

化粧品開発における動物実験の規制問題および REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of CHemicals) 問題である。

化粧品の規制に関しては、2003年に化粧品指令7次改正が公布され、2009年3月に代替法として確立されている試験がある場合には、①EU域内での動物試験の完全禁止、②動物試験した製品、動物試験をした原料を含む製品の販売禁止が決められている¹⁶⁾。さらに、EU委員会は、期限内の開発が困難と判断された試験法の場合には、2013年まで延長する法案を提出するとされている。これに間に合わせるべく、EUでは欧州化粧品工業会(COLIPA)とECVAMが共同で試験法の開発、バリデーションおよび第三者評価を進めている。

一方、REACHとはすでにEU市場に流通している約3万の化学物質に関し、その製造・輸入を行う事業者は、その安全性データなどを揃え、登録することが義務づけられる規制を指す。登録、評価、認可、制限の総称である¹⁷⁾。この背景にはEUで化学品会社が27,000社(売上額590 billion €)あり、170万人の従業員、国際市場の33%を占めている事情がある一方、職業性皮膚炎の治療費に3 million€/日、約600 million €/年が必要であるとともに、既存化学物質86%の毒性データが不足していることに端を発している¹⁸⁾。

この安全性評価はハザードベースでなく、リスクベース(ハザードと曝露評価)が中心である、2009年までに事前登録が期待される180,000物質については、70%の試験を2011~2017年に実施しなければならない。

製造/輸入量に応じた実施すべき試験法のリストを表1¹⁹⁾に示す。実験を行う場合にはintegrated testing strategies (ITS)という戦略に従い、Read-acrossという関連物質情報の調査、構造活性相関などのin silicoの利用、代替法を優先せざるを得ないと記されている。1t以上の製造/輸入物質には代替法により有害性の同定を行う。さらに製造量が増えるにつれて、曝露評価まで求められており、動物実験を有効に使っていかねばならない²⁰⁾。

EUではさらなる代替法の開発が盛んであり、300以上のパートナーと表2に示すような17の研究プロジェクト(予算110 million €以上)を通して、REACHのために“適した”100の試験法を確立する予定である²¹⁾。現在125のINVITTOXによるプロトコールが用意されており、2009年までに40試験法をバリデーションするとされている。これにより、代替法50%およびin silicoで20%の動物数削減を専門家が分析している¹⁸⁾。

ただし、新規試験法が開発されても、例えば、OECDガイドラインなどに受け入れられるためには10年が掛かると言われており、これまで通りの方法では2011年には多くの試験法を用意できない。そこで、バリデーションの短期化、バリデーションが終了したものと同等のものを揃え、バリデーションを実施せずにREACHのために“適切な”方法の選択をするCORRELA (COMmunity RefeREnce Laboratory for Alternative TEsting)という方策が検討されている。

表1. REACHで製造量毎に要求される試験名

	健康	環境
1～10t 優先物質	<i>in vitro</i> 眼刺激性 <i>in vitro</i> 皮膚刺激性／腐食性 皮膚感作性 遺伝毒性(Ames) 急性毒性(一つの投与経路)	急性水生毒性－ミジンコ 生物分解性 急性水生毒性－藻類
10～100t	<i>in vivo</i> 眼刺激性 <i>in vivo</i> 皮膚刺激性 遺伝毒性(マウスリンフォーマまたは遺伝子突然変異) 遺伝毒性(染色体異常または <i>in vitro</i> 小核) 急性吸入／皮膚毒性 亜急性毒性(28日間) 生殖毒性スクリーニング トキシコキネティックス評価	急性水生毒性－魚類 活性汚泥 吸着・脱離スクリーニング 更なる生物分解性 加水分解試験
100～1000t	遺伝毒性(<i>in vivo</i> 小核) 亜慢性毒性(28日または90日間) 更なる生殖毒性試験 (出産前生殖毒性および2世代試験)	長期的水生毒性－ミジンコ及び魚類 更なる分解及び環境中運命・挙動の研究 陸生生物(植物、無脊椎動物)への短期的影響 更なる吸着・脱離スクリーニング 魚貯留性 汚泥微生物への影響
1000t超	遺伝毒性(<i>in vivo</i>) 発癌性 慢性毒性(12ヶ月以上) 更なる生殖毒性試験	更なる分解及び環境中運命・挙動の研究 陸生生物への長期的影響

表2. EU で行われている動物実験代替法開発に絡んだプロジェクト

プロジェクト名	概要	予算(ユーロ)	開始日	期間(月)
ACUTETOX	Optimization and pre-validation of <i>in vitro</i> test strategy of predicting human acute toxicity	9,000,000	2005年1月1日	60
ARTEMIS	<i>In vitro</i> neural tissue system for replacement of transgenic animals with memory/learning deficiencies	1,984,900	2007年3月1日	36
CarcinoGENOMICS	Development of a high throughput genomics-based test for assessing genotoxic and carcinogenic properties of chemical compounds <i>in vitro</i>	10,440,000	2006年11月1日	60
COMICS	Comet assay and cell array for fast and efficient genotoxicity testing	3,189,385	2007年1月1日	36
EXERA	Development of 3D <i>in vitro</i> model for estrogen-receptor mouse tissues for the pharmacotoxicological analysis of nuclear receptors-interacting compounds (NR-Ics)	2,173,492	2006年10月1日	36
Invitroheart	Reducing animal experimentation in drug testing by human cardiomyocyte <i>in vitro</i> models derived from embryonic stem cells	2,701,611	2007年1月1日	36
LINTOP	Optimization of liver and intestine <i>in vitro</i> models for pharmacokinetics and pharmacodynamics studies	2,933,291	2007年1月1日	36
MEMTRANS	Membrane transporters: <i>in vitro</i> models for their role in drug fate	1,900,000	2006年4月1日	36
PREDICTOMICS	Short-term <i>in vitro</i> assays for long-term toxicity	2,259,754	2004年9月1日	39
ReProTect	Development of a novel approach in hazard and risk assessment of reproductive toxicity by a combination and application of <i>in vitro</i> , tissue and sensor technologies	9,100,000	2004年7月1日	60
Sens-it-iv	Novel testing strategies for <i>in vitro</i> assessment of allergens	10,999,700	2005年10月1日	60
TOXDROP	Innovative cell on chip technology to screen chemicals for toxicity, using cultured cells within tiny nanodrops of culture fluid	1,615,888	2005年1月1日	24
VITROCELLOMICS	Reducing animal experimentation in preclinical predictive drug testing by human hepatic <i>in vitro</i> models derived from embryonic stem cells	2,942,000	2006年1月1日	36
新規プロジェクト				
ENATS	Embryonic stem cell-based novel alternative testing strategies	11,895,577	2008年4月1日	60
NANOTEST	Development of methodology for alternative testing strategies for the assessment of the toxicological profile of nano particles used in medical diagnostics	3,933,272	2008年4月1日	42
OPENTOX	Promotion, development, acceptance and implementation of QSARs for toxicology	2,975,360	2008年4月1日	36
PREDICT-IV	Profiling the toxicity of new drugs: a non-animal based approach integrating toxico-dynamics and biokinetics	11,330,907	2008年4月1日	60

5. 日本の動向

日本でも眼刺激性、皮膚刺激性、感作性、光毒性試験などの代替法において日本動物実験代替法学会を中心にバリデーションや第三者評価が行われてきた²²⁾。しかし、内容的に優れているものの、国際的には認知度が低かった。

幸い、昨年8月に第6回国際動物実験代替法会議(WC6)²³⁾、本年2月にWC6フォローアップがいずれも東京で開催され²⁴⁾、日本国内での盛り上がり以上に日本の活動に対する国際的な評価が高まっている。また、図2に示すように、JaCVAMを中心に日本でも国内の協力体制が整い、OECD、ICH(日米EU医薬品規制調和国際会議)、ICCR(化粧品国際規制会議)、ISO(国際標準化機構)などに関わる動物実験の3Rs問題に対する国際協力体制が整うとともに、一昨年から、遺伝毒性、内分泌かく乱物質スクリーニングなどの分野で国際的な共同研究も始まっている。

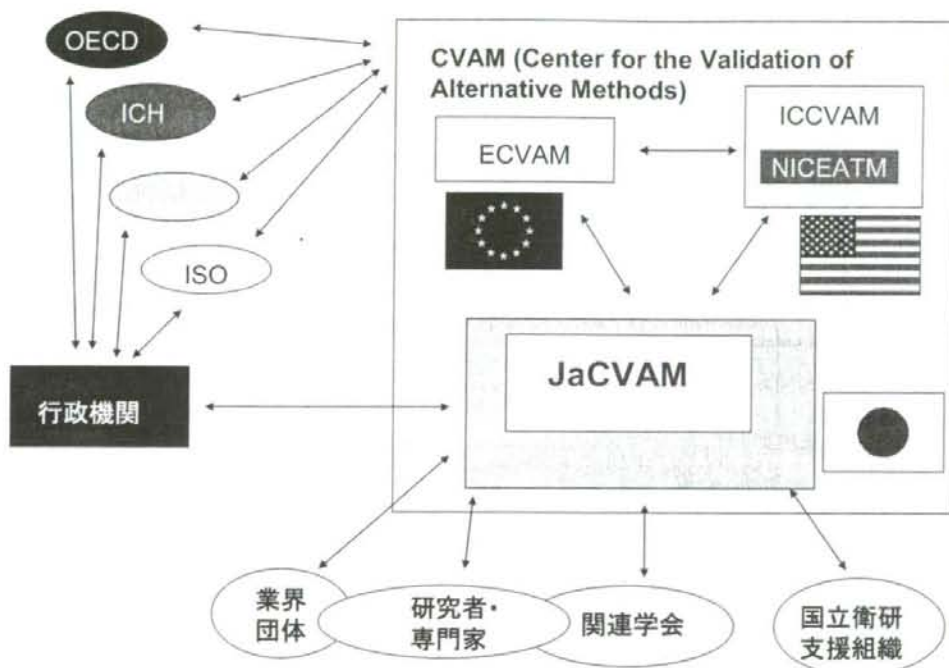


図2. JaCVAMの国際協力概要

以下に2008年8月時点でJaCVAMが関わる試験法の進捗についてまとめた。この概要は表3にまとめている。

1) 皮膚刺激性試験

2007年4月、ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)が皮膚刺激性試験代替法として、培養表皮モデルEPISKINを認証した²⁵⁾。EPISKINに被験物質を15分間処理し、48時間後にMTT法による細胞毒性とインターロイキン1 α を評価指標として測定するものである。

表3. 2008年8月の日本におけるバリデーション、第三者評価の進捗状況

No.	試験法	試験法の概要	目標	現状
1	腐食性試験	培養皮膚モデルを用いた方法	化学物質の腐食性評価に代替法を利用するための公定化	評価会議で最終評価終了
2	光毒性試験	酵母膜破壊と赤血球の溶血試験	日本の医薬部外品ガイドラインへの収載	評価委員会(Peer Review Panel)にて評価中
3	LLNA-DA	マウスリンパ節中のATP量の変化を指標とする方法	OECDガイドライン現行法の改変	評価会議にて評価中
4	LLNA-BrdU	マウスリンパ節中のBrdUの取り込みを指標とする方法	OECDガイドライン現行法の改変	評価委員会にて評価開始予定
5	LLNA	LLNA改良法	日本の医薬部外品ガイドラインへの収載	評価委員会にて評価開始予定
6	h-CLAT	培養細胞を用いた感作性物質のスクリーニング	OECDガイドライン	ECVAM、ICCVAMとの共同バリデーション決定
7	皮膚刺激性試験	培養皮膚モデルを用いた方法	OECDガイドライン	評価委員会にてEPISKIN法について評価中
8	皮膚刺激性試験	培養皮膚モデルを用いた方法	日本の医薬部外品ガイドラインへの収載	日本動物実験代替法学会によるバリデーション研究実施中
9	眼刺激性試験	細胞毒性試験、摘出眼球試験、摘出角膜試験	OECDガイドライン	評価委員会にて摘出眼球、摘出角膜試験の検証、細胞毒性試験の評価中
10	眼刺激性試験	細胞毒性試験(短時間処理法)	OECDガイドライン	日本動物実験代替法学会によるバリデーション研究実施中
11	コメットアッセイ	<i>in vitro</i> 試験法	OECDガイドライン	ECVAM、ICCVAMとの共同バリデーションPhase II 実施中
12	コメットアッセイ	<i>in vivo</i> 試験法	OECDガイドライン	ECVAM、ICCVAMとの共同バリデーションPhase III 実施中
13	内分泌かく乱物質スクリーニング	HeLaレポーター遺伝子アッセイ	OECDガイドライン	ECVAMおよび韓国とのantagonistバリデーション実施中
14	内分泌かく乱物質スクリーニング	Lumi-cellアッセイ	OECDガイドライン	ECVAM、ICCVAMとの共同バリデーションPhase II ~ III 実施中
15	Bhras assay	培養細胞を用いた発がん性物質のスクリーニング	OECDガイドライン	ECVAM、ICCVAMとの共同バリデーション決定

日本でもこれまで培養皮膚や表皮モデルの利用について手をこまねいていた訳ではない。これらモデルが日本で製造・販売されており、多くのユーザーがいる。2000～2002年にかけて東洋紡績株式会社製のTESTSKIN、グンゼ株式会社製のVitrolife-Skin、MatTek製でクラボウ株式会社が販売しているEpiDermを用いて、プレバリデーションを実施し、良好な結果を得ている²⁶⁾。さらに、化粧品原料の使用濃度における皮膚刺激性試験代替を目的に、2002～2004年にかけてTESTSKIN²⁷⁾およびVitrolife-Skinでバリデーションを実施した^{28,29)}。得られた結果が、当初からの評価基準であるパッチテストと動物試験における皮膚刺激性の予測率と同程度であったことから、バリデーションとしてはある程度の成果を残したと考えている。ただし、まだ第三者評価に至っておらず、国内でのコンセンサスは得られていない。一方、EPISKINのESACによる認証を受け、国内モデルにおいても補完バリデーションが日本動物実験代替法学会の主催で開始されている。EPISKINと比較し、化学物質の皮膚刺激性試験代替法として日本製のモデルの有用性の検証は重要であると考えている。

2) 眼刺激性試験

1998年に厚生労働科学研究補助金を得て作成された「細胞毒性試験による眼刺激性試験代替法のガイドランス」は日本においても中々普及していない³⁰⁾。もう一度、JaCVAMとして第三者評価を行い、細胞毒性試験における眼刺激性試験代替法の有用性を検討中である。この資料には日本動物実験代替法学会で実施された細胞毒性試験や³¹⁾、厚生労働科学研究の細胞毒性試験に加え³²⁾、最近ECVAMで実施された細胞毒性試験(ニュートラルレッド放出試験、赤血球試験、フルオレセセンス放出、サイトセンサーマイクロフィジオメーター試験)やバリデーションが計画されているEpiOcularというヒト再構築モデルの結果が用いられることになろう。

一方、欧米では強い眼刺激性評価のために摘出眼球試験、摘出角膜試験、受精鶏卵試験等の第三者評価が終了し^{25,33)}、スクリーニングとしての有用性が指摘されている。前述したJaCVAM第三者評価委員会において、これら試験についても評価を実施している。

3) 光毒性試験

OECDガイドラインとして認証されているニュートラルレッド取り込みによる細胞毒性試験については³⁴⁾、日本でも独自に第三者評価を行い、代替法としての有用性を評価した³⁵⁾。一方、資生堂は酵母膜破壊試験と赤血球溶血試験のバッテリーを用いる光毒性試験の検討を進め、厚生労働科学研究に第三者評価を依頼した³⁶⁻³⁸⁾。評価の過程でバリデーション結果が不足しているとの指摘を受け、二期に渡るバリデーション研究が実施された。これらのバリデーション結果を用いた第三者評価を実施中である。

4) 感作性試験

OECD ガイドラインとして認証されている Local Lymph Node Assay (LLNA) がモルモットを用いた従来の試験の代替法として利用されている³⁹⁾。ただ、この試験法は放射線同位元素を用いることから日本では実施できる施設に限られる。そこで、ATP の取り込みを指標とした LLNA-DA 法⁴⁰⁾、BrdU の取り込みを指標とした LLNA-BrdU 法のバリデーションおよび第三者評価が進んでいる⁴¹⁾。これらが将来的には日本で汎用される日は近いと考えている。LLNA に関しては一濃度のみで評価する reduced-LLNA が ESAC の認証を得るとともに²⁹⁾、改良試験法の評価基準が欧米で検討されるなど現在、議論が盛んな分野である。

ただし、化粧品の安全性評価のためにマウスを用いる本試験を使い続けることは、完全な代替法とはいえない。国際的にも新たに種々の *in vitro* 試験法の開発が進んでおり、日本としては株式会社資生堂および花王株式会社が日本化粧品工業連合会の有志や欧州化粧品工業会 (COLIPA) の協力を得て開発を進めているヒト細胞株活性化試験 (human Cell Line Activation Test: h-CLAT) に注目し^{42,43)}、バリデーションを計画している。ただし、この分野は構造活性相関のプログラム⁴⁴⁾、ペプチド結合試験の開発⁴⁵⁾、h-CLAT 以外のヒト細胞株を用いた試験法などの開発・検討が盛んな分野であり、これらを使いこなして感作性を評価するシステムの検討が必要である。

5) 急性毒性試験

OECD に掲載されている評価法⁴⁶⁻⁴⁸⁾で動物数の削減が一般的になっている昨今、さらに 2005 年 ICCVAM にて細胞毒性試験を用いた代替法の第三者評価が行われた³³⁾。この評価の結果、ヒト正常角質細胞や 3T3 細胞によるニュートラルレッド法を用いて、非毒性物質の検出が可能とされている。さらに、「Human endpoint」に配慮した新たなワークショップも 2008 年 2 月に開かれ³³⁾、JaCVAM としても ICCVAM の第三者評価に協力している状況である。

6) 変異原性試験

エイムス試験、染色体異常試験、動物を用いた小核試験という 3 点セット⁴⁹⁾を補う試験法である肝臓の不定期 DNA 合成の代替法として、日本環境変異原学会 哺乳類変異原性試験研究グループを中心に、ECVAM、NICEATM の協力を得たコメットアッセイ⁵⁰⁾の国際バリデーション研究が実施されている。この試験法は *in vivo* 試験だけでなく、*in vitro* 試験のバリデーションをも進めている。本試験法は開発からかなりの時間がたっていることもあり、方法の統一化がこの国際バリデーションの課題である。

In vivo 試験としては、マウスの肝臓、胃を標的臓器として、日米欧 5 施設によるブラインド化した被験物質を用いた Phase III のバリデーションを実施中である。本バリデーションは、最終的なプロトコールを確定するための実験であり、2009 年からは、Phase IV の本バリデーションが開始される。

一方、*in vitro* 試験のバリデーションはやや遅れて、Phase I バリデーションを開始した。ブラインド化した 6 物質を用いプロトコール確定のための Phase II バリデーションを実施中である。

7) 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 α への結合を評価指標とする試験法である⁵¹⁾。バリデーション終了後、OECD による第三者評価がなされ、評価基準の明確化などでプロトコールの改訂が求められるとともに、antagonist について検討がなされていないとのが指摘あった。そこで、JaCVAM では ECVAM の協力を得て、2008 年春よりバリデーション研究を開始している。

一方、米国 XDS 社で開発されたエンドクラインレセプター α 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 アッセイについても³³⁾、JaCVAM では国際バリデーション研究を進めている。このバリデーション研究は ICCVAM が主催する ECVAM、JaCVAM との共同バリデーションである。日本では日吉株式会社が実験を担当しており、agonist および antagonist の試験結果を求めている。2008 年末までに Phase III まで進める予定である。この試験法も OECD ガイドラインを目指している。

6. 終わりに

動愛法の動物愛護管理基本指針には、毎年度達成状況を点検し、その結果を施策に反映させることや、策定 5 年後に当たる平成 24 年度を目処とした見直しが記載されている。また、本年から始まった第三者認証システムの普及など、実験動物の福祉問題はまだ完成された仕組みではない。

代替法においても、JaCVAM を中心に、当面は化粧品や化学物質の安全性確保のため、国際協調を進めていくことになると考えている。

参考文献

1)動物の愛護及び管理に関する法律(2008)

http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/amend_law2/law.pdf

2)実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準(2008)

http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/law_series/nt_h180428_88.html

3)文部科学省 研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(2008)

http://www.mext.go.jp/b_menu/hakusho/nc/06060904.htm

4)厚生労働省 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(2008) <http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/doubutsu/0606sisin.html>

5)農林水産省 農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針

- (2008) http://www.maff.go.jp/www/press/2006/20060601press_2b.pdf
- 6) 日本学術会議 動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(2008)
<http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-20-k16-2.pdf>
- 7) 重茂浩美(2006) 動物実験に関する近年の動向、科学技術動向、2006-5、10-20.
- 8) AAALAC International Association (2008)<http://www.aaalac.org/>
- 9) 佐々木弥生(2008)http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsaae/WC6_followup/WC6_Follow_Sasaki.pdf
- 10) 国立大学法人動物実験施設協議会(2008)<http://www.kokudoukyou.org/annai/>
- 11) 日本動物実験協同組合(2008)<http://www.labanimal.org/freme.html>
- 12) OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO(2005) 14
- 13) ICCVAM (1997) Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods: a report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. NIH Publication No: 97-3981, 1997, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)
- 14) 大野泰雄(2004) 動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受入れの現状、国立衛研報、122、1-10
- 15) 小島肇夫(2006) 動物実験代替に関する最近の動向、化粧品技術者会誌、40(4)263-268.
- 16) Commission Staff Working Documents(2004) Time Tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 6/768/EEC); EN, SEC82004,1210
- 17) ECH (2008)http://ec.europa.eu/echa/home_en.html
- 18) Hartung, T.(2006)<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsaae/20kai.html>
- 19) 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
- 20) JRC(2008) [http://www.vet.uu.nl/nca/userfiles/other/REACH and the need for intelligent testing strategies.pdf#search=Integrated%20Testing%20Strategies%20REACH](http://www.vet.uu.nl/nca/userfiles/other/REACH_and_the_need_for_intelligent_testing_strategies.pdf#search=Integrated%20Testing%20Strategies%20REACH)
- 21) EC(2008) Alternative Testing Strategies, EUR22846.
- 22) 小島肇夫(2008) 安全性評価と動物実験代替法の現状、薬学雑誌、128(5)747-752.
- 23) Abstracts(2007) 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences
- 24) 抄録集(2008) WC6 フォローアップシンポジウム「3Rs に基づく動物実験の規制と第三者認証」
- 25) ECVAM statement (2008) <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>
- 26) Sonoda, I., et al. (2002) *Altern. Animal Test. Experiment*, 8, 91-106.
- 27) Kojima, H., et al. (2005) Validation study for Vitrolife-Skin™, a three-dimensional cultured human skin model, I, as an alternative to skin irritation testing using ET₅₀ protocol, Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin
- 28) Kojima, H., et al. (2005) Validation study for Vitrolife-Skin™, a three-dimensional cultured human skin model, II, as a alternative to skin irritation testing using Post-Incubation (PI) protocol, Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin
- 29) Kojima, H., et al. (2005) Validation study for TESTSKIN™, a three-dimensional cultured human skin model, as alternatives to skin irritation testing applied to forty cosmetic substances, Fifth World Congress, Alternative and Animal Use in the Life Science, Berlin
- 30) Ohno, Y. (1999) *Fragrance Journal*, 1999-7, 21-26.

- 31) Ohno, T., et al.,(2004) *Altern. Animal Test. Experiment*, 10(2), 50-157.
- 32) Ohno, Y., et al. (1999) *Toxicology in Vitro*, 13,73-98.
- 33) ICCVAM(2008) http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/EPReport/ocu_report.htm
- 34) OECD(2002) Guideline 432: in vitro 3T3 NRU phototoxicity testing. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 35) 大野泰雄ら(2005) *AATEX* ,10(2), 54-157.
- 36) Sugiyama M., Itagaki, H. Hariya, T., Murakami, N. and Kato, S.(1994) *Altern. Animal Test. Experiment*, 2, 183-191.
- 37) Sugiyama M., Itagaki, H. and Kato, S.(1994) *Altern. Animal Test. Experiment*, 2, 193-202.
- 38) Mori M., Hoya, M. Sugiyama, M and Itagaki, H. (2003) *Altern. Animal Test. Experiment*, 10(1), 1-17.
- 39) OECD(2002) Guideline 429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 40) Yamashita K., Idehara, K., Fukuda, N. Yamagishi . and Kawada, N.(2005) *Altern. Animal Test. Experiment*, 11(2) 136-144.
- 41) Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takeyoshi, M. and Kimber, I. (2001) *Toxicol. Lett.* 119, 203-208.
- 42) Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., and Toyoda, (2006) *Toxicol In Vitro*, 767-773.
- 43) Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., and Suzuki, H.,(2006) *Toxicol In Vitro*, 774-784
- 44) Apuula, A.O., Patlewicz, G. And Roberts, D. W. (2005) *Chemical Research in Toxicol*, 18, 1420-1426.
- 45) Gerberic, G. F., Vassallo, J.D., Bailey, R.E., Chaney, J.G., Morral, S.W. and Lepoittevin, J.P. (2004) *Toxicol. Science*, 81, 332-343.
- 46) OECD (2001) Guideline 420: Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 47) OECD (2001) Guideline 423: Acute Oral Toxicity- Acute Toxic Class Method. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 48) OECD (2001) Guideline 425: Acute Oral Toxicity- Modified Up and Down Procedure. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 49) 厚生労働省医薬食品局審査管理課(2006) 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
- 50) Mitchelmore, C.L. and Chipman, J.K. (1998) *Mutation Res.*, 399, 135-147.
- 51) Akahori, Y., Nakai, M., Yamasaki, K. Takatsuki, M. Shimohigashi, Y. and Ohtai M. (2007) *Toxicol. in Vitro*,