

最終報告書

ウサギ角膜由来細胞株 (SIRC) を用いた細胞毒性試験

2) ニュートラル・レッド取り込み試験

試験担当責任者 資生堂 板垣 宏

[参加研究室および研究者]

鐘紡	:	柿島 博、瀬山義行
コーセー	:	岡本裕子
国立衛試・薬理部	:	大野泰雄、宮島敦子
サンスター	:	小谷麻由美
資生堂	:	板垣 宏、柴田道男
日本メナード	:	小島肇夫
ポーラ	:	谷 尚子、木下成美

1. 序

化粧品及び化粧品原料の眼刺激性は、ウサギを用いるDraizeの眼刺激性試験により検討されている。本試験法では、角膜、虹彩及び結膜に生ずる障害の程度を評価するが、このうち角膜に起こる障害は長期間では治癒する場合もあるが重篤な障害をもたらす可能性があるため、角膜の評価点が総評価点の約7割（80点／110点）を占めている。

角膜に生ずる反応を重点をおいて評価するため、眼刺激性試験の代替法には動物の摘出眼球等の組織を用いる試験やウサギ角膜由来細胞をはじめとして種々の培養細胞を用いる試験法がある。これらは、広い意味では眼の細胞毒性に基づく試験法である。

今回のバリデーションに用いたSIRC細胞(CCL60; Statens Seruminstitut Rabbit Cornea, OcyCtolagus cuniculus)は、ウサギ角膜由来の細胞で、角膜由来では唯一の樹立細胞であり、ATCC(American type culture collection)から購入でき、取扱いが容易であることから、眼刺激性試験代替法の研究で汎用されている。

細胞毒性試験は用いる細胞種と毒性検出法との組み合わせにより数多くの眼刺激性試験代替法が報告されているが、今回のバリデーションでは毒性検出法として、操作手順が簡便であり多くの成書や学術雑誌等に広く記載されているクリスタル・バイオレット染色性試験とニュートラル・レッド取込み試験を選択した。

クリスタル・バイオレット染色性試験は、横浜市立大学木原生物学研究所の梅田誠教授が厚生省から依頼された『筋肉注射剤の局所刺激性試験法』の研究で開発した試験法である。この試験法の基本原理は、クリスタル・バイオレットの染色性（吸光度）が生着細胞数に比例することに基づいており、本法の長所としては、ルーチン試験法として重要な操作が簡便であることはもちろんのこと、またマイクロプレートを用いる他の試験法（例えば、ニュートラル・レッド法やMTT法）では不可能な細胞の形態学的観察も可能である。さらに標本（マイクロプレート）が資料として保管できるところに本法の優位性がある。

ニュートラル・レッド取込み試験は、Borenfreund と Puernerによって開発された方法である。この試験法の基本原理は、ライソゾームに取り込まれたニュートラル・レッド量（吸光度）が生存細胞数に比例することに基づいており、最近では、本毒性検出法を用いたキットも発売されている。

本報告書では、SIRC細胞を用いるニュートラル・レッド取込み試験が眼刺激性試験代替法として適用可能か否かについて、バリデーション結果をもとに報告する。

2. 試験方法

2.1. 被験物質

生理食塩液及び9種の界面活性剤を被験物質として用いた(表1)。

表1. 検体番号及び被験物質

検体番号	被 験 物 質
S-1	Isotonic Sodium Chloride Solution
S-2	Polyoxyethylene Hydrogenated Caster Oil
S-3	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (20E.0.)
S-4	Polyoxyethyleneglycol Monolaurate (10E.0.)
S-5	Sodium N-Lauroyl Sarcosinate
S-6	Sodium Hydrogenated Tallow L-Glutamate
S-7	Sodium Lauryl Sulfate
S-8	Sodium Polyoxyethylene Laurylether Sulfate (2E.0.)
S-9	Polyoxyethylene Octylphenylether (10E.0.)
S-10	Benzalkonium Chloride

2.2. 細胞、培養液、試薬及び培養器具等

SIRC細胞(ATCC CCL60、Lot. No. 091492)は大日本製薬株式会社を通して購入し、国立衛生試験所細胞バンクで増殖させた後、各参加機関に配布した。

培養液はGIBCO社のMEM粉末(Cat. No. 410-1100EF、Lot. No. 64N5521)に炭酸水素ナトリウムを加えてpHを調製した後、GIBCO社の仔ウシ血清(Lot. No. 45K4613)を10%濃度になるように添加して用いた。また、試験の再現性の向上を図るため使用する96穴マイクロプレート(BECTON DICKINSON社、Lot. No. 12871112)の製造メーカー及び製造ロットを統一した。

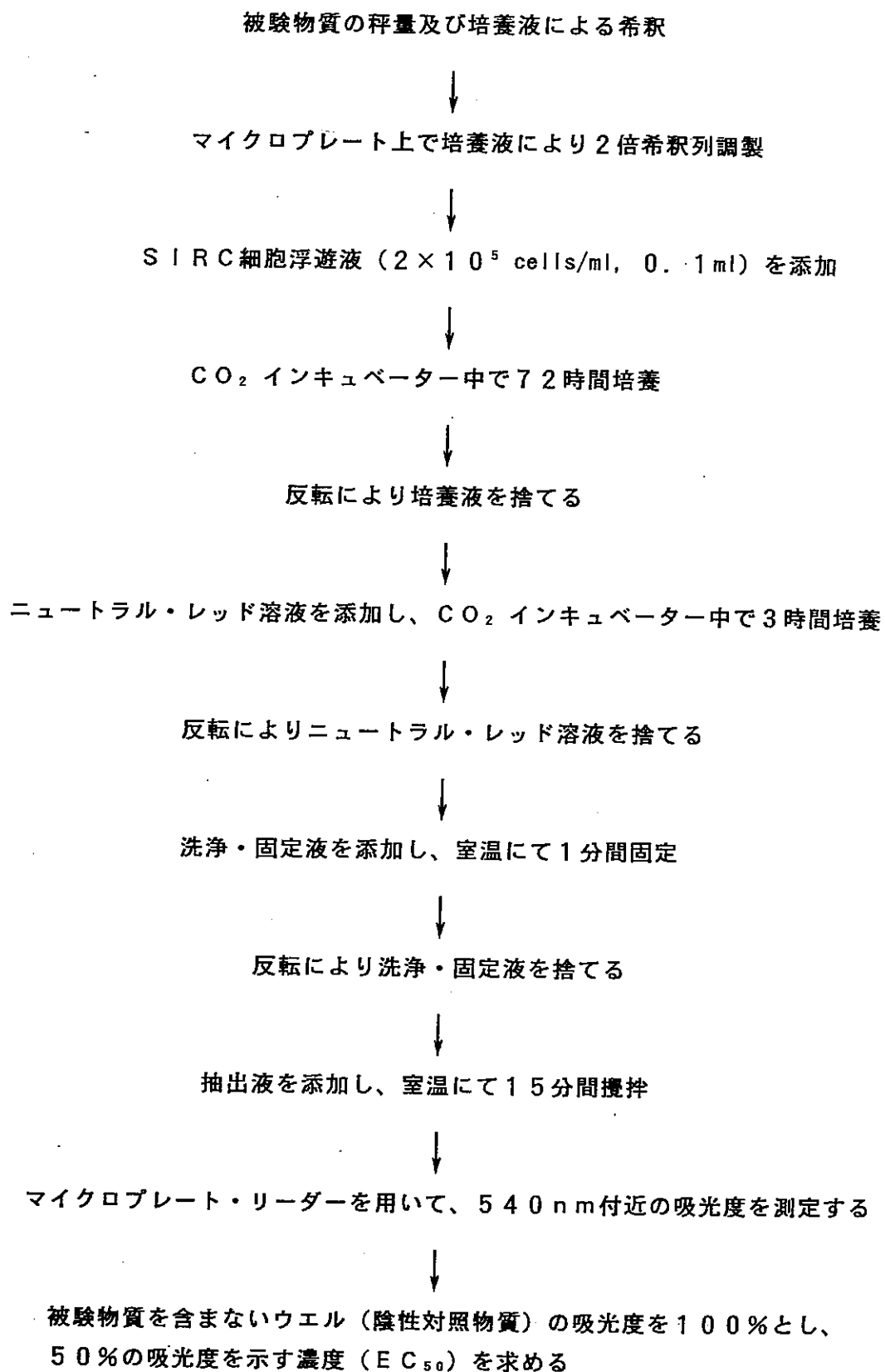
その他の試薬及び培養器具に関しては、製造メーカー及び製造ロットの統一を図らなかった。

2.3. 試験法プロトコルの要約

使用したプロトコルは別添資料とするが、基本的な操作概要は、以下の通り。

被験物質を秤量した後、培養液もしくは適切な溶媒にて溶解もしくは懸濁して被験物質の溶液(被験溶液)を調製する。96穴マイクロプレート上で被験溶液の2倍希釈列を調製した後、SIRC細胞浮遊液を添加し、72時間培養する。反転により培養液を捨てた後、ニュートラル・レッド溶液を添加し、CO₂インキュベーター中で3時間培養する。反転によりニュートラル・レッド溶液を捨てた後、洗浄・固定液を添加し、室温にて1分間固定する。反転により洗浄・固定液を捨てた後、抽出液を添加し、室温にて15分間攪拌し、マイクロプレート・リーダーを用いて、590nm付近の吸光度を測定する。被験物質を含まないウェル(陰性対照物質)の吸光度を100%とし、50%の吸光度を示す濃度(EC₅₀)を求める。

< S I R C細胞を用いるニュートラル・レッド取込み試験の操作概要 >



3. 試験結果

3.1. 細胞生存率の用量作用曲線

用量作用曲線の一例として、研究室Aが実施した結果を図1及び図2に示す。S-1を除く被験物質においては、濃度の上昇に従い細胞生存率(%)は減少した。また、S-1では、試験のSOPで規定した最高濃度である10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (試験のプロトコルでは2% (20000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を被験物質溶液の最高濃度と規定したため、細胞浮遊液を等量添加後は、その1/2が最高濃度となる) でも細胞生存率の減少は認められなかった。この図から、細胞生存率(%)が50%となる濃度 (EC_{50} 値) を求めた。

3.2. 各研究室が提出してきた EC_{50} 値

各研究室が提出してきた EC_{50} 値を表2に示す。試験のプロトコルでは、各研究室が所持しているSLS (Sodium Lauryl Sulfate) の値を含めて2回の試験結果を求めた。

また、2回の試験結果について、提出された EC_{50} 値の比を表3に示した。最下段の平均は各研究室の試験の再現性の一指標であり、最右段の平均は被験物質に特有な再現性の一指標と考えられる。まず、研究室内の再現性の観点から見ると、平均が1.146と公比の2.0以下であることから、試験のプロトコルで規定した2倍希釈系列の濃度段階でも研究室内の再現性は認められることが推察された。

さらに、被験物質に観点から見ると、2以上の値が得られているのはS-4 (研究室C) 及びS-10 (研究室B) のみであり、それらの被験物質の平均はそれぞれ1.284及び1.293であり、それ程大きい値ではなかった。なお、研究室OのSLSでは EC_{50} 値の比は求められなかった。

次に、研究室間の再現性を見るために、各研究室が提出してきた2回の試験結果の平均からもとめた平均と標準偏差及び変動係数を表4に示す。また、研究室間の再現性を視覚的に理解できるように図3に表した。その結果、S-2～S-10の変動係数は0.148～0.551で、変動係数の平均及び標準偏差は0.304 \pm 0.124であり、研究室間の再現性は認められたものと考えられる。変動係数が0.3より大きい被験物質はS-2、S-9、S-5及びS-10であった。この内、S-2は培養液には溶けにくい物質であり、溶解性が再現性に影響したものと考えられる。

さらに、研究室間の再現性の他の指標として表4の平均値に対して大きい方から順位をつけ、研究室間の平均値の順位との順位相関係数をSpearmanの方法により求めた(表5)。その結果、順位相関係数は1.0～0.964であり、非常に良い再現性が認められた。

以上のことから、一部の例を除き、本試験法において、研究室内及び研究室間の再現性は認められたものと考えられる。

4. 試験のプロトコルの改訂のポイント

今回の試験では培養液による2倍希釈系列の濃度段階を用いたが、次回は濃度段階を以下のように改訂する。

①細胞生存率が20～80%間に少なくとも3点が入る濃度段階を用いる。

②ただし、濃度段階の公比が1.1より小さい場合はこの限りではない。

なお、改訂プロトコルは別添資料とする。

5. 眼刺激性試験結果との対応性の検討

5.1. 眼刺激性試験の観察項目との対応性の検討

対応性の検討に用いたインビボ眼刺激性試験結果を表6に示す。また、インビトロ試験結果の値としては表4の平均を用いた。SIRC細胞を用いるニュートラル・レッド取込み試験（NR法）とインビボ眼刺激性試験結果との対応性を図4～7に示し、また、その回帰式及び相関係数は表7にまとめた。

インビボ眼刺激性試験の観察項目の中でインビトロ試験結果と最も良い対応性を示したのは、結膜評価点であり、相関係数の平均及び標準偏差は 0.865 ± 0.006 であった。また、結膜評価点の項目の中で最大値、24時間値、面積比及び部位面積比には大きな差異は認められなかった。

次いでインビトロ試験結果と良い対応性を示したのは、総評価点であり、相関係数の平均及び標準偏差は 0.824 ± 0.031 であった。また、総評価点の項目の中では最大値が結膜評価点と同程度の良い対応性を示し、以下、面積比、24時間値の順であった。

角膜評価点との相関係数の平均及び標準偏差は 0.785 ± 0.031 であった。また、角膜評価点項目の中では最大値が総評価点と同程度の対応性を示し、以下、面積比及び部位面積比、24時間値の順であった。

最も対応性が低かったのは虹彩評価点であり、相関係数の平均及び標準偏差は 0.700 ± 0.190 であった。また、虹彩評価点項目の中では24時間値が最も対応性が低く、他の最大値、面積比及び部位面積比は角膜評価点と同程度の対応性を示した。

つまり、インビトロ試験結果と最も良い対応性を示したのは結膜評価点であり、その他の観察項目については、総評価点（最大）及び虹彩評価点（24時間値）を除いて、対応性は同程度であった。

5.2. 総評価点が20前後における対応性

総評価点が20になる EC_{50} 値は、総評価点（最大値）を一例とすると、回帰式、 $y = 85.767 - 26.038 \cdot \log x$ の y に20を代入し、 x についての方程式を解くと EC_{50} 値として335.6が推定される。インビボ試験結果とインビトロ試験結果をそれぞれ20及び335.6（推定値）で分類して対応性を検討した（表8）。また、表8の結果をBalls等が報告している対応性の指標に従い表9にまとめた。

20前後で分類した場合、今回の被験物質のなかでfalse positiveと評価されるものは、S-7のみであり、またfalse negativeは認められなかったことから、対応性の指標の観点においても良い値が得られた。

以上のことから、回帰式よりDraize試験の総評価点（最大）が20点となるEC₅₀値を求め、その前後で分類する本法は有用であると思われる。

5.3. ニュートラル・レッド法とクリスタル・バイオレット法との比較

毒性検出法の相違が評価に与える影響を検討する目的で、今回のバリデーションで実施したSIRC細胞を用いるニュートラル・レッド法とクリスタル・バイオレット法との結果についてまとめた（表10、図8）。

ニュートラル・レッド法とクリスタル・バイオレット法の差に関しては、順位相関の観点からは、2試験法間に相違は全く認められなかった。また、Draize試験の総評価点（最大値）との順位相関係数はいずれの試験法においても0.961～0.964であり、Draize試験の総評価点とSIRC細胞を用いる試験との間に良い対応性が認められた。

つまり、界面活性剤を被験物質とする場合においては、ライソゾームへの取り込みを指標とするニュートラル・レッド法と細胞の生着性を指標とするクリスタル・バイオレット法には試験法差が認められないこと、また両試験法ともDraize試験の総評価点との間に良い対応性の認められることが示唆された。

6. まとめ

SIRC細胞を用いるニュートラル・レッド取込み試験が眼刺激性試験代替法として適用可能か否かを検討する目的で、界面活性剤を被験物質とする第一次バリデーションを実施した。

参加研究室から提出されたニュートラル・レッド取込み試験結果の解析では、研究室内及び研究室間の再現性が認められ、またDraize試験の観察項目（総評価点、角膜評価点、虹彩評価点及び結膜評価点）との間に良い対応性が認められた。

このことから、被験物質が培養液に溶解する界面活性剤等の場合においては、SIRC細胞を用いるニュートラル・レッド取込み試験が眼刺激性試験代替法として適用可能と考えられる。

最後に、今回使用したSIRC細胞に関して、参加研究室から提出された品質管理データ（倍加時間を除き、参加項目は任意）を表11にまとめたので参考にされたい。

図1. SIRC細胞 (NR法) その1

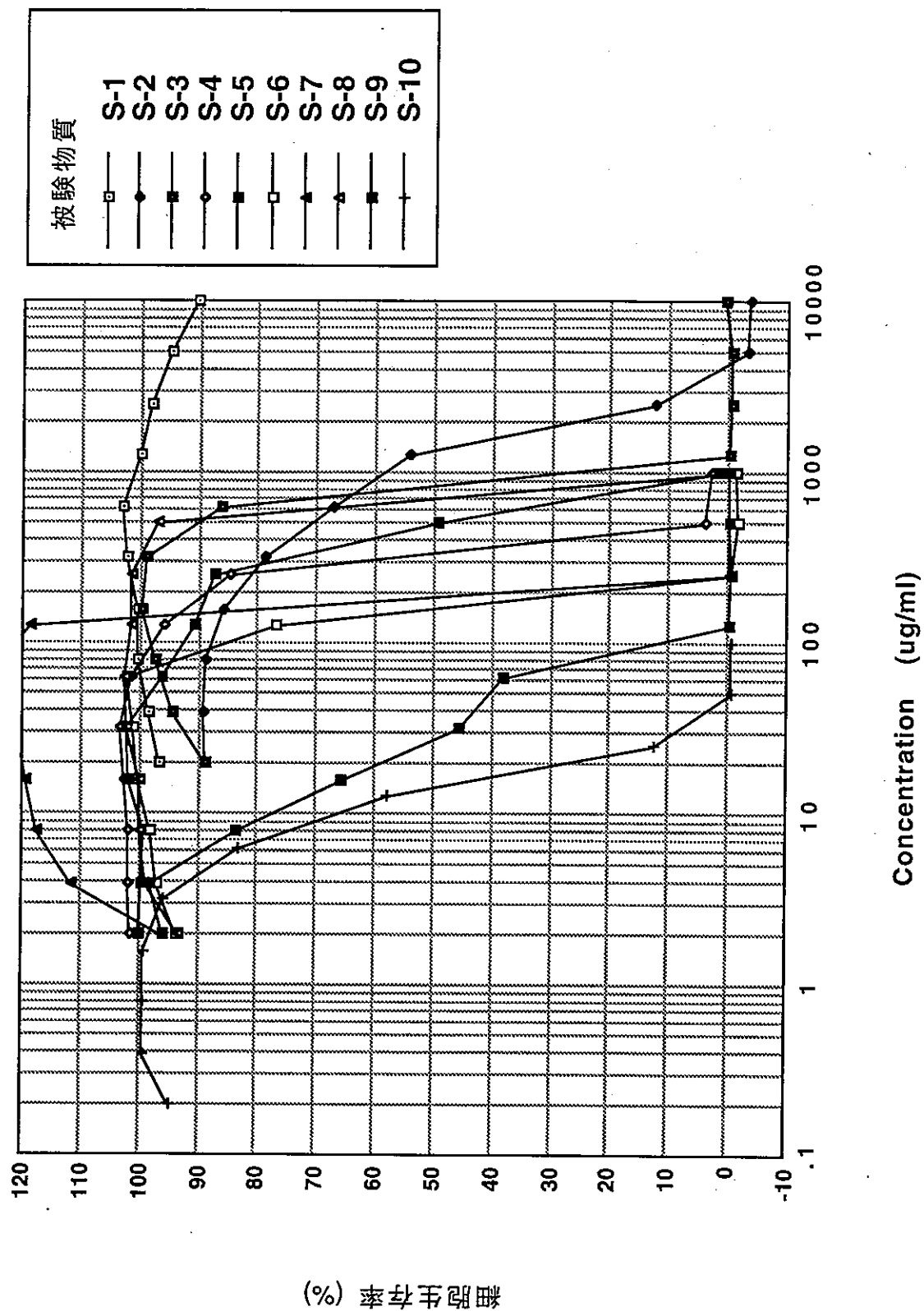


図2. SIRC細胞 (NR法) その2

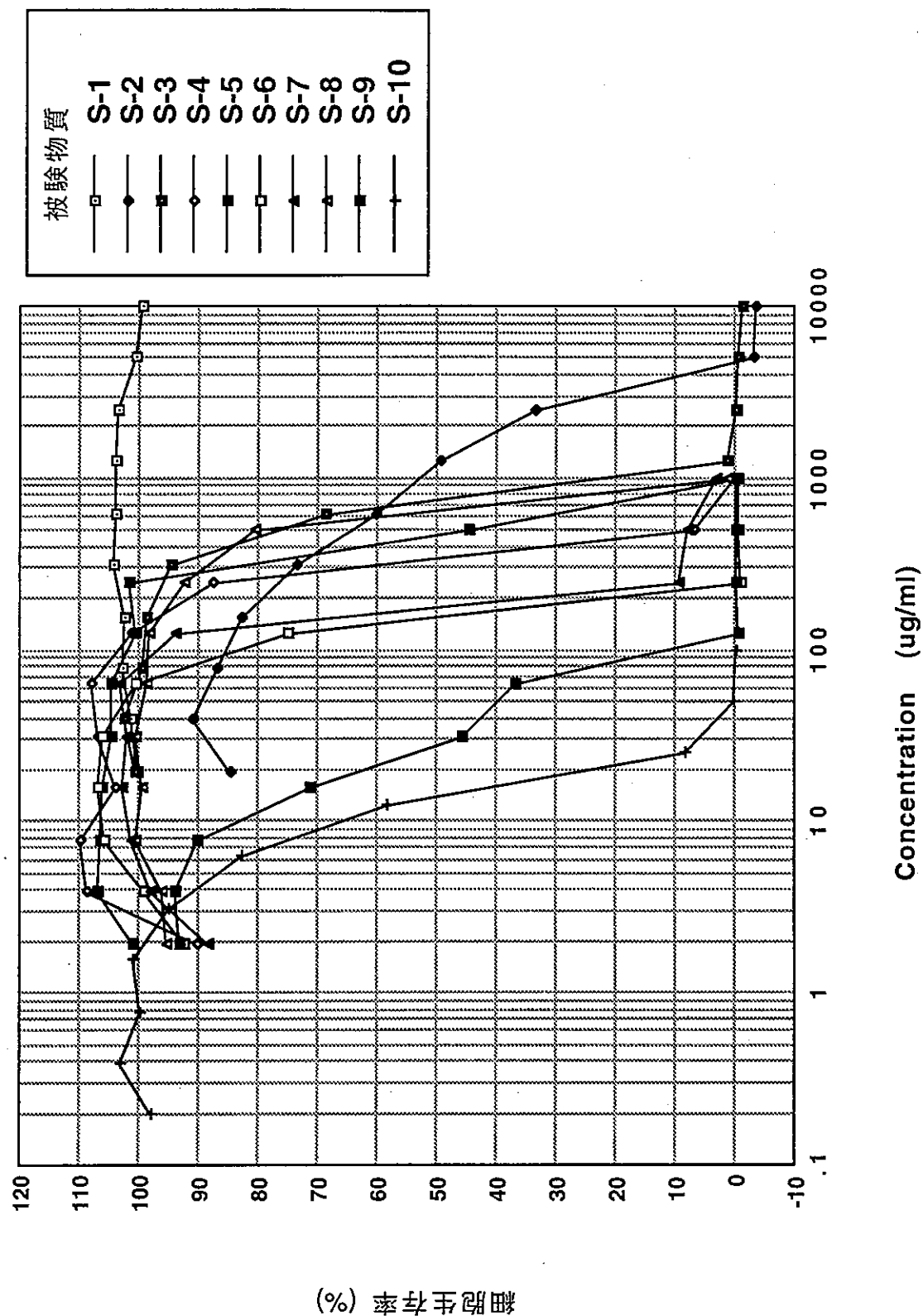


表2. 各研究室提出 E C₅₀ 値

研究室 試料番号	A		B		C		D		G		L		O	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
S-1	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>500000	>500000
S-2	1337.3	1198.2	>10000	1992	6440.6	5935.0	3600	3400	2295.1	1845.5	1550.0	1550.0	4184.85	3444.10
S-3	835.5	756.5	839	814	925.9	1230.8	800	820	933.51	932.73	820.0	720.0	1358.30	1456.40
S-4	336.7	344.5	367.3	344.8	675.4	317.4	370	380	556.78	530.59	300.0	320.0	709.05	434.96
S-5	491.9	467.1	635.6	444.1	475.1	416.0	560	550	130.46	127.64	350.0	390.0	634.03	543.20
S-6	159.1	157.2	127.9	130.7	147.3	148.9	175	168	98.97	89.61	95.0	153.0	232.08	167.88
S-7	186.6	178.9	175.6	171.9	115.0	119.0	180	174	188.70	199.92	160.0	175.0	183.50	183.63
S-8	699.7	652.1	659.2	635.6	895.8	893.2	700	700	733.39	744.90	450.0	450.0	738.02	499.00
S-9	26.8	27.8	52.8	39.3	43.0	55.6	63	63	25.77	26.78	22.0	21.0	63.31	55.11
S-10	14.1	14.0	13.82	34.86	12.5	12.6	14.2	16.2	16.46	18.22	11.7	14.5	28.78	29.61
S L S	175.9	175.0	183.1	179.3	114.8	122.0	170	175	199.99	190.90	145.0	175.0		186.20

注1: 単位は $\mu\text{g}/\text{ml}$

S-1: Isotonic Sodium Chloride Solution、S-2: Polyoxyethylene Hydrogenated Castor Oil

S-3: Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (20E, 0.)、S-4: Polyoxyethyleneglycol Monolaurate (10E, 0.)

S-5: Sodium N-Lauroyl Sarcosinate、S-6: Sodium Hydrogenated Tallow L-Glutamate

S-7: Sodium Lauryl Sulfate、S-8: Sodium Polyoxyethylene Lauryl ether Sulfate (2E, 0.)

S-9: Polyoxyethylene Octylphenylether (10E, 0.)、S-10: Benzalkonium Chloride

S L Sは各研究室で所持しているSodium Lauryl Sulfate

表3. 各研究室提出E C₅₀値における2試験間の比

試験番号/研究室	A	B	C	D	G	L	O	平均
S-1	—	—	—	—	—	—	—	—
S-2	1.116	—	1.085	1.059	1.244	1.000	1.215	1.120
S-3	1.104	1.031	1.329	1.025	1.001	1.139	1.072	1.100
S-4	1.023	1.065	2.128	1.027	1.049	1.067	1.630	1.284
S-5	1.053	1.431	1.420	1.018	1.022	1.114	1.167	1.175
S-6	1.012	1.022	1.011	1.042	1.104	1.611	1.382	1.169
S-7	1.043	1.022	1.035	1.034	1.059	1.094	1.001	1.041
S-8	1.073	1.037	1.003	1.000	1.016	1.000	1.479	1.087
S-9	1.037	1.344	1.293	1.000	1.039	1.048	1.149	1.130
S-10	1.007	2.522	1.008	1.141	1.107	1.239	1.029	1.293
S L S	1.005	1.021	1.063	1.029	1.048	1.207	—	1.062
平均	1.047	1.277	1.238	1.038	1.069	1.152	1.236	1.146

注:

- S-1: Isotonic Sodium Chloride Solution、S-2: Polyoxyethylene Hydrogenated Caster Oil
 S-3: Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (20E, 0.)、S-4: Polyoxyethylene glycol Monolaurate (10E, 0.)
 S-5: Sodium N-Lauroyl Sarcosinate、S-6: Sodium Hydrogenated Tallow L-Glutamate
 S-7: Sodium Lauryl Sulfate、S-8: Sodium Polyoxyethylene Lauryl ether Sulfate (2E, 0.)
 S-9: Polyoxyethylene Octylphenylether (10E, 0.)、S-10: Benzalkonium Chloride
 S L Sは各研究室で所持しているSodium Lauryl Sulfate

表4. ニュートラル・レッド取り込み試験の統計処理

試料名	A	B	C	D	G	L	O	平均	標準偏差	変動係数
S-1	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>500000	>10000	—	—
S-2	1267.8	1992.0	6187.8	3500.0	2070.3	1550.0	3814.5	2911.8	1603.8	0.551
S-3	796.0	826.5	1078.4	810.0	933.1	770.0	1407.4	945.9	229.8	0.243
S-4	340.6	356.1	496.4	375.0	543.7	310.0	572.0	427.7	106.7	0.250
S-5	479.5	539.9	445.6	555.0	129.1	370.0	588.6	444.0	157.2	0.354
S-6	158.2	129.3	148.1	171.5	94.3	124.0	200.0	146.5	34.5	0.236
S-7	182.8	173.8	117.0	177.0	194.3	167.5	183.6	170.9	25.2	0.148
S-8	675.9	647.4	894.5	700.0	739.1	450.0	618.5	675.1	133.9	0.198
S-9	27.3	46.1	49.3	63.0	26.3	21.5	59.2	41.8	16.8	0.402
S-10	14.1	24.3	12.6	15.2	17.3	13.1	29.2	18.0	6.4	0.354
S L S	175.5	181.2	118.4	172.5	195.4	160.0	186.2	169.9	25.3	0.149

注1：単位は $\mu\text{g}/\text{ml}$

S-1：Isotonic Sodium Chloride Solution、S-2：Polyoxyethylene Hydrogenated Caster Oil
S-3：Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (20E, 0.)、S-4：Polyoxyethyleneglycol Monolaurate (10E, 0.)
S-5：Sodium N-Lauroyl Sarcosinate、S-6：Sodium Hydrogenated Tallow L-Glutamate
S-7：Sodium Lauryl Sulfate、S-8：Sodium Polyoxyethylene Lauryl ether Sulfate (2E, 0.)
S-9：Polyoxyethylene Octylphenylether (10E, 0.)、S-10：Benzalkonium Chloride
S L Sは各研究室で所持しているSodium Lauryl Sulfate

図3. SIRC細胞 (NR法) の再現性

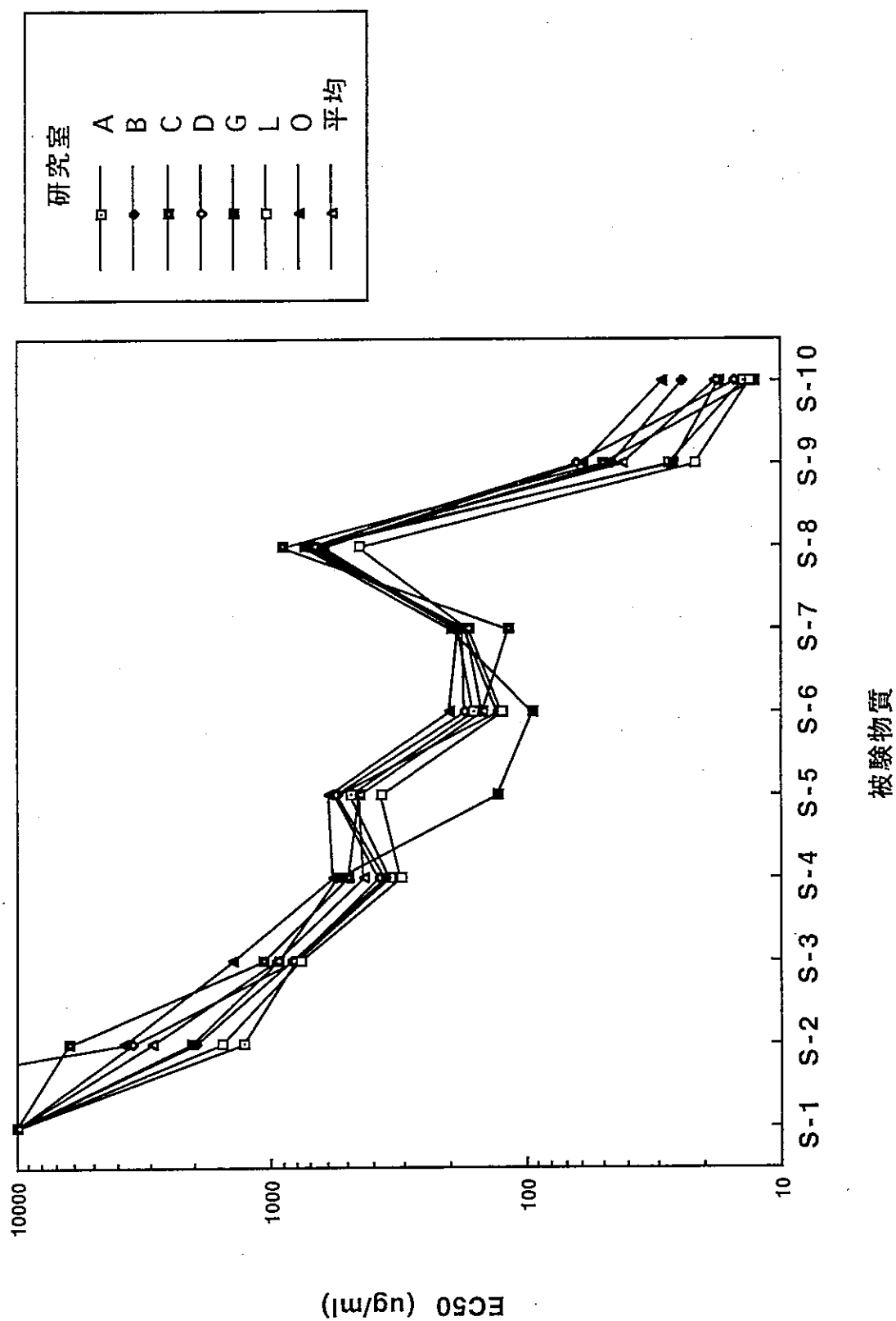


表 5. 平均値との順位相関係数

検体番号 \ 研究室	平均値	A	B	C	D	G	L	O
S-1	I	I	I	I	I	I	I	I
S-2	II	II	II	II	II	II	II	II
S-3	III	III	III	III	III	III	III	III
S-4	VI	VI	VI	V	VI	V	VI	VI
S-5	V	V	V	VI	V	VII	V	V
S-6	VIII	VIII	VII	VII	VIII	VIII	VIII	VII
S-7	VII	VII	VII	VIII	VII	VI	VII	VIII
S-8	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV
S-9	IX	IX	IX	IX	IX	IX	IX	IX
S-10	X	X	X	X	X	X	X	X
平均値との順位相関係数 (Spearman)		1.0	1.0	0.976	1.0	0.964	1.0	0.988

注：E C₅₀値の大きい方から、順に I から X まで順位をつけた

表 6. Draize眼刺激性試験の結果

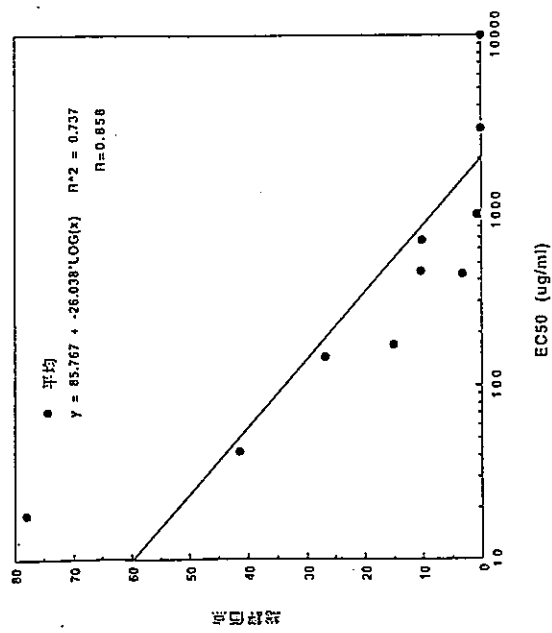
検体番号	最 大				24時間				面積比				部位面積比			
	総評値点	角膜評値点	虹彩評値点	結膜評値点	総評値点	角膜評値点	虹彩評値点	結膜評値点	総評値点	角膜評値点	虹彩評値点	結膜評値点	角膜評値点	虹彩評値点	結膜評値点	総評値点
S-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S-3	0.7	0	0	0.7	0	0	0	0	0.1	0	0	0.1	0	0	0	0
S-4	3.3	0	0	3.3	0	0	0	0	0.2	0	0	0.2	0	0	0	0.9
S-5	10.3	8.3	0	8.0	8.3	5.0	0	3.3	3.4	1.9	0	1.5	1.6	0	0	8.3
S-6	26.7	16.7	1.7	12.0	26.7	16.7	0	10.0	14.9	10.7	0.8	3.5	14.7	8.4	19.4	19.4
S-7	15.0	8.3	0	10.0	14.7	6.7	0	8.0	7.1	4.2	0	3.0	5.7	0	16.4	16.4
S-8	10.0	3.3	0	10.0	2.7	0	0	2.7	2.0	0.7	0	1.4	0.9	0	7.4	7.4
S-9	41.3	30.0	5.0	10.0	24.7	15.0	1.7	8.0	26.9	18.4	2.3	6.3	25.2	24.8	34.8	34.8
S-10	78.0	66.7	5.0	14.7	78.0	66.7	0	11.3	57.3	43.9	2.5	10.9	60.4	27.5	60.1	60.1

表7. SIRC細胞（NR法）を用いる試験法の回帰式及び相関係数

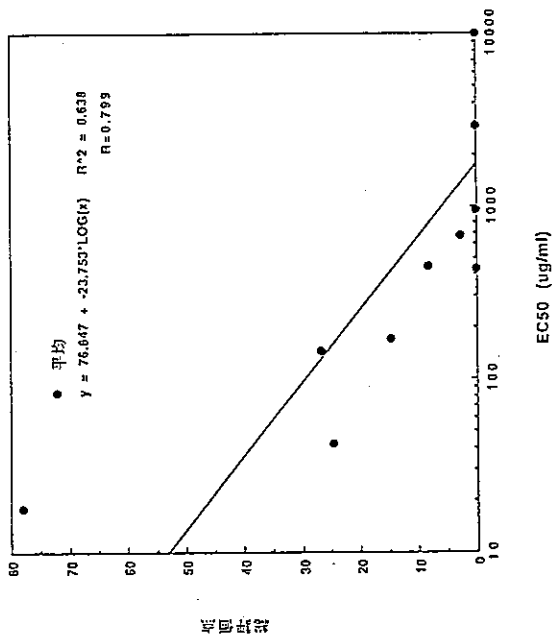
	方 法	回 帰 式	相 関 係 数
総評価点（最大） （24時間） （面積比）	N R	$y=85.767-26.038*\text{Log}x$	-0.858
	N R	$y=76.847-23.753*\text{Log}x$	-0.799
	N R	$y=58.579-18.352*\text{Log}x$	-0.814
角膜評価点（最大） （24時間） （面積比） （部位面積比）	N R	$y=67.575-21.007*\text{Log}x$	-0.813
	N R	$y=59.244-18.679*\text{Log}x$	-0.741
	N R	$y=43.094-13.606*\text{Log}x$	-0.792
	N R	$y=59.249-18.706*\text{Log}x$	-0.792
虹彩評価点（最大） （24時間） （面積比） （部位面積比）	N R	$y=6.407-2.028*\text{Log}x$	-0.792
	N R	$y=0.874-0.273*\text{Log}x$	-0.414
	N R	$y=3.050-0.968*\text{Log}x$	-0.796
	N R	$y=33.543-10.642*\text{Log}x$	-0.796
結膜評価点（最大） （24時間） （面積比） （部位面積比）	N R	$y=21.605-5.706*\text{Log}x$	-0.860
	N R	$y=16.729-4.802*\text{Log}x$	-0.861
	N R	$y=12.436-3.779*\text{Log}x$	-0.870
	N R	$y=68.398-20.785*\text{Log}x$	-0.870

図4. SIRC細胞（NR法）と総評価点との対応性

1) 最大値との対応性



2) 24時間値との対応性



3) 面積比との対応性

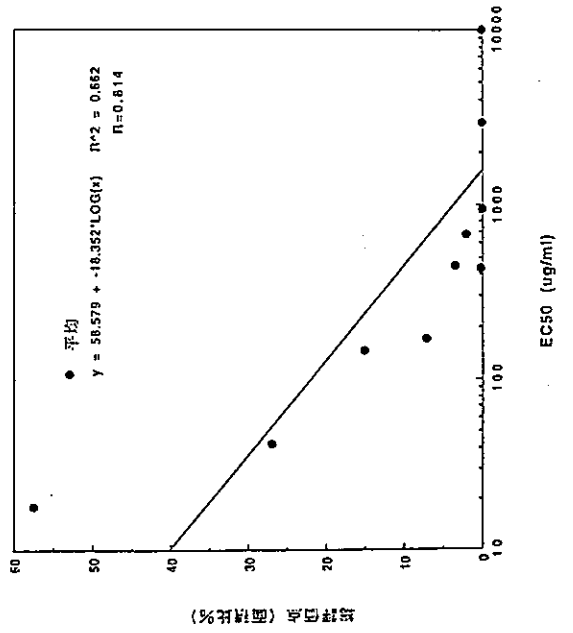
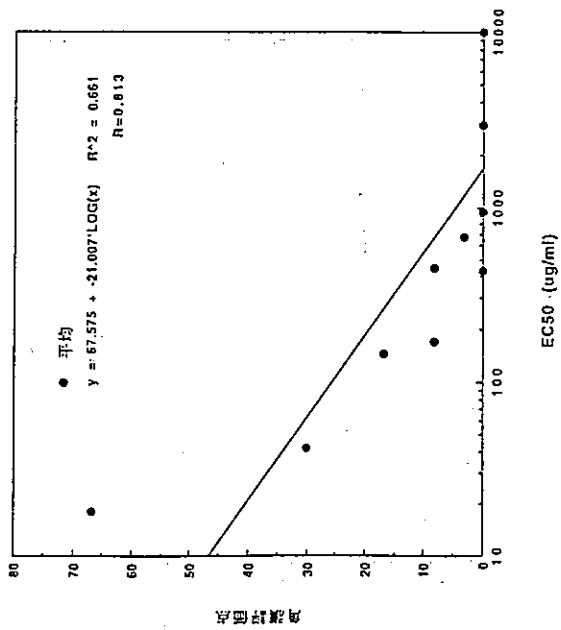
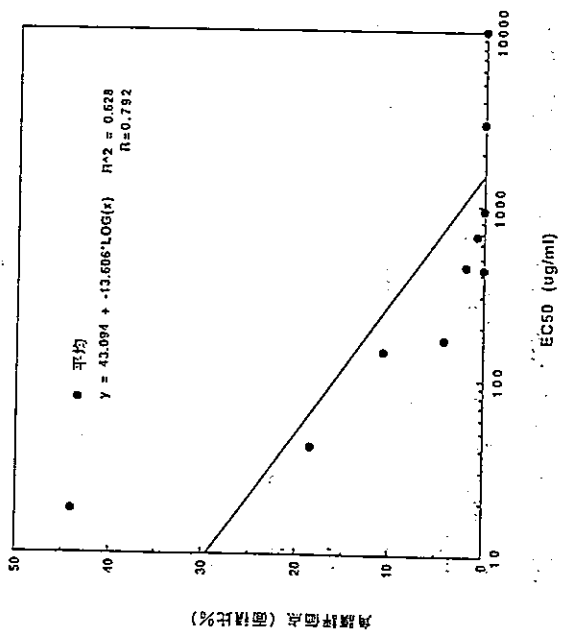


図5. SIRC細胞 (NR法) と角膜評価点との対応性

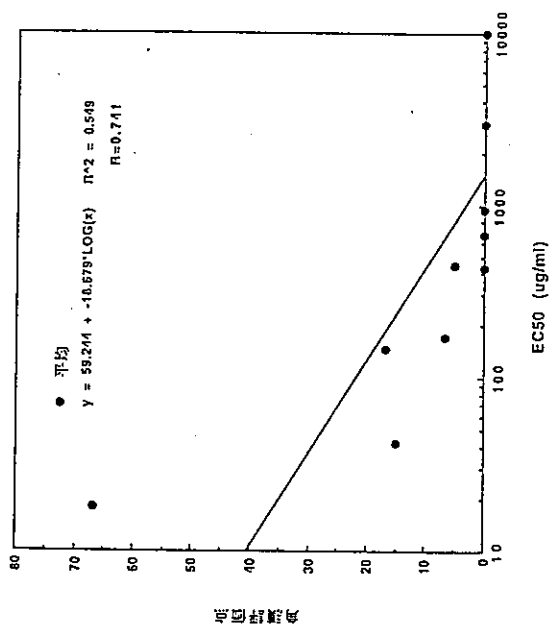
1) 最大値との対応性



3) 面積比との対応性



2) 24時間値との対応性



4) 部位面積比との対応性

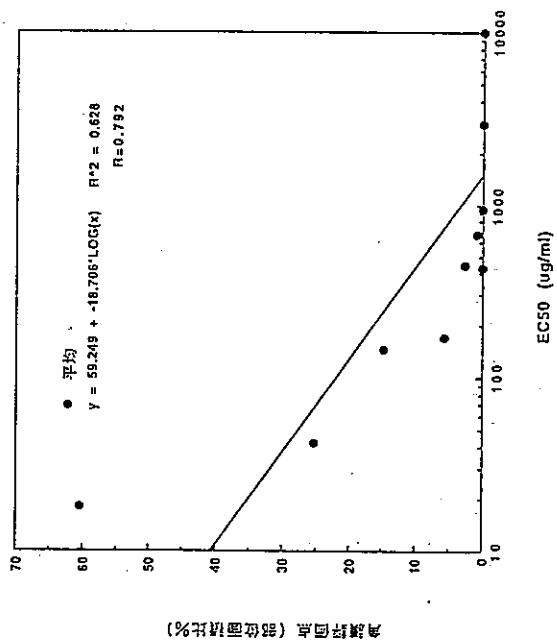
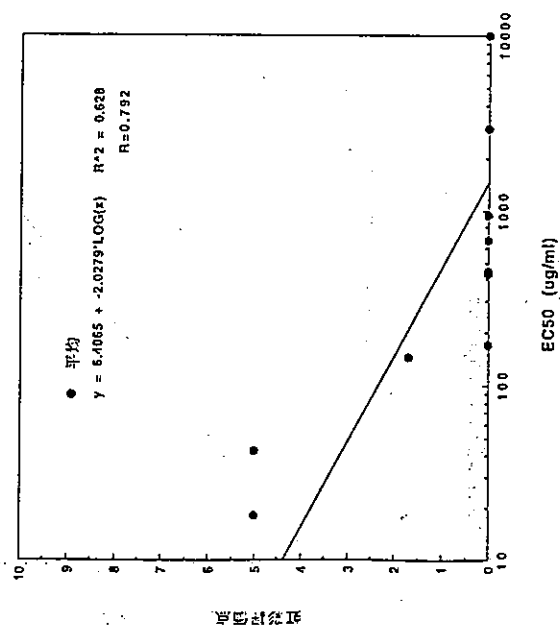
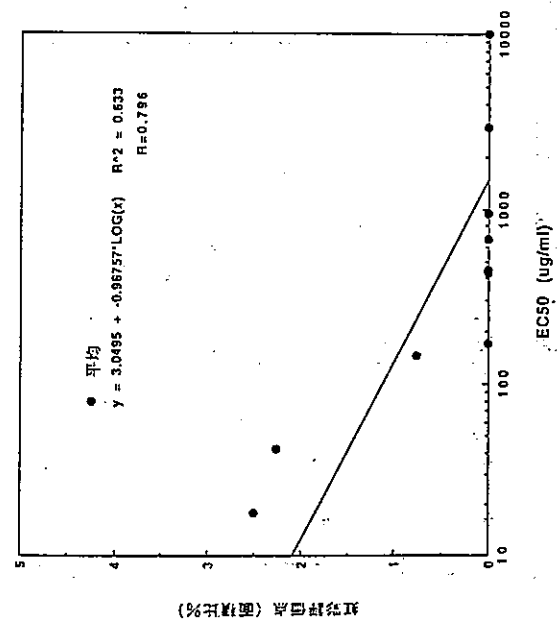


図6. SIRC細胞 (NR法) と虹彩評価点との対応性

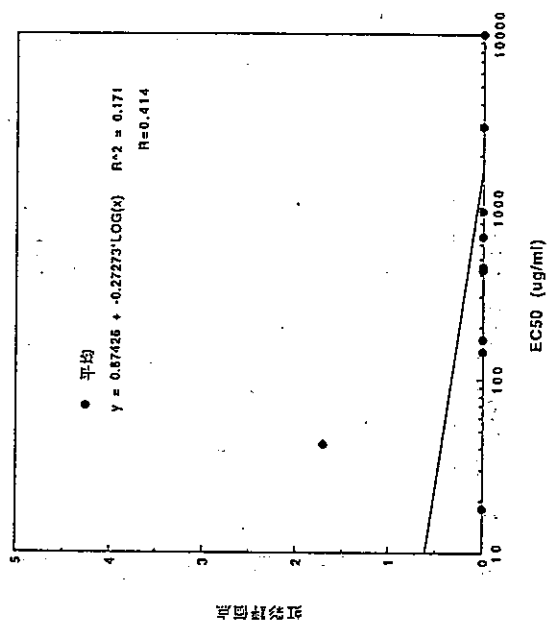
1) 最大値との対応性



3) 面積比との対応性



2) 24時間値との対応性



4) 部位面積比との対応性

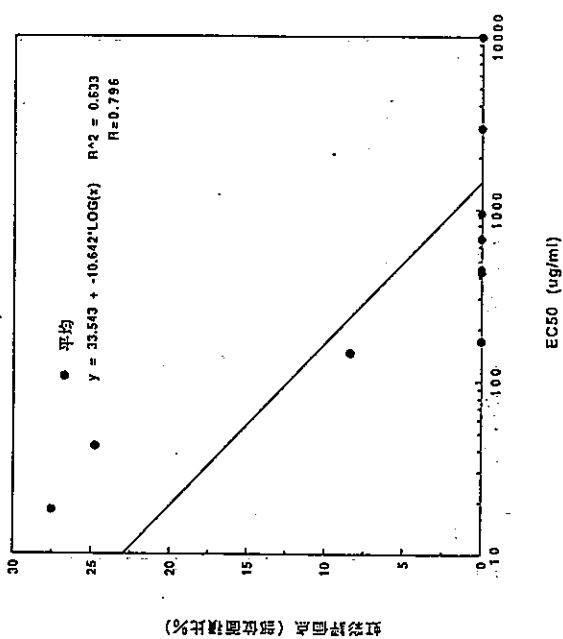
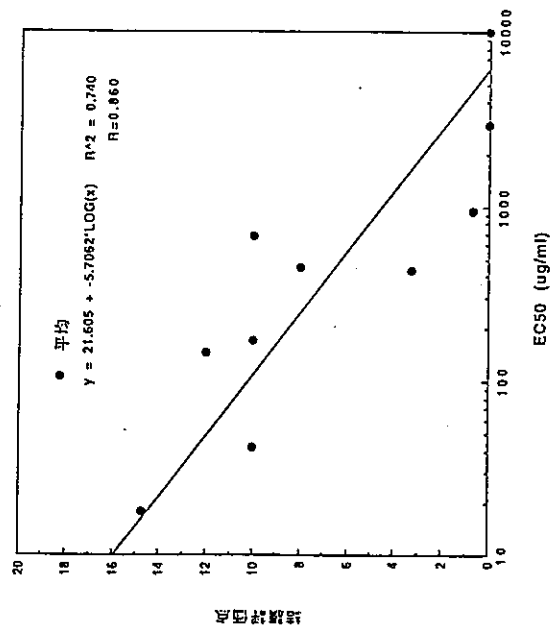
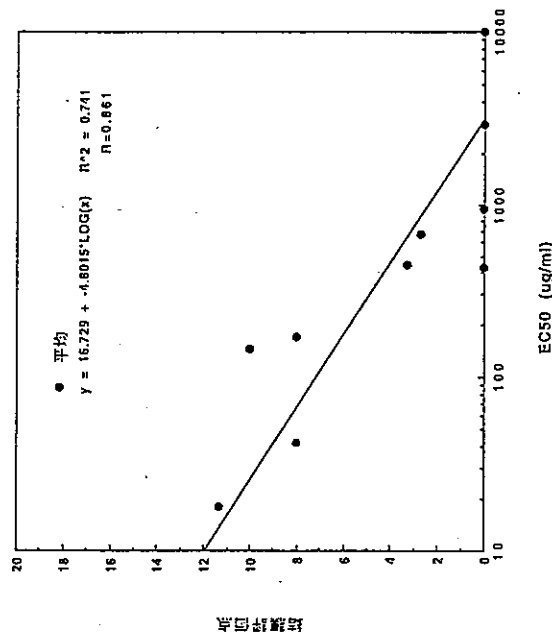


図7. SIRC細胞 (NR法) と結膜評価点との対応性

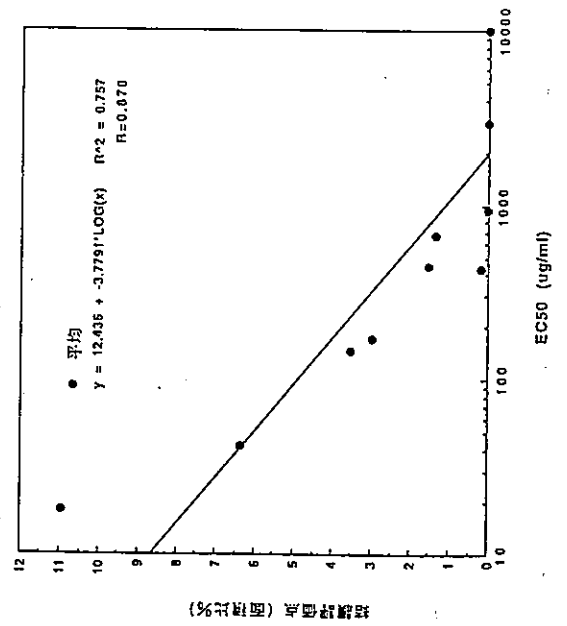
1) 最大値との対応性



2) 24時間値との対応性



3) 面積比との対応性



4) 部位面積比との対応性

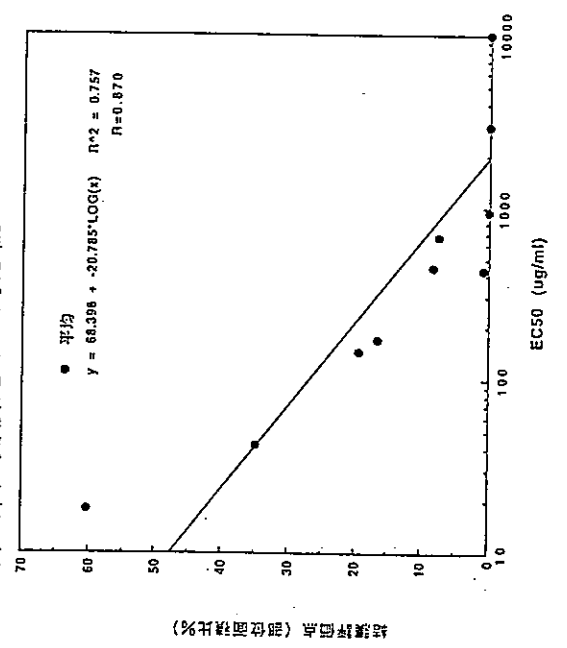


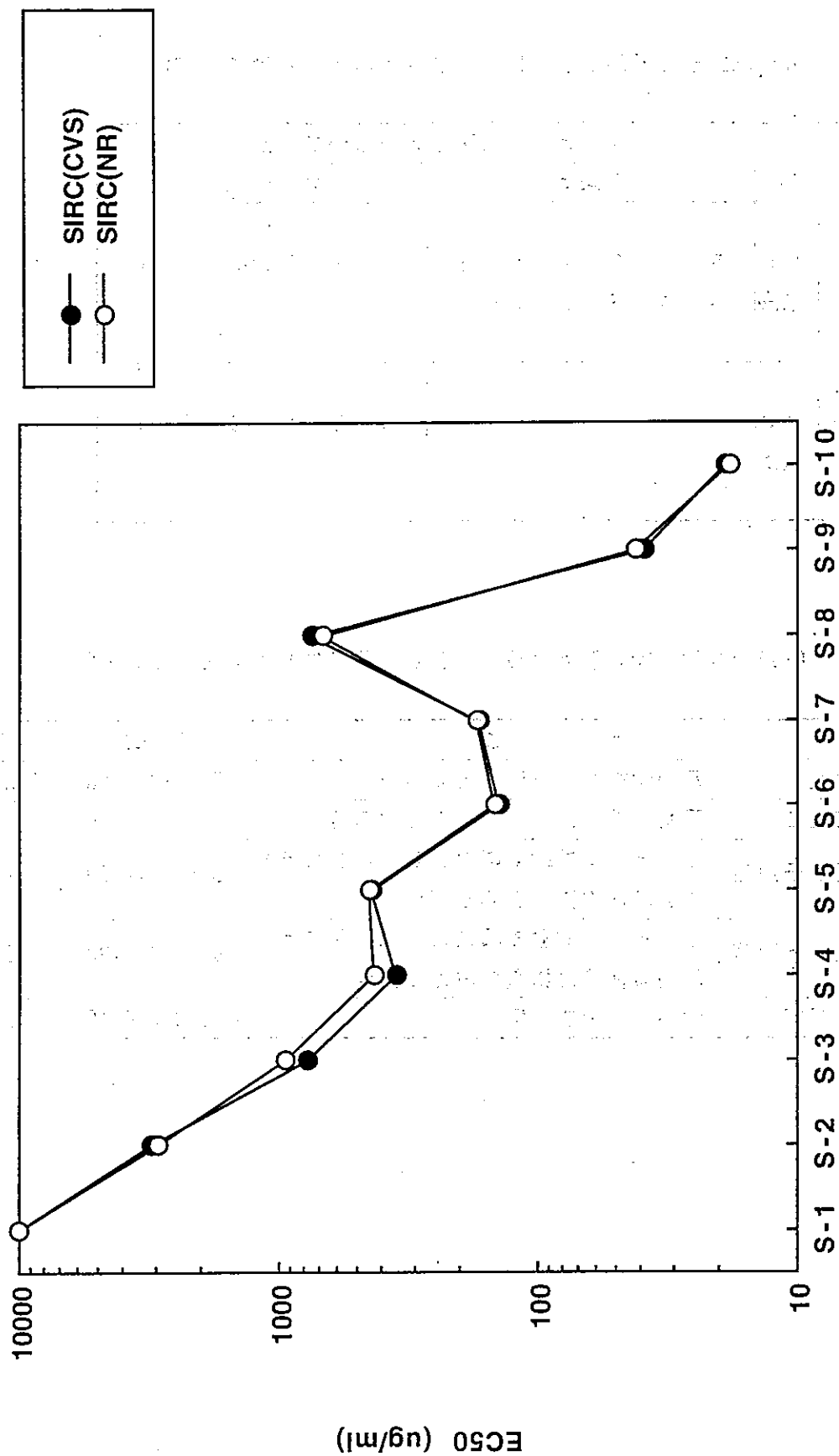
表 8. Draize試験の総評価点（最大）20点前後における対応性

		インビトロ試験結果からの推定値	
		20未満	20以上
イン ビ トロ 試 験 結 果	20 未 満	S-1、S-2、S-3 S-4、S-5、S-8	S-7 (false positive)
	20 以 上	—	S-6、S-9、S-10

表 9. Draize試験の総評価点（最大）20点前後における対応性の指標

指 標		計算式	(%)
感度	眼刺激性物質を陽性とする能力	$3/(3+0) \times 100$	100
特異性	眼刺激性陰性物質を陰性とする能力	$6/(6+1) \times 100$	86
陽性予測値	インビトロ試験で陽性とした物質のうち 眼刺激性物質の占める割合	$3/(3+1) \times 100$	75
陰性予測値	インビトロ試験で陰性とした物質のうち 眼刺激性陰性物質の占める割合	$6/(6+0) \times 100$	100
相関度	対応性を示す指標	$(6+3)/10 \times 100$	90

図8. SIRC細胞を用いる試験法の種差



被験物質

表 10. Draize眼刺激性試験及びSIRC細胞を用いる試験における毒性順位の比較

検体番号	Draize試験		SIRC細胞 (NR法)		SIRC細胞 (CVS法)	
	総評価点	順位	平均	順位	平均	順位
S-1	0.0	I ~ II	>10000	I	>10000	I
S-2	0.0	I ~ II	2911.8	II	3105.8	II
S-3	0.7	III	945.9	III	766.5	III
S-4	3.3	IV	427.7	VI	347.8	VI
S-5	10.3	VI	443.9	V	438.5	V
S-6	26.7	VIII	146.5	VIII	139.7	VIII
S-7	15.0	VII	170.8	VII	167.7	VII
S-8	10.0	V	675.1	IV	747.4	IV
S-9	41.3	IX	41.8	IX	38.4	IX
S-10	78.0	X	18.0	X	19.0	X
Draize試験結果との順位相関係数 (Spearman)			0.961 (0.964)		0.961 (0.964)	

注 1 : Draize試験の総評価点は最大値を使用した

注 2 : 平均の単位は $\mu\text{g}/\text{ml}$

注 3 : 順位相関係数の上段は、Draize試験で $(S-1) = (S-2)$ で解析した場合、
下段は、Draize試験で $(S-1) < (S-2)$ で解析した場合

表11. ニュートラル・レッド取り込み試験参加研究室におけるSIRC細胞の品質管理データ

研究室	倍加時間 (継代数)	染色体モード	コロニー形成率 (%)	細菌汚染	マイコ汚染	アインザイム分析	マイクロプレートリーダー	測定波長 (nm)
A	22.0 (418)	66本 (34%)	72	無	無	NP, G6PDH, MDH, MPI, AST, LDH	BIO-RAD Model 3550	540
B	20.6 (417)	非実施	非実施	非実施	非実施	非実施	東ソー MPR A4	540
C	18.5 (419)	66本 (53%)	43	非実施	非実施	非実施	BIO KINETICS EL 340	550
D	24.0 (417)	非実施	非実施	非実施	非実施	非実施	コロナ電気 MTP 32	540
G	18.0 (418)	66本	29	無	非実施	非実施	インターメッド NJ-2000	540
L	19.3 (417)	非実施	65.8	無	無	NP, G6PDH, LDH	Molecular Devices Emax	540
O	17.2 (422)	66本 (48%)	32.1	無	無	NP, G6PDH, LDH	クラボウ NP-500	540

注1: SIRC細胞 (Lot. No. 091492) は共通

注2: 倍加時間を除き、参加項目は任意

< 参考文献 >

1. S I R C細胞関連

- 1) H. North-Root, F. Yackovich, J. Demetrulias, M. Gacula Jr and J. E. Heinze,
Evaluation of an in vitro cell toxicity test using rabbit corneal cells to
predict the eye irritation potential of surfactants,
Toxicology Letters, 14, 207-212 (1982).
- 2) H. North-Root, F. Yackovich, J. Demetrulias, M. Gacula Jr and J. E. Heinze,
Prediction of the eye irritation potential of shampoos using the in vitro
SIRC cell toxicity test,
Food and Chemical Toxicology, 23, 271-273 (1985).
- 3) R. B. Jacaruso, M. A. Barletta, S. Carson and W. Hardig,
An in vitro method for assessing corneal opacification potential using
a rabbit corneal cell line,
J. Toxicology -Cutaneous and Ocular Toxicology, 4, 49-58 (1985).
- 4) C. M. Hutak, R. B. Jacaruso, S. Carson and M. A. Barletta,
The use of cell lysis as an index of ocular irritation potential,
J. Toxicology -Cutaneous and Ocular Toxicology, 5, 143-161 (1986).
- 5) 鹿島隆一、池田祐三、中村和博、
細胞毒性およびプロスタグランジン E₂ 遊離を指標とした界面活性剤の評価
：動物試験代替法の検討、
日本化粧品科学会誌, 13, 203-210 (1989).
- 6) 岡本裕子、神崎紀子、田中宣征、
眼刺激性試験の代替法の研究：溶血法と培養細胞を用いた方法の比較検討、
日本化粧品技術者会誌, 13, 272-279 (1990).
- 7) H. Itagaki, S. Hagino, S. Kato, T. Kobayashi and M. Umeda,
An in vitro alternative to the Draize eye -irritation test: Evaluation of the
crystal violet staining method,
Toxicology in Vitro, 5, 139-143 (1991).

2. クリスタル・バイオレット染色性試験関連

- 1) 早乙女京子、梅田誠、“細胞トキシコロジー試験法”、第1版、日本組織培養学会編、
朝倉書店、東京、1991、pp. 73-75.
- 2) 梅田誠、“組織培養の技術”、第2版、日本組織培養学会編、朝倉書店、東京、
1988、pp. 256-259.
- 3) 梅田誠、“新生化学実験講座18巻、細胞培養の技術”、第1版、日本生化学会編、
東京化学同人、東京、1990、pp. 85-86.
- 4) K. Saotome, H. Morita and M. Umeda,
Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using
microtitre plate and its application to injection drugs,
Toxicology in Vitro, 3, 317-321 (1989).

5) H. Itagaki, S. Hagino, S. Kato, T. Kobayashi and M. Umeda,

An in vitro alternative to the Draize eye -irritation test: Evaluation of the crystal violet staining method,

Toxicology in Vitro, 5, 139-143 (1991).

3. ニュートラル・レッド取込み試験関連

1) 渡辺正己, "細胞トキシコロジー試験法", 第1版, 日本組織培養学会編, 朝倉書店, 東京, 1991, pp. 71-72.

2) E. Borenfreund and J. Puerner,

Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption,

Toxicology Letters, 24, 119-124 (1985).

3) K. Hockley and D. Baxter,

Use of the 3T3 cell -neutral red uptake assay for irritants as an alternative to the rabbit (Draize) test,

Food and Chemical Toxicology, 24, 473-475 (1986).

4) E. Borenfreund, H. Babich and N. Martin-Alguacil,

Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays -the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests,

Toxicology in Vitro, 2, 1-6 (1988).

4. 眼刺激性試験及び対応性の解析関連

1) J. H. Draize,

Dermal toxicity. In appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics, p. 46-59, FDA officials of US Austin, TX, 1959.

2) M. Balls, et al.,

Report and Recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures,

ATLA, 18, 313-337 (1990).

