

ラッチテストを行う (図1)。

b) 参考までに花粉と果物、野菜の特異 IgE 抗体をチェックする

被験者の血液を用いて測定する抗原特異 IgE 抗体価 (CAP-FEIA) は、通常クラス 2 以上を陽性と判定している。しかし、抗体価と臨床症状とは、必ずしも一致しない。OAS の原因確定にはブリック-ブリック法が現時点では最も優れた検査といえる。今後の詳しい検査のために血清を採取し冷凍保存しておくことも肝要である。

当科では OAS についての関連情報まとめた生活指導カードを、患者に提供している (表1)。

〈松永佳世子〉

6

食餌性アレルギーなどに伴うアナフィラキシーショックへの対応について教えてください

A アナフィラキシーの定義と症状

アナフィラキシーショックは死に至る危険性があり医療の現場では緊急の対応が要求されている。アナフィラキシーは

1. 皮膚あるいは粘膜症状の急性の発症と、a.呼吸困難、またはb.血圧低下ないしは意識障害のいずれかがある場合、
2. 可能性が疑われる抗原曝露後数分から数時間後に a.皮膚粘膜症状があるか、b.呼吸困難があるか、c.血圧低下ないしは意識障害があるか、d.持続する消化管症状のうち2つ以上がある場合、
3. 既知の抗原に曝露したあと血圧低下がみられる場合で、血圧低下とは a. 乳児・小児では収縮期血圧30%以上低下、b. 成人は収縮期血圧が90 mmHg以下、あるいは常時の30%以上低下と定義されている¹⁾。

皮膚科では、蕁麻疹あるいは全身の潮紅に呼吸困難、ないしは血圧低下が加われば、アナフィラキシーショックと診断し、以下の治療を行う。

B アナフィラキシーの治療

原因がわかれば、直ちに除去する。特にラテックスアレルギーの場合は、医師、看護師は合成ゴム手袋を使用し、点滴など天然ゴム製医療用具を使用しない注意が必要になる。

治療はアドレナリンを直ちに0.01 mg/体重 kg、最大量0.5 mgを筋肉注射する。改善しない場合は同じ量を5分から15分毎に筋肉注射する。気道を確保し酸素を吸入させ、下肢を挙上し、血圧が正常になるまで急速輸液10~20 ml/kg 陽圧で注入する。血圧低下が改善されない場合は昇圧剤としてバソプレシン、メタラミノールを使用し、蕁麻疹がある場合はH1およびH2抗ヒスタミン薬を使用する。副腎皮質ホルモン薬はアナフィラキシーショックに即効する根拠がないので、遅発型反応に対する効果を期待し使用する。高血圧でβブロッカー（まれにαブロッカーやACE阻害薬でも）を服用している患者ではエピネフリンが効かないことがあるので、この場合はグルカゴン1~5 mgを使用する。

C ショックが治ったら

遅発型反応が1~20%生じることがあると報告されている。そこで、アナフィラキシーショックのあと24時間は監視下に置く必要があり入院管理を原則とする。症状の再燃や再発を予防するために、

原因を確定することが必要である。そこで詳細な問診と皮膚検査により原因を究明するが、抗ヒスタミン薬使用中の皮膚検査は偽陰性になるので、皮膚アレルギー検査は抗ヒスタミン薬使用中止後少なくとも3日後に行う。ショック時に原因あるいは関連する特異IgE抗体を血液検査すると同時に、後日追加検査のための血清を凍結保存する。小麦、エビなどによる運動誘発アナフィラキシーにおいては、皮膚テストを行った後に、食物、運動負荷、アスピリン負荷の組み合わせによる検査を行い原因確定する。

D 携帯用アドレナリン注射（エピペン^{TR}）を処方する

アナフィラキシーを生じた患者には緊急時の対策として携帯用アドレナリン注射であるエピペン^{TR}を勧める。原因が食物の場合、抗原を避けることを指導するが、給食や外食など、思わぬところに抗原を含む食物が含まれている場合がある。また原因が確定できないアナフィラキシーは、原因を避けることが不可能であり、エピペン^{TR}の携帯によって、緊急時の対応が生命を守るために必要である。エピペン^{TR}は体重30 kg以上の人、アドレナリン0.3 mg、体重15 kg以上30 kg未満の人はアドレナリン0.15 mgを含む2種類の製品がある。体重が15 kg未満の小児には適応がない。エピペン^{TR}は使用方法を患者と養育者に教育し、説明同意を得た患者に対して、資格をもつ医師により処方が可能である。詳しくは (<http://www.epipen.jp/>) を参照のこと。

■文献

- 1) Sampson HA, et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117: 391-7.

〈松永佳世子〉

安全性評価と動物実験代替法の現状

小島 肇夫

Current Status of Safety Evaluation and Alternative to Animal Testings in Japan

Hajime KOJIMA

Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), National Institute of Health Sciences (NIHS), Japan, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received January 11, 2008)

In November 2005, the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) was established as a part of the Division of Pharmacology at the National Center for Biological Safety and Research affiliated with Japan's National Institute of Health Sciences (NIHS). JaCVAM facilitates the validation, peer-review, and international harmonization of alternative to animals testing. Key objectives of JaCVAM are: 1) facilitate 3R's*, prioritizing Reduction and Replacement, and 2) to ensure new test methods are validated, peer reviewed, officially accepted by the regulatory agencies, and made internationally compatible. In this paper, JaCVAM's current activities and future directions are shown in the validation and peer review of alternatives to testing for skin irritation, eye irritation, phototoxicity, skin sensitization, acute toxicity, genotoxicity and endocrine disruptor screening.

* 3R's for animal testing (Reduction, Refinement, Replacement)

Key words—validation, peer review; alternative

1. はじめに

2005年にOECDにて正式に認められたOECD Guidance Document 34 (GD34)¹⁾には、健康や環境を守るために開発される新たな試験法において、Fig. 1に示すような、バリデーション、専門家による第3者評価(以後、第3者評価と記す)を経ないと行政的には受け入れられないと記載されている。²⁾この手順に対応できる機関として、欧州ではECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)、米国にはNICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)-ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)がある。これらと同様の業務を行う機関として、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、国際協調の窓口として、また新規試験法のバリデーションや第3者評価を担当している。JaCVAMの活動目的としては、化学物質等の安全性評価における①動物実験の3Rs (Reduction: 実験動物の削減, Refinement: 実験動物の苦痛の軽減, Replacement: 動物実験の置き換え)の促進、特に削減や置き換えの促進、②国際協調を重視した新規の動物実験代替法(以下、代替法と記す)の公定化である。そのために、以下の主な業務を実施している。

- 1) 新規試験法又は既存試験法の改訂法(新規・改訂試験法)の第3者評価及び公定化
- 2) 新規・改訂試験法のバリデーション
- 3) 3Rsの普及
- 4) 国際協調

この業務を果たすため、JaCVAMは支援組織である運営委員会及び顧問会議の協力を得て、Fig. 2に示すような手順で新規試験法の第3者評価を企画し、行政的な受け入れのための評価会議を開催し、その結果が良好であれば行政機関(厚生労働省)に提案書を送るシステムを構築した。³⁻⁵⁾

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(〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-11)

e-mail: h-kojima@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウムS40で発表したものを中心に記述したものである。

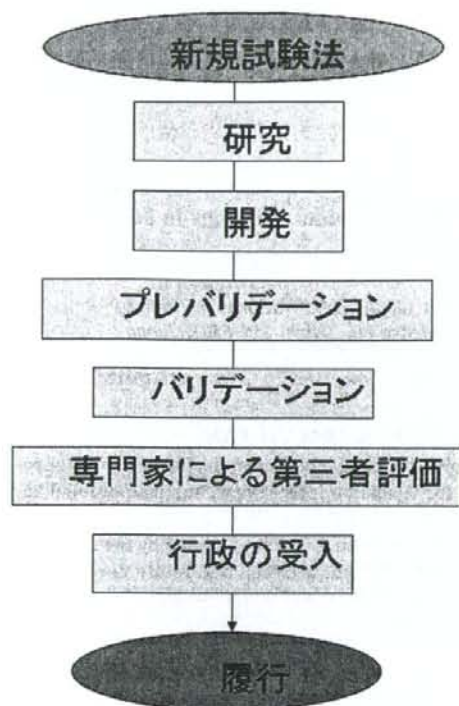


Fig. 1. Stages in the Development of New Toxicological Testing Methods

2. 具体的な試験法の進捗

欧州における化粧品規制⁶⁾及び REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals)⁷⁾に対応した代替法のバリデーション、第3者評価は最も大きな JaCVAM の業務である。Table 1 に示すように、OECD で認められた代替法はまだ少ないが、欧米では多くの代替法が検討されている。JaCVAM でも Table 2 に示すような安全性試験の代替法に取り組んでいるが、化粧品の安全性評価を主眼としたバリデーション及び第3者評価が多い。

Table 1. OECD Guidelines for Alternative Methods

No.	試験名	採択日
429	Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay	Updated Guideline, adopted 24th April 2002
430	<i>In Vitro</i> Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)	Original Guideline, adopted 13th April 2004
431	<i>In Vitro</i> Skin Corrosion: Human Skin Model Test	Original Guideline, adopted 13th April 2004
432	<i>In Vitro</i> 3T3 NRU Phototoxicity Test	Original Guideline, adopted 13th April 2004
435	<i>In Vitro</i> membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion	Original Guideline, adopted 19th July 2004

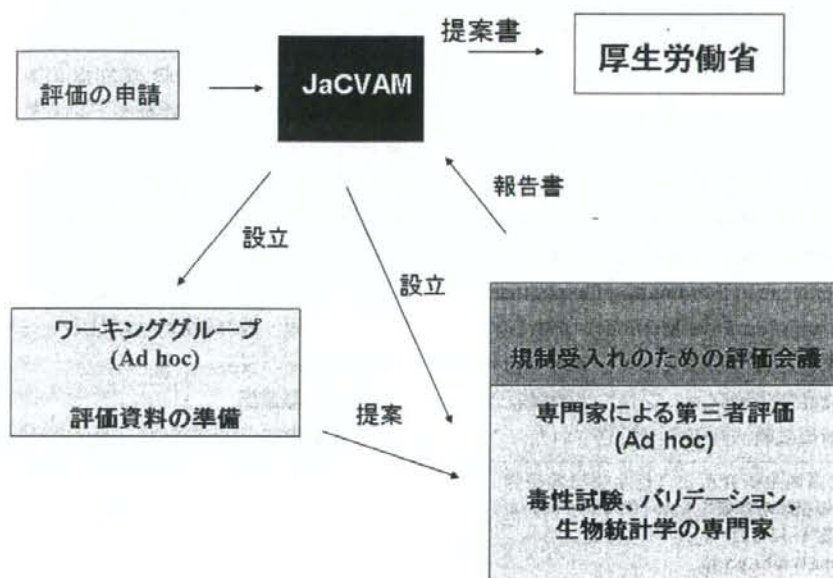


Fig. 2. Framework for Peer Review and Regulatory Acceptance of Alternative Methods

Table 2. Current Validation and Peer Review Correlated by JaCVAM

No.	試験法	試験法の概要	欧米の動向	目 標	現 状	会議の開催	バリ委託先
1	腐食性試験	培養皮膚モデルを用いた方法	代替法を用いた腐食性評価が終了 (OECDガイドライン 430 又は 431, 435)	化学物質の腐食性評価に代替法を利用するための公定化	評価会議で最終評価	2008年4月開催	
2	光毒性試験	酵母膜破壊と赤血球の溶血試験	Balb3T3細胞を用いた細胞毒性試験がOECDにてガイドライン導入済み	日本の医薬部外品ガイドラインへの収載	評価委員会 (Peer Review Panel) にて評価中	2008年4月開催	
3	LLNA-DA	マウスリンパ節中のATP量の変化を指標とする方法	ICCVAM 評価中	OECDガイドライン現行法の改変	バリデーション終了, 評価委員会にて評価中	2008年3月終了	
4	LLNA-BrdU	マウスリンパ節中のBrdUの取り込みを指標とする方法	ICCVAM 評価中	OECDガイドライン現行法の改変	バリデーション終了, 評価委員会にて評価開始	2008年8月開催	日本動物実験代替法学会
5	LLNA	reduced LLNA	ESAC で評価終了	化学物質の感作性評価への利用促進	評価委員会にて検証	2008年5月開催	
6	皮膚刺激性試験	培養皮膚モデルを用いた方法	ESAC で評価終了	日本の医薬部外品ガイドラインへの収載	ワーキンググループにて評価のための資料を作成, 評価委員会にてEPISKIN法の検証, 日本のバリデーション結果の評価開始	2008年2月開催	
7	眼刺激性試験	細胞毒性試験, 摘出眼球試験, 摘出角膜試験, 受精鶏卵試験	ICCVAM, ESAC で評価終了	日本の医薬部外品ガイドラインへの収載	評価委員会にて摘出眼球, 摘出角膜試験の検証, 細胞毒性試験の評価開始	2008年2月開催	
8	コメットアッセイ	<i>in vitro</i> 試験法	日本を中心にバリデーション進行中	OECDガイドライン	Phase I バリデーション実施中		日本環境変異原学会
9	コメットアッセイ	<i>in vivo</i> 試験法	日本を中心にバリデーション進行中	OECDガイドライン	バリデーション Phase II 結果解析中		日本環境変異原学会
10	内分泌かく乱物質スクリーニング	HeLa レポーター遺伝子アッセイ	OECD で評価終了	OECDガイドライン	antagonist バリデーション計画, 2008年6月開始の予定		化学物質評価研究機構 (CERI)
11	内分泌かく乱物質スクリーニング	Lumi-cell アッセイ	NICEATM を中心に国際バリデーション実施中	OECDガイドライン	Phase I 終了		特日吉
12	h-CLAT	培養細胞を用いた感作性物質のスクリーニング	JCIA, COLIPA を中心に共同研究実施中	OECDガイドライン	ECVAM との共同バリデーション決定	2008年9月ワークショップ開催	

以後に JaCVAM が検討かつ国際協力しているバリデーション及び第3者評価に限局して, その現状及び展望にふれておきたい。

2-1. 皮膚刺激性試験 2007年4月, ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) が皮膚刺激性試験代替法として, 培養表皮モデル EPISKIN を認証した。⁸⁾ EPISKIN に被験物質を15分間処理し, 48時間後にMTT法による細胞毒性とイン

ターロイキン α を評価指標として測定するものである。

日本でもこれまで培養皮膚や表皮モデルの利用について手をこまねいていた訳ではない。これらモデルが日本で製造・販売されており, 多くのユーザーがいる。2000-2002年にかけて東洋紡績製法のTESTSKIN, グンゼ製のVitrolife-Skin, MatTek製でクラボウ特が販売しているEpiDermを用い

て、プレバリデーションを実施し、良好な結果を得ている。⁹⁾ さらに、化粧品原料の使用濃度における皮膚刺激性試験代替を目的に、2002-2004年にかけて TESTSKIN¹⁰⁾ 及び Vitrolife-Skin でバリデーションを実施した。^{11,12)} 得られた結果が、当初からの評価基準であるパッチテストと動物試験における皮膚刺激性の予測率と同程度であったことから、バリデーションとしてはある程度の成果を残したと考えている。ただし、まだ第3者評価に至っておらず、国内でのコンセンサスは得られていない。一方、EPISKIN の ESAC による認証を受け、国内モデルにおいても補充バリデーションを行う希望があり、2008年春からのバリデーション研究の動きが進んでいる。EPISKIN と比較し、化学物質の皮膚刺激性試験代替法として日本製のモデルが有用かを、日本動物実験代替法学会とともに検討する予定である。

2-2. 眼刺激性試験 1998年に厚生労働科学研究補助金を得て作成された「細胞毒性試験による眼刺激性試験代替法のガイダンス」は日本においても中々普及していない。¹³⁾ もう一度、JaCVAMとして第3者評価を行い、細胞毒性試験における眼刺激性試験代替法の有用性を検討する予定である。この資料には日本動物実験代替法学会で実施された細胞毒性試験や、¹⁴⁾ 厚生労働科学研究の細胞毒性試験に加え、¹⁵⁾ 最近 ECVAM で実施された細胞毒性試験（ニュートラルレッド放出試験、赤血球試験、フルオレッセン放出、サイトセンサーマイクロフィジオメーター試験）やバリデーションが計画されている EpiOcular というヒト再構築モデルの結果が用いられることになろう。

一方、欧米では摘出眼球試験、摘出角膜試験、受精鶏卵試験等の第3者評価が終了し、^{7,16)} スクリーニングとしての有用性が指摘されている。前述した JaCVAM が計画している第3者評価において、これら試験に加え、ESAC で評価された少量法⁷⁾ の評価を実施する予定である。

2-3. 光毒性試験 OECD ガイドラインとして認証されているニュートラルレッド取り込みによる細胞毒性試験については、¹⁷⁾ 日本でも独自に第3者評価を行い、代替法としての有用性を評価した。¹⁸⁾ 一方、資生堂は酵母膜破壊試験と赤血球溶血試験のバッテリーを用いる光毒性試験の検討を進め、厚生労働科学研究に第3者評価を依頼した。¹⁹⁻²¹⁾ 評価の

過程でバリデーション結果が不足しているとの指摘を受け、2期に渡るバリデーション研究が実施された。これらのバリデーション結果を用いた第3者評価は最終段階にある。

2-4. 感作性試験 OECD ガイドラインとして認証されている Local Lymph Node Assay (LLNA) がモルモットを用いた従来の試験の代替法として利用されている。²²⁾ ただ、この試験法は放射線同元素を用いることから日本では実施できる施設に限られる。そこで、ATP の量の変化を指標とした LLNA-DA 法、²³⁾ BrdU の取り込みを指標とした LLNA-BrdU 法のバリデーション及び第3者評価が進んでいる。²⁴⁾ LLNA-DA 法のバリデーションは良好な結果を得て終了し、現在、第3者評価を実施中である。一方、LLNA-BrdU 法に関しては、第1期のバリデーション結果を受け、改良したプロトコルを用いた第2期バリデーションを終了した。これらが将来的には日本で汎用される日は近いと考えている。LLNA に関しては1濃度のみで評価する reduced-LLNA が ESAC の認証を得るとともに⁷⁾ 改良試験法の評価基準が欧米で検討されるなど現在、議論が盛んな分野である。

ただし、化粧品の安全性評価のためにマウスを用いる本試験を使い続けることは、完全な代替法とはいえない。国際的にも新たに種々の *in vitro* 試験法の開発が進んでおり、日本としては株式会社資生堂及び花王株式会社が日本化粧品工業連合会の有志や欧州化粧品工業会 (COLIPA) の協力を得て開発を進めているヒト細胞株活性化試験 (human Cell Line Activation Test; h-CLAT) に注目し、^{25,26)} バリデーションを計画している。ただし、この分野は構造活性相関のプログラム、²⁷⁾ ペプチド結合試験の開発、²⁸⁾ h-CLAT 以外のヒト細胞株を用いた試験法などの開発・検討が盛んな分野であり、これらを使いこなして感作性を評価するシステムの検討が必要である。

2-5. 急性毒性試験 OECD に掲載されている評価法²⁹⁻³¹⁾ で動物数の削減が一般的になっている昨今、さらに2005年 ICCVAM にて細胞毒性試験を用いた代替法の第3者評価が行われた。¹⁶⁾ この評価の結果、3T3 ニュートラルレッド法を用いて、非毒性物質の検出が可能とされている。さらに、「Human endpoint」に配慮した新たなワークショップも2008年2月に開かれ、JaCVAM としても IC-

CVAMの第3者評価に協力している状況である。

2-6. 変異原性試験 エイムス試験、染色体異常試験、動物を用いた小核試験という3点セット³²⁾を補う試験法である肝臓の不定期DNA合成の代替法として、日本環境変異原学会 哺乳類変異原性試験研究グループを中心に、ECVAM, NICEATMの協力を得たコメットアッセイ³³⁾の国際バリデーション研究が実施されている。このバリデーションでは*in vivo*試験だけでなく、*in vitro*試験も併行しても進めている。本試験法は開発からかなりの時間がたっていることもあり、方法の統一化がこの国際バリデーションの課題である。

*In vivo*試験としては、マウスの肝臓、胃を標的臓器として、日米欧5施設による陽性対照物質エチルメタンサルフォネートを用いたPhase Iバリデーションが2007年2月に終了し、ブラインド化した被験物質を用いたPhase IIのバリデーションが終了した。本バリデーションは、最終的なプロトコルを確定するための実験であり、2008年中からプロトコルの微小な修正を経て、Phase IIIのバリデーションが開始される。

一方、*in vitro*試験のバリデーションはやや遅れて、Phase Iバリデーションを開始した。まだプロトコルが固まっている訳ではないことから、ブラインド化していない5物質を用いたプロトコル確定のためのバリデーションを実施中である。

2-7. 内分泌かく乱物質のスクリーニング

助化学物質評価研究機構 (CERI) の開発したHeLa-9903細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイは、OECDの定める内分泌かく乱物質評価のレベル2に当たるエンドクラインレセプター α への結合を評価指標とする試験法である。³⁴⁾2003年3月第1回OECDのValidation Management Group-Non Animal (VMG-NA) 会議にてプレバリデーションが終了し、他施設のバリデーションを進めるむねが日本より報告された。2004年11月の第2回VMG-NAでは他施設バリデーション結果を報告し、バリデーション報告書及び標準化プロトコルをOECDに提出した。第3回VMG-NA (2005年12月) 後“Validated”といえる試験系かを審議・アドバイスする目的で、Preliminary Validation Assessment Panel (PVAP) が設立された。PVAPメンバーによる第3者評価によりバリデーションとし

ての認証を得て、次にPeer Review Panel (PRP) による第3者評価が実施された。

2007年8月に示されたPRPの報告では、評価基準の明確化などでプロトコルの改訂が求められるとともに、antagonistについて検討がなされていないのが指摘あった。そこで、JaCVAMではCERIに予備試験によるプロトコルの改良を依頼し、ECVAMの協力を得て、2008年春よりバリデーション研究を開始する予定である。

一方、米国XDS社で開発されたエンドクラインレセプター α への結合を評価指標とするレポーター遺伝子アッセイ Lumi-cell アッセイについても、³⁵⁾国際バリデーション研究が進めている。このバリデーション研究はICCVAMが主催するECVAM, JaCVAMとの共同バリデーションである。日本では日吉暢が実験を担当しており、agonist及びantagonistの試験結果を求めている。2007年末までにPhase Iが終了し、2008年からII及びIIIに入る予定である。この試験法もOECDガイドラインを目指している。

3. おわりに

代替法研究は欧米主導で進んでいることは明確である。日本ではそのニーズが低く、JaCVAMができ、ICCVAM, ECVAMと並ぶ3極になったということすら、認知度が低い。予算や人員の確保も難しく、国際協調と一口に言っても各国の思惑の中で右往左往するので手一杯である。このような状況の中ではあるが、日本で開発されている試験法を中心にバリデーションや第3者評価を進め、代替法を用いた場合でも化学物質等の安全性を担保するとともに、国益に適う仕事をするのがJaCVAMの使命であると考えている。

REFERENCES

- 1) OECD series on testing and assessment, Number 34, ENJ/JM/MONO, 14(2005).
- 2) ICCVAM, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), NIH Publication No: 97-3981 (1997).
- 3) Ohno Y., *Frageance J.*, 2005-2, 30-35 (2005).
- 4) Kojima H., *Soc. Cosmet. Chem. J.*, 40(4), 263-268 (2006).
- 5) Kojima H., *J. J. Soc. Cutan. Health*, 57, 129-134 (2007).

- 6) ECB, <http://ecb.jrc.ir/REACH/> (2007).
- 7) Commission Staff Working Documents, EN, SEC82004) 1210 (2004).
- 8) ECVAM statement, <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm> (2007).
- 9) Sonoda I., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **8**, 91-106 (2002).
- 10) Kojima H., et al., Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin, 2005, p.159.
- 11) Kojima H., et al. Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin, 2005, p.160.
- 12) Kojima H., et al. Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin, 2005, p.161.
- 13) Ohno Y., *Frageance J.*, **1999-7**, 21-26 (1999).
- 14) Ohno T., et al., *Altern. Anim. Test. Exp.*, **5** (1-2), 1-38 (1998).
- 15) Ohno Y., et al., *Toxicol. in Vitro*, **13**, 73-98 (1999).
- 16) ICCVAM, (http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/EPreport/ocu_report.htm (2007)).
- 17) "OECD Guideline 432: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Testing," OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France (2002).
- 18) Ohno Y., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **10** (2), 50-157 (2004).
- 19) Sugiyama M., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **2**, 183-191 (1994).
- 20) Sugiyama M., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **2**, 193-202 (1994).
- 21) Mori M., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **10** (1), 1-17 (2003).
- 22) "OECD Guideline 429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay," OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2002).
- 23) Yamashita K., et al., *Altern. Animal Test. Exp.*, **11** (2) 136-144 (2005).
- 24) Takeyoshi M., et al., *Toxicol. Lett.*, **119**, 203-208 (2001).
- 25) Ashikaga T., et al., *Toxicol. in Vitro*, 767-773 (2006).
- 26) Sakaguchi H., et al., *Toxicol in Vitro*, 774-784 (2006).
- 27) Apula, A.O., et al, *Chemical Research in Toxicol*, **18**, 1420-1426 (2005).
- 28) Gerberic, G. F., et al, *Toxicol. Science*, **81**, 332-343 (2004).
- 29) "OECD Guideline 420: Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure," OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2001).
- 30) "OECD Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method," OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2001).
- 31) "OECD Guideline 425: Acute Oral Toxicity-Modified Up and Down Procedure," OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2001).
- 32) "Guide to Qusai-drug and Cosmetic Regulations in Japan," Yakuji Nippo Ltd., 2006, pp.141-147.
- 33) Mitchelmore, C. L., Chipman J. K., *Mutat. Res.*, **399**, 135-147 (1998).
- 34) Akahori, Y., et al., *Toxicol. in Vitro*, **22**, 225-231 (2008).
- 35) ICCVAM, (<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine/endodocs/xdseval2.pdf> (2007)).

動物実験の3Rsにおける国内外の動向

小島肇夫

Hajime KOJIMA

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長

「動物の愛護及び管理に関する法律」が2006年6月に施行され、さらに「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」が環境省より告示された。この基本的な考え方は、3Rs(Reduction; 実験動物の削減, Refinement; 実験動物の苦痛の軽減, Replacement; 実験動物の置き換え)の徹底である。この3Rsの中でも苦痛の軽減については、実験動物の自己点検・評価として当該機関以外の者による認証システムが日本で普及しつつある。

一方、削減や置き換えのために用いる試験法が公的な認証を受けるためには、バリデーションや専門家による第三者評価が必要である。この使命を果たすために、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センター内に新規試験法評価室が設立された。この部署の活動をJaCVAM(Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)と呼ぶ。JaCVAMは日本における3Rsの促進や動物実験代替法に関する国際協調のために活動している。

1 「動物愛護及び管理に関する法律の改訂」及び関連指針

1973年に制定された「動物の愛護及び管理に関する法律(以後、動愛法と記す)」が2006年6月環境省より施行され、第41条 動物を科学上の利用に供する場合の方法、事後措置等が改訂された。¹⁾ これまでの、できる限り動物に苦痛を与えない方法によって実験を行わなければならないことに加え、できる限り動物を供する方法に代わり得るものを利用すること、できる限りその利用に供される動物の数を少なくすること等により動物を適切に利用することに配慮するものとするのが付記された。さらに、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」が環境省より告示された。²⁾ その基本的な考え方には、動物を科学上に利用することは必要不可欠であるので、3Rsを徹底するために、適正な飼養及び保管並びに科学上の利用に努めることが記載されている。

これを受け、同時期に文部科学省,³⁾ 厚生労働省,⁴⁾ 農林水産省,⁵⁾ が「研究機関等における実験動物の実施に関する基本指針」を告示した。動物実験責任者の責務、動物実験委員会の設置、機関内規定の策定、動物実験計画の承認、データの信頼性を確保する観点から、適切な動物実験方法の選択、動物実験等の施設及び設備を踏まえて動物実験計画を立案し、適正に実施することが記載されている。実験方法の選択には動物実験代替法(以下、代替法と記す)の利用、実験動物の選択、苦痛の軽減への配慮が明記されている。さらに、同時期に日本学術会議は「実験動物の適正な実施に向けたガイドライン」を示している。⁶⁾ 動愛法の基本指針を踏まえて、各研究機関が動物実験等に関する規定を整備するに際してモデルとなる共通ガイドラインを作成した。このほかにも、日本実験動物学会、日本薬理学会、日本トキシコロジー学会、日本生理学会、日本神経科学学会、日本実験動物協会などがそれぞれに指針を示している。⁷⁾

2 動物実験施設の第三者認証機関

日本学会議の「実験動物の適正な実施に向けたガイドライン」には、実験動物等の適正化に必要な教育訓練、自己点検・評価および検証並びに情報公開に関する記述がある。⁴⁾ この自己点検・評価には、「当該機関以外の者による検証を行うことを考慮する」と示されている。この検証機関として、米国ではAAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) が国際認証組織としてよく知られているが、⁵⁾ 日本ではこれまで当該機関以外の者が評価する公的な仕組みがなかった。この当該機関以外の者による審査を担当する組織として、本年7月、ヒューマンサイエンス振興財団が第三者認証機関を設立し、⁶⁾ 私立大学実験動物施設協議会、国立大学法人動物実験施設協議会、¹⁰⁾ 日本動物実験協同組合¹¹⁾ など複数の認証制度についても検討が進んでいる。日本においても、いよいよ本格的な当該機関以外の者による検証が始まったと考える。

3 動物実験の置き換えのための国際機関

置き換え試験法の開発の中で、化学物質等の安全性試験の公定化には厳密な国際ルールが作られている。これが2001年に発行されたOECDガイダンス文書GD34である。¹²⁾ この文書の中には、今後、新規試験法が開発される場合のバリデーションや専門家による第三者評価(以後、第三者評価と記す)に関する手順、手法が記載されている。すなわち図1に示すように、¹³⁾ 新規試験法が公定化されるにはバリデーションや第三者評価、行政的な受入れのための評価を経ないとはいけなく、ところが、バリデーションや第三者評価を実施するといっても大変な労力を要する。ましてバリデーションの実施やバリデーション実行委員会の構築にはノウハウが多く、評価においても種々の専門家への要請、公的な認証までの手順をも考慮する必要がある。そこで、このガイダンスに先立ち、1990年代に米国ではICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)、欧州にはECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) が設立された。

欧米の組織と同様、日本においてもこの置き換えや動物数の削減につながる新規または改良代替法の開発・評価のために、2005年11月に当研究所安全性生物試験研究センター内に新規試験法評価室が設立された。¹⁴⁾ この部署の業務の1つが新規、または改良試験法の評価である。この活動を我々はJaCVAMと呼んでいる。JaCVAMの活動目的は、①日本における動物実験の3Rsの普及、②国際協調を重視した新規代替法の公定化である。

4 EUの国際動向

これまで説明してきた動愛法や動物福祉問題は、すべて欧米にその起源が遡る。欧米の動物愛護グループの活動として、捕鯨反対問題ばかりが日本ではクローズアップされるが、この活動はすべての動物に該当する。このような欧米人の思想、感情的な問題が経済にまで波及した他の事例が、化粧品開発における動物実験の規制問題及びREACH (registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals) 問題である。

化粧品の規制に関しては、2003年に化粧品指令7次改正が公布され、2009年3月に代替法として確立されている試験がある場合には、①EU域内での動物試験の完全禁止、②動物試験した製品、動物試験をした原料を含む製品の販売禁止が決められている。¹⁵⁾ さらに、EU委員会は期限内の開発が困難と判断された試験法の場合には、2013年まで延長する法案を提出す

W. W. W. W.

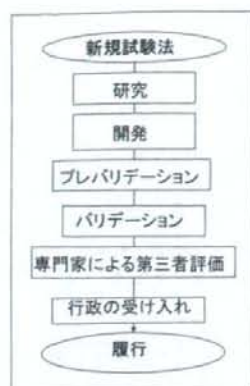


図1 試験法公定化までの手順

表1 REACHで製造量毎に要求される試験名

	健康	環境
1~10 t 優先物質	<i>In vitro</i> 眼刺激性, <i>in vitro</i> 皮膚刺激性/腐食性, 皮膚感作性, 遺伝毒性(Ames), 急性毒性(1つの投与経路)	急性水生毒性—ミジンコ, 生物分解性, 急性水生毒性—藻類
10~100 t	<i>In vivo</i> 眼刺激性, <i>in vivo</i> 皮膚刺激性, 遺伝毒性(マウスリンフォーマまたは遺伝子突然変異), 遺伝毒性(染色体異常または <i>in vitro</i> 小核), 急性吸入/皮膚毒性, 亜急性毒性(28日間), 生殖毒性スクリーニング, トキシコキネティクス評価	急性水生毒性—魚類, 活性汚泥, 吸着・脱離スクリーニング, 更なる生物分解性, 加水分解試験
100~1,000 t	遺伝毒性(<i>in vivo</i> 小核), 亜慢性毒性(28日または90日間), 更なる生殖毒性試験(出産前生殖毒性及び2世代試験)	長期的水生毒性—ミジンコ及び魚類, 更なる分解及び環境中運命・挙動の研究, 陸生生物(植物, 無脊椎動物)への短期的影響, 更なる吸着・脱離スクリーニング, 魚貯留性, 汚泥微生物への影響
1,000 t 超	遺伝毒性(<i>in vivo</i>), 発がん性, 慢性毒性(12か月以上), 更なる生殖毒性試験	更なる分解及び環境中運命・挙動の研究, 陸生生物への長期的影響

るとされている。これに間に合わせるべく、EUでは欧州化粧品工業会(COLIPA)とECVAMが共同で試験法の開発、バリデーション及び第三者評価を進めている。

一方、REACHとは既にEU市場に流通している約3万の化学物質に関し、その製造・輸入を行う事業者は、その安全性データなどを揃え、登録することが義務づけられる規制を指す。登録、評価、認可、制限の総称である。¹⁷⁾ この背景にはEUで化学品会社が27,000社(売上額5.9兆ユーロ)あり、170万人の従業員、国際市場の33%を占めている事情がある一方、職業性皮膚炎の治療費に300万ユーロ/日、約6億ユーロ/年が必要であるとともに、既存化学物質86%の毒性データが不足していることに端を発している。¹⁸⁾ この安全性評価はハザードベースでなく、リスクベース(ハザードと暴露評価)が中心である。2009年までに事前登録が期待される180,000物質については、70%の試験を2011~2017年に実施しなければならない。

製造/輸入量に応じた実施すべき試験法のリストを表1¹⁹⁾に示す。実験を行う場合にはintegrated testing strategies (ITS)という戦略に従い、read-acrossという関連物質情報の調査、構造活性相関などの*in silico*の利用、代替法を優先せざるを得ないと記されている。1t以上の製造/輸入物質には、代替法により有害性の同定を行う。さらに、製造量が増えるにつれて暴露評価まで求められており、動物実験を有効に使っていかねばならない。²⁰⁾

EUでは更なる代替法の開発が盛んであり、300以上のパートナーと表2に示すような17の研究プロジェクト(予算1.1億ユーロ以上)を通して、REACHのために“適した”100の試験法を確立する予定である。²¹⁾ 現在125のINVITTOXによるプロトコールが用意されており、2009年までに40試験法をバリデーションするとされている。これにより、代替法で50%及び*in silico*で20%の動物数削減を専門家が分析している。¹⁸⁾

ただし新規試験法が開発されても、例えばOECDガイドラインなどに受け入れられるためには10年もかかるといわれており、これまで通りの方法では2011年までに多くの試験法を用意できない。そこでバリデーションの短期化、バリデーションが終了したものと同等のものを揃え、バリデーションを実施せずにREACHのために“適切な”方法の選択をするCORRELATE(community reference laboratory for alternative testing)という方策が検討されている。

表2 EUで行われている動物実験代替法開発に絡んだプロジェクト

プロジェクト名	概要	予算(ユーロ)	開始日	期間(月)
ACUTETOX	Optimization and pre-validation of <i>in vitro</i> test strategy of predicting human acute toxicity	9,000,000	2005年1/1	60
ARTEMIS	<i>In vitro</i> neural tissue system for replacement of transgenic animals with memory/learning deficiencies	1,984,900	2007年3/1	36
CarcinoGENO MICS	Development of a high throughput genomics-based test for assessing genotoxic and carcinogenic properties of chemical compounds <i>in vitro</i>	10,440,000	2006年11/1	60
COMICS	Comet assay and cell array for fast and efficient genotoxicity testing	3,189,385	2007年1/1	36
EXERA	Development of 3D <i>in vitro</i> model for estrogen-receptor mouse tissues for the pharmacotoxicological analysis of nuclear receptors-interacting compounds (NR-Ics)	2,173,492	2006年10/1	36
Invitroheart	Reducing animal experimentation in drug testing by human cardiomyocyte <i>in vitro</i> models derived from embryonic stem cells	2,701,611	2007年1/1	36
LINTOP	Optimization of liver and intestine <i>in vitro</i> models for pharmacokinetics and pharmacodynamics studies	2,933,291	2007年1/1	36
MEMTRANS	Membrane transporters : <i>in vitro</i> models for their role in drug fate	1,900,000	2006年4/1	36
PREDICTOMICS	Short-term <i>in vitro</i> assays for long-term toxicity	2,259,754	2004年9/1	39
ReProTect	Development of a novel approach in hazard and risk assessment of reproductive toxicity by a combination and application of <i>in vitro</i> , tissue and sensor technologies	9,100,000	2004年7/1	60
Sens-it-iv	Novel testing strategies for <i>in vitro</i> assessment of allergens	10,999,700	2005年10/1	60
TOXDROP	Innovative cell on chip technology to screen chemicals for toxicity, using cultured cells within tiny nanodrops of culture fluid	1,615,888	2005年1/1	24
VITROCELLOM ICS	Reducing animal experimentation in preclinical predictive drug testing by human hepatic <i>in vitro</i> models derived from embryonic stem cells	2,942,000	2006年1/1	36
新規プロジェクト				
ENATS	Embryonic stem cell-based novel alternative testing strategies	11,895,577	2008年4/1	60
NANOTEST	Development of methodology for alternative testing strategies for the assessment of the toxicological profile of nano particles used in medical diagnostics	3,933,272	2008年4/1	42
OPENTOX	Promotion, development, acceptance and implementation of QSARs for toxicology	2,975,360	2008年4/1	36
PREDICT-IV	Profiling the toxicity of new drugs : a non-animal based approach integrating toxico-dynamics and biokinetics	11,330,907	2008年4/1	60

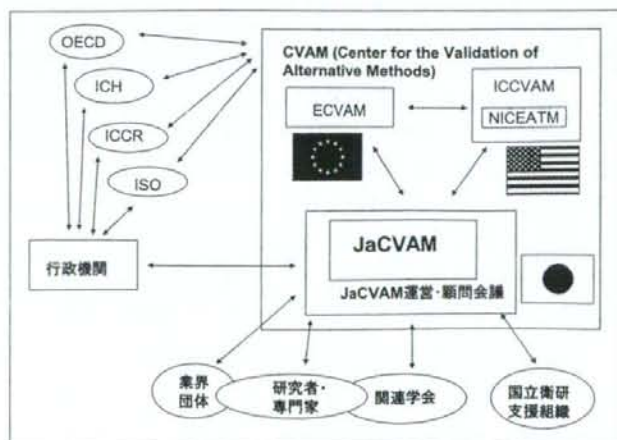


図2 JaCVAMの国際協力概要

Wardlaw

5 日本の動向

これまで、日本でも眼刺激性、皮膚刺激性、感作性、光毒性試験などの代替法において日本動物実験代替法学会を中心にバリデーションや第三者評価が行われてきた。²¹⁾しかし、内容的に優れているものの、国際的には認知度が低かった。

幸い、昨年8月に第6回国際動物実験代替法会議(WC6)、²²⁾本年2月にWC6フォローアップがいずれも東京で開催され、²³⁾日本国内での盛り上がり以上に日本の活動に対する国際的な評価が高まっている。また図2に示すように、JaCVAMを中心に日本でも、OECD、ICH(日米EU医薬品規制調和国際会議)、ICCR(化粧品国際規制会議)、ISO(国際標準化機構)などにおいて動物実験の3Rs問題に対する国際協力体制が整うとともに、一昨年から遺伝毒性、内分泌かく乱物質スクリーニングなどの分野で国際的な共同研究も始まっている。

6 おわりに

動愛法の動物愛護管理基本指針には、毎年度達成状況を点検しその結果を施策に反映させることや、策定5年後に当たる2010年度をめどとした見直し記載されている。また、本年から始まった第三者認証システムの普及など、実験動物の福祉問題はまだまだ完成された仕組みではない。代替法においてもJaCVAMを中心に、当面は化粧品や化学物質の安全性確保のため、国際協調を進めていくことになると考えている。

参考文献

- 1) 動物の愛護及び管理に関する法律(2008) http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend_law2/law.pdf
- 2) 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準(2008) http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law_series/nt_h180428_88.html
- 3) 文科省、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(2008) http://www.mext.go.jp/b_menu/hakusho/nc/06060904.htm
- 4) 厚生省、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(2008) <http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/dobutsu/0606sisin.html>
- 5) 農水省、農林水産省の所管する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(2008) http://www.maff.go.jp/www/press/2006/20060601_press_2b.pdf
- 6) 日本学術会議、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(2008) <http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-20-k16-2.pdf>
- 7) 重茂浩美, 科学技術動向, 5月号, 10-20(2006).
- 8) AAALAC International Association(2008) <http://www.aaalac.org/>
- 9) 佐々木弥生(2008) http://www.soc.nii.ac.jp/jsaae/WC6_followup/WC6_Follow_Sasaki.pdf
- 10) 動物実験施設協議会(2008) <http://www.kokudokuyou.org/annai/>
- 11) 日本動物実験協同組合(2008) <http://www.labanimal.org/freme.html>
- 12) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO(2005)14.
- 13) ICCVAM, NIH Publication No. 97-3981, National Institute of Environmental Health Sciences(NIEHS)(1997).
- 14) 大野泰雄, 国立衛研報, 122, 1-10(2004).
- 15) 小島肇夫, 化粧品技術者会誌, 40, 263-268(2006).
- 16) Commission Staff Working Documents, Time Tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC); EN, SEC(2004)1210.
- 17) ECH(2008) http://ec.europa.eu/echa/home_en.html
- 18) Hartung, T. (2006) <http://www.soc.nii.ac.jp/jsaae/20kai.html>
- 19) 化学物質評価研究機構編 "EU新化学品規則 REACHが分かる本," 工業調査会, 東京, 2007.
- 20) JRC(2008) http://www.vet.uu.nl/nca/userfiles/other/REACH_and_the_need_for_intelligent_testing_strategies.pdf#search=Integrated%20Testing%20Strategies%20REACH
- 21) EC(2008) Alternative Testing Strategies, EUR 22846.
- 22) 小島肇夫, 薬学雑誌, 128, 747-752(2008).
- 23) 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Abstracts, (2007).
- 24) WC6フォローアップシンポジウム「3Rsに基づく動物実験の規制と第三者認証」, 抄録集, 2008.

REACH 対応に必要な動物実験代替法の現状

小島 肇夫 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, Tel 03-3700-1141, Fax 03-3700-7874, E-mail: h-kojima@nihs.go.jp

1 要約

2006 年から施行された REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals) とは、すでに EU 市場に流通している約 3 万の化学物質および新規化学物質に関し、その製造・輸入を行う事業者は、その安全性データなどを揃え、登録することが義務づけられる規制を指すものである。この安全性の規制には動物実験代替法の促進が謳われており、種々の試験法において、REACH のための戦略が練られている。

2 REACH とは？

REACH (Registration, Evaluation and Authorization of CHemicals) とはすでに EU 市場に流通している約 3 万の化学物質および新規の化学物質に対し、その製造・輸入を行う事業者は安全性データなどを揃え、登録することが義務づけられる規制を指す¹⁻⁴⁾。登録、評価、認可、制限の総称であり、2007 年より施行が開始され、2008 年 6 月より運用が開始される。その後のスケジュールを図 1 に示すが、2018 年を目標にすべての既存化学物質の登録と安全性データの収集を終えようというものである。REACH の特徴を確認しておく、責任は産業界におく、既存または新規化学物質を区別しない、ライフサイクル（製造、加工、使用、廃棄）を通して評価する、特定条件に合致する成形品中の化学物質も規制する、サプライチェーンにおけるすべての関係者（製造・輸入業者だけでなく、川下企業、流通業者）が関与するものであるとされている。

この背景には EU で化学品会社が 27,000 社（売上額 590 billion €）あり、170 万人の従業員、国際市場の 33% を占めている事情がある一方、職業性皮膚炎の治療費に 3 million €/日、約 600 million €/年が必要であるとともに、既存化学物質 86% の毒性データが不足している現状に対応するものである⁵⁾。本来なら、EU 域内での問題ではあるが、経済的にも安全性評価の面でも国際化が進む昨今、日本でも無関心ではいられない問題であるとの認識は大きく産業界にも広がっている。

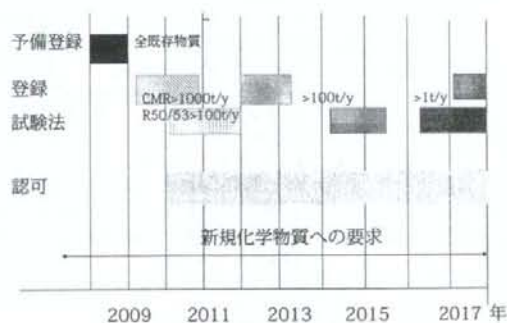


図1 既存物質の登録期限^{6改定}

3 REACH の求める安全性資料

以降に、REACH の求める安全性資料についてその概要をまとめたい。

安全性評価はハザードベースでなく、リスクベース(ハザードと曝露評価)が求められる。2009年までに事前登録が期待される180,000物質については、70%の安全性試験を2011～2018年に実施しなければならない。図1に示すように製造/輸入量に応じてその期限が決められている^{3,4,6)}。もし、現行の動物実験を用いて安全性を評価するとすると、2002年では化学物質の安全性評価に1.3万匹しか使われていなかったのに対し、今後11年間で390万匹の実験動物が必要となり、24億€の経費が掛かる⁷⁾。これは産業界にとって痛手であると同時に、動物愛護団体が納得しない数字である。そこで、1t以上の生産物質すべてを動物実験代替法(以下、代替法と記す)で評価することにより、有害性の同定を可能にする提案がなされている。

実施すべき試験法のリストを表1に示すが⁶⁾、実験を行う場合には、REACHのために定められた総合的な試

験戦略(ITS: Integrated Testing Strategies)に基づき対応する⁷⁾。図2にも示すが、まずRead-acrossという化学物質の総合的な情報(過去の実験データと類似構造物から影響を予測すること)の解析が求められる。次に構造活性相関などのin silicoの利用、その後にハザード評価のために代替法を優先的に使用する。生産量が多い物には曝露評価まで求められており、動物実験を有効に使っていかねばならないが、その場合でも動物数の削減や動物の苦痛の軽減を考慮しなければならない。

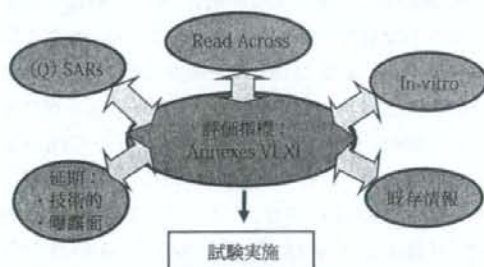


図2 試験実施までに踏みべき段階^{5,8,9)}

表1 REACHで製造量毎に要求される試験名^{6,10)}

	健康	環境
1～10t 優先物質	<i>in vitro</i> 眼刺激性 <i>in vitro</i> 皮膚刺激性/腐食性 皮膚感受性 遺伝毒性(Ames) 急性毒性(一つの投与経路)	急性水生毒性—ミジンコ 生物分解性 急性水生毒性—藻類
10～100t	<i>in vivo</i> 眼刺激性 <i>in vivo</i> 皮膚刺激性 遺伝毒性(マウスリンフォーマまたは遺伝子突然変異) 遺伝毒性(染色体異常または <i>in vitro</i> 小核) 急性吸入/皮膚毒性 亜急性毒性(28日間) 生殖毒性スクリーニング トキシコキネティクス評価	急性水生毒性—魚類 活性汚泥 吸着・脱離スクリーニング 更なる生分解性 加水分解試験
100～1000t	遺伝毒性(<i>in vivo</i> 小核) 亜慢性毒性(28日または90日間) 更なる生殖毒性試験 (出産前生殖毒性および2世代試験)	長期的水生毒性—ミジンコ及び魚類 更なる分解及び環境中運命・挙動の研究 陸生生物(植物, 無脊椎動物)への短期的影響 更なる吸着・脱離スクリーニング 魚貯留性 汚泥微生物への影響
1000t超	遺伝毒性(<i>in vivo</i>) 発癌性 慢性毒性(12ヶ月以上) 更なる生殖毒性試験	更なる分解及び環境中運命・挙動の研究 陸生生物への長期的影響

4 代替法の現状

では、REACHが求める代替法は現在、どれくらい検討が進んでいるのか。REACHのために表1に示すような試験法が記載されているが、各施設独自の方法で評価してよいという訳ではない。バリデーションや第三者評価が終了した試験法でなければならず、今後、欧州代替法バリデーションセンター (ECVAM: European Center for the Validation of Alternative Methods) において300のパートナーと17の研究プロジェクト(予算100 million €)を通して、REACHのために“適切な”100の試験法が確立される予定である。現在125のINVITTOXによるプロトコールが用意されている。2006～2007年に14の試験法バリデーションが終了したが、2009年までに40試験法をバリデーションするとされている⁵⁾。種々の試験法において、REACHのための戦略が練られており⁷⁾、これによる影響分析において、代替法で50%および(Q) SARで20%の動物数削減を専門家が分析している。

ただし、例えば、よく知られているOECDガイドラインの場合、新規試験法が開発され、行政的に受け入れられるためには10年以上かかると言われており、これまで通りの方法では2011年までに多くの試験法を用意できない。そこで、バリデーションの短期化、バリデーションが終了したものと同等の試験法を揃える、バリデーションを実施せずにREACHのために“適切な”方法の選択をするCORRELATE (Commission Reference Laboratory for Alternative Tests) という方策が検討されている。ただし、このCORRELATEの検討はまだ始まったばかりであり、誰がどのような基準で同等と判断するのか、何を持って“適切な”方法と判断するのか決まっていない。

一方、適切な資金・資源の提供を通して、代替法の開発やバリデーションを加速し、安全性評価のための代替法の行政による承認の迅速化を目指すため、欧州ではEPAA (European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing) が設立され¹²⁾、Enterprise, Research, Health & Consumer Protection, Environment, Joint Research Centreなどの省庁、AISE (石鹼洗剤協会)、

CEFIC (欧州化学品工業会)、COLIPA (欧州化粧品工業会)、ECPA (欧州農薬工業会)、EFPIA (欧州製薬団体連合会)、EuropaBIO (欧州バイオテクノロジー工業会)、IFAH (欧州動物愛護協会)などの産業界が協力している。さらに、REACHのためのITSを開発するために、OSIRIS (Optimized Strategies for Risk Assessment of Industrial Chemicals through Integration of Non-Test and Test Information) という産官学の組織も組織され¹³⁾、欧州では多くの資金が代替法の開発に使われている状況である。

以下に1t以上の製造量で要求される主な代替法の進捗状況について説明する。

1) 皮膚刺激性

ウサギを用いるDraize試験が約60年に渡り使われてきた。培養皮膚モデルや抽出皮膚などを用いた代替法のバリデーション研究がECVAMにより2003年以降実施され、その結果として、2007年4月、ECVAM顧問会議 (ESAC: ECVAM Scientific Advisory Committee) が培養表皮モデルEPISKINを用いる方法を皮膚刺激性試験代替法として認証した⁹⁾。EPISKINに被験物質を15分間処理し、48時間後にMTT法による細胞毒性とインターロイキン1 α を評価指標として測定した値で動物実験を置き換えようというものである。

2) 眼刺激性試験

米国動物実験代替法バリデーション省庁間調整委員会 (ICCVAM: Interagency coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) ではニワトリ抽出眼球試験および牛抽出角膜試験の第三者評価が終了し⁹⁾、強刺激物質のスクリーニングとしての有用性が指摘されている。ESACでもこれらを評価し、同様の結論を導いている⁸⁾。さらにESACでウサギへの少量法の検討が行われており、またECVAMでは過去バリデーションが実施された細胞毒性試験(ニュートラルレッド放出試験、赤血球試験、フルオレッセン放出、サイトセンサーマイクロフィジオメーター試験)の回顧的な評価が始まるとともに、ヒト角膜再構築モデルにおいてバリデーション研究が進行している。

3) 感作性試験

OECD ガイドライン 429 として認証されている Local Lymph Node Assay (LLNA) が基本的には代替法として利用される¹⁰⁾。LLNA に関しては一濃度のみで評価する reduced-LLNA が ESAC の認証を得るとともに⁹⁾、放射線同位元素を用いない試験法の確立基準が ICCVAM や ECVAM で検討されるなど現在、もっとも議論が盛んな分野である。

4) 遺伝毒性試験

In vitro 小核試験が OECD ガイドラインとなる目処がつき¹⁰⁾、現行の *in vitro* 遺伝毒性試験のセットが揃った。まずはエイムス試験、次に *in vitro* の染色体異常試験や遺伝子突然変異試験などを利用した評価が進むと予想されている。

5) その他

EU を中心として、大きな代替法に関するプロジェクトが進行している。生殖毒性試験として ReProTex、急性毒性試験として A-cute-Tox、感作性試験として SENS-IT-IV、遺伝毒性および癌原性を評価するためのハイスループットゲノミクスとして Carcinogenomic などが進行中である¹¹⁾。この他にも多くのプロジェクトが計画・進行中であり、EU においては多額の資金が試験法開発に投入されている。

- 3) 財団法人 化学物質評価研究機構編 (2007) EU 新化学品規則 REACH が分かる本, 工業調査会, 東京
- 4) 戸田栄作 (2007) http://www.nies.go.jp/risk/seminar/h191207_17/H191217text01.pdf.
- 5) Hartung, T.(2006)<http://www.soc.nii.ac.jp/jsaae/20ka.html>
- 6) Inke Gubbels-Van Hal(2007)Non-testing in REACH?, Chemistry Today, 25(4), 14-16
- 7) JRC(2008) http://www.vet.uu.nl/nca/userfiles/other/REACH_and_the_need_for_intelligent_testing_strategies.pdf#search=Integrated%20Testing%20Strategies%20REACH
- 8) ECVAM statement (2008) <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>
- 9) ICCVAM(2008) http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/EPReport/ocu_report.htm
- 10) Chemicals Testing: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals - Sections 4: (2008) http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html
- 11) EC(2008)Alternative Testing Strategies, EUR22846
- 12) EPAA(2008) http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index_en.htm
- 13) OSIRIS (2008) <http://www.osiris-reach.eu/>

5 おわりに

REACH の目的は化学物質の安全性の確保であるが、その中心は代替法である。すでに確立された代替法が少ないこともあり、代替法を用いた安全性評価の動向は大きく変動する状況にあると考えている。このような状況下、欧州の動向から目を離さず、各社においても REACH の登録、安全性試験の対策を急いで頂きたいと考えている。

参考文献

- 1) ECH (2008)http://ec.europa.eu/echa/home_en.html
- 2) 風間良英編 (2007) REACH と欧州新化学品規則体制, 化学工業日報社, 東京



Original article

Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement

Takashi Omori^{a,*}, Kenji Idehara^{b,*}, Hajime Kojima^c, Takashi Sozu^d, Kazunori Arima^e, Hirohiko Goto^f, Tomohiko Hanada^g, Yoshiaki Ikarashi^c, Taketo Inoda^h, Yukiko Kanazawaⁱ, Tadashi Kosaka^j, Eiji Maki^k, Takashi Morimoto^l, Shinsuke Shinoda^m, Naoki Shinodaⁿ, Masahiro Takeyoshi^o, Masashi Tanaka^p, Mamoru Uratani^q, Masahito Usami^r, Atsushi Yamanaka^s, Tomofumi Yoneda^t, Isao Yoshimura^u, Atsuko Yuasa^v

^a Kyoto University School of Public Health, Japan^b Daicel Chemical Industries Ltd., Japan^c National Institute of Health Sciences, Japan^d Osaka University, Japan^e Taisho Pharmaceutical Co. Ltd., Japan^f Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd., Japan^g Nippon Shinyaku Co. Ltd., Japan^h Nakano Seiyaku Co. Ltd., Japanⁱ Food and Drug Safety Center, Japan^j Institute of Environmental Toxicology, Japan^k Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides, Japan^l Sumitomo Chemical Co. Ltd., Japan^m Drug Safety Testing Center Co. Ltd., Japanⁿ Santen Pharmaceutical Co. Ltd., Japan^o Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan^p Meiji Seika Kaisha Ltd., Japan^q Ishihara Sangyo Kaisha Ltd., Japan^r Hoya Co. Ltd., Japan^s Pias Corporation, Japan^t Toa Eiyo Ltd., Japan^u Tokyo University of Science, Japan^v Fuji Film Co. Ltd., Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 March 2008

Accepted 7 May 2008

Keywords:

Adenosine triphosphate

Interlaboratory validation

Local lymph node assay based on adenosine

triphosphate content

Local lymph node assay

Skin sensitization

Methods

ABSTRACT

Introduction: The murine local lymph node assay (LLNA) is a well-established alternative to the guinea pig maximization test (GPMT) or Buehler test (BT) for the assessment of the skin sensitizing ability of drugs and chemicals. Daicel Chemical Industries Ltd. has developed a modified LLNA based on the adenosine triphosphate (ATP) content (LLNA-DA). We conducted 2 interlaboratory validation studies to evaluate the reliability and relevance of LLNA-DA. **Methods:** The experiment involved 17 laboratories, wherein 14 chemicals were examined under blinded conditions. In the first study, 3 chemicals were examined in 10 laboratories and the remaining 9 were examined in 3 laboratories. In the second study, 1 chemical was examined in 7 laboratories and the remaining 4 chemicals were examined in 4 laboratories. The data were expressed as the ATP content for each chemical-treated group, and the stimulation index (SI) for each chemical-treated group was determined as the increase in the ATP content relative to the concurrent vehicle control group. An SI of 3 was set as the cut-off value for exhibiting skin sensitization activity. **Results:** The results of the first study obtained in the experiments conducted for the 3 chemicals that were examined in all the 10 laboratories and for 5 of the remaining 9 chemicals were sufficiently consistent with small variations in their SI values. The sensitivity, specificity, and accuracy of LLNA-DA against those of GPMT/BT were 7/8 (87.5%), 3/3 (100%), and 10/11 (90.9%), respectively. In the second study, all the 5 chemicals studied demonstrated acceptably small interlaboratory variations. **Discussion:** In the first study, a large variation was observed for 2 chemicals; in the second study, this variation was small. It was attributed to the

* Corresponding authors. Omori is to be contacted at Department of Biostatistics, Kyoto University School of Public Health, Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. Tel.: +81 75 753 4482; fax: +81 75 753 4487. Idehara, Daicel Chemical Industries, Ltd., 1239 Shinzaike, Aboshi-ku, Himeji, Hyogo 671-1283, Japan. Tel.: +81 79 274 4096; fax: +81 79 274 5831.
E-mail addresses: omori@pbh.med.kyoto-u.ac.jp (T. Omori), kn_idehara@daicel.co.jp (K. Idehara).

application of dimethylsulfoxide as the solvent for the metallic salts. In conclusion, these 2 studies provide good evidence for the reliability of the LLNA-DA.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Skin sensitization (allergic contact dermatitis (ACD)) is an immunologically mediated cutaneous reaction to a drug or chemical. It is known that detecting and evaluating the immune-based adverse effects that are collectively referred to as hypersensitivity reactions is a very difficult task, particularly during the drug approval process, because of the lack of adequate non-clinical models and the low incidence rate of reactions (Hastings, 2001). However, there are several adequate and predictive methods for modeling ACD. For several decades, tests involving guinea pigs, such as the guinea pig maximization test (GPMT) or the Buehler test (BT), have been used for assessing the skin sensitization potential of chemicals (OECD, 1992).

The local lymph node assay (LLNA) employs a mouse model for assessing the relative sensitization potential; it is a well-established alternative method for determining whether a chemical causes ACD. Although GPMT and BT can be viewed as phenomenological methods in which the clinical signs are modeled, LLNA was developed on the basis of a mechanistic understanding of immune-based contact dermatitis (Hastings, 2001). In addition, this method also offers important animal welfare benefits. The use of LLNA has been successfully validated by several studies (Basketter et al., 2002; Basketter, Gerberick, Kimber, & Loveless, 1996; Basketter & Scholes, 1992; Gerberick, Ryan, Kimber, Dearman, & Basketter, 2000; Haneke, Tice, Carson, Margolin, & Stokes, 2001). Recently, it has been recommended that this method be formally adopted by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), according to the guidelines for testing chemicals 406 and 429 (OECD, 1992, 2002), and that it be accepted by the EU and US as a suitable method for classifying the skin sensitizing ability of chemicals (Basketter, Casati, Gerberick, Griem, Philips, & Worth, 2005; Dean, Twerdok, Tice, Sailstad, Hattan, & Stokes, 2001; Sailstad, Hattan, Hill, & Stokes, 2001). The LLNA was specifically designed to identify contact allergens. The assay was not intended to facilitate the detection of low molecular weight chemicals associated with systemic sensitization or drug allergies (Kimber, 2001). However, an investigation, which was designed to explore the ability of LLNA to identify pharmaceutical process intermediates known to cause contact allergy in humans, provided evidence that the assay is a useful method for hazard identification (Durand, De Burlet, Virat, & Nauman, 2003). Furthermore, presently, the use of the method, along with the use of GPMT and BT, is recommended for the determination of the skin sensitization potential of new drugs (FDA, 2002).

The original LLNA uses [³H]-methyl thymidine to measure lymphocyte proliferation; this hinders its use, particularly in Japan, because being a radioisotope (RI)-based method, it requires special facilities. Several authors have been conducting investigations for the development of an alternative non-RI method for performing LLNA (Dearman, Hilton, Basketter, & Kimber, 1999; Ehling et al., 2005a, 2005b; Hatao, Hariya, Katsumura, & Kato, 1995; Lee, Park, Park, Kim, & Oh, 2002; Takeyoshi, Yamasaki, Yakabe, Takatsuki, & Kimber, 2001).

Daicel Chemical Industries Ltd. proposed a modification of LLNA, which involves the measurement of the adenosine triphosphate (ATP) content instead of [³H]-methyl thymidine incorporation for assessing lymphocyte proliferation (Idehara, Yamagishi, Yamashita, & Ito, in press; Yamashita, Idehara, Fukuda, Yamagishi, & Kawada, 2005). This modified assay method is designated as the LLNA modified by Daicel, based on the ATP content (LLNA-DA).

Although LLNA-DA essentially involves the same procedure as LLNA, the evidence available is insufficient for validating the assay method through interlaboratory evaluation. Therefore, we conducted 2 interlaboratory validation studies for LLNA-DA.

In the first study, 2 metallic salts—cobalt chloride and nickel sulfate—dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) produced inconsistent results across the laboratories. We assumed that the inconsistency factor would be due to one of the following 2 reasons: (1) DMSO was used as the vehicle in the control group for the 2 metallic salts, and DMSO application in mice is difficult as compared with acetone–olive oil (AOO) or acetone (ACE) application or (2) LLNA-DA is unsuitable for use with metallic salts, and both the chemicals used were metallic salts. Therefore, a second study employing additional metallic salt with DMSO was planned in order to ascertain the hypothesis.

The primary objectives of the first study were (1) to evaluate the extent of interlaboratory variation with regard to LLNA-DA and (2) to ascertain whether the results of LLNA-DA are comparable with those of LLNA. The primary objective of the second study was to examine the reliability of the LLNA-DA method when metallic salts were tested with DMSO.

2. Methods

2.1. Organization

This study was organized by researchers belonging to the committee for the validation of the assay. The research team comprised

Table 1(a)

Selected chemicals with their corresponding vehicles, the referenced results of LLNA and GPMT/BT, and the allocation of chemicals for the LLNA-DA experiments in the first study

Chemical	CASRN ^a	Vehicle ^b	LLNA	GPMT/BT ^c	Laboratory ^d									
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A: 2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	AOO	+	+	□	□	□	□	○	△	□	□	△	○
B: Hexyl cinnamic aldehyde	101-86-0	AOO	+	+	○	○	△	△	△	□	△	○	○	△
C: 3-Aminophenol	591-27-5	AOO	+	*nonstd	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
D: Glutaraldehyde	111-30-8	ACE	+	+	△	△	□	□	□	□	□	□	□	□
E: Cobalt chloride	7646-79-9	DMSO	+	+	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
F: Isoeugenol	97-54-1	AOO	+	+	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
G: Formaldehyde	50-00-0	ACE	+	+	△	△	□	□	□	□	□	□	□	□
H: Dimethyl isophthalate	1469-93-4	AOO	-	-	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
I: Isopropanol	67-63-0	AOO	-	-	○	○	△	△	△	□	△	○	○	△
J: Nickel sulfate	10101-97-0	DMSO	-	+	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
K: Abietic acid	514-10-3	AOO	+	+	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
L: Methyl salicylate	119-36-8	AOO	-	-	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□

^a The Chemical Abstract Services Registry Number.

^b ACE, acetone; AOO, acetone–olive oil; DMSO, dimethylsulfoxide.

^c Judgment based on the guinea pig maximization test or the Buehler test; *nonstd indicates a nonstandard animal that was not tested for chemical G.

^d Allocated pairs for the LLNA-DA experiments in a laboratory; ○, experiment 1; △, experiment 2; □, experiment 3.