

# 「代替法の利用」のための考え方の整理、提案

国立医薬品食品衛生研究所  
高木 篤也



国立循環器病研究センター  
塩谷 恭子



## 目 的

「代替法の利用」の現状、考え方や課題を整理し、厚生労働省管轄の研究機関等が今後どのような考え方で代替法に対応すればよいかを提案していく。

## 方 法

1. 文献等の調査により、代替法の利用に関する現状について把握するとともにJaCVAMや日本動物実験代替法学会等の取り組みについて把握する。
2. OECDガイドライン、ICH等の情報を収集し国内外の状況を整理する。
3. 得られた各種情報について、分析・整理することで、「今やるべきこと」を認識して、そこにたどり着くための「考え方」をまとめる。

# 代替法の分類

カテゴリー	説明
完全な代替	完全な代替は、いかなる実験動物の使用を回避する。これには、人間のボランティア、組織と細胞、数学的モデルとコンピューターモデル、および樹立された細胞株の使用が含まれる。
部分的な代替	部分的な代替には、現在の科学的思考に基づいて、苦痛を経験することができると考えられていないいくつかの動物の使用が含まれる。これには、ショウジョウバエ、線虫、細胞性粘菌などの無脊椎動物、および未成熟な形態の脊椎動物が含まれます。部分的な置換には、この目的のためだけに殺された動物から採取された初代細胞（および組織）の使用も含まれます（つまり、苦痛を引き起こす科学的手順で使用されていない）。
	NC3Rs(英国国立3Rs代替法センター)ホームページより

# 代替法は何から何へ置き換えるのか？

何から？

日本： 哺乳類、鳥類及び爬虫類、及びこれら以外

英国： 脊椎動物に加えて頭足類（タコ、イカ等）

米国EPA： 脊椎動物

Russell & Burch： 脊椎動物

ボローニャ宣言： 実験動物

# 何へ？

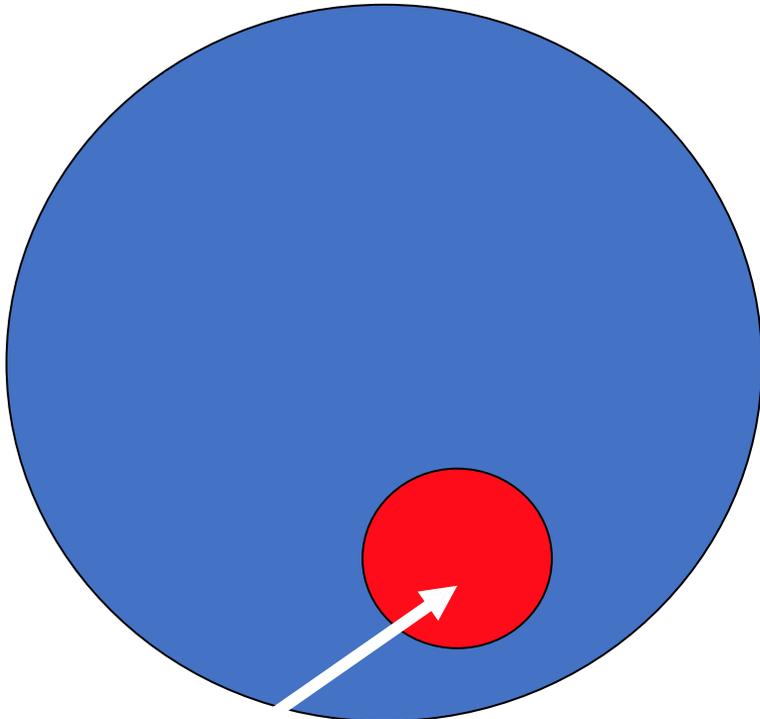
## 代替法の定義における置き換え先生物の比較

カテゴリー	説明
RussellとBurch	我々は、実験の歴史の中で、意識のある生きた脊椎動物を使用する方法に取って代わる可能性のある、非感覚的な材料を使用するあらゆる科学的方法に対して、「置換技術」という用語を使用するものとする。この非感覚物質の中には、高等植物、微生物、および神経系と感覚系がほとんど萎縮している、より退化した後生動物の内部寄生虫が含まれる。
英国3Rセンター	部分的な置換には、現在の科学的思考に基づいて、苦痛を経験することができると考えられていないいくつかの動物の使用が含まれる。これには、ショウジョウバエ、線虫、社会的アメーバ（細胞性粘菌）などの無脊椎動物、および未成熟な形態の脊椎動物が含まれます。部分的な置換には、この目的のためだけに殺された動物から採取された初代細胞（および組織）の使用も含まれる。
日本動物実験代替法学会	動物を用いる試験を、動物を用いない、あるいは系統発生的下位動物を用いる試験法により代替すること。
ボロニア宣言(1999)	知覚機能の乏しい、より低級動物の使用(例、無脊椎動物、植物、微生物)
OECD(2005)	動物実験を非動物系または系統発生的に低い種を使用するものに置き換えること。

# 無脊椎動物への代替についての考え方の違い

Russell & Burch

無脊椎動物

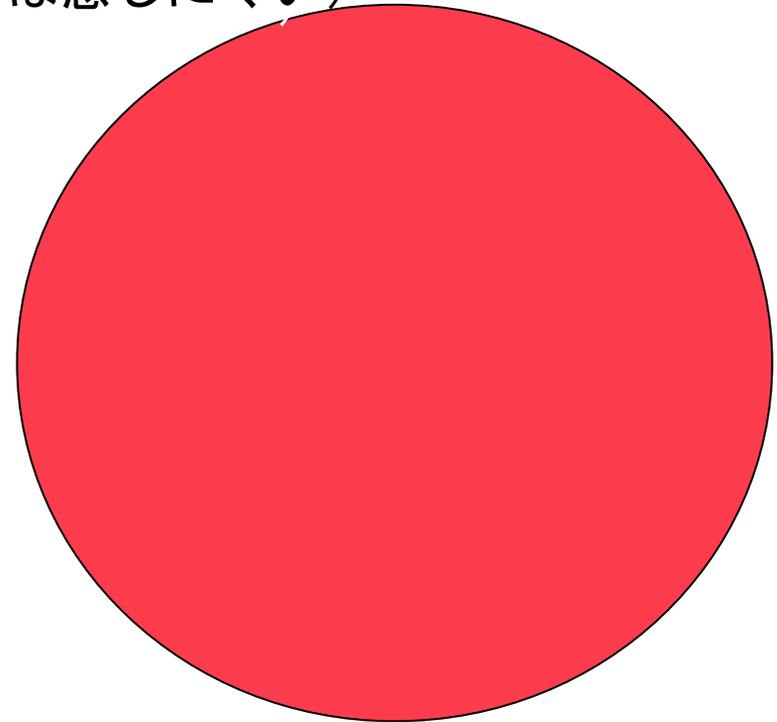


神経系と感覚系がほとんど萎縮している、より退化した後生動物の内部寄生虫

営利目的でのご利用はご遠慮ください。

英国、ボローニヤ宣言

無脊椎動物（＝苦痛を感じない、あるいは感じにくい）



# OECD、日本動物実験代替法学会

動物を用いる試験を、動物を用いない、あるいは**系統発生的下位動物**を用いる試験法により代替すること。

代替？

日本ウナギ

下顎あり



ヤツメウナギ

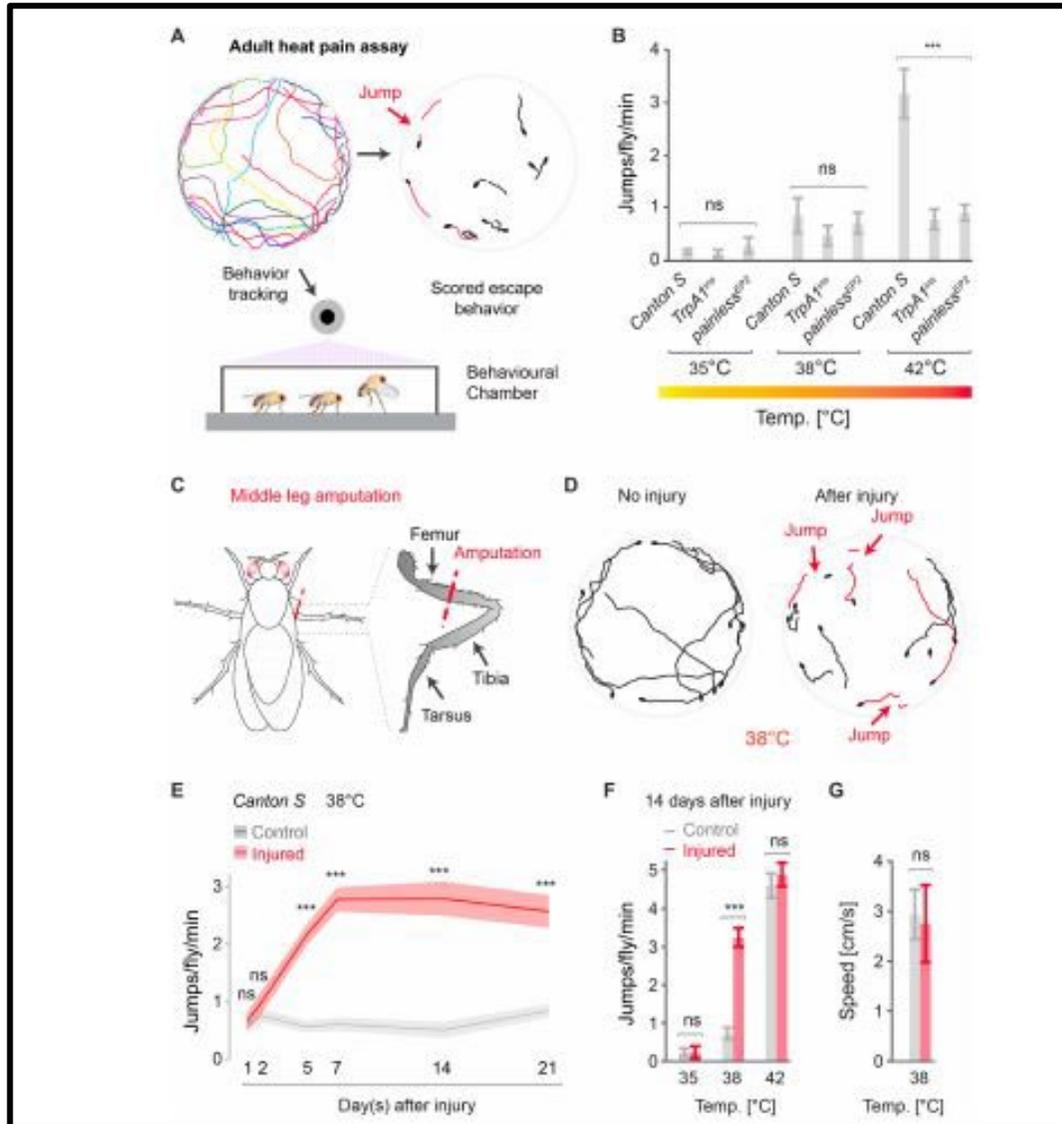
下顎なし

**Russell & Burchの考え方に基づくと、代替先として肝要なのは系統発生的下位動物を用いることではなく、苦痛を感じないと想定される生物を用いることである。**

**Tannenbaumらは代替法を含む3Rsの現在の定義がRussellとBurchの元の定義と乖離している場合、これらの定義は慎重に検討されるべきであると提唱している**

**（Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose J Am Assoc Lab Anim Sci. 2015 Mar;54(2):120-32.）。**

# Drosophilaが痛みを感じている可能性を示唆する最近の報告



Nerve injury drives a heightened state of vigilance and neuropathic sensitization in *Drosophila*  
 Thang M. Khuong et al. *Sci. Adv.* 2019; 5 : eaaw4099 10 July 2019



## SCAWの苦痛の分類

カテゴリーA：

生物個体を用いない実験あるいは植物，細菌，原虫，又は無脊椎動物を用いた実験。

生化学的研究，植物学的研究，細菌学的研究，微生物学的研究，無脊椎動物を用いた研究，組織培養，剖検により得られた組織を用いた研究，屠場から得られた組織を用いた研究。発育鶏卵を用いた研究。無脊椎動物も神経系を持っており，刺激に反応する。従って無脊椎動物も人道的に扱われなければならない。

# AVMA（アメリカ獣医師会）Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition

## 飼育下の無脊椎動物

吸入麻酔薬の過剰摂取は、注射剤が利用できない陸生無脊椎動物の条件で許容されます。多くの種の死を確認するため無脊椎動物は難しい場合があります、その後安楽死の補助的な方法を使用することをお勧めします。

二酸化炭素は、一部の陸生無脊椎動物の安楽死に役立つ可能性があります、その有効性を確認するには追加情報が必要です。

## 中間まとめ

- 動物実験代替法には完全な代替と部分的代替がある。
- 実験動物の対象は各国で部分的に異なるが、脊椎動物は共通して含まれる。
- 無脊椎動物の扱いについてRussell & Burchと現代の考え方に乖離がある。
- 無脊椎動物の苦痛に対する感受性については研究段階であるが、取り扱いには人道的配慮（安楽死時の麻酔薬の使用等）が求められる。

表4 動物実験代替法に関するOECDテストガイドライン

分類	試験法
皮膚腐食性試験	CORROSITEX Skin Corrosivity Test :TG435
	In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method :TG431
	In vitro skin corrosion : Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER) :TG430
皮膚刺激性試験	In vitro reconstructed human epidermis (RhE) test methods, EpiDerm, EPISKIN, SkinEthic LabCyte EPI Model : TG439
光毒性試験	3T3 NRU Phototoxicity Test :TG432
眼刺激性試験	Reconstructed human Cornea like Epithelium ( RhCE ) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage:TG492
	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 Fluorescein Leakage (FL) test method: TG460
	Fluorescein Leakage (FL) test method: TG460
	Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method :TG438
	Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method :TG437
	Eye Irritation/ Corosion TG405
皮膚感作性試験	Nonradioactive LLNA protocol, LLNA:DA :TG442A
	Nonradioactive LLNA protocol (LLNA: BrdU ELISA) :TG442B
	In Chemico Skin Sensitisation Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA): TG442C
	In Vitro Skin Sensitisation ARE Nrf2 Luciferase Test Method :TG442D
	In Vitro Skin Sensitisation h CLAT :TG442E
	Updated Murine local lymph node assay (LLNA) for skin sensitization :TG429
単回投与毒性試験	Inhalation toxicity acute toxic class method : TG436
	Up and Down Procedure (UDP): TG425
	Acute Toxic Class Method (ATC) : TG423
	Fixed Dose Procedure (FDP) : TG420
内分泌かく乱スクリーニング	Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Androgen Receptor Test Performance Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor ( hrER ) In Vitro Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity :TG493
	H295R Steroidogenesis Assay :TG456
	Performance Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor AgonistsTest TG455
遺伝毒性試験	In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene : TG490
	In vitro micronucleus test : TG487
	In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test : TG473
	Bacterial Reverse Mutation Test : TG471
経皮吸収試験	Skin Absorption:In Vitro Method :TG428

# Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)

表6 JaCVAM

経緯	平成17年(2005年)11月 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にJaCVAM(日本動物実験代替法評価センター)を設置
目的	化学物質等の業務関連物質の安全性評価において、国民の安全を確保しつつ、動物実験に関する3Rs(Reduction:削減、Refinement:苦痛の軽減、Replacement:置き換え)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。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及び審査、化粧品基準の改正並びに化学物質、農薬の適正な規制等にも寄与する。
業務	1.業務関連物質の安全性に係る試験法の有用性とその限界及び行政試験法としての妥当性についての評価する。 2. それに必要なバリデーションを実施するとともに、関連分野における国内及び国際協力並びに国際対応に携わる。

表15 バリデーション実行委員会が行う主な確認事項		
基準	確認項目	確認時期
バリデーションの 必要性確認	試験法の定義(目的, 科学的根拠, 行政的な根拠)	バリデーション開始前
	試験法の指標の妥当性	
	開発者の背景情報	
	バリデートされるプロトコル	
	予算確保	
バリデーション開始	バリデーション実行委員会の設立	バリデーション開始時
	プロジェクト計画の作成	
	化学物質リストとin vivoデータ	
	データ入力フォーマットと記録用紙原本の用意	
	参加施設の選別	
施設間での技術移転性	プロトコルのデータ採用基準	プレバリデーション
	プロトコルの技術的な問題点	
	参加施設の再選抜(基準を満たす施設)	
施設内再現性	再現性80%基準を満たすデータ採用基準および予測モデル	プレバリデーション
	プロトコルの技術的な問題点	
	データの信頼性確認	
施設間再現性	再現性80%基準を満たすデータ採用基準および予測モデル	バリデーション
	プロトコルの技術的な問題点	
	データの信頼性確認	
予測性(正確度)	感度80%, 特異度70%以上の予測モデル	バリデーション
	基準を満たさない場合の原因解析	
	データの信頼性確認	
適用範囲	感度95%, 特異度65%以上の基準を満たす化学物質の範囲	バリデーション実験終了後
	習熟度確認物質の設定	
結論	バリデーション報告書	バリデーション実験終了後 第三者評価
	すべての記録	
	最終プロトコルの確定	

# 予測性評価指標

表16 予測性評価指標				
		試験物質		
		陽性	陰性	
代替法の試験結果	陽性	真陽性(A)	偽陽性(B)	陽性予測率(positive predictive value)= $A/(A+B)$ 真陽性の数/代替法試験結果陽性の数
	陰性	偽陰性(C)	真陰性(D)	陰性予測率(negative predictive value)= $D/(C+D)$ 真陰性の数/代替法試験結果陰性の数
		感度(sensitivity)= $A/(A+C)$ 陽性物質を陽性と判定する能力	特異性(specificity)= $D/(B+D)$ 陰性物質を陰性と判定する能力	
精度(accuracy)= $(A+D)/(A+D+B+C)$ ; 総合判定能力				
計算例: 皮膚刺激性陽性 60物質、皮膚刺激性陰性 40物質について代替法を実施した結果、 代替法で陽性60化合物中45化合物が陽性だった場合は、感度は45/60で75%と算出される。 代替法で陰性40化合物中20化合物が陰性だった場合は、特異性は20/40で50%と算出される。 精度は(20+45)/100で65%と算出される。				

表9 JaCVAMで現在進行中の試験法

分類	試験名
皮膚刺激性試験	ヒト皮膚試験LbL法(LbL-3D Sin SIT)
光毒性試験	表皮試験
眼刺激性試験	SIRC-CVS:TEA法
皮膚感作性試験	IL8 Lucアッセイ
	SENS-IS法
	GARDskin法
	kDPRA
	EpiSensA
遺伝毒性試験	Pig-aアッセイ
	ヒト表皮モデル(EpiDermTM)を用いる小核試験
内分泌かく乱物質スクリーニング	ER-CALUX法
	ヒト組換えエストロゲン受容体(hrER) in vitro 試験
発生毒性予測試験	Hand1-Luc EST
代謝・薬物動態試験	CYP誘導法
	PBKモデル法
免疫毒性試験	IL-1 $\beta$ Lucアッセイ
形質転換試験	Bhas 42アッセイ
	Balbアッセイ
発熱性物質試験	<i>In vitro</i> PBMC法
口腔粘膜刺激性試験	EpiOral法 <sup>TM</sup>

## 動物実験代替法の現状

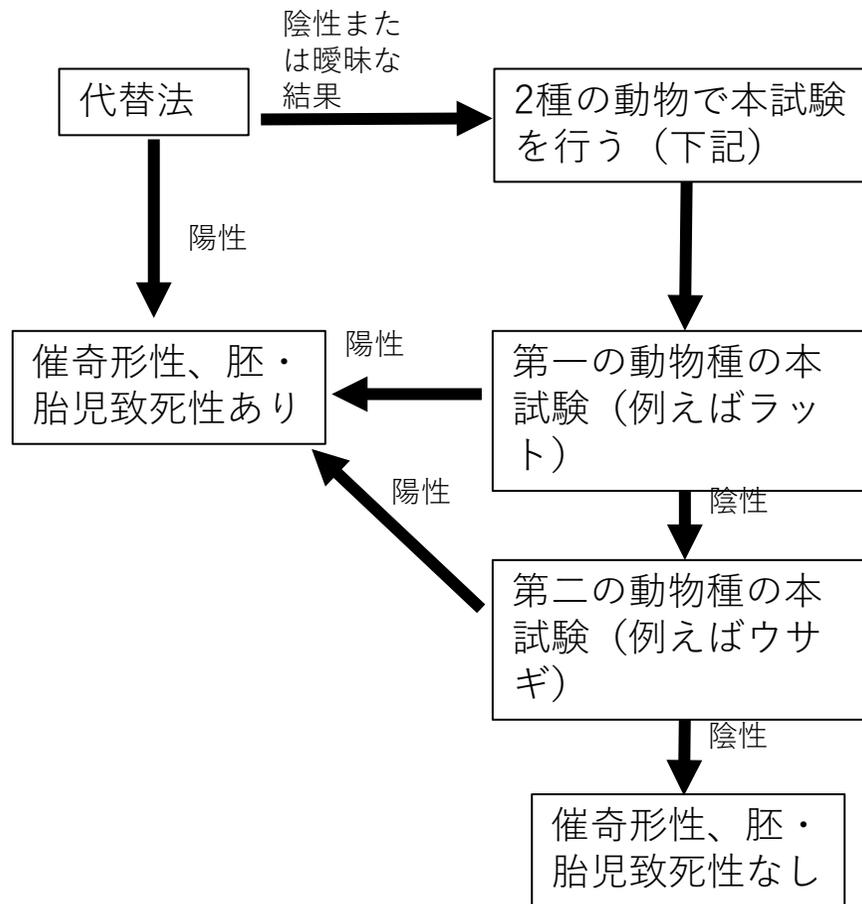
代替法はこれまでに皮膚刺激性、眼刺激性および皮膚感作性といった局所に対する毒性を中心に開発され、安全性評価に使用されているが、全身毒性を評価する代替法はいまだ十分に確立されていない。

→ 複数の機序により生じる可能性のある毒性を単一の代替法により置き換えることには無理がある

# ICH5 (R3) 医薬品の生殖発生毒性試験のガイドライン

図2-1

代替法の利用例1 ークラス、作用機序から催奇形性、胚・胎児致死性が高く予測される医薬品の場合



→ 代替法を動物実験と組み合わせて行うことが有用である

## 結 論

1. 代替法はこれまでに皮膚刺激性、眼刺激性および皮膚感作性といった局所に対する毒性を中心に開発され、安全性評価に使用されているが、さらなる精度の向上やより適用範囲の広い試験法が望まれる。
2. 全身毒性を評価する代替法はいまだ十分に確立されていない。急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性等を評価できる動物実験代替法の開発、発がん性、生殖発生毒性、呼吸器感作性を評価できる動物実験代替法の開発が待たれる。
3. 行政的な有効性、安全性、及び毒性試験の場合においては、バリデーションされた代替法を提供することを目指した研究が奨励される。

4. 現在の代替法の定義にはRusselとBurchの定義と乖離があり、現在の定義について慎重な検討を求める意見があった。

5. 複数の機序により生じる可能性のある毒性を単一の代替法により置き換えることは容易ではないと思われることから、用いる代替法の限界を認識するとともに、段階的な試験戦略や複数の試験を統合した試験スキームの開発（フローチャート）やその評価及び最適化についての研究が推奨される。

6. 「代替法の利用」の実現には、情報収集、上記バリデーションの実施や動物実験との組み合わせによる最適化等についての十分な検討が必要となる。動物を併用する場合には「使用動物数の削減」、「苦痛の軽減」など他の3Rsの項目と三位一体となって推進する必要がある。