

Table 1. Selected chemicals with their corresponding vehicles, the referenced results of LLNA and GPMT/BT, and the allocation of chemicals for the LLNA, BrdU-ELISA experiments

Code	Chemical	CASRN ^a	Vehicle ^b	LLNA	GPMT/BT ^c	Dose	Laboratory									
							1	2	3	4	5	6	7			
A	Nickel sulfate [Nickel(II) sulfate hexahydrate]	10101-97-0	DMSO	+	+	1,3,10										
B	Isopropanol (2-propanol)	67-63-0	AOO	-	-	10,25,50										
C	Eugenol	97-53-0	AOO	+	+	10,25,50										
D	trans-Cinnamic aldehyde	104-55-2	AOO	+	+	1,3,10										
E	2,4-Dinitrochlorobenzene (1-chloro-2,4-dinitrobenzene)	97-00-7	AOO	+	+	0.1,0.3,1.0										
F	Glutaraldehyde solution (ab.25%)	111-30-8	ACE	+	-	0.1,0.3,1.0										
G	Methyl salicylate	119-36-8	AOO	-	-	10, 25,50										
H	Hexylcinnamic aldehyde (hexylcinnamal, α -Hexylcinnamaldehyde)	101-86-0	AOO	+	+	10, 25,50										
I	Lactic acid	598-82-3	DMSO	-	-	10, 25, 50										
J	Formaldehyde solution (36–38%)	50-00-0	ACE	+	+	1,3,10										

^aThe Chemical Abstract Services Registry Number.^bACE, acetone; AOO, acetone-olive oil; DMSO, dimethylsulfoxide.^cJudgment based on the guinea pig maximization test or the Buehler test.

tions were observed with regard to the body weights. The lack of four data points at one laboratory (no.6) was due to experimental problems. There was no evidence that systemic toxicity occurred at any of the doses tested by reference to other observation records.

Acceptance Criteria

In the standard protocol, the mean absorbance in the negative control was set at 0.1–0.2 as acceptance criteria. However, approximately 60% of all data in this study were within this range and the other data were outside the range (data not shown). All the mean absorbances before the stock solutions were diluted were 0.05–0.35. Therefore, we discussed the specified range and changed the criteria. We accepted all data obtained before dilution for the following analysis.

Figure 2 shows the SI values obtained for all the positive control groups with 95% confidence intervals. Most experiments in these studies were acceptable because the SI values were greater than 2, excluding one laboratory (no. 2, test 1). Because all data at Laboratory no. 2, test 1, were judged to be insufficient for the positive control criteria, they were not used for the following analysis.

BrdU Labeling Index and SI Values

The BrdU labeling index and SI values recorded for each of the test chemicals in the experimental laboratories are summarized in Table 3, and the dose–response relationships for the SI values are indicated in Fig. 3. Dose–response relationships for the SI values of chemicals A (nickel sulfate), C (eugenol), D (*trans*-cinnamic aldehyde), E (2,4-dinitrochlorobenzene), F (glutaraldehyde) and H (HCA) were clearly evident in each laboratory, and the SI values at all their high doses were greater than 2. The dose–response relationships for chemicals B (isopropanol) and G (methyl salicylate) were unclear, and the laboratories that assessed these chemicals reported them to be negative. For chemical I (lactic acid), the dose–response relationships of the SI values were clearly evident at two laboratories (3 and 7), and the SI value for the high dose at one laboratory (7) was greater than 2. The dose–response at the other laboratory (4) was unclear. Further, an inconsistency was observed in the BrdU labeling index in the vehicle control group for one chemical. In the case of chemical J (formaldehyde), the dose–response relationship of the SI values yielded a down-regulation at the high dose in one laboratory (1), a v-shaped curve in one laboratory (5) and were unclear in one laboratory (6); therefore, it may be considered that the observed dose–response relationships based on the weighted average values for chemical J were inappropriate.

Intra-laboratory Variability

Although limited, the results obtained from the positive control groups allowed us to evaluate the intra-laboratory variability of the assay. Figure 2 shows the variability of the SI values obtained for the positive control groups from each laboratory. The SI values of the positive control substance were consistent, excluding the first trials of laboratories 2 and 5.

Inter-laboratory Variability

The data shown in Fig. 3 were used to measure the inter-laboratory variability of the SI values at all the chemical doses.

Table 2. Summary statistics of the body weight (g) at days 1 and 6

Laboratory no.	<i>n</i>	Day 1				Day 6				
		Mean	SD	Min	Max	<i>n</i>	Mean	SD	Min	Max
1	108	22.2	1.38	18.4	25.8	108	22.6	1.48	18.7	26.4
2	108	22.6	1.32	20.1	21.7	108	23.8	1.52	20.6	28.0
3	108	22.1	1.38	19.3	26.2	108	23.1	1.48	20.0	27.0
4	108	21.8	1.44	17.6	25.9	108	22.4	1.57	18.1	26.1
5	108	22.6	1.25	19.6	25.2	108	22.8	1.36	19.7	26.0
6	104	22.0	1.30	21.0	25.3	104	22.0	1.27	19.0	24.8
7	108	22.1	1.55	18.9	27.8	108	22.9	1.42	19.7	26.3

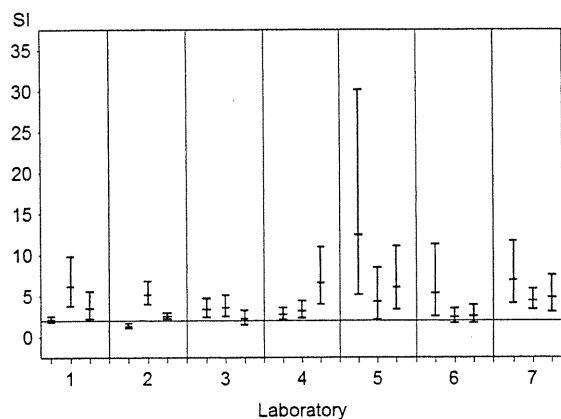
**Figure 2.** SI values with 95% confidence intervals obtained for the positive control groups at the all laboratories in phase II validation study.

Table 4 shows the weighted average of the SI values with 95% confidence intervals and a summary index of the inter-laboratory variability, i.e. τ^2 . In the study, no large inter-laboratory variation was observed in any of the laboratories.

Table 5 shows the results of the judgments based on the positive criteria obtained for all the chemicals in all the laboratories. Two chemicals, I (lactic acid) and J (formaldehyde), showed inconsistent results among the laboratories. The SI values for the high doses were approximately 2 among all three laboratories; thus, the variation was small.

EC2 and Measures of Relevance

To avoid the problem of multiple counts of the same chemicals from different laboratories, the calculations of EC2 and sensitivity, specificity, accuracy, positive predictivity and negative predictivity of LLNA:BrDU-ELISA were based on the weighted averages of the SI values.

Table 6 show the EC2 results and its classification for LLNA:BrDU-ELISA based on the weighted averages for both the studies and the reported EC2 and its classification based on the reported values for the original LLNA. The sensitivity, specificity, accuracy, positive predictivity and negative predictivity of LLNA:BrDU-ELISA with regard to the chemicals in the study, as against those of GPMT/BT and LLNA, are shown in Table 7. To enable comparison of the measurements of LLNA against those of GPMT/BT when the same chemicals were selected, these values calculated only on the basis of the referenced data are

shown in Table 7. The sensitivity, specificity, accuracy, positive predictivity and negative predictivity values of LLNA:BrDU-ELISA against those of GPMT/BT were similar to those of LLNA against those of GPMT/BT.

DISCUSSION

Through the preliminary and phase I studies, we developed and refined the protocol. For acceptable performance of the assay, the acceptance criteria as shown in the protocol must be used. That is, the appropriate absorbance for the negative and positive control must be obtained to achieve an adequate SI value of the positive control. To achieve this objective, the LN cell suspension should be prepared such that the mean absorbance on the negative and positive control is within the range defined by the protocol developers. However, even if the optimized condition was determined by a preliminary study in each laboratory, it was technically difficult to achieve the required absorbance range for the negative control in phase I of the study. As the result, absorbances on the negative and positive controls were in the ranges 0.002–0.398 and 0.003–1.115, respectively, in the phase I study (data not shown). Since the width of this range is so large, the range of average SI values on the positive control was also large, such as 1.7–30.2 at all laboratories.

To modify the acceptable range of the absorbance on the negative control, we discussed the use of data from the diluted stock of the suspension after the phase I study. It was suspected that the error was increased by dilution of the stock. We ultimately decided that the stock of LN cell suspension should not be used. The description of the dilution was eliminated.

Furthermore, we determined that every laboratory should decide their own optimal target volume of LN cell suspension in advance such that the absorbance value of the negative control group would be expected to be within 0.1–0.2.

Using the revised protocol that included these decisions, the phase II study was conducted with the participation of seven independent experimental laboratories. Unfortunately, absorbance data for the negative control did not meet the acceptance range of 0.1–0.2; the absorbance range was 0.05–0.35.

Because the results for the positive control were stable and the range of SI values was between 2.1 and 12.5 at seven laboratories, we accepted all the data for analysis in this study. We believe the results presented here are appropriate to understand the features of the assay.

The fact that the inter-laboratory variations were small for most of the chemicals is considered to be a significant finding of this study. In particular, chemical B (HCA) and chemical E (2,4-

Table 3. Mean absorbance and SI value

Code	Chemical name	Lab. no.	Dose	n	Mean absorbance for chemical	Mean absorbance for vehicle	SI	
Positive	HCA	1	50	4	0.432	0.209	2.07	
			50	4	0.337	0.055	6.11	
			50	4	0.282	0.082	3.43	
		2	fail					
			50	4	0.677	0.131	5.15	
			50	4	0.438	0.174	2.52	
		3	50	4	0.804	0.241	3.34	
			50	4	0.720	0.203	3.54	
			50	4	0.689	0.316	2.18	
		4	50	4	0.756	0.281	2.69	
			50	4	0.710	0.224	3.17	
			50	4	1.012	0.154	6.58	
		5	50	4	1.569	0.126	12.46	
			50	4	0.683	0.161	4.24	
			50	4	0.678	0.112	6.07	
		6	50	4	0.793	0.150	5.30	
			50	4	0.440	0.183	2.41	
			50	4	0.765	0.304	2.52	
		7	50	4	0.614	0.089	6.86	
			50	4	0.372	0.085	4.39	
			50	4	0.581	0.122	4.78	
A	Nickel sulfate	3	1	4	0.303	0.221	1.37	
			3	4	0.424		1.92	
			10	4	0.570		2.58	
		4	1	4	0.431	0.210	2.05	
			3	4	0.420		2.00	
			10	4	0.952		4.53	
		7	1	4	0.273	0.145	1.88	
			3	4	0.386		2.66	
			10	4	0.385		2.66	
B	Isopropanol	1	10	4	0.350	0.158	2.22	
			25	4	0.120		0.76	
			50	4	0.145		0.92	
		3	10	4	0.261	0.266	0.98	
			25	4	0.227		0.85	
			50	4	0.199		0.75	
		4	10	4	0.240	0.241	1.00	
			25	4	0.292		1.21	
			50	4	0.380		1.58	
		5	10	4	0.052	0.055	0.94	
			25	4	0.038		0.69	
			50	4	0.040		0.71	
		6	10	3	0.516	0.253	2.04	
			25	3	0.283		1.12	
			50	3	0.383		1.51	
7	10	4	0.058	0.120	0.48			
	25	4	0.115		0.95			
	50	4	0.121		1.01			
C	Eugenol	2	10	4	0.226	0.173	1.31	
			25	4	0.422		2.45	
			50	4	0.546		3.17	
		6	10	4	0.306	0.210	1.46	
			25	4	0.573		2.73	
			50	4	0.667		3.18	
		7	10	4	0.359	0.123	2.92	
			25	4	0.514		4.18	
			50	4	0.870		7.08	
D	Cinnamic aldehyde	2	1	4	0.196	0.178	1.10	
			3	4	0.397		2.23	
			10	4	0.600		3.37	
		4	1	4	0.426	0.271	1.57	
			3	4	0.796		2.94	
			10	4	0.947		3.49	
		5	1	4	0.171	0.150	1.14	
			3	4	0.315		2.10	
			10	4	0.617		4.11	
E	2,4-Dinitrochlorobenzene	1	0.1	4	0.674	0.302	2.23	
			0.3	4	1.110		3.67	
			1.0	4	1.298		4.30	
		2	0.1	4	1.137	0.178	6.39	
			0.3	4	1.162		6.52	
			1.0	4	1.490		8.36	

Table 3. *Continued*

Code	Chemical name	Lab. no.	Dose	<i>n</i>	Mean absorbance for chemical	Mean absorbance for vehicle	SI		
F	Glutaraldehyde solution	3	0.1	4	0.941	0.220	4.27		
			0.3	4	1.378		6.25		
			1.0	4	1.319		5.99		
		4	0.1	4	1.005	0.271	3.71		
			0.3	4	1.434		5.29		
			1.0	4	1.490		5.50		
		5	0.1	4	2.243	0.150	14.94		
			0.3	4	2.819		18.78		
			1.0	4	2.540		16.93		
		6	0.1	4	0.711	0.210	3.38		
			0.3	4	0.944		4.50		
			1.0	4	1.014		4.83		
		7	0.1	4	0.705	0.123	5.73		
			0.3	4	1.509		12.28		
			1.0	4	1.593		12.96		
		F	Glutaraldehyde solution	1	0.1	4	0.188	0.107	1.76
					0.3	4	0.257		2.40
					1.0	4	0.400		3.73
				5	0.1	4	0.395	0.053	7.44
					0.3	4	0.689		12.98
					1.0	4	1.525		28.73
6	0.1			4	0.162	0.163	0.99		
	0.3			4	0.308		1.89		
	1.0			4	0.367		2.25		
G	Methyl salicylate			1	10	4	0.431	0.302	1.43
					25	4	0.417		1.38
					50	4	0.381		1.26
		2	10	4	0.192	0.173	1.11		
			25	4	0.201		1.16		
			50	4	0.248		1.44		
		3	10	4	0.242	0.220	1.10		
			25	4	0.267		1.21		
			50	4	0.309		1.40		
		H	Hexylcinnamic aldehyde	1	10	4	0.248	0.158	1.57
					25	4	0.412		2.61
					50	4	0.537		3.41
3	10			4	0.491	0.266	1.20		
	25			4	0.625		2.06		
	50			4	0.804		2.87		
4	10			4	0.491	0.241	2.04		
	25			4	0.625		2.59		
	50			4	0.804		3.34		
5	10			4	0.291	0.055	5.25		
	25			4	0.474		8.57		
	50			4	0.746		13.48		
6	10	4	0.450	0.253	1.78				
	25	4	0.727		2.87				
	50	4	0.827		3.27				
7	10	4	0.192	0.120	1.59				
	25	4	0.366		3.04				
	50	4	0.462		3.84				
I	Lactic acid	3	10	4	0.241	0.221	1.09		
			25	4	0.365		1.66		
			50	4	0.397		1.80		
		4	10	4	0.359	0.210	1.71		
			25	4	0.397		1.89		
			50	4	0.343		1.63		
		7	10	4	0.175	0.145	1.21		
			25	4	0.313		2.16		
			50	4	0.367		2.53		
		J	Formaldehyde solution	1	1	4	0.330	0.107	3.08
					3	4	0.471		4.40
					10	4	0.191		1.78
5	1			4	0.225	0.053	4.25		
	3			4	0.088		1.67		
	10			4	0.883		16.64		
6	1			4	0.261	0.163	1.60		
	3			4	0.293		1.80		
	10			4	0.321		1.97		

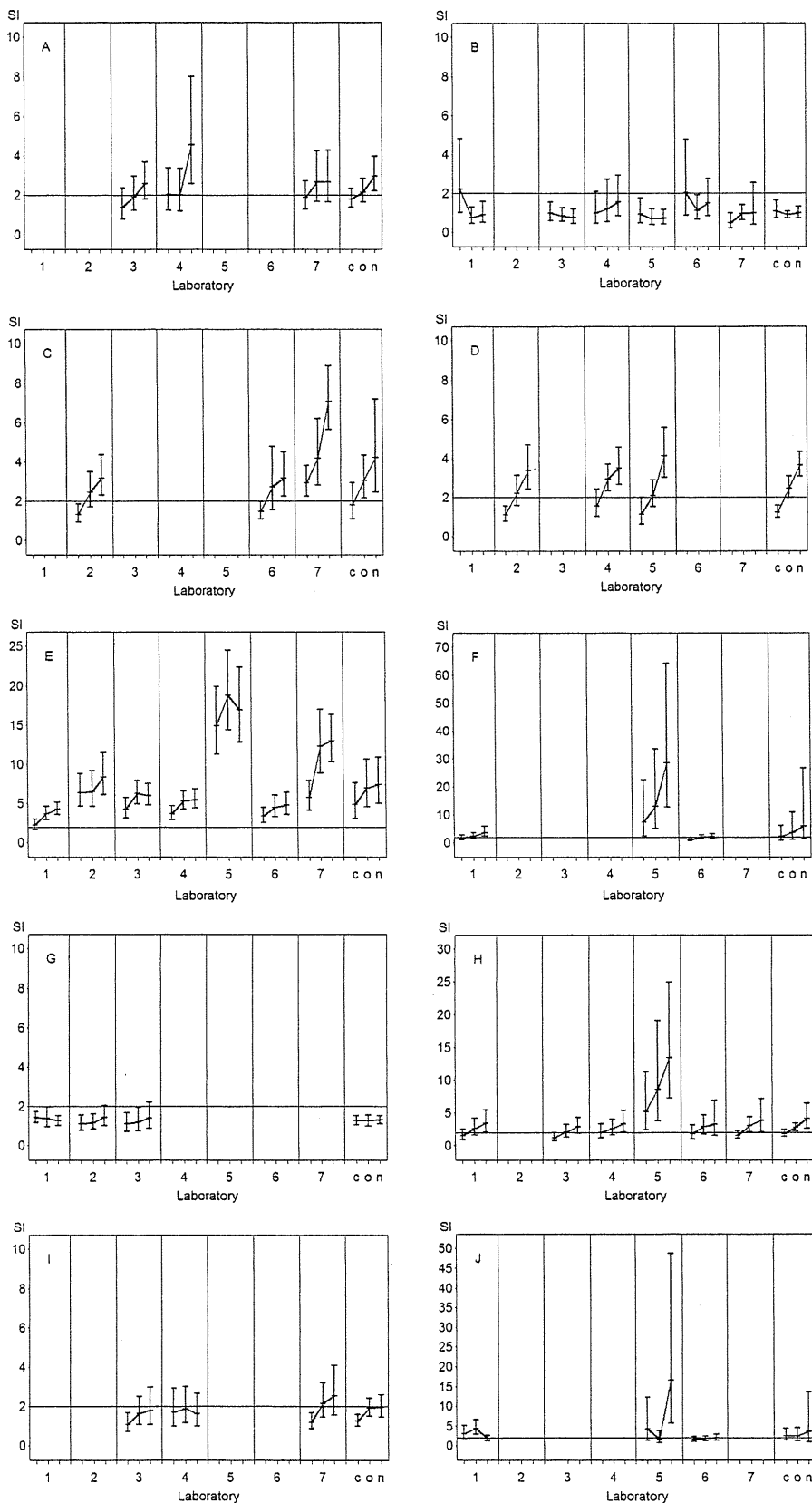


Figure 3. Dose–response relationships of the SI values with 95% confidence intervals for each chemical analyzed at the all laboratories in phase II validation study. WA indicates the weighted average of the SI values obtained by meta-analysis using the random effect model in this study.

Table 4. The weight average of the SI value and the variance component τ^2

Code	Chemical	Low-dose		Middle-dose		High-dose	
		SI	τ^2	SI	τ^2	SI	τ^2
A	Nickel sulfate	1.79	0.000	2.17	0.000	2.96	0.016
B	Isopropanol	1.08	0.144	0.89	0.000	0.99	0.044
C	Eugenol	1.79	0.169	3.05	0.049	4.20	0.201
D	trans-Cinnamic aldehyde	1.24	0.000	2.46	0.017	3.64	0.000
E	2,4-Dinitrochlorobenzene	4.87	0.345	6.98	0.315	7.40	0.255
F	Glutaraldehyde solution	2.11	0.787	3.60	0.864	5.99	1.661
G	Methyl salicylate	1.27	0.008	1.25	0.000	1.31	0.000
H	Hexylcinnamic aldehyde	1.82	0.073	2.83	0.006	4.14	0.231
I	Lactic acid	1.25	0.000	1.90	0.000	1.97	0.000
J	Formaldehyde solution	2.46	0.154	2.44	0.245	3.56	1.279

The variance component τ^2 represents the interlaboratory variance for the log-transformed SI, which is obtained by decomposing the total variance into the between variance and within variance by performing meta-analysis with a random effect model. Since τ^2 indicates variance, its value is greater than 0, and a higher value indicates greater inter-laboratory variation.

Table 5. Judgement based on the SI values greater than 2 for LLNA:BrDU-ELISA and the referenced values for LLNA and GPMT/BT in this study

Code	Chemical	LLNA	GPMT/BT	Laboratory						
				1	2	3	4	5	6	7
A	Nickel sulfate	–	+			+	+			+
B	Isopropanol	–	–	–		–	–	–	+	–
C	Eugenol	+	+		+				+	+
D	trans-Cinnamic aldehyde	+	+		+		+	+		
E	2,4-Dinitrochlorobenzene	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	Glutaraldehyde solution	+		+				+	+	
G	Methyl salicylate	–	–	–	–	–				
H	Hexylcinnamic aldehyde	+	+	+		+	+	+	+	+
I	Lactic acid	–	–			–	–			+
J	Formaldehyde solution	+	+	+				+	–	

dinitrochlorobenzene) were tested by all seven laboratories; it was observed that the SI value of the inter-laboratory variation was small and that the dose–response relationships were similar. These results indicate that LLNA:BrDU-ELISA is a robust technique using the revised protocol.

We did not change the criteria for the positive control in any phase. Data were accepted only when the SI value on the positive control group was equal to or greater than 2. When the SI for the positive control was less than 2, the sensitivity of the test was considered to be inadequate.

The cut-off value of the SI was determined on the basis of the prior examinations. During our validation studies, the value was prespecified and was not changed. We did not intend to optimize the value because the number of chemicals was too limited. The sensitivity, specificity and accuracy in Table 7 were estimated using the SI cut-off value, which showed high relevance. From the above discussion, we derived the current recommendation about the acceptance criteria on the assay as follows.

Final Recommended Acceptance and Positive Criteria

The target mean absorbance for negative control (vehicles) is 0.1–0.2. To set achieve these values, every laboratory should

decide its own optimal target volume of LN cell suspension in advance. The values for the treatment groups are divided by the mean absorbance of the control group to determine the SI values for each treatment group. When the positive control produces an $SI \geq 2$, the data derived from the test substances that are tested concurrently are accepted. If any concentration of the test substance yields $SI \geq 2$, the substance is identified as a sensitizer.

The phase II study also presented certain limitations. First, the results are representative of only 10 chemicals. The variance component τ^2 represents the inter-laboratory variance for the log-transformed SI, which is obtained by decomposing the total variance into the between variance and within variance by performing meta-analysis with a random effect model. Since τ^2 indicates variance, its value is greater than 0, and a higher value indicates greater inter-laboratory variation. The chemicals used in the present studies were selected from a wide range of chemicals, and their skin sensitization potentials were determined by the application of the LLNA method. Further, the precision of the measure of relevance was low because only 10 chemicals were tested by this assay method; therefore, even a difference in only a single chemical would affect the sensitivity. Since the study demonstrated the strong reliability of the assay, further assessments

Table 6. EC2 and chemical classification in this study

Code	Chemical	LLNA:BrdU-ELISA		EC3	LLNA
		EC2	Classification		Classification
A	Nickel sulfate	2.2	Positive	–	Negative
B	Isopropanol	–	Negative	–	Negative
C	Eugenol	12.0	Positive	12.9	Weak
D	Cinnamic aldehyde	2.2	Positive	3.1	Moderate
E	2,4-Dinitrochlorobenzene	<0.1	Positive	0.04	Extreme
F	Glutaraldehyde solution	<0.1	Positive	0.1	Extreme
G	Methyl salicylate	–	Negative	–	Negative
H	Hexylcinnamic aldehyde	12.0	Positive	8.4	Moderate
I	Lactic acid	–	Negative	>25	Negative
J	Formaldehyde solution	<0.1	Positive	0.7	Strong

The EC2 for LLNA:BrdU-ELISA is based on the weighted average. The SI values obtained for chemical E (2,4-dinitrochlorobenzene) with LLNA:BrdU-ELISA were greater than 2 for all the doses; however, since the dose–response relationship yielded a v-shaped curve, the EC2 could not be determined.

Although the weighted averages of the SI values were greater than 2 for all the doses, the EC2 and classification were determined because the dose–response relationship exhibited a v-shaped curve.

Table 7. Sensitivity, specificity, accuracy, positive predictivity and negative predictivity in the study

	Sensitivity	Specificity	Accuracy	Positive predictivity	Negative predictivity
LLNA:BrdU-ELISA vs GPMT/BT	100.0% (6/6)	100.0% (3/3)	100.0% (9/9)	100.0% (6/6)	100.0% (3/3)
LLNA:BrdU-ELISA vs. LLNA	100.0% (6/6)	75.0% (3/4)	90.0% (9/10)	85.7% (6/7)	100.0% (3/3)

For LLNA:BrdU-ELISA, the judgment was based on the weighted average of the SI values. For LLNA and GPMT/BT, judgments were based on the referenced data.

using other known chemicals should be conducted in other studies.

Another limitation is with regard to the quality of the data. It was extremely difficult to ensure complete compliance with GLP in these studies. However, although the experiments involved in the studies were not conducted in complete accordance with GLP, the format file for data recording of individual experiments was devised at the planning stage of the study, and the data files collected for all the experiments complied with this format. Furthermore, since all the data used for the analyses were based on the database, if required, we can provide for review the database regarding the BrdU labeling index obtained for the individual animals with the standard protocol that was used.

Many researchers have provided considerable evidence for the reliability of LLNA. Several inter-laboratory studies on LLNA have been reported, but they did not necessarily employ the same protocol; additionally, these studies were conducted by approximately five experimental laboratories (Basketter *et al.*, 1991; Kimber *et al.*, 1991, 1995, 1998; Loveless *et al.*, 1996; Scholes *et al.*, 1992). On the other hand, limited evidence is available for the reliability of LLNA:BrdU-ELISA. Since the methods involved in LLNA:BrdU-ELISA and the original LLNA are essentially identical, the results of our study, which tested coded chemicals using a standardized protocol, provide adequate evidence in support of LLNA:BrdU-ELISA as an alternative assay method to original LLNA.

In conclusion, this study provides valuable evidence for the reliability of LLNA:BrdU-ELISA. Unlike LLNA, LLNA:BrdU-ELISA measures the BrdU incorporation. It is a simple method for measuring the BrdU using ELISA and it yields quick results. In addition, this method assesses cell-turnover with the same endpoint, lymphocyte proliferation, as in the original LLNA by measuring the incorporation of the thymidine analog BrdU using ELISA. Thus, the principle and study design of the LLNA:BrdU-ELISA and the original LLNA are basically the same. Taken together, these facts indicate that the LLNA:BrdU-ELISA is a promising new version LLNA.

Acknowledgment

This study was partially supported by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare (principal investigator: Yasuo Ohno) and Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments. We would like to express our appreciation to the editors and the reviewers of the original manuscript, who made insightful suggestions that improved the clarity of the presentation.

REFERENCES

- Basketter DA, Scholes EW. 1992. Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Food Chem. Toxicol.* **30**: 65–69.

- Basketter DA, Scholes EW, Kimber I, Botham PA, Hilton J, Miller K. 1991. Interlaboratory evaluation of the local lymph node assay with 25 chemicals and comparison with guinea pig test data. *Toxicol. Meth.* **1**: 30–43.
- Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I, Loveless SE. 1996. The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food Chem. Toxicol.* **34**: 985–997.
- Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I. 1998. Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization tests. *Food Chem. Toxicol.* **36**: 327–333.
- Basketter DA, Lea LJ, Cooper KJ, Ryan CA, Gerberick GF, Dearman RJ. 1999a. Identification of metal allergens in the local lymph node assay. *Am. J. Contact Dermat.* **10**: 207–212.
- Basketter DA, Lea LJ, Dickens A, Briggs D, Pate I, Dearman RJ, Kimber I. 1999b. A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *J. Appl. Toxicol.* **19**: 261–266.
- Basketter DA, Blaikie L, Dearman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR, Rycroft RJ. 2000. Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermat.* **42**: 344–348.
- Basketter DA, Evans P, Fielder RJ, Gerberick GF, Dearman RJ, Kimber I. 2002. Local lymph node assay—Validation, conduct and use in practice. *Food Chem. Toxicol.* **40**: 593–598.
- Basketter DA, Casati S, Gerberick GF, Griem P, Philips B, Worth A. 2005. Skin sensitisation. *Altern. Lab. Anim.* **33**(suppl. 1): 83–103.
- Dean JH, Twerdok LE, Tice RR, Sailstad DM, Hattan DG, Stokes WS. 2001. ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **34**: 258–273.
- Dearman RJ, Hilton J, Basketter DA, Kimber I. 1999. Cytokine endpoints for the local lymph node assay: Consideration of interferon-g and interleukin 12. *J. Appl. Toxicol.* **19**: 149–155.
- Durand G, De Burtet G, Virat M, Nauman BD. 2003. Use of the local lymph node assay in the evaluation of the sensitizing potential of pharmaceutical process intermediates. *Contact Dermat.* **49**: 148–154.
- Ehling G, Hecht M, Heusener A, Huesler J, Gamer AO, van Loveren H, Maurer T, Riecke K, Ullmann L, Ulrich P, Vandebriel R, Vohr HW. 2005a. An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicology* **212**: 60–68.
- Ehling G, Hecht M, Heusener A, Huesler J, Gamer AO, van Loveren H, Maurer T, Riecke K, Ullmann L, Ulrich P, Vandebriel R, Vohr HW. 2005b. An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: 2nd round. *Toxicology* **212**: 69–79.
- FDA. 2002. *Guidance for Industry—Immunotoxicology Evaluation of Investigational New Drugs*.
- Gad SC, Dunn BJ, Dobbs DW, Rely C, Walsh RD. 1986. Development and validation of an alternative dermal sensitization test: the mouse ear swelling test (MEST). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **84**: 93–114.
- Gerberick GF, Ryan CA, Kimber I, Dearman RJ, Lea LJ, Basketter DA. 2000. Local lymph node assay: validation assessment for regulatory purposes. *Toxicology* **11**: 3–18.
- Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Dearman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, Basketter DA. 2004. A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skinsensitization testing. *Contact Dermat.* **50**: 274–288.
- Haneke KE, Tice RR, Carson BL, Margolin BH, Stokes WS. 2001. ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **34**: 274–286.
- Hastings KL. 2001. Pre-clinical methods for detecting the hypersensitivity potential of pharmaceuticals: regulatory considerations. *Toxicology* **158**: 85–89.
- Hatao M, Hariya T, Katsumura Y, Kato S. 1995. A modification of the local lymph node assay for contact allergenicity screening: measurement of interleukin-2 as an alternative to radioisotope-dependent proliferation assay. *Toxicology* **98**: 15–22.
- ICCVAM. 2009. *Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated Validation Status of New Versions and Applications of the Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products*. National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- Idehara K, Yamagishi G, Yamashita K, Ito M. 2008. Characterization and evaluation of amodified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **58**: 1–10.
- Kimber I. 2001. The local lymph node assay and potential application to the identification of drug allergens. *Toxicology* **158**: 59–64.
- Kimber I, Hilton J, Botham PA, Basketter DA, Scholes EW, Miller K, Robbins MC, Harrison PT, Gray TJ, Waite SJ. 1991. The murine local lymph node assay: Results of an inter-laboratory trial. *Toxicol. Lett.* **55**: 203–213.
- Kimber I, Hilton J, Dearman RJ, Gerberick GF, Ryan CA, Basketter DA, Scholes EW, Ladics GS, Loveless SE, House RV et al. 1995. An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicology* **103**: 63–73.
- Kimber I, Hilton J, Dearman RJ, Gerberick GF, Ryan CA, Basketter DA, Lea L, House RV, Ladics GS, Loveless SE, Hastings KL. 1998. Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: an interlaboratory evaluation. *J. Toxicol. Environ. Health A* **53**: 563–579.
- Lee JK, Park JH, Park SH, Kim HS, Oh HY. 2002. A nonradioisotopic endpoint for measurement of lymph node cell proliferation in a murine allergic contact dermatitis model, using bromodeoxyuridine immunohistochemistry. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **48**: 53–61.
- Loveless SE, Ladics GS, Gerberick GF, Ryan CA, Basketter DA, Scholes EW, House RV, Hilton J, Dearman RJ, Kimber I. 1996. Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicology* **108**: 141–152.
- Normand SLT. 1999. Meta-analysis: Formulating, evaluating, combining, and reporting. *Stat. Med.* **18**: 321–359.
- OECD. 1992. *Organization for Economic Co-operation and Development – OECD Guidelines for Testing of Chemicals. No. 406: Skin Sensitization*.
- OECD. 2002. *Organization for Economic Co-operation and Development – OECD Guidelines for Testing of Chemicals. No. 429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay*.
- OECD. 2005. *Organization for Economic Co-operation and Development – OECD Series on Testing and Assessment. No. 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*.
- Omori T, Sozu T. 2007. Variance of the stimulation index for the local lymph node assay. *AATEX* **12**: 321–359.
- Omori T, Idehara K, Kojima H, Sozu T, Arima K, Goto H, Hanada T, Ikarashi Y, Inoda T, Kanazawa Y, Kosaka T, Maki E, Morimoto T, Shinoda S, Shinoda N, Takeyoshi M, Tanaka M, Uratani M, Usami M, Yamanaka A, Yoneda T, Yoshimura I, Yuasa A. 2008. Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **58**: 11–26.
- Sailstad DM, Hattan D, Hill RN, Stokes WS. 2001. ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. I. The ICCVAM review process. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **34**: 249–257.
- Scholes EW, Basketter DA, Sarll AE, Kimber I, Evans CD, Miller K, Robbins MC, Harrison PT, Waite SJ. 1992. The local lymph node assay: results of a final inter-laboratory validation under field conditions. *J. Appl. Toxicol.* **12**: 217–222.
- Takeyoshi M, Yamasaki K, Yakabe Y, Takatsuki M, Kimber I. 2001. Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2Vdeoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol. Lett.* **119**: 203–208.
- Takeyoshi M, Iida K, Shiraishi K, Hoshuyama S. 2005. Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitizing potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.* **5**(2): 129–134.
- Takeyoshi M, Noda S, Yamasaki K. 2006. Advantage of using CBA/N strain mice in a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.* **26**(1): 5–9.
- Yamashita K, Idehara K, Fukuda N, Yamagishi G, Kawada N. 2005. Development of a modified local lymph node assay using ATP measurement as an endpoint. *AATEX* **11**: 136–144.

動物実験の3Rにおける国内外の動向

National and International trends of 3Rs in animal experiments



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 室長

要約

There is slow, steadily progressing the movement of 3Rs (to Replace them with non-sentient alternatives, to Reduce to a minimum the number of animals used, and to Refine experiments which used animals so that they caused the minimum pain and distress) of animal experiments in Japan.

The Japan Health Sciences Foundation established the Center for Accreditation of Laboratory Animal Care and Use in 2007. With the purpose of assessing and verifying compliance with the "Basic Guidelines for Proper Conduct of Animal Testing and Related Activities in the Research Institutions under the Jurisdiction of the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW)", the objective of the center is to promote the optimum

enforcement of scientific animal testing. Other Jurisdiction systems have been established by successive in Japan.

On the other hand, MHLW created the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) at the National Institute of Health Sciences (NIHS) in 2005. JaCVAM has promoted the 3Rs in animal experiments for the evaluation of chemical substance safety and established guidelines for new alternative experimental methods through international collaboration for 5 years. Many Japanese colleagues have supported JaCVAM activities by performing validation studies and peer reviews and by providing regulatory acceptance for new alternative experimental methods. Furthermore, we must push forward with international harmonization efforts in accordance with the International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM) framework, which was organized in April, 2009. We think that developments and continued activities of these centers are key contributions in 3Rs.

We expect these Japanese activities may contribute to the International harmonization in 3Rs.

キーワード：

動物実験代替法、代替法、バリデーション、第三者評価、3R

1. 国内の動向 -1-

1.1 「動物愛護及び管理に関する法律の改訂」および関連指針

昭和48年(1973)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(平成18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」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、3R(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)を徹底するために、適正な飼養およ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。加えて、環境省は平成18年10月「動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針」を定めた³⁾。この中では、実験動物の適正な取扱いの推進について述べられている。

これらを受け、同時期に文部科学省⁴⁾、厚生労働省⁵⁾、農林水産省⁶⁾が関連「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、動物実験等の施設およ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「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を示している⁷⁾。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。この他にも、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⁸⁾。

さて、動愛法には附則第9条において、「政府は、この法律の施行5年後を目途として、新法の施行の状況について検討を加え、必要があると認めるときは、その結果に基づいて所要の措置を講ずるものとする」とされている。これに基づけば、平成23年度を目途として施行状況を検討し、必要であれば法改正を行うことになる。実際、中央環境審議会動物愛護部会において、動物愛護

管理法見直しに向けた議論が平成22年6月より進んでいる⁹⁾。この中で、実験動物の福祉が議題にあがっており、どのような追加記載がなされるのか注目していきたい。ただし、混同がないように、用語を正確に区別しておきたい。環境省が扱っているものは、「実験動物」であり、一方、その他省庁が扱っているのは、「動物実験」である。改訂が検討されているものは、「実験動物」であり、「動物実験」の規制が今後どう改正されるのか定かでない。

ところで、5年前の動愛法の改訂にあたり、3Rの原則が導入された理由について考えてみたい。これについては、鍵山が興味深い記述を残している¹⁰⁾。すなわち、3Rは国際原則であり、先進国で3Rを法令で謳っていない国は日本以外に見当たらなかったこと、研究論文のレフエリーの指摘事項の背景に3Rの原則の非明文化があったこと、我が国の製薬会社は欧米からアウトロー呼ばわりされ、国際展開に苦戦していたことがその理由であると記載している。日本の3Rの必要性は、動物福祉のためでなく、国際社会の中での生き残り、科学水準や国際経済力の維持のためのものである。今回の動愛法の改正によっても、この考え方が中心であろう。

1.2 動物実験施設の第三者認証機関

日本学術会議の「動物実験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・評価および検証ならびに情報公開に関する記述がある⁷⁾。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) が国際認証をできる組織としてよく知られているが¹¹⁾、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、2007年、財団法人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¹²⁾、公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¹³⁾、日本動物実験協同組合¹⁴⁾など複数の認証制度においても審査が進んでいる。日本においても本格的な当該機関以外の者による検証が始まったことを意味している。

2. 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。そこで、我が国の現状を客観的にみるため、欧米諸国の仕組みについて確認しておきたい。

2.1 EUの動向

欧米諸国には、前述した「実験動物」と「動物実験」の線引きはない。例えば、英国はAnimal Actで3つの免許制度を導入している¹⁵⁾。実験実施施設の指定、実験者の免許、実験計画の審査および免許の交付である。ところが、この法律はEUの法律と比べ表現が弱いとされており、2013年には改訂を予定している。このEUの法律とは、欧州議会が、EUの研究室で使用されている年間1200万以上の実験動物を規定するEU指令609-86に代わる新しいものであり、2010年9月に改正案の採用が決議され、ヨーロッパの多くの加盟国に、動物実験の水準向上を促した¹⁶⁾。以下が特記すべき事項である。

- チンパンジーなどの類人猿の使用禁止（一部の例外を除く）。
- 事前の倫理的・科学的な評価の権威化。

- 実験動物のすべてのブリーダー、サプライヤー、ユーザが、機器や動物のケージの選択およびトレーニング等に関する法令の順守。
- EUと加盟国レベルにおける医学研究や教育などを含むすべての分野での、非動物の方法の開発および推進。

このようなEUの思想、法律的問題が経済にまで波及した事例が、化粧品開発における動物実験の規制問題¹⁷⁾およびリーチ法 (REACH: Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) 問題である¹⁸⁾。

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月に代替法が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¹⁷⁾。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している。これに対応すべく、EUでは欧州化粧品工業会 (COLIPA: European Trade Association for the Cosmetic, Toiletry and Perfumery Industry)¹⁹⁾と欧州代替法評価センター (ECVAM: European Centre for the Validation of Alternative Methods)²⁰⁾が共同で試験法の開発、バリデーションおよび専門家による第三者評価（以後、第三者評価と記す）を進めている。

一方、REACHとはすでに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¹⁸⁾。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ことに端を発している²¹⁾。この安全性評価はハザードベースでなく、リスクベース（ハザードと曝露評価）が中心である、2009年までに事前登録された約18万の化学物質について、70%の試験を2017年までに実施しなければならない。実験を行う場合にはITS (Integrated Testing Strategies) 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 (QSAR: Quantitative Structure-Activity (または Affinity) Relationship) 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を同定する。さらに製造量が増えるにつれて、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²²⁾。

ただし、新規代替法が開発されても、例えば、経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) テストガイドラインなどに²³⁾、受け入れられるためには10年が掛かると言われており、これまで通りの方法では2017年までには多くの新規試験法を用意できない。新規試験法に求められるものは、化学物質等の安全・安心の確保であり、代替が第一優先ではない。新規試験法の採用においては、各分野の専門家により、適用範囲や再現性、正確性などの視点で慎重に議論されねばならないからである。そこで、類似した試験法については、既存試験法の性能標準 (performance standard) に基づいたバリデーションにより、REACHのために“適切な”方法を短期間で選択するme-tooバリデーションという方策が検討されている²³⁾。

2.2 米国における動向

アメリカにおいては、実験動物はAnimal Welfare Act²⁴⁾、動物

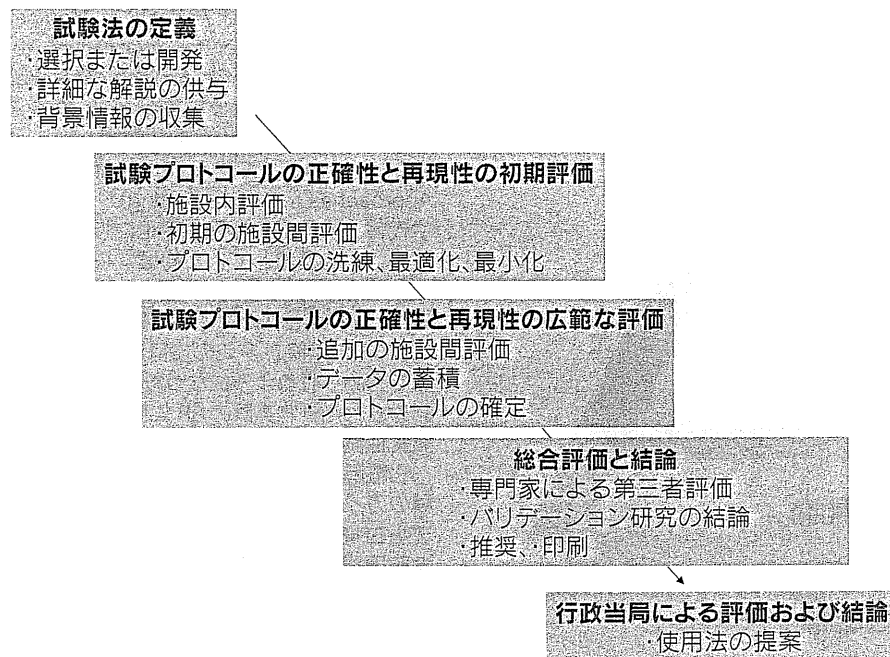


図 1. 試験法の公定化の過程

実験は Health Research Extension Act で規制されている²⁵⁾。これらを国立科学アカデミー (NAC: National Academy of Sciences) 傘下の実験動物研究協会 (ILAR: Institute for Laboratory Animal Research) が関係省庁の支援を受けて、実験動物の管理および使用に関する指針を編集し、実験動物および動物実験の倫理・科学的な自主管理を促している²⁶⁾。以上のような状況は、日本に近い。ただし、その詳細は大きく異なっている。一番大きな相違点は、獣医師の役割である。日本学術会議のガイドラインでは、獣医師の役割は少ないが、ILAR の指針では、実験動物を専門とする獣医師が科学と動物福祉の推進役として定められている。また、前述した AAALAC の国際認証なども厳しいものであると聞いている。

2.3 国際協調機関

このような動物実験の 3R は欧米主導ということもあり、OECD、世界動物保健機関 (OIE: World Organisation for Animal Health)、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)、動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力会議 (VICH: International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products)、化粧品国際規制会議 (ICCR: International Cooperation on Cosmetics Regulations)、国際標準化機構 (ISO: International Organisation for Standardization) などの規制に関わる国際協調機関においても 3R に関する声明を出している。これらの中で、OECD では、今後提案されるテストガイドライン案には 3R の精神が盛り込まれることを望んでおり²⁹⁾、代替法や動物実験でも複数の試験を組み合わせたガイドラインが増えている。OIE の実験動物福祉綱領では、

加盟国に実験動物福祉に関する法的整備を勧告している²⁷⁾。ICH では、動物実験数削減の可能性もテーマの一つとしてあげられており、*in vitro* 試験の議論も少しずつではあるが、増えている²⁸⁾。比較的知名度が低い ICCR とは、厚生労働省、米国医薬食品庁 (FDA: Food and Drug Administration)、カナダ厚生省 (Health Canada) および欧州委員会企業産業総局により 2007 年 9 月に設立された化粧品規制のための国際的な協力会議である。その具体的な議題の一つとして、EU の動物実験事情に国際的に対応するため、「化粧品成分の安全性評価と代替法」が挙げられている²⁹⁾。

2.4 代替法のための国際機関

代替法の開発の中で、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 2005 年に発行された OECD ガイドンス文書 (Guidance Document: GD) No. 34 である³⁰⁾。この文書の中には、今後、新規試験法が公定化される場合のバリデーションや第三者評価に関する手順、手法が記載されている。すなわち、図 2 に示すように³¹⁾、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ければいけない。ところが、図 1 に示すように、バリデーションや第三者評価を実施すると言っても、正確性や再現性の確認に種々の過程を要する。ましてやバリデーションの実施や実行委員会の構築にはノウハウが多い。第三者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、このガイドンスに先立ち、世界各地にバリデーションセンターが設立された。1990 年代に米国では NICEATM (The National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) / ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of

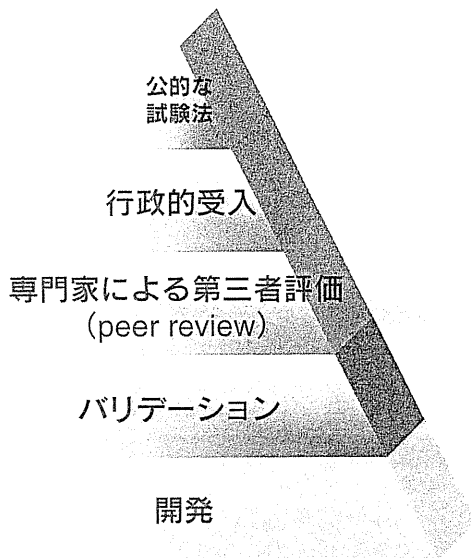


図 2. 公的な試験法ができるまで

Alternative Methods)³²⁾、欧州には ECVAM が設立された²⁰⁾。これらのセンターの役割はそれぞれ法律で規定されており、代替法への関与を肅々と進めている。さらに、遅れて 2009 年には韓国³⁹⁾とブラジル³⁴⁾にもバリデーションセンターが設立された。いよいよ国際的なバリデーションセンター時代の幕開けである。これらセンターの混乱を避ける理由もあり、2009 年 4 月には代替試験法協力国際会議 (ICATM: International Cooperation on Alternative Test Methods) が設立され³⁵⁾、代替法の開発に国際協調の重要性が謳われている。この ICATM が設立された理由は、限られた人的・物量的な資源の中、それぞれのセンターが重複した検討を避け、代替法研究を加速することにある。

ただ、欧米のセンターは米国の Alternative Research & Development Foundation³⁶⁾、CAAT (Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing)³⁷⁾ や EU 内の各国の専門機関 FRAME (Fund for

the Replacement of Animals in Medical Experiments)³⁸⁾、NCA (Netherlands Center for Alternatives to animal use)³⁹⁾、NC3R (UK National Center for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research)⁴⁰⁾ や ZEBET (German Center for the Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments)⁴¹⁾、EPAA (European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing)⁴²⁾ というような歴史ある助成機関や代替法専門研究機関を下地にしており、我が国と研究者の層が違うことを認識しておかねばならない。

2.5 代替法に関する欧米の取り組み

2004 年以降、多くの代替法が OECD でテストガイドラインとして認められるようになった。表 1 に示すように、2001 年以降に認められた動物実験の 3R に関する試験法を示す。光毒性試験⁴³⁾、腐食性試験⁴⁴⁻⁴⁶⁾ などである。

化粧品規制を考慮に入れ、2008 年には、三つの局所刺激性試験のガイドライン案が OECD に提出された²⁹⁾。一つは培養表皮モデル EPISKIN を用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験である。ECVAM 科学諮問委員会 (ESAC: ECVAM Scientific Advisory Committee) の認証を経て⁴⁷⁾、EU から OECD に提出された。さらに、ESAC は他の培養表皮モデル EpiDerm や SkinEthics をも認証し⁴⁸⁾、これらを合わせ、2010 年にテストガイドライン No. 439 として承認されている⁴⁹⁾。

後の二つは眼刺激性試験代替法 BCOP (Bovine Corneal Opacity/Permeability Assay: 牛摘出角膜混濁試験) および ICE (Isolated Chicken Eye Assay: 鶏摘出眼球試験) である。いずれも腐食性・強い眼刺激性を検出できる方法として ICCVAM から提案され⁵⁰⁾、ECVAM も認証した⁵¹⁾。これら代替法は異例の早さで 2009 年 9 月に OECD テストガイドラインとなった^{52,53)}。昨今では、これらの素材に病理学的な評価を組合せ、弱い刺激性を評価しようというガイダンスが検討中である²⁹⁾。さらに、ECVAM では眼刺激性試験の代替法として、過去に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、蛍光物質放出およびマイクロフィジオロメーターの各試験) の回顧的なバリデーションを行い、ESAC は 2009 年 7 月、蛍光物質放出試験およびマイクロフィジオロメーター試験を限定的な使用で認証した⁵⁴⁾。これらの試験法は、OECD テストガイドラインとして検討されること

表 1 2001 年以降成立した動物実験 3R に関する OECD テストガイドライン (TG)

Method	International Acceptance
CORROSITEX Skin Corrosivity Test	OECD TG 435 (2006)
EpiSkin Skin Corrosivity Test	OECD TG 431 (2004)
EpiDerm Skin Corrosivity Test	OECD TG 431 (2004)
SkinEthic RHE Skin Corrosivity Test	OECD TG 431 (2004)
EST-1000 Skin Corrosivity Test	OECD TG 431 (2004)
Rat TER Skin Corrosivity Test	OECD TG 431 (2004)
<i>In vitro</i> reconstructed human epidermis test methods EpiDerm, EPISKIN, SkinEthic RHE	OECD TG 439 (2010)
3T3 NRU Phototoxicity Test	OECD TG 432 (2004)
Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method	OECD TG 437 (2009)
Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method	OECD TG 438 (2009)

Method	International Acceptance
Updated Murine local lymph node assay (LLNA) for skin sensitization (20% reduction)	OECD TG 429 (2010)
Reduced LLNA (rLLNA)	OECD TG 429 (2010)
Nonradioactive LLNA protocol, LLNA: BrdU-ELISA	OECD TG 442B (2010)
Nonradioactive LLNA protocol, LLNA: DA	OECD TG 442A (2010)
Up and Down Procedure (UDP)	OECD TG 425 (2001)
<i>In vitro</i> micronucleus test	OECD TG 487 (2010)
Fixed Dose Procedure (FDP)	OECD TG 420 (2001)
Acute Toxic Class Method (ATC)	OECD TG 423 (2001)
Inhalation toxicity - acute toxic class method	OECD TG 436 (2009)
Stably transfected human estrogen receptor- α transcriptional activation assay for detection of estrogenic agonist-activity of chemicals	OECD TG 455 (2009)

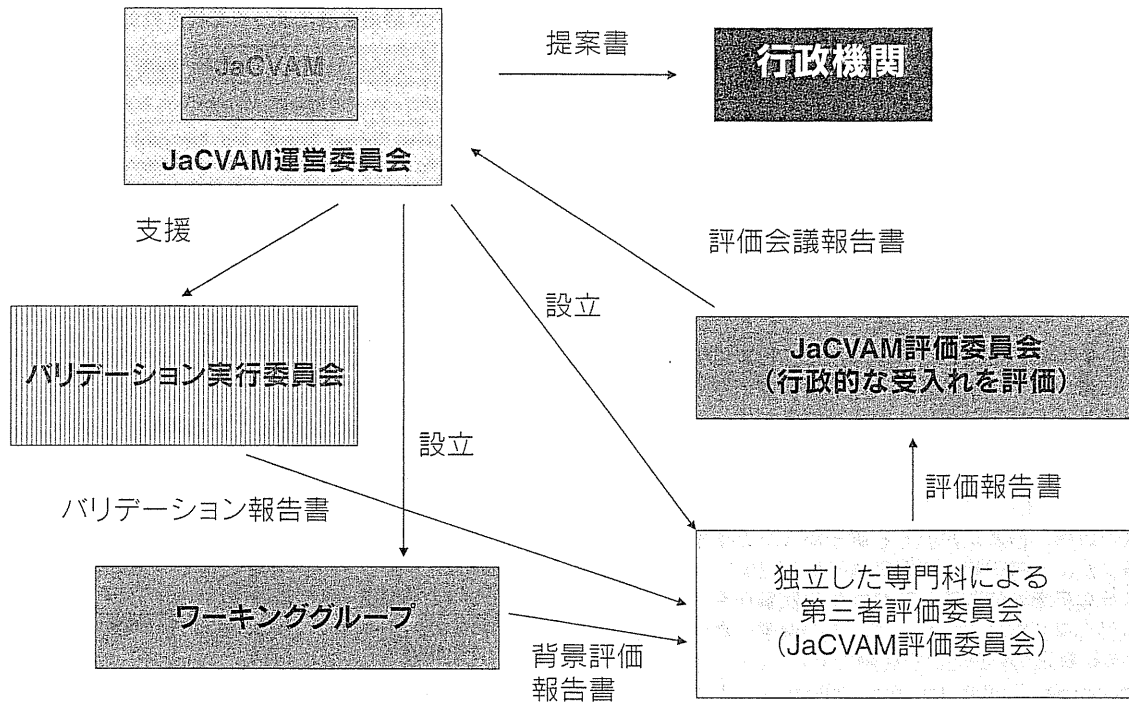


図 3. JaCVAM の試験法評価システム

が 2010 年 3 月に決まっている²³⁾。なお、次のステップとして、EpiOcular、SkinEthics などの培養角膜モデルのバリデーションが進捗中である。

もう一つの開発を急がねばならない代替法である急性毒性試験については、ICCVAM から細胞毒性試験で急性毒性試験の最高適用濃度を定めるという第三者評価報告書⁵⁵⁾が 2009 年、OECD に提案され、2010 年にガイダンスとして承認されている⁵⁶⁾。

また、*in vitro* 皮膚感受性試験代替法のプレバリデーションが ECVAM で始まった²⁰⁾。本試験の代替法として、ペプチド結合試験⁵⁷⁾および細胞株を用いた試験が挙がっており⁵⁸⁻⁶⁰⁾、株式会社資生堂および花王株式会社が日本化粧品工業連合会の有志や COLIPA の協力を得て開発を進めてきたヒト細胞株活性化試験 (Human Cell Line Activation Test : h-CLAT) をも含めた検討が、2010 年 3 月に開始された²³⁾。

一方、10 年以上前に問題となった環境ホルモンの検出 (スクリーニング) を指標としたガイドラインが Stably Transfected Human Estrogen Receptor-alpha Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist (STTA) NO.455 が 2009 年に成立し⁶¹⁾、H295R Steroidogenesis Assay の成立が 2011 年に予定されている²³⁾。

繰り返しになるが、これら試験法の開発を支えているものは、EU や米国における研究資金である。EPAA という政府と産業界が資金を出し合う団体にて、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している⁴²⁾。また、動物愛護国際協会 (Humane Society International) の支援も貢献度が高い⁶²⁾。現在でも、これら団体等により EU での第 7 次の研究支援がな

されており、さらに AXLR8 (accerate) という第三者評価により、研究が推進されている⁶³⁾。

一方、米国においても、NAS は 21 世紀の毒性試験の中で、“包括的な *in vitro* 試験の利用は、ヒトの生物学に基づいた細胞や分子システムと関連する生物学的挙動を明確にし、最終的には、作用機構を基にしたアプローチにより、動物実験の必要性を排除できるかもしれない”と述べている⁶⁴⁾。

また、米国毒性プログラム (NTP : National Toxicology Program) により開発およびバリデートされた試験方法は動物実験の 3R を可能にする。NTP のロードマップの活動と試験法は、規制当局への価値を最大化するため、ICCVAM との協力および協議を促すと述べている⁶⁵⁾。さらに、米国環境省 (EPA : Environmental Protection Agency)、米国環境健康科学研究所 (NIEHS : National Institutes of Environmental Health Sciences)、米国衛生研究所 (NIH : National Institutes of Health) / 米国ヒトゲノム研究所 (NCGC : NIH Chemical Genomics Center) および FDA が進めている ToxCast というプロジェクトでは⁶⁶⁾、化学物質のリスク評価のためのツールとして、ハイスループットシステムを検討している。特に、EPA の戦略では、1) 将来の化学物質のスクリーニングや優先順位付けのための毒性経路情報の利用、2) リスク評価における毒性経路情報の利用、3) 技術移転を主眼としている。

3. 国内の動向 -2-

さて、欧米の状況から世界の潮流を理解して頂いたところで、もう一度、国内の動向、特に代替法に特化して説明していきたい。

3.1 日本動物実験代替法学会の動向

日本動物実験代替法学会は⁶⁷⁾、設立されて20年を越える世界で初めて設立されたの代替法に関する学会である。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ついてバリデーションや第三者評価を行ってきた⁶⁸⁾。これらの内容はレベルの高いものであり、欧米での評価は高い。

2007年8月に第6回国際動物実験代替法会議(6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences: WC6)⁶⁹⁾、2008年2月にWC6フォローアップをいずれも東京で開催し⁷⁰⁾、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い。大会の内容も世界のトップレベルに近いものであったと感じている。ただし、残念ながら、日本は世界の代替法研究の中心にはいない。よって、その情報は欧米から遠く、高い代替法開発の技術を持ちながら、その技術を利用して、世界のニーズに対応させるという戦略が欠けているようである。

3.2 代替法のための機関

欧米の組織と同様、日本においても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⁷¹⁻⁷⁴⁾。この部署の業務の一つが新規または改良試験法の評価という活動である。この活動を我々はJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)と呼んでいる⁷⁵⁾。JaCVAMの活動目的は、1)日本における動物実験の3Rの普及、2)国際協調を重視した新規動物実験代替法の公定化である。その試験法検証のための組織を図3に示す。試験法毎にバリデーション、ワーキンググループ、第三者評価の組織を構築し、それらの報告書を受け、行政的な受入れ評価を行い、公定化に支障のない試験法を行政機関に提案している。残念ながら、JaCVAMは欧米のセンターのような法的な裏付けを持たず、持続的な活動ではない。しかし、ICATMの主要メンバーとして国際的な期待および、その評価は高い。これは、日本人の本分野における活躍への期待が大きいからと認識している。具体的に言えば、試験法の開発・改良、バリデーションへの参画は日本人に向いており、現時点では研究者層は薄くとも、代替法研究の加速を期待させるからと感じている。

3.3 JaCVAMの活動

3Rの国際動向に応えるため、JaCVAMでは、眼刺激性、皮膚刺激性、感作性、光毒性試験などの代替法について、日本独自のバリデーションや第三者評価を実施してきた。これまでJaCVAMが承認し、行政に提案した試験法を表2にまとめた。また、現在関与しているバリデーションを表3に記載した。これらの情報はJaCVAMホームページで逐次更新しており、最新情報を入手してほしい⁷⁶⁾。以下には昨今、大きな進捗がある安全性試験法を紹介する。

1) 腐食性、皮膚刺激性試験

腐食性試験の代替法として、日本製の培養皮膚モデル Vitrolife-Skinの正当性をJaCVAM評価会議が認証した⁷⁸⁾。

また、皮膚刺激性試験の代替法としてESACにより認証された培養表皮モデルEPISKINについて⁴⁷⁾、JaCVAM皮膚刺激性評価委員会がESACの認証内容を確認し、JaCVAM評価会議が認証した⁷⁷⁾。一方、日本製の培養表皮モデルLabCyte EPI-MODEL(株式会社J-TEC)については⁷⁹⁾、2008-2009年に日本動物実験代替法学

表2 JaCVAM 評価会議によって認証された動物実験代替法

No.	Test Method
1	<i>In vitro</i> skin corrosion testing : Vitrolife-Skin, EpiDerm
2	The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants
3	The Isolated Chicken Eye (ICE) for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants
4	Skin sensitization assay, LLNA : DA
5	Skin sensitization assay, LLNA : BrdU-ELISA
6	<i>In vitro</i> skin irritation testing : EPISKIN

表3 JaCVAM が実験に参加している国際バリデーション研究

試験法	終了予定時期	参加施設	目標
遺伝毒性試験 <i>in vivo</i> コメットアッセイ	2011 年秋	14 施設 (内、日本からは 4 施設)	OECD テストガイドライン
遺伝毒性試験 <i>in vitro</i> コメットアッセイ	不明	7 施設 (内、日本からは 1 施設)	OECD テストガイドライン
発癌性試験スクリーニング Bhas 形質転換試験	2010 年 10 月 終了	3 施設 (すべて国内)	OECD テストガイドライン
内分泌かく乱試験スクリーニング STTA-antagonist アッセイ	2011 年 3 月	3 施設 (内、日本から 2 施設)	OECD テストガイドライン
内分泌かく乱試験スクリーニング CCi アッセイ	2011 年 1 月	3 施設 (内、日本から 1 施設)	OECD テストガイドライン
皮膚刺激性試験 LabCyte EPI-MOEDL	2010 年 12 月 終了	3 施設 (すべて国内)	OECD テストガイドライン
眼刺激性試験 STE 法	2010 年 12 月 終了	3 施設 (すべて国内)	未定
光毒性試験 ROS アッセイ	2011 年	未定 (すべて国内)	ICH ガイドライン
皮膚感作性試験 h-CLAT	2011 年	4 施設 (内、日本から 2 施設)	EU 認証

会で実施されたバリデーションおよび2010年のJaCVAM主導の追加バリデーションにおいて、EPISKINと同程度の予測性を持つことが検証された。LabCyte EPI-MODELについてはOECDガイドラインへの掲載を目指している。

2) 眼刺激性試験

BCOPやICEについても、JaCVAM眼刺激性評価委員会がICCVAMの認証内容を確認し、JaCVAM評価会議が認証した⁸⁰⁾。さらに、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ドランス」について^{79,80)}、上記評価委員会にて第三者評価が進行している。また、株式会社花王で開発された細胞毒性試験STE(Short Time Exposure)⁸¹⁾のバリデーションが日本動物実験代替法学会およびJaCVAM主催で実施された。

3) 感作性試験

日本が提案したリンパ節中のATP量の変化を指標としたLLNA-DA法⁸²⁾やBrdUの取り込みを指標としたLLNA-BrdU ELISA法⁸³⁾が、JaCVAM評価会議で認証されるとともに^{84,85)}、2010年にOECDテストガイドラインとなった^{86,87)}。一方、前述したよう

に、h-CLAT^{58,59)}のバリデーション研究をECVAMとともに実施している。

4) 光毒性試験

活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) を指標とした光毒性試験が光毒性の予測に有用であるとの報告を受け⁸⁸⁾、日本製薬工業会の支援を受け、バリデーションを実施している。なお、資生堂株式会社にて酵母・赤血球を用いた光毒性試験の組合せ法は⁸⁹⁻⁹¹⁾、JaCVAM 評価会議でバリデーション結果が不十分と判断されている⁹²⁾。

5) 遺伝毒性試験

コメットアッセイについては⁹³⁾、日本環境変異原学会/哺乳類変異原性(MMS)研究会、欧米の研究機関と協力して国際的なバリデーションを進めている。*in vivo* 試験に関しては、最終的なバリデーションの段階にある。*in vitro* 試験に関しては、プロトコルを固めるプレバリデーションの段階にある。

また、イニシエーションに加え、プロモーターも検出できる形質転換試験法 Bhas アッセイについては⁹⁴⁾、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)プロジェクトでバリデートされ、OECD にテストガイドラインとしての申請を行っている²³⁾。

6) 内分泌かく乱物質スクリーニング

前述したテストガイドライン STTA 法は⁶¹⁾、化学物質評価研究機構(CERI)によって開発された。現在では、このテストガイドラインにアンタゴニストの評価系も加えるべく、バリデーションを実施している。

また、同様に CERI および大塚製薬株式会社によって開発されたアンドロゲンの検出試験においても、テストガイドライン案を OECD に提出している²³⁾。

7) 急性毒性試験

日本薬局方には、プラスチック容器の品質管理のため、急性毒性試験に代わり、細胞毒性試験を推奨している⁹⁵⁾。さらに、ゴム製品の品質管理のために細胞毒性試験の利用を検討している⁹⁶⁾。

8) 発熱性物質試験

欧州薬局方 (European Pharmacopoeia: EP) に掲載された主にヒト血液を用いる *in vitro* 試験に関しては⁹⁷⁾、バリデーション結果が不十分と、ICCVAM⁹⁸⁾ および JaCVAM 評価会議で判断されている⁹⁹⁾。

4. 終わりに

動物福祉問題イコール、3R である。ただ、実験動物に携わる方々とお話して感じて居るのは、3R を持ち出せば、とりあえず既得権を確保できる、免罪符という発想である。確かに、獣医師も Refinement の面では福祉的な配慮をされているが、削減や置換えの知識やその方策を全くお持ちでないことに愕然とする。上記してきたように、公定な代替法の開発には多額の経費と長い時間が掛かることさえも知らない方が多い。欧米の追従でなく、「動物実験 3R は日本にとって得意芸に近い分野であり、国際的な信用を高め、ビジネスチャンスをつかむ好機である」というように発想を変えて頂きたいものである。欧米の期待を横目で見ながら、手を拱いている時間はない。既存の殻を破るため、皆さんの技術を世界に広めるために、今後も JaCVAM 活動に努めてきたいと考えている。

謝辞

バリデーションを進めるにあたり、日本動物実験代替法学会、厚生労働科学研究からの支援に感謝致します。また、試験法の評価に協力頂きましたすべての JaCVAM 関係者に感謝致します。

[参考文献]

- 1) 動物の愛護及び管理に関する法律 (2010) Available at: 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 (2006) Available at: http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law_series/nt_h180428_88.html
- 3) 動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針 (2006) Available at: http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/2_data/laws/guideline_h181031.pdf
- 4) 文部科学省 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 (2010) Available at: http://www.mext.go.jp/b_menu/hakusho/nc/06060904.htm
- 5) 厚生労働省 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 (2010) Available at: <http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/dobutsu/0606sisin.html>
- 6) 農林水産省 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 (2010) Available at: http://www.maff.go.jp/www/press/2006/20060601press_2b.pdf
- 7) 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 (2010) Available at: <http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-20-k16-2.pdf>
- 8) 重茂浩美, "動物実験に関する近年の動向、科学技術動向", 2006, 10-20.
- 9) 中央環境審議会動物愛護部会 (2010) Available at: <http://www.env.go.jp/council/14animal/yoshi14.html>
- 10) 鍵山直子, "動物愛護管理法における 3R 原則の明文化と実験動物の適正な飼養保管", 日獣誌, 2010, 395-398.
- 11) AAALAC International Association (2010) Available at: <http://www.aaalac.org/>
- 12) 佐々木弥生 (2008) Available at: http://www.soc.nii.ac.jp/jsaae/WC6_followup/WC6_Follow_Sasaki.pdf
- 13) 大学法人動物実験施設協議会 (2010) Available at: <http://www.kokudoukyou.org/annai/>
- 14) 日本動物実験協同組合 (2010) Available at: <http://www.labanimal.org/freme.html>
- 15) United Kingdom Protection of Animals Act (2000) Available at: <http://www.veggieglobal.com/protection-of-animals-act-uk.htm#2000>
- 16) Update on the revision of EU lab animal laws (2010) Available at: <http://www.rspca.org.uk/ImageLocator/LocateAsset?asset=document&assetId=1232720902775&mode=prd>
- 17) 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, SEC82004)1210 (2004).
- 18) ECH (2008) Available at: http://ec.europa.eu/echa/home_en.html
- 19) COLIPA (2010) Available at: <http://www.colipa.eu/about-colipa-the-european-cosmetic-cosmetics-association.html>
- 20) ECVAM (2010) Available at: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>
- 21) T. Hartung, (2006) Available at: <http://www.soc.nii.ac.jp/jsaae/20kai.html>
- 22) JRC (2010) Available at: http://www.vet.uu.nl/nca/userfiles/other/REACH_and_the_need_for_intelligent_testing_strategies.pdf#search=Integrated%20Testing%20Strategies%20REACH
- 23) OECD (2010) Available at: http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

- 24) Animal Welfare Act, Available at: http://awic.nal.usda.gov/nal_display/index.php?info_center=3&tax_level=3&tax_subject=182&topic_id=1118&level3_id=6735&level4_id=0&level5_id=0&placement_default=0
- 25) Health Research Extension Act, Available at: <http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/hrea1985.htm>
- 26) ILRA (2010) Available at: <http://dels.nas.edu/ilar/>
- 27) OIE (2010) Available at: http://www.oie.int/eng/bien_etre/en_introduction.htm
- 28) Y. Ohno, *ILAR Journal*, **2002**, *43*, s95-98.
- 29) 厚生労働省 (2010) Available at: <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/08/h0814-1.html>
- 30) OECD (2005) 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
- 31) ICCVAM (1997) Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods: a report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. *NIH Publication* No: 97-3981, 1997, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)
- 32) ICCVAM (2010) Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/EPReport/ocu_report.htm
- 33) KoCVAM (2010) Available at: <http://www.nifds.go.kr/nitr/contents/m91100/view.do>
- 34) O. A. Presgrave, *Altern Lab Anim.*, **2008**, *36*(6), 705-8.
- 35) ICATM (2010) Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/about/icatm.htm>
- 36) Alternative Research & Development Foundation (2010) Available at: <http://www.ardf-online.org/>
- 37) CAAT (2010) Available at: <http://caat.jhsph.edu/>
- 38) FRAME (2010) Available at: <http://www.frame.org.uk/>
- 39) NCA (2010) Available at: <http://www.nca-nl.org/>
- 40) NC3R (2010) Available at: <http://www.nc3rs.org.uk/>
- 41) ZEBET (2010) Available at: <http://www.bfr.bund.de/cd/1591>
- 42) EPA (2010) Available at: http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index_en.htm
- 43) OECD (2004) Test Guideline NO. 432: *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity testing. OECD Guideleline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 44) OECD (2004) Test Guideline No. 430: *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER), OECD Guideleline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 45) OECD (2004) Test Guideline No. 431: *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideleline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 46) OECD (2006) Test Guideline No. 435: *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideleline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 47) ECVAM (2007) Statement on the validity of *in-vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>
- 48) ECVAM (2008) Statement on the scientific validity of *in-vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Available at: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>
- 49) OECD (2010) Test Guideline No. 439: *In Vitro* Skin Irritation *Reconstructed Human Epidermis Test Method*, OECD Guideleline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 50) ICCVAM (2010) Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ocutox.htm>
- 51) ESAC (2009) Statement on the Conclusions of the ICCVAM Retrospective Study on Organotypic *In Vitro* Assays as Screening Tests to Identify Potential Ocular Corrosives and Severe Irritants.
- 52) OECD (2010) Test Guideline No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, OECD Guideleline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 53) OECD (2010) Test Guideline No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, OECD Guideleline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 54) ESAC (2009) ESAC statement on the scientific validity of two *in vitro* eye irritation test methods.
- 55) ICCVAM (2010) Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/acutetox.htm>
- 56) OECD (2010) No 129: Guidance Document on using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests, OECD Guideleline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 57) G. F. Gerberic, J. D. Vassallo, R. E. Bailey, J. G. Chaney, S. W. Morral and J. P. Lepoittevin, *Toxicol. Science*, **2004**, *81*, 332-343.
- 58) T. Ashikaga, Y. Yoshida, M. Hirota, K. Yoneyama, H. Itagaki, H. Sakaguchi, M. Miyazawa, Y. Ito, H. Suzuki and Toyoda, *Toxicol in Vitro*, **2006**, *20*, 767-773.
- 59) H. Sakaguchi, T. Ashikaga, M. Miyazawa, Y. Yoshida, Y. Ito, K. Yoneyama, M. Hirota, H. Itagaki, H. Toyoda and H. Suzuki, *Toxicol in Vitro*, **2006**, *20*, 774-784.
- 60) P. Aeby, T. Ashikaga, S. Bessou-Touya, A. Schepky, F. Gerberick, P. Kern, M. Marrec-Fairley, G. Maxwell, J. M. Ovigne, H. Sakaguchi, K. Reisinger, M. Tailhardat, S. Martinozzi-Teissier and P. Winkler, *Toxicol in Vitro*, **2010**, *24*(6), 1465-73.
- 61) OECD (2009) Test Guideline Test No. 455: The Stably Transfected Human Estrogen Receptor-alpha Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist-Activity of Chemicals, OECD Guideleline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 62) Humane Society International (2010) Available at: <http://www.hsi.org.au/>
- 63) AXLR8 (2010) Available at: <http://www.axlr8.eu/workshops/>
- 64) National Research Council (2007) Toxicity Testing in the 21st century, A vision and a strategy, The National Academies Press, Washington, D.C., USA
- 65) A National Toxicology Program for the 21st century (2010) Available at: <http://ntp.niehs.nih.gov/files/NTPrdmp.pdf>
- 66) ToxCast (2010) Available at: <http://www.epa.gov/ncct/toxcast/summit.html>
- 67) 日本動物実験代替法学会 (2010) Available at: <http://www.asas.or.jp/jsaa/>
- 68) 小島肇夫, *LAB/O21*, **2009**, *38*, 17-20.
- 69) Proceedings of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, *Altern. Animal Test. EXperiment*, **2008**, *14*, Special Issue.
- 70) 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).
- 71) 大野泰雄, 国立衛研報, **2004**, *122*, 1-10.
- 72) 小島肇夫, 化粧品技術者会誌, **2006**, *40*(4), 263-268.
- 73) 小島肇夫, 薬学雑誌, **2008**, *128*(5), 747-752.
- 74) 小島肇夫, コスメティックステージ, **2010**, *4*(5), 56-61.
- 75) JaCVAM (2010) Available at: <http://jacvam.jp/>
- 76) JaCVAM 提案書 (2008) 腐食性試験代替法: 「3次元培養ヒト皮膚モデル (Vitrolife-skinTM) を用いた腐食性試験」.
- 77) JaCVAM 提案書 (2009) 皮膚刺激性試験代替法: 「ヒト皮膚モデル (三次元皮膚 EPISKIN) を用いた皮膚刺激性試験代替法」.
- 78) M. Katoh, F. Hamajima, T. Ogasawara and K. I. Hata, *Journal of Toxicological Science*, **2009**, *34*(3), 327-334.
- 79) Y. Ohno, et al., *Toxicology in Vitro*, **1999**, *13*, 73-98.
- 80) 大野泰雄 他, *Altern. Animal Test. EXperiment*, **2005**, *10*(2), 54-157.
- 81) Y. Takahashi, M. Koike, H. Honda, Y. Ito, H. Sakaguchi, H. Suzuki and N. Nishiyama, (2008) *Toxicology in Vitro*, **2008**, *22*, 760-770.
- 82) K. Yamashita, K. Idehara, N. Fukuda, M. Yamagishi and N. Kawada,

- Altern. Animal Test. Experiment*, **2005**, 11(2), 136-144.
- 83) M. Takeyoshi, K. Yamasaki, Y. Yakabe and I. Kimber, *Toxicol. Lett.*, **2001**, 119, 203-208.
- 84) JaCVAM 提案書(2008)皮膚感作性試験代替法:「皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA法)」
- 85) JaCVAM 提案書(2009)皮膚感作性試験代替法:「皮膚感作性試験代替法(LLNA-BrdU)」
- 86) OECD (2010) Test Guideline Test No. 442A: Skin Sensitization *Local Lymph Node Assay: DA*, OECD Guideleins for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 87) OECD (2010) Test Guideline Test No. Test No. 442B: Skin Sensitization *Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA*, OECD Guideleins for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 88) S. Onoue, N. Igarashi, Y. Yamauchi, S. Yamada and Y. Tsuda, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2008**, 46(1), 187-93.
- 89) M. Sugiyama, H. Itagaki, T. Hariya, N. Murakami and S. Kato, *Altern. Animal Test. Experiment*, **1994**, 2, 183-191.
- 90) M. Sugiyama, H. Itagaki and S. Kato, (1994) *Altern. Animal Test. Experiment*, **1994**, 2, 193-202.
- 91) M. Mori, M. Hoya, M. Sugiyama and H. Itagaki, *Altern. Animal Test. Experiment*, **2003**, 10(1), 1-17.
- 92) JaCVAM 評価報告書 (2010) 光毒性試験代替法:「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶性試験の組み合わせによる光毒性試験代替法」
- 93) R. R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. C. Ryu, Y. F. Sasaki, *Environ Mol Mutagen.*, **2000**, 35(3), 206-21.
- 94) A. Sakai, C. Suzuki, Y. Masui, A. Kuramashi, K. Takatori and N. Tanaka, *Mutat Res.*, **2007**, 630(1-2), 103-11.
- 95) 柘植英哉, 森 充生, 大庭澄明, 大内 正, 寺田三郎, 五島隆志, 田邊豊重, 山影康次, 田中憲穂, 渡辺美香, 畔上二郎, 大向英夫, 小島 肇, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2011.
- 96) 厚生省薬務局医療機器開発課監修, 「医療用具および医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン解説」, 薬事日報社, 東京, 1996.
- 97) Bacterial Endotoxin, European Pharmacopoeia 5.0, **2005**, 161-168.
- 98) ICCVAM (2010) Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/pyrogen/pyrogen.htm>
- 99) JaCVAM 評価報告書 (2010) *in vitro* 発熱性物質試験.

略歴

名前: 小島 肇(ペンネーム: 小島 肇夫) Hajime Kojima, Ph.D.
 学位: 薬学博士
 所属・役職: 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
 藤田保健衛生大学 医学部 客員講師
 連絡先: 〒 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1
 TEL: 03-3700-9874 FAX: 03-3700-1145
 e-mail: h-kojima@niehs.go.jp

生年月日: 昭和 35 年 4 月 9 日生 (50 歳)

略歴: 昭和 58 年 岐阜大学・農学部農芸科学科卒業
 同年 日本メナード化粧品株式会社入社
 昭和 59 ~ 61 年 国立遺伝学研究所・形質遺伝部留学
 平成 8 年 長崎大学薬学部にて博士号取得
 平成 17 年 国立医薬品食品衛生研究所 入所

専門: 毒性学、変異原性、組織培養

学会活動:

- ・日本動物実験代替法学会 評議員、理事、副会長
- ・日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 評議員
- ・日本環境変異原学会 評議員
- ・日本トキシコロジー学会
- ・安全性評価研究会
- ・日本動物細胞工学会
- ・Society of Toxicology

国際協力

- ・ESAC (ECVAM: European Center for the Validation of Alternative Methods Scientific Advisory Committee), observer
- ・SACATM (Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, USA), observer
- ・ICH Center for the Validation Alternative Methods, observer
- ・ICCR Center for the Validation Alternative Methods, observer
- ・OECD Endocrine Disrupter Working Group, non-animal, observer
- ・OECD Test Guideline, National Coordinator

賞罰

- ・日本動物実験代替法学会 1998 年論文賞受賞
- ・日本動物実験代替法学会 2000 年論文賞受賞
- ・日本動物実験代替法学会 2003 年論文賞受賞

Short communication

Validation of a Simple *In Vitro* Comet Assay Method Using CHL Cells

Aoi Kimura^{1 to 4}, Naohiko Torigoe¹, Atsuro Miyata² and Masamitsu Honma³

¹Drug Safety Research Laboratories, Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., Kagoshima, Japan

²Functional Biology and Pharmacology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, Kagoshima, Japan

³Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

(Received June 30, 2010; Revised August 5, 2010; Accepted August 6, 2010)

The comet assay has been widely used as a genotoxicity test *in vitro/vivo* for detecting initial DNA damage in individual cells. One of the difficulties of the assay is slide preparation, for which agarose top and bottom layers and a cell-containing middle layer are needed to immobilize the cells. To establish a practical methodology while maintaining sensitivity and reproducibility, we assessed a simple comet assay method with a hydrophilic slide glass (MAS-coat type, Matsunami glass Ind., Ltd.) instead of an agarose bottom layer. Ethyl methanesulfonate (EMS), mitomycin C (MMC), and *N*-nitroso dimethylamine (DMN) as genotoxic chemicals and triton X-100 (TRX) as a non-genotoxic chemical were used for validation of this method. Chinese hamster lung (CHL) cells were used. The results showed that EMS and DMN induced a significant increase in tail intensity. However, MMC, a known interstrand cross-linker, did not increase tail intensity, and it was considered that this was because MMC-induced DNA-DNA crosslinks prevent separation of the DNA duplex. TRX did not increase tail intensity. These results are consistent with previous reports and demonstrate that the simple comet assay can clearly detect genotoxicity of chemicals other than interstrand cross-linkers.

Key words: *in vitro* comet assay, CHL cells

Introduction

The single cell gel electrophoresis (SCGE) assay, also known as the comet assay, was introduced by Ostling and Johanson (1) and independently modified by Singh *et al.* (2) and Olive *et al.* (3). The comet assay requires less time than genotoxicity tests with different end points, such as chromosome structural abnormalities and base sequence mutation. The assay requires only small amounts of tissue, not a large number of cells, and is applicable to a variety of eukaryotic cells and organs. It is expected to become the most useful method for detecting DNA damage. One of the difficulties of the comet assay is, however, slide preparation, for which agarose top and bottom layers and a cell-containing

middle layer are needed to immobilize the cells. The comet assay results can depend on slide quality, but slide preparation is technically difficult and time-consuming, and therefore, establishment of a practical methodology that maintains sensitivity and reproducibility is desirable. To simplify the methodology, we used a hydrophilic slide glass instead of an agarose bottom layer, and no agarose top layer. Unlike conventional slide specimens which have three agarose layers (4), only one layer was used. The cells were fluorescently stained with SYBR-Gold and scored automatically by a Comet Assay IV (Version 4.11 and 4.2, Perceptive Instruments Ltd., Suffolk, UK) image analyzer.

In this study, a simple comet assay method was validated *in vitro* with genotoxic and non-genotoxic chemicals using Chinese hamster lung (CHL) cells. Known genotoxic chemicals, ethyl methanesulfonate (EMS) as an alkylating agent, mitomycin C (MMC) as a DNA replication inhibitor (cross-linker), and *N*-nitroso dimethylamine (DMN) which requires metabolic activation to form DNA adducts, were selected. Triton X-100 (TRX), a detergent was selected as the non-genotoxic chemical.

Materials and Methods

Cell line and culture conditions: An adherent cell line, CHL, was used. The cells were maintained in Eagle's MEM medium (GIBCO, Invitrogen Corp., CA, USA) supplemented with 10 vol% heat-inactivated bovine serum (GIBCO), 200 µg/mL sodium pyruvate, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. The cultures were incubated at 37°C, with 5% CO₂, and 100% humidity.

Test chemicals: EMS (CAS#62-50-0) and TRX

⁴Correspondence to: Aoi Kimura, Drug Safety Research Laboratories, Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., 2438 Miyanoura, Kagoshima 891-1394, Japan. Tel: +81-99-294-2600, Fax: +81-99-294-3619, E-mail: kimura-aoi@snbl.co.jp

(CAS#9002-93-1) were purchased from Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan). MMC (CAS#50-07-7) and DMN (CAS#62-75-9) were purchased from Kyowa Hakko Kogyo Co. (Tokyo, Japan) and Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), respectively. EMS was dissolved in DMSO (guaranteed grade, Wako) and the others in saline (medical use, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Tokushima, Japan) for use.

Treatment conditions: The cells were treated with test chemicals for 4 or 6 h at 37°C two days after seeding onto $5 \times 10^4/5$ mL/Petri dishes (6 cm diameter). Exogenous metabolizing systems are required to induce DMN genotoxicity. Rat liver S9 fraction (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) prepared from male Sprague-Dawley rats that had received a combination of intraperitoneal injections of phenobarbital and 5,6-benzoflavone to induce drug-metabolizing enzymes was used at a concentration of 5 vol% for the treatment medium.

MAS-coat type slide glass: Hydrophilic MAS-coat type slide glasses (Cat#TF0215M) were provided by Matsunami Glass Ind., Ltd. (Osaka, Japan, http://www.matsunami-glass.co.jp/english/index_e.html). The slide glass had 2-wells and their surfaces were treated with hydrophilic silane to promote agarose adherence. Water-repellent barrier was coated outside of the wells allowing easy application of the samples. It was originally developed for frozen sections of pathological tissue specimens.

Alkaline comet assay: Immediately after treatment of cells in Petri dishes with test chemicals, the medium was poured out and the cells were washed out once with phosphate buffered saline. CHL cells were then harvest-

ed by trypsinization and sampled into a new tube. The tube was centrifuged and the supernatant was removed. The cells were washed once with 1 mL of cold HBSS (Hanks' Balanced Salt Solutions, GIBCO) containing 20 mM EDTA and 10 vol% DMSO and re-suspended in 0.5 mL of the cold HBSS. In accordance with the method shown in Table 1, specimens were prepared using a MAS-coat type slide glass instead of the conventional agarose bottom layer (1,3,4). The cells were thoroughly mixed with 0.5 w/v% low-melting agarose and an aliquot of the mixture was spotted onto a slide glass. After the gel had completely solidified, the slide specimens were immersed in chilled lysing solution overnight in a refrigerator. The slide specimens were rinsed and left in the electrophoresis solution for 20 min to allow the duplex DNA to unwind before electrophoresis. The cells were stained by SYBR-Gold (Molecular Probes, Invitrogen Corp., CA, USA) and at least 100 cells per dose were examined under a fluorescence microscope (BX50 and BX51, Olympus Corp., Tokyo, Japan) connected to the comet assay scoring system and equipped with a U-MNIBA3 filter (excitation: 470-495 nm, absorbing: 510-550 nm, Olympus Corp., Tokyo, Japan). DNA damage was quantified automatically as tail intensity (percentage of DNA migrated from the nucleus to tail, taking DNA in the nucleus as 100%).

Statistical analysis: Significant differences in tail intensity between the chemical-treated group and the solvent-treated group were evaluated by Dunnett's multiple comparison test ($P < 0.05$).

Results and Discussion

EMS: EMS was examined at 6 dose levels, 62.5,

Table 1. A basic protocol for the simple comet assay method

Item		Procedure
Cell	Cell (A)	Cells in HBSS with 20 mM EDTA and 10 vol% DMSO [#] (pH 7.5)
Gel	Bottom layer (B)	MAS-coat type slide glass
	Cell-containing middle layer (C)	0.5 w/v% low-melting agarose in PBS
	Top layer	Nothing
Specimen		Mixture of (A):(C)=1:9 on (B)
Lysis	Solution	2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-base, 10 vol% DMSO [#] , and 1 vol% Triton X-100 [#] in ultrapure water (pH 10)
Rinse	Condition	Overnight in refrigerator (4°C)
	Solution	Ultrapure water
Electrophoresis	Condition	Flushing
	Solution	0.3 M NaOH and 1 mM EDTA in ultrapure water (pH > 13)
Neutralization	Condition	Unwinding: 20 min (< 10°C)
	Solution	Electrophoresis: 15 min at 0.3 A (< 10°C)
Dehydrization		0.4 M Tris-base in ultrapure water (pH 7.5) at least 5 min
Staining		Ethanol at least 5 min
Analysis (scoring)		SYBR-Gold for 10 min
	Software	Comet IV image analyzer
	Number Parameter	At least 100 cells per dose Tail intensity (%)

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solutions, #: Add just before use.

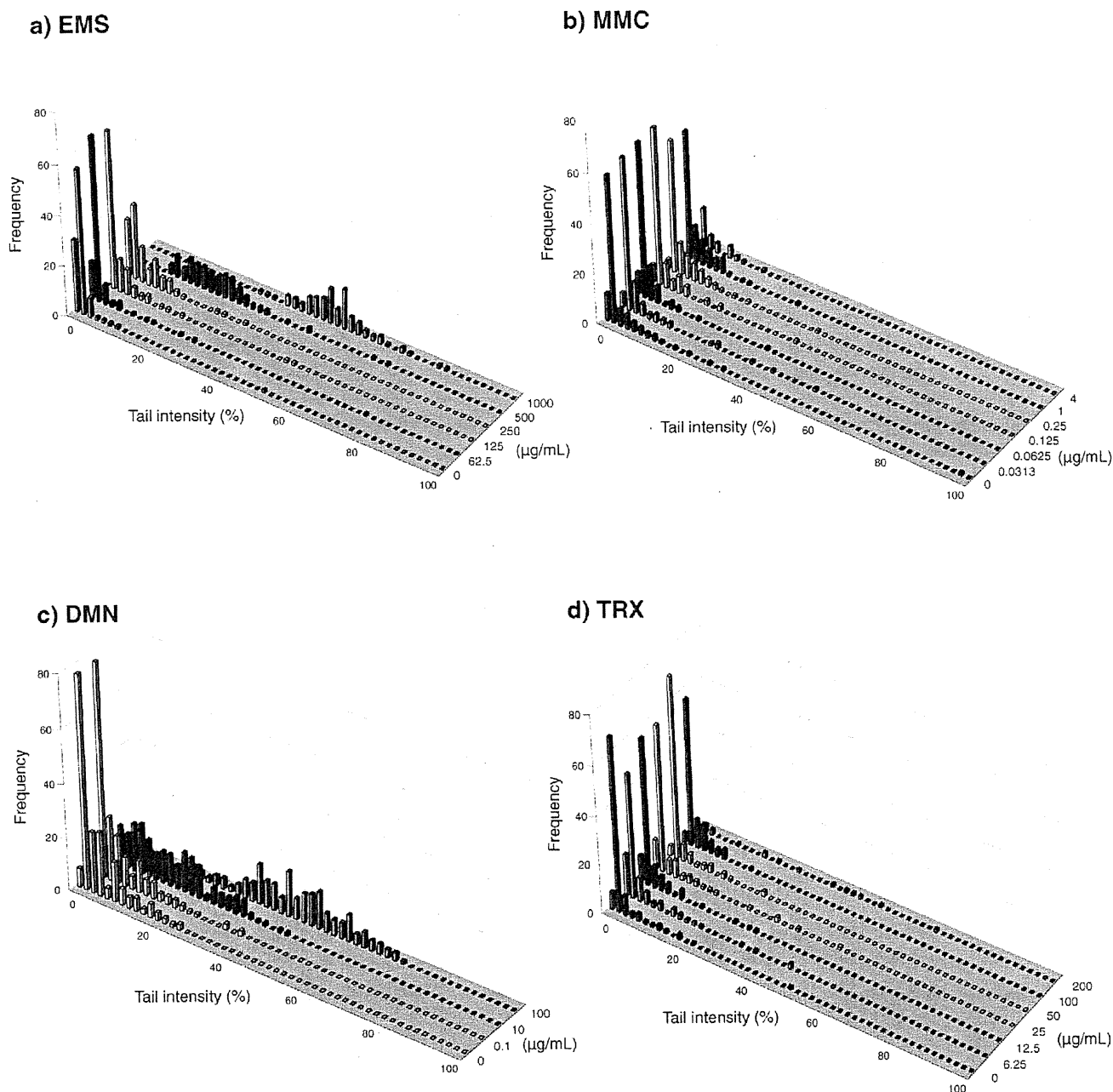


Fig. 1. Histogram of DNA damage induced in CHL cells after treatment with the test chemicals. CHL cells were treated with EMS (a), MMC (b), or TRX (d) for 4 h without metabolic activation, and were treated with DMN (c) for 6 h with metabolic activation. The distributions of tail intensity for 100 cells treated with EMS (a), MMC (b), or TRX (d) and for 200 cells treated with DMN (c) in each dose are shown.

125, 250, 500, 1000, and 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ without metabolic activation. The results of the comet assay (Fig. 1a and 2a) show a significant dose-related increase in tail intensity at 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and greater. At 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the highest dose level, the comet image could not be analyzed because all heavily damaged cells exhibited microscopic images of small or non-existent heads and large diffuse tails ("hedgehogs"). EMS is reported to be positive for the Ames assay, *in vitro* micronucleus test

using human lymphocytes, and *in vivo* unscheduled DNA synthesis (UDS) using mouse germ cells by TOXNET (Toxicology Data Network, <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>). It was also demonstrated that EMS was clearly positive in the comet assay using CHO cells (5).

MMC: MMC was examined at 6 dose levels, 0.0313, 0.0625, 0.125, 0.25, 1, and 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ without metabolic activation. The results of the comet assay (Fig. 1b and