試験ガイドライン No.438

i）眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学物質、および
ii）眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性への分類が不要な化学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.

Reference:

OECD (2023), 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://doi.org/10.1787/9789264203860-en.

©OECD (2013)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at

http://www.oecd.org/termsandconditions/

2013 年 7 月 26 日採択

化学物質の試験に関する OECD ガイドライン

i) 眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学品、および ii) 眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性に分類する必要のない化学品を同定するための、ニワトリ摘出眼球を用いる試験法

はじめに

1. ニワトリの摘出眼球（ICE）を用いる試験法（以下、ICE 試験法）の評価は、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）が主体となり、欧州動物実験代替法評価センター（European Centre for the Validation of Alternative Methods : ECVAM）と日本動物実験代替法評価センター（Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods：JaCVAM）が協力して、2006 年と 2010 年に行われた(1) (2) (3)。1 回目の評価において、ICE 試験法は、国際連合（UN）の化学品の分類および表示に関する世界調和システム（GHS）によって定義された眼に対する重篤な損傷性（区分 1）を引き起こす化学品（物質および混合物）を同定するためのスクリーニング試験として使用できる科学的に妥当な試験法であることが認められた(1) (2) (4)。2 回目の評価においては、ICE 試験法を、UN GHS によって定義された眼刺激性や眼に対する重篤な損傷性にも分類されない化学品を同定するためのスクリーニング試験として使用することについて、評価が行われた(3) (4)。同バリデーション試験の結果と第三者評価委員会の推奨事項については、眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学品の分類（UN GHS 区分 1）に ICE 試験法を用いる際の、オリジナルの推奨事項が維持された。これは、利用できるデータベースが、ICCVAM によるオリジナルのバリデーション以降、依然として変わらなかったためである。この段階では、ICE 試験法の適用範囲を他の区分にも拡大することについて、さらなる推奨事項は示されなかった。バリデーション試験で用いられた *in vitro* および *in vivo* のデータセットの再評価が、眼刺激性や眼に対する重篤な損傷性(5)に分類する必要のない化学品を同定する際の、ICE 試験法の有用性を評価することに的を絞って行われた。この再評価によって、ICE 試験法は、UN GHS (4) (5)で定義された眼刺激性や眼に対する重篤な損傷性にも分類されない化学品の同定にも使用できると結論づけられた。本試験ガイドライン（2009 年に採択、2013 年に更新）には、推奨される使用と、上記の評価結果に基づく ICE 試験法の限界についても記載する。2009 年の初版と 2013 年の改訂版の大きな違いは、UN GHS 分類システムに従った分

©OECD, (2013)
本資料は、個人的な非営利目的であれば、出典を適切に明記するという条件で、OECD に事前の承諾を得ることなく自由に使用してよい。本資料を商業的に利用する場合は、必ず OECD の書面による承諾を得なければならない。

類する必要がない化学品を同定する際の ICE 試験法の使用、試験報告書に含める内容の更新、定義（補遺 1）の更新、習熟度確認物質（補遺 2）の更新などである。

2. 現在、一般に認められているところでは、異なる化学品の種類について刺激を網羅的に予測するための *in vivo* Draize 眼試験は、当面の間、1 つの *in vitro* 眼刺激性試験だけでは代替できない。ただし、階層的試験戦略の中で、いくつかの代替試験法を計画的に組み合わせることによって、Draize 眼試験を代替できる可能性がある(6)。トップダウン方式(7)は、既存の情報に基づき、強い刺激性があることが予想される化学品に対して用いることを意図して設計されているが、ボトムアップ方式(7)は、既存の情報に基づき、分類する必要がないほどの刺激性を引き起こさないことが予想される化学品に対して用いることを意図して設計されている。ICE 試験法は、特定の状況のもとで使用できる *in vitro* 試験法であり、段落 8～10 で述べたように、眼に対する化学品の有害性の分類や表示に、ある決まった限界がある。ICE 試験法は、単独では *in vivo* ウサギ眼試験の代替法として有効ではないと考えられるが、階層的試験戦略、例えば、Scott ら(7)によって提案された、眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学品（すなわち、UN GHS 区分 1 に分類される化学品）を、追加試験を行わずに同定するためのトップダウン方式などの最初の段階に用いることが推奨される(4)。ICE 試験法は、UN GHS 分類で定義された眼刺激性にも眼に対する重篤な損傷性にも分類する必要のない化学品（区分外）(4)の同定にも推奨され、したがって、ボトムアップ方式(7)の試験計画の最初の段階に用いられる可能性がある。ただし、ICE 試験法を用いた結果、眼に対する重篤な損傷性を引き起こさないと予測される化学品や、眼刺激性や眼に対する重篤な損傷性に分類されない化学品については、最終的な分類を行うための追加試験（*in vitro* や *in vivo* で）が必要になる。なお、UN GHS 分類以外の分類法に基づいて、ボトムアップ方式で ICE 試験法を用いる場合は、その前に、しかるべき規制当局に相談すべきである。

3. 本試験ガイドラインの目的は、眼に対する被験物質の有害性をニワトリ摘出眼球における毒性作用誘発能で測定して評価するのに用いる手順について、説明することにある。角膜に対する毒性作用の測定は、(i) 混濁の定性的評価、(ii) 眼球へのフルオレセインの適用（フルオレセイン染色）に基づいた、上皮への損傷の定性的評価、(iii) 厚みの増加（腫脹）の定量的測定、および (iv) 角膜表面への目に見える形態的な損傷の定性的評価によって行う。被験物質への曝露後の角膜混濁、角膜腫脹、および角膜損傷を、それぞれ個別に評価してから組み合わせて、眼刺激性区分を導き出す。

4. 定義を補遺 1 に示す。

最初に考慮すべき事項および限界

5. 本試験ガイドラインは、OECD ガイダンス文書 160 (8)に示されているプロトコルに基づいている。同文書は、ICCVAM が主体となり、欧州動物実験代替法評価センター（European Centre

©OECD, (2013)

for the Validation of Alternative Methods）、日本動物実験代替法評価センター（Japanese Center for the Validation of Alternative Methods）、およびオランダ応用科学研究機関（TNO）の毒性および応用薬理学に関する QOL 研究部門（Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology）が協力して行った国際的なバリデーション試験(1) (3) (9)の後に策定された。また、同プロトコルは、公表されているプロトコルおよび TNO で用いられている最新のプロトコルから得られた情報に基づいている(10) (11) (12) (13) (14)。

6. 本試験ガイドラインの基礎となったバリデーション試験では幅広い化学品が試験され、バリデーション試験の実験によるデータベースの化学品は、152 種類（物質 72 種類、混合物 80 種類）に達した(5)。本試験ガイドラインは、固体、液体、エマルジョン、およびゲルに適用できる。液体では水性のものと非水性のものに適用でき、固体では水に可溶性のものと不溶性のものに適用できる。気体とエアロゾルは、まだバリデーション試験で評価が行われていない。

7. ICE 試験法は、眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学品、すなわち、UN GHS 区分 1 に分類される化学品(4)の同定に用いることができる。同定の目的で ICE 試験法を用いる場合の限界として確認されているのは、アルコール類での高い偽陽性率と固体および界面活性剤での高い偽陰性率に基づくものである(1) (3) (9)。ただし、この場合の偽陰性率（UN GHS 区分 1 が UN GHS 区分 1 として同定されないこと）は、重要ではない。なぜなら、陰性の結果になった被験物質はすべて、規制要件に応じて、十分にバリデートされた別の *in vitro* 試験法を用いて（最終的にはウサギを用いて）、証拠の重み付け方式における順次的な試験計画によって、引き続き試験されることになるからである。*in vivo* Draize 眼刺激性試験では、固体は曝露条件が一定でなく極端なものになる可能性があり、実際の刺激性から外れた予測が下される可能性があることに留意すべきである(15)。ICE 試験法は、あらゆる種類の化学品について使用を考慮することができ、そのことから、陽性の結果は、さらなる試験を行わずに、眼に対する重篤な損傷性（UN GHS 区分 1）を示すものとして受け入れてよい。ただし、アルコールを用いて得られた陽性の結果は、予測が過大になる恐れがあるため、慎重に解釈する必要がある。

8. ICE 試験法を眼に対する重篤な損傷性（UN GHS 区分 1）を引き起こす化学品の同定に用いると、UN GHS 分類システムに従って分類した *in vivo* ウサギ眼試験法のデータに比較して、全体の正確性 86%（120/140）、偽陽性率 6%（7/113）、偽陰性率 48%（13/27）であった(4) (5)。

9. ICE 試験法は、UN GHS 分類システム(4)における眼刺激性や眼に対する重篤な損傷性に分類する必要のない化学品の同定にも使用できる。他の分類法に基づいたボトムアップ方式で ICE 試験法を用いる場合は、その前に、しかるべき規制当局に相談すべきである。ICE 試験法は、あらゆる種類の化学品に使用できることから、眼刺激性や眼に対する重篤な損傷性に分類されない化学品について、陰性の結果を受け入れることができる。ただし、バリデーシ

©OECD, (2013)

ョンのデータベースから得られた結果の 1 つに基づくと、汚れ止めの有機溶剤を含有する塗料は、過小に予測される可能性がある(5)。

10. ICE 試験法を、眼に対する刺激性や重篤な損傷性に分類する必要のない化学品の同定に用いると、UN GHS 分類システムに従って分類した *in vivo* ウサギ眼試験法のデータに比較して、全体の正確性 82%（125/152）、偽陽性率 33%（26/79）、偽陰性率 1%（1/73）であった(4) (5)。特定のクラスの被験物質（例：汚れ止めの有機溶剤を含有する塗料など）をデータベースから除外すると、ICE 試験法は、*in vivo* ウサギ眼試験法に比較して、全体の正確性 83%（123/149）、偽陽性率 33%（26/78）、偽陰性率 0%（0/71）であった(4) (5)。

11. 眼に対する刺激性（UN GHS 区分 2 または区分 2A）に分類すべき被験物質や、眼に対する軽度の刺激性（UN GHS 区分 2B）に分類すべき被験物質については、同定に ICE 試験法を用いることを推奨しない。これは、実際は UN GHS 区分 1 であるのに、それより危険性の低い UN GHS 区分 2、2A、または 2B に分類された化学品や、実際は UN GHS 区分外であるのに、それより危険性の高い UN GHS 区分 2、2A、または 2B に分類された化学品がかなりの数に上っているためである。このため、適切な別の方法による追加試験が必要な可能性がある。

12. ニワトリ眼球の取り扱いについては、それぞれの試験施設における、ヒトや動物由来の材料、例えば、これに限らないが、組織や組織液などを取り扱う際の規定と手順に従うこと。施設共通の予防措置を取ることを推奨する(16)。

13. ICE 試験法は、ウサギを用いる眼刺激性試験法における評価対象の結膜損傷と虹彩損傷を評価対象としない一方で、*in vivo* で UN GHS 分類を考慮する際の重要な分類要素である角膜への影響を評価対象としている。また、ICE 試験法は、角膜損傷の可逆性そのものを評価することはできないが、角膜損傷の当初の深さの評価が、ある種の不可逆的影響の同定に使用できるかもしれないことが、ウサギを用いた眼研究に基づいて提唱されている(17)。なお、当初の高レベルの損傷と関連しない不可逆的影響がどのようにして起こるかを理解するためには、さらなる科学的な知見が必要である。また、ICE 試験法は、眼への曝露に伴う全身毒性の可能性の評価はできない。

14. 本試験ガイドラインは、新しい情報やデータを考慮に入れながら、定期的に更新する予定である。例えば、角膜の損傷について、より完全な特徴付けが必要な場合は、病理組織学的検査が有用である可能性がある。このような場合に備えて、眼球を保存し、ICE 試験法の正確性をさらに改善し得るデータベースと判定基準の作成に用いることができる病理組織検査標本を作製しておくことが推奨される。OECD では、*in vitro* の眼毒性試験法の使用に関するガイダンス文書を作成した。このガイダンス文書には、病理組織検査標本の採取に関する詳細な手順と、標本や病理組織学的データの提出先に関する情報が記載されている(8)。

©OECD, (2013)

15. ICE 試験法を確立することから始める施設は、補遺 2 に示す習熟度確認物質を用いること。施設は、規制上の危険有害性分類の目的で ICE 試験のデータを提出する前に、この熟練証明用の化学品を用いて、ICE 試験法を実施する自身の技術的能力を示すことができる。

試験の概要

16. ICE 試験法は、器官型モデルの一種で、ニワトリ眼球を *in vitro* で短期間維持できる試験法である。ICE 試験法では、被験物質による損傷を、角膜の腫脹度、混濁度、およびフルオレセイン染色度を測定することによって評価する。混濁度とフルオレセイン染色度は定性的な評価によるものであり、一方、腫脹度は定量的な評価によるものである。それぞれの測定結果は、定量的スコアに換算して、全体的な刺激指数の計算に使用するか、定性的に分類して、*in vitro* における眼に対する有害性を UN GHS 区分 1 または UN GHS 区分外のいずれかに分類するのに使用する。得られた結果を用いて、被験物質について、*in vivo* における眼に対する重篤な損傷性を予測することや、眼に対する有害性分類の必要性の有無を推測することができる（判定基準を参照）。ただし、ICE 試験法で、眼に対する重篤な損傷性を引き起こさないことが予測される化学品や、分類されない化学品は、区分外に分類できる（段落 11 を参照）。

ニワトリの眼球入手先と週齢

17. 元来、ICE 試験法では、ヒトの消費用に屠殺する食肉処理場から入手したニワトリから採取した眼球を用いることで、実験動物の必要性を排除している。ヒトの食物連鎖に入るのに適している思われる健康なニワトリの眼球のみを使用する。

18 最適なニワトリの週齢を調べるための対照試験は行われていないが、ICE 試験法で従来用いられているニワトリの週齢と体重は、家禽の食肉処理場で伝統的に処理されている若鶏の週齢と体重（だいたい 7 週齢、1.5～2.5 kg）に一致する。

眼球の採取と施設への輸送

19. ニワトリを鎮静させ（通常は電気ショックによる）、頸部を切開して放血したら、ただちに頭部を切り離す。ニワトリの頭部は、施設の近くにある食肉処理場から入手して、施設に迅速に移送して変質や細菌汚染を最小限に抑えられるようにする。ニワトリの頭部を採取してから、眼球を摘出して灌流チャンバー内に配置するまでの時間は、試験の許容基準を確実に満たせるように、できる限り短くする（一般的に 2 時間以内）。試験に用いる眼球はいずれも、特定の日に採取した同一グループのものであること。

20. 眼球の摘出は施設で行うため、無傷の頭部を食肉処理場から輸送する。輸送は、等張生理食塩水で湿らせたティッシュペーパーで加湿したプラスチック製ボックスに入れて、室温（一般に 18～25℃）で行う。

©OECD, (2013)

ICE 試験法で用いる眼球の選択基準と個数

21. 摘出した眼球のうち、ベースラインのフルオレセイン染色度のスコアが高い（> 0.5）ものや、角膜混濁度のスコアが高い（> 0.5）ものは使用しない。

22. 各曝露群および同時陽性対照群の眼球数は、3 個以上とする。陰性対照群または溶媒対照群（生理食塩液以外の溶媒を使用する場合）の眼球数は、1 個以上とする。

23. GHS 区分外の結果につながる固形物の場合は、眼球 3 個を用いて 2 回目の実験を行い、陰性の結果を承認または棄却することを推奨する。

手順

眼球の準備

24. まぶたを慎重に切り取る。このとき、角膜を損傷しないように気をつける。角膜に損傷がないか、迅速に診断する。まず、2%（w/v）フルオレセインナトリウム溶液を角膜表面に 1 滴滴下し、数秒間置いてから等張生理食塩水で洗い流す。フルオレセイン染色した眼球を細隙灯顕微鏡で検査して、角膜が損傷していないか確認する（フルオレセイン染色スコアおよび角膜混濁スコアが、0.5 以下であること）。

25. 損傷が認められなければ、続いて眼球を頭蓋から切断する。このとき、角膜を損傷しないように気をつける。手術用鉗子で瞬膜をしっかりと把持しながら眼球を眼窩から取り出し、刃先の丸い曲剪刀で眼筋を切断する。このとき、圧力のかけ過ぎによる角膜の損傷（圧迫アーチファクト）を引き起こさないことが大切である。

26. 眼球を眼窩から取り出すとき、視神経の可視部は付着させたままにすること。眼窩から取り出した眼球は吸収パッドの上に置き、瞬膜や他の結合組織を切り取る。

27. 摘出した眼球を、角膜が垂直になる向きにして、ステンレススチール製クランプに取り付ける。次いで、クランプを灌流装置(18)のチャンバー内に移す。灌流装置内で、クランプは、等張生理食塩水を滴下（3～4 滴/分、または 0.15 mL/分）したときに角膜全体に液滴がかかる位置に置く。灌流装置のチャンバーの温度は、32±1.5℃に調節する。補遺 3 に、購入や作製することが可能な代表的な灌流装置と眼球クランプの図を示す。灌流装置は、各施設の必要（例：眼球数の違いなど）に応じて改変してよい。

28. 眼球を灌流装置内に置いた後、細隙灯顕微鏡で眼球を再検査して、摘出した際に眼球が傷ついていないか確認する。この時に、角膜の厚みも測定する。測定は、深さ測定器を細隙灯顕

©OECD, (2013)

微鏡に取り付けて、角膜先端部で行う。眼球は、(i) フルオレセイン染色度のスコアが 0.5 より大きいもの、(ii) 角膜混濁度のスコアが 0.5 より大きいもの、または (iii) (i)と(ii) 以外の損傷の徴候があるものは交換する。上記の基準で交換にならなかった眼球のうち、角膜の厚みがすべての眼球の平均値から 10%以上離れているものは交換する。細隙灯顕微鏡を用いるときは、スリットの幅の設定が異なると、角膜の厚みについて異なる測定値が得られることに注意する。スリットの幅は 0.095 mm に設定する。

29. すべての眼球の検査と選択が済んだら、被験物質を適用する前に、供試眼球を約 45～60 分間インキュベートして、試験系に平衡化させる。平衡化後、角膜の厚みと混濁度について、ゼロ点の基準値を測定し、この値をそれぞれのベースライン（すなわち時間 0）の測定値として用いる。フルオレセイン染色度については、眼球摘出時に測定した値をベースラインの測定値として用いる。

被験物質の適用

30. ゼロ点の基準値を測定したら、眼球（眼球ホルダーに取り付けたまま）をただちに灌流装置から取り出し、水平に置いて、被験物質を角膜に適用する。

31. 液体の被験物質は、通常は希釈しないで試験するが、必要と思われる場合（例：試験デザインの一部である場合）は、希釈してもよい。被験物質を希釈する溶媒として望ましいのは、生理食塩液である。コントロールされた条件下であれば、生理食塩液以外の溶媒を使用してもよいが、その場合は、その代替溶媒の妥当性を証明する必要がある。

32. 被験物質を、角膜の表面全体が被験物質で均一に覆われるように適用する。標準的な適用量は 0.03 mL である。

33. 固体の被験物質は、できれば、乳鉢と乳棒か、同様の粉砕用具を用いて、できる限り細かく砕く。被験物質の粉末を、角膜の表面全体が粉末で均一に覆われるように適用する。標準的な適用量は 0.03 g である。

34. 被験物質（液体または固体）を 10 秒間適用した後、室温の等張生理食塩水（約 20 mL）で眼球から被験物質を洗い落とす。次いで、眼球（眼球ホルダーに取り付けたまま）を、角膜が垂直になる向きにして、灌流装置内に戻す。被験物質を 10 秒間適用した以降の時点で、必要な場合（角膜上に被験物質の残留物が認められた場合など）には、すすぎを追加してよい。通常、すすぎのために追加して使用する生理食塩水の量は重要ではないが、角膜における被験物質の固着の所見は重要である。

©OECD, (2013)

対照物質

35. 実験ごとに、同時陰性対照（または溶媒対照）と同時陽性対照を置く。

36. ICE 試験法において 100%濃度の溶液または固体を試験するときは、試験系における非特異的変化を検出するためと、試験条件が刺激性の反応を不適切に引き起こすものではないことを保証するため、生理食塩液を同時陰性対照として用いる。

37. また、ICE 試験法において希釈溶液を試験するときは、試験系における非特異的変化を検出するためと、試験条件が刺激性の反応を不適切に引き起こすものではないことを保証するため、同時溶媒対照群を置く。段落 31 で述べたように、試験系に有害な影響を及ぼさないことが示されているもの以外は、溶媒として使用しないこと。

38. 既知の眼刺激性物質を、実験ごとに同時陽性対照として置き、適切な反応が引き起こされているかを確認する。本試験ガイドラインでは、ICE 試験法を、腐食性物質や重篤な刺激性物質を同定する目的で使用しているため、陽性対照は、ICE 試験法で重篤な反応を引き起こす参照物質である必要がある。ただし、陽性対照の反応のばらつきが経時的に評価できるためには、引き起こされる重篤な反応が過大であってはいけない。また、陽性対照について、統計的に定義される許容範囲を計算できるだけの十分な量の *in vitro* データが得られる必要がある。ICE 試験法の背景データが十分に得られない陽性対照については、同データを得るための試験を行う必要がある場合がある。

39. 被験物質が液体の場合の陽性対照の例としては、10%酢酸や 5%塩化ベンザルコニウムなどがある。また、被験物質が固体の場合の陽性対照の例としては、水酸化ナトリウムやイミダゾールなどがある。

40. 特定の化学品や製品クラスの未知の化学物質について、眼に対する刺激性を評価する場合や、眼に対する刺激性物質について、刺激反応の特定の範囲内の相対的な刺激性を評価する場合は、基準物質が有用である。

測定項目

41. 角膜の評価を、曝露前と、曝露後のすすぎから 30、75、120、180、240 分（いずれも±5 分）後の時点で行う。これらの測定時点を設定することによって、4 時間という曝露時間にわたって十分な測定数を確保しながら、測定の合間に、すべての眼球に必要な観察を行うのに十分な時間も確保することができる。

42. 評価する指標は、角膜における混濁度、腫脹度、フルオレセイン染色度、および形態学的影響（例：上皮細胞の窪み、上皮組織の緩みなど）である。指標の測定は、フルオレセイン染

©OECD, (2013)

色度を除いて、上述の各時点で行い、フルオレセイン染色度については、曝露前と被検物質曝露後 30 分の時点でのみ行う。

43. 角膜混濁度、フルオレセイン染色度、形態学的影響については、写真を撮影して記録しておくことが望ましい。病理組織学的検査を行った場合も同様である。

44. 病理組織学的検査を行う可能性（詳細については、段落 14 と参考文献(8)を参照）に備え、4 時間後の時点における最終測定時に、眼球を適切な固定液（例：中性緩衝ホルマリン）で保存しておくことを推奨する。

45. 角膜腫脹度は、細隙灯顕微鏡に取り付けた光学式角膜厚測定器で測定した角膜の厚みから求める。角膜腫脹度は百分率で表し、角膜の厚みの測定値から、次式を用いて計算する。

$$\frac{\textit{時間 t における角膜の厚み} - \textit{時間 0 における角膜の厚み}}{\textit{時間 0 における角膜の厚み}} \times 100$$

46. すべての供試眼球について、観察時点ごとに角膜腫脹度の平均値を計算する。観察時点ごとの角膜腫脹度の平均スコアのうち、最も高いスコアに基づいて、各被験物質の全体の区分スコアを求める（段落 51 を参照）。

47. 角膜混濁度を、角膜のうち混濁した部分が最も密な場所を用いて、表 1 に示すスコアリングを行って求める。すべての供試眼球について、観察時点ごとに角膜混濁度の平均値を計算する。観察時点ごとの角膜混濁度の平均スコアのうち、最も高いスコアに基づいて、各被験物質の全体の区分スコアを求める（段落 51 を参照）。

表 1. 角膜混濁度のスコア

スコア	観察結果
0	混濁なし。
0.5	ごくかすかな混濁がある。
1	散在性またはびまん性の混濁領域があるが、虹彩の細部は明瞭に観察できる。
2	容易に識別できる半透明の領域があり、虹彩の細部はわずかに不鮮明である。
3	角膜の著しい混濁があり、虹彩固有の細部は見えないが、瞳孔の大きさはかろうじて判別できる。
4	角膜が完全に混濁し、虹彩も見えない。

48. 30 分後の観察時点でのみ、フルオレセイン染色度を、表 2 に示すスコアリングを行って求める。すべての供試眼球について、30 分後の観察時点におけるフルオレセイン染色度の平均値を計算し、得られた値から各被験物質の全体の区分スコアを求める（段落 51 を参照）。

©OECD, (2013)

表 2. フルオレセイン染色度のスコア

スコア	観察結果
0	染まった細胞が認められない。
0.5	染まった細胞が、極めて少数認められる。
1	染まった細胞が、染色を施した範囲全体に分散して認められる。
2	染まった細胞が、巣状または融合性に密に認められる。
3	染まった細胞が、広範囲にわたって融合性に認められる。

49. 形態学的影響には、角膜上皮細胞の「窪み」、上皮組織の「緩み」、角膜表面の「粗化」、角膜への被検物質の「固着」などがある。これらの形態学的影響は、重症度がそれぞれ異なり、また、同時に認められることもある。これらの形態学的影響の分類は、観察者の判断に基づく主観的なものである。

データおよび報告

データ評価

50. 角膜混濁度、角膜腫脹度、フルオレセイン染色度の測定結果を別々に評価して、項目ごとに ICE クラスに分類する。各指標の ICE クラスを組み合わせて、被験物質ごとに刺激性区分（Irritancy Classification）を行う。

判定基準

51. 各項目の測定が終了すれば、あらかじめ定められた範囲に基づいて、ICE クラスを割り当てることが可能になる。角膜腫脹度、角膜混濁度、フルオレセイン染色度の ICE クラスを、それぞれ表 3、表 4、表 5 に示す 4 つの ICE クラスの範囲に従って判定する。表 3 に示す角膜腫脹度のスコアが適用できるのは、角膜の厚みの測定を、深さ測定器 no. 1 を取り付けた細隙灯顕微鏡 Haag-Streit BP900 を使用して、スリット幅を 9½（＝0.095 mm）に設定して行った場合に限られることに注意する。細隙灯顕微鏡を使用する場合は、スリット幅の設定が異なると、角膜の厚みの測定値も異なることに留意する。

©OECD, (2013)

表 3. 角膜腫脹度の ICE 分類基準

角膜腫脹度の平均（%）*	ICE クラス
0～5	I
>5～12	II
>12～18（曝露から 75 分以降）	II
>12～18（曝露から 75 分以内）	III
>18～26	III
>26～32（曝露から 75 分以降）	III
>26～32（曝露から 75 分以内）	IV
>32	IV

*すべての時点における最高スコアの平均値

表 4. 角膜混濁度の ICE 分類基準

角膜混濁度の最大値の平均*	ICE クラス
0.0～0.5	I
0.6～1.5	II
1.6～2.5	III
2.6～4.0	IV

*すべての時点における最大混濁度の平均値（表 1 で定義した混濁度に基づく）。

表 5. フルオレセイン染色度の平均値の ICE 分類基準

曝露から 30 分後のフルオレセイン染色度の平均スコア*	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 で定義したスコアに基づく。

52. 被験物質の *in vitro* 分類の評価は、表 6 に示す角膜腫脹度、角膜混濁度、フルオレセイン染色度について得られた区分の組み合わせに一致する GHS 分類を判断して行う。

©OECD, (2013)

表 6. 全体的な *in vitro* 分類

UN GHS 分類	3 つの指標の組み合わせ
区分外	3 x I 2 x I、1 x II
予測できない	他の組み合わせ
区分 1	3 x IV 2 x IV、1 x III 2 x IV、1 x II* 2 x IV、1 x I* 30 分後の角膜混濁度が 3 以上（2 個以上の眼球で） すべての時点で角膜混濁度が 4（2 個以上の眼球で） 上皮組織の重篤な緩み（1 個以上の眼球で）

*生じる可能性の低い組み合わせ

試験の許容基準

53. 同時陰性（または溶媒）対照と同時陽性対照が、それぞれ GHS 区分外と GHS 区分 1 と同定された場合に、試験が許容されるものとする。

試験報告書

54. 試験報告書には、以下の情報（試験の実施に関連している場合）を含めること。

被験物質および対照物質

– ケミカルアブストラクツサービス（CAS）で使用されている構造名などの化学名。別名があれば、後ろに併記
– CAS 登録番号があれば記載
– わかる範囲で、被験物質や対照物質、または調製品の純度と組成（重量パーセントで）
– 試験の実施に関連する物理化学的性質（物理的状態、揮発性、pH、安定性、化学的分類、水溶性など）
– 試験前に被験物質や対照物質の処理（例：加温、粉砕）を行った場合は、それを記載
– わかっている場合、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、試験施設、および試験責任者の名前と住所
– 眼球の入手先（例：眼球採取が行われた施設）

試験法の条件

– 用いた試験系の説明

©OECD, (2013)

– 用いた細隙灯顕微鏡（型番など）とその設置環境
– 背景陰性対照および背景陽性対照の結果の参照先。同時基準対照を置いた場合は、その許容範囲を示した背景データの参照先
– 試験法の完全性（正確性と信頼性）を将来的に保証するのに用いる手順（習熟度確認物質による定期的な試験など）

眼球の採取と調製

– 眼球を採取したニワトリの週齢と体重。可能であれば、これ以外の詳細な特徴（性別、系統など）
– 眼球の保存と輸送の条件（例：眼球の採取日時、ニワトリの頭部を採取してから摘出眼球を灌流チャンバーに入れるまでの時間）
– 眼球の準備と取り付け（眼球の品質に関する記載、眼球チャンバーの温度、試験に用いた眼球の選択基準など）

試験手順

– 用いた連数
– 用いた陰性対照と陽性対照の情報（溶媒対照や基準対照を置いた場合は、その情報も記載）
– 被験物質について用いた用量、適用の方法、曝露時間
– 観察の時点（処理前、処理後）
– 用いた評価基準および判定基準の説明
– 用いた試験許容基準の説明
– 試験手順を修正した場合は、その説明

結果

– 各観察時点における個々の眼球についての、角膜腫脹スコア、角膜混濁スコア、角膜フルオレセイン染色スコアの集計。試験した眼球すべてについての、観察時点ごとの平均スコアも表に含めること。
– 観察時点ごとの角膜腫脹スコア、角膜混濁スコア、角膜フルオレセイン染色スコアの各平均値の最高値と、それに関連する ICE クラス
– 他に観察された影響があれば、その説明
– *in vitro* で導き出した GHS 区分
– 必要に応じて、眼球の写真

結果の考察

結論

©OECD, (2013)

LITERATURE

(1) 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]

(2) 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].

(3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. 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.: 10-7553A. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm]

(4) United nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html]

(5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.

(6) OECD (2012). Test Guideline 405. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. DOI : 10.1787/9789264185333-en.

(7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace in vivo Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. Toxicology *In Vitro* 24, 1-9.

(8) OECD (2011) Guidance Document on "The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Paris.

(9) ICCVAM. (2006). Background review document: 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 at: [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.

©OECD, (2013)

(11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Available: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(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) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? Toxicology *in Vitro* 20,78-81.

(16) 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].

(17) 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.

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

©OECD, (2013)

補遺 1

定義

正確性：試験法の結果と、受け入れられている基準値との間の一致の程度。試験法の性能を判断する尺度であり、「妥当性」の 1 つである。この用語は、試験法の正しい結果の割合を意味する「一致度」と同義で用いられることが多い。

参照物質：被験物質との比較のための基準として用いる物質。基準物質として必要な特性は、(i) 安定かつ信頼できる供給源があること、(ii) 構造や機能が被験物質のクラスに類似していること、(iii) 物理的／化学的特性がわかっていること、(iv) 既知の影響に関する参考資料があること、および (v) 望ましい反応の範囲内で作用強度がわかっていることである。

ボトムアップ方式：眼刺激性や眼に対する重篤な損傷性の区分対象外であることが疑われる化学品に対して用いる階層的な方式。第一段階では、この区分外の化学品（陰性の結果）を確定して、それ以外の化学品（陽性の結果）と区別する。

角膜：眼球の前面にあって虹彩と瞳孔を覆い、光を眼球内部に通す透明な部分。

角膜混濁度：被験物質を曝露した角膜の不透明さの程度を測定するもの。角膜混濁度の上昇は、角膜の損傷を示す。

角膜腫脹度：ICE 試験法において、被験物質を曝露した角膜の膨張の程度を客観的に測定するもの。百分率で表し、ベースライン（曝露前）に測定した角膜の厚みと、ICE 試験の被験物質に曝露した後に一定の間隔で測定した角膜の厚みから計算する。角膜腫脹度は、角膜への損傷の程度を示す。

眼刺激性：眼の前側表面に被験物質を適用すると、適用後 21 日以内に完全に回復する眼の変化を引き起こすこと。「眼に対する可逆的影響」や「UN GHS 区分 2」(4)と互換可能。

偽陰性率：陽性の物質のうち、試験法によって誤って陰性となったものの割合。試験法の性能を表す指標の 1 つ。

偽陽性率：陰性の物質のうち、試験法によって誤って陽性となったものの割合。試験法の性能を表す指標の 1 つ。

©OECD, (2013)

フルオレセイン染色度：ICE 試験法において、被験物質を曝露した角膜の上皮細胞がフルオレセインナトリウムを保持する程度を、主観的に測定するもの。フルオレセイン染色度の上昇は、角膜上皮の損傷を示す。

有害性：有機体、身体、個体群（副次集団）に曝露すると、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況に本来備わっている性質。

眼に対する不可逆的影響：「眼に対する重篤な損傷」および「UN GHS 区分 1」を参照。

混合物：互いに反応しない 2 つ以上の物質からなる混合物または溶液。

陰性対照：被験物質に曝露しないこと以外は、被験物質の試料と同じ処理をする試料。溶媒が試験系と相互作用するかどうかを示すために、陰性対照は、被験物質に曝露する試料および他の対照と一緒に処理される。

分類できない：眼刺激性（UN GHS 区分 2）にも、眼に対する重篤な損傷性（UN GHS 区分 1）にも分類されない物質。「UN GHS 区分外」と同義。

陽性対照：曝露する物質が、陽性反応を引き起こすことがわかっている物質であること以外、被験物質の試料と同じ処理をする試料。陽性対照の反応の経時的変動が評価できるためには、重篤な陽性反応が過大でない必要がある。

信頼性：同じプロトコルを用いて試験法を実施する際に、施設内および施設間において、試験法を経時的に再現性よく実施することが可能な程度の尺度。施設内および施設間の再現性と、施設内併行精度を計算して評価する。

眼に対する可逆的影響：「眼刺激性」および「UN GHS 区分 2」を参照。

眼に対する重篤な損傷性：眼球の前側表面に被験物質を適用すると、適用後 21 日以内には完全に回復しない眼の組織損傷や重篤な視力低下を引き起こすこと。「眼に対する不可逆的影響」や「UN GHS 区分 1」と同義(4)。

細隙灯顕微鏡：立体正立像を結ばせ、双眼顕微鏡下で拡大することによって、眼を直接調べることができる機器。ICE 試験法では、細隙灯顕微鏡は、ニワトリ眼球の前側の構造を検査する以外に、深さ測定器を取り付けて角膜の厚みを客観的に測定するのにも用いる。

溶媒対照：試験系のすべての成分が含まれている無処理の試料。被験物質に曝露した対照や他の対照の試料で処理する溶媒など、同一の溶媒に溶解した被験物質に曝露した試料について、べー

©OECD, (2013)

スラインの反応を確かめるための試料。溶媒対照は、同時陰性対照と一緒に試験すると、試験系と相互作用するかどうかも示すことができる。

物質：自然の状態の、または製造過程で得られる化学元素とその化合物のことをいい、その製品の安定性を保つために必要な添加物や、その工程から派生する不純物は含まれるが、その物質の安定性に影響を及ぼすことも、その組成を変化させることもなく分離する可能性のある溶剤は除く(4)。

界面活性剤：液体の表面張力を下げることで、泡立たせることや、固体に浸透できる物質。洗剤などがある。また、湿潤剤とも呼ばれる。

トップダウン方式：眼に対する重篤な損傷性を引き起こす疑いのある化学品に対して用いる階層的な方式。第一段階では、眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学品（陽性の結果）を確定して、それ以外の化学品（陰性の結果）と区別する。

被験物質：ICE 試験法で評価する化学品（物質および混合物）

階層的試験戦略：被験物質に関する既存のすべての情報を、指定された順番で階層的に精査する試験計画。段階ごとに証拠の重み付けのプロセスを用いて、危険有害性分類を決定するための十分な情報が得られるかどうかを決定してから、その次の段階に進む。被験物質の刺激性を既存の情報に基づいて分類できる場合、さらなる試験は必要ない。被験物質の刺激性を既存の情報に基づいて分類できない場合は、明確な分類を行えるまで、一連の階層的な動物試験手順が遂行される。

国際連合による化学品分類および表示に関する世界調和システム（UN GHS）：化学品（物質および化合物）の分類を、物理化学的危険性、健康有害性、環境有害性の、統一された種類や程度に応じて提案するとともに、人々（雇用者、労働者、輸送担当者、消費者、緊急時対応者など）や環境を保護するために、有害な影響に関する情報を伝えられるように、絵表示、注意喚起語、危険有害性情報、注意書き、安全データシートなど、対応する伝達要素を取り扱うシステム(4)。

UN GHS 区分 1：「眼に対する重篤な損傷性」や「眼に対する不可逆的影響」を参照。

UN GHS 区分 2：「眼刺激性」や「眼に対する可逆的影響」を参照。

UN GHS 区分外：UN GHS の区分 1 または区分 2（2A または 2B）への分類要件を満たさない物質。「分類できない」と互換できる。

©OECD, (2013)

バリデートされた試験法：特定の目的のために、妥当性（正確性を含む）および信頼性を確認するためのバリデーション試験が完了している試験法。提唱された目的にふさわしいことがわかっている正確性と信頼性に関し、十分な性能を有していない可能性があることに留意しなければならない。

証拠の重み付け：化学品の危険有害性に関する結論およびその裏付けを得る際に、さまざまな情報の強みと弱みを考慮するプロセス。

©OECD, (2013)

補遺 2

ICE 試験法の習熟度確認物質

施設は、本試験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習熟度を確認する必要があり、そのためには、表 1 で推奨する 13 個の物質について、眼に対する有害性の分類を正確に同定する必要がある。表 1 の物質は、*in vivo* ウサギ眼試験（TG 405）の結果および UN GHS 分類システム（すなわち、UN GHS 区分 1、2A、2B、または区分外）(4) (6)に基づいて、眼に対する有害性の反応の範囲を示すために選抜したものである。他の選抜基準は、市販されている化学品であること、高品質の *in vivo* 参照データが入手可能であること、および *in vitro* 試験法である ICE 試験法から高品質のデータが得られることであった。参照データは、ICE 試験法についての Streamlined Summary Document (5)および ICCVAM Background Review Document (9)から得られる。

©OECD, (2013)

表 1：ICE 試験法の習熟度確認物質

化学品	CAS RN	化学的クラス [1]	物理的形状	*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	区分 1
クロルヘキシジン	55-56-1	アミン、アミジン	固体	区分 1	区分 1
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	区分 1
イミダゾール	288-32-4	複素環式化合物	固体	区分 1	区分 1
トリクロロ酢酸（30%）	76-03-9	カルボン酸	液体	区分 1	区分 1
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	予測できない [4]
硝酸アンモニウム	6484-52-2	無機塩	固体	区分 2A[5]	予測できない [4]
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	予測できない [4]
ジメチルスルホキシド	67-68-5	有機硫黄化合物	液体	区分外	区分外
グリセロール	56-81-5	アルコール	液体	区分外	区分外（境界域）
メチルシクロペンタン	96-37-7	炭化水素（環式）	液体	区分外	区分外
n-ヘキサン	110-54-3	炭化水素（非環式）	液体	区分外	区分外
トリアセチン	102-76-1	脂質	液体	分類できない	区分外

略語：CAS RN = ケミカルアブストラクトサービス（CAS）登録番号

[1] 化学的クラスの各被験物質への割り当ては、標準的な分類法を用いて、米国の国立医学図書館（National Library of Medicine）の医学問題表題集（Medical Subject Headings：MeSH）分類体系（http//www.nlm.nih.gov/mesh で閲覧できる）に基づいて行った。

[2] UN GHS (4)(6)を用い、*in vivo* ウサギ眼試験（OECD TG 405）の結果に基づく。

[3] 表 6 に示す ICE の結果に基づく。

[4] GHS 区分外および GHS 区分 1 を同定するための、表 6 に示したもの以外の ICE スコアの組み合わせ（表 6 参照）

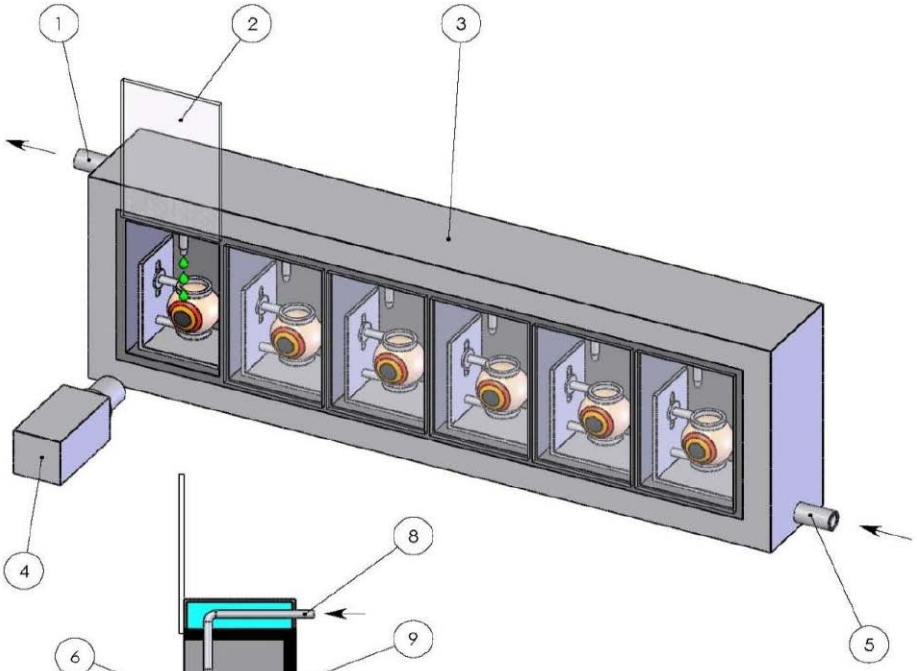
[5] 区分 2A とするか区分 2B とするかは、この 2 つの区分を区別するための UN GHS 基準の解釈、すなわち、区分 2A に分類するための条件を、7 日目に影響を有する個体が 3 匹中 1 匹の場合とするか、3 匹中 2 匹の場合とするかによる。*in vivo* 試験に用いられたのは 3 匹である。1 匹は、結膜発赤以外のすべてのエンドポイントが、7 日目までにスコア 0 に回復した。完全な回復が 7 日目にみられなかった 1 匹は、7 日目の結膜発赤スコアが 1 で、10 日目には完全に回復した。

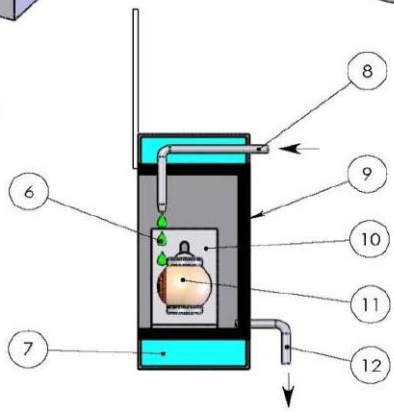
©OECD, (2013)

補遺 3

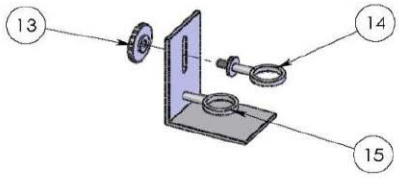
ICE 灌流装置および眼球クランプの図

（灌流装置および眼球クランプの一般的な補足説明については、Burton et al. (18)を参照）





区画の横断面



眼球ホルダー

番号	説明
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	生理食塩液
7	温水
8	生理食塩液流入口
9	区画
10	眼球ホルダー
11	ニワトリ眼球
12	生理食塩液排出口
13	止めねじ
14	上部調整アーム
15	下部固定アーム

©OECD, (2013)