

ドレイズ試験代替法の開発 — ヒト細胞、昆虫細胞を用いた高感度迅速試験法の開発研究

理化学研究所
大 野 忠 夫

As a partial alternative to the Draize eye irritation test for detergents which are used in shampoos or rinses and general chemicals which have been known toxic to human, we developed a sensitive assay protocol for measuring release of lactate dehydrogenase (LDH) activity into the medium from cultured human cells. Results suggest that some commonly used detergents have relatively high cytotoxicity at low concentrations than the cytotoxicity assumed from their ED₅₀. This method was applied to commercial eye drops. We found that 8 of 9 eye drops tested were apparently cytotoxic to human cells because of undescribed component. One of these eye drops stimulated LDH release into tears 10 second after application to human eyes.

Insect cell lines, instead of human cells, were tested their sensitivity to anti-tumor drugs. Although some of the cells showed high sensitivity to the drugs, patterns of the sensitivities to the drugs were different from those of human cell lines.

1. 緒 言

現在、化粧品、シャンプー、リンス等、体表に適用する化成品の毒性・安全性試験は、ウサギ眼・皮膚に当該品を直接投与し、生じた炎症反応を指標にして経時的に観察、評価点を与えていくというドレイズ試験法によって行われている。この方法は、ヒト眼・皮膚の代替としてウサギを使用するものであるが、刺激性の評価には客観性に難があり高度の熟練を要する。しかも、障害の多くは非可逆性のため、ウサギの繰り返し使用はできない^{1,2)}。このため、多種多様な化成品を対象に行わなければならない毒性・安全性試験法としては、迅速性、経済性にも問題がある。

衆知のように、欧米における熾烈な動物実験反対運動はわが国にも波及してきており動物実験の廃止を求める会などの団体が結成されている。ウ

サギ眼に対するドレイズ試験法は残虐性が高いため、動物愛護の立場からは国際的にも最大の攻撃目標になっている。

ドレイズ試験法の本質をなすものは細胞に対する試験物質の障害性である。本研究は、in vitro 細胞培養法を応用し、ドレイズ試験法の欠点である客観性、迅速性、経済性、残虐性を大幅に改善した試験法を開発することを目的とし、2年間の計画で実施したものである。

2. ヒト細胞からの遊離酵素を指標にした シャンプー、リンスに利用される界面 活性剤の安全性試験法の開発

2.1 はじめに

安全性試験法のなかで、培養細胞を利用する場合、その指標のとりかたにもいろいろあるが、特

An Alternative Method to the Draize Eye Irritation Test – Development of Highly Sensitive Test Methods with Human and Insect Cell Lines

Tadao Ohno

定の代謝反応をねらわず、できるだけ広く一般的な毒性を知ろうとする場合、現在では、細胞の生死、増殖性を指標にするのが、最も単純で、大量かつ迅速な検体処理に適する。さらに、細胞から遊離されてくる酵素活性を指標とする方法により、極めて低濃度の界面活性剤のヒト細胞膜破壊の程度が実測できる。これを多種類の界面活性剤に適用し、スクリーニング方法としての実用性、限界、ドレイズ試験法との平行性などを綿密に測定することとした。

Anuforoら³⁾は、tetracyclin処理で遊離されてくる細胞内酵素活性は対照に対する相対量でASAL (arginosuccinate lyase) > LDH (lactate dehydrogenase) > GPT (glutamate pyruvate transaminase) > GOT (glutamate oxaloacetate transaminase) > AP (alkaline phosphatase)の順であったと報告している。我々は細胞質にあって、測定しやすく相対的に安定なLDHを指標とした。臨床検査用に市販されている血清LDH活性測定用キットを利用すればLDH活性測定は極めて単純である。LDHは、ASALやGPTに比べて、どの細胞でも一般に活性が高く測定しやすい酵素である。細胞の前培養さえできていれば、検体処理、培養上清分離、LDH測定の自動化も容易である。

2.2 実験

我々は主にヒト肺癌細胞SQ-5を使用した。またヒト正常2倍体線維芽細胞NB1RGBを含め他のヒト細胞についても検討した。培養用培地はMEMに10%ウシ胎児血清(FBS)を添加したものである。96穴培養プレートに1000cells/well播種し、0.1mlの培地で3日間培養後、PBSで洗浄し試験に供した。試験の対象とした界面活性剤は表1に示した。添加後、20分間室温でインキュベートし培養上清に漏出したLDH活性を測定した。その後0.3%の界面活性剤C(表1)を加えて細胞も含めて溶解し測定した全LDH活性を100%とし、細胞毒性を%で表示した。

昆虫細胞の場合は昆虫細胞用培地を使用した。他の条件はヒト細胞とほとんど同じである。

LDH活性測定には臨床検査用LDH測定キットを使用した。

2.3 結果

表1にあげた界面活性剤についてヒト細胞を使用した結果はToxicology in Vitro誌に発表した⁴⁾。簡略に述べると、表1に示した界面活性剤C, D, Iについて、低用量領域で詳細に検討したところ、界面活性剤CのED₅₀は0.023%, Dでは0.032%, Iでは0.020%で、相対的に言えば、DはC, Iよりも安全性が高く、CとIはほとんど同じと推定された。

しかし、CとIの用量反応曲線は途中でクロスしていたためわずか1%の細胞死を引き起こす用量ED₁を比較すると、Cでは0.0091%, Iでは0.015%となり、ED₅₀で見られていたCとIの関係とは異なり、低用量領域ではIに比較してCの毒性がより強く残存していることが判明した。ED₅₀でははっきり差があるDとIのED₁は、同一であった。

Watanabeらによるドレイズ試験法の結果計算されたドレイズスコア20を与える用量(w/v%)で表示したDS₂₀値⁵⁾と、計算されたED₅₀の相関関係をみたところ、被験物質がわずか10検体で

表1 試験対象界面活性剤

Chemical	Abbreviation
Nonionic detergents	
Polyoxyethylene (10) nonyl phenyl ether	B
Polyoxyethylene (9) lauryl ether	F
Polyoxyethylene (10) lauric acid	I
Anionic detergents	
α-olefinic sodium sulfonate	A
Polyoxyethylene (2) laurylether sodium sulfonate	J
Cationic detergents	
Alkyl benzyl dimethyl ammonium chloride	G
Pentaetoxy stearyl ammonium chloride	H
Stearyl trimethyl ammonium chloride	K
Amphoteric detergents	
Lauryl dimethyl methyl amino betaine acetate	C
Alkyl imidazolin	D

あるにもかかわらず、高い相関関係が観察された(図1)。

2.4 考 察

現在では多くの酵素活性の測定が高感度で可能なため、細胞内酵素を測定する方法は、比較的少数の細胞があれば試験可能であり、試験系全体を高感度化しやすい利点をもっている。酵素の高い基質特異性を利用すれば、特定の代謝反応をねらい打ちにした毒性試験系の設計も可能であるが、大量迅速処理を旨とする動物実験代替法の立場からは、そのような場合はむしろ精製酵素による生化学的検査法が有利となり、一般毒性試験の目的から離れてくる。

細胞の生死をマーカーとする毒性試験の観点から見ると、特に遊離酵素測定法は、死細胞を直接測定できるというMTT法⁶⁾やneutral red法⁷⁾にない特徴を持ち、試験対象物質の低濃度領域における直接的な細胞傷害活性が正確に測定可能である。細胞内残存酵素量を同時に測定できれば、生存細胞数の測定も同時に可能となる。

本研究により、一部の界面活性剤は、弱い細胞毒性を示す用量領域(ED₁領域)で、それらのED₅₀値の順から期待されるよりも、相対的に見て強い細胞毒性が残存していることが判明した。

- しかし、酵素測定法も、
- 1) 確実に死んだ細胞を測定できる反面、細胞膜破壊が起こらなければ酵素は遊離してこないため、膜破壊以前の状態で死んでいる細胞は測定できない、
 - 2) 酵素の種類によっては細胞内でも不安定なものがあり、細胞のわずかな生理状態の変動に大きく影響されやすい、
 - 3) 酵素自体に直接作用する化合物は、細胞毒性試験が容易ではなく、複雑な補正計算を必要とする、等の問題点をもっている。

本法ではLDHを選択したため、上記2)の点は避けられるものの、汎用されている界面活性剤であるsodium dodecyl sulfateはLDH活性を直接阻害するため、本法を適用するためには、直接阻害が起きない低用量領域をあらかじめ選択しておく必要がある。

3. 昆虫細胞株を指標にした制癌剤の迅速細胞毒性試験法の開発

前項で開発した安全性試験法を、界面活性剤のみならず、一般的な化学合成品に適用できるか否か、特に制癌剤を対象にして検討した。また、細胞としてはヒト細胞に比べ、培養がはるかに容易で、炭酸ガスインキュベーターを必要とせず、室温で増殖する昆虫細胞株を対象とし、制癌剤に対しヒト細胞と同等な反応を示すものを探索した。表2にその結果をまとめたものを示す。

この結果は、ヒト子宮頸部癌細胞株であるHeLa細胞に比べ、各種昆虫細胞株の制癌剤に反応するパターンは異なり、これらの細胞株をうまく組み合わせればヒト細胞株と同様の結果が得られるが、組み合わせの分だけ試験回数が増え、ヒト細胞を用いる場合に比べ、必ずしも有利な試験

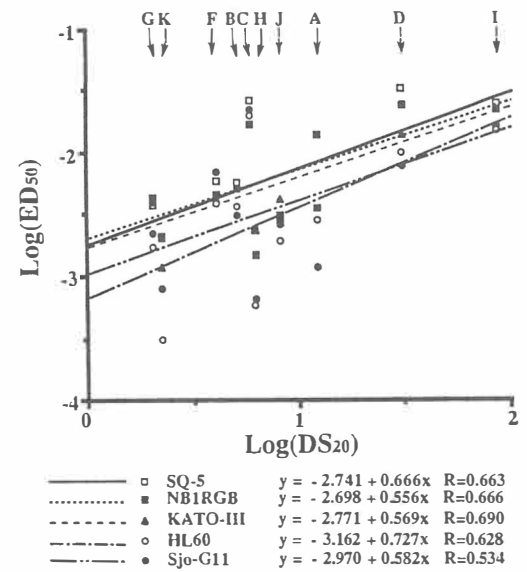


図1 In vivo ドレイズ試験法によるデータと in vitro 安全性試験法(LDH法)との相関関係

表 2 各種制癌剤の昆虫細胞に及ぼす影響。

表の最上段は細胞名、左側カラムは薬剤名である。NIH-SaPe-4からBM-Nまでは各種昆虫細胞株名、HeLa S3, Y79, HL60はヒト癌細胞株、FM3Aはマウス癌細胞株。数値は3日間培養時の各薬剤の最小増殖阻害濃度(μg/ml)を表す。

	NIH-SaPe-4 (RCB280)	NIAS-PX-58 (RCB556)	NIAS-PX-64 (RCB412)	SES-BoHo-15A (RCB430)	BM-N (RCB457)	HeLa S3 (RCB271)	Y79 (RCB427)	HL60	FM3A (RCB086)
cyclophosphamide	10000	10000	10000	5000	5000	5000	10000	2500	5000
carboquone	25	25	25	12.5	12.5	0.78	6.3	0.78	3.1
TESPA *	500	250	250	250	250	10	40	1.25	40
methotrexate	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000
diethylstilbestrol	>25000	391	25000	98	<12	78	78	20	39
5-fluorouracil	1600	100	200	400	100	98	200	24	1600
tegafur	2500	625	5000	1250	625	5000	10000	5000	5000
ancitabin	10000	>10000	>10000	10000	10000	5000	5000	<4.9	9.8
bleomycin	125	125	250	250	62.5	125	500	2.0	62.5
mitomycin C	12.5	100	200	200	100	3.1	3.1	0.20	6.3
neocarzinostacin	0.78	25	>200	12.5	6.3	0.63	10	0.31	20
daunomycin	0.39	6.3	25	100	6.3	0.31	0.63	<0.02	2.5
adriamycin	0.78	1.6	12.5	200	6.3	0.125	8.0	0.016	>8.0
actinomycin D	<0.002	0.0039	0.063	0.063	0.031	<0.002	0.0039	<0.002	1.0
chromomycin A3	<0.002	<0.002	0.0039	0.031	0.063	<0.002	0.0039	0.0039	2.0
* triethylenethiophosphoramide									

法とならないことを示している。

4. 市販目薬の安全性試験

4.1 はじめに

本研究で開発した遊離LDH活性測定法(以下、LDH法と略称する)は、前述したようにneutral red法やMTT法に比較して高感度であり、わずかの量の細胞破壊が被験物質によって起こっても検出可能である。

この高感度という特性によって、実際に人間に適用されており実用化していて、しかもすべての人が安全であると信じている(はずの)製品が本当に細胞破壊を引き起こさないか、我々は市販の目薬を対象にLDH法を適用してみた⁷⁾。

市販目薬を対象とした理由は、

- 1) 目薬に含まれている成分はすべてドレイズ試験を適用された物質のほずであり、
- 2) ヒトの眼に直接適用するため、最終製品としてもドレイズ試験を通過しているはずであり、
- 3) 安全性は保証されていなければならない(少なくとも期待される成分の薬用効果に比べ非

特異的毒性はないはずの低濃度にしてある)はずで、

- 4) LDH活性は涙中でも測定できるため、もし、何らかの細胞毒性が発見されたら、in vivoに目薬を適用してその毒性を検証できる可能性がある、からである。

4.2 実験

方法は前述の2.の場合と同様である。目薬としては、市販品9品目をランダムに選び、スーパーマーケット内の薬店で購入した。これをそのままPBSで希釈し、検体とした。

4.3 結果

市販目薬の能書に記載されていた有効成分は表3のとおりである。

3種のヒト癌細胞株を標的細胞にしてLDH法を適用した結果を表4にまとめた。試験した9種の目薬のうち、7種までが明かな細胞毒性を示し、1種(TG)はHL60細胞にのみ細胞毒性を示した。

そこで、目薬の成分のうち毒性を示すものを検

表3 市販目薬の能書に記載されていた有効成分

Eye Drops (abbreviation)	PV	RN	RP	RS	SN	TA	TE	TG	TM
Lot No.	16727	0040	021	11771	NU391	12052	031B1	011B1	A053
Maker Code	A	B	B	C	D	E	F	F	G
Reported content (mg/ml)									
Panthenol	0	1	0	0	0	0	0	0	0
L-Asparatic acid potassium salt	0	10	10	0	3.5	10	5	0	0
Glycyrrhizic acid potassium salt	0	1	0	1	1	0	0.5	0.5	0
Naphazoline hydrochloride	0	0.03	0.03	0	0	0.03	0	0	0.02
Neostigmine methyl sulfate	0	0.05	0.05	0.02	0.02	0.03	0.02	0	0
Chlorpheniramine maleate	0	0.1	0	0	0.1	0.3	0.2	0.2	0.3
Aminoethanesulfonic acid	0	0	10	0	1	0	5	5	5
Sodium chondroitin sulfate	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Allantoin	0	0	0	1	0	0	1	0	1
Zinc sulfate	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Tetrahydrozoline hydrochloride	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0
Lysozyme	0	0	0	0	0	5	0	0	0
Flavine-adenine dinucleotide	0	0	0.5	0	0	0	0	0.5	0
Pyridoxine	0	0.5	1	1	1	0	1	1	0
Cyanocobalamin	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0

出すため、能書にしたがって各成分をPBSに溶解した再構成目薬を作成し、LDH法にかけたところ、すべての再構成目薬は全く細胞毒性を示さなかった。したがって、細胞毒性を示す成分は能書に記載されていないものであることが判明した。

4.4 考 察

市販目薬は我国では百種以上が販売されているといわれており、それぞれの最終製品の毒性試験結果は公表されていない。目薬に添加できる各成分についての毒性はドレイズ試験法で調べられているはずで(現時点で筆者らにこのデータは入手できていない)、それに十分な安全率を掛けた濃度で添加されているはずだからである。すなわち、目薬は全く安全である(に違いない)という信念に基づいて広く市販されていると筆者らも考えていた。

しかしながら、これらのうちわずか9種を調べたにもかかわらず、その8種までが細胞毒性があり、明らかに毒性がないのはわずか1種にすぎないという結果は驚きであった(表4)。

確かに、培養細胞を用いた我々のLDH法は高

感度であり、それ故にin vitroでは毒性が検出できるが、その細胞毒性の程度はin vivo(つまりヒト裸眼)では問題にならない少なさなのかもしれない。

筆者らの試験では、調査した市販目薬のなかには、細胞に添加してわずか1分で明らかにLDHを遊離させるものがあり、それは実際にヒト裸眼に適用すると涙中のLDH活性を上昇させた(未

表4 3種のヒト癌細胞株に対する9種の市販目薬の細胞毒性

ASSAY	LDH		
CELL	SQ-5	HIL60	Sjo-G11
EYE DROPS	ED50(%)	ED50(%)	ED50(%)
PV	24.2 (23.0 ~ 25.4)*	6.4 (5.6 ~ 7.3)	8.1 (7.8 ~ 8.4)
RN	55.2 (51.4 ~ 59.3)	17.2 (13.6 ~ 20.9)	27.0 (24.8 ~ 30.5)
RP	65.5 (62.8 ~ 68.4)	24.5 (20.1 ~ 29.6)	30.2 (29.2 ~ 30.9)
RS	42.3 (38.1 ~ 46.5)	11.8 (7.8 ~ 16.3)	19.1 (15.6 ~ 23.1)
SN	52.2 (45.2 ~ 57.2)	31.2 (30.4 ~ 32.0)	36.5 (36.1 ~ 37.0)
TA	62.8 (55.6 ~ 72.2)	11.1 (8.3 ~ 14.0)	27.7 (25.1 ~ 30.5)
TE	38.8 (34.5 ~ 43.0)	8.8 (7.5 ~ 10.2)	18.1 (16.2 ~ 20.2)
TG	Undet. **	14.5 (8.1 ~ 20.1)	Undet.
TM	Undet.	Undet.	Undet.

ED50 values were determined from the dose-response curves shown in Fig. 2, Fig. 3a and b, and Fig. 4

*Figures in parentheses are confidence limits of the values shown on the line above.

** Undetectable

発表)。この結果からは、ヒト眼の外界に接する表層細胞の少なくとも一部は目薬の滴下によって破壊されると想定せざるを得ない。しかもそれを引き起こしている成分は、能書に公表されているいわゆる有効成分ではなく、未記載の(したがって従来は誰もその毒性を疑わない安全なはずの)成分だとしか考えられないのである。

5. 総 括

前項のように、わずかな種類の市販製品の細胞毒性を調べただけで一般論を述べるのは時期尚早かもしれないが、我々の得た試験結果は、従来の毒性試験法の考え方について一種のパラダイムの変更を求めているように思われる。

すなわち、少なくともドレイズ試験法を含む局所刺激性試験については、従来のように *in vivo* で調べた毒性試験結果(動物で毒性が発現するまで用量を増加させていって測定する)に十分な安全率を掛け、それによって最終製品を作成するという手順よりも、*in vitro* の試験法によって検出する最大無毒用量を求め、それを *in vivo* 局所刺激試験に適用し安全性を確かめた上で製品化するという、従来とは逆の方法を取るのである。こうすれば不幸にして *in vivo* で毒性が出た動物を除いて、ほとんどの動物は再使用に耐え得るはずであり、動物実験を大幅にセーブできるはずであ

る。

もちろん、製品の種類によっては、毒性があってもなおかつ有効性のメリットが大きいという有効性－毒性のバランスの問題があろう。しかし、目薬のような直接医療現場の制御下で使用されない汎用製品においては、最大無毒用量でなお有効な効果がないものならば、販売許可を出すべきではないのではなかろうか。

文 献

- 1) Marzulli F. N. and Ruggles, D. I.: J. Ass. off. Analt. Chem., 56: 905-914, 1973.
- 2) Weil C. S. and Scala, R. A.: Toxic. appl. Pharmac., 19: 276-360, 1971
- 3) Anuforo, D. C., Acosta, D. and Smith, R. V. In Vitro., 14: 981-988, 1978.
- 4) Sasaki, T., Kawai, K., Saijo-Kurita, K., and Ohno, T.: Toxicol. in Vitro, 6: 451-457, 1992.
- 5) Watanabe, M., Watanabe, K., Suzuki, K., Nikaido, O., Ishii, I., Konishi, H., Tanaka, N., and Sugahara, T.: Toxic. in Vitro, 3: 329-334, 1989.
- 6) Mosmann, T.: J. Immun. Meth. 65: 55-63, 1983.
- 7) Borenfreund, E. and Puerner, J. A.: Toxicol. Lett. 24: 119-124, 1985.
- 8) Sasaki, T. and Ohno, T.: in submission.