

2017年7月、クラスターフォーラム、
タワーホール船堀(東京)

動物実験代替法(非動物試験) の国内外の現状と課題



小島 肇

The author has no conflict of interest to disclose with respect to this presentation.

第30回



The 30th Annual Meeting of
the Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments

日本動物実験代替法学会

会期 2017年11月23日(木・祝)～25日(土)

会場 大田区産業プラザ (PiO)

東京都大田区南蒲田1丁目20-20

大会長 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所

テーマ

レギュラトリーサイエンスと3Rs



池上本門寺

目次

- 動物実験の3Rs
- 昨今の国際動向
- 昨今の国内動向
- 動物を用いない代替法(*in vitro*試験)の開発

動物実験の3Rs

(Russel and Burch 1959)

○ Replacement

動物を用いない方法に置き換える

(例) *In vitro* エンドトキシン試験法

○ Reduction

動物の使用数の削減

(例) 固定用量による単回投与試験

○ Refinement

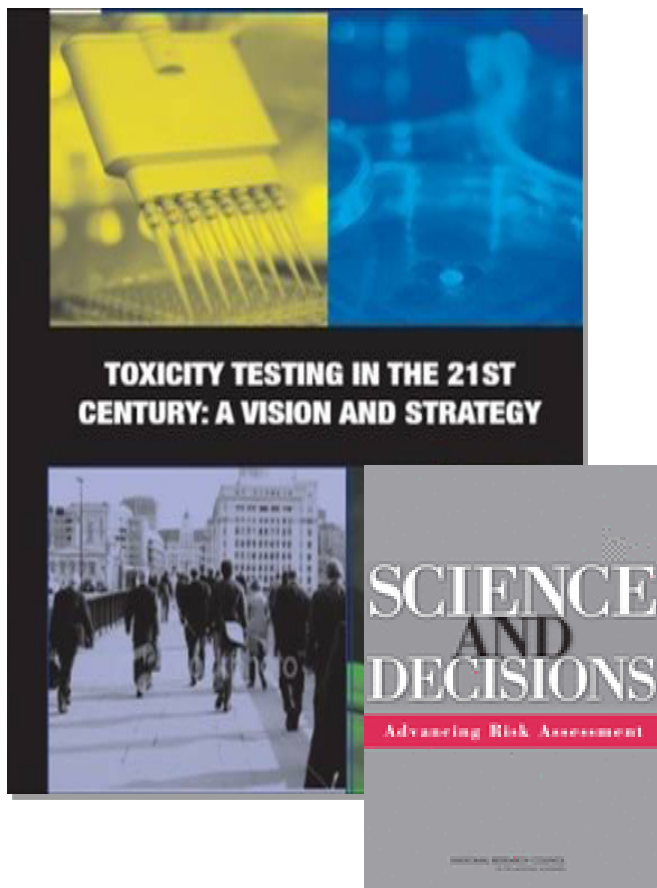
動物使用に伴う苦痛の削減

動物実験代替法

- **Alternative test = 代替法**
3R原則を実現する試験法
- **3Rs principle = 3R 原則**
使用動物数を削減すること(reduction)、実験動物の苦痛軽減と動物福祉を進めること(refinement)、および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置換すること(replacement)、という原則。

昨今の国際動向

The NTP Roadmap are consistent with the recent NAS Report



10 2007 NRC Report:

- Calls for transforming toxicology: *“from a system based on whole-animal testing to one founded primarily on in vitro methods that evaluate changes in biologic processes using cells, cell lines, or cellular components, preferably of human origin.”*
- Envisions pathway-based toxicology, where pathway perturbations are used to predict adverse effects
- **2009 NRC report:** *“the realization of the promise [of the 2007 report] is at least a decade away”*

National Research Council. 2007. Toxicity Testing in the Twenty-first Century: A Vision and a Strategy. Washington, DC: National Academy of Sciences. Available: http://books.nap.edu/catalog.php?record_id=11970

Vision

- 1) to provide broad coverage of chemicals, chemical mixtures, outcomes, and life stages
- 2) To reduce the cost and time of testing
- 3) To use fewer animals and cause minimal suffering in the animals used
- 4) To development a more robust scientific basis for assessing health effects of environmental agents

TABLE 2-1 Options for Future Toxicity-Testing Strategies

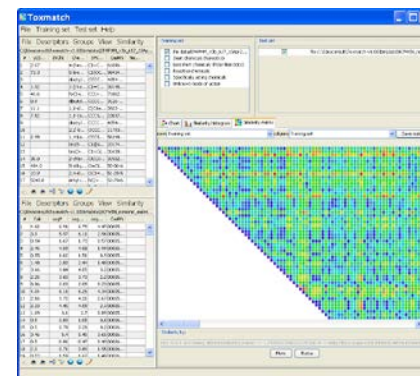
Option I In Vivo	Option II Tiered In Vivo	Option III In Vitro and In Vivo	Option IV In Vitro
Animal biology	Animal biology	Primarily human biology	Primarily human biology
High doses	High doses	Broad range of doses	Broad range of doses
Low throughput	Improved throughput	High and medium throughput	High throughput
Expensive	Less expensive	Less expensive	Less expensive
Time-consuming	Less time-consuming	Less time-consuming	Less time-consuming
Use of relatively large numbers of animals	Use of fewer animals	Use of substantially fewer animals	Use of virtually no animals
Based on apical end points	Based on apical end points	Based on perturbations of critical cellular responses	Based on perturbations of critical cellular responses
	Some screening using computational and in vitro approaches; more flexibility than current methods	Screening using computational approaches possible; limited animal studies that focus on mechanism and metabolism	Screening using computational approaches



Computational Toxicology: physicochemical and reactivity profiling of compounds/metabolites

CRAFT - Chemical Reactivity And Fate Tool

The CRAFT software interface includes a 'Reaction Type Editor' for defining chemical transformations and a 'ToxTree' for hazard estimation. The ToxTree window shows a decision tree for 'Terminal tert-butyl branch' with rules such as 'Q1 Terminal tert-butyl branch No', 'Q2 Epoxide No', and 'Q8 More than two hydroxy substituents on aromatic ring No'.



Toxmatch – Chemical grouping

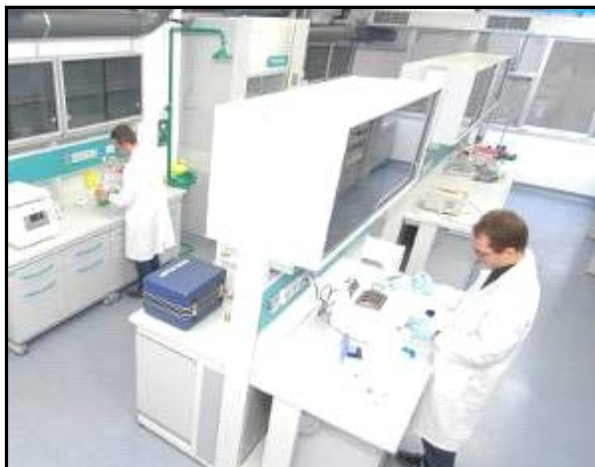
The Endocrine-Active Chemicals Database (EACD) search interface includes a search box, a chemical structure viewer, and a list of chemical groups, used for searching and identifying endocrine-active chemicals.

Endocrine-Active Chemicals Database



Toxtree – Hazard estimation

High throughput testing



Compound management

Large datasets
using the standard
metabolic competent
system



Liquid handling robot



Cell culturing



Compound Repository

NEWS EUROPE

[Home](#) | [UK](#) | [Africa](#) | [Asia](#) | [Europe](#) | [Latin America](#) | [Mid-East](#) | [US & Canada](#) | [Business](#) | [Health](#) | [Sci/Environment](#)

11 March 2013 Last updated at 17:23 GMT



EU bans sale of all animal-tested cosmetics

A complete ban on the sale of cosmetics developed through animal testing has taken effect in the EU.

The ban applies to all new cosmetics and their ingredients sold in the EU, regardless of where in the world testing on animals was carried out.

The 27 EU countries have had a ban on such tests in place since 2009. But the EU Commission is now asking the EU's trading partners to do the same.

Animal rights lobbyists said EU officials had "listened to the people".

The **anti-vivisection group BUAV and the European Coalition to End**



The search for alternatives to animal testing goes on

Related Stories

UK retains strict animal test law

化粧品の安全性評価と 動物実験における各国の状況

国名	状況	補足説明
EU	禁止	化粧品製品とその原料
イスラエル	禁止	化粧品製品とその原料
インド	禁止	2014年より輸入も禁止
中国	動物実験の廃止	2014年より一般化粧品に限る
ブラジル	禁止法案提出	サンパウロ州は禁止
米国	禁止法案提出	
オーストラリア	禁止法案提出	
韓国	一般品の動物実験の 要求なし	機能性化粧品においても代替法 の受入れを表明
日本	一般品の動物実験の 要求なし	医薬部外品においても代替法の 受入れ

資生堂、化粧品・医薬部外品における動物実験の廃止を決定

資生堂は、動物実験代替法(以下、代替法)に基づく安全性保証体系を確立し、これにより2013年4月から開発に着手する化粧品・医薬部外品における社内外での動物実験を廃止します。なお、社会に対して安全性の説明をする必要が生じた場合^{※1}は除きます。本件については、2013年2月28日開催の取締役会において決定しました。

※1 市場にある製品の成分に関して、改めてその安全性を証明する必要が生じ、そのための選択肢が動物実験しかない場合や、一部の国において化粧品の安全性保証に動物実験が不可欠となっている場合。

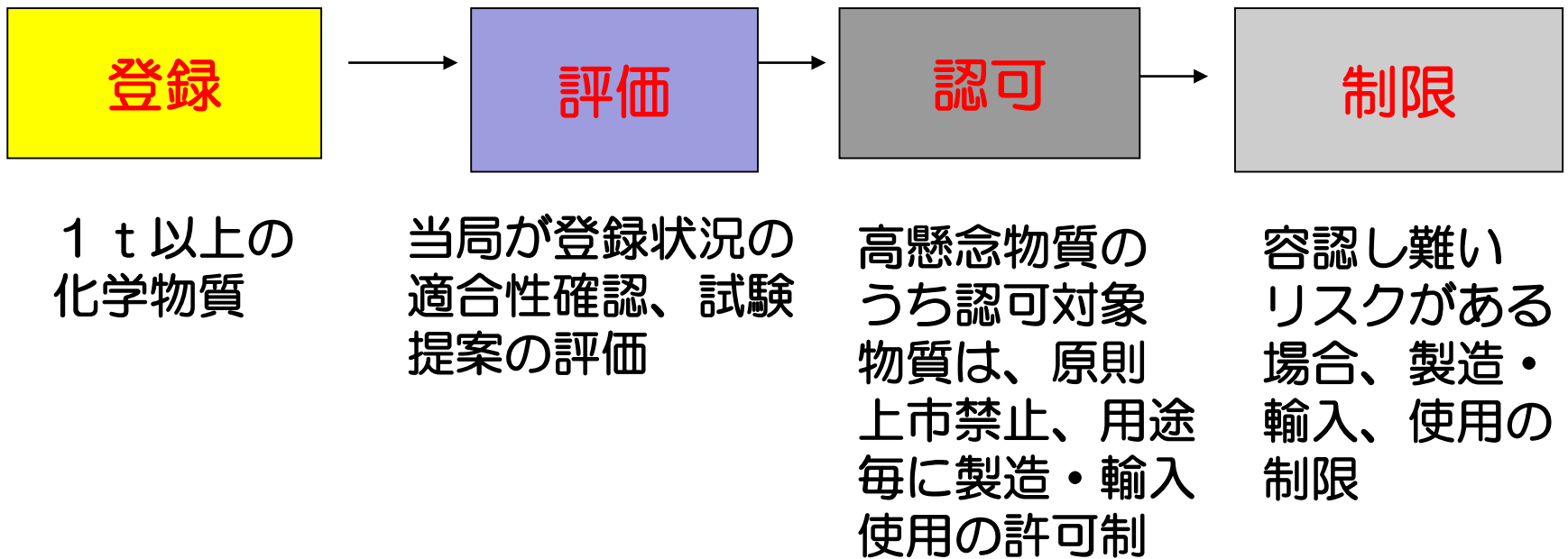
動物実験に対する考え方

マンダムは、動物実験を行わない方針で、
化粧品開発を進めています。

マンダムは、生活者の安全の確保を第一に考えて商品を開発しております。製品等の安全性確認は基本的にヒトを用いた試験（パッチテスト、ステインギングテスト等）および動物実験代替法を適用しており、外注委託を含めて動物実験は実施しておりません。今後も動物実験を行わない方針です。

これからもステークホルダーの皆様のご意見を参考にさせていただき、安全で環境にやさしい商品開発を進めてまいります。

REACHの概要



Read-Across Assessment Framework (RAAF)



REACH is a regulation of the European Union, adopted to improve the protection of human health and the environment from the risks that can be posed by chemicals, while enhancing the competitiveness of the EU chemicals industry. It also **promotes alternative methods for the hazard assessment of substances in order to reduce the number of tests on animals.**

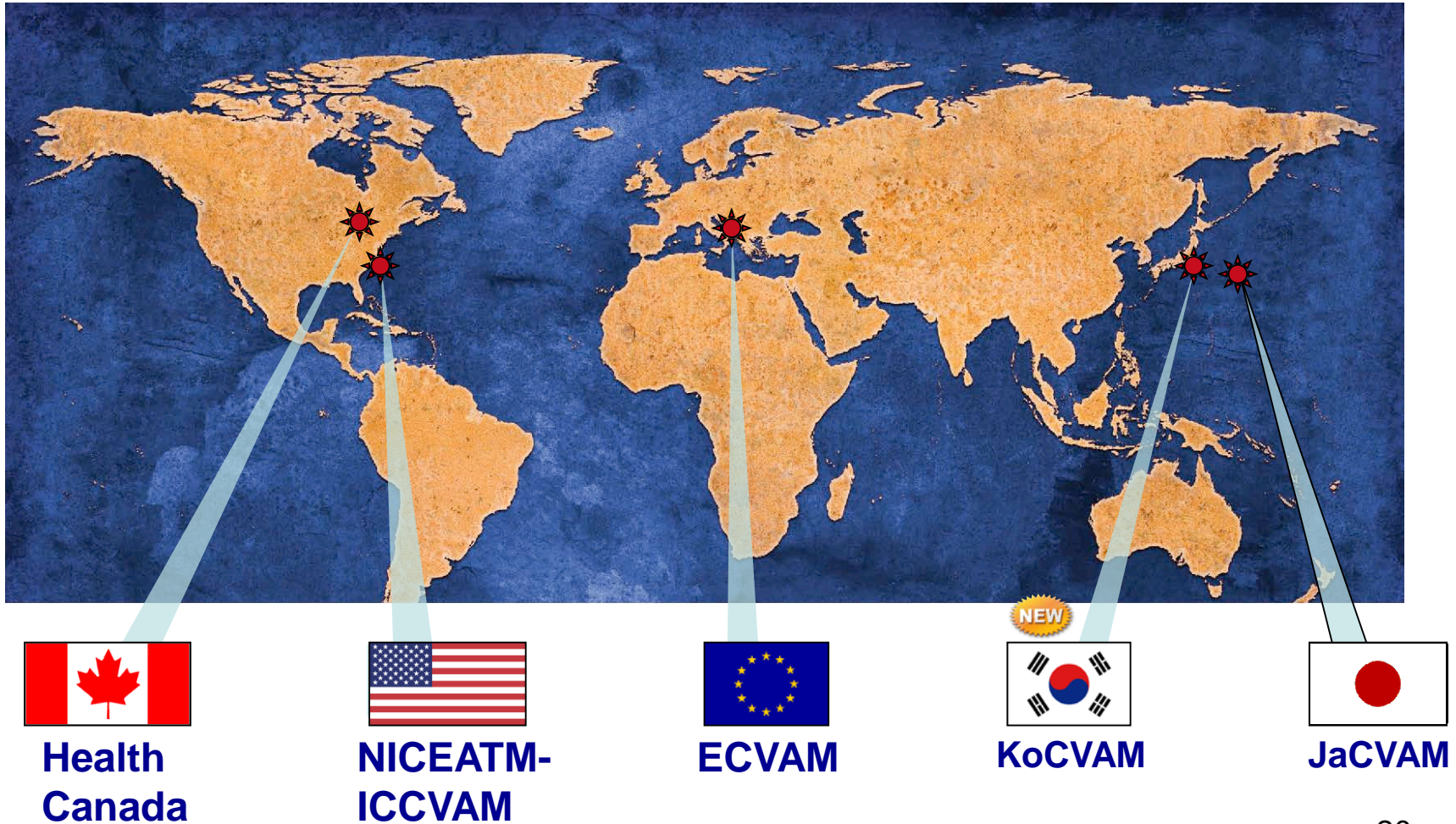
**ICCR (International Cooperation on
Cosmetics Regulations:化粧品協力規制国際
会議)と**

**ICATM (International Cooperation on
Alternative Test Methods:代替試験法協力国**



ICATM 協力関係

ICATM is a **voluntary** international cooperation of national organizations: Canada, the European Union, Japan, South Korea, and the United States.



Concordance of the Toxicity of Pharmaceuticals in Humans and in Animals

Harry Olson,¹ Graham Betton,² Denise Robinson,³ Karluss Thomas,³ Alastair Monro,¹ Gerald Kolaja,⁴
Patrick Lilly,⁵ James Sanders,⁶ Glenn Sipes,⁷ William Bracken,⁸ Michael Dorato,⁹ Koen Van Deun,¹⁰
Peter Smith,¹¹ Bruce Berger,¹² and Allen Heller¹²

¹Pfizer Inc., Groton, Connecticut; ²AstraZeneca Pharmaceuticals, Macclesfield, England; ³ILSI-HEHSI, Washington, DC, 20036; ⁴Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, Michigan; ⁵Biostrater Ingelheim Pharmaceuticals, Ridgefield, Connecticut; ⁶Rhone-Poulenc Rorac, Collegeville, Pennsylvania; ⁷University of Arizona, Tucson, Arizona; ⁸Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois; ⁹Eli Lilly and Co., Greenfield, Indiana; ¹⁰Janssen Research Foundation, Beerse, Belgium; ¹¹Monsanto-Searle Laboratories, Skokie, Illinois; ¹²Sanofi-Synthelabo, Inc., Malvern, Pennsylvania; and ¹³Bayer Corporation, West Haven, Connecticut

Received January 22, 2000

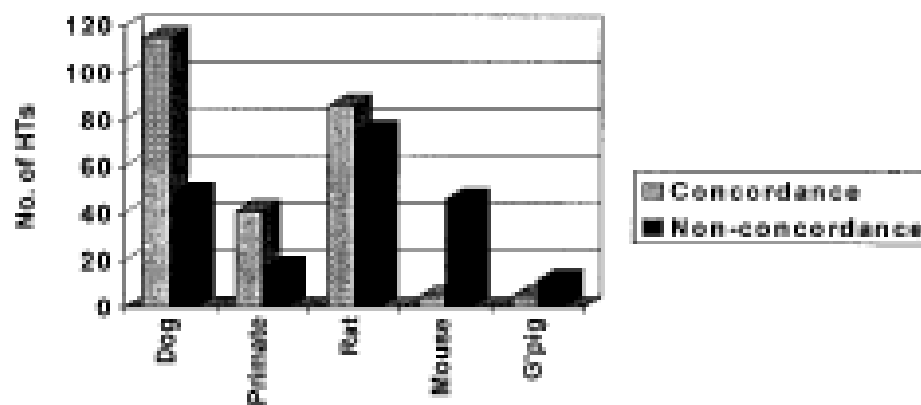


FIG. 4. Concordance rates versus species.

ICH安全性試験ガイドライン

2006年より、見直し

動物実験数削減の可能性もテーマの一つ

各国・地域における規制上の不調和

公衆衛生上の問題

科学技術の進展への対応



EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE MEDICINES HEALTH

3 October 2014

EMA/CHMP/CVMP/JEG-3Rs/450091/2012

Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)

Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP)

Guideline on regulatory acceptance of 3R (replacement, reduction, refinement) testing approaches

Draft

INTERNATIONAL STANDARD

**ISO
10993-2**

Second edition
2006-07-15

Biological evaluation of medical devices —

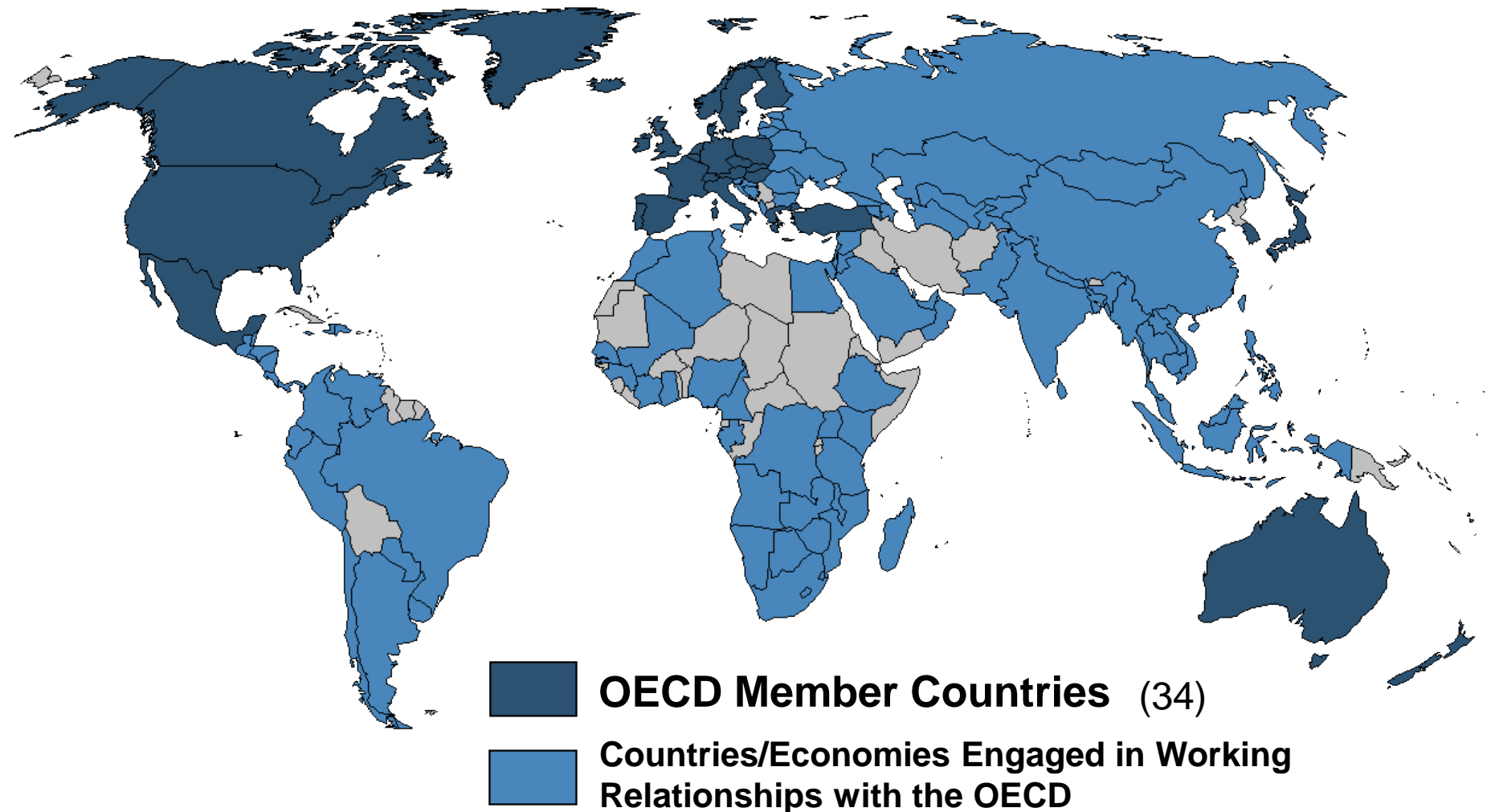
Part 2:

Animal welfare requirements

Évaluation biologique des dispositifs médicaux —

Partie 2: Exigences relatives à la protection des animaux

OECD加盟国および関係国



APPLY INTEGRATED APPROACHES TO TESTING AND ASSESSMENT

All of the work on alternative methods is undertaken at the OECD with the objective of contributing to more integrated approaches to testing and assessment. In practice, integrated approaches, which take into account the tools outlined above, are used in the OECD Existing Chemicals Programme which generates internationally agreed initial hazard assessments of chemicals.

This practical application of integrated approaches improves their regulatory acceptance and facilitates their implementation into national and regional chemical assessment schemes in OECD member countries.

AVOID DUPLICATION OF TESTING

The OECD **Mutual Acceptance of Data (MAD)** framework has had a major impact on testing practices. MAD guarantees that data generated in the testing of chemicals in an OECD member country, or adhering non-member country, in accordance with OECD Test Guidelines and OECD Principles of Good Laboratory Practice shall be accepted in other member or adhering countries for purposes of chemical assessment and other uses relating to the protection of man and the environment. This proactive framework saves thousands of animals every year and its impact increases as non-OECD economies join the MAD system.

Furthermore, the OECD has developed the **Global Portal to Information on Chemical Substances (eChemPortal)**. eChemPortal offers free public access to information on properties of chemicals through a simultaneous search of multiple databases, thereby improving the access to existing test results and reducing the risk of unnecessary testing.

WHERE CAN I FIND OECD TOOLS RELATED TO CHEMICAL SAFETY AND ANIMAL WELFARE ?

(Q)SARs, Grouping of Chemicals and the (Q)SAR Application Toolbox

www.oecd.org/env/existingchemicals/qsar

Test Guidelines, *in vitro* test methods, molecular screening and toxicogenomics

www.oecd.org/env/testguidelines

Integrated Approaches to Testing and Assessment

www.oecd.org/env/existingchemicals

Mutual Acceptance of Data

www.oecd.org/env/qlp

Global Portal to Information on Chemical Substances

www.oecd.org/ehs/eChemPortal

© Photos
Getty Images, 2005
KaYann-Fotolia.com



© OECD 2009
For more information contact
the OECD Secretariat at
ehscont@oecd.org

Chemical Safety and Animal Welfare



Progress made
at the OECD



www.oecd.org/env/ehs

OECDの基本指針

- 動物実験の3Rsを念頭に試験法ガイドライン(TG)を承認する。
- TGの開発には、バリデーションを必須とする。
- 適用限界を明確にし、偽陰性が限りなく少ないTGを開発する。
- データは各国が相互利用できる。

Numbers of OECD Test Guideline (2016)

Section	Project	Numbers
1	Physical-Chemical properties	24
2	Effects on Biotic Systems	44
3	Degradation and Accumulation	20
4	Health Effects	67 (<i>in vitro</i> 23)
5	Other Test Guidelines	10
Total		165

動物実験代替法が関与したOECDのTG(2016)

分類	試験法
皮膚腐食性試験	CORROSITEX Skin Corrosivity Test :TG435
	<i>In vitro</i> skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method :TG431
	<i>In vitro</i> skin corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER) :TG430
皮膚刺激性試験	<i>In vitro</i> reconstructed human epidermis (RhE) test methods, EpiDerm, EPIKIN, 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
	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

動物実験代替法が関与したOECDのTG(2016)

分類	試験法
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 <i>In Vitro</i> Assays to Detect Androgen Receptor Test : TG458
	Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) <i>In Vitro</i> Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity :TG493
	H295R Steroidogenesis Assay :TG456
	Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation <i>In Vitro</i> Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists Test : TG455
遺伝毒性試験	<i>In vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene :TG490
	<i>In vitro</i> micronucleus test : TG487
	<i>In vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Test : TG476
	<i>In vitro</i> Mammalian Chromosome Aberration Test : TG473
	Bacterial Reverse Mutation Test : TG471
経皮吸収試験	Skin Absorption: <i>In Vitro</i> Method :TG428

[Arch Toxicol](#). 2011 May;85(5):367-485. doi: 10.1007/s00204-011-0693-22011 May 1.

Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. [Adler S](#), et al.,

In summary, the experts confirmed that it will take at least **another 7-9 years** for the replacement of the current in vivo animal tests used for the safety assessment of **cosmetic ingredients** for **skin sensitisation**.

For **toxicokinetics**, the timeframe was **5-7 years** to develop the models still lacking to predict lung absorption and renal/biliary excretion, and even longer to integrate the methods to fully replace the animal toxicokinetic models.

For the systemic toxicological endpoints of **repeated dose toxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity**, the time horizon for full replacement **could not be estimated**.

Seurat-1 Research Initiative

First step in long term goal : „Towards the replacement of *in vivo* repeated dose systemic toxicity testing“

- Joint funding by the European Commission and a specific industrial sector (cosmetics industry / Colipa)
- € 25 million EC & € 25 million Colipa

- **OBJECTIVES**
- Development of an **innovative concept** for repeated dose systemic toxicity testing.
- **Proof of concept** for a future full implementation of a **mode-of-action** strategy.
- Development of **innovative testing methods** more predictive than existing testing procedures.

More information and access to SEURAT-1 Annual Report : www.seurat-1.eu

The Project Turns One



together in integrated testing strategies. In particular, we have been working in the last six months to initiate the different case studies that will ultimately

I am proud to introduce to you the first issue of the *EU-ToxRisk Newsletter*. After a highly dynamic first year the EU-ToxRisk project just entered already its second year. As coordinator of the project it has been an exciting year where the various aspects of the project have started. This included aligning technologies as well as testing novel advanced model systems. These different technologies and model systems will ultimately cluster

drive the selection of technologies and models that are fit-for-purpose for regulatory decision making. I am particularly proud that we have received highly positive responses from various regulatory authorities that will provide advice to the case studies during the project. The experimental work within these case studies have now started intensively. Also, our collaboration with our US Tox21 partners is taking shape. With this regular *EU-ToxRisk Newsletter* we want to keep you up to date on the development of the project and the successes we achieved. In this first issue, I am happy to introduce you to the overall project concepts, strategies. and models that make and (will) shape EU-ToxRisk.

Bob van de Water, Leiden Academic Centre for Drug Research (LACDR), Leiden University (The Netherlands), and coordinator of the EU-ToxRisk project



VICH/07/038
Final
18 September 2007

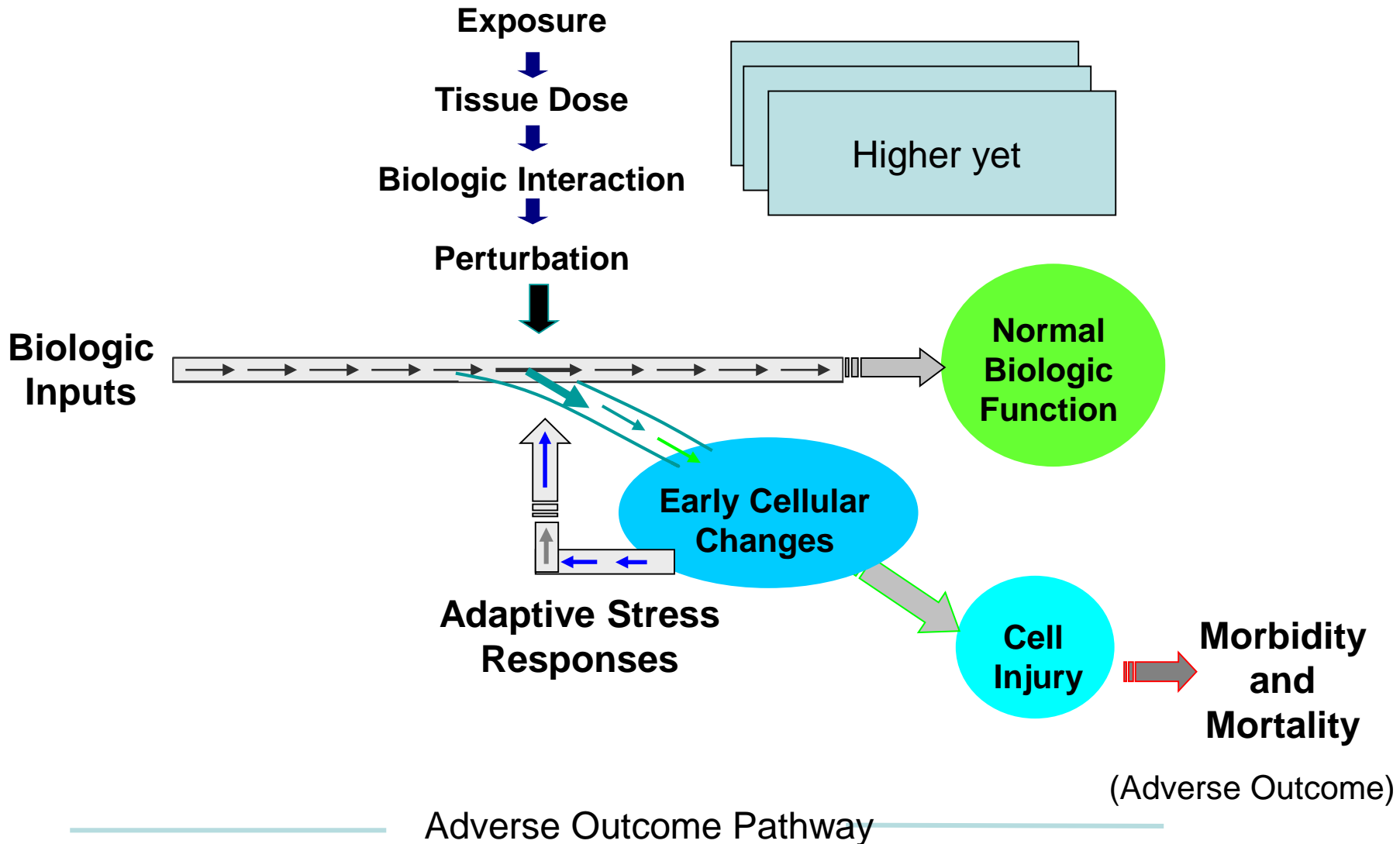
Statement of Principle for VICH – Alternatives to Animal Testing

At its 19th meeting on 23-24 January 2007 in Washington D.C., USA, the VICH Steering Committee reiterated its ambition to minimise animal testing and specifically expressed its support for the 3Rs principle – replacement, refinement and reduction of animals in research.

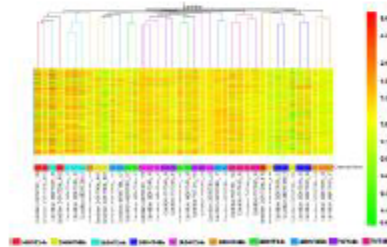
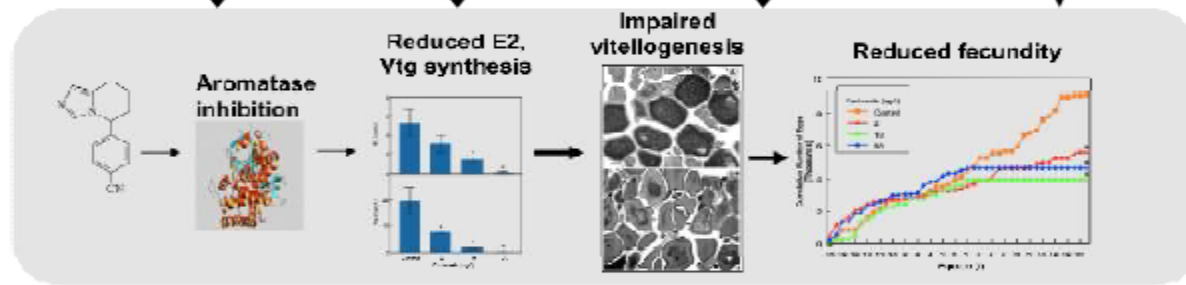
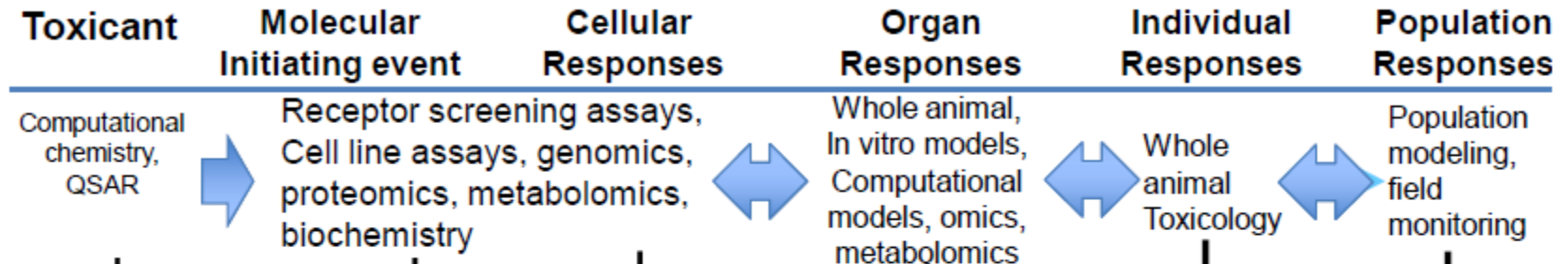
VICH has always striven to eliminate repetitious and unnecessary testing through harmonisation of regulatory requirements for the registration of veterinary products, a goal that undoubtedly leads to a reduction in the number of animals used for product development and registration.

While the validation of alternative testing protocols¹ falls outside the remit of VICH, the Steering Committee recognises that the international status and influence of VICH provide a unique opportunity to encourage the use of validated alternative methods. To this end, Expert Working Groups developing guidelines involving animal experimentation have a specific responsibility to consider animal welfare, and particularly the possibilities for replacement, refinement and reduction of animal testing

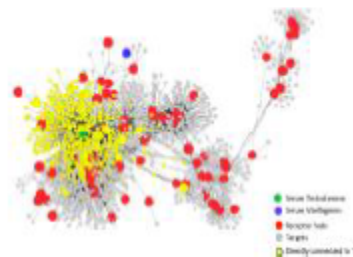
Perturbation of Toxicity Pathways



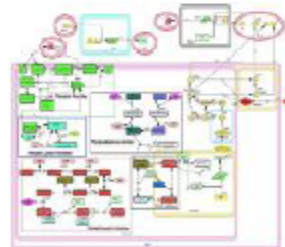
AOP and alternative animals in human health assessment



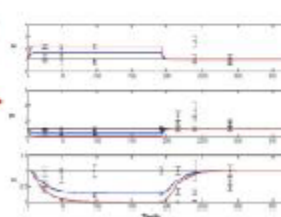
Screening for toxicological effects and chemicals



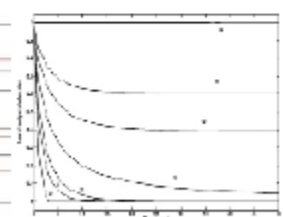
Pathway and network impacts



Mechanistic modeling

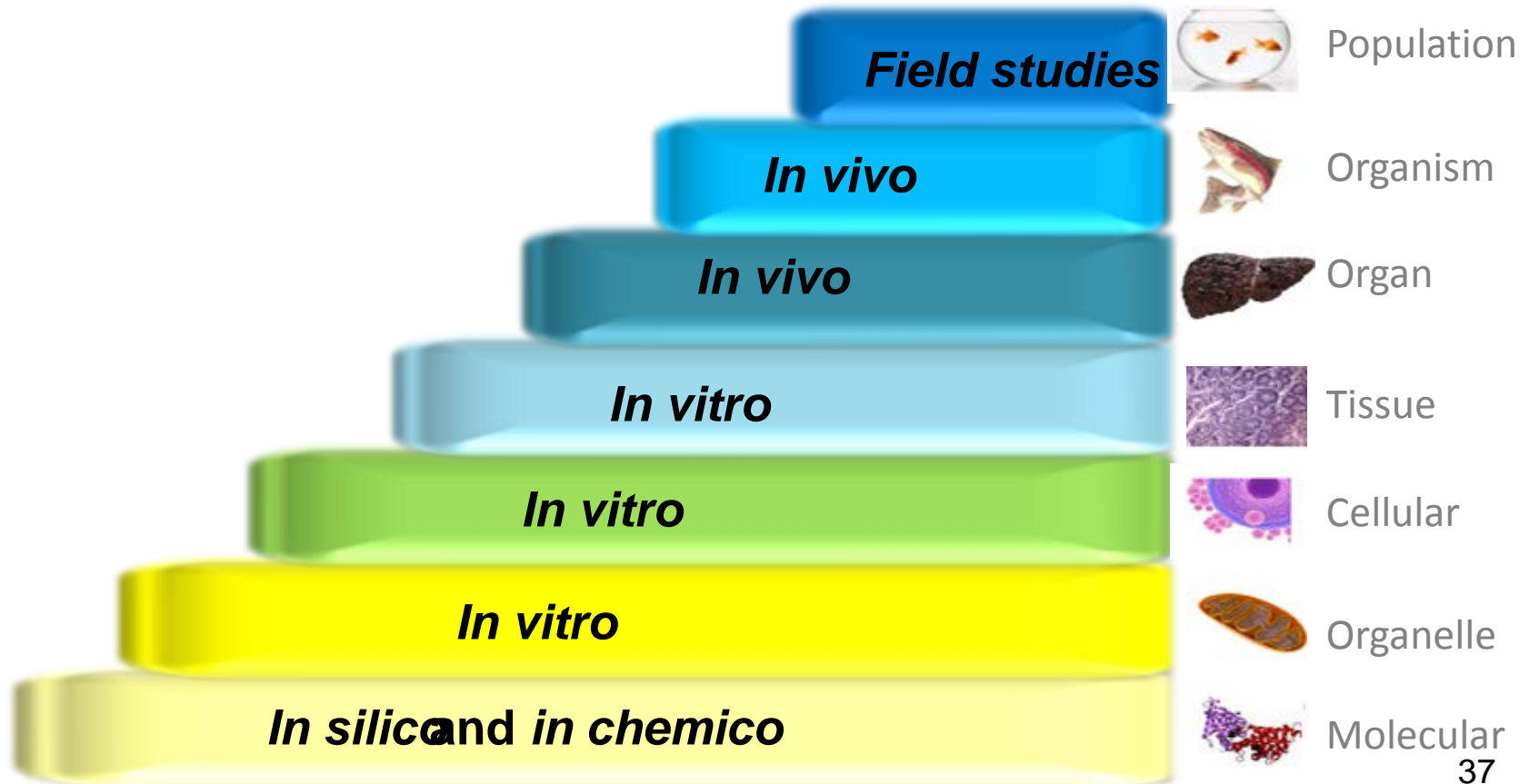


Predicted effect

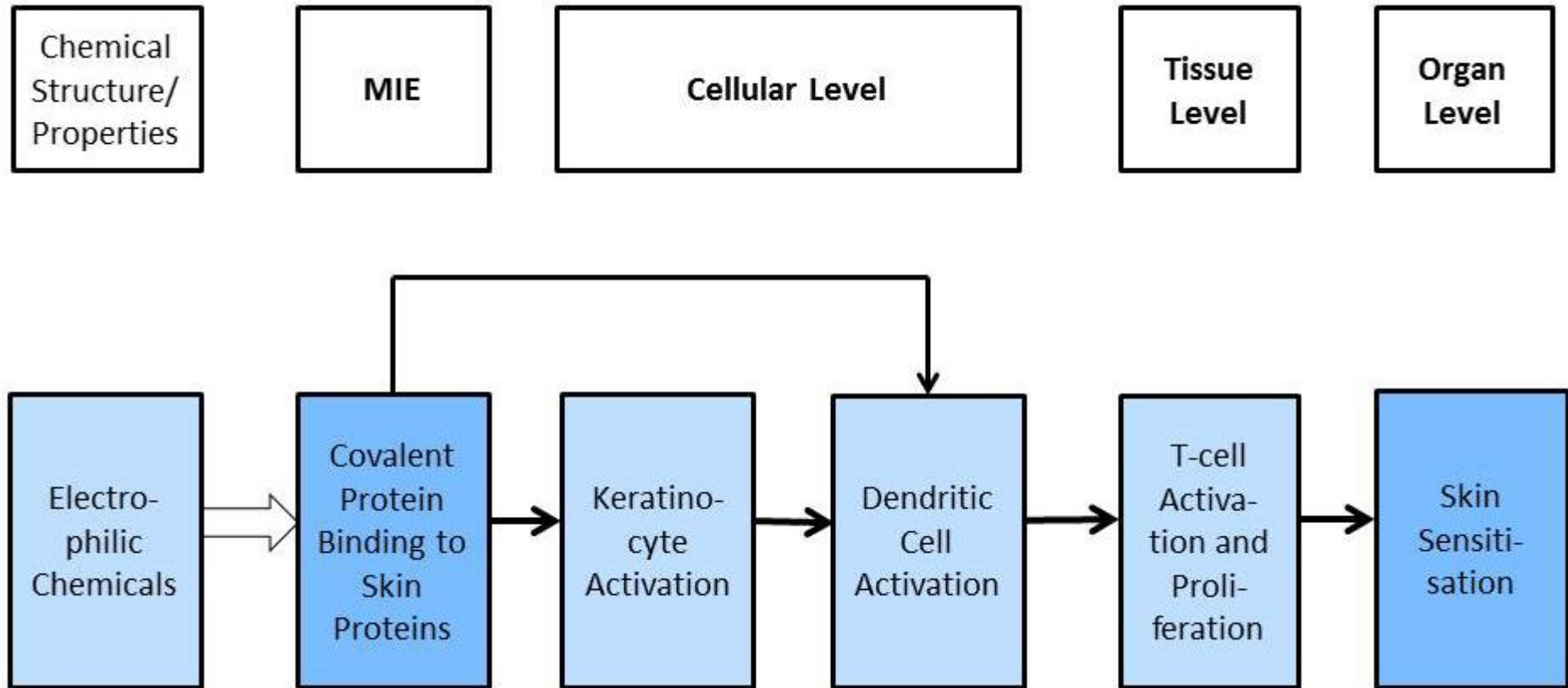


Population impact

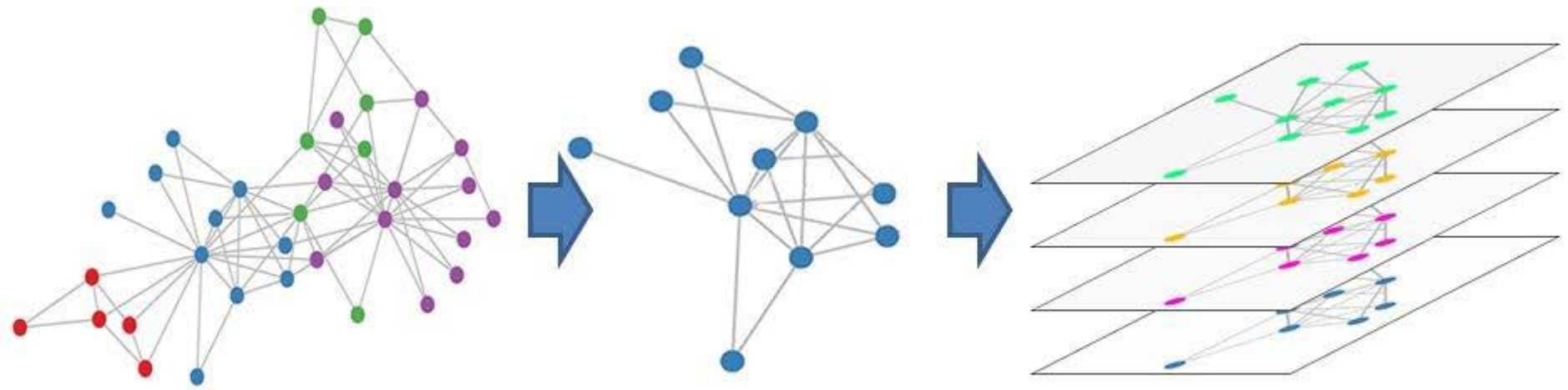
The AOP concept can be used as a framework for the development of Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)



皮膚感作性に関するAOP

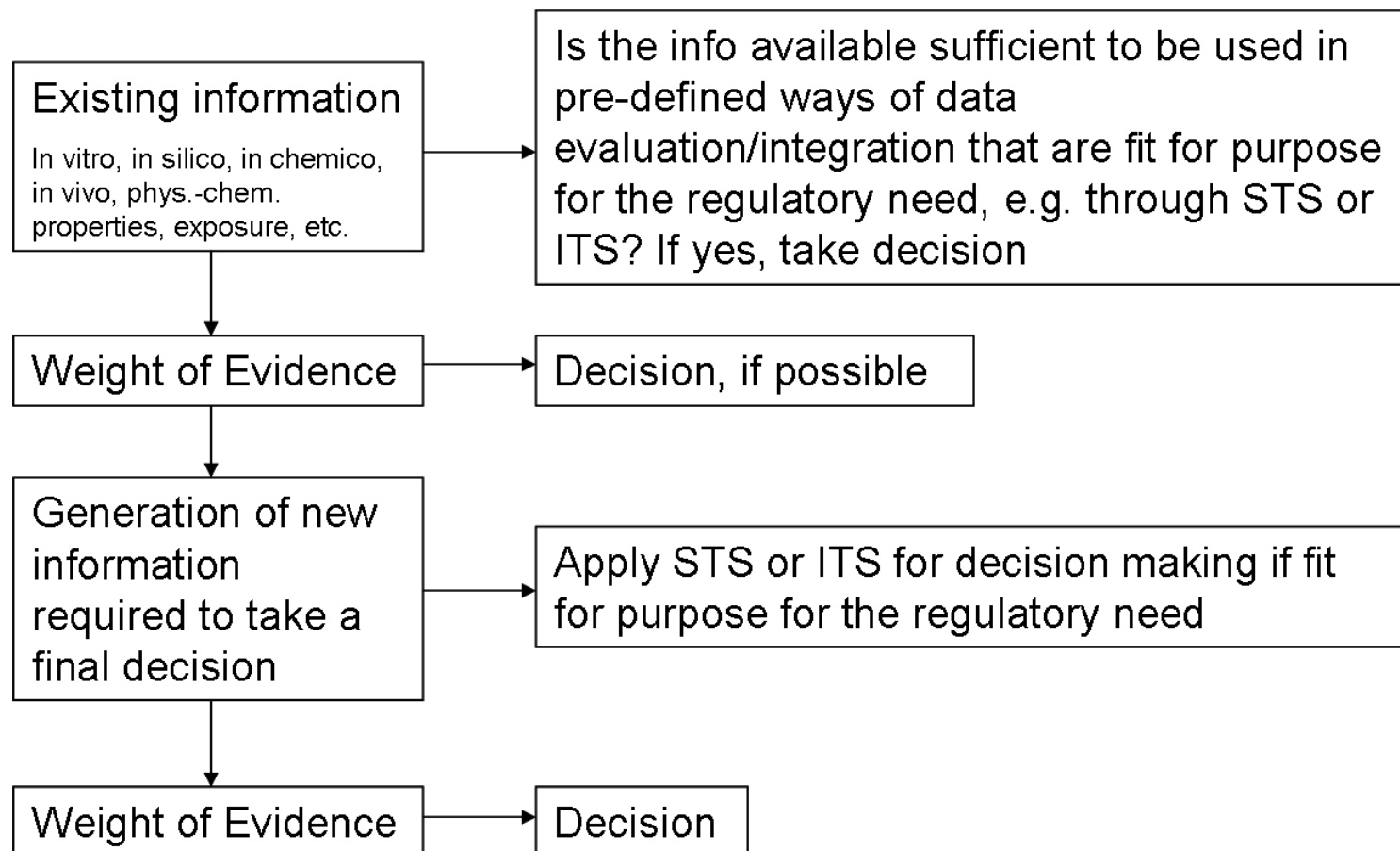


Further information on description of AOP Network Development, and explanation of filters Filters Layers

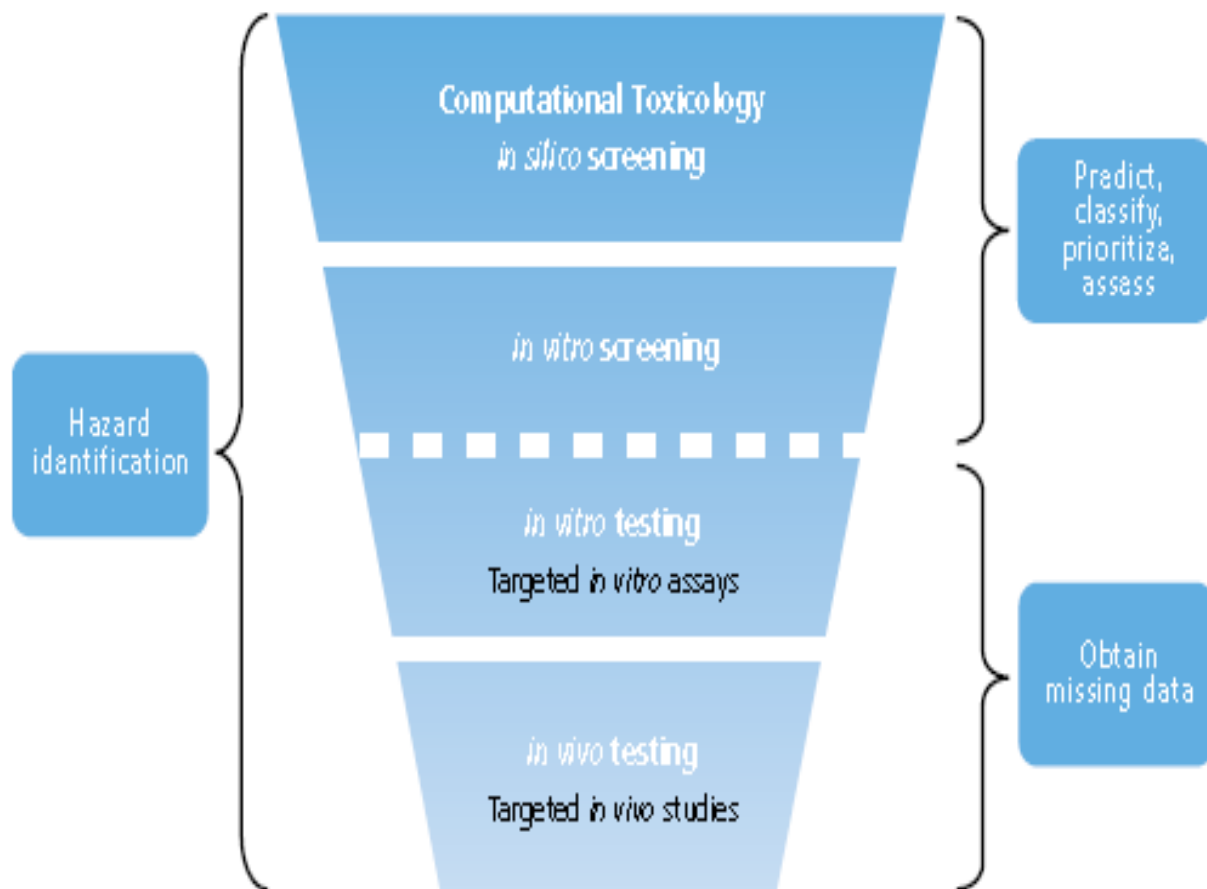


Structured versus free-text fields in the AOP-KB relative to computational applications

IATA (integrated approach on testing and assessment) framework



GUIDANCE DOCUMENT ON THE EVALUATION AND APPLICATION OF INTEGRATED APPROACHES TO TESTING AND ASSESSMENT (IATA) FOR SKIN SENSITISATION



現状

- 欧米主導の動物実験の国際的規約、指針が世界的に普及していく。
- OECDの基本的な考え方から、化学物質等のための動物実験は厳しくなる一方である。
- REACHにおいても、化学物質の少量生産の場合（10t未満）、代替法のみによる安全性評価でよい時代が来る。
- ICH, ISO, 各国行政機関の方針も動物実験を減らす方向に進んでいる。

昨今の国内動向

動物愛護に関する規制の状況

環境省

「動物の愛護及び管理に関する法律」(平成17年改正、平成18年施行)

実験動物の飼養及び管理並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示)

: 実験動物の飼育・管理方法や試験における動物の苦痛軽減の方法等を定めたもの

**3Rs: Refinement(苦痛の軽減)、Replacement(代替法の利用)、
Reduction(動物利用数の削減)**



動物実験等の実施に関する3省の基本方針

文部科学省 基本方針

(平成18年文部科学省告示71号)

【概要】

大学・試験機関等での動物の管理方法、試験実施のための基準を策定

3Rsの原則

厚生労働省 基本方針

(平成18年厚生科学課長通知)

【概要】

厚労省の研究機関・施設での動物の管理方法、試験実施のための基準を策定

3Rsの原則

農林水産省 基本方針

(平成18年農林水産技術会議事務局長通知)

【概要】

農水省の研究機関・施設での動物の管理方法、試験実施のための基準を策定

3Rsの原則

平成24年の動愛法改定

衆・参議院の付帯決議で、
「実験動物の取扱いに係る法制度の検討に際しては、関係者による自主管理の取組及び関係府省による実態把握の取組を踏まえつつ、国際的な規制の動向や科学的知見に関する情報の収集に努めること。また、関係府省との連携を図りつつ、3R(Replacement: 置換え、Reduction: 使用数の削減、Refinement: 苦痛の軽減)の実効性の強化等により、実験動物の福祉の実現に努めること」が記載された。

JaCVAMの歴史

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薬理部 新規試験法評価室内に臨時の組織が設立

2011年4月 正式な組織に昇格

JaCVAMの目的

1. 国際的な協力の下、日本で開発された方法をOECDのガイドラインとする。
2. バリデーションや第三者評価を通じて評価された代替法について、行政的受入れの適否及びその適用可能な範囲を明確にし、公表する。



JaCVAM運営委員会

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

病理部

動物管理室

薬理部

変異遺伝部

安全性予
測評価部

厚生労働省

国立感染症研究所

PMDA

医薬部外品の承認申請資料作成等における動物実験代替法の利用と JaCVAMの活用促進について (平成23年2月4日審査管理課事務連絡)

- 国内では**JaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods**(日本動物実験代替法評価センター)が、国際的な動物実験代替法開発の取組みである**ICATM: International Cooperation on Alternative Test Methods**(代替試験法協力国際会議)と連携し、動物実験代替法に関する情報を取りまとめ、また、新規開発及び改定された動物実験代替試験法の妥当性評価を行い、その評価結果等を公表しています。
- 医薬部外品の承認申請資料の作成においては、下記に示す**JaCVAMのホームページ**に掲載されている情報も参考の上、**適切な資料を作成し**、また化粧品のポジティブリスト改正要望等においても**活用が図られるよう**、貴管下関係業者に対し周知をお願いします。

JaCVAMが厚生労働省に受入れを提案した試験法⁸⁾

No.	試験法
1	皮膚腐食性試験代替法 Vitrolife-Skin, EpiDerm, Episkin, SKinEthics, EpiCS
2	皮膚刺激性試験代替法 Episkin, EpiDerm, SkinEthics, LabCyte EPI-MODEL
3	眼刺激性試験代替法 牛摘出角膜の混濁および透過性試験(BCOP)
4	眼刺激性試験代替法 ニワトリの摘出眼球試験(ICE)
5	眼刺激性試験代替法 フルオレセイン (FL)漏出試験法
6	眼刺激性試験代替法 <i>In vitro</i> 短時間曝露法 (STE法)
7	眼刺激性試験代替法 再構築ヒト角膜様上皮モデル法 (RhCE法)
8	改訂OECD TG 405:ウサギを用いる眼刺激性試験
9	光安全性試験法 活性酸素種 (ROS) アッセイ
10	皮膚感作性試験代替法 LLNA : DA
11	皮膚感作性試験代替法 LLNA : BrdU-ELISA
12	皮膚感作性試験代替法 rLLNA
13	皮膚感作性試験代替法 ペプチド結合試験(DPRA)
14	皮膚感作性試験代替法 角化細胞レポーターアッセイ
15	皮膚感作性試験代替法 ヒト細胞活性化試験 (h-CLAT)
16	<i>In vitro</i> 皮膚透過性試験
17	単回投与毒性試験代替法
18	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
19	ER STTA法 : hER α -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

Update on JaCVAM (15.June / 2009 updated)

Classification	Test name	Validation study	Peer review	Regulatory acceptance	Recommendation to government	OECD	Collaboration
01 Corrosivity test	(1)Reconstructed human tissue test made in Japan: Vitrolife-Skin	Feb-09 	Jun-08 	Jun-08 	Aug-08 	Guideline No.431 	JSAAE
02 Phototoxicity test	(1)3T3-NRU	BfR 	Nov-04 			Guideline No.432 	
	(2)Yeast growth inhibition phototoxicity assay and the red blood cell photohemolysis assay	Jan-09 	May-09 	on going 			JSAAE
03 Skin sensitization test	(1)LLNA-DA	Jun-07 	Feb-08 	Oct-08 	Nov-08 		JSAAE
	(2)LLNA-BrdU	Aug-08 	Feb-09 	on going 			JSAAE
	(3)h-CLAT	start in 2009 					
	(4)LLNA						
	(5)rLLNA	ECVAM, ICCVAM 	start in 2009 				ICCVAM
04 Skin irritation test	(1)Reconstructed human tissue test	ECVAM ^c 	Nov-08 	on going 		Draft test guideline 	ECVAM
	(2)Reconstructed human tissue test made in Japan	May-09 					JSAAE

代替法普及のため発出したガイダンス

- 化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る光毒性試験代替法(3T3 NRU)を活用するためのガイダンス
- 化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る感作性試験代替法(LLNA)を活用するためのガイダンス
- 化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る感作性試験代替法(LLNA:DA)を活用するためのガイダンス
- 化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る感作性試験代替法(LLNA:Brd-ELISA)を活用するためのガイダンス
- 化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る眼刺激性試験代替法(BCOP)を活用するためのガイダンス
- 化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る眼刺激性試験代替法(ICE)を活用するためのガイダンス
- 化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る皮膚透過性試験を活用するためのガイダンス

**厚生労働省、化粧品業界、国立衛研、皮膚科医のメンバーで
より代替法の活用を促すガイダンスを作成。**

動物を用いない代替法(*in vitro* 試験)の開発

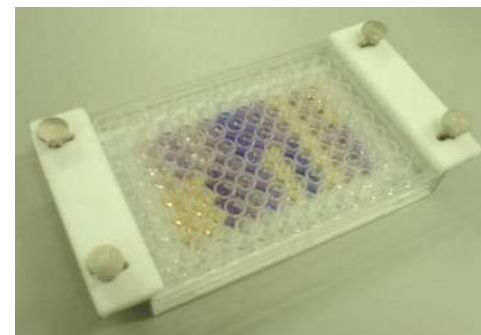
日本発のOECD TGまたはGD

- ✓ Skin sensitization assay, LLNA : DA, TG 442A (2010)
- ✓ Skin sensitization assay, LLNA : BrdU-ELISA , TG 442B (2010)
- ✓ *In vivo* comet assay TG 489 (2014)

- ✓ Skin irritation assay with LabCyte EPI-MODEL 24, TG 439 (2013)
- ✓ Performance-based Test Guideline for stably transfected transactivation *in vitro* assays to detect estrogen receptor agonists and antagonist, Revised TG 455 (2015)
- ✓ Short time exposure (STE) assay for eye irritation testing TG490 (2015)
- ✓ Bhas 42 cell transformation assay (2016) Guidance document
- ✓ h-CLAT assay for skin sensitisation testing (2016)
- ✓ Stable transfected transcriptional activation (STTA) assay for androgen disruptor screening (AR-Ecoscreen)(2016)
- ✓ Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) In Vitro Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity (2016)

ICH S10の中の*in vitro*光安全性試験

Method	Current Status	Lead Action Organization	International Acceptance
3T3 NRU Phototoxicity Test	Completed		OECD TG 432 (2004)
<i>In vitro</i> test method based on reactive oxygen species (ROS) and photostability	Peer review of the JaCVAM-sponsored validation study finalized in 2013.	JaCVAM; EURL ECVAM, NICEATM- ICCVAM, Health Canada and KoCVAM VMT liaisons	ICH S10 including the ROS assay and the 3T3 NRU test method was completed in 2014



OECDで検討中の日本で開発されたTG案

- ✓ Vitrigel-EIT for eye irritation testing
- ✓ LabCyte CORNEA-MODEL for eye irritation testing
- ✓ IL-8 Luc assay for skin sensitization testing **本年成立**
- ✓ Hand-1 Luc EST for developmental screening
- ✓ ROS assay for photosafety testing

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL
REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE

PHOTOSAFETY EVALUATION OF PHARMACEUTICALS

S10

OECD/OCDE

442E

Adopted:
29 July 2016

化学物質の試験に関する OECD ガイドライン

In vitro 皮膚感作性：ヒト細胞株活性化試験 (h-CLAT)

最初に考慮すべき事項および限界

8. 皮膚感作性物質は、DC の活性化に伴い細胞膜マーカーの発現を誘発すると報告されている (2) 。そのため、DC の活性化に関連する単球活性のマーカーを測定する h-CLAT のような試験法は (20) 、化学物質の皮膚感作性の評価に適していると考えられる。ただし、DC 活性化は皮膚感作性 AOP の 1 つの主要な事象のみを示すため、DC 活性化のマーカーを測定する試験法により得られる情報は、それ自体で、化学物質の皮膚感作性がないと結論づけるには十分ではない。したがって、h-CLAT により得られたデータは、IATA などの統合的アプローチに照らした他の補足情報 (例えば、皮膚感作性 AOP の別の主要な事象を対象とした *in vitro* 試験の情報や、類似化学物質からの推定などの試験を伴わない情報) との組み合わせで検討すべきである。

9. 本試験法ガイドライン記載の試験法を用いることにより、IATA に照らして皮膚感作性物質 (すなわち、UN GHS におけるカテゴリ-1) と非感作性物質を識別することができる。本試験法ガイドラインを単独で用いて、皮膚感作性物質を当局が UN GHS (1) で定義したサブカテゴリである 1A および 1B に分類することはできず、安全性評価に際し、皮膚感作性の強さを予測することもできない。ただし、特定の規制の枠組みによっては、h-CLAT での陽性結果を単独で用いて、化学物質を UN GHS におけるカテゴリ-1 に分類できる場合がある。

10. h-CLAT は、細胞培養技術とフローサイトメトリー分析の経験がある実験室への技術移管が可能であることが確認されている。本試験法から見込まれる予測結果の再現性は、同一施設内および複数の施設間でいずれも約 80%であった (11) (21)。バリデーション試験 (22)、および発表された他の研究 (23) から得られたすべての結果によると、LLNA の結果と比較した場合、皮膚感作性物質 (すなわち、UN GHS におけるカテゴリー1) と非感作性物質とを識別する正確度は 85% (N=142)、感度は 93% (94/101)、特異度は 66% (27/41) であった (段落 12 記載のとおり、Log Kow が 3.5 を超える化学物質の陰性結果を含めないすべての既存データでの EURL ECVAM (21) による再解析に基づく)。h-CLAT での偽陰性結果の予測は、皮膚感作性の強度が高い (high) 化学物質 (すなわち、UN GHS におけるサブカテゴリー1A) よりも、皮膚感作性の強度が低い (low) ~中程度 (moderate) の化学物質 (すなわち、UN GHS におけるサブカテゴリー1B) で懸念される可能性がより高い (12) (22) (24)。総合すると、これら情報は、h-CLAT は、皮膚感作性の有害性の識別に有用であることを示している。なお、本試験法は、IATA に照らし上記段落 9 の条項に従って、他の情報と組み合わせて検討されるべきであることから、h-CLAT を単独の試験法として示された正確度の値は指標にすぎない。さらに、動物を用いない皮膚感作性試験法を評価する場合、LLNA 試験およびそれ以外の動物試験の結果は、ヒトにおける皮膚感作性を完全に反映しているとはいえないことに留意すべきである。

12. h-CLAT は、適切な溶媒／媒体（段落 21 参照）に可溶であるか安定した分散液（すなわち、被験物質が沈殿することも、溶媒／媒体から分離して異相を示すこともないコロイドまたは懸濁液）となる被験物質に適用可能である。Log Kow が 3.5 を超える被験物質は、偽陰性結果をもたらす傾向がある（23）。そのため、Log Kow が 3.5 を超える被験物質で得られた陰性結果は、判断に用いてはならない。ただし、Log Kow が 3.5 を超える被験物質で得られた陽性結果については、被験物質を皮膚感作性物質であると判断できる。さらに、h-CLAT に用いられる細胞株の代謝能が限定的であること（25）、また、h-CLAT の実験条件からプロハプテン（すなわち、酵素 P450 を介するなど酵素による活性化を要する物質）、および特に酸化速度が遅いプレハプテン（すなわち、酸化により活性化される物質）も陰性結果を示す場合がある（24）。蛍光被験物質は h-CLAT で評価できるが（26）、フルオレセイン・イソチオシアネート（FITC）またはヨウ化プロピジウム（PI）と同じ波長の強い蛍光被験物質は、フローサイトメトリーによる検出を干渉するため、FITC 標識抗体または PI を用いて正確に評価できない。このような場合、他の蛍光色素で標識された抗体、または他の細胞毒性マーカーが、例えば、補遺 II 収載の習熟度確認物質により、それぞれ FITC 標識抗体（段落 31 参照）、または PI（段落 25 参照）と同様の結果をもたらすことが示される場合に限り、用いることができる。上記を踏まえて、陰性結果は、限られた範囲内の情報、および IATA の枠組み内の他の情報源とともに解釈すべきである。他の特定のカテゴリーに属す被験物質に h-CLAT が適用できない証拠が示される場合、h-CLAT は、そのようなカテゴリーに属す物質に用いるべきではない。

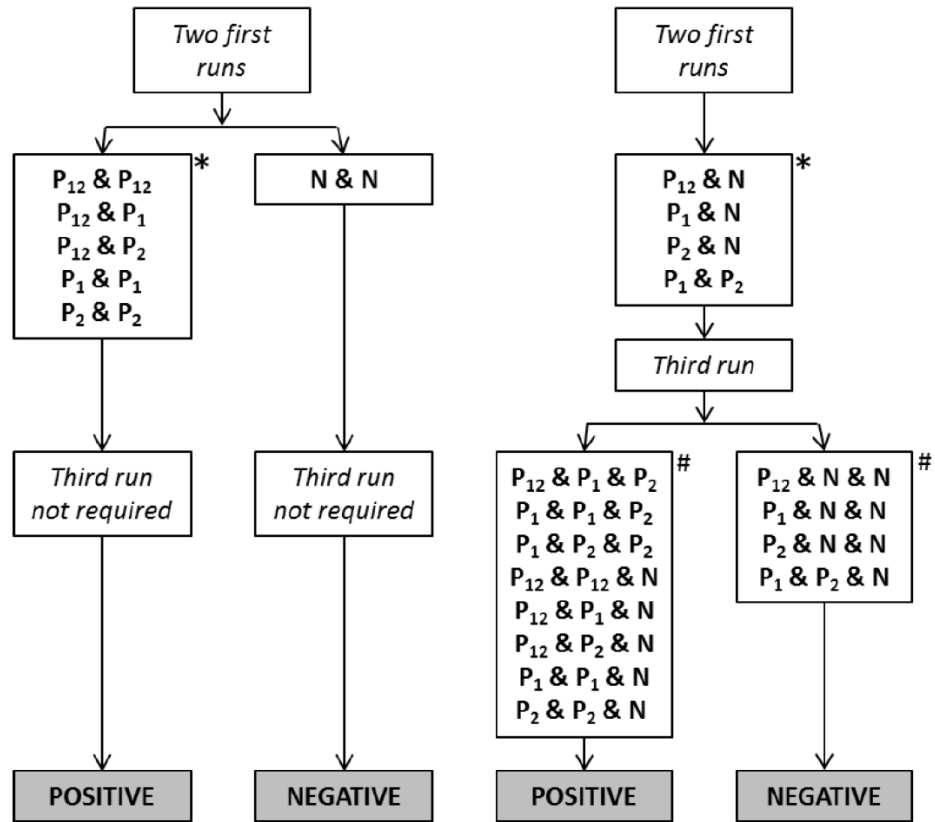


図1：h-CLAT で用いられる予測モデル。h-CLAT による予測は、IATA の枠組みの中で、また、段落9、11 および12 の条項に従って検討すること。P₁：CD86 のみ陽性、P₂：CD54 のみ陽性、P₁₂：CD86 および CD54 とも陽性、N：CD86 および CD54 とも陰性。*最初の測定から得た結果に関連する組合せを、その得られた順序とは関係なく枠内に示す。#上段の枠で示した最初の2回の測定で得られた結果に基づき、3回目の測定結果に関連する組合せを枠内に示す。ただし、得られた結果の順序は反映していない。

34. h-CLAT で陽性と予測された被験物質の場合、CD86 では EC150、CD54 では EC200 の 2 つの効果濃度 (Effective Concentrations : EC) 、すなわち被験物質が 150 または 200 の RFI を誘発する濃度を、必要に応じて求められる。これらの EC 値は、IATA などの統合的アプローチ (12) (13) (14) (15) (16) の中で用いられた場合、感作性の強度の評価 (3) が可能な場合がある。EC 値は、次の式により算出できる。

$$\begin{aligned} \text{EC150 (CD86 の場合)} &= B_{\text{濃度}} + [(150 - B_{\text{RFI}}) / (A_{\text{RFI}} - B_{\text{RFI}}) \times (A_{\text{濃度}} - B_{\text{濃度}})] \\ \text{EC200 (CD54 の場合)} &= B_{\text{濃度}} + [(200 - B_{\text{RFI}}) / (A_{\text{RFI}} - B_{\text{RFI}}) \times (A_{\text{濃度}} - B_{\text{濃度}})] \end{aligned}$$

ここで

$A_{\text{濃度}}$ は、RFI が 150 超 (CD86 の場合) または 200 超 (CD54 の場合) となる最低濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

$B_{\text{濃度}}$ は、RFI が 150 未満 (CD86 の場合) または 200 未満 (CD54 の場合) となる最高濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

A_{RFI} は、RFI が 150 超 (CD86 の場合) または 200 超 (CD54 の場合) となる最低濃度での RFI

B_{RFI} は、RFI が 150 未満 (CD86 の場合) または 200 未満 (CD54 の場合) となる最高濃度での RFI

EC150 および EC200 のより正確な値を得るためには、独立した 3 回の CD86/CD54 発現測定が必要となる場合がある。そこで EC150 および EC200 の最終的な値は、3 回の独立した測定から算出された EC の中央値として求められる。3 回のうち 2 回のみ陽性基準 (段落 33 参照) を満たす場合は、算出された 2 つの値のより高い EC150 または EC200 の値が採用される。

許容基準

35. h-CLAT を用いる場合、次の許容基準を満たすこと (22) (27)。
- 培地対照および溶媒／媒体対照の細胞生存率が 90%より高いこと。
 - 溶媒／媒体対照において、CD86 および CD54 の RFI 値が陽性基準 (CD86 の場合 150% 以上、CD54 の場合 200%以上) を超えないこと。溶媒／媒体対照の RFI 値は、段落 32 記載の式を用いて算出する (「化学物質の MFI」は「溶媒／媒体の MFI」に、「溶媒／媒体の MFI」は「(培地) 対照の MFI」に置き換える)。
 - 培地および溶媒／媒体の両対照では、CD86 および CD54 のアイソタイプ対照に対する MFI 比が 105%を超えること。
 - 陽性対照 (DNCB) において、CD86 および CD54 の RFI 値が陽性基準 (CD86 の場合 150% 以上、CD54 の場合 200%以上) を満たし、細胞生存率が 50%を超えること。
 - 被験物質の場合、細胞生存率が各測定において少なくとも 4 つの試験濃度で 50%を超えること。
36. 陰性結果は、最高試験濃度において 90%未満 (すなわち、段落 27 記載の段階希釈法に従って $1.2 \times CV75$) の細胞生存率を示す被験物質のみに当てはまる。 $1.2 \times CV75$ での細胞生存率が 90%以上の場合、陰性結果は無効とする。このような場合、再度 CV75 の求め、用量設定をやり直すことが推奨される。生理食塩水 (または培地、またはその他の溶媒／媒体) では 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、DMSO では 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または最高可溶濃度が、被験物質の最大試験濃度として用いられた場合、細胞生存率が 90%を上回っても陰性結果は許容されることに留意する。

表 1 : h-CLAT の習熟度確認の立証に推奨される物質

習熟度評価用の物質	CAS 登録番号		<i>In vivo</i> における予測 ¹	($\mu\text{g}/\text{mL}^2$) の基準範囲	の h-CLAT 結果 (EC150 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) の基準範囲) ²	の h-CLAT 結果 (EC200 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) の基準範囲) ²
2,4-ジニトロクロロベンゼン	97-00-7	固体	感作性物質 (非常に強い [extreme])	2-12	陽性 (0.5-10)	陽性 (0.5-1.5)
4-フェニレンジアミン	106-50-3	固体	感作性物質 (強い [strong])	5-95	陽性 (<40)	陰性 (>1.5) ³
硫酸ニッケル	10101-97-0	固体	感作性物質 (中程度 [moderate])	30-500	陽性 (<100)	陽性 (10-100)
2-メルカプトベンゾチアゾール	149-30-4	固体	感作性物質 (中程度 [moderate])	30-400	陰性 (>10) ³	陽性 (10-140)
R (+) -リモネン	5989-27-5	液体	感作性物質 (弱い [weak])	>20	陰性 (>5) ³	陽性 (<250)
イミダゾリジニル尿素	39236-46-9	固体	感作性物質 (弱い [weak])	25-100	陽性 (20-90)	陽性 (20-75)
イソプロパノール	67-63-0	液体	非感作性物質	>5000	陰性 (>5000)	陰性 (>5000)
グリセロール	56-81-5	液体	非感作性物質	>5000	陰性 (>5000)	陰性 (>5000)
乳酸	50-21-5	液体	非感作性物質	1500-5000	陰性 (>5000)	陰性 (>5000)
4-アミノ安息香酸	150-13-0	固体	非感作性物質	>1000	陰性 (>1000)	陰性 (>1000)

略語 : CAS RN = CAS 登録番号 (CAS Registry Number: CAS RN)

¹ *in vivo* における危険有害性 (および強度) の予測結果は、LLNA データ (11) (23) に基づく。*in vivo* における強度は、欧州化学物質生態毒性および毒性センター (ECETOC) (31) により提唱された基準を用いて得られている。

² 既存の測定値 (22) (32) に基づく。

³ 既存の陰性結果の大部分は本マーカーで得られた。従って陰性結果が、主に予測される。記載の範囲は、認められた数少ない既存の陽性結果に基づき定義された。陽性結果が得られた場合、EC 値は報告された基準範囲内でなければならない。

*In vitro*試験法を使用するために

- ・TGの予測性と適用限界を把握する。
- ・TGと論文、公開プロトコルでは食い違う場合があるので、JaCVAM評価書やTGで最終的な方法を確認する。
- ・習熟度確認物質にて、プロトコルに習熟する。
- ・プロトコルは更新されることから、最新の情報収集に努める。

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

表. ボトムアップ 3 out of 3 の予測性

	vs human data			vs LLNA data			N
	感度	特異度	一致率	感度	特異度	一致率	
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	
LLNA	92	65	85	-	-	-	
ボトムアップ 3 out of 3	97	35	81	99	43	86	100

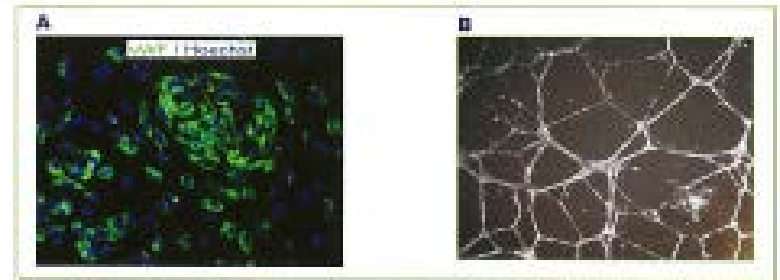
*In vitro*試験の問題点

- 開発されている*in vitro*試験は、皮膚刺激性、光毒性、遺伝毒性および眼刺激性試験に限られる。
- 単独試験法で安全性を担保できる*in vitro*試験はない。
- 正確性が良くても、偽陰性の多い方法は認められない。
- 作用機構に立脚した試験法の開発が期待される。
- 適切な有害性評価のためには、物性、既存物質との比較、構造活性相関、別の*in vitro*試験との組み合わせが必要である。
- 有害性の評価はできても、リスク評価はできない。

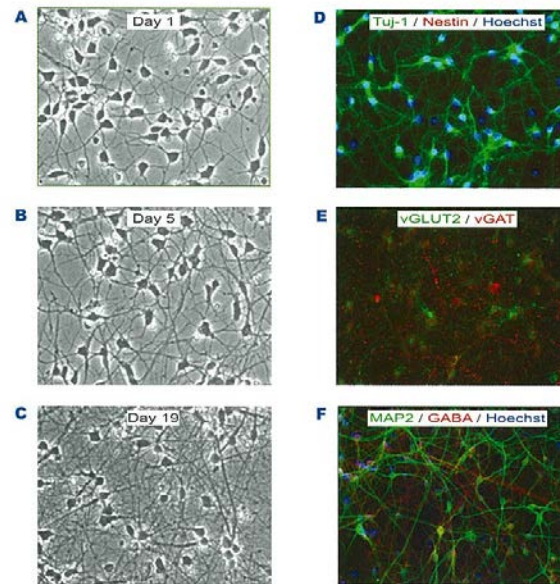
iCell® Cardiomyocytes



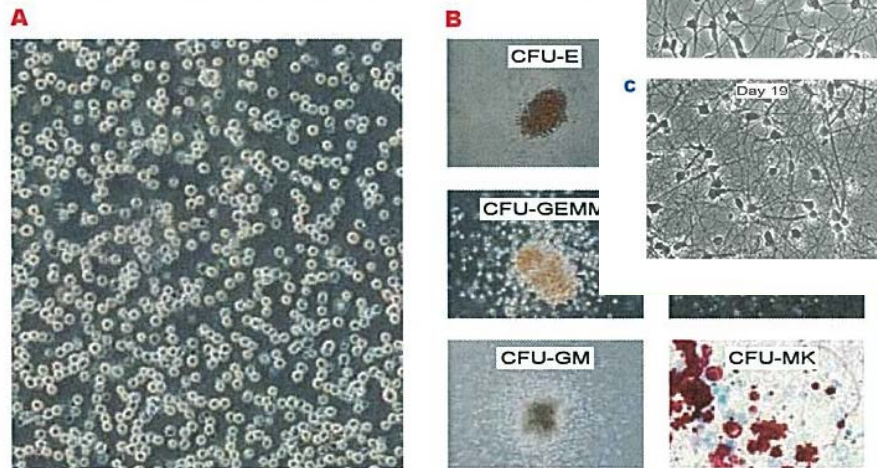
iCell® Endothelial Cells



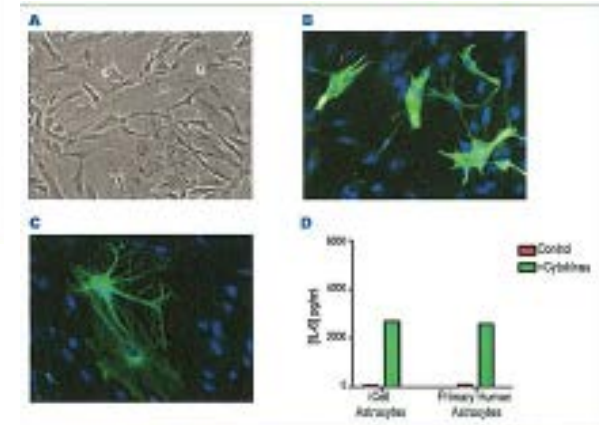
iCell® Neurons



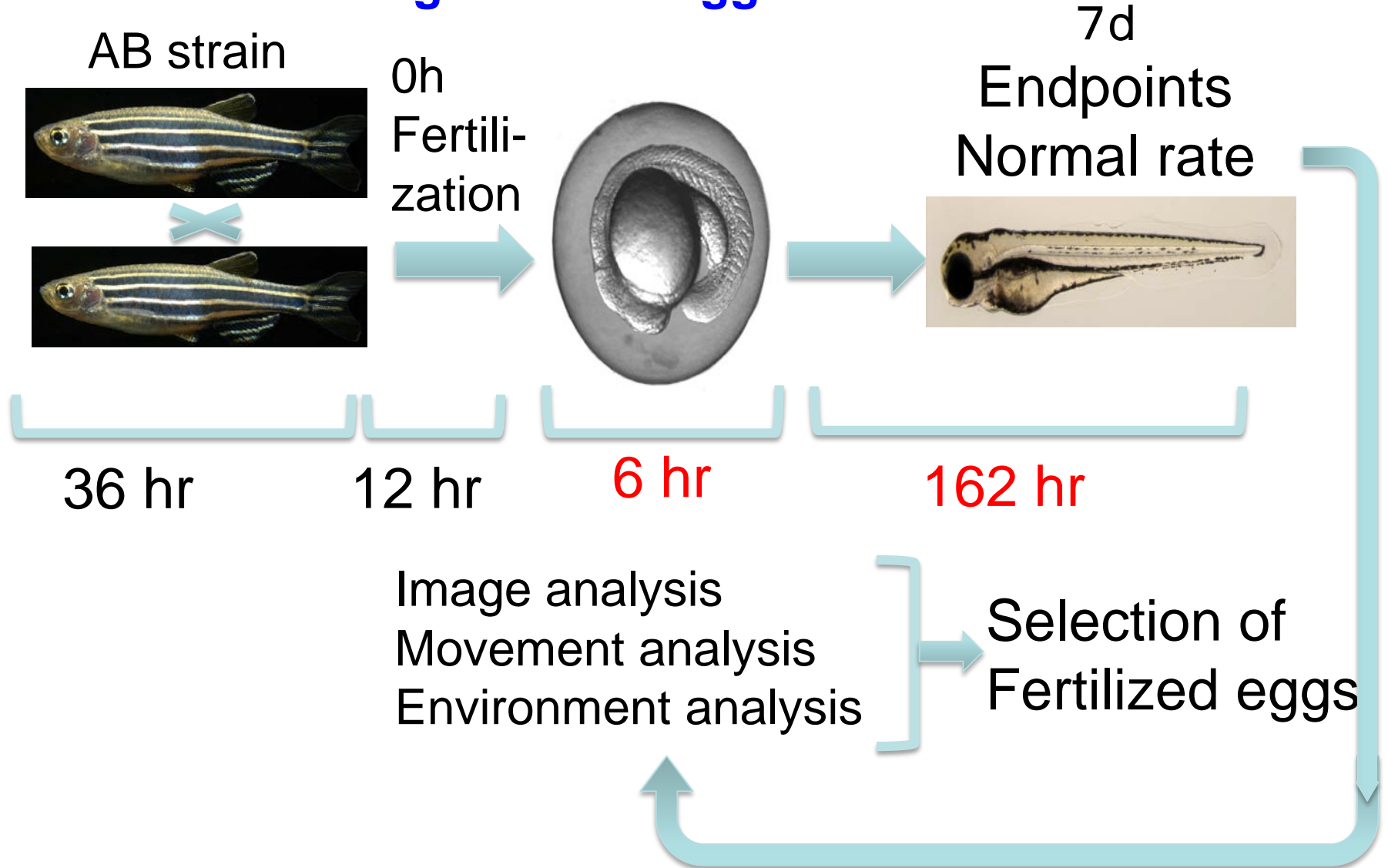
iCell® Hematopoietic Progenitor Cells



iCell® Astrocytes



Development of protocol for embryotoxicity testing using fertilized eggs of zebrafish



化学物質審査AIで短縮

経産省企業の開発環境整備

経済産業省は人工知能(AI)を使い、化学物質の安全審査にかかる期間を短くする。例えば魚への化学物質の蓄積度を調べる試験の代わりに、コンピューターによる仮


想実験を利用する。電子部品や燃料電池などの成長分野で化学物質の開発から製品化までの期間を短縮してコストを抑え、企業の競争力を高める。2019年度から段階的

に導入する。企業は新しい化学物質を使う場合、化学物質審査規制法(化審法)に基づいて安全性の試験を実施する必要がある。試験で得た安全性のデータを

経産省に提出し、審査申し出る。化学物質の件数は年500、000程度に上る。ただ現在の試験は手と時間がかかる。例えば魚に食べさせて物質の

その他期待される方法

- Body-on-a chip
- 3Dプリンター
- オルガノイド、3D培養
- Read Across
- 人工染色体技術
- Omicsの活用

A stylized illustration of the Seattle skyline in shades of green and white. The Space Needle is the most prominent feature, positioned centrally. Other skyscrapers of varying heights and window patterns surround it. The background is a light green gradient.

TENTH WORLD CONGRESS ALTERNATIVES AND ANIMAL USE IN THE LIFE SCIENCES

ABSTRACT DEADLINE:
MARCH 31, 2017

SEATTLE, WASHINGTON, USA
AUGUST 20-24, 2017

The year '2017' is rendered in large, light blue, sans-serif font. The number '0' is replaced by a white line-art icon of a microscope. The number '1' is replaced by a white line-art silhouette of a rabbit. The number '7' is replaced by a white line-art silhouette of a frog. A small white line-art silhouette of a mouse is positioned at the bottom right of the '7'.

2017

3Rs IN ACTION

第30回



The 30th Annual Meeting of
the Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments

日本動物実験代替法学会

会期 2017年11月23日(木・祝)～25日(土)

会場 大田区産業プラザ (PiO)

東京都大田区南蒲田1丁目20-20

大会長 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所

テーマ

レギュラトリーサイエンスと3Rs



池上本門寺



About JaCVAM



Update on JaCVAM



Academic activities



Submission of Alternative
Methods to JaCVAM



International Cooperation

Policy and Mission: JaCVAM's policy and mission is to promote the 3Rs in animal experiments for the evaluation of chemical substance safety in Japan and establish guidelines for new alternative experimental methods through international collaboration.

the 3Rs in animal experiments—Reduction (of animal use)

御静聴ありがとうございました

Replacement (to lessen pain or distress and to enhance animal well-being)
Refinement (of an animal test with one that uses non-animal systems or phylo-genetically
lower species)
(OECD GD34)

News

📧 **[NEW]** news texts dummy texts news texts dummy texts

news texts dummy texts(2009.7.16)

📧 news texts dummy texts news texts (2009.7.3)

📧 news texts dummy texts news texts dummy texts news

texts dummy texts (2009.7.3)

Contents

📧 About JaCVAM

Message from JaCVAM / Policy and Mission of JaCVAM /

Organization of JaCVAM / Glossary /

Proposal for Engagement Rules

📧 JaCVAM Activities



有害性評価支援システム 統合プラットフォーム (HESS)

ユーザー

反復投与毒性を
評価したい化学物質
の化学構造、物質名
CAS番号など

入力

毒性知識情報

試験報告書DB

毒性作用機序DB

代謝知識情報

ラット代謝マップDB
(ラット代謝シミュレータ)

ADME DB
(ヒトP450代謝予測)

ベイジアンネットワーク
毒性推定
システム (ToxBay)

カテゴリープローチ支援機能
(カテゴリークラスタリ等)

出力

評価対象物質や
その類縁物質の
反復投与試験情報
作用機序情報
カテゴリ情報
推定される毒性等

新規材料

エキスパート
ジャッジ

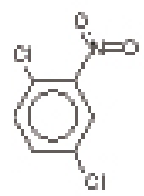
未試験物質の
反復投与毒性

互換性

OECD QSAR Toolbox

TISS DB

Input
Profiling



Chemical name:
CAS No: 88-81-2
SMILES: ClC(=O)c1cc([N+](=O)[O-])ccc1
to data matrix >

評価対象物質

類似物質候補

RDT Data

Categories

Gap Filling

Metabolism

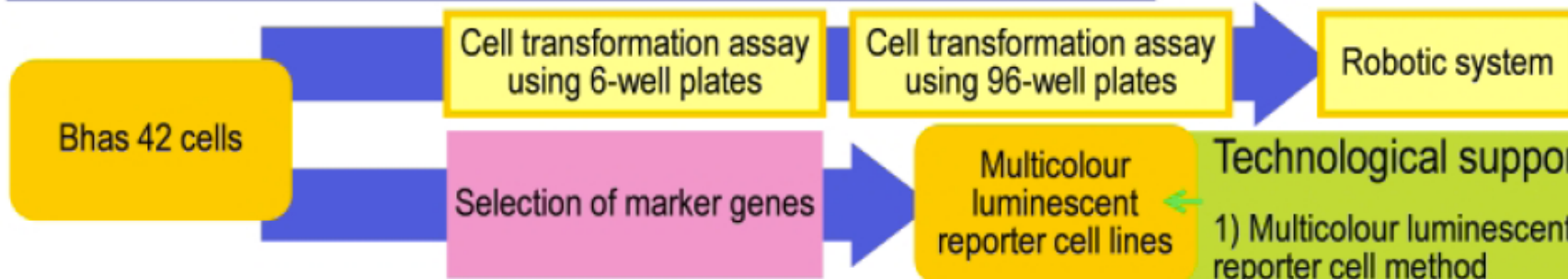
Report

Filter endpoint tree...	1 (Target)	2	3	4	5
Structure					
Substance Identity					
Repeated Dose Toxicity					
LOEL					
Blood Chemical Examin...					M: 20 mg/kg/day
Hematological Examin...					
Undefined Organ					
Blood Cell (Erythro...					
RBC↓	(9/16)	M: 15 mg/kg/day, 1...	M: 20 mg/kg/day, 2...	M: 769 mg/kg/day, ...	M: 385 mg/kg/...
HGB↓	(10/17)	M: 15 mg/kg/day, 1...	M: 20 mg/kg/day, 2...	M: 769 mg/kg/day, ...	M: 385 mg/kg/...
HTC↓	(10/17)	M: 15 mg/kg/day, 1...	M: 20 mg/kg/day, 2...	M: 769 mg/kg/day, ...	
Reticulocyte↑	(10/14)	M: 60 mg/kg/day, 5...	M: 60 mg/kg/day	M: 385 mg/kg/day, ...	
Methemoglobin↑	(5/9)		M: 20 mg/kg/day	M: 182 mg/kg/day, ...	M: 769 mg/kg/...
Histopathological Findings	(9/39)	M: 15 mg/kg/day, 1...	M: 5 mg/kg/day, 5 ...	M: 48.1 mg/kg/day, ...	M: 48.1 mg/kg/...
Organ Weights					
NOEL					
Profile					
Chemical No. (Link to HESS DB)	5	473	286	287	

各所見に対するLOELを物質間で横並びに比較できる

各物質の詳細データ確認のためのHESS DBへのリンク

HTP Assay for Carcinogenicity by Hatano Research Institute



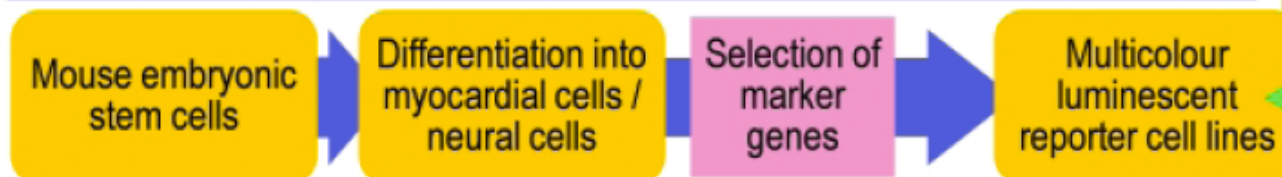
◆ Formation of R&Ds

Technological support

1) Multicolour luminescent reporter cell method by the National Institute of Advanced Industrial Science & Technology and Toyobo Co., Ltd. enables to monitor the expressions of two or three marker genes in each cell simultaneously, promptly, and sequentially

2) Human artificial chromosome (HAC) vector method by Tottori University enables to deliver large size DNA segments and to evade transgene silencing caused by chromosomal position effect

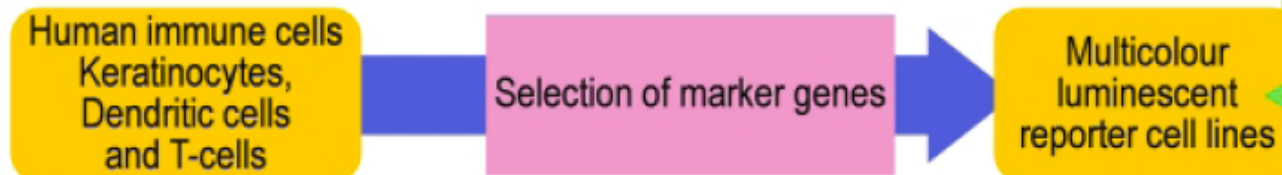
HTP Assay for Teratogenicity by Sumitomo Chemical Co., Ltd.



Confirmation ↓ ↑

Rat whole embryo culture with metabolic activation (S9-mix addition) by Kamakura Woman's University

HTP Assay for Immunotoxicity by Tohoku University



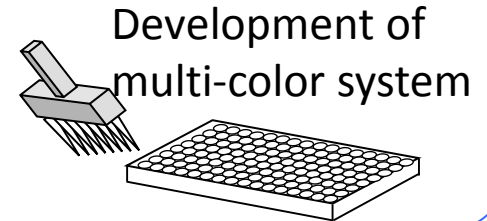
Goal of ARCH-Tox



Tox-in Vitro

Cell Culture system

- Speedily
- Low cost
- High specificity
- High-throughput



Tox-Omics

New Biomarker

Hepatotoxicity



Liver

Neurotoxicity



Brain

Nephrotoxicity



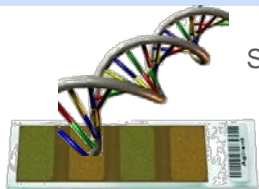
Kidney



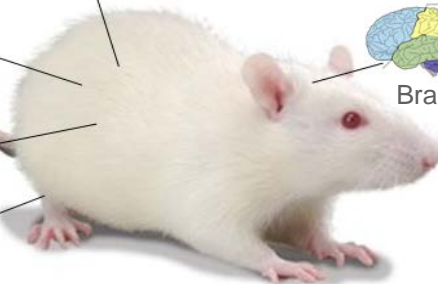
Spleen



Bone Marrow



Gene expression analysis



Prediction system

Screening

More another testings:
carninogenicity,
Long reputed
dose testing,
etc.

Our project has received funding from the METI in Japan.

R社の掲げる万能細胞ビジネス(次世代バイオ産業)

HPより借用

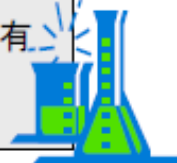
事業領域	 <p>研究試薬 研究機器</p>	 <p>創薬支援</p>	 <p>テイラーメイド 医療</p>	 <p>再生医療</p>
実現時期	現在	現在～5年後	5～10年後	5～20年後
市場規模	数百億円	数千億円	数兆円	数兆円
事業モデル	培地・抗体 研究用細胞 デバイス 機器	創薬モデル細胞 創薬用デバイス 検査受託	検査受託 細胞加工 細胞バンキング	医療用細胞 細胞バンキング

ヒトiPS細胞を用いた新規in vitro毒性評価系の構築

特区の必要性

背景

- 日本の化学物質(薬剤等)の分子毒性解析技術は世界トップクラス
- 世界最大規模(8億件)のトキシコゲノミクス(毒性と遺伝子発現)のデータベース所有
- 「iPS細胞活用毒性評価技術」は総合科学技術会議から革新的技術の位置づけ(平成20年5月「革新的技術戦略」)



本複合体がiPS細胞の創薬応用で世界をリード



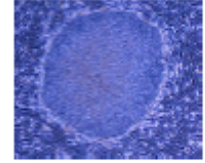
課題

- 動物実験によるスクリーニングでは「種差の壁」の限界を超えられない
- 評価系構築には様々な要素技術の融合が不可欠(細胞品質管理技術、分化誘導技術、毒性評価技術等)
- ヒトiPS細胞の創薬応用分野は世界との競争が激しく研究のスピードアップが不可欠
- 評価系を構築できても新薬承認審査基準に結びつかなければ新薬開発につながらない

スーパー特区による

- 様々な要素技術を融合させた新規評価系構築の研究と
- 規制当局との並行協議による評価系の審査基準への反映(先端技術と審査との乖離の解消)が不可欠

事業の概要



iPS細胞はあらゆる細胞に分化でき倫理上の問題点も少ないため
新規in vitro 毒性評価系開発のための最適な細胞ソース！

ヒト臍帯血細胞、胎盤組織由来細胞、
月経血由来細胞等を材料にした
ヒトiPS細胞コレクションの作成
(性別、年齢、細胞種、遺伝子背景等バリエーション)

ヒトiPS細胞の培養法の確立、
および品質評価法の開発と標準化
(グローバルスタンダードな
ヒトES細胞の標準値との比較)

京都大学
シェフィールド大学(英)
等と連携

目的細胞(肝臓、心筋、神経等)
への高効率分化誘導

世界最大規模(8億件)のトキシゲミクス
(毒性と遺伝子発現)のデータベース活用

ヒトiPS細胞を用いた新規in vitro毒性評価系の開発
各細胞毎に多種の毒性等を一度にスクリーニングできるハイスループットシステム



薬事法上の新薬承認審査基準に反映させる毒性試験ガイドライン案作成(従来基準を置き換える)
世界の新薬開発国が参加するICHのグローバル・スタンダードへ貢献

iPS細胞の「創薬応用」に関する
唯一のプロジェクト

iPS細胞の再生医療等への応用と比較し
創薬応用(毒性評価系構築)は
より早期の実用化が期待される

ICH S5(R3) Expert Working Group Meeting

Workpackages

Integrated testing strategies for EFD (Embryonic and Fetal Development study)

- Design of optional integrated testing strategies involving an *in vivo* mammalian EFD assessment and *in vitro*, *ex vivo* and non-mammalian *in vivo* (e.g. zebrafish) EFD assays
- Identification of scenarios of use and the limited circumstances under which such a testing strategy would be considered.

Combinations of studies –JPMA&MHLW/PMDA

- Delineate options of combining reproductive toxicity studies and their designs
- Describe the circumstances under which the outcome of preliminary EFD studies could determine the ultimate risk assessment for EFD
- Identification of scenarios of use of the different combinations

Proposed Next Steps and Timelines

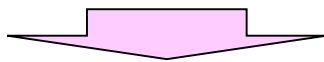
- ✓ EWG face-to-face at June 2016 ICH Meeting is requested
- ✓ Timeline for Step 2a Document by June 2017
- ✓ A total period of 4.5 years is foreseen for Step 4 from the establishment of the EWG
- ✓ Public comments incorporated into Step 4 Document June 2019

In vitro methods for embryotoxicity

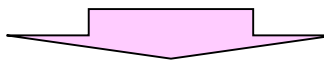
More than 30 different culture systems have been proposed

- 1) Tests on non-vertebrate species (*Hydra*, *Drosophila* etc.)
- 2) Tests on lower vertebrate embryo or embryonic aggregates (fish, birds etc.)
- 3) Tests on whole mammalian embryos
- 4) Tests on micromass cultures from mammalian embryos
- 5) Tests on embryonic stem cells (ES cells)**
- 6) Tests on other mammalian cell lines (neuroblastoma cells, teratocarcinoma cells etc.)

(Food Chem. Toxicol., 2002, 40, 193)



No tests gain regulatory acceptance and use.



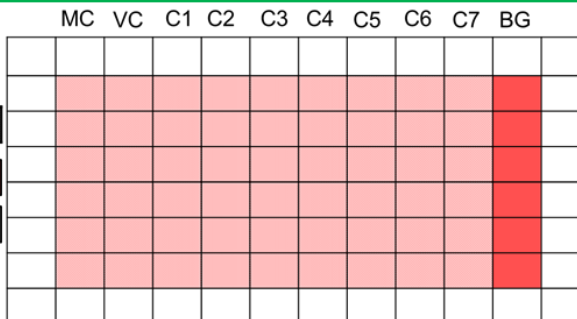
The research on alternative methods for detection of embryotoxicity is very challenging!

The Hand1-Luc EST

Design of the test plate :

MC: Medium control
VC: Vehicle control
BG: Background

Cells
Medium
PBS

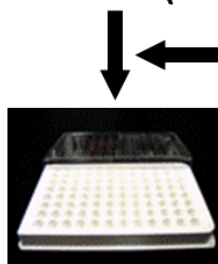


**1 chemical/96
round bottom well
plate**

Current protocol of Hand1-Luc EST:

Hand1-ES (KOB1) cells

Day
0



white U96 well plate

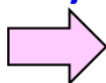
Test compounds
(• Water solubility)

Establishment of
the **maximum
dose**

120
hr

• Cell viability assay

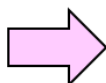
(CellTiter Fluor)



ES-IC₅₀ (Cytotoxicity)

• Luc-activity

(Steady-Glo)



ES-ID₅₀ (Differentiation toxicity)

Hand1-Luc EST is an easy and inexpensive protocol