

報告書

ヒト三次元培養角膜上皮を用いた

イオンブースターの

*in vitro*眼刺激性試験

[OECDテストガイドライン492]

試験施設

株式会社きれいテストラボ

〒135-0047 東京都江東区富岡二丁目11番18号

TEL 03-6695-0144

【無断転載禁止】



試験委託	株式会社アトラスプランニング 〒160-0022 東京都新宿区新宿1-2-5第2飯塚ビル5F 大竹 恵理子
試験受託	株式会社きれいテストラボ
試験実施機関	〒135-0047 東京都江東区富岡2-11-6 長谷萬ビル3F
試験番号	TE21070601
被験物質	イオンブースター pH12.5 (純水99.83%, 水酸化カリウム0.17%)
試験項目	ヒト三次元培養角膜上皮を用いた <i>in vitro</i> 眼刺激性試験
資料保存場所	株式会社きれいテストラボ
試験実施日	2021年7月29日
保存期間	試験終了後5年間

報告書をwebなどへ転載を希望する場合、必ず事前に株式会社きれいテストラボにご相談ください。

目次

略語	4
要約	5
試験目的	5
試験概要	5
試験ガイドライン	5
材料と試験方法	6
1 被験物質	6
2 陽性対照物質	6
3 細胞と培地	6
4 試験構成	6
5 試験操作	6
6 細胞生存率の計算	7
7 数値の取り扱い	7
8 試験成立の条件	7
9 判定	7
試験結果	8
1 試験成立	8
2 結果	8
参考文献	8

(最終ページ:8ページ)

略語

CAS: Chemical Abstracts Services

EURL ECVAM: the European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing

ESAC: ECVAM Scientific Advisory Committee

GHS: Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

WST-8: [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)]-2H-tetrazolium

OD: Optical Density

OECD: Organisation Economic Co-operation and Development

PBS: Phosphate buffer saline

RhCE: Reconstructed Human Cornea-like Epithelium

SD: Standard Deviation

UN: United Nations

要約

ヒト三次元培養角膜上皮を用いた*In Vitro*再構築ヒト角膜上皮モデル試験法 (*In Vitro* Eye Irritation: Reconstructed Human Cornea-like Epithelium Test Method)により

被験物質「イオンブースター」

の眼刺激性を評価した。

培養したヒト三次元角膜に被験物質を60秒曝露後、細胞生存率を測定した。被験物質曝露60秒後の細胞生存率の平均値 ± 標準偏差は122.4 ± 7.4%を示し、40%を超えた。

したがって被験物質は、OECDテストガイドライン492に沿った判定基準により、UN GHSが規定する危険有害性区分において眼に対する一定期間において非可逆的もしくは可逆的な眼損傷／刺激作用を有する「区分1」・「区分2」ではない、すなわち眼損傷／刺激作用を有する物質とは分類されない「区分外」と判定された。

試験目的

被験物質の眼刺激性作用を評価するため、ヒト三次元培養角膜上皮を用いた再構築ヒト角膜上皮モデル試験法 (OECDテストガイドライン492収載¹⁾) による眼刺激性試験代替法を実施した。

試験概要

眼に異物が入った場合、眼への刺激性は最表面の角膜上皮細胞に対する細胞傷害から始まる。そこで本試験では、角膜上皮細胞に対する細胞毒性を指標として眼刺激性を評価する*in vitro*再構築ヒト角膜上皮モデル試験法²⁾ (2018年OECDテストガイドライン492採択済み¹⁾) に基づき、LabCyte CORNEA-MODEL (Cat No. 411324, J-TEC, Japan) を用いて眼刺激性を評価した。RhCEモデルに被験物質を一定時間曝露した後、WST-8 (CAS No. 193149-74-5, Dojin, Japan) の取り込み量を基にしたMTT還元法³⁾ によって細胞生存率を測定し、被験物質の眼刺激性を評価する。*in vitro*再構築ヒト角膜上皮モデル試験法はOECDの性能標準で指定されている30の参照物質を用いた3施設でのバリデーション研究⁴⁾ およびJaCVAMの第三者評価 (JaCVAM, 2017⁵⁾) を経て、UN GHS区分外物質を検出する方法としてバリデーションが行われた。本試験で採用した*in vitro*再構築ヒト角膜上皮モデル試験法は2018年にOECDテストガイドライン492として採択されている¹⁾。

試験ガイドライン

本試験は、OECDテストガイドライン492 [OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage (Adopted 25 June 2018, Corrected 18 June 2019)]¹⁾ に則って実施した。

材料と試験方法

1. 被験物質

試験受託社より提供されたイオンブースターを試験に用いた。なお、LabCyte CORNEA-MODEL24 EYE IRRITATION TEST OPERATION PROTOCOL (Version. 2.7, 2018)項目3.2.1 DETECTION OF THE CHEMICALS THAT STAIN THE TISSUEおよび3.2.2 DETECTION OF CHEMICALS THAT DIRECTLY REDUCE WST-8に従い、被験物質による明らかな三次元培養角膜上皮の着色およびWST-8還元性のないことを確認した。

2. 陽性対照物質

本試験条件下でのヒト三次元培養角膜上皮の刺激反応性を確認するため、眼刺激性を示すことが知られているエタノール (99%, CAS No. 64-17-5, Japan Alcohol, Japan) を陽性対照物質として用いた。

3. 細胞と培地

CO₂インキュベータ (CO₂濃度 5%、37℃) で、アッセイ培地 (Cat No. 401351, J-TEC, Japan) を用いてヒト三次元培養角膜上皮 (LabCyte CORNEA-MODEL, Cat No. 401351, J-TEC, Japan) を培養した。

4. 試験構成

細胞生存率の算出には1つの処理群につきn=3の平均値を用いた。また、1試験につき陰性対照、陽性対照および被験物質をそれぞれ1群設けて試験を実施した。試験に関わる操作は別途記載のないかぎり室温で行った。

5. 試験操作

- 24穴プレート (Cat No. 353047, Corning, USA) に500 μ L/wellのアッセイ培地を加え、ヒト三次元培養角膜上皮を移した。また、1プレートにつき6ウェルのヒト三次元培養角膜上皮を使用し、CO₂インキュベータ内で15～30時間培養した。
- ヒト三次元培養角膜上皮の表皮組織表面に被験物質、陽性対照および陰性対照を50 μ L適用し、60秒間曝露した。陰性対照にはPhosphate buffer saline (PBS (-), Lot. 198601, Nissui, Japan) を用いた。
- 洗浄用ポリ洗浄瓶に充填したPBS (-)にてヒト三次元培養角膜上皮を10回以上洗浄した。24穴プレートに500 μ L/wellの培地を加えて、洗浄したヒト三次元培養角膜上皮を培地を加えたウェルに移して24時間CO₂インキュベータ内で培養した。
- 培養カップに付着した培地をPBS (-) で洗浄し、ペーパータオルで培養カップ周囲のPBS (-) を拭き取った。
- 24穴プレートに300 μ L/wellのWST-8 反応液を加え、ヒト三次元培養角膜上皮を移して4時間CO₂インキュベータ内で培養した。WST-8 反応液はCell Counting kit-8 (Cat No. CK04, Dojin, Japan)をEBSS (Earle balanced salt solution (Cat No. E3024, Sigma-Aldrich, USA) にて10倍希釈して調製した。
- 反応液を攪拌したのち96穴プレート (Cat No. 9107, Corning, USA) に200 μ L加えた。マイクロプレートリーダー (SPARK[®] 10M, TECAN, Switzerland) を用いて450 nmの吸光度 (OD₄₅₀) および650 nmの吸光度 (OD₆₅₀) を測定した。ブランクには200 μ LのWST-8 反応液を用いた。

6. 細胞生存率の計算

各ウェルのOD₄₅₀から、それぞれのOD₆₅₀を差し引いた。さらに算出した被験物質群、陽性対照群、陰性対照群の吸光度(OD₄₅₀ - OD₆₅₀)から、ブランクの値を差し引いた。それらの値を用いて、陰性対照群に対する被験物質群、陽性対照群の細胞生存率を求め、本試験における眼刺激性の判定に用いた。以下に各処理群の吸光度および細胞生存率の計算式を示す。

$$\text{測定値} = (A - B) - (C - D)$$

A :被験物質群、陽性対照群および陰性対照群の450 nmでの吸光度

B :被験物質群、陽性対照群および陰性対照群の650 nmでの吸光度

C :ブランクの450 nmでの吸光度

D :ブランクの650 nmでの吸光度

$$\text{細胞生存率 (\%)} = (\text{被験物質群の測定値} / \text{陰性対照群の測定値平均}) \times 100$$

7. 数値の取り扱い

各数値は次のように取り扱った。

数値の表示桁は以下の通りとし、表示された数値を用いて計算を行った。また、数値は必要とされる桁より1桁下の桁で四捨五入した。

各群における吸光度 :小数点以下3桁

細胞生存率、標準偏差 :小数点以下1桁

8. 試験成立の条件

本試験はOECDテストガイドライン492の基準¹⁾に従い、下記条件を試験成立条件とした。

- 1) 陰性対照群の吸光度測定値平均が0.5以上、1.6以下であること
- 2) 陽性対照群の細胞生存率が40%以下であること
- 3) 陰性対照、陽性対照を含む各被験物質群の細胞生存率の標準偏差が18%以下であること

9. 判定

被験物質の眼刺激性は、表1に示すOECDテストガイドライン492の判定基準¹⁾に沿って判定した。被験物質曝露条件下の細胞生存率が40%を超える場合を眼に対する、一定期間において非可逆的もしくは可逆的な眼損傷／刺激作用を有する「区分1」・「区分2」ではない「区分外」とした。平均細胞生存率が40%以下の場合は「区分1もしくは区分2」とした。

表1 眼刺激性GHS分類の判定

細胞生存率	被験物質のGHS区分
≤ 40%	区分1もしくは2
> 40%	区分外

試験結果

陰性対照群、陽性対照群および被験物質群の吸光度、細胞生存率の平均および標準偏差、被験物質の判定結果を別紙に記載した。

1. 試験成立

陰性対照群、陽性対照群、被験物質群およびブランクのOD₄₅₀およびOD₆₅₀を表2、細胞生存率を表3に示した。
陰性対照群の吸光度測定値平均が0.5～1.6の範囲内であった。また、陽性対照群の細胞生存率は40%以下であった。さらに、すべての処理群の細胞生存率の標準偏差が18%を下回った。これらより、本試験はOECDテストガイドライン492が規定する試験成立条件を満たした。

2. 結果

被験物質群のOD₄₅₀とOD₆₅₀を表2、細胞生存率を表3に示した。また、被験物質の眼刺激性GHS分類を表4に示した。

被験物質群の陰性対照群に対する細胞生存率は122.4 ± 7.4%を示し、40%を超えた。したがってOECDテストガイドライン492に沿った判定基準により、UN GHSが規定する危険有害性区分において眼に対する一定期間において非可逆的もしくは可逆的な眼損傷／刺激作用を有する「区分1」・「区分2」ではない、すなわち眼損傷／刺激作用を有する物質とは分類されない「区分外」に分類された。

参考文献

- 1) OECD Test Guideline 492, 2019.
- 2) EC EURL-ECVAM, 2014.
- 3) T. Mosmann., J. Immunol Methods., 65, 1-2, 55-63, 1983.
- 4) Labcyte Validation Management Team, Validation Report, 2017.
- 5) JaCVAM, JaCVAM Peer Review, 2017.

表2 ブランク、陰性対照、陽性対照および被験物質の吸光度

	OD ₄₅₀						OD ₆₅₀					
	各ウェルのデータ			平均	±	SD	各ウェルのデータ			平均	±	SD
	1	2	3				1	2	3			
ブランク	0.092	0.092	0.092	0.092	±	0.000	0.041	0.040	0.041	0.041	±	0.001
陰性対照	0.958	0.964	0.935	0.952	±	0.015	0.047	0.046	0.045	0.046	±	0.001
陽性対照	0.097	0.095	0.109	0.100	±	0.008	0.042	0.042	0.041	0.042	±	0.001
被験物質	1.210	1.135	1.085	1.143	±	0.063	0.045	0.046	0.046	0.046	±	0.001

SD: Standard deviation

表3 ブランク、陰性対照、陽性対照および被験物質の細胞生存率

	(OD ₄₅₀ - OD ₆₅₀) - ブランク (OD ₄₅₀ - OD ₆₅₀)						細胞生存率 (%)					
	各ウェルのデータ			平均	±	SD	各ウェルのデータ			平均	±	SD
	1	2	3				1	2	3			
ブランク	—	—	—	—		—	—	—	—	—		—
陰性対照	0.859	0.867	0.839	0.855	±	0.014	100.5	101.4	98.1	100.0	±	1.7
陽性対照	0.003	0.001	0.017	0.007	±	0.009	0.3	0.2	2.0	0.8	±	1.0
被験物質	1.114	1.038	0.988	1.046	±	0.063	130.3	121.4	115.6	122.4	±	7.4

SD: Standard deviation

表4 イオンブースターの眼刺激性GHS分類

眼刺激性GHS分類	
被験物質	区分外