

眼刺激性代替法 改訂 OECD TG No.437 牛摘出角膜の混濁および透過性試験法  
(BCOP 法 : Bovine Corneal Opacity and Permeability Test) の評価報告書

平成 25 年 7 月 19 日

眼刺激性代替法評価委員会

委員名：

竹内 小苗 (P&G イノベーション合同会社)  
小坂 忠司 (残留農薬研究所)  
加藤 雅一 (株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング)  
簾内 桃子 (国立医薬品食品衛生研究所)  
細井 一弘 (参天製薬株式会社)  
増田 光輝  
山本 直樹 (藤田保健衛生大学)  
吉村 功 (東京理科大学名誉教授)

## 略語

BCOP:	Bovine Corneal Opacity and Permeability Test
BRD:	Background Review Document
DSD:	Dangerous Substances Directive
EPA:	Environmental Protection Agency
EU:	European Union
GHS:	Globally Harmonized Systems of Classification and Labeling
ICCVAM:	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
IVIS:	In Vitro Irritancy Score
NICEATM:	NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods
OECD:	Organization for Economic Co-operation and Development
UN:	United Nations
US:	United States

## 1. 改訂の背景

牛摘出角膜の混濁および透過性試験法（Bovine Corneal Opacity and Permeability Test; 以下、BCOP 法）は、ウサギを用いた Draize 眼刺激性試験法（以下、Draize 法）の代替試験法である。2003 年から 2006 年の NICEATM（NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods）/ICCVAM（Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods）による回顧的なバリデーションを経て、トップダウンアプローチにおける重篤な眼の傷害を起こす化学物質〔UN（United Nations）GHS（Globally Harmonized Systems of Classification and Labeling）区分 1、US（United States）EPA（Environmental Protection Agency）区分 1、EU（European Union）DSD（Dangerous Substances Directive）R43〕を同定するための試験法として 2009 年に OECD（Organization for Economic Co-operation and Development）テストガイドライン（TG）No.437 として採択された。

さらに、2006 年から 2009 年にかけて、ボトムアップアプローチにおける重篤な眼の傷害を起こす物質および眼刺激性物質とは分類されない物質（以下、区分外物質）の同定法としての適用性について、回顧的なバリデーションが行われた。その結果、2009 年、NICEATM/ICCVAM の第三者評価委員会で、UN GHS および EU DSD の分類における区分外物質を同定する方法として有用であるという結論を得た。この結果を受け、OECD では BCOP 法を重篤な眼の傷害を起こす化学物質だけでなく、区分外物質の同定方法として用いることを検討するため、TG No.437 の改訂検討プロジェクトが立ちあげられた。このプロジェクトで組織された眼刺激性専門家会議において、トップダウンアプローチのための BRD（Background Review Document）に新たなデータを追加した Issue Paper に基づいて、BCOP 法のボトムアップアプローチでの性能が検討された。その結果、2013 年、BCOP 法がボトムアップアプローチでの区分外物質の同定法として正式に改定 TG No.437 に採択された。このとき、適用限界と陽性対照物質等についての改訂も同時に行われた。このようにしてできたのが改定 TG No.437 である。本評価委員会は、この改定 TG No.437 の妥当性を検討した。以下にその検討結果を報告する。

## 2. 試験の概要

BCOP 法は、牛眼球から摘出した角膜に被験物質を一定時間曝露させ、角膜の変性の指標となる角膜混濁度と角膜上皮のバリア機能の指標となる角膜透過度を測定し、それら測定値から計算式によって求められる IVIS（In Vitro Irritancy Score : *in vitro* 刺激性スコア）を基にウサギを用いた Draize 法での眼刺激性を予測する代替眼刺激性試験法である。

試験群あたり 3 個の角膜を使用し、被験物質が液体の場合は原液（100%、ただし界面活性剤の場合は 10%希釈液）を、固体の場合は 20%の溶液または懸濁液を、それぞれ 10 分間、または 4 時間曝露させる。その後、混濁度としてオパシトメータで角膜の光透過度を、また、透過度としてフルオレセインナトリウムの透過度（OD<sub>490</sub>）を測定する。これら 2 つ

の測定値を以下の計算式に当てはめ IVIS 値を算出する。

$$\text{(計算式) IVIS} = \text{mean opacity} + (15 \times \text{mean OD}_{490})$$

IVIS の値が 3 以下の場合、その被験物質は GHS 区分外物質と判断され（追加された基準）、IVIS の値が 55 を超える場合は区分 1 と判断される。IVIS の値が  $3 < \text{IVIS} \leq 55$  の場合、本試験法の結果のみでは眼刺激性の予測はできないため、追加の試験を必要とする。

### 3. 改訂点

#### 3-1. ボトムアップアプローチでの GHS 区分外物質の同定

##### 3-1-1. ボトムアップアプローチでの正確性

前回評価を行った ICCVAM のバリデーションデータベースに 66 の抗菌洗浄製品の結果を新たに追加したデータベースを用いた正確性評価の結果を表 1 に示す。

表 1. BCOP 法の正確性—GHS 分類法での区分外物質の同定

Chemicals	No.	Accuracy		Sensitivity		False Negatives		Specificity		False Positives	
		%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.
All	196	69	135/196	100	107/107	0	0/107	31	28/89	69	61/89
Substances	104	72	75/104	100	55/55	0	0/55	41	20/49	59	29/49
Mixtures	92	65	60/92	100	52/52	0	0/52	20	8/40	80	32/40
All without alcohols, ketones and solids	135	64	87/135	100	75/75	0	0/75	20	12/60	80	48/60
Substances without alcohols, ketones and solids	45	64	29/45	100	24/24	0	0/24	24	5/21	76	16/21
Mixtures without alcohols, ketones and solids	90	64	58/90	100	51/51	0	0/51	18	7/39	82	32/39

Abbreviations: No. = data used to calculate the percentage.

<sup>1</sup>UN GHS classification system (UN 2011) (4): No Category vs. Category 1/2A/2B.

区分外物質の同定において、Draize 法の結果を比較対照にすると、BCOP 法の正確度は 69% (135/196)、偽陽性率 69% (61/89)、偽陰性率 0% (0/107) となった。偽陽性率は高いが、ボトムアップアプローチでは陽性結果が得られた場合、すなわち区分外物質と判定されなかった場合は、他の方法による追加試験が必要となることから、偽陽性率が高いことは必ずしも問題にはならないと判断した。

### 3-1-2. ボトムアップアプローチでの施設内・施設間再現性

BCOP 法の IVIS 値の施設内再現性は十分であるという判断は前回の評価でされている。ボトムアップアプローチにおける区分外物質を同定する場合の施設間再現性について、3 つのバリデーション試験の結果を表 2 に示す。その結果、80% (103/128) の物質において、それぞれの試験参加施設すべての判定が 100%一致した。ボトムアップアプローチでの施設間再現性は十分であると判断した。

表 2. BCOP 法の施設間再現性－GHS 分類法での区分外物質の同定 - ICCVAM(2010)より抜粋

Data Source	No. of Testing Labs	No. of Substances	Substances with 100% Agreement among Labs
Balls et al. (1995)	5	60	55 (92%)
Gautheron et al. (1994)	11 12	52	34 (65%)
Southee (1998)	3	16	14 (88%)
Total	-	128	103 (80%)

### 3-2. トップダウンアプローチでの GHS 区分 1 (重篤な眼の傷害を起こす化学物質) の同定

トップダウンアプローチにおける重篤な眼の傷害を起こす化学物質 (区分 1) を同定する場合の正確性についても、新たなバリデーションデータベースでの結果を表 3 に示す。これによると、正確度、偽陽性率、偽陰性率とも、前回評価の結果が変わるほどの大きな違いはない。

なお、トップダウンアプローチの施設内・施設間再現性は十分であると前報にて判断した。

表 3. BCOP 法の正確性－GHS 分類法での区分 1 物質の同定

Chemicals	No.	Accuracy		Sensitivity		False Negatives		Specificity		False Positives	
		%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.
All	191	79	150/191	86	56/65	14	9/65	75	94/126	25	32/126
Substances	100	73	73/100	77	20/26	23	6/26	72	53/74	28	21/74
Mixtures	91	85	77/91	92	36/39	8	3/39	79	41/52	21	11/52
All without alcohols, ketones and solids	131	85	111/131	92	46/50	8	4/50	80	65/81	20	16/81
Substances without alcohols, ketones and solids	42	83	35/42	83	10/12	17	2/12	83	25/30	17	5/30
Mixtures without alcohols, ketones and solids	89	85	76/89	95	36/38	5	2/38	78	40/51	22	11/51

Abbreviations: No. = data used to calculate the percentage.

<sup>1</sup>UN GHS classification system (UN 2011) (4): Category 1 vs. No Category/Category 2A/2B.

### 3-3. 適用限界

アルコール・ケトン類および固体物質の適用については前回のトップダウンアプローチの評価では本試験法の限界として挙げられていたが、以下の理由からアルコール・ケトン類および固体物質も適用することができると判断した。

- 重篤な眼の傷害を起こす化学物質を同定するのに用いる場合（トップダウンアプローチ）、バリデーションに用いられた化学物質のデータベースの中で、アルコール・ケトン類に対し高い偽陽性率、固体物質に対し高い偽陰性率を示した。ただ、これら化学物質類の中でも正確に予測されたものはある。また、偽陰性の結果を示した固体物質はすべて  $3 < IVIS \leq 55$ （眼刺激性予測不可）となり、結果として別の試験法での検討が必要とされる。アルコール・ケトン類で陽性結果が得られた場合は、高い偽陽性率を考慮し、その結果は慎重に検討する必要がある。結論としては、これら化学物質類を、適用領域から除外する必要はないと判断された。区分外物質を同定するのに用いる場合（ボトムアップアプローチ）、高い偽陽性率を示した。しかしながら、 $3 < IVIS \leq 55$ （眼刺激性予測不可）となった物質は追加試験による分類判断が必要となることから、必ずしも問題はならないと判断した。トップダウンアプローチの場合と異なり、ボトムアップアプローチでは、アルコール・ケトン類、固体物質の結果が正

確性に影響を与えてはいない。

また、バリデーション試験では単一物質・混合物質がそれぞれ 113 物質、100 物質と十分な数が評価されており、どちらも適用可能であると判断されている。

### 3-4. 陽性対照

2009 年に本評価委員会が評価した BCOP 法は液体被験物質の陽性対照として 100%エタノールを用いていたが、OECD ガイドライン化の時点で 100%エタノールに替わり 1%水酸化ナトリウムが採用されていた。

今回の改訂 TG No.437 では陽性対照について以下の条件が必要とされた。すなわち、同じ試験系で陽性反応を誘発することが既知であることと、反応の変動を評価するために反応が過度でないことである。これにより、1%水酸化ナトリウムが陽性対照候補物質リストから除外され、100%エタノールがこのリストに加えられた。100%エタノールは、BCOP 法での眼刺激性分類が Draize 法と一致していないが、改訂 TG No.437 の陽性対照の必要条件には合っており、BCOP 法での背景データが多くあることから、本評価委員会は 100%エタノールを液体被験物質の陽性対照物質とすることに問題はないと判断した。

### 3-5. その他

試験採用基準についても改訂がなされているが、本質的な部分ではなく、具体的なデータもないことからあえて評価は実施しなかった。

## 4. 結論

本評価委員会はその正確性、再現性の結果より、BCOP 法を GHS の眼刺激性分類においてトップダウンアプローチでの重篤な眼の傷害を起こす化学物質を同定するための方法だけでなく、ボトムアップアプローチでの眼刺激性区分外物質を同定する方法としても用いることが可能であると判断した。また、どちらのアプローチにおいても、本試験法の適用物質に制限を設ける必要はなく、液体被験物質の陽性対照として 100%エタノールを用いることができると考えた。

結論として、トップダウンアプローチにおける GHS 区分 1 物質、およびボトムアップアプローチにおける GHS 区分外物質の同定に、Draize 法の代替法として改訂 TG No.437 を用いることは可能であると判断した。



## 5. 文献

- JaCVAM (2009), 眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書 - 評価対象試験：眼に対する腐食性および強刺激性評価のための牛摘出角膜の混濁および透過性試験法
- 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.
- OECD (2009), Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, TG437
- OECD (2013), Updated TG 437 on the BCOP Test Method, ENV/JM/TG(2013)14
- OECD (2013), Issue Paper on the Use of the BCOP Test Method to Identify Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, ENV/JM/TG(2013)15
- OECD (2013), Streamlined Summary Document Supporting OECD Guideline 437 on the Bovine Corneal Opacity and Permeability for Eye Irritation/Corrosion, ENV/JM/MONO(2013)13

