

個別研究例

Short Time Exposure (STE) 法の利用

花王株式会社 安全性科学研究所
安保 孝幸

本日の発表内容

1. STE法の背景
2. 代替法における毒物劇物除外申請の必須条件とSTE法による製剤（希釈物）での濃度依存性と予測性
3. 毒物劇物除外申請された製剤（希釈物）のSTE法による評価結果
4. 毒物劇物除外申請におけるSTE法の利用

**本項目は公知化（論文化）致しますので、
そちらをご確認いただきたく宜しくお願い申し上げます。**

眼が傷害を受ける状況とその症状

紫外線

砂、ほこり

目を強く擦る

薬品

シャンプー

洗剤

目薬

コンタクトレンズ

予想される
眼に対する影響

感覚的な刺激

角膜傷害

混濁、剥離

結膜傷害

充血、浮腫

症状

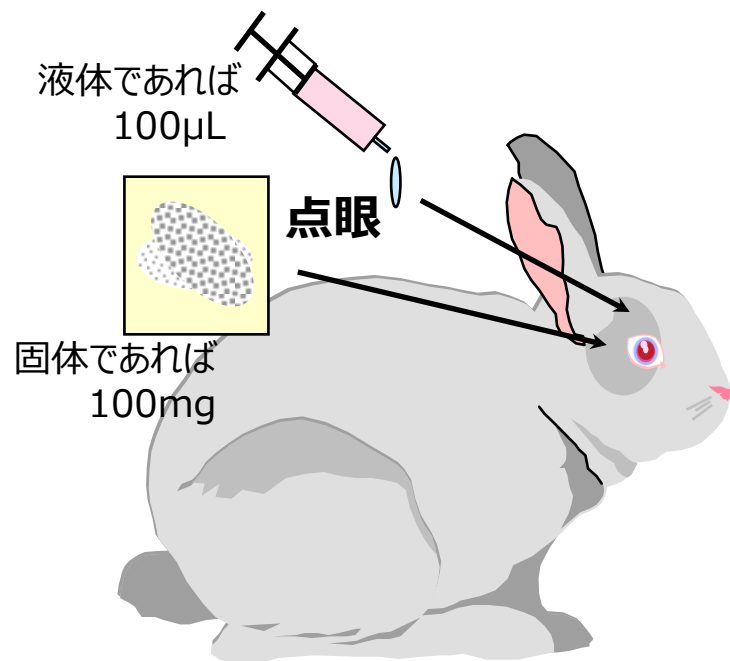
眼の痛み、しみる
かすみ、視力低下
充血、浮腫
涙、眼ヤニ

ウサギを用いた眼刺激性試験法（Draize）

薬品が眼に入ったときの傷害性をウサギを使ってするテスト

Draize 試験

方法



1. 薬品を点眼する

2. 経時的に眼の状態を観察する

(1、3、6、24、48、72、96、168hrs~21days)

- ・角 膜 （混濁度、面積） X 5
- ・虹 彩 （炎症） X 5
- ・結 膜 （充血、浮腫、分泌物） X 2

Draizeスコアの最大値：

110（角膜部80、虹彩部10、結膜部20）

3. 反応評点からMAS*を算出

*MAS：Maximum Average Score、最大平均評点

ウサギを用いたDraize試験の結果によるGHS区分方法

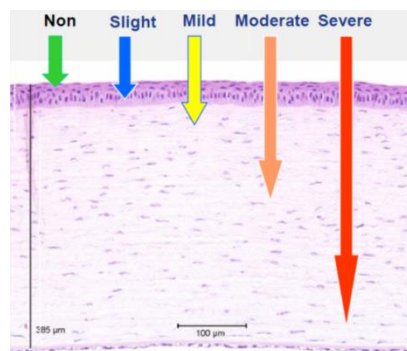
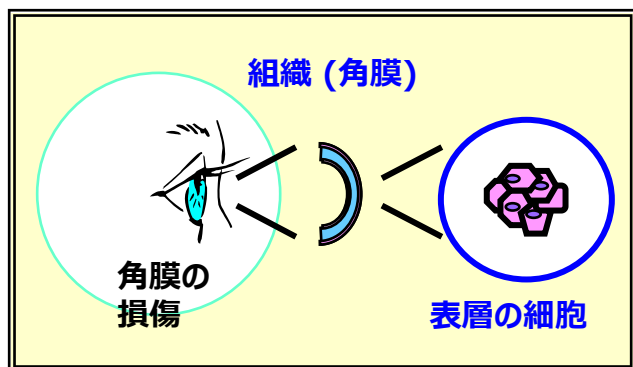
GHS区分	ウサギを用いた試験での条件	区分の条件
Category 1 強度眼刺激性、 腐食性	パターン1 角膜、虹彩、結膜に不可逆的な症状が発現し、 21日目までに回復しない または、 角膜スコア4がいずれかの時点で確認される パターン2 3匹中2匹以上の個体で1, 2, 3日目のスコアの平均が CO \geq 3 and/or IR \geq 1.5	<ul style="list-style-type: none"> パターン1が1匹以上あてはまる パターン2が<u>3匹中2匹以上*</u>あてはまる
Category 2A 中等度眼刺激性	3匹中2匹以上の個体で1, 2, 3日目のスコアの平均が 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	3匹中2匹以上の個体で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)

STE法の眼刺激性メカニズムにおける着眼点

● 眼刺激性を精度良く評価



◆ 実際の曝露条件

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

(Maurer et al., 2002)

眼刺激性評価には短時間曝露時の細胞損傷の評価が重要

● 簡便な方法での評価

→ 簡便な単層培養細胞の試験を選択

→ 従来の単層培養細胞の試験は非水溶性 (油溶性) 物質の評価に課題
(培地中は分離や油分の浮遊により細胞へ接触しない)

→ **短時間曝露⇒油溶性物質を溶媒として使用可**

Short Time Exposure (STE) 法を開発

OECDテストガイドライン承認までの道

2001-

試験法開発

プロトコル最適化、データセット構築、論文化(Takahashi et al., 2008)、SOP作成

2008-
2010

共同研究、バリデーション

- 2施設共同研究 (Takahashi et al. 2009)
- 3施設共同研究 (Takahashi et al. 2010)
- 5施設での1st validation study (Sakaguchi et al. 2011)
- 3施設での2nd validation study (Kojima et al. 2013)

2010-

国際的なPeer review (ICCVAM)

- 希釈物および混合物も含めた評価も実施
- STE Summary Review Document 作成 (2013.6)

2013-

OECD テストガイドライン化に向けた取り組み

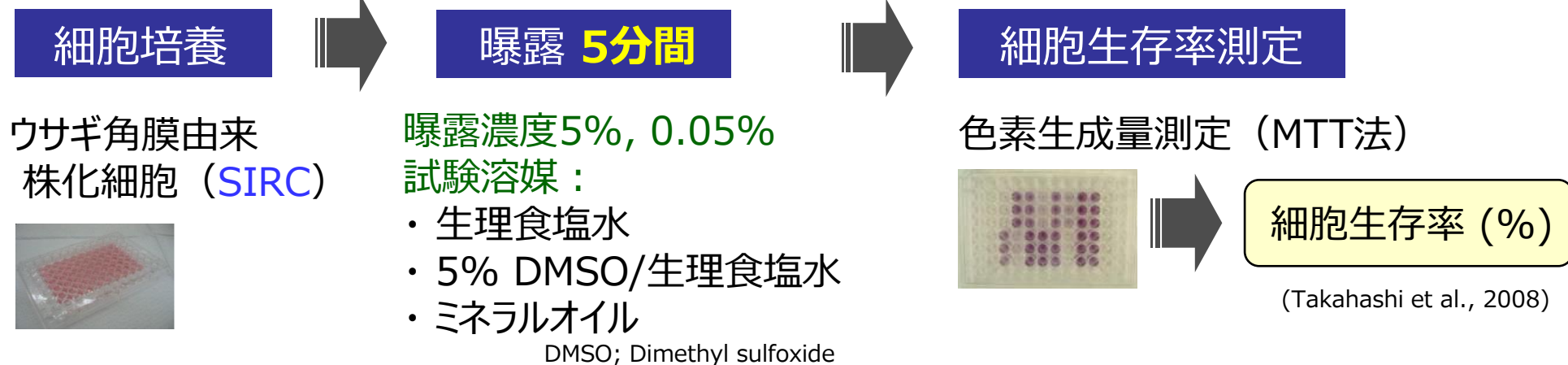
- Draft Test Guidelineの作成
- 世界各国からの膨大なコメント、修正への対応
- 専門家会議、電話会議での説明

2015.7.28

OECDテストガイドライン承認 (TG491)

STE法 (TG491) の概要

【試験方法】



【予測モデル】

Cell viability		GHS* classification
At 5%	At 0.05%	
≤ 70%	≤ 70%	Category 1**
≤ 70%	> 70%	No prediction can be made (No pred)
> 70%	> 70%	No Category (NC)

* GHS: Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals

**Category1: 強度眼刺激性

(OECD TG491., 2015)

**曝露時間、曝露濃度、予測モデルはGHS区分の対応性から検討して設定
単一化学物質および希釈物¹⁾、混合物^{1, 2)}も評価可能な試験法としてTG化**

STE法の適用限界

1) 高揮発性物質 > 6kPa (25°C)

e.g. Acetone, Ethanol, Isopropanol, Methyl acetate

→ 調製・曝露の際、揮発によって評価物質が揮散する可能性

2) 活性剤を除く固体

e.g. Ammonium nitrate, Potassium sorbate, Sodium salicylate

→ *in vivo*の物理的な刺激を捉えられなかった可能性

2つのカテゴリーを上記の理由から適用限界として設定

本日の発表内容

1. STE法の背景
2. 代替法における毒物劇物除外申請の必須条件とSTE法による製剤（希釈物）での濃度依存性と予測性
3. 毒物劇物除外申請された製剤（希釈物）のSTE法による評価結果
4. 毒物劇物除外申請におけるSTE法の利用

代替法におけるGHS区分の現状

- Cat. 1またはNCのみ区分可能
- Cat. 2は区分不可

GHS区分	BCOP (TG437)	ICE (TG438)	FL (TG460)	STE (TG491)
Cat. 1	○	○	○	○
Cat. 2				
No Category	○	○		○

毒物劇物指定および指定除外申請の現状

GHS区分	in vivo	in vitro
Cat. 1	毒劇物指定	毒劇物指定
Cat. 2	指定除外	
No Category		指定除外



Top-down方式

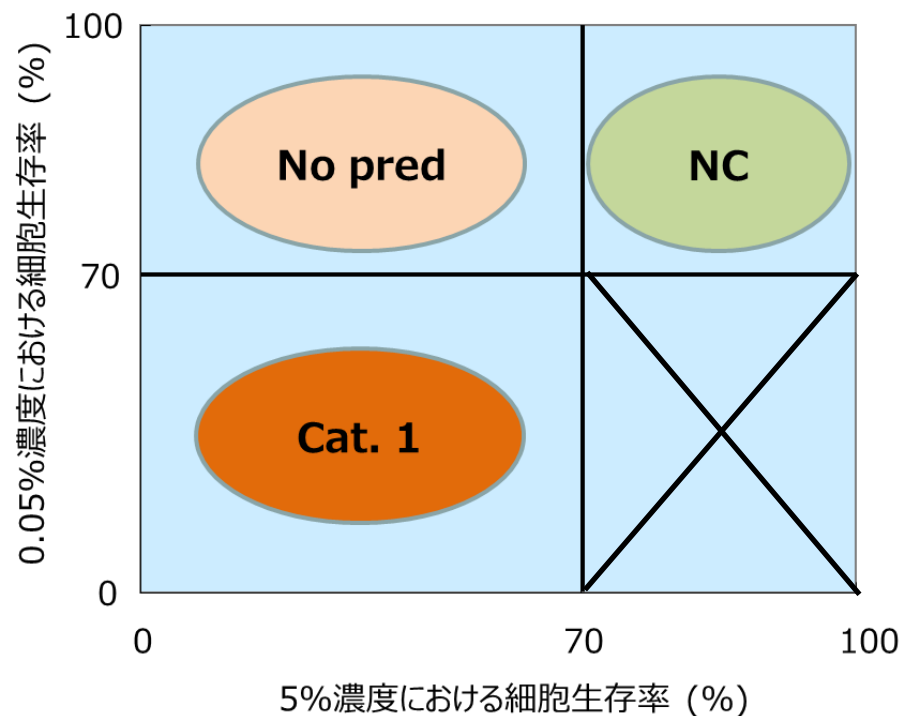


Bottom-up方式

GHS区分におけるSTE法予測モデルの意味合い

- STE法は2つの濃度によってGHSを区分
 - **0.05%**はCat. 1とNo predの区分に関与 (Top-down方式に関与)
 - **5%**はNCとNo predの区分に関与 (Bottom-up方式に関与)

Cell viability		GHS classification
At 5%	At 0.05%	
$\leq 70\%$	$\leq 70\%$	Category 1
$\leq 70\%$	$> 70\%$	No prediction can be made (No pred)
$> 70\%$	$> 70\%$	No Category (NC)



毒物劇物除外申請するための代替法の必須条件

区分結果がCat. 1、No predでは除外不可

→ 代替法を用いる毒物劇物除外申請には
Bottom-up方式（5%濃度での細胞生存率）が必要

必須条件

指定除外申請濃度のような製剤（希釈物）において、

- STE法で**NCと評価した物質が in vivoでNCであること**
(Negative Predictive Value ≒ 100%)
- STE法で**NCと評価した物質が in vivoでCat. 1でないこと**
(NC→Cat .1過大評価率 0%)

STE法における化学物質（224種）のGHS区分予測性

		STE		
		Cat. 1	No pred	NC
in vivo GHS	Cat. 1	18	26	0
	Cat. 2	2	31	3
	NC	2	25	117

- STE法でNCと評価した物質が in vivoでNCであった（117/120）
（Negative Predictive Value ≒ 100%）
- STE法でNCと評価した物質が in vivoでCat. 1なし（0/120）
（NC→Cat .1過大評価率 0%）

STE法における希釈製剤のGHS区分（濃度依存性）

Substance name	CAS RN	<i>in vivo</i> GHS	STE		GHS
			Cell viability (%)		
			5%	0.05%	
Cetyl pyridinium bromide (10% in water)	140-72-7	Cat. 1	2.5	60.7	Cat. 1
Cetyl pyridinium bromide (6% in water)	140-72-7	Cat. 1	4.1	80.9	No pred
Cetyl pyridinium bromide (1% in water)	140-72-7	Cat. 2A	7.3	92.0	No pred
Cetyl pyridinium bromide (0.1% in water)	140-72-7	NC	80.2	103.4	NC
Cetyl pyridinium chloride (10% in water)	6004-24-6	Cat. 1	1.4	65.7	Cat. 1
Cetyl pyridinium chloride (0.1% in water)	6004-24-6	NC	65.4	102.4	No pred
Sodium lauryl sulfate (15% in water)	151-21-3	Cat. 1	0.1	65.7	Cat. 1
Sodium lauryl sulphate (3% in water)	151-21-3	NC	1.1	100.4	No pred
Sodium lauryl sulphate (1% in water)	151-21-3	NC	0.5	99.6	No pred

- **in vivoの濃度依存性はSTE法でも同様の傾向**
- STE法で**NCと評価した物質が in vivoでNCであった**
- STE法で**NCと評価した物質が in vivoでCat. 1なし**
(NC→Cat. 1 過大評価率 0%)
- **希釈製剤においても毒性を検出**

STE法における希釈製剤のGHS区分予測性

49種の希釈物質を評価（濃度：50%～0.1%）

		STE		
		Cat. 1	No pred	NC
in vivo GHS	Cat. 1	11	10	0
	Cat. 2	0	7	0
	NC	1	8	12

- STE法で**NCと評価した物質が in vivoでNCであった（12/12）**
（Negative Predictive Value ≒ 100%）
- STE法で**NCと評価した物質がCat. 1なし（0/12）**
（NC→Cat .1過大評価率 0%）

本日の発表内容

1. STE法の背景
2. 代替法における毒物劇物除外申請の必須条件とSTE法による製剤（希釈物）での濃度依存性と予測性
3. 毒物劇物除外申請された製剤（希釈物）のSTE法による評価結果
4. 毒物劇物除外申請におけるSTE法の利用

毒物劇物除外申請におけるSTE法の利用

STE法は毒物劇物指定物質および製剤（希釈物）においても

- STE法でNCと評価した物質は高い精度でNCとして区分
(Negative Predictive Value \doteq 100%)
- STE法でNCと評価した物質にCat. 1なし
(NC \rightarrow Cat .1過大評価率 0%)

判定基準

- 原体がSTE法の適用限界でないことを確認
- 除外申請濃度の希釈物：

結果が Cat. 1	→ 申請濃度では除外不可
No pred	→ 申請濃度では除外不可 (OECD GD 263*に従い、他の試験法での再評価の可能性)
NC	→ 申請濃度で除外可能

*: 眼刺激性 Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA)に関する資料