

技術講演会「毒物劇物の判定にどう代替法を用いるか」

3. 代替法利用における留意点

高橋 祐次



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 毒性部

本日の内容

1. 有効な動物実験代替法
2. 用語説明
3. 代替法と動物実験の関係
4. 製剤の劇物からの除外申請における代替法の利用
5. まとめ

- 本発表は演者の個人的見解です
- 所属する組織の公式な見解ではありません

本日の内容

1. 有効な動物実験代替法
2. 用語説明
3. 代替法と動物実験の関係
4. 製剤の劇物からの除外申請における代替法の利用
5. まとめ

有効な動物実験代替法 1/2

1. 急性経口毒性試験

信頼性、有用性等の評価が確立した代替法は存在しない

2. 急性経皮毒性試験

信頼性、有用性等の評価が確立した代替法は存在しない

3. 急性吸入毒性試験

現在のところ、代替法は開発されていない

有効な動物実験代替法 2/2

4. 皮膚腐食性/刺激性試験

- OECD TG 430: 経皮電気抵抗試験; TER
- OECD TG 431: ヒト3次元培養表皮モデル皮膚腐食性試験
- OECD TG439: ヒト3次元培養表皮モデル皮膚刺激性試験

5. 眼等の粘膜に対する重篤な損傷

- OECD TG 437: ウシ摘出角膜を用いる混濁度及び透過性試験BCOP
- OECD TG 438: ニワトリ摘出眼球を用いる試験ICE
- OECD TG 460: フルオレセイン漏出試験FL
- OECD TG 491: in vitro短時間暴露法STE

本日の内容

1. 有効な動物実験代替法
2. **用語説明**
3. 代替法と動物実験の関係
4. 製剤の劇物からの除外申請における代替法の利用
5. まとめ

代替法に関する用語説明

- 感度・特異度/偽陽性・偽陰性
- トップダウンアプローチ/ボトムアップアプローチ

感度・特異度/偽陽性・偽陰性

—腐食性を例に—

		腐食性	
		有	無
検査	陽性	A 真陽性	B 偽陽性
	陰性	C 偽陰性	D 真陰性

感度 (sensitivity) = $A / (A + C)$

腐食性物質の検査陽性の割合

特異度 (specificity) = $D / (B + D)$

非腐食性物質の検査陰性の割合

代替法における感度・特異度・正確度

- **感度**

試験された陽性物質の中で、試験法で正しく陽性と判定されたものの割合

- **特異度**

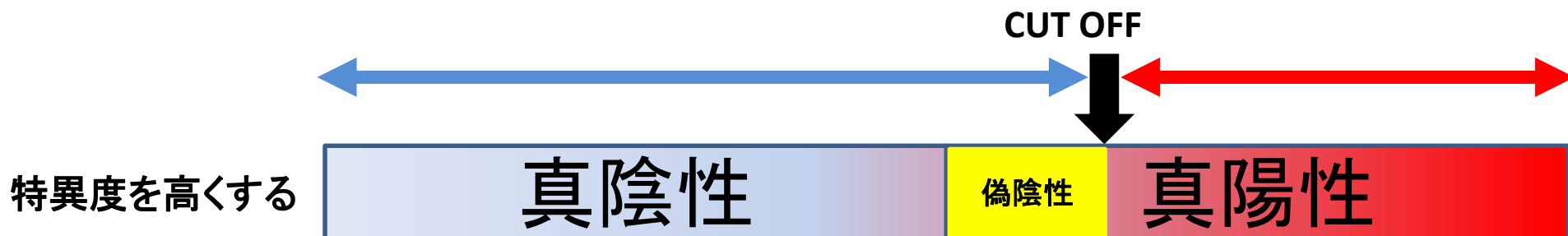
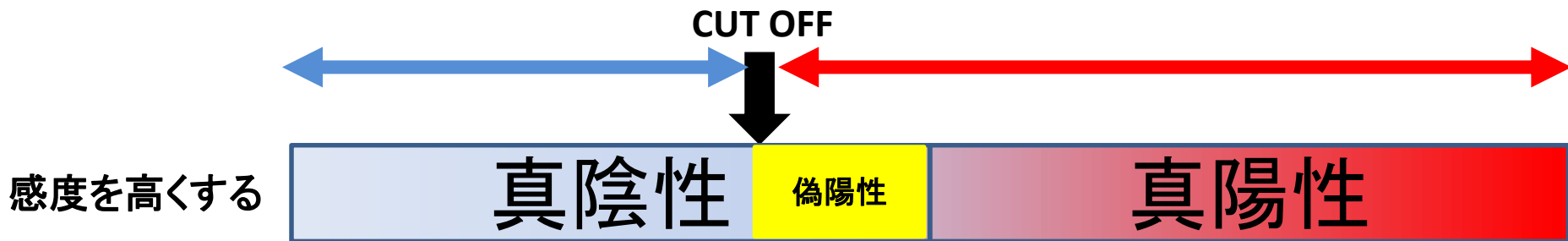
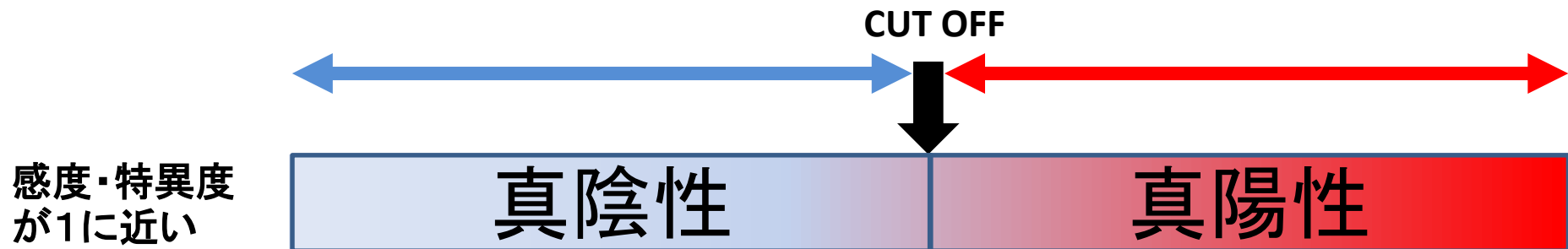
試験された陰性物質の中で、試験法で正しく陰性と判定されたものの割合

- **正確度**

被験物質について試験法で得られる結果が、被験物質の既定の参照値と類似している程度

感度と特異度はトレードオフ

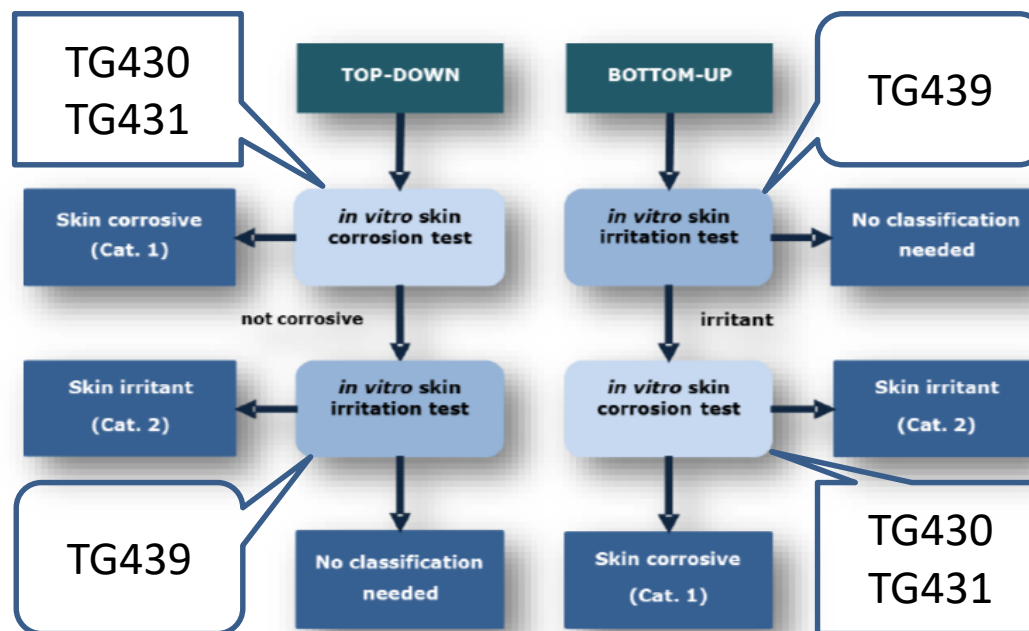
ある検査の値のパラメーター (Ex. 細胞毒性)



トップダウンアプローチとボトムアップアプローチ



Case 3: skin corrosion/irritation



Consider top-down or bottom-up approaches based on presumed properties

腐食性を有すると考えられる一般物質はTop-Downにより、刺激性のない事が前提となる化粧品はBottom-upにより評価を行い、化学物質のカテゴリーを決定する。

眼刺激性試験では...

トップダウンアプローチ:

既存の情報に基づき、強い眼刺激性がある、または眼に対する重篤な損傷性を誘発することが予想される化学品の試験を意図して設計されている

ボトムアップアプローチ:

既存の情報に基づき、刺激性物質と分類するほどの刺激性を起こさないと予想される化学品の試験を意図して設計されている

本日の内容

1. 有効な動物実験代替法
2. 用語説明
3. 代替法と動物実験の関係
4. 製剤の劇物からの除外申請における代替法の利用
5. まとめ

代替法と動物実験

- 動物実験は、人における有害性を予測するものである

動物実験 → → → 人における有害性予測

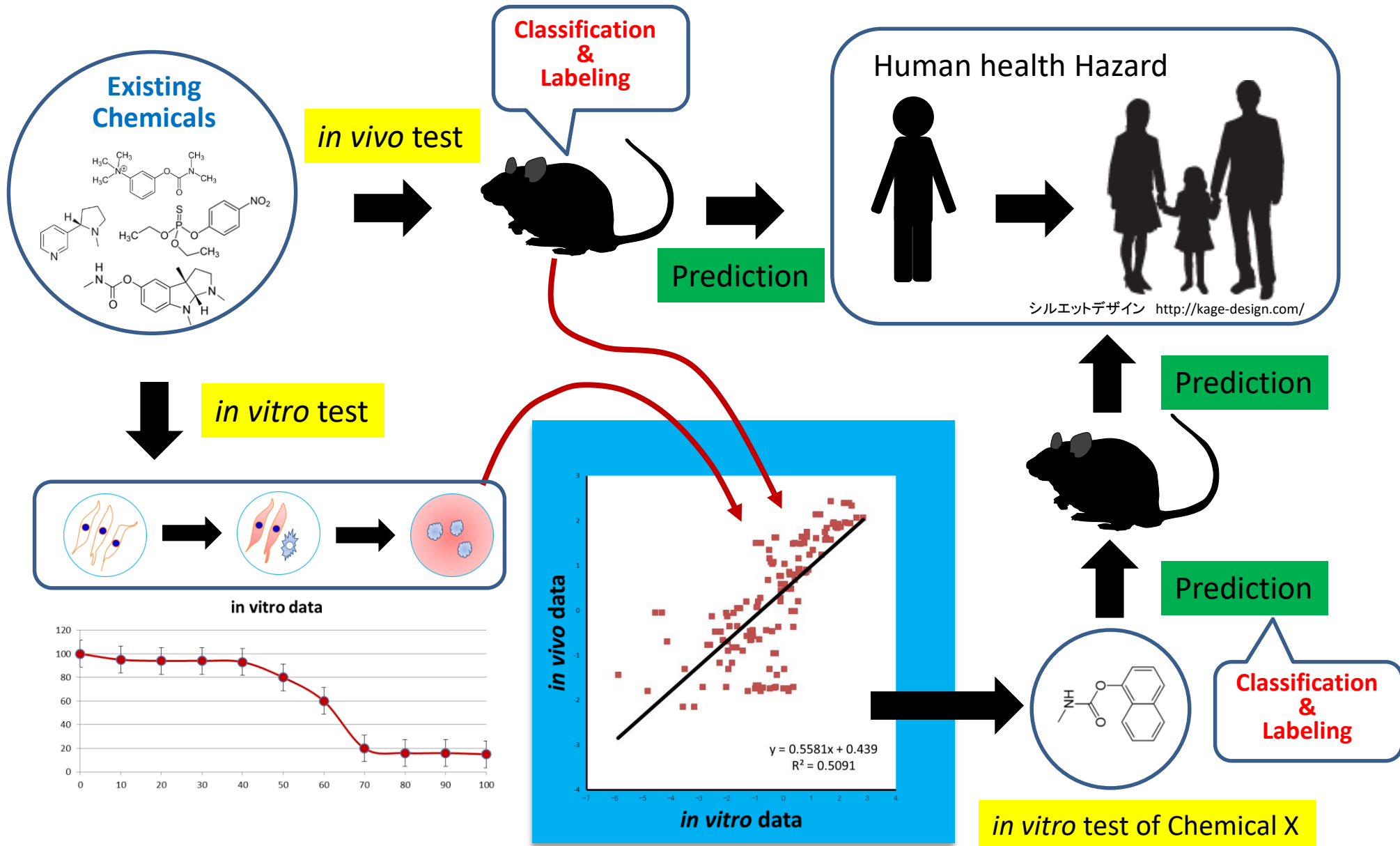
○反復投与毒性: NOAELを求め安全係数等で「安全性の指標」を求める

○急性毒性/腐食性: 化学物質の「分類とラベリング」には有効な手段(安全性の指標ではない)

- 代替法は、動物実験との相関性を基に動物実験の結果を予測するものである

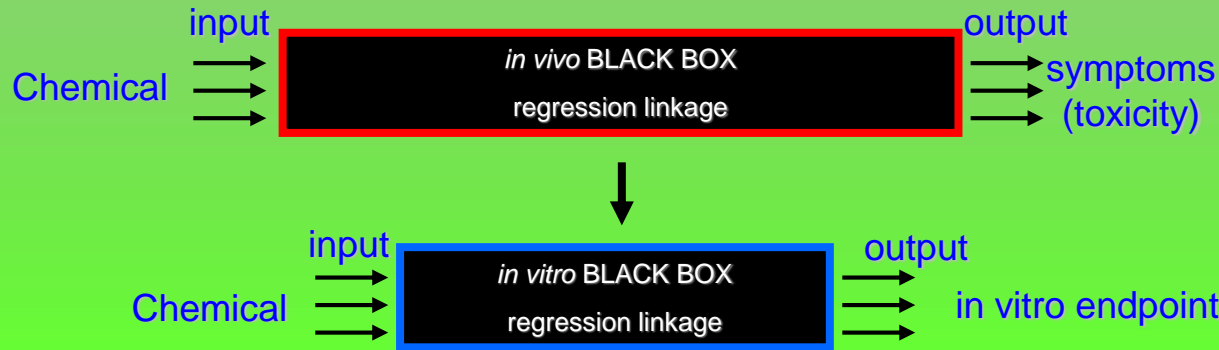
代替法 → 動物実験の予測 → → → 人における有害性予測

代替法は動物実験との相関性を根拠にしている

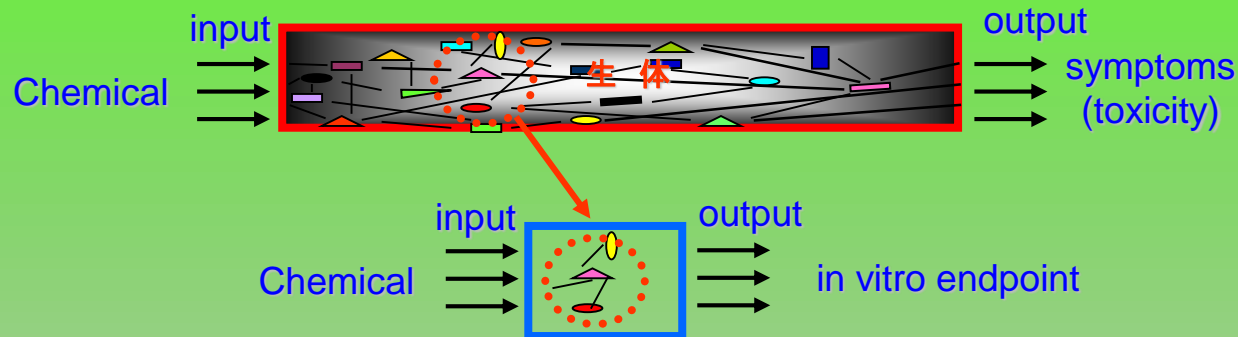


Alternative Methods

(1) Miniature BlackBox Approach



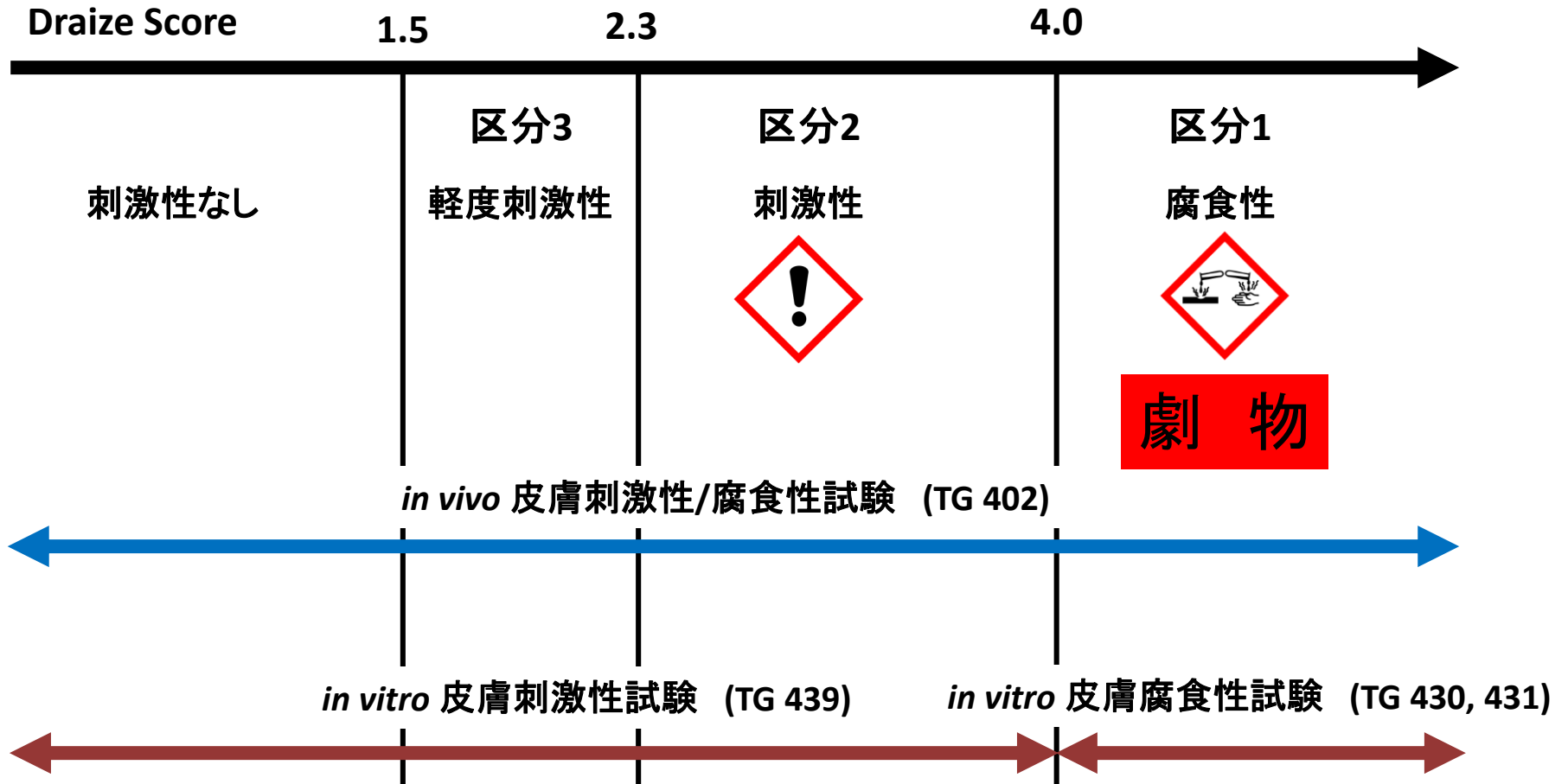
(2) in vivo mechanism Excision approach



動物愛護の立場から、無条件で動物実験を減らそうとする動きにより(1)が提唱され、行われる場合があるが、現実的に評価に利用可能な方法の開発とそのバリデーションをまで総合的に俯瞰した場合、使用する総動物数は(2)の方が少ないことが容易に想定される。

(2)を行う際には、in vivoメカニズムの部分の認定が優先する。

皮膚刺激性/腐食性試験



劇物の評価を目的とするとTG430、TG431のみで十分であるが、動物試験からの置き換えを考慮した場合、TG439を組み合わせることが必要となる。

本日の内容

1. 有効な動物実験代替法
2. 用語説明
3. 代替法と動物実験の関係
4. 製剤の劇物からの除外申請における代替法の利用
5. まとめ

2. 毒物劇物の製剤の除外に関する考え方

毒物又は劇物に判定された物の製剤について、普通物への除外を考慮する場合には、その判断は、概ね次に定めるところによるものとする。なお、製剤について何らかの知見がある場合には（1）を優先すること。

ただし、毒物に判定された物の製剤は、原則として、除外は行わない。^{※2}

（1）製剤について知見が有る場合^{※3}

①急性毒性が強いため劇物に判定された物の製剤を除外する場合は、原則として、次の要件を満たす必要があること。

（a）除外する製剤について、本基準で示された劇物の最も大きい急性毒性値（LD₅₀, LC₅₀）の10倍以上と考えられるものであること。この場合において投与量、投与濃度の限界において安全が確認されたものについては、当該経路における急性毒性は現実的な危害の恐れがないものと考えること。

（例） 経口 対象製剤 2,000mg/kg の投与量において使用した動物すべてに投与物質に起因する毒性徴候が観察されないこと。

（b）経皮毒性、吸入毒性が特異的に強いものではないこと。

②皮膚・粘膜に対する刺激性が強いため劇物に判定された物の製剤を除外する場合は、当該製剤の刺激性は、劇物相当（皮膚に対する腐食性、眼に対し重篤な損傷性又は同等の刺激性）より弱いものであること。

（例） 10%硫酸、5%水酸化ナトリウム、5%フェノールなどと同等以下の刺激性

代替法を用いる上で念頭におくべきこと

- 代替法のガイドラインを理解すること
 - 有害性を評価する方法(トップダウン)
 - 有害性が無い事を評価する方法(ボトムアップ)
- 適用限界を把握すること
 - 被験物質が正しく評価できるカテゴリーであるか
- 代替法は動物実験を完全に置き換える手法ではないこと
 - 都合の良い解釈、都合の良い方法を選択しない

TG437 牛摘出角膜の混濁および透過性試験法

BCOP法 : Bovine Corneal Opacity and Permeability Test

試験法の概略

トップダウンアプローチとして2009年にテストガイドラインとして採択、2013年にボトムアップアプローチでの眼の傷害を引き起こさない化学物質の同定法として改定された。

牛眼球から摘出した角膜に、被験物質を一定時間暴露させ、**角膜の変性の指標となる角膜混濁度と角膜上皮のバリア機能の指標となる角膜透過度**を測定し、それら測定式から計算式によって求められる**IVIS (in vitro刺激性スコア)**を基にウサギを用いたDraize法での眼刺激性を予測する代替法である。

In vitro刺激性スコア (IVIS) : $IVIS = \text{平均混濁度} + (15 \times \text{平均透過率})$

- ・液体と界面活性剤(固体または液体)の場合: 10%w/v 10分曝露
- ・非界面活性固体: 20%w/v 4時間曝露 PC:
- ・ジメチルホルムアミド、20%イミダゾール

適用限界

アルコール・ケトン類では偽陽性率が高い
偽陽性率は約23%

TG437 牛摘出角膜の混濁および透過性試験法

BCOP法 : Bovine Corneal Opacity and Permeability Test

IVIS = 平均混濁度 + (15 × 平均透過率)

- $IVIS \leq 3$: GHS区分外物質と判定
- $IVIS > 55$: GHS区分1
- $3 < IVIS < 55$: 本試験方法のみでは予測ができないため追加の試験を必要とする

BCOPにおけるIVISは、ウサギを用いたDraize法での眼刺激性を予測するための値であり、ベンチマーク化合物と比較可能な値ではない

除外申請における代替法の留意点

- 原体が代替法によって劇物として正しく評価できることを確認する
- 製剤を希釈して用いる試験系では曝露濃度が担保されていることを示すデータも必要

極低濃度では、容器等への吸着により、目的とする濃度に達していない可能性がある

例: STE法では5%、0.05%の濃度を用いる

10w/v%製剤(100mg/mL)を5w/v%で適用した場合

→原体の濃度は0.5%(5mg/mL)

10w/v%製剤(100mg/mL)を0.05w/v%で適用した場合

→原体の濃度は0.005%(0.05mg/mL)

参考: 血清中カルシウム濃度: 2.5mM(0.1mg/mL)

まとめ

- OECDの試験法ガイドライン、JaCVAM評価書を参考に適用限界を認識した上で評価する
- 多くの化学物質が対象となる毒物及び劇物の分類における代替法の利用は、評価の高速化と効率化に寄与する
- 代替法の普及のためには、実験者の正しい理解と運用が不可欠