

再構築ヒト角膜様上皮モデルを用いる 新規 *in vitro* 眼刺激性/損傷性試験 (OECD テストガイドライン No. 492B) の紹介

発 表 者：藤島 沙織（化学物質安全部門）

1. 背景及び目的

眼への毒性評価試験（眼刺激性/損傷性試験）は、人が化学物質を眼に適用又は誤って眼に入れた場合に生じる結膜、虹彩及び角膜に対する傷害を予測する試験であり、化粧品業界をはじめとする各業界で用いられている。従来はウサギを用いる試験法により評価されてきたが、動物福祉の観点から、3Rs（Reduction（使用動物数の削減）、Replacement（動物を用いない方法への代替）、Refinement（動物使用に伴う苦痛の軽減））が求められており、動物を使用しない、培養細胞等を用いる各種眼刺激性/損傷性試験が開発され、経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development、OECD）でテストガイドライン（TG）化されている。

しかし、これまでに OECD で TG 化されている動物実験代替法では、化学品の分類及び表示に関する世界調和システム（GHS）に示されている眼刺激性の区分（重篤な損傷性あり（区分 1）、刺激性あり（区分 2）又は重篤な損傷性/刺激性なし（区分に該当しない））のうち、「区分 2」を単独の試験で判定することは不可能であった。そこで、2022 年 6 月に、「区分 2」を単独の試験で判定可能な動物不使用の試験法として、TG No. 492B「再構築ヒト角膜様上皮モデルを用いる Time-To-Toxicity 試験（通称 TTT 法）」¹⁾が新しく採択された。本機構ではその試験メニュー化を行い、GLP 対応での試験実施体制を整えたため、報告する。

2. 試験方法

試験には、フランスの EPISKIN 社から販売されている再構築ヒト角膜様上皮モデル（SkinEthic™ HCE^{*1}）を使用する（図 1）。試験キットとして、上皮モデル及び培養に必要な培地等がセットで販売されており、国内では株式会社ニコダームリサーチから購入可能である。

試験では、キットを受領後、上皮モデルを前培養する。その後、サンプルを上皮表面に添加することでは



図 1 SkinEthic™ HCE
(株式会社ニコダームリサーチ
の HP から引用)

く露する（図 2）。液体及び固体でばく露条件が異なり、液体で 3 条件、固体で 2 条件を設定する（表 2）。ばく露後、リン酸緩衝液を用いて上皮を洗浄する。その後、MTT^{*2} アッセイにより、サンプルをばく露した上皮モデルでの細胞生存率を算出し、判定基準（表 3）に従って、GHS 区分を判定する。

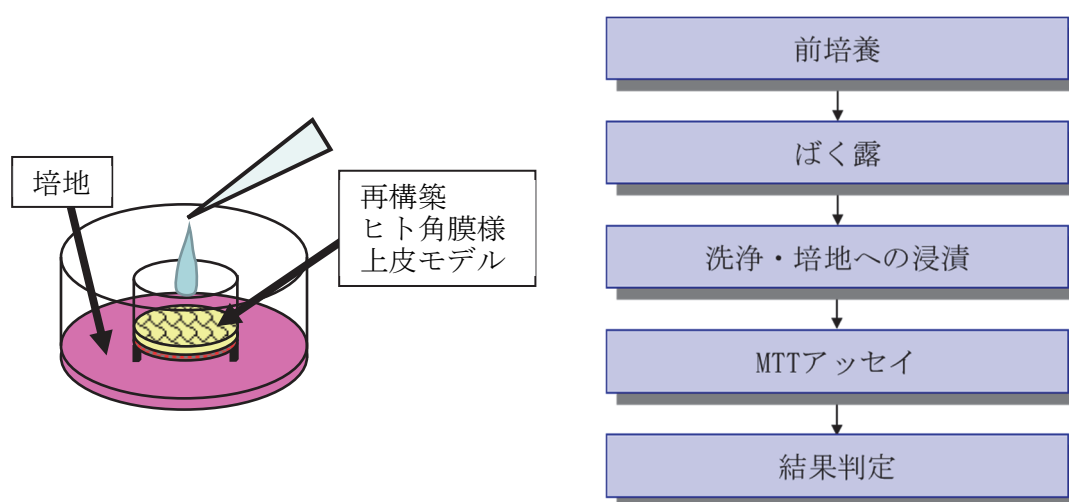


図 2 ばく露概要図及び試験フロー

表 2 各サンプルのばく露条件

性状	ばく露条件	ばく露量
液体	5 分、室温	PBS ^{*3} 10 μ L + サンプル原体 80 μ L
	16 分、室温	PBS 10 μ L + サンプル 20% 水溶液 80 μ L
	120 分、37°C	
固体	30 分、37°C	サンプル原体 80 mg + 蒸留水 80 μ L
	120 分、37°C	

*1: Human Cornea-like Epithelium(ヒト角膜様上皮)

*2: 細胞増殖測定用の還元系発色試薬名

(化学名：3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)

*3: Phosphate buffered saline (Ca²⁺、Mg²⁺を含まないリン酸緩衝生理食塩水)

表 3-1 液体での判定基準

GHS 区分	細胞生存率 (%)		
	5 分ばく露	16 分ばく露	120 分ばく露
区分 1	≤ 50	≤ 50	≤ 50
区分 2	「区分 1」及び「区分に該当しない」に該当しない組合せ		
区分に該当しない	> 50	> 50	> 50

表 3-2 固体での判定基準

GHS 区分	細胞生存率 (%)	
	30 分ばく露	120 分ばく露
区分 1	≤ 40	≤ 60
区分 2	「区分 1」及び「区分に該当しない」に該当しない組合せ	
区分に該当しない	> 40	> 60

3. 試験結果

TG No. 492B に記載されている習熟度確認物質 14 物質について、試験を実施した。その結果、すべての物質の GHS 区分の判定結果が TG の判定結果と一致したことを確認し、技術的習熟度が立証された。習熟度確認物質の試験結果の一例を図 3 に示す。

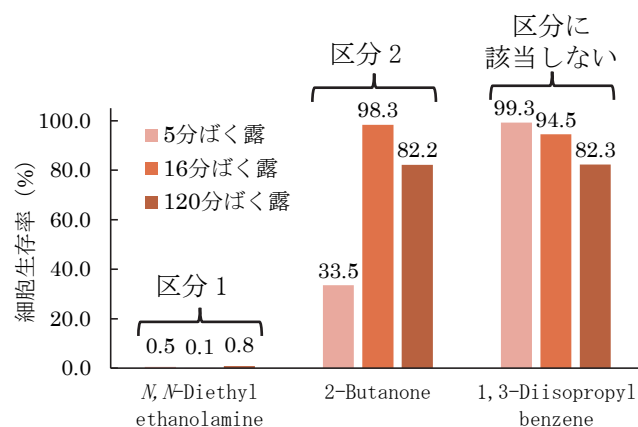


図 3-1 TG No. 492B の習熟度確認物質の試験結果の一例（液体物質）

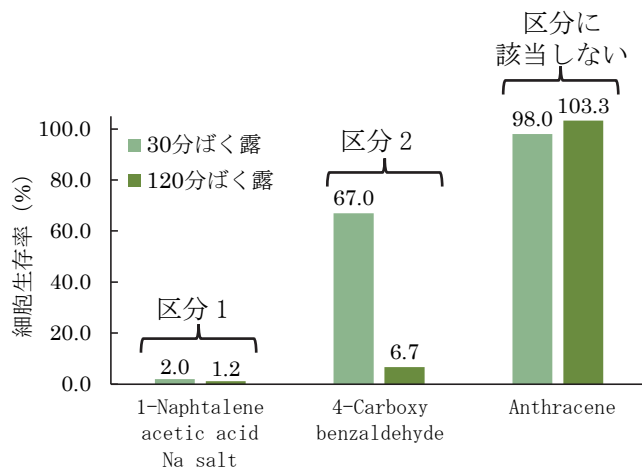


図 3-2 TG No. 492B の習熟度確認物質の試験結果の一例 (固体物質)

4. まとめ

本機構では、*in vitro* 眼刺激性/損傷性試験をはじめとした各種代替法試験について、サンプルの特性、データの用途に合わせた最適な試験法の提案が可能である。さらに、SDS の作成、REACH への申請資料の作成、GHS 分類等の支援業務も行っている。

5. 参考文献

- 1) OECD (2022) Guideline No. 492B “Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RHCE) Test Method for Eye Hazard Identification”