

眼刺激性試験代替法フルオレセイン漏出試験法
(Fluorescein leakage test method ; FL 試験法) の
第三者評価報告書

2012年6月

眼刺激性試験代替法評価委員会

吉村 功 (東京理科大学)
山本 直樹 (藤田保健衛生大学)
小坂 忠司 (残留農薬研究所)
竹内 早苗 (P&G)
細井一弘 (参天製薬株式会社)
加藤雅一 (株式会社 J-TEC)
簾内 桃子 (国立医薬品食品衛生研究所)
増田 光輝 (国立医薬品食品衛生研究所)

まえおき

OECD は公に認めた毒性試験法について、試験ガイドライン (Test Guideline: TG) を作成し公開している。TG 編纂の主体は Working Group of National Coordinators of the Test Guideline Programme (WNT) である。

FL 試験法にはいくつかのプロトコルがある。WNT が焦点を当てて検討したのは、階層的試験方針で眼腐食性・強度眼刺激性を確認するトップダウン方式の INVITTOX Protocol No. 71 (プロトコル 71) と、階層的試験方式で眼刺激性が無いことを確認するボトムアップ方式の INVITTOX Protocol No. 120 (プロトコル 120) である。2011 年 4 月 12~14 日にパリの OECD 本部で行われた WNT 第 23 回会合に提出・検討されたのは、トップダウン方式のプロトコル 71 の TG 案 (Draft OECD Guideline for the Testing of Chemicals : Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants) であった。この TG 案は、同年 11 月 8 日の会合で修正され、12 月 5 日締め切りで意見公募が行われ、2012 年 4 月に改訂が検討され、6 月に最終案が提出された。

本報告では、主としてこの TG 案に基づいたフルオレセイン漏出試験法 (FL 試験法) の概要を紹介し、評価を行う。

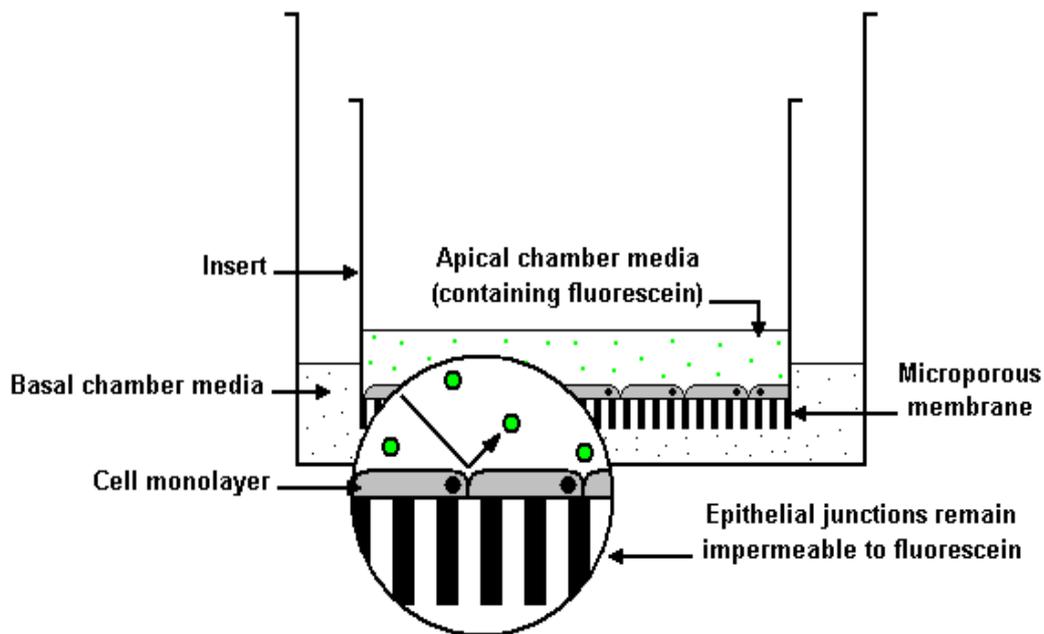
1. 試験法の位置づけ

FL 試験法は、眼腐食性・強度眼刺激性物質、すなわち UN-GHS, EU-CLP, U.S.-EPA でカテゴリー I の化合物・複合物 (以下、化学物質) を検出するためのインビトロ試験法である。強度眼刺激性物質とは、それに触れることで、21 日経っても回復しない眼組織傷害、あるいは、強度の視力損傷、を引き起こすものである。眼腐食性物質とは、眼に回復不能な組織傷害を与えるものである。上記 TG 案では、FL 試験法を、眼腐食性・強度眼刺激性を持つ水溶性物質をトップダウン方式で検出する際に、最初に用いる試験法としている。

2. 試験法の原理

いろいろな物質が眼の中に入るのを阻止するのは、角膜と結膜の重要な役割である。これは細胞間結合で制御されている。FL 試験法は、その傷害を測るために、透過性インサートの薄膜上に Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞、すなわち MDCK-CB997 尿細管上皮細胞を単層培養して、コンフルエント状態になっているモデルを用いる。試験では、フルオレセインナトリウム (sodium fluorescein; Na-F) が単層培養した細胞の間をどれだけ通過するかを測って、短時間の被験物質曝露による毒性発現を評価する。この Na-F 漏出量は、化学的に引き起こされた細胞間結合の損傷に比例するから、これで被験物質の眼刺激性が評価できる。

インサート薄膜上の MDCK 細胞の状態は下図の通りである。単層培養でコンフルエント状態になった MDCK はインサート内の半透過性薄膜上に生成されていて、インサートは 24 穴プレートの各ウェルに置かれている。



試験では、被験物質をインサートの薄膜上に形成された単層培養でコンフルエント状態の細胞に滴下する。滴下 1 分後に被験物質を払拭し、明るい蛍光を発する無毒性染料の Na-F を 30 分間、単層細胞の上に適用する。被験物質による細胞間結合の損傷は、この時間の間に単層細胞とインサートの薄膜を通過するフルオレセイン量 (fluorescein leakage; FL) で同定される。

単層細胞とインサートの薄膜を通過してウエル内の一定量溶液 (Basal chamber media) に届いた Na-F 量は、ウエル内のフルオレセイン濃度を分光蛍光光度計で測定することで得られる。すなわち、FL は、ブランク対照と最大通過対照 (maximum leakage control) におけるフルオレセイン強度値 (fluorescein intensity; FI) を参照して計算できる。被験物質の用量ごとに、対照との比較で、漏出率 (%), すなわち細胞間結合の損傷を測定する。無処理の単層培養でコンフルエント状態のインサートと無細胞のインサートにおける値と対比して 20% の FL が得られる濃度 FL_{20} (mg/mL) を計算する。この FL_{20} 値を眼腐食・強度眼刺激の確認に用いる。

3. 試験手順と結果の判定

3.1 細胞単層の作成

MDCK-CB997 細胞の単層培養は、DMEM/Nutrient Mix F12 を入れた細胞培養フラスコ内で培養されたサブコンフルエント状態の細胞を使って作成する。細胞間結合を完全にするために、FL 試験法での溶媒/溶液では、カルシウム濃度を常に 1.8mM (200mg/L) から 1.0mM (111mg/L) の間に収めておくことが重要である。

均一かつ再現可能な細胞間結合を生成するには、継代数をある範囲にしておくべきである。試験結果の再現性を確保するために、できれば、その継代数の範囲は解凍後

3～30 継代にするべきである。この範囲であれば細胞が類似した機能性を保つからである。

FL 試験法の実施に先立って、トリプシンを適用してフラスコから細胞を外し、解凍し、一定量を 24 穴プレート内のインサートに播種する。細胞を播種するインサートとしては、厚み 80 ～150 μm 、孔サイズ (pore size) 0.45 μm の混合セルロースエステル薄膜を持つ直径 12 mm のものを用いるべきである。バリデーションでは、Millicell-HA 12mm インサートが用いられた。インサートと膜タイプの性質は、細胞成長と化学結合に影響するので、他のインサートを用いるときは、§ 7.2 に示す熟達度確認用化合物 (proficiency chemicals) を使って同等性を確かめるべきである。

ある種の化学物質は Millicell-HA インサートの薄膜と結合して試験結果を説明しがたいものにする。たとえば塩化ベンザルコニウムなどのカチオンは、荷電薄膜と化学結合する傾向がある。インサート薄膜との化学結合は、化学的な曝露時間を増やして化学物質の毒性を過大に見せかける。しかし同時に、インサートの薄膜へのカチオンの化学結合が FL を物理的に減らし、化学物質の毒性を過小に見せかけることもある。いずれも結果の説明を困難にする。

化学結合の発現は、無細胞のインサートの薄膜を最大濃度の被験物質に曝露させた後で、標準時間、標準濃度の Na-F 染色を行うことで監視できる。Na-F 染色が起こったら、被験物質を払拭した後でインサート薄膜が黄色になるからである。細胞に被験物質を適用した結果が適切に説明できるためには、被験物質の化学結合の性質を知っておくことが必須である。

インサート上に播種した細胞は、化学物質曝露の際に、単層のコンフルエント状態を作っていないなければならない。一つのインサートに 1.6×10^5 個の細胞があるように、細胞には、濃度 4×10^5 cells/mL の懸濁液 400 μL を加えなければならない。この条件であれば、播種後 96 時間でコンフルエント状態の細胞単層が構成できる。

MDCK 細胞培養は、CO₂ 濃度が $5 \pm 1\%$ 、温度が $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で、湿度が保たれている培養器で行わなければならない。細胞がバクテリア、ウイルス、マイコプラズマ、真菌類に汚染されないように注意すべきである。

3.2 被験物質の適用と対照物質

被験物質の新鮮な保存溶液は実験ごとに用意し、30 分以内に使用しなければならない。被験物質は、血清蛋白結合を避けるために、1.0～1.8mM 濃度でカルシウムを含みフェノールレッドを含まない Hanks' Buffered Saline Solution (HBSS) 内に用意しなければならない。また、被験物質が HBSS に 250mg/mL まで溶解することを実験前に確かめておかななければならない。化学物質が、この濃度で、均一で 2 層には分かれていない安定した懸濁液・乳液状態を 30 分以上維持するのであれば、HBSS を溶剤として使うことができる。

化学物質がこの濃度で HBSS に可溶でないならば、FL 試験法とは異なる試験法を使うべきである。HBSS に不溶であるためにミネラルオイル (light mineral oil) を

溶剤とすると、FL 試験法が適切な結果をもたらすかどうか分からないからである。

被験物は、カルシウム (1.0~1.8mM) を含みフェノールレッドを含まない HBSS で 1, 25, 100, 250 mg/mL の 5 用量に調製された溶液と、原液又は飽和溶液である。

固体物質の場合は、750 mg/mL という高濃度も含める。この濃度のときは、ポジティブ・ディスプレイメント・ピペットで細胞に適用してもよい。25 mg/mL と 100mg/mL で毒性が発現したときは、1, 25, 50, 75, 100 mg/mL で 2 回再実験をしなければならない。1 mg/mL で毒性が発現したときは、0.10, 0.1, 0.25, 1, 10 mg/mL で 2 回再実験をしなければならない。

被験物は、培養液を除去した後で、除菌され、37°Cに温められている、カルシウムを含みフェノールレッドを含まない HBSS で 2 回洗浄したコンフルエント状態の細胞単層に適用する。実験では、用意された各濃度が、少なくとも 3 回反復して実験されなければならない。

室温で 1 分間曝露した後、注意して被験物を吸引除去し、滅菌して 37°Cに温められた、カルシウムを含みフェノールレッドを含まない HBSS を用いてコンフルエント状態の細胞単層を 2 回洗浄し、すぐ FL を測定する。

インサート上の単層培養された細胞の整合性と、実験での細胞の感度が過去の実績範囲内にあることを確かめるために、各実験実行 (run) には陰性対照 (NC) と陽性対照 (PC) を含めなければならない。

陽性対照としては、Brij 35 (CAS No. 9002-92-0) の 100 mg/mL の使用が勧められている。この濃度は、ほぼ 30% (20%~40%でよい) の FL をもたらすはずである。

陰性対照としては、カルシウムを含みフェノールレッドを含まない HBSS が勧められている。FL₂₀ を計算するには、最大漏出対照も各実験実行に含めることが必要である。最大漏出は無細胞インサート対照を用いて求める。

3.3 フルオレセイン通過性の検量

被験物質と対照物質を除去したら、直ちに十分な量の 0.1% (w/v) Na-F 液を Millicell-HA インサートに添加し、細胞を室温に 30 分間置いておく。フルオレセインを添加した培養の最後に、注意して各ウェルからインサートを取り除く。各フィルタを視認で検査し操作中に生じた損傷があったら記録する。

細胞単層とインサートを通過したフルオレセイン量はインサートを取り除いた後のウェルに残っている溶液で定量する。測定は、波長 485 nm と 530 nm の励起・放出波長の各々で、分光蛍光光度計を用いて行う。分光蛍光光度計の感度は最大 FL 値 (無細胞インサート) と最小 FL 値 (陰性対照) の差の最大値が含まれるようにしておかなければならない。使用する分光蛍光光度計の違いが影響しないように、最大漏出対照に対して、FI が 4000 を超えるように感度を定めておく。ただし、最大 FL 値は 9999 を超えないようにする。

3.4 結果の説明と予測モデル

被験物質の各濃度での相対的な FL 値，すなわち %FL 値は，各実験実行における陰性対照での FI 値と，最大漏出対照での FI 値を参照して，被験物質の FI 値から次のようにして計算する。

すなわち，反復実行に対する，最大漏出 FI の平均値を x とし，陰性対照での FI の平均値を y とすると，100%漏出の平均値 z は， $z = x - y$ となる。各用量で，単層を通過する FL の相対値，%FL は， $\%FL = [(m - y) / z] \times 100\%$ で計算する。ここで m は，各濃度での FI の 3 反復測定の前平均値である。

20%漏出に対応する用量 FL_{20} は，用量反応曲線の直線補間で求める。すなわち，20%より小さい %FL 値 B とそれをもたらしている用量 M_B ，及び 20%より大きい %FL 値 C とそれをもたらしている用量 M_C を調べ，次式で計算する。

$$FL_{20} = [(20 - B) / (C - B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

眼腐食性・強度眼刺激性の予測においては， $FL_{20} \leq 100 \text{ mg/mL}$ のとき，被験物質をカテゴリー I と判定する。すなわち，臨界値 (cut-off value) は 100 である。

3.5 結果の承認

最大漏出値 (x) は 4000 以上，0%漏出値 (y) は 300 以下，100%漏出値 (z) は 3700 と 6000 の間でなければならない。陽性対照の %FL が 20%から 40%の間であれば試験結果は承認できる。

4. 試験法の正確性

文献 1 によれば，水溶性で眼腐食性・強度眼刺激性の化学物質の偽陽性率は 7% (GHS と CLP で 7/103) から 9% (EPA で 9/99)，偽陰性率は 54% (EPA で 15/28) から 56% (GHS と CLP で 27/48) である。括弧内の比率表示における分母は，プロトコル 71 に基づくバリデーション研究に用いられた被験物質数，分子は判定が誤りであった被験物質数である。これより，バリデーション研究で得られた予測の正確度 (concordance rate) は，77.5% (GHS と CLP で 117/151) から 82.7% (EPA で 105/127) となる。

眼腐食性・強度眼刺激性を確かめるという目的に限定すれば，注目すべき値は，正確度や偽陰性率ではなく偽陽性率である。正確度が大きくないことや，偽陰性率が大きいことは重大な弱点でない。階層的試験方式と重み付け評価方式を用いる場合，後に続くインビトロ代替法で，FL 試験法で見逃された偽陰性物質が確認できるからである。

注：上記の数値は，文献 2, 3 に基づいて得られたものの筈である。ところがこれらの文献にあるデータ (文献 2 の Table 6.2.4.2.3) は，次のものである。EPA での

偽陽性率に「9% (9/99)」と「8.3% (9/109)」という食い違いがある。本評価委員会はまたその理由を確かめることができないでいる。文献 2 には他にも集計ミスがあるので、文献 1 の数値が正しいと感じられる。

分類システム	正確度	偽陽性率	偽陰性率
EU			
	77.9% (113/145)	7.1% (7/99)	54.3% (25/46)
GHS			
	77.5% (117/151)	6.8% (7/103)	56.3% (27/48)
EPA			
	82.5% (113/137)	8.3% (9/109)	53.6% (15/28)

上の表の数値は、次に示す 3 分類表（文献 2 の Tables 6.2.4.2.1 a, b, c）を後付け的に 2 分類に縮約したものである。後付けの宿命として、過大評価になっている可能性を認識しておくべきであろう。

判定	EU 分類				判定	GHS 分類				判定	EPA 分類		
	NC	R36	R41			NC	Cat2	Cat1			III/IV	II	I
NC	41	19	21		NC	36	24	14		III/IV	36	16	10
R36	12	20	13		Cat2	4	32	13		II	23	15	5
R41	4	3	21		Cat1	3	4	21		I	3	6	13
計	57	42	46		計	43	60	48		計	62	37	28

どのような化学物質で偽陽性が出やすいかということについては、データが見あたらない。

5. 試験結果の再現性

文献 2, 3 では、施設内再現性、技術移転性、施設間再現性を、過去の文献で得られるデータで多種多様な観点から検討をしている。しかし検討しているデータは、プロトコルの違いがあったり、検討対象の被験物質が界面活性剤に偏っているというような特性があったり、技術移転性と施設間再現性が交絡していたりして、総体としての結論が明らかでない。ここでは、プロトコル 71 に適用できると思われる結果を参考として示すだけにする。

5.1 施設内再現性

施設内で、単純反復の生データ (raw data) が入手できて、実験作業や反復について施設内再現性が検討できる場合について調べた結果では、FL₂₀ (mg/mL) の変動係数 (coefficient variation) の中央値及び平均値は、56.5%~63.2%であった。

5.2 技術移転性

プロトコル 71 に関して技術移転性を検討できるデータは、文献 4 の 60 化合物 4 施設の実験データである。そこでは FL₂₀ についての実験間ピアソン相関係数（計量値の相関係数）が報告されている。報告されている値は 0.167～0.778 であるが、相関係数の値が低いのは特定のある施設と他の施設の間だけである。問題の施設では、プロトコルが忠実に守られていなかったようである。再現性のある結果を得るには、プロトコルの曖昧さを減らすと同時に、プロトコルを忠実に守るトレーニングが必須である。細胞を処理する技術はそれほど困難なものではないからである。

5.3 施設間再現性

前記の文献 4 では FL₂₀ についての施設間の結果の乖離をピアソン相関係数で評価している。得られている値は 0.214～0.841 である。これについても前項で述べたことと同じで、特定のある施設が低い相関係数の源になっている。これをもって施設間再現性が悪いというのか、プロトコルが悪いというのか、それとも技術移転性が悪いというのか、結論は明らかでない。

6. 試験法の適用範囲

この試験法の適用対象は水溶性化合物のみである。文献 1 では、水溶性で、希釈によって毒性が変わらない強度眼刺激性物質は、この試験法で正確に確かめることができるとしている。

強酸・強塩基・定着薬・強揮発性物質はこの試験法の適用範囲外である。これらの化学物質は FL 試験法で評価できない仕組み、例えば、広範な凝固、鹼化・加水分解、ある種の特殊な化学反応等、を伴うからである。

着色性や粘着性のある被験物質も予測性を侵すので適用が妥当でない。これらのタイプの物質は、短時間曝露後に細胞単層から取り除くのが困難である。

液体中に懸濁している固体は、急速に沈殿する傾向があるので適用濃度を正確に定めることが困難である。化学的あるいは物理的にこれらの性質を持つ物質を評価から除外すると、EU, EPA, GHS のどのクラス分けシステムで評価しても、FL 試験法の性能は非常によい。

7. その他の注意

7.1 適切な技術移転が達成できたことを確かめるには、表 1 の熟達度確認用化合物を使う。

表1 熟達度確認用化合物

化合物	CAS 番号	化合物分類	物理性状	トリス試験の結果	FL 試験の結果
#1	8001-54-5	オニウム 化合物	液体	カテゴリー1	腐食性/強刺激性
#2	58-33-3	アミン/アミジン...	固体	カテゴリー1	腐食性/強刺激性
#3	1310-73-2	アルカリ	液体	カテゴリー1	腐食性/強刺激性
#4	151-21-3	カルボキシル酸 (塩)	液体	カテゴリー1	腐食性/強刺激性
#5	619-66-9	カルボキシル酸, ...	固体	カテゴリー2(A)	非腐食性/強刺激性
#6	6484-52-2	無機塩	固体	カテゴリー2(A)	非腐食性/強刺激性
#7	609-14-3	ケトン, エステル	液体	カテゴリー2(B)	非腐食性/強刺激性
#8	56-81-5	アルコール	液体	カテゴリー無	非腐食性/強刺激性

#1: Benzalkonium chloride (5%), #2: Promethazine hydrochloride, #3: Sodium hydroxide (10%), #4: Sodium lauryl sulfate (15%), #5: 4-carboxy-benzaldehyde, #6: Ammonium nitrate, #7: Ethyl-2-methylaceto-acetate, #8: Glycerol

CAS 番号 : Chemical Abstract Service Registry Number

7.2 実験での注意点

MDCK 細胞の培養には特別な技術的制約がある。Na-F が単層培養でコンフルエント状態になった細胞間の通過を阻止する細胞間結合は、培養継代数が増えると弱まる傾向がある。不完全に形成された細胞間接合は無処置対照で FL を増加させる。細胞は時間経過と共に変異するので、実験では、許容できる培養継代数を定めて置くことが必要である。

8. FL 試験法の概要の本委員会としての結論

日本の施設で確認した実験データがないので外国文献上のデータを信用して評価すると、FL 試験法の偽陽性率は、水溶性で眼腐食性・強度眼刺激性の化合物に限定したとき、7% (GHS と CLP で 7/103) から 9% (EPA) である。FL 試験法はこの性能で十分と思われる目的に対して、トップダウン方式の最初の段階で用いることが許される試験法である。

トップダウン方式で用いるのであれば、偽陽性率は小さい方が望ましい。陽性であるという判定の臨界値を小さくすることで、偽陽性率を小さくすることは今後の検討課題である。

本委員会は、FL 試験法の日本語訳として、フルオレセイン漏出試験法 (FL 試験法と略記) を提案する。

9. 文献

1. OECD WNT, 2011. Revised draft OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants.
2. Gartlon, J., Clothier, R., 2008. Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.
3. Gartlon, J., Clothier, R., Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing: Appendices and Annexes.
4. Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H., Spielmann, H., 1995. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicology In Vitro*, 9(6): 871-929.

10. 用語

UN-GHS : Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals by the United Nation (国連による化学物質の分類とラベル付けの世界統一システム) の省略形である。これは、有害作用情報を伝えることで、雇用者、労働者、輸送者、消費者、事故被害者等の人々と環境を護ろうとして、図表示・用語警告・危険声明・警戒宣言・安全情報シートなどの伝達手段を用いて、物理的・健康的・環境的危険の、標準化されたタイプとレベルに応じて、化学物質をクラス分けするシステムである。このシステムのカテゴリー I (GHS Category I) は、これに属する被験物質を眼の表面に適用したとき、21 日経っても完全には回復しない眼組織損傷、あるいは視力障害をもたらすことで特徴付けられる。

EU-CLP : European Commission Regulation on the Classification, Labelling and Packaging of Substance and Mixtures の省略形である。化学物質分類の UN-GHS システムを欧州に導入したものである。

EPA Category I : 米国環境保護庁 (Environmental Protection Agency) が定めているクラス分けのカテゴリー I のことで、その内容は、21 日以上にわたって、腐食 (眼組織を回復できないように破壊すること)、角膜関連損傷、あるいは刺激をもたらす化学物質である。