

評価報告書

In vitro 膜バリア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

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. 435: *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion

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) 435として承認された *in vitro* 膜バリア試験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、*in vitro* 膜バリア試験として Corrositex を評価した結果、本試験法は一部の物質において腐食性の有無を評価できると考えられたが、その適用範囲は狭く、また、適用可能物質の分類が不明確であるため、腐食性の評価に用いることは困難であると判断した。

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、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）にて試験ガイドライン（TG: Test Guideline）435、*in vitro* 膜バリア試験として承認されている²⁾。この試験法は、適用された腐食性物質により引き起こされる膜バリア障害を検出することを指標に皮膚腐食性を評価している。本試験法はバリデーション試験が実施され、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。

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とされたものは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 TG435 に承認された *in vitro* 膜バリア試験として、Corrositex 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

OECD ガイドライン 435 「*in vitro* 膜バリア試験」²⁾ の原理および方法について述べる。

1) 原理 高分子で構成される膜バリアおよび化学物質検知システム（Chemical Detection

System : CDS）からなる。この方法の原理は、化学物質による皮膚腐食性発現機構の重要なステップである皮膚のバリア機能の障害を検出するものである。商業的には図 1 に示すように Corrositex として販売されている²⁾。

2) 方法

被験物質の適用による膜バリアの下の pH の変化またはインジケータ液の特性を含む多数の色の変化を検出し、曝露時間と観察期間との関係において調べることにより、腐食性の程度を判定するものである。

膜バリアを用いる本試験は、使用目的と想定している被験物質に適合していることを予め確認しておかねばならない。膜バリア試験を行う前に適合性試験を実施して、被験物質を CDS によって検出可能か判断する。CDS が被験物質を検出できない場合、膜バリア試験法はその被験物質の腐食性の有無を評価するにふさわしくないため、異なる試験法を用いる。



図 1 . Corrositex²⁾

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

Corrositex の再現性は Botham et al の論文によれば³⁾、プレバリデーションにて様々なカテゴリーの化学物質を含む 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。それらの物質リストを ANNEX 1 に示す。また、Fentem et al のバリデーションにて 60 物質を用いて、再現性および予測性が調べられている⁴⁾。そのリストを ANNEX 2 に示す。これらの中で、適合性試験で評価可能と判断され、評価に使われた物質は 45 物質である。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) の第三者評価では、この 45 物質に加え、製造元の IVI 社から提供され 118 物質、合計 163 物質のデータが使用された⁵⁾。

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

バリデーションで用いら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) 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、それらの参照データは入手できる。一方、IVI 社から提供された 118 物質のデータの客観性は確認できなかった。

5. 試験法の正確性 (再現性)

Botham et al (1995) のバリデーションにおける施設間再現性では、2 施設が 50 の参照物質 (25 腐食性物質および 25 非腐食性物質) を用いて評価した³⁾。Lab. A で評価できた物質が 38、その

うち正確度は 74% (28/38)、Lab. B で評価できた物質が 35、そのうち正確度は 80% (28/35)であるとされており、施設間の再現性は高いと判断されている。

Fentem et al (1998)のバリデーションにおける 60 物質のうち、20 物質で施設内および施設間の変動が評価され、それらの間に有意な差はないと判断された⁴⁾。いくつかの物質の結果が施設間で異なっていたが、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 科学諮問委員会(ESAC: ECVAM Scientific Advisory Committee, 2001) での評価後⁶⁾、ICCVAM においても確認された⁷⁾。

6. 試験法の信頼性

Botham et al (1995)、Fentem et al (1998)およびICCVAM (1999)の集計結果を表1に示す^{3,4,5)}。それぞれの報告に記載された正確度、感度および特異度は、73-80%、約71-89%、65-76%であり、試験間で差が大きかった。もっとも大きな問題点は、バリデーション研究で選択された物質の中で、CDSを用いる適合性試験によりBotham et al (1995)では70-76%、Fentem et al (1998)では64%の物質でしか試験を実施できなかったという結果である。例えば、pH が 4.5~8.5 の範囲の水溶性物質は多くの場合、試験に適用できなかった（これまで検査されたこの pH 範囲の化学物質の 85% は、動物試験にて非腐食性であった）。固体(水溶性/非水溶性)、液体(水溶液/非水溶液)および乳剤に適用できるとされているが、バリデーション試験における適合試験において、検出可能な変化は生じなかった(すなわち、バリデーション試験法のCDSで色の変化を示さなかった場合は適用とみなされない)。この結果から、本試験法は一部の被験物質と混合物の腐食性評価にしか適用できず、他の方法と合わせて利用されねばならない。また、バリデーション結果とメーカーの結果を含むICCVAMの集計結果は、適合可能な163物質の詳細や選定理由が資料に明記されておらず、適切な評価が不可能であった。よって、本委員会は、表1の中で、Fentem et al (1998)の結果がバリデーション結果として妥当な結果と判断し、その感度が71%であることから本試験法の予測性は高くないと判断した。評価できる物質の範囲は有機酸、無機酸、酸無水分解物（化学物質から直接または修飾もしくは部分的な置換によって作り出される酸と幅広く定義される。このクラスには、無水物、ハロ酸、塩類が含まれる）、および 塩基などに限定されると記載されている。プロトコルによれば、限定された物質分類の範囲で、GHS細分類も可能であることを念頭に置いて使用すべきであるとされているが、結果からその妥当性を読み取れなかった。

表 1. Corrositex の予測性^{3,4,5,7)}

	ICCVAM の総計	Botham et al. (1995)		Fentem et al. (1998)
		Lab.A	Lab.B	
正確度	79% (128/163)	74% (28/38)	80% (28/35)	73%
感度	85% (76/89)	81% (17/21)	89% (16/18)	71%
特異度	70% (52/74)	65% (11/17)	71% (12/17)	76%
評価数	163	35/50	38/50	38/60

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「TG430 経皮電気抵抗試験」⁸⁾ および

「TG431 ヒト表皮モデル試験」⁹⁾ 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, EpiSkinTMおよび TER)の正確度、感度および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、適用可能物質であれば、本モデルは他の試験法と同等の予測性を有すると考えられる。

評価可能な化学物質は他の試験法と比べて限定的である。他の試験法と比較して感度が低く、偽陰性が多い。

表 2. 試験法の比較結果

	EpiSkin TM (OECD, 2015) ¹⁰⁾	TER(ICCVAM, 1999) ⁵⁾	CORROSITEX(Fentem, 1998) ⁴⁾
正確度	89.6%	81%	73%
感度	98.5%	94%	71%
特異度	79.3%	71%	76%

8. 3Rs 原則への関与（動物福祉面からの妥当性）

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。

9. 試験法の有用性と限界

6. 試験法の信頼性にも記した適用限界から、多くの化学物質および混合物に適用できない可能性がある。判定も腐食性の有無に限られており、その限界を十分に把握して使用すべきである。

表 3 に示す習熟度確認物質を正しく分類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。TG435 には記載がある。

表3 習熟度確認一覧表²⁾

化学物質 ^{1,2}	CASRN	化学物質クラス	UN GHS 区分 ³ <i>In vivo</i> 試験結果に基づく	VRM 区分 ³ <i>In vitro</i> 試験結果に基づく
ほう素フルオリド二水和物	13319-75-0	無機酸	1A	1A
硝酸	7697-37-2	無機酸	1A	1A
五塩化リン	10026-13-8	無機酸の前駆物質	1A	1A
バレリル酸	638-29-9	酸クロライド	1B	1B
水酸化ナトリウム	1310-73-2	無機塩基	1B	1B
1-(2-アミノエチル)ピペラジン	140-31-8	脂肪族アミン	1B	1B
ベンゼンスルホン酸クロライド	98-09-9	酸クロライド	1C	1C
N,N-ジメチルベンジルアミン	103-83-3	アニリン	1C	1C
テトラエチレンペンタミン	112-57-2	脂肪族アミン	1C	1C
オイゲノール	97-53-0	フェノール類	非腐食性	非腐食性
アクリル酸ノニル	2664-55-3	アクリル酸/ メタクリル酸	非腐食性	非腐食性
炭酸水素ナトリウム	144-55-8	無機塩基	非腐食性	非腐食性

1：上に記載した12の化学物質は、皮膚腐食性物質に関するGHS 細区分のそれぞれから3物質ずつと非腐食性の3物質である。これらは検証済み参照試験法と構造的にも機能的にも類似の試験法について、その精度と信頼性を示す目的に使用されるよう特定されている、化学物質最小リストの中で参照化学物質として列挙されている40の中から選択した^{5,11)}。これらの化学物質は市販業者から容易に購入でき、UN GHS 細区分は高品質の*in vivo* 試験の結果に基づいている¹¹⁾。

2：純度は90%以上

3：UN GHS 細区分1A, 1B および1C にはUN 包装等級I, II およびIII がそれぞれ対応する。
NC; 非腐食性

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、*in vitro* 膜バリア試験である Corrositex を評価した結果、当該試験法は他の試験法と比べて、評価可能な化合物が限定され、偽陰性が多く確認された。当該試験法一部の物質において腐食性の有無を評価できると考えられたが、その適用範囲は狭く、

また、適用可能物質のクラスが不明確であるため、本委員会は、当該試験法を行政目的のための腐食性評価に用いることは困難であると判断した。

12. 文献

- 1) OECD (2015) Guideline for the testing of chemicals. 404, Acute Dermal Irritation/Corrosion
- 2) OECD (2006) Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 435: In Vitro membrane barrier test method
- 3) Botham, P.A. et al. (1995) A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 6. ATLA, 23, 219-255
- 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) ICCVAM (1999) NIH Publication No.99-4495. Corrositex: An in vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals.
- 6) ECVAM (2001) Statement on the Application of the CORROSITEX Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.
- 7) 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.
- 8) OECD (2015) Guideline for the testing of chemicals. 430, in vitro Skin Corrosion: Transcutaneous electrical resistance test (TER).
- 9) OECD (2016) Guideline for the testing of chemicals. 431, in vitro Skin Corrosion: Human skin model test.
- 10) 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
- 11) ICCVAM (2004) ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No. 04-4510. Available at:
[http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf].

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-N-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 2: 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).