

評価報告書

再構築ヒト角膜様上皮モデル法(RhCE 法)

SkinEthic™ HCE/S を用いた眼刺激性試験(SkinEthic™ HCE EIT)

眼刺激性試験資料編纂委員会

平成 29 年 (2017 年) 12 月 4 日

眼刺激性代替法資料編纂委員会

山本 直樹	(藤田保健衛生大学)
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)
波多野 浩太	(ホーユー株式会社)
森村 智美	(一般財団法人食品薬品安全センター)
小島 肇	(国立医薬品食品衛生研究所)

略語

CAS: Chemical Abstracts Services

CE: Cosmetics Europe

EIT: Eye Irritation Test

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

HCE: Human Corneal Epithelium

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

SDS: sodium dodecyl sulphate

SOP: Standard Operating Procedures

TG: Test Guideline

UN: United Nations

VRM: Validated Reference Method

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り、OECD TG 492として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採択されている。SkinEthic™ヒト角膜上皮モデルを用いた眼刺激性試験（SkinEthic™ Human Corneal Epithelium Eye Irritation Test: SkinEthic™ HCE EIT）はRhCE法の一つで、改訂TG 492に追加された検証済み標準試験法である。本報告では、SkinEthic™ HCE/S EITのバリデーション研究論文、第三者評価報告書、関連論文などをもとに試験法の概要を説明しJaCVAM眼刺激性代替法資料編纂委員会の意見をまとめた。

SkinEthic™ HCE EITの信頼性・正確性を確認するため、液体物質および固体物質それぞれ60物質を用いた3施設によるバリデーション研究が行われた。各施設で1物質あたり3回の試験を行った。この3施設バリデーション研究におけるSkinEthic™ HCE/S EITの正確性は、液体物質および固体物質において、それぞれ感度98.3%および92.2%、特異度69.4%および76.6%、正確度84.8%および84.4%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85%以上であった。これらの正確性および再現性の値は、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、SkinEthic™ HCE/S EIT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）、フルオレセイン漏出試験法（**FL 法**、TG 460）、**in vitro** 短時間曝露法（**STE 法**、TG 491）、そして、再構築ヒト角膜様上皮モデル法（**RhCE 法**、TG 492）の 5 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 UN GHS 区分 1（重篤な眼の傷害を起こす）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 UN GHS 区分外（眼に対する重篤な損傷性および眼刺激性を有する物質とは分類されない）物質を検出する方法として用いられる。FL 法は単層培養した尿細管上皮細胞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、トップダウン方式においてのみ用いられる。STE 法は単層培養した角膜細胞を用いて物質の曝露による細胞毒性（細胞生存率）を指標に眼刺激性を評価する方法で、トップダウン方式およびボトムアップ方式において用いられる。

RhCE 法は、再構築ヒト角膜様上皮モデル（RhCE）組織に対する被験物質の細胞毒性を指標とし、ボトムアップ方式により UN GHS 区分外物質を検出することでその物質の眼刺激性を評価する試験法である。RhCE 法である EpiOcular™ 眼刺激性試験（EpiOcular™ Eye Irritation Test: EpiOcular™ EIT）および SkinEthic™ ヒト角膜上皮モデル眼刺激性試験（SkinEthic™ HCE EIT）の 2 試験法について EURL ECVAM と CE の共同バリデーション研究が行われた。EpiOcular™ EIT は、プロトコルの最適化、追加試験、ESAC の第三者評価を経て、RhCE 法の検証済み標準試験法（Validated Reference Method: VRM）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）。その後、SkinEthic™ HCE EIT もプロトコルの最適化、3 施設バリデーション研究および ESAC の第三者評価を経て、2 つ目の VRM（VMR2）として 2017 年 10 月に改訂 TG 492 に追加された。

本報告書は改訂 TG 492 の VRM2 である SkinEthic™ HCE EIT のバリデーション研究論文、第三者評価報告書、その他関連論文などをもとに本試験法の概要を説明し、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。

改訂 TG 492 で追加された VRM は、市販のヒト不死化角膜上皮細胞由来の RhCE 組織である SkinEthic™ HCE/S を用いた眼刺激性試験 (SkinEthic™ HCE EIT) である。被験物質が液体の場合は約 30 分間、固体の場合は約 4 時間、SkinEthic™ HCE/S に曝露した後、MTT 試験より算出した細胞生存率をエンドポイントに用いる。これは、細胞内に取り込まれた MTT の還元により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。被験物質が液体の場合、細胞生存率が陰性対照と比較して 60%を超えると、被験物質は UN GHS 分類において区分外であると判定する。被験物質が固体の場合は細胞生存率が 50%を超えると UN GHS 分類において区分外であると判定する。

4. 試験手順

SkinEthic™ HCE EIT の手順を以下に示す。詳細は、改訂 TG 492 を参照する。SkinEthic™ HCE/S は EPISKIN 社 (フランス) 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。

生存率：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：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 3 層の上皮細胞があり、その表面は角化していない

再現性：陽性および陰性対照の結果を背景データをもとに設定した許容値内にある

これらは SkinEthic™ HCE/S の製造者の出荷基準として採用される。一方、SkinEthic™ HCE/S の使用者は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

物質あたり少なくとも 2 RhCE 組織を用いる。被験物質は評価対象物質そのものを用いる。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。液体被験物質の場合、SkinEthic™ HCE/S に $30 \pm 2 \mu\text{L}$ を適用し、標準培養条件¹で 30 ± 2 分間培養する。その後、リン酸緩衝生理食塩水 20 mL で洗浄して被験物質を除去し、 30 ± 2 分間標準培養条件で培地に浸漬する。固体被験物質の場合、 $30 \pm 2 \text{ mg}$ を均一に適用し、標準培養条件で 4 ± 0.1 時間培養する。その後、リン酸緩衝生理食塩水 25 mL で洗浄して被験物質を除去し、 30 ± 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 ± 0.5 時間培養する。

同時陽性対照には酢酸メチル (CAS No. 79-20-9)、同時陰性対照にはリン酸緩衝生理食塩水が推奨される。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 ± 15

¹ $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $5 \pm 1\% \text{ CO}_2$ 、 $\geq 95\%$ 湿度

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 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、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 本文の説明および ANNEX IV のフローチャートを参照する。

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) 陽性対照の平均細胞生存率が液体被験物質では 30%以下、固体被験物質では 20%以下であること。
 - 3) 被験物質および陰性・陽性対照のそれぞれにおいて 2 RhCE 組織の細胞生存率の差が 20%未満であること。3 RhCE 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。
- 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。固体被験物質では平均細胞生存率が 50%を超えた場合、被験物質は GHS 区分外と判断される。これらのカットオフ値以下の場合、本試験法では偽陽性が生じえるし、また区分 1 と区分 2 物質を識別できないことから、他の試験法による追加試験が必要となる。

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

5. バリデーション研究

開発者の L'Oréal 社をリードラボとして、さらに 2 施設（Charles River Laboratories、Flemish Institute for Technological Research）を加え、合計 3 施設で SkinEthicTM HCE EIT のバリデーション研究が行われた。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、UNGHS 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）。MTT 還元物質やホルマザンと同じような波長に吸収を持つ着色物質も含まれた。

コード化された 120 物質すべてを 3 施設で試験した。試験はすべての被験物質について 3 回実施された。

また、この 3 施設バリデーション研究とは別に、リードラボにおいて、80 物質について追加試験が行われた（Appendix 1）。試験はすべての被験物質について 3 回実施された。

6. 試験法の信頼性

6-1. 技術移転性

バリデーション研究を開始する前に、リードラボにより、参加2施設の技術者に対して SkinEthic™ HCE EIT の液体・固体用プロトールを用いてトレーニングが行われた。その後、液体物質および固体物質それぞれ9物質（コード化）を用いて技術移転の確認を行った。1物質あたり3回試験を実施したところ、良好な結果が得られた。

なお、RhCE 法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改訂 TG 492 に提示されている（Appendix 2）。

6-2. 施設内再現性

バリデーション研究では施設ごとに1被験物質につき複数回の試験を行っている。GHS 分類判定の施設ごとの施設内再現性は、液体用プロトコルでは 88.3 - 95.0%、固体用プロトコルでは 95.0 - 96.7% であった。リードラボで行われた追加試験での施設内再現性は液体用プロトコルでは 91.1%、固体用プロトコルでは 97.1% 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（85%以上）を満たした。

6-3. 施設間再現性

施設ごとに複数回の試験の細胞生存率を平均して GHS 分類判定を行い、施設間再現性を検討した。その結果、3施設間の再現性は液体用プロトコルでは 93.3%、固体用プロトコルでは 96.7% であり、全体では 95.0% 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。

7. 試験法の正確性

正確性の評価には、バリデーション研究として3施設で行われた全試験のデータを用いた。結果は表1の通りである。

表 1. SkinEthic™ HCE EIT の正確性（3施設バリデーション）

評価項目 (受け入れ基準)	液体	固体
感度 (≥90%)	98.3%	92.2%
特異度 (≥60%)	69.4%	76.6%
正確度 (≥75%)	84.8%	84.4%

SkinEthic™ HCE EIT の正確性はバリデーション運営委員会が定めた基準（感度 90%以上、特異度 60%以上、正確度 75%以上）を満たした。

なお、バリデーション研究においてリードラボで得られたデータとリードラボにおいて実施された追加試験の 80 物質（45 液体物質、35 固体物質）のデータを合わせてリードラボにおける正確性を評価した場合、液体物質では感度 100%、特異度 65.3%、正確度 83.5%、固体物質では感度 89.7%、特異度 73.6%、正確度 80.7% であった。バリデーション研究の正確性とほぼ同様な結果が得られた。

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) バリデーション研究において被験物質に含まれなかった気体（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

SkinEthic™ HCE EIT の 3 施設によるバリデーション研究の結果、本試験法は再現性および正確性についてバリデーション運営委員会の定めた基準を満たしていた。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。

SkinEthic™ HCE EIT に用いる RhCE 組織は市販されており、また、RhCE 組織以外は、特殊な機材や試薬を必要とせず、手技も複雑なものではない。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として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、SkinEthic™ HCE EIT 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

- 1) Alépée N et al (2016) Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol In Vitro* 31, 43-53.
- 2) Alépée N et al (2016) Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol In Vitro* 34, 55-70.
- 3) ESAC (2016) ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No. 2016-02 of 24 June 2016.
- 4) OECD (2017) 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.

Appendix 1

バリデーションに用いられた物質

	3 施設 バリデーション	リードラボ 追加データ
全体	120	80
眼刺激性 GHS 分類		
区分 1	32	19
区分 2A	17	12
区分 2B	13	4
区分外	58	45
物質の特性		
液体	60	45
固体	60	35
Functional Group Class		
Aromatic	21	20
Alcohol	19	17
Ester	17	12
Heterocyclic	13	12
Halogenated	9	14
Carboxylic acid	11	7
Amine	3	10
Phenol	12	1
Acrylate	6	2
Ether	0	8
Salt	6	2
Polyether	6	1
Nitrile	2	4
Onium Compound	0	6
Silicium	4	2
Ketone	3	2
Pyrimidine	1	4
Thioether	4	1

注) バリデーション研究論文 (Alépée et al., 2016a, 2016b) をもとに作成。Functional Group Class は物質数の多いものを抽出。物質によっては複数の Functional Group 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
Hydroxyethyl acrylate	818-61-1	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-diimidamide, N,N''-bis(4-chlorophenyl)- 3,12-diimino-,di-D-gluconate (20%, aqueous)	18472-51-0	液体	区分 2A
Sodium benzoate	532-32-1	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
1-Ethyl-3-methylimidazolium ethylsulphate	342573-75-7	液体	区分外
Dicaprylyl ether	629-82-3	液体	区分外
Piperonyl butoxide	51-03-6	液体	区分外
Polyethylene glycol (PEG-40) hydrogenated castor oil	61788-85-0	粘性物	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
Potassium tetrafluoroborate	14075-53-7	固体	区分外