

最終報告書

MRA500(01,02)のV79細胞を用いる細胞毒性試験



財団法人

食品薬品安全センター

秦野研究所

HATANO RESEARCH INSTITUTE
FOOD AND DRUG SAFETY CENTER



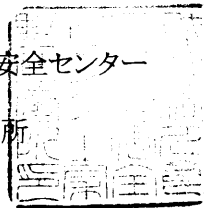
06-依-987
2007年4月12日

MRA500(01,02)のV79細胞を用いる細胞毒性試験

株式会社アメニティーズフォーユー 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所





表題 MRA500(01,02)のV79細胞を用いる細胞毒性試験

試験依頼書番号 06-依-987(2007年2月26日)

試験委託者 株式会社アメニティーズフォーユー
(岡山県玉野市後閑 1681-3)

試験番号 F-06-295

被験物質 MRA500(01,02)

試験項目 コロニー形成法による細胞毒性試験


試験開始日 2007年2月26日

試験終了日 2007年4月12日

資料保存場所 秦野研究所

保存期間 試験終了後5年間
その後の保存については委託者と協議する

試験施設 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
(神奈川県秦野市落合 729-5)

運営管理者 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
所長
小島幸  2007年4月12日

表題 MRA500(01,02)のV79細胞を用いる細胞毒性試験

試験責任者 渡辺美香(細胞毒性学研究室)

試験実施担当者

培養、処理、染色、コロニーカウント 渡辺美香

処理 浅田晋

被験物質管理 三枝克彦、加藤初美

この報告書は、表題の試験について、試験計画に従って確実に遂行されたものを正しく記載したものである。

2007年4月12日

試験責任者 渡辺美香



目次

要約	-----	1
試験目的	-----	1
試験ガイドライン	-----	1
材料と方法	-----	1
1. 被験物質	-----	1
2. 陽性対照物質	-----	1
3. 細胞	-----	2
4. 細胞毒性試験	-----	2
5. 陽性対照物質を用いた細胞毒性試験	-----	2
6. 評価	-----	2
試験成績および考察	-----	3
参考文献	-----	3
表	-----	4
図	-----	5

要約

MRA500(01,02)の細胞毒性作用を、0.0024~5.0 mg/mL の濃度範囲において検討した。その結果、MRA500(01,02)は、0.0098 mg/mL 以下の濃度群においてはV79細胞のコロニー形成を阻害しなかったが、0.020 mg/mL 以上の濃度群でコロニー形成を阻害した。IC₅₀ 値(コロニー形成を50%阻害する濃度)は0.013 mg/mL であった。

試験目的

本試験では、MRA500(01,02)の細胞毒性作用を調べるため、チャイニーズ・ハムスター肺由来のV79細胞を用いるコロニー形成試験を実施した¹⁻⁷⁾。

試験ガイドライン

本試験は、「医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について」(平成15年2月13日、医薬審発第0213001号)、「Biological Evaluation of Medical Devices - Part 1: Evaluation and Testing」(ISO 10993-1, August 1, 2003)、「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」(平成15年3月19日、医療機器審査No. 36)、「Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for *In Vitro* Cytotoxicity」(ISO 10993-5, May 15, 1999)に準拠して実施したものである。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質であるMRA500(01,02)(ロット番号:370101、加工年月日:2007年1月10日)は、白色粉末であり、株式会社アメニティーズフォーユーより提供を受け、使用時まで室温で保管した。

被験物質は、溶解性の予備検討の結果、水、ジメチルスルホキシド(DMSO)およびアセトンに溶解しなかったことから、カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC Na、ロット番号:WAP0390、和光純薬工業)の0.5 w/v%水溶液を媒体として用いた。

2. 陽性対照物質

細胞の感度および実験条件の精度を確認するため、zinc di-*n*-butyldithiocarbamate(ZDBC、ロット番号:WAJ1012、和光純薬工業)を陽性対照物質として用いた。陽性対照物質は、DMSO(ロット番号:EWG8265、和光純薬工業)に溶解して希釈した。

なお、陽性対照物質および陰性対照は同時に実施した他の試験と共用した。

3. 細胞

V79 細胞は JCRB 細胞バンクより 1988 年 9 月 2 日に入手した。入手した時点で 5 代のものを、さらに 14 代まで継代して凍結保存(マイコプラズマ陰性)した。これを解凍後 8 代で試験に用いた。培養は、ウシ胎児血清(ロット番号:24300133、Moregate)を 10 vol%含む Eagle's MEM 培地(MEM10 培地)を用い、CO₂ インキュベーター(CO₂ 濃度 5%、37°C)内で培養した。

試験には 6 ウェルプレート(ウェル直径:35 mm)を用いた。また、6 ウェルプレートの蓋および側面に処理条件を示す記号または数値を記して識別した。1 用量あたり 3 ウェル用いた。

4. 細胞毒性試験

被験物質は、最終処理濃度の最高濃度を 5.0 mg/mL(生理的限界用量)とし、公比 2 で 10 段階の処理群(最終処理濃度:0.0024、0.0049、0.0098、0.020、0.039、0.078、0.16、0.31、0.63、1.3、2.5、5.0 mg/mL)について試験を実施した。すなわち、培地に対する添加量が 10 vol%であることから、0.5 w/v% CMC Na 水溶液に被験物質を 50 mg/mL となるように懸濁して被験物質原液とし、これをさらに希釈して、0.024、0.049、0.098、0.20、0.39、0.78、1.6、3.1、6.3、13、25 および 50 mg/mL の濃度の試験液を用時調製し、試験に用いた。

V79 細胞を 0.25%トリプシンを用いて単離した後、細胞濃度 10³ 個/mL の懸濁液とし、この細胞懸濁液 0.1 mL(100 個)を 2 mL の ME10 培地の入っている 6 ウェルプレート(ウェル直径:35 mm)に分注した。播種翌日、ウェル内の培地を除き、新鮮な ME10 培地 1.8 mL を加えた後、CMC Na(陰性対照)および段階希釈した試験液を、それぞれ培地に 0.2 mL ずつ添加し(溶媒濃度 10 vol%)、CO₂ インキュベーター(CO₂ 濃度 5%、37°C)で 6 日間培養した。

培養終了後、培地を除き、メタノールで固定し、10 vol%ギムザ液で染色した。ウェルあたりのコロニー数(50 個以上の細胞からなるものを 1 個とした)を多目的高速画像解析装置(Model No.:PCA-11、システムサイエンス)で計測し、陰性対照群と比較して各処理群の相対コロニー形成率を算出し、IC₅₀ 値を求めた。また、コロニー形成能(陰性対照群のコロニー数/100)を算出した。

5. 陽性対照物質を用いた細胞毒性試験

前述の 4. 細胞毒性試験と同様の方法により V79 細胞を播種した。翌日、各ウェルより培地を除き、新鮮な MEM10 培地 2 mL を加えた後、最終処理濃度(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 µg/mL)の 200 倍になるように調製した ZDBC 溶液または DMSO(陰性対照)を 10 µL ずつ培地に添加し(溶媒濃度 0.5 vol%)、6 日間培養した。なお、これらの濃度は当研究所での背景データを基に設定した。以下、前述の 4. 細胞毒性試験と同様の方法により、陰性対照群に対する各処理群の相対コロニー形成率を算出し、IC₅₀ 値を求めた。

6. 評価

試験については、以下に記載した内容を満たしていることを確認した。

1)陰性対照群でのコロニー形成能が良好(0.8以上)であること、2)陽性対照物質(ZDBC)のIC₅₀値が1~5 µg/mLの範囲内であること。

試験成績および考察

MRA500(01,02)は、0.0098 mg/mL以下の濃度群においてはV79細胞のコロニー形成を阻害しなかったが、0.020 mg/mL以上の濃度群でコロニー形成を阻害し、IC₅₀値は0.013 mg/mLであった(表1、図1)。陰性対照群でのコロニー形成能は0.92であり、良好であった。

また、陽性対照物質を用いた試験では、ZDBCのIC₅₀値は、2.6 µg/mLであった(表2)。

陰性対照群におけるコロニー形成能および陽性対照物質を用いた試験で得られたIC₅₀値は、「評価」の項に示した基準を満たすものであったことから、本実験は被験物質の細胞毒性作用を適正に評価していると考えられた。

以上の結果から、今回の試験条件下において、MRA500(01,02)には、0.013 mg/mLの濃度でV79細胞のコロニー形成を50%阻害する細胞毒性作用があることが示された。

参考文献

- 1) 日本組織培養学会編:「細胞トキシコロジー試験法」, 朝倉書店, 東京(1991)
- 2) Sasaki, K., Tanaka, N., Watanabe, M., Yamada, M.: Comparison of cytotoxic effects of chemicals in four different cell types. *Toxicol. in Vitro* 5: 403-406 (1991)
- 3) Wakuri, S., Izumi, J., Sasaki, K., Tanaka, N., Ono, H.: Cytotoxicity study of 32 MEIC chemicals by colony formation and ATP assays. *Toxicol. in Vitro* 7: 517-521 (1993)
- 4) 佐々木澄志, 田中憲穂: 細胞毒性試験に影響を与える要因とコロニー形成阻害試験. *フレグランスジャーナル* 20: 34-40 (1992)
- 5) Nakamura, A., Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Kaniwa, M.-A., Sato, M., Toyoda, K., Takahashi, M.: Correlations among chemical constituents, cytotoxicities and tissue responses: in the case of natural rubber latex materials. *Biomaterials* 11: 92-94 (1990)
- 6) Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Hata, H., Toyoda, K., Takahashi, M., Uchima, T., Tanaka, N., Sasaki, K., Nakamura, A.: Comparative studies of the toxicity of standard reference materials in various cytotoxicity tests and *in vivo* implantation tests. *J. Appl. Biomater.* 4: 153-156 (1993)
- 7) Tsuchiya, T., Arai, T., Ohhashi, J., Imai, K., Kojima, H., Miyamoto, S., Hata, H., Ikarashi, Y., Toyoda, K., Takahashi, M., Nakamura, A.: Rabbit eye irritation caused by wearing toxic contact lenses and their cytotoxicities: *In vivo/in vitro* correlation study using standard reference materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 27: 885-893 (1993)

表 1 MRA500(01,02) の V79 細胞におけるコロニー形成試験の結果

物質名	濃度 (mg/mL)	コロニー ^a /ウェル					S.D.	相対コロニー 形成率 (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
		1	2	3	平均 ±				
CMC (陰性対照)	10 vol %	94	88	95	92.3 ±	3.8	100.0		
MRA500(01,02)	0.0024	87	83	83	84.3 ±	2.3	91.3		
	0.0048	91	86	77	84.7 ±	7.1	91.8		
	0.0098	83	81	77	80.3 ±	3.1	87.0		
	0.020	3	1	3	2.3 ±	1.2	2.5		
	0.039	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0		
	0.078	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0	0.013	
	0.16	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0		
	0.31	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0		
	0.63	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0		
	1.3	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0		
	2.5	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0		
	5.0	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0		

a: 多目的画像解析装置 (PCA-11) でのコロニー数計測は、測定するエリア、コロニーの大きさ、コロニー同士の密着度等の状態により設定された係数 (1.3) を乗じて得られた数値を、小数点第1位で四捨五入して整数で表記した。

表 2 陽性対照物質の V79 細胞におけるコロニー形成試験の結果

物質名	濃度 (µg/mL)	コロニー ^a /ウェル					S.D.	相対コロニー 形成率 (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
		1	2	3	平均 ±				
DMSO (陰性対照)	0.5 vol %	88	92	87	89.0 ±	2.6	100.0		
ZDBC (陽性対照物質)	1.0	82	86	90	86.0 ±	4.0	96.6		
	2.0	81	68	90	79.7 ±	11.1	89.6		
	3.0	21	23	27	23.7 ±	3.1	26.6	2.6	
	4.0	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0		
	5.0	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0		

a: 多目的画像解析装置 (PCA-11) でのコロニー数計測は、測定するエリア、コロニーの大きさ、コロニー同士の密着度等の状態により設定された係数 (1.3) を乗じて得られた数値を、小数点第1位で四捨五入して整数で表記した。

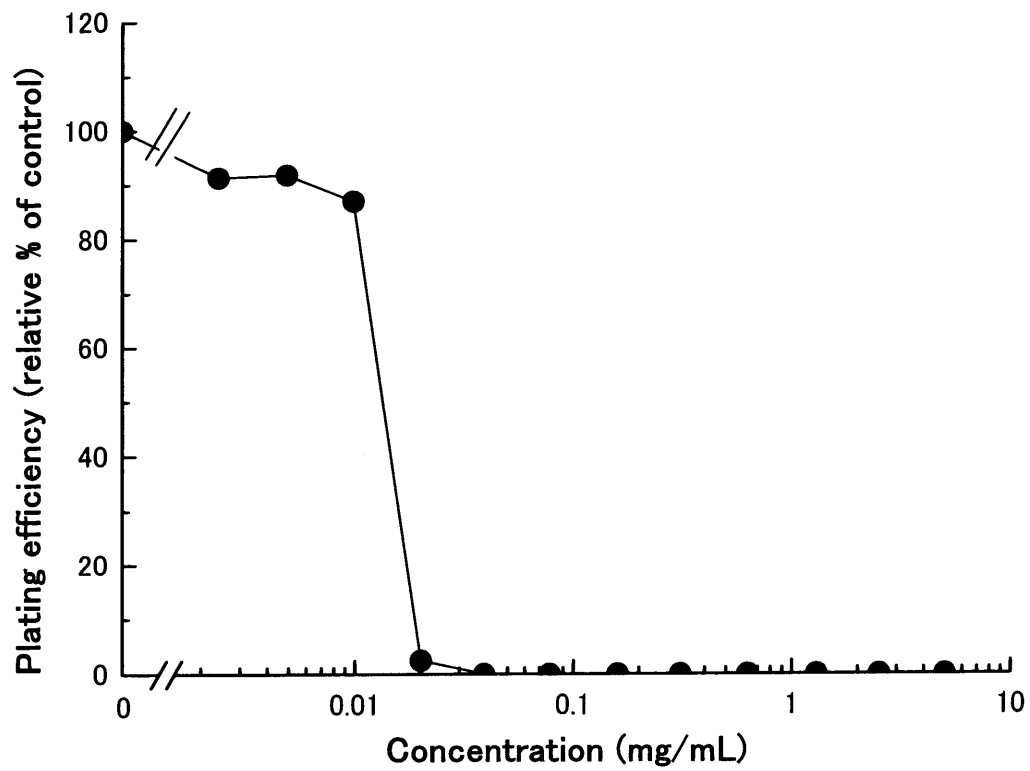


図1 MRA500(01,02)のV79細胞におけるコロニー形成率に対する影響

V79細胞をウェルに100個播種した。翌日、種々の濃度のMRA500(01,02)を添加し6日間培養を続けた後に、固定、染色してコロニー形成率を求めた。

財団法人 食品薬品安全センター
秦 野 研 究 所

〒251-8523 神奈川県秦野市落合729-5 TEL. 0463-82-4751