

***in vitro*眼刺激性試験Short Time Exposure法における
高揮発性物質の適用範囲拡大と予測性検証**

**花王株式会社
安保 孝幸**

- **眼刺激性評価における動向と
*in vitro*眼刺激性試験Short Time Exposure (STE) 法**
- **STE法の適用範囲拡大への取り組み**
- **STE法を含めた複数の試験法による眼刺激性GHS区分**
- **STE法の「医薬部外品・化粧品の安全性評価におけるガイダンス」**

眼が傷害を受ける状況とその症状

紫外線

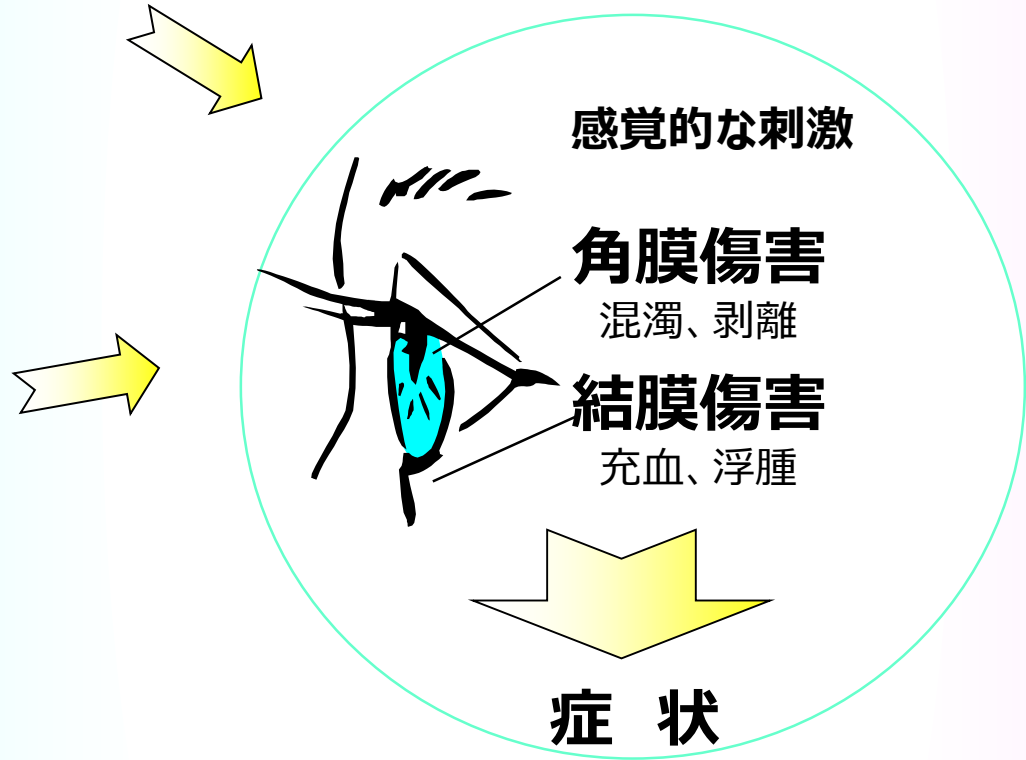
砂、ほこり

眼を強く擦る

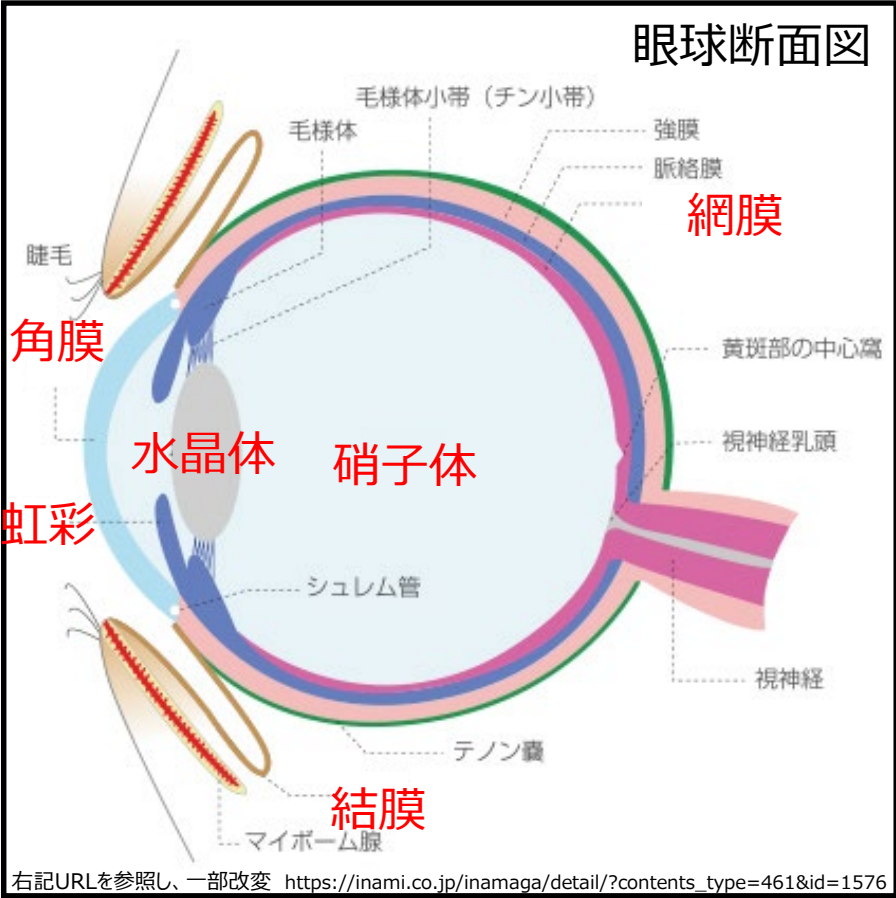
シャンプー

洗剤

薬品



眼の痛み、しみる、涙、眼ヤニ、
かすみ、充血、浮腫、視力低下



弱い眼刺激性：結膜炎症、
角膜表面傷害

強い眼刺激性：深い角膜傷害、
虹彩損傷

ウサギを用いた眼刺激性試験法（Draize試験）

異物が眼に入ったときの傷害性をウサギを用いて評価

Draize試験

(OECD TG 405)

方法

1. 被験物質を点眼する

2. 経時的に眼の状態を観察する

(1、3、6、24、48、72、96、168hrs~21days)

- ・角膜（混濁度、面積）× 5
- ・虹彩（炎症）× 5
- ・結膜（充血、浮腫、分泌物）× 2

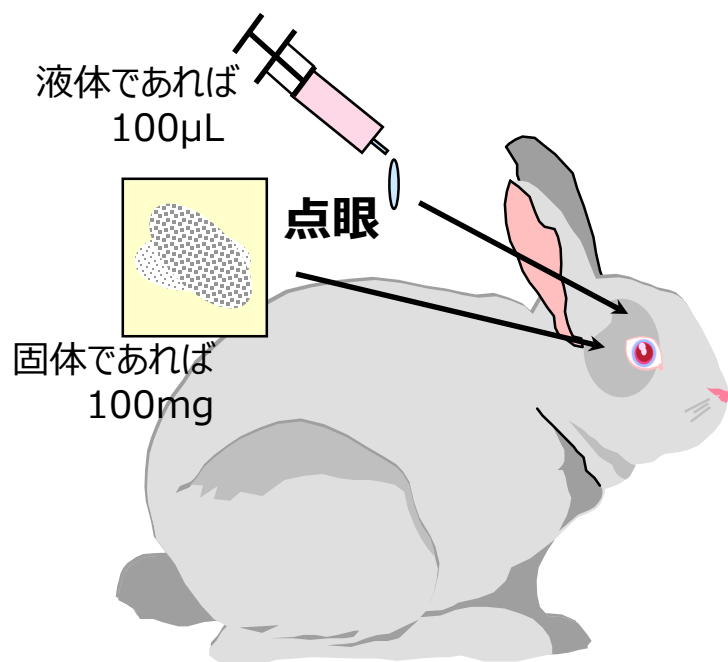
- ① 角膜混濁（80点）
 - a. 程度（最大4点）：角膜実質（コラーゲン）の変性度
⇒コラーゲン自身の変性
⇒コラーゲンの膨潤（上皮・内皮の障害度に依存）
 - b. 面積（最大4点）：角膜実質（コラーゲン）の変性度のもう一つの尺度
- ② 虹彩（10点）
 - a. 経角膜透過の結果生ずる虹彩損傷性（最大2点）：組織破壊と対光反射
- ③ 結膜（20点）
 - a. 発赤（最大3点）：炎症性の血管拡張
 - b. 浮腫（最大4点）：炎症性の浮腫
 - c. 分泌物（最大3点）：涙液の分泌過剰及び炎症性の細胞浸潤反応

3. 反応評点からMAS*を算出

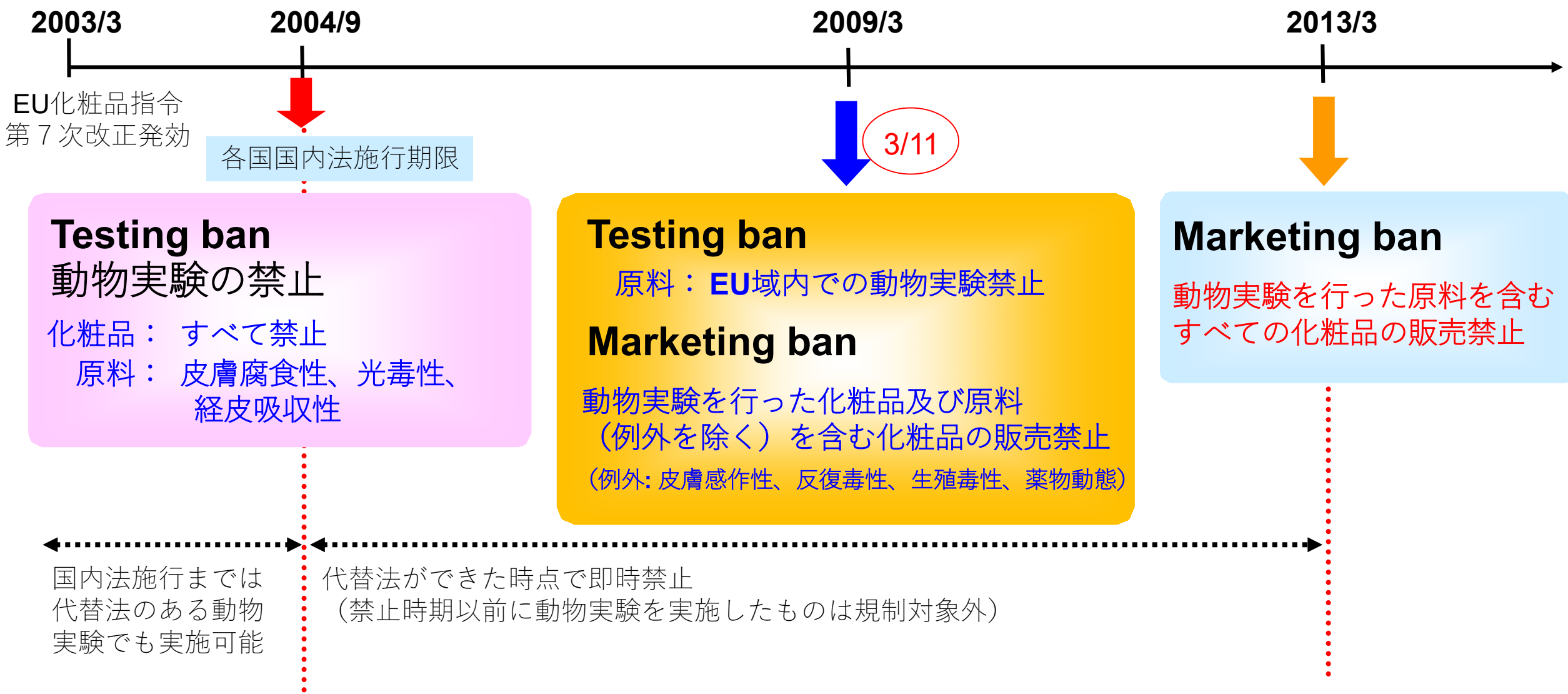
角膜混濁「程度×面積×5」+虹彩「虹彩損傷×5」+結膜「（発赤+浮腫+分泌物）×2」

Draizeスコアの最大値：110（角膜部80、虹彩部10、結膜部20）

*MAS：Maximum Average Score、最大平均評点




EU化粧品指令と代替法開発における歴史



2013年3月以降欧州だけでなく、日本においても自主的に動物実験禁止とする企業増加

眼刺激性試験代替法開発時の課題と技術要件

従来のウサギを用いた眼刺激性試験 (Draize試験)の代替法：

試験種	単層培養細胞  FL、STE	3次元角膜モデル(RhCE)  細胞の重層化モデル EpiOcular™, SkinEthic™ HCE Labcyte CORNEA-MODEL	摘出角膜・眼球  BCOP, ICE	漿尿膜  HET-CAM, CAMVA
長所	<ul style="list-style-type: none"> ・ 簡便 ・ 細胞株を使用 →入手性高い 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 溶解性、物性問わず 評価可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 組織による 評価可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 溶解性、物性問わず 評価可能 ・ 欧州で高受入性
短所	<ul style="list-style-type: none"> ・ 難水溶性物質の 評価困難 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 高偽陽性率 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 高偽陽性率 ・ 組織入手に地域差 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 有精卵使用の課題 (動物かどうか議論多数)

FL; Fluorescein leakage, STE; Short Time Exposure, RhCE; Reconstructed human Cornea-like Epithelium, HCE; Human Corneal Epithelium, BCOP; Bovine Corneal Opacity and Permeability, ICE; Isolated Chicken Eye, HET-CAM; Hen's Egg Test ChorioAllantoic Membrane, CAMVA; ChorioAllantoic Membrane Vascular Assay (Eskes et al., 2005, Scott et al., 2010)

開発時の課題

- ・ 高偽陽性率の試験が多く、非刺激性区分に課題
- ・ 倫理的な課題、組織入手に地域差
- ・ 単層培養細胞試験は難水溶性物質評価困難



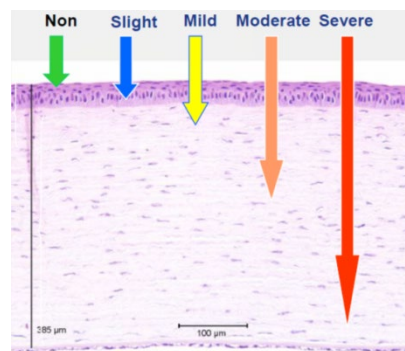
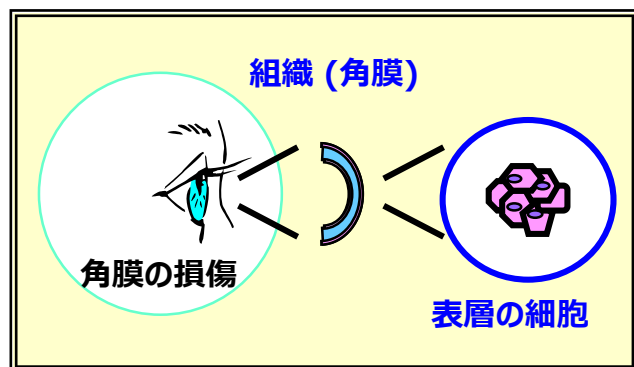
技術要件

- ・ 非刺激性を精度良く区分可能
- ・ 簡便
- ・ 難水溶性物質の評価可能

技術要件を満たす試験法が必要

Short Time Exposure (STE) 法開発における着眼点

● 眼刺激性（特に非刺激性）を精度良く評価



◆ 実際の曝露条件

50 μL点眼液の排出時間（80%排出）
ヒト：1～2分、ウサギ：3～4分
(Mikkelson et al., 1973)

⇒**眼表面からの除去される時間 = 5分以内**

◆ 眼刺激性は

- **最初に最表面の上皮細胞に接触**
- 刺激の有無は表面細胞の損傷
(損傷強度は深さに比例)

(Maurer et al., 2002)

眼刺激性評価には短時間曝露時の細胞損傷の評価が重要

● 簡便な方法、難水溶性物質の評価

→ 他の代替法より簡便な単層培養細胞の試験を選択

→ 従来の単層培養細胞の試験は難水溶性物質の評価に課題

- 培地中は分離など油分等の浮遊により細胞へ接触しない

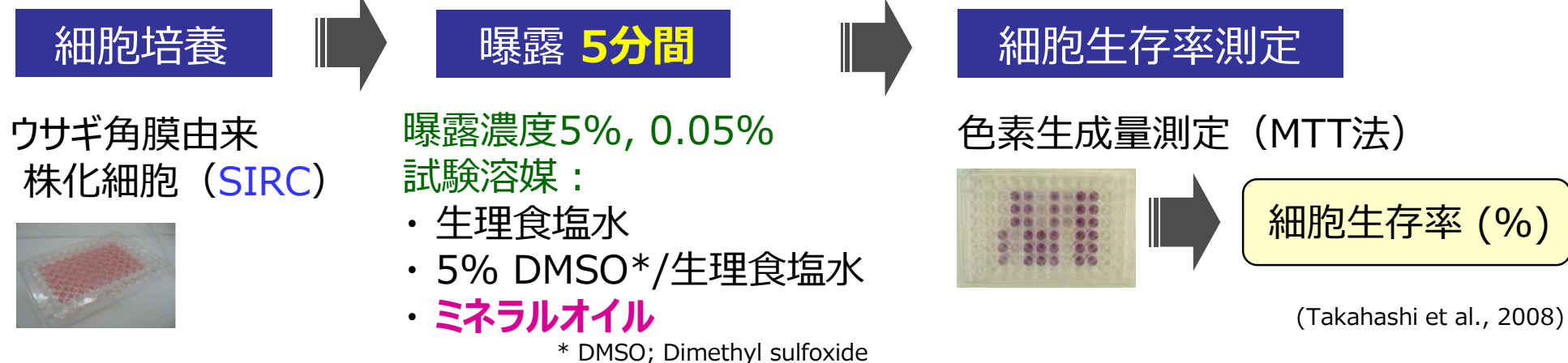
- 油性物質を溶媒として使用 ⇒ 細胞毒性を生じるため使用不可

→ **短時間曝露 ⇒ 油性物質を溶媒として使用可**

Short Time Exposure (STE) 法を開発

STE法の概要

【試験方法】



【予測モデル】

■ カテゴリー分類 (非刺激性/刺激性)

試験濃度5%の細胞生存率 (viability)を元に判定

	viability (Cut-off value)
非刺激性 (Non-irritant)	> 70 %
刺激性 (Irritant)	≤ 70 %

■ ランク分類 (強度3区分)

試験濃度5%及び0.05%の細胞生存率 (viability)から下記に従いスコア化

5%	score	0.05%	score
viability > 70	0	viability > 70	1
viability ≤ 70	1	viability ≤ 70	2

5% score + 0.05% score = **STE rank**

眼刺激性ランク

- 1 : Minimal irritant
- 2 : Moderate irritant
- 3 : Severe irritant

OECDテストガイドライン承認までの道

2001-

試験法開発

プロトコル最適化、データセット構築、論文化、SOP作成

(Takahashi et al., Toxicol. In Vitro, 2008)

2008-
2010

共同研究、バリデーション

- 2施設共同研究 (Takahashi et al., J. Toxicol. Sci., 2009)
- 3施設共同研究 (Takahashi et al., Cutan. Ocul. Toxicol., 2010)
- 5施設での1st validation study (Sakaguchi et al., Toxicol. In Vitro, 2011) by JSAAE
- 3施設での2nd validation study (Kojima et al., Toxicol. In Vitro, 2013) by JaCVAM

2010-

国際的なPeer review (ICCVAM)

- 希釈物および混合物も含めた評価も実施
- STE Summary Review Document 作成 (2013.6)

JSAAE: the Japanese Society for
Alternatives to Animal Experiments

JaCVAM: the Japanese Center for
the Validation of Alternative Methods

2013-

OECD テストガイドライン化に向けた取り組み

- Draft Test Guidelineの作成
- 世界各国からの膨大なコメント、修正への対応
- 専門家会議、電話会議での説明

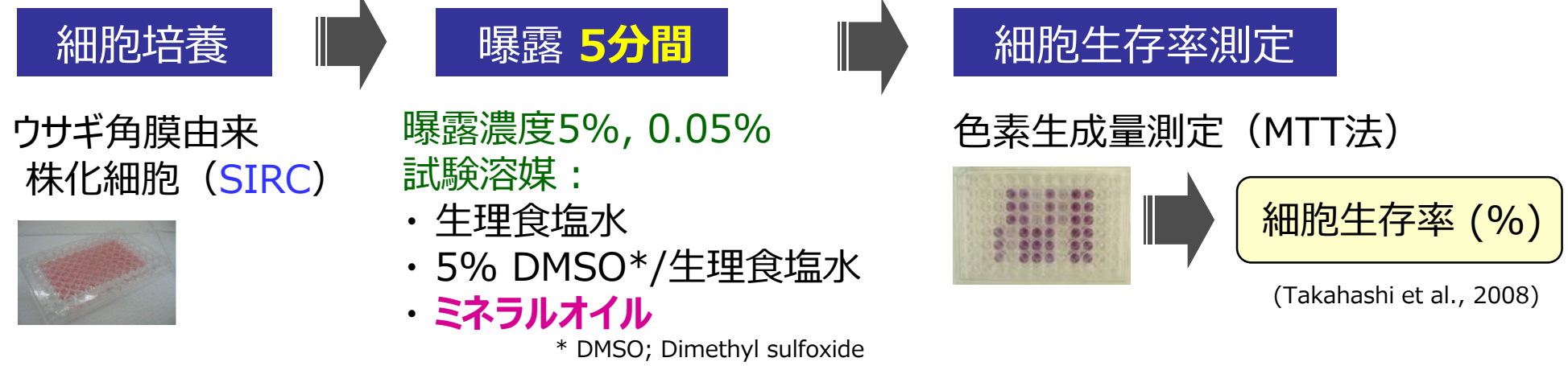
2015.7.28

OECDテストガイドライン承認 (TG 491)

→ 国際的に有用な試験法として確立された

STE法の概要 (TG 491収載の予測モデル)

【試験方法】



【予測モデル】

Cell viability		GHS* classification	
At 5%	At 0.05%		
> 70%	> 70%	No Category	← 非刺激性 (No Cat.)
≤ 70%	> 70%	No stand-alone prediction can be made	← 刺激性 (Irritant)
≤ 70%	≤ 70%	Category 1**	

* GHS: Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
 **Category1: 強度眼刺激性
 (OECD TG491., 2015)

曝露時間、曝露濃度、予測モデルの設定はGHS区分の対応性から検討
 → **本試験条件によって被験物質原体 (未希釈) や希釈物、混合物の眼刺激性を評価可能**

STE法の予測性 (GHS No Cat.の区分について)

【予測性計算方法と良好な予測性参考値】

<i>in vivo</i> GHS	<i>in vitro</i>	
	Irritant	No Cat.
Irritant (Cat. 1 & 2)	A	B
No Cat.	C	D

- Accuracy (一致率) : $(A+D)/(A+B+C+D)$
- False positive rate (FPR, 偽陽性率) : $C/(C+D)$
- False negative rate (FNR, 偽陰性率) : $B/(A+B)$
- Sensitivity (感度) : $A/(A+B)$
- Specificity (特異度) : $D/(C+D)$

OECDの専門家会議で議論された良好な予測性

- Accuracy : **85%以上で良好**
- FPR : **40%以下で良好**
- FNR : **10%以下で良好**
- Sensitivity : **90%以上で良好**
- Specificity : **60%以上で良好**



【予測性】

<i>in vivo</i> GHS (評価物質数: 102)	STE	
	Irritant	No Cat.
Irritant	53	1
No Cat.	9	39

- Accuracy : **90.2% (92/102)**
 - FPR : **18.8% (9/ 48)**
 - FNR : **1.9% (1/ 54)**
 - Sensitivity : **98.1% (53/ 54)**
 - Specificity : **81.3% (39/ 48)**
- (OECD TG491., 2015)

【偽陰性1物質 : Toluene】

- ◆ GHS No Category (ECETOC, 1998)
- ◆ GHS Category 2B (EPA)

No Cat., Cat. 2Bのボーダーライン付近にある物質
 → 試験法の信頼性を下げるような結果でないと結論 (OECD会議)

STE法は良好な予測性を持つ試験法

- 眼刺激性評価における動向と
*in vitro*眼刺激性試験Short Time Exposure (STE) 法
- **STE法の適用範囲拡大への取り組み**
- STE法を含めた複数の試験法による眼刺激性GHS区分
- STE法の「医薬部外品・化粧品の安全性評価におけるガイダンス」

STE法の適用限界

STE法はNo Cat.を区分する際に以下のカテゴリーは評価不可 (Peer review時に議論)

1) 高揮発性物質 > 6kPa (25°C)

e.g. Acetone, Ethanol, Isopropanol, Methyl acetate

→ 調製・曝露の際、評価物質が揮発した可能性

2) 活性剤を除く固体

e.g. Ammonium nitrate, Potassium sorbate, Sodium salicylate

→ *in vivo*では物理的な刺激による影響を捉えた可能性

偽陰性率が高く、上記の理由から適用限界として設定 (OECD TG 491に記載)

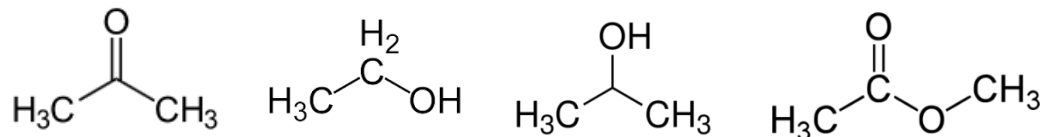
適用範囲拡大に向けた取り組み

適用限界2種のうち高揮発性物質に注目

高揮発性物質 > 6kPa (25°C)

e.g. Acetone, Ethanol, Isopropanol, Methyl acetate

→ 調製・曝露の際、評価物質が揮発した可能性 (Irritantを誤ってNo Cat.と評価)



- 偽陰性物質4種の試験溶媒： 生理食塩水
- 偽陰性物質は両親媒性物質： 生理食塩水、ミネラルオイルどちらにも溶解

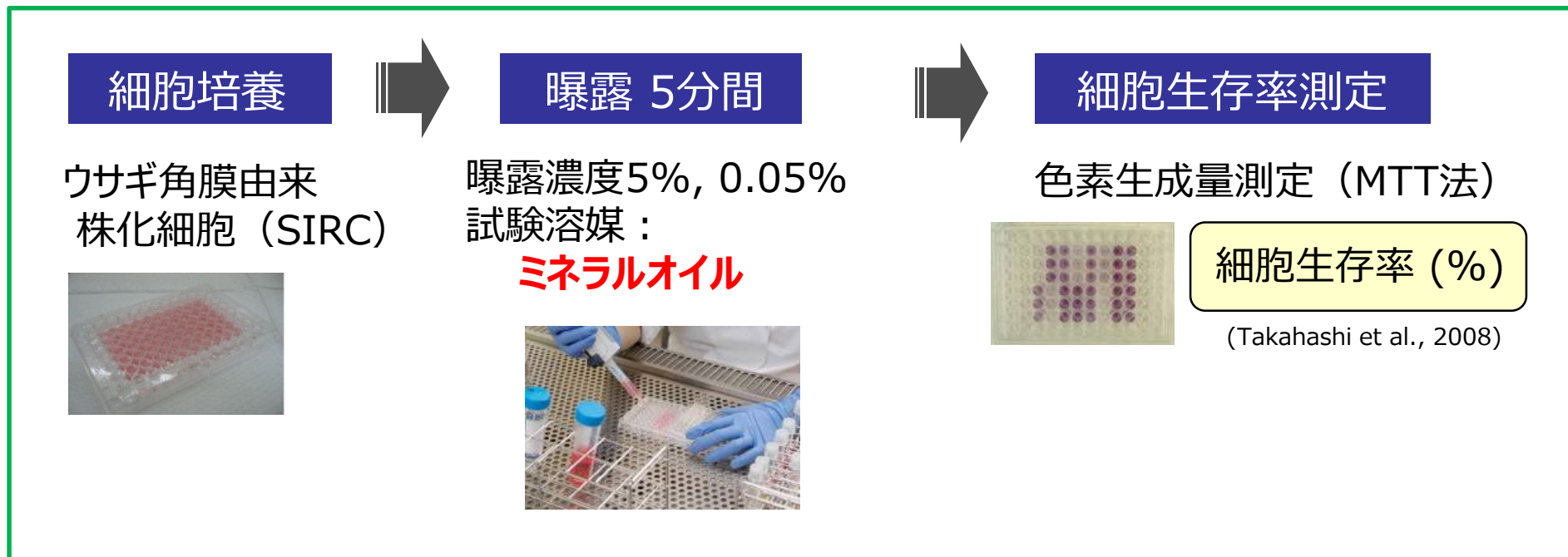
溶媒をミネラルオイルへ変更することで揮発を抑え、眼刺激性を正しく評価できる可能性



偽陰性物質4種を含めた20種の高揮発性物質をミネラルオイルに変更して試験実施

高揮発性物質の試験法改良点と評価方法

- 全ての高揮発性物質の溶媒をミネラルオイルに変更。その他の変更点なし。



- 予測モデルも変更なし
 - 5%、0.05%の細胞生存率70%を閾値にNo Cat./Irritantを区分
- 高揮発性物質はSTE Summary Review Document (SRD) (ICCVAM, 2013)、Draize eye test Reference Database (DRD) (Barroso et al., 2017) 参照して選択
 - *in vivo*によるGHS区分がされた入手できる全ての高揮発性物質を評価 (計20種)

偽陰性物質4種の試験結果

【溶媒変更前】

被験物質名	in vivo GHS	TG491更新前のSTE試験結果			
		溶媒	細胞生存率 (%)		STE classification
			5%	0.05%	
Acetone	Cat. 2A	saline	91.3	105.4	No Cat.
Ethanol	Cat. 2A	saline	98.2	97.1	No Cat.
Isopropanol	Cat. 2A	saline	101.6	97.6	No Cat.
Methyl acetate	Cat. 2A	saline	92.6	96.2	No Cat.

【溶媒変更後】

被験物質名	in vivo GHS区分	溶媒をmineral oilに変更した試験結果			
		溶媒	細胞生存率 (%)		STE classification
			5%	0.05%	
Acetone	Cat. 2A	mineral oil	9.6	101.2	Irritant
Ethanol	Cat. 2A	mineral oil	22.6	95.9	Irritant
Isopropanol	Cat. 2A	mineral oil	6.9	97.8	Irritant
Methyl acetate	Cat. 2A	mineral oil	45.5	96.0	Irritant

5%、0.05%曝露時の細胞生存率70%を閾値に、「両濃度で > 70%」をNo Cat.、
「両濃度で ≤ 70%」もしくは「5%曝露では ≤ 70%、0.05%曝露では > 70%」をIrritant

溶媒をミネラルオイルに変更して試験を実施することで偽陰性物質4種の眼刺激性を正しく評価

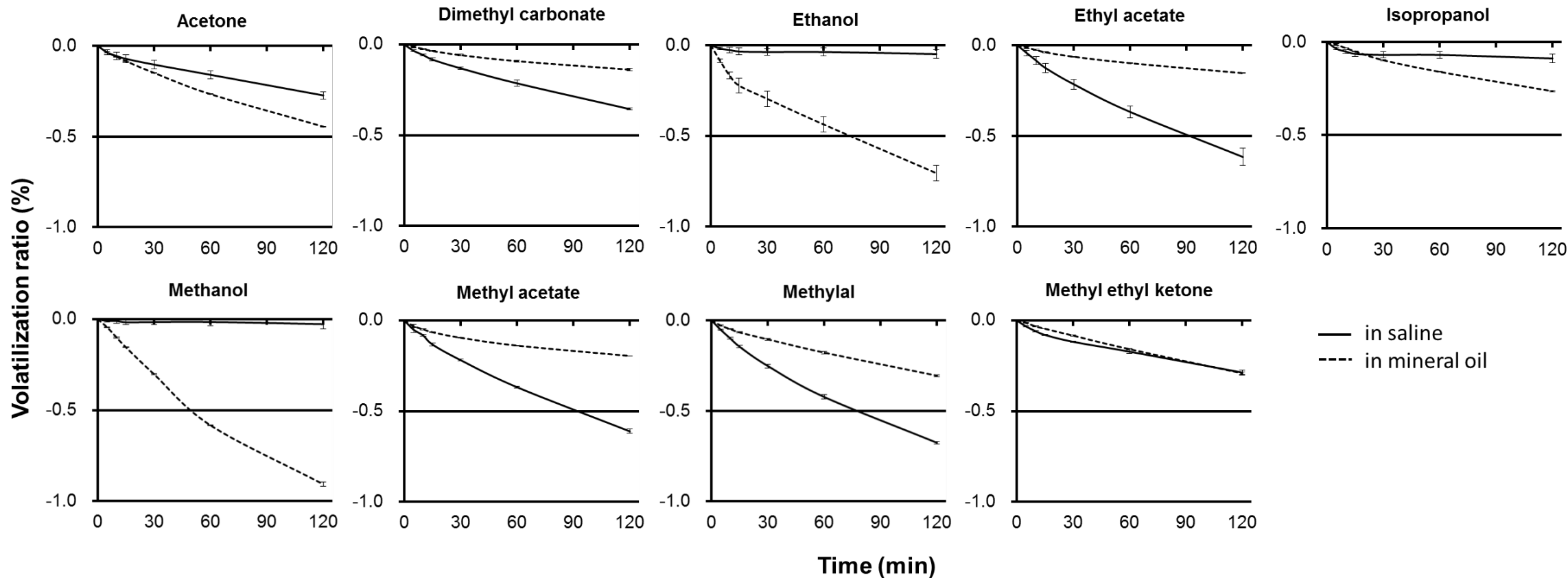
偽陰性4種を含めた20種の高揮発性物質の試験結果

被験物質名	in vivo GHS	TG491更新前のSTE試験結果				溶媒をmineral oilに変更した試験結果		
		溶媒	細胞生存率 (%)		STE classification	細胞生存率 (%)		STE classification
			5%	0.05%		5%	0.05%	
Acetone	Cat. 2A	saline	91.3	105.4	No Cat.	9.6	101.2	Irritant
Ethanol	Cat. 2A	saline	98.2	97.1	No Cat.	22.6	95.9	Irritant
Isopropanol	Cat. 2A	saline	101.6	97.6	No Cat.	6.9	97.8	Irritant
Methyl acetate	Cat. 2A	saline	92.6	96.2	No Cat.	45.5	96.0	Irritant
Methyl ethyl ketone	Cat. 2A	saline	44.7	100.7	Irritant	37.5	100.4	Irritant
Isobutanal	Cat. 2B	mineral oil	6.7	94.6	Irritant	6.7	94.6	Irritant*
n-Butanal	Cat. 2B	mineral oil	4.5	100.5	Irritant	4.5	100.5	Irritant*
1,5-Hexadiene	No Cat.	mineral oil	95.3	104.1	No Cat.	95.3	104.1	No Cat.*
2-Methylpentane	No Cat.	mineral oil	103.1	101.9	No Cat.	103.1	101.9	No Cat.
3-Methylhexane	No Cat.	mineral oil	106.0	104.7	No Cat.	106.0	104.7	No Cat.
3,3-Dimethylpentane	No Cat.	mineral oil	92.6	102.4	No Cat.	92.6	102.4	No Cat.*
Bromo-2-butane	No Cat.	mineral oil	101.8	100.2	No Cat.	101.8	100.2	No Cat.*
Dimethyl carbonate	No Cat.	saline	91.4	103.4	No Cat.	49.1	106.8	Irritant
Ethyl acetate	No Cat.	saline	7.8	109.6	Irritant	97.4	102.3	No Cat.
Furan	No Cat.	mineral oil	116.3	104.4	No Cat.	116.3	104.4	No Cat.*
Isopropyl bromide	No Cat.	mineral oil	105.6	109.4	No Cat.	105.6	109.4	No Cat.*
Methanol	No Cat.	saline	102.9	104.0	No Cat.	70.1	106.6	No Cat.
Methylal	No Cat.	saline	105.8	105.6	No Cat.	102.6	103.8	No Cat.
Methyl cyclopentane	No Cat.	mineral oil	102.2	104.4	No Cat.	102.2	104.4	No Cat.*
n-Hexane	No Cat.	mineral oil	112.0	106.4	No Cat.	112.0	106.4	No Cat.*

*: TG491に従って溶媒にミネラルオイルが選択された場合はTG491での試験結果が記載された。

高揮発性物質の溶媒をミネラルオイルに変更することで偽陰性なく評価

溶媒中の高揮発性物質の経時的な揮発減少率



生理食塩水、ミネラルオイルの両溶媒に溶解する9種の物質を対象

- 「揮発減少率(%)」=「被験物質溶液の重量減少量(g)」-「溶媒のみの重量減少重(g)」 / 「被験物質総量(g)」 X 100
- 重量は電子天秤を用いて0, 5, 10, 15, 30, 60, 120分の時点での重量を測定 (n=3)
(直線は生理食塩水(saline)に溶けた被験物質、点線はミネラルオイル(mineral oil)に溶けた被験物質)

曝露時間 (STE試験条件下 5分間) では揮発減少率に差なし

→ 揮発性が偽陰性の直接原因とは考えにくいと推察

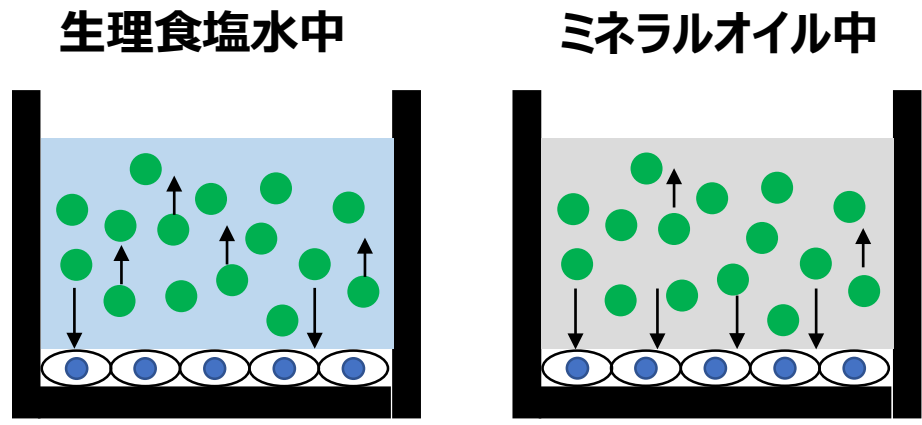
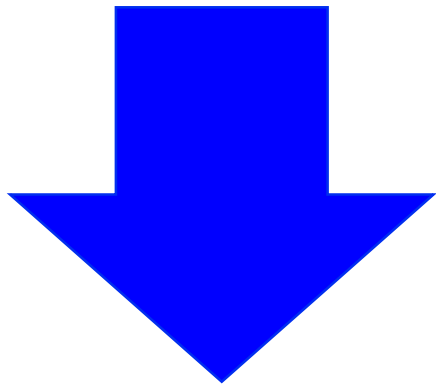
溶媒中の物質の分配と細胞毒性への影響

偽陰性の原因：揮発による影響は小さいと推察

偽陰性物質は両親媒性、

→ 物質の分配は溶媒により異なり細胞毒性へ影響？

→ 偽陰性物質は生理食塩水への親和性の強さから物質の細胞表面への接触が低下？



- : 高揮発性物質
- : 細胞
- : 生理食塩水
- : ミネラルオイル

物理化学性状パラメーター $\log K_{ow}$ を基に
生理食塩水、ミネラルオイルへの予測される親和性から偽陰性の原因を考察

log K_{ow}を用いた高揮発性物質の溶媒中の分配に関する考察

被験物質名	log K _{ow} [†]	in vivo GHS	TG491更新前のSTE試験結果				溶媒をmineral oilに変更した試験結果		
			溶媒	細胞生存率 (%)		STE classification	細胞生存率 (%)		STE classification
				5%	0.05%		5%	0.05%	
Acetone	-0.24	Cat. 2A	saline	91.3	105.4	No Cat.	9.6	101.2	Irritant
Ethanol	-0.14	Cat. 2A	saline	98.2	97.1	No Cat.	22.6	95.9	Irritant
Isopropanol	0.28	Cat. 2A	saline	101.6	97.6	No Cat.	6.9	97.8	Irritant
Methyl acetate	0.37	Cat. 2A	saline	92.6	96.2	No Cat.	45.5	96.0	Irritant
Methyl ethyl ketone	0.26	Cat. 2A	saline	44.7	100.7	Irritant	37.5	100.4	Irritant
Isobutanal	0.74	Cat. 2B	mineral oil	6.7	94.6	Irritant	6.7	94.6	Irritant*
n-Butanal	0.82	Cat. 2B	mineral oil	4.5	100.5	Irritant	4.5	100.5	Irritant*
1,5-Hexadiene	3.02	No Cat.	mineral oil	95.3	104.1	No Cat.	95.3	104.1	No Cat.*
2-Methylpentane	3.21	No Cat.	mineral oil	103.1	101.9	No Cat.	103.1	101.9	No Cat.
3-Methylhexane	3.71	No Cat.	mineral oil	106.0	104.7	No Cat.	106.0	104.7	No Cat.
3,3-Dimethylpentane	3.67	No Cat.	mineral oil	92.6	102.4	No Cat.	92.6	102.4	No Cat.*
Bromo-2-butane	2.58	No Cat.	mineral oil	101.8	100.2	No Cat.	101.8	100.2	No Cat.*
Dimethyl carbonate	0.23	No Cat.	saline	91.4	103.4	No Cat.	49.1	106.8	Irritant
Ethyl acetate	0.86	No Cat.	saline	7.8	109.6	Irritant	97.4	102.3	No Cat.
Furan	1.36	No Cat.	mineral oil	116.3	104.4	No Cat.	116.3	104.4	No Cat.*
Isopropyl bromide	2.08	No Cat.	mineral oil	105.6	109.4	No Cat.	105.6	109.4	No Cat.*
Methanol	-0.63	No Cat.	saline	102.9	104.0	No Cat.	70.1	106.6	No Cat.
Methylal	-0.19	No Cat.	saline	105.8	105.6	No Cat.	102.6	103.8	No Cat.
Methyl cyclopentane	3.1	No Cat.	mineral oil	102.2	104.4	No Cat.	102.2	104.4	No Cat.*
n-Hexane	3.29	No Cat.	mineral oil	112.0	106.4	No Cat.	112.0	106.4	No Cat.*

†: log Kow はEPI suiteにより算出された。データは予測値を示した。*: TG491に従って溶媒にミネラルオイルが選択された場合はTG491での試験結果が記載された。

- 偽陰性物質4種の値 (0.37 ~ -0.24) → 生理食塩水への親和性大
- Methyl ethyl ketone, Dimethyl carbonate, Methanol (0.26, 0.23, -0.63)
 - 溶媒をミネラルオイルに変更し、細胞生存率低下
 - 偽陰性物質4種と同様に生理食塩水への親和性が高く、細胞への接触性が低かった可能性
- Methylalは毒性が弱く両溶媒で無毒性、Ethyl acetateはミネラルオイルへの親和性が高く細胞への接触性低下？

物質の溶媒中の分配が細胞生存率へ影響した可能性

STE法の適用範囲拡大への取り組み まとめ

- STE法の適用限界であった高揮発性物質は、
溶媒をミネラルオイルへ変更することで眼刺激性を偽陰性なく評価可能
→ 溶媒変更のみの改良によりTG 491の改訂（適用範囲を拡大）達成
- 高揮発性物質の偽陰性要因は、揮発による濃度低下ではなく、
溶媒中の分配により細胞毒性に影響したことが推察

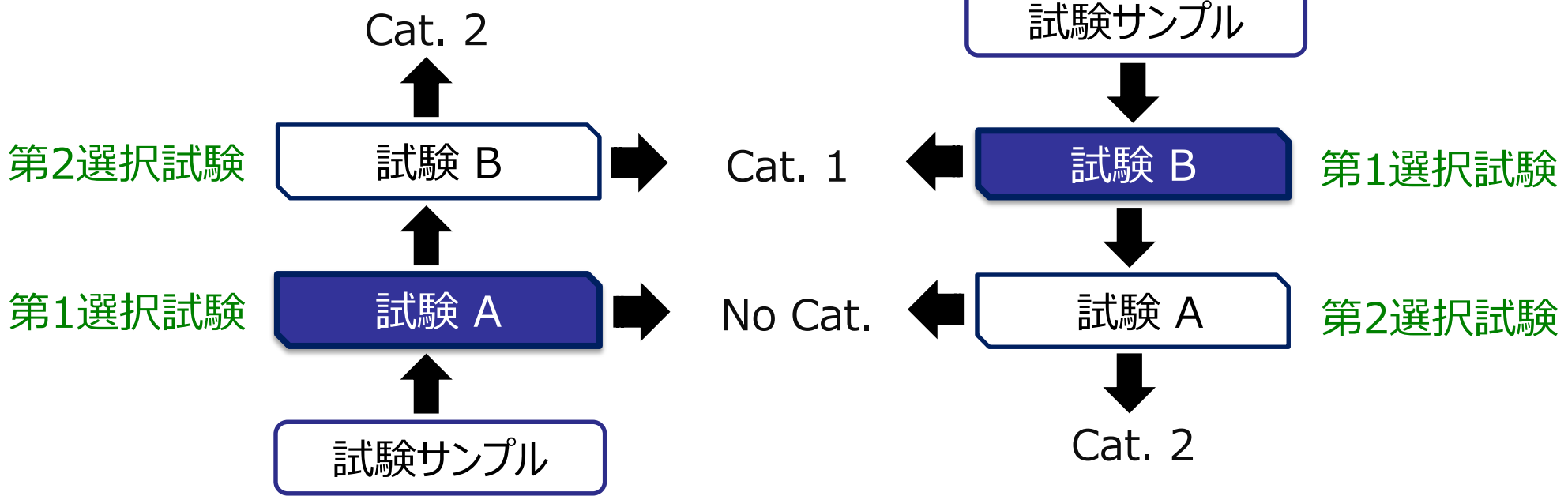
- 眼刺激性評価における動向と
*in vitro*眼刺激性試験Short Time Exposure (STE) 法
- STE法の適用範囲拡大への取り組み
- **STE法を含めた複数の試験法による眼刺激性GHS区分**
- STE法の「医薬部外品・化粧品の安全性評価におけるガイダンス」

段階的評価法 (Tiered approach)

- ・ 検討当時、*in vitro*試験法単独ではGHS 3区分(Cat. 1, 2, No Cat.)を精度良く評価困難
- ・ Draize試験を完全に代替するには複数の*in vitro* 試験を段階的に組み合わせることが有効

Bottom-up approach

Top-down approach



(McNamee et al., 2009, Scott et al., 2010)

→ Tiered approachを検討

Tiered approachにおける効果的な組合せ

選択する試験法の特徴から、false resultを少なくする組合せが必要

Bottom-up approach

第1選択試験でGHS No Cat.を区分 : No Cat.を区分する精度が高い試験法

第2選択試験でGHS Cat. 1を区分 : Cat. 1を区分する精度が高い試験法

Top-down approach

第1選択試験でGHS Cat. 1を区分 : Cat. 1を区分する精度が高い試験法

第2選択試験でGHS No Cat.を区分 : No Cat.を区分する精度が高い試験法

各試験法の特徴を把握し、2試験だけでなく3試験で構築するなどより高精度な評価になるよう組合せを検討

花王検討によるTiered approach (各試験法の特徴把握)

STE, EpiOcular™, BCOP, HET-CAMによる評価結果(最大56物質、液体・固体物質含め様々な化学物質を評価)

Test materials	in vivo GHS	for identification of irritant			for identification of severe irritant	
		STE	EpiOcular™	HET-CAM	BCOP	HET-CAM
		classification	classification	classification	classification*	classification*
1 1-naphthaleneacetic acid	1	N/A	I	N/A	Severe	Non-severe
2 benzalkonium chloride	1	I	I	I	Severe	Severe
3 benzethonium chloride	1	I	I	I	Severe	Severe
4 cetylpyridinium bromide	1	I	I	I	Severe	Severe
5 chlorhexidine	1	N/A	I	N/A	Severe	Severe
6 cyclohexanol	1	I	I	I	Non-severe	Severe
7 dibenzoyl-L-tartaric acid	1	N/A	I	N/A	Severe	Severe
8 hexadecyltrimethylammonium bromide	1	N/A	I	I	Severe	Severe
9 imidazole	1	N/A	I	I	Severe	Severe
10 promethazine hydrochloride	1	N/A	I	I	Severe	Severe
11 pyridine	1	I	I	I	Severe	Severe
12 sodium hydroxide	1	N/A	I	I	Severe	Severe
13 sodium lauryl sulfate	1	I	I	I	Non-severe	Severe
14 sodium oxalate	1	N/A	I	I	Non-severe	Severe
15 sodium perborate Tetrahydrat	1	N/A	I	N/A	Severe	Severe
16 Triton X-100	1	I	I	I	Severe	Severe
17 2-ethyl-1-hexanol	2A	I	I	I	Non-severe	Severe
18 4-formylbenzoic acid	2A	N/A	I	NI	Non-severe	Non-severe
19 acetone	2A	I	I	I	Severe	Severe
20 ammonium nitrate	2A	N/A	I	I	Non-severe	Severe
21 butanol	2A	I	I	I	Severe	Severe
22 butyrolactone	2A	I	I	I	Non-severe	Severe
23 dibenzyl phosphate	2A	N/A	I	N/A	Severe	Severe
24 ethanol	2A	I	I	I	Non-severe	Severe
25 isopropyl alcohol	2A	I	I	I	Severe	Severe
26 methyl acetate	2A	I	I	I	Non-severe	Severe
27 methyl ethyl ketone	2A	I	I	I	Severe	Severe
28 n-lauroylsarcosine sodium salt	2A	I	I	I	Non-severe	Severe
29 ethyl-2-methylacetacetate	2B	I	I	I	Non-severe	Severe
30 1,3-diisopropylbenzene	No Cat.	NI	NI	NI	Non-severe	no data
31 1,5-hexadiene	No Cat.	NI	NI	I	Non-severe	no data
32 1-nitropropane	No Cat.	N/A	I	NI	Non-severe	Non-severe
33 1-phenyl-3-pyrazolidinone	No Cat.	N/A	I	NI	Non-severe	Non-severe
34 2,4,5,6-tetraamino-pyrimidine sulfate	No Cat.	N/A	I	N/A	Non-severe	Non-severe
35 2,4-pentanedione	No Cat.	I	I	I	Severe	Non-severe
36 2-aminophenol	No Cat.	N/A	NI	NI	Non-severe	Non-severe
37 3-glycidoxypropyl-trimethoxysilan	No Cat.	NI	I	I	Non-severe	Non-severe
38 anthracene	No Cat.	N/A	NI	NI	Non-severe	Non-severe
39 betaine monohydrate	No Cat.	NI	NI	I	Non-severe	no data
40 butyl acetate	No Cat.	NI	I	I	Non-severe	Severe
41 dimethyl sulfoxide	No Cat.	NI	I	I	Non-severe	Severe
42 dodecane	No Cat.	NI	NI	NI	Non-severe	no data
43 EDTA, di-potassium	No Cat.	N/A	I	I	Non-severe	Non-severe
44 ethyl acetate	No Cat.	NI	I	I	Non-severe	Severe
45 gluconolactone	No Cat.	N/A	I	I	Severe	Non-severe
46 glycerin	No Cat.	NI	NI	I	Non-severe	Severe
47 hexane	No Cat.	NI	NI	NI	Non-severe	Non-severe
48 iminodibenzyl	No Cat.	N/A	NI	NI	Non-severe	Non-severe
49 methyl cyclopentane	No Cat.	NI	NI	I	Non-severe	Severe
50 methyl iso-butyl ketone	No Cat.	NI	I	I	Non-severe	Severe
51 polyethylene glycol 400	No Cat.	NI	NI	NI	Non-severe	Severe
52 propyl 4-hydroxybenzoate	No Cat.	N/A	I	I	Non-severe	Non-severe
53 toluene	No Cat.	NI	I	I	Non-severe	Severe
54 triethanolamine	No Cat.	NI	I	I	Non-severe	Severe
55 Tween20	No Cat.	I	NI	I	Non-severe	Severe
56 xylene	No Cat.	NI	NI	I	Non-severe	no data

4試験について、GHS 3区分の予測性良好な組合せを検討

NI: Non-irritant (GHS No Cat.), I: Irritantを区分する予測性

GHS STE (5%)		EpiOcular	
		NI (viability > 70)	I (viability ≤ 70)
		16	19
NI		18	2
I (Cat.1, Cat.2)		17	0

GHS EpiOcular		HET-CAM	
		NI (viability > 60)	I (viability ≤ 60)
		13	43
NI		27	14
I (Cat.1, Cat.2)		29	0

GHS HET-CAM		BCOP	
		NI (score 0-7)	I (score 7-21)
		18	32
NI		26	9
I (Cat.1, Cat.2)		24	1

Severe (GHS Cat. 1), Non-severeを区分する予測性

GHS BCOP		HET-CAM	
		non severe IVIS ≤ 55	severe IVIS ≥ 55.1
		36	20
NI+Cat.2		40	7
Cat.1		16	3

GHS HET-CAM		BCOP	
		non severe (score 0-9)	severe (score 9-21)
		14	37
NI+Cat.2		35	13
Cat.1		16	1

花王検討によるTiered approach (各試験法の予測性)

STE, EpiOcular™, BCOP, HET-CAMによる評価結果(最大56物質、液体・固体物質含め様々な化学物質を評価)

	NI / I			Severe / Non-severe	
	STE法	EpiOcular™法	HET-CAM法	BCOP法	HET-CAM法
評価物質数	35	56	50	56	51*
一致率 (%)	94.3	75.0	80.0	82.1	54.9
感度 (%)	100.0	100.0	95.8	81.3	93.8
特異度 (%)	88.9	48.1	65.4	82.5	37.1
偽陽性率 (%)	11.1	51.9	34.6	17.5	62.9
偽陰性率 (%)	0.0	0.0	4.2	18.8	6.3

Hayashi et al., 2012より抜粋して現TG 491で適用して再評価

NI/I (GHS No Cat.を区分) :

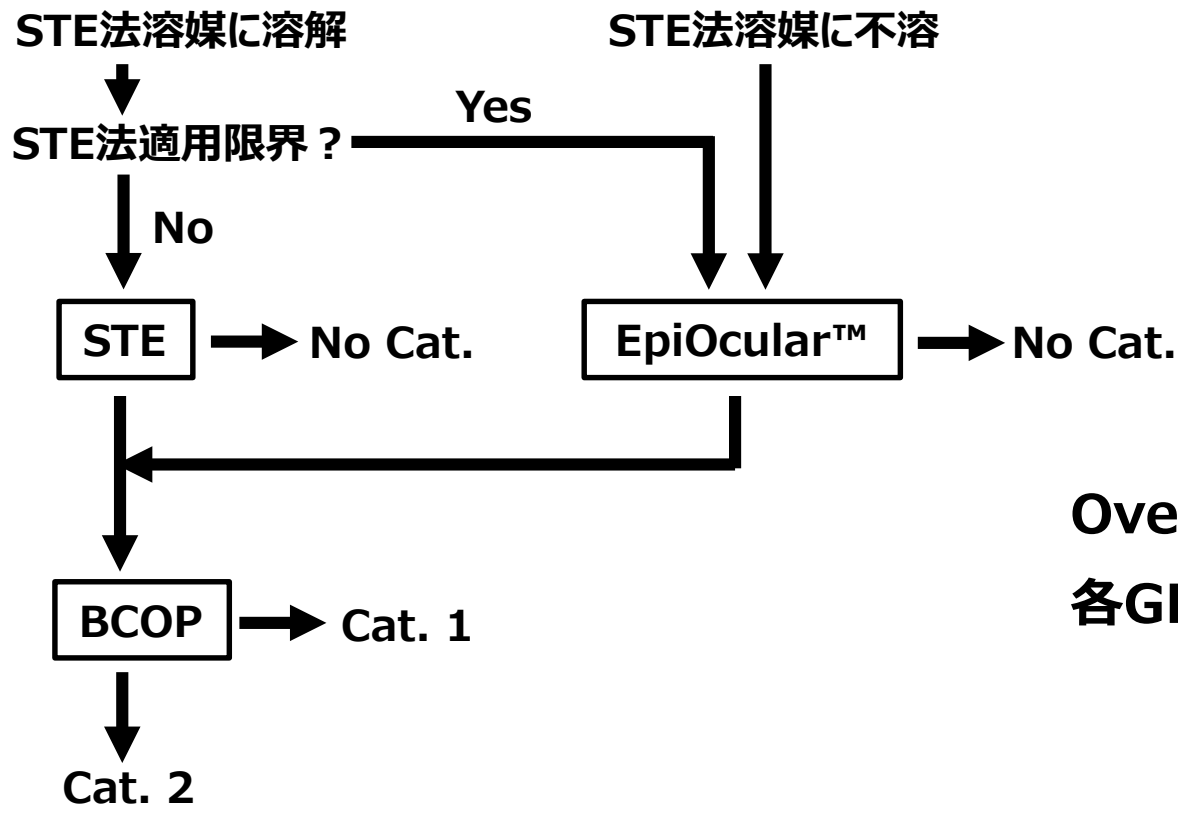
- ・ STE法の一致率は高いが、評価可能物質数はEpiOcular™法が多い
- STE法とEpiOcular™法は偽陰性なし、STE法は偽陽性率も低い
- No Cat.区分試験としてSTE法を選択、STE法で試験不可 (溶媒不溶) 物質をEpiOcular™法で評価

Severe/Non-severe (GHS Cat. 1を区分) :

- ・ 一致率の点でBCOPが有用

花王検討によるTiered approach (効果的な組合せと予測性)

評価対象：液体・固体物質含め様々な化学物質



<i>in vivo</i> GHS	Tiered approachでの区分		
	Cat. 1	Cat. 2	No Cat.
Cat. 1	13	3	0
Cat. 2	5	8	0
No Cat.	2	6	19

Overall Accuracy : 71.4% (40/56)

各GHS区分のAccuracy

Cat. 1 : 81.3% (13/16)

Cat. 2 : 61.5% (8/13)

No Cat. : 70.4% (19/27)

Hayashi et al., 2012より抜粋して現TG 491で適用して再評価

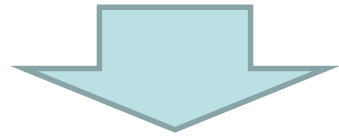
No Cat.を精度よく評価可能なSTE、EpiOcular™
 Cat. 1を精度よく評価可能なBCOPを組合せたTiered approach
 → 溶媒への溶解性を問わず、様々な被験物質のGHS区分を評価できる可能性

化粧品業界団体(Cosmetics Europe)と協同して公知化へ

花王開発Tiered approachについて、

→ 論文発表だけでは、実際にGHS Cat. 2を区分すること不可

→ OECD等でTiered approachの予測性が検証され、公知化される必要あり



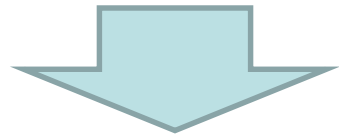
・ 複数の試験法の結果を取得することは1企業のみでは困難（コストや時間が大きくかかる）

・ 欧州化粧品工業会（Cosmetics Europe; CE）は、

Tiered approachの概念を論文発表（McNamee et al., 2009）

OECD GD 263（OECD, 2019）の作成を主導（代替法開発だけでなく利用も積極的に検討）

→ CEに所属する複数企業と協同することで低コスト、短時間でOECDへの受け入れを検討

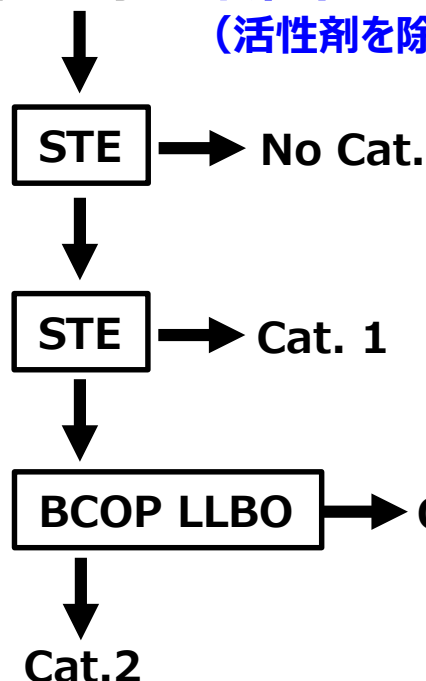


CEとともに評価体系構築を検討、OECDガイドライン化を目指す

STE法とBCOP LLBO法の組合せ評価

評価対象：液体化学物質

(活性剤を除く未希釈物および固体の希釈物も含む)



BCOP LLBO:
従来のOP-KITと検出器のみ異なる方法。
Laser Light-Based Opacitometer.

GHS	STE-BCOP		
	Cat. 1	Cat. 2	No Cat.
Cat. 1 (n=17)	81.2%	17.6%	1.2%
Cat. 2 (n=24)	30.2%	56.3%	13.5%
No Cat. (n=123)	4.2%	10.5%	85.3%

OECD推奨の予測性 (3 x 3)

GHS	Defined Approach		
	Cat. 1	Cat. 2	No Cat.
Cat. 1	≥ 75%	≤ 25%	≤ 5%
Cat. 2	≤ 30%	≥ 50%	≤ 30%
No Cat.	≤ 5%	≤ 30%	≥ 70%

STE法でNo Cat.、Cat. 1を区分し、BCOP LLBO法でCat. 1を区分

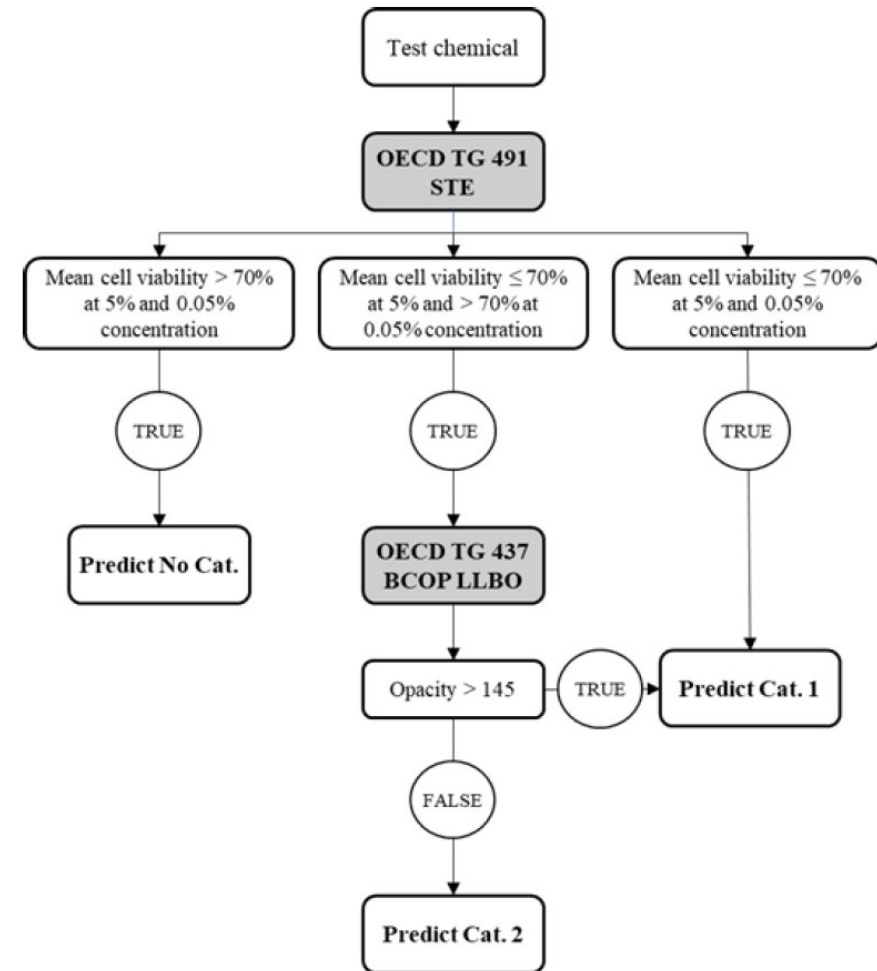
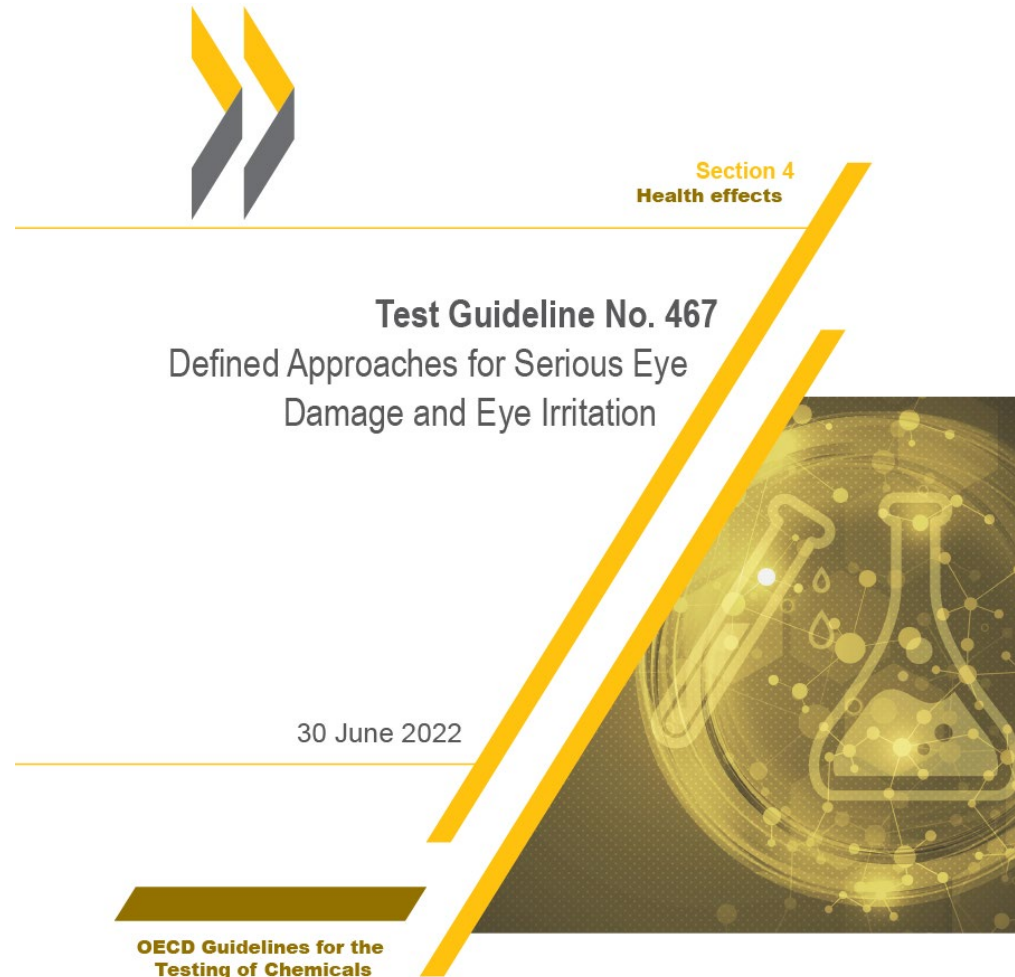
→ Cat. 1の区分で、STE法の低偽陽性率とBCOP LLBO法の低偽陰性率を生かした評価

- Cat. 1とNo Cat.のAccuracyはそれぞれ81.2%、85.3%
- Cat. 2のAccuracyは60%弱

評価物質カテゴリーは異なるが (適用範囲は狭い)、花王単独での検討と同等以上の予測性

評価体系のOECDガイドライン化

GL 467が発出 (STE法とBCOP LLBO法の組合せ評価が評価体系の一つとして収載)



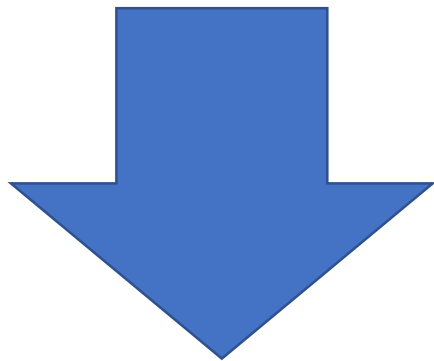
眼刺激性GHS 3区分 (Cat. 1、Cat. 2、No Cat.) を分類可能

- 眼刺激性評価における動向と
*in vitro*眼刺激性試験Short Time Exposure (STE) 法
- STE法の適用範囲拡大への取り組み
- STE法を含めた複数の試験法による眼刺激性GHS区分
- **STE法の「医薬部外品・化粧品の安全性評価におけるガイダンス」**

医薬部外品・化粧品の安全性評価におけるSTE法に関するガイダンスの作成着手

- 2015年のOECDテストガイドライン化後、JaCVAMにより評価書作成

- 医薬部外品申請試験として活用するため、化粧品工業連合会 眼刺激性タスクフォースでガイダンス作成を開始



- パブリックコメント募集
(試験法に関する意見やガイダンス中の表記などコメントを募集)

医薬部外品・化粧品の安全性評価における眼刺激性試験代替法としての「ウサギ角膜由来株化細胞を用いた短時間曝露法（STE法）に関するガイダンス」

眼刺激性は、被験物質が眼に直接接触したことにより生じる結膜の発赤・浮腫・分泌物、虹彩の変化や角膜の混濁等を指標とする反応である。眼刺激性試験はヒトが被験物質を粘膜に適用した場合に生じる傷害性、あるいは誤って眼に入った場合に生じる結膜、虹彩および角膜に対する傷害性を予測するために実施される。

医薬部外品の製造販売承認申請および化粧品基準改正要請では、従来、ウサギを用いた急性眼刺激性/腐食性（Acute Eye Irritation/Corrosion）を評価する Draize 法¹⁾（OECD テストガイドライン 405: OECD TG405 として 1981 年に採択され、その後改定および更新されている²⁾）が用いられてきた。

一方、眼刺激性試験に関する *in vitro* 試験法である「短時間曝露法（Short Time Exposure Test Method: STE 法）」は日本動物実験代替法学会（The Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments: JSAAE）と日本動物実験代替法評価センター（The Japanese Center for the Validation of Alternative Methods: JaCVAM）によるバリデーションを経て^{3,4)}、米国動物実験代替法検証省庁連絡委員会/NTP 代替試験法省庁センター（The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods: ICCVAM/The National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods: NICEATM, ICCVAM/NICEATM）による第三者評価を受け、その報告書（Summary Review Document: SRD）が 2013 年に公表された⁵⁾。

2015 年に経済協力開発機構（The Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD）は、国連（The United Nations: UN）による化学品の分類および表示に関する世界調和システム（The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals: GHS）区分⁶⁾で強度の眼刺激性（区分 1）を有する化学物質あるいは混合物をトップダウン方式で、また無刺激性（区分外）の化学物質あるいは混合物をボトムアップ方式で評価する試験法として STE 法を 2015 年に採択（OECD TG491）、その後改定および更新した⁷⁾。トップダウン方式は重篤な眼傷害性を引き起こすと疑われる被験物質に対して用いられる段階的方法で、重篤な眼の損傷を起こす物質を、それ以外の物質から正確に識別できる試験法で判別することから開始する。また、ボトムアップ方式は眼刺激性あるいは重篤な眼傷害性を有する区分に当たらないと予測される被験物質に対して用いられる段階的方法で、眼刺激性あるいは重篤な眼傷害性ではない物質を、それ以外の物質から正確に識別できる試験法で判別することから開始する⁸⁾。

本ガイダンスは、OECD TG491（STE 法）について、医薬部外品・化粧品の安全性評価に利用するに当たって、必要な留意点等を取りまとめたものである。

SH 引用を修正しています。URL が

TS 文獻 6）GHS の最新版は 2017 年版です

引用先を修正しました。ご確認をお願いいたします。 安保

TS 今回の軽微？変更については何か記載しますか？ 文獻 7）はオリジナルの TG で、今後変更を含めた改訂版が出ると思います。 ちなみに、いまの最新 TG は IATA を組み入れて改訂された 2017 年版です。

先日の OECD 会議で承認された内容を反映したガイダンスですので、最終版となる前に引用先を 2018 年版に修正し忘れないようにしたいと思います。そのため、今はこのままでも良いと思いますが、それとも現時点でも 2017 年版に変更しておいた方が良いでしょう。 安保

TG405 の扱いにない、①2017 年および 2018 年（予定されている）の更新を念頭に「採択、その後改定および更新した」と表現しました。また、②引用としては、時期に出るであろう最新版を引用したいと思います。

TS 重篤な眼傷害性？

本文中の同様の言葉を「眼傷害性」として統一いたしました。いかがでしょうか。 安保

医薬部外品・化粧品の安全性評価におけるSTE法に関するガイダンス発出

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

薬生薬審発 1218 第1号

平成 30 年 12 月 18 日

厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長
(公印省略)

医薬部外品・化粧品の安全性評価における眼刺激性試験代替法としてのウサギ角膜由来株化細胞を用いた短時間暴露法（STE法）に関するガイダンスについて

今般、「医薬品等の安全性評価に関する in vitro 試験（代替法）の開発、国際標準化及び普及促進に関する研究」（平成 30 年度日本医療研究開発機構研究費（医薬品等規制調和・評価研究事業、代表研究者 小島肇））において、医薬部外品・化粧品の安全性評価に眼刺激性試験代替法としてのSTE法を利用するにあたっての留意点等を取りまとめたガイダンスを別添のとおり作成されたので、貴管下関係業者に対して周知願います。

各都道府県衛生主管部（局）薬務主管課 御中

事務連絡
令和元年 10 月 15 日

厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課

医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請に添付する資料に関する質疑応答集（Q&A）について（その2）

Q2 医薬部外品や化粧品の安全性評価に資するためのガイダンスが、OECD¹により採択された動物実験代替法等に基づいた通知等として示されているが、参照している OECD テストガイドライン等が更新された場合、更新後の内容に従って実施した試験を申請資料として用いることは可能か。

A2 参照している OECD テストガイドライン等が更新された場合、更新後の内容に従って実施した試験を申請資料として用いることは可能である。

2018年12月、医薬部外品申請試験として留意点もまとめたガイダンスが厚生労働省より発出

→ BCOP法、ICE法に続けて、医薬部外品申請時の動物実験代替に大きく貢献
(その後、RhCE法も同様にガイダンス化達成)

STE法のOECD TG改定内容（高揮発性物質の適用範囲拡大）もガイダンスに適用

***in vitro*眼刺激性試験Short Time Exposure (STE) 法は、**

- **2015年にTG 491としてOECD TG化され、
2020年に適用限界であった高揮発性物質の評価を可能とする改訂を達成**
- **2022年にOECD GL 467が発出
STE法を含めた複数の試験法による組合せにより、
眼刺激性GHS 3区分が可能な評価体系の1試験として貢献**
- **2018年にSTE法の「医薬部外品・化粧品の安全性評価におけるガイダンス」が
発出され、申請試験として動物実験代替に貢献
(適用限界であった高揮発性物質の評価も可能)**