

評価会議報告書

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**)

JaCVAM 評価会議

平成 30 年 (2018 年) 2 月 21 日

JaCVAM 評価会議

大野 泰雄（公益財団法人 木原記念横浜生命科学振興財団）：座長
飯塚 尚文（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）*
五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部）
石井 雄二（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター）
井上 智彰（日本免疫毒性学会）
今井 教安（日本動物実験代替法学会）
岩瀬裕美子（日本製薬工業協会）
篠田 和俊（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）
杉山真理子（日本化粧品工業連合会）
仲井 俊司（日本化学工業協会）
中村るりこ（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）
西川 秋佳（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター）
沼澤 聡（日本毒性学会）
野口 真希（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）**
森田 健（日本環境変異原学会）
横関 博雄（日本皮膚免疫アレルギー学会）

任期：平成 28 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

*：平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日

**：平成 29 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

再構築ヒト角膜様上皮モデル法（Reconstructed human Cornea-like Epithelium Test Method: RhCE 法）は、ウサギを用いた Draize 眼刺激性試験の代替試験法として、被験物質のヒト角膜様上皮モデル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。OECD TG492 としてボトムアップ方式で United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS) 区分外物質を検出できる RhCE 法の一つとして、EpiOcularTMが採択されている。この度、SkinEthicTM ヒト角膜様上皮モデル（SkinEthicTM HCE/S）を用いた眼刺激性試験(SkinEthicTM HCE EIT)が RhCE 法の一つとして、改訂 TG 492¹⁾に検証済み標準試験法として追加された。SkinEthicTM HCE/S を用いる RhCE 法は、EURL ECVAM(European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing)と CE(Cosmetics Europe)の共同バリデーション研究²⁾が行われ、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 (EURL ECVAM Scientific Advisory Committee) の第三者評価を経て、2017 年 10 月に改訂 TG492 に追記された。JaCVAM 評価会議は、眼刺激性試験資料編纂委員会により作成された「再構築ヒト角膜様上皮モデル法(RhCE 法) Skin EthicTM HCE/S を用いた眼刺激性試験(Skin EthicTM HCE EIT) 評価報告書」³⁾を用いて、本試験法の妥当性について検討した。

1. 試験法の定義

名称： 再構築ヒト角膜様上皮モデル法（Reconstructed human Cornea-like Epithelium Test Method: RhCE 法 SkinEthicTM ヒト角膜様上皮モデルを用いた眼刺激性試験）

代替する対象毒性試験： Draize 眼刺激性試験法

試験法の概略： RhCE 法は、再構築ヒト角膜様上皮モデルを用いた眼刺激性試験である。RhCE 法のひとつである SkinEthicTM HCE EIT では、被験物質が液体の場合は約 30 分間、固体の場合は約 4 時間被験物質を SkinEthicTM HCE/S に曝露した後、MTT の還元量をもとにした細胞生存率を測定し、眼刺激性評価の指標として用いる。これは、MTT がミトコンドリアの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に基づいている（MTT 還元法）。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、また、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。これらカットオフ値以下の場合は、本試験法では偽陽性が生じること、区分 1 と区分 2 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になる。

2. 評価に用いた資料および評価内容の科学的妥当性

眼に異物が入った場合、眼の刺激は、神経等の特定の受容体に作用する場合を除き、一般に角膜や結膜の細胞傷害から始まる。Draize 法における眼刺激性の程度の判定は、主に角膜の初期傷害の程度に大きく影響され、それは角膜上皮細胞の細胞死の程度と相関関係にある。本試験法は、ヒトの角膜上皮に類似した構造を有する RhCE (SkinEthicTM HCE/S) 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。これらのことから、本試験法はウサギを用いる眼刺激性試験の代替法として科学的妥当性がある。

SkinEthic™ HCE EIT については、EURL ECVAM と CE の共同バリデーション研究²⁾が行われた。その後プロトコルの最適化を行って、UN GHS 区分物質・区分外物質や固体・液体のバランスを考慮して 120 物質について 3 施設でバリデーション研究が行われた。被験物質には、MTT 還元物質やホルマザンと同じような波長をもつ着色物質も含まれた。また、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^{4,5)}。

SkinEthic™ HCE EIT は、施設内再現性、施設間再現性および試験法の正確性についても EURL ECVAM バリデーション運営委員会の定めた基準を満たした。さらに ESAC の第三者評価⁶⁾を経て、UN GHS 区分外物質を検出する方法として 2017 年 10 月に改訂 TG492 に追記された。JaCVAM 眼刺激性試験資料編纂委員会は、これらの資料を用いて本試験法を評価しており、科学的に妥当な評価であると考えられる。

3. 本試験法の有用性と適用限界

RhCE 法に用いる SkinEthic™ HCE/S は市販されており、これ以外は特殊な機材や試薬を必要とせず、手技も複雑ではないことから技術移転性は高いと判断できる。但し、入手した SkinEthic™ HCE/S が品質基準の許容範囲にあり、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る必要がある。

UN GHS 区分外物質を検出する方法としての信頼性を調べるため、施設内再現性および施設間再現性を検討するバリデーション研究が行われている。バリデーション研究において、各施設の施設内再現性は、液体用プロトコルで 88.3-95.0%、固体用プロトコルで 95.0-96.7%であり、EURL ECVAM バリデーション運営委員会が定めた基準（85%以上）を満たしていた²⁾。また、施設間再現性に関しては、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 UN GHS 分類判定を施設ごとに行い、液体用プロトコルで 93.3%、固体用プロトコルで 96.7%、全体では 95.0%となり、バリデーション運営委員会が定めた基準（80%以上）を満たしていた³⁾。さらに、バリデーション研究で得られたデータによる正確性の評価では、液体プロトコルで感度 98.3%、特異度 69.4%および正確度 84.8%、固体用プロトコルで感度 92.2%、特異度 76.6%および正確度 84.4%となり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）を満たしていた³⁾。

表. SkinEthic™ HCE EIT の正確性

	物質数	感度(%)	特異度(%)	正確度(%)
液体	60	98.3	69.4	84.8
固体	60	92.2	76.6	84.4
代替法としての 受け入れ基準 ¹⁾	-	≥90%	≥60%	≥75%

眼刺激性代替法資料編纂委員会の報告書（表1）より引用³⁾

但し、細胞生存率の算出に MTT 還元法を用いる他の代替法と同様に、被験物質が MTT を還元する物質の場合、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には、吸光度補正を行う必要がある。その手順については、改訂 TG492 の本文の説明および ANNEX IV の試験法を参照する必要がある。

また、本試験法を適用するには、試験法の性質と正確性の確保を考慮して以下の制限が設けられる。

- 1) バリデーション研究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) UN GHS 区分の区分 1 物質と区分 2（2A/2B）物質の識別には用いることはできない。

以上の点から、TG492 に準拠して実施した場合、ボトムアップ方式において UN GHS 区分外物質を検出する方法として有用であると考えられる。

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れ性および行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性：

本試験法は RhCE に対する化学物質の細胞毒性を指標に用いて眼刺激性を評価する試験法であり、生きた動物を用いないという点で、3Rs の精神に合致している。また、SkinEthic™ HCE/S の入手は容易で、短時間で安価に実施でき、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はない。したがって、入手した SkinEthic™ HCE/S が品質基準の許容範囲にあり、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、基本的な細胞培養の技術と設備を有する施設であれば実施可能であり、技術移転性は高い。以上より、本試験法の社会的受け入れ性は高い。

行政上の利用性：

本試験法は、化学物質による眼刺激性を評価でき、ボトムアップ方式において UN GHS 区分外物質を検出する方法として、行政的利用が可能であると考ええる。

なお、RhCE 法に EpiOcular™ または SkinEthic™ HCE/S 以外を用いる場合には、OECD TG492 の性能標準に記載された物質を用いて、その妥当性を確認しておく必要がある¹⁾。

参考文献

- 1) OECD (2017) Guideline for the testing of chemicals. 492, Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage.
- 2) 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.
- 3) JaCVAM 眼刺激性代替法資料編纂委員会：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) (平成29年(2017年)12月4日)
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) ESAC (2016) ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No. 2016-02 of 24 June 2016.