

200736024A

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

化学物質リスク研究事業

化学物質の有害性の評価戦略に関する研究

平成 19 年度

総括・分担研究報告書

主任研究者 大野 泰雄

国立医薬品食品衛生研究所

平成 20 年 (2008 年) 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質の有害性の評価戦略に関する研究  
(H19-化学-一般-001)

平成19年度 総括・分担研究報告書  
主任研究者 大野 泰雄

平成20年(2008年)3月



## 目 次

I. 総括分担研究報告書	1
化学物質の有害性の評価戦略に関する研究 大野泰雄、中澤憲一、本間正充、小島 肇、菅野 純、 広瀬明彦、森田 健、三森国敏、北嶋 聡	2
1. 試験管内試験法の現状と将来に関する調査 小島 肇	11
2. 化学物質の分類及び化学物質安全性評価の国際動向についての調査 森田 健	19
II. Appendices	29
Appendix1 有害性評価フローの現状・問題点と解決のための戦略に関する論点整理	30
Appendix2 有害性評価に関わる有識者への訪問調査委託報告書 (みずほ情報総研株式会社)	39
Appendix3 21世紀の毒性試験:展望と戦略 米国学術研究委員会(NRC) Executive Summary(日本語訳)	79
Appendix4 化学物質のリスク評価のための選択的総合試験戦略(ITS)(RIVM)報告書 「7. 考察と結論」のみの日本語訳	90
Appendix5 化学物質の有害性評価および危険有害性周知におけるエキスパートジャッジメントの役割 (J.D. Hamilton et al., RTP, 46, 84-92, 2006). の日本語訳	97
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	111
IV. 研究成果の刊行物・別冊	113

平成19年度厚生労働科学研究費補助金  
(化学物質リスク研究事業)

I. 総括分担研究報告書

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金

(化学物質リスク研究事業)

総括・分担研究報告書

化学物質の有害性の評価戦略に関する研究

主任研究者 大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 副所長  
分担研究者 中澤 憲一 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長  
分担研究者 本間 正充 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変異遺伝部 室長  
分担研究者 小島 肇 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 室長  
分担研究者 菅野 純 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毒性部長  
分担研究者 森田 健 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部 室長  
分担研究者 三森 国敏 東京農工大学大学院 共生科学技術研究院 動物生命科学部門 教授  
分担研究者 北嶋 聡 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毒性部 室長  
分担研究者 広瀬 明彦 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総合評価研究室  
主任研究官

研究要旨

本研究は、数万種ともいわれる化学物質についての有害性評価を、より網羅的かつ効率的・迅速に行うために、これまでの評価方法開発の状況、及び、今後、提要可能な最新の科学技術を俯瞰することにより、現在利用可能な評価方法による戦略的かつ網羅的な評価スキームの構築、並びに「化学物質による健康影響リスクの最少化」課題の達成に向けた化学物質の有害性の近未来評価戦略を提言することを目的とする。包括的な化学物質評価管理体制の構成要素として、対象化合物の選択、試験法スキーム、試験法、ハザード・アイデンティフィケーションとその詳細、それに関わるエキスパートジャッジメント、リスク評価、リスク管理、及びリスクコミュニケーションについての現状分析と、今後の新しい対応に関して、特に有害性評価に密接に関わる事項の洗い出しを行った。さらにこれを元に、今後の研究戦略に関する意見を、専門的有識者からのヒアリングによって収集し、より広範な視点から、今後の化学物質の評価管理体制構築に必要な論点を整理した。

その結果、利用可能なあらゆる情報について、その安全性評価上の不確実性や意義を判定しリスク管理方針を決定するエキスパートジャッジメントが最も重要であるという結論に至った。従って、これまで以上にエキスパートジャッジメントを高度化・迅速化するために必要な研究戦略を立てる必要があると考えられた。その為にはリスクの本質を捉える試験法の開発や新しい評価パラダイムに基づいた評価・試験スキームの構築を目的とする研究が必要であると同時に、作用機作追求型研究と応用・行政型研究をより有機的に関連させ、効率的に研究成果をエキスパートジャッジメントの高度化のために資する必要がある。従って、基礎から応用までをカバーした総合プロジェクト的な研究班、あるいはリエゾン機能型研究もしくはいくつかの研究班の役割を調整するタスクフォースを構築することが推奨され、(1) 先端(新機能)物質の評価手法研究(2) 次世代・子供への影響に関する長期的な研究(3) QSAR/カテゴリー、HTPS 手法の開発研究(4) 先端技術を用いたメカニズムベースの評価手法の開発研究の必要性が提言された。その上で、これらの研究活動を通してエキスパートジャッジメントの重要性の周知やエキスパートジャッジメントのための人材の確保を実現していくことが必要であることも示された。



## A. 目的

本研究の目的は、安全性評価に於ける限られた時間と経費の利用を最適化する総合的な戦略を立てることにあり、評価法開発へ提要可能な最新の科学技術やこれまでに開発された評価方法の状況を俯瞰し、現在利用可能な評価方法による戦略的かつ網羅的な評価スキームの構築、並びに化学物質による健康影響リスクの最少化に向けた課題の洗い出し、現在の化学物質の有害性評価の全体像の見直しを行う。

これにより、数万種ともいわれる化学物質について、網羅的かつ効率的・迅速な有害性評価を行うための戦略を得ることが期待される。

## B. 方法

第一段階として本研究班が俯瞰する化学物質管理の包括的な評価管理体制の構成要素として、[1] 対象化合物の選択、[2] 試験法スキーム、[3] 試験法、[4] ハザード・アイデンティフィケーションとその詳細、[5] それに関わるエキスパートジャッジメント（その1）、[6] エクスパートジャッジメント（その2）、[7] リスク評価、[8] リスク管理、及び[9] リスクコミュニケーションを掲げ（Appendix 1 参照）、その内での位置づけを考慮しつつ、有害性評価に密接に関わる現状分析と今後の新しい対応に関する事項の洗い出しを行う。

第二段階として、評価管理体制の中心となるエキスパートジャッジメントの定義やエキスパートジャッジメントを支える今後の研究戦略に対する意見を、上記の事項との関連において、専門的有識者からヒアリングによって収集し、より広範な視点から、今後の化学物質の評価管理体制構築に必要な論点を整理する。

第三段階として、研究戦略として重点的に推進すべき項目を列挙し優先順位を付加して、最終的な提言を作成する。

## C. 結果

まず化学物質管理の包括的な評価管理体制の

構成要素として、方法の項で示したフローの [1] から [8] 各段階における「現状と進行中の研究テーマ」、「問題点と課題」、及び「今後の研究戦略」について、項目の抽出を行った。（Appendix 1 参照）その結果、

[1] 対象化合物の選択では、現状では、法律別、用途別、あるいは物質の化学的分類別に対象を整理しているが、新たな対象として、①粒子の大きさにより規定される新たな毒性誘発物質としてのナノ粒子や②内分泌かく乱化学物質における情動異常誘発物質、③数多くの少量生産量物質の評価の必要性が挙げられた。[2] 評価法スキームにおいては、今後の新規スキーム開発展望として、工業製品の用途別・管理ごとの評価スキーム、優先順位付けスキーム（各種法令やガイドラインを跨ぐ包括的スキーム）、或いは所定の期間内に既存2万物質に対応する件数をこなすスキームの構築の必要性が挙げられた。また、国際協調の観点からは REACH などの国際的なスキームを参照することが必要とされた。[3] 試験法では、開発中・評価中のものとして、内分泌かく乱試験法（QSAR、in vitro、in vivo）、化学物質の安全性評価のための QSAR、変異原性・細胞毒性評価のための HTPS、トキシコゲノミクス、トキシコプロテオミクス、バイオインフォマティクス（Systems Biology を含む）、ナノマテリアル試験法などがあり、今後も継続して研究されるべきであると考えられた。[4] ハザード・アイデンティフィケーションについては、新試験開発や試験法による結果の評価に関わり、基礎的研究としての体内動態(PBTK モデル)、発現メカニズムを組み込んだ生物学的用量作用モデル（low dose 外挿を含む）、毒性学的意義をより明確に反映するための基礎的研究、NOEL やベンチマークドーズを求めたエンドポイントの毒性特性による安全域の最適化等に関する研究の必要性が示された。

[5-1] エクスパートジャッジメントについては、生命科学、医学、獣医学、薬理学、あるいは、病理学、毒性学の知識を総合的に活用して、◎毒性の重篤度や不確実性の判定（安全係数設定）、◎



閾値問題対応、◎毒性の内容に沿った適切な暴露評価の実施、規制決定に関わる毒性学的コメントの発信による「リスク評価の最適化」等の問題に対して、毒性専門家による高度な判断をおこなうものであると定義される。また、[5-2] エキスパートジャッジメントのための人材確保の観点からは、エキスパートのピラミッド体制の形成・維持・整備（ネットワーク形成）、国衛研や学会等による authorize system の構築やエキスパート育成コースや委託システムの構築が必要であり、人的情報網として情報収集能力の維持・向上のためには、国内的研究者レベルの交流としての学会活動、国際的研究者レベルの交流として研究所間交流や学会活動、国際機関活動（WHO/OECD/CODEX）の積極的な活用が必要であると考えられた。[7] リスク評価としては、現状のリスク評価と呼ばれているものでも、暴露量と ADI とを比較した定量評価をしているように見えるが、多くの場合、単に許容値を境にした 2 元論（安全か否か）と変わらない。数値としておなじ NOEL、あるいは ADI でも、毒性の重篤性や不確実性、用途や暴露状況、その他により、そのリスクの意味合いは異なる等の問題がある。従って、規制値と直結する ADI のほかに、たとえば規制値を運用する際の参考となる量的評価数値を開発する研究や暴露評価実施のための提言手法（実施するかしないか、どの様に実施するか、どこで実施するかなど）の研究が必要で、エキスパート手順による既存暴露情報の利用方法の決定（＝最適化手法の開発）が必要。[8] リスク管理においては、すべての用途を把握することは困難であるものの、使用用途に応じたハザード情報を MSDS（Material Safety Data Sheet）等で記載・公示するシステムは有用であると考えられる。また、未同定あるいは多数の微量の化学暴露に対する一括した効率的な管理として TCC（Threshold Concentration Concern）などを用いたアプローチが利用され始めているが、このような手法は、既存の知識と統計的手法だけに依存したものであり、作用メカニズム等に基づいたより科学的に妥当

性の高いものにリファインする必要がある。

以上のことから、単なる NOAEL の設定等という単一的な定量評価ではなく、総合的な視点にたった、エキスパートジャッジメントの高度化と迅速化が重要であることが示された。また、そのエキスパートジャッジメントを支えるには、用途や評価する物質数や毒性情報量に応じた評価スキームに加えて、より基礎的な毒性発現メカニズム等に基づいた総合的な評価スキームが必要であると考えられた。

#### エキスパートジャッジメントの定義について

化学物質の安全性を評価するために、数多くの安全性試験法が標準化されてきているが、これらの定型化された試験の NOAEL 等の数値アウトプットをそのまま判定に使用するだけでは、適切な評価が行われているとは言えない。試験法ごとの特性（評価対象とする毒性との対応性や限界など）を十分に理解した上で、得られた現象（生体反応所見）とそれを裏付ける数値について、高い専門性と倫理性の下で、安全性評価上の意義と不確実性、及びリスク管理上の有用性を評価し、判定することがエキスパートジャッジメントであると考えられる。具体例な例としては以下のような点が考えられる。

- NO(A)EL が同じ場合でも、その際の有害性反応の重篤度やヒトへの外挿性が異なる場合は、規制値等の設定手法や管理の仕方は異なるべきである。
- ガイドライン化された試験結果だけではエキスパートジャッジメントに必要な情報が提供される保証はない。限定された情報に基づいた評価には、常に暫定性が内在している。したがって有害性の重篤度や評価の不確実性、ヒトへの外挿性等の情報など、エキスパートジャッジメントに用いた情報の概要を、許容値などと共にリスク管理者に伝えることもリスク管理に有用且つ必要な情報である。
- 暫定性を減らすための追加すべき適切な試



験や研究の指示も、エキスパートジャッジメントの重要な仕事である考えられる。

- エキスパートジャッジメントの情報源の整備とアクセスの利便化は、長期に亘る活動による経験の蓄積と、次世代エキスパートジャッジメントへの正確な継承のために必須である。

#### 高度なエキスパートジャッジメントを支えるための研究戦略の目的と内容について

厚労科学研究の最終的な目的は、より高度で迅速かつ適正な判断を助けるための科学的な知見を充実させること（エキスパート支援）にある。ただし、得られるアウトプットは単なる科学的知見の集積ではなく、より実質的・直接的にエキスパートへ（将来的に次世代エキスパートへの継承も含めて）提供できるもの（知識ベースや検索システム、評価スキームの構築など）であるべきであると考えられる。また、これらの研究は評価を専門とするエキスパートによって行われれば、より直接的な経験としても蓄積されるが、総合的な評価を必要とするエキスパートジャッジメントにおいては、より幅広い分野のエキスパートの関与も必要である。

#### 厚労科学研究（化学物質リスク事業）の研究戦略について

生命科学の急速な発達と、高度情報化社会による国民の安全性に対する要求度の高度化の狭間で、厚労科学研究（化学物質リスク事業）は、より高度な作用機作追求研究型の要求と、行政ニーズに直接答えるための試験研究や管理手法の改善につながる試験法開発的研究の方向性を持つべきであるという要求とが同時に課せられている。つまり、現状の応用・行政型研究については、より作用メカニズムに基づいた科学的に適切な分類や評価・管理への応用に向けた研究の方向性をもたせることが、より総合（行政）的で科学的根拠を高度に積み上げた研究にするうえで必要であると考えられ、一方、作用機作追求型研究に

も行政への応用化の視点が要求されることになる。この二つの状況を効率的に満たす為には、作用機作追求型研究に試験法開発的要素を過度に持ち込むことは得策ではなく、両研究型の間にリエゾン機能を間に挟むか、調整機能を取り込む形での総合的な大規模なプロジェクト型研究を構築することが推奨される。

#### エキスパートジャッジメントの普及について

化学物質の有害性評価システム（審議会等）へのエキスパート関与のあり方、エキスパート育成のためのリスク評価専門の教育機関・資格等、リスクコミュニケーションへのエキスパートの関与の仕方などを検討することにより、エキスパートジャッジメントの意義を示すとともに、その社会的需要を喚起し、エキスパートを目指す人的リソースを確保することが重要であり、その育成のためのシステムの構築が必要である。

以上の点を踏まえて、25名の専門的有識者からエキスパートジャッジメントの定義も含めて、今後の化学物質の評価管理体制構築に必要な論点のヒアリングを行った。（Appendix2）

その結果、訪問調査によって得られた意見から、有害性評価に関する課題についての抽出を試みた。抽出した課題は、行政側の課題、有害性評価の基盤整備、有害性研究の高度化に分類した。

#### 行政側の課題

有害性評価を行う行政側の課題として、

- (1) 有害性評価機関の一元化
- (2) 人材交流のための仕組みの構築
- (3) エキスパートを確保するための長期的な戦略を挙げる。

#### (1) 有害性評価機関の一元化

食品、医薬品、農薬、一般化学物質らの審査を行う行政機関を一元化することにより、評価の横の繋がりの緊密化や一貫性の確保、評価効率の向上が期待されると考えられる。エキスパートらの訪問調査において、エキスパートの数が足りず特



定の人に評価作業が集中していることが数多く指摘されていた。このような現状を踏まえると、少ないエキスパートで効率よく有害性評価を行う仕組みを構築する必要があると考えられる。

## (2) 人材交流のための仕組みの構築

官民間の人材交流は特に医薬品の審査に対して要望が多かった。人材交流では利益相反が問題視されており、この点をクリアする仕組みを構築する必要が生じると考えられる。民間からの審査官は①他社の医薬品の審査を行う、②収入を保証した上で財団法人や中立的な研究機関に一定期間所属した後に審査官になる等の意見が寄せられていた。

## (3) エキスパートを確保するための長期的な戦略

毒性研究は本調査において何度も指摘されている様に、必ずしも世の注目を浴びる大きな発見につながるものの多い学問ではないが、社会的には必要不可欠な研究領域であり、将来起こりうる様々な有害性に対して日本として対応できる様な人材を永続的に確保できるような運営が必要である。そのためには長期的な戦略の元で有害性評価の迅速化、高度化の研究を行い、最新の毒性学に通じたエキスパートをある一定数維持しておくことが必要になる。そのため有害性評価の高度化のためには継続的な国のサポートが必要になろう。

## 有害性評価の基盤整備

有害性評価の高度化に対する基盤整備として、

- (1) 評価委員のためのデータベースの構築と提供
- (2) 教育拠点の設立
- (3) 生体サンプルバンクの構築
- (4) 試験法評価機関の充実

の課題が挙げられる。

## (1) 評価委員のためのデータベースの構築と提供

評価委員のためのデータベースとしては、過去の試験データとその判定結果をまとめたデータベースの構築を望む声が多かった。このデータベ

ースには化学物質の構造や物性情報、試験結果、代謝などのデータの他に、判定結果とその理由、諸外国での状況や過去の経緯などの情報が含まれていることが望まれていた。これらは議事録などの形で公開されている情報であるが、自然言語で書かれた文章のままでは高度な検索機能の提供やデータの整理などには不向きである。また評価委員に送付される化学物質の評価資料に対しても検索機能の強化を望む声があり、単純なテキストマッチングによる検索機能だけでなく、データベースとリンクさせることにより、物性値や誘導する酵素、化学物質の部分構造や記述子などによる検索機能を提供することなどが考えられよう。更にこのようなデータベースが構築されたならば、有識者の判断についてもデータマイニングの対象となることも考えられ、判断の傾向を分析することが可能になるであろう。

データベースの構築に対しては、ネガティブデータを登録出来るデータベースや、過去に起こった有害事象をまとめたデータベースなどを望む声もあり、これらの情報も統合したデータベースの構築も考えられる。

一方で有害性評価のためのエキスパートのサポートとしては、既存のデータベースの利用も有効であると考えられる。商用のデータベースは一般にライセンス料などが高価であるため、国がライセンスを購入して評価委員に提供することも考えられよう。

## (2) 教育拠点の設立

訪問した有識者の殆どが挙げた課題が、リスクアセスメントを含めた毒性学を専門に教育する場の構築であった。多く有識者は大学で毒性学を専門とする学科を作ることが必要であると考えており、また学会に期待する声もあった。アメリカでは毒性学で学位を取ることが出来るが日本では難しいと言う意見も多く、毒性学の地位が日本では低いことも懸念されていた。ただし教育機関の設立には、毒性学を学んだ人が活躍できる社会であることも必要とされ、就職先の少なさを挙げる声も多数寄せられた。よって民間企業におい



て、毒性学を専門に学んだ学生が必要となる様な仕組みを作ることが、有効な方法論であるかもしれない。また、毒性学分野で著明な成果を上げている研究機関には、毒性学専門家を育てるためのfellowshipを優先的に配分することも有効と思われる。

#### (3) 生体サンプルバンクの構築

大規模なコホート追跡調査で得られる生体サンプルは非常に貴重であり、ある程度長期に保存することが望ましいと考えられる。この様なサンプルを保存しておくことにより、過去に遡って暴露量を評価することや、長時間経過した後に初めて現れる有害性について検討することが可能になると考えられる。集中的に管理することにより研究者の負担を軽減し、また他の目的への有効活用が容易になること等が期待される。

#### (4) 試験法評価機関の充実

適切な安全性試験法を確保することは国民の安全を守るために極めて重要であるが、新規の安全性試験法を開発し、これを国際的に標準化し、認めさせる迄には様々な手続きが必要となる。新規試験法を一研究室や一民間企業で開発することは現実的ではない。有用と思われる試験法については、国のサポートにより育て、妥当性を確認していく必要がある。

### 有害性研究の高度化

本調査を通じて有害性評価における最大の論点は「ヒトへの外挿」であると認識された。そのためヒトへの外挿の高度化に向けた研究について様々な提案を受けた。これらの提案をまとめると、

#### (1) 毒性論理学の構築

#### (2) 遺伝毒性発がん性物質の評価方法の高度化

#### (3) ヒト細胞を使った評価系の構築

#### (4) オミックス技術を使ったバイオマーカーによる評価方法の構築

#### (5) 有害性メカニズムに基づいた代替法の開発などが挙げられる。これらの個別の課題の是非については、本調査の範囲内では多様な意見が得ら

れ、共通した具体的な課題を得るまでには至らなかった。

### D. 考察

ガイドライン化あるいは指針が作成された分野であったとしても、有害性の判定やその用量反応評価に基づく耐容量設定等においては学際的或いはレギュラトリー・サイエンスの観点を取り入れてのトキシコロジストによる"エキスパートジャッジメント"が極めて重要であると考えられる。加えて、有害性情報の殆ど無い何十万といわれる物質について、迅速かつ効率的、倫理的に評価を下すことが求められる国際的な趨勢に対応する為には、有用な新規試験法を開発するとともに、それらを既存の方法と組み合わせた適切な評価スキームを構築することが望まれる。

本研究では、分担研究者を始め、有害性評価に関する行政的な委員会の専門員や学会の評議委員などを対象に意見を収集し、総合的な観点から、既存の評価システムやエキスパートジャッジメントに関しての重要性とそれを支えるための問題点とその解決のための意見の整理を行った。その結果、専門的・学術的観点において、ハザード・アイデンティフィケーション（毒性評価）に関わる様々な学問分野（病理診断学、分子生物学、バイオインフォマティクス等）を総合的に取り入れることは、未知の毒性様式をも推定でき得るような、高度化されたハザード・アイデンティフィケーションのためのエキスパートを育成する体系の設立に寄与できるものと考えられた。さらに、ハザード・アイデンティフィケーションのヒトへの外挿性の向上や精度の高い疫学情報を得るための、汎用的で利便性の高い暴露情報データベースや再解析などのための臨床（生体）サンプルバンクの構築の必要性が提案された。一方、既存の毒性エンドポイントを検出するために最適化されているが、現状の有害性評価にとってはミニマムセットであるガイドライン化された試験法は、より多くの生体影響情報を網羅的に検出できる新規の試験法とその評価システムのために再構



築する必要性が提言された。その他、各種審議会評価委員のエキスパートジャッジメントために、過去の評価内容等を提供できるデータベースの構築と、評価の一貫性や効率の向上の観点からの食品、医薬品、農薬、一般化学物質らのリスク評価に関する行政機関の一元化が望まれていることも示された。

#### <提言>

新たなハザードに基づく新しい対象として、粒子の大きさによる新たな毒性が想定されるナノ粒子や内分泌かく乱化学物質における情動異常誘発物質が重要な研究対象として浮かび上がり、評価手法としては、数多くの少量生産量物質や未評価化学物質を効率的に評価する手法の必要性とそれらの有用性を評価する体制を充実することが望まれていることが示された。

#### ● 先端（新機能）物質の評価手法研究

ナノ粒子等の問題は、これまでとは異なった概念に基づく物理学的尺度により物質を評価する必要性を提起しており、ナノ粒子に限らず、これまでの化学物質のカテゴリーに含まれない新規／先端物質の評価手法の開発に関する研究の必要性を示していると考えられる。

#### ● 次世代・子供への影響に関する長期的な研究

内分泌かく乱物質に関する研究で明らかにされてきた情動異常などの高次機能に対する影響は、その評価手法や毒性学的意義付けの困難さも示してきている。影響は次世代や後発的にあらわれることより、メカニズムに基づいた評価手法の開発に加えて、毒性学的意義付けを確定するための長期間の研究や疫学調査が重要である。そのためには長期間の調査・研究を行えるプロジェクトが必要である。

#### ● QSAR／カテゴリー、HTPS 手法の開発研究

数多くの未評価物質について、優先順位付けの目的も含めて、ある程度のレベルでの評価をする

必要性に迫られている。これまでの知見を集積したデータベースや構造や物理特性の類似性等を駆使して、大量に評価・分類する手法の開発が望まれている。

#### ● 先端技術を用いたメカニズムベースの評価手法の開発研究

上記の開発研究を効率的、科学的に適切に行うためには、メカニズムや毒性発現機序の同定と共にそれらを捉えられる新しい技術（オミクス等）が必要であり、その結果に基づいた評価手法の研究が必要である（オミクス技術を応用した試験／評価法の開発、体内動態やメカニズムに基づいた *in vitro*/代替法の開発）。

さらに、これらの研究を効率的に統合するためには、基礎から行政応用までの研究目的・手法を調整することができる機能を含んだ形で研究班または大型のプロジェクトを構築することや、研究班の間を調整する機能と国際的・行政的対応を専門に行う機能・研究事業組織を設置する必要がある。そして、これら総合的な研究を一貫して行うことは、エキスパートジャッジメントをより高度なものにすることに大きく貢献できるものと考えられる。

また、これらの研究遂行や研究成果に基づく毒性学的知見によるエキスパートジャッジメントを行える人材を確保するための、教育機関や教育プログラムは、切に望まれている。

#### E. 結論

エキスパートジャッジメントをこれまで以上に、高度化・迅速化するために必要な研究戦略を立てる必要がある、リスクの本質を捉える試験法の開発や新しい評価パラダイムに基づいた評価・試験スキームの構築を目的とする研究が必要であると同時に、作用機作追求型研究と応用・行政型研究をより有機的に関連させ、効率的に研究成果をエキスパートジャッジメントの高度化のために資する必要がある。つまり、基礎から応用

までをカバーした総合プロジェクト的な研究班、あるいはリエゾン機能型研究もしくはいくつかの研究班の役割を調整するタスクフォースを構築することが推奨され、以下の項目に示す研究が提言された。

- 先端（新機能）物質の評価手法研究
- 次世代・子供への影響に関する長期的な研究
- QSAR／カテゴリー、HTTP 手法の開発研究
- 先端技術を用いたメカニズムベースの評価手法の開発研究

その上で、これらの研究活動を通してエキスパートジャッジメントの重要性の周知やエキスパートジャッジメントのための人材の確保を実現していくことが必要であることが示された。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

大野泰雄：日本薬理学会の奨める動物実験 ―苦痛の評価と軽減― 「はじめに」および日本薬理学会の新動物実験指針 日本薬理学雑誌 129, 5-9 (2007)

大野泰雄：動物福祉と動物実験代替法への考慮の必要性について。Biophilia 3, 4-5 (2007)

大野泰雄：動物実験代替法の国際動向。Fragrance Journal 10, 20-28 (2007)

内藤真策、古田 盛、吉田武美、北田光一、笛木修、海野 修、大野泰雄、小野寺博志、河村信之、黒川美佐男、佐上文郎、篠田和俊、中澤隆弘、山崎恒義：医薬品開発における代謝物の安全性評価についての考え方。医薬品研究 38, 495-498 (2007)

Naito S., Furuta S., Yoshida T., Kitada K., Fueki O., Unno T., Ohno Y., Onodera H., Kawamura N., Kurokawa M., Sagami F., Shinoda K., Nakazawa T,

Yamazaki T.: Current opinion: Safety evaluation of drug metabolites in development of pharmaceuticals. J. Toxicol. Sci. 32, 329-341 (2007)

大野泰雄：薬学研究における動物実験代替法研究の重要性とその問題点。薬学雑誌 128 (5) 735-740, 2008.

### 2. 学会発表

大野泰雄：ICH 会議における現在の状況. 第 13 回 生殖・発生毒性学東京セミナー(2007.10.5)

Nobuyuki Murayama, Osamu Okazaki, Kaoru Shimada, Kunihiro Mizuno, Momoko Sunouchi, Akio Nakamura, Yoshiteru Kamiyama, Motohiro Kato, Yoshiaki Terauchi, Yusuke Sogawa, and Yasuo Ohno: Feasibility and validation of CYP1A and CYP3A induction in HepaRG, A novel human cell line obtained from a differentiated hepatoma. ISSX (2007.10.9-12)仙台

K Koyama, S Miura, O Okazaki, K Mizuno, K Shimada, T Baba, Y Sekiya, S Komuro, S Ninomiya, Y Yamada, A Miyajima, M Sunouchi, K Aoyama, K Yoshinari, K Nagata, Y Yamazoe and Y Ohno: Application of an Adenoviral Human CYP Expression System toward a Study for the Prediction of In Vivo Metabolism in Humans. ISSX (2007.10.9-12)仙台

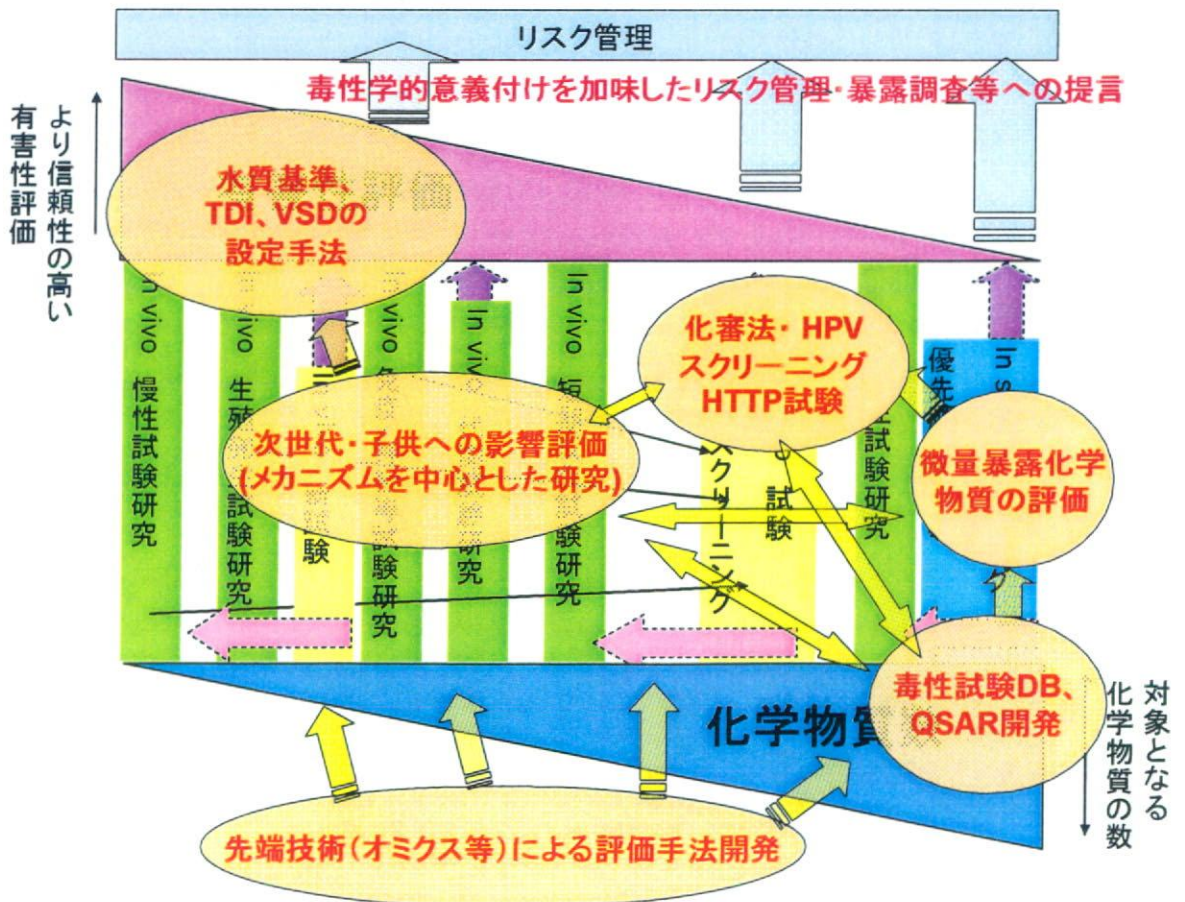
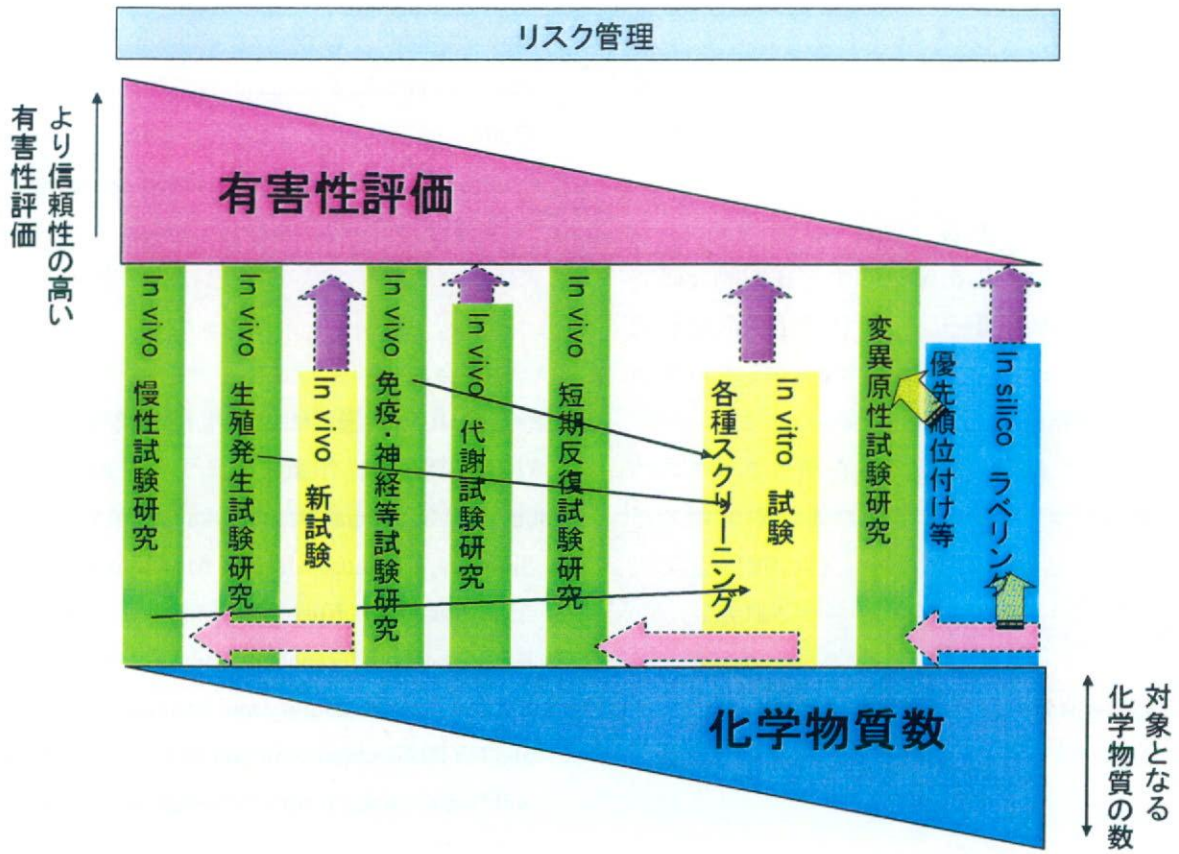
近藤一成, 太田小夜香, 穉山 浩, 大野泰雄: シャンピニオン中のアガリチンについて, 全国衛生化学技術協議会(2007.11.16)津

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし





## 1. 試験管内試験法の現状と将来に関する調査

分担研究者：小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所薬理部室長

### 研究要旨

化学物質における網羅的かつ効率的・迅速な有害性評価を行うためには、評価法開発へ提要可能な最新科学技術やこれまでに開発された評価方法の状況を俯瞰しなければならない。特に、試験管内試験においては、欧米を中心に進んでいる動物実験代替法の現状を鑑みて、その情報を把握しなければならない。

本研究では、プロジェクトでの検討や、バリデーション研究や専門家による第三者評価が進んでいる各種の試験管内試験における現状と将来展望について調査した結果をまとめ、動物実験代替法の課題と本邦における試験管内試験の課題をまとめた。

### A. 研究目的

化学物質における網羅的かつ効率的・迅速な有害性評価を行うためには、評価法開発へ提要可能な最新科学技術やこれまでに開発された評価方法の状況を俯瞰しなければならない。特に、試験管内試験においては、欧米を中心に進んでいる動物実験代替法（以下、代替法と記す）の現状を鑑みて、その情報を把握しなければならない。

本研究では、プロジェクトでの検討やバリデーション研究や専門家による第三者評価が進んでいる各種の試験管内試験における現状と将来展望について調査した。

### B. 研究方法

種々の国際会議に出席して得られた情報や、いくつかのホームページ(OECD、ECVAM、ICCVAM、EPAA など)を定期的に検索した。

(倫理面への配慮)

本研究は代替法および試験管内試験に関する情報を収集することにより、実験動物の福祉向上を目指すものであり、ヒトや動物の権利や福祉に抵触するところはない。

### C. 研究結果および考察

#### C-1. 試験管内試験を必要とする国際動向について

試験管内試験を推奨する欧州における法規制を以下に示す。

##### C-1-1 化粧品指令第7次改正

化粧品指令第7次改正が2003年3月11日付けで公布され<sup>1)</sup>、以下の通りに決まっている。

- ・化粧品及び化粧品原料のEU域内の動物実験禁止
- ・化粧品：加盟国の国内法施行後に即時禁止  
※猶予期間は最大18ヶ月（2004年9月）
- ・原料：代替法がある場合は加盟国の国内法施行後に即時禁止、完全な動物実験禁止はEU化粧品指令発効の6年後(2009年3月)。
- ・完全な製品の販売禁止は、化粧品指令発効の6年後(2009年3月)以降

例外：反復毒性、生殖毒性、薬物動態試験については2013年3月からの販売禁止

- ・EU委員会は、OECDのバリデーションの進展を考慮した上で、SCCNFP（現、SCCP）及びECVAMと協議して、種々の試験の段階的廃止に関する



る期限などの予定を立案する。

#### C-1-2 REACH

化学物質の登録と規制 (REACH; Registration Evaluation and Authorization of Chemicals) は、2003年10月29日にEU委員会案の公表以降、議会と閣僚理事会での修正を経て、2007年6月1日から発効された<sup>2,3)</sup>。EU域内で年間1トン以上製造・輸入されるすべての化学物質の登録を既存物質と新規物質を区別せずに義務付けるものであり、3万種の化学物質が対象となる。既存物質の登録期限は物質の製造・輸入量や有害性への懸念によって分けられ、2018年までに段階的に設けられている。年間1トン以上の物質の登録には、製造・輸入量に応じて物理化学的性状、ヒトの健康への有害性、生態毒性の情報が必要となる。別添表1および2に製造・輸入量毎に実施すべきヒトの健康への有害性、生態毒性試験に関して記載する<sup>3)</sup>。

#### C-2. 試験管内試験のガイドライン

遺伝毒性試験を除く、代替法として認められた OECD ガイドラインを表1に示す。経皮吸収試験代替法については、実験動物を用いた *in vivo* 試験 (OECD TG427)<sup>4)</sup> と同時に、動物 (主にラット及びブタ) またはヒト摘出皮膚を用いた透過拡散セルによる *in vitro* 試験法 (OECD TG428)<sup>5)</sup> が標準化されている。一方、皮膚刺激性試験代替法開発の取り組みは、皮膚腐食性が評価できる代替法の開発にとどまっている。具体的には、三次元皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験法<sup>6)</sup>、Transepidermal Electrical Resistance (TER) 試験法<sup>7)</sup>、蛋白変性検出法<sup>8)</sup>、また Balb/c 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド取り込み法 (3T3NRU 法) が光毒性試験法<sup>9)</sup> として化学物質の *in vitro* 試験法として OECD ガイドラインに採用されている。

この他に、モルモットを用いる試験法の代替法として皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA)<sup>10)</sup> が OECD ガイドライン案となっている。

表1. 動物実験代替法と位置付けられる OECD ガイドライン

TG	Test method	Adopted date
428	<i>Skin Absorption: in vitro Method</i>	<i>Original Guideline, adopted 13th April 2004</i>
429	<i>Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay</i>	<i>Updated Guideline, adopted 24th April 2002</i>
430	<i>In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)</i>	<i>Original Guideline, adopted 13th April 2004</i>
431	<i>In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test</i>	<i>Original Guideline, adopted 13th April 2004</i>
432	<i>In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test</i>	<i>Original Guideline, adopted 13th April 2004</i>
435	<i>In Vitro membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion</i>	<i>Original Guideline, adopted 19th July 2006</i>

#### C-3. 試験管内試験の開発動

化粧品規制や REACH に対応でき、OECD ガイドラインを目指す試験管内試験法の概要を

以下に示す。

##### C-3-1. 単回投与毒性試験

ECVAM の第 6 次 Framework Programme

on Research and Development として、A-Cute-Tox Project が、実験動物を使用しない急性毒性試験の開発を目的に 2005 年 1 月 1 日に開始された。5 年間のプロジェクトとして<sup>11)</sup>、35 名の共同研究者、総予算 1560 万ユーロ、そのうち EU から 900 万ユーロの予算を受けて、ヒトにおける急性毒性を予測する *in vitro* 試験の開発、戦略の最適化、プレバリデーション、データベースの作成等を実施している。現在 9 つのグループで検討が進められている。各グループからは、97 種に及ぶ参照物質の急性毒性に関する *in vivo* (動物およびヒト)、*in vitro* データを含む高品質なデータベースの開発、商業利用可能なスクリーニングロボット基盤に適合できる細胞モデルの獲得、新たな特異的パラメータの使用による予測精度の向上等の成果が上がってきている<sup>12)</sup>。

また、米国では、2002 年より The NTP Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) と the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) の共同によって、急性経口毒性試験の *in vitro* 細胞毒性試験による評価が実施され<sup>13)</sup>、バックグラウンドレビュー文書 (BRD)<sup>14)</sup> および ICCVAM による試験法評価報告書<sup>15)</sup> が 2006 年 11 月に最終化された。BALB/c 3T3 マウス繊維芽細胞 (3T3) および正常ヒト表皮ケラチノサイト (NHK) 2 種の細胞毒性試験は法規制におけるハザード分類のために十分な精度はないが、現在の急性毒性プロトコールである固定容量法<sup>16)</sup>、Acute Toxic Class (ATC) 法<sup>17)</sup>、Up-and-Down Procedure (UDP)<sup>18)</sup> の開始用量を設定するために使用できるとの

勧告を行った。

以上のように、急性毒性試験の代替法については、従来の *in vivo* 試験を改良して使用動物数を削減 (Reduction) あるいは苦痛の軽減 (Refinement) を図る試みと、一方で動物試験を減らすために *in vitro* 試験の利点をできるだけ活用しようとする試みが進められている。

### C-3-2 皮膚刺激性

皮膚刺激性代替試験法としては、OECD ガイドラインに受け入れられる段階には至っていないが、ECVAM においてヒト皮膚モデルである EPISKIN、EpiDerm 等のバリデーションを実施してきた<sup>19)</sup>。これらの結果、EPISKIN に関しては、2007 年 4 月の ESAC による peer review において、皮膚刺激性の表示 (irritant:R38、non-irritant:no-label) の目的で使用されるウサギを用いたドレイズ法の代替法として承認され<sup>20)</sup>、現在、regulatory acceptance に向けて検討を進めている状況である。一方、他のモデルについてもバリデーション研究が進められている。

### C-3-3 眼刺激性

眼粘膜刺激性代替法試験としては、4 種類の試験 Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test (ウシ摘出角膜の混濁及び透過性試験)、The Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) (受精鶏卵の漿尿膜試験)、The Isolated Chicken Eye (ICE) test (鶏の摘出眼球試験)、The Isolated Rabbit Eye (IRE) test (ウサギの摘出眼球試験) については米国環境保護局 (EPA) が *in vitro*



試験法として眼刺激性又は腐食性をスクリーニングできる方法として推薦している。また、これらの試験法に関して、米国官庁間代替法バリデーション委員会 (ICCVAM)、国立環境衛生科学研究所 (NIEHS)、NTP 代替試験法省庁間センター (NICEATM) は 2006 年に最終試験法評価報告書<sup>21)</sup>を公表し、2007 年 10 月にバックグラウンドレビュー文書 (以下、「BRD」)<sup>22)-25)</sup>と共に連邦政府に送っている。この中で腐食性及び強刺激性物質を検出するための眼刺激性試験代替法として BCOP と ICE が承認されたことが記載された。

なお、BCOP と ICE については、欧州においても 2007 年 4 月の ESAC による peer review で腐食性及び強刺激性物質を検出するための眼刺激性試験代替法として承認された<sup>20)</sup>。一方、弱い眼刺激性の検出に関しては、細胞を用いた方法 (Neutral Red Release : NRR、Red Blood Cell : RBC、Fluorescein Leakage : FL、Cytosensor Microphysiometer : CM)、3D 培養モデル (SkinEthic Human Corneal Epithelial Model、EpiOcular OCL-200 Model) 並びに器官型培養系 (Isolated Rabbit Eye Test : IRE、Hen's Egg Test -Chorioallantoic Membrane : HET-CAM) のについて、過去のバリデーションの再評価が進んでいる。

#### C-3-4 皮膚感作性

ECVAM の第 6 次 Framework Programme on Research and Development として、Sens-it-iv プロジェクトが 30 名の共同研究者、1100 万ユーロの資金を受けて、2005 年 10 月から 5 年間の予定で開始された<sup>11)</sup>。

プロジェクトの目的は、皮膚および吸入における感作性物質を同定する *in vitro* 試験法による動物試験の置換である。現在このプロジェクトには 28 のグループ (9 つの企業、15 の大学や研究機関、4 つの業界団体) が参加しており、プロジェクト活動は 10 のグループで進められている。このプロジェクトの活動は一方で動物数のさらなる削減も進めている。

この活動には、過去の LLNA データベースの解析や放射性物質を使用しない別のエンドポイントを用いる LLNA 変法の評価も含まれている。放射性 LLNA は、マウス *in vivo* 試験であり、いわゆる Reduction 及び Refinement を意図した代替法と位置づけられる<sup>26)</sup>。ICCVAM によって第三者評価もなされている<sup>27)</sup>。しかし、従来の LLNA は、放射性物質の <sup>3</sup>H-thymidine を用いて細胞の増殖性を測定するためのラジオアイソトープの施設を必要とする試験法であることから、より簡便な非放射性 LLNA の開発が進められている。そのひとつの方法である LLNA-DA 法は<sup>28)</sup>、被験物質投与における改良に加え <sup>3</sup>H-thymidine の代わりに ATP 量でリンパ節細胞の増殖性を測定する方法である。また、<sup>3</sup>H-thymidine の代わりに BrdU を用いてリンパ節細胞の増殖を測定する LLNA-BrdU 法に関する<sup>29)</sup>バリデーションが実施されている。一方、REACH のための皮膚感作性試験として、ESAC が Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA) を承認した<sup>20)</sup>。

#### C-3-5 生殖毒性

ECVAM の第 6 次 Framework Programme on Research and Development として、ReProTect Project は *in vitro* 生殖発生毒

性試験の開発と最適化の促進を目的に、35の大学、行政機関、企業などの共同研究者、約910万ユーロの資金を受けて進められている<sup>11)</sup>。正式には2004年7月から5年間の予定で開始され、現在大きく3つの大きな研究テーマ（受精、着床、生前発育）そしてそれら研究の横断的技術に関して研究が進められている。一部においては進展も認められるものの、出生前発生に関する3試験法がバリデーション段階に進んでいる。

#### C-3-6 内分泌かく乱物質のスクリーニング

財団法人 化学物質評価研究機構(CERI)の開発した HeLa-9903 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイは、OECDの定める内分泌かく乱物質評価のレベル2にあたるエンドクラインレセプター $\alpha$ への結合を評価指標とする試験法<sup>30)</sup>、ICCVAMが主催する ECVAM、JaCVAM との共同バリデーションである米国 XDS 社で開発されたエンドクラインレセプター $\alpha$ への結合を評価指標とするレポーター遺伝子アッセイ Lumi-cell アッセイ<sup>31)</sup>など、バリデーションされているだけでも10種以上の内分泌かく乱物質スクリーニングの開発が進んでいる。

#### C-3-7 経皮吸収性

現在、OECD TG428 ガイドライン<sup>5)</sup>が経皮吸収試験代替法の中心的な役割を担っている。TG428の改良として、代替材料については、再構築ヒト皮膚モデルが最も研究されている。ドイツで行われたプレバリデーションスタディでは、再構築ヒト表皮を用いた試験法が高い施設内・施設間再現性を示している<sup>32)</sup>。

#### C-4 試験管内試験の課題

以上の国際動向を鑑み、代替法の問題点および本邦における試験管内試験の課題をまとめてみた。

##### C-4-1 代替法の問題点

- 1) 代替法が確立されている方法でも、Hazard identificationでしか利用できない。暴露評価がされておらず、試験法が開発が不十分である。よって、試験管内試験だけではリスク評価ができず、補填する動物実験が必要である。
- 2) 動物実験はBlack Box踏襲型が多いが、試験管内試験は作用機構に基づいた試験法の見直し、組み合わせが必要である。
- 3) 欧州を中心に多額の資金を用いて、多くの検討がなされているが、確立された方法が少ない。

##### C-4-2 本邦における課題

- 1) 代替法を用いた安全性評価の議論が少ない。
- 2) 欧米主導であり、後手の対応となっている。
- 3) 新規試験法の開発、バリデーション、評価のシステムが市民権を得ていない。
- 4) 生物製剤の生産の代替に関する専門家の意識が低い。
- 5) 環境毒性の評価についても専門家の意識が低い。
- 6) 省庁間の繋がりが弱い。
- 7) 欧米に比べて極端に研究予算が少ない。
- 8) 企業中心であり、日本における大学・専門機関の研究者が少ない。

#### D. 結論

2003年3月11日に公布された「化粧品



指令第7次改正」において段階的に設定されたタイムリミットである 2009 年及び 2013 年が迫りつつあり、REACH も発効され、今後ますます代替法開発、バリデーション、第三者評価が促進されるものと考えられる。代替法の開発と、バリデーション、評価は、国際的な合意で非常に長い年月を要するため<sup>33)</sup>、単年度では明確にその全貌を捉えることは困難である。したがって、関連する国際情勢の調査と解析を継続して実施し、積み重ねていく必要があると考える。

E. 健康危険情報  
なし

F. 参考文献

- 1) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003, Official Journal of the European Union, L66/26, (2003)
- 2) ECB, <http://ecb.jrc.ir/REACH/>(2007)
- 3) 財団法人 化学物質評価研究機構編 (2007) EU 新化学品規則 REACH が分かる本、工業調査会、東京
- 4) OECD Guideline 427: In vivo Skin absorption. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France. (2002)
- 5) OECD Guideline 428: In vitro Skin absorption. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France. (2002)
- 6) OECD guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for new guideline: 431, in vitro Skin Corrosion: Human skin model test(2004)
- 7) OECD guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for new guideline: 430, in vitro Skin Corrosion: Transcutaneous electrical resistance test (TER)(2004)
- 8) OECD guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for new guideline: 435, in vitro membrane barrier test method for Skin Corrosion(2004)
- 9) OECD Guideline 432: in vitro 3T3 NRU phototoxicity testing. OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France (2004)
- 10) OECD Guideline 429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2002)
- 11) <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- 12) AcuteTox Newsletter, July 2007, [http://www.acutetox.org/docs/ACuteTox\\_Newsletter\\_2.pdf](http://www.acutetox.org/docs/ACuteTox_Newsletter_2.pdf)(2007)
- 13) Federal Register, 69, 61504 (2004)
- 14) Background Review Document: *In vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity, NIH Publication No. 07-4518, (2006)
- 15) ICCVAM Test Method Evaluation Report: *In vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Testing, NIH Publication No. 07-4519 (2006)
- 16) OECD Guideline 420: Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2001)
- 17) OECD Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2001)
- 18) OECD Guideline 425: Acute Oral Toxicity-Modified Up and Down Procedure. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France (2001)
- 19) Fentem, J. H. et al., Update on the validation and regulatory acceptance of alternative tests for skin corrosion and irritation, ATLA, 32, Suppl. 1, 683 (2004)

- 20) ECVAM statement, [http:// ecvam.jrc.ec.eu.int/ index.htm](http://ecvam.jrc.ec.eu.int/index.htm) (2007)
- 21) ICCVAM Test Method Evaluation Report: *In vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Severe Irritants and Corrosives, NIH Publication No. 07-4517 (2006)
- 22) Background Review Document - Current Status of *In vitro* Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method, NIH Publication No. 06-4512 (2006)
- 23) Background Review Document - Current Status of *In vitro* Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method, NIH Publication No. 06-4513(2006)
- 24) Background Review Document - Current Status of *In vitro* Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Rabbit Eye Test Method, NIH Publication No. 06-4514, (2006)
- 25) Background Review Document - Current Status of *In vitro* Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane Test Method, NIH Publication No. 06-4515(2006)
- 26) Kimber I., Mitchell JA., Griffin AC., Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential Food Chem. Toxicol. 24, 585-586 (1986)
- 27) NIH Publication No: 99-4494 The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds (1999)
- 28) Yamashita, K., Idehara, K., Fukuda, N., Yamagishi G. and Kawada, N., Altern. Animal Test. EXperiment., 11(2) 136-144 (2005)
- 29) Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., and Kimber, I., Toxicol. Lett. 119, 203-208 (2001)
- 30) Akahori, Y., et al., *Toxicol. in Vitro*, 22,225-231 (2008)
- 31) ICCVAM, <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine/endodocs/xdseval2.pdf> (2007)
- 32) Schäfer-Korting, M. et al., Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the German Prevalidation Study, ATLA, 34,283(2006)
- 33) 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