OECD/OCDE

2018/06/25

試験ガイドライン No.491

i）眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学物質、およびii）眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性への分類が不要な化学物質を同定するための、*in vitro* 短時間曝露試験法

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 (2018), 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, 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-491-2018.pdf.

©OECD (2018)

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

OECD/OCDE 491

2018 年 6 月 25 日
採択

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

I）眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学物質、および II）眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性への分類が不要な化学物質を同定するための、*in vitro* 短時間曝露試験法

はじめに

1. 短時間曝露（STE）試験法は *in vitro* 試験法の 1 つであり、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）」（1）により定義されている、眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学物質（物質および混合物）と、眼に対する重篤な損傷性にも眼刺激性にも分類不要な化学物質の有害性の分類および表示について、特定の条件の下で特定の制限付きで使用できる。

2. 長年、眼に対する化学物質の有害性は、*in vivo* ウサギ眼試験（TG 405）を用いて主に評価されてきた。一般に認められているとおり、様々な化学物質分類に向け、完全な範囲の眼に対する重篤な損傷性／眼刺激性反応全体を予測するには、当面、単一の *in vitro* 代替試験では *in vivo* ウサギ眼試験の十分な代替は不可能と考えられる。ただし、（段階的）試験戦略において用いられる代替試験法を戦略的に組み合わせることで、ウサギ眼試験を完全に代替できることが十分に考えられる（2）。トップダウン方式は、既存の情報に基づき、刺激性が高い、または眼に対する重篤な損傷性を引き起こすことが予測可能な化学物質の試験用に設計されている。逆に、ボトムアップ方式は、既存の情報に基づき、分類を要するほどの眼刺激性を引き起こさないと予測可能な化学物質の試験用に設計されている。STE 試験法は、*in vivo* ウサギ眼試験の完全な代替であるとはみなされないが、トップダウン／ボトムアップ方式など、規制上の分類や表示に向けた段階的試験戦略の一部として用いるのに適していることで、追加試験をせずに（i）眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学物質（UN GHS 区分 1）、および（ii）眼刺激性にも眼に対する重篤な損傷性にも分類不要な（揮発性の高い物質、および界面活性剤以外の固体の化学物質すべてを除く）化学物質（UN GHS 区分外）を同定する（1）（2）。ただし、STE 試験法により、眼に対する重篤な損傷性（UN GHS 区分 1）を引き起こすとも、UN GHS 区分外（眼に対する重篤な損傷性も眼刺激性も引き起こさない）とも予測されない化学物質は、最終的な分類を確立する追加試験が必要になると考えられる。

© OECD, （2018）

本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/で入手可能な条項および条件に従って自由に使用できる。

化学物質の評価における「データの相互受け入れ」に関する協議会決定事項補遺 I 改訂のための、権限委譲に関する協議会決定事項[C（2018）49]に従って、本ガイドラインは、OECD の化学物質委員会と化学物質、農薬およびバイオテクノロジーに関する作業部会との合同会議により、書面による手順で 2018 年 6 月 25 日に改訂された。

また、UN GHS 以外の分類法に従ってボトムアップ方式の STE を用いる場合、その前に適切な規制当局に相談すること。最も適切な試験法の選択および本試験ガイドラインの使用については、「眼に対する重篤な損傷性および眼刺激性の試験および評価に関する統合的アプローチについての OECD ガイダンス文書」（14）に照らして確かめること。

3. 本試験ガイドライン（TG）の目的は、被験化学物質の眼に対する有害性の評価に用いる手順を記述することにあり、有害性は、短時間曝露試験法におけるその細胞毒性誘発能に基づいて測定される。化学物質が角膜上皮細胞に及ぼす細胞毒性作用は、角膜上皮の損傷および眼刺激性に導く重要な作用機序（MOA）である。STE 試験法での細胞生存率は定量的測定により評価され、生体染色色素である MTT（3-（4,5-ジメチルチアゾール-2-イル）-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド、別名チアゾリルブルーテトラゾリウムブロミド）が生細胞で産生されるブルーホルマザン塩に酵素変換後、細胞からの抽出により測定される（3）。得られた細胞生存率を溶剤対照と比較し（相対生存率）、また、この細胞生存率を用い、被験化学物質の眼に対する有害性の可能性について推定する。5%および 0.05%両濃度での被験化学物質の細胞生存率が 70%以下になる場合、本化学物質は UN GHS 区分 1 に分類される。逆に、5%および 0.05%両濃度での被験化学物質の細胞生存率が 70%超になる場合、本化学物質は UN GHS 区分外と予測される。

4. 本試験ガイドラインにおける「被験化学物質」という用語は、試験の対象となる物質を指すのに用いられ、物質および／または混合物の試験に対する STE 試験法の適用可能性とは無関係である。定義を補遺 I に示す。

最初に考慮すべき事項および限界

5. 本試験ガイドラインは、花王株式会社が作成したプロトコールに基づいている（4）。プロトコールは 2 種類のバリデーション試験をテーマとしたもので、1 つは日本動物実験代替法学会（JSAAE）（5）、もう 1 つは日本動物実験代替法評価センター（JaCVAM）（6）による。本試験法に関するバリデーション試験報告書および背景レビュー文書に基づき、NICEATM（代替法評価に関する毒性学プログラム省庁間センター）／ICCVAM（米国動物実験代替法検証省庁間連絡委員会）によりピアレビューが実施された（7）。

6. STE 試験法を、眼に対する重篤な損傷性（UN GHS 区分 1）（1）を引き起こす化学物質（物質および混合物）の同定に用いた場合、125 種類の化学物質（物質と混合物の両方を含む）について本試験法で得られたデータと、*in vivo* ウサギ眼試験のデータとを比較したところ、全体の正確性は 83%（104/125）、偽陽性率は 1%（1/86）、偽陰性率は 51%（20/39）であることを示した（7）。この場合に得られた偽陰性率は重大ではない。何故なら、濃度 5%で 70%以下、および濃度 0.05%で 70%超の細胞生存率をもたらす被験化学物質はすべて、規制要件に応じ、また、現在推奨されている順次的な試験戦略および証拠の重み付け方式に従って、十分にバリデートされた別の *in vitro* 試験法により、または最後の選択肢として *in vivo* ウサギ眼試験により、後に検討されると考えられるからである（1）（8）。主に単一成分物質が検討されたが、混合物の試験データも限られた量ながら存在する。それでも、本試験法は、多成分物質および混合物の試験に技術的には適用可能である。混合物、検討困難な化学物質（例えば、不安定な物質）、または本ガイドラインに記載されている適用領域内に明確に含まれない被験化学物質につ

© OECD, (2018)

いて試験を検討する場合、そうした試験の結果が科学的に意味のある結果をもたらすか否かについて事前に考慮する。STE 試験法を UN GHS 区分 1 としての被験化学物質同定に用いる場合、それ以外の具体的な欠点は示さなかった。研究者は、被験化学物質に本試験法を用いて検討することが考えられ、それにより、5%および 0.05%の両濃度での細胞生存率が 70%以下の場合には、追加試験を行わず、UN GHS 区分 1 と分類されるべき眼に対する重篤な損傷性を引き起こす反応が示唆されると認めること。

7. STE 試験法を、眼刺激性および眼に対する重篤な損傷性に分類不要な化学物質（物質および混合物）（すなわち、UN GHS 区分外）の同定に用いた場合、130 種類の化学物質（物質と混合物の両方を含む）について本試験法で得られたデータと、*in vivo* ウサギ眼試験とを比較したところ、全体の正確性は 85%（110/130）、偽陰性率は 12%（9/73）、偽陽性率は 19%（11/57）であることを示した（7）。揮発性の高い物質、および界面活性剤以外の固体の物質をデータセットから除いた場合、全体の正確性は 90%（92/102）、偽陰性率は 2%（1/54）、偽陽性率は 19%（9/48）に改善する（7）。結果として、STE 試験法を、眼刺激性および眼に対する重篤な損傷性に分類不要な被験化学物質（UN GHS 区分外）の同定に用いる場合、本試験法の可能性としての欠点には、i）蒸気圧 6 kPa 超の高揮発性物質、および ii）界面活性剤および界面活性剤のみからなる混合物以外の固体の化学物質（物質および混合物）の高い偽陰性率が挙げられる。こうした化学物質は、STE 試験法の適用領域から除外される（7）。

8. 段落 6 および 7 で述べた化学物質に加え、STE 試験法で生成されたデータセットには 40 種類の混合物に関する社内データも含まれ、*in vivo* Draize 眼刺激性試験と比較した場合、UN GHS 分類システム下での分類不要な混合物予測の正確性は 88%（35/40）、偽陽性率は 50%（5/10）、偽陰性率は 0%（0/30）を示した（9）。よって、STE 試験法は、ボトムアップ方式で UN GHS 区分外としての混合物の同定に適用できるが、例外として、固体の物質に対する限界の範囲を広げ、界面活性剤のみからなる固体の混合物以外の混合物は除かれる。さらに、蒸気圧が 6 kPa より高い物質を含有する混合物は、過小予測の可能性を回避するよう慎重に評価し、個別に正当化する。

9. STE 試験法では、被験化学物質を UN GHS 区分 2、区分 2A（眼刺激性）、UN GHS 区分 2B（軽度の眼刺激性）と同定する場合、UN GHS 区分 1 の化学物質の相当数が UN GHS 区分 2、2A、または 2B と過小予測され、また、UN GHS 区分外の化学物質が UN GHS 区分 2、2A、または 2B と過大予測されることから使用できない（7）。このため、別の適切な方法による追加試験が必要と考えられる。

10. STE 試験法は、生理食塩水、5%ジメチルスルホキシド（DMSO）含有生理食塩水、またはミネラルオイルに溶解または 5 分間以上均一に懸濁する被験化学物質に適している。STE 試験法は、生理食塩水、5% DMSO 含有生理食塩水、またはミネラルオイルに不溶または 5 分間以上均一に懸濁できない被験化学物質には適さない。短時間曝露のため、STE 試験法にミネラルオイルを用いることは可能である。したがって、STE 試験法は、上記提唱された 3 つの溶剤の少なくとも 1 つに混和性を有する場合、水に不溶の被験化学物質（例えば、長鎖脂肪アルコールまたはケトン）の眼に対する有害性の予測に適している（4）。

11. 本試験ガイドラインにおける「被験化学物質」という用語は、試験の対象となっている物質を指すのに用いられ、物質および／または混合物の試験に対す

© OECD, (2018)

る STE 試験法の適用可能性とは無関係である。

本試験の概要

12. STE 試験法は、96 ウェルポリカーボネート製マイクロプレート上で培養した Statens Seruminstitut Rabbit Cornea（SIRC）細胞のコンフルエントな単層において実施される、細胞毒性に基づく *in vitro* アッセイである（4）。被験化学物質に 5 分間曝露後、MTT アッセイによる SIRC 細胞の相対生存率として、細胞毒性を定量的に測定する（4）。細胞生存率の低下は、眼損傷に導く悪影響の可能性の予測に用いられる。

13. ウサギの眼に滴下した溶液の 80%が 3～4 分以内に結膜嚢を通じ排出される一方、ヒトの眼に滴下した溶液の 80%超は 1～2 分以内に排出されることが報告されている（10）。STE 試験法は、これらの曝露時間との近似を試み、エンドポイントとして細胞毒性を用い、被験化学物質への 5 分間曝露後の SIRC 細胞の損傷度を評価する。

習熟度の立証

14. 本試験ガイドライン記載の STE 試験法を定常的に用いる場合、その前に試験実施施設は、表 1 推奨の 11 種類の物質を正しく分類することにより、技術的な習熟度を立証する。これらの物質には、*in vivo* ウサギ眼試験（TG 405）の結果および UN GHS 分類システム（1）に基づき、眼に対する重篤な損傷性または眼刺激性のあらゆる範囲の反応を代表するものが選択された。それ以外の選択基準は、これらの物質が市販品であること、高品質の *in vivo* 参照データが入手可能であること、および STE 試験法から高品質の *in vitro* データが入手可能であることとした（3）。収載した物質が入手できない状況や正当化可能な状況では、ここに記載された基準と同じ基準が用いられれば、適切な *in vivo* および *in vitro* 参照データを入手可能な別の物質を用いることが考えられる。

表 1：習熟度確認物質一覧表

物質名	CASRN	化学物質分類 [1]	物理的状態	*In Vivo 試験での UN GHS 区分* [2]	STE 試験での溶剤	STE 試験での UN GHS 区分
塩化ベンザルコニウム（10%、水性）	8001-54-5	オニウム化合物	液体	区分 1	生理食塩水	区分 1
Triton X-100（100%）	9002-93-1	エーテル	液体	区分 1	生理食塩水	区分 1
アシッドレッド 92	18472-87-2	複素環式化合物；臭素化合物；塩素化合物	固体	区分 1	生理食塩水	区分 1
水酸化ナトリウム	1310-73-2	アルカリ；無機化学物質	固体	区分 1[3]	生理食塩水	区分 1

© OECD, (2018)

ブチロラクトン	96-48-0	ラクトン；複素環式化合物	液体	区分 2A	生理食塩水	予測不能
1-オクタノール	111-87-5	アルコール	液体	区分 2A／B[4]	ミネラルオイル	予測不能
シクロペンタノール	96-41-3	アルコール；炭化水素（環式）	液体	区分 2A／B[5]	生理食塩水	予測不能
酢酸 2-エトキシエチル	111-15-9	アルコール；エーテル	液体	区分外	生理食塩水	区分外
ドデカン	112-40-3	炭化水素（非環式）	液体	区分外	ミネラルオイル	区分外
メチルイソブチルケトン	108-10-1	ケトン	液体	区分外	ミネラルオイル	区分外
n,n-ジメチルグアニジン硫酸塩	598-65-2	アミジン；硫黄化合物	固体	区分外	生理食塩水	区分外

略語：CASRN：ケミカルアブストラクトサービス（CAS）登録番号

[1] 化学物質分類の割り当ては、過去の NICEATM 公表文献から得られた情報を用いて行い、情報が得られない場合、米国国立医学図書館医学件名標目表（MeSH®）（［米国国立医学図書館］ChemIDplus®経由、http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ で入手可能）、および NICEATM により作成された構造決定を用いて行った。

[2] *In vivo* ウサギ眼試験（OECD TG 405）および UN GHS（1）を用いた結果に基づく。

[3] 区分 1 としての分類は、100%水酸化ナトリウムの皮膚腐食性（OECD TG 435 の皮膚腐食性に関する習熟度確認化学物質として記載）、および UN GHS 区分 1 の基準（1）に基づく。

[4] 2A か 2B の分類は、これら 2 つの区分間を識別する UN GHS 基準の解釈に左右される。すなわち、区分 2A の分類生成に必要な 7 日目の影響について、動物 6 例中 2 例か 6 例中 4 例かにより決定される。*In vivo* データセットは 2 試験からなり、それぞれ 3 例とした。1 つ目の試験では、3 例中 2 例が区分 2A の分類を要する影響を 7 日目に示した（11）が、2 つ目の試験では、3 例すべてにおけるすべてのエンドポイントが、区分 2B の分類を要するスコア 0 に 7 日目までに回復した（12）。

[5] 2A か 2B の分類は、これら 2 つの区分間を識別する UN GHS 基準の解釈に左右される。すなわち、区分 2A の分類生成に必要な 7 日目の影響について、動物 3 例中 1 例か 3 例中 2 例かにより決定される。*In vivo* 試験は 3 例とした。角膜混濁かつ結膜充血の 1 例を除き、すべてのエンドポイントが 7 日目までにスコア 0 に回復した。7 日目までに完全な回復を示さなかった 1 例の角膜混濁スコアは 1、結膜充血スコアは 1（7 日目）で、14 日目に完全に回復した（11）。

© OECD, (2018)

手順

細胞単層の調製

15. STE 試験法の実施には、ウサギ角膜細胞株である SIRC を用いる。SIRC 細胞は、米国培養細胞系統保存機関（ATCC）CCL60 など、十分な適格性を有する細胞バンクから入手することが推奨される。

16. SIRC 細胞は 37°C、5% CO_2 存在下の加湿環境下で培養し、培養フラスコには、10%ウシ胎児血清（FBS）、L-グルタミン 2 mM、ペニシリン 50～100 単位/mL、ストレプトマイシン 50～100 µg/mL を添加したイーグル最小必須培地（MEM）からなる培地を含有させる。培養フラスコ内でコンフルエントに達した細胞は、セルスクレーパー使用の有無に関わらず、トリプシン-エチレンジアミン四酢酸溶液を用いて分離する。定常的な試験での使用前に、細胞を培養フラスコ中で増殖させ（例えば、2～3 回の継代培養）、解凍からの継代培養の実施は 25 回以内とする。

17. 次に、STE 試験への使用準備ができた細胞を、適切な密度に調製し 96 ウェルプレートに播種する。推奨される細胞播種密度は、培養液量 200 µL において、細胞を播種後 4 日目に用いる場合は 6.0×10^3 cells/ウェル、あるいは、細胞を播種後 5 日目に用いる場合は 3.0×10^3 cells/ウェルである。適切な密度で培地に播種された STE 試験に用いる細胞は、試験実施時点（すなわち、播種後 4 日目または 5 日目）で 80%超のコンフルエンスに達することになる。

被験化学物質および対照物質の適用

18. 被験化学物質を溶解または懸濁する溶剤の第 1 選択は、生理食塩水である。被験化学物質について溶解度が低いと認められる場合、あるいは生理食塩水に溶解も 5 分間以上均一な懸濁もできない場合、第 2 選択の溶剤として 5% DMSO（CAS 番号：67-68-5）含有生理食塩水を用いる。生理食塩水および 5% DMSO 含有生理食塩水のいずれにも、溶解も 5 分間以上均一な懸濁もできない被験化学物質には、第 3 選択の溶剤としてミネラルオイル（CAS 番号：8042-47-5）を用いる。

19. 被験化学物質を選択した溶剤に 5%（w/w）の濃度で溶解または均一に懸濁させ、さらに 10 倍段階希釈により濃度を 0.5%および 0.05%にする。各被験化学物質は、5%と 0.05%の両濃度で検討される。96 ウェルプレートの培養細胞を、濃度 5%か 0.05%いずれかの被験化学物質溶液（または懸濁液）200 µL/ウェルに室温で 5 分間曝露させる。被験化学物質（単一成分物質、多成分物質、または混合物）は、その純度に関わりなく無希釈の物質とみなし、試験方法に従って希釈または懸濁する。

20. 段落 16 記載の培地を、反復試験ごとの各プレートの培地対照として用いる。さらに、細胞には、反復試験ごとの各プレートにおいて溶剤対照試料にも曝露させる。段落 18 記載の溶剤は、SIRC 細胞の生存率に悪影響を及ぼさないことが確認されている。

21. STE 試験法では、0.01%ラウリル硫酸ナトリウム（SLS）含有生理食塩水を、反復試験ごとの各プレートの陽性対照として用いる。陽性対照の細胞生存率算出のため、反復試験ごとの各プレートには生理食塩水の溶剤対照も含めなければならない。

© OECD, (2018)

22. ブランクは光学濃度（OD）補正の判定に必要で、培地、またはカルシウムおよびマグネシウム不含リン酸緩衝生理食塩水（PBS-）を含有し、かつ細胞不含のウェルにおいて実施する。

23. 各試料（5%および 0.05%の被験化学物質、培地対照、溶剤対照、陽性対照）は、適切な被験化学物質または対照化学物質 200 µL に細胞を 5 分間室温で曝露させることにより、反復試験ごとに 3 重に検討する。

24. 特定の化学物質または製品クラスに属す未知の化学物質について眼刺激性を評価する場合、あるいは、刺激反応が特定の範囲内にある眼刺激物質について相対的な刺激性を評価する場合、ベンチマーク物質が有用である。

細胞生存率の測定

25. 曝露後細胞を PBS 200 µL で 2 回洗浄し、MTT 溶液 200 µL（培地 1 mL 当たり MTT 0.5 mg）を添加する。インキュベーター（37˚C、5% CO_2）で 2 時間の反応時間経過後、MTT 溶液の上清を移し、0.04 N 塩酸-イソプロパノール 200 µL を室温暗所で 60 分間添加することにより MTT ホルマザンを抽出し、MTT ホルマザン溶液の吸光度をプレートリーダーにより 570 nm で測定する。曝露後洗浄を行っても相当な量の被験化学物質が試験系に残留している場合のみ、MTT アッセイに対し（着色剤または直接的な MTT 還元剤による）被験化学物質の干渉が生じる。このことは、3D 再構築ヒト角膜または再構築ヒト表皮に多くの場合当てはまるが、STE 試験法に用いられる 2D 細胞培養物で生じる可能性は低い。ただし、着色剤または直接的な MTT 還元剤由来の残留物質は、光学濃度の測定に干渉すると考えられることから、STE 試験の使用者はその結果を慎重に評価する。試験から区分 1 の予測となる場合、干渉の可能性に対処する追加措置は不要である。可能であれば、そうした干渉の発生について判断するデータを生成する（例えば、被験物質で処理した SIRC 細胞含有ウェルと、被験物質で処理した細胞不含ウェルから得られた MTT アッセイの OD 測定結果を比較する実験の実施）。MTT アッセイに対する干渉が結果に影響を及ぼすと予測される場合、代替の細胞毒性試験（例えば、ニュートラルレッド）を使用できる。ただし、例えば、表 1 の習熟度確認物質の試験により MTT アッセイと同程度の結果を得られると示すことができ、また、過去のデータが入手可能であることで比較可能な実行許容基準を得られる場合に限る（段落 29 参照）。

結果の解釈および予測モデル

26. 次に、各被験化学物質について得られた OD 値を用い、溶剤対照の生存率を 100%とした場合の相対的な細胞生存率を算出する。相対的な細胞生存率は百分率で表され、被験化学物質の OD と溶剤対照の OD の両方の値からそれぞれブランクの OD を減じた後、被験化学物質の OD を溶剤対照の OD で除することにより得られる。

$$\text{細胞生存率（\%）} = \frac{(\text{被験物質の}OD_{570}) - (\text{ブランクの}OD_{570})}{(\text{溶媒対照の}OD_{570}) - (\text{ブランクの}OD_{570})} \times 100$$

同様に、各溶剤対照の相対的な細胞生存率は百分率で表され、各溶剤対照の OD と培地対照の OD の両方の値からそれぞれブランクの OD を減じた後、各溶剤対照の OD を培地対照の OD で除することにより得られる。

© OECD, (2018)

27. ウェルにはそれぞれ 3 つの複製を含み、独立した反復試験を 3 回（すなわち、n=9）実施する。独立した反復試験ごとの各被験化学物質および溶剤対照の 3 ウェルに関する算術平均値を用い、相対的な細胞生存率の算術平均値を算出する。細胞生存率の最終的な算術平均値は、独立した 3 回の反復試験から算出する。

28. 眼に対する重篤な損傷性を引き起こす被験化学物質（UN GHS 区分 1）、および眼刺激性および眼に対する重篤な損傷性の分類が不要な被験化学物質（UN GHS 区分外）の同定について、細胞生存率のカットオフ値を以下に示す。

© OECD, (2018)

表 2：STE 試験法の予測モデル

細胞生存率		UN GHS 分類	適用可能性
濃度 5%	濃度 0.05%		
> 70%	> 70%	区分外	以下を除く物質および混合物。 i） 蒸気圧が 6 kPa1 超の高揮発性物質、ならびに ii） 界面活性剤および界面活性剤のみからなる混合物以外の固体の化学物質（物質および混合物）
≤ 70%	> 70%	予測不能	適用外
≤ 70%	≤ 70%	区分 1	物質および混合物 [2]

[1] 蒸気圧が 6 kPa より高い物質を含有する混合物は、過小予測の可能性を回避するよう慎重に評価し、個別に正当化する。

[2] 主に単一成分物質について得られた結果に基づくが、混合物の試験データも限られた量ながら存在する。それでも、本試験法は、多成分物質および混合物の試験に技術的には適用可能である。規制上の目的を意図したデータ生成の場合、混合物について本試験ガイドラインを用いる前に、当該混合物がその目的に十分な結果を提示できるか否か、また提示できる場合にはその理由を検討する。当該混合物の試験に関する規制要件がある場合、こうした検討は不要である。

[3] この結果から単独での予測はできない。分類目的では、STE 試験の結果を試験および評価に関する統合的アプローチ（IATA）（3）に照らして検討する。

許容基準

29. 以下の基準をすべて満たす場合、試験結果は許容可能と判断される。

a） ブランクの光学濃度を減じた後、培地対照（培地に曝露）の光学濃度が 0.3 以上であること。

b） 溶剤対照の生存率が、培地対照に比べ 80%以上であること。複数の溶剤対照を反復試験ごとに用いる場合、これらの溶剤により検討される被験化学物質を適格とするには、各溶剤対照が 80%超の細胞生存率を示す必要がある。

c） 陽性対照（0.01% SLS）で得られる細胞生存率は、過去の平均値の標準偏差 2 以内にあること。陽性対照の許容上限および許容下限は頻繁に更新する。すなわち、3 ヵ月ごとに更新するか、試験の実施頻度が低い（すなわち、月 1 回未満）試験実施施設では、許容可能な試験の実施ごとに更新する。試験実施施設が、統計的に頑健な陽性対照の分布の確立に十分な回数の実験を完了していない場合、最初の複数の定常的な試験中に内部分布が構築される間、当該試験実施施設における過去のデータに従って、本試

© OECD, (2018)

験法の開発企業により確立された許容上限および許容下限（すなわち、21.1～62.3%）を用いることは許容可能である。

上記基準 a）、b）、c）のいずれかを満たさない場合、追加の反復試験を実施する。

d）　独立した 3 回の反復試験から得られた最終的な細胞生存率の標準偏差は、被験化学物質の濃度 5%と 0.05%の両方で 15%未満であること。標準偏差が 15%以上の場合、その結果を用いず、さらに 3 回反復試験を実施する。

データおよび報告

データ

30.　各反復試験の個別ウェルごとのデータ（例えば、細胞生存率の値）、ならびに全体の平均、標準偏差（SD）、および分類について報告する。

試験報告書

31.　試験報告書は、以下の情報を含む。

被験化学物質および対照物質

- 単一成分物質：IUPAC または CAS 名、CAS 登録番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはその他の識別子などの化学物質識別情報
- 多成分物質、UVCB、混合物：入手可能な範囲で、例えば、成分の化学物質識別情報（上記参照）、純度、発生量、および関連する物理化学的特性（上記参照）による可能な限りの特徴付け
- 入手可能な範囲で、物理的状態、揮発性、pH、LogP、分子量、化学物質分類、および試験実施に関わる追加の関連する物理化学的特性
- 該当する場合で現実に実行可能であれば、純度、不純物の化学的同定など
- 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性

試験法の条件および手順

- 試験依頼者、試験実施施設および試験責任者の氏名、名称および住所
- 用いる試験法の説明
- 用いた細胞株、その供給元、試験に用いた細胞の継代数およびコンフルエンスの状態
- 用いた試験手順の詳細
- 反復試験数および用いた複製数
- 用いた被験化学物質の濃度（推奨濃度と異なる場合）

© OECD, (2018)

- 各被験化学物質についての溶剤選択の正当化
- 被験化学物質に対する曝露期間（推奨期間と異なる場合）
- 試験手順を変更した場合、その記述
- 用いた評価および判定基準の記述
- 過去の陽性対照の平均値および標準偏差（SD）の参照結果
- 本試験法実施に際しての（例えば、習熟度確認物質の試験による）試験実施施設の習熟度の立証、または本試験法に関する経時的な再現性の立証。

結果

- 各被験化学物質および対照物質ならびに各検討濃度について、複製ウェルごとの個々の OD 値、独立した反復試験ごとの OD の算術平均値、独立した反復試験ごとの細胞生存率（%）、および 3 回の反復試験での細胞生存率（%）の最終的な算術平均値および SD を一覧表にして示す。
- 適切な試験許容基準であることを立証した培地、溶剤、および陽性対照の結果
- それ以外に観察された影響の記述
- 用いた予測モデル／判定基準を参照して得られた総合的な分類。

結果の考察

結論

© OECD, (2018)

参考文献

1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth 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_rev05/05files_e.html].

2) 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.

3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Methods 65, 55-63.

4) Takahashi Y, et al. (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an In Vitro Eye Irritation Test Using SIRC Cells. Toxicol. In Vitro 22,760-770.

5) Sakaguchi H, et al. (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. Toxicol. In Vitro 25,796-809.

6) Kojima H, et al. (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. Toxicol. In Vitro 27, pp.1855-1869.

7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Available at: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

8) OECD (2012). Test Guideline for Testing of Chemicals (No.405): Acute Eye Irritation/Corrosion.Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

9) Saito K, et al. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. J. Pharm. Sci.1648-1653.

11) ECETOC. (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No. 48. (2)), Brussels, Belgium.

12) Gautheron P, et al. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an In Vitro Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl Toxicol. 18, 442–449.

13) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications,Series on Testing and Assessment (No. 34.). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

14) OECD (2018). 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, (2018)

補遺 I

定義

正確性：試験法の結果と許容される基準値との一致の近さ。試験法の性能を示す尺度であり、妥当性の捉え方の 1 つに当たる。この用語は、試験法の正しい結果の割合を意味する「一致」としばしば置換可能な使用が行われる（13）。

ベンチマーク物質：被験化学物質との比較の基準として用いられる物質。ベンチマーク物質には次の特性がある。（i）一貫性がありかつ信頼性が高い供給元の存在。（ii）検討中の物質のクラスとの構造および機能の類似性。（iii）物理的／化学的特性が既知であること。（iv）既知の影響に関する裏付けデータの存在。（v）所望の反応範囲での作用強度が既知であること。

ボトムアップ方式：眼刺激性や眼に対する重篤な損傷性への分類が不要であると疑われる被験化学物質に用いられる段階的な方式で、分類不要な化学物質（陰性の結果）を、それ以外の化学物質（陽性の結果）から判定することで開始する。

化学物質：物質または混合物を意味する。

眼刺激性：眼の前面に被験化学物質を適用後眼に生じる変化で、適用から 21 日以内に完全な可逆性を示すもの。「眼に対する可逆的影響」および「UN GHS 区分 2」（1）に言い換えることができる。

偽陰性率：試験法により誤って陰性と同定された、陽性の化学物質すべての割合。試験法の性能を表す指標の 1 つ。

偽陽性率：試験法により誤って陽性と同定された、陰性の化学物質すべての割合。試験法の性能を表す指標の 1 つ。

有害性：物質または状況固有の性質で、ある生物、体系、または（一部の）集団がその物質に曝露すると、悪影響を引き起こす可能性があること。

培地対照：試験系のすべての構成要素を含んだ未処理の複製。この試料を、被験化学物質による処理試料およびそれ以外の対照試料と同時に処理することで、溶剤と試験系との相互作用について判定する。

混合物：2 種類以上の、互いに反応しない物質からなる混合物または溶液（1）。

単一成分物質:定量的組成により定義され、1 つの主成分が 80%（w/w）以上存在する物質。

MTT：3-（4,5-ジメチルチアゾール-2-イル）-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド、チアゾリルブルーテトラゾリウムブロミド。

多成分物質：定量的組成により定義され、複数の主成分が 10%（w/w）以上 80%（w/w）未満の濃度で存在する物質。多成分物質は、製造工程の結果生じる。混合物と多成分物質との差異は、混合物の場合、化学反応なしに 2 種類以上の物質を混合して得られるのに対し、多成分物質の場合、化学反応の結果生じることにある。

OD：光学濃度。

© OECD, (2018)

陽性対照：試験系のすべての構成要素を含み、陽性反応を引き起こすことが既知の物質により処理される複製。陽性対照の反応の経時的ばらつきを確実に評価可能にするため、陽性反応の規模を過度にしないこと。

妥当性：試験と目的とする作用との関係、ならびにその試験が特定の目的に示す意義および有用性の有無に関する記述のこと。当該の試験が目的とする生物学的作用について、正しく測定または予測する程度を示す。妥当性には、試験法の正確性（一致）に関する検討が含まれる（10）。

信頼性：同一プロトコールを用いて試験法を実施した場合、試験実施施設内および試験実施施設間で経時的に高い再現性で実施可能な程度を表す尺度。試験実施施設内および試験実施施設間の再現性、ならびに試験実施施設内の反復性を算出することにより評価される（13）。

感度：当該の試験により正しく分類される、すべての陽性／活性化学物質の割合。分類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際の重要な検討事項である（10）。

眼に対する重篤な損傷性：眼の前面に被験化学物質を適用後眼に生じる組織損傷または身体的に重篤な視力低下で、適用から 21 日以内に完全な可逆性を示さないもの。「眼に対する不可逆的影響」および「UN GHS 区分 1」（1）に言い換えることができる。

溶剤／溶媒対照：試験系のすべての構成要素を含んだ未処理試料で、処理対象の被験化学物質およびそれ以外の対照試料と共に処理される溶剤または溶媒からなり、同じ溶剤または溶媒に溶解させた被験化学物質処理試料のベースラインにおける反応を確立する。同時の培地対照と検討する場合、本試料により、溶剤または溶媒と試験系との相互作用の有無も立証される。

特異度：当該の試験により正しく分類される、すべての陰性／不活性化学物質の割合。分類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際の重要な検討事項である（13）。

物質：自然状態における、または製造工程で得られる化学元素およびその化合物で、その製品の安定性の保持に必要な添加物や、用いる製造工程から得られる不純物をいずれも含むが、当該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されうる溶剤はいずれも除く（1）。

界面活性剤：表面活性剤とも呼ばれる。界面活性剤は洗浄剤などの化学物質の 1 つで、液体の表面張力を低下できるため、固体を泡立て、あるいは固体に浸透させることが可能である。 湿潤剤としても知られている。

被験化学物質：「被験化学物質」という用語は、試験の対象となっている物質を指すのに用いられる。

段階的試験戦略：被験化学物質に関する既存のすべての情報について、指定された順番で検討する段階的な試験戦略。段階ごとに証拠の重み付けのプロセスを用い、有害性分類の判定に十分な情報が入手可能か判断してから次の段階に進む。被験化学物質の刺激性を、既存の情報に基づいて割り当てできる場合、追加試験は不要である。被験化学物質の刺激性を、既存の情報に基づいて割り当てできない場合、明確な分類が可能になるまで、一連の段階的な動物試験の手順が実施される。

© OECD, (2018)

トップダウン方式：眼に対する重篤な損傷性を引き起こすと疑われる被験化学物質に用いられる段階的な方式で、眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学物質（陽性の結果）を、それ以外の化学物質（陰性の結果）から判定することで開始する。

国際連合の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）：ヒト（雇用者、作業員、輸送業者、消費者、緊急時対応者など）および環境の保護を目的として、その悪影響に関する情報伝達のため、化学物質（物質および混合物）を物理、健康、環境上のハザードの標準化された種類およびレベルに従って分類することを提唱し、ピクトグラム、信号語、ハザードの声明、注意書き、安全データシートなど対応する情報伝達要素に取り組むシステム（1）。

UN GHS 区分 1：「眼に対する重篤な損傷性」を参照。

UN GHS 区分 2：「眼刺激性」を参照。

UN GHS 区分外：UN GHS 区分 1 にも 2（2A または 2B）にも分類されない化学物質。

UVCB：組成が未知または変化する物質、複雑な反応生成物または生物材料。

© OECD, (2018)