

## 細胞を用いた動物実験代替法試験

### はじめに

安全性試験とは、化学物質等の生体に対する不利益な影響を評価する試験です。例えば、試験対象を経口摂取したときの毒性を調べる急性経口毒性試験、皮膚に接触したときの刺激性を調べる皮膚刺激性試験、眼に入ったときの刺激性を調べる眼刺激性試験などがあります。身の回りの全てのものが試験対象となり得る、私達にとって身近な試験です。

この安全性試験は、古くからマウス、ラット、ウサギといった実験動物が用いられてきましたが、近年では動物福祉の観点から、動物を用いない手法(動物実験代替法、以下「代替法」という。)が多く開発されており、化粧品業界を中心に活発に利用されています。今回は、将来的に安全性試験のトレンドとなり得る代替法についてご紹介いたします。

### 代替法とは

代替法とはどのような試験を指すのでしょうか。

日本では動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号)が2005年に改正され、実験動物の愛護に関する基本理念である3Rs<sup>1)</sup>原則の概念が盛り込まれました。3RsとはReplacement(動物を用いない方法への置き換え)、Reduction(動物使用数の削減)、Refinement(動物使用に伴う苦痛の軽減)の頭文字のRをとったもので、イギリスのRussellとBurchによって1959年に提唱されました。代替法とは、これら3つのRのうち、Replacementを満たす、つまり動物を用いない方法に置き換えされた安全性試験を指すことが一般的となっています。

### 代替法の種類

日本国内、国外を問わず、様々な代替法が開発されています。国際的に合意された化学物質の試験法集であるOECDテストガイドライン<sup>2)</sup>に記載された代替法を例に、どのような試験方法があるのかをご紹介します。

- ・皮膚刺激性/腐食性試験…OECD TG431, 435, 439
- ・眼刺激性/腐食性試験…OECD TG437, 438, 460, 491, 492, 494
- ・光毒性試験…OECD T432
- ・皮膚感作性試験…OECD TG442C, 442D, 442E

上記のうちOECD TG431, 439及び492では図-1に示した三次元培養モデルを用います。これは直径1cmほどの小さなカップの底にヒト由来の細胞を播種、培養したものです。このほかにも、OECD TG437はウシ摘出角膜、OECD TG438はニワトリ摘出眼球を用いる等、様々な種類の試験法があります。



図-1 三次元培養モデル

## 実際の試験例

動物試験と代替法について、皮膚刺激性試験を例にご紹介いたします。

動物を用いる皮膚刺激性試験のガイドラインである OECD TG404 では、試験対象品をウサギやモルモットの皮膚に貼付し、一定時間経過した後に除去します。その後、皮膚がどのくらい赤くなったか(発赤)、腫れたか(浮腫)を観察し、刺激性の強さを点数化します。非常に軽度な紅斑は1点、はっきりした紅斑は2点のように定められています。この点数に基づき、皮膚刺激性の程度を判定します。

一方、皮膚刺激性試験の代替法である OECD TG439 では、動物の代わりに三次元培養モデルを用います。図-2 に試験方法の概要を示します。まず三次元培養モデル上に試験対象品を適用し、一定時間培養した後、洗い流します。陰性対照物質(刺激性が無いことが分かっている、水などの物質)も同様に適用し洗い流します。その後、生存している細胞内でのみ発色する試薬を用いて染色させます。さらに有機溶媒で発色した色素を抽出し、吸光度を測定します。陰性対照物質を適用した三次元培養モデルの細胞生存率を100%としたとき、試験対象品を適用した三次元培養モデルの細胞がどの程度生存しているかを吸光度の比率で計算し、細胞生存率とします。試験対象品の細胞生存率が基準より高ければ「非刺激性」、低ければ「刺激性」と判定します。刺激性がまったくない(陰性対照物質と同程度である)場合は、細胞生存率は理論上100%となります。また、陽性対照物質(刺激性と判定されることが分かっている物質)を同時に適用し、細胞生存率が基準より低い値であれば、試験が正しく実施されていることが担保されます。

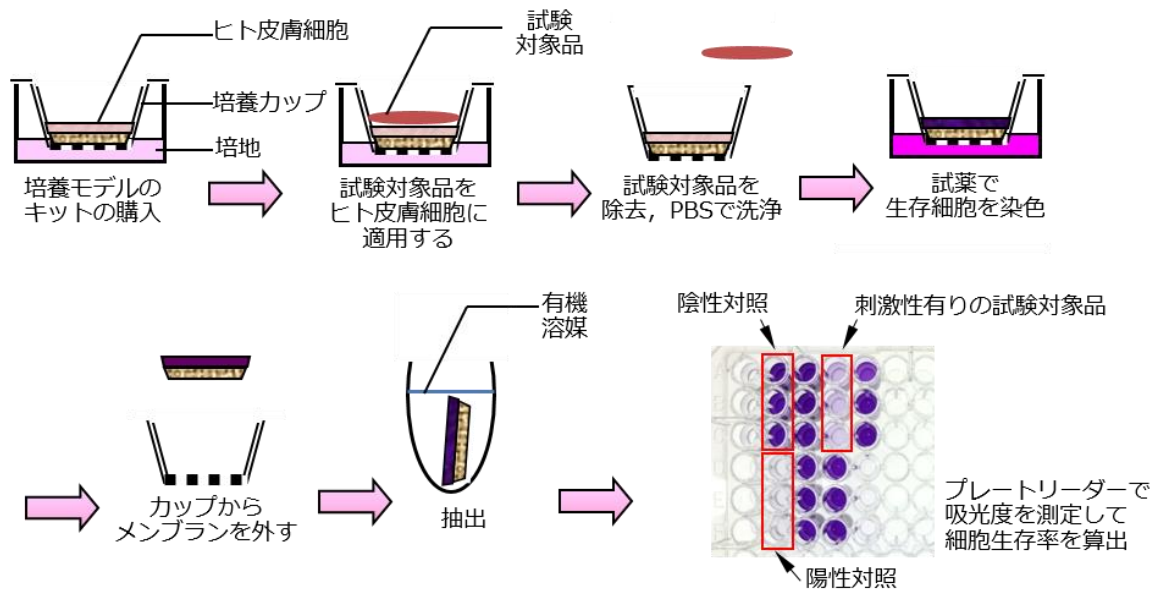


図-2 OECD TG439 皮膚刺激性試験の概要

## 代替法の利用場面

### ①安全データシートの作成

代替法は様々な場面で利用可能です。その中の一つに、安全データシート(以下「SDS」という。)に掲載する安全性データの取得用途があります。SDSとは、化学物質および化学物質を含む混合物を譲渡または提供する際に、その化学物質の物理化学的性

質や危険性・有害性及び取扱いに関する情報を，化学物質等の譲渡先に提供するための文書です。日本工業規格 JIS Z 7253：2019 「GHSに基づく化学品の危険有害性情報の伝達方法ーラベル，作業場内の表示及び安全データシート(SDS)」によって書式や内容が定められており，皮膚刺激性試験や眼刺激性試験といった安全性データが含まれます。SDSにおいて，安全性に関する情報は，世界で統一された危険有害性の分類方法である「GHS(化学品の分類及び表示に関する世界調和システム)」に従って記載することとなっており，代替法はこの GHS で使用を認められています。

## ②業界自主基準の認証取得

代替法は SIAA マーク(抗菌製品技術協議会，図-3)，SEK マーク(繊維評価技術協議会，図-4)といった，業界自主基準の認証取得のための安全性データ取得にも利用可能です。申請のためには，安全性試験の一つとして皮膚刺激性試験のデータが必要です。OECD TG439 の利用が認められており「非刺激性」の結果が求められます。



図-3 SIAA マーク

出典 <https://www.kohkin.net/>



図-4 SEK マーク

出典 <http://www.sengikyo.or.jp/>

## ③行政への届出

行政への届出が必要な試験対象品の場合，安全性試験のデータ取得の手段として，これまでは過去の実績が多い動物試験のみが許容されるケースが多くありました。しかし近年では，行政により受入可能とされる代替法の幅が広がりつつあります。

例えば眼刺激性試験(OECD TG437, 438, 491, 492)，皮膚感作性試験(OECD TG442C, 442D, 442E)，光毒性試験(OECD TG432)，経皮吸収試験(OECD TG428)は，医薬部外品及び化粧品の製造販売の承認申請書に添付する安全性に関する資料の作成のための利用が行政のガイダンスにより認められています(2020年5月時点)<sup>3)</sup>。また，毒物及び劇物取締法(昭和25年法律第303号)における毒物劇物の判定基準(平成29年6月13日薬生薬審発0613第1号)においても，毒物劇物からの除外申請のための試験に皮膚刺激性試験(OECD TG439)，皮膚腐食性試験(OECD TG431)，眼刺激性試験(OECD TG437, 438, 460, 491)が有効な代替法として例示されました。

## 代替法を実施する上での注意点

代替法の注意点として，分類可能な GHS 評価のカテゴリーが動物試験と比べ少ないことが挙げられます。皮膚刺激性試験の GHS 分類(図-5)を例に挙げると，動物試験では区分1(腐食性)，区分2(刺激性)，区分3(軽度の刺激性)，区分に該当しない(非刺激性)に分類することが可能です。一方，代替法では，OECD TG439 により「区分1または区分

2」と「区分3または区分に該当しない」の2つのカテゴリーの分類のみが可能です。OECD TG439を実施して「区分1または区分2」の結果となった場合、どちらの区分に該当するかを調べるためには追加試験(OECD TG431)を実施する必要があります。

動物試験		GHS分類	代替法	
TG404 皮膚刺激性/腐食性試験	TG404 皮膚刺激性試験		TG431 皮膚腐食性試験	TG439 皮膚刺激性試験
区分1A	区分1	区分1A	区分1(腐食性)	区分1または2 (刺激性)
区分1B		区分1B		
区分1C		区分1C		
区分2	区分2	区分2	区分2, 3または 区分に該当しない (非腐食性)	区分3または 区分に該当しない (非刺激性)
区分3	区分3	区分3		
区分に該当しない	区分に該当しない	区分に 該当しない		

図-5 皮膚刺激性/腐食性試験の GHS 分類

また、一部の試験法には試験対象品の適用限界があります。例えば、OECD TG439では試験対象品の性状として液体、半固体(ペースト状)、固体(粉末状に粉砕する)の適用が可能です。布、糸といった繊維状の試験対象品は適用範囲外のため、JIS L 1918:2011「繊維製品の皮膚一次刺激性試験方法-培養ヒト皮膚モデル法」に従います。なお、試験対象品を培養培地に均一に溶解もしくは懸濁させる必要がある試験方法も存在します。試験対象品の性質によっては試験方法の選択に制限があるため、注意が必要です。

## おわりに

動物福祉への関心は日に日に高まっており、弊財団でも皮膚刺激性/腐食性試験、眼刺激性/腐食性試験、皮膚感作性試験代替法を受託しております。代替法を用いた安全性試験をお考えの際は、弊財団までお気軽にご相談ください。

## 参考文献

- 1) 日本動物実験代替法学会ホームページ  
<http://www.asas.or.jp/jsaae/alternative/index.html>
- 2) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals  
[https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals\\_72d77764-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals_72d77764-en)
- 3) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)ホームページ、動物実験代替法について  
<https://www.pmda.go.jp/review-services/drug-reviews/about-reviews/q-drugs/0002.html>