

経済協力開発機構（OECD）改訂ガイドライン（Test Guideline No.405）
ウサギを用いた眼刺激性試験の評価報告書

2013年10月

眼刺激性試験代替法評価委員会

委員名：

小坂 忠司（残留農薬研究所）

吉村 功（東京理科大学）

山本 直樹（藤田保健衛生大学）

竹内 小苗（P&G イノベーション合同会社）

細井 一弘（参天製薬株式会社）

加藤 雅一（株式会社 J-TEC）

簾内 桃子（国立医薬品食品衛生研究所）

増田 光輝

1. 序 論

OECD試験ガイドラインは、最適の科学技術が反映されるように定期的に見直されてきた。その中で、これまでの改訂では不必要な動物実験を回避するための改善が行われてきた。今回はウサギを用いた急性刺激性・腐食性試験ガイドライン¹⁾について、動物福祉への配慮を目的とした改訂が行われた。

本改訂に先立ち、米国ICCVAMの国際的な科学的ピアレビュー委員会 (International Scientific Peer Review Panel)²⁾ において、局所麻酔薬と全身性鎮痛薬の使用により、試験成績に影響を与えることなく動物の痛みと苦痛を回避できるか、そしてその際の局所麻酔薬と全身性鎮痛薬の処方及び人道的エンドポイントについて議論された。本改訂により、ウサギを用いた眼刺激性試験において、試験成績に影響を与えることなく動物の痛みと苦痛が軽減されると考えられた。

今回の改訂の要点を次に示す。

- 1)被験物質投与前では、局所麻酔薬 (例：プロパラカイン、テトラカイン) と全身性鎮痛薬 (例：ブプレノルフィン) による定常的前処置。
- 2)被験物質投与後では、全身性鎮痛薬 (例：ブプレノルフィン及びメロキシカム) による定常的処置。
- 3)動物の痛みと苦痛の症状の計画観察，モニタリングおよび記録。
- 4)全ての眼傷害の (性質，程度および進行状況) 計画観察，モニタリング，記録および人道的エンドポイント設定。

2. ウサギ眼刺激性試験手順

2.1. 供試動物

健康な若齢成熟の白色ウサギを供試動物として使用する。試験開始前24時間以内に供試動物の両眼を検査する。眼の刺激，眼傷害，または角膜損傷が認められた動物は使用しない。

動物は個別飼育する。動物飼育室の温度は $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ ，相対湿度は50%～60%とし，照明は12時間明期，12時間暗期とする。

2.2. 局所麻酔薬及び全身性鎮痛薬の適用

眼刺激性試験の実施にあたり，動物の痛み及び苦痛を回避ないし最小限にすることを目的とする。

被験物質投与の60分前に，ブプレノルフィン0.01 mg/kg (鎮痛薬として治療に用いられる用量) を皮下投与する。

被験物質投与5分前に，両眼に局所麻酔薬 (例えば，0.5%塩酸プロパラカインあるいは0.5%塩酸テトラカイン) を1，2滴点眼する。また，市販局所麻酔点

眼薬中の防腐剤が試験結果に影響する可能性を回避するため、防腐剤が添加されていない局所麻酔点眼薬の使用を推奨する。対照眼には被験物質は投与せず、局所麻酔薬のみを投与する。被験物質投与が顕著な苦痛や痛みを誘起すると予期される場合には、通常 *in vivo* 試験を実施すべきではない。しかしながら、刺激性が不明な場合や試験実施が必要な場合には、被験物質投与前に5分間隔で局所麻酔薬の追加点眼の実施を考慮すべきである。その際、局所麻酔薬の複数回使用によって眼刺激の程度がわずかに高くなり、回復が遅くなる可能性に留意しなければならない。

被験物質投与8時間後にブプレノルフィン0.01 mg/kg及びメロキシカム0.5 mg/kg を皮下投与する。なお、メロキシカムが1日1回皮下投与で眼に対する抗炎症性作用を示すというデータはないが、被験物質投与の8時間後まではメロキシカムを投与すべきではない。

被験物質投与8時間以降は、眼所見や痛み及び苦痛が消失するまで、ブプレノルフィン0.01 mg/kgを12時間間隔で皮下投与し、メロキシカムを0.5 mg/kg 24時間間隔で皮下投与する。

先行投与の鎮痛薬及び局所麻酔薬の効果が不十分な場合には、被験物質投与直後に鎮痛薬の投与を実施する。試験期間中に動物が痛みや苦痛を示した際には直ちに追加の鎮痛薬（緊急用量として0.03 mg/kg ブプレノルフィン、皮下投与）を投与し、必要に応じて8時間毎に緊急用量を投与する。0.5 mg/kg のメロキシカムは緊急用量のブプレノルフィンと併用し、24時間間隔で皮下投与する。

2.3. 被験物質の適用

下眼瞼を穏やかに引き、各動物の片眼の結膜囊内に被験物質を投与する。被験物質の流失を防ぐため、約1秒間上下の眼瞼を静かに合わせ、閉じたままにしておく。

2.3.1. 洗浄

被験物質が固体の場合及び投与直後に刺激性・腐食性作用を示す場合を除いては、被験物質投与後少なくとも24時間は被験動物の眼を洗浄しない。24時間後に適切と考えられる場合は、洗浄してもよい。

科学的に妥当性がない限り、洗浄効果を調査するための衛星群の使用は推奨できない。もし、衛星群が必要な場合は2例のウサギを使用する。洗浄の条件、例えば洗浄時間、洗浄液の組成、温度、使用時間、量及び速度などを記録する。

2.3.2. 用量

(1) 液体の試験

液体の場合は、投与量は0.1 mL とする。被験物質を眼へ投与するために、ポンプスプレーは使用しない。液体のスプレー用検体では予め容器に試料を採取し、そこから0.1 mLを採取し、眼に滴下する。

(2) 固体の試験

固体、ペースト及び粒子状物質の場合は、投与量は容量として0.1 mL、あるいは重量で100 mg以下の量とする。被験物質は摩砕して微粉末化する。固体物質の容量は容器を軽くたたいて詰めた後に測定する。固体物質が投与後1時間の観察時点で生理的機構によって眼から除去されていない場合には、眼を生理食塩液または蒸留水で洗浄してもよい。

(3) エアゾールの試験

ポンプスプレー及びエアゾール製品の場合は、予め内容物を採取し眼に適用することが推奨される。ただし、内容物が気化するために加圧エアゾール容器に入れられている被験物質の場合は例外であり、その場合は眼を開き、眼の直前10 cm の距離から約1秒間単回噴射して被験物質を眼に適用する。この距離は、スプレーの射出圧力及びその含量に応じて変化してもよい。スプレーの射出圧力で眼を損傷しないように注意する。エアゾールからの投与量は、以下のシミュレーションによって概算の投与量を推定する。被験物質を秤量用紙の直前に置いたウサギの眼のサイズの穴を通してスプレーし、秤量用紙の重量増加から眼にスプレーされる量を概算する。揮発性物質の投与量については、被験物質をスプレーする前と後の容器重量を秤量することにより推定する。

2.4. 初回試験（動物1匹を用いる *in vivo* 眼刺激性・腐食性試験）

段階的試験戦略として、*in vivo*試験では、まず1匹の動物を用いて実施する。確認試験に移る前に、刺激性の重度と可逆性の有無を観察する。この観察結果により、被験物質が眼に対して腐食性または強い刺激性を有すると判断される場合には、確認試験は実施しない。

2.5. 確認試験（追加動物を用いる *in vivo* 眼刺激性試験）

初回試験において腐食性ないし強い刺激性作用が観察されない場合は、1匹ないし2匹の追加動物で刺激反応の有無を確認する。先の試験で中等度の刺激性が認められた場合は、2匹の追加動物を同時に投与するよりも、1匹ずつで確認試験を段階的に実施することが推奨される。そして2匹目の動物において、腐食性または強い刺激性作用が認められた場合は試験を継続しない。また2匹目の動物の結果でハザード分類に十分と判断される場合、その後の試験を継続しない。

2.6. 観察期間

観察期間としては、観察された作用の程度及び可逆性を十分に評価できる期間とする。しかし、動物が重度の苦痛または障害を示した場合は、その時点で実験を終了する。作用の可逆性を決定するには、被験物質投与後、通常21日間観察する。可逆性であることが21日以前に確認できた場合は、実験をその時点で終了する。

2.7. 臨床観察及び眼刺激性スコア（評点）

投与後1時間及びその後数日間毎日観察し、眼の損傷の有無を包括的に評価する。投与後3日間は1日に数回観察し、試験中止時期を適宜決定する。試験動物は試験期間中定期的に苦痛及び痛み（例；触れるか擦る、過度の瞬きをする、過度の流涙など）を少なくとも1日2回、6時間以上の間隔で観察し、また必要に応じてそれ以上の頻度で観察する。フルオレセイン染色は定期的に行うべきであり、必要と考えられた場合は細隙灯生体顕微鏡を使用し、眼の損傷域の検出及び計測を適切に判断する（例；角膜潰瘍が認められる時の損傷の深さの検出）。またこれら方法は人道的安楽殺処分のための制定されたエンドポイント要件を満たすかの評価にも使用される。眼のダメージの範囲を恒久的に記録する目的で、参考資料として傷害部位をデジタルカメラも用いて撮影する。確実なデータが得られたのちは、不必要に長く動物を維持してはならない。動物が重篤な苦痛を示した場合は遅滞なく人道的安楽殺処分しなければならず、被験物質の評価は以下のように行う。

投与後、次のような眼傷害を起こした動物は安楽殺を実施する。角膜の穿孔やぶどう腫（Staphyloma）を含む角膜の重度の潰瘍形成、前眼房の出血、程度4の角膜混濁、72時間継続する対光反射の消失（虹彩反応；程度2）、結膜の潰瘍、結膜または瞬膜の壊死、脱落が挙げられる。このような病変は一般的に不可逆性であることによる。さらに、21日間の観察終了までに次の眼病変が認められた場合には人道的エンドポイントとして試験中止と判断することを推奨する。それらの眼病変は、深い損傷（例：角膜実質層に達する角膜損傷）、角膜輪部の損傷が50%以上（結膜組織の蒼白化により評価）、重度の眼感染（化膿性の分泌物）であり、これらの眼病変は21日間の観察終了時までに完全に回復することが望めない、あるいは腐食性または強い刺激性を示す損傷を引き起こすと考えられるからである。また、角膜表面への血管新生（パンヌス）、フルオレセインによる染色域（毎日の観察によって縮小しない）、あるいは被験物質投与後5日以降に見られる角膜上皮再生の欠落などの複合的所見もまた早期試験終了の観察項目として考えられる。

しかしながら、上記眼所見の1つ1つでは早期試験終了の判断材料として十分

ではない。強度の眼への影響が認められた場合、早期試験終了すべきかどうかの判断のため、選任獣医師あるいは資格のある実験動物獣医師、あるいは臨床兆候を確認できるよう訓練された者に獣医学的試験に関して助言を求めねばならない。眼の刺激性反応（結膜、角膜及び虹彩）は被験物質投与後1, 24, 48及び72時間に採点する。眼の傷害が認められない時は、投与後3日以内に試験を終了させてはならない。軽度から中等度の刺激性が明瞭に認められる場合は投与後21日まで観察し、その時点で試験を終了する。観察の実施及び記録は少なくとも投与後1, 24, 48, 72時間, 7, 14及び21日に損傷の状態を評価して、可逆性か非可逆性かを判断する。試験動物が人道的な配慮から安楽殺処分にされるべきか、否定的な結果により試験から除外するべきかについては、より頻繁な観察によって判断すべきである。

眼刺激性のスコア（評点）を各試験で記録する。その他の眼の所見（例えばパンヌス、染色、前眼房の変化）や全身性の有害作用もまた記録する。反応の検査は、双眼ルーペ、手持ち式細隙灯生体顕微鏡または他の適切な器具の使用によって円滑に実施できる。24時間目の観察を記録後、フルオレセインを用いて眼をさらに検査してもよい。眼刺激性のスコア（評点）は主観的になりやすく眼刺激性反応評価の一致を促進させるため、また試験施設及び実験者が観察の実施及び理解を容易とするため、採点方法について観察者の適切な訓練が必要である。

3. 結果の評価

眼刺激性スコアを採点し、その性質及び重症度、ならびにその可逆性の有無についてGHSの基準に従い評価する。また、個別のスコアは刺激性評価の絶対的な標準とはみなさない。

4. 眼刺激性及び腐食性評価のための段階的試験戦略（試験ガイドライン405の付属文書）

科学的妥当性及び動物福祉の実施を目的として、動物の眼に重度の刺激性を誘起する可能性が高い化学物質の眼刺激性試験を回避あるいは最小限にして、不必要な動物の使用を避けることが重要な問題である。ウサギを用いた*in vivo*試験の実施前に、段階的試験戦略の一部として化学物質の潜在的刺激性・腐食性に関するすべての情報を収集し、評価する必要がある。以下の段階的試験戦略による情報を評価して、強度の刺激性や腐食性が認められる場合には*in vivo*試験を実施すべきではない。

(1) ヒトまたは動物の既存データ及び国際的に承認された方法による*in vitro*

試験データの評価

- (2) 構造活性相関 (SAR) の分析
- (3) 物理化学的特性及び化学反応性 (例えば, 2.0以下または11.5以上の極端な pHを示す物質, 強い局所作用の可能性)
- (4) 上記以外の既存情報 (皮膚経路からの全身毒性についての利用可能なすべての情報)
- (5) 皮膚腐食性の評価 (皮膚腐食性及び強い刺激性影響; OECD試験ガイドライン404あるいは国際的に承認された*in vitro* 皮膚腐食性試験法での評価)
- (6) *in vitro*または*ex vivo*試験からの結果 (国際的に承認された*in vitro*または*ex vivo*試験での腐食性ないし強い刺激性)

5. 眼刺激性評価委員会の見解

本委員会はわが国も本改訂試験ガイドラインを受け入れるべきであると考えた。しかしながら, ガイドラインの適用に際しては次の点を考慮すべきである。

(1) 本試験ガイドラインで例示されている局所麻酔薬はわが国では医薬品として流通していない。それゆえ, わが国で入手可能な局所麻酔薬を用いるべきである。防腐剤を添加していない局所麻酔点眼薬として, 「オキシブプロカイン塩酸塩ミニムス点眼液0.4%「センジュ」(千寿製薬株式会社)」がある。また, 局所麻酔薬原体を用いて, 0.5%塩酸プロパラカインあるいは0.5%塩酸テトラカインを調製する場合には, 麻酔薬に関する情報を熟知した獣医師あるいは薬剤師の指導の下で無菌的に実施する必要がある。

(2) 本ガイドラインに記載されている実験動物獣医師は, 欧米では実験動物福祉を担保するために定義されているが, 我が国の関連法令指針にはその定義がない。それゆえ, 実験動物獣医師と同等な獣医師あるいはそれに準ずる実験動物の生理, 疾患, 症状等に熟知した者が獣医学的試験を行い人道的エンドポイントの判定を行うものとすべきである。

(3) 本ガイドラインに記載されている段階的試験戦略 (上記4項) では, 化学物質の潜在的な眼刺激性・腐食性に関するすべての情報, 皮膚刺激性試験情報及び眼刺激性*in vitro*または*ex vivo*試験情報を収集・評価し, これらの情報及び試験情報により強度の刺激性や腐食性が認められると判断される場合には, ウサギを用いる*in vivo*試験 (OECDガイドラインTG405) を実施すべきではないと推奨している。本眼刺激性評価委員会は, ウサギを用いた眼刺激性試験の実施にあたり上記段階的試験戦略を十分考慮した上で当該眼刺激性試験を実施すべきであると判断した。

6. 文献

- 1) OECD (2012), Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing.
- 2) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA.

参考資料

用語解説

選任獣医師：試験研究機関において使用されるすべての動物の健康と福祉に対して責任を有する。この責任を遂行するため研究機関から十分な権限と獣医学的ケア計画を運用するための資源（人的、物的、資金的）を与えられている。

実験動物獣医師（**Laboratory Animal Veterinarian**）：我が国では、国際実験動物医学専門医協会に属する日本実験動物医学専門医協会が「実験動物医学専門医」という資格を認定している。これは実験動物の病気、治療、処置に熟知した獣医師である。

臨床兆候を確認できるよう訓練された者：我が国では、獣医師以外に該当する認定資格はない。現段階では、動物看護師統一認定機構が認定した「認定動物看護師」や日本実験動物技術者協会で所定の教育訓練を受けた者などが、これに該当する例として挙げられる。

人道的エンドポイント（**Humane Endpoint**）：動物実験における強い痛み、苦痛、感染症罹患、または瀕死期を判断するための評価指標。