

Appendix 8.0

2010 年 6 月 23 日

眼刺激性試験代替法「SIRC 細胞毒性試験」
第三者評価のための資料

(株)資生堂
リサーチセンター
萩野滋延

目次	
1 緒言	2
2 代替しようとする試験法の名称および代替法の名称	2
3 Draize 眼刺激性試験(以下、Draize 試験と略す)に関する資料	3
4 SIRC 細胞毒性試験の原理	4
5 厚生科学研究による SIRC 細胞毒性試験のバリデーションデータの解析 [研究 1]	5
6 SIRC 細胞毒性試験の追加研究 [研究 2]	20
7 SIRC 細胞毒性試験による無刺激性物質(NI)の予測	26
8 まとめ	30
9 参考文献	30
10 英語の略名	32

1. 緒言

化粧品についての動物を用いる安全性試験に対する反対運動は 1980 年代に、眼刺激性を予測するためのウサギを用いる Draize 試験や急性毒性を予測する LD50 試験を中心に日米欧においてほぼ同時に活発化し、動物実験廃止へ向けた活動は化粧品業界にとって重要な課題となった(板垣ら, 2008)。

1990 年度に設置された厚生科学研究班の「新規原料配合化粧品の安全性評価のための試験法の研究」では日本化粧品工業連合会(粧工連)が参画し、眼刺激性試験をインビトロ試験に代替可能か否かが検討された。この調査、研究が基盤となり、1991 年度に発足した厚生科学研究班の「新規化粧品原料配合化粧品の安全性評価のための試験法の研究」において、眼刺激性試験代替法のバリデーション研究が実施された。参加施設は国立衛生試験所(当時)と粧工連傘下 18 企業にキットメーカー、大学等を加え、計 29 施設であった。その結果は 1999 年に公表された「代替法を用いて化粧品原料の眼刺激性を評価するにあたっての指針(案)」に結びついた。この指針案では、培養細胞を用いる試験で無毒性と判断された物質は、化粧品製剤への濃度 10%までの配合に対しインビボで眼に対する障害性が少ないと予測できることおよびその場合にインビボ試験を省略できとしている(大野, 1999, Ohno, 2004)。

今回取り上げる SIRC 細胞毒性試験は、先の厚生科学研究のバリデーション研究において施設間の再現性が高いことや Draize 試験の最大平均評価点(MAS)15 点を境界とする分類に対する高い予測能が報告されている(Tani et al., 1999)。一方、眼刺激性評価の国際標準である Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)において無刺激物(NI)に分類される場合は、MAS15 点付近までであることが明らかになってきている。そこで、SIRC 細胞毒性試験が GHS の NI を同定できる試験法であるか否かを検討し、インビトロ眼刺激性試験法としての妥当性を調べた。その際、化学物質原体について GHS の NI か、それ以外かを正しく予測できるか否かの確認に重点をおいた。

2. 代替しようとする試験法の名称および代替法の名称

Draize 試験の代替法として、SIRC 細胞毒性試験について検討した。

3. Draize 試験に関する資料

ヒトの眼に対する刺激を予測するため、ウサギを用いる Draize 試験(Draize,1959)が広く用いられてきた。Draize 試験は被験物質をウサギの結膜嚢に投与し、一定時間毎に角膜、虹彩および結膜の障害を経時的に肉眼判定し評価する方法である。当試験は安全性試験の中でも特に残酷な印象を与えるとして、動物愛護の観点から代替法の開発と法規制への組み込みが望まれている(大野,1996)。

眼の重篤な損傷性、刺激性については、GHSに判定基準があり、区分 1、区分 2A、区分 2B およびこれらに該当しないもの(無刺激性物質;NI)に分類される。その際に用いられる Draize 試験のスコア方法を Table 1 に、GHS の分類方法を Table 2 にそれぞれ示す。

なお、GHS においては、分類のための試験を行う前に、化学物質の眼に対する重篤な損傷性または眼刺激性を判定するために、いくつかの要因を考慮することとされている。そのうちの 하나가 pH であり、 $\text{pH} \leq 2$ および ≥ 11.5 など極端な pH は、特に明らかな緩衝能力をともなっている場合、眼に対する重篤な損傷作用があることが示唆されている。そのような物質は眼に明らかな作用を生じると予測され区分 1 に分類される。

Table 1 Scale for scoring ocular lesions in the Draize eye test

(1) Cornea	
(A) Opacity-degree of density (area most dense taken for reading)	
No Opacity.....	0
Scattered or diffuse area, details of iris clearly visible.....	1
Easily discernible translucent areas, details of iris slightly obscured.....	2
Opalescent areas, no details of iris visible, size of pupil barely discernible.....	3
Opaque, iris invisible.....	4
(B) Area of cornea involved	
One quarter (or less) but not zero.....	1
Greater than one quarter, but less than half.....	2
Greater than half, but less than three quarters.....	3
Greater than three quarters, up to whole area.....	4
$A \times B \times 5$	Total maximum = 80
(2) Iris	
(A) Values	
Normal.....	0
Folds above normal, congestion, swelling, circumcorneal injection (any or all of these or combination of any thereof) iris still reacting to light (sluggish reaction is positive).....	1
No reaction to light, hemorrhage, gross destruction (any or all of these).....	2
$A \times 5$	Total maximum = 10
(3) Conjunctivae	
(A) Redness (refers to palpebral and bulbar conjunctivae excluding cornea and iris)	
Vessels normal.....	0
Vessels definitely injected above normal.....	1
More diffuse, deeper crimson red, individual vessels not easily discernible.....	2
Diffuse beefy red.....	3
(B) Chemosis	
No swelling.....	0
Any swelling above normal (includes nictitating membrane).....	1
Obvious swelling with partial eversion of lids.....	2
Swelling with lids about half closed.....	3
Swelling with lids about half closed to completely closed.....	4
(C) Discharge	
No discharge.....	0
Any amount different from normal (does not include small amounts observed in inner canthus of normal animals).....	1
Discharge with moistening of the lids and hairs just adjacent to lids.....	2
Discharge with moistening of the lids and hairs, and considerable area around the eye.....	3
$\text{Score (A + B + C)} \times 2$	Total maximum = 20

The table is the same as that reported by Draize et al. (1959)

Table 2 GHS classification of serious eye damage / eye irritation

Caterory of GHS	Criteria
1	An eye irritant Category 1 (irreversible effects on the eye) is a test material that produces: (a) at least in one animal effects on the cornea, iris or conjunctiva that are not expected to reverse or have not fully reversed within an observation period of normally 21 days; and/or (b) at least in 2 of 3 tested animals, a positive response of: (i) corneal opacity ≥ 3 ; and/or (ii) iritis > 1.5 ; calculated as the mean scores following grading at 24, 48 and 72 hours after installation of the test material
2	An eye irritant Category 2A (irritating to eyes) is a test material that produces: (a) at least in 2 of 3 tested animals a positive response of: (i) corneal opacity ≥ 1 ; and/or (ii) iritis ≥ 1 ; and/or (iii) conjunctival redness ≥ 2 ; and/or (iv) conjunctival oedema (chemosis) ≥ 2 calculated as the mean scores following grading at 24, 48 and 72 hours after installation of the test material, and which fully reverses within an observation period of normally 21 days. Within this category an eye irritant is considered mildly irritating to eyes (Category 2B) when the effects listed above are fully reversible within 7 days of observation.

The table is the same as the third revised edition of the GHS (2009).

Draize 試験は、化粧品や医薬部外品の原料や製品の評価に使用されてきているが、それらの状況については Appendix1 に記載した。GHS では既存の分類による判定も示されているため、MAS をこれ以降の関連する表中に参考値として加えた。なお、MAS は Table 2 では急性眼刺激性指標 (AOI) で示している。

4. SIRC 細胞毒性試験の原理

代替法開発は、複雑な生体反応の解析をもとに、試験管レベルで生体反応の一部を再現する (板垣ら, 2008)。大野 (1996) は、Draize 試験から得られる情報と代替法から得られる情報を分類し、細胞毒性は角膜上皮細胞の変性、剥離の情報と対応している。すなわち、細胞毒性試験は角膜の障害を予測することを想定している。一方、角膜の評価点は Draize 試験の総評価点 110 点のうち、80 点を占めているため、角膜の評価点が総評価点に対応すると考えられる (Hagino et al, 1991)。GHS における NI は角膜に反応がほぼ認められない程度であると考えられることから、角膜の障害を予測できる細胞毒性試験は GHS における NI を同定するうえで、適切な代替試験法であると考えられる。

なお、化粧品、薬用化粧品は角膜に反応がほぼ認められないということを一つの判断基準としており、化粧品、薬用化粧品の原料を評価する目的で考える場合においても、角膜の障害を予測できる細胞毒性試験は適切な代替試験法であると考えられる。

細胞の種類として、ウサギ角膜由来細胞 (SIRC 細胞) が必須かどうかについては、厚生科学研究で、SIRC 細胞に加えて、ヒト子宮頸部由来上皮癌細胞 (HeLa 細胞)、チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞 (CHL 細胞) などの試験が行われた。結論として、細胞間で差が認められないとされ、これらのうちのどの細胞でも用いることが可能とされている。この 3 種の細胞の中から SIRC 細胞を取り上げる理由は、眼刺激性試験代替法として用いた論文が多いことと、インビトロで用いられる組織と同じ「ウサギ角膜」に由来していることによる。

細胞毒性のエンドポイントは、厚生科学研究で、クリスタルバイオレット染色 (CVS) 法、Neutral red 取り込み (NRU) 法、MTT 法による測定が行われた。結論として、エンドポイント間に差は認められないとされ、これらのうちのどの細胞毒性のエンドポイントも用いることが可能とされている。この 3 種の

エンドポイントの中から CVS 法を取り上げる理由は、エンドポイントアッセイを同一の 96 ウェルマイクロプレート上で行うことができ、他の方法に比較して操作が簡便であることによる。また、操作終了後の着色した 96 ウェルマイクロプレートを特別な条件を設定せずに室温で長期間保存できるという利点もある。

5. 厚生科学研究による SIRC 細胞毒性試験のバリデーションデータの解析 [研究 1]

5.1. 目的

1991 年度に発足した厚生科学研究班の「新規化粧品原料配合化粧品の安全性評価のための試験法の研究」において、12 種の眼刺激性試験代替法のバリデーションが同時に実施された。その中の一つが CVS 法による SIRC 細胞毒性試験である。今回、この SIRC 細胞毒性試験が眼刺激性評価における GHS の NI を同定する試験法という観点で、施設内の再現性、施設間の再現性を再解析した。

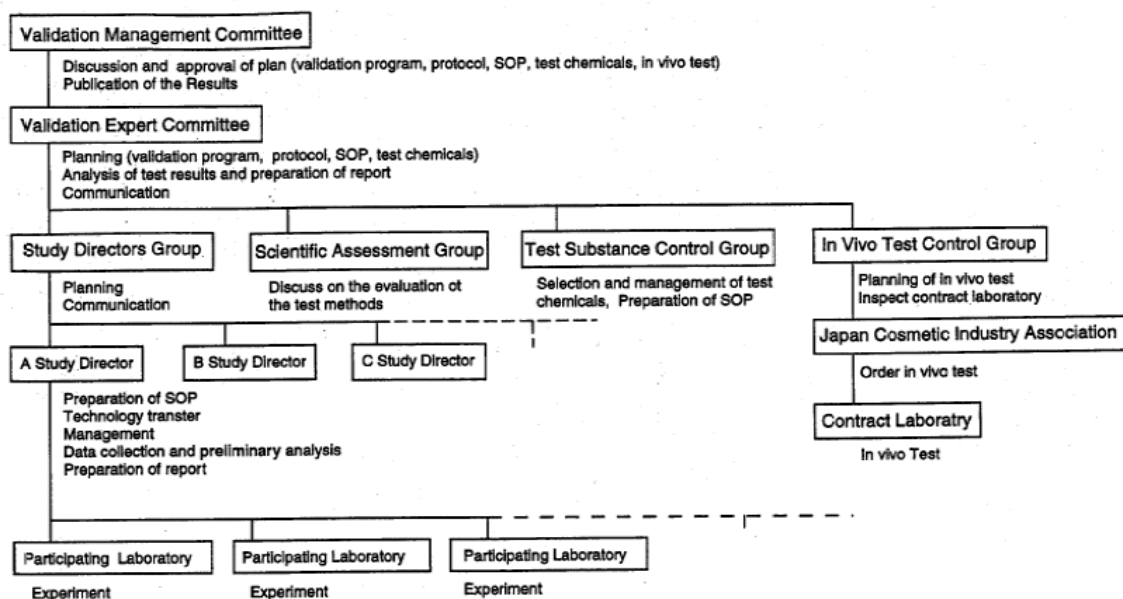
解析にあたっては、新たに原体の NI を同定する比較対照物質として Triethanolamine を設定した。これは厚生科学研究のバリデーションにおいて原体の眼刺激性を評価する基準があらかじめ設定されていなかったためである。Triethanolamine は厚生科学研究のバリデーションにおける被験物質の一つであり、原体の Draize 試験結果で眼刺激性が無く、GHS 分類の NI の予測に適する細胞毒性を有し、試薬として購入でき、水溶性のために試験を実施する上で扱いやすいことから選定された。バリデーションにおいて 1 被験物質当たり 2 回得られたデータは、バリデーションの中で実施された Triethanolamine の 2 回のデータを基にして、評価された。

5.2. バリデーションの組織、参加施設等

バリデーションの組織を Fig. 1 に示す。この組織図は 12 種の試験法の評価が行われた厚生科学研究によるバリデーションの全体に関わるものである。

バリデーション運営委員会を最高決定機関とし、その下に執行機関として実行委員会を置き、さらにその下に試験責任者グループ、科学評価グループ、被験物質管理グループおよびインビボ試験管理グループを置いた。試験責任者グループの下には各試験責任者を置いた。試験法毎に試験責任者を置き、CVS 法による SIRC 細胞毒性試験にも試験責任者を置いた。試験責任者の実施施設がリードラボとしての役割を担った。試験責任者は、SOP の取りまとめ、技術移転、マネジメント、データの集計と処理、報告資料の作成を行った。なお、図に示したものは第二次および第三次バリデーションの組織であり、第一次バリデーションにおいては試験責任者グループを設置しなかった。すなわち、第一次バリデーションの組織は運営委員会の下に実行委員会、被験物質管理委員会、インビボ試験管理委員会を置き、実行委員会の下に試験責任者が設置された。試験責任者の実施施設はいずれの段階においてもリードラボの役割を担った。

Fig. 1 Organization of the second and third validations



The figure is the same as that reported by Ohno et al.(1999). The facilities of the study directors had the role of lead laboratory.

12 種の試験法のバリデーションへの参加施設を示す。参加施設は一定の技術レベルで試験が行えるようにするため、GLP についての講義および技術講習会(1992 年 10 月)を国立衛生試験所(当時)において実施した。参加者は GLP の原理を尊重して試験を実施した。バリデーションにおける試験は SOP に従って行われた。被験物質は被験物質管理グループがコード化し、各施設に配布した。データのチェックは各施設が行い、それをリードラボが集計、そしてその集計にミスが無いかを各施設の試験担当者がチェックした。関連する書類は試験責任者および各施設からの試験担当者がチェックした。バリデーション終了後、すべてのデータは国立衛生試験所(当時)に保管された(Ohno et al, 1999)。そして、試験終了から 5 年以上経過した時点で、廃棄された。

Table 3 List of the co-operating organizations for the Japanese validation

Administrative organizations	Japan Cosmetic Industry Corporation
Ministry of Health and Welfare	Shiseido Safety & Analytical Res. Center
National Institute of Health Sciences	POLA Corp.
(Div. Pharmacol. Div. Toxicol. and Div. Genetics Mutagen.)	Kanebo Ltd
	KOSE Corp.
	Lion Corp.
Universities	KAJO Corp.
Yokohama-City University	SUNSTAR Inc.
Showa University	OPPEN Cosmetic Co. Ltd
	NOEVIR Co. Ltd
Kit suppliers	Kaminomoto Co. Ltd
Oriental Yeast Co. Ltd	Procter & Gamble Far East, Inc.
Kurabo Industries, Ltd	Nippon Mcnard Cosmetic Co. Ltd
Invitro International Japan, Ltd	Yakult Central Institute for Microbiological Res.
Toyobo Co., Ltd	Ajinomoto Co. Inc.
	Cow Brand Soap Kyoshinsha Co., Ltd
Others	Hoyu Co. Ltd
RIKEN Gene Bank	CLUB COSMETICS Co. Ltd
Japan Seigiken Research Centre Co. Ltd	Nippon Shikizai Inc.

The table is the same as that reported by Ohno et al.(1999).

CVS 法による SIRC 細胞毒性試験のバリデーションへの参加は、第一次バリデーションでは 6 施設(資生堂、ポーラ、カネボウ、花王、メナード、国立衛生試験所・薬理部)であり、リードラボは資生堂が務めた。第二次バリデーションは 6 施設(資生堂、ポーラ、サンスター、メナード、ホーユー、理研ジーンバンク)であり、リードラボはポーラが務めた。第三次バリデーションは 5 施設(資生堂、ポーラ、サンスター、ホーユー、理研ジーンバンク)であり、リードラボはポーラが務めた。

Table 4 List of the participation of organization

First valication	Shiseido	Pola	Kanebo	Menard	NIHS	Kao			
Second validation	Shiseido	Pola		Menard			Sunstar	Hoyu	Riken gene bank
Third validation	Shiseido	Pola					Sunstar	Hoyu	Riken gene bank

NIHS:National Institute of Health Sciences

5. 3.SIRC 細胞毒性試験のプロトコール

5.3.1.バリデーションで用いたプロトコール

バリデーションで用いたプロトコールは別紙参照。

5.3.2.提案するプロトコール

・細胞

- ・ウサギ角膜由来細胞(SIRC; Statens Seruminstitut Rabbit Cornea: ATCC No.CCL-60)を ATCC(American Type Culture Collection)から入手する。
- ・細胞はマイコプラズマ汚染がないことを確認する。

・培養液と培養条件

- ・10%牛胎児血清(FBS)と 200mM L-Glutamine を添加し、Sodium bicarbonate で中和した MEM 培養液を用い、37℃、5%CO₂ で培養する。培養液には適切な抗生物質を用いることができる。例えば、Antibiotic-Antimycotic (GIBCO BRL)または Penicillin Streptomycin (GIBCO BRL)を培養液中へ 1%の濃度になるように加える。この場合の最終濃度は、Penicillin 100U/mL, Streptomycin 100 μ g/mL, (Antibiotic-Antimycotic においてはこれに加え Amphotericin B 250ng/mL)である。
- ・凍結保存した細胞は、解凍後、試験に用いる前に1回以上継代し、良好な増殖を示すことを確認する。
- ・96 ウェルプレートに播種する細胞の最終濃度は 1x10⁵ 個/mL とする。

・被験物質の調製

- ・被験物質は用時に調製する。
- ・被験物質は培養液に 10000 μ g/mL の濃度に溶解または均一に懸濁させて被験物質液とする。被験物質を溶解または懸濁させる際に、ミキサー、加温機や超音波処理機を用いることができる。また、DMSO および Ethanol を溶媒として用い、培養液中に溶解または均一に懸濁させることができる。溶媒を用いる際、被験物質液中の DMSO および Ethanol の最高濃度は 10000 μ g/mL とする。最終的な被験物質の最高試験濃度は 5000 μ g/mL、溶媒の試験濃度は 5000 μ g/mL とする。なお、被験物質適用後に沈殿などが認められた場合、該当する濃度は均一に懸濁していなかったものとする。
- ・DMSO、Ethanol 以外の溶媒を用いる場合は、媒体が化学的に安定であること、細胞毒性を示さない濃度であること、被験物質と反応しないことを使用前に確認する。

・被験物質の濃度

- ・被験物質の最高試験濃度を 5000 μ g/mL とし、公比 2 で4段階以上の濃度を設ける。これより細かい公比を設けることができる。(少なくとも 5000 μ g/mL から公比 2 で 4 段階取れば比較対照物質 Triethanolamine の IC₅₀ の範囲である 1000～5000 μ g/mL をカバーすることが可能である)

・対照および試験成立基準

・陽性対照

- ・陽性対照として Sodium dodecyl sulfate(SDS) (CAS:151-21-3)を用いる。標準的なプロトコールで試験された SDS の IC₅₀ は、50～250 μ g/mL の範囲であり、これを試験成立の条件とする。

・比較対照

- ・GHS における NI を同定する比較対照物質として Triethanolamine(CAS:102-71-6)を用いる。標準的なプロトコールで試験された Triethanolamine の IC₅₀ は、1000～5000 μ g/mL の範囲であり、これを試験成立の条件とする。

・陰性対照

- ・陰性対照として、培養液、10000 μ g/mL DMSO 培養液溶液または 10000 μ g/mL Ethanol 培養液溶液を用いる。これらは被験物質を溶解または懸濁させる際に用いた溶媒によつ

て選択する。標準的なプロトコールで試験された場合の吸光度は 0.4 を越えており、これを試験成立の条件とする。

・試験操作

・被験物質等の細胞への適用

- ・96 ウェルマイクロプレート上に被験物質、陽性対照、比較対照の希釈系列(0.1mL/ウェル)を作製する。また、陰性対照のウェル、並びに細胞を添加しないウェル(例えば、PBS(-)を0.2mL/ウェル添加)を作製する。
- ・ 2×10^5 個/mL の SIRC 細胞浮遊液を、被験物質、陽性対照、比較対照および陰性対照のウェルに 0.1mL ずつ添加する。
- ・被験物質が揮発し周囲のウェルへ影響を与える可能性を考慮する場合、ウェルを覆うマイクロプレートシーリングテープを貼付することができる。なお、被験物質が他のウェルに影響を与える場合には、希釈して再試験をすることができる。

・培養

- ・約 20 分間の室温放置後、炭酸ガスインキュベーター中に移し、37℃、5%CO₂ で約 72 時間培養する。

・Crystal violet による細胞染色と吸光度測定

- ・反転により培養液を捨てる。
- ・PBS(-)液により 2 回洗浄する。
(PBS(-)液を 0.2~0.25mL/ウェル入れ、穏やかに攪拌後反転により捨てる)
- ・0.4%Crystal violet methanol 溶液を 0.1mL/ウェル添加し、室温で 30 分間放置する。
- ・水道水にて緩やかに洗浄した後、風乾する。
- ・マイクロプレートリーダーを用いて 588nm の吸光度を測定する。波長は 570nm~595nm の範囲内で設定することができる。
- ・陰性対照の吸光度を 100%とし、50%の吸光度を示す濃度(IC50)を算出する。
- ・IC50 の算出にあたっては、生存率 50%をはさむ 2 濃度とその濃度における細胞生存率から式 $\text{LogIC50} = [(50-y_1)\log x_2 - (50-y_2)\log x_1] / (y_2 - y_1)$ を用いて算出する。(※記号は、被験物質濃度 x_1 (低濃度側)、 x_2 (高濃度側)におけるそれぞれの細胞生存率を y_1 , y_2 で示す。Log は常用対数である。)
- また、片対数グラフに濃度-反応曲線を作成し、陰性対照の 50%となる濃度を求めても良い。適切な解析ソフトがあればそれを用いても良い。
- ・被験物質の濃度 5000 μ g/mL で細胞生存率が 50%以下にならない場合は IC50>5000 μ g/mLとする。試験した最低濃度で細胞生存率が50%未満の場合は、IC50は試験した最低濃度未満とする。

・結果の評価

- ・比較対照物質 Triethanolamine の IC50 と比較し、GHS で NI に分類される物質を予測する。
Triethanolamine の IC50 以上を陰性とし、NI に分類されると予測する。
- ・試験は 2 回を繰り返して行い、その結果に基づき評価する。2 回の評価結果が異なった場合には同様に 3 回目を実施し、2 回の同じ評価結果を採用し、その結果に基づき評価する。

5.3.3. バリデーション時のプロトコールと提案するプロトコールとの違い

バリデーション時のプロトコールと提案するプロトコールとの違いを示す。

表 5 バリデーション時のプロトコールと提案するプロトコールとの違い

項目	バリデーション時のプロトコール	提案するプロトコール
培養液	10%仔牛血清 (CS) を添加した MEM 培養液を用いる。	10%牛胎児血清 (FBS) を添加した MEM 培養液を用いる。
被験物質由来の汚染への対処	培養液および PBS(-)で調製する被験物質は、液体の場合無菌フ	培養液には適切な抗生物質を用いる。例えば、Antibiotic-Antimycotic (GIBCO BRL)ま

	フィルターを用いて、固体の場合エタノール(添加後、蒸散)を用いて滅菌を行う。	または Penicillin Streptomycin (GIBCO BRL)を1%の濃度になるように加える。
被験物質の調製	12 ページの図に従った被験物質の調製手順を細かく設定。	被験物質は培養液に 10000 μ g/mL の濃度に溶解または均一に懸濁させて被験物質液とする。被験物質を溶解または懸濁させる際に、ミキサー、加温機や超音波処理機を用いることができる。また、DMSO および Ethanol を溶媒として用い、培養液中に溶解または均一に懸濁させることができる。溶媒を用いる際、被験物質液中の DMSO および Ethanol の最高濃度は 10000 μ g/mL とする。最終的な被験物質の最高試験濃度は 5000 μ g/mL、溶媒の試験濃度は 5000 μ g/mL とする。なお、被験物質適用後に沈殿等が認められた場合、該当する濃度は均一に懸濁していなかったものとする。
予備試験	実施	実施しない*
被験物質の希釈系列	第一次バリデーションでは公比 2 を用いる。第二次バリデーションでは細胞生存率が 20～80%の間に少なくとも 3 点が入る希釈系列とし、最小で公比 1.1 まで実施する。第三次バリデーションでは細胞生存率が 20～80%の間に少なくとも 1 点が入る希釈系列とし、最小で公比 1.1 まで実施する。	最高試験濃度を 5000 μ g/mL とし、公比 2 で希釈系列を作製のうえ、4段階以上の濃度を設ける。これより細かい公比を設けることができる。この時、少なくとも 1000～5000 μ g/mL の範囲の IC50 を求めることが可能な濃度段階の設定とする。
陽性対照を用いた試験成立の条件	記載なし	陽性対照として Sodium dodecyl sulfate (SDS) を用いる。標準的なプロトコールで試験された SDS の IC50 は、50～250 μ g/mL の範囲であり、これを試験成立の条件とする。
比較対照物質を用いた試験成立の条件	記載なし	GHS における NI を同定する比較対照物質として Triethanolamine を用いる。標準的なプロトコールで試験された Triethanolamine の IC50 は、1000～5000 μ g/mL の範囲であり、これを試験成立の条件とする。
陰性対照を用いた試験成立の条件	記載なし	陰性対照として、培養液、10000 μ g/mL DMSO 培養液溶液または 10000 μ g/mL Ethanol 培養液溶液を用いる。これらは被験物質を溶解または懸濁させる際に用いた溶媒によって選択する。標準的なプロトコールで試験された場合の吸光度は 0.4 を越えており、これを試験成立の条件とする。
洗浄の際の PBS(-)の量	0.2mL/ウェル	0.2～0.25mL/ウェル
マイクロプレートリーダーの測定波長	590nm 付近の吸光度を測定する。	588nm の吸光度を測定する。波長は 570nm～595nm の範囲内で設定することができる。

IC50 計算法	片対数グラフに濃度-反応曲線を作成し、陰性対照の 50%となる濃度を求める。または解析ソフトを用いる。	細胞生存率 50%をはさむ 2 濃度とその濃度における生存率から計算する。また、片対数グラフに濃度-反応曲線を作成し、陰性対照の 50%となる濃度を求めても良い。適切な解析ソフトがあればそれを用いても良い。
結果の評価	バリデーションにおける試験終了後に、MAS15 から回帰直線を用いて外挿した細胞毒性の IC50 値を基準に設定し評価した。 [#]	比較対照物質である Triethanolamine の IC50 との比較により、GHS で NI に分類される物質を予測する。
試験の繰り返し	記載なし	試験は 2 回を繰り返して行い、その結果に基づき評価する。2 回の評価結果が異なった場合には同様に 3 回目を実施し、2 回の同じ評価結果を採用し、その結果に基づき評価する。
Neutral red 取り込み試験を実施した後のプレートの使用	第一次バリデーションでは、Neutral red 取り込み試験を実施した後のプレートを使用せずに試験を実施する。 第二次と第三次バリデーションにおいては Neutral red 取り込み試験を実施した後のプレートを用いて、Crystal violet 染色試験を実施する ^{\$} 。	Neutral red 取り込み試験を実施した後のプレートを使用しない。

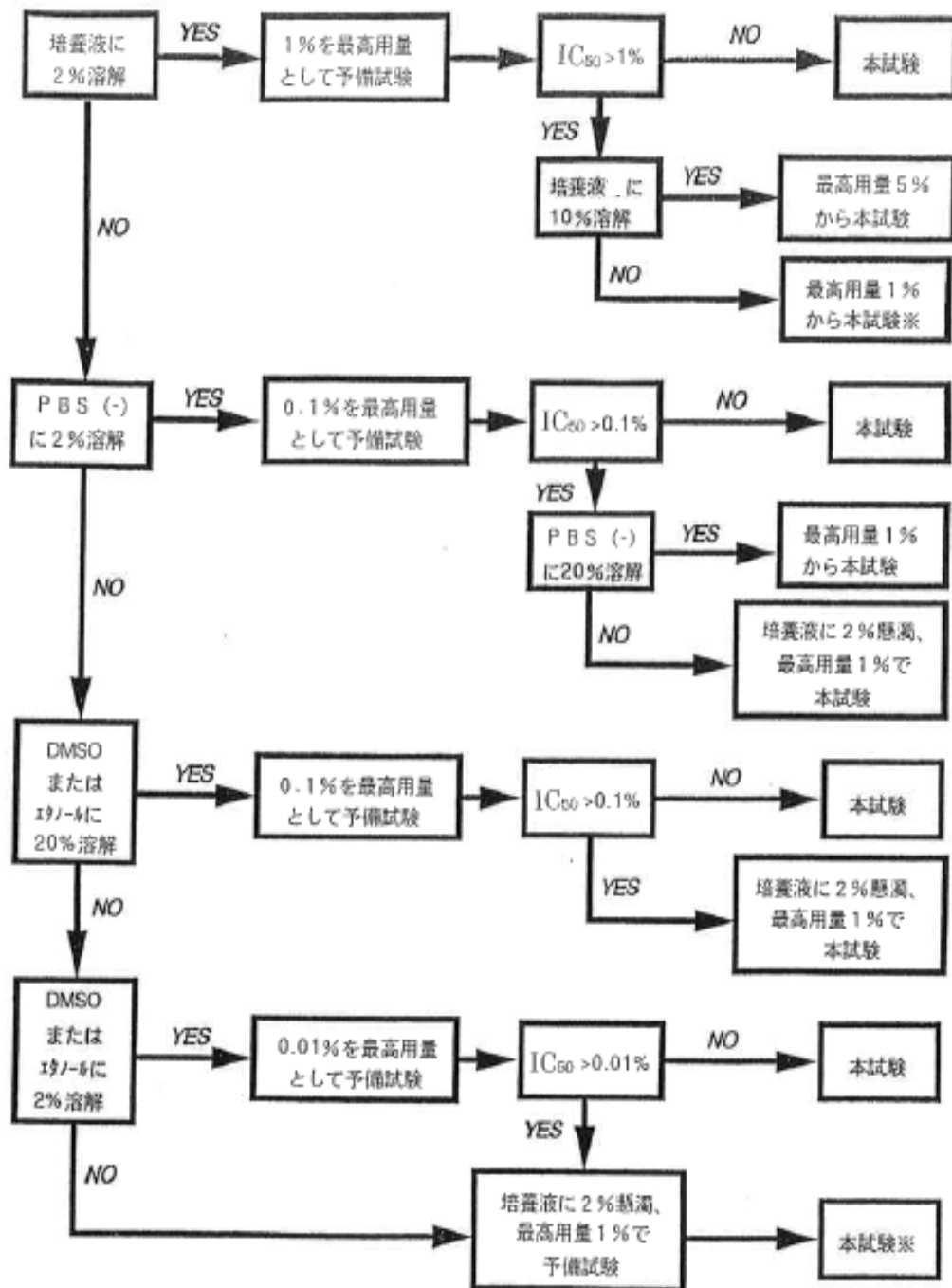
*: 比較対照物質との比較により評価をするため、限定的な範囲の濃度設定で試験することになり、予備試験は必要ない。

#: 当時はバリデーションの方法論が今日のように確立されていなかった。

\$: Neutral red 取り込み試験を実施した後のプレートを使用した場合もしない場合も、値は変わらない。このことは、Neutral red 取り込み試験を実施した後のプレートを使用しない第一次バリデーションにおける SLS の IC50 値と使用した第二、第三次バリデーションにおける SLS の IC50 に差がないことから確認された。また、第一次バリデーションの被験物質のデータと第二、第三次バリデーションの被験物質のデータは、いずれも Neutral red 取り込み試験のデータに極めて近似していることから確認された。(Itagaki et al, 1995, Tani et al, 1999)

なお、プロトコルの提案にあたっては、厚生科学研究によるバリデーションの経験を踏まえた考察を参考とした。小島(1999)は、「私の経験から言うと、(細胞生存率 20～80%の間に)1 ポイントも入らなくても神経質になる必要はないと今は考えている(できれば1ポイント以上入るにこしたことはない)。被験物質の希釈は公比2でも half-log でも良い。それよりも、試験は最低 2 回、日を変えて行い、得られた陽性対照が絶えず同じ値を示すとともに、IC50 値のバラツキが 2 倍以内に入るような精度の高い試験を行うことが大切と考えている」と指摘している。また、大野(1999)は、「細胞の種類や培養液に添加する血清のロットなどの培養条件の微妙な変化により、被験物質の IC50 値が大きく変化することがある。しかし、通常、被験物質間の相対的關係はあまり変わらない。したがって、実際の評価においては IC50 値という絶対値で評価するとともに、標準物質との比較においても評価することが適切である」と述べている。

Fig. 2 細胞毒性試験における被験物質の調製手順(小島, 1999)



5.4.バリデーションに供した被験物質

バリデーション研究に供した 39 被験物質を Table 6 に示す。

被験物質 39 物質の内訳は、化学的クラスで分類すると、界面活性剤が 18 物質、それ以外の有機化合物が 19 物質、無機化合物が 2 物質であった。界面活性剤以外の有機化合物の内訳は、アルコール 3 物質、カルボン酸 3 物質、アルカノールアミン 3 物質、有機塩 3 物質、ポリオール 2 物質、エステル 2 物質、色素 1 物質、PABA 誘導体 1 物質、アミン 1 物質であった。また、存在状態(固体または液体)で分類すると、固体 20 物質、液体 15 物質、水溶液 4 物質であった。

この 39 物質のうちインビボが原体で実施されたものは 18 物質、10%水溶液で実施されたものは 35 物質、1%水溶液で実施されたものは 3 物質、0.1%水溶液で実施されたものは 1 物質であった。複数の濃度段階を設けた物質があり、3 濃度で実施されたものは 3 物質、2 濃度で実施されたものは 12 物質、1 濃度で実施されたものは 24 物質であった。

インビボが原体で実施された 18 物質の内訳は、界面活性剤 3 物質、無機化合物 2 物質、アルコール 2 物質、ポリオール 2 物質、エステル 2 物質、有機塩 2 物質、アルカノールアミン 1 物質、PABA 誘導体 1 物質、色素 1 物質、アミン 1 物質、カルボン酸 1 物質であった。

Table 6 List of the test substances and their characteristics

Substance	CAS	Class	Physical state	MW
Isotonic sodium chloride solution	7647-14-5	Inorganics	Solution	58.4
Polyoxyethylene hydrogenated caster oil (60 E.O.)	61788-85-0	Surfactants	Solid	-
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (20 E.O.)	9005-64-5	Surfactants	Liquid	346.5
Polyethyleneglycol monolaurate (10 E.O.)	9004-81-3	Surfactants	Liquid	-
Sodium N-lauryl sarcosinate (30% solution)	137-16-6	Surfactants	Solution	311.4
Sodium hydrogenated tallow L-glutamate	68187-34-8	Surfactants	Solid	-
Sodium dodecyl sulfate	151-21-3	Surfactants	Solid	288.4
Sodium polyoxyethylene laurylether sulfate (2 E.O.) (27% solution)	3088-31-1	Surfactants	Solution	274.4
Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)	9002-93-1	Surfactants	Liquid	324.4
Benzalkonium chloride	8001-54-5	Surfactants	Solid	283.9
Sucrose fatty acid ester	-	Surfactants	Solid	-
Glycerin	56-81-5	Polyols	Liquid	92.1
Acid red 92	18472-87-2	Color additives	Solid	829.6
Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.)	9005-65-6	Surfactants	Liquid	-
Calcium thioglycolate	814-71-1	Organic salts	Solid	130.2
Distearyldimethylammonium chloride	107-64-2	Surfactants	Solid	586.5
2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzonate	21245-02-3	PABA derivatives	Liquid	277.4
Cetylpyridinium chloride	123-03-5	Surfactants	Solid	340
Methyl p-hydroxybenzoate	99-76-3	Esters	Solid	152.2
Isopropyl myristate	110-27-0	Esters	Liquid	270.5
Polyethylene glycol 400	25322-68-3	Polyols	Liquid	360~400
Silicic anhydride	7631-86-9	Inorganics	Solid	60.1
Benzyl alcohol	100-51-6	Alcohols	Liquid	108.1
Sodium salicylate	54-21-7	Organic salts	Solid	160.1
m-Phenylenediamine	108-45-2	Amines	Solid	108.1
Ethanol	64-17-5	Alcohols	Liquid	64.1
Monoethanolamine	141-43-5	Alkanolamines	Liquid	61.1
Triethanolamine	102-71-6	Alkanolamines	Liquid	149.2
Stearyltrimethylammonium chloride	112-03-8	Surfactants	Solid	348.1
Diisopropanolamine	110-97-4	Alkanolamines	Solid	133.2
Potassium laurate	10124-65-9	Surfactants	Solid	238.4
Cetyltrimethylammonium bromide	57-09-0	Surfactants	Solid	364.5
Acetic acid	64-19-7	Carboxylic acids	Liquid	60.1
Butanol	71-36-3	Alcohols	Liquid	74.1
Chlorhexidine gluconate (20% solution)	18472-51-0	Organic salts	Solution	897.8
Domiphen bromide	538-71-6	Surfactants	Solid	414.5
Lactic acid	50-21-5	Carboxylic acids	Liquid	90.1
Glycolic acid	79-14-1	Carboxylic acids	Solid	76.1
Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate	577-11-7	Surfactants	Solid	488.5

5.5.バリデーションにおける被験物質の Draize 試験データ

厚生科学研究のバリデーションにおける被験物質の原体での Draize 試験結果を Table 7 に示す。GHS で NI に分類されるものは 9 物質、1、2A または 2B に分類されるものは 9 物質であった。GHS 分類については厚生科学研究で行われたインビボデータ資料に基づき、「the third revised edition of the GHS」の方法を用いて求めた。表中において GHS の分類が 1or2A となっているが、これは厚生科学研究における Draize 試験の観察のデータが 14 日目までで 21 日目のデータが無いため 1 と 2A を区別できないためである。しかしながら、本検討は NI を同定することを目的とするため、区別せずに「1or2A」とした。GHS で NI に分類される場合を陰性(N; Negative)、それ以外に分類される場合を陽性(P; Positive)とした。

Table 7 Draize eye test results in the Japanese validation study (as is)

Substance (as is)	Physical state	MAS	GHS	<i>In vivo</i> classification in this study
2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzonate	Liquid	0.0	NI	N
Isopropyl myristate	Liquid	0.0	NI	N
Isotonic sodium chloride solution	Liquid	0.0	NI	N
Silicic anhydride	Powder	2.7	NI	N
Polyethylene glycol 400	Liquid	4.0	NI	N
Glycerin	Liquid	4.7	NI	N
Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20 E.O.)	Liquid	4.7	NI	N
Triethanolamine	Liquid	8.0	NI	N
Methyl p-hydroxybenzoate	Powder	8.7	NI	N
Sucrose fatty acid ester	Powder	28.3	1or2A	P
Benzyl alcohol	Liquid	31.0	1or2A	P
Ethanol	Liquid	32.7	1or2A	P
Acid red 92	Powder	71.0	1or2A	P
Calcium thioglycolate	Powder	79.7	1	P
m-Phenylenediamine	Powder	80.7	1or2A	P
Sodium salicylate	Powder	83.7	1or2A	P
Distearyldimethylammonium chloride	Powder	96.3	1	P
Lactic acid	Liquid	102.7	1	P

MAS: Maximal average score of the Draize eye test.

GHS category 1: Severe or corrosive irritant, 2A: Irritant, 2B: Irritant, NI: Non irritant.

1or2A: The Draize eye test results couldn't discriminate between 1 and 2A for no observation data on day 21. The observation was performed to day 14.

P: Positive, N: Negative.

濃度 10%での Draize 試験結果に基づき、原体における GHS 区分が予測できる物質については、それらのデータに基づいて分類したので Table 8 に示す。すなわち、濃度 10%で刺激性が認められ区分 1、区分 2A または区分 2B に分類されているものは原体ではそれ以上の刺激が認められると予測した。該当する 16 物質の内訳は、界面活性剤 11 物質、カルボン酸 2 物質、アルコール 1 物質、アルカノールアミン 2 物質であった。なお、表中には ICCVAM の推奨する参照物質リストに記載されているデータを加えた。Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)は、ICCVAM の参照物質リストにおいて、原液で適用された場合に GHS 区分 1 へ分類されており、10%における 1or2A への分類との間に妥当な関係が確認された。Sodium dodecyl sulfate は ICCVAM の参照物質リストにおいて濃度 3%のデータに基づいて NI に分類されているが、厚生科学研究の濃度 10%のデータに基づくと 1or2A に分類されており、原体では 1or2A とした。

最終的に厚生科学研究のインビボデータにおいて、GHS でNIに分類されるものは9物質、それ以外に分類されるものは25物質、合計34物質であった。なお、34物質の内訳は、界面活性剤13物質、アルコール3物質、アルカノールアミン3物質、カルボン酸3物質、無機化合物2物質、ポリオール2物質、エステル2物質、有機塩3物質、PABA誘導体1物質、色素1物質、アミン1物質であった。

Table 8 Draize eye test results (as is) in the Japanese validation study,
including the classification predicted from the result of 10% concentration

Substance	MAS	GHS classification based on the data of Japanese validation study	GHS classification by ICCVAM Recommended Reference Substance List	<i>In vivo</i> classification in this study
2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate	0.0	NI		N
Isopropyl myristate	0.0	NI		N
Isotonic sodium chloride solution	0.0	NI		N
Silicic anhydride	2.7	NI		N
Polyethylene glycol 400	4.0	NI		N
Glycerin	4.7	NI		N
Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.)	4.7	NI		N
Triethanolamine	8.0	NI		N
Methyl p-hydroxybenzoate	8.7	NI		N
Sucrose fatty acid ester	28.3	1or2A		P
Benzyl alcohol	31.0	1or2A		P
Ethanol	32.7	1or2A		P
Acid red 92	71.0	1or2A		P
Calcium thioglycolate	79.7	1		P
m-Phenylenediamine	80.7	1or2A		P
Sodium salicylate	83.7	1or2A		P
Distearyldimethylammonium chloride	96.3	1		P
Lactic acid	102.7	1	1 (100%) [#]	P
Sodium dodecyl sulfate*	15.0 ≤	1or2A	NI (3%) [#]	P
Diisopropanolamine*	23.0 ≤	1, 2Aor2B		P
Monoethanolamine*	23.3 ≤	1or2A		P
Glycolic acid*	25.0 ≤	1or2A		P
Sodium hydrogenated tallow L-glutamate*	26.7 ≤	1or2A		P
Chlorhexidine gluconate (20% solution)*	28.3 ≤	1or2A		P
Butanol*	34.0 ≤	1or2A	1 (10%) [#]	P
Potassium laurate*	38.0 ≤	1or2A	1 (10%) [#]	P
Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)*	41.3 ≤	1or2A	1 (100%) [#]	P
Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate*	57.0 ≤	1or2A	1 (10%) [#]	P
Acetic acid*	68.0 ≤	1or2A	1 (10%) [#]	P
Cetyltrimethylammonium bromide*	76.7 ≤	1or2A	1 (10%) [#]	P
Benzalkonium chloride*	78.0 ≤	1or2A	1 (5%) [#]	P
Stearyltrimethylammonium chloride*	91.3 ≤	1		P
Cetylpyridinium chloride*	94.7 ≤	1		P
Domiphen bromide*	96.3 ≤	1or2A	1 (10%) [#]	P

* : The *in vivo* results of as is application were predicted by the data of 10% concentration.

: Tested concentration is shown in parenthesis.

P: Positive, N: Negative.

5.6.SIRC 細胞毒性試験のバリデーション結果

5.6.1.施設内変動

厚生科学研究でバリデーションが行われた被験物質のうち原体における眼刺激性・GHS 分類が判明している物質について、SIRC 細胞毒性試験に基づくインビボ予測結果の施設内の再現性を確認した。施設内の繰り返し数は 2 回である。この 2 回は日をあらためて試験した結果である。

Table 9 は、各被験物質および各施設での細胞毒性試験の結果であり、下段に 2 回の細胞毒性試験結果を、上段にそれらの平均値を示す。細胞毒性試験結果は、比較対照物質として Triethanolamine を用い、NI と予測された場合を陰性(N)、それ以外を陽性(P)とした。第 1 回目のそれぞれの被験物質の IC50 は第 1 回目の Triethanolamine の IC50 と比較して陽性と陰性を評価した。Triethanolamine を実施した 5 施設 Lab.A、B、G、H、I について施設内の再現性を検討したところ、施設内の 2 回の結果が異なることは無かった。したがって、施設内の再現性は良好と考えられた。

なお、Triethanolamine を実施していない施設については、評価を実施できなかった。仮に 5 施設の Triethanolamine の平均 IC50 である $2090 \mu\text{g/mL}$ で分類したところ、2 回の細胞毒性試験が異なる所は認められず、他の施設と評価が異なる所も認められなかった。

Table 9 Results of repeatability on the SIRC-CVS assay

Substance	In vivo Classification	IC50 (µg/mL) [§]								
		Lab.A	Lab.B	Lab.C	Lab.D	Lab.E	Lab.F	Lab.G	Lab.H	Lab.I
2-Ethylhexyl p-dimethylamino Benzoate	N	381 (P)	1193 (P)		97.5 (NE)			570 (P)	484 (P)	120 (P)
		284 (P)	1407 (P)		95 (NE)			643 (P)	140 (P)	
		478 (P)	979 (P)		100 (NE)			470 (P)	325 (P)	100 (P)
Isopropyl myristate	N	10000<(N)	10000<(N)		6000<(NE)			10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		10000<(N)	10000<(N)		6000<(NE)			10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		10000<(N)	10000<(N)		10000<(NE)			10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
Isotonic sodium chloride solution	N	10000<(N)	10000<(N)	50000<(NE)	10000<(NE)	500000<(NE)	500000<(NE)			
		10000<(N)	10000<(N)	50000<(NE)	10000<(NE)	500000<(NE)	500000<(NE)			
Silicic anhydride	N	10000<(N)	10000<(N)		38750 (NE)			10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		10000<(N)	10000<(N)		45000 (NE)			10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		10000<(N)	10000<(N)		32500 (NE)			10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
Polyethylene glycol 400	N	6854.5 (N)	50000<(N)		32750 (NE)			47500 (N)	34500 (N)	40000 (N)
		6522 (N)	50000<(N)		36000 (NE)			48000 (N)	35000 (N)	40000 (N)
		7187 (N)	50000<(N)		29500 (NE)			47000 (N)	34000 (N)	40000 (N)
Glycerin	N	12746 (N)	5347.5 (N)		6750 (NE)			5350 (N)	12500 (N)	27000 (N)
		10343 (N)	5579 (N)		7200 (NE)			4900 (N)	12100 (N)	32000 (N)
		15148 (N)	5116 (N)		6300 (NE)			5800 (N)	12900 (N)	22000 (N)
Polyoxyethylene sorbitan monoolate (20E.O.)	N	745 (P)	762 (P)		1075 (NE)			1075 (P)	710 (P)	1400 (P)
		660 (P)	757 (P)		1100 (NE)			1150 (P)	745 (P)	900 (P)
		830 (P)	767 (P)		1050 (NE)			1000 (P)	675 (P)	1900 (P)
Tricethanolamine	N	1440 (N)	1430 (N)					1750 (N)	1993 (N)	3850 (N)
		1580 (N)	1540 (N)					1850 (N)	1910 (N)	3200 (N)
		1300 (N)	1320 (N)					1650 (N)	2075 (N)	4500 (N)
Methyl p-hydroxybenzoate	N	103 (P)	214 (P)		195 (NE)			257 (P)	215.5 (P)	255 (P)
		140 (P)	238 (P)		240 (NE)			275 (P)	235 (P)	220 (P)
		66 (P)	190 (P)		150 (NE)			239 (P)	196 (P)	290 (P)
Sucrose fatty acid ester	P	250 (P)	304 (P)		315 (NE)			292.5 (P)	294.5 (P)	257.5 (P)
		240 (P)	301 (P)		315 (NE)			290 (P)	300 (P)	255 (P)
		260 (P)	306 (P)		315 (NE)			295 (P)	289 (P)	260 (P)
Benzyl alcohol	P	1148 (P)	888.5 (P)		1100 (NE)			1485 (P)	830 (P)	1675 (P)
		1038 (P)	800 (P)		800 (NE)			1700 (P)	810	1950 (P)
		1258 (P)	977 (P)		1400 (NE)			1270 (P)	850 (P)	1400 (P)
Ethanol	P	10000<(N)	10000<(N)					10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		10000<(N)	10000<(N)					10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		10000<(N)	10000<(N)					10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
Acid red 92	P	230 (P)	231 (P)		332.5 (NE)			340 (P)	268.5 (P)	380 (P)
		220 (P)	221 (P)		360 (NE)			340 (P)	253 (P)	380 (P)
		240 (P)	241 (P)		305 (NE)			340 (P)	285 (P)	380 (P)
Calcium thioglycolate	P	300(P)	660(P)		420(NE)			287.5(P)	292.5(P)	600<(NE; Retest)
		250 (P)	622 (P)		380 (NE)			245 (P)	265 (P)	600<(NE)
		350 (P)	698 (P)		460 (NE)			330 (P)	320 (P)	1000<(NE)
m-Phenylenediamine [*]	P	167 (P)	73 (P)		255 (NE)			290 (P)	167 (P)	355 (P)
		170 (P)	62 (P)		255 (NE)			290 (P)	114 (P)	390 (P)
		163 (P)	84 (P)		212-256.6 (NE)			290 (P)	220 (P)	320 (P)
Sodium salicylate	P	840 (P)	559 (P)		950 (NE)			1195 (P)	635 (P)	1525 (P)
		770 (P)	579 (P)		1100 (NE)			790 (P)	365 (P)	1700 (P)
		910 (P)	539 (P)		800 (NE)			1600 (P)	905 (P)	1350 (P)
Distearyldimethylammonium chloride	P	18.5 (P)	43.8 (P)		35.5 (NE)			57 (P)	32.1 (P)	39.7 (P)
		20.0 (P)	42.4 (P)		35 (NE)			57 (P)	33.2	44.4 (P)
		17.0 (P)	45.3 (P)		36 (NE)			57 (P)	31 (P)	35.0 (P)
Lactic acid	P	994 (P)	982 (P)					1315 (P)	1285 (P)	1575 (P)
		917 (P)	992 (P)					1380 (P)	1240 (P)	1450 (P)
		1070 (P)	971 (P)					1250 (P)	1330 (P)	1700 (P)
Sodium dodecyl sulfate [*]	P	182 (P)	172 (P)	117 (NE)	190 (NE)	198 (NE)	149 (NE)			
		174 (P)	168 (P)	117 (NE)	190 (NE)	201 (NE)	140 (NE)			
		189 (P)	176 (P)	117 (NE)	190 (NE)	194 (NE)	157 (NE)			
Diisopropanolamine [*]	P	455 (P)	901 (P)					720 (P)	170 (P)	1250 (P)
		472 (P)	1040 (P)					820 (P)	170 (P)	1300 (P)
		457 (P)	761 (P)					620 (P)	170 (P)	1200 (P)
Monoethanolamine [*]	P	4.46 (P)	9.8 (P)					5.9 (P)	10.5 (P)	17.5 (P)
		4.33 (P)	9.6 (P)					7.2 (P)	9.6 (P)	17.5 (P)
		4.58 (P)	10.0 (P)					4.6 (P)	11.3 (P)	17.5 (P)
Glycolic acid [*]	P	914 (P)	682 (P)					890 (P)	778 (P)	1075 (P)
		938 (P)	558 (P)					880 (P)	820 (P)	1050 (P)
		889 (P)	806 (P)					900 (P)	735 (P)	1100 (P)
Sodium hydrogenated tallow L-glutamate [*]	P	143 (P)	118 (P)	113 (NE)	90.8 (NE)	235 (NE)	1115 (NE)			
		142 (P)	115 (P)	83.1 (NE)	77.0 (NE)	250 (NE)	1200 (NE)			
		143 (P)	120 (P)	143 (NE)	104.5 (NE)	219 (NE)	1030 (NE)			
Chlorhexidine gluconate (20% solution) [*]	P	67.2 (P)	44.8 (P)					67.5 (P)	45.8 (P)	112.5 (P)
		60.9 (P)	46.3 (P)					78.0 (P)	26.0 (P)	115.0 (P)
		73.5 (P)	43.3 (P)					57.0 (P)	65.5 (P)	110.0 (P)
Butanol [*]	P	10000<(N)	4395 (N)					10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		10000<(N)	5190 (N)					10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		10000<(N)	3600 (N)					10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
Potassium laurate [*]	P	103 (P)	117 (P)					73 #	110 (P)	150 (P)
		107 (P)	123 (P)					58	100 (P)	155 (P)
		99 (P)	110 (P)					88	120 (P)	145 (P)
Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.) [*]	P	26.7 (P)	38.0 (P)	23.3 (NE)	32.3 (NE)	51.0 (NE)	59.5 (NE)			
		25.1 (P)	42.7 (P)	32.2 (NE)	17.5 (NE)	54.9 (NE)	54.0 (NE)			
		28.3 (P)	33.2 (P)	14.3 (NE)	47.0 (NE)	47.0 (NE)	65.0 (NE)			
Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate [*]	P	210 (P)	182 (P)					181 (P)	156 (P)	175 (P)
		209 (P)	177 (P)					190 (P)	148 (P)	175 (P)
		211 (P)	186 (P)					172 (P)	163 (P)	175 (P)
Acetic acid [*]	P	681(P)	691 (P)					690 (P)	795<#	820 (P)
		671 (P)	652 (P)					700 (P)	795	850 (P)
		691 (P)	730 (P)					680 (P)	1000<	790 (P)
Cetyltrimethylammonium bromide [*]	P	2.95 (P)	3.21(P)					1.72 (P)	2.3>#	2.50 (P)
		1.96 (P)	3.31 (P)					1.28 (P)	2.3>	2.10 (P)
		3.94 (P)	3.10 (P)					2.15 (P)	2.3>	2.90 (P)
Benzalkonium chloride [*]	P	16.2 (P)	25.2 (P)	13.2 (NE)	15.5 (NE)	29.0 (NE)	15.0 (NE)			
		15.7 (P)	18.3 (P)	13.6 (NE)	14.5 (NE)	28.3 (NE)	16.5 (NE)			
		16.6 (P)	32.1 (P)	12.8 (NE)	16.5 (NE)	29.7 (NE)	13.5 (NE)			
Stearyltrimethylammonium chloride [*]	P	1.07 (P)	1.47 (P)					1.31 (P)	1.17 (P)	2.90 (P)
		1.42 (P)	1.25 (P)					1.42 (P)	0.98 (P)	2.80 (P)
		0.71 (P)	1.68 (P)					1.20 (P)	1.36 (P)	3.00 (P)
Cetylpyridinium chloride [*]	P	0.53 (P)	0.96 (P)		0.88 (NE)			2.55 (P)	2.245 (P)	2.85 (P)
		0.59 (P)	0.95 (P)		0.94 (NE)			1.8 (P)	2.6 (P)	2.3 (P)
		0.46 (P)	0.96 (P)		0.82 (NE)			3.3 (P)	1.89 (P)	3.4 (P)
Domiphen bromide [*]	P	13.4 (P)	11.4 (P)					7.55 (P)	13.4 (P)	14.8 (P)
		12.10 (P)	10.8 (P)					7.70 (P)	12.9 (P)	13.0 (P)
		14.7 (P)	11.90 (P)					7.40 (P)	13.9 (P)	16.5 (P)

#:Value was excluded from analysis due to deviation from SOP. (Tani et al., 1999)

*:The *in vivo* results of as is application was predicted from the data of 10% concentration.

\$:The intralaboratory results show as two IC50 values in lower parts and the averages in upper parts.

P:Positive, N:Negative, NE:Could not be evaluated

Blank column: Not tested

9.2.施設間変動

厚生科学研究でバリデーションが行われた被験物質のうち、原体における眼刺激性・GHS 分類が判明している物質について、SIRC 細胞毒性試験に基づくインビボ予測結果から施設間の再現性を確認した。比較対照物質は Triethanolamine とし、各施設における 2 回のデータを用いた。細胞毒性試験結果に基づいて予測された GHS 分類 NI を陰性(N)、それ以外の GHS 分類を陽性(P)とした。Table 10 には、Triethanolamine を実施した 5 施設について、物質毎の評価を示した。

その結果、5 施設間の評価に異なる所は認められなかった。一方、Lab. C～Lab.Fについては比較対照物質である Triethanolamine のデータが無く、評価を実施できなかったが、念のため 5 施設(A～E)の Triethanolamine の IC50 の平均値である 2090 μ g/mL を用いて仮に分類したところ、他の施設と評価が異なる所は認められなかった。

以上より、SIRC 細胞毒性試験の施設間の再現性は良好と考えられた。

Table 10 Results of interlaboratory reproducibility on the SIRC-CVS assay

Substance	<i>In vivo</i> classification	<i>In vitro</i> classification				
		Lab. A	Lab. B	Lab. G	Lab. H	Lab. I
2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate	N	P	P	P	P	P
Isopropyl myristate	N	N	N	N	N	N
Isotonic sodium chloride solution	N	N	N			
Silicic anhydride	N	N	N	N	N	N
Polyethylene glycol 400	N	N	N	N	N	N
Glycerin	N	N	N	N	N	N
Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.)	N	P	P	P	P	P
Triethanolamine	N	N	N	N	N	N
Methyl p-hydroxybenzoate	N	P	P	N	N	N
Sucrose fatty acid ester	P	P	P	P	P	P
Benzyl alcohol	P	P	P	P	P	P
Ethanol	P	N	N	N	N	N
Acid red 92	P	P	P	P	P	P
Calcium thioglycolate	P	P	P	P	P	
m-Phenylenediamine#	P					
Sodium salicylate	P	P	P	P	P	P
Distearyltrimethylammonium chloride	P	P	P	P	P	P
Lactic acid	P	P	P	P	P	P
Sodium dodecyl sulfate*	P	P	P			
Diisopropanolamine*	P	P	P	P	P	P
Monoethanolamine*	P	P	P	P	P	P
Glycolic acid*	P	P	P	P	P	P
Sodium hydrogenated tallow L-glutamate*	P	P	P			
Chlorhexidine gluconate (20% solution)*	P	P	P	P	P	P
Butanol*	P	N	N	N	N	N
Potassium laurate*	P	P	P		P	P
Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)*	P	P	P			
Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate*	P	P	P	P	P	P
Acetic acid*	P	P	P	P		P
Cetyltrimethylammonium bromide*	P	P	P	P		P
Benzalkonium chloride*	P	P	P			
Stearyltrimethylammonium chloride*	P	P	P	P	P	P
Cetylpyridinium chloride*	P	P	P	P	P	P
Domiphen bromide*	P	P	P	P	P	P

P:Positive, N:Negative

*: The *in vivo* results of as is application was predicted from the data of 10% concentration.

#:M-Phenylenediamine was excluded from analysis due to instability. (Tani et al., 1999)

Blank column: NT(Not tested) or NE (Could not be evaluated)

6. SIRC 細胞毒性試験の追加研究 [研究 2]

1991 年度に発足した厚生科学研究班の「新規化粧品原料配合化粧品の安全性評価のための試験法の研究」において 12 種の眼刺激性試験代替法のバリデーション研究が実施され、その中の CVS 法による SIRC 細胞毒性試験について GHS の NI を同定する試験法として再解析された。その結果、再現性は施設内および施設間で良好であることが確認された。

次の段階として、GHS の NI を同定する試験法としてインビボを予測できるか否かを検討する必要があるが、そのためには更に多くの物質のデータが必要であった。特に、GHS 分類における 2B の物質のデータが不足していた。また、厚生科学研究のデータに基づく解析では、NI 以外が 25 物質に対し、NI は 9 物質であり、NI の追加も必要と思われた。そこで、ICCVAM Recommended Reference Substance List (2006) に記載されている 2B および NI の化学物質 (計 27 物質) 全てについて SIRC 細胞毒性試験を実施した。また、原体 (100%) でのインビボの報告がある化粧品原料 41 品について SIRC 細胞毒性試験を実施した。厚生科学研究におけるデータに追加データを加え、SIRC 細胞毒性試験が GHS の NI を同定する能力について検討した。

6.2. 研究施設

本研究が行われた研究施設は GLP 適合施設では無く、GLP に従った試験は実施していない。被験物質はコード化されずに試験が行われた。しかしながら、被験物質の管理および測定データの処理を含む試験操作については、施設内で QA チェックが行われ、生データが適切に最終結果に反映されていることなどを確認した。

6.3. プロトコール

6.3.1. 試験に用いたプロトコール

試験に用いたプロトコールは Appendix 13 参照。

6.3.2. 提案するプロトコール

提案するプロトコールは 5.3.2. を参照。

6.3.3. 試験に用いたプロトコールと提案するプロトコールとの違い

表 11 試験に用いたプロトコールと提案するプロトコールとの違い

項目	試験時のプロトコール	提案するプロトコール
陽性対照に基づく試験合格基準	陽性対照 (SDS) の IC50 値が設定した範囲に収まることを試験成立の条件とする。その範囲は、厚生科学研究で得られた SDS の平均 $IC_{50} \pm 3SD$ (99%信頼区間) である $77.7 \sim 258.7 \mu g/mL$ を合格基準とする。	陽性対照として SDS を設定する。標準的なプロトコールで試験された SDS の IC50 が $50 \sim 250 \mu g/mL$ の範囲であり、これを試験成立の条件とする。
2 試験間での陽性対照のばらつきに基づく試験合格基準	2 試験間での陽性対照 (SDS) の IC50 値が ± 2 倍以内に収まることを合格基準とする。	基準を設けない
左右の陰性対照のばらつきに基づく試験合格基準	体系的に試験精度を見極めるために、96 穴マイクロプレートの左右に陰性対照を設定し、両者の吸光度が同様であることを確認する。左右の陰性対照の平均吸光度が全体の平均吸光度の 15% 以内 (平均値 $\pm 15\%$) に収まること	基準を設けない

	を試験の合格基準とする。	
マイクロプレートシーリングテープの貼付	物質が揮発性し周囲のウェルへ影響を与える可能性を考慮し、ウェルを覆うマイクロプレートシーリングテープを貼付する。	被験物質が揮発し周囲のウェルへ影響を与える可能性を考慮する場合、ウェルを覆うマイクロプレートシーリングテープを貼付することができる。

6.4. 被験物質

本研究で用いた物質を Table 12 に示す。ICCVAM Recommended Reference Substance List に収載されている物質のうち NI と 2B に分類されている 27 物質 (No.1～27) を用いた。更に原体 (100%) での *in vivo* の報告があり、かつ培養液に溶解または懸濁可能な化粧品原料 41 物質 (No.28～68) を用いた。これら 68 物質の内訳は、界面活性剤 12 物質、エステル 10 物質、アルコール 9 物質、ポリオール 7 物質、芳香族化合物 5 物質、有機塩 5 物質、ベンゾフェノン 2 原料、オイル 2 物質、無機塩 2 物質、エーテル 2 物質、ニトリル 1 物質、酸 1 物質、アルデヒド 1 物質、有機金属 1 物質、ヘテロサイクリック化合物 1 物質、ハロゲン化炭化水素 1 原料、ケトン 1 物質、チオール 1 物質、ジオキソラン 1 物質、炭化水素 1 物質、トリアセート 1 物質、アミン 1 物質であった。また、これらを存在状態で分類すると、固体 26 物質、液体 40 物質、水溶液 2 物質であった。

Table 12 The 68 substances

	Substance	CAS	Class	Physical state	MW
1	Ethyl-2-methyl acetoacetate	609-14-3	Esters	Liquid	144.2
2	Ammonium nitrate	6484-52-2	Inorganic salts	Solid	80.0
3	Butyl Dipropasol Solvent	29911-27-1	Ethers	Liquid	176.3
4	3-Chloropropionitrile	542-76-7	Nitriles	Liquid	89.5
5	Cyclopentanol	96-41-3	Alcohols	Liquid	86.1
6	3,3-Dithiodipropionic acid	1119-62-6	Acids	Solid	210.3
7	Hexyl cinnamic aldehyde	101-86-0	Aldehydes	Liquid	216.3
8	N-Lauroylsarcosine sodium salt	137-16-6	Surfactants	Solid	293.4
9	Maneb	12427-38-2	Organic metals	Solid	265.3
10	2-Methyl-1-pentanol	105-30-6	Alcohols	Liquid	102.2
11	Propasol Solvent P	1569-01-3	Ethers	Liquid	118.2
12	6-Methyl purine	2004-03-7	Heterocyclic compounds	Solid	134.1
13	Ethyl 2,6-dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropanoate	96568-04-6	Esters	Solid	280.1
14	Triton X-100	9002-93-1	Surfactants	Liquid	250.4
15	iso-Octyl acrylate	29590-42-9	Esters	Liquid	184.3
16	tetra-Aminopyrimidine sulfate	5392-28-9	Organic salts	Solid	238.2
17	2,4-Difluoronitrobenzene	446-35-5	Aromatics	Liquid	159.1
18	n,n-Dimethylguanidine sulfate	598-65-2	Organic salts	Solid	272.3
19	2-(n-Dodecylthio)ethanol	1462-55-1	Alcohols	Liquid	206.3
20	iso-Propyl bromide	75-26-3	Halogenated hydrocarbon	Liquid	123.0
21	Di-iso-butyl ketone	108-83-8	Ketones	Liquid	142.2
22	iso-Octylthioglycolate	25103-09-7	Thiols	Liquid	204.3
23	2,4-Pentanediol	625-69-4	Polyols	Liquid	104.2
24	2,2-Dimethyl-3-pentanol	3970-62-5	Alcohols	Liquid	116.2
25	Potassium tetrafluoroborate	14075-53-7	Inorganic salts	Solid	125.9
26	3-Methoxy-1,2-propanediol	623-39-2	Polyols	Liquid	106.1
27	Toluene	108-88-3	Aromatics	Liquid	92.1
28	2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol	52-51-7	Polyols	Solid	200.0
29	Benzalkonium chloride	8001-54-5	Surfactants	Solid	283.9
30	Benzophenone-1	131-56-6	Benzophenones	Solid	214.2
31	Benzophenone-2	131-55-5	Benzophenones	Solid	246.2
32	Butoxyethanol	111-76-2	Alcohols	Liquid	118.2
33	Butylene glycol	107-88-0	Polyols	Liquid	90.1
34	Cetrimonium chloride	112-02-7	Surfactants	Solid	320.0
35	Cetyl alcohol	36653-82-4	Alcohols	Solid	242.4
36	Chlorhexidine digluconate 20% solution	18472-51-0	Organic salts	Solution	897.8
37	Chlorophene	120-32-1	Aromatics	Solid	218.7
38	Chloroxyleneol	88-04-0	Aromatics	Solid	156.6
39	Diethylhexyl adipate	103-23-1	Esters	Liquid	370.6
40	Diisopropyl adipate	6938-94-9	Esters	Liquid	230.3
41	Dioctyl sodium sulfosuccinate	577-11-7	Surfactants	Solid	488.5
42	Ethylhexyl palmitate	29806-73-3	Esters	Liquid	368.6
43	Hexylene glycol	107-41-5	Polyols	Liquid	118.2
44	Isocetyl stearate	25339-09-7	Esters	Liquid	508.9
45	Isopropyl Myristate	110-27-0	Esters	Liquid	270.45
46	Isopropyl Palmitate	142-91-6	Esters	Liquid	298.5
47	Lauramide DEA	120-40-1	Surfactants	Solid	287.4
48	Methoxyisopropyl acetate	108-65-6	Esters	Liquid	132.2
49	Oleyl alcohol	143-28-2	Alcohols	Liquid	268.5
50	PEG-40 stearate	9004-99-3	Surfactants	Solid	-
51	Phenethyl alcohol	60-12-8	Alcohols	Liquid	122.2
52	Phenoxyethanol	122-99-6	Alcohols	Liquid	138.2
53	Phytantriol	74563-64-7	Polyols	Liquid	330.6
54	Propylene carbonate	108-32-7	Dioxolanes	Liquid	102.1
55	Resorcinol	108-46-3	Aromatics	Solid	110.1
56	Safflower (Carthamus tinctorius) oil	8001-23-8	Oils	Liquid	-
57	Sesame (Sesamum indicum) oil	8008-74-0	Oils	Liquid	-
58	Sodium dehydroacetate	4418-26-2	Organic salts	Solid	190.1
59	Sodium naphthalenesulfonate	532-02-5	Organic salts	Solid	230.2
60	Sodium stearate	822-16-2	Surfactants	Solid	306.5
61	Sorbitan oleate	1338-43-8	Surfactants	Liquid	428.6
62	Sorbitan sesquioleate	8007-43-0	Surfactants	Liquid	1175.7
63	Squalane	111-01-3	Hydrocarbons	Liquid	422.8
64	Stearalkonium chloride	122-19-0	Surfactants	Solid	424.2
65	TEA-Lauryl sulfate 40% solution	139-96-8	Surfactants	Solution	415.6
66	Triacetin	102-76-1	Triacetates	Liquid	218.2
67	Triethylene glycol	112-27-6	Polyols	Liquid	150.2
68	Triisopropanolamine	122-20-3	Amines	Solid	191.3

6.5.被験物質の Draize 試験データに基づく分類

被験物質についての GHS 分類データを Table 13-1 および 13-2 に示す。27 物質 (No.1～27) については ICCVAM Recommended Reference Substance List により分類した。化粧品原料 41 物質 (No.28～68) については、論文並びにグローバルな化学物質データベースのデータに基づいて分類した。用いたデータベースは IUCLID (International Uniform Chemical Information Database)、SIDS (Screening Information Data Set)、ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals)であった。論文に示されたデータは、角膜、虹彩、結膜への影響の有無や MAS 等が記載されているため、角膜に反応が認められない場合または MAS15点以下を NI として分類した。IUCLID および SIDS においては Not (Non) irritating、Slightly irritating の結果となっているもの、または MAS15 点以下を NI と分類した。データベースの記載内容を調べ、GHS 分類に関わるデータを考慮して分類した。ECETOC は直接 GHS 基準で分類した。NI を陰性 (N)、それ以外を陽性 (P) で示した。なお、被験物質の希釈液で陽性の結果が得られている場合には、眼刺激の濃度依存性に基づいて、原体の眼刺激性を陽性と判別した。

Table 13-1 GHS classification of the substances

	Substance	GHS classification by ICCVAM Recommended Reference Substance List	The classification used in this study
1	Ethyl-2-methyl acetoacetate	2B	P
2	Ammonium nitrate	2B	P
3	Butyl Dipropasol Solvent	2B	P
4	3-Chloropropionitrile	2B	P
5	Cyclopentanol	2B	P
6	3,3-Dithiodipropionic acid	2B	P
7	Hexyl cinnamic aldehyde	2B (12.5%)*	P
8	N-Lauroylsarcosine sodium salt	2B	P
9	Maneb	2B	P
10	2-Methyl-1-pentanol	2B	P
11	Propasol Solvent P	2B	P
12	6-Methyl purine	2B	P
13	Ethyl 2,6-dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropanoate	2B	P
14	Triton X-100	1(100%), 2B (5%), NI (1%)	P
15	iso-Octyl acrylate	NI	N
16	tetra-Aminopyrimidine sulfate	NI	N
17	2,4-Difluoronitrobenzene	NI	N
18	n,n-Dimethylguanidine sulfate	NI	N
19	2-(n-Dodecylthio)ethanol	NI	N
20	iso-Propyl bromide	NI	N
21	Di-iso-butyl ketone	NI	N
22	iso-Octylthioglycolate	NI	N
23	2,4-Pentanediol	NI	N
24	2,2-Dimethyl-3-pentanol	NI	N
25	Potassium tetrafluoroborate	NI	N
26	3-Methoxy-1,2-propanediol	NI	N
27	Toluene	NI	N

P: Positive, N:

Negative.

*: Tested concentration is shown in parenthesis.

Table 13-2 GHS classification of the substances

	Substance	GHS classification by ICCVAM Recommended Reference Substance List	GHS classification predicted from the previous paper	GHS classification obtained from Japanese validation study	GHS classification obtained from global chemical databases	The classification used in this study
28	2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol		2B, 2A or 1			P
29	Benzalkonium chloride	1 (5%)*	2B, 2A or 1	2A or 1 (10%)	1(10%)*	P
30	Benzophenone-1		2B			P
31	Benzophenone-2		2B			P
32	Butoxyethanol		1		2B or 2A [#] , 2B or 2A ^{\$}	P
33	Butylene glycol		NI		NI [#]	N
34	Cetrimonium chloride		2B, 2A or 1			P
35	Cetyl alcohol		NI		NI [#]	N
36	Chlorhexidine digluconate		2A or 1			P
37	Chlorophene		2A or 1			P
38	Chloroxylenol		2B, 2A or 1			P
39	Diethylhexyl adipate		NI		NI [#] , NI ^{\$}	N
40	Diisopropyl adipate		NI			N
41	Dioctyl sodium sulfosuccinate		2B, 2A or 1		2A [#] ,	P
42	Ethylhexyl palmitate		NI			N
43	Hexylene glycol		2B, 2A or 1		2B, 2A or 1 [#] , NI, 2B or 2A ^{\$}	P
44	Isocetyl stearate		NI			N
45	Isopropyl Myristate		NI	NI	NI [#]	N
46	Isopropyl Palmitate		NI			N
47	Lauramide DEA		2A or 1			P
48	Methoxyisopropyl acetate		2B, 2A or 1		NI [#] , 2B or 2A ^{\$}	P
49	Oleyl alcohol		NI			N
50	PEG-40 stearate		NI			N
51	Phenethyl alcohol		2B, 2A or 1		2B or 2A [#]	P
52	Phenoxyethanol		2A		2B or 2A [#] , 2B, 2A or 1 ^{\$}	P
53	Phytantriol		2B, 2A or 1			P
54	Propylene carbonate		NI		2B or 2A [#]	P
55	Resorcinol		2B, 2A or 1		2A or 1 [#]	P
56	Safflower (Carthamus tinctorius) oil		NI			N
57	Sesame (Sesamum indicum) oil		NI			N
58	Sodium dehydroacetate		NI			N
59	Sodium naphthalenesulfonate		2A or 1			P
60	Sodium stearate		NI			N
61	Sorbitan oleate		NI			N
62	Sorbitan sesquioleate		NI			N
63	Squalane		NI			N
64	Stearalkonium chloride		2A or 1			P
65	TEA-Lauryl sulfate		2A or 1		2A or 1 [#]	P
66	Triacetin		NI		NI [#] , NI ^{\$}	N
67	Triethylene glycol		NI		NI [#]	N
68	Triisopropanolamine		2B, 2A or 1			P

P: Positive, N: Negative.

*: Tested concentration is shown in parenthesis.

#: It was classified on the basis of the data from the IUCLID.

\$. It was classified on the basis of the data from SIDS.

&: It was classified on the basis of the data from ECETOC Technical report No.48 (2).

6.6. 68 種の被験物質の SIRC 細胞毒性試験

68 物質の SIRC 細胞毒性試験結果について Table 14 に示す。No.4 の 3-Chloropropionitrile は、最高試験濃度 10000 μ g/mL で揮発による陰性対照ウェルへの影響が認められ、1000 μ g/mL で試験した結果、陽性を示した。No.5 の Cyclopentanol は、1 回目の試験が陽性対照の試験成立基準に適合しなかったため再試験を行った結果、陰性を示した。No.9 の Maneb については、溶媒を用いても均一な懸濁が得られず試験を実施できなかった。No.17 の 2,4-Difluoronitrobenzene は最高試験濃度 10000 および 1000 μ g/mL で揮発による陰性対照ウェルへの影響が認められ、100 μ g/mL で試験した結果、陽性を示した。

これらのデータは、SIRC 細胞による GHS の NI の予測についての検討(後述)に供した。

Table14 Results of the 68 substances

No.	Substance	IC50 of the first measurement		IC50 of the second measurement		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Evaluation
		Substance	Triethanolamine	Substance	Triethanolamine			
1	Ethyl-2-methyl acetoacetate	2978.4	2164.2	3410.9	1620.4	N	P	False negative
2	Ammonium nitrate	1999.0	2000.5	1439.6	1808.3	P	P	True positive
3	Butyl Dipropasol Solvent	2729.9	1675.7	3646.0	1401.5	N	P	False negative
4	3-Chloropropionitrile	47.2	1757.2	50.1	1604.0	P	P	True positive
5	Cyclopentanol	2684.1	1656.6	2366.4	1687.6	N	P	False negative
6	3,3-Dithiodipropionic acid	1436.8	1940.1	1313.8	1674.5	P	P	True positive
7	Hexyl cinnamic aldehyde	49.1	1709.2	125.5	1704.8	P	P	True positive
8	N-Lauroylsarcosine sodium salt	53.3	2228.9	55.1	1694.8	P	P	True positive
9	Maneb	Could not be tested		Could not be tested			P	Could not be tested
10	2-Methyl-1-pentanol	1665.9	1558.9	1688.2	1386.8	N	P	False negative
11	Propasol Solvent P	3889.9	1868.2	3816.8	1663.4	N	P	False negative
12	6-Methyl purine	<39.1	1669.9	<39.1	1576.9	P	P	True positive
13	Ethyl 2,6-Dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropanoate	<39.1	1932.9	84.2	1461.8	P	P	True positive
14	Triton X-100	<39.1	1945.1	<39.1	1599.5	P	P	True positive
15	iso-Octyl acrylate	327.7	1424.0	98.1	1251.7	P	N	False positive
16	Tetra-Aminopyrimidine sulfate	97.8	1666.2	85.7	1347.1	P	N	False positive
17	2,4-Difluoronitrobenzene	30.4	1012.3	36.2	1595.4	P	N	False positive
18	n,n-Dimethylguanidine sulfate	1380.8	1526.8	1018.5	1690.2	P	N	False positive
19	2-(n-Dodecylthio)ethanol	<39.1	1501.7	169.6	1448.5	P	N	False positive
20	iso-Propyl bromide	>5000	1763.3	>5000	1206.8	N	N	True negative
21	Di-iso-butyl ketone	>5000	1773.9	>5000	1808.9	N	N	True negative
22	iso-Octylthioglycolate	399.6	1614.6	219.1	1452.7	P	N	False positive
23	2,4-Pentenediol	>5000	1435.9	3126.7	1295.2	N	N	True negative
24	2,2-Dimethyl-3-pentanol	1399.8	1500.2	976.2	1429.1	P	N	False positive
25	Potassium tetrafluoroborate	4595.1	1525.0	>5000	1683.3	N	N	True negative
26	3-Methoxy-1,2-propanediol	>5000	1820.5	>5000	1451.3	N	N	True negative
27	Toluene	>5000	1349.7	>5000	1782.0	N	N	True negative
28	2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol	<39.1	1786.8	<39.1	1757.9	P	P	True positive
29	Benzalkonium chloride	<39.1	1664.1	<39.1	1118.3	P	P	True positive
30	Benzophenone-1	52.4	1338.9	92.9	1452.3	P	P	True positive
31	Benzophenone-2	49.4	2145.3	76.0	1669.1	P	P	True positive
32	Butoxyethanol	2099.4	1861.3	2275.0	1330.7	N	P	False negative
33	Butylene glycol	>5000	1770.2	>5000	1488.4	N	N	True negative
34	Cetrimonium chloride	<39.1	1611.9	<39.1	1534.3	P	P	True positive
35	Cetyl alcohol	<39.1	1550.9	<39.1	2290.9	P	N	False positive
36	Chlorhexidine digluconate 20% solution	<39.1	1408.8	<39.1	1437.1	P	P	True positive
37	Chlorophene	<39.1	1260.3	<39.1	1441.2	P	P	True positive
38	Chloroxyleneol	81.1	1267.2	69.7	1374.6	P	P	True positive
39	Diethylhexyl adipate	>5000	1695.5	>5000	1354.3	N	N	True negative
40	Diisopropyl adipate	372.0	1495.1	333.9	1486.9	P	N	False positive
41	Dioctyl sodium sulfosuccinate	53.2	1339.4	55.5	1303.1	P	P	True positive
42	Ethylhexyl palmitate	>5000	1218.0	>5000	1662.7	N	N	True negative
43	Hexylene glycol	>5000	1484.0	>5000	1485.4	N	P	False negative
44	Isocetyl stearate	>5000	1468.0	>5000	1696.4	N	N	True negative
45	Isopropyl Myristate	>5000	1531.6	3606.0	1452.4	N	N	True negative
46	Isopropyl Palmitate	>5000	1222.7	>5000	1557.3	N	N	True negative
47	Lauramide DEA	<39.1	1737.8	<39	1555.9	P	P	True positive
48	Methoxyisopropyl acetate	2482.4	1662.5	4172.9	1647.2	N	P	False negative
49	Oleyl alcohol	<39.1	1706.2	<39	1283.2	P	N	False positive
50	PEG-40 stearate	288.9	1436.5	249.0	1700.4	P	N	False positive
51	Phenethyl alcohol	621.0	1446.6	753.3	1508.0	P	P	True positive
52	Phenoxyethanol	970.7	1471.9	1420.5	2276.3	N	P	False negative
53	Phytantriol	<39.1	1545.5	53.0	1565.2	P	P	True positive
54	Propylene carbonate	>5000	1584.5	>5000	1552.1	N	N	True negative
55	Resorcinol	401.3	1413.8	386.7	1498.2	P	P	True positive
56	Safflower (Carthamus tinctorius) oil	1786.3	1439.4	2644.7	1601.9	N	N	True negative
57	Sesame (Sesamum indicum) oil	>5000	1622.5	>5000	1009.0	N	N	True negative
58	Sodium dehydroacetate	827.1	1621.0	1012.7	1499.5	P	N	False positive
59	Sodium naphthalenesulfonate	1321.2	1464.9	639.4	1381.5	P	P	True positive
60	Sodium stearate	194.2	1857.2	337.9	1628.4	P	N	False positive
61	Sorbitan oleate	784.6 (test1) 3142.8 (test2)	1403.1 (test1) 1446.3 (test2)	866.0 (test3)	1424.0(test3)	P	N	False positive
62	Sorbitan sesquioleate	1439.8	1713.5	917.4	1781.1	P	N	False positive
63	Squalane	>5000	1513.6	>5000	1550.3	N	N	True negative
64	Stealkonium chloride	<39.1	1631.5	<39.1	1341.0	P	P	True positive
65	TEA-Lauryl sulfate 40% solution	234.4	1825.7	241.6	1586.1	P	P	True positive
66	Triacetin	1470.1	1685.9	1482.6	1576.9	P	N	False positive
67	Triethylene glycol	>5000	1769.7	>5000	1446.2	N	N	True negative
68	Triisopropanolamine	845.5	1642.3	614.0	1549.9	P	P	True positive

7.SIRC 細胞毒性試験による NI の予測

SIRC 細胞毒性試験によって GHS 分類の NI とそれ以外を区別できるか否かについて、厚生科学

研究の 33 物質のデータに追加試験で実施した 68 物質のデータを加えて検討した。NI を陰性(N)、それ以外を陽性(P)として示した。Benzalkonium chloride、Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.) (別名 Triton X-100)、Isopropyl myristate および Di(2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate (別名 Dioctyl sodium sulfosuccinate)、の 4 物質は両者に共通であり、さらに追加試験で用いられた Maneb は難溶解性で試験できなかったため、実質的には 63 物質の追加となり、合計 96 物質で対応性を検討した。なお、Benzalkonium chloride、Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)、Isopropyl myristate および Di(2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate の結果については、厚生科学研究と追加試験の両方で結果は一致し、インビボにおける陽性、陰性を SIRC 細胞毒性試験は正しく予測した。

96 物質中 65 物質の結果がインビトロとインビボで一致した。偽陰性は、Ethanol、Butanol、Ethyl-2-methyl acetoacetate、Butyl Dipropasol Solvent、Cyclopentanol、2-Methyl-1-pentanol、Propasol Solvent P、Butoxyethanol、Hexylene glycol、Methoxyisopropyl acetate、Phenoxyethanol、Propylene carbonate であった。これらはアルコール 6 物質、エステル 2 物質、エーテル 2 物質、ポリオール 1 物質およびジオキシラン 1 物質であり、分子量は 180 未満の低分子であるという特徴を有していた。

ポリオールについてはインビボで陽性を示す 3 物質 (2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol, Hexylene glycol, Phytantoriol)、インビボで陰性を示す 6 物質 (Glycerol、Polyethylene glycol 400、2,4-Pentanediol、3-Methoxy-1,2-propanediol、Butylene glycol、Triethylene glycol) について検討され、8 物質でインビトロとインビボが対応したが、Hexylene glycol のみ偽陰性を示した。

偽陽性は、iso-Octyl acrylate、tetra-Aminopyrimidine sulfate、n,n-Dimethylguanidine sulfate、2-(n-Dodecylthio)ethanol、iso-Octylthioglycolate、2,2-Dimethyl-3-pentanol、Cetyl alcohol、Diisopropyl adipate、Oleyl alcohol、PEG-40 stearate、Sodium dehydroacetate、Sodium stearate、Sorbitan oleate、Sorbitan sesquioleate、Triacetin であった。

感度、特異度、偽陽性度、偽陰性度、一致度はそれぞれ 79%(44/56)、53%(21/40)、48%(19/40)、21%(12/56)、68%(65/96)であった。

Table 15 The eye irritancy of test samples predicted by the SIRC-CVS assay

		<i>In vitro</i> (Classification by SIRC-CVS assay using triethanolamine as a reference substance for non-irritancy)	
		Positive	Negative
<i>In vivo</i> (Classification by GHS)	Positive (1, 2Aor 2B)	(44) Sucrose fatty acid ester Benzyl alcohol Acid red 92 Calcium thioglycolate Sodium salicylate Distearyldimethylammonium chloride Lactic acid Sodium dodecyl sulfate* Diisopropanolamine* Monoethanolamine* Glycolic acid* Sodium hydrogenated tallow L-glutamate* Chlorhexidine gluconate (20% solution)* Potassium laurate* Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)* Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate* Acetic acid* Cetyltrimethylammonium bromide* Benzalkonium chloride* Stearyltrimethylammonium chloride* Cetylpyridinium chloride* Domiphen bromide* ---- Ammonium nitrate 3-Chloropropionitrile 3,3-Dithiodipropionic acid Hexyl cinnamic aldehyde N-Lauroylsarcosine sodium salt 6-Methyl purine 2,6-Dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropanoate 2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol Benzophenone-1 Benzophenone-2 Cetrimonium chloride Chlorhexidine digluconate Chlorophene Chloroxylenol Lauramide DEA Phenethyl alcohol Phytantriol Resorcinol Sodium naphthalenesulfonate Stearalkonium chloride TEA-Lauryl sulfate 40% solution Triisopropanolamine	(12) Ethanol Butanol* ---- Ethyl-2-methyl acetoacetate Butyl Dipropasol Solvent Cyclopentanol 2-Methyl-1-pentanol Propasol Solvent P Butoxyethanol Hexylene glycol Methoxyisopropyl acetate Phenoxyethanol Propylene carbonate
	Negative (NI)	(19) 2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.) Methyl p-hydroxybenzoate ---- iso-Octyl acrylate tetra-Aminopyrimidine sulfate 2,4-Difluoronitrobenzene n,n-Dimethylguanidine sulfate 2-(n-Dodecylthio)ethanol iso-Octylthioglycolate 2,2-Dimethyl-3-pentanol Cetyl alcohol Diisopropyl adipate Oleyl alcohol PEG-40 stearate Sodium dehydroacetate Sodium stearate Sorbitan oleate Sorbitan sesquioleate Triacetin	(21) Isopropyl myristate Isotonic sodium chloride solution Silicic anhydride Polyethylene glycol 400 Glycerin Triethanolamine ---- iso-Propyl bromide Di-iso-butyl ketone 2,4-Pentanediol Potassium tetrafluoroborate 3-Methoxy-1,2-propanediol Toluene Butylene glycol Diethylhexyl adipate Ethylhexyl palmitate Isocetyl stearate Isopropyl Palmitate Safflower (Carthamus tinctorius) oil Sesame (Sesamum indicum) oil Squalane Triethylene glycol

*:The *in vivo* results of as is application was predicted from the data of 10% concentration.

Table 16 Predictive capacity of the SIRC-CVS assay

	N	Sensitivity	Specificity	False positive rate	False negative rate	Concordance
SIRC-CVS assay vs Draize eye test	96	79% (44/56)	53% (21/40)	48% (19/40)	21% (12/56)	68% (65/96)

次に、SIRC 細胞毒性試験による化学物質・原体の眼刺激性の予測に関し、被験物質の適用範囲を限定して検討した。当検討については、ICCVAM において牛角膜混濁および透過性試験 (BCOP)、摘出鶏眼試験 (ICE) を評価する際に行われており、これらの試験の OECD ガイドラインでも特定の物質群を除外することが記載されている。被験物質の適用範囲から除外した物質群は、アルコール、エステル、エーテルで、なおかつ分子量 180 未満の低分子とした。このうち低分子のアルコールについては、今回のものと評価方法は異なるものの、SIRC 細胞毒性試験において偽陰性を示す物質群として ohno ら(1999)により既に報告されている。

該当する 14 被験物質を除外して対応性を検討した結果、82 物質中 63 物質の結果がインビトロとインビボで一致した。偽陰性は Hexylene glycol と Propylene carbonate、2 物質であった。感度、特異度、偽陽性度、偽陰性度、一致度はそれぞれ 95%(42/44)、55%(21/38)、45%(17/38)、5%(2/44)、77%(63/82)であった。このように適用除外となる物質群を考慮することは NI を予測するうえで不可欠であると思われた。

以上より、SIRC 細胞毒性試験は、試験法の特性を理解して用いるならば、GHS の NI に分類される物質を予測できる試験法であると判断した。

Table 17 The eye irritancy of test samples predicted by the SIRC-CVS assay

		<i>In vitro</i> (Classification by SIRC-CVS assay using triethanolamine as a reference substance for non-irritancy)	
		Positive	Negative
<i>In vivo</i> (Classification by GHS)	Positive (1, 2A or 2B)	(42) Sucrose fatty acid ester Benzyl alcohol Acid red 92 Calcium thioglycolate Sodium salicylate Distearyldimethylammonium chloride Lactic acid Sodium dodecyl sulfate* Diisopropanolamine* Monoethanolamine* Glycolic acid* Sodium hydrogenated tallow L-glutamate* Chlorhexidine gluconate (20% solution)* Potassium laurate* Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)* Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate* Acetic acid* Cetyltrimethylammonium bromide* Benzalkonium chloride* Stearyltrimethylammonium chloride* Cetylpyridinium chloride* Domiphen bromide* ---- Ammonium nitrate 3-Chloropropionitrile 3,3-Dithiodipropionic acid Hexyl cinnamic aldehyde N-Lauroylsarcosine sodium salt 6-Methyl purine 2,6-Dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropanoate 2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol Benzophenone-1 Benzophenone-2 Cetrimonium chloride Chlorhexidine digluconate Chlorophene Chloroxylenol Lauramide DEA Phenethyl alcohol Phytantriol Resorcinol Sodium naphthalenesulfonate Stearylaluminum chloride TEA-Lauryl sulfate 40% solution Triisopropanolamine	(2) Ethanol Butanol* ---- Ethyl-2-methylacetate Butyl Dipropasol Solvent Cyclopentanol 2-Methyl-1-pentanol Propasol Solvent P Butoxyethanol Hexylene glycol Methoxyisopropyl acetate Phenoxyethanol Propylene carbonate
	Negative (NI)	(17) 2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.) Methyl p-hydroxybenzoate ---- iso-Octyl acrylate tetra-Aminopyrimidine sulfate 2,4-Difluoronitrobenzene n,n-Dimethylguanidine sulfate 2-(n-Dodecylthio)ethanol iso-Octylthioglycolate 2,2-Dimethyl-3-pentanol Cetyl alcohol Diisopropyl adipate Oleyl alcohol PEG-40 stearate Sodium dehydroacetate Sodium stearate Sorbitan oleate Sorbitan sesquileate Triacetin	(21) Isopropyl myristate Isotonic sodium chloride solution Silicic anhydride Polyethylene glycol 400 Glycerin Triethanolamine ---- iso-Propyl bromide Di-iso-butyl ketone 2,4-Pentanediol Potassium tetrafluoroborate 3-Methoxy-1,2-propanediol Toluene Butylene glycol Diethylhexyl adipate Ethylhexyl palmitate Isocetyl stearate Isopropyl Palmitate Safflower (Carthamus tinctorius) oil Sesame (Sesamum indicum) oil Squalane Triethylene glycol

*:The *in vivo* results of as is application was predicted from the data of 10% concentration.

Table 18 Predictive capacity of the SIRC-CVS assay

	N	Sensitivity	Specificity	False positive rate	False negative rate	Concordance
SIRC-CVS assay vs Draize eye test	82	95% (42/44)	55% (21/38)	45% (17/38)	5% (2/44)	77% (63/82)

8. まとめ

SIRC 細胞毒性試験は、先の厚生科学研究のバリデーション研究において施設間の再現性が高いことや Draize 試験の MAS15 点を境界とする分類に対する高い予測能が報告されている。しかしながら、眼刺激性試験の代替法としての妥当性を示すためには化学物質の原体を評価できることを確認する必要があった。そこで、厚生科学研究のデータを再解析し、さらに1施設で実施した追加のデータを加え、SIRC 細胞毒性試験が GHS の NI を予測可能か否かについて検討した。評価にあたっては Triethanolamine を比較対照物質として用い、その IC50 以上である場合を NI とする予測方法とした。その結果、厚生科学研究のデータからは施設内および施設間共に再現性が良好であるという結果を得た。また、追加データを加えた NI の予測能の検討では、低分子(分子量 180 未満)のアルコール、エステル、エーテル等を除外することにより、NI を予測できると思われた。

以上より、SIRC 細胞毒性試験は試験法の特性を理解して用いるならば、GHS の NI に分類される物質を予測できる試験法であると判断した。

9. 参考文献

Booman, K. A., De Prosopo, J., Demetrulias, J., Driedger, A., Griffith, J. F., Grochoski, G., Kong, B., McCormick, W. C., North-Root, H., Rozen, M. G. and Sedlak, R. I. (1989). The SDA alternatives program: comparison of *in vitro* data with Draize test data. *Journal of Toxicology – Cutaneous and Ocular Toxicology* 8, 35-49.

DeSousa, D. J., Rouse, A. A., and Smolon, W. J. (1984). Statistical consequences of reducing the number of rabbits utilized in eye irritation testing: data on 67 petrochemicals. *Toxicology and Applied Pharmacology* 76(2), 234-42.

Draize, J. H. (1959). Dermal toxicity. In *Appraisal of the Safety of Chemicals in Food, Drugs and Cosmetics*, Vol. 46. The Association of Food and Drug Officials of the United States, Austin, TX.

ECETOC (1998). Technical report No.48 (2) Eye irritaton: Reference chemicals data bank (Second Edition).

Guillot, J. P., Gonnet, J. F., Clement, C., Caillard, L., and Truhaut, R. (1982). Evaluation of the ocular-irritation potential of 56 compounds. *Food and Chemical Toxicology* 20(5), 573-82.

Hagino, S., Itagaki, H., Kato, S., Kobayashi, T., and Tanaka, M. (1991). Quantitative evaluation to predict eye irritancy of chemicals: modification of chorioallantoic membrane test by using trypan blue. *Toxicology in Vitro* 5, 301-304.

ICCVAM (2006). ICCVAM test method evaluation report: Appendix H, ICCVAM recommended reference substances list.

Itagaki, H., Hagino, S., Kato, S., Kobayashi, T., and Umeda, M. (1991). An *in vitro* alternative to the Draize eye-irritation test: evaluation of the crystal violet staining method. *Toxicology in Vitro* 5, 139–143.

Itagaki, H., Shibata, M., Tani, N., Kinoshita, S., Kakishima, H., Seyama, Y., Ohuchi, J., Kasai, Y., Okada, J., Kojima, H., Okamoto, Y., Kotani, M., Ohno, Y., Miyajima, A. and Takanaka, A. (1995). First Phase Inter-Laboratory Validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients: (8) Evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* 3, 182–190.

IUCLID, <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/index.php?PGM=dat>

Kay, J. H., and Calandra, J. C. (1962). Interpretation of eye irritation tests. *Journal of the society of cosmetic chemists* 13, 281–289.

Kitagaki, M., Wakuri, S., Hirota, M., Tanaka, N. and Itagaki, H. (2006). SIRC-CVS cytotoxicity test: an alternative for predicting rodent acute systemic toxicity. *Journal of toxicological sciences* 31, 371–379.

OECD, OECD guideline for the testing of chemicals 405, Acute Eye Irritation/Corrosion, 2002.

OECD, OECD guideline for the testing of chemicals 437, Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, 2009.

OECD, OECD guideline for the testing of chemicals 438, Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, 2009.

Ohno, Y., Kaneko, T., Inoue, T., Morikawa, Y., Yoshida, T., Fujii, A., Masuda, M., Ohno, T., Hayashi, M., Momma, J., Uchiyama, T., Chiba, K., Ikeda, N., Imanishi, Y., Itagaki, H., Kakishima, H., Kasai, Y., Kurishita, A., Kojima, H., Matsukawa, K., Nakamura, T., Ohkoshi, K., Okumura, H., Saijo, K., Sakamoto, K., Suzuki, T., Takano, K., Tatsumi, H., Tani, N., Usami, M., and Watanabe, R. (1999). Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicology in Vitro* 13, 73–98.

Ohno, Y. (2004). The validation and regulatory acceptance of alternative methods in Japan. *Alternatives to Laboratory Animals* 32, Supplement 1, 643–655.

SIDS, <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/oecd/sids/sidspub.html>

Tani, N., Kinoshita, S., Okamoto, Y., Kotani, M., Itagaki, H., Murakami, N., Sugiura, S., Usami, M., Kato, K., Kojima, H., Ohno, T., Saijo, K., Kato, M., Hayashi, M., and Ohno, Y. (1999). Interlaboratory validation of *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (8) Evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells. *Toxicology in Vitro* 13, 175–187.

The third revised edition of the GHS (published in July 2009),
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html

Van Goethem, F., Adriaens, E., Alepee, N., Straube, F., De Wever, B., Cappadoro, M., Catoire,

S., Hansen, E., Wolf, A., and Vanparys, P. (2006). Prevalidation of a new in vitro reconstituted human cornea model to assess the eye irritating potential of chemicals. *Toxicology in Vitro* 20(1), 1-17.

板垣宏, 萩野滋延 (2008). 動物実験代替法への化粧品企業における取り組み. *ファルマシア* 44(9), 863-868.

大野泰雄 (1996). 眼刺激性試験代替法のバリデーション. *組織培養* 22(6), 211-217.

大野泰雄 (1999). 代替法を組み込んだ化粧品の眼刺激性評価ガイダンス案について. *フレグランスジャーナル* 7月号, 21-26.

金子豊蔵 (1996). 代替法バリデーションにおいて比較対照となる在来法の評価の重要性について—眼粘膜刺激性を中心に— *組織培養* 22(6), 218-223.

化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック検討会 (2006). 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック2006. 株式会社薬事日報社, 東京.

厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 (1991). OECD 毒性試験ガイドライン. 株式会社薬業時報社, 東京.

小島肇夫 (1999). 眼刺激性試験代替法—細胞毒性試験. *フレグランスジャーナル*, 7月号, 27-34.

谷尚子, 化粧品安全性評価のための試験開発に関する研究 SIRC-NR および SIRC-CV を用いる方法 最終報告書, 1996.

萩野滋延, 岡崎有羽子, 北垣雅人, 板垣宏(2008). SIRC 細胞毒性試験と3次元培養真皮モデルを用いる試験の組合せによる眼刺激性評価法の検討. 第21回日本動物実験代替法学会講演要旨集, 埼玉, 58, 59.

10. 英語の略名

略名	英語名称	日本語名称
AOI	Acute Ocular Irritation Index	急性眼刺激性指標
ATCC	American Type Culture Collection	
BCOP	Bovine Corneal Opacity and Permeability Test	牛角膜混濁および透過性試験
CV	Coefficient of Variation	変動係数
CVS	Crystal Violet Staining	クリスタルバイオレット染色
ECETOC	European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals	化学物質の環境毒物学と毒物学の欧州センター
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods	欧州代替法検証センター
GHS	Global Harmonized System	世界調和システム
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods	米国動物実験代替法関連官庁調整委員会
IC50	Half Maximal (50%) Inhibitory Concentration	50%阻害濃度
ICE	Isolated Chicken Eye test	摘出鶏眼試験

IUCLID	International Uniform Chemical Information Database	国際統一化学物質情報データベース
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
MAS	Maximal Average Draize Total Score	最大平均評価点
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide	
NRU	Neutral Red Uptake	ニュートラルレッド取り込み
QA	Quality Assurance	品質保証
SD	Standard Deviation	標準偏差
SIDS	Screening Information Data Set	スクリーニング情報データセット
SIRC	Statens Serum Institut Rabbit Cornea	

Appendix 1 Draize 試験による化粧品、医薬部外品の原料の眼刺激性評価

(1) Draize 試験の公的認知と法規制への取り入れ

Draize 試験は、1981 年に OECD テストガイドラインに収載され、1987、2002 年に動物愛護の観点から改正された (OECD, 2002)。多くの国々で規制に取り入れられてきており、本邦でも医薬部外品の規制において、Draize 試験が用いられている。化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2006 (化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック検討会, 2006) には、以下のような試験法が記載されている。

表 1 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2006 に掲載されている試験方法の例

－眼刺激性試験－

試験動物	原則として若齢成熟白色ウサギ
動物数	原則として1群3匹以上
用量	原則として 0.1mL (液体) 又は 100mg (固体)
投与方法	片方の眼の下眼瞼を眼球より穏やかに引き離し、結膜囊内に投与し、上下眼瞼を約 1 秒間穏やかに合わせる。他方の眼は未処置のまま残し、無処置対照眼とする。眼刺激性を示す物質は点眼後に洗眼を行う。
観察	原則として 1、24、48、72 および 96 時間後に眼の観察を行う。持続性の角膜障害等が認められた場合には、その経過および可逆性の有無について観察を続ける。

(2) Draize 試験における観察とスコアリング

Draize 試験ではウサギの眼に 0.1mL の試料を投与し、角膜、虹彩、結膜の障害を肉眼観察しスコア化するが、スコアリングには、Draize の基準が用いられる。被験物質の眼刺激性の強さを表す指標としては、一般的に最大平均評価点 (MAS) が用いられる。理論的な MAS の最高点は 110 点である。配点は、角膜 80 点、虹彩 10 点、結膜 20 点であり、ヒトでの障害の重要性から角膜の変化に重きが置かれている (金子, 1996)。

I 角膜	
A 不透明度:混濁の程度(もっとも混濁した領域を読み取る)	
不透明度なし	0
虹彩を明視できる程度の散在からび慢性的の不透明化	1
虹彩の細部がわずかにぼやけて見える	2
虹彩の細部が観察できないが、瞳孔の大きさはかろうじて識別できる	3
虹彩が透視できない	4
B 角膜損傷域	
正常	0
$0 < A < 1/4$	1
$1/4 \leq A < 1/2$	2
$1/2 \leq A < 3/4$	3
$3/4 \leq A$	4
評点: $A \times B \times 5$ (最大値:80)	
II 虹彩 (A)	
正常	0
皺壁形成亢進、充血、腫脹、角膜周囲の充血 (いずれか1つ、あるいは全て、若しくは組み合わせ)が見られるが、対光反射は認められる (緩除反応陽性)。	1
対光反射消失、出血、広範囲の破壊 (いずれか1つ、あるいは全て) が見られる。	2
評点: $A \times 5$ (最大値:10)	
III 結膜	
A 発赤 (角膜および虹彩を除く瞼、球結膜)	
正常	0
充血亢進	1
広範囲かつ深紅色となり、血管の識別困難	2

全域の深紅色化	3
B 結膜浮腫	
正常	0
腫脹亢進(瞬眼を含む)	1
眼瞼の部分的反外を伴う腫脹	2
腫脹を伴う 1/2 程度の眼瞼閉鎖	3
腫脹を伴う 1/2 以上の眼瞼閉鎖	4
C 分泌物	
正常	0
常量以上の分泌物(正常な動物の内眦に見られる少量は含まない)	1
眼瞼および眼瞼に接する被毛を湿潤	2
眼瞼および眼の周囲を相当範囲湿潤	3
評点: (A+B+C) × 2 (最大値: 20)	

表 2 Draize 試験のスコアリング

(3) Draize 試験における評価基準

Draize 試験における評価基準としては、様々な基準が報告されている。Kay & Calandra (1962) 法の評価基準を以下に示す。その他にも、Guillot ら (1982) の評価基準、DeSousa ら (1984) の評価基準などがある。

表 3 Kay & Calandra 法の評価基準

Ohno ら (1999) により Kay & Calandra 法の改変がなされた。これは、Kay & Calandra 法の基準のように細かく分類することは、Draize 試験のばらつきを考えると意義は乏しいとの考察に基づいている。そして、角膜に反応がほぼ認められない点数である MAS15 点を化粧品原料評価の判断基準としている。これは、ウサギの眼の刺激性物質に対する反応が、わずかな刺激を示す場合には結膜に反応が表れ、一定の刺激強度を持った物質については角膜に反応が表れてくるが、このうち一過性の弱い結膜刺激については許容可とする考え方である。なお、本基準は、後述する厚生科学研究による眼刺激性試験代替法の施設間バリデーションの開始前に提示され、代替法の解析に用いられた。

準

最大平均評価点	評価
0-0.5	無刺激性
0.5-2.5	実質的無刺激性
2.5-15	最軽度刺激性
15-25	軽度刺激性
25-50	中程度刺激性
50-80	強度刺激性
80-100	非常に強い刺激性
100-110	最強度刺激性

表 4 kay & Calandra 変法の評価基準 (Ohno et al, 1999)

最大平均評価点	評価
0～15(以下)	わずかな眼刺激性
15～25	弱い眼刺激性
25～50	中程度の眼刺激性
50～110	強い眼刺激性

また、Ohno(2004)は化粧品原料の眼刺激性評価において、さらに安全性に留意した基準として先の MAS 15 点でなく、5 点を採用した化粧品原料評価の判断基準も示している。この基準は後述する厚生科学研究による眼刺激性試験代替法バリデーションの終了後に、バリデーション研究で得られた結果に基づき考案され、「代替法を組み込んだ化粧品の眼刺激性評価ガイダンス案」に取り入れられた。厚生科学研究のデータに基づき、MAS 5 点を予測するようにインビトロの判断基準を定めておけば、インビトロ試験を実際に用いた際に、陰性であれば陰性であれば眼刺激性はわずかであること、すなわち Draize 試験 MAS15 以下であることがさらに確実に示せるためと考えられる。

表 5 Ohno(2004)による評価基準

最大平均評価点	評価
0～5(以下)	わずかな眼刺激性
5～25	弱い眼刺激性
25～50	中程度の眼刺激性
50～110	強い眼刺激性

Appendix 2 マイクロプレートシーリングテープの影響

SIRC 細胞毒性試験に対するマイクロプレートシーリングテープ使用の影響について検討した。テープの有無による細胞の生育状態を確認するために、常法に従い細胞を均一に播種した 96 穴マイクロプレートの半分のみテープを貼付し、72 時間培養した後に染色および吸光度の測定を行った。試験を 2 回実施した結果、細胞の生育状況を示す陰性対照物質の吸光度に差はなく、比較対照物質および陽性対照物質の IC₅₀ はいずれも同程度の値を示した。したがって、マイクロプレートシーリングテープの貼付が細胞毒性試験の評価に与える影響は少ないと判断した。

Effect of microplate sealing tape in the SIRC cytotoxicity test

	Marker	No.1	No.2	Average
Without microplate sealing tape	OD of negative control	0.684	0.685	0.6845
	IC ₅₀ (μg/mL) of trietanolamine	1805.2	1619.3	1712.25
	IC ₅₀ (μg/mL) of SDS	90.2	89.4	89.8
With microplate sealing tape	OD of negative control	0.638	0.701	0.6695
	IC ₅₀ (μg/mL) of trietanolamine	1413.3	1035.1	1224.2
	IC ₅₀ (μg/mL) of SDS	86.8	90.2	88.5

Appendix 5 Data of triethanolamine and Sodium dodecyl sulfate

(1) Results of triethanolamine

IC50 (μg/mL)	Lab.	Year	Lot.
1540	B	1995	611E1858
1320	B	1995	611E1858
1850	C	1995	611E1858
1650	C	1995	611E1858
1910	D	1995	611E1858
2075	D	1995	611E1858
3200	E	1995	611E1858
4500	E	1995	611E1858
1580	A(Shiseido)	1995	611E1858
1300	A(Shiseido)	1995	611E1858
2164.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
2000.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1675.7	A(Shiseido)	2009	810W1077
1757.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1656.6	A(Shiseido)	2009	810W1077
1940.1	A(Shiseido)	2009	810W1077
1709.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
2228.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1558.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1868.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1669.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1932.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1945.1	A(Shiseido)	2009	810W1077
1424.0	A(Shiseido)	2009	810W1077
1666.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1526.8	A(Shiseido)	2009	810W1077
1501.7	A(Shiseido)	2009	810W1077
1763.3	A(Shiseido)	2009	810W1077
1773.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1614.6	A(Shiseido)	2009	810W1077
1435.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1500.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1525.0	A(Shiseido)	2009	810W1077
1820.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1349.7	A(Shiseido)	2009	810W1077
1786.8	A(Shiseido)	2009	810W1077
1664.1	A(Shiseido)	2009	810W1077
1338.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
2145.3	A(Shiseido)	2009	810W1077
1861.3	A(Shiseido)	2009	810W1077
1770.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1611.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1550.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1408.8	A(Shiseido)	2009	810W1077
1260.3	A(Shiseido)	2009	810W1077
1267.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1695.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1495.1	A(Shiseido)	2009	810W1077
1339.4	A(Shiseido)	2009	810W1077
1218.0	A(Shiseido)	2009	810W1077
1484.0	A(Shiseido)	2009	810W1077
1468.0	A(Shiseido)	2009	810W1077
1531.6	A(Shiseido)	2009	810W1077
1222.7	A(Shiseido)	2009	810W1077
1737.8	A(Shiseido)	2009	810W1077
1662.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1706.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1436.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1446.6	A(Shiseido)	2009	810W1077
1471.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1545.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1584.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1413.8	A(Shiseido)	2009	810W1077
1439.4	A(Shiseido)	2009	810W1077
1622.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1621.0	A(Shiseido)	2009	810W1077
1464.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1857.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1403.1	A(Shiseido)	2009	810W1077
1713.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1513.6	A(Shiseido)	2009	810W1077
1631.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1825.7	A(Shiseido)	2009	810W1077
1685.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1769.7	A(Shiseido)	2009	810W1077
1642.3	A(Shiseido)	2009	810W1077

IC50 (μg/mL)	Lab.	Year	Lot.
1620.4	A(Shiseido)	2009	810W1077
1808.3	A(Shiseido)	2009	810W1077
1401.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1604.0	A(Shiseido)	2009	810W1077
1687.6	A(Shiseido)	2009	810W1077
1674.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1704.8	A(Shiseido)	2009	810W1077
1694.8	A(Shiseido)	2009	810W1077
1386.8	A(Shiseido)	2009	810W1077
1663.4	A(Shiseido)	2009	810W1077
1576.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1461.8	A(Shiseido)	2009	810W1077
1599.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1251.7	A(Shiseido)	2009	810W1077
1347.1	A(Shiseido)	2009	810W1077
1690.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1448.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1206.8	A(Shiseido)	2009	810W1077
1808.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1452.7	A(Shiseido)	2009	810W1077
1295.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1429.1	A(Shiseido)	2009	810W1077
1683.3	A(Shiseido)	2009	810W1077
1451.3	A(Shiseido)	2009	810W1077
1782.0	A(Shiseido)	2009	810W1077
1757.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1118.3	A(Shiseido)	2009	810W1077
1452.3	A(Shiseido)	2009	810W1077
1669.1	A(Shiseido)	2009	810W1077
1330.7	A(Shiseido)	2009	810W1077
1488.4	A(Shiseido)	2009	810W1077
1534.3	A(Shiseido)	2009	810W1077
2290.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1437.1	A(Shiseido)	2009	810W1077
1441.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1374.6	A(Shiseido)	2009	810W1077
1354.3	A(Shiseido)	2009	810W1077
1486.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1303.1	A(Shiseido)	2009	810W1077
1662.7	A(Shiseido)	2009	810W1077
1485.4	A(Shiseido)	2009	810W1077
1696.4	A(Shiseido)	2009	810W1077
1452.4	A(Shiseido)	2009	810W1077
1557.3	A(Shiseido)	2009	810W1077
1555.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1647.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1283.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1700.4	A(Shiseido)	2009	810W1077
1508.0	A(Shiseido)	2009	810W1077
2276.3	A(Shiseido)	2009	810W1077
1565.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1552.1	A(Shiseido)	2009	810W1077
1498.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1601.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1009.0	A(Shiseido)	2009	810W1077
1499.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1381.5	A(Shiseido)	2009	810W1077
1628.4	A(Shiseido)	2009	810W1077
1424.0	A(Shiseido)	2009	810W1077
1781.1	A(Shiseido)	2009	810W1077
1550.3	A(Shiseido)	2009	810W1077
1341.0	A(Shiseido)	2009	810W1077
1586.1	A(Shiseido)	2009	810W1077
1576.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1446.2	A(Shiseido)	2009	810W1077
1549.9	A(Shiseido)	2009	810W1077
1012.3	A(Shiseido)	2010	810W1077
1595.4	A(Shiseido)	2010	810W1077

The substances were obtained from Kanto Chemical CO., INC.

(2) Results of Sodium dodecyl sulfate

IC50 (µg/mL)	Lab.	Year	Manufacturer	Lot.
168	B	1994	Nikko Chemicals	2802
176	B	1994	Nikko Chemicals	2802
172	B	1994	Nikko Chemicals	2802
117	C	1994	Nikko Chemicals	2802
117	C	1994	Nikko Chemicals	2802
117	C	1994	Nikko Chemicals	2802
190	D	1994	Nikko Chemicals	2802
190	D	1994	Nikko Chemicals	2802
187	D	1994	Nikko Chemicals	2802
201	E	1994	Nikko Chemicals	2802
194	E	1994	Nikko Chemicals	2802
198	E	1994	Nikko Chemicals	2802
140	F	1994	Nikko Chemicals	2802
157	F	1994	Nikko Chemicals	2802
123	F	1994	Nikko Chemicals	2802
174	A(Shiseido)	1994	Nikko Chemicals	2802
189	A(Shiseido)	1994	Nikko Chemicals	2802
176	A(Shiseido)	1994	Nikko Chemicals	2802
102.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
87.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.0	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
90.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
90.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
103.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
101.7	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
90.6	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
95.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
96.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.4	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.4	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
96.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
90.3	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
98.8	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
101.7	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
108.0	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
104.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.7	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
100.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
97.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
103.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
113.7	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
107.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
85.9	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.8	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
96.9	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.9	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
96.0	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
86.3	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.4	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
95.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.8	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
95.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.3	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
96.0	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
94.0	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
90.7	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
89.9	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
90.8	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
94.4	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
96.6	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
90.0	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.0	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
90.7	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
89.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.0	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
98.7	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.6	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.6	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
96.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
100.6	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.3	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.8	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
89.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
96.6	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.8	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
94.4	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.4	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149

IC50 (µg/mL)	Lab.	Year	Manufacturer	Lot.
90.8	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
89.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.8	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
95.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.4	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
96.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
89.6	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
89.4	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
86.0	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
94.8	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
96.7	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
89.7	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
88.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.3	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
86.0	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.4	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
89.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
90.6	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
89.0	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.0	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
96.4	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.0	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
90.4	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.8	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
95.3	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
87.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
90.4	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
113.6	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.4	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
94.3	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
88.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.9	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.9	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.7	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
90.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
89.7	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
94.3	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.0	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.9	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.7	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.6	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
109.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.3	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
87.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
101.6	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
89.7	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.8	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.8	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.7	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
93.5	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.1	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
95.2	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.0	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
92.6	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
91.9	A(Shiseido)	2009	Wako	TCG8149
90.7	A(Shiseido)	2010	Wako	TCG8149
95.1	A(Shiseido)	2010	Wako	TCG8149

Nikko Chemicals: Nikko Chemicals CO., LTD.
Wako: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Appendix 6 厚生科学研究データと追加データの比較

厚生科学研究におけるデータ[研究 1]と追加試験のデータ[研究 2]を比較し、同様な評価が可能か否かを確認した。両者で試験した物質は Isopropyl myristate、Triethanolamine、Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.) (別名 Triton X-100)、Sodium dodecyl sulfate、Benzalkonium chloride、Di(2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate (別名 Dioctyl sodium sulfosuccinate) の 6 被験物質であった。Isopropyl myristate、Triethanolamine は同一メーカーでロットが異なり、残りの 4 被験物質はメーカーが異なっていた。GHS で NI が 2 被験物質、それ以外が 4 被験物質であった。研究 1 および研究 2 の IC50 値、並びに Triethanolamine を比較対照とした時の眼刺激性の予測結果を下表に示す。

比較の結果、陰性(NI)あるいは陽性(NI 以外)かの評価上の相違は両者間に認められなかった。6 被験物質における IC50 値の順位については、研究 2 の Triton X-100 と Benzalkonium chloride とともに IC50 値が 39.1µg/mL 未満であり、研究 1 の数値との同等性を詳細に確認することが出来なかったが、評価上の差は認められなかった。したがって、いずれの被験物質においても評価上の差異は認められず、両者の結果を用いて同様の評価が可能と判断した。

The comparison between the Japanese validation study data and the additional data

Substance	MAS	GHS	The Japanese validation study data (IC50;µg/mL)									The additional data (IC50;µg/mL)
			Lab.A	Lab.B	Lab.C	Lab.D	Lab.E	Lab.F	Lab.G	Lab.H	Lab.I	Lab.A
Isopropyl myristate	0	NI	10000<(N)	10000<(N)		6000<(NE)			10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	4303<(N)
Triethanolamine	8	NI	1440(N)	1430(N)					1750(N)	1993(N)	3850(N)	1579(N)
Triton X-100*	41.3≦	1or2A	26.7(P)	38.0(P)	23.3(P)	32.3(NE)	51.0(NE)	59.5(NE)				<39.1(P)
Sodium dodecyl sulfate*	15.0≦	1or2A	182(P)	172(P)	117(P)	190(NE)	198(NE)	149(NE)				94(P)
Di(2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate*	57.0≦	1or2A	210(P)	182(P)					181(P)	156(P)	175(P)	54(P)
Benzalkonium chloride*	78.0≦	1or2A	16.2(P)	25.2(P)	13.2(P)	15.5(NE)	29.0(NE)	15.0(NE)				<39.1(P)

P:Positive, N:Negative, NE:Could not be evaluated

Blank column: Not tested

The additional data of Triethanolamine and Sodium dodecyl sulfate are the mean of 134 tests.

Appendix 7 品質基準に適合しなかったケースについて

品質基準に適合しなかったケースとして、以下の 3 被験物質を計画書に基づき再試験を実施した。3-Chloropropionitrile および 2,4-Difluoronitrobenzene については、揮発による周囲のウェルへの影響(細胞毒性)が認められたため、開始濃度を下げて再試験を実施した。また、Cyclopentanol については、陽性対照の値(SDS: 63.2 μ g/mL)が基準値を下回ったため再試験を実施した。

The reasons of the retesting

No	Substance	Number of test at each concentration			The reasons
		5000 μ g/mL	500 μ g/mL	50 μ g/mL	
4	3-Chloropropionitrile	Acceptance :1 Rejection:1	Acceptance :2 Rejection: 1		Effect of the volatile substance
5	Cyclopentanol	Acceptance :2 Rejection:1			Abnormal value of the positive control
17	2,4-Difluoronitrobenzene	Rejection:2	Rejection:2	Acceptance :2	Effect of the volatile substance

Appendix 8 追加データと学会で報告されているデータの比較

今回追加した試験結果について、以前に2008年日本動物実験代替法学会第21回大会で報告されているSIRC試験データ(JSAAE データ)との比較を行った。JSAAE データでは、SIRC 細胞の最終濃度が 1.5×10^5 個/mLであり、厚生科学研究や追加試験での 1×10^5 個/mLとは異なっていた。また、被験物質によっては溶媒の選択が異なり、さらに、GHS のNIの同定を目的とした研究ではないため、同一プレート上での Triethanolamine の試験を設定していなかった。そのため、得られたIC50 は $1000 \mu\text{g/mL}$ 未満を陽性、 $5000 \mu\text{g/mL}$ 以上を陰性とし、 $1000 \sim 5000 \mu\text{g/mL}$ をEquivocalとした。

両者の対応を確認した結果、41 被験物質のうち 37 被験物質の評価が一致し、Equivocal は、Phenethyl alcohol および Triacetin の 2 被験物質であった。一方、一致しなかった被験物質は Sorbitan oleate および Sorbitan sesquioleate の 2 被験物質であった。

The comparison between the additional data and the previous data reported at the 21th annual meeting of the JSAAE

No	Substance	In vivo Classification	Additional data			JSAAE data		
			Medium	IC50 (µg/mL)	Evaluation	Medium	IC50 (µg/mL±SD)	Evaluation
28	2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol	P	Medium	<39.1	P	Medium	6.42±0.85	P
29	Benzalkonium chloride	P	DMSO/Medium	<39.1	P	DMSO /Medium	3.47±0.47	P
30	Benzophenone-1	P	DMSO/Medium	72.7	P	DMSO /Medium	29.3±8.0	P
31	Benzophenone-2	P	DMSO/Medium	62.7	P	DMSO/Medium	53.4±6.4	P
32	Butoxyethanol	P	Medium	2187.2	N			
33	Butylene glycol	N	Medium	5000<	N	Medium	10000<	N
34	Cetrimonium chloride	P	Medium	<39.1	P	Medium	0.56±0.16	P
35	Cetyl alcohol	N	DMSO/Medium	<39.1	P	DMSO /Medium	25.1±12.1	P
36	Chlorhexidine digluconate (20% Solution)	P	DMSO/Medium	<7.82 【<39.1】	P	DMSO /Medium	7.92±3.92 【39.6±19.6】	P
37	Chlorophene	P	DMSO/Medium	<39.1	P	DMSO /Medium	25.6±9.1	P
38	Chloroxyleneol	P	DMSO/Medium	75.4	P			
39	Diethylhexyl adipate	N	EtOH/Medium	5000<	N	Medium	Could not be tested	
40	Diisopropyl adipate	N	DMSO/Medium	353.0	P	DMSO /Medium	633±16	P
41	Dioctyl sodium sulfosuccinate	P	DMSO/Medium	54.4	P	DMSO/Medium	81.3±4.8	P
42	Ethylhexyl palmitate	N	EtOH/Medium	5000<	N	Medium	10000<	N
43	Hexylene glycol	P	Medium	5000<	N	Medium	7500±600	N
44	Isocetyl stearate	N	EtOH/Medium	5000<	N	Medium	Could not be tested	
45	Isopropyl Myristate	N	EtOH/Medium	>4294.5	N	Medium	Could not be tested	
46	Isopropyl Palmitate	N	EtOH/Medium	5000<	N	Medium	Could not be tested	
47	Lauramide DEA	P	DMSO/Medium	<39.1	P	DMSO /Medium	18.3±4.1	P
48	Methoxyisopropyl acetate	P	Medium	3323.5	N			
49	Oleyl alcohol	N	EtOH/Medium	<39.1	P	Ethanol /Medium	41.9±13.3	P
50	PEG-40 stearate	N	Medium	269.1	P	Medium	230±79	P
51	Phenethyl alcohol	P	DMSO/Medium	688.0	P	Medium	1830±1360	E
52	Phenoxyethanol	P	DMSO/Medium	1195.6	P			
53	Phytantriol	P	DMSO/Medium	<46.1	P	DMSO /Medium	37.2±11.8	P
54	Propylene carbonate	N	Medium	5000<	N	Medium	6050±490	N
55	Resorcinol	P	Medium	394.5	P			
56	Safflower (Carthamus tinctorius) oil	N	DMSO/Medium	2215.1	N	Medium	Could not be tested	
57	Sesame (Sesamum indicum) oil	N	DMSO/Medium	5000<	N	Medium	Could not be tested	
58	Sodium dehydroacetate	N	Medium	919.9	P	Medium	860±224	P
59	Sodium naphthalenesulfonate	P	DMSO/Medium	980.2	P			
60	Sodium stearate	N	Medium	266.1	P	Medium	56.5±8.2	P
61	Sorbitan oleate	N	DMSO/Medium	825.2	P	Medium	5170±1560	N
62	Sorbitan sesquioleate	N	DMSO/Medium	1178.6	P	Medium	10000<	N
63	Squalane	N	DMSO/Medium	5000<	N	Medium	Could not be tested	
64	Stearalkonium chloride	P	EtOH/Medium	<39.1	P	Ethanol /Medium	2.66±0.56	P
65	TEA-Lauryl sulfate 【40% Solution】	P	Medium	95.2 【238.0】	P	Medium	117±3 【290±4】	P
66	Triacetin	N	Medium	1476.4	P	Medium	1780±720	E
67	Triethylene glycol	N	Medium	5000<	N	Medium	10000<	N
68	Triisopropanolamine	P	Medium	729.8	P			

P: Positive, N:Negative, E: Equivocal

NE: It could not be evaluated.

【 】: The data was obtained from diluted agent.

[]: The precipitation was appear at the concentration of 10000µg/mL in the culture of 72hr. The maximal concentrations without the precipitation were 5000ug/mL and 2500ug/mL in No31 and No38, respectively.

Blank column: Not selected, because of no *in vivo* data at 10% concentration

2 試験間で結果が一致しなかった 2 被験物質(Sorbitan oleate および Sorbitan sesquioleate)について、その原因は細胞数の差および溶媒の有無が関係していると考えられた。なお、これらの 2 被験物質は培養液に溶解せずに、懸濁させて適用した物質であった。

この原因を究明するために、同一条件下で溶媒の有無による差異(A と C の差)および同一条件下で細胞数による差異(A と B の差)を確認する 2 つの追加検討を実施した。その結果、溶媒の有無による試験結果は明らかに異なり、溶媒を用いた場合に毒性の増強が確認された。一方、細胞数の違いでは 2 被験物質で結果が異なり、Sorbitan oleate の試験結果はほぼ同等であったが、Sorbitan sesquioleate では明らかな差が確認された。

この結果より、非水溶性の被験物質は適切な溶媒を用いて溶解または均一に懸濁させることが適正な細胞毒性試験を行う上で必要があり、また細胞数も一定数に規定することが重要と考えられた。Sorbitan oleate と Sorbitan sesquioleate の評価についてはいずれも偽陽性であると判断した。

Effect of cell concentration and/or medium in the SIRC cytotoxicity test of sorbitan oleate and sorbitan sesquioleate

Test condition	A		B		C	
Final cell concentration	1x10 ⁵ cells/mL		1.5x10 ⁵ cells/mL		1x10 ⁵ cells/mL	
Medium	Medium		Medium		Medium	
Solvent	DMSO		DMSO		-	
Sorbitan oleate	IC ₅₀ =825.3 (1413.6) 【96.2】	P	IC ₅₀ =1490.7 (1753.0) 【90.2】	P	IC ₅₀ =1722.1 (1600.8) 【92.5】	N
Sorbitan sesquioleate	IC ₅₀ =1178.6 (1747.3) 【92.5】	P	IC ₅₀ =3476.4 (1774.0) 【89.8】	N	IC ₅₀ =4460.0 (1640.9) 【89.0】	N

(n=1:Test condition B and C)

(): IC₅₀ of triethanolamine (μg/mL)

【 】: IC₅₀ of SDS (μg/mL)

Appendix 9 被験物質の適用範囲の限定

SIRC 細胞毒性試験による化学物質・原体の眼刺激性の予測に関し、被験物質の適用範囲を限定して検討した。被験物質の適用範囲から除外した物質群は、アルコール、エステルおよびエーテルで、なおかつ分子量 180 未満の低分子とした。厚生科学研究における被験物質のうち除外条件に該当する被験物質は 3 種であった。

The three preclusive substances in the Japanese validation study

Substance	CAS	MW	MAS	<i>In vivo</i> classification	<i>In vitro</i> classification
2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate	21245-02-3	277.4	0.0	N	P
Isopropyl myristate	110-27-0	270.5	0.0	N	N
Isotonic sodium chloride solution	7647-14-5	58.4	0.0	N	N
Silicic anhydride	7631-86-9	60.1	2.7	N	N
Polyethylene glycol 400	25322-68-3	360~400	4.0	N	N
Glycerin	56-81-5	92.1	4.7	N	N
Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.)	9005-65-6	-	4.7	N	P
Triethanolamine	102-71-6	149.2	8.0	N	N
Methyl p-hydroxybenzoate	99-76-3	152.2	8.7	N	P
Sucrose fatty acid ester	-	-	28.3	P	P
Benzyl alcohol	100-51-6	108.1	31.0	P	P
Ethanol	64-17-5	64.1	32.7	P	N
Acid red 92	18472-87-2	829.6	71.0	P	P
Calcium thioglycolate	814-71-1	130.2	79.7	P	P
m-Phenylenediamine	108-45-2	108.1	80.7	P	P
Sodium salicylate	54-21-7	160.1	83.7	P	P
Distearyldimethylammonium chloride	107-64-2	586.5	96.3	P	P
Lactic acid	50-21-5	90.1	102.7	P	P
Sodium dodecyl sulfate*	151-21-3	288.4	15.0 ≤	P	P
Diisopropanolamine*	110-97-4	133.2	23.0 ≤	P	P
Monoethanolamine*	141-43-5	61.1	23.3 ≤	P	P
Glycolic acid*	79-14-1	76.1	25.0 ≤	P	P
Sodium hydrogenated tallow L-glutamate*	68187-34-8	-	26.7 ≤	P	P
Chlorhexidine gluconate (20% solution)*	18472-51-0	897.8	28.3 ≤	P	P
Butanol*	71-36-3	74.1	34.0 ≤	P	N
Potassium laurate*	10124-65-9	238.4	38.0 ≤	P	P
Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)*	9002-93-1	324.4	41.3 ≤	P	P
Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate*	577-11-7	488.5	57.0 ≤	P	P
Acetic acid*	64-19-7	60.1	68.0 ≤	P	P
Cetyltrimethylammonium bromide*	57-09-0	364.5	76.7 ≤	P	P
Benzalkonium chloride*	8001-54-5	283.9	78.0 ≤	P	P
Stearyltrimethylammonium chloride*	112-03-8	348.1	91.3 ≤	P	P
Cetylpyridinium chloride*	123-03-5	340.0	94.7 ≤	P	P
Domiphen bromide*	538-71-6	414.5	96.3 ≤	P	P

厚生科学研究および追加実験において除外する被験物質は 14 種であった。

The 14 preclusive substances

Substance	Class	Molecular Weight	Result
Benzyl alcohol	Alcohols	108.1	True negative
Butanol	Alcohols	74.1	False negative
Butoxyethanol	Alcohols	118.2	False negative
Butyl Dipropasol Solvent	Ethers	176.3	False negative
Cyclopentanol	Alcohols	86.1	False negative
2,2-Dimethyl-3-pentanol	Alcohols	116.2	False positive
Ethanol	Alcohols	46.1	False negative
Ethyl-2-methyl acetoacetate	Esters	144.2	False negative
Methoxyisopropyl acetate	Esters	132.2	False negative
Methyl p-hydroxybenzoate	Esters	152.2	False positive
2-Methyl-1-pentanol	Alcohols	102.2	False negative
Phenethyl alcohol	Alcohols	122.2	Ture positive
Phenoxyethanol	Alcohols	138.2	False negative
Propasol Solvent P	Ethers	118.2	False negative

Appendix 10 偽陰性となった Hexylene glycol について

Hexylene glycol は SIRC 細胞毒性試験で偽陰性を示した。一方、構造の類似している Butylene glycol はインビボおよびインビトロ共に陰性であった。一般的に両親媒性の有機溶媒(代表例はエタノール、アセトン)の原体は眼刺激性(GHS; 1, 2A または 2B)が認められるが、Hexylene glycol は Butylene glycol(陰性物質)などに比較して炭素数が 2 個多いことにより両親媒性の傾向が強まり、結果的に Ethanol と同じような挙動(偽陰性)を示すと推察された。下表に Butylene glycol と Hexylene glycol の溶解性の違いを示す。

The differences of butylene glycol and hexylene glycol

	Butylene glycol	Hexylene glycol
Predicted GHS evaluation	NI	1, 2A or 2B
SIRC cytotoxicity test result	Negative	Negative
Molecular weight	90.1	118.2
Solubility		
Water	Soluble	Soluble
Alcohol	Soluble	Soluble
Ether	Insoluble	Soluble
Acetone	Soluble	-
Benzene	Insoluble	-
Carbon tetrachloride	Insoluble	-
Aliphatic hydrocarbons	Insoluble	Soluble
Aromatic hydrocarbons	-	Soluble
Fatty acids	-	Soluble

The data of solubility is taken from CIR final report (Journal of the American College of Toxicology, 4 (5), 223-248, 1985) .

Appendix 11 SIRC 細胞毒性試験の結果が掲載されている論文を用いた偽陰性物質の探索

SIRC 細胞毒性試験による IC50 が掲載されている論文 (Kitagaki et al., 2006) において、ICCVAM Recommended Reference Substance List、ECETOC Technical Report No.48 に GHS による眼刺激性分類あるいはこれを算出可能な Draize 試験データが掲載されている被験物質について抜粋し、インビトロとインビボの対応性を確認した。判断基準は SIRC 細胞毒性試験結果が 1000 μ g/mL 未満を陽性、陰性は 5000 μ g/mL 以上を陰性とし、1000～5000 μ g/mL の間は Equivocal と分類した。その結果、Acetone および 2-Propanol が偽陰性に分類され、いずれも分子量は 180 未満であった。したがって、分子量 180 未満のアルコールに加えケトンも同様に偽陰性を示す可能性が示唆された。

The eye irritancy predicted by the SIRC cytotoxicity test

Substance	CAS	MW	Class	GHS	Reference of <i>in vivo</i> classification	IC50 Average (μ g/mL) \pm SD	Evaluation
Styrene	100-42-5	104.2	Aromatics	NI	ECETOC Technical Report No.48	2068.8 \pm 1821.9	Equivocal
Ethyl acetate	141-78-6	88.1	Esters	NI	ECETOC Technical Report No.48	4575.7 \pm 1784.5	Equivocal
2-Propanol	67-63-0	60.1	Alcohols	2A	ECETOC Technical Report No.48	6534.9 \pm 581.1	False negative
Silver I nitrate	7761-88-8	169.9	Inorganic salts	1	ICCVAM Recommended Reference Substances List	2.1 \pm 0.2	True positive
1-Octanol	111-87-5	130.2	Alcohols	2A	ICCVAM Recommended Reference Substances List	328.1 \pm 243.9	True positive
Trichloroacetic acid	76-03-9	163.4	Acids	1	ICCVAM Recommended Reference Substances List	1989.4 \pm 123.6	Equivocal
Imidasol	288-32-4	68.1	Heterocyclic compounds	1	ICCVAM Recommended Reference Substances List	554.7 \pm 102.8	True positive
1-Hexanol	111-27-3	102.2	Alcohols	2A	ICCVAM Recommended Reference Substances List	643.4 \pm 15	True positive
2-Butoxyethanol	111-76-2	118.2	Alcohols	1	ICCVAM Recommended Reference Substances List	2549.8 \pm 1034.5	Equivocal
Sulfuric acid	7664-93-9	98.1	Acids	1	ICCVAM Recommended Reference Substances List	1454.6 \pm 785.5	Equivocal
Isobutanol	78-83-1	74.1	Alcohols	2A	ECETOC Technical Report No.48	2461.1 \pm 1329	Equivocal
Pyridine	110-86-1	58.1	Heterocyclic compounds	1	ICCVAM Recommended Reference Substances List	1762.5 \pm 951.8	Equivocal
Acetone	67-64-1	58.1	ketones	2A	ICCVAM Recommended Reference Substances List	7287.3 \pm 866.3	False negative
Potassium hydroxide	1310-58-3	56.1	Inorganic salts	1	ICCVAM Recommended Reference Substances List	752 \pm 434	True positive

The data of the SIRC cytotoxicity test is the same as that of Kitagaki et al.(2006).

Appendix 12 References of the *in vivo* data of the 41 substances

No	Substance	References
28	2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol	JACT 3(3):139-155,1984. JEPT 4(4):47-61, 1980.
29	Benzalkonium chloride	JACT 8(4):589-625, 1989.
30	Benzophenone-1	JACT 2(5):35-77, 1983.
31	Benzophenone-2	JACT 2(5):79-84, 1983.
32	Butoxyethanol	JACT 15(6):462-526, 1996.
33	Butylene glycol	Hifu 26(5):1065-1074, 1984.
34	Cetrimonium chloride	IJT 16(S3):195-220,1997.
35	Cetyl alcohol	JACT 7(3):359-413, 1988.
36	Chlorhexidine digluconate (20% Solution)	JACT 12(3):201-23, 1993.
37	Chlorophene	IJT 23(S1):1-27 2004.
38	Chloroxylonol	JACT 4(5):147-69, 1985.
39	Diethylhexyl adipate	JACT 3(3):101-30, 1984.
40	Diisopropyl adipate	JACT 3(3):101-30, 1984.
41	Dioctyl sodium sulfosuccinate	IJT 17(S4):1-20, 1998.
42	Ethylhexyl palmitate	JACT 1(2):13-35, 1982.
43	Hexylene glycol	JACT 4(5):223-48, 1985.
44	Isocetyl stearate	JACT 4(5):107-46, 1985.
45	Isopropyl Myristate	JACT 1(4):55-80, 1982.
46	Isopropyl Palmitate	JACT 1(2):13-35, 1982.
47	Lauramide DEA	JACT 5(5):415-54, 1986.
48	Methoxyisopropyl acetate	IJT 27(S2), 2008.
49	Oleyl alcohol	JACT 4(5):1-29, 1985.
50	PEG-40 stearate	JACT 2(7):17-60, 1983.
51	Phenethyl alcohol	JACT 9(2):165-83, 1990.
52	Phenoxyethanol	JACT 9(2):259-77, 1990.
53	Phytantriol	IJT 26(Suppl. 1):107-117, 2007.
54	Propylene carbonate	JACT 6(1):23-51, 1987.
55	Resorcinol	JACT 5(3):167-203, 1986.
56	Safflower (Carthamus tinctorius) oil	JACT 4(5):171-97, 1985.
57	Sesame (Sesamum indicum) oil	JACT 12(3):261-77, 1993.
58	Sodium dehydroacetate	JACT 4(3):123-159, 1985.
59	Sodium naphthalenesulfonate	IJT 22(Suppl. 2:37-44,)2003.
60	Sodium stearate	JACT 1(2):143-77, 1982.
61	Sorbitan oleate	JACT 4(3):65-121, 1985.
62	Sorbitan sesquioleate	JACT 4(3):65-121, 1985.
63	Squalane	JACT 1(2):37-56, 1982.
64	Stearalkonium chloride	JACT 1(2):57-69, 1982.
65	TEA-Lauryl sulfate (40% Solution)	JACT 1(4):143-67, 1982.
66	Triacetin	IJT 22(S2):1-10, 2003.
67	Triethylene glycol	IJT 25(5):121-138,2006.
68	Triisopropanolamine	JACT 6(1):53-76, 1987.

IJT: International Journal of Toxicology, JACT: Journal of the American College of Toxicology
JEPT: Journal of Environmental Pathology & Toxicology

Appendix 13 SIRC 細胞毒性試験による 68 種の化学物質の評価・プロトコール

(株)資生堂 リサーチセンター

2009 年 11 月 30 日作成 (※その後の変更点を反映させた)

試験施設:横浜市金沢区福浦 2-12-1 (株)資生堂 リサーチセンター金沢八景

試験責任者:萩野 滋延

1.目的

本試験は、68 種の化学物質を用い、SIRC 細胞毒性試験が眼刺激性試験代替法として GHS の無刺激性物質 (NI) とそれ以外 (刺激性物質) を区別できるかどうかを調べることを目的とする。

2.試験法の原理

SIRC 細胞毒性試験は Crystal violet が生細胞の細胞膜に入り込んで染色する性質を利用した方法で生細胞のみを測定する。Crystal violet 染色法はほとんどの細胞に適用でき、得られる結果も比較的安定しているため、細胞毒性の簡易試験法として用いられている。また、操作が簡便で、標本の資料保管が可能であることは本試験法の優位性を示すものである。

3.材料

3.1.細胞

細胞はウサギ角膜由来の株化細胞である SIRC 細胞 (Statens Seruminstitut rabbit corneal: ATCC No. CCL-60) を用いる。具体的には、本細胞は大日本製薬株式会社を通じて ATCC (American Type Culture Collection) より入手し、液体窒素中で凍結保存されたものを用いる。

3.2.材料(機材)

炭酸ガスインキュベーター (三洋電機バイオメディカ(株)製 MCO-17AIC)
クリーンベンチ (日立製 CCV1300E)
マイクロプレートリーダー (バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)製 Benchmark Plus™)
位相差顕微鏡 (Nikon 製 ECLIPSE TS100)
オートクレーブ (TOMY 製 BS-325 および SS-320)
低速冷却遠心機 (KUBOTA 製 5800)

3.3.材料(器具)

培養用プラスチックフラスコ (培養面積: 75cm² または 175cm²)
96 穴マイクロプレート
マルチチャンネルピペットおよびマイクロピペット
ディスペンサートレイ
遠心管 (15mL、50mL)
マイクロピペット用チップ (200 μL、1000 μL、5mL)
マイクロプレートシーリングテープ

3.4.材料(培養液および試薬)

Minimum Essential Medium (MEM)
Fetal Bovine Serum (FBS)
Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B (P/S/F) solution
(Antibiotic-Antimycotic x100)
L-Glutamine
Sodium bicarbonate
Phosphate-Buffered Saline (-) (PBS(-))

0.25w/v% Trypsin (1mmol/L EDTA・4Na)

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

Ethanol (EtOH)

Crystal violet

Methanol

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

Triethanolamine

なお、試薬のメーカー、ロットは表 1 の通りとする。

3.5.培養液

MEMを精製水(1L)に溶解させ、オートクレーブにて滅菌する。

使用時に、FBSを10%濃度に、P/S/Fを1%濃度に、L-Glutamineを200mM濃度になるように添加し、さらに7.5% Sodium bicarbonate 水溶液を培養液の色が薄赤色になるまで加える。

3.6.Crystal violet 溶液

Crystal violet をメタノールに溶解し、0.4%溶液を調製する。

3.7.被験物質

表 2 に示す物質を被験物質として用いる。

3.7.1.被験物質の調製

被験物質は培養液に 10000 μ g/mL の濃度に溶解または均一に懸濁させて被験物質液とする。被験物質を溶解または懸濁させる際に、ミキサー、加温機や超音波処理機を用いることができる。また、DMSO および Ethanol を溶媒として用い、培養液中に溶解または均一に懸濁させることができる。溶媒を用いる際、被験物質液中の DMSO および Ethanol の最高濃度は 10000 μ g/mL とする。最終的な被験物質の最高試験濃度は 5000 μ g/mL、溶媒の試験濃度は 5000 μ g/mL とする。なお、被験物質適用後に沈殿等が認められた場合、該当する濃度は均一に懸濁していなかったものとする。

3.7.2.被験物質液の希釈

被験物質液の濃度段階は公比 2 で 8 段階(100 μ L/well)とし、希釈液 1 濃度に対して 2 ウェルを設ける。

3.8.対照物質

3.8.1.陽性対照物質

陽性対照として、SDS を用いる。SDS の調製濃度は 1000 μ g/mL とする。

3.8.2.比較対照物質

比較対照として、Triethanolamine を用いる。Triethanolamine の調製濃度は 10000 μ g/mL とする。

3.8.3.陰性対照物質

陰性対照として、培養液、10000 μ g/mL DMSO 培養液溶液または 10000 μ g/mL Ethanol 培養液溶液を用いる。これらは被験物質を溶解または懸濁させる際に用いた溶媒によって選択する。

4.方法

4.1.細胞の培養と継代

①10%牛胎児血清(FBS)を添加した MEM 培養液を用い、37℃、5%の CO₂ で培養する。培養

液には Antibiotic-Antimycotic (GIBCO BRL)を 1%の濃度になるように培養液中へ加えたものを用いる。なお、この時の抗生物質の濃度は Penicillin 100U/mL、Streptomycin 100 μ g/mL、Amphotericin B 250ng/mL である。

- ②SIRC 細胞の継代はまず培養フラスコから培養液を取り除き、さらに Trypsin inhibitor となる血清を充分取り除くため、PBS(-)10mL で細胞表面を 2 回洗浄する。
- ③PBS(-)を除去した後、0.25%Trypsin 液 (1.5-2mL)を細胞表面の全体に行き渡るように加える (2-10 秒程度)。
- ④0.25%Trypsin 液を除去した後、細胞を剥離させるために 37℃中で 2~3 分間インキュベートし、フラスコの細胞接着面裏から軽くタップし剥離させる。剥離後、適量の MEM (10%FBS) を加えた後、十分なピペティングにより単細胞化させ均等な細胞浮遊液を調製する。血球計算板にて細胞数を計測し、培養液にて $6\sim 8\times 10^5$ cells/mL に調製する。1mL の細胞 ($6\sim 8\times 10^5$ cells) を 15~30mL の MEM (10%FBS) に加え継代する。

4.2.細胞浮遊液の調製

- ①SIRC 細胞の培養フラスコから培養液を取り除き、さらに Trypsin inhibitor となる血清を充分取り除くため、PBS(-)10mL で細胞表面を 2 回洗浄する。
- ②PBS(-)を除去した後、0.25%Trypsin 液 (1.5-2mL)を細胞表面の全体に行き渡るように加える (2-10 秒程度)。
- ③0.25%Trypsin 液を除去した後、細胞を剥離させるために 37℃中で 2~3 分間インキュベートする。
- ④フラスコの細胞接着面裏から軽くタップし剥離させる。
- ⑤剥離後、適量の培養液を加えた後、十分なピペティングにより単細胞化させ均等な細胞浮遊液を調製する。
- ⑥血球計算板にて細胞数を計測し、培養液にて 2×10^5 cells/mL に調製する。

4.3.被験物質の適用

- ①PBS(-)、陰性対照物質、並びに被験物質、陽性対照物質、比較対照物質の希釈系列 (100 μ L/well)を図 1 に示すように 96 穴マイクロプレート内に作製する。(参照)
- ② 2×10^5 cells/mL の細胞浮遊液を 0.1mL、図 2 に示すウェルに添加する。
- ③被験物質が揮発性し周囲のウェルへ影響を与える可能性を考慮し、ウェルを覆うマイクロプレートシーリングテープを貼付する。なお、被験物質が他のウェルに影響を与えた場合には、希釈して再試験することができる。
- ④添加した 96 穴マイクロプレートは細胞を培養床に均一に沈着・接着させるために、そのままクリーンベンチ内で静置(室温、20 分間)し、その後、CO₂ インキュベータ中に移す。
- ⑤約 72 時間、37℃、5% CO₂ 条件下で培養する。

4.4.Crystal violet 染色

- ①培養期間終了後、96 穴マイクロプレートを手軽に反転し被験物質を含む培養液を捨てる。
- ②PBS(-)を 200 μ L 添加し優しく攪拌した後、反転させ PBS(-)を捨てる。これを2回繰り返す。
- ③96 穴マイクロプレートの各ウェルに Crystal violet methanol 溶液を 100 μ L 分注し、30 分間染色する。
- ④染色期間が終了後、96 穴マイクロプレートを手軽に反転させ Crystal violet 溶液を捨て、じゅうぶん水洗する。ペーパータオル上にプレートを伏せ、水分を吸い取らせる。
- ⑤じゅうぶんに風乾した後、マイクロプレートリーダーを用いて各ウェルの吸光度 (588nm) を測定する。

4.5.IC50 の算出

被験物質を含まない陰性対照ウェルの細胞生存率を 100%とした場合における各ウェルの細胞生存率を吸光度から算出する。細胞生存率 50%を示す被験物質濃度 (IC50) の算出にあた

っては、細胞生存率 50%をはさむ 2 濃度とその濃度における細胞生存率から式 $\text{LogIC50} = [(50-y_1)\log x_2 - (50-y_2)\log x_1] / (y_2 - y_1)$ を用いて算出する。(※記号は、被験物質濃度 x_1 (低濃度側)、 x_2 (高濃度側)におけるそれぞれの細胞生存率を y_1 、 y_2 で示す。Log は常用対数である。)

被験物質の最高濃度である $5000 \mu\text{g/mL}$ で細胞生存率が 50%以下にならない場合は $\text{IC50} > 5000 \mu\text{g/mL}$ とする。また、試験した最低濃度である $39.1 \mu\text{g/mL}$ で細胞生存率が 50%未満の場合は、 $\text{IC50} < 39.1 \mu\text{g/mL}$ とする。

なお、表計算ソフト(Excel)において、細胞生存率を算出する段階以降で小数点以下 2 桁目を四捨五入する。

4.6. 評価

比較対照物質として Triethanolamine を用い、被験物質の眼刺激性を予測し、評価する。被験物質の IC50 が Triethanolamine の IC50 以上を陰性、Triethanolamine の IC50 未満を陽性と判定する。試験は 2 回を繰り返して行い、その結果に基づき評価する。2 回の評価結果が異なった場合には同様に 3 回目を実施し、2 回の同じ評価結果を採用し、その結果に基づき評価する。

4.7. 品質基準

試験の精度管理を以下の 5 項目で行う。全ての項で基準を満たすことを試験成立の要件とする。

- ①陰性対照から得られる吸光度の絶対値は、各ウェルに播種した 1×10^4 個の細胞が 72 時間のアッセイ期間中に正常な増加を示しているか否かを表している。したがって、96 穴マイクロプレートの左右に設定した陰性対照の平均吸光度が 0.4 を上回ることを試験の合格基準とする。
- ②陽性対照(SDS)の IC50 値が設定した範囲に収まることを試験成立の条件とする。その範囲は、厚生科学研究で得られた SDS の平均 $\text{IC50} \pm 3\text{SD}$ (99%信頼区間)である $77.7 \sim 258.7 \mu\text{g/mL}$ を合格基準とする。
- ③体系的に試験精度を見極めるために、96 穴マイクロプレートの左右に陰性対照を設定し、両者の吸光度が同様であることを確認する。左右の陰性対照の平均吸光度が全体の平均吸光度の 15%以内(平均値 $\pm 15\%$)に収まることを試験の合格基準とする。
- ④比較対照(Triethanolamine)の IC50 値が設定した範囲に収まることを試験成立の条件とする。その範囲は、 $1000 \mu\text{g/mL}$ 以上 $5000 \mu\text{g/mL}$ 未満とする。
- ⑤実施された 2 回の試験結果が同様であることを確認するために、2 試験間の誤差を確認することが必要である。したがって、2 試験間での陽性対照(SDS)の IC50 値が ± 2 倍以内に収まることを合格基準とする。

参考文献

- K.Saotome, H.Morita and M.Umeda, *Toxicol. in Vitro*, 3, 317 (1989).
H.Itagaki, S.Hagino, S.Kato, T.Kobayashi and M.Umeda, *Toxicol. in Vitro*, 5, 139 (1991).
Y.Ohno, T.Kaneko, T.Kobayashi et al., *In Vitro Toxicol*, 7, 89 (1994).
Y.Ohno, T.Kaneko, T.Kobayashi et al., *AATEX*, 3, 123 (1995).
H.Itagaki, M.Shibata, N.Tani et al., *AATEX*, 3, 182 (1995).
「代替法を用いて化粧品原料の眼刺激性を評価するにあたっての指針」*AATEX*, 5, Suppl., Guideline Draft1-3 (1998).
Y.Ohno, T.Kaneko, H.Itagaki et al., *Toxicol. in Vitro*, 13, 73 (1999).
N.Tani, H.Itagaki, Y.Ohno et al., *Toxicol. in Vitro*, 13, 175 (1999).

表 1 試薬のメーカー、ロット等

Reagent or Medium	Manufacturer	Code or CAS	Lot
MEM (Minimum Essential Medium)	Nissui	Code#: 05900	603901
Fetal Bovine Serum	JRH Bioscience	Cat#: 12603C-500ML	6M0030
Penicillin-Streptomycin-Glutamine(x100)	GIBCO/BRL	REF#: 15240-062	546123
L-Glutamine (200mM)	GIBCO/BRL	REF#: 25030-081	624236
Sodium bicarbonate	Wako	CAS#: 191-01305	1892
Phosphate-Buffered Saline (PBS(-))	Nissui	Code#: 05913	167903
0.25w/v% Trypsin (1mmol/L EDTA・4Na)	Wako	Cat#: 209-16941	WTB9071
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Kanto	CAS # 67-68-5	107U1458
Ethanol (EtOH)	Wako	CAS # 64-17-5	KWK2614
Crystal violet	Wako	CAS# 548-62-9	WKF0614
Methanol	Wako	CAS # 67-56-1	ALF0566
Sodium Dodecyl Sulfate	Wako	CAS # 151-21-3	TCG8194
Triethanolamine	Kanto	CAS# 102-71-6	810W1077

Nissui: NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD

Wako: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Kanto: KANTO CHEMICAL, CO., INC.

表 2 被験物質

No.	CAS	Substance	Alias	Manufacturer	Lot
1	609-14-3	Ethyl-2-methyl acetoacetate		Sigma-Aldrich	00619PC
2	6484-52-2	Ammonium nitrate		Sigma-Aldrich	09223AJ
3	29911-27-1	Butyl Dipropasol Solvent	Di(propylene glycol) propyl ether	Sigma-Aldrich	06127HJ
4	542-76-7	3-Chloropropionitrile		Sigma-Aldrich	17504LA
5	96-41-3	Cyclopentanol		Sigma-Aldrich	S23317-088
6	1119-62-6	3,3-Dithiodipropionic acid		Sigma-Aldrich	04619LB
7	101-86-0	Hexyl cinnamic aldehyde		Sigma-Aldrich	13102MO
8	137-16-6	N-Lauroylsarcosine sodium salt		Sigma-Aldrich	058K0069
9	12427-38-2	Maneb		Fluka	SZE9030X
10	105-30-6	2-Methyl-1-pentanol		Sigma-Aldrich	02929JJ
11	1569-01-3	Propasol Solvent P	Propylene glycol propyl ether	Sigma-Aldrich	03616HJ
12	2004-03-7	6-Methyl purine		Sigma-Aldrich	049K1156
13	96568-04-6	2,6-Dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropanoate	Ethyl 2,6-dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropanoate	Sigma-Aldrich	09620MU
14	9002-93-1	Triton X-100		Sigma-Aldrich	118K0160
15	29590-42-9	iso-Octyl acrylate	Isooctyl acrylate	Sigma-Aldrich	10428CH
16	5392-28-9	tetra-Aminopyrimidine sulfate	2,4,5,6-Tetraaminopyrimidine sulfate	Sigma-Aldrich	15022HH
17	446-35-5	2,4-Difluoronitrobenzene		Sigma-Aldrich	MKAA4323
18	598-65-2	n,n-Dimethylguanidine sulfate	1, 1 – Dimethylguanidine sulfate salt	Sigma-Aldrich	S42370-327
19	1462-55-1	2-(n-Dodecylthio)ethanol	Dodecyl 2-hydroxyethyl sulfide	Sigma-Aldrich	出荷伝票番号 833977017
20	75-26-3	iso-Propyl bromide	2-Bromopropane	Sigma-Aldrich	08331AE
21	108-83-8	Di-iso-butyl ketone	2,6-Dimethyl-4-heptane	Sigma-Aldrich	S26421-416
22	25103-09-7	iso-Octylthioglycolate	Isooctyl mercaptoacetate	Sigma-Aldrich	出荷伝票番号 833977018
23	625-69-4	2,4-Pentanediol		Sigma-Aldrich	02714CJ
24	3970-62-5	2,2-Dimethyl-3-pentanol		Sigma-Aldrich	06520KA
25	14075-53-7	Potassium tetrafluoroborate		Sigma-Aldrich	08216PE
26	623-39-2	3-Methoxy-1,2-propanediol		Sigma-Aldrich	10402CU
27	108-88-3	Toluene		Sigma-Aldrich	KWG6293
28	52-51-7	2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol		fluoro chem	F3542A
29	8001-54-5	Benzalkonium chloride		TCI	GC01
30	131-56-6	Benzophenone-1		Wako	ALM0931
31	131-55-5	Benzophenone-2		Wako	TSF1031
32	111-76-2	Butoxyethanol	2-Butoxyethanol	Wako	ALP5483
33	107-88-0	Butylene glycol	1, 3-Butanediol	Wako	TSQ5034
34	112-02-7	Cetrimonium chloride		Wako	WKF1369
35	36653-82-4	Cetyl alcohol		Wako	WKL2169
36	18472-51-0	Chlorhexidine digluconate 20% solution		Wako	TSQ4561
37	120-32-1	Chlorophene		Wako	TCK0988
38	88-04-0	Chloroxylonol		Wako	TSN6941
39	103-23-1	Diethylhexyl adipate	Octyl adipate	Wako	PEN5136
40	6938-94-9	Diisopropyl adipate		Wako	WKJ4099
41	577-11-7	Diocetyl sodium sulfosuccinate		Alfa aesar	K30S031
42	29806-73-3	Ethylhexyl palmitate	Octyl palmitate	Wako	TSM0246
43	107-41-5	Hexylene glycol	2-Methyl-2,4-pentanediol	Wako	PEN6553
44	25339-09-7	Isocetyl stearate	Isohexadecyl stearate	Wako	TCK0946
45	110-27-0	Isopropyl Myristate		TCI	AGN01
46	142-91-6	Isopropyl Palmitate		Wako	SDK5401
47	120-40-1	Lauramide DEA		Wako	ALM0258

48	108-65-6	Methoxyisopropyl acetate	2-Methoxy-1-methylethyl acetate	Wako	PEQ4882
49	143-28-2	Oleyl alcohol		Wako	LTK3360
50	9004-99-3	PEG-40 stearate		Wako	TSG0625
51	60-12-8	Phenethyl alcohol	2-Phenylethanol	Wako	PEP5880
52	122-99-6	Phenoxyethanol		Wako	WKE1655
53	74563-64-7	Phytantriol		Wako	TCP0387
54	108-32-7	Propylene carbonate	4-Methyl-1,3-dioxolan-2-one	Wako	TSF0417
55	108-46-3	Resorcinol		Wako	WKF1256
56	8001-23-8	Safflower (Carthamus tinctorius) oil		Wako	5765J
57	8008-74-0	Sesame (Sesamum indicum) oil		Wako	4363J
58	4418-26-2	Sodium dehydroacetate		Wako	ALP5014
59	532-02-5	Sodium naphthalenesulfonate		Wako	LTF0381
60	822-16-2	Sodium stearate		Wako	ALN6945
61	1338-43-8	Sorbitan oleate	Sorbitan monooleate	MP Biomedicals	7272H
62	8007-43-0	Sorbitan sesquioleate		Wako	DPR1512
63	111-01-3	Squalane		Wako	PEJ4649
64	122-19-0	Stearalkonium chloride		Wako	ALN0903
65	139-96-8	TEA-Lauryl sulfate 40% solution		Wako	TSG0252
66	102-76-1	Triacetin	Glycerol triacetate	Wako	ALR3379
67	112-27-6	Triethylene glycol	3,6-Dioxo-1,8-octanediol	Wako	WKG5787
68	122-20-3	Triisopropanolamine		Wako	PEN1131

Sigma-Aldrich: Sigma-Aldrich Corp.

TCI: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

Wako: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

図 1 96ウェルマイクロプレートレイアウト

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	NC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	NC	PBS
C	PBS	NC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	NC	PBS
D	PBS	NC	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	NC	PBS
E	PBS	NC	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	NC	PBS
F	PBS	NC	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	NC	PBS
G	PBS	NC	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	NC	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

PBS: PBS(-)を200 μ L、NC: 培養液を100 μ L、S: 被験物質の2倍希釈系列(100 μ L)、R: 比較対照物質の2倍希釈系列(100 μ L)、P: 陽性物質の2倍希釈系列(100 μ L)

図2 細胞浮遊液の添加

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

■ : 細胞浮遊液(100 μ L)