OECD/OCDE

2006/07/19

試験ガイドライン No.435

皮膚腐食性に関する*in vitro* 膜バリア試験法

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 (2006), Test No. 435: In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, 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-435-2006.pdf.

©OECD(2006)

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

435

2006 年 7 月 19 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

皮膚腐食性評価のための *in vitro* 膜バリア試験法

はじめに

1. 皮膚腐食性とは、国連の化学品の分類および表示に関する世界調和システム（GHS）によって定義されるように、被験物質の適用後、表皮から真皮までの不可逆的組織損傷（目に見える壊死として表れる）をいう(1)。この試験ガイドラインでは、生きた動物ではなく *in vitro* で腐食性を評価する方法を述べる。

2. 腐食性物質を特定するための基準として使用されているウサギの皮膚を用いた *in vivo* 法（OECD TG 404）(2)の代替として、多くの *in vitro* 試験法が提案されてきた。本試験ガイドラインは、腐食性物質を特定するために使用可能な *in vitro* 膜バリア試験法である。本試験法では、腐食性物質に対して *in situ* の動物皮膚と同様に反応するようにデザインされた人工膜を利用する。

3. 皮膚腐食性の評価にあたっては、伝統的に生きている動物の皮膚に被験物質を適用し、一定期間後に組織損傷の程度を評価する方法が使用されてきた(2)(3)。皮膚腐食性の評価と分類に関して、国連 GHS が提唱する逐次試験戦略と評価戦略によって有用性が確認され、受け入れられた *in vitro* 試験法については、その使用が認可される(1)。この逐次試験戦略では、動物実験を必要とせずに *in vitro* 試験法の陽性結果によって物質を分類することが可能であり、したがって、試験における動物の使用を減少させ、使用法の改善をもたらす。陰性物質と判定されたものは、逐次戦略に従って追加試験に回される(1)（試験ガイドライン 404 補足(2)を参照）。腐食性物質を特定するために *in vitro* 試験法を使用することにより、動物が用いられる場合に懸念される疼痛と苦痛を回避することができる。

4. 市販の *in vitro* 膜バリア Corrositex®を用いる試験法についての有効性評価試験が完了している(4)(5)(6)。その妥当性が承認された事実に基づいて、この検証済み参照試験法を化学物質の皮膚腐食性を評価するための逐次試験戦略の一部として使用するよう勧告されている(5)。一つの *In vitro* 膜バリア試験法が皮膚腐食性試験として規制目的に使用できるためには、その使用目的に対する信頼性、妥当性（精度）および限界について予め決定し、すでに検証済み参照試験法と同等であることを確認しておかなければならない(7)(8)(9)(10)。

5. 最初の妥当性試験（段落 13 を参照）の結果によれば、このテストガイドラインの基礎である検証済み参照試験法には限界があり、多くの非腐食性の化学物質および混合物、ならびに若干の腐食性の化学物質および混合物が試験にはふさわしくない可能性がある(5)。また、pH が 4.5～8.5 の範囲の水溶性物質は多くの場合、試験には使用できない。しかしながら、これまで検査されたこの pH 範囲の化学物質の 85%は、動物試験で非腐食性であった(5)。*In vivo* 膜バリア試験法は、固体（水溶性／非水溶性）、液体（水溶液／非水溶液）および乳剤で使用できるが、妥当性試験において検出可能な変化は生じなかった（すなわち、検証済み試験法の化学物質検知システム（CDS）では色の変化を示さなかった）。被験物質と混合物については膜バリア試験法では試験できないので、他の方法を用いて試験する。化学物質純品、希釈液、製剤または廃棄物がサンプルになり得る。サンプルの前処置は必要ではない。

6. この試験ガイドラインは、*in vitro* 皮膚腐食性試験法としては 3 番目のものである。他の試験法は再構成したヒトの皮膚を使用するもの（OECD TG 431）(11)と、分離したラットの皮膚を使用するもの（OECD TG 430）(12)である。しかしながら、この試験ガイドラインはまた、腐食性物質を 3 つの GHS 細区分および腐食性に対する 3 つの国連の輸送・包装等級に細区分化するための情報をもたらす。

定義

7. 用いた定義を補遺 1 に示す。

最初に考慮すべき事項

8. 本ガイドラインで述べる試験により、腐食性の化学物質および混合物を特定することができ、GHS に許可されているような腐食性物質のサブカテゴリー化が可能になる（表 1）(1)。更に、そのような試験方法は特殊な化学物質、例えば、有機酸、無機酸、酸誘導体[1]および塩基の腐食性／非腐食性について、輸送目的に限定して使用することも可能である(5)(13)(14)。この試験ガイドラインでは、検証済み参照試験法と同様に、その手順を包括的に述べる(5)。

表 1　国連 GHS による皮膚腐食性の区分と細区分(1)

腐食性区分（区分1）（細区分を使用していない当局に適用）	潜在的腐食性の細区分（一部の当局にのみ適用）	動物3匹のうち1匹以上で腐食性	
		暴露	観察
腐食性	腐食性細区分1A	3分以下	1時間以内
	腐食性細区分1B	3分超1時間以内	14日以内
	腐食性細区分1C	1時間超4時間以内	14日以内

試験の概要

9. 試験システムは 2 つの構成要素、すなわち合成巨大分子のバイオバリアと CDS からなる。この試験方法の基礎は、人工膜バリアの表面に被験物質を適用後、腐食性の被験物質が生きた皮膚に作用するのと同じ機序によって引き起こされる膜バリア損傷を検出することである。

10. 膜バリアへの浸透（または破過）は、バリアの下にある pH 指示薬色素の色の変化、または指示薬溶液のもつ他の性状の変化など、多くの手法で測定できる。

11. 膜バリアは、その意図された使用目的に適合していること、すなわち妥当でありかつ信頼性の高いことを予め確認しておかなければならない。その中にはバリアの特性が異なる被験試料の性質に整合していること、すなわち非腐食性物質に対してはバリアを維持し、腐食性化学物質については、その特性を腐食性の種々のサブカテゴリーにわたって分類でき

[1] 「酸誘導体」とは非特異的なクラスの呼称であって、化学物質から直接または修飾もしくは部分的な置換によって作り出される酸と幅広く定義される。このクラスには、無水物、ハロ酸、塩類および他のタイプの化学物質が含まれる。

ることも含まれている(1)。化学物質が膜バリアを通過して指示薬溶液まで浸透するのに要する時間に基づいて、分類されている。

手順

12. 以下は、腐食性評価に用いる人工膜バリア試験法の構成要素と手順の包括的な説明である(7)(15)。膜バリアおよび妥当性／指示薬溶液ならびに分類された溶液は、作製しても調合してもよいし、またはCorrositex®のようなものを購入してもよい。検証済み参照試験法の試験プロトコールについては、次のアドレスで得られる：http://iccvam.niehs.nih.gov。試験は室温（17～25°C）で行い、構成要素は以下に従うものとする。

被験物質適合性試験

13. 膜バリア試験を行う前に適合性試験を実施して、被験物質がCDSによって検出可能かどうかを決定する。CDSが被験物質を検出しない場合、膜バリア試験法は特にその被験物質の潜在的腐食性を評価するにふさわしくないので、異なる試験法を用いる。適合性試験に使用するCDSと暴露条件は、以降の膜バリア試験における暴露状況を反映するものとする。

被験物質時間尺度カテゴリー試験

14. 試験法に該当するならば、適合性試験に合格して適しているとされた被験物質は時間尺度カテゴリー試験、すなわち弱酸と強酸または塩基とを区別できるかどうかのスクリーニングテストを受けるものとする。例えば、検証済み参照試験法では時間尺度分類試験が用いられるが、これは相当量の酸またはアルカリ予備のどちらが検出されるかにより、2つの時間尺度のうちどちらを用いるべきかを決定するためである。腐食性およびGHS皮膚腐食性サブカテゴリーを決定するためには、化学物質が酸予備を持つかアルカリ予備を持つかに基づいて、バリアの破過に至る2つの異なる時間尺度が用いられる。

膜バリア試験法の構成要素

膜バリア

15. 膜バリアは2つの構成要素、すなわち巨大タンパク分子水性ゲルとこれを支える浸透性膜からなる。タンパク質ゲルは液体および固体に不浸透性であるが腐食性であり、これらの浸透を許容するものとする。完全に構築された膜バリアはゲルの乾燥、微生物の増殖、変形、ひび割れなど、性能の劣化を防ぐために、予め定められた条件下で保存する。許容できる貯蔵期間を決定し、その期間が過ぎた膜バリア試料は使用してはならない。

16. 浸透性支持膜はゲル化過程および被験物質への暴露期間を通じて、タンパク質ゲルを機械的に支持する役目を果たす。この支持膜はゲルのたるみや変形を防ぐ一方で、全ての被験物質が速やかに透過できるものとする。

17. タンパク質ゲルはケラチン、コラーゲンのようなタンパク質、またはタンパク質の混合物からなり、ゲル基質を形成し、被験物質のターゲットの役割を果たす。タンパク性物質を支持膜の表面に置き、ゲル化させてから指示薬溶液の上に膜バリアを置く。タンパク質ゲルは全域にわたって均一な厚さと密度を保ち、その機能を損なう恐れのある気泡や欠損がないものとする。

化学物質検知システム（CDS）

18. 指示薬溶液、すなわち適合性試験に使用したものと同じ溶液は被験物質の存在に反応する。pH 指示薬色素または色素の組み合わせ、例えば、クレゾールレッドやメチルオレンジは被験物質が存在すると色の変化をきたすが、その他のタイプの化学反応や電気化学反応を起こすものも使用できる。測定システムは、光学的なものでも電子的なものでもよい。

19. 被験物質がバリア膜を通過するのを検出するために開発されたシステムは、その妥当性と信頼性に対して評価し、検出可能な物質の範囲と定量的検出限界を明らかにする。

試験の実施

試験法構成要素のアセンブリ

20. 膜バリアを指示薬溶液の入ったバイアルまたは（チューブ）に設置するが、その際、支持膜と指示薬溶液とが完全に密着し、気泡が入らないようにする。また、バリアの健全性が維持されるよう注意する。

被験物質の適用

21. 適当量の被験物質（例えば、500 µL の液体または 500 mg の微細粉末状固体）(5)を、膜バリアの上表面に慎重に重ね、均一に塗布する。各被験物質および相当する対照あたり、妥当な数の複製（例えば 4 例）を用意する(5)。被験物質の膜バリアへの適用時間を記録する。複製バイアルに対する被験物質の適用時間を時間差にして、短い腐食時間が正確に記録できるよう工夫する。

膜バリア浸透性の測定

22. 各バイアルを適切に監視し、指示薬溶液に最初に変化が認められた（すなわち、バリア浸透）時間を記録する。そして、膜バリアへの適用開始と浸透までの経過時間を決定する。

対照

23. 被験物質とともに使用する溶媒または溶剤も評価する場合には、溶媒または溶剤は膜バリアシステムとの敵合性をもつこと、すなわち膜バリアシステムの健全性を損なわないこと、また被験物質の腐食性を変えないことが要求される。該当する場合には、溶剤（または溶媒）対照は被験物質と同時に試験し、膜バリアシステムと溶剤の適合性を示すものとする。

24. 試験システムが許容できる状況で機能しているかどうかを判断するために、中等度の腐食性活性（例えば、水酸化ナトリウム（GHS 腐食性細区分 1B）(7)を持つ陽性（腐食性の）対照化学物質を被験物質と同時に試験する。被験物質と同じ化学クラスの第 2 の陽性対照も試験すれば、被験物質の相対的な腐食性ポテンシャルを評価するのに役立つであろう。陽性対照としては、その腐食性が中等度（例えば、細区分 1B）の物質を選ぶ。測定された浸透時間が確立した参照値に比べて容認できないほど長いか短いことが分かれば、試験システムが適切に機能していないことが分かる。この目的のためには、極度に腐食性の化学物質（GHS 細区分 1A）または非腐食性化学物質の有用性は限られている。GHS 細区分 1B の腐

食性物質は、破過時間が極度に速いか極度に遅い物質の検出を可能にする。弱腐食性物質（GHS 細区分 1C）は、試験法が弱腐食性物質と非腐食性物質を一貫して区別できるかどうかを判定するための陽性対照として使用できる。使用されるアプローチに関係なく、採用する陽性対照物質の反応範囲は陽性対照物質の破過時間の過去データに基づいて許容される範囲（通常、平均± 2〜3 標準偏差）に収まるようにする。標準偏差がこの許容範囲を外れた場合には、それが検出できるよう各試験において陽性対照の破過時間を正確に決定する。

25. 膜バリア機能の健全性を示す品質管理のもう一つの尺度として、陰性（非腐食性）対照物質、例えば、10%クエン酸、6%プロピオン酸(7)を被験物質と同時に試験する。

試験の許容基準

26. GHS 腐食性各細区分について確立した時間パラメータに基づき、被験物質を膜バリアに適用してから浸透するまでの経過時間（分単位）を用いて、被験物質の腐食性を予測することができる。試験が受け入れ可能とみなされるためには、同時に行われた陽性対照の浸透応答時間が予想されたものとする。同様に、陰性対照は腐食性であってはならないし、溶剤対照が含まれる場合には、それが腐食性または被験物質の腐食性ポテンシャルを変えるものであってはならない。試験機関によっては、この試験ガイドラインに忠実に従う試験法を日常的に使用するのに優先して、表 2 で推奨されている 12 の化学物質を用いてその技術における精度管理を示したいと望むかもしれない。このガイドラインに従って確立された試験法で、構造的にも機能的にも検証済み参照試験法(16)に酷似している新規の「模倣した」試験法については、規制用試験として使用する前に、このガイドラインの補遺 2 に記載されている実施基準に従ってその新法の信頼性および精度を示すものとする。

結果の解釈と被験物質の腐食性分類

27. 被験物質を膜バリアに適用してからバリアを浸透するまでの経過時間（分単位）を用いて、被験物質の腐食性(1)、および該当する場合は国連包装等級(17)に関して分類される。3 つの腐食性細区分のそれぞれに対するカットオフ時間値が提案される各試験法に対して確立される。カットオフ時間を最終的に決めるにあたっては、腐食性ハザードを過小に分類する（すなわち、誤って陰性に分類する）可能性を最小にするよう考慮する。

データおよび報告

データ

28. 被験物質および陽性対照の適用からバリア浸透までの経過時間（分単位）は、試験ごとに、それぞれの複製データおよび平均 ± 標準偏差として総括表にして報告する。

試験報告書

29. 試験報告書は、以下の情報を含まなければならない。

被験物質と対照物質
- 分かっている場合、特定データおよび CAS 番号
- 物理的性質と純度（主要不純物）

- 試験の実施に関連する物理化学的性状
- 該当する場合、被験／対照物質の前処理。例えば、保温、粉砕など。
- 分かっている場合、安定性

使用した *in vitro* 膜バリアモデルとプロトコールの精度と信頼性など、妥当性を示すこと

試験の条件
- 使用した装置と操作手順の記述
- 使用した *in vitro* 膜バリアの供給元と構成要素
- 指示薬溶液の組成と性状
- 検出方法
- 被験物質および対照物質の使用量
- レプリケートの数
- 時間尺度分類試験の記述およびその妥当性
- 適用方法
- 観察時間

結果
- 被験物質および対照物質のサンプルそれぞれについて、複製の生データをまとめた表形式のもの
- 観察された他の効果の記述
- 評価および分類基準に関する記述

結果の考察

結論

参考文献

(1) United Nations (UN) (2005). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), First revised edition, UN New York and Geneva, 2005. Available : http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/officialtext.html.

(2) OECD (2002). Test Guideline 404. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute Dermal Irritation/Corrosion. Updated Guideline, adopted April 24, 2002. Available: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html]

(3) U.S. EPA 1998. Health Effects Test Guidelines: Acute Dermal Irritation. OPPTS 870.2500. Washington, DC. U.S. Environmental Protection Agency. Available: [http://www.epa.gov/docs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/870-2500.pdf]

(4) 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. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

(5) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication No. 99-4495. Available at [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/reports/corprrep.pdf], together with a Sample Protocol for the Corrositex® test kit at [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/corrdocs/sampprot.pdf]

(6) Gordon, V.C., Harvell, J.D. and Maibach, H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

(7) ICCVAM (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. A Report of the *ad hoc* Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. NIEHS, NIH Publication No. 97-3981. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf]

(8) OECD (1996). Report of the OECD Workshop on "Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods". Paris, 1996, (Solna Report) [ENV/MC/CHEM(96)9]

(9) OECD (2002). Report of the Stockholm Conference on "Validation and Regulatory Acceptance of New and Updated Methods in Hazard Assessment". Paris, 2002 [ENV/JM/TG/M(2002)2]

(10) Balls, M. and Karcher, W. (1995). Comment: The Validation of Alternative Test Methods. ATLA 23:884-886.

(11) OECD (2004). Test Guideline 431. OECD Guideline for Testing of Chemicals. *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test. Available: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html]

(12) OECD (2004). Test Guideline 430. OECD Guideline for Testing of Chemicals. *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER). Available: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html]

(13) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29(2), 96-97.

(14) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). September 20, 2002. Washington, D.C., U.S. DOT. Available: [http://hazmat.dot.gov/exemptions/E10904.pdf]

(15) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Available: [http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/1120.pdf]

(16) ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No. 04-4510. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiderm.htm]

(17) United Nations (UN) (2003).Recommendations of the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 13rd revised edition, ST/SG/AC.10/1/Rev.13 (Vol. I), UN New York and Geneva, 2003. Available : http://www.unece.org/trans/danger/publi/unrec/rev13/13files_e.html.

表 2　精度管理用化学物質

化学物質	**CAS番号**	化学クラス	*国連GHS細区分* *
硝酸	7697-37-2	無機酸	1A
五塩化リン	10026-13-8	無機酸の前駆物質	1A
セレン酸	7783-08-6	無機酸	1A
バレリル酸	638-29-9	酸クロライド	1B
水酸化ナトリウム	1310-73-2	無機塩基	1B
1-(2-アミノエチル）ピペラジン	140-31-8	脂肪族アミン	1B
ベンゼンスルホン酸クロライド	98-09-9	酸クロライド	1C
硫酸ヒドロキシルアミン	10039-54-0	有機アンモニウム塩	1C
テトラエチレンペンタミン	112-57-2	脂肪族アミン	1C
オイゲノール	97-53-0	フェノール類	NC
アクリル酸ノニル	2664-55-3	アクリル酸／メタクリル酸	NC
炭酸水素ナトリウム	144-55-8	無機塩	NC

上に記載した 12 の化学物質は、皮膚腐食性物質に関する GHS 細区分のそれぞれから 3 物質ずつと非腐食性の 3 物質である。これらは検証済み参照試験法と構造的にも機能的にも類似の試験法について、その精度と信頼性を示す目的に使用されるよう特定されている、化学物質最小リストの中で参照化学物質として列挙されている 40 の中から選択した（補遺 2 参照）(5)(16)。これらの化学物質は市販業者から容易に購入でき、UN GHS 細区分は高品質の *in vivo* 試験の結果に基づいている。

*UN GHS 細区分 1A, 1B および 1C には UN 包装等級 I、II および III がそれぞれ対応する。
NC; 非腐食性

補遺 1

定義

精度：試験法による結果と受け入れられている参照値の合致の程度。試験法の性能の一つの尺度であり、妥当性の一側面である。この言葉は、しばしば「一致」と互換的に使われ、試験法の結果の正しさの割合を意味する(7)(8)(10)。

化学物質検知システム（CDS）：被験物質が存在すると、これに対する指示薬溶液の反応を光学的または電子的に測定するシステム。例えば、pH 指示薬色素や色素の組み合わせのように被験物質の存在に反応して色変化を引き起こすもの、異なるタイプの化学反応によるもの、または電気化学反応によるものがある。

偽陰性率：試験法が誤って陰性と判断した陽性物質の全陽性物質に対する割合。試験法性能の指標の一つ。

偽陽性率：誤って陽性と判定された陰性（非活性の）物質の全陰性物質に対する割合。試験法性能の指標の一つ。

GHS（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）を標準化した物理的、健康および環境におよぼす危険有害性を種類と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、これにより有害作用を周知させ、従業員、労働者、運搬業者、消費者、非常事態対応者はもとより、広く人々と環境をその危険有害性から守ることを計るシステム(1)。

試験機関間の再現性（Inter-laboratory reproducibility）：適正試験機関として認められている異なる試験機関において、同じ被験物質を同じプロトコールに従って試験した場合に得られる結果が定性的および定量的に、どの程度類似性があるかを表す。試験機関間の再現性は予備的有効性評価および有効性評価の過程で決定されるもので、試験が試験機関間でどの程度首尾よく移されるものかを示し、between-laboratory reproducibility とも呼ばれる。

実施基準：検証済み試験法に基づいた基準。機械的にも機能的にも類似の試験法（提案された）を比較評価するための基礎となり、以下が含まれる。(1)試験法の基本的な構成、(2)検証済み試験法の性能が受け入れ可能であることを示すために使われた、化学物質の中から選んだ参照化学物質の最小リスト。および(3)最小リストの参照化学物質を用いて提案された試験法により試験を行うとき、検証済み試験法で得られたのと同等の精度および信頼性のあるデータが得られること。

参照化学物質：検証過程で使用するために選択された化学物質で、*in vitro* または *in vivo* 参照試験システムまたは対象となる種における応答がよく知られているもの。これらの化学物質は、使用予定の試験法によって試験する化学物質のクラスを代表するものでなければならず、また試験で使用するときには想定される反応に関して強から弱、そして陰性に至る全ての領域をカバーするものとする。検証過程のステージの違い、ならびに試験法および試験用法が異なる場合には、異なる対照化学物質が必要になる。

妥当性：試験と対象となる効果との関係について、その目的に対して意義があり、また有用であるかどうかの記述。試験が対象とする生物学的効果を正しく測定するか、または予測する程度を

意味する。妥当性には試験法の精度（一致性）に対する考察も含まれる(7)(8)(10)。

信頼性：同じプロトコールを採用する場合に、試験機関内または試験機関間で長期間にわたってその試験法が再現性よく実施される程度をはかる尺度。試験機関内および試験機関間の再現性、ならびに試験機関内再現性を計算することにより評価される(7)(8)(10)。

感度：全ての陽性／活性物質のうち、試験により正しく分類された割合。分類結果を生み出す試験法の精度の指標で、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。

特異度：全ての陰性／非活性物質のうち、試験により正しく分類された割合。分類結果を生み出す試験法の精度の指標で、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。

皮膚腐食性：被験物質の適用後、表皮から真皮を通して肉眼的な壊死として表れる皮膚の不可逆的障害の発生。

補遺 2

皮膚腐食性のために提案された *in vitro* 膜バリア試験方法の実施特性の評価

はじめに

1. この試験ガイドラインのもとで使用するために提案される試験法は、既知の腐食性物質と非腐食性物質を用いて、その信頼性と精度について評価されるものとする。推奨参照化学物質（表 1）を使用して評価する場合、提案される試験法は検証済み参照試験方法(1)（表 2）と同等の信頼性と精度を持たなければならない。信頼性および精度について達成すべき基準は、3 段落と 4 段落に示されている。提案された試験法の信頼性および精度、すなわち感度、特異度、偽陰性率および偽陽性率を検証済み参照試験法と比較できるように、非腐食性物質および強腐食性から弱腐食性に至る広範囲の腐食性物質で適切な化学クラスを代表する物質を被験物質に加える(1)(2)。輸送危険性分類の目的のために、腐食性物質のリストは国連包装等級分類／GHS 皮膚腐食性細区分(3)(4)の範囲をカバーする物質も含める。これにより、被験物質を国連包装等級／GHS 皮膚腐食性細区分にそれぞれ分けるのに用いる浸透時間が妥当かどうかを決定することが可能になる。被験物質を各包装等級／GHS 皮膚腐食性細区分に分けることに係わる（浸透のための）経過時間は、バリア、指示薬および分類システムの各構成成分について、また特定の試験ごとに決定する。試験法の信頼性および既知の腐食性物質を過大評価するか過小評価するかについても、新規物質に対して使用前に決定する必要がある。また可能な場合、一貫して過大または過小評価される物質のクラスまたは種類についても明記する。

実施基準

2. 参照化学物質は、提案された *in vitro* 膜バリア試験法の信頼性と精度が検証済み参照試験方法(2)と同等かどうかを決定するのに用いられる(2)。表 1 に記載されている 40 の参照化学物質には対象とする化学クラスのそれぞれを代表し、*in vivo* 参照試験法において一連の腐食性応答を示した化学物質、すなわち非腐食性物質ならびに国連包装等級 I（GHS 1A）、II（GHS 1B）および III（GHS 1C）に相当する腐食性物質が含まれる。腐食性および国連包装等級分類／GHS 皮膚腐食性細区分によれば、このリストの化学物質は 12 の非腐食性化学物質と 28 の腐食性化学物質という分布になる。28 の腐食性化学物質のうち、包装等級 I（GHS 1A）と II（GHS 1B）に相当するものが、それぞれ 9、包装等級 III（GHS 1C）に相当するものが 10 である。これらの参照化学物質は、皮膚腐食性測定用に提案された膜バリア試験法の精度と信頼性を評価するのに用いるべき最小限の数を表す。ここにリストされた化学物質が利用できない状況では、*in vivo* 参照データが十分である他の化学物質または製品を使用してもよい。提案された試験法の精度を更に評価したい場合には、他の化学クラスまたは製品クラスを代表する化学物質を参照化学物質の最小リストに加えることができる。ただし、その物質の *in vivo* 参照データが十分ある場合に限る。

3. 提案された試験法の信頼性は、検証済み参照試験法と同等でなければならない。ただし、提案された試験方法が 1 試験機関のみで使用されることになっている場合、試験機関間の再現性の評価は必須ではない。腐食性と非腐食性との区別および国連包装等級分類／GHS 皮膚腐食性細区分への分類に関する試験機関間の再現性は、93%以上とする(1)。膜のバリア破過に要する時間に関して異なる試験機関で実施される試験については、変動係数（CV）

の中央値は 30%を超えないこととする。また、1 試験内における複製の測定については、5%を超えてはならない(1)。

表 1　*In vitro* 膜腐食性試験法の精度と信頼性を決定するための参照化学物質

化学物質[1]	CAS番号	化学物質のクラス[2]	濃度（%）[2]	国連*in vivo* 包装等級[3]	バリデーション試験法包装等級	pH[2]
フルオロ硫酸	7789-21-1	無機酸	未希釈	I	I	0
硝酸	7697-37-2	無機酸	90	I	I	0
五塩化リン	10026-13-8	無機酸の前駆物質	98	I	I	0
セレン酸	7783-08-6	無機酸	95	I	I	0
3フッ化ボロン2水化物	13319-75-0	無機酸	96	I	I	0.4
3臭化リン	7789-60-8	無機酸の前駆物質	97	I	I	1.0
硫酸、10%（重量）	7664-93-9	無機酸	10	I	I	1.2
クロロギ酸ベンジル	501-53-1	酸塩化物	95	I	NC	2.5
1,2-ジアミノプロパン	78-90-0	脂肪族アミン	NA	I	II	8.3
リン酸	7664-38-2	無機酸	85	II	II	0.4
バレリルクロライド	638-29-9	酸クロライド	98	II	II	0.5
酢酸	64-19-7	有機酸	99+	II	II	1.9
カプリル酸	124-07-2	有機酸	95	II	NC	2.7
カプリル酸：カプリル酸（45:55）	68937-75-7	有機酸	95	II	NC	3.0
重フッ化アンモニウム	1341-49-7	有機アンモニウム塩	98	II	II	5.2
1-(2-アミノエチル) ピペラジン	140-31-8	脂肪族アミン	99	II	II	11.8
エタノールアミン	141-43-5	脂肪族アミン	99+	II	II	11.8
水酸化ナトリウム	1310-73-2	無機塩基	100	II	II	13.8
塩化シアヌル	108-77-0	置換トリアジン	99	III	III	1.7
ベンゼンスルホニルクロライド	98-09-9	酸塩化物	未希釈	III	III	1.8
クロトン酸	107-93-7	有機酸	99+	III	III	2.3
無水酪酸	106-31-0	無水物	99	III	III	3.1
硫酸ヒドロキシルアミン	10039-54-0	有機アンモニウム塩	97+	III	III	3.6
2-メチル酪酸	600-07-7	有機酸	NA	III	III	3.6
ジシクロヘキシルアミン	101-83-7	脂肪族アミン	99	III	III	9.6
N,N-ジメチルベンジルアミン	103-83-3	アニリン	99	III	III	10.7
テトラエチレンペンタミン	112-57-2	脂肪族アミン	未希釈	III	III	11.9

化学物質[1]	CAS番号	化学物質の種類[2]	濃度（%）[2]	国連*in vivo*包装等級[3]	有効性評価試験法包装等級	pH[2]
2-エチルヘキシルアミン	104-75-6	脂肪酸アミン	98	III	III	12.0
マレイン酸	110-16-7	有機酸	99	NC	II	1.3
塩化第二銅	7447-39-4	無機塩	97	NC	II	3.0
オイゲノール	97-53-0	フェノール類	NA	NC	NC	3.7
クロム（III）フッ化物	7788-97-8	無機塩	97	NC	NC	3.9
シンナムアルデヒド	14371-10-9	アルデヒド類	100	NC	NC	3.9
エチルトリグリコールメタクリル酸	39670-09-2	アクリル酸／メタクリル酸	未希釈	NC	NC	4.5
アクリル酸ノニル	2664-55-3	アクリル酸／メタクリル酸	未希釈	NC	NC	6.9
塩化ベンザルコニウム	8001-54-5	有機アンモニウム塩	100	NC	NC	7.6
炭酸水素ナトリウム	144-55-8	無機塩	100	NC	NC	8.3
ウンデシレン酸ナトリウム	3398-33-2	陰イオン表面活性剤	33	NC	NC	8.3
炭酸ナトリウム、50%水溶液	497-19-8	無機塩	100	NC	II	11.7
炭酸カルシウム	471-34-1	無機塩	未希釈	NC	NC	12.6

略語：CASRN: CAS 番号、Conc. = 濃度、NA = 入手不可、NC = 非腐食性、PG = 包装等級、UN = 国連

[1] 40 の参照化学物質には、もともと参照試験法（Corrositex®）を検証するために使われた 163 の参照化学物質の中から代表的なものとして選ばれた物質が含まれている。全リストおよび選択基準は文献(1)に記載されている。

[2] 化学物質の種類、試験された濃度および pH 値は、(1)に記載されている出典から得た。pH 値は少数第一位に丸めた。

[3] 国連 GHS 範囲内では PG 分類は次のように対応している。すなわち、PG I は 1A に、PG II は 1B に、PG III は 1C である。これらの分類は、高品質の *in vivo* 試験の結果をもとに決められている(1)。

4. 提案された試験法の精度（感度、特異度、偽陰性率、偽陽性率、国連包装等級分類／GHS 皮膚腐食性細区分への正しい分類）は検証済み試験法と比べて、少なくとも同等でなければならない。

表 2　皮膚腐食性に対する検証済み参照試験法の精度

供給元	化合物の数	感度[2]	特異度[2]	偽陰性率[2]	偽陽性率[2]	包装等級精度[3]
参照化学物質[4]	40	89% (25/28)	75% (9/12)	11% (3/28)	25% (3/12)	96% (24/25)

[1] 表 2 には、検証済み参照試験法が 40 の参照化学物質の腐食性能を正しく特定する精度が示されている。

[2] この分析では、まず、それぞれの試験機関における試験結果の大多数に従って（複製試験が実施された場合）物質を腐食性に関して陽性か陰性に分類する。次に、複数試験機関における試験結果の大多数に従って（複数の試験機関で試験が実施された場合）、物質の腐食性について陽性か陰性かに分類する。

[3] 包装等級精度は、検証済み参照試験法が腐食性物質をウサギにおける *in vivo* 皮膚試験法の結果をもとに分けた国連包装等級分類（または GHS 皮膚腐食性細区分）を正しく特定する頻度を反映する。この計算は、Corrositex®が正確に腐食性であると特定できる物質に限って成立する。

[4] 表 1 を参照。

参考文献

(1) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication No. 99-4495. Available at [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/reports/corprrep.pdf], together with a Sample Protocol for the Corrositex® test kit at [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/corrdocs/sampprot.pdf]

(2) ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No. 04-4509. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf]

(3) United Nations (UN) (2003).Recommendations of the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 13th revised edition, ST/SG/AC.10/1/Rev.13 (Vol.I), UN New York and Geneva, 2003.Available : http://www.unece.org/trans/danger/publi/unrec/rev13/13files_e.html.

(4) United Nations (UN) (2005). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), First revised edition, UN New York and Geneva, 2005. Available : http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/officialtext.html.