岡本裕子 神崎紀子 田中宣征

Studies of an *in vitro* Alternative Method
to the Draize Rabbit Eye Irritation Test——Comparison of Hemolysis of Erythrocytes and
Neutral Red Uptake in Culture Cell——

Yuuko Okamoto, Noriko Kanzaki, Nobuyuki Tanaka

Surface active agents (surfactants) were tested for hemolysis of rat erythrocytes and neutral red uptake using rabbit corneal cell (SIRC). The effects of hemolysis were manifested as the concentration of surfactants at 50% hemolysis of erythrocytes (HC-50 values). The effects of NR-uptake were manifested as the concentration of surfactants at 50% NR-uptake compared with untreated controls (NR-50 values). These results were compared with *in vivo* eye irritation score of surfactants obtained by Draize test.

Good correlations were seen between these inverse numbers of two results (HC-50 values and NR-50 values) and the Draize scores. The results suggest that both the hemolysis assay and the neutral red assay may be useful as an alternative to the Draize test as an *in vitro* method for detecting eye irritation.

1. 緒 言

動物を使って行われている毒性試験は、人に対する毒性を予測するために不可欠のものであるが、最近では、経済的あるいは倫理的な理由から、動物実験の在り方が問われる様になっており、*in vitro* の試験法への代替研究が、活発に行われる様になった。特に眼刺激性試験（ドレイズテスト）については、その代替が、内外の動物愛護団体から強く望まれている。われわれは、これまで生体膜のモデルとして赤血球を用い、界面活性剤の眼刺激性試験の代替の研究を行ってきた。また、他の代替法についても検討し、培養細胞を用いた代替法として、培養細胞のニュートラルレッド（NR）の取り込みを測定する方法¹⁾を検討し、溶血法との比較を試みた。さらに、一部、リポソームによるカルセインの放出率についても

比較したので報告する。

2. 実 験

2.1 試験試料

今回使用した界面活性剤を **Table-1** に示す。これらは、すべて化粧品原料として使用されているもので、%濃度（w/v）で使用した。各試料は、予備試験で、適当な濃度範囲を求め、その範囲内で試験を実施した。

2.2 各種界面活性剤の溶血性の測定

2.2.1 赤血球サスペンションの調製

Wistar 系ラット（300 g～350 g）をエーテル麻酔下、腹部大動脈から、ヘパリン処理した採血チューブを用いて採血し、3000r.p.m. で10分間遠心分離し、赤血球を得る。得られた赤血球は、生理食塩水で洗浄したのち、等張リン酸緩衝液（pH=7.4）で2%になる様に分散させ、赤血球サスペンションを作成する。

2.2.2 各種界面活性剤の50%溶血濃度（HC-50）の測定

（株）小林コーセー研究所：〒114 東京都北区柴町48-18
Research Laboratory, Kobayashi Kose Co., Ltd.:
48-18 Sakae-cho, Kita-ku, Tokyo 114 JAPAN

Table-1 Test materials

Sample No.	Surface active agents
	[cationic]
C A- 1	Stearyltrimethylammonium Chloride 63%
C A- 2	Behenyltrimethylammonium Chloride 80%
C A- 3	Coconutfatty acid L-argininethyl DL-pyrroridon Carboxylic acid
C A- 4	Cocoalkyltrimethylammonium Chloride 50%
C A- 5	Cetyltrimethylammonium Chloride 50%
C A- 6	Distearyldimethylammonium Chloride 75%
	[anionic]
A N- 1	Sodium Lauryl Sulfate
A N- 2	Sodium N-Lauroyl Sarcosinate
A N- 3	Triethanolamine N-acyl-L-glutamate
A N- 4	Sodium Hydrogenated Coconutfattyacidglyceryl Sulfate
A N- 5	P.O.E(12) Laurylether Phosphate
A N- 6	Sodium N-Lauroyl-L-glutamate
A N- 7	Triethanolamide Lauryl Sulfate
	[nonionic]
N O- 1	Lauric acid Diethanolamide
N O- 2	P.O.E(5) Coconutfatty acid Monoethanolamide
N O- 3	P.O.E(20) Hydrogenated Castor Oil
N O- 4	P.O.E(30) Hydrogenated Castor Oil
N O- 5	P.O.E(20) Sorbitan Monooleate I
N O- 6	P.O.E(4.2) Laurylether
N O- 7	Coconutfatty acid Diethanolamide
N O- 8	P.O.E(10) Nonylphenylether
N O- 9	P.O.E(10) Laurylether
N O-10	P.O.E(8) Laurylether
N O-11	P.O.E(20) Laurylether
N O-12	P.O.E(5) Laurylether
N O-13	P.O.E(15) Laurylether
N O-14	P.O.E(20) Sorbitan Monooleate II
N O-15	P.O.E(15) Stearylether
N O-16	P.O.E(15) Cetylether
N O-17	P.O.E(6) Laurylether
N O-18	P.O.E(15) Octylether
N O-19	P.O.E(15) Decylether
N O-20	P.O.E(30) Laurylether
N O-21	P.O.E(15) Myristylether
N O-22	P.O.E(10) Cetylether
	[amphoteric]
A M- 1	2-alkyl-N-carboxymethyl-N-hydroxyethyl Imidazolinium Betaine 40%
A M- 2	Coconutfatty acid amidepropyldimethylaminoacetic acid Betaine
A M- 3	Lauryl Dimethylaminoacetic acid Betaine 28.5%
A M- 4	Alkyldiaminoethylglycine Hydrochloride Solution 30%

試験試料は、等張リン酸緩衝液 (pH=7.4) で調製し、予め、予備試験を行い、赤血球が完全に溶血する濃度と全く溶血しない濃度の範囲を求め、その範囲をさらに10段階の濃度に分けて本試験を実施した。界面活性剤の溶血濃度の測定は、まず、界面活性剤の各濃度につき、2本ずつの試験管を用い、各試験管に2 ml ずつの赤血球サスペンションを取り、同量の界面活性剤溶液を注射器を用いて速やかに加え、32°C で30分間反応させ、赤血球を溶血させる。30分後、1500r.p.m. で10分間遠心分離し、未溶血の赤血球を沈殿させ、上清をリン酸緩衝液で5倍希釈し、その中のヘモグロビン量を545nmの波長で測定する。なお、ブランクとしては、界面活性剤の代わりにリン酸緩衝液を加えて同様に処理したものをを用いる。完全に溶血した時の界面活性剤濃度の吸光度を100とした時の各濃度の吸光度を比較し、各濃度の溶血%を

Table-2 SAA conc. of 50% hemolysis

No.	HC-50 (%)
CA-2	1.39×10^{-3}
CA-1	1.40
AN-1	2.60
NO-17	2.60
NO-12	2.70
NO-10	2.82
NO-9	3.40
CA-3	3.70
AN-4	4.70
NO-13	5.71
NO-2	6.20
NO-6	6.40
NO-11	7.75
NO-8	8.80
NO-1	9.20
NO-7	10.60
AN-7	11.36
AM-2	14.50
AN-5	16.50
AM-1	19.0
AM-2	25.0
NO-19	84.0
AN-3	95.0
AN-6	134.0
NO-14	175.0
NO-18	714.0
NO-3	3000<
NO-4	3000<

求める。縦軸に溶血%，横軸に濃度を取り、各濃度における溶血%をプロットし、溶血曲線を描く。グラフから、50%溶血に必要な界面活性剤濃度 HC-50 値を求める。

2.3 各種界面活性剤による培養細胞のニュートラルレッド取り込みへの影響の測定

2.3.1 材料及び培養法

〔使用細胞〕

細胞としては、樹立株細胞であるウサギ角膜細胞SIRC細胞 (ATCC より購入した。) を使用した。細胞は10%子牛血清を含むイーグル MEM 培地を用い、37°C, 5% CO₂ インキュベーターで培養した。

〔使用溶液及び試験〕

MEM(cs) : 10%子牛血清 (GIBCO, Lot, 32N0077)

含有イーグル MEM 培地 (日水製薬)

PBS⁻ : Ca, Mg, フリー等張リン酸緩衝液 (pH=7.4)

NR/MEM : 0.4%ニュートラルレッド (GIBCO) 水溶液を作成し、それを50μg/mlとなる様にMEM (血清なし) に加える。インキュベーター中に24時間保存したのち、1500r.p.m. で10分間遠心分離したものを使用する。(用時調製)

SAA/MEM : 各種界面活性剤は、10段階の濃度に

Table-3 SAA conc. of 50%NR uptake

No.	NR-50(%)	No.	NR-50(%)
CA-1	0.79×10^{-3}	AN-1	10.90×10^{-3}
CA-5	0.87	AN-2	11.90
CA-2	0.95	AN-5	13.50
CA-4	1.51	NO-2	14.0
AM-4	1.62	CA-3	20.70
NO-10	3.60	AN-4	29.0
NO-9	4.20	AM-3	32.50
NO-15	4.60	AN-7	35.40
NO-22	4.70	AM-2	60.0
NO-16	5.20	AM-1	61.20
NO-6	5.60	AN-6	116.0
NO-12	5.60	NO-5	148.0
NO-17	6.20	NO-18	184.0
NO-21	6.30	NO-14	189.0
CA-6	6.40	AN-3	224.0
NO-8	6.70	NO-3	229.0
NO-1	6.90	NO-4	250.0
NO-7	7.80	NO-19	306.0
NO-13	8.00	NO-20	322.0
NO-11	9.60		

MEM（血清なし）で調整する。濃度は予備試験で 1000mg/10ml 程度から希釈を始めて、適当な濃度範囲を決めて希釈する。

50%グルタルアルデヒド水溶液

1%酢酸—50%エタノール溶液

2.3.2 各種界面活性剤の 50% ニュートラル レッド (NR) 取り込み濃度 (NR-50) の測定

24穴のマイクロプレートに、10% MEM(cs) を 1.8ml ずつ分注し、トリプシン処理して作った SIRC 細胞サスペンション ($3 \sim 8 \times 10^5$ cells/MEM(cs)) を 0.2ml ずつ分注し、24時間培養する。24時間後、培養液を除去し、新しい培養液 1.8ml を分注し、さらに10段階に調製した、SAA/MEM を各濃度につき、0.2ml ずつ4穴に分注し、24時間培養する。（1試料についてプレートは、2枚使用。8穴は、コントロールとして SAA/MEM の代わりに MEM(cs) を加えて同様に処理する。）培養後、SAA/MEM を除去し、PBS⁻ で洗浄し、NR/MEM 2ml を加えて3時間培養し、NR を生存細胞内へ取り込ませる。3時間後、NR/MEM を除去し、PBS⁻ で1回洗浄し、5%グルタルアルデヒド溶液 1ml を加え、直ちに除去し、細胞の固定を行う。固定後、1%酢酸—50%エタノールを各穴 2ml ずつ加えて NR の抽出を行

う。（20分間）抽出した NR を 540nm の波長で吸光度を測定する。コントロールの NR の取り込みを100とした時の各濃度を比較し、NR の取り込み%を求める。縦軸に取り込み%、横軸に界面活性剤濃度を取り、グラフを描く。グラフから50% NR 取り込みの濃度 NR-50 値を求める。

3. 結果及び考察

3.1 50%溶血濃度 (HC-50) の測定結果

今回使用した各種界面活性剤の HC-50 値を Table-2 に示した。この値は、3回の実験の平均値とした。これによると、今回得られた HC-50 値は、0.00139~0.741 まで、かなり幅広いものであった。また、一般に溶血性が強いとされているカチオン系界面活性剤の値は、0.00139~0.0037 と、やはり低い値を示し、際立って強い溶血性を示した。ノニオン系界面活性剤は、溶血性が比較的低いとされているが、今回の結果では、界面活性剤によってかなりの差が認められた。また、溶血性の小さいものは、アニオンのアミノ酸系界面活性剤及びノニオンのソルビタン系界面活性剤であった。

3.2 50% NR 取り込み (NR-50) の測定結果

今回使用した界面活性剤の 50% NR 取り込み濃度

Table-4 Comparison of in vitro (HC-50, NR-50) and in vivo (D.S) test results

No.	D. S	HC-50(%)	NR-50(%)	No.	D. S	HC-50(%)	NR-50(%)
CA-5	70.0	$\times 10^{-3}$	0.87×10^{-3}	NO-16	8.8	$\times 10^{-3}$	5.20×10^{-3}
CA-1	67.0	1.40	0.79	NO-15	8.0		4.60
CA-2	64.0	1.39	0.95	NO-7	7.9	10.60	7.80
CA-4	62.0		1.51	NO-21	7.8		6.30
CA-3	30.2	3.70	20.70	NO-13	7.5	5.71	8.0
AM-4	24.4		1.62	AM-3	7.0		32.50
NO-10	24.1	2.82	3.60	AM-1	6.9	19.0	61.20
NO-1	20.3	9.20	6.90	AN-4	6.5	4.70	29.0
NO-8	20.3	8.80	6.70	AN-6	6.4	134.0	116.0
AN-7	19.3	11.36	35.40	NO-19	5.2	84.0	306.0
CA-6	19.0		6.40	AN-3	5.0	95.0	224.0
NO-2	19.0	6.20	14.0	AN-5	4.3	16.50	13.50
AN-1	18.8	2.60	10.90	NO-20	3.5		322.0
NO-17	17.6	2.60	6.20	NO-11	3.2	7.75	9.60
NO-12	16.6	2.70	5.60	NO-18	2.6	714.0	184.0
NO-6	13.3	6.40	5.60	NO-5	2.0		148.0
AN-2	12.8	25.0	11.90	NO-14	1.7	175.0	189.0
NO-9	12.5	3.40	4.20	NO-4	0.8	3000<	250.0
AM-2	12.0	14.50	60.0	NO-3	0.2	3000<	229.0
NO-22	11.4		4.70				

NR-50 値を **Table-3** に示した。これらは、各々3回の実験の平均値とした。これによると、今回得られた NR-50 値は、0.00079~0.322 と広範囲であり、界面活性剤による作用の強さにかなりの差があることが認められた。

界面活性剤種類でみると、NR-50 値は、カチオン系が最も小さく、細胞に対する作用が強いことがわかった。また、アニオンのアミノ酸系、両イオンのベタイン系、ノニオンのヒマシ油系、高級アルコールエーテル系では、

Fig.-1 Correlation between *in vitro* (HC-50) and *in vivo* (D.S) test results

Fig.-2 Correlation between *in vitro* (NR-50) and *in vivo* (D.S) test results

NR-50値は大きく、作用は小さいことがわかった。

3.3 *in vivo* の眼刺激性 (ドレイズスコア) と HC-50, NR-50 との相関

今回得られた界面活性剤の HC-50 値及び NR-50 値と, *in vivo* で得られた眼刺激性指数 (ドレイズスコア: D・S) の比較を **Table-4** に示した。眼刺激性試験は, Draize の試験方法に準じて行った。雌性日本白色家兔を 1 群 3 匹使用した。5% 界面活性剤溶液を 0.1ml, 家兔の片側の結膜嚢に投与し, もう片側を対照とした。ま

た, 試料投与後, 洗眼は行わなかった。Draize の評価法により, 個々の動物の反応 (角膜, 虹彩, 結膜) を経時的に判定した。評価は 3 匹の平均値とした。ドレイズスコアは, 3 日間の観察期間の合計評価点の取りうる最高点を 100 とした時の, 各界面活性剤の 3 日間の合計評価点の値で示した。**Fig.-1** に眼刺激性と溶血性の相関を示した。溶血性は, $1/\text{HC-50} \times 100$ で示した。また, **Fig.-2** に眼刺激性と NR 取り込みの相関を示した。NR 取り込みは, $1/\text{NR-50} \times 100$ で示した。これによると,

Fig.-3 Effect of Carbons number of Alkyl chain of P.O.E. (E.O. =15) Alkylether

D・S と HC-50 値の間には、相関性が認められた。 $(r=0.86)$ また、D・S と NR-50 値についても相関性が認められた。 $(r=0.91)$ 以上から、界面活性剤の眼刺激性の *in vitro* のスクリーニング法として、溶血法、NR 取り込み法は、ともに有効であることがわかった。

3.4 界面活性剤の構造による D・S, 溶血法, NR 取り込み法及びリポソームのカルセイン放出率の比較

眼刺激性と溶血性, NR 取り込みの関係についてさらに詳しく知るため、ノニオン界面活性剤 (P.O.E. アル

キルエーテル) について、アルキル鎖長と E.O 付加モル数の違いによる各値の変化について検討した。また、これとは別に、林らの方法⁷⁾ によって得られた、リポソームからのカルセイン放出率との比較も行った。

Fig.-3 は炭素鎖長の違いによる各値の変化を示したものである。(E.O 付加=15) これによると、作用の強さは、全般的に炭素鎖長が大きくなると増大しており、炭素鎖長は、 $C_8 \sim C_{18}$ の範囲においては、小さい方が毒性が小さいことがわかった。また、4つのグラフのパタ

Fig.-4 Effect of E.O.units number of P.O.E. Laurylether (C=12)

ーンをみると、*in vivo* の結果である D・S と、NR-50 は、パターンがよく類似しているが、HC-50 とリポソームについては、両者ともグラフの立ち上がり之急で、D・S のグラフとは少し異なるパターンを示した。

また、E・O 付加モル数の差による各値の変化を Fig. 4 に示した。(C=12) これによると、4 つの場合とも、E・O 付加モル数は、大きくなると作用は小さくなることがわかった。また、今回の E・O 付加 4～30 までの範囲においては、各グラフとも、C₇ 付近にピークが存在し、E・O 付加 30 付近では 4 つのグラフとも反応はほとんどなくなるという傾向がみられた。また、グラフのパターンは、4 つともかなり類似していることがわかった。

今回の結果から、4 つの方法を比較してみると、パターン等は 4 つとも類似しているが、反応の程度は、溶血法、リポソームの方が高く、界面活性剤の構造の変化に対する反応が大きく現われることがわかった。一方、D・S、NR 取り込み法の構造変化に対する反応は、あまり大きくなかった。これは、溶血法もリポソーム法も、実験系としては、赤血球、リポソームが一定の濃度で溶液中に分散している形であり、物理化学的に界面活性剤の作用を受けやすい形をとっているが、D・S、NR 取り込み法では、細胞は組織や層状の膜形成をしているため、界面活性剤の作用を受けにくいことや、細胞が生体としての機能を保持しているため、単純な膜損傷だけではない他の要素が含まれるためと考えられる。文献等によると、ノニオンの生体膜に対する作用は、アルキル鎖長が長い方が強く、E・O 付加モル数は、小さい方が作用が強いとされており、今回の 4 つの試験結果と一致する。したがって今回の 4 つの方法はすべて、生体膜に対する界面活性剤の作用という面からは共通であり、今回行った 3 つの方法で、*in vivo* の眼刺激性試験を代替するのは、膜損傷という点から、意味のあることと考える。

3.5 *in vivo* から *in vitro* 代替法への可能性と問題点

in vivo の反応である眼刺激性を代替するという点について、今回行った 3 つの方法を比較してみると、3 つとも、スクリーニング法としては、十分可能性があると考えるが、その中で、*in vivo* の反応に最も近いと思われるのは、NR 取り込み法であった。また、実験のしやすさ、代替に関する諸々の条件（コスト、試験期間）を考慮すると、最も簡便な方法は、溶血法である。また、生体から採取した成分を使用しないという本来の意味での、*in vitro* 代替法としては、やはりリポソーム法である。したがって、これら 3 つの方法は、場合によって使い分けることで、より、時間的にも、コスト的にも、また、倫理的にも、精度的にも有用な代替が可能であると考える。今回、これら 3 種の試験法による、界面活性剤の眼刺激性試験の代替の可能性が示唆されたが、今後は界面活性剤だけでなく、グリコール、脂溶性物質等への応用についてさらに検討する必要がある。

参考文献

- 1) 富沢, 近藤, 表面, Vol.9, No.6, p.321 (1971)
- 2) 富沢, 近藤, 表面, Vol.9, No.7, p.389 (1971)
- 3) 水上茂樹, “赤血球の生化学” (1977) 東京大学出版会
- 4) F.R.Bettley, Br.J. Dermatol. Vol.80, p.635 (1968)
- 5) 近藤他, 生化学, Vol.44, No.10, p.849 (1972)
- 6) E.Borenfreund and J.A.Puerner, Toxicology Lett., 24, p.125 (1985)
- 7) 林 忠信他, 第24回 SCCJ 研究討論会 (1988)
- 8) K.Hockley and D.Baxter, Fd chem.Toxic., Vol.24, No.67, p.473 (1986)

(平成 1 年 4 月 28 日受理)