

10 3Rsへの関与

BCOP法では、試験目的とは異なる食用などの用途で屠殺されたウシの角膜を用いているため、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)。

また、BCOP法は段階的評価の1つとして、動物試験を実施する前に腐食性・強刺激性物質を検出する試験方法であるため、BCOP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)。また、陰性結果を確認するため、動物を用いた眼刺激性試験を実施したとしても、多くの腐食性・強刺激性物質をBCOP法で排除できるため、refinementにも貢献していると考えられる。

11 試験法の有用性と限界

BCOP法の限界として、アルコール・ケトン類などの揮発性物質および固形物に対する偽陽性と偽陰性率が高く、これらの物質の評価には試験法の改良が必要である。

試験法の有用性の観点から、病理組織学的観察を組み入れることで、角膜の損傷程度についてさらに詳細に評価することが提案されているが、組織形態レベルでの影響を判定できる明確な基準の設定が必要である。なお、腐食性・強刺激性物質を判定するという目的でBCOP法を実施する場合は、病理組織学的観察は必ずしも必要ではない。

試験技術の移転性については、試験機関において1) 新鮮なウシ眼球を入手できること、2) 特殊な機器が必要ではないが、非滅菌組織を取り扱う標準手順を整備することが必要である。日本では、ウシ眼球はBSE (Bovine Spongiform Encephalopathy) の集積危険部位とされているため、屠場からの眼球入手および試験での使用についての規制(屠畜場法)があることから、BCOP法の日本国内の日常的な実施は困難である。ただし、日本国外にはBCOP法による眼刺激性試験を実施する受託機関があり、日本の科学者・企業からの委託が可能である。

費用面では、従来のウサギを用いたDraize法と大きな違いはない。1被験物質あたり、\$2050から\$4500程度(対照物質を含む)とBRDで報告されている。

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った場合の試験開始から最終報告書作成までの期間は、従来のDraize法と大きな違いはない。

12 結論

ICCVAMで実施されたBCOP法の第三者評価は、バリデーションに必要な項目、プロセス、データが十分に検討されている。ESACの評価と同様、ICCVAMのバリデーションの結果を受け入れることに問題はないと判断される。

ある特定の化学物質(アルコール・ケトン類などの揮発性物質および固形物等)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ールに基づき試験を実施すれば、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試験法としてBCOP法を使用することに問題はないと判断される。

現在、EUではBCOP法が陽性という結果で化学物質を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BCOP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、BCOP法による腐食性・強刺激性物質を評価することが可能であると考えられる。

13 文献

- Bailey PT, Freeman JJ, Phillips RD, Merrill JC. (2004) Validation of the BCOP assay as a predictor of ocular irritation of various petrochemical products. Poster presentation at the Society of Toxicology 2004 meeting.
- Balls M, Botham PA, Bruner LH, Spielmann H. (1995) The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol In Vitro* 9:871-929.
- Bruner L. (1992) Chapter 7: Ocular irritation. In: *In Vitro Toxicology Testing* (Ed. Frazier J). New York:Marcel Dekker, Inc.
- Butscher P. (1953) Beitrag zur therapie von augenschadigunen durch thioglykolsaur bei der herstellung der sogenannten kaltwelle. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 122:349-350.
- Cassidy SL, Stanton E. (1997) In vitro eye irritation studies on organosilicon compounds. *J Toxicol - Cut and Ocular Toxicol* 16(1):45-60.
- Casterton PL, Potts LF, Klein BD. (1996) A novel approach to assessing eye irritation potential using the bovine corneal opacity and permeability assay. *J Toxicol - Cut and Ocular Toxicol* 15(2):147-163.
- Chamberlain M, Gad SC, Gautheron P, Prinsen MK. (1997) Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem Toxicol* 35:23-37.
- Cooper KJ, Earl LK, Harbell J, Raabe H. (2001) Prediction of ocular irritancy of prototype shampoo formulations by the isolated rabbit eye (IRE) test and bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. *Toxicol In Vitro* 15:95-103.
- 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.
- Gautheron P, Dukic M, Alix D, Sina JF. (1992) Bovine corneal opacity and permeability test: An in vitro assay of ocular irritancy. *Fundam Appl Toxicol* 18:442-449.
- Gautheron P, Giroux J, Cottin M, Audegond L, Morilla A, Mayordomo-Blanco L, Tortajada A, Haynes G, Vericat JA, Pirovano R, Tos EG, Hagemann C, Vanparys P, Deknudt G, Jacobs G, Prinsen M, Kalweit S, Spielmann H. (1994) Interlaboratory assessment of the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. *Toxicol In Vitro* 8(3):381-392.
- Gettings S, Lordo R, Hintze K, Bagley D, Casterton P, Chudkowski M, Curren RD, Demetrius JL, Dipasquale LC, Earl LK, Feder PI, Galli CL, Glaza SM, Gordon VC, Janus J, Kurtz PJ, Marenus KD, Moral J, Pape WJW, Renskers KJ, Rheins LA, Roddy MT, Rozen MG, Tedeschi JP, Zyracki J. (1996) The CTFA evaluation of alternatives program: An evaluation of in vitro alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase III) surfactant-based formulations. *Food Chem Toxic* 34:79-117.
- Grant WM. (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: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512.

Jones PA, Budynsky E, Cooper KJ, Decker D, Griffiths HA, Fentem JH. (2001) Comparative evaluation of five in vitro tests for assessing the eye irritation potential of hair-care products. *ATLA* 29:669-692.

McDonald TO, Seabaugh V, Shaddock JA and Edelhofer HF. (1987) Eye irritation. In *Dermatotoxicology* (Marzulli FN and Maibach HI, eds). Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 641-696.

OECD. (1987) Test guideline 405, Acute eye irritation/corrosion, adopted February 24, 1987. In *OECD Guidelines for Testing of Chemicals*. OECD, Paris.

OECD. (2002) Test guideline 405. Acute eye irritation/corrosion, adopted April 24, 2002. In: *OECD Guidelines for Testing of Chemicals*. OECD, Paris.

Rachui SR, Robertson WD, Duke MA, Paller S, Ziets GA. (1994) Predicting the ocular irritation potential of cosmetics and personal care products using two in vitro models. *In Vitro Toxicol* 7(1):45-52

Rougier A, Cottin M, DeSilva O, Catroux P, Roguet R, Dossou KG. (1994) The use of in vitro methods in the ocular irritation assessment of cosmetic products. *Toxicol In Vitro* 8(4):893-905.

Sina JF, Galer DM, Sussman RG, Gautheron PD, Sargent EV, Leong B, Shah PV, Curren RD, Miller K. (1995) A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.

Southee JA. (1998) Evaluation of the Prevalidation Process. Part 2, final report. Volume 2. The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Assay. European Community Contract No. 11279-95-10F 1ED ISP GB.

Swanson JE and Harbell JW. (2000) Evaluating the eye irritancy potential of ethanolic test materials with the bovine corneal opacity and permeability assay. *The Toxicologist* 54(1):188-189.

Swanson JE, Lake LK, Donnelly TA, Harbell JW, Huggins J. (1995) Prediction of ocular irritancy of full-strength cleaners and strippers by tissue equivalent and bovine corneal assays. *J Toxicol - Cut and Ocular Toxicol* 14(3):179-195.

Ubels JL, Erickson AM, Zylstra U, Kreulen CD, Casterton PL. (1998) Effect of hydration on opacity in the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. *J Toxicol - Cut and Ocular Toxicol* 17(4):197-220.

Ubels JL, Pruis RM, Sybesma JT, Casterton PL. (2000) Corneal opacity, hydration, and endothelial morphology in the bovine corneal opacity and permeability assay using reduced treatment times. *Toxicol In Vitro* 14:379-386.

Ubels JL, Paauw JD, Casterton PL, Kool DJ. (2002) A redesigned corneal holder for the bovine corneal opacity and permeability assay that maintains normal corneal morphology. *Toxicol In Vitro* 16:621-628.

Ubels JL, Ditlev JA, Clousing DP, Casterton PL. (2004) Corneal permeability in a redesigned corneal holder for the bovine corneal opacity and permeability assay. *Toxicol In Vitro* 18:853-857.

UN. (2003) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). New York

& Geneva: United Nations Publications.

Vanparys P, Deknudt G, Sysmans M, Teuns G, Coussement W, Van Cauteren H. (1993) Evaluation of the bovine corneal opacity-permeability assay as an in vitro alternative to the Draize eye irritation test. *Toxicol In Vitro* 7(4):471-476.

定義

Accuracy: (a) 精度 The closeness of agreement between a test method result and an accepted reference value. (b) 正確率 The proportion of correct outcomes 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.

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

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

Corneal opacity (角膜混濁度): 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. Opacity can be evaluated subjectively as done in the Draize rabbit eye test, or objectively with an instrument such as an "opacimeter."

Corneal permeability (角膜透過性): Quantitative measurement of damage to the corneal epithelium by a determination of the amount of sodium fluorescein dye that passes through all corneal cell layers.

Corrosive (腐食性): A substance that causes irreversible tissue damage at the site of contact.

False negative rate (偽陰性率): 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 (偽陽性率): The proportion of all negative substances that are falsely identified by a test method as positive. It is one indicator of test method accuracy.

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 (施設内再現性): 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 (施設内反復性): 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 (施設間再現性): 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 (陰性対照): 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.

In Vitro Irritancy Score: An empirically-derived formula used in the BCOP assay whereby the mean opacity and mean permeability values for each treatment group are combined into a single in vitro score for each treatment group. The In Vitro Irritancy Score = mean opacity value + (15 x mean permeability value).

Opacitometer (オパシトメーター): An instrument used to measure "corneal opacity" by quantitatively evaluating light transmission through the cornea. The instrument has two compartments, each with its own light source and photocell. One compartment is used for the treated cornea, while the other is used to calibrate and zero the instrument. The difference between photocell signals in the two compartments is measured electronically as a change in voltage, and is displayed digitally, generating numerical opacity values with arbitrary units.

Positive control (陽性対照): 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.

Reduction alternative: A new or modified test method that reduces the number of animals required.

Refinement alternative: A new or modified test method that refines procedures to lessen or eliminate pain or distress in animals, or enhances animal well-being.

Reliability: A measure of the degree to which a test method can be performed reproducibly within and among laboratories over time. It is assessed by calculating intra- and inter-laboratory reproducibility and intralaboratory repeatability.

Replacement alternative: A new or modified test method that replaces animals with non-animal systems or one animal species with a phylogenetically lower one (e.g., a mammal with an invertebrate).

Sensitivity (感度): 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).

Severe irritant (強刺激性): (a) A substance that causes tissue damage in the eye following application to the anterior surface of the eye that is not reversible within 21 days of application or causes serious physical decay of vision. (b) Substances that are classified as GHS Category 1, EPA Category I, or EU R41 ocular irritants.

Specificity (特異性): 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 (段階的評価): 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.

Transferability (移転性): The ability of a test method or procedure to be accurately and reliably performed in different, competent laboratories.

眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書

評価対象試験：ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法
(Isolated Chicken Eye Test Method: ICE)

平成 21 年 3 月 30 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 (プロクター・アンド・ギャンブル・ジャパン 株式会社)
宮岡 悦良 (東京理科大学)

略語

- 3Rs: Replacement, Reduction, and Refinement Alternative
BCOP: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test
BRD: Background Review Document
CAS: Chemical Abstracts Service
CV: Coefficient of variation
ECVAM: the European Center for the Validation of Alternative Methods
ESAC: ECVAM Scientific Advisory Committee
EU: European Union
GHS: Global Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals
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る眼刺激性試験（ICE：Isolated Chicken Eye Test）は、被検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）の代替法の1つとして開発された。ICE法は、ICCVAMにおけるバリデーシヨンの情報（BRD）をもとに、JaCVAM眼刺激性試験代替法評価委員会がPeer Reviewを実施した。

ICE法は、ニワトリから摘出した眼球に被検物質を暴露し、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。

本バリデーシヨンには、様々な種類と製剤形態から成る被検物質が用いられた。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正確率、感度および特異性はそれぞれ83%、50%および92%であった。陽性予見率、陰性予見率、偽陽性率および偽陰性率は、それぞれ63%、88%、8%および50%を示した。一方、偽陽性率および偽陰性率とも50%を示すアルコール類、偽陰性率が58%前後を示す固体、農薬および界面活性剤を除外すると、正確率、偽陽性率および偽陰性率は、それぞれ92%、6%および29%となり、ICE法による腐食性および強刺激性の検出精度は良好と判断された。試験法の信頼性は、施設内変動について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。

以上の結果から、化学物質の眼刺激性の段階的評価の1つとして、特定の化学物質（アルコール類、農薬および界面活性剤等）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、腐食性および強刺激性物質をスクリーニングする目的のために、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法による腐食性・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 試験法の科学的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：Isolated Chicken Eye Test）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ウサギを用いた眼刺激性試験（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的および生理学的な違いがあり、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、暴露直後の角膜の刺激性反応は評価できるが、その後の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、病理組織学的評価を参考とすることは可能であると思われる。

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、ウサギを用いた眼刺激性試験（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（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 試験法のプロトコルの妥当性

眼刺激性試験代替法の開発にあたっては、当初 Isolated Rabbit Eye Test Method (IRE:ウサギ摘出眼を用いた眼刺激性試験代替法)が開発されたが、ウサギが食用目的として飼育されることは多くないため、食用目的で使用される動物種の眼球を使用することが検討され、ニワトリの眼球を利用した Isolated Chicken Eye Test Method (ICE法)が開発された。本項では ICCVAM の報告書 (ICCVAM 2006) を基に、また、OECD の試験ガイドライン案 (OECD 2008, Version 2) を加味して試験プロトコル構成の妥当性について記載する。

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 のバリデーションで用いられたプロトコルの概要は、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、基本的に個体、液体とも原体および原液のまま使用する。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する。

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、細隙灯顕微鏡にて検査し、スコア化する。

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

暴露後 30 分に、細隙灯顕微鏡にてフルオレセイン染色性を検査し、スコア化する。

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。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、角膜混濁が Corneal opacity ≥ 3 at 30 min (≥ 2 eyes)、Corneal opacity = 4 at any time point (≥ 2 eyes) の場合と角膜のフルオレセイン染色性が Severe loosening of the epithelium (≥ 1 eye) となる場合も腐食性・強刺激性と判定される。

ICE 法のプロトコールの詳細は、BRD (Background Review Document) 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、統一プロトコルを用いていないが、これらプロトコルの主な違いは使用眼球数が異なることであり、類似したプロトコルが用いられている。これらのプロトコ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が網羅されている。

また、日本においても、鳥インフルエンザウィルス感染が発生していることから、ニワトリ眼球的の入手時には、鳥インフルエンザウィルス感染に対する注意が必要である。

改良点および検討事項として以下の点が考えられる。

1) ニワトリ眼球的の運搬条件

バリデーション試験のプロトコルでは、鶏頭部の運搬中の保存温度は室温とされているが、冷蔵条件下 (目安として摂氏 4~10 度程度) での運搬が望まれる。

2) 被験物質の希釈溶媒

浸透圧などの細胞への影響を考慮すると、被験物質の希釈が必要な場合、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。

これらの化学物質は物理化学的特性により、アルコール類、酸、アルカリ、ハロゲン化アシル類、アミン/アミジン類、カルボン酸類、エステル類、複素環化合物、炭化水素類、無機塩類、ケトン類、オニウム化合物と有機リン化合物などに分類された。市販品あるいは製剤別に分類すると、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。

ICE 法のバリデーションに用いられた被検物質の数と種類（物質区分、製品分類、液体点固体の物性、刺激性の程度など）は、ICE 法の検証と評価に十分であると判断された。

物理化学的特性による分類および供試数：

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、炭化水素類 5、多環類 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。

市販品あるいは製剤別の分類および供試数：

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、農薬/除草剤 15、共重合体 3、保存剤 6、化粧品用成分 1、製薬化合物 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、石鹼 9、酵素阻害物質 1、界面活性剤 25、酵素溶液 3、溶媒 37、工業物・中間体・製剤 20、無分類 23。

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えない。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。

ICE法のバリデーションでは、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法のデータは、ICE法と並行して得られた結果および既存の試験結果である。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。なお、Balls et al. (1995) では、被験物質のコード化 (Coded substances) が実施された。

6 試験法の正確性

ICE 法の正確性については、GHS 分類 (UN 2003)、EPA 分類 (EPA 1996) および EU 分類 (EU 2001) のそれぞれの基準において、腐食性・強刺激性に相応する Draize 法のデータと比較することで評価した。

ICE 法の精度に関しては、表 1 に示したように、GHS 分類による腐食性・強刺激性物質の分類と比較したとき、正確率は (Accuracy) 83%、感度 (Sensitivity) は 50% および特異性 (Specificity) は 92% であった。偽陽性率 (False positive rate) は 8% および偽陰性率 (False negative rate) は 50% を示した。また、陽性予見率 (Positive predictivity) は 63%、陰性予見率 (Negative predictivity) は 88% であった。

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

(ウザ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)

	正確率		感度		特異性		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	9/144	50	15/30
EPA分類	84	122/145	52	15/29	92	107/116	8	9/119	48	14/39
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。)

正 確 率：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 性：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

以下の表 2 では化学物質区分ごとの偽陽性率および偽陰性率を示す。アルコール類は偽陽性率および偽陰性率とも 50%と高く、また、固体、農薬および界面活性剤の偽陰性率もそれぞれ 58%、60%および 56%と高い値を示した。そこで、アルコール類、界面活性剤、固体を除外して ICE 法での眼刺激性を評価した場合、正確率は上がり、偽陽性率および偽陰性率は低下し、それぞれ 92%、6%および 29%と良好な精度であった。

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

対象被験物質/ カテゴリー	物質 数	偽陽性率		偽陰性率	
		%	NO.	%	No.
全データ	144	8	9 / 114	50	15 / 30
化学物質クラス					
アルコール類	12	50	5 / 10	50	1 / 2
アミン類	5	0	0 / 2	33	1 / 3
カルボン酸類	10	0	0 / 3	43	3 / 7
エステル類	9	13	1 / 8	0	0 / 1
複素環類	9	0	0 / 3	33	2 / 6
オニウム化合物	8	0	0 / 2	33	2 / 6
化学物質の性質					
液体	108	10	9 / 90	44	8 / 18
固体	36	0	0 / 24	58	7 / 12
農薬	11	0	0 / 6	60	3 / 5
界面活性剤	21	0	0 / 12	56	5 / 9

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、Siloxane 2 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、変動係数分析 (CV) および一元配置分散分析 (ANOVA) を用いた施設内の反復性と再現性を検討した (Prinsen, 2000)。供試した 4 物質は、EU 分類で非刺激性 1 物質、眼刺激性 (R36) 2 物質および強度刺激性 (R41) 1 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) の範囲であり、非刺激性物質のデータを除いた場合の CV 値は改善された。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のデータに変動が大きかったが、非刺激性物質のデータを除いた場合の CV 値は改善された (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 (非刺激性物質を除く)
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、非刺激性物質データを除いた場合に CV 値 (8.7~18.1%) は改善された。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、非刺激性物質のデータを除いた場合に CV 値は改善された (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 の被検物質について、4 施設による施設間バリデーションを実施した (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 (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>)	被検物質数	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%の被検物質が、4施設間で一致した。また、88%の被検物質が、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

(被検物質総数; 59, n; 該当する被検物質数)

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が、非刺激性物質のデータを除いた場合のCV値は改善された。

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。
- 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