

ウシ摘出角膜を用いる 眼刺激性試験 (BCOP試験) における PAS染色の有用性

○古川正敏¹, 伊藤浩太¹, 榊原隆史¹, 越田美¹, 奥村宗平¹, 立野沙香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

我々はウシ摘出角膜を用いる眼刺激性試験 (BCOP試験) において、被験物質に曝露した角膜の病理組織学的検査で変化が認められない場合や角膜上皮の扁平細胞層に限局した変化のみが認められた場合には非刺激性物質と評価出来ると考えている。我々が行った実験では、*in vitro* 刺激性スコア (IVIS) が6以下の場合には扁平細胞層以外には病理組織学的な変化は認められなかった。これらのことからIVISが6以下の場合には無刺激性物質と考えられることを昨年の本学会にて報告した。一方、我々の行った検討試験において、*n*-butanalはIVISから強刺激性物質と判定されたが、病理組織学的検査では変化は認められなかった。そのため、*n*-butanalに曝露したウシ角膜の特殊染色標本を作製して検索を行い、類似構造物質である isobutyraldehyde, valeraldehyde, hexylaldehyde および propionaldehyde と比較検討した。

材料および方法

BCOP試験はOECD Test Guideline 437に従って実施した。角膜は食用牛の眼球から採取し、陰性対照物質として蒸留水、被験物質として *n*-butanal (Fig.1), isobutyraldehyde (Fig.2), valeraldehyde (Fig.3), hexylaldehyde (Fig.4) および propionaldehyde (Fig.5) を使用した。対照物質あるいは被験物質を角膜に10分間曝露し、混濁度および透過性の測定後、IVISを算出した。OECD Test Guidelineの判定基準では、「IVIS \leq 3」をUN GHS分類なし、「IVIS $>$ 3; \leq 55」を刺激性を予測することができない、「IVIS $>$ 55」をGHSカテゴリ-1で強い刺激性又は腐食性を有すると判定する。角膜は10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋後、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色を実施し鏡検した。

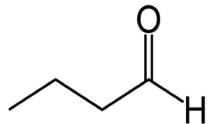


Fig.1 n-butanal

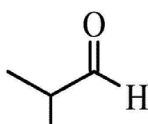


Fig.2 isobutyraldehyde

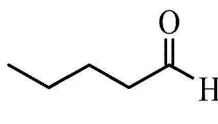


Fig.3 valeraldehyde

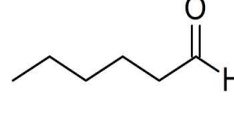


Fig.4 hexylaldehyde

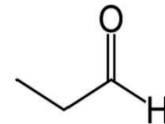


Fig.5 propionaldehyde

結果および考察

各被験物質の混濁度、透過性およびIVISをTable.1に示した。

isobutyraldehydeおよびvaleraldehydeのIVISはそれぞれ39.1および44.6であり、刺激性を予想出来ないと判定された。hexylaldehyde, *n*-butanalおよびpropionaldehydeのIVISはそれぞれ59.9, 72.2および119.7であり、強刺激性物質と判定された。

Table 1 IVISs of test substance

| Test substance | Opacity | Permeability | IVIS |
|-------------------|---------|--------------|-------|
| isobutyraldehyde | 24.4 | 0.980 | 39.1 |
| valeraldehyde | 20.7 | 1.596 | 44.6 |
| hexylaldehyde | 23.7 | 2.414 | 59.9 |
| <i>n</i> -butanal | 36.6 | 2.372 | 72.2 |
| propionaldehyde | 98.0 | 1.449 | 119.7 |

HE染色では蒸留水および*n*-butanalに曝露した角膜では異常所見は認められなかった (Photo.1, 2)。isobutyraldehyde (Photo.3), valeraldehyde (Photo.4), hexylaldehyde (Photo.5) および propionaldehyde (Photo.6) に曝露した角膜では、いずれも角膜上皮全体の染色性の低下が認められた。

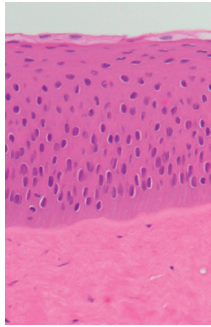


Photo. 1
Corneal epithelium
exposed to distilled
water (H.E. stain).
No morphological
changes observed.

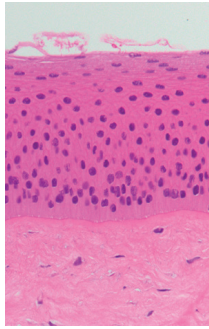


Photo.2
Corneal epithelium
exposed to n-butanol
(H.E. stain).
No morphological
changes observed.

Photo.3
isobutyraldehyde

Photo.4
valeraldehyde

Photo.5
hexylaldehyde

Photo.6
propionaldehyde

Photo. 3 to 6.: Corneal epithelium exposed to aldehydes showed hypo-chromic staining (HE stain).

PAS染色では蒸留水に曝露した角膜上皮はPAS染色陽性であり(Photo.7), 陽性物質は α -アミラーゼ処理によって消失することから, グリコーゲンの貯留を意味していると考えられた. 一方, n-butanolに曝露した角膜上皮はPAS染色陰性であり (Photo.8), isobutyraldehyde (Photo.9), valeraldehyde (Photo. 10), hexylaldehyde (Photo.11) およびpropionaldehyde (Photo.12) に曝露した角膜上皮もPAS染色は陰性であった.

Photo.7
Corneal epithelium
exposed to distilled
water (PAS stain).
PAS stain-positive
substance (pink-violet)
was detected

Photo.8
Corneal epithelium
exposed to n-butanol
(PAS stain).
PAS stain-positive
substance was lost.

Photo.9
isobutyraldehyde

Photo.10
valeraldehyde

Photo.11
hexylaldehyde

Photo.12
propionaldehyde

Photo. 9 to 12: Corneal epithelium exposed to aldehydes had no PAS-positive substance (PAS stain).

BCOP試験において, n-butanolは強刺激性物質であると判定された (IVIS 72.2) が, HE染色標本では角膜上皮に形態学的な変化は確認出来なかった. しかし, PAS染色標本では, 角膜上皮のPAS染色陽性物質が消失していた. PAS染色標本における陽性物質の消失は類似構造を有するアルデヒドでも認められていることから, HE染色で認められた染色性の低下と関連する変化であると考えられ, 被験物質曝露に対する角膜上皮の反応を示唆していると考えられた. 以上のことから, IVISと病理組織学的検査の結果が不一致で, 角膜上皮の染色性低下が推測される場合にはPAS染色を実施することで, 角膜上皮の変化の検出精度を上げることが出来ると考えられた.

～各試験の詳細・お見積り・ご相談はお気軽にお問い合わせください～

 **株式会社 化合物安全性研究所** <http://www.ka-anken.co.jp/>

お見積り承ります。
お気軽にご相談ください！

医薬品をはじめとする化学物質の安全性研究と医薬品開発の臨床研究支援を通して社会に貢献する化合物安全性研究所です

【札幌本社】 〒004-0839 札幌市清田区真栄363番24

【東京事務所】 〒110-0015 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

【関西事務所】 〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町2丁目7番 C1-205

TEL:011-885-5031 FAX:011-885-5313

TEL:03-3831-5810 FAX:03-3831-5818

TEL/FAX:06-6170-7046