OECD/OCDE

2017/10/09

試験ガイドライン No.460

眼腐食性物質および眼に対する重篤な刺激性物質を同定するためのフルオレセイン漏出試験法

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2017), Test No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-460-2017.pdf.

©OECD (2017)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at http://www.oecd.org/termsandconditions/

経済協力開発機構 （OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

採択
2017 年 10 月 9 日

化学物質の試験に関する OECD ガイドライン

眼腐食性物質および眼に対する重篤な刺激性物質を同定するためのフルオレセイン漏出試験法

はじめに

1. フルオレセイン漏出（FL）試験法は *in vitro* 試験法の一種であり、一定の状況と特殊な制約のもとで用いると、化学品（物質または混合物）を、国際連合（UN）の化学品の分類および表示に関する世界調和システム（GHS）（Category 1）、欧州連合（EU）の化学品の分類、表示、包装に関する規則（CLP 規則）（Category 1）、および米国環境保護庁（EPA）（Category 1）で定義されている、眼腐食性物質および眼に対する重篤な刺激性物質に分類することができる(1) (2) (3)。本試験ガイドラインの目的に沿い、重篤な刺激性物質については、被験物質の適用により、眼に 21 日以内に元に戻らない組織損傷を引き起こす化学物質、または損傷による重篤な視力低下を引き起こす化学品と定義し、眼腐食性物質については、眼に対し不可逆的な組織損傷を引き起こす化学品と定義する。これらの化学品は、UN GHS 区分 1、EU CLP 区分 1、または U.S. EPA 区分 I に分類される。

2. FL 試験法は、*in vivo* ウサギ眼試験の代替法として完全なものであるとはみなせないが、規制上の分類や表示を行うための階層的試験戦略の一部として使用することが推奨される。したがって、FL 試験法は、眼腐食性物質または眼に対する重篤な刺激性物質、とりわけ限られた種類の化学品（すなわち水溶性の物質や混合物）を同定するための、トップダウン方式の第一段階として推奨される(4)(5)。最も適切な試験方法の選択および本試験ガイドラインの使用については、重度の眼損傷性および眼刺激性についての「試験および評価に関する統合的アプローチ（IATA）」の OECD ガイダンス文書を参照のこと（10）。

3. 現在、一般に認められているところでは、異なる化学品の種類について刺激を網羅的に予測するための*in vivo* 眼試験（TG 405 (6)）は、当面の間、1 つの*in vitro* 眼刺激試験だけでは代替できない。ただし、（階層的な）試験戦略の中で、いくつかの代替試験法を計画的に組み合わせることによって、*in vivo* 眼試験を代替できる可能性がある(5)。トップダウン方式(5)は、既存の情報に基づき、化学品に強い刺激性があることが予想される場合に使用することを意図して設計されている。

© OECD, (2017)
本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/に掲載されている諸条件に従って自由に使用することができる。

本ガイドラインは、書面手続きにより、2017 年 10 月 9 日付けにて OECD 理事会で採択されたものである［C(2017)97］。

4. FL 試験法は、さらなる試験を行わずに、35 項で詳述する予測モデルに基づいて、適用範囲内の物質を、眼腐食性物質または眼に対する重篤な刺激性物質（UN GHS 区分 1、EU CLP 区分 1、U.S. EPA 区分 I）として同定することができる。同じことは混合物についても考えられるが、混合物はバリデーション試験において使用されていない。したがって、FL 試験法は、順次的な試験計画の TG 405 (6)の後で、化学品の眼刺激性または眼腐食性を判定するのに使用できる可能性がある。ただし、眼腐食性物質または眼に対する重篤な刺激性物質であることが FL 試験法では予測されない化学品については、i) FL 試験法による *in vitro* での眼腐食性または眼に対する重篤な刺激性の試験結果が偽陰性である化学品（UN GHS 区分 1、EU CLP 区分 1、U.S. EPA 区分 I）、ii) 眼腐食性または眼刺激性に分類されない化学品（UN GHS 区分外、EU CLP 区分外、U.S. EPA 区分 IV）、iii) 軽度または中等度の眼刺激性がある化学品（UN GHS 区分 2 および区分 2B、EU CLP 区分 2、U.S. EPA 区分 II および区分 III）の 3 種類のうち少なくとも 1 種類の化学品を正確に同定できる（*in vitro* や *in vivo* の）試験法を 1 つ以上用い、追加試験を行う必要があると予想される。

5. 本試験ガイドラインの目的は、不透過性のコンフルエントな上皮性細胞の単層に損傷を引き起こす能力により測定される、被験物質の潜在的な眼腐食性または眼に対する重篤な刺激性を評価するのに用いる手順について説明することである。経上皮透過性の完全性は、例えば結膜や角膜に見られる上皮の主要機能である。経上皮透過性は、さまざまな密着結合によって制御されている。眼刺激性となって現れる炎症や表面損傷の程度と相関して、*in vivo* での角膜上皮における透過性の上昇が認められている。

6. FL 試験法では、被験物質への短時間曝露後の毒性作用を、透過性インサート上で培養した Madin-Darby イヌ腎臓（MDCK）細胞の上皮性細胞の単層を通り抜けるフルオレセインナトリウムの透過性の増加によって測定する。発生するフルオレセイン漏出の量は、密着結合、デスモソーム結合、および細胞膜に対する化学物質誘発性損傷と比例するため、被験物質の眼毒潜在性を推定するのに用いることができる。補遺 I に、FL 試験法のインサート膜上で増殖する MDCK 細胞の図を示す。

7. 定義を補遺 II に示す。

最初に考慮すべき事項および限界

8. 本試験ガイドラインは、In Vitro Techniques in Toxicology（INVITTOX）のプロトコル 71 (7)に基づいている。このプロトコルについては、欧州動物実験代替法評価センター（ECVAM）(8)が米国動物実験代替法検証省庁間連絡委員会（US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods : ICCVAM）と日本動物実験代替法評価センター（Japanese Center for the Validation of Alternative Methods : JaCVAM）と共同で実施した国際的なバリデーション試験において評価が行われている。

© OECD, (2017)

9. FL 試験法は、バリデーション試験で示された、軽度または中等度の刺激性物質に分類すべき化学品や眼刺激性物質に分類すべきでない化学品（すなわち、GHS の区分 2A、2B、区分外、EU CLP の区分 2、区分外、US EPA の区分 II、III、IV）の同定には推奨されない(4) (8)。

10. FL 試験法は、水溶性の化学品（物質および混合物）にのみ適用できる。眼に対する化学品の重篤な刺激潜在性は、化学品が水溶性である場合、あるいは、その毒性作用が希釈によって影響されない場合には、通常、FL 試験法を用いることで、正確に予測できる(8)。化学品が実験条件下で水溶性に分類されるには、カルシウムを 1.0～1.8 mM の濃度で含み、フェノールレッドを含まない無菌のハンクス緩衝食塩水（HBSS）に、250 mg/mL 以上の濃度（カットオフ値である 100 mg/mL より濃い濃度）で溶ける必要がある。ただし、100 mg/mL より低い濃度で溶けるが、100 mg/mL より低い濃度でも 20%の FL を引き起こす（すなわち、FL_{20} < 100 mg/mL である）被験物質は、GHS 区分 1 または EPA 区分 1 に分類してもよい。

11. FL 試験法について確認されている限界に照らして、強酸、強塩基、細胞固定液、揮発性の高い化学品は、FL 試験法の適用範囲から除外される。これらの化学品には、FL 試験法では測定できないメカニズム、たとえば、広範囲の凝集、鹸化、反応しやすい特殊な化学的性質などがある。FL 試験法について他に確認されている限界としては、色のついた粘稠性の被験物質についての予測能力の結果に起因するものがある(8)。どちらのタイプの化学品も短時間の曝露後に細胞の単層から除去することが難しいことと、洗浄処理の回数を増やせば、FL 試験法の予測性が改善できた可能性があることが示唆されている。液体に懸濁させた固体の化学品は沈殿する傾向があり、細胞内の最終濃度を測定することが難しい可能性がある。こうした化学的および物理的クラスの物質をデータベースから除外すると、EU、EPA、および GHS 分類システム全体にわたる FL 試験法の正確性は、大幅に改善される(8)。

12. FL 試験法の目的（すなわち眼腐食性物質や眼に対する重篤な刺激性物質のみを同定すること）に照らして、偽陰性率（13 項を参照）は重要ではない。なぜなら、これらの物質は、他の十分にバリデートされた *in vitro* 試験法またはウサギを用いた試験法で、規制要件に応じて、証拠の重み付け方式(6)における順次的な試験計画を用いて、引き続き試験されることになるからである（3 項および 4 項も参照）。

13. FL 試験法について他に確認されている限界に、偽陰性および偽陽性率に起因するものがある。水溶性で眼腐食性または眼に対する重篤な刺激性を有する物質および混合物（UN GHS 区分 1、EU CLP 区分 1、U.S. EPA 区分 I）の同定に、FL 試験法をトップダウン方式の初期段階と して用いると、*in vivo* の結果に比較して、FL 試験法の偽陽性率は 7%（7/103）（UN GHS および EU CLP）から 9%（9/99）（U.S. EPA）、偽陰性率は 54%（15/28）（U.S. EPA）から 56%（27/48）（UN GHS および EU CLP）であった。FL 試験法において偽陽性および／または偽陰性の結果を示す化学品のグループについて、ここでは定義しない。

© OECD, (2017)

14. MDCK 細胞の培養には、固有の技術的な限界がいくつか伴う。フルオレセインナトリウム色素が細胞の単層を通るのを妨げる密着結合は、細胞継代数の増加に伴い次第に損なわれる。密着結合の形成が不完全であると、無処理対照における FL が増大する。したがって、無処理対照における許容最大漏出率の定義は重要である(38 項の 0%漏出を参照)。すべての *in vitro* 試験がそうであるように、細胞は時間が経つにつれて形質転換する可能性があり、したがって、試験においては継代数の範囲を明確に提示することが非常に重要である。

15. 場合によっては、現行の適用範囲が広がる可能性があるが、適用範囲の拡大は、試験が行われた被験物質の拡大されたデータセット(試験を通して得られたものであることが望ましい)の分析後に限られる(4)。本試験ガイドラインは、新しい情報やデータを考慮に入れながら、更新する予定である。

16. FL 試験法を確立することから始める施設は、補遺 III に示す習熟度確認物質を用いること。施設は、規制上の危険有害性分類の目的で FL 試験のデータを提出する前に、この習熟度確認物質を用いて、FL 試験法を実施する自身の技術的能力を示すことができる。

試験の概要

17. FL 試験法は、細胞毒性と細胞機能に基づく *in vitro* 試験であり、尿細管上皮細胞由来の細胞株である MDCK CB997 細胞のコンフルエントな細胞の単層上で行う。細胞の単層は、半透過性のインサート上に細胞を増殖させたもので、*in vivo* の角膜上皮の非増殖状態をモデルにしている。MDCK は、十分に確立された細胞株であり、結膜および角膜上皮の頂端側に見られるものに似た密着結合やデスモソーム結合を形成する。*in vivo* では密着結合やデスモソーム結合が、溶質や異物が角膜上皮を透過するのを防いでいる。密着結合やデスモソーム結合の損傷に起因する上皮の不透過性の損失は、化学物質によって引き起こされる眼刺激の初期の現象の 1 つである。

18. インサートの頂端側で増殖させたコンフルエントな細胞の単層には、被験物質が適用される。ヒトへの曝露における通常のクリアランス率を示す場合、1 分間の短時間曝露がルーチン的に用いられる。短い曝露時間の利点は、水性の物質および混合物の場合、曝露後に容易に除去できれば、手際よく試験できることである。これにより、ヒトにおける化学的影響と、より直接的に結果を比較することができる。この後、被験物質を除去してから、無毒性で、強い蛍光を持つフルオレセインナトリウム色素が、細胞の単層の頂端側に 30 分間添加される。被験物質によって密着結合に引き起こされる損傷は、定められた時間内に細胞の単層を通って漏出したフルオレセインの量で判定される。

© OECD, (2017)

19. 細胞の単層とインサートの膜を通過して、（フルオレセインナトリウム色素が漏れて入る）ウェル内にある所定量の溶液に入るフルオレセインナトリウム色素の量は、ウェル内のフルオレセイン濃度を蛍光分析法で測定して決定される。フルオレセイン漏出（FL）量は、ブランクおよび最大漏出の 2 つの対照の蛍光強度（FI）の読み取り値を基準にして計算される。被験物質の設定された濃度ごとの漏出の割合と、したがって密着結合に対する損傷量は、これらの対照を基準にして表される。さらに、FL_{20}（すなわち、無処理のコンフルエントな細胞の単層と無細胞のインサートで記録された値を基準にして 20%の FL を引き起こす濃度）が計算される。眼腐食性物質および眼に対する重篤な刺激性物質の予測モデルでは、FL_{20}（mg/mL）の値が用いられる（35 項を参照）。

20. 回収率は、*in vivo* の眼刺激試験でも評価が行われる、被験物質の毒性プロファイルの重要な部分である。予備的な分析では、回収率のデータ（被験物質への曝露後 72 時間まで）によって、INVITTOX のプロトコル 71 の予測能力が潜在的に向上する可能性があるが、さらなる評価が必要であり、この評価には、おそらく追加データ（追加試験によって得ることが望ましい）が役立つことが示されている(7)。本試験ガイドラインは、新しい情報やデータを考慮に入れながら、更新する予定である。

手順

細胞の単層の作製

21. MDCK CB997 細胞の単層を作製する。作製には、Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12（DMEM/F12）（1 倍濃縮 L-グルタミン、15 mM HEPES、1.0～1.8 mM 濃度のカルシウム、10%熱不活化ウシ胎仔血清）を入れた細胞培養フラスコで増殖させたサブコンフルエントな細胞を用いる。細胞の単層の作製において重要なことは、密着結合の形成と完全性を保証するために、FL 試験法において使用する培地や溶液にはすべて、カルシウムが 1.0～1.8 mM（111～200 mg/L）の濃度で含まれていることである。密着結合の形成の均一性と再現性を保証するために、細胞の継代数の範囲を制御する。できれば、細胞の継代数は解凍後 3～30 回にする。この継代範囲の細胞は類似した機能を有しており、再現性のある試験結果を得るのに役立つためである。

22. FL 試験法を実施する前に、細胞をトリプシン処理によってフラスコから剥がして遠心分離した後、適量の細胞を、24 ウェルプレート（補遺 I を参照）に入れたインサート内に播く。細胞を播くインサートは、混合セルロースエステル膜の付いた直径 12 mm、厚さ 80～150 μm、細孔の大きさ 0.45 μm のものを用いること。バリデーション試験では、Millicell-HA 12 mm のインサートが用いられた。インサートの性状や膜の種類は、細胞の増殖や化学結合に影響を及ぼす可能性があるため、重要である。特定の種類の化学品が Millicell-HA インサート膜に

© OECD, (2017)

結合して、結果の解釈に影響を及ぼす可能性がある。他の膜を用いる場合は、同等性の証明を、熟練度評価用化学物質（補遺 III を参照）を用いて行うこと。

23. インサート膜に結合する化学品は、プラスに帯電している膜に引きつけられるカチオン性の化学物質（塩化ベンザルコニウムなど）の方が多い(8)。インサートの膜に結合する化学品は、化学品への曝露時間を増大させて、化学物質の潜在毒性を過大評価させる可能性があるが、インサートの膜に結合したカチオン性の化学物質にフルオレセインが結合することにより、インサートを通過するフルオレセインの漏出量が減少して、化学物質の潜在毒性を過少評価させる可能性もある。こうした可能性は、膜のみを最高濃度の被験物質に曝露してから、規定濃度のフルオレセインナトリウム色素を標準的な時間添加することで（無細胞対照）、容易に監視できる。フルオレセインナトリウム色素と結合したインサートの膜は、被験物質を洗い落とすと黄色く見える。したがって、化学品が細胞に及ぼす影響を解釈できるためには、被験物質の結合特性を知っておくことが必要不可欠である。

24. インサート上に細胞を播くときは、化学品の曝露時にコンフルエントな細胞の単層が形成されているように行うこと。インサート 1 個あたり、1.6×10^5 個の細胞（細胞密度 4×10^5 個/mL の細胞懸濁液 400 µL）を添加する。この条件では、通常 96 時間の培養で、コンフルエントな細胞の単層が得られる。30 項で述べる目視による管理時に記録された損傷が、操作に起因するものであることが保証できるように、細胞を播く前にインサートの目視検査を行う。

25. MDCK 細胞の培養には炭酸ガスインキュベーターを使用し、CO_2 濃度を 5±1%、温度を 37±1ºC に維持する。細胞は、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌による汚染がないことを確認する。

被験物質および対照物質の適用

26. 被験物質の原液は、実験を行うたびに用時調製し、調製後 30 分以内に使用する。血清蛋白結合を避けるため、被験物質の調製には、カルシウムを含み（濃度 1.0～1.8 mM）、フェノールレッドを含まない HBSS を用いる。被験物質について、HBSS 中濃度が 250 mg/mL における溶解度を試験前に測定すること。被験物質が、この濃度で 30 分以上、安定な懸濁液または乳濁液を形成する（すなわち、均一性を維持することができ、沈殿することも 2 相以上に分離することもない）場合は、HBSS を引き続き溶媒として使用してよい。一方、被験物質が、この濃度で HBSS に不溶であることがわかった場合は、FL 試験法に代わる別の試験法の使用を考慮する。被験物質が HBSS に不溶であることがわかった場合に軽油を溶媒として使用するのは、このような条件下における FL 試験法の実施について判断できるだけの十分なデータがないため、慎重に考慮する。

© OECD, (2017)

27. 試験する化学品はすべて、カルシウムを含み（濃度 1.0～1.8 mM）、フェノールレッドを含まない無菌の HBSS を用いて原液の調製と希釈（重量／体積パーセントで）を行い、1、25、100、250 mg/mL と原液そのままか飽和溶液の、決まった 5 つの濃度で行う。固体の化学品を試験するときは、750 mg/mL の非常に高い濃度を追加する。なお、この濃度の被験物質を細胞に添加するには、ポジティブディスプレイスメントピペットを用いなければならない場合がある。毒性が 25～100 mg/mL であることがわかった場合は、1、25、50、75、100 mg/mL の濃度を追加して 2 回ずつ試験する。許容基準が満たされているならば、FL_{20} 値の導出は、これらの濃度から行う。

28. 培地を除去し、37ºC に加温した無菌の HBSS（カルシウムを含み（濃度 1.0～1.8 mM）、フェノールレッドを含まない）で 2 回洗った後、コンフルエントな細胞の単層に被験物質を適用する。インサート膜は、被験物質との不適合性に起因すると誤解される可能性のある実験前の損傷がないか、事前に目視により検査しておく。実験は、各濃度の被験物質および対照について、3 系列以上で行う。室温で 1 分間曝露した後、被験物質を慎重に吸引除去し、37ºC に加温した無菌の HBSS（カルシウムを含み（濃度 1.0～1.8 mM）、フェノールレッドを含まない）で細胞の単層を 2 回洗い、フルオレセインの漏出をただちに測定する。

29. 実験を行うごとに同時陰性対照（NC）と同時陽性対照（PC）を置いて、細胞の単層の完全性（NC により）と細胞の感度（PC により）が、従来の定義された許容の範囲内であることを示す。PC には、100 mg/mL の濃度の Brij 35（CAS 番号 9002-92-0）が推奨される。この濃度は、約 30%のフルオレセイン漏出（フルオレセイン漏出、すなわち、細胞の単層への損傷の許容範囲が 20～40%）を引き起こす濃度である。NC には、カルシウムを含み（濃度 1.0～1.8 mM）、フェノールレッドを含まない HBSS が推奨される（無処理、ブランク対照）。FL_{20} 値を計算することを考慮して、実験を行うたびに最大漏出対照も置くこと。最大漏出の測定には、無細胞の対照インサートを用いる。

フルオレセイン透過性の定量

30. 被験物質および対照物質の除去後、ただちに、0.1 mg/mL のフルオレセインナトリウム溶液（カルシウムを 1.0～1.8 mM の濃度で含み、フェノールレッドを含まない HBSS に、0.01% (w/v)になるように溶解）400µL を Millicell-HA インサートに添加する。培養した細胞を 30 分間、室温でインキュベーションする。インキュベーション後、各ウェルからインサートを注意深く取り出す。インサート膜を 1 枚 1 枚、目視により検査し、操作中に起こった可能性のある損傷があれば、これを記載する。

31. 細胞の単層とインサートを介して漏出したフルオレセインの量を、インサートを取り出した後のウェル内の残存溶液量で定量する。測定は、分光蛍光光度計を用いて、励起波長 485 nm と蛍光波長 530 nm で行う。分光蛍光光度計の感度は、最大 FL 量（細胞のないインサートに

© OECD, (2017)

おける数値）と最小 FL 量（NC で処理したコンフルエントな細胞の単層のあるインサートにおける数値）間の差が最大になるように設定すること。使用する分光蛍光光度計による違いがあるため、対照の FL 量が最大を示すときの蛍光強度が 4000 より高くなる感度を用いることを推奨する。ただし、FL 量の最大値は 9999 より高くならないこと。また、FL の最大強度が、使用する分光蛍光光度計の線形範囲に入っていること。

結果の解釈と予測モデル

32. FL 量は、化学品によって誘発される、密着結合への損傷の程度に比例する。化学品の各試験濃度における FL 率は、NC の FL 値（NC で処理したコンフルエントな細胞の単層における読み取り値）と最大漏出対照の FL 値（無細胞インサートを通過した FL 量の読み取り値）を基準にして得られた被験物質の FL 値から求められる。

最大漏出蛍光強度の平均値を x とし、
NC における 0%漏出蛍光強度の平均値を y とすると、
100%漏出の平均値 z は、0%漏出蛍光強度の平均値 y を、最大漏出蛍光強度の平均値から引き算することで得られる。
すなわち、z = x - y

33. 決定した濃度ごとの漏出割合は、3 系列で測定した蛍光強度の平均値（m）から 0%漏出蛍光強度の平均値（y）を引き、100%漏出値（z）で割ることで得られる。すなわち、%FL = [(m-y) / z] x 100%

m = 濃度ごとの、3 系列で測定した蛍光強度の平均値
% FL = 細胞層を通して漏出するフルオレセインの割合

34. 20%の FL を引き起こす化学物質濃度の算出には、下記の式を用いること。

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

ここで、
D = 抑制の割合
A = 損傷の割合（フルオレセインの漏出率が 20%）
C = フルオレセイン漏出率が A より小さい割合
C = フルオレセイン漏出率が A より大きい割合
M_C = C の濃度（mg/mL）
M_B = B の濃度（mg/mL）

© OECD, (2017)

35. 化学品を眼腐食性物質または眼に対する重篤な刺激性物質であると予測する際の、FL_{20} のカットオフ値は、下記のとおりである。

FL_{20} (mg/mL)	**UN GHS C&L**	**EU CLP C&L**	**U.S. EPA C&L**
≤ 100	区分 1	区分 1	区分 I

C&L：分類および表示

36. FL 試験法の使用は、水溶性の、眼腐食性物質および眼に対する重篤な刺激性物質（UN GHS 区分 1、EU CLP 区分 1、U.S. EPA 区分 I）を同定する場合に限定することを推奨する（1 項および 10 項を参照）。

37. 水溶性の化学品（物質および混合物）(4) (7) (8)を、「眼に対する重篤な損傷性」（UN GHS または EU CLP における区分 1）または「眼腐食性物質または眼に対する重篤な刺激性物質」（U.S. EPA 区分 I）と同定するには、被験物質によって誘発される FL_{20} 値が 100 mg/mL 以下である必要がある。

結果の許容基準

38. 最大 FL 値の平均（x）は 4000 より高く（31 項を参照）、0%漏出の平均値（y）は 300 以下、および 100%漏出の平均値（z）は 3700～6000 であること。

39. 陽性対照において細胞層の 20～40%（フルオレセインの漏出率として測定）に損傷が引き起こされた場合に、試験が許容されるものとする。

データおよび報告

データ

40. 実験を行うごとに、個々のウェル（2 系列以上）のデータ（たとえば、分類を含む、各被験物質についての蛍光強度値と FL 率の計算データ）を、表形式で報告する。これに加えて、試験を行うごとに、個々の測定値（複数系列）の平均値±標準偏差を報告する。

試験報告書

41. 試験報告書には、以下の情報を含めること。

被験物質および対照物質

© OECD, (2017)

- ケミカルアブストラクツサービス（CAS）で使用されている構造名などの化学名。別名があれば、後ろに併記
- CAS 番号があれば記載
- わかる範囲で、化学品（物質または混合物）の純度と組成（重量パーセントで）
- 試験の実施に関連する物理化学的性質（たとえば、物理的状態、揮発性、pH、安定性、水溶性、化学的クラス）
- 試験前に被験物質または対照物質の処理（たとえば、加温、粉砕）を行った場合は、それを記載
- 保存条件

用いた試験法およびプロトコルの妥当性

- 試験方法の適用範囲や限界に関する考慮事項を記載

試験条件

- 用いた細胞系に関する記述（細胞株についての真正性の証明やマイコプラズマの有無など）
- 用いた試験手順の詳細
- 用いた被験物質の濃度
- 被験物質への曝露の時間
- フルオレセインとのインキュベーションの時間
- 試験手順を修正した場合は、その説明
- 用いた評価基準の説明
- モデルの従来のデータ（たとえば、陰性対照、陽性対照、ベンチマークの化学品（用いた場合））の参照元
- 各施設で証明した技術的熟練に関する情報

結果

- 実験ごと、および 2 系列以上での測定ごとに、個々の被験物質および対照のデータを表形式で記載（個々の結果、平均、標準偏差を含む）
- 用いた予測モデルや判定基準に照らして導かれた分類
- 観察された他の影響に関する説明

結果の考察

- 決定的でない結果（FL_{20} > 100 mg/mL、35 項を参照）に関する考慮事項を記載

結論

© OECD, (2017)

LITERATURE

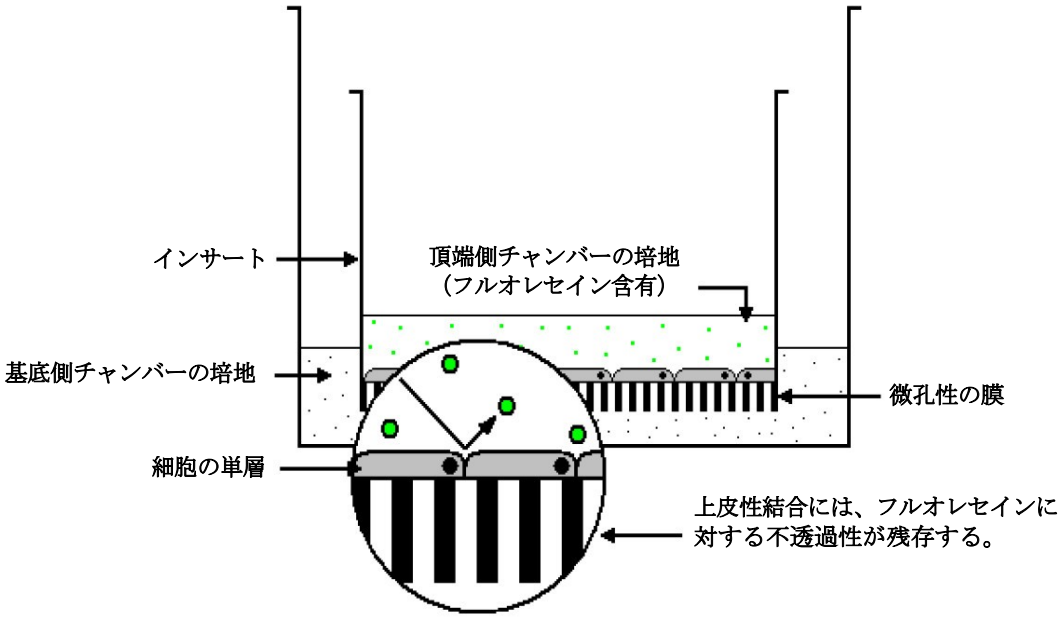
1. UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]
2. EC (2008), Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006, Official Journal of the European Union L353, 1-1355.
3. U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.
4. EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing. Available under *Publications* at: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]
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. OECD (2002), *Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing. doi: 10.1787/9789264070646-en
7. EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Available at: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu]
8. EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing. Available under *Validation Study Documents*, Section *Eye Irritation* at: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]
9. OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]
10. OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No.263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

© OECD, (2017)

補遺 I

FL 試験法用のインサート膜上で増殖する MDCK 細胞の図

インサートの半透過性膜上で、MDCK 細胞のコンフルエントな細胞の層が増殖する。インサートは、24 ウェルプレートのウェル内に置く。



図出典：Wilkinson, P.J. (2006)『Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure』（Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.）

© OECD, (2017)

補遺 II

定義

正確性：試験法の結果と、受け入れられている基準値との間の一致の程度。試験法の性能を判断する尺度であり、「妥当性」の 1 つである。この用語は、試験法の正しい結果の割合を意味する「一致度」と同義で用いられることが多い。

EPA 区分 I：腐食性（眼組織の不可逆的破壊）または 21 日間を超えて持続する角膜の病変または炎症を引き起こす化学品(4)。

EU CLP（化学品の分類、表示、包装に関する欧州連合規則）：欧州連合（EU）において実施されている、化学品（物質および混合物）を分類するための UN GHS システム(3)。

偽陰性率：陽性の化学物質のうち、試験法によって誤って陰性となったものの割合。試験法の性能を表す指標の 1 つ。

偽陽性率：陰性の化学物質のうち、試験法によって誤って陽性となったものの割合。試験法の性能を表す指標の 1 つ。

FL_{20}：被験物質によって引き起こされる、細胞層を通過するフルオレセイン漏出率が 20%のときの、被験物質濃度の測定によって推定できる。

フルオレセイン漏出量：細胞層を通過するフルオレセインの量。蛍光分析法で測定する。

GHS（国際連合（UN）による化学品の分類および表示に関する世界調和システム）：化学品（物質および化合物）の分類を、物理化学的危険性、健康有害性、環境有害性の、統一された種類や程度に応じて提案するとともに、人々（雇用者、労働者、輸送担当者、消費者、緊急時対応者など）や環境を保護するために、有害な影響に関する情報を伝えられるように、絵表示、注意喚起語、危険有害性情報、注意書き、安全データシートなど、対応する伝達要素を取り扱うシステム(2)。

GHS 区分 1：眼の前側表面に被験物質を適用すると、適用後 21 日以内に完全には回復しない眼の組織損傷または重篤な視力低下を引き起こす化学品。

有害性：有機体、身体、個体群（副次集団）に曝露すると、有害な影響を引き起こす可能性のある作用物質または状況に本来備わっている性質。

© OECD, (2017)

混合物：UN GHS (2)関連では、互いに反応しない 2 つ以上の物質からなる混合物または溶液のことをいう。

陰性対照：被験物質に曝露しないこと以外は、被験物質の試料と同じ処理をする試料。溶媒が試験系と相互作用するかどうかを示すために、陰性対照は、被験物質に曝露する試料および他の対照とともに処理される。

区分外：UN GHS の区分 1、区分 2A、区分 2B、EU CLP の区分 1、区分 2、U.S. EPA の区分 I、区分 II、区分 III の眼刺激性物質のいずれにも分類されない化学品(2) (3) (4)。

眼腐食性物質：(a) 眼の不可逆的な組織損傷を引き起こす化学品。(b) UN GHS 区分 1、EU CLP 区分 1、U.S. EPA 区分 I の眼刺激性物質に分類される化学品(2) (3) (4)。

眼に対する刺激性物質:(a) 眼の前側の表面に適用すると、眼に可逆的な変化を引き起こす化学品。(b) UN GHS 区分 2A、区分 2B、EU CLP 区分 2、U.S. EPA 区分 II、または区分 III の、眼刺激性物質に分類される化学品(2)(3)(4)。

眼に対する重篤な刺激性物質：(a) 眼の前側表面に適用すると、適用後 21 日以内に元に戻らない眼の組織損傷または重篤な視力低下を引き起こす化学品。(b) UN GHS 区分 1、EU CLP 区分 1、U.S. EPA 区分 I の、眼刺激性物質に分類される化学品(2) (3) (4)。

陽性対照：曝露する物質が、陽性反応を引き起こすことがわかっている物質であること以外、被験物質の試料と同じ処理をする試料。陽性対照の反応の経時的変動が評価できるためには、陽性反応が過度にならない必要がある。

習熟度確認物質：バリデート済みの基準となる試験法について、試験法の実施経験のない施設が習熟度を確認するために使用することができる、基準となる化学品のリストの一部。

妥当性：試験とその対象となる影響との関連性と、特定の目的にとって意義や有用性があるかを示す。試験が試験対象となる生物学的影響を正確に測定または予測できる程度を示す。妥当性には、試験法の正確性（一致度）への考慮が盛り込まれる(9)。

信頼性：同じプロトコルを用いて試験法を実施する際に、施設内および施設間において、試験法を経時的に再現性よく実施することが可能な程度の尺度。施設内および施設間の再現性と、施設内再現性を計算して評価する、

置換試験：危険有害性の同定やリスク評価のために日常的に使用され、かつ一般に認められている試験の代わりになることを意図して設計された試験であり、試験対象になる可能性のあるすべ

© OECD, (2017)

ての状況および化学品のための、一般に認められている試験に比較して、ヒトや動物の健康や環境（該当する場合）を同等かそれ以上に保護できることが確認されている試験。

感度: すべての陽性または活性のある化学品のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。断定的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で重要な考慮事項(9)。

眼に対する重篤な損傷性: 眼の前側表面に被験物質を適用すると、適用後 21 日以内に完全には元に戻らない眼の組織損傷または重篤な視力低下を生じさせること。

溶媒対照： 試験系のすべての成分が含まれている無処理の試料。被験物質に曝露した対照や他の対照の試料で処理する溶媒など、同一の溶媒に溶解した被験物質に曝露した試料について、ベースラインの反応を確かめるための試料。溶媒対照は、同時陰性対照とともに試験すると、試験系と相互作用するかどうかも示すことができる。

特異度: すべての陰性または不活性な化学品のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。断定的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で重要な考慮事項。

物質： UN GHS との関連では、自然の状態の、または製造過程で得られる化学元素とその化合物のことをいい、その製品の安定性を保つために必要な添加物や、その工程から派生する不純物は含まれるが、その物質の安定性に影響を及ぼすこともその組成を変化させることもなく分離する可能性のある溶剤は除く。

階層的試験戦略： 被験物質に関する既存のすべての情報を、指定された順番で階層的に精査する試験計画。段階ごとに証拠の重み付けのプロセスを用いて、危険有害性分類を決定するための十分な情報が得られるがどうかを決定してから、その次の段階に進む。被験物質の刺激性を既存の情報に基づいて分類できる場合、さらなる試験は必要ない。被験物質の刺激潜在性を既存の情報に基づいて分類できない場合は、明確な分類を行えるまで、一連の階層的な動物試験手順が遂行される。

バリデートされた試験法： 特定の目的のために、妥当性（正確性を含む）および信頼性を確認するためのバリデーション試験が完了している試験法。提唱された目的にふさわしいことがわかっている正確性と信頼性に関し、十分な性能を有していない可能性があることに留意しなければならない(9)。

証拠の重み付け： 化学品の潜在危険有害性に関する結論およびその裏付けを得る際に、さまざまな情報の強みと弱みを考慮するプロセス。

© OECD, (2017)

補遺 III

FL 試験法の習熟度確認物質

施設は、本試験ガイドラインに準拠する試験法を日常的に使用する前に、表 1 で推奨する 8 つの化学品について眼腐食性の分類を正確に同定して、技術的習熟度を確認する必要がある。この 8 つの化学品は、*in vivo* ウサギ眼試験（TG405）の結果に基づく局所眼刺激性または腐食性に対する反応の範囲（すなわち、UN GHS および EU CLP の区分 1、2A、2B、区分外）を示すために選抜したものである(1)(2)(6)。ただし、FL 試験法のバリデートされた有用性（すなわち、眼腐食性または眼に対する重篤な刺激性を同定すること）を考慮した場合、習熟度を確認するための分類の目的に対して、2 つの結果（腐食性または重篤な刺激性か、非腐食性または非重篤な刺激性）しかない。他の選抜基準は、市販されている化学品であること、高品質の *in vivo* 参照データが入手可能であること、および FL 試験法から高品質のデータが得られることであった。このような理由から、習熟度確認用の化学物質は、FL 試験法の後向きバリデーションに使用された『Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing（眼刺激試験の代替法としてのフルオレセイン漏出試験の背景レビュー文書）』(8)から選抜した。

© OECD, (2017)

表 1：FL 試験法の習熟度確認物質

化学品	CAS NR	化学的クラス [1]	物理的形状	*in vivo* 分類 [2]	*in vitro* 分類 [3]
塩化ベンザルコニウム（5%）	8001-54-5	オニウム化合物	液体	区分 1	腐食性･重篤な刺激性
塩酸プロメタジン	58-33-3	アミン／アミジン、複素環系、有機硫黄化合物	固体	区分 1	腐食性･重篤な刺激性
水酸化ナトリウム（10%）	1310-73-2	アルカリ	液体	区分 1	腐食性･重篤な刺激性
ラウリル硫酸ナトリウム（15%）	151-21-3	カルボン酸（塩）	液体	区分 1	腐食性･重篤な刺激性
4-カルボキシベンズアルデヒド	619-66-9	カルボン酸、アルデヒド	固体	区分 2(A)	非腐食性･非重篤な刺激性
硝酸アンモニウム	6484-52-2	無機塩類	固体	区分 2(A)	非腐食性･非重篤な刺激性
2-メチルアセト酢酸エチル	609-14-3	ケトン、エステル	液体	区分 2(B)	非腐食性･非重篤な刺激性
グリセロール	56-81-5	アルコール	液体	区分外	非腐食性･非重篤な刺激性

略語：CAS NR = ケミカルアブストラクトサービス（CAS）登録番号

[1] 化学的クラスの各被験物質への割り当ては、標準的な分類法を用いて、米国の国立医学図書館（National Library of Medicine）の医学問題表題集（Medical Subject Headings：MeSH）分類体系（http//www.nlm.nih.gov/mesh で閲覧できる）に基づいて行った。

[2] UN GHS と EU CLP を用い、*in vivo* ウサギ眼試験（OECD TG405）の結果に基づいて行った(1)(2)(6)。

[3] FL 試験法（INVITTOX のプロトコル 71）で得られた結果に基づいて行った。

© OECD, (2017)