

# 一般財団法人食品薬品安全センターにおける代替法研究

小島肇夫<sup>1</sup>, 渡辺美香<sup>2</sup>

## Report on Alternative to animal testing at the Food and Drug Safety Center, Japan

Hajime Kojima, Senior Research Advisor, Food and Drug Safety Center (FDSC)

Mika Watanabe, Director, Quality Assurance Unit, FDSC

The Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center (FDSC) is a pioneer institute for alternatives to animal testing in Japan. Several alternative methods have been developed and validated by researchers at this center that are consistent with international test guidelines such as the Japanese Pharmacopoeia, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), and International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). The FDSC has supported the activities of the Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments (JSAAE) both financially and in terms of human resources. The FDSC has also assisted the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) with validation studies and in the peer review process.

We believe that the FDSC makes an extremely important contribution to the spread and development of alternative test methods in Japan.

### 序論

一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所(以下、食薬センター)と動物実験代替法(以下、代替法)との関わりは極めて深い。当該研究所は、日本動物実験代替法学会(以下、代替法学会)の設立にも大きく寄与し、JaCVAM(日本動物実験代替法評価センター)の活動を支えてきた。この機会に、第三者の視点から食薬センターの取り組みを客観的な立場で書かせていただきたいと思います。筆を執った。私が食薬センターの歴史をまとめるなど、勘違いも甚だしいかもしれないが、小島幸一代表理事のご許可いただける範囲で、田中憲穂研究顧問の愛弟子である渡辺美香信頼性保証部長の協力を得ながら、まとめさせていただいたつもりである。以降、紙面の関係上、役職および敬称を略させていただくことをお許しいただきたい。

### 2. 代替法の開発と評価

食薬センターは、1990年代から医療機器の細

胞毒性試験の公定化のための研究に取り組み、日本薬局方への収載に寄与するとともに<sup>1-3)</sup>、対照材料の頒布に貢献してきた<sup>4)</sup>。急性毒性試験代替法のMEIC(Multicentre Evaluation of In vitro Cytotoxicity)共同研究への参加<sup>5)</sup>、眼刺激性試験代替のための細胞毒性試験バリデーション研究を指導された<sup>6)</sup>。なお、当該研究所は変異原性や遺伝毒性試験の研究に造詣が深い研究員が多いが、ここでの記載は代替法に絞らせていただく。

2000年初頭は、光遺伝毒性試験にも関与する光毒性試験代替法の日本への導入のため、厚生労働科学研究費補助金(2004~2006年度):200637005B「安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究(代表:大野泰雄)」の中で光毒性試験代替法3T3NRU(ニュートラルレッド取り込み試験)の評価を大野とともに担当されている<sup>7)</sup>。光毒性試験代替法3T3NRUは、変異原性試験以外でOECD(経済協力開発機構)が初めて採択したTG(試験法ガイドライン)であり<sup>8)</sup>、日本でも独立した第三者により評価された。今にして思えば、この第三者評価がJaCVAMの起源となった。

1 研究顧問

2 信頼性保証部

一方、食薬センターでは、発がん性の予知法として開発された形質転換試験の開発に寄与した。BALB/c 3T3細胞を用いたCTA(形質転換試験)の国内外のバリデーション研究に参加し<sup>9,10)</sup>、本試験法の国内導入を図るとともに、BALB/c 3T3細胞にがん遺伝子v-rasを導入したBhas 42細胞を用いる簡易な形質転換試験系(Bhas42CTA)の開発<sup>11,12)</sup>、その後の国内外の施設間再現性研究の結果を受け<sup>13,14)</sup>、データベースやプロトコルを開発した<sup>15,16)</sup>。

一方、2000年代後半に開始したNEDO(新エネルギー・産業技術総合開発機構)高機能簡易型有害性評価手法の開発プロジェクト(以下、NEDOプロジェクト)では、化学物質のリスク評価管理の効率的な実施に貢献することを目標に、食薬センターを中心に培養細胞を用いた有害性評価手法の開発が進められた(2006~2010年度)。このNEDOプロジェクトを田中憲穂が主導し、毒性試験の中でも代替試験法の開発が困難であるとされている発がん性、発生毒性、免疫毒性の3つの分野に関して、3色発光技術(産業技術総合研究所、東洋紡株式会社)やHAC(ヒト染色体由来の人工染色体:鳥取大学)技術など、我が国で開発された先端技術を導入することにより、OECDのTG化を目標として短期試験法の開発を行った。

発がん性の予知については、前述した形質転換試験系(Bhas42CTA)の改良研究とバリデーション研究が行われた<sup>17,18)</sup>。一方、発生毒性に関しては、マウスES細胞を用いるレポーター遺伝子系Hand1 Luc EST<sup>19)</sup>が住友化学株式会社により開発された。免疫毒性においては、免疫応答関連遺伝子の発現を指標とする多色の免疫毒性評価細胞が東北大学医学部皮膚科により多数の細胞株が樹立され、IL-8 Lucアッセイ<sup>20)</sup>、IL-2 Lucアッセイ<sup>21)</sup>およびIL-1 Lucアッセイ<sup>22)</sup>という多くの試験法が開発された。

さらに、後継プロジェクトである経済産業省の石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発プロジェクト(2012~2016年度)においても、田中憲穂をはじめとする食薬センターの研究者により、肝臓毒性、腎臓毒性および神経毒性に関する*in vitro*試験法が開発が主導された。当該研究所では、肝臓毒性試験

法の開発を担当していただいたが、バリデーション研究に進めるような試験法の開発には至らなかった。小島は、このプロジェクトのリーダーを務めたが、残念ながらいずれの試験法もバリデーション研究には至らなかった。

### 3. バリデーション研究と公定化

バリデーション研究といえば、前述した代替法学会が主導した細胞毒性試験を用いた眼刺激性試験代替法が日本で初めて実施された。このバリデーション研究は小野宏と田中憲穂が組織して、50を超える施設の参加を経て実施された<sup>6)</sup>。このバリデーション研究は日本の黎明期の大型イベントであったこともあり、データの処理方法などの計画が明示されないまま実験が走り出した。これもあり、理化学研究所の大野忠夫(元細胞バンクセンター長)や吉村功(東京理科大学元教授)、大森崇(京都大学、当時:学生)が1年かけてデータ処理に取り組んだことを鮮明に覚えている<sup>23)</sup>。これに加え、大野泰雄(元国立医薬品食品衛生研究所所長、当時:国立医薬品食品衛生研究所薬理部長)が1990年代に始めた眼刺激性試験代替法のバリデーション研究の成果<sup>24)</sup>が代替法の行政的な受け入れにつながらなかったこと、および先に挙げたCTAのバリデーション研究<sup>10,13)</sup>の先が見えなかったことなどの閉塞感に加え、OECDで「ハザードアセスメントのための新規又は改定試験法に対するバリデーションと国際的承認に関するガイダンス文書No.34」が2005年に公定化されることになり<sup>25)</sup>、バリデーション研究の国際的なルール作りが進んだ。これらの状況を鑑み、大野泰雄により、2005年11月に国立医薬品食品衛生研究所内にJaCVAMが設立された<sup>26)</sup>。

ところで、JaCVAMとは、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(以下、国立衛研 安全センター)下に設置され、欧米の同様な組織に匹敵する試験法に関する評価法の導入を目指した世界で3番目のバリデーションセンターである<sup>27)</sup>。JaCVAMの基幹組織は運営委員会であり、国立衛研 安全センター長が運営委員長を務め、JaCVAMが検討すべき新規・改定試験法の選考とその評価のための計画に関して、その科学的妥当性と評価実施に必要な予算および人的

資源について審議し、決定する。運営委員会は、国立衛研 安全センター運営会議構成員(国立衛研 安全センター長, 毒性部長, 病理部長, 薬理部長, 変異遺伝部長, 安全性予測評価部部長および毒性部動物管理室長), 国立感染症研究所, 厚生労働省, 独立行政法人医薬品医療機器総合機構の担当者で構成されている。小島は設立当初から, JaCVAM事務局を務め, 16年間にわたり, JaCVAMを支えてきた。現在も国立医薬品食品衛生研究所の特別研究員としてJaCVAM事務局を支えている。

JaCVAMの目的の一つは, 化学物質等の安全性に係る試験法の有用性とその限界および行政試験法としての妥当性についての評価と, それに必要なバリデーション研究を実施するとともに, 関連分野における国内および国際協力ならびに国際対応に携わることである。バリデーション研究に関しては, 運営委員会においてバリデーション研究が必要とされた場合にバリデーション実行委員会が設置される。バリデーション実行委員会は, 当該試験法のバリデーション計画を立て, バリデーション研究を実行する。また, バリデーション研究の結果を踏まえて, 推奨できるプロトコルを含むバリデーション報告書をまとめることになっている。

JaCVAM設立後の食薬センターの協力は特筆すべきものがある。試験法の開発はJaCVAMありき, すなわち評価ありきではない。バリデーション研究を行うためには, 試験法が開発されていなければならない。その視点で, 前述のNEDOプロジェクトの成果は大きく, 試験法という成果物があってこそJaCVAMの存在価値がある。

バリデーション研究においても, NEDOプロジェクトにて研究が進んだBhas42CTAバリデーション研究が<sup>17)</sup>, JaCVAMとしてのコメントアッセイ<sup>28,29)</sup>, 2つの内分泌かく乱物質のスクリーニング試験に続く4つ目の国際バリデーション研究であった。この試験法のバリデーション研究は, 学ぶべきことが多い共同研究であった。林真(元国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部部長)をバリデーション実行委員長として, 海外の専門家や日本バイオアッセイ研究センター, 公益財団法人食品農薬品安全性評価センターの協力を得て,

バリデーション研究が実施された。それまでの方法は直径100 mmのプレートに生じるBhas42細胞のコロニーを計数するものであったが, バリデーション研究では6穴や96穴プレートというハイスループット法がバリデートされた<sup>17)</sup>。バリデーション結果は上々であったが, 結局, TGへの道を進むことはできず, 同様の試験法であるSHE CTAアッセイ同様, OECDガイダンスという位置付けにとどまった<sup>30)</sup>。この経験から, バリデーション研究は単なるプロトコル開発の手段にすぎず, 公定化までの過程で, まず方法ありきでなく, 世界で戦うためにはいかに戦略的に段階を踏むことが重要かを痛感した。この経験が, IL-8 Lucアッセイ<sup>31,32)</sup>やIL-2 Lucアッセイ<sup>33)</sup>, Hand1 Luc EST<sup>27)</sup>のNEDOプロジェクトの成果物や農水省プロジェクトのVitrigel-EIT法<sup>34)</sup>のバリデーション研究に生きている。加えて, JaCVAMは関与していないが, 食薬センターが参加したバリデーション研究にも影響を与えたと考えている<sup>35-37)</sup>。

なお, バリデーション研究では実行委員会という組織を構築するが, その中での専門家の知識が重要となる場合が多い。JaCVAMはこれまで15を超える日本人が開発した試験法をバリデートし, OECDでTGとして公定化してきたが, その中でもICH(医薬品規制調和国際会議)S10 光安全性ガイドラインに寄与できた試験法は, 活性酸素種(ROS)アッセイのみである<sup>38)</sup>。この際に貢献いただいた食薬センター 若栗忍の知識と経験は製薬協を中心とするバリデーション研究に極めて影響力が大きかった<sup>39,40)</sup>。

最後に, これまで食薬センターの皆様にお世話になったJaCVAM主導のバリデーション研究の成果を表1にまとめている。計8試験のバリデーション研究に関わっていただき, 半数の試験法の公定化に寄与していただいたことを感謝している。

#### 4. JaCVAM 資料編纂委員会

JaCVAMのもう一つの目的は, 国立衛研 安全センターの組織規定に示された化学物質等の安全性評価のうち, 国民の安全を確保しつつ, 動物実験に関する3Rs(Reduction: 削減, Refinement:

表1 食薬センターが取り組んできたバリデーション研究

| No. | 試験法名           | 対象試験    | 役割                 | 協力者名                            | 成果          |
|-----|----------------|---------|--------------------|---------------------------------|-------------|
| 1   | SIRC-CVS: TEA  | 眼刺激性試験  | バリデーション実行委員会 (専門家) | 山影康次                            |             |
| 2   | コメットアッセイ       | 遺伝毒性試験  | バリデーション参加施設        | 田中憲穂, 山影康次, 中川ゆづき               | OECD TG487  |
| 3   | Bhas42形質転換アッセイ | 発がん性試験  | 開発者                | 田中憲穂, 山影康次, 佐々木澄志, 酒井綾子他        | OECD GD231  |
| 4   | IL-8 Lucアッセイ   | 皮膚感作性試験 | バリデーション実行委員会 (専門家) | 田中憲穂                            | OECD TG442E |
|     |                | 皮膚感作性試験 | バリデーション参加施設        | 山影康次, 渡辺美香                      |             |
| 5   | IL-2 Lucアッセイ   | 免疫毒性試験  | バリデーション参加施設        | 山影康次, 渡辺美香, 小林美和子               |             |
| 6   | Hand1 Luc EST  | 生殖毒性試験  | バリデーション実行委員会 (専門家) | 田中憲穂, 山影康次, 桑形麻樹子               |             |
|     |                |         | バリデーション参加施設        | 渡辺美香, 生悦住茉友                     |             |
| 7   | Vitrigel-EIT法  | 眼刺激性試験  | バリデーション参加施設        | 渡辺美香, 新妻健, 中川ゆづき, 奥富弘子          | OECD TG494  |
| 8   | EpiSensA       | 皮膚感作性試験 | バリデーション参加施設        | 渡辺美香, 生悦住茉友, 安田美智代, 梶原三智香, 宇野勝洋 |             |

表2 食薬センターのJaCAMへの関与

| No. | 氏名    | 担当                | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 | 2022 |   |   |
|-----|-------|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|---|
| 1   | 小野宏   | 内分泌かく乱試験資料編纂委員会   |      |      |      |      |      |      | ←    | →    |      |      |      |      | →    |      |      |      |      |   |   |
|     |       | 顧問会議              |      | ←    |      |      |      | →    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |   |   |
|     |       | 用語専門委員会           |      |      |      |      |      | ←    | →    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |   |   |
| 2   | 小島幸一  | 皮膚感作性試験資料編纂委員会    |      |      |      |      |      |      |      | ←    |      |      |      |      |      |      |      |      |      | → |   |
|     |       | 評価会議              |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | ← | → |
| 3   | 金澤由起子 | 皮膚感作性試験資料編纂委員会    | ←    |      |      |      |      |      | ←    | →    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |   |   |
| 4   | 田中憲穂  | 評価会議              |      | ←    |      |      |      | →    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |   |   |
|     |       | 運営委員会             |      |      |      |      |      | ←    | →    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |   |   |
|     |       | 皮膚感作性試験資料編纂委員会    | ←    |      |      |      |      | →    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |   |   |
| 5   | 山影康次  | 光毒性試験資料編纂委員会      |      |      |      |      |      |      |      | ←    | →    |      |      |      |      |      |      |      |      |   |   |
|     |       | 形質転換試験資料編纂委員会     |      |      |      |      |      |      |      |      | ←    | →    |      |      |      |      |      |      |      |   |   |
|     |       | in vitro 試験法の基本原則 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | ←    | →    |      |      |      |      |      |   |   |
| 6   | 若栗忍   | 急性毒性試験資料編纂委員会     |      |      |      | ←    | →    |      |      | ←    | →    |      |      |      |      |      |      |      |      |   |   |
| 7   | 森村智美  | 眼刺激性試験資料編纂委員会     |      |      |      |      |      |      |      | ←    | →    |      |      |      |      |      |      |      |      |   |   |
| 8   | 桑形麻樹子 | 生殖発生毒性試験資料編纂委員会   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | ←    | →    |      |      |      |      |      |   |   |

苦痛の軽減, Replacement: 置き換え)<sup>41)</sup>の促進に資する新規動物実験代替法を行政試験法として, 可能な範囲での導入に貢献することである<sup>27)</sup>. これにより, 我が国の医薬品等の製造販売承認申請資料の作成および審査, 化粧品基準の改正ならびに化学物質, 農薬の適正な規制にも寄与するであろう. これらの目的のため, 資料編纂委員会と評価会議が設置されている. 資料編纂委員会は, 当該試験法に関するバリデーション報告書, 第三者評価委員会の報告書および当該試験法の背景情報を用い, 必要に応じて当該試験法に対する意見・提案を国内外の機関に行うとともに, 資料

編纂委員会としての報告書をまとめる. 評価会議は, 資料編纂委員会の報告書および当該試験法の背景情報を用い, 当該試験法の科学的妥当性, その行政的利用および社会的に受け入れ可能かの観点から審議し, 最終報告書を作成し, パブリックコメントに供することになっている. この評価書や評価会議報告書作成においても, 小島幸一をはじめとする食薬センターに人材提供を受けてきた. これまでの当該研究所のJaCAM協力者のリストを表2に示す. また, 当該研究所の皆様が関与してできた評価書のリストを表3に示す<sup>27)</sup>. これまでJaCVAMでは40以上の試験法を評価して

表3 食薬センターの協力を得て評価された試験法

| No. | 試験法   | 年月       | 各種関連通知  |
|-----|---|----------|---|
| 1   | 皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA法)  | 2008年11月 |   |
| 2   | 皮膚感作性試験代替法(LLNA-BrdU法)  | 2010年5月  |   |
| 3   | 単回投与毒性試験代替法   | 2011年6月  |   |
| 4   | 皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA法)  | 2013年1月  | ガイダンス   |
| 5   | 皮膚感作性試験代替法(LLNA-BrdU-ELISA法)  | 2013年1月  | <a href="https://www.pmda.go.jp/files/000160437.pdf">https://www.pmda.go.jp/files/000160437.pdf</a>   |
| 6   | 皮膚感作性試験代替法(rLLNA法)  | 2013年1月  | ガイダンス <a href="https://www.pmda.go.jp/files/000161377.pdf">https://www.pmda.go.jp/files/000161377.pdf</a>   |
| 7   | ヒトエストロゲン受容体結合による活性化・拮抗作用物質を検出するBG1 Luc ER TA法   | 2014年1月  |   |
| 8   | 皮膚感作性試験代替法 Direct Peptide Reactivity Assay (DPR):ペプチド結合性試験                              | 2015年3月  | ガイダンス <a href="https://www.jacvam.jp/files/news/薬生薬審発0111第1号_医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンスについて.pdf">https://www.jacvam.jp/files/news/薬生薬審発0111第1号_医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンスについて.pdf</a>                     |
| 9   | 皮膚感作性試験代替法 角化細胞株レポーターアッセイ   | 2015年8月  |   |
| 10  | 眼刺激性試験代替法 <i>In vitro</i> 短時間曝露法(STE法)  | 2016年3月  | ガイダンス <a href="https://www.pmda.go.jp/files/000230192.pdf">https://www.pmda.go.jp/files/000230192.pdf</a>   |
| 11  | ER STTA法(hER $\alpha$ -HeLa-9903細胞を用いたエストロゲン受容体恒常発現系転写活性化試験法)                           | 2016年12月 |   |
| 12  | 眼刺激性試験代替法 再構築ヒト角膜様上皮モデル法(Reconstructed Human Cornea-like Epithelium Test Method: RhCE法) | 2017年1月  | ガイダンス <a href="https://www.pmda.go.jp/files/000230193.pdf">https://www.pmda.go.jp/files/000230193.pdf</a>   |
| 13  | 皮膚感作性試験代替法 human Cell Line Activation Test(h-CLAT)                                      | 2017年3月  | ガイダンス <a href="https://www.jacvam.jp/files/news/薬生薬審発0111第1号_医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンスについて.pdf">https://www.jacvam.jp/files/news/薬生薬審発0111第1号_医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンスについて.pdf</a>                     |
| 14  | 再構築ヒト角膜様上皮モデル法(RhCE法)Skin Ethic™ HCE EIT  | 2018年3月  | ガイダンス <a href="https://www.pmda.go.jp/files/000230193.pdf">https://www.pmda.go.jp/files/000230193.pdf</a>   |
| 15  | 皮膚感作性試験代替法 U937 Cell Line Activation Test(U-SENSTM)                                     | 2018年11月 |   |
| 16  | AR STTA法(AR-EcoScreen™細胞を用いたアンドロゲン受容体恒常発現系転写活性化試験法)                                     | 2019年2月  |   |
| 17  | 眼刺激性試験代替法 再構築ヒト角膜様上皮モデル法(LabCyte CORNEA-MODEL24 Eye Irritation Test)                    | 2019年2月  | ガイダンス <a href="https://www.pmda.go.jp/files/000230193.pdf">https://www.pmda.go.jp/files/000230193.pdf</a>   |
| 18  | 急性経口毒性を予測するための <i>in vitro</i> 細胞毒性試験   | 2019年4月  | ガイダンス <a href="https://www.jacvam.jp/files/news/030422_課_薬生薬審発0422第1号_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.pdf">https://www.jacvam.jp/files/news/030422_課_薬生薬審発0422第1号_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.pdf</a> |
| 19  | 2018年改定 OECD TG438 ニワトリ眼球を用いた眼刺激性試験(ICE法: Isolated Chicken Eye Test)                    | 2019年11月 | ガイダンス <a href="https://www.pmda.go.jp/files/000208703.pdf">https://www.pmda.go.jp/files/000208703.pdf</a>   |
| 20  | 皮膚感作性試験代替法 ARE-Nrf2 luciferase(LuSens) test method                                      | 2019年11月 |   |
| 21  | 皮膚感作性試験代替法 Interleukin-8 Reporter Gene Assay(IL-8 Luc assay)                            | 2020年12月 |   |
| 22  | Bhas 42細胞形質転換試験法(Bhas 42 CTA)   | 2020年12月 |   |

ガイダンス：医薬部外品・化粧品の安全性評価のための代替法ガイダンス

きたが、その半分にあたる評価書に関わってこられたことがよくわかる。表にもあるように、これらの評価書は、厚生労働省が発出する化粧品・医薬部外品のガイダンスの開発に寄与しており<sup>27)</sup>、日本における代替法の行政的な受け入れに欠かせ

ないものとなっている。

この中で、特筆すべきが、単回投与毒性試験代替法としての細胞毒性試験の評価である。この評価書は、化粧品・医薬部外品のガイダンスの単回投与毒性試験につながる重要な評価書である

が<sup>42)</sup>、若栗忍にはECVAM(欧州動物実験代替法評価センター)の結果を確認するため、追加実験をお願いした。この結果のおかげで、適切な評価書を作成できたとありがたく思っている。

## 5. 日本動物実験代替法学会への貢献

代替法学会は、動物実験の適切な施行の国際原則である3Rsの推進と普及を目的とし、動物実験代替法に関わる研究、開発、教育、調査、標準化等を推進および支援等を行う学術団体である<sup>43)</sup>。1987年に京都大学名誉教授 菅原努が研究会を設立し、1989年に学会となって以来、日本の代替法研究を牽引してきた。2022年より法人化され、その成果を社会に還元している。

### 5.1 小野宏の貢献

小野宏は、医師であり、毒性学者であり、牧師であり、食薬センターの評議員(元代表理事)であり、当時OECDのナショナルコーディネーターであり、スーパーマンのような憧れの方である。代替法学会の前身である研究会からの主要メンバーであり、毒性試験や代替法に関する造詣が深い。

代替法に関しては、バリデーション研究の進め方にも詳しく<sup>44)</sup>、バリデーションの手順を定めたOECD GD34の前身にあたるSoala合意の内容を日本で初めて邦文でまとめ、発表された<sup>45)</sup>。先に示した細胞毒性試験代替法のバリデーション研究をバリデーション実行委員長として組織された<sup>4)</sup>。急性毒性試験の代替に詳しく、総説を書かれている<sup>46)</sup>。1991年11月には日本動物実験代替法学会第5回大会(秦野市文化会館、神奈川県)の大会長を務められ、学会長(1995~1996年度)も歴任されている。2005年に同学会より学会賞を授与され、2011年より名誉会員となっている。

### 5.2 田中憲穂の貢献

田中憲穂は小野と同様、代替法学会の前身である研究会からの主要メンバーである。私の知る田中は、培養細胞および変異原性試験研究の専門家である。初めてお会いしたのは1980年代後半の日本組織培養学会や日本環境変異原学会であり、1989年の日本動物実験代替法学会第3回大会(横浜市立大学)以降、お話しする機会も増えて種々な面でお世話になってきた。

田中は、2005年には日本動物実験代替法学

会第19回大会(フォーラム246、神奈川県)の大会長を務められ、学会長(2005~2006年度)も歴任されている。その際に私が庶務幹事を務めた。2007年8月には第6回国際動物実験代替法会議: World Congress(東京)の副会長を務められた後<sup>47)</sup>、2008年に同学会より学会賞を授与された。実は、この国際会議招致は田中の功績である。世界的な代替法研究の重鎮であるドイツのH. Spielmann博士と懇意にされ、代替法学会大会にも招待して人間関係を構築されてきた。日本の代替法研究の国際化は田中により開かれたといっても過言ではない。この功績を受け、2015年より名誉会員となっている。

### 5.3 山影康次の貢献

山影康次は日本環境変異原学会の重鎮であり、当初は代替法学会とは一線を画しておられた。しかし、2015年11月には断れず、日本動物実験代替法学会第28回大会(ワークピア横浜)の大会長を務めていただくことになる。当時、私は学会長であったが、山影には本当に迷惑をおかけした。前年の第27回大会が史上初めて大赤字を出したことから、山影に与えられた使命は大会の黒字化であった。そのような状況下で、大幅な黒字で立派な大会を納めていただき、学会の発展に貢献いただいた。

### 5.4 小島幸一の貢献

小島幸一が直接、代替法学会で表に出られることはない。とはいえ、代替法学会への継続的な賛助や代替法の技術セミナーのために継続的に研究施設をお借りし、積極的な人材提供など、代替法学会の発展に寄与していただいた。この場をお借りして、感謝を申し上げたい。代替法学会としても食薬センターの功績を軽んじることなく、接していただきたいものである。

## 6. そして新時代へ

これまで記したように食薬センターは、多くのバリデートされた試験法に寄与されてきたが、食薬センターの中で根付き、引き継がれ、柱となっていない試験法が多い点が寂しい。何が原因かをわれわれから語ることはできないが、10年前に終了したNEDO田中プロジェクトで開発され、バリデートされた方法を鑑みるにあたり、田中プ

プロジェクトは時代の先端を行き過ぎたと感じている。全身毒性の代替法とはどうあるべきか、そのバイオマーカーはどう探すかなどの議論なしで、日本発の新たな手法を用いて試験法が開発され、バリデートされた。試験法の再現性や予測性よりも前に必要な科学的な妥当性の議論が欠けていたような気がしている。この教訓は今後の代替法開発に生かしていかなければならない。

数年前より、食薬センターの代替法研究は、安全性事業本部 安全性試験部 立花部長および成田和人研究員が主導する時代に入った。少数精鋭で代替法による各種受託試験および代替法開発のためのバリデーション研究についても積極的に取り組んでいる。主な受託可能な試験法は、3T3 NRU法による *in vitro* 光毒性試験、3次元ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験、*in vitro* 眼刺激性試験 Short Time Exposure (STE) 試験、*in vitro* 皮膚感作性試験 ヒト細胞株活性化試験 (h-CLAT) 等である<sup>48)</sup>。毎年、受託可能な試験法を増やしていると聞いている。食薬センターは代替法に関する伝統をもっている研究所である。今後、GLPでの実施を念頭においた質の高い試験結果を依頼者に返し続けていくことを期待するとともに、実用性の高い新規代替法研究に取り組み、一早く試験法を導入していただきたいと考えている。

#### 参考文献

- 1) Tsuchiya T, Ikarashi Y, Hata H, Toyoda K, Takahashi M, Uchima T, Tanaka N, Sasaki T, Nakamura A: Comparative studies of the toxicity of standard reference materials in various cytotoxicity tests and *in vivo* implantation tests. *J Appl Biomater.* 1993; 4: 153-156
- 2) 柘植英哉, 森 充生, 大庭澄明, 大内 正, 寺田三郎, 五島隆志, 田邊豊重, 山影康次, 田中憲穂, 渡辺美香, 畔上二郎, 大向英夫, 小島 肇: 平成21年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告 輸液用ゴム栓試験法の見直し研究(第3報) - 細胞毒性試験法の検討 - . 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2010; 42: 258-271
- 3) 柘植英哉, 大内 正, 森 充生, 下田耕三, 大庭澄明, 青木光夫, 林 美則, 五島隆志, 山影康次, 渡辺美香, 田中憲穂, 小島 肇, 四方田千佳子: 平成22年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告 輸液用ゴム栓試験法の見直し研究(第4報) - ゴム栓試験法: 細胞毒性試験における試料溶液の調製方法に関する検討 - . 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2011; 43: 473-482
- 4) 田中憲穂, 渡辺美香, 山影康次: 医療機器の生物学的安全性試験に用いる対照材料の開発とその頒布状況. 秦野研究所年報, 2014; 37: 26-30
- 5) Clemedson C, Andersson M, Aoki Y, Barile FA, Bassi AM, Calleja MC, Castano A, Clothier RH, Dierickx P, Ekwall B, Ferro M, Fiskesjö G, Garza-Ocañas L, Gómez-Lechón MJ, Gulden M, Hall T, Imai K, Isomaa B, Kahru A, Kerszman G, Kjellstrand P, Kristen U, Kunimoto M, Kärenlampi S, Lewan L, Lilius H, Loukianov A, Monaco F, Ohno T, Persoone G, Romert L, Sawyer TW, Segner H, Seibert H, Shrivastava R, Sjöström M, Stamatii A, Tanaka N, Thuvander A, Torres-Alanis O, Valentino M, Wakuri S, Walum E, Wang X, Wieslander A, Zucco F, Ekwall B: MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity: Part IV *In Vitro* Results from 67 Toxicity Assays Used to Test Reference Chemicals 31-50 and a Comparative Cytotoxicity Analysis. *ALTA.* 1998; 26: 131-183
- 6) Ohno T, Itagaki H, Tanaka N, Ono H: Validation study in Japan on five different cytotoxicity assays. In: van Zutphen LFM, Balls M eds "Animal Alternatives, Welfare and Ethics". Netherlands: Elsevier Science, 1997. 1145-1154
- 7) Ohno Y, Itagaki H, Okamoto Y, Tanaka N, Omori T, Kojima H, Hatao M, Kaneko T, Imai K, Wakuri S: Balb/c 3T3細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価報告書. AATEX. 2004; 10: 50-157
- 8) OECD Test Guidelines for the Chemicals. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm> (令和4年5月1日現在)
- 9) Tanaka N, Bohnenberger S, Kunkelmann T, Munaro B, Ponti J, Poth A, Sabbioni E, Sakai A, Salovaara S, Sasaki K, Thomas BC, Umeda M: Prevalidation study of the BALB/c 3T3 cell transformation assay for assessment of carcinogenic potential of chemicals. *Mutat Res.* 2012; 744: 20-29
- 10) Tsuchiya T, Umeda M, Nishiyama H, Yoshimura I, Ajimi S, Asakura M, Baba H, Dewa Y, Ebe Y, Fushiwaki Y, Hamada S, Hamamura T, Hayashi M, Iwase Y, Kajiwara Y, Kasahara Y, Kawabata M, Kitada E, Kubo K, Mashiko K, Miura D,

- Mizuhashi F, Mizuno F, Nakajima M, Nakamura Y, Nobe N, Oishi H, Ota E, Sakai A, Sato M, Shimada S, Sugiyama T, Takahashi C, Takeda Y, Tanaka N, Toyozumi C, Tsutsui T, Wakuri S, Yajima S, Yajima N: An Interlaboratory Validation Study of the Improved Transformation Assay Employing Balb/c 3T3 Cells: Results of a Collaborative Study on the Two-stage Cell Transformation Assay by the Non-genotoxic Carcinogen Study Group. *ATLA*. 1999; 27: 685-702
- 11) Sasaki K, Mizusawa H, Ishidate M, Tanaka N: Transformation of ras transfected BALB 3T3 clone (Bhas 42) by promoters: Application for screening and specificity of promoters. *Toxicol In Vitro*. 1990; 4: 657-659
  - 12) Asada S, Sasaki K, Tanaka N, Takeda K, Hayashi M, Umeda M: Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells). *Mutat Res*. 2005; 588: 7-21
  - 13) Ohmori K, Umeda M, Tanaka N, Takagi H, Yoshimura I, Sasaki K, Asada S, Sakai A, Araki H, Asakura M, Baba H, Fushiwaki Y, Hamada S, Kitou N, Nakamura T, Nakamura Y, Oishi H, Sasaki S, Shimada S, Tsuchiya T, Uno Y, Washizuka M, Yajima S, Yamamoto Y, Yamamura E, Yatsushiro T: An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells. Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in the Environmental Mutagen Society of Japan. *Altern Lab Anim*. 2005; 33: 619-639
  - 14) Tsuchiya T, Umeda M, Tanaka N, Sakai A, Nishiyama H, Yoshimura I, Ajimi S, Asada S, Asakura M, Baba H, Dewa Y, Ebe Y, Fushiwaki Y, Hagiwara Y, Hamada S, Hamamura T, Iwase Y, Kajiwara Y, Kasahara Y, Kato Y, Kawabata M, Kitada E, Kaneko K, Kizaki Y, Kubo K, Miura D, Mashiko K, Mizuhashi F, Muramatsu D, Nakajima M, Nakamura T, Oishi H, Sasaki T, Shimada S, Takahashi C, Takeda Y, Wakuri S, Yajima N, Yajima S, Yatsushiro T: Application of the improved BALB/c 3T3 cell transformation assay to the examination of the initiating and promoting activities of chemicals: the second interlaboratory collaborative study by the non-genotoxic carcinogen study group of Japan. *ATLA*. 2010; 38: 11-27
  - 15) Sakai A, Sasaki K, Muramatsu D, Arai S, Endou N, Kuroda S, Hayashi K, Lim YM, Yamazaki S, Umeda M, Tanaka N: A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: the characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat Res*. 2010; 702: 100-122
  - 16) Sasaki K, Bohnenberger S, Hayashi K, Kunkelmann T, Muramatsu D, Phrakonkham P, Poth A, Sakai A, Salovaara S, Tanaka N, Thomas BC, Umeda M: Recommended protocol for the BALB/c 3T3 cell transformation assay. *Mutat Res*. 2012; 744: 30-35
  - 17) Sakai A, Sasaki K, Hayashi K, Muramatsu D, Arai S, Endou N, Kuroda S, Poth A, Bohnenberger S, Kunkelmann T, Asakura M, Hirose H, Ishii N, Mizuhashi F, Kasamoto S, Nagai M, Pant K, Bruce SW, Sly JE, Yamazaki S, Umeda M, Tanaka N: An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat Res*. 2011; 725: 57-77
  - 18) Sasaki K, Umeda M, Sakai A, Yamazaki S, Tanaka N: Transformation assay in Bhas 42 cells: a model using initiated cells to study mechanisms of carcinogenesis and predict carcinogenic potential of chemicals. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2015; 33: 1-35
  - 19) Suzuki N, Yamashita N, Koseki N, Yamada T, Kimura Y, Aiba S, Toyozumi T, Watanabe M, Ohta R, Tanaka N, Saito K: Assessment of technical protocols for novel embryonic stem cell tests with molecular markers (Hand1- and Cmya1-ESTs): a preliminary cross-laboratory performance analysis. *J Toxicol Sci*. 2012; 37: 845-851
  - 20) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, Aiba S: Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro*. 2015; 29: 1816-1830
  - 21) Kimura Y, Terui H, Fujimura C, Amagai R, Takahashi T, Aiba S: Optimization of the IL-2 Luc assay for immunosuppressive drugs: a novel *in vitro* immunotoxicity test with high sensitivity and predictivity. *Arch Toxicol*. 2021; 95: 2755-2768



- 22) Terui H, Kimura Y, Fujimura C, Aiba S: The IL-1 promoter-driven luciferase reporter cell line THP-G1b can efficiently predict skin-sensitising chemicals. *Arch Toxicol.* 2021; 95: 1647-1657
- 23) 大森 崇, 吉村 功: バリデーション研究におけるデータマネジメント, 動物実験代替安全性試験プロトコル集, 東京: シーエムシー出版, 2013. 257-275
- 24) 大野泰雄: 眼刺激性試験代替法のバリデーション. 組織培養, 1996; 22: 211-217
- 25) OECD: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No.34, Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2005
- 26) 大野泰雄: 動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受け入れの現状. *Bull Natl Inst Health Sci.* 2004; 122: 1-10
- 27) JaCVAM. Available at: <http://www.jacvam.jp/> (令和4年5月1日現在)
- 28) Uno Y, Kojima H, Omori T, Corvi R, Honma M, Schechtman LM, Tice RR, Burlinson B, Escobar PA, Kraynak AR, Nakagawa Y, Nakajima M, Pant K, Asano N, Lovell D, Morita T, Ohno Y, Hayashi M: JaCVAM-organized international validation study of the *in vivo* rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens: I. Summary of pre-validation study results. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015; 786-788: 3-13
- 29) Uno Y, Kojima H, Omori T, Corvi R, Honma M, Schechtman LM, Tice RR, Beevers C, Boeck MD, Burlinson B, Hobbs CA, Kitamoto S, Kraynak AR, McNamee J, Nakagawa Y, Pant K, Plappert-Helbig U, Priestley C, Takasawa H, Wada K, Wurnitzer U, Asano N, Escobar PA, Lovell D, Morita T, Nakajima M, Ohno Y, Hayashi M: JaCVAM-organized international validation study of the *in vivo* rodent alkaline comet assay for detection of genotoxic carcinogens: II. Summary of definitive validation study results. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015; 785-788: 45-76
- 30) OECD: Guidance document on the *in vitro* Bhas 42 cell transformation assay, OECD Series on Testing and Assessment No.231, Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2016
- 31) OECD: Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay, OECD Series on Testing and Assessment No.267, Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2017
- 32) Kimura Y, Watanabe M, Suzuki N, Iwaki T, Yamakage K, Saito K, Nakajima Y, Fujimura C, Ohmiya Y, Omori T, Kojima H, Aiba S: The performance of an *in vitro* skin sensitisation test, IL-8 Luc assay (OECD442E), and the integrated approach with direct peptide reactive assay (DPRA). *J Toxicol Sci.* 2018; 43: 741-749
- 33) Kimura Y, Yasuno R, Watanabe M, Kobayashi M, Iwaki T, Fujimura C, Ohmiya Y, Yamakage K, Nakajima Y, Kobayashi M, Mashimo N, Takagi Y, Omori T, Corsini E, Germolec D, Inoue T, Rogen EL, Kojima H, Aiba S: An international validation study of the IL-2 Luc assay for evaluating the potential immunotoxic effects of chemicals on T cells and a proposal for reference data for immunotoxic chemicals. *Toxicol In Vitro.* 2020; 66: 104832
- 34) Kojima H, Yamaguchi H, Sozu T, Kleinstreuer N, Chae-Hyung L, Chen W, Watanabe M, Fukuda T, Yamashita K, Takezawa T: Multi-laboratory Validation Study of the Vitrigel-Eye Irritancy Test Method as an Alternative to In Vivo Eye Irritation Testing. *ATLA.* 2019; 47: 140-157
- 35) Sakaguchi H, Ota N, Omori T, Kuwahara H, Sozu T, Takagi Y, Takahashi Y, Tanigawa K, Nakanishi M, Nakamura T, Morimoto T, Wakuri S, Okamoto Y, Sakaguchi M, Hayashi T, Hanji T, Watanabe S: Validation study of the Short Time Exposure (STE) test to assess the eye irritation potential of chemicals. *Toxicol In Vitro.* 2011; 25: 796-809
- 36) Abo T, Hilberer A, Behle-Wagner C, Watanabe M, Cameron D, Kirst A, Nukada Y, Yuki T, Araki D, Sakaguchi H, Itagaki H: Predictive performance and inter-laboratory reproducibility in assessing eye irritation potential of water- and oil-soluble mixtures using the Short Time Exposure test method. *Toxicol In Vitro.* 2018; 48: 78-85
- 37) Mizumachi H, Sakuma M, Ikezumi M, Saito K, Takeyoshi M, Imai N, Okutomi H, Umetsu A, Motohashi H, Watanabe M, Miyazawa M: Transferability and within- and between-laboratory reproducibilities of EpiSensA for

- predicting skin sensitization potential *in vitro*: A ring study in three laboratories. *J Appl Toxicol.* 2018; 38: 1233-1243
- 38) ICHガイドライン. Available at: <https://www.pmda.go.jp/int-activities/int-harmony/ich/0070.html> (令和4年5月1日現在)
- 39) Onoue S, Hosoi K, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Matsuoka N, Nakamura K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Seto Y, Kato M, Yamada S, Ohno Y, Kojima H: Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standard protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation. *J Appl Toxicol.* 2013; 33: 1241-1250
- 40) Onoue S, Hosoi K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Nakamura K, Ohno Y, Kojima H: Intra-/inter-laboratory validation study on reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation using two different solar simulators. *Toxicol In Vitro.* 2014; 28: 515-523
- 41) Russell WMS, Burch RL: The Principles of Humane Experimental Technique. Available at: [http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane\\_exp/het-toc](http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc) (令和4年5月1日現在)
- 42) 医薬部外品・化粧品の安全性評価における代替法ガイドライン: Available at: <https://www.pmda.go.jp/review-services/drug-reviews/about-reviews/q-drugs/0002.html> (令和4年5月1日現在)
- 43) 日本動物実験代替法学会. Available at: <http://www.asas.or.jp/jsaae/> (令和4年5月1日現在)
- 44) 小野 宏: 動物実験代替法開発過程における評価試験－特に毒性試験代替法の有用性確認(バリデーション)について－, 大野忠夫 編著「動物実験代替法マニュアル」東京: 共立出版, 1994. 123-133
- 45) 小野 宏: 代替法のバリデーションのあり方について. 組織培養. 1996; 22: 207-210
- 46) 小野 宏: 急性毒性試験法ガイドラインの改定とその意義. *J Toxicol Sci.* 2003; 28: 53-62
- 47) WC6 proceeding, AATEX 14, Special Issue (2008). Available at: [http://www.asas.or.jp/jsaae/jsaae/WC6\\_PC.html](http://www.asas.or.jp/jsaae/jsaae/WC6_PC.html) (令和4年5月1日現在)
- 48) FDSC. Available at: <https://www.fdsc.or.jp/>