

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 医薬品等の動物試験代替法の開発及び国際標準化等に関する研究
(英語) Research into the development and international standardization of alternative test methods for evaluating the safety of drugs and quasi-drugs

研究開発実施期間：平成31年4月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 小島 肇
(英語) Hajime Kojima

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官
(英語) Senior Researcher, Division of Risk Assessment, National Institute of Health Sciences

II 研究開発の概要

【小島 肇】

1. 医薬品等の生殖毒性代替法の開発と国際標準化のための共同研究

三重大学 田中利男教授によって作成された高品質受精卵作出プロトコルを適用したバルプロ酸ナトリウムを用いる多施設研究を4施設にて実施した。先の研究班(2015-2017年度)では、胚死亡及び胎児形態異常所見に対する判定の施設間差により施設間差を払拭できなかった。令和元年度はまず、三重大学にて、研究協力4施設の担当者が集い、バルプロ酸に曝露されたゼブラフィッシュの死亡胚及び異常胎児を観察し、胚死亡、正常と異常の胎児の画像を集積し、その後、担当者間で意見を集約して画像による判断基準を作成した。令和元年8月に、三重大学にて試験法研修会を開催し、ゼブラの異常形態に関する議論を重ね、基準を検討した。この基準を用いてバルプロ酸を用いて施設間再現性を確認したところ、目標範囲に到達したと判断した。令和2年度、ICH S5(R3)ガイドラインの陽性対照物質(Topiramate, Methotrexate, Tretinoin : all-trans-retinoic acid)を用い、施設間再現性を確認できた。

令和3年度は、ICH S5 (R3)に示された28陽性物質及び陰性対照4物質を4施設にて実施した。その結果、感度71%(20/28)及び特異度50%(2/4)を得ることができた。今後、一致しなかった物質の解析を行い、プロトコルの改定に反映させる。

2. 局所毒性試験代替法のバリデーション研究

日本で開発された局所毒性試験代替法の OECD における TG としての公定化を目指し、試験法のバリデーション研究及び第三者評価を進めた。

再構築皮膚 LbL モデルを用いた皮膚刺激性試験 (LbL-3D Skin SIT) については、令和元年度、バリデーション報告書とともに、LbL-3D Skin SIT を OECD に TG 申請を行った。令和 2 年度、本試験法のバリデーション結果は国際的な専門家による peer review 報告書が完成し、バリデーション報告とともに OECD に提出した。現在、OECD 専門家より追加データが求められている。令和 3 年度、OECD での各国専門家との議論が進んでいたが、開発者の定年退職に伴い、プロジェクトが頓挫した。

皮膚感作性試験代替法 EpiSensA については、開発者の花王株式会社などの協力を得て実施した。令和元年度は施設内再現性を phase 1A (5 物質を 3 施設) 及び 1B (同左) を検討した。令和 2 年度は phase 1C を実施し、9 月に開催された国際バリデーション会議にて、Phase I の全 15 物質の施設内再現性が 93.3%、93.3% 及び 86.7% と事前に設定した 85% の基準を満たしたことを確認した。施設間再現性も 86.7% と事前に設定した 80% の基準を満たし、Phase I の終了を確認できた。令和 3 年度、施設間再現性確認のため、Phase II (12 物質実施) が実施され、Phase I の結果と合わせ、88.9% という施設間再現性の高いプロトコルを開発できた。この結果を受け、バリデーション報告書を完成させた。

3. 弱い眼刺激性を評価するため、眼刺激性試験代替法 BCOP (牛摘出角膜混濁及び透過性試験) の病理学的評価を用いた改良

OECD TG437 である BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability test method : 牛摘出角膜の混濁及び透過性試験法) の従来法と病理観察の併用により、弱い刺激性を評価する改定を目指し、病理学的評価を加える試験法の改良を本試験の経験が豊富な米国 IIVS 社及び(株)化合物安全性研究所と検討した。2018 年度に OECD に TG437 の改定を提案し、令和元年度より OECD の作業計画に入り、OECD での議論が始まった。

令和 2 年度は、病理観察結果の判定基準で評価を実施したが、令和 2 年 2 月に施設間の再現性が取れていないことが明らかになり、陰性対照を含めてさらなる再評価を実施した。結果として、施設間再現性を確認できたが、感度が目標値である 50% を見たさず、病理基準による陽性の見直しを進めた。

令和 3 年度、病理標本の利用により、弱い眼刺激性が評価できると信じて取り組んだが、まだ想定内の予測性を見出させなかった。これまでの結果を報告書としてまとめ、OECD 専門家と議論して今後の進め方を決める予定である。

4. 皮膚毒性評価ガイダンス開発に関する研究

OECD の試験法をもとに、国立医薬品食品衛生研究所・五十嵐協力研究者、日本化粧品工業連合会及び医薬品医療機器総合機構の協力によるガイダンス検討会にて、医薬部外品・化粧品のガイダンスを作成した。

産官学の協力で作成してきた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) ガイダンスが令和 2 年 6 月に厚生労働省より通知された。

一方、皮膚毒性評価ガイダンス開発に関する研究において、非動物実験による総合的な皮膚刺激性評価体系の構築を目指し、皮膚刺激性が弱い素材区分において、OECD TG439→パッチテスト→ヒト連続適用試験を組み合わせた提案とその根拠構築を行った。この成果を用いて、ガイダンス案の議論を進行した。また、急性毒性試験のガイダンス作成においても、本分担研究の知見を急性毒性に応用して、急性毒性が弱い素材区分とそうでない区分で評価フローを分けたガイダンス案の議論を進行した。

結果として、医薬部外品・化粧品の安全性評価における皮膚刺激性を評価するための評価体系に関するガイダンス及び医薬部外品・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

関するガイダンスが厚生労働省から令和3年4月22日に発出された。

なお、ICCRではJWGにて、動物実験を用いないで化粧品の安全性を評価する事例報告の作成に関与した。令和元年7月10日～12日にモンテリオールでワークショップが開催された。本会議において、小島が日本を代表して、ガイダンス検討会で議論している皮膚刺激性の事例研究を「The Gap between Regulatory Framework and Safety Assessment -Skin irritation assessment for quasi drug and cosmetic ingredient-」として発表した。本ワークショップでは、他に化粧品原料の反復投与毒性に関する2例の事例報告があった。この報告書は令和2年度に公開された。

【山本直樹】

本研究では、ヒトにおける生殖・発生毒性を示すことが明らかとなっているが、未だに動物実験代替法ではその毒性を検出することができない代表的な被験物質の1つであるThalidomideをヒトiPS細胞に曝露した結果、遺伝子発現が変化する候補遺伝子から標的となる遺伝子を検討した。次にこれらの標的遺伝子の発現がモニターできるようにCRISPR-Cas9を用いたゲノム編集を行い、標的遺伝子の発現をルシフェラーゼで測定できるレポーターアッセイによる試験法の確立を目指した。

令和元年度、まず、ヒトiPS細胞を分化させる培養条件について、既報論文等を調査した結果を基に複数の培地組成を検討した。分化時の細胞形態の変化などから15% FBS, DMEM (Glutamine 含有), MEM-NEAA, 2-mercaptoethanolの条件が最も適切であった。サリドマイドの培地添加最大濃度は、懸濁状態ではあるが沈殿を数分で観察しない濃度を最大濃度として、培養液(分化培地)にて希釈系列を作成した。各希釈系列の濃度でiPS細胞にサリドマイドを8日間曝露し、無添加と同様に培養した時のWST-8吸光度を発育阻害率0%としたところ、IC50は500 µg/mLであった(添加24時間後、沈殿が観察されない濃度でもあった)。

500 µg/mLの添加濃度でサリドマイドを分化培地に添加し、4日、6日、8日間培養して分化させた細胞を用いて、次世代型マイクロアレイ(Clariom™ S Human Array, ThermoFisher)を用いて解析を行った。遺伝子発現にターゲットを絞り、さらにアノテーション済みの候補遺伝子(21,448遺伝子)の中でサリドマイドの添加によって遺伝子発現が低下した遺伝子(本研究における候補遺伝子)を令和元年度は十数遺伝子まで絞り込んだ。

令和2年度、遺伝子発現が変化する候補遺伝子から標的となる遺伝子を同定し、4遺伝子(*IRX3*, *EDNRA*, *SHISA2*, *LGR5*)を選出した。次にこの標的遺伝子の発現がモニターできるようにCRISPR-Cas9を用いたゲノム編集を行い、標的遺伝子の発現をルシフェラーゼで測定できるレポーターアッセイによる試験法を確立した。ゲノム編集を行ったクローンを*IRX3*は35クローン、*EDNRA*は65クローン、*SHISA2*は31クローン、*LGR5*は33クローンをピックアップし、細胞実験による遺伝子発現機能評価によるクローニングを行い、4遺伝子のクローンを選出した。

Thalidomide、Valproic acid、Favipiravir(アビガン)、陰性コントロールとしてのD-Mannitolの曝露濃度を決定するため、WST-8による3日間の曝露で被験物質が沈殿・残存せず、細胞活性が70%以上となる濃度で1,000 µg/mLを最高濃度として曝露濃度を検討した。結果として、Thalidomideは500 µg/mL、Valproic acidは400 µg/mL、Favipiravirは1,000 µg/mL、D-Mannitolは1,000 µg/mLであった。上記の濃度にて8日間の曝露によるレポーターアッセイを行い、ルシフェラーゼ測定による生殖・発生毒性の評価を行ったところ、Thalidomideではコントロールと比較して、*IRX3*の発現は13.1%、*EDNRA*は48.3%、*SHISA2*は10.4%、

LGR5は15.1%減少した。また Valproic acid では IRX3 は 8.4%、EDNRA は 1.2%、SHISA2 は 15.6%、LGR5 は 9.5%減少した。Favipiravir も IRX3 の減少は 73%であった。

なお、分化誘導培地については、還元剤である 2-mercaptoethanol を含有していたが、毒物及び劇物取締法に基づき毒物に指定されていることから、培地の組成を再検討した。分化時の細胞形態の変化などから血清濃度を低減させ、還元剤として 2-mercaptoethanol の代わりにモノチオグリセロールを加えることで、適切な分化誘導培地となった。

令和 3 年度は、Thalidomide、Valproic acid、Favipiravir (アビガン)、陰性コントロールとしての D-Mannitol を用いて、昨年までの実験プロトコルを 12 日間から 2 日間短期曝露によるプロトコルに改良した。検出基準としては、WST-8 にて曝露 2 日目まで細胞活性が 80%以上となる最高濃度を決定し、Luciferase アッセイにてコントロールと比べて 80%以下となった場合を発生毒性試験陽性と判断した。このプロトコルを用い、ICH-S5(R3)に記載されている被験物質 (17 物質) の曝露実験を実施した。

最終的に IRX3 を標的遺伝子としたレポーターアッセイを採用した。ICH-S5(R3)に記載されている被験物質の結果、曝露 2 日目において 72.2%の陽性物質を検出することができた。

【田中利男】

ICH S5 で利用できる生殖毒性試験代替法を開発するため、ゼブラフィッシュの受精卵初期発生過程におけるタイムラプス共焦点イメージング及びオミクス解析により、ゼブラフィッシュ受精卵品質保証を基盤にした発生毒性試験プロトコルの基礎を確立した。

令和元年度は、ゼブラフィッシュ発生毒性試験プロトコルを強化するため、受精後 2 時間からエンドポイントの 5-7 日後までの連続的タイムラプス共焦点イメージングシステムの実現性を確立した。形態異常の認められる 80 μ M バルプロ酸と形態異常の認められる 80 μ M サリドマイドの 5dpf におけるトランスクリプトームを比較し、サリドマイドとバルプロ酸による発生形態異常発現機構パスウェイ候補の相違点を明らかにした。

本プロトコルを日本製薬工業協会の 4 施設に導入し、最適化されたプロトコルでデータを集める。正常、陰性対照物質及び陽性対照物質による検討を実施するとともに、共同研究を進めた。

令和 2 年度、受精卵の品質保証プロトコルとして、各ウエルに 1 個の受精卵をソフトに固定し、受精後 3-5 時間の連続タイムラプス共焦点イメージングを基盤とする品質管理画像診断を強化した。さらに受精後 6 時間後から化合物曝露を開始し、受精 5-7 日後における稚魚イメージングを実施し、発生毒性試験結果として解析する新しいプロトコルを開発した。その結果、内因性発生異常を除外した医薬品の発生毒性試験が実現したと思われる。

一方、本プロトコルを日本製薬工業協会の 4 施設でバリデーションし、最適化されたプロトコルでバルプロ酸のデータを集め、各施設間でのデータ再現性が確認できた。さらに、レチノイン酸などを評価した。

令和 3 年度は、受精卵の品質保証プロセスプロトコルとして、受精後 3-5 時間の連続タイムラプス共焦点イメージングを可能にするため、各ウエルに 1 個の受精卵をソフトに固定するプロトコルにより、受精後 3-5 時間の連続タイムラプス共焦点イメージングによる品質管理画像診断を強化した。さらに受精後 6 時間後から化合物曝露を開始し、受精 5 日後における仔魚イメージング (左頭側、側臥位) マニュアルを創成した。その結果、陽性化合物サリドマイド・バルプロ酸、陰性化合物エリスロマイシン・スルファサラジンの曝露により、受精後 3-5 時間のタイムラプス共焦点イメージング品質保証が成立したウエルの受精 5 日後仔魚イメージン

グのみを、発生毒性試験結果として解析する新しいプロトコルが成立した。その結果、内因性発生異常による偽陽性を除外した医薬品の発生毒性試験が実現したと思われる。

一方、本プロトコルを日本製薬工業協会の4施設でバリデーションし、受精卵品質管理が最適化されたプロトコルで多くの化合物のデータを集め、各施設間でのデータ再現性が確認できた。

【藤堂浩明】

再構築皮膚モデルは、ヒトもしくは動物皮膚代替膜として皮膚適用製剤の評価膜として多くの研究機関で行われている。しかしながら、同じく再構築モデルを用いた皮膚刺激試験と異なり、透過試験用のプロトコルがなく、また、透過特性も各再構築モデルにより異なることから、その利用が限定されている。一般に、透過試験で得られる薬物透過量や皮膚移行量のばらつきは、ヒト皮膚>ブタ皮膚>げっ歯類の皮膚（ラットやマウス）>再構築モデルの順で大きくなることが知られている。再構築モデルは、製剤間の透過性の違いをより細かく比較できることから、皮膚適用型医薬品製剤の生物学的同等性試験等への利用が適している可能性がある。しかしながら、令和元年度、意見交換会を行政及び製薬企業の方を交えて開催した結果、再構築モデルは、ロット差、バラつきの回避にはつながると考えられるものの、再構築モデルが動物皮膚と比較して安価であると言えない、剤型と適用範囲を絞る必要がある、行政と業界の必要性を認識し、理論構築が必要である等の意見が得られた。得られた意見をもとに、先行薬の処方変更時（C水準）に同等性を確認するための試験法として再構築モデルを利用するのではなく、医薬部外品申請時の有効成分の皮膚透過評価に利用できるよう計画を再検討することとした。

まず、再構築モデルXを用いて、市販されている医薬部外品製剤（化粧水、乳液、クリームなど）からの有効成分の皮膚透過性を評価し、ヒト皮膚との相関性を確認した。その結果、いくつかの製剤で、透過量の大小関係がヒト皮膚と再構築モデルXで異なる結果が確認された。ヒト皮膚データは、透過量のばらつきが大きくなることが知られており、試験数を多くし（現在はn=1）評価する必要がある。また、再構築モデルXだけでなく、他の再構築モデルでの評価も必要である。今後、再構築モデルの種類だけでなく、ヒト皮膚を用いた試験の例数を増やすことで、各再構築モデルに応じた試験プロトコルを作成した。

令和2年度、市販されている医薬部外品製剤（化粧水、乳液、クリームなど）からの有効成分の皮膚透過性を膜特性の異なる2種の再構築モデルを用いて評価し、ヒト皮膚との相関性を確認することで、皮膚代替膜としての有用性を調査した。その結果、いずれの培養皮膚でも試験は、種々油性及び水性成分を含有する複雑処方系からの有効成分のヒト皮膚透過性の大小関係を推定できることが明らかとなった。しかしながら、本試験では再構築モデルの取り扱いに熟練したものが注意し透過性試験用ガラス製セルに装着する必要がある。熟練度にかかわらず再現性の高い結果を得るため、再構築モデルをガラス製皮膚透過セルへの装着を容易にするアタッチメントの開発が必要であることが課題として挙げられた。

令和3年度、膜特性の異なる2種の再構築モデル（EpiDerm 606X及びLSE-high）を用い、剤形の異なる種々医薬部外品製剤からの有効成分（トラネキサム酸、ニコチン酸アミド及びルシノール）の皮膚透過性を調査し、ヒト皮膚との相関性を確認した。その結果、いずれの再構築モデルを用いた場合でも各種剤形からの有効成分の透過性は、ヒト皮膚を介した有効成分の大小関係と一致した。また、いずれの再構築モデルから得られた透過係数も、ヒト皮膚を介した有効成分の膜透過係数と高い相関を有した（EpiDerm 606X： $r^2=0.87$ ，LSE-high $r^2=0.91$ ）。しかしながら、膜透過係数を有効成分ごとに比較すると、水溶性有効成分のトラネキサム酸やニコチン酸アミドの再構築モデルを介した透過係数は、ヒト皮膚を介した場合より高値を示すことが分かった。適用した製剤処方を調査した結果、製剤中に低級アルコールや非イオン界面活性剤が含まれていることがわかった。通常、医薬部外品製剤は有効成分の透過促進効果を期待しない処方設計がなされていることから、低

級アルコールや非イオン界面活性剤が含まれていたとしても、その量は角層バリアに影響を及ぼさないと考えられる。しかし、ヒト皮膚と比較して角層バリア能の弱い再構築モデルでは、添加物の影響を受け、角層バリア能が低下した可能性が考えられた。一方、脂溶性物質のルシノールは角層バリアの影響を水溶性有効成分と比較して受けにくいと、透過性の変化が認められなかったと考えられた。よって、培養皮膚を用いた部位品製剤からの有効成分の皮膚透過性については、透過性の大小関係は正しく評価できるものの、再構築モデル透過性からヒト皮膚透過性を予測するには難しいと考えられた。

本試験では再構築モデルの取り扱いに熟練したものが注意し透過性試験用ガラス製セルに装着する必要がある。熟練度にかかわらず再現性の高い結果を得るため、再構築モデルをガラス製皮膚透過セルへの装着を容易にするアタッチメントの開発が必要であることが昨年度課題として挙げられた。指摘内容に応えるため、アタッチメントの開発も行い、容易に試験が評価できることも示した。

【矢上晶子・中田土起丈】

1. 皮膚刺激性ガイダンス案

令和元年度、皮膚一次刺激性、連続皮膚刺激性に関して動物を用いずに評価するため、OECD TG439 とヒト 24 時間パッチテスト、Human Repeated Insult Patch Test (hRIPT)や使用試験などのヒトへの連続適用試験を組み合わせた方法について検討を加えた。皮膚刺激性が弱い成分分類の具体化を検討し、「糖質、アミノ酸/ペプチド類 (酵素以外)、多価アルコール類 (C4 以上)、植物エキス類 (蒸発残分 5%以下)、高級脂肪酸 (C14 以上)、高級アルコール (C12 以上)、エステル油 (C12 以上)、ロウ類、トリグリセリド、炭化水素油 (C20 以上)、不揮発性シリコーン (Si 数 7 以上)」とした。また、低皮膚浸透性成分の条件として「分子量 (MW) 1000 以上、「MW500 以上かつ油水分配係数 (Log Kow)が-1 以下もしくは 5 以上) または「不溶性無機粉末」として、これらを低リスク成分とすることを、根拠とともに提案し合意形成を得て評価フローを作成した。引き続き動物実験に依存せず、連続皮膚刺激性までを含めた総合的な皮膚刺激性評価体系を構築し、ガイダンス化するために検討した。この成果を用いて、ガイダンス案を作成し、令和 2 年度ガイダンス検討会で合意を得た。

2. 単回投与毒性ガイダンス案

令和元年度、「医薬部外品・化粧品の安全性評価における単回投与毒性試験代替法としての細胞毒性試験に関するガイダンス (案)」をもとに、安全性データを組み合わせた医薬部外品の添加物の単回投与毒性評価系本試験法の運用方法について検討した。なお、令和 2 年度、単回投与毒性試験の代替法ガイダンス作成においても、本分担研究の知見を急性毒性に応用して、単回投与毒性が弱い素材区分とそうでない区分で評価フローを分けたガイダンス案を提案し、こちらについてもガイダンスの内容に関する合意を得た。

【足利太可雄】令和元年のみ参加

皮膚刺激性試験代替法 LbL-3D Skin SIT のバリデーション研究が開発者の大阪大学などの協力を得て実施された中で、3 施設の試験実施記録、データ記録用紙、機器点検記録検量線記録など Quality Control に関する記録を確認、整備した。

また、皮膚感作性試験代替法 EpiSensA のバリデーション研究については、開発者の花王株式会社などの協力を得て、Phase 1A として行った 3 施設における 5 化合物の 3 回繰り返しによる試験データのとりまとめを行った。

The objective of this study is to promote the international standardization and dissemination of alternative methods for safety evaluations of pharmaceuticals, quasi-drugs, and cosmetics that do not use animals (i.e., "alternative method"). The aim of the research and development, method improvement, validation, and independent peer review of alternative methods, is standardization in international organizations, including ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use), ICCR (International Cooperation on Cosmetics Regulation), and OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Based on this standardized test method, we created the Guidance on Safety Evaluation of Quasi-drugs and Cosmetics, and aimed to disseminate alternative methods.

For research and development, we developed a human induced pluripotent stem cell reporter assay targeting *IRX3* as an alternative for the reproductive and developmental toxicity test. The positive rate following exposure to the test substance described in ICH-S5(R3) was 72.2%, compared with human data.

To improve the test method, we revised it to evaluate weak irritation by combining the original Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test method (OECD TG437) with pathological observations. The test revision included many discussions with OECD experts.

For validation studies, as an alternative method for the reproductive and developmental toxicity test, 28 positive substances and four negative control substances recommended in ICHS5 (R3) were tested at four facilities using the high quality fertilized egg production protocol with zebrafish. The results were highly reproducible, with a sensitivity of 71% (20/28) and specificity of 50% (2/4). As an alternative skin sensitization test, an EpiSensA validation study demonstrated the intra-laboratory reproducibility with 15 substances at 93.3%, 93.3%, and 86.7%, which met the pre-defined 85% criterion. In addition, the inter-laboratory reproducibility using 27 substances was high (88.9%).

The Guidance on Safety Evaluation of Quasi-drugs and Cosmetics was issued by the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) on April 22, 2021, which provides guidance on the evaluation system for assessing skin irritation in the safety evaluation of quasi-drugs and cosmetics. MHLW also issued guidelines on the evaluation system for combining multiple safety data for acute oral toxicity evaluation of quasi-drugs and cosmetics created by the guidance review group on April 22, 2021.