

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 (石鹼洗剤協会)、ECPA (欧州農薬工業会)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、バクテリアを用いるin vitro試験と哺乳類細胞を用いるin vitro細胞遺伝学試験またはin vitro小核試験が陰性の場合）、 <u>吸入または皮膚経路による急性毒性試験</u> 、 <u>短期反復投与毒性試験</u> （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</u> （90日）、 <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</u> （>12カ月）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化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-HER-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。

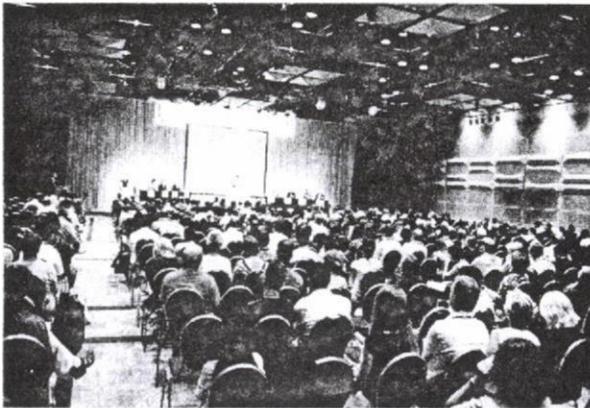
3. 会議の内容

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、会場のあちらこちら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ージョンなど、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つ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:

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

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 x CV75, 1 x CV75, 1/1.2x CV75 (or 0.8333x CV75), 1/1.2²x CV75 (or 0.6944x CV75), 1/1.2³x CV75 (or 0.5787x CV75), 1/1.2⁴x CV75 (or 0.4822x CV75), 1/1.2⁵x CV75 (or 0.4019x CV75)

and 1/1.2⁶x CV75 (or 0.3349x 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 ≥ 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 µg/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.

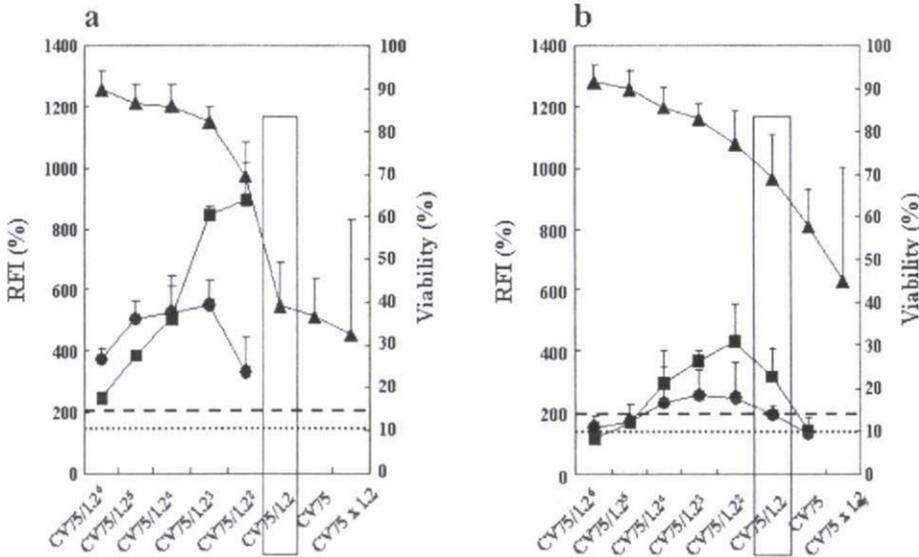


Fig. 1 Improvement of reproducibility (example 1) At laboratory "F", the cell viability at 5 µg/mL DNCB (CV75/1.2) was improved when DNCB was re-evaluated with freshly cultured THP-1 cells. a=First experiment; b=Second experiment. ▲= Viability; ●= CD86; ■= CD54. Small dotted line: criterion for CD86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

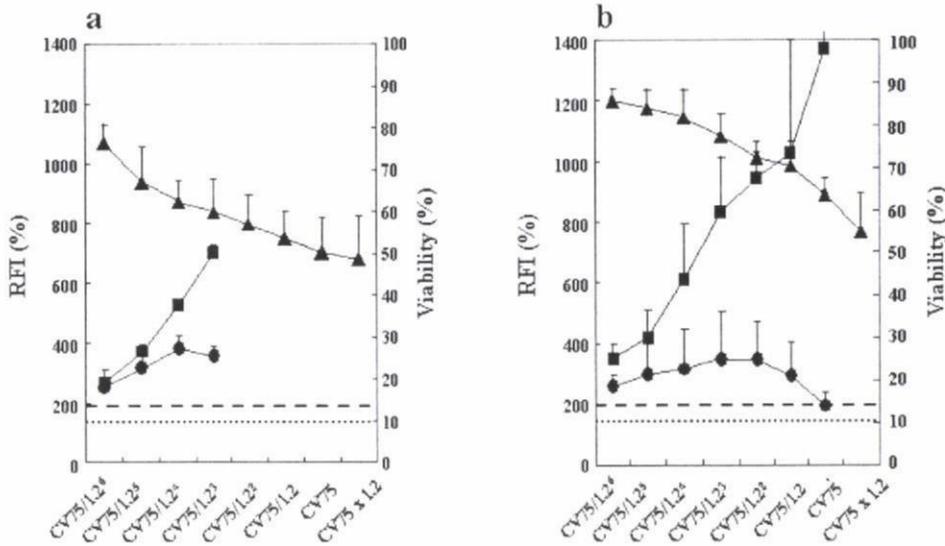


Fig. 2 Improvement of reproducibility (example 2)

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.

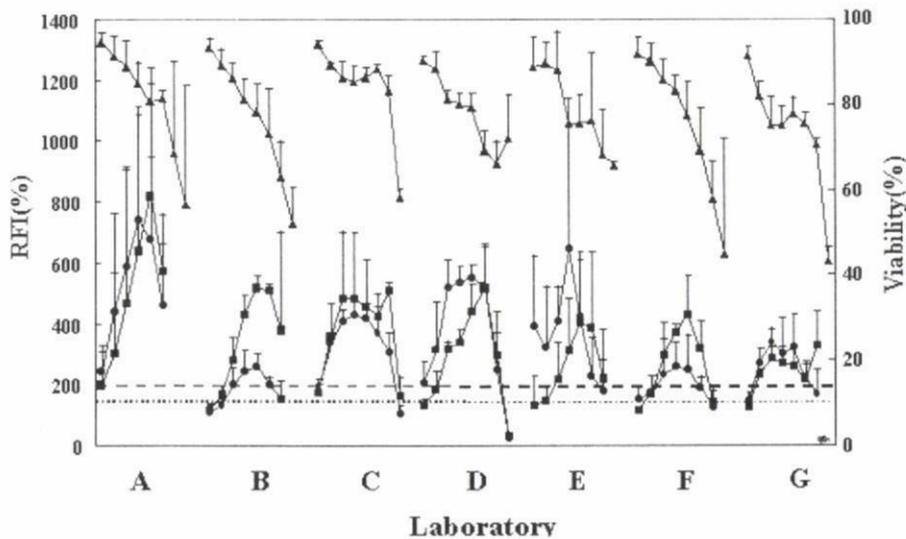


Fig. 3 Inter-laboratory reproducibility of prediction for DNCB

▲= 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

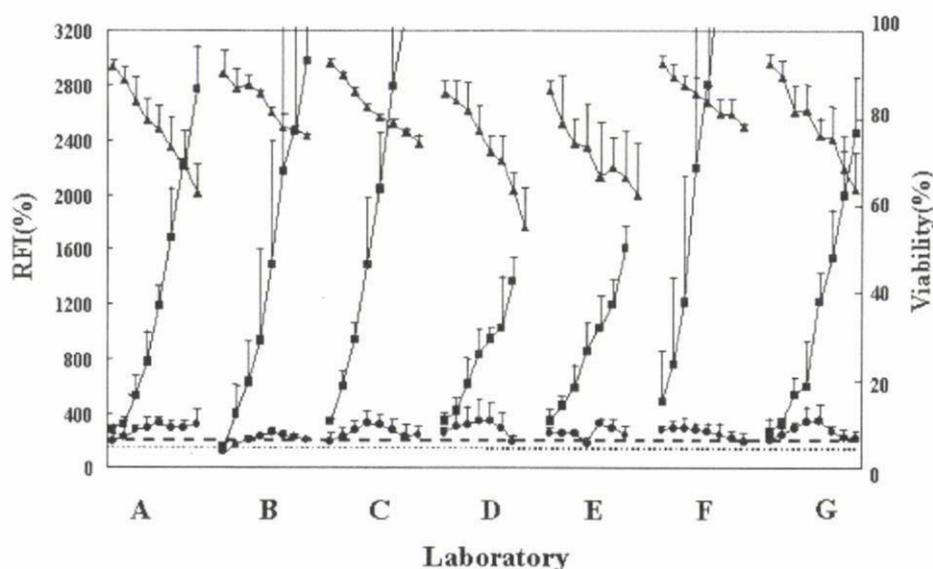


Fig. 4 Inter-laboratory reproducibility of prediction for Ni
 ▲= Viability; ●= CD86; ■= CD54. Small dotted line= criterion for CD86 positivity; dashed line: criterion for CD200 positivity.

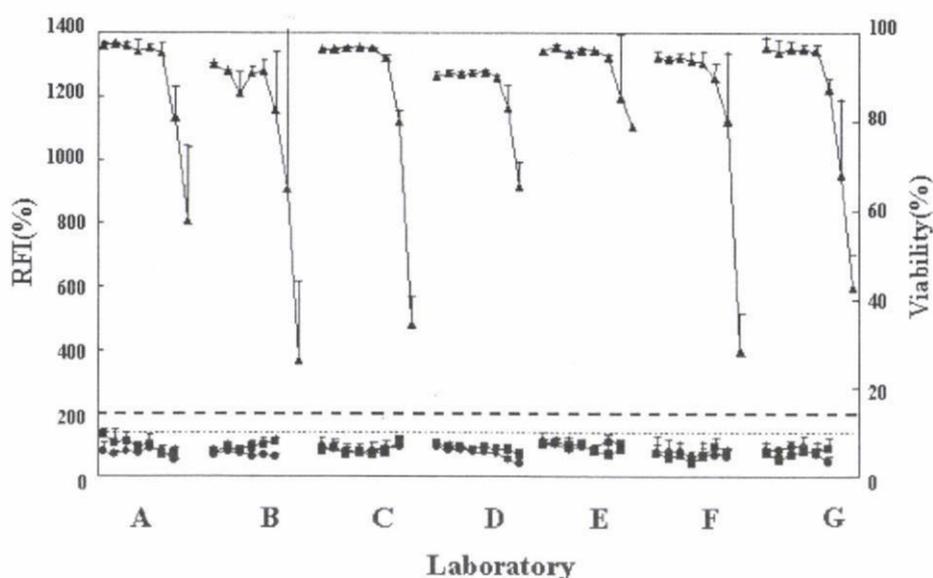


Fig. 5 Inter-laboratory reproducibility of SLS
 ▲= Viability; ●= CD86; ■= CD54. Small dotted line= criterion for CD86 positivity; dashed line: criterion for CD200 positivity.

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 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 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	-(-/-)	-(-/-)	-(-/-)	-(-/-)	-(-/-)	-(-/-)	-(-/-)

laboratory. There was some variation of CV75 among laboratories. This might have been caused by differences of culture conditions between laboratories, because the same lots of serum and the same cell line were used at all laboratories. However, the CV75s at the individual laboratory were very close to the common CV75s used in the second trial. The coefficient of variation for each test chemical was between 0.07 and 0.4, and the range of CV value was good compared with that in another inter-laboratory study on cytotoxicity assay (Tani et al., 1999). The results of the third trial are summarized in Table 4. Among the five test chemicals, p-benzoquinone, glutaraldehyde and lactic acid were correctly evaluated at all laboratories. On the other hand, two laboratories missed the sensitizing potential of ethylene diamine or eugenol. These results are almost the same as those in the second trial.

Discussion

Several in vitro skin sensitization methods using cell lines have been reported in response to current trends in animal welfare and regulatory opinion (Casati et al., 2005), but final validation and regulatory acceptance have not yet been achieved. We have reported that h-CLAT using THP-1 cells was useful for predicting skin sensitization in vitro (Ashikaga et al., 2007; Sakaguchi et al., 2007). However, more data were needed, especially about the transferability of the protocol, and the inter-laboratory reproducibility of the test, in order to support formal validation activities (Hartung et al., 2004). Therefore, we organized a multi-laboratory study involving seven laboratories. As a first step, two well-known sensitizers (DNCB and Ni) and one non-sensitizer (SLS) were evaluated. The purpose of the first trial was to establish technology transfer of the h-CLAT protocol. Because all laboratories correctly evaluated the sensitization potentials of these three chemicals, transferability of the assay was judged to be basically good. However, some differences in dose-response relationship were observed. The reproducibility improved when re-evaluation was conducted with freshly cultured THP-1 cells. These results suggest that tight control of cell culture conditions is important, especially for good reproducibility of cell-based assay in which protein expression is used as an indicator.

Based on these results, we refined the standard operating procedure (SOP). We introduced the requirements that the viability of control cells should be more than 90 %, and that the viability in

the positive control should be more than 60%. After the introduction of tighter control of cell culture conditions, the reproducibility of the dose-response relationship was improved. From the result of the first trial, we concluded that the h-CLAT protocol is easy to transfer, and to further confirm the reproducibility with various kinds of chemicals, we tested four sensitizers and one non-sensitizer in a second trial. In the total of 35 tests (seven laboratories, five chemicals), there were two false-negatives (ethylene diamine and eugenol). Therefore, inter-laboratory reproducibility of the assay was basically good. Ethylene diamine is known to be very reactive with organic compounds (Agius et al., 1991), and it evaporates at room temperature. Further, eugenol showed poor water solubility at the application doses, because oil drops were observed in the cell culture medium. It would be difficult for h-CLAT to evaluate the sensitization potential of such chemicals, so the false negative results may simply reflect the particular characteristics of these two chemicals. It will be necessary to clarify the extent of applicability of h-CLAT, particularly in relation to the physico-chemical properties of target molecules. Some differences in CD86/CD54 expression pattern were also observed among laboratories. This confirms the importance of predicting sensitizing potential not just with one marker, but with two or more markers. Python et al. (2007) reported that a combination of at least two markers was needed to establish a reliable evaluation of dendritic cell activation potential. We also should mention problems of h-CLAT. Test chemicals are treated with THP-1 cells in cell culture medium. Therefore, if test chemical disperse non-equally in cell culture medium (e.g., sticky, water-proof particle, oil spill, etc.), h-CLAT may not evaluate these potential correctly. In addition, THP-1 is thought to almost not have metabolic enzymes such as P-450 (Prof. Yoshida, Showa Univ., personal communication). Therefore, h-CLAT might not be able to evaluate a potential of chemical that can be changed by metabolism. Study on the applicability domain of h-CLAT remains to be done.

Finally, chemicals tested in the second trial were re-evaluated with doses determined at each individual laboratory as a third trial, to see whether more appropriate application doses could be selected, depending on the precise test conditions. However, differences of the values of CV75 between laboratories were not large. Furthermore, the results (positive/negative judgment) were almost

the same as in the second trial with common application doses. In conclusion, further study is necessary, especially to clarify the limitations of the assay. Finally, all laboratories correctly judged the sensitization potential of six test chemicals among eight chemicals. These results suggest that the h-CLAT protocol is easy to transfer, and that inter-laboratory reproducibility is basically good. We consider that h-CLAT will be ready for formal pre-validation study after further minor improvements of the method.

Acknowledgements

This study was supported by a Grant-in-aid from MHLW.

References

- Agius, R. M., Nee, J., McGovern, B., Robertson, A., (1991) Structure activity hypotheses in occupational asthma caused by low molecular weight substances, *Ann. Occup. Hyg.*, 35(2), 129-37.
- Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., and Tagami, H., (1997) Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules, *European Journal of Immunology*, 27, 3031-3038.
- Ashikaga, T., Hoya, M., Itagaki, H., Katamura, Y., and Aiba, S., (2002) Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers, *Toxicology in Vitro*, 16, 711-716.
- Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., and Toyoda, H., (2006) Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol, *Toxicology in Vitro*, 20, 767-773.
- Ashikaga, T., Kosaka, N., Sono, S., Sakaguchi, H., Suzuki H., and Itagaki H., (2007) Comparative evaluation of the in vitro skin sensitization test, human Cell Line Activation Test (h-CLAT) with LLNA and human data, *The Toxicologist*, 96 (1), 237.
- Becker, D., Kolde, G., Reske, K. and Knop, J., (1994) An in vitro endocytotic activation of murine epidermal langerhans cells under the influence of contact allergens, *Journal of Immunological Methods*, 169, 195-204.
- Casati, S., Aeby, P., Basketter, D. A., Cavani, A., Gennari, A., Gerberick, G. F., Griem, P., Hartung, T., Kimber, I., Lepoittevin, J. P., Meade, B.J., Pallardy, M., Rougier, N., Rousset F., Rubinstenn, G., Sallusto, F., Verheyen, G. R., and Zuang, V., (2005) Dendritic cells as a tool for the predictive identification of skin sensitisation hazard.; The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 51, *Altern. Lab. Anim.*, 33(1), 47-62.
- De Silva, O., Basketter, D. A., and Barrat M. D., (1996) Alternative methods for skin sensitization testing, *Alternative Laboratory Animals*, 24, 683-705.
- Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kern, P. S., Schlatter, H., Dearman, R. J., Kimber, I., Patlewicz, G. Y., and Basketter, D. A., (2005) Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods, *Dermatitis*, 16(4), 157-202.
- Hartung, T., Bremer, S., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Fortaner, S., Gribaldo, L., Halder, M., Hoffmann, S., Roi, A. J., Prieto, P., Sabbioni, E., Scott, L., Worth, A., and Zuang, V., (2004) A modular approach to the ECVAM principles on test validity, *Altern. Lab Anim.*, 32(5), 467-72.
- Hopper, U., Degwerat, J., and Steckel, F., (1995) Use of CD1a- dendritic cells and keratinocytes to characterize cellular reaction involved in allergic contact dermatitis, *Journal of Cellular Biochemistry*, 21, Supple A, 11-18.
- Python, F., Goebel, C., Aeby, P., (2007) Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 220, 113-24.
- Tani, N., (1999) Interlaboratory Validation of the In Vitro Eye Irritation Tests for cosmetic Ingredients. (8) Evaluation of Cytotoxicity Tests on SIRC cells, *Toxicology in Vitro*, 13, 175-187.
- Rougier, N., Redziniak, G., Mouglin, D., Schmitt, D., and Vincent, C., (2000). In vitro evaluation of the sensitization potential of weak contact allergens using Langerhans-like dendritic cells and autologous T cells, *Toxicology*, 145, 73-82.
- Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., and Suzuki, H., (2006) Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT, *Toxicology in Vitro*, 20, 774-784.

Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., and Suzuki, H., (2007) Prediction of preservative sensitization potential using surface marker CD86 and/or CD54 expression on human cell line, THP-1, Arch. Dermatol. Res.,*298, 427-37.

Yoshida, Y., Sakaguchi, H., Ito, Y., Okuda, M., and Suzuki, H., (2003) Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naïve THP-1 cell line, Toxicology in Vitro, 17, 221-228.

(Received: August 6, 2007/
Accepted: December 29, 2007)

Corresponding author:

Takao Ashikaga
Shiseido Co., Ltd., Quality Assurance Center,
2-12-1, Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama,
236-8643, Japan
Tel: +81-45-788-7308
Fax: + +81-45-788-7295
E-mail: takao.ashikaga@to.shiseido.co.jp

日本における動物実験代替法の開発動向

小島 肇 夫

Abstract : Considering international trend to safety testing of cosmetic ingredients and finished products, I surmised about a present alternative to animal testing such as skin irritation, skin sensitization, ocular irritation, phototoxicity, acute oral toxicity and genotoxicity. The validation studies of any method in these tests are over or in progress, and various tests may be replaced *in vitro* test in future. However, test methods are not at all much under development. I expect much basic or applied works on alternative to animal testing by a lot of researchers.

Key words : alternative, validation, safety testing, *in vitro*

1. はじめに

国際的な試験法公定化の合意事項により¹⁾、動物実験代替法の開発に係らず、新規試験法を確立するためには図1に示すような試験法の研究・開発後、バリデーション、第三者評価、行政的な受入れという段階を経なければならない²⁾。よって、試験法を開発して論文、特許を作成したとしても、その時点ではこの試験法を用いた安全性評価は公的には何の意味もない。試験法の公定化には10年の時間と多くの経費を要するとも言われており、極めて骨の折れる作業である。この評価にあたる作業を実施する部署として、2005年11月に国立医薬品食品衛生研究所、安全性生物試験研究



図1 試験法バリデーションのプロセス²⁾

“Development for Japanese alternative to animal testing.”

Hajime Kojima (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), Div. of Pharmacology, National Center for Biological Safety Research, National Institute of Health Sciences, 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—158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

1982年岐阜大学農学部農芸化学科卒業、同年日本メナード化粧品株式会社入社、1983～1985年国立遺伝学研究所留学、1996年長崎大学薬学部博士号取得、現在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室長。



センター内に新規試験法評価室が設立された。この部署は国際的にはJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) と名乗り、図2に示すような国際協調の窓口として、新規試験法のバリデーションや第三者評価を担当している^{3)～6)}。

バリデーションや第三者評価はシステム化されつつあるが⁷⁾、研究・開発される試験法のパイには限りがあるという大きな問題点がある。現在、確立された動物実験代替試験法の数は少なく、検討されている試験法も多くはない。もっと多くの試験法が研究・開発されなければならないし、仮

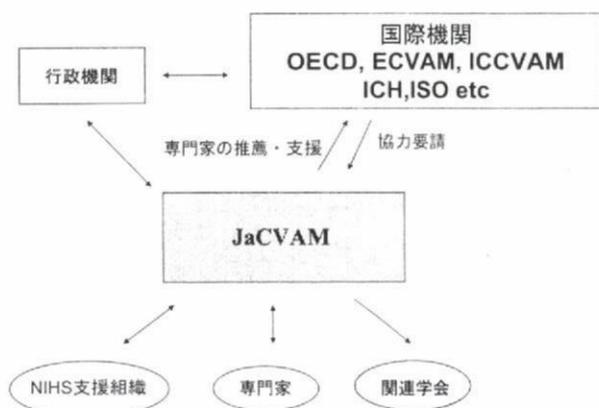


図2 JaCVAMの国際協調

に確立された試験法でも見直しや改良が必要である。このような視点で、化粧品の安全性評価における各試験法について現在の進捗を列記して、新規試験法開発の可能性を以下に挙げていきたい。

2. 皮膚刺激性試験

2-1. 現状

欧州では3次元培養皮膚モデルなどを用いた皮膚刺激性試験代替法への取り組み、主にバリデーション研究が長年に渡り実施されてきた。その結果として、2007年4月、ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) は3次元培養表皮モデルであるEPISKINを用いた皮膚刺激性の評価を承認した⁸⁾。ESACとは欧州動物実験代替法センター：ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) のアドバイ

ザー機関であるとともに、ECVAMでバリデーションが終了した試験法の第三者評価を行う機関である⁹⁾。約10年に渡り、欧州で行われてきた皮膚刺激性試験代替法バリデーションおよび試験法改良の成果が第三者専門家により評価されたことになる^{10)~16)}。頭の整理のために、日米欧のバリデーションや第三者評価の世話役、行政的受け入れの評価機関、それぞれの顧問会議を表1にまとめた。以下、ICCVAM (Interagency coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) という用語も出てくるが²⁾、表1でこの何を行う機関であるかを確認してほしい。

2-2. 問題点

ECVAMでバリデーションされた3次元培養皮膚モデルはEPISKINのみではない。EpiDermもバリデーションされたが^{14), 15)}、残念ながらESACの基準をクリアできなかった。さらに、マウス摘出皮膚を用いた方法もバリデーションされたが¹³⁾、途中段階で脱落している。

日本でも日本製の3次元培養皮膚モデルTEST-SKINやVitrolife-Skinを用いて2002~2003年に皮膚刺激性試験代替法のためにバリデーション研究が実施された^{17)~19)}。残念ながらその結果が論文にされていないこともあり、日本のバリデーション結果は国際的には評価されていない。しかし、化粧品の2009年問題という化粧品の開発・販売に動物実験を使えなくなるというEUの規制は日本でも他人事ではなく、日本製モデルを用いたバ

表1 日米欧の各段階における中心機関

	バリデーション	第三者評価の世話役	行政受入れの評価	顧問会議
米国	NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)	NICEATM	ICCVAM (Interagency coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)	SACATM (Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods)
欧州	ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)	ECVAM	ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)	ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)
日本	学会 (日本動物実験代替法学会など)	JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)	JaCVAM評価会議	JaCVAM顧問会議