OECD/OCDE

2019/06/14

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 (2019), 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-431-2019.pdf.

©OECD (2019)

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

OECD/OCDE 431

2019 年 6 月 14 日
採択

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

In vitro 皮膚腐食性：再構築ヒト表皮（RhE）試験法

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）に定義されるように、被験化学物質の適用後、表皮から真皮まで目視可能な壊死として示される不可逆的な皮膚損傷の発生を指す。本改訂版試験ガイドライン 431 では、UN GHS（1）に従って、非腐食性および腐食性の物質および混合物を同定可能にする in vitro 試験の手順について示す。本ガイドラインにより、腐食性物質の部分的な細区分も可能である。

2. 化学物質の皮膚腐食可能性の評価には、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）；初版 1981 年採択、1992 年、2002 年、2015 年改訂）（2）。現在の TG 431 に加え、化学物質の腐食可能性を検討する別の 2 つの in vitro 試験法が検証済みで、OECD 試験ガイドライン 430（3）および 435（4）として採択されている。さらに、皮膚刺激可能性の試験には、in vitro 試験による OECD TG 439（5）が採択されている。「皮膚腐食性および皮膚刺激性の試験および評価に関する統合的アプローチ（IATA）」に関する文書には、情報源および分析ツールをグループ化した複数のモジュールが記載され、（i）化学物質の皮膚刺激可能性および皮膚腐食可能性の評価について、既存の試験および試験以外のデータを統合し用いる方法に関するガイダンスを示し、また、（ii）さらなる試験を要する場合のアプローチについて提言している（6）。

3. 本試験ガイドラインは、ヒトの健康のエンドポイントである皮膚腐食性を取り扱う。本試験ガイドラインでは、ヒトの皮膚上層部（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を厳密に模倣した再構築ヒト表皮（RhE）（ヒト由来の非形質転換表皮角化細胞から入手）を用いる。本試験ガイドラインは 2004 年に初版が採択され、2013 年、2016 年および 2019 年の改訂により、RhE モデルを用いた追加の試験法が収載された。本試験ガイドラインは 2015 年にも改訂され、腐食性化学物質細区分を裏付ける方法の使用に関する実現性の紹介、IATA に関するガイダンス文書の参照、生存率測定の代替手順使用の紹介を行った。

© OECD, （2019）

本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/で入手可能な条項および条件に従って自由に使用できる。

4. 下記のとおり、本試験ガイドラインには、市販の RhE モデルを用いた 5 種類の検証済み試験法が挙げられている。これらのうち、市販の 2 種類の試験法である EpiSkin™ Standard Model（SM）および EpiDerm™ Skin Corrosivity Test（SCT）（EPI-200）（以下本文ではこれらの「検証済み標準試験法」を VRM、EpiSkin™を VRM1、EpiDerm™を VRM2 と称する）については、皮膚腐食性評価に関するプレバリデーション試験（7）、その後の正式なバリデーション試験（8）（9）（10）が実施済みである（11）（12）。これらの試験結果から、上述の 2 種類の VRM は、腐食性物質（C）と非腐食性物質（NC）とを識別する規制目的に使用でき、さらに、EpiSkin™は腐食性物質細区分の裏付けに使用できるという推奨に至った（13）（14）（15）。それ以外の 2 種類の市販の in vitro 皮膚腐食性 RhE 試験法が、その後、PS に基づくバリデーション（16）（17）（18）に従い、EpiDerm™ SCT と同様の結果を示した。その試験法は、SkinEthic™ RHE1 および EpiCS®（旧名 EST-1000）で、これらも腐食性物質と非腐食性物質を識別する規制目的に使用できる（19）（20）。被験化学物質による非特異的な MTT 還元という干渉を補正した精緻なプロトコールにより、2012～2014 年に RhE モデルの生産者が実施したバリデーション後の試験では、C/NC の識別と腐食性物質細区分の裏付けの両性能が向上した（21）（22）。Epiderm™ SCT、SkinEthic™ RHE および EpiCS®により生成されたバリデーション後のデータについてさらなる統計解析を実施したことで、細区分の予測能を向上させた代替予測モデルが特定された（23）。最後に、LabCyte EPI-MODEL24 は、VRM と科学的類似性が示されたもう 1 つの市販の in vitro 皮膚腐食性 RhE 試験であり、したがって、腐食性物質と非腐食性物質とを識別する規制目的、および腐食性物質細区分の裏付けに使用できる（40）（41）（42）（43）。

5. 皮膚腐食性について、VRM 以外に提唱される類似または改変版の in vitro RhE 試験法を規制目的で使用可能にするには、使用前に、その提唱される使用に関する試験の信頼性、妥当性（正確性）および限界をガイダンス文書 No. 34（25）の原則に従って設定された性能基準（PS）（24）の要件により判定し、VRM との類似性を確保する。PS に従って提唱される新規または改訂版の試験法が審査され、本試験ガイドラインに記載された場合に限り、「データの相互受け入れ」が保証されることになる。本試験ガイドライン記載の試験法を用いると、in vitro 皮膚腐食性試験法の試験結果に関する各国の要件に対処できる一方、「データの相互受け入れ」から有益性を得られる。

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. 本試験ガイドラインは、UN GHS（1）に従って、非腐食性および腐食性の物質および混合物を同定可能にする。本試験ガイドラインは、腐食性の物質および混合物を UN GHS（1）に従って任意の細区分 1A に細区分化すると共に、細区分 1B および 1C の組み合わせをさらに裏付ける（21）（22）（23）。本試験ガイドラインの限界は、一連の周知されている in vivo 腐食性の細区分 1C 化学物質が限られているため、UN GHS（1）に従って、皮膚腐食性の細区分 1B と細区分 1C を識別できないことにある。本試験ガイドラインの下での 5 種類の

©OECD 2019

試験法は、細区分 1A、1B および 1C、NC とを識別できる。

8. 本試験ガイドラインに含まれる試験法を裏付けるバリデーション試験では、主要な個別物質を代表する広範な化学物質が検討されている。非腐食性物質と腐食性物質の識別のため実施されるバリデーション試験の元となるデータベースは、広範な化学物質分類を網羅する 60 品目の化学物質に達した（8）（9）（10）。細区分に向けたアッセイの感度、特異度、正確性および試験実施施設内の再現性を立証する試験が、試験法開発者によりさらに実施され（この場合も、広範な化学物質分類を網羅する 79～80 品目の化学物質を使用）、結果が OECD により検討された（21）（22）（23）。入手可能なデータ全体に基づくと、本試験ガイドラインは、液体、半固体、固体および蝋など、広範な化学物質分類および物理的状態に適用できる。液体は水性か非水性、固体は水溶性か非水溶性について可能である。可能な限り、固体は適用前に粉砕し微粉にすべきであるが、それ以外の試料の前処理は不要である。特定のカテゴリーの被験化学物質について、本試験ガイドライン記載の試験法を適用できないことが証拠により立証可能な場合、その特定のカテゴリーの被験化学物質にこれらの試験法を用いないこと。さらに、本試験ガイドラインは、物質へのその適用性拡大として、混合物に適用可能なことが想定される。ただし、混合物は広範なカテゴリーおよび組成を網羅し、また、混合物の試験について現在入手可能な情報がごく限られることから、特定のカテゴリーの混合物について、本試験ガイドラインを適用できないことが証拠により立証可能な場合（例えば、（26）で提唱された戦略に従って）、本試験ガイドラインをその特定のカテゴリーの混合物に用いないこと。混合物、試験の実施が困難である化学物質（不安定な物質など）、または本ガイドラインに記載されている適用領域の範囲内にあることが明確ではない化学物質の試験にあたっては、実施する試験から科学的に意味のある結果が得られるか否かを前もって検討すること。当該混合物の試験に関する規制要件がある場合、こうした検討は不要である。気体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）（10）。これらは RhE 技術を用いて検討可能と考えられるが、現行の本試験ガイドラインでは、気体およびエアロゾルの試験は行えない。

9. MTT ホルマザンと同じ範囲の光を吸収する被験化学物質、および生体染色色素 MTT を（MTT ホルマザンに）直接還元可能な被験化学物質は、組織生存率の測定結果に干渉するおそれがあり、補正用の適合対照を用いる必要がある。必要とされうる適合対照の種類は、被験化学物質によりもたらされる干渉の種類および MTT ホルマザンの測定に用いられる手順に応じ様々になると考えられる（段落 25～31 参照）。

10. 本試験ガイドラインが皮膚刺激性について提供する情報は十分ではないが、OECD TG 439 では、別のプロトコールを用いているものの、in vitro における皮膚刺激性の健康への影響に具体的に取り組み、同じ RhE 試験系に基づいていることに留意されたい（5）。単回皮膚曝露後の局所皮膚作用の完全な評価については、「試験および評価に関する統合的アプローチに関するガイダンス文書 No. 203」を参照すること（6）。この IATA には、生きている動物による試験を検討する前の、皮膚腐食性（本試験ガイドラインの記載内容など）および皮膚刺激性に関する in vitro 試験の実施が記載されている。ヒトの皮膚の使用は、国内および国際的な倫理的配慮および条件の対象であると認識されている。

©OECD 2019

本試験の概要

11. ヒト由来の非形質転換表皮角化細胞（培養により、多層からなる高度に分化したヒト表皮モデルを形成した細胞）からなる 3 次元 RhE モデルに、被験化学物質を局所適用する。本モデルは、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の細胞間脂質層（in vivo で認められる主要な脂質クラスに類似したクラスを示す）を包含した多層の角質層からなる。

12. RhE 試験法は、腐食性化学物質が拡散または侵食により角質層に浸透可能で、下層の細胞に細胞毒性をもたらすという前提に基づいている。細胞生存率については、生体染色色素 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、チアゾリルブルーテトラゾリウムブロミド；CAS 番号 298-93-1］が青色のホルマザン塩に酵素的に変換されることにより測定され、ホルマザン塩を組織から抽出後定量的に測定する（27）。細胞生存率の低下能が定義された閾値未満の場合、腐食性化学物質と同定される（段落 35 および 36 参照）。RhE ベースの皮膚腐食性試験法は、OECD ガイドライン 404（2）に従ってウサギで評価した、in vivo 皮膚腐食作用について予測することが示されている。

習熟度の立証

13. 本試験ガイドラインを遵守する 5 種類の検証済み RhE 試験法のいずれを定常的に用いる場合も、その前に試験実施施設は、表 1 収載の 12 種類の「習熟度確認物質」を正しく分類することにより、技術的な習熟度を立証する。細区分法を用いる場合も、正しい細区分を立証する。収載した物質が入手できない状況や正当化可能な状況では、表 1 の記載と同じ選択基準が適用されれば、適切な in vivo および in vitro 参照データを入手可能な別の物質を使用できる（例えば、参照化学物質リスト（24）から）。

表 1. 習熟度確認物質一覧表 [1]

物質名	CASRN	化学物質分類 [2]	*In Vivo* 試験結果に基づく UN GHS 区分 [3]	*In Vitro* 試験結果に基づく区分 [4]	VRM での細胞生存率の平均値				物理的状態
					VRM1		VRM2		
					3 分	60 分	3 分	60 分	
細区分 1A の *In Vivo* 腐食性物質									
ブロモ酢酸	79-08-3	有機酸	1A	(3) 1A	3	2.8	3.2	2.8	S
三フッ化ホウ素二水和物	13319-75-01	無機酸	1A	(3) 1A	2.4	4.2	4.4	10.1	L
フェノール	108-95-2	フェノール類	1A	(3) 1A	29.8	21.8	22.6	13.5	S
ジクロロアセチルクロリド	79-36-7	求電子試薬	1A	(3) 1A	5.6	6.3	1.3	1.4	L
細区分 1B および 1C の組み合わせからなる *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 および 1C	(3) 1B および 1C	110.4	22.5	90.4	3.1	S
乳酸	598-82-3	有機酸	1B および 1C	(3) 1B および 1C	80.2	9.4	90	3.5	L
エタノールアミン	141-43-5	有機塩基	1B	(3) 1B および 1C	66.2	40.3	69.7	9.3	粘稠性
塩酸（14.4%）	7647-01-0	無機酸	1B および 1C	(3) 1B および 1C	69.3	5.7	80.8	9	L

©OECD 2019

***In Vivo* 非腐食性物質**

臭化フェネチル	103-63-9	求電子試薬	NC	(3) NC	141	117.2	112.5	71.2	L
4-アミノ-1,2,4 トリアゾール	584-13-4	有機塩基	NC	(3) NC	116.8	120.6	105.7	88.2	S
4-（メチルチオ）-ベンズアルデヒド	3446-89-7	求電子試薬	NC	(3) NC	136.7	150.4	85.4	81.6	L
ラウリン酸	143-07-7	有機酸	NC	(3) NC	102	117.4	90.7	64.4	S

略語：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 = 検証済み標準試験法、EpiSkin™ = VRM1、EpiDerm™ = VRM2；NC = 非腐食性物質

[1] 習熟度確認物質は、まず腐食性物質か非腐食性物質により分類され、次いで腐食性の細区分、化学物質分類の順で分類された。これらの物質は、欧州代替法バリデーションセンター（ECVAM）による EpiSkin™および EpiDerm™のバリデーション試験で用いられた物質（8）（9）（10）、ならびに EpiSkin™（22）、EpiDerm™、SkinEthic™および epiCS®の開発者（23）により提供されたデータに基づくバリデーション後試験から選択された。特に記載のない限り、市販の供給元から購入時に得られた純度で被験物質を検討した（8）（10）。物質の選択では、可能な限り以下の物質を含めている。（i）VRM により、測定または予測可能な腐食性反応の範囲を代表する物質（例えば、非腐食性物質、弱～強腐食性物質）。（ii）バリデーション試験で用いられる化学物質分類を代表する物質。（iii）明確に定義された化学構造を有する物質。（iv）VRM において再現性の高い結果を導く物質。（v）in vivo 標準試験法で最終的な結果を導く物質。（vi）市販されている物質。（vii）法外な廃棄費用を伴わない物質。

[2] Barratt ら（8）により割り当てられた化学物質分類。

[3] UN GHS の 1A、1B および 1C に対応する国連包装等級は、それぞれ I、II および III である。

[4] この表で報告された in vitro における予測は、TG 431 の対象となる 5 種類の試験法すべてで得られたものである。フェノールについては、LabCyte EPI-MODEL24 の実行全体で結果にわずかな不一致（すなわち、1A-1BC-1BC）を認めたが、それ以外の試験法は、試験法開発者により実施されたバリデーション試験またはバリデーション後試験において、これらの分類を達成した。

[5] ECVAM の皮膚腐食性に関するバリデーション試験で得られた生存率の値は、直接的な MTT 還元に関する補正を行わなかった（死亡した対照でのバリデーション試験は実施しなかった）。一方、この表に示した試験法開発者が作成したバリデーション後試験のデータは、適合対照により得られた（23）。

14. 習熟度に関する訓練の一環として、RhE モデル製造者の指定どおり、受領後の組織のバリア特性に関するユーザーの検証が推奨される。このことは、組織の輸送が長距離／長時間にわたる場合、特に重要である。一旦試験法の確立に成功し、その試験法使用の習熟度が立証された場合、こうした検証を定常的に行う必要はないと考えられる。ただし、試験法を定常的に用いる場合、バリア特性の評価を一定の間隔で継続することが推奨される。

手順

15. 本試験ガイドラインの対象となる皮膚腐食性評価用の RhE 試験法について、以下、その構成要素および手順を包括的に記述する。本試験ガイドライン内での使用が科学的に妥当と支持される RhE モデル、すなわち、EpiSkin™（SM）、EpiDerm™（EPI-200）、SkinEthic™ RHE、EpiCS®および LabCyte EPI-MODEL24（16）（17）（19）（28）（29）（30）（31）（32）（33）（40）（41）は、市販品から入手できる。これら 5 種類の RhE モデルの標準操作手順書（SOP）は入手可能で（34）（35）（36）（37）（42）、その試験法の主要な構成要素を補遺 2 に要約する。これらの方法の 1 つを試験実施施設で実行および使用する場合、適切な SOP を参照することが推奨される。本試験ガイドラインの対象となる 5 種類の RhE 試験法による試験では、以下の記述に従う。

©OECD 2019

RhE 試験法の構成要素

条件全般

16. ヒト由来の非形質転換角化細胞を用い、上皮を再構築する。生存上皮細胞の複数の層（基底層、有棘層、顆粒層）が、機能する角質層の下に存在する。角質層は、細胞毒性のベンチマーク化学物質（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る頑健性を備えた機能的バリアとなる、必須の脂質プロファイルを包含した多層とする。バリア機能を立証すべきであるが、このバリア機能については、ベンチマーク化学物質により一定の曝露時間後に組織生存率が 50%低下する濃度（IC50）の測定か、ベンチマーク化学物質を特定の一定濃度で適用した際、細胞生存率が 50%低下するのに必要な曝露時間（ET50）の測定のいずれかにより評価できる（段落 18 参照）。RhE モデルの封じ込め特性により、皮膚曝露モデル不良に導くと考えられる、角質層周囲での物質の生存組織への透過を回避すること。RhE モデルは、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌により汚染されていないこと。

機能条件

生存率

17. 組織生存率の定量に用いるアッセイは、MTT アッセイである（27）。RhE 組織構築物の生存細胞により、生体染色色素 MTT が青色の MTT ホルマザン沈殿物に還元後、本沈殿物をイソプロパノール（または類似の溶剤）を用いて組織から抽出する。抽出溶剤のみの OD は、十分な低値（すなわち 0.1 未満）であること。抽出した MTT ホルマザンは、標準吸光度（OD）の測定か、HPLC/UPLC-分光光度法（38）のいずれかを用い定量できる。RhE モデルのユーザーは、用いる RhE モデルの各バッチが陰性対照の定義基準を満たすよう徹底する。陰性対照の OD 値の許容範囲（上限および下限）は、RhE モデルの開発者／供給元が確立する。本試験ガイドライン記載の 5 種類の検証済み RhE 試験法について、陰性対照の OD 値の許容範囲を表 2 に示す。HPLC/UPLC-分光光度法のユーザーは、陰性対照の許容基準として、表 2 に示す陰性対照の OD の範囲を用いる。陰性対照により処理された組織が、曝露期間持続中の培養において安定であること（同程度の OD 測定結果を提示）を記録する。

表 2. バッチの品質管理のため陰性対照に用いる OD 値の許容範囲

	許容下限	許容上限
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
LabCyte EPI-MODEL24 SCT	≥ 0.7	≤ 2.5

©OECD 2019

バリア機能

18. IC50 または ET50 による推定どおりに、角質層およびその脂質組成が、特定の細胞毒性のベンチマーク化学物質（例えば、SDS または Triton X-100）の急速な浸透に十分に耐えられること（表 3）。用いる RhE モデルの各バッチのバリア機能は、エンドユーザーに組織を供給する際、RhE モデルの開発者／供給元が立証する（段落 21 参照）。

形態

19. RhE モデルの組織学的検査を実施し、基底層、有棘層、顆粒層、角質層を含む多層のヒト表皮様構造を有し、ヒト表皮の脂質プロファイルに類似した脂質プロファイルを示すことを立証する。その組織が適切な形態であることを立証するのに用いる RhE モデルの各バッチの組織学的検査は、エンドユーザーに組織を供給する際、RhE モデルの開発者／供給元が提示する（段落 21 参照）。

再現性

20. 試験法のユーザーは、陽性対照および陰性対照により試験法の経時的再現性を立証する。さらに、RhE モデルの開発者／供給元が、例えば、習熟度確認物質一覧表（表 1）の腐食性および非腐食性の化学物質について、経時的再現性を立証するデータを示している場合のみ、その試験法を用いる。試験法を細区分に用いる場合、細区分に関する再現性も立証する。

品質管理（QC）

21. RhE モデルについては、用いる RhE モデルの各バッチが、定義された製品出荷基準を満たすと開発者／供給元により立証された場合にのみ用い、中でも、生存率（段落 17）、バリア機能（段落 18）、形態（段落 19）の基準を最も重視する。これらのデータについて、試験法のユーザーがその情報を試験報告書に記載できるよう、試験法のユーザーに提供する。QC で許容される組織バッチによりもたらされた結果のみ、腐食性物質の分類について高い信頼性での予測を受け入れることができる。IC50 または ET50 の許容範囲（上限および下限）は、RhE モデルの開発者／供給元が確立する。検証済みの 5 種類の試験法での許容範囲を、表 3 に示す。

©OECD 2019

表 3. QC によるバッチ出荷基準

	許容下限	許容上限
EpiSkin™（SM）（SDS で 18 時間処理）（33）	IC_{50} = 1.0 mg/mL	IC_{50} = 3.0 mg/mL
EpiDerm™SCT（EPI-200）（1% Triton X-100）（34）	ET_{50} = 4.0 時間	ET_{50} = 8.7 時間
SkinEthic™ RHE（1% Triton X-100）（35）	ET_{50} = 4.0 時間	ET_{50} = 10.0 時間
epiCS（1% Triton X-100）（36）	ET_{50} = 2.0 時間	ET_{50} = 7.0 時間
LabCyte EPI-MODEL24 SCT（SDS で 18 時間処理）（42）	IC_{50} = 1.4 mg/mL	IC_{50} = 4.0 mg/mL

被験化学物質および対照物質の適用

22. 各曝露時間に、被験化学物質および対照物質ごとに 2 つ以上の複製組織を用いる。液体および固体の化学物質では、無限用量は回避するが、表皮表面を均一に覆うのに十分な量（すなわち、最低 70 µL/cm^2 または 30 mg/cm^2 を使用）の被験化学物質を適用する。試験法によっては、固体の化学物質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ことで、被験化学物質と表皮表面との接触を改善させる（34）（35）（36）（37）（42）。可能な限り、固体は微粉として検討する。適用する方法が、被験化学物質に対し適切であること（例えば、参考文献（34-37）参照）。曝露期間終了時、水性緩衝液（0.9% NaCl）により被験化学物質を表皮から慎重に洗浄する。5 種類の検証済み RhE 試験法のいずれを用いるかに応じ、被験化学物質ごとに 2～3 回の曝露期間を用いる（5 種類の妥当な RhE モデルすべてについて 3 分間および 1 時間、EpiSkin™では 4 時間の曝露時間を追加）。用いる RhE 試験法および評価する曝露期間に応じ、曝露中のインキュベーション温度は室温と 37ºC の間で変動しうる。

23. 実行ごとに、同時の陰性対照および陽性対照（PC）を用い、組織の生存率（陰性対照を含む）、バリア機能、およびその結果生じる組織感受性（PC を含む）が、定義された過去の許容範囲内であることを立証する。用いる RhE モデルに応じ、提案される PC 化学物質を氷酢酸または 8N KOH とする（詳細については補遺 2 および関連する SOP を参照）。8N KOH は、段落 25 および 26 記載の適合対照を必要としうる直接的な MTT 還元物質であることに留意されたい。提案される陰性対照は、0.9%（w/v）NaCl または水である。

細胞生存率の測定

24. 本試験ガイドラインでは、定量的アッセイである MTT アッセイを用いて細胞生存率を測定する（27）。組織試料を、適切な濃度の MTT 溶液（0.3、0.5、または 1 mg/mL、詳細については補遺 2 および関連する SOP を参照）に 3 時間浸漬する。次に、沈殿した青色のホルマザン生成物を溶剤（例えば、イソプロパノール、酸性イソプロパノール）を用いて組織から抽出し、ホルマザン濃度を、最大±30 nm のバンドパスフィルターにより 570 nm で OD を測定するか、

©OECD 2019

HPLC/UPLC-分光光度法により測定する（段落 30 および 31 参照）（38）。

25. 被験化学物質が MTT を青色のホルマザンに直接還元すること、および／または、被験化学物質が元来または処理手順によりホルマザンと同じ OD 範囲（570 ± 30 nm、主に青色および紫色の化学物質）を吸収する場合、色による干渉が生じることのいずれかにより、被験化学物質は MTT アッセイに干渉するおそれがある。非特異的な MTT 還元（NSMTT）対照や、非特異的な有色（NSC）対照など追加の対照を用い、これらの被験化学物質による干渉の可能性を検出し補正する（段落 26～30 参照）。このことが特に重大となるのは、特定の被験化学物質が洗浄により組織から完全に除去されない場合、あるいは、この化学物質が表皮を浸透したため、MTT での生存率試験実施時に組織に存在する場合である。直接的な MTT 還元および有色の物質による干渉の補正方法に関する詳細な記述は、試験法の SOP において入手可能である（34）（35）（36）（37）（42）。

26. 直接的な MTT 還元物質を同定するには、新たに調製した MTT 培地に各被験化学物質を添加する（34）（35）（36）（37）（42）。被験化学物質を包含した MTT 混合物が青色／紫色に変化した場合、被験化学物質は MTT を直接還元すると推定され、標準吸光度（OD）の測定または HPLC/UPLC-分光光度法の使用とは別に、生存不能な表皮でのさらなる機能検査を実施する。この追加機能検査では、残存する代謝活性のみ有するが、生存組織と同程度の量の被験化学物質を吸収する死亡組織を用いる。各 MTT 還元化学物質を、曝露時間ごとに 2 つ以上の死亡複製組織に適用し、これを皮膚腐食試験全体で実施する。次に、MTT 還元物質に曝露した生存組織で得られた組織生存率から、同じ MTT 還元物質に曝露した死亡組織で得られた非特異的な MTT 還元率を減じることで真の組織生存率を算出し、補正中の試験と同時に実行される陰性対照との相対値（%NSMTT）を算出する。

27. 有色の被験化学物質、または、水かイソプロパノールと接触した場合、着色する被験化学物質による干渉の可能性を同定し、追加管理の必要性を判定するため、水（曝露中の環境）および／またはイソプロパノール（抽出溶液）中の被験化学物質のスペクトル解析を実施する。水および／またはイソプロパノール中の被験化学物質が 570 ± 30 nm の範囲の光を吸収する場合、さらなる有色の対照について実施するか、そうした対照が不要の場合、代わりに HPLC/UPLC-分光光度法を用いる（段落 30 および 31 参照）。標準吸光度（OD）の測定を実施する場合、干渉する有色の各被験化学物質を曝露時間ごとに 2 つ以上の生存複製組織に適用し、これを皮膚腐食試験全体で実施するが、非特異的な有色（NSCliving）対照を生成する MTT でのインキュベーション段階では、MTT 溶液の代わりに培地とインキュベートする。生存組織には固有の生物学的ばらつきがあるため、NSCliving 対照は、（各実行単位で）有色の被験化学物質ごと、曝露時間ごとに同時に実施する必要がある。次に、干渉する被験化学物質に曝露し MTT 溶液とインキュベートした生存組織で得られた組織生存率から、干渉する被験化学物質に曝露し MTT なしの培地とインキュベートした生存組織で得られた非特異的な発色率を減じることで真の組織生存率を算出し、補正中の試験と同時に実行される相対値（%NSCliving）を算出する。

28. 直接的な MTT 還元（段落 26 参照）と色による干渉（段落 27 参照）の両方をもたらすと同定されている被験化学物質も、標準吸光度（OD）の測定を

©OECD 2019

実施する場合、先述の段落に記載した NSMTT 対照および NSCliving 対照とは別に、第 3 の対照を要することになる。このことは、MTT アッセイに干渉する濃色の被験化学物質に通常当てはまり（例えば、青色、紫色、黒色）、その理由は、その物質固有の色が、段落 26 記載のとおり直接的な MTT 還元能の評価を妨げるためである。これらの被験化学物質は生存組織と死亡組織の両方に結合可能なため、NSMTT 対照は、被験化学物質による直接的な MTT 還元の可能性だけでなく、死亡組織への被験化学物質の結合に起因する色による干渉も補正できる。NSCliving 対照は、既に被験化学物質と生存組織との結合に起因する色による干渉を補正しているため、このことは色による干渉の二重補正につながると考えられる。色による干渉での二重補正の可能性を回避するため、死亡組織における非特異的な色（NSCkilled）に関する第 3 の対照の実施を要する。この追加の対照では、被験化学物質を曝露時間ごとに 2 つ以上の死亡複製組織に適用し、これを試験手順全体で実施するが、MTT でのインキュベーション段階では、MTT 溶液の代わりに培地とインキュベートする。独立して実施された試験／実行の回数に関わりなく、被験化学物質ごとに 1 つの NSCkilled 対照で十分であるが、NSMTT 対照と同時に、また可能であれば、同じ組織バッチで実施する。次に、被験化学物質に曝露した生存組織で得られた組織生存率から、%NSMTT と%NSCliving を減じ、干渉する被験化学物質に曝露し MTT なしの培地でインキュベートした死亡組織により得られた非特異的な発色率を加えることで真の組織生存率を算出し、補正中の試験と同時に実行される陰性対照の相対値（%NSCkilled）を算出する。

29. 非特異的な MTT 還元および非特異的な色による干渉から、分光光度計の直線範囲を超える組織抽出物の読み取りが増加しうることに留意されたい。このことに基づき、各試験実施施設は、規制目的での被験化学物質の試験開始前に、市販の供給元由来の MTT ホルマザン（CAS 番号：57360-69-7）を用い、分光光度計の直線範囲を測定する。特に、分光光度計を用いた標準吸光度（OD）の測定が、直接的な MTT 還元物質および色による干渉を有する被験化学物質の評価に適しているのは、直接的な MTT 還元および／または色による干渉に関する補正なしに被験化学物質により得られた組織抽出物の OD が、分光光度計の直線範囲内にある場合、あるいは、被験化学物質により得られた未補正の生存率が既に腐食性物質と定義されている場合である（段落 35 および 36 参照）。それでも、陰性対照の%NSMTT および／または%NSCliving が 50%以上となる被験化学物質の結果は、慎重に取り扱う。

30. MTT アッセイに対するきわめて強力な干渉のため、標準吸光度（OD）の測定と適合しない有色の被験化学物質については、MTT ホルマザンを測定する代替的な HPLC/UPLC-分光光度法を使用できる（段落 31 参照）（37）。HPLC/UPLC-分光光度法システムは、被験化学物質から定量前に MTT ホルマザンを分離できる（38）。このため、HPLC/UPLC-分光光度法を用いる場合、検討中の化学物質とは別に NSCliving 対照および NSCkilled 対照を必要としない。それでも、（段落 26 記載のとおり）被験化学物質が MTT を直接還元すると疑われ、あるいは直接的な MTT 還元能の評価を妨げる色を有する場合、NSMTT 対照を用いる。HPLC/UPLC-分光光度法を用いて MTT ホルマザンを測定する場合、組織生存率は、被験化学物質に曝露した生存組織で得られた MTT ホルマザンのピーク面積について、同時の陰性対照で得られた MTT ホルマザンのピークに対する相対的な割合として算出する。MTT を直接還元可能な被験化学物質の場合、

©OECD 2019

真の組織生存率は、被験化学物質に曝露した生存組織で得られた組織生存率から%NSMTT を減じて算出される。最後に、色による干渉も生じうる直接的な MTT 還元物質の場合、処理後に組織に残留し、MTT をきわめて強力に還元するため、検討対象の組織抽出物の OD（標準吸光度（OD）の測定を使用）やピーク面積（UPLC/HPLC-分光光度法を使用）が分光光度計の直線範囲外に導かれ評価できないが、こうした例は、きわめてまれな状況でのみ生じると予測されることに留意されたい。

31. MTT ホルマザンを測定する場合、HPLC/UPLC-分光光度法は、あらゆる種類の被験化学物質（有色、無色、MTT 還元物質、非 MTT 還元物質）にも使用できる（38）。HPLC/UPLC-分光光度法システムは多種多様であるため、組織抽出物由来の MTT ホルマザン定量に向けシステムを用いる前に、HPLC/UPLC-分光光度法システムの適格性評価について、生物学的分析法バリデーションに関する業界向け米国食品医薬品局（FDA）ガイダンス記載の一連の標準的な適格性評価パラメータに基づき、パラメータの許容基準を満たすことにより立証する（38）（39）。これらの主要パラメータおよびその許容基準を、補遺 4 に示す。一旦補遺 4 に定義された許容基準を満たした場合、当該 HPLC/UPLC-分光光度法システムは適格性があり、本試験ガイドライン記載の実験条件下で MTT ホルマザンを測定できるとみなされる。

許容基準

32. 妥当な RhE モデルを用いた各試験法については、陰性対照で処理された組織は表 2 記載の組織の品質を反映した OD を示し、過去に確立された境界を下回らないこと。PC（すなわち、氷酢酸または 8N KOH）で処理された組織は、当該の試験法条件下で腐食性化学物質に反応する組織能を示すこと（詳細については補遺 2 および関連する SOP を参照）。被験化学物質および／または対照物質の複製組織間のばらつきは、妥当な RhE モデルごとの要件の許容限度内とする（詳細については補遺 2 および関連する SOP を参照）（例えば、2 つの複製組織間の生存率の差は 30%を超えない）。1 回の実行に含まれる陰性対照か PC のいずれかが許容範囲を外れた場合、この実行は適格性なしとみなされ、再度実施すべきである。被験化学物質のばらつきが定義された範囲を外れた場合、その試験を再度実施する。

結果の解釈および予測モデル

33. 各被験化学物質について得られた OD 値を用い、陰性対照の生存率を 100%とした場合の相対的な生存率を算出する。HPLC/UPLC-分光光度法を用いる場合、組織生存率は、被験化学物質に曝露した生存組織で得られた MTT ホルマザンのピーク面積について、同時の陰性対照で得られた MTT ホルマザンのピークに対する相対的な割合として算出する。腐食性と非腐食性の被験化学物質を識別する（あるいは、腐食性物質の様々な細区分間を識別する）細胞生存率のカットオフ値は、本試験ガイドラインが対象とする試験法ごとに、以下の段落 35 および 36 に定義されており、結果の解釈に用いること。

34. 被験化学物質について得られた分類が明確な場合、2 つ以上の複製組織からなる 1 回の試験の実行で十分とする。ただし、複製組織の測定値が一致しないなど結果が境界線上にある場合、2 回目の実行を検討でき、また、最初の 2

©OECD 2019

回の実行間で結果が一致しない場合は 3 回目の実行を検討できる。

35. EpiSkin™による皮膚腐食性試験法（9）（34）（22）の予測モデルを、UN GHS（1）分類システムと関連付け、表 4 に示す。

表 4. EpiSkin™の予測モデル

曝露時点後（「3」分、60 分、240 分）に測定した生存率	**考えられる予測**
3 分間曝露後 35%未満	**腐食性物質：** 任意の細区分 1A*
3 分間曝露後 35%以上、**かつ** 60 分間曝露後 35%未満 **または** 60 分間曝露後 35%以上、**かつ** 240 分間曝露後 35%未満	**腐食性物質：** 任意の細区分 1B および 1C の組み合わせ
240 分間曝露後 35%以上	**非腐食性物質**

*）細区分を裏付けるため、RhE 試験法の有用性評価の観点から生成されたデータによると、EpiSkin™試験法での細区分 1A の結果の約 22%は、実際には細区分 1B または細区分 1C の物質／混合物（すなわち、過大分類）からなる可能性があると示された（補遺 3 参照）。

36. EpiDerm™ SCT（10）（23）（35）、SkinEthic™ RHE（17）（18）（23）（36）、epiCS®（16）（23）（37）、LabCyte EPI-MODEL24（41）（42）による皮膚腐食性試験法の予測モデルを、UN GHS（1）分類システムと関連付け、表 5 に示す。

©OECD 2019

表 5. EpiDerm™ SCT、SkinEthic™ RHE、epiCS®、LabCyte EPI-MODEL24 SCT の予測モデル

曝露時点後（3 分、60 分）に測定した生存率	考えられる予測
EpiDerm™ SCT、SkinEthic™ RHE、epiCS®、LabCyte EPI-MODEL24 SCT のステップ 1	
3 分間曝露後 50%未満	腐食性物質
3 分間曝露後 50%以上、かつ 60 分間曝露後 15%未満	腐食性物質
3 分間曝露後 50%以上、かつ 60 分間曝露後 15%以上	非腐食性物質
EpiDerm™ SCT のステップ 2—ステップ 1 で腐食性物質と同定された物質／混合物の場合	
3 分間曝露後 25%未満	任意の細区分 1A*
3 分間曝露後 25%以上	任意の細区分 1B および 1C の組み合わせ
SkinEthic™ RHE のステップ 2—ステップ 1 で腐食性物質と同定された物質／混合物の場合	
3 分間曝露後 18%未満	任意の細区分 1A*
3 分間曝露後 18%以上	任意の細区分 1B および 1C の組み合わせ
epiCS®のステップ 2—ステップ 1 で腐食性物質と同定された物質／混合物の場合	
3 分間曝露後 15%未満	任意の細区分 1A*
3 分間曝露後 15%以上	任意の細区分 1B および 1C の組み合わせ
LabCyte EPI-MODEL24 SCT のステップ 2—ステップ 1 で腐食性物質と同定された物質／混合物の場合	
3 分間曝露後 15%未満	任意の細区分 1A*
3 分間曝露後 15%以上	任意の細区分 1B および 1C の組み合わせ

* 細区分を裏付けるため、RhE 試験法の有用性評価の観点から生成されたデータによると、EpiDerm™ SCT、SkinEthic™ RHE、epiCS®、LabCyte EPI-MODEL24 SCT 試験法での細区分 1A の結果のそれぞれ約 29%、31%、33%、30%は、実際には細区分 1B または細区分 1C の物質／混合物（すなわち、過大分類）からなる可能性があると示された（補遺 3 参照）。

データおよび報告

データ

37. 各試験での個々の複製組織のデータ（例えば、分類を含む各被験化学物質の OD 値および算出された細胞生存率）について、必要に応じ反復実験のデータを含め表形式で報告する。加えて、各試験での複製組織間の生存率の平均値および範囲ならびに変動係数（CV）を報告する。直接的な MTT 還元物質または有色の被験化学物質が、MTT 試薬との相互作用を認めた場合、被験化学物質ごとに報告する。

©OECD 2019

試験報告書

38. 試験報告書には、以下の情報を含めること。

被験化学物質および対照物質

- 単一成分物質：必要に応じ、また実質的に実行可能な場合など、国際純正・応用化学連合（IUPAC）名または CAS 名、CAS 番号、SMILES 記法または InChI コード、構造式、純度、不純物の化学的同一性などでの化学物質の識別。
- 多成分物質、UVCB、および混合物：可能な限り成分の化学的識別情報（上記参照）、定量的発生、関連する物理化学的特性により特徴付ける。
- 物理的外観、水溶性、およびさらに関連する物理化学的特性。
- 入手可能であれば、供給元、ロット番号。
- 該当する場合、試験前の被験化学物質／対照物質の処理（例えば、加温、粉砕）。
- 既知の場合、被験化学物質の安定性、使用期限または再分析日。
- 保管条件。

用いた RhE モデルおよびプロトコール、ならびにその根拠（該当する場合）

試験条件：

- 用いた RhE モデル（バッチ番号を含む）。
- 測定装置（例えば、分光光度計）の校正情報、（該当する場合）MTT ホルマザンの定量に用いた波長およびバンドパス、ならびに測定装置の直線範囲。
- MTT ホルマザンの定量に用いた方法の記述。
- 該当する場合、HPLC/UPLC-分光光度法システムの適格性評価に関する記述。
- 用いた特定の RhE モデルについて、その性能を含めた完全な裏付け情報。これには以下の情報を含むべきであるが、これらに限定されない。
  - i）生存率
  - ii）バリア機能
  - iii）形態
  - iv）モデルの品質管理（QC）
- モデルの過去のデータに対する言及。これには、過去のバッチデータに関連する QC データの許容性を含むべきであるが、これに限定されない。
- 試験法実施の際、定常的に用いる前の習熟度確認物質の試験による習熟度の立証。

©OECD 2019

試験手順：

- 用いた試験手順の詳細（曝露期間後に用いた洗浄手順を含む）。
- 用いた被験化学物質および対照物質の用量。
- 曝露期間の持続期間および曝露温度。
- 該当する場合、直接的な MTT 還元物質および／または有色の被験化学物質に用いた対照物質の表示。
- 曝露時間ごと、被験化学物質ならびに対照物質（PC、陰性対照および NSMTT、該当する場合、NSCliving および NSCkilled）ごとに用いた複製組織数。
- 用いた RhE モデルに基づいて適用した判定基準／予測モデルの記述。
- 試験手順（洗浄手順を含む）の変更に関する記述。
- 実行および試験の許容基準。
- 過去のデータに基づく陽性対照および陰性対照の平均値および許容範囲。
- 陽性対照および陰性対照に関する複製組織間の許容可能なばらつき。
- 被験化学物質に関する複製組織間の許容可能なばらつき。

結果：

- 曝露期間ごと、実行ごとおよび複製組織測定ごとにみた、OD または MTT ホルマザンのピーク面積、組織生存率、組織生存率の平均値、複製組織間の差、標準偏差（SD）および／または CV など、該当する場合の個々の被験化学物質および対照物質のデータを示した表。
- 該当する場合、OD または MTT ホルマザンのピーク面積、%NSMTT、%NSCliving、%NSCkilled、複製組織間の差、SD および／または CV（該当する場合）、ならびに最終的に補正した組織生存率など、直接的な MTT 還元物質および／または有色の被験化学物質に用いた対照物質の結果。
- 定義された実行および試験の許容基準との関連で、被験化学物質および対照物質により得られた結果。
- それ以外に観察された影響の記述。
- 用いた予測モデル／判定基準を参照して得られた分類。

結果の考察：

結論：

©OECD 2019

参考文献

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. (2015). Guideline for Testing of Chemicals. (No. 404.): Acute Dermal Irritation, Corrosion, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
3. OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (No. 430.): In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER). 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. 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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
6. OECD. (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of 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., Ponec 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. Toxicol.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., Holzhutter 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. Toxicol.in Vitro 12, 483-524.
10. Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, ATLA 28, pp. 371-401.
11. 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. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation

©OECD 2019

of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23, 129-147.

12. 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].

13. 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]

14. 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://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html].

15. 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].

16. Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for In Vitro Skin Corrosivity Testing. Toxicol.In Vitro 19, 925-929.

17. Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for In Vitro Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. Toxicol.In Vitro 20, 547 559.

18. Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm2 Tissue Sample. Toxicol. In Vitro 24, 1379-1385.

19. 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://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html].

20. 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://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html].

21. OECD. (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety

©OECD 2019

Publications, Series on Testing and Assessment (No. 190.). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

22. Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (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. Toxicol.In Vitro 28, 131-145.

23. Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No. 431. Toxicol. In Vitro 29, 2055 2080.

24. OECD. (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

25. 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.

26. Eskes C. et al. (2012). Regulatory Assessment of In Vitro Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.Toxicol.Pharmacol. 62, 393-403.

27. Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Methods 65, 55-63.

28. Tinois E., et al. (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human Epidermis In Vitro. In: In Vitro Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.

29. Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. Toxicol.in Vitro 8, 889 - 891.

30. Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203, 211 - 225.

31. Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). In Vitro and Post Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. Exp. Cell Res. 193: 310-319.

32. Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. Cytotech. 9, 163-171.

33. Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. Biotech.Bioeng.43/8, 747-756.

©OECD 2019

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

35. EpiDremTM SOP. (February 2012). Version MK-24-007-0024 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://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html].

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

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://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html].

38. Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLCspectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in Preparation.

39. US FDA. (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Available at: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

40. Katoh M., Hamajima F., Ogasawara T., and Ken-ichiro Hata. (2010). Assessment of the human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for in vitro skin corrosion testing according to the OECD test Guideline 431. J Toxicol. Sci. 35, 411-417.

41. LabCyte Validation Management Team (2018). Validation Study for in vitro skin corrosion test method using reconstructed human epidermal tissue LabCyte EPI-MODEL24. Available at: [http://www.jacvam.jp/files/doc/01_05/01_05_Z1.pdf].

42. LabCyte EPI-MODEL24 SCT SOP, Version 1.6. (May, 2017). Skin corrosion test using the reconstructed human model "LabCyte EPI-MODEL24". Available at: [http://www.jacvam.jp/files/doc/01_05/01_05_Z2.pdf].

43. Report of the Peer-review of the validation study for LabCyte EPI-MODEL24 In Vitro Skin Corrosion Test Method. Available at [http://www.jacvam.jp/files/doc/01_05/01_05_Z3.pdf].

©OECD 2019

補遺 1—定義

正確性：試験法の結果と、容認されている参照値との間の一致の程度。試験法の性能を示す尺度であり、妥当性の一側面である。この用語はしばしば、試験法の正しい結果の割合を意味する一致率と同義で用いられることが多い（25）。

細胞生存率：細胞集団の全体的な活動性を測定するパラメータであり、例えば、細胞内ミトコンドリア脱水素酵素による生体染色色素 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）還元能として測定される。細胞生存率は、測定するエンドポイントおよび用いる試験デザインにもよるが、生細胞の総数および／または生命力と相関する。

化学物質：物質または混合物を意味する。

一致：分類結果をもたらす試験法について、その試験法の性能を示す尺度であり、妥当性の一側面である。この用語は正確性と時に同義で用いられ、陽性か陰性に正しく分類されるすべての被験化学物質の割合と定義される。一致は、検討中の被験化学物質の種類における陽性の発現率に大きく左右される（25）。

ET50：ベンチマーク化学物質を特定の一定濃度で適用した際、細胞生存率が 50%低下するのに必要な曝露時間の測定により推定できる。IC50 も参照。

GHS（化学品の分類および表示に関する世界調和システム）：ヒト（雇用者、労働者、輸送者、消費者および緊急時対応者など）および環境を保護することを目的として有害作用に関する情報を伝達するために、物理的危険性、ならびに健康および環境有害性に基づいてその種類および程度を標準化し、ピクトグラム、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、対応する伝達要素を取り扱うことで化学品（物質および混合物）の分類を提案するシステム（1）。

HPLC：高速液体クロマトグラフィー。

IATA：試験および評価に関する統合的アプローチ。

IC50：ベンチマーク化学物質の一定の曝露時間後、組織生存率が 50%低下する濃度（IC50）の測定により推定できる。ET50 も参照。

無限用量：表皮表面を完全かつ均一に覆うのに必要な量を超えて、表皮に適用される被験化学物質の量。

混合物：2 種類以上の、互いに反応しない物質からなる混合物または溶液。

単一成分物質：定量的組成により定義され、1 つの主成分が 80%（w/w）以上存在する物質。

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、チアゾリルブルーテトラゾリウムブロミド。

©OECD 2019

多成分物質：定量的組成により定義され、複数の主成分が 10%（w/w）以上 80%（w/w）未満の濃度で存在する物質。多成分物質は、製造工程に起因して生じる。混合物と多成分物質との差異は、混合物の場合、化学反応なしに 2 種類以上の物質を混合して得られるのに対し、多成分物質の場合、化学反応の結果生じることにある。

NC：非腐食性物質。

NSCkilled 対照：死亡組織における非特異的な色に関する対照。**NSCliving 対照：**生存組織における非特異的な色に関する対照。NSMTT：非特異的な MTT 還元。

OD：光学濃度

PC：陽性対照。試験系のすべての要素を含み、陽性反応の誘導が知られている物質により処理される複製組織。陽性対照の反応の経時的ばらつきを確実に評価可能にするため、陽性反応の規模を過度にしないこと。

性能基準（PS）：検証済みの試験法に基づく複数の基準からなり、機械的および機能的に類似している提案された試験法の同等性評価の基盤となる。基準に挙げられているのは以下のとおりである。（i）試験法で必須の構成要素。（ii）検証済みの試験法について、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、参照化学物質に関する最低限のリスト。（iii）検証済みの試験法で得られた結果に基づき提案された試験法について、この参照化学物質に関する最低限のリストを用いて評価した場合、立証すべき信頼性および正確性が同程度のレベルであること（25）。

妥当性：試験法とその対象となる作用との関連性、およびその試験が特定の目的にとって意義や有用性があることの是非を説明するもの。当該の試験法が試験対象となる生物学的作用を正確に測定または予測する程度を示す。妥当性では、試験法の精確さ（一致率）も考慮される（25）。

信頼性：同じ試験手順を用いて実施した場合に得られる経時的な施設内および施設間再現性の程度を表す尺度。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り評価される（25）。

実行：1 回の実行は、陰性対照および PC と同時に検討された 1 つまたは複数の被験化学物質からなる。

感度：試験方法によって正確に分類されるすべての陽性の化学物質または活性のある化学物質の割合。分類結果をもたらす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事項である（25）。

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、被験化学物質を最長 4 時間適用後に認められる、表皮から真皮までの目視可能な壊死である。腐食性反応では潰瘍、出血、血性痂皮が典型的にみられ、また、14 日目の観察終了までに皮膚の脱色に起因する変色、完全な脱毛領域、および瘢痕が典型的に生じる。疑わしい病変を評価するには、病理組織検査を検討する。

特異度：試験方法によって正確に分類されるすべての陰性の化学物質または不

©OECD 2019

活性な化学物質の割合。分類結果をもたらす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事項である（25）。

物質：自然の状態の、または製造工程で得られる化学元素とその化合物を意味し、その製品の安定性を保つために必要な添加物や、製造過程由来の不純物はすべて含まれるが、その物質の安定性に影響を及ぼすことも、その組成を変化させることもなく分離される溶剤はいずれも除く。

被験化学物質：検討中の化学物質を意味する。

UPLC：超高速液体クロマトグラフィー。

UVCB：組成が未知または変化する物質、複雑な反応生成物または生物材料。

©OECD 2019

補遺 2—皮膚腐食性試験での検証済み RhE 試験法の主要な試験法構成要素

番号	1	2	3	4	5
試験法の構成要素	**EpiSkin™**	**EpiDerm™ SCT**	**SkinEthic™ RHE**	**epiCS®**	**LabCyte EPI-MODEL24 SCT**
モデル表面積	0.38 cm^2	0.63 cm^2	0.5 cm^2	0.6 cm^2	0.3 cm^2
複製組織数	曝露時間ごとに 2 つ以上	曝露時間ごとに 2 つ～3 つ	曝露時間ごとに 2 つ以上	曝露時間ごとに 2 つ以上	曝露時間ごとに 2 つ以上
投与量および適用	液体および粘稠性：50 ± 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 ± 5 µL 蝋状／粘着性：ナイロンメッシュを用い 50 ± 2 mg（131.6 mg/cm^2）	液体：ナイロンメッシュを用いる場合も用いない場合も、50 µL（79.4 µL/cm^2） *被験化学物質とナイロンメッシュとの適合性について予備試験を実施* 半固体：50 µL（79.4 µL/cm^2） 固体：H_2O 25 µL（または必要量）+ 25 mg（39.7 mg/cm^2） 蝋：H_2O 15 µL で湿らせた組織上に、直径約 8 mm の平坦な「円盤状」の一片を配置。	液体および粘稠性：ナイロンメッシュを用い 40 ± 3 µL（80 µL/cm^2） *被験化学物質とナイロンメッシュとの適合性について予備試験を実施* 固体：H_2O 20 µL ± 2 µL + 20 ± 3 mg（40 mg/cm^2） 蝋状／粘着性：ナイロンメッシュを用い 20 ± 3 mg（40 mg/cm^2）	液体および粘稠性：ナイロンメッシュを用い 50 µL（83.3 µL/cm^2） *被験化学物質とナイロンメッシュとの適合性について予備試験を実施* 半固体：50 µL（83.3 µL/cm^2） 固体：25 mg（41.7 mg/cm^2）+ H_2O 25 µL（または必要に応じそれ以上） 蝋状／粘着性：H_2O 15 µL で湿らせた組織上に、直径約 8 mm の平坦な「クッキー状」の一片を配置。	液体および粘稠性：50 µL（166.7 µL/cm^2） 固体：50 ± 2 mg（166.7 mg/cm^2）+ H_2O 50 µL 蝋状：容積式ピペットを用い、液体および粘稠性物質として処理する。

©OECD 2019

番号	1	2	3	4	5
試験法の構成要素	**EpiSkin™**	**EpiDerm™ SCT**	**SkinEthic™ RHE**	**epiCS®**	**LabCyte EPI-MODEL24 SCT**
直接的な MTT 還元の事前チェック	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、相対湿度（RH）95%で 180 ± 5 分間 ➔ 溶液が青色／紫色に変化した場合、水で死滅させた適合対照を実行する。	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 ➔ 溶液が青色／紫色に変化した場合、凍結死させた適合対照を実行する。	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 ➔ 溶液が青色／紫色に変化した場合、凍結死させた適合対照を実行する。	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 ➔ 溶液が青色／紫色に変化した場合、凍結死させた適合対照を実行する。	50 µL（液体）または 50 mg（固体）+ 0.5 mg/mL の MTT 溶液 500 µL、37°C、5% CO_2、95% RH で 60 分間 ➔ 溶液が青色／紫色に変化した場合、凍結死させた適合対照を実行する。
色による干渉の事前チェック	10 µL（液体）または 10 mg（固体）+ H_2O 90 µL、室温（RT）で 15 分間混合 ➔ 溶液が着色した場合、生存している適合対照を実行する。	50 µL（液体）または 25 mg（固体）+ H_2O 300 µL、37°C、5% CO_2、95% RH で 60 分間混合 ➔ 溶液が着色した場合、生存している適合対照を実行する。	40 µL（液体）または 20 mg（固体）+ H_2O 300 µL、RT で 60 分間混合 ➔ 溶液が着色した場合、生存している適合対照を実行する。	50 µL（液体）または 25 mg（固体）+ H_2O 300 µL、37°C、5% CO_2、95% RH で 60 分間混合 ➔ 溶液が着色した場合、生存している適合対照を実行する。	50 µL（液体）または 50 mg（固体）+ H_2O 500 µL、37°C、5% CO_2、95% RH で 60 分間混合 ➔ 溶液が着色した場合、生存している適合対照を実行する。
曝露時間および曝露温度	3 分、60 分（±5 分）および 240 分（±10 分）換気されたキャビネット内、室温（RT：18～28°C）	RT で 3 分、および 37°C、5% CO_2、95% RH で 60 分	RT で 3 分、および 37°C、5% CO_2、95% RH で 60 分	RT で 3 分、および 37°C、5% CO_2、95% RH で 60 分	RT で 3 分、および 37°C、5% CO_2、95% RH で 60 分
洗浄	1 x PBS 25mL（2 mL/回）	1 x PBS の一定の弱流で 20 回	1 x PBS の一定の弱流で 20 回	1 x PBS の一定の弱流で 20 回	1 x PBS の一定の強流で 10 回以上
陰性対照	NaCl 溶液（9 g/L）50 µL 曝露時間ごとに検討	H_2O 50 µL 曝露時間ごとに検討	H_2O 40 µL 曝露時間ごとに検討	H_2O 50 µL 曝露時間ごとに検討	H_2O 50 µL 曝露時間ごとに検討
陽性対照	氷酢酸 50 µL 4 時間でのみ検討	8N KOH 50 µL 曝露時間ごとに検討	8N KOH 40 µL 1 時間でのみ検討	8N KOH 50 µL 曝露時間ごとに検討	8N KOH 50 µL 1 時間でのみ検討
MTT 溶液	2 mL（0.3 mg/mL）	300 µL（1 mg/mL）	300 µL（1 mg/mL）	300 µL（1 mg/mL）	500 µL（0.5 mg/mL）

©OECD 2019

番号	1	2	3	4	5
試験法の構成要素	**EpiSkin™**	**EpiDerm™ SCT**	**SkinEthic™ RHE**	**epiCS®**	**LabCyte EPI-MODEL24 SCT**
MTT で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 分（±15 分）	37°C、5% CO_2、95% RH で 180 分	37°C、5% CO_2、95% RH で 180 分（±15 分）	37°C、5% CO_2、95% RH で 180 分	37°C、5% CO_2、95% RH で 180 分（±15 分）
試験法の構成要素	EpiSkin™ EIT	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE EIT	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
抽出溶剤	酸性化イソプロパノール 500 µL（イソプロパノール中 0.04 N HCl）（分離組織を完全に浸漬）	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）	イソプロパノール 300 µL（分離組織を完全に浸漬）
抽出時間および抽出温度	RT、遮光下で一晩	RT で振盪せずに一晩静置、または RT で振盪（約 120 rpm）により 120 分間	RT で振盪せずに一晩静置、または RT で振盪（約 120 rpm）により 120 分間	RT で振盪せずに一晩静置、または RT で振盪（約 120 rpm）により 120 分間	RT、遮光下で一晩
OD の読み出し	標準フィルターなしで 570 nm（545～595 nm）	標準フィルターなしで 570 nm（または 540 nm）	標準フィルターなしで 570 nm（540～600 nm）	標準フィルターなしで 540～570 nm	650 nm の標準フィルターにより 570 nm
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	SDS で 18 時間処理：1.4 mg/mL ≤ IC_{50} ≤ 4.0 mg/mL
許容基準	1. 陰性対照（NaCl）で処理した複製組織の OD の平均値は、いずれの曝露時間についても 0.6 以上 1.5 以下であること。 2. 陽性対照（氷酢酸）に 4 時間曝露させた複製組織の生存率の平均値を、陰性対照に対する割合（%）として表した場合、20%以下であること。	1. 陰性対照（H_2O）で処理した複製組織の OD の平均値は、いずれの曝露時間についても 0.8 以上 2.8 以下であること。 2. 陽性対照（8N KOH）に 1 時間曝露させた複製組織の生存率の平均値を、陰性対照に対する割合（%）として表した場合、15%以下で	1. 陰性対照（H_2O）で処理した複製組織の OD の平均値は、いずれの曝露時間についても 0.8 以上 3.0 以下であること。 2. 陽性対照（8N KOH）に 1 時間（および該当する場合 4 時間）曝露させた複製組織の生存率の平均値を、陰性対照に対する割合（%）	1. 陰性対照（H_2O）で処理した複製組織の OD の平均値は、いずれの曝露時間についても 0.8 以上 2.8 以下であること。 2. 陽性対照（8N KOH）に 1 時間曝露させた複製組織の生存率の平均値を、陰性対照に対する割合（%）として表した場合、15%以下で	1. 陰性対照（H_2O）で処理した複製組織の OD の平均値は、いずれの曝露時間についても 0.7 以上 2.5 以下であること。 2. 陽性対照（8N KOH）に 1 時間曝露させた複製組織の生存率の平均値を、陰性対照に対する割合（%）として表した場合、15%以下で

©OECD 2019

番号	1	2	3	4	5
試験法の構成要素	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
	3. 生存率が 20～100%の範囲、かつ OD が 0.3 以上の場合、2 つの複製組織間の生存率の差は 30%を超えないこと。	あること。 3. 生存率が 20～100%の範囲において、複製組織間の変動係数（CV）は 30%以下であること。	として表した場合、15%以下であること。 3. 生存率が 20～100%の範囲、かつ OD が 0.3 以上の場合、2 つの複製組織間の生存率の差は 30%を超えないこと。	あること。 3. 生存率が 20～100%の範囲、かつ OD が 0.3 以上の場合、2 つの複製組織間の生存率の差は 30%を超えないこと。	あること。 3. 生存率が 20～100%の範囲、かつ OD が 0.3 以上の場合、2 つの複製組織間の生存率の差は 30%を超えないこと。

©OECD 2019

補遺 3—細区分に関する試験法の性能

5 種類の試験法開発者により検討された一連の 79 または 80 品目の化学物質に基づき算出された、5 種類の試験法の性能について下表に示す。4 種類の試験法（EpiSkin™、EpiDerm™ SCT、SkinEthic™ RHE、epiCS®）の算出は OECD 事務局が実施し、専門家グループにより審査および合意された（21）（23）。LabCyte EPI-MODEL24 SCT の算出は試験法開発者が実施し、バリデーション管理グループおよびピアレビュー委員会により審査および合意された（41）（43）。

化学物質全体について得られた予測の統計結果
（80 品目の化学物質について、epiCS®では 2 回の独立した実行、あるいは、EpiDerm™ SCT、EpiSkin™、SkinEthic™ RHE では 3 回の独立した実行により検討。すなわち、それぞれ 159 回*または 240 回の分類について検討。
79 品目の化学物質について、LabCyte EPI-MODEL24 SCT では 3 回の独立した実行により検討。すなわち、237 回の分類について検討。）**

* 1 品目は入手不能のため、EpiCS®での試験が 1 回となった（23）。
** 1 品目は入手不能のため、LabCyte EPI-MODEL24 SCT では検討しなかった。

	EpiSkin	EpiDerm	SkinEthic	epiCS	LabCyte EPI-MODEL24
過大分類：					
1B および 1C を 1A に過大分類	21.5%	29.0%	31.2%	32.8%	30.0%
NC を 1B および 1C に過大分類	20.7%	23.4%	27.0%	28.4%	18.9%
NC を 1A に過大分類	0.0%	2.7%	0.0%	0.0%	2.7%
腐食性物質として過大分類	20.7%	26.1%	27.0%	28.4%	21.6%
包括的な過大分類率（すべてのカテゴリー）	17.9%	23.3%	24.5%	25.8%	21.5%
過小分類：					
1A を 1B および 1C に過小分類	16.7%	16.7%	16.7%	12.5%	13.9%
1A を NC に過小分類	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
1B および 1C を NC に過小分類	2.2%	0.0%	7.5%	6.6%	0.0%
包括的な過小分類率（すべてのカテゴリー）	3.3%	2.5%	5.4%	4.4%	2.1%
正しい分類：					
1A を正しく分類	83.3%	83.3%	83.3%	87.5%	86.1%
1B および 1C を正しく分類	76.3%	71.0%	61.3%	60.7%	70.0%
NC を正しく分類	79.3%	73.9%	73.0%	71.62%	78.4%
全体での正確性	78.8%	74.2%	70.0%	69.8%	76.4%

©OECD 2019

補遺 4—RhE 組織から抽出された MTT ホルマザン測定用の HPLC/UPLC-分光光度法システムの適格性評価に関する主要パラメータおよび許容基準

パラメータ	FDA ガイダンスから得られたプロトコール（36）（38）	許容基準
選択性	イソプロパノール、生存ブランク（未処理の生存 RhE 組織由来のイソプロパノール抽出物）、死亡ブランク（未処理の死亡 RhE 組織由来のイソプロパノール抽出物）の分析	面積値$_{干渉}$ = 面積値$_{LLOQ}$[1] の 20%
精密性	イソプロパノールの品質管理（すなわち、1.6 g/mL、16 g/mL、160 g/mL での MTT ホルマザン）（n=5）	LLOQ に関する CV が 15%または 20%
正確性	イソプロパノールの品質管理（n=5）	LLOQ に関する逸脱率が 15%または 20%
マトリックス効果	生存ブランクの品質管理（n=5）	マトリックス効果率が 85～115%
キャリーオーバー	ULOQ[2] の基準到達後のイソプロパノールの分析	面積値$_{干渉}$ = 面積値$_{LLOQ}$ の 20%
再現性（日内）	3 つの独立した検量線（ULOQ、すなわち 200 g/mL で開始したイソプロパノール中の MTT ホルマザンについて、連続 6 回の 1/3 希釈に基づく）；イソプロパノールの品質管理（n=5）	検量線：LLOQ に関する逸脱率が 15%または 20% 品質管理： 逸脱率が 15%かつ CV が 15%
再現性（日間）	1 日目：イソプロパノールの 1 つの検量線および品質管理（n=3） 2 日目：イソプロパノールの 1 つの検量線および品質管理（n=3） 3 日目：イソプロパノールの 1 つの検量線および品質管理（n=3）	
RhE 組織抽出物中の MTT ホルマザンの短期安定性	調製日および室温での保存の 24 時間後に分析される生存ブランクの品質管理（n='3'）	逸脱率が 15%
RhE 組織抽出物中の MTT ホルマザンの長期安定性（必要な場合）	調製日および指定の温度（例えば、4ºC、-20ºC、-80ºC）での保存の数日後に分析される生存ブランクの品質管理（n='3'）	逸脱率が 15%

注：

[1] LLOQ：1～2%の組織生存率（すなわち、0.8 µg/mL）をカバーするよう定義される定量下限。

[2] ULOQ：陰性対照由来のイソプロパノール抽出液中において、予測される最大 MTT ホルマザン濃度より 2 倍以上の高濃度（すなわち、200 µg/mL）と定義される定量上限。

©OECD 2019