



牛角膜を用いた混濁度および透過性試験法(BCOP法)による弱刺激性物質の評価

○伊藤 浩太¹⁾ 六川 潤美¹⁾ 榊原 隆史¹⁾ 古川 正敏¹⁾ 佐々木 啓¹⁾
 藤平 司郎¹⁾ 平賀 武夫²⁾ 小島 肇³⁾ 松浦 正男¹⁾

1) 株式会社 化合物安全性研究所 2) 酪農学園大学 獣医学群 3) 国立医薬品食品衛生研究所

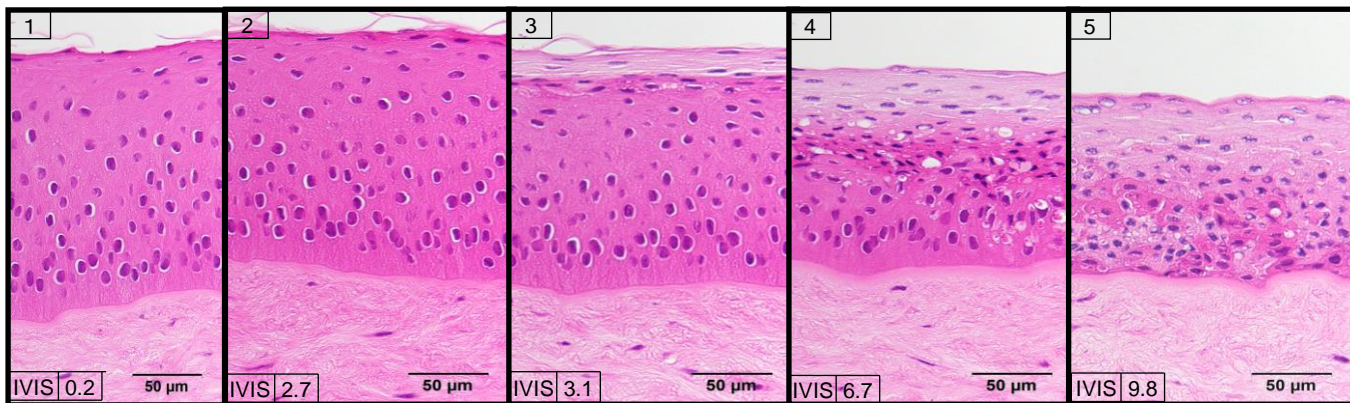
はじめに

「牛角膜を用いた混濁度および透過性試験法(BCOP法)」が、眼腐食性および強度刺激性を評価する試験法として、2009年にOECDの化学物質に関する試験法ガイドライン(TG 437)に採択された。我々は昨年(第39回)日本毒理学学会学術年会において、BCOP法で得られたデータがDraize法の試験結果を基にしたGHS分類と一致度が高く、腐食性や強度刺激性の検出精度が高いことを報告した。今回、我々はBCOP法で、その刺激性がnon-severeと判断された化学物質に着目し、知見が得られたので報告する。

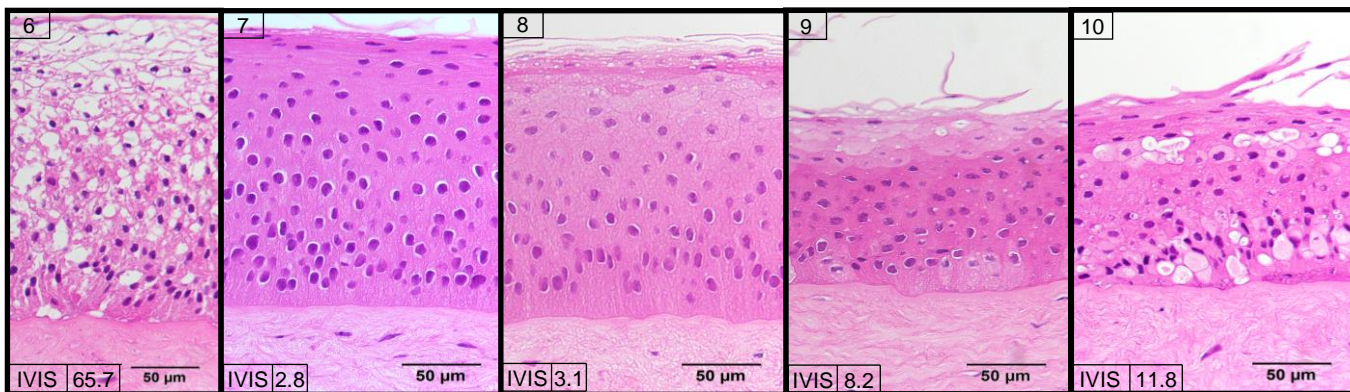
方法

ガイドラインに従って、角膜の混濁度および透過率を測定し算出された*in vitro*刺激性スコア(IVIS)が、55.1未満(non-severe)の角膜について病理組織学的検査を行った。そのうち Dimethyl sulfoxide(DMSO)について曝露時間を1, 3, 5および10分間にした場合のIVISを算出し、それぞれについて病理組織学的検査を行い、経時的变化を検討した。

結果



- 1: Saline(Negative control) : 角膜上皮, 角膜実質, 角膜内皮に異常所見は認められなかった。
- 2: DMSO 1分間曝露 : 角膜上皮, 角膜実質, 角膜内皮に異常所見は認められなかった。
- 3: DMSO 3分間曝露 : 角膜上皮上層の翼細胞に細胞質の空胞化が認められた。
- 4: DMSO 5分間曝露 : 角膜上皮上層で染色性の低下, 核濃縮および各層で細胞質の空胞化, 角膜実質のコラーゲン基質に空胞化が認められた。角膜内皮に異常所見は認められなかった。
- 5: DMSO 10分間曝露 : 角膜上皮各層で染色性の低下, 核濃縮, 細胞質および核の空胞化, 角膜実質のコラーゲン基質に空胞化が認められた。角膜内皮に異常所見は認められなかった。



- 6: N,N-Dimethylformamide (Positive control) : 角膜上皮各層で核濃縮および細胞質の空胞化, 角膜実質のコラーゲン基質の空胞化, 角膜実質細胞の核濃縮が認められた。角膜内皮に異常所見は認められなかった。
- 7: 2-Aminophenol(20%) : 角膜上皮, 角膜実質, 角膜内皮に異常所見は認められなかった。
- 8: 2-Mercaptopyrimidine(20%) : 角膜上皮上層の翼細胞に細胞質の空胞化が認められた。
- 9: Ammonium nitrate(20%) : 角膜上皮上層で染色性の低下, 各層で核および細胞質の膨化ならびに空胞化, 角膜実質のコラーゲン基質の空胞化が認められた。角膜内皮に異常所見は認められなかった。
- 10: 1% Phenol : 角膜上皮各層で核濃縮, 翼細胞および基底細胞で細胞質の空胞化, 角膜実質のコラーゲン基質の空胞化, 角膜実質細胞の核濃縮が認められた。角膜内皮に異常所見は認められなかった。

In vitro 刺激性スコア (IVIS)算出と刺激性判定基準

IVIS = 平均混濁度 + [15 x 平均透過率 (OD490)値]

IVIS	国連GHS
≤3	区分対象外(GHSで定義される物理的性質に該当しない)
>3; ≤55	予測できない
>55	区分1

Draft updated guideline 437 for the testing of chemicals
21 December 2012

BCOP成績 IVIS≤3の被験物質 (化安研検討試験6物質掲載)

被験物質	IVIS
Glycerol	0.3
Tween20	0.2
Iminodibenzyl(20%)	0.2
CMC-Na 0.2%	0.8
CMC-Na 0.5%	2.4
2-Aminophenol(20%)	2.8

まとめ

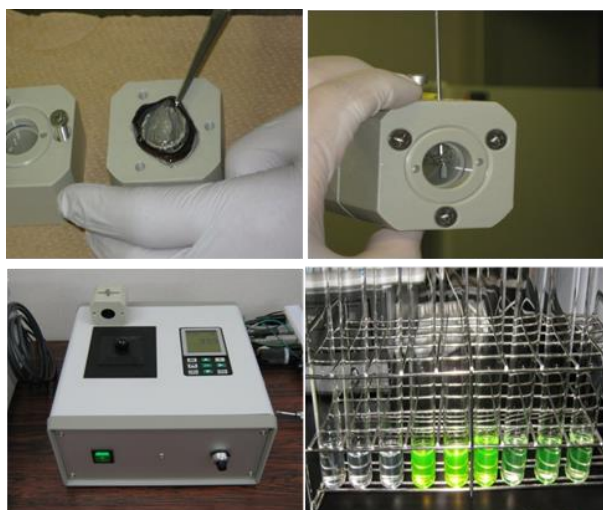
- ・DMSOの曝露時間を変えた場合には、曝露時間を長くするに従ってIVISが大きくなり、角膜の上層側から基底層側へ組織の障害が拡大していくことが確認された。
- ・IVISが10前後までの物質を曝露した角膜では、IVISが大きくなるに従って上層側から基底層側へ組織の障害が拡大していく傾向がみられた。
- ・IVISが3以下の12物質を曝露した角膜では、病理組織学的変化は認められなかった。
- ・今後の課題はBCOP法のIVISおよび病理組織学的検査結果とウサギ眼刺激性試験結果を比較検討することで、BCOP法による弱刺激性物質の評価をより確実にする方法を検討している。

第40回日本毒性学会学術年会 幕張メッセ 国際会議場 2013年6月18日 ポスター会場 P113

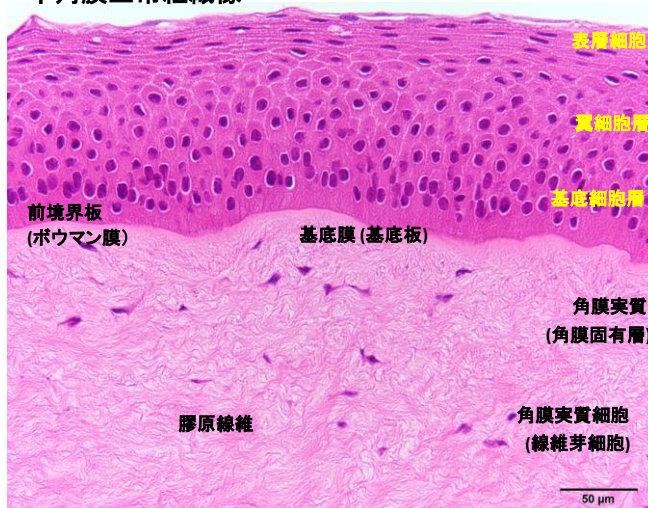
参考資料

BCOP試験方法

- ・眼球より摘出した角膜を専用ホルダーに装着し、培地(ハンクスの平衡塩類溶液)を満たして加温および平衡化。
- ・混濁度をオパシトメーターで測定後、被験物質の適用(液体:10分, 固体:4時間)および洗浄。
- ・被験物質適用後の混濁度をオパシトメーターで測定。
- ・蛍光色素の角膜透過性を比色法により計測。
- ・in vitro刺激性スコア(IVIS)を算出。



牛角膜正常組織像



お問い合わせ



株式会社 化合物安全性研究所

東京事務所: 東京都台東区東上野3-34-6

ヒューリック東上野ビル3階

Tel:03-3831-5810

関西事務所: 大阪府豊中市新千里東町2-7-C1-205

Tel:06-6170-7046

札幌研究所: 札幌市清田区真栄363-24

Tel:011-885-5031

URL : <http://www.ka-anken.co.jp>