OECD/OCDE

2010/07/22

試験ガイドライン No.439

In vitro 皮膚刺激性: 再構築ヒト表皮試験法

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 (2010), Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis 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-439-2010.pdf.

©OECD (2010)

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)

2010 年 7 月 22 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 皮膚刺激性：再生ヒト*表皮* 試験法

はじめに

1. 皮膚刺激性とは、国連（UN）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）(1)によって定義されるように、被験物質を最大 4 時間適用した後に皮膚に可逆的な損傷が生じることである。本試験ガイドライン（TG）には、刺激性化学品（物質および混合物）の有害性が、UN GHS および EU CLP の区分 2(1)(2)(3)に分類されるものであるかどうかを確認することが可能な *in vitro* 手順を示す。任意の区分である UN GHS 区分 3（軽度の刺激物）を採用していない加盟国または加盟地域では、UN GHS および EU CLP の“区分外 (No Category)”(1)(3)に分類されるかどうかの確認にも、本試験ガイドラインを使用することが可能である。規制の枠組みおよび使用している分類システムによっては、*in vivo* 皮膚刺激性試験のための独立した代替試験法としてまたは段階的試験戦略(4)の中で動物実験を部分的に代替する試験法として本試験ガイドラインを用いて、化学品の皮膚刺激性を決定してもよい。

2. これまで皮膚刺激性の評価では通常、実験動物が使用されてきた（OECD TG 404：初版採択 1981 年、改訂 1992 年および 2002 年）(4)。しかし動物愛護の観点から、2002 年に改訂された TG 404 では段階的試験戦略を適用することによって、検証済みの *in vitro* または *ex vivo* 試験法を用いて皮膚腐食性／刺激性を決定することが可能となり、実験動物に疼痛および苦痛を与えることが回避できるようになった。皮膚腐食性の評価については、TG 404 の段階的試験戦略(4)で使用可能な検証済みの *in vitro* 試験法が 3 種類（OECD TG430、431、435(5)(6)(7)）すでに採択されている。

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刺激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*）の生化学的・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細胞源として使用し、代表的な組織・細胞構築を実施したもの）を用いるものである。本試験ガイドラインはまた、欧州代替法検証センター（EC-ECVAM）によって開発された同様の改良 RhE 試験法を、ガイダンス文書 No. 34 (9)の原則に従って評価するための性能基準（PS）（補遺 2）を含むものである(8)。

4. 本試験ガイドラインに準拠する検証済み試験法は現在 3 種類である。その 3 種類のうち、市販の RhE モデル EpiSkin™ を用いた *in vitro* 試験法(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)は、プレバリデーション、最適化およびバリデーション試験が終了しており、検証済み標準試験法（VRM）に指定されている。残り 2 種類の市販の RhE を用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験法（EpiDerm™ SIT（EPI-200）試験法および SkinEthic™ RHE 試験法）も、PS に基づくバリデーションの結果(21)、VRM と同様の結果が得られることが明らかになっている(22)。

5. VRM、EpiDerm™ SIT（EPI-200）試験法または SkinEthic™ RHE 試験法以外の、提案された類似または改良 *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、この提案試験法については、提案試験法を使用する前に、本試験ガイドライン（補遺 2）に示した PS の要件に従って、試験の信頼性、妥当性（正確度）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する。

© OECD（2010 年）
出典が適切に示されている限り、本文書の非営利目的での個人的使用は自由であり、OECD による事前の承諾を必要としない。本文書を営利目的で使用する場合には、OECD の文書による許可を必要とする。

6. 用語の定義は補遺 1 に示している。

最初に考慮すべき事項および限界

7. 本試験ガイドラインの使用上の限界は、バリデーション試験(16)で立証されたように、化学品を任意の区分である UN GHS 区分 3(軽度の刺激物)(1)に分類できないことである。そのため、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踏みの中で決定することにする。動物実験を部分的に代替する試験として用いる場合、皮膚刺激性を完全に特徴付けるために、その後に *in vivo* 試験が要求される場合がある(4)。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。

8. 本試験ガイドラインは、皮膚腐食性／刺激性に関する TG 404 の段階的試験戦略のなかの *in vitro* 皮膚刺激性について適用されるものである(4)。本試験ガイドラインは、皮膚腐食性に関する情報を与えるものではない。ただし、皮膚腐食性に関する試験ガイドラインである TG 431 は、試験プロトコールは異なるものの、本試験ガイドラインと同じ RhE 試験システムに基づくものであることに留意する(6)。本試験ガイドラインは、ヒト角化細胞を用いた RhE モデルに基づくものであり、対象動物種の標的器官を *in vitro* で表したものである。この RhE モデルはまた、*in vivo* での刺激中に発生する炎症カスケード／作用機序の初期段階（局所外傷による細胞・組織の損傷）をそのまま含むものである。本試験ガイドラインを裏付けるために実施されたバリデーション試験では広範な化学品が評価されており、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は計 58 品目に上る(16)(18)(23)。本試験ガイドラインは固体、液体、半固体および蝋に適用可能である。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、適用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。ガスおよびエアロゾルは、これまでにバリデーション試験で評価されたことはない(24)。ガスおよびエアロゾルも RhE 技術を用いて試験可能であると考えられるが、現行のこの試験ガイドラインをガスおよびエアロゾルの試験に使用してはならない。色が濃い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もあることにも注意すること（段落 24～26 を参照のこと）。

9. 試験の結果から分類が明白な場合、3 系列で試験を 1 回行えば十分である。どちらとも決めにくい結果が得られた場合、たとえば試験内で矛盾した結果が得られた場合や平均生存率が 50 ± 5%の場合などは、2 回目の試験の実施を検討する。1 回目と 2 回目の試験結果が逆である場合は、3 回目の試験の実施を検討する。

試験の概要

10. 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。

11. 化学品が誘発する皮膚刺激性では紅斑および浮腫が発現するが、これらは化学品が*角質層*を通過して角化細胞の下層に損傷を与えることから始まる一連のカスケードの結果、生じるものである。死亡した角化細胞はメディエータを放出し、それによって*真皮*細胞（特に間質細胞および内皮細胞）に作用する炎症カスケードが開始され、内皮細胞が拡張して透過性が増すことによって紅斑および浮腫が生じる(24)。RhE 試験法は、このカスケードの初期段階を測定するものである。

12. RhE モデルの細胞生存率は、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(25)。化学品の刺激性の有無は、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（すなわち、細胞生存率が 50%以下の場合、UN GHS 区分 2 と分類する）。規制の枠組みおよび本試験ガイドラインの適用可能性によるが、所定の閾値を上回る細胞生存率を示す化学品は、非刺激性と判断してよい（すなわち、細胞生存率が 50%を超える場合、区分外と分類する）。

技能の証明

13. 試験実施施設は、本試験ガイドラインに準拠する 3 種類の検証済み試験法のいずれであっても、それらを日常的に使用する前に表 1 に示す 10 種類の技能証明用化学物質を用いて、試験実施施設の技能を証明する。本試験ガイドラインに基づいて開発された同様の試験法または 3 種類の検証済み試験法のいずれかの改良法については、それらを規制試験のための試験法として使用する前に、本試験ガイドラインの補遺 2 に示した PS 要件を満たすことを確認する。

14. RhE モデルの使用者は、技能証明の一部として、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技能が一度証明された後は、このような証明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。

表 1：技能証明用化学物質 [1]

化学物質	CAS 番号	*In vivo* スコア [2]	物理的状態	UN GHS 区分
ナフタレン酢酸	86-87-3	0	固体	区分外
イソプロパノール	67-63-0	0.3	液体	区分外
ステアリン酸メチル	112-61-8	1	固体	区分外
ヘプチルブチレート	5870-93-9	1.7	液体	区分外（区分 3 を採用している場合、区分 3）[3]
サリチル酸ヘキシル	6259-76-3	2	液体	区分外（区分 3 を採用している場合、区分 3）[3]
シクラメンアルデヒド	103-95-7	2.3	液体	区分 2
1-ブロモヘキサン	111-25-1	2.7	液体	区分 2
水酸化カリウム（5%水溶液）	1310-58-3	3	液体	区分 2
1-メチル-3-フェニル-1-ピペラジン	5271-27-2	3.3	固体	区分 2
ヘプタナール	111-71-7	3.4	液体	区分 2

1 技能証明用化学物質とは、バリデーション試験で使用する一連の化学物質のことである。

2 OECD TG 404 に従った *in vivo* スコア(4)

3 本試験ガイドラインでは、任意の区分である UN GHS 区分 3（軽度の刺激物）(1)は、区分外とみなす。

試験手順

© OECD（2010 年）

15. 皮膚刺激性評価のための RhE 試験法の要素および手順を以下に説明する。本試験ガイドラインでは RhE モデルを使用するが、RhE モデルは試験実施施設内で作製してもよく、または市販品を入手して使用してもよい。EpiSkin™、EpiDerm™ SIT（EPI-200）および SkinEthic™ RHE の標準操作手順書（SOP）は入手可能である(26)(27)(28)。試験は、以下に従って実施する。

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（たとえば、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、固定の暴露時間で暴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}）、またはマーカー物質を特定の固定の濃度で暴露したときに細胞生存率を 50%低下させるのに必要な暴露時間（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。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(25)。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（NC）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、3 種類の検証済み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、試験の暴露時間中の培養下で安定であること（その生存率測定値が常に同程度であること）を記録する。

表 2：陰性対照の OD 値の許容範囲

	下限値	上限値
EpiSkin™	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™ SIT（EPI-200）	≥ 1.0	≤ 2.5
SkinEthic™ RHE	≥ 1.2	≤ 2.5

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}（表 3）から、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。

形態

19. RhE モデルの組織学的検査を実施して、RhE モデルがヒト*表皮*様構造（多層性の*角質層*を含む）をもつことを立証すること。

再現性

20. 試験法の陽性対照および陰性対照の結果が、経時的再現性をもつことを立証すること。

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。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）を確立すること（施設内で作製したモデルの場合、当該施設が許容範囲（上限および下限）を確立すること）。刺激性分類について信頼できる予測を得るため、適格な組織から得られた結果のみを使用する。例として、3 種類の検証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の例

	下限値	上限値
EpiSkin™（SDS で 18 時間処理）(26)	IC_{50}=1.0 mg/mL	IC_{50}=3.0 mg/mL
EpiDerm™ SIT（EPI-200）（1% Triton X-100）(27)	ET_{50}=4.8 時間	ET_{50}=8.7 時間
SkinEthic™ RHE（1% Triton X-100）(28)	ET_{50}=4.0 時間	ET_{50}=9.0 時間

被験物質および対照物質の適用

22. 各試験は、被験物質および対照物質それぞれについて少なくとも 3 系列で実施する。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、25 µL/cm² または 25 mg/cm² 以上）を適用する。被験物質が固体の場合、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。固体は可能な場合は必ず、適用前に粉砕して微粉とする。暴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*表面を慎重に洗浄し、被験物質を取り除く。暴露時間およびインキュベーション温度は検証済みの 3 種類の RhE 試験法のどれを使用するかに応じて変わるが、暴露時間は 15～60 分、インキュベーション温度は 20～37ºC である。暴露時間およびインキュベーション温度は RhE 試験法ごとに最適化されており、試験法ごとに異なる固有のものである。詳細については、各試験法の SOP (26)(27)(28)を参照のこと。

© OECD（2010 年）

23. 各試験は、同時対照（NC および陽性対照（PC）の双方）を用いて実施すること。これは、組織の生存率（NC と比較）、バリア機能および感受性（PC と比較）が、これまでに確立された特定の許容範囲内であることを立証するためである。PC としては 5% SDS 水溶液が、NC としては水またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が提案される。

細胞生存率の測定

24. 細胞生存率の測定で最も重要なことは、被験物質への暴露終了後直ちに生存率を測定するのではなく、被験物質を取り除いた後、新鮮な培地を用いて十分に長くインキュベーションした後に生存率を測定することである。暴露後に十分に長いインキュベーション時間を設けることで、軽度の細胞毒性が回復するため、明白な細胞毒性作用を確認することができる。試験の最適化(11)(12)(13)(14)(15)を通して、暴露後インキュベーション時間は 42 時間が最適であることが立証されている。

25. 本試験ガイドラインの細胞生存率測定で使用する検証済み定量法は、MTT 法である。MTT 法は、3 次元組織構造物で使用可能である。組織試料を適切な濃度（たとえば、0.3～1 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。

26. 被験物質の光学特性や MTT への化学作用によって MTT 法が影響を受ける場合では、誤った生存率が算出される可能性がある（被験物質が青色発生を阻害、抑制または促進する可能性があるため）。これは、特定の被験物質が組織から完全に取り除かれていない場合や*表皮*を通過した場合にも生じる可能性がある。被験物質が MTT に直接作用する場合（被験物質が MTT 還元剤の場合）、被験物質がもともと有色である場合、または組織への暴露中に被験物質が着色する場合では、被験物質が生存率の測定に与える影響を検出し、補正できるよう対照を追加する。MTT 直接還元の補正および着色による干渉の補正に関する詳細な説明は、3 種類の検証済み試験法の SOP (26)(27)(28)から入手可能である。

許容基準

27. 妥当な RhE モデルバッチ（段落 21 を参照）を用いて各試験法を実施したとき、陰性対照組織の OD 値は、輸送、受領およびすべてのプロトコール工程を経た組織の品質を反映するものであること。対照の OD 値は、これまでに確立された許容範囲の範囲内であること。同様に、陽性対照（すなわち、5% SDS 水溶液）で処理した組織は、試験条件下(26)(27)(28)で刺激性物質に反応する能力を示すものであること。対応する適切な尺度を用いて、各組織間の変動を求めること（たとえば標準偏差（SD）を用いた場合、SD は既存のデータから算出した片側 95%の許容区間の範囲内であること。VRM については、SD は 18%未満であること）。

結果の解釈および予測モデル

28. 各被験物質における細胞生存率は、NC の OD 値を細胞生存率 100%として、各被験物質の OD 値を規格化することによって算出する。被験物質を刺激性または区分外と分類するための細胞生存率のカットオフ値、ならびに結果の評価および刺激性物質の区分特定に使用した統計的手法を、明確に定義して記録したうえ、それらが適切であることを立証すること。刺激性の予測に使用するカットオフ値は、以下のとおりである。

> 暴露後インキュベーション終了後の組織生存率が 50%以下である場合、被験物質が皮膚に刺激性であり、UN GHS 区分 2 に該当するとみなす。

加盟国の規制の枠組みによるが、暴露後インキュベーション終了後の組織生存率が 50%を上回る場合、被験物質が皮膚に非刺激性であり、UN GHS 区分外に該当するとみなしてよい。

データおよび報告

データ

29. 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。また各試験について、平均値 ± SD を報告する。被験物質と MTT 試薬との間に相互作用がみられた場合、および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

30. 試験報告書には、以下の情報を含む。

被験物質および対照物質：

- CAS 名などの化学名および CAS 番号（判明している場合）
- 純度および組成（重量%で表示）
- 本試験の実施に関連する物理化学的特性（たとえば、物理的状態、安定性、揮発性、pH および水溶性（判明している場合））
- 該当する場合、被験物質／対照物質の前処理（たとえば、加温および粉砕）
- 保存条件

使用した RhE モデルおよびプロトコールの妥当性

試験条件：

- 使用した細胞系
- 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。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
- 使用した用量、暴露時間および暴露後インキュベーション時間
- 試験手順のあらゆる変更についての説明
- 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) 過去のバッチ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

© OECD（2010 年）

- 予測モデルのカットオフ値の選択を含め、使用した評価基準の説明
- 対照の過去のデータに対する言及

結果：

- 各試験および各組織について、個々の被験物質のデータを示す表
- 被験物質が直接的な MTT 還元剤である場合や、被験物質が有色であるまたは着色した場合に使用した対照の測定値
- 観察されたその他の作用の説明

結果の考察

結論

参考文献

1. UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

2. EC-ECVAM (2009), Statement on the "Performance under UN GHS of three in vitro assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards", issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

3. EC (2008), REGULATION (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. Official Journal of the European Union L353, 1-1355.

4. OECD (2004), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

5. OECD (2004), *In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER),* OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

6. OECD (2004), *In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

7. OECD (2006), *In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion,* OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8. EC-ECVAM (2009), Performance Standards for in vitro skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

9. OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment,* OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

10. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

11. Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

12. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, *ALTEX* 21, 107–114.

13. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, *ATLA* 33, 351-367.

© OECD（2010 年）

14. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, *ATLA* 33, 329-349.

15. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

16. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, *ATLA* 35, 559-601.

17. Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

18. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

19. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy - Results and performances with 184 cosmetic ingredients, *AATEX*, 14, 351-358.

20. EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

21. EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

22. EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

23. OECD (20xx), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. To be published in OECD Series on Testing and Assessment, No. 1XX, OECD, Paris. Available at:

24. Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, *Toxicol. in Vitro* 18, 231-243.

25. Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

26. EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

27. EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

28. SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

29. Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, *In*: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

30. EC (2001), Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 adapting to technical progress for the 28th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances, Official Journal of the European Union L225, 1-333.

31. Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis* 51, 1-4.

32. Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, *AATEX*, 14, 359-365.

33. Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, *Contact Dermatitis*, 62, 109-116.

© OECD（2010 年）

補遺 1

定義

正確度：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。正確度は、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。正確度の替わりに、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。

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、正確度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暴露して、細胞生存率を 50%低下させるのに必要な暴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。

EU CLP（物質および混合物の分類、表示および包装に関する欧州委員会規則）：UN GHS の化学品（物質および混合物）の分類システムをヨーロッパ連合（EU）で実行するための規則(3)のこと。

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、物理的有害性、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、これによって有害作用に関する情報を周知させ、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目指したものである(1)。

IC_{50}：固定の暴露時間でマーカー物質を暴露して、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：検証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)。

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。

性能基準（PS）：検証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検証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。性能基準には、（i）試験法の重要要素、（ii）最低限評価すべき参照化学物質の一覧表（この一覧表中の参照化学物質は、検証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化学物質一覧表を用いて、検証済み試験法に類似した提案試験法を評価したとき、その正確度および信頼性が検証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)。

参照化学物質：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、異なる参照化学物質が必要となる場合もある(9)。

妥当性：試験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、試験法の正確度（一致度）も考慮する(9)。

信頼性：同一プロトコー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)。

代替試験：有害性同定やリスク評価で常用されている公認試験法の替わりになるよう設計された試験であり、公認試験法と適宜比較したとき、あらゆる試験状況および化学物質において、ヒトもしくは動物の健康の保護、または環境の保護という点で公認試験法と同等かそれ以上に優れていることが立証されている試験のこと(9)。

感度：すべての陽性／活性被験物質のうち、試験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度を示す尺度であり、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)。

皮膚刺激性：被験物質を最大 4 時間適用した後に皮膚に可逆的な損傷が生じること。皮膚刺激性は、刺激直後に現れる局所的な非免疫原性反応である(29)。皮膚刺激性の主な特徴は、炎症反応を含む可逆的過程であること、および炎症過程が関連した刺激徴候（紅斑、浮腫、掻痒および疼痛）が主な特徴的な徴候であることである。

特異度：すべての陰性／不活性被験物質のうち、試験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度を示す尺度であり、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：UN GHS(1)では、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。

段階的試験戦略：複数の試験法を段階的に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（2010 年）

付録 2

皮膚刺激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基準

はじめに

1. この性能基準（PS）の目的は、新規の試験法がその試験目的に合う十分な正確度および信頼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。検証済み公認標準試験法に基づくこの PS を用いることによって、検証済み公認標準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、その信頼性および正確度を評価することが可能である(9)。

2. 改良試験法（すなわち、公認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。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)。

3. 3 種類の検証済み試験法（EpiSkin™（検証済み標準試験法、VRM）、EpiDerm™ SIT（EPI-200）および SkinEthic™ RHE）のいずれかの類似（ゾロ）または改良試験法であり、本試験ガイドラインで使用するために提案された試験法は、ドレイズ刺激性スコアが低い化学物質から同スコアが高い化学物質まで用いて評価を実施し、その信頼性および正確度を決定すること。PS が推奨する 20 種類の参照化学物質（表 1）を用いて評価した場合、提案された類似または改良試験法の信頼性および正確度は、VRM の信頼性および正確度と同等以上であること（表 2）(2)(16)。類似または改良試験法が達成すべき信頼性および正確度の値を、補遺中の段落 8～12 に示す。信頼性および正確度（感度、特異度および総合的な正確度）は、提案試験法と VRM とで比較することができるよう、異なる化学物質分類を代表する分類外（UN GHS 区分外）および分類（UN GHS 区分 2）(1)物質を用いて評価すること。試験法の信頼性、UN GHS 区分 2 の刺激性物質を正確に識別する能力、および加盟国の規制の枠組みに応じて UN GHS 区分外の化学物質を正確に識別する能力（任意の区分である UN GHS 区分 3 を採用していない加盟国または加盟地域のみ）を、提案試験法を使用する前に決定する。

4. この PS は、EC-ECVAM PS(8)に基づくものであり、UN GHS および EU CLP (1)(3)の分類および表示システムに従って改訂されたものである。PS の初版は、バリデーション試験終了後に定義され(21)、危険物質指令修正第 28 条(30)に示す EU 分類システムに基づくものであった。しかし、UN GHS の分類および表示システム（EU CLP）(3)が EU で採択されることになり、その EU CLP の採択がバリデーション試験の最終承認～本試験ガイドライン完成の間であったことから、この PS 改正版(8)が作成されることとなった。この改正における主な変更点は、（i）PS の参照化学物質、（ii）信頼性および正確度の値の定義に関するものであった(2)(23)。

5. このPSは、以下の3つの要素から構成される(9)

I）試験法の重要要素
II）最低限評価すべき参照化学物質の一覧表
III）信頼性および正確度の値の定義

I） 試験法の重要要素

6. 検証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ールに示すこと。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(9)。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 16～21 に詳述した。これらの重要要素に関する試験は、以下の順で実施すること。

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）

II） 最低限評価すべき参照化学物質の一覧表

7. 参照化学物質を用いて、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 3 種類の検証済み試験法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）の信頼性および正確度が VRM と同等以上であるかどうかを確認する(2)(8)(16)(23)。表 1 に示した 20 種類の推奨参照化学物質は、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を含むものであり、ドレイズ刺激性スコアが低い化学物質から同スコアが高い化学物質（非刺激性～強刺激性）を網羅するものである。表 1 に示す化学物質の内訳は、UN GHS 区分 2 の化学物質が 10 種類および UN GHS 区分外の化学物質が 10 種類（UN GHS 区分 3 の化学物質 3 種類を含む）である。本試験ガイドラインでは、区分 3 を区分外とみなす。表 1 に列記した化学物質は、VRM の最適化段階（プレバリデーション後に実施した段階）および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(14)(18)。これらの参照化学物質は、提案された類似または改良試験法の正確度および信頼性を評価するうえで使用すべき最低限の化学物質を示すものであり、新規試験法の開発で使用すべき化学物質を示すものではない。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、VRM の最適化段階および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。提案試験法の正確度を更に評価するために、この最低限評価すべき参照化学物質の一覧法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（2010 年）

表 1 類似または改良 RhE 皮膚刺激性試験法の信頼性および正確度を決定するために最低限評価すべき参照化学物質の一覧表 [1]

化学物質	CAS 番号	物理的状態	*In vivo* スコア	VRM（*in vitro* 試験）による区分	UN GHS（*in vivo* 試験）による区分
1-ブロモ-4-クロロブタン	6940-78-9	液体	0	区分 2	区分外
フタル酸ジエチル	84-66-2	液体	0	区分外	区分外
ナフタレン酢酸	86-87-3	固体	0	区分外	区分外
アリルフェノキシアセテート	7493-74-5	液体	0.3	区分外	区分外
イソプロパノール	67-63-0	液体	0.3	区分外	区分外
4-(メチルチオ)ベンズアルデヒド	3446-89-7	液体	1	区分 2	区分外
ステアリン酸メチル	112-61-8	固体	1	区分外	区分外
ヘプチルブチレート	5870-93-9	液体	1.7	区分外	区分外（*区分 3 を使用している場合、区分 3*）
サリチル酸ヘキシル	6259-76-3	液体	2	区分外	区分外（*区分 3 を使用している場合、区分 3*）
シンナムアルデヒド	104-55-2	液体	2	区分 2	区分外（*区分 3 を使用している場合、区分 3*）
1-デカノール [2]	*112-30-1*	*液体*	*2.3*	*区分 2*	*区分 2*
シクラメンアルデヒド	103-95-7	液体	2.3	区分 2	区分 2
1-ブロモヘキサン	111-25-1	液体	2.7	区分 2	区分 2
2-(クロロメチル)-4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン塩酸塩	86604-75-3	固体	2.7	区分 2	区分 2
ジ-n-プロピルジスルフィド [2]	*629-19-6*	*液体*	*3*	*区分外*	*区分 2*
水酸化カリウム （5%水溶液）	1310-58-3	液体	3	区分 2	区分 2
5-tert-ブチル-2-メチルベンゼンチオール	7340-90-1	液体	3.3	区分 2	区分 2
1-メチル-3-フェニル-1-ピペラジン	5271-27-2	固体	3.3	区分 2	区分 2
ヘプタナール	111-71-7	液体	3.4	区分 2	区分 2
四塩化エチレン	127-18-4	液体	4	区分 2	区分 2

[1] これらの化学物質は、次の基準に基づいて選択されたものである；(i) 市販されていること、(ii) ドレイズ刺激性スコアが低い化学物質から同スコアが高い化学物質（非刺激性～強刺激性）まで網羅するものであること、(iii) 化学構造がはっきりと同定されていること、(iv) バリデーション過程で使用した化学官能性を代表するものであること、(v) 特に強い毒性プロファイル（たとえば発癌性または生殖毒性）をもたないことおよび廃棄コストが極めて高いものではないこと。

[2] これらの化学物質はウサギでは刺激性を示す。しかしヒトでは、非刺激性であることを示す信頼性の高い知見が得られている(31)(32)(33)。

III） 信頼性および正確度の値の定義

8. 複数の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 20 種類のすべての参照化学物質を用いて、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。1 施設でしか使用する予定がない提案試験法については、複数の施設でバリデーション試験を実施する必要はない。このようなバリデーション試験は、国際的なガイドライン(9)に従って、国際的に認定された第三者検証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、20 種類のすべての参照化学物質について、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 回実施する。いずれの試験も、被験物質、NC および PC それぞれについて、少なくとも 3 系列で試験を実施する。

9. 提案試験法の信頼性および正確度の値を算出する際には、事前に定義された一貫した方法で信頼性および妥当性を求めることができるように、以下の 4 つの基準を考慮に入れること。

1. 施設内変動性、施設間変動性および予測能（正確度）の算出では、完全試験シーケンスの試験データのみを使用する。

2. 各施設における各参照化合物の最終的な分類は、完全試験シーケンス内の異なる試験間の平均生存率を用いて行う。

3. 試験法の施設間変動性の算出では、全参加施設において完全試験シーケンスが達成された化学物質のデータのみを使用する。

4. 正確度の値は、各参加施設で 20 種類の参照化学物質で評価を行い、個々の施設ごとに算出する。

試験シーケンスとは、各施設における各参照物質に対する独立した一連の 3 回の試験のことである。**完全試験シーケンス**とは、各施設における各参照物質に対する 3 回の試験がいずれも有効であった試験シーケンスのことである。すなわち、1 回でも無効な試験があった場合、3 回の試験から成る試験シーケンス全体が無効となる。

施設内再現性

10. 施設内再現性の評価では、20 種類の参照化学物質に対する独立した異なる試験で得られた分類（UN GHS 区分 2 および区分外）の施設内の一致度が 90%以上であること。

施設間再現性

11. 提案試験法を 1 施設でのみ使用する予定の場合、施設間再現性を評価する必要はない。提案試験法を複数の施設で使用する予定の場合、20 種類の参照化学物質に対する独立した異なる試験で得られた分類（UN GHS 区分 2 および区分外）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。

予測能（正確度）

12. 提案された類似または改良試験法の正確度（感度、特異度および総合的な正確度）は、VRM と同等以上とするが、対象動物種における妥当性に関する追加情報を考慮する（表 2）。提案試験法の感度は 80%以上とする(2)(8)(23)。ただしこれは、*in vivo* 試験で区分 2 に分類される化学

 © OECD（2010 年）

物質のうち、*in vitro* 提案試験法で複数の施設において区分外に誤って分類される可能性がある化学物質が 2 種類（*1-デカノール*および*ジ-n-プロピルジスルフィド*）あることから、*in vitro* 提案試験法の感度に特定の制限を適用したものである。提案試験法の特異度は 70%以上である(2)(8)(23)。*In vitro* 提案試験法の特異度については、これ以上制限を設けないこととする（すなわち試験実施施設は、提案試験法の最終的な特異度の許容範囲内で、*in vivo* 試験で区分外に分類されるあらゆる化学物質を、*in vitro* 提案試験法で誤って分類する可能性がある）。提案試験法の総合的な正確度は、75%以上であること(2)(8)(23)。表 1 に示した 20 種類の参照化学物質から算出した VRM の感度は 90%であるが、*1-デカノール*（境界線上の化学物質）および*ジ-n-プロピルジスルフィド*（VRM で偽陰性となる化学物質）は、ウサギを用いた試験で刺激性を示すが、ヒトで非刺激性であることが知られているため(31)(32)(33)、提案された類似または改良試験法が有効であると判断される感度下限値は 80%に設定されている。RhE モデルは、ヒト由来細胞に基づくものであるため、これらの 2 種類の化学物質は、非刺激性（UN GHS 区分外）と予測される可能性がある。

表 2：類似または改良試験法を有効とみなすために要求される感度、特異度および総合的な正確度の値

感度	特異度	総合的な正確度
≥ 80%	≥ 70%	≥ 75%

試験合格基準

13. 1 種類以上の参照物質に対する 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。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。

14. 再試験を実施しても、すべての各参照化学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、そのデータセットを合格と判断する。

1. 20 種類の参照化学物質のいずれもが、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（20 種類の参照化学物質を用いた場合、各施設において許容される無効試験シーケンスの数は 3 つである）。

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 20 種類の参照化学物質を用いた場合、全体で許容される無効試験シーケンスの数は 6 つである）。