

牛摘出角膜を用いた混濁度及び透過性試験(BCOP法:眼刺激性代替試験)における角膜の病理組織学的検査による弱刺激性物質の評価

○伊藤 浩太¹⁾, 榊原 隆史¹⁾, 古川 正敏¹⁾, 奥村 宗平¹⁾, 越田 美¹⁾, 河村 公太郎¹⁾, 小島 肇²⁾, 松浦 正男¹⁾
 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 安全性生物試験研究センター 薬理部

はじめに

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)を評価可能な眼刺激性代替試験である(OECD TG437)。他方、BCOP法をはじめとする眼刺激性代替試験において、弱刺激性物質を含むGHS区分2Aと2Bを評価可能な試験系はなく大きな課題となっている。我々は、BCOP法に病理組織学的検査を併用することによる弱刺激性物質評価の可能性について検討を行ってきた。今回、74 の物質 (Table 1) について、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) の成績より、弱刺激性物質の評価基準について検討を行った。

材料および方法

Table 1 74 test substances tested

GHS	Physicality	Chemical Name	GHS	Physicality	Chemical Name	GHS	Physicality	Chemical Name
No	Liquid	isopropyl myristate	2B	Liquid	isobutyraldehyde	2A	Liquid	ethanol
No	Liquid	glycerol	2B	Liquid	1-(2-propoxy-1-methylethoxy)-2-propanol	2A	Liquid	cyclohexanone
No	Solid	2,2'-methylene-bis-(6-(2Hbenzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol)	2B	Liquid	2-methyl-1-pentanol	2A	Liquid	isopropanol
No	Solid	1-(9Hcarbazol-4-yloxy)-3-[[2-(2-methoxyphenoxy)ethyl]amino]-2-propanol	2B	Liquid	toluene	2A	Solid	4-carboxybenzaldehyde
No	Liquid	1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate	2B	Liquid	2-ethoxyethanol	2A	Solid	hexadecyltrimethylammonium bromide
No	Solid	2-(2-hydroxy-3-(trimethylammonio)propoxy)ethyl ether chloride	2B	Solid	glycolic acid	2A	Solid	cetylpyridinium bromide
No	Liquid	3,3-dimethylpentane	2B	Liquid	5% triton X-100	2	Liquid	hexane
No	Liquid	glycidyl methacrylate	2B	Liquid	n-butanol	2	Liquid	methanol
No	Liquid	methyl amyl ketone (2-heptanone)	2B	Solid	2-hydroxy-1,4-naphthoquinone	1	Solid	dibenzoyl-L-tartaric acid
No	Liquid	2,4-dimethyl-3-pentanol	2B	Liquid	propylene glycol propyl ether	1	Liquid	chloroform
No	Solid	3,4-dimethoxy benzaldehyde	2B	Liquid	cyclopentanol	1	Liquid	pyridine
No	Solid	3-methyl-1,5-di(2,4-xylyl)-1,3,5-Triazapenta-1,4-ethyl 2,6-dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropionate	2B	Liquid	monoethanolamine	1	Liquid	N,N'-dimethylformamide
2B	Solid	iminodibenzyl	2B	Liquid	acetone	1	Liquid	acetic acid
2B	Solid	camphene	2A	Solid	2,4,5,6-tetraaminopyrimidine sulfate	1	Liquid	5% benzalkonium chloride
2B	Solid	4-nitrobenzoic acid	2A	Solid	anthracene	1	Solid	imidazol
2B	Liquid	dimethyl sulfoxide	2A	Solid	2-mercaptopyrimidine	1	Liquid	1% sodium hydroxide
2B	Liquid	diethyl toluamide	2A	Solid	phenylbutazone	1	Liquid	30% trichloroacetic acid
2B	Liquid	3,3'-dithiodipropionic acid	2A	Solid	2-aminophenol	unknown	Liquid	tween 20
2B	Solid	sodium chloroacetate	2A	Liquid	2,6-dichlorobenzoyl chloride	unknown	Liquid	formalin
2B	Liquid	ethyl-2-methylacetacetate	2A	Liquid	butyrolactone	unknown	Solid	1-phenyl-3-pyrazolidone
2B	Liquid	isopropyl acetacetate	2A	Solid	ammonium nitrate	unknown	Liquid	furan
2B	Liquid	ethyl acetate	2A	Liquid	1,2,3-trichloropropane	unknown	Liquid	2,4-pentanedione
2B	Liquid	3-chloropropionitrile	2A	Liquid	1-octanol	unknown	Solid	n-lauroylsarcosine sodium salt
2B	Liquid	2-methoxyethanol	2A	Liquid	isobutanol	unknown	Solid	gluconolactone

IVIS値は常法に従い被験物質暴露による角膜の混濁度とその透過性の変化に基づき算出した。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以下の基準でスコア化した。

- Score 0 : No lesions.
- Score 1 : Lesions limited to squamous cell layer.
- Score 2 : Lesions limited to squamous and wing cell layer.
- Score 3 : Lesions extended to basal cell layer. Some intact basal cells are remained.
- Score 4 : Lesions extended to basal cell layer. All basal cells are damaged.

結果およびまとめ

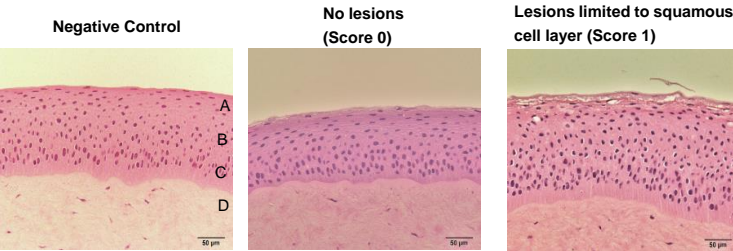


Fig. 1 Distilled water (IVIS:0.0)
 A: Squamous cell layer
 B: Wing cell layer
 C: Basal cell layer
 D: Corneal stroma

Fig. 2 Ethyl 2,6-dichloro-5-fluoro-beta-3-pyridinepropionate (IVIS: 1.7)
 No pathological changes.

Fig. 3 1-Ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate (IVIS: 1.4): Squamous cells with the coarse cytoplasm and vacuoles were observed.

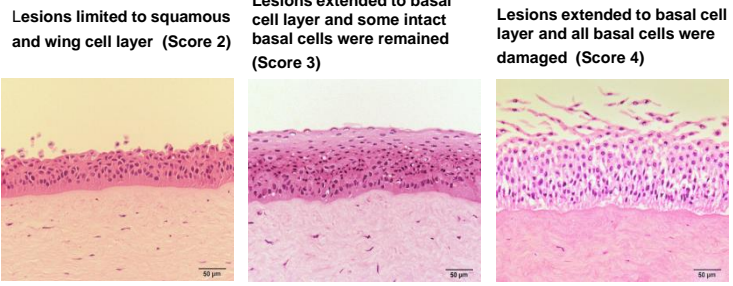


Fig. 4 Hexane (IVIS: 6.5): In squamous and upper wing cell layers, epithelial cells were lost. Lower wing cells and basal cells remained intact.

Fig. 5 Dimethyl sulfoxide (IVIS: 7.3): Squamous cells with hypochromic cytoplasm and vacuolar nucleus, and eosinophilic wing cells with vacuoles were observed. However cytoplasmic and nuclear vacuoles were observed in basal cell layer, some intact basal cells were remained

Fig. 6 3,4-Dimethoxy benzaldehyde (IVIS: 37.2): Epithelial cells shrank and intercellular spaces were dilated in all layers of corneal epithelium. Vacuolization was observed in the corneal stroma. Corneal endothelial cells remained intact.

Table 2 Correlation between IVIS and histopathological score

Range of IVIS	Histopathological score				
	0	1	2	3	4
IVIS≤3	4/8 50.0%	4/8 50.0%	0/8 0.0%	0/8 0.0%	0/8 0.0%
3<IVIS≤6	6/9 66.7%	3/9 33.3%	0/9 0.0%	0/9 0.0%	0/9 0.0%
6<IVIS≤20	0/12 0.0%	2/12 16.7%	5/12 41.7%	5/12 41.7%	0/12 0.0%
20<IVIS≤55	0/23 0.0%	0/23 0.0%	0/23 0.0%	2/23 8.7%	21/23 91.3%
55<IVIS	1/22 4.5%	0/22 0.0%	2/22 9.1%	3/22 13.6%	16/22 72.7%

病理組織検査スコア1の物質では扁平上皮層に変化が局限している (Fig 3) ことから速やかに回復すると考えられ、スコア2または3の物質では翼細胞層および基底細胞層に変化が認められたが、正常な基底細胞層が残存している (Fig 4および5) ことから回復性が期待された。スコア4の物質は基底細胞層全体に変化が認められた (Fig 6) ことから、回復には長時間を要する、あるいは回復しない変化と考えられた。

Table 2は無刺激性物質 (IVIS≤3) の病理組織検査スコアが0または1に局限し、3<IVIS≤6の物質の病理組織検査スコアも0または1に限定していることを示す。

病理組織検査のスコアとIVISを比較すると、IVISが3以下では、全ての物質がScore 0または1であり、IVISが6以下の物質のスコアも0 または1であった。以上のことから、IVISが6以下の物質についても無刺激性物質と評価出来る可能性が示唆された。