

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

Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying
Ocular Corrosives and Severe Irritants

Version 2

平成 21 年 10 月 14 日

眼刺激性試験代替法評価委員会

委員長 簾内 桃子 (国立医薬品食品衛生研究所)
委員 小坂 忠司 (残留農薬研究所)
山本 直樹 (藤田保健衛生大学)
増田 光輝 (国立医薬品食品衛生研究所)
竹内 小苗 (P&G イノベーション合同会社)
宮岡 悦良 (東京理科大学)

略語

3Rs: Replacement, Reduction, and Refinement Alternative

BCOP: Bovine Corneal Opacity and Permeability

BRD: Background Review Document

CAS: Chemical Abstracts Service

CV: Coefficient of variation

ECVAM: European Center for the Validation of Alternative Methods

ESAC: ECVAM Scientific Advisory Committee

EU: European Union

GHS: Global Harmonized System

GLP: Good Laboratory Practices

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

ICE: Isolated Chicken Eye Test Method

IRE: Isolated Rabbit Eye Test Method

IVIS: *In Vitro* Irritancy Score

MAS: Maximum Average Score

MMAS: Modified Maximum Average Score

NICEATM: Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods

OECD: Organization for Economic Co-operation and Development

US EPA: United States Environmental Protection Agency

要旨

ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験（ICE：Isolated Chicken Eye Test）は被験物質の眼刺激性を評価する試験法であり、ウサギを用いた眼刺激性試験（Draize法）の代替法として開発された。本試験法を腐食性および強刺激性物質をスクリーニングする目的で使用するために行われた ICCVAM（Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods）におけるバリデーション試験の情報（BRD：Background Review Document）をもとに、JaCVAM 眼刺激性試験代替法評価委員会においても、本試験法についての Peer Review を実施した。

ICE 法は、ニワトリから摘出した眼球に被験物質を暴露し、その結果、眼球に生じる物理的特性の変化を、角膜の腫脹、角膜混濁および角膜のフルオレセイン染色性を経時的に評価することによって、眼の腐食性および強刺激性を判定する方法である。

本バリデーション試験には、様々な種類と十分な数の被験物質が用いられた。ICCVAM の BRD によると、ICE 法の正確性は、GHS 分類による腐食性・強刺激性の眼刺激性分類と比較して、その一致度は 83% であり、偽陽性率と偽陰性率はそれぞれ 8% および 50% であった。一方、被験物質には分類により、偽陽性率および偽陰性率とも高い区分（アルコール類）、また偽陰性率の高い区分（固体、界面活性剤）がみられた。これら特定の区分を除くと、一致度および偽陽性率は 92% と 6% であり、偽陰性率は 7 例中 2 例の 29% となり、腐食性・強刺激性の検出精度は良好と判断された。試験法の信頼性については、施設内変動の検討は十分といえないものの、施設間変動については良好な結果が得られていると判断された。

以上のような結果から、ある特定の化学物質（アルコール類、固体、界面活性剤）の特性を考慮に入れた上で、化学物質の眼刺激性の段階的評価の 1 つとして、腐食性および強刺激性物質を評価する目的のために、ICE 法を使用することに問題はないと判断された。我が国の GHS に準拠する化学物質に関わる法規制において、ICE 法により腐食性・強刺激性物質を評価することは可能であると考えられる。

1 試験法の科学のおよび規制上での妥当性

ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験 ICE は、ニワトリから摘出した眼球の角膜に被験物質を暴露し、その結果、角膜に生じる物理的特性の変化から被験物質の眼刺激性を評価する試験法である。

角膜は偶発的な事故などにより刺激物に暴露される眼表面組織の広範囲を占めており、その損傷は視力障害を引き起こす可能性がある。したがって、従来の眼刺激性試験評価法である Draize 法では、角膜への影響に評価の重みをおいている。ニワトリから採取した眼球を用いる本試験法も、Draize 法と同様な考え方に基づいて化学物質の眼刺激性を評価していると判断される。

ヒト、ウサギおよびニワトリの角膜には解剖学のおよび生理学の違いがあり、この違いが Draize 法や ICE 法を用いた場合のヒト眼刺激性の予測性におよぼす影響については明らかではない。しかしながら、現在、Draize 法を使用することで、化学物質がヒトの眼に対して重篤な損傷を与える可能性については十分予知できている。したがって、ICE 法の妥当性を検討するにあたっては、Draize 法との比較を行うことで、その目的が達成されると考えられる。

生体を用いた試験では、化学物質の眼の暴露に対する保護作用が働くが、ICE 法ではこの作用は組み入れられないため、より過酷な試験条件下で評価していると考えられる。また、暴露後の角膜の刺激性反応は評価できるが、回復性や角膜以外の眼組織については、評価できない。しかし、腐食性・強刺激性の判定が微妙な場合は、病理組織学的評価を参考とすることが可能である。

化学物質の危険有害性の情報については、ラベルや安全性データシートを通じて使用者に伝達されるような法律や規則が各国において定められている。眼刺激性については、現在、Draize 法による腐食性（非回復性）の有無、さらに、回復性の刺激についてはその重症度（強・中・弱刺激性）等をもとに、米国環境保護庁（US EPA）、欧州連合（EU）、および化学品の分類と表示に関する世界調和システム（GHS）において分類基準が示されている（EPA 1996, EU 2001, UN 2003）。

ICCVAM のバリデーション試験（ICCVAM 2006）では、US EPA、EU、GHS のそれぞれの分類基準に応じて、腐食性および強刺激性物質の判定法としての評価を行っている。わが国においては、化学物質に関する法律のうち、2009 年 1 月現在、労働安全衛生法が GHS を導入している。また、今後、化学物質の流通の更なるグローバル化を考えると、危険有害情報の共有化が必要となり、国内の他の化学物質に関する法律も GHS を導入していくことが推測される。よって、ICE 法の GHS 分類基準に対する評価は、国内法への適用にも対応するものである。

2 試験法のプロトコールの妥当性

本試験は、以下の3つの評価項目をもとに、眼の腐食性・強刺激性を評価する。

1. 角膜の腫脹 (Corneal swelling) : 光学的厚度計 (Optical Pachymeter) を装着した細隙灯顕微鏡にて、角膜の厚さを測定し、その変化を定量的に評価する。
2. 角膜混濁 (Corneal opacity) : 細隙灯顕微鏡にて角膜の濁度すなわち変性を、評価する。
3. 角膜のフルオレセイン染色性 (Fluorescein retention) : 細隙灯顕微鏡にてフルオレセイン染色性を検査する。

この3つの評価値を総合し、眼の腐食性および強刺激性を判定する。ICCVAM のバリデーション試験で用いられたプロトコールの概要は、以下のとおりである。

1) 眼球の入手

主に食用目的で屠場にて処分された若鳥 (7 週齢程度で 2.5~3.0 kg、雌雄の区別無し) から頭部を入手する。屠殺後の鶏頭部は、生理食塩液で湿潤させた紙を敷いた上に置き、箱に入れて室温で運搬する。運搬は屠殺後 2 時間以内に行うことが指定されている。

2) 眼球の準備

角膜の損傷をフルオレセイン染色により確認後、鶏頭部から眼球を取り出し、ステンレス製のクランプ (固定器) に固定して Corneal Swelling (角膜の腫脹) を検査し、腫脹が平均値の 10% を逸脱する眼球を除く。32±1.5℃ の生理食塩水を用いて 1 分間に 0.1~0.15 mL (2~3 滴) の流速で眼球を湿潤させる。

3) 試験群 :

各試験群あたり 3 個の眼球を使用する。被験物質は、基本的に固体、液体とも原体および原液のまま使用。液体被験物質の希釈が必要な場合は、生理用食塩水あるいは蒸留水を用いる。陰性対照として、生理食塩水あるいは蒸留水を用いる。

4) 暴露法 :

ICE 法検査装置の固定器に設置した眼球を上向きにし、被験物質が液体の場合には 30 mL、固体の場合には 30 mg を暴露させ、10 秒後に 20 mL の生理食塩水にて洗い流す。

5) 測定 :

5-1) 角膜の腫脹 (Corneal swelling)

暴露後 30 分、75 分、120 分、180 分、240 分に、光学的厚度計 (Optical Pachymeter) を装着した細隙灯顕微鏡にて角膜の厚さを測定し、変化した角膜の厚さをパーセントで表示し、以下に示す I~IV 段階のカテゴリーに分類する。

平均最大角膜腫脹 (%) #	カテゴリー
0-5	I
6-12	II
13-18 (75分以降)	II
13-18 (75分以内)	III
19-26	III
27-32 (75分以降)	III
27-32 (75分以内)	IV
33以上	IV

: 各観察時の 3 個の平均値の最大値

5-2) 角膜混濁 (Corneal opacity)

暴露前 (0 分)、暴露後 30 分、75 分、120 分、180 分、240 分に、細隙灯顕微鏡にて角膜混濁の程度を評点 0~4 の 4 段階に採点し、以下に示す I~IV 段階のカテゴリーに分類する。

平均最大角膜混濁 #	カテゴリー
0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-4.0	IV

: 各観察時の 3 個の平均値の最大値

5-3) 角膜のフルオレセイン染色性 (Fluorescein retention)

暴露後 30 に、細隙灯顕微鏡にてフルオレセイン染色性を 0~3 の 3 段階に採点し、以下に示す I~IV 段階のカテゴリーに分類する。

平均最大フルオレセイン染色による透過性 (投与後30分)	カテゴリー
0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-3.0	IV

6) 判定:

角膜腫脹の変化、また、角膜混濁スコアおよび角膜のフルオレセイン染色性スコアからカテゴリー化を行い、3 種の測定項目の結果を総合して腐食性・強刺激性を判定する。

すなわち、カテゴリーIV が 2 項目以上の場合、腐食性・強刺激性と判定される。

また、角膜混濁の採点が、暴露後 30 分の観察で 3 以上 (2 眼球) あるいはいずれの観察時期でも 4 (2 眼球) の場合、そしてフルオレセイン染色性が重度の角膜上皮欠損 (1 眼球) となった場合、腐食性・強刺激性と判定される。

ICE 法のプロトコールの詳細は、BRD に提示されている。1993 から 2005 年までに実施された ICE 法に関する 5 つのバリデーション試験では、統一プロトコールを用いていないが、これらプロトコールの主な違いは使用眼球数が異なることであり、類似したプロトコールが用いられている。これらのプロトコールでは眼刺激性試験を評価するにあたっての必要な項目を網羅している。

改良点、検討事項として以下の点が考えられる。

1) ニワトリ眼球の運搬条件

鶏頭部の運搬中の保存温度は室温とされているが、適切な温度範囲は指定されていない。氷上保存では角膜に白濁の恐れがあるので、冷蔵条件下 (目安として摂氏 4~10 度程度) での運搬が好ましいと思われる。

2) 被験物質の希釈溶媒

被験物質の希釈が必要な場合、浸透圧などの細胞への影響を考慮すると、希釈溶媒は蒸留水ではなく、生理用食塩水が適切であると考えられる。

3) 陽性 (腐食性・強刺激性) 対照物質

Draize 法の結果と一致し、かつ、再現性の高い適切な陽性対照物質の選定が必要である。

3 バリデーション試験に用いられた物質の分類と妥当性

5 つのバリデーション試験において、合計 175 の化学物質または製品が評価された。これらのうち、90 物質は単一の化学物質であり、85 物質は市販品あるいは製剤などの混合物であった。化学物質区分でまとめると、アルコール類、酸、アルカリ、ハロゲン化アシル類、アミド/アミジン類、カルボン酸類、エステル類、複素環化合物、炭化水素、無機塩、ケトン類、オニウム化合物と有機リン酸化合物などであった。製品別に分類すると、洗剤、農薬、粉末シリコン、インク、染料、溶媒、界面活性剤、トイレ用クリーナー、感熱紙用コーティング剤などであった。

被験物質の化学物質区分および供試数：

アセテート類 1、無機塩化物 1、酸 5、無機塩 3、ハロゲン化アシル 1、無機銀/窒素化合物 1、アルコール類 15、ケトン類 4、アルデヒド類 2、ラクトン 1、アルカリ 3、脂質 1、アミド/アミジン類 7、ニトリル 1、アミノ酸 1、ニトロ化合物 1、ホウ素化

合物 1、炭水化物 2、オニウム化合物 8、カルボン酸類 12、有機シリコン化合物 2、エステル類 10、有機硫黄化合物 3、エーテル 1、有機金属化合物 2、複素環類 9、有機リン 1、炭化水素 5、多環式化合物 4、イミド類 2、ポリエーテル類 3、無機化合物 1、尿素化合物 1、無分類 85。

被験物質の製品分類および供試数：

接着剤 2、肥料 1、抗真菌薬 2、食品添加物 1、抗ヒスタミン剤 1、殺菌剤 1、抗感染薬 3、消毒剤 2、腐食性剤 4、光学的分割剤 1、塩素化副産物 1、塗料 4、クリーナー 8、殺虫剤/除草剤 15、共重合体 3、保存剤 6、化粧品用成分 1、医薬品 5、洗剤 8、原料 9、現像液 1、試薬 4、殺菌剤 5、樹脂 2、染料 10、シリコン樹脂 1、エラストマー類 2、石けん 9、酵素阻害物質 1、界面活性剤 25、酵素溶液 3、溶媒 37、工業用化学物質・中間体・製剤 20、無分類 23。

これらのバリデーション試験に用いられた被験物質の数と種類(物質区分、製品区分、液体・固体区分、刺激性の程度など)は、十分であると判断される。

4 試験法の正確性を評価するために用いられた化学物質の *in vivo* および参照データ

現在入手できる化学物質のヒトに対する眼刺激性のデータは十分とはいいがたい。試験データとしてあるものは、そのほとんどが弱刺激性物質である。事故により強刺激性物質に暴露された報告はあるが、詳細については不明である。したがって、現段階においてヒトに対する眼刺激性のデータは、参照データとしては適切ではないと考えられる。

今回のバリデーション試験では、ウサギを用いた眼刺激性試験(Draize法)のデータが参照として用いられた。Draize法は、OECDテストガイドラインが作成されており(OECD TG 405)、我が国でも使用されている方法である。Draize法では、ウサギの眼粘膜に化学物質を暴露させ、細隙灯顕微鏡などを用いて暴露後少なくとも72時間まで肉眼的に観察し、角膜、虹彩および結膜の刺激性程度を採点する。角膜混濁の採点に重みづけをしており、観察時間ごとにMaximum Average Score (MAS) や Modified Maximum Average Score (MMAS) を算出し、眼刺激性程度を評価する。

Draize法のデータについては、既存の試験結果、またはICE試験と並行して実施された結果が用いられている。その多くはGLPに準拠した試験であったため、GHS、EPA、EUのいずれかの分類基準による評価が可能なデータをバリデーションに用いた。この中でGHSの分類基準は、我が国において化学物質の眼刺激性・腐食性の評価・分類基準として採用されているため、分類基準において強度の刺激性に相当する区分1については以下に示す。

Draize 法については、ヒトと比較した場合の正確性や試験法の信頼性について検討されている。弱刺激性から中刺激性の物質に対しては、ヒトと同様の反応が確認されており (McDonald et al. 1987)、強刺激性物質については、チオグリコール酸で同様な反応が報告されている (Grant 1974, Butscher 1953)。一方、ヒトとウサギでは異なる反応を示したケースも報告されている (McDonald et al. 1987)。しかしながら、現在、Draize 法により、化学物質がヒトの眼に対して重篤な損傷を与える可能性について十分予知できており、腐食性・強刺激性を判定することを目的とした ICE 法の評価において、Draize 法を参照データとして用いることに問題はないと判断できる。

GHS の分類基準 (眼に対する刺激性区分)

区分 1 (眼に対する非可逆的影響) :

少なくとも 1 匹の動物で角膜、虹彩または結膜に対して、可逆的であると予測されない作用が認められる、または通常 21 日間の観察期間中に完全には回復しない作用が認められる、または試験動物 3 匹中少なくとも 2 匹で、試験物質滴下後 24、48 および 72 時間における評価の平均スコア計算値が角膜混濁 ≥ 3 または虹彩炎 > 1.5 で陽性反応が得られる。

5 試験法のデータと結果の利用性

以下の 5 つのバリデーション試験から角膜の厚み・腫脹、角膜混濁およびフルオレセイン染色性のデータを得ている。

Prinsen and Koeter. (1993)	21 物質供試
Balls et al. (1995)	59 物質供試
Prinsen. (1996)	44 物質供試
Prinsen. (2000)	4 物質供試
Prinsen. (2005)	50 物質供試

全てのバリデーション試験は GLP に準拠して行われたことが確認されており、また、被験物質のコード化 (Coded substances) が Balls et al. (1995) および Prinsen. (2005) のバリデーション試験で実施されている。

6 試験法の正確性

正確性の評価は、GHS (UN 2003)、EPA (EPA 1996) および EU (EU 2001) 各法規制の分類基準ごとに行われている。Draize 法のデータと比較した場合、ICE 法は眼に対する腐食性・強刺激性の判定において、表 1 に示したような結果を得た。

表1 腐食性・強刺激性物質の予見に関するICE法の精度結果

(ウサギを用いた試験データを基にGHS、EPA、EUの各基準で分類した場合との比較)

	一致度		感度		特異度		偽陽性率		偽陰性率	
	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
GHS分類	83	120/144	50	15/30	92	105/114	8	9/114	50	15/30
EPA分類	84	122/145	52	15/29	92	107/116	8	9/116	48	14/29
EU分類	87	134/154	59	19/32	94	115/122	6	7/122	41	13/32

(個々のバリデーション試験の結果を、化学物質ごとでまとめ、最も多く分類された刺激カテゴリー、あるいは最も重度の刺激カテゴリーを判定結果として選択し、各法規制の分類基準と比較した。)

- 一致度：正確な結果（陽性・陰性）の比率
- 感度：全陽性物質中の陽性結果の比率
- 特異度：全陰性物質中の陰性結果の比率
- 偽陽性率：全陰性物質中の陽性結果（偽陽性）の比率
- 偽陰性率：全陽性物質中の陰性結果（偽陰性）の比率

また、化学物質、物質の特性（形状）、製品の区分（5例以上の被験物質がある区分のみ）ごとにみると、全般的に一致度は高く、偽陽性率は低いが、分類により偽陽性率および偽陰性率の高い区分（アルコール類）と偽陰性率の高い区分（固体、界面活性剤、農薬）が確認された。その他、液体やカルボン酸類でも比較的高い偽陰性率が示された。GHSの分類基準と比較した被験物質の分類区分ごとの一致度、偽陽性率および偽陰性率を表2にまとめた。

そこで、偽陽性率および偽陰性率の高いアルコール類、偽陰性率の高い固体物質と界面活性剤を除いた場合のICE法の評価結果は、以下に示すとおり、一致度が上がり偽陽性率と偽陰性率はさらに低下した。

- 一致度：92% (69/75)
- 偽陽性率：6% (4/68)
- 偽陰性率：29% (2/7) (GHS分類基準における結果)

以上の結果から、ICE法においてアルコール類・固体・界面活性剤を除いた場合、眼に対する腐食性・強刺激性の検出精度は十分であると判断できる。

表2 被験物質分類ごとの GHS 分類基準と比較した場合の一致度・偽陽性率・偽陰性率

	一致度	偽陽性率	偽陰性率
全体	83% (120/144)	8% (9/114)	50% (15/30)
化学物質区分 ^{注1)}			
アルコール類	50% (6/12)	50% (5/10)	50% (1/ 2)
アミド・アミジン類	80% (4/ 5)	0% (0/ 2)	33% (1/ 3)
カルボン酸類	70% (7/10)	0% (0/ 3)	43% (3/ 7)
エステル類	89% (8/ 9)	13% (1/ 8)	0% (0/ 1)
複素環類	78% (7/ 9)	0% (0/ 3)	33% (2/ 6)
オニウム化合物	75% (6/ 8)	0% (0/ 2)	33% (2/ 6)
物質の特性 (形状)			
液体	84% (91/108)	10% (9/90)	44% (8/18)
固体	81% (29/36)	0% (0/24)	58% (7/12)
製品区分 ^{注2)}			
界面活性剤	76% (16/21)	0% (0/12)	56% (5/ 9)
農薬	73% (8/11)	0% (0/ 6)	60% (3/ 5)

注1) 5例以上の被験物質がある化学物質区分のみのデータを抽出した

注2) 主な製品のみ

7 試験法の信頼性

施設内変動 (Intralaboratory repeatability, Intralaboratory reproducibility) :

施設内変動では、4物質 (界面活性剤2物質、Siloxane2物質) について、同一施設内で4~5回試験を繰り返し、角膜の厚さ、角膜の腫脹、角膜混濁および角膜のフルオレセイン染色性の各項目において、施設内の反復性と再現性が検討された (Prinsen, 2000)。供試物質は、EU分類で非刺激性1物質、刺激性 (R36) 2物質および強度刺激性 (R41) 1物質の4物質であった。

反復性解析において実験内で比較した場合、角膜の厚さの CV 値は 0.9~6.1%の範囲であった。角膜混濁の CV 値は 0~86.6% (最高値は非刺激性物質データ)、その他の角膜の腫脹およびフルオレセイン染色性においても非刺激性物質データの変動が大きかったが、非刺激性物質を除いた場合の CV 値はいずれにおいても低下した (表3)。

表3 ICE法の施設内変動 (反復性: Intralaboratory repeatability)

被験物質	4物質での CV 値	3物質での CV 値 (非刺激物質を除く)
角膜の厚さ	0.9 ~ 6.1	1.5 ~ 6.1
角膜の腫脹	- 86.6 ~ 346.4	9.5 ~ 49.5
角膜の混濁	0 ~ 86.6	0 ~ 43.3
角膜の染色性	0 または 86.6	0

実験間での再現性について比較した場合、角膜の厚さの CV 値は 1.8~6.3%の範囲であった。角膜混濁の CV 値は 8.7~95.8%（最高値は非刺激性物質データ）の範囲であり、その他の角膜の腫脹およびフルオレセイン染色性においても非刺激性物質データの変動が大きく、非刺激性物質を除いた場合の CV 値はいずれにおいても低下した(表4)。

表4 ICE法の施設内変動(再現性: Intralaboratory reproducibility)

被験物質	4物質での CV 値	3物質での CV 値 (非刺激性物質を除く)
角膜の厚さ	1.8 ~ 6.3	4.0 ~ 6.3
角膜の腫脹	15.2 ~ 138.7	15.2 ~ 22.4
角膜の混濁	8.7 ~ 95.8	8.7 ~ 18.1
角膜の染色性	0 または 141.4	0

施設間変動 (Interlaboratory reproducibility) :

59の被験物質について、4施設による施設間バリデーション試験を実施した(Balls et al., 1995)。Draize法にて陽性と判定された物質は22物質であり、そのうち11物質はICE法で陽性と判断され、4施設で一致した陽性物質は7物質(64%)、3施設以上で一致した物質は10物質(91%)となった。同様に、偽陰性において4施設で一致した偽陰性物質は11物質中9物質(82%)、3施設以上で一致した偽陰性物質は11物質中11物質(100%)であった。次に、Draize法にて陰性と判定された物質において、4施設で一致した陰性物質は26物質中22物質(85%)であり、3施設以上で一致した陰性物質は26物質(100%)であった。

表5 ICE法の施設間検証

(GHS分類を用いた眼に対する腐食性・強刺激性あるいは非刺激性の *in vivo* データの比較)

眼刺激性分類 (<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>)	被験物質数	試験施設数	4施設で一致した物質数 (%)	3施設以上で一致した物質数 (%)
+ / +	11	4	7 (64%)	10 (91%)
+ / -	11	4	9 (82%)	11 (100%)
- / +	6	4	1 (17%)	1 (17%)
- / -	26	4	22 (85%)	26 (100%)
n. d. / +	3	4	3 (100%)	(-)
n. d. / -	2	4	2 (100%)	(-)
総数	59	4	44 (75%)	53 (90%)

(n. d. : データ無し)

ICE試験データのみを用いて陽性(腐食性・強刺激性)および陰性(腐食性・強刺激性以外)判定の施設間における一致度の比較を行った(表6)。75~76%の被験物質が、

4施設間で一致した。また、88%の被験物質が、4施設中3施設以上で一致した。一致度が低いものは、アルコール、エステルおよびケトン類であった。

表6 腐食性・強刺激性物質の予見に関するICE法の施設間一致度のばらつき
(GHS、EPA、EU分類を用いた眼に対する腐食性・強刺激性判定の一致度比較)

	試験施設数	4施設で一致 (一致度;100%)		3施設で一致 (一致度:75%)		2施設で一致 (一致度:50%)	
		n	%	n	%	n	%
GHS分類	4	44	75	8	14	7	12
EU分類	4	44	75	8	14	7	12
EPA分類	4	45	76	7	12	7	12

(被験物質総数;59、 n;該当する被験物質数)

以上の結果から、施設内変動では角膜腫脹の指標(角膜の厚さ)がいずれの物質でもCV値が低く、再現性が認められた。その他の指標では非刺激性物質データに変動が大きかった。非刺激性物質のデータを除いた場合のCV値は低下したが、わずか4被験物質で実施された施設内変動についての検討は不十分であった。

施設間変動では、4施設中3施設以上で陽性、偽陰性、陰性の再現性が確認され、Draize法との比較で91%、ICE法のみでの比較でも88%を示し、良好な結果が得られていると判断された。

8 試験法のデータの質

バリデーション試験に用いられた以下の報告について、ICE法とDraize法の試験のGLP準拠を示す。

- Prinsen and Koeter. (1993)

ICE法はGLP準拠、Draize法はGLP準拠の宣誓は無い。被験物質はコード化されていない。

- Balls et al. (1995)

ICE法はGLP準拠、Draize法はGLP準拠でOECDの試験ガイドラインTG405に従い実施された。被験物質はコード化された。

- Prinsen. (1996)

ICE法およびDraize法ともGLP準拠で実施された。被験物質はコード化されていない。

- Prinsen. (2000)

ICE法およびDraize法ともGLP準拠で実施された。被験物質はコード化されていない。

い。

- Prinsen. (2005)

ICE 法および Draize 法とも GLP 準拠で実施された。被験物質はコード化された。

9 試験法の科学的な報告

バリデーション試験に用いられた 5 試験以外にも ICE 法による報告がされているが、被験物質情報の無記載、数字データの無記載、個体データの欠如など、バリデーション試験としては不適当な報告も見られた。

以下の 3 試験では *in vitro* の ICE 法と *in vivo* の Draize 法との関連性を検討し、ピアソンの相関解析法にて相関係数 (r) が評価されている。

- Balls et al. (1995)

ICE 法の Index Score において、全被験物質で相関係数は 0.490~0.599 であり、特に界面活性剤では相関性は 0.724~0.833 と良好であった。

- Chamberlain et al. (1997)

角膜、虹彩、結膜などの採点における相関係数は 0.89~0.97 であった。

- Prinsen. (1996)

角膜、虹彩、結膜などの採点で相関係数は 0.86~0.92 であった。

Procter and Gamble (P&G) 社より、28 物質について TNO Nutrition and Food Institute で実施された資料が提供され、*in vitro* の ICE 法と *in vivo* LVET (Low Volume Eye Irritation Test: 少容量法) の Draize 法において、EU 分類での評価が検討された。5% SLS (ラウリル硫酸ナトリウム) ではいずれも非刺激性、10% 塩化ベンザルコニウムではいずれも R41 (強刺激性) と判定され、その他の物質 (界面活性剤、洗剤など) では 10 物質で ICE 法と Draize 法のデータが一致、5 物質で不一致であった。

10 3Rs への関与 (動物福祉面としての妥当性)

ICE 法で使用されている眼球試料は、試験目的ではなく食用として屠殺されたニワトリの眼球を用いているため、試験目的だけの実験動物の使用を抑えることができる (reduction)。また、従来の Draize 法と比較して、試験操作による動物への苦痛は無い (refinement)。加えて、ICE 法で陽性と判断された場合には追加の動物試験を行う必要がなくなることから、化学物質の眼刺激性評価全体において不必要な動物試験を回避できる (reduction) など、眼刺激試験のためにウサギを用いる従来の Draize 法と比較して動物福祉面からも評価できる。この意味では、動物が受ける苦痛の除去 (refinement)、使用動物数の削減 (reduction) および不必要な動物試験の回避 (reduction) が達成できる。

1 1 試験法の有用性と限界

ICE法の評価項目において、Corneal Swelling（角膜の腫脹）については光学的厚度計を用いた客観的な指標であることから、Draize法と比較しても、試験実施施設間での誤差を軽減することができると考えられる。眼刺激性強度カテゴリーの境界線上の判断が要求される際には、Morphological effects（組織学的変化）を参考にすることも可能である。

試験法の移転性については、機器の特殊性、汎用性および試験技術の修得から、現時点では日本国内での日常的な実施は困難である。ただし、国外にはICE法による眼刺激性試験を実施する受託機関（1施設）があり、日本の科学者や企業からの委託が可能である。

ICE法の限界として、アルコール類に対する偽陽性率と偽陰性率が高いこと、また固体、界面活性剤および農薬に対する偽陰性率も高いことから、これらの物質を評価する際には注意が必要である。

費用面では、従来のDraize法と大きな違いはない。しかし、病理組織学的観察を考えた場合は、更なる出費が予想される。

試験期間については観察期間は短縮されるが、病理組織学的観察を行う場合は、従来のDraize法と大きな違いはない。

1 2 結 論

ICCVAMで実施されたICE法の第三者評価はバリデーション試験に必要な項目、プロセス、データが検討されている。ESACの評価と同様、ICCVAMのバリデーション試験の結果を受け入れることに問題はないと判断される。

特定の化学物質（アルコール類、固体、界面活性剤）ではその精度が十分ではない等の試験の限界を考慮に入れた上で、適切なプロトコルに基づき試験を実施すれば、ICE法は、化学物質の眼刺激性の段階的評価の1つとして、腐食性・強刺激性物質をスクリーニングすることが可能であると判断される。

現在、EUではICE法の陽性結果をもって化学物質をR41に区分することを既に受け入れている。また、米国では、FDA・EPAが化学物質の眼刺激性評価において、腐食性・強刺激性物質の判断にICE法の結果を受け入れることを公式に発表している。

わが国においても、GHSに準拠する化学物質に関わる法規制において、ICE法による腐食性・強刺激性物質の眼刺激性を評価することが可能である。

1 3 文献

Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann, H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol In Vitro* 9:871-929.

Butscher, P. (1953). Beitrag zur therapie von augenschadigunen durch thioglykolsaur bei der herstellung der sogenannten kaltwelle. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 122:349-350.

Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem Toxicol* 35:23-37.

ESAC (2007). ESAC statement on the conclusions of the ICCVAM retrospective study on Organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants as determined by US EPA, EU (R41) and UN GHS classifications in a tiered testing strategy, as part of a weight of evidence approach.

EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U. S. Environmental Protection Agency.

EU (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 adapting to technical progress for the 28th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. Official Journal of the European Communities L255:1-333.

Grant, W.M. (1974). Toxicology of the eye. 2nd ed. Springfield, IL: Charles C. Thomas.

ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No. : 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program.

McDonald, T.O., Seabaugh, V., Shadduck, J.A. and Edelhauser, H.F. (1987). Eye

irritation. In *Dermatotoxicology* (Marzulli, F.N. and Maibach H. I., eds). Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 641-696.

Nakano, M. (1958). Effect of various antifungal preparations on the conjunctiva and cornea of rabbits. *Yakuzaigaku* 18:94-99.

Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem Toxicol* 34:291-296.

Prinsen, M.K. (2000). Chicken enucleated eye test with reference surfactants and siloxane polymers in Phase II of the reference standard validation project; an ex vivo alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. TNO Report V99.521b. Unpublished report provided directly to NICEATM by M Prinsen, TNO Nutrition and Food Research Institute.

Prinsen, M.K. (2005). *In vitro* and *in vivo* data for 94 substances tested in the isolated chicken eye test. Unpublished data provided directly to NICEATM by MK Prinsen, TNO Nutrition and Food Research Institute.

Prinsen, M.K. and Koeter, B.W.M. (1993). Justification of 419 the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Food Chem Toxicol* 31:69-76.

UN (2003). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). New York & Geneva: United Nations Publications.

附表 1
定義 (Definitions)

Accuracy: (a) The closeness of agreement between a test method result and an accepted reference value. (b) The proportion of correct outcomes (positive and negative) of a test method. It is a measure of test method performance and one aspect of relevance. The term is often used interchangeably with concordance (see also two-by-two table). Accuracy is highly dependent on the prevalence of positives in the population being examined.

Coded substances: Substances labeled by code rather than name so that they can be tested and evaluated without knowledge of their identity or anticipation of test results. Coded substances are used to avoid intentional or unintentional bias when evaluating laboratory or test method performance.

Coefficient of variation (CV): A statistical representation of the precision of a test. It is expressed as a percentage and is calculated as follows:

$$\left(\frac{\textit{standard deviation}}{\textit{mean}} \right) \times 100\%$$

Corneal Opacity: A subjective measurement of the extent of opaqueness of the cornea following exposure to a test substance. Increased corneal opacity is indicative of damage to the cornea.

Corneal Swelling: An objective measurement in the ICE test of the extent of distention of the cornea following exposure to a test substance. It is expressed as a percentage and is calculated from corneal thickness measurements that are recorded at regular intervals during the ICE test. Increased corneal swelling is indicative of damage to the corneal epithelium.

False negative rate: The proportion of all positive substances falsely identified by a test method as negative (see two-by-two table). It is one indicator of test method accuracy.

False positive rate: The proportion of all negative substances that are falsely identified by a test method as positive. It is one indicator of test method accuracy.

Fluorescein retention: A subjective measurement in the ICE test of the extent of fluorescein sodium that is retained by epithelial cells in the cornea following exposure to a test substance. Increased fluorescein retention is indicative of damage to the corneal epithelium.

Globally Harmonized System (GHS) : A classification system presented by the United Nations that provides (a) a harmonized criteria for classifying substances and mixtures according to their health, environmental and physical hazards, and (b) harmonized hazard communication elements, including requirements for labeling and safety data sheets.

Good Laboratory Practices (GLP) : Regulations promulgated by the U. S. Food and Drug Administration and the U. S. Environmental Protection Agency, and principles and procedures adopted by the Organization for Economic Cooperation and Development and Japanese authorities that describe record keeping and quality assurance procedures for laboratory records that will be the basis for data submissions to national regulatory agencies.

Interlaboratory reproducibility: A measure of whether different qualified laboratories using the same protocol and test substances can produce qualitatively and quantitatively similar results. Interlaboratory reproducibility is determined during the prevalidation and validation processes and indicates the extent to which a test method can be transferred successfully among laboratories.

Intralaboratory repeatability: The closeness of agreement between test results obtained within a single laboratory, when the procedure is performed on the same substance under identical conditions within a given time period.

Intralaboratory reproducibility: The first stage of validation; a determination of whether qualified people within the same laboratory can successfully replicate results using a specific test protocol at different times.

Negative control: An untreated sample containing all components of a test system, except the test substance solvent, which is replaced with a known non-reactive material, such as water. This sample is processed with test substance-treated samples and other control samples to determine whether the solvent interacts with

the test system.

Negative predictivity: The proportion of correct negative responses among substances testing negative by a test method (see two-by-two table). It is one indicator of test method accuracy. Negative predictivity is a function of the sensitivity of the test method and the prevalence of negatives among the substances tested.

Positive control: A sample containing all components of a test system and treated with a substance known to induce a positive response, which is processed with the test substance treated and other control samples to demonstrate the sensitivity of each experiment and to allow for an assessment of variability in the conduct of the assay over time.

Positive predictivity: The proportion of correct positive responses among substances testing positive by a test method (see two-by-two table). It is one indicator of test method accuracy. Positive predictivity is a function of the sensitivity of the test method and the prevalence of positives among the substances tested.

Sensitivity: The proportion of all positive substances that are classified correctly as positive in a test method. It is a measure of test method accuracy (see two-by-two table).

Specificity: The proportion of all negative substances that are classified correctly as negative in a test method. It is a measure of test method accuracy

Tiered testing: A stepwise testing strategy where all existing information on a test substance is reviewed, in a specified order, using a weight of evidence process at each tier to determine if sufficient information is available for a hazard classification decision, prior to progression to the next tier. If the irritancy potential of a test substance can be assigned based on the existing information, no additional testing is required. If the irritancy potential of a test substance cannot be assigned based on the existing information, a step-wise sequential animal testing procedure is performed until an unequivocal classification can be made.