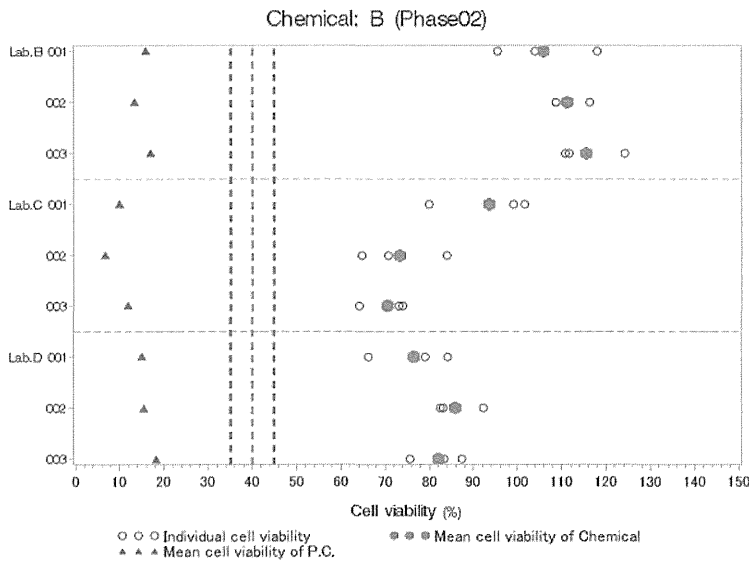


315 3.4 被験物質

316 3.4.1 生細胞率

317 SAS を用いて算出した各被験物質の 1 組織生細胞率と生細胞率平均、陽性対
 318 照の生細胞率平均を図 7~10 に示す。この時、刺激性の判定基準値となる 40%
 319 の値と 35%と 45%の値を点線で同じ図に表した。また、各被験物質の 1 組織生
 320 細胞率と精細胞率平均、生細胞率の標準偏差を表 15~18 に示す。

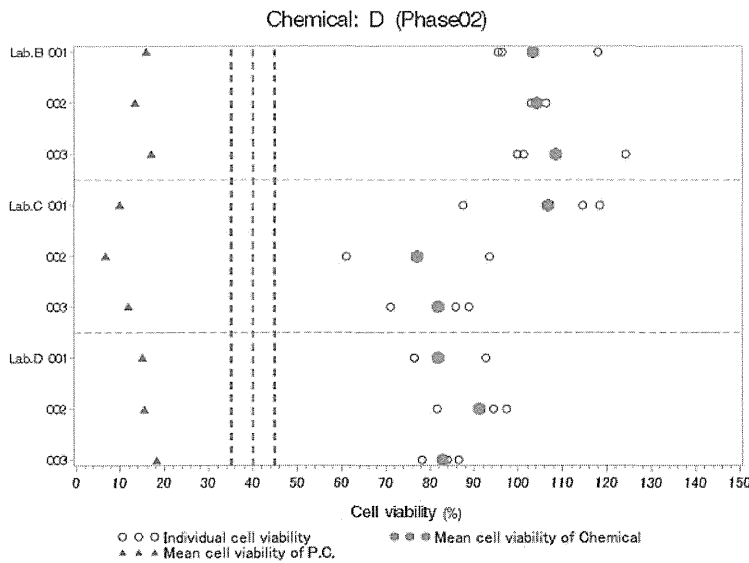
321



322

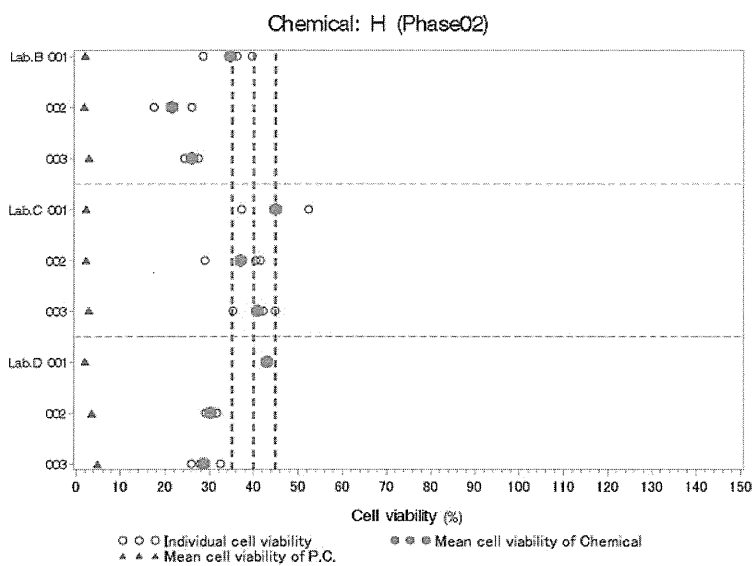
323 図 7 : Liquid B の 1 組織生細胞率と生細胞率平均、および陽性対照の生細胞率平均

324



325

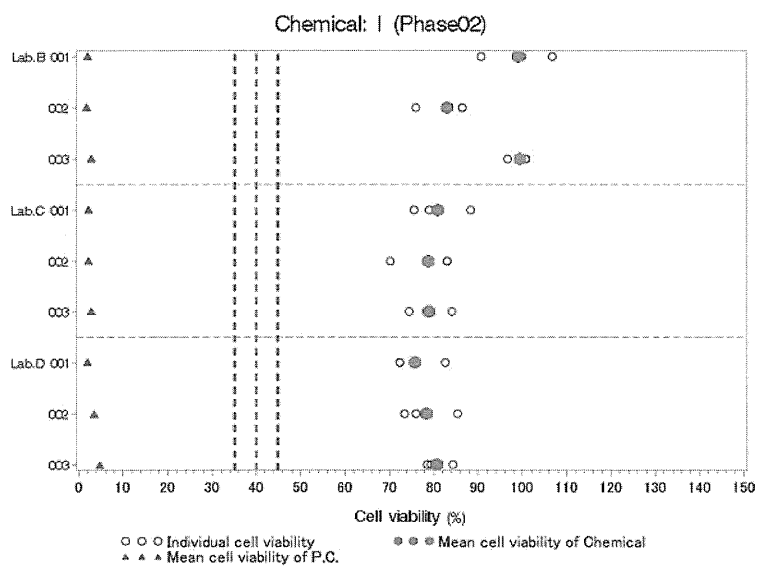
326 図 8 : Liquid D の 1 組織生細胞率と生細胞率平均、および陽性対照の生細胞率平均



327

328 図 9 : Solid H の 1 組織生細胞率と生細胞率平均、および陽性対照の生細胞率平均

329



330

331 図 10 : Solid I の 1 組織生細胞率と生細胞率平均、および陽性対照の生細胞率平均

332 表 15 : Liquid B の生細胞率平均と標準偏差

Lab.	Repeat	Individual (1)	Individual (2)	Individual (3)	Mean	SD
B	1	95.5	118.2	103.9	105.9	11.4
	2	116.4	108.8	108.8	111.3	4.4
	3	110.8	111.6	124.3	115.6	7.6
C	1	79.8	99.1	101.7	93.6	12.0
	2	70.8	64.8	84.0	73.2	9.8
	3	64.1	74.0	73.0	70.4	5.4
D	1	84.1	66.3	79.0	76.5	9.2
	2	83.1	92.2	82.4	85.9	5.5
	3	83.2	75.6	87.4	82.1	6.0

333

334

335 表 16 : Liquid D の生細胞率平均と標準偏差

Lab.	Repeat	Individual (1)	Individual (2)	Individual (3)	Mean	SD
B	1	118.2	96.4	95.5	103.4	12.8
	2	102.8	103.7	106.2	104.2	1.8
	3	124.3	99.7	101.3	108.4	13.7
C	1	118.5	114.6	87.6	106.9	16.8
	2	93.6	76.8	61.2	77.2	16.2
	3	85.9	88.8	71.1	81.9	9.5
D	1	92.6	76.5	76.5	81.9	9.3
	2	81.6	97.5	94.5	91.2	8.4
	3	84.0	78.2	86.6	82.9	4.3

336

337 表 17: Solid H の生細胞率平均と標準偏差

Lab.	Repeat	Individual (1)	Individual (2)	Individual (3)	Mean	SD
B	1	28.6	39.5	36.1	34.7	5.6
	2	20.9	17.4	25.8	21.4	4.2
	3	24.2	25.8	27.5	25.8	1.7
C	1	37.2	45.3	52.3	45.0	7.6
	2	28.8	40.4	41.5	36.9	7.0
	3	44.9	42.0	35.4	40.8	4.9
D	1	42.6	42.6	43.5	42.9	0.5
	2	29.9	31.6	29.1	30.2	1.3
	3	27.8	32.6	25.9	28.8	3.5

338

339

340 表 18: Solid I の生細胞率平均と標準偏差

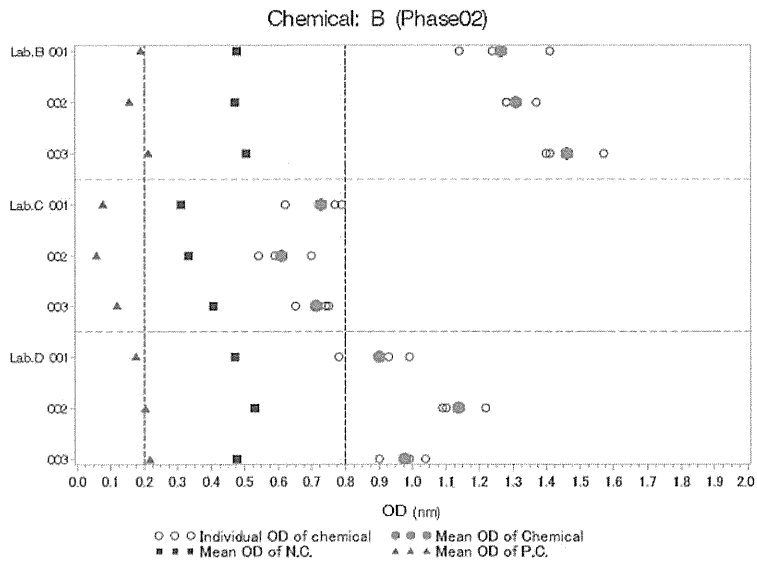
Lab.	Repeat	Individual (1)	Individual (2)	Individual (3)	Mean	SD
B	1	106.7	100.0	90.8	99.2	8.0
	2	86.5	86.5	76.0	83.0	6.0
	3	100.8	100.8	96.7	99.4	2.4
C	1	88.4	75.6	79.1	81.0	6.6
	2	70.4	83.1	83.1	78.8	7.3
	3	74.5	84.1	78.3	79.0	4.8
D	1	72.4	72.4	82.7	75.9	5.9
	2	73.5	85.5	76.1	78.3	6.3
	3	78.6	79.6	84.3	80.8	3.1

341

342 3.4.2 吸光度測定値

343 各被験物質の吸光度測定値と吸光度測定値平均、陽性対照の測定値平均およ
 344 び陰性対照の測定値平均×0.4の値を図11～14に示す。また、各被験物質の吸
 345 光度測定値と吸光度測定値平均を表19～22に示す。

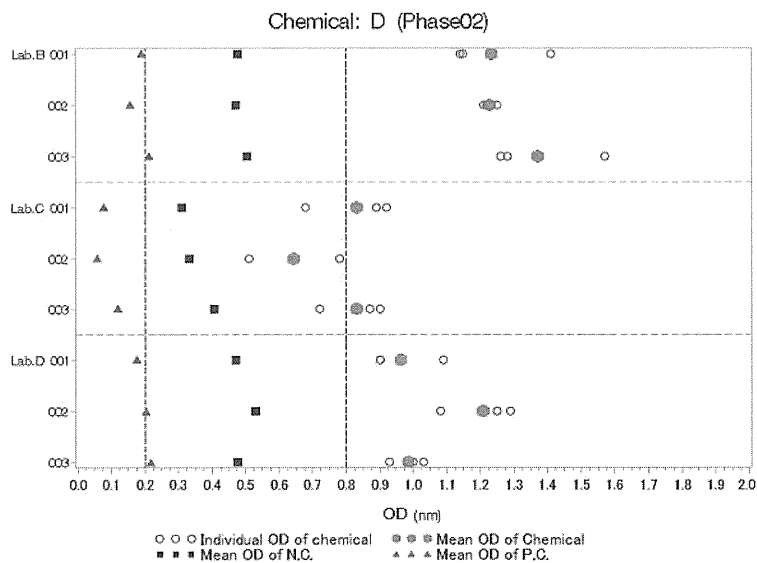
346



347

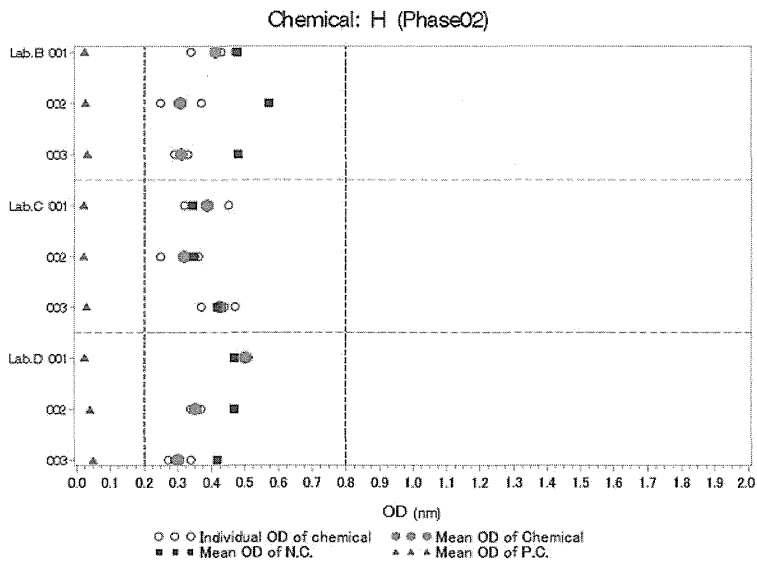
348 図 11 : Liquid B の測定値と平均、陽性対照の測定値平均、陰性対照の測定値平均×0.4

349



350

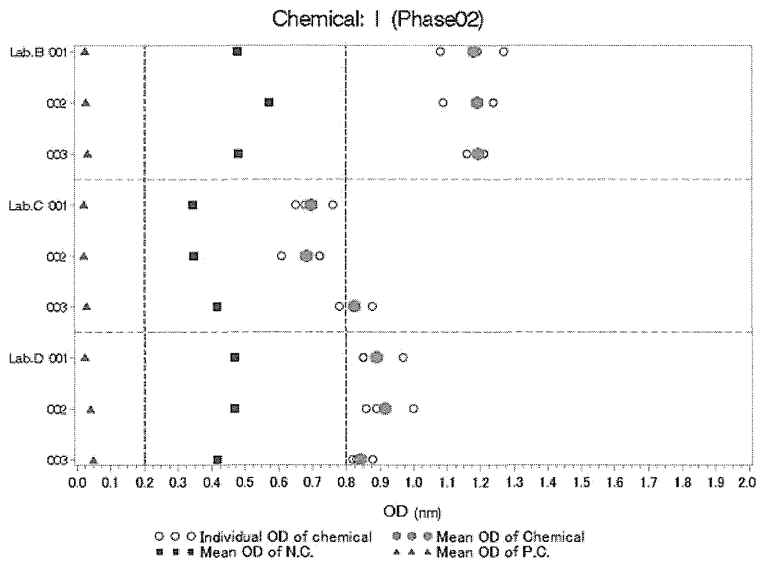
351 図 12 : Liquid D の測定値と平均、陽性対照の測定値平均、陰性対照の測定値平均×0.4



352

353 図 13 : Solid H の測定値と平均、陽性対照の測定値平均、陰性対照の測定値平均×0.4

354



355

356 図 14 : Solid I の測定値と平均、陽性対照の測定値平均、陰性対照の測定値平均×0.4

357 表 19 : Liquid B の吸光度測定値と吸光度測定値平均

Lab.	Repeat	Individual (1)	Individual (2)	Individual (3)	Mean	SD
B	1	1.14	1.41	1.24	1.26	0.14
	2	1.37	1.28	1.28	1.31	0.05
	3	1.40	1.41	1.57	1.46	0.10
C	1	0.62	0.77	0.79	0.73	0.09
	2	0.59	0.54	0.70	0.61	0.08
	3	0.65	0.75	0.74	0.71	0.06
D	1	0.99	0.78	0.93	0.90	0.11
	2	1.10	1.22	1.09	1.14	0.07
	3	0.99	0.90	1.04	0.98	0.07

358

359

360 表 20 : Liquid D の吸光度測定値と吸光度測定値平均

Lab.	Repeat	Individual (1)	Individual (2)	Individual (3)	Mean	SD
B	1	1.41	1.15	1.14	1.23	0.15
	2	1.21	1.22	1.25	1.23	0.02
	3	1.57	1.26	1.28	1.37	0.17
C	1	0.92	0.89	0.68	0.83	0.13
	2	0.78	0.64	0.51	0.64	0.14
	3	0.87	0.90	0.72	0.83	0.10
D	1	1.09	0.90	0.90	0.96	0.11
	2	1.08	1.29	1.25	1.21	0.11
	3	1.00	0.93	1.03	0.99	0.05

361

362 表 21 : Solid H の吸光度測定値と吸光度測定値平均

Lab.	Repeat	Individual (1)	Individual (2)	Individual (3)	Mean	SD
B	1	0.34	0.47	0.43	0.41	0.07
	2	0.30	0.25	0.37	0.31	0.06
	3	0.29	0.31	0.33	0.31	0.02
C	1	0.32	0.39	0.45	0.39	0.07
	2	0.25	0.35	0.36	0.32	0.06
	3	0.47	0.44	0.37	0.43	0.05
D	1	0.50	0.50	0.51	0.50	0.01
	2	0.35	0.37	0.34	0.35	0.02
	3	0.29	0.34	0.27	0.30	0.04

363

364

365 表 22 : Solid I の吸光度測定値と吸光度測定値平均

Lab.	Repeat	Individual (1)	Individual (2)	Individual (3)	Mean	SD
B	1	1.27	1.19	1.08	1.18	0.10
	2	1.24	1.24	1.09	1.19	0.09
	3	1.21	1.21	1.16	1.19	0.03
C	1	0.76	0.65	0.68	0.70	0.06
	2	0.61	0.72	0.72	0.68	0.06
	3	0.78	0.88	0.82	0.83	0.05
D	1	0.85	0.85	0.97	0.89	0.07
	2	0.86	1.00	0.89	0.92	0.07
	3	0.82	0.83	0.88	0.84	0.03

366

367 3.4.3 吸光度測定値平均の施設内再現性

368 各被験物質について、試験 3 回分(Lab.C は 4 回分)の吸光度測定値平均の平均
369 値と標準偏差を表 23~26 にまとめた。

370

371 表 23 : Liquid B の吸光度測定値平均の平均値と標準偏差

Lab.	Mean (R=1)	Mean (R=2)	Mean (R=3)	Mean of Mean	SD of Mean
B	1.26	1.31	1.46	1.34	0.10
C	0.73	0.61	0.71	0.68	0.06
D	0.90	1.14	0.98	1.00	0.12

372

373 表 24 : Liquid D の吸光度測定値平均の平均値と標準偏差

Lab.	Mean (R=1)	Mean (R=2)	Mean (R=3)	Mean of Mean	SD of Mean
B	1.23	1.23	1.37	1.28	0.08
C	0.83	0.64	0.83	0.77	0.11
D	0.96	1.21	0.99	1.05	0.13

374

375 表 25 : Solid H の吸光度測定値平均の平均値と標準偏差

Lab.	Mean (R=1)	Mean (R=2)	Mean (R=3)	Mean of Mean	SD of Mean
B	0.41	0.31	0.31	0.34	0.06
C	0.39	0.32	0.43	0.38	0.05
D	0.50	0.35	0.30	0.39	0.11

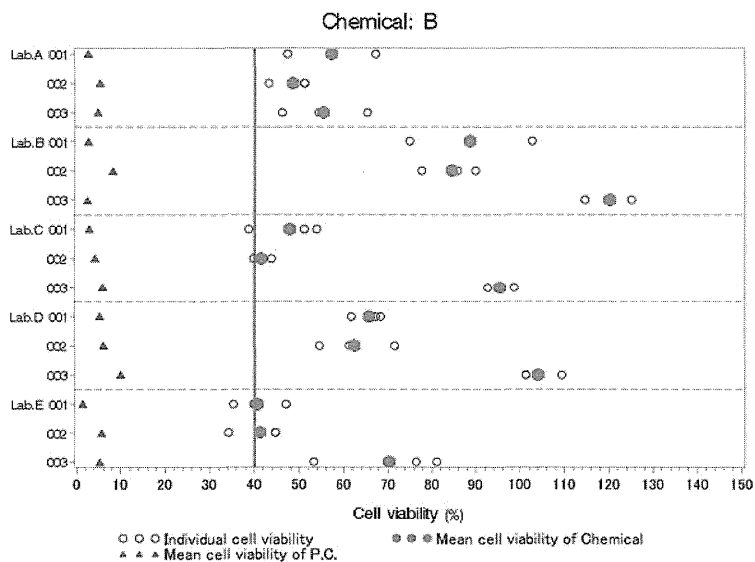
376

377 表 26 : Solid I の吸光度測定値平均の平均値と標準偏差

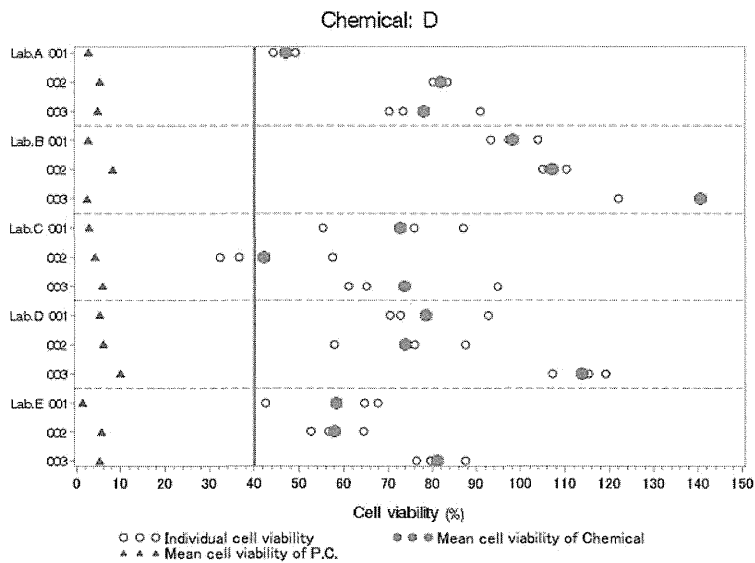
Lab.	Mean (R=1)	Mean (R=2)	Mean (R=3)	Mean of Mean	SD of Mean
B	1.18	1.19	1.19	1.19	0.01
C	0.70	0.68	0.83	0.74	0.08
D	0.89	0.92	0.84	0.88	0.04

378

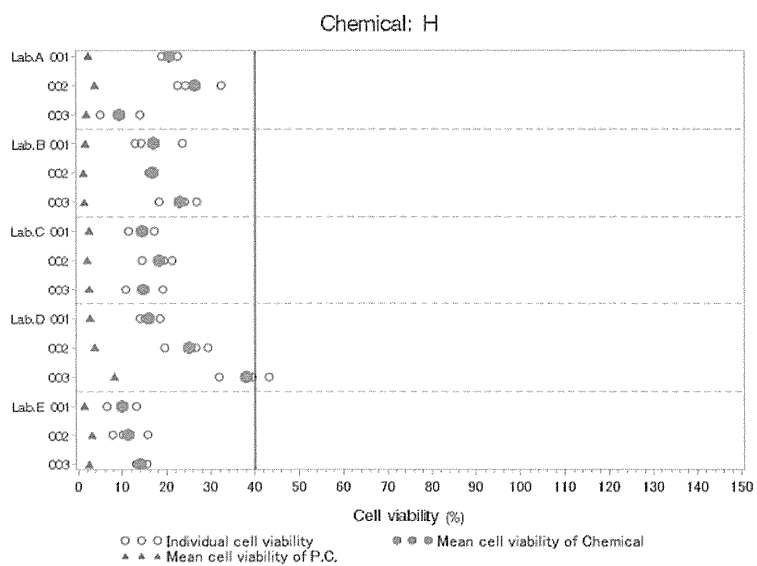
379 付録 前回の共同研究の結果



380
381 図 1a : Liquid B の 1 組織生細胞率と生細胞率平均、および陽性対照の生細胞率平均
382



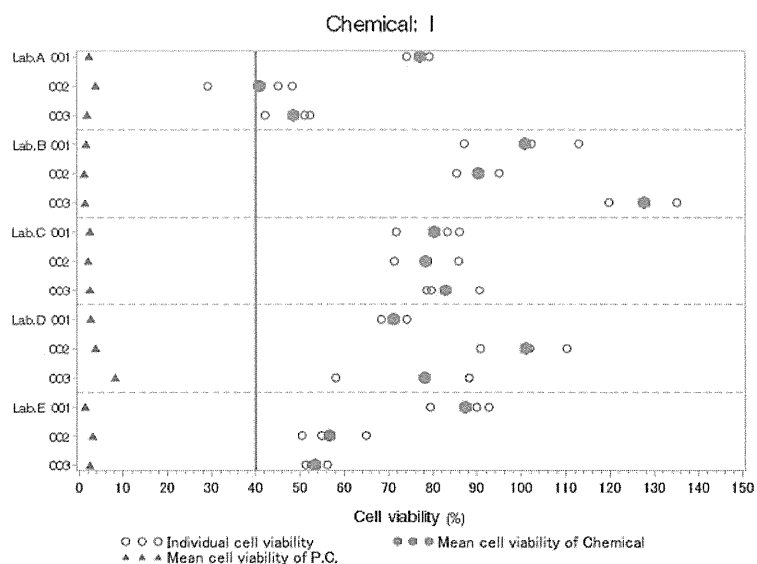
383
384 図 2a : Liquid D の 1 組織生細胞率と生細胞率平均、および陽性対照の生細胞率平均



385

386 図 3a : Solid H の 1 組織生細胞率と生細胞率平均、および陽性対照の生細胞率平均

387



388

389 図 4a : Solid I の 1 組織生細胞率と生細胞率平均、および陽性対照の生細胞率平均

眼刺激性試験を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するための留意事項

1. 序論

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等を指標とする変化であり、眼刺激性試験はヒトが被験物質を粘膜に適用、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傷害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および化粧品基準改正要請では、原料および製剤の眼刺激性を評価するため、従来、ウサギを用いた方法（Draize 法¹⁾）が通常実施されてきた。Draize 法は、急性眼刺激性／腐食性（Acute Eye Irritation/Corrosion）を評価する経済協力開発機構（OECD）テストガイドライン（Test Guideline: TG）405 として 1981 年に採択され、その後改訂および更新されている²⁾。

2012年のOECD TG 405の改訂に先立ち、米国の動物実験代替法評価センター（ICCVAM）の国際的な第三者評価委員会（International Scientific Peer Review Panel）³⁾において、局所麻酔薬と全身性鎮痛薬の使用により、試験成績に影響を与えることなく動物の痛みと苦痛を回避できるか、そしてその際の局所麻酔薬と全身性鎮痛薬の処方およびエンドポイントについて議論された。その結果、ウサギを用いた眼刺激性試験において、試験成績に影響を与えることなく動物の痛みと苦痛が軽減されると考えられ、本改訂にいたった。

今回のOECD TG 405 (2012)の改訂の要点を次に示す。

- 1) 被験物質投与前には、局所麻酔薬（例：プロパラカイン、テトラカイン）と全身性鎮痛薬（例：ブプレノルフィン）による前処置を行う。
- 2) 被験物質投与後では、全身性鎮痛薬（例：ブプレノルフィン、メロキシカム）による処置を行う。
- 3) 動物の痛みと苦痛の症状の計画観察、モニタリングおよび記録。
- 4) 全ての眼傷害の（症状、程度および進行状況）計画観察、モニタリング、記録及びエンドポイントの設定。

本文書は、TG 405(2012)を用い、化粧品・医薬部外品の安全性評価に利用するに当たっての必要な留意点を取りまとめたものである。

なお、試験実施にあたっては、JaCVAMの資料編纂委員会報告書⁴⁾やOECD TG 405 (2012)の原文²⁾を参照することにも留意すべきである。

2. ウサギ眼刺激性試験手順

2.1. 供試動物

健康な若齢成熟のアルビノウサギを供試動物として使用する。試験開始前24時間以内に供試動物の両眼を検査する。眼の刺激、眼傷害又は角膜損傷が認められた動物は使用しな

い。

動物は個別飼育とし、通常の動物室で飼育する。

2.2. 局所麻酔薬及び全身性鎮痛薬の適用

眼刺激性試験の実施にあたり、動物の痛み及び苦痛を回避ないし最小限にする適用方法を例示する。

被験物質投与の60分前に、ブプレノルフィン0.01 mg/kg（鎮痛薬として治療に用いられる用量）を皮下投与する。

被験物質投与5分前に、両眼に局所麻酔薬（例えば、0.5% 塩酸プロパラカインあるいは0.5% 塩酸テトラカイン）を1、2滴点眼する。局所麻酔点眼薬中の防腐剤が試験結果に影響する可能性を回避するため、防腐剤無添加の局所麻酔点眼薬の使用を推奨する。^{注1} 対照眼には被験物質は投与せず、局所麻酔薬のみを投与する。

被験物質投与8時間後にブプレノルフィン0.01 mg/kg及びメロキシカム0.5 mg/kg を皮下投与する。なお、メロキシカムが1日1回皮下投与で眼に対する抗炎症性作用を示すというデータはないが、被験物質投与の8時間後まではメロキシカムを投与すべきではない。被験物質投与8時間以降は、眼所見や痛み及び苦痛が消失するまで、ブプレノルフィン0.01 mg/kgを12時間間隔、メロキシカム0.5 mg/kgを24時間間隔で皮下投与する。^{注2}

2.3. 被験物質の適用

下眼瞼を穏やかに引き、各動物の片眼の結膜囊内に被験物質を投与する。被験物質の流失を防ぐため、約1秒間上下の眼瞼を静かに合わせ、閉じたままにしておく。

2.3.1. 洗浄

被験物質が固体の場合や投与直後に眼刺激性・腐食性作用を示す場合を除いては、被験物質投与後少なくとも24時間は被験動物の眼を洗浄しない。24時間後に洗浄してもよい。

科学的に妥当性がない限り、洗浄による影響を評価するためのサテライト群の使用は推奨できない。もし、サテライト群が必要な場合は2例のウサギを使用する。洗浄の条

注1 OECD TG 405(2012)のガイドラインで例示されている局所麻酔薬は、わが国において、現時点では医薬品として流通していない。それゆえ、わが国で入手可能な局所麻酔薬を用いるべきである。防腐剤を添加していない局所麻酔点眼薬として、「オキシプロカイン塩酸塩ミニムス点眼液 0.4%「センジュ」（千寿製薬株式会社）」がある。

注2 先行投与の鎮痛薬および局所麻酔薬の効果が不十分な場合には、被験物質投与直後に鎮痛薬の投与を実施する。試験期間中に動物が痛みや苦痛を示した際には直ちに追加の鎮痛薬（0.03 mg/kg ブプレノルフィン、皮下投与）を投与し、必要に応じて8時間毎に投与する。0.5 mg/kgメロキシカムは緊急用量のブプレノルフィンと併用し、24時間間隔で皮下投与する。なお、その際は12時間間隔で実施しているブプレノルフィン投与は実施しない。

件、例えば洗浄時間、洗浄液の組成、温度及び量などを記録する。

2.3.2. 用量

(1) 液体での試験

被験物質が液体の場合、投与量は0.1 mL とする。

(2) 固体での試験

被験物質が固体、ペースト及び粒子状の場合、投与量は容量として0.1 mL、あるいは重量で100 mg 以下の量とする。被験物質は摩砕して微粉末化する。固体物質の容量は容器に詰めた後に秤量する。固体物質が投与後1時間の観察時点で、生理的機能によって眼から除去されていない場合には、眼を生理食塩液または蒸留水で洗浄してもよい。

(3) エアゾールでの試験

ポンプスプレー及びエアゾール製品の場合は、予め内容物を採取し眼に適用することが推奨される。ただし、被験物質が気化するために加圧エアゾール容器に入れられている場合は例外であり、その場合は開眼させ、眼の直前10 cm の距離から約1秒間単回噴射して被験物質を眼に適用する。この距離は、スプレーの射出圧力およびその含量に応じて変えてもよい。スプレーの射出圧力で眼を損傷しないように注意する。スプレーからの噴射による投与量は、以下のシュミレーションによって概算の投与量を推定する。

被験物質を秤量用紙の直前に置いたウサギの眼のサイズの穴を通してスプレーし、秤量用紙の重量増加から眼にスプレーされる量を概算する。揮発性物質の投与量については、被験物質をスプレーする前と後の容器重量を秤量することにより推定する。

2.4. 初回試験（動物1例を用いる *in vivo* 眼刺激性・腐食性試験）

段階的試験戦略（下記3項）に示すように、*in vivo*試験では、まず1例の動物を用いて実施する。確認試験に移る前に、眼刺激性の重症度と回復性の有無を観察する。この初回試験の観察結果により、被験物質が腐食性又は強度の眼刺激性を有すると判断される場合には、それ以降の確認試験は実施しない。

2.5. 確認試験（追加動物を用いる *in vivo* 眼刺激性試験）

初回試験において腐食性ないし強度の眼刺激性作用が観察されない場合は、1例ないし2例の動物を追加して刺激反応の有無を確認する。初回試験で中等度の眼刺激性が認められた場合は、確認試験で2例の動物を同時に投与するよりも、1例ずつ段階的に投与する確認試験を実施することが推奨される。そして2例目の動物において、腐食性又は強度の眼刺激性作用が認められた場合はそれ以降の試験を実施しない。また2例目の動物の結果でハザード分類に十分と判断された場合でも、それ以降の確認試験は実施しない。

2.6. 観察期間

観察期間としては、傷害の程度及び回復性を十分に評価できる期間とする。しかし、動

物が重度の苦痛又は傷害を示した場合は、その時点で試験を中止する。傷害の回復性を評価するためには、被験物質投与後、通常21日目までは観察する。回復性が21日以前に確認できた場合は、その時点で試験を中止する。

2.7. 臨床観察及び眼刺激性スコア（評点）

投与後1時間及びその後数日間毎日観察し、眼の傷害の有無を詳細に観察する。眼刺激性のスコア（評点）を各試験で記録する。その他の眼の所見（例えばパンヌス、染色、前眼房の変化）や全身性の影響も詳細に記録する。

動物は試験期間中、定期的に苦痛及び痛み（例；繰り返しの眼部接触又は擦り、過度の瞬きをする、過度の流涙など）の症状を観察する。フルオレセイン染色は定期的に行うべきであり、必要と考えられた場合は細隙灯生体顕微鏡を使用し、眼の損傷域の検出及び程度を適切に判断する（例；角膜潰瘍が認められる時の損傷の深さの検出）。またこれら方法は安楽殺処分のための制定されたエンドポイント要件を充足する判断にも使用される。眼における傷害の程度を不変的な記録として保存する目的で、傷害部位をデジタルカメラ等も用いた記録は参考資料となる。評価に必要な十分なデータが得られた後は、意味のない動物飼育は避ける。

動物が重篤な苦痛を示した場合や次のような眼傷害を起こした動物は安楽殺を実施する。角膜の穿孔やぶどう腫（Staphyloma）を含む角膜の重度の潰瘍形成、前眼房の出血、グレード4の角膜混濁、72時間継続する対光反射の消失（虹彩反応；グレード2）、結膜の潰瘍、結膜又は瞬膜の壊死、脱落が挙げられる。このような傷害は一般的に回復しない。さらに、21日間の観察終了までに次の眼傷害が認められた場合には、動物愛護の観点からのエンドポイントとして試験を中止する判断を推奨する。それらの眼傷害は、重い損傷（例：角膜実質層に達する角膜損傷）、角膜輪部の損傷が50%以上（結膜組織の蒼白化により評価）、重度の感染症状（化膿性の分泌物）であり、これらの眼所見は21日間の観察終了時まで完全に回復することが望めない、あるいは腐食性又は強度の眼刺激性による損傷を示すと考えられるからである。また、角膜表面への血管新生（パンヌス）、フルオレセインによる染色域（毎日の観察によって縮小しない）、あるいは被験物質投与後5日以降に見られる角膜上皮再生の欠落などの複合的所見もまた早期試験中止の判定根拠として考えられる。

しかしながら、上記に示した各々の眼所見だけでは、試験中止判断材料として十分ではない。総合的に重症度を判定し、早期に試験を中止すべきかどうかの判断のため、選任獣医師、資格のある実験動物獣医師あるいは臨床症状を正確に判定できるよう訓練された実験動物技術者に試験の継続に関して助言を求めねばならない。

眼の刺激性反応（結膜、角膜及び虹彩）は被験物質投与後 1、24、48 及び 72 時間に採点する。眼の傷害が認められない時は、投与後 3 日以内に試験を終了させてはならない。軽度から中等度の眼刺激性が明らかに認められる場合は投与後 21 日まで観察し、その時

点で試験を終了する。観察の実施および記録は少なくとも投与後 1、24、48、72 時間、7、14 及び 21 日に損傷の状態を観察して、回復の有無を評価する。被験物質を投与された動物が動物愛護の観点から安楽殺処分された場合、評価の対象にするか否かの判断は、所見の観察結果によって判断されるべきである。

眼刺激性のスコア（評点）は試験施設および実験者が観察結果を一致させるため、判断が主観的となることがある。観察者は適切な訓練を受け正確に評価することが必要である。

2.8. 結果の評価

眼刺激性スコアを採点し、その傷害の種類及び重症度、並びにその回復性の有無について化学品の分類及び表示に関する世界調和システム（UN GHS）の基準に従い評価する。また、個別のスコアは眼刺激性評価に用いない。

3. 眼刺激性及び腐食性評価のための段階的試験戦略（TG 405(2012)の付属文書）

科学的妥当性及び動物福祉を目的として、強度の眼刺激性を惹起する可能性が高い被験物質を動物の眼に投与する眼刺激性試験は回避あるいは最小限にとどめ、不必要な動物の使用を避けることが重要である。ウサギを用いた *in vivo* 試験の実施前に、段階的試験戦略の一部として被験物質の潜在的な眼刺激性・腐食性に関する可能な限り多くの情報を収集し、評価する必要がある。以下の情報から、強度の眼刺激性や腐食性が認められる場合には *in vivo* 試験を実施すべきではない。

- 1) ヒトまたは動物の既存データおよび国際的に承認された方法による *in vitro* 試験データの評価
- 2) 構造活性相関（SAR）の解析
- 3) 物理的・化学的特性および化学反応性（例えば、pH2.0以下又は11.5以上の強酸、強塩基物質）
- 4) 上記以外の既存情報（塗布による全身毒性等利用可能なすべての情報）
- 5) *in vitro* 皮膚腐食性試験の評価（皮膚腐食性及び強度の眼刺激性影響；*in vitro* 皮膚腐食性試験法：TG430、431及び435）
- 6) *in vitro* または *ex vivo* 眼刺激性試験の評価（*in vitro* 又は *ex vivo* 試験：TG437及びTG438）

4. 本試験法の運用方法に関する留意点

TG 405(2012) の利用に際しては次の点を考慮すべきである。

- 1) ウサギを用いる *in vivo* 試験を実施する場合には、OECD TG 405(2012) に記載されている段階的試験戦略（上記3項）に従って、被験物質の潜在的な眼刺激性・腐食性に関するすべての情報、皮膚刺激性試験情報及び眼刺激性 *in vitro* 又は *ex vivo* 試験情報を収集・評価すべきである。これらの情報及び試験結果により強度の眼刺激性や腐食性が認められると判断される場合には、ウサギを用いる *in vivo* 試験を実施すべきではない。

- 2) 特段の理由がない限り、動物愛護の観点から、ウサギを用いる *in vivo*試験の実施には局所麻酔薬および鎮痛薬を使用すべきである。
- 3) OECD TG 405(2012)中に記載のある局所麻酔薬、鎮痛薬は例示であり、本邦では医薬品として流通していない薬剤もある、同様の効能・効果を持つ医薬品あるいは動物用医薬品である局所麻酔薬及び鎮痛薬を適宜使用することで問題ない。
- 4) 実験動物の生理、疾患、症状等を熟知し、臨床兆候を確認できるよう訓練された者が試験の実施及びエンドポイントの適切な判定に従事すべきである。

5. 引用文献

- 1) 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
- 2) OECD (2012). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion.
<http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html>
- 3) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA
- 4) JaCVAM (2014)
<<http://www.jacvam.jp/>>

(案)

眼刺激性試験代替法としてのニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法(ICE)を
化粧品・医薬部外品の安全性評価に資するためのガイダンス

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等を指標とする変化であり、眼刺激性試験はヒトが被験物質を粘膜に適用した場合に生じる傷害、あるいは誤って眼に入れた場合に生じる結膜、虹彩、および角膜に対する傷害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および化粧品基準改正要請では、従来、ウサギを用いた急性眼刺激性／腐食性(Acute Eye Irritation/Corrosion)を評価する Draize 法¹⁾(OECD テストガイドライン 405(OECD TG 405)として 1981 年に採択され、その後改定および更新されている²⁾)を用いられてきた。

一方、眼刺激性試験に関する *in vitro* 試験法である「ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験(Isolated Chicken Eye Test、以下 ICE 法)」は米国動物実験代替法検証省庁間連絡委員会(Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods:ICCVAM)、欧州動物実験代替法評価センター(European Centre for the Validation of Alternative Methods: ECVAM)および日本動物実験代替法評価センター(Japanese Center for the Validation of Alternative Methods: JaCVAM)により 2006 年と 2010 年に評価された^{3),4),5)}。

経済協力開発機構(Organization for Economic Cooperation and Development: OECD)では、ICE 法を 2009 年に UN GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals)区分⁶⁾で強度の眼刺激性を有する化学物質あるいは混合物を評価するトップダウン方式の OECD テストガイドライン 438 (OECD TG438)として採択し、さらに 2013 年にはボトムアップ方式の UN GHS 区分で無刺激性の化学物質あるいは混合物も併せて評価する試験法として同ガイドラインの改定を行った^{7),8)}。

本ガイダンスは、改定された OECD TG438 (ICE 法)について、化粧品・医薬部外品の安全性評価に利用するに当たって、必要な留意点等を取りまとめたものである。

1. 試験法の概要

1-1. 原理

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等を指標とする変化である。角膜は偶発的な事故等により刺激物に曝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。ICE 法も、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、眼球に生じる角膜の変性をとらえており、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考えられる。

ICE 法は主に食用に屠殺された直後のニワトリから摘出した眼球を使用し、ニワトリ眼球の正常

な生理学的・生化学的機能を *in vitro* で短期間維持して使用する器官型モデルである。本試験法では、眼球に生じる角膜の変性を、角膜腫大、角膜混濁およびフルオレセイン染色度の変化としてとらえる。角膜腫大は光学的厚度計を装着した細隙灯顕微鏡にて角膜の厚さを測定し、曝露から240分後までの経時的な変化率を定量的に求める。角膜混濁は細隙灯顕微鏡にて経時的な変化を曝露から240分後まで評価し評点に変換する。フルオレセイン染色度は細隙灯顕微鏡にて曝露から30分後の角膜表面のフルオレセイン染色度を評価し評点に変換する。各項目の結果を傷害の程度により、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^{9),10)}。

1-2. 試験手順および判定

1-2-1. 試験手順

詳細な内容を確認する場合には、OECD TG 438 (ICE法)⁸⁾を参照する。

眼球的準備

各試験群につき最低3個の眼球を使用する。主に食用目的で屠殺された若齢のニワトリ(7週齢程度で1.5~2.5kg)から頭部を入手する。屠殺後のニワトリ頭部は生理食塩水で湿潤させた紙を敷いた上に置き、箱に入れて室温(18~25°C)で運搬する。頭部回収から眼球をICE法検査装置に設置するまでの時間は最小限に抑える(通常2時間以内)。角膜に損傷を与えないように注意して眼瞼を切除する。角膜表面に2%(w/v)フルオレセインナトリウムを1滴滴下して数秒後に生理食塩水で洗浄し、角膜に損傷がないことを素早く確認する。次にフルオレセイン処理を行った眼球を細隙灯顕微鏡によりフルオレセイン染色度および角膜混濁度について観察し、後述する方法に従い採点し、それぞれ0.5以下であることを確認する(表2-1および表3-1参照)。角膜損傷が無いことを確認した後、眼窩から眼球を摘出し、ステンレス製の眼球固定器に固定する。更に眼球固定器をICE法検査装置に設置し、角膜全体に生理食塩水を1分間に3~4滴または0.1~0.15mLの流量で供給する。ICE法検査装置内は32±1.5°Cの温度に調整する。ICE法検査装置に設置した後に再び細隙灯顕微鏡(間隙幅は0.095mm)で損傷がないことを確認する。さらに細隙灯顕微鏡に装着した光学的厚度計を用いて角膜の厚さを測定する。眼球が以下のいずれかの状態である場合には、それらの要件に抵触しない眼球と交換する。

- (i) フルオレセイン染色度スコアが0.5を超える。
- (ii) 角膜混濁が0.5を超える。
- (iii) その他の損傷の兆候がある。
- (iv) 角膜の厚さが以上の条件を満たす眼球の平均値の±10%を逸脱する。

全ての要件を満たしたことを確認した後、約45~60分間平衡化させ、角膜の厚さと混濁を測定し、開始時(時間0)の結果として記録する。フルオレセイン染色度は眼球摘出時の結果を記録する。

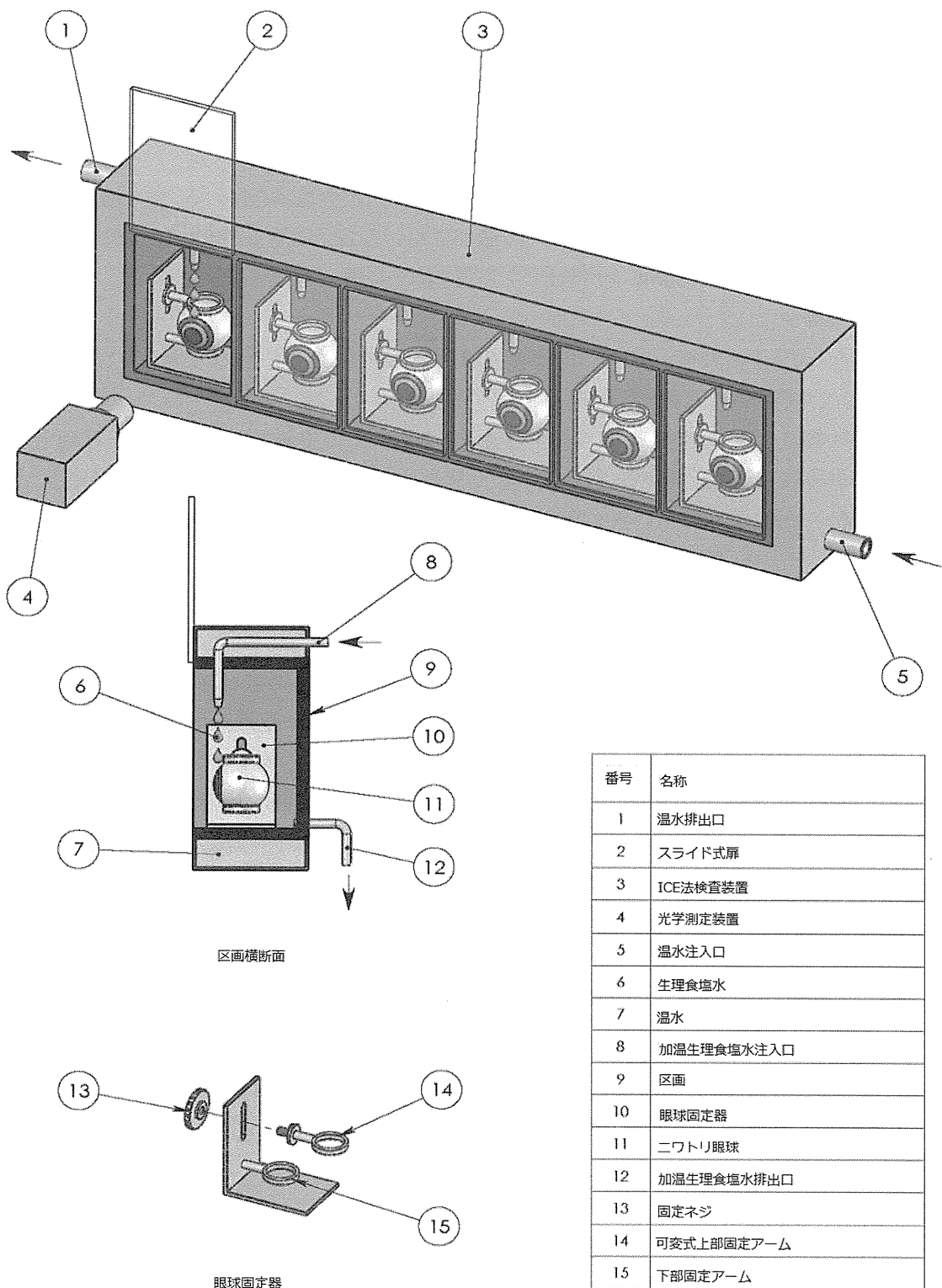


図1. ICE試験用装置と眼球固定器