

ECVAM SIVS の第一フェーズでは、NCD から得られた 20 種の化学物質(刺激性物質:9 種、非刺激性物質:11 種)が、盲検状態で主導施設(EPISKIN - L'OREAL, EpiDerm - ZEBET, SIFT - Syngenta)において試験された。用いられた方法(Standard Operating Procedures, SOP's)は詳細に検討され、最適化されたプロトコールが ECVAM プレバリデーション研究後に作成された。

ヒト皮膚モデルを用いた試験に関しては、試験物質を皮膚モデルの表面に 15 分接触させ、更に 42 時間培養後、MTT 試験法を用いて細胞の生存率に与える化学物質の影響を評価する。

フェーズ1および2で用いられた MTT 法の判定基準を以下に示す。

「暴露および後処理培養後における組織の生存率が 50%以下の場合、試験物質は皮膚刺激性(R38)であると考える」

細胞生存率(MTT 還元)が判定基準として用いられた場合、これら二つの皮膚モデルはバリデーションの Management Team(MT)によって設定された容認基準を満たしていた。

EPISKIN と EpiDerm による試験の特異性(非刺激性物質の正確な予測)は共に 91%であったが、感度(R38 皮膚刺激性物質の正確な予測)はそれぞれ 67%と 56%であった。しかしながら、刺激性物質と識別できなかったほとんどの化学物質は、欧州連合の分類方式から見て刺激性物質と非刺激性物質の境界にあるものであったので、MT は EpiDerm と EPISKIN の予測性能はフェーズ 2 へと進むのに充分と判断した。一方、SIFT の予測性能は充分でないと判断された。SIFT については、特に固体および非界面活性剤の測定に関して、試験プロトコールと予測モデルを主導施設において再評価することが勧められた。

フェーズ2では 58 種の化学物質すべてが、異なった 3 つの施設でそれぞれの再構成皮膚モデルに対して試験された。EpiDerm の試験はドイツの ZEBET(主導施設)、アメリカ合衆国の Institute for In vitro Sciences (IIVS)、そしてドイツの BASF によって行われた。EPISKIN の試験はフランスの L'OREAL(主導施設)、イギリスの Unilever、そしてフランスの Sanofi-Synthelabo が担当した。

盲検性を確かにするために、化学物質は再度コード付けした。EpiDerm と EPISKIN の判定基準はそれまでに実施されたすべての試験と同様に、MTT の還元によって測定された細胞生存率である。しかしながら、刺激性が予測できる閾値よりも細胞生存率が低くならなかった化学物質について感度を改善できるかを検討するために、第二の判定基準、インターロイキン-1 α の放出量の測定が加えられた。この第二の判定基準は EPISKIN を試験したすべての研究施設と EpiDerm を試験した主導施設で用いられた。

フェーズ2で用いられた MTT 法と IL-1 α を組み合わせた場合の判定基準は以下の通りである。

試験物質は以下の場合、皮膚に対して刺激性と考える；
15 分の暴露および 42 時間の後処理培養後における組織の生存率が 50%を越え (>50%)、さらに IL-1 α の放出が 60pg/ml を越える (>60pg/ml) 場合

試験物質は以下の場合、皮膚に対して非刺激性と考える；
15 分の暴露および 42 時間の後培養後における組織の生存率が 50%を越え (>50%)、さらに IL-1 α の放出が 60pg/ml 以下である (\leq 60pg/ml) 場合

フェーズ 2 における試験の予測性能を表 2 に示す。

許容基準に適合した 3 回以上の個別の実験結果から得られた判定の一致性による施設内再現性は、EPISKIN で 93.9% (MTT)、EpiDerm で 96.0% (MTT) であった。各施設で得られた中央値による判定が一致した割合で評価した施設間再現性は EPISKIN で 89.5%、EpiDerm で 88.5% であった。

表 2. EPISKIN と EpiDerm の予測性能 (MTT: 研究施設ごとの中央値による判定をもとに算出; MTT + IL-1 α : 試験物質および研究施設ごとの個別実験における平均生存率から得られた判定をもとに算出)

	<i>EPISKIN (MTT)</i>	<i>EPISKIN (MTT+IL1-α)</i>	<i>EpiDerm (MTT)*</i>
感度	74.7%	90.7%	57.3%
特異性	80.8%	78.8%	83.8%
一致性	78.2%	83.0%	72.4%

* EpiDerm プロトコールについては IL-1 α の測定を行っても、結果の改善は見られなかった。

研究結果は、EPISKIN がウサギ皮膚刺激性試験法の代替と考えられること、また EpiDerm は今後の代替法の一つの候補と考えられること、という提案とともに、ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) に送られた。

ECVAM 皮膚刺激試験法バリデーション研究の背景

1998年、ECVAM Skin Irritation Task Force (ECVAM 皮膚刺激タスクフォース) は *in vitro* 皮膚刺激性試験の現状についての報告書を発表し、ウサギにおける *in vivo* 試験、*in vivo* ヒトパッチ4時間テストのデータに呼応し、ヒト皮膚モデル EpiDerm による *in vitro* データが利用できる、有望な 10 種の「チャレンジ化学物質」を提案した。

新規 *in vitro* 試験システムの提案者は、これらの物質に対する新規 *in vitro* 皮膚刺激性試験プロトコールによって得られたデータの提出を促し(1)、これらの試験を ECVAM のプレバリデーションに取り上げるかどうかを評価することとなった。同時に、欧州連合第4次枠組み共同プロジェクトにより、いくつかのヒト再構成皮膚モデルを用いてヒト皮膚刺激性の予測のために様々な判定基準の適正性が評価され、細胞生存率(MTTの還元)とIL-1 α の放出が最も有力な判定基準であることが示された。

MTTの還元とIL-1 α の放出は、高い相関を示し、IL-1 α はより激しい変動を示すことから、ヒト皮膚モデルについてはMTTの還元が最も適した判定基準として提案された(2)。

ECVAM TF に提出された試験法は 5 つ[還元したブタ耳、Prediskin、SIFT、EPISKIN、EpiDerm]で、ECVAM のプレバリデーション研究に取り上げる有力な方法と考えられた。しかしながら、プレバリデーション研究では、フェーズ 2 において、2 つの試験法は再現性に乏しいことが分かった。その他の方法[SIFT、EPISKIN と EpiDerm]は良好な施設内および施設間再現性を示した一方で、ECVAM プレバリデーション研究のフェーズ 3 で試験された 20 種の化学物質について皮膚刺激性を正確に予測することはできなかった(3)。

従って、ECVAM Management Team はこれらの 3 つの試験法を正式なバリデーションにかける前に、詳細検討を行い最適化することを提案した。

2001年、ECVAM Skin Irritation Task Force と詳細検討を担当していた施設は再び、正式なバリデーションへの方策についての会議をおこなった。プレバリデーションで得られたEPISKINとEpiDermのMTT還元についての事後評価は同等の感受性を示したので、正式なバリデーションを開始する前に、双方の皮膚モデルに共通なプロトコールを作成することが提案された(4)。

2002年11月、ECVAM Skin Irritation Task Force (TF) は SIFT(5)と皮膚モデル試験法(6)の詳細検討を議論し、正式なバリデーションへ移行することができると結論付けた。しかしながら、すべての詳細検討はプレバリデーション研究で用いられた 20 の化学物質を使用して行われていたので、TF は SIFS を二つのフェーズに分けて行うことを勧めた: 最初のフェーズ(フェーズ 1)では、新規の物質を管理された盲検条件で試験し、主導施設である Syngenta (SIFT)、L'OREAL (EPISKIN)、ZEBET (EpiDerm)によって行われた最適化検討の結果を確認する。もし、フェーズ 1 での結果が有望であるならば、その試験法は第二のフェーズ(フェーズ 2)に進むことにし、すなわち、一つの試験法を 3 施設で検討することになる。

2003年の間にEPISKIN試験法はL'OREALによって更に詳細検討が進み、化学物質による微弱な反応の回復や有意な影響の増幅が確認できることから、15 分間の

化学物質暴露に続く、組織の後処理培養時間を42時間に延長することとした。2003年5月に、ECVAM Stakeholder Workshopは正式なバリデーション研究を行うことを勧告し、試験法は欧州連合の分類システム(R38 ラベル 対 非ラベル)識別に従って開発され最適化されているので、この分類システムの予測に注力するよう求めた。

L'OREALとZEBETはECVAM SIVSに用いられる共通のプロトコルを開発することで協力し、手始めにECVAMのプレバリデーションで用いられた20種のチャレンジ化学物質を評価した。

2004年、ECVAM SIVS Management Teamの要請によって、SIVS フェーズ1と同時に、ECETOC 対照データベース(ECETOC Report No.66)で推奨されている非腐食性化学物質をすべて試験することによって、更にデータの数が増加した。

二つの皮膚モデルを用い、共通のプロトコルによって得られたデータはかなり有望で、2005年に連続して発表された(7, 8)。

欧州委員会による2003年6月のECVAM SIVSに関する公募に応じたBfRとは2003年11月に契約を交わした。2003年11月17-18日のSIVS Management Team(MT)の第一回会議を以って、バリデーションが正式に開始された。

皮膚刺激性試験バリデーションの結果および試験物質の選定については、現在発表原稿を作成中である。

参考資料

1. Botham, P.A., Lesley, K. E., Fentem, J.H., Roguet, R and J.J.M. van de Sandt (1998) Alternative Methods for Skin Irritation Testing: the Current Status. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 1, *ATLA* **26**, 195-211
2. Faller, C., Bracher, M., Dami, N. and R. Roguet (2002) Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for assessment of Skin Irritation of cosmetics. *Toxicology In vitro* **16**, 557-572
3. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne, C., Elliott, G. r., Harbell, J. W., Heylings, J. R., Portes, P., van de Sandt, J.J.M. and P.A. Botham (2001) A prevalidation study on *in vitro* tests for acute Skin Irritation: results and evaluation by the Management Team. *Toxicology In vitro* **15**, 57-93
4. Zuang, v., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliott, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J. R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van de Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and P.A. Worth (2002) Follow-up to the ECVAM prevalidation study on the *in vitro* tests for acute Skin Irritation. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 2. *ATLA* **30**, 109-129
5. Heylings, J. R., Diot, S., Esdaile, D. J., Fasano, W.J., Manning L.A. & Owen H.M. (2003) A prevalidation study on the *in vitro* irritation function test (SIFT) for prediction of acute Skin Irritation in vitro: results and evaluation of ECVAM phase 3. *Toxicology In vitro* **17**, 123-138

6. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik B. & Spielmann H. (2004) Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. *ATLA* **21**, 107-114
7. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and H. Spielmann (2005) The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on the Skin Irritation Tests – An Assessment of the performance of the optimised Test. *ATLA* **33**, 351-367
8. Cotovió, J., Grandidier, M-H. Portes, P., Rouget, R. and G. Rubinsteen (2005) The *in vitro* acute Skin Irritation of chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of ECVAM Validation Process. *ATLA* **33**, 329-349

ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法の第三者評価報告書

評価対象:3次元皮膚モデル EPISKIN に関する ESAC の statement の評価

皮膚刺激性試験代替法の第三者評価委員会

要旨

欧州代替法バリデーションセンター(ECVAM)で行われた第26回会議(2007年4月26日)において、ECVAM科学諮問委員会の非理事会メンバー(ESAC)によって提出された3次元皮膚モデルEPISKINを用いたin vitro皮膚刺激試験法の承認に関するESACのstatementについて評価した。

ESACの評価は、欧州で1998年から開始された、ウサギによる皮膚一次刺激性試験結果を予測できる試験法探索のためのECVAM皮膚刺激タスクフォースから提出された正式バリデーション報告書をもとに実施されている。

このバリデーションの目的は、現在行われている欧州でのR38表示(EU classification system: 皮膚刺激性物質をR38として分類表示し、非刺激性物質を表示しない)による化学物質の分類をin vitro試験が予測できるかどうかを評価することであった。

3次元ヒト皮膚モデルEPISKINを用いたin vitro皮膚刺激試験法の概要は、試験物質を皮膚の表面に15分接触させ、更に42時間培養後、MTTの還元を用いた組織生存率を測定し、50%生存率を識別点として刺激性を識別するものである。バリデーションにおいて、良好な結果が得られたことから、ESACは、3次元ヒト皮膚モデルであるEPISKINを用いた試験法が、ウサギ皮膚刺激性を予測するため、またR38表示を区別する目的で使用されるDraize皮膚刺激性試験(OECD TG 404 およびEU危険物指令 Directive 67/548/EEC の付属 Annex V に記載の試験法 B.4)を代替する、信頼性があり適切なスタンド・アローンの試験法であると評価した。

また、特異性を損なわずに感受性を向上させる可能性があるという理由で、IL-1 α の放出測定による判定を追加することが、MTT還元法で得られた陰性判定を確定するために有効な補助法であると判断している。

本委員会では、ESACが評価した資料について検証・確認を行い、以下の結論を得た。

- ① ウサギによる皮膚一次刺激性試験が、人の皮膚の損傷を評価するのに対し、本試験法では人細胞を用いた三次元モデルを用いることから、代替試験として科学的に妥当である。
- ② この方法は、OECDのTG404を代替するものと明記されており、試験法適用の目的が化学物質の皮膚刺激表示R38(2段階)及びGHS(3段階)の表示の識別評価に用いるためと明記されている。
- ③ 試験プロトコールは、皮膚モデルへの試験物質暴露方法とその細胞毒性評価にいたる詳細なプロトコールが存在している。またその内容も本試験が正確に実施できるようなものであると判断できる。
- ④ OECDのGuidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (No.34)に基づいてバリデーションがなされている。
- ⑤ ヒト皮膚モデルの製造に関し、生産施設の監査が実施され、品質確認されている。
- ⑥ バリデーションマネージメントチームが組織され、その中に生物統計の専門家が含まれている。
- ⑦ バリデーション結果が専門家に評価されている点から得られたデータの信頼性・質・正確性は国際水準を満たしていると判断できる。
- ⑧ データ解析において、施設内変動性、施設間変動性について評価しており、施設内再現性・施設間再現性に問題はないものである。
- ⑨ 58種の試験資料は、in vivoデータが入手できる既存の信頼できる3つのデータベースに

登録されているものから選択されており、選択基準は妥当である。陰性コントロールはPBS、陽性コントロールは0.5%SDSが設定されている。

以上より、3次元皮膚モデル EPISKIN を用いた *in vitro* 皮膚刺激試験法の承認に関する ESAC の評価結果は、納得できるものであることが確認され、R38 表示による化学物質の分類を予測する *in vitro* 試験として有用な方法であることが確認された。

評価結果

1. 試験法の科学的および規制面からの妥当性

現在広く利用されているウサギを用いる皮膚刺激性試験法は、被験物質の刺激性を検出する感度は非常に優れているものの、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こと、更に動物に苦痛とストレスを与えることから、動物福祉の観点から、その代替法の開発が切望されている。

今回、欧州代替法バリデーションセンター (ECVAM) 科学諮問委員会の非理事会メンバー (ESAC) によって 3 次元ヒト皮膚モデル EPISKIN を用いた *in vitro* 皮膚刺激試験法の承認に関する statement が提出された。

皮膚刺激性は、皮膚表面に直接投与された物質によって引き起こされる可逆的な皮膚の炎症反応であって、肉眼的には紅斑と浮腫として認められるものである。皮膚刺激反応は、刺激物質が、皮膚角質層に吸収され、拡散し、下層の細胞に影響を与えるため生ずると考えられることから、3 次元皮膚モデルを用いて被験物質暴露後の細胞生存率等を指標に皮膚刺激性を評価する代替法は妥当であるとして利用されている。

EPISKIN は、真皮に相当するコラーゲンマトリックスの上でヒト成人ケラチノサイトを培養し、表皮構造を再構成した再構築皮膚モデルである。また、本試験法は、MTT 還元法による細胞毒性評価を第一指標に、また第二指標に炎症性サイトカイン IL-1 α の放出量を指標としている。MTT 還元法による皮膚モデルの細胞毒性評価については、事前の検討においてその妥当性が検討され採用されている。サイトカイン放出 (IL-1 α) と刺激性の関連については、IL-1 α 、AK (adenylylate kinase) および IL-8 を指標に検討した結果、刺激性の過程と関連が考えられること、購入可能なキットがあることから IL-1 α が有効であるとして採用されているが、その詳細な説明については記載されていない。

ECVAM 皮膚刺激タスクフォースによって実施された正式バリデーションは、バリデーションの計画、実施、データの解析、得られた結果の独立した検証等、OECD No.34 に基づいて実施されていることから、バリデーションのプロセスに問題はなかった。この正式バリデーションの結果、EPISKIN を用いた *in vitro* 皮膚刺激試験法が、欧州における人体と環境に対する危険物の分類と表示に関する指令 Directive 67/548/EEC に基づく化学物質の皮膚刺激性リスク識別、R38 表示 (EU classification system: 皮膚刺激性物質を R38 として分類表示し、非刺激性物質を表示しない) を区別する目的で使用される Draize 皮膚刺激性試験である OECD TG 404 および EU 危険物指令 Directive 67/548/EEC の付属 Annex V に記載の試験法 B.4 を代替する、信頼性があり適切なスタンド・アローン評価法であると ESAC は評価している。

R38 表示は EU 域内における皮膚刺激性 (irritant) のリスク表示であるが、同様な識別として、国連による化学品の危険有害性分類・表示の国際的な調和の実現のためのシステムとして「化学品の分類及び表示に関する世界調和システム」(The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals :GHS) がある。

日本でも GHS 分類の受け入れについて、環境省、厚生労働省及び経済産業省が省庁間連携事業として、GHS 危険有害性の分類マニュアルを作成し対応している。GHS における皮膚刺激/腐食性分類規定も、OECD TG 404 により得られた皮膚刺激性結果をもとに分類されていることから、今後の GHS 分類への対応も考慮すべき問題である。

2. 試験プロトコール構成の妥当性

ECVAM 皮膚刺激タスクフォースで実施された正式バリデーションは、Phase 1 と Phase 2 に

分けて実施された。Phase 1 は、それまでのプレバリデーションで最適化検討された試験プロトコルを検証することを目的として実施された。その結果、false negative を減少させるための改良が行われ、刺激によって皮膚から放出される炎症メディエーターである IL-1 α の放出量の測定が SOP に追加された。SOP を最適化し、技術伝達を実施した後、Phase 2 は、3 施設で実施された。

Phase 2 で実施された試験プロトコルは、MTT 還元法による細胞毒性評価法、IL-1 α 測定 の 2 試験ともに正式かつ詳細な SOP (EPISKIN SKIN IRRITATION TEST^{42hours}、 DETERMINATION OF IL-1 α CONCENTRATION IN THE CULTURE MEDIUM) が存在し、その内容は、基本的には本試験を正確に実施できるようなものであった。また、SOP には、この試験の目的が、欧州における R38 表示に従って、化学物質の皮膚刺激性ポテンシャルを分類・予測するためモデルとして設計されていることが明記されている。

R38 表示も国連による GHS 表示も OECD TG 404 により得られた皮膚刺激性結果をもとに分類されていることから、正式バリデーションでは、得られた in vitro 結果と GHS 分類との解析も考慮して試験物質を選択しているが、試験プロトコルについては R38 による識別に特化して作成されている。プロトコルの概略は以下のとおりである。

【EPISKIN SKIN IRRITATION TEST^{42hours}】

12 well プレートを用い、各 well に培養液 2 ml を加えてヒト皮膚モデルを置き、24 時間前培養し、試験に供した。被験物質が液状の場合はピペッターで 10 μ l を皮膚モデル上層に適用し、固形の場合は 10 mg を計測し、あらかじめ 5 μ l の蒸留水でしめらせた皮膚モデル上層にスバチュラで適用した (n=3)。適用時間は 15 分間とし、15 分後に、25 ml の PBS を用いて試験物質を除去し、インサートに残った PBS をふき取った後、新しい培養液を入れた 12 ウェルプレート移動し、42 時間培養した。42 時間後、IL-1 α 測定のためプレートを 15 分間プレートシェーカーにかけ、1.6ml の培養液をチューブに分取した。チューブは -20 $^{\circ}$ C に保存した。MTT 色素を含む培養液 2.0ml 入れた well にヒト皮膚モデルを移し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ インキュベータ中に 3 時間静置し培養した。3 時間後、付属のパンチをもちいて円形状にくり貫き、マイクロチューブにいれ、酸性イソプロパノールを 500 μ l 加えて、抽出した。96 well プレートに抽出液を 200 μ l ずつ移し(1 物質あたり 2 well)、マイクロプレートリーダーを用いて 545 nm から 595 nm の領域での吸光度を測定した。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た。陰性対照の吸光度を 100%とした時の各物質の生存率(%)を計算した。使用した 3 つのモデルの平均生存率(3 つの皮膚モデルの個別生存率からの平均)が 50%以下の結果を示す物質を R38(irritant)と判定した。陰性対照は PBS を用いた。陽性対照は 5%SDS を用いた。試験は原則として繰り返し 3 回実施した。

【DETERMINATION OF IL-1 α CONCENTRATION IN THE CULTURE MEDIUM】

IL-1 α 測定のために分取した培養液を用いて実施した。IL-1 α モノクローナル抗体をプレコーディングしたプレートを用い、サンドイッチ酵素免疫抗体法を用いて測定した。測定には、Quantikine[®] (R&D Systems)を用いた。

手順は Quantikine[®] human IL-1 α Procedure、R&D Systems に従った。使用した 3 つの皮膚モデルの個別測定値からの平均値を pg/ml で示した。MTT 還元法で、平均生存率が 50% 超の結果を示し、かつ、IL-1 α 測定で 50pg/ml 以上の結果を示す物質を R38(irritant)と判定し 50%超の結果を示し、かつ、IL-1 α 測定で 50pg/ml 未満の結果を示す物質を表示なし(Non irritant)と判定した。また、SOP には、この結果は、Quantikine[®] (R&D Systems)を使用した場

合に役に立つ方法であると記載されている。

この試験はMTT-還元法で陰性となった試験物質及び3回の結果判定がばらついた試験物質のみに適用されている。

上記2試験法の判定基準の妥当性は、得られた結果解析により検証された。

MTT還元法については、細胞生存率による判定基準を変化させたときの感度と特異度のバランスの分析から、参加3施設全体の総合結果から、感度と特異度のバランスが安定して高いのは、生存率24%から77%で、最も予測性能が高い(1.593)のは生存率55%であり、これは、設定した判定基準50%の接近していたことから、生存率50%を識別としたことの妥当性が検証されている。

一方、IL-1 α 測定判定基準は、SOPでは50pg/mlと設定され、バリデーションは実行されたが、同様の結果解析により、判定基準を60pg/mlに変更することで、識別予測能が向上することが確認された。ECVAMはこの結果を受け入れ、最終的に判定基準は60pg/mlに変更された。

3. バリデーションに用いた物質の分類、選択理由の妥当性

試験物質の選択は、Chemicals Selection Sub-committee(CSSC)によって実施された。試験物質数は58種であった。試験物質を表1、2に示す。

試験物質の選定基準は、in vivo データが入手可能であり、データの質が確保されているものとして、3つのデータベース(i European Centre for the Ecotoxicity and Toxicology of Chemicals (ECETOC)データベース、ii European Chemical Bureau(ECB)による新規化学物質データベース(New Chemicals Database, NCD)、iii Toxic Substance Control Act (TSCA)データベース)に登録されている化学物質から選定された。in vivo データは、ドレイズ試験結果から、3羽以上の個別動物の個別平均刺激値から得られた優位な中央値(dominant median (Draize) score)を採用している。この中央値を採用することで、EU分類 R38(irritant:2以上/no label)だけでなく、GHS分類(Irritant I:2.3以上、Mild irritant MI:1.5以上 2.3未満、non-irritant NI:1.5未満)への適用が可能となる。

ECETOC、TSCAからの試験物質の個別in vivo データは記載されているが、NCDからの試験物質の個別in vivo データは秘密保持の問題で記載されず、中央値の記載のみであった。

58種の試験物質の内訳は、EU分類において、R38表示物質が25種、no labelが33種であった。GHS分類によると、Irritantが13種、Mild irritantが17種、non-irritantが28種となった。EU-GHS分類では、R38-Iが13種、R38-MIが12種、no label-MIが5種、no label-NIが28種であった。これらは、さまざまな分子構造、置換基、物理化学的性質を持つものであった。これらは、それぞれ個別にコードがつけられ、参加施設に配布された。

以上より、CSSCによる試験物質の選択については、選択基準が明確であり、58種を選択していることから、質的にも量的にも妥当であった。

しかし、採用されたin vivo データについて、ドレイズ法によるとされているが、ドレイズ法には、OECD-TG404を含めいくつかの変法があることから、どのような試験法によって得られたかを確認しておく必要がある。

日本において実際に運用しようとする場合、今回EUで試験物質として選定された58物質に加えて、日本において特に使用頻度が高い皮膚刺激性物質についても、バリデーションし、試験物質リストに追加することが必要ではないかと考えられる。その点については、日本全体というよりも、業界単位でリストアップするほうが効率的で、現実的な対応ができると考える。

表1 試験物質一覧 Hoffmann, S., (2006)から引用 *No.14, No.38 は phase 2 試験から除外

chemical number	substance name	CAS-number	source
1	2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine hydrochloride	86604-75-3	NCD
2	1-bromo-4-chlorobutane	8940-78-9	ECETOC
3	1-bromohexane	111-25-1	ECETOC
4	1-decanol	112-30-1	ECETOC
5	3-chloro-4-fluoronitrobenzene	350-30-1	ECETOC
6	3-diethylaminopropionitrile	5351-04-2	ECETOC
7	3-mercaptophexano	51755-83-0	NCD
8	4-methylthio-benzaldehyde	3448-89-7	ECETOC
9	2,6-dimethyl-4-nitrobenzearmine	10947-63-0	NCD
10	allyl heptanoate	142-19-8	ECETOC
11	allyl phenoxyacetate	7493-74-5	ECETOC
12	2-ethylhexyl 4-aminobenzoate	26218-04-2	NCD
13	1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenylbutan-1-one	69047-07-4	NCD
14*			
15	a-terpineol	98-55-5	ECETOC
16	capryl-isostearate	209802-43-7	NCD
17	2-methyl-3-[(1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl)oxy]-1-propanol, bornyl isomer	128119-70-0	NCD
18	butyl methacrylate	97-88-1	TSCA
19	2,5-dimethyl-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-yl acetate	4166-20-5	NCD
20	cyclamen aldehyde	103-95-7	ECETOC
21	A mixture of: 5-exo-decylbicyclo[2.2.1]hept-2-ene; 5-endo-decylbicyclo[2.2.1]hept-2-ene	22094-85-5	NCD
22	diethyl phthalate	84-66-2	ECETOC
23	di-n-propyl disulphide	629-19-6	ECETOC
24	di-propylene glycol	25265-71-8	ECETOC
25	dipropylene glycol monobutyl ether	29911-29-2	TSCA
26	3,4-dimethyl-1H-pyrazole	2820-37-3	NCD
27	2-isopropyl-2-isobutyl-1,3-dimethoxypropane	129229-21-3	NCD
28	ethyl cis-4-[4-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]piperazine-1-carboxylate	67914-69-6	NCD
29	Mixture of: 2-methyl-4-(2',2',3'-trimethyl-3'-cyclopenten-1'-yl)-4-penten-1-ol 58% (1'R,2R) & 40% (1'R,2S) isomer	014864-90-6	NCD
30	Mixture of: diethyl cis-1,4-cyclohexanedicarboxylate; diethyl trans-1,4-cyclohexanedicarboxylate	0072903-27-6	NCD
31	A mixture of isomers: ethyl exo-tricyclo[5.2.1.0(2,6)]decane-endo-2-carboxylate; ethyl endo-tricyclo[5.2.1.0(2,6)]decane-exo-2-carboxylate	80607-64-3 (mix)	NCD
32	2S-(2-furyl)-5R-hydroxy-4R-(1R,2-dihydroxy)ethyl-6S-hydroxymethyl-1,3-dioxane	7089-59-0	NCD
33	heptyl butyrate	5870-93-9	ECETOC
34	hexyl salicylate	6259-76-3	ECETOC
35	cyclohexadecanone	2550-52-9	NCD
36	isopropanol	67-63-0	ECETOC
37	[2-(cyclopentyl)oxy]ethylbenzene(cyclopentyl 2-phenylethyl ether)	not allocated	NCD
38*			
39	methyl stearate	112-81-8	ECETOC
40	1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	5271-27-2	NCD
41	naphthalene acetic acid	86-87-3	TSCA
42	disodium 2,2'-(1,4-phenylene)bis-(1H-benzimidazole-4,6-disulfonic acid or monosulfonic acid, monosulfonate or disulfonate)	180898-37-7	NCD
43	A mixture of isomers: 1-(1,1-dimethylpropyl)-4-ethoxy-cis-cyclohexane; 1-(1,1-dimethylpropyl)-4-ethoxy-trans-cyclohexane	181258-87-7 (cis), 181258-89-9 (trans)	NCD
44	phenylethylalcohol	60-12-8	ECETOC
45	(+/-) trans-3,3-dimethyl-5-(2,2,3-trimethyl-cyclopent-3-en-1-yl)-pent-4-en-2-ol	107898-54-4	NCD
46	4-methyl-8-methylenetricyclo[3.3.1.1(3,7)]decane-2-ol	122760-84-3	NCD
47	4-methyl-8-methylenetricyclo[3.3.1.1(3,7)]dec-2-yl acetate	122760-85-4	NCD

48	2-(formylamino)-3-thiophenecarboxylic acid	43028-69-9	NCD
49	isostearic acid monoisopropanolamide	152848-22-1	NCD
50	2-phenylhexanenitrile	3508-98-3	NCD
51	Mixture of isomers: 1-(2-isopropylphenyl)-1-phenylethane (CAS 191044-63-7) 1-(3-isopropylphenyl)-1-phenylethane (CAS 191044-52-4) 1-(4-isopropylphenyl)-1-phenylethane (CAS 2320-06-1)	52783-21-8 (mix.)	NCD
52	propyl (2S)-2-(1,1-dimethylpropoxy)-propanoate	0319002-92-1	NCD
53	silene A-1430	2530-87-2	TSCA
54	Mixture of isomers: 1-(spiro[4.5]dec-7-en-7-yl)pent-4-en-1-one (CAS 224031-70-3) 1-(spiro[4.5]dec-6-en-7-yl)pent-4-en-1-one (CAS 224031-71-4)	224031-70-3	NCD
55	terpinyl acetate	80-26-2	ECETOC
56	benzenethiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl (NB: CAS name from company)	7340-90-1	NCD
57	triethylene glycol	112-27-6	TSCA
58	tri-isobutyl phosphate	126-71-6	TSCA
59	(E,E)-3,7,11-trimethyldodeca-1,4,6,10-tetraen-3-ol	125474-34-2	NCD
60	bis[(1-methylimidazol)-(2-ethyl-hexanoate)], zinc complex	not allocated	NCD

表 2 試験物質の皮膚刺激分類と刺激値 Hoffmann, S. (2006)から引用

* No.14, No.38 は phase 2 試験から除外

chemical	classification		dominant median	dominant endpoint
	ECS	GHS		
1	R38	I	2.7	B
2	no label	NI	0.0	B
3	R38	I	2.7	E
4	R38	I	2.3	E
5	no label	NI	1.0	E
6	no label	NI	0.0	B
7	no label	NI	0.0	B
8	no label	NI	1.0	E
9	no label	NI	0.3	E
10	no label	MI	1.7	E
11	no label	NI	0.3	E
12	no label	NI	0.7	E
13	R38	MI	2.0	E
14*				
15	R38	I	2.7	O
16	no label	NI	1.0	E
17	no label	MI	1.7	E
18	R38	I	3.0	E
19	no label	NI	0.0	B
20	R38	I	2.3	O
21	no label	MI	1.7	E
22	no label	NI	0.0	E
23	R38	I	3.0	E
24	no label	NI	0.0	E
25	no label	NI	0.0	E
26	no label	NI	0.0	B
27	R38	I	4.0	E
28	no label	NI	0.0	B
29	R38	MI	2.0	B
30	no label	NI	1.3	E
31	R38	MI	2.0	O
32	no label	NI	0.0	B
33	no label	MI	1.7	E
34	R38	MI	2.0	B
35	no label	NI	0.0	B
36	no label	NI	0.3	E
37	R38	I	3.0	E
38*				
39	no label	NI	1.0	E
40	R38	I	3.3	E
41	no label	NI	0.0	B
42	no label	NI	0.0	B
43	R38	MI	2.0	B
44	no label	NI	1.0	E
45	R38	I	2.7	E
46	R38	MI	2.0	B
47	R38	MI	2.0	B
48	no label	NI	0.0	B
49	R38	MI	2.0	E
50	no label	MI	1.7	E
51	R38	MI	2.0	E
52	no label	NI	0.7	E
53	no label	NI	0.0	B
54	no label	NI	1.3	E
55	R38	MI	2.0	B
56	R38	I	3.3	O
57	no label	NI	0.0	B
58	R38	MI	2.0	E
59	R38	I	4.0	E
60	R38	MI	2.0	E

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

選定した 58 種類の試験物質の in vitro 評価結果は下記の資料として提出されている。

- 1 Hoffmann, S., (2006) ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL-1 α , 135pp, Will be available under Downloads of study documents, at <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/index.htm>,
- 2 Spielmann, H., et al., (2007) The ECVAM International Validation Study on in vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assay and on the Skin Integrity Function Test, ATLA 35, 559-601.

5. データの質

正式バリデーションの Phase 2 の結果を基に評価した。

各施設で実施された試験結果は SOP に添付されたデータシートに記載してマネージメントチームの生物統計家のみ提出されている。またデータシートは ECVAM によってパスワード保護され、パスワード保護が解除されていない場合に限り、解析データとして受け入れ可能としている。

Phase 2 における試験は、1 試験ごとに 3 つの皮膚モデルを用いて実施し、3 回の試験結果から評価されている。Phase 1 から得られた結果を基に、陰性対照の OD 値が 0.6 以上であること、陽性対照の細胞生存率が 40% 以下であること、さらに試験物質の各試験における 3 つの皮膚モデルでの細胞生存率の SD が 18% 以下になることをデータ受け入れ基準として試験実施している。また、この基準を満たさない場合、3 回の試験に加えて 1 度だけ再試験の実施が認められている。これらのデータ取り扱い、マネージメントチームによって議論され、最終的に、各試験物質について得られたすべてのデータを評価するが、受け入れ基準に適合した 3 回のデータ解析結果に重点をおくと結論した。

すべてのデータを基にした解析と受け入れ基準をクリアしたデータのみによる解析が個別に実施され、生物統計家による評価結果から、両者に大きな差が確認されなかったことから、最終結論にはすべてのデータを採用して得られた数値が採用された。

以上より、データの質については検討結果に基づいて受け入れ基準を設定し、最終受け入れについて議論されており、問題ないと判断できる。

6. 試験結果とその解析

各施設で実施された phase 2 の結果を用いて評価した。データ解析は生物統計家によって実施されている。MTT 還元法の施設内再現性の評価には、3 回の試験結果の一元配置分散分析(有意水準 1%)、施設内標準偏差の比較、Pearson の相関係数、得られた 3 回の繰り返し結果の識別が一致した割合で比較する方法の 4 種の統計手法が採用された。IL-1 α 測定では、相関係数による評価の代わりに変動係数が用いられた。

予測性能の評価は、本バリデーションが、EU のリスク表 R38 を予測するために計画されたも

のであることから、予測結果と試験物質の識別の 2×2 分割表による評価を実施した。すなわち、感度 (sensitivity)、特異性 (specificity)、一致性 (accuracy)、陽性予知能力 (positive predictability)、陰性予知能力 (negative predictability) によって評価した。

MTT 還元法に関する施設内・施設内間の結果の解析および総合的な予測性能の評価は、3 回または 4 回の個別試験結果すべてまたはその中央値 (median) を用いて解析した。IL-1 α 測定の結果は、判定基準 60 pg/ml を採用して解析した。各試験物質に関する各施設の平均放出量を用いて評価した。

MTT 還元法について、3 施設で実施された 58 種の試験物質に対する試験数は、ロレアルでは、178 (4 回実施 4 品) でそのうち、細胞生存率の SD18% 以下を満たさず、10 試験が基準外となった。ユニリーバでは、187 (4 回実施 13 品) でそのうち、18 試験が基準外となった。Sanofi では 182 (4 回実施 8 品) で、そのうち 16 試験が基準外となった。58 種の試験物質に関し、細胞生存率の SD18% 以下を満たした 3 回の結果が得られた数は、ロレアルでは、55/58 であった。ユニリーバでは、56/58 であった。Sanofi では 54/58 であった (表 3)。

MTT 還元法において、すべての各施設の各試験物質における中央値を用いた解析において、R38 表示を正しく判定した例は、75 試験中 56 試験であり、感度は 56/75 (74.7%) であった。99 試験中 80 試験であり、非表示を正しく評価した例は 99 試験中 80 試験であり、特異性は 80/99 (80.8%) であった。一致率は 136/174 (78.2%) であった (表 4、表 5)。

R38 表示の 25 種の試験物質において、中央値を用いた場合、いずれかの施設で陰性と評価された試験物質数は 12 種であり、その中ですべての施設の結果がすべて陰性と評価されたものは 3 種あった (試験物質 No. 34、49、51)。一方、非表示物質 33 種のなかで、いずれかの施設で陽性と評価された試験物質数は、10 種であり、すべての施設で陽性と評価されたものが 3 種あった (試験物質 No. 2、17、26) (表 6)。

IL-1 α 測定の結果の追加に関しては、判定基準 60 pg/ml を採用して解析した。IL-1 α 測定を追加した場合の一致性は、R38 表示を正しく判定した例は、75 試験中 68 試験であり、感度は 68/75 (90.7%) であった。非表示を正しく評価した例は試験中 78 試験であり、特異性は 78/99 (78.8%) であった。一致率は 146/174 (83.9%) であった。IL-1 α 測定の追加により、予測性能の向上が確認された (表 7)。

IL-1 α 測定追加した場合、試験物質の優位な中央値の識別で評価すると、R38 表示物質を正しく判定した例は、25 物質中 23 物質であり、感度は 23/25 (92.0%) であった。非表示を正しく評価した例は 33 物質中 26 物質であり、特異性は 26/33 (78.8%) であった。一致率は 49/58 (84.5%) であった。

試験物質数が 58 物質と比較的十分な数であることから、感度、特異度、一致度の指標の精度について大きな問題はなく、予測性能について結論は妥当であるといえる。

表3 各施設における MTT 還元法の個別試験結果の標準偏差(S.D.)

Hoffmann, S., (2006) から引用 * No.14, No.38 は phase 2 試験から除外

Chemical number	L'Oréal run				Unilever run				Sanofi run			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	0.77	0.15	1.20		1.22	3.44	0.57		0.43	1.08	0.46	
2	0.79	0.71	0.56		0.29	0.93	0.19		0.26	0.69	0.32	
3	14.26	10.05	17.12		34.14	4.80	13.93	8.54	5.16	11.49	12.61	
4	1.83	2.76	1.28		1.11	2.48	1.81		0.18	2.20	0.82	
5	23.09	23.61	26.72		1.00	4.61	15.80		26.73	13.79	0.71	0.84
6	17.74	12.06	18.49	5.79	10.74	11.73	8.54		27.66	28.19	29.11	
7	3.94	5.51	13.88		15.52	5.08	2.27		7.68	13.11	1.86	
8	1.59	17.40	14.91		1.35	19.81	5.23	1.49	1.67	6.43	1.56	
9	4.48	6.69	5.56		8.89	31.94	4.26	5.67	2.75	8.96	4.41	
10	6.49	3.84	7.64		13.48	9.37	16.19		3.30	11.37	3.95	
11	2.15	7.08	7.24		11.96	9.69	7.71		3.42	5.99	4.11	
12	3.47	11.58	6.48		5.02	10.35	14.35		3.37	7.16	2.82	
13	0.71	1.39	0.35		0.55	0.32	2.48		4.45	0.39	17.52	
14												
15	11.69	7.84	18.85	6.37	0.83	0.40	0.25		1.13	15.88	0.15	
16	2.42	1.61	5.10		2.34	2.48	7.40		3.55	1.81	6.76	
17	2.71	0.61	1.87		0.96	2.62	0.05		2.02	0.66	0.70	
18	4.76	1.70	1.46		25.23	4.12	10.12	4.45	44.18	7.40	26.47	
19	5.20	1.53	2.45		10.59	4.86	6.70		3.54	27.13	4.70	5.44
20	11.38	2.89	13.13		0.60	3.89	2.20		3.62	29.88	6.17	31.89
21	3.04	7.26	3.92		10.28	4.61	7.20		2.05	1.72	7.02	
22	4.10	5.88	4.52		2.83	3.41	15.27		6.76	1.19	2.90	
23	29.88	11.68	6.66	30.12	1.59	21.64	3.27	11.19	2.16	21.12	6.52	10.49
24	11.58	5.09	7.29		4.36	9.53	8.02		27.24	6.38	2.83	3.99
25	3.38	6.60	1.18		2.02	3.28	9.07		13.10	10.08	1.68	
26	1.92	1.70	1.35		13.08	4.45	11.39		0.74	3.10	0.10	
27	14.90	17.82	15.22		42.94	2.13	13.72	0.04	7.61	7.03	5.75	
28	3.73	1.95	6.32		6.61	9.22	5.77		5.12	1.00	2.45	
29	2.28	1.32	0.38		0.54	1.22	1.33		0.44	0.55	1.10	
30	14.52	4.91	4.32		9.80	21.52	13.54	9.77	4.36	2.33	2.76	
31	1.32	2.90	1.03		0.35	16.38	2.92		2.00	0.89	0.82	
32	1.13	6.65	4.00		5.71	7.37	12.24		6.02	8.05	1.00	
33	1.98	2.77	7.27		6.46	13.06	5.76		7.14	6.45	5.07	
34	3.65	9.41	1.44		28.67	8.09	3.86	1.15	14.11	6.73	3.74	
35	4.85	3.09	2.25		7.67	14.06	7.44		9.55	9.10	4.88	
36	14.16	6.67	2.77		6.40	21.80	9.06	2.72	27.26	0.63	3.68	7.56
37	1.68	1.84	0.50		0.26	1.06	1.31		0.41	12.27	0.74	
38												
39	1.44	4.32	6.94		7.46	6.02	8.56		2.21	3.96	7.24	
40	1.26	7.75	6.08		11.42	3.02	11.15		22.68	0.81	6.62	0.1
41	2.10	3.80	2.01		4.54	6.68	3.71		7.99	3.33	6.13	
42	5.25	1.38	5.86		44.07	3.91	10.71	6.91	5.98	6.07	6.10	
43	3.17	15.30	5.13		2.43	2.90	4.13		20.17	16.80	7.59	16.92
44	5.23	5.13	5.00		14.97	16.43	33.46	10.04	10.19	5.19	12.70	
45	1.15	0.54	0.41		0.95	1.57	1.11		0.63	2.68	0.81	
46	3.41	9.73	4.73		1.33	0.66	3.48		0.30	2.24	0.75	
47	1.11	6.41	2.37		4.52	10.48	10.88		1.26	3.36	1.75	
48	10.98	5.31	2.42		4.10	6.76	5.54		9.24	6.11	2.62	
49	14.55	4.81	3.40		3.43	2.16	4.48		6.05	5.30	3.46	
50	5.77	5.68	3.98		2.87	29.41	9.65	7.72	7.22	3.73	5.02	
51	18.87	10.26	8.62		3.61	4.00	1.87		3.88	8.93	7.14	
52	34.48	5.08	9.21	5.32	15.30	10.20	38.07	16.14	3.11	6.64	17.22	
53	28.20	14.17	24.75		21.20	22.61	18.91		5.55	9.36	11.06	
54	8.61	7.43	5.31		2.25	17.55	9.84		5.77	4.54	10.69	
55	15.88	10.75	11.31		0.78	1.28	0.40		20.99	23.03	4.45	
56	2.06	1.44	1.54		30.48	10.88	32.10		8.40	2.69	2.35	
57	3.91	7.04	2.45		6.84	13.38	5.94		3.39	6.47	1.91	
58	0.47	0.33	1.72		0.49	0.93	0.44		0.74	1.18	0.35	
59	0.80	2.32	6.11		0.90	0.61	10.91		6.20	7.39	10.40	
60	2.86	1.54	4.42		1.98	0.78	0.64		3.70	5.93	17.52	

表 4 EPISKIN における試験結果総括 Hoffmann, S., (2006)から引用 * No.14, 38 は phase 2 試験から除外

chemical number	chemical	EU class	MTT classification (based on mean viability over all runs per laboratory)			IL-1 α classification (Cul-01: 60 ng/ml)			combined classification			combined classification (median over all laboratories)
			L'Oréal	Unilever	Sanoft	L'Oréal	Unilever	Sanoft	L'Oréal	Unilever	Sanoft	
1	2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine hydrochloride	R38	1	1	1				1	1	1	1
2	1-bromo-4-chlorobutane	no label	1	1	1				1	1	1	1
3	1-bromobenzene	R38	1	1	1				1	1	1	1
4	1-decanol	R38	1	1	1				1	1	1	1
5	3-chloro-4-nitrobenzene	no label	0	1	1			0	0	1	1	1
6	3-diethylaminopropionitrile	no label	1	0	0			0	0	0	0	0
7	3-mercaptohexanol	no label	0	1	1			0	0	1	1	1
8	4-methylthio-benzaldehyde	no label	0	1	1			0	0	1	1	1
9	2,6-dimethyl-4-nitrobenzamide	no label	0	0	0			0	0	0	0	0
10	allyl heptanoate	no label	0	0	0			0	0	0	0	0
11	allyl phenoxycetate	no label	0	0	0			0	0	0	0	0
12	2-ethylhexyl 4-aminobutanoate	no label	0	0	0			0	0	0	0	0
13	1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenylbutan-1-one	R38	1	1	1				1	1	1	1
14	alpha-terpineol	R38	1	1	1				1	1	1	1
15	caprylisocaproate	no label	0	0	0			0	0	0	0	0
16	2-methyl-3-[(1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl)oxy]-1-propanol, bonyl isomer	no label	1	1	1				1	1	1	1
17	butyl methacrylate	R38	1	1	1				1	1	1	1
18	2,5-dimethyl-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-yl acetate	no label	0	0	0			0	0	0	0	0
19	cyclamen aldehyde	R38	1	1	1				1	1	1	1
20	A mixture of 5-oxo-decylbicyclo[2.2.1]hept-2-ene 5-oxo-decylbicyclo[2.2.1]hept-2-ene	no label	0	0	0			0	0	0	0	0
21	diethyl phthalate	no label	0	0	0			0	0	0	0	0
22	di-n-propyl disulphide	R38	0	1	0			1	1	1	1	1
23	di-n-propylene glycol	no label	0	0	0			0	0	0	0	0
24	dipropylene glycol monobutyl ether	no label	0	0	0			0	0	0	0	0
25	3,4-dimethyl-1H-pyrazole	no label	1	1	1				1	1	1	1
26	2-(5-oxopropyl)-2-butoxy-1,3-dimethoxypropane	R38	0	1	0			1	1	1	1	1

28	ethyl cis-4-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)methyl]-1,3-dioxane-4-yl)methylphenylpiperazine-1-carboxylate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	Mixture of: 2-methyl-4-(2',3'-trimethyl-3'-cyclopenten-1'-yl)-4-penten-1-ol 50% (1R,2R) & 40% (1R,2S) isomer	R38	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	Mixture of: diethyl cis-1,4-cyclohexanedicarboxylate; diethyl trans-1,4-cyclohexanedicarboxylate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	A mixture of isomers: ethyl exo-icyclod[5.2.1.0(2,3)]decane-endo-2-carboxylate; ethyl endo-icyclod[5.2.1.0(2,6)]decane-endo-2-carboxylate	R38	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	2S-(2-oxo-5R-hydroxy-4R-(1R,2-dihydroxyethyl)-5S-hydroxymethyl)-3-dioxane	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	heptyl butyrate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	hexyl salicylate	R38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	cyclohexanone	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	isopropanol	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	[2-(cyclohexyloxy)ethyl]benzene (cyclohexyl 2-phenylethyl ether)	R38	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	methyl stearate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	1-methyl-2-phenyl-1-piperazine	R38	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	1-methyl-2-phenyl-1-piperazine	R38	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	naphthalene acetic acid	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	disodium 2,2'-[1,4-phenylenebis(4-1H-benzimidazole-4,6-dithione acid of monosulfonic acid, monosulfonate or disulfonate)	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	A mixture of isomers: 1-(1,1-dimethylpropyl)-4-ethoxy-cis-cyclohexane; 1-(1,1-dimethylpropyl)-4-ethoxy-trans-cyclohexane	R38	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	phenylethylalcohol	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	(4S) trans-3,3-dimethyl-5-(2,2,3-trimethyl-cyclopropyl)-3-oxo-1,9B-pent-4-en-2-ol	R38	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	4-methyl-8-methylfentriptyl[3,3,1,1(2,2)]decane-2-ol	R38	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	4-methyl-8-methylfentriptyl[3,3,1,1(2,2)]dec-2-yl acetate	R38	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	2-(trimylamino)-3-thiophenecarboxylic acid	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	fossilic acid monoisopropanolamide	R39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	2-phenylthiazantillite	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	Mixture of isomers: 1-(2-isopropylphenyl)-1-phenylethane 1-(3-isopropylphenyl)-1-phenylethane 1-(4-isopropylphenyl)-1-phenylethane	R38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	propyl (2S)-2-(1,1-dimethylpropoxy)propanoate	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	silane A-1430	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	Mixture of isomers: 1-[3-(2,4,5-trimethyl-7-yl)pent-4-en-1-one 1-[3-(2,4,5-trimethyl-7-yl)pent-4-en-1-one	no label	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
54		no label	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
55	terphthalate	R38	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
56	benzoinol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl	R36	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
57	trihydric glycol	no label	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	triisobutyl phosphate	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
59	(E,E)-3,7,11-trimethyltrideca-1,4,6,10-tetraen-3-ol	R38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
60	bi[[1-methylimidazo]-(2-ethyl-hexanoate)], zinc complex	R38	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0