

薬生薬審発 0624 第 1 号
令和元年 6 月 24 日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長
（公印省略）

医薬部外品・化粧品の安全性評価における眼刺激性試験代替法としての
再構築ヒト角膜様上皮モデル法（RhCE 法）に関するガイダンスについて

今般、「医薬品等の安全性評価に関する in vitro 試験（代替法）の開発、国際標準化及び普及促進に関する研究」（日本医療研究開発機構研究費（医薬品等規制調和・評価研究事業、代表研究者 小島肇））において、医薬部外品・化粧品の安全性評価に眼刺激性試験代替法としての RhCE 法を利用するにあたっての留意点等を取りまとめたガイダンスを別添のとおり作成されたので、貴管下関係業者に対して周知願います。

医薬部外品・化粧品の安全性評価における眼刺激性試験代替法としての 再構築ヒト角膜様上皮モデル法（RhCE法）に関するガイダンス

眼刺激性は、被験物質が眼に直接接触したことにより生じる結膜の発赤・浮腫・分泌物、虹彩の変化や角膜の混濁等を指標とする反応である。眼刺激性試験はヒトが被験物質を眼粘膜に適用した場合に生じる傷害性、あるいは誤って眼に入った場合に生じる結膜、虹彩及び角膜に対する傷害性を予測するために実施される。

医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請では、従来、ウサギを用いた急性眼刺激性／腐食性（Acute Eye Irritation/Corrosion）を評価する Draize 法¹⁾（OECD テストガイドライン：TG405²⁾）が用いられてきた。

経済協力開発機構（the Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD）は眼刺激性試験に関する *in vitro* 試験法である「再構築ヒト角膜様上皮モデル法（Reconstructed human Cornea-like Epithelium test method: RhCE 法）」を国連（the United Nations: UN）による化学品の分類及び表示に関する世界調和システム（the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals: GHS³⁾）区分で無刺激性（区分外）の化学物質又は混合物をボトムアップ方式で評価する試験法として OECD TG492⁴⁾を採択した。ボトムアップ方式は眼刺激性又は重篤な眼傷害性を有する区分に当たらないと予測される被験物質に対して用いられる段階的方法で、眼刺激性又は重篤な眼傷害性ではない物質を、それ以外の物質から正確に識別できる試験法で判別することから開始する⁵⁾。一方、トップダウン方式は重篤な眼傷害性を引き起こすと疑われる被験物質に対して用いられる段階的方法で、重篤な眼の損傷を起こす物質を、それ以外の物質から正確に識別できる試験法で判別することから開始するものであるが、OECD TG492（RhCE 法）はトップダウン方式で評価する試験法ではない。

本ガイダンスは、OECD TG492（RhCE 法）について、医薬部外品・化粧品の安全性評価に利用するに当たって、必要な留意点等を取りまとめたものである。RhCE 法は複数のモデルがあり、各モデル眼刺激性試験法の説明は補遺 1 等に示した。

1. 試験法の概要

1-1. 原理

眼刺激性は、被験物質が眼に直接接触したことにより生じる結膜の発赤・浮腫・分泌物、虹彩の変化や角膜の混濁等を指標とする反応である。角膜は偶発的な事故等により刺激物に曝露される眼表面組織の広範囲を占めており、その損傷は視力障害を引き起こす可能性がある。したがって、従来の眼刺激性評価法であるウサギを用いた眼刺激性試験（Draize 法）では、角膜に対する影響を中心に評価している。

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り、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傷害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である RhCE 組織を用いて、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。

採択された OECD TG 492 には各種の細胞を用いた複数のモデルが含まれており、本ガイダンスでは各モデル眼刺激性試験法に関する説明を補遺に示している。

RhCE 法では被験物質を RhCE 組織に曝露した後、テトラゾリウム色素 (tetrazolium dye: TD) が生細胞によって還元されて生じるホルマザン色素 (formazan dye: FD) を吸光度 (Optical Density: OD) 測定法 (紫外可視吸光度測定法) 又は高速液体クロマトグラフィー/超高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography: HPLC/Ultra-high Performance Liquid Chromatography: UPLC) (HPLC/UPLC 法) により定量することにより求められる細胞生存率を評価項目とする⁶⁾。

1-2. 試験手順及び判定

1-2-1. 試験手順

詳細な内容を確認する場合には、OECD TG492 を参照する。

被験物質及び対照物質の適用

試験に供する物質毎に複数の RhCE 組織を用いる。「2. 本試験法の運用方法に関する留意点」に示すとおり、被験物質としては、原料、原料を製剤配合濃度以上の濃度に調製したもの、製剤等がある。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。必要に応じてヒトの眼の湿潤状態に合わせて、前処理として Mg^{2+}/Ca^{2+} 不含リン酸緩衝生理食塩水を用いて RhCE 組織表面を湿らせる。

液体の被験物質の場合、RhCE 組織表面に均等に広がる量を適用し、各モデル眼刺激性試験法に規定した時間と条件で曝露する。曝露後、室温で Mg^{2+}/Ca^{2+} 不含リン酸緩衝生理食塩水を用いて十分に洗浄し被験物質を除去し、さらに必要な場合は各モデル眼刺激性試験法に規定した処理を行う。

固体の被験物質の場合、RhCE 組織の表面を覆うのに十分な量を均一に適用し、各モデル眼刺激性試験法に規定した時間と条件で曝露する。なお、可能な場合は必ず、適用前に粉碎して微粉とする。曝露後、室温でリン酸緩衝生理食塩水を用いて十分に洗浄し被験物質を除去し、さらに必要な場合は各モデル眼刺激性試験法に規定した処理を行う。

同時に陰性対照及び陽性対照も試験を行い、使用する RhCE 組織の陰性対照の細胞生存率と陽性対照による感度がこれまでのデータに基づいて規定した試験成立範囲内であることを確認する。なお、陰性対照試験は被験物質を処理した組織の相対的な細胞生存率パーセント (%細胞生存率_{被験物質}) を計算するためのベースライン (100%細胞生存率) として用いる。

対照物質の適用及び後処理は、各モデルの被験物質 (液体又は固体) の適用手順に準じる。

なお、ベンチマーク物質は、特定の化学物質若しくは製品クラスに属する未知の化学物質の眼刺激性、又は刺激反応が特定の範囲内にある眼刺激性物質を相対的に評価する上で有用である。

細胞生存率

OECD TG492 では FD の紫外可視吸光度測定法又は HPLC/UPLC 法により得られた被験物質及び陰性対照物質の測定値の平均に基づき細胞生存率を算出する。

$$\%細胞生存率_{被験物質} = \frac{\text{被験物質の測定値の平均}}{\text{陰性対照の測定値の平均}} \times 100$$

試験法の適用範囲

RhCE 法のバリデーション研究では気体及びエアロゾルが評価されておらず、そのため気体及びエアロゾルは適用範囲から除外する。

1-2-2. 判定

- %細胞生存率_{被験物質}が各モデル眼刺激性試験法で設定したカットオフ値よりも大きい場合、その被験物質は無刺激性と判定する。
- %細胞生存率_{被験物質}が各モデル眼刺激性試験法で設定したカットオフ値以下である場合、その被験物質の眼刺激性を判定することは出来ない。

1-3. 試験実施上の留意点

1-3-1. 試験実施における注意事項

新たに試験を実施する試験施設では、RhCE 法の習熟度確認物質（補遺 2）等を活用し精度の向上に努めること。

1-3-2. 試験成立条件について

以下の 3 条件を満たした場合、試験の結果を判定に用いる。

- (1)陰性対照の OD 値が各モデルの眼刺激性試験法に規定した陰性対照に関する試験成立条件を満たすこと。
 - (2)陽性対照の%細胞生存率が各モデルの眼刺激性試験法に規定した陽性対照に関する試験成立条件を満たすこと。
 - (3)被験物質、陰性対照物質及び陽性対照物質のそれぞれについて、2 組織を用いた場合は細胞生存率の差が 20%未満、3 組織以上を用いた場合は細胞生存率の標準偏差が 18%以下であること。
- (1)又は(2)の条件を満たさない場合、当該試験は不成立となり、繰り返し実施する必要がある。
- (3)について、陰性対照又は陽性対照の試験結果がその条件を満たさない場合、当該試験は不成立となり、繰り返し実施する必要がある。
- (3)について、被験物質の試験結果がその条件を満たさない場合、被験物質に関する試験は不成立となり、被験物質の再試験を実施する必要がある。

結果がボーダーラインとなった場合、すなわち複数組織での測定値がカットオフ値において一致しない場合や%細胞生存率が各モデルの眼刺激性試験法のカットオフ値±5%となった場合は 2 回目の試験実施を検討するべきである。また、1 回目と 2 回目の試験結果が不一致の場合は 3 回目の試

験実施を検討するべきである。

1-3-3. ベンチマーク物質について

被験物質との比較に用いられるベンチマーク物質は以下の要件を満たすものである。

(i)供給源に一貫性及び信頼性があること、(ii)化学構造及び機能が被験物質に類似していること、(iii)物理的及び化学的特性が既知であること、(iv)既知の眼刺激作用に関するデータがあること、(v)眼刺激性が望ましい範囲内にあること（ヒトが安全に使用できること等）を示す既知のデータがあることである。

1-3-4. 細胞生存率の測定を干渉する場合の対処について

被験物質自体が、曝露処理を経た被験物質がFDの吸収波長と同様の吸収波長を有する場合、又はTDをFDに直接還元する作用を有する場合、細胞生存率の測定を干渉する可能性がある。これらの性質の有無を確認し、有する場合は被験物質の真の細胞生存率を求めるために補正が必要となる。各モデル眼刺激性試験法の確認及び補正の流れについては補遺1に示す。

2. 本試験法の運用方法に関する留意点⁷⁾

(1) 原料を用いて試験し、細胞生存率が各モデルの眼刺激性試験法で設定したカットオフ値を超え、無刺激性と判定され場合は、その原料は無刺激性であると結論できる。

(2)(1)で評価した結果、原料が無刺激性と判定されなかった場合でも、以下の手順で原料又は製剤の評価を行うことができる。

①原料を製剤配合濃度以上の濃度に調製した溶液を被験物質として試験し、判定が無刺激性である場合は、試験に供した被験物質は無刺激性であると結論できる。

② ①で評価した結果、判定が無刺激性ではない場合は、製剤による評価を行うことができる。製剤を被験物質として試験し、判定が無刺激性である場合は、その製剤は無刺激性であると結論できる。

③ ②で評価した結果、判定が無刺激性ではない場合は、原料に関連したベンチマーク物質との相対評価を行うこともできる。

(3) 本試験法により実施した試験の結果から無刺激性であると判断できない場合、最終的な評価は他の試験結果を考慮することができる。

3. 引用文献

1) Draize et al., (1944) Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 82: 377-390.

- 2) OECD (2017). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-405-acute-eye-irritation-corrosion_9789264185333-en
- 3) United Nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Sixth revised edition, UN New York and Geneva, 2017.
- 4) 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. Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/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_9789264242548-en
- 5) 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, 1-9.
- 6) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Colored Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.
- 7) 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会最終報告書－眼刺激性分科会報告－(2009) 平成21年度厚生労働科学研究 動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究. Available at: <https://research-er.jp/projects/view/139325>

補遺 1. 各モデル眼刺激性試験法に関する説明

2018年に採択された OECD TG 492 に示されている眼刺激性試験法には、ヒト表皮角化細胞 (primary human epidermal keratinocytes) 由来の EpiOcular™ OCL-200 を用いた EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) 法^{1),2)}、ヒト不死化角膜上皮細胞 (human immortalized corneal epithelial cells) 由来の SkinEthic™ HCE/S を用いた SkinEthic™ HCE EIT 法^{3),4)}及びヒト角膜上皮細胞 (primary human corneal epithelial cells: HCE) 由来の LabCyte CORNEA-MODEL24 を用いた LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT 法^{5),6)}がある。

RhCE 法では被験物質を RhCE 組織に曝露した後、テトラゾリウム色素 (tetrazolium dye: TD) が生細胞によって還元されて生じるホルマザン色素 (formazan dye: FD) を測定することにより求められる細胞生存率を評価項目とする。

EpiOcular™ EIT 法及び SkinEthic™ HCE EIT 法において用いる TD は 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT; CAS 番号 298-93-1) である。LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT 法において用いる TD は 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-8; CAS 番号 193149-74-5) である。EpiOcular™ EIT 法及び SkinEthic™ HCE EIT 法の場合、MTT が還元されて生じる MTT ホルマザン (MTT FD) をインプロパノール (又は同様の溶媒) で抽出し、吸光度 (Optical Density: OD) 測定法 (紫外可視吸光度測定法) 又は高速液体クロマトグラフィー/超高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography: HPLC/Ultra-high Performance Liquid Chromatography: UPLC) (HPLC/UPLC 法) により定量する。LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT 法の場合、WST-8 が還元されて生じる WST-8 ホルマザン (WST-8 FD) を紫外可視吸光度測定法又は HPLC/UPLC 法により定量する。

各モデル眼刺激性試験については、以下を参照する。

補遺 1-1. EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) 法

補遺 1-2. SkinEthic™ HCE EIT 法

補遺 1-3. LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT 法

引用文献

- 1) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.
- 2) JaCVAM(2016) 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), Available at: <http://www.jacvam.jp/effort/effort02.html>

- 3) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for *in vitro* toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, pp. 147-159.
- 4) JaCVAM(2018) 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 (RhCE 法)、SkinEthic™ HCE/S を用いた眼刺激性試験 (SkinEthic™ HCE EIT) , Available at: <http://www.jacvam.jp/effort/effort02.html>
- 5) Katoh, M., Uemura, N., Hamajima, F., Ogasawara T., Hata, K. (2012). Morphological characterization of a reconstructed human corneal epithelial model (LabCyte CORNEA-MODEL) as an alternative to the Draize eye test for the assessment of eye irritation. *AATEX*. 17, 22-28.
- 6) JaCVAM(2018) 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 (RhCE 法)、LabCyte CORNEA-MODEL24 を用いた眼刺激性試験 (LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT) , Available at: <http://www.jacvam.jp/effort/effort02.html>

補遺1-1. EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) 法

1. 試験手順

1-1. 被験物質及び対照物質の適用

試験に供する物質あたり 2 組織を用いる。「2. 本試験法の運用方法に関する留意点」に示すとおり、被験物質としては、原料、原料を製剤配合濃度以上の濃度に調製したもの、製剤等がある^{1),2)}。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。必要に応じてヒトの眼の湿潤状態に合わせて、前処理として 20 μ L の Mg^{2+}/Ca^{2+} 不含リン酸緩衝生理食塩水を用いて RhCE 組織表面を湿らせる。その後、標準培養条件（温度 37 \pm 2°C、二酸化炭素濃度 5 \pm 1%、相対湿度 95%以上）で 30 分間曝露する。

液体被験物質の場合、RhCE 組織表面に均等に広がる量として、50 μ L を適用し、標準培養条件で 30 分間曝露する。曝露後、室温で Mg^{2+}/Ca^{2+} 不含リン酸緩衝生理食塩水を用いて十分に洗浄し被験物質を除去する。新たな培地を用い 12 分間の曝露後の浸漬（post-exposure immersion）を実施する。さらに新たな培地を用い標準培養条件で 120 分間、曝露後の培養（post-exposure incubation）を行う。

固体被験物質の場合、RhCE 組織の表面を覆うのに十分な量として、50mg を均一に適用し、標準培養条件で 6 時間曝露する。なお、可能な場合は必ず、適用前に粉碎して微粉とする。曝露後、室温で Mg^{2+}/Ca^{2+} 不含リン酸緩衝生理食塩水を用いて十分に洗浄し被験物質を除去する。新たな培地を用い 25 分間の曝露後の浸漬（post-exposure immersion）を実施する。さらに新たな培地を用い標準培養条件で 18 時間、曝露後の培養（post-exposure incubation）を行う。

同時に陰性対照及び陽性対照も試験を行い、使用する RhCE 組織の細胞生存率（陰性対照による）と感度（陽性対照による）がこれまでのデータに基づいて規定した試験成立範囲内であることを確認する。なお、陰性対照試験は被験物質を処理した組織の相対的な細胞生存率パーセント（%細胞生存率_{被験物質}）を計算するためのベースライン（100%細胞生存率）として用いる。

陽性対照物質は酢酸メチルであり、液体及び固体の被験物質の両方に用いることができる。また、陰性対照物質は超純水であり液体及び固体の被験物質の両方に用いることができる。

ベンチマーク物質は、特定の化学物質若しくは製品クラスに属する未知の化学物質の眼刺激性、又は刺激反応が特定の範囲内にある眼刺激性物質を相対的に評価する上で有用である。

1-2. 細胞生存率

培地を除去した後、0.3mL の 1 mg/mL MTT 溶液を加え標準培養条件下で 180 \pm 15 分間反応させる。適量のイソプロパノール又は同様の溶媒を用い、青色 MTT FD を抽出する。同時に試験する陰性及び陽性対照群も同様に処理する。液体の被験物質（無色）の場合は、RhCE 組織の上部及び底部両方から抽出する。固体の被験物質及び液体の被験物質（有色）の場合は、組織中に残留する可能性のある被験物質が混入することを最小限にするため、RhCE 組織の底部のみから抽出する。なお、液体被験物質を試験した組織で容易に洗浄できない場合は組織の底部のみから抽出する。紫外可視吸光度測定法による波長 570nm（ \pm 30nm）における MTT FD 抽出液の吸光度（OD_{570nm}）、又は HPLC/UPLC 法（ピーク面積）による MTT FD 濃度をもとに、陰性対照に対する細胞生存率を算出する。

$$\%細胞生存率_{被験物質} = \frac{\text{被験物質の測定値の平均}}{\text{陰性対照の測定値の平均}} \times 100$$

2. 判定

- %細胞生存率_{被験物質}がカットオフ値よりも大きい場合、その被験物質は無刺激性と判定する。この場合、他の試験法による更なる試験の実施は不要である。
- %細胞生存率_{被験物質}がカットオフ値以下である場合、その被験物質の眼刺激性を判定することは出来ない。

表 1. %細胞生存率_{被験物質}による判定

被験物質の状態	無刺激性	判定不可
液体及び固体	>60%	≤ 60%

3. 試験実施上の留意点

3-1. 試験実施における注意事項

新たに試験を実施する試験施設では、RhCE法の習熟度確認物質（補遺2）等を活用し精度の向上に努めること。

3-2. 試験成立条件について

以下の3条件を満たした場合、試験の結果を判定に用いる。

- (1) 陰性対照のOD値が表2-1.『陰性対照に関する試験成立条件』を満たすこと。

表 2-1. 陰性対照に関する試験成立条件

被験物質の状態 [陰性対照物質]	下限値 (OD値)	上限値 (OD値)
液体及び固体 [超純水]	>0.8	<2.5

- (2) 陽性対照の%細胞生存率が表2-2.『陽性対照に関する試験成立条件』を満たすこと。

表 2-2. 陽性対照に関する試験成立条件

被験物質の状態 [陽性対照物質]	%細胞生存率
液体及び固体 [酢酸メチル]	<50%

- (3) 被験物質、陰性対照物質、及び陽性対照物質のそれぞれについて、細胞生存率の差が20%未満であること。

(1)又は(2)の条件を満たさない場合、当該試験は不成立となり、繰り返し実施する必要がある。

(3)について、陰性対照又は陽性対照の試験結果がその条件を満たさない場合、当該試験は不成立と

なり、繰り返し実施する必要がある。

(3)について、被験物質の試験結果がその条件を満たさない場合、被験物質に関する試験は不成立となり、被験物質の再試験を実施する必要がある。

4. 細胞生存率の測定を干渉する場合について

被験物質自体が、曝露処理を経た被験物質が FD の吸収波長と同様の吸収波長を有する場合（すなわち MTT : 570nm 付近、有色の被験物質）、又は TD を FD に直接還元する作用を有する場合、細胞生存率の測定を干渉する可能性がある。これらの性質の有無を確認し、有する場合は被験物質の真の細胞生存率を求めるために補正が必要となるが、状況ごとの補正方法を以下のとおり示す。

(1)有色の被験物質

紫外可視吸光度測定法を用いる場合は以下の補正を行う。TD 溶液の代わりに培地を添加する対照群 NSC 生細胞組織 (non-specific colour in living tissues) を設け、一連の試験を実施する。

NSC 生細胞組織 対照試験の測定値から %NSC 生細胞組織 を求め、次式により補正後%細胞生存率_{被験物質}を求める。

$$\text{補正後\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} = \text{未補正\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} - \% \text{NSC}_{\text{生細胞組織}}$$

なお、HPLC/UPLC 法を用いる場合、補正する必要は無い。

(2)還元作用を有する被験物質

紫外可視吸光度測定法又は HPLC/UPLC 法のいずれを用いる場合も以下の補正を行う。RhCE 組織を低温で処理し凍結死させた組織、又は RhCE 組織を水中にて細胞死させた組織を用い、これを非特異的 TD 対照群として NSMTT (non-specific MTT) を設け、一連の試験を実施する。

NSMTT 対照試験の測定値から %NSMTT を求め、次式により補正後%細胞生存率_{被験物質}を求める。

$$\text{補正後\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} = \text{未補正\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} - \% \text{NSMTT}$$

(3)有色かつ還元作用を有する被験物質

紫外可視吸光度測定法を用いる場合は以下の補正を行う。有色の被験物質として %NSC 生細胞組織 により、また還元作用を有する被験物質として %NSMTT による補正を行う。ここで、被験物質による直接 TS 還元の可能性を NSMTT のみで補正することはできず、死細胞組織における被験物質の吸収・保持による色素干渉も考慮する必要がある。この場合、NSC 生細胞組織 対照物質が生細胞組織による被験物質の吸収・保持に伴う色素干渉を既に補正しているので、色素干渉に対して二重補正となりうる。そのため、死細胞組織における色素干渉である NSC 死細胞組織 を加えることにより二重補正を修正する。

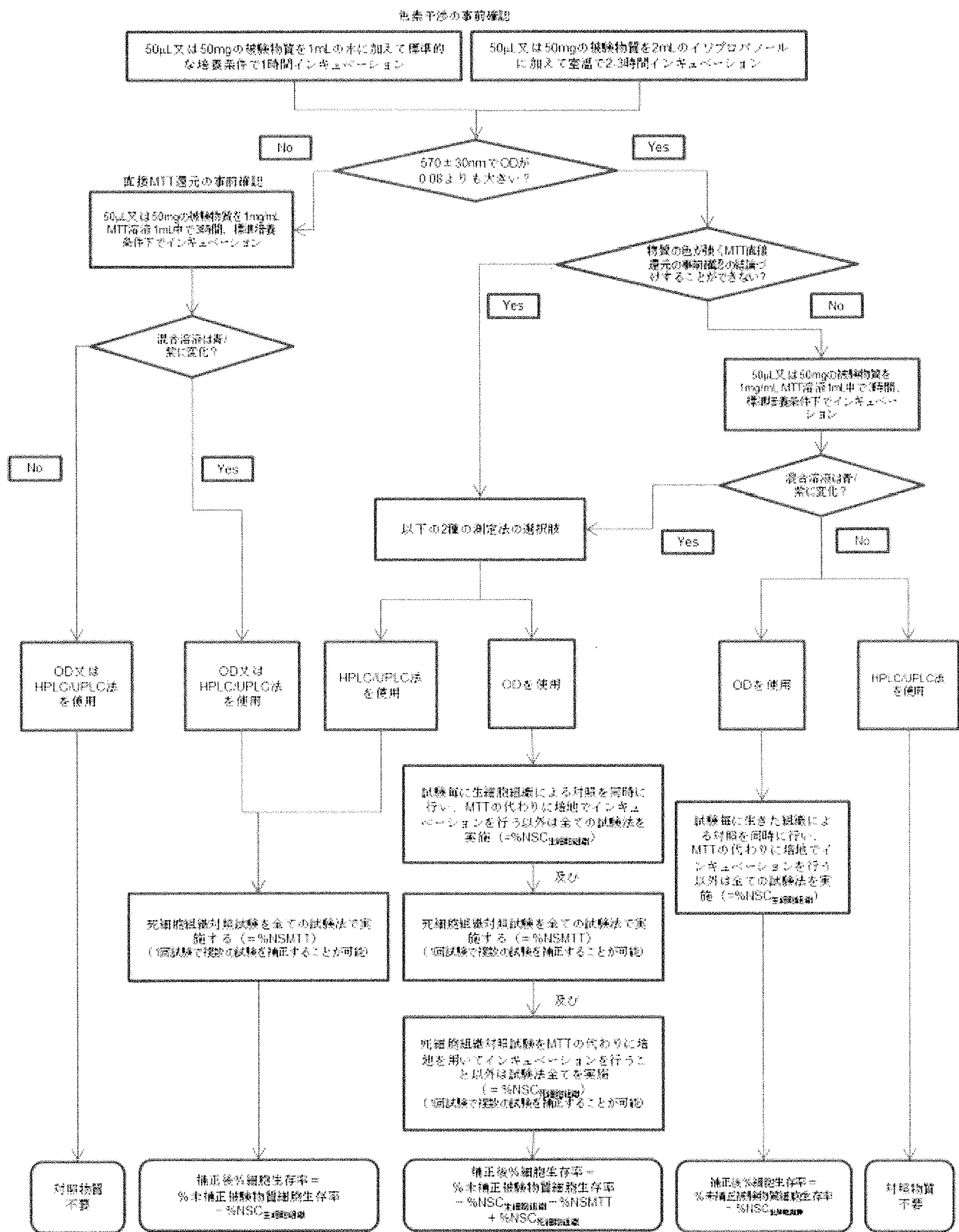
補正後%細胞生存率_{被験物質} = 未補正%細胞生存率_{被験物質} - %NSMTT - %NSC_{生細胞組織} + %NSC_{死細胞組織}

なお、有色かつ還元作用を有する被験物質について HPLC/UPLC 法を用いる場合は(2)還元作用を有する被験物質の補正方法に従う。

5. 引用文献

- 1) EC EURL ECVAM. (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Available at: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
- 2) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

図 1-1. 直接 MTT 還元及び/又は色素干渉物質を判定して扱うための決定木：EpiOcular™ EIT VRM1 SOP に基づく
(EpiOcular™ EIT の検証済み標準試験法 1 標準業務手順書；Validated Reference Methods 1 Standard Operating Procedure)



補遺1—2. SkinEthic™ HCE EIT法

1. 試験手順

1-1. 被験物質及び対照物質の適用

試験に供する物質あたり少なくとも2組織を用いる。「2. 本試験法の運用方法に関する留意点」に示すとおり、被験物質としては、原料、原料を製剤配合濃度以上の濃度に調製したもの、製剤等がある^{1),2)}。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、RhCE組織表面に均等に広がる量として、10μLのMg²⁺/Ca²⁺ 不含リン酸緩衝生理食塩水とともに30μLの被験物質を適用し、標準培養条件（温度37±2°C、二酸化炭素濃度5±1%、相対湿度95%以上）で30分間曝露する。曝露後、室温でMg²⁺/Ca²⁺ 不含リン酸緩衝生理食塩水を用いて十分に洗浄し被験物質を除去する。新たな培地を用い30分間の曝露後の浸漬（post-exposure immersion）を実施する。

固体被験物質の場合、RhCE組織の表面を覆うのに十分な量として、30μLのMg²⁺/Ca²⁺ 不含リン酸緩衝生理食塩水とともに30mgの被験物質を均一に適用し、標準培養条件で4時間曝露する。なお、可能な場合は必ず、適用前に粉碎して微粉とする。曝露後、室温でMg²⁺/Ca²⁺ 不含リン酸緩衝生理食塩水を用いて十分に洗浄し被験物質を除去する。新たな培地を用い30分間の曝露後の浸漬（post-exposure immersion）を実施する。さらに新たな培地を用い標準培養条件で18時間、曝露後の培養（post-exposure incubation）を行う。

同時に陰性対照及び陽性対照も試験を行い、使用するRhCE組織の細胞生存率（陰性対照による）と感度（陽性対照による）がこれまでのデータに基づいて規定した試験成立範囲内であることを確認する。なお、陰性対照試験は被験物質を処理した組織の相対的な細胞生存率パーセント（%細胞生存率_{被験物質}）を計算するためのベースライン（100%細胞生存率）として用いる。

陽性対照物質は酢酸メチルであり、液体及び固体の被験物質の両方に用いることができる。また、陰性対照物質はMg²⁺/Ca²⁺ 不含リン酸緩衝生理食塩水であり液体及び固体の被験物質の両方に用いることができる。

ベンチマーク物質は、特定の化学物質若しくは製品クラスに属する未知の化学物質の眼刺激性、又は刺激反応が特定の範囲内にある眼刺激性物質を相対的に評価する上で有用である。

1-2. 細胞生存率

培地を除去した後、0.3mLの1mg/mL MTT溶液を加え標準培養条件下で180±15分間反応させる。適量のイソプロパノール又は同様の溶媒を用い、青色MTT FDを抽出する。同時に試験する陰性及び陽性対照群も同様に処理する。液体被験物質（無色）の場合は、RhCE組織の上部及び底部両方から抽出する。固体の被験物質及び液体の被験物質（有色）の場合は、組織中に残留する可能性のある被験物質が混入することを最小限にするため、RhCE組織の底部のみから抽出する。なお、液体被験物質を試験した組織で容易に洗浄できない場合は組織の底部のみから抽出する。紫外可視吸光度測定法による波長570nm（±30nm）におけるMTT FD抽出液の吸光度

（OD_{570nm}）、又はHPLC/UPLC法（ピーク面積）によるMTT FD濃度をもとに、陰性対照に対する細胞生存率を算出する。

$$\%細胞生存率_{被験物質} = \frac{\text{被験物質の測定値の平均}}{\text{陰性対照の測定値の平均}} \times 100$$

2. 判定

- %細胞生存率_{被験物質}がカットオフ値よりも大きい場合、その被験物質は無刺激性と判定する。この場合、他の試験法による更なる試験の実施は不要である。
- %細胞生存率_{被験物質}がカットオフ値以下である場合、その被験物質の眼刺激性を判定することは出来ない。

表 1. %細胞生存率_{被験物質}による判定

被験物質の状態	無刺激性	判定不可
液体	>60%	≤ 60%
固体	>50%	≤ 50%

3. 試験実施上の留意点

3-1. 試験実施における注意事項

新たに試験を実施する試験施設では、RhCE 法の習熟度確認物質（補遺 2）等を活用し精度の向上に努めること。

3-2. 試験成立条件について

以下の 3 条件を満たした場合、試験の結果を判定に用いる。

- (1) 陰性対照の OD 値が表 2-1. 『陰性対照に関する試験成立条件』を満たすこと。

表 2-1. 陰性対照に関する試験成立条件

被験物質の状態 [陰性対照物質]	下限値 (OD 値)	上限値 (OD 値)
液体及び固体 [Mg ²⁺ /Ca ²⁺ 不含リン酸緩衝生理食塩水]	>1.0	≤2.5

- (2) 陽性対照の%細胞生存率が表 2-2. 『陽性対照に関する試験成立条件』を満たすこと。

表 2-2. 陽性対照に関する試験成立条件

被験物質の状態 [陽性対照物質]	%細胞生存率
液体 [酢酸メチル]	≤30%
固体 [酢酸メチル]	≤20%

- (3) 被験物質、陰性対照物質、及び陽性対照物質のそれぞれにおいて、細胞生存率の差が 20%未満であること。

- (1)又は(2)の条件を満たさない場合、当該試験は不成立となり、繰り返し実施する必要がある。
- (3)について、陰性対照又は陽性対照の試験結果がその条件を満たさない場合、当該試験は不成立となり、繰り返し実施する必要がある。
- (3)について、被験物質の試験結果がその条件を満たさない場合、被験物質に関する試験は不成立となり、被験物質の再試験を実施する必要がある。

4. 細胞生存率の測定を干渉する場合について

被験物質自体が、曝露処理を経た被験物質が FD の吸収波長と同様の吸収波長を有する場合（すなわち MTT : 570nm 付近、有色の被験物質）、又は TD を FD に直接還元する作用を有する場合、細胞生存率の測定を干渉する可能性がある。これらの性質の有無を確認し、有する場合は被験物質の真の細胞生存率を求めるために補正が必要となるが、状況ごとの補正方法を以下のとおり示す。

(1)有色の被験物質

紫外可視吸光度測定法を用いる場合は以下の補正を行う。TD 溶液の代わりに培地を添加する対照群 NSC_{生細胞組織} (non-specific colour in living tissues) を設け、一連の試験を実施する。NSC_{生細胞組織}対照試験の測定値から%NSC_{生細胞組織}を求め、次式により補正後%細胞生存率_{被験物質}を求める。

$$\text{補正後\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} = \text{未補正\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} - \% \text{NSC}_{\text{生細胞組織}}$$

なお、HPLC/UPLC 法を用いる場合、補正する必要は無い。

(2)還元作用を有する被験物質

紫外可視吸光度測定法又は HPLC/UPLC 法のいずれを用いる場合も以下の補正を行う。RhCE 組織を低温で処理し凍結死させた組織、又は RhCE 組織を水中にて細胞死させた組織を用い、これを非特異的 TD 対照群として NSMTT (non-specific MTT) を設け、一連の試験を実施する。NSMTT 対照試験の測定値から%NSMTT を求め、次式により補正後%細胞生存率_{被験物質}を求める。

$$\text{補正後\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} = \text{未補正\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} - \% \text{NSMTT}$$

(3)有色かつ還元作用を有する被験物質

紫外可視吸光度測定法を用いる場合は以下の補正を行う。有色の被験物質として%NSC_{生細胞組織}により、また還元作用を有する被験物質として%NSMTT による補正を行う。ここで、被験物質による直接 TS 還元の可能性を NSMTT のみで補正することはできず、死細胞組織における被験物質の吸収・保持による色素干渉も考慮する必要がある。この場合、NSC_{生細胞組織}対照物質が生細胞組織による被験物質の吸収・保持に伴う色素干渉を既に補正しているので、色素干渉に対して二重補正となりうる。そのため、死細胞組織における色素干渉である NSC_{死細胞組織}を加えることにより二重補正を

修正する。

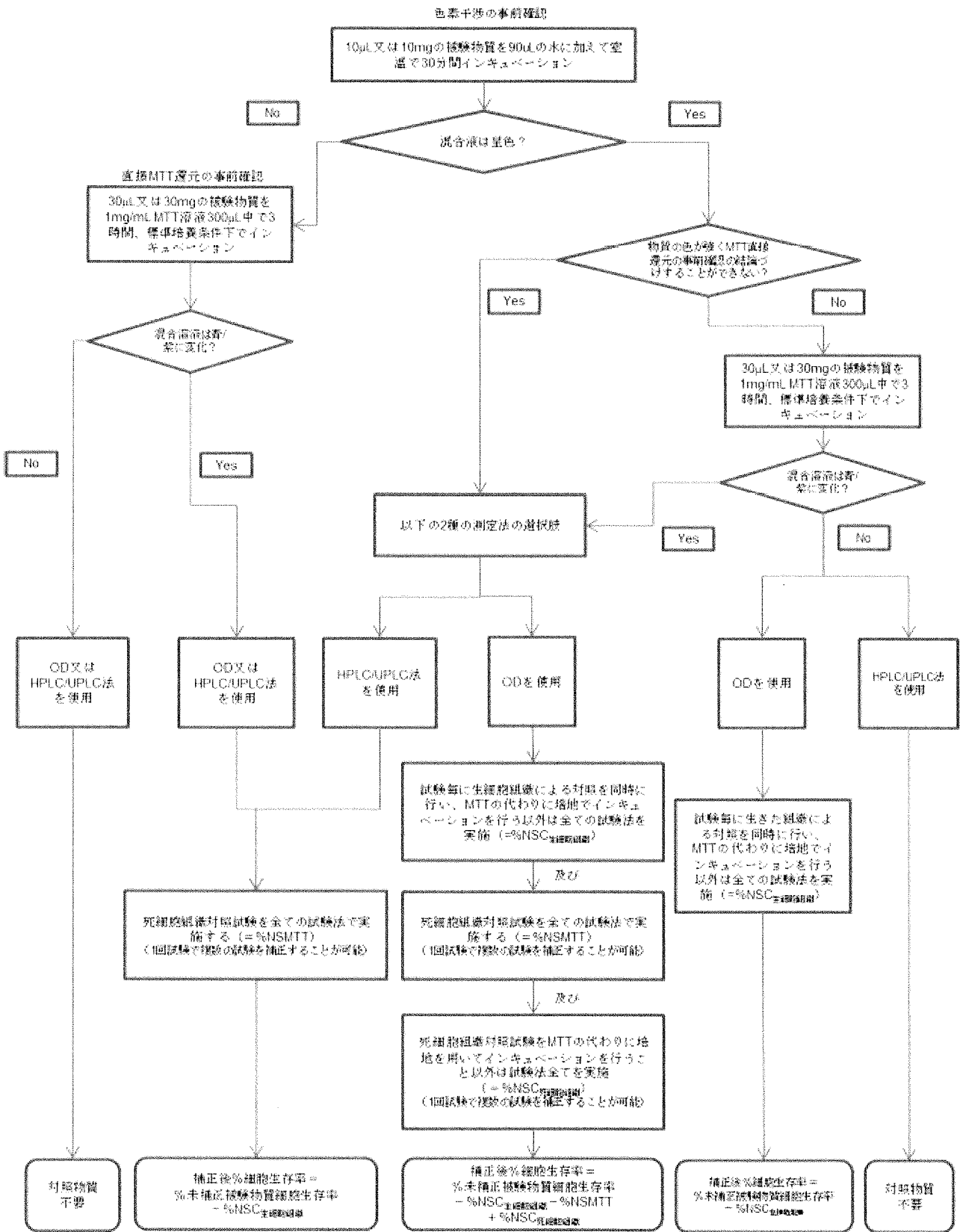
$$\text{補正後\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} = \text{未補正\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} - \% \text{NSMTT} - \% \text{NSC}_{\text{生細胞組織}} + \% \text{NSC}_{\text{死細胞組織}}$$

なお、有色かつ還元作用を有する被験物質について HPLC/UPLC 法を用いる場合は(2)還元作用を有する被験物質の補正方法に従う。

5. 引用文献

- 1) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.
- 2) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

図 1-2. 直接 MTT 還元及び/又は色素干渉物質を判定して扱うための決定木：SkinEthic™ HCE EIT VRM2 SOP に基づく
 (SkinEthic™ HCE EIT の検証済み標準試験法 2 標準業務手順書；Validated Reference Methods 2 Standard Operating Procedure)



補遺1-3. LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT法

1. 試験手順

1-1. 被験物質及び対照物質の適用

試験に供する物質あたり少なくとも3組織を用いる。「2. 本試験法の運用方法に関する留意点」に示すとおり、被験物質としては、原料、原料を製剤配合濃度以上の濃度に調製したもの、製剤等がある^{1),2)}。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。

液体の被験物質の場合、RhCE組織表面に均等に広がる量として、50μLを適用し、室温で1分間曝露する。曝露後、室温でMg²⁺/Ca²⁺ 不含リン酸緩衝生理食塩水を用いて十分に洗浄し被験物質を除去する。新たな培地を用い標準培養条件で24時間、曝露後の培養 (post-exposure incubation) を行う。

固体の被験物質の場合、RhCE組織の表面を覆うのに十分な量として、10mgを均一に適用し、標準培養条件 (温度 37±2°C、二酸化炭素濃度 5±1%、相対湿度 95%以上) で24時間曝露する。なお、可能な場合は必ず、適用前に粉碎して微粉とする。曝露後、室温でMg²⁺/Ca²⁺ 不含リン酸緩衝生理食塩水を用いて十分に洗浄し被験物質を除去する。

同時に陰性対照及び陽性対照も試験を行い、使用するRhCE組織の細胞生存率 (陰性対照による) と感度 (陽性対照による) がこれまでのデータに基づいて規定した試験成立範囲内であることを確認する。なお、陰性対照試験は被験物質を処理した組織の相対的な細胞生存率パーセント (%細胞生存率_{被験物質}) を計算するためのベースライン (100%細胞生存率) として用いる。

陽性対照物質は液体の被験物質についてはエタノールであり、固体の被験物質についてはラウリン酸である。陰性対照物質は液体の被験物質についてはCa²⁺/Mg²⁺ 不含リン酸緩衝生理食塩水であり、固体の被験物質については無処理である。

ベンチマーク物質は、特定の化学物質若しくは製品クラスに属する未知の化学物質の眼刺激性、又は刺激反応が特定の範囲内にある眼刺激性物質を相対的に評価する上で有用である。

1-2. 細胞生存率

0.3mLの希釈WST-8溶液を加え標準的培養条件下で240分間反応させる。黄色WST-8 FDは可溶性であるため、抽出の工程は不要である。同時に試験する陰性及び陽性対照群も同様に処理する。紫外可視吸光度測定法による波長450nm (レファレンス波長として650nm) におけるWST-8 FDの吸光度 (OD_{450nm} - OD_{650nm})、又はHPLC/UPLC法 (ピーク面積) によるWST-8 FD濃度をもとに、陰性対照に対する細胞生存率を算出する。

$$\%細胞生存率_{被験物質} = \frac{\text{被験物質の測定値の平均}}{\text{陰性対照の測定値の平均}} \times 100$$

2. 判定

- %細胞生存率_{被験物質}がカットオフ値よりも大きい場合、その被験物質は無刺激性と判定される。この場合、他の試験法による更なる試験の実施は不要である。
- %細胞生存率_{被験物質}がカットオフ値以下である場合、その被験物質の眼刺激性を判定することは出来ない。

表 1. %細胞生存率_{被験物質}による判定

被験物質の状態	無刺激性	判定不可
液体及び固体	>40%	≤40%

3. 試験実施上の留意点

3-1. 試験実施における注意事項

新たに試験を実施する試験施設では、RhCE法の習熟度確認物質（補遺2）等を活用し精度の向上に努めること。

3-2. 試験成立条件について

以下の3条件を満たした場合、試験の結果を判定に用いる。

- (1) 陰性対照のOD値が表2-1.『陰性対照に関する試験成立条件』を満たすこと。

表 2-1. 陰性対照に関する試験成立条件

被験物質の状態 [陰性対照物質]	下限値 (OD 値)	上限値 (OD 値)
液体 [Mg ²⁺ /Ca ²⁺ 不含リン酸緩衝生理食塩水] 固体 [無処理]	≥0.5	≤1.6

- (2) 陽性対照の%細胞生存率が表2-2.『陽性対照に関する試験成立条件』を満たすこと。

表 2-2. 陽性対照に関する試験成立条件

被験物質の状態 [陽性対照物質]	%細胞生存率
液体 [エタノール]	≤40%
固体 [ラウリン酸]	≤40%

- (3) 被験物質、陰性対照物質、及び陽性対照物質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。

(1)又は(2)の条件を満たさない場合、当該試験は不成立となり、繰り返し実施する必要がある。

(3)について、陰性対照又は陽性対照の試験結果がその条件を満たさない場合、当該試験は不成立となり、繰り返し実施する必要がある。

(3)について、被験物質の試験結果がその条件を満たさない場合、被験物質に関する試験は不成立と

なり、被験物質の再試験を実施する必要がある。

4. 細胞生存率の測定を干渉する場合について

被験物質自体が、曝露処理を経た被験物質が WST-8 FD の吸収波長と同様の吸収波長を有する場合（すなわち 450nm 付近、有色の被験物質）、又は TD を WST-8 FD に直接還元する作用を有する場合、細胞生存率の測定を干渉する可能性がある。これらの性質の有無を確認し、有する場合は被験物質の真の細胞生存率を求めるために補正が必要となるが、状況ごとの補正方法を以下のとおり示す。

(1) 有色の被験物質

紫外可視吸光度測定法を用いる場合は以下の補正を行う。TD 溶液の代わりに培地を添加する対照群 NSC_{生細胞組織} (non-specific colour in living tissues) を設け、一連の試験を実施する。NSC_{生細胞組織} 対照試験の測定値から %NSC_{生細胞組織} を求め、次式により補正後%細胞生存率_{被験物質} を求める。

$$\text{補正後\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} = \text{未補正\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} - \%NSC_{\text{生細胞組織}}$$

なお、HPLC/UPLC 法を用いる場合、補正する必要は無い。

(2) 還元作用を有する被験物質

紫外可視吸光度測定法又は HPLC/UPLC 法のいずれを用いる場合も以下の補正を行う。RhCE 組織を低温で処理し凍結死させた組織を用い、これを非特異的 TD 対照群として NSWST (non-specific WST) を設け、一連の試験を実施する。NSWST 対照試験の測定値から %NSWST を求め、次式により補正後%細胞生存率_{被験物質} を求める。

$$\text{補正後\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} = \text{未補正\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} - \%NSWST$$

(3) 有色かつ還元作用を有する被験物質

紫外可視吸光度測定法を用いる場合は以下の補正を行う。有色の被験物質として %NSC_{生細胞組織} により、また還元作用を有する被験物質として %NSWST による補正を行う。ここで、被験物質による直接 TS 還元の可能性を NSWST 対照物質のみで補正することはできず、死細胞組織における被験物質の吸収・保持による色素干渉も考慮する必要がある。この場合、NSC_{生細胞組織} 対照物質が生細胞組織による被験物質の吸収・保持に伴う色素干渉を既に補正しているので、色素干渉に対して二重補正となりうる。そのため、死細胞組織における色素干渉である NSC_{死細胞組織} を加えることにより二重補正を修正する。

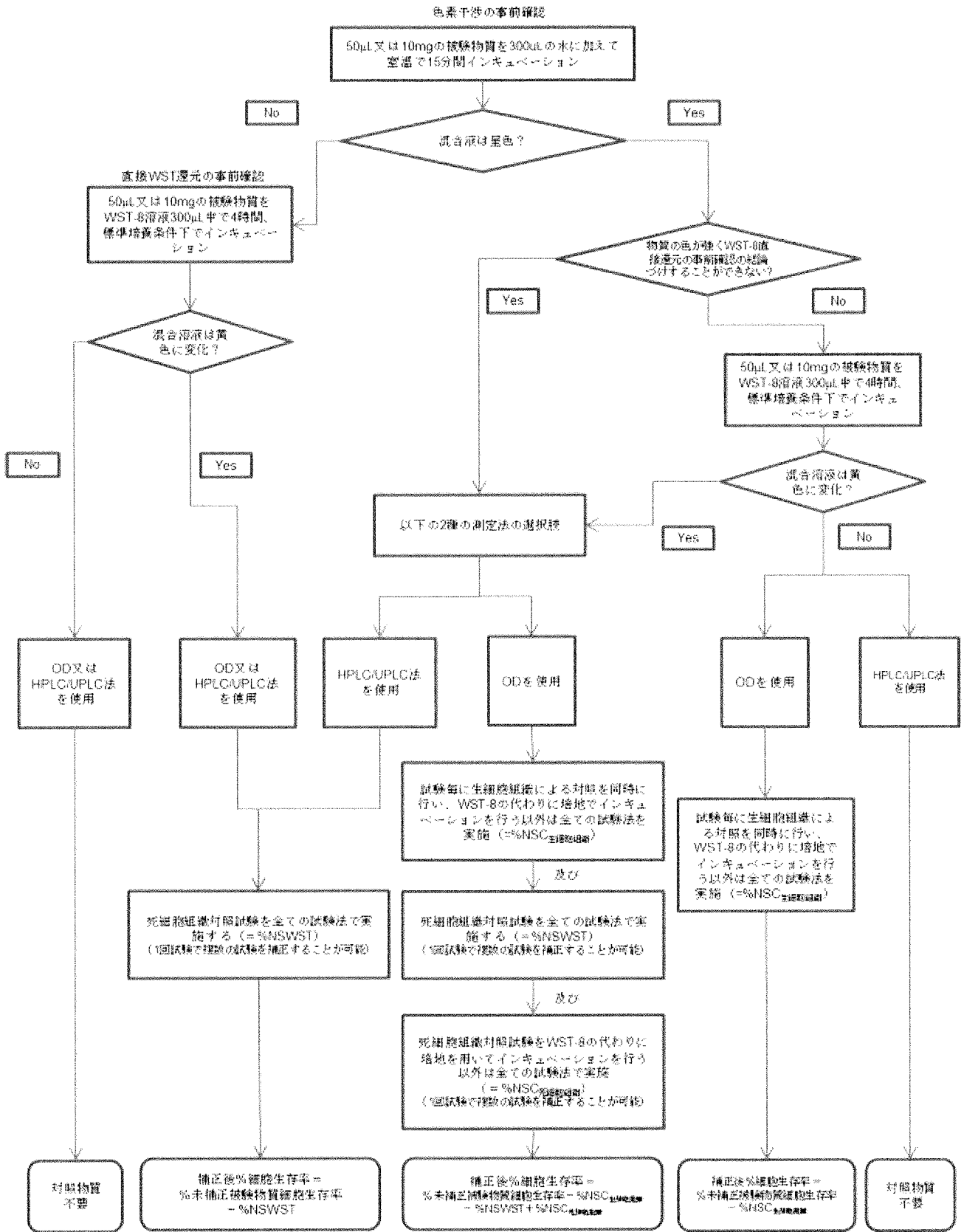
$$\text{補正後\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} = \text{未補正\%細胞生存率}_{\text{被験物質}} - \%NSWST - \%NSC_{\text{生細胞組織}} + \%NSC_{\text{死細胞組織}}$$

なお、有色かつ還元作用を有する被験物質について HPLC/UPLC 法を用いる場合は(2)還元作用を有する被験物質の補正方法に従う。

5. 引用文献

- 1) OECD (2018) Peer Review Report on Validation status of the LabCyte CORNEA-MODEL24 EYE IRRITATION TEST, OECD Series on Testing and Assessment No.282. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2018\)14&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2018)14&doclanguage=en)
- 2) JaCVAM (2017) Me-too validation report – Validation study for LabCyte CORENA-MODEL24 EYE IRRITATION TEST, Available at: <http://www.jacvam.jp/effort/effort02.html>

図 1-3. 直接 WST 還元及び/又は色素干渉物質を判定して扱うための決定木: LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT SOP に基づく



補遺 2 RhCE 法の習熟度確認物質リスト

物質名	CAS番号	官能基 分類 ¹	状態	各種EIT試験法での細胞生存率 (%)			UN GHS 区分	還元	色
				EpiOcular™ ²	SkinEthic™ HCE ³	LabCyte CORNEA-MODEL24 ³⁻¹			
In Vivo区分1⁴									
チオグリコール酸メチル	2365-48-2	カルボキシル酸エステル; チオアルコール	液	10.9±6.4	5.5±7.4	1.7±1.2	判定不可	有(強)	無
アクリル酸ヒドロキシエチル	818-61-1	アクリル酸; アルコール	液	7.5±4.75 ⁵	1.6±1.0	7.5±4.75	判定不可	無	無
2,5-ジメチル-2,5-ヘキサジオール	110-03-2	アルコール	固	2.3±0.2	0.2±0.1	2.8±2.6	判定不可	無	無
シュウ酸ナトリウム	62-76-0	オキソカルボキシル酸	固	29.0±1.2	5.3±4.1	3.7±1.5	判定不可	無	無
In Vivo区分2A⁴									
D-グルコン酸/N,N'-ビス(4-クロロフェニル)-3,12-ジイミノ-2,4,11,13-テトラアザテトラデカンジアミン (別名: グルコン酸クロルヘキシジン) (20%、水溶液) ⁶	18472-51-0	芳香族ヘテロサイクリックハロゲン化合物; アリールハロゲン化合物; ジヒドロキシル基; グアニジン	液	4.0±1.1	1.3±0.6	0.4±0.4	判定不可	無	有(弱)
安息香酸ナトリウム	532-32-1	アリール; カルボキシル酸	固	3.5±2.6	0.6±0.1	2.9±2.6	判定不可	無	無
In Vivo区分2B⁴									
N,N-ジエチル-m-トルアミド	134-62-3	ベンザミド	液	15.6±6.3	2.8±0.9	32.4±9.3	判定不可	無	無
2,2-ジメチル-3-メチレンビシクロ[2.2.1]ヘプタン (別名: カンフェン)	79-92-5	アルカン; 側鎖-炭素; アルケン; ビシクロヘプタン; 架橋環状炭素化合物; シクロアルカン	固	4.7±1.5	15.8±1.1	2.2±2.6	判定不可	無	無
In Vivo区分外⁴									
エチル硫酸1-エチル-3-メチルイミダゾリウム	342573-75-5	アルコキシ; アンモニウム塩; アリール; イミダゾール; 硫酸塩	液	79.9±6.4	79.4±6.2	48.0±8.9	区分外	無	無
ジカプリリルエーテル	629-82-3	アルコキシ; エーテル	液	97.8±4.3	95.2±3.0	92.7±5.0	区分外	無	無
ビペロニルブトキシド	51-03-6	アルコキシ; ベンゾジオキソール; ベンジル; エーテル	液	104.2±4.2	96.5±3.5	95.6±14.0	区分外	無	無
ポリエチレングリコール (PEG-40) 水添ヒマシ油	61788-85-0	アシラー; アルコール; アリル; エーテル	粘性	77.6±5.4	89.1±2.9	62.6±11.5	区分外	無	無
1-(4-クロロフェニル)-3-(3,4-ジクロロフェニル)尿素 (別名: トリクロカルバン、トリクロカルバニド)	101-20-2	芳香族ヘテロ環ハロゲン化合物; アリールハロゲン化合物; 尿素誘導体	固	106.7±5.3	101.9±6.6	77.8±9.0	区分外	無	無
2,2'-メチレンビス[6-(2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール] (別名: メチレンビスベンゾトリアゾリルテトラメチルブチルフェノール)	103597-45-1	第4級炭素分枝アルカン; 縮合多環芳香族; 縮合飽和ヘテロ環化合物; キノイド前駆体化合物; t-ブチル	固	102.7±13.4	97.7±5.6	90.2±5.8	区分外	無	無
テトラフルオロホウ酸カリウム	14075-53-7	無機塩	固	88.6±3.3	92.9±5.1	66.6±0.2	区分外	無	無

略号等: CAS番号: Chemical Abstracts Service Registry Number(CASRN); UN GHS: United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals

¹ OECD Toolbox 3.1 nested analysisにおいて割り当てられた官能基。

² The EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS)におけるEpiOcular™ EIT法に関して得られた結果に基づく。

³ バリデーション研究におけるSkinEthic™ HCE EIT法に関して得られた結果に基づく。

³⁻¹ バリデーション研究におけるLabCyte CORNEA-MODEL24 EIT法に関して得られた結果に基づく。

⁴ *in vivo*ウサギ眼刺激性試験 (OECD TG 405)から得られた結果及びUN GHSに基づく。

⁵ the CEFIC CONsortiumによる*in vitro*眼刺激性試験戦略研究 (*in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI)) から得られた結果に基づく。

⁶ 2A又は2Bへの分類はそれらを区別するUN GHS区分の解釈によるものである。すなわち、7日目まで影響が3匹中1匹又は2匹であるかにより2Aの区分となる。*in vivo*研究では3匹の動物が用いられた。1匹の動物での角膜混濁以外、全ての項目に関しては7日目以前にスコアが0に回復した。7日目までに完全に回復していない1匹の動物は角膜混濁スコア1 (7日目) となったものが9日目において完全に回復した。

補遺3 各モデルの眼刺激試験の比較

モデル試験法名	EpiOcular™ EIT法		SkinEthic™ HCE EIT法		LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT法	
	液体	固体	液体	固体	液体	固体
モデル表面積	0.6 cm ²	0.6 cm ²	0.5 cm ²	0.5 cm ²	0.3 cm ²	0.3 cm ²
評価する組織数	少なくとも2組織	少なくとも2組織	少なくとも2組織	少なくとも2組織	3組織	3組織
色素干渉の予備検討	50 μL + 1 mL H ₂ O、60分、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH (無色被験物質)、又は50 μL + 2 mL イソプロパノール、2-3時間、室温 (有色被験物質) 被験物質のOD (570±20 nm) がイソプロパノール又は水のODを差し引いた後で> 0.08(陰性対照の平均OD値の約5%に相当する)、生きた組織の適切な対照を設ける (living adapted controls)	50 mg + 1 mL H ₂ O、60分、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH (無色被験物質)、又は50 mg + 2 mL イソプロパノール、2-3時間、室温 (有色被験物質) 被験物質のOD (570±20 nm) がイソプロパノール又は水のODを差し引いた後で> 0.08 (陰性対照の平均OD値の約5%に相当する)、生きた組織の適切な対照を設ける (living adapted controls)	10 μL + 90 μL H ₂ O、30±2分、室温 (室温、18-28 °C) 被験物質が有色である場合、生きた組織の適切な対照を設ける (living adapted controls)	10 mg + 90 μL H ₂ O、30±2分、室温 (室温、18-28 °C) 被験物質が有色である場合、生きた組織の適切な対照を設ける (living adapted controls)	50 μL + 0.5 mL 蒸留水、15分、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH 被験物質が有色である場合、生きた組織の適切な対照を設ける (living adapted controls)	10 mg + 0.5 mL 蒸留水、15分、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH 被験物質が有色である場合、生きた組織の適切な対照を設ける (living adapted controls)
直接TD還元の前備検討	50 μL + 1 mL MTT 1 mg/mL溶液、180±15 分、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH 溶液が青/紫に変化した場合、凍結死させた適切な対照を設ける(50 μL MTT溶液に滅菌脱イオン水を加えたものを陰性対照とする)	50 mg + 1 mL MTT 1 mg/mL溶液、180±15分、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH 溶液が青/紫に変化した場合、凍結死させた適切な対照を設ける(50 μL MTT溶液に滅菌脱イオン水を加えたものを陰性対照とする)	30 μL + 300 μL MTT 1 mg/mL溶液、180±15分、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH 溶液が青/紫に変化した場合、水で死滅させた適切な対照を設ける(50 μL MTT溶液に滅菌脱イオン水を加えたものを陰性対照とする(30 μL MTT溶液に滅菌脱イオン水を加えたものを陰性対照とする))	30 mg + 300 μL MTT 1 mg/mL溶液、180±15分、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH 溶液が青/紫に変化した場合、水で死滅させた適切な対照を設ける(50 μL MTT溶液に滅菌脱イオン水を加えたものを陰性対照とする(30 μL MTT溶液に滅菌脱イオン水を加えたものを陰性対照とする))	50 μL + 300 μL 希釈したWST-8溶液、240±20分、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH 溶液が黄色に変化した場合、凍結死させた適切な対照を設ける。	10 mg + 300 μL 希釈したWST-8溶液、240±20分、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH 溶液が黄色に変化した場合、凍結死させた適切な対照を設ける。
前処理	20 μL Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 不含DPBS、30±2分、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH、遮光	20 μL Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 不含DPBS、30±2分、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH、遮光	-	-	-	-
適用量及び適用方法	50 μL (83.3 μL/cm ²)	50 mg (83.3 mg/cm ²) 校正された器具を使用(例 さじ1杯分で50mg塩化ナトリウム)	10 μL Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 不含DPBS + 30±2 μL (60 μL/cm ²)、粘性がある場合、ナイロンメッシュ使用	30 μL Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 不含DPBS + 30±2 mg (60 mg/cm ²)	50 μL (167 μL/cm ²)	10 mg (33 mg/cm ²)
曝露時間及び温度	30分(± 2分)培地中、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH	6時間(± 0.25時間)培地中、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH	30分(± 2分)培地中、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH	4時間(± 0.1時間)培地中、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH	1分(± 5秒)培地中、室温	24時間(± 1時間)培地中、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH
室温での洗浄	3回、100mL Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 不含DPBS	3回、100mL Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 不含DPBS	20mL、Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 不含DPBS	25mL、Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 不含DPBS	Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 不含DPBS、10回又はそれ以上流す	Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 不含DPBS、10回又はそれ以上流す
曝露後浸漬	12分(± 2分)室温、培地中	25分(± 2分)室温、培地中	30分(± 2分)、37 °C、5% CO ₂ 、95% RH、培地中	30分(± 2分)室温、培地中	-	-

補遺3 (つづき) 各モデルの眼刺激性試験の比較

試験法の要素	EpiOcular™ EIT法		SkinEthic™ HCE EIT法		LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT法	
曝露後培養	培地中で120分(±15分)、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH	培地中で18時間(±0.25時間)、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH	無し	培地中で18時間(±0.5時間)、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH	培地中で24時間(±1時間)、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH	無し
陰性対照	50 µL H ₂ O 同時試験	50 µL H ₂ O 同時試験	30 ± 2µL Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 不含DPBS 同時試験	30 ± 2µL Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 不含DPBS 同時試験	50 µL Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 不含DPBS 同時試験	無処理で同時試験
陽性対照	50 µL酢酸メチル、同時試験	50 µL酢酸メチル、同時試験	30±2µL酢酸メチル、同時試験	30±2µL酢酸メチル、同時試験	50 µLエタノール、同時試験	10 mgラウリン酸、同時試験
TD	300 µL 1 mg/mL MTT	300 µL 1 mg/mL MTT	300 µL 1 mg/mL MTT	300 µL 1 mg/mL MTT	300 µL 希釈WST-8溶液(10倍希釈 CCK-8)	300 µL 希釈WST-8溶液(10倍希釈 CCK-8)
TDとの反応時間と温度など	180分(±15分)、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH	180分(±15分)、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH	180分(±15分)、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH	180分(±15分)、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH	240分(±15分)、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH	240分(±15分)、37±2°C、5±1% CO ₂ 、≥95% RH
抽出溶媒	2 mLインプロパノール(組織を穿孔しインサートの上部及び下部から抽出)	2 mLインプロパノール(組織を穿孔しインサートの下部から抽出)	1.5 mLインプロパノール(組織を穿孔しインサートの上部及び下部から抽出)	1.5 mLインプロパノール(組織を穿孔しインサートの下部から抽出)	不要	不要
抽出時間と温度	2-3時間、振とう(~120 rpm)、室温又は4-10°C、オーバーナイト	2-3時間、振とう(~120 rpm)、室温又は4-10°C、オーバーナイト	4時間、振とう(~120 rpm)、室温又は4-10°C、少なくともオーバーナイト、振とうなし	少なくとも2時間、振とう(~120 rpm)、室温	不要	不要
ODの測定	570 nm (550 - 590 nm)、レファレンスフィルターを使用せず	570 nm (550 - 590 nm)、レファレンスフィルターを使用せず	570 nm (540 - 600 nm)、レファレンスフィルターを使用せず	570 nm (540 - 600 nm)、レファレンスフィルターを使用せず	450 nm、レファレンスフィルター使用(650 nm)	450 nm、レファレンスフィルター使用(650 nm)
組織の品質管理	100 µL0.3% (v/v) Triton X-100で処理 12.2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37.5 min	100 µL0.3% (v/v) Triton X-100で処理 12.2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37.5 min	SDS (50 µL)で30分処理 1.0 mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 3.5 mg/mL	SDS (50 µL)で30分処理 1.0 mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 3.5 mg/mL	SDS(25 µL)で60分処理 1.0 mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 4.0 mg/mL	SDS(25 µL)で60分処理 1.0 mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 4.0 mg/mL
試験成立条件	1. 陰性対照物質で処理した組織の平均OD値が> 0.8であり< 2.5 2. 陽性対照物質に30分曝露した組織の平均細胞生存率を陰性対照物質に対する割合で求めたものは< 50% 3. 複数回の組織間での細胞生存率の差が20%以下	1. 陰性対照物質で処理した組織の平均OD値が> 0.8であり< 2.5 2. 陽性対照物質に30分曝露した組織の平均細胞生存率を陰性対照物質に対する割合で求めたものは< 50% 3. 複数回の組織間での細胞生存率の差が20%以下	1. 陰性対照物質で処理した組織の平均OD値が> 1.0であり< 2.5 2. 陽性対照物質に30分曝露した組織の平均細胞生存率を陰性対照物質に対する割合で求めたものは≤ 30% 3. 複数回の組織間での細胞生存率の差が20%以下	1. 陰性対照物質で処理した組織の平均OD値が> 1.0であり< 2.5 2. 陽性対照物質に4時間曝露した組織の平均細胞生存率を陰性対照物質に対する割合で求めたものは≤ 20% 3. 複数回の組織間での細胞生存率の差が20%以下	1. 陰性対照物質で処理した組織の平均OD値が> 0.8であり≤ 1.6 2. 陽性対照物質処理した組織の平均細胞生存率を陰性対照物質に対する割合で求めたものは≤ 40% 3. 複数回の組織間での細胞生存率の標準偏差が18%以下	1. 陰性対照物質で処理した組織の平均OD値が> 0.8であり≤ 1.6 2. 陽性対照物質処理した組織の平均細胞生存率を陰性対照物質に対する割合で求めたものは≤ 40% 3. 複数回の組織間での細胞生存率の標準偏差が18%以下