

平成25年8月30日、大阪
日本化粧品技術者会 大阪支部勉強会

動物実験代替法の国際動向



小島 肇

JaCVAM, NIHS

内容

1. 動物実験を巡る国内外の動向
 - ・動物実験の3Rs
 - ・**ICCR とICATMへの関与**
 - ・厚生労働省の対応
2. OECD TGの動向とJaCVAM
3. 眼刺激性試験代替法の最新情報
4. 皮膚感作性試験代替法の最新情報
5. AOPと試験法



動物実験を巡る国内外の動向

動物実験の3Rs

(Russel and Burch 1959)

○ Replacement

動物を用いない方法に置き換える

(例) *In vitro* エンドトキシン試験法

○ Reduction

動物の使用数の削減

(例) 固定用量による単回投与試験

○ Refinement

動物使用に伴う苦痛の削減

NEWS EUROPE

[Home](#) | [UK](#) | [Africa](#) | [Asia](#) | [Europe](#) | [Latin America](#) | [Mid-East](#) | [US & Canada](#) | [Business](#) | [Health](#) | [Sci/Environment](#)

11 March 2013 Last updated at 17:23 GMT



EU bans sale of all animal-tested cosmetics

A complete ban on the sale of cosmetics developed through animal testing has taken effect in the EU.

The ban applies to all new cosmetics and their ingredients sold in the EU, regardless of where in the world testing on animals was carried out.

The 27 EU countries have had a ban on such tests in place since 2009. But the EU Commission is now asking the EU's trading partners to do the same.

Animal rights lobbyists said EU officials had "listened to the people".

The **anti-vivisection group BUAV and the European Coalition to End Animal Experiments (ECEAE)** said they had spent more than 20 years



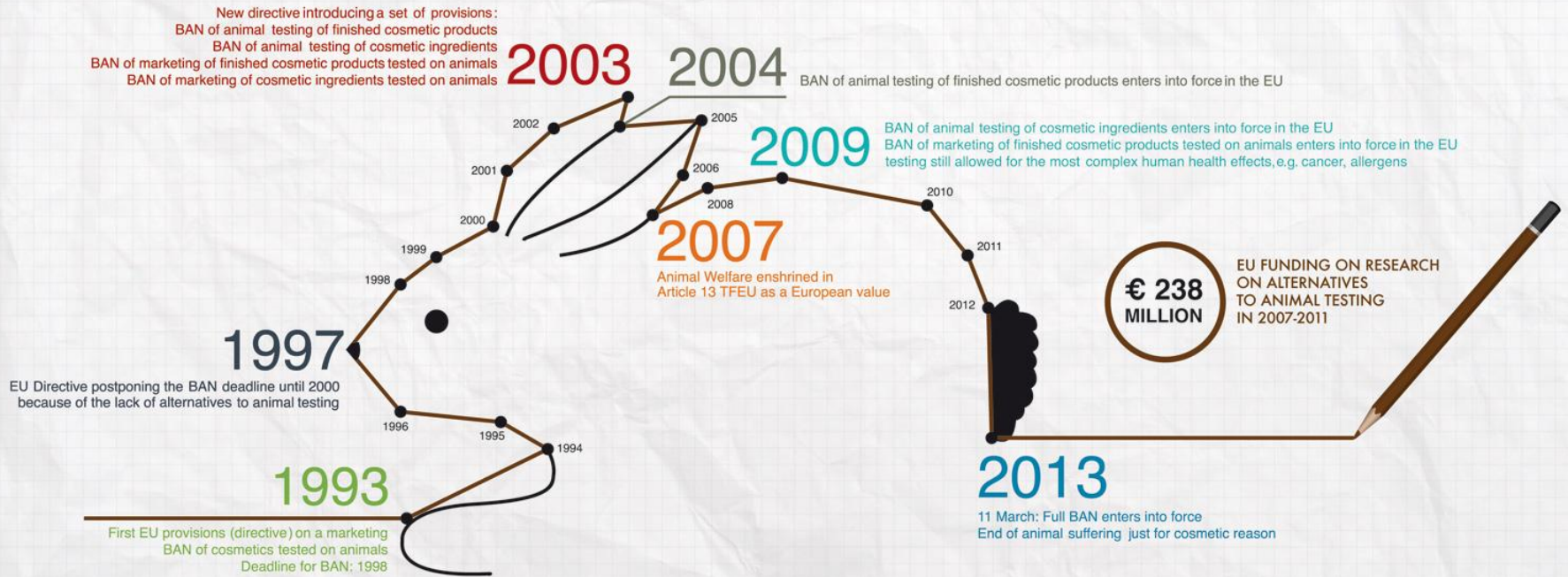
The search for alternatives to animal testing goes on

Related Stories

UK retains strict animal test law

CONNECTING THE DOTS FOR ANIMALS:

HISTORY OF THE EU BAN ON ANIMAL TESTING FOR COSMETICS



資生堂、化粧品・医薬部外品における動物実験の廃止を決定

資生堂は、動物実験代替法(以下、代替法)に基づく安全性保証体系を確立し、これにより2013年4月から開発に着手する化粧品・医薬部外品における社内外での動物実験を廃止します。なお、社会に対して安全性の説明をする必要が生じた場合^{※1}は除きます。本件については、2013年2月28日開催の取締役会において決定しました。

※1 市場にある製品の成分に関して、改めてその安全性を証明する必要が生じ、そのための選択肢が動物実験しかない場合や、一部の国において化粧品の安全性保証に動物実験が不可欠となっている場合。

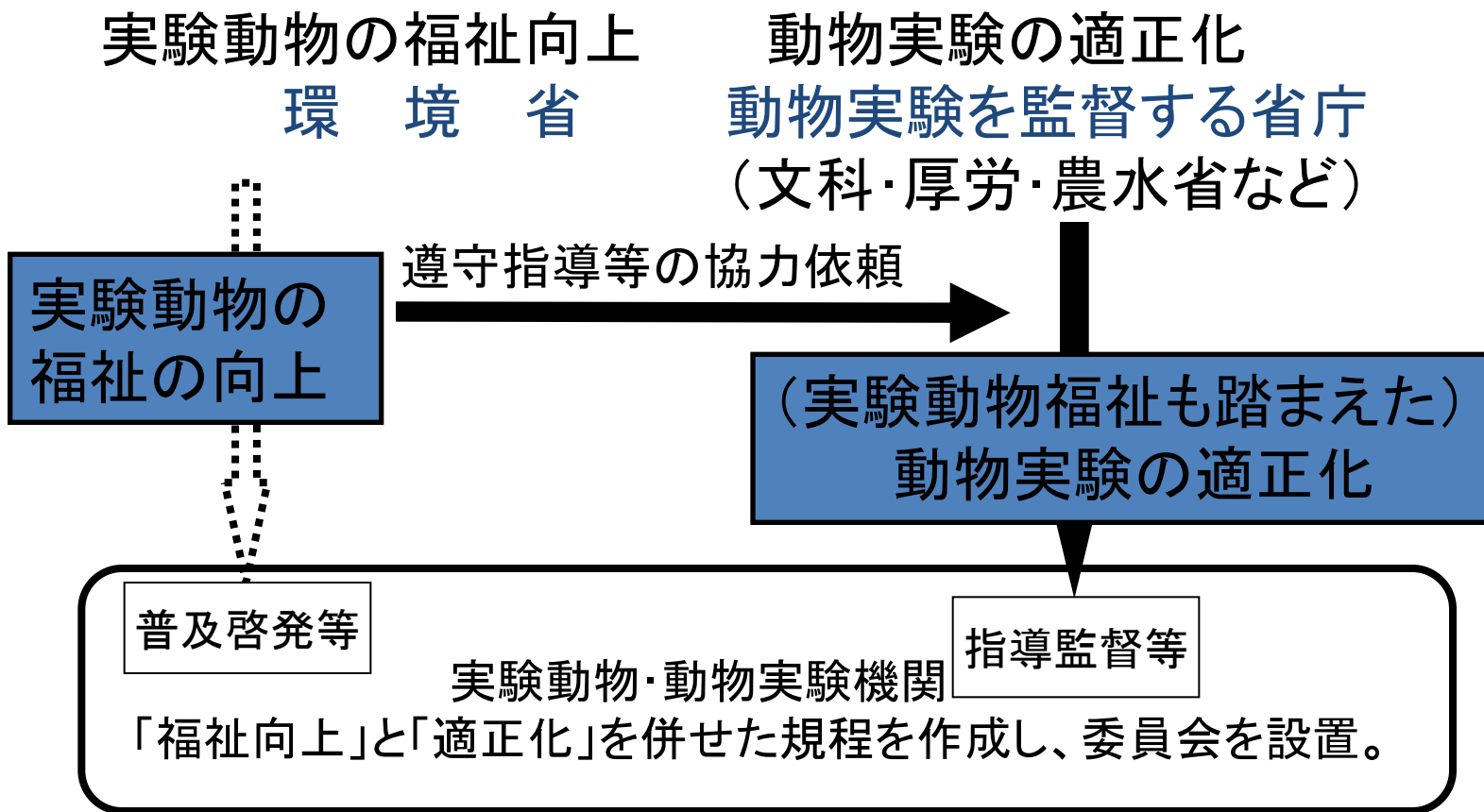
動物実験に対する考え方

**マンダムは、動物実験を行わない方針で、
化粧品開発を進めています。**

マンダムは、生活者の安全の確保を第一に考えて商品を開発しております。製品等の安全性確認は基本的にヒトを用いた試験（パッチテスト、ステインギングテスト等）および動物実験代替法を活用しており、外注委託を含めて動物実験は実施しておりません。今後も動物実験を行わない方針です。

これからもステークホルダーの皆様のご意見を参考にさせていただき、安全で環境にやさしい商品開発を進めてまいります。

「動物の愛護及び管理に関する法律」(動物愛護管理法)が改定され、平成18年6月1日から施行



実験動物における3Rsの徹底

平成24年の動愛法改定

- 実験動物に関する記載内容

第二条の2 何人も、動物を取り扱う場合には、その飼養又は保管の目的の達成に支障を及ぼさない範囲で、適切な給餌及び給水、必要な健康管理並びにその動物の種類、習性等を考慮した使用または保管を行うための環境の確保を行わなければならない。

第四十一条の二 獣医師は、その業務を行うに当たり、みだりに殺されたと思われる動物の死体またはみだりに傷つけられ、若しくは虐待を受けたと思われる動物を発見したときは、都道府県知事その他の関係機関に通報するように努めなければならない。

これら以外の動物実験に関する部分の改定は見送られたが、参議院の付帯決議で「実験動物の取扱いに係る法制度の検討に際しては、関係者による自主管理の取組及び関係府省による実態把握の取組を踏まえつつ、国際的な規制の動向や科学的知見に関する情報の収集に努めること。また、関係府省との連携を図りつつ、3R（Replacement: 置換え、Reduction: 使用数の削減、Refinement: 苦痛の軽減）の実効性の強化等により、実験動物の福祉の実現に努めること」が記載された

化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律の一部を 改正する法律案に対する附帯決議

平成二十一年五月十二日
参議院経済産業委員会

(中略)

- 十 試験に要する費用・期間の効率化や国際的な動物試験削減の要請にかんがみ、定量的構造活性相関の活用等を含む動物試験の代替法の開発・活用を促進すること。
また、国内外の法制度で明記されている動物試験における3 R（代替法活用、使用数削減、苦痛軽減）の原則にかんがみ、不合理な動物実験の重複を避けるなど、3 Rの有効な実施を促進すること。

(以下略)

参考：

衆議院の附帯決議は、下記のような文面でした。

- 七 事業者による自主的な化学物質管理を推進するため、化学物質管理を担える人材の育成及び研究機関の充実に努めること。また、大学及び大学院における定量的構造活性相関(QSAR)の手法、計測、リスク評価及び管理に関する専門家育成の検討に加え、学校教育における化学物質に関する教育内容の見直しを図ること。

**ICCR (International Cooperation on Cosmetics
Regulations:化粧品協力規制国際会議)と
ICATM (International Cooperation on
Alternative Test Methods:代替試験法協力国
際会議)への関与**

ICCRの動向1

化粧品規制協力国際会議について

平成19年10月11日

厚生労働省、米国医薬食品庁(FDA)、カナダ厚生省、欧州委員会企業産業総局が2007年9月26～28日にブリュッセルで化粧品に関する規制を議論するために会議を行った。

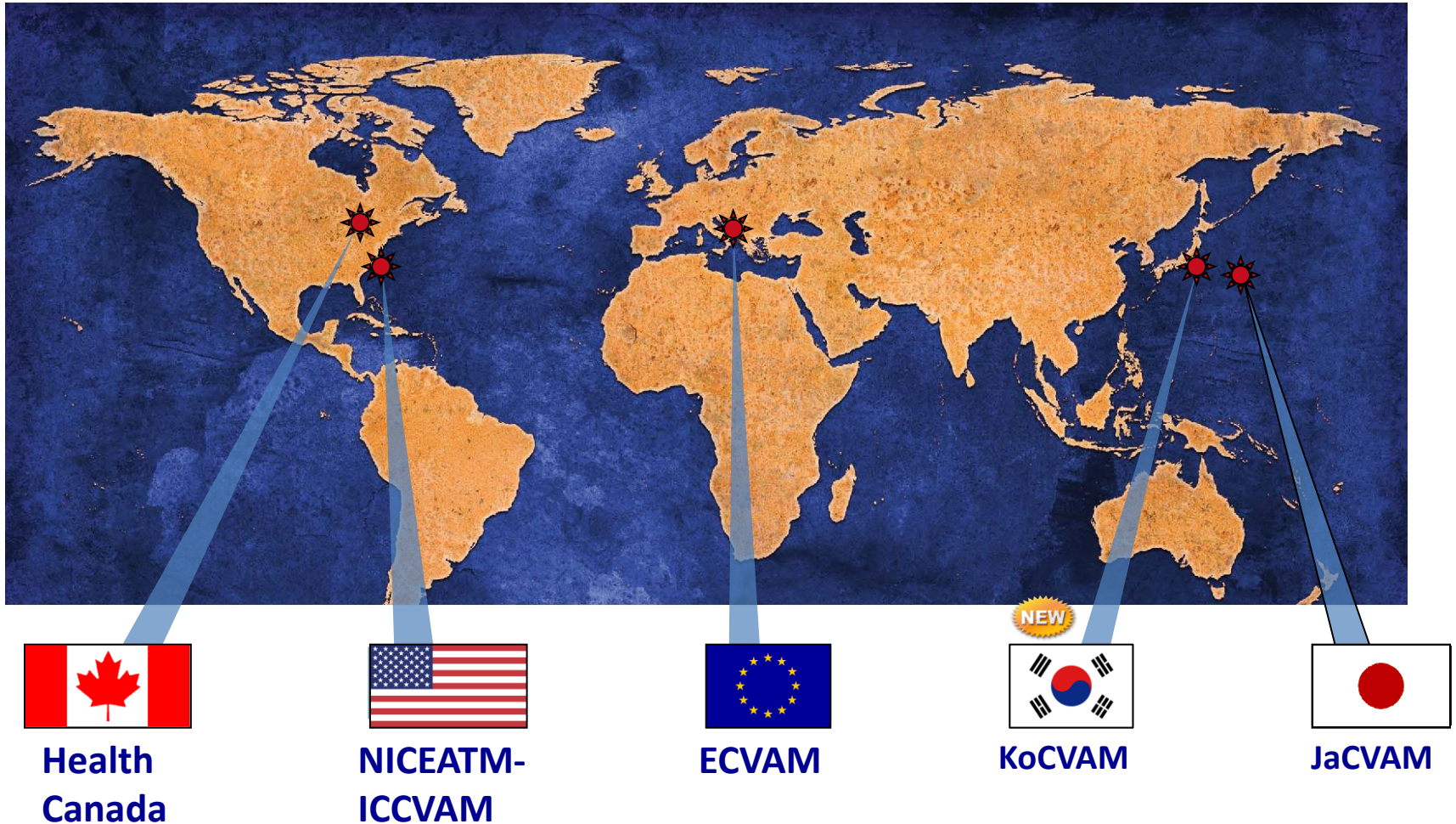
これは「化粧品規制協力国際会議」(International Cooperation on Cosmetics Regulations, ICCR)の最初の会議であり、この会議は化粧品の安全性を国際協力を通じて確保するための情報交換の場となるものである。

この会議では、以下の議題が話し合われた。

- 適正製造規範(GMP)
- 化粧品国際命名法(INCI nomenclature)の使用
- ナノテクノロジー
- 市場監視システムと協力
- **化粧品成分の安全性評価と動物代替試験法**

ICATM cooperation

ICATM is a **voluntary** international cooperation of national organizations: Canada, the European Union, Japan, South Korea, and the United States.



厚生労働省の対応

これまでの代替法に関する通知

医薬部外品の製造販売承認申請等に添付する資料については、平成18年7月19日付医薬食品局審査管理課事務連絡「医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請に添付する資料に関する質疑応答集(Q&A)について」において、動物実験代替試験法等の利用に関してOECD等により採用された代替試験法あるいは適切なバリデーションでそれらと同等と評価された方法に従った試験成績であれば、当該品目の申請資料として差し支えない旨を示しているところです。

医薬部外品の製造販売承認申請及び 化粧品基準改正要請に添付する資料に関するQ&A

1. 医薬部外品の製造販売承認申請について

(1) 安全性に関する資料全般について

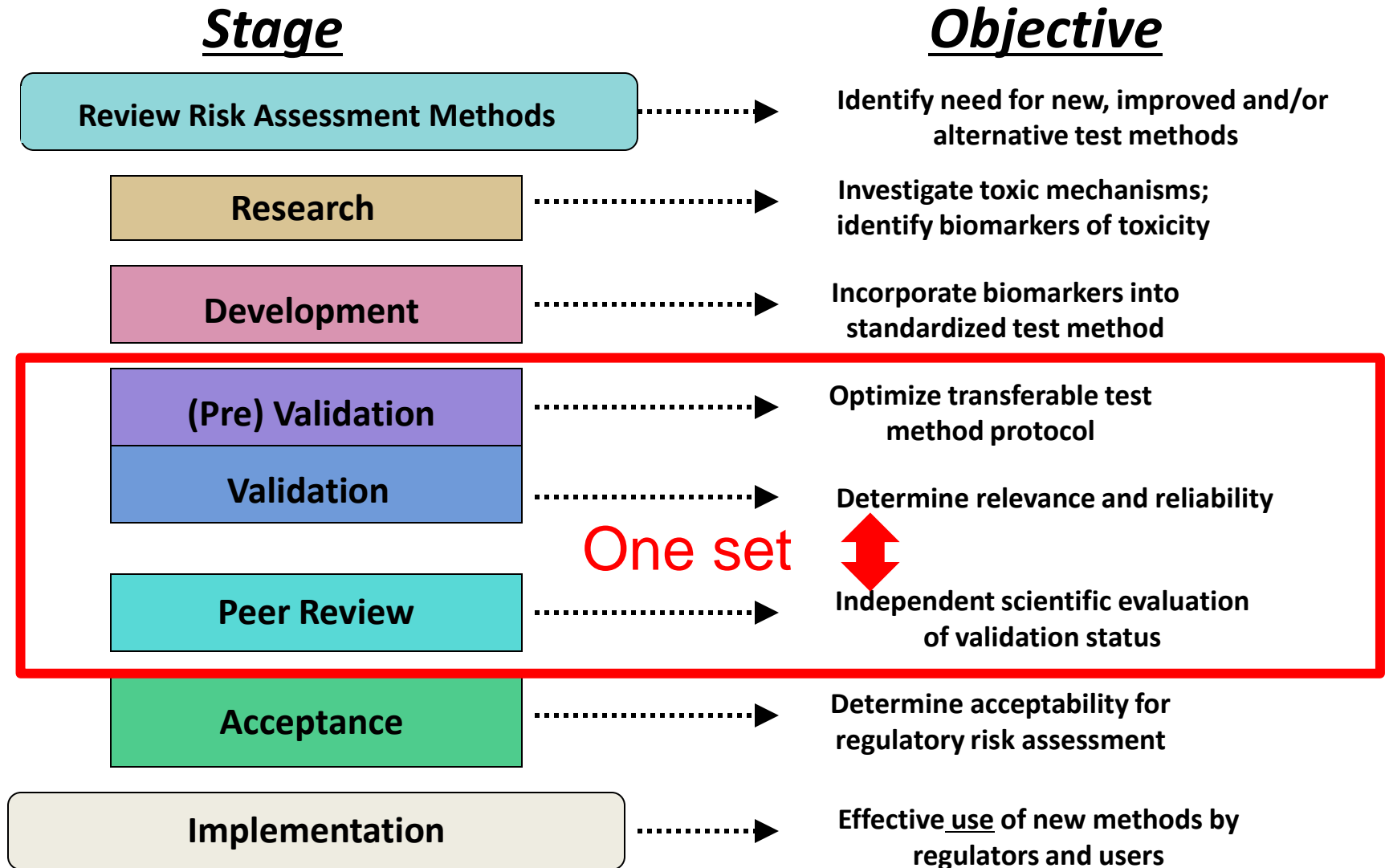
Q1: どのような毒性試験法に従えばよいか。

A1:

原則として、以下の通知やOECDガイドライン等の公的に確立された試験法に従って実施すること。また、動物実験の実施に際しては、「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について」(平成18年6月1日科発第0601001号)その他の動物実験等に関する法令等の規定を遵守すること。

- ・ **医薬品**の製造販売承認申請に必要な**毒性試験のガイドライン**について
(平成元年9月11日、薬審1第24号: 以下「**医薬品毒性試験ガイドライン**」という。)
- ・ 医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて
(平成11年11月1日、医薬審第1604号: 以下、「**遺伝毒性試験ガイドライン**」という)
- ・ 医薬品のがん原性試験に関するガイドラインについて
(平成11年11月1日、医薬審第1607号)

Test Method Evolution and Translation Process: Concept to Implementation



医薬部外品の承認申請資料作成等における動物実験代替法の利用とJaCVAMの活用促進について

- 国内ではJaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (日本動物実験代替法検証センター)が、国際的な動物実験代替法開発の取組みであるICATM: International Cooperation on Alternative Test Methods (代替試験法協力国際会議)と連携し、動物実験代替法に関する情報を取りまとめ、また、新規開発及び改定された動物実験代替試験法の妥当性評価を行い、その評価結果等を公表しています。
- 医薬部外品の承認申請資料の作成においては、下記に示すJaCVAMのホームページに掲載されている情報も参考の上、**適切な資料を作成し**、また化粧品のポジティブリスト改正要望等においても**活用が図られるよう**、貴管下関係業者に対し周知をお願いします。

事務連絡
平成24年4月26日

事務連絡
平成25年5月30日

各都道府県衛生主管部（局）
薬務主管課 御中

各都道府県衛生主管部（局）
薬務主管課 御中

厚生労働省医薬食品局審査管理課

厚生労働省医薬食品局審査管理課

皮膚感作性試験代替法及び光毒性試験代替法を化粧品・医薬部外品の
安全性評価に活用するためのガイドランスについて

皮膚感作性試験代替法（LLNA：DA、LLNA：BrdU-ELISA）を化粧品・医薬部外品の
安全性評価に活用するためのガイドランスについて

今般、皮膚感作性試験代替法及び光毒性試験代替法について、その利用促進を図るため、平成23年度レギュラトリーサイエンス総合研究事業（研究代表者 小島肇）において、それぞれ化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイドランスを作成したので、貴管下関係業者に対して周知願います。

今般、皮膚感作性試験代替法（LLNA：DA、LLNA：BrdU-ELISA）について、その利用促進を図るため、平成24年度レギュラトリーサイエンス総合研究事業（研究代表者 小島肇）において、それぞれ化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイドランスを作成したので、貴管下関係業者に対して周知願います。

なお、その他の代替法に関するガイドランスについては、順次、作成する予定です。

なお、その他の代替法に関するガイドランスについては、順次、作成する予定です。

（添付資料）

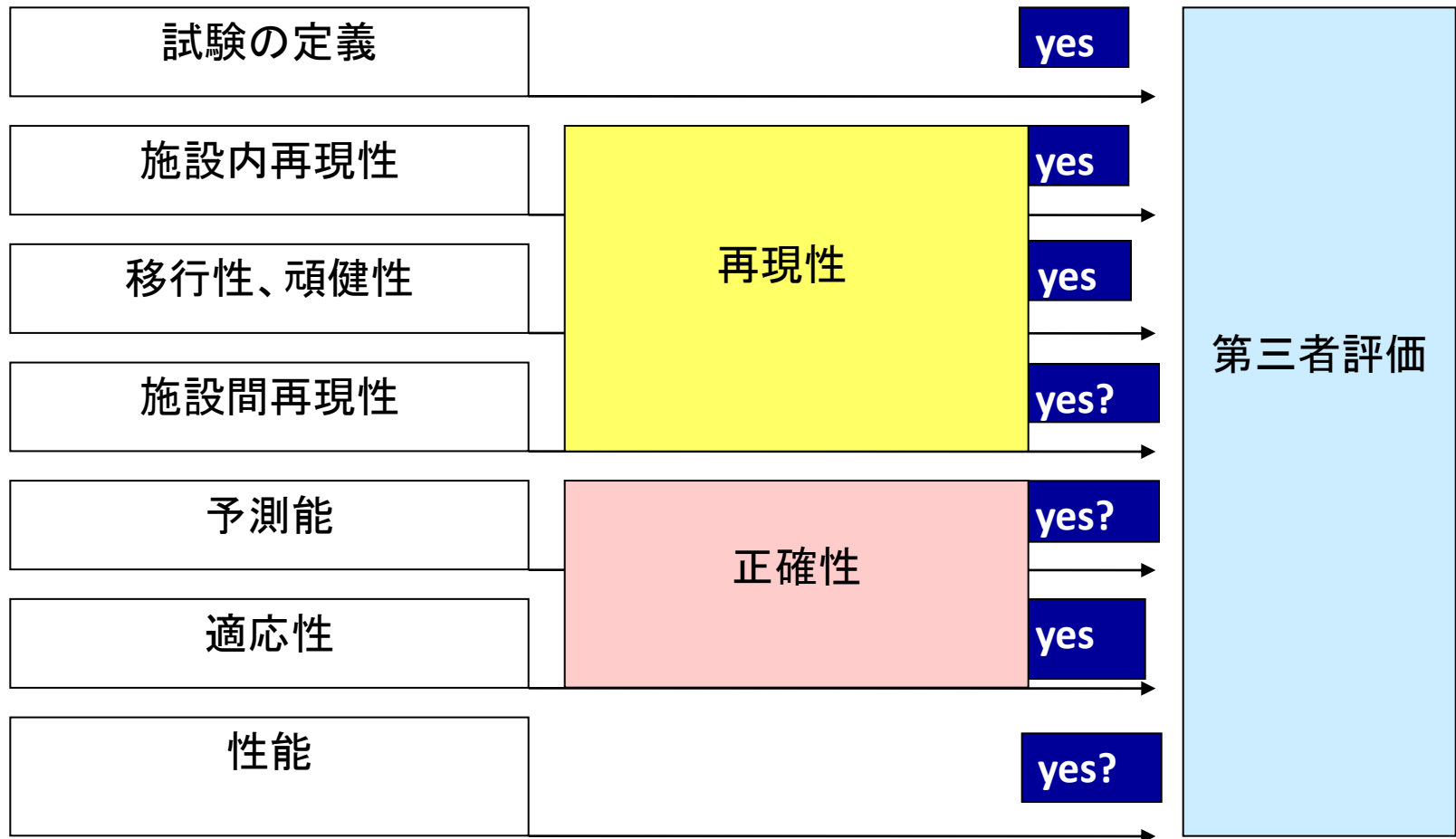
- ① 皮膚感作性試験代替法としての LLNA を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイドランス
- ② 光毒性試験代替法としての *in vitro* 3T3 NRU 光毒性試験を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイドランス

（添付資料）

- ① 皮膚感作性試験代替法としての LLNA：DA を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイドランス
- ② 皮膚感作性試験代替法としての LLNA：BrdU-ELISA を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイドランス

OECD TGの動向とJaCVAM

バリデーションの検討項目*



*from Thomas Hartung, ECVAM, 2003

JaCVAMの歴史

2005年11月 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 新規試験法評価室内に臨時の組織が設立

2011年4月 正式な組織に昇格

JaCVAMの目的

1. 国際的な協力の下、日本で開発された方法をOECDのガイドラインとする。
2. 主に、国際的な協力の下、バリデーションや第三者評価を通じて評価された代替法について、行政的受入れの適否及びその適用可能な範囲を明確にし、公表する。



APPLY INTEGRATED APPROACHES TO TESTING AND ASSESSMENT

All of the work on alternative methods is undertaken at the OECD with the objective of contributing to more integrated approaches to testing and assessment. In practice, integrated approaches, which take into account the tools outlined above, are used in the OECD Existing Chemicals Programme which generates internationally agreed initial hazard assessments of chemicals.

This practical application of integrated approaches improves their regulatory acceptance and facilitates their implementation into national and regional chemical assessment schemes in OECD member countries.

AVOID DUPLICATION OF TESTING

The OECD **Mutual Acceptance of Data (MAD)** framework has had a major impact on testing practices. MAD guarantees that data generated in the testing of chemicals in an OECD member country, or adhering non-member country, in accordance with OECD Test Guidelines and OECD Principles of Good Laboratory Practice shall be accepted in other member or adhering countries for purposes of chemical assessment and other uses relating to the protection of man and the environment. This proactive framework saves thousands of animals every year and its impact increases as non-OECD economies join the MAD system.

Furthermore, the OECD has developed the **Global Portal to Information on Chemical Substances** (eChemPortal). eChemPortal offers free public access to information on properties of chemicals through a simultaneous search of multiple databases, thereby improving the access to existing test results and reducing the risk of unnecessary testing.

WHERE CAN I FIND OECD TOOLS RELATED TO CHEMICAL SAFETY AND ANIMAL WELFARE ?

(Q)SARs, Grouping of Chemicals and the (Q)SAR Application Toolbox

www.oecd.org/env/existingchemicals/qsar

Test Guidelines, *in vitro* test methods, molecular screening and toxicogenomics

www.oecd.org/env/testguidelines

Integrated Approaches to Testing and Assessment

www.oecd.org/env/existingchemicals


Mutual Acceptance of Data

www.oecd.org/env/glp

Global Portal to Information on Chemical Substances

www.oecd.org/ehs/eChemPortal

© Photos
Getty Images, 2005
KaYann-Fotolia.com



© OECD 2009
For more information contact
the OECD Secretariat at
ehscont@oecd.org

Chemical Safety and Animal Welfare



Progress made at the OECD



www.oecd.org/env/ehs

代替法が
関与した
OECDのTG
(2011)

分類	試験法
皮膚腐食性試験	CORROSITEX Skin Corrosivity Test
	EpiSkin Skin Corrosivity Test
	EpiDerm Skin Corrosivity Test
	Rat TER Skin Corrosivity Test
皮膚刺激性試験	In vitro reconstructed human epidermis (RhE) test methods, EpiDerm, EPISKIN, SkinEthic
光毒性試験	3T3 NRU Phototoxicity Test
眼刺激性試験	Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method
	Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method
皮膚感作性試験	Updated Murine local lymph node assay (LLNA) for skin sensitization (20% 動物数削減)
	Nonradioactive LLNA protocol (LLNA: BrdU-ELISA)
	Nonradioactive LLNA protocol, LLNA:DA
単回投与毒性試験	Up and Down Procedure (UDP)
	Fixed Dose Procedure (FDP)
	Acute Toxic Class Method (ATC)
	Acute inhalation toxicity
	Inhalation toxicity - acute toxic class method
内分泌かく乱スクリーニング	Stably transfected human estrogen receptor- α transcriptional activation assay for detection of estrogenic <u>agonist</u> -activity of chemicals
	H295R Steroidogenesis Assay
遺伝毒性試験	In vitro micronucleus test
	Transgenic rodent in vivo gene mutation assays.
経皮吸収試験	Skin Absorption: In Vitro Method

2012年に成立したOECD TGおよび2013年に成立する予定の試験法

Method	Lead Country	International acceptance
BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists	USA	OECD TG 457 (2012)
Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists Test	USA & Japan	OECD updated TG 455 (2012)
Fluorescein Leakage (FL) test method	EU	OECD TG 460 (2012)
Use of anesthetics, analgesics, and humane endpoints for routine use in the TG 405	USA	OECD updated TG 405 (2012)
<i>In vitro</i> skin irritation testing including LabCyte EPI-Model	Japan	OECD TG updated 439 (2013)
Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method	USA & EU	OECD TG updated 437 (2013)
Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method	Netherland	OECD TG updated 438 (2013)

Table with Internationally Accepted Alternative Test Methods for Cosmetic Products/Ingredients Safety Testing, successfully worked upon by ICATM

Method	International Acceptance
<i>Dermal Corrosivity Test Methods</i>	
<i>CORROSITEX Skin Corrosivity Test</i>	OECD TG 435 (2006)
EpiSkin Skin Corrosivity Test. EpiSkin, EpiDerm,	OECD TG 431 (2004)
Rat TER Skin Corrosivity Test	OECD TG 430 (2004)
<i>Dermal Irritation Test Methods</i>	
<i>In vitro</i> reconstructed human epidermis (RhE) test methods EpiDerm; EPISKIN; SkinEthic	OECD TG 439 (2010)
<i>Dermal penetration Test Methods</i>	
Skin Absorption: In Vitro Method	OECD TG 428 (2004)
<i>Phototoxicity Test Methods</i>	
3T3 NRU Phototoxicity Test	OECD TG 432 (2004)
<i>Ocular Toxicity Test Methods</i>	
Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method for identification of ocular corrosives and severe irritants	OECD TG 437 (2009)
Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method	OECD TG 438 (2009)
Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants	OECD TG 460 (2012)
Use of histopathology as an additional endpoint in Ocular safety testing	OECD Guidance Document 160 (2011)

Table with Internationally Accepted Alternative Test Methods for Cosmetic Products/Ingredients Safety Testing, successfully worked upon by ICATM

<i>Acute Toxicity Tests</i>	
<i>In Vitro</i> cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity tests	OECD Guidance document 129 (2010)
<i>Endocrine Disruptor Test Methods</i>	
Performance-Based Test for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists	OECD TG 455 (2012)
H295R Steroidogenesis Assay	OECD TG456 (2011)
BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists	OECD TG 457 (2012)
<i>Genetic Toxicity Test Methods</i>	
Bacterial Reverse Mutation Test	OECD TG471 (1997)
In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test	OECD TG473 (1997)
In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test	OECD TG476 (1997)
<i>In Vitro</i> micronucleus Test	OECD TG 487 (2010)

JaCVAMが成立に関与したOECDテストガイドライン

JaCVAMが主導

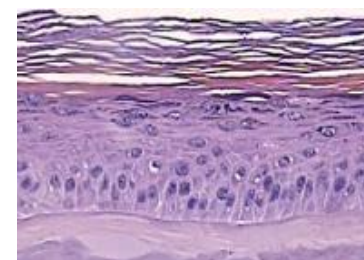
- **No. 442a: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay Non-RI method (LLNA:DA)**
- **No. 442b: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay Non-RI method (LLNA:BrdU-ELISA)**
- **No.455:The Stable Transfected Human Estrogen Receptor-alpha Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist-Activity of Chemicals**
- **TG439 : Skin irritation assay using LabCyte EPI-MODEL24**

JaCVAMが支援

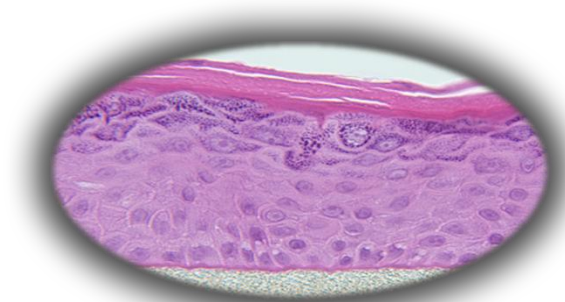
- **No. 429: Updated Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay**
- **No. 437 Bovine Corneal Opacity and permeability Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants**
- **No. 438 Isolated Chicken Eye Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants**
- **No. 439 In vitro skin Irritation assay**
- **No.457 BG1 Luc ER TA Assay for Detection of Estrogenic Agonist- and antagonist Activity of Chemicals**
- **NO.460 Fluorescein leakage (FL) Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants**

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS**In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method****TEST METHODS INCLUDED IN THIS TG**

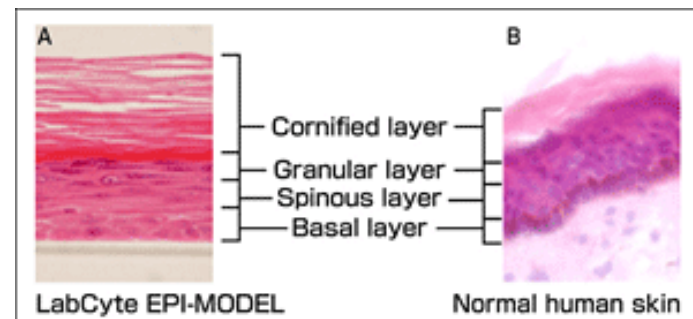
Nr.	Test method name	Validation study type	References
1	EpiSkin™	Full prospective validation study (2003-2007). The test method components of this method were used to define the essential test method components of the original and updated ECVAM PS (8) (9) (22)*. Moreover, the method's data relating to identification of non-classified vs classified substances formed the main basis for defining the specificity and sensitivity values of the original PS*.	(2) (8) (9) (11) (12) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (24) (27)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (<i>original</i>): Initially the test method underwent full prospective validation together with Nr. 1. from 2003-2007. The test method components of this method were used to define the essential test methods components of the original and updated ECVAM PS (8) (9) (22)*. EpiDerm™ SIT (EPI-200): A modification of the original EpiDerm™ was validated using the original ECVAM PS (22) in 2008*	(2) (8) (9) (11) (13) (14) (16) (17) (18) (19) (21) (22) (24) (28) (2) (22) (23) (24) (28)
3	SkinEthic™ RHE	Validation study based on the original ECVAM Performance Standards (22) in 2008*.	(2) (22) (23) (24) (29)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validation study (2011-2012) based on the Performance Standards (PS) of OECD TG 439 which are based on the updated ECVAM PS* (8) (9).	(8) (9) (35) (36) (37) (38) (39) (40) and PS of this TG*



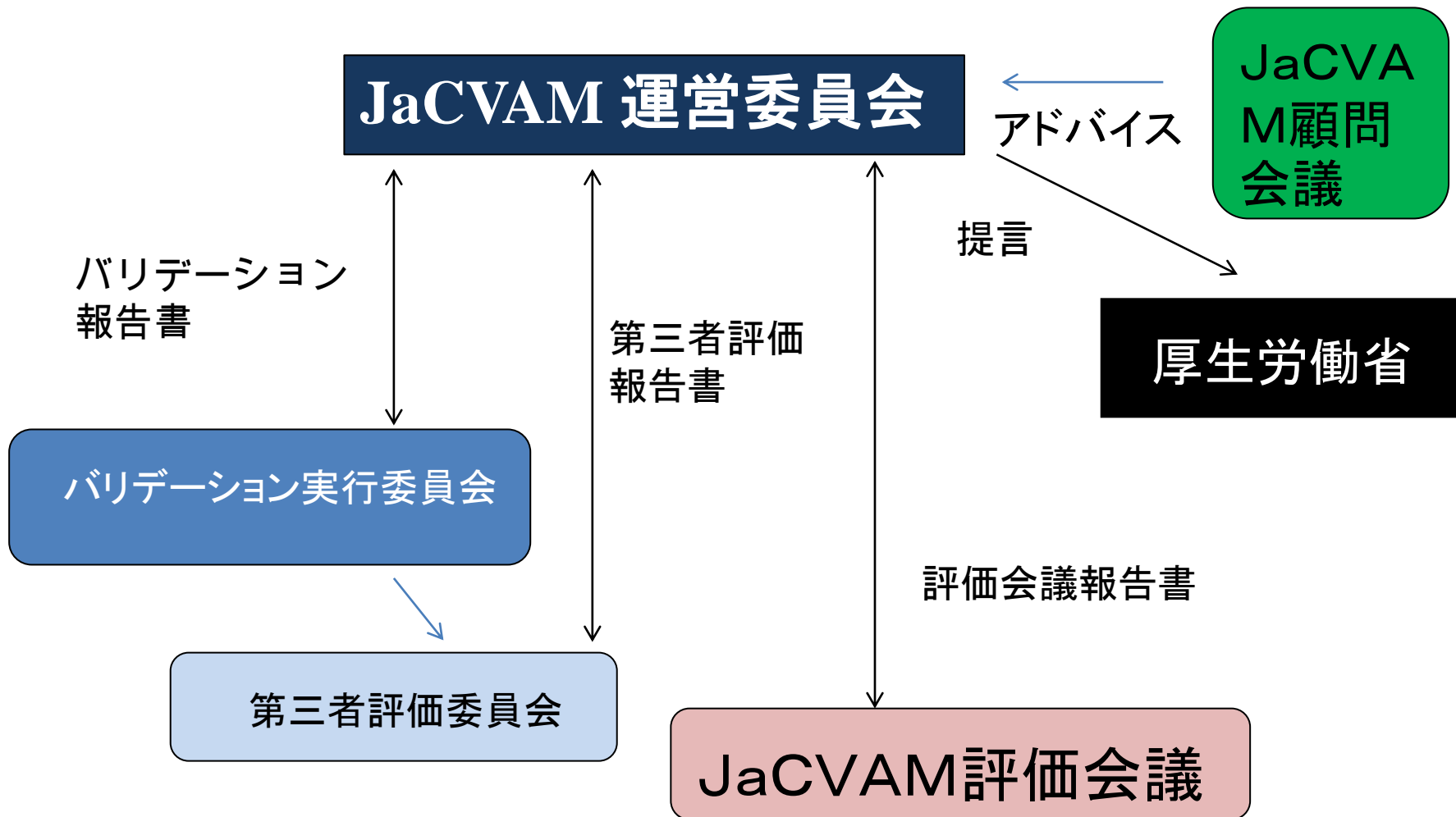
EpiSkin



EpiDerm Tissue Model



JaCVAM組織図



Update on JaCVAM (15.June / 2009 updated)

Classification	Test name	Validation study	Peer review	Regulatory acceptance	Recommendation to government	OECD	Collaboration
01 Corrosivity test	(1)Reconstructed human tissue test made in Japan: Vitrolife-Skin	Feb-09 	Jun-08 	Jun-08 	Aug-08 	Guideline No.431 	JSAAE
02 Phototoxicity test	(1)3T3-NRU	BfR 	Nov-04 			Guideline No.432 	
	(2)Yeast growth inhibition phototoxicity assay and the red blood cell photohemolysis assay	Jan-09 	May-09 	on going 			JSAAE
03 Skin sensitization test	(1)LLNA-DA	Jun-07 	Feb-08 	Oct-08 	Nov-08 		JSAAE
	(2)LLNA-BrdU	Aug-08 	Feb-09 	on going 			JSAAE
	(3)h-CLAT	start in 2009 					
	(4)LLNA						
	(5)rLLNA	ECVAM, ICCVAM 	start in 2009 				ICCVAM
04 Skin irritation test	(1)Reconstructed human tissue test	ECVAMで 	Nov-08 	on going 		Draft test guideline 	ECVAM
	(2)Reconstructed human tissue test made in Japan	May-09 					JSAAE
05	(1)3T3-NRU	ECVAM					

新規試験法提案書

平成 25 年 1 月 20 日

No. 2012-04

皮膚感作性試験代替法 Local Lymph Node Assay (LLNA): BrdU-ELISA の判定基準の変更に関する提案

平成 24 年 10 月 1 日に東京、国立医薬品食品衛生研究所にて開催された新規試験法評価会議（通称：JaCVAM 評価会議）において以下の提案がなされた。

提案内容：皮膚外用剤として用いる医薬品、医療機器、化粧品、皮膚適用の医薬部外品、農薬等に含まれる物質又はそれらの製品の皮膚感作性を予測する皮膚感作性試験代替法 Local Lymph Node Assay (LLNA): BrdU-ELISA は、RI を使用せずとも従来試験法と同等の結果が得られることから、行政上利用することは可能である。

この提案書は、米国 Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) LLNA: BrdU-ELISA Evaluation Report (2010)、LLNA: BrdU-ELISA の JaCVAM 評価報告 (2011) および OECD Test Guideline (TG) 442B をもとに、皮膚感作性試験代替法評価委員会によりまとめられた文書を用いて JaCVAM 評価会議が評価および検討した結果、その有用性が確認されたことから作成された。

以上の理由により、行政当局の安全性評価方法として「皮膚感作性試験代替法 LLNA: BrdU-ELISA の判定基準の変更」に関する提案をするものである。

吉田武美 

JaCVAM 評価会議 議長

西川秋佳 

JaCVAM 運営委員会 委員長

JaCVAM statement on the Local Lymph Node Assay (LLNA): BrdU-ELISA for skin sensitization assay

At the meeting concerning the above method, held on 1 October 2012 at the National Institute of Health Sciences (NIHS), Tokyo, Japan, the members of the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) Regulatory Acceptance Board unanimously endorsed the following statement:

The LLNA: BrdU-ELISA can be used to identify substances as potential skin sensitizers or nonsensitizers as well as LLNA for regulatory use, without Radio-isotope.

Following the review of the results of the ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, USA) Evaluation Report, JaCVAM peer review panel reports, and OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) Test Guideline revised No. 442B, it is concluded that the LLNA: BrdU-ELISA for skin sensitization assay is clearly beneficial.

The JaCVAM Regulatory Acceptance Board has been regularly kept informed of the progress of the study, and this endorsement is based on an assessment of various documents, including, in particular, the evaluation report prepared by the JaCVAM ad hoc peer review panel for skin sensitization assay.



Takemi Yoshida
Chairperson
JaCVAM Regulatory Acceptance Board



Akiyoshi Nishikawa
Chairperson
JaCVAM Steering Committee

20 January, 2013

JaCVAM評価会議が認証してきた試験法

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
7	Utilization of cytotoxicity test for acute oral toxicity testing
8	Skin sensitization assay, rLLNA
9	<i>In vitro</i> skin irritation testing: EpiDerm, SKINEthics
10	Fluorescein leakage (FL) Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants

2012年度にJaCVAM評価会議が認証した試験法

No.	Test Method
1	Skin sensitization assay, LLNA : DA
2	Skin sensitization assay, LLNA : BrdU-ELISA
3	Skin sensitization assay, rLLNA
4	<i>In vitro</i> skin irritation testing: EpiDerm, SKINEthics
5	Fluorescein leakage (FL) Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants

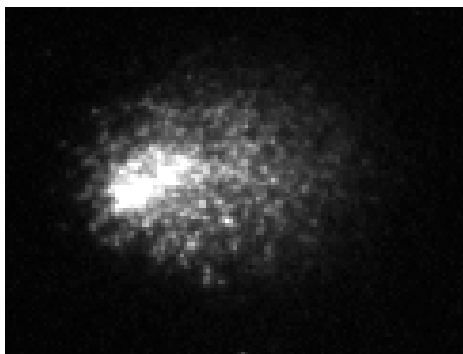
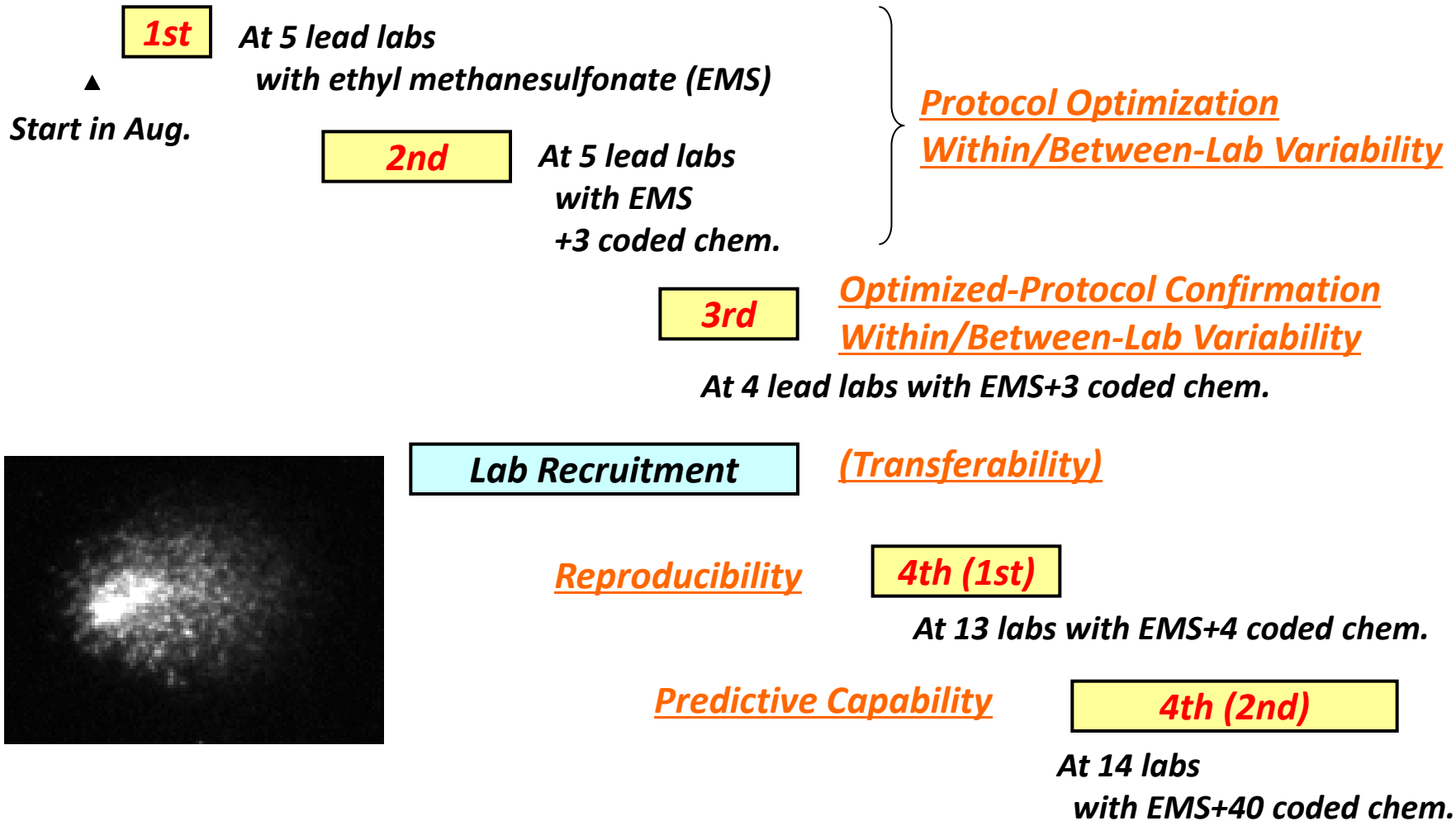
実施中のバリデーションや第三者評価研究

- 1) 皮膚感作性試験 IL-8 Lucアッセイ(経産省プロジェクト)
- 2) Stable transfected transcriptional activation (STTA) アンタゴニストアッセイ 内分泌かく乱スクリーニング(厚労省・経産省プロジェクト)
- 3) SIRC-CVS アッセイ 眼刺激性試験
- 4) STTA法 アンドロジェン(経産省プロジェクト)
- 5) 生殖毒性試験 Hand-1 Luc アッセイ(経産省プロジェクト)
- 6) Vitrigel-EIT(農林水産省プロジェクト)

- 7) 遺伝毒性試験 *in vivo* コメットアッセイ(OECD)
- 8) 光毒性試験 ROSアッセイ (ICH S10)
- 9) 形質転換試験 Bhasアッセイ(OECD)

History of Our Validation Effort (In Vivo comet assay)

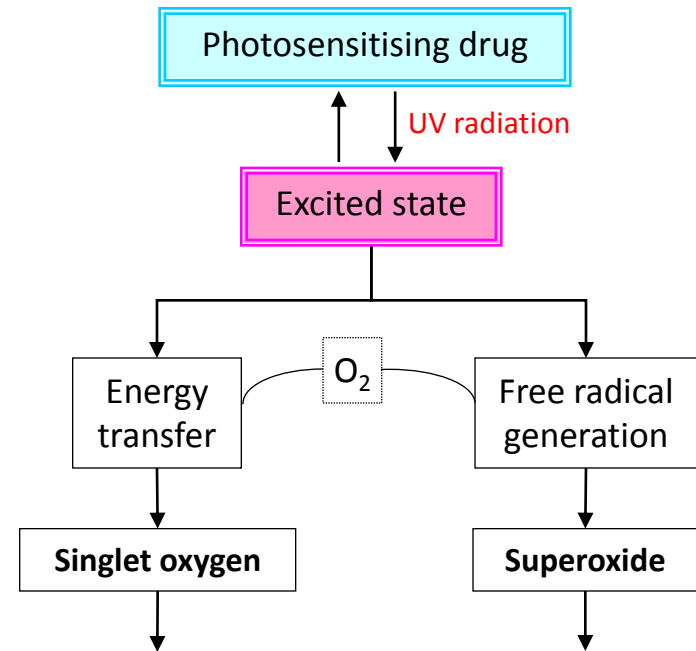
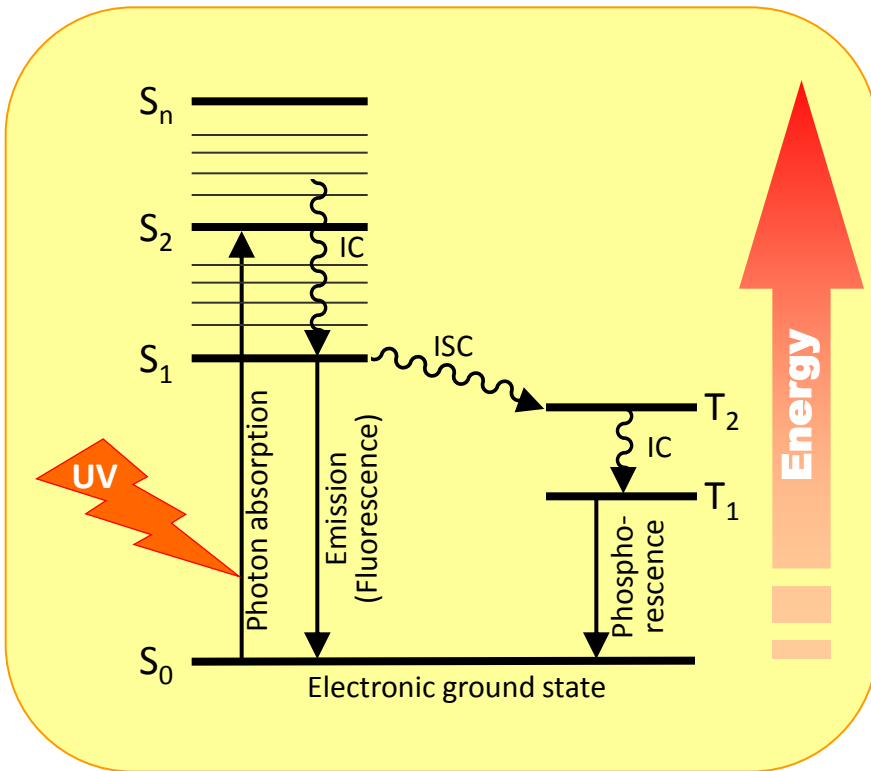
2006	2007	2008	2009	2010	2011
------	------	------	------	------	------



Possible phototoxic pathways

- Working hypothesis;

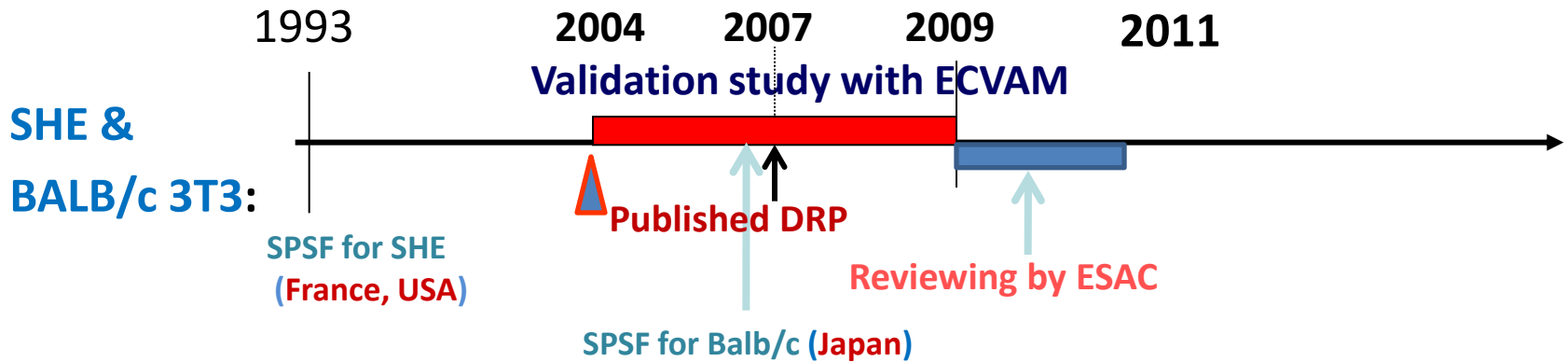
“ROS may induce photochemical/toxic reactions”



**This validation study is on-going.
A part of results will be reported
in the next ICH meeting, November.**

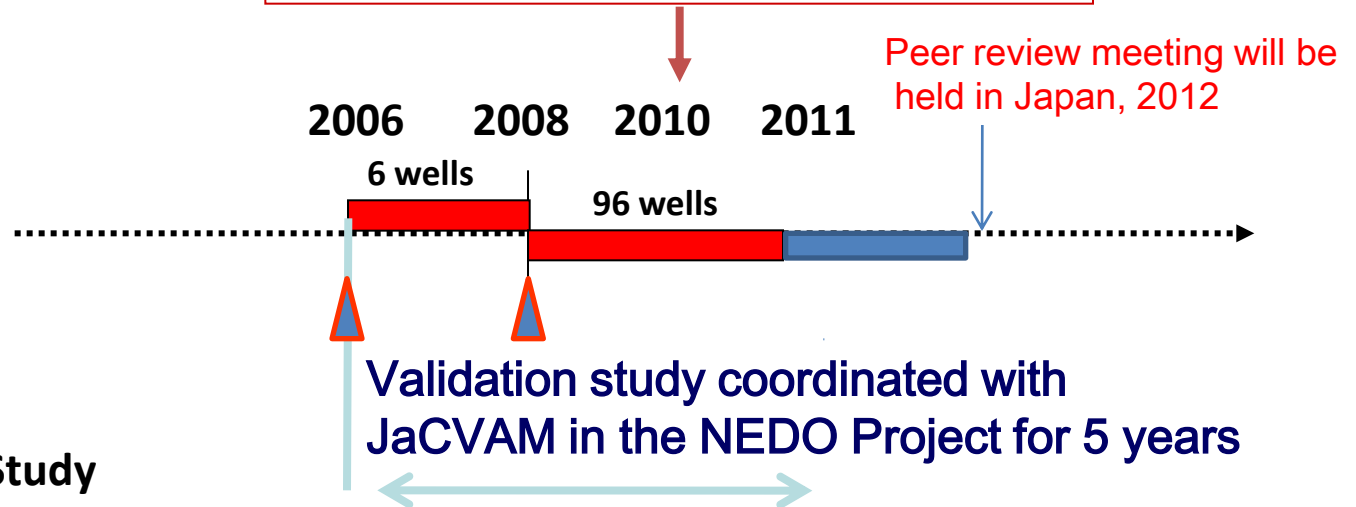
**Photochemical reactions ?
(Photodegradation)
and/or
Phototoxic skin responses ?
(Photoirritation, Photogenotoxicity, Photoallergy)**

Current situation of cell transformation assays



Submitted Bhas 42 CTA (SPSF)

Bhas 42:



: Validation Study

眼刺激性試験代替法の最新情報

眼刺激性試験代替法の国際動向1

Method	Current status	Lead Organization	International acceptance
Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method	Completed		OECD TG 437 (2009)
Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method	Completed		OECD TG 438 (2009)
Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method and the Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method	Completed	NICEATM-ICCVAM, EURL ECVAM and the Netherlands	Adopted by WNT 25 in April 2013.
Use of Histopathology as an additional endpoint in Ocular Safety Testing	Completed		OECD GD 160 (2011)
Cytotoxicity test: SIRC CVS	JaCVAM-sponsored validation study ongoing	JaCVAM; EURL ECVAM, NICEATM-ICCVAM, and Health Canada VMT	
Cytotoxicity test: three-dimensional dermal model (MATREX)	JaCVAM-sponsored validation study in the planning stage	JaCVAM; EURL ECVAM, NICEATM-ICCVAM, and Health Canada VMT	

眼刺激性試験代替法の国際動向2

Method	Current status	Lead Organization	International acceptance
Cytotoxicity test: Short Time Exposure (STE) test	JaCVAM-sponsored validation study completed –peer review completed by NICEATM-ICCVAM	JaCVAM; EURL ECVAM, NICEATM-ICCVAM, and Health Canada VMT liaisons	SPSF submitted and approved in 2012.
Use of anesthetics, analgesics, and humane endpoints for routine use in the TG 405	Completed		OECD updated TG 405 (2012)
Cytosensor Microphysiometer® (CM) Test method	The draft TG submitted to OECD.	EURL ECVAM; NICEATM-ICCVAM	Adoption of draft TG expected by WNT 26 in 2014.
Fluorescein Leakage (FL) test method	Completed		OECD TG 460 (2012)
Human reconstructed tissue models for eye irritation <ul style="list-style-type: none"> - EpiOcular EIT™ - SkinEthic HCE 	EURL ECVAM validation study completed. Peer review anticipated by 2013.	EURL ECVAM; JaCVAM, NICEATM-ICCVAM, and Health Canada VMT liaisons	

OECD/OCDE

437

Adopted:
26 July 2013

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage

OECD/OCDE

438

Adopted:
26 July 2013

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage

牛摘出角膜を用いた 眼刺激性試験代替法（BCOP法） を実際に体験する研修会を開催

(株)化合物安全性研究所は、「ウサギを用いる眼刺激性試験(Draize法)」の代替法試験としてOECDテストガイドライン(TG437)化されている、「牛摘出角膜を用いた眼刺激性試験代替法(BCOP法)」を2012年度に受託試験として立上げました。

BCOP法は食用牛の廃棄部位である眼球(角膜)を有効利用するもので、生存動物への直接適用を避けることで実験動物の使用数の削減と苦痛の軽減を実現しながら、眼への強度刺激性あるいは腐食性を有する化学物質を判定できるとともに無刺激性の化学物質を判定できる有用な代替法試験とされています。さらに弊社では、BCOP法に病理組織学的検査を組み合わせることで、弱刺激性を有する化学物質の分類・判定についての検討を進めております。

本研修会では、試験法の解説、プロトコルの配布、BCOP法の操作体験、今日までの弊社の研究成果のご報告(と今後の検討に関する討論)、懇親会など、1泊2日に渡って充実した内容の研修会となっております。人数に限りはございますが、是非ご参加いただきたく、ご案内申し上げます。

皆様のご意見、ご要望を直接弊社担当者にお聞かせ下さい。

自然豊かな北海道でお待ちしております。

■開催日時:2013年9月3日(火)~4日(水)の1泊2日

■開催場所:株式会社化合物安全性研究所 北海道札幌市清田区真栄363番24

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE 4XX

The Short Time Exposure Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying Chemicals Not Classified as Irritant, as well as Ocular Corrosive and Severe Irritant Chemicals

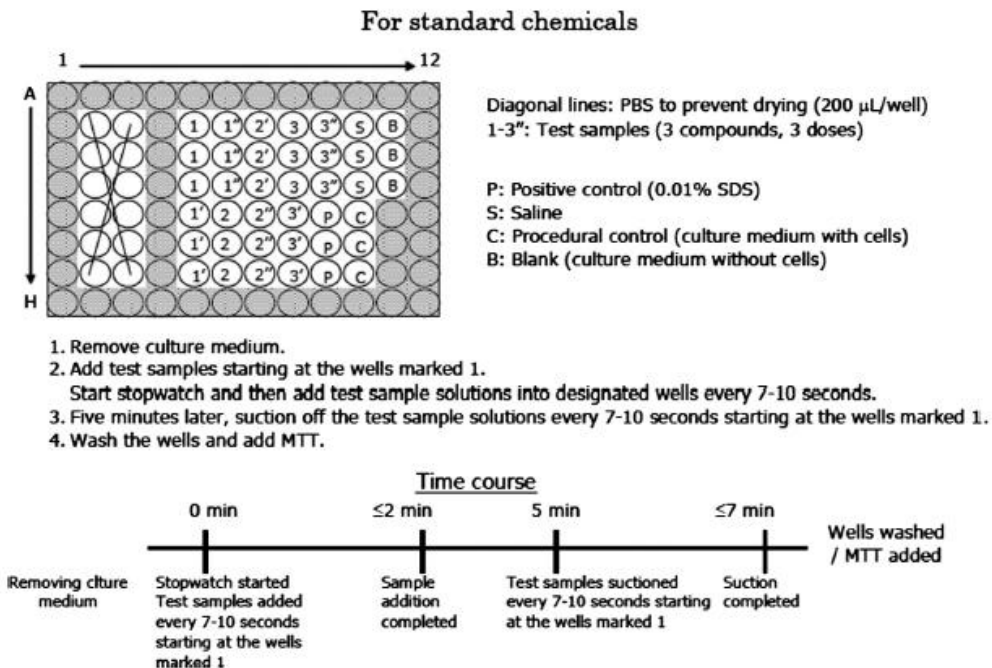


Fig. 2. Methods of test sample exposure.

STE score			
Test substance	Score	Test substance	Score
5%(high)		0.5%(low)	
If CV >70%	0	If CV >70%	1
If CV \le 70%	1	If CV \le 70%	2

CV: Cell Viability



5% score + 0.05% score = STE rank

STE rank	Eye irritation potential
1	Minimal irritant
2	Moderate irritant
3	Severe irritant

Validation study on SIRC assay

Comparison with STE assay and SIRC assay

	STE assay	SIRC assay
Exposure time	5min.	72 hr
Solvents	Saline, 5% DMSO, Mineral oil	Saline, 0.1% DMSO, 0.1% Ethanol
Endpoint	MTT	CV
Relative control	None	Triethanolamine

Both assays are a cytotoxicity with SIRC cell line.

ECVAM-LED VALIDATION STUDIES – EYE IRRITATION (EIVS)

Objective: stand-alone test methods to identify chemicals not classified as eye irritant under GHS for use in a bottom-up testing strategy

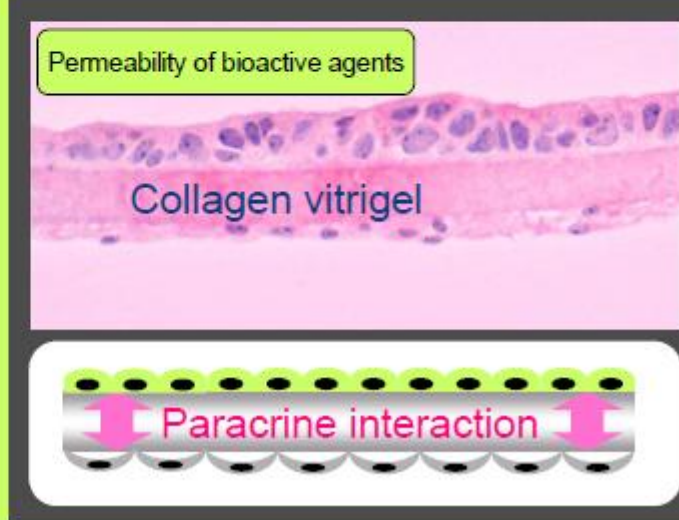
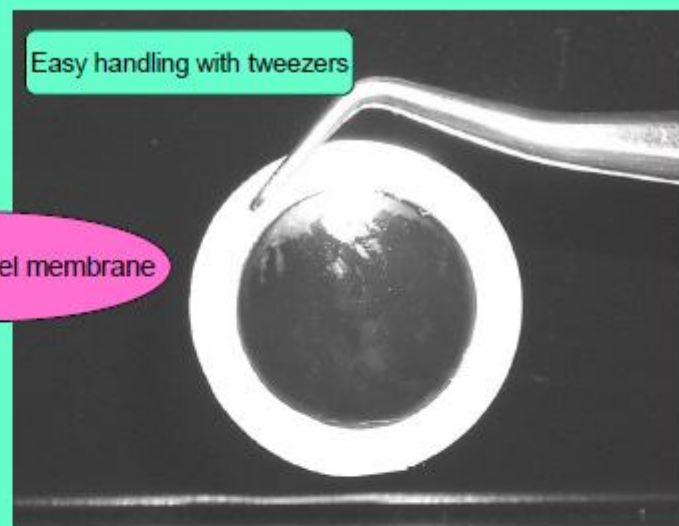
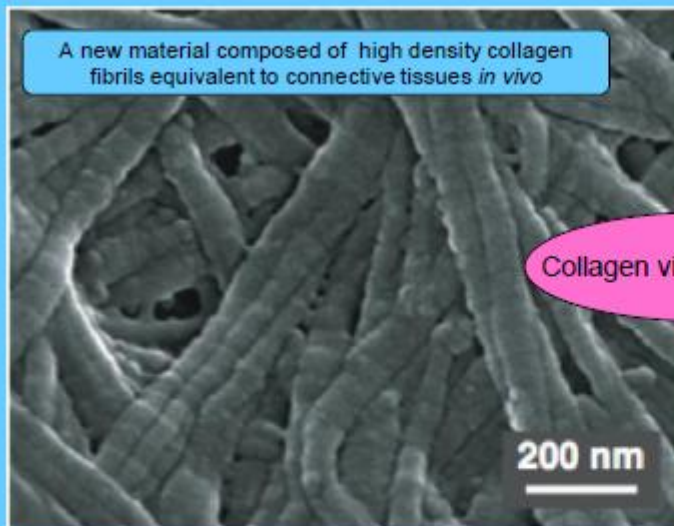
Test systems: EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE

Status:

- 104 chemicals selected and undergoing testing in 3 laboratories
- Testing phase **not finished yet, additional tests needed**
- Analysis of data thereafter, Validation Report possibly to ESAC for peer review in March (**or October**) 2012

Note: The test methods are not intended to differentiate between GHS Category 1 (irreversible effects) and 2A-B (reversible effects). This differentiation would be left to another tier of the Bottom-up/Top-down testing strategy (ECVAM Workshop 2005; Scott et al., 2009).

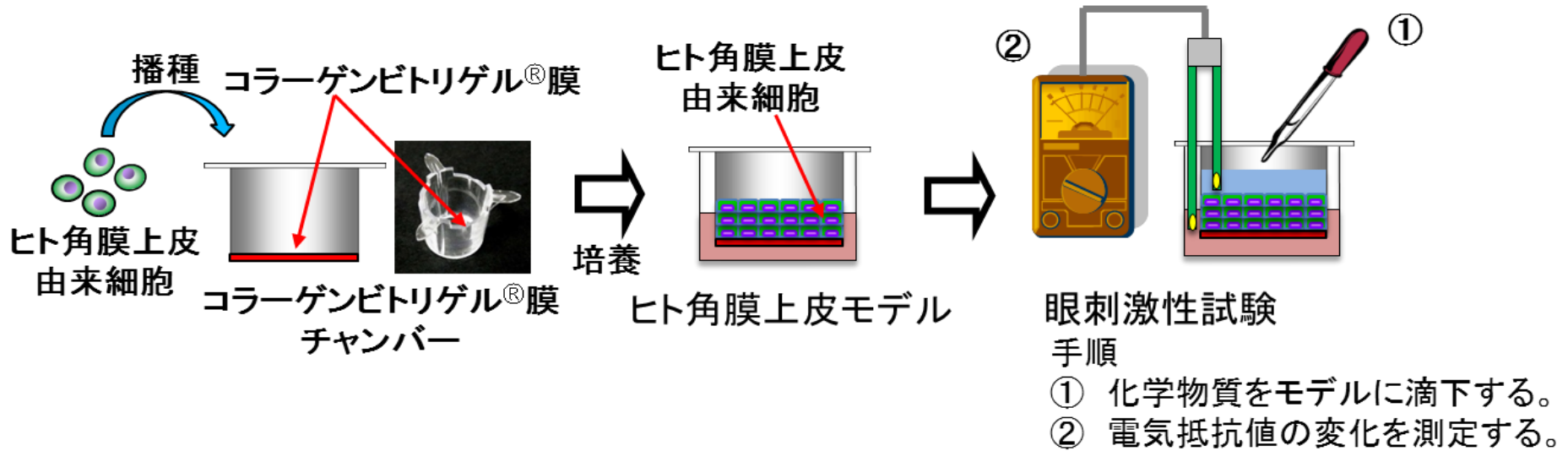
Background- 1 : Collagen vitrigel membrane (CVM)



Takezawa T, *et al.*, Cell Transplantation, 13: 463-473, 2004
Takezawa T, *et al.*, Tissue Engineering, 13: 1357-1366, 2007

Takezawa T, *et al.*, Cell Tissues Organs, 185: 237-4241, 2007
Takezawa T, *et al.*, Yakugaku Zasshi, 130: 565-574, 2010

コラーゲンビトリゲル[®]膜チャンバーを用いた眼刺激性試験法





培養角膜モデルLabCyte CORNEA-MODEL24 を用いた眼刺激性試験代替法共同研究

¹小島 肇、²安中 希、³土屋成一郎、⁴吉武裕一郎、⁵許 睿、⁶鈴木 克、⁷嶋谷 亘、⁸梶田明美、⁹中村 牧、¹⁰渡辺美香、¹¹中嶋圓、¹²坂本興嗣、¹³竹田竜嗣、¹⁴久間將義、¹⁵池田英史、¹⁶稲垣 愛美、¹⁷棟近由記美、¹⁸山本 裕、¹⁹笠原利彦、²⁰福田隆之、²¹仲原 聡、²²渡辺真一、²³倉田 隼人、²⁴篠田伸介、²⁵加藤雅一

- ¹国立医薬品食品衛生研究所、²(株)アイビー化粧品、³石原産業(株)、⁴オッペン化粧品(株)、⁵花王(株)、⁶(一財)化学物質評価研究機構、⁷(株)化合物安全性研究所、⁸(株)鎌倉テクノサイエンス、⁹小林製薬(株)、¹⁰(財)食品薬品安全センター秦野研究所、¹¹(公財)食品農医薬品安全性評価センター、¹²大正製薬(株)、¹³DRC(株)、¹⁴東洋ビューティ(株)、¹⁵日本コルマー(株)、¹⁶(財)日本食品分析センター、¹⁷日本農薬(株)、¹⁸(株)ノエビア、¹⁹富士フィルム(株)、²⁰(株)ボゾリサーチセンター、²¹(株)マンダム、²²ライオン(株)、²³ロート製薬(株)、²⁴(株)薬物安全性試験センター、²⁵(株)ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング

皮膚感作性試験代替法の最新 情報

皮膚感作性試験代替法の国際動向1

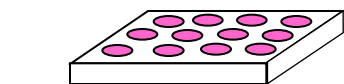
Method	Current status	Lead Organization	International acceptance
Murine Local lymph Node Assay (LLNA)	Completed		OECD TG 429 (2002), ISO (2002)
Updated LLNA	Completed		Updated OECD TG 429 (2010), ISO (2010)
Reduced LLNA (rLLNA)	Completed		Updated OECD TG 429 (2010)
LLNA:DA	Completed		OECD TG442A (2010)
LLNA:BrdU-ELISA	Completed		OECD TG 442B (2010)
Nonradioactive LLNA protocol (LLNA: BrdU-Flow Cytometry)	<ul style="list-style-type: none"> - ICCVAM international peer review, 2009 ➤ KoCVAM validation study on-going 	NICEATM- ICCVAM, KoCVAM	

皮膚感作性試験代替法の国際動向2

Method	Current status	Lead Organization	International acceptance
<i>In vitro</i> skin sensitization assays (h-CLAT; DPRA; MUSST)	Multi-laboratory validation ends in August 2012 (h-CLAT and MUSST). DPRA peer review is over.	EURL ECVAM; JaCVAM and NICEATM-ICCVAM VMT liaison members	Proposal for an Adverse Outcome Pathway for skin sensitization has been approved by the OECD. SPSFs approved for the DPRA, and h-CLAT.
<i>In vitro</i> skin sensitization assay KeratinoSens	External Validation Study, peer review is over.	EURL ECVAM	SPSF approved
<i>In vitro</i> skin sensitization assay IL-8 Luc assay	METI-sponsored validation study ongoing	JaCVAM; EURL ECVAM, NICEATM-ICCVAM, KoCVAM and Health Canada VMT liaisons	

human Cell Line Activation Test (h-CLAT)*

Procedure



THP-1
1x10⁶ cells /mL

24h

Culture with chemicals,
8 doses based on CV75

↑
FcR blocking

↑
Cell staining (CD86 & CD54)

↑
Flow cytometric analysis



Relative Fluorescence Intensity (RFI)

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

MFI = geometric mean fluorescence intensity

Prediction Model

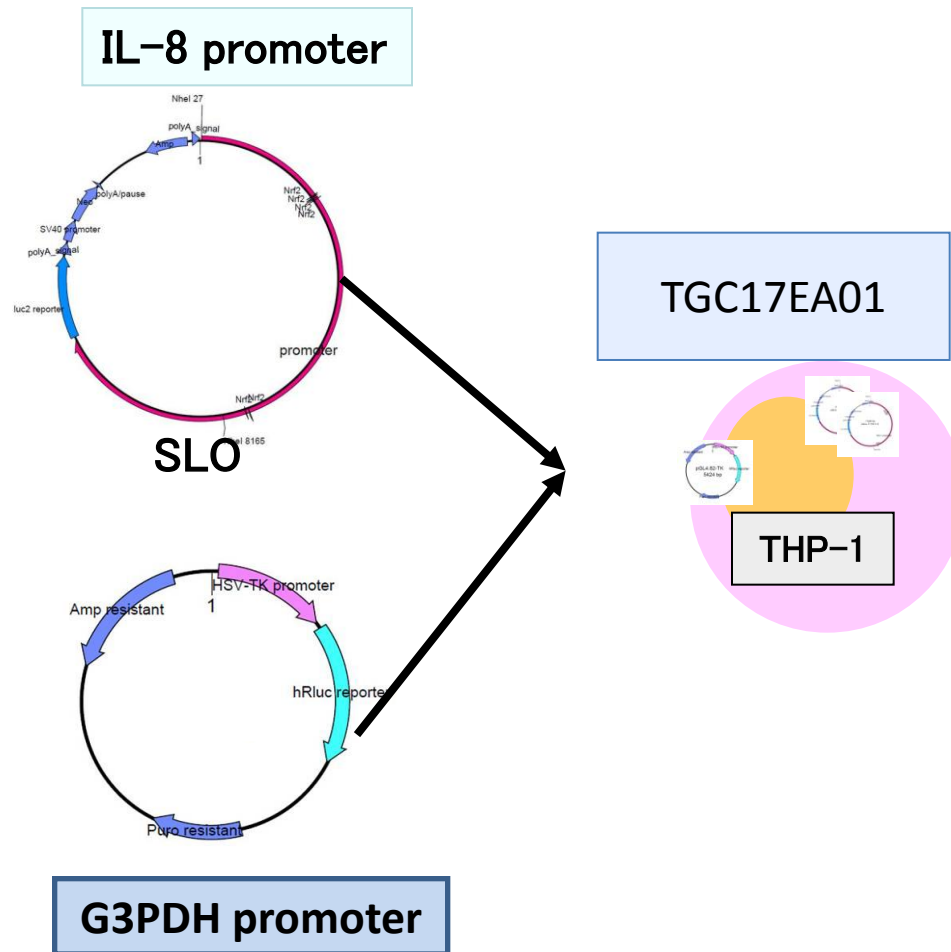
Viability \geq 50% by Propidium Iodide

Positive criteria: CD86 RFI \geq 150% and/or CD54 RFI \geq 200%

Positive: 2 of 3 independent data at any dose should exceed the positive criteria

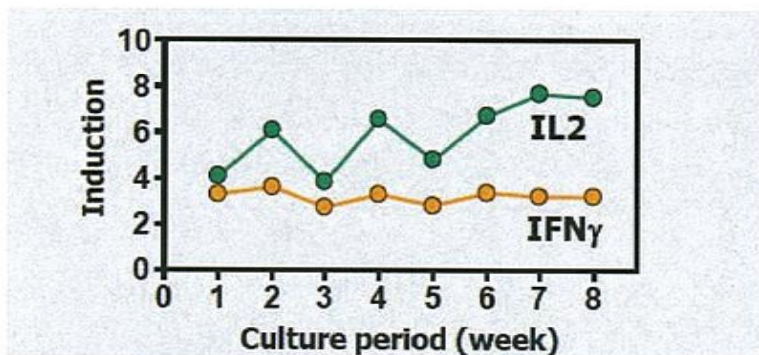
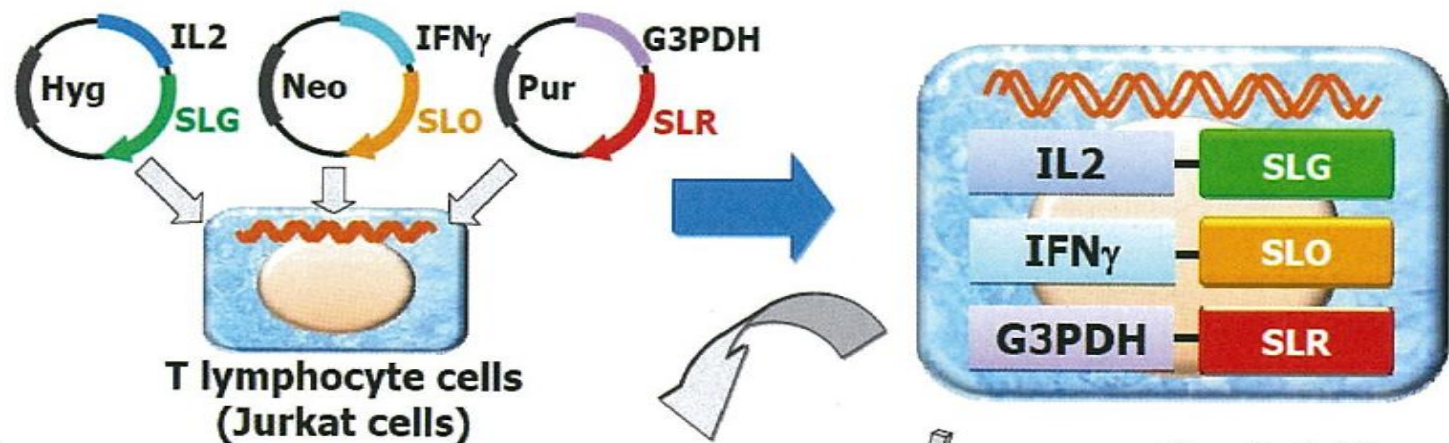
*: Ashikaga et al., 2006 Toxicol In Vitro 767-73., Sakaguchi et al., 2006 Toxicol In Vitro 774-84.

IL-8 Luc assay



Example of toxicity test for immunology using a multireporter assay

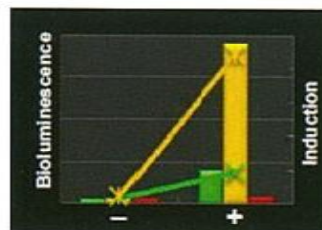
Generation of T cells stably express SLG, SLO and SLR enzymes under two marker gene promoters and internal control gene promoter.



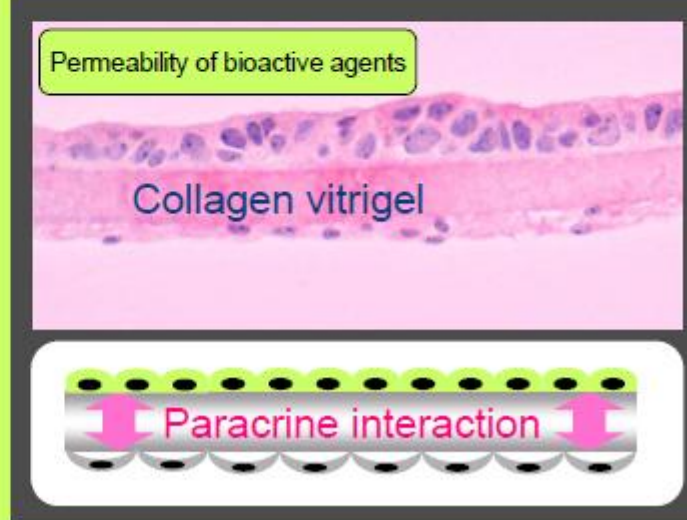
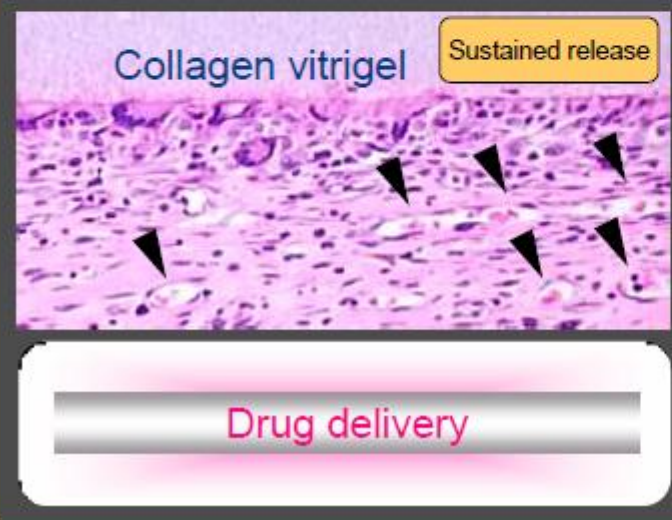
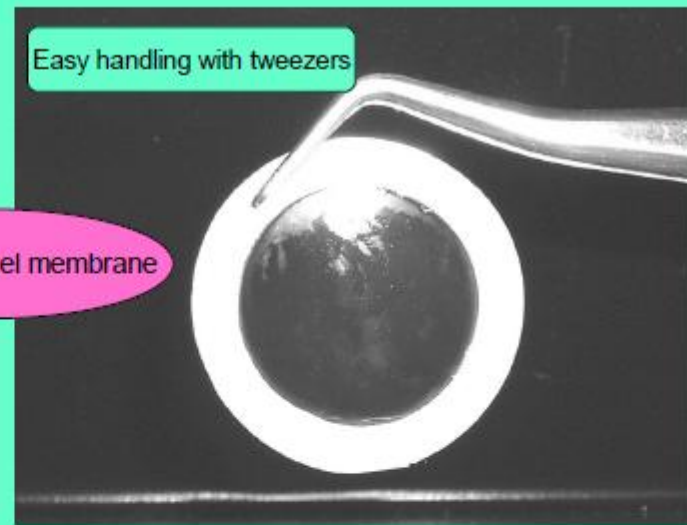
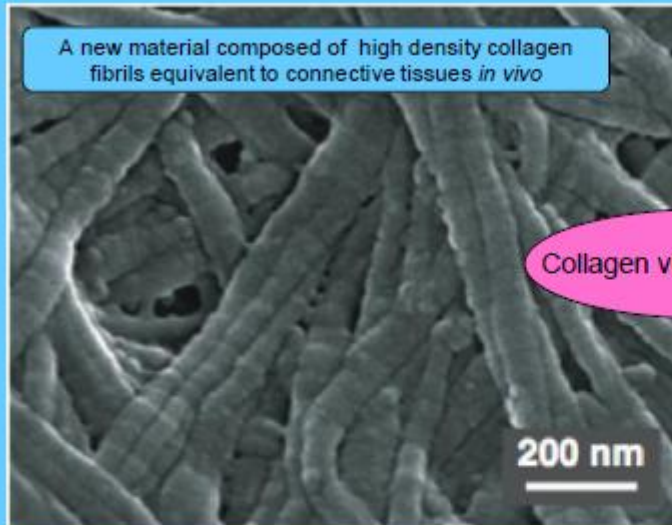
Cells display stable luciferase expressions and respond to chemicals during prolonged culture.

Chemical risk analysis
in a 96well plate
format HTP assay

Reaction with Tripluc[®] assay Reagents



Background- 1 : Collagen vitrigel membrane (CVM)



Takezawa T, *et al.*, Cell Transplantation, 13: 463-473, 2004
Takezawa T, *et al.*, Tissue Engineering, 13: 1357-1366, 2007

Takezawa T, *et al.*, Cell Tissues Organs, 185: 237-4241, 2007
Takezawa T, *et al.*, Yakugaku Zasshi, 130: 565-574, 2010

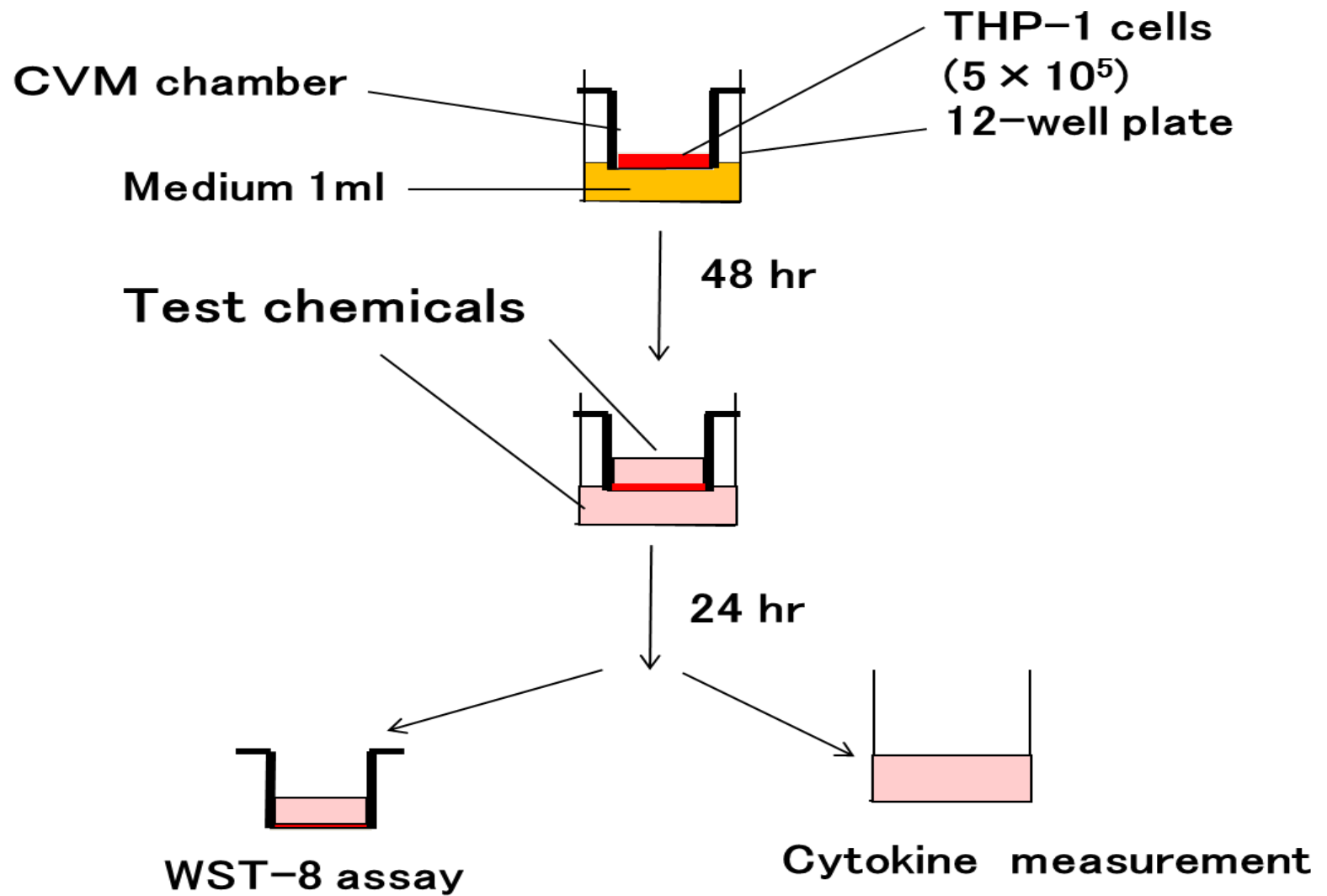
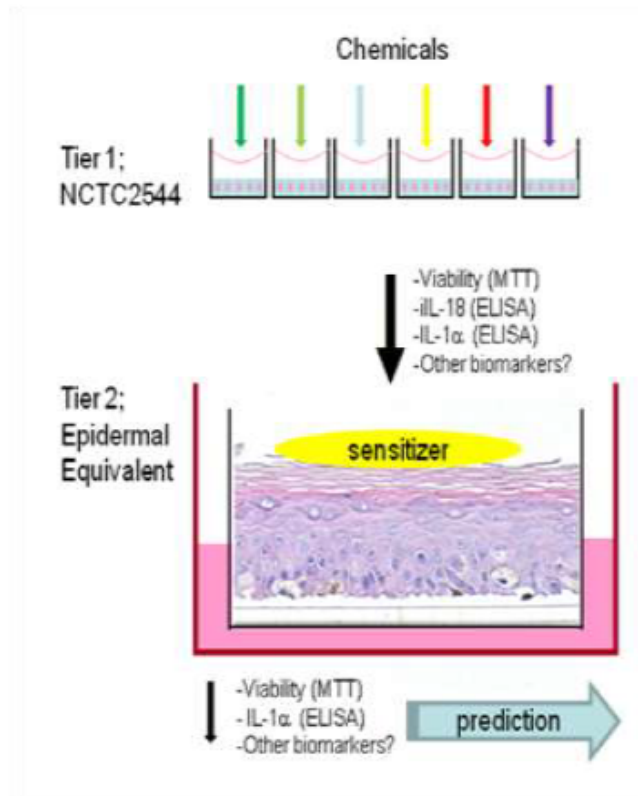


Fig.1 Vitrigel-SST model

A 2-tiered approach for identification and classification of skin sensitizers

3RsMC

3Rs Management
and Consultancy
www.3RsMC.eu



- Identification of contact sensitizers in Tier 1
- IL-18 expression

- Identification of potency of sensitizers in Tier 2
- EC50, MTT
- IL-1 α expression

NCTC2544/IL-18:

- 30 chemicals tested
- WLR: >95%
- Transferable
- BLR: >95%
- Accuracy: 97% (labeling)

RHE potency test:

- 16 chemicals tested
- WLR: >95%
- Transferable
- BLR: >95%
- Concordancy: 92% (classification)

Assessed by Cosmetics Europe

- 10 coded compounds

まとめ: 各試験法の限界と特徴 (EURL-ECVAM)

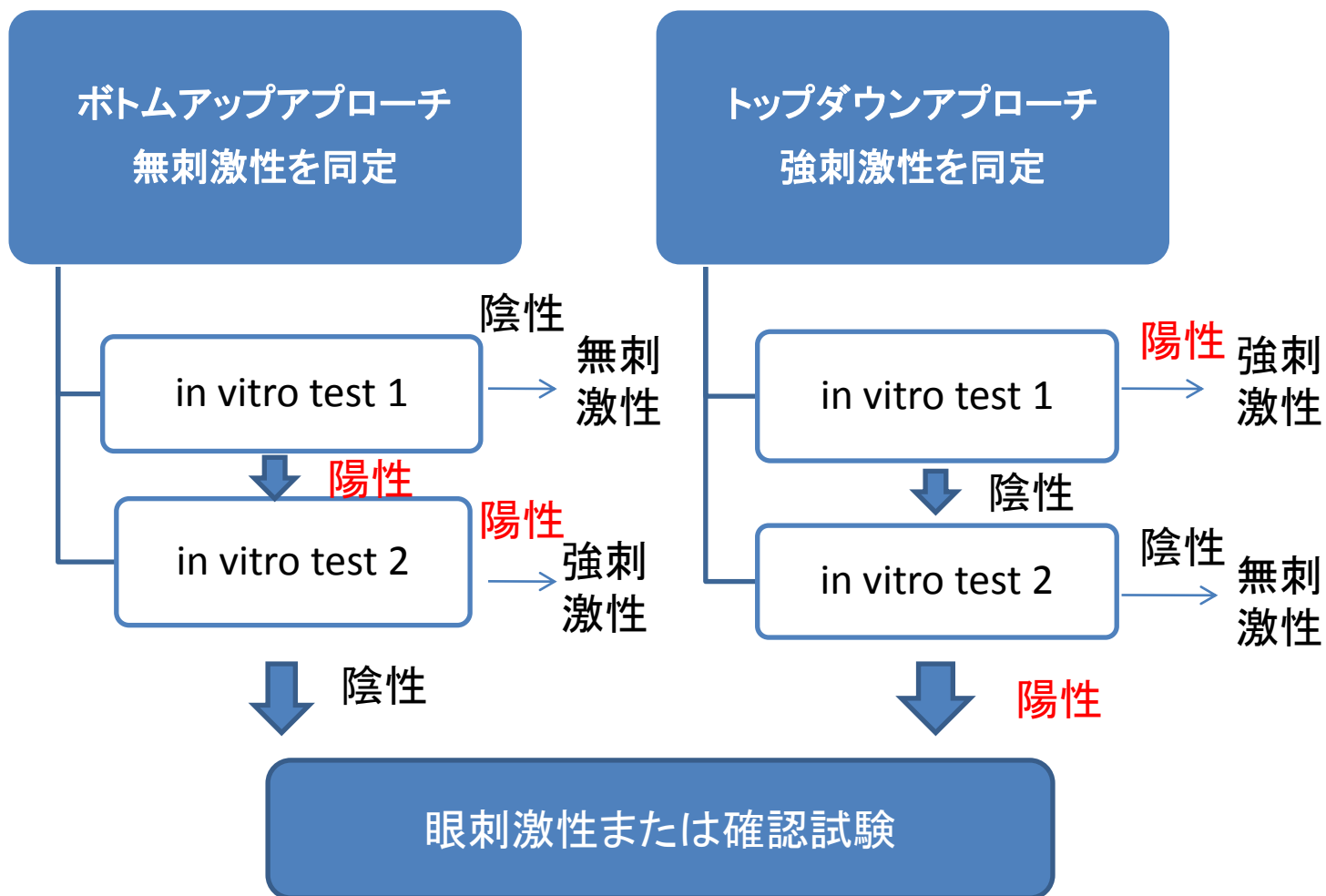
Test	Concordance (%)	Potency class dependent	Pro-haptens	Irritant	Respiratory sensitizations	Dye interference	HTS	Solubility issue	Potency information
DPRA*	85	No(?)	No	Yes	Yes	No	No	Yes	(Yes)
Keratino-sens*	87	Yes	Yes	+/-	?	Yes	Yes	Yes	No
IL-18 detection	97	Yes	Yes	No	No	No	Yes	No	(Yes)
Skin GARD (Genomic Allergen Rapid Detection)	>95	No	Yes	No	Res GARD	No	Yes	Yes	(Yes)
VitroSense	89	No(?)	Yes	No	?	No	Yes	Yes	(Yes)
h-CLAT**	78	Yes	?	Yes	?	?	No	Yes	(Yes)
MUSST**	78	Yes	?	Yes	?	?	No	Yes	No

*: ESAC opinion, **: ECVAM validation performed

AOPと試験法

現在の代替法の特徴

- 単独試験法で安全性を担保できる代替法はない。
- 物性、既存物質との比較、構造活性相関、別の代替法との組み合わせが必要である。
- 試験ありきでなく、情報を活用した毒性の想定が重要である。
- 有害性の評価には有用だが、リスク評価はできない。
- 正確性が良くても、偽陰性の多い方法は認められない。



眼刺激性評価における代替法の組合せ

皮膚感作性試験の有害性転帰事象 (AOP)

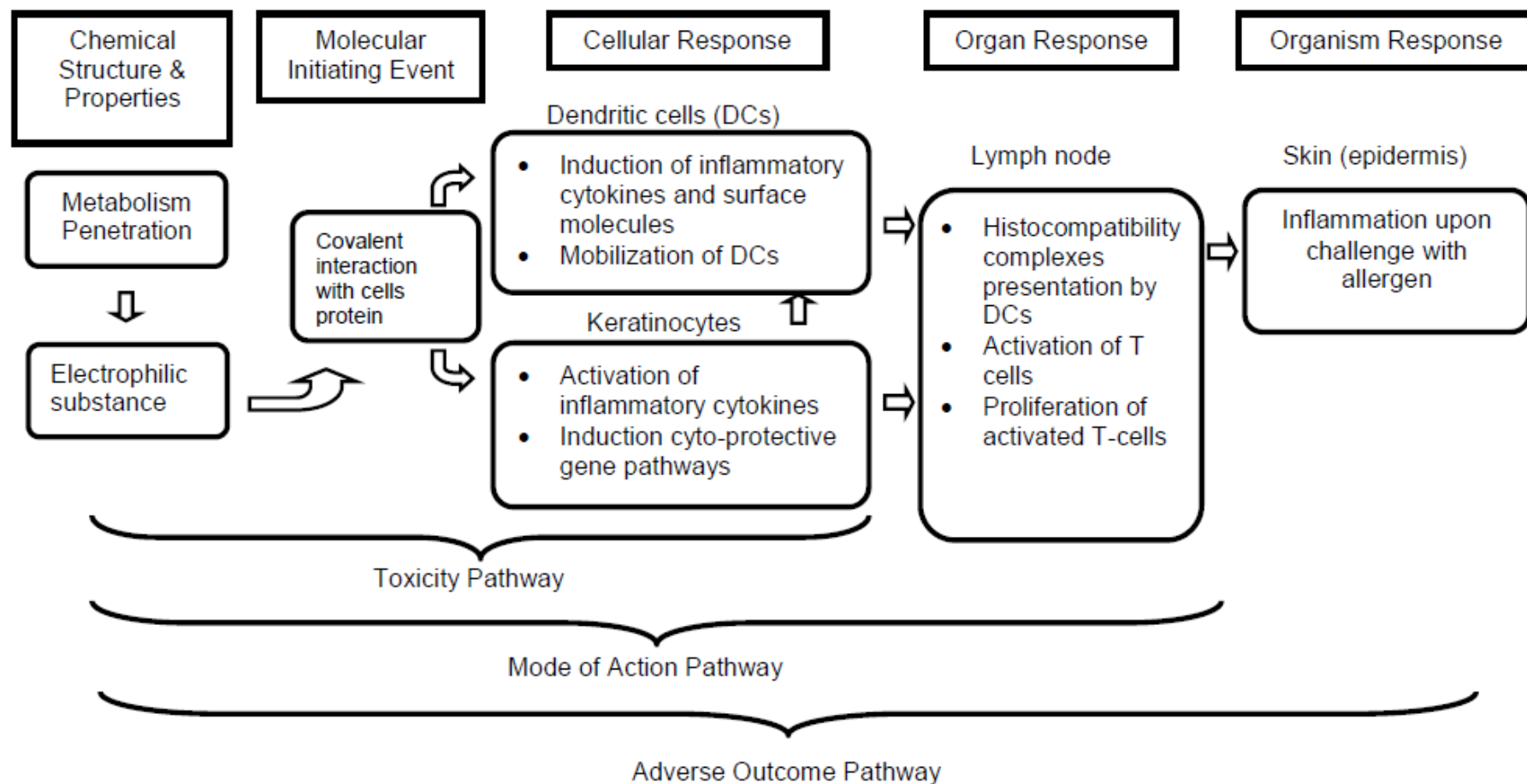
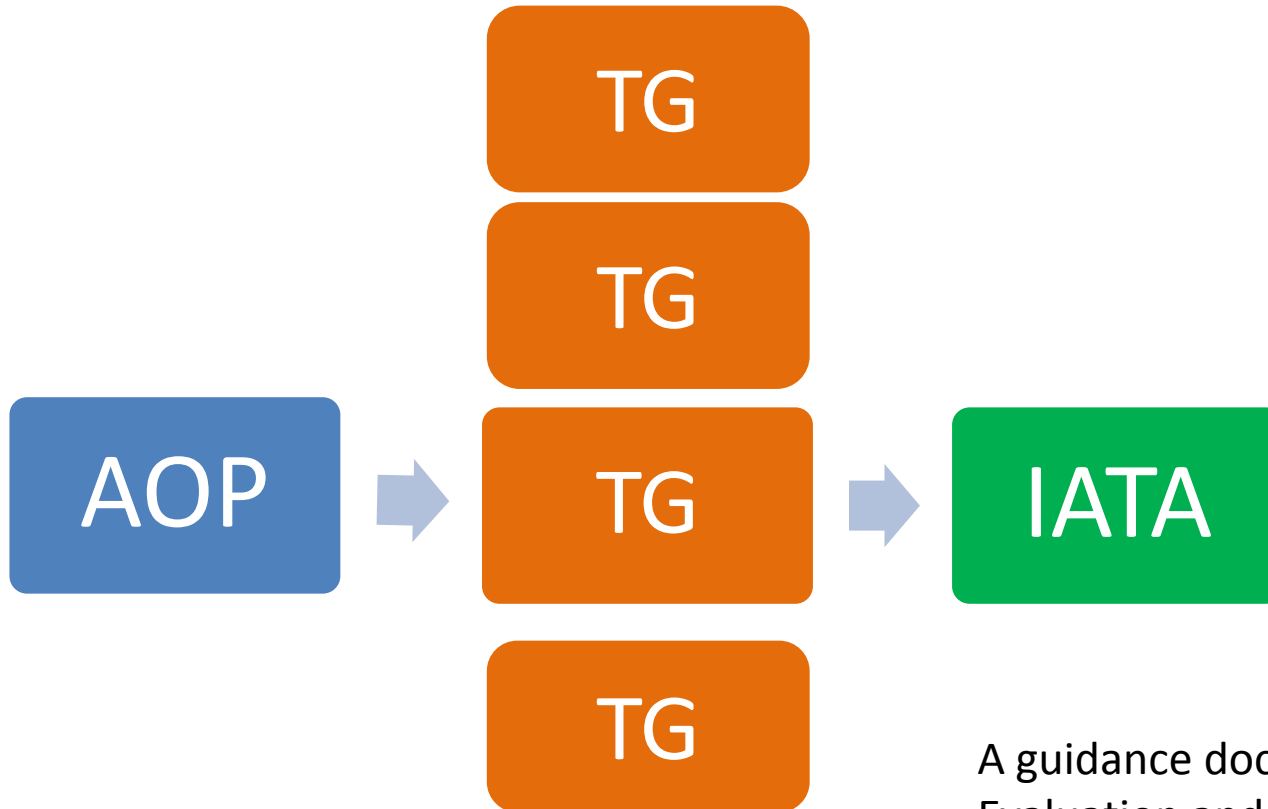


Figure 3. Flow diagram of the pathways associated with skin sensitisation.

行政的な受入れに関するOECDの戦略



AOP: Adverse
Outcome Pathway

TG: Test Guideline

A guidance document on the
Evaluation and Application of
Integrated Approaches to Testing
and Assessment (IATA)

皮膚感作性試験の有害性転帰事象 (AOP) と試験法

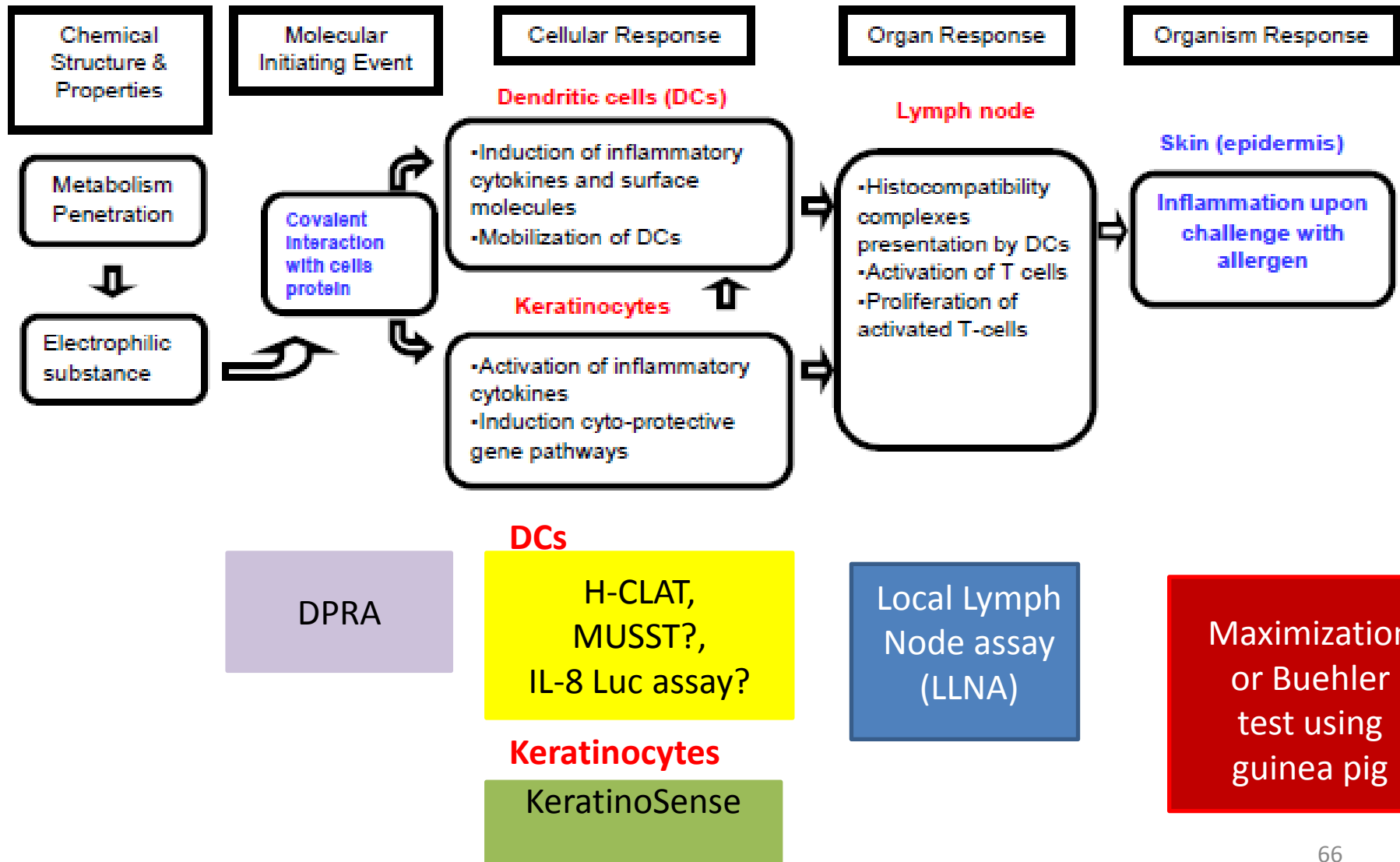
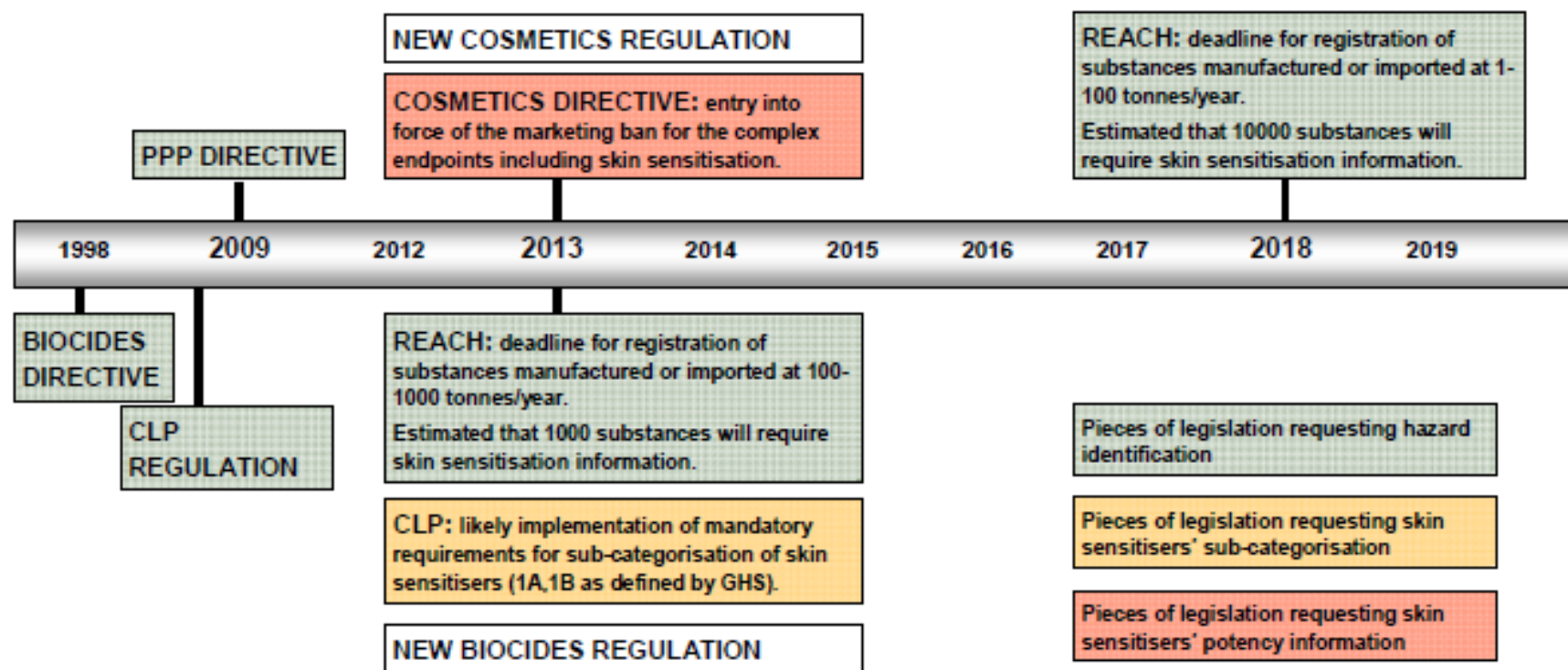


Figure 3: Timeline for implementation of EU legislation and skin sensitisation information requirements.



7次改正の影響

基本概念:

OECDで認証された代替法は即座に安全性試験に用いる。

in vitro 試験法がなくても、**2014年に動物実験を用いた製品は販売できない。**

免責:

2013年までに以下のin vitro 試験法は利用できない

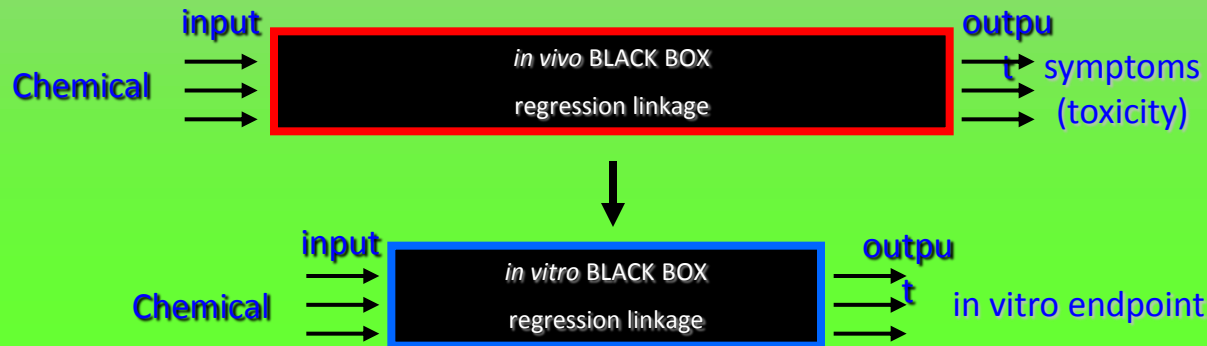
トキシコキネティクス、反復投与毒性、発がん性、皮膚感作性、生殖毒性

問題点

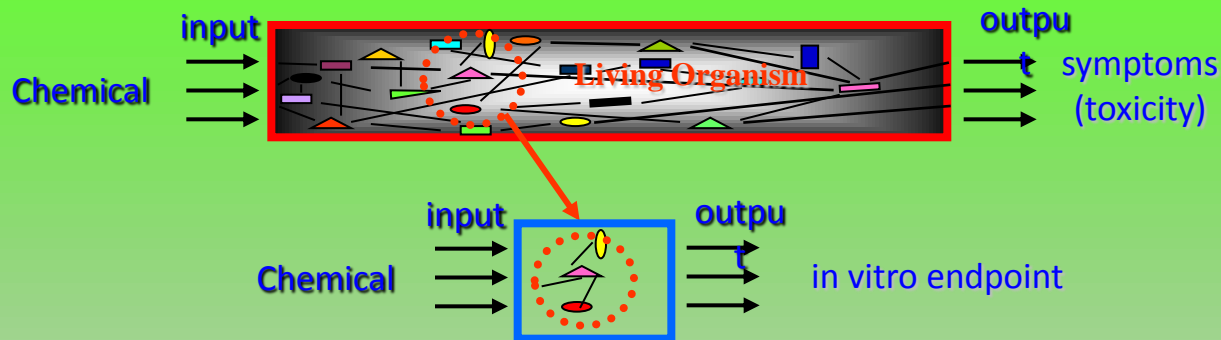
1. EUの化粧品規制により、動物試験は2%しか減らない
2. World Trade Organisation (WTO) = 日本 + 米国に抵触?

動物モデルと*in vitro*

(1) Miniature BlackBox Approach

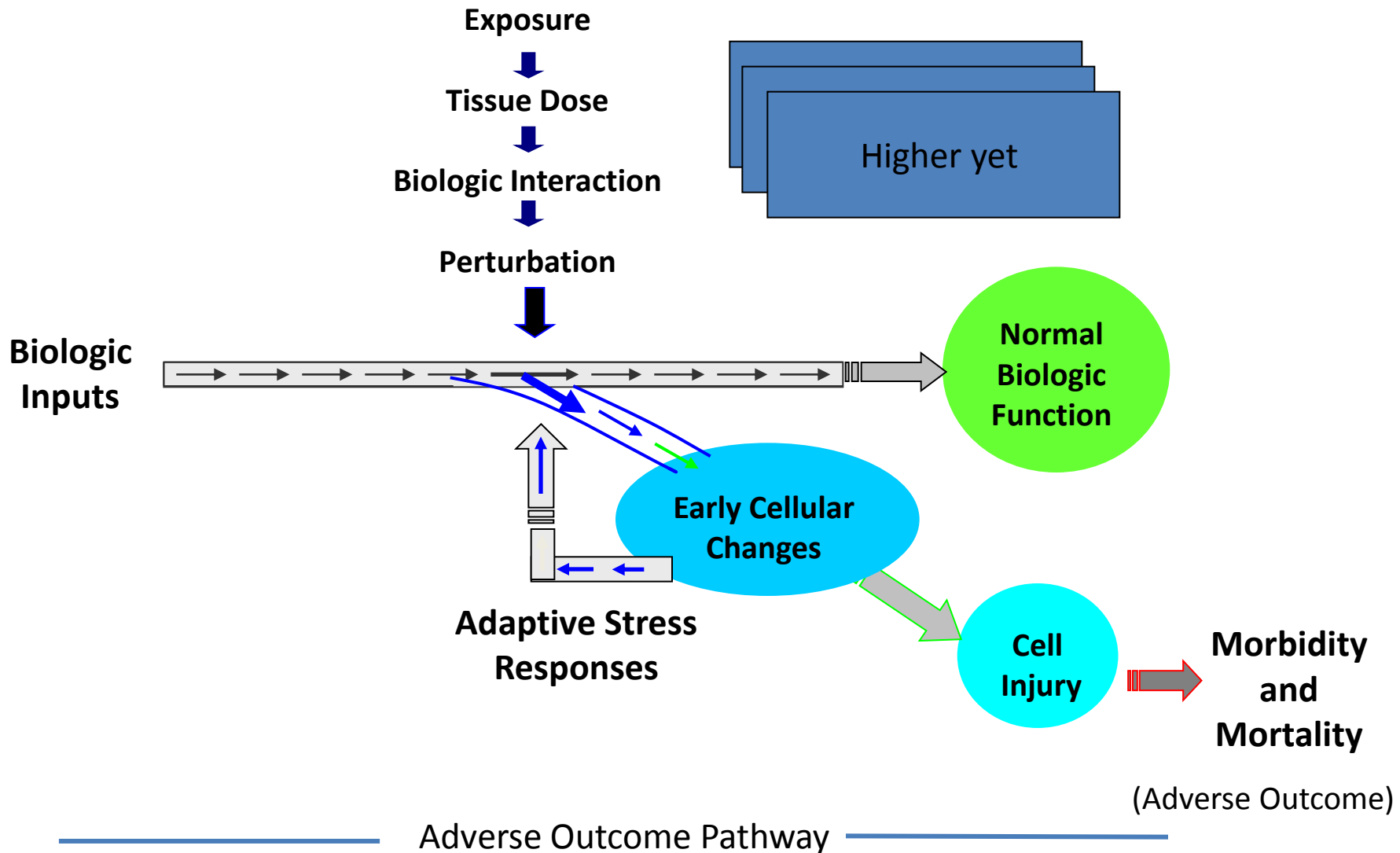


(2) *In vivo* mechanism Excision Approach

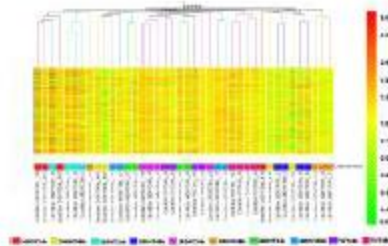
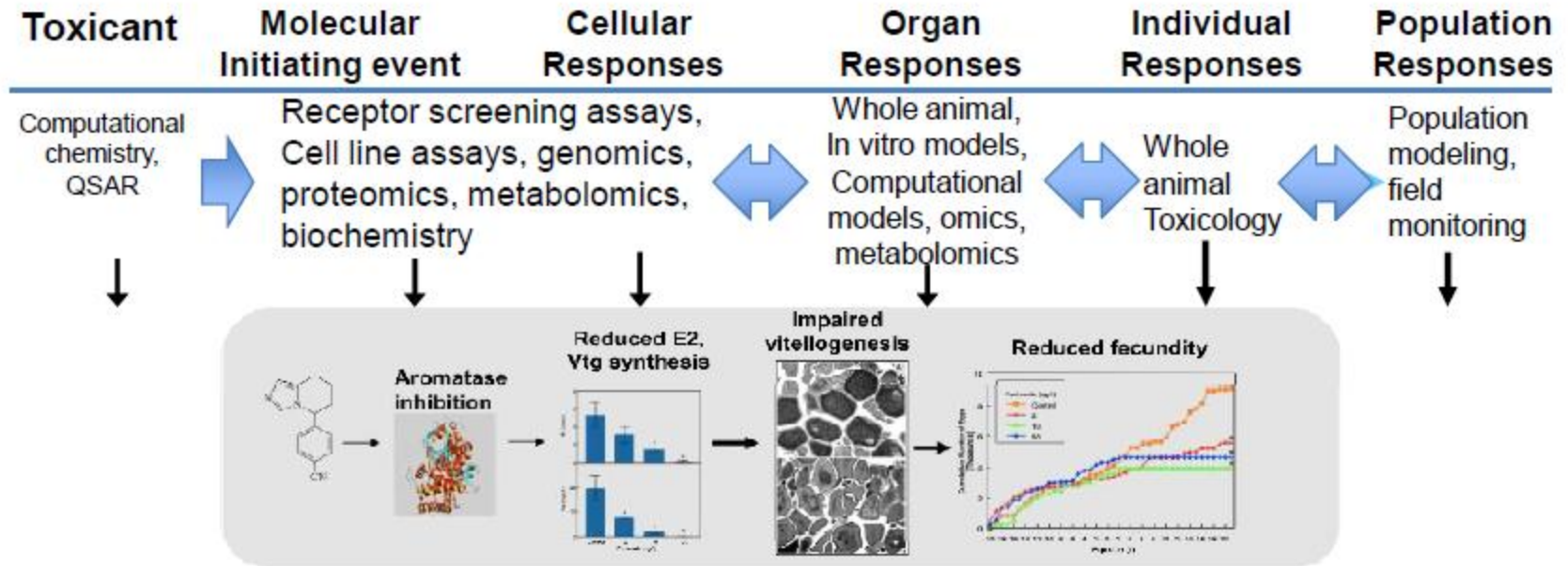


- (1) Miniature BlackBox Approach requires “diagnostic” process similar to *in vivo* studies. Until cellular symptoms are well understood to the level of *in vivo* diagnosis, the validation process will be virtually endless.
- (2) Mechanism-excision type methods always have Positive controls and Negative controls. With which the validation process is easy and concise.

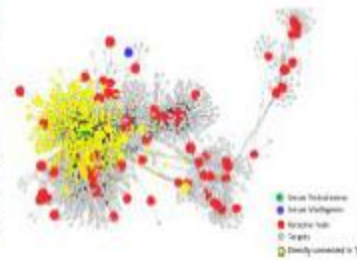
Perturbation of Toxicity Pathways



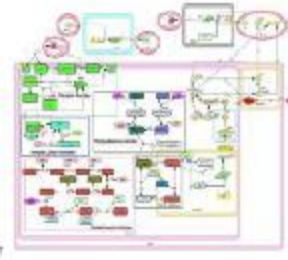
AOP and alternative animals in human health assessment



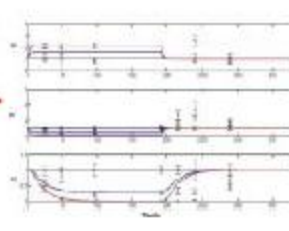
Screening for toxicological effects and chemicals



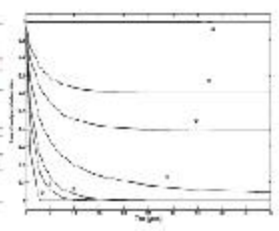
Pathway and network impacts



Mechanistic modeling

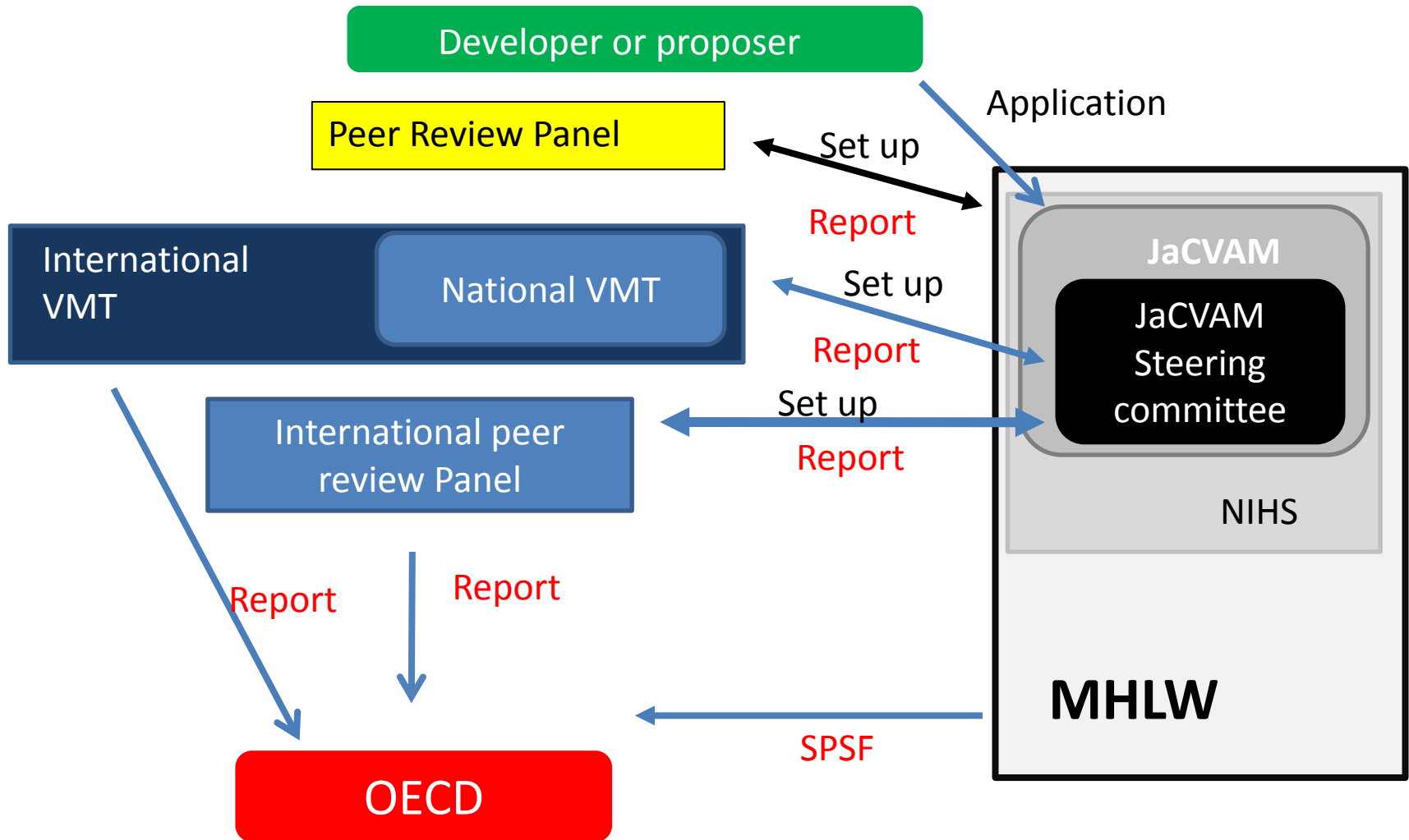


Predicted effect



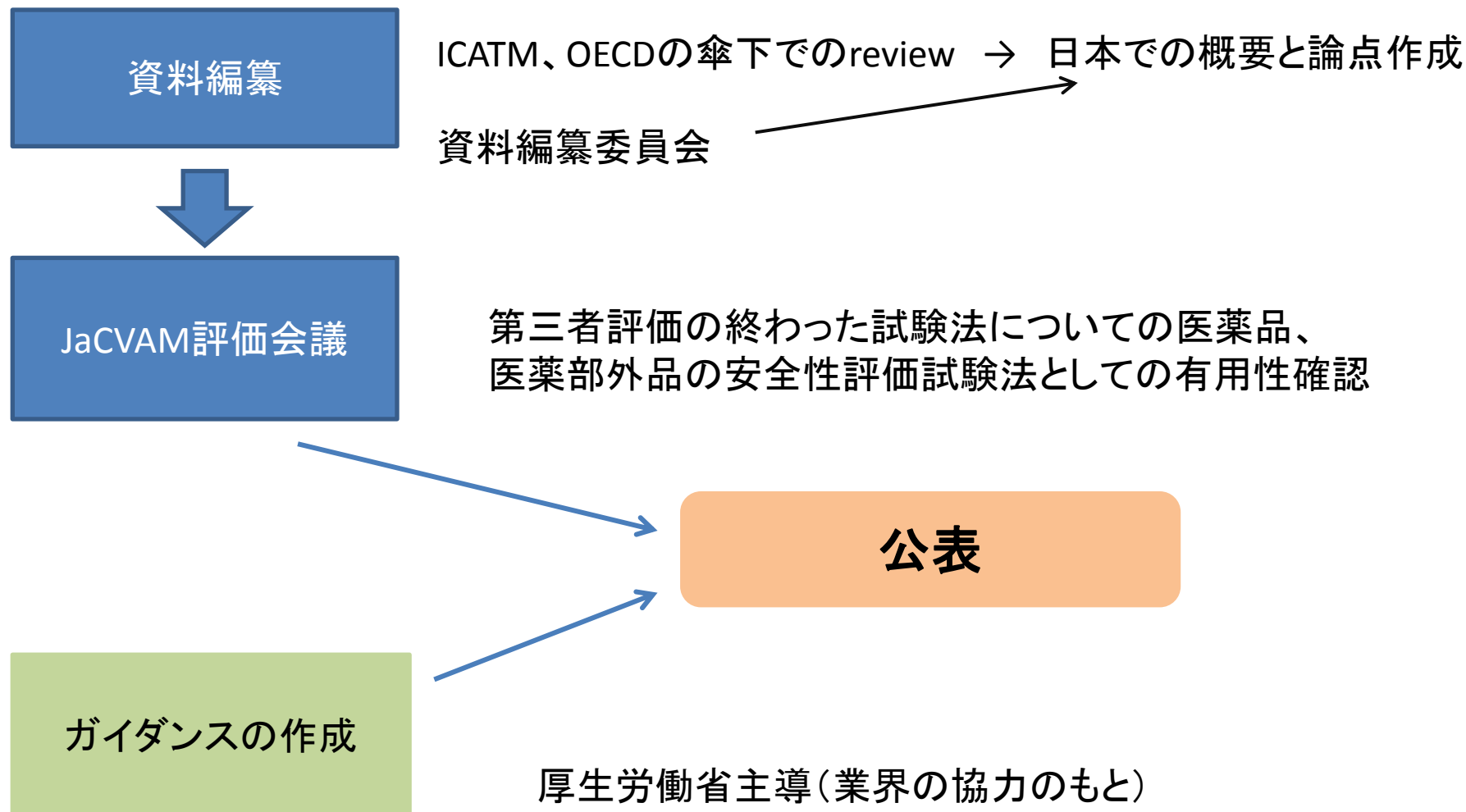
Population impact

今後の試験法に関するまとめ1



Test Guideline

今後の試験法に関するまとめ2





About JaCVAM



Update on JaCVAM



Academic activities



Submission of Alternative
Methods to JaCVAM



International Cooperation

御静聴ありがとうございました

Policy and Mission: JaCVAM's policy and mission is to promote the 3Rs in animal experiments for the evaluation of chemical substance safety in Japan and establish guidelines for new alternative experimental methods through international collaboration.

the 3Rs in animal experiments—Reduction (of animal use)

Refinement (to lessen pain or distress and to enhance animal well-being)

Replacement (of an animal test with one that uses non-animal systems or phylo-genetically lower species)
(OECD GD34)

News

⊕【NEW】news texts dummy texts news texts dummy texts
news texts dummy texts(2009.7.16)

⊕news texts dummy texts news texts (2009.7.3)

⊕news texts dummy texts news texts dummy texts news
texts dummy texts (2009.7.3)

Contents

⊕About JaCVAM

Message from JaCVAM / Policy and Mission of JaCVAM /

Organization of JaCVAM / Glossary /

Proposal for Engagement Rules

⊕JaCVAM Activities