

# 眼刺激性試験代替法の評価会議報告書

再構築ヒト角膜様上皮モデル法

(Reconstructed Human Cornea-like Epithelium Test Method: RhCE 法)

JaCVAM 評価会議

平成 28 年（2016 年）7 月 5 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)  
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)  
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

### 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)  
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)  
森田 健 (日本環境変異原学会)  
横関 博雄 (日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会)

任期：平成 28 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 眼刺激性試験法の代替法として、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。

ボトムアップ方式において United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS) 区分外物質を検出する方法としてバリデーションが行われ<sup>1)</sup>、2015 年に OECD TG492 として採択された<sup>2)</sup>。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評価報告書」<sup>3)</sup>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)

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 (Reconstructed human Cornea-like Epithelium: RhCE) 組織を用いた眼刺激性試験である。RhCE 法の一つである EpiOcular<sup>TM</sup> を用いる眼刺激性試験法 (EpiOcular<sup>TM</sup> 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 6 時間、ヒト角膜様上皮構造を有する組織に曝露した後、MTT の取り込み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、生成されたホルマゼン量 (青色) は生存細胞数に比例することに基づいている (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、ヒトの角膜上皮様構造を有する RhCE 組織 (EpiOcular<sup>TM</sup>) 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。

EpiOcular<sup>TM</sup> EIT については、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試験<sup>1)</sup>が行われた。その試験では、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。バリデーション試験は、コード化された 107 物質について行われた。その後プロトコルの最適化を行って、新たな固体 8 物質を追加し、115 物質で評価された。

EpiOcular™ EIT は、再現性も正確性も EURL ECVAM バリデーション運営委員会の定めた基準を満たしており、さらに ESAC の第三者評価<sup>4)</sup>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 により試験ガイドラインに採択された (TG492)<sup>2)</sup>。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、科学的に妥当であると考えます。

### 3. 本試験法の有用性と適用限界

EpiOcular™ は市販されており、米国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、特別な手技も必要ないことから技術移転性は高いと判断できる。バリデーション試験においても、参加施設の技術者に対して技術習得のためのトレーニングが行われた結果、技術移転性に問題がなかったことが確認されている。但し、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が TG492 に定められており、それらを用いて技術移転が達成できたことを確かめる必要がある。

UN GHS 区分外物質を検出する方法としての妥当性を調べるためのバリデーション試験において施設内再現性は、UN GHS 分類判定の施設ごとの施設内再現性は EURL ECVAM-CE バリデーション運営委員会が定めた基準 (85%以上) を満たしていた。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、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、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。

UN GHS 区分外物質を検出する方法として試験法の正確性に関しては、物質自体の色がホルマゼン定量での吸光度測定を妨げる 3 物質と、強い還元性物質 1 物質を除く 111 物質の結果を用いて評価が行われた。その結果、下記のように、液体物質のみの場合、固体物質のみの場合および液体物質・固体物質を含めた場合に分けて解析した場合のいずれにおいても、一致度、偽陰性率、偽陽性率はバリデーション運営委員会が定めた受け入れ基準<sup>1)</sup>を満たしていた。

EpiOcular™ EIT の正確性

	物質数	一致度(%)	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 <sup>1)</sup>	-	≥ 75	≤ 10	≤ 40

眼刺激性代替法資料編纂委員会の報告書 (表 1) より引用<sup>3)</sup>

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、あるいはホルマゼ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、TG492 の本文の説明および ANNEX II のフローチャート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) UN 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。

バリデーション試験に用いられた混合物の数は限られていたが、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）を用いて評価が行われた<sup>5)</sup>。結果は一致度 82%、偽陰性率 9%、偽陽性率 28%で、これら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ことから、混合物にも適用できる可能性がある。

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える。

#### 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 RhCE 組織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、EpiOcular™ 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ない。したがって、入手した EpiOcular™ 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、EpiOcular™ EIT 以外の RhCE 法を用いる場合には、OECD TG492 の性能標準に記載された物質を用いて<sup>6)</sup>、その妥当性を確認しておく必要がある。

参考文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) JaCVAM 眼刺激性代替法資料編纂委員会 : OECD TG492 ヒト角膜様上皮モデル法 (Reconstructed Human Cornea-like Epithelium Test Method: RhCE法)評価報告書 (2016年1月25日)
- 4) 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.
- 5) Kolle SN et al. (2015) The EpiOcular™ eye irritation test is the method of choice for the *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.
- 6) 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