

日本における牛摘出角膜を用いた眼刺激性試験代替法(BCOP)の受託体制確立

松浦 正男 [株式会社化合物安全性研究所／代表取締役社長]
河村 公太郎 [株式会社化合物安全性研究所第四研究室／室長]
平田 真理子 [株式会社化合物安全性研究所臨床検査室／室長]
市戸 等 [株式会社化合物安全性研究所第二研究室／室長]
古川 正敏 [株式会社化合物安全性研究所病理検査室／室長]
並木 正人 [株式会社化合物安全性研究所第三研究室／室長]
石川 典子 [株式会社化合物安全性研究所臨床検査室／室長補佐]
榎原 隆史 [株式会社化合物安全性研究所第四研究室／副主任研究員]
六川 潤美 [株式会社化合物安全性研究所病理検査室／副主任研究員]
伊藤 浩太 [株式会社化合物安全性研究所病理検査室／副主任研究員]
平賀 武夫 [酪農学園大学獣医学群解剖学ユニット／教授]
小島 肇 [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新規試験法評価室／室長]

背景・目的

日本では化粧品、非経口投与医薬品、農薬等の開発段階において安全性評価の一環としてウサギを用いた眼刺激性試験(Draize法)が義務づけられています。しかしながら、この試験法はEUでは動物愛護の観点から禁止され、代替法の導入が急務となっております。一方、「牛摘出角膜を用いた眼刺激性試験代替法(BCOP法)」が、2009年に経済協力開発機構(OECD)の化学物質に関する試験法ガイドラインに眼刺激性試験の代替法として採択されました。BSEなどの問題もあり、実施が困難な状況でした。そこで我々は受託試験としてのBCOP法を国内で初めて立上げ、受託事業化(安全性評価受託事業)を展開するために、酪農学園大学の平賀教授のご協力を得て検討を実施することとしました。

内容・方法

と畜場にて、と殺された牛の眼球を用いて、OECDテストガイドライン(TG437)に沿って角膜を処理(化学物質を暴露)し、オパシトメーター(BASF)により角膜の混濁度を測定する。その後フルオレセインナトリウムを角膜に添加し、角膜を通過したフルオレセインナトリウムの量を分光光度計で測定し、角膜の透過率を評価する。

混濁度および透過率より、*in vitro* 刺激性スコア(IVIS)を算出し、化学物質の腐食性または刺激性の強さを判定する。

混濁度と透過率の測定後、全ての角膜を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、ヘマトキシリン・エオシン染色標本を作製して病理組織学的検査を実施する。必要に応じて特殊染色を行い、被験物質により角膜に生じる変化を検査する。

上記操作については、ウサギを用いた眼刺激性試験による結果をもとに化学品の分類と表示に関する世界調和システム(GHS)において分類基準が示されている物質を用いて実施し、担当者の手技を向上させるとともに、施設の背景データを充実させる。

結果・成果

1. 牛眼球の鮮度保持について

採取した眼球の角膜をできる限り新鮮な状態で保持するため、容器および保冷温度の維持について検討した。また、眼球採取後の保存時間が長いほど角膜表面に変化が生じやすくなることがわかり、作業の効率化に努めた。その結果眼球採取後の角膜の損傷が減り、眼球のロスが減少し、暴露前の混濁度測定では安定した測定値が得られるようになった。

2. 摘出角膜の処理について

眼球からの角膜採取時の取り扱いには十分な注意が必要なため、採取方法を統一化することで、従事者によって角膜の状態に差が生じることを防いでいる。この結果、多数の担当者により、同時にサンプル処理が可能となり、一度に大規模の実験が可能となった。

3. 被験物質の混濁度および透過率の評価

陽性対照物質を用いたバリデーション試験では、刺激性スコア(IVIS)による評価は *in vivo* ウサギ眼刺激性試験の結果に基づく刺激性の分類と一致度は高く、強度刺激性の検出精度が高いことが確認された。

角膜への暴露後、測定までの時間差が生じないように作業効率を検討した結果、各被験物質内で角膜によるばらつきの少ない安定した測定値が得られている。

4. 病理組織学的検査

HE染色実施後、酪農学園大学の平賀教授のご指導の下、角膜上皮、角膜固有質、角膜内皮のそれぞれに生じた変化について観察し、各病理所見についてはその程度によってグレード評価を行った。必要に応じて特殊染色も実施した。病理組織学的検査を実施することによって、被験物質による角膜の損傷程度をさらに詳細に評価でき、刺激性スコア(IVIS)の結果に対して確かな裏付けとなると期待できる。

5. 背景データの取得

これまでにOECDテストガイドラインで実施を推奨されている物質を含めて約40物質の検査を行ってきた。これらの刺激性スコア(IVIS)評価は報告されているバックグラウンドデータと一致度が高く、また特に推奨物質

については数回検査を繰り返し、測定値および病理組織変化の再現性を確認している。この間アメリカで BCOP 法による受託試験を先駆けて実施している IIVS 社の技術指導もいただき、手技的にも信頼性の高いデータを収集できた。

以上の検討の関連内容は7月に開催された日本毒性学会および日本比較眼科学会で発表することができた。

今後の展望

昨年10月より、BCOP 法の受託事業化へ向けて検討試験を重ねてまいりました。牛角膜の採取から測定までの手技を確立し、眼刺激性の評価および病理組織学的検査に関するデータを取得でき、2012年4月より受託化を開始できる運びとなりました。これを BCOP 展開の第一段階とし、今後は BCOP 法の弱い部分、すなわち、弱い刺激性の物質の評価も補えるように、他の代替法試験と組み合わせた提案や病理組織評価の検討を進め、BCOP に沿った新基準を確立し、刺激性の強さを問わず に多種の化学物質を評価できるような眼刺激性試験の実施を考えていきたいと思っております。また、これを北海道から全世界へ発信できるように努力する所存です。