

# 眼刺激性試験代替法の評価会議報告書

2013年改訂 OECD TG 438 ニワトリの摘出眼球を用いた眼刺激性試験  
(ICE法: Isolated Chicken Eye Test)

JaCVAM 評価会議

平成26年(2014年)10月28日

## JaCVAM 評価会議

- 大野泰雄 (運営委員会推薦) : 座長
- 五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部)
- 一鬼 勉 (日本化学工業協会)
- 篠田和俊 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
- 杉山真理子 (日本化粧品工業連合会)
- 谷川浩子 (日本動物実験代替法学会)
- 西川秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
- 平賀秀明 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
- 牧 栄二 (日本免疫毒性学会)
- 増田光輝 (座長推薦)
- 森田 健 (日本環境変異原学会)
- 山田隆志 (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
- 横関博雄 (日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会)
- 吉田武美 (日本毒性学会)
- 吉田 緑 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部)
- 吉村 功 (座長推薦)
- 渡部一人 (日本製薬工業協会)

任期 : 平成 26 年 4 月 1 日 ~ 平成 28 年 3 月 31 日

ニワトリの摘出眼球を用いた眼刺激性試験(Isolated Chicken Eye Test、以下 ICE 法)は、ウサギを用いた Draize 眼刺激性試験(以下、Draize 法)の代替試験法である。2003 年から 2006 年にかけて、トップダウン方式における重篤な眼の傷害を引き起こす化学物質(UN GHS 区分 1 物質)を同定するための試験法として、回顧的バリデーションが NICEATM/ICCVAM によりなされ、2009 年に OECD TG 438 (以下、TG438(2009)<sup>1)</sup>)として採択された。

これとは別に NICEATM/ICCVAM は、ECVAM および JaCVAM の協力の下、2006 年から 2010 年にかけて、ボトムアップ方式における区分外物質の同定法としての適用性に関する回顧的バリデーションを新たに行った。バリデーションには、初回に使用された ICCVAM データ(2006)<sup>2)</sup>がそのまま用いられて解析がなされたが、ICE 法拡大適用の提言には至らなかった。

その後、2012 年、OECD 専門委員会により UN GHS 区分下において再評価が実施された。初回に使用されたデータベースにおける *in vivo* および *in vitro* 両方のデータが見直されたほか、*in vitro* の区分外基準が正式に設定された。そこで改めて評価が行われた結果、ICE 法はトップダウン方式における UN GHS 区分 1 物質の同定のみならず、ボトムアップ方式における区分外物質の同定法として使用することが可能であると判断され、2013 年 7 月 26 日付けで 2013 年改訂 TG 438(以下、TG438(2013)<sup>3)</sup>)として採択された。

TG 438(2013)における主な改訂点は、1) ボトムアップ方式による UN GHS 区分外物質同定への適用および 2) 適用限界、である。JaCVAM 評価会議は、この改訂の妥当性について検討した。

## 1. 試験法の定義

名称： 2013 年改訂 OECD TG 438 (TG438 (2013) <sup>3)</sup>)

ニワトリの摘出眼球を用いた眼刺激性試験 (ICE 法: Isolated Chicken Eye Test)

代替する対象毒性試験： Draize 法

試験法の概略： ICE 法は、ニワトリから摘出した眼球に被験物質を曝露し、その結果、眼球に生じる角膜の変性を、角膜の腫脹、混濁度およびフルオレセイン染色性の変化としてとらえる。これら 3 評価項目の変化をそれぞれ個別のスコアに変換して得られる総合評価をもとに *in vivo* の眼刺激性を予測する。

各評価項目の変化は、A)角膜の腫脹：光学的厚度計を装着した細隙灯顕微鏡にて角膜の厚さを測定し、曝露 240 分後までの経時的な変化率を定量的に求める。B)角膜の混濁度：細隙灯顕微鏡にて角膜混濁度の経時的な変化を曝露 240 分後まで観察する。C)フルオレセイン染色性：細隙灯顕微鏡にて曝露 30 分後の角膜表面のフルオレセイン染色性を調べる。各項目の結果を傷害の程

度により、眼刺激性の最も弱いクラス I から最も強いクラス IV の 4 段階に分類し、それらの分類結果を総合して、被験物質の眼刺激性を判定する。

## 2. 評価に用いた資料および評価内容の科学的妥当性

NICEATM/ICCVAM による回顧的バリデーションを経て OECD にて TG 438(2009)として採択された後、2012 年に OECD 専門委員会により UN GHS 区分下において再評価が実施され、2013 年には TG 438(2013)として採択されており、その評価に用いた資料<sup>1-5)</sup>と評価内容に科学的妥当性がある。また、今回の改訂に先立ち OECD 専門委員会により、前回評価を行った ICCVAM(2006)バリデーションデータベースの 175 物質について、*in vivo* および *in vitro* の個々のデータについて再評価されたが、最終的にボトムアップ方式の評価には 175 物質中 152 物質（単一物質：72、混合物質：80）が、トップダウン方式の評価には 140 物質（単一物質：65、混合物質：75）が用いられ、十分な数を用いて評価されている。

## 3. 本試験法の有用性と適用限界

第三者評価報告書(ICCVAM 2006<sup>4)</sup>、第三者評価報告書 2012<sup>6)</sup>で報告されているとおり、トップダウン方式およびボトムアップ方式における施設内・施設間再現性は高い。また、適用限界に関しては、防汚有機溶媒含有塗料、固体物質、界面活性剤およびアルコール類については、高い偽陰性率あるいは偽陽性率が示されたが、以下の理由からこれらの化学物質にも ICE 法を適用することができると報告された。

ボトムアップ方式：

- ・防汚有機溶媒含有塗料で陽性 2 物質のうち、1 物質（TNO-94）が偽陰性であったが、用途の類似した化合物（TNO-93）は陽性であった。従って、ICE 法への適用領域から除外するには根拠が不十分であり、防汚有機溶媒含有塗料を適用領域から除外する必要はない。
- ・単一物質、混合物質、液体、固体等における偽陰性率は 5%以下と低い。偽陽性率については、ICE 法では 33%と他の試験法に比べ低いことが示された（BCOP（Bovine Corneal Opacity and Permeability）法; 69%、CM (Cytosensor Microphysiometer)法：68%<sup>5)</sup>）。単一物質および界面活性剤についての偽陽性率は高いが、ボトムアップ方式において陽性と判断された場合には、他の適切な試験法による確認が必要とされていることから、これらの化学物質を適用領域から除外する必要はない。

トップダウン方式：

・偽陰性率は固体物質および界面活性剤において高く、偽陽性率はアルコール類において高かった。しかし、これらの分類においても眼刺激性が正確に予測された物質があること、さらにトップダウン方式において陰性と判断された場合には他の適切な試験法による確認が必要とされていることから、固体物質および界面活性剤を適用領域から除外する必要はない。ただし、アルコール類で陽性結果が得られた場合は、結果の解釈は慎重にすべきである。

以上から、ICE 法はボトムアップ方式での区分外物質およびトップダウン方式での UN GHS 区分 1 物質の同定法として、すべての種類の化学物質に適用できるとされた。

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、行政上利用及び社会的受け入れの可能性

社会的受け入れ性：

ICE 法では、食用として屠殺されたニワトリの眼球を用いるため Draize 法よりも社会的受け入れ性は高い。今回の改訂においては、動物福祉の観点からの変更がないことから、本改訂法の社会的受け入れ性は、改訂前と変わらない。

行政上の利用性：

TG 438 (2013) は、化学物質による眼刺激性を評価でき、トップダウン方式において UN GHS 区分 1 物質（重篤な眼の傷害を引き起こす物質）ならびにボトムアップ方式における UN GHS 区分外物質（眼刺激性物質として分類されない）の範囲において行政的利用は可能であると考えられる。

参考文献

- 1) OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Isolated Chicken Eye Test for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, TG438 (Adopted 7 September 2009)
- 2) ICCVAM, ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No. 10-7553. Volume 1 and Volume 2 (2010).
- 3) OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Isolated Chicken Eye Test for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, TG438 (Adopted 26 July 2013)
- 4) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment No. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris. (21 June 2013)
- 5) ICCVAM, Background Review Document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Methods. NIH Publication No. 06-4513 (2006).

- 6) JaCVAM, 眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書 - 評価対象試験：眼に対する腐食性および強刺激性評価のためのニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法, AATEX-JaCVAM J1, 16-29 (2012)