

2010年10月18日

眼刺激性試験代替法「MATREX™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 MATREX™ 試験の原理	4
5 MATREX™ の品質	5
6 厚生科学研究による MATREX™ 試験のバリデーションデータの解析 [研究 1]	8
7 MATREX™ 試験の追加研究 [研究 2]	20
8 MATREX™ 試験による無刺激性物質(NI)の予測	26
9 まとめ	31
10 参考文献	31
11 英語の略名	33

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、MATREX™ を用いる試験は、施設間の再現性が高く、インビボとの対応も良好であった。そして、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)」の注釈の中に「人工皮膚モデル等の内にも刺激性物質と無刺激性物質の識別が可能な方法もある」と記載され、有用であることが示されている(大野, 1999, Ohno, 2004)。

今回取り上げる MATREX™ 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(Ohuchi 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、MATREX™ 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、MATREX™ 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、 $pH \leq 2$ 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 Grading of ocular lesions

Cornea	
Opacity: degree of density (readings should be taken from most dense area)*	
No ulceration or opacity.....	0
Scattered or diffuse areas of opacity (other than slight dulling of normal lustre); details of iris clearly visible	1
Easily discernible translucent area; details of iris slightly obscured	2
Nacrous area; no details of iris visible; size of pupil barely discernible	3
Opaque cornea; iris not discernible through the opacity	4
Maximum possible: 4	
* The area of corneal opacity should be noted	
Iris	
Normal	0
Markedly deepened rugae, congestion, swelling, moderate circumcorneal hyperaemia; or injection; iris reactive to light (a sluggish reaction is considered to be an effect	1
Hemorrhage, gross destruction, or no reaction to light.....	2
Maximum possible: 2	
Conjunctivae	
Redness (refers to palpebral and bulbar conjunctivae; excluding cornea and iris)	
Normal	0
Some blood vessels hyperaemic (injected)	1
Diffuse, crimson colour; individual vessels not easily discernible.....	2
Diffuse beefy red.....	3
Maximum possible: 3	
Chemosis	
Swelling (refers to lids and/or nictating membranes)	
Normal	0
Some swelling above norma	1
Obvious swelling, with partial eversion of lids.....	2
Swelling, with lids about half closed	3
Swelling, with lids more than half closed	4
Maximum possible: 4	

The table is the same as that of OECD guideline for the testing of chemicals 405, Acute eye irritation/Corrosion (2002).

Table 2 GHS classification of serious eye damage / eye irritation

Category 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 Appendix 1 に記載した。

4. MATREX™ 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。

MATREX™ (東洋紡績株式会社製)は、コラーゲンゲル中にヒト由来の線維芽細胞を包埋培養し、三次元構造を有する Living dermal model (LDM)である(Bell et al., 1991, Gay et al., 1992, 石橋, 1996)。被験物質適用 24 時間後に MTT アッセイが行われ、細胞毒性を検出する。培養液中で培養した細胞を用いる細胞毒性試験と異なる点は、被験物質をゲルの上面へ適用するため、適用可能な被験物質の範囲は水溶性物質に限らず、非水溶性物質、粉末にもおよび事である。また、未希釈の場合を含め、インビボと同じ濃度での適用が可能であるという点も挙げられる。これらは、インビボに比較的近似した試験状況を再現できることを意味している。

MATREX™ で用いられている細胞は角膜由来の細胞では無いが、化学物質に対する細胞毒性試験の結果は角膜以外の組織に由来する細胞であっても角膜由来の細胞(SIRC 細胞)に近似した結果が得られる場合があることが知られている。ヒト子宮頸部癌由来 HeLa 細胞やチャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞(CHL 細胞)を用いる細胞毒性試験の結果は、角膜由来の SIRC 細胞毒性試験の結果と高い相関性を示すことが Ohnoら(1999)により報告されている。MATREX™ 試

験の結果も、被験物質適用条件が大きく異なるものの、SIRC 細胞毒性試験と高い相関性が認められている(Appendix 2)。厚生科学研究で取り上げられた一連の細胞毒性試験はいずれも、Draize 試験評価点との間に高い相関性が認められることが報告されている。

5. MATREX™ の品質

5.1. MATREX™ について

MATREX™ は、コラーゲンゲル内にヒト線維芽細胞を包埋し、3次元培養した組織モデルであり、マサチューセッツ工科大学の Bellら(1979)によって基本技術が開発された。1987年に米国マサチューセッツ州ボストンにある Organogenesis Inc.が独占実施権を取得し、製造販売を行った。1994年には東洋紡績株式会社が製造販売ライセンスを取得し、日本において製造販売を開始した。2007年には基本特許(US4,539,716、US4,546,500)が満期で失効した。日本におけるコラーゲンゲルの製法特許(生組織等価物(平5-53505)(公告1993-8-10))は2008年8月10日に失効した。現在、東洋紡績株式会社は Organogenesis Inc.から原料供給を受けながら製造している。

MATREX™ の材料はヒト皮膚線維芽細胞、コラーゲン、製造用培地である。ヒト皮膚線維芽細胞はヒト新生児(白人)の包皮由来、コラーゲンはウシ胎児の腱由来、製造用培地はウシ新生児血清約2%および抗生物質としてゲンタマイシンを含む DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)である。

MATREX™ の作製方法は、ヒト皮膚線維芽細胞をコラーゲン溶液に懸濁させ、20~30分でコラーゲンのゲル化を起こさせる。その後、製造用培地を添加、液中培養を行い、コラーゲンゲルを収縮させる。16日目から空気暴露培養を行い、19日目以降に出荷する(Appendix 3)。

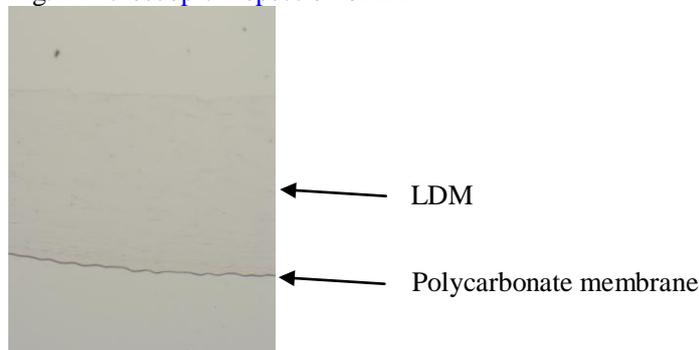
デルマタン硫酸プロテオグリカンやグルコサミノグリカンなどがこの包埋培養中に生成される。増殖性は抑制されている。ヒト線維芽細胞の密度は約 $1 \times 10^7 / \text{cm}^3$ 、タイプ I コラーゲン密度は約 40mg/mL となっている(石橋,1996)。

なお、製品に添付されている測定用培地は DMEM と Ham をブレンドした無血清培地であり、抗生物質としてゲンタマイシンが添加されている。

5.2. MATREX™ の形態

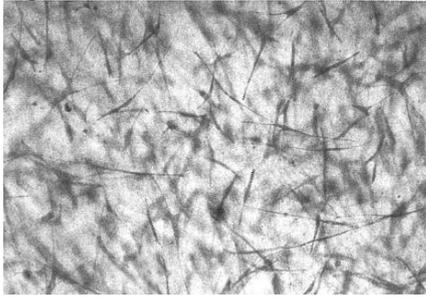
LDM のヘマトキシリン・エオシン染色をした切片の写真を Fig.1 に示す。LDM はウシタイプ I コラーゲンとヒト皮膚線維芽細胞を包埋培養し、細胞の牽引力によって、コラーゲンゲルが収縮し、コラーゲン線維の再配列と共に、コラーゲン密度と物理的強度が高くなり、真皮層に類似した構造を取っている。厚さは約 200 μm である。同様の写真は Ohuchi ら(1999)より、報告された(Appendix 4)。このような収縮コラーゲンゲル内の線維芽細胞は、二次元培養と異なり、その構造は二極化した紡錘形状を保っている(Fig.2)。

Fig.1 Microscopic inspection of LDM



The specimen of LDM was stained with hematoxylin and eosin.
The picture was taken by Toyobo Co., Ltd on July 26 '10.

Fig.2 Fibroblast cell in the LDM stained by Nile blue



The picture is the same as that reported by Ishibashi (1996).

5.3.形状の規定と出荷基準

LDM はポリカーボネート膜上にており、上側から円形のメサ部が観察できる(Fig.3)。東洋紡績株式会社では出荷前にメサ径が 10mm~20mm であること、および外縁に捲くれがないことを肉眼的に検査している(Fig. 4)。東洋紡績株式会社の実施した 216 ロットの検査データでは全ロットで異常が認められず、良好な結果が得られている(Appendix 5)。

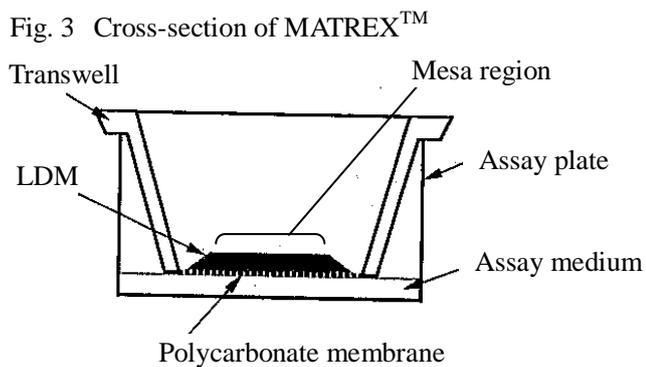
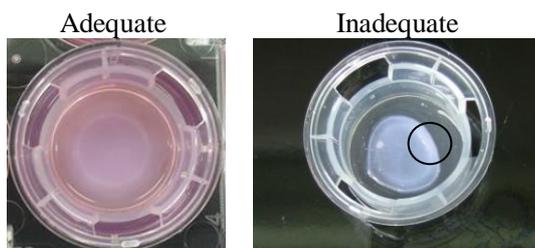


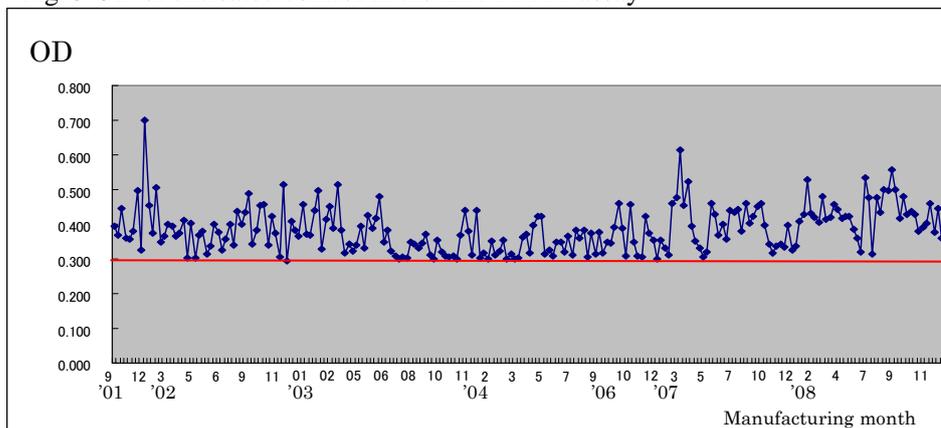
Fig. 4 Macroscopic inspection of MATREX™



5.4.無処置 LDM の吸光度(OD)と出荷基準

無処置 LDM の OD は、東洋紡績株式会社による 216 ロットの出荷前検査結果によると、平均 0.385、標準偏差 0.065 であった。出荷基準として、無処置 LDM の OD 値について 0.30 以上が設定されている。全 216 ロットで異常が認められず、良好な結果が得られた。(Fig.5 および Appendix 5)

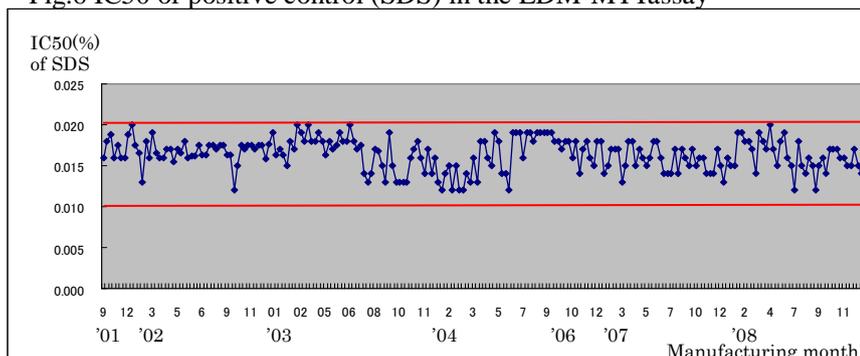
Fig. 5 OD of untreated control in the LDM-MTT assay



5.5.陽性対照の IC50 と出荷基準

陽性対照である Sodium dodecyl sulfate (SLS)の IC50 値は、東洋紡績株式会社による 216 ロットの出荷前検査結果によると、平均 0.016%、標準偏差 0.002%であった。出荷基準として、陽性対照 SDS の IC50 について 0.010~0.020%が設定されている。216 ロット全てで異常が認められず、良好な結果が得られた。(Fig. 6 および Appendix 5)

Fig.6 IC50 of positive control (SDS) in the LDM-MTT assay



6. 厚生科学研究による MATREX™ 試験のバリデーションデータの解析 [研究 1]

6.1. 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 MATREX™ 試験である。今回、この MATREX™ 試験について、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。

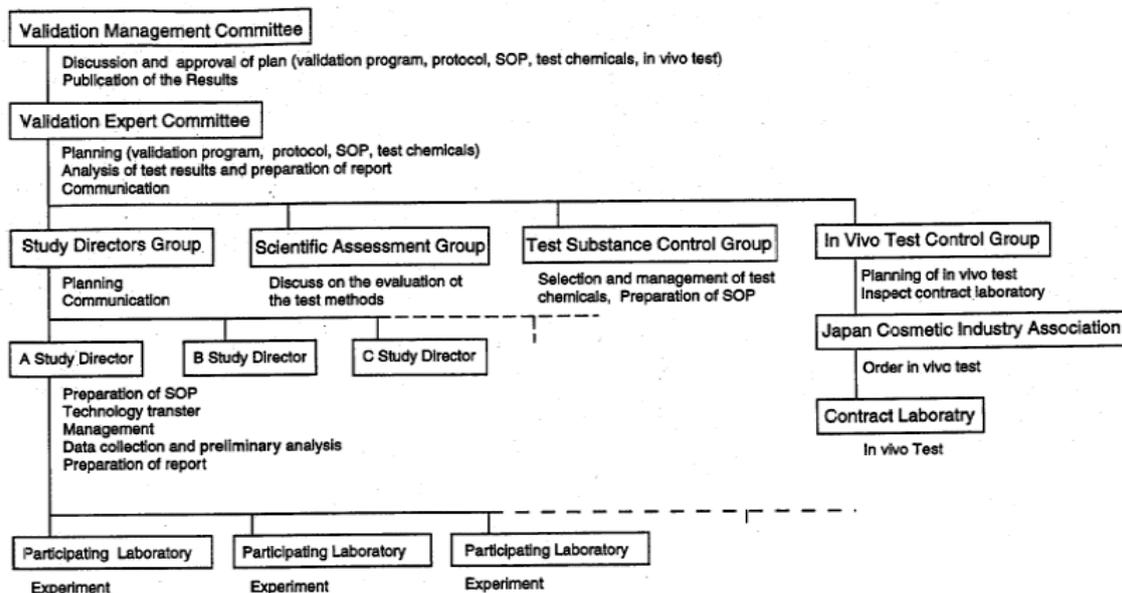
厚生科学研究のバリデーションにおいて原体の眼刺激性を評価する基準はあらかじめ設定されていなかったため、解析にあたって、新たに細胞生存率が 50%以上を陰性、50%未満を陽性とする基準を設定した。

6.2. 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. 7 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、MATREX™ 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、マネージメント、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. 7 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 (Div. Pharmacol. Div. Toxicol. and Div. Genetics Mutagen.)	POLA Corp.
	Kanebo Ltd
	KOSE Corp.
	Lion Corp.
Universities	KAO 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 Menard 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).

MATREX™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3施設(花王、東洋紡、ライオン)、第二次バリデーションは7施設(花王、東洋紡、ライオン、ノエビア、ポーラ、P&G、メナード)、第三次バリデーションは4施設(花王、東洋紡、ライオン、ノエビア)であった。リードラボは花王が務めた。

Table 4 List of the participation of organization

First validation	Kao	Toyobo	Lion				
Second validation	Kao	Toyobo	Lion	Noevir	Pola	P&G	Menard
Third validation	Kao	Toyobo	Lion	Noevir			

6. 3. MATREX™ 試験のプロトコール

6.3.1. 厚生科学研究による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。

6.3.2. 提案するプロトコール

(1) MATREX™ の購入および受け入れ検査

- MATREX™ キットを東洋紡績株式会社から購入する。受け入れ時にキット中の組織トレイの培地の pH が受け入れ可能な範囲内の 6.8~7.7 にあることを付属の培地 pH チャートを用いて確認する。範囲外である時、その組織トレイの中の LDM は使用不可とする。また、東洋紡績株式会社で出荷前検査として実施された無処置の LDM における細胞生存率の試験と陽性対照を用いた試験の成績を確認する。すなわち、付属の LDM 品質試験報告書の検定項目において、LDM 中の細胞の生存を示す MTT 試験の検定項目が 0.30 以上であること、および陽性対照の試験として実施された Sodium dodecyl sulfate (SDS) の IC50 値が 0.01~0.02% であることを確認する。キット中の LDM は、20~37°C (好ましくは約 30°C) のインキュベーターで保管する。記載されている使用期限内に使用する。

(2) 被験物質の準備

- 原体の眼刺激性を予測する場合は原体で、希釈液の眼刺激性を予測する場合には該当する濃度に希釈する。
- 希釈する場合には、蒸留水、50%ジメチルスルホキシド(DMSO)、エチレングリコール、流動パラフィンを用いる。これ以外の溶媒を用いる場合は、溶媒が化学的に安定であること、細胞毒性を示さないこと、被験物質と反応しないことを使用前に確認する。
- 固体の場合は、必要に応じて乳鉢等により細かくする。

(3) LDM の準備

- 組織トレイ中のトランスウェルを 6 ウェルのアッセイトレイ(キット付属品;東洋紡績株式会社)に移し、LDM 上に 5mL のアッセイ培地(キット付属品;東洋紡績株式会社)を加え、室温で約 30 分間放置後、アッセイ培地を除去する。
- アッセイリング(キット付属品;東洋紡績株式会社)をピンセットでつまみ、片面にシリコーン接着剤(キット付属品;東洋紡績株式会社)を塗り、LDM の上に装着する。
- 1.2mL のアッセイ培地を LDM の下側のアッセイトレイのウェルへ加える。

(4) 被験物質の適用

- 80 μ L (または固体の場合 80mg) の被験物質を LDM の表面に適用する。暴露は 37°C、24 時間行う。
- 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フィルムを貼付することができる。さらに、アッセイトレイをラップフィルムで包むことができる。

(5) 対照物質

- 陽性対照として、0.1(w/v)% SDS 水溶液を用いる。
- 陰性対照は無処置のウェルとする。被験物質が希釈液の場合には、用いた溶媒を陰性対照として用いる。また、0.01(w/v)% SDS 水溶液を精度管理のための陰性対照として用いる。0.01%SDS 水溶液のウェルは被験物質の細胞生存率の計算には用いない。

(6) 試験成立基準

- プレート内において、無処置の平均吸光度が 0.25 未満、かつ被験物質の平均細胞生存率が 50% 以上の場合、該当するプレートを用いる試験は不成立とする。
- プレート内において、0.01% SDS 水溶液の吸光度が 0.25 未満、かつ被験物質の平均細胞生

存率が 50%以上の場合、該当するプレートを用いる試験は不成立とする。

- ・陽性対照である 0.1% SDS 水溶液の吸光度が 0.1 以上の場合、該当するプレートを用いる試験は不成立とする。
- ・上記以外を試験成立とする。試験不成立の場合は再試験を行う。

(7) MTT アッセイ

- ・被験物質暴露終了後、LDM 表面を培地で洗浄した後、LDM 表面に新たな培地を 3mL 分注して約 15 分間室温放置し、LDM 組織内の被験物質を除去する。
- ・培地を除き、MTT 溶液 (0.333mg/培地 1mL) を各ウェル 1.2mL 分注し、37°C で 3 時間インキュベートする。
- ・LDM の中央部を直径 8mm のバイオプシーパンチで切除する。
- ・切除した LDM を 0.04N 塩酸を含むイソプロパノール溶液 0.3mL に浸し、2 時間抽出する。
- ・抽出液 0.2mL を 96 ウェルマイクロプレートに移し、570nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定する。
- ・0.04N 塩酸を含むイソプロパノール溶液の吸光度をブランクとし、各ウェルにおける吸光度からブランクの吸光度を引いた値を算出する。被験物質のそれぞれのウェルにおける細胞生存率は、陰性対照の平均吸光度に対する被験物質適用ウェルにおける吸光度の割合 (百分率) で求める。さらに、1 プレート内の 2 ウェルの平均細胞生存率を求める。

(8) 結果の評価

- ・被験物質を適用した 2 ウェルの平均細胞生存率が 50%以上を陰性、50%未満を陽性と判定する。
- ・試験は 2 回、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。

6.3.3. 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
LDM の受け入れ検査	記載なし。	付属の LDM 品質試験報告書の検定項目のうち MTT 試験の検定項目が 0.30 以上であること、および陽性対照の試験として実施された Sodium dodecyl sulfate (SDS) の IC50 値が 0.01~0.02%であることを確認する。
LDM の下側のアッセイ培養液の量	1.5mL	1.2mL
予備試験	実施する。	実施しない*
濃度段階の設定	予備試験結果に基づき予想される IC50 付近について 5 濃度段階を設定する。	設定しない# 比較する <i>in vivo</i> と同一の濃度を適用する。
1 プレート内のレイアウト	被験物質群 3 ウェル、対照群 3 ウェルを設ける。	被験物質 2 ウェル、陰性対照 2 ウェル、陽性対照 1 ウェル、低濃度 SDS の陰性対照 1 ウェルを設ける。
陽性対照を用いた試験成立の条件	設定していない。	陽性対照として 0.1% SDS 水溶液を用いる。0.1% SDS 水溶液を標準的なプロトコールで試験した時の吸光度は 0.1 未満であり、これを試験成立の条件とする。
陰性対照を用いた	設定していない。	・陰性対照は無処置のウェルとする。被験物

試験成立の条件		質が希釈液の場合には、用いた溶媒を陰性対照として用いる。また、0.01(w/v)% SDS 水溶液を精度管理のための陰性対照として用いる。なお、0.01%SDS 水溶液のウェルは被験物質の細胞生存率の計算には用いない。 <ul style="list-style-type: none"> •プレート内において、無処置の平均吸光度が 0.25 未満、かつ被験物質の平均細胞生存率が 50%以上の場合、該当するプレートを用いる試験は不成立とする。 •プレート内において、0.01% SDS 水溶液の吸光度が 0.25 未満、かつ被験物質の平均細胞生存率が 50%以上の場合、該当するプレートを用いる試験は不成立とする。
0.333mg/mL MTT 培養液溶液の量	1.5mL	1.2mL
IC50 の算出	細胞生存率に基づき作成した用量相関曲線より生存率 50%となる濃度 IC50 を求める。	IC50 を算出しない。細胞生存率を求める。
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。 [§]	細胞生存率が 50%以上を陰性、50%未満を陽性とする。
試験の繰り返し	1 回	試験は 2 回、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。

*: 原体または希釈液における細胞生存率により評価を行い、IC50を求めないため、予備試験は必要としない。

#: IC50 を求めるために行う被験物質の希釈は実施しない。眼刺激性を評価する原体または希釈液について、希釈せずに試験を行う。

§: 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。

6.4.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、アルコールアミン 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、アルコールアミン 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 castor 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

MW: Molecular weight

6.5.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
2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate	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 (Table 8)。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14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2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
1	2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate	0.0	NI		N
2	Isopropyl myristate	0.0	NI		N
3	Isotonic sodium chloride solution	0.0	NI		N
4	Silicic anhydride	2.7	NI		N
5	Polyethylene glycol 400	4.0	NI		N
6	Glycerin	4.7	NI		N
7	Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.)	4.7	NI		N
8	Triethanolamine	8.0	NI		N
9	Methyl p-hydroxybenzoate	8.7	NI		N
10	Sucrose fatty acid ester	28.3	1or2A		P
11	Benzyl alcohol	31.0	1or2A		P
12	Ethanol	32.7	1or2A		P
13	Acid red 92	71.0	1or2A		P
14	Calcium thioglycolate	79.7	1		P
15	m-Phenylenediamine	80.7	1or2A		P
16	Sodium salicylate	83.7	1or2A		P
17	Distearyldimethylammonium chloride	96.3	1		P
18	Lactic acid	102.7	1	1 (100)#	P
19	Sodium dodecyl sulfate*	15.0 \leq	1or2A	NI (3)#	P
20	Diisopropanolamine*	23.0 \leq	1, 2Aor2B		P
21	Monoethanolamine*	23.3 \leq	1or2A		P
22	Glycolic acid*	25.0 \leq	1or2A		P
23	Sodium hydrogenated tallow L-glutamate*	26.7 \leq	1or2A		P
24	Chlorhexidine gluconate (20% solution)*	28.3 \leq	1or2A		P
25	Butanol*	34.0 \leq	1or2A	1 (10)#	P
26	Potassium laurate*	38.0 \leq	1or2A	1 (10)#	P
27	Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)*	41.3 \leq	1or2A	1 (100)#	P
28	Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate*	57.0 \leq	1or2A	1 (10)#	P
29	Acetic acid*	68.0 \leq	1or2A	1 (10)#	P
30	Cetyltrimethylammonium bromide*	76.7 \leq	1or2A	1 (10)#	P
31	Benzalkonium chloride*	78.0 \leq	1or2A	1 (5)#	P
32	Stearyltrimethylammonium chloride*	91.3 \leq	1		P
33	Cetylpyridinium chloride*	94.7 \leq	1		P
34	Domiphen bromide*	96.3 \leq	1or2A	1 (10)#	P

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

: Tested concentration is shown in parenthesis.

P: Positive, N: Negative.

6.6. MATREX™ 試験のバリデーション結果

厚生科学研究では、予備試験結果から推定した IC50 付近の 5 濃度段階を設定して試験を実施し IC50 を求めたが、提案する方法は原体を適用した時の細胞生存率を求め、それが 50%以上であるか否かで陽性か陰性かを判定する。IC50 が得られていると、濃度 100%における細胞生存率が 50%以上か否かが得られることから、厚生科学研究時の IC50 を用いて原体適用時における判定を行い、その結果を施設内変動、施設間変動の解析へ用いた。

なお、MATREX™ 試験で陰性と判定した物質は全て、実際に原体での適用が行われ細胞生存率が 50%以上を示したデータである。一方、陽性と判定した物質については、必ずしも原体での適用が実施されたデータではない。原体における判定は、被験物質と LDM が十分に接触した場合のデータに基づくべきと考えられることから、希釈液で陽性が得られた場合には原体の判定は陽性とした。

6.6.1. 施設内変動

厚生科学研究において 7 施設で試験が行われた被験物質の結果(大内ら, 1994)を用いて、MATREX™ 試験の施設内の再現性を確認した。原体を適用した際の細胞生存率が得られるケースは予備試験と本試験の 2 回認められるため、その2回で再現性を検討した。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試験結果であり、上段に予備試験時の結果に基づく判定を、下段に本試験時の結果に基づく判定を示す。試験結果は、細胞生存率が 50%以上を陰性(N)、50%未満を陽性(P)とした。原体または希釈液で 50%未満の細胞生存率が得られた場合、原体における結果は陽性とした。

7 施設の再現性を確認したところ、Lab.E と Lab.F の Polyethylene glycol 400 の結果が異なった。Lab.E では、第 1 回目の原体適用における細胞生存率は 50%未満で陽性となったが、第 2 回目は 50%以上で陰性に評価された。Lab.F では、第 1 回目は陰性であったが、第 2 回目では陽性であった。これら 2 例および判定ができなかった 3 例*を除き、第 1 回目と第 2 回目で評価が異なることはなかった。したがって、施設内の再現性は良好と考えられた。

(※希釈液のデータで細胞生存率が 50%以上であっても、原体での細胞生存率が 50%以上か否かは不明であるため、判定できなかった)

Table 9 Results of repeatability on the LDM-MTT assay

Substance	<i>In vivo</i> classification	<i>In vitro</i> results						
		Lab.A	Lab.B	Lab.C	Lab.D	Lab.E	Lab.F	Lab.G
2-Ethylhexyl p-dimethylamino Benzoate	N	N	N	N	N	N	N	N
Isopropyl Myristate	N	N	N	N	N	N	N	N
Silicic anhydride	N	N	N	N	NC	NC	N	N
Polyethylene glycol 400	N	N	N	P	P	P	N	P
Glycerin	N	N	N	N	N	N	N	N
Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.)	N	P	P	P	P	P	P	P
Methyl p-hydroxybenzoate	N	P	P	P	P	P	P	P
Sucrose fatty acid ester	P	P	P	P	NC	P	P	P
Benzyl alcohol	P	P	P	P	P	P	P	P
Acid red 92	P	P	P	P	P	P	P	P
Calcium thioglycolate	P	P	P	P	P	P	P	P
m-Phenylenediamine [§]	P	P	P	P	P	P	P	P
Sodium salicylate	P	P	P	P	P	P	P	P
Distearyldimethylammonium chloride	P	P	P	P	P	P	P	P
Cetylpyridinium chloride*	P	P	P	P	P	P	P	P

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

#: The repeated data were taken from range finding test (upper column) and main test (lower column) in the Japanese validation study. The *in vitro* results were classified on the basis of their IC50 data.

§: m-Phenylenediamine was excluded from analysis due to instability.

P:Positive, N:Negative, NC:Could not be classified.

6.6.2.施設間変動

厚生科学研究でバリデーションが行われた 39 物質について MATREX™ 試験に基づくインビボ予測結果の施設間再現性を確認した。MATREX™ 試験結果は、生存率が 50%以上を陰性(N)、50%未満を陽性(P)とした。また、希釈液で 50%未満の値が得られた場合、原体における結果は陽性とした。なお、表中にはそれぞれの被験物質のインビボの分類を加えた。39 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は34物質(No.1～No.34)、判明していない物質は5物質(No.35～No.39)である。これらは、MATREX™ 試験の施設間再現性の確認には関わりが無いが参考情報として示した。

施設間で評価が異なる物質は、Polyethylene glycol 400 であり、3 施設が陰性、4 施設が陽性と評価した。これ以外の物質では施設間で評価が異なる物質は認められず、施設間の再現性は良好と考えられた。

Table 10 Results of interlaboratory reproducibility on the LDM-MTT assay

	Substance	<i>In vivo</i> classification	<i>In vitro</i> results						
			Lab. A	Lab. B	Lab. C	Lab. D	Lab. E	Lab. F	Lab. G
1	2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate	N	N	N	N	N	N	N	N
2	Isopropyl myristate	N	N	N	N	N	N	N	N
3	Isotonic sodium chloride solution	N	N	N	N				
4	Silicic anhydride	N	N	N	N	N	N	N	N
5	Polyethylene glycol 400	N	N	N	P	P	N	P	P
6	Glycerin	N	N	N	N	N	N	N	N
7	Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.)	N	P	P	P	P	P	P	P
8	Triethanolamine	N	P	P	P	P			
9	Methyl p-hydroxybenzoate	N	P	P	P	P	P	P	P
10	Sucrose fatty acid ester	P	P	P	P	P	P	P	P
11	Benzyl alcohol	P	P	P	P	P	P	P	P
12	Ethanol	P	P	P	P	P			
13	Acid red 92	P	P	P	P	P	P	P	P
14	Calcium thioglycolate	P	P	P	P	P	P	P	P
15	m-Phenylenediamine [#]	P	P	P	P	P	P	P	P
16	Sodium salicylate	P	P	P	P	P	P	P	P
17	Distearyldimethylammonium chloride	P	P	P	P	P	P	P	P
18	Lactic acid	P	P	P	P	P			
19	Sodium dodecyl sulfate*	P	P	P	P				
20	Diisopropanolamine*	P	P	P	P	P			
21	Monoethanolamine*	P	P	P	P	P			
22	Glycolic acid*	P	P	P	P	P			
23	Sodium hydrogenated tallow L-glutamate*	P	P	P	P				
24	Chlorhexidine gluconate (20% solution)*	P	P	P	P	P			
25	Butanol*	P	P	P	P	P			
26	Potassium laurate*	P	P	P	P	P			
27	Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)*	P	P	P	P				
28	Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate*	P	P	P	P	P			
29	Acetic acid*	P	P	P	P	P			
30	Cetyltrimethylammonium bromide*	P	P	P	P	P			
31	Benzalkonium chloride*	P	P	P	P				
32	Stearyltrimethylammonium chloride*	P	P	P	P	P			
33	Cetylpyridinium chloride*	P	P	P	P	P	P	P	P
34	Domiphen bromide*	P	P	P	P	P			
35	Polyoxyethylene hydrogenated castor oil (60 E.O.)	Could not be classified	P	P	P				
36	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (20 E.O.)	Could not be classified	P	P	P				
37	Polyethyleneglycol monolaurate (10 E.O.)	Could not be classified	P	P	P				
38	Sodium N-lauryl sarcosinate (30% solution)	Could not be classified	P	P	P				
39	Polyoxyethylene hydrogenated castor oil (60 E.O.)	Could not be classified	P	P	P				

*: 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.

P:Positive, N:Negative

Blank column: NT(Not tested)

7. MATREX™ 試験の追加研究 [研究 2]

7.1. 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研究が実施され、その中の MATREX™ 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 MATREX™ 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 50 品について MATREX™ 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、MATREX™ 試験が GHS の NI を同定する能力について検討した。

7.2. 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。

7.3. プロトコール

7.3.1. 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 15 参照。

7.3.2. 提案するプロトコール

提案するプロトコールは 6.3.2. を参照。

7.3.3. 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
LDM の受け入れ検査	記載なし*	付属の LDM 品質試験報告書の検定項目のうち MTT 試験の検定項目が 0.30 以上であること、および Positive Control Test として実施された Sodium dodecyl sulfate (SDS) の IC50 値が 0.01~0.02%であることを確認する。
マイクロプレートシーリングフィルムの貼付と食品用ラップフィルムの使用	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フィルムを貼付する。さらに、他のプレートへ影響を与える可能性を考慮し、プレートを食品用ラップフィルムで包む。	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フィルムを貼付することができる。また、他のプレートへ影響を与える可能性を考慮する場合、食品用ラップフィルムで包むことができる。
試験の繰り返し	被験物質 No.28~No.77 については、細胞生存率が 40~60%を示した場合を除き 1 回の評価結果に基づいて評価する。1 回目の平均細胞生存率が 40~60%	試験を 2 回、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。

	<p>を示した場合には、2 回目の試験を行い、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。#</p>	
--	---	--

*:試験後に MTT 試験の検定項目が 0.30 以上であったこと、および Positive Control Test として実施された Sodium dodecyl sulfate (SDS) の IC50 値が 0.01~0.02 であったことを確認した。

#:2008 年日本動物実験代替法学会第 21 回大会で同じ被験物質を用いたデータを報告したため、2 回の繰り返しを実施しなかった。

7.4.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* の報告がある化粧品原料 50 物質 (No.28~77) を用いた。これら 77 物質の内訳は、エステル 15 物質、界面活性剤 13 物質、アルコール 10 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、オイル 3 物質、ベンゾフェノン 2 原料、無機塩 2 物質、エーテル 2 物質、有機金属 2 物質、ニトリル 1 物質、酸 1 物質、アルデヒド 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、トリアセテート 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 31 物質、液体 44 物質、水溶液 2 物質であった。

Table 12 The 77 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	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-Pentandiol	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 oil	8001-23-8	Oils	Liquid	-
57	Sesame 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

69	Acetyl tributyl citrate	77-90-7	Esters	Liquid	402.5
70	Cetyl palmitate	540-10-3	Esters	Solid	480.9
71	Decyl oleate	3687-46-5	Esters	Liquid	422.7
72	Ethylhexyl stearate	22047-49-0	Esters	Liquid	396.7
73	Glyceryl stearate	11099-07-3	Esters	Solid	358.6
74	PEG-2 stearate	106-11-6	Surfactants	Solid	89.1
75	Castor seed oil	8001-79-4	Oils	Liquid	-
76	Stearyl alcohol	112-92-5	Alcohols	Solid	270.5
77	Zinc stearate	557-05-1	Organic metals	Solid	632.3

MW: Molecular weight

7.5. 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 50 物質 (No.28~77) 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	<i>In vivo</i>
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	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-Pentandiol	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

*: Tested concentration is shown in parenthesis.

P: Positive, N: Negative.

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	<i>In vivo</i> classification
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 ^S	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	Chloroxyleneol		2B, 2A or 1			P
39	Diethylhexyl adipate		NI		NI [#] , NI ^S	N
40	Diisopropyl adipate		NI			N
41	Diocetyl 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 ^S	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 ^S	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 ^S	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 oil		NI			N
57	Sesame 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 ^S	N
67	Triethylene glycol		NI		NI [#]	N
68	Triisopropanolamine		2B, 2A or 1			P
69	Acetyl tributyl citrate		NI			N
70	Cetyl palmitate		NI			N
71	Decyl oleate		NI			N
72	Ethylhexyl stearate		NI		NI [#]	N
73	Glyceryl stearate		NI			N
74	PEG-2 stearate		NI			N
75	Castor seed oil		NI			N
76	Stearyl alcohol		NI		NI [#] , NI ^S	N
77	Zinc stearate		NI		NI [#]	N

*: 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).

P: Positive, N: Negative.

7.6. 77 種の被験物質の MATREX™ 試験

77 物質の MATREX™ 試験結果について Table 14 に示す。No.9 の Maneb の 3 回の試験結果は、陽性、陰性、陽性であり、最終的に陽性と評価された。2 回目の陰性は被験物質適用後の洗浄後に LDM へ付着したまま残った被験物質の影響が考えられた。No.61 の Sorbitan oleate の 3 回の試験結果は陽性、陰性、陰性であり、最終的に陰性と評価された。これら 3 回の細胞生存率は 46.6%、63.3%、71.8%であり、陽性と陰性の境界である 50%付近の値であることにより一致しないケースであると考えられた。

2-(n-Dodecylthio)ethanol および iso-Octylthioglycolate については、陰性の結果が認められているものの、チオエーテル基、チオール基をもち、MTT を還元する物質であることから MTT アッセイによる評価はできないとした。関連データは Appendix 9 から 11 に示した。この 2 物質は、MATREX™ 試験による NI の予測についての検討から除外することとした。

No.28~No.77 の 50 物質については、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 LDM-MTT 試験データ(JSAAE データ;萩野ら, 2008)との比較を行った(Appendix 12)。49 物質の評価が一致したが、Phytantriol のみ評価が一致しなかった。今回の Phytantriol の細胞生存率の結果は、58.1%、55.2%であり、陽性と陰性の境界である 50%付近の値であった。

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

Table14 Results of the 77 substances

No.	Substance	Results of the first measurement		Results of the second measurement		<i>In vitro</i> results	<i>In vivo</i> classification	Evaluation
		Viability (%)	Positive (P) or Negative (N)	Viability (%)	Positive (P) or Negative (N)			
1	Ethyl-2-methyl acetoacetate	6.6	P	3.2	P	P	P	True positive
2	Ammonium nitrate	4.3	P	1.9	P	P	P	True positive
3	Butyl Dipropasol Solvent	13.1	P	2.1	P	P	P	True positive
4	3-Chloropropionitrile	7.2	P	2.1	P	P	P	True positive
5	Cyclopentanol	13.1	P	1.2	P	P	P	True positive
6	3,3-Dithiodipropionic acid	2.8	P	2.0	P	P	P	True positive
7	Hexyl cinnamic aldehyde (12.5%)	44.0	P	35.2	P	P	P	True positive
8	N-Lauroylsarcosine sodium salt	3.5	P	4.0	P	P	P	True positive
9	Maneb	17.1	P	5.7	P	P	P	True positive
10	2-Methyl-1-pentanol	6.2	P	1.6	P	P	P	True positive
11	Propasol Solvent P	18.2	P	2.1	P	P	P	True positive
12	6-Methyl purine	26.8	P	3.8	P	P	P	True positive
13	2,6-Dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropanoate	6.6	P	6.9	P	P	P	True positive
14	Triton X-100	3.8	P	1.2	P	P	P	True positive
15	iso-Octyl acrylate	4.1	P	0.4	P	P	N	False positive
16	Tetra-Aminopyrimidine sulfate	5.4	P	3.7	P	P	N	False positive
17	2,4-Difluoronitrobenzene	10.7	P	1.0	P	P	N	False positive
18	n,n-Dimethylguanidine sulfate	9.4	P	11.3	P	P	N	False positive
19	2-(n-Dodecylthio)ethanol	81.2	N	118.9	N	NE*	N	Could not be evaluated
20	iso-Propyl bromide	3.8	P	6.0	P	P	N	False positive
21	Di-iso-butyl ketone	2.6	P	3.2	P	P	N	False positive
22	iso-Octylthioglycolate	171.3	N	141.3	N	NE*	N	Could not be evaluated
23	2,4-Pentanediol	3.1	P	2.6	P	P	N	False positive
24	2,2-Dimethyl-3-pentanol	1.2	P	2.6	P	P	N	False positive
25	Potassium tetrafluoroborate	2.2	P	4.6	P	P	N	False positive
26	3-Methoxy-1,2-propanediol	10.1	P	13.0	P	P	N	False

27	Toluene	4.7	P	1.3	P	P	N	positive False positive
----	---------	-----	---	-----	---	---	---	-------------------------------

continued

No.	Substance	Results of the first measurement		Results of the second measurement		In vitro results	In vivo classification	Evaluation
		Viability (%)	Positive (P) or Negative (N)	Viability (%)	Positive (P) or Negative (N)			
28	2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol	9.9	P			P	P	True positive
29	Benzalkonium chloride	5.0	P			P	P	True positive
30	Benzophenone-1	1.6	P			P	P	True positive
31	Benzophenone-2	4.0	P			P	P	True positive
32	Butoxyethanol	2.5	P			P	P	True positive
33	Butylene glycol	71.8	N			N	N	True negative
34	Cetrimonium chloride	5.0	P			P	P	True positive
35	Cetyl alcohol	21.2	P			P	N	False positive
36	Chlorhexidine digluconate (20% solution)	4.1	P			P	P	True positive
37	Chlorophene	13.2	P			P	P	True positive
38	Chloroxylenol	3.3	P			P	P	True positive
39	Diethylhexyl adipate	107.1	N			N	N	True negative
40	Diisopropyl adipate	2.9	P			P	N	False positive
41	Diocetyl sodium sulfosuccinate	3.8	P			P	P	True positive
42	Ethylhexyl palmitate	77.2	N			N	N	True negative
43	Hexylene glycol	2.2	P			P	P	True positive
44	Isocetyl stearate	100.9	N			N	N	True negative
45	Isopropyl Myristate	98.4	N			N	N	True negative
46	Isopropyl Palmitate	102.8	N			N	N	True negative
47	Lauramide DEA	2.2	P			P	P	True positive
48	Methoxyisopropyl acetate	1.3	P			P	P	True positive
49	Oleyl alcohol	89.0	N			N	N	True negative
50	PEG-40 stearate	1.9	P			P	N	False positive
51	Phenethyl alcohol	3.5	P			P	P	True positive
52	Phenoxyethanol	1.8	P			P	P	True positive
53	Phytantriol	58.1	N	55.2	N	N	P	False negative
54	Propylene carbonate	4.8	P			P	P	True positive
55	Resorcinol	10.0	P			P	P	True positive
56	Safflower oil	104.9	N			N	N	True negative
57	Sesame oil	101.3	N			N	N	True negative
58	Sodium dehydroacetate	1.7	P			P	N	False positive
59	Sodium naphthalenesulfonate	0.0	P			P	P	True positive
60	Sodium stearate	2.4	P			P	N	False positive
61	Sorbitan oleate	63.3	N	71.8	N	N	N	True negative
62	Sorbitan sesquioleate	58.9	N	85.8	N	N	N	True negative
63	Squalane	69.2	N			N	N	True negative
64	Stearylalcohol chloride	4.7	P			P	P	True positive
65	TEA-Lauryl sulfate (40% solution)	1.4	P			P	P	True positive
66	Triacetin	6.8	P			P	N	False positive
67	Triethylene glycol	77.0	N			N	N	True negative
68	Triisopropanolamine	2.0	P			P	P	True positive
69	Acetyl tributyl citrate	127.3	N			N	N	True negative
70	Cetyl palmitate	47.2	P	47.5	P	P	N	False positive
71	Decyl oleate	106.4	N			N	N	True negative
72	Ethylhexyl stearate	91.0	N			N	N	True negative
73	Glyceryl stearate	101.3	N			N	N	True negative
74	PEG-2 stearate	85.3	N			N	N	True negative
75	Castor seed oil	99.9	N			N	N	True negative
76	Stearyl alcohol	82.0	N			N	N	True negative
77	Zinc stearate	106.3	N			N	N	True negative

*: 2-(n-Dodecylthio)ethanol and iso-Octylthioglycolate were excluded from analysis due to the interference of the MTT assay.

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

Blank column: NT(Not tested)

8. MATREX™ 試験による NI の予測

MATREX™ 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 34 物質のデータに追加試験で実施した 77 物質のデータを加えて検討した。厚生科学研究のデータは、バリデーション時には IC50 で判定されたが、「研究 1」において判定方法を変更し、原体適用後の細胞生存率に基づく判定を行った。「研究 2」では「研究 1」と同様に原体適用後の細胞生存率に基づく判定を行った。そのため、両者を合わせた検討が可能であった。NI を陰性(N)、それ以外を陽性(P)として示した。厚生科学研究のデータにおいて m-Phenylenediamine は安定性の観点から解析から除外した。また、追加試験のうち、2-(n-Dodecylthio)ethanol および iso-Octylthioglycolate は、MTT アッセイを妨害する物質のため解析から除外した。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 物質は両試験に共通であった。そのため、実質的には合計 104 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、さらにインビボにおける陽性、陰性を MATREX™ 試験は正しく予測した(Appendix 13)。

104 物質中 81 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、ポリオールである Phytantriol 1 物質であった。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、Phytantriol)、インビボで陰性を示す 6 物質 (Glycerin、Polyethylene glycol 400、2,4-Pentanediol、3-Methoxy-1,2-propanediol、Butylene glycol、Triethylene glycol) について検討され、9 物質中 5 物質でインビトロとインビボが対応したが、Polyethylene glycol 400、2,4-Pentanediol、3-Methoxy-1,2-propanediol が偽陽性、Phytantriol が偽陰性を示した。

偽陽性は、Polyethylene glycol 400、Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.)、Triethanolamine、Methyl p-hydroxybenzoate、iso-Octyl acrylate、tetra-Aminopyrimidine sulfate、2,4-Difluoronitrobenzene、n,n-Dimethylguanidine sulfate、2-(n-Dodecylthio)ethanol、iso-Propyl bromide、Di-iso-butyl ketone、2,4-Pentanediol、2,2-Dimethyl-3-pentanol、Potassium tetrafluoroborate、3-Methoxy-1,2-propanediol、Toluene、Cetyl alcohol、Diisopropyl adipate、PEG-40 stearate、Sodium dehydroacetate、Sodium stearate、Triacetin、Cetyl palmitate 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 98%(56/57)、53%(25/47)、47%(22/47)、2%(1/57)、78%(81/104)であった(Table 16)。

偽陰性を示した Phytantriol は細胞生存率が 50%をやや上回り陰性となっているが、過去の JSAAE データでは陽性となっている。細胞生存率が 50%付近の物質では施設内、施設間で常に同一の判定となることが難しいことが予測され、これに対処する方法として「Equivocal」の設定が考えられた。細胞生存率 40%以上 60%未満を Equivocal とする分類を検討した結果、Table 17 に示すように 3 物質が Equivocal に分類され、偽陰性が認められなくなり、一致度の向上が認められた。感度、特異度、偽陽性度、偽陰性度、一致度は、それぞれ 100% (56/56)、54%(25/46)、46%(21/46)、0%(0/56)、79%(81/102)であった(Table 18)。

以上より、MATREX™ 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 15 The eye irritancy of test samples predicted by the LDM-MTT 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)	(56) Sucrose fatty acid ester Benzyl alcohol Ethanol 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)* Butanol* Potassium laurate* Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)* Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate* Acetic acid* Cetyltrimethylammonium bromide* Benzalkonium chloride* Stearyltrimethylammonium chloride* Cetylpyridinium chloride* Domiphen bromide* --- Ethyl-2-methyl acetoacetate Ammonium nitrate Butyl Dipropasol Solvent 3-Chloropropionitrile Cyclopentanol 3,3-Dithiodipropionic acid Hexyl cinnamic aldehyde(12.5%) N-Lauroylsarcosine sodium salt Maneb 2-Methyl-1-pentanol Propasol Solvent P 6-Methyl purine 2,6-Dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropanoate --- 2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol Benzophenone-1 Benzophenone-2 Butoxyethanol Cetrimonium chloride Chlorhexidine digluconate Chlorophene Chloroxylenol Hexylene glycol Lauramide DEA Methoxyisopropyl acetate Phenethyl alcohol Phenoxyethanol Propylene carbonate Resorcinol Sodium naphthalenesulfonate Stearalkonium chloride TEA-Lauryl sulfate 40% solution Triisopropanolamine	(1) Phytantriol
	Negative (NI)	(22) Polyethylene glycol 400 Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.) Triethanolamine Methyl p-hydroxybenzoate --- iso-Octyl acrylate tetra-Aminopyrimidine sulfate 2,4-Difluoronitrobenzene n,n-Dimethylguanidine sulfate iso-Propyl bromide Di-iso-butyl ketone 2,4-Pentandiol 2,2-Dimethyl-3-pentanol Potassium tetrafluoroborate 3-Methoxy-1,2-propanediol Toluene --- Cetyl alcohol Diisopropyl adipate PEG-40 stearate Sodium dehydroacetate Sodium stearate Triacetin Cetyl palmitate	(25) 2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate Isopropyl myristate Isotonic sodium chloride solution Silicic anhydride Glycerin --- Butylene glycol Diethylhexyl adipate Ethylhexyl palmitate Isocetyl stearate Isopropyl Palmitate Oleyl alcohol Safflower oil Sesame oil Sorbitan oleate Sorbitan sesquioleate Squalane Triethylene glycol Acetyl tributyl citrate Decyl oleate Ethylhexyl stearate Glyceryl stearate PEG-2 stearate Castor seed oil Stearyl alcohol Zinc stearate

*: The *in vivo* results of as is application was predicted from the data of 10% concentration. m-Phenylenediamine was excluded from the table due to instability. 2-(n-Dodecylthio)ethanol and iso-octylthioglycolate were excluded from the table due to the interference for MTT assay.

Table 16 Predictive capacity of the LDM-MTT assay

	N	Sensitivity	Specificity	False positive rate	False negative rate	Concordance
LDM-MTT assay vs Draize eye test	104	98% (56/57)	53% (25/47)	47% (23/47)	2% (1/57)	78% (81/104)

Table 17 The eye irritancy of test samples predicted by the LDM-MTT assay in the case of considering the equivocal classification

		<i>In vitro</i> (Classification by SIRC-CVS assay using triethanolamine as a reference substance for non-irritancy)		
		Positive	Equivocal	Negative
<i>In vivo</i> (Classification by GHS)	Positive (1, 2A or 2B)	(56) Sucrose fatty acid ester Benzyl alcohol Ethanol 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)* Butanol* Potassium laurate* Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)* Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate* Acetic acid* Cetyltrimethylammonium bromide* Benzalkonium chloride* Stearyltrimethylammonium chloride* Cetylpyridinium chloride* Domiphen bromide* --- Ethyl-2-methyl acetoacetate Ammonium nitrate Butyl Dipropasol Solvent 3-Chloropropionitrile Cyclopentanol 3,3-Dithiodipropionic acid Hexyl cinnamic aldehyde(12.5%) N-Laurylsarcosine sodium salt Nameb 2-Methyl-1-pentanol Propasol Solvent P 6-Methyl purine 2,6-Dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropanoate --- 2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol Benzophenone-1 Benzophenone-2 Butoxyethanol Cetrimonium chloride Chlorhexidine digluconate Chlorophene Chloroxylenol Hexylene glycol Lauramide DEA Methoxyisopropyl acetate Phenethyl alcohol Phenoxyethanol Propylene carbonate Resorcinol Sodium naphthalenesulfonate Stearylalkonium chloride TEA-Lauryl sulfate 40% solution Triisopropanolamine	(1) Phytantriol	(0)
	Negative (NI)	(21) Polyethylene glycol 400 Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.) Triethanolamine Methyl p-hydroxybenzoate --- iso-Octyl acrylate tetra-Aminopyrimidine sulfate 2,4-Difluoronitrobenzene n,n-Dimethylguanidine sulfate iso-Propyl bromide Di-iso-butyl ketone 2,4-Pentandiol 2,2-Dimethyl-3-pentanol Potassium tetrafluoroborate 3-Methoxy-1,2-propanediol Toluene --- Cetyl alcohol Diisopropyl adipate PEG-40 stearate Sodium dehydroacetate Sodium stearate Triacetin	(1) Cetyl palmitate	(25) 2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate Isopropyl myristate Isotonic sodium chloride solution Silicic anhydride Glycerin --- Butylene glycol Diethylhexyl adipate Ethylhexyl palmitate Isocetyl stearate Isopropyl Palmitate Oleyl alcohol Safflower oil Sesame oil Sorbitan oleate Sorbitan sesquioleate Squalane Triethylene glycol Acetyl tributyl citrate Decyl oleate Ethylhexyl stearate Glyceryl stearate PEG-2 stearate Castor seed oil Stearyl alcohol Zinc stearate

*: The *in vivo* results of as is application was predicted from the data of 10% concentration. m-Phenylenediamine was excluded from the table due to instability. 2-(n-Dodecylthio)ethanol and iso-octylthioglycolate were excluded from the table due to the interference for MTT assay.

Table 18 Predictive capacity of the LDM-MTT assay
in the case of considering the equivocal classification

	N	Sensitivity	Specificity	False positive rate	False negative rate	Concordance
LDM-MTT assay vs Draize eye test	102	100% (56/56)	54% (25/46)	46% (21/46)	0% (0/56)	80% (81/102)

9. まとめ

MATREX™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、MATREX™試験が GHS の NI を予測可能か否かについて検討した。評価にあたっては原体をそのままLDMへ適用し、細胞生存率50%以上を陰性、50%未満を陽性とした。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、感度が高く、偽陰性率が極めて低い方法であり、この方法で陰性であればNIであると予測できると思われた。

以上より、MATREX™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。

10. 参考文献

Bell, E., Ivarsson, B. and Merrill, C. (1979). Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A 76, 1274-1278.

Bell, E., Parenteau, N., Gay, R., Nolte, C., Kemp, P., Bilbo, P., Ekstein, B. & Johnson, E. (1991). The living skin equivalent: Its manufacture, its organotypic properties and its responses to irritants. Toxicology *in Vitro* 5, 591-596.

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).

Gay, R.J., Swiderek, M., Nelson, D. & Stephens, T.J. (1992). The living dermal equivalent as an *in vitro* model for predicting ocular irritation. Journal of Toxicology – Cutaneous & Ocular Toxicology 11, 47-68.

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.

Hagino, S., Okazaki, Y., Kitagaki, M. and Itagaki, H. (2010). Further verification of an *in vitro* tier system for the identification of cosmetic ingredients that are not ocular irritants. *Alternatives to Laboratory Animals* 38, 139-52.

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

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.

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

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.

Ohuchi, J., Kasai, Y., Sakamoto, K., Ohnuma, M., Kitamura, M., Kawasaki, Y., Kakishima, H., Suzuki, K., Kuwahara, H., Imanishi, Y., Tatsumi, H., Kotani, M., Inoue, K., Okumura, H., Arashima, M., Kurishita, A., Kinoshita, S., Tani, N., Kojima, H., Nakamura, T., Suzuki, K., Ishibashi, T., Hori, H., Takahashi, H., Nishikawa, T., Kitano, Y. & Ohno, Y. (1999). Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. 6: Evaluation of MATREX. *Toxicology in Vitro* 13, 153-162.

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

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

石橋卓也 (1996). 人工皮膚真皮モデル(MATREX) 組織培養 22(6), 234-237.

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.

大内淳子, 化粧品安全性評価のための試験開発に関する研究 MATREX™ 試験法最終報告書, 1996.

大内淳子ら, MATREX 試験生データ検討会議事録, 1994.

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 (2008). 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック2008. 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.

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.

※*in vivo* データの参考文献については、Appendix 14 に示した。

11. 英語の略名

略名	英語名称	日本語名称
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
OD	Optical density	吸光度
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	
QA	Quality Assurance	品質保証

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記載され、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2008(化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック検討会, 2008)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 2008 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)。

表 2 Draize 試験のスコアリング

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
瓣壁形成亢進、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眼、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
眼瞼の部分的な外反を伴う腫脹	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: $(A+B+C) \times 2$ (最大値: 20)	

(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

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

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。

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 厚生科学研究で取り上げられた眼刺激性試験代替法間の相関

厚生科学研究で取り上げられた眼刺激性試験代替法間の相関が Ohno ら(1999)により報告されている。細胞種、エンドポイントを変えても差は認められず、SIRC、HeLa、CHL 細胞間の相関係数は 0.96 以上であった。これらの細胞は、ウサギ角膜由来、ヒト子宮頸部癌由来、チャイニーズハムスター肺由来であり、角膜由来で無くとも角膜細胞に近似した細胞毒性を示す場合があることが示された。また、MATREX™ 試験と角膜由来の SIRC 細胞毒性試験との相関係数は 0.81 であり、高い相関が認められた。

Table 1 Correlation of the results between alternatives methods in the Japanese validation study

	HET- CAM	CAM- TB	RBC	SKIN ² ™	MATREX™	CornePack [#]	SIRC- CVS	SIRC- NRU	HeLa- MTT	CHL- CVS	EYTEX™
HET-CAM	1.000										
CAM-TB	0.679	1.000									
RBC	-0.653	-0.743	1.000								
SKIN ² ™	-0.479	-0.811	0.953	1.000							
MATREX™	-0.628	-0.733	0.936	0.931	1.000						
CornePack [#]	-0.480	-0.690	0.892	0.846	0.913	1.000					
SIRC-CVS	-0.582	-0.820	0.809	0.838	0.813	0.773	1.000				
SIRC-NRU	0.589	0.823	0.814	0.821	0.814	0.768	0.997	1.000			
HeLa-MTT	-0.580	-0.831	0.838	0.872	0.840	0.812	0.985	0.985	1.000		
CHL-CVS	-0.545	-0.765	0.811	0.841	0.820	0.798	0.972	0.968	0.969	1.000	
EYTEX™	0.751	0.313	-0.542	-0.188	-0.389	-0.202	-0.397	-0.391	-0.370	-0.331	1.000

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

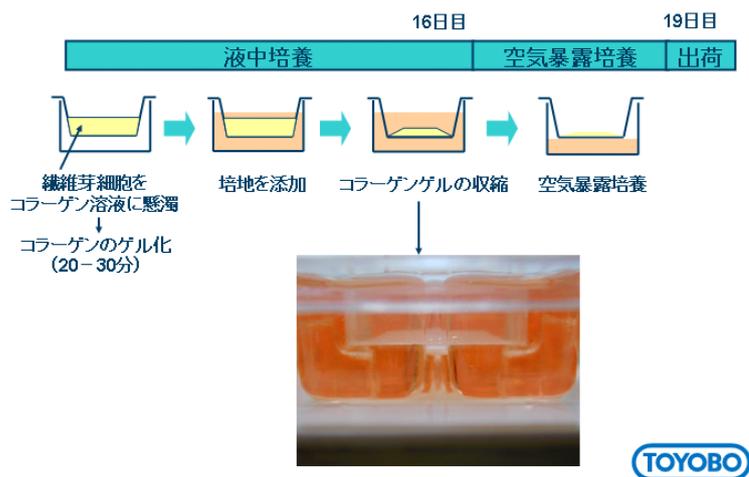
#: Non irritants for which IC50 values are not determined are given maximum values.

Appendix 3 MATREX™の作製方法

MATREX™の材料はヒト皮膚線維芽細胞、コラーゲン、製造用培地である。ヒト皮膚線維芽細胞はヒト新生児(白人)の包皮由来、コラーゲンはウシ胎児の臍由来、培地はウシ新生児血清約2%および抗生物質としてゲンタマイシンを含むDMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)である。

MATREXの作製方法は、ヒト皮膚線維芽細胞をコラーゲン溶液に懸濁させ、20~30分でコラーゲンのゲル化を起こさせる。製造用培地を添加し、液中培養を行い、コラーゲンゲルを収縮させる。16日目から空気暴露培養を行い、19日目以降に出荷する(Fig. 1)。

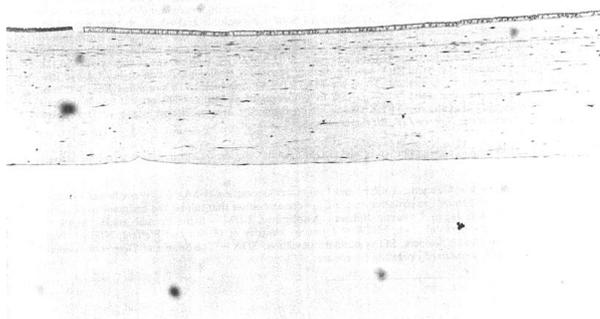
Fig. 1 MATREX™の作製方法



Appendix 4 Ohuchi らにより報告された MATREX™ の組織像

厚生科学研究のバリデーション時に撮影された LDM の切片を Fig. 1 に示す (Ohuchi ら, 1999)。コラーゲンと線維芽細胞により真皮層に類似した構造が認められた。

Fig.1. Histological section of LDM



The picture is the same as reported by Ohuchi et al (1999).

Appendix 5 MATREX™ の品質データ

東洋紡績株式会社における出荷前の品質検査の結果を Table 1-1～1-5 に示す。形状、無処置 LDM の吸光度(OD)および陽性対照である Sodium dodecyl sulfate (SLS)の IC50 がロット毎に調べられた。出荷基準は、形状を肉眼観察しメサ径が 10mm～20mm であること、および外縁に捲くれないこと、無処置 LDM の OD 値は 0.30 以上、陽性対照 SDS の IC50 は 0.10～0.20%である。形状は 216 ロットの全てが合格であった。無処置 LDM の OD は平均 0.385、標準偏差 0.065 で、陽性対照 SLS の IC50 は平均 0.016%、標準偏差 0.002%で全ロットが合格であった。なお、Fig. 1 および Fig. 2 には、216 ロットの無処置 LDM の OD 並びに SLS の IC50 を測定値毎の頻度で示した。

Table 1-1 The Quality data of MATREX™

No.	Date	Lot.No.	Shape	OD of untreated LDM	IC50 of SDS (%)	Pre-shipment examination
1	9 28 '01	D1514	Acceptable	0.394	0.016	Acceptable
2	10 12 '01	D1527	Acceptable	0.369	0.018	Acceptable
3	10 22 '01	D1555	Acceptable	0.446	0.019	Acceptable
4	10 26 '01	D1532	Acceptable	0.359	0.016	Acceptable
5	11 10 '01	D1575	Acceptable	0.358	0.018	Acceptable
6	11 19 '01	D1601	Acceptable	0.379	0.016	Acceptable
7	12 17 '01	D1629	Acceptable	0.496	0.016	Acceptable
8	12 21 '01	D1656	Acceptable	0.325	0.019	Acceptable
9	1 11 '02	D1677	Acceptable	0.700	0.020	Acceptable
10	1 18 '02	D2104	Acceptable	0.455	0.018	Acceptable
11	2 1 '02	D2117	Acceptable	0.374	0.017	Acceptable
12	2 8 '02	D2129	Acceptable	0.507	0.013	Acceptable
13	2 15 '02	D2131	Acceptable	0.349	0.018	Acceptable
14	2 22 '02	D2157	Acceptable	0.366	0.016	Acceptable
15	3 1 '02	D2164	Acceptable	0.400	0.019	Acceptable
16	3 8 '02	D2171	Acceptable	0.394	0.017	Acceptable
17	3 15 '02	D2178	Acceptable	0.365	0.016	Acceptable
18	3 29 '02	D2214	Acceptable	0.373	0.016	Acceptable
19	4 5 '02	D2221	Acceptable	0.412	0.017	Acceptable
20	4 12 '02	D2228	Acceptable	0.304	0.017	Acceptable
21	4 19 '02	D2254	Acceptable	0.403	0.016	Acceptable
22	5 7 '02	D2268	Acceptable	0.302	0.017	Acceptable
23	5 10 '02	D2275	Acceptable	0.368	0.017	Acceptable
24	5 24 '02	D2309	Acceptable	0.380	0.018	Acceptable
25	5 31 '02	D2316	Acceptable	0.314	0.016	Acceptable
26	6 7 '02	D2323	Acceptable	0.337	0.016	Acceptable
27	6 14 '02	D2330	Acceptable	0.401	0.016	Acceptable
28	6 21 '02	D2357	Acceptable	0.378	0.018	Acceptable
29	6 28 '02	D2363	Acceptable	0.326	0.016	Acceptable
30	7 5 '02	D2370	Acceptable	0.358	0.016	Acceptable
31	7 12 '02	D2377	Acceptable	0.401	0.018	Acceptable
32	7 19 '02	D2404	Acceptable	0.340	0.018	Acceptable
33	7 26 '02	D2411	Acceptable	0.437	0.017	Acceptable
34	8 3 '02	D2418	Acceptable	0.400	0.018	Acceptable
35	8 23 '02	D2458	Acceptable	0.435	0.018	Acceptable
36	9 9 '02	D2472	Acceptable	0.490	0.016	Acceptable
37	9 16 '02	D2480	Acceptable	0.342	0.016	Acceptable
38	9 27 '02	D2512	Acceptable	0.382	0.012	Acceptable
39	10 7 '02	D2519	Acceptable	0.455	0.015	Acceptable
40	10 11 '02	D2527	Acceptable	0.458	0.018	Acceptable
41	10 18 '02	D2553	Acceptable	0.340	0.017	Acceptable
42	10 25 '02	D2560	Acceptable	0.422	0.018	Acceptable
43	11 1 '02	D2567	Acceptable	0.374	0.018	Acceptable
44	11 8 '02	D2574	Acceptable	0.307	0.017	Acceptable
45	11 15 '02	D2581	Acceptable	0.514	0.018	Acceptable
46	11 22 '02	D2607	Acceptable	0.295	0.018	Acceptable
47	11 29 '02	D2614	Acceptable	0.410	0.016	Acceptable
48	12 6 '02	D2621	Acceptable	0.383	0.018	Acceptable
49	12 13 '02	D2628	Acceptable	0.365	0.019	Acceptable

Table 1-2 The Quality data of MATREX™

No.	Date	Lot.No.	Shape	OD of untreated LDM	IC50 of SDS (%)	Pre-shipment examination
50	01 06 '03	D2669	Acceptable	0.457	0.016	Acceptable
51	01 10 '03	D2676	Acceptable	0.372	0.017	Acceptable
52	01 24 '03	D3109	Acceptable	0.369	0.016	Acceptable
53	02 03 '03	D3116	Acceptable	0.439	0.015	Acceptable
54	02 07 '03	D3123	Acceptable	0.498	0.018	Acceptable
55	02 14 '03	D3131	Acceptable	0.330	0.017	Acceptable
56	02 21 '03	D3156	Acceptable	0.413	0.020	Acceptable
57	02 28 '03	D3163	Acceptable	0.451	0.019	Acceptable
58	03 07 '03	D3170	Acceptable	0.388	0.018	Acceptable
59	03 14 '03	D3177	Acceptable	0.515	0.020	Acceptable
60	03 21 '03	D3206	Acceptable	0.383	0.018	Acceptable
61	03 31 '03	D3213	Acceptable	0.318	0.018	Acceptable
62	04 04 '03	D3220	Acceptable	0.342	0.019	Acceptable
63	04 11 '03	D3227	Acceptable	0.323	0.018	Acceptable
64	05 03 '03	D3267	Acceptable	0.340	0.016	Acceptable
65	05 09 '03	D3274	Acceptable	0.395	0.018	Acceptable
66	05 16 '03	D3280	Acceptable	0.331	0.017	Acceptable
67	05 23 '03	D3309	Acceptable	0.427	0.018	Acceptable
68	05 30 '03	D3315	Acceptable	0.389	0.019	Acceptable
69	06 06 '03	D3323	Acceptable	0.416	0.018	Acceptable
70	06 13 '03	D3330	Acceptable	0.480	0.018	Acceptable
71	06 20 '03	D3355	Acceptable	0.349	0.020	Acceptable
72	06 27 '03	D3362	Acceptable	0.382	0.018	Acceptable
73	07 04 '03	D3370	Acceptable	0.324	0.017	Acceptable
74	07 11 '03	D3376	Acceptable	0.309	0.018	Acceptable
75	07 18 '03	D3403	Acceptable	0.300	0.014	Acceptable
76	07 25 '03	D3411	Acceptable	0.305	0.013	Acceptable
77	08 01 '03	D3417	Acceptable	0.302	0.014	Acceptable
78	08 08 '03	D3425	Acceptable	0.349	0.017	Acceptable
79	08 15 '03	D3451	Acceptable	0.344	0.017	Acceptable
80	08 22 '03	D3457	Acceptable	0.331	0.015	Acceptable
81	09 05 '03	D3472	Acceptable	0.346	0.013	Acceptable
82	09 15 '03	D3478	Acceptable	0.372	0.019	Acceptable
83	09 22 '03	D3504	Acceptable	0.312	0.015	Acceptable
84	09 26 '03	D3511	Acceptable	0.301	0.013	Acceptable
85	10 3 '03	D3518	Acceptable	0.355	0.013	Acceptable
86	10 17 '03	D3553	Acceptable	0.319	0.013	Acceptable
87	10 24 '03	D3559	Acceptable	0.309	0.013	Acceptable
88	10 31 '03	D3566	Acceptable	0.306	0.016	Acceptable
89	11 7 '03	D3574	Acceptable	0.308	0.017	Acceptable
90	11 14 '03	D3581	Acceptable	0.301	0.018	Acceptable
91	11 24 '03	D3607	Acceptable	0.369	0.016	Acceptable
92	11 28 '03	D3613	Acceptable	0.440	0.014	Acceptable
93	12 5 '03	D3621	Acceptable	0.380	0.017	Acceptable
94	12 12 '03	D3627	Acceptable	0.311	0.014	Acceptable

Table 1-3 The Quality data of MATREX™

No.	Date	Lot.No.	Shape	OD of untreated LDM	IC50 of SDS (%)	Pre-shipment examination
95	1 5 '04	D3668	Acceptable	0.441	0.016	Acceptable
96	1 9 '04	D3675	Acceptable	0.304	0.013	Acceptable
97	1 26 '04	D4109	Acceptable	0.316	0.012	Acceptable
98	1 30 '04	D4116	Acceptable	0.300	0.014	Acceptable
99	2 6 '04	D4122	Acceptable	0.352	0.015	Acceptable
100	2 13 '04	D4129	Acceptable	0.312	0.012	Acceptable
101	2 20 '04	D4156	Acceptable	0.324	0.015	Acceptable
102	2 27 '04	D4162	Acceptable	0.355	0.012	Acceptable
103	3 5 '04	D4170	Acceptable	0.300	0.012	Acceptable
104	3 12 '04	D4177	Acceptable	0.315	0.014	Acceptable
105	3 19 '04	D4205	Acceptable	0.301	0.013	Acceptable
106	3 26 '04	D4211	Acceptable	0.304	0.016	Acceptable
107	4 2 '04	D4218	Acceptable	0.362	0.013	Acceptable
108	4 9 '04	D4226	Acceptable	0.371	0.018	Acceptable
109	4 16 '04	D4251	Acceptable	0.318	0.018	Acceptable
110	4 25 '04	D4258	Acceptable	0.398	0.016	Acceptable
111	5 10 '04	D4272	Acceptable	0.422	0.015	Acceptable
112	5 14 '04	D4280	Acceptable	0.424	0.019	Acceptable
113	5 31 '04	D4313	Acceptable	0.315	0.018	Acceptable
114	6 4 '04	D4320	Acceptable	0.327	0.014	Acceptable
115	6 11 '04	D4327	Acceptable	0.309	0.014	Acceptable
116	6 18 '04	D4353	Acceptable	0.348	0.012	Acceptable
117	6 25 '04	D4361	Acceptable	0.348	0.019	Acceptable
118	7 2 '04	D4367	Acceptable	0.321	0.019	Acceptable
119	7 9 '04	D4374	Acceptable	0.367	0.019	Acceptable
120	7 16 '04	D4401	Acceptable	0.311	0.016	Acceptable
121	7 23 '04	D4409	Acceptable	0.382	0.019	Acceptable
122	8 1 '04	D4416	Acceptable	0.359	0.019	Acceptable
123	8 6 '04	D4422	Acceptable	0.384	0.018	Acceptable
124	8 11 '04	D4430	Acceptable	0.305	0.019	Acceptable
125	8 20 '04	D4455	Acceptable	0.373	0.019	Acceptable
126	9 2 '04	D4469	Acceptable	0.314	0.019	Acceptable
127	9 10 '04	D4476	Acceptable	0.378	0.019	Acceptable
128	9 17 '04	D4507	Acceptable	0.318	0.019	Acceptable
129	9 24 '04	D4510	Acceptable	0.348	0.018	Acceptable
130	8 4 '06	645400	Acceptable	0.345	0.018	Acceptable
131	8 18 '06	646100	Acceptable	0.392	0.017	Acceptable
132	8 25 '06	646400	Acceptable	0.459	0.018	Acceptable
133	9 8 '06	647300	Acceptable	0.389	0.018	Acceptable
134	10 6 '06	655800	Acceptable	0.308	0.016	Acceptable
135	10 27 '06	658600	Acceptable	0.457	0.018	Acceptable
136	11 2 '06	659500	Acceptable	0.348	0.014	Acceptable
137	11 10 '06	655500	Acceptable	0.308	0.017	Acceptable
138	11 24 '06	661900	Acceptable	0.306	0.018	Acceptable
139	12 1 '06	663100	Acceptable	0.423	0.016	Acceptable
140	12 8 '06	663900	Acceptable	0.374	0.015	Acceptable
141	12 15 '06	665200	Acceptable	0.353	0.018	Acceptable

Table 1-4 The Quality data of MATREX™

No.	Date	Lot.No.	Shape	OD of untreated LDM	IC50 of SDS (%)	Pre-shipment examination
142	1 12 '07	667200	Acceptable	0.301	0.018	Acceptable
143	1 26 '07	711400	Acceptable	0.354	0.014	Acceptable
144	2 2 '07	712500	Acceptable	0.331	0.015	Acceptable
145	2 9 '07	713700	Acceptable	0.312	0.017	Acceptable
146	2 23 '07	716100	Acceptable	0.460	0.017	Acceptable
147	3 2 '07	716700	Acceptable	0.478	0.017	Acceptable
148	3 9 '07	717600	Acceptable	0.613	0.013	Acceptable
149	3 23 '07	721000	Acceptable	0.454	0.015	Acceptable
150	3 30 '07	722000	Acceptable	0.524	0.018	Acceptable
151	4 6 '07	722600	Acceptable	0.395	0.018	Acceptable
152	4 13 '07	723300	Acceptable	0.352	0.015	Acceptable
153	4 20 '07	725400	Acceptable	0.331	0.017	Acceptable
154	5 11 '07	726900	Acceptable	0.307	0.016	Acceptable
155	5 25 '07	730400	Acceptable	0.320	0.015	Acceptable
156	6 1 '07	731500	Acceptable	0.461	0.016	Acceptable
157	6 8 '07	732200	Acceptable	0.430	0.018	Acceptable
158	6 15 '07	735400	Acceptable	0.368	0.018	Acceptable
159	6 22 '07	736100	Acceptable	0.399	0.016	Acceptable
160	6 29 '07	736600	Acceptable	0.357	0.014	Acceptable
161	7 6 '07	737600	Acceptable	0.439	0.014	Acceptable
162	7 20 '07	740500	Acceptable	0.434	0.014	Acceptable
163	7 27 '07	741400	Acceptable	0.443	0.017	Acceptable
164	8 3 '07	742000	Acceptable	0.380	0.014	Acceptable
165	8 24 '07	745700	Acceptable	0.461	0.017	Acceptable
166	9 14 '07	746800	Acceptable	0.402	0.016	Acceptable
167	9 28 '07	751400	Acceptable	0.423	0.015	Acceptable
168	10 5 '07	752300	Acceptable	0.451	0.017	Acceptable
169	10 12 '07	752900	Acceptable	0.461	0.015	Acceptable
170	10 19 '07	755700	Acceptable	0.398	0.016	Acceptable
171	10 26 '07	756300	Acceptable	0.344	0.016	Acceptable
172	11 9 '07	757300	Acceptable	0.316	0.014	Acceptable
173	11 16 '07	760400	Acceptable	0.338	0.014	Acceptable
174	11 23 '07	761200	Acceptable	0.342	0.014	Acceptable
175	11 30 '07	761900	Acceptable	0.333	0.017	Acceptable
176	12 7 '07	762900	Acceptable	0.398	0.015	Acceptable
177	12 14 '07	763800	Acceptable	0.325	0.013	Acceptable

Table 1-5 The Quality data of MATREX™

No.	Date	Lot.No.	Shape	OD of untreated LDM	IC50 of SDS (%)	Pre-shipment examination
178	1 7 '08	765900		0.337	0.016	Acceptable
179	1 11 '08	766000		0.409	0.015	Acceptable
180	2 1 '08	811000		0.428	0.015	Acceptable
181	2 8 '08	811900		0.530	0.019	Acceptable
182	2 15 '08	812500		0.432	0.019	Acceptable
183	2 22 '08	815800		0.420	0.018	Acceptable
184	2 29 '08	816600		0.407	0.018	Acceptable
185	3 7 '08	817400		0.481	0.017	Acceptable
186	3 14 '08	817900		0.413	0.014	Acceptable
187	3 21 '08	821000		0.421	0.019	Acceptable
188	4 4 '08	822200		0.456	0.018	Acceptable
189	4 11 '08	823000		0.442	0.017	Acceptable
190	4 18 '08	825800		0.417	0.020	Acceptable
191	5 9 '08	826500		0.424	0.017	Acceptable
192	5 30 '08	830500		0.422	0.015	Acceptable
193	6 6 '08	831300		0.387	0.018	Acceptable
194	6 13 '08	832200		0.361	0.019	Acceptable
195	6 20 '08	835500		0.320	0.016	Acceptable
196	6 27 '08	836400		0.534	0.015	Acceptable
197	7 18 '08	840500		0.476	0.012	Acceptable
198	7 25 '08	841200		0.314	0.018	Acceptable
199	8 1 '08	841900		0.478	0.015	Acceptable
200	8 8 '08	842700		0.435	0.014	Acceptable
201	8 18 '08	845500		0.499	0.016	Acceptable
202	8 22 '08	845800		0.497	0.015	Acceptable
203	9 12 '08	846400		0.558	0.012	Acceptable
204	9 26 '08	850800		0.501	0.015	Acceptable
205	10 3 '08	851500		0.418	0.016	Acceptable
206	10 10 '08	852200		0.480	0.014	Acceptable
207	10 17 '08	855500		0.430	0.017	Acceptable
208	10 24 '08	856100		0.438	0.017	Acceptable
209	11 7 '08	857700		0.428	0.017	Acceptable
210	11 14 '08	858500		0.380	0.016	Acceptable
211	11 21 '08	860500		0.392	0.016	Acceptable
212	11 28 '08	861200		0.404	0.015	Acceptable
213	12 5 '08	862000		0.460	0.015	Acceptable
214	12 12 '08	862900		0.378	0.017	Acceptable
215	1 5 '09	865500		0.445	0.015	Acceptable
216	1 9 '09	865600		0.359	0.014	Acceptable

Fig. 1 The distribution of OD of untreated control in the LDM-MTT assay

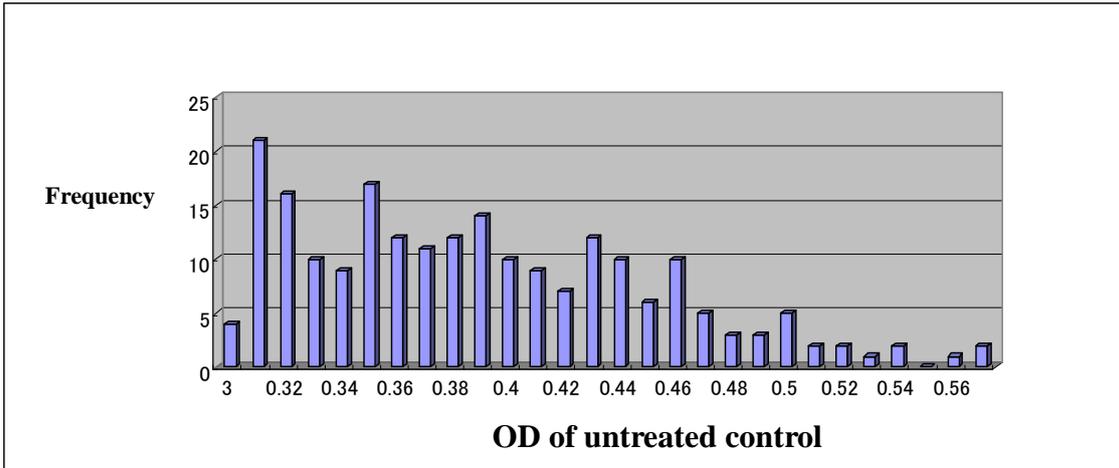
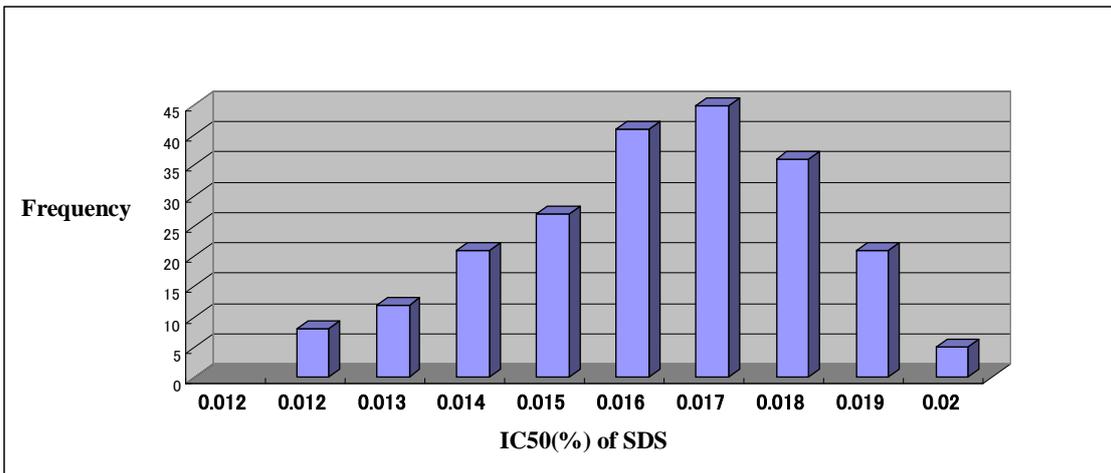


Fig. 2 The distribution of IC50 of positive control in the LDM-MTT assay



Appendix 6 マイクロプレートシーリングフィルムおよびラップフィルムの影響

MATREX™ 試験に対するマイクロプレートシーリングフィルムおよびラップフィルムの使用の影響について検討した。シーリングフィルムおよびラップフィルム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 24 時間培養した後に MTT アッセイを行った。細胞の生育状況を示す陰性対照物質 (DW または 0.01% SDS) の吸光度に差は無く、用いた試料を適用した後の細胞生存率も同程度の値を示した。したがって、シーリングフィルムおよびラップフィルムの使用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。

Table 1 The effect of microplate sealing tape and wrap film in the LDM-MTT assay

	Substances	OD	Viability (%)
Without microplate sealing tape and wrap film	Negative control (DW)	0.306	100
	20% triethanolamine	0.018	5.9
	10% triethanolamine	0.059	19.3
	5% triethanolamine	0.157	51.3
	0.1% SDS	0.005	1.6
	0.01% SDS	0.31	101.3
With microplate sealing tape and wrap film	Negative control (DW)	0.264	100
	20% triethanolamine	0.015	5.7
	10% triethanolamine	0.055	20.8
	5% triethanolamine	0.155	58.7
	0.1% SDS	0.012	4.5
	0.01% SDS	0.348	131.8

Appendix 7 無処置対照および SDS を用いる対照のデータ

資生堂において実施された MATREX™ 試験の無処置対照のデータおよび SDS (陽性対照) のデータを示す。試験の成立に関して、1 ロットのみ不合格があったものの、それ以外は合格であった。

(1)無処置対照のデータ

同一プレートにおいて被験物質が陰性を示した時の無処置の OD を以下に示す。

Table 1 The untreated control data in the LDM-MTT assay

OD	The date of the measurement
0.387	February 11, 2010
0.372	March 11, 2010
0.308	March 11, 2010
0.398	March 11, 2010
0.343	March 11, 2010
0.379	March 11, 2010
0.376	March 11, 2010
0.366	March 11, 2010
0.362	March 11, 2010
0.354	March 11, 2010
0.440	March 26, 2010
0.359	March 26, 2010
0.376	March 26, 2010
0.371	March 26, 2010
0.358	March 26, 2010
0.393	March 26, 2010
0.370	March 26, 2010
0.368	March 26, 2010
0.367	March 26, 2010
0.360	March 26, 2010
0.352	March 26, 2010
0.405	March 26, 2010
0.427	March 26, 2010
0.390	March 26, 2010
0.427	March 26, 2010
0.381	March 26, 2010
0.337	April 8, 2010
0.313	April 8, 2010
0.307	April 8, 2010
0.310	April 8, 2010
0.309	June 3, 2010
0.271	June 3, 2010
0.255	June 3, 2010
0.245	June 3, 2010
(Unacceptable)	
0.300	June 3, 2010
0.296	June 3, 2010
0.273	June 3, 2010
0.295	June 3, 2010
0.293	June 3, 2010
0.365	June 17, 2010

(2)SDS のデータ

同一プレートにおいて被験物質が陰性を示した時の 0.01%SDS、0.1%SDS の OD を以下に示す。

Table 2 The data of 0.01% and 0.1%SDS in the LDM-MTT assay

OD		The date of the measurement
0.01% SDS	0.1% SDS	
0.605	0.054	February 11, 2010
0.331	0.010	March 11, 2010
0.330	0.013	March 11, 2010
0.422	0.010	March 11, 2010
0.386	0.006	March 11, 2010
0.371	0.011	March 11, 2010
0.424	0.013	March 11, 2010
0.334	0.013	March 11, 2010
0.366	0.013	March 11, 2010
0.411	0.012	March 11, 2010
0.482	0.009	March 26, 2010
0.345	0.022	March 26, 2010
0.424	0.020	March 26, 2010
0.378	0.014	March 26, 2010
0.425	0.008	March 26, 2010
0.399	0.012	March 26, 2010
0.406	0.014	March 26, 2010
0.502	0.016	March 26, 2010
0.418	0.024	March 26, 2010
0.380	0.010	March 26, 2010
0.441	0.009	March 26, 2010
0.514	0.015	March 26, 2010
0.431	0.008	March 26, 2010
0.481	0.006	March 26, 2010
0.434	0.009	March 26, 2010
0.405	0.008	March 26, 2010
0.407	0.011	April 8, 2010
0.431	0.011	April 8, 2010
0.389	0.013	April 8, 2010
0.397	0.012	April 8, 2010
0.366	0.009	June 3, 2010

The SDS was obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Lot.TCG8194).

Appendix 8 厚生科学研究において 7 施設で試験が行われた被験物質の細胞毒性試験 (IC50 値) 結果

厚生科学研究において7施設で試験が行われた被験物質の結果を用いて、MATREX™試験の施設内の再現性を確認した。原体を適用した際の細胞生存率が得られるケースは予備試験と本試験の 2 回認められるため、その 2 回で再現性を検討した。この 2 回は日をあらためて試験した結果である。

Table 1 は、各被験物質および各施設での試験結果であり、上段に予備試験時のものを、下段に本試験時のものを示した。50%阻害濃度 (IC50) に基づいて原体適用における細胞生存率が 50%以上となる場合を陰性 (N)、50%未満となる場合を陽性 (P) とした。すなわち、原体だけでなく希釈液で 50%未満の値が得られた場合、原体における結果は陽性とした。

7 施設の再現性を確認したところ、Lab.E と Lab.F の Polyethylene glycol 400 の結果が異なった。

Lab.E では、第 1 回目の原体適用における細胞生存率は 50%未満で陽性となったが、第 2 回目は 50%以上で陰性に評価された。Lab.F では、第 1 回目は陰性であったが、第 2 回目では陽性であった。これら 2 例および判定ができなかった 3 例を除き、第 1 回目と第 2 回目で評価が異なることはなかった。したがって、施設内の再現性は良好と考えられた。

Table 1 Results of repeatability on the LDM-MTT assay

Substance	<i>In vivo</i> classification	IC50 (%) and <i>in vitro</i> classification [#]						
		Lab.A	Lab.B	Lab.C	Lab.D	Lab.E	Lab.F	Lab.G
2-Ethylhexyl p-dimethylamino Benzoate	N	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)
		>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)
Isopropyl Myristate	N	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)
		>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)
Silicic anhydride	N	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>50 (NC)	>50 (NC)	>100 (N)	>100 (N)
		>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)
Polyethylene glycol 400	N	>100 (N)	>100 (N)	Around 75 (P)	Around 75 (P)	Around 75 (P)	>100 (N)	75-100 (P)
		>100 (N)	>100 (N)	85 (P)	76 (P)	>100 (N)	67 (P)	82 (P)
Glycerin	N	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)
		>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)	>100 (N)
Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.)	N	1-5 (P)	Around 5 (P)	1-2.5 (P)	1-2.5 (P)	Around 2.5 (P)	7.5-10 (P)	2.5-5 (P)
		4.8 (P)	2.53 (P)	1.65 (P)	1.4 (P)	1.93 (P)	3.2 (P)	1.55 (P)
Methyl p-hydroxybenzoate	N	1-5 (P)	Around 1 (P)	1-2.5 (P)	1-2.5 (P)	1-2.5 (P)	1-2.5 (P)	Around 2 (P)
		1.6 (P)	1.66 (P)	1.6 (P)	1.4 (P)	1.36 (P)	1.75 (P)	2.2 (P)
Sucrose fatty acid ester	P	0.025-0.01 (P)	0.025-0.05 (P)	Around 0.025 (P)	>0.01 (NC)	0.01-0.02 (P)	0.01-0.025 (P)	0.01-0.025 (P)
		0.027 (P)	0.014 (P)	0.024 (P)	0.009 (P)	0.013 (P)	0.02 (P)	0.033 (P)
Benzyl alcohol	P	Around 7.5 (P)	Around 5 (P)	5-7.5 (P)	5-7.5 (P)	Around 7.5 (P)	7.5-10 (P)	Around 5 (P)
		7.4 (P)	7 (P)	8.6 (P)	6.2 (P)	8.2 (P)	7.15 (P)	6.4 (P)
Acid red 92	P	Around 0.0075 (P)	Around 0.0075 (P)	0.0075-0.01 (P)	<0.005 (P)	0.005-0.01 (P)	<0.001 (P)	0.0075-0.01 (P)
		0.0086 (P)	0.0062 (P)	0.0074 (P)	0.0038 (P)	0.0073 (P)	0.0008 (P)	0.018 (P)
Calcium Thioglycolate	P	1.25-2.5 (P)	Around 5 (P)	Around 10 (P)	Around 7.5 (P)	1-2.5 (P)	7.5-10 (P)	1-2 (P)
		1.4 (P)	6.4 (P)	6 (P)	7.7 (P)	2.15 (P)	7 (P)	1.5 (P)
m-Phenylenediamine ^κ	P	0.25-0.5 (P)	5-7.5 (P)	0.25-0.5 (P)	<1 (P)	0.25-0.5 (P)	1-10 (P)	0.25-0.5 (P)
		0.56 (P)	3.4 (P)	0.145 (P)	0.72 (P)	0.47 (P)	0.45 (P)	0.4 (P)
Sodium salicylate	P	Around 7.5 (P)	10-25 (P)	7.5-10 (P)	5-7.5 (P)	1-10 (P)	5-7.5 (P)	5-10 (P)
		9.2 (P)	9.8 (P)	8.5 (P)	6 (P)	5.47 (P)	11.5 (P)	11.5 (P)
Distearyldimethylammonium Chloride	P	0.1-0.5 (P)	5-7.5 (P)	0.1-0.25 (P)	<0.05 (P)	0.01-0.025 (P)	0.25-0.75 (P)	0.10 (P)
		0.11 (P)	0.072 (P)	0.295 (P)	0.092 (P)	0.0125 (P)	0.22 (P)	0.07 (P)
Cetylpyridinium chloride*	P	0.001-0.0075 (P)	0.001-0.0025 (P)	0.001-0.0025 (P)	Around 0.001 (P)	<0.001 (P)	0.001-0.0025 (P)	0.001-0.0025 (P)
		0.0027 (P)	0.00133 (P)	0.00265 (P)	0.0013 (P)	0.00124 (P)	0.00165 (P)	0.0026 (P)

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

#: The repeated data were taken from range finding test (upper column) and main test (lower column) in the Japanese validation study.

P:Positive, N:Negative, NC:Could not be classified.

Appendix 9 MTT アッセイを妨害する物質の評価

MTT アッセイは、被験物質の LDM への付着、染色や MTT に対する還元作用により、妨害を受ける。そのため、MTT アッセイを妨害する物質について検討した。妨害物質の検出にあたっては、LDM 中の細胞を死細胞とする操作に 1% Cetylpyridinium chloride (CPC) を用いた。CPC の設定理由は、細胞毒性が強いために LDM 中の細胞を死細胞とすることができ、なおかつ MTT やホルマザン色素と化学反応を起こさないことによる。

(1) 対象とする被験物質

MTT アッセイに対する妨害の確認は細胞毒性の評価で陰性を示した物質について実施した。陽性を示す物質は、妨害があったとしても「陽性」の評価に影響を与えない程度であると考えられるため、試験を必要としないと考えられる。

(2) 妨害物質の検出試験の方法

- LDM の準備および被験物質の適用は、MATREX™ 試験のプロトコールと同様に実施した。アッセイプレートのレイアウトは、①無処置で 37°C、24 時間インキュベートするウェル、②無処置で 37°C、24 時間インキュベートし、1% Cetylpyridinium chloride (CPC) で死細胞とするウェル、③被験物質を 37°C、24 時間適用し、1% CPC 水溶液で死細胞とするウェルを設けた。(Fig. 1)
- 培養に用いるアッセイプレートとは別に同様な 6 ウェルプレートを準備し、必要な数のウェルに 1% CPC 水溶液 1.2mL を添加した。
- アッセイプレートから該当するトランスウェルを取り出し、1% CPC 水溶液の入ったウェルに移した。3 分間浸けた後、トランスウェルの外側を蒸留水で洗浄した。(Fig. 2)
- MTT アッセイにおけるインキュベート、抽出、吸光度測定の手続きを MATREX™ 試験のプロトコールと同様に実施した。
- 0.04N 塩酸を含むイソプロパノール溶液のみの吸光度をブランクとし、各ウェルの吸光度からブランクの吸光度を引いた値を算出した。1% CPC 処理をしていない無処置の値を 100% として、それ以外のウェルそれぞれについて割合を計算し、細胞生存率を求めた。
- 被験物質を適用後、1% CPC で処理したウェルにおける吸光度が 0.1 未満の場合を MTT アッセイの妨害が認められないと判定した。吸光度が 0.1 以上の場合には MTT アッセイの妨害が認められるとし、以下にしたがって妨害の強さを計算した。
- MTT アッセイの妨害が認められた被験物質について、MATREX™ 試験のデータに基づき、妨害の強さを次の式で計算した。30% 以上の場合には MTT アッセイにより細胞毒性を評価できないと判定した。

$$\text{妨害の強さ (\%)} = (T - N) / N * 100$$

※記号は以下の通りとした。

T: The viability of LDM treated with the substance
(被験物質を適用した LDM の細胞生存率)

N: The viability of LDM of negative control
(陰性対照 LDM の細胞生存率)

- 妨害強さが 30% 未満の場合には、MATREX™ 試験で得られた「被験物質を適用した LDM の細胞生存率」並びに妨害物質の検出試験でえられた「被験物質を適用後、1% CPC で処理したウェルの細胞生存率」および「被験物質を適用せず、1% CPC で処理したウェルの細胞生存率」を用いて、修正細胞生存率を以下の式で計算した。

$$\text{修正細胞生存率 (\%)} = T - (CT - CN)$$

※記号は以下の通りとした。

T: The viability of LDM treated with the substance

(被験物質を適用した LDM の細胞生存率)

CT: The viability of LDM treated with 1%CPC following the substance application.

(被験物質を適用後、1%CPC で処理したウェルの細胞生存率)

CN: The viability of LDM treated with 1%CPC following no substance application.

(被験物質を適用せず、1%CPC で処理したウェルの細胞生存率)

• MTT アッセイを妨害する物質の検出試験における精度管理は以下の通りに行った。①と②の両方を満たす場合を試験成立とした。試験不成立の場合は再試験をした。

①被験物質を適用せず、1%CPC で処理したウェルにおける吸光度が 0.1 未満であることを試験成立の条件とした。

②プレート内において、無処置の吸光度が 0.25 以上であることを試験成立の条件とした。

• 結果の評価は以下の通りに行った。

• 被験物質を適用後、1%CPC で処理したウェルにおける吸光度が 0.1 未満の場合を MTT アッセイの妨害が認められないと判定した。この場合、MATREX 試験の評価は、陰性とした。

• MTT アッセイを妨害する物質の評価において、妨害の強さが 30%以上の場合、評価できないとした。

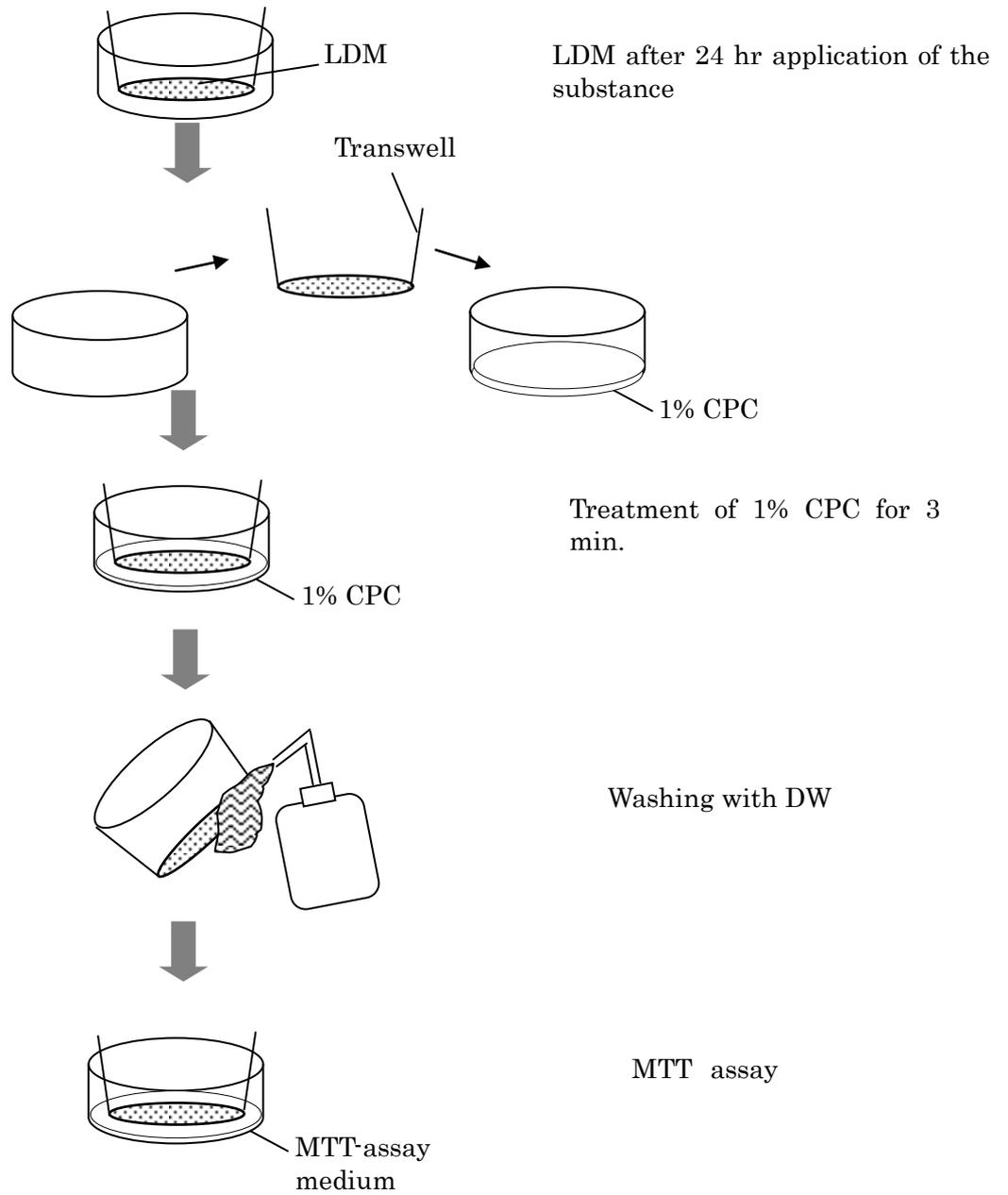
• MTT アッセイを妨害する物質の評価において、妨害が認められ、その強さが 30%未満の場合、修正細胞生存率が、50%以上を陰性、50%未満を陽性と判定し、これを最終的な評価とした。

Fig.1 Layout of 6 well microplate at the test for detecting substances that interfere with MTT endpoint

	1	2
A	Negative control (non-treated control or solvent)	Sample1 (the LDM killed by 1% CPC)
B	Negative control (non-treated control or solvent)	Sample2 (the LDM killed by 1% CPC)
C	Control (the LDM killed by 1% CPC)	Sample3 (the LDM killed by 1% CPC)

Well No.1 (Row A, Column 1), No.2 (Row B, Column 1), No.3 (Row C, Column 1), No.4 (Row A, Column 2), No.5 (Row B, Column 2), No.6 (Row C, Column 2)

Fig. 2 Killing of LDM by using 1% CPC



(3) 結果

追加試験で用いた 77 物質のうち、MATREX™ 試験で陰性の結果であった 24 物質について妨害物質の検出試験を実施した。その結果、22 物質で MTT アッセイへの妨害が認められないと判定された。2-(n-Dodecylthio)ethanol および iso-Octylthioglycolate の 2 物質は、妨害が認められた。2-(n-Dodecylthio)ethanol は、MTT を還元する物質であったが、MTT アッセイを妨害する強さが 0.1%であったため、細胞生存率を修正して評価を行った。その結果、修正細胞生存率は 44.6%であり、最終的に MATREX™ 試験は陽性と評価された。一方、iso-Octylthioglycolate は妨害の強さが 56.3%であり、細胞毒性を評価できる基準の 30%を大きく上回った。したがって、MTT アッセイによる評価ができない物質であると評価された。

Table 1 Results of the MATREX™ test included the interference data of the MTT assay

No.	Substance	Results of the first measurement		Results of the second measurement		MTT assay interference [Corrected viability (%)]	<i>In vitro</i> results	<i>In vivo</i> classification	Evaluation
		Viability (%)	Positive (P) or Negative (N)	Viability (%)	Positive (P) or Negative (N)				
19	2-(n-Dodecylthio)ethanol	81.2	N	118.9	N	P, Intensity =0.1 [44.6]	P	N	False positive
22	iso-Octylthioglycolate	171.3	N	141.3	N	P, Intensity =56.3 [NE]	NE	N	Not evaluated
33	Butylene glycol	71.8	N			N	N	N	True negative
39	Diethylhexyl adipate	107.1	N			N	N	N	True negative
42	Ethylhexyl palmitate	77.2	N			N	N	N	True negative
44	Isocetyl stearate	100.9	N			N	N	N	True negative
45	Isopropyl Myristate	98.4	N			N	N	N	True negative
46	Isopropyl Palmitate	102.8	N			N	N	N	True negative
49	Oleyl alcohol	89.0	N			N	N	N	True negative
53	Phytantriol	58.1	N	55.2	N	N	N	P	False negative
56	Safflower oil	104.9	N			N	N	N	True negative
57	Sesame oil	101.3	N			N	N	N	True negative
61	Sorbitan oleate	63.3	N	71.8	N	N	N	N	True negative
62	Sorbitan sesquioleate	58.9	N	85.8	N	N	N	N	True negative
63	Squalane	69.2	N			N	N	N	True negative
67	Triethylene glycol	77.0	N			N	N	N	True negative
69	Acetyl tributyl citrate	127.3	N			N	N	N	True negative
71	Decyl oleate	106.4	N			N	N	N	True negative
72	Ethylhexyl stearate	91.0	N			N	N	N	True negative
73	Glyceryl stearate	101.3	N			N	N	N	True negative
74	PEG-2 stearate	85.3	N			N	N	N	True negative
75	Castor seed oil	99.9	N			N	N	N	True negative
76	Stearyl alcohol	82.0	N			N	N	N	True negative
77	Zinc stearate	106.3	N			N	N	N	True negative

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

Blank column: NT(Not tested)

Appendix 10 厚生科学研究の5陰性物質がMTTアッセイを妨害しないことの確認

厚生科学研究のバリデーションにおいて陰性の結果が認められた5物質について、MTTアッセイに対する妨害の評価を実施した。妨害物質の検出方法は、前述のAppendix 9と同様の方法で実施した。その結果、5物質ともMTTアッセイの妨害は認められず、これらの5物質のMATREX™試験は陰性であることが確認された。

Table 1 Results of Interference of MTT assay by 5 substances evaluated as a negative in the Japanese validation study

	Substance	The previous results in the Japanese validation study								MTT assay interference	<i>In vitro</i> Results	<i>In vivo</i> Classification	Evaluation
		Lab. A	Lab. B	Lab. C	Lab. D	Lab. E	Lab. F	Lab. G	Final results				
1	2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	True negative
2	Isopropyl myristate	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	True negative
3	Isotonic sodium chloride solution	N	N	N	N				N	N	N	N	True negative
4	Silicic anhydride	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	True negative
5	Glycerin	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	True negative

P:Positive, N:Negative

Blank column: Not tested

Appendix 11 肉眼判定法による被験物質の MTT 還元性の確認

厚生科学研究で用いられた 34 物質および追加試験で用いられた 77 物質について MTT 還元性を肉眼観察法により検討した。

(1) 方法

被験物質を 80 μ L (または固体の場合 80mg) 取り、0.333mg/mL MTT-アッセイ培地溶液 1.2mL を添加し、37°C で 3 時間インキュベートした。MTT 無添加のアッセイ培地を用いて同様な操作を行ったものを対照として肉眼で色の変化を観察した。MTT-アッセイ培地溶液の色が明らかに青/紫に変化した場合を MTT 還元性陽性(+)と判定した。

(2) 厚生科学研究で用いられた 34 物質の還元性試験結果

厚生科学研究で用いられた 34 物質の MTT 還元性を Table 1 に示した。MTT 還元性陽性と判定された物質は、Calcium thioglycolate、m-Phenylenediamine、Diisopropanolamine Monoethanolamine の 4 物質であった。これら 4 物質はいずれも MATREX™ 試験で陽性を示しているため、MTT アッセイの妨害があったとしても影響は少なく、「陽性」の評価を変えるほどでは無かった。

Table 1 Results of the MTT reduction by 34 substances used in the Japanese validation study

	Substance	<i>In vivo</i> Classifica- -tion	MATREX™ test results	MTT reduction
1	2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate	N	N	-
2	Isopropyl myristate	N	N	±
3	Isotonic sodium chloride solution	N	N	-
4	Silicic anhydride	N	N	-
5	Polyethylene glycol 400	N	P	-
6	Glycerin	N	N	-
7	Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.)	N	P	-
8	Triethanolamine	N	P	±
9	Methyl p-hydroxybenzoate	N	P	-
10	Sucrose fatty acid ester	P	P	-
11	Benzyl alcohol	P	P	±
12	Ethanol	P	P	-
13	Acid red 92	P	P	Red
14	Calcium thioglycolate	P	P	+
15	m-Phenylenediamine	P	P	+
16	Sodium salicylate	P	P	-
17	Distearyldimethylammonium chloride	P	P	-
18	Lactic acid	P	P	-
19	Sodium dodecyl sulfate	P	P	-
20	Diisopropanolamine	P	P	+
21	Monoethanolamine	P	P	+
22	Glycolic acid	P	P	-
23	Sodium hydrogenated tallow L-glutamate	P	P	NT
24	Chlorhexidine gluconate (20% solution)	P	P	-
25	Butanol	P	P	-
26	Potassium laurate	P	P	±
27	Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)	P	P	-
28	Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate	P	P	-
29	Acetic acid	P	P	-
30	Cetyltrimethylammonium bromide	P	P	-
31	Benzalkonium chloride	P	P	-
32	Stearyltrimethylammonium chloride	P	P	-
33	Cetylpyridinium chloride	P	P	-
34	Domiphen bromide	P	P	-

+: The color of the MTT medium changed to blue/purple significantly, and the MTT reduction was evaluated as positive.

±: The color of the MTT medium or the substance changed slightly.

-: The color of the MTT medium did not change, and the MTT reduction was evaluated as negative.

NT: not tested

Red: The color of the MTT medium changed red, because acid red 92 was red dye.

(3) 追加試験で用いられた 77 物質の還元性試験結果

追加試験で用いられた 77 物質の MTT 還元性を table 2-1 および 2-2 に示した。MTT 還元性陽性と判定された物質は、Hexyl cinnamic aldehyde (12.5%)、Maneb、2-(n-Dodecylthio)ethanol、iso-Octylthioglycolate、Chlorophene、Chloroxlenol、Lauramide DEA、Phenethyl alcohol、Resorcinol の 9 物質であった。このうち Hexyl cinnamic aldehyde (12.5%)、Maneb、Chlorophene、Chloroxlenol、Lauramide DEA、Phenethyl alcohol、Resorcinol の 7 物質は、MATREX™ 試験で陽性を示しており、MTT アッセイの妨害があったとしても影響は少なく、「陽性」の評価を変えるほどでは無かった。2-(n-Dodecylthio)ethanol、iso-Octylthioglycolate は MATREX™ 試験で細胞生存率が 50%以上を示しているため、MTT アッセイが妨害されている可能性が考えられた。なお、この 2 物質が MTT アッセイを妨害することについては、Appendix 9 に示す妨害の検討からも確認された。この 2 物質は MATREX™ 試験による NI の予測の検討から除外された。

MATREX™ 試験陰性の物質のうち、Diethylhexyl adipate、Ethylhexyl palmitate、Isocetyl stearate、Isopropyl myristate、Isopropyl palmitate、Oleyl alcohol、Safflower oil、Sesame oil、Sorbitan oleate、Sorbitan sesquioleate、Decyl oleate、Ethylhexyl Stearate、Castor seed oil の 13 物質は変色が認められ、MTT アッセイに影響を与える可能性が考えられた。これらの物質については、次段階として LDM を用いて MTT アッセイを妨害する物質の検討を行う必要があると考えられた。その結果については、Appendix 9 に示しており、すべて MTT アッセイを妨害しないことが確認された。

Table 2-1 Results of the MTT reduction by the 77 substances

No.	Substance	<i>In vivo</i> classification	<i>In vitro</i> results	MTT reduction
1	Ethyl-2-methyl acetoacetate	P	P	±
2	Ammonium nitrate	P	P	-
3	Butyl Dipropasol Solvent	P	P	-
4	3-Chloropropionitrile	P	P	±
5	Cyclopentanol	P	P	-
6	3,3-Dithiodipropionic acid	P	P	-
7	Hexyl cinnamic aldehyde (12.5%)	P	P	+
8	N-Lauroylsarcosine sodium salt	P	P	-
9	Maneb	P	P	+
10	2-Methyl-1-pentanol	P	P	-
11	Propasol Solvent P	P	P	-
12	6-Methyl purine	P	P	-
13	2,6-Dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropanoate	P	P	-
14	Triton X-100	P	P	-
15	iso-Octyl acrylate	N	P	±
16	Tetra-Aminopyrimidine sulfate	N	P	-
17	2,4-Difluoronitrobenzene	N	P	±
18	n,n-Dimethylguanidine sulfate	N	P	-
19	2-(n-Dodecylthio)ethanol	N	NE*	+
20	iso-Propyl bromide	N	P	-
21	Di-iso-butyl ketone	N	P	±
22	iso-Octylthioglycolate	N	NE*	+
23	2,4-Pentanediol	N	P	-
24	2,2-Dimethyl-3-pentanol	N	P	±
25	Potassium tetrafluoroborate	N	P	-
26	3-Methoxy-1,2-propanediol	N	P	-
27	Toluene	N	P	±

+: The color of the MTT medium changed to blue/purple significantly, and the MTT reduction was evaluated as positive.

±: The color of the MTT medium or the substance changed slightly.

-: The color of the MTT medium did not change, and the MTT reduction was evaluated as negative.

*: 2-(n-Dodecylthio)ethanol and iso-Octylthioglycolate could not be evaluated due to the interference of the MTT assay. However, the uncorrected results of the MTT

assay were negative when the interference of the MTT was not considered.
P: Positive, N: Negative, NE: Could not be evaluated

Table 2-2 Results of the MTT reduction by the 77 substances

No.	Substance	<i>In vivo</i> Classifica- -tion	<i>In vitro</i> results	MTT reduction
28	2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol	P	P	-
29	Benzalkonium chloride	P	P	-
30	Benzophenone-1	P	P	±
31	Benzophenone-2	P	P	±
32	Butoxyethanol	P	P	-
33	Butylene glycol	N	N	-
34	Cetrimonium chloride	P	P	-
35	Cetyl alcohol	N	P	-
36	Chlorhexidine digluconate (20% solution)	P	P	-
37	Chlorophene	P	P	+
38	Chloroxylenol	P	P	+
39	Diethylhexyl adipate	N	N	±
40	Diisopropyl adipate	N	P	±
41	Diocetyl sodium sulfosuccinate	P	P	±
42	Ethylhexyl palmitate	N	N	±
43	Hexylene glycol	P	P	-
44	Isocetyl stearate	N	N	±
45	Isopropyl myristate	N	N	±
46	Isopropyl Palmitate	N	N	±
47	Lauramide DEA	P	P	+
48	Methoxyisopropyl acetate	P	P	-
49	Oleyl alcohol	N	N	±
50	PEG-40 stearate	N	P	-
51	Phenethyl alcohol	P	P	+
52	Phenoxyethanol	P	P	±
53	Phytantriol	P	N	-
54	Propylene carbonate	P	P	-
55	Resorcinol	P	P	+
56	Safflower oil	N	N	±
57	Sesame oil	N	N	±
58	Sodium dehydroacetate	N	P	-
59	Sodium naphthalenesulfonate	P	P	±
60	Sodium stearate	N	P	±
61	Sorbitan oleate	N	N	±
62	Sorbitan sesquioleate	N	N	±
63	Squalane	N	N	-
64	Stearalkonium chloride	P	P	-
65	TEA-Lauryl sulfate (40% solution)	P	P	-
66	Triacetin	N	P	-
67	Triethylene glycol	N	N	-
68	Triisopropanolamine	P	P	±
69	Acetyl tributyl citrate	N	N	-
70	Cetyl palmitate	N	P	-
71	Decyl oleate	N	N	±
72	Ethylhexyl stearate	N	N	±
73	Glyceryl stearate	N	N	-
74	PEG-2 stearate	N	N	-
75	Castor seed oil	N	N	±
76	Stearyl alcohol	N	N	-
77	Zinc stearate	N	N	-

+: The color of the MTT medium changed to blue/purple significantly, and the MTT reduction was evaluated as positive.

±: The color of the MTT medium or the substance changed slightly.

-: The color of the MTT medium did not change, and the MTT reduction was evaluated as negative.

P: Positive, N: Negative.

Appendix 12 追加で試験したデータと学会で報告されているデータの比較

追加研究において試験した 50 物質の結果について、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 LDM-MTT 試験データ(JSAAE データ)との比較を行った。両者の対応を確認した結果、50 物質のうち 49 物質の評価が一致した(Table 1)。一致しなかった 1 物質は、Phytantriol であった。Phytantriol は、50%付近の細胞生存率を示す物質であった(Table 1)。

Table 1 The comparison between the additional data and the previous data reported at the 21th annual meeting of the JSAAE

No	Substance	<i>In vivo</i> classification	Additional data	JSAAE data
28	2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol	P	P	P
29	Benzalkonium chloride	P	P	P
30	Benzophenone-1	P	P	P
31	Benzophenone-2	P	P	P
32	Butoxyethanol	P	P	P
33	Butylene glycol	N	N	N
34	Cetrimonium chloride	P	P	P
35	Cetyl alcohol	N	P	P
36	Chlorhexidine digluconate (20% Solution)	P	P	P
37	Chlorophene	P	P	P
38	Chloroxylenol	P	P	P
39	Diethylhexyl adipate	N	N	N
40	Diisopropyl adipate	N	P	P
41	Diocetyl sodium sulfosuccinate	P	P	P
42	Ethylhexyl palmitate	N	N	N
43	Hexylene glycol	P	P	P
44	Isocetyl stearate	N	N	N
45	Isopropyl Myristate	N	N	N
46	Isopropyl Palmitate	N	N	N
47	Lauramide DEA	P	P	P
48	Methoxyisopropyl acetate	P	P	P
49	Oleyl alcohol	N	N	N
50	PEG-40 stearate	N	P	P
51	Phenethyl alcohol	P	P	P
52	Phenoxyethanol	P	P	P
53	Phytantriol	P	N	P
54	Propylene carbonate	N	P	P
55	Resorcinol	P	P	P
56	Safflower oil	N	N	N
57	Sesame oil	N	N	N
58	Sodium dehydroacetate	N	P	P
59	Sodium naphthalenesulfonate	P	P	P
60	Sodium stearate	N	P	P
61	Sorbitan oleate	N	N	N
62	Sorbitan sesquioleate	N	N	N
63	Squalane	N	N	N
64	Stearalkonium chloride	P	P	P
65	TEA-Lauryl sulfate (40% Solution)	P	P	P
66	Triacetin	N	P	P
67	Triethylene glycol	N	N	N
68	Triisopropanolamine	P	P	P
69	Acetyl tributyl citrate	N	N	N
70	Cetyl palmitate	N	P	P
71	Decyl oleate	N	N	N
72	Ethylhexyl stearate	N	N	N
73	Glyceryl stearate	N	N	N
74	PEG-2 stearate	N	N	N
75	Castor seed oil	N	N	N
76	Stearyl alcohol	N	N	N
77	Zinc stearate	N	N	N

P:Positive, N:Negative

Table 2 Results of phytantriol in the LDM-MTT assay

	Viability (%)	
	Additional data	JSAAE data
First measurement	58.1 (Negative)	28.2 (Positive)
Second measurement	55.2 (Negative)	42.7 (Positive)
Final result	Negative	Positive

Appendix 13 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。両者で試験された物質は Isopropyl myristate、Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.) (別名 Triton X-100)、Sodium dodecyl sulfate、Benzalkonium chloride および Di(2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate (別名 Dioctyl sodium sulfosuccinate) の 5 物質であった。Isopropyl myristate は同一メーカーでロットが異なり、残りの 4 物質はメーカーが異なっていた。GHS で NI が 1 物質、それ以外が 4 物質であった。それらの研究 1 および研究 2 における眼刺激性の予測結果を表 1 に示す。

比較の結果、いずれの被験物質においても評価上の相違は両者間に認められず、両者の結果を用いて同様の評価が可能と判断した。

Table 1 The comparison between the Japanese validation study data and the additional data

Substance	<i>In vivo</i> classification	The Japanese validation study data							The additional data
		Lab.A	Lab.B	Lab.C	Lab.D	Lab.E	Lab.F	Lab.G	Lab.H
Isopropyl myristate	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Sodium dodecyl sulfate*	P	P	P	P					P [#]
Triton X-100*	P	P	P	P					P
Di(2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate*	P	P	P	P	P				P
Benzalkonium chloride*	P	P	P	P					P

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

#: The results of the sodium dodecyl sulfate are predicted from the data of 0.1% solution as a positive control.

P: Positive, N: Negative

Blank column: Not tested

Appendix 14 *in vivo* データの参考文献Table 1 References of the *in vivo* data of the 50 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	Diocetyl 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 oil	JACT 4(5):171-97, 1985.
57	Sesame 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.
69	Acetyl tributyl citrate	IJT 21(S2):1-17, 2002
70	Cetyl palmitate	JACT 1(2):13-35, 1982.
71	Decyl oleate	JACT 1(2):85-95, 1982.
72	Ethylhexyl stearate	JACT 4(5):107-46, 1985
73	Glyceryl stearate	JACT 1(4):169-192, 1982
74	PEG-2 stearate	JACT 2(7):17-60, 1983.
75	Castor seed oil	JACT 7(6):721-739, 1988
76	Stearyl alcohol	JACT 4(5):1-29, 1985.
77	Zinc stearate	JACT 1(2):143-77, 1982.

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

Appendix 15 MATREX™ 試験による 77 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

2010 年 2 月 9 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、77 種の化学物質を用い、MATREX™ 試験が眼刺激性試験代替法として GHS 基準の無刺激性物質(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

MATREX™(東洋紡績株式会社製)は、コラーゲングル中にヒト由来の線維芽細胞を包埋培養したものであり、三次元構造を有する。被験物質適用 24 時間後に MTT アッセイが行われ、細胞毒性を検出する。培地中で培養する細胞毒性試験と異なる点は、被験物質をゲルの上面へ適用するため、適用可能な被験物質の範囲は水溶性物質に限らず、非水溶性物質、粉末も適用できる事である。また、未希釈の場合を含め、インビボと同じ濃度での適用が可能であるという点も挙げられる。これらは、インビボに比較的近似した適用状況を再現できることを意味している。

3.材料

3.1. MATREX™

MATREX™ キットを東洋紡績株式会社から購入する。受け入れ時にキット中の組織トレイの培地の pH が受け入れ可能な範囲内の 6.8~7.7 にあることを付属の培地 pH チャートを用いて確認する。範囲外である時、その組織トレイの中の Living dermal model (LDM)は使用不可とする。また、東洋紡績株式会社で出荷前検査として実施された無処置の LDM における細胞生存率の試験と陽性対照を用いた試験の成績を確認する。すなわち、付属の LDM 品質試験報告書の検定項目において、LDM 中の細胞の生存を示す MTT 試験の検定項目が 0.3 以上であること、および陽性対照の試験として実施された Sodium dodecyl sulfate (SDS) の IC50 値が 0.01~0.02%であることを確認する。キット中の LDM は、20~37℃(好ましくは約 30℃)のインキュベーターで保管する。記載されている使用期限内に使用する。

キットには組織トレイの他に、アッセイトレイ、アッセイリング、アッセイ培地、アッセイリング、シリコーン接着剤が含まれるので、その有無を確認する。

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式会社製 MCO-17AIC)

インキュベーター(三菱電機エンジニアリング株式会社製 CN-25A)

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 ラボラトリーズ株式会社製 Benchmark Plus™)

3.3.材料(器具)

バイオプシーパンチ(直径 8mm)(東洋紡績株式会社製 RS-6330)

ピンセット

小試験管

96 穴マイクロプレート

マイクロピペット

マイクロピペット用チップ(200 μ L、1000 μ L、5mL)

微量分注器(GILSON 製 MICROMAN™)

微量分注器用キャピラリーとピストン(GILSON 製 CP250)

マイクロプレートシーリングフィルム(スリーエムヘルスケア株式会社製 9793R)

3.4.材料(試薬)

Sodium dodecyl sulfate (SDS)

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

Ethylene glycol

Liquid paraffin

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

Isopropanol

Hydrochloric acid (HCl)

3.5.MTT アッセイのための溶液の調製

3.5.1. 0.333mg/mL MTT-培地溶液

MTT をキットに付属されているアッセイ培地で溶解し、0.333mg/mL 溶液を調製する。

3.5.2.0.04N HCl-Isopropanol 溶液

12N HCl を Isopropanol と混和し、0.04N 溶液を調製する。

3.6.被験物質

表 1 に示す物質を被験物質として用いる。なお、被験物質が希釈液の場合、溶媒を用いて所定の濃度に溶解または均一に懸濁させる。被験物質を溶解または懸濁させる際には、試験管ミキサーを用いる。さらに、加温機、超音波処理機を用いることもできる。溶媒には Distilled water、50%(v/v)DMSO、Ethylene glycol または Liquid paraffin を用いる。

3.7.対照物質

3.7.1.陽性対照

陽性対照として、0.1(w/v)% SDS 水溶液を用いる。

3.7.2.陰性対照

陰性対照は無処置のウェルとする。被験物質が希釈液の場合には、用いた溶媒を陰性対照として用いる。また、0.01(w/v)% SDS 水溶液を精度管理のための陰性対照として用いる。0.01%SDS 水溶液のウェルは被験物質の細胞生存率の計算には用いない。

4.方法

4.1.LDM の準備

- ・組織トレイ中のトランスウェルを 6 ウェルのアッセイトレイに移し、LDM 上に 5mL のアッセイ培地を加え、室温で約 30 分間放置後、アッセイ培地を除去する。
- ・アッセイリングをピンセットでつまみ、片面にシリコン接着剤を塗り、LDM の上に装着する。
- ・1.2mL のアッセイ培地を LDM の下側のアッセイトレイのウェルへ加える。

4.2.被験物質の適用

- ・アッセイトレイのレイアウトは Fig. 1 に示すように設定する。
- ・80 μ L の被験物質を LDM の表面に適用する。固体の場合は必要に応じて乳鉢等により細かくした後、80mg を取り、適用する。暴露は 37°C、24 時間行う。
- ・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し、ウェルを覆うマイクロプレートシーリングフィルムを貼付する。さらに、アッセイトレイをラップフィルムで包む。
- ・被験物質暴露終了後、アッセイ培地を吸引除去し、さらに LDM 表面をアッセイ培地で洗浄する。次に、LDM 表面に新たな培地を 3mL 分注して約 15 分間室温放置した後、アッセイ培地を除去する。

4.3.MTT アッセイ

- 0.333mg/mL MTT-培地溶液を各ウェル 1.2mL 分注し、37°Cで 3 時間インキュベートする。
- LDM の中央部を直径 8mm のバイオプシーパンチで切除する。
- 切除した LDM を 0.04N HCl-Isopropanol 溶液 0.3mL を用いて、2 時間抽出する。
- 抽出液 0.2mL を 96 ウェルマイクロプレートに移し、570nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定する。
- 0.04N HCl-Isopropanol 溶液(0.2mL)の吸光度をブランクとし、各ウェルにおける吸光度からブランクの吸光度を引いた値を算出する。被験物質のそれぞれのウェルにおける細胞生存率は、陰性対照の平均吸光度に対する被験物質適用ウェルにおける吸光度の割合(百分率)で求める。さらに、1 プレート内の 2 ウェルの平均細胞生存率を求める。なお、表計算ソフト(Excel)において、平均細胞生存率を算出する段階で小数点以下 2 桁目を四捨五入する。

4.4.品質基準

試験の精度管理を以下の通りに行う。

- ①プレート内において、無処置の平均吸光度が 0.25 未満、かつ被験物質の平均細胞生存率が 50%以上の場合、該当するプレートを用いる試験は不成立とする。
- ②プレート内において、0.01% SDS 水溶液の吸光度が 0.25 未満、かつ被験物質の平均細胞生存率が 50%以上の場合、該当するプレートを用いる試験は不成立とする。
- ③陽性対照である 0.1% SDS 水溶液の吸光度が 0.1 以上の場合、該当するプレートを用いる試験は不成立とする。

上記に該当しない場合を試験成立とする。試験不成立の場合は再試験を行う。

4.5.結果の評価

- 被験物質を適用した 2 ウェルの平均細胞生存率が 50%以上を陰性、50%未満を陽性と判定する。
- 被験物質 No.1～No.27 については、試験を 2 回、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。
- 被験物質 No.28～No.77 については、細胞生存率が 40～60%を示した場合を除き 1 回の評価結果に基づいて評価する。1 回目の平均細胞生存率が 40～60%を示した場合には、2 回目の試験を行い、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。
(※被験物質 No.1～No.27 と被験物質 No.28～No.77 の間で、試験の繰り返し数が異なる理由は、後者が 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データがあり、比較、確認することが可能なためである。ただし、細胞生存率が 50%の周辺である 40～60%を示す場合には、前者と同様に繰り返しを行うこととする。)

参考文献

Hagino, S., Okazaki, Y., Kitagaki, M. and Itagaki, H. (2010). Further verification of an *in vitro* tier system for the identification of cosmetic ingredients that are not ocular irritants. *Alternatives to Laboratory Animals* 38, 139-52.

MATREX™取扱説明書 <http://www.bio.toyobo.co.jp/bio01/file/TMLDM-001.pdf>

OECD, OECD guideline for the testing of chemicals. Draft proposal for a new guideline. In vitro skin irritation: Reconstructed human epidermis (RhE) test method, 2009.

Ohuchi, J., Kasai, Y., Sakamoto, K., Ohnuma, M., Kitamura, M., Kawasaki, Y., Kakishima, H., Suzuki, K., Kuwahara, H., Imanishi, Y., Tatsumi, H., Kotani, M., Inoue, K., Okumura, H., Arashima, M., Kurishita, A., Kinoshita, S., Tani, N., Kojima, H., Nakamura, T., Suzuki, K., Ishibashi, T., Hori, H., Takahashi, H., Nishikawa, T., Kitano, Y. & Ohno, Y. (1999). Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. 6: Evaluation of MATREX. *Toxicology in Vitro* 13, 153-162.

大内ら, MATREX™による刺激性試験プロトコール、1995.

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.

以上

表1 被験物質

No.	CAS	被験物質	別名	メーカー	ロット
1	609-14-3	2-メチルアセト酢酸エチル		Sigma-Aldrich	00619PC
2	6484-52-2	硝酸アンモニウム		Sigma-Aldrich	09223AJ
3	29911-27-1	1-(1-メチル-2-プロポキシエトキシ)-2-プロパノール		Sigma-Aldrich	06127HJ
4	542-76-7	3-クロロプロピオニトリル		Sigma-Aldrich	17504LA
5	96-41-3	シクロペンタノール		Sigma-Aldrich	S23317-088
6	1119-62-6	3,3'-ジチオジプロピオン酸		Sigma-Aldrich	04619LB
7	101-86-0	α -ヘキシルシンナムアルデヒド		Sigma-Aldrich	13102MO
8	137-16-6	N-ラウロイルサルコシナトリウム		Sigma-Aldrich	058K0069
9	12427-38-2	マンネブ	N,N'-エチレンビス(ジチオカルバミド酸)マンガン(II)	Fluka	SZE9030X
10	105-30-6	2-メチル-1-ペンタノール		Sigma-Aldrich	02929JJ
11	1569-01-3	1-プロポキシ-2-プロパノール		Sigma-Aldrich	03616HJ
12	2004-03-7	6-メチル-1H-プリン		Sigma-Aldrich	049K1156
13	96568-04-6	3-[2,6-ジクロロ-5-フルオロ-(3-ピリジイル)]-3-オキソプロパノン酸エチル		Sigma-Aldrich	09620MU
14	9002-93-1	ポリエチレンオクチルフェニルエーテル(10 E.O.)		Sigma-Aldrich	118K0160
15	29590-42-9	アクリル酸イソオクチル		Sigma-Aldrich	10428CH
16	5392-28-9	2,4,5,6-テトラアミノピリミジン硫酸塩		Sigma-Aldrich	15022HH
17	446-35-5	2,4-ジフルオロニトロベンゼン		Sigma-Aldrich	MKAA4323
18	598-65-2	N,N-ジメチルグアニジン硫酸塩	1,1-ジメチルグアニジン硫酸塩	Sigma-Aldrich	S42370-327
19	1462-55-1	2-(ドデシルチオ)エタノール	ドデシル(2-ヒドロキシエチル)スルフィド	Sigma-Aldrich	出荷伝票番号 833977017
20	75-26-3	臭化イソプロピル	2-プロモプロパン	Sigma-Aldrich	08331AE
21	108-83-8	ジイソブチルケトン	2,6-ジメチル-4-ヘプタノン	Sigma-Aldrich	S26421-416
22	25103-09-7	チオグリコール酸イソオクチル	メルカプト酢酸イソオクチル	Sigma-Aldrich	出荷伝票番号 833977018
23	625-69-4	2,4-ペンタンジオール		Sigma-Aldrich	02714CJ
24	3970-62-5	2,2-ジメチル-3-ペンタノール		Sigma-Aldrich	06520KA
25	14075-53-7	テトラフルオロ硼酸カリウム		Sigma-Aldrich	08216PE
26	623-39-2	3-メトキシ-1,2-プロパンジオール		Sigma-Aldrich	10402CU
27	108-88-3	トルエン		Sigma-Aldrich	KWG6293
28	52-51-7	2-ブロモ-2-ニトロ-1,3-プロパンジオール		fluoro chem.	F3542A
29	8001-54-5	塩化ベンザルコニウム		TCI	GC01
30	131-56-6	ベンゾフェノン-1		Wako	ALM0931
31	131-55-5	ベンゾフェノン-2		Wako	TSF1031
32	111-76-2	ブトキシエタノール	2-ブトキシエタノール	Wako	ALP5483
33	107-88-0	ブチレングリコール	1,3-ブタンジオール	Wako	TSQ5034
34	112-02-7	塩化セチルトリメチルアンモニウム		Wako	WKF1369
35	36653-82-4	セチルアルコール		Wako	WKL2169
36	18472-51-0	クロルヘキシジンジグルコネート 20% 溶液		Wako	TSQ4561
37	120-32-1	クロロフェン		Wako	TCK0988
38	88-04-0	クロロキシレノール		Wako	TSN6941
39	103-23-1	アジピン酸ジエチルヘキシル	アジピン酸オクチル	Wako	PEN5136
40	6938-94-9	アジピン酸ジイソプロピル		Wako	WKJ4099
41	577-11-7	ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム		Alfa aesar	K30S031
42	29806-73-3	パルミチン酸エチルヘキシル	パルミチン酸オクチル	Wako	TSM0246
43	107-41-5	ヘキシレングリコール	2-メチル-2,4-ペンタンジオール	Wako	PEN6553
44	25339-09-7	ステアリン酸イソセチル	ステアリン酸イソヘキサデシル	Wako	TCK0946

45	110-27-0	ミスチン酸イソプロピル		TCI	AGN01
46	142-91-6	パルミチン酸イソプロピル		Wako	SDK5401
47	120-40-1	ラウラミドDEA		Wako	ALM0258
48	108-65-6	メキシイソプロピルアセテート	2-メキシ-1-メチルエチルアセテート	Wako	PEQ4882
49	143-28-2	オレイルアルコール		Wako	LTK3360
50	9004-99-3	ステアリン酸PEG-40		Wako	TSG0625
51	60-12-8	フェネチルアルコール	2-フェニルエタノール	Wako	PEP5880
52	122-99-6	フェノキシエタノール		Wako	WKE1655
53	74563-64-7	フィタントリオール		Wako	TCP0387
54	108-32-7	炭酸プロピレン	4-メチル-1,3-ジオキソラ-2-オン	Wako	TSF0417
55	108-46-3	レソルシノール		Wako	WKF1256
56	8001-23-8	サフラワー油		Wako	5765J
57	8008-74-0	ゴマ油		Wako	4363J
58	4418-26-2	デヒドロ酢酸ナトリウム		Wako	ALP5014
59	532-02-5	ナフタレンスルホン酸ナトリウム		Wako	LTF0381
60	822-16-2	ステアリン酸ナトリウム		Wako	ALN6945
61	1338-43-8	オレイン酸ソルビタン	モノオレイン酸ソルビタン	MP Biomedicals	7272H
62	8007-43-0	セスキオレイン酸ソルビタン		Wako	DPR1512
63	111-01-3	スクワラン		Wako	PEJ4649
64	122-19-0	ステアラルコニウムクロリド	ステアリルベンジルジメチルアンモニウムクロリド	Wako	ALN0903
65	139-96-8	ラウリル硫酸TEA 40%溶液		Wako	TSG0252
66	102-76-1	トリアセチン	三酢酸グリセロール	Wako	ALR3379
67	112-27-6	トリエチレングリコール	3,6-ジオキサ-1,8-オクタジオール	Wako	WKG5787
68	122-20-3	トリイソプロパノールアミン		Wako	PEN1131
69	77-90-7	アセチルクエン酸トリブチル	O-アセチルクエン酸トリブチル	Wako	TSK2949
70	540-10-3	パルミチン酸セチル	パルミチン酸ヘキサデシル	Wako	TSE0947
71	3687-46-5	オレイン酸デシル		Wako	TSH0248
72	22047-49-0	ステアリン酸エチルヘキシル	ステアリン酸オクチル	Wako	DPE0247
73	11099-07-3	ステアリン酸グリセリル		Wako	TSN0362
74	106-11-6	ステアリン酸PEG-2		Wako	DPP0621
75	8001-79-4	ヒマシ油		Wako	WKM0332
76	112-92-5	ステアリルアルコール	1-オクタデカノール	Wako	KWQ3911
77	557-05-1	ステアリン酸亜鉛		Wako	CER0118

Sigma-Aldrich: Sigma-Aldrich Corp.

TCI: 東京化成工業株式会社

Wako: 和光純薬工業株式会社

図 1 MATREX™試験におけるアッセイトレイ(6 ウェル)のレイアウト

	1	2
A	被験物質	被験物質
B	陰性対照 (無処置対照または溶媒対照)	陰性対照 (無処置対照または溶媒対照)
C	陰性対照 (0.01% SDS)	陽性対照 (0.1%SDS)

ウェル No.1 (行 A, Column 1), No.2 (行 A, Column 2), No.3 (行 B, Column 1), No.4 (行 B, Column 2), No.5 (行 C, Column 1), No.6 (行 C, Column 2)