

团 体 标 准

T/SHS0TXXXX—2020

基于 BCOP 和 CAMVA 的眼刺激性的整合测试 评估方法

Integrated approaches for testing and assessment for eye irritation based on BCOP
and CAMVA method

草案版次选择

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

上海市毒理学会 发 布

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由上海市毒理学会提出并归口。

本文件起草单位：广州市华代生物有限公司、上海交通大学医学院、上海市疾病预防控制中心、雅诗兰黛亚太研发中心、无限极（中国）有限公司、拉芳家化股份有限公司、广东三好科技有限公司、上海博理生物科技有限公司，等。

本文件主要起草人：陈志杰、程树军、罗婷婷、陶功华、徐宏景、敢小双、徐娟、畅绍念、季晓谟。

本文件首批执行单位：广州市华代生物有限公司、上海市疾控中心、上海化工研究院、拉芳家化、等。

基于 BCOPA 和 CAMVA 的眼刺激性的整合测试评估方法

1 范围

本方法适用于化学品的眼刺激性的危害识别。

本方法适用于化妆品原料及产品、消毒产品眼刺激性的危害识别。

本方法适用于对化学物质进行更准确的分类识别，用于更准确评估潜在的化学品眼刺激危害。

本方法规定了基于CAMVA和BCOP的整合测试策略的原则、内容、方法和技术要求。

本方法也适用于其他接触眼部物质引起的眼刺激性的测试。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本部分。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

OECD TG437 牛角膜浊度与通透性测试方法（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)

SN/T4153 化学品 牛角膜浑浊与渗透性试验

EURL- ECVAMDB-ALM: Method Summary Chorioallantoic Membrane Vascular Assay (CAMVA) – Summary Guidance document

OECD No 263 on integrated approaches to testing and assessment (IATA) for serious eye damage and eye irritation series on testing and assessment(Second Edition)

3 术语和定义

3.1

基准剂量（BenchMark Dose BMD）或基准浓度（Concentration BMC）

作为与试验化学物质比较标准的物质。基准物质应具有以下特性：(i)一致和可靠的来源；(ii)与被测物质类别的结构和功能相似性；(iii)已知物理/化学特性；(iv)已知效应的支持数据，(v)预期响应范围内的已知效力。

3.2

角膜浑浊度

测量暴露于试验化学物质后角膜的浑浊程度。角膜混浊度的增加表明角膜有损伤。混浊的程度可借助光学仪器定量检测。

3.3

角膜渗透性

眼刺激物可造成角膜上皮间隙受损而导致渗透性增加,通过测定穿过所有角膜细胞层的荧光素钠染料的数量来定量测量角膜上皮的损伤。

3.4

眼刺激性

眼前部直接接触受试物后引起的眼及其周围粘膜可逆性炎性变化。

3.5

绒毛尿囊膜

胚龄 4d~5d 时, 由绒毛膜体壁中胚层和尿囊膜脏层中胚层融合而成, 其组织学结构有三层。

3.6

体外刺激评分(IVIS)

BCOP 测试方法中使用的经验衍生公式, 用 OP-KIT 测量平均不透明度, 并将每个治疗组的平均渗透率值组合为每个治疗组的单一体外评分。IVIS=平均浑浊度值(读出 OP-KIT)+(15x 平均渗透率值)。

3.7

测试和评估的整合方法(IATA)

指一个根据多种来源的信息用于化学品危害识别、危害特征描述和安全性评估的方法。

3.8

证据权重(weight of evidence, WoE)

指采取综合的方法, 解释和权衡源于 IATA 组件的多个证据链, 其结果得出的结论可以用于决策。

3.9

定义性方法(define assay, DA)

由一组固定来源的数据和信息(数据类型)加上一个解释数据的算法(数据解释过程)组成, 通常作为毒性预测的一种方式。

4 符号和缩略语

下列符号和缩略语适用于本文件。

4.1C&L

分类和标识

5 原理

5.1 整合测试策略原则

5.1.1 IATA 概念

测试和评估的整合方法(IATA)是一个根据多种来源的信息用于化学品危害识别、危害特征描述和安全性评估的方法。一个 IATA 整合并权重了所有相关的现有的证据,并在有需要时指导产生目标性的新数据,以指导关于潜在危害和风险的法规决策制定。IATA 方案中,来自不同的信息源数据,如理化特征、计算机模型、分类方法和交叉参照方法、体外方法、体内试验和人的数据,进行评估和整合以得出关于化学品危害和风险的结论。这些信息来源通常包括不同的预测模型或体外方法。例如,计算机方法和体外方法用于预测试验动物的效应,正如动物试验传统上用于预测人体效应一样。

5.1.2 定义性方法和判定性方法

应用 IATA 时应区分两类方法,基于规则的方法可以产生预测,被称为测试和评估的“定义方法”(DA),而基于判定的方法较为灵活可以得到安全性的结论。DA 由一组固定来源的数据和信息(数据类型)加上一个解释数据的算法(数据解释过程)组成,通常作为毒性预测的一种形式。IATA 的一个重要特性是需要明确地定义问题和使用场景,因为这些因素将决定方法的不确定性及其可接受水平、方法(组件)的选择和证据集成的方法。IATA 内的不同组件需要加以区分,有一些元素原则上是可以被验证和标准化的(如 DA 方法),而另外一些元素需要依靠专家判断,只能部分协调一致,例如,交叉参照方法。

5.1.3 证据权重

证据权重(WoE)是指采取综合的方法,解释和权衡源于 IATA 组件的多个证据链,其结果得出的结论可以用于决策。各种证据链的组成可以由现有的信息组成,以及由测试策略新生成的信息组成。在这种情况下,测试策略可能是现有的 DA 的组合,或者是基于初始的证据权重建立的专用的策略。新数据的生成和证据权重的应用是一个逐层迭代的过程,直到得出达到期望水平的确定性的结论。证据权重可以采用不同的方式进行,并且应当是以明确的和透明的方式,可以很容易地被跟进、重复和评审。

5.1.4 IATA 组成来源

IATA 的目的是评估来自于化学品暴露的人类健康和环境的风险,IATA 是一个过程,运用全面的证据权重的方法,用以权衡和集成可以用到的化学品危害和暴露的信息和经验性数据。根据评估问题和保护目标,IATA 的构建模块(组件)可以组装成不同的方式,可以包括一系列不同的方法和信息来源。IATA 可以使用毒性效力学(toxicodynamic, TD)和毒代动力学(toxicokinetic, TK)信息。IATA 中 TD 的信息可以来源于有害结局通路(AOP),是指导致有害效应的生物学事件的结

构化表示，并提供关于分子起始事件、关键事件和关键事件关系的机制性的信息。TK 信息的来源包括体外方法以及计算方法，例如构效关系和 PBK 模型。

5.1.4.1 方法和信息源的类型

作为 IATA 输入的信息源是指任何来源的数据，不管实验获得或预测的，现有的或新生成的。既包括传统动物实验和新试验方法，也包括可以用于生成解释和集成数据的计算方法。体外方法包括各种不同类型的试验方法，可以根据试验的生物学基础进行分类，例如基于细胞培养体系的分类（如细胞检测和重建组织的检测），再比如基于方法的技术实现方式或底层支撑技术分类（如高通量筛选、高内涵筛选、高内涵成像、组学）。体外方法还包括计算机方法，例如基于定量结构活性关系(构象)模型的方法，基于规则的和基于知识的预测模型，以及基于数学的动力学模型。多种数学技术可以用于开发计算机模型，如机器/深度学习的 QSAR 和其他基于规则的模型（如贝叶斯网络）。分类和交叉参照方法通常被归类为计算机方法，因为对化学品进行分类(根据毒理学相关标准)和填充数据缺口(通过从一个或多个类似物的属性“交叉互读”)的工作流通常需要使用计算机工具。

5.1.4.2 标准化和可接受水平

可以根据方法的被接受程度区分 IATA 中的组成方法，通常接受程度最高的是国际性的方法（如 OECD 健康效应中的测试准则、基于性能的测试指南方法或关于性能标准的方法）、国家标准、行业标准（如化妆品安全技术规范、原质检总局发布的检验检疫行业标准），其次是非准则和非标准方法，但可以在 IATA 内使用。定义性方法（DA）是标准化和依赖固定数据解释程序的，是构成 IATA 策略的主要方法，但 IATA 策略还要考虑证据权重和专家判断，必要时应当补充非标方法。

5.1.5 IATA 的适用性

化学品和混合物均适用 IATA 评估。当用于混合物评估时，在组成模块的适用性上应考虑可用信息的数量，并且该适用性可能取决于每个评估个案的可用信息的质量。

5.2 眼刺激性的 IATA 方案

5.2.1 模块组成

眼刺激的 IATA 模块由三个部分 9 个模块组成。第一部分现有数据，可从文献和数据库以及其他可靠的来源获取有用信息，用于模块 1 到 6。模块 7 理化性质中主要考虑 pH 值。模块 8 中包含有非测试方法。如用于化学物的 (Q)SAR、交叉参照、分类和专家系统以及用于混合物的过渡性原则和可加性理论。第二部分包括模块 9，WoE 分析，如果 WoE 分析对潜在皮肤刺激性和腐蚀性具有不确定性，那么需要进行第三部分新的测试，优先采用体外方法，动物实验建议作为最后选择。

表 眼刺激 IATA 的组成和模块

组成*	模块
第一部分 (现有信息, 理化特性和非测试方法)	1、严重眼损伤和眼刺激性的现有人体数据
	2、皮肤腐蚀性现有数据 (人体、体内和体外)
	3、严重眼损伤和眼刺激性的体内动物数据 (OECD TG 405)
	4、严重眼损伤和眼刺激性的其他体内动物数据 (LVET)
	5、严重眼损伤和眼刺激性的体外数据
	a) OECD TG 437 的 BCOP 方法 b) OECD TG 438 的 ICE 方法 c) OECD TG 491 的 STE 方法 d) OECD TG 492 的 RhCE 方法 e) OECD TG 460 的 FL 方法
	6、严重眼损伤和眼刺激性的其他体外数据 a) 组织病理学作为附加体外终点 b) OECD 现有工作计划内的体外方法 c) 互补作用机制的体外方法 (如持续效应和血管系统) d) 用于包括 UN GHS Cat.2 分类, 鉴定眼危害性完整范围的体外方法 e) 其他先进的体外方法
	7、理化性质 (现有, 测量或预测的, -如 pH, 酸/碱度)
	8、非测试方法 a) 对于化学物: (Q)SAR、专家系统、分类和交叉比对 b) 对于混合物: 过渡性原则和可加性理论
第二部分 (WoE 分析)	9、WoE 方法阶段和元素
第三部分 (新测试)	5、鉴定严重眼损伤和眼刺激性的体外方法
	6、鉴定严重眼损伤和眼刺激性的其他体外方法
	3、急性眼损伤和眼刺激性的体内动物实验 (OECD TG 405)

*当 3 部分最为顺序组成时, 第一部分的模块 1 到 8 的顺序可以适当调整。

5.2.2 证据权重判定程序和分析

眼刺激性 IATA 程序的主要目的是分类和标识。采用 WoE 方法对第一部分所收集的现有和非测试数据进行评估。如果 WoE 可以下结论, 那么可确定 C&L。如果不确定, 则应当利用所有可用数据形成一种最大可能性的假设, 用于指导后续试验的顺序, 是自上而下法 (top-down) 还是自下而上法 (bottom-up) 进行。

5.2.3 证据的权重

根据具体情况对每个可用信息进行权重分析，IATA 中所包含模块的顺序并不等不同于其重要性的先后。证据的相对优先顺序除了考虑数据的指示性作用外，还取决于个案中每个数据的质量。一般而言，当数据质量相等时，被监管认可的数据优先。模块中权重的相对优先顺序如下：

5.2.3.1 可靠的现有人体数据（模块 1）将作为最大的权重。

5.2.3.2 体内动物实验严重眼损伤和刺激性数据（模块 3）和体外严重眼损伤和刺激性数据（模块 5 和 4）作为同等权重考虑。特别是对体内方法的原始特征进行批判性评价，如不确定性、变异性和分类的驱动因素，特别是当考虑与体外数据进行对比时。

5.2.3.3 非测试方法（模块 8）的固有权重较小，如非标准化体内眼损伤和刺激性数据（模块 4）、其他体外眼毒性数据（模块 6）、理化性质（模块 7）和非测试方法（模块 8）。

5.2.4 证据权重的分析过程

5.2.4.1 一般过程

检索现有资料，如果其直接与眼刺激性相关，将分到模块1到5中；将检索的其他体外和体内皮肤毒性数据的资料分到模块6。因此，现有数据的检索可以采用逐步的方式进行：只有当模块1到6的信息无法对潜在皮肤刺激性和腐蚀性下结论时，才有必要对模块7-8检索（第二次检索），考虑其相关理化信息和/或获得新的非测试数据，如化学品的(Q)SAR、交叉参照以及混合物的桥连原则、可加性原则。基于第一部分的部分信息，如模块1到8，某些情况下可以先进行简单的WoE，再考虑给出分步检索的建议：

5.2.4.2 如果已知评估的化学物具有极端 pH 值（结合高缓冲溶液的混合物）（模块 7），其可以将该化学物定为严重眼损伤（Cat.1），而不需要检索其他现有信息（模块 1 到 6）。

5.2.4.3 如果具有高质量的人体数据（模块 1），并且体内或眼损伤没有可用数据时（模块 2 到 6），或者有数据且与人体结果一致时，那么没有必要进行模块 7 到 9 的评估。

5.2.4.4 如果只具有足够质量的体内严重眼损伤或眼刺激性数据（模块 3）时，没有必要进行模块 2 和 4 到 8 的评估。

5.2.4.5 如果只有可靠的体外数据提示严重眼损伤或不分类时，不需要进行模块 6 到 8 的评估。

5.2.4.6 如果只有类似物的眼损伤资料，并且具有说服力的交叉参照（模块 8）时，无需进行模块 6 和 7 的评估。

5.2.4.7 关于模块 8，可以使用 OECD QSAR Toolbox 作为起步工具用于相关数据的分析，由于其可以用于类似物（对于交叉参照）的鉴别，可以获得目标化学物和类似物的第一步的现有实验数据（理化和毒理），并且最后用机制和其他方式对这些化学物进行表征，包括结构改变对化学物的严重眼损伤和刺激性的影响。

5.2.4.8 关于 WoE 分析（模块 9），根据对每个数据元素的质量、相关性、范围（严重眼刺激性、眼刺激性和不分类）和关联的不确定性进行的描述，决定现有数据得到纳入或排除。当“合格”的数据一致时，WoE 可以对相关终点或足够的信息要形成结论，并且不需要进一步测试。另一方面，“不合格”的数据被排除/搁置后，仍没有足够的信息，或当余下的数据不一致或相反时，WoE 将决定需要实施进一步测试（第三部分），并且根据要求，指出需要何种实验以填补数据缺口。

6 测试策略与评估过程

6.1 范围和策略

6.1.1 应用范围

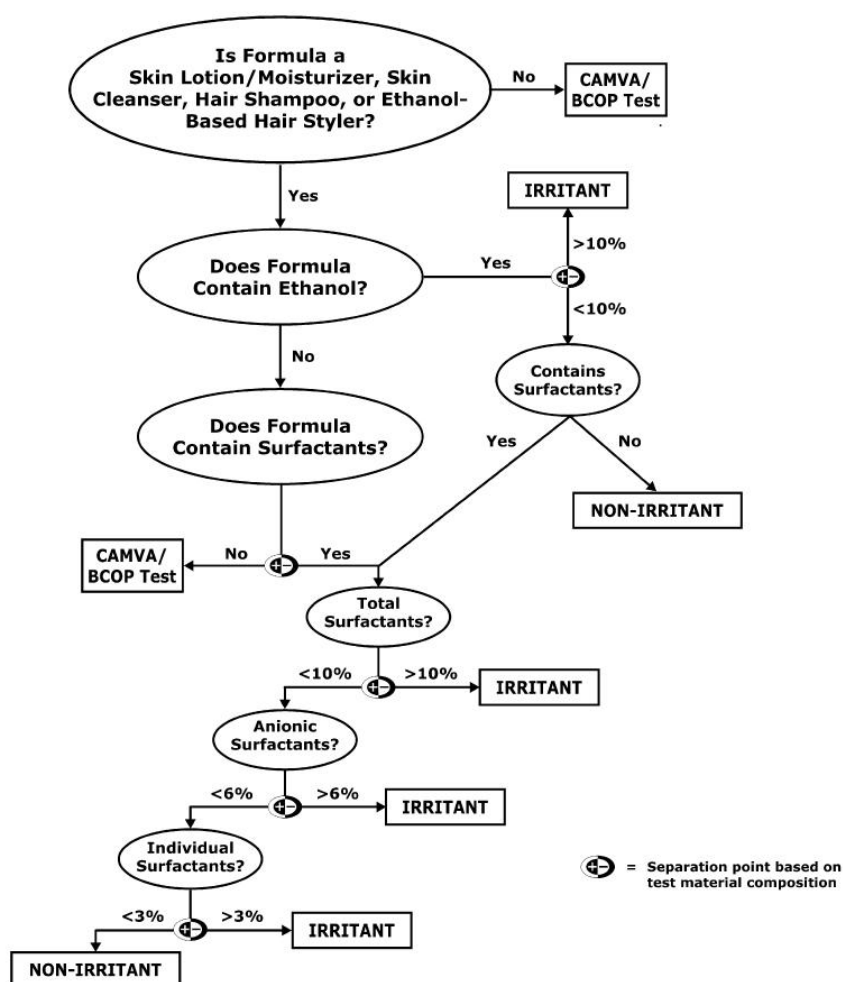
基于器官型体外方法（CAMVA-BCOP）的眼刺激性预测的 IATA 方法主要用于模块 5-6，当现有资料的证据权重分析不足以得出确定性的分类和标识时，作为一种实验步骤最优、获得结果最可靠的组合方式，用于测试物质准确的证据权利分析。具体可采用自下而上策略（即先进行非刺激性或轻度刺激性测试，再进行严重刺激性测试）或自上而下策略（即先进行严重眼刺激性测试，再进行非刺激性测试）。

6.1.2 评估和测试决策树判定程序

6.1.2.1 如果配方是润肤露/保湿霜，皮肤清洁剂、洗发水或乙醇基头发造型剂组合物则继续步骤 6.1.2.2，如果公式不满足这些条件，它便需要进行 CAMVA/BCOP 测试。

6.1.2.2 如果新配方中含有一定浓度的乙醇成分 $\geq 10\%$ ，可归类为眼刺激物。发用定型喷雾中乙醇成分

D.A. Donahue et al./Toxicology in Vitro 25 (2011) 563–572



$\geq 55\%$ 应归类为中度眼刺激物。如果乙醇浓度 $<10\%$ 且不存在表面活性剂，则配方可归类为对眼睛无刺激性。然而，如果含有表面活性剂存在且配方中乙醇含量 $<10\%$ 的，进行第 6.1.2.4 步和第 6.1.2.5 步评估。

6.1.2.3 如果新配方不含表面活性剂或乙醇，它应该进行 CAMVA/BCOP 测试。如果表面活性剂存在于

公式中，继续步骤 6.1.2.4。

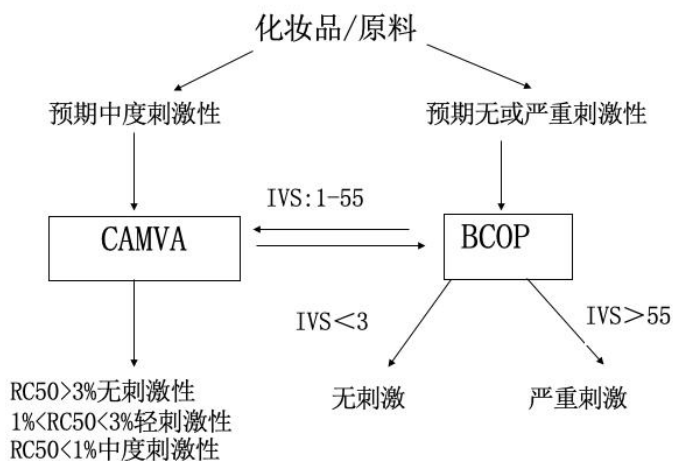
6.1.2.4 如果新配方含有总表面活性剂浓度 $\geq 10\%$ 和/或含有的阴离子表面活性剂浓度 $\geq 6\%$ ，配方可归类为眼刺激性的。表面活性剂总量 $\geq 98\%$ 的配方应被归类为中度眼刺激物。如果配方不满足这些条件，继续执行步骤 6.1.2.5。

6.1.2.5 如果配方中含有总表面活性剂浓度 $< 10\%$ 和含有的阴离子表面活性剂浓度 $< 6\%$ ，但含有至少一种单个表面活性剂的浓度 $\geq 3\%$ ，即可归类为眼刺激物。

6.1.2.6 不满足第 6.1.2.4 步或第 6.1.2.5 步条件的新制剂可归类为非眼刺激性产品或配方，前提是对所有成分进行保守的证据权重评估，表明没有新的或未充分表征的原料，否则需要进行 CAMVA/BCOP 测试。对于具有组合表面活性剂系统（例如阳离子-阴离子表面活性剂系统）的配方，全面的产品风险评估尤其重要，因为组合可能会改善或加剧单个表面活性剂的影响。在这些情况下，有关产品潜在眼刺激性的判断，都需要进行 CAMVA/BCOP 测试。

6.1.3 自上而下策略

当初步判断供试物为中度或严重刺激性时，执行自上而下的策略，可以先进行 BCOP 测试（见规范性附录 B），当 BCOP IVS 分值 >55 时可直接评价为严重眼刺激性；当 BCOP 测试 IVS 分值为 1-55 时可考虑为存在眼刺激性，此时需要补充 CAMVA 测试进行刺激性的具体分类。根据 CAMVA RC50 进行最终刺



激性的衡量，如果同时满足 BCOP 测试中 $1 < IVS < 3$ ，且 CAMVA $RC_{50} > 3\%$ 时，可判断为无眼刺激性；如果同时满足 BCOP 测试中 $3 < IVS < 55$ ，且 CAMVA $RC_{50} > 3\%$ 时，可判断为轻度眼刺激性；CAMVA 结果为 $1\% < RC_{50} < 3\%$ 时，则需要判断为轻度眼刺激性；CAMVA 结果为 $RC_{50} < 1\%$ 时，则需要判断为中度眼刺激性。

6.1.4 自下而上的策略

当初步判断供试物为轻度或无眼刺激性时，执行自下而上的策略，先进行 CAMVA 测试（见规范性附录 A），当 CAMVA 结果为 $1\% < RC_{50} < 3\%$ 时，可直接评价为轻度刺激性。当 CAMVA 结果为 $RC_{50} < 1\%$ 时，则考虑为存在中度或严重眼刺激性，需要补充 BCOP 测试进行更具体的分类。当 CAMVA 结果为

RC50>3%时，则考虑可能存在无刺激性或轻度刺激性的情况，但仍需补充 BCOP 进行最终判定。

6.1.4.1 当满足 CAMVA 结果为 RC50<1%时，同时 BCOP 结果为 $3<IVS<55$ ，则判断供试品为中度眼刺激性。

6.1.4.2 当满足 CAMVA 结果为 RC50<1%时，同时 BCOP 结果为 $IVS>55$ ，则判断供试品为严重眼刺激性。

6.1.4.3 当满足 CAMVA 结果为 RC50<1%时，同时 BCOP 结果为 $3<IVS<55$ ，则判断供试品为轻度眼刺激性

6.1.4.4 当满足 CAMVA 结果为 RC50<1%时，同时 BCOP 结果为 $IVS<3$ ，则判断供试品为无眼刺激性

6.2 CAMVA 方法

6.2.1 试验过程

见规范性附录 A

6.2.2 注意事项

6.2.2.1 阳性对照

鸡胚绒毛尿囊膜血管实验（CAMVA）使用的是 SDS 作为阳性对照物。

6.2.2.2 RC50 值

CAMVA 的 RC50 值需要供试品的多种浓度得到测试后，数学曲线拟合的模型（例如剂量反应曲线）可以通过增加的重复测试进行计算。相关参数处在可接受变化范围。

6.3 角膜混浊度和渗透性(BCOP)测试

6.3.1 试验过程

见规范性附录 B

6.3.2 注意事项

6.3.2.1 阳性对照

牛角膜浑浊渗透性测试（BCOP）使用的是无水乙醇作为阳性对照物（该物质既能够引起浊度值增加也能导致荧光素钠渗透增加）

6.3.2.2 基准对照

可根据实验目的选择具有基准意义的化学品、样品或其他参考物质作为基准对照，如选择体外评分在眼刺激性与非眼刺激临界（3 分左右）的物质作为基准对照，用于监控实验方法操作的稳定性。基准物质的选择依据、历史数值，以及在实验中的测试数据应如实记录，并与测试物一起分析。

6.3.2.3 浊度值测定

浊度值检测与仪器的灵敏度相关，采用平行光技术可以减少因光线偏差造成的数据偏倚，选择和更换浊度检测仪应给予说明，必要时进行验证，并记录验证结果。

6.3.2.4 组织学评分

必要时，可以将实验结束后的角膜组织进行固定和组织学制片，显微镜观察组织学变化，对眼刺激的病理损伤机制进行判定。

6.4 方法性能和可接受标准

6.4.1 体外方法的一致性

实验需确保结果的重复性、可靠性、可接受性和结果的实用性的关键。体外测试系统有大量的因变量。实验操作者需要负责保持测试系统的稳定和一致性。

6.4.2 再现性

该测试策略应使用阳性和阴性对照证明试验方法随时间推移的可重复性。测试的时间跨度上的一致和实验室间结果的一致性，才能使用该试验方法，

6.4.3 可接受性标准

牛角膜浑浊渗透性测试（BCOP）使用的是无水乙醇作为阳性对照物（因为该物质既能够引起浊度值增加也能导致荧光素钠渗透增加），它的体外评分 IVS 值：（浊度值+15×荧光素钠渗透值）数据为 51.6 ± 6.2 ，它的可接受范围即为 39.2-64.0（均数±2SD）

7 数据和报告

7.1 数据

7.1.1 数据记录

当数据需要通过公式转化成标准化、计算脚本模式和/或任一模拟等式拟合数据，这就需要标准化操作这个过程。标准化计算应该记录档案（检查精确度）、验证（当应用的是电子化版本）和揭示对照在计算过程中的注释和调整。计算机类软件脚本用于处理原始数据（EXCEL 等）应该经过验证和保留。

7.1.2 数据统计

当模拟等式满足数据（例如拟合的剂量反应曲线，标准化曲线或其他模型），等式和选择的原因都需要在后续的选项进行描述。例如，当满足剂量反应曲线时，等式类型符合数据的情况需要注释（例如，四个参数的 logistic 曲线），伴随需要有相应的约束条件（例如最大约束到 100%的标准化数据）和权重（如不确定数据的相反数）。另外，软件的名称和版本号在使用过程中也要标注，关注点计算数据需要提供置信区间（如 RC50 值）相关的拟合参数和指数（R²、平方和等）也要注释。相关参考可查阅 8.8 和 OECD 211 的 4.3，方法评估验证过程，同样的方法需要报告最新的数据进展。

7.2 实验报告

7.2 实验报告内容

7.2.1 测试化学品和对照化学物质：

单一成分物质:化学标识，如 IUPAC 或化学文摘社名称、化学文摘社编号、SMILES 或 InChI 代码、结构式、纯度、适当和实际可行的杂质化学标识等；

多成分物质、UVCB 和混合物：尽可能识别单一化学品成分、定量，进行物理化学性质分析；

物理外观、水溶性、pH、LogP、分子量、化学等级以及任何其他相关的物理化学性质；

纯度、杂质的化学特性等；

来源、批号(如果有)；

测试前对测试化学品/对照化学物质的处理，如适用（如加温、研磨）；

测试化学品的稳定性、使用限制日期或重新分析日期(如果已知)；

储存条件。

7.2.2 实验过程

实验步骤的细节（包括角膜暴露样品后的冲洗），测试化学物以及对照化学物质的浓度；暴露和后培养的时间及温度；CAMVA 和 BCOP 对照组的使用；使用的阴性和阳性对照的标识（如果适用，也包括溶剂和基准对照）；使用的试验化学浓度、应用、暴露时间和暴露后孵化时间；使用的评价和决策标准的描述；使用的研究接受标准的描述；试验程序任何修改的描述；使用的决策标准的描述；相应的预测模型及模型和实验方法的可接受标准；对于操作步骤的改动（包括冲洗）等。

7.2.3 结果

来自个别试验样本数据的表格(如浑浊度和 OD490 值和试验化学品和阳性、阴性和基准对照的 IVIS 或 LIS，包括适当重复实验的数据，平均值±每个实验的标准偏差)；观察到的其他影响，包括角膜染色；体外 UNGHS 分类。

7.2.4 结论

附录 A 眼刺激性的 CAMVA 法

（规范性）

A.1 试验材料及准备

A1.1 鸡 胚

A1.1.1 品系和来源

白莱杭鸡受精鸡胚，应当选用 SPF 级鸡胚，鸡胚质量符合国家标准要求，供应商应具有检验用 SPF 级鸡蛋定点生产企业资格。

A1.1.2 运输与贮存

购买 0 日龄的鸡胚，气室朝上贮存于蛋架上运输。应在不影响胚胎活性或发育的情况下转移或运输鸡胚，避免对鸡胚摇动、不必要的倾斜、敲打以及其他机械性刺激。

A1.1.3 规格要求

鸡胚应新鲜、干净、完好，质量 50~60g。孵化至 4 日龄时，应照蛋检查，弃去未受精、无活性或有缺陷的鸡胚，严重畸形、破壳或薄壳鸡胚也不能使用。

A1.1.4 孵化条件

室温 20℃~25℃，相对湿度 45%~70%。孵化温度 37.5℃±0.5℃，相对湿度 55%~70%，第 3 天放平鸡胚。

A1.1.5 CAM 制备

在第 4 天用铅笔标记壳的表面，使用牙科钻在鸡蛋的尖端附近进行划刻小孔（直径 2-3mm）。通过该孔使用一次性注射器抽出约 2-3ml 蛋白。鸡蛋的这个区域用酒精垫擦拭，以避免污染。蛋白的抽出在蛋的上表面的壳下面形成空气空间。加热融化蜡封孔。在胚胎附近用牙科钻的边缘仔细切割矩形窗口（约 1.0cm×1.5cm）。然后用保鲜膜覆盖窗口，将蛋返回培养箱。至少隔天监测一次鸡胚活性。孵育至第 14 天，鸡胚将用于测试。

A1.1.6 孵化率评价

在第 4 天是随机选取 10 只鸡胚，不做任何处理，孵育至第 14 天，照蛋检查并计算孵化率。孵化率计算参考

A1.2 实验设备、试剂及实验耗材

A1.2.1 恒温培养箱

A1.2.2 牙科钻、涡旋混匀器、100uL 粘液枪、照蛋器（光源）、电子计时器

超纯水、玉米油、70%乙醇

1mL 注射器、10 mL 注射器、弯镊子、及一次性吸头、保鲜膜。

A1.3 阳性对照

每次试验应设置一个已知的眼刺激物（如 0.05M SDS）。阳性对照物的选择应当基于有效、可信的体内试验资料。

A1.4 阴性对照

超纯水或植物油（例如玉米油）。

A1.5 受试物及制备

A1.5.1 固体受试物

粉末状可直接称量，块状固体需研磨成细颗粒状再称量。

A1.5.2 液体受试物

稀释受试物至一系列浓度。

A1.5.3 其他混合物

半固体、乳状、悬浮液等状态的样品，制备前需进行充分摇匀，尽可能使其成分均匀分散。需要配制不同浓度的，可用超纯水或植物油（例如玉米油）稀释受试物至一系列浓度。所有配制的受试物质包括对照物需要在涡旋混匀器上至少振荡 20min，充分混匀后方可进行测试，必要时可进行其他预处理，如水浴、加热、超声等。

A2 实验过程

A2.1 操作过程

待鸡胚发育第 14 日龄，取出鸡胚并剥离多余的蛋壳，任何发育不正常的，未发育的 CAM 或其他异常的鸡胚丢弃，CAM 上可放置 1-2 个 Teflon 环，环内加入 40 μ L 或 40mg 不同浓度受试物，封上保鲜膜后返回培养箱，暴露 30 $\pm$ 5min 后，取出鸡胚，观察环内 CAM 上的充血、出血、凝血、鬼影等血管反应并进行评分记录。

A2.2 简化试验分组

A2.2.1 初步筛选

选择 5 个浓度，即 10%，30%，50%和 70%，100%，每个浓度测试 1 只鸡胚。

A2.2.2 正式测试

选择 3 个浓度，即 15%，30%，70%，每个浓度平行测试 5 只鸡胚。

A2.3 完全试验分组

A2.3.1 初步筛选

选择 3 个浓度，即 15%，30%和 70%，每个浓度平行测试 3 只鸡胚。

A2.3.2 正式测试

根据初步筛选的结果，将选择剂量以获得具有阳性反应的浓度，其允许计算 RC 50。至少 2 个浓度，每个浓度平行测试 10 只鸡胚。

A3 数据分析

A3.1 数据输入

将数据以下列格式表示：例如将数据导入 SPSS 统计软件，选择依次选择 Analysis-Regression-Prohibit,

按下图选择参数，确定后输出结果，找到 RC50 值和对应的置信区间。

A3.2 预测模型

计数出现阳性反应数量，通过概率法计算 RC50 ，通过下列预测模型进行眼刺激性预测。

表 2 CAMVA 方法预测模型

RC50	预测分类 Classification
>3%	无刺激性 Non-irritant (NI)
≥1%, ≤3%	无法确定 Indeterminate (IN)
<1%	刺激性 Irritant (IR)

A3.3 实验可接受标准

如果实验设定的阴性对照和阳性对照产生的反应结果正好分别在非刺激性和严重刺激性的分类范围内，鸡胚孵化率≥70%，则实验结果可以认为是可接受的。

附录 B 识别无刺激性和严重刺激性的牛角膜混浊和渗透性试验

（规范性）

B1 实验材料和准备

B1.1 牛眼球的来源和要求

牛眼球应来源于健康的食用牛。牛的年龄应在 12-60 个月内，不同年龄来源的牛角膜其尺寸可能会有所变化。在这个年龄段，角膜水平直径 $<28.5\text{mm}$ ，中心角膜厚度（CCT） $<900\mu\text{m}$ 。8 岁以上的牛，角膜水平直径 $>30.5\text{mm}$ ，CCT 值 $\geq 1100\mu\text{m}$ ，而不到 12 个月大的牛的眼睛仍在发育，角膜的厚度和角膜直径比成年牛的眼睛要小得多。6 至 12 月龄的牛角膜也可以用于本实验，其优势在于来源个体相对健康、年龄跨度小、角膜受损率较低等。

B1.2 牛眼球的收集及实验室运送

眼睛由屠宰场、商业供应商和研究机构的训练有素的员工收集。为了尽量减少机械对眼睛和其他类型对眼睛的损害，屠宰牛后应尽快摘除眼睛，并在摘除后和运输过程中立即冷却。眼睛应立即完全浸在冷却的汉克斯平衡盐溶液(HBSS)中，装在适当大小的容器中，并运至实验室，尽量减少变质和/或细菌污染。因为眼睛是在屠宰过程中收集的，它们可能暴露于血液和其他生物物质中，包括细菌和其他微生物。因此，必须确保将污染的风险降至最低（例如，在收集和运输过程中将含有眼睛的容器放在湿冰上，并在运输过程中用来储存眼睛的 HBSS 中添加抗生素[例如， 100IU/mL 的青霉素和 $100\mu\text{g/mL}$ 的链霉素]）。

B1.3 牛眼球的选用标准及数量

收集眼球后应在当天尽快使用角膜，牛眼一旦到达实验室，就会仔细检查其缺陷，包括浑浊度增加、划痕和新生血管。只使用没有这些缺陷的眼角膜。

B2 实验方法

B2.1 牛眼球的预处理

将眼角膜在距虹膜边缘 2 至 3 毫米的地方切开，并小心避免损害角膜上皮细胞和内皮细胞。分离的角膜安装在专门设计的角膜支架上，包括眼前房和眼后房，接口分别是角膜上皮细胞和内皮细胞。两个眼房都充满预热过的无酚红 MEM 培养基，确保不会形成气泡。然后，该装置在 $32\pm 1^\circ\text{C}$ 下育孵至少 1 小时，以使角膜与介质平衡，并尽可能实现正常的新陈代谢。

B2.2 角膜的选用标准

在平衡期之后，向两室添加新鲜的预热的无酚红培养基 MEM，并对每个角膜进行基线浑浊度读数。弃去显示组织损伤（如划痕、色素沉着、新生血管）的角膜或读数小于 1200 勒克斯或大于 1850 勒克。至少三个角膜被选择为阴性（或溶剂）控制角膜。每个处理组（测试组、阴性对照组和阳性对照组）至少包括 3 只眼球。

B2.3 测试物的预处理与角膜接触

B2.3.1 液体和表面活性剂

液体测试物不进行稀释。对于表面活性剂测试物，无论是固体还是液体，均应制备成质量体积比为

10%的溶液，溶剂使用 0.9%的氯化钠溶液，蒸馏水或其他溶剂（被证明在试验系统中无可见效应）。半固体、乳化剂和蜡状物通常当做液体检测。眼角膜与测试物接触 10min。若选择其他稀释浓度及接触时间应提供适当依据。

B2.3.2 非表面活性剂的固体

均应配制成质量体积比为 20%的溶液，溶液使用 0.9%的氯化钠溶液，蒸馏水或其他溶剂（被证明在实验系统中无可见效应）。某些情况下有适当的科学依据，固体也可以用其他方法进行灵活的检测。眼角膜与检测物接触 4 小时。若选择其他稀释浓度及接触时间应提供适当依据。

B2.3.3 特殊物测试

对于一些特殊的测试物（列如，难溶物质、黏稠液体等），可以根据测试物的理化性质使用不同的处理方法，但应确保测试物充分覆盖于上皮细胞表面且在清洗时可以被充分去除。

B2.4 对照

每个实验都应同时包括阴性或溶剂对照和阳性对照。用于液体测试物的阳性对照物是 1%的氢氧化钠或二甲基甲酰胺。用于固体测试物的阳性对照品是溶于 0.9%的氯化钠溶液中的质量体积比为 20%的咪唑。对于不稀释的液体测试物，阴性对照品为 0.9%的氯化钠溶液或蒸馏水，而对于溶解稀释过测试物，阴性对照品应为其溶剂。

B2.5 清洗

测试物与角膜接触后，先洗掉眼前房和上皮上的测试物（阴性组或阳性组相同操作），至少 MEM（含酚红指示剂）洗涤 3 次（或直到无可见的测试物发现）。用含酚红的培养液冲洗直至酚红发生可见颜色改变，来确定清洗酸碱材料的有效性。未发现酚红变色（黄色或紫色），或仍可见测试物的角膜要洗涤 3 次以上。培养液中无测试物时，用 MEM（无酚红）最后冲洗角膜一次。用 MEM（无酚红）最后清洗以确保在检测浊度之前除去眼前房的酚红。随后在眼前房中注满不含酚红的新鲜 MEM。

B2.6 育孵

对于液体或表面活性剂，清洗后角膜要在 $32 \pm 1^\circ \text{C}$ 下育孵至少 2 小时，对于固体不要求进一步孵育。

B2.7 检测

B2.7.1 角膜混浊度

孵育（液体和表面活性剂）或清洗（固体）后，记录每个角膜混浊度。此外，目视观察每个角膜并做相关观察记录。

B2.7.2 荧光渗透性实验

检测暴露受试物后透过角膜的荧光素钠的渗透率可反应屏障功能受损程度。

B2.7.2.1 液体受试物

针对液体受试物和相应的对照组，在孵育 2h 并测得角膜的浊度值后，移除前室中的无酚红 MEM 溶液，前室中加入 1.0mL 0.4%的溶解于 DPBS 的荧光素钠溶液。

B2.7.2.2 固体受试物

针对固体受试物和其相应对照组，在 4h 暴露并测得角膜的浑浊度后，移除前室中的无酚红 MEM 溶液，前室中加入 1.0mL0.5%的溶解于 DPBS 的荧光素钠溶液。

B2.7.3 孵化

每个装置重新垂直放置于 32℃（±1℃）孵化箱中 90min(±5min)。

B2.7.4 测量 OD 值

用注射器抽取全部后室液体并混匀，依次吸取各组溶液 360μL 置于 96 孔板中，通过酶标仪在 490nm 处测量每个角膜对应的 OD₄₉₀ 值。

B3 数据处理

B3.1 数据校正

受试组、阳性对照组及阴性对照组相应的浊度值通过各自的基础浊度值及空白组浊度值进行校正，受试组及阳性对照组的 OD 值通过阴性对照组的 OD 值进行校正。

B3.2 角膜浊度值和 OD 值两个终点组合成最终的体外刺激评分（IVIS）：

$$IVIS = \text{平均浊度值} + 15 \times \text{平均 OD}_{490} \text{ 值}$$

B3.3 预测模型

根据体外评分预测体内眼刺激性。预测模型见表 8-1。

表 8-1 BCOP 方法预测模型

IVIS	UN GHS 分类
≤3	无分类
>3; ≤55	2A 或 2B
>55	1 类（严重腐蚀性）

若重复测试结果与初次测试的预测结果一致（以平均体外刺激评分为准）或测试结果将受试物归为 1 类物质，可作最终评估，无需进一步测试。若重复测试与初次测试的预测结果不一致，则应进行第三次测试和最终测试，解决可疑的预测结果，并对受试物进行分类。