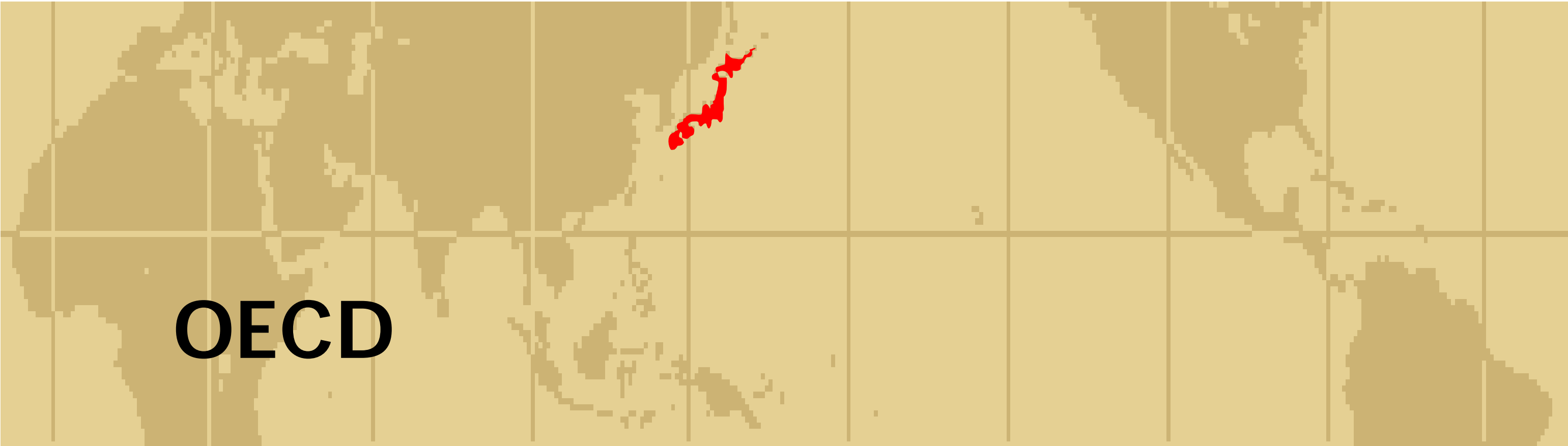
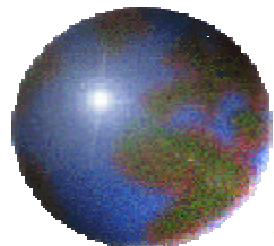


**日本動物実験代替法学会・JaCVAM合同ワークショップ**  
**動物実験の3Rにおける国際動向**

A world map with a grid overlay, rendered in a light tan color. The country of Japan is highlighted in a bright red color, positioned in the upper-middle part of the map.

**日本発の代替法の  
OECDテストガイドライン化への取り組み**

**坂口 斉 (花王株式会社)**



# 動物を用いない代替法研究の意義

## 動物愛護の面

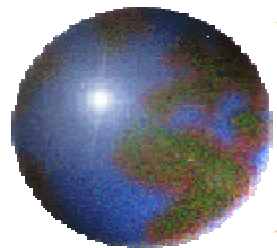
動物実験代替法への積極的な取り組みは社会的責任

## 法律への対応

EU化粧品指令 7次改正 (DIRECTIVE 2003/15/EC) の  
‘動物実験禁止’に向けた対応

## 原料・商品開発の効率化

原料探索スクリーニングの迅速化、労力、費用の低減  
(多数のサンプルを、少量で、短期間で評価)



# EU化粧品指令第7次改正のポイント



EU第7次  
改正発効

各国国内法施行期限

3/11

## 動物実験の禁止

製品 : 全面禁止  
 原料 : 皮膚腐食性  
           光毒性  
           経皮吸収性

## 動物実験の禁止

原料 : EU域内での動物実験禁止

## 販売の禁止

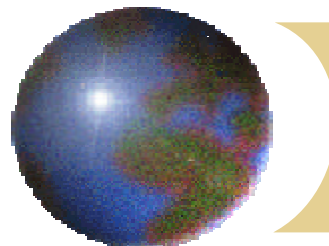
動物実験を行った製品の販売禁止  
 動物実験を行った原料 (例外を除く)  
 を含む製品の販売禁止

例外 : 皮膚感作性、反復毒性、  
 生殖毒性、薬物動態

## 販売の禁止

動物実験を行った原料を  
 含む製品の販売禁止

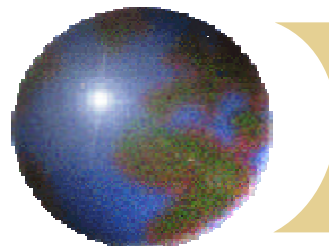
動物代替法技術の保有が必要条件



# 動物実験代替法開発状況

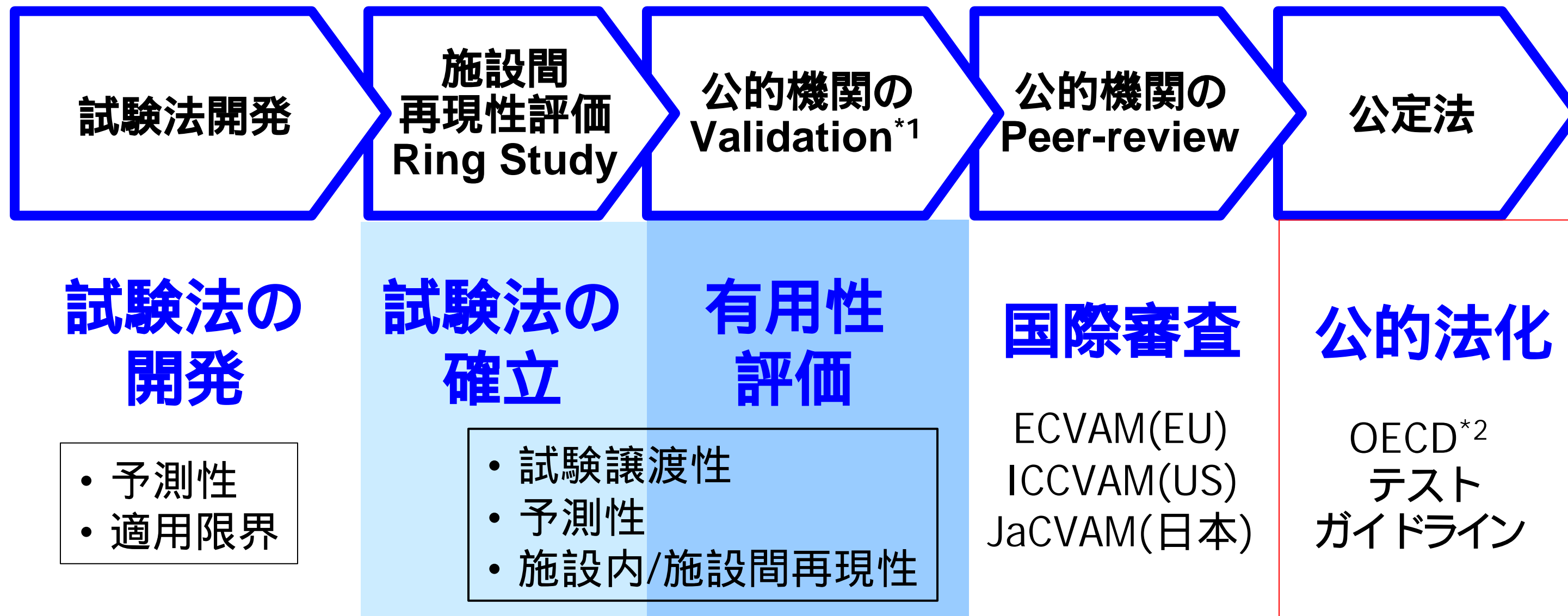
試験項目	公的代替法 (OECD*ガイドライン)	公的にはまだ受け入れられていない代替法 (バリデーション等は評価済み)
単回投与毒性	なし	細胞毒性試験
皮膚刺激性	3次元モデル	-
光毒性	3T3 NRU	酵母生育阻害試験、赤血球溶血試験
眼粘膜刺激性	摘出角膜・眼球試験 :強刺激性 蛍光漏出 (FL)試験法 (ドラフト) Cytosenser Microphysiometer(ドラフト)	細胞毒性試験(STE等)、3次元モデル、 卵しょう膜試験等
変異原性	Ames試験、染色体異常試験、 マウスリンフォーム試験、In vitro小核	
経皮吸収性	ヒト、ブタ皮膚を用いた試験	
皮膚感作性	なし	タンパク結合性試験(DPRA)、 ランゲルハンス細胞活性化試験(h-CLAT, MUSST等)
光感作性	なし	なし
反復投与毒性	なし	なし
繁殖生殖毒性	なし	ES細胞試験
発がん性	なし	なし

OECDガイドラインの代替法は一部の項目のみ



# OECD Test Guidelineまでの流れ

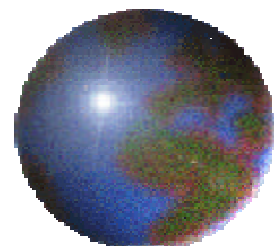
欧州代替法評価センターの資料を改変



**OECD TG化には、複数の施設との協調と長い年月が必要**

\*1 バリデーション(validation) : 複数の施設において、試験法の有用性、再現性などを確認するための試験

\*2 OECD : 経済協力開発機構



# OECD TGに必要な試験法としての要件

## Modular approach\*

### ■ Test definition

テストプロトコールとSOPなど

### ■ Predictive capacity

予測性

### ■ Applicability domain

適用限界

### ■ Transferability

譲渡性 (技術易習得性)

### ■ Within-laboratory variability

施設内再現性

### ■ Between-laboratory variability

施設間再現性

### ■ Performance standard

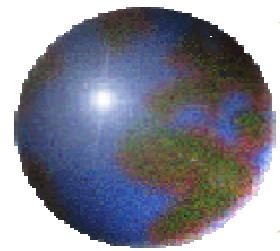
リファレンスとなる化合物

Relevance  
(正確性)

Reliability  
(再現性)

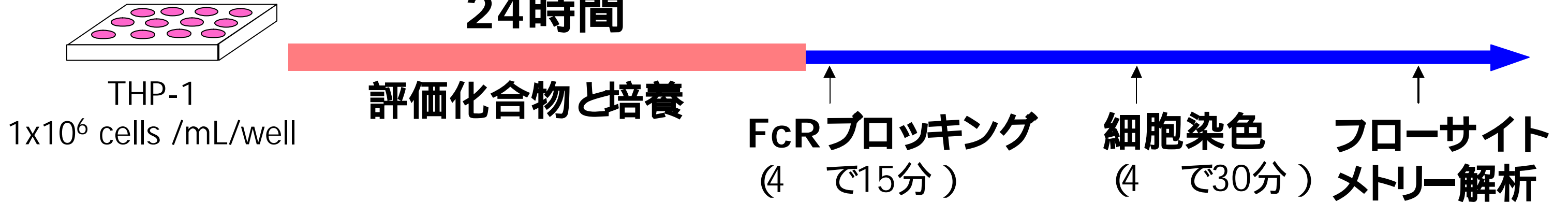
\*: Hartung et al., 2004 ATLA 32, 467-472.





# human Cell Line Activation Test (h-CLAT)

花王と資生堂による共同開発\*



- **試験濃度** : 予備試験から生存率が75%となる濃度 (CV75) を規定  
CV75を基準に前後に公比1.2で8濃度を設定



- **FcRブロッキング** : 0.01%のGlobulins Cohn fraction , , Human(SIGMA)
- **細胞染色** : 抗CD86抗体 FUN-1(BD PharMingen)、抗CD54抗体6.5B5 (DAKO)

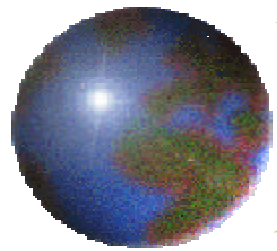
$$\text{相対発現量(\%)} = \frac{\text{被験物質処理細胞のMFI} - \text{被験物質処理細胞でのIsotype controlのMFI}}{\text{溶媒処理細胞のMFI} - \text{溶媒処理細胞でのIsotype controlのMFI}} \times 100$$

**(RFI)**

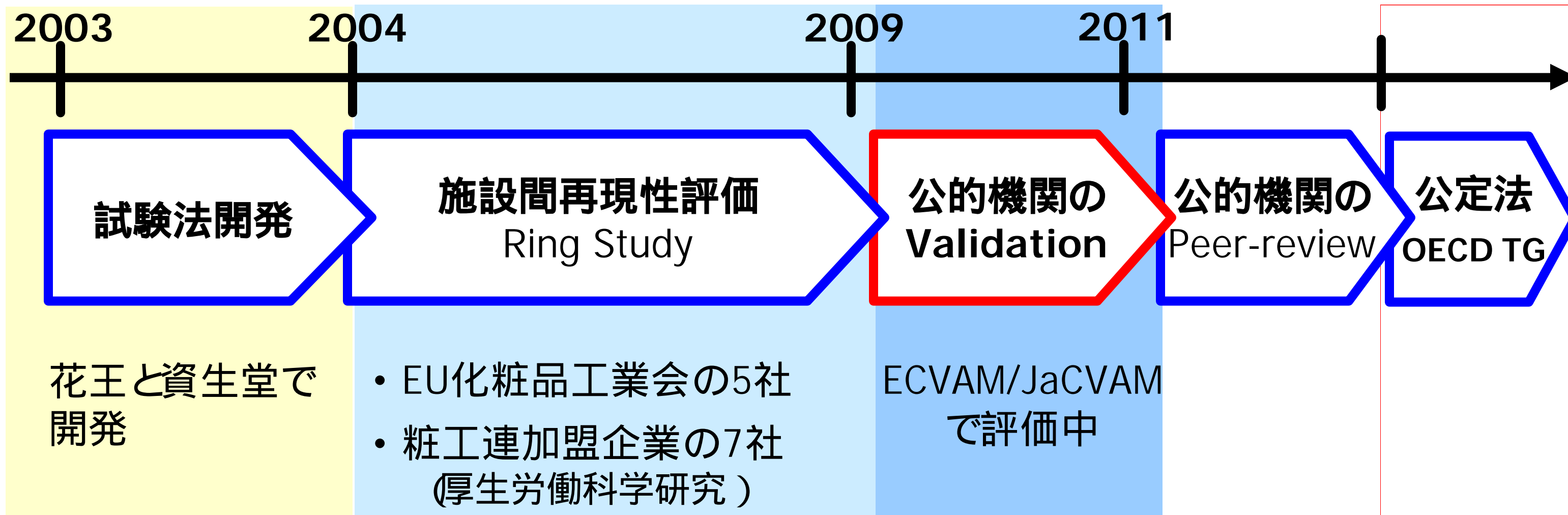
MFI : Geometric Mean Fluorescence Intensity

- **判断基準** : CD86 ? 150% and/or CD54 ? 200% (3回の実験中2回以上)

\*: Ashikaga *et al.*, 2006. TIV, 20, 767-773., Sakaguchi *et al.*, 2006. TIV, 20, 774-784.



# OECD TGへの取り組み (h-CLAT)



## ■ 欧州代替法評価センター (ECVAM) によるPre-validation

(JaCVAMもサポート)

欧州の2施設と花王、資生堂の4施設で  
計24化合物を評価

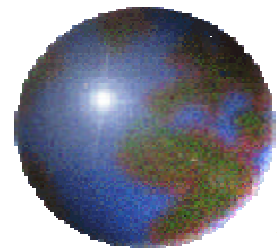
(譲渡性、施設内/施設間再現性、予測性)

2009年9月

~ 2011年11月

(終了予定)



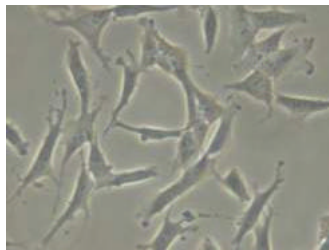
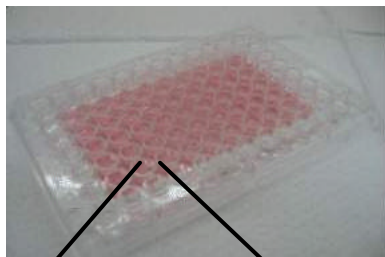


# Short Time Exposure (STE)

細胞培養

**SIRC細胞**

ウサギ角膜由来  
株化細胞



3.0 × 10<sup>3</sup> cells/well、  
96well-plateに播種し、  
5日間前培養

試料曝露

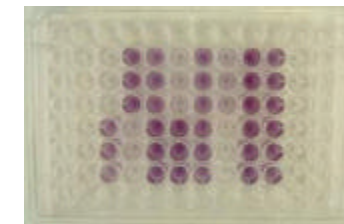
**5 分間**

濃度 : 5%、0.05%  
溶媒 : 生理食塩水、  
5%DMSO添加生理食塩水、  
ミネラルオイル



生細胞測定

色素生成量測定  
(MTT法)



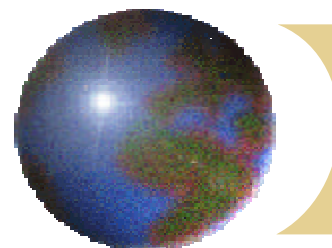
細胞生存率(%)

サンプル群の色素量 ×100

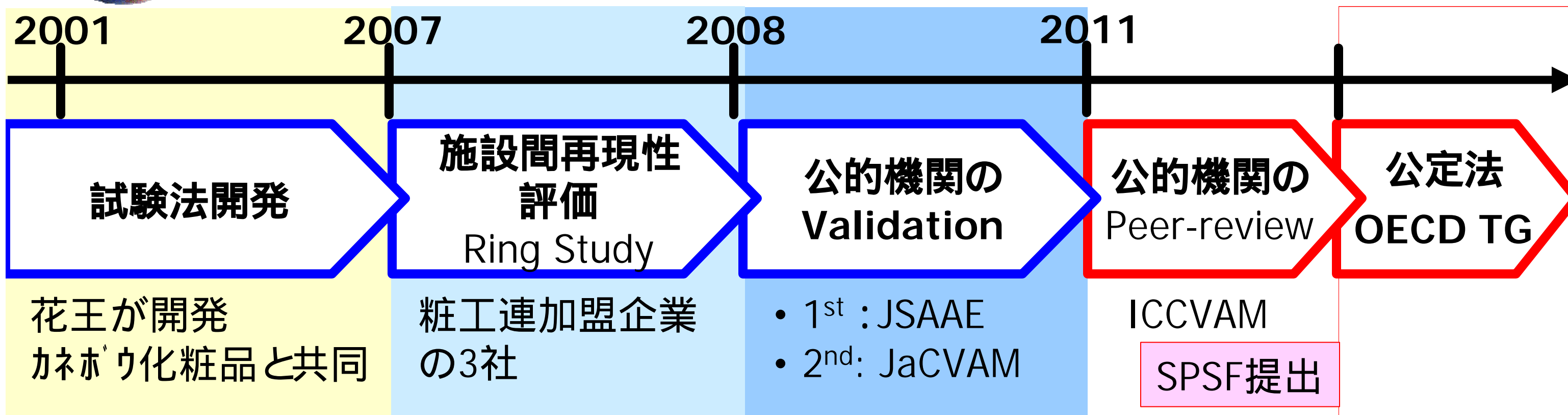
対照群の色素量

(3回の試験の平均値を使用)

5%溶液	Viability (cutoff value)
non irritant	> 70 %
irritant	≤ 70 %



# OECD TGへの取り組み (STE)



## ■ 日本動物実験代替法学会によるValidation<sup>1)</sup>

2008年4月

5施設<sup>1)</sup>で盲検試料25化合物を評価  
(譲渡性、施設内/施設間再現性、予測性)

~ 2009年3月

<sup>1)</sup> カネボウ化粧品、コーセー、ポーラ化成工業、ピアス、ライオン

## ■ JaCVAMによる追加Validation<sup>2)</sup>

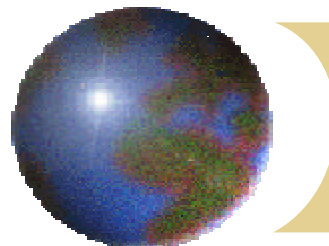
2010年6月

3施設<sup>2)</sup>で盲検試料40化合物を評価 (予測性)

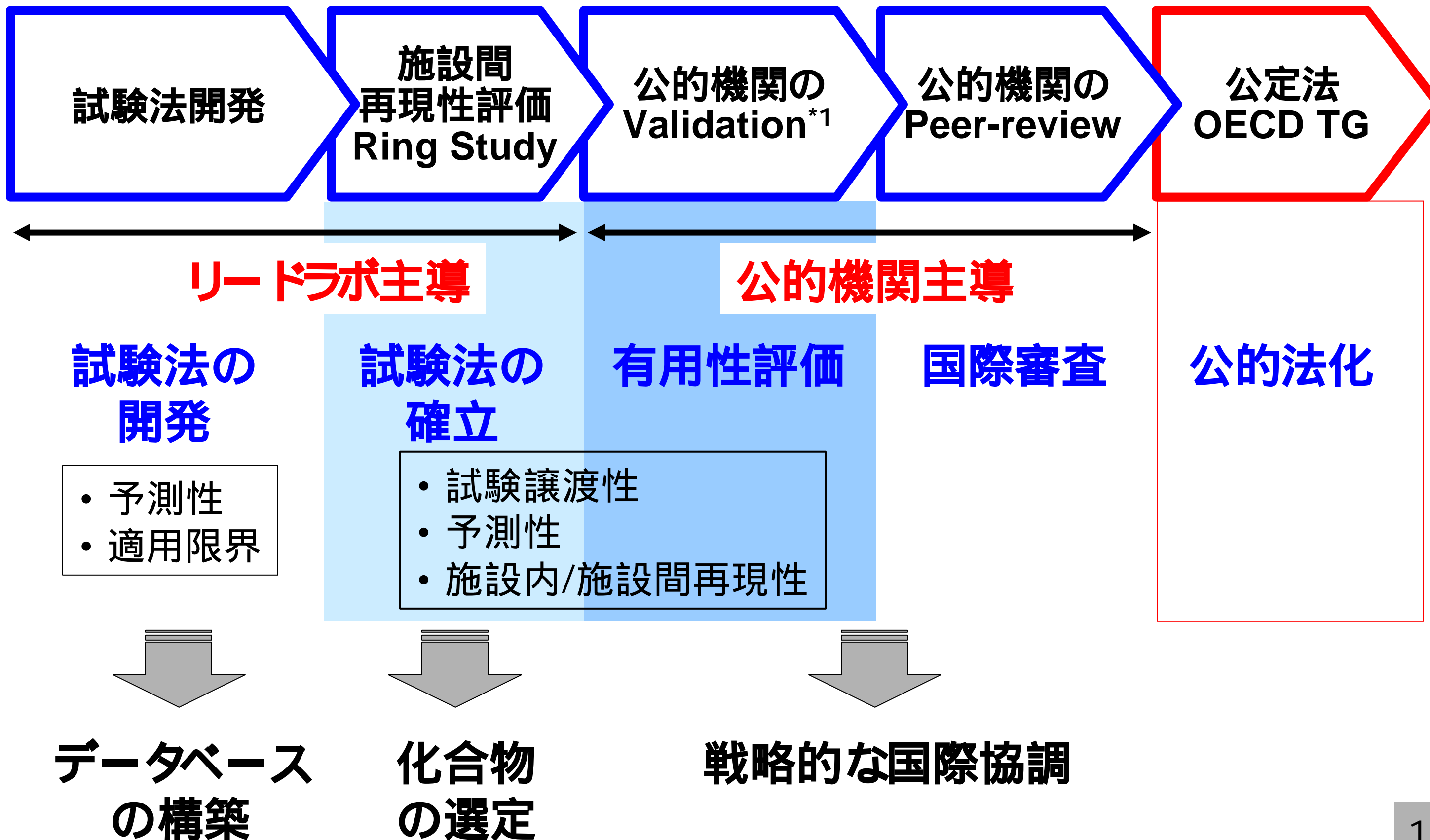
~ 2010年12月

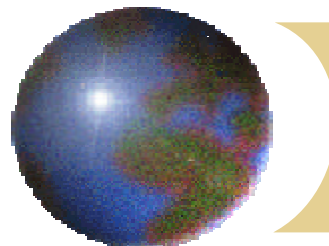
<sup>2)</sup> カネボウ化粧品、ポーラ化成工業、ライオン

## ■ 公的機関でのPeer-review : ICCVAMによるピアレビュー 2011年秋



# OECD TGまでのポイント





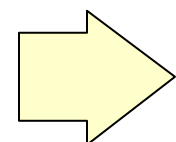
## 試験法開発段階での確認事項

### ■ 予測性：

in vivo試験結果との一致率の把握

### ■ 適用限界：

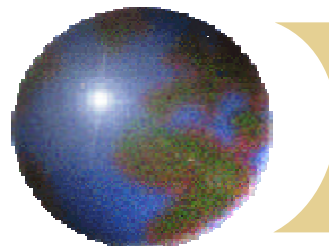
評価に適さない化合物の特徴把握



多くの化合物での評価結果が必要  
データベースの充実

**ポイント：**

- 1) データベースに必要な化合物数
- 2) データ取得までの時間



# データベースの化合物数

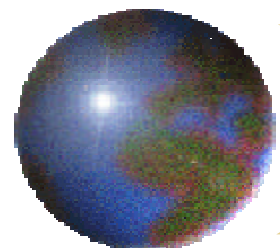
## ■ 皮膚感作性

- LLNA: 211 (Gerberick et al., 2005)
- DPRA: 81 (Gerberick et al., 2007)  
(Direct Peptide Reactivity Assay)
- **h-CLAT: 100** (Ashikaga et al., 2010)  
**109** (Nukada et al., 2010)  
(human Cell line Activation Test)
- ARE assay: 116 (Natsch et al., 2009)
- KeratinoSens: 67  
(Emter et al., 2010)

## ■ 眼刺激性

- SkinEthic™ HCE model: 102  
(Cotovio et al., 2007)
- SkinEthic™ HCE model: 435  
(Cotovio et al., 2010)
- HET-CAM: 145  
(Schrage et al., 2010)
- **STE test: 114** (Hayashi et al., 2009)  
(Short Time Exposure)

**100程度の化合物数が必要**



# データベースの充実

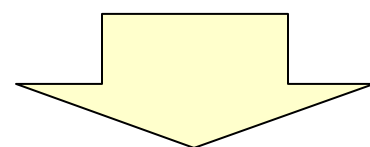
## h-CLATの例

2004.3	4濃度、平均値	9化合物
2005.3	10濃度、平均地	29化合物
--		
2006.3	8濃度、平均値	54化合物
2007.3	8濃度、平均値	62化合物
--		
2007.8	8濃度、個別値	64化合物
2007.10	8濃度、個別値	76化合物
2008.3	8濃度、個別値	100化合物
2009.12	8濃度、個別値	106化合物
2010.10	8濃度、個別値	109化合物

プロトコール  
変更

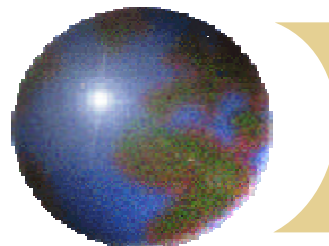
Prediction  
model修正

**タイムリーにデータを取得**



cell-based assay代替法の主流へ





# 施設間再現性評価「段階でのポイント」

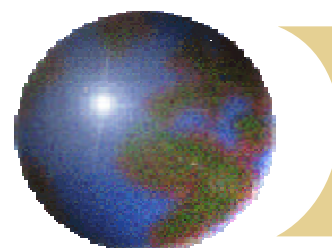
## 複数の施設による共同研究での確認事項

- **試験法譲渡性** : 新たな評価施設における試験法導入の簡便性
- **施設内再現性** : 同じ評価施設における結果の再現性
- **施設間再現性** : 異なる評価施設における結果の再現性
- **予測性** : in vivo試験結果との一致率の把握

複数の施設による同一化合物を評価するRing Studyを実施

**ポイント:**

- 1) 評価する化合物の数は
- 2) どの化合物を評価するか？



# Ring Studyの実施

## ■ h-CLAT

- **COLIPA: 5 labs**

Henkel, L 'Oreal, P&G  
資生堂、花王

2004.6 ~ 2007.12

4回の評価：計37化合物

- **日本：7 labs**

カネボウ化粧品、コーセー、日本メナード、  
ポーラ化成、ライオン、資生堂、花王

2005.4 ~ 2007.3

3回の評価：計15化合物

## ■ STE

- **日本：2 labs**

カネボウ化粧品、花王

2006.8 ~ 2007.8

計70化合物

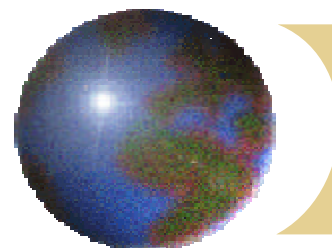
- **日本：3 labs**

ライオン、カネボウ化粧品、花王

2007.9 ~ 2008.11

計51化合物

**30 ~ 50化合物数が必要**



# 化合物リスト

## ■ 皮膚感作性

- **Performance Standard**

(ICCVAM, 2008)

LLNA用に作成

<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/PerfStds/LLNAPerfStd07Jan08FD.pdf>

- **COLIPA List**

代替法開発用リスト: 33

(感作性物質 : 14+6, 非感作性物質 : 8+5)

- **ECVAM List** (Casati et al., 2009)

代替法開発用リスト: 15

(感作性物質 : 7+4, 非感作性物質 : 4)

- **Sens-it-iv List** (Sens-it-iv, 2009)

代替法開発用リスト: 23

(感作性物質 : 9+4, 非感作性物質 : 10)

[http://www.sens-it-iv.eu/files/newsletter/Sens-it-iv\\_Newsletter\\_32.html](http://www.sens-it-iv.eu/files/newsletter/Sens-it-iv_Newsletter_32.html)

## ■ 眼刺激性

- **COLIPA List** (ESTIV 2010)

Eye Irritation Task Force提案

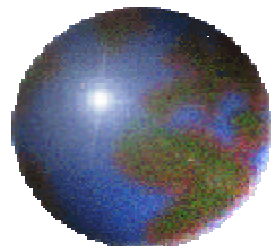
代替法開発用リスト: 50

GHS category 1 10

category 2 20

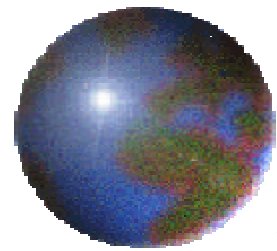
Not classified 20

**提案されている化合物を  
評価することが大事**



# 皮膚感作性代替法開発のためのCOLIPA List

	Chemical	CAS #	LLNA EC3 (%)
Clear positive (14)	Oxazolone	15646-46-5	0.003
	MCI/MI	Mixture/26172-55-4	0.009
	DNCB	97-00-7	0.05
	Glutaraldehyde	111-30-8	0.1
	1,4-Phenylenediamine	106-50-3	0.16
	Formaldehyde	50-00-0	0.61
	Methyldibromo glutaronitrile	35691-65-7	0.9
	Isoeugenol	97-54-1	1.2
	Ethylene diamine	107-15-3	2.2
	Cinnamic aldehyde	104-55-2	3.0
	<i>Nickel sulfate</i>	10101-97-0	4.8
	4-Aminophenol	123-30-8	?
	Trinitrobenzene sulphonate	2508-19-2	?
	<i>Cobalt chloride</i>	7646-79-9	+
Clear negative (8)	Diethylphthalate	84-66-2	NC
	Lactic acid	50-21-5	NC
	Octanoic acid	124-07-2	NC
	Glycerol	56-81-5	NC
	Methyl salicylate	119-36-8	NC
	Phenol	108-95-2	NC
	Dimethyl formamide (DMF)	68-12-2	NC?
	<i>Zinc sulphate</i>	7733-02-0	NC
Difficult substance (11)	Hexylcinnamic aldehyde (HCA)	101-86-0	11
	Citral	5392-40-5	13
	Eugenol	97-53-0	13
	Penicillin G	61-33-6	30
	Toluenediamine bismaleimide		+
	Sodium lauryl sulfate	151-21-3	+
	4-Aminobenzoic acid (PABA)	150-13-0	NC
	Benzalkonium chloride	63449-41-2	NC
	Benzocaine	94-09-7	NC
	Diphenylthiourea	3898-08-6?	NC*
	Vanillin	121-33-5	NC



# Validation/Peer-review 段階でのポイント

## 化粧品規制協力国際会議 (ICCR):

- 日本、EU、US、カナダの行政による化粧品の規制を議論する会議
- 2007年9月に第一回会議をブリュッセルで開催
- ICCRは動物実験の削減、洗練、代替についての協力を推進する為のワーキンググループである**代替試験法協力国際会議 (ICATM) を2009年4月に設立**

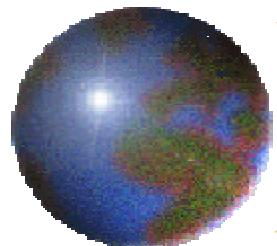
### ICATMの役割

- (1) Validation
- (2) 試験法の科学的妥当性についての独立したPeer-review
- (3) 動物代替試験法の正式な試験法勧告の策定

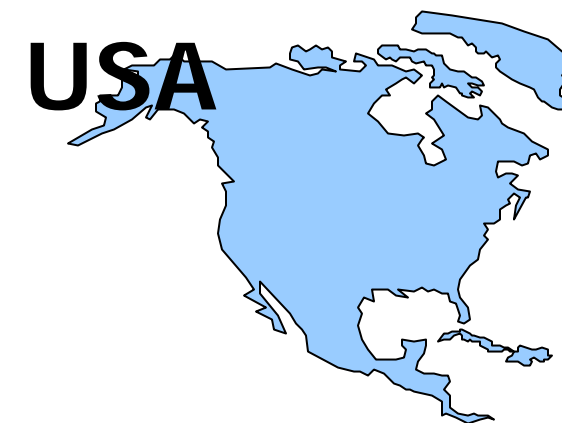
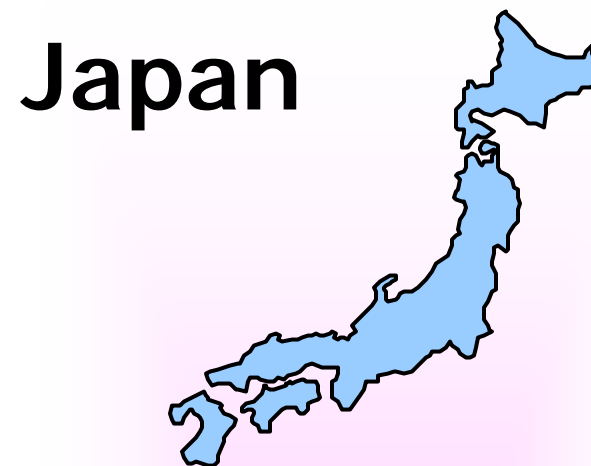
➔ ICATMの下、国際validation、peer-reviewが実施

ICCR: International Cooperation on Cosmetics Regulations

ICATM: International Cooperation on Alternative Test Methods



# 世界の代替法開発の推進機関



業界団体

**COLIPA**  
(PCR)

**JCIA**  
(動物実験代替専門委員会)

**PCPC**

行政

**ECVAM**  
代替法のバリデーション機関

**JaCVAM**  
代替法検証センター

**ICCVAM**  
代替法に関する  
省庁間の調整機関

学会

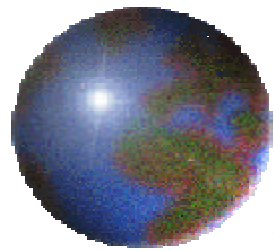
**ESTIV**  
European Society of  
Toxicology In Vitro

**JSAAE**  
日本動物実験代替法学会

**ASCCT**  
American Society for  
Cellular and Computational  
Toxicology

**Validation、Peer-reviewには、  
国際間の協調を戦略的！**

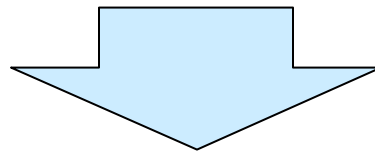




# h-CLATのPre-validation

- 2003.12 COLIPAにて日本2社の共同研究案を提示
- 2004.6 COLIPAにてh-CLATのRing Studyを提案

**h-CLATのガイドライン化の主戦場はEU！**

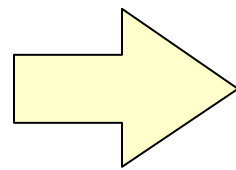


**ValidationはECVAM！**

- 2008.1 ECVAMでのprevalidationが基本合意
- 2009.6 試験費用の分担が解決

ECVAM提案

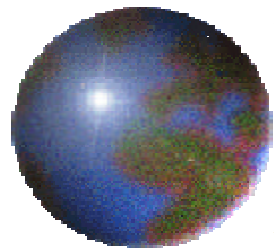
1つのLead lab  
2つのNaïve lab



JaCVAMとの提案

2つのLead lab (費用は日本)  
2つのNaïve lab (費用はECVAM)

- 早い段階からどこでやるのかを決める
- 自分たちの体制を維持するために、提案していく



# STE試験のPeer-review

- 2008.4 ~ 日本動物実験代替法学会による1<sup>st</sup> validation
- 2010.6 ~ JaCVAMによる2<sup>nd</sup> validation

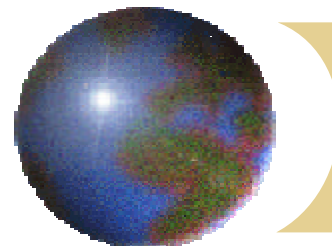
Validationは国内で実施 → **Peer-reviewはインターナショナルで!**

## どの機関か？

- JaCVAM : 他の眼刺激性試験法をreview中
- ECVAM : 3次元モデルをvalidation中
- ICCVAM :

ICCVAMとの3回の打ち合わせ → **ICCVAMで実施予定**

- **現状の把握が必要**
- **積極的なコンタクト(JaCVAMのサポート付きで)**

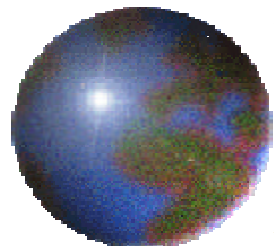


# 学会発表/論文投稿の重要性

- 日本だけでなく欧米の学会での発表
- 代替法学会、毒性学会、皮膚科学会など様々な分野で
- ポスター発表だけでなく、論文投稿を

## 眼刺激性代替法 (STE)

- 学会発表: 19回
  - 日本動物実験代替法学会
  - アメリカ毒性学会 (Society of Toxicology)
  - 世界代替法会議
  - European Society of Toxicology In Vitro
- 論文 5報
  - 試験法 1報
  - Ring Study (施設間再現性評価) 2報
  - Validation 1報
  - Database 1報 (投稿中)



# h-CLATに関する外部発表

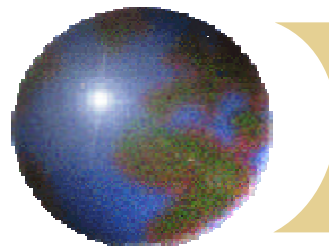
## ■ 学会発表: 56回

- 日本動物実験代替法学会
- 日本皮膚アレルギー学会
- 日本香粧品科学会
- 日本免疫毒性学会
- アメリカ毒性学会 (Society of Toxicology)
- 世界代替法会議
- ヨーロッパ毒性学会
- ERGECD (European Research Group on Experimental Contact Dermatitis)
- Contact Dermatitis

## ■ 論文 13報

- 試験法 7報
- Ring Study (施設間再現性評価) 2報
- Predictive performance 3報
- Database 1報

**積極的な**  
• 海外での発表  
• 論文投稿 (英語)

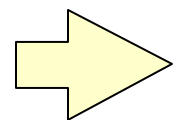


# Givaudanの皮膚感作性代替法開発研究

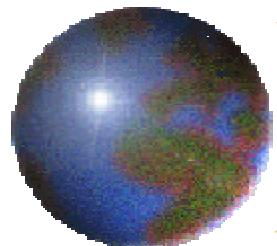
ARE活性化を評価する皮膚感作性reporter gene assay

- Natsch et al., 2008 (*Toxicol Sci* 102, 110-119)  
ヒト乳がん細胞株 MCF7を用いたARE活性化を指標とする試験法 **ARE assay**
- Natsch et al., 2009 (*Toxicol Sci* 107, 106-121)  
代替法試験法の統合 :in silico + Peptide assay + ARE assay
- Emter et al., 2010 (*Tox App Pharm* 245 281-290) : **KeratinoSens**  
HaCaTでのARE reporter gene assay
- Natsch et al., 2010 (*Toxicol Sci* 107, 106-121)  
皮膚感作性におけるNrf2-Keap1-AREのpathwayに関するreview
- Natsch et al., 2011 (*Tox in Vitro* in press)  
KeratinoSensの5 labでのRing Study

- 論文化が早い
- impact factorの高い雑誌



**OECD TGに向けては、  
質の高い研究をタイムリーに発表**



## まとめと今後

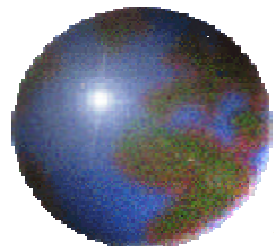
- 日本人は、器用、まじめ、正確、試験法開発は
- 戦略と経験が十分でなかった

- 試験法開発： 100化合物程度のデータベース構築
- Ring Study： 適切な化合物の選定  
例 ) COLIPA提案リスト
- Validation/Peer-review：  
JaCVAMと連携しながらECVAM、ICCVAMと  
戦略的に実施
- 積極的な英語での学会発表・論文投稿

日本動物実験代替法学会、JaCAVAMのサポートを受けて

**より多くの日本発の代替法をOECD TGへ**

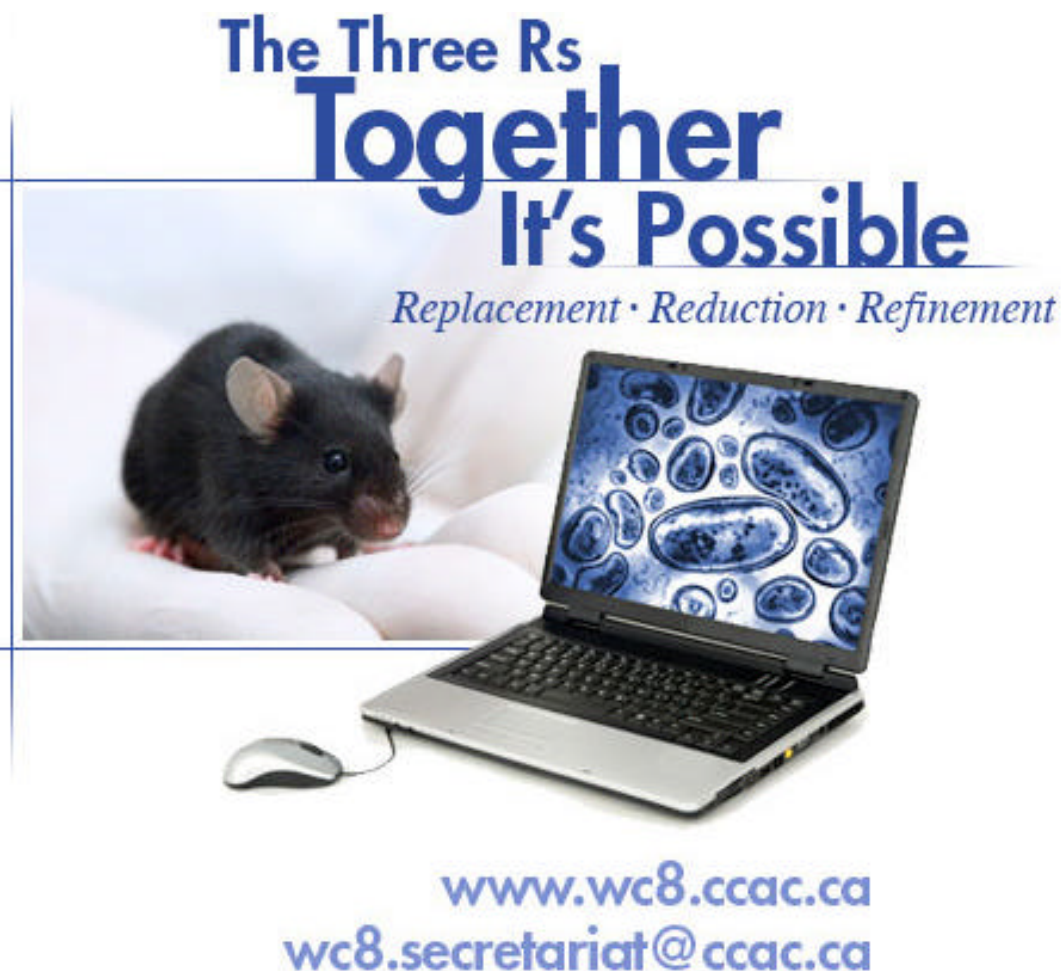




# WC8への積極的な参加 & 発表を！

**8<sup>th</sup>** World Congress  
on Alternatives and Animal Use  
in the Life Sciences

2011年8月21-25日  
カナダ、モントリオールで開催



日本のすばらしい研究成果を世界へ！  
若手研究員によるプレゼンを！

日本-モントリオール	16万円弱
東京-那覇	16万強 (3月)

# Acknowledgments

## ■ h-CLAT COLIPA Ring Study

P&G C. Ryan  
L'Oreal J-M. Ovigne  
Henkel K. Schroeder  
Shiseido T. Ashikaga

## ■ STE Japanese Ring Study

カネボウ化粧品 林、桑原  
ライオン 渡辺、相澤、  
江幡、中村  
花王 高橋、小池

## ■ h-CLAT Japanese Ring Study

カネボウ化粧品	岡本、桑原
コーセー	水野、岡本
ライオン	佐藤、児玉
日本メーデ化粧品	山田、長谷川
ポーラ化成	吉田、太田
資生堂	藪、足利
花王	麦田

ご清聴ありがとうございました