

評価報告書

眼刺激性試験代替法 SkinEthic™ HCE TTT 法

眼刺激性試験資料編纂委員会

令和5年（2023年）12月12日

眼刺激性試験資料編纂委員会

山本直樹（委員長：藤田医科大学）

小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所）

佐々木正治（アレクシオンファーマ合同会社）

竹内小苗（P&G イノベーション合同会社）

波多野浩太（ホーユー株式会社）

原 範子（藤田医科大学）

山下晴洋（アステラス製薬株式会社）

略語

CAS:	Chemical Abstracts Services
GHS:	Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
HCE:	Human Corneal Epithelium
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
IATA :	Integrated Approaches to Testing and Assessment
JaCVAM:	Japanese Center for the Validation of Alternative Methods
MTT:	3- (4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide
OECD:	Organization for Economic Co-operation and Development
PBS:	Phosphate-Buffered Saline
PRP:	Peer Review Panel
RhCE:	Reconstructed human Cornea-like Epithelium
TG:	Test Guideline
TTT:	Time-to-Toxicity
UN:	United Nations
UPLC:	Ultra Performance Liquid Chromatography
VRM:	Validated Reference Method

要旨

SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Time-to-Toxicity (TTT)法は、L'Oréal 社によって開発され、再構築ヒト角膜様上皮モデル(Reconstructed human Cornea-like Epithelium: RhCE)である SkinEthic™ HCE 用いて、液体および固体の化学物質における国際連合化学品の分類および表示に関する世界調和システム(United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals: UN GHS)による UN GHS 区分 1、UN GHS 区分 2 への分類および区分に該当しない場合の判定ができる方法として開発された眼刺激性評価試験法である。

SkinEthic™ HCE TTT 法は、バリデーション研究の後、科学的妥当性を評価するために第三者評価委員会(Peer Review Panel : PRP)による検証がなされた。その後、経済協力開発機構(Organization for Economic Co-operation and Development: OECD)による専門家会議での議論を経て、UN GHS 区分 1、UN GHS 区分 2 への分類および区分に該当しない場合の判定が可能な試験法と判断され、OECD 試験法ガイドライン(Test Guideline : TG)492B として 2022 年 6 月に採択された。

本バリデーション研究は、本試験法に用いられる RhCE である SkinEthic™ HCE を販売している企業の親会社である L'Oréal 社がスポンサーとなり行われた。そのため、バリデーション実行委員会の独立性について、PRP で慎重に議論された。その結果、PRP はバリデーション報告書の記載に不備は多いが、バリデーションの結果は受け入れると結論している。いずれの施設の記録も十分であり、データも適切であることを PRP が確認していることから、バリデーション結果に大きな問題はないと本委員会も考える。

本試験法の技術移転性は高いと判断された。再現性に関しては、液体被験物質(Time-To-Toxicity Test Method On Liquids : TTL)について、3 施設でのコード化された 20 物質によるバリデーション研究の結果から、施設内再現性は 85-95%であり、施設間再現性は 90%であった。固体被験物質(Time-To-Toxicity Test Method On Solids: TTS)について、3 施設でのコード化された 20 物質によるバリデーション研究の結果から、施設内再現性は 100%であり、施設間再現性も 100%であったことから、SkinEthic™ HCE TTT 法の再現性は高いと考えられた。また、本試験法の正確度については、UN GHS 区分 1 物質、区分 2 物質、および区分に該当しない物質がそれぞれ 79.2%、69.2%および 74.9%の割合で正しく判定され、本試験法の予測性は OECD 専門家会議が提案した採用基準を満たしていた。以上より、SkinEthic™ HCE TTT 法は、技術移転性、施設内再現性、施設間再現性は高い試験法である。ただし、UN GHS 区分 2 の固体物質を区分に該当しない物質と判定する偽陰性率が 28.9%と高く、30%以下という基準に近い値であることから、安全性評価上懸念を持つとの見解で一致した。

以上より、SkinEthic™ HCE TTT 法は、OECD TG492B に準拠して実施した場合、UN GHS 区分 1、UN GHS 区分 2 への分類および区分に該当しない場合の判定を可能とする試験法である。ただし、固体物質の UN GHS 区分 2 の分類は慎重に評価されるべきであると本資料編纂委員会は考える。

1. 緒言

OECD は TG として、既に複数の眼刺激性試験代替法を採択している¹⁾。UN GHS 区分 1 の分類および UN GHS 区分に該当しない場合を判定試験法としてウシ摘出角膜の混濁および透過性試験法 (Bovine Corneal Opacity and Permeability test method: BCOP 法、TG437)、ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験 (Isolated Chicken Eye Test: ICE 法、TG438)、*in vitro* 短時間暴露法 (Short Time Exposure: STE 法、TG491)、*in vitro* マクロモレキュラ試験法 (TG496) があり、UN GHS 区分 1 を検出する試験法としてフルオレセイン漏出試験法 (TG460)、UN GHS 区分に該当しない場合を判定する試験法として再構築ヒト角膜様上皮モデル法 (Reconstructed human Cornea-like Epithelium: RhCE 法、TG492)²⁾ および Vitrigel-Eye Irritancy Test (Vitrigel-EIT, TG494) がある。ただし、いずれの試験法においても、UN GHS 区分 2 の化学物質の検出をすることはできず、*in vivo* ドレイズ試験の代替法ではない。

この度、UN GHS 区分 1、UN GHS 区分 2 への分類および区分に該当しない場合の判定が可能となる試験法として L'Oréal 社によって開発された SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Time-to-Toxicity (TTT) 法は、RhCE である SkinEthic™ HCE を用いて液体および固体に対する化学物質の眼刺激性の評価を行う試験法である^{3,4)}。SkinEthic™ HCE TTT 法は、L'Oréal 社がスポンサーとなり、L'Oréal R&I と Adriaens Consulting BVBA の主導で実施されたバリデーション研究の後、科学的妥当性を評価するために第三者評価委員会 (Peer Review Panel: PRP) による検証がなされた。その後、OECD による専門家会議での議論を経て、UN GHS 区分 1、UN GHS 区分 2 への分類および区分に該当しない場合の判定が可能となる試験法と判断され、OECD TG492B として 2022 年 6 月に採択された⁵⁾。

本報告書は、バリデーション研究論文⁶⁾、第三者評価報告書⁷⁾、その他関連論文などをもとに本試験法の概要を説明し、JaCVAM 眼刺激性試験資料編纂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

SkinEthic™ HCE TTT 法は、化学物質 (単一物質および混合物) の眼刺激性を UN GHS において UN GHS 区分 1、UN GHS 区分 2 への分類および区分に該当しない場合の判定に用いることができる試験法である。

3. 原理

本試験法は、SkinEthic™ HCE を用いて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。角膜混濁などの細胞傷害は種々の作用機序に伴って発生する可能性があるが、細胞毒性は *in vivo* で見られる化学物質の眼刺激性を決定するうえで重要な役割を果たす。また、化学物質の眼刺激性は主に初期損傷の程度によって決定され、細胞死の程度とその後の反応および最終的な結果の程度と相関する。

4. 試験手順

SkinEthic™ HCE TTT 法の手順を以下に示す^{8,9)}。SkinEthic™ HCE は EPISKIN 社(フランス)および我が国では株式会社ニコダームリサーチより購入できる。

4-1. RhCE 組織の機能的条件

RhCE 組織の機能的条件は、以下のとおりである。

陰性対照吸光度：陰性対照において $1.0 < OD \leq 2.5$

(使用時の基準であり、製造者の出荷基準は異なる場合もある)

バリア機能：50 μ L ドデシル硫酸ナトリウム(Sodium Lauryl Sulphate : SDS)の30分間曝露において $1.0 \leq IC_{50}(\text{mg/mL}) \leq 3.2$

(IC_{50} ：細胞生存率を50%低下させるのに必要な濃度)

形態：少なくとも4層の上皮細胞があり、角化していない

再現性：陽性および陰性対照の結果が背景データをもとに設定した許容範囲内にある

これらは SkinEthic™ HCE 製造者の出荷基準として採用される。一方、SkinEthic™ HCE の使用者は毎回、生存率と再現性を確認する必要がある。

4-2. 被験物質の適用

37°C 以下において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。RhCE 組織は、一晚、標準培養条件(37 \pm 2°C、5 \pm 1% CO₂、 \geq 95% 湿度)で培養し、更に新たな培地を用いて標準培養条件で30分間以上培養する。

液体物質の場合(SkinEthic™ HCE Time-to-Toxicity for Liquids chemicals: TTL)、評価対象物質そのもの、および蒸留水で20% (w/v)に希釈したものをを用いる。SkinEthic™ HCE に Phosphate-Buffered Saline (PBS) 10 \pm 2 μ L を適用し被験物質 80 \pm 2 μ L を加える。評価対象物質そのものは室温で5 \pm 0.25分間、20% (w/v)希釈調整液は室温で16 \pm 1分間および標準培養条件で120 \pm 2分間培養する。その後、PBS 25mL で洗浄して被験物質を除去し、10 \pm 1分間室温で培地に浸漬する。同時に行う陽性対照には、酢酸メチル(Chemical Abstracts Services : CAS No. 79-20-9)が推奨され、適用・培養・後処理は対象評価物質の条件に準じる。同時に行う陰性対照には PBS が推奨され、80 \pm 2 μ L のみを適用する。培養・後処理は対象評価物質の条件に準じる。

固体物質の場合(SkinEthic™ HCE Time-to-Toxicity for Solids chemicals: TTS)、評価対象物質そのものを用いる。被験物質 80 \pm 2 mg を均一に適用した後に蒸留水 80 \pm 2 μ L を加え、標準培養条件で30 \pm 2分間および120 \pm 5分間培養する。その後、PBS 25 mL で洗浄して被験物質を除去し、30 \pm 2分間室温で培地に浸漬する。同時に行う陽性対照として、乳酸1% (w/v)水溶液(CAS No. 50-21-5)が推奨され、80 \pm 2 μ L を適用した後に蒸留水 80 \pm 2 μ L を加える。同時に行う陰性対照には PBS が推奨され、80 \pm 2 μ L のみを適用する。陽性・陰性対照とも培養・後処理は対象評価物質の条件に準じる。

それぞれの曝露条件で少なくとも2つのRhCE組織を用いる。

4-3. 細胞生存率の算出

細胞生存率算出には 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (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±15 分間標準培養条件で反応させ、その後 1.5 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無色透明でない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、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、洗浄が困難な場合には、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様に行う。抽出したホルマザンの定量は OD_{570nm} 測定または High Performance Liquid Chromatography (HPLC)/Ultra Performance Liquid Chromatography (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 (570nm±30nm) に吸収を持つ着色物質の場合、細胞生存率の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 (33-40 項) および Annex 3 のフローチャートを参照する⁵⁾。

4-4. 試験成立の承認基準

以下の条件をすべて満たした場合、試験の成立を承認する。

- 1) 陰性対照の平均 OD が $1.0 < OD \leq 2.5$ であること。
- 2) 液体被験物質では、陽性対照物質の平均細胞生存率が 5 分間の曝露時間で 50%以下、16 分および 120 分間の曝露時間で 50%を超えること、固体被験物質では、陽性対照物質は平均細胞生存率が 30 分間の曝露時間で 40%を超えること、120 分間の曝露時間で $20\% < \% \text{生存率} \leq 70\%$ であること。いずれも背景データの範囲内にあること。
- 3) 被験物質および陰性・陽性対照のそれぞれにおいて 2 つの RhCE 組織の細胞生存率の差が 20%未満であること。3 つの RhCE 組織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。

なお、複数の被験物質を同時に試験した場合は、この条件を満たさない被験物質のみ不成立とする。

4-5. 刺激性の判定

液体被験物質では、すべての曝露時間 (5 分、16 分および 120 分) で平均細胞生存率が 50%を超えた場合、被験物質は UN GHS 区分に該当しない、すべての曝露時間で平均細胞生存率が 50%以下の場合 UN GHS 区分 1 と判断される。それら以外の場合は UN GHS 区分 2 と判断される。たとえば、5 分間(原体)と 16 分間(20%希釈液)の曝露条件では平均細胞生存率が 50%を超えていても、120 分間(20%希釈液)で 50%以下である物質は UN GHS 区分 2 となる。

固体被験物質では、平均細胞生存率が 30 分間(原体)の曝露時間で 40%を超え、かつ 120 分間(原体)の曝露時間で 60%を超えた場合、被験物質は UN GHS 区分に該当しないと判断され、平均細胞生存率が 30 分間(原体)の曝露時間で 40%以下、かつ 120 分間(原体)の曝露時間で 60%以下の場合は UN GHS 区分 1 と判断される。それら以外の場合は UN GHS 区分 2 と判断される。

なお、平均細胞生存率がカットオフ値近辺の場合(±5%)は 2 回目の試験を検討する。1 回目と 2 回目の試験で結果が一致しない場合は 3 回目の試験を検討する。

5. バリデーション研究

5-1. バリデーション研究の透明性

本バリデーション研究は、本試験法に用いられる RhCE である SkinEthic™を販売している企業の親会社である L'Oréal 社がスポンサーとなり行われた。そのため、バリデーション実行委員会の独立性が PRP でも慎重に議論された⁷⁾。バリデーション実行委員会の中の第三者機関としては、コンサルティング企業である Adriaens Consulting BVBA のみが関与し、コード化やデータ解析を実施しているが、被験物質の選択は L'Oréal 社が実施している。さらに、統計学者の報告書もバリデーションの採用基準も計画にはなく、バリデーション報告書にも不明確な記載が多かった。これらの事実から、PRP は OECD GD 34 で推奨されている試験マネジメントや被験物質の選択に関する独立性については不明確であるとしている。

このような状況を PRP が慎重に検討して明らかにし、以下の 15 項目について確認した⁷⁾。その結果、PRP はバリデーション報告書の記載に不備は多いが、バリデーションの結果は受け入れると結論している。

- 1) バリデーション研究と試験法の目的(Study objective and test method purpose)
- 2) 既存の試験法との比較による必要性和有用性(Need and benefits in comparison to existing test methods)
- 3) 性能標準(OECD GD216)¹⁰⁾に記載された要件に叶う試験法との比較(Comparison of the test method with the essential test method components as described in the Performance Standards)
- 4) 生物学のおよび作用機序的な関連性 (Biological and mechanistic relevance)
- 5) 試験法プロトコル (Test method protocol)
- 6) バリデーション研究の管理と実行の適正 (Appropriateness of the validation study management and conduct)
- 7) バリデーション研究の目的に沿った適切な被験物質の選択 (Adequacy of chemicals selection for the validation study objective)
- 8) 関連性評価に使われた参照データの質 (Quality of the reference data used for the evaluation of relevance)
- 9) 経験のない施設へのトレーニングと技術移転 (Training of naive laboratories and transferability)

- 10) データの信頼性保証 (Use of quality assurance system (s) during data generation)
- 11) 施設内および施設間再現性 (Within- and between-laboratory reproducibility)
- 12) 予測性 (Predictive capacity)
- 13) 適用範囲と限界 (Applicability domain and limitations)
- 14) データと文書の完成度 (Completeness of data and documentation)
- 15) 他の関連事項 (Other relevant aspects)

なお、予測性に関しては OECD の専門家会議で定められた採用基準をもとに評価された。

本委員会では、バリデーション研究を遂行する場合には、開発者でなく、第三者機関が主導し、透明性や利益相反に考慮するべきであると考えている。ただし、バリデーション報告書の記載に不備は多いが、いずれの施設の記録も十分であり、データも適切であることを PRP が確認しており、バリデーション結果に大きな問題はないと本委員会も考えた。

5-2. トレーニングと技術移転

SkinEthic™ HCE TTT 法のバリデーション研究にはリードラボの EPISKIN 社と本試験法の経験がない 2 施設 (EUROSAFE 社、VITROSCREEN 社) を加えた合計 3 施設が参加した。すべての施設が開発者から 3~4 日間のトレーニングを受けた。

技術移転性として、コード化された 3 物質、陰性対照物質および陽性対照物質を用い、少なくとも 2 回の実験が実施された。液体被験物質の場合 (TTL) において、1 回目で 1 物質の 5 分間処理の判定結果が 2 施設で食い違ったが、細胞毒性 50% の基準前後のバラツキによるものと判断された。しかし、すべての参加施設で 2 回目は正確に予測できていた。固体被験物質の場合 (TTS) では、3 施設の判定結果はすべて同じであった。

以上の結果から、本試験法の技術移転性は高いと判断されている。なお、本試験法を実施する試験施設の技術習得を確かめるための習熟度確認物質の一覧は Appendix 1 (液体は Appendix 1-1、固体は Appendix 1-2) にある。

5-3. 施設内および施設間再現性^{3,4)}

TTL に関しては、コード化された 20 物質 (新規 14 物質を含む) を用いたバリデーション研究が実施され、合計 60 回 (20 物質×3 回) の試験が行われた。施設内再現性は 85、90 および 95% であり、20 物質の施設間再現性は 90% であった。TTS に関しても、コード化された 20 物質 (新規 11 物質を含む) を用いたバリデーション研究において、施設内再現性は 100% であり、施設間再現性も 100% であった。これらの結果から、SkinEthic™ HCE TTT 法の再現性は高いと考えられた。

5-4 試験法の予測性^{1,2,6)}

表 1 に SkinEthic™ HCE TTT 法の正確性を示す。SkinEthic™ HCE TTT 法の正確性は、加重算出した。たとえば、1 種類の被験物質について 3 回の試験結果がある場合で、2 回は Cat.1、1 回は Cat.2 と判定された場合、Cat.1 および Cat.2 の予測はそれぞれ 0.66 (2/3) および 0.33 (1/3) とした。

TTLでは、UN GHS区分1物質、UN GHS区分2物質および区分に該当しない物質が、それぞれ、85.4%、79.8%および79.2%の割合で、また、TTSでは、それぞれ、74.7%、55.3% および71.7%の割合で正しく判定された。TTLとTTSを合わせたTTTの正確度については、UN GHS区分1物質、UN GHS区分2物質および区分に該当しない物質が、それぞれ 79.2%、69.2%および74.9%の割合で正しく判定され、本試験法の予測性はOECD専門家会議が承認した採用基準を満たしていた。詳細な結果はAnnex 3および4に示している。この基準はSkinEthic™ HCE TTTの開発者の提案を受け、peer review report, 3.12 予測性 (Evaluation criterion 12)¹¹⁾での検討をもとにOECD専門家会議が承認したものであるが、本委員会でも再度慎重に議論した。特に、UN GHS区分2の固体物質を区分に該当しない物質と判定する偽陰性率が28.9%と高く、OECDが定めた30%以下という採用基準に近い値であることから、安全性評価上懸念を持つとの見解で一致した。

SkinEthic™ HCE TTT 法は、OECD TG492B に準拠して実施した場合、UN GHS 区分 1、UN GHS 区分 2 への分類および区分に該当しない場合の判定を可能とする試験法である。ただし、固体物質の UN GHS 区分 2 の分類は慎重に評価されるべきであるとの意見でまとまった。

表 1 SkinEthic™ HCE TTT 法の正確性*

UN GHS Cat. (# of Chemical)	SkinEthic™ HCE TTL (%)		
	Cat. 1	Cat.2	No Cat.
Cat 1 (21)	85.4	14.6	0.0
Cat. 2 (25)	20.2	79.8	0.0
No Cat. (24)	0.0	20.8	79.2
UN GHS Cat. (# of Chemical)	SkinEthic™ HCE TTS (%)		
	Cat. 1	Cat.2	No Cat.
Cat 1 (29)	74.7	25.3	0.0
Cat. 2 (19)	15.8	55.3	28.9
No Cat. (33)	3.0	25.3	71.7
UN GHS Cat. (# of Chemical)	SkinEthic™ HCE TTT (%)		
	Cat. 1	Cat.2	No Cat.
Cat 1 (50)	79.2	20.8	0
Cat. 2 (44)	18.3	69.2	12.5
No Cat. (57)	1.8	23.4	74.9

*: 値は加重算出した。網掛け箇所が正しく予測できた割合。

of Chemical : 物質数、Cat.1 : 区分 1、Cat.2 : 区分 2、No Cat. : 区分に該当しない

表 2 に SkinEthic™ HCE TTT 法とその他の RhCE 法の UN GHS 区分に該当しない物質に対する正確性を示す。EpiOcular™ Eye Irritation Test (EpiOcular), SkinEthic™ Human Corneal Epithelium Eye Irritation Test (SkinEthic), LabCyte CORNEA-MODEL24 Eye Irritation Test (LabCyte)の正確度、感度および特異度は 80%~88%、95%~100%および 63%~73%であった。SkinEthic™ HCE TTT 法の US GHS 区分に該当しない物質に対する正確度、感度および特異度は、それぞれ、87%、94%および 75%であった。SkinEthic™ HCE TTT 法の正確度、感度、特異度はその他の RhCE 法と同等であった。

表2 UN GHS 区分に該当しない物質に対しての正確性の比較

	正確度 % (# of Chemical)	感度 % (# of Chemical)	特異度 % (# of Chemical)
EpiOcular*	80 (112)	96 (57)	63 (55)
SkinEthic*	84 (200)	95 (97)	72 (103)
LabCyte**	88 (139)	100 (76)	73 (63)
SkinEthic™ HCE TTT***	87 (151)	94 (94)	75 (57)

Round to the first decimal place when necessary, EpiOcular=EpiOcular™ Eye Irritation Test, SkinEthic=SkinEthic™ Human Corneal Epithelium Eye Irritation Test, LabCyte=LabCyte CORNEA-MODEL24 Eye Irritation Test, #=number

*TG 492²⁾

**Peer Review report, December 2018¹⁾

***TEST GUIDELINE 492B より算出

6. 試験法の適用範囲および留意点

SkinEthic™ HCE TTT は、UN GHS 区分 1、UN GHS 区分 2 への分類および区分に該当しない場合の判定に用いることができるが、UN GHS 区分 2A と 2B を区別することはできない。UN GHS 区分 2A と 2B の区別が必要となる場合は、他の方法やアプローチで対応する必要がある¹²⁾。

本試験法は、プロトコルで定められた濃度に溶解又は均一懸濁した液体の評価が可能である単一物質、混合物、固体、液体、半固体およびワックスに適用することができる。液体は水性と非水性、固体は可溶性と不溶性のいずれも適用可能であるが、水溶性の低い固体 (< 0.014 mg/mL) についてはバリデーション研究において予測性が低かったことから注意が必要である(例：区分 1 の 9 物質のうち 5 つが区分 2 に分類された)。水溶性の低い液体では、20% (w/v) 希釈水溶液で 16 分または 120 分間曝露する際に安定した混合液の状態を保持できない可能性があり、予測性への影響が考えられる。しかしながら、バリデーション試験では水への溶解性が 0.1 g/L 未満の液体 16 物質において予測性に大きな問題はみられなかった。ガスとエアロゾルについてはバリデーション研究で評価されておらず本試験法には適用できない。多成分の物質やその混合物については、技術的には適応可能であるものの、その適応性については限られた情報しか得られていない¹⁾。特定の製剤において本試験が適応できないことを示す根拠がある場合、その製剤は本試験法に適用できない。混合物や試験が困難な化学物質(例：不安定な化学物質)、あるいは適応範囲に明らかに含まれていない物質の試験を検討する場合は、その試験結果が科学的に意味のある結果をもたらすかどうか事前に考慮すべきである。

ホルマザン色素と同じ範囲の光吸収スペクトルを持つ物質や MTT を直接還元する物質は組織生存率の測定に干渉する可能性があり、補正のために適合させた対照物質の使用が必要となる。必要となる対照物質は、被験物質によって生じる干渉の種類および各ホルマザン色素の定量化に使用する手順によって異なる(TG492B の 33-40 項参照)⁶⁾。

7. 結論

SkinEthic™ HCE TTT は、技術移転性、施設内再現性および施設間再現性の高い試験法である。予測性に関しては、OECD 専門家会議が定めた採用基準は満たしていた。

バリデーション報告書の記載に不備は多いが、いずれの施設の記録も十分であり、データも適切であることを PRP が確認しており、バリデーション結果に大きな問題はないと本委員会は考える。

よって、SkinEthic™ HCE TTT 法は、OECD TG492B に準拠して実施した場合、UN GHS 区分 1、UN GHS 区分 2 への分類および区分に該当しない場合の判定を可能とする試験法である。ただし、固体物質の UN GHS 区分 2 の分類は慎重に評価されるべきであると本資料編纂委員会は考える。

8. 参考文献

- 1) OECD Test Guidelines for Chemicals, Available at: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm> (2022 年 6 月現在)
- 2) OECD (2018) 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.
- 3) Alépée N, Leblanc V, Grandidier MH, Teluob S, Viricel A, Adriaens E, Michaut V.(2021) SkinEthic HCE Time-to-Toxicity on solids: A test method for distinguishing chemicals inducing serious eye damage, eye irritation and not requiring classification and labelling., *Toxicol In Vitro.*,75:105203. doi: 10.1016/j.tiv.2021.105203.
- 4) Alépée N, Leblanc V, Grandidier MH, Teluob S, Tagliati V, Adriaens E, Michaut V.(2020) Development of the SkinEthic HCE Time-to-Toxicity test method for identifying liquid chemicals not requiring classification and labelling and liquids inducing serious eye damage and eye irritation.,*Toxicol In Vitro.*, 269:104960. doi: 10.1016/j.tiv.2020.104960.
- 5) OECD (2022) Test Guideline 492B. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for Eye Hazard
- 6) Alépée N, Grandidier MH, Teluob S, Amaral F, Caviola E, De Servi B, Martin S, Meloni M, Nardelli L, Padelou C, Tagliati V, Viricel A, Adriaens E, Michaut V. (2022) Validation of the SkinEthic HCE Time-to-Toxicity test method for eye hazard classification of chemicals according to UN GHS.*Toxicol In Vitro.* 80:105319. doi: .1016/j.tiv.2022.105319.
- 7) Barroso, J., Eskes, C., Germolec, D., Kim, B-H., Kojima, H. (2021). Peer Review Panel Report on the scientific validity of the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Time-To-Toxicity Test (TTT) on liquids (TTL) and on solids (TTS). January, 12, 2021.
- 8) SkinEthic™ HCE Time-to-Toxicity on Liquids SOP, Version 1. (June 16, 2020). *In Vitro* Eye Irritation Time-To-Toxicity Test Method On Liquids (TTL): SkinEthic™ Human Corneal Epithelium Model (HCE). Available at: [www.episkin.com].
- 9) SkinEthic™ HCE Time-to-Toxicity on Solids SOP, Version 1. (June 16, 2020). *In Vitro* Eye Irritation Time-To-Toxicity Test Method On Solids (TTS): SkinEthic™ Human Corneal Epithelium Model (HCE). Available at: [www.episkin.com].
- 10) OECD (2017) Performance Standards for the Assessment of proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RHCE) Test Methods for Eye Hazard
- 11) OECD (2018) PEER REVIEW REPORT OF THE VALIDATION OF THE LABCYTE CORNEA-MODEL²⁴ EYE IRRITATION TEST FOR INCLUSION IN TEST GUIDELINE 492, SERIES ON TESTING AND ASSESMENT No. 282
- 12) OECD (2019) Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation Series on Testing & Assessment No. 263 (Second Edition)

Appendix 1

SkinEthic™ HCE TTL (Table 2A) および SkinEthic™ HCE TTS (Table 2B)の 習熟度確認物質リスト

Appendix 1-1 SkinEthic™ HCE TTL リスト

物質名	CASRN	有機官能グループ ¹	物性	生存率1 5分 (%) ^{2,3}	生存率2 16分 (%) ^{2,3}	生存率3 120分 (%) ^{2,3}	VRM 予測性
<i>In Vivo</i> カテゴリー-1							
N,N--Diethylethanolamine	100-37-8	Alcohol. Aliphatic Amine. tertiary	L	2.9±1.7	1.0±1.3	0.6±0.5	Cat 1
Acetic acid (10%)	64-19-7	Carboxylic acid	L	4.2±0.4	25.9±12.7	2.8±0.3	Cat 1
<i>In Vivo</i> カテゴリー-2							
2-Butanone	78-93-3	Ketone	L	21.1±5.4	90.8±13.7	87.6±12.3	Cat 2
Acetone	67-64-1	Ketone	L	6.4±2.6	97.1±3.9	99.1±3.5	Cat 2
Hexadecyltrimethylammonium chloride (2%)	112-02-7	Ammonium salt. Alkylammonium salt	L	58.0±10.7	62.1±9.2	2.4±0.8	Cat 2
<i>In Vivo</i> 非カテゴリー							
1,3-Diisopropylbenzene	99-62-7	Cyclic. Phenyl. Aromatic	L	100.5±8.5	94.5±6.3	96.5±9.3	No Cat
Dodecane	112-40-3	Methyl. Methylene	L	98.3±6.9	103.1±5.6	98.9±5.1	No Cat

Appendix 1-2 SkinEthic™ HCE TTSのリスト

物質名	CASRN	有機官能グループ ¹	物性	生存率1 30分 (%) ^{2,3}	生存率2 120分 (%) ^{2,3}		VRM 予測性
<i>In Vivo</i> カテゴリー-1							
1-Naphthalene acetic acid Na salt	61-31-4	Benzyl. Carboxylic aromatic. Naphthalene	S	1.6±0.7	1.6±0.4		Cat 1
1,2-Benzisothiazol-3(2H)-one	2634-33-5	Benzothiazole/ Benzisothiazole	S	4.0±1.0	4.0±0.4		Cat 1
<i>In Vivo</i> カテゴリー-2							
4-Carboxybenzaldehyde	619-66-9	Aldehyde. Aryl. Carboxylic acid	S	80.1±12.3	5.0±1.4		Cat 2
2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone	83-72-7	Enol. Naphthoquinone	S	82.1±8.9	4.5±1.5		Cat 2
Ammonium nitrate	6484-52-2	Amine. Nitrate. Ammonium	S	61.0±4.8	1.8±0.4		Cat 2
<i>In Vivo</i> 非カテゴリー							
Magnesium carbonate	56378-72-4	Magnesium. Carbonate	S	98.3±7.1	93.4±11.7		No Cat
Anthracene	120-12-7	Anthracene. Carboxylic aromatic	S	97.7±6.6	98.1±4.7		No Cat

略号: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

VRM = Validated Reference Method, SkinEthic™ HCE TTT

¹ 有機機能グループ OECD QSAR Toolbox 分析に従い分類された (version 3.2; <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm>).

² SkinEthic™ HCE TTT バリデーション研究を基に得られた。

³ 液体の場合, the SkinEthic™ HCE TTL は 3 曝露回数を用いる。原体 5 分、20%水溶液 16 分および 120 分である。固体の場合, the SkinEthic™ HCE TTS は 2 曝露回数を用いる。原体 30 分および 120 分である。