

- トキシコキネティクス
  - ・ トキシコキネティクス (EC B. 36, OECD417)
- 光が誘起する毒性
  - 1) 光毒性及び光感作性 (in vitro)
    - ・ 3T3 NRU PT (EC B. 41, ドラフトOECD432)
    - ・ in vitro光感作性試験はない。
  - 2) 光変異原性及び光染色体異常誘発性
    - ・ ケースバイケースで評価 (未だ有用な結果が得られていないため)
- ヒト試験結果

#### C-1-4 EU 危険物質指令関連試験法

化粧品指令第7次改正の第4a条の1(d)には、動物実験の禁止に係わるものとして、危険物質指令の別表V(Council directive 67/548/EEC Annex V)並びにEU委員会とSCCNFPが協議して新たに作成する別表IXが記述されている<sup>2)</sup>。この危険物質指令の別表Vに係わるのが欧州化学局(CEB; European Chemicals Bureau)である。

CEBは、9月12日にEU危険物質指令に関する試験法の状況を更新した<sup>13)</sup>。第29次修正の日程は明らかにされていないが草稿が完成しており、第29次修正に加えらるる予定の試験法は、以下の通り。

- ・ 固定用量法(B.1 bis, 修正版)
- ・ 急性毒性等級法(B.1 tris, 修正版)
- ・ 皮膚刺激性/腐食性(B.4, 修正版)
- ・ 眼刺激性/腐食性(B.5, 修正版)
- ・ げっ歯類及び非げっ歯類における催奇形性試験(B.31, 修正版)
- ・ 二世代生殖毒性試験(B.35, 修正版)
- ・ LLNA(B.42, 新規)
- ・ 神経毒性(B.43, 新規)

また、2004年に検討が予定されている試験法は以下の通り。

- ・ 皮膚腐食性試験(in vitro)
- ・ in vitro皮膚腐食性試験:  
ラットTER(B.40)
- ・ in vitro皮膚腐食性試験:  
3次元ヒト皮膚モデル(B.40 bis)
- ・ in vitro光毒性試験:3T3 NRU PT(B.41)
- ・ 急性毒性試験:上げ下げ法(B.1)

これらは全て、OECDガイドラインとして承認されたものやECVAMのESACにより承認された試験法である。

#### C-1-5 小括

本年度は昨年度末に公布された化粧品指令第

7次改正により、EU関係機関において新しい動きが認められた年であった。ECVAMは開発すべき試験法への取り組みを明確化させるために重点項目を再編成し、さらにはグローバルな共同研究体制を推進してきたが、本年度はESACにより新たに承認された試験法はなかった。

一方、行政サイドとしては、EUの危険物質指令に係わるECBや化粧品第7次改正を踏まえSCCNFPが、各安全性試験項目の見直しを開始し、現時点で適用可能な代替法を明確にしたことが挙げられる。このように、EUでは、OECDやECVAMのESACでの検討結果が着実に行政サイドへ反映されつつある。

#### C-2 米国における代替法開発の動向

##### C-2-1 ICCVAMにおける代替法評価状況

ICCVAMは、米国官庁間の調整を図り共通の目標である代替法のバリデーションを統括する委員会として機能してきており、現在はNIEHSの恒久的委員会として位置付けられている。現在、ICCVAMは9省庁の15研究機関からの委員で構成されている。

本年度の代替法評価に関連するものとしては、新規代替法評価をICCVAMに提案するための最新ガイドライン<sup>14)</sup>をICCVAMのホームページに公開したことを2003年11月14日の官報(Federal Register)に告示した<sup>15)</sup>。これは、1998年5月に公表されたガイドラインの第2次改定版であるが、これまでに評価したLLNAやCORROSITEX™などの検討経緯を踏まえて作成され、研究、開発、プレバリデーション、バリデーション、専門家による評価(Peer Review)、承認及び行政における採択からなる評価プロセスから始まり、試験の原理やプロトコール、結果の精度・再現性・信頼性等の提出に必要な関連データがガイドラインとして示されている。

また、皮膚腐食性代替法CORROSITEX™のプロトコールを事例としてホームページに公開した<sup>16)</sup>。本プロトコールには、国連危険物質輸送専門委員会が定めた皮膚腐食性分類、PACKING GROUP I:強腐食性、PACKING GROUP II:中腐食性、PACKING GROUP III:弱腐食性の3つに分類するための試験手順や判定基準などが記載されている。

また、ICCVAMはECVAMと密接な情報交換を持ち、お互いが承認した試験法については、完備型の評価を実施しない評価促進プロセスを適用するのみならず、急性全身毒性を評価するための細胞毒性試験については共同のバリデーションを実施中であるが、2004年2月に、ヒト急性毒性予測モデル確立に向けたin vitro細胞毒性

試験法のバリデーション活動の進捗状況に関する最新情報が ICCVAM サイトに掲載された<sup>17)</sup>。Phase Ia 試験は 2002 年 11 月に、Phase Ib 試験は 2003 年 5 月に完了し、それらの結果を踏まえて再現性向上の観点からプロトコルを修正した Phase II 試験を 2003 年 11 月に完了した。現在、最適化されたプロトコルを使用した試験 Phase III の段階にあり、そのプロトコルが公開されている (TEST METHOD PROTOCOL for the Normal Human Keratinocyte (NHK) Neutral Red Uptake Cytotoxicity Test 及び TEST METHOD PROTOCOL for the BALB/c 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Test)。

また、ICCVAM で現在進行中のものとしては、4種の眼刺激性試験代替法のプレバリデーション計画である。この4種眼刺激性試験代替法は、EU において重み付けアプローチとしてケースバイケースで使用されている BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability)、HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane)、ICE (Isolated Chicken Eye Test) 及び IRE (Isolated Rabbit Eye Test) であることから、このプレバリデーションに関しても ECVAM との連携が推測される<sup>18)</sup>。

一方、これまでに ICCVAM で評価された試験法で行政サイドにおいて採用されたものとしては、EPA による LLNA が挙げられるが、その他の試験法については採択の情報はない<sup>19)</sup>。

#### C-2-2 小括

本年度の米国における代替法開発の動向としては、新規試験法の評価を ICCVAM に提案するためのガイドラインの最新版を ICCVAM のホームページに公開したことが挙げられる。このことにより、代替法の開発や評価がこれまで以上に加速することが予想される。

また、ICCVAM と ECVAM の相互協力の流れは、現在実施されている急性毒性試験代替法としての細胞毒性試験の共同バリデーションや今後予想される眼刺激性試験代替法のプレバリデーションの共同実施より確実に加速していると思われる。

さらには、ICCVAM が承認した LLNA が EPA により採用されたことは、米国においても行政サイドにおける代替法活用の道筋が明確化してきたことを示すものと考えられる。

### C-3 OECD の動向

#### C-3-1 OECD ガイドラインの動向

これまでに OECD ガイドラインについては、LLNA ガイドライン、in vivo 経皮吸収試験ガイドラ

イン、in vitro 経皮吸収試験ガイドライン、in vitro 光毒性試験ガイドライン、皮膚刺激性/腐食性試験ガイドライン及び眼刺激性/腐食性試験ガイドラインについて日本化粧品工業連合会・技術委員会安全性部会で検討し、質問やコメントを一般的なものと個別なものに分けて取りまとめ、厚生科学研究班を通じて、OECD に提出してきた。

このうち、皮膚刺激性/腐食性試験ガイドライン 404、眼刺激性/腐食性試験ガイドライン 405 及び LLNA ガイドライン 429 については、2002 年 4 月に承認され、昨年度ガイドライン化されている。

一方、in vitro 光毒性試験ガイドライン 432、in vivo 経皮吸収試験ガイドライン 427、in vitro 経皮吸収試験ガイドライン 428、in vitro 皮膚腐食性試験ガイドライン 430 (Transcutaneous Electrical Resistance Test)、in vitro 皮膚腐食性試験ガイドライン 431 (Human Skin Model Test) については 2002 年 5 月の専門家会議で承認されているが、ガイドライン化はまだなされていない。これは、ガイドライン化に向けた事務的作業の遅れによるものと考えられている。

この他、In vitro 毒性試験の GLP 化についての議論が進行中との情報があるが、まだ、ドラフト案は公開されていない。

その他の試験法については、現在のところ審議状況に関する情報は得られていない。

#### C-3-2 小括

昨年度は、LLNA ガイドライン 429 や皮膚刺激性/腐食性試験ガイドライン 404、眼刺激性/腐食性試験ガイドライン 405 が正式に認められている。皮膚刺激性/腐食性試験ガイドライン 404 や眼刺激性/腐食性試験ガイドライン 405 では皮膚刺激性や眼刺激性を評価する上で、皮膚腐食性を先に評価することが求められている。そのため、2002 年 5 月に専門家会議で承認された in vitro 皮膚腐食性試験ガイドライン 430 (Transcutaneous Electrical Resistance Test) や in vitro 皮膚腐食性試験ガイドライン 431 (Human Skin Model Test) がガイドライン化されれば、この方法を皮膚刺激性評価や眼刺激性評価に先行して実施することが要求される。

OECD 毒性試験ガイドラインは、新規化学物質の安全性評価法として幅広く適用されることから、本邦においては、行政を中心とした産官学による組織的な対応が必要と考えられる。

### C-4 日本における代替法開発の動向

C-4-1 厚生労働科学研究班における代替法の評価

平成15年度の本厚生労働科学研究班の活動において特筆すべきことの一つとして、5月22日の参議院厚労委員会において、本邦における代替法開発に関しての討議がなされ、本研究班の紹介があったことが挙げられる<sup>20)</sup>。このことにより、本研究班の存在が国会レベルで認識されたことは、今後の代替法の開発やバリデーションに大きな影響を与えるものと考えられる。

本厚生科学研究班『動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究』は平成13年度に設置された。この研究班の目的は、海外におけるバリデーションに関する情報を収集し、それを関連科学分野の専門家と行政担当者を含めた会議により総合的に評価することである。この評価により、欧米あるいはOECDで承認された代替法の利点・欠点を明らかにし、それらの本邦における採用の可否の決定並びに適正利用に資することを意図している。

平成13年度及び平成14年度は、ECVAMで既に承認され、現在、OECDでガイドライン案が検討されている『Balb/c 3T3細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法』について、評価会議や評価委員会を組織して、総合的に評価してきた。それらの結果の詳細については、平成13年度及び平成14年度の本厚生科学研究班の報告書に詳細に記載されている。なお、平成14年度の本厚生科学研究班の報告書に記載した『Balb/c 3T3細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法』の評価文書については、本評価文書が多くの研究者に認知・活用されるように学術雑誌への掲載に向け準備中である。

平成15年度の本厚生労働科学研究班の活動としては、OECDガイドライン案『Balb/c 3T3細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法』に従って試験を実施する場合の問題点を明らかにするため、4研究機関でのバリデーションを実施したことがまず挙げられる。このバリデーションでは、ガイドライン作成のためにEUのバリデーション研究で使用されたメタルハライドランプ(SOL500)とそれぞれの研究機関での実績のある光源を用いた場合について比較検討を行っている。結果の一部については、日本動物実験代替法学会第17回大会で報告されたが、現在、詳細な解析が進行中である<sup>20)</sup>。

また、平成15年度の本厚生労働科学研究班の活動としては、評価すべき試験法を広く公募した結果提案されてきた『酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法』を、評価委員会、評価会議、研究会議により評価し、日本動物実験代替法学会に施設間バリデーションを委託した点も

挙げられる。当該試験法については、現在、日本動物実験代替法学会のバリデーション委員会において、6研究機関による施設間バリデーションが実施中である。

さらに、本厚生労働科学研究班では、平成14年度に引き続き平成15年度も評価すべき試験法を広く公募し、その結果、非 RI-LLNA 法が評価を希望する試験法として提案されてきている。

一方、本厚生労働科学研究班では、代替法開発の促進や評価された試験法のグローバルハーモナイゼーションを図る目的で、2003年8月6日に、本研究班の大野班長、日本動物実験代替法学会副会長の板垣氏及び本研究班の国際情報担当である豊田が、ECVAMを訪問して共同研究の方向性の打合せを持った。その結果、ECVAMとの間で以下のような非公式な協力関係についての了解を得た。

- 1) プロトコール、SOPs、Prediction model については、資料があればコメント可能である。
- 2) 試験結果の解析についても、資料があればコメント可能である。
- 3) 日本においても、ECVAMとICCVAMとの共同バリデーションの様な形式ができればもっと良い。
- 4) 基準に則ったデータを伴った試験ならばESACへ上程できるし、それについては協力しても良い。

#### C-4-2 日本動物実験代替法学会における動向

日本動物実験代替法学会における本年度の特筆すべき動向としては、国際代替法会議の2007年日本開催を決定したこと並びに第17回大会において、将来的なECVAMとの共同研究を目指してECVAMからの講演者を招待したこと、代替法開発の促進を求める参議院議員を招待したことが挙げられる<sup>20)</sup>。

日本動物実験代替法学会には、評価委員会とバリデーション委員会とが組織として設置されている。評価委員会は、本厚生労働研究班から委託された『酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法』の評価の実務を担当している。一方、バリデーション委員会は、バリデーションに関する実務を担当する委員会、本厚生労働研究班から依頼された『酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法』の施設間バリデーションを実施中である。また、『市販キットである3次元皮膚モデルを用いる皮膚刺激性試験代替法』の施設間バリデーションの結果を解析中である<sup>20)</sup>。

本邦においては、その他の試験法に関して、行政や学会が関与したバリデーションに関する

報告は見あたらない。

#### C-4-3 小括

本邦における代替法の開発・評価において本年度の特筆すべきことは、国会レベルで本研究班が認識されたこと並びに ECVAM との国際的共同研究へ一歩踏み出したことである。

しかし、本邦における代替試験法の社会的認知に向けた活動は、日本動物実験代替法学会の協力を得て本厚生労働科学研究班のみが実施している状況にある。また、評価すべき試験法のバリデーションについても、日本動物実験代替法学会が本厚生労働研究班から委託された『酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法』と学会が独自に実施している『市販キットである3次元皮膚モデルを用いる皮膚刺激性試験代替法』のみが挙げられる。この原因は、代替法の開発は、化粧品に関連する産業とそれに係わる行政のみの問題と考えられているところにあるのかも知れない。

今回、本厚生労働研究班に代替法としての評価を希望する試験法として、非 RI-LLNA 法が提案されてきている。この提案は化粧品に関連する企業からの提案ではないことから、他の産業界における代替法の開発が促進されてきたこと並びに本厚生労働研究班の目指す代替法評価機関(仮称:JaCVAM)設置に向けた動きが加速することを期待したい。

いずれにしても、代替法の開発と評価については、国際協力が必要であり、その受け皿としての評価機関(JaCVAM)の設置や評価機関における成果がガイドライン等の作成に直接結びつくようなルート構築が必要であろう。

#### D. 考察

各結果小括の項で述べた如く、本年度は、昨年度末に公布された「動物実験を実施した原料を配合した化粧品の販売禁止に最終期限を設けたEU化粧品指令第7次改正」の各国批准と法制化が進められる年として、EU各国及び関連団体の動きが注目される年であった。

この化粧品指令第7次改正の公布により、現在使用可能な代替法と今後開発の必要な代替法が明らかとなり、それらの課題への幾つかの対応が開始された。まず、現在使用可能な代替法に関しての対応としては、化粧品の安全性評価に係わる SCCNFP や危険物質指令に係わる ECB が関係するガイドラインの見直しを開始し、代替法の導入を図ったことである。一方、これから開発すべき代替法への取り組みとしては、ECVAM が重点項目を再編成し、ICCVAM との

共同研究体制を定着化させたことであろう。

本邦においては、国会レベルで本厚生労働研究班が認識されたこと並びに ECVAM との国際的共同研究へ一歩踏み出したことが本年度の特筆すべきこととして挙げられる。本厚生労働研究班は本年度で終了するが、今後、国会レベルの認識により関連する新規厚生労働研究班への支援強化を期待するとともに、ECVAM を仲介に ICCVAM との連携を含めたグローバルハーモナイゼーションの促進が期待される。また、このグローバルハーモナイゼーションを考えると、その核となるべき、行政認知の本邦独自の代替法評価機関(JaCVAM)の設置が是非とも必要と考える。

一方、新規代替法の開発という観点から本年度を概観すると、バリデーション等により公的な承認がなされた新規試験法については、国内外を問わずなかった。このことは、これから開発すべき代替法の困難さを示しているものと考えられる。この課題を解決するためには、これまで代替法を開発してきた枠組みからの脱却と監督官庁の枠を超えた国家レベルでの積極的な研究支援が必要であろう。

以上のことを総合的に推進することにより、ECVAM や ICCVAM とのグローバルハーモナイゼーションが構築され、さらには本邦発のグローバルスタンダードが作成されると考えるものである。

#### E. 結論

本年度は、昨年度末に公布された「動物実験を実施した原料を配合した化粧品の販売禁止に最終期限を設けたEU化粧品指令第7次改正」の各国批准と法制化が進められる年として、EU各国及び関連団体の動きが注目される年であった。

このような中で ECVAM は、今後開発すべき試験法への取り組みを明確化させるために重点項目を再編成し公表するとともに、グローバルな共同研究体制を推進してきた。また、EU における行政サイドの取り組みとしては、危険物質指令に係わる欧州化学局(ECB)や化粧品非食品に関する科学諮問委員会(SCCNFP)が、安全性評価のために必要な試験項目と試験法を公開し、その中で現時点で適用可能な代替法を明確にした。

米国では、新規試験法の評価を ICCVAM に提案するためのガイドラインの最新版が公開されたことから、代替法の開発や評価がこれまで以上に加速することが予想される。また、ICCVAM が承認した LLNA が EPA により採用されたことは、米国においても行政サイドにおける代替法活用の

道筋が明確化してきたことを示すものとする。さらには、ICCVAM と ECVAM の相互協力の流れは、確実に加速されつつある。

OECD については、専門家会議で承認されたガイドライン化が遅れているため、本年度は特筆すべき動向は認められなかった。

本邦においては、代替法の社会的認知に向けた活動は、日本動物実験代替法学会の協力を得て本厚生労働科学研究班のみが実施している状況にある。本年度の特筆すべきこととしては、本厚生労働科学研究班が国会レベルで認識されたこと、代替法評価機関としての実務を推進したこと及び ECVAM との国際的共同研究へ一歩踏み出したことである。

本分担研究の3年間を通しての結論としては、本邦における問題は、本研究班の結論が行政的なガイドライン等への採用に結びつかない点にある。本研究班の目的とする“動物実験代替法の開発と利用の促進”を図るためには、本邦においても、ECVAM や ICCVAM に匹敵する本邦独自の、行政認知の代替法評価機関(JaCVAM)を設置し、ガイドライン化へと結びつけるシステム作りが急務であるとする。また、代替法開発の状況を概観すると、今後開発が必要な試験法は、生体反応の解析を含め非常に難易度が高いと考えられ、これらの代替法の開発や評価を総合的に推進するためには、監督官庁の枠を超えた国家レベルでの積極的な研究支援が必要とする。

#### F.健康危険情報

なし

## G. 参考文献

- 1) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council, February 27, 2003; Official Journal of the European Union, L66, 11/03/2003, P0026-0035 及び日本語訳文 (添付資料-1)
- 2) CTPA News update, February 6, 2003 (添付資料-2)
- 3) CTPA News update, March 3, 2003, (添付資料-3)
- 4) The Rose Sheet Vol.24 No.34, p.7 (2003) (添付資料-4)
- 5) ATLA, 30, 261-262 (2002) (添付資料-5)
- 6) FRAME News, Issue No.55, August 2002 (添付資料-6)
- 7) ATLA, 31, 473-481 (2003) (添付資料-7)
- 8) ATLA, 31, 87-87 (2003) (添付資料-8)
- 9) ATLA, 31, 379-379 (2003) (添付資料-9)
- 10) ATLA, 31, 471-471 (2003) (添付資料-10)
- 11) ATLA, 31, 551-551 (2003) (添付資料-11)
- 12) The SCCNFP' S notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation (5th Revision) Adopted by the SCCNFP during the 25th plenary meeting of 20 October 2003. pp18-30 (添付資料-12)
- 13) <http://ecb.jrc.it/testing-methods/content1.html> (添付資料-13)
- 14) <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/subguide.htm> ICCVAM Guidelines for the Nomination and Submission of New, Revised, and Alternative Test Methods; NIH Publication No.03-4508, September 2003 (添付資料-14)
- 15) Federal Register Vol.68, No.220, 14/11/2003, p64636 (添付資料-15)
- 16) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/corrode.htm> CORROSITEX : A Validated and Accepted Dermal Corrosion Test Method for Classifying Substances According to the UN Packing Groups, October 2003 (添付資料-16)

- 17) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invitro.htm> In vitro methods for assessing acute systemic toxicity (添付資料-17)
- 18) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/eyeirrit.htm> In vitro screening test methods for severe eye irritants (添付資料-18)
- 19) ATLA, 31, 233-233 (2003) (添付資料-19)
- 20) 日本動物実験代替法学会第17回大会要旨集、2003年11月7,8日

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

無し

### 2. 学会発表

- 1) 豊田英一、“化粧品工業界における動物実験代替法の取り組みの現状”、日本動物実験代替法学会第17回大会 市民公開フォーラム“わが国における動物実験代替法の取り組みの現状と将来”、2003年11月8日
- 2) 足利太可雄、穂谷昌利、板垣宏、相場節也、豊田英一、“ヒト細胞株を用いる感作性試験代替法の開発”、日本化粧品科学会第28回学術大会、2003年6月5日
- 3) 豊田英一、“欧州における化粧品規制と動物実験代替法の現状”、日本動物実験代替法学会第16回大会 フォーラム“動物実験代替法の国際動向”、2002年12月5日

## I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

別紙 5

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当無し					

20031256

P.93-103, P.115-291は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、P.7-8の目次をご参照ください。

化粧品に関する加盟各国の法律の統一化に関する理事会指令 76/768/EEC を修正する 2003 年 2 月 27 日付け欧州議会および理事会指令 2003/15/EC (EEA に関連する条文)

欧州共同体設立条約、特にその第 95 条に鑑み、  
欧州委員会の提案[1]を考慮し、  
欧州経済社会委員会の見解[2]を考慮し、  
欧州共同体設立条約第 251 条に定められた手順に従い調停委員会が 2002 年 12 月 3 日に承認した共同条文[3]に照らし、

欧州議会と欧州連合理事会は、以下の事項を考慮に入れて、本指令を採択した。

(1) 理事会指令 76/768/EEC[4]は化粧品に関する国内法の包括的調整を定めており、公衆の健康の保護を主要目的とする。この目的を達するには、一定の毒性試験を行い化粧品の安全性を評価することが今後とも不可欠である。

(2) アムステルダム条約により欧州共同体設立条約に付け加えられた動物の保護および福祉に関するプロトコールは、欧州共同体および加盟各国が欧州共同体政策、特に域内市場に関する政策を実施する際には動物の福祉に関する要求事項を十分に顧慮することを規定している。

(3) 実験または他の科学的目的で使用する動物の保護に関する加盟各国の法律、規制および行政命令の統一化に関する 1986 年 11 月 24 日付け理事会指令 86/609/EEC[5]により欧州共同体域内における実験目的での動物使用に関する共通規則が確立され、加盟各国国内においてかかる実験を実施する際に従うべき条件が規定された。特に同指令の第 7 条は、動物実験の代替法が存在し、その方法が科学的に満足なものである場合には、動物実験に代えて代替法を使用することを求めている。化粧品部門において生きた動物を使用しない代替法の開発と使用を促進するために、化粧品に関する加盟各国の法律の統一化に関する指令 76/768/EEC の 6 回目の修正となる 1993 年 6 月 14 日付け理事会指令 93/35/EEC[6]により明確な規定が導入された。

ただし、上記の規定は動物を使用しない代替法のみに関するものであり、実験に使用する動物数を減らすか動物が受ける苦痛を低減させるために開発された代替法は考慮に入れられていない。従って、欧州共同体域内における動物を使用した化粧品試験の禁止および動物で試験した化粧品の販売の禁止が実施されるまでの期間に

化粧品の試験に使用される動物の保護を最適に行えるように、指令 86/609/EEC の第 7 条(2)項および(3)項に規定する代替法への完全な移行が未だ可能でない場合には、代替法への移行が予定されている従来法と同等のレベルで消費者を保護できることを条件として、試験に使用する動物数を減らすか動物が受ける苦痛を低減させる方法を組織的に使用できるように上記の規定を修正する必要がある。

(4) 指令 86/609/EEC および指令 93/35/EEC に基づき、化粧品試験のための動物実験を廃止するという目標を追及し、加盟各国国内においてかかる実験の禁止を実施することが肝要である。この禁止の完全実施を保証するためには、指令 86/609/EEC を修正する提案を欧州委員会がさらに提示することが必要となろう。

(5) 現在のところ、欧州代替法バリデーションセンター (ECVAM) または経済協力開発機構 (OECD) により科学的バリデーションが行われ、かつ化学部門全体に適用できる代替法のみが共同体レベルで組織的に採択されている。しかし、化粧品およびその成分の安全性は、化学成分のすべての用途には適用できない代替法でも保証できる。従って、このような代替法で同等レベルの消費者保護を行える場合には、化粧品業界全体における代替法の使用を促進し、共同体レベルでの採択を保証する必要がある。

(6) 化粧品最終製品の安全性は、製品に含まれる成分の安全性に関する知見があれば、それに基づいて保証できる。従って、化粧品最終製品の動物試験を禁止する規定を指令 76/768/EEC に盛り込める。中小企業を主な標的として動物を使用しない方法による化粧品最終製品の安全性評価を促進するために、欧州委員会はガイドラインを設定する必要がある。

(7) 共同体レベルのバリデーションが完了した動物を使用しない代替法、または OECD 内でのバリデーションの進展を十分考慮した上で科学的バリデーションで妥当性が検証された方法として ECVAN が承認した動物を使用しない代替法により化粧品に使用される成分の安全性を保証することが次第に可能になると予測される。欧州委員会は、バリデーション済み代替法の化粧品分野における適用性に関して消費者向け化粧品および非食品製品に関する科学委員会 (SCCNFP) と協議を行った後、化粧品成分への適用が可能とみなされたバリデーション済みの方法または承認された方法を直ちに発表する必要がある。できる限り高水準の動物保護を実現するために、完全禁止の導入期限を設定しなければならない。

(8) 欧州委員会は、本指令の発効日から6年後を最終期限として、動物試験が行われた化粧品、最終処方、成分または成分の組み合わせの販売を禁止する期限および動物を使用して行われている現行試験を禁止する期限の予定を立てる必要がある。ただし、反復投与毒性、生殖毒性および毒物動態に関する試験法については検討段階にある代替法が存在しないことを考慮すると、これらの試験を使用する化粧品の販売を禁止する期限は本指令の発効日から最大10年とすることが適切である。上記のそれぞれの最終期限内の予定を年次報告書に基づいて採択する権限を欧州委員会に与える必要がある。

(9) 共同体レベルでの資源調整を改善すれば、代替法の開発に不可欠な科学的知見の蓄積に有用である。このためには、欧州共同体が改善努力を継続・強化し、研究促進および動物を使用しない新規代替法の開発に必要な措置を、特に欧州会議・理事会決議 1513/EC/2002[1]で定められた第6次研究開発枠組計画の範囲内で講じる必要がある。

(10) 欧州共同体で開発された代替法に対する非加盟各国の認識を高める必要がある。この目的を達成するために、欧州委員会および加盟各国はOECDによる代替法受け入れを促進するあらゆる適切な措置を講じる必要がある。さらに、欧州委員会は、代替法で試験した化粧品の輸出が妨げられないように、また非加盟各国が動物を使用した試験の繰り返しを要求することを防ぐか避けるために、代替法を使用して共同体域内で行われた安全性試験の結果に対する非加盟各国の理解を得るよう欧州共同体協力協定の枠組み内で努力する必要がある。

(11) 開発に関連して動物試験を実施しなかったことを謳った化粧品の出現が考えられる。欧州委員会は、宣伝文の使用に共通基準が適用されること、宣伝文に対する理解の統一を得ることを、また特にこのような宣伝文が消費者に誤解を与えないことを保証するために加盟各国と協議してガイドラインを作成する必要がある。このようなガイドラインの作成に当たって、欧州委員会は「試験に動物を使用しない」生産者の大半を占める多数の中小企業および関連の非政府組織の見解も勘案し、消費者が動物試験基準に基づいて製品を実際に識別できることが必要であるという点を考慮に入れなければならない。

(12) SCCNFP は、危険物質の分類、包装およびラベル表示に関する法律、規制および行政命令の統一化に関する1967年6月27日付け理事会指令67/548/EEC[2]に基づきカテゴリー1または2の発癌性物質（吸入によってのみ発癌性が生じる物質を

除く)、変異誘発性物質または生殖毒性物質に分類された物質および同等の可能性を有する物質を化粧品に意図的に添加してはならず、指令 67/548/EEC に基づいてカテゴリー3 の発癌性物質、変異誘発性物質または生殖毒性物質に分類された物質および同等の可能性を有する物質は、その濃度が消費者の健康を脅かす値よりも低い場合を除き、化粧品に意図的に添加してはならないとの見解を 2001 年 9 月 25 日に示した。

(13) 指令 67/548/EEC に基づきカテゴリー1、2、3 の発癌性物質、変異誘発性物質または生殖毒性物質に分類された物質が人間の健康に及ぼし得る特別なリスクを考慮して、このような物質の化粧品への使用は禁止する必要がある。カテゴリー3 に分類された物質は、SCCNFP が評価を行い、化粧品への使用が許容できると判断された場合には化粧品に使用できる。

(14) 消費者に提供する情報を改善するために、品質保証期限に関するより正確な情報を化粧品に表示する必要がある。

(15) 香料に敏感な消費者の接触アレルギー反応を引き起こす重要な原因として特定されている物質がある。従って、このような消費者に対し十分な情報を提供するために、指令 76/768/EEC の規定を修正し、上記の物質が含まれていることを成分リストで言及することを求める必要がある。この情報を表示することにより、香料に敏感な消費者に接触アレルギーが生じた場合に原因を特定しやすくなり、使用に耐えない化粧品を避けることができる。

(16) アレルギー反応を引き起こす可能性がある物質が SCCNFP により多数特定されていることから、このような物質の使用を制限するか一定の条件を付けることが必要となる。

(17) 欧州委員会に与えられた実施権の行使に関する手順を定める 1999 年 6 月 28 日付け理事会指令 1999/468/EC[1]に従って、本指令の実施に必要な措置を採択する必要がある。

(18) 動物試験を行った成分または成分の組み合わせを含む化粧品の販売を禁止する指令 93/35/EEC の規定を、本指令の規定に置き換える必要がある。従って、法的な確実性を期して、2002 年 6 月 1 日から効力を発する本指令の第 1 条(1)項を正当な期待の原則を十分に尊重しながら適用することが適切である。

## 第1条

指令 76/768/EEC を次の通りに修正する。

1. 第4条(1)(i)項を削除するものとする。
2. 以下の条項を挿入するものとする。

### 「第4条a項

1. 加盟各国は、第2条より派生する一般的義務を侵害することなく、以下の禁止事項に従うものとする。

(a) 代替法のバリデーションが行われ、OECD 内でのバリデーションの進展を十分考慮した上で共同体レベルでその代替法が採択された後は、本指令の要求事項を満たすためにかかる代替法以外の方法による動物試験を行った最終処方を使用した化粧品を販売することを禁止する。

(b) 代替法のバリデーションが行われ、OECD 内でのバリデーションの進展を十分考慮した上で共同体レベルでその代替法が採択された後は、本指令の要求事項を満たすためにかかる代替法以外の方法による動物試験を行った成分または成分の組み合わせを含む化粧品を販売することを禁止する。

(c) 本指令の要求事項を満たすために化粧品最終製品の動物試験を加盟各国国内で実施することを禁止する。

(d) 危険物質の分類、包装およびラベル表示に関する法律、規制および行政命令の統一化に関する 1967 年 6 月 27 日付け理事会指令 67/548/EEC[\*] の附則 V または本指令の附則 IX に示すバリデーション済みの代替法のいずれかを動物試験に代わって使用することが求められる日付以前の期間についても、本指令の要求事項を満たすために成分または成分の組み合わせの動物試験を加盟各国国内で実施することを禁止する。

2004 年 9 月 11 日までに、欧州委員会は第 10 条(2)項に規定する手順に従って、消費者向け化粧品および非食品製品に関する科学委員会 (SCCNFP) と協議を行った上で、附則 IX の内容を作成するものとする。

2. 欧州委員会は、SCCNFP および欧州代替法バリデーションセンター (ECVAM) と協議を行った上で、種々の試験の段階的廃止に関する期限など、1(a)、(b)、(d)項の規定の実施に関する予定を立てるものとする。これらの予定を 2004 年 9 月 11 日までに開示し、欧州会議および欧州連合理事会に送付するものとする。実施期間は、1(a)、(b)、(d)項に関連して指令 2003/15/EC が発効した後 6 年以内に限定する。

(2.1) 検討段階にある代替法が存在しない反復投与毒性試験、生殖毒性試験および

毒物動態試験については、1(a)、(b)項の実施期間を指令 2003/15/EC が発効した後 10 年以内に限定する。

(2.2) 欧州委員会は、試験禁止に際して、特に検討段階の代替法が存在しない反復投与毒性試験、生殖毒性試験および毒物動態試験の禁止条項に準拠するに当たって生じ得る技術的問題について調査を行うものとする。このような調査の暫定的結果および最終結果に関する情報は、第 9 条に従って提出する年次報告書の一部を成す。

この年次報告書に基づいて、2 項に従って作成された予定を、2 項に規定する 6 年の期限内または 2.1 項に規定する 10 年の期限内で、2 項に規定する機関と協議した上で採択できる。

(2.3) 欧州委員会は、禁止条項に準拠するに当たって生じ得る技術的問題のほか、進捗状況および期限準拠状況を調査するものとする。欧州委員の調査の暫定的結果および最終結果に関する情報は、第 9 条に従って提出する年次報告書の一部を成す。2.1 項に規定する最大期間の最後の 2 年間に、2.1 項に規定する試験の中に技術的な理由により同項に規定する期限内には開発およびバリデーションが完了しないと予測されるものがあるとの結論がこれらの調査で下された場合には、欧州委員会は欧州議会および欧州連合理事会にその旨を報告し、欧州共同体設立条約の第 251 条に従って法案を提示するものとする。

(2.4) 既存の化粧品成分の安全性に関して重大な問題が生じた例外的状況においては、加盟各国は欧州委員会に対し、1 項の適用除外を求めることができる。この要求を行う際には、状況の評価を提示し必要な措置を示すものとする。これに基づいて、欧州委員会は SCCNEP と協議した上で道理に適った決定を下すことにより、第 10 条(2)項に規定する手順に従って適用除外を許可できる。この許可を下す際には、具体的な目的、期間および結果報告に関して、適用除外の条件を定めるものとする。

適用除外は以下の条件を満たす場合にのみ許可されるものとする。

(a) 問題の成分が広く使用されており、同等の機能を有する他の成分に置き換えられない。

(b) 人の健康に関する特定の問題が存在することが実証され、動物試験実施に正当な必要性があると評価され、この評価の基礎となった詳細な研究プロトコールが提示されている。

欧州委員会は、適用除外の許可に関する決定、それに伴う条件および達成された最終結果を第 9 条に従って提出する年次報告書に含めるものとする。

3. 本条項では、以下の定義を使用する。

(a) 「化粧品最終製品」とは、市販され、最終消費者が使用できる最終処方化粧品の、またはそのプロトタイプを意味する。

(b) 「プロトタイプ」とは、バッチ生産されていない最初のモデルまたはデザインで、化粧品最終製品の複製または最終的開発の元になるものを意味する。

#### 第4条b項

指令 67/548/EEC の附則 I に基づいてカテゴリー1、2、3 の発癌性物質、変異誘発性物質または生殖毒性物質に分類された物質の化粧品への使用は禁止するものとする。この目的を達成するために、欧州委員会は第10条(2)項に規定する手順に従って必要な措置を採択するものとする。カテゴリー3 に分類された物質は、SCCNFP が評価を行い、化粧品への使用が許容できると判断された場合には化粧品に使用できる。

#### 3. 第6条(1)(c)項は以下の通りに書き換える。

「(c) 「～までにご使用下さい」という表現で最短品質保証期限を表示し、期限を指定する部分には以下のいずれかの表現を使用するものとする。

一日付。

一期限を包装のどの部分に表示しているかを詳細に示す情報。

日付は明確に表し、年と月を使用するか、日、月、年の順に示すものとする。必要な場合には、記載した品質保証期限を保証するために満たすべき条件を補足情報として示すものとする。

最短品質保守期限が30ヵ月を超える化粧品については、品質保証期限の日付の表示は必須ではない。このような製品については、開封後に消費者が害を受けることなく製品を使用できる期間を示すものとする。この情報は、附則 VIIIa に規定する記号の後に期間（月数または年数）を示す形で表示するものとする。」

#### 4. 第6条(1)(g)項は以下の通りに書き換えるものとする。

「(g) 添加時の重量の多いものから並べた成分のリスト。このリストの冒頭に「成分」と記載するものとする。実用上の理由でこれが不可能な場合には、添付するパンフレット、ラベル、テープまたはカードに成分を記載し、包装に表示しなければならない略号情報または附則 VIII に規定する記号に基づいて消費者が成分を照会できるようにする必要がある。

ただし、以下のものは成分とはみなされない。

一使用した原料中の不純物。

一調製工程に使用したが、最終製品には含まれない補助的な技術的材料。

—香料および芳香成分の溶媒または担体として必要最小量で使用された材料。

香料および芳香成分とその原料は、「香料」または「芳香料」という言葉を使用して示すものとする。ただし、附則 III の「その他の制限および要求事項」の欄に示す必要がある物質が存在する場合には、製品中におけるその物質の機能とは関係なく、このリストに記載するものとする。

濃度 1%未満の成分は、1%を超える物質の後に任意の順序で示して良い。

着色剤は、附則 IV で採用されている色素インデックス番号または色素名に従って、他の成分の後に任意の順序で示して良い。複数の色合いを使用したメイク用化粧品については、「含まれることがあります」という表現か「+/-」記号を追加するのであれば、これらの色を出すために使用したすべての着色剤を示せる。

成分の特定には、第 7 条(2)項に規定する共通名を使用するか、これを使用しない場合は、第 5 条 a(2)項の第 1 段落に規定する名称のいずれかを使用しなければならない。

化粧品のラベル表示に使用されるリストへの成分記載免除に関する理事会指令 76/768/EEC(\*)に従って、メーカーは企業秘密を理由としてひとつまたは複数の成分について上記リストへの記載の免除を受けられるが、欧州委員会は、第 10 条(2)項に規定する手順に従って、上記指令の適用に関する詳細な規則を定める 1995 年 6 月 19 日付け委員会指令 95/17/EC に規定の基準および条件をこの記載免除に関して採用できる。

5. 第 6 条(3)項の最後の文を削除し、以下の文章を追加するものとする。

「さらに、メーカーまたは欧州共同体市場での製品販売の責任者は、メーカーまたはその供給業者が最終製品、そのプロトタイプまたは最終製品に含まれる成分について動物試験の実施または委託を行っていないか、新規化粧品開発の目的で第三者が行った動物試験の対象となった成分を使用していない場合にのみ、製品の包装、または製品に添え付けるか製品に言及する文書、通知、ラベル、リングまたはカラーに、動物を使用しない試験を実施した旨を記載できる。ガイドラインの採択は、第 10 条(2)項に規定する欧州連合官報発表済みの手順に従って行うものとする。欧州議会は、欧州委員会に提出された措置案の副本を受け取るものとする。」

6. 第 7 条 a(1) (d)項を以下の通りに書き換えるものとする。

「(d)人の健康に対する最終製品の安全性の評価。この評価を行うために、メーカーは成分の全般的な毒物学的プロファイル、化学構造および曝露レベルを考慮するものとする。特に、製品を使用する部分または標的とする消費者集団に特有の曝露特性を考慮に入れるものとする。とりわけ、3 歳未満の小児への使用を目的とした

化粧品および外性器衛生専用の化粧品については、その用途に応じた評価を行うものとする。

同じ製品を欧州共同体域内の複数の場所で製造する場合には、メーカーは安全性情報を得る場所を 1 ヶ所選択できる。このような選択を行う場合および監視上の理由で場所の選択が必要とされる場合には、監視当局または関係当局に選択した場所を示すことが義務付けられる。その場合、選択した場所に関する情報を速やかに閲覧できるように準備するものとする。」

7. 以下の部分を第 7 条 a(1) 項に追加するものとする。

「(h) 製品またはその成分の開発または安全性評価に関連してメーカー、その代理店または供給業者が実施した動物試験に関するデータ。これには、非加盟各国の法律または規制の要求事項を満たすために実施した動物試験が含まれる。

加盟各国は、企業秘密および知的所有権などの保護を侵害しない範囲で、(a) 項および(f) 項で要求される情報が適切な手段で速やかに開示されることを保証する必要がある。(a) 項で開示が要求される定量的情報は、指令 67/548/EEC に規定する危険物質に関する情報に限定される。」

8. 第 8 条 (2) 項および第 8 条 a(3) 項で使用されている「化粧品類に関する科学委員会」という記載を、「消費者向け化粧品および非食品製品に関する科学委員会」に書き換えるものとする。

9. 第 9 条および第 10 条を以下の通りに書き換えるものとする。

「第 9 条

欧州委員会は、毎年、欧州議会および欧州連合委員会に以下の項目に関する報告書を提出するものとする。

(a) 代替法の開発、バリデーションおよび法的受入れの進捗状況。報告書には、化粧品に関係して実施された動物実験の件数および種類に関する正確なデータを含めるものとする。加盟各国には、実験および他の科学的目的に使用される動物の保護に関する加盟各国の法律、規制および行政命令の統一化に関する 1986 年 11 月 24 日付け理事会指令 86/609/EEC(\*) で定められた統計的データを収集するほか、上記のデータを収集する義務がある。欧州委員会は、生きた動物を使用しない代替試験法の開発、バリデーションおよび法的受入れの保証に特に留意するものとする。

(b) バリデーションにより共同体レベルで妥当性が保証された代替法の OECD による受入れを獲得するために、また欧州共同体において代替法を使用して行われた安

全性試験、特に欧州共同体と非加盟各国との協力協定の枠組み内で行われた試験の結果に対する非加盟各国の認識を得るために、欧州委員会が行った活動の進捗状況。

(c) 中小企業に特有のニーズを考慮に入れた方法。

10. 以下の部分を附則 III のパート I に追加するものとする。

#### 第 10 条

1. 欧州委員会は、化粧品常任委員会の支援を受けるものとする。
2. 本項に言及する場合には、指令 1999/468/EC の第 5 条および第 7 条を、同指令の第 8 条を考慮して適用するものとする。

指令 1999/468/EC の第 5 条(6) 項で定められる期間は 3 ヶ月とする。

3. 欧州委員会は、手順に関する委員会規則を採択するものとする。

11. 開封後のクリーム瓶を表す記号から成る附則 VIIIa を追加するものとする。欧州委員会は、第 10 条(2) 項に規定する手順に従って、この記号を遅くとも 2003 年 9 月 11 日までに制定するものとする。

#### 第 2 条

指令 76/768/EEC 第 6 条(1)(g) 項第 3 段落に関する第 1 条 4 項のほか、指令 76/768/EEC 第 6 条(1)(c) 項第 3 段落に関する第 1 条 3 項を適用するために、

加盟各国は、2005 年 3 月 11 日以降、欧州共同体域内で設立されたメーカーおよび輸入業者が本指令に準拠しない化粧品を販売しないことを保証するために必要なあらゆる措置を講じるものとする。

#### 第 3 条

1. 加盟各国は、2004 年 9 月 11 日までに本指令の準拠に必要な法律、規制および行政命令を施行するものとする。加盟各国は、かかる施行を直ちに欧州委員会に通知するものとする。

加盟各国は、上記の措置を採択するに当たり、本指令に言及するか、官報発行に際して本指令に言及する部分を添付するものとする。かかる言及の方法については、加盟各国が定めるものとする。

2. 加盟各国は、本指令で規定する分野に関して採択した国内法の規定の本文を欧州委員会に通知するものとする。

#### 第4条

本指令は、欧州連合官報に発表された日付をもって効力を発するものとする。

第3条の適用除外の手段として、第1条(1)項を2002年7月1日から適用するものとする。

#### 第5条

本指令は、加盟各国を対象とする。

2003年2月27日、ブリュッセルにて作成

欧州議会議長 P. Cox 殿

欧州連合理事会理事長 M. Chrisochoidis 殿

第4次 OECD guideline, skin absorption : in vitro method (案)  
-TEWL を用いた皮膚 integrity 試験の妥当性 (2) -

分担研究者 森本 雅憲 (城西大学薬学部)

### 研究要旨

皮膚に適用する化学物質の有効性と安全性を評価するために経皮吸収試験が行われる。経皮吸収試験の信頼性の確保は、先ず、試験に用いられる皮膚試料の Integrity が担保されていることであるが、これまでの多くの試験においては、Integrity に言及するものはなく、標記 OECD guideline が初めてそのコンセプトを示した。ガイドラインには Integrity 評価法として、皮膚抵抗値および経皮的水分損失 (Transepidermal water loss : TEWL) の測定が盛り込まれたものの、運用上の詳細については述べられていない。著者らは、前回までに、日本の経皮吸収試験の汎用動物であるヘアレスラット皮膚を用い、tape stripping により皮膚損傷を作成して、脂溶性の異なる 4 種モデル薬物の皮膚透過性と皮膚抵抗値および TEWL の測定値との関連性を検討した。その結果、皮膚抵抗値は強い損傷でなければ反応せず、また、TEWL はバラツキの大きいことが問題となった。しかし、このバラツキは tape stripping による損傷作成法に起因している可能性がモデル解析により強く示唆された。すなわち、テープによる角質層の垂直方向の剥離は、とりわけ水に対する角質層のバリアー能を著しく変動させるため (Fig. 1)、TEWL の測定値のバラツキはこれを反映している可能性があった。そこで、今回は、垂直方向の剥離を極力避ける条件として、テープの圧着圧を 5~10 g/cm<sup>2</sup>、また、垂直の剥離が見られる 200 g/cm<sup>2</sup> の 2 通りの方法をヘアレスラット皮膚、さらには、角質層がタイトであることが知られているブタ耳皮膚を用いて、stripping による皮膚の剥離状態の観察と TEWL 測定値のバラツキの関係を検討した。その結果、ヘアレスラットの低圧力では TEWL のバラツキは小さくなり、また、ブタ耳ではヘアレスラットよりもバラツキが小さいことが明らかとなり、TEWL は角質損傷を反映していると思われた。

TEWL は水の角質層透過を反映する測定値であるため、角質層の 4~5 層の剥離までは損傷に対して敏感ではないものの、その性質を知った上で利用する価値はある。

### A. 研究目的

皮膚に適用する化学物質の有効性と安全性を評価するために、経皮吸収試験が行われる。経皮吸収試験の信頼性の確保は、まず、試験に用いられる皮膚試料の integrity が担保されていることであるが、これまでの多くの試験においては、integrity に言及するものはなく、第 4 次 OECD guideline が初めてそのコンセプトを示した。ガイドラインには integrity 評価法として、経皮的水分損失 (Transepidermal water loss ; TEWL) の測定が盛り込まれたものの、運用上の詳細については述べられていない。

日本において経皮吸収試験を行う場合、ヒト摘出皮膚の使用に、未だかなりの制限を受けているため、動物モデルが使用されており、ヘアレスラットが最も汎用されている。そのため、日本において OECD guideline を適用する際には、ヘアレスラットの TEWL について調べておく必要がある。

本研究では、tape stripping で種々程度の

ダメージ皮膚を作成し、それらの皮膚について、TEWL の値と種々物性を有する薬物の透過性を調べ、これらの結果を理論モデルに基づき考察することで、TEWL をヘアレスラット皮膚の integrity やダメージの指標とすることが妥当であるかを検討することとした。さらに、ヒト皮膚代替モデルとして有用であり<sup>1)</sup>、今後使用の拡大の可能性のあるブタ耳皮膚の TEWL についても調べることにした。

### B. 研究方法

#### 1. Preparation of skin sample

雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht、8 週齢、180~200 g) の腹腔にペントバルビタールナトリウム (50 mg/mL) を 0.1 mL/100 g で適用し、麻酔の効果が現れたことを確認して (麻酔後約 10 分) から、腹部皮膚を剃毛 (ブラウン 5413<sup>®</sup>) した。このとき角質層を傷つけないよう十分注意した。剃毛後皮膚 (約 5 cm<sup>2</sup>) を摘出し、有効拡散面積 3.14cm<sup>2</sup> の縦型拡散セル (容積 16 mL)