OECD/OCDE

2009/09/07

試験ガイドライン No.437

眼腐食性および強度刺激性物質を同定するための
ウシ角膜を用いる混濁度および透過性試験法

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. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, 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-437-2009.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 ウシ角膜を用いる混濁度および透過性試験法

はじめに

1. ウシ角膜を用いる混濁度および透過性（BCOP）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。BCOP 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）（6）を眼腐食性および強度刺激性物質に分類することができ、その場合はウサギを用いる試験を追加的に実施する必要はない。陰性の場合に、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および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、ウシ摘出角膜に混濁および透過性の増大を誘発する能力で測定する。角膜に対する毒性は、(i) 光透過性の低下（混濁度）および（ii）フルオレセインナトリウム色素の透過性の増大（透過性）で評価する。被験物質暴露後の角膜の混濁度および透過性の評価結果を組み合わせて *in vitro* 刺激性スコア（In Vitro Irritancy Score（IVIS））を求め、被験物質の刺激性レベルを分類するために用いる。

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 BCOP 試験法を用いることはできるが、EPA（15）、EU（26）、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 BCOP 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 BCOP 試験法プロトコル（8）に準拠するものである。なお、BCOP 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（ECVAM））と日本動物実験代替法検証センター（JaCVAM）も参加した。そのプロトコルは、1997～1998 年に実施された欧州共同体出資の BCOP 測定法プレバリ

© 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。

デーション試験で用いられたプロトコルに相当する、Institute for In Vitro Sciences（IIVS）および INVITTOX Protocol 124（10）から得られた情報に基づいている。上記プロトコルは両者ともに Gautheron ら（11）が最初に報告した BCOP 測定法に基づいている。

6. バリデーションデータベースにおいてアルコールおよびケトンで偽陽性率が高く、固体で偽陰性率が高いことから本試験法には限界が認められる（パラグラフ 44 を参照のこと）(5)。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 BCOP の正確度が著しく改善する（5)。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被験物質（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、アルコールやケトン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. ウシの眼球や角膜を用いた操作はすべて、組織と組織液をはじめとする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（12)。

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、BCOP 試験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づき、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（13)。最後に BCOP 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 BCOP 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 45 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角膜を保存し、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、BCOP 試験法の非強度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 BCOP 試験データを提出する前にこのような化学物質を使用して、BCOP 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. BCOP 試験法は、ウシ角膜の正常な生理学的・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、角膜の混濁度と透過性の変化量をそれぞれオパシト

メータ（opacitometer）および可視光分光光度計を用いて定量的に測定して被験物質による損傷を評価する。両測定値を用いて IVIS を算出し、IVIS を用いて被験物質の *in vivo* 眼刺激性を予測するための *in vitro* 刺激性危険有害性分類区分を割り当てる（判定基準を参照のこと）。

12. BCOP 試験法では、屠殺直後の畜牛の眼球から摘出した角膜を使用する。角膜の混濁度は、角膜を通過する光の量から定量的に測定する。透過性は、十分な厚みの角膜を通過したフルオレセインナトリウム色素の量を後部チャンバー中の培地から検出して定量的に測定する。被験物質を角膜ホルダーの前部チャンバーに添加することにより、角膜の上皮表面に適用する。付録 III に BCOP 試験法で用いる角膜ホルダーの解説と図を示す。角膜ホルダーは様々な入手先から購入することもできるし、組み立てることもできる。

ウシの年齢、眼球の入手先および動物種の選択

13. 屠殺場に送られた畜牛は、一般的には人間の消費用またはそのほかの商業用途用に屠殺される。BCOP 試験法で使用する角膜の原料には、食品流通網への販売に適すると考えられる健康な畜牛のみを使用する。畜牛の体重は品種、年齢、性別により大きく異なるため、屠殺時の動物の体重について推奨するものはない。

14. 様々な年齢の動物の眼球を使用すると角膜の寸法が変動する可能性がある。8 歳齢を超える畜牛では一般的に水平方向の直径が 30.5 mm 超、中心角膜厚（CCT）が 1100 μm 以上の角膜が得られるが、5 歳齢未満の畜牛では一般的に水平方向の直径が 28.5 mm 未満、CCT が 900 μm 未満である（14）。そのため、60 カ月齢超の畜牛の眼球は通常、使用しない。12 カ月齢未満の畜牛の眼球は発育途中であり、角膜厚と角膜径が成牛の眼球で報告されている値より著しく小さいため従来使用されていない。しかし、若齢動物（6～12 カ月齢）の場合、入手しやすくなること、年齢幅が狭いこと、および作業者がウシ海綿状脳症の暴露を受ける（15）危険有害性が低減されることなど、多少の利点があるため容認できる。腐食性および刺激性物質に対する反応性に及ぼす角膜の大きさと厚さの影響をさらに研究することは有用であるため、本試験法使用者には、試験で用いた角膜を採取した動物の推定年齢や体重を報告するよう勧める。

眼球の採取および試験施設への搬送

15. 眼球は屠殺場の職員により採取される。機械的損傷などの損傷を最小限にするために、死亡後可及的速やかに眼球を摘出する。屠殺場の職員は動物の頭部を洗浄する際、刺激性が疑われる物質の暴露を防止するため洗剤を使用してはならない。

16. 適切な大きさの容器に入れたハンクスの平衡塩類溶液（HBSS）に眼球を完全に浸漬し、劣化や細菌汚染を最小限に抑える方法で試験施設に搬送する。眼球は屠殺工程で採取されるため、血液やほかの生物学的物質（細菌などの微生物を含む）に暴露される可能性がある。そのため、汚染リスクを確実に最小限にすること（例えば、眼球の入った容器の氷冷、眼球搬送用の HBSS への抗生物質[例、ペニシリン 100 IU/mL、ストレプトマイシン 100 μg/mL]の添加）が重要である。

17. 眼球の採取から BCOP 試験における角膜の使用までの時間を最短（一般的に採取と使用を同じ日に実施する）にし、試験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。試験ではすべて、ある特定の日に採取された同じ群の眼球を使用する。

© OCDE、（2009）

BCOP 試験用眼球の選別基準

18. 試験施設に到着次第、眼球に混濁の増大、擦過傷、新生血管形成などの異常を注意深く検査する。そのような異常のない眼球の角膜のみを試験に使用する。

19. 試験の後半段階で各角膜の質も評価する。最初の 1 時間の平衡期間後に 7 混濁度単位（注：オパシトメータは、混濁度単位を設定するために使用する混濁度標準で較正しておくこと、付録 III を参照のこと）を超える混濁度がみられた角膜は廃棄する。

20. 各処理群（被験物質、同時陰性および陽性対照物質）で最低 3 個の眼球を使用する。BCOP 試験法の陰性対照角膜に 3 個の角膜を使用する。角膜はすべて眼球から切除し、角膜チャンバーに装着するので、個々の角膜混濁度および透過性（陰性対照を含む）に対して取り扱い方法に起因する人為的影響が生じる可能性がある。さらに、陰性対照角膜の混濁度および透過性を使用して、被験物質および陽性対照物質処理角膜の IVIS 計算用の混濁度および透過性を補正する。

手順

眼球の準備

21. 角膜の上皮と内皮への損傷を避けるように注意しながら、その後の取り扱いを容易にするために強膜辺縁を 2～3 mm 残したままで切開して、異常のない角膜を採取する。摘出した角膜を、特別に設計した、前部および後部区画からなる角膜ホルダーに装着する。前部および後部区画はそれぞれ角膜の上皮側と内皮側に接続する。両チャンバーをあらかじめ温めたイーグルの最少必須培地（EMEM）で泡が発生しないようにあふれるまで満たす（後部チャンバーを最初に）。その後、可能な範囲で角膜を培地に平衡化させ、代謝活性を正常な状態にするために装置を 1 時間以上 32 ± 1℃に維持する（*in vivo* での角膜表面の温度は約 32℃）。

22. 平衡化期間後、新たに調製して温めた EMEM を両チャンバーに加え、角膜ごとに混濁度のベースライン値を測定する。肉眼的組織損傷（擦過傷、色素沈着、新生血管形成など）がみられる角膜、または 7 混濁度単位超の角膜は廃棄する。すべての平衡化角膜の平均混濁度を算出する。全角膜の中央値に近い混濁度値を有する角膜を最低 3 個選び、陰性（または溶媒）対照角膜とする。次に、残りの角膜を処理群および陽性対照群に振り分ける。

23. 熱容量は空気より水の方が大きいので、インキュベーションでは水を使用すると一層安定した温度状態にすることができる。そのため、角膜ホルダーとその内容物を 32 ± 1℃に維持するために恒温水槽の使用を推奨する。しかし、安定した温度管理ができるよう注意（例えば、ホルダーと培地をあらかじめ温めておくことにより）すれば恒温器も使用できる。

被験物質の適用

24. 2 種類の処理プロトコルを使用する。1 つは液体と界面活性剤（固体または液体）用で、もう 1 つは非界面活性固体用である。

25. 液体は希釈しないで試験するが、界面活性剤は 0.9%塩化ナトリウム溶液、蒸留水、または試験系に有害な影響のないことが証明されているその他の溶媒を用いて 10%w/v の濃度で試験する。半固体、クリーム、ワックスは一般的に液体と同様に試験する。上記に代わる希釈濃度については適切な根拠を示す。液体または界面活性剤に、角膜を 10 分間暴露する。暴露時間を変更する場合は適切な科学的根拠が必要である。

26. 非界面活性固体は、0.9%塩化ナトリウム溶液、蒸留水、または試験系に有害な影響のないことが証明されているその他の溶媒を用いて溶液または懸濁液として、20%の濃度で試験する。固体の場合、一定の状況および適切な科学的根拠があれば、水に分散させずに開放系チャンバー法（パラグラフ 29 を参照のこと）を用いて角膜表面に直接適用して試験することもできる。非界面活性固体の場合、角膜に 4 時間暴露させるが、液体や界面活性剤のときと同様に、暴露時間を変更する場合は適切な科学的根拠が必要である。

27. 被験物質の物理学的および化学的特性（例えば、固体、液体、液体の粘性）に応じて異なる処理法が使用できる。重要な因子は、被験物質が上皮表面を十分に覆い、洗浄段階で被験物質を完全に除去することである。閉鎖系チャンバー法は一般的に非粘性～低粘性液体の被験物質に用い、一方、開放系チャンバー法は一般的に半粘性および粘性液体の被験物質、ならびに水に分散しない固体に使用する。

28. 閉鎖系チャンバー法では、角膜の上皮側を完全に覆うことができる量の被験物質（750 µL）をチャンバーの上面の注入孔から前部チャンバー内に添加し、次いで暴露中は注入孔をチャンバープラグで封をする。重要なことは、被験物質を適切な時間、角膜に暴露させることである。

29. 開放系チャンバー法では、処理の前に前部チャンバーから窓固定用リングとガラス製窓を外す。マイクロピペットを用いて、対照物質または被験物質（750 µL または角膜を完全に覆うことのできる十分量の被験物質）を角膜の上皮表面に直接適用する。被験物質をマイクロピペットで取り扱うことが困難である場合は、注入が容易になるようにポジティブディスプレイスメント方式のピペットに加圧下で負荷することができる。物質がディスプレイスメントチップ内に加圧下で負荷されるように、ポジティブディスプレイスメント方式のピペットのチップをシリンジのディスペンシングチップに挿入する。ピペットのピストンを上方向に引きながら、同時にシリンジプランジャを押し下げる。ピペットチップに気泡が発生した場合には被験物質を除去（排出）して、泡を発生させずにチップに採取できるまで上記の作業を繰り返す。必要に応じて普通のシリンジ（針のない）を使用できる。そうすれば被験物質の正確な用量を測定できるとともに角膜の上皮表面に容易に適用できる。注入後にガラス製窓を前部チャンバーに戻して閉鎖系システムを再構成する。

暴露後のインキュベーション

30. 暴露後、被験物質、陰性対照物質および陽性対照物質を前部チャンバーから取り除き、上皮層を EMEM（フェノールレッドを含む）で 3 回以上（または被験物質が肉眼で認められなくなるまで）洗浄する。フェノールレッド含有培地を洗浄に用いるのは、フェノールレッドの変色から酸性物質またはアルカリ性物質の洗浄効率を確認するためである。フェノールレッドがまだ変色（黄色または紫色）したままであるか、または被験物質がまだ肉眼で認識できる場合は 4 回以上洗浄する。被験物質が培地からなくなれば角膜を EMEM（フェノールレッドを含まない）で最終的に洗浄する。最終洗浄として EMEM（フェノールレッドを含まない）を使用するのは、混濁度測定前に前部チャンバーからフェノールレッドを確実に除去するためである。次いで前部チャンバーを、新たに調製した EMEM（フェノールレッドを含まない）で再度満たす。

© OCDE、（2009）

31. 液体または界面活性剤の場合は、洗浄後、角膜を 32 ± 1℃でさらに 2 時間インキュベートする。一定の状況下では暴露後の時間を延長すると役に立つことがあり、ケースバイケースで考慮する。非界面活性固体で処理した角膜は 4 時間の暴露の最終時点で十分に洗浄するが、追加的なインキュベーションは必要ない。

32. 液体および界面活性剤では暴露後のインキュベーション期間の最終時点、および非界面活性固体では 4 時間の暴露の最終時点で、各角膜の混濁度と透過性を記録する。また、各角膜を肉眼で観察して関連観察所見を記録する（組織剥皮、被験物質残存、不均一な混濁パターンなど）。このような観察所見はオパシトメータの指示値の変動をもたらすので重要なことがある。

対照物質

33. 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。

34. BCOP 試験法で液体物質を 100%で試験する場合、試験系における非特異的変化を検出し、測定評価項目に関するベースラインを得るために陰性対照（0.9%塩化ナトリウム溶液または蒸留水など）を同時に測定する。このようにすれば、測定条件に起因する不適切な刺激性反応の発生を防止できる。

35. BCOP 試験法で希釈液体、界面活性剤または固体を試験する場合、試験系の非特異的変化を検出し、測定評価項目に関するベースラインを得るために溶媒／媒体対照群の試験を同時に実施する。試験系に対して有害な影響がないことが証明されている溶媒／媒体のみを使用できる。

36. 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、適切な反応が誘導されることを立証する。本テストガイドラインでは BCOP 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、理想的には陽性対照物質として本試験法で有意な反応を誘導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刺激性反応は過剰であってはならない。

37. 液体被験物質用の陽性対照物質の例は 1%水酸化ナトリウムおよびジメチルホルムアミドである。固体被験物質用の陽性対照物質の例は 20%（重量／容量）イミダゾール 0.9%塩化ナトリウム溶液である。

38. 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

39. 混濁度は角膜を通過する透過光の量で測定する。角膜混濁はオパシトメータで定量的に測定することから、混濁度は連続尺度で測定されることになる。

40. 透過性は角膜全細胞層（角膜外表面の上皮層から角膜内表面の内皮細胞まで）を貫通するフルオレセインナトリウム色素量で測定する。1 mL のフルオレセインナトリウム（液体および界面活性剤、または非界面活性固体の測定ではそれぞれ 4 または 5 mg/mL）を角膜ホルダーの前部チャンバー（角膜の上皮側に面する）に添加し、一方、後部チャンバー（角膜の内皮側に面する）には EMEM を満たす。次いでホルダーを水平にして 32 ± 1℃で 90 ± 5 分インキュベートする。後

部チャンバーまで通過したフルオレセインナトリウムの量を UV/VIS 分光光度計で定量的に測定する。490 nm の波長で分光光度計を用いて測定した値を光学密度（OD_{490}）または吸光度値として記録する。これは連続尺度による測定値である。フルオレセイン透過率は標準 1 cm 光路長を用いた可視光分光光度計による OD_{490} 値を用いて測定する。

41. 代替法として 96 ウエルマイクロタイタープレートリーダーを使用することができるが、その条件は（i）プレートリーダーでフルオレセイン OD_{490} 測定の直線範囲を確立できること、および（ii）96 ウエルプレートで正確な容量のフルオレセイン試料を使用し、その結果標準 1 cm 光路長に等価な OD_{490} 値を得ることができること（これにはウエルを完全に満たす必要がある（通常 360 μL））である。

データおよび報告

データ評価

42. 混濁度および平均透過率（OD_{490}）をそれぞれバックグラウンド混濁度および陰性対照透過率（OD_{490}）で補正したあと、各処理群の平均混濁度および透過率（OD_{490}）を、以下の実験的に求められた式に代入して *in vitro* 刺激性スコア（IVIS）を処理群ごとに算出する。

$$IVIS = 平均混濁度 + (15 \times 平均透過率\ OD_{490}\ 値)$$

Sina ら（16）の報告によると、この式は試験施設内および施節間研究で導かれたものである。多施設試験で 36 化合物を用いて得られたデータについて多変量解析を行ない、*in vivo* データと *in vitro* データの関係に最も適合する式を決定した。この解析は異なる 2 つの会社の科学者により行なわれたが、ほとんど同じ式が導かれた。

43. 被験物質が腐食性を誘発するか、それとも強度刺激性を誘発するかを確認するために、2 つの評価項目の 1 つのみを用いて混濁度および透過性を独立して評価することも必要である（判定基準を参照のこと）。

判定基準

44. IVIS が 55.1 以上の物質は腐食性または強度刺激性物質と定義する。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、BCOP 試験法の全般的な正確度は 79%（113/143）～81%（119/147）、偽陽性率は 19%（20/103）～21%（22/103）、偽陰性率は 16%（7/43）～25%（10/40）である。特定の化学的（アルコール、ケトン）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 BCOP の正確度は 87%（72/83）～92%（75/85）、偽陽性率は 12%（7/58）～16%（9/56）、偽陰性率は 0%（0/27）～12%（3/26）である。

45. 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 BCOP 試験法の有用性と限界をさらに評価する上で BCOP 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）。

© OCDE、（2009）

試験結果採用基準

46. 陽性対照物質の IVIS が最新の背景データ平均値から 2 標準偏差以内であれば、または試験頻度が低い（月 1 回未満）試験施設では受け入れ可能な試験を行なうごとに試験結果を採用できる。最新の背景データ平均値は少なくとも 3 カ月ごとに更新される。陰性または溶媒／媒体対照の混濁度および透過性が、それぞれの陰性または溶媒／媒体対照で処理されたウシ角膜から得られるバックグラウンドの混濁度および透過性の上限値未満である必要がある。

試験報告書

47. 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）
眼球の保管および搬送（眼球の採取日時、試験開始までの時間、搬送用培地および温度条件、使用した抗生物質など）
可能であれば、眼球を採取した動物の特性（供試動物の年齢、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

同時陽性対照および陰性対照の結果が背景データの範囲内である場合は、試験結果を採用できる。該当する場合、同時ベンチマーク対照の結果が背景データの範囲内であれば試験結果を採用できる。

試験条件

使用した試験系の説明
使用した角膜ホルダーの種類
混濁度および透過率測定用装置（オパシトメータ、分光光度計など）の較正に関する情報
使用したウシ角膜の情報（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

個々の試験試料のデータ（混濁度および OD_{490} 値、ならびに被験物質、陽性対照物質、陰性対照物質、基準対照物質（試験した場合）の IVIS 計算値、必要に応じて反復再試験のデータおよび各試験の平均値 ± 標準偏差を含む表形式で報告）
以上のほかに観察された影響の説明

結果に関する考察

結論

© OCDE、（2009）

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) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). New York & Geneva: United Nations Publications. Available:[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) 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]

(5) 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 Evalu tion of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.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 BCOP 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: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

(11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(12) 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].

(13) 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.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.

(17) 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]

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

© OCDE、（2009）

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) 物理学／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。混濁度はウサギの眼球を用いるドレイズ試験では主観的に、一方「オパシトメータ」などの装置を用いると客観的に評価することができる。

角膜透過性：角膜上皮層の損傷の定量的測定値。角膜全細胞層を通過したフルオレセインナトリウム色素量を測定することにより得られる。

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。

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）。

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。

***In vitro* 刺激性スコア（IVIS）：**BCOP 測定法において、各処理群の平均混濁度および平均透過率を経験式に代入して求める、処理群ごとの単一の *in vitro* スコア。IVIS＝平均混濁度+（15×平均透過率）。

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、または GHS 区分 1、2A、2B に分類されない物質。

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）。

オパシトメータ（opacitometer）：角膜の透過光量を定量的に測定して「角膜混濁度」を測定するための装置。この装置は一般的に、それぞれに光源および光電池のある 2 つの区画から構成される。1 区画を処理角膜用に用い、もう 1 区画を装置の較正およびゼロ合わせのために用いる。ハロゲンランプから対照区画（窓や液体のない空のチャンバー）を通過して光電池に到達した光の量を、角膜を装着したチャンバーを収容する測定区画を通過して光電池に達した光の量と比較する。光電池からの透過光信号の差を比較して混濁度測定値を数値としてデジタルディスプレーに表示する。

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。

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連続的な試験を行なう。

© OCDE、（2009）

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。

付録 II

BCOP 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 推奨参照物質を参照のこと）した（5)。参照データについては BCOP およびニワトリ摘出眼（ICE）試験法に関する ICCVAM Background Review Document で閲覧できる（17）(18)。

© OCDE、（2009）

表 1 BCOP 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
エチル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。

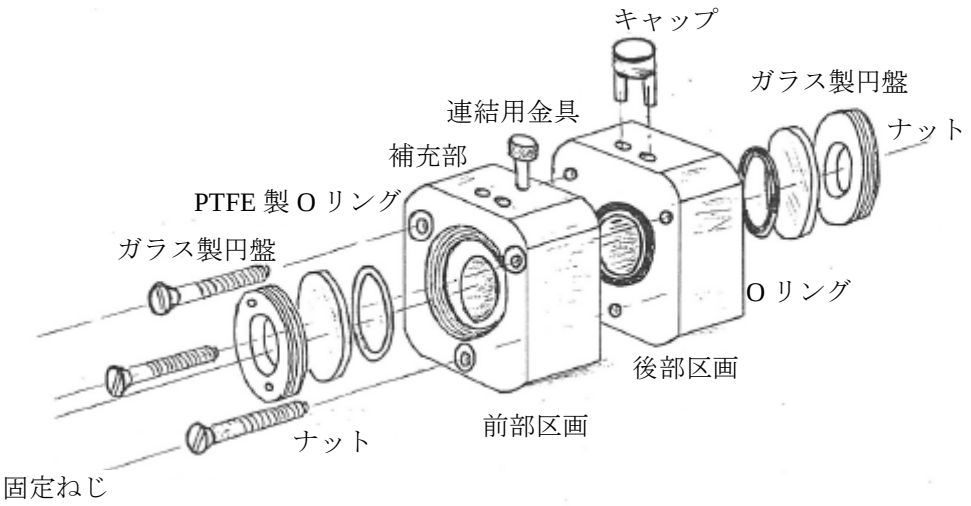
[2] *in vivo* ウサギ眼試験（OECD TG405）の結果に基づき、UN GHS（3）（7）を使用。

[3] BCOP および ICE の結果に基づく。

付録 III

BCOP 試験用角膜ホルダー

1. BCOP試験用角膜ホルダーは不活性素材（ポリプロピレンなど）からできている。ホルダーは二分できる構造（前部チャンバーと後部チャンバー）であり、2 つの類似した円筒状の内部チャンバーを有する。各チャンバーの容積は 5 mLであり、ガラス製窓で仕切られている。その窓を通して混濁度が測定される。各内部チャンバーの直径は 1.7 cm、深さは 2.2 cmである [1]。後部チャンバーにOリングを付けて漏出を防止している。角膜は、内皮側が後部チャンバーのOリングに接触するように置き、前部チャンバーを角膜の上皮側に置く。チャンバーはステンレス製ねじ 3 個を用いて外周縁部で固定する。各チャンバーの端には、角膜を扱いやすいように取り外し可能なガラス製窓を付ける。Oリングをガラス製窓とチャンバーの間に取り付けて漏出を防止する。各チャンバーの上部にある 2 つの孔から培地や被験物質の導入や除去ができる。注入孔は処理およびインキュベーション中はゴム製キャップで封をする。



[1] 上記の寸法は 12～60 カ月齢の乳牛用の角膜ホルダーについてのものである。6～12 カ月齢の動物を使用するのであれば代わりに各チャンバーの容積が 4 mL、各内部チャンバーの直径が 1.5 cm、深さが 2.2 cm になるようにホルダーを設計する。角膜ホルダーを新たに設計する場合は後部チャンバー容積に対する角膜暴露面積の比率を従来の角膜ホルダーと同じ比率にすることが特に重要である。これは、透過率を正確に測定し、本ガイドラインで提案した式で IVIS を計算するために必要である。

オパシトメータ

2. オパシトメータは透過光測定装置である。ハロゲンランプから対照区画（窓も液体もない空のチャンバー）を通過して光電池に達した光の量を、角膜を装着したチャンバーを収容する測定区画を通過して光電池に達する光の量と比較する。透過光による光電池からの信号の差を比較して、混濁度を数値としてデジタルディスプレーに表示する。混濁度単位を決定する。

3. オパシトメータは、予測モデル（Prediction Model）で記述されている様々な分類に用いられるカットオフ値を含む、混濁度指示値の範囲（すなわち、最大で腐食性／強度刺激性を決定するカットオフ値まで）で直線的な応答を示すことが必要である。最大 75～80 混濁度単位まで直線的で正確な指示値を示すようにオパシトメータを一連の較正用標準で較正する必要がある。較正用標準（ポリエステル製の不透明なシート）を較正用チャンバー（較正用標準を固定するための角膜チャンバー）に装着し、オパシトメータで測定する。較正用チャンバーは、光源と光電池の間で混濁度測定時に角膜を置いたときとほぼ同じ距離になる位置に較正用標準を固定できるように設計されている。オパシトメータは最初、較正用標準のない較正用チャンバーを用いて混濁度ゼロの較正を行なう。次いで 3 種の異なる較正用標準を較正チャンバーに 1 つずつ装着して混濁度を測定する。較正用標準 1、2、3 が、それぞれ 75、150、225 混濁度単位± 5%の設定値に等しい混濁度指示値を示す必要がある。

© OECD、(2009)