

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)

眼刺激性試験資料編纂委員会

令和元年（2019年）9月26日

眼刺激性試験資料編纂委員会

山本直樹（藤田医科大学）

小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所）

佐々木正治（アッヴィ合同会社）

竹内小苗（P&Gイノベーション合同会社）

波多野浩太（ホーユー株式会社）

森村智美（一般財団法人食品薬品安全センター）

要旨

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、OECD TG 438 として試験法が標準化されている。2013年に採択された改定 TG 438（2013）には、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、既に JaCVAM 評価会議において妥当性が確認されている。本報告では、2018年6月に採択された改定 TG 438（2018）について改正点の概要を説明し、バリデーション研究報告書、第三者評価報告書および関連論文などをもとに、JaCVAM 眼刺激性試験資料編纂委員会としての意見をまとめた。

改定 TG 438（2018）では、ボトムアップ方式による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 UN GHS 区分 1 の判定において、これまで偽陰性率の高かった界面活性剤の評価を向上させるため、病理組織学的検査の併用が検証された。この併用により、 $2 < \text{pH} < 11.5$ の洗浄剤および界面活性剤（29物質）の感度は33%から71%に向上し、偽陰性率は67%から29%に抑制された。また、12の界面活性剤を用いた3施設間の再現性は83%であった。

以上より、本委員会は、ボトムアップ方式による判定基準の変更は妥当であり、また、 $2 < \text{pH} < 11.5$ の洗浄剤および界面活性剤については、トップダウン方式により UN GHS 区分 1 を検出する際、病理組織学的検査を補助的に用いることができると結論した。

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

JaCVAM: Japanese Center 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

1. 改定の背景

ICE 法は、ウサギを用いた Draize 眼刺激性試験法 (Draize 法) の代替法であり、トップダウン方式により眼に重篤な損傷を引き起こす化学物質 (UN GHS¹⁾ 区分 1 物質) を検出する方法として、2009 年に OECD で TG 438 (2009) として採択された。その後、眼刺激性に関する UN GHS 分類 について、*in vivo* と *in vitro*、双方のデータベースが再評価され、トップダウン方式における区分 1 物質の検出のみならず、ボトムアップ方式で UN GHS 区分 1 物質及び眼刺激性を引き起こす化学物質 (UN GHS¹⁾ 区分 2 物質) のいずれの区分にも該当しない物質も検出することが可能であると判断され、2013 年に改定 TG 438 (2013) として採択された。

今回、ICE 法の再評価が行われ、改定 TG 438 (2018)²⁾ が採択された。主な改正点は、ボトムアップ方式による区分に該当しない物質検出のための判定基準の変更と、トップダウン方式による UN GHS 区分 1 を識別するエンドポイントとして $2 < \text{pH} < 11.5$ の洗浄剤および界面活性剤についての病理組織学的検査の併用である。本資料編纂委員会は、この TG 438 (2018) の改定点について検討した。以下にその結果を報告する。

2. 標準的な ICE 法の概要

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。

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被験物質曝露後 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。

3. 改定点

3-1. ボトムアップ方式による UN GHS 区分に該当しない物質判定基準の変更

TG 438 (2013) に制定された 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 (表 1)。

表 1. 被験物質を UN GHS 区分に該当しないと評価するための判定基準²⁾

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
	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

区分外：UN GHS による眼に対する重篤な損傷性および眼刺激性のいずれの区分にも該当しない。「用語」参照。

上記の基準の下に、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。その結果、表 2 に示すように、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) を示した。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。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、固体で陰性結果が得られた場合、3 眼球を用いて 2 回目の実験を行い、陰性結果を承認または棄却することが推奨されている。

表 2. ボトムアップ方式における ICE 法の正確性—UN GHS 区分法での区分に該当しない物質の同定²⁾

ボトムアップ方式	No.	正確度		感度		偽陰性率		特異度		偽陽性率	
		%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.
判定基準 (2018)	184	88	161/184	97	98/101	3	3/101	76	63/83	24	20/83
判定基準 (2013)	152	82	125/152	99	72/73	1	1/73	67	53/79	33	26/79

なお、トップダウン方式においても、新たな物質が加わったデータにおいて区分 1 物質を検出する場合の正確性が再評価され、これらの予測性は、更新前と同程度であった。

3-2. トップダウン方式による UN GHS 区分 1 物質の判定

3-2-1. 病理組織学的検査の追加

病理組織学的検査を行う場合、ICE 法に用いた眼球（被験物質を曝露した 3 眼球全て）の病理組織標本を作製して評価する。10%中性緩衝ホルマリン、4%グルタルアルデヒドまたは 2.5%グルタルアルデヒドと 2%ホルムアルデヒド混合液で固定した眼球（角膜）を常法に従い脱水、パラフィン包埋、薄切し、HE 染色あるいは PAS 染色等を施した病理組織標本を作製する。角膜上皮のびらん、空胞化および壊死、角膜実質（固有層）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（表 3）。

表 3. ニワトリ眼球の病理組織標本のための半定量的評点化システム²⁾

指標	判定	スコア	説明
上皮：びらん	ごく軽度	1/2	数個の細胞から最表層 1 層までの欠損
	軽度	1	3 層以下の欠損
	中等度	2	50%までの上皮層の欠損
	重度	3	基底膜に達する上皮層の欠損
上皮：空胞化 上皮を上、中、下の各層に分けてスコア化	ごく軽度	1/2	空胞化細胞が 1 個～数個散在性にみられる
	軽度	1	空胞化細胞の集簇または小空胞を有する細胞が単一層にみられる
	中等度	2	上皮の 50%まで空胞化細胞が占める
	重度	3	上皮の 50～100%を空胞化細胞が占める
上皮：壊死	正常範囲	-	細胞質が膨化した細胞 10 個未満
	ごく軽度	1/2	細胞質が膨化した細胞 10～20 個
	軽度	1	細胞質が膨化した細胞 20～40 個
	中等度	2	細胞質が膨化した細胞が多数認められるが上皮層の 50%未満を占める場合
	重度	3	細胞質が膨化した細胞が上皮層の 50～100%を占める場合
実質：核濃縮 上部または下部領域	正常範囲	—	5 個未満の細胞の核濃縮
	軽度	1	5～10 個の細胞の核濃縮
	中等度	2	10 個を超える細胞の核濃縮
実質の線維異常	あり	P	不規則な線維
内皮：壊死	あり	P	内皮は単層のため、グレード分けはしない

表 3 の刺激性のスコアを区分 1 物質の評価基準（表 4）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。

表 4. UN GHS 区分 1 物質の同定のため、ICE 法に加えて実施することが推奨される病理組織学的検査の評価基準²⁾

組織層	眼に重篤な損傷を引き起こす可能性（UN GHS区分1）の評価基準
角膜上皮	<ul style="list-style-type: none"> ・少なくとも 3 眼中 2 眼で中等度（スコア 2）以上のびらんを示す ・3 眼中 2 眼で角膜上皮の中層ないし下層におけるごく軽度の空胞化（スコア 1/2）を伴う ・3 眼中 1 眼で中程度（スコア 2）以上のびらんを示した場合、少なくともその他の 2 眼中 1 眼で角膜上皮の中層ないし下層におけるごく軽度の空胞化（スコア 1/2）を伴う ・少なくとも 3 眼中 2 眼で中等度（スコア 2）以上の壊死を示す

さらに、表 3 のうち、角膜の空胞化については、洗浄剤および界面活性剤による空胞化の好発部位を考慮し、形態的な背景値に対して表 5 の鑑別基準が示されている。

表 5. 背景値として認められる小さな空胞と真の空胞化を鑑別するための基準³⁾

空胞の大きさ	発生部位	真の空胞化であるか? (Yes/No)
上皮細胞の核の大きさの 1/3 またはそれ以上	上皮細胞内 (不特定)	Yes
上皮細胞の核の 1/3 よりも小さい	基底膜に接する部位	No
	上皮細胞内の基底膜側から数え て 1 列目の核の層よりも上	Yes
	基底膜と 1 列目の核の層との間	追加情報を基に判断*

*段階的評価：

- 1) 他 2 つの眼球標本を観察し、2 つとも作用が認められない場合は真の空胞化ではないと判断し、2 つのうち 1 つの眼球ではっきりした作用が認められた場合は真の空胞化と判断する。
- 2) 他 2 つの眼球標本を観察してもはっきりしない場合、例えば固形物による局所的な作用の可能性を考慮するといった標準的な ICE 法での観察結果も参考にする。

これら上皮細胞の空胞化の他、界面活性剤による組織変化の特徴として、曝露および培養によって角膜上皮細胞と基底膜との接着性が低下したことにより生じた空隙や、刺激物質によって脆弱となった細胞-細胞間に病理標本作製過程で間隙が生じることが知られている。

なお、組織標本の評価は検査担当者の見解の基に成り立っていることから、病理組織学的検査は、ICE 法の組織標本観察に習熟した病理専門家が行った上で、OECD GLP No.16⁴⁾に準じて、別の病理学専門家によるピアレビューを実施することを定めている。

3-2-2. 病理組織学的検査の追加結果

TG 438 (2013) の検証⁵⁾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が検証された。検証では、まず洗浄剤 (1 種類以上の界面活性剤を 3 %超含む洗浄用混合物、界面活性剤単体の希釈液は含まない) のうち、 $2 < \text{pH} < 11.5$ の 30 物質⁶⁾、 $\text{pH} \leq 2$ の 9 物質および $11.5 \leq \text{pH}$ の 9 物質⁷⁾について病理組織学的検査を併用し、重篤な眼の損傷を引き起こす可能性 (UN GHS 区分 1) を評価した。その結果、 $2 < \text{pH} < 11.5$ の洗浄剤では、病理組織学的検査の併用により感度が向上した (0%から 75%、 $n=8$)⁶⁾。一方、 $\text{pH} \leq 2$ または $11.5 \leq \text{pH}$ の洗浄剤では、病理組織学的検査の併用により、偽陽性率が高くなり (17%から 67%、 $n=12$)、その結果、特異性が 83%から 33%に低下した⁷⁾。

これらの結果を受け、 $2 < \text{pH} < 11.5$ の洗浄剤および界面活性剤に限り病理組織学的検査を併用することが検討され、最終的に 30 物質について検証された⁸⁾。このうちの 1 物質がアルカリ洗剤 ($\text{pH}=12.0$) であったことから、本委員会では、それを除く 29 物質につい

て解析した（表 6）。

表 6. 最終評価に用いた 29 物質の内訳⁸⁾

	区分 1	区分 2	区分外
界面活性剤	13	2	3
洗浄剤 (2 < pH < 11.5)	8	2	1

区分外：区分 1 および区分 2 のいずれにも該当しない。

その結果、表 7 に示すように、*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。

表 7. トップダウン方式において病理組織学的検査を併用し 2<pH<11.5 の洗浄剤および界面活性剤を判定した場合の正確性の検証結果²⁾

病理組織学的検査	No.	正確度		感度		偽陰性率		特異度		偽陽性率	
		%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.
併用あり (2018)	29	76	22/29	71	15/21	29	6/21	87	7/8	13	1/8
併用なし (2013)	29	52	15/29	33	7/21	67	14/21	100	8/8	0	0/8

さらに、UN GHS 区分 1 の 6 物質、区分 2A の 3 物質、区分に該当しない 3 物質の計 12 物質の界面活性剤について、3 施設で UN GHS 区分 1 物質であるか否かを判定した場合の再現性を確認した結果⁸⁾、施設間再現性は 83% (10/12) となり、良好であった。

以上、2<pH<11.5 の洗浄剤および界面活性剤については、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。

3-3. その他

3-3-1. 習熟度確認物質の変更：

TG 438 (2013) では、ICE 法の習熟度確認物質として 13 物質が推奨された。本改定版では、このうち 4 物質が変更（濃度のみの変更を含む）され、表 8 に示す 13 物質になった。

表 8. ICE 法の習熟度確認物質²⁾

化学物質	CAS 番号	分類	物理的 性状	<i>In Vivo</i> UN GHS 区分	ICE UN GHS 区分
Benzalkonium chloride (10%)	8001-54-5	オニウム 化合物類	液体	区分 1	区分 1
Chlorhexidine	55-56-1	アミン類 アミジン類	固体	区分 1	区分 1
Sodium hydroxide (10%)	1310-73-2	塩基	液体	区分 1	区分 1
Imidazole	288-32-4	ヘテロサイクリ ック化合物類	固体	区分 1	区分 1
Trichloroacetic acid (30%)	76-03-9	カルボン酸類	液体	区分 1	区分 1
2,6- Dichlorobenzoyl chloride	4659-45-4	アシルハライド 類	液体	区分 2A	予測不可
Ammonium nitrate	6484-52-2	無機塩	固体	区分 2B	予測不可
Sodium hydroxide (1%)	1310-73-2	塩基	液体	区分 2B	予測不可
Dimethyl sulfoxide	67-68-5	有機硫黄 化合物	液体	区分外	区分外
Ethyl trimethyl acetate	3938-95-2	エステル	液体	区分外	区分外
Methylcyclopentane	96-37-7	炭化水素 (環状)	液体	区分外	区分外
n-Hexane	110-54-3	炭化水素 (鎖状)	液体	区分外	区分外
Triacetin	102-76-1	脂質	液体	区分外	区分外

区分外：表 1 参照。

予測不可：エンドポイントのスコアの組み合わせが区分 1 および区分外のどちらにも該当しないため、ICE における区分が判定できない

3-3-2. 病理組織学的検査における習熟度確認物質

今回、新たに ICE 法の病理組織学的検査における習熟度確認物質として、表 9 に示す 6 物質（同一物質の濃度違いを含む）が推奨された。

表 9. ICE 法の病理組織学的検査の習熟度確認物質²⁾

化学物質	CAS 番号	界面活性剤の種類	物理的性状	UN GHS 区分		
				<i>In Vivo</i>	標準的 ICE	ICE 病理組織学的検査*
Benzalkonium chloride (5%)	8001-54-5	カチオン	液体	区分 1	区分 1	区分 1 (びらん)
Benzsulphonyl-chloride	98-09-9	アニオン	液体	区分 1	区分 1	区分 1 (壊死および空胞化)
Cetylpyridinium bromide (10%)	140-72-7	カチオン	液体	区分 1	予測不可	区分 1 (空胞化)
Cetylpyridinium bromide (1%)	140-72-7	カチオン	液体	区分 2A	予測不可	予測不可
N-Lauroyl sarcosine Na salt (10%)	137-16-6	アニオン	液体	区分 2A	予測不可	予測不可
Cetylpyridinium bromide (0.1%)	140-72-7	カチオン	液体	区分外	予測不可	予測不可

*表 3～表 5 の基準に従って判定し、合致することを確認する。

区分外：区分に該当しない

4. 結論

JaCVAM 眼刺激性試験資料編纂委員会は、TG 438 (2018) に基づいた正確性と再現性の結果から、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た。また、 $2 < \text{pH} < 11.5$ の洗浄剤および界面活性剤については、トップダウン方式において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を推奨する。

用語 (TG 438 ANNEX 1, DEFINITIONS) ²⁾

トップダウン方式:

TG 438 (2018) では、眼に重篤な損傷を引き起こす疑いのある化学物質に適用する段階的な評価方式を指し、眼に重篤な損傷を引き起こす化学物質 (陽性結果) と、それ以外の化学物質 (陰性結果) を識別することから始める。

ボトムアップ方式:

TG 438 (2018) では、眼刺激性あるいは重篤な眼の損傷性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、眼刺激性物質に区分されない化学物質と、それ以外の化学物質を識別することから始める。

区分 1 物質:

UN GHS 分類体系 ²⁾下、眼球表面へ適用することにより、眼球の組織損傷や重篤な視力低下を引き起こす化学物質。いわゆる「重篤な眼の損傷」や「眼に対する非可逆的な作用」を示し、その損傷は適用後 21 日を経ても十分には回復しない。

区分 2 物質:

UN GHS 分類体系下、眼球表面へ適用することにより、眼球の変化をもたらす化学物質。「眼刺激性」や「眼に対する可逆的な作用」を示し、その損傷は適用後 21 日以内に完全に回復する。

区分外または UN GHS 区分に該当しない物質:

UN GHS 分類体系下、GHS 区分 1 あるいは 2 (2A または 2B) への分類を要求されるような刺激性を有しておらず、眼刺激性物質として区分されない化学物質。

引用文献

- 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 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)
- 3) OECD (2017) Guidance Document on "The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and the Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Series on Testing and Assessment No. 160, ENV/JM/MONO(2011)45/REV1. Available at: [<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>]
- 4) OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, Number 16 Advisory Document of the Working Group on Good Laboratory Practice -Guidance on the GLP Requirements for Peer Review of Histopathology, JT03362564 26-Sep-2014
- 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: 26 July 2013)

- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) OECD (2019). Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment No 188. ENV Publications, OECD, Paris.