

ウシ摘出角膜の混濁度および透過性試験法 (BCOP試験)  
－ 腐食性・強刺激性物質の判定における  
病理組織学的検査の有用性 －

 株式会社化合物安全性研究所

安全性研究部 アドバイザー  
河村 公太郎

2018年8月2日

# 内容

毒劇物解除とBCOP法

BCOP法の試験法概要 (一部省略)

眼刺激性のGHS区分 1 の評価における  
病理組織学的検査の有用性(一部省略)

# 毒劇物解除とBCOP法

# 毒物劇物の判定基準の改定について(通知)

薬生薬審発0613第1号平成29年6月13日

## 有効な動物実験代替法による知見の活用について

### ⑤眼等の粘膜に対する重篤な損傷

以下に挙げる代替法は、眼腐食性物質及び強度刺激性物質を同定する試験として推奨されるとした。

- OECD TG 437 (BCOP)
- OECD TG 438 (ICE)
- OECD TG 460 (FL)
- OECD TG 491 (STE)

## 毒劇物の判定基準

③眼等の粘膜に対する重篤な損傷：眼の場合

劇物:ウサギを用いたDraize 試験において、少なくとも1匹の動物で角膜、虹彩又は結膜に対する、可逆的であると予測されない作用が認められる、または、通常21日間の観察期間中に完全には回復しない作用が認められる

または

試験動物3匹中少なくとも2匹で、被験物質滴下後24、48及び72時間における評価の平均スコア計算値が角膜混濁  $\geq 3$  または虹彩炎  $>1.5$  で陽性応答が見られる場合。

眼刺激のGHS分類で区分1に相当

## 毒物劇物の製剤の除外に関する考え方

②皮膚・粘膜に対する刺激性が強いため劇物に判定された物の製剤を除外する場合は、当該製剤の刺激性は、劇物相当（皮膚に対する腐食性、眼に対し重篤な損傷性又は同等の刺激性）より弱いものであること。

(例) 10%硫酸、5%水酸化ナトリウム、5%フェノール  
などと同等以下の刺激性

## 条文から判断される代替法の使用方法 (1)

GHS区分 1 の識別が可能な代替法を用いて陰性結果となる劇物の希釈濃度は、毒劇物除外を申請できる。



眼刺激のGHS分類で区分外と区分1の評価が可能なBCOP法を適用。

## BCOP法の毒劇物解除使用における現状

GHS区分外であれば可.

GHS区分 1 の評価では偽陰性の可能性を  
払拭できないとの判断.

GHS区分 1 の評価が可能で  
申請に適合する試験法は？

## 条文から判断される代替法の使用方法 (2)

代替法を用いて、比較対照物質 (10%硫酸、5%水酸化ナトリウム、5%フェノール) と比べ同等以下の刺激性である劇物の希釈濃度は、毒劇物除外を申請できる。



申請できない

化合物安全性研究所コメント

代替法 (OECD TG437, TG431) における比較対照物質間の反応に大きな差がある。

代替法では、10%硫酸と5%水酸化ナトリウムは眼および皮膚ともに腐食性あり (区分1) の評価となる。

## BCOP法の毒劇物解除利用のための焦点

### 偽陰性の捉え方

- ・ *in vitro*代替法試験は再現性に優れる
- ・ 比較対照物質の反応との関係性

### 偽陰性を減少させる取り組み

# BCOP法の試験法概要

(一部省略)

## BCOP法のガイドライン等

- **OECD**

  - Test guideline 437 (2009年採択、2013年改訂)

- 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 新規試験法評価会議

  - 化学物質の腐食性・強刺激性を科学的に評価できる試験法 (平成21年)

- 厚生労働省医薬食品局

  - 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 (平成26年)

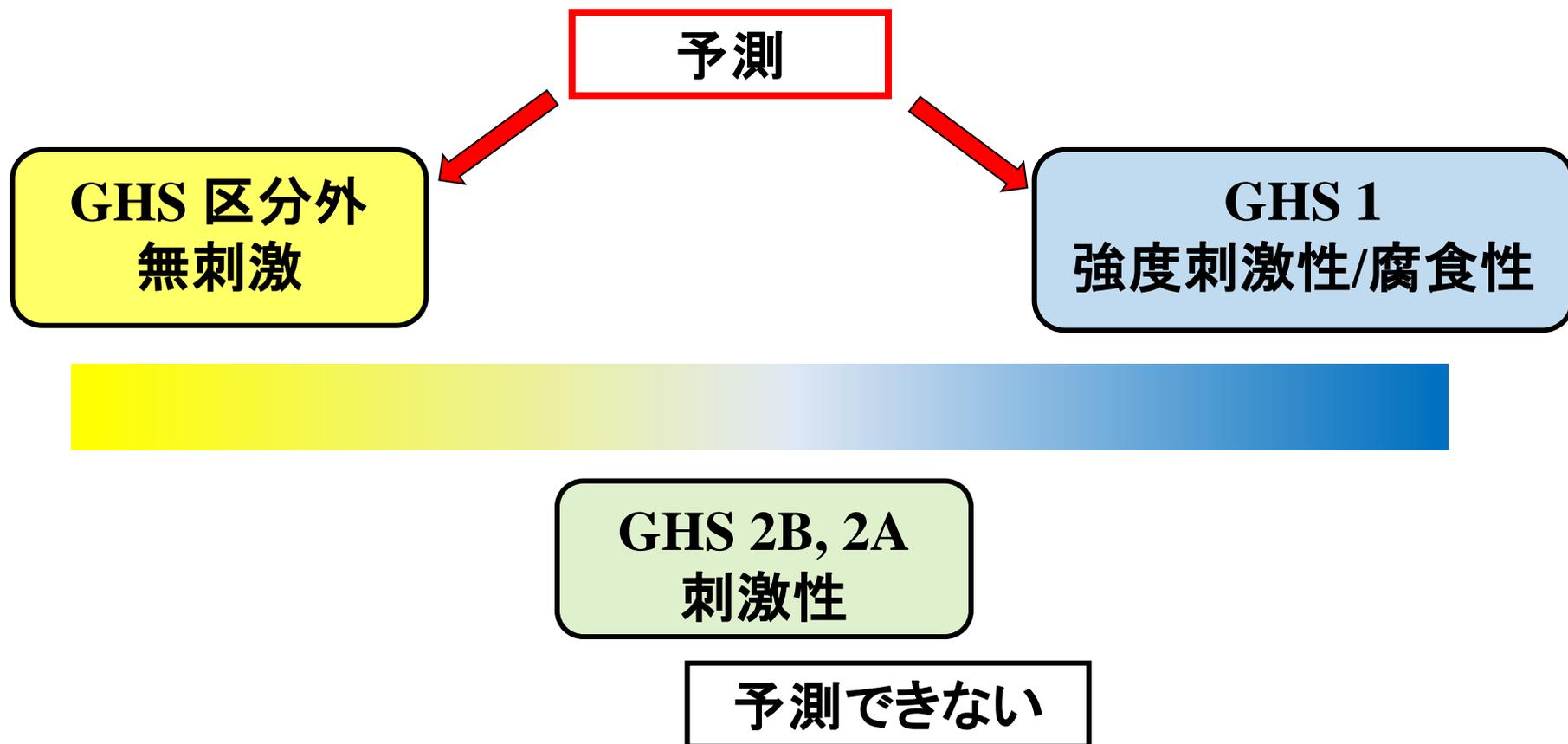
## BCOP法におけるデータ評価

IVIS (*in vitro* 刺激性スコア)

= 平均混濁度 + (15 × 平均透過率OD<sub>490</sub>値)

IVIS	UN GHS
≤ 3	区分外 (無刺激)
> 3 ≤ 55	予測できない
> 55	区分 1

# BCOP法の眼刺激のGHS分類における評価



## 眼刺激代替法試験としてのBCOP法

眼球は生体由来組織で物理的な強度を有し、水に難溶な被験物質等に対する許容範囲が広い。

**GHS 区分外の判定での疑陽性 (over estimate) の比率が他の試験法と比較し高め。偽陰性率は低い。**

**GHS 区分 1 の判定での偽陰性 (under estimate) の比率は他の試験法と比較し同等以下。**

BCOP法でのGHS区分 1 評価における  
病理組織学的検査の有用性  
(一部省略)

# BCOP法の評価精度向上への取組み

GHS区分外判定での over estimate  
弱刺激性物質の評価  
GHS区分 1 判定での under estimate

BCOP法の病理組織学的検査に、角膜上皮の回復性を指標とした病理組織スコアを導入し、眼刺激性のGHS分類の精度を向上させる取組み。

## 角膜の病理標本作製

- ・混濁度と透過度を測定後, 10%中性緩衝ホルマリン液で24時間以上固定.
- ・角膜の中央部から1眼球につき2箇所を切出.
- ・ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し光学顕微鏡で観察.

ホルマリン固定



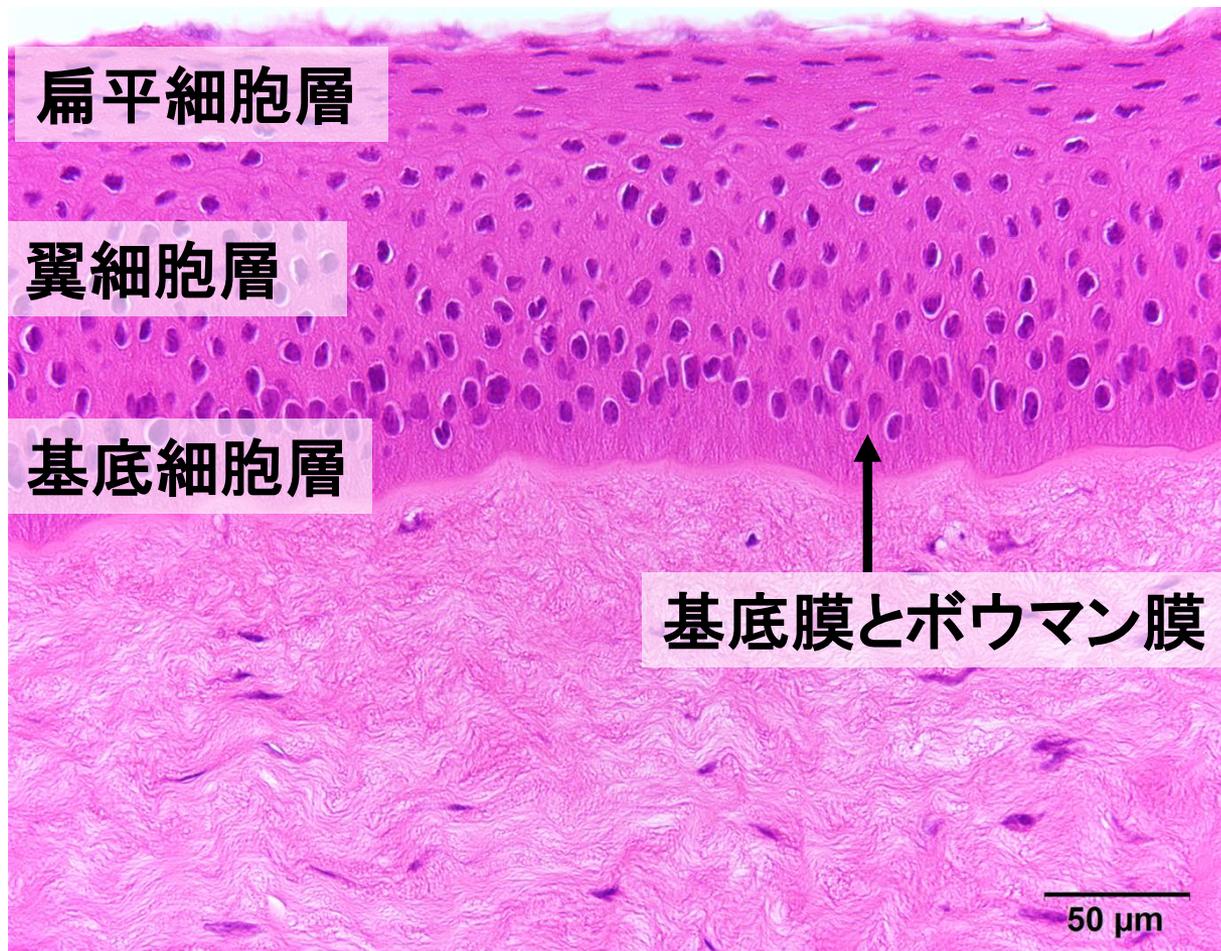
固定後の角膜



HE染色標本



# 眼球角膜の正常像



# 角膜上皮の新生と回復性

角膜上皮は細胞回転により常に新生

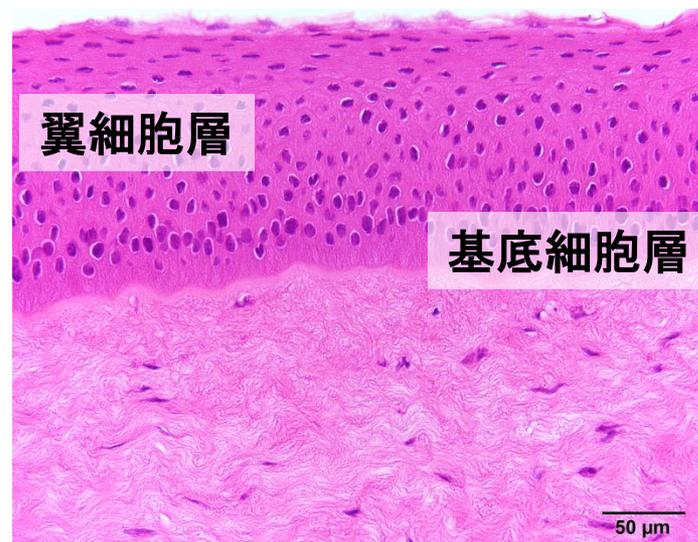
扁平(表層)細胞が脱落



基底細胞が分裂し、一部が翼細胞に分化し表層へ向かって移動し表層細胞となる。

角膜上皮に障害が起こると細胞回転は速くなる。

## 角膜上皮



## BCOP法における病理組織スコアの評点基準

角膜上皮の回復性の維持に重要な基底細胞の変化に着目し角膜上皮の所見にスコア付け。

病理組織スコア	評価基準
0	変化なし
1	扁平細胞層に局限した変化
2	翼細胞層あるいは基底細胞層に至る変化。 ただし、正常な基底細胞が残存している。
3	ほぼ全ての基底細胞が障害されている。 あるいは角膜実質に至る傷害。

# GHS Category 1 物質

GHS区分1の物質の中で $55 < \text{IVIS}$ は12/15であった。3/15物質は $\text{IVIS} \leq 55$ の偽陰性判定であったことから、IVISのみでは毒劇物の判定を誤る可能性が示唆された。これら物質の病理所見を調べたところ、全て角膜上皮の回復性が期待できないスコア3であり、病理評価を加えることで腐食性・強刺激性物質を確実に区分できると考えられた。

## まとめ

BCOP試験に角膜上皮の病理組織学的検査における回復性の指標を加えることで、腐食性・強刺激性物質を確実に弱刺激性および無刺激性物質と区分できると考えられる。