

【報告様式A】

課題管理番号: 24mk0101223j0003 作成／更新日: 令和 7 年 5 月 23 日

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) 医薬品等の安全性評価に用いる動物試験代替法の開発、評価及び標準化に関する研究

(英語) Study of development, verification and standardization of alternative to animal tastings to safety assessment for pharmaceuticals

研究開発実施期間: 令和 4 年 4 月 1 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 足利 太可雄

(英語) Takao Ashikaga

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・ゲノム安全科学部・室長

(英語) National Institute of Health Sciences, Division of Genome Safety Science, Section Chief

II 研究開発の概要

国際的な動物実験の3Rs (Reduction、Refinement、Replacement) の普及により、化学物質のみならず医薬品等 (医薬品、医薬部外品、化粧品など) の安全性評価においても、動物を用いない動物実験代替法 (以下、代替法と記す) の利用が拡大しており、本研究開発では、ICH S5 (R3) 生殖毒性試験ガイドラインに記載できるような代替法として、再現性と予測性が高いゼブラフィッシュ受精卵を用いる試験及びヒト iPS 細胞を用いる試験法を開発し、旧研究班でバリデートしてきた皮膚感作性試験代替法 EpiSensA など日本発の代替法の OECD (経済協力開発機構) TG (試験法ガイドライン) 化を目指し、さらに医薬部外品添加剤の申請に必要な代替法ガイダンスを整備することを目標としてきた。これまでに得られた成果および意義については以下の通りである。

研究開発項目 1 医薬品のゼブラフィッシュを用いた生殖毒性試験代替法の開発については、まず高品質受精卵製造時の新しい品質管理プロトコルを開発し、従来の OECD プロトコルと比較した結果、精度向上を確認した。ICH S5 に準じた新しい試験法の改良については、予測性の改善を行った上で、プロトコルを確立し、研究内容が令和 7 年度に *Journal of Toxicological Science* に掲載された (本論文は毒性学会第 52 回年会において、田邊賞を受賞することになった)。ゼブラフィッシュ系統の検討としては、ゼブラフィッシュ系統のゲノムシーケンスを行い、系統差の核心としてのゲノムの違いを明らかにした論文がサイエンティフィック・リポーツ誌に掲載された。さらに発生毒性試験の系統差の解析については、奇形が現れない低濃度での遺伝子発現変化を RNA-Seq で解析し、遺伝子発現変化について系統差が小さいことを明らかにした。以上の成果により、ICH S5 (R3) ガイドラインで受け入れ可能なプロトコルの開発と、その妥当性を説明可能な基盤情報の整備ができたと考える。

研究開発項目 2 医薬品の生殖毒性試験代替法に有用なヒト由来細胞株の評価に関する研究については、血清を用いない完全人工合成の分化培地を完成させ、この培地は細胞の *viability* について血清と同等性を示し、また Thalidomide の検出性能があることを確認した。次に、分化誘導 6 日間のプロトコルを完成させ、TaqMan® hPSC Scorecard Panel を用いた三胚葉への多分化性を遺伝子発現レベルで確認した。さらに ICH-S5(R3) の陽性対照物質 (バルプロ酸 ; VPA、Thalidomide など) および陰性対照物質 (Saxagliptin、Vildagliptin など) の合計 12 物質の最高適用濃度と最低適用濃度の設定基準を確立した。なお、これら一連の成果をまとめ、ヒト iPS 細胞を用いた発生毒性試験代替法としての特許出願 (特願 2024-191215) を行い、日本動物実験代替法学会 第 37 回大会にて発表し、優秀演題賞を受賞した。研究成果は英語論文として *Cells* に投稿し、受理された。

研究開発項目 3 皮膚感作性試験代替法の国際標準化については、皮膚感作性試験代替法 EpiSensA の *peer review* を実施し、*validation report* とドラフトテストガイドラインとともに OECD に提出した。その後 OECD 皮膚感作性専門家委員会にて本代替法の審議が行われ、各国からのコメント対応を行った結果、2024 年 6 月に OECD TG442D に収載された。また新規皮膚感作性試験代替法 α -Sens のバリデーションを継続して実施し、Phase I を 2024 年 5 月、phase II を 2025 年 2 月にそれぞれ終了させた。その結果、化学物質 12 品による施設間再現性は 91.7-100%、25 品による施設内再現性は 96.0% となり非常に良好であった。そこで本来次期の研究で行う予定であった *peer review* を令和 6 年度中に前倒しで開始することとし、2025 年 3 月に *pre peer review meeting* として欧米の 3 名を含む 5 名の皮膚感作性の専門家による対面会議を開催した。EpiSensA の収載により、皮膚感作性試験代替法の OECD テストガイドライン 10 試験法のうち 4 試験法が日本で開発されたものとなった。この実績は我が国が皮膚感作性試験代替法開発および国際標準化において文字通り世界を牽引してきたことを示し、蓄積されたノウハウや経験は今後他の毒性エンドポイントの代替法開発においても水平展開すべきと考える。

研究開発項目 4 再構築表皮モデルを用いた医薬部外品の皮膚刺激性に関する研究については、令和 4 年度は、12 物質について再構築表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験を実施しデータを取得した。その結果、3 物質で皮膚刺激性「陽性」と判定された。これらの陽性物質の無刺激性濃度を算出するため、その刺激性を評価したところ、すべての刺激性物質において、無刺激性濃度（再構築表皮モデルを用いる皮膚刺激性試験で陰性となる最大濃度）を求めることができた。令和 5 年度および令和 6 年度は、皮膚刺激性試験代替法ガイダンスの改定に必要な皮膚刺激性試験データの拡充を行った。被験物質は、ヒトパッチやヒト繰り返し適用試験の結果が既知の医薬部外品成分リスト 144 物質から 38 物質を選定した。これらの被験物質について、再構築表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験を実施した結果、6 物質で皮膚刺激性「陽性」の結果が得られ、これらの陽性物質は適切な溶媒で希釈することで無刺激性濃度を算出可能であった。また、希釈媒体の種類が無刺激性濃度に与える影響を評価するため、日局注射用水および日局ゴマ油に加え、50%ブタンジオール (BG) 水溶液を希釈媒体として検討した。その結果、ゴマ油と 50%BG 水溶液両方に溶解した 1 物質において、算出された無刺激性濃度に差はみられず、媒体の種類による影響は小さいことが示唆された。以上 3 年間の結果をもとに、ヒトパッチやヒト繰り返し適用試験の結果が存在する計 50 の医薬部外品成分について、データセットをまとめた結果、再構築表皮モデルを用いた試験で陽性と判定される物質であっても、適切な溶媒で希釈し無刺激性濃度を算出することで、この無刺激濃度以下であればヒトパッチやヒト繰り返し適用試験を実施できる可能性が示唆された。本研究成果をもとに、現在の医薬部外品の皮膚刺激性ガイダンスをリスク評価を可能にするものに改定する予定である。

研究開発項目 5 皮膚毒性評価ガイダンス開発に関する研究については、以下の結果を得た。

(1)令和 3 年度に検討した光安全性ガイダンス発出に向けた最終調整（パブコメ対応など）を行い、2022 年 10 月 27 日にガイダンス文章が厚生労働省から発出された（薬生薬審発 1027 第 1 号）。

(2)令和 4 年度から、OECD ガイドライン 497（Defined Approaches on Skin Sensitisation）に基づく皮膚感作性ガイダンス化に取り組んだ。本ガイドラインは、3 試験中 2 試験が陰性なら、感作性陰性と判断可能な 2 out of 3(2o3)と、in silico モデルを含み、GHS 分類が可能な Integrated Testing Strategy (ITS) v1 及び ITS v2 から成り、感作性試験代替法 3 試験すべて陰性なら感作性陰性という、既存の医薬部外品ガイダンスと異なるものである。本ガイドラインで記載されている 3 つのアプローチの特徴や考え方について、本検討会メンバーに説明し理解を得た上で、ガイダンス化の骨子における合意形成を経て文章化に取り組んだ。その結果、パブリックコメントを経て、2025 年 3 月 28 日にガイダンス文章が厚生労働省から発出された（医薬薬審発 0328 第 3 号）。

(3)皮膚刺激性ガイダンスの改定についても取り組み、現行の適用範囲を拡大する提案を検討している。現行ガイダンスは低リスク成分のみを適用範囲として、TG439 で陰性である場合のみ、ヒト試験が可能な評価フローであった。現在、①低経皮吸収性物性をもつ成分については、適用範囲を有効成分や化粧品ポジティブリストに拡大、②EU・米国で許可されたポジティブリスト成分（紫外線吸収剤、色素、防腐剤）については、24 時間曝露の刺激性試験データが無くとも、追加動物実験は不要、③TG439 陽性成分など、その他成分については、ガイダンス文章案では特定の安全マージンを設定せず、申請者が安全マージンに関する本研究班の成果を参考にして設定、という 3 つの視点で適用範囲拡大を議論している。今後皮膚刺激性については本研究開発項目と研究開発項目 4 で得られた成果による医薬部外品ガイダンスの改定を目指す。

研究開発項目 6 NAM による全身毒性の安全性評価代替法の検討については、以下の成果を得た。令和 4 年度は、事例形式の確立に向け、研究開発協力機関と密な議論を行い、OECD で実施された IATA Case Studies Project、NAM や次世代リスク評価（NGRA）に関する海外動向の情報を収集・共有した。また、

研究開発協力機関にて実施された NAM 事例を例に、想定される様々な側面から、事例研究の形式について議論を深め、方針を定めた。これに基づき、有害性評価の専門家や規制機関、業界団体の協力を仰ぎ、次年度以降に事例研究を実施する体制を整えた。令和 5 年度は、OECD で実施されている IATA Case Studies Project、NAM や次世代リスク評価 (NGRA) に関する最新の海外動向の情報を収集・共有した。さらに、前年度に定めた方針に従い、研究開発協力機関のもとで全身毒性に対するリードアクロス事例 1 を作成し、協力を依頼した有害性評価の専門家、規制機関、業界団体と共有し、レビューを行った。各所からのレビューコメントを元に、現実的な行政受入を明確に意識した、リードアクロスの安全性評価代替法としての課題を議論した結果、幾つかの重要な課題を洗い出し、示唆に富む見解を挙げる事ができた。令和 6 年度は、研究開発協力機関のもとで発生毒性に対するリードアクロス事例 2 を作成し、前年度のメンバーに発生毒性の専門家を新たに加え、レビューを行い、同様にレビューコメントを元にリードアクロスの課題を議論し、さまざまな課題を整理することができた。事例 1、事例 2 とともにレビューを元に修正を行った。2 つの事例とそのレビューで得られた知見について学会にて成果発表を行い、幅広い研究者に向けて情報を共有することができた。現在これらの発表内容を論文にまとめており、学術誌に投稿中である。本研究開発項目の実施により、医薬部外品申請においてリードアクロスが安全性評価の一部として使用可能ということを示せたと考える。また、リードアクロスにおける、類似物質の選定や評価の難しさ、毒性機序の仮説の立て方の留意点、既存情報の限界を補うための *in vitro* および *in silico* 手法の重要性を確認できた。

With the spread of the 3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) in animal testing internationally, the use of alternative methods without using animals (hereinafter referred to as alternative methods) is expanding not only for safety evaluation of chemical substances but also for safety evaluation of pharmaceuticals (pharmaceuticals, quasi-drugs, cosmetics, etc.). In this research and development, we developed a test using fertilized zebrafish eggs and a test method using human iPS cells, which are highly reproducible and predictable as alternative methods that can be listed as references in the ICH S5 (R3) reproductive toxicity test guideline, and aimed to make Japanese alternative methods such as EpiSensA, an alternative method for skin sensitization testing that had been validated by the former research group, into OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) TGs (Test Guidelines), and further aimed to develop alternative method guidance required for applications for quasi-drug additives. The results and significance obtained so far are as follows.

Item 1: Development of alternative methods for reproductive toxicity testing of pharmaceuticals using zebrafish. First, we developed a new quality control protocol for producing high-quality fertilized eggs and confirmed that the accuracy was improved. Regarding the improvement of the new test method based on ICHS5, after improving predictability, a protocol was established. Regarding the study of zebrafish strains, specific gene mutations related to the toxic response for each strain were identified, and a list of disrupted genes and a list of genes with reduced function were compiled. Based on the above results, we believe that we have developed a protocol that is acceptable for the ICH S5 (R3) guideline.

Item 2: Research on the evaluation of human-derived cell lines useful as alternative methods for reproductive toxicity testing of pharmaceuticals. A serum-free, fully synthetic differentiation medium was completed. Next, a 6-day protocol for differentiation induction was completed, and pluripotency into three germ layers was confirmed at the gene expression level using the TaqMan® hPSC Scorecard Panel. In addition, setting standards for the maximum and minimum application concentrations of a total of 12 substances were established.

Item 3, the international standardization of alternative methods for skin sensitization testing, a peer review of the

alternative method for skin sensitization testing, EpiSensA, was conducted and submitted to the OECD along with the validation report and draft test guidelines. As a result, it was included in OECD TG442D in June 2024. In addition, validation of the new alternative method for skin sensitization testing, a-Sens, was completed in success. The peer review, which was originally scheduled to be conducted in the next research period, was started in March 2025.

Item 4, research on the skin irritation of quasi-drugs using a reconstructed epidermis model, in 2022, skin irritation tests were conducted on 12 substances using a reconstructed epidermis model and data were obtained. As a result, the non-irritant concentration (the maximum concentration that is negative in a skin irritation test using a reconstructed epidermis model) could be obtained for all irritating substances. In FY2023 and FY2024, the skin irritation test data necessary for revising the guidance on alternative methods for skin irritation tests was expanded to 50 substances.

Item 5, research on the development of skin toxicity assessment guidance, the following results were obtained. (1) In FY2021, the guidance document of the photosafety guidance was issued by the Ministry of Health, Labour and Welfare. (2) Starting in FY2022, we worked on creating skin sensitization guidance based on OECD guideline 497 (Defined Approaches on Skin Sensitisation). As a result, after public comments, the new skin sensitization guidance was issued by the Ministry of Health, Labor and Welfare in FY2024. (3) We are also working on revising the skin irritation guidance and considering proposals to expand the current scope of application. In the future, we aim to revise the quasi-drug guidance regarding skin irritation based on the results of this research and development item and research and development item 4.

Item 6, the following results were obtained with regard to the study of alternative methods for safety assessment of systemic toxicity using NAM. In FY2022, in order to establish a case format, we held close discussions with research and development cooperation organizations, and collected and shared information on the IATA Case Studies Project conducted by the OECD, and overseas trends regarding NAM and next-generation risk assessment (NGRA). In FY2023, we created a read-across case study 1 for systemic toxicity under the research and development cooperation organization, shared it with hazard assessment experts, regulatory agencies, and industry associations that we requested to cooperate, and reviewed it. In FY2024, we created read-across case 2 for developmental toxicity under the R&D collaboration organization, added a developmental toxicology expert to the members from the previous year, reviewed it, and similarly discussed the issues of read-across based on the review comments, and were able to organize various issues. We are currently summarizing the contents of these presentations in a paper and are submitting it to an academic journal.