

報告書

SIRC細胞を用いた
HuFuferme（フフファーム）の
*in vitro*眼刺激性試験
[OECDテストガイドライン491]

試験施設

株式会社きれいテストラボ

〒135-0047 東京都江東区富岡二丁目11番6号 長谷萬ビル3F

TEL 03-6695-0144

【無断転載禁止】



試験委託	株式会社ケーツーカーコミュニケーションズ 〒101-0047 東京都千代田区内神田1-13-1 豊島屋ビル7階 菊地 真知子
試験受託	株式会社きれいテストラボ 〒135-0047 東京都江東区富岡2-11-18
試験実施機関	株式会社きれいテストラボ 試験センター 〒135-0047 東京都江東区富岡2-11-6 長谷萬ビル3F
試験番号	SE23072001
被験物質	HuFuferme (フフファーム)
試験項目	SIRC細胞を用いた in vitro 眼刺激性試験 (Short Time Exposure試験)
資料保存場所	株式会社きれいテストラボ
試験実施日	2023年8月23日
保存期間	試験終了後5年間

報告書をwebなどへ転載を希望する場合、必ず事前に株式会社きれいテストラボにご相談ください。

目次

略語	4
要約	5
試験目的	5
試験概要	5
試験ガイドライン	5
材料と試験方法	6
1. 被験物質	6
2. 陽性対照物質	6
3. 細胞	6
4. 培地	6
5. 試験構成	6
6. 試験操作	6
7. 細胞生存率の計算	7
8. 数値の取り扱い	7
9. 試験成立の条件	7
10 判定	8
試験結果	9
1. 試験成立	9
2. 結果	9
参考文献	9

(最終ページ:11ページ)

略語

CAS: Chemical Abstracts Services

EMEM: Eagle's Minimal Essential Medium

FBS: Fetal Bovine Serum

GHS: Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals

JaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

OD: Optical Density

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development

PBS: Phosphate-buffered saline

SD: Standard Deviation

SIRC: Statens Seruminstitut Rabbit Cornea

SLS: Sodium Lauryl Sulfate

STE: Short Time Exposure In Vitro Test

UN: United Nations

要約

SIRC細胞を用いた*in vitro*短時間曝露法 (Short Time Exposure *In Vitro* Test, STE法, OECD TG491)により

被験物質「HuFuferme (フフファーム)」

の眼刺激性を評価した。細胞播種4日間または5日後、ウサギ角膜由来細胞株 (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea, SIRC細胞)を0.05% (v/v)または5.0% (w/w) の被験物質に5分間曝露し、細胞生存率を測定した。被験物質への曝露後の細胞生存率の平均値 ± 標準偏差は、0.05%曝露条件において103.1 ± 1.9%、5.0%曝露条件において104.0 ± 1.8%を示した。したがって被験物質は、OECDテストガイドライン491に沿った判定基準により、UN GHSが規定する危険有害性区分において一定期間において非可逆的もしくは可逆的な眼損傷/刺激作用を有する「区分1」ではない、すなわち眼損傷/刺激作用を有する物質とは分類されない「区分外」と判定された。

試験目的

被験物質の眼刺激性作用を評価するため、SIRC細胞を用いたSTE法 (OECDテストガイドライン491収載¹⁾)による眼刺激性試験代替法を実施した。

試験概要

眼に異物が入った場合、眼への刺激性は最表面の角膜上皮細胞に対する細胞傷害から始まる。そこで本試験では、角膜上皮細胞に対する細胞毒性を指標として眼刺激性を評価するSTE法 (2015年OECDテストガイドライン491採択済み^{1,2)})を用いた。

コンフルエントに単層培養したSIRC細胞に被験物質希釈液を5分間曝露する。次にMTTの取り込み量をもとにしたMTT還元法³⁾によって細胞生存率を測定し、被験物質の眼刺激性を評価する。

眼に入った異物の大部分がヒトでは1~2分で眼内から排出され、ウサギでは3~4分で80%が排出されると報告されている⁴⁾。これら実際の曝露条件を考慮して、STE法では通常の細胞毒性と比べて短時間曝露の試験として設計されている⁵⁻⁹⁾。STE法は日本動物実験代替法学会 (Sakaguchi et al. 201110) とJaCVAM (Kojima et al. 201311) のバリデーションを経て、トップダウン方式においてUN GHS区分1物質を検出する方法およびボトムアップ方式においてUN GHS区分外物質を検出する方法としてバリデーションが行われた。本試験で採用したSTE法は2015年にOECDテストガイドライン491として採択されている^{1,2)}。

試験ガイドライン

本試験は、OECDテストガイドライン491 [OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Short Time Exposure *In Vitro* Test Method for Identifying Chemicals Inducing Serious Eye Damage and Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (Adopted 28 July 2015, Updated 26 June 2020)]¹⁾を参考に実施した。

材料と試験方法

1. 被験物質

被験物質の溶媒は、本試験の最高濃度5.0% (w/w) で可溶化可能な生理食塩水 (0.9% (w/v) 塩化ナトリウム溶液, CAS No. 7647-14-5, FUJIFILM Wako Pure Chemical, Japan) とした。生理食塩水によって被験物質を5.0%および0.05% (v/v) に調製し、試験に用いた。

2. 陽性対照物質

本試験条件下でのSIRC細胞の刺激反応性を確認するため、眼刺激性を示すことが知られているSodium Lauryl Sulfate (SLS, CAS No. 151-21-3, Sigma-Aldrich, USA)を生理食塩水で0.01% (v/v)に調製し、陽性対照物質として用いた。

3. 細胞

ウサギ角膜上皮由来のSIRC細胞 (RIKEN BRC, Japan) を、CO₂インキュベータ (CO₂濃度 5%、37°C) を用いて培養し、本試験を実施した。

4. 培地

10.0% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS, Cat No. SH30071.03, Hyclone, UK) および1.0% (v/v) 抗真菌剤 (Antibiotic-Antimycotic 100X, Cat No. 15240-062, Invitrogen, USA) を含むEMEM (Cat No. 051-07615, FUJIFILM Wako Pure Chemical, Japan) を用いた。

5. 試験構成

- 1) 細胞生存率の算出には1つの処理群につき3ウェルの平均値を用いた。また、1プレートにつきブランク群、操作対照群、溶媒対照群および陽性対照群をそれぞれ1群、0.05%、5.0%の被験物質を被験物質群としてそれぞれ1群設けて試験を実施した。被験物質調製を含め、試験に関わる操作は別途記載のないかぎり室温で実施した。
- 2) 眼刺激性試験は3回実施し、細胞生存率の平均値から眼刺激性作用の判定を行った。

6. 試験操作

- 1) 96ウェルプレート (Cat No. 3860-096, Iwaki, Japan) に 3.0×10^4 cells/mLまたは 1.5×10^4 cells/mLのSIRC細胞を200 μ Lで播種し、CO₂インキュベータ内でそれぞれ4日間または5日間培養した。培養時の乾燥を防ぐため、試験に用いないウェルにPBS (-) (Cat No. 198601, Nissui, Japan) を200 μ L加えた。
- 2) 培地を除去し、各ウェルを37°Cに加温したPBS (-) 200 μ Lで静かに洗浄した。
- 3) 被験物質、溶媒および陽性対照を200 μ L添加し、5分間曝露した。ブランクには同量の培地を用いた。

- 4) 5分間曝露添加した溶液をすべて除去し、200 μ LのPBS (-) にて2回洗浄を行った。0.5 mg/mL MTT (CAS No. 298-93-1, Dojin, Japan) 液を1ウェルあたり200 μ L加え、CO₂インキュベータ内で2時間培養した。
- 5) 培養終了後、MTT溶液を除去し、200 μ LのPBS (-) で洗浄した。生成された不溶性のホルマザンを可溶化するため、0.04 N塩酸 (CAS No. 7647-01-0, FUJIFILM Wako Pure Chemical, Japan) を含む2-プロパノール (CAS No. 166-04836, FUJIFILM Wako Pure Chemical, Japan) を200 μ L加え、遮光下で1時間室温静置した。
- 6) 96ウェルプレートに270 rpmで10秒間振盪し、ウェル内の色素を均一に分散した後、マイクロプレートリーダー (SPARK[®] 10M, TECAN, Switzerland) を用いて570 nmの吸光度 (OD₅₇₀) を測定した。

7. 細胞生存率の計算

被験物質、陽性対照、溶媒対照および操作対照それぞれの吸光度とブランクの平均吸光度の差を求めた。それらの値を用いて、溶媒対照に対する被験物質ならびに陽性対照の細胞生存率を以下の式に従い算出した。また、操作対照に対する溶媒対照の細胞生存率も同様に算出した。さらに試験ごとに細胞生存率を算出し、3試験の平均値を眼刺激性の判定に用いた。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = [(A - B) / (C - B)] \times 100$$

- A : 被験物質、陽性対照および操作対照の570 nmでの吸光度
- B : ブランクの570 nmでの吸光度 (平均)
- C : 各溶媒の570 nmでの吸光度 (平均)

8. 数値の取り扱い

各数値は次のように取り扱った。

数値の表示桁は以下の通りとし、表示された数値を用いて計算を行った。また、数値は必要とされる桁より1桁下の桁で四捨五入した。

- 濃度 : 小数点以下1桁
- 各群における吸光度 : 小数点以下3桁
- 細胞生存率、標準偏差 : 小数点以下1桁

9. 試験成立の条件

本試験はOECDテストガイドライン491の基準¹⁾に沿って下記条件を試験成立条件とし、条件を満たさなかった場合は、再試験を行うこととした。

- 1) 操作対照のOD₅₇₀がブランク減算後0.3以上であること
- 2) 操作対照に対する溶媒対照の細胞生存率が80%以上であること
- 3) 陽性対照の細胞生存率が21.1%から62.3%の範囲であること
- 4) 独立した3回の試験から得られた被験物質曝露の細胞生存率の標準偏差が15%未満であること

10. 判定

被験物質の眼刺激性はOECDテストガイドライン491の基準¹⁾に沿って、GHS区分に分類し、表1に示した。被験物質濃度0.05%、5.0%条件下のいずれも細胞生存率が70%を超えた場合を、眼に対する重篤な損傷性を有する物質および眼刺激性物質とは分類されない「区分外」とした。また、0.05%、5.0%条件下のいずれも細胞生存率が70%以下であった場合を、眼に対する重篤な損傷性物質を表す「区分1」とした。尚、被験物質0.05%条件下では細胞生存率が70%を超え、5%条件下では70%以下であった場合はGHS区分に「分類できない」とした。

表1 眼刺激性GHS分類の判定

被験物質希釈濃度	平均細胞生存率	被験物質のGHS分類
0.05 %	> 70 %	区分外
5.0 %	> 70 %	
0.05 %	> 70 %	分類できない
5.0 %	≤ 70 %	
0.05 %	≤ 70 %	区分1
5.0 %	≤ 70 %	

試験結果

1. 試験成立

陽性対照、溶媒対照、操作対照およびブランクの眼刺激性試験のOD₅₇₀を表2-1、2-2および2-3に示した。また、陽性対照、溶媒対照および操作対照の細胞生存率を表3に示した。

操作対照であるSLSのOD₅₇₀はブランク減算後に0.3以上であった。また、溶媒対照に対する細胞生存率は0.01%曝露条件下において細胞生存率が21.1%~62.3%の範囲内であることが確認された。さらに、操作対照群に対する溶媒対照群の細胞生存率が80%以上であったこと、独立した3試験のすべての被験物質群において細胞生存率の標準偏差が15%を下回った。これらにより、本試験はOECDテストガイドライン491が規定する試験成立条件を満たした。

2. 結果

被験物質のOD₅₇₀を表2-1、2-2および2-3に示した。また、被験物質の細胞生存率と判定結果をそれぞれ表3、表4に示した。

被験物質の溶媒対照に対する細胞生存率は、0.05%曝露条件において103.1 ± 1.9%、5.0%曝露条件において104.0 ± 1.8%を示した。したがって被験物質は、OECDテストガイドライン491に沿った判定基準により、UN GHSが規定する危険有害性区分において眼に対する一定期間において非可逆的もしくは可逆的な眼損傷/刺激作用を有する「区分1」ではない、すなわち眼損傷/刺激作用を有する物質とは分類されない「区分外」に分類された。

参考文献

- 1) OECD Test Guideline 491, 2020.
- 2) ICCVAM Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, 2013.
- 3) T. Mosmann., J. Immunol Methods., 65, 1-2, 55-63, 1983.
- 4) T.J. Mikkelsen et al., J. Pharm. Sci., 1648-1653, 1973.
- 5) Y. Takahashi et al., Toxicol. In Vitro, 22, 760-770, 2008.
- 6) Y. Takahashi et al., J. Toxicol. Sci., 34, 6, 611-626, 2009.
- 7) Y. Takahashi et al., Cutan. Ocul. Toxicol., 29, 2, 77-90, 2010.
- 8) Y. Takahashi et al., Toxicol. In Vitro, 25, 1425-1434, 2011.
- 9) K. Saito et al., Toxicol. In Vitro, 29, 3, 617-620, 2015.
- 10) H. Kojima et al., Toxicol. In Vitro, 27, 6, 1855-1869, 2013.
- 11) H. Sakaguchi et al., Toxicol. In Vitro, 25, 4, 796-809, 2011.

表2-1 OD₅₇₀および細胞生存率1

濃度	OD ₅₇₀						ブランク減算後のOD ₅₇₀					細胞生存率 (%)						
	各ウェルのデータ			mean	±	s.d.	各ウェルのデータ			mean	±	s.d.	各ウェルのデータ			mean	±	s.d.
	1	2	3				1	2	3				1	2	3			
ブランク	-	0.056	0.053	0.052	0.054 ±	0.002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
操作対照	-	0.961	0.987	0.941	0.963 ±	0.023	0.907	0.933	0.887	0.909 ±	0.023	99.8	102.6	97.6	100.0 ±	2.5		
溶媒対照 (生理食塩水)	-	0.915	0.901	0.908	0.908 ±	0.007	0.861	0.847	0.854	0.854 ±	0.007	94.7	93.2	94.0	94.0 ±	0.8		
溶媒対照 (被験物質溶媒)	-	n.t.	n.t.	n.t.	- ±	-	-	-	-	- ±	-	-	-	-	- ±	-		
陽性対照	0.01% (v/v)	0.313	0.294	0.313	0.307 ±	0.011	0.259	0.240	0.259	0.253 ±	0.011	30.4	28.1	30.4	29.6 ±	1.3		
被験物質	0.05% (v/v)	0.929	0.957	0.955	0.947 ±	0.016	0.875	0.903	0.901	0.893 ±	0.016	102.5	105.7	105.5	104.6 ±	1.8		
	5.0% (v/v)	0.982	0.942	0.954	0.959 ±	0.021	0.928	0.888	0.900	0.906 ±	0.021	108.7	104.0	105.4	106.0 ±	2.4		

表2-2 OD₅₇₀および細胞生存率2

濃度	OD ₅₇₀						ブランク減算後のOD ₅₇₀					細胞生存率 (%)						
	各ウェルのデータ			mean	±	s.d.	各ウェルのデータ			mean	±	s.d.	各ウェルのデータ			mean	±	s.d.
	1	2	3				1	2	3				1	2	3			
ブランク	-	0.056	0.053	0.052	0.054 ±	0.002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
操作対照	-	0.885	0.934	0.917	0.912 ±	0.025	0.831	0.880	0.863	0.858 ±	0.025	96.9	102.6	100.6	100.0 ±	2.9		
溶媒対照 (生理食塩水)	-	0.838	0.818	0.746	0.801 ±	0.048	0.784	0.764	0.692	0.747 ±	0.048	91.4	89.0	80.7	87.0 ±	5.6		
溶媒対照 (被験物質溶媒)	-	n.t.	n.t.	n.t.	- ±	-	-	-	-	- ±	-	-	-	-	- ±	-		
陽性対照	0.01% (v/v)	0.326	0.327	0.314	0.322 ±	0.007	0.272	0.273	0.260	0.269 ±	0.007	36.5	36.6	34.9	36.0 ±	1.0		
被験物質	0.05% (v/v)	0.806	0.824	0.856	0.829 ±	0.025	0.752	0.770	0.786	0.770 ±	0.017	100.7	103.1	107.4	103.7 ±	3.4		
	5.0% (v/v)	0.840	0.828	0.793	0.820 ±	0.024	0.786	0.774	0.739	0.767 ±	0.024	105.3	103.7	99.0	102.6 ±	3.3		

$n = 3$, mean ± s.d.

s.d.: standard deviation

n.t.: not tested (被験物質溶媒が生理食塩水の場合、試験未実施)

表2-3 OD₅₇₀および細胞生存率3

濃度	OD ₅₇₀						ブランク減算後のOD ₅₇₀					細胞生存率 (%)						
	各ウェルのデータ			mean	±	s.d.	各ウェルのデータ			mean	±	s.d.	各ウェルのデータ			mean	±	s.d.
	1	2	3				1	2	3				1	2	3			
ブランク	-	0.050	0.052	0.052	0.051 ±	0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
操作対照	-	0.854	0.959	0.952	0.922 ±	0.059	0.803	0.908	0.901	0.870 ±	0.059	92.2	104.3	103.5	100.0 ±	6.7		
溶媒対照 (生理食塩水)	-	0.814	0.812	0.794	0.807 ±	0.011	0.763	0.761	0.743	0.755 ±	0.011	87.6	87.4	85.3	86.8 ±	1.3		
溶媒対照 (被験物質溶媒)	-	n.t.	n.t.	n.t.	- ±	-	-	-	-	- ±	-	-	-	-	- ±	-		
陽性対照	0.01% (v/v)	0.238	0.233	0.235	0.235 ±	0.003	0.187	0.182	0.184	0.184 ±	0.003	24.7	24.1	24.3	24.4 ±	0.3		
被験物質	0.05% (v/v)	0.807	0.819	0.814	0.813 ±	0.006	0.756	0.768	0.763	0.762 ±	0.006	100.0	101.6	101.0	100.9 ±	0.8		
	5.0% (v/v)	0.844	0.863	0.786	0.831 ±	0.040	0.793	0.812	0.735	0.780 ±	0.040	104.9	107.5	97.3	103.2 ±	5.3		

表3 細胞生存率の3試験の平均値および標準偏差

濃度	細胞生存率 (%)					
	各試験の平均値			mean	±	s.d.
	1	2	3			
ブランク	-	-	-	-	-	-
操作対照	-	-	-	-	-	-
溶媒対照 (生理食塩水)	-	94.0	87.0	86.8	89.3 ±	4.1
溶媒対照 (被験物質溶媒)	-	-	-	-	- ±	-
陽性対照	0.01% (v/v)	29.6	36.0	24.4	30.0 ±	5.8
被験物質	0.05% (v/v)	104.6	103.7	100.9	103.1 ±	1.9
	5.0% (v/v)	106.0	102.6	103.2	104.0 ±	1.8

n = 3, mean ± s.d.

s.d.: standard deviation

n.t.: not tested (被験物質溶媒が生理食塩水の場合、試験未実施)

表4 HuFuferme(フフファーム)のGHS分類

眼刺激性のGHS分類に基づく判定	
被験物質	区分外