

表2 BCOP試験法のバリデーションに供与された被験物質の製品分類

分類	供試数	分類	供試数
接着剤	1	難燃剤	1
農薬	2	香料	3
不凍剤	1	食品添加物	1
殺菌剤/防カビ剤/消毒剤	11	除草剤	3
飲料	1	防虫剤	8
漂白剤	3	潤滑油・潤滑油添加剤	6
キレート剤	2	塗料・ニス（成分）	1
化学・合成中間体	28	殺虫剤	8
クリーナー	15	石油製品	16
クレンザー（パーソナルケア品）	13	写真薬剤・現像液	2
結合剤	1	植物成長調整剤	2
切削液	2	可塑剤	4
油性洗浄剤	1	防腐剤	2
乾燥剤	1	試薬	5
洗剤	11	毛髪用シャンプー	14
医薬品・代謝物	17	石けん	3
ドライクリーニング製剤	1	溶剤	34
工業用染料	3	界面活性剤	39
乳化剤	1	陰イオン界面活性剤	3
エッチング・電気メッキ剤	2	陽イオン界面活性剤	6
火薬	1	非イオン界面活性剤	5
柔軟剤	1	温度計液	1
肥料	1		

注) 被験物質によっては複数の製品分類にまたがっている場合もあるため、合計は被験物質総数と一致しない。

#### 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。

今回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法のデータについては、既存の試験結果、またはBCOP試験と並行して実施した結果を用いており、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。

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BCOP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。

## 5 データと結果の利用性

以下の8つのバリデーション試験から、161の化学物質について、平均光透過度、平均OD<sub>490</sub>、標準偏差、繰り返し試験数、平均IVIS (*In Vitro* Irritancy Score) 値、眼刺激分類評価、被験物質のCAS No.などのデータを得ている。

Gautheron et al. (1994)	52物質供試
Balls et al. (1995)	51物質供試
Swanson et al. (1995)	20物質供試
Gettings et al. (1996)	25物質供試
Casterton et al. (1996)	64物質供試
Southee (1998)	9物質供試
Swanson and Harbell (2000)	12物質供試
Bailey et al. (2004)	16物質供試

8つのバリデーション試験のうち、5つのバリデーション試験ではGLPに準拠して行われたことが確認されており、また、7つのバリデーション試験では被験物質をコード化して評価されている。

## 6 試験法の正確性

正確性の評価は、GHS、EPA、EUの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、BCOP試験法は眼に対する腐食性・強刺激性物質の判定において、表3に示したような結果を得た。

表3 腐食性・強刺激性物質の予見に関するBCOP法の結果  
(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	81	119/147	84	36/43	80	83/104	20	21/104	16	7/43
EPA分類	79	113/143	75	30/40	81	83/103	19	20/103	25	10/40
EU分類	80	114/143	82	33/40	79	81/103	21	22/103	18	7/40

(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力カテゴリー、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。)

GHSの分類基準におけるそれぞれのバリデーション試験結果は、表4のとおりであった。

表4 GHS分類基準と比較した場合の各バリデーション試験結果

試験	判定法	N	一致度 (%)	感度 (%)	特異度 (%)	偽陽性率 (%)	偽陰性率 (%)
Gautheron et al. (1994)	IVIS	47	77	69	79	21	31
Balls et al. (1995)	IVIS	54	70	77	66	34	24
Swanson et al. (1995)	IVIS	8	100	100	100	0	0
Gettings et al. (1996)	Perm	23	87	75	93	7	25
Casterton et al. (1996)	O/P	55	67	48	86	14	52
Southee. (1998)	IVIS	15	79	76	83	17	24
Swanson and Harbell. (2000)	IVIS	9	78	100	75	25	0
Bailey et al. (2004)	IVIS	14	93	67	100	0	33

化学物質区分ごとにとみると(5例以上の被験物質がある区分のみ)、分類基準に関わらず、偽陽性率は全般的に低いが、アルコール類は偽陽性率が高く、その他、ケトン類、カルボン酸類やヘテロ環式化学物質でも比較的高い偽陽性率が確認された。偽陰性率も全般的に低いが、アルコール類で偽陰性率の高い結果が得られた。被験物質を物理的物性で区分すると、固体で高い偽陰性を示した。GHSの分類基準について、これら被験物質区分での一致度・偽陽性・偽陰性率を表5にまとめた。

表5 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・偽陰性率

	一致度	偽陽性率	偽陰性率
全体	81% (119/147)	20% (21/104)	16% (7/43)
化学物質区分 <sup>注1)</sup>			
アルコール類	44% (8/18)	53% (8/15)	67% (2/3)
アミン・アミド類	100% (8/8)	0% (0/4)	0% (0/4)
カルボン酸類	73% (11/15)	38% (3/8)	14% (1/7)
エステル類	92% (11/12)	12% (1/8)	0% (0/4)
エーテル・ポリエーテル類	100% (6/6)	0% (0/5)	0% (0/1)
ヘテロ環式化学物質	75% (9/12)	33% (2/6)	17% (1/6)
炭化水素	92% (11/12)	8% (1/12)	- (0/0)
無機塩	100% (5/5)	0% (0/3)	0% (0/2)
ケトン類	60% (6/10)	40% (4/10)	- (0/0)
オニウム化合物	100% (11/11)	0% (0/3)	0% (0/8)
物質の特性(形状) <sup>注2)</sup>			
液体	79% (73/92)	26% (18/68)	4% (1/24)
固体	78% (25/32)	10% (2/20)	42% (5/12)

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) 形状不明のものは含まれていない

偽陽性率・偽陰性率の高いアルコール類・ケトン類・固体物質を除いた場合のBCOP試験法の評価結果は、以下に示すように一致度が上がり、偽陽性・偽陰性率はさらに低下した。

一致度： 92%

偽陽性率： 12%

偽陰性率： 0% (GHS分類基準における結果)

以上の結果から、BCOP試験法においてアルコール類・ケトン類・固体物質を除いた場合、腐食性・強刺激性の検出精度は、十分高いと判断できる。

## 7 試験法の信頼性

### 施設内変動について

*In vitro* Irritancy Score (IVIS) のrepeatability (反復性) の検討が3つのバリデーション試験で行われており、その結果は以下の通りであった。

Southee. (1998) : IVISの%CV、中央値 11.8-14.2 (3施設の値)

Joseph Sina. (2006) : IVISの%CV、範囲 1.1-13 (強刺激物質のみを抽出した場合)

Gautheron et al. (1994) : IVISの%CV、中央値 18.1

IVISのreproducibility (再現性) の検討は2つのバリデーション試験で行われ、その結果は以下の通りであった。

Gettings et al. (1996) : Permeabilityの%CV、平均値 33.4、中央値 29.0

Southee. (1998) : IVISの%CV、平均値 12.6-14.8、中央値 6.7-12.4 (3施設の値)

### 施設間変動について

3つのバリデーション試験 (Balls et al. (1995)、Gautheron et al. (1994)、Southee. (1998)) の結果は、67-94%の被験物質が施設間の分類で一致した。一致度が低いものは、化学物質区分でまとめるとアルコール類、ケトン類、ヘテロ環式化学物質であり、また製品区分で分けると、有機溶媒、界面活性剤、化学中間体、洗剤、農薬であった。

BCOP法の信頼性は、施設内変動・施設間変動とも良好な結果が得られていると判断される。

### 陽性対照物質のデータ

陽性対照として用いられたエタノールとイミダゾールのヒストリカルデータは、表6に示した通りである。

表6 BCOP試験法の陽性対照物質のヒストリカルデータ

陽性対照	Opacity	OD <sub>490</sub>	In Vitro Score
エタノール (10分暴露)			
平均値 (n=632)	31.2	1.422	52.7
SD	4.8	0.345	6.4
CV	15.3%	24.3%	12.1%
上限・下限値	21.7-40.7	0.742-2.112	39.9-65.4
イミダゾール (4時間暴露)			
平均値 (n=125)	76.4	1.768	103.0
SD	18.4	0.488	16.6
CV	24.1%	27.6%	16.2%
上限値・下限値	39.7-113.2	0.792-2.745	69.7-136.2

陽性対照として用いられたエタノールは、変動が比較的少ないので、試験の成否を判断する標準物質としては適切と考えられる。しかしながら、Draize法の結果との一致性が高くない (偽陽性) ことから、今後、Draize法の結果と一致し、かつ、再現性の高い適切な腐食性・強刺激性を呈する陽性対照物質の選定が必要である。

## 8 試験法のデータの質

バリデーションに用いられた試験の一部は異なるプロトコールで実施されており、また、IVISの平均値のみでSDの報告のない試験法もあるが、ほとんどのBCOP法およびDraize法の試験は、GLPに準拠して実施されている。

## 9 その他の試験法における科学的な報告

バリデーションに用いられた8つの試験以外にもBCOP法の結果を公表している14の文献 (Gautheron et al. 1992, Vanparys et al. 1993, Rachui et al. 1994, Rougier et al. 1994, Sina et al. 1995, Cassidy and Stanton. 1997, Chamberlain et al. 1997, Bruner et al. 1998, Ubels et al. 1998, 2000, 2002, 2004, Cooper et al. 2001, Jones et al. 2001) があるが、被験物質情報の無記載、*in vivo*のデータが無いことなどにより、バリデーションには組み入れられなかった。

## 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・ケトン類および固形物に対する偽陽性・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・ケトン類および固形物等) ではその正確性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・強刺激性物質を評価する試験法として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, Demetrulias 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, Zyrocki 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 Edelhauser 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) 正確性 The closeness of agreement between a test method result and an accepted reference value. (b) 一致度 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:

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

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 “opacitometer.”

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 (特異度):** 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：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 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 分に、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言いがたい。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 $\geq 3$  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。