

- 43) Schneider K, Akkan Z. Quantitative relationship between the local lymph node assay and human skin sensitization assays. 1: Regul Toxicol Pharmacol. 2004, 39, 245-255.
- 44) Warbrick EV, Dearman RJ, Basketter DA, Kimber I. Influence of application vehicle on skin sensitization to methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone: an analysis using the local lymph node assay. Contact Dermatitis. 1999, 41, 325-329.

付録 1: 動物の系統差について

No.	Title	Author	Journal	Year	Vol	No.	pp	Animl	Method	Chemical	Results	Ref
1	Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential.	Kimber I., Mitchell JA., Griffin AC	Food Chem Toxicol	1986	24	585-586		BALB/c male 6-8W	dpm	5% DNCB		original CBAの方が感度が高い(データなし)
2	The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds	NIH Publication		1999	99-4494			CBA/Ca sex: Female 8-12W	dpm			ICCVAMのpeer review
3	OECD guidelines for testing of chemicals. No. 429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay	OECD		2002	429			CBA/Ca sex: Female 8-12W	dpm			OECD guideline
4	Identification of contact allergens using the murine local lymph node assay: comparisons with the Buehler occluded patch test in guinea pigs	Kimber I., Hilton J., Botham PA	J Appl Toxicol	1990	10	3173-80		CBA/Ca sex: ? 6-8W	12.5/25/50 w/v%	24物質/acetone	SIで分類する (sensitizer/equivocal/nonsensitizer)と Buehlerとまあまあ良く一致	Buehler法の結果との比較
5	The murine local lymph node assay: results of an inter-laboratory trial	Kimber I., Hilton J., Botham PA, Basketter DA, Scholes EW, Miller K, Robbins MC, Harrison PT, Gray TJ, Waite SJ	Toxicol Lett	1991	55	2203-13		CBA/Ca sex: ? 8-12W		8 chemicals AOO/ DMSO		UKでのバリデーション
6	Skin sensitization—a critical review of predictive test methods in animals and man	Botham PA, Basketter DA, Maurer T, Mueller D, Potokar M, Bontinck WJ	Food Chem Toxicol	1991	29	4275-86		不明	human, sp. miceの試験方法 review			Review
7	Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens	Basketter DA, Scholes EW	Food Chem Toxicol	1992	30	165-9		CBA/Ca sex: ? 8-12W	SI	40		GPMTの結果との比較
8	The value of the local lymph node assay in quantitative structure-activity investigations	Basketter DA, Roberts DW, Cronin M, Scholes EW	Contact Dermatitis	1992	27	3137-42		CBA/Ca	QSAR/SI/Clog P	brncoalcanes		
9	Results with OECD recommended positive contact sensitizers in the maximization Buehler and local lymph node assays	Basketter DA, Selbie E, Scholes EW, Lees D, Kimber I., Botham PA	Food Chem Toxicol	1993	31	163-7		CBA/Ca sex: ? 8-12W	SI	HCA, MBT, benzocaine		
10	Assessment of the sensitization potential of 10 fragrance salts in the murine local lymph node assay	Mandervelt C, Clottens FL, Demedts M, Nemery B	Toxicology	1997	6	12065-73		BALB/c female 6W	in vitro LLNA SI>2	NaSO4, K2Cr2O7, CoCl2, BeSO4, Na2PtCl6 in DMSO, TD1, oxazolone	SI弱い	
11	Vehicle stability for use as a vehicle in the local lymph node assay	Basketter DA, Kimber I.	Contact Dermatitis	1996	35	3190-1		CBA/Ca sex: ? 6-8W	dpm	vehicle比較	6ヶ月経過 olive oilでも差がない	
12	The murine local lymph node assay: search for an alternative more adequate vehicle than acetone/olive oil (4:1)	Montelius J, Bonan A, Wahlqvist H, Wahlberg JE	Contact Dermatitis	1996	34	6428-30		不明 maybe CBA/CA	dpm, SI	003メーカー, 00/AOO/DMF/Acetone	00のみ、次が DMF	
13	Influence of application vehicle on skin sensitization to methylchloroisothiazoline/methylisothiazoline: an analysis using the local lymph node assay	Warbrick EV, Dearman RJ, Basketter DA, Kimber I	Contact Dermatitis	1999	41	6325-329		CBA/Ca sex: Female 8-12W	LLNA (EC3)	MCI/ MI	溶媒の検討 AOO, MEK, DMSO, DMF, acetone	溶媒の影響
14	A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses	Basketter DA, Lea JL, Briggs D, Plate L., Dearman RJ., Kimber I	J. Applied Toxicol.	1999	19	261-266		CBA/Ca sex: ? 6-12W	LLNA (EC3)	Oxazolone, K2Cr2O7, phenyl benzoate, bronohexadecane, dimethylaminopyrrolamine, isoeugenol, diethyl maleate, HCA, eugenol	室間、室内再現性に優れている	2ラボのバリデーション
15	Skin sensitization, vehicle effects and the local lymph node assay	Basketter DA, Gerberick GF., Dearman R.J., Kimber I	Food and Chemical Toxicol	2001	39	621-627		不明 maybe CBA/CA	LLNA (EC3)	Vehicle によって10倍違う	溶媒の検討 AOO, MEK, DMSO, DMF, PG	溶媒の影響
16	Pre-clinical methods for detecting the hypersensitivity potential of pharmaceuticals: regulatory considerations	Hastings KL	Toxicology	2001	158	85-89		不明	LLNA/GPMT/IgE/PCA/ASA/PLNA		完璧はない	
17	Contact allergenic potency: Correlation of human and local lymph node assay data	Gerberick GF, Robinson MK, Ryan CA, Dearman RJ, Kimber I., Basketter DA, Wright Z, Marks G	Ame. J. Contact Dermatitis	2001	12	3156-161		不明	LLNA (EC3)			HRIPTとの相関良好
18	Measurement of allergenic potency using the local lymph node assay	Basketter DA, Gerberick GF., Kimber I	TRENs in Pharmacological Sciences	2001	22	6264-265		CBA	LLNA (EC3)		animal welfare, 3Rs ヒトと相関良好	

付録 1: 動物の系統差について(続)

No.	Title	Author	Journal	Year	Vol	No.	pp	Animal	Method	Chemical	Results	Ref
19	Classification of contact allergens according to potency: proposals	Kimber I, Basketter DA, Butler M, Gamer A, Garrigue J-L, Gerberick GF, Newsome C, Sterling W, Vohr H-W	Food and Chemical Toxicol	2003		41	1799-1809	不明	LLNA/OECD/ECETOC			
20	A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing	Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Deaman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, Basketter DA	Contact Dermatitis	2004		50	274-288	CBA/Ca sex: F 7-12W	dataset/EC3/ logKo, logKo/w	41 chemicals prohapten	in vitro new method の開発 に役に立つ。	
21	Compilation of historical the local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods	Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Schlatter H, Deaman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, Basketter DA	Dermatitis	2005		16	4 157-202	CBA sex: F 7-12W	dataset/EC3	211	in vitro new method の開発 に役に立つ。	
22	Predictive identification of human skin sensitization thresholds	Jefferies D, Safford B, Ryan CA, Gerberick GF, Dearman RJ, Kimber I	Contact Dermatitis	2005		53	260-267	CBA/Ca sex: ? 7-12W	LLNA (EC3)	26 A00	HRIPTとの相関 良好 dose per unit area	
23	Mechanistic applicability domain classification of a local lymph node assay dataset for skin sensitization	Roberts DW, Patlewicz GY, Kern PS, Gerberick GF, Kimber I, Deaman RJ, Ryan CA, Basketter DA, Aptula AO	Chem Res. Toxicol.	2007		20	1019-1030	不明	LLNA/QSAR	55	reaction mechanism	
24	Extrapolations local lymph node assay EC3 values to estimate relative sensitizing potency	Ryan CA, Chaney JG, Gerberick GF, Kern PS, Deaman RJ, Kimber I, Basketter DA	Cutaneous and Ocular Toxicology	2007		26	135-145	不明 maybe CBA/CA	LLNA (EC3)	片対数		
25	The murine local lymph node assay: Regulatory and potency considerations under REACH	McGarry HF	Toxicology	2007		238	71-89	不明	LLNA/Vehicle /EC3	REACH		
26	ICCVAM evaluation of murine local lymph node assay	Hanake KH, Tice RR, Carson BL, Margolin BH, Stokes WS	Regulatory Toxicol. And Pharmacol.	2001		34	274-286	不明 maybe CBA/CA	human, mice の比較	ICCVAM data		
27	Local Lymph Node Assay: Validation assessment for regulatory purposes	Gerberick GF, Ryan CA, Deaman RJ, Kimber I, Dearman RJ, Lea LJ, Basketter DA	Ame. J. Contact Dermatitis	2000		11	1 3-18	CBA/Ca sex: F 6-16W CBA/Jもok	LLNA/EC3/GPM T/BT/HMT	バリデーション	HMT/GPMT と良い相関、有用な試験法	
28	The local lymph node assay and skin sensitization: a cut-down screen to reduce animal requirement?	Kimber I, Dearman R J, Betts, C J, Gerberick, G F, Ryan CA, Kern PS, Patlewicz GY, Basketter DA	Contact Dermatitis	2007		24	181-185	CBA/Ca sex: F 7-12W	SI	211 chemicals		
29	The local lymph node assay in practice: a current regulatory perspective.	31) Cockshott, A, Evans P, Ryan CA, Gerberick, GF, Betts, CJ, Dearman, RJ, Kimber, I and Basketter, DA.	Human & Experimental Toxicology	2006		25	387-394.	CBA/Ca sex: F 7-12W 最近、CBA/CA male, BALB/c male OK	dpm		OECDとの比較	
30	The popliteal lymph node assay: a tool for predicting drug allergies	Pieters, R	Toxicology	2001		158	65-69	不明				PLNA
31	Activity of human contact allergens in the murine local lymph node assay	Ryan CA, Gerberick GF, Cruse, LW, Basketter DA, Lea, L, Blaikie, L, Dearman RJ, Warbrick, EV, and Kimber I.	Contact Dermatitis	2000		43	95-102	CBA/J or CBA/CA sex: F 6-12W		18 chemicals 11 positive, 7 negative	3 labs validation 16/18 一致	
32	Local lymph node assay - validation, conduct and use in practice	Basketter DA, Evans P, Fielder RJ, Gerberick, GF, Dearman RJ, Kimber I.	Food and Chemical Toxicology	2002		40	593-598	CBA				
33	OECD guidelines for testing of chemicals. No. 406 Skin sensitization	OECD		1992		406		GP				GPMT
34	Development of a modified local lymph node assay using ATP measurement as an endpoint	Yamashita, K, Idehara, K, Fukuda, N, Yamagishi, G and Kawada, N	AATEX	2005		11	2 136-144	CBA/JN female 7-11W	LLNA-DA	DNCB, eugenol, HCA, methyl salicylate. in A00		

付録 2: 溶媒に関して

表 1 には 5 つの感作性物質に対し、種々の溶媒を用いた場合の EC3 とランクを記載した (Warbrick et al., 1999; ZM Wright et al., 2001)。同一被験物質での EC3 値は溶媒間で概ねほぼ同等であるように見えるが、一部の溶媒で EC3 に差異が生じランクが変化する場合が見受けられる。例えば、MCI/MI については、AOO、DMF、MEK、DMSO、Acetone を用いた場合の EC3 が 0.0049~0.0076 でランクは Extreme であるのに対し、PG を用いた場合のみ EC3 が 0.048 でランクが Strong に変化している。Isoeugenol の場合は EC3 の違いはわずかであるが DMSO を用いた場合のみランクが Strong となっている。相対的に DMSO、DMF、MEK が強い反応性、PG が弱い反応性を示しているが、必ずしも全ての被験物質でその傾向が見られるわけではなく、被験物質と溶媒の組み合わせによるというのが現状である。

表 1. 溶媒の違いによる感作性評価への影響

Chemicals		Vehicles							
		AOO	DMF	MEK	PG	DMSO	Acetone	50% EtOH	90% EtOH
MCI/MI ⁴	EC3	0.0049	0.0075	0.0068	0.048	0.0075	0.0076		
	Rank	Extreme	Extreme	Extreme	Strong	Extreme	Extreme		
Isoeugenol ⁶	EC3	1.0	1.4	1.0	2.5	0.9		4.9	1.8
	Rank	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	Strong		Moderate	Moderate
Cinnamic aldehyde ⁹	EC3	1.7	0.5	1.1	1.4	0.9		1.2	1.6
	Rank	Moderate	Strong	Moderate	Moderate	Strong		Moderate	Moderate
3-Dimethylamino propylamine ⁹	EC3	2.2	1.7	1.8	>1.0	3.2		7.1	4.1
	Rank	Moderate	Moderate	Moderate		Moderate		Moderate	Moderate
Dibromo dicyanobutane ⁹	EC3	5.2	6.4	0.4	N.D.	N.A.		N.D.	1
	Rank	Moderate	Moderate	Strong					Moderate

* MCI/MI; Methylchloroisoithiazolinone/Methylisoithiazolinone

付録 3: 皮膚感作性リスクアセスメント

以下に、Api らが LLNA を用いたリスクアセスメントの 4 ステップを示した(AM Api et al., 2006)。

1. Hazard identification; 物質が悪影響を引き起こす可能性の検証

動物実験(LLNA など) のデータやヒト(HRIPT) のデータなどから、化合物が持つ皮膚感作性のポテンシャルを把握する。

2. Dose response assessment; 有害事象が起こる曝露量の把握

許容曝露量 RfD を算出する。

$$RfD = NOEL / UF$$

*NOEL; human RIPT から得られた No effect level * UF; uncertainty factor

*UF は実使用での曝露や、前臨床/臨床評価での曝露との差に基づき算出。

3. Consumer exposure; 実使用時の曝露量の把握

製品形態に応じ、実使用上の曝露条件を把握し、化学物質が実際にどの程度曝露されるかを見積もる。

4. Risk assessment; 実使用時を考慮に入れた危険性の把握

Margin of Safety(MOS)を算出するために、RfD と実使用上の曝露量を比較。MOS が 1 以上であれば基本的安全は確保される。

$$MOS = RfD / \text{consumer exposure}$$

表 2 に Cinnamaldehyde を Active 0.1% で製品に配合した場合のリスクアセスメントの一例を示した。図 1 ではリンスオフ製品としてシャンプーを、リーブオン製品としてオードトワレを例に上げ、上記フローに沿ってリスクアセスメントを実施したところ、シャンプーの場合は MOS が 12.5 となり、1 以上で安全であると推定された。一方オードトワレの場合、MOS は 0.4 で 1 以下となり、安全性を担保することが困難であると推定された。

皮膚感作性の正確なリスク評価は、製品の特性、使用条件をよく理解し、対象物質の感作性ポテンシャルをきちんと把握する必要がある。LLNA の EC3 値は、HRIPT の NOEL と非常に良く相関することから、相対的な皮膚感作性ポテンシャルの決定だけでなく、感作性物質のリスク評価を科学的に行うのにも役立つことが示唆されている。

<Cinnamaldehyde (CA)をActive 0.1%で配合した場合のリスクアセスメントの一例>

1. Hazard identification		
2. Dose response assessment		
EC3 from LLNA	500 µg/cm ²	
NOEL from humanRIPT	591 µg/cm ²	
Potency classification	Moderate	
Default NOEL	100 µg/cm ²	
3. Consumer exposure	Shampoo	Eau de Toilette
製品パラメーター	女性の平均体表表面積 1.69 m ² 全体表面で顔の占める割合 7.1% 顔の表面積 0.12 m ² 半顔(頭皮)の表面積 600 cm ² 全体表面で手の占める割合 5.1% 手の表面積 860 cm ² 1日に使われるシャンプーの量 12g 頭皮に1%残留すると仮定 0.01 (EPA exposure factor handbook: SOGNEP guidance document)	製品から皮膚までの距離 5-20 cm 1push当たりの容量 54-103 mg 暴露面積 23-154 cm ² 表面積当たりの暴露量 0.44-2.58 mg/cm ² (P&G unpublished data)
CAの単位面積当たりの曝露量	$= 1000 \mu\text{g/g} \times 12 \text{g} / 1460 \text{cm}^2$ $= 8.2 \mu\text{g/cm}^2 \times 0.01$ $= 0.08 \mu\text{g/cm}^2$	$= 1000 \mu\text{g/g} \times 0.1\% \times 2.6 \text{mg/cm}^2$ $= 2.6 \mu\text{g/cm}^2$
4. Risk assessment	Shampoo	Eau de Toilette
Uncertainty factor	100 10: 個体間の感受性(HRIPTデータだけでは不十分) 3: 製品の影響(洗剤がCAの経皮透過に作用する) 3: 使用条件(生涯使用、1日1回以上、肌への影響)	100 10: 個体間の感受性(HRIPTデータだけでは不十分) 1: 製品の影響(製品濃度とNOEL試験時の濃度が同じ) 10: 使用条件(Consumer, 長時間暴露、肌への影響)
RfD	$100 (\mu\text{g/cm}^2) / 100 = 1 \mu\text{g/cm}^2$	$100 (\mu\text{g/cm}^2) / 100 = 1 \mu\text{g/cm}^2$
MOS	$1 / 0.08 = 12.5 \gg 1$	$1 / 2.4 = 0.4 < 1$

表 2. Cinnamaldehyde (CA)を Active 0.1%で配合した場合のリスクアセスメントの一例

付録 4: 海外でのピアレビューに関して

海外のピアレビューでは水溶液や混合物の評価はデータ不足のため現状では難しい、単一の試験として感作強度の判別は難しく、感作性の有無の判定のみならば約 80%の精度で可能と記載されている。

また、2007 年 4 月の ESAC による REACH のためのピアレビューでは、LLNA より動物数を削減した reduced LLNA (rLLNA) が承認されている。LLNA は陰性、及び陽性コントロール群、及び 3 濃度 (高、中、低) の被験物質群が必要であるが、rLLNA は陰性コントロール群と被験物質群 (高) のみの試験である。LLNA と比較すると偽陽性はないが、偽陰性はあるとされており、rLLNA の結果だけでは感作性物質のポテンシャルの決定はできず、あくまでもスクリーニング試験として位置づけている。

また、NICEATM、及び ICCVAM は CPSC から LLNA の適用範囲やいくつかの変法に関するバリデーション状況を評価するよう要請され、2007 年 9 月に ICCVAM は LLNA の Performance Standards 案を公表した。非放射性物質による LLNA 変法の適切性、信頼性を評価するための基準を国際的にハーモナイズすることを最終的な目的とするこの Performance Standards 案の作成は、パブリックコメントを経て、その修正案について、本年 3 月に ICCVAM 第三者科学専門家委員会が開催され、LLNA の新たな手法、及び適用方法に関するバリデーション状況、rLLNA のバリデーション状況などの議論が行なわれた。同委員会の見解として、ハザード評価法として rLLNA が使用可能と考えられること、検討した非 RI 手法はいずれも RI を使用する従来の LLNA の代替手法として十分ではないことなどが示された。

医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討委員会 眼刺激性分科会報告

1. 試験名

眼刺激性試験法

2. 検討委員会名簿

平野 耕治	藤田保健衛生大学
畠 賢一郎	株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング
森田 正道	アイリス動物医療センター
萩野 滋延	株式会社 資生堂
金子 豊蔵	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部
瀬戸 洋一	プロクター・アンド・ギャンブル・ジャパン株式会社
小島 肇	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 新規試験法評価室(JaCVAM)

3. 目的

眼刺激性は、被験物質を眼に直接接触させることにより生じる結膜の発赤・浮腫・分泌物、虹彩の変化や角膜の混濁などを指標とする刺激反応であり、眼刺激性試験はヒトが被験物質を粘膜に単回適用、あるいは誤って眼に入れた場合に生じる結膜、虹彩、及び角膜に対する刺激性を予測するために実施される。医薬部外品の製造販売承認申請においては、ウサギを用いた眼刺激性試験¹⁾が示されているが、ヒトへの安全性を担保し、動物愛護の観点で今後の眼刺激性確認のあり方を考え、これまでの動物を用いた試験の代替法が医薬部外品の薬事申請において利用可能であるかについて検討することとなった。

これまで化学物質等のヒトの眼に対する刺激性を評価する方法として、ウサギを用いた眼刺激性試験である Draize 法²⁾が多くの規制当局によって公的に受け入れられており、膨大なデータの蓄積もある。この方法により、多くの物質が評価されヒトの眼に対する刺激性を予測してきたものと考えられるが、一方で、結果が大きく変動する可能性があるなどの問題点も指摘される。

海外においては、2003年に公布された欧州化粧品指令第7次改正[2003/15/EC]で段階的な動物実験の禁止スケジュールが進められ、眼刺激性試験については2009年3月11日以降、動物実験禁止と、動物実験を行った製品、及び原料を含む製品の欧州域内の販売禁止措置が取られており、代替法の公的受け入れが急がれている。

このような状況にあつて、本分科会では、医薬部外品(薬用化粧品)の眼刺激性を評価する上で代替法をどのように活用していくかを検討するにあたり、まず代替される側である Draize の眼刺激性試験に関する情報の確認を行った。そして日本国内、及び海外の眼刺激性試験代替法の研究開発動向を調査し、バリデーションや第三者評価の状況等から有力と考えられる方法を対象として、医薬部外品申請の眼刺激性評価に

おける利用の可能性について検討してきた。その中で、第三者評価は行われていなかったが、過去に厚生科学研究でバリデーションが実施されている細胞毒性試験についてもその内容の確認を行い、代替法評価のための基礎的な情報とした。これらの理解を踏まえた上で、今般、経済協力開発機構(Organization for Economic Cooperation and Development、以下、OECD)においても認証された2種類の^① ウシ摘出角膜の混濁、及び透過性試験、^② ニワトリの摘出眼球試験の検討を行った。

4. 検討した代替法の名称とその理由

4-1. 検討した代替法の名称

ウシ摘出角膜の混濁、及び透過性試験 (Bovine Corneal Opacity and Permeability Test、以下 BCOP 法)
ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験代替法(Isolated Chicken Eye Test Method、以下 ICE 法)

4-2. BCOP 法と ICE 法を検討対象とした理由

眼刺激性に関する国内外の動向を調査した時点において、下記^①~^③に示す通り、BCOP、及び ICE の両法は国際的な認証に向けた動きが活発であり、公的受入れ可能性において有力な方法であると考えた。

- ① 両法は米国・代替法検証省庁間連絡委員会(Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods、以下、ICCVAM)と欧州代替法検証センター(European Centre for the Validation of Alternative Methods、以下、ECVAM)によって検証され、眼腐食性、及び強刺激性評価法として承認されていたこと^{3), 4)}。
- ② 米国がOECDに提案し、ガイドライン化が進められていたこと^{5), 6)}。
- ③ わが国においては、JaCVAM の眼刺激性試験代替法評価委員会が両法の第三者評価を実施していたこと^{7), 8)}。

こうした状況において本分科会は両法が医薬部外品(薬用化粧品)の製造販売承認申請の安全性試験のうち、原料や製品の眼刺激性評価に利用できるかについて検討を行う必要があると判断した。なお、両法は共通して屠場からの組織入手が必要であり、わが国においては屠畜場からの眼球入手や試験利用に制約があることや機器の特殊性等からそれらの方法を日常的に実施することは困難であるが、海外では受託機関が存在し日本からの委託も可能である。

以下、BCOP 法、及び ICE 法に関する国際動向を概説する。

米国では、ICCVAM が2005年に *in vitro* 眼刺激性試験法バリデーション評価のための専門家委員会を開催し、*in vitro* 試験法として、4 種類、BCOP 法、ICE 法、ウサギの摘出眼球試験(The Isolated Rabbit Eye test、以下、IRE 法)、受精鶏卵の漿尿膜試験(The Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane、以下、HET-CAM 法)の試験法を提案、それらの眼刺激性試験代替法の評価を実施した。NTP 代替試験法省庁間センター(NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods、以下 NICEATM)は2006年11月にこれら 4 種類の眼刺激性試験代替法の最終試験法評価報告書⁹⁾を公表し、^①4 法はいずれも *in vivo* 試験法を代替する方法とはならないが、^②BCOP と ICE の両法は眼腐食性、及び強度刺激性物質のスクリーニング法として限定的使用できるものとして挙げられ、^③HET-CAM と IRE の両法については眼腐食性や強い眼刺激性物質を同定するためには試験方法や判断基準の最適化、追加バリデーションが必要であることを報告している。2007年10月には公的受け入れについて検討するため最終試験法評価報告書とバックグラウンドレビュードキュメント(Background Review Document、以下、BRD^{10), 11)}が関連省庁に送られ、2008年6月、米国国立衛生研究所(National Institute of Health、NIH)は米国消費者製品安全

委員会 (Consumer Product Safety Commission、CPSC)、米国環境保護局 (Environmental Protection Agency、EPA)、及び米国医薬品食品庁 (Food and Drug Administration、FDA) が米国危険物質法 (Federal Hazardous Substance Act, 15 U.S.C. 1261-1278) の下で実施されるラベル表示に BCOP と ICE の両法を適用することを了承すると発表した³⁾。BCOP 法、又は ICE 法のどちらかの試験の結果、陽性となった場合、その化学物質を眼腐食性・強眼刺激性に分類することができるというものである。

欧州においては、ECVAM 科学諮問委員会 (ECVAM Scientific Advisory Committee、以下、ESAC) が腐食性、及び強刺激性物質を検出する眼粘膜刺激性試験代替法として BCOP と ICE の両法を承認した⁴⁾。BCOP 法、又は ICE 法のいずれかを実施し、陽性結果が得られた場合には、その化学物質を R41 (強度眼刺激性) に区分することを受け入れている。消費者向けの化粧品、及び非食品に関する科学委員会 (Scientific Committee on Cosmetics and Non-Food Products、SCCNFP、現 Scientific Committee on Consumers Safety; SCCS) は化粧品成分の安全性確認のため実施する毒性試験についてガイドラインを策定している¹²⁾。その中で、眼刺激性試験は、従来の Draize 眼刺激性試験の代わりになるような方法は存在しないが、BCOP 法が中性の有機化学物質に関して適当としている。

OECD では、BCOP 法、及び ICE 法のガイドライン案^{13)、14)}が2008年に提出されており、腐食性、及び強刺激性物質を検出するための眼刺激性試験の代替法としてのガイドライン化が行われた。また、専門家会合において Proficiency Standard 熟練標準を追加することが合意され、2009年3月30日に開催された 21st Meeting of the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Programme で、試験ガイドラインとして認証されるに至った^{5)、6)}。2009年9月に OECD は BCOP 法を OECD Test Guideline 437¹⁵⁾、ICE 法を OECD Test Guideline 438¹⁶⁾として採択した。

わが国においては、JaCVAM が2008年度の JaCVAM 第三者評価会議 (眼刺激性試験代替法評価委員会) で BCOP 法、及び ICE 法についてそれぞれ第三者評価を実施し、ICCVAM の BRD 等に基づき、わが国の GHS に準拠する化学物質に関わる法規制において、両法が眼腐食性・強刺激製物質を評価することが可能であるとの報告を行っている^{7)、8)}。

5. 試験法

5-1. BCOP 法の概要

本法はウシ眼球から採取した角膜を用い、被験物質の眼刺激性を評価する方法であり、ウサギを用いた眼刺激性試験の代替法として開発された。眼刺激性の段階的評価法の一つとして、眼腐食性、又は強刺激性を有する物質 (欧州連合 R41、米国環境保護庁 US EPA カテゴリー1、化学品の分類及び表示に関する世界調和システム (GHS) カテゴリー1) を検出することを目的としている。本法で実施した試験において腐食性、又は強刺激性を有すると評価された場合は、追加試験を実施することなく、その物質は「眼腐食性、又は強刺激性を有する物質」と分類することができる。BCOP 法¹³⁾の試験法詳細については、別添1を参照。

5-2. ICE 法の概要

本法は、ニワトリから摘出した眼球を用い、被験物質を曝露した後に角膜に生じる変化から、被験物質の眼刺激性を評価する方法であり、ウサギを用いた眼刺激性試験の代替法として開発された。

眼刺激性の段階的評価法の一つとして、眼腐食性、又は強刺激性を有する物質 (欧州連合 R41、米国環境保護庁 US EPA カテゴリー1、化学品の分類及び表示に関する世界調和システム (GHS) カテゴリー1) を検出することを目的としている。本法で実施した試験において腐食性、又は強刺激性を有すると評価された

場合は、追加試験を実施することなく、その物質は「眼腐食性、又は強刺激性を有する物質」と分類することができる。ICE 法¹⁴⁾の試験法詳細については、別添2を参照。

6. Draize 試験に関する考察

過去に厚生科学研究において実施された Draize 試験のデータを用いて、これまでに詳細に検討されていなかった最大平均評価点 (Maximum Average Score、以下 MAS) と回復時間の関係について検討した。その結果、濃度 10% で適用された被験物質 34 品において MAS と回復時間の間に対応関係が認められ、MAS 15 点以下であれば、ほぼ 7 日以内に回復していた。MAS 15 点は眼刺激性の指標として有用な指標となる可能性が示唆された。また、MAS 5 点以下であれば、7 日以内に回復しない事例は認められず、こちらも一つの指標となる可能性が示唆された。pH 2 以下、及び 11.5 以上の物質の中には、回復が著しく遅い場合が認められた。10% 乳酸水溶液は pH 1.94 であり、MAS 9.7 点にも関わらず 7 日後にも回復しなかった。なお、厚生科学研究で実施された濃度 10% 以外の Draize 試験データ (n=21) においても、同様に MAS 15 点以下であれば、ほぼ 7 日以内に回復することが確認された。

厚生科学研究における同じ Draize 試験のデータを用いて、眼の各部位の反応についても検討した。その結果、以下のようなことが確認された。

- ① 結膜が他の部位(角膜、虹彩)に比較して感受性が高かった。
- ② 結膜のみの反応であれば、7 日以内に回復した。
- ③ 角膜に反応が認められる場合では、7 日を超え回復が遅れる場合が認められた。
- ④ 虹彩は角膜に傷害が無いときには反応は認められず、角膜の傷害に伴って反応が認められる傾向があった。

これらの結果より、眼に対する安全性を考える上で、角膜の反応を重要視するべきであることが示唆された。化学物質による角膜の傷害は、細胞毒性とバリア機能の破壊が主たる機序であるので、それらを評価する *in vitro* 試験の必要性が示唆された。

厚生科学研究における同じ Draize 試験データについて、世界調和システム (Global Harmonization System、以下、GHS) による分類を検討した。厚生科学研究ではウサギの眼の観察期間を 14 日目までとしたため、21 日目までのデータが存在せず、GHS 基準による 1 (強度刺激性) と 2A (刺激性) の違いを判別できなかったが、2B (刺激性) と NI (無刺激性) の違いについては判別可能であった。この 2B (刺激性) と NI (無刺激性) を判別する境界は概ね Draize 試験の MAS 15 点であった。GHS の刺激性と無刺激性を判別する境界が MAS 15 点であることは Van Goethem ら (2006)¹⁷⁾ の文献データと一致していた。したがって、MAS 15 点以下となることを予測できる *in vitro* 試験法であるならば、GHS にも合致している試験法であると考えられた。

一方、眼刺激性を評価するうえで、重要な事項と考えられるウサギとヒトの反応性の違いを文献により確認した。Feeberg ら (1986)¹⁸⁾、Roggeband ら (2000)¹⁹⁾ の報告に基づき、概ねウサギの眼はヒトよりも感受性が高いことを確認した。ウサギは①角膜が薄く、②涙の量が少なく、③ヒトにはあるボーマン層が無く、④内皮は再生し(ヒトは再生しない)、⑤瞬膜があるなどの特徴がある。また、鼻涙管はヒトでは二つであるのに対してウサギでは一つであり、しかも通路が曲がりくねっているため、流れにくく、つまりやすい構造であり、化学物質の貯留性が長くなる可能性もある。これらの構造的な違いが両者の感受性の違いに影響しているものと考えられた。ウサギの眼がヒトよりも概ね感受性が高いことにより、ウサギの眼の反応を代替することにより、ヒトに対する安全性も確保できることが改めて確認された。

わが国においては厚生科学研究で細胞毒性試験による眼刺激性代替試験法のバリデーション研究が過

去に実施されており、この研究結果を確認し Draize 法の代替法を評価するための基礎的な情報とした。なお、厚生科学研究の細胞毒性試験法としては、ウサギ角膜由来細胞 (SIRC) を用いた細胞毒性試験 (以下、SIRC 細胞毒性試験) と三次元培養真皮モデル (MATREX™) を用いる試験 (以下、三次元培養真皮モデル試験と記載) があり、大野らの論文²⁰⁾を中心に既存の論文、報告書等の情報に基づいて検討した。SIRC 細胞毒性試験は化粧品、薬用化粧品原料のすべてに適用可能とはいえないが、試験法の特性を理解して用いるならば、それらの原料が 10% の濃度で眼刺激性がわずかであることを予測できることが確認された。また、三次元培養真皮モデルも化粧品、薬用化粧品原料の評価に有用であることが確認された。SIRC 細胞毒性試験、三次元培養真皮モデルは、両者を組合せた場合も含め、化粧品、薬用化粧品原料の眼刺激性評価に有用であると考察した。これら試験法については今後 JaCVAM の第三者評価委員会の評価が実施された場合に、その検討結果も踏まえつつ、医薬部外品 (薬用化粧品) の眼刺激性評価への活用方法をさらに検討する必要がある。

7. 試験法としての採用の可否

Draize 試験の検討結果も踏まえて、BCOP、及び ICE 両法の医薬部外品製造販売承認申請への適用の可能性について眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書^{7), 8)}の内容に基づいて検討した。BCOP 法、ICE 法それぞれの検討結果を以下に述べる。

7-1. BCOP 法

第三者評価の報告等から、当分科会で検討した本試験法の長所、及び短所については別添3を参照。本法の医薬部外品承認申請における眼刺激性試験法としての受け入れ可能性について以下に示す。

BCOP 法の医薬部外品承認申請における眼刺激性試験法としての受け入れ可能性

ICCVAM の BRD¹⁰⁾によると、BCOP 試験法の正確性は、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一致度、感度、及び特異度はそれぞれ 81%、84%、及び 80% であった。偽陽性率、及び偽陰性率はそれぞれ 20%、及び 16% であった。一致度の低いアルコール類・ケトン類・固体物質を除くと一致度、偽陽性率、及び偽陰性率はそれぞれ 92%、12%、及び 0% となり、腐食性・強刺激性の検出精度としては十分高いと判断された。試験法の信頼性は、施設間・内変動において良好な結果が得られており、十分であると判断された。海外の評価機関における本法に関する評価結果としては、米国において ICCVAM-NICEATM は眼腐食性又は重度の眼刺激性を検出する方法として、その正確性、信頼性は十分にあると判断されており、また、欧州連合 ESAC も ICCVAM の評価過程が適切に行われており、本試験で陽性の結果から EU R41 へ分類することができると判断された。

眼刺激性試験代替法評価委員会では、特定の化学物質 (アルコール類、ケトン類、及び固体物質) における本試験法の限界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、及び強刺激性物質をスクリーニングする目的のために BCOP 法を使用することに問題はないと判断され、わが国の GHS に準拠する化学物質に関わる法規制において、BCOP 法により腐食性・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ことが示された⁷⁾。

以上の通り、BCOP 法はバリデーションと第三者評価の結果、眼腐食性・強刺激性物質のスクリーニングに利用可能と判断されている。6で考察した通り、医薬部外品製造販売承認申請に Draize 法の代替として用いられるためには MAS15 点付近を境界線とする弱刺激性・無刺激性の判定可能性について評価する

必要があるが、これまでのバリデーションや第三者評価等では実施されていない。

これより、現時点においては医薬部外品(薬用化粧品)の眼刺激性試験法として受入るためには、BCOP法について弱刺激性物質・無刺激性物質を判定できるか否かについての科学的評価が必要であると考えている。

今後、BCOP法が弱刺激性物質、無刺激性物質を判定できる試験法として第三者評価等で認められた場合には、その結果に基づき本分科会で医薬部外品製造販売承認申請のための眼刺激性試験としての利用の可能性を再度検討することとした。

7-2. ICE法

第三者評価の報告等から、当分科会で検討した本試験法の長所、及び短所については別添4を参照。本法の医薬部外品承認申請における眼刺激性試験法としての受け入れ可能性について以下に示す。

ICE法の医薬部外品承認申請における眼刺激性試験法としての受け入れ可能性

ICCVAMのBRD¹⁾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一致度、感度、及び特異度はそれぞれ83%、50%、及び92%であった。一方、偽陽性率、及び偽陰性率とも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、及び界面活性剤を除外すると、一致度、偽陽性率、及び偽陰性率は、それぞれ92%、6%、及び29%となり、ICE法による腐食性、及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言えないものの、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。

眼刺激性試験代替評価委員会では、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、及び界面活性剤等)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、及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ものと判断した。そして、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法によって腐食性・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ことが示された⁸⁾。

以上の通り、ICE法はバリデーションと第三者評価の結果、眼腐食性・強刺激性物質のスクリーニングに利用可能と判断されている。6で考察した通り、医薬部外品製造販売承認申請にDraize法の代替として用いられるためにはMAS15点付近を境界線とする弱刺激性・無刺激性の判定可能性について評価する必要があるが、これまでのバリデーションや第三者評価等では実施されていない。また、医薬部外品(薬用化粧品)でも使用される界面活性剤について偽陰性率が高いことが示されており、BCOP法と比較したときに、その適用範囲が限られる可能性も考えられた。

これより、現時点においては医薬部外品(薬用化粧品)の眼刺激性試験法として受入るためには、ICE法について弱刺激性物質、無刺激性物質の判定可能性に関する科学的評価が必要であると考えている。

今後、ICE法が弱刺激性・無刺激性物質を判定できる試験法として第三者評価等で認められた場合には、その結果に基づき本分科会で医薬部外品製造販売承認申請のための眼刺激性試験としての利用の可能性を再度検討することとした。

8. まとめ

BCOP、及び ICE 両法は化学物質の腐食性、及び強刺激性物質をスクリーニングする目的において使用することについては問題ないと判断され、GHS に関する化学物質規制において、腐食性、及び強刺激性物質を判定する目的での使用については可能と考えられている^{7), 8)}。

一方、医薬部外品においては、Draize 試験における MAS15点を境界線とした弱刺激性、無刺激性を確認する必要があると考えられることから、現時点においては医薬部外品(薬用化粧品)の眼刺激性試験として公的受入れのための科学的評価は十分に行われていないものとする。

今後、弱眼刺激性物質・無刺激性物質を評価できる試験法として、バリデーションや第三者評価が終了した場合には、再度、医薬部外品製造販売承認申請における安全性試験・眼刺激性評価法としての公的受け入れ可能性について検証する意義があるものとする。

本報告で取り上げた BCOP 法、及び ICE 法以外にも、国内・外において各種代替試験法のバリデーションと第三者評価が活発に進められている状況にあり、評価された方法の中から弱刺激性・無刺激性物質の評価法として検討がされたものがあれば、同様に医薬部外品製造販売承認申請における安全性試験・眼刺激性評価としての公的受け入れの可能性について検証する。

なお、それらの試験法は長所・短所等の特性を理解したうえで、代替法試験の医薬部外品承認申請における安全性試験(眼刺激性)への組み入れ方についても検討するべきとする。

9. 参考文献

- 1) 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2008、薬事日報社、2008
- 2) Draize, J.H. (1959) Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics, Association of Food and Drug Officials of the United States
- 3) NIH Press Release (June 23, 2008): Newly Approved Ocular Safety Methods Reduce Animal Testing
<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/transmit/OcularfinalJune23.pdf>
- 4) EC (2004) Manual of Decisions for Implementation of the 6th and 7th Amendments to Directive 67/548/EEC on Dangerous Substances. Updated version of July 2004. 189pp.
- 5) Draft proposal for a new test guideline: The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test method for identifying ocular corrosives and severe irritants, OECD ENV/JM/TG(2009)29, February 19, 2009
- 6) Draft proposal for a new test guideline: The Isolated Chicken Eye (ICE) test method for identifying ocular corrosives and severe irritants, OECD ENV/JM/TG(2009)30, February 19, 2009
- 7) 眼刺激性試験代替法評価委員会、眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書—評価対象試験：ウシ摘出角膜の混濁および透過性試験(BCOP: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test)、平成21年10月21日
- 8) 眼刺激性試験代替法評価委員会、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10月21日
- 9) ICCVAM Test Method Evaluation Report: *In vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Severe Irritants and Corrosives, NIH Publication No. 07-4517, November 2006
http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/OTeval/OTevalrpt.pdf

- 10) Background Review Document – Current Status of *In vitro* Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method, NIH Publication No. 06-4512, March 2006
- 11) Background Review Document – Current Status of *In vitro* Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method, NIH Publication No. 06-4513, March 2006
- 12) Part B: Methods for the determination of toxicity, Annex V to Directive 67/548/EEC
<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/testing-methods/annex5/>
<http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Testing-Methods/ANNEXV/B05web2004.pdf>
- 13) Draft Test Guideline for the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants (2008)
<http://www.oecd.org/dataoecd/37/8/41896718.pdf>
- 14) Draft Test Guideline for the Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants (2008)
<http://www.oecd.org/dataoecd/37/10/41896968.pdf>
- 15) OECD Test Guideline 437, Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants (2009)
- 16) OECD Test Guideline 438, Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants (2009)
- 17) Van Goethem, F., Adriaens, E., Alepee, N., Straube, F., De Wever, B., Cappadro, M., Catoire, S., Hansen, E., Wolf, AS., and Vanparys, P. (2006). Pre-validation of a new *in vitro* reconstituted human cornea model to assess the eye irritation potential of chemicals., *Toxicology in Vitro* 20(1), 1-17
- 18) Freeberg, F.E., Hooker, D.T., and Griffith, J.F. (1986) Correlation of animal eye test data with human experience for household products; An update. *Journal of Toxicology – Cutaneous and Ocular Toxicology* 5(2), 115-123
- 19) Roggeband, R., York, M., Pericoi, M., and Braun, W. (2000) Eye irritation responses in rabbit and man after single applications of equal volumes of undiluted model liquid detergent products. *Food Chemical Toxicology* 38(8), 727-734
- 20) Ohno, Y., Kaneko, T., Inoue, T., Morikawa, Y., Yoshida, T., Fujii, A., Masuda, M., Ohno, T., Hayashi, M., Momma, J., Uchiyama, T., Chiba, K., Ikeda, N., Imanishi, Y., Itagaki, H., Kakishima, H., Kasai, Y., Kurishita, A., Kojima, H., Matsukawa, K., Nakamura, T., Ohkoshi, K., Okumura, H., Saijo, K., Sakamoto, K., Suzuki, T., Takano, K., Tatsumi, H., Tani, N., Usami, M., and Watanabe, R. (1999). Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicology in Vitro* 13, 73-98.

10. 分科会検討会議

回数	開催日	概要
第1回	平成19年10月15日	<ul style="list-style-type: none"> ■ 医薬部外品の安全性評価と動物実験代替法を用いた安全性評価体制確立 ■ 代替法の現状と将来について
第2回	平成19年12月12日	<ul style="list-style-type: none"> ■ 眼刺激性試験代替法開発のこれまでの流れ ■ 眼刺激性試験及び代替法開発の質疑応答
第3回	平成20年2月13日	<ul style="list-style-type: none"> ■ ヒト角膜傷害や痛みについて ■ 代替法の国際動向概要
第4回	平成20年4月30日	<ul style="list-style-type: none"> ■ ウサギの角膜について ■ Draize 試験の解析
第5回	平成20年7月2日	<ul style="list-style-type: none"> ■ 欧米の状況と今後の予定 ■ 厚生科学研究ガイダンス案
第6回	平成20年9月17日	<ul style="list-style-type: none"> ■ 試験法の第三者評価委員会眼刺激性試験との合同会議 ■ BCOP 法、及び ICE 法の検討
第7回	平成20年10月15日	<ul style="list-style-type: none"> ■ 細胞を用いた眼刺激性評価の検討 ■ あり方検討委員会の今後の内容について
第8回	平成21年1月21日	<ul style="list-style-type: none"> ■ OECD、及び ECVAM の状況について ■ 日本動物実験代替法学会の結果報告と確認
第9回	平成21年4月22日	<ul style="list-style-type: none"> ■ 第三者評価委員会・眼刺激性分科会の BCOP 法、及び ICE 法に関する報告書に基づく本分科会としての検討

別添1 BCOP 法 試験法概説

1) 眼球の入手

主に食用目的で屠場にて処分されたウシから新鮮な眼球を入手する。摘出された眼球は、適切な保存条件により試験実施施設に運搬する。

2) 角膜の準備

角膜の損傷を目視で確認後、強膜を2~3mm残して角膜を摘出し、前・後部2つのコンパートメントからなる専用チャンバーに設置する。チャンバーを培地で満たし、 $32 \pm 1^\circ\text{C}$ で1時間培養する。1時間後、新しい培地に入れ替え、光透過度をオパシトメーターで測定し、角膜に損傷が確認されたもの以外を試験に使用する。

3) 投与

被験物質が液体の場合、界面活性剤は10%希釈液を、それ以外は100%(未希釈)を使用する。被験物質が固体の場合は、20%の溶液、又は懸濁液を調製する。培地を除いた角膜上皮側のチャンバーに、被験物質を注入し $32 \pm 1^\circ\text{C}$ で液体被験物質は10分間、固体被験物質は4時間培養する。培養後、被験物質を取り除き、培地で洗う。液体被験物質は再び新しい培地を注入し $32 \pm 1^\circ\text{C}$ でさらに2時間培養する。

4) 測定

4-1) 混濁度(Opacity)

被験物質を取り除いた直後と、液体の場合は2時間の培養後、角膜の混濁度を測定する。チャンバー内を新しい培地と入れ替え、角膜の光透過度をオパシトメーターで測定する。

4-2) 透過性(Permeability)

混濁度を測定した後、液体被験物質の場合は0.4%、固体被験物質の場合は0.5%のフルオレセインナトリウム溶液を前部チャンバーに注入し、90分後、後部チャンバーに透過したフルオレセインナトリウムを分光光度計で測定(OD_{490})する。

4-3) 組織病理学的評価

透過性を測定後、固定・染色し、角膜の損傷を観察する。

5) 判定

以下の計算式を用いて *In Vitro* Irritancy Score を計算する。混濁度は各角膜で得られた光透過度について、投与前の測定値で調節し、さらに、陰性対象の平均光透過度で最終調整を行い、その後、各投与群の平均値を求める。透過性は各角膜で得られた OD_{490} 値について陰性対象で調節し、その後、各投与群の平均値を求める。

(計算式) *In Vitro* Irritancy Score (IVIS) = 平均混濁度 + (15 x 平均透過性)

IVIS が ≥ 55.1 となる場合、強度の眼刺激性があると判定される。また、平均透過性(mean OD_{490}) が > 0.600 となる場合も強度の眼刺激性があると判定される。

別添2 ICE 法 試験法概説

1) 眼球の準備

主に食用目的で屠場にて処分された若鳥(7週齢程度、2.5~3.0kg、雌雄の区別無し)を使用する。屠場から試験施設までは屠殺後2時間以内に運搬可能な条件とする。屠殺された後の鶏頭部は生理食塩水で浸潤した紙を敷いた箱に入れ運搬する。

2) 眼球の使用前検査と前処理

試験施設に到着後、フルオレセイン染色による角膜検査実施。角膜に損傷がなければ、頭部から眼球を摘出。眼球をステンレス製のクランプに固定し、ICE 法検査装置に設置(11個の眼球を設置)。32±1.5°Cの生理食塩水を1分間に0.1~0.15mL(2~3滴)の流速で眼球を浸潤。角膜の腫脹(corneal swelling)を検査し、平均値の10%を逸脱するものは除く。その後、45~60分間馴化し再測定(zero reference)する。

3) 投与

固定器に設置した眼球を上向きにして、被験物質が液体の場合には30μL、固定の場合には30mgを曝露し、10秒後に20mLの生理食塩水で洗い流す。

4) 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、液体ともに原体、及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。

5) 眼の検査(ICE 法評価項目)

5-1) 角膜腫脹(角膜の厚さ)(corneal swelling)

光学的厚度計(optical Pachymeter)を装着した細隙灯顕微鏡を用いて検査する。

百分率で表示。投与後30分、75分、120分、180分、240分で検査を実施する。

5-2) 角膜混濁(corneal opacity)

細隙灯顕微鏡を用いて検査する。0~4段階の評価点で評価する。

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

投与後30分で細隙灯顕微鏡を用いて検査する。0~3段階の評価点で評価する。

5-4) 角膜の組織学的変化(morphological effects)

試験終了後、角膜組織を固定し、標本作製。

6) 判定

角膜腫脹の変化、角膜混濁の評価点、及び角膜のフルオレセイン染色性の評価点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、角膜混濁が3以上(2眼球)、いずれの観察時期でも4(2眼球)の場合、フルオレセインの染色性が重度の角膜上皮欠損(1眼球)となった場合には腐食性・強刺激性と判定される。

別添3 BCOP 法の長・短所について

長所

- Draize 法は角膜への影響に評価の重みをおいているが、ウシ眼球から採取した角膜を用いる本試験法も、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考えられる。
- 被験物質の角膜への直接的な作用を評価することから、生体における防御機構を介すことなく、角膜への損傷をより過酷な条件下で検討することができる。
- オパシトメーターによる角膜の光透過度や、分光光度計によるフルオレセインナトリウムの角膜透過性の測定を行うため、客観的なデータに基づく評価方法である。
- *In vitro* 試験であるため、被験物質の適用が簡便である。
- 測定操作方法は、混濁度、透過性、ともに簡便である。(特に病理組織学的評価をしない場合)。
- 角膜に対する被験物質の作用を複数(2つ)のパラメーターで評価し、眼刺激性の予測を行う。
- 一連の操作を通常業務内に実施することができる。
- 判定方法が客観的である。
- 動物で眼刺激を行う前に実施されるならば、刺激性をあらかじめ予測することで、結果として動物が受ける苦痛の除去(refinement)に貢献するものである。
- 陽性物質のスクリーニングという点においては、動物使用の抑制(reduction)にもつながるものと考えられる。
- 施設内・施設間での再現性も良好であり、陽性(腐食性・強刺激性)物質の検出ができる。
- 技術的な移転は比較的容易であると考えられる。

短所

- ヒト、ウサギおよびウシの角膜には解剖学的・生理学的な違いがあり、この違いによるヒト眼刺激性予測への影響は明確ではない。
- 虹彩や結膜への影響は評価されない。また、回復性も観察することができない。これらの評価については、病理組織学的評価法を組み入れるなどの検討が必要と考えられる。
- 定性的な評価は標準操作法には含まれない。また実施する場合、病理組織学的評価については、手技、観察、評価において、専門性・経験を必要とする。
- わが国においては、ウシ眼球が BSE 集積危険部位とされ、屠畜場法上、日常的なウシ眼球の入手は現時点では困難であると考えられる。
- 試験を委託した場合、期待される大幅な費用削減にはならず、BRD 報告では、1被験物質あたり2050~4500米ドル。
- 現時点では腐食性・強刺激性物質の判定のための方法であり、部外品の申請への利用性を考察する上では、今後、中度、軽度の眼刺激性物質、及び無刺激性物質の評価法としての検討が必要。

別添4 ICE 法の長・短所について

長所

- Draize 法は角膜への影響に評価の重みをおいているが、ニワトリから摘出した眼球を用いる本試験法も、評価対照部位として角膜であり、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考えられる。
- 被験物質の角膜への直接的な作用を評価することから、生体における防御機構を介すことなく、角膜への損傷をより過酷な条件下で検討することができる。
- *In vitro* 試験であるため、被験物質の適用が容易である。
- 角膜の腫脹(Corneal Swelling)については光学的厚度計を用いた客観的な評価が取り入れられている。
- 角膜に対する被験物質の作用を複数(3つ)のパラメーターで評価し、眼刺激性の予測している。
- ICE 法で使用されている眼球試料は、試験目的ではなく食用として屠殺されたニワトリの眼球を用いているため、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)。
- 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)。
- ICE 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)。
- 動物が受ける苦痛の除去(refinement)、使用動物数の削減(reduction)、及び不必要な動物試験の回避(reduction)が達成できる。
- 一連の操作を通常業務内に実施することができる。
- 判定方法は測定結果に基づき簡易である。
- 施設間再現性において良好な結果が得られている。

短所

- ヒト、ウサギ、及びニワトリの角膜に解剖学的・生理学的な違いがあり、この違いによるヒト眼刺激性予測への影響は明確ではない。
- 回復性の評価については、病理組織学的評価法を組み入れるなどの検討が必要と考えられる。
- 虹彩や結膜への影響は評価されない。
- 特別なチャンバーが必要であり、現時点では実施施設も限られ、技術移転についても課題がある。
- 屠殺場から2時間以内に試験施設が必要であり、ハード面での整備の必要性がある。
- 定性的な評価(角膜混濁度、フルオレセイン染色性、病理組織学的評価)については、主観的であり、その標準化が必要と考えられ、また、手技、観察、評価において、専門性・経験を必要とする。
- 現時点では腐食性・強刺激性物質の判定のための方法であり、部外品の申請への利用性を考察する上では、今後、中度、軽度の眼刺激性物質、及び無刺激性物質の評価法としての検討が必要。
- 医薬部外品(薬用化粧品)でも使用される界面活性剤について偽陰性率が高いことが示されており、BCOP法と比較してより適用範囲が限られる可能性がある。