

博士論文

眼刺激性試験代替法

Short Time Exposure (STE) 法の

適用範囲拡大と混合物評価に関する研究

(Study on expanding the applicability domain and
evaluating mixtures for eye irritation potential using
the Short Time Exposure (STE) test method)

横浜国立大学大学院

工学府

板垣 研究室

15SA608

安保孝幸

2018年9月

Abbreviations

ATCC	American Type Culture Collection
BCOP	Bovine Corneal Opacity and Permeability
CAM	Chorioallantoic membrane
CAS	Chemical Abstracts Service
CO ₂	Carbon dioxide
CT	Calcium thioglycolate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DRD	Draize eye test Reference Database
ECETOC	European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals
ECHA	European Chemicals Agency
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EPA	United States Environmental Protection Agency
EPI	Estimation Programs Interface
EU	European Union
FBS	Fetal Bovine Serum
FL	Fluorescein Leakage
FNR	False-negative rate
FPR	False-positive rate
GHS	Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
GD	Guidance Document
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCE	Human Corneal Epithelium
HCl	Hydrochloric acid
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
ICE	Isolated Chicken Eye
JaCVAM	Japanese Center for the Validation of Alternative Methods
JSAAE	Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MEM	Minimum Essential Media
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide
NC	No Category
NICEATM	National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PBS	Phosphate Buffered Saline
RhCE	Reconstructed human Cornea-like Epithelium
SD	Standard deviation

SIRC	Statens Seruminstitut Rabbit Cornea
SLS	Sodium lauryl sulfate
SRD	Summary Review Document
STE	Short Time Exposure
TG	Test Guideline
TW80	Tween 80
UN	United Nations

目次

序論

1. 従来の眼刺激性評価と動物実験禁止の動き	P 5
2. <i>in vitro</i> 試験法開発の歴史と OECD 毒性試験ガイドライン	P 9
3. 眼刺激性試験代替法 Short Time Exposure (STE) 法の開発背景と有用性	P13
4. 混合物の眼刺激性評価の重要性	P17
5. 本研究の目的	P17

第二章 STE 法による高揮発性物質の眼刺激性評価

本章における検討の背景と課題	P20
----------------	-----

検討結果

1. STE 法標準プロトコールで実施した試験結果	P20
2. 溶媒をミネラルオイルに変更して実施した試験結果	P25
3. 溶媒間における高揮発性物質の揮発の影響	P27
4. 溶媒間における高揮発性物質の細胞への到達性	P30
5. 高揮発性物質を含めた化学物質の GHS NC / Irritant の予測性	P30

考察	P43
----	-----

第三章 STE 法による油溶性混合物の眼刺激性評価

本章における検討の背景と課題	P47
----------------	-----

検討結果

1. 油溶性混合物の GHS NC / Irritant の予測性	P47
-----------------------------------	-----

考察	P50
----	-----

第四章 混合物の眼刺激性評価における STE 法の技術移転性と施設間再現性

本章における検討の背景と課題	P51
----------------	-----

検討結果

1. 技術移転性の検証	P51
-------------	-----

2. 混合物を用いた施設間再現性の検証	P54
---------------------	-----

考察	P58
----	-----

第五章 総括及び結論

	P60
--	-----

謝辞

	P62
--	-----

実験の詳細

	P63
--	-----

参照文献

	P74
--	-----

付記

	P83
--	-----

序論

1. 従来之眼刺激性評価と動物実験禁止の動き

ヒトの眼に接触する可能性のある化粧品や農薬、眼に直接接触させる医薬品の開発時に眼刺激性は重要な評価項目の一つである。特に、化粧品は一般的に広く入手可能なものであり、誤使用により眼に入る場合や使用時に跳ねて眼に入るような突発的な事故が想定される。従来化粧品の眼刺激性試験において、ウサギを用いた *in vivo* Draize 試験が用いられ、角膜混濁の程度とその影響した面積、虹彩損傷性、結膜の発赤、浮腫、分泌物を指標に計 110 点で評価されてきた (Draize *et al.*, 1944)。眼の損傷が重篤な場合は失明の恐れがあるため、表 1 に示すように、特に角膜を重視して評価されてきた。

ウサギの眼に被験物質を投与し、経時的に以下の項目を確認、スコア化

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

以下の式によりスコアを算出 (計110点)

$$\text{角膜混濁「程度} \times \text{面積} \times 5\text{」} + \text{虹彩「虹彩損傷} \times 5\text{」} + \text{結膜「(発赤} + \text{浮腫} + \text{分泌物)} \times 2\text{」}$$

表1 ウサギを用いた Draize 試験の評価項目

Draize 試験によって評価される項目を示した。角膜混濁は混濁の程度 (最大 4 点) とその面積 (最大 4 点) から「程度×面積×5」の計算式によって最大 80 点で評価される。虹彩はその損傷 (最大 2 点) から「虹彩損傷×5」の計算式によって最大 10 点で評価される。結膜は発赤 (最大 3 点)、浮腫 (最大 4 点)、分泌物 (最大 3 点) から「(発赤+浮腫+分泌物)×2」の計算式によって最大 20 点で評価される。

通常の Draize 試験は最大観察期間が 21 日間であり、異物が眼に入った際の急性影響だけでなく遅延影響も考慮されてきた。また、眼の損傷はその重篤度だけでなく回復性も一つの指標として評価されてきた。例えば、影響は小さくても 21 日間で回復しない眼刺激性と影響は強いが 7 日間で完全に回復する眼刺激性は異なると解釈される。その他には、実際の状況を反映して、眼に異物が混入しても洗眼することで影響が軽減するかの確認も行われてきた (OECD, 2002; UN, 2015)。さらに 2003 年には Draize 試験により得られたスコアを用いて眼への損傷とその重篤度を一定の基準で区分するように国際連合 (United Nations; UN) が Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) を発行した。GHS では眼刺激性を「眼に対する重篤な損傷性を誘発する化学品 (Category 1; Cat. 1)」、「眼に対する刺激性を誘発する化学品 (Category 2; Cat. 2)」及び「眼に対する重篤な損傷性にも眼刺激性にも分類を要しない化学品 (No Category; NC)」と区分している。また、Cat. 2 の細区分として 7 日間で完全に回復するかを指標に、7 日間で回復しない影響を Cat. 2A、7 日間で回復する影響を Cat. 2B としている。表 2 に眼刺激性 GHS の区分方法詳細を示した。

GHS区分	ウサギを用いた試験での条件	区分の条件
Category 1 強度眼刺激性、 腐食性	パターン1 角膜、虹彩、結膜に不可逆的な症状が発現し、 21日目までに回復しない または、 角膜スコア4がいずれかの時点で確認される パターン2 1, 2, 3日目のスコアの平均が CO \geq 3 and/or IR \geq 1.5	<ul style="list-style-type: none"> パターン1が1匹以上あてはまる パターン2が<u>3匹中2匹以上*</u>あてはまる
Category 2A 中等度眼刺激性	1, 2, 3日目のスコアの平均が 下記のいずれかを満たし、 21日目までに完全に回復する CO \geq 1 but $<$ 3 IR \geq 1 but $<$ 1.5 CR \geq 2 CC \geq 2	<ul style="list-style-type: none"> 左記の条件が<u>3匹中2匹以上*</u>あてはまる 3匹中1匹が左記の条件を、 1匹が2Bの条件にあてはまる
Category 2B 中等度眼刺激性	1, 2, 3日目のスコアの平均が 下記のいずれかを満たし、 7日目までに完全に回復する CO \geq 1 but $<$ 3 IR \geq 1 but $<$ 1.5 CR \geq 2 CC \geq 2	<ul style="list-style-type: none"> 左記の条件が<u>3匹中2匹以上*</u>あてはまる
No category 区分外	上記のいずれも満たさない	<ul style="list-style-type: none"> 左記の条件が<u>3匹中2匹以上*</u>あてはまる

*: 「3匹中2匹以上」は、ウサギの数が3匹以上の場合、4匹中3匹以上、5匹中3匹以上、6匹中4匹以上のように全体のウサギの数の2/3以上を指す。
CO: Corneal opacity (角膜混濁), IR: Iritis (虹彩損傷), CR: Conjunctival redness (結膜発赤), CC: Conjunctival chemosis (結膜浮腫)

表 2 Draize 試験の結果を用いた GHS 区分方法

各 GHS 区分の評価基準を示した。Cat. 1 は、角膜、虹彩、結膜への影響が観察期間 21 日間で完全に回復しない場合、またはいずれかの観察時点で角膜への影響が 4 点以上の影響が確認され、その影響が試験された全個体中 1 個体以上に認められると Cat.1 となる。または被験物質投与 1 日後 (24 時間後)、2 日後 (48 時間後)、3 日後 (72 時間後) の「角膜混濁の平均スコアが 3 以上」及び「虹彩損傷の平均スコアが 1.5 以上」といずれかの影響が確認され、その影響が 3 個体中 2 個体以上に認められると Cat. 1 となる。

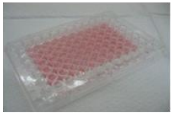

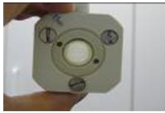
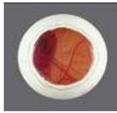
Cat. 2 は、被験物質投与 24 時間後、48 時間後、72 時間後の「角膜混濁の平均スコアが 1 以上 3 未満」、「虹彩損傷の平均スコアが 1 以上 1.5 未満」、「結膜発赤の平均スコアが 2 以上」及び「結膜浮腫の平均スコアが 2 以上」といずれかの影響が確認され、その影響が 3 個体中 2 個体以上に認められると Cat. 2 となる。また Cat. 2 の影響が 21 日までに完全に回復する場合を 2A とし、7 日までに完全回復する場合を 2B とする。

NC は Cat. 1 及び Cat. 2 の条件を満たさない場合である。

しかし、近年の動物愛護の波及や EU 化粧品指令による化粧品開発における動物実験禁止を受け (Directive 2003/15/EC, 2003)、Draize 試験を代替する *in vitro* 試験法の開発が進められてきた (Eskes *et al.*, 2005)。動物実験禁止の動きは EU を始め世界中に波及しており、米国、一部のアジア地域や中東地域においても化粧品開発の動物実験は禁止されている。日本においては、法規制ではないものの、多くの化粧品企業が自主的に自社開発の原料や製品を動物実験せずに開発することを公式に発表している。

2. *in vitro* 試験法開発の歴史と OECD 毒性試験ガイドライン

眼刺激性は異物が眼に接触した時点から始まり、角膜細胞の膜融解や凝固により発現することが知られている (Maurer *et al.*, 2002; McNamee *et al.*, 2009)。そのため、Draize 試験を代替する *in vitro* 試験法として、1980 年代から、単層培養した株化細胞を用いる方法、再構築角膜モデルを用いる方法、摘出角膜または眼球を用いる方法、鶏卵の漿尿膜 (Chorioallantoic membrane; CAM) を用いる方法などが開発されてきた (Eskes *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2010)。表 3 は眼刺激性試験代替法の主な試験種と特徴を示している。

試験種	単層培養細胞  FL、STE	3D角膜モデル(RhCE)  EpiOcular™, SkinEthic™HCE	摘出角膜・眼球  BCOP, ICE	漿尿膜  HET-CAM, CAMVA
長所	<ul style="list-style-type: none"> ・ 簡便、低コスト ・ 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"> ・ 油溶性物質の 評価不可 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 高偽陽性率 ・ 入手性低く、高価 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 高偽陽性率 ・ 組織供給に課題 	<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

表 3 眼刺激性試験代替法の主な試験種と特徴

これまでに開発されてきた眼刺激性試験代替法の主な 4 種類の試験法と特徴を示している。単層培養細胞の試験は株化細胞を用いるため、入手すればその後は継代培養により半永久的に使用可能である。また試験方法も一般的な細胞培養技術と分光光度計があれば、すぐに試験を導入可能である。一方で被験物質を水溶性の培地に溶解させて試験するため、油溶性物質の評価ができない。Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) の試験は被験物質を直接暴露できるため、溶媒への溶解性を問わず様々な物質を評価可能であるが、刺激性のない物質を刺激性として評価する偽陽性率が高い。またその RhCE モデルは開発元による受注生産となるため入手性が低く、高価である。摘出角膜・眼球の試験は RhCE の試験の特徴に加えて組織を包埋して組織学的にも評価可能である。一方で偽陽性率が高いことや、組織入手先が少なく、試験を実施する施設と離れていると新鮮な組織を入手できないといった供給に関する課題がある。漿尿膜の試験も RhCE の試験と摘出角膜・眼球の試験と同様の特徴を持つが、神経組織が未発達の有精卵を使用するものの、有精卵を使用することから、動物かどうかの議論が続けられている。

単層培養細胞を用いる試験法は簡便で経済的である一方、培地を用いて暴露するため油溶性物質の評価はできない。油溶性物質を評価可能な試験法として、被験物質を未希釈で暴露可能な試験法である再構築角膜モデル、牛や鶏等の摘出角膜や受精鶏卵の漿尿膜を用いる試験法がある。しかしながら、これらの試験法は眼刺激性が陰性の物質を陽性として誤って評価する偽陽性率が高いという課題がある。*in vitro* 試験法を用いて眼刺激性を評価する際に各試験法の特徴を理解して、被験物質の特性に合った試験方法を選択せねばならない。また、単一の *in vitro* 試験法で *in vivo* の Draize 試験を代替することは現在のところ困難であるため、複数の試験方法を組み合わせて評価する方法が推奨されている (McNamee *et al.*, 2009)。複数の *in vitro* 試験法の理解と特徴に基づいた組み合わせ評価によって Draize 試験を完全代替する試みが様々な研究者によって取り組まれている (Hayashi *et al.*, 2012; Adriaens *et al.*, 2017a, 2017b)。これらの研究は、経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD) の評価指針として知られる Guidance Document (GD) にも記載されている (OECD, 2017)。*in vitro* 試験法の開発において、開発初期に方法の最適化や予測性を検討する。その後、同施設内における結果の再現性や複数施設における施設間再現性を経て、第三者機関による評価 (peer review) により試験法の頑健性を確認する。これまでに、OECD の毒性試験ガイドライン (Test Guideline: TG) に収載された眼刺激性試験代替法として、ウシ摘出角膜を用いる Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) 法 (TG437)、鶏眼球を用いる Isolated Chicken Eye (ICE) 法 (TG438)、単層培養したイヌ腎臓尿細管上皮株化細胞 Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) を用いる Fluorescein Leakage (FL) 法 (TG460)、単層培養したウサギ角膜由来株化細胞 Statens Seruminstitut Rabbit Cornea (SIRC) を用いる Short Time Exposure (STE) 法 (TG 491)、ヒト角膜様に重層化培養

した培養角膜モデルを用いる Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) 法 (TG492) がある (OECD 2012, 2013a, 2013b, 2015a, 2015b)。BCOP 法、ICE 法、STE 法は、UN GHS で、Cat. 1 及び NC を区分可能な試験法とされている。また、FL 法は Cat.1 を区分可能な試験法であり、RhCE 法は NC を区分可能な試験法とされている。なお、既存の眼刺激性試験代替法の中で Cat. 2A と 2B の細区分だけでなく、Cat. 2 を区分可能な *in vitro* 試験法はない (表 4)。

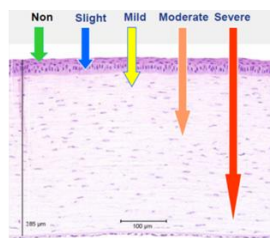
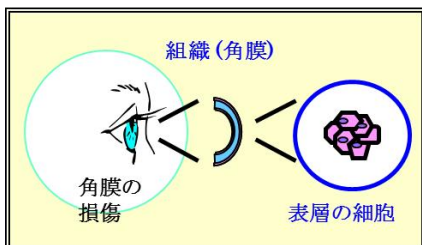
表 4 眼刺激性試験代替法を用いた際の区分可能な GHS

代替法	区分可能なGHS		
	Cat. 1 (強度眼刺激性)	Cat. 2 (中等度眼刺激性)	NC (区分外)
BCOP	○	×	○
ICE	○	×	○
FL	○	×	×
STE	○	×	○
RhCE	×	×	○

ウシ摘出角膜を用いる BCOP、鶏眼球を用いる ICE 及び株化細胞 SIRC を用いる STE 法は GHS Cat. 1 及び NC を区分可能である。一方で株化細胞 MDCK を用いる FL 法は GHS Cat. 1 のみ区分可能であり、培養角膜モデルを用いる RhCE 法は GHS NC のみ区分可能である。いずれの試験法も Cat. 2 を区分できない。

3. 眼刺激性試験代替法 Short Time Exposure (STE) 法の開発背景と有用性

OECD TG の中に TG491 の SIRC 細胞を単層培養して用いる短時間暴露法の STE 法がある。STE 法開発の着眼点は主に二つある (図 1)。第一に、異物が眼に混入した際の排出時間である。異物が眼に入った場合、ヒトでは 1~2 分、ウサギでは 3~4 分程度で、その 80%以上が排出される (Mikkelson *et al.*, 1973)。すなわち、眼刺激性物質が眼に入ると短時間で眼表面の角膜細胞に作用し、毒性を発現すると考えられる。第二に、接触部位が角膜最表面から始まることである。眼刺激性の重篤度は角膜損傷の深さに比例する (Maurer *et al.*, 2002)。そのため、特に化粧品原料や製品のような眼刺激性が弱い製品を中心に評価する場合は角膜細胞表面の損傷の評価が重要である。



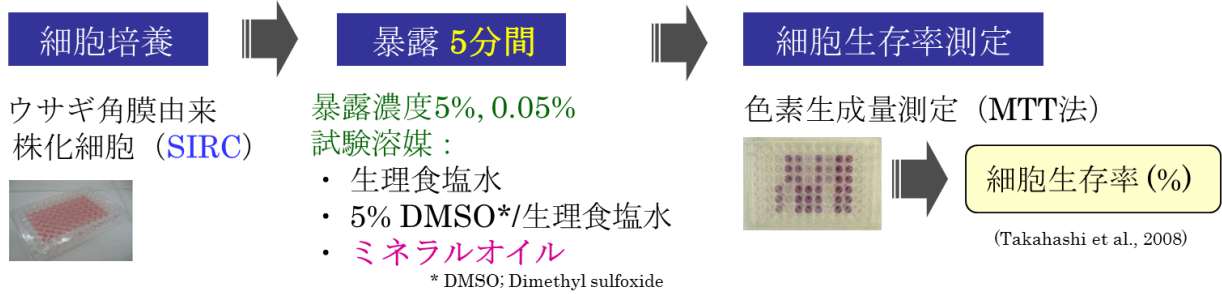
- ◆ 実際の暴露条件
50 μL点眼液の排出時間 (80%排出)
ヒト:1~2分、ウサギ:3~4分
(Mikkelson *et al.*, 1973)
⇒眼内滞留時間は5分以内
- ◆ 眼刺激性は
 - ・ 最初に最表面の上皮細胞に接触
 - ・ 刺激の有無は表面細胞の損傷
 - ・ 強度 (重篤度) は深さに比例
(Maurer *et al.*, 2002)

図 1 STE 法開発の着眼点

これら 2 つの特徴から、実際の眼への暴露状況を考慮した単層培養細胞を用いた STE 法が開発された (Takahashi *et al.*, 2008) 。STE 法は暴露時間が 5 分間と短く、被験物質暴露後の追培養がない。さらに、従来の単層培養系で用いる培地での被験物質の希釈を必要とせず、5 分間の暴露時間で細胞毒性が発現しない物質は溶媒として使用可能である。そのため、水性物質の生理食塩水や 5% Dimethyl sulfoxide (DMSO) を含む生理食塩水だけでなく油性物質のミネラルオイルを溶媒として用いることができる。このように油溶性物質を評価できることが STE 法の特徴である。ミネラルオイルが選択された理由は、他の油性物質と比べて粘性が低く、培養細胞の物理的剥離の影響が小さいと考えられたためである。さらに、STE 法の溶媒は培地のように緩衝作用を受けないため、pH の影響を考慮した評価が可能である。

図 2 に STE 法の方法を簡略化して示した。培地を除去した SIRC 細胞に直接、5%、0.05%被験物質溶液を添加する。5分間暴露後、被験物質溶液を除去し、洗浄後 Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 法により細胞生存率を算出する。得られた細胞生存率を基に GHS Cat. 1 または NC を区分する。

【試験方法】



【予測モデル】

Cell viability		GHS* classification	STE rank classification	
At 5%	At 0.05%			
> 70%	> 70%	No Category	Minimal	← 非刺激性
≤ 70%	> 70%	No prediction can be made	Moderate	← 刺激性 (Irritant)
≤ 70%	≤ 70%	Category 1**	Severe	

* GHS: Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
**Category1: 強度眼刺激性
(Takahashi et al., 2008; OECD TG491., 2015)

図2 STE法の試験方法と予測モデル

試験の概略と予測モデルを示した。SIRC細胞を培養し、溶媒として生理食塩水、5%DMSO生理食塩水、ミネラルオイルのいずれかを用いて5%、0.05%の被験物質溶液を調製し、5分間細胞へ暴露する。その後MTT法により細胞生存率を算出する。予測モデルは5%、0.05%被験物質溶液を暴露した際の細胞生存率から70%を閾値としてGHS区分及びSTE rank classificationを評価する。

STE 法は Draize 試験によって区分される眼刺激性 GHS との一致率が高く、複数の施設において試験法の有用性及び再現性を確認するためのバリデーション研究を通して良好な施設間再現性であることを検証済みである。GHS Cat. 1 と Cat. 2 を合わせた Irritant 及び NC の 2 区分予測において、STE 法による予測性は 87.2% (95/109) であった (Takahashi *et al.*, 2011)。さらに、GHS Cat. 1、Cat. 2 及び NC の 3 区分予測において、STE 法による一致率は 73.4% (80/109) であった (Takahashi *et al.*, 2011)。

STE 法の技術移転性や施設間再現性の確認は、日本動物実験代替法学会 (Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments; JSAAE) と日本動物実験代替法評価センター (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods; JaCVAM) が主催したバリデーション研究のもとで進められた (Sakaguchi *et al.*, 2011、Kojima *et al.*, 2013)。5 施設で技術移転性を確認し、化学物質 65 種を用いて施設間再現性を確認したところ、良好な結果が得られた。その後 peer review へ進み、第三者機関として米国動物実験代替法検証省庁間連絡委員会 (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods; ICCVAM) と共同でデータ解析を行い、適用範囲を設定した (Hayashi *et al.*, 2013; NICEATM, 2013)。この peer review で、STE 法の Summary Review Document (SRD) が作成された。この報告内容に基づいて OECD での評価会議へ進み、2015 年に TG491 として収載された (OECD 2015a)。STE 法は適用範囲が明確であり、高揮発性物質 (蒸気圧 > 6kPa, 25°C) 及び活性剤を除く固体は、刺激性があるため陽性と判定されるべき物質を誤って非刺激性の陰性として評価する偽陰性の割合が高いため評価できない。高揮発性物質については被験物質の調製または暴露時に揮発することで被験物質の散逸が起こっている可能性があること、固体物質については Draize 試験では物理的な影響も含めて評価されている可能性があることなどが推察されている。そのため、これらの物

質は STE 法の適用範囲外とされている。

4. 混合物の眼刺激性評価の重要性

眼刺激性試験代替法の開発初期は特に化学物質を用いて Draize 試験で区分された GHS との一致性を確認する。これは化学物質の Draize 試験結果は学術論文や規制当局等の資料により確認が可能なためである。一方で化粧品のような混合物の Draize 試験の結果は動物愛護や法規制により試験結果がないことが多い。眼刺激性は異物が眼に接触して物理化学的な影響として発現するため、様々な化学物質が共存する混合物はその複合的な影響を評価することが必要である。例えば、化粧品としては主に洗浄成分や乳化剤として界面活性剤を含む水溶性混合物や主に油剤を含む油溶性混合物がある。化粧品における水溶性混合物はシャンプー (Shampoos) やコンディショナー (Conditioners) のような一般消費者用の製品カテゴリーがある。また、油溶性混合物は艶出しヘアスタイリング剤 (Hair grooming) オイルローション (Body lotion) のような一般消費者用の製品カテゴリーがある。これまでに STE 法を用いた混合物の眼刺激性評価について、Saito et al. (2015) は水溶性混合物を用いて GHS NC / Irritant の予測性を検討している。全体の結果として、一致率は 87.5% (35/40)、偽陽性率は 50% (5/10)、偽陰性率は 0% (0/30) であった。結論として、Saito et al. (2015) は STE 法が純粋な化学物質だけでなく、混合物についても眼刺激性評価が可能であり、有用な試験法であることを示している。

5. 本研究の目的

OECD TG に記載された他の眼刺激性試験と比較すると、STE 法は簡便な方法である一方で適用範囲

が狭いため、評価できる物質数が少ないといった報告がある (Adriaens *et al.*, 2017a)。そこで、本研究は STE 法の適用範囲外である高揮発性物質 (蒸気圧 >6kPa, 25°C) に着目し、適用範囲拡大に向けた検討を行った。

STE 法の SRD に含まれる高揮発性物質の中で、偽陰性は 4 物質 (Acetone、Ethanol、Isopropanol、Methyl acetate) であった。これらの物質は STE 法での溶媒選択において生理食塩水が選択されている。これら 4 物質はその化学構造から両親媒性物質であり、油性物質にも溶解することが考えられた。そこで、第二章において、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被験物質の揮発量が変わり、眼刺激性を適正に評価可能か検討した。次に、高揮発性物質を適正に評価できた要因を検討するため、被験物質の溶媒からの揮発による減少率を算出した。また、偽陰性物質が両親媒性物質であることに着目し、生理食塩水またはミネラルオイルのどちらに親和性が高いか水とオクタノールの分配係数を示す $\log K_{ow}$ を用いて評価し、高揮発性物質の溶媒中の分配を考察した。さらに、高揮発性物質を含む STE 法の予測性を検討した。

STE 法は、水溶性化学物質及び油溶性化学物質の GHS NC を高い精度で区分可能である (Sakaguchi *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2011; Kojima *et al.*, 2013)。化粧品のように複数の化学物質が共存する混合物についても評価可能と TG 491 に記載されており、水溶性混合物についてはその有用性が検討されている (Saito *et al.*, 2015)。一方で油溶性混合物については有用性が検討されていない。様々な混合物の評価が可能であれば、その混合物を処方して検討される一般消費者に向けた製品の安全性保証が可能となることが示唆される。製品の安全性保証は安心安全な社会に向けた重要な視点である。そこで、第三章において、油溶性混合物を用いて、STE 法により GHS NC / Irritant の評価が可能か検討した。さら

に、第四章において、STE 法の認知度向上を目的として、技術移転性及び水溶性混合物と油溶性混合物を用いた施設間再現性を検証した。

本論文は、以下に示す五章より構成される。

序論

第二章 STE 法による高揮発性物質の眼刺激性評価

第三章 STE 法による油溶性混合物の眼刺激性評価

第四章 混合物の眼刺激性評価における STE 法の技術移転性と施設間再現性

第五章 総括及び結論

第二章 STE 法による高揮発性物質の眼刺激性評価

本章における検討の背景と課題

STE 法の適用範囲外の一つである高揮発性物質は ICCVAM での peer review により偽陰性率が高いことが明らかにされている (NICEATM, 2013)。高揮発性物質が偽陰性となった要因は被験物質溶液を調製する際や暴露時に溶媒から揮発することで濃度が低下し、眼刺激性を過小評価したことが推察された。一方、STE 法では定義される全ての高揮発性物質 (蒸気圧 >6kPa, 25°C) が偽陰性ではない。高揮発性物質のうち、偽陰性となった物質は Propan-2-one (Acetone)、Ethanol、Propan-2-ol (Isopropanol)、Methyl acetate の 4 物質であった。これら 4 物質の試験時に選択された溶媒はいずれも生理食塩水であった。また、これら 4 物質は化学構造から両親媒性物質であり、ミネラルオイルに溶解することが確認された。このことから、生理食塩水より揮発性が低く、高揮発性物質の揮発性を低下させることが考えられるミネラルオイルを溶媒として用い、偽陰性物質 4 種及び他の高揮発性物質の眼刺激性を適正に評価可能か検討した。

検討結果

1. STE 法標準プロトコールで実施した試験結果

TG491 に記載される STE 法標準プロトコールに従って、高揮発性物質を試験した。溶媒は図 3 に示した通りに選択した。また、図 4 に STE 法試験概要を示した。なお、詳細は第二章の実験の詳細 2 及び 3 に記載した。

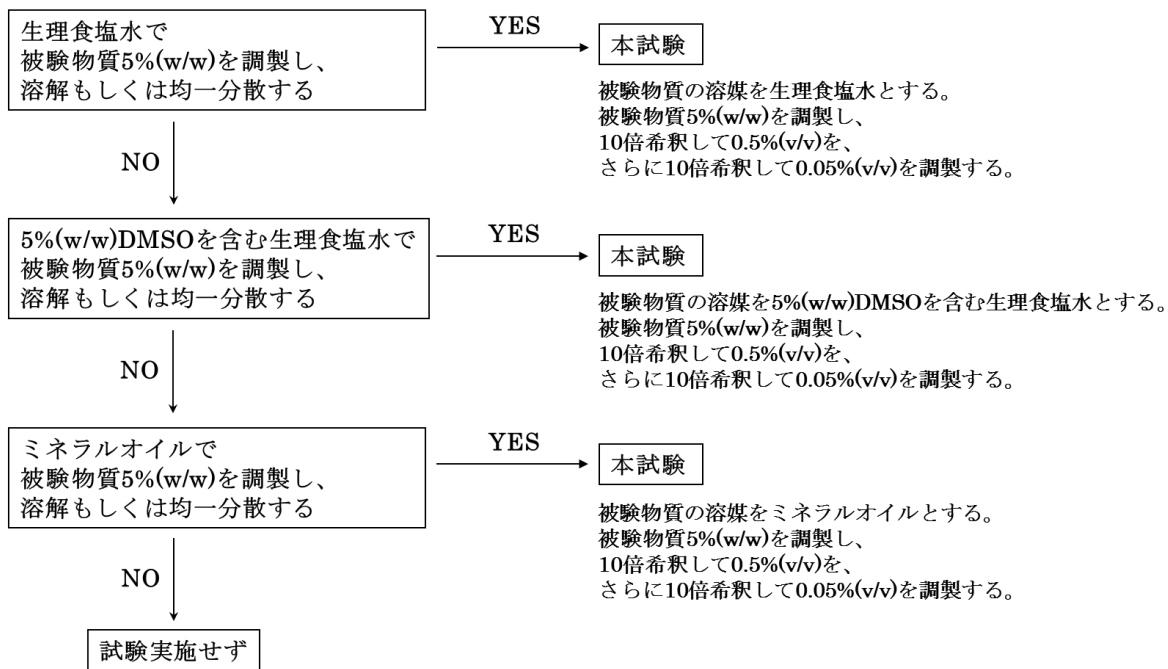


図3 STE法の試験溶媒選択

STE法の試験溶媒選択方法を示した。まず被験物質が生理食塩水で5%溶液に調製できるか確認する。溶解した場合は生理食塩水を溶媒として試験を実施する。溶解しない場合は、次に、5%DMSOを含む生理食塩水で5%溶液に調製できるか確認する。5%DMSOを含む生理食塩水に溶解した場合は5%DMSOを含む生理食塩水を溶媒として試験を実施する。生理食塩水にも5%DMSOを含む生理食塩水にも溶解しない場合は、ミネラルオイルで5%溶液に調製できるか確認する。ミネラルオイルに溶解した場合はミネラルオイルを溶媒として試験を実施する。いずれの溶媒でも5%溶液を調製できない場合は試験を実施できない。

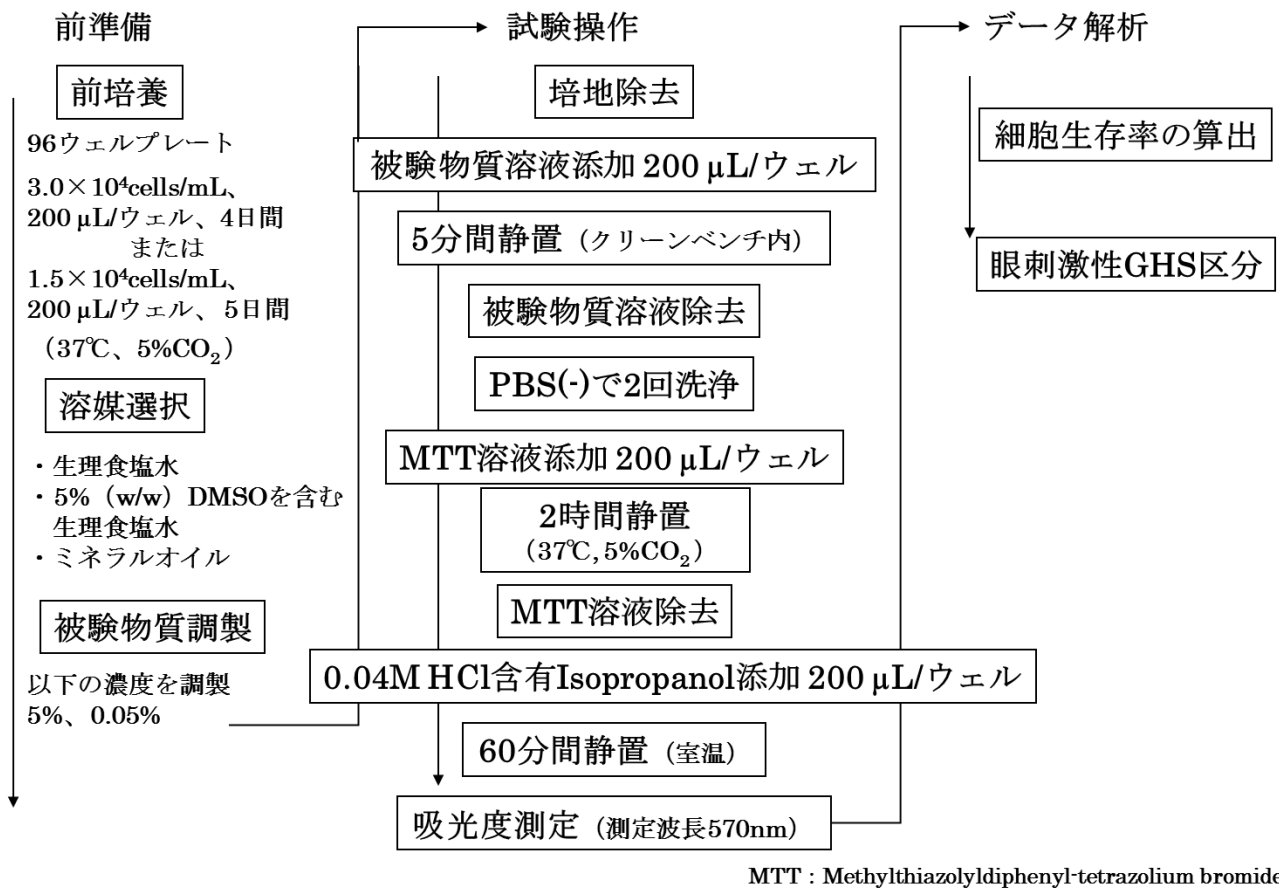


図4 STE法試験概要

STE法試験概要を前培養、試験操作、データ解析として示した。前培養では、所定の細胞濃度を所定の日数で培養し、図3で示したように溶媒を選択して5%、0.05%被験物質溶液を調製する。試験操作では培地を除去後、被験物質溶液を5分間暴露する。洗浄操作を行い、MTT溶液を添加して静置し、その後MTT抽出操作を行う。測定波長570nmで吸光度を測定し、吸光度から細胞生存率を算出して眼刺激性を評価する。

表 5 に示したように高揮発性物質 20 種のうち、GHS Cat. 2 は 7 物質 (2A が 5 物質、2B が 2 物質)、NC は 13 物質が選択された。選択された溶媒は Cat. 2 の物質のうち 5 物質が生理食塩水、2 物質がミネラルオイルであり、NC の物質のうち 4 物質が生理食塩水、9 物質がミネラルオイルであった。STE 法は細胞生存率 70%を閾値として「細胞生存率 >70%」を GHS NC、「細胞生存率 ≤70%」を Irritant と分類する。STE 法標準プロトコールで生理食塩水が溶媒として選択された物質のうち、5%暴露濃度で細胞生存率が 91.3%の Acetone、98.2%の Ethanol、101.6%の Isopropanol、92.6%の Methyl acetate の 4 物質が偽陰性となった。同様に、5%暴露濃度で細胞生存率が 7.8%の Ethyl acetate の 1 物質が偽陽性となった。その他の 15 物質については、適正に眼刺激性が評価された。

表5 STE法標準プロトコール (TG 491) と溶媒をミネラルオイルに変更して試験した高揮発性物質の評価

Substance name	CAS RN	Vapor pressure (kPa, 25°C) ^a	log K_{ow} (25°C) ^b	<i>in vivo</i> GHS classification ^c	TG491 ^d			Using mineral oil as a solvent			
					Solvent	Cell viability (%)		NC / Irritant	Cell viability (%)		NC / Irritant
						5%	0.05%		5%	0.05%	
Acetone	67-64-1	3.32E+01	-0.24 (-0.24)	Cat. 2A	Saline	91.3	105.4	NC	9.6	101.2	Irritant
Ethanol	64-17-5	8.12E+00	-0.14 (-0.31)	Cat. 2A	Saline	98.2	97.1	NC	22.6	95.9	Irritant
Isopropanol	67-63-0	6.61E+00	0.28 (0.05)	Cat. 2A	Saline	101.6	97.6	NC	6.9	97.8	Irritant
Methyl acetate	79-20-9	7.03E+00	0.37 (0.18)	Cat. 2A	Saline	92.6	96.2	NC	45.5	96.0	Irritant
Methyl ethyl ketone	78-93-3	1.31E+01	0.26 (0.29)	Cat. 2A	Saline	44.7	100.7	Irritant	37.5	100.4	Irritant
Isobutanal	78-84-2	2.19E+01	0.74	Cat. 2B	Mineral oil	6.7	94.6	Irritant	6.7	94.6	Irritant ^e
<i>n</i> -Butanal	123-72-8	1.44E+01	0.82 (0.88)	Cat. 2B	Mineral oil	4.5	100.5	Irritant	4.5	100.5	Irritant ^e
1,5-Hexadiene	592-42-7	2.86E+01	3.02 (2.87)	NC	Mineral oil	100.0	102.3	NC	100.0	102.3	NC ^e
2-Methylpentane	107-83-5	2.78E+01	3.21	NC	Mineral oil	103.1	101.9	NC	103.1	101.9	NC ^e
3-Methylhexane	589-34-4	8.29E+00	3.71	NC	Mineral oil	106.0	104.7	NC	106.0	104.7	NC ^e
3,3-Dimethylpentane	562-49-2	1.01E+01	3.67	NC	Mineral oil	92.6	102.4	NC	92.6	102.4	NC ^e
Bromo-2-butane	78-76-2	8.23E+00	2.58	NC	Mineral oil	101.8	100.2	NC	101.8	100.2	NC ^e
Dimethyl carbonate	616-38-6	7.49E+00	0.23	NC	Saline	91.4	103.4	NC	49.1	106.8	Irritant
Ethyl acetate	141-78-6	1.31E+01	0.86 (0.73)	NC	Saline	7.8	109.6	Irritant	97.4	102.3	NC
Furan	110-00-9	7.95E+01	1.36 (1.34)	NC	Mineral oil	116.3	104.4	NC	116.3	104.4	NC ^e
Isopropyl bromide	75-26-3	2.85E+01	2.08 (2.14)	NC	Mineral oil	105.6	109.4	NC	105.6	109.4	NC ^e
Methanol	67-56-1	1.58E+01	-0.63 (-0.77)	NC	Saline	102.9	104.0	NC	70.1	106.6	NC
Methylal	109-87-5	5.49E+01	-0.19 (0)	NC	Saline	105.8	105.6	NC	102.6	103.8	NC
Methyl cyclopentane	96-37-7	1.78E+01	3.1 (3.37)	NC	Mineral oil	102.2	104.4	NC	102.2	104.4	NC ^e
<i>n</i> -Hexane	110-54-3	2.00E+01	3.29 (3.9)	NC	Mineral oil	112.0	106.4	NC	112.0	106.4	NC ^e

NC: No Category

a: 蒸気圧はEPI suiteにより算出された。

b: log K_{ow} はEPI suiteにより算出された。データは予測値を示し、括弧内には登録されている実測値を示した。

c: GHS区分にはSTE SRDとDRDに記載された区分結果を用いた。

d: TG491に従って試験は実施された。細胞生存率70%を閾値として「細胞生存率>70%」をGHS NC、「細胞生存率≤70%」をIrritantと分類した。

e: 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。

2. 溶媒をミネラルオイルに変更して実施した試験結果

高揮発性物質 20 種について、溶媒をミネラルオイルへ変更することで眼刺激性を適正に評価可能か検討し、STE 法標準プロトコールにおける 4 つの偽陰性物質の眼刺激性を適正に評価できた (表 5)。その偽陰性であった Acetone、Ethanol、Isopropanol、Methyl acetate の 5%暴露濃度での細胞生存率はそれぞれ、91.3%、98.2%、101.6%、92.6%であったのに対し、ミネラルオイルを溶媒として用いた場合はそれぞれ、9.6%、22.6%、6.9%、45.5%となり、適正に Irritant として評価された。また、STE 法標準プロトコールにおいて NC として適正に評価された Dimethyl carbonate は溶媒をミネラルオイルへ変更することで Irritant と評価され、偽陽性の結果となった。Dimethyl carbonate の 5%暴露濃度での細胞生存率は溶媒に生理食塩水を用いた際に 91.4%であったのに対し、ミネラルオイルを用いた際に 49.1%と低下した。反対に、STE 法標準プロトコールにおいて Irritant と評価され、偽陽性であった Ethyl acetate は溶媒をミネラルオイルへ変更することで適正に NC と評価された。Ethyl acetate の 5%暴露濃度での細胞生存率は溶媒に生理食塩水を用いた際に 7.8%、ミネラルオイルを用いた際に 97.4%と上昇した。その他に、Methanol は溶媒をミネラルオイルへ変更しても GHS 区分は変わらなかったが、溶媒にミネラルオイルを用いた場合の 5%暴露濃度での細胞生存率は STE 法標準プロトコールによって得られた 102.9%から STE 法の GHS NC / Irritant の区分の閾値付近である 70.1%まで低下した。

以上のことから、溶媒をミネラルオイルに変更して試験した結果、高揮発性物質を偽陰性なく評価できた。STE 法標準プロトコールで試験した 20 物質の高揮発性物質の予測性は、一致率 75.0% (15/20)、偽陽性率 7.7% (1/13)、偽陰性率 57.1% (4/7) であった。一方、溶媒をミネラルオイルに変更して試験した結果、一致率、偽陽性率、偽陰性率はそれぞれ 95.0% (19/20)、7.7% (1/13)、0% (0/7) と偽陽性率以

外の予測性が向上した (図 5)。

TG491		STE		Accuracy	75.0% (15/20)
		Irritant	NC		
in vivo GHS	Irritant	3	4	FNR	57.1% (4/ 7)
	NC	1	12	Sensitivity	42.9% (3/ 7)
				Specificity	92.3% (12/13)

Using mineral oil as a solvent		STE		Accuracy	95.0% (19/20)
		Irritant	NC		
in vivo GHS	Irritant	7	0	FNR	0.0% (0/ 7)
	NC	1	12	Sensitivity	100.0% (7/ 7)
				Specificity	92.3% (12/13)

"FPR": False-positive rate "FNR": False-negative rate

図 5 STE 法標準プロトコール及び溶媒をミネラルオイルへ変更した方法での高揮発性物質の予測性

計 20 種の高揮発性物質を用いて予測性は評価された。計算方法について、第二章の実験の詳細 6 を参照した。いずれの表も in vivo GHS 区分と STE 法で得られた GHS NC と Irritant の 2 区分の一致率が検討された。予測性は一致率 (Accuracy)、偽陽性率 (False positive rate)、偽陰性率 (False negative rate)、感度 (Sensitivity)、特異度 (Specificity) が評価された。上表は STE 法標準プロトコールで評価された高揮発性物質の予測性である。下表は溶媒としてミネラルオイルを用いて評価された高揮発性物質の予測性である。

3. 溶媒間における高揮発性物質の揮発の影響

高揮発性物質の溶媒をミネラルオイルへ変更することで偽陰性なく評価できることが明らかとなった。高揮発性物質が偽陰性となる要因の一つとして、室温での調製や暴露にともなう被験物質の揮発による散逸が想定された。これを検証するため、生理食塩水とミネラルオイルを溶媒とした時の高揮発性物質の揮発を比較した。

まず、電子天秤を用いて重量減少を測定し、揮発量を算出した。溶媒の影響を調べた高揮発性物質は STE 法標準プロトコールで溶媒に生理食塩水が選択された Acetone、Ethanol、Isopropanol、Methyl acetate、Dimethyl carbonate、Ethyl acetate、Butan-2-one (Methyl ethyl ketone)、Dimethoxymethane (Methylal)、Methanol である。これら 9 物質は両親媒性であり、生理食塩水だけでなくミネラルオイルにも溶解する。それぞれを溶媒として上記 9 種の化学物質の 5% 被験物質溶液を調製し、これをスクリーン管に入れて重量変化から揮発量を算出した。被験物質溶液調製から暴露までの時間を考慮して 0、5、10、15、30、60、120 分間の時点での重量を測定し、溶媒のみの系との差から各高揮発性物質の揮発量から揮発率を算出した (図 6)。

その結果、生理食塩水を溶媒とした場合の被験物質の揮発による減少率は Methylal > Ethyl acetate > Methyl acetate > Dimethyl carbonate > Methyl ethyl ketone > Acetone > Isopropanol > Ethanol > Methanol の順で高かった。ミネラルオイルを溶媒とした場合での被験物質の揮発による減少率は Methanol > Ethanol > Acetone > Methylal > Methyl ethyl ketone > Isopropanol > Methyl acetate > Dimethyl carbonate > Ethyl acetate の順で高かった。またいずれの被験物質も揮発はするものの、測定条件下で減少率が 1% を超えることはなかった。Dimethyl carbonate、Ethyl acetate、Methyl acetate、

Methylal の揮発による減少率は、溶媒に生理食塩水を用いた方が高かった。高揮発性物質は溶媒に生理食塩水を用いた際の調製や暴露時に揮発することで濃度が低下し、眼刺激性を過小評価しているという仮説に合致する物質としては Dimethyl carbonate 及び Methyl acetate があることが分かった。一方、Acetone、Ethanol、Isopropanol 及び Methanol の揮発による減少率は溶媒にミネラルオイルを用いた方が高く、Ethyl acetate の揮発率は溶媒に生理食塩水を用いた方が高いものの、細胞生存率は溶媒に生理食塩水を用いた方が高く、この仮説には合致しなかった。なお、Methylal の揮発率は溶媒に生理食塩水を用いた方が高いものの、いずれの溶媒を用いても無毒性で細胞生存率に差が認められず、Methyl ethyl ketone は溶媒間で揮発による減少率に差が認められなかった。

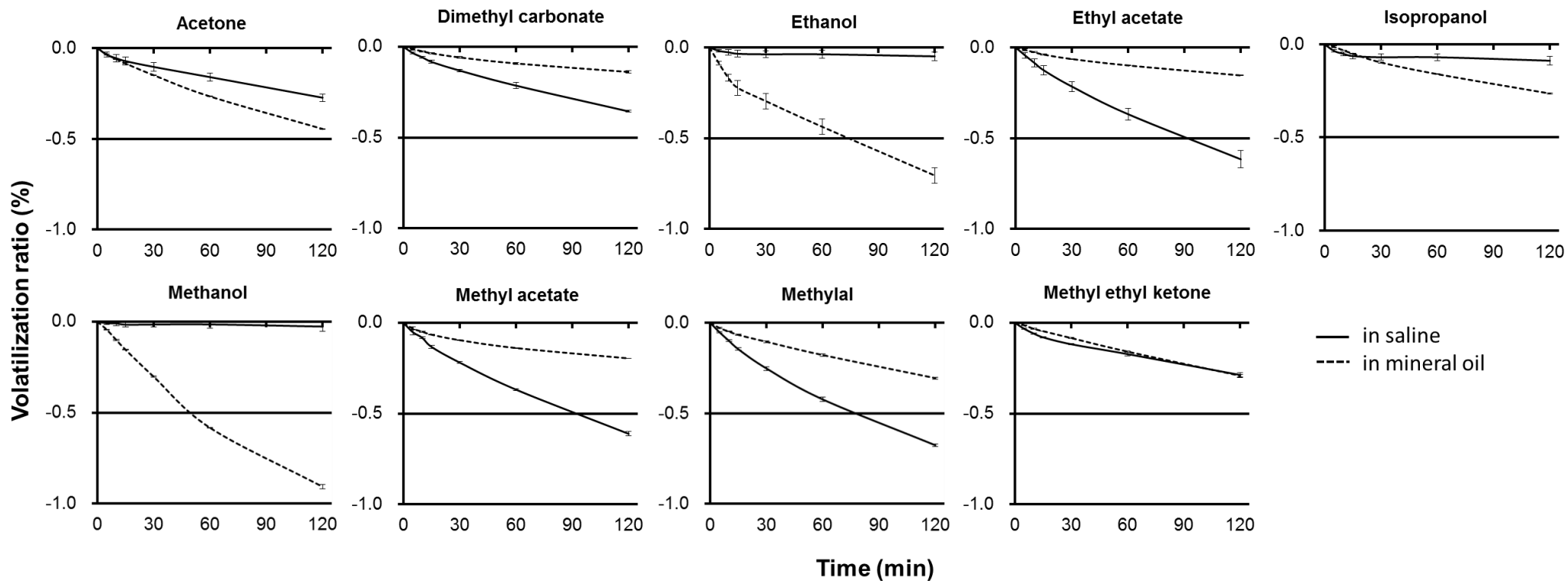


図6 生理食塩水とミネラルオイル中の高揮発性物質の揮発減少率

電子天秤を用いて溶媒のみの揮発減少重量を基に各高揮発性物質の揮発減少重量から揮発減少率を算出した。縦軸は揮発減少率として百分率を示している。横軸は測定した時点を示し、0、5、10、15、30、60、120分間で測定した。1被験物質の1時点における揮発減少率は3つの測定値の平均から算出された (n=3)。実線は生理食塩水中の高揮発性物質の揮発減少率を示し、点線はミネラルオイル中の高揮発性物質の揮発減少率を示している。

4. 溶媒間における高揮発性物質の細胞への到達性

生理食塩水とミネラルオイルの両方に溶解することから、高揮発性物質について物理化学性状パラメーターで水とオクタノールの分配係数である $\log K_{ow}$ により細胞毒性への影響を考察した。

表 5 に高揮発性物質の物理化学性状パラメーターの $\log K_{ow}$ を記載した。本章では $\log K_{ow}$ を生理食塩水とミネラルオイルへの分配の考察に用いた。 $\log K_{ow}$ の値は米国環境保護庁 (United States Environmental Protection Agency; EPA) による Estimation Programs Interface (EPI) Suite™ v4.11 を用いて算出した (EPA, 2012)。結果として、Methanol と Methylal を除く高揮発性物質は偽陰性であった下記 4 物質、Acetone (実測値で $\log K_{ow} -0.24$)、Ethanol (実測値で $\log K_{ow} -0.31$)、Isopropanol (実測値で $\log K_{ow} 0.05$)、Methyl acetate (実測値で $\log K_{ow} 0.18$) よりも $\log K_{ow}$ が高かった。これは偽陰性物質 4 種の水への親和性は他の高揮発性物質のそれより高いことを示している。一方、眼刺激性が適正に評価された物質の中で $\log K_{ow}$ が 0.18 から -0.31 の範囲より低く、水への親和性が高いと予測される Methanol、Methylal はそれぞれ実測値で -0.77 、0 であった。

5. 高揮発性物質を含めた化学物質の GHS NC / Irritant の予測性

適用範囲外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偽陰性なく評価できることが明らかとなった。そこで、ミネラルオイルで試験した高揮発性物質の結果を含めて、STE 法の予測性について検討した。検討には、peer review の際に用いられた化学物質を STE SRD から選択し、新たに GHS 区分における NC / Irritant が明確な物質を加えてデータベース拡充を行った。新たに加えた物質は、*in vitro* 試験法の予測性を検討する際に Draize 試験の結果において個体差や施設間でばらつきが

ない物質で、より適切に GHS 区分された推奨物質が記載されている Draize eye test Reference Database (DRD) を参照して選抜した (Adriaens *et al.*, 2014; Barroso *et al.*, 2017) 。予測性の検討は、化粧品の評価において重要である GHS NC / Irritant の 2 区分を用いた。

選択した化学物質 239 種は、固体の界面活性剤 16 物質及び様々な Organic function group を含む液体 223 物質であり、GHS 区分全体に占める割合は、Cat. 1 が 19.2% (46/239) 、Cat. 2 が 16.3% (39/239) 、NC が 64.4% (154/239) であった。DRD 内の推奨物質は計 375 種が記載され、GHS 区分全体に占める割合は Cat. 1 が 17.9% (67/375) 、Cat. 2 が 14.1% (53/375) 、NC が 68.0% (255/375) であった。すなわち、本章での被験物質データセットにおける GHS 区分の割合は DRD と比べてほぼ同等であった。高揮発性物質は、溶媒をミネラルオイルに変更して実施した試験結果を記載した (表 6) 。なお、239 物質中 15 物質の 4-*tert*-Butylbenzene-1,2-diol (4-*tert*-Butylcatechol) (85% in methanol) 、Phenylmethanol (Benzyl alcohol) 、(1*E*)-2-[6-[[amino-[(*E*)-[amino-(4-chloroanilino)methylidene]amino]methylidene]amino]hexyl]-1-amino-(4-chloroanilino)methylidene]guanidine;(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexanoic acid (Chlorhexidine gluconate) (20% in aqueous solution) 、3-Chloropropionitrile 、(*RS*)-3-Allyl-2-methyl-4-oxocyclopent-2-enyl(1*R*,3*R*)-2,2-dimethyl-3-(2-methylprop-1-enyl)cyclopropanecarboxylate (*S*-Bioallethrin) 、1-Nitropropane 、2-Ethylhexyl 4-(dimethylamino)benzoate (2-Ethylhexyl *p*-dimethylamino benzoate) (10% in aqueous solution) 、(3-Phenoxyphenyl)methanol (3-Phenoxy benzyl alcohol) 、Phenylmethanol (Benzyl alcohol) (1% in aqueous solution) 、Propan-2-yl tetradecanoate (Isopropyl myristate) (10% in aqueous solution) 、1-Isocyanatoctadecane

(Octadecyl isocyanate) 、 1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6-Tetradecafluorohexane (Perfluoro-*n* hexane) 、
4-Methylsulfanylbenzaldehyde (*p*-Methyl thiobenzaldehyde) 、
(*Z*)-4-Hydroxypent-3-en-2-one;vanadium (Triethanolamine orthovanadate) (30% in aqueous solution)
及び (*Z*)-4-Hydroxypent-3-en-2-one;vanadium (Triethanolamine orthovanadate) (3% in aqueous
solution) は STE 法の溶媒に溶解せず、評価できなかった。この 15 物質について、共通した化学構造的
特徴を見出せなかった。

図 7 は、表 6 の結果に基づいた予測性を示している。No prediction can be made 及び Cat. 1 の結果
は Irritant として計算した。一致率、偽陽性率、偽陰性率はそれぞれ 86.6% (194/224) 、18.8% (27/144) 、
3.8% (3/80) であった。偽陰性であった物質は 2,6-Dichlorobenzoyl chloride 、 Ethyl
(*E*)-3-ethoxyprop-2-enoate (Ethyl trans-3-ethoxyacrylate) 及び Toluene の 3 物質であった。これら 3
物質の溶媒は全てミネラルオイルであり、3 物質とも GHS Cat.2 に該当した。GHS Cat.1 の偽陰性物質
はなかった。なお、これら 3 物質に共通する化学構造的な特徴は見出せなかった。偽陽性であった物質は
2-Methylidenepentanedinitrile (2,4-Dicyano-1-butene) 、 Pentane-2,4-dione (2,4-Pentanedione) 、
2-Ethylhexanoyl chloride 、 2-Methoxy-3,4-dihydro-2H-pyran (2-Methoxy-3,4-dihydropyran) 、
Disodium;2',4',5',7'-tetrabromo-4,5,6,7-tetrachloro-3-oxospiro[2-benzofuran-1,9'-xanthene]-3',6'-diola
te (Acid Red 92) (1% in aqueous solution) 、 1-Hexadecylpyridinium chloride (Cetyl pyridinium
chloride) (0.1% in aqueous solution) 、 Cyclohexanone、 Dimethyl carbonate、 Ethyl 3-oxobutanoate
(Ethyl acetoacetate) 、 3-Chloropropyl(trimethoxy)silane (gamma-Chloropropyltrimethoxy silane) 、
Tris(2-chloroethyl) phosphate (Genomoll P) 、 Oxiran-2-ylmethanol (Glycediol) 、 Oxiran-2-ylmethyl

2-methylprop-2-enoate (Glycidyl methacrylate) 、 3,5,5-Trimethylhexanal (Isononylaldehyde) 、
2-Hydroxypropanoic acid (Lactic acid) (10% in aqueous solution) 、 3-Methoxybenzaldehyde
(*m*-Methoxybenzaldehyde) 、 Polyethylene glycol monolaurate 、 Poly(oxy-1,2-ethanediyl),
alpha-Phenyl-omega-hydroxy-, styrenated (Polyoxyethylene(13) (mono-, di-, tri-)styrenated phenyl
ether) 、 Potassium:(*Z*)-octadec-9-enoate (Potassium oleate) (16% in aqueous solution) 、
1-[[2-(2,4-Dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-yl]methyl]-1,2,4-triazole (Propiconazole) 、
Sodium;dodecyl sulfate (Sodium lauryl sulphate) (3% in aqueous solution) 、 Sodium;dodecyl sulfate
(Sodium lauryl sulphate) (1% in aqueous solution) 、 Sodium;dodecoxyethyl sulfate (Sodium
polyoxyethylene laurylether sulphate) (27% in aqueous solution) 、 Dodecanoic acid
[2-[(2*R*,3*R*,4*S*)-3,4-dihydroxy-2-tetrahydrofuran-2-yl]-2-hydroxyethyl] ester (Sorbitan monolaurate) 、
2,2,2-Trichloroacetic acid (Trichloroacetic acid) (3% in aqueous solution) 、
2-[4-(2,4,4-Trimethylpentan-2-yl)phenoxy]ethanol (Triton X-100) (1% in aqueous solution) 及び
Ethenyl(trimethoxy)silane (Vinyl trimethoxy silane) の 27 物質であった。この 27 物質についても共通
の化学構造的特徴を見出せなかった。

表6 STE SRD と DRD を参照して選択した STE 適用範囲内の物質と高揮発性物質の試験結果

Substance name	CAS RN	Vapor pressure (kPa, 25°C) ^a	<i>in vivo</i> GHS classification ^b	TG491 + Using mineral oil as a solvent for HVS			
				Solvent	Cell viability (%)		GHS classification
					5%	0.05%	
1-Chlorooctan-8-ol	23144-52-7	4.15E-04	Cat. 1	Mineral oil	4.1	102.9	No pred
1-Dodecanaminium, <i>N</i> -(2-hydroxy-3-sulfopropyl)- <i>N,N</i> -dimethyl-, inner salt (30% in aqueous solution)	13197-76-7	1.16E-21	Cat. 1	Saline	0.0	90.7	No pred
2-Hydroxy isobutyric acid ethyl ester	80-55-7	1.80E-01	Cat. 1	Saline	6.4	102.4	No pred
2-Methylbutyric acid	116-53-0	1.49E-01	Cat. 1	Mineral oil	4.7	100.4	No pred
2-Naphthalenesulfonic acid,6-hydroxy-,monosodium salt, polymer with formaldehyde and hydroxymethylbenzenesulfonic acid monosodium salt (24% in aqueous solution)	85255-76-1	n.d.	Cat. 1	Saline	0.1	96.6	No pred
(3-Aminopropyl)triethoxy silane	919-30-2	9.79E-03	Cat. 1	Saline	1.6	97.5	No pred
4- <i>tert</i> -Butylcatechol (85% in methanol)	98-29-3	n.c.	Cat. 1	N/A	-	-	-
Acetic acid (10% in aqueous solution)	64-19-7	n.c.	Cat. 1	Saline	39.3	99.9	No pred
Benzalkonium chloride	63449-41-2	2.51E-12	Cat. 1	Saline	2.1	3.1	Cat. 1
Benzalkonium chloride (10% in aqueous solution)	63449-41-2	n.c.	Cat. 1	Saline	6.5	48.3	Cat. 1
Benzalkonium chloride (5% in aqueous solution)	63449-41-2	n.c.	Cat. 1	Saline	8.9	80.7	No pred
Benzethonium chloride (10% in aqueous solution)	121-54-0	n.c.	Cat. 1	Saline	6.2	58.3	Cat. 1
Benzene, 1,1'-oxybis-, tetrapropylene derivs., sulfonated, sodium salts (48% in aqueous solution)	119345-04-9	n.c.	Cat. 1	Saline	0.0	51.9	Cat. 1
Benzyl alcohol	100-51-6	7.14E-03	Cat. 1	N/A	-	-	-
bis-(3-Aminopropyl)-tetramethyldisiloxane	2469-55-8	3.39E-04	Cat. 1	Mineral oil	31.0	18.7	Cat. 1
Butanol	71-36-3	1.04E+00	Cat. 1	Saline	8.4	90.9	No pred
Butyl cellosolve	111-76-2	6.33E-02	Cat. 1	Saline	5.6	106.9	No pred
Butylnaphthalenesulfonic acid sodium salt (34% in aqueous solution)	25638-17-9	n.c.	Cat. 1	Saline	0.0	86.7	No pred
Cetyl pyridinium bromide (10% in aqueous solution)	140-72-7	n.c.	Cat. 1	Saline	2.5	60.7	Cat. 1
Cetyl pyridinium bromide (6% in aqueous solution)	140-72-7	n.c.	Cat. 1	Saline	4.1	80.9	No pred
Cetyl pyridinium chloride (10% in aqueous solution)	6004-24-6	n.c.	Cat. 1	Saline	1.4	65.7	Cat. 1
Cetyl trimethyl ammonium bromide (10% in aqueous solution)	57-09-0	n.c.	Cat. 1	Saline	2.5	69.0	Cat. 1
Cyclohexanol	108-93-0	8.66E-02	Cat. 1	Mineral oil	1.4	104.5	No pred

Di(2-ethylhexyl)sodium sulphosuccinate (10% in aqueous solution)	577-11-7	n.c.	Cat. 1	Saline	9.6	93.4	No pred
Diethylethanolamine	100-37-8	8.63E-02	Cat. 1	Saline	0.2	91.5	No pred
Diethylethanolamine (50% in aqueous solution)	100-37-8	n.c.	Cat. 1	Saline	1.0	95.2	No pred
Diethylethanolamine (25% in aqueous solution)	100-37-8	n.c.	Cat. 1	Saline	0.8	99.1	No pred
Distearyl dimethylammonium chloride	107-64-2	2.55E-15	Cat. 1	Saline	57.6	101.7	No pred
Domiphen bromide (10% in aqueous solution)	538-71-6	n.c.	Cat. 1	Saline	5.2	51.6	Cat. 1
(Ethylenediamine propyl)trimethoxysilane	1760-24-3	4.68E-04	Cat. 1	Mineral oil	11.6	101.1	No pred
Ethylhexyl acid phosphate ester	12645-31-7	7.11E-08	Cat. 1	Mineral oil	2.7	45.1	Cat. 1
Hydroxyethyl acrylate	818-61-1	1.69E-02	Cat. 1	Saline	59.2	92.8	No pred
Isobutyl alcohol	78-83-1	1.78E+00	Cat. 1	Saline	6.1	98.3	No pred
Lactic acid	50-21-5	3.81E-03	Cat. 1	Saline	4.4	87.3	No pred
Lauric acid	143-07-7	1.88E-04	Cat. 1	Mineral oil	9.7	92.6	No pred
Lauryldimethylamine oxide (35% in aqueous solution)	1643-20-5	1.68E-15	Cat. 1	Saline	0.0	1.1	Cat. 1
Methoxyethyl acrylate	3121-61-7	5.98E-01	Cat. 1	Saline	0.1	101.1	No pred
<i>n</i> -Octylamine	111-86-4	1.31E-01	Cat. 1	Mineral oil	2.9	69.0	Cat. 1
Polyoxyethylene(10) polyoxypropylene(1.5) lauryl-myristyl ether	68439-51-0	3.31E-03	Cat. 1	Saline	0.0	1.8	Cat. 1
Potassium laurate	10124-65-9	0.00E+00	Cat. 1	Saline	0.8	1.7	Cat. 1
Sodium lauryl sulfate (15% in aqueous solution)	151-21-3	n.c.	Cat. 1	Saline	0.1	65.7	Cat. 1
Sodium polyoxyethylene(3) lauryl ether sulfate (25.5% in aqueous solution)	9004-82-4	2.27E-13	Cat. 1	Saline	0.0	50.9	Cat. 1
Stearyl trimethylammonium chloride (10% in aqueous solution)	112-03-8	n.c.	Cat. 1	Saline	3.2	80.7	No pred
Tetraethylene glycol diacrylate	17831-71-9	4.11E-05	Cat. 1	Saline	31.7	109.1	No pred
Triethanolamine polyoxyethylene(3.0) lauryl ether sulfate (40% in aqueous solution)	27028-82-6	2.50E-10	Cat. 1	Saline	0.0	38.3	Cat. 1
Triton X-100	9002-93-1	9.32E-01	Cat. 1	Saline	0.0	0.7	Cat. 1
1-Octanol	111-87-5	1.32E-02	Cat. 2A	Mineral oil	0.0	96.8	No pred
2,6-Dichlorobenzoyl chloride	4659-45-4	1.18E-03	Cat. 2A	Mineral oil	71.0	100.1	NC
2-Benzyloxyethanol	622-08-2	2.94E-04	Cat. 2A	Saline	2.0	101.3	No pred
2-Ethyl-1-hexanol	104-76-7	2.46E-02	Cat. 2A	Mineral oil	44.0	93.4	No pred
Acetone ^c	67-64-1	3.32E+01	Cat. 2A	Mineral oil	9.6	101.2	No pred
Cetyl pyridinium bromide (1% in aqueous solution)	140-72-7	n.c.	Cat. 2A	Saline	7.3	92.0	No pred
Chlorhexidine gluconate (20% in aqueous solution)	18472-51-0	n.c.	Cat. 2A	N/A	-	-	-
Cyclopentanol	96-41-3	3.07E-01	Cat. 2A	Saline	7.2	105.4	No pred

Deoxycholic acid Na salt (10% in aqueous solution)	302-95-4	n.c.	Cat. 2A	Saline	0.9	101.6	No pred
Ethanol ^c	64-17-5	8.12E+00	Cat. 2A	Mineral oil	22.6	95.9	No pred
Ethyl trans-3-ethoxyacrylate	5941-55-9	n.d.	Cat. 2A	Mineral oil	76.3	98.0	NC
Furfural	98-01-1	3.09E-01	Cat. 2A	Saline	5.7	99.8	No pred
gamma-Butyrolactone	96-48-0	3.94E-02	Cat. 2A	Saline	43.1	99.5	No pred
Isopropanol ^c	67-63-0	6.61E+00	Cat. 2A	Mineral oil	6.9	97.8	No pred
Lauryl sulphobetaine (10% in aqueous solution)	14933-08-5	n.c.	Cat. 2A	Saline	0.8	103.2	No pred
Methyl acetate ^c	79-20-9	7.03E+00	Cat. 2A	Mineral oil	45.5	96.0	No pred
Methyl cyanoacetate	105-34-0	4.69E-02	Cat. 2A	Saline	39.2	98.8	No pred
Methyl ethyl ketone ^c	78-93-3	1.31E+01	Cat. 2A	Mineral oil	37.5	100.4	No pred
Naphthalenesulfonic acid, butyl-, polymer with formaldehyde and 2-naphthalenesulfonic acid, sodium salt	188070-49-7	n.d.	Cat. 2A	Saline	0.0	82.4	No pred
<i>n</i> -Hexanol	111-27-3	1.17E-01	Cat. 2A	Mineral oil	0.0	98.3	No pred
Polyoxyethylene(20) hydrogenated tallow amine	61790-82-7	9.16E-15	>Cat. 2A	Saline	0.0	0.5	Cat. 1
Polyoxyethylene(23) lauryl ether	9002-92-0	2.03E-13	Cat. 2A	Saline	27.5	101.6	No pred
Propasol Solvent P	1569-01-3	1.80E-01	Cat. 2A	Saline	10.6	102.1	No pred
Sodium hydroxide (1% in aqueous solution)	1310-73-2	n.c.	Cat. 2A	Saline	0.0	97.6	No pred
Sodium lauryl sulfate	151-21-3	2.40E-13	>Cat. 2A	Saline	0.3	0.0	Cat. 1
Triton X-100 (5% in aqueous solution)	9002-93-1	n.c.	Cat. 2A	Saline	1.8	105.2	No pred
2-Methyl-1-pentanol	105-30-6	1.91E-01	Cat. 2B	Mineral oil	1.8	101.6	No pred
2-Pseudoionone	141-10-6	2.56E-03	Cat. 2B	Mineral oil	67.8	100.7	No pred
3-Chloropropionitrile	542-76-7	2.00E+00	Cat. 2B	N/A	-	-	-
Butyl Dipropasol Solvent	29911-27-1	4.74E-03	Cat. 2B	Saline	0.5	100.0	No pred
Diethyl toluamide	134-62-3	4.42E-01	Cat. 2B	Mineral oil	8.0	95.9	No pred
Ethyl-2-methyl acetoacetate	609-14-3	9.15E-02	Cat. 2B	Mineral oil	1.7	99.4	No pred
Glycolic acid (10% in aqueous solution)	79-14-1	n.c.	Cat. 2B	Saline	4.6	100.5	No pred
Isobutanal ^c	78-84-2	2.19E+01	Cat. 2B	Mineral oil	6.7	94.6	No pred
Isopropyl acetoacetate	542-08-5	9.61E-02	Cat. 2B	Mineral oil	56.2	99.0	No pred
Monoethanolamine (10% in aqueous solution)	141-43-5	n.c.	Cat. 2B	Saline	1.3	98.5	No pred
<i>n</i> -Butanal ^c	123-72-8	1.44E+01	Cat. 2B	Mineral oil	4.5	100.5	No pred
S-Bioallethrin	28434-00-6	4.70E-06	Cat. 2B	N/A	-	-	-
Toluene	108-88-3	3.16E+00	>Cat. 2B	Mineral oil	101.3	99.5	NC
1,2,3-Trichloropropane	96-18-4	3.86E-01	NC	Mineral oil	101.1	102.7	NC
1,2,4-Trimethylbenzene	95-63-6	2.15E-01	NC	Mineral oil	95.8	101.2	NC
1,2,6-Hexanetriol	106-69-4	1.06E-05	NC	Saline	110.2	103.3	NC

1,3-Dibromopropane	109-64-8	3.15E-01	NC	Mineral oil	97.9	95.6	NC
1,3-Di-iso-propyl benzene	99-62-7	4.10E-02	NC	Mineral oil	97.3	93.6	NC
1,4-Dibromobutane	110-52-1	7.96E-02	NC	Mineral oil	95.6	106.3	NC
1,5-Dibromopentane	111-24-0	2.35E-02	NC	Mineral oil	98.0	103.2	NC
1,5-Hexadiene ^c	592-42-7	2.86E+01	NC	Mineral oil	100.0	102.3	NC
1,6-Dibromohexane	629-03-8	7.39E-03	NC	Mineral oil	97.1	103.7	NC
1,9-Decadiene	1647-16-1	3.20E-01	NC	Mineral oil	96.7	98.0	NC
1-Bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	1.64E-01	NC	Mineral oil	107.7	107.0	NC
1-Ethyl-3-methylimidazolium ethyl sulphate	342573-75-5	n.d.	NC	Saline	103.2	101.5	NC
1-Methylpropylbenzene	135-98-8	1.76E-01	NC	Mineral oil	96.0	99.4	NC
1-Nitropropane	108-03-2	1.27E+00	NC	N/A	-	-	-
2,2-Dimethyl-3-pentanol	3970-62-5	4.14E-01	NC	Mineral oil	84.7	100.7	NC
2-(2-Ethoxy ethoxy) ethanol	111-90-0	1.25E-02	NC	Saline	97.0	97.5	NC
2,4-Dicyano-1-butene	1572-52-7	7.08E-03	NC	Mineral oil	31.5	101.2	No pred
2,4-Pentanediol	625-69-4	7.30E-03	NC	Saline	83.8	99.3	NC
2,4-Pentanedione	123-54-6	1.16E+00	NC	Mineral oil	9.4	101.4	No pred
2-Ethoxyethanol	110-80-5	4.14E-01	NC	Saline	89.7	98.8	NC
2-Ethylhexanoyl chloride	760-67-8	5.78E-02	NC	Mineral oil	50.0	98.8	No pred
2-Methoxyethanol	109-86-4	7.48E-01	NC	Saline	92.2	100.1	NC
2-Ethoxyethyl methacrylate	2370-63-0	1.03E-01	NC	Mineral oil	105.5	106.7	NC
2-Ethylhexyl <i>p</i> -dimethylamino benzoate	21245-02-3	4.72E-06	NC	Mineral oil	105.4	102.2	NC
2-Ethylhexyl <i>p</i> -dimethylamino benzoate (10% in aqueous solution)	21245-02-3	n.c.	NC	N/A	-	-	-
2-Ethylhexyl thioglycolate	7659-86-1	1.14E+00	NC	Mineral oil	104.9	102.6	NC
2-Methoxy-3,4-dihydropyran	4454-05-1	2.77E+00	NC	Mineral oil	44.9	100.7	No pred
2-Methylpentane ^c	107-83-5	2.78E+01	NC	Mineral oil	103.1	101.9	NC
3,3-Dimethylpentane ^c	562-49-2	1.01E+01	NC	Mineral oil	92.6	102.4	NC
3-Ethyl toluene	620-14-4	3.15E-01	NC	Mineral oil	102.2	101.9	NC
3-Methoxy-1,2-propanediol	623-39-2	1.92E-03	NC	Saline	93.6	98.1	NC
3-Methylhexane ^c	589-34-4	8.30E+00	NC	Mineral oil	106.0	104.7	NC
3-Phenoxy benzaldehyde	39515-51-0	2.19E-05	NC	Mineral oil	71.8	100.5	NC
3-Phenoxy benzyl alcohol	13826-35-2	3.13E-07	NC	N/A	-	-	-
4-Bromophenetole	588-96-5	9.89E-03	NC	Mineral oil	89.2	101.0	NC
Acid Red 92 (1% in aqueous solution)	18472-87-2	n.c.	NC	Saline	21.3	103.4	No pred
Allyl methacrylate	96-05-9	8.89E-01	NC	Mineral oil	102.9	102.3	NC

Amyl acetate	628-63-7	5.55E-01	NC	Mineral oil	96.4	102.1	NC
Benzotrichloride	98-07-7	1.66E-02	NC	Mineral oil	89.5	104.3	NC
Benzyl alcohol (1% in aqueous solution)	100-51-6	n.c.	NC	N/A	-	-	-
Bicyclo [2,2,1]hept-5-ene-2-carbonitrile	95-11-4	2.73E-02	NC	Mineral oil	88.3	101.9	NC
bis-(3-Triethoxisilylpropyl)-tetrasulphide	40372-72-3	2.20E-11	NC	Mineral oil	102.2	103.4	NC
Brij-35 (10% in aqueous) (Chemical name: Polyoxyethylene 23 lauryl ether)	9002-92-0	n.c.	NC	Saline	118.0	103.8	NC
Bromo-2-butane ^c	78-76-2	8.23E+00	NC	Mineral oil	101.8	100.2	NC
Calcium thioglycolate (10% in aqueous solution)	814-77-1	n.c.	NC	Saline	94.9	105.9	NC
Cellosolve acetate	111-15-9	3.97E-01	NC	Saline	102.0	98.8	NC
Cetyl pyridinium bromide (0.1% in aqueous solution)	140-72-7	n.c.	NC	Saline	80.2	103.4	NC
Cetyl pyridinium chloride (0.1% in aqueous solution)	6004-24-6	n.c.	NC	Saline	65.4	102.4	No pred
cis-Cyclooctene	931-87-3	1.16E+00	NC	Mineral oil	104.6	100.9	NC
Cyclohexanone	108-94-1	5.39E-01	NC	Saline	6.5	103.6	No pred
Di-isobutyl ketone	108-83-8	2.87E-01	NC	Mineral oil	104.3	103.3	NC
Di-isopropanolamine (10% in aqueous solution)	110-97-4	n.c.	NC	Saline	96.9	102.1	NC
Dimethyl carbonate ^c	616-38-6	7.49E+00	NC	Mineral oil	49.1	106.8	No pred
Dimethyl hydropolysiloxane	68037-59-2	1.68E-02	NC	Mineral oil	101.3	102.2	NC
Dimethyl sulfoxide	67-68-5	8.29E-02	NC	Saline	95.3	94.8	NC
Di- <i>n</i> -propyl disulphide	629-19-6	6.64E-02	NC	Mineral oil	94.6	103.5	NC
Dioctyl ether	629-82-3	1.12E-03	NC	Mineral oil	101.3	100.7	NC
Dodecane	112-40-3	3.15E-02	NC	Mineral oil	96.3	102.3	NC
Ethanol (10% in aqueous solution)	64-17-5	n.c.	NC	Saline	98.5	97.4	NC
Ethyl acetate ^c	141-78-6	1.31E+01	NC	Mineral oil	97.4	102.3	NC
Ethyl acetoacetate	141-97-9	1.24E-01	NC	Saline	62.6	102.7	No pred
Ethylene glycol diethyl ether	629-14-1	2.57E+00	NC	Saline	104.2	101.6	NC
Ethylhexyl salicylate	118-60-5	9.51E-07	NC	Mineral oil	107.7	109.3	NC
Ethyl thioglycolate	623-51-8	3.86E-01	NC	Mineral oil	84.0	107.4	NC
Ethyl trimethyl acetate	3938-95-2	2.24E+00	NC	Saline	99.2	98.3	NC
Fungitrol zinc 8% fungicide (Chemical name: Zinc naphthenate)	12001-85-3	n.c.	NC	Mineral oil	76.2	99.0	NC
Furan ^c	110-00-9	7.95E+01	NC	Mineral oil	116.3	104.4	NC
gamma-Chloropropyltrimethoxy silane	2530-87-2	4.53E-02	NC	Mineral oil	40.0	99.9	No pred
gamma-Glycidylxypropyltrimethoxy silane	2530-83-8	1.90E-03	NC	Saline	77.3	97.6	NC
gamma-Mercaptopropyl trimethoxy silane	4420-74-0	2.08E-02	NC	Mineral oil	108.4	104.8	NC

gamma-Methacryloxypropyltrimethoxy silane	2530-85-0	1.69E-03	NC	Mineral oil	90.8	103.5	NC
Genomoll P (Chemical name: Tris(2-chloroethyl) phosphate)	115-96-8	5.22E-05	NC	Mineral oil	21.6	102.8	No pred
Glycediol	556-52-5	7.46E-01	NC	Saline	69.4	103.7	No pred
Glycerol	56-81-5	1.06E-05	NC	Saline	89.8	97.2	NC
Glycerol (10% in aqueous solution)	56-81-5	n.c.	NC	Saline	102.6	102.7	NC
Glycidyl methacrylate	106-91-2	8.29E-02	NC	Mineral oil	3.7	99.0	No pred
Isobornyl acetate	125-12-2	1.43E-02	NC	Mineral oil	96.9	98.4	NC
Isononylaldehyde	5435-64-3	1.80E-01	NC	Mineral oil	32.7	104.0	No pred
Isooctyl acrylate	29590-42-9	2.05E-02	NC	Saline	90.3	99.3	NC
Isopropyl bromide ^c	75-26-3	2.85E+01	NC	Mineral oil	105.6	109.4	NC
Isopropyl myristate	110-27-0	1.08E-04	NC	Mineral oil	99.7	103.0	NC
Isopropyl myristate (10% in aqueous solution)	110-27-0	n.c.	NC	N/A	-	-	-
Kerosine	8008-20-6	3.15E-02	NC	Mineral oil	98.5	100.4	NC
Lactic acid (10% in aqueous solution)	50-21-5	n.c.	NC	Saline	5.6	99.5	No pred
Methanol ^c	67-56-1	1.58E+01	NC	Mineral oil	70.1	106.6	NC
Methylal ^c	109-87-5	5.49E+01	NC	Mineral oil	102.6	103.8	NC
Methyl amyl ketone	110-43-0	6.55E-01	NC	Mineral oil	91.7	101.7	NC
Methyl cyclopentadiene dimer	26472-00-4	3.60E-02	NC	Mineral oil	100.8	100.2	NC
Methyl cyclopentane ^c	96-37-7	1.78E+01	NC	Mineral oil	102.2	104.4	NC
Methyl isobutyl ketone	108-10-1	2.90E+00	NC	Mineral oil	88.5	107.3	NC
Methyl tetraglycol	23783-42-8	1.43E-05	NC	Saline	103.8	106.4	NC
Methyl triglycol	112-35-6	4.63E-04	NC	Saline	108.1	105.0	NC
Methyl trimethyl acetate	598-98-1	4.76E+00	NC	Mineral oil	104.3	105.1	NC
Metolachlor	51218-45-2	6.73E-04	NC	Mineral oil	114.1	104.8	NC
<i>m</i> -Methoxythylbenzaldehyde	591-31-1	9.89E-03	NC	Mineral oil	34.8	97.0	No pred
<i>m</i> -Phenylene diamine (10% in aqueous solution)	108-45-2	n.c.	NC	Saline	94.3	102.9	NC
<i>n</i> -Amyl bromide	110-53-2	1.65E+00	NC	Mineral oil	93.6	100.0	NC
<i>n</i> -Butyl acetate	123-86-4	1.59E+00	NC	Mineral oil	103.2	106.7	NC
<i>n</i> -Hexane ^c	110-54-3	2.00E+01	NC	Mineral oil	112.0	106.4	NC
<i>n</i> -Hexyl bromide	111-25-1	5.41E-01	NC	Mineral oil	98.5	105.0	NC
Nitrobenzene	98-95-3	2.79E-02	NC	Mineral oil	98.1	104.6	NC
<i>n,n</i> -Dimethylguanidine sulfate	598-65-2	4.04E+00	NC	Saline	78.6	101.0	NC
<i>n</i> -Octyl bromide	111-83-1	6.90E-02	NC	Mineral oil	90.7	98.3	NC
Octadecyl isocyanate	112-96-9	2.60E-04	NC	N/A	-	-	-

<i>p</i> -Chlorobenzotrifluoride	98-56-6	9.08E-01	NC	Mineral oil	109.9	105.6	NC
Pentaerythritol, propoxylated	9051-49-4	4.14E-26	NC	Saline	101.7	100.4	NC
Perfluoro- <i>n</i> -hexane	355-42-0	3.19E+01	NC	N/A	-	-	-
Petroleum ether	8032-32-4	1.98E+00	NC	Mineral oil	99.3	105.8	NC
Piperonyl butoxide	51-03-6	6.96E-07	NC	Mineral oil	93.9	96.4	NC
<i>p</i> -Methyl thiobenzaldehyde	3446-89-7	2.59E-03	NC	N/A	-	-	-
Polyethylene glycol 400	25322-68-3	3.98E-08	NC	Saline	97.2	101.3	NC
Polyethylene glycol 400 (10% in aqueous solution)	25322-68-3	n.c.	NC	Saline	100.1	97.0	NC
Polyethylene glycol 600	25322-68-3	3.98E-08	NC	Saline	110.9	105.6	NC
Polyethylene glycol dimethylether	24991-55-7	n.d.	NC	Saline	106.6	102.4	NC
Polyethylene glycol monolaurate	9004-81-3	n.d.	NC	Saline	2.3	101.1	No pred
Polyoxyethylene(13) (mono-, di-, tri-)styrenated phenyl ether	104376-75-2	n.d.	NC	Saline	8.3	40.8	Cat. 1
Polyoxyethylene(14) tribenzylated phenyl ether	116998-28-8	n.d.	NC	Saline	94.1	95.5	NC
Polyoxyethylene(19) (mono-, di-, tri-)styrenated phenyl ether	104376-75-2	n.d.	NC	Saline	102.2	99.8	NC
Polyoxyethylene(40) hydrogenated castor oil	61788-85-0	1.37E-37	NC	Saline	103.6	94.3	NC
Polyoxyethylene(160) sorbitan triisostearate	54392-28-8	n.d.	NC	Saline	109.0	98.2	NC
Polyoxyethylene hydrogenated castor Oil (60E.O.)	61788-85-0	1.37E-37	NC	Saline	117.9	101.2	NC
Potassium oleate (16% in aqueous solution)	143-18-0	4.93E-10	NC	Saline	0.0	93.1	No pred
Propiconazole	60207-90-1	4.79E-07	NC	Mineral oil	7.6	105.8	No pred
Propylene glycol	57-55-6	1.48E-02	NC	Saline	92.5	104.3	NC
Silan 108 (Chemical name: Trimethoxyoctylsilane)	3069-40-7	4.77E-03	NC	Mineral oil	99.5	102.0	NC
Silicone Y-4081 (Chemical name: Hexamethyldisiloxane)	107-46-0	5.21E+00	NC	Mineral oil	113.5	107.2	NC
Sodium chloride isotonic solution	7647-14-5	n.c.	NC	Saline	92.0	92.0	NC
Sodium lauryl sulphate (3% in aqueous solution)	151-21-3	n.c.	NC	Saline	1.1	100.4	No pred
Sodium lauryl sulphate (1% in aqueous solution)	151-21-3	n.c.	NC	Saline	0.5	99.6	No pred
Sodium polyoxyethylene laurylether sulphate (27% in aqueous solution)	68585-34-2	n.c.	NC	Saline	0.2	53.9	Cat. 1
Sodium salicylate (10% in aqueous solution)	54-21-7	n.c.	NC	Saline	99.4	98.4	NC
Sorbitan monolaurate	1338-39-2	1.25E-15	NC	Saline	33.2	90.4	No pred
Styrene	100-42-5	6.74E-01	NC	Mineral oil	95.4	100.0	NC
Thiodiglycol	111-48-8	3.23E-05	NC	Saline	98.2	107.5	NC
Trichloroacetic acid (3% in aqueous solution)	76-03-9	n.c.	NC	Saline	7.0	100.6	No pred
Tricresyl phosphate	1330-78-5	1.62E-03	NC	Mineral oil	113.4	99.6	NC
Triethanolamine	102-71-6	4.51E-07	NC	Saline	101.6	99.9	NC
Triethanolamine (10% in aqueous solution)	102-71-6	n.c.	NC	Saline	99.9	100.2	NC

Triethanolamine orthovanadate (30% in aqueous solution)	13476-99-8	n.c.	NC	N/A	-	-	-
Triethanolamine orthovanadate (3% in aqueous solution)	13476-99-8	n.c.	NC	N/A	-	-	-
Triethoxyoctylsilane	2943-75-1	1.95E-04	NC	Mineral oil	104.3	106.5	NC
Triethylene glycol	112-27-6	2.65E-05	NC	Saline	101.3	107.5	NC
Trifluoroethyl methacrylate	352-87-4	4.78E+00	NC	Mineral oil	112.7	108.7	NC
Triisooctylamine	25549-16-0	1.34E-06	NC	Mineral oil	100.1	103.6	NC
Trimethoxy(3,3,3-trifluoropropyl)silane	429-60-7	1.41E+00	NC	Mineral oil	112.1	105.5	NC
Triphenyl phosphite	101-02-0	1.02E-05	NC	Mineral oil	99.7	103.3	NC
Triton X-100 (1% in aqueous solution)	9002-93-1	n.c.	NC	Saline	8.4	102.6	No pred
Tween 20	9005-64-5	1.15E-33	NC	Saline	82.9	91.3	NC
Tween 80	9005-65-6	2.22E-36	NC	Saline	114.1	104.6	NC
Tween 80 (10% in aqueous solution)	9005-65-6	n.c.	NC	Saline	96.7	98.9	NC
Vinyl 2-ethylhexanoate	94-04-2	5.49E-02	NC	Mineral oil	107.0	100.2	NC
Vinyl trimethoxy silane	2768-02-7	2.06E+00	NC	Saline	18.7	104.6	No pred
Vinyl tris (beta-methoxyethoxy) silane	1067-53-4	1.32E-04	NC	Mineral oil	74.7	102.2	NC
Xylene	1330-20-7	9.08E-01	NC	Saline	100.3	104.4	NC

HVS: Highly volatile substances (vapor pressure >6kPa, 25°C), N/A: Not applicable for insoluble in the test solvent, No pred: No prediction can be made, NC: No Category

a: 蒸気圧はEPI suiteにより算出された。"n.c."は希釈溶液のため"計算不可(not calculated)"を示し、"n.d."はEPI suiteにデータ登録がないため"no data"と示した。

b: GHS区分にはSTE SRDとDRDに記載された区分結果を用いた。5%、0.05%の濃度で得られた細胞生存率がそれぞれ70%を超えるものをNCとした。

5%の濃度で得られた細胞生存率が70%以下、0.05%の濃度で得られた細胞生存率が70%を超えるものをNo prediction can be made (No pred)とした。

5%、0.05%の濃度で得られた細胞生存率がそれぞれ70%以下のものをCat. 1とした。なお、No predとCat. 1の結果をIrritantとした。

c: 被験物質は高揮発性物質のため、第二章実験の詳細4に従って実施された。

		STE		Accuracy	86.6% (194/224)
		Irritant	NC		
in vivo GHS	Irritant	77	3	FNR	3.8% (3/ 80)
	NC	27	117	Sensitivity	96.3% (77/ 80)
				Specificity	81.3% (117/144)

"FPR": False-positive rate "FNR": False-negative rate

図 7 STE 法適用範囲内の物質に高揮発性物質を加えたデータセットにおける STE 法の予測性

表 6 の結果から予測性を評価した。表 6 の結果の No pred と Cat. 1 は Irritant として評価に用いた。計算方法について、第二章の実験の詳細 6 を参照した。

考察

本章では、STE 法の適用範囲外の一つである高揮発性物質は、溶媒を生理食塩水から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できることが明らかとなった。この要因について、高揮発性物質の揮発量が STE 法の眼刺激性評価に影響したかどうか確認するため、高揮発性物質 9 種の揮発による減少率と細胞生存率の関連性を評価した。しかし、全体的な傾向として、揮発による減少率と細胞生存率の関連性は低いことが示唆された (表 5、図 6)。また、秤量した被験物質重量から揮発した重量により揮発率を確認しても溶媒間で得られた結果に対する結論は変わらなかった (data not shown)。

次に被験物質の $\log K_{ow}$ の値により溶媒間の被験物質の分配を予測し、細胞毒性への影響について考察した。例えば水またはオクタノールへの親和性によっては物質の細胞表面への到達性が低下したことが推察される。偽陰性は 4 物質 (Acetone、Ethanol、Isopropanol、Methanol) とも $\log K_{ow}$ の値が実測値で 0.18 以下であった (表 5)。この値は高揮発性物質の中でも低く、また水への親和性がオクタノールへの親和性より高いことを示している。この結果から、 $\log K_{ow}$ がマイナスまたは 0 付近の物質は被験物質溶液として細胞へ暴露された際に水性の生理食塩水への親和性が高いため、細胞表面の脂質二重膜に到達し難いことが考えられた。一方、油性のミネラルオイルを溶媒とした場合、生理食塩水を溶媒とした場合より細胞の脂質二重膜へ暴露されやすい可能性が考えられた。0.18 以下の物質は偽陰性物質 4 種以外に 2 つの GHS NC の物質 (Methanol、Methylal) があつた (表 5)。この 2 物質の眼刺激性は NC として一致していた。しかし、実際は偽陰性物質 4 種と同様に生理食塩水中では細胞表面への到達性が低かったため NC の結果となった可能性が考えられた。特に、Methanol はミネラルオイルを溶媒とした際に GHS NC / Irritant の区分の閾値付近である 70.1%まで細胞生存率の低下が認められた (表 5)。そ

のため、溶媒にミネラルオイルを用いたことで Methanol が細胞表面に到達しやすくなり、細胞毒性が高くなった可能性が考えられた。

STE 法標準プロトコールに従った試験で偽陽性だった Ethyl acetate は、溶媒をミネラルオイルに変更したところ、NC として評価された (表 5)。表 7 に示すように、Ethyl acetate (100%濃度) の Draize 試験の結果は、GHS NC であった (ECETOC, 1998)。GHS Cat. 2 は角膜混濁、結膜発赤および結膜浮腫の 24hr、48hr、72hr における平均スコアから区分されるが、Ethyl acetate の 24hr でのスコアはいずれの個体も Cat. 2 相当の影響が認められている (表 7)。しかし 48hr 以降の影響は非常に小さくなったため、Ethyl acetate は角膜混濁や結膜の炎症に関連する眼刺激性の回復性が高い物質であることが確認されている。すなわち Ethyl acetate は急性的な影響は強いが、その影響は持続せず回復が早かった。そのため、本章での STE 法試験条件の変更は Ethyl acetate の GHS NC と Cat. 2 のボーダーライン上と考えられる Draize 試験の結果を反映した可能性がある。一方、STE 法標準プロトコールに従って試験して適正に評価できた Dimethyl carbonate は溶媒をミネラルオイルに変更することで偽陽性となった。Dimethyl carbonate の $\log K_{ow}$ は 0.23 であり、偽陰性物質の 0.18 から -0.31 の範囲とほぼ同等の値と考えられたため、溶媒をミネラルオイルへ変更することで細胞に対してより暴露されやすくなった可能性が考えられた。Dimethyl carbonate も Ethyl acetate と同様に Draize 試験の結果を確認することでより深い考察が可能かもしれない。

表 7 Ethyl acetate の Draize 試験の結果 (n=4)

Rabbit 1		24hr	48hr	72hr	168hr
Cornea	Opacity	2	0	0	0
	Area involved	1	0	0	0
Iris		0	0	0	0
Conjunctiva	Redness	2	1	1	0
	Chemosis	1	1	0	0
	Discharge	1	0	0	0

Rabbit 2		24hr	48hr	72hr	168hr
Cornea	Opacity	1	0	0	0
	Area involved	1	0	0	0
Iris		1	0	0	0
Conjunctiva	Redness	2	1	1	0
	Chemosis	1	1	0	0
	Discharge	1	0	0	0

Rabbit 3		24hr	48hr	72hr	168hr
Cornea	Opacity	1	0	0	0
	Area involved	1	0	0	0
Iris		0	0	0	0
Conjunctiva	Redness	2	1	1	0
	Chemosis	1	1	0	0
	Discharge	1	0	0	0

Rabbit 4		24hr	48hr	72hr	168hr
Cornea	Opacity	1	0	0	0
	Area involved	1	0	0	0
Iris		0	0	0	0
Conjunctiva	Redness	1	1	1	0
	Chemosis	1	0	0	0
	Discharge	1	0	0	0

Ethyl acetate の Draize 試験の結果について、ECETOC のデータベースを参照した (ECETOC, 1998)。被験物質投与から 24hr 後で角膜の混濁が認められており、うち Rabbit 1 はスコア 2 の影響であった。また、Rabbit 2 は虹彩損傷も認められた。結膜への影響は全ての個体で同様の傾向であった。特に 24hr 後のスコアが高く、Rabbit 1、2、3 では発赤がスコア 2 として評価された。いずれの個体も 7 日目 (168hr) までに完全に回復してスコア 0 となった。この結果から表 1 及び表 2 に従って GHS 区分すると、いずれの個体においても 24hr、48hr、72hr の角膜混濁および虹彩損傷の平均スコアが 1 を満たさず、結膜の発赤、浮腫も 24hr、48hr、72hr の平均スコアがそれぞれで 2 を満たさないため、NC となった。

STE 法の高揮発性物質に関する適用範囲を拡大した STE 法の予測性を検討した。偽陰性物質のうち、2,6-Dichlorobenzoyl chloride 及び Ethyl trans-3-ethoxyacrylate の細胞生存率は 5% の暴露濃度で 71.0%、76.3% であった。これら細胞生存率は GHS NC / Irritant を区分する閾値である 70% 付近であった。Toluene には 2 つの Draize 試験の結果があり、一方は GHS NC、もう一方は GHS 2B であった (NICEATM, 2013)。これら 2 つの Draize 試験の結果から、Toluene は弱い Irritant と評価され、STE 法での偽陰性の結果は試験法の信頼性を失うようなものではないと結論されている (NICEATM, 2013)。また、Adriaens *et al.* (2017b) は Testing Strategy を構築する際に各試験法の偽陰性率の目安として、

GHS Cat.1 を NC にする過小評価率を 0%、GHS Cat. 2 を NC にする過小評価率を 20%未満、全体としての偽陰性率 10%未満を指標とすべきと述べている。本章の結果は Cat. 1 の過小評価率は 0%であり、GHS Cat. 2 を NC にする過小評価率、すなわち本章においては全体としての偽陰性率が 3.8%であったため、十分に許容できる偽陰性率であると考えられた (図 8)。

偽陽性物質は多様な Organic function group を持つ物質であったため、偽陽性物質の特徴を見出すことは難しかった。Adriaens *et al.*, (2017b) は偽陽性率について、GHS 区分で NC となる物質を適正に NC と評価した割合を示す Specificity で 60%以上が必要であると報告している。本章の検討における Specificity は 81.3%であったため、許容できる偽陽性率であると考えられた (図 7)。

		STE		Cat. 1 FNR	0.0% (0/44)
		Irritant	NC		
in vivo GHS	Cat. 1	44	0	Cat. 2 FNR	8.3% (3/36)
	Cat. 2	33	3	FNR	3.8% (3/80)

FNR: False-negative rate

図 8 GHS 区分ごとの偽陰性率

GHS Cat. 1 (44 物質) 及び Cat. 2 (36 物質) に区分される被験物質 (計 80 物質) について偽陰性率を算出した。Cat. 1 FNR は Cat. 1 から得られた偽陰性の割合を示している。Cat. 2 FNR は Cat. 2 から得られた偽陰性の割合を示している。FNR は GHS Cat.1 及び Cat. 2 の物質から得られた偽陰性の割合を示している。

第三章 STE 法による油溶性混合物の眼刺激性評価

本章における検討の背景と課題

STE 法は純粋な化学物質と複数の化学物質が共存する混合物に対する眼刺激性を予測する試験法として OECD TG 491 に記載されている。しかし、混合物に関し、化粧品企業が持つ様々な製品カテゴリーを用いた検討はなされていない。例えば、TG に記載されている予測性のうち、混合物で評価されたものは主にシャンプー (Shampoos) やコンディショナー (Conditioners) のような洗い流すことができる製品の水溶性混合物である (NICEATM 2013)。化学物質の評価では、その化学物質のみの影響を評価できるが、混合物の場合には他の成分による影響を考慮しなければならない。例えば、pH、粘度、吸収促進剤の存在、安定性への影響である。そのため、その他の製品カテゴリーの中でこれまで検討されていない複数の油性化学物質が共存する油溶性混合物について眼刺激性を適正に評価可能か検討した。

検討結果

1. 油溶性混合物の GHS NC / Irritant の予測性

油溶性混合物を用いて、STE 法による GHS NC / Irritant の予測性を検討した研究は行われていない。そこで本章では、油溶性混合物の評価に、艶出しヘアスタイリング剤 (Hair grooming)、セット用ヘアスタイリング剤 (Hair dressing)、口紅 (Rouge)、防臭剤 (Deodorant)、オイルローション (Body lotion)、日焼け止めボディクリーム (Body cream)、保湿剤 (Moisturizing lotion) のカテゴリーから 24 種を選択し、STE 法を実施した。この 24 種は Draize 試験を実施していないため、その結果から特定さ

れた GHS 区分がない。そこで、本章では、他の OECD TG である RhCE 法によって区分された GHS NC / Irritant の結果と比較した (OECD, 2015b)。RhCE 法は細胞生存率 60%を閾値として「細胞生存率 > 60%」を GHS NC、「細胞生存率 ≤ 60%」を Irritant と分類する。

油溶性混合物 24 種の溶媒はいずれもミネラルオイルとした。24 種を STE 法で評価した結果、24 種中 22 種で RhCE 法の区分結果と一致した (表 8)。GHS NC / Irritant の結果が一致しなかった 2 種は Code h (Hair dressing) と Code m (Rouge) であった。Code h の STE 法の 5%暴露濃度での細胞生存率は 63.0%、RhCE 法での細胞生存率は 102.2%であり、Code m の STE 法の 5%暴露濃度での細胞生存率は 52.9%、RhCE 法での細胞生存率は 91.6%であった。この Code h と Code m の 2 種は RhCE 法と比較して、STE 法で眼刺激性が過大評価された。

表 8 油溶性混合物を用いた STE 法と RhCE 法の GHS NC / Irritant の試験結果

Code	Tested mixture category*	STE				RhCE (EpiOcular™)***	
		Test concentration (%)	Cell viability** (%)	SD	NC / Irritant	Cell viability (%)	NC / Irritant
a	Hair grooming	5	48.6	5.5	Irritant	16.1	Irritant
		0.05	99.9	4.4			
b	Hair grooming	5	3.1	7.0	Irritant	37.1	Irritant
		0.05	74.1	4.8			
c	Hair grooming	5	32.9	2.5	Irritant	22.9	Irritant
		0.05	97.5	3.2			
d	Hair grooming	5	58.5	11.3	Irritant	26.3	Irritant
		0.05	100.8	3.5			
e	Hair grooming	5	104.2	2.7	NC	95.4	NC
		0.05	101.5	2.9			
f	Hair grooming	5	101.5	2.6	NC	94.1	NC
		0.05	102.2	2.2			
g	Hair grooming	5	87.8	3.9	NC	123.2	NC
		0.05	93.9	5.6			
h	Hair dressing	5	63.0	4.6	Irritant	102.2	NC
		0.05	93.1	5.2			
i	Rouge (Lip gloss)	5	101.2	2.4	NC	100.1	NC
		0.05	100.3	1.5			
j	Rouge (Lip gloss)	5	100.0	2.4	NC	92.0	NC
		0.05	101.6	2.6			
k	Rouge (Lip gloss)	5	102.9	2.7	NC	91.3	NC
		0.05	103.6	1.9			
l	Rouge (Lip gloss)	5	100.9	7.0	NC	94.9	NC
		0.05	104.3	4.9			
m	Rouge (Lip gloss)	5	52.9	2.2	Irritant	91.6	NC
		0.05	105.0	5.4			
n	Deodorant (underarm, roll on type)	5	92.7	2.7	NC	90.6	NC
		0.05	96.9	1.7			
o	Deodorant (underarm, roll on type)	5	87.6	1.0	NC	83.6	NC
		0.05	96.7	4.6			
p	Body lotion (oil type)	5	93.7	9.3	NC	103.1	NC
		0.05	105.5	4.9			
q	Body lotion (oil type)	5	93.9	4.3	NC	103.3	NC
		0.05	97.9	1.8			
r	Body lotion (oil type)	5	94.6	2.0	NC	104.7	NC
		0.05	95.7	2.8			
s	Body lotion (oil type)	5	98.0	2.3	NC	109.2	NC
		0.05	99.8	1.9			
t	Body cream (Sunscreen)	5	90.5	10.5	NC	102.3	NC
		0.05	106.0	3.6			
u	Body cream (Sunscreen)	5	104.0	7.1	NC	108.9	NC
		0.05	106.5	2.9			
v	Body cream (Sunscreen)	5	99.4	8.7	NC	104.8	NC
		0.05	104.1	6.3			
w	Body cream (Sunscreen)	5	100.8	3.8	NC	103.7	NC
		0.05	103.6	2.4			
x	Moisturizing lotion	5	89.9	4.0	NC	105.9	NC
		0.05	97.3	3.6			

SD: Standard Deviation NC: No Category

* 製品カテゴリーは米国パーソナルケア製品評議会 (PCPC) の化粧品成分審査委員会 (CIR) で記載される製品カテゴリーを参照して記載された。

** 細胞生存率は3回の結果 (n=3) から平均値を算出した。

*** 被験物質を100%で30分間暴露した。細胞生存率60%を閾値として「細胞生存率 > 60%」をNC、「細胞生存率 ≤ 60%」をIrritantと分類した。

考察

油溶性混合物を用いて STE 法の予測性を検討した。STE 法と RhCE 法で異なる評価結果が得られた 2 種 (Code h; Hair dressing、Code m; Rouge) は、STE 法で Irritant、RhCE 法で NC と判定されており、RhCE 法による結果と比較した場合に STE 法で過大評価されたことになる。このことは、これらの混合物 2 種が上市後に眼刺激性に関する問題を起こしていないことから示唆される。Code h は乳化剤としてカチオン活性剤が含まれている。STE 法で 5%濃度によって暴露することで、カチオン活性剤が溶媒中に選択的に溶解し細胞毒性を及ぼした可能性が考えられた。Code m は配合原料の構造に眼刺激性のあるヒドロキシ酸を含む原料が配合されており、このヒドロキシ酸が溶媒中に選択的に溶解することで細胞毒性を及ぼした可能性が考えられた。複数の化学物質が共存する混合物は、溶媒の希釈により刺激に関わる物質が溶媒中で選択的に溶解するような場合に毒性が強くなることが考えられた。一方、RhCE 法は被験物質を 100%で 30 分間暴露するため、刺激性物質が選択的に溶解するような状況はなかったと考えられた。

しかし、眼に異物が混入した際に生体応答として流涙があり、その際に混合物から眼刺激性に関わる物質が選択的に溶解する可能性がある。このため、STE 法のような溶媒を用いる試験系は実際の眼への暴露状況を反映していることが考えられた。点眼剤のような医薬品と異なり、通常は眼に入れない化粧品が暴露された場合はすぐに洗い流すと考えられるため、眼刺激性に関する問題が起きていない可能性がある。すなわち、STE 法は眼刺激性を適正に評価したことが考えられた。

以上より、本章で評価した油溶性混合物について、STE 法は GHS NC / Irritant を精度良く評価可能であり、安全性評価に有用な試験法であることが明らかとなった。

第四章 混合物の眼刺激性評価における STE 法の技術移転性と施設間再現性

本章における検討の背景と課題

第三章でも述べたように、異物が眼に接触した時点で始まる眼刺激性は香粧品を評価する際には、混合物を評価することが消費者の安全性担保のために重要である。STE 法は混合物の評価が可能であると結論された。また、これまでの化学物質を用いた STE 法のバリデーション研究において、良好な施設間再現性が示されている (Sakaguchi *et al.*, 2011)。そこで STE 法の認知度がさらに向上した際に他施設でも同様に評価可能か調べるため、技術移転性と混合物による施設間再現性を検証した。

検討結果

1. 技術移転性の検証

STE 法の実施経験がない 3 か所の受託試験機関 (Lab. A、Lab. B、Lab. C) に対して STE 法の紹介とプロトコールを配布し、一度試験機関を訪問して技術確認することで STE 法の技術移転を行った。施設は米国の Institute for In Vitro Sciences Inc.、ドイツの Envigo CRS GmbH、一般財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所が参加した。技術移転性の確認は、水溶性化学物質 3 種 (Sodium lauryl sulphate; SLS、Calcium thioglycolate; CT、Tween 80; TW80)、油溶性化学物質 2 種 (1-Octanol、Dodecane)、計 5 種を用いて STE rank classification (3 区分の Minimal, Moderate, Severe; 表 9 参照) による比較検証を行った (表 10)。5 物質すべてにおいて、3 つの Lab. A、Lab. B、Lab. C は STE 法開発施設である Lab. D と同じ STE rank classification が得られた。

表9 STE rank classification を含めた STE 法の予測モデル

Cell viability		UN GHS classification	No Category (NC) or Irritant	STE rank classification
At 5%	At 0.05%			
> 70%	> 70%	No Category (NC)	No Category (NC)	Minimal
≤ 70%	> 70%	No prediction can be made (No pred)	Irritant	Moderate
≤ 70%	≤ 70%	Category 1 (Cat.1)		Severe

STE 法で得られた細胞生存率を基に評価される GHS 区分、GHS NC / Irritant および STE rank classification を示している。

表 10 水溶性化学物質 3 種と油溶性化学物質 2 種を用いた STE 法の技術移転性確認

Substance name	Solvent	Test concentration (%)	Lab. A			Lab. B			Lab. C			Lab. D**		
			Cell viability (%)*	NC / Irritant	STE rank classification	Cell viability (%)*	NC / Irritant	STE rank classification	Cell viability (%)*	NC / Irritant	STE rank classification	Cell viability (%)*	NC / Irritant	STE rank classification
SLS	Saline	5	1.2	Irritant	Severe	1.5	Irritant	Severe	0.0	Irritant	Severe	0.0	Irritant	Severe
		0.05	1.0			0.0			2.2			0.4		
CT	Saline	5	12.5	Irritant	Moderate	9.4	Irritant	Moderate	33.5	Irritant	Moderate	11.3	Irritant	Moderate
		0.05	100.4			101.8			103.8			99.2		
TW80	Saline	5	95.0	NC	Minimal	98.2	NC	Minimal	111.0	NC	Minimal	113.2	NC	Minimal
		0.05	97.0			95.7			90.0			97.8		
1-Octanol	Mineral oil	5	3.4	Irritant	Moderate	9.0	Irritant	Moderate	3.8	Irritant	Moderate	5.0	Irritant	Moderate
		0.05	87.6			98.9			90.7			95.3		
Dodecane	Mineral oil	5	75.9	NC	Minimal	89.4	NC	Minimal	97.2	NC	Minimal	93.3	NC	Minimal
		0.05	90.2			91.1			87.5			98.7		

SLS: sodium lauryl sulfate, CT: calcium thioglycolate, TW80: Tween 80, NC: No Category

* 細胞生存率は3回の結果 (n=3) から平均値を算出した。

** SLS, CT及びTW80の結果はn=107の結果の平均値を、1-Octanol及びDodecaneの結果はn=17の結果の平均値を示した。

2. 混合物を用いた施設間再現性の検証

技術移転がされている3つのLab. A、Lab. B、Lab. C及びLab. Dを含めて混合物による施設間再現性を検証した。水溶性または油溶性混合物である、シャンプー (shampoos)、コンディショナー (conditioners)、セット用ヘアスタイリング剤 (hair stylers)、ヘアカラー (hair colorants)、顔体用洗浄剤 (face and skin cleansers)、防臭剤 (deodorants)、ボディローション/保湿剤 (lotion/moisturizers) のカテゴリーから20種を選択してSTE法を実施し、表9に従ってGHS NC / Irritant (2区分) とSTE rank classification (3区分) に対する試験結果を表11に示した。

2区分では、20種中13種が4施設全てにおいてIrritantと評価された(表11)。また、20種中5種が4施設全てにおいてNCと評価された。結果として、全施設での一致率は90% (18/20) であった。さらに、図9に各施設間での結果の一致率を示した。Lab. AとLab. Bの結果の一致率は90%であり、Lab. Cとは95%、Lab. Dとは100%であった。Lab. BとLab. Cの結果の一致率は95%であり、Lab. Dとは90%であった。Lab. CとLab. Dの結果の一致率は95%であった。すなわち、各施設間での一致率は90~100%であった。Code D (Hair conditioner) とCode G (Hair dye) は施設間で異なる結果となった。

3区分では、20種中5種が4施設全てでMinimal、20種中8種がModerate、20種中1種がSevereと評価された(表11)。すなわち、20種中14種が同じ結果となり、全施設での一致率は70% (14/20) であった。図9に各施設間での結果の一致率を示した。Lab. AとLab. Bの結果の一致率は75%であり、Lab. Cとは75%、Lab. Dとは95%であった。Lab. BとLab. Cの結果の一致率は90%であり、Lab. Dとは80%であった。Lab. CとLab. Dの結果の一致率は80%であった。すなわち、各施設間での一致率は75%~95%であった。Code A (Shampoo)、Code D (Hair conditioner)、Code G (Hair dye)、Code

J (Face cleanser) 、 Code K (Body cleanser) 、 Code R (Hair grooming) は施設間で異なる結果となった。異なる結果が示された 6 種でも、ある施設で Minimal、他の施設で Severe といったように、評価結果が大きく異なることはなかった。

表 11 水溶性及び油溶性混合物を用いた STE 法の施設間再現性の評価

Code	Tested mixture category*	Solvent	Test concentration (%)	Cell viability** (%)						NC / Irritant				STE rank classification			
				Lab. A	Lab. B	Lab. C	Lab. D	Average	SD	Lab. A	Lab. B	Lab. C	Lab. D	Lab. A	Lab. B	Lab. C	Lab. D
A	Shampoo	saline	5	1.0	9.0	1.7	1.3	3.2	3.8	Irritant	Irritant	Irritant	Irritant	Moderate	Severe	Severe	Moderate
			0.05	87.2	65.7	52.1	91.7	74.2	18.6								
B	Shampoo	saline	5	1.1	0.0	0.7	1.2	0.8	0.5	Irritant	Irritant	Irritant	Irritant	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate
			0.05	84.0	88.7	84.3	108.3	91.3	11.5								
C	Hair conditioner	saline	5	83.6	87.1	102.6	90.6	91.0	8.3	NC	NC	NC	NC	Minimal	Minimal	Minimal	Minimal
			0.05	101.8	108.5	100.3	95.8	101.6	5.3								
D	Hair conditioner	saline	5	98.6	58.8	98.0	83.5	84.7	18.6	NC	Irritant	NC	NC	Minimal	Moderate	Minimal	Minimal
			0.05	98.6	90.6	99.5	97.6	96.6	4.1								
E	Hair lightener	saline	5	97.4	94.4	94.4	92.4	94.7	2.1	NC	NC	NC	NC	Minimal	Minimal	Minimal	Minimal
			0.05	95.9	95.9	99.9	104.9	99.2	4.3								
F	Hair lightener	saline	5	22.5	36.9	17.4	18.6	23.9	9.0	Irritant	Irritant	Irritant	Irritant	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate
			0.05	102.1	101.0	100.5	101.2	101.2	0.7								
G	Hair dye	saline	5	75.4	47.0	64.2	91.9	69.6	18.9	NC	Irritant	Irritant	NC	Minimal	Moderate	Moderate	Minimal
			0.05	99.9	105.3	96.2	98.9	100.1	3.8								
H	Hair dye	saline	5	1.4	4.5	2.0	0.7	2.2	1.7	Irritant	Irritant	Irritant	Irritant	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate
			0.05	101.1	110.3	104.2	107.4	105.8	4.0								
I	Bath soap and detergent (Face cleanser)	saline	5	0.4	8.8	3.7	1.6	3.6	3.7	Irritant	Irritant	Irritant	Irritant	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate
			0.05	94.3	107.4	100.6	100.6	100.7	5.4								
J	Bath soap and detergent (Face cleanser)	saline	5	1.8	1.5	3.1	0.1	1.6	1.2	Irritant	Irritant	Irritant	Irritant	Severe	Severe	Moderate	Severe
			0.05	41.3	54.3	96.2	65.0	64.2	23.4								
K	Bath soap and detergent (Body cleanser)	saline	5	0.9	12.8	4.7	0.0	4.6	5.8	Irritant	Irritant	Irritant	Irritant	Moderate	Severe	Severe	Moderate
			0.05	80.3	60.0	69.1	93.1	75.6	14.3								
L	Bath soap and detergent (Hand soap)	saline	5	0.2	3.4	4.7	0.6	2.2	2.2	Irritant	Irritant	Irritant	Irritant	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate
			0.05	94.7	77.7	95.6	102.3	92.6	10.5								
M	Bath soap and detergent (Bar soap)	saline	5	0.5	0.0	0.0	0.5	0.3	0.3	Irritant	Irritant	Irritant	Irritant	Severe	Severe	Severe	Severe
			0.05	31.0	57.0	20.8	49.8	39.7	16.7								
N	Hair dressing	saline	5	16.4	9.5	9.5	13.2	12.2	3.3	Irritant	Irritant	Irritant	Irritant	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate
			0.05	85.6	97.6	87.8	88.8	90.0	5.3								
O	Hair dressing	saline	5	52.5	34.8	57.7	47.0	48.0	9.8	Irritant	Irritant	Irritant	Irritant	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate
			0.05	98.5	92.0	96.3	96.9	95.9	2.8								
P	Hair grooming	saline	5	51.0	49.9	24.5	16.6	35.5	17.6	Irritant	Irritant	Irritant	Irritant	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate
			0.05	103.5	97.8	91.4	100.2	98.2	5.1								
Q	Hair spray (pump)	saline	5	94.6	109.1	83.8	101.7	97.3	10.8	NC	NC	NC	NC	Minimal	Minimal	Minimal	Minimal
			0.05	87.7	109.3	97.2	97.6	98.0	8.8								
R	Hair grooming	Mineral oil	5	68.1	66.9	66.4	63.0	66.1	2.2	Irritant	Irritant	Irritant	Irritant	Severe	Moderate	Moderate	Moderate
			0.05	63.4	83.2	91.3	93.1	82.8	13.6								
S	Deodorant (underarm, solid type)	Mineral oil	5	123.7	101.6	103.3	114.6	110.8	10.4	NC	NC	NC	NC	Minimal	Minimal	Minimal	Minimal
			0.05	96.8	107.1	98.4	107.6	102.5	5.7								
T	Moisturizing lotion	saline	5	100.6	101.3	108.5	108.7	104.8	4.4	NC	NC	NC	NC	Minimal	Minimal	Minimal	Minimal
			0.05	97.8	107.2	95.1	98.7	99.7	5.2								

SD: Standard Deviation NC: No Category

* 製品カテゴリーは米国パーソナルケア製品評議会 (PCPC) の化粧品成分審査委員会 (CIR) で記載される製品カテゴリーを参照して記載された。

** 細胞生存率は3回の結果 (n=3) から平均値を算出した。

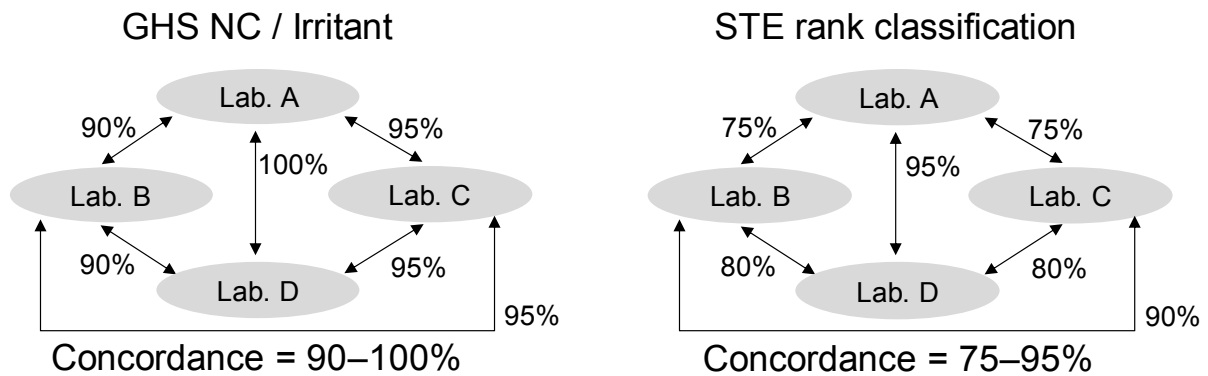


図 9 施設間における GHS NC / Irritant と STE rank classification の一致率

各施設間の試験結果の一致率を示した。左図は GHS NC / Irritant の 2 区分における施設間再現性の結果を示している。右図は STE rank classification の 3 区分における施設間再現性の結果を示している。両図において、Concordance は各施設で得られた一致率の範囲を示している。

考察

STE法の技術移転性は、過去のバリデーションにおいて本章で用いた水溶性化学物質3種（SLS、CT、TW80）によって確認されている（Sakaguchi *et al.*, 2011）。本章では、新たに3つのLab. A、Lab. B、Lab. Cで技術移転を実施した。技術移転性はLab. Dが3種の水溶性化学物質と2種の油溶性化学物質を選択し、バリデーション時と同様にLab. Dの背景データのSTE rank classificationとの一致性により検証した。過去のバリデーションと同様に、3つのLab. A、Lab. B、Lab. CのSTE rank classificationの結果はLab. Dの背景データと一致した。現在、STE法はTG491に技術習熟の確認のためのProficiency chemicalsが記載されている（OECD, 2015a）。しかし、本章の5種の化学物質の中で水溶性化学物質であるSLS、CT、TW80はProficiency chemicalsリストに記載されていない。これは本研究での技術移転性検証時にはまだProficiency chemicalsがなかったためである。

Lab. Dを含めた4施設で水溶性混合物と油溶性混合物の計20種を用いて施設間再現性を確認したところ、GHS NC / IrritantにおいてCode D、Gの2種、STE rank classificationにおいてCode A、D、G、J、K、Rの6種で施設間再現性が得られなかった。一方、これら6種の細胞生存率は20–85%の範囲にあり、標準偏差（Standard Deviation; SD）も13.6%以上と、施設間で結果が一致した混合物と比較して高い値であった。

次に、他の*in vitro*試験法よりも結果のばらつきが小さく、施設間再現性が良好であることを確認するため、施設間での5%及び0.05%暴露濃度で得られた細胞生存率からPearsonの相関係数（ r^2 ）を算出し、他の*in vitro*試験法の細胞生存率やスコアを用いて報告されている相関係数（ r^2 ）と比較した。STE法では各4施設で20種の混合物の評価結果を用いてPearsonの相関係数（ r^2 ）を算出した。各施設で得られ

た相関係数は、0.86-0.93 の範囲に収まった (表 12)。この範囲は、60 種の化学物質について 5 施設で実施された BCOP 試験の相関係数の範囲 0.86–0.95 と同程度であり (Balls *et al.*, 1995)、20 種の化学物質について 4 施設で実施された Skin Ethic™ Human Corneal Epithelium (HCE) による RhCE 試験の相関係数 0.82–0.98 と同程度であった (Van Goethem *et al.*, 2006)。また、BCOP 試験と同様に 60 種の化学物質について 5 施設で実施された ICE 試験と FL 試験の相関係数はそれぞれ 0.76–0.85、0.21–0.84 であり (Balls *et al.*, 1995)、STE 法の相関係数はこれら試験法を上回る結果であった。

以上より、得られた Pearson の相関係数に基づく STE 法の細胞生存率のばらつきは他の試験法の結果のばらつきと比べても同等以下であり、STE 法は混合物の評価においても施設間再現性の高い試験法であることが確認された。

表 12 水溶性混合物と油溶性混合物を用いた施設間での細胞生存率の分布の相関係数 (r^2)

Correlation coefficient	Lab. A	Lab. B	Lab. C	Lab. D
Lab. A	-	0.87	0.88	0.93
Lab. B	-	-	0.86	0.88
Lab. C	-	-	-	0.91

5%、0.05%被験物質溶液を暴露した際の施設間での細胞生存率の分布の相関係数 (r^2) を示した。相関係数は Pearson の相関係数の算出方法により計算された。

第五章 総括及び結論

本論文は、昨今の動物愛護や EU 化粧品指令による動物実験禁止の動きから多くの研究者によって開発されてきた *in vitro* 試験法の STE 法について、適用範囲外の一つであった高揮発性物質の評価方法について検討した。また、その適用範囲を拡大した際の予測性を検討した。さらに混合物の評価と混合物を用いた施設間再現性についても検討した。

序論では、従来のウサギを用いた眼刺激性試験の評価についてまとめた。また、動物実験の禁止から *in vitro* 試験法の開発が進められている状況や OECD TG に記載されている試験方法をまとめた。さらに *in vitro* 眼刺激性試験である STE 法の開発背景と過去の研究をまとめ、現状の課題から必要な検討事項を示した。

第二章では、STE 法の適用範囲外である高揮発性物質について評価方法を検討し、溶媒をミネラルオイルへ変更するのみで偽陰性なく評価可能であることを示した。得られた結果を揮発性や溶媒中の分配といった視点から検討し、偽陰性や偽陽性となった高揮発性物質の要因を考察した。さらに得られた高揮発性物質の評価結果を含めて、STE 法の予測性を検討した。本章の検討では、STE SRD 内の物質と Draize 試験を精査した DRD を参照してデータセットを構築し、試験を実施した。その結果、STE 法は GHS NC / Irritant の予測性が良好な試験法であることが明らかとなった。

第三章では、油溶性混合物の評価を実施した。GHS NC / Irritant の一致率は良好であり、偽陰性なく評価されたため、混合物の安全性評価として非常に有用な試験法であることが明らかとなった。

第四章では、まず技術移転性を確認した。次に、水溶性混合物と油溶性混合物を用いて施設間再現性

を確認した。この結果、混合物においても施設間再現性が良好であることから、異なる地域や施設でも同等の結果が得られる有用な試験法であることが明らかとなった。

本研究において、現状の STE 法の課題であった 3 つの要件 1) 適用範囲の拡大、2) 混合物の評価の有用性、3) 混合物の評価における施設間再現性 について検討した結果、3 つの要件が満たされ、STE 法は混合物も含めて眼刺激性評価において有用な試験法であることが明らかとなった。これらの結果は、眼刺激性評価における動物試験の削減に貢献できるとともに、化粧品、化学品、医薬品など幅広い業界の発展に寄与することが期待される。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、懇切丁寧に御指導頂きました横浜国立大学大学院教授 板垣宏先生に謹んで感謝申し上げます。

また本研究を進めるうえで混合物の施設間再現性の確認につきまして試験を実施いただいた、Institute for In Vitro Sciences, Inc. Allison Hilberer 氏、Envigo CRS GmbH Christine Behle-Wagner 氏、食品薬品安全センター 秦野研究所 渡辺 美香氏に深く感謝申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、私に貴重な機会を与えて多大なるご援助を頂きました花王株式会社 安全性科学研究所 第2研究室長 坂口斉博士、同研究所 高橋豊博士、荒木大作氏、行卓男博士、額田裕子博士に心より御礼申し上げます。また、本研究に関して活発なご議論を展開頂いた横浜国立大学大学院 板垣研究室の学生の皆様、花王株式会社 安全性科学研究所の研究員の皆様に心より御礼申し上げます。最後に本論文をまとめるにあたり、文章を精査くださった横浜国立大学大学院 板垣研究室の成田和人博士、九十九英恵氏に心より御礼申し上げます。

実験の詳細

第二章の実験の詳細

1. 被験物質

高揮発性物質は STE SRD と DRD の推奨物質から 20 物質を選択した。20 物質は Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, MO, USA) から購入した。なお、STE 法における高揮発性物質は蒸気圧 >6kPa (25°C) である。各物質の詳細は表 5 に示した。

高揮発性物質を含む GHS NC / Irritant の予測性検討における被験物質の選択方法について、被験物質は STE SRD と DRD を参照して STE 法の適用範囲内の物質を選択した。それぞれのデータセットに記載される化学物質の GHS 区分は in vivo Draize 試験より区分されているが、これらはすでに著者らが過去に実施した検討から引用して区分しており、本研究において Draize 試験は実施されていない (NICEATM, 2013; Barroso et al., 2017)。また、Barroso et al. (2017) は Draize 試験の結果を十分評価した上で個体間のばらつきが少なく、施設間の結果も同等な精度の高い化学物質を選出して記載している。高揮発性物質は STE 法の適用範囲外であるが、本章の結果から評価可能な方法を見出したと考え、高揮発性物質も含めて選択した。STE SRD には、様々な Organic function group を持ち、且つ適正に GHS 区分が特定された化学物質 104 種が収載されている。また、DRD にも、多様な Organic function group を持つ化学物質 634 種が収載されている。これらの中の 375 物質が Draize 試験において個体差の影響が小さく、施設間の結果が同等な物質であることが確認されており、試験法の予測性を検討する際に適切な推奨物質とされている。被験物質には、現在も購入可能なもので STE 法適用範囲内である液体物質、活性剤及び適用範囲外であった高揮発性物質の 239 種を選択した。評価被験物質は Alfa Aesar

(Ward Hill, MA, USA) 、Sigma Aldrich Co. LLC、東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) 、和光純薬株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。

2. 細胞培養

ウサギ角膜由来株化細胞である SIRC 細胞を American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) より購入した。細胞は解凍してから試験使用までに 2、3 回の継代を行い、培養を開始してから継代数 25 回までのものを使用した。培地は 10% (v/v) ウシ胎仔血清 (Fetal Bovine Serum; FBS) 、2 mmol/L L-glutamine、50~100 unit/mL Penicillin 含有 50~100 µg/mL Streptomycin (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) を含有する EAGLE Minimum Essential Media (MEM) 培地 (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) を用い、SIRC 細胞を培養フラスコにて培養 (37°C、5%CO₂) した。培養フラスコ内でコンフルエントとなった細胞をトリプシン・EDTA 溶液 (トリプシン 500 mg/L、EDTA 200 mg/L 含有 HBSS 溶液; Sigma-Aldrich Co. LLC) を用いて単細胞化し、培養フラスコに継代あるいは 96 ウェルプレートに播種した。培地にて 3.0×10⁴ cells/mL あるいは 1.5×10⁴ cells/mL になるように細胞浮遊液を調製した。96 ウェルプレートに 3.0×10⁴ cells/mL を 200 µL ずつ播種する場合は 4 日間、1.5×10⁴ cells/mL で播種する場合は 5 日間、37°C、5%CO₂ で前培養した。なお、1 被験物質の判定に際して、独立した試験を 3 回繰り返し、各試験において 1 プレートを使用するため、合計 3 プレートを準備した。

3. 試験方法 (STE 法)

図 4 に第二章の実験の詳細 2 も含めて STE 法のフローチャートを示した。方法は TG 491 に準じて実施された。また、図 3 に溶媒選択方法の詳細を示した。適切な溶媒を生理食塩水（大塚製薬株式会社, Tokyo, Japan）、5% (w/w) DMSO (CAS: 67-68-5; Sigma-Aldrich Co. LLC) を含む生理食塩水（大塚製薬株式会社）、ミネラルオイル (light oil, suitable for mouse embryo cell culture; CAS: 8042-47-5; Sigma-Aldrich Co. LLC, 製品コード M5310) の中から選択した。

はじめに、生理食塩水を溶媒として被験物質 5% (w/w) を調製し、溶解性を確認した。溶解もしくは均一分散する場合は、生理食塩水を被験物質の溶媒とした。生理食塩水に溶解もしくは均一分散しない場合は、5% (w/w) DMSO を含む生理食塩水を溶媒として被験物質 5% (w/w) を調製し、溶解性を確認した。溶解もしくは均一分散する場合は、5% (w/w) DMSO を含む生理食塩水を被験物質の溶媒とした。5% (w/w) DMSO を含む生理食塩水に溶解もしくは均一分散しない場合は、ミネラルオイルを溶媒として被験物質 5% (w/w) を調製し、溶解性を確認した。溶解もしくは均一分散する場合は、ミネラルオイルを被験物質の溶媒とした。ミネラルオイルに溶解もしくは均一分散しない場合は試験を実施しなかった。STE 法での均一分散は目視等によって確認し、その定義は、被験物質が溶液中で均一に分散し、この状態が暴露時間を考慮した 5 分間以上保たれていることとした。被験物質の調製に際しては必要に応じてボルテックスミキサーによる攪拌、超音波破碎あるいは 37°C の加温によって、溶解性を高めた。

試験には被験物質が 5% (w/w) 及び 0.05% (v/v) になるよう調製した溶液、あるいは均一分散液を供した。被験物質 0.05% (v/v) の調製には被験物質 5% (w/w) を用い、10 倍希釈して 0.5% (v/v) を調製、さらに 10 倍希釈して 0.05% (v/v) を得た。陽性対照にはラウリル硫酸ナトリウム (Sodium lauryl sulfate) の 0.01% (v/v) 生理食塩水溶液を用いた。陽性対照の調製について、まず 1% (w/w) 以上の溶液を調製し、

被験物質溶液調製と同様に段階希釈により 0.01% (v/v) を得た。これらに加え、溶媒対照、操作対照（培地対照）及びブランク（細胞なし、培地のみ）を設けた。これら対照及びブランクは各プレートに用意した。1回の試験（プレート1枚）で各被験物質溶液（5%、0.05%）、陽性対照、溶媒対照、操作対照及びブランクを3ウェルずつ用意して試験を実施した。

所定の濃度と日数で SIRC 細胞を前培養したプレートをクリーンベンチ内で傾けながら、アスピレーターにより各ウェルの培地を除去した。続けて、被験物質溶液をウェルに添加した。クリーンベンチ内で正確に5分間暴露した後、各ウェルの被験物質溶液をアスピレーターにより除去した。各ウェルに 200 μ L の Phosphate Buffered Saline (PBS) (-) (Sigma-Aldrich Co. LLC) をウェルの壁面を通じて添加し、その後すぐに除去した。この操作を2回繰り返してウェル内の洗浄を行った。その際、PBS (-) がウェル内に残らないように丁寧に除去した。各ウェルに、培地に溶解させた後でマイクロフィルターを通して濾過した 0.5mg/mL の MTT (CAS 298-93-1, Sigma-Aldrich Co. LLC) 溶液を 200 μ L ずつ添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ で2時間静置した。2時間静置後、ペーパータオル等の上でプレートをたたいて、ウェル内の MTT 溶液を十分に除去した。その後細胞内の MTT を抽出するために 0.04M Hydrochloric acid (HCl) 含有 Isopropanol を各ウェルに 200 μ L ずつ添加し、1時間暗所にて静置した。各ウェルの MTT 抽出液をミキシング等で均一にしてから、分光光度計であるプレートリーダー (BioTek, Winooski, VT, USA) で測定波長 570nm の吸光度を測定した。

4. 高揮発性物質の試験方法

試験方法は第二章の実験の詳細 3 に準じた。ただし、溶媒はミネラルオイルに変更した。

5. データ解析と眼刺激性予測モデル

各ウェルの吸光度から、以下の式に従って細胞生存率 (Cell viability) を算出した。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = \frac{\text{被験物質溶液吸光度 (被験物質溶液の吸光度 - ブランク)}}{\text{溶媒対照吸光度 (溶媒対照の吸光度 - ブランク)}} \times 100$$

1 回の試験あたり、各被験物質溶液の 1 試験濃度につき 3 ウェルの吸光度の平均値から細胞生存率を求めた。細胞生存率がマイナスの値を示した場合は、細胞生存率を 0% とした。各被験物質溶液の最終的な細胞生存率は、独立した 3 回の試験の平均値を用いた。STE 法の試験成立条件を以下に示す。

- ① 操作対照のブランク減算後の吸光度が 0.3 以上あること
- ② 操作対照の細胞生存率を 100% としたとき、溶媒対照の細胞生存率が 80% 以上であること
- ③ 陽性対照の細胞生存率が 21.1% ~ 62.3% の範囲内であること
- ④ 独立した 3 回の試験の細胞生存率の標準偏差 (SD) が 15 未満であること

①、②、③を満たしたものを独立した 1 回の試験とした。1 回の試験 (1 プレート) で 3 ウェルの平均値から求めた細胞生存率を 1 回の独立した試験の細胞生存率とした。④で示す独立した 3 回の試験とは① ~ ③の条件を満たした 3 回の試験である。独立した 3 回の試験の細胞生存率の SD が 15 を超えた場合は、新たに試験を 3 回行ない、④を再度評価した。

STE 法による眼刺激性 GHS 区分について、5%、0.05% の濃度で得られた細胞生存率がそれぞれ 70% を超えるものを GHS NC とした。5% の濃度で得られた細胞生存率が 70% 以下、0.05% の濃度で得られ

た細胞生存率が 70%を超えるものを No prediction can be made とした。5%、0.05%の濃度で得られた細胞生存率がそれぞれ 70%以下のものを Cat. 1 とした (図 2、表 9)。なお、Cat. 1 と No prediction can be made を Irritant として定義した (図 2、表 9)。さらに、従来、STE 法で用いられてきた STE rank classification (Minimal、Moderate、Severe) を示した (図 2、表 9)。

6. 予測性の検討

図 10 にそれぞれの予測性の算出方法について記載した。一致率は GHS NC / Irritant の結果が一致した割合を示した。偽陽性率は GHS NC の物質を Irritant と判定した割合を示した。偽陰性率は Irritant の物質を GHS NC と判定した割合を示した。感度は Irritant の物質を適正に Irritant と判定した割合を示した。特異度は GHS NC の物質を適正に GHS NC と判定した割合を示した。

<i>in vitro</i> GHS	STE and RhCE	
	Irritant	GHS NC
Irritant	A	B
GHS NC	C	D

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

図 10 予測性算出方法の詳細

7. 溶媒中の高揮発性物質の揮発減少重量測定

高揮発性物質の中で生理食塩水、ミネラルオイルの両方に溶解する物質 (Acetone, Ethanol, Isopropanol, Methyl acetate, Dimethyl carbonate, Ethyl acetate, Methyl ethyl ketone, Methylal, Methanol) について、二つの溶媒に溶解させた被験物質溶液 5%を用意し、その揮発性を調べるために電子天秤で重量を測定した。被験物質秤量後、スクリー管の蓋を開けて、室温で 0、5、10、15、30、60、120 分後の被験物質重量を測定した。測定時間は STE 法の暴露時間である 5 分間及び被験物質の調製から暴露までに想定される経過時間を考慮して設定した。揮発減少率は以下の式に従って算出した。計算式の被験物質群は被験物質溶液のスクリー管を、溶媒群は溶媒のみのスクリー管を示す。

$$\text{揮発減少率 (\%)} = \frac{\text{相対減少重量 (被験物質群の減少重量 - 溶媒群の減少重量)}}{\text{被験物質群の重量}} \times 100$$

8. log K_{ow} を用いた被験物質の溶媒中の分配の予測

表 5 に各被験物質とその物理化学性状パラメーターである log K_{ow} を記載した。log K_{ow} は EPA の EPI suite™ v4.11 (2012) を用いて算出した。log K_{ow} は計算値を示し、実測値があるものは実測値を併記した。

第三章の実験の詳細

1. 被験物質

油溶性混合物として 24 種を選択した。選択した混合物のカテゴリーは、hair grooming、hair dressing、

rouge、deodorant、body lotion、body cream、moisturizing lotion であった。これらの混合物はデータを取得した時点において、一般に購入可能な混合物であった。

2. 細胞培養

第二章の実験の詳細 2 に記載の方法にて実施した。

3. 試験方法 (STE 法)

第二章の実験の詳細 3 に記載の方法にて実施した。

4. STE 法のデータ解析と眼刺激性予測モデル

第二章の実験の詳細 5 に記載の方法にて実施した。

5. 試験方法 (EpiOcular™ を用いた RhCE 法)

RhCE 法で用いた角膜モデルである EpiOcular™ は MatTek 社 (Ashland, MA, USA) より購入した。

試験方法は TG492 に準じて行った。被験物質、陰性対照 (注射用水) 及び陽性対照 (Methyl acetate) は duplicate で試験を実施した。37°C に温めたアッセイ培地を、6 ウェル細胞培養プレートに 1.0 mL ずつ分注した。組織をそのプレートに移し、37°C、5%CO₂ で 18 時間の前培養を行った。前培養後、PBS を 20 µL ずつ組織へ添加した。37°C、5%CO₂ で 30 分間静置後、被験物質を 50 µL ずつ添加し、30 分間正確に暴露した (計 24 種、n=2)。その後、PBS で組織上の被験物質を洗浄し、予めアッセイ培地を 5 mL

ずつ分注した 12 ウェル細胞培養プレートに移し、12 分間浸漬させた。さらに角膜モデルはアッセイ培地を 1 mL ずつ分注した 6 ウェル細胞培養プレートに移し、2 時間 37°C、5%CO₂ で追培養を行った。追培養後、MTT 液 (1.0 mg/mL、0.3 mL) を分注した 24 ウェル細胞培養プレートに組織を移し、37°C、5%CO₂ で 3 時間静置した。静置後、抽出液 (Isopropanol) を 2 mL ずつ添加した 24 ウェル細胞培養プレートに組織を移し、室温暗所で 2 時間静置した。抽出液を採取し、570 nm の吸光度を測定した。

6. EpiOcular™ を用いた RhCE 法の予測モデル

エンドポイントである細胞生存率は、陰性対照群の吸光度に対する被験物質群の吸光度の割合から算出した。「細胞生存率 > 60%」を GHS NC、「細胞生存率 ≤ 60%」を Irritant と分類した。RhCE 法の試験成立条件を以下に示す。

- ① 陽性対照の細胞生存率が 50%以下であること
- ② 陰性対照の吸光度が 0.8 以上であること
- ③ 2 つの組織で得られた細胞生存率のばらつきが 18%未満であること

上記の 3 点を満たしたものを試験結果とした。

7. 予測性の検討

第二章の実験の詳細 6 に記載の方法にて実施した。

第四章の実験の詳細

1. 被験物質

技術移転性を確認するために、水溶性化学物質として SLS、CT、TW80 の 3 物質、油溶性化学物質として 1-Octanol、Dodecane の 2 物質が選択された。SLS、TW80、1-Octanol、Dodecane は Sigma-Aldrich Co. LLC から、CT は Sigma-Aldrich Co. LLC または東京化成工業株式会社から購入した。

混合物の施設間再現性検証では、水溶性混合物から 18 種、油溶性混合物から 2 種を選択した。混合物のカテゴリーとして、shampoos、conditioners、hair stylers、hair colorants、face and skin cleansers、deodorants、lotion/moisturizers から選択した。選択基準について、上記の混合物は Irritant が予測されるもしくは使用時に眼に入るリスクがあるものを多種類含むよう設定した。これらの混合物は試験を実施した時点において、一般に購入可能な混合物であった。また、試験実施の際は混合物を盲検化（コード化）して評価施設に配布した。

2. 細胞培養

第二章の実験の詳細 2 に記載の方法にて実施した。

3. 試験方法（STE 法）

第二章の実験の詳細 3 に記載の方法にて実施した。

4. 眼刺激性予測モデル

第二章の実験の詳細 5 に記載の方法にて実施した。

5. STE 法の技術移転性

第四章の実験の詳細 1 に記載の化学物質を用いて評価した。評価は STE rank classification の 3 区分との一致性を確認した。

6. STE 法の混合物を用いた施設間再現性

第四章の実験の詳細 1 に記載の混合物を用いて評価した。評価は GHS NC / Irritant の 2 区分の一致率と STE rank classification の 3 区分との一致率を確認した。

7. 施設間再現性に関する統計解析

得られた 2 区分 (GHS NC / Irritant)、3 区分 (STE rank classification) の結果について、施設間での 5%及び 0.05%濃度で得られた細胞生存率から Pearson の相関係数 (r^2) を算出し、眼刺激性を評価する他の *in vitro* 試験法で報告されている相関係数 (r^2) と比較することで施設間再現性を検証した。

参照文献

Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014): Retrospective analysis of the Draize test for serious eye damage/eye irritation: Importance of understanding the in vivo endpoints under UN GHS/EU CLP for the development and evaluation of in vitro test methods. *Archives of Toxicology*, 88, 701–723.

Adriaens, E., Willoughby, J.A., Meyer, B.R., Blakeman, L.C., Alépée, N., Fochtman, P., Guest, R., Kandarova, H., Verstraelen, S., Van Rompay, A.R. (2017a): CON4EI: Short Time Exposure (STE) test method for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals. *Toxicol. In Vitro*, Article in Press.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28964898> > (accessed 5. Apr. 2018)

Adriaens, E., Verstraelen, S., Alépée, N., Kandarova, H., Drzewiecka, A., Gruszka, K., Guest, R., Willoughby, J.A., Van Rompay, A.R. (2017b): CON4EI: Development of testing strategies for hazard identification and labelling for serious eye damage and eye irritation of chemicals. *Toxicol. In Vitro*, Article in Press.

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28801046> > (accessed 5. Apr. 2018)

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. *Toxicol. In Vitro*, 9, 871–929.

Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017): Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Archives of Toxicology*, 91, 521–547.

Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003. Official Journal of the European Union, L66, 26–35.

Draize, I.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944): Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 377–390.

The European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). (1998): Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report No.48 (2). Brussels, Belgium.

<<http://www.ecetoc.org/publication/tr-048-eye-irritation-reference-chemicals-data-bank-second-edition/>> (accessed 24. Jan. 2018).

The United States Environmental Protection Agency (EPA). (2012): EPI Suite™ - Estimation Program Interface v4.11. Washington, D.C., USA.

<<https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/download-epi-suitetm-estimation-program-interface-v411>> (accessed 24. Jan. 2018)

Eskes, C., Bessou, S., Bruner, L., Curren, R., Harbell, J., Jones, P., Kreiling, R., Liebsch, M., McNamee, P., Pape, W., Prinsen, M.K., Seidle, T., Vanparys, P., Worth, A., Zuang, V. (2005): Alternative (Non-Animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects, 3.3, eye irritation. *Altern. Lab. Anim.*, 33, 47–81.

Hayashi, K., Mori, T., Abo, T., Ooshima, K., Hayashi, T., Komano, T., Takahashi, Y., Sakaguchi, H., Takatsu, A., Nishiyama, N. (2012): Two-stage bottom-up tiered approach combining several alternatives for identification of eye irritation potential of chemicals including insoluble or volatile substances. *Toxicol. In Vitro*, 26, 1199–1208.

Hayashi, K., Abo, T., Nukada, Y., Sakaguchi, H. (2013): Definition of the applicability domain of the

Short Time Exposure (STE) test for predicting the eye irritation of chemicals. *Altern. Lab. Anim.*, 41, 157–71.

Kojima, H., Hayashi, K., Sakaguchi, H., Omori, T., Otoizumi, T., Sozu, T., Kuwahara, H., Hayashi, T., Sakaguchi, M., Toyoda, A., Goto, H., Watanabe, S., Ahiko, K., Nakamura, T., Morimoto, T. (2013): Second-phase validation study of short time exposure test for assessment of eye irritation potency of chemicals. *Toxicol. In Vitro*, 27, 1855–1869.

Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002): Extent of initial corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 36, 106–117.

McNamee, P., Hibatallah, J., Costabel-Farkas, M., Goebel, C., Araki, D., Dufour, E., Hewitt, N.J., Jones, P., Kirst, A., Le Varlet, B., Macfarlane, M., Marrec-Fairley, M., Rowland, J., Schellauf, F., Scheel, J. (2009): A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: eye irritation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 54, 197–209.

Mikkelsen, T.J., Chrai, S.S., Robinson, J.R. (1973): Altered bioavailability of drugs in the eye due to drug-protein interaction. *J. Pharm. Sci.*, 62, 1648–1653.

NICEATM. (2013): Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document. adopted

June 2013,

<<https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/test-method-evaluations/ocular/ste/index.html#sr>
d> (accessed 24. Jan. 2018).

OECD. (2002): Acute Eye Irritation/Corrosion. Test Guideline 405, Organisation for Economic

Co-operation and Development. adopted 24 April 2002,

<http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-405-acute-eye-irritation-corrosion_9789264070646-en> (accessed 24. Jan. 2018)

OECD. (2012): Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe

Irritants. Test Guideline 460, Organisation for Economic Co-operation and Development.

adopted 9 October 2017,

<http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-460-fluorescein-leakage-test-method-for-identifying-ocular-corrosives-and-severe-irritants_9789264185401-en> (accessed 24. Jan. 2018).

OECD. (2013a): Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals

Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation

or Serious Eye Damage. Test Guideline 437, Organisation for Economic Co-operation and Development. adopted 9 October 2017,

http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-437-bovine-corneal-opacity-and-permeability-test-method-for-identifying-i-chemicals-inducing-serious-eye-damage-and-ii-chemicals-not-requiring-classification-for-eye-irritation-or-serious-eye-damage_9789264203846-en (accessed 24. Jan. 2018).

OECD. (2013b): Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Test Guideline 438, Organisation for Economic Co-operation and Development. adopted 9 October 2017,

http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-438-isolated-chicken-eye-test-method-for-identifying-i-chemicals-inducing-serious-eye-damage-and-ii-chemicals-not-requiring-classification-for-eye-irritation-or-serious-eye-damage_9789264203860-en (accessed 24. Jan. 2018).

OECD. (2015a): Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Test Guideline 491, Organisation for Economic Co-operation and Development. adopted 9 October 2017,

<http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-491-short-time-exposure-in-vitro-test-method-for-identifying-i-chemicals-inducing-serious-eye-damage-and-ii-chemicals-not-requiring-classification-for-eye-irritation-or-serious-eye-damage_9789264242432-en> (accessed 24. Jan. 2018).

OECD. (2015b): Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. Test Guideline 492, Organisation for Economic Co-operation and Development. adopted 9 October 2017,

<http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-492-reconstructed-human-cornea-like-epithelium-rhce-test-method-for-identifying-chemicals-not-requiring-classification-and-labelling-for-eye-irritation-or-serious-eye-damage_9789264242548-en> (accessed 24. Jan. 2018).

OECD. (2017): Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation. Series on Testing & Assessment No. 263. Organisation for Economic Co-operation and Development. adopted 20 July 2017,
<[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2017\)15&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2017)15&doclanguage=en)> (accessed 24. Jan. 2018)

Saito, K., Miyazawa, M., Nukada, Y., Ei, K., Abo, T., Sakaguchi, H. (2015): Predictive performance of

the Short Time Exposure test for identifying eye irritation potential of chemical mixtures.

Toxicology in Vitro, 29, 617-620

Sakaguchi, H., Ota, N., Omori, T., Kuwahara, H., Sozu, T., Takagi, Y., Takahashi, Y., Tanigawa, K., Nakanishi, M., Nakamura, T., Morimoto, T., Wakuri, S., Okamoto, Y., Sakaguchi, M., Hayashi, T., Hanji, T., Watanabe, S. (2011): Validation study of the Short Time Exposure (STE) test to assess the eye irritation potential of chemicals. *Toxicol. In Vitro*, 25, 796–809.

Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alepée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Varlet, BL., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielmann, H., Stokes, W., Trouba, K., Berghe, C.V., Gothem, F.V., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010): A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. In Vitro*, 24, 1–9.

Takahashi, Y., Koike, M., Honda, H., Ito, Y., Sakaguchi, H., Suzuki, H., Nishiyama, N. (2008): Development of the short time exposure (STE) test: an in vitro eye irritation test using SIRC cells. *Toxicol. In Vitro*, 22, 760–770.

Takahashi, Y., Hayashi, K., Abo, T., Koike, M., Sakaguchi, H., Nishiyama, N. (2011): The Short Time Exposure (STE) test for predicting eye irritation potential: intra-laboratory reproducibility and correspondence to globally harmonized system (GHS) and EU eye irritation classification for 109 chemicals. *Toxicol. In Vitro*, 25, 1425–1434.

United Nations. (2015): Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Sixth revised edition. adapted 2015,
<https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html>
(accessed 11. Apr. 2017).

Van Goethem, F., Adriaens, E., Alépée, N., Straube, F., De Wever, B., Cappadoro, M., Catoire, S., Hansen, E., Wolf, A., Vanparys, P. (2006): Prevalidation of a new in vitro reconstituted human cornea model to assess the eye irritating potential of chemicals. *Toxicol. In Vitro*, 20, 1–17.

付記

本論文の内容は、下記に示す原著論文により構成される。

1. Takayuki Abo, Takuo Yuki, Rui Xu, Daisuke Araki, Yutaka Takahashi, Hitoshi Sakaguchi, Hiroshi Itagaki (2018): Expansion of the applicability domain for highly volatile substances on the Short Time Exposure test method and the predictive performance in assessing eye irritation potential. *The Journal of Toxicological Sciences*, 43 (7), 407-422
2. Takayuki Abo, Allison Hilberer, Christine Behle-Wagner, Mika Watanabe, David Cameron, Annette Kirst, Yuko Nukada, Takuo Yuki, Daisuke Araki, Hitoshi Sakaguchi, Hiroshi Itagaki (2018): Predictive performance and inter-laboratory reproducibility in assessing eye irritation potential of water- and oil-soluble mixtures using the Short Time Exposure test method. *Toxicology in Vitro*, 48, 78–85