin sensitisation, 3) EpiSensA for skin sensitisation, 4) Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for photosafety test, 5) Immunotoxicity test IL-2 Luc assay, 6) Immunotoxicity test IL-2 Luc Leukocyte Toxicity Test (LTT), 7) Detailed Review Paper (DRP) for *in vitro* reproductive and developmental toxicity test using pluripotent stem cell.

In addition, JaCVAM is conducting validation studies and peer reviews through international collaboration, which include Multi-ImmunoTox assay (MITA) IL-2 Luc LTT and MITA IL-1 β Luc assay for immunotoxicity, EpiSensA for skin sensitisation and MylcMAT for pyrogenicity.

1. 緒言

日本動物実験代替法評価センター (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods: JaCVAM) の令和 3 年 (2021) 4 月から令和 4 (2022) 年 6 月までの成果をまとめた。

2. 人事異動

令和 3 年 3 月 31 日付けで小島 肇が定年退官した。同年 4 月 1 日付けで足利太可雄が室長に、小島肇が再任用研究員としてそれぞれ着任した。さらに、小島 肇は令和 4 年 4 月 1 日付けで国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部および食品添加物部の特別研究員に着任した。

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 Cooperation 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、評価書としてとりまとめた。

- 1) 皮膚腐食性試験代替法 LabCyteEPI-MODEL24SCT
- 2) 眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS: TEA 法
- 3) 眼刺激性試験代替法 Vitrigel®-EIT 法

皮膚腐食性試験代替法 LabCyteEPI-MODEL24SCT および眼刺激性試験代替法 Vitrigel®-EIT 法に関しては、評価書作成後、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。

一方、眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS: TEA 法については、評価を実施した結果、適用除外物質の設定に科学的な根拠が乏しく、行政的に用いることは適切でないと判断されたため評価書作成に止め、行政提案は行わなかった。

なお、評価会議の下部組織である資料編纂委員会では、以下の試験法の評価書を作成している。

- 1) 眼刺激性試験代替法 SkinEthics 時間毒性 (Time To Toxicity: TTT)
- 2) 眼刺激性試験確定方式 (Defined Approach: DA) for serious Eye Damage/eye irritation
- 3) 皮膚感作性試験代替法 アミノ酸誘導体結合性試験 (Amino acid Derivative Reactivity Assay: ADRA)
- 4) 皮膚感作性試験確定方式 (Defined Approach for Skin Sensitization: DASS)
- 5) 発熱性物質試験代替法 PyroMAT
- 6) 口腔粘膜試験代替法 EpiOral
- 7) 光毒性試験代替法 再構築表皮モデルを用いた光毒性試験 (Reconstructed human Epidermis Phototoxicity Test)

また、OECD プロジェクト対応として、以下の資料編纂委員会も活動している。

- *In silico* 毒性学
- 発達神経毒性試験代替法

3-2. OECD TG

令和 3 年 6 月、OECD はヒト健康に関する 6 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 2 試験の改定作業に協力し、それらの採択に深く関与した。

- 1) Vitrigel®-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage: TG494
- 2) *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

また、令和4年6月に、OECDはヒト健康に関する10本のTG²⁾を採択した。JaCVAMは、このうち日本で開発されたADRAを含むTG442Cのさらなる改定作業および*in vitro*免疫毒性試験Detailed Review Paper(DRP)の開発に協力し、それらの採択に深く関与した。

この他、令和4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。なお、TGの開発や改定などの提案が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レビューする。JaCVAMは、令和4年7月以降のTG案の成立に向けて開発者に協力している。

- 1) 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
- 2) 皮膚感作性試験TG442Eの改定: IL-8 Luc assayの改良
- 3) 皮膚感作性試験EpiSensAの開発
- 4) 光安全性試験Integrated Approaches to Testing and Assessment(IATA)の開発
- 5) 免疫毒性試験IL-2 Luc assayの開発
- 6) 免疫毒性試験IL-2 Luc Leukocyte Toxicity Test(LTT)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

なお、OECD TG439への掲載を目指していた皮膚刺激性試験LbL 3D-Skin Skin Irritation Test(SIT)は、モデルの安定供給の目途が立たず開発を中止した。

3-3. 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-2 Luc LTT
- 2) 東北大学にて開発されたMITA IL-1 β Luc assay
- 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) 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て開発された発熱性物質試験代替法MylcMAT

3-4. ICATM および参加機関対応

例年開催されるICATM会議はCOVID-19の感染拡大のため該当期間に開催されなかった。また、令和3年9月28、29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)では、主に米国Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods(NICEATM)/The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods(ICCVAM)の活動報告が行われ、New Approach Method(NAM)の活用促進のためにConsideration of Alternative Methods Workgroupを設立したこと等の情報収集を行った。なおEuropean Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing(EURL ECVAM) Scientific Advisory Committee(ESAC)により例年開催されるICATM参加機関を招く会議も、COVID-19の感染拡大のため該当期間に開催されなかった。

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

ガイダンス検討会における光安全性に関するガイダンス作成のために、JaCVAM光毒性試験資料編纂委員会より関連資料を提供した。

4. JaCVAMの外部評価

1年に1回以上の頻度で、顧問会議委員(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、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。令和3年度は令和4年2月17日にリモート形式で顧問会議を開催し、難易度の高い全身毒性に関する代替法の開発の必要性など今後の方向性が議論された。

また令和3年度より、幅広い関連団体に、JaCVAMが行政に提案した新規または改定試験法を周知し、評価すべき試験法等について意見を集めることを目的としてステークホルダー会議を設置した。令和3年6月1日に第1回会議および令和4年6月3日に第2回会議を開催し、参加機関の代替法に関する取り組みを紹介いただくとともに、事前にいただいた質問や要望に基づいて質疑応答を行った。なお、これら会議の議事録はJaCVAMホームページ⁷⁾で公開さ

れている。

5. 総括

令和 3 年 4 月から令和 4 年 6 月までに、JaCVAM 評価会議にて 3 試験の評価を終了（行政提案は 2 試験）するとともに、OECD において、日本で開発された 2 試験の TG の改定に貢献することができた。今後もこのような活動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) Work plan for the Test Guidelines Programme (TGP) Available at: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/work-plan-test-guidelines-programme-july-2021.pdf>

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 ●		2021年12月 ●
	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 TG No. 498 ●	●
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 ヒト角膜試験 (SkinEthics™ HCE TTT)	L'Oreal ●	Independent Peer Reviewer ●	OECD TG No. 492B ●	●
	10 Vitrigel-EIT法	JaCVAM ●	JaCVAM ●	OECD TG No. 494 ●	2022年6月 ●
	11 CM法	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	OECD ●	●
	12 マクロモレキュラアッセイ	InVitro International ●	EURL ECVAM ●	OECD TG496 ●	●
	13 SIRC-CVS:TEA法	JaCVAM ●	JaCVAM ●	●	2021年7月 ●
	14 ヒト表皮試験 (MATREX法)	JaCVAM ●	●	●	●
	15 DA眼刺激性	●	●	OECD TG467 ●	●

● 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 ●	●	2015年3月 ●
	07 ADRA	JaCVAM ●	JaCVAM ●	OECD TG No. 442C ●	●
	08 KDPRA	BASF ●	EURL ECVAM ●	●	●
	09 KeratinoSense法	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	OECD TG No. 442D ●	2015年8月 ●
	10 LuSens法	BASF ●	EURL ECVAM ●	●	2019年11月 ●
	11 h-CLAT	JaCVAM & EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	●	2017年3月 ●
	12 IL-8 Luc アッセイ	JaCVAM ●	JaCVAM ●	OECD TG No. 442E ●	2020年12月 ●
	13 U-SENS™法	Loreal ●	EURL ECVAM ●	(IL-8 Lucアッセイ改定中) ●	2018年11月 ●
	14 GARDskin法	3RsMC ●	EURL ECVAM ●	●	●
	15 SENS-IS法	ImmunoSearch ●	EURL ECVAM ●	OECD ●	●
	16 EpiSensA	JaCVAM ●	●	OECD ●	●
	17 DASS	●	●	OECD TG No. 497 ●	●
06 皮膚透過性試験	01 In vitro 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 In vitro 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 In vivo コメットアッセイ	JaCVAM ●	OECD ●	OECD TG No. 489 ●	●
	03 Pig-aアッセイ	US FDA ●	●	OECD TG470 ●	●
	04 ヒト表皮モデル(EpiDerm™)を用いる小核試験	Cosmetic Europe/ EURL ECVAM ●	●	●	●
	05 In vitro 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 GD No. 331 ●	●
12 免疫毒性試験	01 IL-2 Lucアッセイ	JaCVAM ●	JaCVAM ●	●	●
	02 IL-2 Luc LTT	JaCVAM ●	●	●	●
	03 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 No. 214 ●	2018年3月 ●
	02 Bhas 42アッセイ	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM ●	OECD GD No. 231 ●	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. ●	2010年12月 ●
	02 PyroMAT法	EURL ECVAM ●	EURL ECVAM or ICCVAM ●	Ph. Eur. ●	●
	03 MylcMAT法	JaCVAM ●	●	●	●
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