

評価報告書

皮膚腐食性試験代替法

ヒト表皮モデル法

皮膚腐食性試験資料編纂委員会

平成 29 年（2017 年）2 月 24 日

皮膚腐食性試験資料編纂委員会

高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

中村るりこ 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

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) で試験ガイドライン(TG: Test Guideline) 431 として承認されたヒト表皮モデルを用いる試験法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、ヒト表皮モデルを用いた試験を評価した結果、TG431 に掲載されているすべてのモデル EpiSkin™、EpiDerm™、SkinEthic™、epiCS®が腐食性の有無を評価できるモデルとして推奨できると考えられた。ただし、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)分類の細区分を考慮する場合は EpiSkin™が皮膚腐食性試験の代替法としてもっとも有用であると結論した。

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、種々のガイドラインでは 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きた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として長く使用されてきたものの、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動物実験代替法（以下、代替法と記す）の開発が切望されていた。

この代替法として、経済協力開発機構(OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) で試験ガイドライン(TG: Test Guideline)431 には、皮膚腐食性試験として角質層を有し 3 次元的に再構築されたヒト表皮モデルを使用した評価方法が記載されている²⁾。この試験法は、腐食性物質が角質層の傷害または角質層に吸収された後拡散することにより、下層の細胞に到達して細胞毒性を示すという仮説に基づき、被験物質曝露後の細胞生存率を指標に皮膚腐食性を評価している。EpiSkin™や EpiDerm™等のヒト表皮モデルは欧米では既にバリデーション研究が実施され、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。この TG431 は昨今、毎年種々の点で改訂されており、現在は 2016 年版となっている³⁾。

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は、一般的に行政的に受け入れられるが、現在まで代替法での結果をもとに行政的に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、我が国でも科学的に妥当なものは積極的に受け入れることが必要となっている。なお、国内企業からも国際的な評価に耐えうるヒト表皮モデルが開発されている。

本評価書では、OECD TG431 に掲載されたヒト表皮モデル EpiSkin™、EpiDerm™、SkinEthic™ および epiCS®を用いる腐食性試験法の有用性を評価した³⁾。

2. 試験プロトコル構成の妥当性³⁾

被験物質が角質層を通過して表皮細胞に曝露され、MTT〔3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide〕の還元量から求めた細胞生存率の割合から皮膚腐食性を判定する。それらの概要を表 1 にまとめた。実験操作上の違いは、前培養法および染色液の用量、組織からの抽出法等であり、基本的な曝露時間と判定基準については表 2 を参照されたい。

試験プロトコルとして、EpiDerm™を例に説明する。6 well プレートの各 well に培養液 1 mL を加えた後にヒト表皮モデルを置き、被験物質が液状の場合はピペッターで 50 μL、粉末など固形の場合は 25 mg を 25 μL の水と合わせ、モデル上層に適用する (n=2)。被験物質を 3 分または 60 分処理後、プレートから被験物質をデカンテーションにより除去した後、10 mL の PBS で 2~3 回軽く洗浄する。洗浄後、ペーパータオル等で水分を切り、破損に注意しながら別の 24 well プレートにヒト表皮モデルを移動する。MTT 色素を含む培養液をヒト表皮モデルの下方に 0.3 mL 添加する。37℃、CO₂ インキュベータ中に 3 時間静置した後、以下の手順にて抽出を行う。イソプロパノールを 2 mL 添加し、一晚室温放置後、96 well プレートに抽出液を 200 μL ずつ移し (1 物

質あたり 2~3 well)、マイクロプレートリーダーを用いて 540 nm あるいは 570 nm 領域での吸光度を測定する。イソプロパノールのみを加えた well をブランクとし、実測値とブランク値の差を求める。溶媒対照の吸光度を 100% とし各検体の 3 または 60 分間処理時の吸光度を%として算出し細胞の生存率とする。3 分間処理したときの生存率が 50%未満、あるいは 3 分間では生存率が 50%以上であるが 60 分間処理したときに 15%未満の結果を示す物質を“腐食性”と判定する。一方、3 分間処理したときに生存率が 50%以上、60 分間処理したときに 15%以上の物質は“非腐食性”と判定する。試験は 1 回とし、well 間で異なる結果が得られた場合のように明確な評価ができなかった場合は追加試験を実施し、最終評価とする。

表 1. 皮膚腐食性試験のために確認された RHE 試験方法からなる主な試験方法³⁾
 *で示した数字は、ばらつきのある許容範囲を示す。

テスト方法 要素	EpiSkin™	EpiDerm™SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
モデル表面積	0.38cm ²	0.63 cm ²	0.5 cm ²	0.6 cm ²
組織数	曝露時間毎に少なくとも 2	曝露時間毎に 2-3	曝露時間毎に少なくとも 2	曝露時間毎に少なくとも 2
使用量と適用	<p>液体および粘性物質：50±3 μL (131.6μL/cm²)</p> <p>固体：20±2 mg (52.6 mg/cm²)+100 ±5 μL の NaCl 溶液(9 g/L)</p> <p>ロウ様/粘着性物質：ナイロンメッシュを用いて 50±2 mg (131.6 mg/cm²)</p>	<p>液体：ナイロンメッシュを用いた状態で、もしくは用いない場合でも 50 μL (79.4 μL/cm²) 被験物質とナイロンメッシュとの親和性は予試験で確認する。</p> <p>半固体：50 μL (79.4 μL/cm²)</p> <p>固体：25 mg (39.7 mg/cm²)+25 μL の水(必要であればそれ以上)</p> <p>ロウ様物：15 μL の水で湿らせた直径約 8 mm のフラットなディスク様の片を上に乗せる。</p>	<p>液体および粘性物質：ナイロンメッシュを使用して 40±3 μL (80 μL/cm²) 被験物質とナイロンメッシュとの親和性は予試験で確認する。</p> <p>固体：20±3 mg (40 mg/cm²) + 20±2 μL の水</p> <p>ロウ様粘着性物質：ナイロンメッシュを用いた状態で 20±3 mg (40 mg/cm²)</p>	<p>液体：ナイロンメッシュを用いた状態で 50 μL (83.3 μL/cm²) 被験物質とナイロンメッシュとの親和性は予試験で確認する。</p> <p>半固体：50 μL (83.3 μL/cm²)</p> <p>固体：25 mg (41.7 mg/cm²)+25 μL の水(必要であればそれ以上)</p> <p>ロウ様物：15 μL の水で湿らせたフラットな、直径約 8 mm のクッキー様の片を上に乗せる。</p>
直接 MTT 還元性の事前確認	50 μL(液体)もしくは 20 mg(固体)に 0.3 mg/mL MTT 溶液 2 mL を加えて、37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95% で 180±5 分培養 →溶液の色が青/紫に変わった場合、水処理でモデル構成細胞を死滅させたものに被験物質を処置する対照もとる。	50 μL(液体)もしくは 25 mg(固体)に 1 mg/mL MTT 溶液 1 mL を加えて、37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95% で 60 分培養 →溶液の色が青/紫に変わった場合、凍結処理でモデル構成細胞を死滅させたものに被験物質を処置する対照もとる。	40 μL(液体)もしくは 20 mg(固体)に 1 mg/mL MTT 溶液 1 mL を加えて、37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95% で 180±15 分培養 →溶液の色が青/紫に変わった場合、凍結処理でモデル構成細胞を死滅させたものに被験物質を処置する対照もとる。	50 μL(液体)もしくは 25 mg(固体)に 1 mg/mL MTT 溶液 1 mL を加えて 37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95% で 60 分培養 →溶液の色が青/紫に変わった場合、凍結処理でモデル構成細胞を死滅させたものに被験物質を処置する対照もとる。

テスト方法 要素	EpiSkin™	EpiDerm™SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
着色障害の事前確認	10 μ L(液体)もしくは10 mg(固体)に 90 μ L の水を加えて室温で 15 分攪拌する。 →溶液が着色した場合、MTT のみを加えない対照をとる。	50 μ L(液体)もしくは25 mg(固体)に 300 μ L の水を加えて 37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95%で 60 分攪拌する。 →溶液が着色した場合、MTT のみを加えない対照をとる。	40 μ L(液体)もしくは20 mg(固体)に 300 μ L の水を加えて室温で 60 分攪拌する。 →被験物質の色が着色している場合、MTT のみを加えない対照をとる。	50 μ L(液体)もしくは25 mg(固体)に 300 μ L の水を加えて 37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95%で 60 分攪拌する。 →溶液の色が着色している場合、MTT のみを加えない対照をとる。
曝露時間と温度	室温 (18-28°C) で 3 分、60 分 (\pm 5 分) および 240 分 (\pm 10 分) 換気されたキャビネット内	室温で 3 分、および 37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95%で 60 分	室温で 3 分、および 37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95%で 60 分	室温で 3 分、および 37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95%で 60 分
PBS によるすすぎ	PBS 25 mL(すすぎ一回毎に 2 mL)	PBS を一定した弱流で 20 回	PBS を一定した弱流で 20 回	PBS を一定した弱流で 20 回
陰性対照	50 μ L の塩化ナトリウム溶液 (9g/L) 曝露時間毎に	50 μ L の水 曝露時間毎に	40 μ L の水 曝露時間毎に	50 μ L の水 曝露時間毎に
陽性対照	50 μ L の氷酢酸で 4 時間曝露時のみ	8 N 水酸化カリウム 50 μ L で曝露時間毎に	8 N 水酸化カリウム 40 μ L で 1 時間曝露時のみ	8 N 水酸化カリウム 50 μ L で曝露時間毎に
MTT 溶液	濃度 0.3 mg/mL 2 mL	濃度 1 mg/mL 300 μ L	濃度 1 mg/mL 300 μ L	濃度 1 mg/mL 300 μ L
MTT 溶液での培養時間および温度	37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95%で 180 分 (\pm 15 分)	37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95%で 180 分	37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95%で 180 分 (\pm 15 分)	37°C、CO ₂ 濃度 5%、湿度 95%で 180 分
抽出溶媒	500 μ L の酸性化イソプロパノール (0.04 N 塩酸を含むイソプロパノール) (分離した組織を十分に浸漬させる)	2 mL のイソプロパノール (インサート全体から抽出する)	1.5 mL のイソプロパノール (インサート全体から抽出する)	2 mL のイソプロパノール (インサート全体から抽出する)

テスト方法 要素	EpiSkin™	EpiDerm™SCT	SkimEthic™ RHE	epiCS®
抽出時間および温度	遮光し、室温で一晩	室温で振とうせずに一晩、もしくは室温で振とうした状態で (~120rpm) 120分	室温で振とうせずに一晩、もしくは室温で振とうした状態で (~120rpm) 120分	室温で振とうせずに一晩、もしくは室温で振とうした状態で (~120rpm) 120分
OD 測定条件	参照フィルターなしで 570nm (545-595nm)	参照フィルターなしで 570nm (もしくは 540nm)	参照フィルターなしで 570nm (545-600nm)	参照フィルターなしで 540-570nm
組織の品質確認	SDS で 18 時間処理 1.0 mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 3.0 mg/mL	1% Triton X-100 で処理 4.08 時間 ≤ ET ₅₀ ≤ 8.7 時間	1% Triton X-100 で処理 4.0 時間 ≤ ET ₅₀ ≤ 10.0 時間	1% Triton X-100 で処理 2.0 時間 ≤ ET ₅₀ ≤ 7.0 時間
試験回数	1 回、明確な結果が得られなかった時は 2 回	1 回、明確な結果が得られなかった時は 2 回	1 回、明確な結果が得られなかった時は 2 回	1 回、明確な結果が得られなかった時は 2 回
適合判定基準	1. 陰性対照(塩化ナトリウム溶液)で処理された組織の OD 値の平均は、曝露時間毎に 0.6 以上 1.5 以下。 2. 陽性対照(氷酢酸)で 4 時間処置された組織の生存率の平均は 20% 以下。 3. 生存率の幅が 20-100% および OD 値が 0.3 以上の場合、2 つの組織間の生存率の差は 30% をこえない。	1. 陰性対照(水)で処置された組織の OD 値の平均は、全ての曝露時間において 0.8 以上 2.8 以下。 2. 陽性対照 (8N 水酸化カリウム) に 1 時間曝露した組織複製物の測定値の生存率は 15% 未満。 3. 生存率が 20-100% の場合において、組織間の変動係数 (CV) は 30% 以下。	1. 陰性対照(水)で処置された組織の OD 値の平均は、曝露時間毎に 0.8 以上 3.0 以下。 2. 1 時間(もし可能であれば 4 時間)陽性対照(8N 水酸化カリウム)で処置された組織複製物の測定値の生存率は 15% 未満。 3. 20-100% の生存率および 0.3 以上の OD 値において、2 つの組織間の生存率の差は 30% を超えない。	1. 陰性対照(水)で処置した組織の OD 値の平均は、各曝露時間毎に 0.8 以上 2.8 以下。 2. 1 時間(もし可能であれば 4 時間)陽性対照(8N 水酸化カリウム)で処置された組織複製物の測定値の生存率は 15% 未満。 3. 20-100% の生存率および 0.3 以上の OD 値において、2 つの組織間の生存率の差は 30% を超えない。

表 2-1 EpiSkin™ の予測モデル³⁾

3分、60分および240分曝露後の生存率	予測性の評価
3分曝露後の生存率が35%未満	腐食性 ・国連 GHS 細区分 1A*
3分曝露後の生存率が35%以上で、かつ60分曝露後の生存率が35%未満の場合、もしくは 60分曝露後の生存率が35%以上で、かつ240分曝露後の生存率が35%未満	腐食性 ・国連 GHS 細区分 1B あるいは 1C
240分曝露後の生存率が35%以上	非腐食性

*) 腐食性の細区分における RhE 試験法の有用性を評価するために作成したデータによると、EpiSkin™ 試験法により区分 1A に分類された物質/混合物の約 22%が、実際には区分 1B または 1C に属するものである可能性がある (すなわち、過大評価)。

表 2-2 EpiDerm™SCT、SkinEthic™RHE および epiCS®の予測モデル³⁾

3分および60分曝露後の生存率	予測性の評価
3分曝露後の生存率が50%未満	腐食性 ・国連 GHS 細区分 1A*
3分曝露後の生存率が50%以上で、かつ60分曝露後の生存率が15%未満	腐食性 ・国連 GHS 細区分 1B あるいは 1C
3分曝露後の生存率が50%以上で、かつ60分曝露後の生存率が15%以上	非腐食性

*) 腐食性の細区分における RhE 試験法の有用性を評価するために作成したデータによると、EpiSkin™ 試験法により区分 1A に分類された物質/混合物の約 22%が、実際には区分 1B または 1C に属するものである可能性がある (すなわち、過大評価)。

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、*in vitro* および参照データの有無

EpiSkin™ の再現性は、60 の被験物質により調べられている。それらの物質が掲載された論文の抜粋を ANNEX 1 に示す⁴⁾。EpiDerm™の再現性は、24 の被験物質により調べられている。それらの物質が掲載された論文の抜粋を ANNEX 2 に示す⁵⁾。SkinEthic™の再現性は、12 の被験物質により調べられている。それらの物質が掲載された論文の抜粋を ANNEX 3 に示す⁶⁾。EpiCS®の再現性は、12 の被験物質により調べられている。それらの物質の抜粋を ANNEX 4 に示す²⁾。さらに、上記4つのモデルの予測性が 80 被験物質で調べられている。それらの物質が掲載された論文の抜粋を ANNEX 5 に示す⁷⁾。評価に使用された被験物質の多くは欧州代替法評価センター (ECVAM : European Centre for the Validation of Alternative Methods) 主導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る。これら被験物質の評価結果は下記の資料として提出されている。

Liebsh et al., ATLA 2000⁵⁾, Barratt et al., Toxicol. In Vitro 1998⁸⁾, Fentem et al, Toxicol. In Vitro 1998⁴⁾, Worth et al., ATLA 1998⁹⁾, Botham et al., ATLA 1995¹⁰⁾, ICCVAM(1999) NIH Publication No:99-4495¹¹⁾, ICCVAM (2002) NIH Publication No: 02-4502¹²⁾

4. 試験法の正確性（再現性）

EpiSkin™においては、60物質を用いた3施設での2-wayのANOVA解析を用い、施設内および施設間の変動については、それらの間に有意な差はないと判断された(Fentem et al 1998)⁴⁾。60物質（27腐食性物質および33非腐食性物質）のうち、42物質は3施設とも施設内および施設間再現性が良好であった。残る18物質では何等か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¹³⁾。この結論は、ECVAM科学諮問会議（ESAC: ECVAM Scientific Advisory Committee）¹³⁾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）¹²⁾での評価においても確認された。

EpiDerm™においては、24物質を用いた3施設での2回の実験において、21物質の腐食性を3施設すべてで正しく予測できた（Liebsch et al 2000）⁵⁾。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、ESACの評価後¹⁴⁾、ICCVAMにおいても確認された^{11,12)}。

SkinEthic™においては、12物質を用いた3施設での3回の実験において、93.2%の結果が一致し（Kandarova et al 2006）⁶⁾、ESACにおいて施設内および施設間再現性が高いと判断された¹⁵⁾。

EpiCS®においては、TG431（2004）の参照12物質を用いた4施設での3回の実験において²⁾、テトラクロロエチレンを除く11物質の結果が一致し、ESACにおいて施設内および施設間再現性が認められた¹⁶⁾。

5. 試験法の信頼性^{7, 17, 18)}

いずれのヒト表皮モデルも腐食性の有無の予測性は高く、正確度¹⁾は84~90%、感度²⁾は95~100%、特異度³⁾は72~79%であり、偽陰性率は0~5%と低いレベルであった（表3）。これらの値から、OECDの性能標準では正確度、感度および特異度をバリデーションに必要な基準として82.5、95および70%と定めている。

さらに、各モデルの細区分の予測性を表4まとめた。80物質を2または3回実験して得られた値を見る限り、細区分である1B/1Cを80%程度で評価できているモデルはEpiSkin™のみであった。その他のモデルは国連GHS細区分の評価には利用できないと判断した。

これらモデルはMTT還元物質への対応方法もTG431に記載されている。適用できない物質としてはガス、エアロゾルのみが記載されている（バリデーション未実施）。これらモデルは物理状態（液体・固体等）および水溶性の有無にかかわらず適用可能であり、ガス、エアロゾルを除く混合物でも適用可能とされている。なお、特定の種類の物質や混合物においてこれらモデルの適用性を否定するような明確な根拠が得られた場合には、適用範囲から除外するべきであるとされている。

1 正確度：被験物質について試験法で得られる結果が、被験物質の既定の参照値と類似している程度。

2 感度：試験された陽性物質の中で、試験法で正しく陽性と判定されたものの割合。

3 特異度：試験された陰性物質の中で、試験法で正しく陰性と判定されたものの割合。

表 3. OECD で集計した全セットの化学物質を用いた予測性の計算結果(腐食性 [国連 GHS 区分 1] の有無) ¹⁷⁾

	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
正確度	89.6%	87.9%	84.6%	84.3%
感度	98.5%	100%	94.6%	95.3%
特異度	79.3%	73.9%	73.0%	71.6%
偽陽性率	20.7%	26.1%	27.0%	28.4%
偽陰性率	1.5%	0%	5.4%	4.7%

表 4. OECD で集計した全セットの化学物質を用いた予測性の計算結果 (細区分: 国連 GHS 区分 1 A、1 B/1C、非腐食性) ³⁾

化学品全体の統計データ (%) (80 種類の化学品を 2 または 3 回試験、すなわち、159*または 24 回の分類結果) *1 品目は、入手不可能であったため 1 回のみ試験				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	EpiCS®
過大評価				
区分 1BC の化学品の 1 A への過大評価	21.5	29.0	31.2	32.8
区分 NC の化学品の 1 B/1 C への過大評価	20.7	23.4	27.0	28.4
区分 NC の化学品の 1 A への過大評価	0.0	2.7	0.0	0.0
過大評価された区分 NC 化学品	20.7	26.1	27.0	28.4
全区分での過大評価率	17.9	23.3	24.5	25.8
過小評価				
区分 1 A の 1 B/1C への過小評価	16.7	16.7	16.7	12.5
区分 1 A の NC への過小評価	0.0	0.0	0.0	0.0
区分 1 B/1C の NC への過小評価	2.2	0.0	7.5	6.6
全区分での過小評価率	3.3	2.5	5.4	4.4
正確な分類				
正しく分類された 1 A 化学品	83.3	83.3	83.3	87.5
正しく分類された 1 B/1C 化学品	76.3	71.0	61.3	60.7
正しく分類された NC 化学品	79.3	73.9	73.0	71.6
一致度(予測能)	78.8	74.2	70.0	69.8

NC:非腐食性

6. 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、TG431 の他に「TG430 TER (Transcutaneous Electrical Resistance Test Method: 経皮電気抵抗性試験)」¹⁹⁾ および「TG435 (In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion): in vitro 膜バリア試験」²⁰⁾ が承認されている。これらはいずれも ECVAM にてバリ

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、感度および特異度について比較している (表 5) ^{11,12)}。

これらの比較においては同じ物質を用いて評価されておらず、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数値だけをもって、単純にヒト表皮モデルの優越性を比較評価することは困難であるが、いずれの試験法も同等の予測性を有すると思われる。

表 5. 試験法の比較結果 ^{11,12)}

	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)

7. 3Rs 原則との関係 (動物福祉面からの妥当性)

いずれの表皮モデルも動物を使用しておらず、動物福祉面から代替法として妥当である。

8. 試験法の有用性と限界 (コスト、時間からの妥当性など)

強い酸性 (pH 2.0 以下) またはアルカリ性 (pH 11.5 以上) 物質は、強い局所作用を有する可能性が高いことから、皮膚腐食性と判断しても良いことになっている ²¹⁾。しかしながら、これは腐食性についての情報が他にない場合に行われるワーストケースとしての判断であり、例えば酸や塩基の添加により pH が変わり易い物質や混合物の場合は偽陽性の判断となる可能性も考えられる ²²⁾。このため、このような物質に対して動物を用いる必要のない TG431 で皮膚腐食性を評価することは有用である。

表 6 に示す習熟度確認物質を正しく分類できるか否か試験することにより、専門技術の習熟について確認することができるとの記載が TG431 にある。

9. その他

OECD に承認されたヒト表皮モデルは海外で開発された製品であり、コスト面でやや割高である。日本製のヒト表皮モデルとして、これまでに LabCyte EPI-Model²⁴⁾ や Vitrolife-Skin が報告されている ²⁵⁾。特に、Vitrolife-Skin は厚生労働科学研究補助金事業でバリデートされ ²⁶⁾、JaCVAM においても評価がなされている ²⁷⁾。ただし、OECD の性能標準に準じたバリデーションは実施されておらず、OECD に新たな試験法として推奨できるモデルではない。よって、これらのモデルの評価は本評価書では行わなかった。

特許についての情報は今回の検討資料に示されていない。なお、上記したヒト表皮モデルは既に市販されており、いずれも購入可能である。

10. 結論

信頼性と妥当性という視点において、ヒト表皮モデルを用いた皮膚腐食性試験を評価した結果、被験物質の皮膚腐食性を評価する試験法として EpiSkin™、EpiDerm™、SkinEthic™および epiCS®が推奨できるモデルとして挙げられた。ただし、国連 GHS 細区分を考慮する場合は、EpiSkin™が皮膚腐食性試験の代替法としてもっとも有用であると結論した。

表 6. 習熟度確認物質³⁾

化学物質 ¹	CASRN	化学物質分類 ²	UN GHS (in vivo 試験) による区分 ³	VRM (in vitro 試験) による区分 ⁴	MTT 還元剤 ⁵	物理的状態
区分 1A の in vivo 腐食性物質						
ブromo酢酸	79-08-3	有機酸	1A	(3) 1A	--	固体
3 フッ化ボロン二水和物	13319-75-0	無機酸	1A	(3) 1A	--	液体
フェノール	108-95-2	フェノール類	1A	(3) 1A	--	固体
ジクロロアセチルクロリド	79-36-7	求電子剤	1A	(3) 1A	--	液体
区分 1B/1C の in vivo 腐食性物						
グリオキシル酸一水和物	563-96-2	有機酸	1B/1C	(3) 1B/1C	--	固体
乳酸	598-82-3	有機酸	1B/1C	(3) 1B/1C	--	液体
エタノールアミン	141-43-5	有機塩基	1B	(3) 1B/1C	□	粘稠性
塩酸 (14.4%)	7647-01-0	無機酸	1B/1C	(3) 1B/1C	--	液体
in vivo 非腐食性物質						
臭化フェネチル	103-63-9	求電子剤	NC	(3) NC	□	液体
4-アミノ-1,2,4-トリアゾール	584-13-4	有機塩基	NC	(3) NC	--	固体
4-(メチルチオ)ベンズアルデヒド	3446-89-7	求電子剤	NC	(3) NC	□	液体
ラウリン酸	143-07-7	有機酸	NC	(3) NC	--	固体

略語: CASRN=CAS 登録番号; UNGHS=国連勧告「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標準試験法; NC=非腐食性

¹ これらの化学物質は、まず腐食性であるか非腐食性であるかにより分類し、さらに腐食性の細区分および化学物質の種類により細分類した。表に記載した化学物質は、ECVAM による EpiSkinTM および EpiDermTM のバリデーション試験で使用された物質^{4,5,8)}、ならびに EpiSkin^{TM23)}、EpiDermTM、SkinEthicTM および epiCS^{®7)}の開発者により提供されたデータに基づいたバリデーション後試験より選択したものである。特に記載のない限り、市販されている化学物質の購入時の純度において試験を行った^{5,8)}。この選択にあたっては、可能な限り以下のような物質を含めることとした: (i) VRM により測定または予測可能な腐食性反応の範囲 (例えば、非腐食性、弱腐食性ないし強腐食性)を代表する化学物質、(ii)バリデーション試験で用いられた化学物質分類を代表する物質、(iii)化学構造が明確に同定されている物質、(iv)VRM において再現性の高い結果が得られる物質、(v)in vivo での標準試験法において確実な結果が得られる物質、(vi)市販されている物質、ならびに(vii)非常に高額な廃棄コストがかからない物質。

²Barratt ら(1998)による化学物質分類⁸⁾。

³UN GHS の細区分 1A、1B および 1C には、国連包装等級 I、II および III がそれぞれ対応する。

⁴表に記載した VRM による in vitro での分類予測は、試験法の開発者が行ったバリデーション後試験において EpiSkinTM および EpiDermTM 試験法 (VRM) により得られたものである。

⁵ECVAM による皮膚腐食性試験で得られた生存率の値は、直接的な MTT 還元を考慮した補正を行っていない。バリデーション後試験のデータは、適切な対照を用いて得たものである。

11. 文献

- 1) OECD (2015) Guideline for the testing of chemicals. 404, Acute Dermal Irritation/Corrosion
- 2) OECD (2004) Guideline for the testing of chemicals. 431, in vitro Skin Corrosion: Human skin model test.
- 3) OECD (2016) Guideline for the testing of chemicals. 431, in vitro Skin Corrosion: Human skin model test.
- 4) 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.
- 5) Liebsch, M., et al. (2000) The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing. *ATLA*, 28, 371-401.
- 6) Kandarova, H. et al. (2006) Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431, *Toxicology in Vitro*, 20, 547-559.
- 7) Desprez, B. et al. (2015) Two novel prediction models improve prediction of skin corrosive sub-category by test methods of OECD Test Guideline No. 431, *Toxicol. In Vitro*, 29, 2055-2080.
- 8) 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.
- 9) Worth, A.P. et al. (1998) An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion. *ATLA*, 26, 709-720.
- 10) Botham, P.A. et al. (1995) A pre-validation study on in vitro skin corrosivity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 6. *ATLA*, 23, 219-255.
- 11) ICCVAM (1999) NIH Publication No.99-4495. Corrositex: An in vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals.
- 12) 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.
- 13) ECVAM (1998) Statement on the scientific validity of the Episkin test (An in vitro test for skin corrosivity)
- 14) ECVAM (2000) Statement on the application of the EpiDermTM human skin model for skin corrosivity testing
- 15) ECVAM (2006) Statement on the application of the SkinEthicTM human skin model for skin corrosivity testing
- 16) ECVAM (2009) ESAC Statement on the scientific validity of an in-vitro test for skin corrosivity testing
- 17) OECD (2015) Series on Testing & Assessment No. 219, Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro reconstructed human epidermis (RhE) test methods for skin corrosion testing as described in TG 431
- 18) OECD (2013) Series on Testing & Assessment No. 190, Summary document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-Categorisation
- 19) OECD (2015) Guideline for the testing of chemicals. 430, in vitro Skin Corrosion: Transcutaneous electrical resistance test (TER).

- 20) OECD (2015) Guideline for the testing of chemicals. 435, in vitro membrane barrier test method for Skin Corrosion.
- 21) OECD (2014) Series on Testing and Assessment No. 203, Guidance document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for skin corrosion and irritation
- 22) Sheel J. et.al. (2011) Classification and labeling of industrial products with extreme pH by making use of in vitro methods for the assessment of skin and eye irritation and corrosion in a weight of evidence approach, *Toxicology in Vitro*, 25, 1435-1447
- 23) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method according to UNGHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28, 131-145.
- 24) Katoh, M., et al. (2010) Assessment of the human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for In vitro skin corrosion testing according to the OECD test guideline 431. *J Toxicol Sci.*, 35(3):411-7.
- 25) Morikawa, N., et al. (2005) Experimental study on a novel chemical application procedure for in vitro skin corrosivity testing using the Vitrolife-Skin™ human skin model, *AATEX*, 11, 1, 68-78.
- 26) Kojima H et al. (2008) Validation of human skin models for skin corrosivity tests in Japan, *AATEX* 13(1), 36-44.
- 27) JaCVAM (2008) ヒト皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法の第三者評価報告書 (Vitrolif-Skin™)

ANNEX

- 1) 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 拔粹
- 2) Liebsch, M. et al. (2000), The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing. *ATLA*, 28, 371-401 拔粹
- 3) Kandarova, H. et al. (2006), Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431, *Toxicology in Vitro*, 20, 547-559拔粹
- 4) OECD (2004) Guideline for the testing of chemicals. 431, in vitro Skin Corrosion: Human skin model test. 拔粹
- 5) OECD (2013) GD190 Summary document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-Categorisation 拔粹
- 6) Desprez, B. et al. (2015), Two novel prediction models improve prediction of skin corrosive sub-category by test methods of OECD Test Guideline No. 431, *Toxicol. In Vitro*, 29,2055-2080 拔粹

ANNEX 1 : Fentem et al (1998)⁴⁾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	Dimethyldipropylettriamine	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).

Table VIII: Comparison of predictions obtained with EpiDerm and EPISKIN for the 24 chemicals tested blind in three laboratories, either in the present study, or in the ECVAM skin corrosivity validation study

No.	Chemical name	<i>In vivo</i>	EPISKIN	EpiDerm
1	4-Amino-1,2,4-triazole	NC	NC	NC
2	Benzylacetone	NC	NC	NC
3	1,9-Decadiene	NC	NC	NC
4	Dodecanoic (lauric) acid	NC	NC	NC
5	Eugenol	NC	NC	NC
6	Hydrogenated tallow amine	NC	NC	NC
7	Isostearic acid	NC	NC	NC
8	Methyl 2,2-dimethylpropanoate	NC	NC	C ^a
9	Sodium carbonate (50% aq.)	NC	NC	NC
10	Sodium lauryl sulphate (20% aq.)	NC	NC	NC
11	Sulphamic acid	NC	C ^a	C ^a
12	Tetrachloroethylene	NC	NC	NC
13	Boron trifluoride dihydrate	C	C	C
14	2- <i>tert</i> -Butylphenol	C	C	C
15	1,2-Diaminopropane	C	C	C
16	Dimethyldipropylenetriamine	C	C	C
17	Dimethylisopropylamine	C	C	C
18	Glycol bromoacetate (85%)	C	C	C
19	<i>n</i> -Heptylamine	C	NC ^a	C
20	Methacrolein	C	C	NC ^a
21	Octanoic (caprylic) acid	C	C	C
22	60/40 Octanoic/decanoic acids	C	C	C
23	Phosphorus tribromide	C	C	C
24	Potassium hydroxide (10% aq.)	C	C	C

Each classification represents six independent tests in the case of EpiDerm and nine independent tests in the case of EPISKIN. For clarity, in the few cases of conflicting results obtained in repeated tests or in different laboratories, the classification shown represents the majority of classifications obtained.

^a*Misclassification.*

ANNEX 3: Kandarova et al (2006)⁶⁾のバリデーションで使われた 12 物質

Table 2
OECD reference chemicals—phase II

No.	Chemical name	CAS no.	In vivo class (C/NC)	Remarks on data supporting classification/ general comments
1	1,2-Diaminopropane	78-90-0	C*	Interaction with MTT was observed Published data with EpiDerm or EPISKIN model missing (corrosive on EpiDerm after 3 min at ZEBET—unpublished experiment)
2	Acrylic acid	79-10-7	C*	
3	2-tert-Butylphenol	88-18-6	C	Borderline C/NC chemical, as judged from the proximity of the chemical to the classification boundary (SAR analysis) (Barratt et al., 1998). Interaction with MTT
4	Potassium hydroxide (10% aq)	1310-58-3	C	
5	Octanoic acid (caprylic acid)	124-07-02	C	C, but supporting data do not enable unequivocal classification as either R34 (II/III) or R35 (I); more probable to be R34 (II/III) (Barratt et al., 1998) Borderline C/NC chemical, as judged from the proximity of the chemical to the classification boundary (SAR analysis) (Barratt et al., 1998)
6	Sulfuric acid (10% wt.)	7664-93-9	C	
7	4-Amino-1,2,4-triazole	584-13-4	NC	According to the classification mentioned in OECD Guideline 431, the chemical is classified as corrosive According to Annex I of the Directive 67/548/EEC in range of concentration 5–15% the chemical is classified as irritant Non-irritant
8	Eugenol	97-53-0	NC	
9	Phenethyl bromide	103-63-9	NC	Borderline NC/C chemical, as judged from the proximity of the chemical to the classification boundary (SAR analysis) (Barratt et al., 1998) Interaction with MTT Interaction with MTT
10	Tetrachloroethylene	127-18-4	NC	
11	Isostearic acid	30399-84-9	NC	Classified as C in one of three EPISKIN laboratories in the validation study (Fentem et al., 1998) Very high scores for irritation in vivo in rabbits (ECETOC, 1995) Non-irritant
12	4-(Methylthio)-benzaldehyde	3446-89-7	NC	

C*—severely corrosive; C—corrosive; NC—non-corrosive.

ANNEX 4:OECDTG431 (2004)³⁾の参照物質

Table 1: Reference Chemicals

1,2-Diaminopropane	CAS-No. 78-90-0	Severely Corrosive
Acrylic Acid	CAS-No. 79-10-7	Severely Corrosive
2-tert-Butylphenol	CAS-No. 88-18-6	Corrosive
Potassium hydroxide (10%)	CAS-No. 1310-58-3	Corrosive
Sulfuric acid (10%)	CAS-No. 7664-93-9	Corrosive
Octanoic acid (caprylic acid)	CAS-No. 124-07-02	Corrosive
4-Amino-1,2,4-triazole	CAS-No. 584-13-4	Not corrosive
Eugenol	CAS-No. 97-53-0	Not corrosive
Phenethyl bromide	CAS-No. 103-63-9	Not corrosive
Tetrachloroethylene	CAS-No. 127-18-4	Not corrosive
Isostearic acid	CAS-No. 30399-84-9	Not corrosive
4-(Methylthio)-benzaldehyde	CAS-No. 3446-89-7	Not corrosive

ANNEX 5: Desprez et al(2015)⁷⁾ 80 物質抜粋

Internal reference	Chemical name	CASRN	In vivo	Physical state	EpiSkin™-results of EpiSkin™ are presented for the purpose of the ROC analysis performed on the basis of PM _{W12}																		
					In vitro results Run 1					In vitro results Run 2					In vitro results Run 3								
					V3	V60	V240	Vfin	Current PM	PM _{W12}	V3	V60	V240	Vfin	Current PM	PM _{W12}	V3	V60	V240	Vfin	Current PM	PM _{W12}	
					(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 40, z = 380)	(y = 18, z = 130)
1	o-Methoxyphenol (guaiacol)	90-05-1	NC	L	109.5	64.8	36.1	538.9	NC	NC	98.6	49.9	37.3	481.6	NC	NC	83.7	35.5	15.7	134.9	1BC	1BC	1BC
2	2,4-Xyridine (2,4-dimethylamine)	95-68-1	NC	L	109.8	101.2	31.2	242.2	1BC	1BC	124.5	98.3	77.7	674	NC	NC	139.5	93.8	50.8	702.6	NC	NC	NC
3	Phenethyl bromide (2-bromoethyl benzene)	103-63-9	NC	L	141	127.2	117.2	808.4	NC	NC	144.7	137.5	139.4	855.7	NC	NC	147.6	173	182.7	946.1	NC	NC	NC
4	Buryl carbamate	592-35-8	NC	S	110.9	113.9	91.1	648.6	NC	NC	108.5	112.1	86.2	632.3	NC	NC	91.6	107.6	93.5	567.5	NC	NC	NC
5	L-Glutamic acid hydrochloride	138-15-8	NC	S	106.7	84.2	33.6	224.5	1BC	1BC	95.3	90.2	68.6	540	NC	NC	94.5	94	42.8	514.8	NC	NC	NC
6	1-(o-Tolyl)biguanide	93-69-6	NC	S	115.6	110.3	104.9	677.6	NC	NC	94.6	98.5	98.9	575.8	NC	NC	94.6	107.1	104	589.5	NC	NC	NC
7	Buryl glycolate (polysohan)	7397-62-8	NC	L	110.9	108.2	82.6	634.4	NC	NC	88.7	92.6	74.5	521.9	NC	NC	96.1	105.7	94.1	584.2	NC	NC	NC
8	2-Hydroxyisobutyric acid	594-61-6	NC	S	94.7	42.6	5.4	142.7	1BC	1BC	95.5	41.4	3.7	140.6	1BC	1BC	103	35	6.7	144.7	1BC	1BC	1BC
9	Oxalic acid dihydrate	6153-56-6	NC	S	103.6	38.9	4.2	146.7	1BC	1BC	91.5	51.9	17.5	160.9	1BC	1BC	109.6	50.3	6.4	166.3	1BC	1BC	1BC
10	alpha-Ketoglutaric acid	328-50-7	NC	S	71.5	18.1	4.1	89.6	1BC	1BC	101.7	19.8	6.6	121.5	1BC	1BC	101.7	10.5	5.7	112.2	1BC	1BC	1BC
11	Sulphamic acid	5329-14-6	NC	S	102.9	26.6	20.9	129.5	1BC	1BC	97.9	19.4	0.6	117.3	1BC	1BC	111.2	34.2	2.5	145.4	1BC	1BC	1BC
12	Dodecanoic acid (lauric acid)	143-07-7	NC	S	102	117.4	120.8	646.2	NC	NC	104	111.5	141.7	669.2	NC	NC	104.6	94.4	108.4	621.2	NC	NC	NC
13	Sodium lauryl sulphate (20%)	151-21-3	NC	L	104.9	100.1	79	598.7	NC	NC	114	114.6	94.2	664.8	NC	NC	89	90.2	80.6	526.8	NC	NC	NC
14	Methyl trimethylacetate	598-98-1	NC	L	111.3	117.4	75.3	637.9	NC	NC	106.5	100.9	94	620.9	NC	NC	116.2	109.3	97.2	671.3	NC	NC	NC
15	4-Amino-4H-1,2,4-triazole	584-13-4	NC	S	116.8	120.6	79.6	667.4	NC	NC	105.9	106	99.4	629	NC	NC	105	105.6	97.2	622.8	NC	NC	NC
16	1,9-Decadiene	1647-16-1	NC	L	109.5	112.4	87.8	638.2	NC	NC	114.3	136.3	126.7	720.2	NC	NC	137.6	128.6	110.2	789.2	NC	NC	NC
17	Sodium carbonate (50%)	497-19-8	NC	L	103.8	65.2	60.7	541.1	NC	NC	140	107.5	44.7	712.2	NC	NC	73.8	79	43.5	417.7	NC	NC	NC

(continued on next page)

Table 9 (continued)

18	Benzylacetone (4-phenyl-2-butanone)	2550-26-7	NC	L	133.2	141.2	137.1	811.1	NC	NC	134.7	151.3	149.9	840	NC	NC	150.3	142.2	143.4	886.8	NC	NC
19	Eugenol	97-53-0	NC	L	188.4	122.3	42.7	918.6	NC	NC	121.7	86	12.1	219.8	IBC	IBC	132.9	74.8	14.2	221.9	IBC	IBC
20	Tetrachloroethylene	127-18-4	NC	L	106.5	88.4	68.5	582.9	NC	NC	113.1	116.3	56.2	624.9	NC	NC	112	97.4	75	620.4	NC	NC
21	Sodium undecylenate (33%)	3398-33-2	NC	L	137.6	36	10.7	184.3	IBC	IBC	127.7	40.2	11	178.9	IBC	IBC	149.7	55	16.5	221.2	IBC	IBC
22	4-Amino-5-methoxy-2-methylbenzenesulphonic acid	6471-78-9	NC	S	98.9	115.6	98.6	613.8	NC	NC	105.7	92.3	85.1	600.2	NC	NC	98.2	112.6	101.2	606.6	NC	NC
23	Potassium hydroxide (5%)	1310-58-3	NC	L	72.3	24.6	16.5	96.9	IBC	IBC	68.5	30.1	14.6	98.6	IBC	IBC	94.8	18.9	26.8	113.7	IBC	IBC
24	3,3-Dichloropropionic acid	1119-62-6	NC	S	113.4	117.5	105.8	676.9	NC	NC	107.9	108.9	95.7	636.2	NC	NC	110.3	102.1	113.1	656.4	NC	NC
25	Isopropanol	67-63-0	NC	L	98.9	84.4	88.5	568.5	NC	NC	91.8	87.8	80.8	535.8	NC	NC	98.1	100.2	94.7	587.3	NC	NC
26	2-Phenylalcohol (2-Phenylethanol)	60-12-8	NC	L	102.1	98.1	91.5	598	NC	NC	110.5	108.3	126.1	676.4	NC	NC	88.1	87.6	100.1	540.1	NC	NC
27	n-Butyl propionate	590-01-2	NC	L	106.3	80.5	58.7	564.4	NC	NC	111.5	105.7	63.1	614.8	NC	NC	95.3	70.4	47.9	499.5	NC	NC
28	Methyl palmitate	112-39-0	NC	S	108.3	105.3	97.2	635.7	NC	NC	115.7	109.3	92.1	664.2	NC	NC	96.5	80.1	103.1	569.2	NC	NC
29	Methyl laurate	111-82-0	NC	L	100.9	100.2	93.6	597.4	NC	NC	102.4	95.8	100.5	605.9	NC	NC	105.8	117.9	110.8	651.9	NC	NC
30	Sodium bicarbonate	144-55-8	NC	S	94.3	95.1	90.7	563	NC	NC	105	102.1	115.3	637.4	NC	NC	102.8	92.3	97.4	600.9	NC	NC
31	2-Bromobutane	78-76-2	NC	L	105.6	85.5	35.3	543.2	NC	NC	101.8	95.1	103.2	605.5	NC	NC	133.8	104	54.3	693.5	NC	NC
32	4-(Methylthio)benzaldehyde	3446-89-7	NC	L	136.7	150.4	138.1	835.3	NC	NC	143.7	150.3	150.7	875.8	NC	NC	142.2	158.3	154.2	881.3	NC	NC
33	2-Ethoxyethyl methacrylate	2370-63-0	NC	L	132	133.2	125.8	787	NC	NC	142	139.6	164.5	872.1	NC	NC	133.1	139.7	154.6	826.7	NC	NC
34	Cinnamaldehyde	14371-10-9	NC	L	142.1	125.1	99.3	792.8	NC	NC	134.5	97.3	80	715.3	NC	NC	138.5	94.2	48.8	697	NC	NC
35	4,4'-Methylene-bis-(2,6-di-tert-butylphenol)	118-82-1	NC	S	108.5	100.9	102.7	641.6	NC	NC	110.3	104.8	100.7	646.7	NC	NC	110.6	100.5	95.4	638.3	NC	NC
36	Sodium bisulfate	7631-90-5	NC	S	94.9	67.6	42.3	489.5	NC	NC	89.4	92.8	93.8	544.2	NC	NC	71.3	54.2	47.4	386.8	NC	NC
37	10-Undecenoic acid	112-38-9	NC	S	118.2	67.4	60	600.2	NC	NC	114.6	134	102.3	694.7	NC	NC	96.7	93.8	101.6	582.2	NC	NC
38	N,N-Dimethylbenzylamine	103-83-3	IBC	L	97.4	50	20.6	168	IBC	IBC	98	38.5	19.7	156.2	IBC	IBC	85.9	44.1	14.9	144.9	IBC	IBC
39	Fluoboric acid (hydrogen tetrafluoroborate) (48%)	16872-11-0	IBC	L	111.5	4.1	3.5	11.5	IA	IA	18.9	4.1	4.8	18.9	IA	IA	9.6	2.5	2.7	9.6	IA	IA
40	Maleic anhydride	108-31-6	IBC	S	78.8	13	2.7	91.8	IBC	IBC	72.5	10.1	4.3	82.6	IBC	IBC	80.2	6	5.5	86.2	IBC	IBC
41	60/40 octanoic/decanoic acid	68937-75-7	IBC	L	77.4	7.4	2	84.8	IBC	IBC	55	12.4	3.4	67.4	IBC	IBC	103.6	18	7.3	121.6	IBC	IBC
42	55/45 octanoic/decanoic acid	68937-75-7	IBC	L	59.3	18	4.1	77.3	IBC	IBC	68.8	13.6	4.6	82.4	IBC	IBC	103.2	7.6	3	110.8	IBC	IBC

43	65/35 octanoic/decanoic acid	68937-75-7	IBC	L	62.4	8.9	3.4	71.3	IBC	IBC	84.4	7.4	2.7	91.8	IBC	IBC	1007	8.5	3.5	109.2	IBC	IBC
44	N,N-dimethylisopropylamine	996-35-0	IBC	L	94.3	12.9	8.9	107.2	IBC	IBC	87.7	14.2	8.3	101.9	IBC	IBC	77.6	13.7	9.4	91.3	IBC	IBC
45	Hydrochloric acid (14.4%)	7647-01-0	IBC	L	69.3	5.7	1.9	75	IBC	IBC	63.3	2.2	4.6	65.5	IBC	IBC	65.3	2.5	6.8	67.8	IBC	IBC
46	n-Heptylamine	111-68-2	IBC	L	36.2	50.7	31.9	118.8	IBC	IBC	43.9	25.5	9.7	69.4	IBC	IBC	26.2	22.9	13.3	26.2	IA	IA
47	Octanoic acid (caprylic acid)	124-07-2	IBC	L	16.5	4.1	5.3	16.5	IA	IA	25	6.7	5.3	25	IA	IA	18.2	3.7	3.7	18.2	IA	IA
48	Carvacrol	499-75-2	IBC	L	48.9	23.4	12.1	72.3	IBC	IBC	57.3	26.5	12.5	83.8	IBC	IBC	73.4	31.1	14.7	104.5	IBC	IBC
49	2-tert-butylphenol	88-18-6	IBC	L	86.3	7.5	12.3	93.8	IBC	IBC	52.9	20.8	9.2	73.7	IBC	IBC	60.7	7.2	9.7	67.9	IBC	IBC
50	Methacrolein	78-85-3	IBC	L	85.4	20.6	0	106	IBC	IBC	122.3	32.6	45.4	154.9	IBC	IBC	92.3	42.9	27	162.2	IBC	IBC
51	Lactic acid	598-82-3	IBC	L	80.2	9.4	6.8	89.6	IBC	IBC	72.3	6.3	4	78.6	IBC	IBC	93.6	8.9	4.2	102.5	IBC	IBC
52	Sodium bisulphate monohydrate	10034-88-5	IBC	S	108	51.5	12.2	171.7	IBC	IBC	102.3	40.9	27.2	170.4	IBC	IBC	88.5	44.3	18.8	151.6	IBC	IBC
53	Glyoxylic acid monohydrate	563-96-2	IBC	S	110.4	22.5	24.6	132.9	IBC	IBC	93.6	40.5	12.3	146.4	IBC	IBC	84.9	27.6	10.8	112.5	IBC	IBC
54	Sodium bisulphate	7681-38-1	IBC	S	100.1	31.7	4	131.8	IBC	IBC	103.7	44.1	10.7	158.5	IBC	IBC	83.4	35.9	14.6	133.9	IBC	IBC
55	Cyclohexylamine	108-91-8	IBC	L	89.8	13.1	8.4	102.9	IBC	IBC	46.8	3.4	18.3	50.2	IBC	IBC	73.9	9.2	10.3	83.1	IBC	IBC
56	2-Methylbutyric acid	600-07-7	IBC	L	80.4	2.2	3.2	82.6	IBC	IBC	35.9	3.9	5.6	39.8	IBC	IA	83	5	3.6	88	IBC	IBC
57	Glycol bromoacetate (85%)	3785-34-0	IBC	L	106.3	33.8	27	140.1	IBC	IBC	70.6	5.6	30.6	157.2	IBC	IBC	90.1	71.3	16.9	178.3	IBC	IBC
58	3-Methoxypropylamine	5332-73-0	IBC	L	32.8	20.1	12.9	32.8	IA	IA	23.8	15.8	7.9	23.8	IA	IA	38	30	29.8	68	IBC	IBC
59	Allyl bromide	106-95-6	IBC	L	113.9	37.9	8.2	160	IBC	IBC	119.4	17.4	21.9	136.8	IBC	IBC	108.7	21.1	7.7	129.8	IBC	IBC
60	1-(2-Aminoethyl)piperazine	140-31-8	IBC	L	89.5	69.7	26.7	185.9	IBC	IBC	90.9	41.8	5.5	138.2	IBC	IBC	87.2	57.6	27.3	172.1	IBC	IBC
61	Iron(III) chloride	7705-08-0	IBC	S	77.6	-	43.1	-	NC	-	80.4	58.6	50.6	430.8	NC	NC	78	89.6	28.3	195.9	IBC	IBC
62	Phosphoric acid	7664-38-2	IBC	L	65.6	20.6	1.7	86.2	IBC	IBC	113.1	9.8	2.3	122.9	IBC	IBC	67.4	20.8	9	88.2	IBC	IBC
63	Propionic acid	79-09-4	IBC	L	3.2	2.5	3.9	3.2	IA	IA	5.5	11.8	4.3	5.5	IA	IA	5.8	4.3	9.3	5.8	IA	IA
64	Butyric acid	107-92-6	IBC	L	3.8	2.4	6.3	3.8	IA	IA	8	2.8	3.4	8	IA	IA	14.8	4.7	4.6	14.8	IA	IA
65	Boron trifluoride-acetic acid complex	373-61-5	IBC	L	29.1	4	5.9	29.1	IA	IA	71.6	3	2.3	74.6	IBC	IBC	28.9	4	3.1	28.9	IA	IA
66	Ethanolamine	141-43-5	IBC	V	66.2	40.3	20.8	127.3	IBC	IBC	105.7	52.3	20.2	178.2	IBC	IBC	78.7	67.4	10.8	156.9	IBC	IBC
67	Hydrobromic acid (48%)	10035-10-6	IBC	L	15.8	16.4	5.9	15.8	IA	IA	4.1	3.2	2.9	4.1	IA	IA	2.8	4.2	4.6	2.8	IA	IA
68	HCl + sulphuric acid + citric acid (5, 5, 5 wt.%)	-	IBC	L	84.6	1.6	4.1	86.2	IBC	IBC	95.4	19.3	3.3	114.7	IBC	IBC	79.4	32.4	4.5	111.8	IBC	IBC
69	1,2-Diaminopropane	78-90-0	IA	L	37.2	21.2	11.8	58.4	IBC	IBC	33	14.7	8.3	33	IA	IA	32	14.4	13	32	IA	IA
70	Phosphorus tribromide	7789-60-8	IA	L	5.5	2.5	8.1	5.5	IA	IA	8.4	8	1.8	8.4	IA	IA	9.4	15.1	8.6	9.4	IA	IA
71	Boron trifluoride dihydrate	13319-75-0	IA	L	2.4	4.2	2.7	2.4	IA	IA	2.5	2.6	1.9	2.5	IA	IA	4.5	2.9	2.6	4.5	IA	IA

(continued on next page)

Table 9 (continued)

72	Acrylic acid	79-10-7	1A	L	1.8	2.7	3.2	1.8	1A	1A	2.4	3.8	3.4	2.4	1A	1A	2.8	2.5	2.9	2.8	1A	1A
73	Formic acid	64-18-6	1A	L	4.3	5.6	9.6	4.3	1A	1A	5.7	4.4	5.8	5.7	1A	1A	7.8	4.8	9.9	7.8	1A	1A
74	Dichloroacetyl chloride	79-36-7	1A	L	5.6	6.3	8.3	5.6	1A	1A	5.8	8.5	10.2	5.8	1A	1A	6.2	10.5	8.1	6.2	1A	1A
75	Silver nitrate	7761-88-8	1A	S	12.1	13.4	14.5	12.1	1A	1A	80.6	4.4	1.2	85	1BC	1BC	66.9	2.5	6.4	69.4	1BC	1BC
76	Phenol	108-95-2	1A	S	29.8	21.8	23.1	29.8	1A	1A	22	18.4	18.5	22	1A	1A	21.4	17.2	17.2	21.4	1A	1A
77	Acetic acid	64-19-7	1A	L	2.4	5.6	3	2.4	1A	1A	4.5	4.7	2.8	4.5	1A	1A	2.9	4.1	2.6	2.9	1A	1A
78	Bromoacetic acid	79-08-3	1A	S	3	2.8	3.5	3	1A	1A	3	2.5	3.7	3	1A	1A	2	2.7	4.3	2	1A	1A
79	N,N-dimethyl- dipropylethylamine	10563-29-8	1A	L	93.5	55.1	23.3	171.9	1BC	1BC	90.8	45	32	167.8	1BC	1BC	74.4	70.6	28.7	173.7	1BC	1BC
80	Sulphuric acid (98%)	7664-93-9	1A	L	8	13.8	9.7	8	1A	1A	10.5	9.9	10.1	10.5	1A	1A	14.1	13.9	14.4	14.1	1A	1A

ANNEX 6: OECD (2013)¹⁸予測性データ抜粋

表 A-1. EpiDerm™ の腐食性有無の予測性

EpiDerm with entire set of chemicals (80 chemicals tested over 3 runs, i.e. 240 classifications)				
In vivo categories	Test method: EpiDerm			Sum
	Classified as Cat. 1A	Classified as Cat. 1BC	Classified as Cat. NC	
In vivo Cat. 1A	33	3	0	36
In vivo Cat. 1BC	39	54	0	93
In vivo Cat. NC	3	26	82	111
Sum	75	83	82	240

Within Corrosive: Cat. 1A Versus Cat. 1BC		Calculations over the 3 chemicals categories:			
Sensitivity for 1A	91.67 %	Accuracy (Pred. C) 70.42%	Checking the misclassifications over the 3 categories:		
Sensitivity for 1BC	58.06 %		% OverClass 1BC as 1A	% OverClass NC as 1BC	% OverClass NC as 1A
Accuracy	67.44 %	Correctly Classified Cat. 1A 91.67% Cat. 1BC 58.06% Cat. NC 73.87%	% UnderClass 1A as 1BC	% UnderClass 1A as NC	% UnderClass 1BC as NC
Cat. Corr. Versus Cat. Non Corr			% of OverClass	% of UnderClass	

Sensitivity for Corr.		Fentem's criteria		According to Fentem, test are UNACCEPTABLE if...	
Sensitivity for Non-Corr.	73.87 %	%OverClass NC as Corr.	%OverClass 1BC as 1A	If % OverClass NC as Corr ≥ 50%	If OverClass 1BC as 1A ≥ 50%
Accuracy	87.92 %	%UnderClass 1BC as NC	%UnderClass 1A as NC	If % UnderClass 1BC as NC ≥ 30%	If UnderClass 1A as NC ≥ 30%

表 A-2. EpiSkin™ の腐食性有無の予測性

EpiSkin with entire set of chemicals (80 chemicals tested over 3 runs, i.e. 240 classifications)				
In vivo categories	Test method: EpiSkin			Sum
	Classified as Cat. 1A	Classified as Cat. 1BC	Classified as Cat. NC	
In vivo Cat. 1A	30	6	0	36
In vivo Cat. 1BC	20	71	2	93
In vivo Cat. NC	0	23	88	111
Sum	50	100	90	240

Within Corrosive: Cat. 1A Versus 1BC		Calculations over the 3 chemicals categories:			
Sensitivity for 1A	83.33 %	Accuracy (Pred. C) 78.75%	Checking the misclassifications over the 3 categories:		
Sensitivity for 1BC	78.02 %		% OverClass 1BC as 1A	% OverClass NC as 1BC	% OverClass NC as 1A
Accuracy	79.53 %	Correctly Class	% UnderClass 1A as 1BC	% underClass 1A as NC	% UnderClass 1BC as NC
Cat. Corr. Versus Cat. Non Corr		Cat. 1A 83.33%	16.67%	0.00%	2.15%
		Cat. 1BC 76.34%	% of OverClass	% of UnderClass	
		Cat. NC 79.28%	17.92%	3.33%	

Sensitivity for Corr.		Fentem's criteria		According to Fentem, tests are UNACCEPTABLE if...	
Sensitivity for Non Corr.	79.28 %	%OverClass NC as Corr.	%OverClass 1BC as 1A	If % OverClass NC as Corr ≥ 50%	If OverClass 1BC as 1A ≥ 50%
Accuracy	89.58 %	20.72%	21.51%		
		% UnderClass 1BC as NC	% UnderClass 1A as NC	If % UnderClass 1BC as NC ≥ 30%	If UnderClass 1A as NC ≥ 30%
		2.15%	0.00%		

表 A-3. SkinEthic™ の腐食性有無の予測性

SkinEthic with entire set of chemicals (80 chemicals tested over 3 runs, i.e. 240 classifications)				
Test method: SkinEthic				
In vivo categories	Classified as Cat. 1A	Classified as Cat. 1BC	Classified as Cat. NC	Sum
In vivo Cat. 1A	31	5	0	36
In vivo Cat. 1BC	43	43	7	93
In vivo Cat. NC	3	27	81	111
Sum	77	75	88	240

Within Corrosive: Cat. 1A Versus Cat. 1BC		Calculations over the 3 chemicals categories:			
Sensitivity for 1A	86.11 %	Accuracy (Pred. C) 64.58%	Checking the misclassifications over the 3 categories:		
Sensitivity for 1BC	50.00 %		% OverClass 1BC as 1A	% OverClass NC as 1BC	% OverClass NC as 1A
Accuracy	60.66 %		46.24%	24.32%	2.70%
Corr. Versus Non Corr		Correctly Class	% UnderClass 1A as 1BC	% underClass 1A as NC	% UnderClass 1BC as NC
Sensitivity for Corr	94.57 %	Cat. 1A 86.11%	13.89%	0.00%	7.53%
		Cat. 1BC 46.24%	% of OverClass	% of UnderClass	
		Cat. NC 72.97%	30.42%	5.00%	
		Fentem's criteria	According to Fentem, tests are UNACCEPTABLE if...		

Sensitivity for Non Corr	72.97 %	%OverClass NC as Corr.	%OverClass 1BC as 1A	If % OverClass NC as Corr \geq 50%	If OverClass 1BC as 1A \geq 50%
Accuracy	84.58 %	27.03%	46.24%		
		%UnderClass 1BC as NC	%UnderClass 1A as NC	If % UnderClass 1BC as NC \geq 30%	If UnderClass 1A as NC \geq 30%
		7.53%	0.00%		

表 A-4. EpiCS® 腐食性有無の予測性

epiCS with entire set of chemicals				
Test method: epiCS				
In vivo categories	Classified as Cat. 1A	Classified as Cat. 1BC	Classified as Cat. NC	Sum
In vivo Cat. 1A	22	2	0	24
In vivo Cat. 1BC	28	29	4	61
In vivo Cat. NC	0	21	53	74
Sum	50	52	57	159

Within 1A Vs. 1BC		Calculations over the 3 chemicals categories:			
Sensitivity for 1A	91.67%	Accuracy (Pred. C) 65.41%	Checking the misclassifications over the 3 categories:		
Specificity = Sensitivity for 1BC	50.88%		% OverClass 1BC as 1A	% OverClass NC as 1BC	% OverClass NC as 1A
Accuracy	62.96%		45.90%	28.38%	0.00%
Corr. Vs. Non Corr		Correctly Class	% UnderClass 1A as 1BC	% underClass 1A as NC	% UnderClass 1BC as NC
Sensitivity for Corr	95.29%	Cat. 1A 91.67%	8.33%	0.00%	6.56%
Sp for Coor = Se for Non Corr	71.62%	Cat. 1BC 47.54%	% of OverClass	% of UnderClass	
Accuracy	84.28%	Cat. NC 71.62%	30.82%	3.77%	