OECD/OCDE

2014/09/26

試験ガイドライン No.431

In vitro 皮膚腐食性：再構築ヒト表皮（RhE）試験法

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません**。本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。
本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。
This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2014), Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-431-2014.pdf.

©OECD (2014)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at http://www.oecd.org/termsandconditions/

経済協力開発機構 （OECD）の化学物質の 試験に関するガイドライン Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

2014 年 9 月 26 日採択

化学物質の試験に関する OECD ガイドライン

In vitro 皮膚腐食性：ヒト皮膚モデル（再生ヒト表皮：RhE）試験

はじめに

1. 皮膚腐食性とは、国連（UN）勧告「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、皮膚に対して、*表皮*から*真皮*に至る肉眼で認められる壊死として現れる不可逆的組織損傷を生じさせることをいう。この改訂版試験ガイドライン 431 では、UN GHS(1)に基づいた腐食性および非腐食性の物質ならびに混合物を特定することができる *in vitro* 試験の手順を示す。また、この試験手順を用いることにより、腐食性物質の細区分も一部可能である。

2. 皮膚腐食性の評価には、通例として実験動物が使用されてきた（OECD 試験ガイドライン 404[TG 404]；初版採択 1981 年、改訂 1992 年および 2002 年）(2)。しかし、動物愛護の観点から、改訂された TG404 では、バリデーション済みの *in vitro* または *ex vivo* 試験法の実施を含めた階層的試験戦略を用いて皮膚腐食性および皮膚刺激性を決定し、実験動物の疼痛および苦痛を回避することが推奨されている。TG 431（初版採択 2004 年） (3)に加え、皮膚腐食性を評価するための *in vitro* 試験法として他の 2 種類の試験法がバリデーション済みであり、OEDE 試験ガイドライン 430 (4)および 435 (5)に採択されている。また、皮膚刺激性の評価については、TG 404 (2)の階層的試験戦略において用いることができるバリデーション済みの *in vitro* 試験法 3 種類が TG 439 (6)に採択されている。

3. 本試験ガイドラインは、ヒトの健康有害性の評価項目である皮膚腐食性に関するものである。本試験ガイドラインは、ヒトの皮膚上層（*すなわち表皮*）の組織学的、形態学的、生化学的および生理学的特性に全体的に極めて類似するよう設計された再生ヒト*表皮*（RhE）（ヒト由来の非形質転換表皮角化細胞）を用いるものである。本試験ガイドラインは 2004 年に初版が採択され、2013 年および 2014 年の改訂により、類似または改良された RhE 試験法(7)をガイダンス文書 No. 34 (8)の原則に従って評価するための性能標準（PS）（補遺 1）を含むこと

© OECD, (2014)
本資料は、個人的な非営利目的であれば、出典を適切に明記するという条件で、OECD に事前の承諾を得ることなく自由に使用してよい。本資料を商業的に利用する場合は、必ず OECD の書面による承諾を得なければならない。

とした。また、この改訂による他の変更点として、RhE モデル SkinEthi™ RHE[1] および epiCS® （旧名：EST-1000）を用いる 2 種類の試験法を追加し、さらに、これらの試験法を腐食性化学品の細区分に使用できる可能性についても述べている。

4. 本試験ガイドラインでは、市販の RhE モデルを用いた 4 種類のバリデーション済み試験法を示す。このうち、EpiSkin™ Standard Model（SM）および EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT)（EPI-200）を用いた 2 種類の皮膚腐食性試験については、先行バリデーション 試験(9)ならびに皮膚腐食性の評価に関する正式なバリデーション試験(10)(11) (12)が実施済みである (13) (14) （以下の本文中では、バリデーション済み標準試験法[VRM]とする）。この一連の試験の結果より、上述の 2 種類の VRM は腐食性物質（C）と非腐食性物質（NC）とを区別するための規制目的に使用することができ、EpiSkin™ はこれに加えて腐食性物質の細区分にも使用できると推奨されている(15) (16) (17)。残る 2 種類の市販の RhE を用いた *in vitro* 皮膚腐食性試験法についても、PS に基づくバリデーション(18) (19) (20)により、EpiDerm™ を用いた VRM と同様の結果が得られることが明らかにされている。これらは SkinEthic™ RHE および epiCS® （旧名：EST-1000）であり、これらの試験もまた、腐食性物質と非腐食性物質とを区別するための規制目的に使用してもよい(21) (22)。2012 年～2014 年に RhE モデルの製造業者が改良プロトコルにより実施したバリデーション後試験では、被験物質による非特異的な MTT の還元による干渉が補正され、腐食性物質の細区分を行いながら、C/NC の両者の識別の性能に向上が認められている(23) (24)。

5. 皮膚腐食性の評価において、VRM 以外の提案される類似または改良 *in vitro* RhE 試験法を、規制目的で使用することは可能である。ただし、提案試験法を使用する前に、本試験ガイドライン（補遺 1）に示した PS の要件に従って、試験の信頼性、妥当性（正確性）および意図する用途における限界が VRM と同様であることを確認しなければならない。本試験ガイドラインの PS に従って提案された新規または改良試験法については、バリデーションされ、本ガイドラインに収載された場合に限り、データ相互受け入れ制度（Mutual Acceptance of Data：MAD）の対象とする。本試験ガイドラインに収載されている試験法を用いれば、MAD による恩恵を得られる一方で、*in vitro* 皮膚腐食性試験法の結果に対する各国の要件を満たすことができる。

定義

6. 本ガイドラインで用いた定義は補遺 2 に示している。

[1] RhE（＝Reconstructed human Epidermis：再生ヒト表皮）という略語は RhE 技術に基づいたすべてのモデルに対して使用されることに留意されたい。一方、SkinEthicTM モデルとともに使用する RHE という略語は、意味は同様であるがこの特殊な試験法の市販名の一部であり、この場合はすべて大文字で表記する。

© OECD, (2014)

最初に考慮すべき事項

7. 本試験ガイドラインは、皮膚腐食性/刺激性の評価に関する TG 404 に推奨される階層的試験戦略のなかの *in vitro* 皮膚腐食性の要素に適用されるものである(2) (25)。 これにより、UN GHS(1)に基づいた腐食性物質、非腐食性物質および混合物を特定することができ、さらに、腐食性物質および混合物を UN GHS (1)による任意の区分である細区分 1A、ならびに 1B と 1C を統合した細区分（1B/1C）に分類することもできる(23) (24)。本試験ガイドラインにおける限界は、*in vivo* における皮膚腐食性の区分 1C に該当する既知の化学品が限られているために、UN GHS (1)に基づいた皮膚腐食性の細区分 1B と 1C とを区別できないことである。EpiSkin™ 、EpiDerm™ 、SkinEthic™ および epiCS® を用いる試験法により上記の細区分（すなわち、1A、1B/1C、NC の 3 つの区分に分類）を行うことが可能であるが、EpiSkin™ 試験法と他の 3 種類の試験法（EpiDerm™ 、SkinEthic™ および epiCS®）とでは細区分に関する情報提供能力に差が認められる。EpiSkin™ による結果はそのまま使用することができるのに対し、EpiDerm™ 、SkinEthic™ および epiCS® では 1B/1C の区分で過大評価（高い区分への分類）する割合が高くなる（補遺 4 を参照のこと）。したがって、EpiDerm™ 、SkinEthic™ および epiCS® に関しては、区分 1A という予測は区分 1B/1C の過大評価である割合が高いため、1B/1C に分類された化学品は 1B/1C であるとみなしてよいが、3 分間の曝露による細胞生存率が 50%を下回る化学品は、区分 1 と判定するに留めるべきである。過大評価である確率が高いことを認識した上で区分 1A の分類をそのまま容認するか、もしくはこの結果を確認するためにさらに試験を実施するかどうか等、本試験ガイドラインをどのように使用するかは、各加盟国の規制の枠組みの中で決定することとする。

8. バリデーション試験においては、主な工業化学物質を代表する広範な化学品が検討されており、腐食性および非腐食性の特定における本試験ガイドライン収載試験法の妥当性が裏付けられている。バリデーション試験でこれまでに実際に評価された化学品のデータベースは 60 品目に及び、幅広いクラスの化学品が網羅されている(10) (11) (12)。細区分のための分析の感度、特異度、正確性および試験実施施設内での再現性を確認するための試験が試験法の開発者によって行われ、OECD がこの結果を検討した(23) (24)。利用可能なデータ全体に基づくと、本試験ガイドラインは、化学品の幅広いクラスに適用することができる。また、液体、半固体、固体および蝋を含むさまざまな物理的状態の物質に適応可能であり、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。固体は可能な場合は必ず、試験実施前に粉砕して微粉とすべきであるが、これ以外に試料の前処理は不要である。万一、特定の種類の被験物質において本試験ガイドラインに収載されている試験法の適用性を否定するような根拠が得られた場合、この種の被験物質に対しては当該試験法を用いてはならない。また、個別の物質に対する適用性を考慮すると、混合物に対しても本試験ガイドラインを適用することができると考えられるが、混合物の種類および組成は広範にわたり、なおかつ混合物の試験に関して現在公表されている情報は非常に限られていることから、特定の種類の混合物において本試験ガイドラインの適用性を否定するような根拠が得られた場合（例えば、

© OECD, (2014)

(26)で提案された戦略に従って）、この種の混合物に対して本試験ガイドラインを用いてはならない。なお、気体およびエアロゾルについては、バリデーション試験における評価はなされていない(10) (11) (12)。 気体およびエアロゾルに対しても RhE 技術を用いた試験が可能であると考えられるが、現行の本試験ガイドラインでは、これらの試験を認めていない。また、ある種の化学品は細胞生存率の測定に影響を与える可能性があり、適切な対照を用いて補正する必要が生じる場合があることにも注意すること（段落 25～27 を参照のこと）。

9. 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与えるものではないが、健康有害性の評価項目である皮膚刺激性の *in vitro* 試験に関する OECD 試験ガイドライン 439 が、試験プロトコルは異なるものの本試験ガイドラインと同じ RhE 試験システムに基づいていることに留意すること(6)。単回の皮膚曝露後に生じる局所皮膚効果を完全に評価するためには、試験ガイドライン TG 404(2)の補遺に示されている階層的試験戦略に従うことが推奨される(25)。この試験戦略は、生きた動物による試験を考慮する前に、*in vitro* において皮膚腐食性試験（本ガイドラインで述べる）および皮膚刺激性試験を行うものである。ヒト皮膚の使用については、国内的および国際的な倫理的考察および条件が必要であることは周知のとおりである。

10. 本試験ガイドラインでは、VRM に構造的および機能的に類似している、類似および改良された皮膚腐食性試験法(7)のバリデーションの状態（信頼性および妥当性）をガイダンス文書 No. 34 (8)の原則に従って評価するための性能標準（PS）（補遺 1）についても述べる。この PS には、試験法の性能の評価に用いる参照物質の一覧表、新たに提案された試験法の構造的、機能的および手順的な類似性を評価するための試験法の重要要素、ならびに当該試験法が VRM と同等であるとみなされるために最低限必要とされる信頼性および正確性の値が含まれる。参照物質の一覧表内には、試験実施施設が *in vitro* ヒト皮膚モデルの使用における技能の証明に用いる 13 種類の習熟度確認物質のサブセット（表 1）が含まれている（段落 13 および 14 を参照のこと）。

試験の概要

11. 被験物質を、3 次元の RhE モデルに局所塗布する。この 3 次元の RhE モデルはヒト由来の非形質転換表皮角化細胞から構成されるものであり、培養によって多層から成る高度に分化したヒト*表皮*モデルに構築したものである。この RhE モデルは、組織化された基底層、有棘層および顆粒層、ならびにラメラ構造をもつ細胞間脂質を含む多層性の*角質層*から構成される。この細胞間脂質の主な脂質組成は、*in vivo* で認められる脂質組成と同様である。

12. RhE モデル試験の原理は、腐食性物質が拡散または浸食することによって*角質層*を透過することが可能で、下層の細胞層に対して細胞毒性であるという前提に基づいている。細胞生存率は、生体染色色素である MTT（3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド、チアゾリルブルー；CAS 番号 298-93-1）の酵素反応による青色ホルマザン

© OECD, (2014)

塩への変換を、青色ホルマザン塩を組織から抽出して定量することによって測定する(27)。化学品の腐食性の有無は、細胞生存率が所定の閾値を下回るかどうかによって決定する（段落 31 および 32 を参照のこと）。RhE を用いた皮膚腐食性試験法により、OECD ガイドライン 404 (2)に従ってウサギを用いて評価した *in vivo* での皮膚腐食作用を予測できることが明らかにされている。

習熟度確認

13. 試験実施施設は、本試験ガイドラインに準拠した 4 種類のバリデーション済み RhE 試験法のいずれにおいても、それらを日常的に使用する前に表 1 に示す 12 種類の習熟度確認物質を正確に分類することによって試験実施施設の習熟度を確認すること。細区分を行うためにこれらの試験法を用いる場合は、当該試験法による細区分が正確であることも確認しなければならない。

表 1：習熟度確認物質一覧

化学物質 [1]	CASRN	化学物質分類 [2]	UN GHS（in vivo 試験）による区分 [3]	VRM（in vitro 試験）による区分 [4]	MTT 還元剤 [5]	物理的状態
区分 1A の *in vivo* 腐食性物質						
ブロモ酢酸	79-08-3	有機酸	1A	(3) 1A	--	固体
3 フッ化ボロン 2 水化物	13319-75-0	無機酸	1A	(3) 1A	--	液体
フェノール	108-95-2	フェノール類	1A	(3) 1A	--	固体
ジクロロアセチルクロリド	79-36-7	求電子剤	1A	(3) 1A	--	液体
区分 1B/1C の *in vivo* 腐食性物質						
グリオキシル酸一水和物	563-96-2	有機酸	1B/1C	(3) 1B/1C	--	固体
乳酸	598-82-3	有機酸	1B/1C	(3) 1B/1C	--	液体
エタノールアミン	141-43-5	有機塩基	1B	(3) 1B/1C	○	粘稠性
塩酸（14.4%）	7647-01-0	無機酸	1B/1C	(3) 1B/1C	--	液体
***in vivo* 非腐食性物質**						
臭化フェネチル	103-63-9	求電子剤	NC	(3) NC	○	液体
4-アミノ-1,2,4-トリアゾール	584-13-4	有機塩基	NC	(3) NC	--	固体
4-（メチルチオ）ベンズアルデヒド	3446-89-7	求電子剤	NC	(3) NC	○	液体
ラウリン酸	143-07-7	有機酸	NC	(3) NC	--	固体

略語：CASRN＝CAS 登録番号；UN GHS＝国連勧告「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標準試験法；NC＝非腐食性

[1] これらの化学物質は、まず腐食性であるか非腐食性であるかにより分類し、さらに腐食性の細区分および化学物質の種類により細分類した。表に記載した化学物質は、ECVAM による EpiSkin™ および EpiDerm™ のバリデーション試験で使用された物質(10) (11) (12)、ならびに EpiSkin™ (24)、EpiDerm™、SkinEthic™ および epiCS® の開発者により提供されたデータに基づいたバリデーション後試験より選択したものである。特に記載のない限り、市

© OECD, (2014)

販されている化学物質の購入時の純度において試験を行った(10)(12)。この選択にあたっては、可能な限り以下のような物質を含めることとした：(i) VRM により測定または予測可能な腐食性反応の範囲（例えば、非腐食性、弱腐食性ないし強腐食性）を代表する化学物質、(ii)バリデーション試験で用いられた化学物質分類を代表する物質、(iii)化学構造が明確に同定されている物質、(iv)VRM において再現性の高い結果が得られる物質、(v)*in vivo* での標準試験法において確実な結果が得られる物質、(vi)市販されている物質、ならびに(vii) 非常に高額な廃棄コストがかからない物質。

[2]Barratt ら(1998)による化学物質分類(10)。

[3]UN GHS の細区分 1A、1B および 1C には、国連包装等級 I、II および III がそれぞれ対応する。

[4] 表に記載した VRM による *in vitro* での分類予測は、試験法の開発者が行ったバリデーション後試験において EpiSkin™ および EpiDerm™ 試験法（VRM）により得られたものである。

[5]ECVAM による皮膚腐食性試験で得られた生存率の値は、直接的な MTT 還元を考慮した補正を行っていない（バリデーション試験では、死滅させた組織を用いた対照が設けられなかった）。しかし、この表中に示した試験法開発者らによるバリデーション後試験のデータは、適切な対照を用いて得たものである。

14 RhE モデルの使用者は、習熟度確認の一部として、組織のバリア特性が RhE モデル作製者によって明記されたとおりであるかどうかを、モデル受領後に確認することが推奨される。これは、組織の輸送が長距離／長時間であった場合、特に重要である。試験法が首尾よく確立され、当該試験法を使用する習熟度が一度確認された後は、このような確認を定期的に行う必要はない。ただし、試験法を日常的に使用するようになってもバリア特性の評価は引き続き定期的に実施することが推奨される。

手順

15. 以下に、皮膚刺激性評価に用いる本試験ガイドライン収載 RhE 試験法の構成要素および手順を包括して説明する。本試験ガイドラインでの使用における科学的妥当性が認められている RhE モデル、すなわち EpiSkin™（SM）、EpiDerm™（EPI-200）、SkinEthic™ RHE および epiCS® モデル(18) (19) (20) (28) (29) (30) (31) (32) (33)は、市販のものを入手することができる。また、これら 4 種の RhE モデルの標準操作手順書（SOP）が入手可能である(34) (35) (36) (37)。補遺 3 に、これらの試験法の主要な構成要素を示している。試験実施施設で実施する試験にこれらの試験法の一つを用いる場合は、該当する SOP を参照することが勧められる。本試験ガイドラインに収載されている 4 種類の RhE 試験法による試験は、以下の手順に従って実施すること。

RhE 試験法の要素

一般的条件

16. ヒトの非形質転換角化細胞を用いて、表皮を構築すること。機能する*角質層*の下に、生きた表皮細胞からなる複数の細胞層（基底層、*有棘層*および*顆粒層*）が存在すること。*角質層*は、細胞毒性マーカー（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）または Triton X-100）の急速な浸透に耐えられる頑強なバリアとして機能するように、これに必要な脂質プロファイルを有する多層であること。バリア機能を備えていることを立証すること。バリア機能は、固定の曝露時間で曝露したときに組織の生存率を 50%低下させるマーカー物質濃度（IC_{50}）、また

© OECD, (2014)

はマーカー物質を特定の固定の濃度で曝露したときに細胞生存率を 50%低下させるのに必要な曝露時間（ET_{50}）のいずれかを決定することによって評価可能である（段落 18 を参照のこと）。RhE モデルは、物質が*角質層*の周囲を通過して生きた組織へと到達するのを防ぐのに十分な浸透防止機能を備えていること。RhE モデルは、バクテリア、ウイルス、マイコプラズマまたは菌類に汚染されていないこと。

機能条件

生存率

17. 生存率は、MTT 法を用いて定量する(27)。RhE モデルの使用者は、使用した RhE モデルの各バッチが陰性対照に関する所定の基準を満たすことを必ず確認すること。抽出溶媒単独の光学濃度（OD）は、十分に低い値（すなわち OD＜0.1）であること。RhE モデルの皮膚刺激性試験法条件下における陰性対照の OD 値の許容範囲（上限値および下限値）は、RhE モデルの開発者／供給者で確立されており、本試験に収載している 4 種類のバリデーション済み RhE 試験法における許容範囲は表 2 に示すとおりである。陰性対照組織が曝露時間中の培養下で安定であること（その OD 測定値が常に同程度であること）を記録する。

表 2：バッチの品質管理用陰性対照の OD 値の許容範囲

	下限値	上限値
EpiSkin™ (SM)	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
epiCS®	≥ 0.8	≤ 2.8

バリア機能

18. *角質層*およびその脂質組成は、IC_{50} または ET_{50} から、ある種の細胞毒性マーカー（たとえば SDS または Triton X-100）の急速な浸透に耐えられると判断されるものであること（段落 21 を参照のこと）。

形態

19. RhE モデルの組織学的検査を実施して、RhE モデルが多層性のヒト*表皮*様構造（基底層、有棘層、顆粒層および角質層を含む）をもち、ヒト表皮に類似した脂質プロファイルを備えていることを立証すること。

© OECD, (2014)

再現性

20. 試験法の使用者は、陽性対照および陰性対照を用いて当該試験法における経時的再現性を立証すること。また、RhE モデルの開発者／供給者が、*例えば*技能証明用化学物質の一覧表（表1）に記載されているような腐食性または非腐食性の化学物質を用いて経時的再現性を立証するデータを示している場合にのみ当該試験法を用いるべきである。細区分を行うためにこれらの試験法を用いる場合は、当該試験法による細区分の再現性も立証しなければならない。

品質管理（QC）

21. RhE モデルの開発者／供給者は、RhE モデルの各バッチが所定の製品出荷基準を満たすことを保証し、立証すること。製品出荷基準のなかでも、生存率（段落 17）、バリア機能（段落 18）および形態（段落 19）は、特に重要な基準である。RhE モデルの使用者がこれらの情報を試験報 告書に含めることができるよう、これらのデータを使用者に提供すること。腐食性分類について信頼できる予測を得るため、QO により適格であると認められた組織バッチから得られた結果のみを使用する。RhE モデルの開発者 ／供給者はまた、IC_{50} および ET_{50} の許容範囲（上限および下限）を確立する。4 種類のバリデーション済み試験法における IC_{50} および ET_{50} の許容範囲を表 3 に示す。

表 3：QC におけるバッチ出荷基準

	下限値	上限値
EpiSkin™ (SM) （SDS で 18 時間処理）(35)	IC_{50}＝1.0 mg/mL	IC_{50}＝3.0 mg/mL
EpiDerm™ SCT (EPI-200) （1% Triton X-100）(36)	ET_{50}＝4.0 時間	ET_{50}＝8.7 時間
SkinEthic™ RHE （1% Triton X-100）(37)	ET_{50}＝4.0 時間	ET_{50}＝10.0 時間
epiCS® (1% Triton X-100)(38)	ET_{50}＝2.0 時間	ET_{50}＝7.0 時間

被験物質および対照物質の適用

22. 各曝露時間につき、被験物質および対照物質のそれぞれに対して 2 つ以上の複製組織を用いること。固体および液体の被験物質のいずれでも、過剰量を適用するのは避けるべきであるが、表皮表面を均一に覆うのに十分な量（*すなわち*、70 μL/cm^2 または 30 mg/cm^2 以上）を適用する。被験物質が固体の場合、試験法によっては、被験物質と表皮表面の接触を改善するため、適用前に表皮表面を脱イオン水または 蒸留水で湿らせる必要がある(34) (35) (36) (37)。固体は可能な場合は必ず、適用前に粉砕して微粉とする。被験物質は、それに適した方法を用いて適用する（例として、参考文献 12、35～38 を参照のこと）。曝露時間が終了したら、水性緩衝液または 0.9%塩化ナトリウム水溶液を用いて*表皮*を慎重に洗浄し、被験物質 を取り除く。4 種類のバリデーション済み RhE 試験法のうちいずれの試験法を用いるかにより、被

© OECD, (2014)

験物質ごとに 2 ないし 3 段階の曝露時間を設定する（4 種類のバリデーション済み RhE モデルのすべてで 3 分間および 1 時間、EpiSkin™ の場合は 4 時間の曝露時間を追加する）。曝露時のインキュベーション温度は、用いる RhE 試験法および評価を行う曝露時間に応じて室温～37 ºC の範囲とする。

23. 陰性対照および陽性対照（PC）を同時に設け、生存率（陰性対照と比較）、組織のバリア機能および感度（PC と比較）が過去の実績に基づいた許容範囲内にあることを実証する。陽性対照物質としては、使用する RhE モデルに応じて氷酢酸または 8N 水酸化カリウム（8N KOH）が推奨される。ただし、8N KOH は適切な対照を設ける必要がある直接的な MTT 還元剤であることに注意を要する（段落 25 および 26 を参照のこと）。陰性対照には、0.9% (w/v) 塩化ナトリウムまたは水が推奨される。

細胞生存率の測定

24. 本ガイドラインでは、細胞生存率の測定に、定量的測定法である MTT 法を用いることとする (28)。組織試料は、適切な濃度（0.3 または 1 mg/mL）の MTT 溶液中に 3 時間浸漬する。沈殿した青いホルマザン産物を溶媒（*たとえば*、イソプロパノールまたは酸性イソプロパノール）を用いて組織から抽出し、± 30 nm 以内の帯域フィルタを 用いて 570 nm の波長で OD を測定することによってホルマザン濃度を算出する。

25. 被験物質が MTT を青色のホルマザンへと直接還元する作用を有する場合、あるいは被験物質が有色である場合［被験物質がもともと有色であるかもしくは曝露処理中に着色し、ホルマザンと同じ OD が測定される（570±30 nm、主として青色および紫色の化学物質）］、このような被験物質は MTT 法の結果に影響を及ぼす恐れがある。このため、追加の対照を用いて、このような被験物質による干渉を検出し、補正する必要がある（段落 26 および 27 を参照のこと）。特に重要なのは、特定の被験物質が洗浄後も組織から完全に取り除かれていないか、または*表皮*を通過したために、MTT を用いた生存率試験の実施時に組織中に残存している場合である。直接的な MTT 還元作用および被験物質の色による干渉を補正する方法は、各試験法の SOP に詳述されている(34) (35) (36) (37)。このような干渉による非特異的な MTT 還元（NSMTT）および非特異的な着色（NSC）がある場合、組織抽出物の OD が分光光度計の線形範囲を超えて増加することがある。したがって、試験実施施設は、規制目的での被験物質の試験を開始する前に、Sigma-Aldrich 社より市販されている MTT formazan（製品番号 M2003、CAS 番号 57360-69-7）*など*を用い、使用する分光光度計の OD の線形範囲を特定しておくことが重要である。組織抽出物の OD が分光光度計の線形範囲を超えた場合は、酸性イソプロパノールでこれを希釈し、希釈倍数を考慮に入れて NSMTT や NSC の割合（同時に測定した陰性対照に対する相対値 : %）を求め、試験値を補正する。陰性対照に対する NSMTT や NSC の相対値が 50%以上であるような被験物質については、試験結果の取り扱いに注意が必要である。

© OECD, (2014)

26. 直接的な MTT 還元剤を検出するため、新たに調製した MTT 培地に各被験物質を添加する。この混合物を、使用する RhE モデルに応じて 60～180 分間、暗所にて 37°C、5% CO_2 でインキュベートする(34) (35) (36) (37)。対照には、MTT 培地を用いる。被験物質を含んだ MTT 混合液（被験物質が不溶性化合物であれば懸濁液）が青色／紫色に変化した場合、被験物質は MTT を直接還元する物質であると考え、生存能力のない*表皮*を用いてさらに確認試験を実施する。この確認試験には、代謝活性は有しないが、生きている組織と同等量の被験物質を吸収、結合する死滅させた組織を用いる。MTT 還元物質のそれぞれを各曝露時間につき 2 つ以上の死滅させた組織に適用し、これを含めて皮膚腐食性試験を実施する。MTT 還元剤で処理した生きた組織における OD 値と同様の処理をした凍結組織における OD 値の差として組織の真の生存率を求め、同時に試験を行った陰性対照の OD 値でこれを除して相対的な生存率を算出する。

27. 色による干渉を検出するため、有色の化学物質を水（曝露時の環境）やイソプロパノール（抽出溶媒）に添加してスペクトル解析を行い、当該化学物質に対して対照を追加する必要があるか否かを評価する。水やイソプロパノールに加えた化学物質が 570±30 nm の範囲の光を吸収した場合は、着色した対照を設ける。有色の化学物質のそれぞれを各曝露時間につき 2 つ以上の生きた組織に適用し、これを含めて皮膚腐食性試験を実施するが、これらの試料については MTT とのインキュベーションの段階で MTT 溶液の替わりに培地を用いる。生きた組織には固有の生物学的変動がみられるため、（実施するすべてのランにおいて）各曝露時間、および有色の被験物質のそれぞれに対して独立した NSC 対照を設ける必要がある。MTT 溶液でインキュベートした生きた組織における OD 値と MTT を加えない培地でインキュベートした生きた組織における OD 値の差として組織の真の生存率を求め、同時に試験を行った陰性対照の OD 値でこれを除して相対的な生存率を算出する。

許容基準

28. バリデーション済みの RhE モデルを用いた各試験法において、陰性対照物質で処理した組織の OD 値は、表 2 に示すように組織の品質を反映したものでなくてはならず、過去の実績により確立された限度値を下回ってはならない。また、PC（すなわち、氷酢酸または 8N KOH）で処理した組織では、腐食性の化学物質に対する反応が試験条件下で認められなければならない（補遺 3 を参照のこと）。被験物質や対照物質で処理した組織間の変動は、バリデーション済みの各 RhE モデルに対して規定された限度値（補遺 3 を参照のこと）の範囲内でなければならない（例えば、2 つの組織間の変動の差が 30%を超えない等）。陰性対照または PC に許容範囲の逸脱が認められた場合は、当該試験は無効であるとみなされ、再試験を行う必要がある。また、被験物質における変動が規定の範囲を超えた場合にも、再試験を実施しなければならない。

© OECD, (2014)

結果の解釈および予測モデル

29. 各被験物質における OD 値を用い、陰性対照の OD 値を細胞生存率 100%としたときの相対的な細胞生存率を算出する。本試験ガイドラインに収載されている各試験法において被験物質を腐食性または非腐食性に分類するため（または、腐食性の細区分間を行うため）に設定した細胞生存率のカットオフ値を以下の段落 31 および 32 に示している。結果の解釈においては、このカットオフ値を用いること。

30. 試験結果により被験物質の皮膚腐食性の分類が明確に示される場合は、2 つ以上の組織を用いて実施した 1 回の試験のみで十分である。しかし、組織間での測定値の変動が大きい等、明確な結果が得られなかった場合は、2 回目の試験の実施を考慮する。さらに、最初の 2 回の試験の結果が一致しない場合には、3 回目の試験を考慮する。

31. EpiSkin™ を用いる皮膚腐食性試験法(11) (34) (24)における UN GHS (1)の分類システムに基づいた予測モデルを表 4 に示す。

表 4：EpiSkin™ の予測モデル

曝露後の生存率 **（曝露時間：3 分、60 分および 240 分）**	**腐食性分類の予測**
3 分間曝露後の生存率が 35%未満	**腐食性：** • 細区分を行う場合は細区分 1A *とみなす
3 分間曝露後の生存率が 35%以上で、**かつ** 60 分間曝露後の生存率が 35%未満 **または** 60 分間曝露後の生存率が 35%以上で、**かつ** 240 分間曝露後の生存率が 35%未満	**腐食性：** • 細区分を行う場合は、1B と 1C を統合した細区分とみなす
240 分間曝露後の生存率が 35%以上	非腐食性

*) 腐食性の細区分における RhE 試験法の有用性を評価するために作成したデータによると、EpiSkin™ 試験法により区分 1A に分類された物質／混合物の約 22%が、実際には区分 1B または 1C に属するものである可能性がある（すなわち、過大評価）（補遺 4 の表 4.0 を参照のこと）。

32. EpiDerm™ SCT (13) (36)、SkinEthic™ RHE (19) (20) (36)および epiCS® (18) (37)を用いる皮膚腐食性試験法における UN GHS (1)の分類システムに基づいた予測モデルを表 5 に示す。

表 5：EpiDerm™ SCT、SkinEthic™ RHE および epiCS® の予測モデル

曝露後の生存率（曝露時間：3 分および 60 分）	**腐食性分類の予測**
3 分間曝露後の生存率が 50%未満	**腐食性：** • 細区分を行う場合は 1A *とみなす

© OECD, (2014)

3 分間曝露後の生存率が 50%以上で、**かつ** 60 分間曝露後の生存率が 15%未満	**腐食性：** • 細区分を行う場合は、1B と 1C を統合した細区分とみなす
3 分間曝露後の生存率が 50%以上で、**かつ** 60 分間曝露後の生存率が 15%以上	非腐食性

*) 腐食性の細区分における RhE 試験法の有用性を評価するために作成したデータによると、EpiDerm™ 試験法により区分 1A に分類された物質／混合物の約 42%、および SkinEthic™ 試験法および epiCS® 試験法により区分 1A に分類された物質／混合物の約 46%が、実際には区分 1B または 1C に属するものである可能性がある（すなわち、過大評価）（補遺 4 の表 4.0 を参照のこと）。

データおよび報告

データ

33. 各試験について、個々の組織のデータ（*たとえば*、被験物質の OD 値、算出した細胞生存率および分類される区分）を表で報告する。該当する場合、反復試験のデータも含める。加えて、各試験における組織間の生存率の平均値や範囲および CV を報告する。被験物質と MTT 試薬との間に直接的な MTT 還元剤による相互作用がみられた場合、または被験物質が有色であるまたは着色した場合、それらを報告する。

試験報告書

34. 試験報告書には、以下の情報を含めなければならない。

被験物質および対照物質：

- IUPAC または CAS などの化学名、および分かっている場合は CAS 番号
- 物質または混合物の純度および組成（重量百分率で）
- 本試験の実施において重要な物理化学的性状（例えば、物理的状態、安定性、揮発性、pH および水溶性など）
- 該当する場合は、被験物質／対照物質に対する前処理（例えば、加温、粉砕など）
- 保存条件

使用した RhE モデルおよびプロトコル、ならびに必要に応じてその使用の根拠

試験条件：

- 使用した RhE モデル（バッチ番号を含む）
- 測定装置（例えば、分光光度計）の較正情報、細胞生存率の測定に使用した帯域フィルタ、および測定装置の OD の線形範囲
- 使用した特定の RhE モデルを裏付ける性能などのあらゆる情報。

© OECD, (2014)

これには以下の情報を含むべきであるが、これらに限定されるものではない。

i) 生存率

ii) バリア機能

iii) 形態

iv) 再現性および予測能

v) モデルの品質管理（QC）

– 使用した試験手順の詳細。これには以下の情報を含むべきであるが、これらに限定されるものではない。

i) 曝露後の洗浄の手順

ii) OD（細胞生存率）の測定に用いた波長および帯域（フィルタ）

– 試験で用いた用量、曝露時間の長さおよび曝露温度

– 曝露時間ごと、被験物質および対照物質（PC、陰性対照、ならびに該当する場合は NSMTT および NSC）ごとに使用した組織の数

– 直接的な MTT 還元剤や有色の被験物質に対して使用した対照物質の効能

– 試験手順のあらゆる変更についての説明（洗浄の手順を含む）

– モデルの過去のデータに対する言及。これには以下の情報を含むべきであるが、これらに限定されるものではない。

i) 過去のデータに言及したうえで QC データが許容可能かどうかを示す

ii) 陽性対照および陰性対照の平均値および範囲に言及したうえで、陽性対照および陰性対照の測定値が許容可能かどうかを示す

iii) 組織間の変動の過去のデータに言及したうえで試験結果が許容可能かどうかを示す

– 使用した RhE モデルに基づいて適用した判定基準／予測モデルについての説明

結果：

– 曝露時間ごと、試験ごと、組織ごとの測定値、平均値、範囲および CV、ならびに分類された区分について個々の被験物質および対照物質のデータを示す表

– 直接的な MTT 還元剤や有色の被験物質に対して使用した対照物質における結果

– 観察されたその他の作用の説明

– 用いた予測モデル／判定基準に言及したうえで分類された区分を示す

結果の考察

結論

© OECD, (2014)

文献

(1) UN (2013), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) OECD (2002), *Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264070622-en.

(3) OECD (2004), *Test No. 431: In vitro skin model*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264071148-en.

(4) OECD (2004), *Test No. 430: In vitro skin corrosion*: *Transcutaneous Electrical Resistance (TER)*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264071124-en.

(5) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro membrane barrier test method*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264067318-en.

(6) OECD (2010), *Test No. 439: In vitro skin irritation: reconstructed human epidermis test method*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264090958-en.

(7) ICCVAM (2004), Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion, NIH Publication Number 04-4510, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf .

(8) OECD (2005), "Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 34, OECD Publishing, Paris.

(9) Botham, P.A. et al. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 6, *ATLA,* Vol. 23, pp. 219-255.

(10) Barratt, M.D. et al. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro,* Vol. 12/4, pp. 471-482.

(11) Fentem, J.H. et al. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro,* 12/4, pp. 483-524.

(12) Liebsch, M. et al. (2000), The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing, *ATLA,* Vol. 28, pp. 371-401.

(13) Balls, M. et al. (1995), Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops, *ATLA,* Vol. 23, pp. 129-147.

© OECD, (2014)

(14) 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. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

(15) 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.
http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf

(16) EC-ECVAM (1998), Statement on the scientific validity of the EpiSkin™ test (an *in vitro* test for skin corrosivity), issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998. Available at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

(17) EC-ECVAM (2000), Statement on the application of the EpiDerm™ human skin model for skin corrosivity testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000. Available at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

(18) Hoffmann, J. et al. (2005), Epidermal-skin-test 1000 (EST-1000)-A new reconstructed epidermis for *in vitro* skin corrosivity testing, *Toxicology in Vitro,* Vol. 19/7, pp. 925-929.

(19) Kandárová, H. et al. (2006), Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for *in vitro* skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431, *Toxicology in Vitro,* Vol. 20/5, pp. 547–559.

(20) Tornier, C., M. Roquet, A.B. Fraissinette (2010), Adaptation of the validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) skin corrosion test method to 0.5 cm^2 tissue sample, *Toxicology in Vitro,* Vol. 24/5, pp. 1379-1385.

(21) EC-ECVAM (2006), Statement on the application of the SkinEthic™ human skin model for skin corrosivity testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006. Available at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

(22) EC-ECVAM (2009), ESAC statement on the scientific validity of an *in-vitro* test method for skin corrosivity testing: the EST-1000, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009. Available at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

(23) OECD (2013), "Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 190, OECD Publications, Paris.

(24) Alépée, N., M.H. Grandidier, J. Cotovio (2014), Sub-categorisation of skin corrosive chemicals by the EpiSkin™ reconstructed human epidermis skin corrosion test method according to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431, *Toxicology in Vitro,* Vol. 28/2, pp. 131-145.

© OECD, (2014)

(25) Worth, A.P. et al. (1998), An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion, *ATLA,* Vol. 26, pp. 709-720.

(26) Eskes, C. et al. (2012), Regulatory assessment of *in vitro* skin corrosion and irritation data within the European framework: Workshop recommendations, *Regulatory Toxicology and Pharmacology,* Vol. 62/2, pp. 393-403.

(27) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods,* Vol. 65/1, pp. 55-63.

(28) Tinois, E. et al. (1994), The Episkin model: Successful reconstruction of human *epidermisin vitro*, in *In vitro Skin Toxicology*, Rougier, A., A.M. Goldberg, H.I. Maibach (eds.), Mary Ann Liebert, Inc., pp. 133-140.

(29) Cannon, C. L. et al. (1994), New epidermal model for dermal irritancy testing, *Toxicology in Vitro,* Vol. 8/4, pp. 889 - 891.

(30) Ponec, M. et al. *(*2000), Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models, *International Journal of Pharmaceutics,* Vol. 203/1-2, pp. 211 - 225.

(31) Tinois, E. et al. (1991), *In vitro* and post –transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute, *Experimental Cell Research,* Vol. 193/2, pp. 310-319.

(32) Parenteau, N.L. et al. (1992), The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function, *Cytotechnology*, Vol. 9, pp. 163-171.

(33) Wilkins, L.M. et al. (1994), Development of a bilayered living skin construct for clinical applications, *Biotechnology and Bioengineering,* Vol. 43/8, pp. 47-756.

(34) EpiSkin™ SOP, *INVITTOX* Protocol No. 118 (December 2011), EpiSkin™ Skin Corrosivity Test. Available at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

(35) EpiDerm™ SOP, Version MK-24-007-0024 (February 2012), Protocol for: *In vitro*EpiDerm™ skin corrosion test (EPI-200-SCT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm. Available at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

(36) SkinEthic™ RHE SOP, *INVITTOX* Protocol (January 2012), SkinEthic™ Skin Corrosivity Test. Available at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

(37) epiCS® SOP, Version 4.1 (January 2012), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems. Available at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

© OECD, (2014)

補遺 1

皮膚腐食性評価のために提案された類似または改良 *in vitro* 再生ヒト*表皮*（RhE）試験法を評価するための性能標準 [2]

はじめに

1. この性能標準（PS）の目的は、新規または改良試験法がその試験目的に合う十分な信頼性および妥当性を備えているかどうかを、その試験法の所有権（すなわち著作権、商標登録または登録）の有無にかかわらず、決定することが可能な基準を示すことである。バリデーション済み承認試験法に基づくこの PS を用いることによって、バリデーション済み承認試験法と同じ生物学的作用または毒性作用を測定または予測するために同様の科学的原則に基づいて新たに提案された類似試験法（口語的には、ゾロ（me-too）試験法と呼ばれる）について、その信頼性および妥当性を評価することが可能である(8)。一方、改良試験法（すなわち、承認済試験法に手を加えた提案試験法）については、新たに提案された変更が試験の性能にどのような影響を与えるか、またバリデーション過程の他の要素で使用する情報にこの変更がどの程度影響を与えるかを決定するために、改良試験法を採用前に評価する必要がある。改良試験法を新規試験法のためのバリデーション過程によって評価するか、または（適切な場合）信頼性および妥当性に関する PS を使用する限定的な評価を実施して評価するかは、新たに提案された変更の数およびその性質、得られたデータ、ならびにそれらの変更を裏付ける文書に応じて決定する(9)。

2. 本試験ガイドラインのもとでの使用が提案される類似（ゾロ）または改良試験法は、TG 404 に示された *in vivo* 腐食性のすべてのスコア、すなわち腐食性（UN GHS 区分 1A および区分 1B/1C）ならびに非腐食性 (1)を代表する化学物質を網羅した参照物質（表 1）を用いて評価し、その信頼性および妥当性を実証する。提案される類似または改良試験法は、2 種類の VRM［EpiSkin™ (SM)および EpiDerm™ SCT (EPI-200)］と同等もしくはこれを上回る信頼性および予測能を有していなければならない。求められる信頼性および予測能については、本補遺の段落 6～10（表 2 および 3）に記述する(11) (12) (24)。新規または改良試験法の信頼性、ならびに非腐食性物質と腐食性物質とを正確に識別する能力および腐食性物質を UN GHS 区分 1A と区分 1B/1C とに細区分する能力は、被験物質の試験に提案試験法を使用する前に決定する。

[2] 本試験ガイドラインに示した PS に従って提案される新規または改良試験法は OECD に提出し、採用されて本試験ガイドラインに収載された後に規制目的に使用すること。

© OECD, (2014)

3. ここに示す PS は、新規または改良 RhE 試験法の評価を行うための米国動物実験代替法検証省庁間連絡委員会（US-ICCVAM PS） (7)に基づいたものである。本 PS では、(i)試験法の重要要素、(ii) 推奨される参照物質、および(iii)提案試験法において最低限必要とされる信頼性および正確性の値の定義について述べる (8)。

試験法の重要要素

4. バリデーション済み試験法における構造的、機能的および手順的な重要要素のことである。これらは 構造的および機能的に類似したまたは改良された提案試験法のプロトコルに示すこと。これらには、その試験法固有の特徴、重要な手順詳細、品質管理で用いる尺度などが含まれる。試験法のこれらの重要要素を厳守することは、提案された類似または改良試験法が VRM と同じ概念に基づくものであることを保証するのに役立つ(6)。試験法のこれらの重要要素は、本試験ガイドラ インの段落 16～32 に詳述した。

一般的条件（段落 16）

機能条件（以下を含む）

- 生存率（段落 17）
- バリア機能（段落 18）
- 形態（段落 19）
- 再現性（段落 20）
- 品質管理（段落 21）

手順的条件（段落 22～32）

例えば表 2、3、4、5 および 6 に示したような特定のパラメータについては、試験法によって固有の値が異なることがあるため、新規のすべての類似または改良試験法において適切な値を設定しなければならない。

最低限評価すべき参照物質の一覧表

5. 参照物質を用いて、提案された類似または改良試験法（構造的および機能的に VRM に 十分類似しているまたは VRM のどれかを若干改良したものであることが証明されているもの）の信頼性および妥当性が VRM と同等以上であるかどうかを確認する(11) (12) (24)。表 1 に示した 30 種類の推奨参照物質には、異なる化学物質分類（*すなわち*、官能基に基づく化学物質区分）を代表する化学物質が含まれており、かつ、TG 404 に示された *in vivo* スコアを代表する化学物質がすべて網羅されている。これら 30 種類の参照物質の内訳は、UN GHS 区分 1A

© OECD, (2014)

の化学物質 10 種類、UN GHS 区分 1B および 1C（*in vivo* データでは、これら 2 つの区分を区別することができない）の化学物質 10 種類、ならびに非腐食性の化学物質 10 種類である。表 1 に列記した化学物質は、バリデーション試験で使用した化学物質から、化学官能性および物理的状 態に基づいて選択したものである(10) (11) (12) (24)。これらの参照物質は、UN GHS (1)に基づいた区分 1A、区分 1B/1C および非腐食性の化学物質および混合物を区別することができる（1A、1B/1C および NC に分類）として提案された類似または改良試験法の信頼性および妥当性を評価するうえで使用すべき最低限の化学物質数を示すものである。腐食性および非腐食性の化学物質ならびに混合物を区別することはできるが腐食性物質の細区分を行うことはできない（C と NC に分類）類似または改良試験法については、表 1 に示した 30 種類の化学物質のうち 20 種類（*斜体*表記ではないもの）を評価するのみでよい（UN GHS 区分 1A の化学物質 5 種類、UN GHS 区分 1B および 1C の化学物質 5 種類、ならびに非腐食性の化学物質 10 種類）。なお、新規の類似試験法の開発／最適化においては、これらの参照物質の使用は可能な限り避けるべきである。表に列記した化学物質が入手できない場合、適切な *in vivo* 参照データが入手可能な他の化学物質を、主として VRM のバリデーション試験で使用した化学物質から選択して使用してもよい。提案試験法の正確性を更に 評価するために、この最低限評価すべき参照物質のほかに他の化学物質分類を代表 するその他の化学物質（ただし、適切な *in vivo* 参照データが入手可能なもの）の評価を追加して もよい。

© OECD, (2014)

表 1 : 類似または改良 *in vitro* RhE 皮膚腐食性試験法の信頼性および予測能を決定するために最低限評価すべき参照物質の一覧表。腐食性物質と非腐食性物質とを区別するために提案される類似または改良試験法（細区分は行わない）においては、*斜体*表記ではない 20 種類の化学物質について試験を行う。細区分 1A、1B および 1C を統合した細区分（以下、1B/1C とする）ならびに非腐食性の化学物質を識別するために提案される類似または改良試験法については、さらに多くの参照物質について試験を行う必要がある。この場合に追加すべき参照物質を*斜体*で示している。

化学物質 [1]	CASRN	化学物質分類 [2]	物理的状態	EpiSkin™ M 4	EpiDerm™ 4	SkinEthic™ 4	epiCS® [4]
***in vivo* 試験の結果に基づいた非腐食性化学物質 [3]**							
臭化フェネチル*	103-63-9	求電子剤	液体	(3) NC	(3) NC	(3) NC	(2) NC
4-アミノ-1,2,4-トリアゾール	584-13-4	有機塩基	固体	(3) NC	(3) NC	(3) NC	(2) NC
4-（メチルチオ）ベンズアルデヒド*	3446-89-7	求電子剤	液体	(3) NC	(3) NC	(3) NC	(2) NC
ラウリン酸	143-07-7	有機酸	固体	(3) NC	(3) NC	(3) NC	(2) NC
1,9-デカジエン	1647-16-1	中性有機物	液体	(3) NC	(3) NC	(3) NC	(2) NC
2,4-ジメチルアニリン	95-68-1	有機塩基	液体	(2) NC (1) 1B/1C	(1) NC (2) 1B/1C	(2) 1B/1C (1) 1A	(1) NC (1) 1B/1C
3,3'-ジチオジプロピオン酸	1119-62-6	有機酸	固体	(3) NC	(3) NC	(3) NC	(2) NC
パルミチン酸メチル	112-39-0	中性有機物	固体	(3) NC	(3) NC	(3) NC	(2) NC
2-ヒドロキシイソ酪酸	594-61-6	有機酸	固体	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(2) 1B/1C
ウンデシレン酸ナトリウム（33%）	3398-33-2	石けん／界面活性剤	液体	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(2) 1B/1C
***in vivo* 試験の結果に基づいた UN GHS 区分 1B および 1C の物質 [3]**							
グリオキシル酸一水和物	563-96-2	有機酸	固体	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(2) 1B/1C
乳酸	598-82-3	有機酸	液体	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(2) 1B/1C
硫酸水素ナトリウム一水和物	10034-88-5	無機塩	固体	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(2) 1B/1C (1) NC	(2) 1B/1C
エタノールアミン*	141-43-5	有機塩基	粘稠性	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(2) 1B/1C
カプリル酸：カプリン酸（60：40）	68937-75-7	有機酸	*液体*	*(3) 1B/1C*	*(3) 1B/1C*	*(3) 1B/1C*	*(2) 1B/1C*
塩酸（14.4%）	7647-01-0	無機酸	液体	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(2) 1B/1C
フルオロほう酸	16872-11-0	無機酸	*液体*	*(3) 1A*	*(3) 1A*	*(3) 1A*	*(2) 1A*
プロピオン酸	79-09-4	有機酸	*液体*	*(3) 1A*	*(3) 1A*	*(3) 1A*	*(2) 1A*

© OECD, (2014)

*2-tert-ブチルフェノール**	88-18-6	フェノール類	*液体*	*(3) 1B/1C*	*(3) 1A*	*(3) 1A*	*(2) 1A*
*シクロヘキシルアミン**	108-91-8	有機塩基	*液体*	*(3) 1B/1C*	*(3) 1A*	*(3) 1A*	*(2) 1A*
***in vivo* 試験の結果に基づいた UN GHS 区分 1A の物質 [3]**							
アクリル酸	79-10-7	有機酸	*液体*	*(3) 1A*	*(3) 1A*	*(3) 1A*	*(2) 1A*
ブロモ酢酸	79-08-3	有機酸	固体	(3) 1A	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
3 フッ化ボロン 2 水化物	13319-75-0	無機酸	液体	(3) 1A	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
フェノール	108-95-2	フェノール類	固体	(3) 1A	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
3 臭化リン	7789-60-8	無機酸	*液体*	*(3) 1A*	*(3) 1A*	*(3) 1A*	*(2) 1A*
硝酸銀	7761-88-8	無機塩	*固体*	*(1) 1A (2) 1B/1C*	*(3) 1A*	*(3) 1A*	*(2) 1A*
ギ酸	64-18-6	有機酸	*液体*	*(3) 1A*	*(3) 1A*	*(3) 1A*	*(2) 1A*
ジクロロアセチルクロリド	79-36-7	求電子剤	液体	(3) 1A	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
硫酸（98%）	7664-93-9	無機酸	*液体*	*(3) 1A*	*(3) 1A*	*(3) 1A*	*(2) 1A*
N-（3-ジメチルアミノプロピル）-1,3-プロピレンジアミン*	10563-29-8	有機塩基	液体	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(2) 1B/1C

略語：CASRN = CAS 登録番号； UN GHS =国連勧告「化学品の分類および表示に関する世界調和システム」(1)；NC＝非腐食性

[1] これらの化学物質は、まず腐食性であるか非腐食性であるかにより分類し、さらに腐食性の細区分により細分類した。表に記載した化学物質は、ECVAM による EpiSkin™ および EpiDerm™ SCT のバリデーション試験で使用された物質(10) (11) (12)、ならびに EpiSkin™ (24)、EpiDerm™ 、SkinEthic™ および epiCS® の開発者により提供されたデータに基づいたバリデーション後試験より選択したものである。特に記載のない限り、市販されている化学物質の購入時の純度において試験を行った(10) (12)。選択にあたっては、可能な限り以下のような物質を含めることとした : (i) VRM により測定または予測可能な腐食性反応の範囲（例えば、非腐食性、弱腐食性ないし強腐食性）を代表する化学物質、(ii)バリデーション試験で用いられた化学物質分類を代表する物質、(iii)VRM の性能特性を反映する化学物質、(iv)化学構造が明確に同定されている物質、(v)VRM において再現性の高い結果が得られる物質、(vi)*in vivo* での標準試験法において確実な結果が得られる物質、(vii)市販されている物質、ならびに(viii)非常に高額な廃棄コストがかからない物質。アスタリスク（*）を付した化学物質は、直接的な MTT 還元剤として作用する可能性のある物質である。

[2] Barratt ら(1998)による化学物質分類(10)。

[3] UN GHS の細区分 1A、1B および 1C には、国連容器等級 I、II および III がそれぞれ対応する。

[4] 表に記載した VRM による *in vitro* での分類予測は、試験法の開発者が行ったバリデーション後試験中にさまざまな試験法によって得られた。これらの予測は、死滅させた対照組織を用いて直接的な MTT 還元作用を補正したものである。

© OECD, (2014)

信頼性および正確性の値の定義

6. 複数の独立した試験実施施設での使用が予定されている類似のまたは改良された提案試験法では、表 1 に示した 30 種類のすべての参照物質を用いて、少なくとも 3 施設でバリデーション試験を実施し、信頼性および妥当性を確立する（腐食性化学物質の細区分を行えない試験法の場合は、24 種類の参照物質）。しかし、PS に基づいたすべてのバリデーション試験は、国際的なガイドライン(8)に従って、国際的に認定された第三者評価機関によって評価を受けることが重要である。各試験実施施設では、十分な時間間隔を開けて、異なるバッチの組織を用いた独立した試験を 3 回実施し、該当するすべての参照物質を各曝露時間にて検討する。いずれの試験も、被験物質、陰性対照物質および PC のそれぞれについて曝露時間ごとに少なくとも 2 つ以上の組織を用い、直接的な MTT 還元作用および/または色による干渉がある場合には適切な対照を設けること。

7. 提案試験法の信頼性および予測能を算出する際には、以下に示す基準に従い、事前に定義された一貫した方法を用いること。

    1. 施設内再現性（WLR）は、2 つ以上の有効な試験が行われた参照物質における有効な試験のみを用いて分類の一致率に基づいて算出する。加えて、有効な試験が 1 つ以下であった参照物質（WLR の算出から除外）の数および種類、ならびに 2 つまたは 3 つの有効な試験が実施された参照物質（WLR の算出に使用）の数および種類を、試験実施施設ごとに報告する。

    2. 施設間再現性（BLR）の算出にあたっては、試験実施施設ごとに有効な試験全体における生存率の算術平均を用いて各参照物質の最終的な分類を行う。BLR は、各試験実施施設で 1 つ以上の有効な試験が行われた参照物質について、有効な試験のみを用いて分類の一致率に基づいて算出する。いずれかの試験実施施設における有効な試験数が 0 であった参照化学物質（BLR の算出から除外）の数および種類、ならびに試験実施施設全体での有効な試験数が 3～9（各試験実施施設で 1 つ以上）であった BLR の算出に使用することができる参照物質の数および種類を報告する。

    3. 予測能（*例えば*、感度、特異度、および C と NC との分類の正確性）は、試験実施施設ごとに各参照物質における有効な試験のすべてを用いて算出する。この計算は、各試験実施施設の参照物質ごとの有効な試験のそれぞれにおける個々の予測に基づいて行うこととし、他の有効な試験を含めた生存率の算術平均を用いてはならない。

    ここにおいて、有効な試験とは、該当する SOP に基づいた試験の許容基準を満たした試験のことであり、有効なランにおいて実施されたものである。これ以外の試験は、無効であると

© OECD, (2014)

みなされる。また、有効なランとは、該当する SOP に定められている NC および PC の試験許容基準を満たしたランのことであり、これ以外のランは無効であるとみなされる。

施設内再現性

8. 腐食性化学物質と非腐食性化学物質とを区別（ただし、腐食性化学物質の細区分は行わない）するとして提案される類似または改良試験法における施設内再現性の評価では、該当する 24 種類の参照物質に対する独立した異なる試験で得られた分類（腐食性または非腐食性）の施設内の一致度が 90%以上であること（各試験実施施設における EpiSkin™ での実測値は、それぞれ 100%、100%および 96%）。また、区分 1A、区分 1B/1C および非腐食性の化学物質を区別するために提案される類似または改良試験法における施設内再現性の評価では、30 種類の参照物質に対する独立した異なる試験で得られた分類（区分 1A、区分 1B/1C または非腐食性）の施設内の一致度が 80%以上であること（各試験実施施設における EpiSkin™ での実測値は、それぞれ 96%、96%および 88%）。

施設間再現性

9. 腐食性化学物質と非腐食性化学物質とを区別（ただし、腐食性化学物質の細区分は行わない）するとして提案される類似または改良試験法では、該当する 24 種類の参照物質に対する独立した異なる試験で得られた分類（腐食性または非腐食性）の施設間（好ましくは 3 施設以上）の一致度が 80%以上であること（EpiSkin™ での実測値は 88%）。また、区分 1A、区分 1B/1C および非腐食性の化学物質を区別するために提案される類似または改良試験法においては、30 種類の参照物質に対する独立した異なる試験で得られた分類（区分 1A、区分 1B/1C または非腐食性）の施設間（好ましくは 3 施設以上）の一致度が 70%以上であること（EpiSkin™ での実測値は 80%）。

予測能

10. 提案された類似または改良試験法の予測能は、VRM と同等以上とする。腐食性化学物質と非腐食性化学物質とを区別（C と NC に分類）するのみで、腐食性の細区分は行わないとして提案される類似または改良試験法については、該当する 20 種類の参照物質（表 1）における感度および特異度がそれぞれ 95%以上および 70%以上、一致度は 82.5%以上であることとする（表 2）。また、区分 1A、区分 1B/1C および非腐食性の化学物質を区別（1A、1B/1C および NC に分類）するために提案される類似または改良試験法に関しては、EpiSkin™ 試験法および EpiDerm™ 試験法に類似した RhE 試験法について、30 種類の参照物質（表 1）において要求される予測能の下限値を表 3 に示している。

© OECD, (2014)

表 2：腐食性化学物質と非腐食性化学物質とを区別（C と NC に分類）するが、腐食性を細区分することはできないとして提案された類似または改良 RhE 試験法を有効とみなすために要求される感度、特異度および一致度の値。これらの値は、表 1 の斜体表記ではない 20 種類の参照物質における 2 種類の VRM（EpiSkin™ 試験法および EpiDerm™ 試験法）の結果に基づいたものである。

感度	特異度	一致度
≥ 95% （実測値：EpiSkin™ - 100%、EpiDerm™ - 100%）	≥ 70% （実測値：EpiSkin™ - 76.7%、EpiDerm™ - 73.3%）	≥ 82.5% （実測値：EpiSkin™ - 88.3%、EpiDerm™ - 86.7%）

表 3：細区分 1A、1B と 1C を統合した細区分（以下、1B/1C とする）ならびに非腐食性の化学物質を区別（1A、1B/1C および NC に分類）するとして提案された類似または改良 RhE 試験法を有効とみなすために要求される予測能の値*。これらの値は、30 種類の参照物質（表 1 を参照のこと）に対する 2 種類の VRM（EpiSkin™ 試験法および EpiDerm™ 試験法）の結果に基づいたものである。

VRM	EpiSkin™	EpiDerm™
感度（C と NC に分類）	≥ 95% （EpiSkin™ における実測値：100.0%）	≥ 95% （EpiDerm™ における実測値:100.0%）
1A を正しく分類	≥ 80% （EpiSkin™ における実測値：83.3%）	≥ 90% （EpiDerm™ における実測値：90.0%）
1A を 1B/1C に過小評価	≤ 20% （EpiSkin™ における実測値：16.7%）	≤ 10% （EpiDerm™ における実測値：10.0%）
1A を NC に過小評価	0% （EpiSkin™ における実測値：0.0%）	0% （EpiDerm™ における実測値：0.0%）
1B/1C を正しく分類	≥ 80% （EpiSkin™ における実測値：80.0%）	≥ 55% （EpiDerm™ における実測値：60.0%）
1B/1C を 1A に過大評価	≤ 20% （EpiSkin™ における実測値：20.0%）	≤ 45% （EpiDerm™ における実測値：40.0%）
1B/1C を NC に過小評価	≤ 5% （EpiSkin™ における実測値：0.0%）	≤ 5% （EpiDerm™ における実測値：0.0%）
特異度	≥ 70% （EpiSkin™ における実測値：76.7%）	≥ 70% （EpiDerm™ における実測値：73.3%）
NC を 1A に過大評価	≤ 5% （EpiSkin™ における実測値：0.0%）	≤ 5% （EpiDerm™ における実測値：0.0%）
NC を 1B/1C に過大評価	≤ 30% （EpiSkin™ における実測値：23.3%）	≤ 30% （EpiDerm™ における実測値：26.7%）
一致度（C と NC に分類）	≥ 87% （EpiSkin™ における実測値：92.2%）	≥ 87% （EpiDerm™ における実測値：91.1%）
一致度（1A、1B/1C および NC に分類）	≥ 78% （EpiSkin™ における実測値：80.0%）	≥ 72% （EpiSkin™ における実測値：74.4%）

*本試験ガイドラインでは、類似または改良 RhE 試験法における 30 種類の参照物質の結果に基づき、当該試験法を EpiSkin™ の類似試験法または EpiDerm™ の類似試験法として認める。EpiSkin™ 試験法および EpiSkin™ 試験法はいずれも細区分（すなわち、1A、1B/1C および NC に分類）を可能とするが、両試験法には異なる点が認められる（SkinEthic™ および epiCS® は EpiDerm™ と同様）。EpiSkin™ との類似性が立証された RhE 試験法では、予

© OECD, (2014)

測された結果をそのまま使用することができる。しかし、EpiDerm^{TM} との類似性が立証された RhE 試験法では、これに類する 3 種類の試験法における区分 1A という予測は区分 1B/1C の過大評価である割合が高いため、1B/1C に分類された化学品は 1B/1C であるとみなしてよいが、3 分間の曝露による細胞生存率が 50%を下回る化学品は区分 1 と判定するに留めるべきである（本ガイドラインの段落 7 も参照のこと）。過大評価の確率が高いことを認識した上で区分 1A の分類をそのまま容認するか、もしくはこの結果を確認するためにさらに試験を実施するかどうか等、本試験ガイドラインをどのように使用するかは、各加盟国の規制の枠組みの中で決定することとする。

試験許容基準

11. 1 種類以上の参照物質および対照物質に対する 1 回以上の試験が、被験物質および対照物質に対する基準を満たさないなどの理由から不合格であると判断される場合がある（無効な試験）。そのような場合、欠測値を補完するために追加試験（“再試験”）を各試験実施施設につき最大 2 回実施してもよい。再試験の場合には、PC および NC も同時に試験しなくてはならないため、各試験実施施設において各参照物質について追加試験を最大 2 回実施することが可能である。ただし、同一の試験実施施設で、一つの参照物質に対する有効な試験が 4 回以上行われてはならない。過剰なデータの収集、およびこれに続くデータの選択は、不適切であるとみなされる。

12. 再試験を実施しても、すべての各参照物質について有効な試験が 3 回分以上揃うことが、すべての各参加施設で達成されない場合があり、データマトリックスが不完全になることがある。このような場合、以下の 3 つの基準をすべて満たすときのみ、PS に基づいたバリデーション試験のデータセットとして合格と判断する。

    1. 該当する参照物質（腐食性区分 1 と非腐食性を分類する試験法で 24 種類、区分 1A、1B/1C、および非腐食性を分類する試験法では 30 種類）のいずれもが、各試験実施施設においてそれぞれ少なくとも 1 つの完全試験シーケンスをもつこと。

    2. 少なくとも 3 施設の参加施設それぞれにおいて、試験シーケンスの 85%以上が完全試験シーケンスであること（24 種類および 30 種類の参照物質を用いた場合、各施設において許容される無効試験シーケンスの数は それぞれ 3 および 4 である）。

    3. 少なくとも 3 施設の参加施設全体において、試験シーケンスの 90%以上が完全試験シーケンスであること（3 施設で 24 種類および 30 種類の参照物質を用いた場合、全体で許容される無効試験シーケンスの数はそれぞれ 7 および 9 である）。

    ここにおいて、試験シーケンスとは、一つの参照物質に対して単一の試験実施施設で実施された独立した試験の総数のことであり、再試験もこれに含める（計 3 回～5 回の試験）。また、完全試験シーケンスとは、3 回の有効な試験を含む試験シーケンスのことである。有効な試験が 3 回未満であった試験シーケンスは、不完全であるとみなされる。

© OECD, (2014)

補遺 2

定義

正確性：試験法の結果と採択された基準値との間の一致の程度のことである。正確性は、試験法の性能を示す尺度であり、試験法の妥当性を確認するための指標の 1 つである。正確性の替わりに、正しい試験結果の割合を意味する“一致度”という用語が使用される場合もある(9)。

細胞生存率：細胞集団の総活性の尺度となるパラメータであり、細胞内ミトコンドリアの脱水素酵素が生体染色色素である MTT（3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリ ウムブロミド、チアゾリルブルー）を還元する能力として測定する。これは、測定した評価項目および使用した試験デザインにも依存するが、生細胞の総数や活性に相関するパラメータである。

化学品：物質または混合物を指す。

完全試験シーケンス： 3 回の有効な試験を含む試験シーケンスのことである。有効な試験が 3 回未満であった試験シーケンスは、不完全であるとみなされる（以下に示す「試験シーケンス」の定義も参照のこと）。

一致度：分類結果が得られる試験法について、その試験法の性能を示す尺度であり、試験法の妥当性を確認するための指標の 1 つである。一致度の替わりに、正確性という用語が使用される場合もある。一致度とは、陽性または陰性と正しく分類された全被験物質の割合として定義される。一致度は、検討した被験物質の種類における陽性率に強く依存する(9)。

ET_{50}：マーカー物質を特定の固定の濃度で曝露して、細胞生存率を 50%低下させるのに必要な曝露時間を測定することによって求める。IC_{50} も参照のこと。

IC_{50}：固定の曝露時間でマーカー物質を曝露して、組織の生存率を 50%低下させるマーカー物質濃度を測定することによって求める。ET_{50} も参照のこと。

過剰量：*表皮*表面を均一に完全に覆うのに必要な量を上回る被験物質の*表皮*適用量のこと。

ゾロ（Me-too）試験：バリデーション済み公認標準試験法に構造的および機能的に類似した試験法の口語的表現。このような試験法は、今後、Catch-up バリデーションを行う候補となり得る。類似試験法の同義語である(9)。

© OECD, (2014)

混合物：UN GHS(1)では、少なくとも 2 種類以上の互いに反応し合わない物質から構成される混合物または溶液を示す用語のことである。

MTT：3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリ ウムブロミド

NC：非腐食性

OD：光学密度

PC：陽性対照

性能標準（PS）：バリデーション済み試験法に基づく基準のことであり、構造的および機能的に類似した提 案試験法をバリデーション済み試験法と比較してその同等性を評価するときに基準となるものである。性能標準には、（i）試験法の重要要素、（ii）最低限評価すべき参照物質の一覧表（この一覧表中の参照物質は、バリデーション済み試験法の性能が十分であることを立証する際に使用された化学物質のなかから選択する）、（iii）最低限評価すべき参照物質一覧表を用いて、バリデーション済み試験 法に類似した提案試験法を評価したとき、その信頼性および正確性がバリデーション済み試験法と同程度であることを立証することが含まれる(9)。

有効な試験（ラン）：該当する SOP に基づいた NC および PC の試験許容基準を満たした試験（ラン）のことである。これ以外のランは、無効であるとみなされる。

有効な試験（テスト）：該当する SOP に基づいた試験の許容基準を満たした試験のことであり、有効なランにおいて実施されたものである。これ以外のテストは、無効であるとみなされる。

参照物質：バリデーション過程で使用するために選択された化学物質であり、*in vitro*／*in vivo* 参照試験系または対象動物種における反応が既知であるもの。これらの化学物質は、試験法で使用されることが予測される各化学物質分類を代表するものであり、予測される化学物質の反応の程度に関して強～弱～陰性までのすべての範囲を網羅するものである。バリデーション過程の段階が異なる場合、または試験法および試験用途が異なる場合、異なる参照物質が必要となる場合もある(9)。

妥当性：試験法と試験対象となる作用との関係を示すものであり、その試験が特定の目的にとって意義があり、有用であるかどうかを説明するものである。その試験が測りたい生物学的作用を正しく測定または予測しているかの程度を示すものである。妥当性では、試験法の正確性（一致度）も考慮する(9)。

© OECD, (2014)

信頼性：同一プロトコルを用いて試験法を実施したとき、試験実施施設内および試験実施施設間において、経時的に再現性よく試験法が実施される程度を示す尺度のこと。試験実施施設内および試験実施施設間の再現性を算出することによって評価する (9)。

試験（ラン）：ランとは、一つまたは複数の化学物質を陰性対照および PC と同時に検討する試験のことである。

感度：すべての陽性／活性化学物質のうち、当該試験法によって正しく分類された割合のこと。分類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にあたって考慮すべき重要な事項である(9)。

***In vivo* 皮膚腐食性：**皮膚の不可逆的損傷が生じること。すなわち、被験物質を最長 4 時間適用後に生じる*表皮*から真皮にいたるまで肉眼で確認できる壊死である。腐食性反応として代表的に現れるのは、潰瘍、出血および血痂皮で、14 日の観察期間終了までに、皮膚のブランチングによる変色、脱毛の全面的な領域および瘢痕が現れる。疑わしい損傷を評価するためには、病理組織診断を考慮する。

特異度：すべての陰性／不活性化学物質のうち、当該試験法によって正しく分類された割合のこと。分類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にあたって考慮すべき重要な事項である (9).

物質：その状態で自然から産出されるまたは製造過程によって作り出される化学元素およびその化合物を示す用語のことである。ただし、物質の安定性を維持するのに必要なあらゆる添加物および製造過程由来のあらゆる不純物を含んでよいこととし、物質の安定性に影響を与えることなくまたは物質の組成を変更することなく物質から分離可能な溶媒は含まないこととする。

試験（テスト）：該当する SOP に示されるように単一の被験物質を 2 つ以上の組織で同時に検討する試験のことである。

試験シーケンス：一つの参照物質に対して単一の試験実施施設で実施された独立した試験の総数のことであり、再試験もこれに含める。試験シーケンスには、有効な試験および無効な試験の双方が含まれる。

被験物質：試験において評価の対象となる物質。

階層的試験戦略：複数の試験法を順次用いて試験を行うこと。次段階で使用する試験法は、前段階の試験の結果に基づいて決定する(9)。

© OECD, (2014)

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」）：化学品（物質および混合物）を、物理化学的危険性、健康有害性および環境有害性の標準化された種類および程度によって分類し、絵表示、注意喚起語、危険有害性情報、注意書きおよび安全データシートなどよってその情報を伝達するシステムのことであり、これによって危険有害作用に関する情報を周知させ、雇用者、労働者、輸送担当者、消費者、緊急時対応者はもとより、広く人々と環境をその危険有害性から守ることを目指したものである(1)。

© OECD, (2014)

補遺 3

皮膚腐食性の試験に用いるバリデーション済み RhE 試験法の主要要素

試験法の要素	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
モデル表面	0.38cm^2	0.63 cm^2	0.5 cm^2	0.6 cm^2
評価する組織数	各曝露時間で 2 つ以上	各曝露時間で 2～3	各曝露時間で 2 つ以上	各曝露時間で 2 つ以上
適用量および適用方法	液体および粘稠性物質： 50 µL±3 µL (131.6 µL/cm^2) 固体： 20±2 mg (52.6 mg/cm^2)＋NaCl 溶液(9 g/L) 100 µL±5µL 蝋状／粘着性物質： 50±2 mg (131.6 mg/cm^2) ナイロンメッシュ使用	液体： 50 µL (79.4 µL/cm^2) ナイロンメッシュ使用（任意） *被験物質とナイロンメッシュとの適合性を予備検討* 半固体： 50 µL (79.4 µL/cm^2) 固体： 25 µL H_2O（適宜増量可）＋25 mg (39.7 mg/cm^2) 蝋： 15 µL の H_2O を用いて湿らせた組織上に、直径約 8 mm の平坦な「円盤状」に適用	液体および粘稠性物質： 40 µL±3µL (80 µL/cm^2) ナイロンメッシュ使用 *被験物質とナイロンメッシュとの適合性を予備検討* 固体： 20 µL±2µL H_2O＋20±3 mg (40 mg/cm^2) 蝋状／粘着性物質： 20±3 mg (40 mg/cm^2) ナイロンメッシュ使用	液体： 50 µL (83.3 µL/cm^2) ナイロンメッシュ使用 *被験物質とナイロンメッシュとの適合性を予備検討* 半固体： 50 µL (83.3 µL/cm^2) 固体： 25 mg (41.7 mg/cm^2)＋25 µL H_2O （適宜増量可） 蝋状物質： 15 µL の H_2O を用いて湿らせた組織上に、直径約 8 mm の平坦な「クッキー状」に適用
直接的な MTT 還元作用の予備検討	50 µL（液体）または 20 mg（固体）＋ 0.3 mg/mL の MTT 溶液 2 mL 37°C、5% CO_2、95% RH で 180±5 分間 →溶液が青／紫色に変化した場合は、水で死滅させた適切な対照を設ける。	50 µL（液体）または 25 mg（固体）＋ 1 mg/mL の MTT 溶液 1 mL 37°C、5% CO_2、95% RH で 60 分間 →溶液が青／紫色に変化した場合は、凍結死させた適切な対照を設ける。	40 µL（液体）または 20 mg（固体）＋ 1 mg/mL の MTT 溶液 1 mL 37°C、5% CO_2、95% RH で 180±15 分間 →溶液が青／紫色に変化した場合は、凍結死させた適切な対照を設ける。	50 µL（液体）または 25 mg（固体）＋ 1 mg/mL の MTT 溶液 1 mL 37°C、5% CO_2、95% RH で 60 分間 →溶液が青／紫色に変化した場合は、凍結死させた適切な対照を設ける。

© OECD, (2014)

試験法の要素	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
色による干渉の予備検討	10 µL（液体）または 10 mg（固体）＋H_2O 90 µL 室温で 1 5 分間混合 →溶液が着色された場合は、生きた組織の適切な対照を設ける。	50 µL （液体）または 25 mg（固体）＋H_2O 300 µL 37°C、5% CO_2、95% RH で 60 分間 →溶液が着色された場合は、生きた組織の適切な対照を設ける。	40 µL（液体）または 20mg（固体）＋H_2O 300 µL 室温で 60 分間混合 →被験物質が有色である場合は、生きた組織の適切な対照を設ける。	50 µL （液体）または 25 mg（固体）＋H_2O 300 µL 37°C、5% CO_2、95% RH で 60 分間 →溶液が着色された場合は、生きた組織の適切な対照を設ける。
曝露時間および曝露温度	3 分間、60（±5）分間および 240（±10）分間 換気されたキャビネット内 室温（RT、18～28°C）	RT で 3 分間、および 37°C、5% CO_2、95% RH で 60 分間	RT で 3 分間、および 37°C、5% CO_2、95% RH で 60 分間	RT で 3 分間、および 37°C、5% CO_2、95% RH で 60 分間
洗浄	1 倍 PBS 25 mL（2 mL/回）	1 倍 PBS で 20 回、静かに洗い流す	1 倍 PBS で 20 回、静かに洗い流す	1 倍 PBS で 20 回、静かに洗い流す
陰性対照	NaCl 溶液(9 g/L) 50 µL 各曝露時間で実施	H_2O 50 µL 各曝露時間で実施	H_2O 40 µL 各曝露時間で実施	H_2O 50 µL 各曝露時間で実施
陽性対照	氷酢酸 50 µL 4 時間曝露のみで実施	8N KOH 50 µL 各曝露時間で試験	8N KOH 40 µL 1 時間曝露のみで実施	8N KOH 50 µL 各曝露時間で試験
MTT 溶液	2 mL（0.3 mg/mL）	300 µL（1 mg/mL）	300 µL（1 mg/mL）	300 µL（1 mg/mL）
MTT 試験のインキュベーションの時間および温度	37°C、5% CO_2、95% RH で 180（±15）分間	37°C、5% CO_2、95% RH で 180 分間	37°C、5% CO_2、95% RH で 180（±15）分間	37°C、5% CO_2、95% RH で 180 分間
抽出溶媒	酸性イソプロパノール 500 µL （0.04 N HCl を加えたイソプロパノール） （取り出した組織全体を完全に浸す）	イソプロパノール 2 mL （インサート全体から抽出）	イソプロパノール 1.5 mL （インサート全体から抽出）	イソプロパノール 2 mL （インサート全体から抽出）
抽出時間および抽出温度	RT で一晩、遮光	振とうせずに RT で一晩静置、または振とう（約 120 rpm）して RT で 120 分間	振とうせずに RT で一晩静置、または振とう（約 120 rpm）して RT で 120 分間	振とうせずに RT で一晩静置、または振とう（約 120 rpm）して RT で 120 分間
OD の測定	標準フィルタを使用せず 570 nm（545～595 nm）で測定	標準フィルタを使用せず 570 nm（または 540 nm）で測定	標準フィルタを使用せず 570 nm（540～600 nm）で測定	標準フィルタを使用せず 540～570 nm で測定
組織の品質管理	SDS で 18 時間処理 1.0 mg/mL ≤ IC_{50} ≤ 3.0 mg/mL	1% Triton X-100 で処理 4.08 時間 ≤ ET_{50} ≤ 8.7 時間	1% Triton X-100 で処理 4.0 時間≤ ET_{50} ≤ 10.0 時間	1% Triton X-100 で処理 2.0 時間≤ ET_{50} ≤ 7.0 時間

© OECD, (2014)

試験法の要素	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
許容基準	1.陰性対照物質（NaCl）で処理した組織の平均 OD 値が、いずれの曝露時間においても 0.6 以上 1.5 以下であること。 2.陽性対照物質（氷酢酸）に 4 時間曝露した組織の平均生存率（陰性対照に対する相対生存率）が、20%以下であること。 3.生存率 20～100%、OD 値 0.3 以上の範囲で、同じ処理をした 2 つの組織間の生存率の差が 30%を超えないこと。	1. 陰性対照物質（H_2O）で処理した組織の平均 OD 値が、いずれの曝露時間においても 0.8 以上 2.8 以下であること。 2. 陽性対照物質（8N KOH）に 1 時間曝露した組織の平均生存率（陰性対照に対する相対生存率）が、15%未満であること。 3.生存率 20～100%の範囲で、同じ処理をした組織間の変動係数（CV）が 30%以下であること。	1. 陰性対照物質（H_2O）で処理した組織の平均 OD 値が、いずれの曝露時間においても 0.8 以上 3.0 以下であること。 2. 陽性対照物質（8N KOH）に 1 時間曝露（必要に応じ、4 時間での評価を追加）した組織の平均生存率（陰性対照に対する相対生存率）が、15%未満であること。 3. 生存率 20～100%、OD 値 0.3 以上の範囲で、同じ処理をした 2 つの組織間の生存率の差が 30%を超えないこと。	1. 陰性対照物質（H_2O）で処理した組織の平均 OD 値が、いずれの曝露時間においても 0.8 以上 2.8 以下であること。 2. 陽性対照物質（8N KOH）に 1 時間曝露した組織の平均生存率（陰性対照に対する相対生存率）は、20%未満であること。 3. 生存率 20～100%、OD 値 0.3 以上の範囲で、同じ処理をした 2 つの組織間の生存率の差が 30%を超えないこと。

© OECD, (2014)

補遺 4

細区分における試験法の性能

本補遺では、4 種類の試験法の開発者らが試験を行った 80 種の化学品のデータに基づいて算出した各試験法の性能を表にして示す。なお、この計算は OECD 事務局が行い、専門家会議による検閲および同意を得ている(23)。

EpiSkin™、EpiDerm™、SkinEthic™および epiCS® を用いる試験法により細区分（すなわち、1A、1B および 1C、NC の 3 つの区分に分類）を行うことが可能であるが、EpiSkin™ 試験法と他の 3 種類の試験法（EpiDerm™、SkinEthic™および epiCS® ）とでは細区分に関する情報提供能力に差が認められる。EpiSkin™ による結果はそのまま使用することができるのに対し、EpiDerm™ 、SkinEthic™および epiCS® では 1B/1C の区分における過大評価（高い区分への分類）の割合が高いことを考慮に入れる必要がある（補遺 4 の表 4.0 を参照のこと）。したがって、EpiDerm™ 、SkinEthic™ および epiCS® に関しては、1B/1C に分類された化学品は 1B/1C であるとみなしてよいが、3 分間の曝露による細胞生存率が 50%を下回る化学品は区分 1 と判定するに留めるべきである。過大評価である確率が高いことを認識した上で予測の原則に基づいて区分 1A の分類をそのまま容認するか、もしくは 1B/1C であるか否かを確認するためにさらに試験を実施するかどうか等、本試験ガイドラインをどのように使用するかは、各加盟国の規制の枠組みの中で決定することとする。

© OECD, (2014)

表 4.0：4 種類の各試験法につき 2～3 回以上の試験を行った 80 種類の化学品のデータに基づいた各試験法の性能、過大評価率、過小評価率、および正確性（予測能）

化学品全体の統計データ （**80 種類の化学品を 2 回または 3 回試験、すなわち、159 回*または 240 回の分類結果**） *1 品目は、入手不可能であったため 1 回のみ試験				
	EpiSkin™	**EpiDerm™**	**SkinEthic™**	**epiCS®**
過大評価（高い区分への分類）：				
区分 1BC 化学品の 1A への過大評価	21.50%	41.94%	46.24%	45.90%
区分 NC 化学品の 1B/1C への過大評価	20.72%	23.42%	24.32%	28.38%
区分 NC 化学品の 1A への過大評価	0.00%	2.70%	2.70%	0.00%
過大評価された区分 NC 化学品	20.72%	26.13%	27.03%	28.38%
全区分での過大評価率	17.92%	28.33%	30.42%	30.82%
過小評価（低い区分への分類）：				
区分 1A の 1B/1C への過小評価	16.67%	8.33%	13.89%	8.33%
区分 1A の NC への過小評価	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
区分 1BC の NC への過小評価	2.15%	0.00%	7.53%	6.56%
全区分での過小評価率	3.33%	2.47%	5.00%	3.77%
正確な分類：				
正しく分類された 1A 化学品	83.33%	91.67%	86.11%	91.67%
正しく分類された 1B/1C 化学品	76.34%	58.06%	46.24%	47.54%
正しく分類された NC 化学品	79.28%	73.87%	72.97%	71.62%
一致度（予測能）	78.75%	70.42%	64.58%	65.41%

NC＝非腐食性

© OECD, (2014)