

# 眼刺激性試験代替法評価報告書

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)

平成26年9月12日

JaCVAM 眼刺激性試験資料編纂委員会

JaCVAM 眼刺激性試験資料編纂委員会

委員長	小坂 忠司 (残留農薬研究所)
委員	簾内 桃子 (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)
	増田 光輝
	加藤 雅一 (株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング)
	細井 一弘 (参天製薬株式会社)
	山本 直樹 (藤田保健衛生大学)
	吉村 功 (東京理科大学名誉教授)

## 略語

BCOP:	Bovine Corneal Opacity and Permeability
BRD:	Background Review Document
CM:	Cytosensor Microphysiometer
CV:	Coefficient of Variation
EURL ECVAM:	European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing
GHS:	Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals
ICCVAM:	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
ICE:	Isolated Chicken Eye Test
JaCVAM:	Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods
NICEATM:	NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods
OECD:	Organization for Economic Co-operation and Development
SSD:	Streamlined Summary Document
TG:	Test Guideline
UN:	United Nations

## 用語

トップダウン方式:	重度の刺激性を正確に識別できる試験法から始める評価方式。本ガイドラインでは、重篤な眼の損傷を引き起こすと疑われる化学物質に適用される段階的な評価方式を指し、まず、重篤な眼の損傷を起こす物質を、それ以外の物質から正確に識別できる試験法で判別することから始める (TG438 ANNEX 1, DEFINITIONS)。
ボトムアップ方式:	非刺激性を正確に識別できる試験法から始める評価方式。本ガイドラインでは、眼刺激性あるいは重篤な眼の傷害性ではないと予測される化学物質に適用される段階的な評価方式を指し、まず、眼刺激性あるいは重篤な眼の傷害性ではない物質を、それ以外の物質から正確に識別できる試験法で判別することから始める (TG438 ANNEX 1, DEFINITIONS)。
区分1物質:	UN (United Nations) GHS (Globally Harmonized Systems of Classification and Labeling of Chemicals) 区分体系下、重篤な眼の傷害を引き起こす物質として区分される化学物質
区分外物質:	UN GHS区分体系下、眼刺激性物質として区分されない化学物質

## 1. 改訂の背景

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 眼刺激性試験法 (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 (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 (NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) / ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) によりなされ、2009 年に OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) テストガイドライン (TG: Test Guideline) 438 (TG 438, 2009) として採択された。

これとは別に NICEATM/ICCVAM は EURL ECVAM (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing) および JaCVAM (Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods) 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が新たに行われた。バリデーションには、初回に使用された ICCVAM データ (2006) がそのまま用いられて解析がなされたが、ICE 法の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 (United Nations) GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals) 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 日付けで改訂 TG 438 (TG 438, 2013) として採択された。

TG 438 (2013) の主な改訂点は、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。本資料編纂委員会は、この TG 438 (2013) の改訂点について検討した。以下にその結果を報告する。

## 2. 試験の概要

ICE 法では、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* での眼刺激性を予測する。

各評価項目の変化としては、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て暴露 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暴露 240 分後まで観察する)、C) フルオレセイン染色性 (細隙灯顕微鏡にて暴露 30 分後の角膜表面のフルオレセイン染色性) を測定することである。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。

## 3. 改訂点

### 3-1. *In vivo* - *in vitro* データベースの見直し

TG 438 (2013) 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をもとにまとめられた SSD (Streamlined Summary Document), Appendix 1 (OECD,

2013) から重複する 3 物質を除外した 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。*In vivo* データについては、生データが欠如している 15 物質を対象から除外し、さらに個々のデータを見直すことにより UN GHS 区分での再判定がなされた。また、*in vitro* データではデータの見直しと新たに設定した UN GHS 区分 (3-2-1 項) に基づく再判定がなされた。以上の再評価において、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) が用いられた。

### 3-2. ボトムアップ方式での UN GHS 区分外物質同定への適用

#### 3-2-1. UN GHS 区分外物質評価の新たな判定基準の設定

TG 438 (2013)では、新たなボトムアップ方式による UN GHS 区分外物質の同定に対応するため、区分外物質評価のための判定基準が新たに設定された。追加された判定基準を表 1 に示す。

表 1. UN GHS 区分外物質評価のための判定基準

UN GHS 区分	3 評価項目の組み合わせ*
区分外	3 項目ともクラス I に分類される 2 項目がクラス I に分類され、1 項目がクラス II に分類される

\* ) 3 評価項目 : 角膜の腫脹、角膜混濁、角膜のフルオレセイン染色性

クラス I : 最も弱い眼刺激性

#### 3-2-2. ボトムアップ方式での正確性

上記のように評価した新たなデータベースを用い、ボトムアップ方式における区分外物質を同定する場合の正確性について評価された。結果を表 2 に示す。

区分外物質の同定において、*Draize* 法の結果と比較すると、*ICE* 法の正確度は 82% (125/152)、感度 99% (72/73)、特異度は 67% (53/79)、偽陰性率は 1% (1/73) および偽陽性率は 33% (26/79) を示した。偽陰性率は低く、偽陰性を示した物質は防汚有機溶媒含有塗料 3 物質中 1 物質 (TNO-94) のみであった。一方、偽陽性率は高いが、ボトムアップ方式では陽性結果が得られた場合、他の適切な試験法による確認が必要とされている。

表 2. ボトムアップ方式における *ICE* 法の正確性—UN GHS 区分法での区分外物質の同定<sup>1</sup>

ボトムアップ方式	No.	一致度		感度		偽陰性率		特異度		偽陽性率	
		%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.
被験物質	152	82	125/152	99	72/73	1	1/73	67	53/79	33	26/79
防汚有機溶媒含有塗料を除外した場合	149	83	123/149	100	71/71	0	0/71	67	52/78	33	26/78

No. = 被験物質数

<sup>1</sup>UN GHS 区分: (区分外物質) 対 (区分外物質以外)

### 3-2-3. ボトムアップ方式における施設内・施設間再現性

第三者評価報告書（第三者評価報告書 2012、ICCVAM BRD : Background Review Document 2006）で報告されているとおり、ICE 法の角膜腫脹を指標とした場合の施設内 CV 値は 1.8%～6.3%であった。

被験物質のうち、ボトムアップ方式およびトップダウン方式とも、全ての施設において UN GHS 区分が一致した被験物質は 75%を占めた。また、UN GHS 区分との一致を指標とした場合、主導施設と他の参加施設との間の相関係数は 0.829～0.849 であった。

### 3-3. トップダウン方式での UN GHS 区分 1 物質同定への適用

#### 3-3-1. トップダウン方式での正確性

トップダウン方式における区分 1 物質を同定する場合の正確性について、新たなデータベースを用いて評価された。結果を表 3 に示す。

区分 1 物質の同定において Draize 法の結果と比較すると一致度は 86%（120/140）、偽陰性率は 48%（13/27）、偽陽性率は 6%（7/113）であった。アルコール、固体および界面活性剤を除外した場合、一致度は上がり偽陰性率と偽陽性率は低下した。

表 3. トップダウン方式における ICE 法の正確性－UN GHS 区分 1 物質の同定<sup>1</sup>

トップダウン方式	No.	一致度		感度		偽陰性率		特異度		偽陽性率	
		%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.
被験物質	140	86	120/140	52	14/27	48	13/27	94	106/113	6	7/113
アルコール、固体および界面活性剤を除外した場合	82	94	77/82	71	5/7	29	2/7	96	72/75	4	3/75

No. = 被験物質数

<sup>1</sup>UN GHS 区分: (区分 1 物質) 対 (区分 1 物質以外)

#### 3-3-2. トップダウン方式における施設内・施設間再現性

第三者評価報告書（第三者評価報告書 2012、ICCVAM BRD 2006）で報告されているとおり、トップダウン方式における施設内・施設間再現性はボトムアップ方式と同様な結果が得られている。

### 3-4. 適用限界

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）が偽陰性であり、用途の類似した化合物（TNO-93）には認められなかった。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とされた。

- 単一物質、混合物質、液体、固体等における偽陰性率は5%以下と低く、偽陽性率については33%と他の試験法（BCOP: Bovine Corneal Opacity and Permeability ; 69%、CM : Cytosensor Microphysiometer ; 68%）に比べ低いことが示された。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は陽性と判断された場合、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とされた。

トップダウン方式：

- 偽陰性率は固体物質（n=34, 55%=6/11）および界面活性剤（n=21, 67%=6/9）において高く、偽陽性率はアルコール類（n=12, 0%=4/10）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とされた。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とされた。

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。

### 3-5. その他

- 習熟度確認物質の追加：  
TG 438（2009）では、ICE法の習熟度チェック用物質として10物質が推奨された。しかし、10推奨物質の中に、区分外物質が含まれていなかったことから、本改訂版では、3種類の区分外物質が追加され、以下のような習熟度確認物質としてまとめられた（表4）。
- 眼球の運搬温度（外界温度）として“18°Cから25°C”の温度範囲が示された。
- 被験物質暴露後の眼球洗浄において、“追加の洗浄”が認められた。
- 報告書への記載項目が追加された。
- 語句の定義について追加・訂正がなされた。
- ICE法判定に関する用語として、カテゴリーがクラスという用語に置き換わった。

表 4. ICE 法の習熟度確認物質

化学物質	CAS番号	分類	物理的 状態	<i>In vivo</i> での 区分	ICEでの区分
塩化ベンザルコニウム (5%) Benzalkonium chloride (5%)	8001-54-5	オニウム 化合物類 Onium compound	液体 Liquid	区分1 Category 1	区分1 Category 1
クロルヘキシジン Chlorhexidine	55-56-1	アミン類 アミジン類 Amine, Amidine	固体 Solid	区分1 Category 1	区分1 Category 1
ジベンゾイル-L-酒石酸 Dibenzoyl-L- tartaric acid	2743-38-6	カルボン酸類 エステル類 Carboxylic acid, Ester	固体 Solid	区分1 Category 1	区分1 Category 1
イミダゾール Imidazole	288-32-4	ヘテロ サイクリック 化合物類 Heterocyclic	固体 Solid	区分1 Category 1	区分1 Category 1
トリクロロ酢酸 (30%) Trichloroacetic acid (30%)	76-03-9	カルボン酸類 Carboxylic acid	液体 Liquid	区分1 Category 1	区分1 Category 1
2,6-ジクロロベンゾイル クロリド Dichlorobenzoyl chloride	4659-45-4	アシル ハライド類 Acyl halide	液体 Liquid	区分2A Category 2A	区分不可
硝酸アンモニウム Ammonium nitrate	6484-52-2	無機塩 Inorganic salt	固体 Solid	区分2B Category 2B	区分不可
エチル-2-メチルアセト酢酸 Ethyl-2-methylacetoacetate	609-14-3	ケトン類 エステル類 Ketone, Ester	液体 Liquid	区分2B Category 2B	区分不可
ジメチルスルホキシド Dimethyl sulfoxide	67-68-5	有機硫黄 化合物 Organic sulphur compound	液体 Liquid	区分外 Not Classified	区分外 Not Classified
グリセロール Glycerol	56-81-5	アルコール類 Alcohol	液体 Liquid	区分外 Not Classified	区分外 Not Classified
メチルシクロペンタン Methylcyclopentane	96-37-7	炭化水素 (環状) Hydrocarbon (cyclo)	液体 Liquid	区分外 Not Classified	区分外 Not Classified
n-ヘキサン n-Hexane	110-54-3	炭化水素 (鎖状) Hydrocarbon (acylic)	液体 Liquid	区分外 Not Classified	区分外 Not Classified
トリアセチン Triacetin	102-76-1	脂質 Lipid	液体 Liquid	区分外 Not Classified	区分外 Not Classified



#### 4. 結論

TG 438 (2013) では、その正確性と再現性の結果から、UN GHS の眼刺激性区分においてトップダウン方式における区分 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に ICE 法を適用することは可能であり、どちらの方式においても適用物質に制限を設ける必要はないとされている。

眼刺激性資料編纂委員会としても、トップダウン方式における UN GHS 区分 1 物質ならびにボトムアップ方式における UN GHS 区分外物質の同定に、Draize 法の代替試験法として TG 438 (2013) を適用することは可能であると考えた。

#### 参考文献

- 1) OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, 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, TG438 (Adopted 26 July 2013)
- 2) OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Isolated Chicken Eye Test for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, TG438 (Adopted 7 September 2009)
- 3) 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)
- 4) 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).
- 5) 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).
- 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)