

P1-029

## 試験法および細胞種の違いによる 細胞毒性試験結果の検討

渡辺美香<sup>1</sup>、小林美和子<sup>1</sup>、若栗忍<sup>1</sup>、佐々木澄志<sup>1</sup>、山影康次<sup>1</sup>、  
倉田信弘<sup>2</sup>、田中憲穂<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(財)食品薬品安全センター・秦野研究所、<sup>2</sup>ユニ・チャーム株式会社

Study of cytotoxicity test depending upon assay systems and cell strains applied  
Watanabe Mika<sup>1</sup>, Kobayashi Miwako<sup>1</sup>, Wakuri Shinobu<sup>1</sup>, Sasaki Kiyoshi<sup>1</sup>, Yamakage  
Koji<sup>1</sup>, Kurata Nobuhiro<sup>2</sup>, and Tanaka Noriho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, <sup>2</sup>Unicharm Corporation

### 【目的】

細胞毒性試験は代替法のみならず、物質の毒性を調べる簡便な方法として有用性が極めて高いバイオアッセイ法である。医療用具の安全性の分野では、わが国の安全性試験ガイドラインやISO10993などの国際標準に細胞毒性試験が取り込まれている。わが国のガイドラインでは抽出液による試験法：コロニー形成法およびサブコンフルエント法 (Elution 法)、間接接触法：寒天重層法、フィルター拡散法および直接接触法が示され、それぞれ感度、定量性等が異なることから、リスク評価のためのハザード検出に当たっては、感度が高く定量性のある方法を推奨している。細胞毒性試験は、数多くの試験法があり、どの試験法のデータを安全性評価に採用するかについては、国によって条件が異なっている。わが国で推奨されている方法と海外で実施されている方法に関して、試験法の原理や感度、定量性などを考慮して、安全性を比較評価する必要があることから、本研究では、種々の試験法、細胞種間で得られた結果の相違点などを明確にすることを目的とした。

### 【方法】

わが国で主に用いられている V79 細胞、BALB 3T3 細胞、L-929 細胞等の 3 種の株細胞と、ISO10993-5 に示す MRC-5 細胞を用いる事により、コロニー法、Elution 法、およびニュートラルレッド (NR) 法の 3 種の方法について、3 種の標準材料 (高密度ポリエチレンフィルム、0.1% ZDEC 含有ポリウレタンフィルム、0.25% ZDBC 含有ポリウレタンフィルム) と細胞毒性を有することが知られているラテックスを用いて検討した。また、各試験方法で良く用いられるそれぞれの細胞種について、わが国のガイドラインに記載の V79 細胞を用いるコロニー形成試験による直接接触法、USP<87>に記載の L-929 細胞を用いる Direct Contact 法および Agar Diffusion 法についてそれぞれのガイドラインに沿って試験した。

### 【結果と考察】

コロニー法においては、4 種の細胞株を用いた各種の試験条件、すなわち、M05 培地を用いる V79 細胞 (V79/M05)、ME10 培地を用いる V79 細胞

(V79/ME10)、L-929 細胞、BALB 3T3 細胞および MRC 細胞を用いて、RM-A、RM-B、ラテックス、および RM-C の 4 種の材料についての細胞毒性の比較検討を行った。

IC<sub>50</sub> 値でそれぞれの細胞毒性強度を比較したところ、RM-A については BALB 3T3 > L-929 > MRC-5 > V79、RM-B については V79 > BALB 3T3 > L-929 > MRC-5、ラテックスについては BALB 3T3 > L-929 > V79 > MRC-5 の順で感度が高かった。陰性材料である RM-C に対しては、いずれもコロニー形成阻害を示さなかった。細胞毒性試験として良く用いられている NR 法については、どの検体に対してもほぼ Elution 法と同程度の検出感度を示した。コロニー法と Elution 法の試験原理上の大きな違いは、コロニー法ではウエルあたり 100 個の細胞を播種し、1 個の細胞がクローン増殖する全過程にわたり、検体を暴露 (6 日以上) の培養全期間) するのに対して、Elution 法および NR 法では、ウエルあたり 10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> 個の細胞を播種し、細胞間接触が保たれた状態で検体に 24~48 時間暴露してその毒性を調べる。したがって、処理期間の差、細胞間接触の有無、細胞の増殖期と処理の時期の関係などにより、理論的にもコロニー法が薬物に対する毒性反応が高い結果となることが予測できる。実際、日本動物実験代替法学会で実施された、5 種の細胞毒性試験法のバリデーションスタディにおいても、コロニー法が最も感度が高いことが報告されている。

本研究では、それぞれの試験法による細胞毒性感度の違いと、同一試験法の中でも細胞種の違いによって毒性反応が異なるかを調べた。試験法については、わが国のガイドラインで推奨するコロニー法が感受性の点で優れる事が分った。しかしながら、抽出溶媒に血清含有の培地を用い、重量比 (コロニー法で 0.1 g/mL に対し、Elution 法で 0.2 g/mL) で抽出を行った場合の Elution 法や NR 法でも、コロニー法に遜色なく十分に検出可能である事が分った。試験に用いる細胞株については、同一試験法の中での細胞種による感度の違いは試験材料によって異なり、一定の法則は見られずガイドラインに記載されている細胞株で特に感受性の弱いと思われる細胞はなかった。