OECD/OCDE

2021/06/14

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.

Reference:

OECD (2025), 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://doi.org/10.1787/9789264242845-en.

©OECD (2025)

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)

OECD/OCDE 439

採択：
2021 年 6 月 14 日

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:再構築ヒト表皮試験法

はじめに

1. 皮膚刺激性とは、物質または混合物に曝露した後に生じる、皮膚に対して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]による定義）(1)。本試験ガイドライン（TG）に、UN GHS 区分 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(1) (2)。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、試験方式の中の部分的な代替試験としても使用できる(3)。

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 は 1981 年に初版を採択、1992 年、2002 年および 2015 年に改訂）(4)。腐食性試験のための 3 つのバリデート済み *in vitro* 試験法として、OECD TG 430、TG 431、TG 435 がすでに採択されている(5) (6) (7)。「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）」に関するガイダンス文書（GD）203 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）さらに試験を要する場合のアプローチについて提言している(3)。

3. 本試験ガイドラインは、ヒトの健康の指標である皮膚刺激性を取り扱う。これは、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* 試験系に基づいている。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。GD 34 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、性能標準（performance standard：PS）が役立つ(8) (9)。本試験ガイドラインは 2010 年に初版が採択され、RhE モデルを用いた追加の試験法を収載するために 2013 年に改訂され、GD 203 を記載し、生存率を測定するための代替法の利用を導入するために 2015 年に改訂され、その後、RhE モデルを用いた追加の試験法を収載するために改訂された。

4. 本試験ガイドラインに記載した試験法を、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。補遺 2 に述べるように、本試験ガイドラインおよび PS の策定には、バリデーション済み標準試験法（VRM）を用いている(8)。独立したピアレビューの後、本試験ガイドラインに含まれる方法はいずれも、以下の最小予測能力を満たすと考えられた。感度 80%、特異度 70%、正確性 75%。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、PS (8)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、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するのに区別なく使用することができるほか、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。

© OECD, (2021)

本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/に掲載されている諸条件に従って自由に使用することができる。

5. 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

6. 本試験ガイドラインの限界は、RhE 試験法(16)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、化学品を任意区分の UN GHS 区分 3（軽度刺激物）(1)に分類できないことである。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。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、「IATA GD 203」を参照すること(3)。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。

7. 本試験ガイドラインは、ヒトの健康の指標である皮膚刺激性を取り扱う。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(6)。本試験ガイドラインはヒト角化細胞を用いた RhE モデルに基づいている。したがって、対象生物種の標的器官を *in vitro* で再現しており、また、*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 VRM バリデーション試験で幅広い化学品が試験され、この VRM 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(16) (18) (23)。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(29)。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。

8. 混合物、検討困難な化学物質（例えば、不安定な物質）、または本試験ガイドラインに記載されている適用領域内に明確に含まれない被験化学物質について試験を検討する場合、そうした試験の結果が科学的に意味のある結果をもたらすか否かについて事前に考慮する必要がある。そのような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。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は（例えば、Eskes et al (30)で提唱された戦略に従って）、本試験ガイドラインをそのようなカテゴリーの混合物に用いるべきではない。化学的分類または物理化学的性質が現行の試験ガイドラインにあてはまらないことが判明した場合にも、同様に対処する必要がある。65 種類の農薬製剤の *in vitro* および *in vivo* データを比較した試験によれば、全体の正確性は 54%（65 種類の農薬製剤に基づく）、感度は 44%（25 種類の製剤に基づく）、特異度は 60%（40 種類の製剤に基づく）であった。このデータは、RhE に基づく *in vitro* 皮膚刺激性試験を農薬製剤に適用できないことを示している(47)。

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、細胞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（段落 27～33 参照）。

10. 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

@OECD 2021

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

11. 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、被験物質を局所適用する。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。

12. 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(29)。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）を測定する方法である(16) (17)。

13. 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(31)。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

14. 本試験ガイドラインに準拠する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物質 10 種類を使用して、試験施設の習熟度を証明すること。試験ガイドラインに含まれる方法のユーザーは、以下の表 1 に記載される個々の熟達度物質で達成される細胞生存率の指標範囲について、補遺 3 の表 2 を参照するとよい。収載した物質を入手できない場合や正当な理由で使用できない場合は、表 1 の記載と同じ選択基準を適用できれば、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(8)）。別の習熟度確認物質を使用する場合は、その妥当性を示すこと。

15. RhE モデルを使用する際には、受領後の組織のバリア特性が、RhE モデルの製造業者の記載通りであることを、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。

@OECD 2021

表 1.習熟度確認物質 [1]

物質名	CAS 番号	*In vivo* スコア [2]	物理的状態	UN GHS 区分
区分外の物質（UN GHS 区分外）				
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]
分類済み物質（UN GHS 区分 2）				
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 [4]	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 [4]	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

注：

[1] 習熟度確認物質とは、バリデーション試験で使用する物質の一部であり、この選択は下記基準に基づく：(i)化学物質が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)複数の試験および複数の検査室で再現性のある *in vitro* 結果を得ていること、(vi) *In vitro* で正確に予測されていること、(vi)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。

[2] OECD TG 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。

[4] 1-メチル-3-フェニル-1-ピペラジンおよび 1-ブロモヘキサンは、供給業者に応じて試験室毎に様々な結果を生じる可能性があることから、段落 14 の記載に従って検討する。

試験手順

16. 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試験法については、標準操作手順書（SOP）が入手できる(32) (33) (34) (35) (42) (44) (48)。

RhE 試験法の構成要素

全般的な条件

17. 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（IC50）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（ET50）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

18. 生存率の定量には、MTT 法を用いる(31)。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され、その後、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。抽出溶媒単独の光学濃度（OD）は、十分に低い（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(36)のいずれかを用いて定量できる。これについては段落 33 で詳しく説明する。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。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。本試験ガイドラインに含めたバリデート済み RhE 試験法について、許容範囲を補遺 3、表 4 に示す。HPLC/UPLC-分光光度法を使用する場合、陰性対照の許容基準として、補遺 3、表 4 に示す陰性対照の OD の範囲を用いる。陰性対照の組織について、曝露期間中の培養が安定していること（生存率の測定値に差がない）を記録によって立証すること。

バリア機能

19. 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、IC50 や ET50 の値（表 3）から推定されるものであること（補遺 3、表 5）。

形態

20. 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

21. 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。

品質管理（QC）

22. 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 18）、バリア機能（段落 19）、形態（段落 20）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。IC50 および ET50 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

@OECD 2021

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試験法について、許容範囲を補遺 3、表 5 に示す。

被験化学物質および対照物質の適用

23. 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。液体でも固体でも、十分量（26～83 μL/cm^2 または mg/cm^2）の被験化学物質で、表皮表面を均一に覆う（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。すべての試験条件に、ナイロンメッシュを使用して散布してよい（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 20～37ºC 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）。

24. 実験ごとに、同時の陰性対照（NC）および陽性対照（PC）を同時に使用し、組織の生存率（NC を使用する）、バリア機能、およびその結果生じる組織感受性（PC を使用する）が、定義された過去の許容範囲内であることを立証する。PC には、SDS の 5%水溶液が推奨される。また、NC には、水またはリン酸緩衝食塩水（PBS）が推奨される。

細胞生存率の測定

25. 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 2 つの RhE ベースの試験法の最適化で、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(11) (12) (13) (14) (15)。現時点では、42 時間が、本試験ガイドラインに含まれるすべての試験方法の標準パラメータである。

26. 本試験ガイドラインで細胞生存率の測定に用いる標準化された定量法は、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 を測定するか、HPLC/UPLC-分光光度法を用いて測定する（段落 33 参照）(36)。

27. 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

@OECD 2021

渉を検出して補正するため、別の対照を追加する（段落 28 および 32 を参照）。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バリデート済み試験法の SOP を参照のこと(32) (33) (34) (35) (42) (44) (48)。

28. 直接的な MTT 還元物質を同定するには、新たに調製した MTT 溶液に各被験化学物質を添加する。被験化学物質を含む MTT 混合物が青色／紫色に変化した場合、この被験化学物質は 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 RhE 組織に対する追加の機能検査を実施する。この追加機能検査では、残存代謝活性しかないものの、生組織と同様に被験化学物質を吸収する死亡組織を用いる。各 MTT 還元被験化学物質を、2 つ以上の死亡複製組織に適用する。この組織に試験手順全体を実施して、非特異的な MTT 還元(NSMTT)を生じさせる(32) (33) (34) (35) (42) (44) (48)。独立して実施された試験／実験の回数に関わりなく、被験化学物質ごとに 1 つの NSMTT 対照で十分である。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、補正する試験と同時に実施する陰性対照との相対値（%NSMTT）を算出する。

29. 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に着色する被験化学物質による干渉の可能性を特定し、新たな対照の必要性を判定するため、水（曝露中の環境）ないしイソプロパノール（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。水ないし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、別の有色の対照を実施するか、そのような対照が不要の場合、代わりに HPLC/UPLC-分光光度法を用いる（段落 32 および 33 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 2 つ以上の生存複製組織に適用し、これに試験手順全体を実施するが、非特異的な有色（NSCliving）対照を生成するのに、MTT インキュベーション段階で、MTT 溶液ではなく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、有色の被験化学物質の試験と同時に実施する必要がある。複数の試験の場合は、独立の NSCliving 対照を（各実験単位で）試験ごと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、補正している試験と同時に実施される相対値（%NSCliving）を算出する。

30. 直接的な MTT 還元（段落 28 参照）と色による干渉（段落 29 参照）の両方をもたらすことがわかっている被験化学物質も、標準吸光度（OD）の測定を実施する場合、前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 法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 28 に記載したように直接的な MTT 還元能の評価を妨げるためである。このような被験化学物質は生存組織と死亡組織の両方に結合可能であるため、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をもたらす可能性がある。色による干渉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 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

@OECD 2021

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／実験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、補正している試験と同時に実施される陰性対照の相対値（%NSCkilled）を算出する。

31. 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、規制を目的とする被験化学物質の試験を開始する前に、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。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 還元ないし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 50% 以下である場合である。それでも、陰性対照の%NSMTT ないし%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。その理由は、この値は、化学物質が区分されるか区分外かを分けるカットオフであるからである（段落 35 参照）。

32. MTT 法に対するきわめて強力な干渉のため、標準吸光度（OD）の測定に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のに代替的な HPLC/UPLC-分光光度法を使用できる（段落 33 参照）(36)。HPLC/UPLC-分光光度法システムは、被験化学物質の定量前に MTT ホルマザンを分離できる(36)。このため、HPLC/UPLC-分光光度法を用いる場合、検討する化学物質とは別に NSCliving 対照および NSCkilled 対照を必要としない。それでも、（段落 28 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、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 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 OD 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なり評価できないが、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。

33. 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）に使用できる(36)。HPLC/UPLC-分光光度法システムは多様であるため、組織抽出物由来の MTT ホルマザン定量に向けてシステムを用いる前に、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(36) (37)を満たすことにより、HPLC/UPLC-分光光度法システムの適格性評価を明らかにする必要がある。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。ひとたび補遺 4 に定義された許容基準を満たした場合、当該

@OECD 2021

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

34. 適正な RhE モデルのロット（段落 22 を参照）を用いたどの試験でも、陰性対照に曝露した組織に、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 値を認めること。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、本試験法に含めた試験法の SOP を参照のこと）(32) (33) (34) (35) (42) (44) (48)。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）。

結果の解釈と予測モデル

35. 陰性対照を 100%に設定して標準化した細胞生存率の計算には、各被験化学物質を用いて得られる OD 値を使用する。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。刺激性の被験化学物質を区分外の被験化学物質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。

- 被験化学物質に曝露した後のインキュベーション後の平均組織生存率が 50%以下である被験物質を、UN GHS（区分 2 または区分 1）に基づく分類および表示を要すると判断する。本試験ガイドラインが対象とする RhE 試験法は UN GHS 区分 1 か区分 2 かを区別できないため、皮膚腐食性に関する追加情報を基に最終分類を決定する必要がある［GD 203 (3)も参照］。被験化学物質が非腐食性で（TG 430、431 または 435 に基づく）、曝露およびインキュベーション後の細胞生存率が 50%以下である場合、被験化学物質を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（任意区分の UN GHS 区分 3 を採用していない場合）、皮膚刺激性なしとみなし、UN GHS 区分外としてよい。

@OECD 2021

データおよび報告

データ

36. 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有色被験物質について報告すること。

試験報告書

37. 試験報告書には、以下の情報を記載すること。

被験化学物質および対照物質

- 単一成分物質：IUPAC 名または CAS 名、CAS 番号、SMILES 記法または InChI コード、構造式、純度などの化学的特定名や、場合により実質的な不純物の化学的特定名。
- 多成分物質、UVCB、および混合物：成分の化学的特定名（上記参照）や、可能であれば UVCB のスペクトルデータ、量、関連する物理化学的特性を用いてできるだけ特性を明らかにする。
- 物理的外観、水溶性や、そのほかの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ル（該当する場合は選択の根拠も）

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。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）。このようなものに下記があるが、これに限定されない。

  i) 生存率

  ii) バリア機能

  iii) 形態

@OECD 2021

iv) 該当モデルの品質管理（QC）

- そのモデルの背景データの参照先。過去のバッチデータに関する QC データの許容性を含むが、これに限定されない。
- 定常的使用の前の習熟度確認物質の試験による試験法実施習熟度の立証。

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。
- 曝露時間、曝露温度および曝露後のインキュベーション時間。
- 該当する場合、被験物質が MTT の直接還元剤である場合や有色の場合に用いる対照。
- 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の数。
- 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。

実験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：

- 実験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および SD など、個々の被験化学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 および SD、ならびに最終的に補正した組織生存率など、直接的な MTT 還元物質や有色の被験化学物質に用いた対照物質の結果。
- 規定の実験および試験の許容基準に関して、被験化学物質および対照物質を用いて得た結果。
- 観察された他の効果に関する説明。
- 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

- 試験中に特定されたガイドラインからの逸脱と、これがアッセイの結果に及ぼした影響の有無。

@OECD 2021

結論

@OECD 2021

参考文献

1. United Nations (UN). (2019). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second 8th Revised Edition, UN New York and Geneva, 2019. Available at: [https://unece.org/ghs-rev8-2019].
2. EURL-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. OECD. (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
4. OECD. (2015). OECD Guideline for Testing of Chemicals. (No. 404.): Acute Dermal Irritation, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
5. OECD. (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 430.): *In vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER).
6. OECD. (2016). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 431.): *In vitro* Skin Model. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
7. OECD. (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 435.); *In vitro* Membrane Barrier Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
8. OECD. (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In vitro* Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
9. 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.
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 2021

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

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

21. EURL-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 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.

22. EURL-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].

23. OECD. (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No. 137.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

24. 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

25. 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

26. OECD. (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing

and Assessment (No. 159.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

27. OECD. (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 155.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

28. 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.

29. 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.

30. 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).

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

32. EpiSkin™. (February 2009). SOP, Version 1.8, 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://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].

33. EpiDerm™. (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, 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://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].

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

35. LabCyte. (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model “LabCyte EPI-MODEL24” Available at: [http://www.jpte.co.jp/english/business/LabCyte/Testprotocol.pdf].

36. 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. (2015) Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry 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. Toxicol *In vitro*. 29(4), 741-761.

37. 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].

38. 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.

39. EURL-ECVAM. (2009). Performance Standards for *In vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). Available at: [http://www.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. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available related to the present TG.

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

41. 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.

42. Skin+ ® RHE SOP, Version 5.0 (May 2016), Skin Irritation Test for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals with Sterlab's RHE: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation. Available at [http://www.sterlab-store.com/wp-content/uploads/SOP_Sterlab_skin_irritation_v5-May-2016.pdf].

43. Peer Review Report of the Validation of the Skin Irritation Tests Using Skin+ ® and Using epiCS® (2018)

44. epiCS® RHE SOP, Version 5.1 (January 2017) Skin Irritation Test for use with CellSystems Reconstructed Human Epidermal Model epiCS® Test Method 20 min application + 42 hours Post- Incubation. Available at [https://reconstructed-human-epidermis.com/user-data/downloads/manuels-sops/INVITTOX%20protocol%20epiCS%20Skin%20Irritation%20version%205.1%2C%2001.2017.pdf].

45. ESAC Opinion on the Validation Study of the epiCS® Test Method based on the EURL ECVAM/OECD Performance Standards for *in vitro* Skin Irritation Testing using Reconstructed human Epidermis (RhE), ESAC Opinion Number 2016-05

46. EURL ECVAM Status Report on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of Alternative Methods and Approaches (2016)

47. Kolle S.N, van Ravenzwaay B. and Landsiedel R. (2017). Regulatory accepted but out of domain: *In vitro* skin irritation tests for agrochemical formulations. Regul. Toxicol. Pharmacol 89, 125-130.

48. KeraSkin™ SIT SOP, Version 1.5 (January, 2019), KeraSkin™ skin irritation test operation protocol. Available at: [http://www.keraskin.co.kr/eng/product/skinmodel.asp]

49. Jung, K.M., Lee, S.H., Jang, W.H., Jung, H.S., Heo, Y., Park, Y.H., Bae, S., Lim, K.M., Seok, S.H., 2014. KeraSkin-VM: a novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA 28, 742-750.

50. Han, J., Kim, S., Lee, S.H., Kim, J.S., Chang, Y.J., Jeong, T.C., Kang, M.J., Kim, T.S., Yoon, H.S., Lee, G.Y., Bae, S., Lim, K.M., 2020. Me-too validation study for in vitro skin irritation test with a reconstructed human epidermis model, KeraSkin for OECD test guideline 439. Regulatory toxicology and pharmacology : 117, 104725.

51. OECD (2021). Validation study report and Independent Peer-Review Report for inclusion of KeraSkin™ SIT to the Test Guideline 439 on In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 339.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

補遺 1 - 定義

正確性：試験法による結果が、許容されている参照値にどの程度一致するかを示す近似性の指標。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、多くの場合、試験法の正確な結果の割合を意味する一致性と同義的に用いられる(9)。

細胞生存率：細胞集団の総活性を測定するパラメータ。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。測定したエンドポイントや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(9)。

ET50：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。IC50 も参照のこと。

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals by the United Nations (UN)):（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)。

HPLC (High Performance Liquid Chromatography)：高速液体クロマトグラフィー。

IATA (Integrated Approach on Testing and Assessment)：試験および評価に関する統合的アプローチ。

IC50：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（IC50）を求めることによって推定する。ET50 も参照のこと。

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。

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

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。

多成分物質：定量的組成に、2 つ以上の主要成分が濃度 10%（w/w）以上 80%（w/w）未満存在することにより定義される物質。多成分物質は、製造工程の結果生じる。混合物と多成分物質

@OECD 2021

との違いは、混合物は、2つ以上の物質が化学反応を起こさず混合することにより得られるのに対し、多成分物質は化学反応の結果得られることにある。

NSCkilled (Non-Specific Colour in killed tissues)：死亡組織の非特異的な色。

NSCliving (Non-Specific Colour in living tissues)：生組織の非特異的な色。

NSMTT (Non-Specific MTT reduction)：非特異的な MTT 還元。

性能基準（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す必要があり、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(9)。

PC (Positive Control)：陽性対照。試験系のすべての構成要素を含み、陽性反応を引き起こすことがわかっている物質により処理した複製組織。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。

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）を含む(9)。

信頼性：同じプロトコルを用いて試験法を実施したときに得られる経時的な実験室内および実験室間再現性の程度を表す尺度。施設内および施設間の再現性を算出して評価する(9)。

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(9)。

実験：陰性対照および PC と同時に検討される 1 つ以上の被験化学物質からなる一組の試験。

感度：すべての陽性被験化学物質や活性被験化学物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。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(9)。

***In vivo* 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(38)。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化学物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。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(9)。

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

@OECD 2021

剤は除く。

被験化学物質：試験対象の物質のことをいう。
UPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography)：超高速液体クロマトグラフィー。

UVCB (substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials)：組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質。

@OECD 2021

補遺 2 - 本試験ガイドラインに含めた試験法

RhE 試験系をベースにした 7 種類の市販の *in vitro* 試験法について、予備的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おり(10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (43) (45) (50) (51)、最小予測能は以下の通りである：（感度 80%、特異度 70%、正確性 75%）。これら 7 つの試験法を本試験ガイドラインに含め、以下に一覧表示する。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ついても記載する。本試験ガイドラインおよび PS (8)の開発に用いた VRM は、EpiSkin™と EpiDerm™ SIT (EPI-200)である。

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™ (VRM)**	完全な前向きバリデーション試験（2003～2007 年）。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(39) (40) (21)*。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) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	**EpiDerm™ SIT(EPI-200) (VRM)**	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(39) (40) (21)*。	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40)
		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(21)を用いて 2008 年にバリデートされた*。	(2) (21) (22) (23) (33)
3	**SkinEthic™ RHE**	2008 年に策定されたオリジナルの ECVAM の性能標準(21)に基づいたバリデーション試験*。	(2) (21) (22) (23) (31)
4	**LabCyte EPIMODEL24 SIT**	OECD TG 439 (8)の性能標準(PS)に基づいた 2011～2012 年のバリデーション試験。OECD TG 439 の性能標準(8)は、更新された最新の ECVAM の性能標準* (39) (40)に基づいている。	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) および本試験ガイドラインの PS (8)*
5	**epiCS®**	2016 年の ESAC の見解(45)および 2018 年の独立したピアレビュー(43)に準拠した OECD GD 220 (8)の SIT に向けた性能基準に基づくバリデーション試験。	(1) (8) (23) (39) (40) (44) (43) (45)
6	**Skin+ ®**	2016 年の ECVAM の見解(46)および 2018 年の独立ピアレビュー(43)後の OECD GD 220 (8)に従った SIT の性能ベースバリデーション試験。	(1) (8) (23) (39) (40) (42) (43) (46)
7	**KeraSkin™ SIT**	OECD GD 220 (8)とその後の 2020 年の独立したピアレビューに従った性能基準に基づくバリデーション試験。	(48) (49) (50) (51)

@OECD 2021

注 : ECVAM のオリジナルの性能標準(21)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(16)の完了後まもない 2007 年に、EU 危険物指令第 28 次改正(41)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)、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) (39) (40)。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(16)によるデータに基づいているが、3 番の試験法による参照物質に関するデータも追加使用されている。2010 年に、更新された最新の ECVAM の性能標準を用いて、本試験ガイドラインに関する性能標準を規定した(8)。この試験ガイドラインの目的上、性能標準の基準すべてを作成するために EpiSkin™が使用されたという事実により、EpiSkin™を VRM とみなす。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(23)を参照されたい。

SIT:皮膚刺激性試験

RHE：再構築ヒト表皮

@OECD 2021

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

表 2 - 本試験ガイドラインに含まれる各試験方法に固有のプロトコルパラメータの概要

RhE 試験法については、きわ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 37°C で 42 時間のインキュベーション時間を置く(32) (33) (34) (35) (42) (44) (48)。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) (23)	**EpiDerm™ SIT (EPI-200) (23)**	**SkinEthic RHE™ (23)**	**LabCyte EPI-MODEL24 SIT (26)**	**epiCS® (43)(44)**	**Skin+ ® (42)(43)**	**KeraSkin™ SIT (48)**
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 時間以上	15～30 時間	4 時間または一晩	2 時間または一晩	20～24 時間
培地量	2 mL	0.9 mL	0.3 または 1 mL	0.5 mL	1 mL	1 mL	0.9 mL
B) 被験化学物質の適用							
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)	30 µL (50 µL/cm^2)	16 µL (32 µL/cm^2)	40 µL (67 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)	30 mg (50 mg/cm^2) + DPBS (50 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + DW (10 µL)	40 mg (67 mg/cm^2) + DPBS (40 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	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	20 分間	42 分間	30 分間
適用温度	室温	a) 室温で 25 分間 b) 37ºC で 35 分間	室温	室温	室温	室温	37ºC

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	1 mL	2 mL	0.9 mL
MTT 溶液	2 mL 0.3 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	500 µL 0.5 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 0.5 mg/mL	300 µL 0.4 mg/mL
D) 許容基準							
陰性対照（水または DPBS）で処理した複製組織の OD の平均値	0.6 以上 1.5 以下	0.8 以上 2.8 以下	0.8 以上 3 以下	0.7 以上 2.5 以下	0.8 以上 2.8 以下	0.8 以上 2.5 以下	0.7 以上 1.6 以下
陽性対照（SDS 5%）で処理した複製組織の生存率の平均値を、陰性対照に対する割合（%）で表したもの	< 40%	< 20%	< 40%	< 40%	< 20%	< 40%	≤ 40%
複製組織間の標準偏差	SD ≤ 18%	SD ≤ 18%	SD ≤ 18%	SD ≤ 18%	SD ≤ 18%	SD ≤ 18%	SD ≤ 18%

RT：室温（18～25ºC）

DW：蒸留水

DPBS：ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水

* SOP に記載されているとおり、校正目盛付き匙を用いて定量する

表 3 - 各試験法および習熟度確認物質で得られた細胞生存率（%）の指標範囲

ここに挙げた値は情報提供を目的として提供されたもので、個々の方法のバリデーション試験に参加した臨床検査室が得た範囲を示している。この範囲は本試験ガイドラインの一部ではないが、規制目的で日常的に使用する前に、試験室が最初に試験方法を設定する場合に有用である。

	EpiSkin™ (SM) (23)	EpiDerm™ SIT (EPI-200) (23)	SkinEthic RHE™ (23)	LabCyte EPI-MODEL24 SIT (26)	epiCS® (43)(44)	Skin+ ® (42)(43)	KeraSkin™ SIT (51)
区分外の物質（UN GHS 区分外）							
ナフタレン酢酸	92.3 +/- 5.2	100.7 +/-8.4	104.0 +/- 12.9	100.4 +/-7.6	99.3 +/-10.4	94.6 +/-17.9	81.8 +/-15.0
イソプロパノール	88.1 +/- 8.7	65.6 +/-16.5	101.0 +/-11.3	76.7 +/-7.0	97 +/-6.8	90.7 +/-27.5	76.6 +/-9.4
ステアリン酸メチル	98.5 +/- 11.3	107.7 +/-4.9	104.4 +/-15.8	99.3 +/-10.4	101 +/-8.0	101.7 +/- 6.5	93.4 +/-11.3
酪酸ヘプチル	102 +/-4.2	104.1 +/-4.2	92.1 +/-17.5	105.4 +/-11.1	100.3 +/- 5.1	79 +/-17.8	87.3 +/-11.9
サリチル酸ヘキシル	89 +/-1.8	106.9 +/-5.2	95.9 +/-12.5	100.9 +/-8.2	95 +/-8.0	89.1 +/- 16.3	88.3 +/-10.4
分類済み物質（UN GHS 区分 2）							
シクラメンアルデヒド	25.4 +/- 12.1	18.5 +/-16.2	1.7 +/- 0.9	9.1 +/-2.9	12.8 +/-26.4	3 +/-0.4	1.7 +/-3.0
1-ブロモヘキサン	24.4 +/- 15.9	16.9 +/-2.5	1.3 +/-3.9	15.7 +/-3.4	10.4 +/-4.8	5.6 +/-0.7	18.9 +/-12.9
水酸化カリウム（5%水溶液）	9.3+/-10.0	4.3 +/-1	16,7 +/-17	3.3 +/-3.1	2.6 +/-3.6	5.2 +/-1.5	-1.2 +/-2.0[1]

[1] 負の値は、平均細胞生存率が検出限界やデータのばらつきに近いことを示す。

@OECD 2021

1-メチル-3-フェニル-1-ピペラジン	23.8+/-17.8	7.35 +/-2.7	8,2 +/-7.1	5.8 +/-3.7	38. 8 +/-37.9	4.5 +/-0.7	5.4 +/-9.5
ヘプタナール	16.6+/-13.6	5.1 +/-0.3	1.3 +/-0.9	9.9 +/-1.3	4.4 +/-4.9	9.3 +/-0.2	2.8 +/-2.8

@OECD 2021

表 4 本試験ガイドラインに含めた MTT 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
epiCS®	≥ 0.8	≤ 2.8
Skin+ ®	≥ 0.8	≤ 2.5
KeraSkin™ SIT	≥ 0.7	≤ 1.6

表 5. 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）(32)	IC_{50} = 1.0 mg/mL	IC_{50} = 3.0 mg/mL
EpiDerm™ SIT(EPI-200) (1% Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4.0 時間	ET_{50} = 8.7 時間
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4.0 時間	ET_{50} = 10.0 時間
LabCyte EPI-MODEL24 SIT （SDS に曝露後 18 時間） (35)	IC_{50} = 1.4 mg/mL	IC_{50} = 4.0 mg/mL
epiCS® (1% Triton X-100) (44)	ET_{50} = 2.0 時間	ET_{50} = 7.0 時間
Skin+ ® (1% Triton X-100) (42)	ET_{50} = 4.0 時間	ET_{50} = 9.0 時間
KeraSkin™ SIT （SDS に曝露後 18 時間）(48)	IC_{50} = 1.5 mg/mL	IC_{50} = 4.8 mg/mL

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 ガイダンスによるプロトコル (36)(37)	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%
精度	イソプロパノールの品質管理（すなわち、1.6 µg/mL、16 µg/mL、160 µg/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 µg/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%および 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（18～25ºC）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。