OECD/OCDE

2013/07/26

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 (2013), 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-439-2013.pdf.

©OECD (2013)

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)

2013 年 7 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 皮膚刺激性：再構築ヒト表皮試験法

はじめに

1. 皮膚刺激性とは、被験物質を最大4時間適用した皮膚に、可逆的な損傷を引き起こす性質のことである（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)による定義）。本試験ガイドライン（TG）には、UN GHS区分2 (1) (2)に一致する刺激性化学品（物質および混合物）の危険有害性を同定するのに使用できる*in vitro*手順を示す。任意指定のUN GHS区分3（軽度の刺激性物質）を採用していない加盟国や地域では、本試験ガイドラインを、区分外の化学品の同定にも使用できる。したがって、本試験ガイドラインは、化学品の皮膚刺激性の判定に際し、規制の枠組みや使用している分類システムに応じて、*in vivo*皮膚刺激性試験の単独の代替法としても、階層的試験方式の中の部分的な代替試験としても使用できる(4)。

2. 皮膚刺激性の評価には、主として実験動物が用いられてきた（OECD TG 404 [1981年に採択、1992年と2002年に改訂]）(4)。動物愛護の問題との関連で、TG 404 (4)の補遺では、皮膚腐食性や皮膚刺激性の同定には、動物の苦痛を避けるため、バリデートされた*in vitro*試験法や*ex vivo*試験法を用いた階層的試験方式が推奨されている。TG 404 (4)の補遺で推奨されている階層的試験方式の腐食性のパートに用いることのできるバリデート済みの*in vitro*試験法として、OECD TG 430(5)、TG 431(6)、TG 435(7)の3つの試験法が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を扱うものであり、ヒトの皮膚の上部（すなわち、表皮）の生化学的・生理学的特性を厳密に模倣した再構築ヒト表皮（reconstructed human *epidermis*：RhE）の*in vitro*試験系基づいている。RhE試験系は、代表的な組織構造と細胞配列を有する表皮モデルを再構築するための細胞源として、ヒト由来の非形質転換ケラチノサイトを用いている。ガイダンス文書No. 34 (10)の原則に従った、RhEをベースとする類似の試験法や改変した試験法のバリデーションや評価を行う際には、EC-ECVAMが策定した性能標準(8) (9)が役立つ（補遺4を参照）。

© OECD, (2013)
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。

4. RhE試験系をベースにした4種類の市販の*in vitro*試験法について、先行バリデーション試験、最適化試験、バリデーション試験が完了している(11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (35) (36) (37) (38) (39)。これら4つの試験法を本試験ガイドラインに含め、補遺2に一覧表示する。補遺2には、それぞれの試験法をバリデートするのに用いたバリデーション試験法の種類に関する情報も掲載する。これらの試験法のうち3つは、補遺2に述べるように、性能標準（補遺4）を含む本試験ガイドラインの策定に用いており、また、補遺2と補遺4に述べるように、バリデーション済み標準方法（VRM）と呼ぶ。

5. これらの試験法がOECDによって審査および採択された場合、性能標準（補遺4）に従ってバリデーションされた試験法に対してのみ、データの相互受け入れが保証される。本試験ガイドラインに記載された試験法は、対象を選ばず使用して、皮膚刺激性の*in vitro*試験法による試験結果に関する国の要件に対応できる一方、データの相互受け入れによる恩恵も受けることができる。

6. 本試験ガイドラインで用いた用語の定義を補遺1に示す。

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限界は、RhE試験法の評価および特徴づけを行う完全な前向きバリデーション試験が示すように(17)、化学品を任意区分のUN GHS区分3（軽度刺激物）に分類できないことである(1)。したがって、本試験ガイドラインをどのように用いるかは、加盟各国の規制の枠組みによって決まってくる。部分的な代替試験として用いるときは、皮膚刺激性を完全に特徴づけるために、フォローアップの*in vivo*試験が必要になる場合がある(4)。ヒト皮膚の使用については、国内および国際的な倫理的配慮や条件に従うものとする。

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の補遺で推奨されている**階層的試験方式**の中の、*in vitro*皮膚刺激性の部分に適応される(4)。本試験ガイドラインは、皮膚腐食性に関して十分な情報を有していないが、皮膚腐食性に関するOECD TG 431は、別のプロトコルを用いているものの、同じRhE試験系に基づいていることに留意する必要がある(6)。本試験ガイドラインは、ヒトのケラチノサイトを用いた（したがって、*in vitro*で対象動物の標的器官となる）RhEモデルに基づいている。また、本試験ガイドラインは、*in vivo*での刺激中に起きた作用（局所外傷をもたらす細胞損傷や組織損傷）の炎症カスケードや炎症メカニズムの初期段階を直接的に網羅している。本試験ガイドラインの基礎となったバリデーション試験では幅広い化学品が試験され、このバリデーション試験のデータベースの化学品は、58種類に達している(17) (19) (24)。本試験ガイドラインは、固体、液体、半固体、ワックスに適用できる。液体については、水性、非水性の両方に適用でき、固体については、水に可溶性、不溶性の両方に適用できる。可能であれば、固体は適用前に必ず粉砕して微粉末にすべきであるが、これ以外に必要な前処理はない。気体とエアロゾルは、まだバリデーション試験で評価が行われていない(25)。気体とエアロゾルについては、RhEの技術を用いて試験でき

© OECD, (2013)

ると考えられるが、現行の試験ガイドラインでは、これらを試験することを認めていない。濃い色の化学品は細胞生存率の測定を妨げ、適切な対照を用いて補正しなければならない場合があることにも留意する（24～26項を参照）。

9. 分類の結果に曖昧さがなければ、実験は、被験物質ごとに3系列の組織で1回行えば十分である。ただし、3系列の測定値が一致しない場合や、生存率の平均が50±5%である場合など、結果がどちらとも言えない場合は、2回目の実験を検討する。また、1回目と2回目の実験の結果が一致しない場合は、3回目の実験を検討する。

試験の概要

10. 高度に分化した多層培養ヒト*表皮*モデルを形成させた、ヒト由来の非形質転換表皮ケラチノサイトからなる三次元RhEモデルに、被験物質を局所塗布する。同モデルは、組織化した基底層、有棘層、顆粒層と、*in vivo*で認められるものに類似した主要な脂質類を代表する細胞間脂質ラメラ層を含む多層性の角質層からなる。

11. 化学物質が引き起こす皮膚刺激は、主に紅斑や浮腫となって現れるが、これは、化学物質が角質層を通過して浸透することを発端とした現象のカスケードの結果であり、この場合、化学物質は、下位層にあるケラチノサイトなどの皮膚細胞を損傷する可能性もある。損傷した細胞は、炎症メディエーターを放出したり、あるいは炎症カスケードを誘発して、真皮にある細胞、特に間質細胞や血管内皮細胞にも作用を及ぼす可能性がある。紅斑や浮腫の発生は、内皮細胞が膨張して透過性が増大することによって発生する(25)。特に、RhEベースの試験法は、*in vitro*試験系において血管新生がない場合に、細胞生存率を読み取り値として用いて、カスケードの起因現象（例えば、細胞や組織の損傷(17) (18)）を測定する方法である。

12. 生体染色色素の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）をブルーホルマザン塩に酵素的に転化し、これを組織から抽出して定量し、RhEモデルにおける細胞生存率を求める(25)。細胞生存率を規定の閾値よりも下げる化学品は、刺激性とみなす（すなわち、細胞生存率が50%以下の場合は、UN GHS区分2に分類する）。規制の枠組みや本試験ガイドラインの適用の可能性にもよるが、細胞生存率が規定の閾値より高い化学品は、非刺激性とみなしてよい（すなわち、細胞生存率が50%より高い場合は、区分外に分類する）。

習熟度の確認

13. 本試験ガイドラインに準拠する4つのバリデート済み試験法（補遺2）のいずれかを日常的に使用する場合、その前に、表1に示す習熟度確認用の化学品10種類を使用して、試験施設の習熟度を証明すること。

© OECD, (2013)

14. RhE モデルを使用する際には、受け取った組織のバリア性が RhE モデルの製造者によって明記されたとおりであるかを、習熟度を証明する試験の一部として確認することが推奨される。これは、組織の輸送が長時間や長距離に及んだ場合に特に重要である。試験法が十分に確立され、かつ試験法の使用における習熟度の習得と証明がなされた場合には、このような確認を日常的に行う必要はない。ただし、試験法を日常的に使用する際には、バリア性の評価を定期的に続けることが推奨される。

表 1：習熟度確認物質 [1]

化学品	CAS 番号	*in vivo* スコア [2]	物理的状態	UN GHS 区分
分類されていない化学品				
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
酪酸ヘプチル	5870-93-9	1.7	液体	区分外 (任意区分 3)[3]
サリチル酸ヘキシル	6259-76-3	2	液体	区分外 (任意区分 3)[3]
分類された化学品				
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] 習熟度確認物質とは、バリデーション試験で使用する化学品の一部である。
[2] OECD試験ガイドライン404 (4)に従った*in vivo*スコア。
[3] 本試験ガイドラインでは、UN GHS の任意区分である区分 3（軽度刺激物）(1)は、区分外とみなす。

試験手順

15. 皮膚刺激性評価のための RhE 試験法について、構成要素と手順を以下に説明する（各試験法に関連するパラメータについては、補遺 3 も参照）。本試験ガイドラインに従う 4 つの試験法については、標準操作手順書（SOP）が入手できる(27) (28) (29) (40)。

RhE 試験法の構成要素

全般的な条件

16. 上皮の再構築には、ヒト由来の非形質転換ケラチノサイトを用いること。生存可能な上皮性細胞で構成される複数の層（基底層、有棘層、顆粒層）が、機能的な角質層の下に存在していること。角質層は複数の層からなり、細胞毒性を有する基準物質（例：ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、Triton X-100など）の急速な浸透にも強い耐性を有する機能性バリアを生じ

© OECD, (2013)

るのに不可欠な脂質プロファイルを含有すること。バリア機能を証明し、一定時間曝露後に組織の細胞生存率が50%に低下する基準物質の濃度（IC_{50}）を求めるか、または、基準物質を規定の固定濃度で適用し、細胞生存率を50%に低下させるのに必要な曝露時間（ET_{50}）を求めることによってバリア機能の証明および評価をすることができること。RhEモデルの封じ込め特性（containment property）は、角質層周辺の物質が生存組織に透過・移行するのを妨げるものであり、皮膚への曝露が少ないモデリングが得られると考えられるものであること。RhEモデルは、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌のいずれにも汚染されていないこと。

機能的な条件

生存率

17. 生存率の測定には、MTT法を用いる(26)。RhEモデルを使用する場合は、陰性対照について規定された基準を満たしているかを、使用するRhEモデルロットごとに確認すること。抽出溶媒単独の光学濃度（OD）は、十分に低い（0.1未満である）こと。陰性対照のOD値は、皮膚刺激性試験法の条件下における許容範囲（上限値と下限値）が、RhEモデルの開発者や供給者によって規定されている。表2に、バリデーション済みの4つの試験法の許容範囲を示す。陰性対照の組織について、曝露期間中において、培養が安定していること（生存率の測定値が同様であること）を記録によって立証すること。

表2：本試験ガイドラインに含めた試験法における、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™ SIT (EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0.7	≤ 2.5

バリア機能

18. 角質層とその脂質組成物は、細胞毒性の基準物質（例：SDS、Triton X-100 など）の急速な浸透に十分に耐えられることが、IC_{50} や ET_{50} の値（表 3）から推定されるものであること。

形態

19. RhEモデルのヒト*表皮*様構造（多層の*角質層*を含む）を証明するため、組織学的検査を行うこと。

再現性

20. 試験法の陽性対照と陰性対照の結果は、経時的再現性が示されること。

© OECD, (2013)

品質管理（QC）

21. RhEモデルは、使用するRhEモデルの各ロットが、定められた製造・出荷基準を満たしていることが、RhEモデルの開発者や供給者によって証明されている場合にのみ使用すること。この製造・出荷基準の中でも問題となるのは、*生存率*（段落17）、*バリア機能*（段落18）、*形態*（段落19）である。これらのデータをRhE試験法の使用者に提供して、使用者が試験報告書に記載できるようにすること。IC_{50}およびET_{50}の許容範囲（上限と下限）は、RhEモデルの開発者や供給者が規定すること。刺激性分類の予測を信頼できるものにするためには、適格な組織を用いて得られた結果のみを受け入れること。本試験ガイドラインに含めた4つの試験法について、許容範囲を表3に示す。

表3：本試験ガイドラインに含めた試験法の、品質管理のためのロット出荷基準

	下限値	上限値
EpiSkin™ (SM) （SDS に曝露後 18 時間）(27)	IC_{50} = 1.0 mg/mL	IC_{50} = 3.0 mg/mL
EpiDerm™ SIT (EPI-200) （1% Triton X-100）(28)	ET_{50} = 4.0 時間	ET_{50} = 8.7 時間
SkinEthic™ RHE （1% Triton X-100）(29)	ET_{50} = 4.0 時間	ET_{50} = 10.0 時間
LabCyte EPI-MODEL24 SIT （SDS に曝露後 18 時間）(40)	IC_{50} = 1.4 mg/mL	IC_{50} = 4.0 mg/mL

被験物質および対照物質の適用

22. 実験は、各被験物質および各対照について、3 系列以上で行う。液体と固体いずれも、*表皮*表面を均一に覆うのに十分な量で、かつ過剰量にならない量（液体の場合は表皮 1 cm^2 当たり 26～83 µL、固体の場合は表皮 1 cm^2 当たり 26～83 mg）を適用する（補遺 3 を参照）。また、固体の場合は、*表皮*表面との接触を良くするため、*表皮*表面を脱イオン水または蒸留水で湿らせてから適用する。可能であれば、固体は必ず微粉末で試験する。場合によっては、ナイロンメッシュを使用して散布してもよい（補遺 3 を参照）。曝露終了後、水性緩衝液または 0.9%塩化ナトリウム水溶液で、*表皮*表面から慎重に被験物質を洗い落とす。用いる RhE 試験によって、曝露時間は 15～60 分間、インキュベーション温度は 20～37℃と幅がある。これらの曝露時間と温度は、それぞれの RhE 試験法ごとに最適化されており、試験法によって固有の特性（例：バリア機能など）が異なることを示している（補遺 3 を参照）。

23. 実験を行うごとに同時陰性対照と同時陽性対照を用いて、組織の生存率（陰性対照により）、組織のバリア機能および得られた組織感度（陽性対照により）が、従来の定義された許容の範囲内であることを実証する。陽性対照物質には、SDSの5%水溶液が推奨される。また、陰性対照物質には、水またはリン酸緩衝食塩水（PBS）が推奨される。

© OECD, (2013)

細胞生存率の測定

24. 試験手順に従い、細胞生存率の測定は、曝露直後ではなく、曝露後に組織をすすいでから、新鮮な培地中でインキュベーションする時間を十分にとってから行うこと。このインキュベーションの時間を設けることによって、弱い細胞毒性作用から回復させる一方、明らかな細胞毒性作用を発現させることができる。本試験ガイドラインの基礎をなしているRhEベースの試験法のうち、2つの試験法の最適化において、処理後のインキュベーション時間は42時間が最適であった(12) (13) (14) (15) (16)。

25. 本試験ガイドラインにおいて細胞生存率の測定に用いるバリデーション済み定量法は、MTT法である。MTT法は、三次元の組織構造物での使用に適合している。組織試料を、適切な濃度（例：0.3〜1 mg/mLなど）のMTT溶液に3時間浸漬する。MTTは、生存細胞によって、ブルーホルマザンに転化される。ブルーホルマザンの沈殿生成物を組織から溶剤（例：イソプロパノール、酸性イソプロパノールなど）で抽出し、最大値±30 nmのバンドパスフィルターを用いて、570 nmでホルマザンのODを測定する。

26. 被験物質の光学特性や、被験物質のMTTに対する化学作用（例えば、化学物質によって、発色が起こるだけでなく、発色の阻害や後退も引き起こされる可能性がある）が分析に干渉して、細胞生存率の推定値に誤りが起きる場合がある。これは、特定の被験物質が組織から完全に洗い流されていない場合や、*表皮*に浸透してしまっている場合に起こる可能性がある。被験物質がMTTに直接作用する場合（例えば、MTTを還元する物質である場合など）、被験物質がもともと着色されている場合、あるいは組織に曝露している間に被験物質に色が着く場合は、被験物質が細胞生存率の測定法に及ぼす干渉を検出して補正するため、別の対照を追加する。MTTの直接還元と着色剤による干渉を補正する方法の詳細については、本試験ガイドラインに含めた4つの検証済み試験法(27) (28) (29) (40)のSOPを参照のこと。

許容基準

27. 試験ごとに、適正なRhEモデルのロット（段落21を参照）を用い、出荷、受け取り手続き、プロトコルのすべてのプロセスを経た後の組織の品質を反映するOD値が、陰性対照に曝露した組織において得られること。陰性対照におけるOD値が、従来確立された境界域より低い値でないこと。一方、陽性対照（SDSの5%水溶液）に曝露した組織においても、RhE試験法の条件下で、刺激性物質に反応する能力が示されること（補遺3を参照。詳細については、本試験法に含めた4つの試験法(27) (28) (29) (40)のSOPを参照のこと）。連間の組織におけるばらつきに関連する適切な基準、すなわち標準偏差（SD）が、RhE試験法について確立された許容範囲内であること（補遺3を参照）。

© OECD, (2013)

結果の解釈と予測モデル

28. OD 値を陰性対照（100%に設定した）に標準化した細胞生存率の計算には、各被験物質を用いて得られる OD 値が使用できる。刺激性の化学品を区分外の化学品と区別するための細胞生存率のカットオフ値と、結果の評価と刺激性物質の同定に用いる統計的手順について、明確に定義し、記録し、適切であることを証明すること（詳細は、各試験法の SOP を参照）。刺激性を予測する際のカットオフ値は、下記のとおりである。

- 曝露した後のインキュベーション後の細胞生存率が50%以下である被験物質は、皮膚刺激性とみなし、UN GHS区分2とする。

- 曝露した後のインキュベーション後の細胞生存率が50%より高い被験物質も、加盟国の規制の枠組みによっては、皮膚刺激性なしとみなし、UN GHS区分外としてよい。

データおよび報告

データ

29. 実験を行うごとに、系列ごとの組織のデータ（例：分類を含む、各被験物質についてのOD値と算出した細胞生存率のデータなど）を、表形式で報告すること。実験を繰り返した場合は、そのデータも含めること。これに加え、実験ごとの平均値±標準偏差を報告すること。被験物質ごとに、MTT試薬との相互作用の観察結果および被験物質の着色について報告すること。

試験報告書

30. 試験報告書には、以下の情報を含めること。

被験物質および対照物質

- CAS名などの化学名。CAS番号がわかれば、これも記載
- 純度と組成（重量%で記載）
- 試験の実施に関連する物理化学的性質（例：物理的状態、安定性、揮発性、pH、水溶性（わかっている場合））
- 試験前に被験物質や対照物質の処理（例：加温、粉砕など）を行った場合は、それを記載
- 保存条件

使用したRhEとプロトコルの妥当性

試験条件：

- 使用した細胞系

© OECD, (2013)

- 使用した特定のRhEモデルについて、その性能も含む完全な裏付け情報（その性能も含む）。例として下記のものを含めること。
    i) 生存率
    ii) バリア機能
    iii) 形態
    iv) 再現性と予測性
    v) 該当モデルの品質管理（QC）
- 用いた試験手順の詳細
- 用いた用量、曝露時間、曝露後のインキュベーション時間
- 試験手順を修正した場合は、その説明
- そのモデルの背景データの参照先。これには、例えば、次のようなものを含めること。
    i) QCデータについて、背景のロットデータに基づく受け入れ可能性
    ii) 陽性および陰性対照の値について、平均値と範囲に基づく受入れ可能性
- 用いた評価基準の説明。予測モデルにおけるカットオフポイントの選択について、正当とする証拠も含む。
- 被験物質がMTTの直接還元剤である場合や着色している場合に用いる、対照の指標

結果：

- 個々の被験物質について、データを実験ごとおよび複製組織ごとに集計した表。表には、平均、標準偏差、全体の分類を含める。
- 被験物質がMTTの直接還元剤である場合や着色させる場合に用いる対照の結果
- 観察された他の効果に関する説明

結果の考察

結論

© OECD, (2013)

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://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]

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://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing] *N.B. This is the current version of the ECVAM PS, updated in 2009 in view of the implementation of UN GHS.*

9. EC-ECVAM (2009), ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for in vitro skin irritation testing using Reconstructed human Epidermis, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]

10. 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]

© OECD, (2013)

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. 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://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]

19. 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.

20. 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.

21. 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://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]

22. EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing] *N.B. These are*

© OECD, (2013)

the original PS used for the validation of two test methods. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available.

23. 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://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]

24. OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. Published in OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris. Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)36&doclanguage=en

25. 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.

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

27. 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://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]

28. 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://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]

29. 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://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]

30. 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.

31. 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.

32. 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.

33. 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.

34. 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, (2013)

35. Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009), Assessment of human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for in vitro skin irritation testing according to European centre for the validation of alternative methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol Sci*, 34, 327-334

36. Katoh, M. and Hata K. (2011), Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 skin Irritation test method for adaptation to the requirements of OECD test guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

37. OECD (2011), Validation report for the skin irritation test method using LabCyte EPI-MODEL24, OECD Series on Testing and Assessment No. 159, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

38. OECD (2011), Peer review report of validation of the skin irritation test using LabCyte EPI-MODEL24, OECD Series on Testing and Assessment No. 155, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

39. Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012), Validation Study of the In Vitro Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

40. LabCyte EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3 (June 2011), Skin irritation test using the reconstructed human model "LabCyte EPI-MODEL24" Available at: [http://jacvam.jp/]

© OECD, (2013)

補遺1

定義

正確性：試験法の結果と、採用されている標準値との間の一致の程度。試験法の性能を判断する尺度であり、妥当性の一つである。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「一致度」と同義で用いられることが多い(10)。

細胞生存率：細胞集団の総活性を、例として、細胞のミトコンドリアの脱水素酵素が、生体染色色素の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パラメータ。測定したエンドポイントと使用した試験デザインにもよるが、生細胞の総数や活力と相関する。

化学品：物質または混合物。

一致度：カテゴリカルな結果が得られる試験法の性能を判断する尺度であり、妥当性の一つである。この用語に代えて正確性が用いられることもある。一致度は、試験されたすべての化学品のうち、陽性または陰性に正しく分類されたものの割合と定義される。一致度は、試験されているすべての被験物質に占める陽性の割合に、大きく左右される(10)。

ET_{50}：基準物質を規定の固定濃度で適用して、細胞生存率が50%低下するのに必要な曝露時間を求めることによって推定する。IC_{50}も参照のこと。

EU CLP（物質および混合物の分類、表示、包装に関する欧州委員会規則）：欧州連合（EU）において実施されている、化学品（物質および混合物）を分類するためのUN GHSシステム(3)。

GHS（国際連合（UN）による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（物質および化合物）の分類を、物理化学的危険性、健康有害性、環境有害性の、統一された種類や程度に応じて分類することを提案するとともに、人々（雇用者、労働者、輸送担当者、消費者、緊急時対応者など）や環境を保護するために、有害事象に関する情報を伝えられるように、絵表示、注意喚起語、危険有害性情報、注意書き、安全データシートなど、対応する伝達要素を取り扱うシステム(1)。

IC_{50}:基準物質を一定時間曝露後､組織の活性が50%低下する濃度を求めることによって推定する。ET_{50}も参照のこと。

© OECD, (2013)

過剰量：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物質の量。

ゾロ（me-too）試験法：バリデートされ、採用された標準試験法に、構造的・機能的に類似している試験法の口語的表現。類似試験法は、追走的なバリデーションの候補になる。「類似試験法」と同義で用いられる(10)。

混合物：互いに反応しない2つ以上の物質からなる混合物または溶液。

性能標準（PS）：バリデーション済み試験法に基づいた基準。提案された試験法のうち、構造的・機能的に類似したものについて、その同等性を評価する際の根拠となる。性能標準には、(i) 試験法における不可欠な要素、(ii) バリデーション済み試験法において許容される性能を示すのに使用される化学品の中から選抜された、参照物質の最小限のリスト、(iii) 提案された試験法を参照物質の最小限のリストを用いて評価する際に示さなければならない、バリデーション済み試験法について得られたものと同等レベルの正確性と信頼性が含まれる(10)。

参照物質：*in vitro*または*in vivo*の標準試験系や対象動物種における反応が知られている化学物質の中から、バリデーションのプロセスで使用するために選抜された化学物質。参照物質は、その試験法で使用することが予想される化学物質のクラスを代表するものであり、使用した場合には、幅広い反応（強～弱の反応と陰性の反応）が得られることが予想されるものでなければならない。参照物質は、バリデーションのプロセスの段階、試験法、および試験の使用目的ごとに、それぞれ異なるセットが必要になる可能性がある(10)。

妥当性：試験とそれによって生じる影響との関係と、試験が特定の目的にとって意義や有用性があるかを示す。試験が試験対象となる生物学的影響を正確に測定または予測できる程度を示す。妥当性には、試験法の正確性（一致度）への考慮が盛り込まれる(10)。

信頼性：同じプロトコルを用いて試験法を実施する際に、施設内および施設間において、試験法を経時的に再現性よく実施することが可能な程度の尺度。施設内および施設間の再現性を算出して評価する(10)。

置換試験：危険有害性の同定やリスク評価のために日常的に使用され、かつ一般に認められている試験の代わりになるようにデザインされた試験であり、試験対象になる可能性のあるすべての状況や化学品に関して、一般に認められている試験に比較して、ヒトや動物の健康や環境（該当する場合）を同等かそれ以上に保護できることが確認されている試験(10)。

感度：すべての陽性や活性のある被験物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。断定的な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上で考慮することが重要である(10)。

© OECD, (2013)

皮膚刺激性：被験物質を最大4時間適用した皮膚に、可逆的な損傷を引き起こす性質のこと。皮膚刺激性は、被験物質に冒された皮膚組織に生じる局所的な反応であり、被験物質の適用直後から現れる(30)。皮膚組織の生得の（非特異的な）免疫系が関与する局所的な炎症反応に起因する。皮膚刺激性の主な特徴は、その可逆的な過程が炎症反応に関与していることと、刺激作用の特徴的な臨床症状（紅斑、浮腫、そう痒、疼痛）の多くが、炎症過程に関連していることである。

特異度：すべての陰性や不活性な被験物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。断定的な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上で考慮することが重要である(10)。

物質：自然の状態の、または製造過程で得られる化学元素とその化合物のことをいい、その製品の安定性を保つために必要な添加物や、その工程から派生する不純物は含まれるが、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する可能性のある溶剤は除く。

被験物質：試験対象の物質のことをいう。

階層的試験方式：複数の試験法を順次的に用いて試験を行うこと。各段階で選択する試験法を、その前の段階の試験結果に基づいて決定する(10)。

© OECD, (2013)

補遺2

本試験ガイドラインに含めた試験法

番号	試験法の名称	バリデーション試験の種類	参考文献
1	**EpiSkin™**	完全な前向きバリデーション試験（2003～2007）。この試験法の構成要素は、オリジナルおよび更新されたECVAMの性能標準に不可欠な試験法の構成要素を定義するのに用いられた(8) (9) (22)*。また、未分類の物質と分類済みの物質の同定に関連する試験法のデータは、オリジナルの性能標準*の特異度と感度を定義するための最も重要な根拠となっている。	(2) (8) (9) (11) (12) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (24) (27)
2	**EpiDerm™ SIT (EPI-200)**	EpiDerm™（オリジナル）：2003～2007年に、1番の試験とともに、最初の完全な前向きバリデーション試験が行われた試験法。この試験法の構成要素は、オリジナルおよび最新のECVAMの性能標準に不可欠な試験法の構成要素を定義するのに用いられた(8) (9) (22)*。 **EpiDerm™ SIT (EPI-200)**：オリジナルのEpiDerm™の変法が、オリジナルのECVAMの性能標準を用いて2008年にバリデートされた(22)*。	(2) (8) (9) (11) (13) (14) (16) (17) (18) (19) (21) (22) (24) (28) (2) (22) (23) (24) (28)
3	**SkinEthic™ RHE**	2008年に策定されたオリジナルのECVAMの性能標準に基づいたバリデーション試験(22)*。	(2) (22) (23) (24) (29)
4	**LabCyte EPI-MODEL24 SIT**	OECD TG 439の性能標準に基づいた2011～2012年のバリデーション試験。TG 439の性能標準は、更新された最新のECVAMの性能標準に基づいている(8) (9)*。	(8) (9) (35) (36) (37) (38) (39) (40)、および本試験ガイドラインの性能標準*

*) ECVAMのオリジナルの性能標準(22)は、1番と2番の試験法の性能の評価を行った前向きバリデーション試験(17)の完了後まもない2007年に、EU危険物指令第28次改正(31)に記載されている分類システムを基準にして策定された。UN GHSが導入された2008年に(1) (3)、未分類の物質を分類済み物質と区別するための*in vivo*スコアのカットオフ値が2.0から2.3に引き上げられた。この規制要件の変更に対応するため、正確性の値とECVAMの性能標準の参照物質リストが、2009年に更新された(2) (8) (9)。オリジナルの性能標準であるため、更新された最新の性能標準も、ほとんどは1番と2番の試験法によるデータに基づいているが(17)、3番の試験法による参照物質に関する

© OECD, (2013)

データも追加使用されている。更新された最新のECVAMの性能標準は、2010年に、本試験ガイドラインに示す性能標準を規定するために用いられた（補遺4を参照）。1番、2番、および3番の試験法（すなわち、EpiSkin™、EpiDerm™ SIT (EPI-200)、SkinEthic™ RHE）は、性能標準を含め、本試験ガイドラインを規定するために用いられているため、バリデート済み標準方法（VRM）とみなされる（補遺4を参照）。バリデーション試験に関する詳細や、得られたデータの集計、UN GHS施行の結果として必要になった性能標準の改変の背景については、本試験ガイドラインに対するECVAM/BfRの背景に関する説明文書(24)を参照されたい。

SIT：皮膚刺激性試験

RHE：再構築ヒト表皮

© OECD, (2013)

補遺3

本試験ガイドラインに含めた各試験法に固有のプロトコルパラメータ

RhE 試験法については、極めて類似したプロトコルが示されており、いずれの試験法も、曝露後に 42 時間のインキュベーション時間を置く(27) (28) (29)。試験法のバリア機能の違いに関連する主要な 3 つのパラメータ、すなわち、A) インキュベーション前の時間と量、B) 被験物質の適用、C) インキュベーション後の量については、下記に示すように試験間でばらつきがある。

	EpiSkin™ (SM)	**EpiDerm™ SIT (EPI-200)**	**SkinEthic RHE™**	**LabCyte EPI-MODEL24 SIT**
A) インキュベーション前				
インキュベーションの時間	18～24 時間	18～24 時間	2 時間未満	15～30 時間
培地量	2 mL	0.9 mL	0.3 mL	0.5 mL
B) 化学物質の適用				
液体の場合	10 µL (26 µL/cm^2)	30 µL (47 µL/cm^2)	16 µL (32 µL/cm^2)	25 µL (83 µL/cm^2)
固体の場合	10 mg (26 mg/cm^2) + DW (5 µL)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µL)	16 mg (32 mg/cm^2) + DW (10 µL)	25 mg (83 mg/cm^2) + DW (25 µL)
ナイロンメッシュの使用	使用しない	適宜使用する	使用する	使用しない
総適用時間	15 分間	60 分間	42 分間	15 分間
適用温度	室温	a) 室温で 25 分間 b) 37°C で 35 分間	室温	室温
C) インキュベーション後の量				
培地量	2 mL	0.9 mL x 2	2 mL	1 mL
D) 最大許容変動				
連間の標準偏差	SD≦18	SD≦18	SD≦18	SD≦18

DW：蒸留水

DPBS：ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水

© OECD, (2013)

補遺 4

提案された類似または改変した、再構築ヒト表皮（RhE）を用いる *類似の in vitro* 皮膚刺激性試験または試験法の改変案を評価するための性能標準

（新規または改変した類似試験法の開発者向け）

1. 一般的に言って、性能標準の意図するところは、新しい試験法について、それが知的所有権下にある（すなわち、著作権表示、商標登録、または登録されている）かそうでないかに関わらず、特定の試験目的に対して十分な正確性と信頼性があると判断できる根拠を示すことにある。以下に示す性能標準は、RhE を用いた 3 つの標準方法（いずれもバリデーション済みかつ採用されているもの）に基づいて規定したものであり、同様の科学的原理や測定に基づいた別の類似試験法（口語で「ゾロ（me-too）試験」と呼ばれる）の信頼性や正確性を評価したり、同様の生物学的作用や毒性作用を予測するのに用いることができる(10)。

2. 改変した試験法（すなわち、認可された試験法に対する改善案）について取り上げる前に、変更案が試験性能に及ぼす影響と、変更案がバリデーションのプロセスにおける別の構成要素に利用できる情報に及ぼす影響の程度を明らかにするための評価を行う必要がある。変更案は、その数と種類、得られたデータ、裏付けとなる資料にもよるが、新しい試験について述べたものと同じバリデーションプロセスに従うか、適切な場合は、確立された性能標準を用いて、信頼性と妥当性の限定的な評価に従うこと(10)。

3. バリデーション済み RhE 法の現在の性能標準や改変を規定するのに用いられた、バリデート済み標準方法（VRM、補遺 2 を参照）に類似している（ゾロ）とみなされた方法は、試験ガイドラインに含める前に評価して、信頼性と正確性を判定すること。判定には、Draize 法のすべての刺激性スコアを示す化学物質を用いること。性能標準において推奨される 20 種類の参照物質（表 1）を用いて評価した場合、類似の試験法または試験の変更案の信頼性と正確性の値が、VRM（補遺 4 の表 2）から導出された値と同等以上であること(2) (17)。得るべき信頼性と正確性の値については、補遺 4 の 8～12 項に述べる。異なる化学的分類を代表する分類されない化学品（UN GHS 区分外）と分類された化学品（UN GHS 区分 2）(1)が含まれる。試験法の信頼性だけでなく、UN GHS 区分 2 の刺激性の化学品を正確に同定できる能力の程度も、さらに、加盟国における規制の枠組みによっては、UN GHS 区分外の化学品を正確に同定できる能力の程度も（任意区分の UN GHS 区分 3 を採用していない加盟国の場合）、新たな被験物質の試験に性能標準を用いる前に判定しておくこと。

© OECD, (2013)

4. これらの性能標準は、EC-ECVAM PS (8)に基づいており、分類と表示に関する UN GHS システムに従って更新されている(1) (2) (9)。オリジナルの性能標準(22)は、バリデーション試験(17)の完了後まもなくして規定されたが、EU 危険物指令第 28 次改正(31)に記載されている EU 分類システムに基づいたものであった。EU における分類と表示に関する UN GHS システム（EU CLP）(3)が採択されたのが、バリデーション試験が完了した時点と本試験ガイドラインが完成した時点との間であったため、オリジナルの性能標準は、すでに更新されている(8) (9)。更新されているのは、*i*) 性能標準の標準物質の種類、*ii*) 信頼性および正確性の規定値に関するものである(2) (9) (24)。

5. この性能標準は、下記の 3 つの要素からなる。
   I) 試験法に不可欠な構成要素
   II) 標準物質の最小限のリスト
   III) 信頼性および正確性の規定値

I) 試験法に不可欠な構成要素

6. バリデーション済み試験法の構成要素のうち、構造的要素、機能的要素、および手順的要素が必要不可欠であり、機構的かつ機能的に類似した試験法または試験法の改変案のプロトコルに含める必要がある。これらの構成要素には、その試験法の独自の特徴、重大な意味を持つ手順の詳細、品質管理の手段も含まれる。試験法に不可欠な構成要素を遵守することは、類似の試験法または試験法の改変案が、性能標準を規定するのに用いられたバリデーション済み試験法と同じ概念に基づいていることを保証するのに役立つであろう(10)。試験法に不可欠な構成要素については、下記のとおり、本試験ガイドラインの 16～21 項に詳述した。

   全般的な条件（16 項）
   機能的な条件（下記を含む）
   - 生存率（17 項）
   - バリア機能（18 項）
   - 形態（19 項）
   - 再現性（20 項）
   - 品質管理（21 項）

表 2 や表 3 などにある特定のパラメータについては、適切な値の設定が、類似または改変した新しい試験法のいずれにおいても行われること。これらの特定の値は、試験法によって異なる可能性がある。

II) 標準物質の最小限のリスト

© OECD, (2013)

7. 類似の試験法または試験法の改変案の性能（信頼性および正確性）が、検証済み標準方法（VRM）と同等またはそれ以上であるかどうかを判定するには、標準物質を用いる(2) (8) (9) (17) (24)。この標準物質に基づく評価は、上述の性能標準 I)（試験法に不可欠な構成要素）に照らして構造的かつ機能的に十分に類似していることが証明されている方法や、現在の性能標準を規定するのに用いられたいずれかのバリデーション済み試験法をわずかに改変した方法であることが提示されている方法についてのみ行うことができる。推奨する標準物質として下記の表 1 に示す 20 種類の化学物質は、それぞれ異なる化学的分類（すなわち、官能基に基づく化学的区分）を代表し、Draize 法のすべての刺激性スコア（非刺激性から強刺激性まで）を示す化学物質である。表 1 のリストに示した化学物質の内訳は、UN GHS 区分 2 が 10 種類、区分外が 10 種類（このうち 3 種類は、任意の UN GHS 区分 3）である。任意の UN GHS 区分 3 は、本試験ガイドラインでは「区分外」とみなす。表 1 に示す化学物質は、VRM によって得られたデータや、前向きバリデーション試験(17)に用いられた化学物質に関するデータ、先行バリデーション後の最適化フェーズで用いられた化学物質に関するデータに基づいて選抜したものである。表 1 の作成においては、化学官能性と物理的状態が十分に考慮されている(15) (19)。参照物質は、類似の試験法または試験法の改変案の正確性と信頼性を評価するのに用いるべき最小限の化学物質であるが、新しい試験法の開発には用いるべきではない。表 1 に示す化学物質を入手できない場合は、*in vivo* の参照データが十分に入手できる別の化学物質、例えば、VRM のバリデーション試験や先行バリデーション後の最適化フェーズで用いられた化学物質などを使用してもよい。別の化学的分類を代表する化学物質や *in vivo* の参照データが十分に入手できる化学物質を、必要に応じ、参照物質の最小限のリストに追加して、提案された試験法の正確性について、さらなる評価を行ってもよい。

© OECD, (2013)

表 1：新規または改変した RhE 皮膚刺激性試験法について、正確性および信頼性の数値を決定するのに必要な参照物質の最小限のリスト[1]

化学物質	CAS 番号	物理的状態	*in vivo* スコア	VRM*区分 (*in vitro* での結果に基づく)	UN GHS 区分 (in vivo での結果に基づく)
区分外の化学物質					
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
アリルフェノキシ酢酸	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
酪酸ヘプチル	5870-93-9	液体	1.7	区分外	区分外 (任意区分 3)
サリチル酸ヘキシル	6259-76-3	液体	2	区分外	区分外 (任意区分 3)
桂皮アルデヒド	104-55-2	液体	2	区分 2	区分外 (任意区分 3)
分類済み化学物質					
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
テトラクロロエチレン	127-18-4	液体	4	区分 2	区分 2

*) VRM = バリデーション済み標準方法（補遺 2）

[1] 化学物質の選抜は、(i) 市販されていること、(ii) Draize 法ですべての刺激性スコア（非刺激性から強刺激性まで）を示すこと、(iii) 化学構造が明確であること、(iv) バリデーションのプロセスで用いられた化学官能性を示すこと、(v) 非常に強い毒性（例：発がん性、生殖器系に対する毒性など）を持たず、廃棄処理コストがそれほど高くないこと、の 5 つの基準に基づいて行った。

[2] ウサギに対し刺激性がある化学物質のうち、ヒトに対し刺激性がないという信頼できる証拠があるもの(32) (33) (34)。

© OECD, (2013)

III) 信頼性および正確性の規定値

8. 施設間での移管が予定されている、類似の試験法または試験法の改変案について、信頼性と妥当性を確立するためには、少なくとも 3 つの施設において、それぞれが表 1 の 20 種類の参照物質をすべて試験する必要がある。ただし、提案された試験法を用いる予定の施設が 1 つのみである場合は、必ずしも複数の施設でバリデーションを行う必要はない。ただし、上述したバリデーション試験の評価は、国際的なガイドライン(10)に合わせ、国際的に認められているバリデーション機関が別々に行うことが不可欠である。それぞれの施設は、20 種類の参照物質のいずれについても、試験を別々に 3 回、毎回異なるロットの組織を用い、実施する間隔を十分に空けて行うこと。実験は毎回、被験物質、陰性対照、陽性対照について、いずれも 3 系列以上の組織を用いて行うこと。

9. 提案された試験法の信頼性と正確性の値を計算するときは、下記の 4 つの基準もすべて考慮に入れて、信頼性と正確性の値の計算が、あらかじめ定めた一貫性のある方法で行われるようにすること。
   1. 完全な実験シーケンスで得られたデータ以外は、試験法の施設間および施設内のばらつきや予測能（正確性）を計算するのに用いるデータとして認めないこと。
   2. 各参加施設におけるそれぞれの参照物質の最終的な分類は、完全な実験シーケンスにおける個別の実験ごとの細胞生存率の平均値を用いて得ること。
   3. すべての参加施設において完全な実験シーケンスがある化学物質について得られたデータ以外は、試験法の施設間のばらつきを計算するのに用いるデータとして認めないこと。
   4. 正確性の値の計算は、20 種類の参照物質について得られたそれぞれの施設の予測に基づいて、参加施設ごとに行うこと。

   ここでは、**実験シーケンス**とは、1 つの施設において、1 種類の被験物質について別々に行われた 3 回の実験のことをいい、**完全な実験シーケンス**とは、3 回の実験がすべて有効であった実験シーケンスのことをいう。よって、3 回のうち 1 回でも実験が無効であった実験シーケンスは無効である。

施設内再現性

10. 施設内再現性の評価によって、20 種類の標準物質の、それぞれ別々に行われた実験で得られた分類（UN GHS 区分 2 と区分外）の一致度が、同一の施設内で 90%以上であることが示されること。

© OECD, (2013)

施設間再現性

11. 提案された試験法が 1 つの施設でしか用いられない場合、施設間再現性の評価は必須ではない。試験法を施設間で移管する場合、20 種類の参照物質の、それぞれ別々に行われた実験で得られた分類（UN GHS 区分 2 と区分外）の一致度が、（できれば 3 つ以上の）施設間で 80%以上であること。

予測能

12. 類似の試験法または試験法の改変案の予測能（感度、特異度、正確性）は、対象動物種における妥当性に関連する追加情報も考慮した上で（下記の表 2 を参照）、バリデート済み標準方法（VRM）と同等かそれ以上であること。感度は、80%以上であること(2) (8) (9) (24)。ただし、複数の参加施設が区分外に誤分類する可能性のある *in vivo* で区分 2 の参照物質が、*1-デカノールとジ-n-プロピルジスルフィド*の 2 つしかないため、提案された *in vitro* 試験法の感度には、さらに厳密な制約が課される。特異度は、70%以上であること(2) (8) (9) (24)。提案された *in vitro* 試験法の特異度に関しては、これ以上の制約は課されない。すなわち、どの参加施設も、試験法の特異度が最終的に許容範囲内である限り、*in vivo* で区分外の化学物質のいずれかを誤って分類する可能性がある。正確性は、75%以上であること(2) (8) (9) (24)。表 1 に示す 20 種類の参照物質については、計算した VRM の感度が 90%に等しいが、類似の試験法または試験法の改変案を有効とみなすのに必要な感度の値は 80%以上に規定する。これは、*1-デカノール*（境界域の化学物質）も*ジ-n-プロピルジスルフィド*（VRM の偽陰性）も、ヒトに対して刺激性がないことが知られているが(32) (33) (34)、ウサギを用いる試験では刺激性物質と同定されているためである。RhE モデルはヒト由来の細胞を基盤としているため、これらの化学物質は非刺激性（UN GHS 区分外）であると予測される可能性がある。

表 2：類似の試験法または試験法の改変案法を有効とみなすのに必要な、感度、特異度、および一致度の予測値

感度	特異度	一致度
≥ 80%	≥ 70%	≥ 75%

試験の許容基準

13. 1 つまたはそれ以上の被験物質に関係する 1 つまたは複数の試験が、被験物質や対照物質の試験許容基準を満たさない可能性や、別の理由で許容できない可能性がある。欠測データを補完するための追加実験（「再試験」）は、1 つの被験物質につき 2 回まで行うことが認められる。具体的には、再試験する場合には、陽性対照と陰性対照についても同時に試験しなければならないため、1 つの被験物質（およびそれに伴い、各対照物質）につき、追加実験を 2 回まで行える。

© OECD, (2013)

14. 再試験しても、被験物質ごとに最低限必要な 3 回の有効実験が、すべての標準物質や、すべての参加施設において得られるとは限らず、データ行列が不完全になる場合が考えられる。そのような場合、下記の 3 つの基準がすべて満たされれば、そのデータセットは許容できるとみなしてよい。

    1. 20 種類の参照物質のいずれについても、少なくとも 1 回、完全な実験シーケンスが実行されていること。
    2. 少なくとも 3 つの施設おいて、それぞれにおいて、実験シーケンスの 85%以上が完了していること（20 種類の参照物質に対し、1 つの施設において許容される無効な実験シーケンスの数は 3 個）。
    3. 少なくとも 3 つの施設おいて、すべの可能な実験シーケンス全体の 90%以上が完了していること（20 種類の参照物質を 3 つの施設で試験した場合、全体で許容される無効な実験シーケンスの数は 6 個）。

© OECD, (2013)