

評価報告書

経皮電気抵抗試験を用いた皮膚腐食性試験代替法

皮膚腐食性試験資料編纂委員会

平成 29 年（2017 年）2 月 24 日

評価委員

- 高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部
- 中村 りこ 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター
- 須方 督夫 住友化学株式会社 レスポンシブルケア部 (化学品安全グループ)
／日本化学工業協会
- 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部

目次

1. 試験法の科学的および規制面からの妥当性
2. 試験プロトコル構成の妥当性
3. 開発および評価に使われた物質の分類、選択理由の妥当性
4. 試験法の正確性を評価するために用いられた物質の *in vitro* および参照データの有無
5. 試験法の正確性 (再現性)
6. 試験法の信頼性
7. 他の科学的な報告との比較の有無
8. 3Rs 原則への関与 (動物福祉面からの妥当性)
9. 試験法の有用性と限界 (コスト、時間からの妥当性など)
10. その他 (特許の有無など)
11. 結論
12. 文献

Annex

Appendix

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 430: *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER)

要旨

ウサギを用いる皮膚腐食性試験の動物実験代替法(代替法)として、経済協力開発機構(OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development)にて試験ガイドライン(TG: Test Guideline) 430として承認されたラット摘出皮膚を用いる経皮電気抵抗試験(TER: Transcutaneous Electrical Resistance)の有用性を評価した。信頼性と妥当性という視点において、TERを評価した結果、適用範囲に限界はあるものの、本試験法により腐食性の有無を評価できると考えられた。しかし、生きているラットから採取した皮膚を用いることから化粧品等の評価への応用には問題がある。

1. 試験法の科学的および規制面からの妥当性

皮膚腐食性試験は皮膚刺激性試験の一環として行われ、ガイドラインでは Draize らにより提唱されたウサギを用いる方法が推奨されている¹⁾。この方法は被験物質の刺激性や腐食性を検出する試験法として長く用いられてきたものの、判定を肉眼で行うため客観性に乏しく実験間や施設間での再現性が乏しい、更に動物に激しい痛みとストレスを与えることが社会的に問題となり、以前より動物を使用しない代替法の開発が切望されていた。この動物実験代替法（以下、代替法と記す）として、経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）にて承認された試験ガイドライン（TG: Test Guideline）430 には、経皮電気抵抗試験（TER: Transcutaneous Electrical Resistance）が記載されている²⁾。この試験法は、腐食性物質が角質層に吸収された後拡散し、下層の表皮細胞を傷害することにより皮膚のバリアー機能を傷害するという考えをもとに、被験物質曝露後の電気抵抗値を指標に皮膚腐食性を評価している。本試験法は欧州代替法評価センター（ECVAM: European Centre for the Validation of Alternative Methods）によるバリデーション研究を経て、欧州では化学物質の皮膚腐食性評価を目的として承認され、化学物質のリスク表示や識別等に利用されている。特に昨今では国連化学品の分類および表示に関する世界調和システム（UN GHS: United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals）分類に従って評価されるケースが増えている。

我が国で既存の化学物質を評価する場合、OECD で承認された試験方法による結果を利用することは可能であるが、現在まで代替法での結果をもとに腐食性を評価された例は多くない。安全性評価における代替法の普及が切望されている現状において、我が国でも積極的に受け入れることが必要となっている。

これらの状況に鑑み、本評価書では、OECD TG430 に掲載された TER の腐食性評価における有用性を評価した²⁾。

2. 試験プロトコル構成の妥当性²⁾

1) 原理 切除したラット皮膚を試験システムとして使用し、その電気抵抗の変化を皮膚傷害性の指標とする。

2) 方法 摘出した直径20 mm円盤状の皮膚（ラット、28-30日齢ほど）を図1に示すように、テフロン（ポリテトラフルオロエチレン: PTFE）チューブの下部に表皮面を上にしてあり、ゴム製のOリングではさむ。皮膚のついたPTFEチューブを硫酸マグネシウム（154 mM）溶液につけ、被験物質溶液150 μ Lを表皮面に、30°Cで24時間適用する。Wheatstone 電橋装置に低電圧をかけ、100 Hzにおける電気抵抗度を測定する。

さらに、電気抵抗が 5 k Ω 以下の場合には、10%スルホローダミンB染色液にて2時間染色し、皮膚に吸着された色素の量を吸光度から算出する。

電気抵抗度が 5 k Ω より小さく、明らかに損傷のある場合、または損傷がなくても色素量が陽性対照物質である 10 M 塩酸以上の場合、腐食性と判断する。

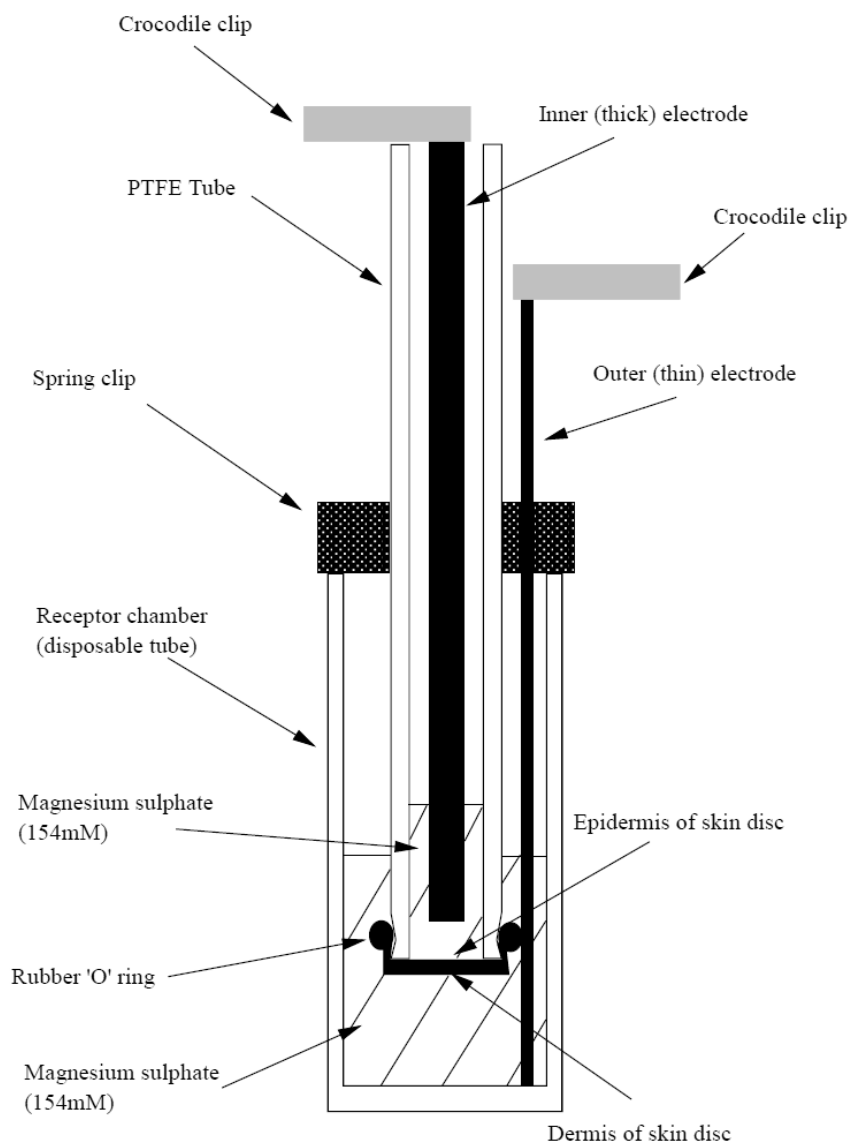


図 1 . TER 概要図²⁾

3. 開発および評価に使われた物質の分類、選択理由の妥当性

Botham らにより TER については、20 の被験物質により施設内再現性³⁾、および 50 の被験物質により施設間再現性および予測性が調べられている⁴⁾。それらの物質リストとそれらの物理・化学的性状を ANNEX 1 および 2 に示す。また Fentem らにより、60 物質を用いて、再現性および予測性が調べられている⁵⁾。それらの物質リストを腐食性や pH, 規制状況とともに ANNEX 3 に示す。それらでわかるように、本試験法は幅広い性状の化学物質で検討されている。

4. 試験法の正確性を評価するために用いられた物質の *in vitro* および参照データの有無

被験物質の多くは ECVAM の皮膚腐食性試験バリデーションで使用された物質であり⁶⁾、それらの腐食性に関する参照データが入手可能である

5. 試験法の正確性 (再現性)

TER の施設内再現性は 20 の被験物質 (6 腐食性物質および 14 非腐食性物質) を用い、3 施設

間で ANOVA 解析を用い、施設間に有意差がないとされている³⁾。

一方、施設間再現性では、2 施設が 50 の被験物質（25 腐食性物質および 25 非腐食性物質）を用い、92%（いずれの物質群も 23 物質での結果が一致した）であるとされている⁴⁾。以上の結果から、再現性は高いと判断されている。

60 物質を用いた 3 施設での 2 way の ANOVA 解析において、施設内および施設間の変動に有意な差はないと判断された⁵⁾。また、60 物質（27 腐食性物質および 33 非腐食性物質）のうち、37 物質は 3 施設とも施設内および施設間再現性が認められた。残る 23 物質のうち 10 物質で施設内再現性が悪かった。このように、いくつかの物質で再現性の結果が異なっていたが、ECVAM は本試験法の信頼性と再現性は高いと判断した。この結論は、ECVAM 科学諮問会議 (ESAC: ECVAM Scientific Advisory Committee)⁷⁾ および米国の代替法に関する省庁間連絡会議 (ICCVAM : Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)⁸⁾ での評価においても確認された。

6. 試験法の信頼性

Botham et al (1996)とFentem et al (1998)の検討結果およびそれらを合算したICCVAMの集計結果⁶⁾を表 1 に示す。その結果とそれぞれの論文の正確度、感度、特異度に大きな差はなく、正確度は約81%、感度は約94%、特異度は約71%であった。偽陰性は6%、3物質認められ、これらは Methacrolein、Glycol bromoacetate (85%)および1,2-Benzisothiazolin-3-one (33%) in aqueous propylene glycolであった。MethacroleinおよびGlycol bromoacetate (85%)はUNの腐食性の細分類でいずれも強くないもの(1B/1C)に属するものであり、1,2-Benzisothiazolin-3-one (19.3%)においては皮膚刺激性もないと化学物質等安全データシート (MSDS : Material Safety Data Sheet) に記載がある（未添付資料）。以上の結果から、上記偽陰性となった3物質の腐食性は強くないと判断できる。

種々の化学物質分類による差はなく、TER は腐食性および非腐食性を分類するための代替法として有用である。ただし、それ以上の細分類については検討が不十分であるとされている。

表 1. TER の予測性

	ICCVAM (1999) の 総計 ⁶⁾	Botham et al. (1992 and 1996) ^{3,4)}	Fentem et al. (1998) ⁵⁾
正確度	81% (99/122)	82% (53/65)	81% (47/58)
感度	94%(51/54)	96%(27/28)	93%(25/27)
特異度	71%(48/68)	70%(26/37)	71%(22/31)

7. 他の科学的な報告との比較の有無

OECD の腐食性試験代替法ガイドラインとして、他に「TG431 ヒト表皮モデル試験」⁹⁾および「TG435 *in vitro* 膜バリア試験」¹⁰⁾ が承認されている。これらはいずれもバリデーション研究が実施され、ICCVAM はこれらの試験法(Rat Skin TER, EpiSkin™, EpiDerm™および Corrositex®)の正確度、感度、特異度、について比較した結果を表 2 に示す。

試験物質の数量や選択物質の種類が異なっているため結果の判定だけをもって、単純に当該試験法の優越性を評価することは困難であるが、当該試験法は他の試験法と同等の予測性を有すると思われる。

表 2. 試験法の比較結果^{6,8)}

	TER	EpiSkin	EpiDerm	Corrositex
物質数	122	60	24	163
正確度	81% (99/122)	83% (50/60)	92% (22/24)	79% (128/163)
感度	94%(51/54)	82%(23/28)	92%(11/12)	85%(76/89)
特異度	71%(48/68)	84%(27/32)	83%(10/12)	72%(52/74)

8. 3Rs 原則への関与（動物福祉面からの妥当性）

本試験法は、ラットの摘出皮膚を用いているため完全な置き換え試験とはならない。しかし、安楽殺により皮膚を摘出すること、1 匹から得られる皮膚で複数の試験が実施可能である。したがって、動物数の削減が可能であり、また、腐食性物質による動物へのストレスを与えることは無く、動物実験代替法として 3Rs の原則に適った試験法である。

9. 試験法の有用性と限界

本試験法は種々の種類の化学物質に対して適用できるが、プロトコルから類推して、難水溶性の固体や粘性の高い物質は適切に評価できない可能性がある。腐食性の細分類（UN GHS による）には使用できないと言われている²⁾。表 3 に示す習熟度確認物質を用いることにより専門技術の習熟について確認することができる²⁾。

10. その他（特許の有無など）

特許については示されていない。

11. 結論

信頼性と妥当性という視点において、ラット摘出皮膚を用いる経皮電気抵抗試験（TER）を評価した結果、本委員会は当該試験法を用いれば、腐食性の有無を評価できると考えた。

表3 習熟度確認一覧表²⁾

化学物質 ¹	CASRN	化学物質 クラス ²	UN GHS 区分 ³ <i>In vivo</i> 試験結 果に基づく	VRM 区分 ⁴ <i>In vitro</i> 試験 結果に基づく	物理的状 態	pH ⁵
<i>In vivo</i> における腐食性物質						
N,N'-ジメチルジプロピレントリアミン	10563-29-8	有機塩基	1A	6×腐食性	液体	8.3
1,2-ジアミノプロパン	78-90-0	有機塩基	1A	6×腐食性	液体	8.3
硫酸 (10%)	7664-93-9	無機酸	(1A/1B/1C)	5×腐食性 1×非腐食性	液体	1.2
水酸化カリウム (10%aq)	1310-58-3	無機塩基	(1A/1B/1C)	6×腐食性	液体	13.2
オクタン酸 (カプリル酸)	124-07-2	有機酸	1B/1C	4×腐食性 2×非腐食性	液体	3.6
2-tert-ブチルフェノール	88-18-6	フェノール	1B/1C	4×腐食性 2×非腐食性	液体	3.9
<i>In vivo</i> における非腐食性物質						
イソステアリン酸	2724-58-5	有機酸	非腐食性	6×非腐食性	液体	3.6
4-アミノ-1,2,4-トリアゾール	584-13-4	有機塩基	非腐食性	6×非腐食性	固体	5.5
臭化フェネチル	103-63-9	求電子物質	非腐食性	6×非腐食性	液体	3.6
4-(メチルチオ)-ベンズアルデヒド	3446-89-7	求電子物質	非腐食性	6×非腐食性	液体	6.8
1,9-デカジエン	1647-16-1	中性有機物質	非腐食性	6×非腐食性	液体	3.9
テトラクロロエチレン	127-18-4	中性有機物質	非腐食性	6×非腐食性	液体	4.5

略語：aq.=水溶液、CASRN=CAS 登録番号、UN GHS=国連化学品の分類および表示に関する世界調和システム(1)、VRM=バリデーション済み参照試験法

1：これらの物質は、最初に腐食性物質と非腐食性物質、次に腐食性の細区分、さらに化学物質クラスの順で分類され、欧州代替法評価センター (ECVAM) によるラット TER 測定法のバリデーション試験に用いられる物質から選択されたものである (Barratt et al 1998¹¹⁾, Fentem et al 1998⁵⁾)。特に断りがない限り、掲載した物質は市販品購入時の純度で試験を行った (Barratt et al 1998¹¹⁾)。可能な限り、次の基準を満たす物質を選択した。(i)VRM による測定または予測を行える腐食性反応の範囲を代表する物質であること (例えば、非腐食性物質、腐食性物質のうち反応が弱い物質から強い物質まで)。(ii)バリデーション試験に用いられた化学物質クラスを代表する物質であること。(iii)VRM の性能特性を反映する物質であること。(iv)明確に定義された化学構造を持つ物質であること。(v) *In vivo* における参照試験法で明確な結果を導く物質であること。(vi)市販品であること。(vii)極端に高額な廃棄費用を伴わない物質であること。

2：Barratt et al (1998¹¹⁾) により指定された化学物質クラスとした。

3：UN GHS の 1A、1B、1C に相当する国連容器等級はそれぞれ I、II、III である。

4：バリデーションにて施設間再現性結果を記載している。灰色部分は 6 実験の判定結果が異なること

を意味する。

5 : pH 値は Fentem et al⁵⁾ および Barratt et al¹¹⁾ の文献から得た。

12. 文献

- 1) OECD (2015) Guideline for the testing of chemicals. 404, Acute Dermal Irritation/Corrosion.
- 2) OECD (2015) Guideline for the testing of chemicals. 430, in vitro Skin Corrosion: Transcutaneous electrical resistance test (TER).
- 3) Botham, P.A. et al. (1992) The skin corrosivity test in vitro. Results of an inter-laboratory trial. *Toxicol In Vitro*, 6:191-4
- 4) Botham, P.A. et al. (1996) A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 6. *ATLA*, 23, 219-255
- 5) Fentem, J.H. et al. (1998) The ECVAM International Validation Study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the management team. *Toxicology in Vitro*, 12, 483-524
- 6) ICCVAM (1999) NIH Publication No.99-4495. Corrositex: An in vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals.
- 7) EC-ECVAM (1998) Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998. Available at: [<http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html>].
- 8) ICCVAM (2002) NIH Publication No.02-4502. ICCVAM Evaluation of EPISKIN, and EpiDerm (EPI-200) and rat skin transcutaneous electrical resistance (TER) assay: in vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals.
- 9) OECD (2016) Guideline for the testing of chemicals. 431, in vitro Skin Corrosion: Human skin model test.
- 10) OECD (2015) Guideline for the testing of chemicals. 435, in vitro membrane barrier test method for Skin Corrosion.
- 11) Barratt, M.D. et al. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. *Toxicology in Vitro*, 12, 471-482

ANNEX1: Botham 1992 のバリデーションで使われた 20 物質

Table 1.

Code	Chemical name or substance type	pH	Physical form
1	Sodium silicate	> 12	Solid
2	40% HCl	1-2	Liquid
3	40% H ₂ SO ₄	1-2	Liquid
4	1 M-KOH	> 12	Liquid
5	1,6-Hexane diamine	13.0	Solid
6	Surfactant-based material	10.0	Liquid
7	Surfactant-based material	7.3	Liquid
8	Surfactant-based material	5-6	Liquid
9	Surfactant-based material	5-6	Liquid
10	Lubricant (ethylene oxide + propylene oxide)	9.0	Liquid
11	Nickel molybdenum catalyst	5-6	Solid
12	Surfactant-based material	9.5	Liquid
13	Ink jet dye	7-8	Solid
14	Lubricant (ethylene oxide + propylene oxide)	9.0	Liquid
15	Ink jet dye	6-7	Solid
16	Dicyandiamine/formaldehyde condensate	6-7	Liquid
17	Tetrahydropyran	5-6	Liquid
18	Difluorohydroxy-based material	6-7	Solid
19	Amino-toluic acid	3-4	Solid
20	Deionized water	7-8	Liquid

Code No. 1~6 が腐食性物質、その他は非腐食性物質

Table I: Test chemicals

Trade name	Chemical name (if different)	Chemical class	Appearance
Corrosives			
Acetic acid (glacial) ^a		Organic acid	Clear liquid
Acrylic acid (99%) ^a		Organic acid	Clear liquid
Armeen CD ^b	Cocoamine	Organic base	Clear liquid
Armeen TD ^b	Tallowamine	Organic base	Opaque gel
Arquad 16-50 ^b	Hexadecyltrimethyl- ammonium chloride, 50% in isopropanol	Cationic surfactant	Clear liquid
Arquad DMMCB-50 ^c	Coco(C12)dimethylbenzyl- ammonium chloride, 50% in aqueous ethylene glycol	Cationic surfactant	Clear viscous liquid
Bromoacetic acid (8%) ^a		Organic acid	Clear liquid
Bromoacetic acid (55.6%) ^a		Organic acid	Clear liquid
Butylamine (40%) ^a		Organic base	Clear liquid
Capric/caprylic (45:55) acid ^b		Organic acid	Clear liquid
Caprylic acid ^b		Organic acid	Clear liquid
Cyclohexylamine (11.9%) ^a		Organic base	Clear liquid
1,4-Diaminobutane (30%) ^a		Organic base	Clear liquid
Dichloroacetic acid (36.1%) ^a		Organic acid	Clear liquid
Diethylamine (35%) ^a		Organic base	Yellow liquid
Duoquad T-50 ^b	Pentamethyl- <i>N</i> -tallow-1,3- propanediammonium chloride, 50% in isopropanol	Cationic surfactant	Yellow liquid
Formic acid (33.9%) ^a		Organic acid	Clear liquid
Hexanoic acid ^a		Organic acid	Clear yellow liquid
Mercaptoacetic acid (15.1%) ^a		Organic acid	Clear liquid
Proxel BD ^b (biocide A)	1,2-Benzisothiazolin-3-one (33%) in aqueous propylene glycol	Neutral organic	Tan opaque liquid
Pyrrolidine (34.5%) ^a		Organic base	Yellow liquid
Sodium hydroxide (4.88%) ^a		Inorganic	Clear liquid
Sodium metasilicate ^b		Inorganic	Granular powder ^c
Sodium silicate A140 ^b		Inorganic	Clear gel
Synprolam 35X2 ^b	C13-15Alkyl-di(2- hydroxyethyl)amine	Organic base	Clear viscous liquid

^a *Jacobs & Martens (12) classification from animal data.*

^b *Original animal data.*

^c *Prepared in distilled water at 1g/ml.*

Table I: continued

Trade name	Chemical name (if different)	Chemical class	Appearance
Non-corrosives			
Armeen 2C ^d	Dicocoamine	Organic base	Crystalline powder ^c
Aromox DMMCD-W ^b	Coco(C12)dimethylamine oxide (30%)	Amine oxide	Clear liquid
Arquad C-33-W ^d	Coco(C12)trimethylammonium chloride, 33% in water	Cationic surfactant	Clear gel
Butylbenzene ^a		Neutral organic	Clear liquid
Dequest 2000 ^e	Aminotris(methylphosphonic acid), 50% in water	Organic acid	Clear liquid
Dowanol PNB ^f	Propylene glycol <i>n</i> -butyl ether	Neutral organic	Clear liquid
Elfan OS 46 ^d	C12-14 α -Olefin sulphonate, sodium salt	Anionic surfactant	Yellow viscous liquid
Empicol LZPV/C ^d	Sodium dodecyl sulphate	Anionic surfactant	Dry pellets ^c
Empigen OB ^d	Coco(C12)dimethylamine oxide (30%)	Amine oxide	Clear liquid
Empilan CME ^d	Fatty acid monoethanolamide coco	Neutral organic	Dry chips ^c
Empilan KB2 ^d	Fatty alkylethoxylate 2EO	Neutral organic	White opaque cream
Ethomeen T/25 ^b	Polyoxyethylene(15)tallowamine	Organic base	Yellow viscous liquid
Genamin KDM-F ^d	Behenyl(C20-22)trimethylammonium chloride, 80% in isopropanol	Cationic surfactant	Powdered flakes ^c
Genapol LRO ^d	Coco(C12)2EO sulphate, sodium salt (70%)	Anionic surfactant	Clear gel
<i>n</i> -Hexanol ^a		Neutral organic	Clear liquid

^a Jacobs & Martens (12) classification from animal data.

^b Original animal data.

^c Prepared in distilled water at 1g/ml.

^d CESIO classification from animal data.

^e Harmonised Electronic Dataset (HEDSET) data.

^f Manufacturers' data sheet and summary of test data.

Table I: continued

Trade name	Chemical name (if different)	Chemical class	Appearance
Hostaphat KLD ^d	Alkyl(4EO)phosphate ester	Neutral organic	Clear viscous liquid
Lauric acid ^b		Organic acid	Fine powder ^c
<i>n</i> -Nonanol ^a		Neutral organic	Clear liquid
Oleic/caprylic (80:20) acid ^b		Organic acid	Yellow liquid
Proxel AB ^b (biocide B)	1,2-Benzisothiazolin-3-one (33%), aqueous	Neutral organic	Opaque tan liquid
Sodium perborate ^e		Inorganic	Crystalline powder ^c
Sodium percarbonate ^e		Inorganic	Granular powder ^c
Sodium silicate H100 ^b		Inorganic	Clear viscous liquid
Triethanolamine ^a		Organic base	Clear viscous liquid
<i>n</i> -Undecanol ^a		Neutral organic	Clear liquid

^a *Jacobs & Martens (12) classification from animal data.*

^b *Original animal data.*

^c *Prepared in distilled water at 1g/ml.*

^d *CESIO classification from animal data.*

^e *Harmonised Electronic Dataset (HEDSET) data.*

ANNEX 3: Fentem 1998 のバリデーションで使われた 60 物質

Table 4. Test chemicals

No.	Chemical	C/NC	EU risk phrase	UN packing group	PII*
Organic acids					
1	Hexanoic acid	C	R34	II/III	—
29	65/35 Octanoic/decanoic (capric) acids	C	R34	II/III	NPC†
36	2-Methylbutyric acid	C	R34	II/III	> 4
40	Octanoic (caprylic) acid	C	R34	II/III	4.44
47	60/40 Octanoic/decanoic acids	C	R34	II/III	NPC
50	55/45 Octanoic/decanoic acids	C	R34	II/III	5.11
7	3,3'-Dithiodipropionic acid	NC			0
12	Dodecanoic (lauric) acid	NC			0.44
26	Isostearic acid	NC			4.33
34	70/30 Oleine/octanoic acid	NC			3.78
58	10-Undecenoic acid	NC			2.42
Organic bases					
2	1,2-Diaminopropane	C	R35	I	—
15	Dimethyldipropylenetriamine	C	R35	I	NPC
38	Tallow amine	C	R35	II	NPC
55	1-(2-Aminoethyl)piperazine	C	R34	II	—
13	3-Methoxypropylamine	C	R34	II/III	6.67
17	Dimethylisopropylamine	C	R34	II/III	5.61
45	<i>n</i> -Heptylamine	C	R34	II/III	6.67
10	2,4-Xylidine (2,4-dimethylaniline)	NC			1.44
35	Hydrogenated tallow amine	NC			3.56
59	4-Amino-1,2,4-triazole	NC			0
Neutral organics					
8	Isopropanol	NC			0.78
11	2-Phenylethanol (phenylethylalcohol)	NC			0.92/2.22
16	Methyl trimethylacetate	NC			0
19	Tetrachloroethylene	NC			5.67
22	<i>n</i> -Butyl propionate	NC			1.08
27	Methyl palmitate	NC			4.56
44	Benzyl acetone	NC			1.21
51	Methyl laurate	NC			3.89
56	1,9-Decadiene	NC			3.0
Phenols					
3	Carvacrol	C	R34	II/III	> 4
23	2- <i>tert</i> -Butylphenol	C	R34	II/III	5.67
9	<i>o</i> -Methoxyphenol (Guaiacol)	NC			2.38
30	4,4-Methylene-bis-(2,6-di- <i>tert</i> -butylphenol)	NC			0
49	Eugenol	NC			2.92
Inorganic acids					
4	Boron trifluoride dihydrate	C	R35	I	—
28	Phosphorus tribromide	C	R35	I	—
32	Phosphorus pentachloride	C	R35	I	—
25	Sulfuric acid (10% wt)	C	R34/R35‡	I/II/III	—
57	Phosphoric acid	C	R34	II	—
43	Hydrochloric acid (14.4% wt)	C	R34	II/III	—
53	Sulfamic acid	NC			—
Inorganic bases					
18	Potassium hydroxide (10%, aq.)	C	R34/R35‡	I/II/III	NPC
42	2-Mercaptoethanol, Na salt (45%, aq.)	C	R34	II/III	NPC
21	Potassium hydroxide (5%, aq.)	NC			5.22
24	Sodium carbonate (50%, aq.)	NC			2.33
Inorganic salts					
20	Iron (III) chloride	C	R34	II	—
52	Sodium bicarbonate	NC			0.11
54	Sodium bisulfite	NC			1.0
Electrophiles					
5	Methacrolein	C	R34	II/III	4.11
14	Allyl bromide	C	R34	II/III	7.17
48	Glycol bromoacetate (85%)	C	R34	II/III	7.67
6	Phenethyl bromide	NC			0
31	2-Bromobutane	NC			2.44
33	4-(Methylthio)-benzaldehyde	NC			0.89
39	2-Ethoxyethyl methacrylate	NC			1.56
46	Cinnamaldehyde	NC			3.71
Soaps/surfactants					
37	Sodium undecylenate (33%, aq.)	NC			1.67
41	20/80 Coconut/palm soap	NC			2.67
60	Sodium lauryl sulfate (20%, aq.)	NC			6.78

*PII = primary irritation index (Bagley *et al.*, 1996; ECETOC, 1995); †NPC = not possible to calculate; ‡ = the animal data and other supporting information are not sufficiently comprehensive to enable unequivocal classification as R34/II & III or R35/I; however, it is more probable that an R34/II & III label is appropriate, and this is the classification which has been used in the analysis of the results obtained in the validation study. The numbers are for the identification of individual chemicals (Barratt *et al.*, 1998).