OECD/OCDE

2018/06/25

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.

Original work:

OECD (2018), 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-438-2018.pdf.

©OECD (2018)
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

OECD/OCDE 438

2018 年 6 月 25 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

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

はじめに

1. ニワトリ摘出眼球（ICE）試験法の評価は、I 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（ECVAM）と日本動物実験代替法評価センター（JaCVAM）が協力して、2006 年と 2010 年に行われた（1）（2）（3）。初版の評価において 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）」により定義された、眼に対する重篤な損傷性（区分 1）を引き起こす化学物質（物質および混合物）を同定する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）。バリデーション試験で用いられた *in vitro* および *in vivo* データセットの再評価から、UN GHS で定義された眼刺激性および眼に対する重篤な損傷性への分類が不要な化学物質の同定にも ICE 試験法は使用可能と結論付けられ、2013 年採択の TG 438 改訂版に至った（4）（5）。それ以降、UN GHS 分類システムに従って分類が不要な化学物質の同定に用いる判定基準は、最新の許容基準に基づいて改訂されてきた（5）（6）（7）（8）。さらに、UN GHS 区分 1 の極端でない pH（$2 < pH < 11.5$）の洗浄剤および界面活性剤の同定には、病理組織検査が有用な追加エンドポイントであると示されている（9）（10）。本試験ガイドライン（2009 年採択、2013 年および 2018 年に改訂）には、こうした評価に基づく ICE 試験法について、最新の推奨される用途および限界が記載されている。

2. 現在、一般に認められているとおり、様々な化学物質分類に向け完全な範囲の刺激性全体を予測するには、当面、単一の *in vitro* 眼刺激性試験では *in vivo* Draize 眼試験の十分な代替は不可能と考えられる。ただし、（段階的）試験戦略ならびに／または試験および評価に関する統合的アプローチ（IATA）の中で、代替試験法を戦略的に組み合わせれば、Draize 眼試験の代替は可能であると考えられる（7）（11）。

© OECD, (2018)

本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/で入手可能な条項および条件に従って自由に使用できる。

化学物質の評価における「データの相互受け入れ」に関する協議会決定事項補遺 I 改訂のための、権限委譲に関する協議会決定事項[C（2018）49]に従って、本ガイドラインは、OECD の化学物質委員会と化学物質、農薬およびバイオテクノロジーに関する作業部会との合同会議により、書面による手順で 2018 年 6 月 25 日に改訂された。

トップダウン方式は、既存の情報に基づき、化学物質が強い刺激性を有すると予測される場合に設計される一方、ボトムアップ方式は、既存の情報に基づき、化学物質が分類を要するほどの眼刺激性を引き起こさないと予測される場合に設計される（7）（11）。ICE 試験法は特定の状況の下で使用できる *in vitro* 試験法であり、段落 7～11 記載のとおり、眼に対する化学物質の有害性の分類および表示には明確な限界がある。ICE 試験法は、*in vivo* ウサギ眼試験の単独での代替としては妥当でないとみなされるが、眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学物質（すなわち、UN GHS 区分 1（4）と分類される化学物質）を追加試験なしで同定するには、OECD GD 263（7）において推奨されるトップダウン方式のように、試験戦略内の第 1 段階として推奨される。ICE 試験法は、UN GHS により定義された眼刺激性および眼に対する重篤な損傷性に分類が不要な化学物質（区分外）（4）の同定にも推奨されるため、ボトムアップ方式の試験戦略（OECD GD 263（7））における第 1 段階として使用できる。ただし、ICE 試験法により、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物質、あるいは、眼刺激性／眼に対する重篤な損傷性に分類されない化学物質については、最終的な分類を確立する追加情報が必要になると考えられる。最も適切な試験法の選択および本試験ガイドラインの使用については、「眼に対する重篤な損傷性および眼刺激性の試験および評価に関する統合的アプローチについての OECD ガイダンス文書」（7）に照らして確かめること。さらに、UN GHS 以外の分類法について、ボトムアップ方式の ICE 試験法を用いる場合、その前に適切な規制当局に相談すること。

3. 本試験ガイドラインの目的は、被験化学物質の眼に対する有害性の評価に用いる手順を記述することにあり、有害性は、ニワトリ摘出眼球におけるその毒性誘発能の有無により測定される。角膜に対する毒性作用の測定は、（i）混濁の定性評価、（ii）眼球へのフルオレセイン適用（フルオレセイン染色）に基づいた上皮損傷の定性評価、（iii）角膜厚の増加（腫脹）の定量測定、および（iv）処理した眼球表面の肉眼的形態的損傷の定性評価により行う。被験化学物質への曝露後の角膜混濁、角膜腫脹、角膜損傷の評価を個別に実施後、これらを組み合わせて眼刺激性分類を得る。さらに、UN GHS 区分 1 の極端でない pH（2 < pH < 11.5）の洗浄剤および界面活性剤の予測を可能性として改善するため、病理組織検査所見も追加エンドポイントとして使用できる（段落 8 および 56 参照）。

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（12）に提唱されるプロトコールに基づいている。この文書は 2011 年に初版が採択され、2017 年および 2018 年にさらに改訂された。このプロトコールは、公表されているプロトコールから得られた情報に基づいている（13）（14）（15）（16）（17）。

© OECD 2018

6. 本試験ガイドラインの基盤となる評価では広範な化学物質が検討され、データベース全体については、現在 75 種類の物質および 109 種類の混合物からなる 184 種類の被験化学物質に達している（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。液体は水性か非水性、固体は水溶性か非水溶性について可能である。気体およびエアロゾルは、未だバリデーション試験で評価されていない。

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物質、すなわち、UN GHS 区分 1（4）と分類される化学物質の同定に使用できる。この目的で用いる場合、ICE 試験法の限界が確認されており、その根拠には、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が挙げられる（1）（3）（18）。さらに、*in vivo* で持続的に重度でない影響を引き起こす被験化学物質は、過小な予測のリスクも生じうる（22）。ただし、この場合の偽陰性率（UN GHS 区分 1 が UN GHS 区分 1 でないと同定されていること）は重大ではない。何故なら、陰性の結果になった被験化学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* 試験により、またはウサギでの最後の選択肢として、証拠の重み付け方式における順次的な試験戦略を用い、後に検討されると考えられるからである。さらに、病理組織検査を、*in vivo* において主に持続的に重度でない影響を引き起こすことが示されている、UN GHS 区分 1 の極端でない pH（2 < pH < 11.5）の洗浄剤（および界面活性剤）の同定に用いた場合、偽陰性率を低下させる有用な追加エンドポイントであることが認められた（9）（10）（19）。固体に関しては、*in vivo* Draize 眼刺激性試験において、固体にはばらつきがあり極端な曝露条件になる可能性があり、真の刺激性とは無関係の予測となりうることに留意すべきである（20）。研究者はあらゆる種類の化学物質について本試験法の使用を検討すると考えられるが、それによる陽性の結果は眼に対する重篤な損傷性を示す、すなわち UN GHS 区分 1 の分類として追加試験なしで受け入れること。ただし、アルコール類により得られた陽性の結果は、過大な予測となるリスクがあるため、慎重に解釈する。

8. 眼に対する重篤な損傷性（UN GHS 区分 1）を引き起こす化学物質の同定に用いた場合、ICE 試験法（病理組織検査の使用なし）を、UN GHS 分類システムに従って分類された *in vivo* ウサギ眼試験法のデータと比較すると、全体の正確性は 83%（142/172）、偽陽性率は 7%（9/127）、偽陰性率は 47%（21/45）であることが認められた（4）（5）。UN GHS 区分 1 の極端でない pH（2 < pH < 11.5）の洗浄剤および界面活性剤同定のため、病理組織検査を追加エンドポイントとして考慮した場合、ICE 試験法の偽陰性率とその正確性が改善する（偽陰性が 64%から 27%（n=22）、正確性が 53%から 77%（n=30））一方、許容可能な偽陽性率は維持されている（偽陽性が 0%から 12.5%（n=8））（10）。

9. ICE 試験法は、UN GHS 分類システム（4）下における眼刺激性や眼に対する重篤な損傷性への分類が不要な化学物質の同定にも使用できる。本試験法は、あらゆる種類の化学物質に使用できることから、眼刺

© OECD 2018

激性や眼に対する重篤な損傷性に化学物質が分類されない場合、陰性の結果を受け入れ可能と考えられる。ただし、バリデーシ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. 眼刺激性および眼に対する重篤な損傷性への分類が不要な化学物質の同定に用いた場合、ICE 試験法を UN GHS に従って分類された *in vivo* ウサギ眼試験法のデータと比較すると、全体の正確性は 88%（161/184）、偽陽性率は 24%（20/83）、偽陰性率は 3%（3/101）となる（4）（5）。特定のクラス内の被験化学物質（すなわち、汚れ止めの有機溶剤を含有する塗料）をデータベースから除外した場合、UN GHS 分類システム（4）に関する ICE 試験法の正確性は 88%（159/181）、偽陽性率は 24%（20/83）、偽陰性率は 2%（2/99）である。

11. 眼刺激性（すなわち、UN GHS 区分 2 または区分 2A）と分類すべき被験化学物質、あるいは軽度の眼刺激性（UN GHS 区分 2B）と分類すべき被験化学物質の同定については、UN GHS 区分 1 の化学物質を UN GHS 区分 2、2A、または 2B と過小に分類し、また、UN GHS 区分外の化学物質を UN GHS 区分 2、2A、または 2B と過大に分類する例が相当数に及ぶため、ICE 試験法は推奨されない。このため、さらなる情報、また必要であれば、別の適切な方法による追加試験が必要と考えられる。

12. ニワトリ眼球に関するすべての手順では、ヒトまたは動物由来の材料（組織および組織液を含むが、これらに限定されない）について、適用可能な地域の規制および試験実施施設の取扱手順に従うこと。試験実施施設共通の事前対策が推奨される（21）。

13. ICE 試験法は、ウサギ眼刺激性試験法において評価される結膜損傷と虹彩損傷について直接取り扱わないが、UN GHS 分類検討時の *in vivo* での主要な分類推進要因である角膜への影響について扱っている。この点に関し、UN GHS に従って化学物質を分類する場合、虹彩に及ぼす影響の重要性はより低いことに留意すべきである（8）（22）。また、ICE 試験法では角膜損傷の可逆性それ自体は評価できないが、極端でない pH（$2 < pH < 11.5$）の洗浄剤により引き起こされる影響など、初期の高レベルの損傷と関連しない不可逆的影響を引き起こす被験化学物質の同定には、病理組織検査所見が役立ちうると示されている（9）。最後に、ICE 試験法は、眼の曝露に伴う全身毒性の可能性について評価できない。

14. 本試験ガイドラインは、新たな情報およびデータを考慮するため、定期的に更新される。例えば、極端でない pH の洗浄剤および界面活性剤以外の被験化学物質については、さらなる病理組織検査データが入手可能と考えられる。こうした可能性を評価するため、ユーザーは眼球を保存し、ICE 試験法の正確性をさらに改善しうるデータベースおよび判定基準の作成に使用可能な病理組織標本を準備することが奨励される。OECD では、ICE および BCOP（ウシ角膜を用いる混濁度および透過性）での *in vitro* 眼毒性試験法を用いる場合に考慮するガイダンス文書 160 を

© OECD 2018

作成しており、本文書には、評価用の病理組織標本の採取および処理に関する詳細な手順が記載されている（12）。

習熟度の立証

15. いずれの試験実施施設も最初に標準的な ICE 試験法を確立するには、補遺 2 に示した習熟度確認化学物質を用いる。試験実施施設は、規制目的で有害性を分類する場合、ICE データ提出の前にこれらの化学物質を用い、標準的な ICE 試験法実施の際の技術的能力を立証できる。極端でない pH の洗浄剤および界面活性剤の規制目的での有害性分類に向け、ICE の病理組織検査を確立する意思のある試験実施施設については、改訂版 OECD GD 160 に示された ICE の図解および推奨事項を用いる（12）。調和がとれ、一貫性があり、再現可能な病理組織検査所見を確保するため、統合された訓練、輸送能、習熟度評価が推奨される。さらに、現行の推奨事項（23）に従って、また病理組織検査のピアレビューの GLP 要件に関する OECD 勧告文書 No. 16（24）に従って、加えて段落 50 記載のとおり、内部病理検査のピアレビューを実施する。こうしたピアレビュープロセスにより、病理診断および解釈の正確性および品質を検証し改善することができる。最後に、極端でない pH の洗浄剤および界面活性剤の規制目的での有害性分類に向け、ICE の病理組織検査データを提出する場合、その前に試験実施施設では補遺 3 に示された習熟度確認化学物質を用い、ICE の病理組織検査で認められた影響のスコアリングに関する技術的能力を立証する。

本試験の概要

16. ICE 試験法は、ニワトリ眼球を *in vitro* で短期間維持できる器官型モデルである。本試験法では、被験化学物質による損傷を、角膜腫脹、角膜混濁、およびフルオレセイン染色の測定により評価する。さらに、病理組織検査の使用により、UN GHS 区分 1 の極端でない pH（2 < pH < 11.5）の洗浄剤および界面活性剤同定法の感度を上昇できる（10）。角膜腫脹の測定が定量評価で示される一方、角膜混濁、フルオレセイン染色および病理組織検査の変化はそれぞれ定性評価となる。各測定結果は、ICE クラス（I～IV）の割り当てに用いる定量的スコアに変換されるか、*in vitro* での眼に対する有害性分類の割り当てに用いる定性的区分（UN GHS 区分 1 か UN GHS 区分外）に割り当てられるかのいずれかになる（判定基準参照）。ただし、ICE 試験法では、UN GHS 区分 1 にも UN GHS 区分外にも同定されない化学物質の予測はできず（段落 11 参照）、そうした場合、ICE 試験の結果が「予測不能」であったら、分類のため追加情報が必要になると考えられる［ガイダンスについては（7）参照］。

ニワトリ眼球の入手先および週齢

17. 従来、ICE 試験法では、ヒトの消費用に屠殺された食肉処理場のニワトリから採取した眼球を用い、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とみなされる、健康なニワトリの

© OECD 2018

眼球のみ用いる。

18. ニワトリの最適な週齢を評価する対照試験は実施されていないが、本試験法で従来用いられているニワトリの週齢および体重は、家禽の食肉処理場により従来処理されている若鶏と一致する（すなわち約 7 週齢、1.5～2.5 kg）。

眼球の採取および試験実施施設への輸送

19. ニワトリを人道的にスタンニングし、放血のため頸部切開後直ちに頭部を除去する。人道的なスタンニング方法には、ニワトリ眼球の品質に悪影響を及ぼさないことを示せる限り（段落 21 参照）、電気スタンニングと人工ガス（controlled atmosphere）スタンニングが挙げられる。試験実施施設に近接するニワトリの現地入手先は、その頭部を食肉処理場から試験実施施設に十分に迅速に輸送することで、劣化および／または細菌汚染を最小化できるよう場所を設定する。ニワトリ頭部の採取から摘出後の眼球の灌流チャンバー配置までの時間間隔を最小限（通常 2 時間以内）にし、試験法の許容基準を確実に満たす。本試験法に用いる眼球はすべて、特定の日に採取した同一グループの眼球とする。

20. 眼球摘出は試験実施施設で行われるため、無傷の頭部を等張生理食塩水に浸したティッシュペーパーで湿らせたプラスチック製ボックスに入れ、環境温度（通常 18～25°C）で食肉処理場から輸送する。

ICE 試験法で用いる眼球の選択基準および個数

21. 眼球摘出後、ベースラインにおけるフルオレセイン染色の高スコア（すなわち 0.5 超）、または、角膜混濁の高スコア（すなわち 0.5 超）の眼球は却下する。

22. 各投与群および同時の陽性対照群は、3 眼以上からなる。陰性対照群または溶剤対照群（生理食塩水以外の溶剤を用いる場合）は、少なくとも 1 眼からなる。

23. GHS 区分外の結果に導く固体材料の場合、3 眼の 2 回目の実行により、陰性の結果を確認または棄却することが推奨される。

手順

眼球の準備

24. 角膜を損傷しないよう留意しながら、眼瞼を慎重に切除する。2%（w/v）フルオレセインナトリウムを角膜表面に 1 滴滴下し数秒間経過後、等張生理食塩水で洗浄し、角膜の完全性を速やかに評価する。次に、フルオレセイン処理を行った眼球を細隙灯顕微鏡で検査し、角膜損傷がないことを確認する（すなわち、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）。

© OECD 2018

25. 損傷がない場合、角膜を損傷しないよう留意しながら、眼球を頭蓋からさらに切除する。手術用鉗子で瞬膜を確実に固定することにより眼球を眼窩から摘出し、刃先の丸い曲剪刀で眼筋を切断する。過度の圧力による角膜損傷（すなわち圧迫アーチファクト）の発生を回避することが重要である。

26. 眼球を眼窩から摘出する場合、視神経の可視部は付着したままにする。一旦眼窩から摘出したら、眼球を吸収パッドに置き、瞬膜および他の結合組織を切除する。

27. 摘出眼球は、角膜の位置が垂直になるようクランプ（ステンレス鋼または適切な代替品）に取り付け、（ニワトリ眼球の強膜は比較的強固であるが、眼球の適切な固定に要する圧力はごくわずかであるため）クランプによる眼球の過度の圧迫を回避する。次に、クランプを灌流装置のチャンバーに移す（25）。角膜全体に等張生理食塩水の滴下（3～4滴／分または 0.1～0.15 mL/分）が供給されるよう、クランプを灌流装置に位置付ける。灌流装置のチャンバーの温度は、32 ± 1.5°C に調節する。補遺 4 に、購入または構築により入手可能な典型的な灌流装置および眼球クランプの図を示す。灌流装置は、個々の試験実施施設の必要性を満たすため（例えば、様々な眼球数に対応するため）変更できる。

28. 灌流装置に配置後、眼球を細隙灯顕微鏡（例えば、Haag-Streit BP900）で再度検査し、切離手技中に眼球が損傷しなかったことを確認する。このとき、細隙灯顕微鏡下で深度測定装置を用い角膜頂点における角膜厚も測定する。（i）フルオレセイン染色スコアが 0.5 超、（ii）角膜混濁スコアが 0.5 超、または（iii）損傷のさらなる徴候がある眼球は交換する。上記いずれの基準に基づいても却下されない眼球の場合、個々の眼球について、角膜厚がすべての眼球の平均値から 10%超逸脱していれば却下する。深度測定装置 no. 1 を用いた Haag-Streit BP900 細隙灯顕微鏡の場合、スリット幅の設定は 9½（0.095 mm に相当）にする。代わりに、深度測定装置に取り付け可能で、スリット幅 0.095 を適用可能な限り、Haag-Streit BQ900 細隙灯顕微鏡を使用できる（段落 53 も参照）。細隙灯顕微鏡のスリット幅の設定が異なれば、顕微鏡がもたらす角膜厚の測定値も異なると考えられることをユーザーは認識すること。

29. 一旦すべての眼球の検査および承認を終えたら、投与前に眼球を約 45～60 分間インキュベートし、試験系に平衡化させる。平衡化の時間が過ぎたら、角膜厚および角膜混濁について 0 となる基準測定値を記録し、ベースライン値（すなわち、時間 0）として用いる。切離時に測定したフルオレセイン染色スコアを、本試験のエンドポイントのベースライン測定値として用いる。

被験化学物質の適用

30. 0 となる基準測定値の記録後、直ちに（眼球ホルダーの）眼球を灌流装置から取り出し、水平となる位置に配置し、被験化学物質を角膜に適用する。

© OECD 2018

31. 液体の被験化学物質は通常は希釈せずに検討するが、（例えば、試験デザインの一環として）必要とみなされる場合、希釈できる。被験化学物質の希釈に好ましい溶剤は（等張）生理食塩水である。ただし、管理された条件下では別の溶媒も使用できるが、生理食塩水以外の溶剤である適切性について立証すること。

32. 液体の被験化学物質については、角膜の表面全体がこの被験化学物質で均一に覆われるよう角膜に適用する。標準的な量は 0.03 mL である。

33. 可能であれば、固体の被験化学物質は、乳鉢および乳棒または同様の粉砕ツールでできる限り細かく粉砕する。この粉末を、角膜の表面が被験化学物質で均一に覆われるよう角膜に適用する。標準的な量は 0.03 g である。

34. 被験化学物質（液体または固体）を 10 秒間適用後、環境温度で等張生理食塩水（約 20 mL）により眼球から洗浄する。その後、（眼球ホルダーの）眼球を元の垂直となる位置にして灌流装置に戻す。必要な場合、10 秒間適用後およびそれ以降の時点（例えば、角膜上に被験化学物質の残留物を発見した場合）において、追加の洗浄を行える。通常、洗浄に追加で用いられる生理食塩水の量が重要なのではなく、角膜への化学物質付着を観察することが重要である。

対照化学物質

35. 実験ごとに、同時の陰性対照または溶剤／溶媒対照、および陽性対照を含める。

36. 100%の液体または固体を検討する場合、ICE 試験系における非特異的な変化を検出するため、また、本試験法の条件により不適切な刺激反応が生じないことを確保するため、本試験法では（等張）生理食塩水を同時の陰性対照として用いる。

37. 希釈した液体を検討する場合、本試験系における非特異的な変化を検出するため、また、本試験法の条件により不適切な刺激反応が生じないことを確保するため、本試験法では同時の溶剤／溶媒対照群を含める。段落 31 で述べたとおり、本試験系に悪影響を及ぼさないと立証されている溶剤／溶媒のみ使用できる。

38. 既知の眼刺激性物質を、実験ごとに同時の陽性対照として含め、適切な反応が引き起こされることを検証する。本試験ガイドラインでは、眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学物質の同定に ICE 試験法が用いられているため、陽性対照は、本試験法の UN GHS 区分 1 としての分類基準を満たす反応を引き起こす参照化学物質とする。ただし、陽性対照の反応の経時的ばらつきを確実に評価可能にするため、重度の反応の大きさを過度にしないこと。陽性対照について統計的に定義される許容範囲を算出できるよう、陽性対照の十分な *in vitro* データを生成する。特定の陽性対照について過去の十分な ICE 試験法のデータを入手できな

© OECD 2018

い場合、試験を実施しこの情報を提示する必要があると考えられる。

39. 液体の被験化学物質での陽性対照の例には、10%酢酸または 5%塩化ベンザルコニウムが挙げられ、一方、固体の被験化学物質での陽性対照の例には、水酸化ナトリウムまたはイミダゾールが挙げられる。

40. 特定の化学物質または製品クラスに属す未知の化学物質について眼刺激性を評価する場合、あるいは、刺激反応が特定の範囲内にある眼刺激物質について相対的な刺激性を評価する場合、ベンチマーク化学物質が有用である。

測定されるエンドポイント

41. 処理した角膜を、投与前と、投与後の洗浄から 30、75、120、180、240 分（±5 分）後の時点で評価する。これらの時点により、4 時間の観察期間に十分な数の測定を行えると同時に、すべての眼球に実施される必要な観察の測定間に十分な時間を残している。

42. 評価されるエンドポイントは、角膜混濁、角膜腫脹、フルオレセイン染色、および形態学的影響（例えば、上皮の窪みまたは緩み）である。すべてのエンドポイントについて、（投与前および被検化学物質曝露後 30 分にのみ測定される）フルオレセイン染色を除き、上述の各時点で測定する。

43. 角膜混濁、フルオレセイン染色、形態学的影響、また実施した場合には病理組織検査所見について記録するため、写真を撮影するのが望ましい。

44. 4 時間での最終検査後、特に、極端でない pH（2 < pH < 11.5）の洗浄剤および界面活性剤に関する病理組織検査の可能性に向け、ユーザーには眼球を適切な固定液（例えば、中性緩衝ホルマリン）に保存することが奨励される（段落 7、14、56 参照）。病理組織検査を実施する場合、OECD GD 160 （12）内の病理組織標本の採取および処理について記載された手順に従って、眼球の固定、トリミング、パラフィンワックスでの包埋、薄切、および染色を行う。

45. 角膜腫脹は、細隙灯顕微鏡下で光学式厚度計により得られた角膜厚測定結果から判定する。角膜腫脹は百分率で表され、角膜厚測定結果から次の式に従って算出される。

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

46. すべての供試眼球を対象にした角膜腫脹の百分率の平均値を、すべての観察時点について算出する。いずれかの時点で観察された最も高い角膜腫脹スコア平均値に基づき、各被験化学物質の ICE クラスを割り当てる（段落 53 参照）。

47. 角膜混濁は、最も濃密に混濁している角膜領域をスコアリングに

© OECD 2018

用いることにより、表 1 記載の所見に従って評価する。すべての供試眼球を対象にした角膜混濁の平均値を、すべての観察時点について算出する。いずれかの時点で観察された最も高い角膜混濁スコア平均値に基づき、各被験化学物質の ICE クラスを割り当てる（段落 53 参照）。

表 1. 角膜混濁スコア

スコア	所見
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領域があるが、虹彩の細部は明視できる
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明瞭である
3	重度の角膜混濁があり、虹彩の具体的な細部は視認できないが、瞳孔の大きさはかろうじて識別できる
4	完全な角膜混濁で、虹彩を視認できない

48. フルオレセイン染色は、30 分後の観察時点でのみ表 2 に示すスコアに従って評価する。次に、すべての供試眼球を対象にした 30 分後の観察時点でのフルオレセイン染色の平均値を算出し、これを用いて各被験化学物質の ICE クラスを割り当てる（段落 53 参照）。

表 2. フルオレセイン染色スコア

スコア	所見
0	フルオレセイン染色なし
0.5	ごく少数の点状染色あり
1	角膜処理領域の至るところに散在する点状染色あり
2	単巣性または融合性の濃染された点状染色あり
3	フルオレセイン染色した角膜の、融合した大型の領域あり

49. 形態学的影響には、角膜上皮の「窪み」、上皮の「緩み」、角膜表面の「粗化」、角膜への被検物質の「固着」が挙げられる。これらの所見の重症度は様々で、同時に発現することがある。これらの所見の分類は、試験責任者の解釈に従って主観的に行われる。

50. 病理組織検査を実施する場合、表 3 記載の半定量的なスコアリングシステムを用いる。例えば、上皮の空胞化の影響に関しては、投与関連の影響と、病理組織検査によるアーチファクトおよび／または背景となる形態との識別がきわめて重要である。この目的のため、OECD GD 160 補遺 II に示された図解（Atlas）を慎重に調査する（12）。さらに、一部の影響には組織の 3 次元評価を要することから、（顕微鏡写真ではなく）元のスライドを用いる必要がある。観察された影響のみスコア化する。仮説を立てないこと（例えば、上皮上部の層が欠損している場合、

© OECD 2018

この層の空胞化についてはスコア化できないと考えられる）。加えて、組織構造が保持されていた場合、角膜縁近接部の影響／変化についてスコア化する。ただし、角膜縁内に発生した影響／変化は、化学物質曝露に関連しない影響のためスコア化しないこと。現行の推奨事項（23）に従って、また病理組織検査のピアレビューの GLP 要件に関する OECD 勧告文書 No. 16（24）に従って、内部病理検査のピアレビューシステムを実施する。このプロセスでは、（評価対象組織に関する専門知識を有する）病理検査担当者が多数のスライドおよび病理検査データをピアレビューし（例えば、3 眼中 1 眼）、病理診断および解釈の精緻化に際し当該試験の病理検査担当者を支援する。こうしたピアレビュープロセスにより、病理診断および解釈の正確性および品質を検証し改善することができる。最後に、一貫性がある病理組織検査所見を確保するため、統合された訓練、輸送能、習熟度評価が推奨される。

© OECD 2018

表 3. 固定、トリミング、パラフィンワックス包埋、薄切および染色されたニワトリ摘出眼球に用いられる半定量的病理組織検査スコアリングシステム

パラメータ	所見	スコア	説明*
上皮：びらん	ごく軽度	½	数個の単一細胞から最表層 1 層全体まで消失
	軽度	1	3 層まで消失
	中等度	2	上皮層の 50%まで消失*
	重度	3	基底膜まで至る上皮層の消失
上皮：空胞化 ***上皮を上部、中部、下部に分けてスコア化****	ごく軽度	½	1 個～数個の細胞が散在性にみられる
	軽度	1	空胞化細胞の集簇または小空胞を有する細胞が単一層にみられる
	中等度	2	上皮の 50%まで空胞化細胞からなる*
	重度	3	上皮の 50～100%が空胞化細胞からなる
上皮：壊死***	正常	-	壊死細胞が 10 個未満†
	ごく軽度	½	壊死細胞が 10～20 個†
	軽度	1	壊死細胞が 20～40 個†
	中等度	2	壊死細胞を多数認めるが、上皮層の 50%未満
	重度	3	上皮層の 50～100%が壊死
実質：核濃縮††; †††	正常	-	5 個未満の細胞の核濃縮
上部または下部領域	軽度	1	5～10 個の細胞の核濃縮
	中等度	2	10 個を超える細胞の核濃縮
実質の線維異常†††	あり	P	不規則な外観の線維
内皮：壊死	あり	P	内皮は 1 層のみからなるため、グレード分けは妥当でない

注：OECD GD 160（12）補遺 II には、処理の有無に伴うニワトリ摘出眼球の典型的な顕微鏡写真による図解が示され、上述の様々な病理組織学的影響の可能性が説明されている。

*OECD TG 438 内の要件どおり、被験化学物質を均一に適用しても、局所的な影響を引き起こす被験化学物質（例えば、一部の固体の化学物質）の場合を除く、角膜全体について説明。この場合には、評価は曝露部位での局所的な影響に基づく。

**上部、中部、下部は、それぞれ上皮層の 1/3 の部分に等しいことを示す。上部の層が欠損している場合、中部の層は「新規」の上部の層とはならず、なお中部の層である（さらなる詳細については、OECD GD 160 補遺 II 参照（12））。

***付着した細胞／組織の壊死のみ。

†壊死細胞は角膜の全長にわたり計数する（用いるニワトリ眼球の大きさ、および顕微鏡的に評価される標本の大きさにほとんどばらつきがないため、角膜の全長は各スライド

© OECD 2018

で一致することから、細胞数報告のため特定の固定長にする必要はない）。スコアリングシステムは、「正常」から「軽度」まで細胞絶対数を用いるのに対し、「中等度」および「重度」では百分率を用いる。このことは、評価が特定の検査員により実施される方法であることに起因し、壊死細胞は個別のものとみなされる。壊死細胞がより多くなれば、通常は散乱する。こうしたことから、当該検査員は壊死細胞を計数することで、壊死の量に関する印象を得る。壊死はびらんとは対照的に、当該検査員が気付く最初の影響が上皮の一部欠損であるため、推定損失率を用いることには意味がある。

††ICE 試験法には、細隙灯顕微鏡を用いた角膜厚の精密な測定が既に含まれている。したがって、その後の病理組織学的評価では、実質の腫脹は個別にスコア化しない。

†††スコア化される実質に関する影響は、（1）*in vivo* 曝露後のウサギ角膜所見に基づき、Maurer（2001）が用いたスコアリングシステム由来の核濃縮（角膜実質細胞の消失／壊死として記述）、および（2）線維異常からなる。（1）については、核濃縮の存在は時に観察されるにすぎず、核濃縮の発現は、（*in vivo* における）角膜の損傷の深さおよび／または炎症プロセスに左右されることが提唱されている。さらに、実質線維芽細胞は伸長した形状であるため、正常な核が細胞切片の方向によっては、核濃縮と誤って判断されることが考えられる。（2）については、実質線維が既に「自然に」異常を示すため、線維異常の所見やスコアリングは困難になりうる。顕微鏡検査用の角膜の処理が、実質線維の人為的な異常に寄与することも考えられる。（核濃縮と線維異常の）両ケースとも、これらの所見は、細隙灯顕微鏡所見により既に観察された角膜への重度の影響、ならびに、上皮層の中部および／または下部に観察される影響と一致する。

52. OECD TG 438 は、被験化学物質が処理した眼球の表面に均一に分布することを要件としている。こうした曝露に基づき、被験化学物質はニワトリ摘出眼球の角膜に通常均一な影響をもたらしており、スライド全体での病理組織学的影響の平均値をスコア化する。ただし、一部の被験化学物質を均一に適用しても、（例えば、一部の固体の被験化学物質に関しては）特定の箇所に限局する単巣性または多巣性の影響を生じうる。ICE 試験法の実施中に単巣性（または多巣性）の影響が認められた場合、病理組織検査担当者に通知し、被験化学物質への曝露発生に際し認められた局所的な悪影響に基づき、病理組織検査スコアリングを実施する。さらに、疑念が残る場合（例えば、ICE の結果と病理組織検査所見との間に不一致が認められる場合）、観察された切片に存在する影響が局所的であることを確保するため、角膜の別の部分で追加の切片を作製できる。

データおよび報告

データの評価

53. 角膜混濁、角膜腫脹、フルオレセイン染色の結果を別々に評価し、エンドポイントごとに ICE クラスを作成する。次に、エンドポイントごとの ICE クラスを組み合わせ、各被験物質の「*in vitro* 分類」を予測する。同様に、該当する場合、病理組織検査の評価を個別に実施し、段落 55 および 56 に従って検討する。

判定基準

54. 一旦各エンドポイントが評価されたら、事前に定めた範囲に基づいて ICE クラスを割り当てることができる。4 段階の ICE クラスを用いて、角膜腫脹（表 4）、角膜混濁（表 5）、フルオレセイン染色（表 6）の解釈を以下に示す尺度に従って行う。表 4 に示す角膜腫脹スコアは、

© OECD 2018

深度測定装置 no. 1 を用い 9½（0.095 mm に相当）に設定したスリット幅の Haag-Streit BP900 細隙灯顕微鏡（または、代わりに Haag-Streit BQ900 細隙灯顕微鏡）で角膜厚を測定した場合のみ、適用可能であることに留意されたい。細隙灯顕微鏡のスリット幅の設定が異なれば、顕微鏡がもたらす角膜厚の測定値も異なると考えられることをユーザーは認識すること。

表 4. 角膜腫脹の ICE 分類基準

角膜腫脹の平均値（%）*	ICE クラス
0〜5	I
>5〜12	II
>12〜18（処理後 75 分超）	II
>12〜18（処理後 75 分以内）	III
>18〜26	III
>26〜32（処理後 75 分超）	III
>26〜32（処理後 75 分以内）	IV
>32	IV

*注：*いずれかの時点で観察された最も高いスコア平均値。

表 5. 角膜混濁の ICE 分類基準

最大の混濁スコア平均値*	ICE クラス
0.0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-4.0	IV

*注：**いずれかの時点で観察された最大のスコア平均値（表 1 に定義された混濁スコアに基づく）。*表 2 に定義されたスコアに基づく。

表 6. フルオレセイン染色の平均値の ICE 分類基準

処理後 30 分でのフルオレセイン染色スコア平均値*	ICE クラス
0.0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-3.0	IV

注：表 2 に定義されたスコアに基づく。

© OECD 2018

55. 被験化学物質の *in vitro* 分類は、表 7 記載の角膜腫脹、角膜混濁、フルオレセイン染色について得られた区分の組み合わせに一致する UN GHS 分類を読み取ることにより評価する。

表 7. 全体での *in vitro* 分類

UN GHS 分類	3 種類のエンドポイントの組み合わせ
区分外	3 x I 2 x I, 1 x II 2 x II, 1 x I
予測不能	それ以外の組み合わせ
区分 1	3 x IV 2 x IV, 1 x III 2 x IV, 1 x II* 2 x IV, 1 x I* 角膜混濁：（2 眼以上について）30 分で 3 角膜混濁：（2 眼以上について）いずれかの時点で 4 （少なくとも 1 眼で）上皮の重度の緩み

*注：*生じる可能性が低い組み合わせ。

56. 病理組織検査を極端でない pH（2 < pH < 11.5）の洗浄剤および界面活性剤に用いる場合、表 8 に示す判定基準を用いる。さらに、実質の核濃縮スコアが、3 眼中 2 眼以上で軽度（スコア 1）以上であることが観察された場合；または、内皮に対する影響が 3 眼中 2 眼以上で観察された場合、そうした影響は、影響の重症度の指標となる観察結果として留意する。

表 8. UN GHS 区分 1 の極端でない pH（2 < pH < 11.5）の洗浄剤および界面活性剤同定のため、バリデートされた標準的な ICE 試験法に加え用いられる組織病理検査の判定基準

組織層	眼に対する重篤な損傷性（GHS 区分 1）を引き起こす影響の識別
上皮	- 3 眼中 2 眼以上で中等度（スコア 2）のびらん - ならびに／または、3 眼中 2 眼以上で中部および／もしくは下部に観察される空胞化（ごく軽度：スコア 1⁄2） - または、3 眼中 1 眼で中等度（スコア 2）のびらんがあり、かつ、3 眼中別の 1 眼以上で中部および／もしくは下部にごく軽度（スコア 1⁄2）の空胞化が観察される場合 - ならびに／または、3 眼中 2 眼以上に観察される中等度（スコア 2）の壊死

57. さらに、表 9 に示す予測モデルを用いる。表 8 および表 9 にそれぞれ記載された ICE の組織病理検査の判定基準および予測モデルは、UN GHS 区分 1 の極端でない pH（2 < pH < 11.5）の洗浄剤および界面活性剤の同定にのみ適用できる。

© OECD 2018

表 9. ICE の病理組織検査の評価に基づく極端でない pH（2 < pH < 11.5）の洗浄剤および界面活性剤同定に関する予測モデル

基準となる ICE	表 8 記載の ICE の病理組織検査の判定基準	UN GHS 分類
予測不能	基準を満たす	UN GHS 区分 1
	基準を満たさない	予測不能

試験の許容基準

58. 同時の陰性対照または溶媒／溶剤対照ならびに同時の陽性対照が、それぞれ GHS 区分外および GHS 区分 1 と同定された場合、試験を許容可能とみなす。

試験報告書

59. 試験報告書には、試験の実施に関連している場合、以下の情報を記載する。

被験化学物質および対照化学物質

- IUPAC または CAS 名称、CAS 登録番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはその他の識別子などの化学物質識別情報
- 被験／対照物質、または混合物の純度および組成（重量パーセント）に関する入手可能な範囲の情報
- 多成分物質および UVCB の場合：入手可能な範囲で、例えば、成分の化学物質識別情報（上記参照）、純度、発生量、および関連する物理化学的特性（上記参照）による可能な限りの特徴付け
- 試験の実施に関連する物理化学的特性（物理的状態、揮発性、pH、安定性、化学物質分類、水溶性など）
- 該当する場合、試験前の被験化学物質／対照化学物質の処理（例えば、加温、粉砕）
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性

試験依頼者および試験実施施設に関する情報

- 試験依頼者、試験実施施設および試験責任者、ならびに該当する場合、当該試験の病理検査担当者の氏名、名称および住所
- 眼球供給元の明示（例えば、眼球を採取した施設）

試験法の条件

© OECD 2018

- 用いた試験系の説明
- 用いた細隙灯顕微鏡および厚度計（例えば、モデル）、ならびに用いた機器設定
- 過去の陰性対照および陽性対照の結果、ならびに該当する場合、許容可能な同時のベンチマーク対照の範囲を示した過去のデータの参照先
- 試験法の経時的な完全性（すなわち、正確性および信頼性）確保に用いた手順（例えば、習熟度確認化学物質の定期的な試験実施）。
- 病理組織検査を実施する場合の組織固定に用いた手順。

眼球の採取および準備

- 眼球ドナー動物の週齢および体重、ならびに入手可能な場合、眼球を採取した動物に関するそれ以外の具体的な特徴（例えば、性別、系統）
- 眼球の保存および輸送条件（例えば、眼球の採取日時、ニワトリの頭部採取から摘出眼球の灌流チャンバー配置までの時間間隔）
- 眼球の品質、眼球チャンバーの温度、試験に用いた眼球の選択基準に関する記述など、眼球の準備および取り付けに関する事項

試験手順

- 用いた複製の数
- 用いた陰性対照および陽性対照の明示（該当する場合、溶剤対照およびベンチマーク対照も明示）
- 用いた被験化学物質の用量、適用法、曝露時間
- 観察時点（処理前、処理後）
- 該当する場合、病理組織検査などに用いた評価基準および判定基準の記述
- 該当する場合、病理組織検査所見に用いたピアレビューシステム
- 用いた試験許容基準の記述
- 試験手順を変更した場合、その記述。
- さらに、例えば標準操作手順書（SOP）に記載されていない場合、入手可能であれば、以下の情報を含めるものとする。
- 統合された訓練および輸送能に関する記述
- 固定剤、脱水剤、清澄剤、および用いたプロトコール
- 用いた包埋材料、浸潤溶剤、濃度
- 組織切片の厚さ
- 用いた（報告書単位の）染色および関連する染色プロトコール
- 使用機器に関する情報

© OECD 2018

結果

- 供試眼球すべての観察時点ごとのスコア平均値を含む、個々の眼球ごとおよび観察時点ごとに得られた角膜腫脹、角膜混濁、フルオレセイン染色のスコア一覧表
- 観察された形態学的影響の記述
- （いずれかの時点から）観察された角膜腫脹スコア、角膜混濁スコア、フルオレセイン染色スコアの最も高い平均値、およびその関連する ICE クラス。
- 該当する場合、半定量的病理組織検査スコアリングの所見および得られた結論の一覧表
- 該当する場合、病理組織検査スコアリング用の局所的な影響の使用に関する指示
- それ以外に観察された影響の記述
- 得られた *in vitro* における GHS 区分
- 適切な場合、処理した眼球および対照眼球の写真
- 該当する場合、病理組織標本の任意のデジタル画像またはスライドのデジタルスキャン

結果の考察

結論

参考文献

(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 at: [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 at: [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 at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm]

(4) United nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Seventh revised edition, UN New York and Geneva, 2017. Available at: https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/English/03e_part3.pdf.

(5) OECD (2018). Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment No 188. ENV Publications, OECD, Paris.

© OECD 2018

(6) OECD (2018). Test Guideline 492. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France. Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788.

(7) OECD (2018). Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye Irritation. Series on Testing and Assessment, No. 263. Environment, Health and Safety Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

(8) Adriaens E., Barroso J., Eskes C., Hoffmann S., McNamee P., Alépée N., Bessou-Touya S., De Smedt A, de Wever B., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Zuang V. (2014). Draize test for serious eye damage / eye irritation: importance of the endpoints evaluated with regard to UN GHS / EU CLP classification. Archives of Toxicology 88, 701-723.

(9) Cazelle E., Eskes C., Hermann M., Jones P., McNamee P., Prinsen M., Taylor H., Wijnands M.V.W. (2014). Suitability of histopathology as an additional endpoint to the isolated chicken eye test for classification of non-extreme pH detergent and cleaning products. Toxicology In Vitro 28, 657-666.

(10) Reproducibility and predictive capacity of the Isolated Chicken Eye Test for the identification of non-extreme pH detergents and surfactants causing serious eye damage. Manuscript in preparation

(11) 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.

(12) OECD (2018) 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. **Error! Hyperlink reference not valid.**Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(13) 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.

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

(15) 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.

© OECD 2018

(16) 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.

(17) 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.

(18) 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]

(19) Cazelle E., Eskes C., Hermann M., Jones P., McNamee P., Prinsen M., Taylor H., Wijnands M.V.W. (2015). Suitability of the Isolated Chicken Eye Test for Classification of Extreme pH Detergents and Cleaning Products. Toxicology In Vitro 29, 609-616.

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

(21) 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 at: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

(22) Barroso J., Pfannenbecker U., Adriaens E., Alépée N., Cluzel M., De Smedt A., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Templier M., McNamee P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). Archives of Toxicology 91, 521-547.

(23) Morton D., Sellers R.S., Barale-Thomas E., Bolon B., George C., Hardisty J.F., Irizarry A., McKay J.S., Odin M., Teranishi M. (2010). Recommendations for Pathology Peer Review. Toxicol. Pathol. 38, 1118-1127.

(24) OECD (2014). Advisory document n. 16. Guidance on the good laboratory practice (GLP) Requirements for Peer Review of Histopathology. OECD Series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Advisory document of the working group on GLP. ENV/JM/MONO(2014)30. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm.

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

(26) OECD (2017). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France. Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788.

© OECD 2018

補遺 1：定義

正確性：試験法の結果と許容される基準値との一致の近さ。試験法の性能を判断する尺度であり、「妥当性」の一側面である。この用語は、試験法の正しい結果の割合を意味する「一致」としばしば置換可能な使用が行われる。

ベンチマーク化学物質：被験化学物質との比較の基準として用いられる化学物質。ベンチマーク化学物質には次の特性がある。（i）一貫性がありかつ信頼性が高い供給元の存在。（ii）検討中の化学物質のクラスとの構造および機能の類似性。（iii）物理的／化学的特性が既知であること。（iv）既知の影響に関する裏付けデータの存在。（v）所望の反応範囲での作用強度が既知であること。

ボトムアップ方式：眼刺激性や眼に対する重篤な損傷性への分類が不要であると疑われる化学物質に用いられる段階的な方式で、分類不要な化学物質（陰性の結果）を、それ以外の化学物質（陽性の結果）から判定することで開始する。

角膜：虹彩と瞳孔を覆い内部に光を通す、眼球前面の透明な部分。

角膜混濁：被験化学物質曝露後、角膜の不透明さの程度を測定したもの。角膜混濁の増加は、角膜損傷を示す。

角膜腫脹：被験化学物質曝露後、角膜の膨張の程度について ICE 試験法で客観的に測定したもの。百分率で表し、ベースライン（投与前）の角膜厚測定値、および ICE 試験での被験物質曝露後に一定間隔で記録した角膜厚から算出する。角膜腫脹の程度は、角膜損傷の指標である。

洗浄剤：洗浄および浄化工程を目的として、最終濃度 3%超の界面活性剤を 1 つまたは複数含有する混合物（単一の界面活性剤希釈物を除く）。洗浄剤はいかなる形状（液体、粉末、ペースト、棒状、固形、成形品、具体的な形など）にもでき、家庭、施設、または産業用の目的で販売または使用できる。

眼刺激性：眼の前面に被験化学物質を適用後眼に生じる変化で、適用から 21 日以内に完全な可逆性を示すもの。「眼に対する可逆的影響」および「UN GHS 区分 2」（4）に言い換えることができる。

偽陰性率：試験法により誤って陰性と同定された、陽性の化学物質すべての割合。試験法の性能を表す指標の 1 つ。

偽陽性率：試験法により誤って陽性と同定された、陰性の化学物質すべての割合。試験法の性能を表す指標の 1 つ。

フルオレセイン染色：被験化学物質曝露後、角膜上皮細胞により保持されるフルオレセインナトリウムの程度について、ICE 試験法で主観的に測定したもの。フルオレセイン染色の程度は、角膜上皮損傷の指標である。

有害性：物質または状況固有の性質で、ある生物、体系、または（一部の）集団がその物質に曝露すると、悪影響を引き起こす可能性があるこ

© OECD 2018

と。

IATA：試験および評価に関する統合的アプローチ。

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

混合物：2 種類以上の、互いに反応しない物質からなる混合物または溶液（4）。

陰性対照：試験系のすべての構成要素を含んだ未処理の複製。この試料を、被験化学物質による処理試料およびそれ以外の対照試料と同時に処理することで、溶剤と試験系との相互作用について判定する。

分類されない：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）にも分類されない被験化学物質。「UN GHS 区分外」に言い換えることができる。

陽性対照：試験系のすべての構成要素を含み、陽性反応を引き起こすことが既知の化学物質により処理される複製。陽性対照の反応の経時的ばらつきを確実に評価可能にするため、重度の反応の大きさを過度にしないこと。

信頼性：同一プロトコールを用いて試験法を実施した場合、試験実施施設内および試験実施施設間で経時的に高い再現性で実施可能な程度を表す尺度。試験実施施設内および試験実施施設間の再現性、ならびに試験実施施設内の反復性を算出することにより評価される。

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：眼の前面に被験化学物質を適用後眼に生じる組織損傷または身体的に重篤な視力低下で、適用から 21 日以内に完全な可逆性を示さないもの。「眼に対する不可逆的影響」および「UN GHS 区分 1」（4）に言い換えることができる。

細隙灯顕微鏡：立体正立像の作成により、双眼顕微鏡拡大下で眼を直接検討するのに用いる機器。ICE 試験法では、本機器を用いてニワトリ眼球前側の構造を検査し、また、深度測定装置を取り付け角膜厚を客観的に測定する。

溶剤／溶媒対照：試験系のすべての構成要素を含んだ未処理試料で、処理対象の被験化学物質およびそれ以外の対照試料と共に処理される溶剤または溶媒からなり、同じ溶剤または溶媒に溶解させた被験化学物質処理試料のベースラインにおける反応を確立する。同時の陰性対照と検討する場合、本試料により、溶剤または溶媒と試験系との相互作用の有無も立証される。

物質：自然状態における、または製造工程で得られる化学元素およびその化合物で、その製品の安定性の保持に必要な添加物や、用いる製造工程から得られる不純物をいずれも含むが、当該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されうる溶剤はいずれも除く（4）。

© OECD 2018

界面活性剤：表面活性剤とも呼ばれる、1つまたは複数の親水基と1つまたは複数の疎水基からなる物質および／または（適切な溶剤／溶媒を用いた）その希釈液。液体の表面張力の低下能、ならびに気液界面における拡大もしくは吸着した単層の形成能、ならびに／またはエマルジョン、マイクロエマルジョンおよび／もしくはミセルの形成能、ならびに／または固液界面における吸着能がある。

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と疑われる化学物質に用いられる段階的な方式で、眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学物質（陽性の結果）を、それ以外の化学物質（陰性の結果）から判定することで開始する。

被験化学物質：本試験法において評価される化学物質（物質または混合物）。

段階的試験戦略：被験化学物質に関する既存のすべての情報について、指定された順番で検討する段階的な試験戦略。段階ごとに証拠の重み付けのプロセスを用い、有害性分類の判定に十分な情報が入手可能か判断してから次の段階に進む。被験化学物質の刺激性を、既存の情報に基づいて割り当てできる場合、追加試験は不要である。被験化学物質の刺激性を、既存の情報に基づいて割り当てできない場合、明確な分類が可能になるまで、一連の段階的な動物試験の手順が実施される。

国際連合の化学品の分類および表示に関する世界調和システム（UN GHS）：ヒト（雇用者、作業員、輸送業者、消費者、緊急時対応者など）および環境の保護を目的として、その悪影響に関する情報伝達のため、化学物質（物質および混合物）を物理、健康、環境上の有害性の標準化された種類およびレベルに従って分類することを提唱し、ピクトグラム、信号語、有害性の声明、注意書き、安全データシートなど対応する情報伝達要素に取り組むシステム（4）。

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

UN GHS 区分 2：「眼刺激性」および／または「眼に対する可逆的影響」を参照。

UN GHS 区分外：UN GHS 区分 1 または 2（2A または 2B）としての分類要件を満たさない被験化学物質。「分類されない」に言い換えることができる。

バリデートされた試験法：特定の目的に関する妥当性（正確性を含む）および信頼性を判断するためのバリデーション試験が完了した試験法。バリデートされた試験法は、提唱された目的に対し許容可能と認められる正確性および信頼性の観点からは、十分な性能がないと考えられることに留意されたい。

証拠の重み付け：化学物質の有害性に関する結論に到達し結論を裏付ける際、様々な部分の情報の強みおよび弱みを検討するプロセス。

© OECD 2018

補遺 2：ICE 試験法の習熟度確認化学物質

本試験ガイドラインを遵守する試験法を定常的に用いる場合、その前に試験実施施設は、表 10 で推奨される 13 種類の化学物質の眼に対する有害性分類を正しく同定することにより、技術的な習熟度を立証する。提示される ICE の結果は、評価試験中に観察される反応の範囲の例を表し、その範囲を予測できる（5） （18）。これらの化学物質を選択したのは、*in vivo* ウサギ眼試験（TG 405）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）の結果に基づき、眼に対する有害性の反応の範囲を示すためである（4） （26）。それ以外の選択基準として、可能な限り、ICE 試験法において再現性の高い結果をもたらすこれらの化学物質が市販され、入手可能な高品質の *in vivo* 参照データを有していることとした。参照データは、簡素化された要約文書（SSD）（5）において入手できる。記載された化学物質を入手できない、あるいは、それ以外の正当な理由で使用できない状況においては、上記基準を満たす別の化学物質（例えば、ICE 試験法の評価およびバリデーションに用いた化学物質から）を用いることが考えられる（5） （18）。ただし、そうした逸脱の正当性を示すこと。

表 10. ICE での技術的習熟度立証用の推奨化学物質

化学物質	CASRN	化学物質分類 [1]	物理的形状	*In Vivo* 試験での UN GHS 分類 [2]	ICE 試験での UN GHS 分類 [3,4]
塩化ベンザルコニウム（10%）	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
水酸化ナトリウム（10%）	1310-73-2	アルカリ	液体	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リド	4659-45-4	ハロゲン化アシル	液体	区分 2A	予測不能 [4]
硝酸アンモニウム	6484-52-2	無機塩類	固体	区分 2A[5]	予測不能 [4]
水酸化ナトリウム（1%）	1310-73-2	アルカリ	液体	区分 2B	予測不能 [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
トリメチル酢酸エチル	3938-95-2	エステル	液体	区分外	区分外
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	区分外	区分外

© OECD 2018

略語：CASRN：ケミカルアブストラクトサービス（CAS）登録番号、ICE：ニワトリ摘出眼球試験、n.a.：該当なし、UN GHS：国際連合の化学品の分類および表示に関する世界調和システム（4）。

[1] 化学物質分類の各化学物質への割り当ては、米国国立医学図書館医学件名標目表（MeSH）の分類システム（http//www.nlm.nih.gov/mesh で入手可能）に基づき、標準的な分類体系を用いて行った。

[2] *In vivo* ウサギ眼試験（OECD TG 405）および UN GHS を用いた結果に基づく（4）（26）。

[3] 表 7 記載の ICE の結果に基づく。

[4] GHS 区分外と GHS 区分 1 を識別するための、表 6 記載の ICE スコアを除いたスコアの組み合わせ（表 7 参照）

[5] 2A か 2B の分類は、これら 2 つの区分間を識別する UN GHS 基準の解釈に左右される。すなわち、区分 2A の分類生成に必要な 7 日目の影響について、動物 3 例中 1 例か 3 例中 2 例かにより決定される。*In vivo* 試験は 3 例とした。結膜充血 1 例を除き、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。7 日目までに完全な回復を示さなかった 1 例の結膜充血スコアは 1（7 日目）で、10 日目に完全に回復した。

© OECD 2018

補遺 3：極端でない pH（2 < pH < 11.5）の洗浄剤および界面活性剤という限定的な適用領域について、標準的な ICE 試験法に加え用いられる ICE の病理組織検査用の習熟度確認化学物質

極端でない pH（2 < pH < 11.5）の洗浄剤および界面活性剤という限定的な使用領域について、標準的な ICE 試験法に加え ICE の病理組織検査を定常的に用いる場合、その前に試験実施施設は、表 11 で推奨される 6 種類の化学物質の眼に対する有害性分類を正しく同定することにより、技術的な習熟度を立証する。これらの化学物質を選択したのは、*in vivo* ウサギ眼試験（TG 405）および UN GHS 分類システム（すなわち、UN GHS 区分 1、2、または区分外）の結果に基づき、眼に対する有害性の反応の範囲を示すためである（4）（26）。それ以外の選択基準として、可能な限り、ICE の病理組織検査において再現性の高い結果をもたらすこれらの化学物質が市販され、入手可能な高品質の *in vivo* データを有していることとした。記載された化学物質を入手できない、あるいは、それ以外の正当な理由で使用できない状況においては、上記基準を満たす別の化学物質（例えば、ICE の病理組織検査の評価に用いた化学物質から）を用いることが考えられる（10）。ただし、そうした逸脱の正当性を示すこと。

略語：CASRN：ケミカルアブストラクトサービス（CAS）登録番号、NPCM：

© OECD 2018

表 11. ICE の病理組織検査での技術的習熟度立証用の推奨化学物質

化学物質	CASRN	界面活性剤の種類	物理的形状	*In vivo* 試験での分類 [1]	標準的な ICE 試験での UN GHS 分類 [2]	ICE の病理組織検査での UN GHS 分類 [3]
塩化ベンザルコニウム（5%）	8001-54-5	陽イオン性	液体	区分 1	区分 1	試験実施施設 3 件中 3 件で区分 1（びらん）
ベンゼンスルホニルクロリド	98-09-9	陰イオン性	液体	区分 1	区分 1	試験実施施設 3 件中 3 件で区分 1（壊死および空胞化）
臭化セチルピリジニウム（10%）	140-72-7	陽イオン性	液体	区分 1	予測不能	試験実施施設 3 件中 3 件で区分 1（空胞化）
臭化セチルピリジニウム（1%）	140-72-7	陽イオン性	液体	区分 2A	予測不能	試験実施施設 3 件中 3 件で予測不能
N-ラウロイルサルコシンナトリウム塩（10%）	137-16-6	陰イオン性	液体	区分 2A	予測不能	試験実施施設 3 件中 3 件で予測不能
臭化セチルピリジニウム（0.1%）	140-72-7	陽イオン性	液体	区分外	予測不能	試験実施施設 3 件中 3 件で予測不能

略語：CASRN：ケミカルアブストラクトサービス（CAS）登録番号、NPCM：予測不能

1 *In vivo* ウサギ眼試験（OECD TG 405）および UN GHS を用いた結果に基づく（4）（26）。

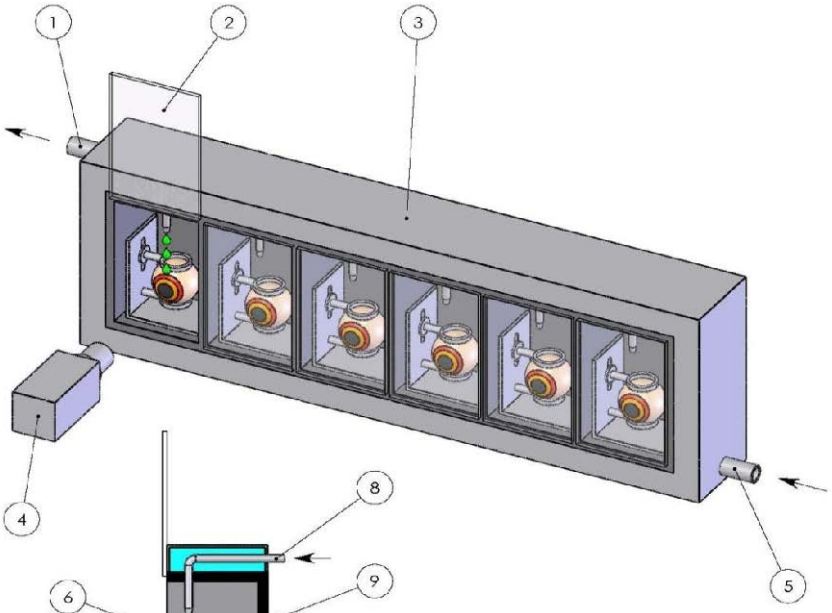
2 表 7 記載の ICE の結果に基づく。

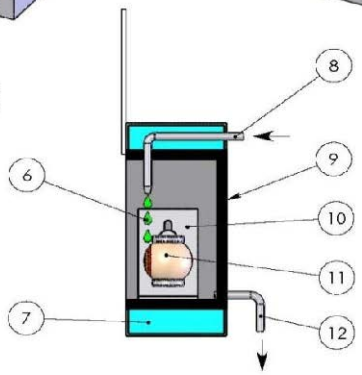
3 表 8、表 9、改訂版 OECD GD 160 （12）内に記載された ICE の病理組織検査の判定基準に基づく。

© OECD 2018

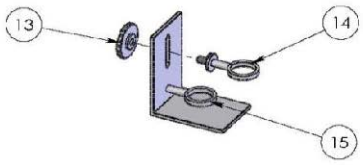
補遺 4

図 1. ICE 灌流装置および眼球クランプの図





区画の横断面



眼球ホルダー

項目番号	説明
1	温水排出口
2	引戸
3	潅流装置
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	上部調整アーム
15	下部固定アーム

注：灌流装置および眼球クランプのさらに包括的な説明については（25）を参照。

© OECD 2018