OECD/OCDE

2018/06/25

試験ガイドライン No.492

眼刺激性または重度の眼損傷性として分類および表示する必要のない化学物質を同定するための再構築ヒト角膜様上皮モデル法 (RhCE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. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling 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-492-2018.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 **492**

採択
2018 年 6 月 25 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

眼刺激性または重度の眼損傷性として分類および表示する必要のない化学品を同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. *重度の眼損傷性*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）」の定義によれば、被験物質を前眼部表面に適用した後に、21 日以内に完全には回復しない眼組織の損傷、または重度の物理的視力低下を生じることである（1）。また、UN GHS によれば、*眼刺激性*とは、被験物質を前眼部表面に適用した後に、眼に変化を生じることであり、適用後 21 日以内に完全に回復するもののことである。UN GHS の分類では、重度の眼損傷を誘発する被験物質は区分 1、眼刺激を誘発する被験物質は区分 2 に分類される。眼刺激性や重度の眼損傷性に分類されない被験物質は、UN GHS の区分 1 および 2（2A または 2B）のいずれの分類基準に該当しない（すなわち、UN GHS 区分外）化学品と定義される。

2. 通常、重度の眼損傷性／眼刺激性の評価には、実験動物が使用されてきた（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）。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あたっては、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（3）。

3. この試験ガイドラインでは、UN GHS による眼刺激性または重度の眼損傷性として分類および表示する必要のない化学品（化学物質および混合物）の同定が可能な *in vitro* 法を取り上げる。本試験法では、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を忠実に再現した再構築ヒト角膜様上皮（reconstructed human cornea-like epithelium：RhCE）を利用する。その他にも、ヒトの健康に関連した評価項目である重度の眼損傷性、または分類されない化学品に対応する *in vitro* 試験法として 4 法についてバリデーションが実施され、科学的妥当性が認められ、OECD の試験ガイドライン（Test Guideline：TG）437（4）、438（5）、460（6）および 491（7）として採択されている。

© OECD, (2018)

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、2018 年 6 月 25 日付けにて作成された手順書に従い、「化学品評価におけるデータ相互受け入れに関する理事会決定（Decision of the Council on the Mutual Acceptance of Data in the Assessment of Chemicals）」の「補遺 I」を改訂するための「権限の委任に関する理事会決定（Decision of the Council on a Delegation of Authority）」に則って［C（2018）49］、OECD の化学品委員会と化学品、農薬、バイオテクノロジーに関する作業部会との合同会議で改訂された。本ガイドラインは、手順書に従い、OECD 理事会により 2018 年 6 月 25 日付けにて採択されたものである。

4. 本試験ガイドラインには、市販の RhCE モデルを利用したバリデーション済みの試験法が 3 種含まれている。眼刺激性／重度の眼損傷性の評価に関するバリデーション試験は、EpiOcular™ Eye Irritation Test（EIT）、SkinEthic™ Human Corneal Epithelium（HCE）EIT および LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT を用いて実施された（8）（9）（10）（11）（12）（13）（14）（15）（16）。いずれの試験法も市販の RhCE 組織構造物を試験系として利用しており、そのうちの 2 法、すなわち、EpiOcular™ EIT および SkinEthic™ HCE EIT を「バリデーション済み標準試験法」（それぞれ順に VRM1 および VRM2）として以降は引用する。上記のバリデーション試験とその独立したピアレビューから（10）（13）、EpiOcular™ EIT、SkinEthic™ HCE EIT および LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT は、UN GHS（1）に基づく眼刺激性または重度の眼損傷性として分類および表示する必要のない化学品（化学物質および混合物）を正確に同定できるとの結論が得られたことから、この目的において当該試験法は科学的に妥当性が認められた試験法として推奨されている（14）。試験方法の重要な要素の概要および具体的な状況に応じた指針を示したフローチャートを、補遺 II から補遺 V に示す。

5. 現時点では、予測可能な将来において、さまざまなクラスの化学品の重度の眼損傷性／眼刺激性を全面的に予測するために、*in vivo* Draize 眼試験に完全に置き換えられるような単一の *in vitro* 試験法はないというのが一般的な見解である（2）（16）。ただし、ボトムアップ方式またはトップダウン方式などの（階層的）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、Draize 眼試験を完全に代替できる可能性はある（17）。トップダウン方式は、既存の情報に基づき、重度の眼損傷を生じることが予想される化学品の試験を意図して設計されているが、ボトムアップ方式は、既存の情報に基づき、眼刺激性物質と分類するほどの眼刺激性を起こさないと予想される化学品の試験を意図して設計されている。UN GHS に基づき、眼刺激性または重度の眼損傷性に分類する必要のない化学品（UN GHS 区分外）については（1）、Scott らによって提案された試験戦略内で、ボトムアップ方式の最初の段階として、またはトップダウン方式の最終段階の一部として、追加試験を実施することなく同定する場合に、EpiOcular™ EIT、SkinEthic™ HCE EIT および LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT が推奨される。ただし、EpiOcular™ EIT、SkinEthic™ HCE EIT および LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT は、UN GHS 区分 1（重度の眼損傷性）と UN GHS 区分 2（眼刺激性）を判別するよう意図されていない。このような判別については、試験戦略の他の段階で対処する必要が出てくる（3）。したがって、EpiOcular™ EIT、SkinEthic™ HCE EIT、または LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT を用いて眼刺激性／重度の眼損傷性のある物質として分類する必要があると特定された被験物質については、TG 437、TG 438、TG 460、TG 491、または必要に応じて TG 405 などに従って追加試験（*in vitro* および／または *in vivo*）を実施し、最終的な結論（UN GHS の区分外、区分 2、または区分 1）を出す必要がある。

6. この試験ガイドラインの目的は、テトラゾリウム染色（tetrazolium dye：TD、VRM1 および VRM2 では 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、CAS 登録番

© OECD, (2018)

号：298-93-1］、またはLabCyte CORNEA-MODEL24 EITではWST-8［2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム, モノナトリウム塩、CAS登録番号：193149-74-5］など）試験によって測定される（18）（19）（第22段落参照）、RhCE組織構造物における被験物質の細胞毒性誘発能に基づいて眼への有害性を評価する手順を規定することである。被験物質曝露後のRhCE組織の生存率を、陰性対照物質で処理した組織との比較により測定し（%生存率）、その結果を用いて被験物質の眼への有害性を予測する。

7. ガイダンス文書No. 34の原則に従って（21）、EpiOcular™ EIT、SkinEthic™ HCE EITおよびLabCyte CORNEA-MODEL24 EITに類似した、RhCEを用いた*in vitro*系の新規試験法または改変試験法のバリデーションを促進し、本試験ガイドラインを適時に改訂して追加できるような「性能基準」（20）がある。「データの相互受入れ（MAD）」は、「性能基準」に則ってバリデーションを実施した試験方法が、OECDの審査を経て本試験ガイドラインに収載されている場合にのみ保証されることになる。

8. 定義を補遺Iに示す。

最初に考慮すべき事項および限界

9. 本試験ガイドラインは、初代ヒト表皮角化細胞（すなわち、EpiOcular™ OCL-200）、不死化ヒト角膜上皮細胞（すなわち、SkinEthic™ HCE/S）、初代ヒト角膜上皮細胞（すなわち、LabCyte CORNEA-MODEL24）のいずれかを用いて作製された市販の三次元RhCE組織構造物を基にしている。EpiOcular™ OCL-200、SkinEthic™ HCE/SおよびLabCyte CORNEA-MODEL24のRhCE組織構造物は、*in vivo*の角膜上皮の三次元構造と類似しており、対象動物種の細胞を用いて製造されている（22）（23）（24）。さらに、この試験方法では、化学品曝露後の化学品の角膜透過、ならびに細胞損傷および組織損傷の発生によって生じる細胞毒性を直接測定し、測定された細胞毒性から、*in vivo*での重度の眼損傷性／眼刺激性について総合的な反応を判定する。細胞損傷の発生には複数の作用機序が考えられるが（第21節を参照）、細胞毒性は、一次毒性でない限り、*in vivo*では主に角膜混濁、虹彩炎、結膜発赤および／または結膜水腫として現れる化学品の重度の眼損傷性／眼刺激性の総合的な反応を、組織損傷の基礎にある物理化学的過程に関係なく判定する上で、重要な機能的役割を担っている。

10. 本試験ガイドラインの基礎を成すバリデーション試験では、多様な化学種、化学的分類、分子量、LogP、化学構造などを網羅した広範な化学品が対象となった。EpiOcular™ EITのバリデーションデータベースには合計113の化学品が含まれており、OECDのQSARツールボックスによる解析によれば（9）、95の相異なる有機官能基が網羅されている。これらの化学品の多くは単一成分物質であったが、多成分物質もいくつか（ホモポリマー3物質、共重合体5物質および擬似ポリマー10物質）バリデーション試験の対象となった。これら113の被験物質の物理的状態およびUN GHSの分類に基づく分布は、区分1の液体が13物質、区分1の固体が15物

© OECD, (2018)

質、区分 2A の液体が 6 物質、区分 2A の固体が 10 物質、区分 2B の液体が 7 物質、区分 2B の固体が 7 物質、区分外の液体が 27 物質および区分外の固体が 28 物質であった（8）。SkinEthic™ HCE EIT のバリデーションデータベースには合計 200 の化学品が含まれており、165 の相異なる有機官能基が網羅されている（9）（11）（12）。これらの化学品の多くは単一成分物質であったが、多成分物質もいくつか（ポリマー10 物質）バリデーション試験の対象となった。これら 200 の被験物質の物理的状態および UN GHS の分類に基づく分布は、区分 1 の液体が 27 物質、区分 1 の固体が 24 物質、区分 2A の液体が 19 物質、区分 2A の固体が 10 物質、区分 2B の液体が 9 物質、区分 2B の固体が 8 物質、区分外の液体が 50 物質および区分外の固体が 53 物質であった（11）（12）。LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT の追走的バリデーションのデータベースには、本試験ガイドライン 492 の性能基準（20）に掲載されている標準物質が 30 物質含まれていた。

11. 本試験ガイドラインの適用対象は、物質および混合物、ならびに固体、液体、半固体および蝋状物質である。液体には水溶性液体と非水溶性液体がある。また、固体には水溶性固体と非水溶性固体がある。固体は、可能な限り粉砕して、微細粉末にしてから使用する。それ以外、検体の前処理は必要ない。気体およびエアロゾルについてはバリデーション試験で検討された例はない。RhCE の技術を用いた試験の実施も考えられるものの、現行の試験ガイドラインでは気体およびエアロゾルを用いる試験は認められていない。

12. ホルマザン色素（formazan dye：FD）と同じ波長域の光を吸収する被験物質（自然吸収、または処理後）および生体染色色素テトラゾリウムの直接還元能（FD にする）を有する被験物質は、組織生存率の測定を妨害する可能性があるため、補正用の適合対照を用いる必要がある。必要とされる適合対照の種類は、被験物質による妨害の種類および各 FD の定量に用いる手順によって異なる（第 37 段落～第 43 段落参照）。

13. バリデーション前の試験（25）（26）（27）およびバリデーション試験（9）（11）（12）（15）で得られた結果から、EpiOcular™ EIT、SkinEthic™ HCE EIT および LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT を用いた試験の実施経験がないと考えられる試験施設への移譲が可能であること、また、施設内および施設間で再現性が認められることが実証された。これらの試験によると、EpiOcular™ EIT について 113 化学品のデータから予想される予測一致率の再現性は、施設内で約 95%、施設間で約 93%である。また、SkinEthic™ HCE EIT について 120 化学品のデータから予想される予測一致率の再現性は、施設内で約 92%、施設間で約 95%である。さらに、LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT について性能基準（21）に掲載されている 30 の標準物質のデータから予想される予測一致率の再現性は、施設内で約 96%、施設間で約 87%である。

14. EpiOcular™ EIT は、UN GHS の分類体系によるところの（1）、眼刺激性または重度の眼損傷性に分類する必要のない化学品の同定に使用することができる。バリデーション試験で得られたデータを検討した場合（9）、*in vivo* ウサギ眼試験の

© OECD, (2018)

参照データ（OECD の TG 405）（2）（16）を UN GHS の分類体系（1）に従って分類した場合と比較すると、EpiOcular™ EIT の総合的な精確さは 80%（112 品中）、感度は 96%（57 品中）、偽陰性率は 4%（57 品中）、特異度は 63%（55 品中）、偽陽性率は 37%（55 品中）である。97 の農薬液剤について EpiOcular™ EIT を用いて実施された試験により、この種の混合物における本試験方法の性能はバリデーション試験と同程度であることが実証された（28）。*In vivo* ウサギ眼試験の参照データ（OECD の TG 405）（2）（16）を基に UN GHS の分類体系（1）に従って分類した場合、これら 97 製剤の分布は、区分 1 が 21 剤、区分 2A が 19 剤、区分 2B が 14 剤および区分外が 43 剤であった。総合的な精確さは 82%（97 製剤中）、感度は 91%（54 製剤中）、偽陰性率は 9%（54 製剤中）、特異度は 72%（43 製剤中）、偽陽性率は 28%（43 製剤中）であった（28）。

15. SkinEthic™ HCE EIT は、UN GHS の分類体系によるところの（1）、眼刺激性または重度の眼損傷性に分類する必要のない化学品の同定に使用することができる。バリデーション試験で得られたデータを検討した場合（11）（12）、*in vivo* ウサギ眼試験の参照データ（OECD の TG 405）（2）（16）を UN GHS の分類体系（1）に従って分類した場合と比較すると、SkinEthic™ HCE EIT の総合的な精確さは 84%（200 品中）、感度は 95%（97 品中）、偽陰性率は 5%（97 品中）、特異度は 72%（103 品中）、偽陽性率は 28%（103 品中）である。

16. LabCyte CORNEA-MODEL EIT は、UN GHS の分類体系によるところの（1）、眼刺激性または重度の眼損傷性に分類する必要のない化学品の同定に使用することができる。追走的バリデーション試験で得られたデータを検討したところ（15）、LabCyte CORNEA-MODEL EIT は、本試験ガイドラインの「性能基準」が求める再現性および再現能力の基準に適合している（20）。さらに、この組織構築物の開発者により、139 の化学品からなるデータベースを用いた試験も行われている（データ未発表）。

17. 以上の RhCE 法について、物質または混合物のいずれかについて得られた偽陰性率は、*in vivo* Draize 眼試験の試験内変動である 12%の範囲内に収まっている（29）。組織生存率が確立されているカットオフ値以下であった被験物質はすべて、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」の OECD ガイダンス文書に従って（3）、規制要件に応じて、他の *in vitro* 試験法、または最終選択肢としてウサギを用いて追加試験を行う必要があることから（第 45 段落参照）、物質、または混合物について RhCE 法により得られた偽陽性率についてはいずれも、本試験ガイドラインにおいては重要ではない。これらの RhCE 法はあらゆる種類の化学品に使用できることから、眼刺激性および重度の眼損傷性に分類されない化学品（UN GHS 区分外）について、陰性結果を受け入れるべきである。UN GHS 以外の分類法により EpiOcular™ EIT、SkinEthic™ HCE EIT および LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT を使用する場合は、事前に適切な規制当局に相談すること。

18. 本試験ガイドラインの限界は、UN GHS の定義（1）による眼刺激性／眼に対する可逆的影響（区分 2）と重度の眼損傷性／眼に対する不可逆的影響（区分 1）、

© OECD, (2018)

および眼刺激性物質（任意区分 2A）と軽度の眼刺激性物質（任意区分 2B）との識別ができないことである。このため、他の *in vitro* 試験のガイドラインによる追加試験の実施が必要となる（3）。

19. 本試験ガイドラインにおける「被験物質」という用語は、試験の対象となる物質のことであり [1]、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。

試験の概要

20. 被験物質を最低 2 個の三次元 RhCE 組織構造物に局所的に適用し、曝露および処理後の培養期間を経た後、組織生存率を測定する。RhCE 組織は、初代ヒト表皮角化細胞、不死化ヒト角膜上皮細胞、または初代培養ヒト角膜上皮細胞から再構築され、ヒト角膜と形態学的に類似した高分化重層扁平上皮を形成するまで数日間培養されている。EpiOcular™および LabCyte CORNEA-MODEL24 の RhCE 組織構造物は、少なくとも 3 つの生存細胞層と非角化表面で構成され、*in vivo* 構造と類似した角膜様構造を示す（24）。SkinEthic™ HCE の RhCE 組織構造物は、正常なヒト角膜上皮と同様に、円柱状の基底細胞、翼状の移行細胞および表面の扁平上皮細胞を含む、少なくとも 4 つの生存細胞層からなる（23）（30）。

21. *in vivo* では主に角膜混濁、虹彩炎、結膜発赤および／または結膜水腫として現れる化学物質誘発性の重度の眼損傷／眼刺激は、化学品の角膜および／または結膜透過、ならびに細胞損傷の発生から始まる一連の事象の結果である。細胞損傷は、細胞膜溶解（界面活性剤、有機溶媒などによる）、高分子（特にタンパク質）の凝固（界面活性剤、有機溶媒、アルカリおよび酸などによる）、脂肪の鹸化（アルカリなどによる）、アルキル化、その他高分子との共有結合性相互作用（漂白剤、過酸化物およびアルキル化剤などによる）など複数の作用機序により発生する（17）（31）（32）。ただし、細胞毒性については、一次毒性でない限り、化学品の重度の眼損傷性／眼刺激性の総合的な反応を、組織損傷の基礎にある物理化学的過程に関係なく判定する上で、重要な機能的役割を担っていることが示されている（33）（34）。さらに、基本的に化学品の重度の眼損傷性／眼刺激性は、最初の損傷の程度によって決定され（31）、細胞死の程度（33）、ならびにその後の反応の程度および最終転帰（36）と相関する。したがって、一般的にごく軽度の刺激性物質は表層の角膜上皮にしか影響を及ぼさず、軽度および中等度の刺激性物質は主に角膜上皮および実質表層を、また重度の刺激性物質は角膜上皮、実質深部、場合によっては角膜内皮を損傷する（34）（37）。重度の眼損傷性／眼刺激性に分類する必要のない化学品（UN GHS 区分外）の同定において、被験物質への局所曝露後の RhCE 組織構造物の生存率測定は、重度の眼損傷または眼刺激を誘発する化学品はすべて角膜上皮および／または結膜において細胞毒性を誘発することを前提としている。

[1] 2013 年 6 月の合同会議において、可能な場合、新規および改訂版の試験ガイドラインでは、試験の対象となる物質を表現する「被験物質」という用語について、より一貫した使用を行うべきであることが合意された。

© OECD, (2018)

22. RhCE の組織生存率は、組織の生存細胞によるテトラゾリウム色素（VRM1 および VRM2 では MTT、LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT では WST-8）から有色のホルマザン色素（青色の MTT ホルマザン、または黄色の WST-8 ホルマザン）への酵素変換を基にした古典的手法によって測定される。青色の MTT ホルマザン色素の定量は組織から抽出した後に行うが（18）、黄色の WST-8 ホルマザンは水溶性であるために抽出する必要がなく、WST-8 法の実施中に組織の培養を行う WST-8 溶液から直接定量する（19）。UN GHS により分類および表示する必要のない化学品は、組織生存率が定められた閾値を下回らない化学物質（すなわち、組織生存率が EpiOcular™ EIT および SkinEthic™ HCE EITL[2]では 60%超、SkinEthic™ HCE EITS[3]では 50%超、LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT では 40%超）として同定される（第 45 段落参照）。

習熟度の立証

23. 試験施設は、規制目的で RhCE 法を日常的に使用する前に、表 1 に示す 15 種の習熟度確認物質について正確に予測することにより、技術的習熟度を立証しなければならない。これらの習熟度確認物質は、VRM1 および VRM2 のバリデーション試験で使用した化学物質から選択されている（9）（11）（12）。選択にあたっては、（i）さまざまな物理的状態を網羅している物質、（ii）*in vivo* ウサギ眼試験（OECD の TG 405）（2）の標準試験（16）から得られた信頼性の高い結果および UN GHS の分類体系（すなわち、区分 1、2A、2B、または区分外）（1）に基づいて、*in vivo* での重度の眼損傷性／眼刺激性を全般的に網羅する物質、（iii）*in vivo* において分類を推進するさまざまな要因を網羅する物資（29）（38）、（iv）バリデーション試験で使用した化学的分類を代表する物質（9）（11）（12）、（v）代表的な有機官能基を適切かつ広範に網羅している物質（9）（11）（12）、（vi）化学構造が明確にわかっている物質（9）（11）（12）、（vii）有色の、および／またはテトラゾリウム色素を直接還元する物質、（viii）バリデーション試験中に RhCE 法により再現性のある結果が得られた物質、（ix）バリデーション試験期間中に RhCE 法により正確に予測された物質、（x）信頼性の高い RhCE 法データに基づく *in vitro* 反応を全般的に（生存率 0～100%）網羅している物質、（xi）市販されている物質、（xii）入手および／または廃棄に非常に高額な費用がかからない物質が、できる限り含まれている。表 1 の物質が入手できないか、その他の正当な理由で使用できない状況である場合、VRM のバリデーションに用いられる化学物質等、上記の基準を満たす別の物質を使用してもよい。ただし、そのような逸脱については正当な理由を示すこと。

[2] EITL：液体に SkinEthic™ HCE を用いた場合の EIT

[3] EITS：固体に SkinEthic™ HCE を用いた場合の EIT

© OECD, (2018)

表 1：習熟度確認物質一覧

物質名	CAS RN	有機官能基 [1]	性状	VRM1 の生存率（%）[2]	VRM2 の生存率（%）[3]	LabCyte の生存率（%）[3-1]	VRM の予測	TS 還元剤か	Colour interf.
In Vivo 区分 1[4]									
チオグリコール酸メチル	2365-48-2	カルボン酸エステル、チオアルコール	液体	10.9±6.4	5.5±7.4	1.7±1.2	予測不能	Yes（強い）	No
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	液体	7.5±4.75[5]	1.6±1.0	7.5±4.75	予測不能	No	No
2,5-ジメチル-2,5-ヘキサンジオール	110-03-2	アルコール	固体	2.3±0.2	0.2±0.1	2.8±2.6	予測不能	No	No
シュウ酸ナトリウム	62-76-0	オキソカルボン酸	固体	29.0±1.2	5.3±4.1	3.7±1.5	予測不能	No	No
In Vivo 区分 2A[4]									
2,4,11,13- テトラアザテトラデカン-ジイミドアミド, N,N''- ビス(4-クロロフェニル)- 3,12-ジイミノ-, ジ-D-グルコネート（20%水溶液）[6]	18472-51-0	芳香族複素環ハロゲン化合物、ハロゲン化アリール、ジヒドロキシル基、グアニジン	液体	4.0±1.1	1.3±0.6	0.4±0.4	予測不能	No	Yes（弱い）
安息香酸ナトリウム	532-32-1	アリール、オキソカルボン酸	固体	3.5±2.6	0.6±0.1	2.9±2.6	予測不能	No	No
In Vivo 区分 2B[4]									
ジエチルトルアミド	134-62-3	ベンズアミド	液体	15.6±6.3	2.8±0.9	32.4±9.3	予測不能	No	No
2,2-ジメチル-3-メチレンビシクロ [2.2.1] ヘプタン	79-92-5	第三級炭素を有する分岐アルカン、アルケン、ビシクロヘプタン、架橋環	固体	4.7±1.5	15.8±1.1	2.2±2.6	予測不能	No	No
炭素環、シクロアルカン									
In Vivo 区分外[4]									
1-エチル-3-メチルイミダゾリウムエチルスルファート	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	液体	79.9±6.4	79.4±6.2	48.0±8.9	区分外	No	No
ジカプリリルエーテル	629-82-3	アルコキシ、エーテル	液体	97.8±4.3	95.2±3.0	92.7±5.0	区分外	No	No
ピ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	液体	104.2±4.2	96.5±3.5	95.6±14.0	区分外	No	No
ポリエチレングリコール（PEG-40）硬化ヒマシ油	61788-85-0	アシラール、アルコール、アリール、エーテル	粘性	77.6±5.4	89.1±2.9	62.6±11.5	区分外	No	No
1-(4-クロロフェニル)-3-(3,4-ジクロロフェニル)尿素	101-20-2	芳香族複素環ハロゲン化合物、ハロゲン化アリール、尿素誘導体	固体	106.7±5.3	101.9±6.6	77.8±9.0	区分外	No	No
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)	103597-45-1	第四級炭素を有する分岐アルカン、縮合炭素環式芳香族、縮合飽和複素環、前駆体キノイド化合物、tert-ブチル	固体	102.7±13.4	97.7±5.6	90.2±5.8	区分外	No	No
テトラフルオロホウ酸カリウム	14075-53-7	無機塩	固体	88.6±3.3	92.9±5.1	66.6±0.2	区分外	No	No

略語：CASRN：Chemical Abstracts Service Registry Number（ケミカル・アブストラクト・サービス登録番号）、UN GHS：国連の化学品の分類および表示に関する世界調和システム（1）、VRM1：バリデーション済み標準試験法（EpiOcular™ EIT）、VRM2：バリデーション済み標準試験法（SkinEthic™ HCE EIT）、Colour interf.（色素干渉）：ホルマザン色素の標準吸光度（光学密度［OD］）測定の色による妨害。

[1] OECD ツールボックス 3.1 のネスト解析によって割り当てられた有機官能基（9）。

[2] EURL ECVAM／Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study（EIVS）（化粧品の眼刺激性に関する欧州バリデーション試験）により EpiOcular™ EIT について得られたた結果に基づく（9）。

[3]バリデーション試験により SkinEthic™ HCE EIT について得られた結果に基づく（11）（12）。

© OECD, (2018)

[3-1] バリデーション試験により LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT について得られた結果に基づく（15）。

[4] *in vivo* ウサギ眼試験（OECD TG 405）（2）から得られた結果（15）および UN GHS（1）に基づく。

[5] CEFIC in vitro 眼刺激性試験の試験戦略（CON4EI）に関する共同研究会によって得られた結果に基づく。

[6] 2A または 2B への分類はそれらを区別する UN GHS の基準の解釈に従う。すなわち、7 日目に影響が認められたのが、3 匹中 1 匹か、3 匹中 2 匹かが区分 2A への分類に必要となる。*in vivo* 試験には 3 匹の動物が用いられた。1 匹の角膜混濁を除き、すべての評価項目が 7 日目までにスコア 0 に回復した。7 日目までに完全に回復しなかった 1 匹の角膜混濁のスコアは 1（7 日目）であったが、9 日目には完全に回復した。

24. RhCE 組織構造物の製造者によって指定されている通り、受け取った組織のバリア性について習熟度検証試験の一環として使用者が検証するよう勧告する（第 26 段落、第 28 段落および第 31 段落参照）。これは、組織の輸送が長時間や長距離に及んだ場合に特に重要である。試験方法が確立され、かつ試験方法の使用における習熟度の取得と証明がなされた場合には、このような検証を日常的に行う必要はない。ただし、試験法を日常的に使用する際には、バリア性の評価を定期的に続けることが推奨される。

試験の手順

25. 本試験ガイドラインが現在対象としている試験方法は、科学的に妥当な EpiOcular™ EIT、SkinEthic™ HCE EIT および LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT であり（10）（13）（14）、最初の二法は「バリデーション済み標準試験法」（それぞれ VRM1、VRM2）として参照される。RhCE 法の標準操作手順書（SOP）を利用できるので、施設で RhCE 法を導入し使用する際にこれを用いる（39）（40）（41）。RhCE 法の主な構成要素と手順を本段落以降および補遺 II に示す。

RhCE 法の構成要素

全般的な条件

26. 角膜様上皮組織の三次元再構築には、適切なヒト由来細胞を用いること。角化していない細胞により段階的に層状化されていること。RhCE 組織構造物は、栄養分が細胞に届くよう多孔性の合成膜を間に挟んで作製されている。再構築角膜様上皮には、生存非角化上皮細胞が多層含まれていなければならない。RhCE 組織構造物は、*in vivo* で想定される角膜上皮の曝露と同様に被験物質が直接局所曝露されるように、上皮表面が直接大気に触れていること。RhCE 組織構造物は、Triton X-100 やドデシル硫酸ナトリウム（SDS）などの細胞毒性を有する基準物質の急速な浸透にも耐える、十分な堅牢性を有する機能性バリアを形成していること。規定され

© OECD, (2018)

た一定濃度の基準物質（0.3%（v/v）Triton X-100 を 100 µL など）を適用した場合に組織生存率を 50%低下させるのに必要な曝露時間（ET_{50}）、または一定時間曝露後に（SDS 50 µL にて 30 分間、または SDS 25 µL にて 60 分間処理する等）組織生存率が 50%に低下する基準物質の濃度（IC_{50}）のいずれかを測定することによって、バリア機能の証明をしなければならない。またこれにより、バリア機能の評価も行える（第 31 段落参照）。RhCE 組織構造物の封じ込め特性は、被験物質が生存組織の縁周囲を通過しないようにするものであるが、これが角膜曝露のモデリング不良につながる可能性がある。RhCE 組織構造物の構築に用いるヒト由来細胞は、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、または真菌により汚染されていないこと。組織構造物の無菌性については、真菌や細菌による汚染がないことを供給者によって確認されること。

機能的な条件

生存率

27. 組織生存率の定量化に用いる試験法は、テトラゾリウム染色（VRM1 および VRM2 では MTT、LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT では WST-8）法である（18）（20）。RhCE 組織構造物の生存細胞が生体染色色素 MTT を還元して青色の MTT ホルマザン沈殿物を生成し、これをイソプロパノール（またはこれに類する溶媒）を用いて組織から抽出する。または、RhCE 組織構造物の生存細胞により、生体染色色素 WST-8 が黄色の水溶性ホルマザンに還元される。抽出されたホルマザン色素は、標準吸光度（光学密度［OD］）測定、または HPLC／UPLC 分光光度法のいずれかを用いて定量することができる（42）。ブランク溶液単独（MTT 法の場合は抽出溶媒、WST-8 法の場合は WST-8 培地の希釈液）の OD は十分低く、0.1 未満であること。RhCE 組織構造物の使用者は、用いる RhCE 組織構造物の各バッチが、定められた陰性対照基準を満たしていることを確認しなければならない。VRM 用陰性対照の OD 値の許容範囲を表 2 に示す。HPLC／UPLC 分光光度計の使用者は、陰性対照の許容基準として、表 2 に示した陰性対照の OD 値の範囲を用いること。陰性対照物質で処理した組織は、試験の曝露期間中、培地内で安定であったこと（組織生存率の測定値が同程度であったこと）を試験報告書に記載する。当該組織の製造者は、精度管理のためのバッチ出荷の一環として同様の手順を順守しなければならないが、この場合、表 2 に規定した許容基準とは別の基準を適用してもよい。（QC 試験法の条件下での）陰性対照の OD 値の許容範囲（上限および下限）は、RhCE 組織構造物の開発者や供給者が設定すること。

© OECD, (2018)

表 2：陰性対照の OD 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
EpiOcular™ EIT（OCL-200） – VRM1（液体、固体両者の試験計画書用）	> 0.8[1]	**< 2.5**
SkinEthic™ HCE EIT（HCE/S） – VRM2（液体、固体両者の試験計画書用）	> 1.0	**≤ 2.5**
LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT（液体、固体両者の試験計画書用）	**≥ 0.5**	**≤ 1.6**

[1] この許容下限値については、出荷／保管期間が延長される（4 日超など）可能性を考慮して設定されており、試験法の性能に影響しないことが示されている（43）。

バリア機能

28. RhCE 組織構造物は、例えば ET_{50}（Triton X-100）または IC_{50}（SDS）により推定されるように（表 3）、細胞毒性の指標となる物質の急速な透過に耐える十分な厚さと堅牢性を有するべきである。用いる RhCE 組織構造物の各バッチのバリア機能は、最終使用者へ当該製品が供給された時点で、当該 RhCE 組織構造物の開発者／販売者によって実証されていなければならない（第 31 段落参照）。

形態

29. RhCE 組織構造物のヒト角膜様上皮構造（少なくとも 3 層の生存上皮細胞および非角化表面を含む）を証明するため、組織学的検査を行うこと。当該 3 種の RhCE 法については、開発者／供給者よって適切な形態が確立されていることから、RhCE 法の利用者が用いる組織バッチごとに再度実証する必要はない。

再現性

30. 試験法の陽性対照と陰性対照の結果は、経時的再現性が示されること。

品質管理（QC）

31. RhCE 組織構造物は、使用する RhCE 組織構造物の各バッチが、定められた製造・出荷基準を満たしていることが開発者や供給者によって証明されている場合にのみ使用すること。この製造・出荷基準の中でも問題となるのは、生存率（第 27 段落）およびバリア機能（第 28 段落）である。ET_{50} または IC_{50} によって測定されるバリア機能の許容範囲（上限および下限、第 26 および 28 段落参照）は、RhCE 組織構造物の開発者や供給者が規定すること。試験方法に使用した RhCE 組織構造物の開発者／供給者が QC におけるバッチ出荷基準として用いた ET_{50} および IC_{50} の許容範囲を表 3 に示す。RhCE 組織構造物の開発者／供給者は、すべての製造・出荷基準に適合していることを示すデータを RhCE 法の利用者に提供して、利用者が試験報

© OECD, (2018)

告書に記載できるようにすること。UN GHS に従って眼刺激性または重度の眼損傷性に分類および表示する必要のない化学品の予測を信頼できるものにするためには、これらの製造・出荷基準をすべて満たす組織を用いて得られた結果のみを受け入れること。

表 3：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
EpiOcular™ EIT（OCL-200） – VRM1（0.3%（v/v）Triton X-100 を 100 µL）	ET_{50} = 12.2 分	**ET_{50} = 37.5 分**
SkinEthic™ HCE EIT（HCE/S） – VRM2（SDS50 µL で 30 分間処理)	IC_{50} = 1.0 mg/mL	**IC_{50} = 3.2 mg/mL**
LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT –（SDS25 µL で 60 分間処理)	**IC_{50} = 1.0 mg/mL**	**IC_{50} = 4.0 mg/mL**

被験物質および対照物質の適用

32. 実験は、各被験物質および各対照物質について、2 系列以上の組織で行う。処理方法として、液体の被験物質用と固体の被験物質用の 2 種類を用いる（39）（40）（41）。VRM の二法では、被験物質を適用する前にヒトの眼の湿潤状態を再現するため、組織構造物表面をカルシウムおよびマグネシウム非含有の Dulbecco のリン酸緩衝生理食塩水（Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS）で湿らせること。組織の処理は、被験物質および対照物質への曝露で始まる。VRM 二法の処理方法では必ず、十分な量の被験物質または対照物質を、無限用量とならぬよう注意しつつ、上皮表面を均一に覆うように適用する（第 33 段落および第 34 段落参照）（補遺 II）。

33. RhCE 法 3 種において、37°C 以下で（ポジティブディスプレイスメント式ピペットを必要に応じて用いて）ピペットで滴下できる被験物質は液体として処理し、それ以外は固体として処理する（第 34 段落参照）。RhCE 法では、液体の被験物質は組織表面に均等に広げる（すなわち、最低 60 µL/cm^2 適用）（補遺 II、（39）（40）（41）参照）。組織への投与量を正確にするには、（組織表面の）インサートに少量適用した場合に生じる可能性のある毛細管効果（表面張力効果）をできる限り避けなければならない。液体の被験物質で処理した組織は、各 RhCE 法の標準条件にて 1 分間（LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT）または 30 分間（VRM1 および VRM2）培養する。曝露期間終了後、室温の Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS を用いて十分に洗浄し、液体被験物質および対照物質を組織表面から慎重に除去する。VRM 二法については、この洗浄操作の後、新たな培地を用いて、使用する VRM ごとに予め定められた期間、（組織中に吸収された被験物質をすべて除去するため）室温にて曝露後浸漬を行う。VMR1 および LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT については、テトラゾリウム染色法を行う前に、新鮮培地を用いて標準培養条件にて曝露後培養を実施する（補遺 II 参照）（39）（40）（41）。

© OECD, (2018)

34. 37°C 以下ではピペットで滴下できない被験物質は、RhCE 法 3 種では固体として取り扱う。被験物質の適用量は、組織の表面全体を覆う十分な量、すなわち、最低 33 mg/cm^2 を適用量とする（補遺 II）。固体は、可能な場合は必ず微粉として試験に用いる。固体の被験物質で処理した組織は、標準培養条件にて（用いる RhCE 法に応じて）所定の期間培養する（補遺 II 参照）（39）（40）（41）。曝露期間終了後、室温の Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS を用いて十分に洗浄し、固体被験物質および対照物質を組織表面から慎重に除去する。VRM 二法については、この洗浄操作の後、新たな培地を用いて、使用する VRM ごとに予め定められた期間、（組織中に吸収された被験物質をすべて除去するため）室温にて曝露後浸漬を行い、テトラゾリウム染色法を行う前に、新鮮培地を用いて標準培養条件にて曝露後培養を実施する（補遺 II 参照）（39）（40）（41）（42）。

35. 組織の生存率（陰性対照を用いて測定）および感度（陽性対照を用いて測定）が、背景データを基に規定された許容範囲内にあることを実証するため、試験実施回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、被験物質で処理した組織の相対生存率（%生存率$_{被験物質}$）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。VRM に用いる陽性対照として推奨する物質は、液体、固体いずれの試験についても純酢酸メチル（CAS 登録番号：79-20-9、シグマアルドリッチ社、カタログ番号：45997、液体）である。LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT に用いる陽性対照として推奨する物質は、被験物質が液体の場合はエタノール（CAS 登録番号：64-17-5）、固体の場合はラウリン酸（CAS 登録番号：143-07-7）である。陰性対照として推奨する物質は、被験物質が液体、固体のいずれの場合も、VRM1 では超純水、VRM2 では Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS である。LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT に用いる陰性対照として推奨する物質は、被験物質が液体の場合は Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS（CAS 登録番号：64-17-5）、固体の場合は無処理である。以上の対照物質は VRM のバリデーション試験で使用された対照物質であり、ほとんどの背景データが存在する。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な理由を示すこと。陰性対照および陽性対照については、試験実施回ごとにその対象となる被験物質（すなわち、液体および／または固体）に用いられる試験計画書と同じ手順に従って実験を行うこと。対照物質の適用は、テトラゾリウム染色法の実施に先行して（第 36 段落参照）、液体被験物質と同時に実験を行う対照（第 33 段落参照）、または固体被験物質と同時に実験を行う対照（第 34 段落参照）について記載した通り、処理曝露、洗浄、曝露後浸漬、曝露後培養と必要に応じて進めていくこと（39）（40）（41）。同一実験内で行われる場合、物理的状態が同じである（液体または固体の）全被験物質に対し、1 組の陰性対照と陽性対照で十分である。

組織生存率の測定

36. 本試験ガイドラインにおいて組織生存率の測定に用いる標準定量法は、テトラゾリウム染色法である（18）（19）。テトラゾリウム染色法は、三次元組織構造物に適した定量法である。曝露後の手順を踏んだらすぐに、テトラゾリウム染色法の実施に入る。VRM には MTT 法を用いる。VRM では、RhCE 組織構造物試料を 1 mg/mL MTT 溶液 0.3 mL 中に入れ、標準培養条件にて 180±15 分間反応させる。生

© OECD, (2018)

体染色色素である MTT は、RhCE 組織構造物の生存細胞によって還元され、青色の MTT ホルマザン沈殿物を生成する。次に、この青色の MTT ホルマザン沈殿物を適量のイソプロパノール（またはこれに類する溶媒）を用いて組織から抽出する（39）（40）。被験物質が液体であった場合、組織の上部と底部の両方から抽出し、固体および有色の液体であった場合は、組織の底部からのみ抽出すること（組織上に残留している可能性がある被験物質によってイソプロパノール抽出液が汚染される可能性を最小限に抑えるため）。被験物質が容易には洗い流されない液体であった場合も、組織の抽出は底部からのみでよい。LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT には WST-8 法を用いる。LabCyte CORNEA-MODEL24EIT では、標準操作手順書（41）に従って調製した WST-8 希釈液 0.3 mL 中に RhCE 組織構造物試料を入れ、標準培養条件にて 240 分間反応させると、生体染色色素である WST-8 が、RhCE 組織構造物の生存細胞によって黄色の WST-8 ホルマザンに還元され、WST-8 希釈液中に溶出する（41）。被験物質と同時に実験を行った陰性対照物質および陽性対照物質の処理は、当該被験物質と同様に行うこと。VRM1 および VRM2 において抽出した MTT ホルマザンの定量は、最大± 30 nm のバンドパスフィルターを用いて 570 nm で標準吸光度（OD）を測定するか、HPLC／UPLC 分光光度法を用いて行う（第 43 段落参照）（12）（42）。LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT の WST-8 ホルマザンについては、最大± 30 nm のバンドパスフィルター用いて 450 nm で標準吸光度（OD）を測定するか、HPLC／UPLC 分光光度法を用いることにより直接定量することができる（すなわち、抽出手順を必要としない）（第 43 段落参照）。

37. 被験物質の光学特性やテトラゾリウム色素（VRM1 および VRM2 では MTT、LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT では WST-8）に対する化学作用によってホルマザン色素の測定が妨害され、組織生存率が誤って推定される場合がある。被験物質がテトラゾリウム色素を有色ホルマザン（青色の MTT ホルマザンまたは黄色の WST-8 ホルマザン）に直接還元することにより、または被験物質自体が、もしくは試験中の処理を経た被験物質がホルマザン色素と同じ OD 範囲内（すなわち、MTT ホルマザンで 570 nm 付近、WST-8 ホルマザンで 450 nm 付近）に吸収波長を有する場合は色素干渉により、ホルマザン色素の測定が妨害される可能性がある。試験前にテトラゾリウム色素を直接還元する可能性のある物質および／または色素干渉の可能性がある物質を特定できるよう予め確認するとともに、そのような被験物質による干渉を検出および補正するための対照を追加しなければならない（第 38 段落～第 42 段落参照）。このことは、特定の被験物質が洗浄によって RhCE 組織構造物から完全には除去されない場合、または角膜様上皮を貫通し、テトラゾリウム染色法を実施する段階で RhCE 組織構造物中に被験物質が存在している場合には特に重要である。ホルマザン色素と同じ波長域の光を吸収する被験物質（自然吸収、または処理後）は、干渉力が強い、すなわち、570 ± 30 nm（MTT ホルマザンの場合）または 450 ± 30 nm（WST-8 ホルマザンの場合）での吸光性が高いため、ホルマザン色素の標準吸光度（OD）測定に適合しない。したがって、ホルマザン色素測定法として HPLC／UPLC 分光光度法を用いるとよい（第 42 段落および第 43 段落参照）（11）（40）。着色剤によるテトラゾリウム色素の直接還元能および干渉能を検出・補正する方法については、各 ChCE 法の SOP にて詳細な説明がなされている（39）（40）（41）。また、VRM1、VRM2 および LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT においてテ

© OECD, (2018)

トラゾリウム色素を直接還元する物質および／または色素に干渉する物質の識別および取り扱い方法については、その指針を示す説明図をそれぞれ補遺 III、補遺 IV および補遺 V に示す。

38. ホルマザン色素と同じ波長域の光を吸収する被験物質（自然吸収、または処理後）の干渉作用を判定し、対照を追加する必要性について判断を下すため、被験物質を水および／またはイソプロパノールに加え、室温にて適切な時間静置する（補遺 II 参照）（39）（40）（41）。VRM1 において水および／またはイソプロパノール中の被験物質が 570 ± 20 nm の波長域の光を吸収する場合（補遺 III 参照）、または VRM2（補遺 IV 参照）および LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT（補遺 V 参照）において被験物質と水を混合した溶液が有色であった場合、被験物質がホルマザン色素の標準吸光度（OD）測定に干渉すると推定し、着色した対照を追加するか、HPLC／UPLC 分光光度法を用いる。後者の場合、対照は不要である（第 42 段落および第 43 段落、ならびに補遺 III、補遺 IV および補遺 V 参照）（39）（40）（41）。標準吸光度（OD）測定を行う場合は、干渉する被験物質ごとに 2 系列以上の生存組織を用いて試験の全工程を実施する。ただし、テトラゾリウム色素との培養工程ではテトラゾリウム溶液の代わりに培地を用いて培養し、生細胞組織における非特異的着色（$NSC_{生細胞組織}$）対照とすること（39）（40）（41）。$NSC_{生細胞組織}$対照は、有色の被験物質と同時に試験を実施する必要があり、試験が複数回にわたる場合は、生細胞組織固有の生物学的変動を考慮して、実施回（実験）ごとに独立して $NSC_{生細胞組織}$対照を設ける必要がある。真の組織生存率は、干渉する被験物質に曝露させ、MTT または WST-8 溶液で培養した生細胞組織における組織生存率（$\%生存率_{被験物質}$）から、補正を要する試験と同時併行的に干渉する被験物質に曝露させ、MTT および WST-8 を含有しない培地で培養した生細胞組織における非特異的着色率（$\%NSC_{生細胞組織}$）を差し引いた値、すなわち、真の組織生存率＝［$\%生存率_{被験物質}$］－［$\%NSC_{生細胞組織}$］となる。

39. MTT または WST-8 を直接還元する物質を同定するには、用時調製したテトラゾリウム色素に各被験物質を添加しなければならない。適切な量の被験物質をテトラゾリウム溶液に加え、この混合液を標準培養条件におよそ 3、4 時間静置する（補遺 III、補遺 IV および補遺 V 参照）（39）（40）（41）。被験物質を含むテトラゾリウム混合液（不溶性の被験物質の場合は懸濁液）が青色／紫色（MTT 溶液の場合）、または黄色／橙色（WST 溶液の場合）に変化した場合、当該被験物質はテトラゾリウム色素を直接還元すると推定されることから、標準吸光度（OD）測定または HPLC／UPLC 分光光度法を用いずに、非生存 RhCE 組織構造物の機能についてさらに確認する。この確認試験には、残っている代謝活性だけで、生存組織と同様に被験物質を吸収、保持する死滅組織を使用する。VRM1 の死滅組織の調製は低温曝露により行う（「凍結死」）。VRM2 の死滅組織は、水中に長時間（24 ± 1 時間以上など）静置した後、低温保存して調製する（「水死」）。LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT の死滅組織の調製は、組織を 2 回にわたって－80°C 以下で 30 分間凍結させることにより行う（「凍結死」）。テトラゾリウム色素を還元する被験物質ごとに 2 系列以上の死滅組織を用いて試験の全工程を実施し、非特異的テトラゾリウム色素還元（NSMTT または NSWST）対照とする（39）（40）（41）。NSMTT または NSWST 対照は、独立した試験／実験の実施回数に関係なく、被験物質ごと

© OECD, (2018)

に 1 つで十分である。真の組織生存率は、テトラゾリウム色素還元物質に曝露した生細胞組織における組織生存率（%生存率被験物質）から、同じ還元物質に曝露させ、補正を要する試験と同時併行的に実施した陰性対照との比較により算出した死滅組織における非特異的テトラゾリウム色素還元率（%NSMTT または%NSWST）を差し引いた値、すなわち、真の組織生存率＝［%生存率被験物質］－［%NSMTT または%NSWST］となる。

40. 色素干渉（第 38 段落参照）もテトラゾリウム色素の直接還元（第 39 段落参照）も両方生じることが特定された被験物質についても、標準吸光度（OD）測定を実施する際には、前段落に記載した NSMTT または NSWST 対照、および NSC 生細胞組織対照とは別の 3 番目の対照を設定する必要がある。通常、このような場合に該当するのは、MTT ホルマザンでは 570 ± 30 nm の波長域の光を吸収する暗色の被験物質（青色、紫色、黒色など）、WST-8 ホルマザンでは 450 ± 30 nm の波長域の光を吸収する明色の被験物質（黄色、橙色など）である。その理由は、第 39 段落で述べたように、これらの被験物質の固有色が MTT または WST-8 の直接還元能の評価を妨げるためである。この理由により、初期設定としては NSMTT または NSWST 対照と NSC 生細胞組織対照の同時利用が強いられる。NSMTT または NSWST 対照と NSC 生細胞組織対照の両者を設ける被験物質は、生細胞組織と死滅組織の両方に吸収・保持される可能性がある。したがって、この場合、NSMTT または NSWST 対照は、被験物質によるテトラゾリウム色素を直接還元する可能性に対してだけではなく、死滅組織による被験物質の吸収および保持に起因する色素干渉についても補正されうる。これでは、生細胞組織による被験物質の吸収および保持に起因する色素干渉は、NSC 生細胞組織対照によって既に補正されているため、色素干渉の二重補正につながる可能性がある。色素干渉が二重補正される可能性を回避するため、死滅組織の非特異色に対する第三の対照（NSC 死細胞組織）を設ける必要がある（補遺 III および補遺 IV 参照）（39）（40）（41）。追加したこの対照では、被験物質を 2 系列以上の死滅組織を用いて試験の全工程を実施するが、テトラゾリウム色素との培養工程ではテトラゾリウム溶液の代わりに培地を用いて培養する。NSC 死細胞組織対照は、独立した試験／実験の実施回数に関係なく、被験物質ごとに 1 つで十分であるが、NSMTT または NSWST 対照と同時に、同じ組織バッチで実施すること。真の組織生存率は、被験物質に曝露させた生細胞組織における組織生存率（%生存率被験物質）から%NSMTT または%NSWST と%NSC 生細胞組織を差し引き、干渉する被験物質に曝露させ、テトラゾリウム色素を含有しない培地で培養し、補正を要する試験と同時併行的に実施した陰性対照との比較により算出した死滅組織における非特異的着色率（%NSC 死細胞組織）を加えた値、すなわち、真の組織生存率＝［%生存率被験物質］－［%NSMTT または%NSWST］－［%NSC 生細胞組織］＋［%NSC 死細胞組織］となる。

41. テトラゾリウム色素の非特異的還元および非特異的色素干渉が、分光光度計の線形領域を超えて試料の OD 値（標準吸光度測定を行う場合）を増加させる可能性があること、また、テトラゾリウム色素の非特異的還元が、分光光度計の線形領域を超えて試料のホルマザン色素のピーク面積（HPLC／UPLC 分光光度測定を行う場合）を増加させる可能性があることに注意しなければならない。したがって、RhCE 法を用いる場合、各試験施設は、シグマアルドリッチ社などが市販する（カタログ番号：M2003）MTT ホルマザン（CAS 登録番号：57360-69-7）、または

© OECD, (2018)

Dojindo Molecular Technologies 社が市販する WST-8 ホルマザン（CAS 登録番号：193149-76-7）を用いて、分光光度計の OD／ピーク面積の線形領域を決定することが重要である。

42. 分光光度計を用いた標準吸光度（OD）測定は、ホルマザン色素測定により観測される干渉が強くない場合（すなわち、テトラゾリウム色素の直接還元および／または色素干渉について補正していない被験物質試料の OD 値が分光光度計の線形領域内にある場合）に、テトラゾリウム色素を直接還元する物質および色素に干渉する被験物質の評価に適している。それでもやはり、陰性対照の%NSMTT または%NSWST および／または%NSC 生細胞組織が 60%以上（VRM1、および被験物質が液体の場合の VRM2）、50%以上（被験物質が固体の場合の VRM2）、または 40%以上（LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT）である被験物質の結果については、これらの数値が、分類される化学品と分類されない化学品とを区別するために VRM で用いられる、確立されたカットオフ値であることから、注意して取り扱わなければならない（第 45 段落参照）。ただし、ホルマザン色素測定により観測された干渉が強い場合（すなわち、試験試料の未補正の OD 値が分光光度計の線形領域外にある場合）は、標準吸光度（OD）を測定することはできない。ホルマザン色素の標準吸光度（OD）測定を強く妨げる、有色の被験物質、または水もしくはイソプロパノールとの接触によって着色した被験物質については、HPLC／UPLC 分光光度法を用いて評価することができる（補遺 III、補遺 IV および補遺 V 参照）。その理由は、HPLC／UPLC システムでは、定量前にホルマザン色素が被験物質から分離されるためである（40）。このため、HPLC／UPLC 分光光度法を用いる場合は、試験対象である化学品に関係なく、NSC 生細胞組織または NSC 死細胞組織対照を必要とすることはない。ただし、被験物質がテトラゾリウム色素を直接還元することが疑われる場合には、（第 39 段落に記載された手順に従って）NSMTT または NSWST 対照を用いること。第 39 段落に記載したように、テトラゾリウム色素に対する直接還元能の評価を妨害する色（固有色、または水に入れた場合に現れる色）を有する被験物質についても NSMTT または NSWST 対照を用いること。ホルマザン色素の測定に HPLC／UPLC 分光光度法を用いる場合、組織生存率は、同時陰性対照のホルマザン色素のピーク面積に対する被験物質に曝露した生細胞組織のホルマザン色素のピーク面積の割合として算出する。テトラゾリウム色素に対し直接還元能を有する被験物質の場合は、第 39 段落の最後の文で述べた通り、%生存率被験物質から%NSMTT または%NSWST を差し引いて真の組織生存率を求める。最後に、テトラゾリウム色素を直接還元する物質、またはテトラゾリウム色素を直接還元し、かつ色素干渉も生じる物質において、頻度としてはごく稀ではあるものの、処理後に組織内に保持されてテトラゾリウム色素を強力に還元するため、検体の OD 値（標準吸光度測定の場合）またはピーク面積（UPLC／HPLC 分光光度測定の場合）が分光光度計の線形領域から外れる場合には、RhCE 法で評価できないことに留意しなければならない。

43. HPLC／UPLC 分光光度計は、あらゆる種類の被験物質（有色、無色、テトラゾリウム色素を還元する物質および還元しない物質）のホルマザン色素の測定に利用できる（12）（42）。HPLC／UPLC 分光光度計のシステムは多様であるために、使用者がそれぞれ全く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、HPLC／UPLC 分光光度計を使用する前に、米国食品医薬品局の生物学的分析法のバ

© OECD, (2018)

リデーションに関する業界向けガイダンスの規定に基づき、適格性評価用の標準パラメーター式を用いた場合に許容基準を満たしていることを示すことによって、使用するシステムが試料中のテトラゾリウム色素の定量に適していることを実証しなければならない（42）（44）。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。補遺 VI にて規定した許容基準が満たされれば、その HPLC／UPLC 分光光度計のシステムは適格であり、本試験ガイドラインに記載された試験条件下でホルマザン色素を測定することが可能であるとみなされる。

許容基準

44. 試験実施に際しては毎回、品質管理に適合した RhCE 組織バッチ（第 31 段落参照）を用い、出荷、受け取り手続きおよび試験計画書のすべての手順を経た後の組織の品質を反映する OD 値が、陰性対照物質で処理した組織において得られ、表 2 の従来確立された境界域を外れないこと（第 27 段落参照）。同様に、陽性対照物質、すなわち、酢酸メチル（VRM1 および VRM2）、エタノール（LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT で被験物質が液体の場合）、またはラウリン酸（LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT で被験物質が固体の場合）で処理した組織においても、組織生存率の平均値がそれぞれ陰性対照と比較して、VRM1 では被験物質が液体または固体の場合で 50%未満、VRM2 では 30%以下（被験物質が液体の場合）または 20%以下（被験物質が固体の場合）、LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT では 40%以下であることが示され、各試験方法の条件下で刺激性のある被験物質に組織が反応する能力が反映されていること（39）（40）（41）。被験物質および対照物質の系列間組織における変動が許容範囲内であること（すなわち、2 系列の組織間の生存率の差が 20%未満であるか、3 系列の組織間の標準偏差（SD）が 18%を超えないこと）。試験を実施する際に毎回設けられている陰性対照、陽性対照のいずれかが許容範囲外である場合、当該実施回については 「不適格」 とみなし、再度実施すること。被験物質の系列間組織における変動が許容範囲外である場合、当該試験は 「不適格」 と判断し、当該被験物質については再度試験を実施すること。

結果の解釈と予測モデル

45. 各被験物質について複数系列の試料から得られた OD 値／ピーク面積を用いて、陰性対照を 100%として正規化した組織の平均生存率（各組織系列間の平均値）を算出する。眼刺激性、または重度の眼損傷性に分類する必要のない被験物質（UN GHS の区分外）を特定するための組織生存率のカットオフ値を表 4 に示す。したがって、結果の解釈は以下の通りである。

- 曝露後および曝露後培養後の組織生存率の平均値が、表 4 の確立された組織生存率のカットオフ値を上回る（＞）場合、当該被験物質は、UN GHS における分類および表示する必要のない化学品（区分外）とする。この場合、他の試験法による追加試験は必要としない。
- 曝露後および曝露後培養後の組織生存率の平均値が、表 4 の確立された組織生存率のカットオフ値以下である（≦）場合、この結果単独では予測することができな

© OECD, (2018)

い。この場合、RhCE 法では偽陽性結果が一定数みられ（第 14～16 段落参照）、UN GHS の区分 1 か区分 2 か判断できないことから（第 18 段落参照）、他の試験法を用いてさらに試験を行う必要がある。このように RhCE 法において「予測不能」という結果が得られた場合、分類するためには追加情報が必要となる（指針については（3）を参照のこと）。

表 4：UN GHS の分類に基づく予測モデル

試験法	区分外	予測不能
EpiOcular™ EIT（液体、固体両者）	平均組織生存率 60%超	**平均組織生存率 60%以下**
SkinEthic™ HCE EIT（被験物質が液体の場合）	平均組織生存率 60%超	**平均組織生存率 60%以下**
SkinEthic™ HCE EIT（被験物質が固体の場合）	平均組織生存率 50%超	**平均組織生存率 50%以下**
LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT（液体、固体両者）	**平均組織生存率 40%超**	**平均組織生存率 40%以下**

46. 結果が明確であれば、1 被験物質につき 2 系列以上の組織で構成される単一試験で十分なはずである。ただし、測定値が系列間で一致しない、および／または組織生存率の平均値が 60 ± 5%（VRM1、および／または被験物質が液体の場合の VRM2）、50 ± 5%（被験物質が固体の場合の VRM2）、または 40 ± 5%（LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT）相当であるなど、結果が境界域にある場合は、2 回目の試験を行うこと、さらには最初の 2 回の試験間で結果が一致しなかった場合は 3 回目の試験を行うことも検討する。

47. 基準物質は、未知の被験物質または製品クラスについて重度の眼損傷性／眼刺激性を評価する場合や、一定の陽性反応の範囲内で分類される化学品の眼毒性を相対的に評価する場合に有用であると考えられる。

データおよび報告

データ

48. 試験の実施回ごとに各系列の組織から得られたデータ（被験物質および対照の OD 値／ホルマザン色素のピーク面積および組織生存率の計算データ、ならびに RhCE 法の最終予測など）は、必要に応じて反復試験のデータを含め、被験物質ごとに表形式にて報告すること。さらに、各被験物質および対照ごとに、組織生存率の平均値と、2 系列の組織間の生存率の差（系列が n=2 の場合）または SD 値（系列が n≥3 の場合）を報告すること。テトラゾリウム色素の直接還元および／または

© OECD, (2018)

色素干渉を介してホルマザン色素の測定に被験物質による干渉が認められた場合は、被験物質ごとに報告すること。

試験報告書

49. 試験報告書には、以下の情報を含めること。

被験物質

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的識別情報
  - 物理的状態、揮発性、pH、LogP、分子量、化学的分類、その他、試験の実施に関連する物理化学的性状を可能な範囲で
  - 純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など
  - 該当する場合は、試験の前処理（加温、粉砕など）
  - 保存条件および安定性を可能な範囲で

多成分物質、UVCB 物質および混合物

- 成分の化学的識別情報（上記参照）、純度、定量的組成、ならびに関連のある物理化学的性状（上記参照）などによって可能な限り特徴付けること
- 物理的状態、その他、試験の実施に関連する物理化学的性状を可能な範囲で
- 純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など
- 該当する場合は、試験の前処理（加温、粉砕など）
- 保存条件および安定性を可能な範囲で

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的識別情報
- 物理的状態、揮発性、分子量、化学的分類、その他、試験の実施に関連する物理化学的性状を可能な範囲で
- 純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など
- 該当する場合は、試験の前処理（加温、粉砕など）
- 保存条件および安定性を可能な範囲で
- 陰性対照として補遺 II に掲載されている物質と異なる物質を陰性対照として利用する場合は、その妥当性

© OECD, (2018)

- 陽性対照として補遺 II に掲載されている物質と異なる物質を陽性対照として利用する場合は、その妥当性
- 試験実施ごとの許容基準が適切であることを立証する背景陽性対照および陰性対照データへの言及

試験委託者および試験施設に関する情報

- 試験委託者および試験施設の名称および住所、試験責任者の氏名および住所

用いた RhCE 組織構造物および試験計画書（該当する場合は、選択の理論的根拠を示す）

試験条件

- 用いた RhCE 組織構造物（バッチ番号を含む）
- ホルマザン色素の定量に用いた波長およびバンドパス（妥当な場合）、ならびに測定機器（分光光度計など）の線形領域
- ホルマザン色素の定量方法の説明
- 該当する場合は、使用した HPLC／UPLC 分光光度計のシステムの説明
- 実際に用いた RhCE 組織構造物について、その性能も含む完全な裏付け情報。例として下記のものを含めること。
  i. 生存率の精度管理（供給者）
  ii. 試験条件下での生存率（使用者）
  iii. バリア機能の品質管理
  iv. 入手可能であれば、形態
  v. 再現性および予測能
  vi. 入手可能であれば、使用した RhCE 組織構造物のその他の品質管理（QC）
- 使用した RhCE 組織構造物の背景データへの言及。例として下記のものを含めること。背景のバッチデータに基づく QC データの許容基準
- RhCE 法を日常的に使用する前に、習熟度確認物質を用いた試験により試験施設の習熟度が立証されている旨の陳述

実験および試験の許容基準

- 背景データを基にした陽性対照および陰性対照の平均値、ならびに許容範囲
- 陽性および陰性対照において、系列間の組織で許容可能な変動
- 被験物質の系列間の組織について許容可能な変動

© OECD, (2018)

試験手順：

- 用いた試験手順の詳細
- 用いた被験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培養（該当する場合）の時間と温度
- 試験手順を変更した場合は、その説明
- 被験物質がテトラゾリウム色素の直接還元剤である場合や着色している場合に用いる、対照の指標
- 各被験物質および各対照（陽性対照、陰性対照、NSMTT または NSWST、NSC 生組織細胞および NSC 死細胞組織［必要に応じて］）に対して用いた系列数

結果：

- 各被験物質および各対照物質について、データを試験実施回（該当する場合は再試験を含む）ごとおよび系列ごとに集計した表。OD 値またはホルマザン色素のピーク面積、組織生存率、平均組織生存率、系列間の差または SD、最終予測を含む。
- 被験物質がテトラゾリウム色素の直接還元剤である場合や有色である場合に用いる対照の結果。OD 値またはホルマザン色素のピーク面積、%NSMTT または%NSWST、%NSC 生細胞組織、%NSC 死細胞組織、系列間の差または SD、最終的に補正された組織生存率、最終予測を含む。
- 実験および試験の許容基準の決定に関連して被験物質および対照物質を用いて得られた結果
- 有色の被験物質による組織の着色など、認められたその他の影響の説明

結果の考察

結論

© OECD, (2018)

参考文献

1) UN (2017). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.7, Seventh Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Available at: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/English/ST-SG-AC10-30-Rev7e.pdf].

2) OECD (2012). 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 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.

4) OECD (2013). 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. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

5) OECD (2013). 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 (2012). 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 (2015). 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) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261- 266.

9) 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].

© OECD, (2018)

10) EURL ECVAM Science Advisory Committee. (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC opinion No. 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702].

11) 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.

12) 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.

13) EURL ECVAM Science Advisory Committee. (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No. 2016-02 of 24 June 2016;EUR 28175 EN; doi : 10.2787/390390. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704].

14) Nakahara, S., Kojima, H., Omori, T., Yamashita, A., Endo, M., Satake, M., Nishiura, H., Shinoda, S., Hagiwara, S., Kasahara, T., Tahara, H., Yamamoto, Y., Ikeda, H., Yoshitake, Y., Lee, J. Ik., Han, Y., Lee, S., Sugawara, K., Katoh, M. A catch-up validation study of an in vitro eye irritation test method using reconstructed human corneal epithelial tissue, LabCyte CORNEA-MODEL24. (Manuscript submitted).

15) 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.

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) 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.

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

19) Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto. F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., Watanabe, M., (1999). A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. Anal. Commun. 36, 47–50.

© OECD, (2018)

20) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No. 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

21) 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: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

22) 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.

23) 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.

24) Katoh, M., Uemura, N., Hamajima, F., Ogasawar,a 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.

25) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. Toxicol. In Vitro 27, 619-626.

26) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. Toxicol. In Vitro 27, 1476- 1488.

27) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawar,a T., Hata, K.. (2013). Establishment of a new in vitro test method for evaluation of eye irritancy using a reconstructed human corneal epithelial model, LabCyte CORNEA-MODEL. Toxicol. In Vitro. 27, 2184-2192.

28) 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.

29) 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

© OECD, (2018)

the In Vivo Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of In Vitro Test Methods. Arch. Toxicol. 88, 701-723.

30) 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.

31) 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.

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

33) 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.

34) 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.

35) 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.

36) 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.

37) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. Cutan. Ocul. Toxicol. 25, 41–54.

38) 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.

39) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8. (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: [http://www.ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

40) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: [http://www.ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

41) LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT SOP, Version 2.5.6. (February, 2017). LabCyte CORNEA-MODEL24 eye irritation test operation protocol. Available at: [http://www.jacvam.jp/files/doc/06_11/06_11_E1.pdf].

© OECD, (2018)

42) 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.

43) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. Altern. Lab Anim. 43, 101-127.

© OECD, (2018)

補遺 I

定義

精確さ：試験法の結果と、容認されている参照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」の一側面である。 この用語はしばしば、試験法の正しい結果の割合を意味する「一致率」と同義で用いられることが多い（21）。

基準物質：被験物質との比較のための標準として用いる物質。基準物質として必要な特性は、（i）識別および特徴に一貫性および信頼性のある供給源であること、（ii）構造的、機能的および／または化学的分類、または製品クラスが、試験対象物質に類似していること、（iii）物理化学的特性が既知であること、（iv）既知の作用に関する裏付けデータがあること、（v）望ましい反応の範囲内で作用強度がわかっていることである。

ボトムアップ方式：眼刺激性または重度の眼損傷性として分類および表示する必要のないと思われる被験物質に用いる段階的手法。最初に、分類および表示する必要のない化学品（陰性結果）とそれ以外の化学品（陽性結果）との識別を行う（3）。

化学品：物質または混合物。

一致率：「精確さ」を参照されたい。

角膜：眼球の前面にあって虹彩と瞳孔を覆い、光を眼球内部に通す透明な部分。

CV：変動係数（Coefficient of Variation）の略。

Dev：逸脱（Deviation）の略。

EIT：眼刺激性試験（Eye Irritation Test）の略。

EURL ECVAM：欧州連合の動物実験代替法基準試験所（European Union Laboratory for Alternatives to Animal Testing）の略。

眼刺激性：被験物質を前眼部表面に適用した後に、眼に変化を生じることであり、適用後 21 日以内に完全に回復するもののこと。「眼に対する可逆的影響」および「UN GHS 区分 2」と同義に用いられる（1）。

ET_{50}：規定された一定濃度の基準物質を適用した場合に組織生存率を 50%低下させるのに必要な曝露時間。

偽陰性率：試験法によって陰性と誤判定されたすべての陽性物質の割合。試験法の性能を表す指標の 1 つ。

偽陽性率：試験法によって陽性と誤判定されたすべての陰性物質の割合。試験法の性能を表す指標の 1 つ。

ホルマザン色素（Formazan dye：FD）:MTT および WST-8 を還元する発色剤。

有害性：曝露後に生命体、系、または個体群（副次集団）に有害作用を生じる可能性のある作用因子または状況に本来備わっている性質。

© OECD, (2018)

HCE：SkinEthic™ Human Corneal Epithelium の略。

HPLC：高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography）の略。

IC_{50}：基準物質を一定時間曝露（SDS で 30 分間または 60 分間処理など）後、組織の生存率を 50%低下させる基準物質の濃度。

無限用量：上皮表面を完全かつ均一に覆うのに必要な量を超えて RhCE 組織構造物に適用される被験物質の量。

眼に対する不可逆的影響：「重度の眼損傷性」を参照されたい。

LLOQ：定量下限（Lower Limit of Quantification）の略。

LogP：オクタノール／水分配係数の対数。

混合物：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（1）。

単一成分物質：定量的組成によって定義され、1 つの主成分を少なくとも 80%（w/w）含有する物質。

多成分物質：定量的組成によって定義され、複数の主成分を少なくとも 10%（w/w）以上かつ 80%（w/w）未満の濃度で含有する物質。多成分物質は、製造工程に起因して生じる。混合物と多成分物質の違いは、混合物は 2 つ以上の物質を混ぜることによって化学反応を起こすことなく得られるという点である。多成分物質は、化学反応の結果として生じる。

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（3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide）の略。チアゾリルブルーテトラゾリウムブロミド（CAS 登録番号：298-93-1）。

陰性対照：試験系のすべての要素を含み、その試験系において陽性反応を誘導しないことが分かっている物質を用いて処理する試料。この試料を、被験物質で処理した試料および他の対照試料とともに手順を進め、100%組織生存率の決定に使用する。

分類されない：眼刺激性（UN GHS 区分 2、2A または 2B）にも重度の眼損傷性（UN GHS 区分 1）にも分類されない化学品。「UN GHS 区分外」と同義に用いられる。

NSC 死細胞組織：死滅組織における非特異的着色（Non-Specific Colour in killed tissues）の略。

NSC 生細胞組織：生細胞組織における非特異的着色（Non-Specific Colour in living tissues）の略。

NSMTT：非特異的 MTT 還元（Non-Specific MTT reduction）の略。

NSWST：非特異的 WST-8 還元（Non-Specific WST-8 reduction）の略。

OD：光学密度（Optical Density）の略。

性能基準：科学的妥当性が認められたバリデーション済み試験法を基にした基準。提案された試験法のうち、構造的・機能的に類似したものについて、その同等性を評価する際の根拠となる。性能基準には、（i）試験法に不可欠な要素、（ii）バリデーション済み試験法の性能が許容されることを立証する際に用いられた化学品の中から選抜された、参照物質の最小限のリスト、（iii）提案された試験法を参照物質の最小限のリストを用いて評価する際に示さなければならない、バリデーション済み試験法について得られたものと同等レベルの精確さと信頼度が

© OECD, (2018)

含まれる（21）。

陽性対照：試験系のすべての要素を含み、その試験系において陽性反応を誘導することが分かっている物質を用いて処理する試料。この試料を、被験物質で処理した試料および他の対照試料とともに手順を進める。陽性対照の反応の経時的変動を確実に評価するためには、陽性反応が過度であってはならない。

妥当性：試験とその対象となる作用との関連性、およびその試験が特定の目的にとって意義や有用性があることの是非を説明するもの。その試験が試験対象となる生物学的作用を正確に測定または予測する程度を示す。妥当性では、試験法の精確さ（一致率）も考慮される（19）。

信頼度：同じ試験手順を用いて実施した場合に得られる経時的な施設内および施設間再現性の程度を表す尺度。施設内および施設間再現性、ならびに施設内併行精度を算定することで評価する（21）。

代替試験：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ようにデザインされた試験であり、試験対象になる可能性のあるすべての状況や化学品に関して、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（21）。

再現性：同じ試験手順を用いて同じ被験物質について試験を繰り返し実施した場合に得られた結果が一致していること（「信頼度」 参照）（21）。

眼に対する可逆的影響：「眼刺激性」を参照されたい。

RhCE：再構築ヒト角膜様上皮（Reconstructed human Cornea-like Epithelium）の略。

実験／試験（の）実施回：陰性対照および陽性対照を同時に使って、1 つ以上の被験物質を対象とした試験を行う実施単位のこと。

SD：標準偏差（Standard Deviation）の略。

感度：試験によって正確に分類されるすべての陽性被験物質または活性のある被験物質の割合。断定的な結果をもたらす試験法の精確さを示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮すべき重要な事項である（21）。

重度の眼損傷性：被験物質を前眼部表面に適用した後に、21 日以内に完全には回復しない眼組織の損傷、または重度の物理的視力低下を生じること。「眼に対する不可逆的影響」および「UN GHS 区分 1」と同義に用いられる（1）。

標準操作手順書（SOP）:具体的な日常業務および試験固有の実験業務の実施方法を詳細に記載した正式な手順書。GLP の要件である。

特異度：試験によって正確に分類されるすべての陰性被験物質または不活性な被験物質の割合。断定的な結果をもたらす試験法の精確さを示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮すべき重要な事項である（21）。

物質：自然の状態の、または任意の製造過程において得られる化学元素とその化合物。その製品の安定性を保つために必要な添加物や、製造過程由来の不純物はすべて含まれるが、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される可能性のある溶媒はすべて除く（1）。

試験：該当する SOP に規定されているように、単一被験物質を対象に、2 系列以上の組織で同

© OECD, (2018)

時に実施する試験のこと。

テトラゾリウム色素（TD）：テトラゾリウム塩 MTT および WST-8。

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 を還元する能力として測定するパラメータ。測定する評価項目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／または活性と相関する。

トップダウン方式：重度の眼損傷を引き起こす疑いのある化学品に用いる段階的手法。最初に、重度の眼損傷を誘発する化学品（陽性結果）とそれ以外の化学品（陰性結果）との識別を行う（3）。

被験物質：「被験物質」という用語は、試験の対象物を指す場合に用いられる。

階層的試験戦略：試験方法を順次用いて段階的に実施していく試験戦略。戦略の次の段階に進む前に、証拠の重み付けプロセスを用いて、被験物質に関する既存のすべての情報を各段階で審査し、危険性分類の決定に十分な情報があるかどうかを判断する。特定の段階で既存の情報を基に被験物質の有害性／作用強度を分類することができる場合、それ以上試験を行う必要はない（21）。

ULOQ：定量上限（Upper Limit of Quantification）の略。

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、労働者、輸送者、消費者および緊急時対応者など）および環境を保護することを目的として有害作用に関する情報を伝達するために、物理的危険性、ならびに健康および環境有害性に基づいてその種類および程度を標準化し、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、対応する伝達要素を取り扱うことで化学品（物質および混合物）の分類を提案するシステム（1）。

UN GHS 区分 1：「重度の眼損傷性」を参照されたい。

UN GHS 区分 2：「眼刺激性」を参照されたい。

UN GHS 区分外：UN GHS 区分 1 および区分 2（2A または 2B）の分類要件に該当しない化学品。「分類されない」と同義に用いられる。

UPLC：超高速液体クロマトグラフィー（Ultra-High Performance Liquid Chromatography）の略。

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妥当性および信頼度が十分であるとみなされる、科学的に有効な原理に基づく試験方法。決して、絶対的な意味で試験方法が妥当であるわけではなく、定められた目的に関して妥当であるにすぎない（21）。

バリデーション済みの試験法：バリデーション試験が完了し、特定の目的に対する妥当性（精確さを含む）および信頼度が決定されている試験方法。バリデーション済みの試験法は、提案された目的に対して許容可能であると認められる精確さおよび信頼度の観点からは、性能が不十分である可能性があるということに留意しておかなければならない（21）。

VRM：バリデーション済み標準試験法（Validated Reference Method）の略。

VRM1：EpiOcular™ EIT をバリデーション済み標準試験法 1 とする。

© OECD, (2018)

VRM2：SkinEthic™ HCE EIT をバリデーション済み標準試験法 2 とする。

証拠の重み付け：被験物質の有害性に関する結論およびその裏付けを得る際に、さまざまな断片的情報の強みと弱みを検討するプロセス。

WST：水溶性テトラゾリウム塩。

WST-8：水溶性テトラゾリウム塩-8：［2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム, モノナトリウム塩（CAS 登録番号：193149-74-5）。

© OECD, (2018)

補遺 II

眼刺激性または重度の眼損傷性として分類および表示する必要のない化学品を同定するための RhCE 法の主な構成

試験法の構成要素	EpiOcular™ EIT（VRM 1）		SkinEthic™ HCE EIT（VRM 2）		LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT	
試験計画書	液体（37 ± 1°C 以下で 15 分間ピペット操作が可能）	固体（ピペット操作不可能）	液体および粘性（ピペット操作可能）	固体（ピペット操作不可能）	液体（ピペット操作可能）	固体（ピペット操作不可能）
モデル表面	0.6 cm^2	0.6 cm^2	0.5 cm^2	0.5 cm^2	0.3 cm^2	0.3 cm^2
組織の系列数	2 系列以上	2 系列以上	2 系列以上	2 系列以上	3 系列	3 系列
色素干渉の事前確認	50 µL に水 1 mL を加えて 37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 60 分間（無色の被験物質）、または 50 µL にイソプロパノール 2 mL を加え、室温で 2〜3 時間撹拌（有色の被験物質） →570 ± 20 nm においてイソプロパノールまたは水の OD 値を引いた後の被験物質の OD 値が 0.08（陰性対照の平均 OD 値のおよそ 5%に相当する）を超える場合、生細胞組織の適合対照を設けること。	50 mg に水 1 mL を加えて 37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 60 分間（無色の被験物質）および／または 50 mg にイソプロパノール 2 mL を加え、室温で 2〜3 時間撹拌（有色および無色の被験物質） →570 ± 20 nm においてイソプロパノールまたは水の OD 値を引いた後の被験物質の OD 値が 0.08（陰性対照の平均 OD 値のおよそ 5%に相当する）を超える場合、生細胞組織の適合対照を設けること。	10 µL に水 90 µL を加えて室温（18〜28°C）で 30 ± 2 分間撹拌 →被験物質が着色した場合、生細胞組織の適合対照を設けること。	10 mg に水 90 µL を加えて 室温で 30 ± 2 分間撹拌 →被験物質が着色した場合、生細胞組織の適合対照を設けること。	50 µL に蒸留水 0.5 mL を加え、37 ± 2°C、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 15 分間撹拌 被験物質が着色した場合、生細胞組織の適合対照を設けること。	10 mg に蒸留水 0.5 mL を加え、37 ± 2°C、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 15 分間撹拌 被験物質が着色した場合、生細胞組織の適合対照を設けること。

© OECD, (2018)

試験法の構成要素	EpiOcular™ EIT（VRM 1）		SkinEthic™ HCE EIT（VRM 2）		LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT	
試験計画書	液体	固体	液体	固体	液体	固体
MTT の直接還元能の事前確認	50 µL に 1 mg/mLMTT 溶液を 1 mL 加え、37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 180 ± 15 分間 →溶液が青色／紫色に変わった場合、凍結死滅組織の適合対照を設ける （陰性対照として、滅菌した脱イオン水 50 µL を MTT 溶液に加えたものを用いる）	50 mg に 1 mg/mLMTT 溶液を 1 mL 加え、37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 180 ± 15 分間 →溶液が青色／紫色に変わった場合、凍結死滅組織の適合対照を設ける （陰性対照として、滅菌した脱イオン水 50 µL を MTT 溶液に加えたものを用いる）	30 µL に 1 mg/mLMTT 溶液を 300 µL 加え、37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 180 ± 15 分間 →溶液が青色／紫色に変わった場合、水死させた死滅組織の適合対照を設ける （陰性対照として、滅菌した脱イオン水 30 µL を MTT 溶液に加えたものを用いる）	30 mg に 1 mg/mLMTT 溶液を 300 µL 加え、37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 180 ± 15 分間 →溶液が青色／紫色に変わった場合、水死させた死滅組織の適合対照を設ける （陰性対照として、滅菌した脱イオン水 30 µL を MTT 溶液に加えたものを用いる）	50 µL に WST-8 培地の希釈液 300 µL を加え、37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 240 ± 20 分間 溶液が黄色に変わった場合、凍結死滅組織の適合対照を設ける	10 mg に WST-8 培地の希釈液 300 µL を加え、37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 240 ± 20 分間 溶液が黄色に変わった場合、凍結死滅組織の適合対照を設ける
前処理	Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS 20 µL で遮光下、37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%にて 30 ± 2 分間。	Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS 20 µL で 遮光下、37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%にて 30 ± 2 分間。	-	-	-	-
適用量および適用方法	50 µL（83.3 µL/cm^2）	50 mg（83.3 mg/cm^2）、較正済みの機器を用いること（さじ 1 杯で塩化ナトリウム 50 mg 分など）。	10 µL Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS + 30 ± 2 µL（60 µL/cm^2） 粘性がある場合、ナイロンメッシュを使用	30 µL Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS + 30 ± 2 mg（60 mg/cm^2）	50 µL（167 µL/cm^2）	10 mg（33 mg/cm^2）
曝露時間および温度	培地中で 37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、 相対湿度 95%以上にて 30 分（± 2 分）	培地中で 37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、 相対湿度 95%以上にて 6 時間（± 0.25 時間）	培地中で 37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、 相対湿度 95%以上にて 30 分（± 2 分）	培地中で 37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、 相対湿度 95%以上にて 4 時間（± 0.1 時間）	培地中で 室温にて 1 分（± 5 秒）	培地中で 37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、 相対湿度 95%以上にて 24 時間（± 1 時間）

© OECD, (2018)

室温での洗浄	Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS 100 mL で 3 回	Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS 100 mL で 3 回	Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS 20 mL	Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS 25 mL	Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS で 10 回以上流す	Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS で 10 回以上流す
曝露後浸漬	培地中で室温にて 12 分（± 2 分）	培地中で室温にて 25 分（± 2 分）	培地中で 37°C、5%CO_2 相対湿度 95%にて 30 分（± 2 分）	培地中で室温にて 30 分（± 2 分）	-	-

試験法の構成要素	EpiOcular™ EIT（VRM 1）		SkinEthic™ HCE EIT（VRM 2）		LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT	
試験計画書	液体	固体	液体	固体	液体	固体
曝露後培養	培地中で 37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 120 分（± 15 分）	培地中で 37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 18 時間（± 0.25 時間）	なし	培地中で 37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 18 時間（± 0.5 時間）	培地中で 37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 24 時間（± 1 時間）	なし
陰性対照	H_2O：50 µL 同時試験	H_2O：50 µL 同時試験	Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS：30 ± 2 µL 同時試験	Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS：30 ± 2 µL 同時試験	Ca^{2+}／Mg^{2+}非含有 DPBS：50 µL、同時試験	無処理 同時試験
陽性対照	酢酸メチル：50 µL 同時試験	酢酸メチル：50 µL 同時試験	酢酸メチル：30 ± 2 µL 同時試験	酢酸メチル：30 ± 2 µL 同時試験	エタノール：50 µL、同時試験	ラウリン酸：10 mg 同時試験
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	濃度 1 mg/mL を 300 µL	濃度 1 mg/mL を 300 µL	WST-8 希釈液（10 倍希釈 CCK-8）を 300 µL	WST-8 希釈液（10 倍希釈 CCK-8）を 300 µL
テトラゾリウム塩との反応時間と温度など	37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 180 分（± 15 分）	37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 180 分（± 15 分）	37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 180 分（± 15 分）	37 ± 2ºC、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 180 分（± 15 分）	37 ± 2°C、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 240 分（± 15 分）	37 ± 2°C、5 ± 1%CO_2、相対湿度 95%以上にて 240 分（± 15 分）
抽出溶媒	イソプロパノール 2 mL（組織を穿孔し、インサートの上部および底部から抽出）	イソプロパノール 2 mL（組織を穿孔し、インサートの底部から抽出）	イソプロパノール 1.5 mL（インサートの上部および底部から抽出）	イソプロパノール 1.5 mL（インサートの底部から抽出）	不要	不要

© OECD, (2018)

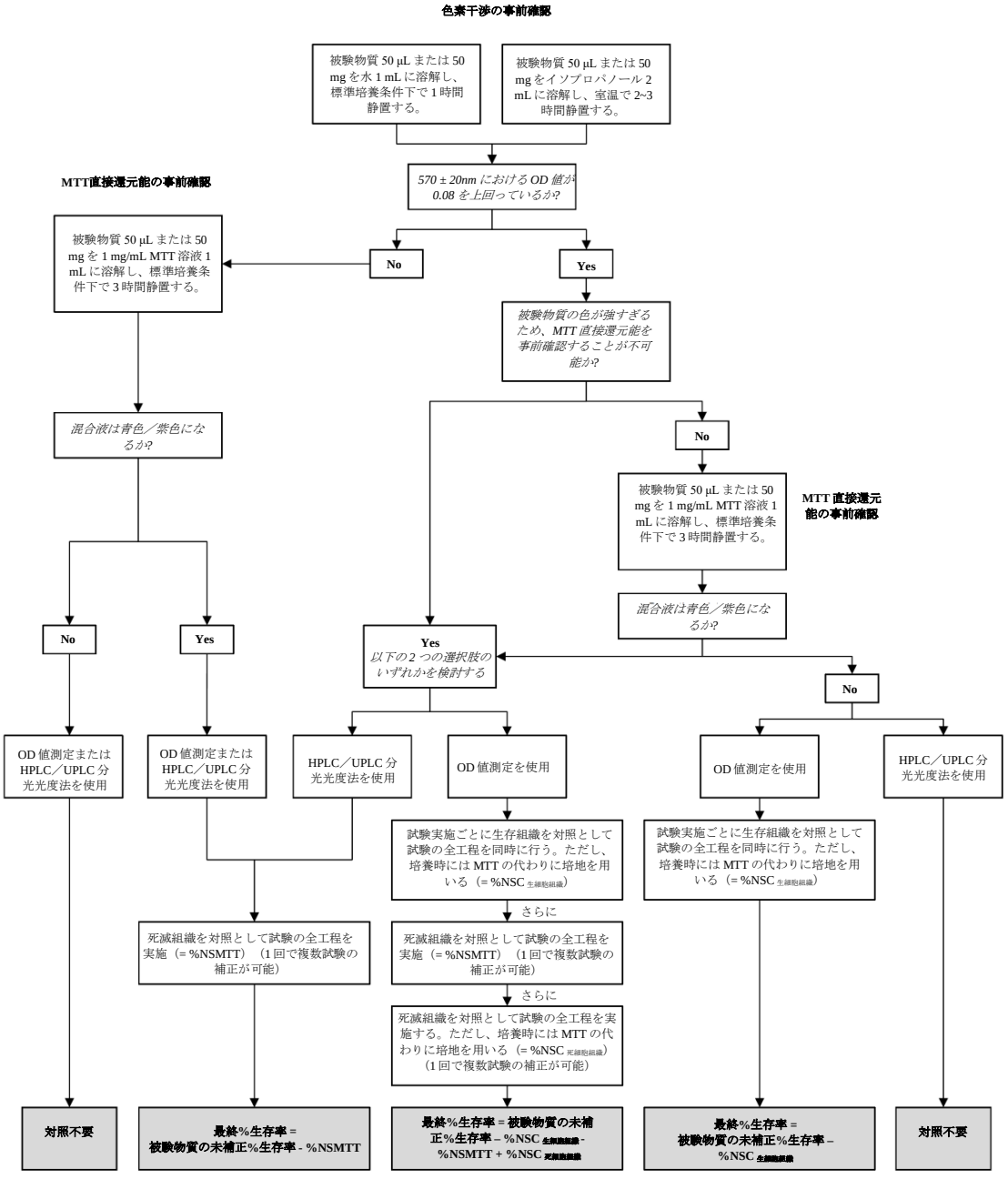
抽出時間および温度	室温で振とう（約 120 rpm）しながら 2～3 時間、または 4～10°C で一晩	室温で振とう（約 120 rpm）しながら 2～3 時間、または 4～10°C で一晩	室温で振とうしながら（約 120 rpm）4 時間、または 4～10°C で少なくとも一晩（振とうなし）	室温で振とうしながら（約 120 rpm）少なくとも 2 時間	不要	不要
OD 値の測定	570 nm（550～590 nm） リファレンスフィルター不使用	570 nm（550～590 nm） リファレンスフィルター不使用	570 nm（540～600 nm） リファレンスフィルター不使用	570 nm（540～600 nm） リファレンスフィルター不使用	リファレンスフィルターを使って 450 nm（650 nm）	リファレンスフィルターを使って 450 nm（650 nm）
組織の品質管理	0.3%（v/v）Triton X-100 100 µL で処理 12. 2 分 ≤ ET_{50} ≤ 37.5 分	0.3%（v/v）Triton X-100 100 µL で処理 12. 2 分 ≤ ET_{50} ≤ 37.5 分	SDS（50 µL）で 30 分間処理 1.0 mg/mL ≤ IC_{50} ≤ 3.5 mg/mL	SDS（50 µL）で 30 分間処理 1.0 mg/mL ≤ IC_{50} ≤ 3.2 mg/mL	SDS（25 µL）で 60 分間処理 1.0 mg/mL ≤ IC_{50} ≤ 4.0 mg/mL	SDS（25 µL）で 60 分間処理 1.0 mg/mL ≤ IC_{50} ≤ 4.0 mg/mL

試験法の構成要素	**EpiOcular™ EIT（VRM 1）**		**SkinEthic™ HCE EIT（VRM 2）**		**LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT**	
試験計画書	液体	固体	液体	固体	液体	固体
許容基準	1. 陰性対照で処理した系列の平均 OD 値が 0.8 超 2.5 未満であること 2. 陽性対照に 30 分間曝露した系列の平均生存率（陰性対照に対する割合［%］で表したもの）が 50%未満であること 3. 2 系列間の生存率の差は 20%未満であること	1. 陰性対照で処理した系列の平均 OD 値が 0.8 超 2.5 未満であること 2. 陽性対照に 6 時間曝露した系列の平均生存率（陰性対照に対する割合［%］で表したもの）が 50%未満であること 3. 2 系列間の生存率の差は 20%未満であること	1. 陰性対照で処理した系列の平均 OD 値が 1.0 超 2.5 以下であること 2. 陽性対照に 30 分間曝露した系列の平均生存率（陰性対照に対する割合［%］で表したもの）が 30%以下であること 3. 2 系列間の生存率の差は 20%未満であること	1. 陰性対照で処理した系列の平均 OD 値が 1.0 超 2.5 以下であること 2. 陽性対照に 4 時間曝露した系列の平均生存率（陰性対照に対する割合［%］で表したもの）が 20%以下であること 3. 2 系列間の生存率の差は 20%未満であること	1. 陰性対照で処理した系列の平均 OD 値が 0.5 以上 1.3 以下であること 2. 陽性対照で処理した系列の平均生存率が 40%以下であること 3. 3 系列間の標準偏差（SD）が 18%を超えないこと	1. 陰性対照で処理した系列の平均 OD 値が 0.5 以上 1.3 以下であること 2. 陽性対照で処理した系列の平均生存率が 40%以下であること 3. 3 系列間の標準偏差（SD）が 18%を超えないこと

© OECD, (2018)

補遺 III

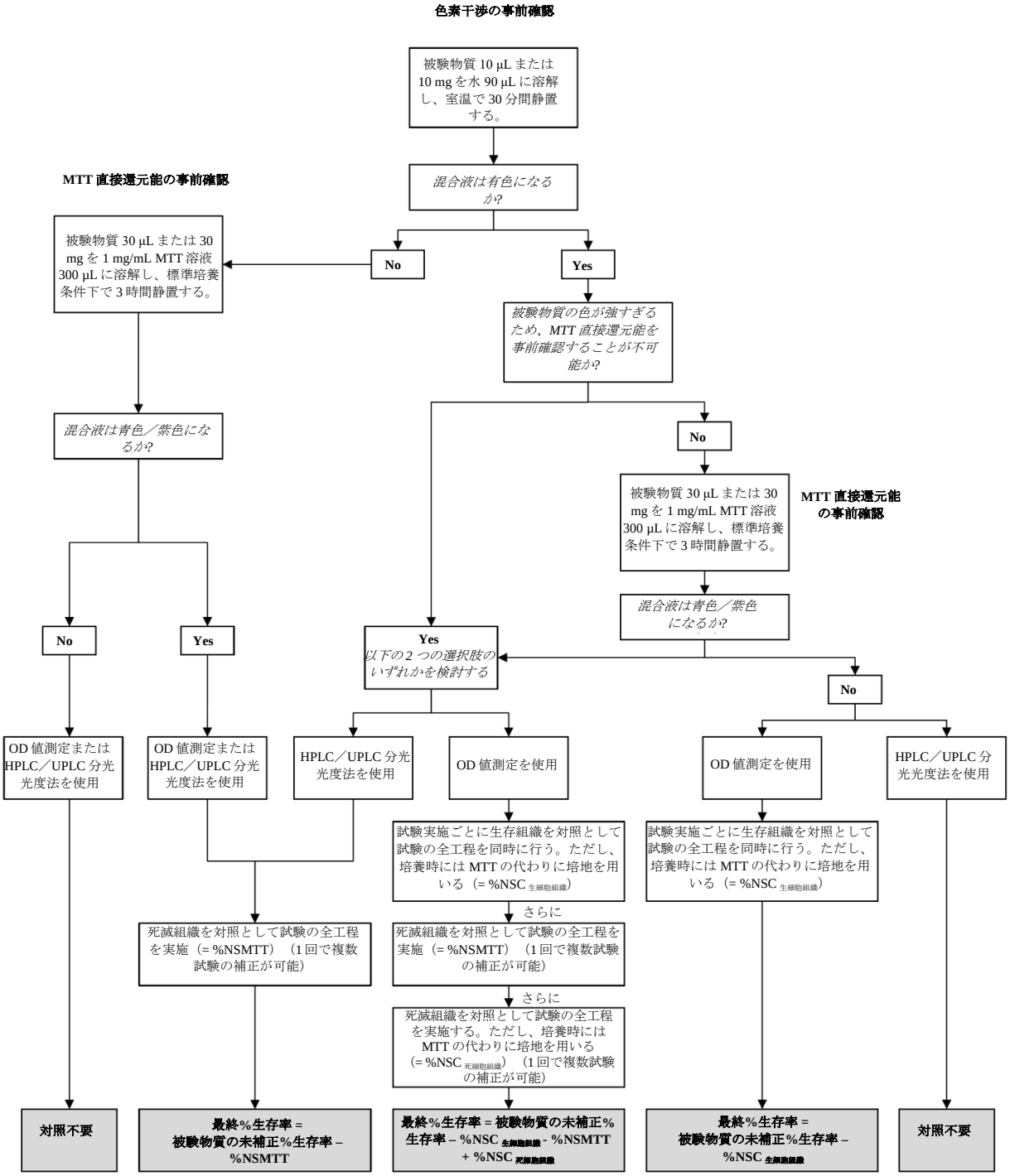
VRM1 の SOP に基づいた MTT を直接還元する物質および／または色素干渉を生じる物質の識別および取り扱い方法の指針に関する説明図



© OECD, (2018)

補遺 IV

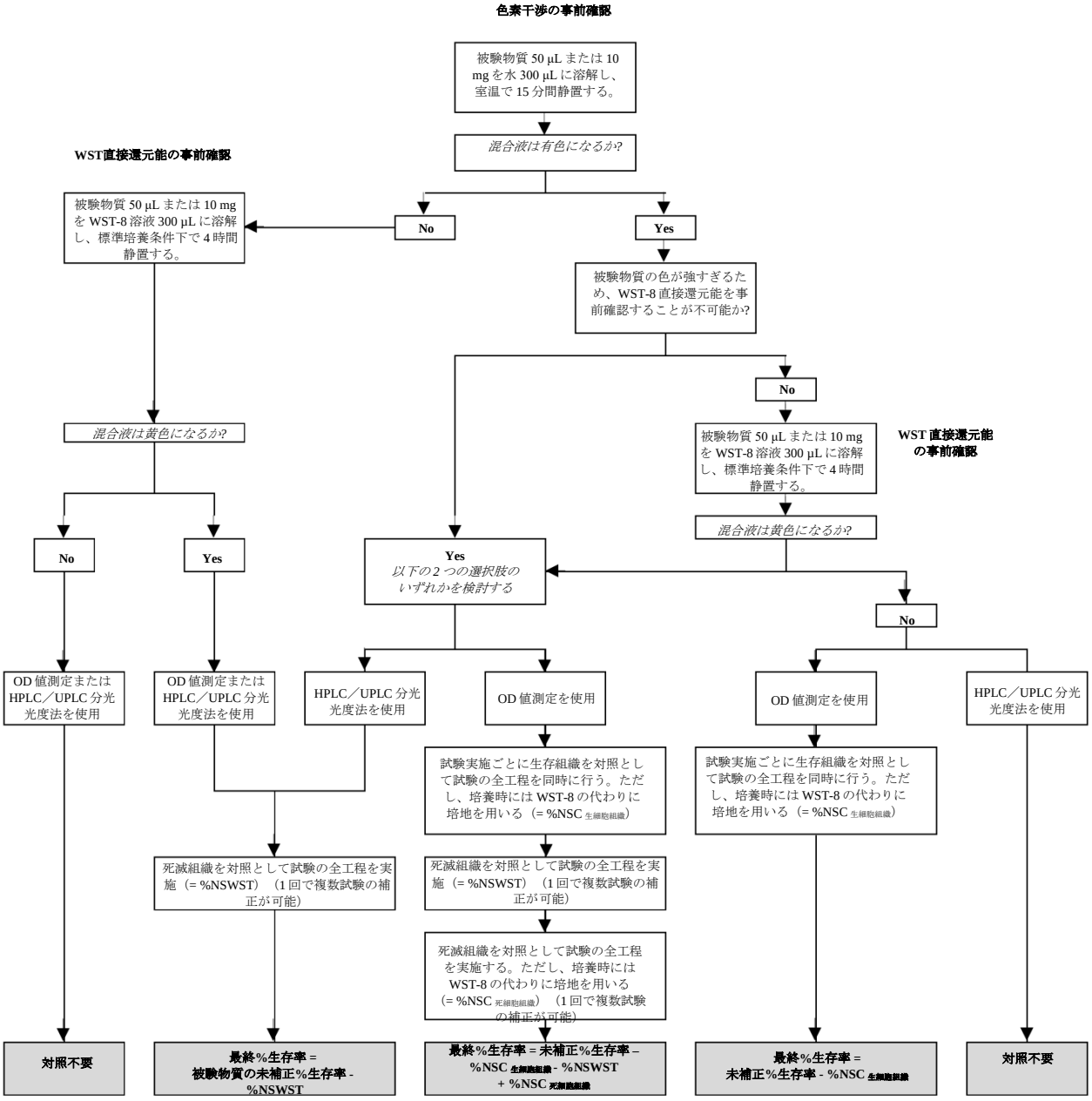
VRM2 の SOP に基づいた MTT を直接還元する物質および／または色素干渉を生じる物質の識別および取り扱い方法の指針に関する説明図



© OECD, (2018)

補遺 V

LABCYTE CORNEA-MODEL24 EIT の SOP に基づいた WST を直接還元する物質および／または色素干渉を生じる物質の識別および取り扱い方法の指針に関する説明図



© OECD, (2018)

補遺 VI

RhCE 組織構造物から抽出された MTT ホルマザンを測定するための HPLC／UPLC 分光光度計システムの適格性評価用の主要パラメータおよび許容基準

パラメータ	FDA の指針に基づく操作（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 組織構造物のイソプロパノール抽出物）、死滅組織ブランク（未処理の死滅 RhCE 組織構造物のイソプロパノール抽出物）および色素（メチレンブルーなど）の分析	面積色素干渉が面積 LLOQ[1] の 20%以下
精度	イソプロパノール（n = 5）を用いた精度管理（すなわち、MTT ホルマザン 1.6 µg/mL、16 µg/mL および 160 µg/mL において）	CV が 15%以下、または LLOQ において 20%以下
精確さ	イソプロパノール（n = 5）を用いた精度管理	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（n = 5）を用いた精度管理	マトリックス効果が 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	面積色素干渉が面積 LLOQ の 20%以下
再現性（日内）	それぞれ独立した検量線 3 本（イソプロパノールを溶媒とした MTT ホルマザン溶液を ULOQ、すなわち 200 µg/mL の濃度から連続して 6 回 3 倍希釈して作成）、イソプロパノール（n = 5）を用いた精度管理	検量線：逸脱率が 15%以下、または LLOQ において 20%以下 精度管理：逸脱率 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（n = 3）を用いた精度管理 2 日目：検量線 1 本およびイソプロパノール（n = 3）を用いた精度管理 3 日目：検量線 1 本およびイソプロパノール（n = 3）を用いた精度管理	
RhCE 組織抽出物中での MTT ホルマザンの短期安定性	生存組織ブランク（n = 3）を用いた精度管理により、調製日および室温にて 24 時間保存後に分析	逸脱率 15%以下
RhCE 組織抽出物中での MTT ホルマザンの長期安定性（必要に応じて）	生存組織ブランク（n = 3）を用いた精度管理により、調製日および-20°C にて数日間保存後に分析	逸脱率 15%以下

[1] LLOQ：定量下限。組織生存率 1～2%が対象となる 0.8 µg/mL と既定。
[2] ULOQ：定量上限。陰性対照のイソプロパノール抽出物中の MTT ホルマザンの予想最高濃度（VRM で約 70 µg/mL）の少なくとも 2 倍である 200 µg/mL と既定。

© OECD, (2018)