

評価報告書

再構築ヒト角膜様上皮モデル法 (RhCE 法) LabCyte CORNEA-MODEL24 眼刺激性試験 (LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT)

眼刺激性試験資料編纂委員会

平成 30 年 (2018 年) 12 月 27 日

眼刺激性試験資料編纂委員会

山本 直樹 (藤田医科大学)
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

EIT: Eye Irritation Test

ESAC: EURL ECVAM Scientific Advisory Committee

GHS: Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals

JaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods

OD: Optical Density

OECD: Organization for Economic Co-operation and Development

RhCE: Reconstructed human Cornea-like Epithelium

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate

TG: Test Guideline

UN: United Nations

VRM: Validated Reference Method

WST: Water Soluble Tetrazolium Salt

要旨

再構築ヒト角膜様上皮モデル（Reconstructed human Cornea-like Epithelium: 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 TG492 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。LabCyte CORNEA-MODEL24 眼刺激性試験（LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT）は RhCE 法の一つで、2018 年に改訂 TG492 に追加された試験法である。本報告では、LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT のバリデーション研究報告書、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 眼刺激性試験資料編纂委員会の意見をまとめた。

LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT の信頼性・正確性を確認するため、OECD の性能標準（Performance Standard）で指定されている 30 の参照物質（Reference Chemicals）を用いて 3 施設で追走的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 回試験を行った。この追走的バリデーション研究において LabCyte CORNEA-MODL24 EIT の施設内再現性はそれぞれの施設で 93%、97%、100%、また、施設間再現性は 87%であった。正確性は、感度 97.8%、特異度 68.9%、正確度 83.5%であった。これら再現性、正確性の値は、性能標準が定めた基準を満たしていた。

以上より、本委員会は、LabCyte CORNEA-MODEL24 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

再構築ヒト角膜様上皮モデル（Reconstructed human Cornea-like Epithelium: RhCE）法は、RhCE 組織に対する被験物質の細胞毒性を指標に眼刺激性を評価する試験法で、ボトムアップ方式により UN GHS 区分外物質を検出する。

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™ Human Corneal Epithelium Eye Irritation Test: SkinEthic™ HCE EIT）は 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 OECD TG492 に記載されている¹⁾。また、OECD は新規 RhCE 組織を用いた試験法（me-too 試験法）に対してその構造・機序が VRM と同等であり十分な信頼性と関連性を備えていることを評価する性能標準（Performance Standard）を定めた²⁾。LabCyte CORNEA-MODEL24 眼刺激性試験（LabCyte CORNEA-MODEL24 Eye Irritation Test: LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT）は me-too 試験法として、OECD の性能標準で指定されている 30 の参照物質（Reference Chemicals）を用いた 3 施設で追及的バリデーション研究³⁾、JaCVAM の第三者評価⁴⁾を経て 2018 年に TG492 に記載された¹⁾。

本報告書は LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT のバリデーション研究報告書、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損傷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。

LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT は、ヒト角膜上皮細胞を重層培養した市販の RhCE 組織（LabCyte CORNEA-MODEL24）を用いる⁵⁾。被験物質が液体の場合は約 1 分間、固体の場合は約 24 時間、被験物質を LabCyte CORNEA-MODEL24 に曝露した後、WST-8 法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、細胞内の脱水素酵素の働きにより電子メディエーターの存在下で WST-8（2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt, CAS No.193149-74-5）が還元されて生成される橙色ホルマザン量が生存細胞数に比例することを基本原理としている⁶⁾。細胞生存率が陰性対照と比較して 40%を超えた場合、被験物質は UN GHS 分類において区分外であると判定する。

4. 試験手順

LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT の手順を以下に示す。詳細は、改訂 TG492¹⁾およびプロトコル⁷⁾を参照する。使用する RhCE 組織 LabCyte CORNEA-MODEL24 は株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング（J-TEC、日本）より購入できる。

4-1. RhCE 組織の機能的条件

LabCyte CORNEA-MODEL24 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 $0.5 \leq OD \leq 1.6$

(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 (25 μ L) の 60 分間曝露において $1.0 \leq IC_{50} \text{ (mg/mL)} \leq 4.0$

(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は背景データをもとに設定した許容値内にある

これら 4 項目は LabCyte CORNEA-MODEL24 の製造者の出荷基準として採用される。一方、LabCyte CORNEA-MODEL24 の使用者は生存率と再現性の 2 項目を確認する必要がある。

4-2. 被験物質の適用

物質あたり 3 RhCE 組織を用いる。被験物質は調製せず、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、LabCyte CORNEA-MODEL24 に 50 μ L を適用し、室温で 1 分間 (± 5 秒) 培養する。その後、 Ca^{2+}/Mg^{2+} 不含 Dulbecco リン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) の水流で 10 回あるいはそれ以上洗浄して被験物質を除去し、 24 ± 1 時間標準培養条件*で培養する。固体被験物質の場合、10 mg を均一に適用し、標準培養条件で 24 ± 1 時間培養する。その後、 Ca^{2+}/Mg^{2+} 不含 DPBS の水流で 10 回あるいはそれ以上洗浄して被験物質を除去する。洗浄後の培養は行わない。

同時陽性対照には液体被験物質の場合はエタノール (CAS No. 64-17-5)、固体被験物質の場合はラウリン酸 (CAS No. 143-07-7) が推奨される。同時陰性対照には液体被験物質の場合は Ca^{2+}/Mg^{2+} 不含 DPBS が推奨され、固体被験物質の場合は無処理を用いる。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 WST-8 法を用いる。洗浄・後培養 (液体のみ) 後、RhCE 組織を WST-8 溶液 (Cell Count Kit-8 溶液:アール平衡塩溶液= 1:10) 0.3 mL 中で 240 ± 15 分間標準培養条件下で反応させる。WST-8 溶液中のホルマザンの定量は OD 測定 ($OD_{450nm} - OD_{650nm}$) または HPLC/UPLC で行う。

被験物質が WST-8 還元物質の場合、あるいはホルマザンと同じような波長 (450 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。被験物質が WST-8 法を干渉する物質であるかどうかの事前検討とその場合の細胞生存率の補正の手順については TG 本文の説明および ANNEX V 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 $0.5 \leq OD \leq 1.6$ であること。
- 2) 陽性対照の平均細胞生存率が 40%以下であること。

* $37 \pm 2^{\circ}C$ 、 $5 \pm 1\%$ CO_2 、 $\geq 95\%$ 湿度

- 3) 被験物質および陰性・陽性対照のそれぞれにおいて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. 判定

被験物質の平均細胞生存率が 40%を超えた場合、被験物質は UN GHS 区分外と判断される。平均細胞生存率が 40%以下の場合、その結果のみでは被験物質の眼刺激性の予測はできない。本試験法では偽陽性の可能性があり、また UN GHS 区分 1 と区分 2 を区別できない。その場合は、被験物質の眼刺激性を分類するには追加の情報が必要となる。

各組織の測定値での判定が一致しない、平均細胞生存率が $40 \pm 5\%$ の範囲にある等、得られた結果がボーダーラインの場合は 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。

表 1. VRM と LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT の主な項目の比較

	EpiOcular™ IET (VRM1)	SkinEthic™ HCE EIT (VRM2)	LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT
RhCE 組織の由来	ヒト表皮角化細胞	ヒト不死化角膜上皮細胞	ヒト角膜上皮細胞
曝露量	50 μ L または 50 mg (0.6 cm ²)	30 μ L または 30 mg (0.5 cm ²)	50 μ L または 10 mg (0.3 cm ²)
曝露時間	30 分 (液体)、6 時間 (固体)	30 分 (液体)、4 時間 (固体)	1 分 (液体)、24 時間 (固体)
陽性・陰性対照	陽性：酢酸メチル 陰性：超純水	陽性：酢酸メチル 陰性：Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 不含 DPBS	陽性：エタノール (液体)、 ラウリン酸 (固体) 陰性：Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 不含 DPBS (液体)、 無処理 (固体)
生存率測定	MTT 法	MTT 法	WST-8 法
UN GHS 区分外判定基準 (平均細胞生存率)	>60%	>60% (液体)、>50% (固体)	>40%

5. 追走的バリデーション研究

開発者の J-TEC (リードラボ) とは異なる 3 施設 (株式会社薬物安全性試験センター、日本コルマー株式会社、富士フィルム株式会社) で LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT の追走的バリデーション研究が行われた³⁾。これら 3 施設は追走的バリデーション研究の前に技術移転性の確認を行った総当たり試験に参加した施設である⁸⁾。被験物質には OECD の性能標準で指定されている 30 の参照物質を用いた (Appendix 1)。試験はすべての被験物質について 3 施設でそれぞれ 3 回実施された。

5-1. 試験法の信頼性

5.1.1. 技術移転性

技術移転性については、追走的バリデーションの実施前に行われた 24 施設が参加した総当たり試験

で検討され、良好な結果が得られている⁸⁾。

5-1-2. 施設内再現性

UN GHS 分類判定の施設ごとの施設内再現性は 93%、97%、100%であった。これらの値は OECD の性能標準が定めた基準（90%以上）を満たした³⁾。

なお、リードラボである J-TEC の社内データ（139 物質）では、施設内再現性は 97%であった⁸⁾。

5-1-3. 施設間再現性

UN GHS 分類判定の施設間再現性は 87%であった。この値は OECD の性能標準が定めた基準（85%以上）を満たした³⁾。

5-2. 試験法の正確性

正確性の評価には、3施設で行われた全試験のデータを用いた。その結果、感度 97.8%、特異度 68.9%、正確度 83.5%であった。これらの値は OECD の性能標準が定めた基準（感度 90%以上、特異度 60%以上、正確度 75%以上）を満たした³⁾。

なお、リードラボである J-TEC の社内データ（139 物質）では、感度 100.0%、特異度 73.0%、正確度 87.8%であった⁸⁾。

6. 試験法の適用範囲

TG492 は、試験法の適正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) 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。

7. 本委員会の結論

LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT の追走的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 OECD の性能標準が定めた基準を満たしていた。

LabCyte CORNEA-MODEL24 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技術習得がガイドラインの習熟度確認物質(Appendix2)で確かめられていれば、LabCyte CORNEA-MODEL24 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。

8. 文献

- 1) 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.
- 2) OECD (2015) Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Eye Hazards, Series on Testing & Assessment No. 216
- 3) LabCyte Validation Management Team (2017) Me-too Validation Report: Validation Study for LabCyte CORNEA-MODEL24 Eye Irritation Test (Version. 3.0), JaCVAM
- 4) Peer Review Panel (2017) Validation status of the LabCyte CORNEA-MODEL24 EYE IRRITATION TEST, Report of the Peer Review Panel on a JaCVAM co-ordinated study programme addressing the validation status of LabCyte CORNEA-MODEL24 EYE IRRITATION TEST for discriminating eye irritant from non eye irritant substances
- 5) Katoh, M et al (2013) Establishment of a new *in vitro* test method for evaluation of eye irritation using a reconstructed human corneal epithelial model, LabCyte CORNEA-MODEL, Toxicol. in Vitro 27, 2184
- 6) Ishiyama, M. et al (1997) A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability, Talana 44, 1299
- 7) Japan Tissue Engineering Co., Ltd. (2017) *In Vitro* Eye Irritation Test Using Human Corneal Tissue Model: LabCyte CORNEA-MODEL24 (Version. 2.5.6), JaCVAM
- 8) Katoh, M et al (2017) Background Review Document: New Established *In Vitro* Eye Irritation Test Method using Reconstructed Human Corneal Epithelium, LabCyte CORNEA-MODEL24 (Version 2.2), JaCVAM

Appendix 1

追走的バリデーションに用いられた参照物質

物質名	CAS 番号	性状	UN GHS 分類
(Ethylenediaminepropyl)-trimethoxysilane	1760-24-3	液体	区分 1
Methylthioglycolate	2365-48-2	液体	区分 1
Tetraethylene glycol diacrylate	17831-71-9	液体	区分 1
1,2-Benzisothiazol-3(2H)-one	2634-33-5	固体	区分 1
2,5-Dimethyl-2,5-hexanediol	110-03-2	固体	区分 1
Disodium 2,2'-([1,1'-biphenyl]-4,4'-diyldivinylene)bis- (benzenesulphonate)	27344-41-8	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
gamma-Butyrolactone	96-48-0	液体	区分 2A
1,5-Naphthalenediol	83-56-7	固体	区分 2A
Sodium benzoate	532-32-1	固体	区分 2A
2-Methyl-1-pentanol	105-30-6	液体	区分 2B
Diethyl toluamide	134-62-3	液体	区分 2B
1,4-Dibutoxy benzene	104-36-9	固体	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	342573-75-5	液体	区分外
2-Ethoxyethyl methacrylate	2370-63-0	液体	区分外
3-Phenoxybenzyl alcohol	13826-35-2	液体	区分外
4-(Methylthio)-benzaldehyde	3446-89-7	液体	区分外
Dipropyl disulphide	629-19-6	液体	区分外
Ethyl thioglycolate	623-51-8	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	区分外
1-(4-Chlorophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl) urea	101-20-2	固体	区分外
2,2'-[[3-Methyl-4-[(4-nitrophenyl)azo]-phenyl]imino]bis-ethanol	3179-89-3	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
4,4'-Methylene bis-(2,6-di-tert-butylphenol)	118-82-1	固体	区分外
Cellulose, 2-(2-hydroxy -3-(trimethylammonium) propoxy) ethyl ether chloride (91%)	68610-92-4	固体	区分外
Potassium tetrafluoroborate	14075-53-7	固体	区分外
Trisodium mono-(5-(1,2-dihydroxyethyl)-4-oxido-2-oxo-2,5-dihydro-furan-3-yl) phosphate	66170-10-3	固体	区分外

Appendix 2

RhCE 法の習熟度確認物質

物質名	CAS 番号	性状	UN 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