

眼刺激性試験代替法の評価報告書

再構築ヒト角膜様上皮モデル法
(Reconstructed Human Cornea-like Epithelium Test Method: RhCE 法)

眼刺激性代替法資料編纂委員会

平成 28 年 (2016 年) 1 月 25 日

眼刺激性代替法資料編纂委員会

小坂 忠司 (一般財団法人 残留農薬研究所)

佐々木 正治 (アッヴィ合同会社)

竹内 小苗 (P&G イノベーション合同会社)

森村 智美 (一般財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所)

吉村 功 (東京理科大学名誉教授)

略語

CAS: Chemical Abstracts Services

CE: Cosmetics Europe

EURL ECVAM: the European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing

ESAC: ECVAM Scientific Advisory Committee

GHS: Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals

JaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

OD: optical density

OECD: Organization for Economic Co-operation and Development

SOP: Standard Operating Procedures

TG: Test Guideline

UN: United Nations

要旨

再構築ヒト角膜様上皮モデル法（Reconstructed Human Cornea-like Epithelium Test Method：RhCE法）は、化学物質のRhCE組織に対する細胞毒性を指標に用い、その物質の眼刺激性を評価する試験法である。UN GHS 区分外物質を検出する方法として EURL ECVAM と CE の共同バリデーションを経て 2015 年に OECD によりテストガイドライン TG 492 として採択された。JaCVAM 眼刺激性代替法資料編纂委員会は、TG 492 で示された RhCE 法の 1 つである EpiOcular™ を用いた眼刺激性試験について、バリデーション報告書、第三者評価報告書、関連論文などをもとに試験法の概要および委員会の意見をまとめた。

従来のウサギを用いた Draize 法の結果を基準として正確を評価したとき、一致度は 79.7%、偽陽性率は 37.0%、偽陰性率は 4.3%であった。技術移転性に関して懸念される結果は得られておらず、施設内再現性および施設間再現性はどちらも 90%以上であった。これらの値は、バリデーション運営委員会が定めた基準を満たしていた。

本委員会は、RhCE 法はボトムアップ方式で UN GHS 区分外物質を検出する方法として用いることができる結論した。

1. まえおき

化学物質の眼刺激性を評価する方法として従来使用されてきたのは、Draize 法というウサギを用いた動物試験である。しかし、近年の動物福祉に対する関心の高まりや欧州における法規制改正は、その代替法の開発・バリデーションを促進した。OECD がテストガイドラインとしてすでに採択した代替法は、ウシ摘出角膜の混濁および透過性試験法（BCOP 法、TG 437）、ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法（ICE 法、TG 438）、およびフルオレセイン漏出試験法（FL 法、TG 460）の 3 試験法である。BCOP 法と ICE 法は食用などの目的で処分された動物より摘出した器官・組織を用いて化学物質の曝露により生じる角膜の物理的特性の変化を指標に眼刺激性を評価する試験法で、トップダウン方式において重篤な眼の傷害を起こす（すなわち、UN GHS 区分 1）物質を検出する方法として、またボトムアップ方式において眼に対する重篤な損傷性を有する物質および眼刺激性物質とは分類されない（すなわち、UN GHS 区分外）物質を検出する方法として用いられる。FL 法は尿管上皮細胞の単層培養を用いて化学物質の曝露により生じる細胞間結合の傷害を指標に眼刺激性を評価する試験法で、トップダウン方式でのみ用いられる。

再構築ヒト角膜様上皮モデル法（Reconstructed Human Cornea-like Epithelium Test Method、以下 RhCE 法）は、被験物質のヒト角膜様上皮モデル（RhCE）組織に対する細胞毒性を指標に用い、その物質の眼刺激性を評価する試験法である。RhCE 組織に被験物質を曝露した後、陰性対照との比較により細胞生存率を算出し被験物質の眼刺激性を評価する。

RhCE 法は EURLECVAM と CE の共同バリデーション研究（EURLECVAM-CE, 2014）および ESAC の第三者評価（ESAC, 2014）を経て、UN GHS 区分外物質を検出する方法として 2015 年 7 月に OECD によりテストガイドラインに採択された（TG 492）。

本報告書はバリデーション報告書、第三者評価報告書、関連論文などをもとに OECD TG 492 RhCE 法の概要を説明し、本委員会の意見をまとめたものである。

2. 試験法の位置づけ

RhCE 法は、UN GHS 区分外物質（単一物質および混合物）を検出するために用いる試験法である。

3. 試験法の原理

眼刺激性は、物質が角膜を含む眼表面に接触し細胞傷害を引き起こすことから始まる。その機序は様々であるが、細胞毒性が重要な役割を担っている。また、物質の眼刺激性は主に角膜の初期傷害の深度により決定され、それは細胞死の程度と相関関係にある。RhCE 法は、再構築ヒト角膜様上皮モデルである RhCE 組織を用いて、被験物質の細胞毒性を指標として眼刺激性を評価する試験法である。

TG 492 で認められている RhCE 法は、ヒト新生児包皮細胞由来の市販の RhCE 組織である EpiOcular™ を用いた眼刺激性試験（EpiOcular™ EIT）である（Kaluzhny et al, 2011）。被験物質が液体の場合は約 30 分間、固体の場合は約 6 時間、RhCE 組織に曝露した後での MTT の取り込み量をもとにした細胞生存率をエンドポイントに用いる。これは、MTT が脱水素酵素の基質となる性質を利用し、細胞内に取り込まれた MTT がミトコンドリア内脱水素酵素により還元され、生成されたホルマ

ザン量（青色）が生存細胞数に比例することを基本原理としている（MTT還元法）。細胞生存率が陰性対照と比較して60%を超える場合、被験物質はUN GHS分類において区分外であると判定する。

4. 試験手順

以下に示す手順は、TG 492 で認められている EpiOcular™ EIT についてのものである。EpiOcular™ はアメリカの製造元より購入できる。詳細は、TG 492 および SOP（SOP Version 9, 2015）を参照すること。

4-1. RhCE 組織の機能的条件

RhCE 組織の機能的条件には、RhCE 組織の生存率とバリア機能が含まれ、その許容範囲は以下のとおりである。

生存率：陰性対照において $0.8 < OD < 2.5$

バリア機能：0.3% Triton X-100 に対し $12.2 \leq ET_{50} (\text{min}) \leq 37.5$

(ET_{50} ：細胞生存率を50%低下させるのに必要な曝露時間)

これらは RhCE 組織の製造者の出荷基準としても採用される。また、製造者は組織学的検査で RhCE 組織がヒトの角膜上皮様構造を有することを保証しておく必要がある。一方、RhCE 組織の使用者は試験で得られた陽性および陰性対照の結果を背景データと比較して、再現性を確認する必要がある。

4-2. 被験物質の適用

物質あたり少なくとも2組織を用いる。被験物質は調製せず、原体そのものを用いる。37°C以下でピペットで扱えるものは液体として、それ以外は固体として試験を行う。特に、被験物質が粘性のある物質や樹脂・ワックス・ゲル状物質の場合は、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 15 ± 1 分間水浴でインキュベートして液体か固体かを判断する。RhCE 組織はリン酸緩衝生理食塩水 ($\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ free) を用いて 30 ± 2 分間標準培養条件¹で前処理する。液体被験物質の場合、RhCE 組織に $50 \mu\text{L}$ を適用し、標準培養条件で 30 ± 2 分間培養する。その後、リン酸緩衝生理食塩水で十分に洗浄して被験物質を除去し、 12 ± 2 分間室温で培地に浸漬後、新たな培地を用いて標準培養条件で 120 ± 15 分間培養する。固体被験物質の場合、RhCE 組織の表面を覆うのに十分な量、約 50 mg を均一に適用し、標準培養条件で 6 ± 0.25 時間培養する。その後、リン酸緩衝生理食塩水で十分に洗浄して被験物質を除去し、 25 ± 2 分間室温で培地に浸漬後、新たな培地を用いて標準培養条件で 18 ± 0.25 時間培養する。

陽性対照には酢酸メチル (CAS No. 79-20-9)、陰性対照には超純水が推奨される。対照物質の適用・後処理は対照となる被験物質（液体または固体）の条件に準じる。

4-3. 細胞生存率の算出

細胞生存率算出には MTT 還元法を用いる。培地を除去し、 1 mg/mL MTT 溶液 0.3 mL 中で 180 ± 10 分間標準培養条件で反応させ、その後 2 mL イソプロパノール（または同様な溶媒）で青色のホルマザンを抽出する。液体被験物質の場合は、RhCE 組織の上部・底部両方から抽出する。固体被験物質および色の付いている液体被験物質の場合は、組織に残存する被験物質の混入を最小限に抑えるため、

¹ 暗所、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $5 \pm 1\%$ CO_2 、高湿度

ホルマザンの抽出は RhCE 組織の底部のみから行う。液体被験物質でも、洗浄しづらい場合には、底部のみから抽出を行う。同時対照物質に対しての抽出方法は被験物質と同じとする。抽出したホルマザンの定量は OD_{570nm} 測定または HPLC/UPLC で行う。

被験物質が MTT 還元物質の場合、あるいはホルマザンと同じような波長（570 nm 近辺）に吸収を持つ着色物質の場合、吸光度補正を行う必要がある。その手順については TG 本文の説明および ANNEX II のフローチャートを参照すること。

4-4. 試験成立の承認基準

以下の条件を満たした場合、試験の成立を承認する。

- 1) 陰性対照の OD が $0.8 < OD < 2.5$ であること。
- 2) 陽性対照の平均細胞生存率が 50%未満であること。
- 3) 被験物質および陰性・陽性対照のそれぞれにおいて、2 組織を用いた場合は細胞生存率の差が 20%未満、3 組織以上を用いた場合は細胞生存率の標準偏差が 18%以下であること。

4-5. 刺激性の判定

刺激性判定のカットオフ値は平均細胞生存率 60%である。すなわち、平均細胞生存率が 60%を超えた場合、被験物質は GHS 区分外と判断される。平均細胞生存率が 60%以下の場合、本試験法では偽陽性が生じえるし、また区分 1 と区分 2 を検出できないことから、他の試験法による追加試験が必要となる。

5. バリデーション試験

EURLECVAM と CE の協同で EpiOcular™ EIT のバリデーション試験が行われた。正確性の評価のために必要な動物試験のデータを持っていることを前提条件に、UN GHS 区分物質・区分外物質や固体・液体等のバランスを考慮して被験物質の選択が行われた（Appendix 1）。

コード化された 107 物質についてすべてを 3 施設で試験した（本試験）。試験はすべての被験物質について 3 回実施された。固体物質に対しては、その後プロトコルの最適化（被験物質の曝露時間を 90 ± 5 分から 6 ± 0.25 時間に変更）が行われたため、107 物質中の固体および新たな固体 8 物質について、追加試験が 1 施設で行われた。

このバリデーション試験では吸光度でホルマザンを定量し、細胞生存率を求めている。HPLC/UPLC を利用したホルマザン定量・細胞生存率算出については、CE により皮膚刺激性試験に用いられるヒト組織モデルと合わせてバリデーションが行われている。

6. 試験法の信頼性

6-1. 技術移転性

バリデーション試験を開始する前に、バリデーション参加施設の技術者（施設当たり 3 名）に対して技術習得のためのトレーニングを行った。その後で、8 物質を用いて技術移転の確認を行ったところ、異なる判定は 1 施設の技術者 1 名の 1 液体物質のみであった。EpiOcular™ EIT を実施する試験施設の技術習得を確かめるための熟達度確認物質の一覧は、Appendix 2 にある。

6-2. 施設内再現性

バリデーション試験では施設ごとに 1 被験物質につき複数回の試験を行っている。本試験では、GHS 分類判定の施設ごとの施設内再現性は 94.2–96.2%であった（固体物質のデータを含む）。1 施設で行われた追加試験での施設内再現性は 96.6%であった。これらの値は EURL ECVAM-CE バリデーション運営委員会が定めた基準（85%以上）を満たした。

6-3. 施設間再現性

本試験で得られた細胞生存率（複数回試験）の平均値をもとに GHS 分類判定を施設ごとに行い、その一致度を検討した（固体物質のデータを含む）。その結果、GHS 分類判定の施設間再現性は 93.2%であった。この値はバリデーション運営委員会が定めた基準（80%以上）を満たした。プロトコル最適化後の固体物質に対しての GHS 分類判定の施設間再現性のデータは、追加試験を 1 施設のみで行ったため存在しない。バリデーション運営委員会は、施設内再現性は本試験・追加試験とも高い値であり、また、同時にバリデーションを行った別の RhCE 法において曝露時間を変更した際に、変更前と比較して変更後でも同等の高い施設間再現性が得られていることから、プロトコル最適化後の施設間再現性の確認は必要ないと判断している。ESAC の第三者評価では、プロトコル最適化後の施設間再現性がない点が大きな支障になるとは考えていない。

7. 試験法の正確性

バリデーション報告書での正確性の評価には、バリデーション試験で用いられた 115 物質のうち物質自体の色がホルマザン定量での OD 測定を妨げる 3 物質と強い還元性物質 1 物質を除く 111 物質の結果が用いられた。成立した全試験のデータを用いて求めた結果は表 1 の通りである。EpiOcular™ EIT の正確性はバリデーション運営委員会が定めた受け入れ基準を満たしている。

表 1. EpiOcular™ EIT の正確性—全試験データ

	物質数	一致度度(%)	偽陰性率(%)	偽陽性率(%)
液体	52	81.9	1.7	33.3
固体	59	78.0	6.5	39.3
液体・固体	111	79.7	4.3	37.0
代替法としての受け入れ基準	-	≥ 75	≤ 10	≤ 40

ESAC の第三者評価では、被験物質ごとに判定を最高スコア（Best-case、得られた試験データのうち一つでも動物試験のデータと一致した判定があればそれを採用）と最低スコア（Worst-case、得られた試験データのうち一つでも動物試験のデータと一致しなかった判定があればそれを採用）の 2 パターンで確定し、その結果を用いて正確性の検討をしている。その結果は表 2 の通りである。最低スコアでは偽陽性率については受け入れ基準を満たさなかったが、それ以外の正確性の数値はすべて受け入れ基準を満たした。本試験法の予測精度は最低スコアと最高スコアの間になることを考慮すると、

EpiOcular™ EIT の正確性はバリデーション運営委員会が定めた受け入れ基準を満たすと第三者評価は結論した。なお、第三者評価では、バリデーションレポートで除外された強い還元性物質も組み入れられている。

表 2. EpiOcular™ EIT の正確性—物質ごとのデータ

	物質数	一致度度(%)	偽陰性率(%)	偽陽性率(%)
最低スコア				
液体	53	75.5	7.7	40.7
固体	59	76.3	6.5	42.9
液体・固体	112	76.1	7.0	41.1
最高スコア				
液体	53	84.9	0.0	29.6
固体	59	79.7	6.5	35.7
液体・固体	112	82.1	3.5	32.7
代替法としての 受け入れ基準	-	≥ 75	≤ 10	≤ 40

バリデーションに用いられた混合物の数は限られていた。バリデーション試験とは別に、動物試験のデータがある農薬処方（97 処方、うち区分外は 43 処方）を用いて評価を行った報告では、正確度 82%、偽陰性率 9%、偽陽性率 28%であった（Kolle et al, 2015）。

8. 試験法の適用範囲

TG 492 は、試験法の性質と正確性の確保を考慮して RhCE 法の適用に以下の制限を設けている。

- 1) バリデーション試験において被験物質に含められなかった気体（ガス）およびエアゾールは適用物質から除外される。
- 2) GHS 区分 1、区分 2（2A・2B）物質の検出には用いることはできない。

9. 本委員会の結論

EpiOcular™ EIT は再現性も正確性もバリデーション運営委員会の定めた基準を満たしており、本委員会はバリデーション運営委員会の定めた基準は妥当であると考えます。EpiOcular™ EIT に用いる RhCE 組織は市販されており、アメリカの製造元より入手できる。RhCE 組織以外は、特殊な機材や試薬を必要とせず、必要な手技も複雑なものでない。入手した RhCE 組織が機能的条件の許容範囲にあり、かつ実施する試験施設の技術習得がガイドラインの熟達度確認物質で確かめられていれば、EpiOcular™ EIT は UN GHS 区分外物質を検出する方法として用いることができる。

EpiOcular™ EIT は RhCE 法を代表するものと考えられるので、TG 492 に準拠して実施した場合、RhCE 法はボトムアップ方式で UN GHS 区分外物質を検出する方法として用いることができる、と本委員会は考える。

10. 文献

EpiOcular™ EIT SOP, Version 9 (April 6, 2015). EpiOcular™ EIT for the prediction of acute ocular irritation of chemicals. Available at: <http://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/> (as of Nov. 2015)

ESAC (2014) ESAC Opinion based on the ESAC Scientific Peer Review of the ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-photometry as an alternative endpoint detection system for formazan reaction product.

EURL ECVAM-CE (2014) Prospective validation study of Reconstructed human Tissue-based test methods for identifying chemical not requiring classification for serious eye damage/eye irritation - Validation Study Report.

Kaluzhny Y et al (2011) Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals in response to the requirements of the EU cosmetics directive and REACH legislation. ATLA. 39, 339-64.

Kolle SN et al (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the method of choice for *in vitro* eye irritation testing of agrochemical formulations: Correlation analysis of EpiOcular Eye Irritation Test and BCOP test data according to UN GHS, US EPA and Brazil ANVISA classification schemes. ATLA. 43, 181-198.

OECD (2012) Test Guideline 437. Bovine Corneal Opacity and Permeability test method for identifying i) chemicals inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage.

OECD (2012) Test Guideline 438. Isolated Chicken Eye test method for identifying i) chemicals inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage.

OECD (2012) Test Guideline 460. Fluorescein Leakage test method for identifying ocular corrosives and severe irritants.

OECD (2015) Test Guideline 492. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage.

OECD (2015) Series on Testing & Assessment 216. Performance standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for eye hazard

Appendix 1

バリデーションに用いられた物質のカテゴリーごとの数

全体	115
眼刺激性 GHS 分類	
区分 1	30
区分 2A	16
区分 2B	14
区分外	55
物質の特性	
液体	53
固体	62
Chemical Class	
Ether	25
Alcohol	19
Aryl	18
Carboxylic acid ester	16
Carboxylic acid	14
Alkoxy	13
Aromatic heterocyclic halide	10
Aryl halide	10
Alkyl halide	9
Phenol	9
Allyl	6
Ammonium salt	6
Benzyl	6
Aliphatic Amine, tertiary	5
Alkane, branched with tertiary carbon	5
Aromatic amine	5
Dihydroxyl group	5
Guanidine	5
Saturated heterocyclic fragment	5
Sulfate	5

注) バリデーション報告書をもとに作成。Chemical Class は物質数の多いものを抽出した。物質によっては複数の Chemical Class にまたがっている場合もある。

Appendix 2

RhCE 法の熟達度確認物質

物質名	CAS 番号	性状	GHS 分類
Methylthioglycolate	2365-48-2	液体	区分 1
Tetraethylene glycol diacrylate	17831-71-9	液体	区分 1
2,5-Dimethyl-2,5-hexanediol	110-03-2	固体	区分 1
Sodium oxalate	62-76-0	固体	区分 1
2,4,11,13-Tetraazatetradecane-diimidamine, N,N''-bis(4-chlorophenyl)- 3,12-diimino-,di-D-glucose (20%, aqueous)	18472-51-0	液体	区分 2A
1,5-Naphthalenediol	83-56-7	固体	区分 2A
Diethyl toluamide	134-62-3	液体	区分 2B
2,2-Dimethyl-3-methylenebicyclo[2.2.1]heptane	79-92-5	固体	区分 2B
Dipropyl disulphide	629-19-6	液体	区分外
Piperonyl butoxide	51-03-6	液体	区分外
1-Ethyl-3-methylimidazolium ethylsulphate	342573-75-7	液体	区分外
Polyethylene glycol (PEG-40) hydrogenated castor oil	61788-85-0	粘性物	区分外
Potassium tetrafluoroborate	14075-53-7	固体	区分外
1-(4-Chlorophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)urea	101-20-2	固体	区分外
2,2'-Methylene-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol)	103597-45-1	固体	区分外