

眼刺激性試験代替法の評価会議報告書

In vitro 短時間曝露法
(The Short Time Exposure *In Vitro* Test Method: STE 法)

JaCVAM 評価会議

平成 27 年 (2015 年) 12 月 18 日

JaCVAM 評価会議

- 大野泰雄 (運営委員会推薦) : 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 病理部)
- 岩瀬裕美子 (日本製薬工業協会)
- 金子和弘 (日本化学工業協会)
- 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)
- 谷川浩子 (日本動物実験代替法学会)
- 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)
- 牧 栄二 (日本免疫毒性学会)
- 森田 健 (日本環境変異原学会)
- 山田隆志 (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
- 横関博雄 (日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会)
- 吉田武美 (日本毒性学会)
- 吉村 功 (座長推薦)

任期：平成 26 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

In vitro 短時間曝露法 (The Short Time Exposure *In Vitro* Test Method : STE 法) は、ウサギを用いた Draize 眼刺激性試験法の代替試験法であり、ウサギ角膜由来の上皮細胞株 (SIRC 細胞) 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る。トップダウン方式において重篤な眼の損傷を起こす物質 (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals: UN GHS 区分 1) を検出する方法、およびボトムアップ方式において眼刺激性物質とは分類されない物質 (UN GHS 区分外) を検出する方法¹⁾ としてバリデーションが行われ、2015 年に OECD TG491 として採択された²⁾。JaCVAM 評価会議は、この TG491 の妥当性について検討した。

1. 試験法の定義

名称： *In vitro* 短時間曝露法 (The Short Time Exposure *In Vitro* Test Method : STE 法)

代替する対象毒性試験： Draize 眼刺激性試験

試験法の概略：

コンフルエントになるように単層培養した SIRC 細胞に被験物質希釈液を 5 分間曝露した後、細胞を洗浄し、その後、MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) の取り込み量で測定した細胞生存率を指標に用いる。これは MTT がミトコンドリア内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 が還元され、生成するホルマザン量が生存細胞数に比例することを利用して (MTT 還元法)。

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、眼の刺激性は角膜や結膜の細胞傷害から始まる。本試験法はこれに注目して、角膜上皮細胞に対する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。眼に溶液が入った場合、ヒトではその大部分が 1~2 分で眼内から排出され、ウサギでは 3~4 分で 80% が排出されると報告されている³⁾。このような実際の曝露状況を考慮して、本試験法は通常の細胞毒性試験と比べて短時間曝露の試験として設計されている。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。

本試験法は日本動物実験代替法学会⁴⁾ と JaCVAM⁵⁾ のバリデーション試験を経て、トップダウン方式において UN GHS 区分 1 物質を検出する方法および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 ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)/NICEATM (National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) により第三者評価を受け、その報告書が 2013 年 6 月に公表された⁶⁾。その後、2015 年 7 月に OECD によりトップダウン・ボトムアップ両方式で利用できる眼刺激性試験代替法として TG491 が採択された²⁾。

ICCVAM/NICEATMによるトップダウン方式の正確性の検討には125物質が、ボトムアップ方式の正確性の検討には130物質が用いられ、十分な数がICCVAM/NICEATMにより第三者評価委員会により評価されている。JaCVAM眼刺激性試験資料編纂委員会は、それらの資料を用いて本試験法を評価しており、妥当である。

3. 本試験法の有用性と適用限界

本試験法のバリデーションの結果、トップダウン方式の偽陽性率は1.2%、ボトムアップ方式の偽陰性率は、適用限界を考慮しない場合12.3% 考慮する場合1.9%という優れた値である。

本試験法は、短時間で安価に実施でき、使用細胞は公的な細胞バンクから入手可能であり、特殊な機材や試薬を必要としないことから、基本的な細胞培養の技術と設備を持っている施設であれば実施可能であり、技術移転性は高い。2つのプレバリデーション試験^{7,8)}においても技術移転性についての問題は指摘されていないが、OECDのガイドラインに示された熟達度確認物質^{2,9)}を用いて、実施する試験施設へ適切な技術移転が達成できたことを確かめる必要がある。

本試験法には試験の性質と正確性の観点から以下の制限が設けられている。

- 1) 生理食塩水、5% (w/w) DMSOを含む生理食塩水、およびミネラルオイルのいずれにも溶解しない、あるいはそれら溶媒中で均一分散している状態が5分以上保たれない物質は適用不可能である。
- 2) ボトムアップ方式で単一物質に適用する場合、蒸気圧が6 kPaを超える物質および界面活性剤ではない固体は、高い偽陰性率を示すことから、適用可能物質から除外される。固体混合物に適用する場合は、界面活性剤のみから構成される物質は対象にするが、それ以外の物質は除外する。また、蒸気圧が6 kPaを超える物質を含む混合物に適用する場合は、眼刺激性が過小評価される可能性があるので注意する必要がある。
- 3) トップダウン方式で単一物質に適用することには制限がなく、バリデーションデータは限られてはいるものの、混合物質への適用にも制限がない。

以上の点から、TG491に準拠して実施した場合、トップダウン方式において重篤な眼の損傷を起こす（すなわち、UN GHS 区分1）物質を検出する方法、およびボトムアップ方式において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有用である。

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：

本試験法はウサギ角膜由来の上皮細胞株（SIRC細胞）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、短時間で安価に実施でき、使用細胞の入手は容易であり、特殊な機材や試薬を必要としないことか

ら、基本的な細胞培養の技術と設備を持ってい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、本試験法は社会的受け入れ性が高い。

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、トップダウン方式において重篤な眼の傷害を起こす物質（UN GHS 区分 1）物質を検出する方法、ならびにボトムアップ方式において眼刺激性物質とは分類されない物質（UN GHS 区分外）を検出する方法として、行政的利用が可能である。

参考文献

- 1) Scott, L., et al. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol in Vitro*, 24(1): 1-9.
- 2) OECD (2015) Test Guideline 491. Short Time Exposure *in vitro* test method for identifying i) Chemicals inducing serious eye damage and ii) Chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage.
- 3) Mikkelsen TJ, et al. (1973). Altered bioavailability of drugs in the eye due to 34 drug-protein interaction. *J. Pharm. Sci.* 1648-1653.
- 4) Sakaguchi et al. (2011) Validation study of the Short Time Exposure (STE) test to assess the eye irritation potential of chemicals. *Toxicol. In Vitro*, 25(4): 796-809.
- 5) Kojima et al. (2013) Second-phase validation study of the short time exposure test for assessment of eye irritation potency of chemicals. *Toxicol. In Vitro*, 27(6): 1855-1869
- 6) ICCVAM (2013) Short Time Exposure (STE) test method, Summary review document.
- 7) Takahashi et al. (2009) Inter-laboratory study of short time exposure (STE) test for predicting eye irritation potential of chemicals and correspondence to globally harmonized system (GHS) classification. *J Toxicol Sci*, 34(6): 611-626.
- 8) Takahashi et al. (2010) An interlaboratory study of the short time exposure (STE) test using SIRC cells for predicting eye irritation potential. *J. Cutan. Ocul. Toxicol.*, 29(2): 77-90.
- 9) JaCVAM 眼刺激性代替法資料編纂委員会：OECD TG491 *in vitro* 短時間曝露法（The Short Time Exposure *In Vitro* Test Method：STE法）評価報告書（2015年9月29日）

