

評価報告書

眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS:TEA 法

眼刺激性試験資料編纂委員会

令和3年(2021年)5月6日

眼刺激性試験資料編纂委員会

山本直樹（委員長：藤田医科大学）

佐々木正治（アレクシオンファーマ合同会社）

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）

山下晴洋（大正製薬株式会社）

* : SIRC-CVS Test Method の peer review panel

略語

CVS:	Crystal Violet Staining
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
EIT:	Eye Irritation Test
GHS:	Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
IC50:	Half maximal (50%) Inhibition Concentration
JaCVAM:	Japanese Center for the Validation of Alternative Methods
OECD:	Organisation for Economic Co-operation and Development
PBS(-):	Ca ²⁺ /Mg ²⁺ free Phosphate-Buffered Saline
PRP:	Peer Review Panel
SIRC:	Statens Seruminstitut Rabbit Cornea
SDS:	Sodium Dodecyl Sulfate
TEA:	Triethanolamine
TG:	Test Guideline
UN:	United Nations

要旨

SIRC-CVS法は、ウサギ角膜由来細胞(SIRC細胞)を用いて、クリスタルバイオレットが細胞膜を透過して生体高分子を染色する性質を利用した細胞毒性を測定する試験法である。本試験法は、株式会社資生堂により、トリエタノールアミン(TEA)を比較対照物質として、ボトムアップ方式で国際連合化学品の分類および表示に関する世界調和システム(UN GHS)区分に該当しない化学物質を検出することができる方法であるSIRC-CVS:TEA法として改定され、JaCVAMによるバリデーション研究が実施された。本報告書では、SIRC-CVS:TEA法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。

SIRC-CVS:TEA法の信頼性を確認するため、バリデーション研究が行われた。この研究において、20物質を用いて3施設の施設内再現性はすべての施設で100%、また、30物質を用いた3施設での施設間再現性は90%であり、いずれの再現性もバリデーション実行委員会の定めた80%の基準を満たした。一方、正確性は、116物質を用いてバリデートされ、正確度55.2%、感度60%、特異度47.8%であった。この値は行政的利用を目指す試験法にとって十分なものではなく、予測性を改良するため、種々の適用除外物質の検討が開発者により提案された。しかし、長年にわたる検討を経ても、開発者と第三者評価委員会(PRP)の間で科学的に十分な説明がつく適用除外に合意ができず、予測性の適切な改善には至らなかった。

以上より、本委員会においても、PRPの見解同様、SIRC-CVS:TEA法はボトムアップ方式でUN GHS区分に該当しない化学物質を検出する方法として、行政的に用いることは相応しくないと結論した。

キーワード：眼刺激性試験、代替法、細胞毒性、*in vitro*、バリデーション

1. 緒言

SIRC-CVS 法は、板垣らにより開発されたウサギ角膜由来細胞(SIRC 細胞)の細胞毒性を指標として、クリスタルバイオレット染色(CVS)により細胞生存率を測定し、化学物質の眼刺激性を評価する試験法であり^{1,2)}、1990年代に厚生科学研究にて化粧品原料のみを対象にバリデーション研究が行われた³⁻⁶⁾。本試験法を用いて「代替法を用いて化粧品原料の眼刺激性を評価するにあたっての指針」も作成されている⁷⁾。

細胞毒性を指標として用いた眼刺激性試験として、短時間曝露法が OECD TG491⁸⁾に、3次元培養角膜モデルを用いた EpiOcularTM 眼刺激性試験(EIT)、SkinEthicTM EIT、LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT および MCTT HCETM EIT が OECD TG492 に記載されている⁹⁾。これらの方法は、ボトムアップ方式で UN GHS 区分に該当しない化学物質を検出する方法として公定化されている。

SIRC-CVS 法も上記の細胞毒性を指標とする方法同様、ボトムアップ方式により国際連合化学品の分類および表示に関する世界調和システム(UN GHS)区分に該当しない化学物質を検出することができる方法として、株式会社資生堂によって TEA を比較対照物質として用いた SIRC-CVS:TEA 法に改定され¹⁰⁾、JaCVAM によりバリデーション研究が実施された。

本報告書では、SIRC-CVS:TEA 法のバリデーション研究報告書¹¹⁾、第三者評価報告書(Annex 1)¹²⁾、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ものである。

2. 試験法の原理

CVS 法はクリスタルバイオレット(CV)が細胞膜を透過して生体高分子を染色する性質を利用した細胞毒性を測定する試験法である。CVS 法は多くの細胞に適用でき、得られる結果も比較的安定しているため、細胞毒性の簡易試験法として用いられている。細胞毒性試験は角膜の障害を予測することを想定しており、バリデーション研究報告書¹¹⁾の introduction では“Cytotoxicity is considered a useful index of the eye irritation potency of various substances, as the corneal damage that has a greater impact on the total eye irritation is related to damage of the corneal epithelium cell¹³⁾”、また、大野によると Draize 試験から得られる情報と代替法から得られる情報を分類し、細胞毒性は角膜上皮細胞の変性、剥離の情報と対応するとされている⁷⁾。

3. 試験手順

SIRC-CVS:TEA 法の手順を以下に示す。

3-1. SIRC 細胞の培養、継代と細胞浮遊液の調製

- 1) SIRC 細胞は培養液(10% FBS:Fetal Bovine Serum を含む MEM:Minimum Essential Medium)を用い、37℃、5% CO₂ インキュベータで培養される。
- 2) SIRC 細胞の継代はまず培養フラスコから培養液を取り除き、さらにトリプシン阻害剤となる血清を充分取り除くため、PBS(-) 10 mL で細胞表面を 2 回洗浄する。
- 3) PBS(-)を除去した後、0.25% Trypsin 液(1.5-2 mL)を細胞表面の全体に行き渡るよ

う加える(2-10秒程度)。

- 4) 0.25% Trypsin 液を吸い取った後、細胞を剥離させるために 37°C で 2~3 分間インキュベートし、フラスコの細胞接着面裏から軽くタップする。剥離後、適量の培養液を加えた後、十分なピペッティングにより単細胞化させ均等な細胞浮遊液を調製する。細胞数を計測し、培養液にて $6\sim 8 \times 10^5$ cells/mL に調製する。1 mL の細胞 ($6\sim 8 \times 10^5$ cells) を 15~30 mL の培養液に加え継代する。
- 5) 実験開始の際には、細胞数を計測し、培養液にて 2×10^5 cells/mL に調製する。

3-2. 被験物質の適用

- 1) PBS(-)、陰性対照物質、並びに被験物質、陽性対照物質、比較対照物質の希釈系列(100 μ L/well)を図 1 に示すように 96 穴マイクロプレート内に作製する。溶媒は培養液、10,000 μ g/mL DMSO 培養液溶液または 10,000 μ g/mL Ethanol 培養液溶液を用いる。陰性対照物質は、被験物質を溶解させた溶媒を用いる。陽性対照物質として SDS を用いる。比較対照物質として TEA を用いる。対照物質の溶媒には培養液を用いる。被験物質の最高適用濃度は 10,000 μ g/mL とし、溶解または均一に懸濁させるために必要に応じて 5,000 μ g/mL とする。それでも均一に懸濁しないものは試験に不適な物質と判断する。SDS および TEA はそれぞれ 1,000 μ g/mL と 10,000 μ g/mL とする。被験物質、および陽性対照物質、比較対照物質は公比 2 で 8 段階に調整する。
- 2) 2×10^5 cells/mL の細胞浮遊液を 0.1 mL、図 2 に示すウェルに添加する。
- 3) 被験物質が揮発し周囲のウェルへ影響を与える可能性を考慮し、ウェルを覆うマイクロプレートシーリングテープを貼付する。さらに、ラップフィルムを用いることができる。なお、被験物質が他のウェルに影響を与えた場合には、希釈して試験することができる。
- 4) 添加した 96 穴マイクロプレートは細胞を培養床に均一に接着させるために、そのままクリーンベンチ内で静置(室温、20 分間)し、その後、CO₂ インキュベータ中に移す。
- 5) 約 72 時間、37°C、5% CO₂ 条件下で培養する。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS											
B	PBS	NC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	NC	PBS
C	PBS	NC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	NC	PBS
D	PBS	NC	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	NC	PBS
E	PBS	NC	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	NC	PBS
F	PBS	NC	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	NC	PBS
G	PBS	NC	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	NC	PBS
H	PBS											

PBS : PBS(-)を 200 μ L、NC : 培養液、10,000 μ g/mL DMSO 培養液溶液または 10,000 μ g/mL Ethanol 培養液溶液を 100 μ L、S : 被験物質の 2 倍希釈系列(100 μ L)、R : 比較対照物質の 2 倍希釈系列(100 μ L)、P : 陽性物質の 2 倍希釈系列(100 μ L)

図 1. 96 穴マイクロプレートのフォーマット

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
C		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
D		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
E		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
F		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
G		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
H												

■ : 細胞浮遊液(100 μ L)

図 2. 細胞浮遊液の添加

3-3. CVS

- 1) 培養期間終了後、96 穴マイクロプレートを手静かに反転し被験物質を含む培養液を捨てる。
- 2) PBS(-)を 200 μ L 添加し優しく攪拌した後、反転させ PBS(-)を捨てる。これを 2 回繰り返す。
- 3) 96 穴マイクロプレートの各ウェルに CV メタノール溶液を 100 μ L 分注し、30 分間染色する。
- 4) 染色時間が終了後、96 穴マイクロプレートを手静かに反転させ CV 溶液を捨て、十分に水洗する。ペーパータオル上にプレートを伏せ、水分を吸い取らせる。
- 5)十分に風乾した後、マイクロプレートリーダーを用いて各ウェルの吸光度(588 nm)を測定する。

3-4. IC50 の算出

被験物質を含まない陰性対照ウェルの細胞生存率を 100%とした場合における各ウェルの細胞生存率を吸光度から算出する。細胞生存率 50%を示す被験物質濃度(IC50)の算出にあたっては、細胞生存率 50%をはさむ 2 濃度とその濃度における細胞生存率から式 $\text{LogIC50} = [(50-y1)\log x2 - (50-y2)\log x1] / (y2-y1)$ を用いて算出する。(※記号は、被験物質濃度 $x1$ (低濃度側)、 $x2$ (高濃度側)におけるそれぞれの細胞生存率を $y1$ 、 $y2$ で示す。Log は常用対数である。)

被験物質の最高濃度である 5,000 μ g/mL で細胞生存率が 50%以下にならない場合は $\text{IC50} > 5,000 \mu\text{g/mL}$ とする。また、試験した最低濃度である 39.1 μ g/mL で細胞生存率が 50%未満の場合は、 $\text{IC50} < 39.1 \mu\text{g/mL}$ とする。

なお、表計算ソフト(Excel)において、細胞生存率を算出する段階以降で小数点以下 2 桁目を四捨五入する。

3-5. 評価

比較対照物質として TEA を用い、被験物質の眼刺激性を予測し、評価する。被験物質の IC50 が TEA の IC50 以上を陰性、TEA の IC50 未満を陽性と判定する。試験は 2 回を繰り返して行い、その結果に基づき評価する。2 回の評価結果が異なった場合には同様に 3 回目を実施し、2 回の同じ評価結果を採用し、その結果に基づき評価する。

なお、TEA は UNGHS 分類で眼刺激性に分類されない物質の中で、IC50 が高い参照物質としてバリデートされており、その結果から妥当な選択物質であると本委員会も考えている。本委員会は本物質が化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律(平成七年四月五日法律第六十五号)¹⁴⁾により第二種指定物質として指定されていることは把握しているものの、さまざまな化粧品の製造時に pH 調整剤として使用されていることから安全性上も利便上も問題ないと考える。

3-6. 品質基準

試験の精度管理を以下の 5 項目で行う。全ての項目で基準を満たすことを試験成立の要件とする。試験成立の要件を満たさない場合には該当プレートについて再試験を

行う。特に、揮発した物質の毒性により要件を満たさない場合には、被験物質の濃度を下げて試験を行う。

- 1) 陰性対照から得られる吸光度の絶対値は、各ウェルに播種した 2×10^4 個の細胞が 72 時間のアッセイ期間中に正常な増加を示しているか否かを表している。したがって、96 穴マイクロプレートに左右に設定した陰性対照の平均吸光度が 0.4 を上回ることを。
- 2) 標準的なプロトコルで試験された陽性対照 SDS の IC50 は 77.7~258.7 $\mu\text{g/mL}$ の範囲であること。
- 3) 標準的なプロトコルで試験された比較対照物質 TEA の IC50 は 1,000~2,500 $\mu\text{g/mL}$ の範囲であること。
- 4) 体系的に試験精度を見極めるために、96 穴マイクロプレートに左右に陰性対照を設定し、両者の吸光度が同様であることを確認する。左右の陰性対照の平均吸光度が全体の平均吸光度の $\pm 15\%$ 以内(平均値 $\pm 15\%$)に収まること。
- 5) 採用された 2 回の試験結果が同様であることを確認するために、2 試験間の誤差を確認することが必要である。したがって、2 試験間での陽性対照の IC50 値が ± 2 倍以内(高値/低値 ≤ 2)に収まること。

4. バリデーション研究

バリデーション報告書に示すようなバリデーション実行委員会(VMT)を組織し、開発者とは異なる 3 施設(日本コルマー株式会社: Lab A、株式会社ボゾリサーチセンター: Lab B、Biotoxtech Co., Ltd, Seoul, : Lab C)の協力を得て、SIRC-CVS:TEA 法のバリデーション研究が行われた³⁾。これら 3 施設はバリデーション研究の開始前に開発者からビデオで試験手順の説明を受けた後、技術移転性を確認した。

4-1. 試験法の信頼性

4-1-1. 技術移転性

技術移転性については、プレバリデーション研究(Phase I)にて評価した。3 施設によるコード化していない 4 物質(Ethyl-2-methyl acetoacetate, Safflower oil, 3-Chloropropionitrile, Sodium dehydroacetate)、陽性対照物質および比較対照物質を用いた試験が行われ、プロトコルの妥当性が確認された³⁾。その結果、表 1 に示すように、すべての施設で一致した結果が得られた。なお、Lab A の 1 回目の結果は、他の施設と一致しなかった。調査の結果、被験物質の希釈法が不適切であったことが判明し、再試験を行ったところ、他施設と同様の結果となった。この結果から、プロトコルに大きな改訂の必要はなく、順守すれば、適切な結果が得られることが明らかになった。

表 1. SIRC-CVS:TEA 法バリデーション研究 Phase I の結果

Chemical Code	Name of test substances	Laboratory A			Laboratory A (Retest)			Laboratory B			Laboratory C			GHS Category
		Run 1	Run 2	Run 3	Run 1	Run 2	Run 3	Run 1	Run 2	Run 3	Run 1	Run 2	Run 3	
P1-001	Ethyl-2-methyl acetoacetate	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	2
P1-002	Safflower oil	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	No
P1-003	3-Chloropropionitrile	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	2
P1-004	Sodium dehydroacetate	P	N	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	No

* N: Negative, P: Positive

4-1-2. 施設内再現性

SIRC-CVS:TEA 法の施設内再現性は、バリデーション研究 Phase II の 20 物質を用いて 3 施設で実施された。その結果、表 2 に示すように、SIRC-CVS:TEA 法の施設内再現性はすべての施設で 100%となり、バリデーション実行委員会の定めた基準(80%)を満たした。

表 2. SIRC-CVS:TEA 法バリデーション研究 Phase II の施設内再現性結果

Chemical code	Name of test substance	Set	Laboratory A			Laboratory B			Laboratory C			Final Evaluation	GHS Category
			Run 1	Run 2	Run 3	Run 1	Run 2	Run 3	Run 1	Run 2	Run 3		
P2-001	Piperonylbutoxide	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	No
		2	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
		3	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
P2-002	2,5-Dimethylhexaediol	1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1
		2	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
		3	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
P2-003	1-(2-Propoxy-1-methylethoxy)-2-propanol	1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	2B
		2	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
		3	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
P2-004	Ammonium nitrate	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	2A
		2	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
		3	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
P2-005	Potassium tetrafluoroborate	1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	No
		2	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
		3	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
P2-006	3,4,4'-Trichlorocarbanilide	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	No
		2	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
		3	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
P2-007	1-Bromohexane	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	No
		2	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
		3	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
P2-008	4,4'-Methylenebis(2,6-di-tert-butylphenol)	1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	No
		2	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
		3	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
P2-009	Propylene glycol propyl ether	1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	2A
		2	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
		3	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
P2-010	Ethyl thioglycolate	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	No
		2	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
		3	P	P	P	P	P	P	P	P	P		

Chemical code	Name of test substance	Set	Laboratory A			Laboratory B			Laboratory C			Final Evaluation	GHS Category
			Run 1	Run 2	Run 3	Run 1	Run 2	Run 3	Run 1	Run 2	Run 3		
P2-011	Sodium oxalate	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
		2	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
		3	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
P2-012	2-Phospho-L-ascorbic acid trisodium salt	1	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	No
		2	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
		3	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
P2-013	1-Bromo-4-chlorobutane	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	No
		2	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
		3	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
P2-014	Sodium hydrogensulfite	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	No
		2	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
		3	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
P2-015	Isobutyraldehyde	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	2B
		2	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
		3	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
P2-016	1-Naphthaleneacetic acid	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
		2	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
		3	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
P2-017	Propyl 4-hydroxybenzoate	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	No
		2	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
		3	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
P2-018	Ethyl 2,6-dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropionate	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	2B
		2	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
		3	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
P2-019	Camphene	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	2B
		2	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
		3	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
P2-020	Cyclopentanol	1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	2A
		2	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
		3	N	N	N	N	N	N	N	N	N		

*N: Negative, P: Positive

4-1-3. 施設間再現性

Phase II の 20 物質および Phase III の 10 物質、合計 30 物質を用いて 3 施設で施設間再現性が確認された。表 3 に示すように、Phase II の 20 物質ではすべての施設で施設間再現性が一致した。さらに追加して、Phase III の 10 物質で施設間再現性を確認したところ、表 4 に示すように、3 物質で不一致があった。P3-010 (n,n-Dimethylguanidine sulfate) および P3-012 (Polyethylene hydrogenated castor oil (40E.O.)) はいずれの施設でも同様の濃度依存性であったが、3 施設で結果が一致しなかった。P3-003 (Dipropyl disulfide) の濃度依存性は施設間で異なっていた。その原因は溶媒の選択による溶解性の差とバリデーション実行委員会は判断した。用いた溶媒が Lab A で 培養液、Lab B で Ethanol および Lab C が DMSO であったことによる。

結果として、施設間再現性は 90% となり、バリデーション実行委員会の定めた基準 (80%) を満たした。なお、一致しなかった物質を予測性の評価に用いる場合には、多数決の結果を用いることがバリデーション実行委員会により決定した。

表 3. SIRC-CVS:TEA 法バリデーション研究 Phase II の施設間再現性結果

Chemical code	Name of test substance	Laboratory A	Laboratory B	Laboratory C	Inter-laboratory reproducibility
P2-001	Piperonylbutoxide	P	P	P	1
P2-002	2,5-Dimethylhexaediol	N	N	N	1
P2-003	1-(2-Propoxy-1-methylethoxy)-2-propanol	N	N	N	1
P2-004	Ammonium nitrate	P	P	P	1
P2-005	Potassium tetrafluoroborate	N	N	N	1
P2-006	3,4,4'-Trichlorocarbamilide	P	P	P	1
P2-007	1-Bromohexane	P	P	P	1
P2-008	4,4'-Methylenebis(2,6-di-tert-butylphenol)	N	N	N	1
P2-009	Propylene glycol propyl ether	N	N	N	1
P2-010	Ethyl thioglycolate	P	P	P	1
P2-011	Sodium oxalate	P	P	P	1
P2-012	2-Phospho-L-ascorbic acid trisodium salt	N	N	N	1
P2-013	1-Bromo-4-chlorobutane	P	P	P	1
P2-014	Sodium hydrogensulfite	P	P	P	1
P2-015	Isobutyraldehyde	P	P	P	1
P2-016	1-Naphthaleneacetic acid	P	P	P	1
P2-017	Propyl 4-hydroxybenzoate	P	P	P	1
P2-018	Ethyl 2,6-dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropionate	P	P	P	1
P2-019	Camphene	P	P	P	1
P2-020	Cyclopentanol	N	N	N	1

*1: N: Negative, P: Positive

*2: 1: The results from all three laboratories were concordant

表 4. SIRC-CVS:TEA 法バリデーション研究 Phase III の施設間再現性結果

Chemical code	Name of test substance	Laboratory A	Laboratory B	Laboratory C	Inter-laboratory reproducibility
P3-003	Dipropyl disulfide	P	P	N	0
P3-005	2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol	N	N	N	1
P3-010	n,n-Dimethylguanidine sulfate	N	P	N	0
P3-012	Polyethylene hydrogenated castor oil (40E.O.)	N	P	N	0
P3-019	Diethyl toluamide	P	P	P	1
P3-020	4-Nitrobenzoic acid	N	N	N	1
P3-024	2-Amino-3-hydroxy pyridine	P	P	P	1
P3-028	Tetraethylene glycol	P	P	P	1
P3-029	Dodecanoic acid	P	P	P	1
P3-033	gamma-Butyrolactone	N	N	N	1

*1: N: Negative, P: Positive

*2: 1: All laboratories' judge agreed, 0: Only two laboratories' judge agreed

4.2. 試験法の正確性

正確性は、表 5 に示すように、Phase II の 20 物質と Phase III の 96 物質、合計 116 物質を用いて評価された。Phase III では当初、100 物質を用いて実施され、各施設にそのうちの 40 物質が配布され、データが取得された。しかしながら、P3-023 および P3-095 に物質の重複 (3,3-Dithiodipropionic acid) があり、それらの結果が一致していることから P3-023 のみの結果が解析に用いられた。また、P3-066 (Calcium thioglycolate trihydrate) は沈殿が生じて IC50 を計測できなかった。この試験法の技術的な限界と考えられた。さらに、P3-067 (Citric acid) および P3-068 (Potassium sorbate) については、個々の動物実験結果を見つけれなかった。よって、Phase III に用いられた 100 物質のうちこれら 4 物質が正確性の解析から削除され、最終的に 96 物質が正確性の評価に加えられた。結果として、表 6 に示すように、ボトムアップ方式での正確性は正確度 55.2%、感度 60.0%、特異度 47.8%であった。

表 5. SIRC-CVS:TEA 法バリデーション研究 Phase III の全結果

Chemical code	Laboratory	Name of test substance	Run 1	Run 2	Final Evaluation	GHS Category
P3-001	B	2-Ethoxyethyl methacrylate	P	P	P	No
P3-002	C	iso-Octylthioglycolate	N	N	N	No
P3-003	A/B/C	Dipropyl disulfide	P/P/N	P/P/N	P	No
P3-004	C	1-Bromo-octane	P	P	P	No
P3-005	A/B/C	2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol	N/N/N	N/N/N	N	No
P3-006	C	Diocetyl ether	P	P	P	No
P3-007	C	3-Phenoxybenzyl alcohol	P	P	P	No
P3-008	B	Glycidyl methacrylate	P	P	P	No
P3-009	C	2-Ethylhexylthioglycolate	N	N	N	No
P3-010	A/B/C	n,n-Dimethylguanidine sulfate	N/P/N	N/P/N	N	No
P3-011	C	6-Hydroxy-2,4,5-triaminopyrimidine Sulfate	P	P	P	No
P3-012	A/B/C	Polyethylene hydrogenated castor oil (40E.O.)	N/P/N	N/P/N	N	No
P3-013	C	2,2'-Methylene-bis-(6-(2Hbenzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol)	N	N	N	No
P3-014	C	Cellulose, 2-(2-hydroxy-3-(trimethylammonio)propoxy) ethyl ether chloride	N	N	N	No
P3-015	C	3,4-Dimethoxy benzaldehyde	P	P	P	No
P3-016	C	3-Chloropropionitrile	P	P	P	2B
P3-017	C	2-Methyl-1-pentanol	N	N	N	2B
P3-018	C	Ethyl-2-methylacetoacetate	N	N	N	2B
P3-019	A/B/C	Diethyl toluamide	P/P/P	P/P/P	P	2B
P3-020	A/B/C	4-Nitrobenzoic acid	N/N/N	N/N/N	N	2B
P3-021	C	Sodium chloroacetate	P	P	P	2B
P3-022	A	2,4,11,13-tetraazatetra (Chlorohexidine glucocinate)	P	P	P	2A
P3-023	C	3,3-Dithiodipropionic acid	N	N	N	2B
P3-024	A/B/C	2-Amino-3-hydroxy pyridine	P/P/P	P/P/P	P	2A
P3-025	C	Sodium benzoate	N	N	N	2A
P3-026	C	Methylthioglycolate	P	P	P	1
P3-027	A	3-(2-Aminoethylamino)propyl] trimethoxysilane	P	P	P	1
P3-028	A/B/C	Tetraethylene glycol	P/P/P	P/P/P	P	1
P3-029	A/B/C	Dodecanoic acid	P/P/P	P/P/P	P	1
P3-030	C	1,2-Benzisothiazol-3(2H)-one	P	P	P	1
P3-031	C	2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone	P	P	P	2B
P3-032	C	Disodium 4,4'-bis(2-sulfonatostyryl) biphenyl	P	P	P	1

Chemical code	Laboratory	Name of test substance	Run 1	Run 2	Final Evaluation	GHS Category
P3-033	A/B/C	gamma-Butyrolactone	N/N/N	N/N/N	N	2A
P3-034	C	1-Methylpropyl benzene	N	N	N	No
P3-035	C	4-(Methylmercapto)benzaldehyde	P	P	P	No
P3-036	C	1,9-Decaine	P	P	P	No
P3-037	C	2,4-Dimethyl-3-pentanol	N	N	N	No
P3-038	C	1-Ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate	N	N	N	No
P3-039	C	1,2,4-Triazole,sodium salt	P	P	P	1
P3-040	C	4,4'-(4,5,6,7-Tetrabromo-1,1-dioxido-3H-2,1-benzoxathiole-3,3-diyl) bis[2,6-dibromophenol]	P	P	P	1
P3-041	C	Benzenamine,4,4'-(4-aimino-3-methylphenyl)(4-imino-3-methyl-2,5-cyclohexadien-1-ylidene) methyl-2-methy HCL	P	P	P	1
P3-042	A	1-(9H-Carbozol-4-yloxy)-3-[[2-(2-methoxy phenoxy)ethyl] amino]-2-propanol	P	P	P	No
P3-043	B	3-Methyl-1,5-di(2,4-xylyl)-1,3,5-Triazapenta-1,4-dien	P	P	P	No
P3-044	C	Isopropyl acetoacetate	N	N	N	2B
P3-045	A	(3R,4R)-4-Acetoxy-3-[(R)-(tert-butyl)dimethylsilyloxy]ethyl]-2-azetidinone	P	P	P	2A
P3-046	B	1-Octanol	P	P	P	2A
P3-047	B	2-Benzyloxyethanol	N	N	N	2A
P3-048	B	Butanol	N	N	N	1
P3-049	B	Isobutyl alcohol	P	P	P	1
P3-050	B	Isopropyl alcohol	N	N	N	2A
P3-051	B	Myristyl alcohol	P	P	P	2A
P3-052	B	Hexyl cinnamic aldehyde	P	P	P	2
P3-053	B	n-Butanal	P	P	P	2B
P3-054	B	Monoethanolamine	P	P	P	2B
P3-055	B	m-Phenylenediamine	P	P	P	1
P3-056	B	Ethyl acetate	N	N	N	No
P3-057	B	Isopropyl myristate	N	N	N	No
P3-058	B	Methoxyethyl acrylate	P	P	P	1
P3-059	B	Methyl acetate	N	N	N	2A
P3-060	B	Methyl cyanoacetate	N	N	N	2A
P3-061	B	Imidazole	P	P	P	1
P3-062	B	Pyridine	N	N	N	1
P3-063	B	Isopropyl bromide	N	N	N	No
P3-064	B	Cyclohexanone	N	N	N	No

Chemical code	Laboratory	Name of test substance	Run 1	Run 2	Final Evaluation	GHS Category
P3-065	B	2-Methylbutyric acid	N	N	N	1
P3-066	B	Calcium thioglycolate trihydrate	NA	NA	NA	1
P3-067	B	Citric acid	P	P	P	No data
P3-068	B	Potassium sorbate	N	N	N	No data
P3-069	B	Sodium salicylate	N	N	N	1
P3-070	B	Distearyldimethyl ammonium chloride	P	P	P	1
P3-071	B	n-Lauroylsarcosine sodium salt	P	P	P	2B
P3-072	B	Sodium lauryl sulfate	P	P	P	2A?
P3-073	A	Triton X-100 (5%)	P	P	P	2B
P3-074	A	2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate	P	P	P	No
P3-075	A	Promethazine hydrochloride	P	P	P	1
P3-076	A	2-Ethyl-1-hexanol	P	P	P	2A
P3-077	A	3-Methoxy-1,2-propanediol	N	N	N	No
P3-078	A	Cyclohexanol	N	N	N	1
P3-079	A	Ethanol	N	N	N	2A
P3-080	A	n-Hexanol	N	N	N	2A
P3-081	A	3,3-Dimethylpentane	P	P	P	No
P3-082	A	Methyl cyclopentane	P	P	P	No
P3-083	A	Toluene	N	N	N	2B?
P3-084	A	Acetone	N	N	N	2A
P3-085	A	Gluconolactone	N	N	N	No
P3-086	A	Methyl amyl ketone (2-heptanol)	N	N	N	No
P3-087	A	Methyl ethyl ketone (2-butanone)	N	N	N	2A
P3-088	A	Methyl isobutyl ketone(4-methyl 2-pentanol)	N	N	N	No
P3-089	A	Glycerol	N	N	N	No
P3-090	A	Cetylpyridinium bromide	P	P	P	1
P3-091	C	Triton X-100	P	P	P	1
P3-092	C	Tween20	P	P	P	No
P3-093	A	Sodium hydroxide	P	P	P	1
P3-094	A	Glycolic acid	N	N	N	2B
P3-095	C	3,3-Dithiodipropionic acid	N	N	N	2B
P3-096	A	Sucrose fatty acid ester	N	N	N	2A?
P3-097	A	methyl para-Hydroxybenzoate	P	P	P	2?
P3-098	A	Silic acid	P	P	P	No

Chemical code	Laboratory	Name of test substance	Run 1	Run 2	Final Evaluation	GHS Category
P3-099	A	Benzyl alcohol	P	P	P	1
P3-100	A	Lactic acid	N	N	N	1

*1: N: Negative, P: Positive

*2: Eye irritation potential of common test substances were expressed as a representative of three laboratories.

*3: NA: Not applicable

表 6. SIRC-CVS:TEA 法のボトムアップ方式における正確性 (TEA の有無による)

Regulatory System	Judgement by IC50 value of triethanolamine	Judgement by IC50 at 1600 µg/mL
Accuracy	55.2% (64/116)	58.9% (66/112)
Sensitivity	60.0% (42/70)	69.1% (47/68)
Specificity	47.8% (22/46)	43.2% (19/44)
False Negative Rate	40.0% (28/70)	30.9% (21/68)
False Positive Rate	52.2% (24/46)	56.8% (25/44)

5. 試験法の有用性と限界

本試験法は、眼刺激性試験代替法として原理も明確な *in vitro* の手法であり、同じ目的のために実施される動物実験と比べ、「動物の愛護及び管理に関する法律」および 3Rs の精神と合致している。また、細胞毒性を指標とした試験法であるため、操作が簡便で、標本の資料保管が可能である。実施の際に必要な消耗品費については、細胞株は細胞バンクから購入でき、試薬・実験資材等も高価なものを用いておらず、動物実験よりも安価である。

本試験法の正確性を改良するため (すなわち、偽陰性を減らすため)、開発者はバリデーション結果に加え、株式会社資生堂の *in-house* のデータも合わせて解析した。まず、開発者は分子量 180 未満のアルコール、エステル、エーテル、ケトン、ヘテロ環状物質、カルボン酸の適用除外物質案を示した。PRP はこの案により、感度 90% 以上 (偽陰性 10% 以下) と高くなるものの、科学的な合理性が乏しいと判断した。そこで、開発者は新たに、酸解離定数 pKa が 4 以下の酸、および $-1.5 < \log D < 2$ の物質を除外という適用限界を提案した。しかし、この提案も PRP は感度 90% 以上 (偽陰性 10% 以下) と高くなるが、科学的に十分な説明がつくものではないと判断し、開発者との間で明確なメカニズムに基づく正確性の高い適用除外物質案の合意には至らなかった。参考までに、予測性値の一覧を Annex2 にまとめた。株式会社資生堂の *in-house* のデータを含めるか否かを問わず、どの案も同程度の正確性を示している。また、Cosmetic Europe が発表した *in vivo* 結果の検証論文 (Barroso ら、Archives of Toxicology, 2017, 91(2), 521-547) を基に、Barroso の

結果で解析した SIRC-CVS:TEA の結果も検討したが(Annex1)、PRP は採用しなかった。その理由は、正確性があまり変わらなかったことによる。

なお、この評価の経験から、今後新規代替法のバリデーションを実施する場合には、被験物質選択時に *in vivo* 試験結果の個別確認を事前に行うことの重要性を本委員会から提言させて頂く。

6. 本委員会の結論

SIRC-CVS:TEA 法は施設内および施設間再現性の高い方法ではあるけれども、表 6 に示すように、比較対照物質 TEA との比較による正確度は約 60%と低い。参考資料として、同表に比較対照物質を用いず、IC50 値 1,600 µg/mL を基準として正確性を求めたが、大きな改善はみられなかった。PRP の見解同様、本委員会においても適用除外物質の設定により、偽陰性率は低くなるものの、科学的な根拠が乏しく、ボトムアップ方式で UN GHS 区分に該当しない化学物質を検出する方法として行政的に用いることは相応しくないと結論した。

7. 利益相反(COI)について

特になし

8. 引用文献(最終アクセス日 2021 年 7 月 30 日)

- 1) Saotome, K., Morita, H. and Umeda, M. (1989) Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs, *Toxicol. in Vitro*, 3, 317-321.
- 2) Itagaki H, Hagino S, Kobayashi T. and Umeda M. (1991) An *in vitro* alternative to the Draize eye-irritation test: Evaluation of the crystal violet staining method. *Toxicol. In Vitro*. 5;139-43.
- 3) Ohno, Y., Kaneko, T., Kobayashi, T., et al. (1995) First phase inter-laboratory validation of the *in vitro* eye irritation test for cosmetic ingredients;(1)Overview, organization and results of validation study, *AATEX*, 3, 123-136.
- 4) Itagaki H, Shibata M, Tani N, et al. (1995) First phase inter-laboratory validation of the *in vitro* eye irritation test for cosmetic ingredients;(8) Evaluation of cytotoxicity test on SIRC cells. *AATEX* 3;182-190.
- 5) Ohno, Y., Kaneko, T., Inoue, T., et al (1999) Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicology in Vitro* 13, 73-98.
- 6) Tani N., Kinoshita S., Okamoto Y., et al. (1999) Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (8) Evaluation of cytotoxicity Tests on SIRC cells. *Toxicol. In Vitro*. 13;175.
- 7) 大野泰雄(1996)眼刺激性試験代替法のバリデーション、*組織培養* 22(6)211-217.
- 8) OECD 2015 Test No. 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, In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. Paris:OECD Publishing

- 9) OECD 2015 Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. Paris:OECD Publishing
- 10) Hagino S., Okazaki Y., Kitagaki M. and Itagaki H. (2010) Further verification of an *in vitro* tier system for the identification of cosmetic ingredients that are not ocular irritants. *Altern Lab Anim.* 38; 139-152.
- 11) Validation Study for the Statens Seruminstitut Rabbit Cornea–Crystal Violet Staining Cytotoxicity Test 1 Method with Triethanolamine (SIRC-CVS:TEA Test Method) as an Alternative to Eye Irritation Test – Study Report Version 8.9 (2019)
- 12) SIRC-CVS Test Method: Report of the Peer Review Panel on a JaCVAM coordinated study programme addressing the validation status of the SIRC-CVS test method for the prospective identification of eye irritating substances (2019)
- 13) Jester, J.V., Li Li, Molai, A., and Maurer, J.K. (2001) Extent of initial corneal injury as a basis for alternative eye irritation tests. *Toxicology in Vitro* 15, 115-130.
- 14) 化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律施行令（平成七年五月一日政令第百九十二号） Available at: http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/cwc/domestic_sekorei.html