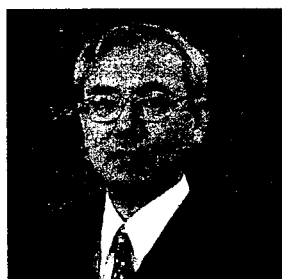


動物福祉と動物実験代替法への考慮の必要性について



大野 泰雄

国立医薬品食品衛生研究所 副所長

東京大学薬学系大学院博士課程修了(薬害作用部門)。薬学博士。薬剤師。日本トキシコロジー学会認定トキシコロジスト。国立衛生試験所薬理部厚生技官、国立衛生試験所安全性生物試験研究センター薬理部長を経て、2005年より現職。おもに、薬物代謝と肝腎毒性に関する研究、動物実験代替法に関する研究、ヒト組織を用いた薬物動態研究を進めている。この間、カロリンスカ研究所法医学教室(Prof. Sten Orrenius)に1年間留学し、肝腎遊離細胞を用いた毒性学的研究を取得。日本薬理学会評議員、日本トキシコロジー学会生涯教育小委員会委員長、日本動物実験代替法学会理事、HAB研究機構評議員、全国衛生化学技術者協議会副会長、薬事・食品衛生審議会委員、食品安全委員会専門委員を歴任。また、2007年8月に開催予定の第6回国際動物実験代替法会議会長を務める。

社会へ向けて 実験の意義を示さなければならない

生命科学の研究や教育、医薬品等の有効性及び安全性評価において、培養細胞等を用いるin vitro研究が増加している。しかし、さまざまな生体機構の統合としての個体への科学的理解を深め、それへの化学物質等の作用を明らかにするためには、依然として、動物実験や実験動物から採取した試料を用いた研究は不可欠であるし(表1)、近未来において、動物実験が不要となるとは思われない。一方、動物福祉や権利に対する社会の関心が高まり、動物実験への反対運動も度々報道されている。欧米には、Humane Society of the US(HSUS)のように、毎年100億円以上の寄付を集める動物福祉団体もあり、大きな政治力を持っている。

現在の科学研究には多額の費用が必要であり、公的な資金なしに研究を進めることできない。科学者はこのような状況に適切に対応しなければならない。すなわち、生命科学の研究における動物実験の意義を社会に示し、科学的に必要なかつ倫理的に妥当な実験を行うことにより、我々の研究への社会の支持を得ることが不可欠である。図1に示したように、動物実験の必要性についての説明が十分になされることにより、科学的に必要な動物実験に賛同する者が確実に増加する。動物実験を計画する際は、研究の目的とそれに必要な方法を精査し、不必要な動物実験を避け、やむを得ず行う動物実験においても、使用する動物数と動物に与える苦痛を最少限にしなければならない。これは動物実験における3つの原則(3R: Replacement, Reduction, Refinement)として、平成17年6月に改訂された「動物の愛護及び管理に関する法律」(動愛法)に組み込まれた法的な義務である。この法を補足するため、文部科学省、厚生労働省、および環境省は、それぞれ所管する分野を対象に動物実験指針を作成し、平成18年4月から6月にかけて通知した(「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(環境省告示 第88号)」)、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(文部科学省告示 第71号)」、「厚生労働省の所管する動物実験等の実施に関する基本指針(厚生労働省通知 科発0601002号)」)。日本学術会議も動物実験に関する詳細指針「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を作成し、通知した。

これからの取り組みに向けて

研究者が「動物が命あるものであることにかんがみ、何人も動物をみだりに殺し、傷つけ、又は苦しめることのないようにするのみでなく、人と動物の共生に配慮しつつ、その習性を考慮して適正に取り扱うようにしなければならない」という動愛法第2条に示された基本原則を理解し、前記の3Rの原則を満たし、倫理的に妥当な動物実験を行う上で、施設を運営管理す

表1 第77回日本薬理学会で用いられた試験系*

試験系の種類	例数		
in vivo実験	185	335	69.6%
薬物等で処理した動物から組織試料を採取して研究	32		
動物から抽出した試料を用いて研究	118		
in vitro研究(細胞株等を用いた研究)	95	138	28.7%
屠殺場から入手した試料を用いた研究	17		
ヒト試料を用いた研究	19		
アフリカツメガエル卵母細胞を用いた研究	7		
その他(臨床試験、情報研究等)	8	8	1.7%
合計	481	481	

*: 第77回日本薬理学会でのポスター発表(2005年3月8日及び9日)の調査結果

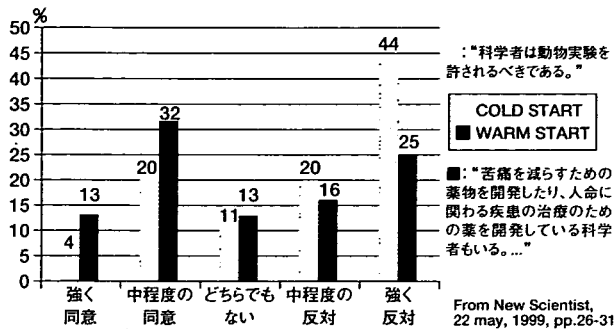


図1 動物実験への反応

表2 動物実験倫理に関する薬学系大学の教育内容

教育内容*	教えている大学の割合
動物愛法	80.8%
実験動物の生理、生態、習性	65.4%
実験動物の飼育、管理方法	84.6%
動物実験における3Rの原則	69.2%
動物の苦痛の評価	69.2%
苦痛の軽減方法	73.1%
安楽死の方法	80.8%
動物実験代替法	57.7%
その他	42.3%

文部科学省等の指針から教えることが望ましいと思われるもの。
平成19年2-3月にアンケート調査した結果の集計(回答数29、回答施設数24)。

表3 第6回国際動物実験代替法会議での特別講演等

Plenary lecture Judy MacArthur Clark, IAACLAM, USA	Alternative research and practice supported by international veterinary professionals such as IAACLAM
Julia Fentem, Unilever, UK Paul Flecknell, Newcastle Univ., UK Makoto Hayashi, NIHS, Japan	Exploring new approaches to assess safety without animal testing Assessment and alleviation of pain and distress of laboratory animals 3Rs in Mutation Research--from in vivo to in silico evaluation
Special Lecture Alan Goldberg, Johns Hopkins Univ., USA Baroness Perry of Southwark, House of Lord, UK	The Science of Alternatives - The last 25 years and tomorrow A British Example of Balanced Inquiry into the Ethics of Animal Experiment
Next President Special Lecture Herman Koeter, EFSA, Italy	Globalization of animal welfare concepts integrated in the scientific agenda of international agencies for regulatory risk assessment
Animal Welfare Memorial Lecture Michael Balls, FRAME, UK	Professor William Russell (1925-2006): Doyen of the Three Rs

る者の責任は重い。適正な動物実験施設を確保するとともに、動物実験委員会を適正に運用し、適正な動物実験を行うための教育を行なうことにより、研究者の動物福祉に関する意識と関連技術を高めなければならない。しかし、平成19年2月-3月に行った薬学系大学について行った調査においては、動物実験における3Rの原則や動物実験代替法(代替法)や苦痛の削減方法に関する教育(表2)や動物実験委員会の委員構成に不十分と思われるところがあり、今後の改善が望まれる。

なお、代替法や動物福祉に関する情報を得るよい機会がある。すなわち、第6回国際動物実験代替法会議が2007年8月21日から25日にかけて、東京都江東区のホテルイースト21東京で開催される。この会議は日本動物実験代替法学会と日本学術会議、および国際動物実験代替法会議信託基金(The Alternative Congress Trust: ACT)の主催で、1)教育・研究・試験のための動物実験における3Rの進展を概観し、代替法についての現実的な理解を醸成する、2)科学の進展や生物や疾患への理解を深めるとともに、そのために動物実験が必要であるとの認識を醸成する、また、3)科学者と社会とのコミュニケーションを促進することを目的に開催される。国際トキシコロジー連合、日本環境変異原学会、日本実験動物医学会、日本実験動物学会、日本組織培養学会、日本実験動物環境研究会、日本トキシコロジー学会など、多くの学会が協賛している。

この会議では、動物実験や代替法、また、in vitroトキシコロジー分野で著名な科学者8名によるプレナリーレクチャーや特別講演等が行われる(表3)。また、10の主テーマ(表4)のも

表4 第6回国際動物実験代替法会議でのシンポジウムテーマ

テーマ 1: 動物福祉
テーマ 2: 動物使用におけるモラル・倫理・文化
テーマ 3: 教育と訓練における3R
テーマ 4: 知識管理と情報サービス
テーマ 5: トキシコロジー/バリデーション
テーマ 6: 環境トキシコロジー
テーマ 7: バイオロジクスの開発・生産・品質管理における3R
テーマ 8: 3Rへの新科学技術の応用
テーマ 9: 3Rのグローバルゼーション
テーマ10: リスクアセスメントとリスク管理

と、約40のシンポジウムが行われ、それぞれの分野で著名な実績のある講演者が招待されている。ポスター発表と若手を中心の口頭発表も行われる。現在、500近くの要旨が集まっている。なお、小グループの議論の場も提供される予定である。

2009年にはEU化粧品指令第7次改正により、化粧品の安全性評価のための動物実験が原則禁止される。これに対応するためには、今回の会議で代替法開発の現状を十分に議論し、理解を深めておく必要がある。また、今回の会議は欧米における関連分野における欧米の状況を知るよい機会であるが、中国や韓国、インド、その他のアジア諸国から多くの講師を招待しており、アジア諸国における動物福祉や代替法開発についても、情報を集めるよい機会である。また、動物福祉活動家との対話を目的としてシンポジウムや市民を対象にした公開シンポジウムも開催される。会議の公用語は英語であるが、公開シンポジウムは通訳が付く。詳細は日本動物実験代替法学会のホームページ(<http://www.soc.nii.ac.jp/jsaae/>)および国際代替法会議のホームページ(<http://www.ech.co.jp/wc6/>)に記載されている。

動物実験代替法の国際動向

大野 泰雄

Abstract : There were several international and national institutes for the promotion of 3Rs. Those were ECVAM, ICCVAM, NCA, ZEBET, JaCVAM and etc. FRAME, 3R Research Foundation, and NC3Rs are agencies that support research on alternatives. This article introduced those institutes and agencies outside Japan and explained situation of regulatory acceptance of alternatives by OECD, EU, and US. Scientific association for the promotion of 3Rs were also established in Europe, Japan, and Korea. 6th World Congress on Alternatives and Animal Use gathered more than 1000 attendents from every continents. 3Rs is now globally accepted to harmonize the need of life science and ethical requirement to respect life.

3Rs declaration was agreed by EU governments and industries in 2005. They promised to establish partnership among them to promote 3Rs. REACH project was accepted in 2006 to improve the protection of human health and the environment while maintaining competitiveness. About 30,000 chemicals, produced more than 1 ton/year, are to be registered with some kinds of safety data. This implies conduct of a lot of animal experiments. Therefore, the use of alternative methods are recommended where appropriate methods are available.

Key words : alternatives, ECVAM, ICCVAM, 3Rs declaration, REACH

1. はじめに

動物を用いる生命科学研究が社会に受け入れられ、その支持を得、意味のない摩擦を避けるためには、不必要な動物実験を止め、やむを得ず行う動物実験においては適切な手続きに従い、動物使用数と動物に与える苦痛を最小限にする必要がある。

欧米ではこのような認識は古くからあり、

“Current situation of alternatives to animal experiments outside Japan.”



Yasuo Ohno (National Institute of Health Sciences, 国立医薬品食品衛生研究所—158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

1976年国立衛生試験所入所。現在、国立医薬品食品衛生研究所副所長、日本薬理学会評議員、日本動物実験代替法学会評議員、HAB協議会評議員、日本薬物動態学会監事。薬学博士。

1954年にはRusselとBurchにより動物実験代替法(代替法)についての3Rsの原則が提案された。また、イギリスでは医学分野における実験動物を他のものに置き換えるための基金(FRAME)が1969年に、米国では1981年にジョーンズホプキンス大学に代替法センターが開設され代替法の開発や評価が行われてきた。新たに開発された動物実験代替法を科学的に評価し、可能なものについては取り入れていこうという考えの下、EUは代替法開発の拠点とし、代替法についてのデータベースを設置・維持するため、また、行政、産業、生物・医学分野の科学者、消費者、および動物愛護運動グループの対話を促進することを目的に1991年に代替法バリデーションセンター(European Center for the Validation of Alternative Methods: ECVAM)を設立した。米国は毒性試験法の開発、バリデーション、受け入

れ、および国内・国際レベルでのハーモナイゼーションに関する問題を連邦政府内で調整するためにNICEATM (NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) の下にNIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) の機関としてICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) を1993年に設置した。ICCVAMは15の行政機関および研究機関からの代表により構成され、米国内外から提供されたバリデーションデータのPeer Reviewによる代替法評価を行っている。

1996年には安全性評価のための動物実験代替法のバリデーションと行政的受け入れに関するOECDの会議が開催され、それらの基準が示された²⁾。その要点については、先に解説した³⁾。要約すると、代替法はリスクアセスメントの目的のために、既存の方法と比較し同等以上、望むらくはそれ以上の価値を有するデータが得られ、堅牢かつ経済的であり、科学的、倫理的に妥当なものでなくてはならない。また、それらが、code化された被験物質を用い、GLP原則に準じて行われた適切なバリデーションに基づく公開データで裏付けられたものでなくてはならない。また、施設内外での反復性や再現性についての情報が提供されなければならない。

なお、ECVAMやICCVAMでは従来の安全性試験の代替法のみならず、定量的構造活性相関や内分泌かく乱化学物質検索のような新たな毒性評価の要請やトキシコゲノミクスのような新しい技術を取り入れるための検討も行っている。また、ECVAMとICCVAMは評価結果の相互承認や共同バリデーションの実施などの協力を行っている。

本稿では代替法の受け入れ状況と、それを巡る最近の国際情勢について述べる。

2. 動物実験代替法を巡る最近の国際状況

2-1. OECDの状況

医薬品や農薬、化学物質の安全性評価においては、行政やOECDのような国際機関の定めた毒性試験法ガイドラインに基づいて各種の試験が実施されることが多い。これらの試験法についても、

動物福祉への配慮が求められ、2002年よりOECD安全性試験法専門家会議に動物福祉団体代表で構築されたInternational Council on Animal Protection in OECD Programmes (ICAPO) の代表が参加するようになった。最近承認された動物福祉を考慮した試験法ガイドラインを表1に示した。皮膚感作性試験法 (OECDガイドライン429: Local Lymph Node Assay (LLNA)) が1998年に採用された。これはモルモットを用いるMaximization法に完全に替わるものではないが、動物の使用数や動物に与える苦痛が少ない方法である。2000年には動物実験に関する人道的なエンドポイントに関するガイドライン⁵⁾を通知した。また、単回投与毒性試験においては統計的に厳密なLD50値を求めないとし、従来の多数の動物を用いてLD50値を求める試験法(401)を廃止し、10匹程度の動物でLD50を推定する試験法(420: Fixed Dose Method, 423: Acute Toxic Class Method, 425: Up-and-Down Procedure)を採用した(2001)。また、2002年には皮膚腐食性試験として皮膚の導電度を測定する方法(TER法)や培養細胞を用いて作成した皮膚三次元モデルを用いる試験法(430: Transcutaneous Electrical Resistance Test, 431: Human Skin Model Test)が、2004年には皮膚吸収性試験のためのヒトやブタの皮膚を用いた試験法(同428: Skin Absorption: *in vitro* Method)や光毒性試験ガイドライン(432: *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test)が採用された。これらの試験法については別に解説したり。

最近の動きとして、2006年には皮膚腐食性のための*In vitro*膜バリアー試験法(435: *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion)が掲載された。また、ガイドライン案として、2006年度に*In vitro*小核試験(Draft Proposal for 487: *In Vitro* Micronucleus Test)、並びに、hER-HeLa-9903 Cell Lineを用いたStably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assayがエストロゲン様作用の検出試験法として掲載された⁶⁾。今後も*in vitro*の眼刺激性試験や皮膚刺激性試験、感作性試験などの開発が期待されている。

表1 代替法の行政的受け入れ状況 (http://ecvam.jrc.it/index.htmに一部追加)

- 1) EpiSkin™ skin corrosivity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
- 2) 3T3 NRU phototoxicity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
- 3) EpiDerm™ skin corrosivity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
- 4) Rat TER skin corrosivity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
- 5) In vitro tests for percutaneous absorption (OECD 2002)
- 6) Deletion of the acute oral toxicity test, Lethal Dose (LD50) (67/548/EEC 2001, OECD 2001)
- 7) Local Lymph Node Assay for skin sensitisation (LLNA) (OECD 1998, updated 2002, U.S. EPA OPPTS 1998)
- 8) ELISA test for batch potency testing of erysipelas vaccines (EDQM/European Pharmacopoeia 2004)
- 9) ELISA test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use (EDQM/European Pharmacopoeia 2003)
- 10) Toxin Binding Inhibition (ToBI) test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use (EDQM/European Pharmacopoeia, 2003)
- 11) In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion (OECD 2006)

括弧の中はそれぞれの機関で承認された年を示した。

EDQM : European Directorate of the Quality of Medicines & HealthCare

2-2. EUにおける状況

2-2-1. EUにおける化粧品の安全性評価と代替法の受け入れ状況

EUでは1993年の化粧品の安全性評価に関する指令⁷⁾において、適切な代替法があればとの前提つきではあるが、1998年までには実験動物を用いて安全性を評価した化粧品原料および最終製品の販売を禁止することを決めた。しかし、代替法の開発・バリデーションが充分でなかったことから、その施行を2000年6月30日まで延期した。その後、2002年6月末まで再度延期された。その再再延長に関する調停会議での合意結果を踏まえ、化粧品およびその原料の安全性評価に関する化粧品指令第7次改正がEU政府および議会で認められ、2003年3月11日付けで公布された⁸⁾。その内容は①ECVAMやOECDで承認された代替法があるものはすべて即時禁止、②2009年までに動物を用いるすべての安全性試験を全面的に禁止、および動物実験を行った化粧品の販売禁止、また、動物を用いて安全性評価を行った化粧品のEU域内への輸入を禁止、ただし、③薬物動態試験や生殖発生毒性、反復投与毒性試験などの全身的な作用を検討する試験については2013年まで猶予する、というものである。

第七改正が成立したことを受け、ECVAMは重点課題を以下の11項目に整理した⁹⁾。1) 全身毒

性(単回投与毒性、反復投与毒性、神経毒性、肺毒性、腎毒性、肝毒性、免疫毒性、血液毒性)、2) 局所毒性(光毒性、皮膚腐食性、皮膚刺激性、眼刺激性)、3) 感作性(皮膚感作性、吸入感作性)、4) 発がん性、5) 生殖毒性、6) トキシコキネティクス、7) 環境毒性、8) 科学的な情報サービス、9) 定量的構造活性相関、10) 生物学材料(発熱性物質試験)、11) 戦略開発(*in vitro* 毒性試験やバリデーションにおけるGLP, Good Cell Culture Practice (GCCP) のガイドライン、トキシコゲノミクス)。

これらのうち、光毒性試験、皮膚腐食性試験、皮膚感作性試験、および経皮吸収試験についてはOECDレベルあるいはEUレベルでのガイドラインあるいはその案が存在する(表1)。また、ECVAMの諮問委員会であるESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)は1997年には3T3 NRU 光毒性試験、1998年には皮膚腐食性試験としてヒト皮膚三次元モデルであるEPISKIN™とTER法を、2000年には皮膚感作性のためのLLNA試験、EpiDerm™皮膚腐食性試験、CORROSITEX™皮膚腐食性試験を確立された代替試験法として承認した(表2)。生殖毒性試験については2002年には生殖発生毒性評価のための胚性幹細胞試験、全胚培養試験、マイクロマス試験を科学的にバリデーションされた方法として

ESACより報告された。このESACの結論を受けてEUはこれらの代替試験から得られたデータを化粧品安全性評価に用いることに合意した。

EUの化粧品および非食品に関する健康および消費者保護担当機関であるSCCNFP (Scientific Committee for Cosmetic Products, and Non-food Products intended for Consumers) は光毒性試験 (3T3 NRU PT法) および皮膚腐食性試験 (TER, EPISKIN™, EpiDerm™法) を公的に validation された試験法として認めた。また、経皮吸収試験 (ヒトあるいはブタ皮膚を用いる *in vitro* Skin Absorption法) および皮膚感作性試験 (LLNA法) を認めた (2002) ¹⁰⁾。なお、フランスは眼刺激性試験法としてアガロースゲル拡散細胞毒性試験法とウサギ角膜線維芽細胞法 (NR) を公示した (1999.12.30)。

ECVAMは現在単回投与毒性試験と皮膚刺激性試験、および眼刺激性試験についてはバリデーシ

ョン中、あるいはその準備中である。また、*in vitro* 胎児毒性試験、皮膚刺激性試験、急性毒性試験、免疫毒性試験、トキシコゲノミクスについてECVAM主催のWorkshopを開催し、検討を進めている。なお、ECVAMは2004年の“Report for establishing the timetable for phasing out animal testing for the purpose of the Cosmetic Directive”において、皮膚腐食性、皮膚刺激性、光毒性、光遺伝毒性を除く多くの試験法は、化粧品指令第7次改正の禁止年には完全代替は困難と予測している。このため、ECVAMは、第6次 Framework Programme on Research and Developmentとして、急性毒性試験、生殖発生毒性試験、感作性試験に関する検討プロジェクトを組織した。また、2002年よりNICEATM (The NTP Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) と共同で急性経口毒性を評価するための *in vitro* 細胞毒性試験のバリデー

表2 ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) により科学的にバリデーションされた代替法として報告された試験法 (<http://ecvam.jrc.it/index.htm>)

- 1) Artificial skin models (EPISKIN®, EpiDerm®) for skin irritation testing (27 April 2007)
- 2) Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA) for skin sensitisation (27 April 2007)
- 3) Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on Organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. (27 April 2007)
- 4) Micronucleus Test as an Alternative to the In Vitro Chromosome Abberation Assay for Genotoxicity Testing (17 November 2006)
- 5) SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing (17 November 2006)
- 6) Five In Vitro Pyrogen Tests (21 March 2006)
- 7) Testing Strategy to Reduce the Use of Fish in Acute Aquatic Toxicity Testing (21 March 2006)
- 8) The Colony Forming Unit-Granulocyte/Macrophage (CFU-GM) Assay for Predicting Acute Neutropenia in Humans (21 March 2006)
- 9) ELISA test for batch potency testing of erysipelas vaccines (28 June 2002)
- 10) Embryonic stem cell test for embryotoxicity (01 May 2002)
- 11) Micromass embryotoxicity assay (01 May 2002)
- 12) Whole rat embryo embryotoxicity assay (01 May 2002)
- 13) CORROSITEX assay for skin corrosivity (06 December 2000)
- 14) ELISA test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use (06 December 2000)
- 15) Toxin Binding Inhibition (ToBI) test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use (06 December 2000)
- 16) Local Lymph Node Assay for skin sensitisation (LLNA) (21 March 1999)
- 17) 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) phototoxicity test (1997)
- 18) In vitro production of monoclonal antibodies (14 May 1998)
- 19) EpiSkin™ skin corrosivity test (03 April 1998)
- 20) Rat Transcutaneous Electrical Resistance (TER) skin corrosivity test (03 April 1998)
- 21) EpiDerm™ skin corrosivity test (21 March 1998)

ーション研究を実施した。

2-2-2. EUにおけるECVAM以外の代替法関連機関の活動

EUにはドイツのZEBET (Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments, 1989設立) やオランダのNCA (Netherlands Centre for Alternatives to Animal Use) のような国レベルの代替法研究機関がある。また、イギリスにおけるFRAME (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments: 1969年設立) やスイスにおける3R Research Foundation (1987設立) のような代替法研究支援のための民間の財団が以前から存在し、代替法に関する情報の収集や研究、バリデーション、あるいはそれらの支援活動を行ってきた。最近では2004年にイギリスにおいて動物試験、研究における3Rsの推進、開発、実施を目的にNC3Rs (National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research)²⁷⁾ が設立された。質の高い3Rs研究に資金を提供し、3Rsを広めるためのセミナーやシンポジウムを組織し、また、3Rsの情報ソースやガイドラインを開発している。これには英国内務省やMRC (Medical Research Council), BBSRC (Biotechnology and Biological Sciences Research Council), ABPI (The Association of the British Pharmaceutical Industry) およびThe Wellcome Trustより資金が提供されている。

代替法に関連する学会として、ESTIV (European Society of Toxicology *in Vitro*) があり、*in vitro*毒物学を促進することを目的に活動し、「Toxicology *in Vitro*」を発刊している。また、MEGAT (Middle European Society for Alternative Methods to Animal Testing) も、代替法の普及とバリデーション、3Rsの分野での研究の推進、メディアへの情報提供などを目的に活動している。

2-2-3. 化粧品業界の活動

COLIPA (欧州化粧品工業連合会) は動物試験代替法の開発と受け入れに向けたコーディネートを目的に、1992年にSCAAT (Steering

Committee on Alternatives to Animal testing) を常設の委員会として設置した。現在、眼刺激性、感作性・皮膚刺激性、光毒性および変異・遺伝毒性に関する代替法検討のための4つのTask Force (TF) があり、それぞれ積極的に活動が進められている^{11) 12)}。

このうち感作性・皮膚刺激性TFにおいては、日本企業により開発されたヒト単球由来細胞株であるTHP-1細胞を用いた*in vitro*皮膚感作性試験h-CLAT (human Cell Line Activation Test) のring studyが2004年6月から開始された。また、同様のU937細胞を用いた試験法やグルタチオンや合成システインペプチドとの結合性を評価するpeptide reactivity assayなどが評価されている。

2-2-4. 3Rs宣言

2005年11月に行われた欧州委員会主催のワークショップ「EU goes Alternatives」において、今後、EUの各産業分野において、効果と安全性の両面に関する代替法の開発を促進することが宣言された(3Rs宣言)。これには代替法開発に関するパートナーシップ (EPAA: European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing) として¹³⁾、欧州委員会からは企業、研究、健康と消費者保護、環境、共同研究センターのそれぞれに関わる常任理事会およびECVAMの6機関が参加している。工業会からもCEFIC (欧州化学品工業会)、EFPIA (欧州製薬団体連合会)、COLIPA (欧州化粧品工業会)、Euro BIO (欧州バイオテクノロジー工業会)、AISE (石鹸洗剤協会)、ECPA (欧州農業工業会) など6団体が参加している。また、医薬品、化粧品、化学品メーカーなど27企業が参加している。

3Rs宣言においては以下のような基本認識が示されている。

- 1) 政策の策定・施行にあたり、動物の福祉要件を全面的に尊重する。
- 2) 大部分の産業部門は動物実験抜きでは充足し得ない規制・行政上の義務を負っている。
- 3) 動物試験の置き換えが可能な分野ではそのための研究を、いまだ達成できない分野では、動物実験の削減と洗練に関する研究を加速化するように努力すべきである。

- 4) いくつかの分野では置換代替法の使用により既に評価できるようになっている。その他でも、より少数の実験動物を用い、また実験動物の苦痛を緩和した方法で評価することが可能となっている。
- 5) 3Rs促進のために、更に、探求する余地が多く残されている。
- 6) 動物実験への依存性の低い安全性評価への革新的取組みにプロテオミクスやゲノミクス、バイオインフォマティクスのような先端技術を活用できる。
- 7) 会議参加者は、実験動物の福祉および3Rsへの新しい取組みを連携・強化する必要性がある。
- 8) 新試験法の開発は動物実験を減らすだけでなく、EU企業の競争力を高めるものである。
また、EU政府と関連機関および団体・企業は以下の点について合意した。

- 1) 企業団体とEU委員会が動物試験の削減を目的とした代替法を用いた対応を促進するための協力関係を構築する。
- 2) 短期・中期・長期的活動および応分の責任範囲を特定する「行動計画」の策定、およびその年次改正・更新に寄与する。
- 3) 適切な資源と資金提供を通して代替法の開発、妥当性検証、実施を促進し、かつ、規制当局による承認の迅速化を目指す。

この合意に基づき、1年後の2006年12月にBrusselsでEPAA年次大会が開催され、EPAAの進捗状況とステークホルダーによる評価が報告された。

2-2-5. REACH (Registration, Evaluation, and Authorisation of Chemicals) の施行と代替法

REACHはヒトの健康と環境保護を改善するとともに、EUの化学産業の競争力を維持し、イノベーション能力を高めることを目的とし、化学物質によるリスクを管理し、流通経路の各段階で、安全性に関する情報を提供する責任を課すものである。

この規制は2006年12月18日にEU委員会の環境閣僚理事会で承認され、2007年6月1日から発効することになった^{14)~16)}。REACHは、EU域内で年間1トン以上製造・輸入されるすべての化学物質の登録を既存物質と新規物質を区別せずに義務付けるものであり、3万種の化学物質が対象となる。既存物質の登録期限は物質の製造・輸入量や有害性への懸念によって分けられるが、2018年までに段階的に登録される。年間1トン以上の物質の登録には、製造・輸入量に応じて物理化学的性状、ヒトの健康への有害性、生態毒性の情報が必要となる。動物試験が行われる場合、重複を避けるために関係書類の事前審査が義務づけられる。ヒトに対する毒性に関する情報は、可能なら代替手段を用いて入手する。これらの代替手段は欧州委員会によって確認され、さらに化学物質庁または国際的な機関によって認定されなくてはならない。EU委員会は代替法の使用に関し3年ごとに報告書を提出し、必要なら新たな法的提案を行うことになっている。

安全性評価のために提出が義務付けられているデータを表3に示した。

表3 REACHにより要求される安全性に関するデータ

年間1トン以上：皮膚刺激性または皮膚腐食性試験，眼刺激性試験，皮膚感作性試験， <u>バクテリアを用いるin vitro変異原性試験</u> ，経口投与急性毒性試験
年間10トン以上： <u>in vivo皮膚刺激性試験</u> ， <u>in vivo眼刺激性試験</u> ， <u>哺乳類細胞を用いるin vitro細胞遺伝学試験</u> または <u>in vitro小核試験</u> ， <u>哺乳類細胞を用いるin vitro遺伝子突然変異試験</u> （ただし， <u>バクテリアを用いるin vitro試験</u> と <u>哺乳類細胞を用いるin vitro細胞遺伝学試験</u> または <u>in vitro小核試験</u> が陰性の場合），吸入または皮膚経路による急性毒性試験，短期反復投与毒性試験（28日間，場合によって90日間）， <u>生殖/発生毒性に関するスクリーニング</u> ， <u>トキシコキネティクス試験</u> ， <u>リスクアセスメント</u>
年間100トン以上： <u>亜慢性毒性（90日）</u> ， <u>出生前発生毒性試験</u> ， <u>二世代生殖毒性試験</u>
年間1,000トン以上： <u>慢性毒性（>12カ月）</u> や <u>追加評価</u> ， <u>発がん性試験</u>

下線はESACにより科学的にバリデーションされた代替法が報告されているもの。

2-3. 米国の状況

2-3-1. ICCVAMによる検討

ICCVAMは1998年に皮膚腐食性試験法としてのCorrositex[®]についてPeer Reviewを行い、本方法が動物愛護の点で問題はないこと、また、すべての化学物質に有用とは言えないが、Department of Transport (DOT) で必要とされる状況においては有用であると評価した¹⁷⁾。また、本試験で陰性の場合には皮膚刺激性試験により確認の必要があるが、false positiveを許容するならば陽性の場合の動物試験は不要とした。同様の検討により、モルモットを用いたMaximization法の代替試験法としてLLNA法について、マウスを用いることから完全な代替法ではないが、妥当な方法であるとして認知した¹⁸⁾。また、皮膚腐食性試験としてEpiDerm[™]、およびEPISKIN[™]法およびTER法について評価し、皮膚腐食/刺激性評価のためのスキームにおいてweight-of-evidence評価のための一つとして使用できるとした。また、これらの試験で陽性とされたものは、そのまま陽性として分類やラベリングして良いとしている。

ICCVAMはECVAMと密接な協力関係を結び、お互いが承認した試験法については、簡易の評価促進プロセスを採用している¹⁹⁾。また、急性全身毒性を評価するための細胞毒性試験 (BALB/c 3T3または正常ヒト角化細胞 (NHK) を用いるNeutral Red 取り込み (NRU) 試験法) についての共同バリデーションを実施し、2006年10月にはほぼ最終化されたバックグラウンドレビュー文書 (BRD) 並びにICCVAMによる試験法評価報告書が公表された。本報告書でICCVAMは、「これら2種の細胞毒性試験は法規制におけるハザード分類という目的には精度は十分ではないが、現在の急性毒性プロトコールであるUp-and-Down Procedure (UDP) およびAcute Toxic Class (ATC) 法の開始用量を設定するために使用することができる」と勧告した²⁰⁾。

4種の眼刺激性試験代替法 (BCOP法, HET-CAM法, ICE (Isolated Chicken Eye Test) 法およびIRE (Isolated Rabbit Eye Test) 法) の専門家による評価を行い、2006年3月にそれらの最終BRD^{21)~24)} が公表された。本文書では、(1)

4法はいずれも*in vivo*試験法を代替する方法とはならないこと、(2) ICCVAMが推奨する限定的に使用でき、眼腐食性など強い眼刺激性物質のスクリーニングに使用できる方法としてBCOP試験およびICE試験が挙げられること、(3) HET-CAM試験およびIRE試験については、現時点では推奨できず、眼腐食性や強い眼刺激性物質を同定するためにはプロトコールや判断基準の最適化、追加バリデーションが必要であることを報告している。

ICCVAMは、生殖毒性試験としてカエルの胚を用いたFETAX試験 (Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus) を、内分泌かく乱化学物質評価系として*in vitro* estrogen receptor and androgen receptor binding and transcriptional activation (TA) 法の評価の依頼をEPAから受けており、その一環としてJaCVAMやECVAMとの共同バリデーション計画を進めている。また、LLNA法の評価もPeer Reviewを近い時期に行う予定である。

2006年11月にNICEATMとICCVAMは代替法の5カ年計画案を発表した²⁵⁾。この計画では、(1) 連邦政府機関試験計画に、適切で信頼性のある方法を統合するための、新規および改良された非動物および他の代替試験の研究開発、解釈および検証、(2) 3Rs推進のための新規および改良された非動物試験と代替試験に関する最優先分野の確認、の2点に取り組むとした。また、試験開発の優先分野としては、①急性眼刺激性、腐食性、②Biologics/Vaccines、③急性皮膚毒性 (刺激性・腐食性、感作性と吸収を含む)、④急性全身毒性 (経口、経皮、吸入)、⑤慢性毒性・発がん性、⑥生殖・発達毒性、⑦内分泌攪乱物質、⑧神経毒性、⑨免疫毒性の9項目を挙げている。

2-3-2. CTFAの状況

CTFA (米国化粧品工業会) は化粧品の原料および最終製品について、安全性を立証する方法としての前臨床試験および臨床試験の使用に関するガイダンスの広範な改訂作業に取り組んでいる。1991年に作成した現行ガイドラインとの大きな相違点の一つは動物実験代替法の追加であり、細胞、組織、器官培養を用いる*in vitro*代替法や構

表4 代替法に関連したICHでの検討

- 1) 単回投与毒性試験において統計学的に厳密なLD50値を要求しない。
非齧歯類では必ずしも死亡するまで用量を上げなくとも良い。
- 2) 反復投与毒性試験において12カ月試験を要求しない。
- 3) 雄性生殖臓器毒性検出系としての2週間反復投与毒性試験で良いとした。
- 4) 発がん性試験における動物種数を1種に削減し、代替法で補足しても良い。
- 5) 臨床試験との関係における非臨床試験実施タイミングについて合意

造活性相関を用いてコンピュータによる予測を行う *in silico* 法も含まれる可能性がある。

2-4. アジアの状況

日本においては、日本動物実験代替法学会の前身である日本動物実験研究会が1982年に発足して以来、代替法の開発やバリデーション、並びに市民との交流を行ってきた。中国や韓国においても代替法関連研究が行われ、昨年には韓国にも代替法学会が設立された。2007年8月に東京で開催された第6回国際動物実験代替法会議にはこれらの国をはじめとし、台湾、タイ、インドなどからも多くの研究者が参加し、今までで最も多くの参加者があった。動物福祉と代替法に関する研究が発表された。韓国および北京においてサテライトシンポジウムも開催され、多くの参加者を集め、関心の高さが示された。

3. おわりに

動物実験は近未来において不要となるとは思われない。一方、3Rsの原則は欧米や日本だけでなく、世界的に広く受け入れられている。今後も、生命科学研究における動物利用の適性を計る必要があるとともに、可能なものについては、積極的に代替法に置き換える努力が必要である。なお、医薬品の承認申請に添付すべき資料の国際的ハーモナイゼーションのための会議(ICH)では表4に示したような安全性試験法ガイドラインの変更がなされ、我が国のガイドラインにも導入された。これらは3Rsの原則を念頭に入れてはいたが、必ずしもそれを意図したものではなかったが、結果として、ICHは3Rsの原則に貢献したと言える。

謝辞

本稿をまとめるに際し、厚生労働科学研究費補助

金(医薬安全総合研究事業)「安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究(主任研究者:大野泰雄)」において、分担研究者の板垣宏氏が、日本化粧品工業連合会・動物実験代替専門委員会委員とともに作成した「代替法についての国際情勢の調査」報告を利用させていただいた。ここに感謝する。

参考文献

- 1) Russel W.M.S, Burtch R.L., The principles of Human Experimental Technique (Methuen, London) (1959)
- 2) OECD (1996) Final report of the OECD workshop on harmonization of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods, OECD: ENV/MC/CHEM/TG (96) 9.
- 3) 大野泰雄, 動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受け入れの現状, 国立医薬品食品衛生研究所報告1~12 (2004)
- 4) 大野泰雄, 皮膚と美容, **35**, 2~8 (2003)
- 5) OECD (2000) Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.19.
- 6) OECD (2006) Draft Guideline for the Testing of Chemicals: Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay for Detecting Estrogenic Activity of Chemicals—The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using HeLa-ER-9903 Cell Line—Ver. 2006. Oct. 12
- 7) EU (1993) Council Directive 93/35/EEC
- 8) EU (2003) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council, February 27, 2003; Official Journal of the European Union, L66, 11/03/2003, P0026~0035
- 9) Hartung T. et al., *ATLA*, **31**, 473~481 (2003)

- 10) SCCNFP (2002) SCCNFP/0546/02, final June 4, 2003, Memorandum concerning of the actual status of alternative methods to the use of animals in the safety testing of cosmetic ingredients.
- 11) De Silva, O. et al., *ALTEX*, **22**, Special Issue, 255 (2005)
- 12) Basketter, D. et al., *ALTEX*, **22**, Special Issue, 139 (2005)
- 13) EU (2005) European Partnership to Promote Alternative Approaches to Animal Testing. 3Rs Declaration. (http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index_en.htm)
- 14) EU (2006) Regulation (EC) No1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No793/93 and Commission Regulation (EC) No1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC, Official Journal of the European Union, L396, Volume 49.
- 15) EU (2006) Directive 2006/121/EC of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 amending Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances in order to adapt it to Regulation (EC) No 1907/2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) and establishing a European Chemicals Agency.
- 16) EU (2006) Q and A on the new Chemicals policy, REACH (<http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=MEMO/06/488&format=HTML&aged=0&language=EN&guiLanguage=fr>)
- 17) ICCVAM (1999) Corrositex[®]: An *in vitro* test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No : 99-4495.
- 18) ICCVAM (1999) The Murine Local Lymph Node Assay : A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds. NIH Publication No.99-4494.
- 19) Federal Register Vol.67, No.147, 31/07/2002, p49706-49707.
- 20) ICCVAM (2006) Background Review Document : In Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity. NIH Publication No : 07-4518.
- 21) ICCVAM (2006) Background Review Document for BCOP : *In Vitro* Test Methods for Detecting Ocular Corrosives and Severe Irritants. NIH Publication No : 06-4512.
- 22) ICCVAM (2006) Background Review Document for Isolated Chicken Eye (ICE) Test, NIH Publication No : 06-4513.
- 23) ICCVAM (2006) Background Review Document for Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test, NIH Publication No : 06-4515.
- 24) ICCVAM (2006) Background Review Document for Isolated Rabbit Eye (IRE) Test, NIH Publication No : 06-4514 NIH Publication No : 06-4514
- 25) NICEATM/ICCVAM (2006) Federal Register notice requesting comments on the development of the Five-Year Plan. Federal Register/Vol.71, No.218, pp.66172-66173, November 13, 2006

レオパールKL2・TL2・TT2・MKL2 デキストリン脂肪酸エステル
レオパールISK2・ISL2 イヌリン脂肪酸エステル

IWASE
COSFA

<http://www.cosfa.co.jp>

油性基剤のゲル化剤、増粘剤、乳化安定剤

粉末分散安定剤、感触改良剤

製造元 千葉製粉株式会社

販売元 **岩瀬コスファ株式会社**

大阪 : Tel.06-6231-3456 東京 : Tel.03-6202-2345

WC6 を終えて

第 6 回国際動物実験代替法会議 会長 大野泰雄

1. 謝辞

第 6 回国際動物実験代替法会議は日本動物実験代替法学会、日本学術会議、Alternative Congress Trust (ACT, 日本語では国際動物実験代替法連合と訳した)の主催で、平成 19 年 8 月 21 日(火)から 8 月 25 日(土)までの 5 日間、東京都江東区のホテルイースト 21 で、34 カ国および 1 地域 (台湾) より 1,036 人 (国外 440 人, 国内 596 人) の参加者を得て、開催され、成功裏に終了することができた。これは、表 1 に示したように、日本動物実験代替法学会を中心とする多数の機関および方々の協力のおかげです。ここに深くお礼を申し上げますとともに、以下に、内容を報告させていただきます。

2. 会議の目的と経緯

ACT は 1) 教育、研究および試験における生命科学における動物福祉の向上と動物実験代替法開発を促進すること、2) 科学の進展や生物や疾患への理解を深めるために動物実験が必要であるとの認識を醸成すること、また、3) 科学者と社会とのコミュニケーションを促進することを目的に設立された基金です。ACT は、1) 教育、研究、試験分野における 3Rs (Reduction, Refinement, Replacement)の実現に向けての進展を概観し、2) 動物実験代替法の状況に対する現実的な理解を深め、3)動物を用いる研究が臨床研究や *in vitro* 試験法とともに、科学の発展をもたらすものであるという理解を醸成し、4) 生物学や疾患に対する我々の基本的な理解に貢献し、並びに 5) 動物保護グループと科学者との間に建設的な議論を行うことを奨励することを目的に、国際動物実験代替法学会 (World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences) を開催してきた。第 1 回は 1993 年にボルチモア (米国) で開催され、それ以来、1996 年にユトレヒト (オランダ)、1999 年にボロニア (イタリア)、2002 年にニューオーリンズ (米国)、2005 年にベルリン (ドイツ) と回を重ねてきた。

日本動物実験代替法学会は、第 1 回会議から日本からの参加や発表の呼びかけを行い、参加者へ

の旅費支援、また、運営委員会への参画等を通じて積極的に協力するとともに、外国の関係者との交流を進めてきた。また、日本開催に向けて準備金を積み立ててきた。これらの基盤の上で、日本開催に向けて立候補し、平成 15 年 11 月開催の ACT 会議で 2007 年に東京で開催することが認められた。それ以来、学会では開催の準備を進めてきた。本会議の開催はアジアでは初めてであったことから、今回の会議では上記の目的を達成するとともに、アジアにおける代替法研究の発展とアジアからの代替法発信をめざし、韓国ならびに中国の関係者にも協力を求めた。日本動物実験代替法学会は以前より市民との対話を重視しており、動物福祉団体や動物実験に反対する団体の代表者をシンポジウムに呼び、対話を行って来た。今回の国際会議においても市民を対象としてセッションを市民公開講座として設けた。

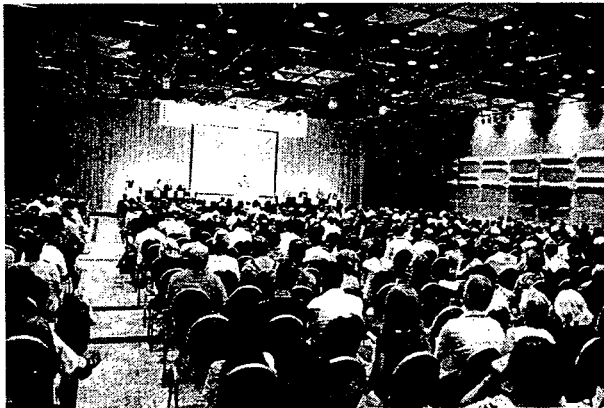
3. 会議の内容

今回の会議では「動物実験代替法開発の促進、3Rs [Reduction (動物実験の削減), Refinement (動物の苦痛軽減), Replacemnet (動物を用いない方法への置き換え)]のグローバリゼーション並びに科学者と動物福祉活動者との対話」をメインテーマに、プレナリーレクチャーや特別講演(表 3)、また、表 4 に示したように、3Rs の原則に関係する多岐にわたる分野についてシンポジウムが開催された。即ち、動物福祉(Theme 1)、動物使用の道徳、倫理および文化(Theme 2)、3Rs 教育(Theme 3)、知識管理と情報サービス(Theme 4)、トキシコロジーとバリデーション(Theme 5)、環境毒性(Theme 6)、バイオロジクスの開発・生産・品質管理における 3Rs (Theme 7)、新しい科学と技術の 3Rs への応用(Theme 8)、3Rs のグローバリゼーション(Theme 9)、リスクアセスメントと規制(Theme 10)の分野で最新の情報交換が行われた。これらとは別に、メインテーマに掲げた「科学者と動物福祉活動者との対話」のための特別シンポジウムを実施した。レクチャーの総数は 10、シンポジウムの総数は 47 であった。多数のシンポジウムを通して、多岐な分野に研鑽を積むことがで

きた。また、総数 256 のポスター発表や、若手研究者の一般演題 20 など多数の発表を見聞きすることができた。講演会場は 8 会場に分かれていたが、1 階のメイン会場以外はすべて 3 階に集中しており、参加者は興味あるシンポジウムを渡り歩き、時間を有効に使うことができた。また、会場のあちこちで参加者が熱い討論を繰り返していた。現在、会議の成果は吉村出版委員長を中心に、プロシーディングとしてまとめられている。

会議初日のウェルカムパーティでは動物慰霊祭、会議 3 日目の夕刻の都内観光、4 日目夕刻の晩餐会、その他、同伴者のためのエクスカッションなど、学術面以外のイベントについても、数多くのボランティアの方々のご協力により、楽しんでいただいた。

なお、会議では外国からの多数のシンポジストに旅費の補助を行うとともに、国内外の若手研究者（約 70 名）に渡航補助を行うとともに、彼らの中から優れた演題に賞を送った。科学委員の投票により 11 名の受賞者が選ばれ、若手研究者にとっては励みになったと思われる。



開会式の会場風景



若手研究者の授賞式の一場面

4. 会議の成果

会議では世界の方々が動物実験代替法に関する最先端の研究成果を発表するとともに、倫理的な動物実験についての発表があった。国内はもとより、海外の参加者からも会議の質が高く、満足したとの声が多く聞かれたのは、大変嬉しかった。我が国の動物実験代替法に向けた熱意を感じ取って頂け、国際社会の中で日本の存在感を示すことができたと感じている。また、我が国のこの分野の科学者が世界の多くの科学者と直接交流することができ、今後の我が国における動物福祉と動物実験代替法開発に関する研究を更に発展させる契機となったと思われる。このような成果は、やむを得ず行う動物実験を用いた医薬品の有効性や安全性の評価、また、生産等に対する社会の同意を得ることに資するものと期待される。

動物福祉や動物実験代替法という分野は日本においてはマイナーであるが、欧米においてはきわめて大きな課題となっている。OECD における安全性試験法ガイドラインの作成においても、動物福祉活動団体が参加するようになっている。今回の会議を日本が主催し、成功させることができたことは今後の我が国の研究者の国際的な活動に資するものと思われる。

5. 市民公開講座

会議最終日の 8 月 25 日(土)午後 2 時から 5 時半まで、ホテルイースト 21 東京の 1 階ホールで、「実験動物のためにできること—研究者の立場から—」というテーマで市民公開講座を開催した。これには、総数 214 名(会議に参加していない一般市民が約 8 割を占めた)の方が参加してくれた。これには動物福祉団体のご協力が大きかったと考えま



市民公開講座の会場風景

ま. そこでは、実験動物や動物実験の意義や役割について研究者の意見を聞いて頂くとともに、参加者からの意見や質問に多数答えることができた。質疑応答は予定の時間を大幅に上回り、参加者に満足して頂ける内容となったと考えている。メインテーマの一つである科学者と動物福祉活動者との対話を実現する意義深い内容であったと考える。

6. 会計

先に述べたように日本動物実験代替法学会は会議を招請するにあたり、多額の準備金を用意した。また、ACTは本会議の計画と運営について全面的な協力を行うとともに、極東地域以外の参加者への支援等のため15万ドルの支援してくれた。本会議の企画に際しては、会場費や招待者の旅費、警備費等に多くの費用がかかり、収支が懸念された。国内組織委員会では赤字が出たときには、幹事が連帯して責任を負うとの誓約書を作成し、不転の決意で準備をすすめた。しかし、我が国内外の多くの機関から多額の寄付をいただいたこと、主催者である日本学術会議から多額の補助金を得たこと、また、予想以上の参加者を得たことから、どうやら赤字を出さずにすんだ。集計結果については、公認会計士の監査を受けた上で、別途報告する予定である。

7. サテライトシンポジウム

本会議とは別に、会議の前に北京とソウルで、会議の後では京都でサテライトシンポジウムが開催された。それぞれは独立採算で、北京はNational Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products (NICPBP)のXing Ruichang 実験動物センター長の主催で「Welfare and Alternatives in Animal Experiments」について、ソウルはソウル大学獣医学部教授で韓国動物実験代替法学会長であるJae-Hak Park ソウル大学獣医学部教授の主催で「New Era of Korean Alternative Research for World Harmonization」について、京都は大阪歯

科大学の今井弘一博士の主催で「New Bioscience for 3Rs Research」について、開催された。北京とソウルは約100名、京都は約50名の参加者を集め、会議が催された。

8. 次回会議への動き

次回会議は、2009年にECVAMのThomas Hartung 所長およびEuropean CommissionのHerman Koetter博士が会長となり、イタリアのローマにおいて開催される。今回のメインテーマの一つである「動物実験代替法開発の促進、3Rsのグローバル化」は次回会議に引き継がれ、議論が深まると思われる。

9. 最後に

私にとって初めての国際会議の主催であり、多くの不手際があったにも関わらず、会議の準備と当日の運営、その後のフォローアップに多大な時間と労力をかけてご協力いただいたすべての方々に感謝します。特に、国内組織委員会の幹事の方々には大変お世話になりました。厚くお礼申し上げます。また、皇族をお呼びすることにより、日本における動物福祉への熱意を世界に伝えたいと考えましたが、いろいろな行き違いがあり、実現することができなかったことが残念でした。なお、日本学術会議におかれては会議の結果に満足していただき、更に、フォローアップシンポジウムを開催しないかとの提案を受けた。そこで、よりよい動物実験を目指すとともに、市民との交流を深めるため、現在、2月23日の朝10時より午後5時半頃まで、六本木ヒルズ(仮押さえ)で「3Rsに基づく動物実験の規制と第三者認証」のタイトルでシンポジウムを開催する予定です。厚生労働省傘下のヒューマンサイエンス財団は動物実験の第三者認証機関としての準備を進めており、それについての情報も得られることになっています。参加費は無料です。多数の参加者をお待ちしておりますので、希望者は代替法学会のホームページを見て、お申し込みください。

ORIGINAL ARTICLE

Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study

Takao Ashikaga¹, Hitoshi Sakaguchi², Kenji Okamoto³,
Makoto Mizuno⁴, Jun Sato⁵, Takaaki Yamada⁶, Mayumi Yoshida⁷,
Naoko Ota⁷, Seiji Hasegawa⁶, Tatsuji Kodama⁵, Yuko Okamoto⁴,
Hirofumi Kuwahara³, Nanae Kosaka², Sakiko Sono¹
and Yasuo Ohno⁸

¹Shiseido Co., Ltd., Kanagawa, Japan; ²Kao Corporation, Tochigi, Japan; ³Kanebo Cosmetics Inc., Kanagawa, Japan; ⁴Kose Corporation, Tokyo, Japan; ⁵Lion Corporation, Kanagawa, Japan; ⁶Nippon Menard Cosmetic Co., Ltd., Aichi, Japan; ⁷Pola Chemical Industries, Inc., Kanagawa, Japan; ⁸National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

Abstract

The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) is an in vitro skin sensitization test based on the enhancement by sensitizers of CD86 and/or CD54 expression on THP-1 cells. The aim of this study is to confirm the transferability and reproducibility of the h-CLAT protocol. Seven Japanese laboratories participated in this h-CLAT ring study. First, two well-known sensitizers (dinitrochlorobenzene (DNCB) and nickel sulfate (Ni)) and one non-sensitizer (sodium lauryl sulfate (SLS)) were evaluated at each laboratory with the same protocol at the same application dose. All laboratories correctly evaluated the skin sensitization potential of these three chemicals. Next, four sensitizers and one non-sensitizer were tested as a second trial. There were two false-negatives (ethylene diamine and eugenol) in some laboratories. Finally, chemicals tested in the second trial were re-evaluated with doses individually determined by each laboratory as a third trial. The results were almost the same as the results obtained when all the laboratories tested the same application doses. These results suggest that for more precise evaluation of difficult samples (e. g., unstable or water-insoluble chemicals), modifications of the protocol and prediction model are needed. However, the protocol was easily transferred to all laboratories and there were only a few false-negatives among 56 tests (8 chemicals at 7 laboratories).

Key words: Skin sensitization, alternatives, THP-1, reproducibility, h-CLAT

Introduction

Because of increasing social concern about animal welfare and the use of animals in testing, many alternative, non-animal tests have been proposed. There is particular interest in developing alternative methods for skin sensitization testing (De Silva et al., 1996). Measuring phenotypic changes, such as CD86 or CD54 expression on dendritic cells, induced by sensitizers is an important approach for developing alternative methods of evaluating skin sensitization potential (Aiba et al., 1997; Hopper et al., 1995). However, the effects of

chemicals on the surface phenotype of dendritic cells are dependent on the source of peripheral blood used to obtain the cells; in other words, the effect varied from donor to donor (Aiba et al., 1997; Rougier et al., 2000). Furthermore, it is not easy to obtain sufficient fresh peripheral blood. In order to overcome these problems, we tested human leukemia cell lines, such as THP-1, as surrogates for dendritic cells. We have reported that THP-1 cells, which show enhanced CD86 and/or CD54 expression when treated with sensitizers, can be used in an in vitro skin sensitization test

(Ashikaga et al., 2002; Yoshida et al., 2003), and we named this test the human cell line activation test (h-CLAT). In our previous study, we optimized the test conditions (Ashikaga et al., 2006) and confirmed good predictive performance using nine chemicals (Sakaguchi et al., 2006). When the criteria for positive response of CD86 and CD54 in h-CLAT were set at 150% and 200% respectively, the correspondence between in vivo and in vitro was more than 90% (Ashikaga et al., 2007). h-CLAT could predict the sensitization potential of preservatives, which are well-known sensitizers (Sakaguchi et al., 2007). These results suggested that h-CLAT could be a useful in vitro test system for predicting sensitizing properties of chemicals. Before submission of h-CLAT to a public center for validation of alternative methods, we required further data, especially on inter-laboratory reproducibility among multiple laboratories. Therefore, this inter-laboratory study was set up to confirm the transferability and reproducibility of the h-CLAT protocol. Seven Japanese laboratories participated in this study, with the support of the Ministry of Health, Labor and Welfare.

Materials and Methods

Study management and SOP

An initial test protocol was developed based on our previous study (Ashikaga et al., 2006). In the light of subsequent experiments, a refined and detailed standard operating procedure (SOP) was defined for conducting further study.

Cells and culture

THP-1 cells (ATCC No. TIB-202) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were cultured in RPMI

1640 medium (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA USA) with 10% FBS (v/v) (MP Biomedicals, Morgan Irvine, CA, USA, Cat. No. 29165, Lot. No. 2688H), 0.05 mM 2-mercaptoethanol and 1% Antibiotic-Antimycotic (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA USA).

h-CLAT procedure

THP-1 cells were seeded at between 0.1×10^6 and 0.2×10^6 cells/mL, and pre-cultured for 48 h or 72 h. After the incubation, THP-1 cells were plated at 1×10^6 cells/ml in a 24-well plate and treated for 24 h with test chemical. The final concentration of DMSO, when this was used as a solvent, in culture media was less than 0.2%. Chemical-treated cells were washed twice with PBS(-) containing 0.1% BSA. Then, the cells were treated with 0.01% globulins, Cohn fraction II, III (Sigma-Aldrich) for FcR blocking, for 10 min at 4°C. Cell staining was done at 4°C for 30 min. Anti-human CD86 antibody was obtained from BD-PharMingen (Clone: Fun-1, San Diego, CA, USA). Anti-human CD54 antibody was obtained from DAKO (Clone: 6.5B5, Glostrup, Denmark). FITC labeled-mouse IgG1 was purchased from DAKO (Clone: DAK-G01, Glostrup, Denmark) and used as an isotype control. Cells were washed once with PBS(-) containing 0.1% BSA, and expression of cell surface antigens was analyzed by flow cytometry. Dead cells were gated out by staining with propidium iodide (PI, 0.625 µg/ml). In total, 10,000 living cells were analyzed. When the cell viability was less than 50%, Relative Fluorescence Intensity (RFI) was not calculated because of diffuse labeling of cytoplasmic structures due to cell membrane destruction (Becker et al., 1992). RFI was used as an in-

Table 1 Test chemicals and common dose setting

(ND= No data).

Test chemicals	LLNA EC3(%)	Potency category by LLNA	Common CV75 (µg/mL)	vehicle for h-CLAT
<i>p</i> -Benzoquinone (BQ)	0.0099	Extreme	3.5	DMSO
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB)	0.05	Extreme	6.0	DMSO
Glutaraldehyde (GA)	0.1	Strong	8.0	Saline
Ethylene diamine (ED)	2.2	Moderate	250	Saline
Nickel sulfate (Ni)	4.8	Moderate	150	Saline
Eugenol (EU)	13	Weak	150	DMSO
Lactic acid (LA)	Not calculated	Non-sensitizer	2800	Saline
Sodium lauryl sulfate (SLS)	N.D.	False positive	60	Saline

indicator of CD86 and CD54 expression and was calculated as follows:

$$\text{RFI (\%)} = \frac{(\text{MFI of chemical-treated cells} - \text{MFI of chemical-treated Isotype control cells})}{(\text{MFI of vehicle control cells} - \text{MFI of vehicle Isotype control cells})} \times 100$$

MFI = (Geometric) Mean fluorescence intensity

Test chemicals and application doses

Eight test chemicals are shown in Table 1. All chemicals have been evaluated and classified with the LLNA (Gerberick et al., 2005). Six sensitizers were evaluated: two extreme, one strong, two moderate, and one weak allergens, as classified by LLNA. Two non-sensitizers were also evaluated: one non-classified allergenic chemical and the other false positive by LLNA. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. In first and second trials, application doses were determined from the results of cytotoxicity tests conducted at two laboratories. Cytotoxicity was evaluated by flow cytometry with propidium iodide (PI) (PI assay). From the PI assay data, eight doses based on the dose estimated to give 75% cell viability (CV75) were used [$1.2 \times \text{CV75}$, $1 \times \text{CV75}$, $1/1.2 \times \text{CV75}$ (or $0.8333 \times \text{CV75}$), $1/1.2^2 \times \text{CV75}$ (or $0.6944 \times \text{CV75}$), $1/1.2^3 \times \text{CV75}$ (or $0.5787 \times \text{CV75}$), $1/1.2^4 \times \text{CV75}$ (or $0.4822 \times \text{CV75}$), $1/1.2^5 \times \text{CV75}$ (or $0.4019 \times \text{CV75}$)

and $1/1.2^6 \times \text{CV75}$ (or $0.3349 \times \text{CV75}$)]. The appropriateness of this dose setting was confirmed by the evaluation of more than 60 chemicals (Ashikaga et al., 2007). All CV75 doses of test chemicals used in this study are shown in Table 1. The vehicle was saline or DMSO (SIGMA-ALDRICH, Cat. No. 154938, purity $\geq 99.9\%$). In the third trial, each laboratory individually conducted cytotoxicity testing for determination of the application doses.

Data analysis

Tests were performed three times with each chemical. The values of cell viability and CD86/54 expression were calculated as the mean of the three tests. The average of three experiments at any dose should exceed the positive criterion ("CD86 ≥ 150 or CD54 ≥ 200 ") in order for the test chemical to be considered as 'positive'.

Cell culture conditions

THP-1 cells cultured in Lab "F" showed unacceptably low viability (less than 50%) when treated with $5 \mu\text{g/mL}$ DNCB (CV75/1.2), which was used as a positive control in every experiment. For that reason, the dose-response of DNCB in Lab "F" was different from the results in other laboratories (Fig. 1-a). However, when freshly cultured THP-1 cells were introduced in Lab "F", the results were very similar to those in the other laboratories (Fig. 1-b). Both the firstly tested cell and the freshly cultured cell originated from a same lot of THP-1.

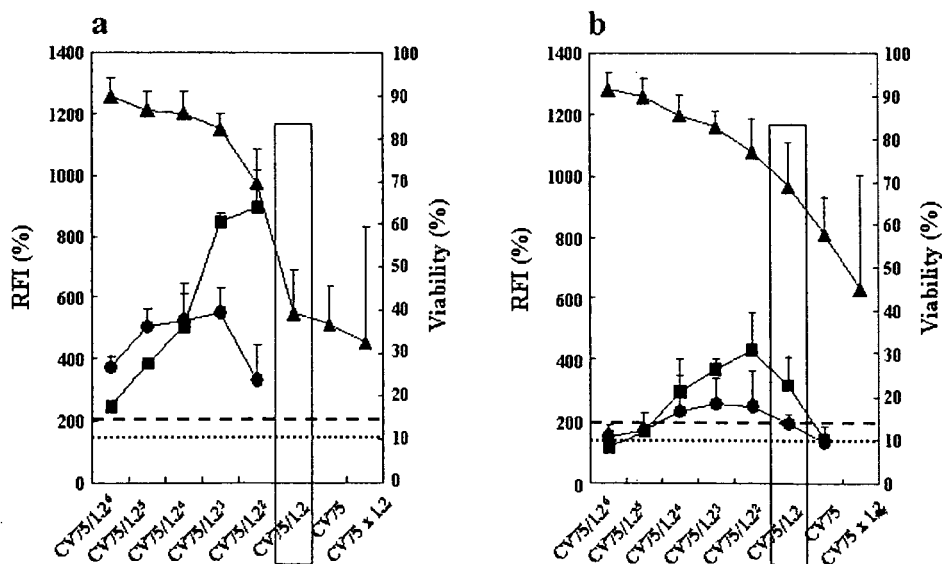


Fig. 1 Improvement of reproducibility (example 1) At laboratory "F", the cell viability at $5 \mu\text{g/mL}$ DNCB (CV75/1.2) was improved when DNCB was re-evaluated with freshly cultured THP-1 cells. a=First experiment; b=Second experiment. ▲= Viability; ●= CD86; ■= CD54. Small dotted line: criterion for CD86 positivity; dashed line: criterion for CD200 positivity.

The viability of the freshly cultured cell treated with 5mg/mL of DNCB (CV75/1.2) was about 70%. On the other hand, that of the firstly tested cell was less than 40%, and the value meant condition of the cell was not good. Condition of the firstly tested cell could have decreased due to wrong operation such as over-growth during cell culture. Moreover, in Lab "D" the dose-response of Ni was initially different from those in the other laboratories (Fig. 2-a). Cell viability of control cells at this time was less than 90%, which was unusual. When Lab "D" re-evaluated Ni with freshly cultured THP-1 cells, the viability of con-

trol cells was over 90% and both CD86 and CD54 were enhanced by treatment of the test cells with Ni (Fig. 2-b). These results suggested that tight control of cell culture conditions is important for good reproducibility in the test.

Inter-laboratory reproducibility with three well-known chemicals

As a first trial, seven laboratories tested two well-known sensitizers (DNCB and Ni) and one non-sensitizer (SLS), after the introduction of tighter control of cell culture conditions. Fig. 3 shows the inter-laboratory reproducibility for

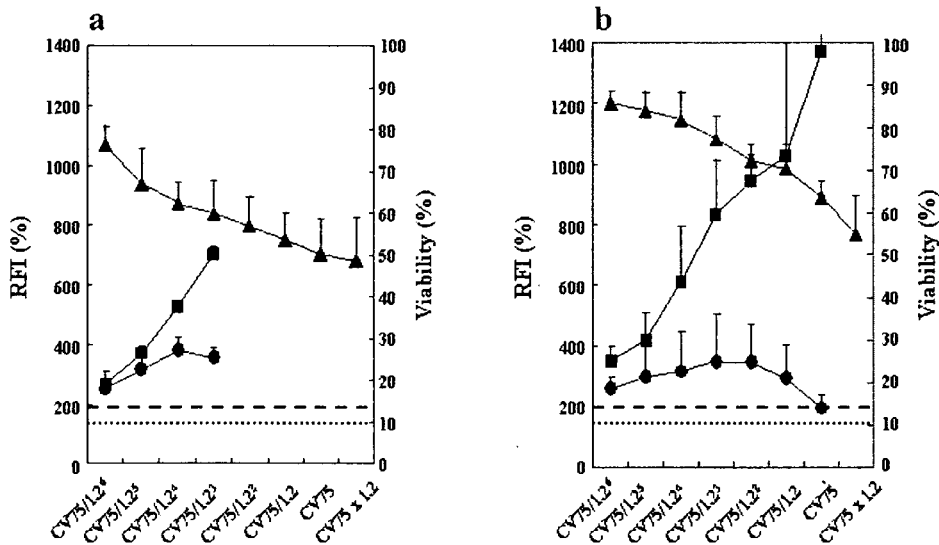


Fig. 2 Improvement of reproducibility (example 2)

At laboratory "D", the cell viability of control cells was improved when freshly cultured THP-1 cells were used, and the dose-response curve of Ni was similar to those in the other laboratories. a=First experiment; b=Second experiment. ▲= Viability; ●= CD86; ■= CD54. Small dotted line: criterion for CD86 positivity; dashed line: criterion for CD200 positivity.

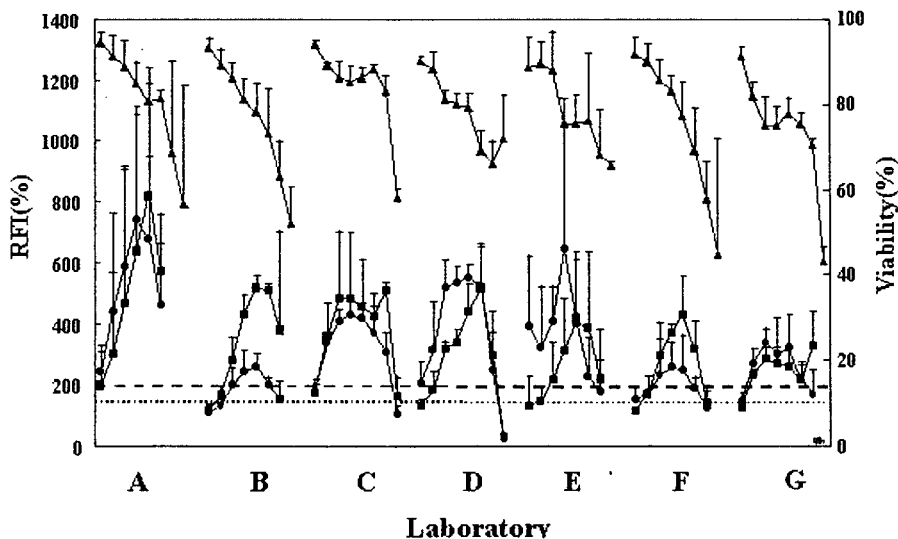


Fig. 3 Inter-laboratory reproducibility of prediction for DNCB

▲= Viability; ●= CD86; ■= CD54. Small dotted line: criterion for CD86 positivity; dashed line: criterion for CD200 positivity.

DNCB. In all laboratories, DNCB clearly enhanced both CD86 and CD54 at several doses and the dose-response relationships were basically similar. Both CD86 and CD54 were augmented dose-dependently at lower doses and their expression was suppressed due to cytotoxicity at higher doses. Ni also enhanced both CD86 and CD54 of THP-1 cells in all laboratories (Fig. 4). In particular, CD54 expression was remarkably induced by the Ni treatment in a dose-dependent manner. On the other hand, SLS, a non-sensitizer, did not affect

CD86 or CD54 expression at any dose, including higher “subtoxic doses”, in all laboratories (Fig. 5). All seven laboratories correctly evaluated the sensitizing potential of these three chemicals. The reproducibility of dose-response relationships among laboratories was excellent.

Inter-laboratory reproducibility of five additional chemicals

Next, four sensitizers, covering diverse sensitizing potentials, and one non-sensitizer were tested as a

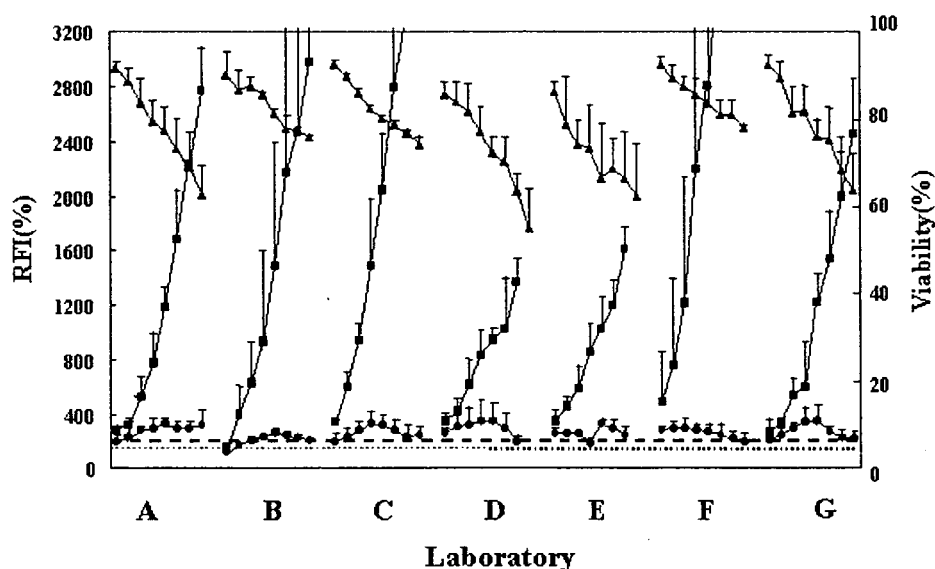


Fig. 4 Inter-laboratory reproducibility of prediction for Ni
 ▲= Viability; ●= CD86; ■= CD54. Small dotted line= criterion for CD86 positivity; dashed line: criterion for CD200 positivity.

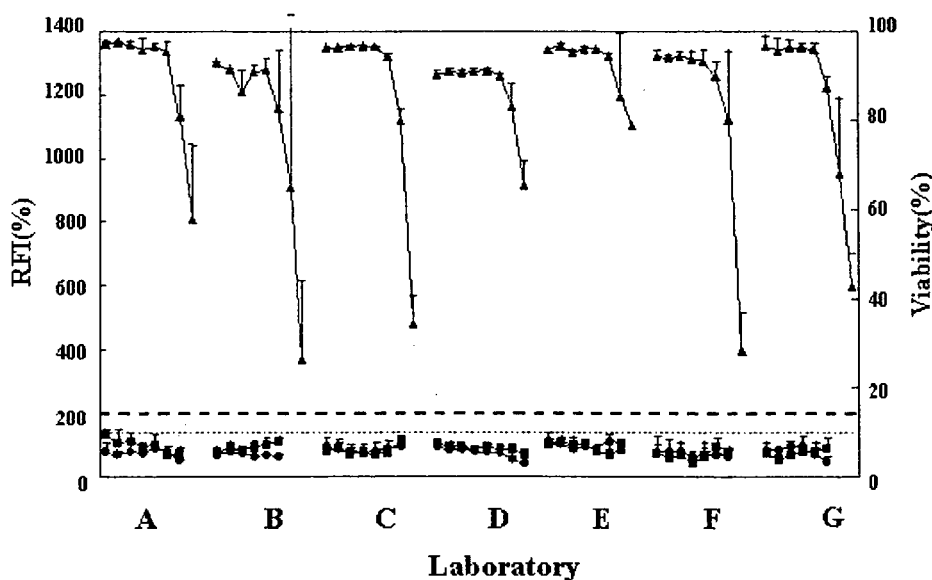


Fig. 5 Inter-laboratory reproducibility of SLS
 ▲= Viability; ●= CD86; ■= CD54. Small dotted line= criterion for CD86 positivity; dashed line: criterion for CD200 positivity.

second trial. In the second trial, all five chemicals were tested based on common CV75 values. The results for the five chemicals in seven laboratories are summarized in Table 2. Thirty-three out of 35 tests corresponded with LLNA. There were two false-negatives (ethylene diamine and eugenol), but no false-positives. The overall accuracy of the 1st and 2nd trials was about 96%. In summary, the reproducibility of h-CLAT was basically good. Either CD86 or CD54 was slightly enhanced in the two false-negative cases (data not shown), but the

increases did not meet the criteria for positivity.

Inter-laboratory reproducibility, including dose finding

In order to further assure of the performance of the assay, chemicals tested in the second trial were evaluated again in a third trial. In this trial, each laboratory individually performed cytotoxicity assay, and determined the application doses based on their own results. Table 3 shows CV75 values (estimated dose affording 75% cell viability) at each

Table 2 Summary of the first and second trials

The results of evaluation of eight chemicals in the seven laboratories are summarized. Results; += positive; -= negative. Battery (CD86/CD54). *; Laboratory "D" judged BQ positive as a result of eight experiments. Shaded cell= LLAN and h-CLAT predictions differ.

Test chemical	Laboratory						
	A	B	C	D	E	F	G
p-Benzoquinone (BQ)	+(+/+)	+(+/+)	+(+/+)	+(+*/-)	+(+/-)	+(+/+)	+(+/-)
Glutaraldehyde (GA)	+(+/+)	+(+/+)	+(+/+)	+(+/-)	+(+/-)	+(+/+)	+(+/-)
Ethylene diamine (ED)	+(+/-)	+(+/-)	-(+/-)	+(+/-)	+(+/-)	+(+/-)	+(+/-)
Eugenol (EU)	+(+/+)	+(+/-)	+(+/+)	+(+/-)	+(+/+)	+(+/+)	-(+/-)
Lactic acid (LA)	-(-/-)	-(-/-)	-(-/-)	-(-/-)	-(-/-)	-(-/-)	-(-/-)

Table 3 Values of CV75 at each laboratory in the third trial

Grand mean= mean value of all seven laboratories; SD= standard deviation; CV= coefficient of variation.

Test chemical	Common CV75 in the second trial	CV75s (µg/mL) in the third trial									
		A	B	C	D	E	F	G	Grand mean	SD	CV
DNCB	6.0	4.3	4.2	5.0	4.6	3.6	4.6	6.4	4.7	0.9	0.19
pBQ	3.5	2.6	5.5	3.2	7.3	5.4	2.8	3.7	4.3	1.7	0.40
GA	8.0	9.7	12	12	20	7.5	8.2	9.2	11	4.3	0.38
ED	250	267	256	274	278	248	370	277	281	41	0.14
EU	150	153	161	155	202	177	190	120	165	27	0.17
LA	2800	2730	2754	3045	3055	2997	3300	2920	2972	195	0.07

Table 4 Summary of the third trial

The results of re-evaluation of five chemicals in the seven laboratories are summarized. Results; += positive; -= negative. Battery (CD86/CD54). Hatched cell= LLAN and h-CLAT predictions differ.

Test chemical	Laboratory						
	A	B	C	D	E	F	G
BQ	+(+/+)	+(+/+)	+(+/+)	+(+/-)	+(+/-)	+(+/+)	+(+/-)
GA	+(+/+)	+(+/+)	+(+/+)	+(+/-)	+(+/+)	+(+/+)	+(+/+)
ED	+(+/-)	+(+/-)	-(+/-)	-(+/-)	+(+/-)	+(+/-)	+(+/+)
EU	+(+/+)	-(+/-)	+(+/-)	+(+/-)	+(+/-)	+(+/+)	+(+/+)
LA	-(-/-)	-(-/-)	-(-/-)	-(-/-)	-(-/-)	-(-/-)	-(-/-)