

SIRC-CVS 細胞毒性試験・プロトコール(Version 3.4)

2015年7月15日作成

〒224-8558 横浜市都筑区早渕 2-2-1

(株)資生堂 リサーチセンター

萩野 滋延

E-mail shigenobu.hagino@to.shiseido.co.jp

Protocol for SIRC-CVS cytotoxicity test (Version 3.3)

July 15, 2015.

Shigenobu Hagino, Ph.D.

Shiseido Research center

2-2-1, Hayabuchi, Tsuzuki-ku, Yokohama-shi, 224-8558, Japan

E-mail shigenobu.hagino@to.shiseido.co.jp

## 1. 目的

本試験は、SIRC 細胞を用いて化学物質の細胞毒性を測定し、ボトムアップ・アプローチ<sup>1)</sup>として眼に対する眼刺激性の無い物質 (NI) とそれ以外 (眼刺激性物質) を区別するために用いられる<sup>2,3)</sup>。評価のための *in vivo* の基準は、Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) の分類に基づく。

## 1. Purpose

This test method is used to measure cytotoxicity of chemicals using SIRC cell and to discriminate between non ocular irritant (NI) and ocular irritant (Others) as a bottom up approach<sup>1-3)</sup>. The *in vivo* standard for the assessment is based on the classification of the Globally Harmonized System of Classification.

## 2. 試験法の原理

細胞毒性は化学物質による眼刺激性を評価する指標として知られている<sup>4)</sup>。それは、眼の刺激の全体に対して大きな影響力のある角膜障害が、角膜上皮細胞の障害と関連しているからである。細胞毒性試験は、角膜に影響がほとんど無い無刺激性物質を同定するために有用であると報告されている。用いる細胞はウサギの角膜由来の細胞である。適用時間の72時間は、以前の研究の *in vivo* データに基づき、化学物質 (酸とアルカリを除く) の点眼から最大の眼刺激が認められるまでの時間 (72 時間以内) を考慮して設定された<sup>9)</sup>。

SIRC 細胞毒性試験は、細胞膜を透過し生体高分子を染色する Crystal violet により染色された生細胞の測定に基づいている。Crystal violet 染色法は多くの細胞に適用でき、得られる結果も比較的安定しているため、細胞毒性の簡易試験法として用いられている<sup>5-9)</sup>。更に、安定した試験結果を得るために比較対照を用いている<sup>10,11)</sup>。また、操作が簡便で、試験済みマイクロプレートの保管が可能である。結果は、保管されたマイクロプレートを用いて確認できる。これらのことは本試験

法の優位性を示すものである。

一方、本試験法の欠点は被験物質が培地に溶解または均一に懸濁する物質に限定されることである。

## 2. The principle of SIRC cytotoxicity test

The cytotoxicity has been known as an index for evaluating the eye irritation by chemicals, as the corneal damage that has a greater impact on the total eye irritation is related to that of the corneal epithelium cell<sup>4)</sup>. The cytotoxicity test is reported to be useful for identifying the non ocular irritants that has almost no effect on the cornea. The cell line used comes from rabbit cornea. The application time of 72hr is set with consideration of time (within 72hr) from ocular instillation to maximal eye irritation for general chemicals except acid or alkali, on the basis of *in vivo* data at the previous research project<sup>5)</sup>.

The SIRC cytotoxicity test is based on the measurement of viable cells stained by crystal violet, which penetrates via cell membrane and stains biological macromolecules. The crystal violet staining method can be used for many cultured cells and can produce the relatively invariable results<sup>5-9)</sup>. The relative control is additionally used to obtain the invariable results<sup>10,11)</sup>. Moreover, the operation is simple and easy, and the tested microplate can be stored. The results can be confirmed by using the stored microplates in any time. No other method can match it.

On the other hand, the disadvantage of this method is to be confined to test substances which are solved or uniformly suspended in the medium.

## 3. 材料

### 3.1. 細胞

ウサギ角膜由来の株化細胞である SIRC 細胞 (Statens Seruminstitut rabbit corneal cell: ATCC No. CCL-60) は ATCC (American Type Culture Collection) より入手する。細胞は液体窒素中で凍結保存することができる。細胞はマイコプラズマ汚染がないことを確認する (例 Venor GeM Mycoplasma Detection Kit, Minerva Biolabs GmbH, 11-1025)。細胞は、培養を開始して 3 ヶ月以内に使用する (例 435 代で培養を開始し、3 日に 1 回の継代を行った場合、470 代まで使用する)。それらの細胞は 4.7 の品質基準でチェックされる。

## 3. Materials

### 3.1. Cell

The SIRC cell (Statens Seruminstitut rabbit corneal cell: ATCC NO. CCL-60), the cell line from the rabbit cornea is obtained from ATCC (American Type Culture Collection). The cells can be frozen and kept in liquid nitrogen. The cells should be confirmed the absence of mycoplasma (e.g., Venor GeM Mycoplasma Detection Kit, Minerva Biolabs GmbH, 11-1025). The cells should be used during 3 months after the start of cultivation (e.g. When the cell culture starts at passage number of 435 and is maintained by passage every four days, it

should be used within passage number of 470). They should be checked on the basis of the quality control of 4.7.

### 3.2.材料(機材)

- ・炭酸ガスインキュベーター(例 三洋電機バイオメディカ(株)製 MCO-17AIC)
- ・クリーンベンチ(例 日立製 CCV1300E)
- ・マイクロプレートリーダー(例 バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)製 Benchmark Plus™)
- ・位相差顕微鏡(例 Nikon 製 ECLIPSE TS100)
- ・オートクレーブ(例 TOMY 製 BS-325 および SS-320)
- ・低速冷却遠心機(例 KUBOTA 製 5800)
- ・水浴
- ・電子天秤
- ・超音波洗浄器
- ・ボルテックスミキサー
- ・マグネチックスターラー
- ・血球計算盤 (例 エルマ販売株式会社、03-303-5) またはセルカウンター

### 3.2.Technical Equipment

- ・CO<sub>2</sub> Incubator (e.g., SANYO Electric Co., Ltd., MCO-17AIC)
- ・Clean bench (e.g., Hitachi, Ltd., CCV1300E)
- ・Microplate reader (e.g., Bio-Rad Laboratories, Benchmark Plus™)
- ・Inverse phase contrast microscope (e.g., Nikon, ECLIPSE TS100)
- ・Autoclave (e.g., TOMY SEIKO CO.,LTD, BS-325 and SS-320)
- ・Centrifuge (e.g., Kubota Corporation, 5800)
- ・Water bath
- ・Electronic chemical balance
- ・Ultrasonic bath sonicator
- ・Vortex mixer
- ・Magnetic stirrer
- ・Hemocytometer (e.g. ERMA INC, 03-303-5) or Cell counter

### 3.3.材料(器具)

- ・培養用プラスチックフラスコ(培養面積:75 cm<sup>2</sup>または175 cm<sup>2</sup>)(例 BD Falcon 353136 and 353112)
- ・96 ウェルマイクロプレート (例 BD Falcon、353072)
- ・ストレージプレート (例 Thermo Scientific、0.8 mL ストレージプレート、AB-0765)
- ・マルチチャンネルピペットおよびマイクロピペット

- ・デispensサートレイ
- ・チューブ
- ・細胞凍結用保存チューブ (1.5 mL)
- ・遠心管 (15 mL、50 mL)
- ・マイクロピペット用チップ (200  $\mu$ L、1,000  $\mu$ L、5 mL)
- ・マイクロプレートシーリングテープ
- ・紙タオル (例 日本製紙クレシア株式会社、キムタオル™、61000)
- ・食品用ラップフィルム (例 サランラップ)

### 3.3. Experimental instrument

- ・Tissue culture flasks (75 cm<sup>2</sup>, 25 cm<sup>2</sup>) (e.g., BD Falcon 353136 and 353112)
- ・96-well flat bottom tissue culture microtiter plates (e.g., BD Falcon, 353072)
- ・Storage plate (e.g., Thermo Scientific, 0.8 mL Storage plate, AB-0765)
- ・Multichannel pipette, micropipette
- ・Dispenser tray
- ・Tubes
- ・Cryotube (1.5 mL)
- ・Centrifuge tube (15 mL, 50 mL)
- ・Tip for micropepette (200  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 5 mL)
- ・Microplate sealing tape
- ・Paper towel (e.g., NIPPON PAPER CRECIA Co. LTD, Kim towel™, 61000)
- ・Wrap film (e.g., Saran Wrap)

### 3.4. 材料(培養液および試薬)

Minimum Essential Medium (MEM)

Fetal Bovine Serum (FBS)

- ・牛胎児血清は非働化して用いる。非働化は 56°C の水浴に血清を 30 分間浸ける。温度が低下したら 56 mL または 28 mL ずつチューブ等に分注する。分注した FBS は、-70°C 以下、あるいは -20°C 以下にて保存する。

Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B (P/S/F) solution

(Antibiotic-Antimycotic 100x ; GIBCO BRL)

Phosphate-Buffered Saline (-) (PBS(-))

0.25% (w/v) Trypsin (1mmol/L EDTA·4Na)

Dimethyl Sulfoxide (DMSO; CAS Number 67-68-5)

- ・秤量は比重に基づき容量に換算できる。

Ethanol (CAS Number 64-17-5)

- ・秤量は比重に基づき容量に換算できる。

Crystal Violet (CAS Number 548-62-9)

Methanol (CAS Number 67-56-1)

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS; CAS Number 151-21-3)

Triethanolamine (CAS Number 102-71-6)

・純度 98%以上を用いる。

Hydrochloric Acid (CAS Number 7647-01-0)

Sodium Hydroxide (CAS Number 1310-73-2)

なお、試薬のメーカー等の例は表 1 の通りとする。

### 3.4. Culture medium and reagent

Minimum Essential Medium (MEM)

Fetal Bovine Serum (FBS)

・Inactivated fetal bovine serum should be used. Inactivation is performed by 56°C, 30 min in the water bath. After fall in temperature, the serum is taken 56 mL or 28 mL in each tube. The serum is stored at -70°C or less or at -20°C or less.

Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B (P/S/F) solution

(Antibiotic-Antimycotic 100x ; GIBCO BRL)

Phosphate-Buffered Saline (-) (PBS(-))

0.25% (w/v) Trypsin (1mmol/L EDTA·4Na)

Dimethyl Sulfoxide (DMSO; CAS Number 67-68-5)

・the weighing can be converted to volume on the basis of specific gravity.

Ethanol (CAS Number 64-17-5)

・the weighing can be converted to volume on the basis of specific gravity.

Crystal Violet (CAS Number 548-62-9)

Methanol (CAS Number 67-56-1)

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS; CAS Number 151-21-3)

Triethanolamine (CAS Number 102-71-6)

・It should be used that of Purity >= 98.0%.

Hydrochloric Acid (CAS Number 7647-01-0)

Sodium Hydroxide (CAS Number 1310-73-2)

The example of the manufacturer and so on of the reagent is shown in the Table 1.

### 3.5. 培養液

MEM に非働化 FBS および適切な抗生物質(P/S/F solution)をそれぞれ 10%および 1%の最終濃度になるように加える。例えば、MEM 500 mL に非働化 FBS を 56 mL、P/S/F を 5.6 mL 添加し、調製する。

この時の抗生物質の濃度は、Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/mL, Amphotericin B 250ng/mL である。

### 3.5. Medium

MEM is supplemented with 10% FBS (inactivated) and 1% appropriate antibiotic (P/S/F solution). For example, 500 mL of MEM is supplemented with 56 mL of FBS and 5.6 mL P/S/F. At this time, the concentrations of the antibiotics are Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/mL and Amphotericin B 250 ng/mL, respectively.

### 3.6. Crystal violet 溶液

Crystal violet を Methanol に溶解し、0.4% 溶液を調製する。

### 3.6. Crystal violet solution

0.4% Crystal violet solution is prepared using methanol.

### 3.7. 被験物質

被験物質を調製する。

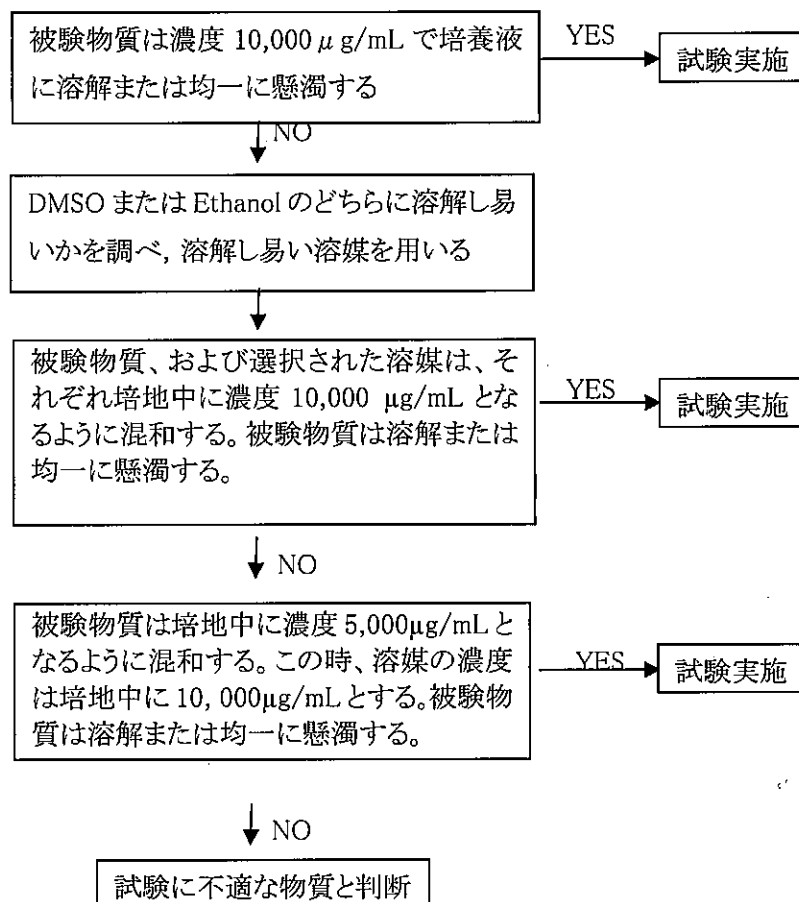
### 3.7. Test substances

Test substance is prepared.

#### 3.7.1. 被験物質の培養液中での安定性の検討

被験物質の培養液中での溶解性に関する事前検討を図 1 に示す操作で実施する。被験物質は培養液に 10,000 µg/mL (1 w/v%) の濃度で溶解または均一に懸濁するか否かを調べる。被験物質は適宜、ミキサー、加温機や超音波処理機を用いて溶解または懸濁させる。均一に懸濁しなかった場合には、DMSO、Ethanol のどちらに溶解し易いかを調べる。被験物質と選択された溶媒は、それぞれ濃度 10,000 µg/mL (1 w/v%) となるように培地で混和する。超音波処理機等により均一に懸濁するか否かを調べる。均一に懸濁しない場合には、培地中に 10,000 µg/mL (1 w/v%) の溶媒を含む 5000 µg/mL (0.5w/v%) の被験物質を用いて調べる。濃度を 5000 µg/mL (0.5w/v%) に下げても均一に懸濁しない場合には試験に不適な物質と判断し、当該物質については試験を実施しない。これらは目視にて判定する。

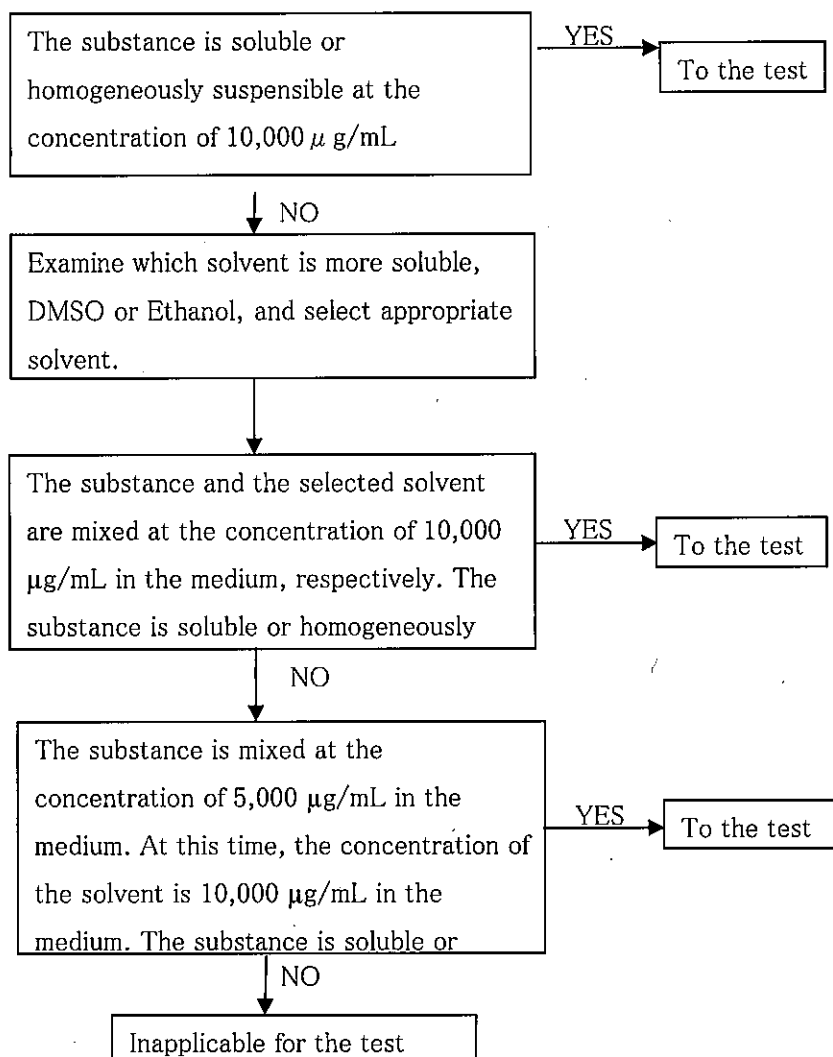
図1 被験物質の培養液中での安定性の検討のフローチャート



### 3.7.1. Examination of stability for the substance in the medium

The solubility of each substance in the medium should be confirmed in advance, using the procedure shown in Fig. 1. The solubility or suspensibility of the substance is examined at the concentration of 10,000 µg/mL (1 w/v%) in the medium. It is solved or uniformly suspended using vortex mixer, waterbath and sonicator when it finds necessary. When it is not suspended uniformly, the solubility to DMSO and ethanol is examined as a next step. The substance and the selected solvent are mixed at the concentration of 10,000 µg/mL (1 w/v%) in the medium, respectively. The suspensibility is examined after sonication and so on. When it is not suspended uniformly at the concentration of 10,000 µg/mL (1 w/v%), the suspensibility is examined using the substance of 5,000 µg/mL (0.5 w/v%) containing the selected solvent of 10,000 µg/mL (1 w/v%) in the medium. The substance that is not suspended homogeneously is judged as an inapplicable substance for this test, and has no test. These judges are performed macroscopically.

Figure 1. Flow chart of examination of stability for the substance in the medium



### 3.7.2. 被験物質の調製

3.7.1.で述べられている操作に従って、適切な濃度に被験物質を溶解又は均一に懸濁する。4.3.で述べる SIRC 細胞を含む培地で希釈した後の最終的な被験物質の最高試験濃度は 5,000  $\mu\text{g/mL}$  (0.5 w/v%)、溶媒の試験濃度は 5,000  $\mu\text{g/mL}$  (0.5 w/v%)である。低濃度の被験物質を選択した時の最終的な被験物質の最高試験濃度は 2,500  $\mu\text{g/mL}$  (0.25 w/v%)、DMSO または Ethanol の最終濃度は 5,000  $\mu\text{g/mL}$  (0.5 w/v%)である。なお、被験物質と細胞の混和後、特に 72 時間のインキュベーション後、沈殿等が認められたウェルのデータは、均一に懸濁していなかったとして採用しない。

### 3.7.2. Preparation of test substances

The test substance is solved or uniformly suspended at appropriate concentration by the



procedure described in 3.7.1. The final maximal concentrations of the substances and the recommended solvents are 5,000 µg/mL (0.5 w/v%), respectively, after diluted by the medium containing the SIRC cells as described in 4.3. The final maximal concentration of the substances and recommended solvents are 2,500 µg/mL (0.25 w/v%) and 5,000 µg/mL (0.5 w/v%), respectively, when the low concentration of the substance is selected. Furthermore, the data of the well with precipitation or so on at anytime after the mix of the substance and the cell, especially after 72 hr incubation, should be rejected for unsuitable suspension.

### 3.7.3. 被験物質液の希釈

被験物質液の濃度段階は公比 2 で 8 段階 (100 µL/well) とし、希釈液 1 濃度に対して 2 ウェルを設ける。

### 3.7.3. Dilution of substance solution

The dilution step of substance should be eight by a common ratio of two. The test of the same concentration should be performed in duplicate on the plate.

## 3.8. 対照物質

### 3.8.1. 陽性対照物質

陽性対照として、SDS を用いる。SDS の調製濃度は 1,000 µg/mL とし、培地で調製する。

### 3.8.2. 比較対照物質

比較対照として、Triethanolamine を用いる。Triethanolamine の調製濃度は 10,000 µg/mL とし、培地で調製する。

### 3.8.3. 陰性対照物質

陰性対照として、培養液、10,000 µg/mL DMSO 培養液溶液または 10,000 µg/mL Ethanol 培養液溶液を用いる。これらは被験物質を溶解または懸濁させる際に用いた溶媒によって選択する。

## 3.8. Reference substance

### 3.8.1. Positive control substance

SDS should be used as a positive control. The SDS solution is prepared at the concentration of 1,000 µg/mL in the medium.

### 3.8.2. Relative control substance

Triethanolamine should be used as a relative control. The triethanolamine solution is prepared at the concentration of 10,000 µg/mL in the medium.

### 3.8.3. Negative control substance

Medium, 10,000 µg/mL DMSO-medium solution or 10,000 µg/mL ethanol-medium solution

should be used as a negative control. It should be selected on the basis of what kind of solvent solve or suspend test substance.

#### 4.方法

##### 4.1.SIRC 細胞の培養と継代

###### ・細胞培養

- (1)SIRC 細胞は調製した培養液を用い、37°C下、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。
- (2)SIRC 細胞の継代はまず培養フラスコから培養液を取り除き、さらに Trypsin inhibitor となる血清を充分取り除くため、PBS(-) 10 mL で細胞表面を2回洗浄する。
- (3)PBS(-)を除去した後、0.25% Trypsin 液 (1.5-2 mL)を細胞表面の全体に行き渡るよう加える(2-10秒程度)。
- (4)0.25% Trypsin 液を吸い取った後、細胞を剥離させるために37°C中で2~3分間インキュベートし、フラスコの細胞接着面裏から軽くタップする。剥離後、適量の MEM(10% FBS)を加えた後、十分なピペッティングにより単細胞化させ均等な細胞浮遊液を調製する。細胞数を計測し、培養液にて  $6\sim 8 \times 10^5$  cells/mL に調製する。1 mL の細胞 ( $6\sim 8 \times 10^5$  cells)を15~30 mL の MEM(10% FBS)に加え継代する。

###### ・細胞の凍結保存

- (1)細胞の凍結用培養液として、10% DMSO を含む MEM 培養液を調製する。市販の細胞凍結保存液(例 十慈フィールド株式会社 セルバンカー1または2)を使用することができる。血清タイプ、無血清タイプの両方、使用可能である。
- (2)細胞を凍結用培地で  $1 \times 10^6$  cells/mL となるように希釈し、ストックチューブに1 mL 入れ、ゆっくりした速度(-1~2°C/3分程度が望ましい)で凍結させる。例えば、氷中に5分、約-20°Cに50分、約-70°Cに12時間保存し、最後に液体窒素に入れる。また、凍結処理容器(例 日本フリーザー株式会社、BICELL)を用いることができる。この場合、調製済み細胞入りチューブを容器に入れ、約-70°Cの中に静置し、3時間~24時間後に、液体窒素へ入れる。
- (3)液体窒素中に保存する。

###### ・細胞の融解

- (1)ストックチューブを37°Cの温湯で素早く融解させる。
- (2)遠心管に細胞浮遊液を入れ、10 mL の培地を加え、1,000 rpm で5分間遠心する。
- (3)上清を除き、培地で細胞浮遊液を調製する。

・凍結保存した細胞は、解凍後、試験に用いる前に1回以上継代し、良好な増殖を示すことを確認する。

#### 4. Procedure

##### 4.1. Passage culture of cell

###### ・cell culture

- (1)The SIRC cell is cultured with MEM supplemented 10% FBS, 1% P/S/F and so on at 37 °C in a humidified incubator containing 5% (v/v) CO<sub>2</sub> in air. The concentrations of the penicillin, streptomycin and amphotericin B are 100 U/mL, 100 µg/mL and 250 ng/mL, respectively.
- (2)After the medium is removed from culture flask, the SIRC cells are rinsed 2 times by PBS(-)

10 mL for removing serum as a trypsin inhibitor.

- (3) After PBS(-) is removed, 0.25% trypsin solution (1.5-2 mL) is added contacting the all cells in the culture flask.
- (4) After 0.25% trypsin solution is removed halfway, the cells are incubated for 2-3 minutes at 37°C. The cells are detached from the surface of the flask, tapping it. They are collected by the appropriate amount of the MEM (10% FBS) from the culture flask. After counting the cells, the cell suspension is prepared at the density of  $6-8 \times 10^5$  cells in 15-30 mL of the medium. The passage culture is performed using it.

•Freeze preservation of cell

- (1) The medium contained 10% DMSO is prepared as a medium for the freeze preservation of cell. The commercial available freeze preservative solution (e.g., Juji Field Inc., Cell banker 1 or 2) can be used. Both serum type and non serum type can be used.
- (2) The cell of  $1 \times 10^6$  cells/mL is add to stock tube. It is froze slowly. For example, the freeze is performed at 5 minutes in the ice, 50 minutes at about -20°C and 12 hours in about -70°C and in the liquid nitrogen in order. The commercial available freezing vessel (e.g., Nihon Freezer Co. LTD., BICELL) can be used. In this case, the vessel containing the tube for the cell is frozen at about -70°C and in the liquid nitrogen after 3 hours - overnight.
- (3) The tube containing the cell is preserved in the liquid nitrogen.

•Melting of cell

- (1) The stock tube is dipped in the water of 37°C for melting.
- (2) The cell suspension added the medium of 10 mL is centrifuged at 1,000 rpm x5 min.
- (3) After removing the supernatant, the cell suspension is prepared by the medium.

•The freeze preservative cell is passaged one or more times and should be confirmed the appropriate growth.

#### 4.2.細胞浮遊液の調製

- (1) SIRC 細胞の培養フラスコから培養液を取り除き、さらに Trypsin inhibitor となる血清を充分取り除くため、PBS(-)10 mL で細胞表面を 2 回洗浄する。
- (2) PBS(-)を除去した後、0.25% Trypsin 液 (1.5-2 mL)を細胞表面の全体に行き渡るよう加える (2-10 秒程度)。
- (3) 0.25% Trypsin 液を除去した後、細胞を剥離させるために 37°C 中で 2~3 分間インキュベートする。
- (4) フラスコの細胞接着面裏から軽くタップし剥離させる。
- (5) 剥離後、適量の培養液を加えた後、十分なピペッティングにより単細胞化させ均等な細胞浮遊液を調製する。
- (6) 細胞数を計測し、培養液にて  $2 \times 10^5$  cells/mL に調製する。

#### 4.2. Preparation of cell suspension

- (1) After the medium is removed from culture flask, the SIRC cells are rinsed 2 times by PBS(-) 10 mL for removing serum as a trypsin inhibitor.
- (2) After PBS(-) is removed, 0.25% trypsin solution (1.5-2 mL) is added contacting the all cells in the culture flask.
- (3) After 0.25% trypsin solution is removed halfway, the cells are incubated for 2-3 minutes at 37°C.
- (4) The cells are detached from the surface of the flask, tapping it.
- (5) The cells are collected by the appropriate amount of the MEM (10% FBS) and pepetting.
- (6) After counting the cells, the cell suspension is prepared at the density of  $2 \times 10^5$  cells/mL.

#### 4.3. 被験物質の適用

- (1) PBS(-)、陰性対照物質、並びに被験物質、陽性対照物質、比較対照物質の希釈系列(100  $\mu$ L/well)を図 1 に示すように 96 ウェルマイクロプレート内に作製する。
- (2)  $2 \times 10^5$  cells/mL の細胞浮遊液を 0.1 mL、図 2 に示すウェルに添加する。
- (3) 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。さらに、ラップフィルムを用いることができる。品質基準の 5 項目(4.7.(1)-(5))で揮発性物質が他のウェルに影響しているかどうかを確認する。影響の基準は品質基準と同じである。揮発性物質が他のウェルに影響にている時には希釈して再試験を実施する。
- (4) 添加した 96 ウェルマイクロプレートは細胞を培養床に均一に沈着・接着させるために、そのままクリーンベンチ内で静置(室温、20 分間)し、その後、CO<sub>2</sub> インキュベータ中に移す。
- (5) 約 72 時間、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養する。

#### 4.3. Application of test substance

- (1) PBS(-), negative control, and dilution series of test substance, positive control and relative control are prepared in the 96 well microplate. The layout of the microplate is shown in fig. 1.
- (2) One tenth mL of the  $2 \times 10^5$  cells/mL cell suspension is added to the wells as shown in fig.2.
- (3) Microplate sealer is used to avoid the effect of volatile toxicant. Moreover, wrap film can be used. The five measurements (4.7.(1)-(5)) of the quality control should be used for checking wether the volatile substance has an effect on other wells. The criterion of the toxic effect is the same as that of the quality control. When the volatile substance has an effect on other wells, the retest should be performed using dilution.
- (4) The microplate added the test substance and the cell suspension is still standing for 20 minutes in the clean bench. The cell is adhered to the bottom of the microplate. After that, the microplate is moved to the CO<sub>2</sub> incubator.
- (5) The microplate is incubated for about 72 hr at the condition of 37°C and 5% CO<sub>2</sub>,

#### 4.4. Crystal violet 染色

- (1)培養期間終了後、96 ウェルマイクロプレートを手静かに反転し被験物質を含む培養液を捨てる。
- (2)PBS(-)を 200  $\mu$ L 添加し優しく攪拌した後、反転させ PBS(-)を捨てる。これを2回繰り返す。
- (3)96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに Crystal violet methanol 溶液を 100  $\mu$ L 分注し、30 分間染色する。
- (4)染色期間が終了後、96 ウェルマイクロプレートを手静かに反転させ Crystal violet 溶液を捨て、じゅうぶん水洗する。ペーパータオル上にプレートを伏せ、水分を吸い取らせる。
- (5)じゅうぶんに風乾した後、マイクロプレートリーダーを用いて各ウェルの吸光度(588 nm)を測定する。同等性が証明された近い波長での測定を用いることができる。

#### 4.4. Crystal violet staining

- (1)After the incubation, the medium containing the test substances is removed by gentle turnover of the microplate.
- (2)PBS(-) of 200  $\mu$ L is added. After gentle shake, PBS(-) is removed by the turnover of the microplate. This procedure is repeated twice.
- (3)One hundred  $\mu$ L of crystal violet methanol solution is added to each well of the microplate, and stain the cells for 30 minutes.
- (4)After the staining, the crystal violet methanol solution is removed by gentle turnover of the microplate. It is washed by tap water sufficiently, and is blotted water with the paper towel.
- (5)After drying sufficiently, the absorbance at 588 nm is measured with an automatic microplate reader. The measurement at the near wavelength that the equivalency was demonstrated can be used.

#### 4.5. IC<sub>50</sub> の算出

被験物質を含まない陰性対照ウェルの細胞生存率を 100%とした場合における各ウェルの細胞生存率を吸光度から算出する。細胞生存率 50%を示す被験物質濃度 (IC<sub>50</sub>) の算出にあたっては、細胞生存率 50%をはさむ 2 濃度とその濃度における細胞生存率から式  $\text{LogIC}_{50} = \frac{[(50-y_1)\log x_2 - (50-y_2)\log x_1]}{(y_2-y_1)}$  を用いて算出する。(※記号は、被験物質濃度  $x_1$  (低濃度側)、 $x_2$  (高濃度側)におけるそれぞれの細胞生存率を  $y_1$ 、 $y_2$  で示す。Log は常用対数である。)

被験物質の最高濃度である 5,000  $\mu$ g/mL で細胞生存率が 50%以下にならない場合は IC<sub>50</sub>>5,000  $\mu$ g/mL とする。また、試験した最低濃度である 39.1  $\mu$ g/mL で細胞生存率が 50%未満の場合は、IC<sub>50</sub><39.1  $\mu$ g/mL とする。

もし1被験物質から 50%の細胞生存率を示す濃度が複数、得られた場合は、最も低い IC<sub>50</sub> を採用する。

なお、表計算ソフト(Excel)において、細胞生存率を算出する段階以降で小数点以下2桁目を四捨五入する。

#### 4.5. Calculation of IC<sub>50</sub>

The absorbance of control wells, which contained no test substance, is regarded as 100%, and the percentage absorbance for each well is calculated. The concentration at which the growth of cells was inhibited to 50% of the control (IC<sub>50</sub>) is obtained from the next formula using two concentrations around the predicted concentration of 50% cell viability.

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

(x<sub>1</sub> : Low concentration, x<sub>2</sub> : High concentration, y<sub>1</sub>: cell viability at low concentration, y<sub>2</sub> : cell viability at high concentration, Log means common logarithm.)

If the cell viability is >50% at the maximal concentration of 5,000 μg/mL, the result of the test substance is IC<sub>50</sub>>5,000 μg/mL. Also, if the cell viability is <50% at the concentration of 39.1 μg/mL, the result of the test substance is IC<sub>50</sub><39.1 μg/mL.

If the multiple concentrations showing 50% cell viability were obtained from one substance, the lowest IC<sub>50</sub> should be adopted.

In a spreadsheet software (Excel), the cell viability value is rounded to the nearest tenths.

#### 4.6. 評価

比較対照物質として Triethanolamine を用い、被験物質の眼刺激性を予測し、評価する(添付文書 1 参照)。Triethanolamine (100%) の眼刺激性の分類は GHS 基準で「カテゴリー無し」である。GHS 基準で被験物質の IC<sub>50</sub> が Triethanolamine の IC<sub>50</sub> 以上を陰性(カテゴリー無し)、Triethanolamine の IC<sub>50</sub> 未満を陽性(カテゴリー 1 または 2)と判定する。試験は 2 回を繰り返して行い、その結果に基づき評価する。2 回の評価結果が異なった場合には同様に 3 回目を実施し、2 回の同じ評価結果を採用し、その結果に基づき評価する(付属書 1 の表 3 および 4 参照)。なお、3 回の結果のばらつきを確認する場合には、試験を 3 回繰り返して行う。

#### 4.6. Evaluation

The eye irritation of the test substance is evaluated by using triethanolamine as a relative control (see annex 1). The classification of the eye irritation of triethanolamine (100%) is “Not Category” of GHS standard. For the GHS standard, the test substance is judged as negative (Not Category) when the IC<sub>50</sub> is higher than or equal to that of triethanolamine, and is judged as positive (Category 1 or 2) when the IC<sub>50</sub> is lower than that of triethanolamine. If the two decisions are different, the two results with the same decision are adopted after the third test. If the confirmation of the deviation is needed with three results, the test is repeated three times.

#### 4.7. 品質基準

試験の精度管理を以下の 6 項目で行う。全ての項目で基準を満たすことを試験成立の要件とする。試験成立の要件を満たさない場合には該当プレートについて再試験を行う。特に、揮

発した物質の毒性により要件を満たさない場合には、被験物質の濃度を下げて試験を行う。

- (1)陰性対照から得られる吸光度の絶対値は、各ウェルに播種した  $1 \times 10^4$  個の細胞が 72 時間のアッセイ期間中に正常な増加を示しているか否かを表している。したがって、96 ウェルマイクロプレートの左右に設定した陰性対照の平均吸光度が 0.4 を上回ることをとする。
- (2)陽性対照として Sodium dodecyl sulfate (SDS) を用いる。標準的なプロトコールで試験された SDS の  $IC_{50}$  は 77.7~258.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲とする。
- (3)比較対照物質として Triethanolamine を用いる(付属書 1 参照)。標準的なプロトコールで試験された Triethanolamine の  $IC_{50}$  は 1,000~2,500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲とする(付属書 2 参照)。
- (4)被験物質の 2 系列の差について確認する。2 系列のそれぞれの  $IC_{50}$  は、1 系列目の  $IC_{50}$  と 2 系列目の  $IC_{50}$  の平均  $IC_{50}$  の  $\pm 20\%$  以内に収まることをとする。なお、この確認において、 $IC_{50} < 39.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  の時は  $IC_{50} = 39.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  に、 $IC_{50} > 5000 \mu\text{g}/\text{mL}$  の時は  $IC_{50} = 5000 \mu\text{g}/\text{mL}$  に置き換えて計算する。不等号で表される  $IC_{50}$  の処置は同様に行う。
- (5)体系的に試験精度を見極めるために、96 ウェル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陰性対照全体の平均吸光度の  $\pm 15\%$  以内(平均値  $\pm 15\%$ )に収まることをとする。
- (6)採用された 2 回の試験結果が同様であることを確認するために、2 試験間の誤差を確認することが必要である。したがって、2 試験間での陽性対照 (SDS) の  $IC_{50}$  値が  $\pm 2$  倍以内(高値/低値  $\leq 2$ )に収まることを合格基準とする。

シト母の  
NCの平均が  
0.4を上回ること

Table 1.  
n=4の正しさ  
セルの数

72セルの最終  
サマリーシート  
summary  
sheet

#### 4.7. Quality control

The quality control of the SIRC cytotoxicity test is performed by the six measurements. It needs to satisfy the next criterion. If it is not satisfy the criterion, the retest of the microplate should be performed. Especially, if the toxic effect of the volatile substance causes unacceptable values, the retest should be performed at the lower concentration.

- (1)The absolute OD obtained from the negative control is index of normal proliferation of SIRC cell seeded at the concentration of  $1 \times 10^4$  cells/well and incubated 72hr. The mean OD of the negative control (the right and left wells) should be  $> 0.4$  for complete test.
- (2) Sodium dodecyl sulfate (SDS) is used as a positive control. The  $IC_{50}$  of SDS should be 77.7-258.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  when it is tested by the standard protocol. It needs for complete test.
- (3) Triethanolamine is used as a relative control (see appendix 1). The  $IC_{50}$  range of triethanolamine should be 1,000-2,500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  when it is tested by the standard protocol (see appendix 2 ). It needs for complete test.
- (4) The difference between two dilution series of the substance should be confirmed. The  $IC_{50}$ s of the first series and the second series should be within  $\pm 20\%$  of the mean  $IC_{50}$  of two series(the mean of the first  $IC_{50}$  and the second  $IC_{50}$ ), respectively. It needs for complete test. If the  $IC_{50}$  is lower than 39.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , it is calculated using the  $IC_{50} = 39.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ . If the

IC<sub>50</sub> is higher than 5000μg/mL, it is calculated using the IC<sub>50</sub>=5000μg/mL. Treatment of IC<sub>50</sub> expressed with inequality sign is performed in the same manner.

- (5) The difference between left and right wells of the negative control should be confirmed to check the systematic quality. The mean ODs of left and right wells should be within  $\pm 15\%$  of the mean OD of all negative control wells (the mean  $\pm 15\%$ ), respectively. It needs for complete test.
- (6) The difference between the two test results adopted should be confirmed to check the equality of them. The IC<sub>50</sub> values of two tests of positive control (SDS) should be lower or equal to twice. (The high value/the low value  $\leq 2$ )

## 5.参考文献

- 1) Scott, L. et al., *Toxicol. In Vitro*, 24(1), 1-9 (2010).
- 2) Hagino, S. et al., *ATLA*, 36, 641-652 (2008)
- 3) Hagino, S. et al., *ATLA*, 38, 139-152 (2010)
- 4) Itagaki, H. et al., *Toxicol. in Vitro*, 5, 139-143 (1991).
- 5) Ohno, Y. et al., *Toxicol. in Vitro*, 13, 73 (1999).
- 6) Saotome, K. et al., *Toxicol. in Vitro*, 3, 317-321 (1989).
- 7) Itagaki, H., *AATEX*, 3, 182-190 (1995).
- 8) Ohno, Y et al., *AATEX*, 3, 123 (1995).
- 9) Tani, N., *Toxicol. in Vitro*, 13,175 (1999).
- 10) 「代替法を用いて化粧品原料の眼刺激性を評価するにあたっての指針(厚生科学研究班の作成した案)」*AATEX*,5,Suppl., Guideline Draft1-3 (1998).
- 11) Ohno, Y., *ATLA*, 32, Supplement 1, 643-655, 2004.

## 5.References

- 1) Scott, L. et al., *Toxicol. In Vitro*, 24(1), 1-9 (2010).
- 2) Hagino, S. et al., *ATLA*, 36, 641-652 (2008)
- 3) Hagino, S. et al., *ATLA*, 38, 139-152 (2010)
- 4) Itagaki, H. et al., *Toxicol. in Vitro*, 5, 139-143 (1991).
- 5) Ohno, Y. et al., *Toxicol. in Vitro*, 13, 73 (1999).
- 6) Saotome, K. et al., *Toxicol. in Vitro*, 3, 317-321 (1989).
- 7) Itagaki, H., *AATEX*, 3, 182-190 (1995).
- 8) Ohno, Y et al., *AATEX*, 3, 123 (1995).
- 9) Tani, N., *Toxicol. in Vitro*, 13,175 (1999).
- 10) Guidance for evaluation of eye irritation of cosmetic ingredients using alternative method (Draft document by the study team supported by Ministry of Health and Welfare), *AATEX*,5,Suppl., Guideline Draft1-3 (1998).
- 11) Ohno, Y., *ATLA*, 32, Supplement 1, 643-655, 2004.



## 6.略語、頭字語リスト

°C	Degrees Centigrade
ATCC	American Type Culture Collection
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EPA	United States Environmental Protection Agency
FBS	Fetal Bovine Serum
GHS	Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
IC <sub>50</sub>	50% Inhibitory Concentration
JaCVAM	Japanese Center for the Validation of Alternative Methods
MEM	Minimum Essential Medium
NI	Non Irritant
OD	Optical density
PBS(-)	Phosphate-Buffered Saline (-)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIRC cell	Statens Seruminstitut Rabbit Corneal Cell
SIRC-CVS	Statens Seruminstitut Rabbit Cornea-Crystal Violet Staining

## 6.List of abbreviations and acronyms

°C	Degrees Centigrade
ATCC	American Type Culture Collection
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EPA	United States Environmental Protection Agency
FBS	Fetal Bovine Serum
GHS	Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
IC <sub>50</sub>	50% Inhibitory Concentration
JaCVAM	Japanese Center for the Validation of Alternative Methods
MEM	Minimum Essential Medium
NI	Non Irritant
OD	Optical density
PBS(-)	Phosphate-Buffered Saline (-)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIRC cell	Statens Seruminstitut Rabbit Corneal Cell
SIRC-CVS	Statens Seruminstitut Rabbit Cornea-Crystal Violet Staining

## 7.本プロトコールの改訂について

(1) ver.1 から ver1.71 (= ver.1.71j and ver.1.71e) の改訂は ver2.13 において緑の文字で示した。  
Ver.1 は 2009-2010 年に資生堂において 68 種の化学物質を評価するために用いられたプロトコール

であり、JaCVAM によるピアレビューを受けている。

(2) ver1.71 より後の改訂は ver2.13 において青の文字で示した。

(3) ver2.07 から ver.2.08 へ変更時の修正:

4.7.(4)において、「被験物質の2系列の差について確認する。2系列のそれぞれのIC50は、2系列の平均で求めたIC50の±20%以内に収まることとする。」は、「2系列のそれぞれのIC50は、1系列目のIC50と2系列目のIC50の平均IC50の±20%以内に収まることとする。」へ変更した。

(4) ver2.08 から ver.2.09 へ変更時の修正:

品質基準の5項目(4.7.(1)-(5))で揮発性物質が他のウェルに影響しているかどうかを確認する。影響の基準は品質基準と同じである。揮発性物質が他のウェルに影響している時には希釈して再試験を実施する。

(5) ver2.09 から ver.2.10 へ変更時の修正:

SIRC 細胞毒性試験を SIRC-CVS 細胞毒性試験へ修正する。3.7.1.の Table 1 を Figure 1 へ修正した。

(6) ver.2.10 から ver.2.12 へ変更時の修正:

バージョンをタイトルに加えた。SIRC-CVSを6.の略語、頭字語リストに加えた。「図1 96ウェルマイクロプレートのレイアウト」を「図2 96ウェルマイクロプレートのレイアウト」に修正した。「図2 細胞浮遊液の添加」を「図3 細胞浮遊液の添加」に修正した。

(7) ver.2.12 から ver.2.13 へ変更時の修正:

3.7.2. において、「なお、被験物質と細胞の混和後、沈殿等が認められたウェルのデータは、均一に懸濁していなかったとして採用しない。」を「なお、被験物質と細胞の混和後、特に72時間のインキュベーション後に沈殿等が認められたウェルのデータは、均一に懸濁していなかったとして採用しない。」に修正した。

作成者の住所「〒236-8643 横浜市金沢区福浦 2-12-1」を「〒224-8558 横浜市都筑区早淵 2-2-1」へ修正した。

(7) ver.2.12 から ver.3.1 へ変更時の修正:

バージョンと日付を修正した。

1.において、「および United States Environmental Protection Agency (EPA)」を削除した。3.1.において、「(例 435 代で培養を開始し、週2回の継代を行った場合、約458代まで使用する)」を加えた。

3.4.において、「試薬のメーカー等は表1の通りとする」は「試薬のメーカー等の例は表1の通りとする」に修正した。

3.7.1.において、「被験物質の培養液中での溶解性に関する事前検討を実施する。」は「被験物質の培養液中での溶解性に関する事前検討を図1に示す操作で実施する。」に修正した。

4.6.において、「EPA 基準で「カテゴリーIII」および「EPA 基準で被験物質のIC50がTriethanolamineのIC50を超える場合を陰性(カテゴリー4)、TriethanolamineのIC50以下を陽性(カテゴリー1-3)と判定する。」を削除する。

4.7.(5)において、「全体」を「陰性対照全体」へ修正した。

表1において、「試薬のメーカー等」は「試薬のメーカー等の例」に修正した。また、ロット番号は備

考欄から削除した。

付属書1において、「in vivo の評価を EPA 分類として同様に行った検討を表 2 に示す。In vivo の結果は EPA 基準のカテゴリー4とそれ以外(カテゴリー1から3)の間で区別される。Triethanolamine はカテゴリー3 に分類される。それゆえ、今後の被験物質の IC50 値が Triethanolamine の IC50 値よりも大きい時には、無刺激性物質と評価する。もし、被験物質の IC50 値が Triethanolamine の IC50 値以下の時には、刺激性物質と評価する。」及び「EPA については表 4 へそれぞれ」を削除した。

付属書1の表2と表4を削除し、表番号を繰り上げた。

(8) ver.3.1 から ver.3.2 へ変更時の修正:

4.7.の(4)において「不等号で表される IC50 の処置は同様に行う。」を加えた。

(9) ver.3.2 から ver.3.3 へ変更時の修正:

1. 目的において、「ボトムアップ・アプローチとして」を加えた。

2. 試験法の原理において、「更に、安定した試験結果を得るために比較対照を用いている(Ohno, 2004)。」を加えた。

3.4.材料(培養液および試薬)の Triethanolamine の部分で、「純度 98%以上を用いる。」を加えた。

3.7.2. 被験物質の調製において、3.7.1 との重複を取り除いた。「被験物質は培養液に 10,000 µg/mL (1 w/v%) の濃度に溶解または均一に懸濁させて被験物質液とする。被験物質は適宜、ミキサー、加温機や超音波処理機を用いて溶解または懸濁させる。必要に応じて DMSO、Ethanol を溶解または均一に懸濁させるために用いる。DMSO または Ethanol の濃度は最初の被験物質液中に 10,000 µg/mL (1 w/v%) である。溶媒の選択は培地、DMSO、Ethanol の順とする。さらに、必要に応じて被験物質の最高濃度は均一に懸濁させるために 5,000 µg/mL (0.5w/v%) とする。それでも均一に懸濁しないものは試験に不適な物質と判断する。」を削除した。そして、「3.7.1.で述べられている操作に従って、適切な濃度に被験物質を溶解又は均一に懸濁する。」を加えた。

3.7.2.被験物質の調製において、「被験物質と細胞の混和後、沈殿等が認められたウェルのデータは、均一に懸濁していなかったとして採用しない。」の「混和後」の後に、「特に 72 時間のインキュベーション後、」を加えた。

4.6.評価において、「大野らの in vivo データに基づいて、」を削除。

5.参考文献と本文において、参照番号をつけた。書式を変更した。以下の文献を加えた。

Ohno, Y., ATLA, 32, Supplement 1, 643-655, 2004.

Scott, L. et al., Toxicol. In Vitro, 24(1), 1-9 (2010).

以下の文献を削除した。

Ohno, Y. et al., In Vitro Toxicol.,7, 89 (1994)

付属書 1 の表2と関連する記述を削除した。

付属書1の参考文献のフォーマットを変更した。

(10) ver.3.3 から ver.3.4 へ変更時の修正:

2.試験法の原理において、「適用時間の 72 時間は、以前の研究の in vivo データに基づき、化学物質(酸とアルカリを除く)の点眼から最大の眼刺激が認められるまでの時間(72 時間以内)を考慮

して設定された<sup>9)</sup>。」を加えた。

2.試験法の原理において、「SIRC 細胞毒性試験は Crystal violet が生細胞の細胞膜に入り込んで染色する性質を利用した方法で生細胞のみを測定する。」を「SIRC 細胞毒性試験の操作は、細胞膜を透過し生体高分子を染色する Crystal violetにより染色された生細胞の測定に基づいている。」へ修正した。

2.試験法の原理において、「一方、本試験法の欠点は被験物質が培地に溶解または均一に懸濁する物質に限定されることである。」を加えた。

4.5.IC<sub>50</sub> の算出において、「もし 50%の細胞生存率を示す濃度が複数、1被験物質から得られた場合には、最も低い IC50 を採用する。」を加えた。

#### 7.About the revision of this protocol

(1) The revision of ver.1 - ver.1.71 that is the same as ver.1.71j and ver.1.71e, is shown by the green character in the ver 2.13. The protocol of the ver.1 was used for evaluating 68 chemicals at Shiseido Research Center in 2009-2010 and was subjected to the peer review by JaCVAM.

(2) The revision after ver.1.71 is shown by the blue character in the ver.2.13.

(3) The revision from ver.2.07 to ver.2.08:

In 4.7.(4), “The difference between two dilution series of the substance should be confirmed. The IC50s of the first series and the second series should be within + 20% of the mean IC50 of two series (the mean  $\pm$  20%), respectively.” was changed to “The difference between two dilution series of the substance should be confirmed. The IC50s of the first series and the second series should be within  $\pm$  20% of the mean IC50 of two series(the mean of the first IC50 and the second IC50), respectively.”

(4) The revision form ver.2.08 to ver.2.09:

In 4.3.(3), “The five measurements (4.7.(1)-(5)) of the quality control should be used for checking whether the volatile substance has an effect on other wells. The criterion of the toxic effect is the same as that of the quality control. When the volatile substance has an effect on other wells, the retest should be performed using dilution.”

(5) The revision from ver.2.09 to ver.2.11:

“SIRC cytotoxicity test” was changed to “SIRC-CVS cytotoxicity test”. “Table 1” of 3.7.1. was changed to “Figure 1”.

(6) The revision from ver.2.11 to ver.2.12:

The version was added to title. SIRC-CVS was added to list of abbreviations and acronyms of 6. “Figure 1. Layout of 96 well microplate” was changed to “Figure 2. Layout of 96 well microplate”. “Figure 2. Addition of cell suspension” was changed to “Figure 3. Addition of cell suspension”

(7)The version from ver.2.12 to ver.2.13:

In 3.7.2., “Futhermore, the data of the well with precipitation or so on at anytime after the mix of the substance and the cell should be reject for unsuitable suspension” was changed to “

Furthermore, the data of the well with precipitation or so on at anytime after the mix of the

substance and the cell, especially after 72 hr incubation, should be rejected for unsuitable suspension”.

The address of the author, “2-12-1, Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama-shi, 236-8643 Japan” was changed to “2-2-1, Hayabuchi, Tsuzuki-ku, Yokohama-shi, 224-8558, Japan”.

(8)The revision from ver.2.12 from ver.3.1:

The version and the date were renewed.

In 1., “and United States Environmental Protection Agency (EPA)” was deleted.

In 3.1, “(e.g. When the cell culture starts at passage number of 435 and is maintained by two passages per one week, it should be used within passage number of 458)” was added.

In 3.4., “The manufacturer and so on of the reagent is shown in the Table 1.” was changed to “The example of the manufacturer and so on of the reagent is shown in the Table 1.”.

In 3.7.1., “The solubility of the substance in the medium should be confirmed in advance.” was changed to “The solubility of each substance in the medium should be confirmed in advance, using the procedure shown in Fig. 1.”.

In figure 1, “Select the solvent on the basis of the examination of the solubility in DMSO or Ethanol.” was changed to “Examine which solvent is more soluble, DMSO or Ethanol, and select appropriate solvent.”

In 4.6., “For EPA standard, the test substance is judged as negative (Category 4) when the IC50 is higher than that of triethanolamine, and is judged as positive (Category 1-3) when the IC50 is lower than or equal to that of triethanolamine (see table 3 and 4 of appendix 1).” was deleted.

In table 1., “The manufacturer and so on of the reagent” was changed to “The example of the manufacturer and so on of the reagent” . Also, lot numbers were deleted from remarks.

In appendix 1, “The same examination that the in vivo evaluation is performed by EPA classification is shown in table 2. The in vivo results are discriminated between category 4 and others (category 1-3) of the EPA standard. Triethanolamine is classified as category 3. Therefore, when the IC50 of future test substance is higher than that of triethanolamine, it should be evaluated as a non irritant. If the IC50 of the test substance is lower than or equal to that of triethanolamine, it should be evaluated as an irritant.” was deleted.

Table 2 and Table 4 of appendix 1 were deleted and table number was moved up.

(8)The revision from ver.3.1 to ver.3.2:

In 4.7. (4), “Treatment of IC50 expressed with inequality sign is performed in the same manner.” was added.

(9)The revision from ver.3.2 to ver.3.3:

In “1.Purpose”, “as a bottom up approach (Scott et al., 2010)” was added.

In “2. The principle of SIRC cytotoxicity test”, “The relative control was additionally used to obtain the invariable results (Ohno, 2004).” was added.

In triethanolamine of “3.4. Culture medium and reagent”, “It should be used that of Purity $\geq$ 98.0%.” was added.

In 3.7.2., overlap with 3.7.1 was removed. "The test substance is solved or uniformly suspended with medium at a concentration of 10,000 µg/mL (1 w/v%). It is solved or uniformly suspended using vortex mixer, waterbath and sonicator when it finds necessary. DMSO or ethanol is used for solving or suspending if needed. The concentration of DMSO or ethanol is 10,000µg/mL (1 w/v%) in the initial substance solution. The solvent selection is medium, DMSO in medium and ethanol in medium in order. In addition, the concentration of the substance is decreased to 5,000 µg/mL (0.5 w/v%) for suspending when it finds necessary. The substance that is not suspended homogeneously is judged as an inapplicable substance for this test." was deleted. And, "The test substance is solved or uniformly suspended at appropriate concentration by the procedure described in 3.7.1." was added.

In "4.6.Evaluation", "on the basis of the in vivo data by Ohno et al. " was deleted.

In "5.References" and the text, the reference numbers were added. The format of reference was changed. The references of the following paper were added.

Ohno, Y., ATLA, 32, Supplement 1, 643-655, 2004.

Scott, L. et al., Toxicol. *In Vitro*, 24(1), 1-9 (2010).

The reference of the following paper was deleted.

Ohno, Y. et al., *In Vitro Toxicol.*, 7, 89 (1994)

Table 2 of appendix 1 and the related sentences were deleted.

In reference of appendix 1, the format of references was changed.

(10)The revision from ver.3.3 to ver.3.4:

In 2., "The application time of 72hr is set with consideration of time (within 72hr) from ocular instillation to maximal eye irritation for general chemicals except acid or alkali, on the basis of in vivo data at the previous research project<sup>9)</sup>." was added.

In 2., "The SIRC cytotoxicity test procedure is based on the measurement of viable cells stained by crystal violet." was changed to "The SIRC cytotoxicity test is based on the measurement of viable cells stained by crystal violet, which penetrates via cell membrane and stains biological macromolecules."

In 2., "On the other hand, the disadvantage of this method is to be confined to test substances which are solved or uniformly suspended in the medium." was added.

In 4.5., "If the multiple concentrations showing 50% cell viability were obtained from one substance, the lowest IC<sub>50</sub> should be adopted." was added.

表 1. 試薬のメーカー等の例

No.	試薬 または 培養液	メーカー	カタログ番号	備考
1	MEM (Minimum Essential Medium)	GIBCO	Code#: 11095	
2	Fetal Bovine Serum	GIBCO	REF#: 26140-079	
3	Penicillin-Streptomycin-Amphotericin (100x)	GIBCO/BRL	REF#: 15240-062	
4	Phosphate-Buffered Saline (PBS(-))	日水製薬	Code#: 05913	
5	0.25% (w/v) Trypsin (1mmol/L EDTA・4Na)	和光純薬	Cat#: 209-16941	
6	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	関東化学	Cat# 2950-1B	
7	Ethanol	和光純薬	Cat#: 057-00456	
8	Crystal violet	和光純薬	Cat#: 031-04852	
9	Methanol	和光純薬	Cat#: 131-01826	
10	Sodium Dodecyl Sulfate	和光純薬	Cat#: 191-07145	
11	Triethanolamine	関東化学	Cat#: 40268-00	

No.1、2、3、10、11 は同一規格のものを使用。それ以外の試薬はメーカーを問わず同等品を使用可能。

日水製薬：日水製薬株式会社

和光純薬：和光純薬工業株式会社

関東化学：関東化学株式会社

Table 1. The example of the manufacturer and so on of the reagent

No.	Reagent or Medium	Manufacturer	Catalog number	Remarks
1	MEM (Minimum Essential Medium)	GIBCO	Code#: 11095	
2	Fetal Bovine Serum	GIBCO	REF#: 26140-079	
3	Penicillin-Streptomycin-Amphotericin (100x)	GIBCO/BRL	REF#: 15240-062	
4	Phosphate-Buffered Saline (PBS(-))	Nissui	Code#: 05913	
5	0.25% (w/v) Trypsin (1mmol/L EDTA·4Na)	Wako	Cat#: 209-16941	
6	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Kanto	Cat# 2950-1B	
7	Ethanol	Wako	Cat#: 057-00456	
8	Crystal violet	Wako	Cat#: 031-04852	
9	Methanol	Wako	Cat#: 131-01826	
10	Sodium Dodecyl Sulfate	Wako	Cat#: 191-07145	
11	Triethanolamine	Kanto	Cat#: 40268-00	

The products of the same specification are used for the reagents of No.1, 2, 3, 10 and 11. The equivalents regardless of manufacturer are acceptable for other reagents.

Nissui: NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD

Wako: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Kanto: KANTO CHEMICAL, CO., INC.



図2 96ウェルマイクロプレートのレイアウト

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8		PBS
C	PBS		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8		PBS
D	PBS											PBS
E	PBS											PBS
F	PBS		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8		PBS
G	PBS		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8		PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

ODの平均値を出す  
20%以内か  
どうか。  
102に  
IC50を出す

PBS:PBS(-)を 200  $\mu$ L、NC:培養液、10,000  $\mu$ g/mL DMSO 培養液溶液または 10,000  $\mu$ g/mL Ethanol 培養液溶液を 100  $\mu$ L、S:被験物質の2倍希釈系列(100  $\mu$ L)、R:比較対照物質の2倍希釈系列(100  $\mu$ L)、P:陽性物質の2倍希釈系列(100  $\mu$ L)

被験物質を溶解または懸濁させた溶媒(培養液、10,000  $\mu$ g/mL DMSO-培養液溶液または 10,000  $\mu$ g/mL Ethanol 培養液溶液)は、希釈系列を作る時にも用いる。陽性対照と比較対照の希釈系列には培地を用いる。

15%未満

Figure 2. Layout of 96 well microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8		PBS
C	PBS		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8		PBS
D	PBS											PBS
E	PBS											PBS
F	PBS		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8		PBS
G	PBS		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8		PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

PBS:PBS(-) of 200  $\mu$ L, NC:Medium, 10,000  $\mu$ g/mL DMSO-Medium solution or 10,000  $\mu$ g/mL ethanol-Medium solution of 100  $\mu$ L, S:Dilution series of the test substances by a common ratio of two (100  $\mu$ L), R:Dilution series of the relative control by a common ratio of two (100  $\mu$ L), P: Dilution series of the positive control by a common ratio of two (100  $\mu$ L).

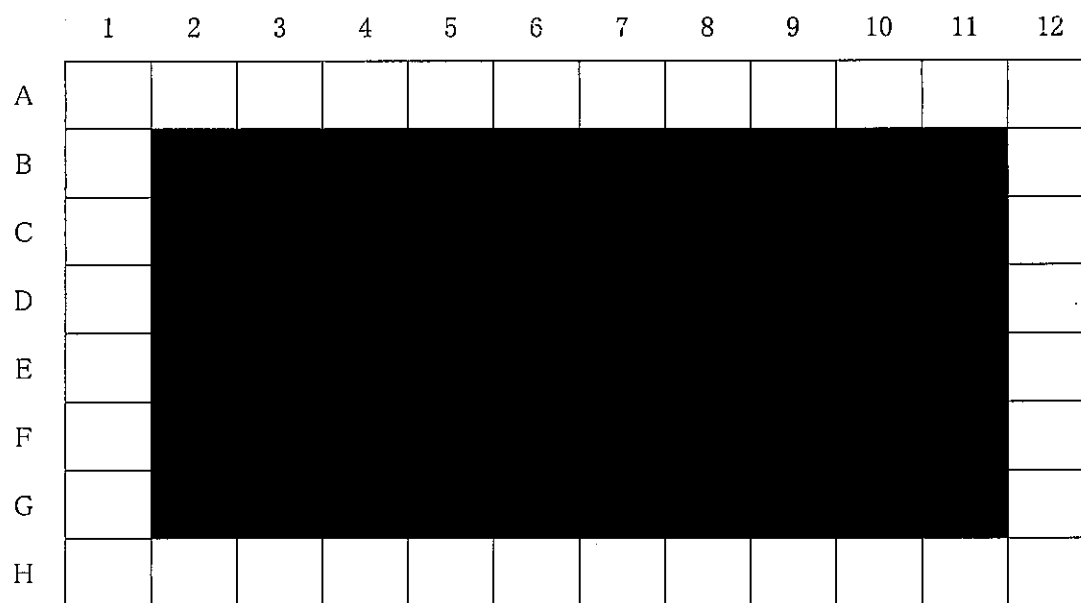
The dilution series of the test substance should be made using medium, 10,000  $\mu$ g/mL DMSO-Medium solution or 10,000  $\mu$ g/mL ethanol-Medium solution. The dilution series of positive control and relative control should be made using medium.

図3 細胞浮遊液の添加

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		■										
C												
D												
E												
F												
G												
H												

■:細胞浮遊液(100  $\mu$ L)

Figure 3. Addition of cell suspension



■ : Cell suspension (100  $\mu$ L)

## 付属書 1 比較対照物質として Triethanolamine を選定した理由

GHS 基準における無刺激性物質 (NI) とそれ以外 (刺激性物質) を区別するための比較対照物質として Triethanolamine を設定した。Triethanolamine は大野ら<sup>1)</sup>や谷ら<sup>2)</sup>によって報告された「厚生科学研究および日本化粧品工業連合会によるバリデーション研究」における被験物質の一つである。また、試薬として購入でき、培地に溶解可能で、眼刺激性評価の目的のために有用な細胞毒性と *in vivo* のデータを有している。

比較対照物質の選定にあたっては、それぞれの被験物質を比較対照として選ぶという仮定で、以前のバリデーションで用いられた利用可能な全ての物質に対して無刺激物と刺激物を区別するための正確度等をチェックした。GHS 分類による比較検討の結果として、表 1 に示すように、比較的少ない偽陰性、細胞毒性が求められなかった物質 (10000 以下など) を除いた場合に得られた最も高い正確度、そして偽陰性物質のカテゴリー (例、アルコール) が明確であるという理由により、比較対照物質として triethanolamine が選定された。偽陰性物質群の同定は眼刺激性のリスクを避けるために重要である。

### 参考文献

- 1) Ohno, Y. et al., *Toxicology in Vitro* 13, 73-98 (1999)
- 2) Tani, N. et al., *Toxicology in Vitro* 13, 175-187(1999)

表1 比較対照物質選定のための以前のバリデーション研究データに基づく相関性評価 -GHS 分類-

被験物質	In vivo 評価	SIRC 細胞毒性: IC <sub>50</sub> (ug/mL)	順位付けに 利用した値	True Negativ e	False Negativ e	True Positive	False Positive	一致 率(%)
Polyethylene glycol 400	NI	35300<	35300	1	0	27	6	82
Silicic anhydride	NI	14800<	14800	2	0	26	6	82
Glycerin	NI	11600	11600	3	0	25	6	82
Isotonic sodium chloride solution	NI	10000<	10000	4	1	24	5	82
Ethanol	1or2A	10000<	10000	4	1	24	5	82
Isopropyl myristate	NI	9330<	9330	5	1	24	4	85
Butanol*	1or2A	8880<	8880	5	2	23	4	82
Triethanolamine	NI	2090	2090	6	2	23	3	85
Lactic acid	1	1230	1230	6	3	22	3	82
Benzyl alcohol	1or2A	1190	1190	6	4	21	3	79
Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.)	NI	963	963	7	4	21	2	82
Sodium salicylate	1or2A	952	952	7	5	20	2	79
Glycolic acid*	1or2A	868	868	7	6	19	2	76
Acetic acid*	1or2A	721	721	7	7	18	2	74
Diisopropanolamine*	1, 2Aor2B	699	699	7	8	17	2	71
2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate	NI	474	474	8	8	17	1	74
Calcium thioglycolate	1	392	392	8	9	16	1	71
Acid red 92	1or2A	297	297	8	10	15	1	68
Sucrose fatty acid ester	1or2A	286	286	8	11	14	1	65
m-Phenylenediamine	1or2A	218	218	8	12	13	1	62
Methyl p-hydroxybenzoate	NI	207	207	9	12	13	0	65
Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate*	1or2A	181	181	9	13	12	0	62
Sodium lauryl sulfate*	1or2A	168	168	9	14	11	0	59
Sodium hydrogenated tallow L-glutamate*	1or2A	140	140	9	15	10	0	56
Potassium laurate*	1or2A	120	(Data from 4 labs) 120	9	16	9	0	53
Chlorhexidine gluconate (20% solution)*	1or2A	67.6	67.6	9	17	8	0	50
Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)*	1or2A	38.4	38.4	9	18	7	0	47
Distearyldimethylammonium chloride	1	37.8	37.8	9	19	6	0	44
Benzalkonium chloride*	1or2A	19.0	19	9	20	5	0	41
Domiphen bromide*	1or2A	12.1	12.1	9	21	4	0	38
Monoethanolamine*	1or2A	9.62	9.62	9	22	3	0	35
Cetyltrimethylammonium bromide*	1or2A	2.59	(Data from 4labs) 2.59	9	23	2	0	32
Cetylpyridinium chloride*	1	1.67	1.67	9	24	1	0	29
Stearyltrimethylammonium chloride*	1	1.58	1.58	9	25	0	0	26

§: Draize 試験結果は 21 日目の観察が行われていないため、GHS 分類の 1 と 2 の区別は必ずしもできなかった。観察は 14 日目まで行われた。

#: SIRC 細胞毒性試験のデータは一部を除いて 5 施設以上の IC<sub>50</sub> 値の平均である。

\*: 原体適用の in vivo 結果は濃度 10% におけるデータから外挿された。

## Appendix 1 The reason for selecting triethanolamine as a reference control

Triethanolamine was selected as a relative control substance of the SIRC cytotoxicity test for discriminating between non irritant (NI) (= not classified) and irritant in the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). It is one of the substances used in the previous validation study that was performed by a Research Grant for Health Sciences, MHW and Japanese Cosmetic Industry Association, and reported by Ohno et al.<sup>1)</sup> and Tani et al.<sup>2)</sup> Also, it has the ready availability as a commercial reagent, the solvability in the medium, and the useful cytotoxicity and in vivo data for evaluating the eye irritancy.

For selecting the relative control substance, the accuracy and others for discriminating between non irritant and irritant was checked using every available substances in the previous validation with the intention of selecting each substance as a relative control substance. As a result of the comparative study using GHS classification, the triethanolamine was selected as a relative control substance because of the relatively small false negative, the highest accuracy except for substances which could not be obtained the cytotoxicity (10000< etc.), and the clarity about the category (for example, alcohol) of false negative substances, as shown in table 1. The identification of the group of the false negative substances is important to avoid the risk of eye irritation.

### References

- 1) Ohno, Y. et al., *Toxicology in Vitro* 13, 73-98 (1999)
- 2) Tani, N. et al., *Toxicology in Vitro* 13, 175-187(1999)

Table 1 The correlative evaluation on the basis of the previous validation study data for selecting relative control substance – GHS classification –

Substances	In vivo Evaluation by GHS <sup>§</sup>	The SIRC cytotoxicity : IC <sub>50</sub> (ug/mL) <sup>#</sup>	The values for ranking	True Negative	False Negative	True Positive	False Positive	Accuracy (%)
Polyethylene glycol 400	NI	35300<	35300	1	0	27	6	82
Silicic anhydride	NI	14800<	14800	2	0	26	6	82
Glycerin	NI	11600	11600	3	0	25	6	82
Isotonic sodium chloride solution	NI	10000<	10000	4	1	24	5	82
Ethanol	1or2A	10000<	10000	4	1	24	5	82
Isopropyl myristate	NI	9330<	9330	5	1	24	4	85
Butanol*	1or2A	8880<	8880	5	2	23	4	82
Triethanolamine	NI	2090	2090	6	2	23	3	85
Lactic acid	1	1230	1230	6	3	22	3	82
Benzyl alcohol	1or2A	1190	1190	6	4	21	3	79
Polyoxyethylene sorbitan monooleate (20E.O.)	NI	963	963	7	4	21	2	82
Sodium salicylate	1or2A	952	952	7	5	20	2	79
Glycolic acid*	1or2A	868	868	7	6	19	2	76
Acetic acid*	1or2A	721	721	7	7	18	2	74
Diisopropanolamine*	1, 2Aor2B	699	699	7	8	17	2	71
2-Ethylhexyl p-dimethylamino benzoate	NI	474	474	8	8	17	1	74
Calcium thioglycolate	1	392	392	8	9	16	1	71
Acid red 92	1or2A	297	297	8	10	15	1	68
Sucrose fatty acid ester	1or2A	286	286	8	11	14	1	65
m-Phenylenediamine	1or2A	218	218	8	12	13	1	62
Methyl p-hydroxybenzoate	NI	207	207	9	12	13	0	65
Di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate*	1or2A	181	181	9	13	12	0	62
Sodium lauryl sulfate*	1or2A	168	168	9	14	11	0	59
Sodium hydrogenated tallow L-glutamate*	1or2A	140	140	9	15	10	0	56
Potassium laurate*	1or2A	120 (Data from 4 labs)	120	9	16	9	0	53
Chlorhexidine gluconate (20% solution)*	1or2A	67.6	67.6	9	17	8	0	50
Polyoxyethylene octylphenylether (10 E.O.)*	1or2A	38.4	38.4	9	18	7	0	47
Distearyldimethylammonium chloride	1	37.8	37.8	9	19	6	0	44
Benzalkonium chloride*	1or2A	19.0	19	9	20	5	0	41
Domiphen bromide*	1or2A	12.1	12.1	9	21	4	0	38
Monoethanolamine*	1or2A	9.62	9.62	9	22	3	0	35
Cetyltrimethylammonium bromide*	1or2A	2.59 (Data from 4 labs)	2.59	9	23	2	0	32
Cetylpyridinium chloride*	1	1.67	1.67	9	24	1	0	29
Stearyltrimethylammonium chloride*	1	1.58	1.58	9	25	0	0	26

§ : The Draize eye test results couldn't always discriminate between 1 and 2 of GHS classification for no observation data on day 21. The observation was performed to day 14.

# : The data of SIRC cytotoxicity test were the mean of IC<sub>50</sub> (ug/mL) from more than 5 laboratory except for one part.

\* : The in vivo results of as is application was predicted from the data of 10% concentration.



付属書 2 比較対照物質の Triethanolamine の IC<sub>50</sub> の範囲の根拠

Triethanolamine の IC<sub>50</sub> の範囲である 1,000~2,500 µg/mL は、n=144 のデータの平均±2倍の標準偏差に基づいている。

Appendix 2 The basis for the set IC<sub>50</sub> range of triethanolamine as a reference control

The IC<sub>50</sub> range of triethanolamine, 1,000-2,500 µg/mL is based on the mean  $\pm$  2 x standard deviation from the data (n=144).