

# 眼刺激性試験代替法の第三者評価報告書（案）

評価対象試験：SIRC 細胞毒性試験

平成 23 年 10 月 28 日

## 眼刺激性試験代替法評価委員会

委員長	小坂 忠司（残留農薬研究所）
委員	加藤 雅一（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング）
	竹内 小苗（P&G イノベーション合同会社）
	細井 一弘（参天製薬株式会社）
	山本 直樹（藤田保健衛生大学）
	吉村 功（東京理科大学名誉教授）

## 要旨

SIRC 細胞毒性試験（本試験）は、ウサギ角膜由来細胞（SIRC 細胞）に被験物質を暴露した後、72 時間培養後の SIRC 細胞の細胞生存率を評価指標として、眼の非刺激性を判定する方法である。本試験は、眼に対する非刺激性物質をスクリーニングする目的でウサギを用いた眼刺激性試験（Draize 法）の代替法として、厚生労働科学研究の補助金を受けてバリデーションが実施された。JaCVAM は、本試験の有用性を評価するために、眼刺激性試験代替法評価委員会（本委員会）を組織して、本試験法の第三者評価を依頼した。評価は、主導施設（株式会社資生堂）が用意した **Background Review Document (BRD)** を主資料として行われた。本報告書はその評価結果である。

本バリデーション試験では、供試被験物質の物質区分、液体・固体の物性などにおいては十分な数の被験物質が用いられた。SIRC 細胞毒性試験での非刺激性物質検出における正確性を GHS 分類による眼刺激性分類と比較した場合、感度は 75%、特異度は 50%、一致度は 65%であった。一方、被験物質の化学物質分類において、アルコール類およびエステル類は偽陰性率が高い区分として認められた。この特定の区分を除くと、感度は 89%に、一致度は 74%に改善された。試験法の信頼性については、施設内・間変動において良好な結果が得られ問題ないと判断された。

以上の結果から、我が国の GHS に準拠する化学物質に関わる法規制において、特定の化学物質の特性や培養に適さない物理化学的性状を考慮した上で、化学物質の眼刺激性の段階的評価の 1 つとして、非刺激性物質を検出する目的のために SIRC 細胞毒性試験法を使用する事は可能であると判断された。

しかし、本試験の正確性と信頼性を厳密に評価するには、提案プロトコールに従い、3 施設以上の GLP 施設にて十分な数の被験物質をコード化して追加バリデーションを実施する事が望まれた。

## 1 試験法の科学的および規制上での妥当性

本試験法は、ウサギ角膜由来細胞（SIRC 細胞：Statens Seruminstitut Rabbit Cornea）に被験物質を暴露し、培養後の細胞生存率をクリスタルバイオレット染色により測定し、それを指標として被験物質の眼刺激性を評価する試験法である。本試験法は、特に非刺激性物質を検出する事を焦点に開発された。

刺激性を有する化学物質が偶発的に眼に暴露される場合、眼球表面の広範囲を占めている角膜の損傷は視力障害等の重篤な障害を誘起する可能性がある。従来の眼刺激性試験評価法であるウサギを用いた眼刺激性試験（Draize 法）では、角膜への影響に評価の重みをおいている。細胞毒性は角膜上皮細胞の変性・剥離の情報と対応すると考えられることから、細胞毒性試験は角膜の障害を予測する事が期待されている。したがって、本試験法も基本的に角膜の影響の評価に重みをおいている Draize 法と同様な考え方に基づいて、化学物質の眼刺激性を評価している。

ヒトおよびウサギの角膜には生理学的な違いがあり、ウサギを用いた眼刺激性試験（Draize 法）がヒトの眼刺激性予測を完全に外挿できる方法ではないものの、現在 Draize 法を使用する事で、化学物質がヒトの眼に対して重篤な損傷を与える可能性について十分予知できている。したがって、本試験法の妥当性を検討するにあたっては、Draize 法との比較を行う事で、目的が達成されると考えられた。

生体では化学物質の眼の暴露に対する保護作用が働くが、本試験法ではこの作用は組み入れられないため、より過酷な試験条件下で評価しており、非刺激性物質を検出する考え方に合致していると考えられた。

化学物質の危険有害性の情報については、ラベルや安全性データシートを通じて使用者に伝達されるような法律や規則が各国において定められている。眼刺激性については、現在 Draize 法による腐食性（非回復性）の有無、さらに回復性の刺激についてはその重症度（強・中・弱刺激性）等をもとに、米国環境保護庁（US EPA）、欧州連合（EU）および化学品の分類と表示に関する世界調和システム（GHS）において分類基準が示されている（EPA 1996, EU 2001, UN 2003）。

わが国においては、化学物質に関する法律のうち、2010 年 12 月現在では労働安全衛生法が GHS を導入している。今後、化学物質の流通の更なるグローバル化を考えると、危険有害情報の共有化が必要となり、国内の他の化学物質に関する法律も GHS を導入していく事が推測される。よって、本試験法の GHS 分類基準に対する評価は、国内法への適用に対応するものである。

## 2 試験法のプロトコールの妥当性

### 2-1. 試験法の原理の妥当性

動物実験代替法の開発においては、複雑な生体反応を十分に解析する事で生体反応の一部を試験管レベルで再現する事が重要な点である。本試験法は、SIRC 細胞の細胞毒性を指標としている。これは、Draize 試験における角膜上皮細胞の変性・剥離に対応するものであり、角膜障害の予測を想定している。Draize 試験の評点では、角膜障害に関する評価点が全体の

評点の73% (110点中80点) を占めており、角膜組織の障害が眼刺激性予測の重要な項目である事を示唆している。よって細胞毒性試験は眼刺激性試験の適切な代替試験法の1つとなりうると考えられた。

SIRC細胞の他にヒト子宮頸部由来上皮癌細胞 (HeLa細胞) およびチャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞 (CHL細胞) での細胞毒性が検討されており (Ohno, Y. *et al*, Toxicology in Vitro 13, 1999)、細胞間で有意な差は認められなかった。今回、SIRC細胞を選択した理由としては、前述のようにSIRC細胞が Draize 試験で用いられる組織と同じ「ウサギ角膜」に由来している事、および眼刺激性試験代替法としてこの細胞を用いた文献が多い事が挙げられる。代替法使用細胞の選択理由としては、目的に沿った妥当な選択と考えられた。

細胞毒性の指標としては、クリスタルバイオレット染色法、ニュートラルレッド取り込み法、およびMTT法が検討されているが、いずれの方法にも検出力に有意な差が認められず、染色操作が簡便であり技術移転が容易である事から、クリスタルバイオレット染色法が選択された。

## 2-2. 試験プロトコールの概要

本試験法の提案プロトコールの詳細はBRDに提示されている。この資料には、厚生労働科学研究でのバリデーション研究 (研究1) および単独施設による追加研究 (研究2) の2回の研究結果が示されている。これらの研究に用いられたプロトコールは同一ではなく、研究2で用いられたプロトコールに軽微の変更を加えたものが提案 (提案プロトコール) されている。提案プロトコールの概要を下に示す。

### 1) SIRC細胞の入手

SIRC細胞 (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea: ATCC No. CCL-60) を American Type Culture Collection (ATCC) から入手する。

### 2) SIRC細胞の準備

SIRC細胞の培養には、10%牛胎児血清 (FBS) と4mM L-Glutamine を添加したMEM培地を用い、37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養する。凍結保存した細胞は、良好な増殖を確認するため解凍後、試験前に1回以上継代する。

### 3) 試験試料の調製

被験物質試料:

被験物質の物理的性状 (液体、固体) に関わらず、培養液 (10%牛胎児血清添加MEM培地) を用いて、最高試験濃度 (5,000 μg/mL) から公比2で4段階以上の希釈系列溶液を試験ごとに用時調製する。被験物質が培養液に不溶で、かつ良好な懸濁性が得られない場合には、必要に応じてDMSOあるいはエタノールを可溶化溶媒として使用する (溶媒の最高濃度: 10,000 μg/mL)。

陽性対照物質: ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecyl sulfate (SDS)、CAS:151-21-3)

比較対照物質: トリエタノールアミン (Triethanolamine、CAS:102-71-6)

陰性対照物質: 被験物質の調製に使用した培養液 (可溶化溶媒を用いた場合は使用溶媒を添加した培養液)

#### 4) 被験物質の暴露

被験物質、陽性対照、比較対照および陰性対照物質の希釈系列溶液を 96 ウェルマイクロプレート各ウェルに 0.1mL 入れる。続いて、各ウェルに SIRC 細胞 ( $1 \times 10^5$  細胞/mL) を 0.1mL ずつ播種する。

#### 5) 培養

SIRC 細胞を播種して約 20 分間室温で放置した後、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  で約 72 時間培養する。

#### 6) 測定と計算

クリスタルバイオレットによる染色後、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度 ( $588\text{nm}$  :  $570 \sim 595\text{nm}$  の間で設定) を測定する。陰性対照の吸光度を 100% とし、50% の吸光度を示す濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) を算出する。具体的には、希釈系列濃度の中で生存率 50% をはさんでいる 2 濃度溶液の細胞生存率から下に示す計算式により  $\text{IC}_{50}$  を算出する。

$$\text{LogIC}_{50} = [(50 - y_1) \log x_2 - (50 - y_2) \log x_1] / (y_2 - y_1)$$

※記号 被験物質濃度 (低濃度側) :  $x_1$       細胞生存率 (低濃度側) :  $y_1$

被験物質濃度 (高濃度側) :  $x_2$       細胞生存率 (高濃度側) :  $y_2$

$\text{IC}_{50}$  が  $5,000 \mu\text{g} / \text{mL}$  以上の場合 (上限値) には  $\text{IC}_{50} > 5,000 \mu\text{g} / \text{mL}$  とし、試験最低濃度以下の場合には  $\text{IC}_{50} < \text{試験最低濃度}$  とする。

#### 7) 判定

比較対照物質であるトリエタノールアミンの  $\text{IC}_{50}$  と比較して、以下の基準に従い眼刺激性を予測する。

刺激性 :      被験物質の  $\text{IC}_{50} < \text{トリエタノールアミンの } \text{IC}_{50}$

非刺激性 :      被験物質の  $\text{IC}_{50} \geq \text{トリエタノールアミンの } \text{IC}_{50}$

#### 8) 試験成立条件

以下の各条件に全て合致する場合には試験成立とした。

陽性対照 :       $50 \mu\text{g} / \text{mL} \leq \text{SDS の } \text{IC}_{50} \leq 250 \mu\text{g} / \text{mL}$

比較対照 :       $1,000 \mu\text{g} / \text{mL} \leq \text{トリエタノールアミンの } \text{IC}_{50} \leq 5,000 \mu\text{g} / \text{mL}$

陰性対照 :      吸光度 0.4 以上

提案プロトコールは、眼刺激性を予測する上での細胞毒性試験として必要な項目を網羅していると判断した。

### 2-3. 試験プロトコルの相違点

研究1および研究2に用いられたプロトコルは、提案プロトコルとは同一のものではない。提案プロトコルと研究1のプロトコルの相違点は表1のとおりである。

表1 提案プロトコルと研究1のプロトコルとの相違点

項目	研究1のプロトコル	提案プロトコル
培養液	10%仔牛血清添加 MEM 培地	10%牛胎児血清添加 MEM 培地
被験物質由来の汚染への対処	液体：ろ過滅菌 固体：エタノール除菌	抗生物質使用
被験物質の調製	決定樹に従い被験物質の調製手順を細かく設定（培養液、PBS-、DMSO/エタノールの順）。	10,000 $\mu\text{g/mL}$ 濃度を調製（試験濃度 5,000 $\mu\text{g/mL}$ ）する。培養液に不溶でかつ良好な懸濁液が調整できない場合は、溶媒として DMSO あるいはエタノール使用。
予備試験	実施する。	実施しない。
被験物質の希釈系列	第1次バリデーション：公比2 第2次バリデーション：20-80%間に3点以上含まれる（最小公比1.1） 第2次バリデーション：20-80%間に1点以上含まれる（最小公比1.1）	最高試験濃度 5,000 $\mu\text{g/mL}$ とし、公比2で4段階以上の濃度設定。
陽性対照物質を用いた試験成立の条件	記載なし	SDS を使用し、SDS の IC50 が 50 ~ 250 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で試験成立。
比較対照物質を用いた試験成立の条件	記載なし	トリエタノールアミンを使用し、トリエタノールアミンの IC50 が 1,000 ~ 5,000 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で試験成立。
陰性対照を用いた試験成立の条件	記載なし	培養液、10,000 $\mu\text{g/mL}$ DMSO 培養液、または 10,000 $\mu\text{g/mL}$ エタノール培養液の各陰性対照で吸光度 $\geq 0.4$ で試験成立。
洗浄 PBS(-) 量	0.2mL/ウェル	0.2~0.25mL/ウェル
測定波長	590nm 付近	588nm (570nm~595nm)
IC50 計算法	片対数グラフ、解析ソフト。	細胞生存率 50%をはさむ2濃度とその生存率から算出。
結果の評価	記載なし。	トリエタノールアミンと被験物質の IC50 を比較して、刺激性および非刺激性を分類。
試験の繰り返し	記載なし。	2回実施。 2回の評価結果が異なった場合は3回目を実施。

研究1のプロトコルは、結果の評価においてトリエタノールアミンを比較対照物質にしていなかった。しかし提案プロトコルでは、トリエタノールアミンを比較対照物質として評価している。被験物質の IC50 値は変動するため、試験ごとにトリエタノールアミンの IC50 値を測定し、その値を基準に解析する事が妥当と考えられる。よって、本委員会は研究1の結果判定と提案プロトコルの結果判定との相違は軽微であるとは言い難いと判断した。結果の評価以外の相違については、結果に大きな影響を与えないと判断した。

提案プロトコルと研究2のプロトコルの相違点は表2のとおりであり、これらの相違点は試験結果に大きな影響を与えないと判断した。

表2 提案プロトコルと研究2のプロトコルとの相違点

項目	研究2のプロトコル	提案プロトコル
陽性対照に基づく試験合格基準	陽性対照(SDS)の IC50 値が設定した範囲に収まる事を試験成立の条件とする。その範囲は、厚生労働科学研究で得られた SDS の平均 IC50 $\pm$ 3SD (99%信頼区間) である 77.7~258.7 $\mu$ g/mL を合格基準とする。	陽性対照として SDS を設定する。標準的なプロトコルで試験された SDS の IC50 が 50~250 $\mu$ g/mL の範囲であり、これを試験成立の条件とする。
2 試験間での陽性対照のばらつきに基づく試験合格基準	2 試験間での陽性対照 (SDS) の IC50 値が $\pm$ 2 倍以内に収まる事を合格基準とする。	基準を設けない
陰性対照のばらつきに基づく試験合格基準	体系的に試験精度を見極めるために、96 穴マイクロプレートの左右に陰性対照を設定し、両者の吸光度が同様であることを確認する。左右の陰性対照の平均吸光度が全体の平均吸光度の 15% 以内(平均値 $\pm$ 15%)に収まる事を試験の合格基準とする。	基準を設けない
マイクロプレートシーリングテープの貼付	物質が揮発性し周囲のウェルへ影響を与える可能性を考慮し、ウェルを覆うマイクロプレートシーリングテープを貼付する。	被験物質が揮発し周囲のウェルへ影響を与える可能性を考慮する場合、ウェルを覆うマイクロプレートシーリングテープを貼付することができる。

## 2-4. 試験法のプロトコールの改良点、検討事項

本提案のプロトコールの改良点、検討事項として、以下の点が考えられた。

1) トリエタノールアミンを比較対照物質として選択した科学的根拠が明記されず、その妥当性を支持する文献も見あたらないので、妥当性を考察する必要があると思われる。より適切な比較対照物質の検討も引き続き必要であると考えられた。

2) 被験物質の希釈溶媒について、非水溶性の被験物質はDMSOやエタノールなど適切な溶媒を選択できるとしているが、それらの選択基準が具体的には示されていない。研究1においてDMSOを優先して選択しているため、提案のプロトコールに具体的な選択基準を示す必要がある。

## 3 バリデーションに用いられた物質の分類、選択理由の妥当性

研究1では、39物質が供試され、そのうち32物質が評価された(付表1)。研究2では、ICCVAM Recommended Reference Substance List (2006)において区分外(NC)と弱刺激性(2B)に分類されている全27物質および原体で動物実験情報がある化粧品原料41物質の合わせて68物質が供試され、そのうち67物質が評価された(付表2)。

BRDでは研究1の32物質と研究2の67物質を合わせて、最終的に合計94物質(研究1および2で使用した5物質が重複)を用いて予測率が評価された。化学分類の内訳は、主に界面活性剤、エステル、アルコール、ポリオール、有機塩、芳香族化合物、カルボン酸などであった(表3)。また、これらを存在状態で分類すると固体41物質、液体53物質であった。

表3 バリデーションで用いられた被験物質の化学分類(研究1と2の合計)

分類	物質数	分類	物質数
界面活性剤	22	酸	1
アルコール	12	アルデヒド	1
エステル	11	ケトン	1
ポリオール	9	ニトリル	1
有機塩	7	トリアセテート	1
芳香族	5	炭化水素	1
無機塩	4	ハロゲン化炭化水素	1
カルボン酸	3	ヘテロ環状化合物	1
アルカノールアミン	2	チオール	1
ベンゾフェノン	2	PABA誘導体	1
オイル	2	色素	1
エーテル	2	ジオキソラン	1
アミン	1		
		総計	94

正確性評価に用いられた物質：

前項で述べたとおり、本試験法の提案プロトコールはトリエタノールアミンを比較対照物質として用いる事が求められている。研究1では被験物質によってはトリエタノールアミンと同時に試験を行っていないものも含まれる。よって、それら化学物質を除いたデータで本試験法を評価する事が妥当と考えられた。なお、SDSは研究1ではトリエタノールアミンと同時に試験を行っていなかったため評価からは削除したが、研究2では被験物質としてではなく陽性対照として組み込まれているため、研究1と2を合わせた場合の正確性の評価に含めた。この場合、本評価に用いられる化学物質は合計で79物質となった。化学分類の内訳は、主に界面活性剤、エステル、アルコール、ポリオール、有機塩、芳香族化合物、カルボン酸などであった（表4）。また、これらを存在状態で分類すると、固体32物質、液体47物質であった。GHSの眼刺激性の区分は、NCが32物質、2Bが13物質、刺激性がある（2Bまたは2Aまたは1のどれか）と区分されるものは合計で47物質であった。

本試験法を評価するにあたり、これら化学分類、液体・固体の物性、刺激性の程度は十分であると判断した。

表4 本評価で用いた被験物質の化学分類

分類	物質数	分類	物質数
界面活性剤	17	アミン	1
アルコール	11	酸	1
エステル	10	アルデヒド	1
ポリオール	7	ケトン	1
有機塩	5	ニトリル	1
芳香族	5	トリアセテート	1
無機塩	2	炭化水素	1
カルボン酸	3	ハロゲン化炭化水素	1
アルカノールアミン	2	ヘテロ環状化合物	1
ベンゾフェノン	2	チオール	1
オイル	2	ジオキソラン	1
エーテル	2		
総計			79

#### 4 試験法の正確性を評価するために用いられた化学物質のインビボおよび参照データ

本試験法のバリデーションでは、Draize 法のデータが参照として用いられた。Draize 法については、OECD テストガイドライン (OECD TG 405) が作成されており、我が国でも眼刺激性の判定に使用されている方法である。

研究 1 では、本試験法と並行して実施された Draize 法の結果が参照データとして用いられた。試験は被験物質の GLP の純度分析を行っていない点を除けば GLP に準拠しており、被験物質はコード化されて試験が実施された。観察期間が 14 日目までであり、21 日目のデータが無い場合 GHS 分類の 1 と 2A を区別することはできないが、本試験法は区分外 (NC) を検出する事を目的とするため、正確性を評価するには影響はないと考えられた。10%濃度 (あるいはそれ以下の濃度) のみで試験された物質については、Draize 法のデータが GHS 分類で 1、2A または 2B と評価された物質のみ、その原体 (100%) の眼刺激性は 10%濃度の評価と同等あるいはより強いと予測されるので、原体の GHS 分類は 10%濃度の分類とあるいはそれ以上とした。

研究 2 では、新たなインビボ試験は行われていない。研究 2 で選択された被験物質は ICCVAM の推奨する参照物質リスト (ICCVAM 2006) に記載されており GHS 分類での区分がわかっているものか、既存の Draize 法の公表試験結果をもとに GHS 分類を行ったものであった。

評価に用いられたインビボのデータは妥当であると判断した。

#### 5 データと結果の利用性

以下の 2 つのバリデーション研究から、合計 102 の化学物質についての情報が評価資料として提出された。被験物質の CAS 番号、IC50 値、GHS の眼刺激性区分などのデータを得ている。研究 2 については、生データも参照として本委員会に提出された。

研究 1：厚生労働科学研究による SIRC 細胞毒性試験のバリデーション (Ohno, Y. *et al*, Toxicology in Vitro 13, 1999)

39 物質が供試され、一次および二次バリデーションでは 6 施設、三次バリデーションでは 5 施設で実施された。

研究 2：単独施設による追加研究 (2009/2010)

68 物質が供試され、バリデーションは 1 施設で実施された。

2 つのバリデーション試験とも非 GLP ではあるが、それぞれにデータの質は確認された。また、研究 1 では被験物質をコード化して評価されている。

本試験法を評価するには、十分詳細な内容が示されていると判断した。

## 6 試験法の正確性

本試験法の正確性を評価する参照基準として GHS 分類を用いた。すなわち、Draize 法のデータから GHS 分類の区分外 (NC) に属する被験物質を非刺激性 (陰性) 物質、GHS 分類の 1、2A および 2B に属する被験物質を刺激性 (陽性) 物質と分類し、本試験法がどの程度の感度、特異度、および一致度を達成したかという事で正確性を評価した。

正確性の評価には、偽陽性率、偽陰性率、陽性予測率、陰性予測率という指標も用いられるが、これらは感度、特異度、一致度から計算できるため記載しなかった。

BRD では研究 1 および 2 のすべての評価判定データを解析に用いていたが、研究 1 では比較対照物質を用いた評価を実施していなかった。そのため、研究 1 での試験結果をそのまま正確性評価に使用する事は難しいと考えられた。研究 2 では被験物質はコード化されていなかったため、厳密に正確性評価を行うデータは存在しなかった。

研究 1 の第 3 次バリデーション試験では被験物質としてトリエタノールアミンの IC50 値を測定しており、提案プロトコルの試験法の比較対照物質として評価する事が可能であったため、正確性評価においては研究 1 の第 3 次バリデーション試験および研究 2 の試験データで正確性を評価した。その結果を表 5 および付表 3 に示す。なお、SDS は研究 1 ではトリエタノールアミンと同時に試験を行っていなかったため評価からは削除したが、研究 2 では被験物質としてではなく陽性対照として組み込まれているため、研究 1 と 2 を合わせた場合の正確性の評価に含めた。

表 5 GHS 分類で非刺激性と刺激性を判定した SIRC 細胞毒性試験法の正確性

研究の種類	感度		特異度		一致度	
	%	物質数	%	物質数	%	物質数
研究 1	84.6	11/13	-	-	84.6	11/13
研究 2	71.4	25/35	50.0	16/32	61.2	41/67
研究 1 と 2 の合計 <sup>#</sup>	74.5	35/47	50.0	16/32	64.6	51/79

<sup>#</sup> : 両研究で 2 物質が重複。SDS を追加。

研究 1 と 2 に供試された被験物質を併合して正確性を評価した場合、本試験法の正確性は、感度 74.5%、特異度 50.0%、一致度 64.6%であった。

この結果において偽陰性あるいは偽陽性と評価された物質を化学物質クラスカテゴリーで吟味すると、以下の特徴がみられる（表 6）。アルコール類は陰性と判定された 7 物質のうち 6 物質、エステル類では 3 物質のうち 2 物質が偽陰性であった。また、アルコール類は陽性と判定された 4 物質のうち 3 物質が偽陽性であった。エーテル類・ジオキソランは供試数が少なかったが（それぞれ 2 および 1 物質）、すべてが偽陰性であった。

表 6 被験物質の化学物質クラスカテゴリー別の偽陽性・偽陰性率

被験物質の化学物質クラス カテゴリー	物質 数	偽陰性率		偽陽性率	
		%	NO.	%	No.
全データ	79	25.5	12/47	50.0	16/32
アルコール	11	85.7	6/ 7	75	3/ 4
エステル	10	66.7	2/ 3	28.6	2/ 7
エーテル	2	100.0	2/ 2	0	0/ 0
界面活性剤	13	0	0/13	100	5/ 5
有機塩	5	0	0/ 2	100	3/ 3
固体	31	0	0/25	85.7	6/ 7
液体（溶液を含む）	47	54.5	12/22	40	10/25

供試数が十分あり偽陰性率の高かったアルコール類とエステル類を除いた場合の GHS 分類と本試験法の対応を以下の表に示す（表 7、付表 4）。この場合の本試験法の感度は 89.2%、特異度は 47.6%、一致度 74.1%となった。

表 7 アルコール・エステル類を除いたときの GHS 分類と本試験法の対応（物質数）

GHS 分類	本試験法の判定		計
	陽性	陰性	
陽性	33	4	37
陰性	11	10	21
計	44	14	58

## 7 試験法の信頼性

### 施設内再現性：

研究 1 では、各施設で 2 回の実験を日を変えて反復されているので、この 2 回の判定結果が異なるかどうかで施設内の再現性を評価した。

これについて Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment (OECD series on testing and assessment No 34, 2005) では、施設内で実験を繰り返したときに同一結果が得られるかどうかについて、施設内反復性 (intra-laboratory repeatability) と施設内再現性 (intra-laboratory reproducibility) の異なった解析方法を示している。しかし、当該試験法が開発された時代には、この概念区別が

確立されていなかった。そこで本委員会では、研究 1 で実施された 33 物質について A、B、G、H、I 施設の各施設内再現性（付表 5）とする事とした。各施設で同一物質を 2 回試行して IC50 値が得られた。刺激性の判定は、IC50 値がトリエタノールアミンの値以上を刺激性陰性（非刺激性）、未満を刺激性陽性（刺激性）とした。このように 5 施設の施設内再現性を検討したところ、2 回の IC50 値も安定しており、刺激性判定結果も各施設とも全て同一であった。したがって、施設内再現性は良好であると判断した。

#### **施設間再現性：**

複数施設で同一被験物質を評価したのは研究 1 だけであり、研究 1 の中でトリエタノールアミンが被験物質に含まれたのは第 3 次バリデーションだけであった。

第 3 次バリデーションでの被験物質数はトリエタノールアミンを含めて 14 物質で、施設数は 5 施設である。この 14 物質での陽性・陰性の評価結果は 5 施設全てで一致した。

第 2 次バリデーションの被験物質数は 14 物質である。この 14 物質の IC50 値を、第 3 次バリデーションでのトリエタノールアミンの IC50 値と比較したとき、陽性・陰性の評価結果は 5 施設全てで一致した。

第 3 次バリデーションのトリエタノールアミンの IC50 値のばらつきを実験間のばらつきとすると、施設間再現性の評価には、第 2 次バリデーションの IC50 値を、第 3 次バリデーションのトリエタノールアミンの IC50 値の範囲（1430～3850mg/L）の最大値あるいは最小値と比較する事も必要と考えられる。そうすると、施設 G の Benzyl alcohol、施設 I の Benzyl alcohol、Sodium salicylate において、陽性・陰性の評価結果が異なる事になる。この場合、任意の 2 施設間 10 通りでの一致率を求めて平均すると、平均一致率が 96%で、施設間再現性は良好であると判断した。

これらの一致率の変動は比較的少数の物質による結果であり、特定の施設に他と異なる結果が集中していた。より多くの物質を用いた確認が望ましい。

#### **技術移転性：**

研究 1 では、1992 年 10 月に国立衛生研究所（現国立医薬品食品衛生研究所）にて技術講習会が開催され、技術移転が実施された。本試験法は特殊な機器を必要とせず、通常の細胞培養の施設および標準操作手順（SOP）を整備する事で試験が可能であり、使用細胞株も市販されている事から技術移転性は高いと判断した。

## 8 試験法のデータの質

試験法のデータの質については、BRDに加え、研究1で実施した一次バリデーション、二次バリデーションおよび三次バリデーション試験に関する Ohno らの報告(1999)も評価に用いた。研究2については試験関連資料のコピー(追加検討資料)も評価に用いた。

研究1は、GLP 査察官による教育訓練を受けた研究参加者によって、GLPの原理を尊重してSOPに従い実施された。被験物質は被験物質管理グループによりコード化され、試験施設に配布された。各試験施設のデータの信頼性の確認は各施設で行なわれた。各施設のデータの集計はリードラボが行い、集計の信頼性は各施設の試験担当者が確認した。本研究に関連する書類は試験責任者および各施設の試験担当者が確認した。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に保管され、試験終了から5年以上経過した時点で廃棄された。

以上の事から、研究1では一連の多施設バリデーションはGLP準拠で実施されていないが、試験データの質の向上に努めて実施されたと評価できる。

研究2では、試験計画書、試験計画書変更書、試験資料調査点検リスト、署名記録およびSIRC細胞毒性試験の結果記録などの記録書類は適切に保管されていた。試験結果の計測値は測定実施者以外の試験担当者により点検され、試験計画書および試験結果の記録は第三者により点検され、問題ない事が確認された。以上の事から、この部分の試験操作はGLPの原理を尊重し適切に実施されたものと考えられた。

## 9 その他の科学的な報告

厚生労働科学研究において、SIRC細胞およびHeLa細胞を用いた眼刺激性評価が板垣らにより検証され、報告された(Itagaki, H. *et al.* Toxicology in Vitro 5, 1991)。

本報告では眼刺激性を評価するために、界面活性剤12剤についてSIRC細胞およびHeLa細胞を用いた細胞毒性をクリスタルバイオレット染色法にて実施した。インビトロ試験のIC50値とDraize試験の最大角膜スコア(maximum corneal scores)あるいは最大総スコア(maximum total scores)との相関性について調査した結果、いずれも良好な相関性(最大角膜スコアとで $r = -0.863$ 、最大総スコアとで $r = -0.816$ )が認められた。この事は、本試験法がDraize試験評点とよく相関している事を強く示唆し、本試験法での眼刺激性試験代替法の評価が期待できた。

## 10. 3Rs への関与

本試験法は、ヒトの眼刺激性を評価する目的で化学物質の登録に関する行政的な毒性試験として使用されているDraize法に替わる方法として開発され、科学的に検証された培養細胞を用いたインビトロ試験法の代替法である。

本試験法は段階的評価のひとつとして、非刺激性物質を検出する事を目的とした試験方法である事から、化学物質の眼刺激性評価を目的として試験に供される動物数を抑える事ができる(reduction)。

## 11. 試験法の有用性と限界

### 1) SIRC 細胞毒性試験法の有用性と限界

上記視点（6 試験法の正確性、7 試験法の信頼性）で研究1および研究2をまとめると、以下のとおりである。

本試験法は眼刺激性の第一段階の試験として有用性があると判断した。

本試験法の限界として、本試験を非刺激物質の検出試験法として使用する場合、アルコール類およびエステル類（供試例数は少ないもののエーテル類およびジオキソラン）に対する偽陰性率が高く、これらの物質の評価には試験法の改良が必要であると判断した。

また、試験培地への難溶解性物質、エアロゾル状・ガス状物質、着色性物質などの被験物質の物理化学的性状によっては、本試験には適用できない化学物質群がある。

試験技術の移転性については、1) 使用した細胞株が市販のSIRC細胞であり容易に入手できる事、2) 特殊な機器を必要とはせず、通常の細胞培養の施設および標準操作手順を整備する事で試験が可能となる事、3) 当該バリデーション研究で技術易移転性が示されていることから、SIRC細胞毒性法の日本国内の日常的な実施は可能であると判断した。

試験期間については、Draize法と比べ短縮されると判断した。

### 2) 化粧品原料評価での有用性

2003年に公布された欧州化粧品指令第7次改正[2003/15/EC]により、眼刺激性試験については2009年3月11日以降、動物実験禁止と動物実験を行った製品および原料を含む製品の欧州域内の販売禁止措置が取られており、代替法の公的受け入れが急がれている。

「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討委員会 眼刺激性分科会報告」（2010）ではDraize法の最大平均評価点（maximum average score、以下MAS）と回復時間の関係が研究1で得られたDraize法の結果をもとに検討された。それによると、MASと回復時間の間に対応関係が認められ、MAS15点以下であれば、ほぼ7日以内に回復していた。また、結膜のみの反応であれば7日以内に回復し、虹彩は角膜に傷害が無いときには反応は認められず、角膜の傷害に伴って反応が認められる傾向があった。現在の医薬部外品の申請において、眼刺激性についてはDraize法が求められており、（最大適用濃度の）化粧品原料を用いた試験で角膜・虹彩に反応が見られた場合は、製品での試験結果が求められている。以上の事をまとめると、MAS15点以下が医薬部外品申請における眼刺激性の指標として有用な指標となる可能性が示唆されている。

研究1は、濃度10%の化粧品原料を対象に、本試験法で得られるIC50値とDraize法の結果（MAS）の相関性をみる事が目的で行われたバリデーション研究であり、その良好な相関性は既に示されている。研究1と研究2を併せて、合計70以上の化粧品原料が用いられているので、現在得られているデータを見直し、本試験法の医薬部外品申請への適用を検討する意義はあると思われた。

## 12. 結論

本試験法は、非刺激性物質を検出する目的で Draize 法の代替法として開発され、本委員会はバリデーションに必要な項目、過程、データを検討した。

本試験法に不適な被験物質の物理化学的性状等の限界を考慮に入れた上で提案されたプロトコールに基づき試験を実施すれば、非刺激性物質を検出する段階的評価の1つとして使用する事は可能であると判断した。

しかし、研究1でのバリデーション試験では試験評価の点で提案プロトコールとの相違点があり、研究2では1施設にて被験物質をコード化しないで実施され、厳密な意味での正確性および信頼性は評価できなかった。本試験の正確性と信頼性を厳密に評価するには、提案プロトコールに従い、3施設以上のGLP施設にて十分な数の被験物質をコード化し、さらに研究1で用いられた具体的な選択基準に基づく被験物質の希釈溶媒選択を行った追加バリデーションを実施する事が望まれる。

### 13 文献

EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

EU (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 adapting to technical progress for the 28th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labeling of dangerous substances. Official Journal of the European Communities L255:1-333.

UN (2003). Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). New York & Geneva: United Nations Publications.

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. 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 (1999), 73-98.

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

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

OECD series on testing and assessment No 34 (2005), Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment.

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

EU (2003), Directive 2003/15/EC of the European parliament and of the council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. Official Journal of the European Union L66:26-35.

## 用語の定義

### 一致度 (Concordance)

試験法で得られる結果が、既定の参照値の分類と一致している割合。一致度は、試験された被験物質中の陽性物質の割合に左右されるところが大きい。

### 陰性対照 (Negative control)

陰性対照陰性の結果が得られるべき物質・条件を与えた試験系の特別な部分。

### 感度 (Sensitivity)

試験された陽性物質の中で、試験法で正しく陽性と判定されたものの割合。

### 偽陰性率 (False negative rate)

実験対象として取り上げられた陽性物質のうち、試験法によって誤って陰性と判定されたものの割合。

### 偽陽性率 (False positive rate)

実験対象として取り上げられた陰性物質のうち、試験法によって誤って陽性と判定されたものの割合。

### 施設間再現性 (Interlaboratory reproducibility)

複数の試験施設が同じ被験物質を同じプロトコルを用いて試験をしたとき、試験結果が質的、量的に再現される度合。

### 施設内再現性 (Intralaboratory reproducibility )

同じ施設で、適格の実験者が、同じプロトコルで同じ被験物質を異なる時期に再度試験をしたとき結果の再現される程度。

### 正確性 (Accuracy)

試験法で得られる結果が、被験物質の既定の参照値と類似している程度。

### 特異度 (Specificity)

試験された陰性物質の中で、試験法で正しく陰性と判定されたものの割合。

### 陽性対照 (Positive control)

陽性対照陽性の結果が得られるべき物質・条件を与えた試験系の特別な部分。

**GHS (Globally Harmonized System)**

国連勧告として出された化学品の分類法で「化学品の分類および表示に関する世界調和システム」と訳されている。化学品の危険有害性を一定の基準に従って分類し、その結果をラベルやMSDS（化学物質等安全データシート）に反映させ、災害防止および人の健康や環境の保護に役立てようとするもの。

**GLP (Good Laboratory Practices)**

提出された試験結果が適切な施設・人員での実験を正確に反映していることを保証できるように、実験の計画、実施、監視、記録、報告、および資料保管のやり方について、行政機関が定めている原則。

## 別添資料

付表 1 研究 1 に供試された 39 被験物質

番号	物質名	固体 液体	化学物質 分類	GHS 分 類	正確性 評価へ の採用
1	2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate	液体	PABA 誘導體	N	×
2	Isopropyl myristate	液体	エステル	N	×
3	Isotonic sodium chloride solution	液体	無機塩	N	×
4	Silicic anhydride	固体	無機塩	N	×
5	Polyethylene glycol 400	液体	ポリオール	N	×
6	Glycerin	液体	ポリオール	N	×
7	Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E. O.)	液体	界面活性剤	N	×
8	Triethanolamine*	液体	アルカノールアミン	N	×
9	Methyl p-hydroxybenzoate	固体	エステル	N	×
10	Sucrose fatty acid ester	固体	界面活性剤	P	×
11	Benzyl alcohol	液体	アルコール	P	×
12	Ethanol	液体	アルコール	P	○
13	Acid red 92	固体	色素	P	×
14	Calcium thioglycolate	固体	有機塩	P	×
15	Sodium salicylate	固体	有機塩	P	×
16	Distearyldimethylammonium chloride	固体	界面活性剤	P	×
17	Lactic acid	液体	カルボン酸	P	○
18	Sodium dodecyl sulfate	固体	界面活性剤	P	×
19	Diisopropanolamine	固体	アルカノールアミン	P	○
20	Monoethanolamine	液体	アルカノールアミン	P	○
21	Glycolic acid	固体	カルボン酸	P	○
22	Sodium hydrogenated tallow L-glutamate	固体	界面活性剤	P	×
23	Chlorhexidine gluconate (20% solution)	液体	有機塩	P	×
24	Butanol	液体	アルコール	P	○
25	Potassium laurate	固体	界面活性剤	P	○
26	Polyoxyethylene octylphenylether (10E. O.)	液体	界面活性剤	P	×
27	Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate	固体	界面活性剤	P	×
28	Acetic acid	液体	カルボン酸	P	○
29	Cetyltrimethylammonium bromide	固体	界面活性剤	P	○
30	Benzalkonium chloride	固体	界面活性剤	P	×
31	Stearyltrimethylammonium chloride	固体	界面活性剤	P	○
32	Cetylpyridinium chloride	固体	界面活性剤	P	×
33	Domiphen bromide	固体	界面活性剤	P	○
34	m-Phenylenediamine#	固体	アミン	P	×
35	Polyoxyethylene hydrogenated castor oil (60 E. O.) &	固体	界面活性剤	-	×
36	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (20 E. O.)&	液体	界面活性剤	-	×
37	Polyoxyethyleneglycol monolaurate (10 E. O.)&	液体	界面活性剤	-	×
38	Sodium N-lauroyl sarcosinate (30% solution)&	液体	界面活性剤	-	×
39	Sodium polyoxyethelene laurylether sulfate (2 E. O.) (27% solution)&	液体	界面活性剤	-	×

N : GHS 分類の NC に属する被験物質 (刺激性陰性物質 ; 非刺激性物質)

P : GHS 分類の 1、2A、または 2B に属する被験物質 (刺激性陽性物質 ; 刺激性物質)

\* : 比較対照物質として使用したため、バリデーション評価から除外

# : 不安定な物質であるため、バリデーション評価から除外

& : GHS 分類不明のため、バリデーション評価から除外

付表 2 研究 2 に供試された 68 物質

番号	物質名	固体 液体	化学物質 分類	GHS 分 類	正確性 評価へ の採用
1	Ethyl-2-methyl acetoacetate	液体	エステル	P	○
2	Ammonium nitrate	固体	無機塩	P	○
3	Butyl Dipropasol Solvent	液体	エーテル	P	○
4	3-Chloropropionitrile	液体	ニトリル	P	○
5	Cyclopentanol	液体	アルコール	P	○
6	3,3-Dithiodipropionic acid	固体	酸	P	○
7	Hexyl cinnamic aldehyde	液体	アルデヒド	P	○
8	N-Lauroylsarcosine sodium salt	固体	界面活性剤	P	○
9	Maneb	固体	有機金属	P	×
10	2-Methyl-1-pentanol	液体	アルコール	P	○
11	Propasol Solvent P	液体	エーテル	P	○
12	6-Methyl purine	固体	ヘテロ環状化合物	P	○
13	2,6-Dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropanoate	固体	エステル	P	○
14	Triton X-100	液体	界面活性剤	P	○ <sup>#</sup>
15	iso-Octyl acrylate	液体	エステル	N	○
16	tetra-Aminopyrimidine sulfate	固体	有機塩	N	○
17	2,4-Difluoronitrobenzene	液体	芳香族	N	○
18	n,n-Dimethylguanidine sulfate	固体	有機塩	N	○
19	2-(n-Dodecylthio)ethanol	液体	アルコール	N	○
20	iso-Propyl bromide	液体	ハロゲン化炭化水素	N	○
21	Di-iso-butyl ketone	液体	ケトン	N	○
22	iso-Octylthioglycolate	液体	チオール	N	○
23	2,4-Pentanediol	液体	ポリオール	N	○
24	2,2-Dimethyl-3-pentanol	液体	界面活性剤	N	○
25	Potassium tetrafluoroborate	固体	無機塩	N	○
26	3-Methoxy-1,2-propanediol	液体	ポリオール	N	○
27	Toluene	液体	アルコール	N	○
28	2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol	固体	ポリオール	P	○
29	Benzalkonium chloride	固体	界面活性剤	P	○ <sup>#</sup>
30	Benzophenone-1	固体	ベンゾフェノン	P	○
31	Benzophenone-2	固体	ベンゾフェノン	P	○
32	Butoxyethanol	液体	アルコール	P	○
33	Butylene glycol	液体	ポリオール	N	○
34	Cetrimonium chloride	固体	界面活性剤	P	○
35	Cetyl alcohol	固体	アルコール	N	○
36	Chlorhexidine digluconate 20% solution	液体	有機塩	P	○ <sup>#</sup>
37	Chlorophene	固体	芳香族	P	○
38	Chloroxylenol	固体	芳香族	P	○
39	Diethylhexyl adipate	液体	エステル	N	○
40	Diisopropyl adipate	液体	エステル	N	○
41	Dioctyl sodium sulfosuccinate	固体	界面活性剤	P	○ <sup>#</sup>
42	Ethylhexyl palmitate	液体	エステル	N	○
43	Hexylene glycol	液体	ポリオール	P	○
44	Isocetyl stearate	液体	エステル	N	○
45	Isopropyl Myristate	液体	エステル	N	○ <sup>#</sup>
46	Isopropyl Palmitate	液体	エステル	N	○
47	Lauramide DEA	固体	界面活性剤	P	○
48	Methoxyisopropyl acetate	液体	エステル	P	○
49	Oleyl alcohol	液体	アルコール	N	○
50	PEG-40 stearate	固体	界面活性剤	N	○
51	Phenethyl alcohol	液体	アルコール	P	○
52	Phenoxyethanol	液体	アルコール	P	○
53	Phytantriol	液体	ポリオール	P	○
54	Propylene carbonate	液体	ジオキソラン	P	○
55	Resorcinol	固体	芳香族	P	○

N : GHS 分類の NC に属する被験物質 (刺激性陰性物質 ; 非刺激性物質)

P : GHS 分類の 1、2A、または 2B に属する被験物質 (刺激性陽性物質 ; 刺激性物質)

○<sup>#</sup> : 研究 1 と重複する物質

付表 2 研究 2 に供試された 68 物質 (続き)

番号	物質名	固体 液体	化学物質 分類	GHS 分 類	正確性 評価へ の採用
56	Safflower (Carthamus tinctorius) oil	液体	オイル	N	○
57	Sesame (Sesamum indicum) oil	液体	オイル	N	○
58	Sodium dehydroacetate	固体	有機塩	N	○
59	Sodium naphthalenesulfonate	固体	有機塩	P	○
60	Sodium stearate	固体	界面活性剤	N	○
61	Sorbitan oleate	液体	界面活性剤	N	○
62	Sorbitan sesquioleate	液体	界面活性剤	N	○
63	Squalane	液体	炭化水素	N	○
64	Stearalkonium chloride	固体	界面活性剤	P	○
65	TEA-Lauryl sulfate 40% solution	液体	界面活性剤	P	○
66	Triacetin	液体	トリアセテート	N	○
67	Triethylene glycol	液体	ポリオール	N	○
68	Triisopropanolamine	固体	アミン	P	○

N : GHS 分類の NC に属する被験物質 (刺激性陰性物質 ; 非刺激性物質)

P : GHS 分類の 1、2A、および 2B に属する被験物質 (刺激性陽性物質 ; 刺激性物質)

付表 3 SIRC 細胞毒性試験研究における正確性評価に用いられた個々の物質の判定結果

		<i>In vitro</i> ( Classification by SIRC-CVS assay)	
		Positive	Negative
<i>In vivo</i> (Classification by GHS)	Positive (1, 2Aor 2B)	Lactic acid Sodium dodecyl sulfate Diisopropanolamine Monoethanolamine Glycolic acid Chlorhexidine gluconate (20% solution) Potassium laurate Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate Acetic acid Cetyltrimethylammonium bromide Stearyltrimethylammonium chloride Domiphen bromide Ammonium nitrate 3-Chloropropionitrile 3,3-Dithiodipropionic acid Hexyl cinnamic aldehyde N-Lauroylsarcosine sodium salt 6-Methyl purine 2,6-Dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropanoate Triton X-100 2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol Benzalkonium chloride Benzophenone-1 Benzophenone-2 Cetrimonium chloride Chlorophene Chloroxylenol Lauramide DEA Phenethyl alcohol Phytantriol Resorcinol Sodium naphthalenesulfonate Stearylalkonium chloride TEA-Lauryl sulfate 40% solution Triisopropanolamine	Ethanol Butanol Ethyl-2-methyl acetoacetate Butyl Dipropasol Solvent Cyclopentanol 2-Methyl-1-pentanol Propasol Solvent P Butoxyethanol Hexylene glycol Methoxyisopropyl acetate Phenoxyethanol Propylene carbonate
	Negative (NC)	iso-Octyl acrylate tetra-Aminopyrimidine sulfate 2,4-Difluoronitrobenzene n,n-Dimethylguanidine sulfate 2-(n-Dodecylthio)ethanol iso-Octylthioglycolate 2,2-Dimethyl-3-pentanol Cetyl alcohol Diisopropyl adipate Oleyl alcohol PEG-40 stearate Sodium dehydroacetate Sodium stearate Sorbitan oleate Sorbitan sesquioleate Triacetin	iso-Propyl bromide Di-iso-butyl ketone 2,4-Pentanediol Potassium tetrafluoroborate 3-Methoxy-1,2-propanediol Toluene Butylene glycol Diethylhexyl adipate Ethylhexyl palmitate Isocetyl stearate Isopropyl myristate Isopropyl Palmitate Safflower (Carthamus tinctorius) oil Sesame (Sesamum indicum) oil Squalane Triethylene glycol

付表4 SIRC 細胞毒性試験研究における正確性（アルコール・エステル類を削除）

		<i>In vitro</i> ( Classification by SIRC-CVS assay)	
		Positive	Negative
<i>In vivo</i> (Classification by GHS)	Positive (1, 2Aor 2B)	Lactic acid Sodium dodecyl sulfate Diisopropanolamine Monoethanolamine Glycolic acid Chlorhexidine gluconate (20% solution) Potassium laurate Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate Acetic acid Cetyltrimethylammonium bromide Stearyltrimethylammonium chloride Domiphen bromide Ammonium nitrate 3-Chloropropionitrile 3,3-Dithiodipropionic acid Hexyl cinnamic aldehyde N-Lauroylsarcosine sodium salt 6-Methyl purine Triton X-100 2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol Benzalkonium chloride Benzophenone-1 Benzophenone-2 Cetrimonium chloride Chlorophene Chloroxyleneol Lauramide DEA Phytantriol Resorcinol Sodium naphthalenesulfonate Stearalkonium chloride TEA-Lauryl sulfate 40% solution Triisopropanolamine	Butyl Dipropasol Solvent Propasol Solvent P Hexylene glycol Propylene carbonate
	Negative (NC)	tetra-Aminopyrimidine sulfate 2,4-Difluoronitrobenzene n,n-Dimethylguanidine sulfate iso-Octylthioglycolate 2,2-Dimethyl-3-pentanol PEG-40 stearate Sodium dehydroacetate Sodium stearate Sorbitan oleate Sorbitan sesquioleate Triacetin	iso-Propyl bromide Di-iso-butyl ketone 2,4-Pentanediol Potassium tetrafluoroborate 3-Methoxy-1,2-propanediol Butylene glycol Safflower (Carthamus tinctorius) oil Sesame (Sesamum indicum) oil Squalane Triethylene glycol

付表 5 SIRC 細胞毒性試験における 2 回反復実験で得られた IC50 値および刺激性判定

物質	GHS 分類での評価	試行	IC 50 値 (mg/L)				
			施設 A	施設 B	施設 G	施設 H	施設 I
2-Ethylhexyl p-dimethylamino Benzoate	N	平均	381 (P)	1193 (P)	570 (P)	484 (P)	120 (P)
		1	284 (P)	1407 (P)	670 (P)	643 (P)	140 (P)
		2	478 (P)	979 (P)	470 (P)	325 (P)	100 (P)
Isopropyl Myristate	N	平均	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		1	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		2	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
Isotonic sodium chloride Solution	N	平均	10000<(N)	10000<(N)			
		1	10000<(N)	10000<(N)			
		2	10000<(N)	10000<(N)			
Silicic anhydride	N	平均	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		1	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		2	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
Polyethylene glycol 400	N	平均	6854.5 (N)	50000<(N)	47500 (N)	34500 (N)	40000 (N)
		1	6522 (N)	50000<(N)	48000 (N)	35000 (N)	40000 (N)
		2	7187 (N)	50000<(N)	47000 (N)	34000 (N)	40000 (N)
Glycerin	N	平均	12746 (N)	5347.5 (N)	5350 (N)	12500 (N)	27000 (N)
		1	10343 (N)	5579 (N)	4900 (N)	12100 (N)	32000 (N)
		2	15148 (N)	5116 (N)	5800 (N)	12900 (N)	22000 (N)
Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.)	N	平均	745 (P)	762 (P)	1075 (P)	710 (P)	1400 (P)
		1	660 (P)	757 (P)	1150 (P)	745 (P)	900 (P)
		2	830 (P)	767 (P)	1000 (P)	675 (P)	1900 (P)
Triethanolamine	N	平均	1440 (N)	1430 (N)	1750 (N)	1993 (N)	3850 (N)
		1	1580 (N)	1540 (N)	1850 (N)	1910 (N)	3200 (N)
		2	1300 (N)	1320 (N)	1650 (N)	2075 (N)	4500 (N)
Methyl p-hydroxybenzoate	N	平均	103 (P)	214 (P)	257 (P)	215.5 (P)	255 (P)
		1	140 (P)	238 (P)	275 (P)	235 (P)	220 (P)
		2	66 (P)	190 (P)	239 (P)	196 (P)	290 (P)
Sucrose fatty acid ester	P	平均	250 (P)	304 (P)	292.5 (P)	294.5 (P)	257.5 (P)
		1	240 (P)	301 (P)	290 (P)	300 (P)	255 (P)
		2	260 (P)	306 (P)	295 (P)	289 (P)	260 (P)
Benzyl alcohol	P	平均	1148 (P)	888.5 (P)	1485 (P)	830 (P)	1675 (P)
		1	1038 (P)	800 (P)	1700 (P)	810	1950 (P)
		2	1258 (P)	977 (P)	1270 (P)	850 (P)	1400 (P)
Ethanol	P	平均	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		1	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		2	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
Acid red 92	P	平均	230 (P)	231 (P)	340 (P)	268.5 (P)	380 (P)
		1	220 (P)	221 (P)	340 (P)	252 (P)	380 (P)
		2	240 (P)	241 (P)	340 (P)	285 (P)	380 (P)
Calcium thioglycolate	P	平均	300(P)	660(P)	287.5(P)	292.5(P)	
		1	250 (P)	622 (P)	245 (P)	265 (P)	
		2	350 (P)	698 (P)	330 (P)	320 (P)	
Sodium salicylate	P	平均	840 (P)	559 (P)	1195 (P)	635 (P)	1525 (P)
		1	770 (P)	579 (P)	790 (P)	365 (P)	1700 (P)
		2	910 (P)	539 (P)	1600 (P)	905 (P)	1350 (P)
Distearyldimethylammonium chloride	P	平均	18.5 (P)	43.8 (P)	57 (P)	32.1 (P)	39.7 (P)
		1	20.0 (P)	42.4 (P)	57 (P)	33.2	44.4 (P)
		2	17.0 (P)	45.3 (P)	57 (P)	31 (P)	35.0 (P)
Lactic acid	P	平均	994 (P)	982 (P)	1315 (P)	1285 (P)	1575 (P)
		1	917 (P)	992 (P)	1380 (P)	1240 (P)	1450 (P)
		2	1070 (P)	971 (P)	1250 (P)	1330 (P)	1700 (P)
Sodium dodecyl sulfate	P	平均	182 (P)	172 (P)			
		1	174 (P)	168 (P)			
		2	189 (P)	176 (P)			
Diisopropanolamine	P	平均	455 (P)	901 (P)	720 (P)	170 (P)	1250 (P)
		1	472 (P)	1040 (P)	820 (P)	170 (P)	1300 (P)
		2	437 (P)	761 (P)	620 (P)	170 (P)	1200 (P)
Monoethanolamine	P	平均	4.46 (P)	9.8 (P)	5.9 (P)	10.5 (P)	17.5 (P)
		1	4.33 (P)	9.6 (P)	7.2 (P)	9.6 (P)	17.5 (P)
		2	4.58 (P)	10.0 (P)	4.6 (P)	11.3 (P)	17.5 (P)
Glycolic acid	P	平均	914 (P)	682 (P)	890 (P)	778 (P)	1075 (P)
		1	938 (P)	558 (P)	880 (P)	820 (P)	1050 (P)
		2	889 (P)	806 (P)	900 (P)	735 (P)	1100 (P)
Sodium hydrogenated tallow L-glutamate	P	平均	143 (P)	118 (P)			
		1	142 (P)	115 (P)			
		2	143 (P)	120 (P)			
Chlorhexidine gluconate (20% solution)	P	平均	67.2 (P)	44.8 (P)	67.5 (P)	45.8 (P)	112.5 (P)
		1	60.9 (P)	46.3 (P)	78.0 (P)	26.0 (P)	115.0 (P)
		2	73.5 (P)	43.3 (P)	57.0 (P)	65.5 (P)	110.0 (P)
Butanol	P	平均	10000<(N)	4395 (N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		1	10000<(N)	5190 (N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
		2	10000<(N)	3600 (N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
Potassium laurate	P	平均	103 (P)	117 (P)	#	110 (P)	150 (P)
		1	107 (P)	123 (P)		100 (P)	155 (P)
		2	99 (P)	110 (P)		120 (P)	145 (P)
Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)	P	平均	26.7 (P)	38.0 (P)			
		1	25.1 (P)	42.7 (P)			
		2	28.3 (P)	33.2 (P)			
Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate	P	平均	210 (P)	182 (P)	181 (P)	156 (P)	175 (P)
		1	209 (P)	177 (P)	190 (P)	148 (P)	175 (P)
		2	211 (P)	186 (P)	172 (P)	163 (P)	175 (P)
Acetic acid	P	平均	681(P)	691 (P)	690 (P)	#	820 (P)
		1	671 (P)	652 (P)	700 (P)		850 (P)
		2	691 (P)	730 (P)	680 (P)		790 (P)

Cetyltrimethylammonium bromide	P	平均	2.95 (P)	3.21(P)	1.72 (P)	#	2.50 (P)
		1	1.96 (P)	3.31 (P)	1.28 (P)		2.10 (P)
		2	3.94 (P)	3.10 (P)	2.15 (P)		2.90 (P)
Benzalkonium chloride	P	平均	16.2 (P)	25.2 (P)			
		1	15.7 (P)	18.3 (P)			
		2	16.6 (P)	32.1 (P)			
Stearyltrimethylammonium chloride	P	平均	1.07 (P)	1.47 (P)	1.31 (P)	1.17 (P)	2.90 (P)
		1	1.42 (P)	1.25 (P)	1.42 (P)	0.98 (P)	2.80 (P)
		2	0.71 (P)	1.68 (P)	1.20 (P)	1.36 (P)	3.00 (P)
Cetylpyridinium chloride	P	平均	0.53 (P)	0.96 (P)	2.55 (P)	2.245 (P)	2.85 (P)
		1	0.59 (P)	0.95 (P)	1.8 (P)	2.6 (P)	2.3 (P)
		2	0.46 (P)	0.96 (P)	3.3 (P)	1.89 (P)	3.4 (P)
Domiphen bromide	P	平均	13.4 (P)	11.4 (P)	7.55 (P)	13.4 (P)	14.8 (P)
		1	12.10 (P)	10.8 (P)	7.70 (P)	12.9 (P)	13.0 (P)
		2	14.7 (P)	11.90 (P)	7.40 (P)	13.9 (P)	16.5 (P)

試行では2回試行の IC50 値およびその平均値を示す。

括弧内は刺激性判定結果 (P: 刺激性陽性、N: 刺激性陰性)

#: SOP からの逸脱があったため評価からは除外

付表 6 SIRC 細胞毒性試験における IC50 値の施設間比較

物質	GHS 分類で の評価	IC 50 値 (mg/L)					
		施設間の範囲	施設 A	施設 B	施設 G	施設 H	施設 I
2-Ethylhexyl p-dimethylamino Benzoate	N	120 - 1193	381 (P)	1193 (P)	570 (P)	484 (P)	120 (P)
Isopropyl Myristate	N	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
Silicic anhydride	N	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
Polyethylene glycol 400	N	34500 - 6854.5 (N)	6854.5 (N)	50000<(N)	47500 (N)	34500 (N)	40000 (N)
Glycerin	N	5347.5 - 27000 (N)	12746 (N)	5347.5 (N)	5350 (N)	12500 (N)	27000 (N)
Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.)	N	710 - 1400 (P)	745 (P)	762 (P)	1075 (P)	710 (P)	1400 (P)
Triethanolamine 3rd V	N	1430 - 3850 (N)	1440 (N)	1430 (N)	1750 (N)	1993 (N)	3850 (N)
Methyl p-hydroxybenzoate	N	103 - 257 (P)	103 (P)	214 (P)	257 (P)	215.5 (P)	255 (P)
Sucrose fatty acid ester	P	250 - 294.5 (P)	250 (P)	304 (P)	292.5 (P)	294.5 (P)	257.5 (P)
Benzyl alcohol	P	830 - 1675 (P)	1148 (P)	888.5 (P)	1485 (P)	830 (P)	1675 (P)
Ethanol 3rd V	P	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
Acid red 92	P	230 - 380 (P)	230 (P)	231 (P)	340 (P)	268.5 (P)	380 (P)
Calcium thioglycolate	P	287.5 - 660 (P)	300(P)	660(P)	287.5(P)	292.5(P)	-
Sodium salicylate	P	559 - 1525 (P)	840 (P)	559 (P)	1195 (P)	635 (P)	1525 (P)
Distearyldimethylammonium chloride	P	18.5 - 57 (P)	18.5 (P)	43.8 (P)	57 (P)	32.1 (P)	39.7 (P)
Lactic acid 3rd V	P	982 - 1575 (P)	994 (P)	982 (P)	1315 (P)	1285 (P)	1575 (P)
Diisopropanolamine 3rd V	P	170 - 1250 (P)	455 (P)	901 (P)	720 (P)	170 (P)	1250 (P)
Monoethanolamine 3rd V	P	4.46 - 17.5 (P)	4.46 (P)	9.8 (P)	5.9 (P)	10.5 (P)	17.5 (P)
Glycolic acid 3rd V	P	682 - 1075 (P)	914 (P)	682 (P)	890 (P)	778 (P)	1075 (P)
Chlorhexidine gluconate 3rd V (20% solution)	P	44.8 - 112.5 (P)	67.2 (P)	44.8 (P)	67.5 (P)	45.8 (P)	112.5 (P)
Butanol	P	4395 - 10000<(N)	10000<(N)	4395 (N)	10000<(N)	10000<(N)	10000<(N)
Potassium laurate 3rd V	P	103 - 150 (P)	103 (P)	117 (P)	#	110 (P)	150 (P)
Di (2-ethylhexyl) sodium 3rd V sulfosuccinate	P	156 - 210 (P)	210 (P)	182 (P)	181 (P)	156 (P)	175 (P)
Acetic acid 3rd V	P	681 - 820 (P)	681(P)	691 (P)	690 (P)	#	820 (P)
Cetyltrimethylammonium 3rd V bromide	P	1.72 - 3.21 (P)	2.95 (P)	3.21(P)	1.72 (P)	#	2.50 (P)
Stearyltrimethylammonium 3rd V chloride	P	1.07 - 2.90 (P)	1.07 (P)	1.47 (P)	1.31 (P)	1.17 (P)	2.90 (P)
Cetylpyridinium chloride 3rd V	P	0.53 - 2.85 (P)	0.53 (P)	0.96 (P)	2.55 (P)	2.245 (P)	2.85 (P)
Domiphen bromide 3rd V	P	7.55 - 14.8 (P)	13.4 (P)	11.4 (P)	7.55 (P)	13.4 (P)	14.8 (P)

括弧内は刺激性判定結果 (P: 刺激性陽性、N: 刺激性陰性)

#: SOP からの逸脱があったため、評価からは除外

3rd V: 第三次バリデーションのデータ