

眼刺激性評価のためのフルオレセイン漏出試験法の評価会議報告

JaCVAM 評価会議

平成 24 年（2012 年）10 月 1 日

JaCVAM 評価会議

吉田武美（日本毒性学会）：座長
浅野哲秀（日本環境変異原学会）
五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部）
大島健幸（日本化学工業協会）
小笠原弘道（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）
小野寺博志（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）
黒澤 努（日本動物実験代替法学会）
杉山真理子（日本化粧品工業連合会）
西川秋佳（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター）
長谷川隆一（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）
牧 栄二（日本免疫毒性学会）
増田光輝（座長推薦）
横関博雄（日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会）
吉田 緑（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部）
吉村 功（座長推薦）
渡部一人（日本製薬工業協会）

任期：平成 24 年 4 月 1 日～平成 26 年 3 月 31 日

以上

本報告の評価対象は、OECD の Test Guideline 460 (TG 460) で説明されている眼刺激性評価のための Fluorescein leakage test method である^{1,2)}。

以下ではこの試験法を当該試験法と記すが、具体名が必要な場合は、「フルオレセイン漏出試験法」あるいは「FL 試験法」と記すことにする。

当該試験法は、単層の細胞層を通過する sodium fluorescein (Na-FL) 量を測ることで、被験物質による強度の眼刺激性と眼腐食性を代替的に評価するものである³⁻⁵⁾。今回、眼刺激性試験評価委員会からの報告²⁾を受け、以下の 10 項目について評価したので報告する。

< 審議内容 >

1. 当該試験法は、どのような従来試験法を代替するものか。または、どのような毒性を評価あるいは予測するものか。

当該試験法は、ウサギを用いたドレイズ眼刺激性試験法で評価されてきた毒性の一部である、強度眼刺激性と眼腐食性を検出するための代替法である。

TG 460 では、当該試験法で陽性とされた被験物質は、強度眼刺激性あるいは眼腐食性を示すが、当該試験法での陰性結果は、被験物質が強度眼刺激性あるいは眼腐食性物質でないことを示すものではないとしている。

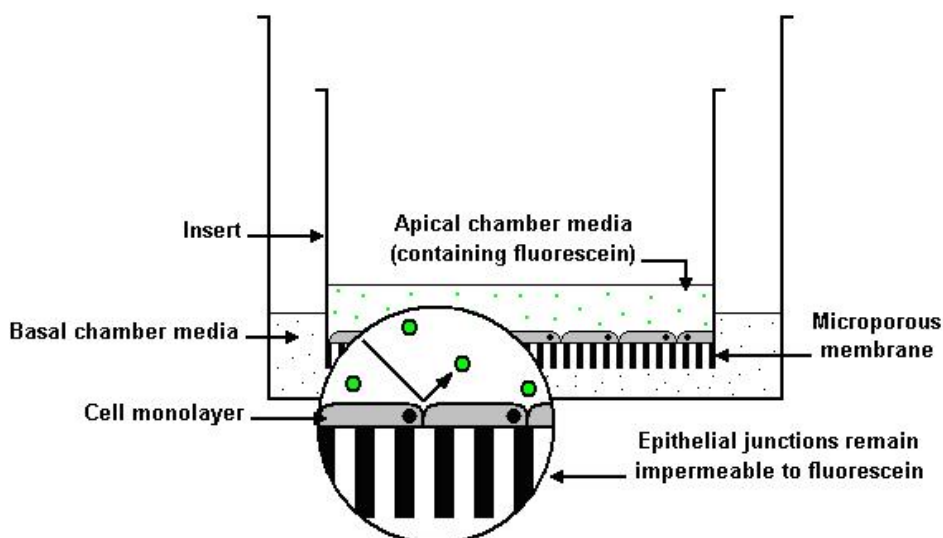
当該試験法は、トップダウン方式（末尾の用語集参照）による強度眼刺激性あるいは眼腐食性を検出する試験法である⁶⁾。

2. 当該試験法と従来試験法の間どのような科学的なつながりがあるか。

当該試験法は、インサート(別図参照)の内側に単層の細胞層を構築し、細胞層の上部に被験物質を曝露した後、細胞層の上部からフルオレセインを添加する。このフルオレセインの細胞層下部への漏出を測定することによって、被験物質による細胞への傷害や細胞間結合の脆弱化を評価するものである。

これに対してウサギを用いたドレイズ試験法は、被験物質の角膜、結膜、虹彩への傷害を、角膜 80 点、結膜 20 点、虹彩 10 点、最大が 110 点のスコアで評価している。

すなわち、ドレイズ試験法は、細胞間結合や細胞自身への傷害以外の損傷も評価しているという点で、当該試験法より多様な損傷を評価している。



3. 当該試験法とそのデータは、透明で独立な科学的評価を受けているか。

当該試験法の妥当性を示すデータは、J. Gartlon と R. Clothier によって background review document (BRD) としてまとめられており、そのデータの妥当性は、ECVAM によって透明で独立した評価を受けている。

4. 当該試験法は、従来試験法の代替法として、どのような物質又は製品を評価することを目的としているか。

当該試験法は、医薬品、医療機器、化粧品、医薬部外品、農薬など、ドレイズ眼刺激性試験法が適用される物質または製品の眼刺激性・眼腐食性を評価することを目的としている。

5. 当該試験法は、ハザード評価あるいはリスク評価のどちらに有用であるか。

当該試験法は、強度眼刺激性または眼腐食性を検出するものであるから、ハザード評価に有用であるが、リスク評価には利用できない。

6. 当該試験法は、目的とする物質又は製品の毒性を評価できるか。その場合、当該試験法の適用条件が明確になっているか。

当該試験法は、強度眼刺激性あるいは眼腐食性をトップダウン方式で検出する際に、最初の段階で実施される試験法である。

当該試験法で陽性の場合、毒性があると判断できるが、陰性の場合には、毒性がないと判断することはできない。陰性の場合に、その毒性がないことを確かめるには、他の試験法でさらに検討をすることが必要である。

適用可能な物質は水溶性物質に限られている。強酸、強塩基、組織固定液、強揮発性物質は適用外である。

7. 当該試験法はプロトコルの微細な変更に対して頑健であるか。

以下のことから、当該試験法は、プロトコルの微細な変更に対して頑健と考えられる。

- 1) 培養細胞として広く使用されている MDCK 細胞株を用いている。
- 2) 単層の細胞層が適切に構成されていることがフルオレセイン漏出の有無で容易に確認できる。
- 3) TG460 では特別な条件設定は見当らず、BRD にも特段の注意がない。

8. 当該試験法の技術習得は、適切な訓練と経験を経ている担当者にとって容易なものであるか。試験法の実施に特殊な設備が必要か。

単層の細胞層の構築以外は特殊技能が不要であり、特殊設備も不要である。

単層の細胞層の構築についても、TG 460 に詳細な説明があるので、適切な訓練と経験を経ている担当者であれば技術習得が容易である。

9. 当該試験法は、従来試験法と比べて時間的経費的に優れているか。

当該試験法は、ドレイズ眼刺激性試験法に比べて、時間的経費的に優れている。

10. 当該試験法は、動物福祉の観点及び科学的見地から、目的とする物質又は製品の毒性を評価する代替法として、行政上利用することは可能か。

当該試験法は、動物を用いずに強度眼刺激性・眼腐食性を評価できるので、動物福祉の観点から有用である。

目的とする物質又は製品の毒性を評価する代替法として、科学的見地から行政上利用することが可能である。

しかし、トップダウン方式でのみ利用可能であること、水溶性物質のみが適用可能であること、からその有用性は限定的である。

参考文献

- 1) 吉村功, 山本直樹: FL 試験法 (Fluorescein leakage test method ; フルオレセイン漏出試験法) の概要, JaCVAM 評価会議 (4, June, 2012)
- 2) Proposal for a New Test Guideline 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants.
- 3) Gartlon, J., Clothier, R.: Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing. Available under Validation Study Documents, Section Eye Irritation at [<http://ecvam.jrc.it>]
- 4) Gartlon, J., Clothier, R.: Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing: Appendices and Annexes. Available under Validation Study Documents, Section Eye Irritation at [<http://ecvam.jrc.it>]
- 5) Fluorescein Leakage (FL) Test DB-ALM Protocol no.71. Available under Validation Study Documents, Section Eye Irritation at [<http://ecvam.jrc.it>]
- 6) ECVAM Retrospective Validation Study on Cytotoxicity/Cell-Function Based in vitro Assays for the prediction of Eye Irritation: ESAC Peer Review. Available under Validation Study Documents, Section Eye Irritation at [<http://ecvam.jrc.it>]

用語集

トップダウン方式

一つの被験物質に対して複数の試験法を逐次適用する試験方式の一つ。前段階の試験法で毒性があると判定された場合は、それで試験を終了し、毒性が無いと判断された場合は、次段階の試験法を適用して、無毒性が真であるかどうかを確認するという毒性判定法。