第 4 項
健康への影響

試験ガイドライン No. 492B

眼に対する危険有害性を特定するための再構築ヒト角膜様上皮モデル法（RHCE 法）

2022 年 6 月 30 日

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

OECD
BETTER POLICIES FOR BETTER LIVES

OECD/OCDE 492B

採択：
2022 年 6 月 30 日

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

眼に対する危険有害性を特定するための再構築ヒト角膜様上皮モデル法（RHCE 法）

はじめに

1. 重篤な眼損傷性とは、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）」（1）により定義されているとおり、被験化学物質に対する眼曝露後に生じ、完全には回復しない眼組織の損傷または重篤な物理的視力低下をもたらすことを言う。また、UN GHS によれば、眼刺激性とは、被験化学物質に対する眼曝露後に生じ、完全に回復する眼の変化をもたらすことを言う。重篤な眼損傷性を誘発する被験化学物質は UN GHS 区分 1 に分類される一方、眼刺激性を誘発する被験化学物質は UN GHS 区分 2 に分類される。眼刺激性にも重篤な眼損傷性にも分類されない被験化学物質は、UN GHS 区分 1 および 2（2A および 2B）としての分類要件を満たさない被験化学物質と定義され、すなわち、UN GHS 区分外と称される。

2. 重篤な眼損傷性／眼刺激性の評価には、当初、実験動物の使用が含まれていた（OECD 試験ガイドライン（TG）405；1981 年採択、1987 年、2002 年、2012 年、および 2017 年改訂）（2）。重篤な眼損傷性の可能性がある化学物質を特定するため、および／または眼に対する危険有害性の可能性の分類が不要な化学物質を特定するため、複数の *in vitro* または *ex vivo* 試験法が OECD 試験ガイドライン（TG）437（4）、438（5）、460（6）、491（7）、492（8）、494（9）および 496（10）として採択されている。用いる最も適切な試験法の選択は、「重篤な眼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（IATA）についての OECD ガイダンス文書」（3）に照らして検討する。

3. 本 TG では、UN GHS による眼に対する危険有害性区分（1）に従って、分類不要な化学物質（物質および混合物）（区分外）、眼刺激性への分類を要する化学物質（区分 2）、ならびに重篤な眼損傷性への分類を要する化学物質（区分 1）について単独での特定を可能にする *in vitro* 手順を記述する。

4. 本 TG では、検証済みの試験法、すなわち、市販の再構築ヒト角膜様上皮（HCE）を用いた SkinEthic™ヒト角膜上皮（HCE）毒性発現時間（TTT）試験について記述する。RhCE 法は、ヒト角膜上皮の組織学的、形態学的、生化学的、および生理学的特性に厳密に類似するよう設計されている。RhCE 法については、3 つの UN GHS による眼に対する危険有害性区分を評価するバリデーション試験が実施されており（11）（12）（13）、以下本文では「検証済み標準試験法（VRM）」と呼ぶ。バリデーション試験およびその独立したピアレビュー（14）から、SkinEthic™ HCE TTT は重篤な眼損傷性／眼刺激性に関する 3 つの UN GHS 区分、すなわち UN GHS 区分 1、区分 2、および区分外の化学物質の識別（1）により、化学物質（物質と混合物の両方）を正確に特定可能であると結論付けられ、本試験法は、化学物質の分類について *in vivo* ドレイズ急性眼刺激性試験に対する完全な代替法として推奨された。

© OECD, (2022)

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。

本試験ガイドラインの使用は、国内および国際的な規制上の配慮および条件の対象であると認識されている。必要とみなされる場合、証拠の重み付けアプローチにより他の適切な *in vitro* 試験法を用いてさらなる試験を実施するに際しては、IATA についてのガイダンス文書 No. 263 を参照すること（3）。試験法の重要な要素の概要、および具体的な状況に関するガイダンスを示したフローチャートについて、補遺 II～V に提示する。

5. 本 TG の目的は、RhCE 組織構築物におけるその細胞毒性誘発能に基づき、被験化学物質の眼に対する危険有害性の可能性の評価に用いる手順を記述することにあり、評価の測定には、生体染色色素（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；CASRN 298-93-1］、以下テトラゾリウム色素（TD）と称する）の還元を用いる（15）（段落 23 参照）。被験化学物質曝露後の RhCE 組織の生存率を、陰性対照物質で 2～3 回曝露処理した組織との比較により測定し（%生存率）、次に、この生存率を用いて、被験化学物質の眼に対する危険有害性の可能性について予測する。

6. 定義を補遺 I に示す。

最初に考慮すべき事項および限界

7. SkinEthic™ HCE 組織構築物は、*in vivo* 角膜上皮に類似する対象種由来の細胞を用いて作製された 3 次元モデルである（17）。本試験法では、化学物質曝露後の角膜上皮を介した化学物質の透過、ならびに細胞および組織の損傷発生に起因する細胞毒性を直接測定し、その結果を用いて、被験化学物質の眼に対する危険有害性の特定について予測する。細胞損傷は、複数の作用機序により発生しうる（段落 16 参照）が、細胞毒性は、組織損傷の根底にある物理化学的プロセスに関わりなく、化学物質の重篤な眼損傷性／眼刺激性の反応全体を判定する際、主要ではないとしても重要な機構的役割を果たし、*in vivo* においては、主に角膜混濁、虹彩炎、結膜発赤および／または結膜浮腫により明示される。

8. 本 TG の根底をなすバリデーション試験では、様々な種類の化学物質、化学的分類、化学構造に加え、分子量、LogP、およびそれ以外の物理化学的特性を網羅した計 151 種類の化学物質が試験されている。そのバリデーションデータベースには、134 種類の有機官能基（11）（12）（13）および *in vivo* における主要な分類推進要因すべて（26）（27）が網羅された。これらの化学物質の大多数は単一成分物質であった（計 151 物質、このうち 16 物質は希釈して試験された）が、複数の多成分物質（界面活性剤またはポリマーなど）もバリデーション試験の対象となった。物理的状態に照らし、また、UN GHS 区分（1）に従うと、151 種類の被験化学物質の分布は以下のとおりであった。液体は 70 種類からなり、内訳は区分 1 が 21 種類、区分 2 が 25 種類（区分 2A：16 種類、区分 2B：9 種類）、区分外が 24 種類、また、固体は 81 種類からなり、内訳は区分 1 が 29 種類、区分 2 が 19 種類、区分外が 33 種類であった（11）（12）（13）。

9. SkinEthic™ HCE TTT は、UN GHS 区分 2A（眼刺激性：21 日以内に完全に回復する作用）と UN GHS 区分 2B（軽度の眼刺激性：7 日以内に完全に回復する作用）の識別を意図していない。識別が必要であるとみなされる場合、他の方法またはアプローチによりその区別に取り組む必要がある（3）。

10. 本 TG は、固体、液体、半固体および蝋状の物質および混合物に適用できる。液体は水性か非水性、固体は水溶性か非水溶性について可能である。難水溶性（0.014 mg/mL 未満）の固体の化学物質は、バリデーション試験での SkinEthic™ HCE TTS により頻回に過小予測（例：区分 1 の化学物質 9 種類中 5 種類が区分 2 に過小予測）されたことから、そうした化学物質を試験する場合には注意すべきである。気体およびエアロゾルは、バリデーション試験で評価されていない。これらは RhCE 技術を用いて試験可能と考えられるが、現行の TG では、気体およびエアロゾルの試験は認められていない。多成分物質／混合物への本試験法適用の可能性については、現時点で入手可能な情報は限られている（11）。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。本 TG を特定の製剤に適用できないことが証拠から立証される場合、本 TG をそうした製剤に用いるべきではない。試験困

© OECD, (2022)

難な化学物質（例：不安定な物質）、または本ガイドライン記載の適用領域内に明確に含まれない被験化学物質もしくは混合物につ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。

11. ホルマザン色素（FD）と同じ範囲の光を（自然にまたは処理後に）吸収する被験化学物質、および生体染色色素 MTT を（FD に）直接還元可能な被験化学物質は、組織生存率の測定結果に干渉するおそれがあり、補正用の適合対照を用いる必要がある。必要とされうる適合対照の種類は、被験化学物質によりもたらされる干渉の種類および各 FD の定量化に用いられる手順に応じて異なる（段落 33～38 参照）。

12. 3 ヵ所の試験実施施設で行われたバリデーション試験から、SkinEthic™ HCE TTT は、本試験法の実施経験がないとみなされる試験実施施設に移転可能であること、また、試験実施施設内および施設間で再現可能であることも立証された（13）（14）。SkinEthic™ の施設内再現性（WLR）は、TTL（20 種類の化学物質）で 85～95%、TTS（20 種類の化学物質）で 100%であった。施設間再現性（BLR）は、TTL で 90%、TTS で 100%であった。

13. SkinEthic™ HCE TTT 試験は、UN GHS 分類システム（1）に従って、眼刺激性にも重篤な眼損傷性にも分類不要な化学物質の特定に使用できる。得られたデータ（13）（14）（表 1）を検討すると、*in vivo* ウサギ眼試験の参照データ（OECD TG 405）（2）（16）と比較し、UN GHS 分類システム（1）に従って分類したところ、SkinEthic™ HCE TTT 試験は 74.4%（151 種類の化学物質に基づく）のバランスのとれた正確度を示し、正確な予測結果は区分 1 で 79%（50 種類の化学物質に基づく）、区分 2 で 69%（44 種類の化学物質に基づく）、区分外で 75%（57 種類の化学物質に基づく）であった。SkinEthic™ HCE TTL と TTS の性能は異なる（補遺 V）。

表 1. UN GHS 区分ごとに正確な予測、過小予測、および過大予測を示す 3x3 マトリックスによる SkinEthic™ HCE TTT の重み付き [1]性能

UN GHS 区分	SkinEthic HCE TTT により予測される区分（n/N%）		
	区分 1（n）	区分 2（n）	区分外（n）
区分 1（N=50）	79.2% (39.60)	20.8% (10.40)	0% (0.00)
区分 2（N=44）	18.3% (8.06)	69.2% (30.46)	12.5% (5.48)
区分外（N=57）	1.8% (1.00)	23.3% (13.33)	74.9% (42.67)

14. 本 TG 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 RhCE 法の適用可能性とは無関係である。

試験の原理

15. 被験化学物質を最低 2 個の 3 次元 RhCE 組織構築物に局所的に適用し、曝露および曝露後浸漬のインキュベーション期間を経た組織生存率を測定する。SkinEthic™ HCE 組織は、不死化ヒト角膜上皮細胞から再構築され、ヒト角膜に認められる上皮と形態学的に類似した、高分化型重層扁平上皮を形成するまで数日間培養されている。SkinEthic™ HCE 組織構築物は、正常ヒト角膜上皮の場合と類似した、円柱状の基底細胞、移行型の翼細胞、表層扁平細胞など、少なくとも 4 つの生細胞層からなる（17）（18）。

[1] 加重計算では、試験の実行回数に関わりなく、各化学物質は性能において同等の重み 1 を有する（すなわち、全部で 3 回試験を実行した場合、化学物質 A が試験で区分 1 に 2 回、区分 2 に 1 回該当すれば、分数の重み 0.66（2/3）および 0.33（1/3）をそれぞれ区分 1 および区分 2 の予測数（n）に割り当てる）（11）。

© OECD, (2022)

16. 化学物質により誘発される重篤な眼損傷性／眼刺激性は、*in vivo* においては、主に角膜混濁、虹彩炎、結膜発赤および／または結膜浮腫により明示されるが、このことは、角膜および／または結膜を介した化学物質の透過、ならびに当該の細胞の損傷発生を発端とする一連の事象の帰結である。細胞損傷は、細胞膜溶解（例：界面活性剤、有機溶剤による）、高分子（特にタンパク質）の凝固（例：界面活性剤、有機溶剤、アルカリ、および酸による）、脂質のけん化（例：アルカリによる）、高分子とのアルキル化またはそれ以外の共有結合性相互作用（例：漂白剤、過酸化物、およびアルキル化剤による）など、複数の作用機序により発生しうる（19）（20）（21）。一方、細胞毒性は、組織損傷の根底にある物理化学的プロセスに関わりなく、化学物質の重篤な眼損傷性／眼刺激性の反応全体を判定する際、主要ではないとしても重要な機構的役割を果たすことが示されている（22）。さらに、化学物質の重篤な眼損傷性／眼刺激性の可能性は最初の損傷の程度により主に決定され（20）、細胞死の程度（22）、ならびに、その後の反応の程度および最終転帰と相関する（23）（24）。したがって、軽微な刺激性物質は概して角結膜上皮表層にのみ影響を及ぼし、軽度および中等度の刺激性物質は主に上皮および実質表層を損傷し、重度の刺激性物質は上皮、実質深部、また時に内皮を損傷する（22）（25）。重篤な眼損傷性／眼刺激性に分類不要な化学物質（UN GHS 区分外）を特定するため、被験化学物質への局所曝露後に行う RhCE 組織構築物の生存率の測定に関しては、重篤な眼損傷性または眼刺激性を誘発するすべての化学物質は、角膜上皮および／または結膜において細胞毒性をもたらすことになるという仮説に基づいている。

17. SkinEthic™ HCE TTT の場合、RhCE 組織の生存率は、MTT からホルマザン色素（FD）への組織生細胞による酵素変換により古典的に測定され、FD は組織から抽出後に定量的に測定される（15）。

18. SkinEthic™ HCE TTT 試験は、液体（SkinEthic™ HCE TTL）と固体（SkinEthic™ HCE TTS）の 2 種類のプロトコールに基づいている。SkinEthic™ HCE TTT が用いる曝露回数は、TTL では 3 回、TTS では 2 回である（段落 29〜30 参照）。SkinEthic™ HCE TTL および TTS のプロトコールでは、様々な予測モデルが使用されている。SkinEthic™ HCE TTL では、すべての処理回数の範囲内で平均生存率が 50%以下となる化学物質は区分 1 に分類され、平均生存率が厳密に 50%超となる化学物質は区分外と分類される。平均生存率の値がそれ以外の組み合わせであれば、区分 2 への分類となる（段落 43 参照）。SkinEthic™ HCE TTS では、平均生存率が曝露 30 分後に 40%以下となり、かつ、曝露 120 分後に 60%以下となる化学物質は、区分 1 に分類される。2 回の処理範囲内でこれらのカットオフ値を厳密に超える平均生存率であれば、当該化学物質は区分外と分類される。平均生存率の値がそれ以外の組み合わせであれば、当該化学物質は区分 2 と分類される（段落 43 参照）。

習熟度の立証

19. 規制目的で本試験法を定常的に用いる前に、試験実施施設は、表 2 記載の 14 種類の習熟度確認化学物質を正確に予測することにより、技術的習熟度を立証すべきである。これらの化学物質は、SkinEthic™ HCE TTT のバリデーション試験で用いられた化学物質から選択された（13）（14）。選択では、可能な限り以下（i）〜（xi）の化学物質を対象とする。（i）様々な物理的状態を網羅している。（ii）参照する *in vivo* ウサギ眼試験（OECD TG 405）（2）（16）において得られた質の高い結果および UN GHS 分類システム（すなわち、区分 1、区分 2、または区分外）（1）に基づき、*in vivo* での重篤な眼損傷性／眼刺激性の反応の範囲を網羅している。（iii）*in vivo* における主要な分類推進要因を網羅している（26）（27）。（iv）バリデーション試験に用いた化学的分類の代表例である（13）。（v）有機官能基の適切かつ広範な代表例を網羅している（11）（12）（13）。（vi）明確に定義された化学構造を有している（11）（12）（13）。（vii）バリデーション試験中、RhCE 法において再現性のある結果をもたらした。（viii）バリデーション試験中、RhCE 法により正確に予測された。（ix）試験法のデータの質の高さに基づき、*in vitro* 反応の範囲を網羅している。（x）市販品である。（xi）入手および／または廃棄にきわめて高額な費用を伴わない。記載された化学物質を入手できない、あるいは、それ以外の正当な理由で使用できない状況においては、上記基準を満たす別の化学物質（例えば、SkinEthic™ HCE TTT のバリデーションに用いた化学物質から）を用いることが考えられる。ただし、そうした逸脱の正当性を示すこと。

© OECD, (2022)

表 2：SkinEthic™ HCE TTL（表 2A）用および SkinEthic™ HCE TTS（表 2B）用の習熟度確認化学物質一覧

表 2A. SkinEthic™ HCE TTL 用の習熟度確認化学物質一覧

化学名	CASRN	有機官能基 [1]	物理的状態	生存率 1：5 分 (%) [2,3]	生存率 2：16 分 (%) [2,3]	生存率 3：120 分 (%) [2,3]	VRM での予測
***In Vivo* 区分 1**							
N,N-ジエチルエタノールアミン	100-37-8	アルコール。脂肪族アミン。三級	液体	2.9±1.7	1.0±1.3	0.6±0.5	区分 1
酢酸（10%）	64-19-7	カルボン酸	液体	4.2±0.4	25.9±12.7	2.8±0.3	区分 1
***In Vivo* 区分 2**							
2-ブタノン	78-93-3	ケトン	液体	21.1±5.4	90.8±13.7	87.6±12.3	区分 2
アセトン	67-64-1	ケトン	液体	6.4±2.6	97.1±3.9	99.1±3.5	区分 2
ヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロリド（2%）	112-02-7	アンモニウム塩。アルキルアンモニウム塩	液体	58.0±10.7	62.1±9.2	2.4±0.8	区分 2
***In Vivo* 区分外**							
1,3-ジイソプロピルベンゼン	99-62-7	環式。フェニル。芳香族	液体	100.5±8.5	94.5±6.3	96.5±9.3	区分外
ドデカン	112-40-3	メチル。メチレン	液体	98.3±6.9	103.1±5.6	98.9±5.1	区分外

表 2B. SkinEthic™ HCE TTS 用の習熟度確認化学物質一覧

化学名	CASRN	有機官能基 [1]	物理的状態	生存率 1：30 分 (%) [2,3]	生存率 2：120 分 (%) [2,3]		VRM での予測
***In Vivo* 区分 1**							
1-ナフタレン酢酸ナトリウム塩	61-31-4	ベンジル。芳香族カルボン酸。ナフタレン	固体	1.6±0.7	1.6±0.4		区分 1
1,2-ベンズイソチアゾール-3(2H)-オン	2634-33-5	ベンゾチアゾール／ベンゾイソチアゾール	固体	4.0±1.0	4.0±0.4		区分 1
***In Vivo* 区分 2**							
4-カルボキシベンズアルデヒド	619-66-9	アルデヒド。アリール。カルボン酸	固体	80.1±12.3	5.0±1.4		区分 2
2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノン	83-72-7	エノール。ナフトキノン	固体	82.1±8.9	4.5±1.5		区分 2
硝酸アンモニウム	6484-52-2	アミン。硝酸塩。アンモニウム	固体	61.0±4.8	1.8±0.4	-	区分 2
***In Vivo* 区分外**							
炭酸マグネシウム	56378-72-4	マグネシウム。炭酸塩	固体	98.3±7.1	93.4±11.7		区分外
アントラセン	120-12-7	アントラセン。芳香族カルボン酸	固体	97.7±6.6	98.1±4.7		区分外

1,3-ジイソプロピルベンゼン
1,2-ベンズイソチアゾール-3(2H)-オン
略語：CASRN：ケミカルアブストラクトサービス登録番号、VRM：SkinEthic™ HCE TTT に関する検証済み標準試験法。

© OECD, (2022)

[1] 有機官能基は、OECD QSAR Toolbox での解析（バージョン 3.2、https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm）に従って割り当てた。
[2] SkinEthic™ HCE TTT に関するバリデーション試験（13）（14）において得られた結果に基づく。
[3] 液体の場合、SkinEthic™ HCE TTL では、以下 3 つの曝露時間を用いる。被験化学物質を希釈せず 5 分間（生存率 1）、20%（w/v）に希釈して 16 分間（生存率 2）および 120 分間（生存率 3）適用する。固体の場合、SkinEthic™ HCE TTS では、以下 2 つの曝露時間を用いる。被験化学物質を希釈せず 30 分間（生存率 1）、および 120 分間（生存率 2）適用する（段落 29 参照）。

20. 習熟度試験の一環として、RhCE 組織構築物生産者の指定どおり、使用者は、受領後の組織のバリア特性を検証することが推奨される（段落 24、25、および 27 参照）。このことは、組織の輸送が長距離／長時間にわたる場合、特に重要である。一旦試験法の確立に成功し、その試験法使用の習熟度が得られ立証された場合、こうした検証を定常的に行う必要はないと考えられる。ただし、試験法を定常的に用いる場合、バリア特性の評価を一定の間隔で継続することが推奨される。

手順

21. 現在、本 TG の対象となる試験法は、科学的に検証済みの SkinEthic™ HCE TTT 試験である（14）。SkinEthic™ HCE TTL および TTS 両方の標準業務手順書（SOP）が入手可能であり、試験実施施設で本試験法を実施し使用する場合に導入する（28）（29）。以下の段落および補遺 II に、RhCE 法の主要な構成要素および手順を記述する。

RhCE 法の構成要素

全般的な条件

22. 角膜様上皮の 3 次元組織の再構築には、適切なヒト由来細胞を用い、その組織は、漸次重層化されているが、角化されていない細胞からなるべきである。RhCE 組織構築物は、栄養が細胞に移動可能な多孔性の合成膜を備えた挿入物において作製される。再構築角膜様上皮には、非角化上皮生細胞が多層存在すること。RhCE 組織構築物は、*in vivo* における角膜上皮の曝露方法と同様の様式で、被験化学物質の直接的な局所曝露が可能になるよう、空気と直接接触する上皮表面を有すること。RhCE 組織構築物は、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）といった細胞毒性に関するベンチマーク物質の急速な透過に耐える、十分な頑健性を有する機能的バリアを形成していること。例えば、一定の曝露時間（例：30 分間）50 µL SDS 処理後に、ベンチマーク物質が組織の生存率を 50%低下させる濃度（IC_{50}）を判定することによりバリア機能を立証すべきであり、また、評価することができる（段落 27 参照）。RhCE 組織構築物の封じ込め特性に関しては、角膜曝露のモデリング不良に導くと考えられる、生存組織の縁周囲への被験化学物質の通過を回避すること。RhCE 組織構築物の確立に用いるヒト由来細胞は、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、および真菌により汚染されていないこと。組織構築物の無菌性については、真菌および細菌による汚染がないことを供給業者により確認されていること。

© OECD, (2022)

機能的な条件

生存率

23. 組織生存率の定量に用いるアッセイは、テトラゾリウム色素（MTT）法（15）である。RhCE 組織構築物の生細胞により、生体染色色素 MTT が青色の MTT ホルマザン沈殿物に還元後、イソプロパノール（または類似の溶剤）を用いて組織から本沈殿物を抽出する。抽出したホルマザン色素は、標準吸光度（光学密度［OD］）の測定か、HPLC／UPLC 分光光度法の手順のいずれかを用い定量できる（28）（29）。（MTT 法の抽出溶媒である）ブランク溶液単独での OD は十分な低値、すなわち OD は 0.1 未満であること。RhCE 組織構築物の使用者は、用いる RhCE 組織構築物の各バッチが、陰性対照について定義された基準を満たすよう確保する。SkinEthic™ HCE TTT での陰性対照の OD の値について、許容範囲を表 3 に示す。HPLC／UPLC 分光光度法では、陰性対照の許容基準として、表 3 に示す陰性対照の OD の範囲を用いる。陰性対照物質により処理された組織が、試験での曝露時間持続中、培養に関して安定であること（同程度の組織生存率測定結果を提示）を試験報告書に記録する。品質管理（QC）における組織バッチ出荷の一環として、組織の生産者は上記と類似の手順に従うべきであるが、その場合、表 3 指定の基準とは異なる許容基準の適用が考えられる。（QC 検査法の条件下での）陰性対照における OD の値の許容範囲（上限値および下限値）は、RhCE 組織構築物の開発業者／供給業者が確立する。

表 3. 陰性対照における OD の値の許容範囲（RhCE 法の使用者用）

試験法	許容下限値	許容上限値
SkinEthic™ HCE TTT（HCE/S）—VRM（TTL および TTS の両プロトコール用）	> 1.0	≤ 2.5

バリア機能

24. RhCE 組織構築物は、例えば、IC_{50}（SDS）により推定されるとおり、細胞毒性に関するベンチマーク物質の急速な透過に耐える、十分な厚さと頑健性を有するべきである（表 4）。用いる RhCE 組織構築物の各バッチのバリア機能は、最終使用者に当該組織が供給された時点で、RhCE 組織構築物の開発業者／供給業者により立証されていること（段落 27 参照）。

形態

25. RhCE 組織構築物の組織学的検査では、ヒト角膜様上皮構造であること（4 層以上の上皮生細胞からなるなど）を立証すべきである。VRM については、適切な形態が供給業者により確立されていることから、試験法の使用者が用いる組織バッチごとに再度立証する必要はない。

再現性

26. 本試験法の陽性対照および陰性対照の結果は、経時的に再現性が示されること。

© OECD, (2022)

品質管理（QC）

27. RhCE 組織構築物については、用いる RhCE 組織構築物の各バッチが定義された製品出荷基準、その中でも、生存率（段落 23）およびバリア機能に最も関連する基準を満たしていると、開発業者／供給業者が立証している場合にのみ用いる。IC_{50} により測定されるバリア機能の許容範囲（上限値および下限値）は、RhCE 組織構築物の供給業者が確立する。本試験法において用いられる RhCE 組織構築物について、供給業者の QC におけるバッチ出荷基準として用いる IC_{50} の許容範囲を表 4 に示す。製品出荷基準すべての遵守を立証したデータについて、RhCE 組織構築物の供給業者は、本試験法の使用者がその情報を試験報告書に記載できるよう提供する。これらの製品出荷基準をすべて満たした組織での生成結果のみが、UN GHS に従って眼に対する危険有害性を特定する場合、化学物質の信頼できる予測を許容可能にする。

表 4. SkinEthic™ HCE 組織構築物の QC におけるバッチ出荷基準

試験法	許容下限値	許容上限値
SkinEthic™ HCE TTT （HCE/S）—VRM（SDS 50µL の 30 分間処理）	IC_{50} = 1.0 mg/mL	IC_{50} = 3.2 mg/mL

被験化学物質および対照物質の適用

28. 各回の処理時点での組織 2 個以上の反復実験を、実行時ごとに、被験化学物質ごとおよび対照物質ごとに行う。2 種類の処理プロトコールを用い、一方は液体の被験化学物質用、もう一方は固体の被験化学物質用とする（28）（29）。SkinEthic™ HCE TTT では、ヒト眼の湿潤状態を模倣するため、液体用のプロトコールの場合、被験化学物質の適用前にカルシウムおよびマグネシウム不含ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（Ca^{2+}／Mg^{2+}不含 DPBS）により、また、固体用のプロトコールの場合、水により、組織構築物の表面を湿らせる。組織の処理は、被験化学物質および対照物質への曝露により開始する。いずれの処理プロトコールでも、上皮表面を均一に覆うのに十分な量の被験化学物質または対照物質を適用する。

29. 37°C 以下でピペット（必要な場合、容積式ピペットを使用）が扱える被験化学物質は、本試験法において液体として処理し、それ以外は固体として処理する（段落 30 参照）。溶液および安定な懸濁液を形成しない液体の具体的な手順については、SOP（28）に記載されている。本試験法では、液体の被験化学物質は組織表面に均等に広げる（すなわち、160 ± 2 µL/cm^2 適用）（補遺 II）。SkinEthic™ HCE 組織は、3 種類の処理時間で局所的に曝露される。被験化学物質を希釈せず 5 分間、蒸留水中で 20%（w/v）に希釈して 16 分間および 120 分間、予め定義した本試験法の条件で適用する（28）。曝露時間終了時点で、室温で Ca^{2+}／Mg^{2+}不含 DPBS を用いて広範囲にわたり洗浄することで、液体の被験化学物質および対照物質を組織表面から慎重に除去する。この洗浄段階に続き、MTT 法実施前に（組織に吸収された被験化学物質除去のため）室温で新鮮培地において 10 分間曝露後浸漬を行う（補遺 II）（28）。

30. ピペットで扱えない被験化学物質（例：高粘性液体）は、本試験法では固体として処理される。被験化学物質の適用量は、組織の表面全体を覆うのに十分な量、すなわち、最低 160 ± 2 mg/cm^2 の適用量を用いる（補遺 II）。可能な限り、固体は微粉として試験する。SkinEthic™ HCE 組織は、標準的な培養条件で 30 分間および 120 分間、被験化学物質に局所的に曝露される（補遺 II 参照）（29）。曝露時間終了時点で、室温で Ca^{2+}／Mg^{2+}不含 DPBS を用いて広範囲にわたり洗浄することで、固体の被験化学物質および対照物質を組織表面から慎重に除去する。この洗浄段階に続き、TD 法実施前に（組織に吸収された被験化学物質除去のため）室温で新鮮培地において 30 分間曝露後浸漬を行う（補遺 II）（29）。

31. 組織の生存率（陰性対照により測定）および感度（陽性対照により測定）が、歴史的データに基づいて定義された許容範囲内にあることを立証するため、実行時ごとに同時陰性対照および同時陽性対照を設けること。同時陰性対照からは、被験化学物質により処理された組織の相対生存率（%）（%

© OECD, (2022)

生存率試験）を算出するためのベースライン（100%組織生存率）も得られる。SkinEthic™ HCE TTT で用いる陽性対照物質に推奨されるのは、液体用のプロトコールでは無希釈の酢酸メチル（CASRN：79-20-9、市販品）、また、固体用のプロトコールでは 1%（w/v）乳酸水溶液（CASRN：50-21-5、市販品）である。用いる陰性対照物質に推奨されるのは、液体用と固体用のいずれのプロトコールでも Ca^{2+}／Mg^{2+}不含 DPBS である。これらは、SkinEthic™ HCE TTT のバリデーション試験において用いられる対照物質であったことに加え、ほとんどの歴史的データが存在する物質である。陽性または陰性対照として適切な代替物質を用いる場合、科学的かつ十分に正当性を示すこと。陰性対照および陽性対照は、当該の試験実行対象となる被験化学物質に用いられるものと同じ（すなわち、液体用および／または固体用の）プロトコールにより試験を行う。対照物質の適用に続き、液体の被験化学物質と同時に実行する対照（段落 29 参照）、または、固体の被験化学物質と同時に実行する対照（段落 30 参照）について記載したとおり、曝露処理、洗浄、曝露後浸漬を行った後、MTT 法（段落 32 参照）を実施する（26）（27）。同一試験の実行対象となる、同一の物理的状態（液体または固体）の被験化学物質については、すべて単一の陰性対照および陽性対照で十分である。

組織生存率の測定

32. MTT 法は、本 TG 下で組織生存率の測定に用いるべき標準化された定量法（15）である。MTT 法は、3 次元組織構築物での使用に適合している。MTT 法は、曝露後浸漬の手順の直後に実施する。RhCE 組織構築物試料を、1 mg/mL の MTT 溶液 0.3 mL 中で標準培養条件にて 180 ± 15 分間静置する。生体染色色素である MTT は、RhCE 組織構築物の生細胞により、青色の MTT ホルマザン沈殿物に還元される。次に、沈殿した青色の MTT ホルマザン産物を適量のイソプロパノール（または類似の溶剤）を用いて組織から抽出する（28）（29）。液体の被験化学物質により試験した組織については、組織の上部と底部の両方から抽出する一方、固体の被験化学物質または有色の液体により試験した組織については、組織の底部からのみ抽出する（組織に残存していたと考えられる被験化学物質により、イソプロパノール抽出液が汚染される可能性を最小化するため）。容易に洗浄されない液体の被験化学物質により試験した組織も、組織の底部からのみ抽出できる。同時に試験した陰性対照物質および陽性対照物質は、当該被験化学物質と同様に処理すること。抽出した MTT ホルマザンは、570 nm で最大±30 nm のバンドパスフィルターを用いた標準吸光度（OD）測定か、HPLC／UPLC 分光光度法の手順（段落 40 参照）の使用のいずれかにより定量できる。

33. 被験化学物質の光学特性またはその MTT における化学作用により、ホルマザン色素（FD）の測定が干渉され、組織生存率の推定に誤り、すなわち、過小予測である眼刺激性に導かれる可能性がある。被験化学物質が FD 測定に干渉する可能性には、MTT を直接還元し有色の FD（青色の MTT ホルマザン）にすること、および／または、被験化学物質が FD と同じ OD の範囲（すなわち、MTT ホルマザン：約 570 nm）で、自然に、もしくは処理手順により吸収した場合には、色干渉が挙げられる。化学物質が TD の直接還元および／または色干渉（有色の被験化学物質にのみ必要）をもたらす可能性については、試験前に確認する。FD に対する干渉がある場合、そうした被験化学物質による干渉の可能性を補正するために、追加の対照を用いる（段落 34～36 および補遺 III 参照）。このことが特に重要となるのは、特定の被験化学物質が洗浄により RhCE 組織構築物から完全に除去されない場合、あるいは、その化学物質が角膜様上皮を透過したため、MTT 法実施時に RhCE 組織構築物に存在する場合である。FD と同じ範囲の光を（自然に、または処理後）吸収する被験化学物質の場合、強い干渉、すなわち（MTT ホルマザンでの）570 ± 30 nm における強い吸収のため FD の標準吸光度（OD）測定に適合せず、FD 測定には、HPLC／UPLC 分光光度法の手順を採用することが考えられる（段落 39 および 40 参照）（28）。直接的な MTT 還元および着色剤による干渉の検出方法および補正方法に関する詳細な記述は、本試験法の SOP（28）（29）において入手可能である。直接的な MTT 還元物質および／または色干渉を示す化学物質の特定方法および取り扱い方法について、そのガイダンスを示した説明用フローチャートも補遺 III に提示する。

34. FD と同じ範囲の光を（自然に、または処理後）吸収する被験化学物質による干渉の可能性を特定し、追加の対照の必要性を判定するために、被験化学物質を水に添加し、室温で適切な時間インキュ

© OECD, (2022)

ベートする（補遺 II）（28）（29）。被験化学物質と水を混合したときに有色の溶液が得られた場合（補遺 III 参照）、被験化学物質は FD の標準吸光度（OD）測定に干渉すると推定される。こうした場合、着色剤の対照をさらに実施するか、あるいは、これらの対照が不要な HPLC／UPLC 分光光度法の手順を用いるべきである（段落 39 および 40、ならびに補遺 III および IV 参照）。標準吸光度（OD）測定を実施する場合、干渉する被験化学物質ごとに、生存組織 2 個以上での反復実験を適用すべきである。反復実験ではすべての試験手順を実施するが、生存組織非特異的発色（NSC $_{生存組織}$）対照作製のため、MTT でのインキュベーション段階中、MTT 溶液の代わりに培地によりインキュベートする（28）（29）。NSC $_{生存組織}$対照は、有色の被験化学物質の試験と同時に実施する必要があり、試験を複数回実施する場合、生存組織固有の生物学的ばらつきがあるため、実施する試験ごと（実行時ごと）に個別の NSC $_{生存組織}$対照により行う必要がある。真の組織生存率は次のとおり算出される。干渉する被験化学物質に曝露し、MTT と共にインキュベートした生存組織で得られた組織生存率（%）（%生存率$_{被験化学物質}$）から、干渉する被験化学物質に曝露し、MTT なしの培地でインキュベートした生存組織で得られた非特異的発色の割合（%NSC $_{生存組織}$：本試験と同時に実行し補正に用いられる）を減じて求められる。すなわち、真の組織生存率＝［%生存率$_{被験化学物質}$］－［%NSC $_{生存組織}$］である。

35. 直接的な MTT 還元物質を特定するには、新たに調製した MTT 溶液に各被験化学物質を添加する。適切な量の被験化学物質を MTT 溶液に添加し、その混合液を標準培養条件にて約 3 時間インキュベートする（補遺 III 参照）（28）（29）。被験化学物質を含有する MTT 混合液（または、不溶性の被験化学物質の場合は懸濁液）が青色／紫色に変化した場合、当該被験化学物質は MTT を直接還元すると推定され、標準吸光度（OD）測定または HPLC／UPLC 分光光度法の手順を用いるのとは別に、非生存の RhCE 組織構築物でのさらなる機能検査を実施する。この追加機能検査では、残存する代謝活性のみ有するが、生存組織と同程度に被験化学物質を吸収および保持する死滅組織を用いる。SkinEthic™ HCE TTT 用の死滅組織は、水中で長時間（例：24 ± 1 時間以上）インキュベーション後、低温で保存することにより作製される（「水中での死滅」）。MTT 還元作用を有する各被験化学物質には、死滅組織 2 個以上での反復実験を適用する。反復実験では、非特異的 MTT 還元（NSMTT）対照作製のため、すべての試験手順を実施する（28）（29）。実施された個別の試験／実行の回数に関わりなく、被験化学物質ごとに単一の NSMTT 対照で十分である。真の組織生存率は次のとおり算出される。MTT 還元物質に曝露した生存組織で得られた組織生存率（%）（%生存率$_{被験化学物質}$）から、同一の還元物質に曝露した死滅組織で得られた非特異的 TD 還元の割合（%NSMTT：本試験と同時に実行し、補正に用いられる陰性対照との関連で算出）を減じて求められる。すなわち、真の組織生存率＝［%生存率$_{被験化学物質}$］－［%NSMTT］である。

36. 色干渉（段落 34 参照）と直接的な MTT 還元（段落 35 参照）の両方をもたらすと特定されている被験化学物質も、標準吸光度（OD）測定を実施する場合、先述の段落に記載した NSMTT 対照および NSC $_{生存組織}$対照とは別に、3 つ目の対照を要することになる。このことは、MTT ホルマザンでは、570 ± 30 nm の範囲の光を吸収する濃色の被験化学物質に通常当てはまり（例：青色、紫色、黒色）、その理由は、その物質固有の色が、段落 35 記載の直接的な MTT 還元能の評価を妨げるためである。このことから、初期設定では、NSMTT 対照と NSC $_{生存組織}$対照とを併用せざるをえない。NSMTT 対照と NSC $_{生存組織}$対照の両方が実施される被験化学物質は、生存組織と死滅組織の両方に吸収および保持されうる。したがって、この場合、NSMTT 対照は、被験化学物質による直接的な MTT 還元の可能性だけでなく、死滅組織による被験化学物質の吸収および保持に起因する色干渉も補正できる。この場合、生存組織による被験化学物質の吸収および保持に起因する色干渉が、NSC $_{生存組織}$対照により既に補正されているため、色干渉の二重補正につながることが考えられる。色干渉の二重補正の可能性を回避するため、死滅組織非特異的発色（NSC $_{死滅組織}$）に関する 3 つ目の対照の実施を要する（補遺 III）（28）（29）。追加したこの対照について、被験化学物質には死滅組織 2 個以上での反復実験を適用する。反復実験では、すべての試験手順を実施するが、MTT でのインキュベーション段階中、MTT 溶液の代わりに培地によりインキュベートする。実施された個別の試験／実行の回数に関わりなく、被験化学物質ごとに単一の NSC $_{死滅組織}$対照で十分であるが、NSMTT 対照と同時に同じ組織バッチにより実施すること。真の組織生存率は次のとおり算出される。被験化学物質に曝露した生存組織で得られた組織生存率（%）（%生存率$_{被験化学物質}$）から、%NSMTT および%NSC $_{生存組織}$を減じ、さらに、干渉する被験化学物質に曝露し、MTT なしの培地でインキュベートした死滅組織で得られた非特異的発色の割合（%NSC $_{死滅組織}$：本試験と同時に実

© OECD, (2022)

行し、補正に用いられる陰性対照との関連で算出）を加えて求められる。すなわち、真の組織生存率＝［%生存率$_{被験化学物質}$］－［%NSMTT］－［%NSC $_{生存組織}$］＋［%NSC $_{死滅組織}$］である。

37. MTT の非特異的還元および非特異的色干渉により、（標準吸光度測定を実施した場合）分光光度計の直線範囲を超える試料の OD 増加となりうること、また、MTT の非特異的還元では、（HPLC／UPLC 分光光度法測定を実施した場合）分光光度計の直線範囲を超える試料の FD ピーク面積増加も生じうることに留意されたい。このことに基づき、RhCE を用いる場合、各試験実施施設では、市販の MTT ホルマザン（CASRN：57360-69-7）での分光光度計の OD／ピーク面積について、直線範囲を決定することが重要である。

38. 分光光度計を用いた標準吸光度（OD）測定が、直接的な MTT 還元物質および色干渉を示す被験化学物質の評価に適しているのは、FD 測定により認められる干渉が強くない場合である（すなわち、直接的な MTT 還元および／または色干渉に関する補正なしに被験化学物質により得られた試料の OD が、分光光度計の直線範囲内にある場合である）。それでも、陰性対照の%NSMTT および／または%NSC $_{生存組織}$が、液体用のプロトコールでは 50%以上、あるいは固体用のプロトコールでは 60%以上となる被験化学物質の結果は、慎重に取り扱う。ただし、FD 測定に関する干渉が強い場合（すなわち、試験試料の未補正での OD が分光光度計の直線範囲外に導かれる場合）、標準吸光度（OD）は測定できない。FD の標準吸光度（OD）測定に強く干渉する、有色の被験化学物質または水との接触により発色した被験化学物質については、HPLC／UPLC 分光光度法を用いてなお評価できる（補遺 III）。その理由は、HPLC／UPLC システムでは、定量前に被験化学物質から FD を分離できるためである。そのため、HPLC／UPLC 分光光度法を用いる場合、試験対象の化学物質とは別に、NSC $_{生存組織}$対照および NSC $_{死滅組織}$対照を検討する必要はない。それでも、被験化学物質が MTT を直接還元すると疑われる場合、（段落 35 記載の手順に従って）NSMTT 対照を用いる。段落 35 記載のとおり、MTT の直接還元能の評価を妨げる色（固有の色、または水中での発色）を有する被験化学物質にも、NSMTT 対照を用いること。FD 測定のため HPLC／UPLC 分光光度法を用いる場合、組織生存率（%）は、同時陰性対照で得られた FD ピーク面積に対する、被験化学物質に曝露した生存組織で得られた FD ピーク面積の割合として算出される。MTT を直接還元可能な被験化学物質の場合、真の組織生存率は、段落 35 の最後の文に記述したとおり、%生存率$_{被験化学物質}$から%NSMTT を減じて算出される。

39. 最後に、色干渉も生じる直接的な MTT 還元物質の場合、処理後に組織に残留し、MTT をきわめて強力に還元するため、試験試料の OD（標準吸光度（OD）測定を用いた場合）、あるいは、ピーク面積（UPLC／HPLC 分光光度法を用いた場合）が分光光度計の直線範囲外に導かれ、RhCE 法での評価を行えないが、こうした例は、きわめてまれな状況でのみ生じると予測されることに留意されたい。

40. HPLC／UPLC 分光光度法は、あらゆる種類の被験化学物質（有色、無色、MTT 還元物質、および MTT 非還元物質）の FD 測定に使用できる。HPLC／UPLC 分光光度法システムは多様であるため、各使用者が厳密に同じシステム条件を確立することは不可能である。そのため、試料の MTT 定量に向けシステムを用いる前に、HPLC／UPLC 分光光度法システムの適格性評価を実施し、その許容基準を満たしていることを立証する。立証は、生物学的分析法バリデーションに関し、米国食品医薬品局（FDA）が業界向けに発行したガイダンス記載の一連の標準的な適格性評価パラメータに基づいて行う（30）（31）。これらの主要パラメータとその許容基準を補遺 IV に示す。一旦補遺 IV に定義された許容基準を満たした場合、当該 HPLC／UPLC 分光光度法システムは適格性があり、本 TG 記載の実験条件下で FD を測定できるとみなされる。

許容基準

41. 品質管理（段落 27 参照）を満たした RhCE 組織バッチを用いた実行時ごとに、陰性対照物質で処理された組織は出荷、受領段階、およびプロトコール処理過程すべてに従った組織の品質を反映した OD を示し、表 3 記載の歴史的に確立された境界外にならないこと（段落 23 参照）。SkinEthic™ HCE TTL プロトコールでは、陽性対照物質（すなわち、酢酸メチル）で処理した組織の平均組織生存率が、陰性対照に比べ 5 分曝露時で 50%以下、16 分および 120 分曝露時のいずれでも 50%超を示すこと。ま

© OECD, (2022)

た、SkinEthic™ HCE TTS プロトコールでは、陽性対照物質、すなわち 1%（w/v）乳酸水溶液で処理した組織の平均組織生存率が、陰性対照に比べ 30 分曝露時で 40%超、120 分処理後の%生存率が 20%超 70%以下を示し、したがって、本試験法の条件下（28）（29）で、刺激性の被験化学物質に反応する組織能が反映されていること。

42. 被験化学物質と対照物質に関する組織反復実験間のばらつきが、許容限度内におさまること（すなわち、組織 2 個の反復実験間の生存率の差が 20%未満であるか、組織 3 個の反復実験間の標準偏差（SD）が 18%以下であること）。実行時の対象となる陰性対照か陽性対照のいずれかが許容範囲外である場合、当該実行分については「不適格」とみなし、再度実施する。被験化学物質に関する組織反復実験間のばらつきが許容範囲外である場合、当該試験は「不適格」とみなさなければならず、当該被験化学物質については再度試験すべきである。

結果の解釈および予測モデル

43. 被験化学物質ごとに反復実験での試料から得られた OD の値／ピーク面積を用いて、陰性対照を 100%に設定して正規化された平均組織生存率（%）（組織反復実験間の平均値）を算出する。UN GHS 分類による眼に対する危険有害性区分について、被験化学物質の特定および分類に用いられる組織生存率（%）のカットオフ値、すなわち、区分外（分類されない）、区分 2（眼刺激性）、および区分 1（重篤な眼損傷性）を表 5 に示す。したがって、結果の解釈は以下のとおりとする。

- 曝露および曝露後浸漬のインキュベーションを経た平均組織生存率（%）が、すべての時点の処理内で、確立された組織生存率（%）のカットオフ値を超える（＞）場合、被験化学物質は、UN GHS による分類および表示が不要な化学物質（区分外）と特定される。
- 曝露および曝露後浸漬のインキュベーションを経た平均組織生存率（%）が、すべての時点の処理内で、確立された組織生存率（%）のカットオフ値以下（≦）の場合、被験化学物質は、UN GHS により重篤な眼損傷性を誘発する化学物質（区分 1）と特定される。
- 表 5 に示すとおり、すべての時点の処理内で、平均組織生存率（%）の組み合わせが、被験化学物質を区分外または区分 1 と特定するため確立された基準の範囲外になる場合、被験化学物質は、UN GHS により眼刺激性を誘発する化学物質（区分 2）と特定される。

表 5. UN GHS の分類による予測モデル

	区分外	区分 2	区分 1
SkinEthic HCE TTL（液体用のプロトコールの場合）	平均組織生存率：すべての時点の処理内で>50%	別の値の組み合わせ [1]	平均組織生存率：すべての時点の処理内で≤50%
SkinEthic HCE TTS（固体用のプロトコールの場合）	平均組織生存率：30 分後に>40%、かつ 120 分後に>60%	別の値の組み合わせ [1]	平均組織生存率：30 分後に≤40%、かつ 120 分後に≤60%

[1] 区分外または区分 1 に定義された値以外の組み合わせ。

44. 結果が明解である場合、1 被験化学物質につき組織 2 個以上の反復実験からなる単一試験で十分なはずである。一方、反復実験測定結果が一致しない、および／または平均組織生存率（%）が、特定の時点の処理内で、確立された組織生存率（%）のカットオフ値± 5%に相当するなど境界線上の結果である場合には、2 回目の試験を検討し、また、最初の 2 回の試験間での結果が相いれない場合には、3 回目の試験を検討する。

© OECD, (2022)

データおよび報告

データ

45. 実行時に個別の反復実験を行った組織から得られたデータ（例：被験化学物質および対照の OD の値／FD ピーク面積および組織生存率（%）の算出データ、ならびに、RhCE 法での最終予測）は、必要に応じて反復試験データを含め、被験化学物質ごとに表形式で報告する。さらに、平均組織生存率（%）、および、組織 2 個の反復実験間（反復実験を行った組織が n=2 の場合）または SD 間（反復実験を行った組織が n≥3 の場合）での生存率の差について、個別の被験化学物質および対照ごとに報告する。MTT の直接還元および／または色干渉を通じ、FD 測定に被験化学物質による干渉が認められれば、被験化学物質ごとに報告する。

試験報告書

46. 試験報告書には、以下の情報を記載する。

被験化学物質

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
- 入手可能な範囲での物理的状態、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
- 純度、必要に応じ現実的に実行可能な場合の不純物の化学的特定など
- 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）
- 入手可能な範囲で、保存条件および安定性。

多成分物質、UVCB、および混合物

- 例えば、可能な範囲での成分の化学物質識別情報（上記参照）、純度、定量情報、および関連のある物理化学的特性（上記参照）による可能な限りの特徴付け
- 可能な範囲での物理的状態、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
- 純度、必要に応じ現実的に実行可能な場合の不純物の化学的特定など
- 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）
- 可能な範囲での保存条件および安定性。

陽性および陰性対照物質

- 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
- 入手可能な範囲での物理的状態、揮発性、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
- 純度、必要に応じ現実的に実行可能な場合の不純物の化学的特定など
- 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）
- 入手可能な範囲での保存条件および安定性

© OECD, (2022)

- 該当する場合、補遺 II に引用されている陰性対照以外の異なる物質を用いる場合、その正当化
- 該当する場合、補遺 II に引用されている陽性対照以外の異なる物質を用いる場合、その正当化
- 適切な実行許容基準であることを立証する歴史的陽性および陰性対照結果への言及。

試験依頼者および試験実施施設に関する情報

- 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。

用いた RhCE 組織構築物およびプロトコール（選択の根拠を提示）

試験法の条件

- 用いた RhCE 組織構築物（バッチ番号を含む）
- FD の定量に用いた波長およびバンドパス（該当する場合）、ならびに測定機器（例：分光光度計）の直線範囲
- FD の定量に用いた方法の記述
- 該当する場合、用いた HPLC／UPLC 分光光度法システムの記述。LLOQ、ULOQ、ならびに HPLC／UPLC のバリデーションと同じ種類のフィッティングおよび重み付けを用いた検量線および QC の結果を報告に含めること。
- 用いた特定の RhCE 組織構築物について、その性能を含めた完全な裏付け情報。これには以下の情報を含むべきであるが、これらに限定されない。
  - i. 生存率の品質管理（供給業者）
  - ii. 試験法の条件下での生存率（使用者）
  - iii. バリア機能の品質管理（供給業者）
  - iv. 入手可能であれば、形態（供給業者）
  - v. 入手可能であれば、RhCE 組織構築物のそれ以外の品質管理（QC）結果（供給業者）
- RhCE 組織構築物の歴史的データへの言及。これには以下の情報を含むべきであるが、これらに限定されない。バッチの歴史的データ参照による QC データの許容性
- 試験実施施設が、習熟度確認化学物質の試験により、その試験法の使用に習熟していることを定常的な使用前に立証した旨の記述

実行および試験の許容基準

- 歴史的データに基づいた陽性対照および陰性対照の平均値および許容範囲
- 陽性対照および陰性対照に関する組織反復実験間での許容可能なばらつき
- 被験化学物質に関する組織反復実験間での許容可能なばらつき

試験手順：

- 用いた試験手順の詳細（例：SOP のバージョン）
- 用いた被験化学物質および対照物質の用量
- 曝露、曝露後浸漬、および曝露後インキュベーション期間の時間および温度（該当する場合）
- 試験手順を変更した場合、その記述
- 該当する場合、直接的な MTT 還元物質および／または有色の被験化学物質に用いた対照の表示
- 被験化学物質および対照物質（該当する場合、陽性対照、陰性対照、NSMTT、NSC $_{\text{生存組織}}$、および NSC $_{\text{死滅組織}}$）ごとに用いた組織反復実験数

© OECD, (2022)

結果：

- 実行時ごと（該当する場合、再実験を含む）および反復実験測定結果ごとに行った個別の被験化学物質および対照物質のデーター覧表－OD の値または FD ピーク面積、組織生存率（%）、平均組織生存率（%）、組織反復実験間または SD 間の差、および最終予測など
- 該当する場合、直接的な MTT 還元物質および／または有色の被験化学物質に用いた対照の結果－OD の値または FD ピーク面積、%NSMTT、%NSC $_{生存組織}$、%NSC $_{死滅組織}$、組織反復実験間または SD 間の差、最終的に補正された組織生存率（%）、および最終予測など
- 定義された実行および試験の許容基準との関連で、被験化学物質および対照物質により得られた結果
- 例えば、有色の被験化学物質による組織の発色など、認められたその他の影響に関する記述

結果の考察

結論

© OECD, (2022)

参考文献

(1) United Nations (UN) (2021), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Ninth revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://unece.org/transport/standards/transport/dangerous-goods/ghs-rev9-2021].

(2) OECD (2017). Guideline for Testing of Chemicals No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(3) OECD (2018). Guidance Document on an Integrated Approach 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.

(4) OECD (2020). Guideline for Testing of Chemicals No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Availableat: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(5) OECD (2018). Guideline for Testing of Chemicals No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(6) OECD (2017). Guideline for Testing of Chemicals No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(7) OECD (2020). Guideline for Testing of Chemicals 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. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(8) OECD (2019). Guideline for Testing of Chemicals No. 492: 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. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(9) OECD (2021). Guideline for Testing of Chemicals No. 494: Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(10) OECD (2019). Guideline for Testing of Chemicals No. 496: *In vitro* Macromolecular Test Method for Identifying Chemicals Inducing Serious Eye Damage and Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(11) Alépée, N., Leblanc, V., Grandidier, MH., Teluob, S., Tagliati, V., Adriaens, E., Michaut, V. (2020) Development of the SkinEthic HCE Time-to-Toxicity test method for identifying liquid chemicals not requiring classification and labelling and liquids inducing serious eye damage and eye irritation. Toxicol. in Vitro 69, 104960.

(12) Alépée, N., Leblanc, V., Grandidier, MH., Teluob, S., Viricel, A., Adriaens, E., Michaut, V. (2021). SkinEthic HCE Time-to-Toxicity on Solids: A test method for distinguishing chemicals inducing serious eye damage, eye irritation and not requiring classification and labelling. Toxicol. in Vitro 75, 105203.

© OECD, (2022)

(13) Alépée, N., Grandidier, MH., Teluob, S., Amaral, F., Caviola, E., De Servi, B., Martin, S., Meloni, M., Nardelli, L., Pasdelou, C., Tagliati, V., Viricel, A., Adriaens, E., Michaut, V. (2022). Validation of the SkinEthic HCE Time-to-Toxicity test method for eye hazard classification of chemicals according to UN GHS. Toxicol. in Vitro, 80, 105319. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105319

(14) OECD (2022). Peer Review Panel Report on the scientific validity of the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Time-to-Toxicity Test (TTT) on liquids (TTL) and on solids (TTS). Series on Testing and Assessment, No. 355. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm]

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

(16) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics 82, 377-390

(17) 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.

(18) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. Molecular Vision 17, 113-126.

(19) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (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.

(20) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(21) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(22) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39, 922–936.

(23) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. Reg. Tox. Pharmacol. 36, 106-117.

(24) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. Toxicol. In Vitro 15, 115–130.

(25) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39, 2610–2625.

(26) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the in vivo Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test

© OECD, (2022)

Methods. Arch. Toxicol. 88, 701-723.

(27) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). Arch. Toxicol. 91, 521-547.

(28) SkinEthic™ HCE Time-to-Toxicity on Liquids SOP, Version 1. (June 16, 2020). *In Vitro* Eye Irritation Time-To-Toxicity Test Method On Liquids (TTL): SkinEthic™ Human Corneal Epithelium Model (HCE). Available at: [www.episkin.com/eye-irritation/Time-To-Toxicity].

(29) SkinEthic™ HCE Time-to-Toxicity on Solids SOP, Version 1. (June 16, 2020*). In Vitro* Eye Irritation Time-To-Toxicity Test Method On Solids (TTS): SkinEthic™ Human Corneal Epithelium Model (HCE). Available at: [www.episkin.com/eye-irritation/Time-To-Toxicity].

(30) 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 Coloured Test Chemicals. Toxicol. In Vitro 29, 741-761

(31) US FDA (2018). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2018. Available at: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(32) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2005)14&doclanguage=en

© OECD, (2022)

補遺 I：定義

バランスのとれた正確度：各区分の正しい予測の割合の平均値。クラス分布の不均衡を考慮した、試験法の結果と許容される基準値との一致の近さ。

ベンチマーク化学物質：被験化学物質との比較の基準として用いられる化学物質。ベンチマーク化学物質は次の特性を有すること。（i）その識別および特徴付けに関し、一貫性がありかつ信頼性が高い供給元の存在。（ii）試験対象の化学物質との構造、機能および／または化学物質レベル、あるいは製品クラスの類似性。（iii）物理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。

化学物質：物質または混合物。

一致：「正確度」参照。

角膜：虹彩と瞳孔を覆い内部に光を通す、眼球前面の透明な部分。

CV：変動係数。

Dev：逸脱。

眼刺激性：物質または混合物に対する眼曝露後に生じ、完全に回復する眼の変化をもたらすこと。「眼に対する可逆的影響」、ならびに、任意の区分 2A（21 日以内に完全に回復する作用）および 2B（7 日以内に完全に回復する作用）からなる「UN GHS 区分 2」（1）と同義。

ホルマザン色素（FD）：MTT 還元による発色産物。

危険有害性：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。

HCE：SkinEthic™ヒト角膜上皮

HPLC：高速液体クロマトグラフィー。

IC_{50}：ベンチマーク化学物質を一定時間曝露（例：SDS による 30 分間処理）後、組織生存率を 50%低下させる濃度。

眼に対する不可逆的影響：「重篤な眼損傷性」参照。

LLOQ：定量下限。

LogP：オクタノール／水分配係数の対数

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。

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違いは、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。

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。（CASRN：298-93-1）

© OECD, (2022)

陰性対照：試験系のすべての要素を含み、試験系に陽性反応をもたらさ<u>ない</u>ことが既知である物質により処理された試料。この試料を、被験化学物質により処理した試料および他の対照試料と共に処理し、100%組織生存率の判定に用いる。

分類されない：眼刺激性（UN GHS 区分 2：2A または 2B）にも、重篤な眼損傷性（UN GHS 区分 1）にも分類されない化学物質。「UN GHS 区分外」と同義。

NSC $_{\text{死滅組織}}$：死滅組織における非特異的発色。**NSC** $_{\text{生存組織}}$：生存組織における非特異的発色。**NSMTT**：非特異的な MTT 還元。

OD：光学密度。

陽性対照：試験系のすべての要素を含み、試験系に陽性反応をもたらすことが既知である物質により処理された試料。この試料を、被験化学物質により処理した試料および他の対照試料と共に処理する。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、陽性反応の大きさを過度にしないこと。

妥当性：試験と対象となる作用との関係、および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。妥当性は、対象となる生物学的作用について、その試験が正確に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（32）。

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（32）。

代替試験：危険有害性の特定および／またはリスク評価のため定常的に用いられ、かつ容認されている試験の代わりになるようデザインされた試験であり、また、該当する場合、試験対象となりうるすべての状況および化学物質に関し、容認されている試験に比べ、ヒトまたは動物の健康または環境を同等かそれ以上に保護できると判断された試験（32）。

再現性：同一試験プロトコールを用いた同一被験化学物質の反復試験から得られた結果が、一致していること（「信頼性」参照）（32）。

眼に対する可逆的影響：「眼刺激性」参照。

RhCE：再構築ヒト角膜様上皮。

実行：1 回の実行は、複数の被験化学物質と、同時に行う陰性対照および陽性対照の試験からなる。

SD：標準偏差。

重篤な眼損傷性：物質または混合物に対する眼曝露後に生じ、完全には回復しない眼組織の損傷または重篤な物理的視力低下をもたらすことを言う。「眼に対する不可逆的影響」および「UN GHS 区分 1」（1）と同義。

標準業務手順書（SOP）：具体的な定常業務および試験固有の試験実施施設での業務の実施方法について詳細に記述し、正式に文書化された手順書。GLP の要件である。

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）。

試験：対応する SOP の定義どおり、単一被験化学物質を対象に、組織最低 2 個の反復実験で同時に実施される試験。

組織生存率：再構築組織中の細胞集団の総活性を、生体染色色素である MTT の還元能として測定するパラメータ。測定するエンドポイントおよび用いる試験デザインにもよるが、生細胞の総数および／または生命力と相関する。

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。

© OECD, (2022)

TTL：液体の化学物質での SkinEthic™ HCE の毒性発現時間

TTS：固体の化学物質での SkinEthic™ HCE の毒性発現時間

TTT：SkinEthic™ HCE の毒性発現時間による試験法

ULOQ：定量上限。

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）：人々（雇用者、労働者、輸送担当者、消費者、緊急時対応者など）および環境を保護するため、有害作用に関する情報伝達を目的として、物理的、健康上、および環境上の危険有害性について、標準化された種類およびレベルに応じて化学品（物質および混合物）を分類する提案を行い、また、ピクトグラム、注意喚起語、危険有害性情報、注意書き、および安全データシートなど、対応する伝達要素について取り扱うシステム（1）。

UN GHS 区分 1：「重篤な眼損傷性」参照。

UN GHS 区分 2：「眼刺激性」参照。

UN GHS 区分外：UN GHS 区分 1 または 2（2A または 2B）としての分類要件を満たさない化学物質。「分類されない」と同義。

UPLC：超高速液体クロマトグラフィー。

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。

妥当な試験法：特定の目的に対して十分な妥当性および信頼性があるとみなされる、科学的に健全な原理に基づく試験法。試験方法が絶対的な意味で妥当なのではなく、定義された目的との関連でのみ妥当であるということ（31）。

検証済みの試験法：特定の目的に関する妥当性（正確度を含む）および信頼性を判断するバリデーション試験が完了した試験法。検証済みの試験法は、提唱された目的に対し許容可能と認められる正確度および信頼性の観点からは、十分な性能でない可能性があることに留意されたい（31）。

VRM：検証済み標準試験法。

証拠の重み付け：被験化学物質の危険有害性の可能性に関する結論に達し結論を裏付ける際、情報の様々な断片の強みおよび弱みを検討するプロセス。

© OECD, (2022)

補遺 II：眼に対する危険有害性の特定について検証される、SkinEthic™ HCE TTT 試験法に関する主要な試験法構成要素

試験法の構成要素	SkinEthic™ HCE TTT（VRM）	
プロトコール [1]	TTL プロトコール：液体および粘性の被験化学物質（ピペットで扱える）	TTS プロトコール：固体の被験化学物質（ピペットで扱えない）
モデル表面積	0.5 cm^2	0.5 cm^2
組織反復実験数	2 個以上	2 個以上
色干渉の事前または事後確認	10 µL + H_2O 90 µL を室温 [2] で 30 ± 2 分間混合 →被験化学物質が有色である場合、生存組織の適合対照での確認を実施	10 mg + H_2O 90 µL を室温で 30 ± 2 分間混合 →被験化学物質が有色である場合、生存組織の適合対照での確認を実施
直接的なテトラゾリウム還元の事前または事後確認	化学物質 50～80 µL + MTT 1 mg/mL 溶液 300 µL を 37 ± 2°C、CO_2 5 ± 1%、室内湿度 95%以上で 180 ± 15 分間 →溶液が青色／紫色に変化した場合、水中での死滅組織の適合対照での確認を実施 （陰性対照として、滅菌脱イオン水 50～80 µL を MTT 溶液に添加して用いる）	化学物質 30～80 mg + MTT 1 mg/mL 溶液 300 µL を 37 ± 2°C、CO_2 5 ± 1%、室内湿度 95%以上で 180 ± 15 分間 →溶液が青色／紫色に変化した場合、水中での死滅組織の適合対照での確認を実施 （陰性対照として、滅菌脱イオン水 30～80 µL を MTT 溶液に添加して用いる）
投与量および適用	Ca^{2+}/Mg^{2+}不含 DPBS 10 µL + 80 ± 2 µL（160 µL/cm^2） 粘性がある場合、ナイロンメッシュを使用	80 ± 2 mg（160 mg/cm^2）（組織表面全体を覆うために必要であれば粉砕する） + 蒸留水 80 µL

[1] プロトコールの詳細に関しては、試験実施施設で本試験法を実施する場合、最新版の標準業務手順書（SOP）を参照および使用する（28-29）。

[2] 室温：18～28°C

© OECD, (2022)

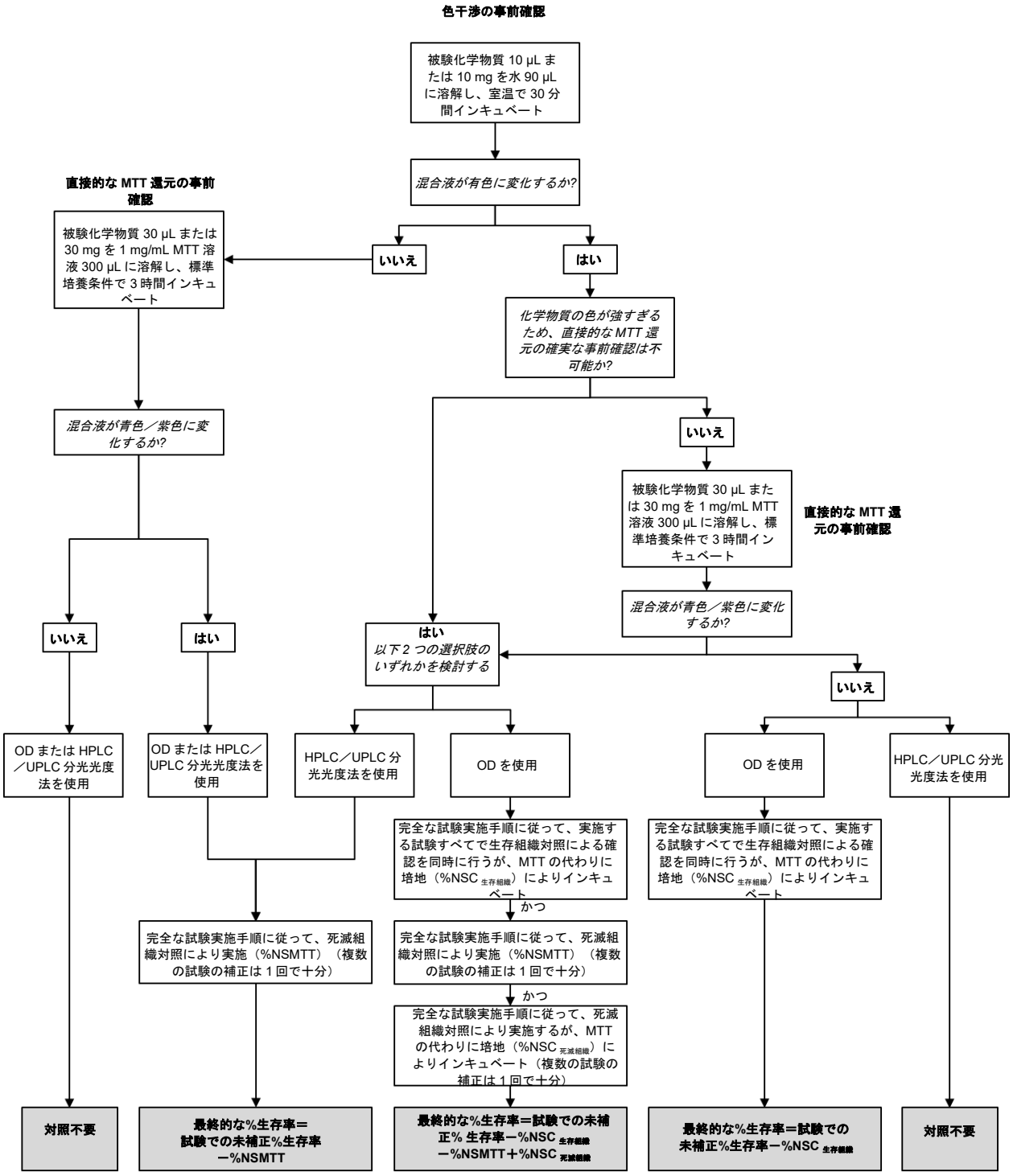
		ナイロンメッシュを使用
曝露時間および温度	室温の培地で 5 分（± 15 秒）（無希釈）、16 分（± 1 分）（蒸留水に添加した 20%（w/v）溶液）、および、37 ± 2°C、CO_2 5 ± 1%、室内湿度 95%以上の培地で 120 分（± 2 分）（蒸留水に添加した 20%（w/v）溶液）	37 ± 2°C、CO_2 5 ± 1%、室内湿度 95%以上の培地で 30 分（± 2 分）および 120 分（± 5 分）（無希釈）
室温での洗浄	Ca^{2+}/Mg^{2+}不含 DPBS 25 mL（1 プッシュ当たり 2 mL）	Ca^{2+}/Mg^{2+}不含 DPBS 25 mL（1 プッシュ当たり 2 mL）
曝露後浸漬	4 mL 培地中で室温にて 10 分（± 1 分）	4 mL 培地中で室温にて 30 分（± 2 分）
陰性対照	Ca^{2+}/Mg^{2+}不含 DPBS 80 ± 2μL、同時に試験	Ca^{2+}/Mg^{2+}不含 DPBS 80 ± 2μL、同時に試験
陽性対照	酢酸メチル（CASRN：79-20-9）80 ± 2 μL、同時に試験	1%乳酸水溶液（w/v）（CASRN：50-21-5）80 ± 2 μL、同時に試験
テトラゾリウム塩溶液	濃度 1 mg/mL を 300 μL	濃度 1 mg/mL を 300 μL
テトラゾリウム塩のインキュベーションおよび温度	37 ± 2°C、CO_2 5 ± 1%、室内湿度 95%以上で 180 分（± 15 分）	37 ± 2°C、CO_2 5 ± 1%、室内湿度 95%以上で 180 分（± 15 分）
抽出溶剤	イソプロパノール 1.5 mL（750 μL 未満および 750 μL 超） （上部および底部の挿入箇所から抽出）	イソプロパノール 1.5 mL （底部の挿入箇所から抽出）
抽出時間および温度	室温で振とうしながら（約 120 rpm）2 時間以上、または 4～10°C で振とうせず一晩以上	室温で振とうしながら（約 120 rpm）2 時間以上
OD の読み出し	570 nm（540～600 nm） リファレンスフィルターなし	570 nm（540～600 nm） リファレンスフィルターなし
組織の品質管理	SDS（50 μL）で 30 ± 2 分間処理 1.0 mg/mL ≤ IC_{50} ≤ 3.2 mg/mL	SDS（50 μL）で 30 ± 2 分間処理 1.0 mg/mL ≤ IC_{50} ≤ 3.2 mg/mL
許容基準	1. 陰性対照での処理による組織反復実験の平均 OD が、1.0 超 2.5 以下である	1. 陰性対照での処理による組織反復実験の平均 OD が、1.0 超 2.5 以下である

© OECD, (2022)

	2. 陰性対照に対する割合で表した陽性対照の平均生存率が、5 分間曝露時点で 50%以下、16 分間および 120 分間の両時点で 50%超である。 3. 組織 2 個の反復実験の生存率の差が 20%未満である	2. 陰性対照に対する割合で表した陽性対照の平均生存率が、30 分間曝露時点で 40%超、120 分曝露時点で 20%超 70%以下である。 3. 組織 2 個の反復実験の生存率の差が 20%未満である

© OECD, (2022)

補遺 III：SkinEthic™ HCE TTT の SOP に基づいた、直接的な MTT 還元物質および／または色干渉を示す化学物質の特定方法および取り扱い方法について、そのガイダンスを示した説明用フローチャート



© OECD, (2022)

補遺 IV：RhCE 組織構築物から抽出された MTT ホルマザン測定用の HPLC／UPLC 分光光度法システムの適格性評価に関する主要パラメータおよび許容基準

パラメータ	FDA ガイダンスから得られたプロトコール（43）（45）	許容基準
選択性	イソプロパノール、生存組織ブランク（未処理の生存 RhCE 組織構築物のイソプロパノール抽出液）、死滅組織ブランク（未処理の死滅 RhCE 組織構築物のイソプロパノール抽出液）、および色素（例：メチレンブルー）の分析	面積干渉が面積 LLOQ[1] の 20%以下
精度	イソプロパノールでの品質管理（すなわち、1.6 µg/mL、16 µg/mL、および 160 µg/mL での MTT ホルマザン）（n=5）	CV が 15%以下、または LLOQ において 20%以下
正確度	イソプロパノールでの品質管理（n=5）	逸脱率が 15%以下、または LLOQ において 20%以下
マトリックス効果	生存組織ブランクでの品質管理（n=5）	マトリックス効果の割合が 85%以上 115%以下
キャリーオーバー	ULOQ[2] の標準試料分析後にイソプロパノールを分析	面積干渉が面積 LLOQ の 20%以下
再現性（日内）	独立した検量線 3 本（ULOQ、すなわち 200 µg/mL から開始したイソプロパノール中の MTT ホルマザンについて、連続 6 回の 3 倍希釈に基づく）；イソプロパノールでの品質管理（n=5）	検量線：逸脱率が 15%以下、または LLOQ において 20%以下 品質管理：逸脱率が 15%以下かつ CV が 15%以下
再現性（日間）	1 日目：検量線 1 本およびイソプロパノールでの品質管理（n=3） 2 日目：検量線 1 本およびイソプロパノールでの品質管理（n=3） 3 日目：検量線 1 本およびイソプロパノールでの品質管理（n=3）	
RhCE 組織抽出物中での MTT ホルマザンの短期安定性	調製日および室温保存の 24 時間後に分析される生存組織ブランクでの品質管理（n=3）	逸脱率が 15%以下
RhCE 組織抽出物中での MTT ホルマザンの長期安定性（必要な場合）	調製日および-20°C で数日保存後に分析される生存組織ブランクでの品質管理（n=3）	逸脱率が 15%以下

[1] LLOQ：定量下限。1～2%の組織生存率、すなわち、0.8 µg/mL を対象にするよう定義。
[2] ULOQ：定量上限。陰性対照のイソプロパノール抽出液中の MTT ホルマザンの予想最高濃度（VRM で約 70 µg/mL）の 2 倍以上、すなわち、200 µg/mL と定義。

F© OECD, (2022)

補遺 V：UN GHS 区分ごとに正確な予測、過小予測、および過大予測を示す 3x3 マトリックスによる液体および固体での SkinEthic™ HCE TTT の性能

表 1：SkinEthic™ HCE TTL プロトコールの性能

47.

UN GHS 区分	SkinEthic™ HCE TTL により予測される区分		
	区分 1	区分 2	区分外
区分 1（N=21）	85.4%	14.6%	0.0%
区分 2（N=25）	20.2%	79.8%	0.0%
区分外（N=24）	0.0%	20.8%	79.2%

表 2：SkinEthic™ HCE TTS プロトコールの性能

48.

UN GHS 区分	SkinEthic™ HCE TTS により予測される区分		
	区分 1	区分 2	区分外
区分 1（N=29）	74.7%	25.3%	0.0%
区分 2（N=19）	15.8%	55.3%	28.9%
区分外（N=33）	3.0%	25.3%	71.7%

© OECD, (2022)