OECD/OCDE

2021/06/14

試験ガイドライン No.494

眼刺激性または重篤な眼損傷性の分類を必要としない化学物質を特定するためのVitrigel®-Eye Irritancy Test 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.

Reference:

OECD (2026), Test No. 494: Vitrigel-Eye Irritancy 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://doi.org/10.1787/9f20068a-en.

©OECD (2021)

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

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

採択：
2021 年 6 月 14 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

眼刺激性または重篤な眼損傷性の分類を必要としない化学物質を特定するための Vitrigel®-Eye Irritancy Test 法

はじめに

1. 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)に定義されているとおり、重篤な眼損傷とは、物質または混合物に眼が曝露した後に生じる眼組織損傷発生または重篤な視力低下で、完全な可逆性を示さないものをいう。また、UN GHS によれば、眼刺激とは、物質または混合物に眼が曝露した後に生じる、完全に可逆的な眼の変化の発生を指す。重篤な眼損傷を生じる被験化学物質は UN GHS 区分 1 に分類され、眼刺激を生じる被験化学物質は UN GHS 区分 2（細区分 2A ないし 2B）に分類される。眼刺激性や重篤な眼損傷に関して区分 1 にも区分 2 にも分類されない被験化学物質は、UN GHS 区分外とされる。

2. 重篤な眼損傷および眼刺激性の評価には従来、実験動物が使用されてきた。これについては、1981 年に採択され、何度か改訂されている OECD 試験ガイドライン（TG）405 (2)に記載されている。最も適切な試験法の選択および本試験ガイドラインの使用が、「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）に関する OECD ガイダンス文書(GD) 263」(3)に記載されている。しかし、この方法では、毒性および眼毒性の可逆性を検討していない。したがって、分類目的に使用する一群の検査を選択する際には、GD263 (3)に概説されている既存のデータおよび知識に基づき、被験化学物質の眼毒性について考えられるすべての機序を考慮する必要がある。

3. Vitrigel®-Eye Irritancy Test (EIT)法は、追加の試験を実施せずに、UN GHS (1)が定義した眼刺激性または重篤な眼損傷の分類および表示を必要としない（UN GHS 区分外）被験化学物質を同定することができる *in vitro* 試験法であり(4, 5, 6)、したがって Scott らが示唆したボトムアップ法で実施される(7)。しかし、Vitrigel®-EIT 法は、UN GHS 区分 1 と UN GHS 区分 2 を識別し、区別するためのものではない。これを区別するために、別の試験戦略が必要である(3)。

4. 本試験ガイドラインは Yamaguchi and Takezawa (8)が作成したプロトコルをベースとしている。このプロトコルは、日本動物実験代替法評価センター（JaCVAM）が International Collaboration on Alternative Test Methods（ICATM）と共同で組織したバリデーション運営委員会（Validation Management Team：VMT）によるバリデーション試験を受けている(9)。このバリデーション試験は、参加した 3 つの日本の研究室が実施した。バリデーション報告書は、国際的な専門家で構成される独立したピアレビュー委員

© OECD, (2021)

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。

会によって評価された(10)。さらに、OECD 専門家グループは、Vitrigel®-EIT 法が、眼刺激性または重篤な眼損傷の分類および表示を必要としない被験化学物質（UN GHS 区分外化学物質）を特定するためのボトムアップ法の最初の段階として使用するのに有効であると結論している。

5. 本試験ガイドラインに、Vitrigel ®-EIT 法を用いたヒト角膜上皮（hCE）モデルのバリア機能に対する損傷誘発能に基づく被験化学物質の眼刺激性を評価する手順を記載する。既存の *in vitro* 試験法では、*in vitro* での培養細胞の生存率または *ex vivo* での摘出眼球の角膜混濁が評価項目として利用されてきた。眼を刺激する化学物質は、まず眼の涙液膜と上皮バリア機能を破壊し、次に上皮細胞死を誘発し、最後に間質変性と内皮細胞死を引き起こして角膜混濁を生じることが知られている(11, 12)。したがって、上皮バリア機能の変化は、眼刺激を検出する上で重要な評価項目である(13, 14)。Vitrigel®-EIT 法で、経上皮電気抵抗（Transepithelial Electrical Resistance：TEER）値の時間依存性変化は、被験化学物質に曝露した後の角膜上皮のバリア機能の損傷を示す。この状況は、被験化学物質への曝露後に観察されたウサギ角膜の損傷と類似している。この角膜の損傷が重要な作用機序であり、角膜上皮の損傷や眼刺激をもたらす(4, 13)。

6. 本試験ガイドラインで「被験化学物質（test chemical）」という用語は試験対象の化学物質を指すものとして使用されており、Vitrigel ®-EIT 法を化学物質の試験に適用できるかどうかを示すものではない。「調製被験化学物質（test chemical preparation）」という用語を、被験化学物質と培地の混合物を指すのに用いる（段落 27 を参照）。

7. 定義を補遺 1 に示す。

試験の概要

8. Vitrigel®-EIT 法は、collagen vitrigel® membrane（CVM）チャンバー内に作製した hCE モデルを用いた *in vitro* アッセイである(5)。被験物質の眼刺激性を、3 種類の指標のスコアを用いて TEER 値の時間依存性変化を解析することにより予測する（表 2 の予測モデルを参照）。

9. Vitrigel®-EIT 法では、hCE モデルのバリア機能に対する被験化学物質の破壊作用を、hCE モデルの損傷の程度を評価する指標として用いる。hCE モデルに曝露する前に被験化学物質を培地に溶解または懸濁し、溶解が遅いことによる反応の遅延を防ぐ。過去の試験では、hCE モデルの TEER 値は調製被験化学物質の曝露直後に低下し、3 分以内に一定になった(4)。そのため、hCE モデルの調製被験化学物質への曝露時間を 3 分とした。

最初に考慮すべき事項および限界

10. Vitrigel®-EIT は、ホルマザン色素と同じ範囲の光を吸収する被験化学物質や、テトラゾリウム色素を直接的に還元しうる被験化学物質を試験するのに適用できる（段落 16 参照）。しかし、以下に説明するように、固体でも液体でも酸性（pH 5 以下）を示す調製被験化学物質や、速やかな相分離を示す調製被験化学物質は、試験法の適用範囲外である。0 分時点および 3 分時点における 2.5%重量/容積（w/v）の調製被験化学物質の吸光度の絶対差が 0.1 より大きい場合、この化学物質を試験しないこと。詳細は段落 28 を参照。

©OECD 2021

11. バリデーション試験の結果、3 つの試験室の施設内再現精度はいずれも 80～100%であり、施設間再現精度は 92%であった。バリデーションと、93 種類の化学物質に関する開発業者の社内データ(9, 15, 16, 17)に基づいて、予測能を評価した。Vitrigel ®-EIT 法は、感度 83%（50/60）、特異度 70%（23/33）、正確性 78%（73/93）を示した。この段落の記載からすると、このアッセイは、予測性が思わしくない（特異度が低い）ため、最適の方法ではない。

12. 偽陰性反応を解析したところ、偽陰性化学物質 10 種類のうち 5 種類が酸性であり、曝露に用いた 2.5% w/v 調製物の pH が 5 未満であった。一般に、UN GHS 区分外化学物質に曝露後の hCE モデルの TEER 値は、最初の TEER 値からほとんど変化しなかった。偽陰性を生じた 5 種類の酸性試験化学物質に曝露したところ、これまでに報告されたとおり、hCE モデルの TEER 値が上昇した(18, 19)。また、水に不溶な固体が培地から容易に分離し、偽陰性となる場合がある。*In vivo* Draize 眼刺激性試験では、このような化学物質の曝露条件が、極端でばらつきのあるものとなり、真の刺激性を適正に予測できない可能性があることに留意すべきである(2)。pH 5 以下を示す固体被験化学物質や、試験時間である 3 分間に速やかな相分離を示す固体被験化学物質を除外するための予備試験を実施することにより、Vitrigel®-EIT 法を液体だけでなく固体にも適用することができる（段落 28 を参照）。

13. このような考慮事項に従い、液体 94 種および固体 64 種からなる被験化学物質 158 種を試験した。試験を実施したこの 158 種の化学物質のうち、事前試験に基づき固体 22 種を除外した。7 種が pH≤ 5 を示し（このうち 2 種は速やかな相分離も示した）、15 種が速やかな相分離のみを示した。次に挙げる液体 29 種を除外した。5 種が酸性を示し（うち 2 種は速やかな相分離も示した）、24 種が速やかな相分離のみを示した。ここに挙げた除外を考慮すると、ドメイン内に残っている 107 種の被験化学物質に関するアッセイの感度、特異度および正確性はそれぞれ、96%（51/53）、67%（36/54）および 81%（87/107）である。表 1 に、液体および固体の被験物質を予測する能力を分けて示す。

表 1.予測能

液体	固体
感度：100% (34/34) 特異度：71% (22/31) 正確性：86% (56/65)	感度：89% (17/19) 特異度：61% (14/23) 正確性：74% (31/42)

2 種の偽陰性化学物質が GHS 区分 2B であった（軽度眼刺激物）。

14. 本試験法は偽陽性率が高い。Vitrigel®-EIT 法を用いた偽陽性率は、本試験ガイドラインに関して重要ではない。その理由は、「単独で予測できない」被験化学物質はすべて、OECD GD 263 (3)に基づいて、規制要件に応じて追加の情報や試験を必要とすることによる。UN GHS 以外の分類法に従う試験法を用いる場合、その前にしかるべき規制当局に相談すること。

15. 本試験ガイドラインの限界として、UN GHS (1)の定義による、眼刺激性/眼に対する可逆的作用（UN GHS 区分 2）と重篤な眼損傷/眼に対する不可逆的作用（UN GHS 区分 1）との区別のほか、眼刺激物（任意区分 2A）と軽度眼刺激物（任意区分 2B）との区別ができないことが挙げられる。この目的のために、他の *in vitro* 試験法を用いた追

©OECD 2021

加の試験が必要である(3)。

16. 本試験ガイドラインは、単一成分物質、多成分物質、組成が未知または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質（UVCB）に対して技術的に適用できる。ただし、混合物、気体およびエアロゾルはバリデーション試験による評価が行われていない。混合物、検討困難な化学物質（例えば、不安定な物質や水反応性物質）、または本ガイドラインに記載されている適用領域に含まれることが明確でない被験化学物質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こと。そのような混合物の試験に関する規制要件がある場合、こうした検討は不要である。Vitrigel®-EIT 法を用いて、ホルマザン色素と同じ範囲の光を吸収する被験化学物質や、テトラゾリウム色素 MTT を直接的に還元しうる被験化学物質も試験することができる。

17. 培地中 2.5% w/v 濃度で上記の予備試験の基準（具体的には、3 分間以上にわたって溶解または均一な分散状態を保つ、pH>5 である調製被験化学物質）を満たす被験化学物質を、Vitrigel®-EIT 法で試験することができる。容易に溶解しない試験化学物質は、以下のいずれかの方法のあとに試験するとよい。a）ボルテックスミキサーを用いて機械的に混合する、b）超音波処理する、c）最高 70ºC まで加熱する（手順を参照）。

習熟度の確認

18. 本試験ガイドライン記載の Vitrigel®-EIT 法を定常的に使用する前に、試験実施施設は補遺 2 の表 3 に推奨されている 10 種類の物質を正しく分類することにより、技術的な習熟度を立証する必要がある。ここに挙げた物質は、TG 405 の *in vivo* ウサギ眼試験の結果(2)および UN GHS 分類システム(1)に基づいて、重篤な眼損傷または眼刺激性の反応すべてを代表するものが選択されている。それ以外の選択基準を、そのような物質が市販品であること、高品質の *in vivo* 参照データと Vitrigel®-EIT 法の高品質の *in vitro* データが入手可能であることとした(9, 10)。収載した物質が入手できない場合や正当な理由のために使用できない場合では、適切な *in vivo* および *in vitro* 参照データが入手可能な別の習熟度確認物質を代わりに使用する。

試験手順

19. Vitrigel®-EIT 法の主な内容と作業手順をバリデーション済み標準試験法（VRM）(8)として、以下の段落に記す。Good In Vitro Method Practices (20)に従って試験を実施する必要がある。本プロトコルに整数で示した値は、もうひとつの有効数字まで正確であると考える。したがって、「37ºC」は許容範囲が 36.5ºC～37.4ºC であることを示す。

hCE 培養細胞

20. 不死化 hCE 細胞 [1]を、5%熱不活性化ウシ胎児血清、5 µg/mL 遺伝子組換えヒトイ

[1] HCE-T 細胞 RCB 2280（日本、つくば市、理化学研究所バイオリソース研究センターより入手）。この試験ガイドラインを実施するには、理研 BRC と MTA を結ぶ必要がある。

©OECD 2021

ンスリン、10 ng/mL 遺伝子組換えヒト上皮増殖因子、0.5%ジメチルスルホキシド、100 単位/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル培地と栄養混合物 F-12 の 1:1 の混合液からなる培養培地で維持する。細胞を、空気中 5% CO_2 の加湿雰囲気下 37°C で増殖させる。この細胞に、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌のいずれの混入もあってはならない。ただし、hCE モデルに対する調製被験化学物質の添加は除く。

CVM チャンバーの調製

21. 使用直前に、コラーゲンキセロゲル膜チャンバー（VRM[2]に使用する ad-MED Vitrigel®）を、12 ウェルプレートのウェルに設置し、ウェル内でチャンバーの外側に 1.5 mL、内側に 0.5 mL の培地を注いで浸漬し、キセロゲルが vitrigel®になるまで 10 分間置く。これに代わるチャンバーを使用する場合は、チャンバー内に調製した hCE モデルが適切な TEER 値を示す必要がある。

hCE モデルの製作

培養手順

22. 12 ウェルプレートのウェル内にあるチャンバー外側の培養液を、1.5 mL の新鮮培地と交換する。マイクロピペットを用いてチャンバー内の培地を注意深く取り除き、1.2×10^5 cells/mL の細胞懸濁液 0.5 mL をチャンバー内の CVM に注ぎ、37°C で 2 日間培養する。マイクロピペットを用いて慎重にチャンバー内培地を取り除き、チャンバー外培地を新鮮培地に交換した後、細胞を気液界面でさらに 4 日間培養して hCE モデルを得る。気液界面培養 3 日目にチャンバー外の培地を交換する。

品質チェック

23. hCE モデルは、化学物質曝露後の急速な破壊を予防するため、hCE と同等の十分なロバスト性（頑健性）を有する必要がある。TEER 値を測定することにより、各 hCE モデルのバリア機能を確認する。まず、hCE モデルのチャンバーに新鮮培地 500 µL を注ぎ、培地の温度が 28±2°C になるように調整する。次に、チャンバー外の培地に TEER 測定装置の長い電極（「hCE モデルにおける TEER 値の測定[Measurement of TEER value in a hCE model]」の項を参照）を、チャンバー内の培地には短い電極を入れ、各 hCE モデルの TEER 値（曝露前 TEER 値）を測定する。適正範囲内の TEER 値を示す hCE モデルに限り、同日に実施する化学物質試験に用いてよい。VRM については、TEER 値が 140 Ω·cm^2 ～220 Ω·cm^2 の hCE モデルを試験に許容しうる。

hCE モデルにおける TEER 値の測定

24. hCE モデルの TEER 値は、低電圧交流電流の電気抵抗計を用いて測定する。装置の一般的な仕様は、50～1,000 Hz の交流電流で、少なくとも 0.1～3 kΩ の測定範囲であ

[2] ad-MED Vitrigel®（日本、東京、関東化学株式会社）

©OECD 2021

る。VRM の TEER 測定装置の写真[3]を補遺 3 に示す。代替装置を使用する場合は、同じ結果が得られることを証明する必要がある。電極ユニットの直径は 23 mm、高さは 35 mm である。内部電極をチャンバー内側に、外部電極をチャンバー外側に配置する。内部電極と外部電極の間の距離を固定する。こうする理由は、この距離が電気抵抗値を左右するためである。また、抵抗測定時には、電極がチャンバー内外の培地や緩衝液に浸漬する深さも固定する。CVM チャンバー内に培養した hCE モデルがある電気抵抗値（Rmodel）と、ブランクの CVM チャンバーの電気抵抗値（Rblank）を測定する。hCE モデルの TEER 値を以下の通りに算出する。

$$\text{hCE モデルの TEER 値}(\Omega \cdot cm^2) =$$

$$\{\text{Rmodel}\ (\Omega) - \text{Rblank}\ (\Omega)\} \times \text{有効表面積}\ (cm^2)$$

25. 試験前に TEER 測定装置の感度を確認し、適切な範囲を示す必要がある。これは、導電率の異なる 2 種類以上の溶液の電気抵抗を測定し、導電率の差があらかじめ定めた値に収まることを確認することによって行う。VRM では、TEER 測定装置の測定前チェックを以下の通りに実施する。12 ウェルプレートの 2 つのウェルに CVM なしチャンバー（CVM のない ad-MED Vitrigel®）をセットする。一方のウェルに 3.0 mL の 0.90% NaCl 水溶液を、もう一方のウェルに 0.45% NaCl 水溶液を 25±5°C で充填する。ここで、TEER 測定装置を用いて 2 つのウェルの TEER 値を測定する。TEER 測定値が以下の条件を満たすとき、TEER 測定は正常に機能している。

$$\text{（0.45\% NaCl 水溶液の TEER 値）}$$

$$-\text{（0.90\% NaCl 水溶液の TEER 値）} \geq 60\ \Omega \cdot cm^2$$

対照物質の調製

26. Vitrigel®-EIT 法では、陰性対照として生理食塩水、陽性対照として塩化ベンザルコニウム、参照試料（reference control）として中間の反応を誘発するエタノールを使用している。参照試料を使用して、hCE モデルの品質をチェックする。15 mL チューブに生理食塩水、塩化ベンザルコニウムまたはエタノールを 0.1 g～0.2 g 入れ、しかるべき容積の培地を加えて、培地中 2.5% w/v 濃度の対照物質溶液を調製し、均一に分散するまで攪拌する。また、未知の化学物質の眼刺激性を評価する場合や、刺激反応が特定の範囲内にある化学物質の相対的な眼刺激性を評価する場合には、ベンチマーク物質が有用である。

[3] 例:TEER 測定装置（日本、東京、関東化学株式会社）

©OECD 2021

被験化学物質の調製

27. 培地を用いて2.5% w/vの被験化学溶液または懸濁液を調製する理由は、2.5% w/v調製物の電気抵抗値は、通例、被験化学物質の導電率にかかわらず、培地の電気抵抗値にほとんど影響しないためである。被験化学物質は、溶解するまでまたは最大 1 分間、用手的に培地と混合する。被験化学物質が容易に溶解しない場合、以下の方法のいずれかを使用する。ここに優先順位の順番に記載する。

a) ボルテックスミキサーを用いて最長 1 分間機械的に混合する、

b) 最大 20 分間超音波処理する、または、

c) 最高 70°C まで加熱する。

混合後、ホットプレート、ウォーターバスまたはエアコンを用いて調製被験化学物質の温度を 28±2°C に調整し、被験化学物質の溶解性を目視により確認する。次のステップは、調製被験化学物質が十分に溶解または均一に分散した後にのみ実施する。上記の方法を用いても不溶性または不混和性であることが分かった被験化学物質については、被験化学物質を使用直前に培地中で最高 1 分間ボルテックスを実施して均質な懸濁液とする。

28. 2.5% w/v の各調製被験化学物質の pH を、pH 1～11 をカバーするユニバーサルpH試験紙またはpHメーターを用いて測定する。2.5% w/v調製物のpHが5以下の場合、この化学物質を試験すべきではない。また、調製 0 分後および 3 分後に、UV-VIS 分光光度計を用いて 2.5% w/v 調製被験化学物質の 660 nm における吸光度を測定する。しかし、この波長での被験物質の吸収が測定を妨害する場合は、異なる波長を使用する必要がある。測定した絶対差が 0.1 を超える場合、その化学物質を試験すべきではない。

被験化学物質および対照物質の適用

29. 品質チェックに合格した hCE モデルは、被験化学物質に対する曝露に使用できる。hCE モデルは、CO_2 インキュベータから取り出して 2 時間以内に化学物質曝露実験を行う。チャンバー内の培地を 500 µL の調製被験化学物質と交換し、調製被験化学物質に対する曝露後 3 分間にわたり、10 秒間隔で Rmodel を測定する。どの実験でも、それぞれの対照物質溶液およびそれぞれの調製被験化学物質に対して、少なくとも 3 つの hCE モデルを使用すべきである。1 回の実験結果を用いて被験化学物質の眼刺激性を予測する。

30. 再現性を確保するためには、調製被験化学物質の添加後 2～5 秒の間に測定を開始することが不可欠である。電極周囲の液体は、調製被験化学物質の添加後最大 2 秒間にわたり不安定であることが多いため、測定開始前に少なくとも 2 秒間の待ち時間が必要である。しかし、被験化学物質の存在下で 5 秒以上経過すると hCE モデルの TEER 値が変化するため、調製被験化学物質の添加後 5 秒以内に開始する必要がある。

31. hCE モデルおよび調製被験化学物質の温度は、化学物質曝露試験中 28±2°C を保つ必要がある。これを、ホットプレート、ウォーターバスまたはエアコンを用いて実施してよい。hCE モデルの温度は、hCE モデル外の実際の培地温度を測定することで確認

©OECD 2021

できる。

予測モデル

32. 被験化学物質に曝露後の hCE モデルの TEER 値を、「hCE モデルにおける TEER 値の測定（Measurement of TEER value in a hCE model）」の項に記載した式を用いて算出する。3 試験すべての TEER 平均値を、時間差（time lag） (t1)、低下速度（intensity） (− [P2 − P1] / [t2 − t1])および終点での低下率（plateau level） (100 − P2)からなる 3 つの指標を用いて解析する。補遺 4 に、被験化学物質に対する hCE モデルの曝露後の TEER プロファイルの解析を示すグラフを掲載する。各指標のスコアを算出する。表 2 に示すように、指標のスコアが時間差> 180 秒、低下速度< 0.05%/秒、終点での低下率≤ 5.0%の場合に、被験化学物質を、UN GHS に基づく分類と表示を必要としない（区分外）と特定する。この場合、他の試験方法による追加試験は不要と考えられる。指標のスコアが、時間差 ≤ 180 秒、低下速度≥ 0.05%/秒、終点での低下率> 5.0%の場合、表 2 に示すように、この結果のみでは単独で予測できない。これは、真陽性の場合に、この試験法では UN GHS 区分 1 と区分 2 とを分離できないためである。さらに、Vitrigel®-EIT 法では偽陽性となる割合が高い（段落 14 を参照）。いずれの場合も、GD 263 (3)に準拠した分類目的には、追加の情報や検査が必要となる。

表 2.UN GHS 分類に基づく予測モデル*

基準	予測
時間差 ≤ 180 秒または 低下速度 ≥ 0.05%/秒または終点 での低下率 > 5.0%	単独で予測できない [1]
時間差 > 180 秒および 低下速度 < 0.05%/秒および終点 での低下率 ≤ 5.0%	区分外 [2]

注：

[1] 「単独で予測できない」は、IATA ガイダンス文書（3）による分類目的のため、さらに情報が必要な化学物質に該当する。

[2] 「区分外」は、UN GHS による重篤な眼損傷または眼刺激性に関する分類を必要としないものに該当する。

* 区分を導き出す際には、GD 263 (3)に概説されている既存のデータや知識に基づいて、被験化学物質に考えられる眼毒性の潜在的機序すべてを考慮する必要がある。

許容基準

33. 以下の 4 つの基準をすべて満たす場合、実験を許容可能と判断する。

a) 陰性対照：終点での低下率≤ 5%

b) 陽性対照：終点での低下率 ≥ 40%

c) 参照試料：終点での低下率≥ 10%

d) 各被験化学物質の TEER プロファイル全体の平均標準偏差が 15%以下である。

©OECD 2021

バリデーション試験における陽性対照の過去の結果の範囲が、65%～90%である。

データおよび報告

データ

34. 各 hCE モデルで得た TEER 値、各指標のスコアおよび Vitrigel®-EIT 法による最終予測を報告する必要がある。

試験報告書

35. 試験報告書には、以下の情報を記載すること。

被験化学物質および対照物質

- 単一成分物質：IUPAC 名または CAS 名、CAS 登録番号、SMILES コードまたは InChI コード、構造式を始めとする識別子などの化学物質識別情報
- 多成分物質、UVCB、混合物：入手可能な範囲の成分の化学的特定名（上記参照）、純度、含有量および関連のある物理化学的性質（上記参照）などによるできる限りの成分の特性決定
- 入手可能な範囲で、物理的状態、pH、揮発性、分子量、化学物質分類および試験実施に関わるその他の物理化学的特性
- 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特定名など
- 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温）
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性

試験法の条件および手順

- 試験依頼者、試験実施施設および試験責任者の氏名、名称および所在地
- 用いた試験法の説明
- 用いた試験手順の詳細
- 用いた細胞株、その供給元、試験に用いた細胞の継代数およびコンフルエントの状態
- 試薬の供給業者、カタログ番号およびロット番号
- hCE 細胞の継代日時、トリプシン処理期間、細胞の希釈率
- hCE モデル作成の各ステップの期間
- TEER 測定装置の QC チェックデータ
- 調製被験化学物質の記録（被験化学物質の重量、溶媒容積、混合方法および被験化学物質の溶解性、調製被験化学物質の pH、調製 0 分後および 3 分後の 660 nm における吸光度など）

©OECD 2021

- 曝露試験開始時の hCE モデルおよび調製被験化学物質の温度

- hCE モデルのロット番号
- CO_2 インキュベータから hCE モデルを取り出した時刻と、被験化学物質に hCE モデルを曝露した時刻
- TEER 測定装置による TEER 測定開始時刻
- 用いた被験化学物質の濃度（推奨濃度と異なる場合）
- 被験化学物質に対する曝露期間（推奨期間と異なる場合）
- 実験の数と、実験あたりに用いた hCE モデルの数（推奨と異なる場合）
- 試験手順を変更した場合はその説明。
- 試験法の常用前に、試験施設が試験法に習熟していることを、習熟度確認化学物質の試験によって実証した旨の記述

結果

- 被験化学物質ごとおよび対照物質ごとに、使用した hCE モデルごとの曝露前 TEER 値と、3 分間にまたがる被験化学物質曝露後の経時的 TEER 値、3 つの指標のスコアおよび被験化学物質の *in vitro* 予測値を表に示す。
- 観察された他の効果に関する説明

結果の考察

結論

©OECD 2021

参考文献

1. United Nations UN (2019). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Eighth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 9789210040839. Available at: [https://doi.org/10.18356/f8fbb7cb-en].
2. OECD. (2020). Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
3. OECD (2019). Guidance Document No. 263 on Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation (Second Edition). Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
4. Takezawa T, et al. (2011). Development of a human corneal epithelium model utilizing a collagen vitrigel membrane and the changes of its barrier function induced by exposing eye irritant chemicals. Toxicol in Vitro 25, 1237–1241.
5. Yamaguchi H, et al. (2013). Vitrigel-eye irritancy test method using HCE-T cells. Toxicol Sci 135, 347–355.
6. Yamaguchi H, et al. (2016). Predictive performance of the Vitrigel-eye irritancy test method using 118 chemicals. J Appl Toxicol 36, 1025-1037.
7. Scott L, et al. (2010) A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. Toxicol. In Vitro 24: 1-9.
8. Yamaguchi H and Takezawa T. (2019). Standard Protocol for the Vitrigel-EIT method, Version 1.82e. (May 20 2019). Available at: [https://www.jacvam.jp/files/list/04/04_09_Z7.pdf].
9. Kojima H, et al. (2019). Multi-laboratory Validation Study of the Vitrigel-Eye Irritancy Test Method as an Alternative to In Vivo Eye Irritation Testing. Altern Lab Anim. 47, 140-157.
10. OECD (2019), Report of the Validation Study and Report of the Peer Review of the Validation of the Vitrigel Eye Irritancy Test Method in Test Guideline 494. Series on Testing and Assessment No. 301. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
11. Reim M. (2003). The Ocular Surface: Barrier Function and Mechanisms of Injury and Repair, in Alternative Toxicological Methods (Salem H and Katz SA eds) pp. 89-108, CRC Press, Boca Raton.
12. Movahedan A, et al. (2013). Loss of Notch1 Disrupts the Barrier Repair in the Corneal Epithelium. PLoS One 8, e69113
13. Uematsu M, et al. (2007). Acute corneal epithelial change after instillation of benzalkonium chloride evaluated using a newly developed in vivo corneal transepithelial electric resistance measurement method. Ophthalmic Res. 39, 308–314.
14. Meloni M, et al. (2010). Occludin gene expression as an early in vitro sign for mild eye irritation assessment. Toxicol in Vitro 24, 276–285.

©OECD 2021

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

16. National Institute of Environmental Health Sciences. (2010). Appendix J: NICEATM Analysis: Reduced Eye Hazard Labeling Resulting from Using Globally Harmonized System (GHS) Instead of Current U.S. Regulatory Classification Criteria. ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products, National Institutes of Health Publication No. 10-7553, National Institutes of Health (2010): http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs /ocutox_docs/invitro-2010/appj-analysis.pdf.

17. ICCVAM. (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document. NIH. Available at: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_ docs/STE-SRD-NICEATM508.pdf.

18. Farré R, et al. (2008). Short exposure of oesophageal mucosa to bile acids, both in acidic and weakly acidic conditions, can impair mucosal integrity and provoke dilated intercellular spaces. Gut 57, 1366-1374.

19. Oshima, et al. (2012). Acid modulates the squamous epithelial barrier function by modulating the localization of claudins in the superficial layers. Lab. Invest 92, 2231.

20. OECD (2018), Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP), Series on Testing and Assessment No. 286. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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

22. Takezawa T, et al. (2004). Collagen vitrigel: a novel scaffold that can facilitate a three-dimensional culture for reconstructing organoids. Cell Transplant 13, 463–473.

23. Takezawa T, et al. (2007). Reconstruction of hard connective tissue utilizing a pressed silk sheet and type-I collagen as the scaffold for fibroblasts. Tissue Engineering 13, 1357–1366.

24. Takezawa T, et al. (2007). A protein-permeable scaffold of a collagen vitrigel membrane useful for reconstructing crosstalk models between two different cell types. Cells Tissues Organs 185, 237–241.

25. Takezawa T, et al. (2007). Collagen vitrigel membrane useful for paracrine assays in vitro and drug delivery systems in vivo," Journal of Biotechnology 131, 76–83.

26. Takezawa T, et al. (2008). A novel culture model of rabbit corneal epithelium utilizing a handy scaffold of collagen vitrigel membrane and its cryopreservation," Alternatives to Animal Testing and Experimentation 13, 176.

27. OECD (2021), Performance Standards on Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Series on Testing and Assessment No. 313. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

©OECD 2021

©OECD 2021

補遺 1 - 定義

正確性：試験法による結果が、許容されている参照値にどの程度一致するかを示す近似性の指標。試験法の性能を判断する尺度であり、妥当性の一つである。この用語は、多くの場合、試験法の正確な結果の割合を意味する一致性と同義的に用いられる(21)。

適用領域：ある試験方法を適用可能な化学物質の物理化学的性質やその他の性質の記述(21)。

ボトムアップ法：眼刺激性や重篤な眼損傷に関する分類が不要であると予想される被験化学物質に用いられる段階的な方法で、分類不要な化学物質（陰性の結果）を、それ以外の化学物質（陽性の結果）から判別することから始まる(3)。

化学品：物質または混合物。

Collagen vitrigel membrane (CVM)：高密度コラーゲン原線維でできた膜で、*in vivo* の結合組織をモデル化しており、ピンセットで容易に扱うことができる。また、高度な透明性と透過性を有するタンパク質で分子量が高く、理想的な細胞培養担体となる(22-26)。CVM チャンバーは、市販のコラーゲンキセロゲル膜チャンバーから作成する。

有効表面積：CVM チャンバーの底面積。

眼刺激性：物質または混合物に眼が曝露した後に生じる、完全に可逆的な眼の変化の発生を指す(1)。

偽陰性率：試験法により誤って陰性と同定された、陽性の化学物質すべての割合。試験法の性能を表す指標の 1 つである(21)。

偽陽性率：試験法により誤って陽性と同定された、陰性（活性なし）の化学物質すべての割合。試験法の性能を表す指標の 1 つである(21)。

有害性：健康または生態系に悪影響を及ぼす性質。有害な影響は、十分な曝露量がある場合にのみ現れる(21)。

hCE:ヒト角膜上皮。

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。

MoA (mode of action)：作用機序

単一成分物質：定量的組成に、1 主要成分が 80%（w/w）以上存在することにより定義される物質。

多成分物質：定量的組成に、2 つ以上の主要成分が濃度 10%（w/w）以上 80%（w/w）未満存在することにより定義される物質。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、多成分物質は化学反応の結果得られることにある。

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誘導しないことが分かっている物質を用いて処理した試料。この試料を、被験化学物質で処理した試料やその他の対照試料とともに試験する。これにより、hCE モデルの耐久性をチェックする。

©OECD 2021

性能標準：バリデーション済み試験法に基づいた基準。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。性能標準には、(i)試験法における不可欠な要素、(ii)バリデーション済み試験法において許容される性能を示すのに使用される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す必要があり、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正確性と信頼性が含まれる(21)。

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誘導することが分かっている物質を用いて処理した試料。陽性対照の反応の経時的ばらつきを確実に評価可能にするため、陽性反応の規模を過度にしないこと。

参照試料：試験系のすべての要素を含み、試験系に中等度のクラス反応を誘導することが分かっている物質を用いて処理した試料。この試料を、被験化学物質で処理した試料やその他の対照試料とともに試験する。これにより、hCE モデルの品質をチェックする。

妥当性：試験とそれによって生じる影響との関係と、試験が特定の目的にとって意義や有用性があるかを示す。試験が試験対象となる生物学的影響を正確に測定または予測できる程度を示す。妥当性は、試験法の正確性（一致度）を含む(21)。

信頼性：同じプロトコルを用いて試験法を実施したときに得られる経時的な実験室内および実験室間再現性の程度を表す尺度。実験室内および実験室間再現性ならびに実験室内の繰り返し精度を算出して評価する(21)。

実験：陰性対照、陽性対照および参照試料と同時に検討される 1 つ以上の被験化学物質からなる一組の試験。

感度：すべての陽性物質や活性物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。分類結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する際の重要な検討事項である(21)。

重篤な眼損傷：化学物質または混合物に眼が曝露した後に生じる眼組織損傷発生または重篤な視力低下で、完全な可逆性を示さないもの(1)。

特異度：すべての陰性/不活性物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。分類結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する際の重要な検討事項である(21)。

物質：自然の状態の、または製造過程で得られる化学元素とその化合物のことをいい、その製品の安定性を保つために必要な添加物や、その使用工程から派生する不純物は含まれるが、その物質の安定性に影響を及ぼすことも、その組成を変化させることもなく分離する可能性のある溶媒は除く(1)。

被験化学物質：「被験化学物質」という用語は、試験対象をいう場合に用いる。

段階的試験戦略：被験化学物質に関する既存のすべての情報について、指定された順番で検討する段階的な試験戦略。段階ごとに証拠の重み付けのプロセスを用い、有害性分類の判定に十分な情報が入手可能か判断してから次の段階に進む。既存の情報に基づいて、被験化学物質を刺激性ありと判断できれば、追加試験は

©OECD 2021

不要である。既存の情報に基づいて、被験化学物質の刺激性の有無を判断できない場合、明確な分類が可能になるまで、一連の段階的な動物試験の手順を実施する(21)。

トップダウン方式：重篤な眼損傷を引き起こすことが疑われる被験化学物質に用いられる段階的な方式で、重篤な眼損傷性を引き起こす化学物質（陽性の結果）を、それ以外の化学物質（陰性の結果）と判別することから始まる(3)。

経上皮電気抵抗（TEER）:上皮または上皮細胞層の電気抵抗。これは、角膜上皮のタイトジャンクションの完全性を評価するのに適した手段（指標）と考えられる。

国際連合の化学品の分類および表示に関する世界調和システム（UN GHS）：化学品（物質および化合物）の分類を、物理化学的危険性、健康有害性、環境有害性の、統一された種類や程度に応じて分類することを提案するとともに、人々（雇用者、労働者、輸送担当者、消費者、緊急時対応者など）や環境を保護するために、有害事象に関する情報を伝えられるように、絵表示、注意喚起語、危険有害性情報、注意書き、安全データシートなど、対応する伝達要素を取り扱うシステム(1)。

UN GHS 区分 1：重篤な眼損傷/不可逆性作用(1)。

UN GHS 区分 2：眼刺激性/眼に対する可逆的影響(1)。

UN GHS 区分 2A：眼刺激性(1)。

UN GHS 区分 2B：軽度眼刺激性(1)。

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

UVCB (Substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials)：組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質。

Vitrigel：The ad-MED Vitrigel® コラーゲンキセロゲル膜チャンバーを VRM に使用した。Vitrigelは、従来のハイドロゲルをガラス化した後に再水和することによって生じる安定した状態にあるゲルと定義される(22, 23, 24, 25, 26)。「Vitrigel」は農業・食品産業技術総合研究機構（NARO）の商標で、日本、米国、EU および中国で登録されている。

VRM (Validated Reference Method)：バリデーション済み標準方法

©OECD 2021

補遺 2 - Vitrigel® -EIT 法のための習熟度確認化学物質

本試験ガイドラインを遵守する試験法を定常的に用いる前に、試験実施施設は、表 3 で推奨される 10 種類の化学物質の眼に対する有害性分類を正しく同定することにより、技術的な習熟度を立証する。ここに提示した Vitrigel®-EIT 法の結果は、この方法のバリデーション試験で確認された結果の一部である(9, 10)。選択は、可能な限り、以下の化学物質を含む。

(i) UN GHS 分類システム（区分 1、2A、2B または区分外）に基づいた *in vivo* の重篤な眼損傷/眼刺激反応の全範囲を網羅する

(ii) 参考の *in vivo* ウサギ眼試験（OECD TG 405）で得られた高品質の結果に基づく(2)

(iv) バリデーション試験で使用したものを代表する幅広い化学種および有機官能基をカバーする(10)

(v) 高品質の Vitrigel®-EIT データに基づく *in vitro* 反応の範囲をカバーする

(vi) VRM で正確かつ再現可能な予測を生じる

(vii) 市販されている

(viii) 取得または処分のための価格が法外ではない。

記載した化学物質を入手できない場合や、その他の正当な理由のために使用できない場合は、上記基準を満足する別の化学物質で代替する。これには例えば、Vitrigel®-EIT 法のバリデーションに用いられる化学物質や、性能標準(27)の参照化学物質として記載されている化学物質がある。

表 3.Vitrigel®-EIT 法の技術的習熟度を立証するために推奨される化学物質

1) CASRN および物理化学的性質

	化学名	CASRN	有機官能基	物理的状態	pH
***In vivo* 試験で UN GHS 区分 1**[1]					
1	3-（2-アミノエチルアミノ）プロピルトリメトキシシラン	1760-24-3	ケイ素化合物	液体	10
2	テトラエチレングリコールジアクリラート	17831-71-9	アクリル酸エステル	液体	7
3	サリチル酸ナトリウム	54-21-7	有機塩類	固体	7
***In vivo* 試験で UN GHS 区分 2A**[1]					
4	シクロペンタノール	96-41-3	アルコール類	液体	7
5	シアノ酢酸メチル	105-34-0	エステル類、ニトリル化合物	固体	7
***In vivo* 試験で UN GHS 区分 2B**[1]					
6	エチル-2-メチルアセトアセテート	609-14-3	エステル類	液体	7
7	硝酸アンモニウム	6484-52-2	無機塩類	固体	8
***In vivo* 試験で UN GHS 区分外** [1]					
8	イソオクチルチオグリコール酸	25103-09-7	チオ化合物、エステル	液体	7
9	テトラブロモビスフェノール A	79-94-7	アリール；アリールハロゲン化物フェノール	固体	7
10	4, 4'-スルホニルビスベンズアミド	80-08-0	スルホンジアニリン	固体	7

©OECD 2021

©OECD 2021

2) 試験結果

	化学名	時間差（秒）[2]			低下速度（%/秒）[2]			終点での低下率（%）[2]			予測
		平均値±SD	最小値	最大値	平均値±SD	最小値	最大値	平均値±SD	最小値	最大値	
***In vivo* 試験で UN GHS 区分 1[1]**											
1	3-（2-アミノエチルアミノ）プロピルトリメトキシシラン	0 ± 0	0	0	0.36 ± 0.05	0.33	0.41	64 ± 8	60	73	単独で予測できない
2	テトラエチレングリコールジアクリラート	7 ± 12	0	20	0.23 ± 0.02	0.20	0.24	40 ± 5	35	43	単独で予測できない
3	サリチル酸ナトリウム	0 ± 0	0	0	0.48 ± 0.11	0.35	0.54	41 ± 3	38	43	単独で予測できない
***In vivo* 試験で UN GHS 区分 2A[1]**											
4	シクロペンタノール	0 ± 0	0	0	0.29 ± 0.01	0.28	0.30	52 ± 2	51	55	単独で予測できない
5	シアノ酢酸メチル	10 ± 10	0	20	0.10 ± 0.06	0.06	0.17	18 ± 11	11	30	単独で予測できない
***In vivo* 試験で UN GHS 区分 2B[1]**											
6	2-メチルアセト酢酸エチル	3 ± 6	0	10	0.22 ± 0.03	0.19	0.25	41 ± 6	34	46	単独で予測できない
7	硝酸アンモニウム	0 ± 0	0	0	0.69 ± 0.12	0.58	0.82	29 ± 17	18	49	単独で予測できない
***In vivo* 試験で UN GHS 区分外[1]**											
8	イソオクチルチオグリコール酸	>180	>180	>180	-0.01 ± 0.01	-0.02	0.00	1 ± 1	0	2	区分外
9	テトラブロモビスフェノール A	>180	>180	>180	-0.02 ± 0.01	-0.02	-0.01	0 ± 0	0	0	区分外
10	4, 4'-スルホニルビスベンズアミド	>180	>180	>180	-0.02 ± 0.01	-0.03	-0.01	0 ± 0	0	0	区分外

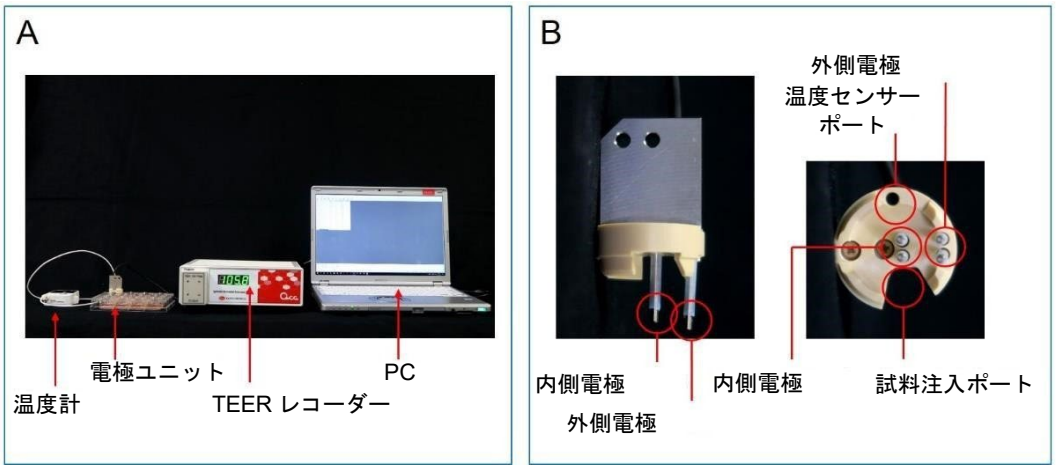
略語：CASRN = CAS 登録番号；UN GHS = 国連「化学品の分類および表示に関する世界調和システム」；VRM = 検証済み標準試験法

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

[2] Vitrigel®-EIT 法バリデーション試験の結果に基づく(9,10)。化学物質番号 5、7、9、10 のデータは、開発業者の社内データの結果に基づいている。3 回の実験データからそれぞれのスコアを算出した。実験ごとに 3 つの hCE モデルを使用した。

©OECD 2021

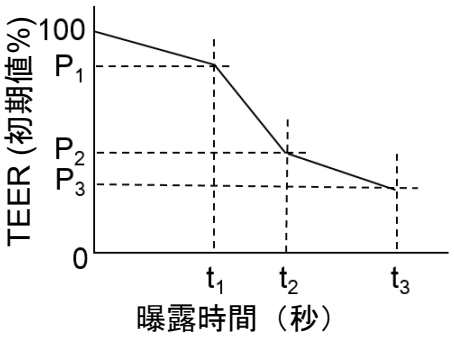
補遺 3 - TEER 測定装置の写真



TEER 測定装置（A）および電極ユニット（B）。

©OECD 2021

補遺 4 - 被験化学物質に対するモデル曝露後の TEER プロファイルの解析を示すグラフ



時間差（秒） = t_1

低下速度 (%/秒)= - (P_2 - P_1) /(t_2 - t_1)

終点での低下率(%)= 100 - P_2

注 :

t1（秒）；dP/dT が 0≥dP/dT> -0.03%/秒である最大の時間。
t2（秒）；dP/dT ≤ −0.03%/秒を満たした後に、0 ≥ dP (P3 − P2)/dT (t3 − t2) > −0.03%/秒を満たした最初の曝露時間。
t3（秒）；t2 + 30 秒。これは、30 秒間のプロファイルによって終点を評価することによる。
P1（%）；0 秒の TEER 値に対する t1 の TEER 値の割合。
P2（%）；0 秒時点の TEER 値に対する t2 時点の TEER 値の割合。
P3（%）；0 秒時点の TEER 値に対する t3 時点の TEER 値の割合。
dP/dT；t に対する P の微分係数。

©OECD 2021