

## 新規毒性試験法の評価と行政的提案

小島 肇<sup>#</sup>

### Validation and regulatory acceptance on novel toxicological test methods

Hajime Kojima<sup>#</sup>

The Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) is a public agency that was established in 2005 as part of the Center for Biological Safety and Research (CBSR) at the National Institute of Health Sciences (NIHS). JaCVAM's stated mission is to promote the use of alternatives to animal testing in regulatory studies, thereby replacing, reducing, or refining (the Three Rs) the use of animals wherever possible while meeting the responsibility of the CBSR, as stipulated in the NIHS regulations, to ensure the protection of the general public by assessing the safety of chemicals and other substances. JaCVAM activities are also beneficial to the application and approval for manufacture and sale of pharmaceutical and other products as well as for revisions to standards for cosmetic products. Until now, JaCVAM also participates in International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM), under which it has organised a number of international validation studies that have performed validation studies and have led to the issuance of 15 guidelines from the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) and International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). On the other hand, JaCVAM has assessed the utility, limitations, and suitability for use in regulatory studies of 35 test methods for determining the safety of chemicals and other materials and proposed them to the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) for regulatory acceptance.

Keywords: validation, alternative method, regulatory acceptance, JaCVAM, OECD

#### 1. 序

レギュラトリーサイエンスとは我々の身の回りの物質や現象について、その成因や機構、量的と質的な実態、および有効性や有害性の影響をよりの確に知るための方法を編み出し、その成果を用いてそれぞれの有効性と安全性を予測・評価し、行政を通じて国民の健康に資する科学である<sup>1)</sup>。

身の回りの物質である医薬品、化粧品、農薬、その他の一般化学物質の有害性の影響をよりの確に知るための方法を用いて安全性を予測・評価するため、これ

まで種々の毒性試験が利用されてきた。しかし、欧州中心の動物実験に関する3Rs (Reduction: 削減, Refinement: 苦痛の軽減, Replacement: 置き換え)<sup>2)</sup>に関する規制<sup>3)</sup>や米国の毒性試験に関する戦略変更を受け<sup>4)</sup>、科学の進歩をもとに新規な方法が開発され、改良されねばならない状況になっている。ただし、既存の試験法を新規な方法や改良された方法に替えて用いるためには、新規試験法が実際に有用であることを証明しなければならない<sup>5)</sup>。これが試験法のバリデーション研究であり、試験法の方法や手順、評価が、特定の目的に対して信頼性と妥当性を持つのか検証することと定義されている<sup>6)</sup>。すなわち、行政を通じて国民の健康を守るためには、レギュラトリーサイエンスの肝である試験法を開発するだけでなく評価することが、レギュラトリーサイエンスの活発な展開を目指して日々の業務を遂行している国立医薬品食品研究所の重要な役割である<sup>7)</sup>。

新規の試験法をバリデートするため、大野泰雄薬理

<sup>#</sup> Hajime Kojima, Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, Div. of Risk Assessment, Center for Biological Safety and Research, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501, Japan  
Tel & Fax :+81-44-270-6597; E-mail: h-kojima@nihs.go.jp

部長（当時）のご尽力で、2005年度から、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内に新規試験法の評価を所掌業務する新設組織の設置が認められ<sup>8)</sup>、薬理部第5室の新規試験法評価室として2005年11月21日に設置された。この新規試験法評価室が事務局を務める日本動物実験代替法評価センター（JaCVAM：Japanese Center for the Validation of Alternative Methods）が業務を開始したことになる。当初の仕事はJaCVAMの規則を作りながら、日本で開発された新規試験法のためのバリデーション研究の実施であった。

2007年からはJaCVAMの設置規則を定めてきたが、2011年4月に改定された設置規則が厚生労働省により認められた<sup>6)</sup>。以後、JaCVAMは安全性生物試験研究センター各部の協力を仰ぎながら新規試験法の評価と行政提案を行ってきた。2015年4月には新設された安全性予測評価部第2室に移転した後、現在に至る<sup>7)</sup>。

本稿では、現行のJaCVAMの組織、設立後、15年間のJaCVAMにおける試験法の標準化の成果や、試験法の行政的な受け入れに向けたJaCVAMの活動をまとめ、その中で得たバリデーション研究に関する教訓をまとめた。

## 2. JaCVAMの組織<sup>6)</sup>

### 2.1. 目的と業務（設置規則第2条）

JaCVAMの目的は、化学物質等の安全性評価のうち、国民の安全を確保しつつ、動物実験に関する3Rs<sup>2)</sup>の促進に資する新規の動物実験代替法（以下、代替法と記す）を行政試験法として、可能な範囲での導入に貢献することである。これにより、我が国の医薬品等の製造販売承認申請資料の作成および審査、化粧品基準の改正等並びに化学物質、農薬の適正な規制にも寄与する。その業務を以下に記す。

- 1) 化学物質等の安全性に係る試験法の有用性とその限界および行政試験法としての妥当性について評価する。
- 2) 項目1を明らかにするために必要なバリデーション研究を実施するとともに、関連分野における国内および国際協力並びに国際対応に携わる。

### 2.2. 主体組織

JaCVAM活動の適正な運営を図るために、運営委員会、顧問会議、評価会議、資料編纂委員会、バリデーション実行委員会および第三者評価委員会を設けた（設置規則第3条）。

運営委員会は、JaCVAMが検討すべき新規・改訂試験法の選考とその評価のための計画に関して、その科学的妥当性と評価実施に必要な予算および人的資源につい

て審議し、決定する。また、評価会議の最終報告書について審議し、行政試験法として妥当とされた試験法について、JaCVAMとしての意見書を添え、厚生労働省の担当部局に伝達するとともに、公表する。さらに、顧問会議の委員、評価会議の委員、試験法毎の資料編纂委員会委員長、バリデーション実行委員会委員長および試験法毎の第三者評価委員会委員長を指名するとされている（設置規則第4条）。

Fig.1に示すように、運営委員会の構成は、国立衛研所長、安全センター運営会議構成員（安全センター長、毒性部長、病理部長、薬理部長、変異遺伝部長、安全性予測評価部長および毒性部動物管理室長）、国立感染症研究所担当者、厚生労働省担当者、独立行政法人医薬品医療機器総合機構担当者および事務局により構成され、安全センター長が委員長を務める。委員長の判断に基づいて、必要に応じてオブザーバーの参加を認めることができる。運営委員会は年に2回ほど開催されることになっている。

顧問会議は、JaCVAMの運営とその計画および成果について、1年に1回以上の頻度で運営委員会から報告を受け、それらについて審議し、助言する（設置規則第5条）。委員は、国立衛研所長、安全センター長、行政機関の担当者、動物福祉の専門家、関連学会の代表、業界の代表およびその他座長が必要とした者により10人程度で構成され、国立衛研所長が座長を務めるとされている。

事務局は、JaCVAM運営に関わる事務的作業を行い、第4条から第9条により規定された会議および委員会をサポートするとともに、化学物質等の安全性評価のための代替法の評価に関わるわが国内外の学会や機関との協力および対応を行う。また、試験法評価に関わる情報を収集・整理し、提供する（第10条）。必要に応じて、顧問会議の委員候補、評価会議の委員候補、資料編纂委員会委員長候補者、バリデーション実行委員会委員長候補者および第三者評価委員会委員長候補者を運営委員会に

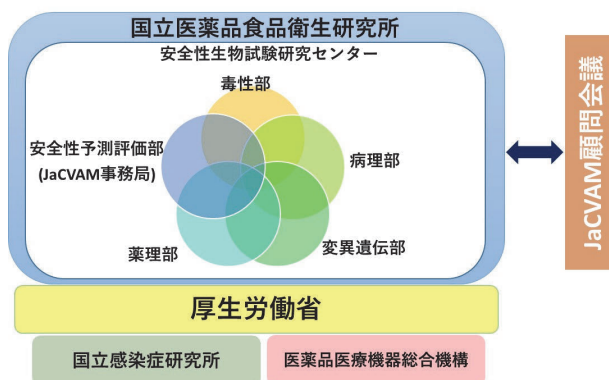


Fig. 1 Organization of JaCVAM steering committee

推薦する。さらに、それぞれの委員会委員の選考にあたり、委員長に助言を行うとされている。

### 2.3. 試験法の評価と試験法の行政的な受け入れ提案

化学物質等の安全性に係る試験法の有用性とその限界および行政試験法としての妥当性について評価するため、JaCVAMはFig.2に示す評価会議および資料編纂委員会という組織を持つ。

評価会議は、資料編纂委員会の報告書および当該試験法の背景情報を用い、当該試験法の科学的妥当性、その行政的利用および社会的受け入れ可能性の観点から審議し、最終報告書を作成し、パブリックコメントに供する(設置規則第6条)。委員は、安全センター長、化学物質の安全性や統計解析の専門家および安全センター長が必要と認められた者により構成され、座長は委員の互選により決める。必要に応じて座長は若干の委員を追加できるとされている。

資料編纂委員会は、当該試験法に関するバリデーション報告書、第三者評価委員会の報告書および当該試験法の背景情報を用い、必要に応じて当該試験法に対する意見・提案を国内外の機関に行うとともに、資料編纂委員会としての報告書をまとめる(設置規則第7条)。以下の内容が評価報告書にまとめる記載事項である。

- ・ 提案する試験法の科学的根拠、並びに規制上の根拠
- ・ 試験法プロトコルにおける本質的要素の根拠
- ・ 提案する試験法のバリデーション研究に使用した物質の詳細と、これらを選択した根拠
- ・ 試験法の正確性評価に用いた被験物質の*in vivo*若しくはその他の適切な参照値(該当する場合)
- ・ 提案されている試験法と参照試験法から得られたすべてのデータと結果・試験法の性能(正確性)
- ・ 試験法の信頼性(反復性/再現性)
- ・ 試験法のデータの質を評価した記述
- ・ 関連のあるその他の科学的報告やレビュー
- ・ 試験法における動物実験の3Rsの評価結果

委員会は、当該試験法毎に、当該分野に係る安全性や統計解析の専門家により構成される。運営委員会から指名された資料編纂委員会の委員長が、事務局と相談の上、委員を指名する。資料編纂委員会は運営委員会に許可を受けながら、毒性分野毎に設置しており、これまでTable 1に示すような委員会が設立されてきた。現在でも、眼刺激性や皮膚感作性などの6つの資料編纂委員会が活動を続けている。

繰り返しになるが、運営委員会は、検討すべき新規・改訂試験法の選考とその評価のための計画に準じた評価会議の最終報告書について審議し、行政試験法として妥当とされた試験法について、JaCVAMとして

の意見書を添え、厚生労働省の担当部局に伝達するとともに、公表してきた。これまでに提案された試験法をTable 2に示す。評価された試験法すべてを行政に提案してきた訳ではないが、多くの試験法が厚生労働省に提案されてきた。試験法の多くは、経済協力開発機構(OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development)で試験法ガイドライン(TG: Test Guideline)となったものであるが、TGであるからといってそのまま国内規制に使用してもよいとは考えていない。一方で、ガイダンス(GD: Guidance Document)の中でも行政機関に提案できる試験法もあることによる。

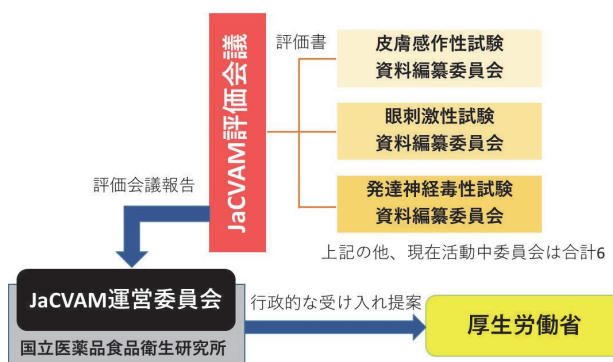


Fig. 2 Regulatory acceptance system in JaCVAM

Table 1. JaCVAM editorial committees

No.	委員会名
1	腐食性試験
2	皮膚刺激性試験
3	光毒性試験*
4	眼刺激性試験*
5	口腔粘膜刺激性試験*
6	皮膚透過性試験
7	皮膚感作性試験*
8	急性毒性試験
9	遺伝毒性試験
10	形質転換試験
11	内分泌かく乱スクリーニング
12	薬物代謝試験
13	薬物動態試験
14	生殖発生毒性試験
15	発達神経毒性試験*
16	発熱性試験*
17	<i>in vitro</i> 試験法の基本原則
18	用語検討

\*活動中委員会



Table 2. Test methods evaluated by JaCVAM for regulatory uses

	試験法	年月
1	腐食性試験法Vitrolife-Skin™	2008年8月
2	皮膚感作性試験代替法 (LLNA-DA法)	2008年11月
3	ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法 (ICE法: Isolated Chicken Eye Test)	2009年12月
4	牛摘出角膜を用いた眼刺激性試験代替法 (BCOP法: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test)	2009年12月
5	ヒト皮膚モデル (3次元皮膚モデルEPISKIN) を用いた皮膚刺激性試験代替法	2010年3月
6	皮膚感作性試験代替法 (LLNA-BrdU法)	2010年5月
7	単回投与毒性試験代替法	2011年6月
8	皮膚刺激性試験代替法EpiDermおよびSkinEthics	2013年1月
9	皮膚感作性試験代替法 (LLNA-DA法)	2013年1月
10	皮膚感作性試験代替法 (LLNA-BrdU-ELISA法)	2013年1月
11	皮膚感作性試験代替法 (rLLNA法)	2013年1月
12	眼刺激性試験代替法フルオレセイン漏出試験法	2013年1月
13	皮膚刺激性試験代替法LabCyte EPI-MODEL24	2013年11月
14	改訂OECD TG No.437牛摘出角膜の混濁および透過性試験法 (BCOP法: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test)	2014年1月
15	改訂OECD TG405: ウサギを用いる眼刺激性試験法	2014年1月
16	ヒトエストロゲン受容体結合による活性化・拮抗作用物質を検出するBG1 Luc ER TA法	2014年1月
17	<i>In vitro</i> 皮膚透過試験	2014年1月
18	2013年改訂OECD TG 438ニワトリの摘出眼球を用いた眼刺激性試験 (ICE法: Isolated Chicken Eye Test)	2015年1月
19	皮膚感作性試験代替法 Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA): ペプチド結合性試験	2015年3月
20	皮膚感作性試験代替法 角化細胞株レポーターアッセイ	2015年8月
21	光安全性評価法ROSアッセイ	2016年1月
22	眼刺激性試験代替法 <i>In vitro</i> 短時間暴露法 (STE法)	2016年3月
23	ER STTA法 (hER $\alpha$ -HeLa-9903 細胞を用いたエストロゲン受容体恒常発現系転写活性化試験法)	2016年12月
24	眼刺激性試験代替法 再構築ヒト角膜様上皮モデル法 (Reconstructed Human Cornea-like Epithelium Test Method: RhCE法)	2017年1月
25	皮膚感作性試験代替法 human Cell Line Activation Test (h-CLAT)	2017年3月
26	皮膚腐食性試験代替法 ヒト表皮モデル法	2017年6月
27	経皮電気抵抗試験を用いた皮膚腐食性試験代替法	2017年10月
28	<i>In vitro</i> 膜バリア試験を用いた皮膚腐食性試験代替法	2017年10月
29	皮膚感作性試験代替法 U937 Cell Line Activation Test (U-SENSTM)	2018年11月
30	再構築ヒト角膜様上皮モデル法 (RhCE法) SkinEthic™ HCE EIT	2018年3月
31	AR STTA法 (AR-EcoScreen™細胞を用いたアンドロゲン受容体恒常発現系転写活性化試験法)	2019年2月
32	眼刺激性試験代替法 再構築ヒト角膜様上皮モデル法 (LabCyte CORNEA-MODEL24 Eye Irritation Test)	2019年2月
33	急性経口毒性を予測するための <i>in vitro</i> 細胞毒性試験	2019年4月
34	2018年改定OECD TG438 ニワトリ眼球を用いた眼刺激性試験 (ICE法: Isolated Chicken Eye Test)	2019年11月
35	皮膚感作性試験代替法ARE-Nrf2 luciferase (LuSens) test method	2019年11月

#### 2.4. 試験法のバリデーション研究

JaCVAMでは、試験法開発者からの依頼を受け、運営委員会が検討すべき新規・改訂試験法の選考とその評価のため、その科学的妥当性と評価実施に必要な予算および人的資源について審議し、バリデーション実行委員会を設置することになっている。関連分野における国内および国際協力並びに国際を受けながら、必要なバリデーション研究を実施するため、JaCVAMはFig.3に示すような組織を試験法毎に構築している。特に、試験法をOECDなどにて標準化するためには<sup>9)</sup>、国内組織だけのバリデーションでは不十分である。そこで、以下2.5に示す代替法試験協力国際会議 (ICATM: International Cooperation on Alternative Test Methods) から<sup>10)</sup>、試験法毎にバリデーションや第三者評価の専門家を推薦し

て頂いている。

バリデーション実行委員会は、当該試験法のバリデーション計画を立て、バリデーション研究を実行する。また、バリデーション研究の結果を踏まえて、推奨できるプロトコルを含むバリデーション報告書をまとめる。なお、バリデーション実行委員会は、運営委員会においてバリデーションが必要とされた場合に設置される (設置規則第8条)。運営委員会から指名されたバリデーション実行委員会委員長が、事務局と相談の上、委員を指名するとされている。

第三者評価委員会は、バリデーション報告書および当該試験法の背景情報を用い、第三者の専門家としての立場から当該試験法の信頼性と適正を科学的に評価する。必要に応じて追加バリデーション研究の実施とそこで検

Table 3. Japanese test methods approved in International organization

No.	Test Method	Accepted TG	Year
1	Skin sensitization: Local Lymph Node Assay: DA	OECD TG442A	2010
2	Skin sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or -FCM	OECD TG442B	2010
3	<i>In Vitro</i> Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, LabCyte EPI-Model24	OECD TG439	2013
4-1	ROS (Reactive Oxygen Species) Assay for Photosafety	ICH S10	2013
5	<i>In Vivo</i> Mammalian Alkaline Comet Assay	OECD TG489	2014
6	Short Time Exposure <i>In Vitro</i> Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage	OECD TG491	2015
7	Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation <i>In Vitro</i> Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, The Stably Transfected TA (STTA) assay using the (h) ER $\alpha$ -HeLa-9903 cell line	OECD TG455	2015
8	Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, AR-Ecoscreen	OECD TG458	2016
9	<i>In Vitro</i> Skin Sensitisation Assays addressing the Key Event on Activation of Dendritic Cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, Human Cell Line Activation Test (h-CLAT)	OECD TG442E	2016
10	<i>In Vitro</i> Bhas 42 Cell Transformation Assay (Bhas 42 CTA)	OECD GD231	2016
11	<i>In Vitro</i> Skin Sensitisation Assays addressing the Key Event on Activation of Dendritic Cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, IL-8 Luc assay	OECD TG442E	2017
12	Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, LabCyte Cornea-Model24	OECD TG492	2018
13	Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage	OECD TG494	2019
14	<i>In Vitro</i> Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method, LabCyte EPI-Model24	OECD TG431	2019
15	<i>In Chemico</i> Skin Sensitisation Assays addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Covalent Binding to Proteins, ADRA (Amino acid Derivative Reactivity Assay)	OECD TG442C	2019
4-2	ROS Assay for Photoreactivity	OECD TG495	2019

討すべき内容について提案する。これらの結果を踏まえて、審議を行い、第三者評価委員会としての報告書をまとめる（設置規則第9条）。委員は、当該試験法の開発およびバリデーション研究に参画しなかった化学物質の安全性や統計解析の専門家により構成される。運営委員会から指名された第三者評価委員会の委員長が、事務局と相談の上、委員を指名するとされている。

上記委員会のお陰で、これまでJaCVAMがバリデーション研究に関与した試験法がOECD<sup>11)</sup>や医薬品規制調和国際会議（ICH: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use）<sup>11)</sup>の中で議論され、標準化されてきた。15の試験法をTable 3に示すが、その多くは局所毒性試験代替法である<sup>6)</sup>。これは、JaCVAMというよりは本分野における日本の研究者のレベルの高さを示していると言える。なお、バリデーション研究の詳細は教訓として後述する。

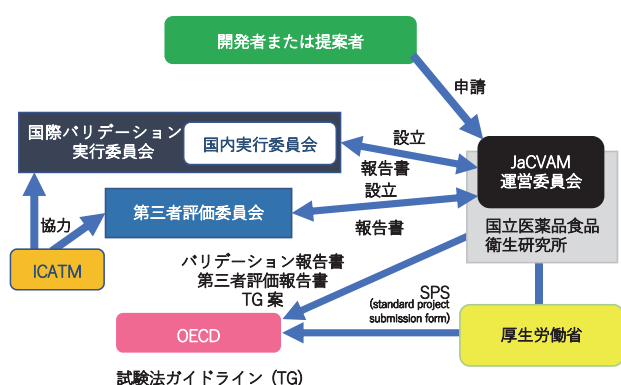


Fig. 3 JaCVAM validation process

## 2.5. 国際協力

2007年より、設立された化粧品規制協力国際会議（ICCR: International Cooperation on Cosmetics Regulation, ICCR）<sup>12)</sup>にて代替法問題について議論を深めるため、ICATM設立が提案された<sup>10)</sup>。ICCRの勧めもあり、1990年代に設立された欧州動物実験代替法評価センター（当時はECVAM: European Center for the Validation of Alternative Methods, 現在のEURL ECVAM: European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing）、米国動物実験代替法検証省庁間連絡委員（ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods）/代替法評価に関する毒性学プログラム省庁間センター（NICEATM: National Toxicology Programme Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods）とともに、JaCVAMは合意書の議論を続けてきた。その

結果、2009年4月27日にNational Institutes of Health（NIH: 米国・メリーランド州ベセスダ）にて開催されたICATMの調印式には、ICCRの基調国である4カ国（欧米・カナダ・日本）から、バリデーションセンターや親組織の代表が出席し、代替法の国際協調合意書に署名した。日本からは西島正弘所長（当時）の代理で小島が出席した。さらに、ICATMへの韓国動物実験代替法評価センター（KoCVAM: Korean Center for the Validation of Alternative Methods）の加盟を認めるため、2011年3月8日、ICATMに関わる「協力覚書」の修正文書への署名式が行われた。

まだ合意書までは至っていないが、昨今ではカナダ動物実験代替法評価センター（CCAAM/ CaCVAM: Canadian Centre for Alternatives to Animal Methods / Canadian Centre for the Validation of Alternative Methods）やブラジル動物実験代替法評価センター（BraCVAM: Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods）も加盟し、Fig.4に示すように国際協調の輪を広げている。



Fig. 4 Information on ICATM

## 3. バリデーション研究に関する教訓

試験法のバリデーション研究とは、試験法の再現性と妥当性を通して標準プロトコルを開発する研究である。妥当性とは、試験法の予測性と適用範囲を指す。これらを一度のバリデーションで確認する計画では、再現性の受け入れ基準を満たせなかった場合、すべての結果が不採用となってしまい、時間と労力の無駄になる可能性が高い。まず、技術移転性と施設内再現性をプレバリデーション研究で、施設間再現性と予測性をバリデーション研究で確認するという段階を踏むべきである。適用範囲は、バリデーション実験後、予測性を高めるために多くの専門家とともに開発されていく。以上のような段階を経て、試験法のプロトコルは精緻化されるのである。

小野<sup>5)</sup>や、大野<sup>8,13)</sup>、大森<sup>14)</sup>、私も以前に解説しているが<sup>15-19)</sup>、その詳細はOECD GD34に記載されている<sup>20)</sup>。試験法やバリデーション研究といっても、種々の

Table 4. Check list for a validation management group

基準	確認項目	確認時期
バリデーシンの 必要性確認	試験法の定義（目的，科学的根拠，行政的な根拠）	バリデーション開始前
	試験法の指標の妥当性	
	開発者の背景情報	
	バリデートされるプロトコル	
	予算確保	
バリデーション開始	バリデーション実行委員会の設立	バリデーション開始時
	プロジェクト計画の作成	
	化学物質リストとin vivoデータ	
	データ入力フォーマットと記録用紙原本の用意	
	参加施設の選別	
施設間での技術移転性	プロトコルのデータ採用基準	プレバリデーション
	プロトコルの技術的な問題点	
	参加施設の再選抜（基準を満たす施設）	
施設内再現性	再現性80%基準を満たすデータ採用基準および予測モデル	プレバリデーション
	プロトコルの技術的な問題点	
	データの信頼性確認	
施設間再現性	再現性80%基準を満たすデータ採用基準および予測モデル	バリデーション
	プロトコルの技術的な問題点	
	データの信頼性確認	
予測性（正確度）	感度80%，特異度70%以上の予測モデル	バリデーション
	基準を満たさない場合の原因解析	
	データの信頼性確認	
適用範囲	感度95%，特異度65%以上の基準を満たす化学物質の範囲	バリデーション実験終了後
	習熟度確認物質の設定	
結論	バリデーション報告書	バリデーション実験終了後 第三者評価
	すべての記録	
	最終プロトコルの確定	

種類や定義があるが本稿では触れず，バリデーション研究を成功させるためにバリデーション実行委員会が行う主な確認事項を抜粋してTable 4にまとめた。これまでOECDにて，数々の試験法の標準化とバリデーション研究に関わってきた経験から，確認事項および目標値を示した。以下，これらの確認項目を満たすために，試験法開発者およびバリデーションを主導する専門家が注意すべき項目をまとめた。

なお，以下の記載はバリデーションまではいかなくとも，in houseで試験法を開発し，薬効や安全性スクリーニングに用いようとする方や共同研究を企画している方にも参考になると信じている。必要に応じてご活用頂ければ幸いである。

### 3.1. 試験法開発者

試験法開発者の標準化の意思から，バリデーション研究は始まると言って過言ではない。まずはJaCVAMへの申請が第一段階である。ただし，これまでに実施したバリデーション研究の2倍以上のご相談を頂き，事務局との面談で断念されたケースだけでなく，JaCVAM運営委員会でご説明頂いたもののバリデーション研究までに至らなかった試験法もある。意思だけでなく，試験法の目的，科学的な妥当性，適切なプロトコル，データベースなども整備されていないといけない。特にプロトコルの完成度が重要であり，実験手技だけでなく，結果の受け入れ基準，予測モデル（陰性および陽性判断基準）の記載が必須である。この許容範囲がバリデーション研究を通して精査される。

また，バリデーション研究が始まれば，主導施設とし



て参加施設の研修を行い、プロトコルのトラブル解決をお願いしなければならない。最終的にはバリデートされたプロトコルの改訂を依頼することになる。ただし、当然のことながら、開発者はプロトコルの大きな改訂を嫌う。開発者がすでにデータベースを構築し、これまでの蓄積データがある、論文投稿しているなどという理由である。これにより、施設内再現性を評価するプレバリデーション研究の段階で進行が遅滞した例は多い。Table 3に示す試験法の中で、内分泌かく乱スクリーニングER-STTA (Human Estrogen Receptor Stably Transfected Transcriptional Activation Assay) では、施設間の結果が揃わない理由は、参加施設のレベルが低いとの判断で、バリデーション研究が繰り返された。LabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激性試験代替法では、開発者が中々、プロトコルの改訂に応じず、追加バリデーションをせざるえなかった。皮膚感作性試験代替法IL-8 Lucアッセイに関して、開発者しかできない手法で施設内再現性を確保できず、バリデーションを繰り返した。この遅滞により、半年から一年は無駄な時間を過ごさねばならず、途中で資金がなくなり、予算集めに奔走したこともあった。今にして思えば、失敗した理由はプロトコルと標準作業手順書に対する開発者と参加施設の齟齬である。プロトコルは試験法を明確に段階を追って記述した文書であり、標準作業手順書は、特定の試験操作、機器の使用方法等について具体的な手順を記述した文書である。この用語の定義から<sup>6)</sup>、時によっては参加者への説明が必要である。

バリデーション研究では、実験ありきでなく、技術移転性、施設間再現性確認の段階まで、開発者と参加施設のコミュニケーションが重要となる。

### 3.2. 参加施設

バリデーション研究は、時に共同研究と間違われる。日本人研究者は共同研究が好きで、バリデーション研究を公募すると参加希望は多い。プロトコルの技術移転の段階であれば、多くの施設が参加することは意義があるが、ことバリデーション研究を行う場合には好ましく思っていない。バリデーション参加施設は3~4で十分である。参加施設が多くなり過ぎると、実験数が増え、コストやデータ管理が複雑になる。必ずしも科学的な結果の質が向上するわけでない。

できれば、プレバリデーション研究前に、参加を希望する施設と共通の少数物質を用いた共同研究を実施し、施設の選別を行うことが望ましい。バリデーション研究の成功は、参加施設の実力に掛かっている。興味本位の参加施設により、結果のばらつきが大きくなり、途中でバリデーションを中止した例も過去にはあった。もちろん

、この場合、論文にもならないので、記録には残っていないが、安易な共同研究の立案は避けるべきである。参加施設の選定の一番の基準はGLP (Good Laboratory Practice) 施設である。これはGLPの原則である記録を取るという習慣が身につけていること、機器等のメンテナンスが定期的になされていることによる。GLP施設以外が参加される場合は、GLP原則<sup>21)</sup>の情報共有化を徹底するべきである。

なお、国際標準化を目指す以上、国際共同研究が望ましい。ただ、国際的なバリデーション研究の実施は簡単とは言えない。Table 3に示す試験法の中で、コメントアッセイやER-STTAのバリデーションは国際機関が参加した共同研究であったが、一番の問題点は言葉の壁であることに間違いはない。実験を通して明確になったプロトコルの齟齬をどのように改定するか中々伝わらないと実感した。

さらに、言葉の問題だけではなく、被験物質に毒物劇物が存在すると海外への配布が困難であること、対面会議の旅費などの問題で参加施設が簡単に集えないなどが挙げられている。現実的には、コメントアッセイ以降、Bhas42アッセイのバリデーション研究あたりから、国内の参加施設が中心となった。ICATMの協力を得て、国際的な専門家をバリデーション実行委員会に招聘し、一年に一度バリデーション実行委員会の対面会合、数回の電話会議を開く形式が根付いている。

### 3.3. バリデーション管理組織

バリデーションを行う上で必要な管理組織はバリデーション実行委員会である。バリデーション実行委員会には、その毒性分野の専門家に加え、開発者、統計学者、バリデーションの専門家が加わらねばならない。この組織の透明性が、バリデーションの成否に関与する。標準化を目指すのであれば、国内メンバーだけでなく、国際的な専門家にも協力を得るべきである。これはOECDなどの国際機関が国内のみでバリデートされた方法は、国際標準化にはそぐわないことを明言していることによる。選ばれたメンバーが、バリデーションの過程を想定したプロジェクト計画を立てることが第二段階である。計画にはスケジュール管理や被験物質の承認なども大切であるが、バリデーション結果の受け入れ基準が必要である。再現性や予測性を確保するための基準を計画作成時に合意しておかないと最終的なゴールが見えず、結果を解析する段階で混乱する。

当然ながら、組織構築には予算も必要である。開発者または事務局は予算確保に尽力しなければならない。協力者には申し訳ないが、ボランティアでお手伝い頂くとしても、旅費や消耗品などの経費のために数百万円



の確保がなければ、バリデーション研究は始められない。また、プレバリデーション研究には1年以上、バリデーション研究にも1年と時間も掛かることは確かであるが、しっかりとしたPDCAサイクル (PDCA cycle, plan-do-check-act cycle) でバリデーション研究は実施されねばならない。

### 3.3.1. 事務局

バリデーション実行委員会を管理するためには、バリデーションの経験は重要であり、実行委員会をまとめる代表や事務局を務めるJaCVAMの存在は欠かせないと考えている。短期間でバリデーション研究の実施が可能であるフォーマットがJaCVAMにおいて確立できている。

### 3.3.2. 被験物質選定グループ

バリデーション研究の実施にあたり、もっとも重要な案件が被験物質の選択である。意図的な被験物質の選択 (毒性が強いものと弱いものだけ) を行えば、再現性も予測性も高くなる。これは実用性に乏しい意図的な行為である。これを避けるためには、各分野の専門家を集め、透明性が高い被験物質選択の議論を繰り返さねばならない。ICATM推薦の専門家の協力がなければ、バリデーションは成功しなかったと思う例が多い。なぜなら、日本にはよい化学物質のデータベースがないからである。遺伝毒性や反復投与毒性試験においては、国立衛研を中心に集められたデータベースが有名であるが<sup>22)</sup>、他の毒性に関しては、欧州化学物質生態毒性および毒性センター (ECETOX)<sup>23)</sup>やNTP (National Toxicology Programme)<sup>24)</sup>、IRIS (Integrated Risk Information System)<sup>25)</sup>のデータベースには適わない。このデータベースにも精通する国際的な毒性の専門家をバリデーション実行委員会に招聘し、その結果をもとに被験物質を選ばねばならない。選ばれた物質候補から、物理化学的性状、毒性強度、国内在庫、価格、毒物劇物の回避、安定性などを考慮して最終的な被験物質リストが作成される。特に、毒性強度に応じた物質の比が重要であり、昨今ではUnited nations (UN) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) 分類を考慮して<sup>26)</sup>、予測性を算出するためにバランスよい物質選択が望まれる。時には、意図的に開発者や類似試験法が報告している偽陰性や偽陽性物質も加えるべきである。

### 3.3.3. 被験物質配布グループ

折角選んだ物質も、コード化して配布しないと意味がない。実験者はその意思 (思い込み) で陽性を陰性結果

に変えることがままある。バリデーション管理組織の下に、被験物質配布グループを設置し、利害関係のない第三者がコード化した物質を参加施設に配布する。施設内再現性を求めるために忘れてはならないことは、10物質を用いて3施設で再現性を確認する場合、各施設に10物質をコード化して3セット、合計30物質を配布することである。この方法でないと正確に施設内再現性を取ったことにならない。事前にプロジェクト計画で定めた施設内再現性の基準を満たした後、施設間再現性を確認するため、さらに30物質をコード化して配布し、合計40物質で施設間再現性を確認することが望ましい。施設間再現性の基準を満たした後、予測性を評価するべきである。

ただし、コード化した場合、実験中の事故処理の遅れが懸念される。そこで、コード化した被験物質は実験実施者でなく、まず各施設の化学物質管理者 (毒物劇物管理者が望ましい) に送付し、被験物質すべてを危険物として管理することを依頼する。実験者は実験毎に物質管理者の管理下で実験を行うことになる。不慮の事故があった場合には、被験物質とともに封書配布した化学物質等安全データシートMSDS (Material Safety Data Sheet) を開封し、適切な対処をお願いすることになっている。

### 3.3.4. 統計解析グループ

統計学者もバリデーション研究には不可欠である。バリデーション結果の透明性を保つためには、統計学者にデータを管理して頂くことは必須である。日本動物実験代替法学会が主催した初期の共同研究では<sup>27)</sup>、膨大な結果の管理を誤り、データ整理に多大なる時間を要した経験もあり、誤記が少なく、実験後のデータ管理を容易にするデータシートの用意が欠かせない<sup>14)</sup>。これにより、データの受け入れ基準の変更、予測モデルの構築が容易になる。

とはいえ、統計を使って結果をこねくり回し、素人を煙に巻くべきではない。ECVAMのh-CLATバリデーション研究では、施設内再現性が基準を満たさず、ECVAMの統計学者は難解な解析で無理矢理に施設内再現性を確保した。これは本当に正しかったのか、今でもよく判断できていない。

### 3.3.5. 記録管理グループ

参加施設でも記したが、GLP施設の協力をバリデーション研究において歓迎する。とはいえ、GLP下でバリデーション研究を行うことは極めて難しい。OECDのGLP<sup>21)</sup>の原則に則って行うことが精一杯である。本来、GLPは信頼性保証部門 (QAU: Quality Assurance Unit) の施設内査察があって成立するが、そこまで参加施設に

無償でお願いすることは不可能に近い。そこで、バリデーション実行委員会内で記録管理グループが信頼性管理を行うことになる。統計学者とともに、すべての記録を集め、記録管理グループで実験に不備がないことを確認すべきである。

### 3.4. 第三者評価委員会

バリデーション研究はバリデーション報告書の完成で終わりではない。もちろん、バリデーション報告書は論文にするべきであるが、論文になってからでもバリデーション研究をした以上は、その報告書は独立した第三者評価 (Independent peer review: peer review) を受けねばならない。peer reviewはバリデーションの一プロセスであり、peer reviewまで終了して初めて国際標準化への道が開ける。

良いpeer reviewは、バリデーション研究にもすぐる。国内で専門家を探しただけでは狭い業界ということもあり、何らかの柵が残る。国際標準化を目指す場合には、国内に拘らず、ICATMの協力を得て、当該試験法に精通した専門家を招聘し、peer reviewして頂くことが最も重要である。

### 3.5. 付記

バリデーション研究の最終目的は、試験法の行政的な受け入れである。しかし、JaCVAMの設立前には、その受け皿がなく、バリデーション研究と銘打って試験法の共同研究が多く実施されてきた。例えば、1990年代には日本動物実験代替法学会を中心に細胞毒性試験の共同研究が実施されてきた<sup>27)</sup>。大野らも厚生科学研究で眼刺激性試験代替法のバリデーション研究を実施し<sup>28,29)</sup>、行政的な受け入れを目指したが、実現しなかった。一番の問題点は当時、国際的なpeer reviewがなされなかったことである。バリデーションとpeer reviewはセットであるとの認識が低く、すべての試験法が標準化への道を歩めなかった。このバリデーションを期にJaCVAMの必要性が謳われていくことになる。残念ながら、結局、当時バリデートされた代替法においても標準化という日の目を見なかった点が、関係者として心残りである。

## 4. 今後の問題点

JaCVAMから行政への提案された試験法は、「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」という事務連絡以降<sup>30)</sup>、化粧品・医薬部外品の代替法ガイダンスという形で厚生労働省からの通知で発出されている<sup>31)</sup>。特にこのガイダンスはJaCVAMの評価書をもとに開発されていることからTable 5としてまとめさせて頂いた<sup>32)</sup>。ま

た、毒物劇物法の判定基準の変更においても腐食性試験や強い眼刺激性評価にも代替法の利用が盛り込まれ<sup>33)</sup>、日本薬局方の試験法に関する研究：輸液用ゴム栓試験法の見直しにおける細胞毒性試験法の導入にも寄与してきた<sup>34)</sup>。

Table 5. Guidances on the use of alternative test methods for the safety assessment of cosmetics and quasi-drugs

No.	ガイダンス名
1	化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る光毒性試験代替法 (3T3 NRU) を活用するためのガイダンス
2	化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る感作性試験代替法 (LLNA) を活用するためのガイダンス
3	化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る感作性試験代替法 (LLNA: DA) を活用するためのガイダンス
4	化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る感作性試験代替法 (LLNA: Brd-ELISA) を活用するためのガイダンス
5	化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る眼刺激性試験代替法 (BCOP) を活用するためのガイダンス
6	化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る眼刺激性試験代替法 (ICE) を活用するためのガイダンス
7	化粧品・医薬部外品の安全性評価に係る皮膚透過性試験を活用するためのガイダンス
8	医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンスについて
9	医薬部外品・化粧品の安全性評価における眼刺激性試験代替法としてのウサギ角膜由来株化細胞を用いた短時間曝露法 (STE法) に関するガイダンス
10	医薬部外品・化粧品の安全性評価における眼刺激性試験代替法としてのヒト角膜様モデルを用いた細胞毒性試験に関するガイダンス

引き続き、行政に新規試験法の受け入れを提案していきたいところではあるが、今後は局所毒性試験だけでなく、全身毒性 (反復投与毒性、生殖発生毒性、免疫毒性、発がん性など) 試験法の代替法が開発・評価され、医薬品や食品などの規制にも関与していくことを望んでいる。ただし、有害性発現経路 (AOP: Adverse Outcome Pathway)<sup>35)</sup>を加味した試験法であっても、単独では評価できないことは現状でも明らかであり、試験法と評価への統合アプローチ (IATA: Integrated Approaches to Testing and Assessment) や確定方式 (Defined Approach)<sup>36)</sup>などという新たな概念を駆使して、既存情報や試験法の組み合わせを慎重に考えていかねばならない。

一方、新規試験法の開発に向け、人工多能性幹細胞 (iPS細胞: induced pluripotent stem cells) など

のヒト細胞を用いた大量高速スクリーニング (High throughput screening), ハイコンテンツアナライシス (High content analysis), レポーター遺伝子アッセイ, -Omicsやtranscriptomeデータなどの膨大なデータ利用や管理, スフェロイドなどの3次元培養や3次元プリンターやOrganoid, Organ-on-a chipを用いた人体模倣システム (MPS: Microphysiological System) およびAI (Artificial Intelligence) やRead-across, 構造活性相関QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) などのコンピューターモデルを用いた予測系の開発などの技術革新が進んでいる<sup>37-40)</sup>.

このような技術革新に対応していくためには, これまでのバリデーション研究の取り組み方では時間や労力が掛かり過ぎるとの懸念の声も上がっている. このままでは, MPSのような多岐の条件に対応できない. とはいえ, 安全性を適切に評価するためには, 試験法の再現性と妥当性の検証は必須である. これまでの経験をもとに, 今後, 新たなデータの受け入れ基準やバリデーション基準が再検討されていくことになると推察している. JaCVAMはこれまで単独の試験法の評価のみに取り組んできたが, 時代の変化に対応し, 多様な対応を望まれることになろう. 国立医薬品食品衛生研究所の皆様, そしてJaCVAMに関わる皆様の奮闘に期待している.

## 謝辞

JaCVAMは国立医薬品食品衛生研究所 医薬品等規制行政に直結する政策研究費の一つで運営されている. 予算確保にご協力頂いたすべての皆様に感謝します.

JaCVAMの活動に寄与してこれられた運営委員会を初めとするすべての国内外の協力者に感謝致します. 特に, JaCVAMの設立時に際し, 適切なお助力およびご支援を頂いた大野泰雄・元所長, 故井上達・元センター長, 林 真・元変異遺伝部長, 金子豊蔵・元動物管理室長, 田中憲穂・財団法人食薬センター秦野研究所顧問, Dr. Willam Stokes (former NICEATM), Dr. Thomas Hartung (former ECVAM) の皆様にこの場を借りて深く感謝します. また, 長年に渡り, 評価会議での議論に参画して頂いた五十嵐良明・生活衛生化学部部長, 西川秋佳・元センター長, 増田光輝・元(株)ライオン生物科学研究所所長, 吉村功・元東京理科大学教授, 横関博雄・東京医科歯科大学教授, 吉田武美・元昭和大学教授の皆様々に感謝致します.

最後に, 本稿を作成するにあたり協力頂きました平林容子・センター長, 足利太可雄主任研究員, 吉川環非常勤職員の皆様に感謝致します.

## 引用文献

- 1) 日本薬学会 レギュラトリーサイエンス部会: Available at: [http://www.nihs.go.jp/dec/rs/whats\\_rs.html](http://www.nihs.go.jp/dec/rs/whats_rs.html) (令和2年6月1日現在)
- 2) Russell, W.M.S. and Burch, R.L.: The Principles of Humane Experimental Technique, Available at: [http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane\\_exp/het-toc](http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc) (令和2年6月1日現在)
- 3) Council Directive EU Directive 2010/63/EU, Available at: [https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm) (令和2年6月1日現在)
- 4) National Research Council: Toxicity Testing in the 21st Century, The National Academies Press, Washington, D.C. (2007)
- 5) 小野宏: *組織培養* 1996, 22(6): 207-210.
- 6) JaCVAM: Available at: <http://www.jacvam.jp/> (令和2年6月1日現在)
- 7) 国立医薬品食品衛生研究所: Available at: <http://www.nihs.go.jp/nihs/index.html#shimei> (令和2年6月1日現在)
- 8) 大野泰雄: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 2004; 122: 1-10.
- 9) OECD Test Guidelines for the Chemicals: Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm> (令和2年6月1日現在)
- 10) ICATM: Available at: <https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/iccvam/international-partnerships/icatm/index.html> (令和2年6月1日現在)
- 11) ICHガイドライン: Available at: <https://www.pmda.go.jp/int-activities/int-harmony/ich/0070.html> (令和2年6月1日現在)
- 12) ICCR: Available at: <https://iccr-cosmetics.org/topics/> (令和2年6月1日現在)
- 13) 大野泰雄: *組織培養*, 1996; 22(6): 211-217.
- 14) 大森崇, 吉村功: 動物実験代替安全性試験プロトコル集, 小島肇夫監修, (株) シーエムシー出版, 東京, pp.257-275 (2013)
- 15) 小島肇夫: “最新動物実験代替法”, 小島肇夫監修, (株) 技術情報協会, 東京, pp.267-273 (2007)
- 16) 小島肇夫: *COSMETIC STAGE*, 2007; 8: 54-56.
- 17) 小島肇夫: “化粧品・医薬部外品 安全性評価試験法”, 小島肇夫著, (株) じほう, 東京, pp.10-15 (2014)
- 18) 小島肇夫: “*In vitro*毒性・動態評価の最前線” 小島



- 肇夫監修, (株) シーエムシー出版, 東京, pp.1-7 (2013)
- 19) 小島肇夫: “動物実験代替法のためのバイオマテリアル・デバイス”, 酒井康行, 民谷栄一監修, (株) シーエムシー出版, 東京, pp.1-5 (2014)
- 20) OECD: Guidance Document No.34, OECD Series on Testing and Assessment, OECD, Paris (2005) Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2005\)14&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2005)14&doclanguage=en) (令和2年6月1日現在)
- 21) OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring: Available at: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm> (令和2年6月1日現在)
- 22) 既存化学物質毒性データベース: Available at: [https://dra4.nihs.go.jp/mhlw\\_data/jsp/SearchPage.jsp](https://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp) (令和2年6月1日現在)
- 23) ECETOC: Available at: <http://www.ecetoc.org/?s=database> (令和2年6月1日現在)
- 24) National Toxicology Program: Available at: <https://ntp.niehs.nih.gov/data/index.html> (令和2年6月1日現在)
- 25) EPA: Available at: <https://www.epa.gov/iris> (令和2年6月1日現在)
- 26) United nations (UN) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS): Fourth revised edition, UN New York and Geneva, Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev04/04files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html) (令和2年6月1日現在)
- 27) Ohno T and 98 co-authors: “Animal Alternatives, Welfare and Ethics” eds. L. F. M. van Zutphen and M. Balls, Elsevier Science, The Netherlands, pp.1145-1154, (1997).
- 28) Ohno Y, Kaneko T, Kobayashi T, Inoue T: *AATEX*, 1995; 3: 123-136.
- 29) Ohno Y, Kaneko T, Inoue T, Morikawa Y: *Toxicol. in Vitro*. 1999; 13: 73-98. doi.org/10.1016/S0887-2333(98) 00064-2
- 30) 厚生労働省医薬品審査管理課: 事務連絡平成23年2月4日, Available at: <https://www.pmda.go.jp/files/000160730.pdf> (令和2年6月1日現在)
- 31) PMDA: Available at: <https://www.pmda.go.jp/review-services/drug-reviews/about-reviews/q-drugs/0002.html> (令和2年6月1日現在)
- 32) Kojima H, Ikarashi Y, Nakada T, Yagami A: “Alternatives to Animal Testing” eds. Kojima H, Seidle T, Spielmann H, Springer, Singapore, pp.63-68 (2019)
- 33) 厚生労働省医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課長: 薬生薬審発0613第1号 平成29年6月13日 Available at: <http://www.nihs.go.jp/law/dokugeki/kijun.pdf> (令和2年6月1日現在)
- 34) 柘植英哉, 大内正, 森充生, 下田耕三: *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 2012; 43(5): 473-482.
- 35) OECD, AOP, Available at: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/adverse-outcome-pathways-molecular-screening-and-toxicogenomics.htm> (令和2年6月1日現在)
- 36) OECD Guidance document on the reporting of defined approaches and individual information sources to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitization, Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2016\)29&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2016)29&doclanguage=en) (令和2年6月1日現在)
- 37) Dent M, Amaral RT, Da Silva PA, Ansell J: *Computational Toxicology* 2018; 7: 20-26. doi.org/10.1016/j.comtox.2018.06.001
- 38) Tox21, Available at: <https://tox21.gov/all-publications/> (令和2年6月1日現在)
- 39) EUTOXRISK, Available at: [https://www.eu-toxrisk.eu/page/media\\_items/test-methods8.php](https://www.eu-toxrisk.eu/page/media_items/test-methods8.php) (令和2年6月1日現在)
- 40) Kojima, H.: *Translat Regulat Sci*. 2019; 1(2): 66-72. doi: 10.33611/trs.1\_66.