

**Study for the selection of appropriate solvent for solid test materials
in the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) Test Abstract Body**

**ウシ角膜混濁度及び透過性 (BCOP)
試験に適切な固体試験材料を選択する検討**

ラメッシュ・ヴァルマ、ヴィシュワニン・ダラル、シュレヤス・バティ、テラジュ・ビーセ、マニッシュ・バテル
毒物系、Jal Research Foundation (JRF)、ヴァルヴァーダー-396 105、グジャラート、インド



Abstract:

The Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay (BCOP) is an ex vivo assay, which may be used to assess the eye irritation potential of new chemicals and finished products. The BCOP assay has been accepted by several regulatory agencies for the identification of serious eye damage or irritation, replacing the rabbit eye test. As per the TG OECD 437 for eye irritation (BCOP assay), non-solvent solid materials are typically tested up to 20% dilutions prepared in 0.9% sodium chloride solution or other solvent that has been demonstrated to have no adverse effects on the test system. However, the limited solubility of some chemicals adds technical challenges in finding a suitable vehicle that would ensure the material's availability to the excised corneas without affecting the test system. In this study, we evaluated three solvents in the BCOP assay; normal saline, olive oil, and propylene glycol. Based on the available classification systems, our preliminary data showed that normal saline and olive oil were predicted as non-irritants, while propylene glycol had an irritating effect on the cornea. To demonstrate the influence of the type of solvent on the outcome/prediction of the BCOP assay for solid materials, we tested a 20% suspension of dicamba prepared in olive oil and propylene glycol. Previous animal tests have reported corrosive effect of dicamba. Our results demonstrated that when mixed in propylene glycol and corn oil, dicamba was predicted to be a corrosive but there was a great difference in the IVIS Score. The difference in the IVIS score may be enhanced by the use of the vehicle. These results support the need for further investigation of the solvent's influence in the BCOP assay to allow the correct prediction of the irritation potential of solid materials.

要約:

ウシ角膜混濁度及び透過性試験 (BCOP) は ex vivo 分析方法で新規化学物質と完成品の眼刺激性を評価するために使用されている。牛摘出角膜混濁度及び透過性試験 (BCOP) はウサギ眼検査の代わりに厳しい角膜表面の眼刺激物質を識別する試験として OECD に承認されたテスト方法である。TG OECD 437眼刺激 (BCOP 試験) によって非界面活性固体物質は 0.9% 塩化ナトリウム溶液又は眼に悪影響を与えない他の液で 20% 希釈して使用される。しかし、幾つかの化学物質の限られた溶解度はテスト・システムに影響を与えることを示す。従来の分類システムに基づいて我々の予備データは、生理食塩水とオリーブ油が非刺激性として予測されたが、プロピレン glycol は角膜に刺激を与えることを示した。固体物質に対する BCOP 試験の結果 / 予測に溶媒の影響を示すために我々はオリーブ油とプロピレン glycol とジカンバの 20% 懸濁液をテストした。前の動物試験ではジカンバの腐食作用を報告されている。我々の実験結果はプロピレン glycol 、コーン油に混入した場合にジカンバは腐食性であると予測されたが IVIS スコアに大きな差があった。これらの結果は固体材料の刺激性の正確な予測のために BCOP 試験における溶媒の影響をさらなる調査する必要を強調している。

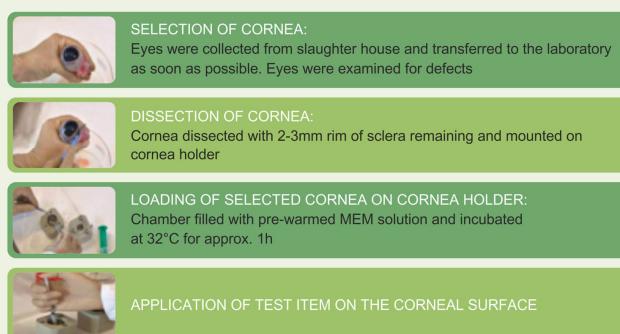
背景

牛摘出角膜混濁度及び透過性試験 (BCOP) は動物試験の代わりに in vitro 眼刺激試験として OECD に示唆されたテスト方法である。BCOP テストは修正器官モデルで単離システム内の角膜の正常な生物学的及び生化学的機能を短期的に維持することを要求する。基本的に当試験は、眼の化学物質への偶発暴露時に発生する損傷から生じる視力障害の指標として角膜の役割に依存している。さらに、BCOP 試験で得られた結果は、 in vivo (生体内) でのドライス眼刺激性試験で得られたものと比較できる。ドライステストに眼刺激性のためのスコアリングシステムにおいて角膜への影響はかなり重要な課題である。

しかし、TG OECD 437眼刺激 (BCOP 試験) によって非界面活性固体物質は通常 0.9% 塩化ナトリウム溶液又は眼に悪影響を与えない他の液で 20% 希釈して使用される。しかし、幾つかの化学物質の限られた溶解度はテスト・システムに影響を与えることを示す。従来の分類システムに基づいて我々の予備データは、生理食塩水とオリーブ油が非刺激性として予測されたが、プロピレン glycol は角膜に刺激を与えることを示した。固体物質に対する BCOP 試験の結果 / 予測に溶媒の影響を示すために我々はオリーブ油とプロピレン glycol とジカンバの 20% 希釈液を調整するために使用した。前の動物試験で眼に対してジカンバの激しい腐食作用を報告されている。

試験方法

1. 角膜の選択 - 眼は死肉場から採取して実験室へ早急に移動した。欠陥がないか検査した。



2. 角膜の解剖 - 角膜は周囲の 2~3mm 強膜を保持して眼球から摘出した。

3. 角膜ホルダー上選択した角膜を乗せる - チャンバーにあらかじめ温めた MEM 液を注いで 32°C で、1 時間インキュベートした。

4. 被テスト化合物を角膜上に適用した。



In vitro 刺激性スコア - (IVIS) 計算

IVIS は各グループに対して下記のように算出した。

IVIS = 不透通度の平均値 + (15 × 平均透過性 OD490)

決定基準

IVIS	UN GHS
≤ 3	カテゴリなし
> 3; ≤ 55	予測不可能
> 55	カテゴリー 1

決定基準

溶媒	不透過度の平均値	平均 OD490 (Permeability)	In vitro スコア	予測した刺激
オリーブ油	0.18	0.096	1.62	非刺激性
プロピレン glycol	18.04	1.147	35.24	予測不可能
オリーブ油にジカンバ	308.50	-0.023	308.18	カテゴリー 1
プロピレン glycol にジカンバ	414.80	0.048	415.52	カテゴリー 1

図



結論

- 試験結果は予測した通り生理食塩水とオリーブ油は非刺激性であることを示した。試験結果に基づいてプロピレン glycol は予測不可能と分類された。
- BCOP 試験ではオリーブ油とプロピレン glycol にジカンバが腐蝕性と予測されたが IVIS スコアには大きな差があった。
- したがって、本研究は BCOP 試験において被験固体质のための適切な溶媒を選択することの重要性を強調する。
- 試験結果は溶媒の選択に大きな調査の必要性をサポートする。

参考文献

OECD, 1998: OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, Number 1, "OECD Principles on Good Laboratory Practice" ENV/MIC/CHEM(98)17 (as revised in 1997).
OECD, 2013: OECD N° 437, "Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage". The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guideline for the Testing of Chemicals, adopted by the Council on July 26, 2013.
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).