

評価会議報告書

2018年改定 OECD TG 438 ニワトリ眼球を用いた眼刺激性試験 (ICE法 : Isolated Chicken Eye Test)

JaCVAM 評価会議

令和元年（2019年）9月30日

JaCVAM 評価会議

大野 泰雄	(公益財団法人 木原記念横浜生命科学振興財団): 座長
五十嵐良明	(国立医薬品食品衛生研究所)
石井 雄二	(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)
稲若 邦文	(日本化学工業協会)
井上 智彰	(日本免疫毒性学会)
今井 教安	(日本動物実験代替法学会)
岩瀬裕美子	(日本製薬工業協会)
久保 文宏	(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)*
中村るりこ	(独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
西川 秋佳	(国立医薬品食品衛生研究所 病理部 / 済生会宇都宮病院)
西村 次平	(独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
沼澤 聡	(日本毒性学会)
平林 容子	(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)
廣田 衛彦	(日本化粧品工業連合会)**
増村 健一	(日本環境変異原学会)
横関 博雄	(日本皮膚免疫アレルギー学会)

任期：平成 30 年 4 月 1 日～令和 2 年 3 月 31 日

*：平成 30 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日

**：平成 31 年 4 月 1 日～令和 2 年 3 月 31 日

ニワトリ眼球を用いた眼刺激性試験（ICE法：Isolated Chicken Eye Test）は、ニワトリから摘出した眼球に被験物質を曝露して生じる角膜の変化をもとに *in vivo* の眼刺激性を予測する試験であり、ウサギを用いた Draize 眼刺激性試験法（Draize 法）の代替法である。眼に重篤な損傷を引き起こす化学物質（UN GHS：United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals¹⁾ 区分 1 物質）をトップダウン方式により検出する方法として、2009 年に OECD TG 438 として採択された²⁾。2013 年に採択された改定 TG 438³⁾では、トップダウン方式により UN GHS 区分 1 物質を、ボトムアップ方式により UN GHS 区分に該当しない物質を判定する場合の基準が定められており、JaCVAM 評価会議において妥当性が確認されている⁴⁾。今回、ICE 法の再評価が行われ、2018 年改定 TG 438⁵⁾が採択された。本改定では、ボトムアップ方式による UN GHS 区分に該当しない物質の判定基準が変更され、偽陽性率が改善された。また、トップダウン方式による区分 1 の判定において、これまで偽陰性率の高かった洗浄剤と界面活性剤の評価性能を向上させるため、病理組織学的検査の併用が追加された。JaCVAM 評価会議は、眼刺激性試験資料編纂委員会により作成された「2018 年改定 OECD TG 438 ニワトリ眼球を用いた眼刺激性試験（ICE法：Isolated Chicken Eye Test）」⁶⁾を用いて、本試験法の妥当性について検討した。

1. 試験法の定義

名称：2018 年改定 OECD TG 438 ニワトリ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 眼刺激性試験法

試験法の概略：ICE 法では、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、眼球の角膜に生じる変性を、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、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。本試験では、被験物質群および陽性対照群は 3 眼球以上、媒体対照群および陰性対照群は 1 眼球以上を使用する。角膜の腫脹は、光学的厚度計を装着した細隙灯顕微鏡を用いて角膜の厚さを曝露後 240 分間測定し、経時的な変化率として定量的に求める。角膜の混濁度は、細隙灯顕微鏡にて角膜混濁度の経時的な変化を曝露後 240 分間観察し、結果を評点化する。フルオレセイン染色性は、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観察し、評点化する。得られた結果を項目毎に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。

2018 年改定点：

- 1) UN GHS 区分に該当しない物質のボトムアップ方式における判定基準に「1 項目がクラス I に分類され、2 項目がクラス II に分類される」場合が加わった。この基準の下に、新たな物質を加えて再構築したデータにおいて正確性が再評価された結果、TG 438 (2013) の判定基準と比較して、偽陰性率は低く抑えられたまま、偽陽性率が改善された。

2) トップダウン方式による UN GHS 区分 1 物質の判定に、病理組織学的検査が追加された。2<pH<11.5 の洗浄剤および界面活性剤について、トップダウン方式において偽陰性率が高いことから、標準的な ICE 法で陰性結果が得られた際には、病理組織学的検査を併用して判定することを推奨する。ICE 法に用いた眼球の病理組織標本を作製して、角膜上皮のびらん、空胞化および壊死、角膜間質の核濃縮の程度および線維の乱れ、ならびに角膜内皮の壊死の有無を基準に刺激性を評点化する。評点を区分 1 物質の評価基準に照らし、合致した場合に UN GHS 区分 1 と判定し、合致しない場合には予測不可とする。

3) ICE 法および病理組織学的検査における習熟度確認物質一覧が更新された。

2. 評価に用いた資料および評価内容の科学的妥当性

本試験法は OECD にて TG 438 (2009)、改定 TG 438 (2013) を経て、改定 TG 438 (2018) として採択された。今回、改定 TG 438 (2018) においてボトムアップ方式の判定基準を改定するにあたり、新たな物質を加えて再構築したデータ (184 物質) において再評価が行われた⁵⁾。その結果、Draize 法との比較では、ICE 法の正確度は 88% (161/184)、感度 97% (98/101)、特異度は 76% (63/83)、偽陰性率は 3% (3/101) および偽陽性率は 24% (20/83) を示し、TG 438 (2013) の判定基準と比較して、偽陰性率は低く抑えられたまま、偽陽性率は改善された。また、トップダウン方式において偽陰性率が高かった洗浄剤および界面活性剤について、検出感度を向上させるため、病理組織学的検査の併用について検証が行われた⁷⁸⁾。これらの結果を受けて、2<pH<11.5 の洗浄剤および界面活性剤 29 物質について JaCVAM 眼刺激性試験資料編纂委員会が解析した結果、*in vivo* の判定との比較において、病理組織学的検査を併用することにより、感度が 33% から 71% に向上し、正確度も 52% から 76% に上昇した。評価会議では、評価資料は適切であり、TG 438 改定における評価方法の変更は科学的に妥当であると考えられる。

3. 本試験法の有用性と適用限界

ICE 法は生きた動物を用いないため代替法として有用性がある。2018 年の改定 TG 438 に基づいて正確性が向上したことから、UN GHS の眼刺激性分類においてトップダウン方式における区分 1 物質の同定およびボトムアップ方式における UN GHS 区分に該当しない物質の同定に ICE 法を適用することは可能であると考えられる。なお、ボトムアップ方式で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。また、トップダウン方式においては、2<pH<11.5 の洗浄剤および界面活性剤については、陰性結果が得られた場合、病理組織学的検査を併用することが推奨される。

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、社会的受け入れ性および行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性：

本試験法は、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。今回の改定においては、動物福祉の観点からの変更がないことから、本試験法の社会的受け入れ性は、改定前と変わらない。

行政上の利用性：

本試験法は、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いて UN GHS 区分に該当しない物質（眼刺激物質として分類されない）を識別するという用途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) United nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS), Seventh revised edition, UN New York and Geneva, 2017. Available at: [https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/English/03e_part3.pdf]
- 2) OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Isolated Chicken Eye Test for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, TG 438 (Adopted: 7 September 2009)
- 3) 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, TG 438 (Adopted: 26 July 2013)
- 4) JaCVAM評価会議：眼刺激性試験代替法の評価会議報告書 2013年改訂 OECD TG 438 ニワトリ眼球を用いた眼刺激性試験（ICE 法: Isolated Chicken Eye Test）（2014年10月28日）
- 5) 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, TG 438 (Adopted: 25 June 2018)
- 6) JaCVAM資料編纂委員会：眼刺激性試験代替法評価報告書 2018年改定 OECD TG 438 ニワトリ眼球を用いた眼刺激性試験（ICE 法: Isolated Chicken Eye Test）（2019年9月26日）
- 7) Cazelle E., Eskes C., Hermann M., et al. (2014). Suitability of Histopathology as an Additional Endpoint to the Isolated Chicken Eye Test for classification of non-extreme pH detergent. Toxicology In Vitro 28, 657-666.
- 8) Cazelle E., Eskes C., Hermann M., et al. (2015). Suitability of the Isolated Chicken Eye Test for Classification of Extreme pH Detergents and Cleaning Products. Toxicology In Vitro 29, 609-616.