試験ガイドライン No.437

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に分類する必要のない化学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

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 (2020), Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage,

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-437-2020.pdf

©OECD (2020)

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 437
採択：
2020 年 6 月 26 日

化学物質の試験に関する OECD ガイドライン

眼に対する危険有害性に関する BCOP 試験法の改訂版試験ガイドライン 437

はじめに

1. 2006 年および 2010 年、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）は欧州動物実験代替法評価センター（European Centre for the Validation of Alternative Methods：ECVAM）および日本動物実験代替法評価センター（JaCVAM）と共に、ウシ角膜を用いる混濁度および透過性（BCOP）OP-KIT 試験法を評価した（1）（2）。最初の評価では、眼に対する重篤な損傷を引き起こす化学品（物質および混合物）の同定における BCOP 試験法の有用性が評価され（1）、2 度目の評価では、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（物質および混合物）の同定における BCOP 試験法の有用性が評価された（2）。BCOP 試験法のバリデーションのデータベースには、合計 113 種の物質および 100 種の混合物のデータが収載されている（2）（3）。上記の評価およびこれらに対する第三者評価により、BCOP OP-KIT 試験法は国連（UN）勧告「化学品の分類および表示に関する世界調和システム（GHS）」（4）に定義される眼に対する重篤な損傷を引き起こす化学品（物質および混合物のいずれも）ならびに眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性にも分類されない化学品（物質および混合物のいずれも）を正確に同定することができる試験法であると結論され、これら双方の同定において科学的に妥当な試験法として認められている。眼に対する重篤な損傷とは、眼の前表面への適用後に、21 日以内に消失しない組織損傷、または深刻な視力の低下が生じることである。眼に対する重篤な損傷を引き起こす化学品は、UN GHS 区分 1 に分類される。一方、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は、UN GHS 区分 1 および 2（2A または 2B）のいずれの分類にも該当しない（すなわち、UN GHS 区分外）化学品と定義される。本テストガイドライン（2009 年採択、2013 年改訂）では、BCOP 試験法の評価に基づいた当該試験法の推奨される用途および限界について述べる。本改訂版（2013 年）における初版（2009 年）との主な相違点としては、UNGHS に基づいた分類不要の化学品を同定するための BCOP 試験法の使用（2 項および 7 項）、アルコール、ケトンおよび固体の試験（6 項および 7 項）ならびに物質および混合物の試験（8 項）に対する BCOP 試験法の適用性の明確化、界面活性剤および界面活性剤を含有する混合物の試験法の明確化（28 項）、陽性対照に関する記述の改訂および明確化（39 項および 40 項）、BCOP 試験法の判定基準の改訂（47 項［訳注：正しくは 48 項］）、試験結果許容基準の改訂（48 項［訳注：正しくは 49 項］）、試験報告書記載事項の改訂（48 項［訳注：正しくは 50 項］）、補遺 I の定義の改訂、様々な分類システムにおける BCOP 試験法の予測能に関する補遺 II の追加、補遺 III の習熟度確認物質一覧表の改訂、ならびに補遺 IV の BCOP 試験用角膜ホルダー（1 項）およびオパシトメータ（2 項および 3 項）に関する記述の改訂などが挙げられる。2020 年、本試験ガイドラインは改訂され、BCOP 試験法のバリデーションに用いられる OP-KIT オパシトメータと同程度の性能を有することが示されたレーザー光ベースのオパシトメータ（LLBO）の使用が可能となった（6、7、42、45、48 項、補遺 II、補遺 V 参照）。習熟度確認物質一覧表に関する補遺 III も、2020 年に改訂された。

2. 現在のところ、ドレイズ法による *in vivo* 眼刺激性試験（5）に代わり単一の試験で様々なクラスの化学品の刺激性を完全に予測することができる *in vitro* の試験法はないというのが一般的な見解である。しかし、（階層的）試験戦略において複数の代替試験法を戦略的に組み合わせることにより、ドレイズ法による眼刺激性試験を代替することが可能であると考えられる（6）。トップダウン方式（6）は、既存の情報に基づくと被験物質は強度の刺激性を示すであろうと考えられる場合に用いるようデザインされた評

© OECD, (2020)

本資料は、HTTP://WWW.OECD.ORG/TERMSANDCONDITIONS/に掲載されている諸条件に従って自由に使用することができる。

価方法であり、ボトムアップ方式（6）は、既存の情報に基づくと被験物質は分類を必要とするほど強い眼刺激を起こさないであろうと考えられる場合に用いるようデザインされたものである。BCOP 試験法は、化学品の眼に対する危険有害性の分類および表示を行うために特定の状況下で使用することができる *in vitro* 試験法であり、固有の限界を有している。BCOP 試験法は、単独で *in vivo* ウサギ眼試験の代替法として用いるには不十分であると考えられるが、Scott ら（6）が示唆するトップダウン方式のような試験戦略の第 1 段階として使用することが推奨される。これにより、眼に対する重篤な損傷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、追加試験を行うことなく同定することが可能である（4）。また、ボトムアップ方式（6）のような試験戦略の一部として、UN GHS（UN GHS 区分外）（4）に定義された眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性の分類が不要な化学品の同定に使用することも推奨される。しかし、BCOP 試験法による予測において、眼に対する重篤な損傷を引き起こす化学品、または眼刺激性/眼に対する重篤な損傷性については区分外である化学品のいずれにも該当しない化学品については、分類を確定するために追加試験（*in vitro* や *in vivo*）を実施する必要がある。最適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。

3. 本テストガイドラインの目的は、ウシ摘出角膜に混濁を誘発する能力および透過性の増大を指標として、被験物質の眼に対する危険有害性を評価する方法を示すことである。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。被験物質曝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）または LLBO 刺激性スコア（LLBO Irritancy Score：LIS）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。

4. 用いた定義を補遺 I に示す。

最初に考慮すべき事項および本試験法における限界

5. 本テストガイドラインは、Institute for In Vitro Sciences（IIVS）のプロトコルより得た情報および INVITTOX Protocol 124（10）をもとに開発された ICCVAM の BCOP 試験法プロトコル（8）（9）に基づいて作成したものである。INVITTOX Protocol 124 は、1997～1998 年に実施された欧州共同体出資のプレバリデーション試験で用いられたプロトコルに相当するものである。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. BCOP OP-KIT および LLBO 試験法は、UN GHS（4）に定義された眼に対する重篤な損傷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）を同定するために用いることができる。この目的に用いた場合、UN GHS 分類システムに従って分類された *in vivo* ウサギ眼試験法データと比較したときの BCOP OP-KIT 試験法の全般的な正確性は 79%（n=191）、偽陽性率は 25%（n=126）、偽陰性率は 14%（n=65）である（3）（補遺 II、表 1 を参照のこと）。特定の化学的分類（すなわち、アルコール、ケトン）または物理学的分類（すなわち、固体）に属する物質をデータベースから除外すると、UN GHS 分類システムにおける BCOP OP-KIT 試験法の全般的な正確性は 85%（n=131）、偽陽性率は 20%（n=81）、偽陰性率は 8%（n=50）となる（3）。UN GHS 分類システムに従って分類された *in vivo* ウサギ眼試験法データと比較したときの BCOP LLBO 試験法の全般的な正確性は 78%（n=145）、偽陽性率は 21%（n=89）、偽陰性率は 24%（n=56）である（12）（補遺 II、表 3 を参照のこと）。特定の化学的分類（すなわち、アルコール類、ケトン類）または物理学的分類（すなわち、固体）に属す被験物質をデータベースから除外すると、UN GHS 分類システムにおける BCOP LLBO 試験法の全般的な正確性は 85%（n=55）、偽陽性率は 17%（n=32）、偽陰性率は 13%（n=23）となる（12）。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物質は、BCOP 試験法において過小予測のリスクも生じうる（13）。バリデーションデータベース（1）（2）（3）（12）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に基づくと、この点が、眼に対する重篤な損傷を引き起こす化学品（UN GHS 区分 1）の同定における BCOP 試験法の欠点であると考えられる。しかし、すべてのアルコールおよびケトンが BCOP 試験法によって過大評価（高い区分への分類）されるわけではなく、UN GHS 区分 1 として正しく分類される場合もあることから、これら 2 種の有機官能基が本試験法の適用範囲外であるとはみなされない。アルコールおよびケトンが過大評価された可能性が容認できるとするか、もしく

©OECD 2020

は証拠の重み付けを考慮して追加試験を実施するかは、本テストガイドラインを使用する者が判断してよい。一方、固体における偽陰性率に関しては、ドレイズ法による *in vivo* 眼刺激性試験では、固体を用いた場合の曝露条件が苛酷であったり変動したりすることがあるため刺激性の予測が不適切となる可能性があることに留意が必要である（14）。また、ICCVAM のバリデーションデータベース（2）（3）および LLBO 評価試験（12）においては、眼に対する重篤な損傷を引き起こす化学品（UN GHS 区分 1）の同定に関連した偽陰性の判定に、UN GHS 区分外と予測されるものがない点にも留意すべきである。加えて、UN GHS に従って単独では予測不能な化学品はすべて、規制要件に応じて証拠の重み付け手法による逐次的試験戦略により、適切にバリデートされたその他の *in vitro* 試験もしくは最終的にはウサギを用いる試験で引続き試験されることを考慮すると、BCOP 試験法における偽陰性の判定は重大ではない。さらに、BCOP 試験法によって固体の化学品が UN GHS 区分 1 として正しく分類される場合もあることを考慮すると、この物理的状態についても本試験法の適用範囲外であるとはみなされない。したがって、本試験法の最終使用者はすべての種類の被験物質に本試験法を使用でき、これにより、予測される UN GHS 区分 1 を、追加試験なしで UN GHS 区分 1 に従った分類に使用できる。しかし、既に述べたように、アルコールやケトンで得られる陽性結果については過大評価である可能性があるため、慎重に解釈する必要がある。

7. また、BCOP 試験法は、UN GHS 分類システム（4）に定義された眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性に分類されない化学品を同定するためにも用いることができる。この目的に用いた場合、UN GHS 分類システムに従って分類された *in vivo* ウサギ眼試験法データと比較したときの BCOP OP-KIT 試験法の全般的な正確性は 69%（n=196）、偽陽性率は 69%（n=89）、偽陰性率は 0%（n=107）である（3）（補遺 II、表 2 を参照のこと）。UN GHS 分類システムに従って分類された *in vivo* ウサギ眼試験法データと比較したときの BCOP LLBO 試験法の全般的な正確性は 83%（n=145）、偽陽性率は 45%（n=41）、偽陰性率は 6%（n=104）である（12）（補遺 II、表 4 を参照のこと）。偽陽性（*in vivo* で UN GHS 区分外である化学品、48 項を参照のこと）率がかなり高い値であるが、単独では予測不能な化学品はすべて、規制要件に応じて証拠の重み付け手法による逐次的試験戦略により、適切にバリデートされたその他の *in vitro* 試験もしくは最終的にはウサギを用いる試験で引続き試験されることを考慮すると、BCOP 試験法における偽陽性率は重要な意味を有していない。アルコール、ケトンおよび固体の試験に関しては、眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性の分類が不要な化学品（UN GHS 区分外）を同定することが目的である場合には、BCOP 試験法に特有の欠点は認められていない（3）（12）。したがって、研究者は本試験法を用いてすべての種類の被験物質を検討することができ、この試験における陰性結果（UN GHS 区分外）は分類不要（UN GHS 区分外）であることを示しているとみなしてよい。ただし、眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性の分類が不要な化学品の同定における BCOP OP-KIT および LLBO 試験法の正確性はそれぞれわずか 31%および 55%であることから、同等の感度があり特異度に優れたバリデート済みの認められている他の *in vitro* 試験法が利用できる場合は、本試験法をボトムアップ方式の評価（6）における最初の試験として選択すべきではない。

8. 混濁度に OP-KIT 装置を用いる BCOP 試験法のバリデーションデータベースには、合計 113 種の物質および 100 種の混合物が登録された（2）（3）。混濁度に LLBO を用いる BCOP 試験法の評価用データベースには、145 種の物質が登録された（12）。これまで、LLBO を用いた混合物の試験は行われなかったが、両装置は物質および混合物の試験に適用できるとみなされる。

9. BCOP 試験法では UN GHS 区分 1 の化学品が UN GHS 区分 2、2A または 2B として過小評価されること、ならびに UN GHS 区分外の化学品が UN GHS 区分 2、2A または 2B として過大評価されることが多いため（2）（3）（12）、眼刺激性（UN GHS 区分 2 または 2A）もしくは軽度の眼刺激性（UN GHS 区分 2B）に分類すべき被験物質の同定に本試験を用いることは推奨されない。このような化学品の同定には、他の適切な試験を用いてさらに試験を行う必要があると考えられる。BCOP 試験法は、UN GHS 区分 1 に分類すべき農薬製剤の識別について、過小予測することが明らかにされた（15）。

10. 眼球および角膜の供給元には、食肉処理場、営利事業での供給業者、および研究機関が含まれるが、これらに限定されない。供給者は、適用されるすべての法律、規制、方針、ガイドラインおよび許可要件を遵守する。試験施設に関しては、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施設の適用可能な規則や手順に従って実施する。施設の普遍的予防措置を推奨する（16）。

©OECD 2020

11. BCOP 試験法では結膜および虹彩の損傷については考慮しないが、UN GHS 分類を検討する場合に *in vivo* での分類の主要な要因となる角膜への影響を評価の対象としている。しかし、BCOP 試験法では、角膜病変の可逆性そのものを評価することはできない。ウサギを用いた眼刺激性試験に基づき、角膜の初期損傷の深度を評価することによりある種の不可逆的影響を識別することが提案されている（17）。しかしなお、高度の初期損傷との関連がみられない不可逆的影響がいかにして生じるのかを理解するためには、さらなる科学的知見が必要である。最後に BCOP 試験法では、眼への曝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。

12. 本テストガイドラインは、新たな情報およびデータを検討して定期的に更新される。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場合には病理組織検査が有用である可能性がある。OECD ガイダンス文書 No.160（18）に示すとおり、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、本試験法の正確性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。

13. 本試験法を初めて確立する施設は、補遺 III に示す習熟度確認物質を使用する。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

14. 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 または LIS を算出し、いずれかを用いて被験物質の *in vivo* 眼刺激性の予測に向け、*in vitro* 刺激性危険有害性分類区分を割り当てる（48 項の判定基準参照）。

15. BCOP 試験法では、屠殺直後の畜牛（仔ウシまたはウシ）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、角膜の全層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。補遺 IV 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

16. 屠畜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他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。

17. 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（19）。そのため、60 ヵ月齢超の畜牛の眼球は通常、使用しない。12 ヵ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（すなわち、6〜12 ヵ月齢）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（BSE）の曝露を受ける（20）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。なお、作業者の BSE 曝露の可能性に関しては、国内の規制を遵守すること。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。

©OECD 2020

眼球の採取および施設への搬送

18. 訓練を受けた食肉処理場の従業員、営利事業での供給業者、および研究機関が眼球を採取する。機械的損傷などの損傷を最小限にするために、死亡後できる限り速やかに眼球を摘出する。摘出後は直ちに冷却し、搬送中も低温を維持する。屠畜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曝露を防止するため洗剤を使用してはならない。

19. 適切な大きさの容器に入れた低温のハンクス平衡塩類溶液（HBSS）に眼球を早急かつ完全に浸漬し、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、血液や他の生物学的物質（細菌などの微生物を含む）に曝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、採取時および搬送中は眼球の入った容器を氷冷する、搬送時の眼球保存用の HBSS に抗生物質［例、ペニシリン 100 IU/mL、ストレプトマイシン 100 µg/mL］を添加する等）が重要である。

20. 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。

BCOP 試験用眼球の選別基準

21. 眼球が施設に到着し次第、混濁の増大、擦過傷、新生血管形成などの異常の有無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。

22. 試験の後半段階でも各角膜の質を評価する。OP-KIT については、最初の 1 時間の平衡時間（t0）後、7 混濁度単位以上の混濁度となる未処理の角膜は廃棄する。LLBO については、t0 の時点でのレーザー測定値が 1200 ルクス未満か 1850 ルクス超の未処理の角膜は廃棄する（注：混濁度単位の確立に用いられる混濁度標準物質によりオパシトメータを較正する。補遺 V 参照）。

23. 各処理群（被験物質、同時陰性対照および同時陽性対照）は、最低 3 個の眼球からなる。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、被験物質処理角膜および陽性対照物質処理角膜の IVIS/LIS 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

24. 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面する（補遺 IV）。両チャンバーをあらかじめ温めたフェノールレッドを含まない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（t0）以上 32 ± 1°C に維持する（*in vivo* での角膜表面の温度は約 32°C）。

25. 平衡化期間後、新たに調製して温めた EMEM（フェノールレッドを含まない）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、血管新生など）がみられる角膜、またはオパシトメータでの OP-KIT の混濁度が 7 混濁度単位を超える角膜、および LLBO でのレーザー測定値が 1200 ルクス未満または 1850 ルクス以上の角膜は廃棄する。少なくとも 3 個の角膜を陰性（または溶媒）対照角膜として選択し、残りの角膜を処理群および陽性対照群に振り分ける。

©OECD 2020

26. 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°C 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

27. 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。

28. 液体は希釈しないで試験する。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。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。上記に代わる希釈濃度については適切な根拠を示す必要がある。界面活性剤を含有する混合物については、原液のまま試験するか、または該当するヒトでの曝露シナリオに応じて適切に希釈してもよい。ただし、試験に用いた濃度について適切な根拠を示す必要がある。液体または界面活性剤には、角膜を 10 分間曝露する。曝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。界面活性剤および界面活性剤を含有する混合物の定義については、補遺 I を参照されたい。

29. 非界面活性固体は、通常、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% w/v 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（32 項を参照のこと）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。固体の場合、角膜に 4 時間曝露させるが、液体や界面活性剤のときと同様に、適切な科学的根拠がある場合は曝露時間を変更してもよい。

30. 被験物質の物理学的性質および化学的特性（例えば、固体、液体、または液体の粘性）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、ならびに未希釈の固体に使用する。

31. 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、次いで曝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、角膜に曝露させることである。

32. 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を満たす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。

曝露後のインキュベーション

33. 曝露後、被験物質、陰性対照物質または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

©OECD 2020

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。

34. 液体または界面活性剤の場合は、洗浄後、角膜を 32 ± 1°C でさらに 2 時間インキュベートする。一定の状況下では曝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。固体で処理した角膜は 4 時間の曝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。

35. 液体および界面活性剤では曝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 時間の曝露の最終時点で、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

36. 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。

37. 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することもできる。

38. 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。

39. 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、試験系の完全性および試験が正しく実施されていることを立証する。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。

40. 液体被験物質用の陽性対照物質の例は 100%エタノールまたは 100%ジメチルホルムアミドである。また、固体被験物質用の陽性対照物質の例は 20% w/v イミダゾール 0.9%塩化ナトリウム溶液である。

41. 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

42. 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。OP-KIT オパシトメータは、BCOP 試験法のバリデーションにおいて使用された標準的な装置である（9）（21）。評価されたそれ以外の装置は、Duratec オパシトメータ（22）および LLBO（レーザー光ベースのオパシトメータ）（12）（21）（23）である（補遺 V 参照）。習熟度確認物質の試験により許容可能であることが立証されている、類似のオパシトメータも使用できる。

43. 透過性は角膜全細胞層（すなわち、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を検討する場合は 4 mg/mL、非界面活性固体を検討する場合は 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°C 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

©OECD 2020

で分光光度計を用いて測定した値を光学密度（OD490）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 OD490 値を用いて測定する（11）。

44. 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 OD490 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 OD490 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

45. 混濁度および平均透過率（OD490）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（OD490）で補正したあと、各処理群の平均混濁度および透過率（OD490）を、実験的に求められた式に代入して *in vitro* 刺激性スコア（IVIS）を算出する。LLBO の場合、測定単位はルクス（照度の SI 単位）、混濁度はルクスの平均値/7 と定義する（23）。

- OP-KIT による IVIS = 平均混濁度の値（OP-KIT の読み出し）+（15 x 平均透過性 OD490 の値）
- LLBO による LIS = 平均混濁度の値（ルクス/7 での LLBO の読み出し）+（15 x 平均透過性 OD490 の値）

46. Sina ら（24）の報告によると、この OP-KIT の式は施設内および施設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われたが、ほとんど同じ式が導かれた。Verstraelen ら（23）は、29 種類の被験物質による初回の社内試験の間に得られた LLBO の式について報告し、この式は、80 種類および 65 種類の化学物質による追加社内試験（12）、ならびに 13 種類の習熟度確認物質による試験施設間試験（25）において確認された。

47. 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

48. 眼に対する重篤な損傷性を有する被験物質（UN GHS 区分 1）、および眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性の分類が不要な被験物質（UN GHS 区分外）を識別するための予測モデルを以下に示す。

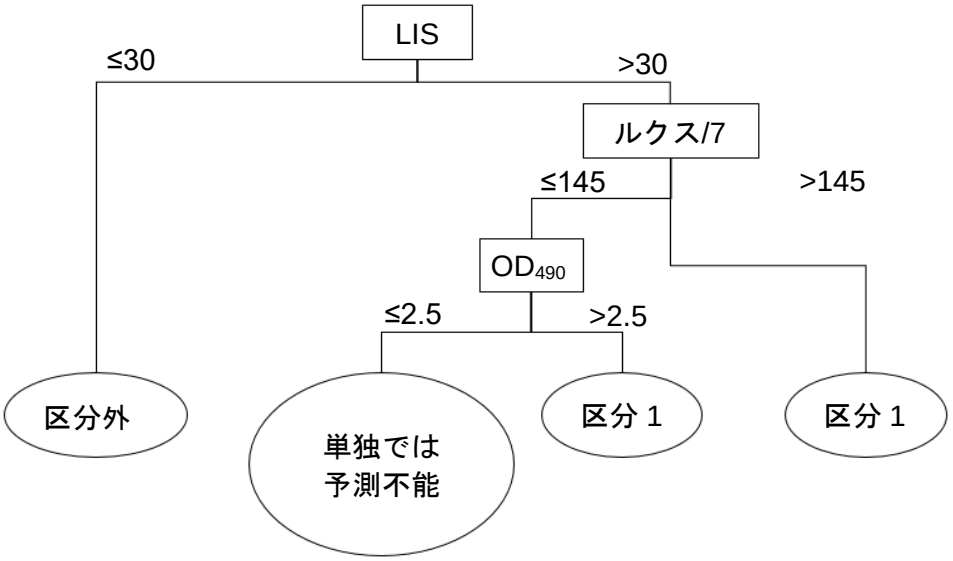
オパシトメータ 1	**オパシトメータ 2**	
OP-KIT*および Duratec	**LLBO****	**UN GHS**
IVIS ≤ 3	LIS ≤ 30	区分外
3 < IVIS ≤ 55	LIS > 30 かつルクス/7 ≤ 145 かつ OD_{490} ≤ 2.5	単独では予測不能
IVIS > 55	• LIS > 30 かつルクス/7 ≤ 145 かつ OD_{490} > 2.5、または • LIS > 30 かつルクス/7 > 145	区分 1

* 113 種類の物質と 100 種類の混合物を含む ICCVAM データベースに基づく（1）（2）（3）（22）。

** 145 種類の物質による LLBO 評価試験に基づく（12）。

©OECD 2020

図 1：BCOP LLBO 試験法の予測モデル



試験結果許容基準

49. 陽性対照から得られた値が OP-KIT 装置での IVIS に関する過去の平均値の 2 標準偏差以内にある場合、試験は許容可能とみなされる。LLBO を使用する場合、陽性対照から得られた値が（ルクス/7 で定義される）混濁度に関する過去の平均値の 2 標準偏差以内にある場合、試験は許容可能とみなされる。陽性対照は、少なくとも 3 ヵ月ごとに更新するか、試験の実施頻度が低い（すなわち、月 1 回未満）試験施設では、許容可能な試験の実施ごとに更新する。陰性または溶媒/媒体対照の混濁度および透過性は、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た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。被験化学物質について得られた予測が明確である場合は、3 個以上の角膜を用いて実施した 1 回の試験で十分である。しかし、初回の試験の結果が不明確である場合は、2 回目の試験の実施を考慮する（ただし、必ずしも必要であるとは限らない）。さらに、最初の 2 回の試験で予測が一致しない場合には、3 回目の試験を考慮する。ここにおいては、以下に示すように 3 つの角膜における予測が一致しない場合に、初回の試験の結果は不明確であるとみなされる。

- 3 個のうち 2 個の角膜で得た予測が、3 個の角膜すべての平均値から得られた予測と一致しない場合。または
- 3 個のうち 1 個の角膜で得た予測が、3 個の角膜すべての平均値から得られた予測と一致せず、かつ以下の不一致の結果を示した場合。
    - OP-KIT：IVIS と、カットオフ閾値である 55 との差が 10 単位を超えていた。
    - LLBO：混濁度に基づくと UN GHS 区分 1 の予測（ルクス/7、平均混濁度 145 超）となるが、3 個中 1 個の角膜の混濁度（ルクス/7）が 130 未満であった（12）。
    - LLBO：OD に基づくと UN GHS 区分 1 の予測（平均 OD 2.5 超）となるが、3 個中 1 個の角膜の OD が 2.0 未満であった（12）。
    - LLBO：LIS に基づくと UN GHS 区分外の予測（平均 LIS が 30 以下）となるが、3 個中 1 個の角膜の LIS が 40 超であった（12）。

©OECD 2020

2 回目の試験の結果が初回の試験の結果と一致した場合は、3 回目の試験を行わず、これを最終判定としてよい。2 回目の試験の結果が初回の試験の結果と一致しない場合には、予測を明確にして被験物質を分類するために、最終試験として 3 回目の試験を実施する。いずれかの試験で UN GHS 区分 1 であることが予測された場合には、分類および表示を行うための上記の追加試験は実施しなくてもよい。

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

- 単一成分物質：IUPAC または CAS 名、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
- 多成分物質、UVCB、混合物：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、定量的発生、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
- 入手可能な範囲で、物理的状態、揮発性、pH、LogP、分子量、化学物質分類、および試験実施に関わる追加の関連する物理化学的特性
- 必要に応じ、また現実に実行可能な場合など、純度、不純物の化学的同一性
- 該当する場合は試験前の処理法（加温、粉砕など）
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性

試験委託者および施設に関する情報

- 試験委託者および施設の名称および住所、試験責任者の氏名および住所

試験条件

- 使用したオパシトメータ（例えば、モデルおよび規格）および機器の設定
- 測定の直線性を確認するための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
- 使用した角膜ホルダーの種類（例えば、モデルおよび規格）
- 使用したその他の装置の説明
- 試験法の完全性（正確性と信頼性）を保証するためにある期間にわたって用いられた手順（習熟度確認物質による定期的試験など）

許容試験基準

- 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こと
- 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ること

眼球の採取および準備

- 眼球の入手先（採取された施設）
- 眼球の保管および搬送条件（例えば、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）
- ウシ角膜の品質、角膜径に対する角膜ホルダーの適合性、角膜ホルダーの温度、および試験に使用する角膜の選択規準に関する記述など、ウシ角膜の準備および装着に関する情報

©OECD 2020

試験手順

- 使用した角膜の数
- 使用した陰性対照および陽性対照の識別情報（該当する場合は、溶媒およびベンチマーク対照の識別情報を追加）
- 被験物質の濃度、適用方法、曝露時間および曝露後インキュベーション時間
- 評価および判定基準についての説明
- 試験採用基準についての説明
- 試験手順のあらゆる変更についての説明
- 判定基準についての説明

結果

- 個々の試験試料のデータの表（混濁度および OD490 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 または LIS 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）
- 角膜の染色など、他に観察された影響の説明
- 該当する場合は、得られた *in vitro* での UN GHS 分類

結果に関する考察

結論

©OECD 2020

参考文献

1. ICCVAM (2006). 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. ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm].
3. OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.
4. UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. Available: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html].
5. 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].
6. Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.
7. OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No.263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
8. ICCVAM (2006). 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 (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. 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].
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.

©OECD 2020

12. Adriaens, E., Verstraelen, S., et al Van Rompay, A.R.,., (2020). Overall performance of Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Laser Light-Based Opacitometer (LLBO) test method with regard to solid and liquid chemicals testing, Manuscript under preparation

13. 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.

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

15. Kolle S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for In vitro Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. ATLA 43, 1-18.

16. Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2019). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available: [https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/environmental-guidelines-P.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. 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. Adopted October 25, 2011. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development.

19. 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.

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

21. Van Goethem, F., Hansen, E., Sysmans, M., De Smedt, A., Vanparys, P., Van Gompel, J. (2010). Development of a new opacitometer for the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. *Toxicol. In Vitro* 24:1854-1861.

22. Verstraelen, S., Jacobs, A., De Wever, B., Vanparys, P. (2013). Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an in vitro alternative to the Draize rabbit eye irritation test. Toxicol. In Vitro 27: 1298–1311.

23. Schrage, A., Kolle, S. N., Moreno, M. C. R., Norman, K., Raabe, H., Curren, R., … Landsiedel, R. (2011). The Bovine Corneal Opacity and Permeability Test in Routine Ocular Irritation Testing and its Improvement within the Limits of OECD Test Guideline 437. Alternatives to Laboratory Animals, 39(1), 37–53. https://doi.org/10.1177/026119291103900119

24. 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.

25. Van Rompay, A.R, Adriaens, E.,., et al., Verstraelen, S. (2019). Multi-laboratory validation of Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Laser Light-Based Opacitometer (LLBO) test method regarding solid and liquid chemicals testing, Manuscript under preparation.

©OECD 2020

26. OECD (2017). 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].

27. 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].

©OECD 2020

補遺 I—定義

正確性：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わす近似性の指標。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、試験法の正確な結果の割合を意味する「一致性」の代わりに用いられる。

基準物質：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。基準物質には次の特性がある。（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。

ボトムアップ方式：眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性の分類が不要であると考えられる化学物質に適用される階層的な評価方式。最初に、分類不要の物質（陰性結果）とそれ以外の物質（陽性結果）とを識別する試験を行う。

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：被験物質曝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。

眼刺激：眼の前表面に被験物質を適用した後に生じる眼の変化で、21 日以内に完全に回復するもの。「眼に対する可逆的な影響」および「UN GHS 区分 2」（4）と同義に用いられる。

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。

有害性：曝露後に生物、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（OP-KIT の読み出し）+（15 x 平均透過性の値）

眼に対する不可逆的影響：「眼に対する重篤な損傷」の項を参照のこと。

LLBO 刺激性スコア（LIS）：BCOP 試験法において用いられる経験的に得られた式のことで、これにより、各処理群の LLBO で測定される平均混濁度と平均透過性の値が、処理群ごとに単一の *in vitro* スコアに結合される。*LIS* = 平均混濁度の値（ルクス/7 での LLBO の読み出し）+（15 x 平均透過性の値）

混合物：互いに反応し合わない複数の物質からなる混合物または溶液（4）。

陰性対照：試験系のすべての成分を含む未処理の試験。被験物質処理試料およびその他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う。

区分外（Not Classified）：眼刺激性（UN GHS 区分 2、2A または 2B）にも眼に対する重篤な損傷性（UN GHS 区分 1）にも分類されない化学物質。「UN GHS 区分外（No Category）」と同義に用いられる。

©OECD 2020

オパシトメータ：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。市販のオパシトメータには様々な種類がある。BCOP のバリデーションにおいて使用される OP-KIT オパシトメータには 2 つの区画があり、それぞれ独自の光源とフォトセルを有する。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。このタイプのオパシトメータは、角膜を通過した白色光の透過性が変化した場合、電圧変化の測定により光透過性について中央部に重点を置いた測定を行う。もう 1 つの例はレーザー光ベースのオパシトメータ（LLBO）であり、これは、可視光の代わりに光源としてヘリウムネオン（HeNe）グリーンレーザー（クラス IIa/3R）を用いる（12）（21）（23）。LLBO は角膜表面全体を解析するという利点があるため、切除した角膜の周囲に位置する不透明な部分をより効率的に検出できる。装置が異なると、刺激性区分の相違を識別する読み出しが異なり、閾値も異なる。装置は、データの品質と信頼性を損なうことなく互換可能である。

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。

眼に対する可逆的影響：「眼刺激」の項を参照のこと。

信頼性：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施設内および施設間再現性の程度を表わす尺度。施設内および施設間再現性、ならびに施設内反復性の算出により評価する。

眼に対する重篤な損傷：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生じること。「眼に対する不可逆的影響」および「UN GHS 区分 1」（4）と同義に用いられる。

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他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。

物質：自然状態にあるか、または任意の製造過程において得られる化学元素およびその化合物。製品の安定性を保つ上で必要な添加物や用いられる工程に由来する不純物も含むが、当該物質の安定性に影響せず、またその組成を変化させることなく分離することが可能な溶媒は除く（4）.

界面活性剤：表面活性剤とも呼ばれる。液体の表面張力を低下させることにより泡を発生させたり固体に浸透しやすくしたりする作用を有する洗剤などの物質であり、湿潤剤としても知られている。

界面活性剤を含有する混合物：本テストガイドラインでは、1 種以上の界面活性剤を含有する混合物のうち、その最終濃度が 5%を超えるものをいう。

トップダウン方式：眼に対する重篤な損傷を引き起こす疑いがある化学物質に適用される階層的な評価方式。最初に、眼に対する重篤な損傷を引き起こす物質（陽性結果）とそれ以外の物質（陰性結果）とを識別する試験を行う。

被験物質：試験法において評価の対象とされる化学品（物質または混合物）。

階層的試験戦略：複数の試験法を用いて階層的に試験を行う試験戦略。被験物質に関するすべての既存の情報を、各段階で証拠の重み付け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、動物を用いた階層的で逐次的な試験を行う。

©OECD 2020

国連勧告「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）：人々（雇用主、労働者、輸送担当者、消費者、緊急時対応者など）および環境を守るために、危険有害作用に関する情報を伝達することを目的として、物理学的危険性ならびに健康および環境に対する有害性の種類および程度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（4）。

UN GHS 区分 1：「眼に対する重篤な損傷」の項を参照のこと。

UN GHS 区分 2：「眼刺激」の項を参照のこと。

UN GHS 区分外（No Category）：UN GHS 区分 1 および 2（2A または 2B）のいずれの分類にも該当しない化学物質。「区分外（Not Classified）」と同義に用いられる。

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（正確性を含む）および信頼性が確認された試験法。バリデートされた試験法に、正確性と信頼性の点で、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。

証拠の重み付け（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。

©OECD 2020

補遺 II—BCOP 試験法の予測能

表 1：眼に対する重篤な損傷を引き起こす化学物質の同定における BCOP OP-KIT 試験法の予測能［UN GHS 区分 1 と区分 1 以外（区分 2 + 区分外）に分類］（1）（2）（3）

分類システム	No.	一致度		感度		偽陰性		特異度		偽陽性	
		%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.
UN GHS	191	78.53	150/191	86.15	56/65	13.85	9/65	74.60	94/126	25.40	32/126

表 2：眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性に分類されない化学物質（「非刺激性物質」）の同定における BCOP OP-KIT 試験法の予測能［UN GHS 区分外とこれ以外（区分 1 + 区分 2）とに分類］（1）（2）（3）

分類システム	No.	一致度		感度		偽陰性		特異度		偽陽性	
		%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.
UN GHS	196	68.88	135/196	100	107/107	0	0/107	31.46	28/89	68.54	61/89

表 3：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おける BCOP LLBO 試験法の予測能［UN GHS 区分 1 と区分 1 以外（区分 2 + 区分外）に分類］（12）

分類システム	No.	一致度		感度		偽陰性		特異度		偽陽性	
		% [a]	No.	% [a]	No.	% [a]	No.	% [a]	No.	% [a]	No.
UN GHS	145	77.93	145	75.89	56	24.11	56	79.21	89	20.79	89

[a] 表中の割合は重量の算出に基づく。各化学物質について、すべての結果を考慮に入れ、すべての化学物質が同一重量（重量を 1）になるよう補正率を適用した。

©OECD 2020

表 4：眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性に分類されない化学物質（「非刺激性物質」）の同定における BCOP LLBO 試験法の予測能［UN GHS 区分外とこれ以外（区分 1 + 区分 2）とに分類］（12）

分類システム	No.	一致度		感度		偽陰性		特異度		偽陽性	
		% [a]	No.	% [a]	No.	% [a]	No.	% [a]	No.	% [a]	No.
UN GHS	145	82.76	145	93.75	104	6.25	104	54.88	41	45.12	41

[a] 表中の割合は重量の算出に基づく。各化学物質について、すべての結果を考慮に入れ、すべての化学物質が同一重量（重量を 1）になるよう補正率を適用した。

©OECD 2020

補遺 III—BCOP 試験用の習熟度確認物質

試験実施施設は、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 13 物質の眼に対する危険有害性を正確に分類して技術的熟練度を証明しなければならない。これらの物質は、*in vivo* ウサギ眼試験（TG 405）（26）の結果および UN GHS 分類システム（すなわち、区分 1、2A、2B、または区分外）（4）に基づいて、眼に対する危険有害性物質に対する幅広い反応の低度をすべて網羅するように選別したものである。また、この他に、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、および BCOP 試験法による高品質の *in vitro* データがあることも選択基準とした。なお、参照データは、Streamlined Summary Document（3）および BCOP 試験法に関する ICCVAM Background Review Document（2）（27）で閲覧可能である。

例えば、収載した物質が入手できない状況や、別の正当な理由で使用できない状況では、表 1 の記載と同じ選択基準が適用されれば、同じ物理的形状かつ同じ *in vivo* 分類であり、適切な *in vivo* および *in vitro* 参照データを入手可能な別の物質を使用できる（例：参照化学物質リスト（2）（3）から）。別の習熟度確認物質を使用する場合、その正当性を示すべきである。

©OECD 2020

表 1：BCOP 試験法で習熟度を確認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]	BCOP 分類
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
安息香酸	65-85-0	カルボン酸	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リド [4]	4659-45-4	ハロゲン化アシル	液体	区分 2A	単独では予測不能
エチル-2-メチルアセトアセテート	609-14-3	ケトン、エステル	液体	区分 2B	単独では予測不能
硝酸アンモニウム	6484-52-2	無機塩類	固体	区分 2[3]	単独では予測不能
EDTA 二カリウム塩	25102-12-9	アミン、カルボン酸（塩）	固体	区分外	区分外
Tween 20	9005-64-5	エステル、ポリエーテル	液体	区分外	区分外
2-メルカプトピリミジン	1450-85-7	ハロゲン化アシル	固体	区分外	区分外
フェニルブタゾン	50-33-9	複素環式化合物	固体	区分外	区分外
ポリオキシエチレン（23）ラウリルエーテル（BRIJ-35）（10%）	9002-92-0	アルコール	液体	区分外	区分外

略語：CASRN：ケミカルアブストラクトサービス（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。

©OECD 2020

2 *in vivo* ウサギ眼試験（OECD TG 405）（26）の結果に基づき、UN GHS（4）を使用。

3 2A に分類するか 2B に分類するかは、これら 2 つの区分を区別する UN GHS の基準の解釈（すなわち、区分 2A に分類するためには、7 日目に影響が認められる動物が 3 例中 2 例である必要があるとするか、もしくは 3 例中 1 例でもよいと解釈するか）により異なる。この *in vivo* 試験では 3 例の動物が用いられ、1 例における結膜発赤を除き、他の評価項目はすべて 7 日以内にスコア 0 まで回復した。7 日目までに完全に回復しなかった 1 例ではスコア 1 の結膜発赤（7 日目）が認められ、この反応は 10 日目に完全に回復した。

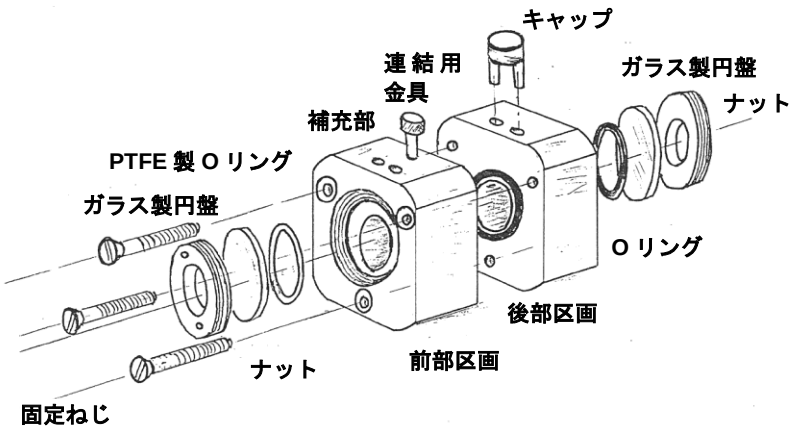
4 2,6-ジクロロベンゾイルクロリドは、供給業者に応じ様々な試験施設で結果のばらつきを示す可能性があり、この補遺 III の第 2 段落で示唆されているとおり検討することが考えられる。

©OECD 2020

補遺 IV—BCOP 試験用角膜ホルダー

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。ガラス製窓とチャンバーの間にも O リングを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。損耗や亀裂の影響、もしくは特殊な化学物質の残留物のチャンバー内壁またはガラス製窓への蓄積は光の散乱または反射率に影響を及ぼすため、このような原因により角膜ホルダーを通過する透過光量が変化する可能性がある。この結果として角膜ホルダーを通過する透過光量のベースライン値が増減し（このとき、混濁度のベースライン値は逆の変化を示す）、個々のチャンバーで測定されるベースラインの角膜混濁度に顕著な変化が認められることがある（すなわち、特定の角膜ホルダーで測定した初回の角膜混濁度が常に、予測されるベースライン値と 2〜3 混濁度単位を超えて異なるような場合）。したがって、施設ごとに、試験対象とする化学物質の性質およびチャンバーの使用頻度に応じて、角膜ホルダーを通過する透過光量の変化を評価するためのプログラムの確立を検討するべきである。個々の角膜ホルダーにおけるベースライン値は、角膜ホルダーを日常的に使用する前に、角膜を装着せずにチャンバーに培地を満たしてベースラインの混濁度（または透過光量）を測定することによって設定することができる。その後も、使用期間を通じて、透過光量の変化を定期的に確認する。このような角膜ホルダーの確認の頻度は、試験対象とする化学物質、使用頻度および角膜混濁度のベースライン値の変化の状態に基づいて、各施設で決定してよい。角膜ホルダーを通過する透過光量に顕著な変化が認められた場合は、適切な方法による角膜ホルダー内面の洗浄や研磨、もしくは交換を考慮する。

©OECD 2020



[1] 上記の寸法は 12～60 ヵ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 ヵ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曝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 または LIS を計算するために必要である。

©OECD 2020

補遺 V—オパシトメータ

1. オパシトメータは透過光測定装置である。標準的な装置は BCOP 試験法のバリデーションに用いられた Electro Design 社（所在地：フランス、リオン）製の OP-KIT 装置で、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。フォトセルから得られる光透過性の差を、電圧の変化としてコンピュータで測定、比較し、混濁度の数値をデジタルディスプレーに示し、混濁度単位を決定する。もう 1 つ考えられる装置は、Peira Scientific Instruments 社（ベルギー、ベーアセ）製のレーザー光ベースのオパシトメータ（LLBO）であり、OP-KIT と同程度の性能を有することが示された（23）（12）。LLBO では、可視光の代わりに光源としてヘリウムネオン（HeNe）グリーンレーザー（クラス IIa/3R）を用いる。操作波長は、可視スペクトルの緑色部分で 10.0 mW のコヒーレントでランダムな偏光単色光ビーム（0.81 mm）を発生させる 543.5 nm である。LLBO は角膜表面全体を解析するという利点があるため、切除した角膜の周囲に位置する不透明な部分をより効率的に検出できる。バリデートされた装置と同等の結果が得られることが証明されている場合は、他の種類のオパシトメータを異なる設定で使用してもよい（例えば、対照および測定区画の平行測定を必要としない等）。

2. 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。OP-KIT オパシトメータ（フランス、リオン）の場合、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。較正用標準を較正用チャンバー（角膜チャンバーは較正用標準を固定するようにできている）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。参照値および最初の設定値は使用する装置の種類によって異なるが、装置に固有の適切な方法を用いて測定値の直線性を確保する。例えば、Electro Design 社（所在地：フランス、リオン）製の OP-KIT 装置の場合は、最初に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。Peira Scientific Instruments 社（ベルギー、ベーアセ）製の LLBO の場合、使用の 30 分前にオパシトメータのスイッチを入れる。本装置は 1 区画/1 ビームシステムである。測定単位は、ルクス（照度の SI 単位）である。本装置は、ヒトによる明るさの知覚の標準モデルである比視感度に従って波長に重点を置き、表面に当たるか通過する光の見かけ上の輝度の尺度としての測光法において用いられる（23）（12）。測定用ボックスに「空」の角膜ホルダーを配置して開始値を「2000 ± 20 ルクス」に設定し、照度計のルクスの値を記録する。次に、本装置が完全に動作し、信頼できる測定値を提供することを検討し保証するため、一連の各測定前に検証を実施しなければならない。本装置は、製造業者の仕様に従って、4 つの中性密度ガラスフィルター（OD：0.3、0.6、0.8、1.0）を用いて検証する。検証後、本装置は、処理した（未処理の）角膜混濁度の値を測定できる。「空」の角膜ホルダーを、処理済み（未処理）の角膜を含む角膜ホルダーに交換し、ルクスの値を記録後、別の角膜ホルダーに交換する。3 組測定後、「空」の角膜ホルダーを用い「2000 ルクス」測定値を検査し、必要に応じ調整する。以降、本装置は、処理済み（未処理）の角膜を含む次の 3 組の角膜ホルダーについて測定できる（21）（23）（12）。

©OECD 2020

表：OP-KIT オパシトメータおよび LLBO の特徴（11）（12）（21）（23）

可視光ベースのオパシトメータ（OP-KIT）	**レーザー光ベースのオパシトメータ（LLBO）**
白色（多色）光	**レーザー（単色）光**
寿命の異なる 2 つの光源（デュアルビーム）	**1 つの光源（1 ビーム）**
中央部に重点を置いた測定	**角膜全体の分析**
非直線的	**直線的**
-	**光線の幅を調整可能**

©OECD 2020