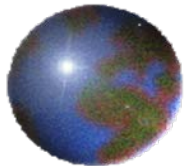


*JaCVAM*第2回ワークショップ

眼刺激性試験

Short Time Exposure (STE)
バリデーション研究

花王株式会社
安全性評価研究所
坂口 斉

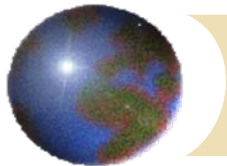


眼刺激性試験代替法の状況

- ウサギを用いるDraize試験の代替法として多くの試験法が開発
(細胞毒性: NRU、細胞機能: FL、再構成組織モデル: EpiOcular、
器官: HET-CAM、摘出器官: BCOP)

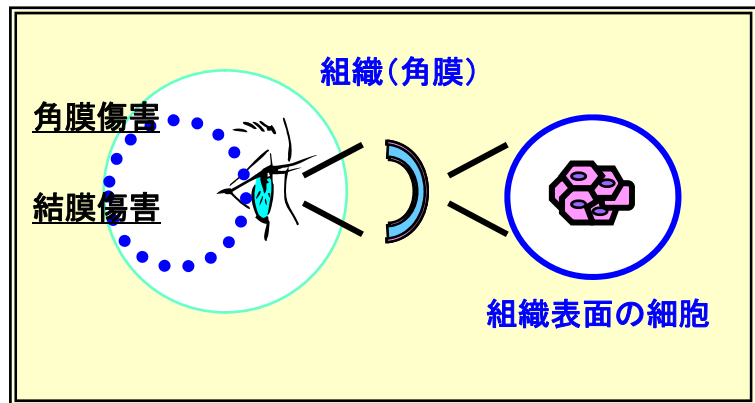
細胞毒性	再構成組織モデル	器官	摘出器官
(ウサギ角膜細胞株)	(ヒト角膜細胞)	(卵)	(ウシ角膜)

- 1980年代後半から日米欧で多くのバリデーションが実施
(1987 SDA、1990 CTFA、1991 EU/HO、1991 厚生科学研究、
1992 日本動物実験代替法学会、1995 COLIPA等)
- OECDテストガイドラインとして認められた試験法はない
(ESACはBCOP、ICEを腐食性及び強刺激物の評価法として承認)



新たな眼刺激代替法の開発

試験法開発の着眼点



1. 接触は短時間

50 μ L点眼時の排出時間(Motoseら 1984)
ヒト: 1~2分、ウサギ: 3~4分(80%排出)

眼内滞留時間は短時間(約5分)

2. 接触する部分は最表面の細胞

細胞傷害→眼刺激性発現

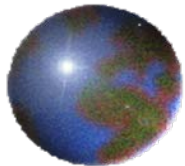
実際の曝露状況を考慮した
短時間(5分)曝露の細胞毒性試験を開発
Short Time Exposure (STE)

試験法開発

バリデーション

公的機関
によるレビュー

ガイドライン化
OECD



STE: Short Time Exposure (短時間曝露試験)

Takahashi et al., 2008 22, 760-770

細胞培養

試料曝露

生細胞測定

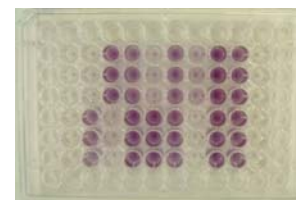
SIRC細胞

ウサギ角膜由来
株化細胞

5 分間

濃度: 5%、0.05%
溶媒: *

色素生成量測定
(MTT法)



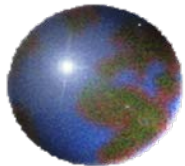
細胞生存率(%)

$$\frac{\text{サンプル群の色素量}}{\text{対照群の色素量}} \times 100$$

3回の実験の平均

*: 溶解性により溶媒を選択

生理食塩水、5%DMSO添加生理食塩水、ミネラルオイル



STE試験の眼刺激性区分と予測モデル

眼刺激性区分

	Non Irritant (NI)	Irritant (I)
細胞生存率	$> 70\%$	$\leq 70\%$

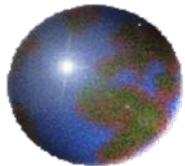
予測モデル

CV: cell viability

5%	スコア	0.05%	スコア
$70\% < CV$	0	$70\% < CV$	1
$70\% \geq CV$	1	$70\% \geq CV$	2

5%スコア + 0.05%スコア = STEランク

1: 弱い刺激 2: 中等度の刺激 3: 強度の刺激



STE試験結果とGHSとの対応性評価

1. STE試験(5%)とGHSの非刺激物、刺激物の一致性を評価

GHS (Draize 100%)	STE(5%)	
	NI (> 70)	I (≤ 70)
NI		
I (Cat. 1と2)		

NI: 無刺激物

Cat. 1: 不可逆的の刺激物

Cat. 2: 刺激物

2. STE試験(5%、0.05%)のランク分類とGHS区分の一致性を評価

STE試験ランク分類

STEスコア

5%	スコア	0.05%	スコア
70 < CV	0	70 < CV	1
70 ≥ CV	1	70 ≥ CV	2

CV: 細胞生存率



5%スコア + 0.05%スコア = STEランク

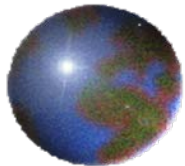
眼刺激性ランク

GHS Rank	STE Rank		
	1	2	3
NI			
Cat. 2			
Cat. 1			

Category 2: 刺激物

Category 1: 不可逆的の刺激物

□ 1 : 弱い刺激 □ 2 : 中等度の刺激 □ 3 : 強度の刺激



STE試験バリデーション研究

- 日本動物実験代替法学会のもとで実施(バリデーション委員会サポート)
- 研究施設：5施設(カネボウ化粧品、コーセー、ポーラ化成、ピアス、ライオン)
- 研究期間：2008年4月～2009年3月
- 目的と方法

1. 技術易習得性を確認する

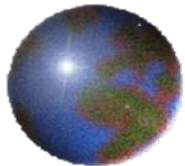
標準物質3化合物(Sodium lauryl sulfate、Calcium Thioglycollate、Tween80)の評価

2. 施設間再現性を評価する

各施設が盲検試料(25化合物)を試験し、施設間再現性を評価

3. 眼刺激予測性を評価する

各施設が盲検試料(25化合物)を試験し、Globally Harmonized System(GHS)の刺激区分との一致性を評価



STE試験バリデーション実行委員会

- ・試験プロトコルの審議と決定
- ・試験計画書の審議と決定

- ・被験物質候補の審議
- ・データ解析内容の確認

- ・研究結果の公表

VMT (Validation Management Team)

実行委員長(坂口)

- ・バリデーション運用管理の責任者
- ・試験計画書の草稿作成
- ・試験プロトコルの草稿作成
- ・被験物質案作成
- ・被験物質の最終選定
- ・参加企業との連絡、調整
- ・報告書の作成
- ・定期会議の実施

データ解析委員 (大森*、寒水*)

- ・結果の解析
(データ解析)

会計(谷川*)

- ・費用の管理

被験物質管理委員(森本*)

- ・被験物質の最終選定案作成
- ・被験物質の最終選定
- ・被験物質のコード化
- ・被験物質の管理、分配

試験開発責任者(高橋)

- ・技術講習会の実施
- ・技術援助

実験記録管理委員(若栗)

- ・被験物質調製記録用紙、
データ記入シートなどの
作成、配布、管理
- ・記録用紙、
データシートの回収

実験施設

カネボウ化粧品

実験施設

コーセー

実験施設

ピアス

実験施設

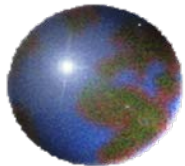
ポーラ化成工業

実験施設

ライオン

STE試験実施(試験法の技術易習得性、施設間再現性を確認)、記録用紙、データの提出

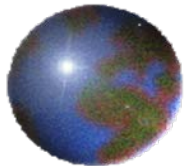
*: 日本動物実験代替法学会バリデーション委員



バリデーションスケジュール



期日	項目
08年4月	第1回 実行委員会開催(4/11)
	各委員の選出と承認、試験プロトコールと研究計画案の読み合わせ
5月	STE技術講習会(5/29)、第2回 実行委員会開催(5/29)
6月	Sodium lauryl sulfateを用いた試験法の習得、標準物質の配布、標準物質の評価
7月	第3回 実行委員会開催(7/23)、標準物質を用いた技術易習得性確認
8月	被験物質の配布(盲検試料12化合物)
9月	Phase I 実施
10月	Phase I(盲検試料12化合物)結果解析
	第1回 VMT会議/第4回 実行委員会開催(10/31)
11月	被験物質の配布(盲検試料13化合物)、Phase II 実施
	日本動物実験代替法学会にてポスター発表
12月	Phase II(盲検試料13化合物)結果解析
09年1月	第2回 VMT会議/第5回 実行委員会開催(1/19)、盲検試料のコード開示
3月	Society of Toxicologyにてポスター発表(アメリカ、ボルチモア)



STE試験技術講習会

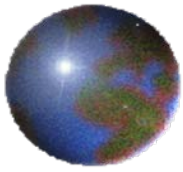
- 日時 & 場所: 2008年5月29日、13:00-16:00、カネボウ化粧品
- 参加施設: バリデーション研究施設 + 参加を希望した施設

10施設から17名

- 目的: STE試験法を理解する
- 講習会の内容

- ① 開会の挨拶 実行委員長
- ② STE技術講習会の進め方
- ③ インストラクター紹介/グループ分け(3グループ)
- ④ インストラクターによる実技と説明/試験操作手順
の実際(溶媒の選択、試料調製、試験操作など)
- ⑤ 参加者による実技操作
- ⑥ データシートの使い方
- ⑦ 質疑応答



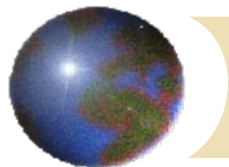


標準物質3化合物の評価結果

評価施設のデータは背景データと

- 3化合物の各濃度における平均生存率がほぼ同じ
- 2濃度の生存率によるランクがすべて同一

STE試験の技術易習得性が確認された



盲検試料25化合物

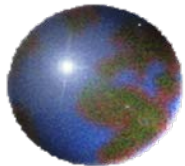
- HCE (ヒト角膜3次元モデル) のprevalidation済み20化合物
Goethemら、2006 Toxicology in Vitro 20, 1-17.
- EpiOcular (ヒト角膜3次元モデル) で評価済み5化合物
- GHS分類 (NI: 13化合物, Cat. 2: 7化合物, Cat. 1: 5化合物)
- 同一ロット品を評価施設に配布

Phase I (12)

code	Test Chemicals	GHS
A	3-Methoxy-1,2-propanediol	NI
B	Polyethylene glycol 400	NI
C	Glycerol	NI
D	Tween20	NI
E	Ethanol	2
F	Sodium hydroxide	1
G	Triton X-100	1
H	Cetylpyridinium bromide	1
I	Benzalkonium Chloride	1
J	Methyl amyl ketone	NI
K	2-Methyl-1-pentanol	2
L	n-Hexanol	2

Phase II (13)

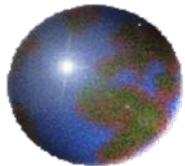
code	Test Chemicals	GHS
M	3,3-Dimethylpentane	NI
N	Methyl cyclopentane	NI
O	Methyl isobutyl ketone	NI
P	Toluene	NI
Q	1-Octanol	2
R	2-Ethyl-1-hexanol	2
S	Acetone	2
T	Cyclohexanol	1
U	n,n-Dimethylguanidine sulfate	NI
V	2-Ethylhexyl p-dimethyl-amino benzoate	NI
W	Gluconolactone	NI
X	Methyl ethyl ketone	2
Y	Propylene glycol	NI



細胞生存率から求めた散布図

各施設のプロットは同様の箇所集中しており、
施設間再現性が概ね良好

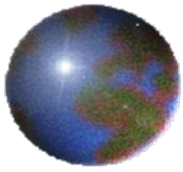
(Methyl amyl ketone, 2-Ethyl -1-hexanol, Gluconolactone,
Methyl ethyl ketoneは施設間でランクが異なった)



STE(5%データ)とGHS刺激区分との対応性

STE試験の刺激性区分とGHSの区分は、

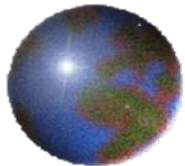
- 良く対応
- 施設間でほぼ同じ結果



STE (5%, 0.05%データ)によるランクとGHSとの対応性

STE試験によるランクとGHSの区分は、

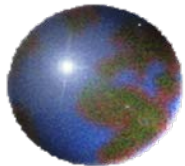
- 良く対応
- 施設間でほぼ同じ結果



施設内再現性(溶媒、陽性対照評価結果)

- 溶媒(生理食塩水、5%DMSO添加生理食塩水、Mineral oil)
- 陽性対照(SLS 0.01%)
- 各試験毎に評価したこれらサンプルで施設内再現性評価

施設内再現性は良好

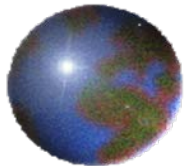


まとめと今後

- 標準3化合物の評価結果から、技術易習得性が確認された
- 盲検試料25化合物での5施設間再現性は、良好であった
- 盲検試料25化合物の眼刺激予測性は、充分高かった
- 施設内再現性も良好であった

STE試験の技術易習得性及び高い施設内／施設間再現性、予測性が確認でき、STE試験は有用な in vitro試験法と考えられた

- バリデーション報告書を作成
- 論文投稿
- ピアレビューへの準備



謝辞

日本動物実験代替法学会

- | | |
|--------|--------------------------|
| 大森 崇 | (京都大学大学院医学研究科医療統計学分野) |
| 寒水 孝司 | (大阪大学臨床医工学融合研究教育センター) |
| 若栗 忍 | ((財)食品薬品安全センター 細胞毒性学研究室) |
| 森本 隆史 | (住友化学株式会社 生物環境科学研究所) |
| 谷川 浩子 | (株コーセー 基礎研究所) |
| 高橋 豊 | (花王株式会社 安全性評価研究所) |
| 桑原 裕史 | (株カネボウ化粧品 製品保証研究所) |
| 林 卓巳 | (株カネボウ化粧品 製品保証研究所) |
| 中西 美樹 | (株コーセー 基礎研究所) |
| 岡本 裕子 | (株コーセー 基礎研究所) |
| 高木 裕美 | (ピアス株式会社 安全性研究所) |
| 判治 貴之 | (ピアス株式会社 安全性研究所) |
| 太田 尚子 | (ポーラ化成工業(株) 品質研究部) |
| 坂口 眞由美 | (ポーラ化成工業(株) 品質研究部) |
| 中村 恒彰 | (ライオン株式会社 安全性評価センター) |
| 渡辺 真一 | (ライオン株式会社 安全性評価センター) |