

牛摘出角膜の混濁度および透過性試験法 (BCOP試験)

～腐食性・強刺激性物質の判定における病理組織学的検査の有用性～

○伊藤 浩太¹⁾、遠藤 ちひろ¹⁾、榊原 隆史¹⁾、河村 公太郎¹⁾、松浦 正男¹⁾、小島 肇²⁾

1) 株式会社化合物安全性研究所 2) 国立医薬品食品衛生研究所

背景と目的

牛摘出角膜を用いた眼刺激性試験 (BCOP法) は、無刺激性物質 (GHS区分外) および腐食性・強刺激性物質 (GHS区分1) の評価が可能な眼刺激性代替試験法ガイドライン (OECD TG437) である。BCOP法を毒物劇物の評価に用いる場合、本試験法によるGHS区分1の判定で生じる偽陰性を減らすことへの対応が重要である。このたび、角膜上皮の病理所見とBCOP法の評価規準であるIVIS (*in vitro* irritation score) についての85物質の成績より、腐食性・強刺激性物質の判定における病理組織学的検査の有用性を検討した。

方法

BCOP試験はOECD TG437に従って実施した。IVIS値は被験物質を食用牛から摘出した角膜に暴露し、角膜の混濁度とその透過性の変化に基づき算出した (GHS区分外: IVIS<3、GHS区分1: 55<IVIS)。

病理組織学的検査は、測定終了後の角膜を10%中性緩衝ホルマリン液で固定しHE染色を行い鏡検した。角膜上皮の病理所見は上皮の損傷程度に応じて0から3の4段階でスコアを付した。このうちスコア0には変化がなく、上皮細胞に損傷は認められるものの正常な基底細胞層が存在するスコア1と2では角膜上皮の回復性が期待された。病理組織学的検査の結果は下記の基準に従ってスコア化した。

病理組織スコア(HS)	基準
0	変化なし。
1	扁平細胞層に局限した損傷 (速やかな回復が期待出来る)。
2	翼細胞層あるいは基底細胞層に至る損傷。ただし、正常な基底細胞層が残存 (比較的早期の回復が期待出来る)。
3	基底細胞層全体の損傷。あるいは基質に至る損傷 (早期の回復が期待出来ない)。

結果および結論

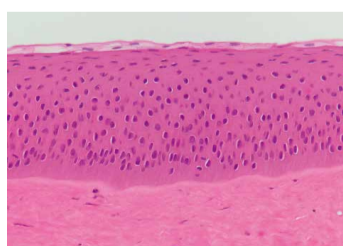
表1 GHS区分1である被験物質のIVISと病理組織スコア (HS)

被験物質名称	IVIS	病理組織スコア
2,4-pentanedione	43.2	3
glycolic acid	49.3	3
butanol	49.9	3
chlorhexidine	61.7	3
formic acid	64.3	3
pyridine	79.2	3
N,N'-dimethylformamide	80.4	3
monoethanolamine	89.2	3
acetic acid	108.0	3
5% benzalkonium chloride	119.3	3
10% n-lauroylsarcosine sodium salt	128.3	3
imidazol	138.5	3
1% sodium hydroxide	151.3	3
20% n-lauroylsarcosine sodium salt	190.3	3
30% trichloroacetic acid	385.8	3

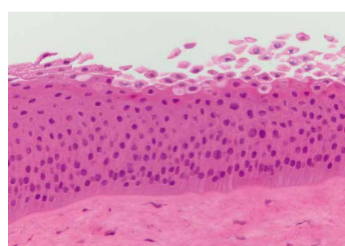
表2 GHS分類とIVISおよび病理組織学的検査 (回復性) の関係

GHS	55 > IVIS	IVIS ≤ 55, > 3		IVIS ≤ 3
	早期の回復性なし	早期の回復性なし	早期の回復性あり ^{a)}	早期の回復性あり ^{a)}
1	12/15	3/15	0/15	0/15
2A	16/42	15/42	11/42	0/42
2B	0/15	5/15	8/15	2/15
No Category	0/13	0/13	2/13	11/13

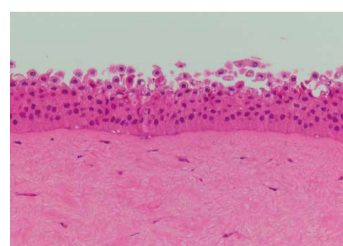
^{a)}病理組織学的検査で変化なしを含む



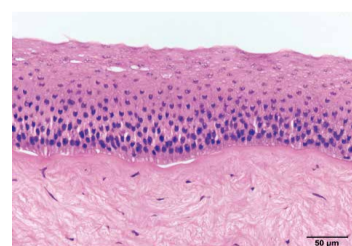
正常な角膜



3,3-dimethylpentaneに暴露した角膜
扁平細胞層の細胞脱落がみられる
IVIS: 3.3、HS: 1



glycidyl methacrylateに暴露した角膜
翼細胞層の細胞脱落がみられる
IVIS: 10.4、HS: 2



2-methyl-1-pentanolに暴露した角膜
上皮細胞の核および細胞質の空胞化に加え、基質の空胞化がみられる
IVIS: 43.2、HS: 3

これらの結果から以下の結論を得た。

- GHS区分1の物質の内、55<IVISは12/15であり、3/15物質はIVIS<55の偽陰性判定であったことから、IVISのみでは毒劇物の判定を誤る可能性が示唆された。
- IVISからは眼刺激性を判定出来ない3<IVIS≤55の物質について、病理組織学的検査を実施することが有用と考えられた。
- これら物質の病理所見を調べたところ、全て角膜上皮の回復性が期待できないスコア3であり、病理評価を加えることで腐食性・強刺激性物質を確実に区分できると考えられた。以上のことから、BCOP試験に角膜上皮の病理組織学的検査における回復性の指標を加えることで、腐食性・強刺激性物質を確実に弱刺激性および無刺激性物質と区分できるものと考えられた。