OECD/OCDE

2009/09/07

試験ガイドライン No.438

眼腐食性および強度刺激性物質を同定するためのニワトリ摘出眼球を用いる試験法

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2009), Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-438-2009.pdf.

©OECD (2009)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at http://www.oecd.org/termsandconditions/

経済協力開発機構 （OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

2009 年 9 月 7 日採択

経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン

眼腐食性および強度刺激性物質を同定するための ニワトリ摘出眼球を用いる試験法

はじめに

1. ニワトリ摘出眼球（ICE）を用いる試験法は *in vitro* 試験法であり、この方法を用いると、物質を一定の状況と制限のもとで眼腐食性および強度刺激性物質に分類することができる。なお、眼腐食性および強度刺激性物質とは、米国環境保護庁（EPA）（区分 1）、欧州連合（EU）（区分 R41）、国際連合（UN）化学品の分類および表示に関する世界調和システム（GHS）（区分 1）（1）（2）（3）で定義されている物質である。本試験ガイドラインの目的に則して強度刺激物質を、ウサギにおいて処理後 21 日以上持続する眼病変を誘発する物質と定義する。ICE は、*in vivo* ウサギ眼試験の完全な代替法として十分なものとは考えられないものの、特定の適用領域における規制上の分類および表示に関する段階的試験戦略の一部として使用することを推奨する（4）（5）。被験物質（単一成分および多成分調製物である物質など）（6）が本試験法で陽性であれば、ウサギを用いる試験を追加的に実施するまでもなく眼腐食性または強度刺激性物質に分類することができる。陰性の場合には、OECD テストガイドライン 405（7）で概説されているように逐次的な試験戦略に従ってウサギを用いる試験が必要となるであろう。

2. 本テストガイドラインの目的は、被験物質の眼腐食性または強度刺激性について評価する方法を示すことである。眼腐食性および強度刺激性は、摘出したニワトリ眼球の毒性作用誘発能で測定する。角膜に対する毒性は、(i) 混濁度の定性的評価、(ii) フルオレセイン染色法による上皮損傷の定性的評価（フルオレセイン染色性）、(iii) 角膜厚の増加（腫大）の定量的測定、(iv) 眼球表面の肉眼的形態学的損傷の定性的評価により推測する。被験物質暴露による角膜混濁度、腫大および損傷の評価は個別に行ない、それらを組み合わせて眼刺激性分類（Eye Irritancy Classification）を行なう。

3. 処理後 21 日未満で消失する病変を誘発する眼刺激性物質、および非刺激性物質の試験にも ICE 試験法を用いることはできるが、EPA（1）、EU（2）、GHS（3）により定義されているように、このような区分の物質に関しては ICE 試験法の正確度と信頼性は公式には評価されていない。

4. 定義を付録 1 に示す。

ガイドラインの目的および限界

5. 本テストガイドラインは、国際的バリデーション試験（4）（5）（9）に続いて開発された、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））の ICE 試験法プロトコル（8）に準拠するものである。なお、ICE 試験法プロトコルの開発には欧州動物実験代替法検証センター（European Centre for the Validation of Alternative Methods）、日本動物実験代替法検証センターおよびオランダ TNO 毒性および応用薬理学に関する QOL 研究部門（TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology）も参加した。そのプロトコルは、公表されているプロトコルならびに TNO で用いられている最新のプロトコル（10）（11）（12）（13）（14）から得られた情報に基づいている。

© OECD、（2009）

本文書を個人的に非営利目的で使用する場合には、出典を明らかにすれば OECD の事前の同意がなくとも自由に使用することができますが、営利目的で使用する場合には、必ず文書による OECD の承認が必要です。

6. アルコールにおける陽性率、固体および界面活性剤における陰性率を考慮すると、本試験法には限界が認められる（パラグラフ 47 を参照のこと）(4)。こうした化学的・物理学的クラスに属する物質をデータベースから除外すると、EU、EPA、GHS 分類システムのすべてにわたる ICE の正確度が著しく改善する（4)。この測定法の目的（眼腐食性／強度刺激性物質のみを判別すること）から考えると、偽陰性率は重大な問題ではない。それは、このような物質は、規制要件に応じて証拠の重みづけ手法による逐次的試験戦略により、ウサギを用いる試験、または、適切にバリデートされたその他の *in vitro* 試験で引続き試験されるからである。さらに、現行のバリデーションデータベースは、いくつかの化学的または製品クラス（調製物など）の適切な評価はなされていない。しかし、研究者は本試験法を用いてすべての種類の物質（調製物を含む）を検討することができ、そのことにより陽性結果を眼腐食性または強度刺激性応答を示す徴候と考えることができる。しかし、アルコールで得られる陽性結果については慎重に評価し、過大に予測するリスクを避けるべきである。

7. ニワトリ眼球を用いた操作はすべて、組織と組織液をはじめとするヒトまたは動物由来の材料の取り扱いに関する試験施設の適用可能な規則や手順に従って実施する。試験施設の普遍的予防措置を推奨する（15)。

8. 本試験法の一つの限界は、ウサギを用いる眼刺激性試験法で評価される眼への影響および重症度を多少考慮に入れているとしても、結膜や虹彩の傷害を考慮していないことである。また、ICE 試験法自体では角膜病変の回復性の評価はできないが、ウサギ眼刺激性試験に基き、角膜傷害の初期深度の評価による不可逆的作用と可逆的作用の区別の方法が提案されている（16)。最後に ICE 試験法では、眼への暴露から全身毒性が発現するかどうかを評価することはできない。

9. 非強度刺激性物質および非刺激性物質の判別に関する ICE 試験法の有用性と限界をさらに調べるための努力がなされている（パラグラフ 48 を参照のこと)。本テストガイドラインは定期的に更新され、新たな情報とデータが考慮される。例えば、角膜損傷の特徴を一層完全に把握する必要があるときに病理組織検査が有用なこともある。この可能性を評価するために本試験法使用者には、眼球を保存し、病理組織検査標本を作製することを勧める。病理組織検査標本は、本試験法の正確度を一層向上させるデータベースおよび判断基準を開発するために用いることができる。また、ICE 試験法の非強度眼刺激性物質および非刺激性物質の判別を含む、将来の利用可能性を公式に評価している検証機関に標本やデータを提供することを勧める。経済協力開発機構（OECD）は *in vitro* 眼毒性試験法の使用に関するガイダンス文書を開発しており、その文書には病理組織検査標本の収集に関する詳細な手順および標本や病理組織検査データの提出先に関する情報を加える予定である。

10. 本試験法を初めて確立する試験施設は、付録 II に示す熟練度評価用化学物質を使用する。試験施設は、規制上の危険有害性分類用に ICE データを提出する前にこのような化学物質を使用して ICE 試験法実施の技術的能力を証明することができる。

試験の概要

11. ICE 試験法は、ニワトリ眼球を *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、角膜腫大、混濁度およびフルオレセイン染色度を測定して被験物質による損傷を評価する。後者の 2 つのパラメータについては定性的評価を、角膜腫大の分析では定量的評価を行なうことになる。各評価結果は、定量的スコアに変換して全般的な刺激指数の算出に用いるか、または定性的な範疇に区分して *in vitro* 腐食性および強度刺激性分類を割り当てるために使用する。これらの結果のいずれかを用いて、被験物質の *in vivo* 眼腐食性および強度刺激性を予測することができる（判断基準を参照のこと)。

眼球の入手先およびニワトリの週齢

12. 歴史的にみると本試験法では、実験動物を使う必要がないように、人間の消費用に屠殺場で屠殺されたニワトリの眼球が用いられてきた。使用できるのは食品流通網への販売に適すると判断された健康な動物の眼球だけである。

13. ニワトリの最適週齢を検討するための比較試験は実施されていないが、従来から本試験法で用いられてきたのは、伝統的に家禽屠殺場で処理されている、一定の週齢および体重（約 7 週齢で 1.5～2.5 kg）を有する若齢のニワトリである。

眼球の採取および試験施設への搬送

14. 通常はニワトリを電気ショックで鎮静させ、頸部を切断して失血させたあと、直ちに断頭する。ニワトリの入手先としては、その頭部を試験施設に速やかに搬送して劣化や細菌汚染を最小限に抑えることが可能な位置にある、試験施設に近い地元の屠殺場を選ぶ。ニワトリ頭部の採取から ICE 試験法で眼球を使用するまでの時間を最短（一般的に 2 時間以内）にし、測定結果に悪影響がないことを証明する。この評価は、眼球の選別基準、ならびに陽性対照と陰性対照の反応により行なう。測定ではすべて、ある特定の日に採取された同じ群の眼球を使用する。

15. 眼球は試験施設内で摘出するため、無傷の頭部を、等張生理食塩水を含ませたタオルで加湿したプラスチック製容器に入れて外界温度で屠殺場から搬送する。

ICE 試験用眼球の選別基準

16. 摘出後のベースライン評価時にフルオレセイン染色スコアが高い（> 0.5）か、または角膜混濁度スコアが高い（> 0.5）眼球は使用しない。

17. 各処理群および同時陽性対照群で最低 3 個の眼球を使用する。陰性対照群または溶媒対照（生理食塩水以外の溶媒を用いる場合）では 1 個以上の眼球を用いる。

手順

眼球の準備

18. 角膜に傷をつけないように注意しながら眼瞼を慎重に切除する。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等張生理食塩水で洗浄し、角膜に損傷がないことをすばやく確認する。次いで、フルオレセイン処理眼を細隙灯顕微鏡で検査し、角膜に損傷のないこと（つまりフルオレセイン染色スコアおよび角膜混濁度スコア≤ 0.5 であること）を確認する。

19. 損傷がみられた場合には、別の眼球を頭蓋骨から摘出する。その際、角膜に傷をつけないように注意する。瞬膜を外科用鉗子でしっかりとつかみながら眼球を眼窩から引き抜き、眼筋を剪刀（鈍曲）で切断する。過度の圧力による角膜損傷（圧迫によるアーチファクト）が発生しないようにすることが重要である。

20. 眼球を眼窩から取り出すとき、視神経の眼に見える部分は付けたままにしておく。眼球を眼窩から摘出したら吸収パッドの上に置き、瞬膜および結合組織を切除する。

© OCDE、（2009）

21. 摘出眼球を角膜が垂直になるようにステンレス製クランプに載せる。次いでクランプを灌流装置（16）のチャンバーに移す。灌流装置の中でクランプの位置を等張生理食塩水が角膜全体に滴下するように調節する。灌流装置のチャンバーの温度は 32 ± 1.5℃に調節する。付録 III に代表的な灌流装置および眼球のクランプの例を図示する。これらは購入することもできるし、組み立てることもできる。灌流装置は試験施設ごとに必要に応じて改造することができる（収容する眼球の数を変更するなど)。

22. 眼球を灌流装置に置いてから再度細隙灯顕微鏡で検査し、角膜が摘出操作で損傷を受けていないことを確認する。同時に、細隙灯顕微鏡に取り付けた深度測定装置を用いて角膜頂点の位置で角膜厚の計測も行なう。(i) フルオレセイン染色スコアが> 0.5、(ii) 角膜混濁度が> 0.5、または（iii）そのほかに損傷のなんらかの徴候がみられる眼球は取り替える。以上の基準のいずれにも該当しないため除外されなかった眼球でも、角膜厚が、すべての眼球から求めた平均値から10%の範囲を超過する場合は除外する。本試験法の使用者は、スリット幅の設定が異なれば細隙灯顕微鏡の角膜厚測定結果が異なることを忘れてはならない。スリット幅は 0.095 mm に設定する。

23. すべての眼球を検査して試験に使用できると判断した場合には、眼球を約 45～60 分間インキュベートして被験物質の適用前に試験系に対して平衡化しておく。平衡期間後に、角膜厚および混濁度のゼロ参照測定値を記録してベースライン値（すなわち、時間＝0）として用いる。摘出時に測定したフルオレセイン染色スコアは、その評価項目のベースライン値として用いる。

被験物質の適用

24. ゼロ参照値測定後直ちに眼球（ホルダー内の）を灌流装置から取り外して水平に置き、被験物質を角膜に適用する。

25. 液体の被験物質は一般的に希釈しないで試験するが、必要に応じて（例えば、試験デザインの一部として）希釈してもよい。希釈用の標準溶媒は生理食塩水である。溶媒対照を設定するのであれば別の溶媒も使用できるが、生理食塩水以外の溶媒を使用する場合にはその妥当性を証明するものとする。

26. 液体の被験物質は、角膜の表面全体が均一に覆われるように角膜に適用する。標準容量は 0.03 mL である。

27. 固体物質は、可能であれば、乳鉢・乳棒または同様の粉砕器具を用いてできるだけ微細に粉砕する。角膜表面が均一に覆われるように被験物質の粉末を適用する。標準量は 0.03 g である。

28. 液体、固体にかかわらず被験物質を 10 秒間適用したあとで室温の等張生理食塩水（約 20 mL）で洗浄する。次に眼球（ホルダー内の）を灌流装置に返して元の直立状態に戻す。

対照物質

29. 試験ごとに陰性対照または溶媒／媒体対照、および陽性対照を同時に試験する。

30. ICE 試験法で液体（100%濃度）または固体を試験する場合、試験系における非特異的変化を検出するとともに測定条件に起因する刺激性反応の異常な発生がないことを確認するために陰性対照として生理食塩水を同時に試験する。

31. 液体被験物質を希釈して ICE 試験法で試験する場合、試験系の非特異的変化を検出するとともに測定条件に起因する刺激性反応の異常な発生がないことを確認するため、溶媒／媒体対照群の試験を同時に実施する。パラグラフ 25 で述べたように、使用できるのは試験系に対して有害な影響を及ぼさないことが証明されている溶媒／媒体のみである。

32. 試験ごとに同時陽性対照として既知の眼刺激性物質を試験して、適切な反応が誘発されることを立証する。本テストガイドラインでは ICE 試験法を腐食性または強度刺激性物質を判定するために使用していることから、陽性対照物質として、本試験法で強い反応を誘発する参照物質を使用する。しかし、陽性対照反応の時間的変動を評価できるように、その反応は過剰であってはならない。容認できる陽性の範囲を統計学的に定義できるように、陽性対照の十分な *in vitro* データを収集する。特定の陽性対照に関する ICE 試験法の適切な背景データを利用できない場合には、この情報が得られるように試験を実施する必要がある。

33. 液体被験物質用の陽性対照物質の例は 10%酢酸または 5%塩化ベンザルコニウムである。一方、固体被験物質用の陽性対照物質の例は水酸化ナトリウムまたはイミダゾールである。

34. 基準物質は、特定の化学または製品クラスに属する未知の化学物質の眼刺激性、または刺激反応が特定の範囲内にある眼刺激性物質の相対的刺激性を評価する上で有用である。

測定評価項目

35. 処理角膜の評価は、処理前および処理後の洗浄が済んでから 30、75、120、180、240 分（±5 分）後に行なう。測定時点をこのようにすれば、4 時間の処理時間が終了するまでに十分な測定数を確保でき、一方で、すべての眼球を確実に観察する上で十分な測定間隔を保つことができる。

36. 評価項目は角膜混濁度、腫大の程度、フルオレセイン染色度および形態学的変化（上皮層のくぼみまたは疎性化）である。フルオレセイン染色度（測定は処理前および被験物質暴露 30 分後のみ）を除くすべての評価項目は上記の時点で毎回測定する。

37. 角膜混濁、フルオレセイン染色度、形態学的変化、さらに実施した場合には病理組織学的検査を記録するために写真撮影をすることが望ましい。

38. 本試験法の使用者には、4 時間目の最終検査後に眼球を適切な固定液（中性緩衝ホルマリン液など）に浸漬して保存し、病理組織学的検査に備えることを推奨する。

39. 角膜腫大の程度は、細隙灯顕微鏡に取り付けた光学角膜厚計で角膜厚を測定して評価する。角膜厚の増加率（%）として表わし、角膜厚測定値から次式を用いて算出する。

$$\left(\frac{\text{時間}t\text{における角膜厚} - \text{時間}0\text{における角膜厚}}{\text{時間}0\text{における角膜厚}}\right)\times 100$$

40. 毎回の観察時点ですべての供試眼球を計測し、平均角膜厚増加率を算出する。いずれかの時点で観察された最高平均角膜腫大スコアに基づいて、各被験物質の全般的な区分スコアを求めることができる。

41. 角膜混濁度の測定は最も混濁した領域を使用する。毎回の観察時点ですべての供試眼球を評価し、平均角膜混濁度を求める。いずれかの時点で観察された、最高平均角膜混濁度スコアに

© OCDE、（2009）

基づいて、各被験物質の全般的な区分スコアを求めることができる（表 1)。

表 1　角膜混濁度スコア

スコア	観察所見
0	混濁なし
0.5	ごくかすかな混濁
1	散在性またはびまん性の混濁領域があるが、虹彩は明視できる
2	半透明の領域を容易に識別できるが､虹彩の細部はわずかに不鮮明
3	かなり混濁して虹彩の細部を識別できないが､瞳孔の大きさはかろうじて判別できる
4	完全に混濁し、虹彩も透視できない

42.　30 分観察時点に限ってすべての供試眼球のフルオレセイン染色試験を行ない、平均フルオレセイン染色スコアを算出する。そのデータを用いて各被験物質の全般的な区分スコアを求めることができる（表 2)。

表 2　フルオレセイン染色スコア

スコア	観察所見
0	フルオレセイン染色を認めない
0.5	ごく少数の点状染色が認められる
1	角膜の処理領域の至るところに散在する点状染色が認められる
2	濃染された、巣状または斑状の点状染色が認められる
3	融合し、広がった染色領域がみられる

43.　形態学的変化には、角膜上皮細胞の「くぼみ」、上皮の「疎性化」、角膜表面の「粗化」、および角膜に対する被験物質の「付着」などがある。これらの所見は程度が様々であり、同時にみられることもある。これらの所見の分類は研究者の解釈による主観的なものである。

データおよび報告

データ評価

44.　角膜混濁度､腫大の程度およびフルオレセイン染色度は個別に評価して評価項目ごとに ICE クラスを割り当てる。次に評価項目ごとの ICE クラスを組み合わせて被験物質ごとに刺激性分類（Irritancy Classification）を割り当てる。

判定基準

45.　各評価項目の評価が終われば、事前に定義した範囲に基づいて ICE クラスを割り当てる。角膜厚（表 3)、混濁度（表 4)、フルオレセイン染色度（表 5）を以下の尺度に従い、4 つの ICE クラスを当てはめて評価する。

表 3　角膜厚に関する ICE 分類基準

平均角膜厚増加率（%）*	ICEクラス
0～5	I
＞5～12	II
＞12～18（処理から75分以降）	II
＞12～18（処理から75分以内）	III
＞18～26	III
＞26～32（処理から75分以降）	III
＞26～32（処理から75分以内）	IV
＞32	IV

*角膜厚を Haag-Streit BP900 細隙灯顕微鏡に取り付けた深度測定装置 no. I を用いてスリット幅設定値 9½（0.095 mm）で測定したときに限り角膜腫大スコアが適用できる。本試験法の使用者は、スリット幅の設定が異なれば細隙灯顕微鏡の角膜厚測定結果が異なることを忘れないものとする。

表 4　混濁度に関する ICE 分類

最高平均混濁度スコア*	ICEクラス
0.0～0.5	I
0.6～1.5	II
1.6～2.5	III
2.6～4.0	IV

*表 1 を参照のこと。

表 5　平均フルオレセイン染色度に関する ICE 分類

処理から30分後の平均フルオレセイン染色スコア*	ICEクラス
0.0～0.5	I
0.6～1.5	II
1.6～2.5	III
2.6～3.0	IV

*表 2 を参照のこと。

46.　角膜腫大、角膜混濁度、フルオレセイン染色度の各スコアについて得られた区分の組み合わせに一致する刺激性分類を読み取り、表 6 に示す基準を適用して被験物質に関する全般的な *in vitro* 刺激性分類を行なう。

© OCDE、（2009）

表 6　全般的な *in vitro* 刺激性分類

分類	3評価項目の組み合わせ
腐食性／強度刺激性	3×IV 2×IV、1×III 2×IV、1×II* 2×IV、1×I* 角膜混濁度≧3（30分後）（2眼球以上） 角膜混濁度＝4（いずれの時点でも）（2眼球以上） 上皮の重度の疎性化（1眼球以上）

*みられる可能性が低い組み合わせ

47.　パラグラフ 1 で述べたように、被験物質が腐食性物質とも強度刺激性物質とも判定されない場合は、分類および表示を目的とした追加的な試験を行なう。EPA（1）、EU（2）または GHS（3）分類システムに従って分類された *in vivo* ウサギ眼試験法データと比較すると、ICE 試験法の全般的な正確度は 83%（120/144）～87%（134/154）、偽陽性率は 6%（7/122）～8%（9/116）、偽陰性率は 41%（13/32）～50%（15/30）である。特定の化学的（アルコールおよび界面活性剤）または物理学的クラス（固体）に属する物質をデータベースから除外すると、EU、EPA および GHS 分類システムを通じて ICE の正確度は 91%（75/82）～92%（69/75）、偽陽性率は 5%（4/73）～6%（4/70）、偽陰性率は 29%（2/7）～33%（3/9）である（4）。

48.　被験物質について眼腐食性および強度刺激性分類を行なうことができなかった場合でも、*in vivo* ウサギ眼試験または適切にバリデートされた *in vitro* 試験の試験データと関連付けて考えれば、非強度刺激性物質および非刺激性物質の判別に関する ICE 試験法の有用性と限界をさらに評価する上で ICE データが有用であると思われる（*in vitro* 眼毒性試験法の使用に関するガイダンス文書を開発中である）。

試験結果採用基準

49.　同時陰性対照または媒体／溶媒対照および同時陽性対照の試験の結果、刺激性分類がそれぞれ非刺激性クラスおよび強度刺激性／腐食性クラスとなった場合には試験結果を採用できる。

試験報告書

50.　試験報告書には試験実施に関連する以下の情報を記載する。

被験物質および対照物質

Chemical Abstracts Service（CAS）で使用されている体系名などの化学名、および情報があれば別名
情報があれば CAS 登録番号（RN）

情報を入手できる範囲で、純度、および物質または調製物の組成（重量パーセントで）
物理的形態、揮発性、pH、安定性、化学物質クラス、試験実施に関連する水への溶解度などの物理化学的性質
該当する場合は試験前の被験／対照物質の処理法（加温、粉砕など）
情報があれば安定性

試験委託者および試験施設に関する情報

試験委託者および試験施設の名称および住所、試験責任者の氏名および住所
眼球の入手先（採取された施設など）
眼球の保管・搬送条件（眼球採取の日付と時刻、試験開始までの時間など）
可能であれば、眼球を採取した動物の特性（供試動物の週齢、性別、体重など）

試験法および用いたプロトコルの妥当性

試験法の完全性

試験法の完全性（正確度と信頼度）を全期間にわたって保証するために用いられた手順（熟練度評価用物質の定期的試験、陰性対照および陽性対照物質に関する背景データの使用など）
試験結果採用基準
該当する場合、背景データの範囲内にある、容認できる同時基準対照の結果

試験条件

使用した試験系の説明
使用した細隙灯顕微鏡（型式など）
細隙灯顕微鏡の設定条件
使用したニワトリ眼球の情報（質に関する陳述を含む）
使用した試験操作の詳細
使用した被験物質の濃度
試験操作が修正された場合はその修正の内容
モデルの背景データ（陰性および陽性対照物質、熟練度評価用物質、基準物質など）に対する参照
使用した評価基準の説明

結果

以上の他に観察された影響の説明
必要に応じて眼球の写真

© OCDE、（2009）

結果に関する考察

結論

参考文献

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(2) 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.

(3) United nations (UN) (2003). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(5) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Available: [http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(6) EC (2006). Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. Official Journal of the European Union L396/1 of 30.12.2006. OPOCE, Luxembourg.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Available: [http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

© OCDE、（2009）

(11) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Available: [http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

(15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

(16) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(19) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe IritantsIsolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

付録 I

定義

正確度：ある試験法による結果が、一般に容認された参照値にどの程度一致するかを表す近似性の指標。試験法の性能の尺度であり、「妥当性」の一側面である。この用語は、多くの場合、試験法の正確な転帰の割合を意味する「一致性」の代わりに用いられる。

基準物質：被験物質との比較に標準として用いられる物質。基準物質には以下の性質が必要である。すなわち、(i) 供給源に一貫性および信頼性があること、(ii) 構造および機能が試験対象物質のクラスに類似していること、(iii) 物理的／化学的特性が既知であること、(iv) 既知の作用に関する裏付けデータがあること、(v) 望ましい反応の範囲で効果が既知であること。

角膜：虹彩と瞳孔を覆うとともに光を内部へ導く、眼球の正面の透明な部分。

角膜混濁度：被験物質暴露後に角膜に生じる不透明さの程度を表わす測定値。角膜混濁度の上昇は角膜損傷を示す。

角膜腫大：ICE 試験における客観的測定値であり、被験物質暴露により生じる角膜の膨張の程度である。増加率（%）で表し、ベースライン時（被験物質適用前）および ICE 試験の被験物質暴露後に一定の間隔で測定した角膜厚から算出する。

EPA 区分 1：21 日間を超えて持続する腐食（眼組織の不可逆的な破壊）または角膜傷害、または刺激（1）。

EU 区分 R41：眼の前表面への適用から 21 日以内に完全な回復がみられない眼組織損傷または深刻な視力低下を生じる被験物質の区分（2）。

偽陰性率：陽性物質であるにもかかわらず試験法で誤って陰性と判定されたすべての物質の割合。試験法の性能を表わす指標の一つである。

偽陽性率：陰性物質であるにもかかわらず試験法で誤って陽性と判定されたすべての物質の割合。試験法の性能を表わす指標の一つである。

フルオレセイン染色度：ICE 試験における主観的評価項目であり、被験物質暴露後の角膜の上皮細胞がフルオレセインナトリウムで染色される程度である。フルオレセイン染色の度合いが角膜上皮の損傷の程度を示す。

GHS（化学品の分類および表示に関する世界調和システム）：人々（雇用主、労働者、運送者、消費者、緊急時対応者など）および環境を守るために、有害作用に関する情報を伝達することを目的として、物理学的危険有害性ならびに健康および環境に対する危険有害性の種類およびレベルの基準に従って化学品（物質および混合物）の分類法を提案するとともに、絵表示・注意喚起語・危険有害性情報・注意書き・化学物質安全性データシートなどの対応する伝達要素を取り扱うシステムである。

GHS 区分 1：眼の前表面への適用から 21 日以内に完全な回復がみられない眼組織損傷または深刻な視力低下を生じる被験物質の区分（3）。

© OCDE、（2009）

危険有害性：暴露後に生物、系または（亜）集団に有害な影響を引き起こす可能性のある作用物質または状態の固有の性質。

陰性対照：試験系のすべての成分を含む未処理の試験。被験物質処理試料およびそのほかの対照試料とともに処理して溶媒が試験系と反応するかどうかを確認するために行なう。

非刺激性物質：眼刺激性物質の区分である EPA 区分 I、II、III または EU 区分 R41、R36、および GHS 区分 1、2A、2B に分類されない物質（1）（2）（3）。

眼腐食性物質：（a）眼に不可逆的な組織損傷を引き起こす物質、（b）GHS 区分 1、EPA 区分 I、EU 区分 R41 の眼刺激性物質に分類される物質（1）（2）（3）。

眼刺激性物質：（a）眼の前表面への適用後に可逆的な変化を引き起こす物質、（b）EPA 区分 II または III、EU 区分 R36、GHS 区分 2A または 2B の眼刺激性物質に分類される物質（1）（2）（3）。

眼強度刺激性物質：（a）眼の前表面への適用後、21 日以内に消失しない組織損傷、または深刻な視力低下を引き起こす物質、（b）GHS 区分 1、EPA 区分 I、EU 区分 R41 の眼刺激性物質に分類される物質（1）（2）（3）。

陽性対照：試験系のすべての成分を含み、陽性反応を誘導することが知られている物質で処理を行なう試験。陽性対照反応の経時的変化を評価できるように、反応が過剰であってはならない。

信頼度：同じプロトコルを用いて試験法を適用したときに得られる経時的な試験施設内および施設間再現性の程度を表わす尺度。試験施設内および施設間再現精度、ならびに施設内併行精度の算出により評価する。

細隙灯顕微鏡：双眼顕微鏡の倍率で立体的な正立像を観察して眼を直接検査するために用いる装置。ICE 試験法では、この装置を用いてニワトリ眼球の前眼部構造の観察、ならびに付属の深度測定装置により角膜厚を客観的に測定する。

溶媒／媒体対照：溶媒または媒体などの試験系のすべての成分を含む、未処理の試料。被験物質処理試料およびほかの対照試料とともに処理して、同じ溶媒／媒体に溶解した被験物質による処理試料に対するベースライン反応を得る。この試料でも、同時陰性対照とともに試験すると、溶媒または媒体が試験系と反応するかどうかが分かる。

段階的試験：段階的試験戦略。被験物質に関するすべての既存の情報を、各段階で科学的根拠の重要性を考慮に入れた手順を用いて一定の順序で再検討し、次の段階に進む前に、危険有害性分類決定に十分な情報が利用可能であるかどうかを確認する。既存情報に基づいて被験物質の刺激性の分類が可能であれば追加的試験は必要ない。そうでない場合は、明確な分類が可能になるまで、動物を用いた段階的で逐次的な試験を行なう。

バリデートされた試験法：バリデーション試験が完了しており、特定の目的に対して妥当性（正確度を含む）および信頼度が確認された試験法。バリデートされた試験法に、正確度と信頼度の

点で、試験時の目的から考えて容認できるだけの性能がない場合もあることに注意する。

証拠の重みづけ（weight-of-evidence）: 物質の危険有害性に関する結論および裏付けを得る上で問題となる各種情報の強みと弱みを考慮する過程。

© OCDE、（2009）

付録 II

ICE 試験用の熟練度評価用化学物質

本テストガイドラインに準拠する試験法を日常的に使用する前に、表 1 で推奨されている 10 物質の眼腐食性を正確に分類して技術的熟練度を証明しようとする試験施設もあると思われる。これらの物質は、局所眼刺激性／腐食性に対する反応の範囲を示すために選別したものであり、*in vivo* ウサギ眼試験（TG405）（区分 1、2A、2B、UN GHS による表示なし）(3)（7）の結果に基づいている。しかし、これらの測定の有用性のうちバリデートされたもの（判別するのは眼腐食性／強度刺激性のみ）を考慮すると、熟練度を証明するには分類に関する試験の転帰は 2 つ（腐食性／強度刺激性物質であるか、非腐食性／非強度刺激性物質であるか）しかない。ほかの選別基準は、物質が市販されていること、高品質の *in vivo* 参照データが入手できること、テストガイドラインを開発中の 2 つの *in vitro* 試験法による高品質のデータがあることである。このような理由により刺激性物質は、*in vitro* 眼毒性試験法のバリデーション用の 122 個の参照物質からなる ICCVAM 推奨リストから選別（付表 H：ICCVAM 推奨参照物質リストを参照のこと）した（4)。参照データについてはウシ角膜における混濁度および透過度試験法（BCOP）および ICE 試験法に関する ICCVAM Background Review Document で閲覧できる（18）(19)。

表 1　ICE 試験法で技術的熟練度を証明するための推奨物質

化学物質	CASRN	化学物質クラス[1]	物理的形態	*In Vivo*分類[2]	*In Vitro*分類[3]
塩化ベンザルコニウム（5%）	8001-54-5	オニウム化合物	液体	区分1	腐食性／強度刺激性
クロルヘキシジン	55-56-1	アミン、アミジン	固体	区分1	腐食性／強度刺激性
ジベンゾイル-L-酒石酸	2743-38-6	カルボン酸、エステル	固体	区分1	腐食性／強度刺激性
イミダゾール	288-32-4	複素環式化合物	固体	区分1	腐食性／強度刺激性
トリクロロ酢酸（30%）	76-03-9	カルボン酸	液体	区分1	腐食性／強度刺激性
2,6-ジクロロベンゾイルクロライド	4659-45-4	ハロゲン化アシル	液体	区分2A	非腐食性／非強度刺激性
2-メチルアセト酢酸エチル	609-14-3	ケトン、エステル	液体	区分2B	非腐食性／非強度刺激性
硝酸アンモニウム	6484-52-2	無機塩	固体	区分2A	非腐食性／非強度刺激性
グリセロール	56-81-5	アルコール	液体	表示なし	非腐食性／非強度刺激性
n-ヘキサン	110-54-3	炭化水素（非環式）	液体	表示なし	非腐食性／非強度刺激性

略語：CASRN＝CAS 登録番号

[1] 化学分類は、米国医学図書館医学主題見出し（National Library of Medicine Medical Subject Headings（MeSH））分類システム（http//www.nlm.nih.gov/mesh で閲覧できる）に基づいて、標準的分類体系を用いて各物質に割り当てた。

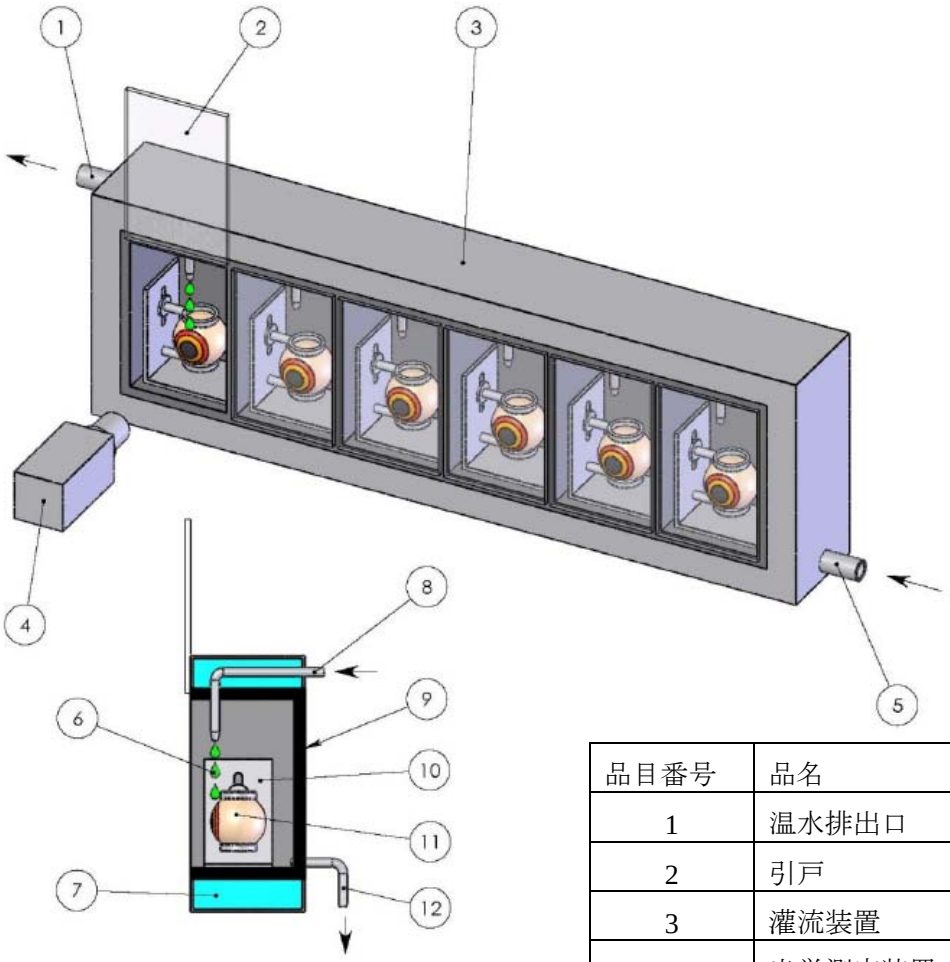
[2] *in vivo* ウサギ眼試験（OECD TG405）の結果に基づき、UN GHS（3）（7）を使用。

[3] BCOP および ICE の結果に基づく。

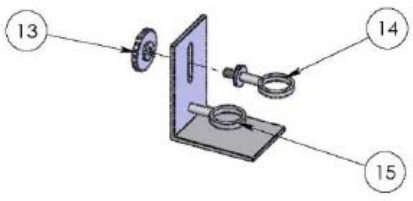
© OCDE、（2009）

付録 III　ICE 灌流装置および眼球クランプの図

（灌流装置および眼球クランプのさらに詳細な一般的説明が必要な場合には Burton らの文献(17)を参照のこと）



区画の断面



眼球ホルダー

品目番号	品名
1	温水排出口
2	引戸
3	灌流装置
4	光学測定装置
5	温水流入口
6	生理食塩水
7	温水
8	生理食塩水流入口
9	区画
10	眼球ホルダー
11	ニワトリ眼球
12	生理食塩水排出口
13	止めねじ
14	上部調整腕金
15	下部固定腕金