

評価会議報告書

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)

JaCVAM 評価会議

平成 31 年 (2019 年) 2 月 19 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
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）
稲若 邦文（日本化学工業協会）
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）
久保 文宏（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）
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/済生会宇都宮病院）
西村 次平（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）
沼澤 聡（日本毒性学会）
平林 容子（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）
増村 健一（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 30 年 4 月 1 日～平成 32 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 には、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 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) が ESAC (EURL ECVAM Scientific Advisory Committee) 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) として記載されている¹⁾。また、OECD は新規 RhCE 組織を用いた試験法に対してその構造および機序が VRM と同等で十分な信頼性を備えていることを評価する性能標準を定めている²⁾。LabCyte CORNEA-MODEL24 を用いた眼刺激性試験 (LabCyte CORNEA-MODEL24 Eye Irritation Test: LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT) は類似試験法として、OECD の性能標準で指定されている 30 の参照物質を用いた 3 施設での追走的バリデーション研究³⁾ および JaCVAM の第三者評価⁴⁾を経て、2018 年に TG492 に記載された⁵⁾。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「改訂 OECD TG492 再構築角膜様上皮モデル法 LabCyte CORNEA-MODEL24 眼刺激性試験評価報告書」⁶⁾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) LabCyte CORNEA-MODEL24 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 法のひとつである LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT では、ヒト角膜上皮細胞を重層培養した LabCyte CORNEA-MODEL24 に被験物質が液体の場合は 1 分間、固体の場合は 24 時間被験物質を曝露した後、WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)2H-tetrazolium, monosodium salt) 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、WST-8 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 WST-8 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) が生存細胞数に比例することに基づいている。被験物質が液体・固体に関わらず、平均細胞生存率が 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。なお、本試験法で偽陽性を回避するためには、また、UN GHS 分類区分 1 と区分 2 を識別する必要がある場合は、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 (LabCyte CORNEA-MODEL24) 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。

LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT については、リードラボとは異なる 3 施設において OECD の性能標準で指定されている 30 の参照物質を用いた追走的バリデーション研究が行われた³⁾。その結果、LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT は、UN GHS 区分外物質予測性の施設内再現性、施設間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た。さらに JaCVAM の第三者評価⁴⁾を経て、UN GHS 区分外物質を検出する方法として 2018 年に改訂 OECD 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 LabCyte CORNEA-MODEL24 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 LabCyte CORNEA-MODEL24 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習熟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、UN GHS 分類判定の施設ごとの施設内再現性は 93-100% であり、OECD の性能標準が定めた基準 (90% 以上) を満たしていた⁵⁾。また、施設間再現性は、87% で、OECD の性能標準が定めた基準 (85% 以上) を満たしていた⁶⁾。さらに、バリデーション研究で得られたデータによる性能評価では、感度 97.8%、特異度 68.9% および正確度 83.5% となり 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) を満たしていた⁶⁾。

但し、細胞生存率の算出に際し、被験物質が WST-8 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 (450 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 V 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、試験法の性能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まれなかった気体 (ガス) およびエアロゾル状物質は適用から除外される。
- 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、LabCyte CORNEA-MODEL24 は比較的安価であり、その入手は容易で、短時間で実施できる。また、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 LabCyte CORNEA-MODEL24 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習熟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。

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) OECD (2016) Performance standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro reconstructed human cornea-like epithelium (RhCE) test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage, based on the validated reference methods Epiocular™ EIT and Skinethic™ HCE EIT described in TG492.
- 3) LabCyte Validation Management Team (2017) Me-too Validation Report: Validation Study for LabCyte CORNEA-MODEL24 Eye Irritation Test (Version. 3.0).
- 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) 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.
- 6) JaCVAM 眼刺激性試験資料編纂委員会：評価報告書 再構築ヒト角膜様上皮モデル法 (RhCE法) LabCyte CORNEA-MODEL24眼刺激性試験 (LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT) (2018年12月27日)