

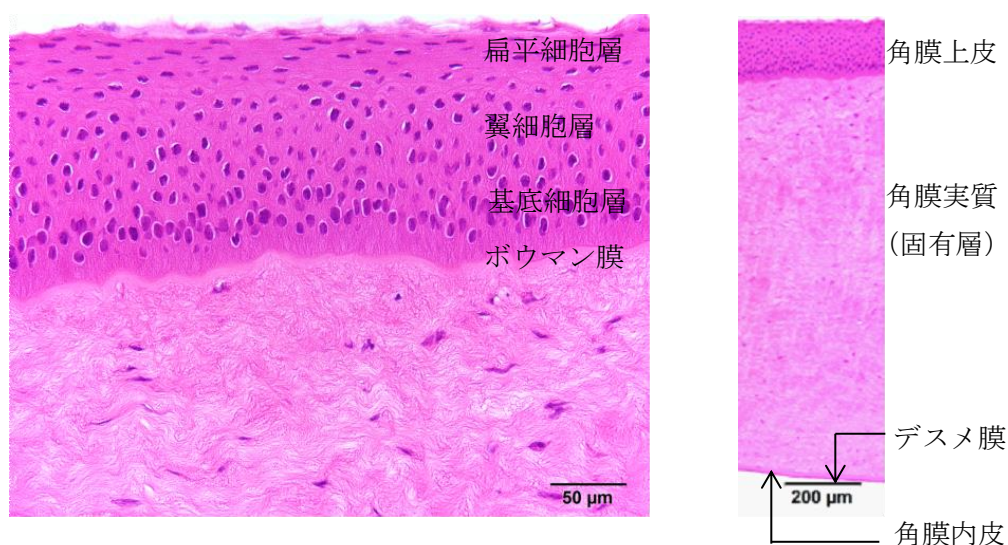
## はじめに

BCOP 法（牛摘出角膜の混濁および透過性試験法）はウサギを用いる眼刺激性試験（Draize 法）の代替法として開発され 2009 年に経済協力開発機構（OECD）のテストガイドライン（TG437）に採択されました。2013 年には、United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals（UN GHS 区分）の無刺激性物質と強刺激性物質を同時に検出出来る方法としてガイドラインが改訂されています。また、日本国内では、2014 年に厚生労働省より「眼刺激性試験代替法としての牛摘出角膜の混濁および透過性試験法（BCOP）を化粧品・医薬部外品の安全性評価に資するためのガイダンス」が発出されています。しかし、BCOP 法では他の眼刺激性試験代替法と同様に UN GHS 分類の 2A あるいは 2B に相当する弱刺激性物質の判定が出来ないことが課題となっています。弊社は 2011 年より BCOP 法のバリデーション試験を開始し、2012 年 4 月より BCOP 試験の受託を開始しておりますが、同時に多くの被験物質について試験を重ね、病理組織学的検査を組み合わせることで弱刺激性物質の判定基準を確立するための検討を続けてまいりました。ここでは、80 の化学物質と 15 の製品（化粧品・医薬部外品）の計 95 物質について行った弱刺激性物質の判定についての検討試験の結果を紹介します。

## 角膜の構造

角膜は大きく分けて角膜上皮、角膜実質（固有層）および角膜内皮により構成され、角膜上皮と角膜実質の間にはボウマン膜が、角膜実質と角膜内皮の間にはデスメ膜が存在します（図 1）。また、角膜には血管やリンパ管がないことが特徴のひとつとなっています。

図 1 正常牛角膜



角膜上皮は表層から順に扁平細胞層，翼細胞層および基底細胞層によって構成されています。角膜上皮では活発な細胞の新陳代謝がみられ，扁平細胞が脱落すると基底細胞が分裂，移動し，翼細胞を経て扁平細胞に分化します。また，上皮の損傷により基底細胞層で細胞の分裂周期が短縮し，短時間で修復することが知られています。従いまして，扁平細胞層の障害は速やかに回復しますが，基底細胞が障害されると角膜上皮の回復は遅延し，特に基底細胞層全体が障害された場合には回復に極めて時間を要する，あるいは回復出来ないと考えています。

## BCOP 法

食肉牛の不要部位として採取した角膜を専用ホルダーに装着し，被験物質に曝露（液体は 10 分間，固体は 4 時間）して角膜の混濁度と透過性の変化量をオパシトメーターおよび分光光度計を用いて測定し，混濁度と透過性から *in vitro* irritancy score (IVIS) を算出しました。OECD の TG437 では表 1 のように眼刺激性の判定基準が定められています。区分対象外が無刺激性物質，区分 1 が腐食性・強度刺激性物質と判定されます。

表 1 IVIS による眼刺激性判定基準

IVIS	UN GHS
≤3	区分対象外
>3, ≤55	予測できない
>55	区分 1

$$\text{IVIS} = \text{平均混濁度} + [15 \times \text{平均透過率 (OD}_{490}\text{)}]$$

測定後の角膜は 10%中性緩衝ホルマリン液で 24 時間以上固定し，常法に従って，ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し，鏡検しました。病理組織学的検査は角膜上皮，角膜実質および角膜内皮のそれぞれについて所見を記録し，角膜上皮に認められた変化については，表 2 に従って分類しました。

表 2 病理組織学的検査による角膜上皮の分類

病理組織スコア	判定基準
0	異常なし。
1	扁平細胞層に局限した変化。
2	扁平細胞層から翼細胞に至る変化。
3	基底細胞層に至る変化。正常な基底細胞が残存。
4	基底細胞層に至る変化。基底細胞全体に障害あり。

## 結果とまとめ

IVIS と病理組織スコアの関係を表 3 にまとめました.

表 3 IVIS と病理組織スコアの比較

IVIS	病理組織スコア				
	0	1	2	3	4
IVIS $\leq$ 3	15/25 <sup>a</sup>	10/25	0/25	0/25	0/25
3<IVIS $\leq$ 6	8/12	4/12	0/12	0/12	0/12
6<IVIS $\leq$ 20	0/11	2/11	4/11	5/11	0/11
20<IVIS $\leq$ 55	0/23	0/23	0/23	2/23	21/23
55<IVIS	1/24	0/24	3/24	3/24	17/24

a : 病理組織スコアに該当する変化のみられた物質数/該当する IVIS のみられた物質数

これらの結果から IVIS $\leq$ 6 の物質では全ての物質で病理組織スコアが 0 または 1 であることがわかりました (図 2,3). 従いまして, 弊社では IVIS $\leq$ 6 の物質につきましては IVIS $\leq$ 3 の物質と同様に無刺激性物質と判定できると考えております. また, 6<IVIS $\leq$ 20 の物質では病理組織スコアが 4 未満であり (図 4), 角膜上皮の再生において重要な役割を果たす基底細胞が残存していることから, 弱刺激性物質と判定出来る可能性を考えております. 20<IVIS の多くの物質では基底細胞全体に変化がみられました (図 5). しかし, 6<IVIS でありながら病理組織スコアが 0 または 1 である物質 (偽陰性物質) が散見されることから, 判定精度向上のための検討を進める予定です.

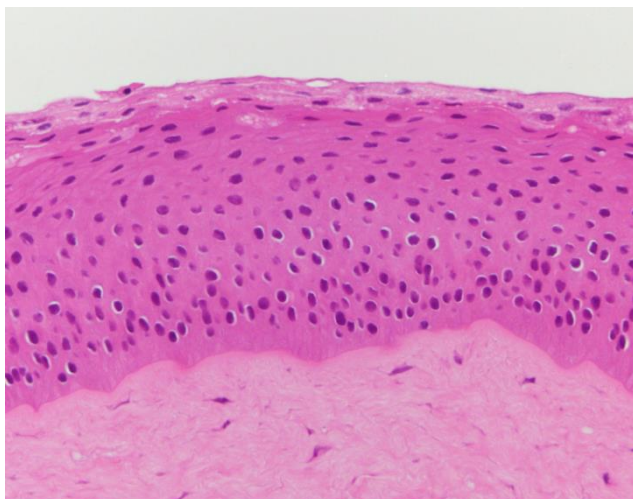


図 2

被験物質 :

1-ethyl-3-methylimidazolium ethyl sulfate

IVIS: : 1.4

病理組織スコア : 1

扁平細胞層に局限して細胞質の染色性の低下と空胞が認められる.

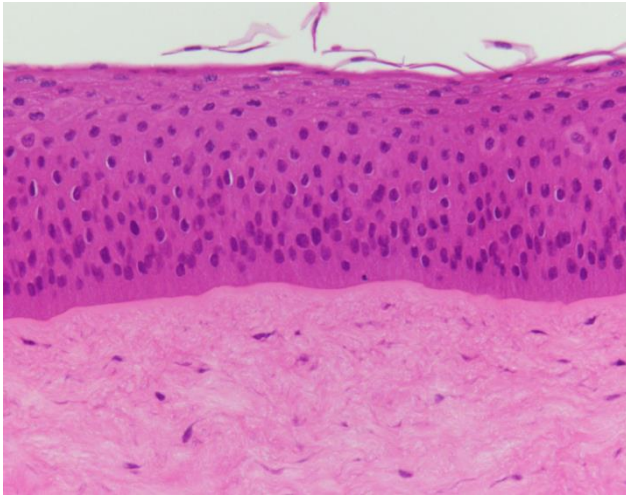


図 3

被験物質：4-nitrobenzoic acid

IVIS: : 6.0

病理組織スコア：0

異常なし.

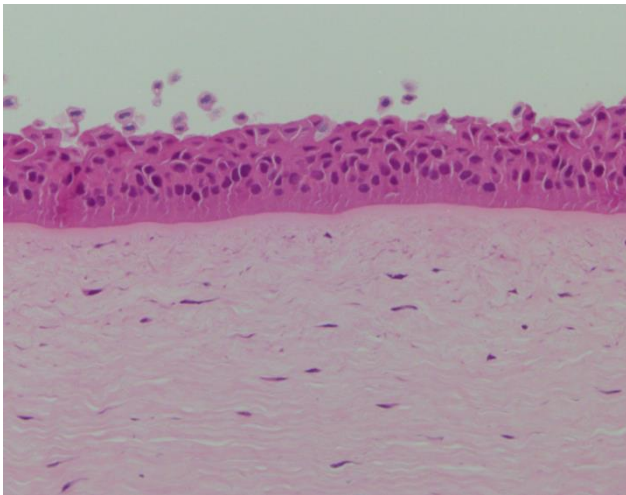


図 4

被験物質：hexane

IVIS: : 6.5

病理組織スコア：2

扁平細胞層および翼細胞層の細胞脱落が認められる.

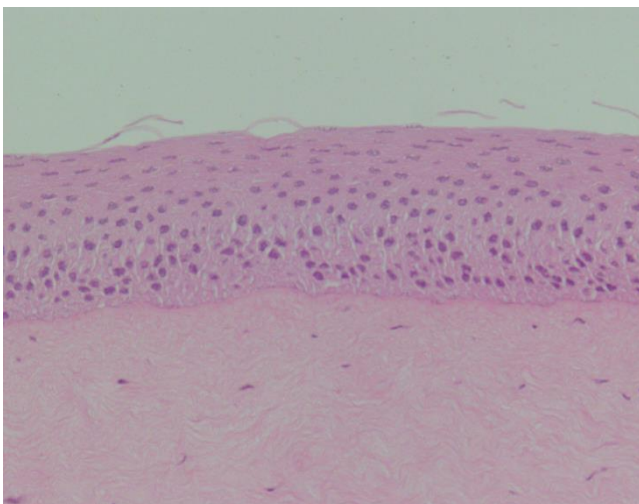


図 5

被験物質：ethyl acetate

IVIS: : 20.8

病理組織スコア：4

角膜上皮全体に細胞質の染色性低下がみられ、基底細胞層では細胞間隙の拡張も認められる.