

OECD の化学物質の試験に関するガイドライン

in vitro 皮膚腐食性:経皮電気抵抗試験 (TER)

はじめに

1. 皮膚腐食性とは、(国連 (UN) 化学品の分類および表示に関する世界調和システム (GHS) (1)によって定義されるように) 被験物質の適用後、表皮および真皮に視認できる壊死として認められる不可逆的な皮膚損傷が生じることをいう。この改訂版試験ガイドライン 430 では、UN GHS (1)に基づいた非腐食性および腐食性の物質ならびに混合物の識別を可能にする *in vitro* における手順を示す。
2. 皮膚腐食性の評価には通常、実験動物が使用されてきた (OECD 試験ガイドライン 404 (TG 404) : 最初に 1981 年に採択、1992 年、2002 年および 2015 年に改訂) (2)。現行の TG 430 に加え、化学物質の皮膚腐食性試験に関する他の *in vitro* 試験法も検証され、OECD 試験ガイドライン 431 (3)、435 (4)として採択されており、必要に応じて腐食性化学物質の細区分を特定することもできる。いくつかの有効性が確認された *in vitro* 試験法が OECD TG 439 (5)として採択され皮膚刺激性の試験に使用されている。皮膚腐食性および皮膚刺激性の試験および評価に対する統合的アプローチ (IATA) に関する文書では、様々な情報源および分析ツールを分類する複数のモジュールについて説明しており、(i) 化学物質の皮膚刺激性および皮膚腐食性の評価のために既存の試験データおよび非試験データを統合して使用する方法、および (ii) さらに試験が必要な場合のアプローチを提案するガイダンスを提供している(6)。
3. 本試験ガイドラインでは、ヒトの健康に関する評価項目の皮膚腐食性を取り扱っている。本試験ガイドラインはラット経皮電気抵抗 (TER) 測定法に基づいている。本測定法では皮膚ディスクを用いて、正常角質層の完全性とバリア機能を失わせる能力により腐食性物質を特定する。本試験ガイドラインは、最初は 2004 年に採択され、IATA のガイダンス文書を参照するために 2015 年に更新された。
4. 規制目的の *in vitro* 皮膚腐食性試験を評価するため、皮膚腐食性を評価するラット皮膚 TER 測定法の先行バリデーション試験(7)に続き、正式なバリデーション試験が実施された(8)(9)(10)(11)。これらの試験結果から、(バリデーション済み参照試験法 (VRM) 指定の) TER 測定法は、*in vivo* 皮膚腐食性を評価する規制目的に使用可能であるという勧告に至った(12)(13)(14)。
5. 提唱される類似または改変 *in vitro* 皮膚腐食性 TER 測定法が、VRM 以外の試験法でも規制目的で使用可能となるには、提唱される使用に対する試験法の信頼性、妥当性 (正確性)、限界が性能基準の要件に従って、VRM との類似性の確保について判断する必要がある(15)。本試験ガイドラインの性能基準に従って提唱される新規または更新試験法は、いずれも再検討されて本試験ガイドラインに収載されることにより、初めてデータの相互受け入れが保証されることになる。

定義

6. 用いた定義を補遺 1 に示す。

最初に考慮すべき事項

7. バリデーション試験(10)および他に公表された試験(16)(17)の報告では、ラット皮膚 TER 測定法により既知の皮膚腐食性物質と非腐食性物質との識別が可能であり、122 種類の物質からなるデータベースでは、全体の感度が 94% (51/54)、特異度が 71% (48/68) を示している。

8. 本試験ガイドラインは、*in vitro* 皮膚腐食性を対象とする。本試験ガイドラインにより、UN GHS (1)に従って非腐食性および腐食性の被験物質の識別が可能になる。本試験ガイドラインは、バリデーション試験(8)(9)(10)(11)により示されているとおり、UN GHS (1)に従って腐食性物質および混合物の細区分化を行えないことに限界がある。本試験ガイドラインの使用法については、各 OECD 加盟国の規制の枠組みの中で決定されることになる。本試験ガイドラインは皮膚刺激性について十分な情報を示さないが、OECD TG 439 が *in vitro* において健康に影響を及ぼす皮膚刺激性を特異的に取り扱う(5)ことに留意されたい。単回の皮膚曝露後に生じる局所的な皮膚への影響を完全に評価するには、試験評価の総合的アプローチに関するガイダンス文書 203 を参照のこと(6)。

9. 主な物質を代表する広範な化学物質が本試験ガイドラインの根拠となるバリデーション試験を受けており、本バリデーション試験の経験的データベースは、広範な化学物質クラスを網羅した 60 種類の物質である(8)(9)。入手可能なデータ全体に基づく、本試験ガイドラインは、広範な化学物質のクラスならびに液体、半固体、固体、ワックスなどの物理的状態に適用可能である。ただし、特定の物理的状態では適切な参照データのある試験品目が直ちに入手できないため、少数の類似したワックスおよび腐食性固体がバリデーションの過程で評価されたことに留意されたい。液体は水溶性でも非水溶性でもよく、固体は水に可溶でも不溶でもよい。特定の化学物質区分に属す物質には本試験ガイドラインを適用できないとの根拠が示され得る場合、本試験ガイドラインは、そうした特定の化学物質区分に属す物質に用いないこと。さらに、本試験ガイドラインは各物質への適用の延長として、混合物に対しても適用可能であることが想定される。しかし、混合物は化学物質区分および組成が広範囲で、混合物の試験実施に関する現在入手可能な情報は限られている。そのため、(例えば、Eskes ら (2012 年) (18)が提唱した戦略に従って)特定の化学物質区分に属す混合物には、本試験ガイドラインを適用できないとの根拠が示され得る場合、本試験ガイドラインは、そうした特定の化学物質区分に属す混合物に用いないこと。ある混合物について規制目的を意図してデータを生成する場合、この試験ガイドラインを用いる前に、ガイドラインからその目的に合った適切な結果が示され得るか、また、示される場合の理由について検討する。当該混合物の試験の規制要件がある場合には、こうした検討は不要である。ガスおよびエアロゾルは、未だバリデーション試験で評価されていない(8)(9)。ガスおよびエアロゾルは TER 測定法を用いて検討可能であると考えられるが、現行の試験ガイドラインではこれらの試験を行えない。

試験の概要

10. 2 コンパートメント試験システムでは、皮膚ディスクはコンパートメント間を分離する機能を果たすが、その皮膚ディスクの表皮面に最長 24 時間にわたって被験物質を適用する。人道的に屠殺した 28~30 日齢のラットから皮膚ディスクを採取する。腐食性化学物質は、正常角

質層の完全性とバリア機能を失わせる能力（TERを閾値よりも下げる能力として測定できる）により確認される(16)（段落 32 参照）。ラット皮膚 TER については、5 kΩ のカットオフ値が選択された。この値は、広範囲にわたる物質についての詳細なデータに基づくもので、大多数の物質はこの値より明らかに上（しばしば 10 kΩ 超）か、かなり下の値（しばしば 3 kΩ 未満）であった(16)。通常、動物に対して非腐食性の被験物質では、刺激性の有無を問わず、TER をこのカットオフ値より低下させない。さらに、他の皮膚試料または他の装置を使用する場合、カットオフ値が変化することがあるため、さらなるバリデーションが必要になることがある。

11. 5 kΩ 付近値を含め、TER 陽性結果を確認する試験として色素結合ステップが試験手順に組み込まれる。色素結合ステップでは、イオン透過性の増加が角質層の物理的破壊によるものかどうかを確定する。ラット皮膚を用いる TER 法の結果は、OECD ガイドライン 404(2)で評価されるウサギにおける *in vivo* 腐食性を予見することが示されている。

習熟度確認

12. 本試験ガイドラインを遵守してラット皮膚 TER 測定法を日常的に用いるのに先立ち、施設は、表 1 の推奨される 12 種類の習熟度確認物質を正しく分類することにより、専門技術の習熟について確認する。記載されている物質が入手できない場合、または妥当な場合には、表 1 に記載されているものと同じ選択基準が適用されるのであれば、*in vivo* および *in vitro* の適切な参照データが入手可能な別の物質を使用してもよい（例えば、参照化学物質リスト(16)から）。

表 1：習熟度確認物質のリスト¹

物質	CASRN	化学物質 クラス ²	<i>In vivo</i> 試験結 果に基づく UN GHS 区分 ³	<i>In vitro</i> 試験 結果に基づ く VRM 区分	物理的 状態	pH ⁴
<i>In vivo</i> における腐食性物質						
N,N'-ジメチルジプロ ピレントリアミン	10563-29-8	有機塩基	1A	6 x 腐食性	液体	8.3
1,2-ジアミノプロパン	78-90-0	有機塩基	1A	6 x 腐食性	液体	8.3
硫酸 (10%)	7664-93-9	無機酸	(1A)1B/1C	5 x 腐食性 1x 非腐食性	液体	1.2
水酸化カリウム (10% aq.)	1310-58-3	無機塩基	(1A)1B/1C	6 x 腐食性	液体	13.2
オクタン酸 (カプリ ル酸)	124-07-2	有機酸	1B/1C	4 x 腐食性 2 x 非腐食性	液体	3.6
2-tert-ブチルフェノー ル	88-18-6	フェノール	1B/1C	4 x 腐食性 2 x 非腐食性	液体	3.9
<i>In vivo</i> における非腐食性物質						
イソステアリン酸	2724-58-5	有機酸	非腐食性	6 x 非腐食性	液体	3.6
4-アミノ-1,2,4-トリア ゾール	584-13-4	有機塩基	非腐食性	6 x 非腐食性	固体	5.5

臭化フェネチル	103-63-9	求電子物質	非腐食性	6 x 非腐食性	液体	3.6
4- (メチルチオ) -ベンズアルデヒド	3446-89-7	求電子物質	非腐食性	6 x 非腐食性	液体	6.8
1,9-デカジエン	1647-16-1	中性有機物質	非腐食性	6 x 非腐食性	液体	3.9
テトラクロロエチレン	127-18-4	中性有機物質	非腐食性	6 x 非腐食性	液体	4.5

略語：aq=水溶性、CASRN=CAS 登録番号、UN GHS=国連化学品の分類および表示に関する世界調和システム(1)、VRM=バリデーション済み参照試験法、ND=未決定。

¹ 習熟度確認物質は、最初に腐食性物質と非腐食性物質、次に腐食性の細区分、さらに化学物質クラスの順で分類され、欧州代替法評価センター (ECVAM) によるラット皮膚 TER 測定法のバリデーション試験に用いられる物質から選択されたものである(8)(9)。特に断りがない限り、掲載した物質は市販品購入時の純度で試験を行った(8)。可能な限り、次の基準を満たす物質を選択した。(i) VRM による測定または予測を行える、腐食性反応の範囲を代表する物質であること (例えば、非腐食性物質、腐食性物質のうち反応が弱い物質から強い物質まで)。(ii) バリデーション試験に用いられる化学物質クラスを代表する物質であること。(iii) VRM の性能特性を反映する物質であること。(iv) 明確に定義された化学構造を持つ物質であること。(v) *In vivo* における参照試験法で決定的な結果を導く物質であること。(vi) 市販品であること。(vii) 極端に高額な廃棄費用を伴わない物質であること。

²Barratt ら (1998 年) (8)により指定された化学物質クラスとした。

³UN GHS の 1A、1B、1C に相当する国連容器等級はそれぞれ I、II、III である。

⁴pH 値は Fentem ら(9)および Barratt ら(8)の文献から得た。

手順

13. ラット皮膚 TER による皮膚腐食性試験法の標準操作手順書 (SOP) が入手可能である(19)。本試験ガイドラインが対象とするラット皮膚 TER 測定法では、下記事項を遵守する。

動物

14. ラットを用いる。その理由は、本測定法においてラット皮膚の物質に対する感受性が以前に示されており(12)、正式にバリデーションされた唯一の皮膚供給源であるからである(8)(9)。

(皮膚を採取する際) 毛包が成体で発毛を開始する以前の休止期にあることを確保するために、ラットの週齢および系統が特に重要である。

15. 約 22 日齢の若齢雄または雌ラット (Wister 系または同等の系統) の背面および側面の毛を、小さいクリッパーで慎重に刈り取る。次に、毛刈りした領域を抗生物質溶液 (例えば、微生物の増殖を阻害するのに効果的な濃度のストレプトマイシン、ペニシリン、クロラムフェニコールおよびアムホテリシンを含む) に浸し、慎重に拭きながら洗浄する。1 回目の洗浄後、3 日目または 4 日目に再び動物を抗生物質溶液で洗浄し、2 回目の洗浄から 3 日以内に使用する。このとき角質層が除毛から回復している。

皮膚ディスクの準備

16. 28～30日齢（この日齢が非常に重要）の動物を人道的に屠殺する。次に、各動物の背外側の皮膚を採取し、過剰な皮下脂肪を皮膚から慎重に剥離し、除去する。1 つにつき直径約 20 mm の皮膚ディスクを取り出す。陽性および陰性対照データが、新鮮皮膚で得られたものに等しいことが示される場合には、ディスクを使用するまで皮膚を保存してもよい。

17. 各皮膚ディスクは PTFE（ポリテトラフルオロエチレン）チューブの一端に配置し、表皮面をチューブと確実に接触させる。配置した皮膚を保持するためチューブの端にゴム製 O リングを装着し、過剰な組織を切り取る。次に、ゴム製 O リングを PTFE チューブの末端までワセリンで慎重に密封する。チューブは MgSO_4 溶液（154 mM）を含むレセプター室内で、バネクリップで支持される（図 1）。皮膚ディスクは MgSO_4 溶液に完全に浸す。10～15 本の皮膚ディスクが 1 匹のラット皮膚から得られる。チューブと O リングの寸法を図 2 に示す。

18. 試験を始める前に、各動物の皮膚の品質管理手順として 2 つの皮膚ディスクの TER を測定する。残りのディスクが本測定法に使用できるためには、両ディスクが 10 k Ω を超える電気抵抗値を示す必要がある。抵抗値が 10 k Ω より低い場合、その皮膚由来の残りのディスクは廃棄する。

被験物質および対照物質の適用

19. 実験モデルが適切な性能であることを確認するため、実行（実験）ごとに陽性対照および陰性対照を必ず同時に設置する。1 回の実行（実験）単位で 1 匹の動物からの皮膚ディスクを使用する。陽性および陰性対照の被験物質として、10 M 塩酸と蒸留水がそれぞれ推奨される。

20. 液体被験物質（150 μL ）を、チューブの内側の表皮面に均一に適用する。固形物の試験の場合、十分量の固体を表皮面の全てが確実に覆われるように均一にディスクに適用する。脱イオン水（150 μL ）をこの固体の表面に加え、チューブを穏やかに攪拌する。皮膚との接触を最大にするために、固体を 30°C に温めて被験物質を熔融もしくは軟化させるか、挽いて粒状または粉末にする必要を生じることがある。

21. 各被験物質および対照物質に対して、1 回の試験実行（実験）単位で 3 つの皮膚ディスクを用いる。被験物質を 20～23°C で 24 時間適用する。室温以下の水道水を噴射し、物質をそれ以上除去できなくなるまで洗浄することにより、被験物質を除去する。

TER の測定

22. 皮膚インピーダンスは、低電圧交流ホイートストンブリッジを用いることにより、TER として測定される(18)。ブリッジは一般的仕様として作動電圧 1～3 ボルト、50～1000 Hz の正弦波または矩形波交流で、少なくとも 0.1～30 k Ω の測定範囲である。バリデーション試験に用いられたデータブリッジでは、直列型または並列型値を用い、100 Hz または 1 kHz の周波数でインダクタンス（誘導係数）、キャパシタンス（容量）およびレジスタンス（抵抗）がそれぞれ 2000 H、2000 μF および 2 M Ω の値まで測定された。TER 測定法による腐食性検討のため、測定結果は 100 Hz の周波数、直列型値を用いて、抵抗を単位にして記録する。電気抵抗を測定するのに先立って、表皮を十分量の 70%エタノールを加えて覆うことにより、皮膚の表面張力を低減する。数秒後にエタノールをチューブから除去し、3 mL の MgSO_4 溶液（154 mM）を組織に加えて水和する。データブリッジ電極は抵抗（k Ω /皮膚ディスク）を測定するために、皮膚ディスクの両側に配置する（図 1）。電極の寸法およびワニロクリップの下に露出する電極の長さは、図 2 で示さ

れる。内側電極に取り付けられるクリップは、抵抗を測定する間、PTFE チューブの最上部にセットし、電極の一定の長さを MgSO_4 溶液に浸した状態に保つ。外側の電極は、レセプター室内底に静置するように配置する。バネクリップと PTFE チューブの底面の距離は一定に維持する(図 2)。それは、この距離が得られた抵抗値に影響を及ぼすからである。したがって、内側電極と皮膚ディスクの間の距離は一定かつ最小限にする必要がある(1~2 mm)。

23. 測定された抵抗値が $20 \text{ k}\Omega$ を超える場合、これは皮膚ディスクの表皮面を覆っていた被験物質が残存していることに起因する可能性がある。その場合、残存物質をさらに除去するよう試みることができる。例えば、手袋をした親指で PTFE チューブを密封して、約 10 秒間それを振とうする。次に、 MgSO_4 溶液を廃棄し、新鮮な MgSO_4 により抵抗の測定を繰り返すことが挙げられる。

24. 用いられた試験装置と実験手順の特性や特質が、得られた TER 値に影響を与える可能性がある。 $5 \text{ k}\Omega$ という腐食閾値は、本試験ガイドラインに記載されている特定の装置および手順で得られたデータから設定したものである。試験条件の変更または異なる装置の使用があった場合、異なる閾値と対照値を適用してもよい。したがって、バリデーション試験に使用されている物質(8)(9)、または検討中の物質に類似の化学物質クラスから選んだ一連の習熟度確認物質を試験することによって、方法論および抵抗閾値を校正する必要がある。一連の適切な習熟度確認物質は、表 1 で特定されている。

色素結合法

25. 特定の非腐食性物質に曝露すると抵抗は $5 \text{ k}\Omega$ のカットオフ値よりも低下するので、イオンは角質層を通過できるようになり、これにより電気抵抗は低下する可能性がある(9)。例えば、中性有機物質および表面活性を持つ物質(洗剤、乳化剤およびそれ以外の界面活性剤など)は皮膚の脂質を除去するためバリアのイオン透過性がより増加する可能性がある。よって、こうした化学物質により生じる TER 値が $5 \text{ k}\Omega$ 未満または $5 \text{ k}\Omega$ 付近で、皮膚ディスクに視認可能な損傷がない場合には、対照および処理組織の色素透過性を評価し、得られた TER 値が皮膚の透過性増加によるものか、あるいは皮膚腐食性によるものかを判断する必要がある(7)(9)。後者、すなわち角質層が破壊された場合には、色素スルホローダミン B を皮膚表面に適用すると速やかに浸透して下部の組織を染色する。この特殊な色素は広範にわたる物質に対して安定であり、以下に述べる抽出手順の影響を受けない。

スルホローダミン B 色素の適用と除去

26. TER 評価の後、硫酸マグネシウムをチューブから廃棄し、皮膚に明らかな損傷がないかどうか慎重に調べる。大きな損傷(例えば穿孔)が認められない場合には、スルホローダミン B 色素(アシッドレッド 52、C.I.45100、CAS 番号 3520-42-1)の 10% (w/v) 蒸留水希釈液 $150 \mu\text{L}$ を各皮膚ディスクの表皮面に 2 時間適用する。次に、室温以下の水道水で約 10 秒間、これらの皮膚ディスクを洗浄し、過剰な色素または結合しなかった色素を除去する。各皮膚ディスクを慎重に PTFE チューブから取り外し、脱イオン水(8 mL)を含むバイアル(20 mL のガラスシンチレーションバイアルなど)に移す。バイアルを 5 分間穏やかに攪拌し、さらに結合しなかった色素を除去する。続いて、この洗浄手順を繰り返した後、皮膚ディスクを取り出し、蒸留水希釈 30% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム(SDS) 5 mL を含むバイアルに入れ、 60°C で一晩培養する。

27. 培養後、各皮膚ディスクを取り出して廃棄し、残留溶液を 21°C で 8 分間遠心分離する（相対遠心力約 175 x g）上清試料 1 mL に蒸留水希釈 30% (w/v) SDS 4 mL を加えて 5 倍 (v/v)（すなわち、1 mL + 4 mL）に希釈する。溶液の光学濃度 (OD) を、565 nm で測定する。

色素含有量の算出

28. ディスクあたりのスルホローダミン B 色素含有量は、OD 値（565 nm におけるスルホローダミン B 色素のモル吸光係数を 8.7×10^4 、また分子量を 580 とする）から算出する(9)。適切な校正曲線を用い、各皮膚ディスクの色素含有量を決定する。次に、これら同型の皮膚ディスクに対する平均色素含有量を算出する。

許容基準

29. 試験施設での方法において同時に実施された陽性および陰性対照値が許容範囲に収まる場合には、TER の平均結果は受理される。上述の方法および装置による許容抵抗範囲を以下の表に示す。

対照	物質	抵抗範囲 (kΩ)
陽性	10M 塩酸	0.5 - 1.0
陰性	蒸留水	10 - 25

30. 同時に実施された対照値が本法の許容範囲に収まる場合には、色素結合の平均結果は受理される。上述の方法および装置による対照物質について示唆される許容色素含有範囲を以下の表に示す。

対照	物質	色素含有量範囲 (μg/ディスク)
陽性	10M 塩酸	40 - 100
陰性	蒸留水	15 - 35

結果の解釈

31. 被験物質の腐食性と非腐食性を識別する TER のカットオフ値は、試験法最適化の際に確立され、先行バリデーションの段階で検討を行い、正式なバリデーション試験において確認された。
32. UN GHS (1)分類系と関連付けられる、ラット皮膚 TER による皮膚腐食性試験法の予測モデル(9)(19)について以下に示す。

以下の場合、被験物質は皮膚に対して非腐食性であると判断される。

- i) 被験物質について得られた TER 平均値が 5 kΩ を超える場合。または、
- ii) 被験物質について得られた TER 平均値が 5 kΩ 以下であり、かつ、
 - 皮膚ディスクには明らかな損傷（例えば穿孔）が認められない。および、
 - ディスクの平均色素含有量が同時に得られた 10 M 塩酸陽性対照ディスクの平均色素含有量よりも低値である場合（陽性対照値については段落 30 参照）。

以下の場合、被験物質は皮膚に対して腐食性であると判断される。

被験物質について得られた TER 平均値が 5 kΩ 以下で、皮膚ディスクに明らかな損傷（穿孔など）が認められる場合。または、

被験物質について得られた TER 平均値が 5 kΩ 以下であり、かつ、

- 皮膚ディスクには明らかな損傷（例えば穿孔）が認められないが、
- ディスクの平均色素含有量が同時に得られた 10 M 塩酸陽性対照のディスクの平均色素含有量以上である場合（陽性対照値については段落 30 参照）。

33. 腐食性の分類が明確である場合、3 つ以上の同型の皮膚ディスクからなる試験実行（実験）は、1 被験物質に対し 1 回行えば十分であるとする。ただし、同型のディスク測定結果が一致しない、および／または TER 平均値が 5 ± 0.5 kΩ であるなど結果が境界値の場合、別途 2 回目の独立した試験実行（実験）を検討する。さらに、試験実行（実験）の結果が 1 回目と 2 回目とで一致しない場合、3 回目を検討する。

データおよび報告

データ

34. 該当する場合には、被験物質および陽性／陰性対照の抵抗値 (kΩ) および色素含有量 (μg/ディスク) を、試験実行（実験）ごとにそれぞれ同型のディスク別にしたデータおよび平均値±標準偏差を含む表形式にして報告する。繰り返し実験の結果は全て報告する。皮膚ディスクに認められた損傷は、被験物質ごとに報告する。

試験報告書

35. 試験報告書には、以下の情報を含める。

被験物質および対照物質：

- 単一成分物質：化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式、純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的同定など
- 多成分物質、UVCB 物質（組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質）、混合物：構成成分の化学的同定（上記参照）、含有量および関連のある物理化学的性質によるできる限りの特徴付け
- 外観、水溶性およびその他の関連する物理化学的性質
- 入手可能な場合、供給元、ロット番号
- 試験前の被験物質／対照物質に対する処理（例えば保温、粉碎など）（該当する場合）
- 被験物質の安定性、使用期限、再分析日が判明している場合はその日付
- 保存条件

供試動物：

- 使用する系統および性
- 供試動物として使用される時点の週齢
- 供給元、飼育条件、飼料など
- 皮膚の準備の詳細

試験条件：

- 試験装置の校正曲線
- 該当する場合、色素結合試験成績の校正曲線、OD値測定に用いた通過帯域、および測定機器（例えば分光光度計）のODの直線範囲
- TER測定に用いた試験手順の詳細
- 該当する場合、色素結合評価に用いた試験手順の詳細
- 使用された被験物質の用量、曝露時間、および曝露温度
- 曝露時間終了後に用いた洗浄手順の詳細
- 被験物質および対照物質（陽性対照および陰性対照）あたりに用いた同型の皮膚ディスク数
- 試験手順の修正についての説明
- 本モデルの背景データに対する言及。内容には下記事項を含むべきであるが、これに限定されるものではない。
 - i) 陽性および陰性対照の抵抗範囲に基づいた、陽性および陰性対照のTER値（単位 $k\Omega$ ）の許容性
 - ii) 陽性および陰性対照の色素含有量範囲に基づいた、陽性および陰性対照の色素含有量（単位 $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ ）の許容性
 - iii) 同型の皮膚ディスク間における背景データのばらつきに基づいた、試験結果の許容性
- 適用した許容基準／予測モデルの説明

結果：

- 被験物質および対照別、試験実行（実験）ごと、ならびに同型の皮膚ディスク（個別別および皮膚試料別）ごとのTERおよび色素結合法（該当する場合）から得られたデータ、平均値、標準偏差、変動係数の表
- 認められた影響の記載
- 用いた予測モデル／許容基準に基づいて得られた分類

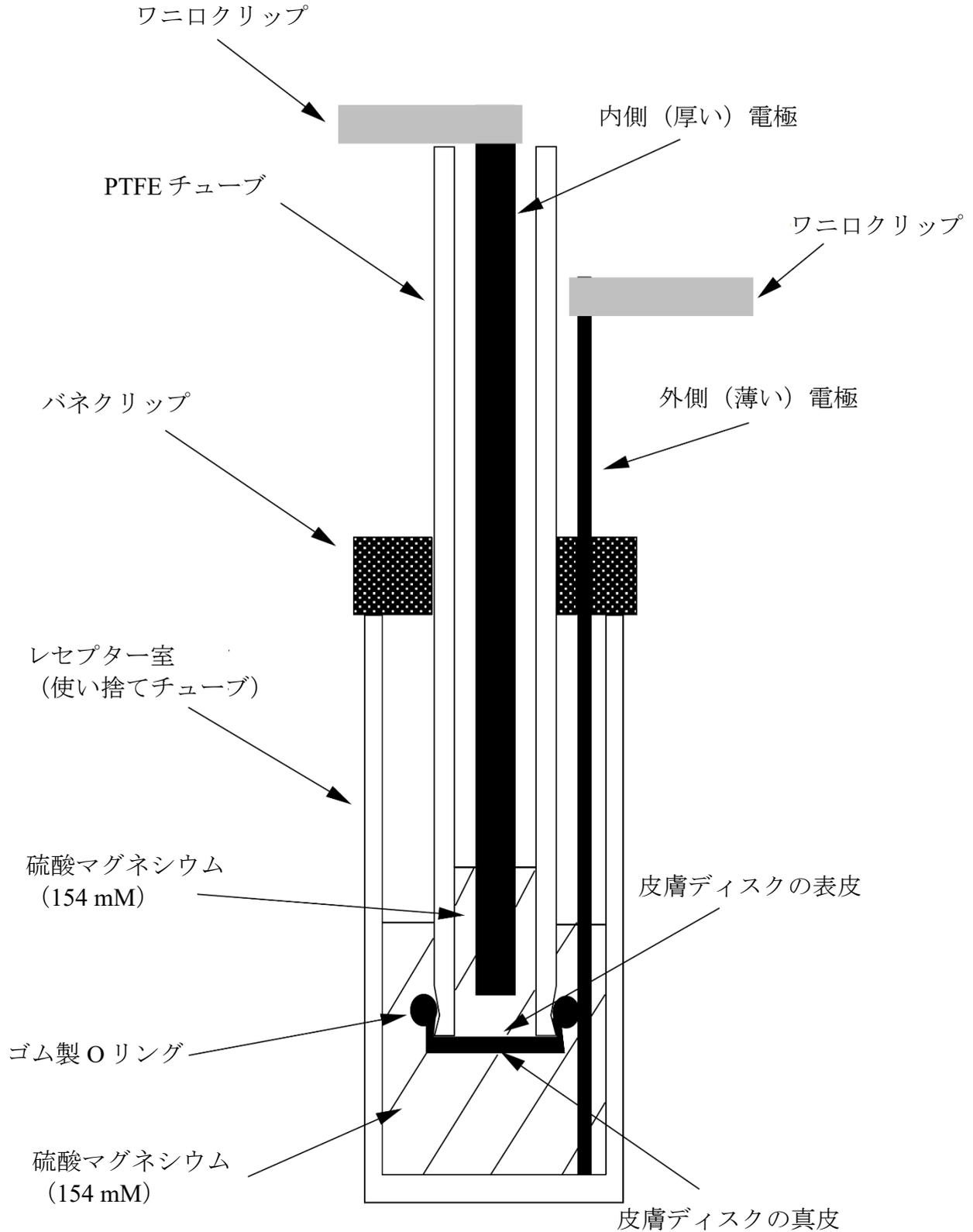
結果の考察**結論**

参考文献

- (1) United Nations (UN). (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].
- (2) OECD. (2015). Guideline for Testing of Chemicals. (No. 404.): Acute Dermal Irritation, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris..
- (3) OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (No. 431.): *In Vitro* Skin Model, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (No. 435.) *In Vitro* Membrane Barrier Test Method, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (5) OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (No. 439.) *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method.
- (6) OECD. (2014). Guidance document on Integrated Approached to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219-255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.
- (9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro* 12, 483- 524.
- (10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23, 129-147.
- (11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. Available at: [<http://www.iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>].

- (12) EC-ECVAM. (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998. Available at: [<http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html>].
- (13) ECVAM. (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.
- (14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. Available at: [http://www.iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf].
- (15) OECD. (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 507-512.
- (17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol.In Vitro* 6, 191-194.
- (18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.
- (19) TER SOP. (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No. 115.) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test. Available at: [<http://www.ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
- (20) OECD. (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

図1：ラット皮膚 TER 測定のための装置



補遺 1

定義

正確性：試験法による結果と、一般に認められた参照値との一致の近さ。正確性は試験法の性能の尺度であり、妥当性の一側面にあたる。この用語は、試験法の正しい結果が占める割合を意味する「一致度」の代わりに用いられることが多い(20)。

C：腐食性

化学物質：物質または混合物の意。

一致度：各種試験法により区分化の結果が得られる場合、一致度はその試験法の性能を示す尺度であり、妥当性の一側面にあたる。この用語は、時に正確性の代わりに用いられることがあり、陽性または陰性に正しく分類される全ての被験物質の割合と定義される。一致度は、検討中の各種被験物質の陽性率に大きく左右される(20)。

GHS (国連 (UN) 化学品の分類および表示に関する世界調和システム)：物理学的危険有害性ならびに健康および環境上の危険有害性の標準の種類および程度に従った化学物質（物質および混合物）の分類を提唱し、絵表示、注意喚起語、危険有害性情報、注意書き、安全データシートなど、対応する情報要素に対処するシステムのことである。これにより、人々（雇用者、労働者、輸送業者、消費者、緊急要員など）および環境を保護する観点から、危険有害作用に関する情報が伝達される(1)。

IATA：試験および評価に関する総合的アプローチ。

混合物：互いに反応しない2つ以上の物質からなる混合物または溶液の意。

単一成分物質：1つの主要成分が80% (w/w) 以上存在する定量的組成によって定義される物質。

多成分物質：2つ以上の主要成分が10% (w/w) 以上、80% (w/w) 未満の濃度で存在する、その定量的組成によって定義される物質。多成分物質は、製造工程の結果である。混合物と多成分物質の違いは、混合物は化学反応を起こさずに2種類以上の物質を混合して得られることである。多成分物質は、化学反応の結果である。

NC：非腐食性

OD：光学濃度

PC：陽性対照。試験系の全成分を含み、陽性反応を誘発することが知られている物質で処理された複製。陽性対照反応の経時的な変動を確実に評価できるようにするために、陽性反応の大きさは過度であってはならない。

性能基準 (PS)：バリデーション済み試験法に基づき、機構上および機能上類似している提唱される試験法が、バリデーション済み試験法に匹敵することの評価根拠となる基準。含まれる内

容な次の通りである。(i) 試験法に必須の要素。(ii) バリデーション済み試験法で許容可能な性能の立証に用いられる化学物質の中から選択された、最小限の参照物質一覧表。(iii) 提唱される試験法が最小限の参照物質一覧表により評価された際、バリデーション済み試験法で得られた結果に基づき立証すべ信頼性および正確性の類似を示す水準。

妥当性：試験法と対象になる作用との関係、およびその試験法が特定の目的に対し意味を持ち、有用であるか否かの関係を示す用語。試験法が対象の生物学的作用を、正しく測定または予測する度合いのことである。妥当性には、試験法の正確性（一致度）の検討が含まれる(20)。

信頼性：同一のプロトコルを用いて試験法を実施した場合、施設内および施設間で経時的に再現可能な度合いを示す尺度。信頼性は、施設内および施設間再現性の算出により評価される(20)。

感度：全ての陽性／活性化学物質のうち、試験法によって正しく分類される割合のこと。区分化の結果が得られる試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する際の重要な検討項目である(20)。

In vivo 皮膚腐食性：皮膚に不可逆的損傷が生じること。すなわち、被験物質を最長4時間適用した後、表皮から真皮にかけて視認できる壊死である。腐食性反応の代表例は、潰瘍、出血および血痂皮で、14日の観察期間終了までに、皮膚の白化による変色、全域に及ぶ脱毛および瘢痕が現れる。疑わしい損傷を評価するためには、病理組織診断を検討する。

特異度：全ての陰性／不活性化学物質のうち、試験法によって正しく分類される割合のこと。区分化の結果が得られる試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する際の重要な検討項目である(20)。

物質：自然状態または製造過程で得られる化学元素およびその化合物の意。特定の製品の安定性維持に必要な添加物、および用いられた製造過程由来の不純物はこれに含まれるが、物質の安定性に影響を与える事なく、または、物質の組成に変化をもたらさずに分離可能な溶媒は除外される。

(試験) 実行：単一の被験物質を対象に、最低3つの同型の皮膚ディスクで同時に試験を行うこと。

被験物質：試験において評価対象となる物質。

経皮電気抵抗 (TER)：抵抗値をキロオームで表した皮膚の電気インピーダンスの尺度のこと。皮膚を透過するイオンをホイートストンブリッジ装置で記録することにより、そのバリア機能を評価する単純かつ頑健な方法。

UVCB：組成が不明であるか、変動する物質、複雑な反応生成物、または生物学的物質。