

■ Original article

生体消毒薬の安全性評価に向けた *in vitro* 系での基礎的検討

—4 種の培養細胞と 7 種の消毒薬を用いた生細胞数評価法に関する検討—

池本真実子^{1,2}、松村有里子^{1*}、岩澤篤郎¹、木村 哲¹¹ 東京医療保健大学大学院² フリーキラ製薬A study on the evaluation of safety of antiseptics using *in vitro* assay: Evaluation method of cell viability using four cultured cell lines and seven kinds of antisepticsMamiko Ikemoto^{1,2}, Yuriko Matsumura^{1*}, Atsuo Iwasawa¹, Satoshi Kimura¹¹ Division of Infection Prevention and Control, Tokyo Healthcare University Postgraduate School² FreeKira Pharmaceutical Co., Ltd.

背景：「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」（薬機法）による医薬品申請時に、ヒトに対する安全性を確保するために実験動物を使用した毒性に関する試験を求めている。近年、世界的に実験動物の基準理念である 3R の原則の徹底がはかられ、様々な分野で代替試験法による評価が行われてきている。しかし、消毒薬の毒性に関して実用化されている代替試験法はない。

目的：生体消毒薬の安全性評価について、動物実験の代替法として培養細胞を用いた試験法を確立するための基礎的検討として、生細胞数の評価方法と消毒薬作用による細胞生存率の違いを検討した。

方法：培養細胞は、Chang conjunctiva 細胞、HeLa 細胞、Human Dermal Fibroblast 細胞、FRSK 細胞を用いた。供試サンプルには、市販の微弱酸性次亜塩素酸水溶液と消毒用エタノール、消毒薬の主成分である次亜塩素酸ナトリウム溶液、亜塩素酸ナトリウム溶液、グルコン酸クロルヘキシジン溶液、塩化ベンザルコニウム溶液または塩化ベンゼトニウム溶液を 100 ppm に調整して使用した。常法に従って培養した各細胞株を単層培養後、培養液量 100 μ L に対して供試サンプル 10 μ L を接触させ、2 日後に MTT 法および NR 法により細胞生存率を評価した。

結果：塩素系消毒薬作用後の細胞生存率は、細胞株によらずいずれの評価方法でもコントロールとほぼ同じであったが、亜塩素酸ナトリウム水溶液のみ最終濃度 9 ppm で細胞生存率が低下した。低水準消毒薬は細胞株によらず細胞生存率は低下した。消毒用エタノールはいずれの方法でも 100 倍希釈以上の濃度で作用すると細胞生存率はほぼ 80 % 以上であった。低水準消毒薬では細胞生存率の求め方によって乖離した結果となった。細胞株間で異なる細胞生存率を示すものがあった。

結論：消毒薬の毒性を評価する際には消毒薬の作用機序を勘案して適切な生細胞数の評価方法を選択する必要がある。生体消毒薬の安全性を評価する際には、評価対象に応じた系を選択する必要があることが示唆された。

Key words：生体消毒薬（Antiseptics）、動物実験代替法（Animal testing alternative）、培養細胞（Cultured cells）、MTT 法（MTT assay）、NR 法（NR assay）

1. はじめに

医療現場での感染対策として、手指消毒や環境表面の清浄化を行う際に消毒薬が使用されている。消毒薬には、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」（薬機法）による承認を受けた医薬品と医薬部外品、指定医薬部外品、化粧品に加え、除菌を目的に雑品として販売されているものもある。薬機法による承認を受けるためには、医薬品申請時に、ヒトに対する安全性を確保するために実験動物を用いた毒性試験の実施を要する「ホ、急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、催奇形性その他の毒性に関する資料」を提出する必要がある¹⁾。しかし近年、動物福祉や倫理の観点から実験動物を用いない代替法による試験の実施が推奨されてきている。特に、欧州では2013年に動物実験が行われた化粧品の販売が禁止されている。化学物質やその混合物の安全性を評価するための国際的に合意された試験方法のコレクションである経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD）テストガイドライン²⁾には、現在、表1に示す10のカテゴリーで動物実験にかわる代替試験法が記載されているが、実験動物を用いる試験法も多く存在する。日本でも、2020年に「動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針」³⁾に、世界的な動物実験の基準理念である「3R（Reduction, Replacement, Refinement）がある¹⁾。しかし近年、動物福祉や倫理の観点から実験動物を用いない代替法による試験の実施が推奨されてきている。特に、欧州では2013年に動物実験が行われた化粧品の販売が禁止されている。化学物質やその混合物の安全性を評価するための国際的に合意された試験方法のコレクションである経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD）テストガイドライン²⁾には、現在、表1に示す10のカテゴリーで動物実験にかわる代替試験法が記載されているが、実験動物を用いる試験法も多く存在する。日本でも、2020年に「動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針」³⁾に、世界的な動物実験の基準理念である「3R（Reduction, Replacement, Refinement）

表1 OECD テストガイドライン²⁾に記載されている動物試験代替法

番号	試験法	略称・日本語呼称、採用されている試験法
皮膚腐食性試験		
TG430	<i>in vitro</i> Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER)	経皮電気抵抗試験 (TER)
TG431	<i>in vitro</i> Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) test method	RHE（再生ヒト皮膚モデル）、LabCyte EPI-MODEL24
TG435	CORROSITEX Skin Corrosivity Test	膜バリア試験法、ORROSITEX 法
皮膚刺激性試験		
TG439	<i>in vitro</i> Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test methods, EpiDerm, EPISKIN, SkinEthic, LabCyte EPI-Model	EpiDerm, EPISKIN, SkinEthic, LabCyte EPI-Model
光毒性試験		
TG432	3T3 NRU Phototoxicity Test	3T3 NRU 法
TG495	Ros (Reactive Oxygen Species) Assay for Photoreactivity	ROS 法
TG498	In vitro Phototoxicity: Reconstructed Human Epidermis Phototoxicity test method	再構築ヒト表皮光毒性試験 (RhE PT) 法
眼刺激性試験		
TG437	Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method	牛摘出角膜の混濁および透過性試験法 (BCOP)
TG438	Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method	ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法 (ICE 法)
TG460	Fluorescein Leakage (FL) Test Method	フルオレセイン漏出試験法 (FL 法)
TG491	Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage	STE 法
TG492	Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage	重症眼損傷物質同定用再構築ヒト角膜様上皮 (RhCE) 試験、ヒト角膜モデル EpiOcular、SkinEthics、LabCyte Cornea-model24 EIT
TG494	Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage	Vitrigel [®] - EIT (Eye Irritancy Test) 法
TG496	<i>in vitro</i> Macromolecular Test Method for Identifying Chemicals Inducing Serious Eye Damage and Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage	マクロモレキュラ法
皮膚感作性試験		
TG442C	<i>in chemico</i> Skin Sensitization, Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)	DPRA 法（ペプチド結合性試験）
TG442D	In Vitro Skin Sensitization, ARE-Nrf2 Luciferase Test Method	角化細胞株レポーター法 (Keratin Sens 法と Lu Sens 法)
TG442E	<i>in vitro</i> Skin Sensitization	<i>in vitro</i> 皮膚感作性試験 (h-CLAT、U-SENS、IL-8 Luc Assay)
Guideline 497	Defined Approaches for Skin Sensitization	皮膚感作性試験の確定方式 (DA)

表1 OECD テストガイドライン²⁾に記載されている動物試験代替法(つづき)

番号	試験法	略称・日本語呼称、採用されている試験法
皮膚透過性試験(経皮吸収試験)		
TG428	Skin Absorption: <i>in vitro</i> Method	<i>in vitro</i> 皮膚透過試験法
内分泌かく乱スクリーニング		
TG455	Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation <i>In vitro</i> Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists Test	化学物質のエストロゲンアゴニスト活性の検出を目的とした、安定に形質移入されたヒトエストロゲン受容体- α の転写活性化試験、(ER-STTA(agonist) (antagonist)、BG1Luc ERTA 法)
TG456	H295R Steroidogenesis Assay	H295R 細胞ステロイド生合成法
TG457	BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists	BG1Luc ER TA 法(ヒトエストロゲン受容結合体による活性化・拮抗作用物質を検出する BG1Luc ER TA 法)
TG493	Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) <i>in vitro</i> Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity	CER1 <i>In Vitro</i> Estrogen Receptor Binding Assay
TG458	Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals	ヒトアンドロゲン(AR)受容体安定トランスフェクト転写活性試験(AR-EcoScreen)
遺伝毒性試験		
TG471	Bacterial Reverse Mutation Test	細菌を用いる復帰突然変異試験
TG473	<i>In vitro</i> Mammalian Chromosome Aberration Test	ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験
TG476	<i>In vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Test	ほ乳類培養細胞を用いる突然変異試験
TG487	<i>In vitro</i> Micronucleus Test	ほ乳類細胞を用いた <i>in vitro</i> 小核試験
TG490	<i>In Vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene	<i>in vitro</i> チミジンキナーゼ遺伝子による哺乳動物細胞遺伝子変異試験
形質転換試験		
GD214	Syrian Hamster Embryo (SHE) Cell Transformation Assay: Guidance Document	SHE 法
発がん性スクリーニング		
GD231	<i>in vitro</i> Bhas 42 Cell Transformation Assay	Bhas 42 細胞形質転換試験(Bhas 法)

の原則」に基づく内容が規定され、代替試験法に関する研究が加速してきている。これまでに、培養細胞を用いた消毒薬の細胞毒性に関する検討として、ヒト繊維芽細胞を用いた検討⁴⁾やヒト気道上皮の線毛細胞の細胞株を用いた検討⁵⁾が報告されている。しかし、消毒薬の毒性に関する代替試験法として実用化されている方法はなく、*in vitro* 試験系での毒性評価に培養細胞を用いることで、細胞レベルでの評価が可能になることが期待される。

培養細胞の生細胞数の評価に使用される細胞生存率は、細胞の代謝活性から算出する ELISA を用いたタンパク量測定⁶⁾や PCR を用いた RNA の定量⁴⁾、細胞の増殖能力を指標として顕微鏡観察によりコロニー数を計測するコロニー形成法⁴⁾、放射性同位体元素で標識したチミジンを細胞中の DNA に取り込ませてシンチレーションカウンター等で標識チミジンを定量するチミジン取り込み法⁷⁾、還元発色試薬と生細胞中の脱水素酵素活性を利用して吸光度測定により細胞数を計測する WST 法や MTT 法⁸⁾等を用いて行われている。しかし、これらの

評価方法を用いたこれまでの研究では特定の培養細胞を用いており、多様な培養細胞の比較を実施した報告例はない。

本研究では、実験動物の代替として培養細胞を用いる試験系の確立に向けた基礎的な検討として、4 種類の培養細胞に対する 3 種の塩素系消毒薬、3 種の低水準消毒薬、消毒用エタノールの細胞生存率の違いを検討することで、消毒薬の毒性試験系の指標を見出すこととした。塩素系消毒薬には第 2 類医薬品である微弱酸性次亜塩素酸水溶液と一般的に広く使用されている次亜塩素酸ナトリウム水溶液と亜塩素酸ナトリウム水溶液を用い、低水準消毒薬として汎用されているグルコン酸クロロヘキシジン水溶液、塩化ベンザルコニウム水溶液、塩化ベンゼトニウム水溶液を用いた。生細胞数の評価には、放射性同位体を使用せず、短時間で結果が得られる方法として還元発色試薬と生細胞中の脱水素酵素活性を利用した MTT 法と OECD テストガイドライン (OECD TG 432) の光毒性試験²⁾で生細胞数の評価に用いられている NR 法を用い、消毒薬の毒性試験に適した生細胞数の評価方

法についても検討した。

2. 方法

2.1 材料

培養細胞は、Chang conjunctiva 細胞（ヒト成人結膜由来、Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival cell line、大日本製薬株式会社）、HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌由来、名古屋衛研より分与）、Human Dermal Fibroblast 細胞（ヒト皮膚線維芽細胞、Cell Systems）、FRSK 細胞（ラット表皮由来、JCRB0005）を用いた。培地は、Chang conjunctiva 細胞には 199 培地（日水製薬株式会社）に 10% Fetal bovine serum（FBS、NICHIREI）を添加し、HeLa 細胞には Eagle's minimal essential medium 培地（E-MEM、日水製薬株式会社）に 10%FBS を添加し、H. D. Fibroblast 細胞と FRSK 細胞にはダルベッコ MEM（日水製薬株式会社）に 10%FBS を添加して使用した。

生体消毒薬は、市販の塩素系消毒薬である微弱酸性次亜塩素酸水溶液（フリーキラ S[®]、有効塩素濃度 150 ～ 260 ppm、株式会社フリーキラ製薬）と消毒用エタノール（日本薬局方消毒用エタノール[®]、76.9 ～ 81.4 v/v%、富士フイルム和光純薬株式会社）を用いた。

その他の消毒薬として次亜塩素酸ナトリウム水溶液は次亜塩素酸ナトリウム溶液（和光純薬工業株式会社）から、亜塩素酸ナトリウム水溶液は、亜塩素酸ナトリウム溶液（Sigma-Aldrich）から、グルコン酸クロルヘキシジン水溶液は 20% グルコン酸クロルヘキシジン溶液（富士フイルム和光純薬株式会社）から、塩化ベンザルコニウム水溶液は塩化ベンザルコニウム溶液（ナカライテスク株式会社）から、塩化ベンゼトニウム水溶液は塩化ベンゼトニウム溶液（東京化成工業株式会社）から、Mil-liQ 水で 100 ppm に調整して用いた。

2.2 評価方法

各細胞株を単層培養後、2 日間供試サンプルと接触させ、MTT 法および NR 法により消毒薬作用後の細胞生存率を求めた。以下に詳細を示す。

2.2.1 MTT 法

96 ウェルプレートの各ウェルに約 10⁴ cells/100 μ L の細胞を 100 μ L ずつ播種し、CO₂ インキュベーター（CO₂ 濃度 5%、37℃）内で 2 日間培養した。ダルベッ

コリン酸緩衝生理食塩水（Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(PBS(-))）で消毒薬の希釈系列を作成し、単層培養した細胞の所定のウェルに 10 μ L ずつ添加し、CO₂ インキュベーター内で 2 日間培養した。消毒薬の最終濃度は添加時の濃度の 0.09 倍となる。5 mg/mL の MTT (SIGMA) を各ウェルに 10 μ L 添加して 4 時間 CO₂ インキュベーター内で培養した後、0.04M 塩酸-イソプロパノール溶液 100 μ L 添加して、析出した難溶性の沈殿物を溶解した。マイクロプレートリーダー（バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社 iMark）で対照波長を 630 nm として 570 nm の吸光度（Abs_{薬剤処理}）を測定した。

2.2.2 NR 法

MTT 法と同様に細胞を単層培養した後、PBS(-) で希釈系列を作成した消毒薬を、所定のウェルに 10 μ L ずつ添加し、CO₂ インキュベーター内で 2 日間培養した。消毒薬の最終濃度は添加時の濃度の 0.09 倍となる。500 μ g/mL のニュートラルレッド（和光純薬工業株式会社）水溶液を各ウェルに 10 μ L 加え、3 日間培養した。PBS(-) で洗浄し、1% の塩化カルシウム（和光純薬工業株式会社）を含む 1% ホルムアルデヒド液（和光純薬工業株式会社）で 15 分固定した。PBS (-) で洗浄後、50% エタノールー 1% 酢酸液で抽出し、540 nm の吸光度（Abs_{薬剤処理}）をマイクロプレートリーダーで測定した。

2.2.3 細胞生存率の算出

MTT 法および NR 法で得られた Abs_{薬剤処理} とコントロールとして PBS(-) を用いた時の吸光度（Abs_{未処理}）を用いて、式 1 により薬剤処理後の細胞生存率（%）を算出した。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = \text{Abs}_{\text{薬剤処理}} / \text{Abs}_{\text{未処理}} \times 100 \quad (\text{式 1})$$

3. 結果

3.1 塩素系消毒薬作用後の細胞生存率

各細胞に 3 種の塩素系消毒薬をそれぞれ作用した後の細胞生存率を図 1 に示す。

微弱酸性次亜塩素酸水溶液または次亜塩素酸ナトリウム水溶液を作用させると、いずれの消毒薬も濃度によらず、すべての細胞において生細胞数の評価方法によらず細胞生存率はほぼ 100% であった（図 1(a)~(d)）。亜塩

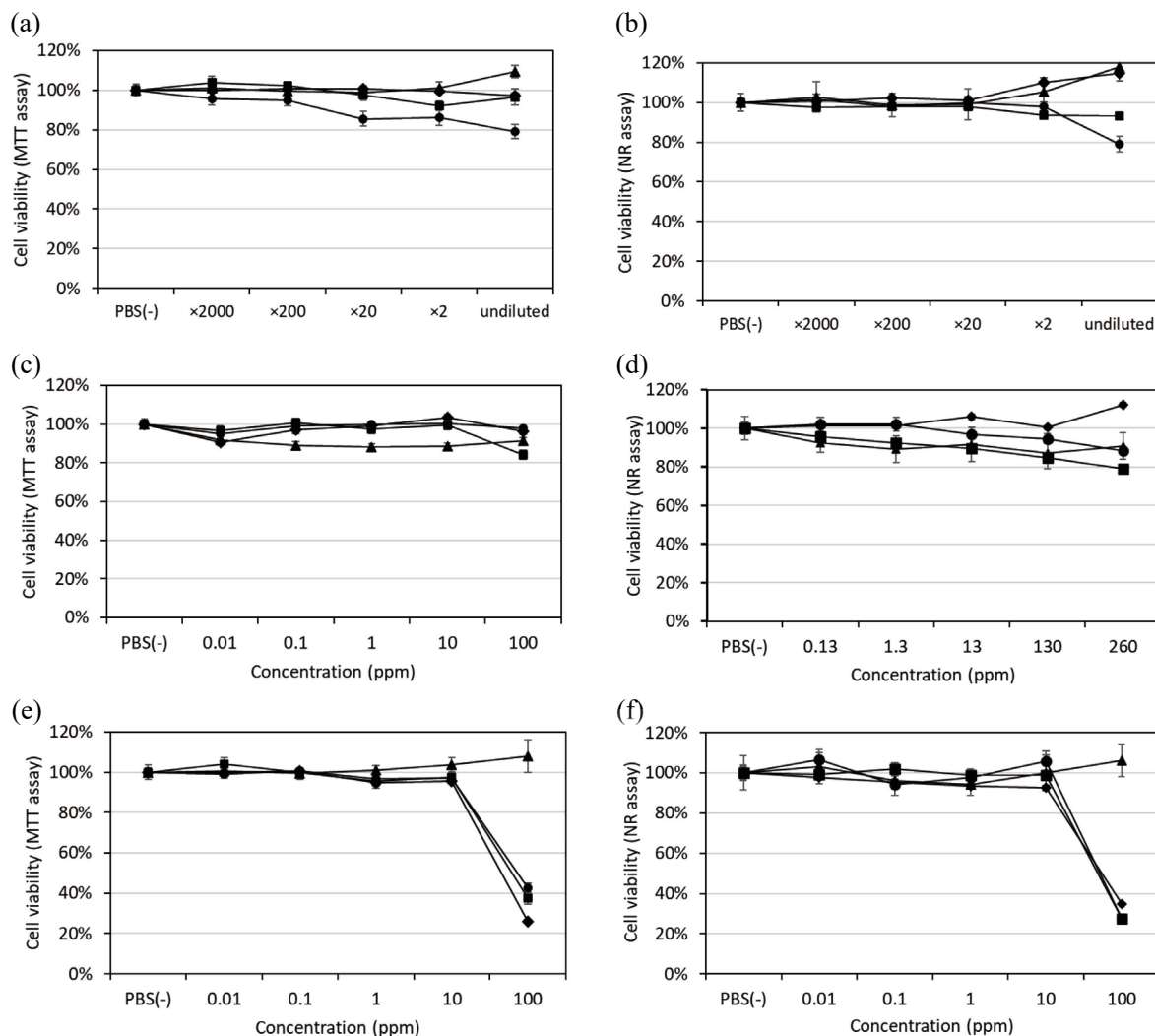


図1 塩素系消毒薬の4種の細胞に対するMTT法(a, c, e)およびNR法(b, d, f)で求めた細胞生存率

(a), (b): 微弱酸性次亜塩素酸水溶液

(c), (d): 次亜塩素酸ナトリウム水溶液

(e), (f): 亜塩素酸ナトリウム水溶液

●: Chang conjunctiva cells、■: HeLa cells、◆: Human Dermal Fibroblast cells、▲: FRSK cells

素酸ナトリウム水溶液を作用させると、FRSK細胞では消毒薬の濃度によらず細胞生存率はほぼ100%であったのに対し、Chang conjunctiva細胞、HeLa細胞、Human Dermal Fibroblast細胞では、原液の100 ppm（最終濃度9 ppm）を作用させると生細胞数の評価方法によらず細胞生存率は40%以下に減少した（図1(e), (f)）。

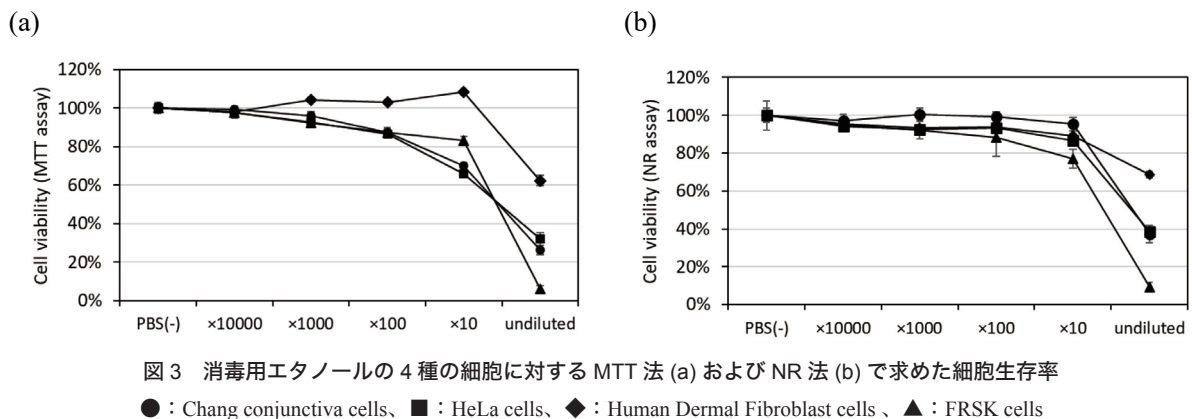
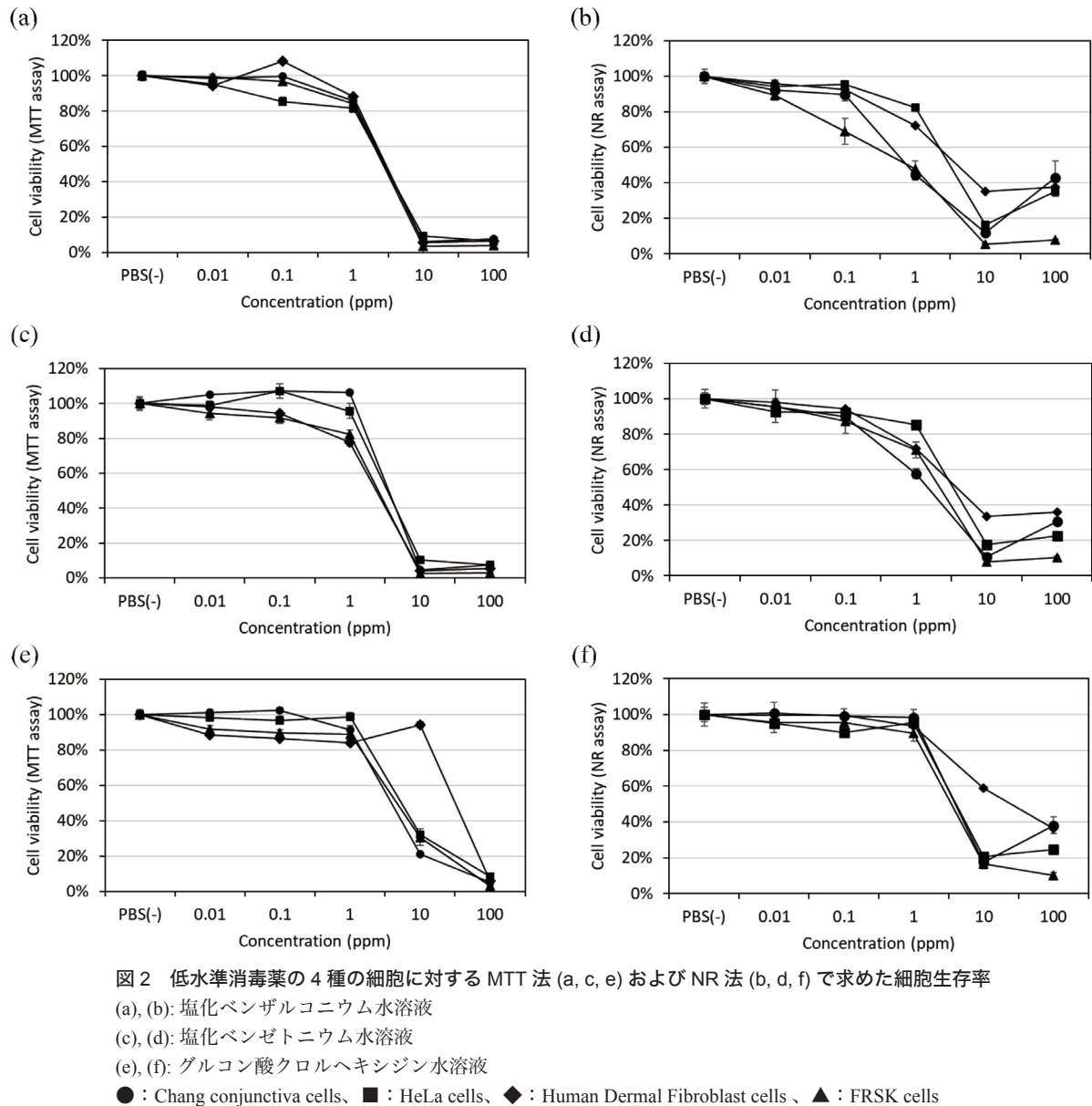
3.2 低水準消毒薬作用後の細胞生存率

各細胞に3種の低水準消毒薬をそれぞれ作用させた後の細胞生存率を図2に示す。

MTT法を用いると、塩化ベンザルコニウム水溶液作用時には、100倍希釈以下の濃度ではすべての細胞において細胞生存率は82%以上であったが、10 ppm（最終濃度0.9 ppm）以上の濃度では細胞生存率は10%未満

となった（図2(a)）。NR法を用いると、0.01 ppm（最終濃度0.0009 ppm）ではすべての細胞で細胞生存率は約90%であったが、0.1 ppm（最終濃度0.009 ppm）以上の濃度で細胞生存率が減少した。その生存率は細胞の種類により異なり、10 ppm（最終濃度0.9 ppm）ではHeLa細胞は16%、Chang conjunctiva細胞では12%、FRSK細胞では6%となった（図2(b)）。

塩化ベンゼトニウム水溶液を作用させると、0.1 ppm（最終濃度0.009 ppm）以下の濃度では生細胞数の評価方法によらず細胞生存率は85%以上であった。10 ppm（最終濃度0.9 ppm）以上の濃度では、NR法より求めたHuman Dermal Fibroblast細胞の細胞生存率を除き、生細胞数の評価方法によらず細胞生存率は35%以下であった（図2(c)(d)）。



グルコン酸クロルヘキシジン水溶液を作用させると、1 ppm (最終濃度 0.09 ppm) 以下の濃度では生細胞数の評価方法によらず細胞生存率は 80 ~ 100% であった。10 ppm (最終濃度 0.9 ppm) では Human Dermal Fibro-

blast 細胞の細胞生存率を除き、生細胞数の評価方法によらず細胞生存率は 30% 未満であった (図 2(e)(f))。

3.3 消毒用エタノール作用後の細胞生存率

各細胞に消毒用エタノールを作用した後の細胞生存率を図3に示す。100倍希釈以下の濃度で作用させると、生細胞数の評価方法によらず細胞生存率は80～100%であった。10倍希釈の濃度では、NR法より求めた細胞生存率はほぼ100倍希釈の濃度作用時と同様の結果であったが、MTT法を用いるとHuman Dermal Fibroblast細胞を除きわずかに細胞生存率が低下した。原液作用時には評価方法によらず細胞生存率が低下し、Human Dermal Fibroblast細胞の細胞生存率は60～70%、HeLa細胞とChang conjunctiva細胞は20～40%、FRSK細胞では10%以下まで減少した。

4. 考 察

生体消毒薬の安全性評価には、実験動物を用いた毒性試験が実施されており、動物を用いない代替試験法として実用化されたものはない。先行研究において我々は、数社から市販されている10%ポビドンヨード製剤の殺菌効果に違いは認められないこと、およびポビドンヨード自体の細胞毒性は低いものの添加物である界面活性剤により細胞毒性が異なることを見出し、創傷部に繰り返し使用する際には添加物の毒性にも注意が必要であることを示してきた^{9,10)}。培養細胞に対して消毒薬が毒性を示す場合、細胞の代謝活性の低下や生細胞数の減少がみられることから、消毒薬作用後の細胞生存率を評価することで毒性を評価できるものと考えられる。

そこで本研究では、培養細胞を用いた試験系の確立に向けた基礎的な検討として、消毒薬に対する4種類の培養細胞の細胞生存率について検討を行った。細胞生存率を算出するためにMTT法とNR法を用いて生細胞数の評価を行った。

毒性評価結果に与えるこれらの評価方法の違いを検討するために各消毒薬を作用させた時のMTT法とNR法で算出した細胞生存率の関係を図4に示す。MTT法とNR法で同じ結果が得られた場合、実線で示される回帰直線上にプロットされる。Chang conjunctiva細胞とHuman Dermal Fibroblast細胞におけるMTT法とNR法の細胞生存率は、 $p < 0.1$ の許容範囲ではそれぞれ12点と14点が異なる値を示し、一致率は65.7%と60%であった。 $p < 0.2$ の許容範囲ではいずれの細胞でも6点異なる値を示し、一致率は82.9%であった。一方、HeLa細胞

とFRSK細胞は、MTT法から得られた細胞生存率とNR法で得られた細胞生存率は、 $p < 0.1$ の許容範囲でそれぞれ6点と4点が異なる値を示し、一致率はそれぞれ82.9%と88.6%であった。 $p < 0.2$ の許容範囲ではいずれの細胞でも2点異なる値を示し、一致率は94.3%であった。許容範囲を $p < 0.2$ とすることで、MTT法とNR法のいずれの評価方法を用いても同様の細胞生存率が算出されることが示唆された。

細胞の種類によらず $p < 0.2$ の許容範囲で算出された細胞生存率に乖離が認められる消毒薬は、低水準消毒薬であるグルコン酸クロルヘキシジン水溶液と塩化ベンザルコニウム水溶液と塩化ベンゼトニウム水溶液であった。これら消毒薬を原液の100 ppm（最終濃度9 ppm）で作用させると、MTT法での細胞生存率は10%未満であるのに対し、NR法での細胞生存率は8～43%を示した。一方、0.1 ppm（最終濃度0.009 ppm）で作用させると、いずれの消毒薬でもMTT法の細胞生存率は84%以上であるのに対し、NR法の細胞生存率は69%以上であった。MTT法は、MTTが生細胞内に取り込まれたのち、ミトコンドリアに存在する脱水素酵素によってMTT-formazanに変化することを利用して吸光度測定により生細胞数を計測する方法である。一方NR法は、ニュートラルレッドが生細胞の細胞膜の能動輸送により細胞内に取り込まれリソソームに沈着することを利用して取り込まれたニュートラルレッドの総量を見ることで生細胞数を計測する方法である。低水準消毒薬で見られたこの乖離は、ミトコンドリアにおける代謝活性の障害と細胞膜能動輸送能への障害の差を反映しているものと推測される。このことは、これらの低水準消毒薬が細胞膜に作用して能動輸送能を低下させニュートラルレッドの取り込み量が減少するものの、消毒薬の濃度が高くなってもある程度の能動輸送能は維持され、膜を透過した消毒薬が細胞の代謝活性の低下を引き起こすものと推察される。塩素系消毒薬と消毒用エタノールはどちらの方法でも同じ結果が得られたが、低水準消毒薬では細胞生存率の求め方によって乖離した結果となったことから、消毒薬の毒性を評価する際には消毒薬の作用機序を勘案して生細胞数の適切な評価方法を選択する必要があることが示唆された。

次に各消毒薬に対する細胞の感受性の違いに着目し、消毒薬の作用による細胞生存率を細胞間で比較した。細胞間で同じ結果が得られた場合、図5に示す実線で示

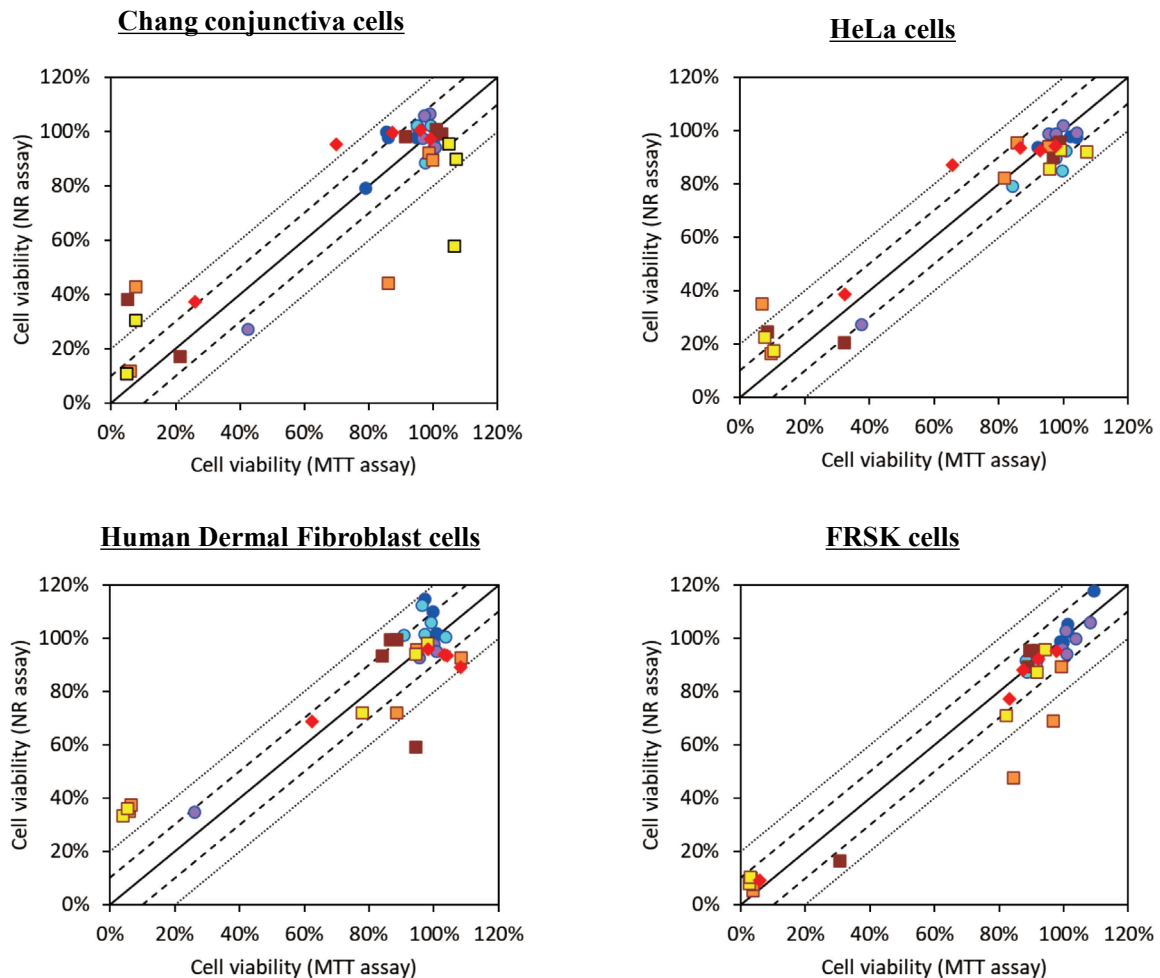


図4 MTT法とNR法の比較

実線：回帰直線、点線： $p < 0.2$ 、破線： $p < 0.1$

- 微弱酸性次亜塩素酸水溶液
- 次亜塩素酸ナトリウム水溶液
- 亜塩素酸ナトリウム水溶液
- グルコン酸クロルヘキシジン水溶液
- 塩化ベンザルコニウム水溶液
- 塩化ベンゼトニウム水溶液
- ◆ 消毒用エタノール

される回帰直線上にプロットされる。今回、MTT法とNR法を比較した際に $p < 0.2$ の許容範囲で評価方法によらず同じ細胞生存率となったことから、細胞間比較においても $p < 0.2$ の許容範囲内にプロットされるものを細胞生存率が同じであると判定した。Chang conjunctiva細胞とHuman Dermal Fibroblast細胞の細胞生存率は、消毒薬の種類によらず同程度の感受性が見られた。NR法を用いると、低水準消毒薬でFRSK細胞より細胞生存率が高いものがあった。HeLa細胞では、いずれの評価方法を用いてもほぼ同じ細胞生存率を示し、特に、MTT法ではChang conjunctiva細胞とHeLa細胞で同じ結果が得られた。HeLa細胞の細胞生存率は、MTT法においてFRSK細胞とほぼ同じ細胞生存率を示したが、NR法を

用いると低水準消毒薬でわずかに高い値となり、Human Dermal Fibroblast細胞より低い細胞生存率を示す消毒薬があった。また、Human Dermal Fibroblast細胞は、低水準消毒薬でFRSK細胞より高い細胞生存率を示した。図4から消毒用エタノールはChang conjunctiva細胞、HeLa細胞、FRSK細胞においてはMTT法よりNR法で算出した細胞生存率に高い傾向が認められたが、Human Dermal Fibroblast細胞ではNR法よりMTT法で算出した細胞生存率に高い傾向が認められた。

細胞株間で異なる細胞生存率を示すことは、細胞株により消毒薬に対する細胞の感受性が異なることを意味している。次亜塩素酸系の消毒薬はいずれの細胞を用いても同様の結果が得られる傾向があるが、亜塩素酸ナト

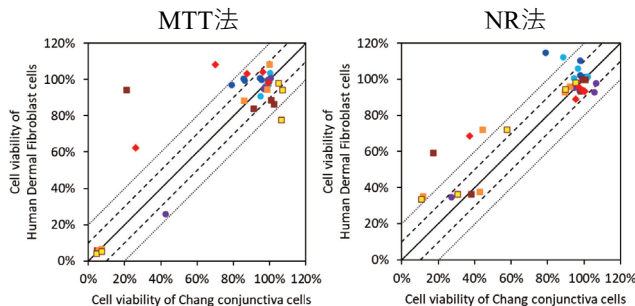
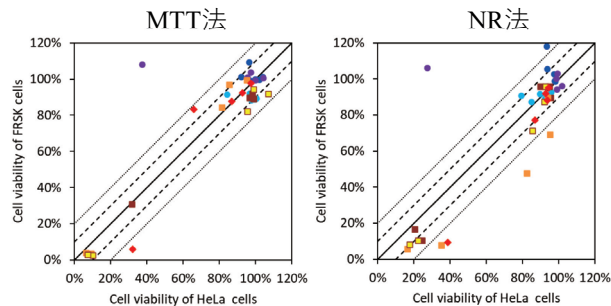
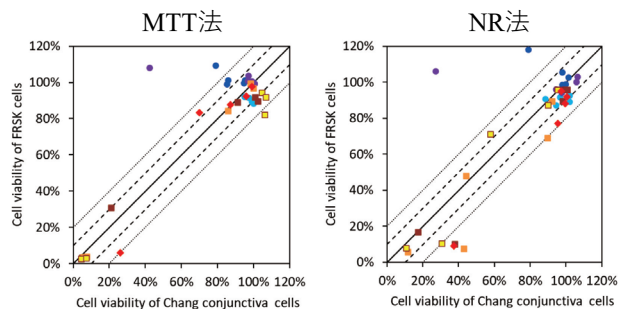
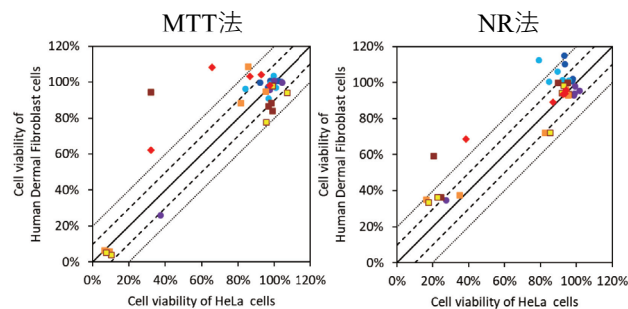
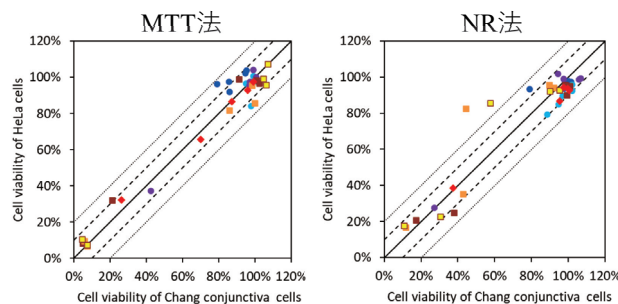
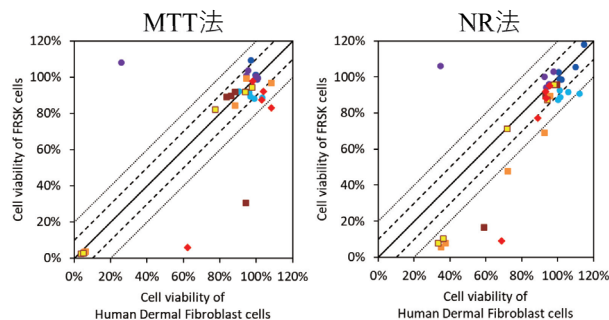
Chang conjunctiva cells vs Human Dermal Fibroblast cells**HeLa cells vs. FRSK cells****Chang conjunctiva cells vs FRSK cells****HeLa cells vs Human Dermal Fibroblast cells****Chang conjunctiva cells vs HeLa cells****Human Dermal Fibroblast cells vs. FRSK cells**

図5 細胞生存率の細胞間での比較

実線：回帰直線、点線： $p < 0.2$ 、破線： $p < 0.1$

- 微弱酸性次亜塩素酸水溶液
- 次亜塩素酸ナトリウム水溶液
- 亜塩素酸ナトリウム水溶液
- グルコン酸クロルヘキシジン水溶液
- 塩化ベンザルコニウム水溶液
- 塩化ベンゼトニウム水溶液
- ◆ 消毒用エタノール

リウム水溶液に対して FRSK 細胞は感受性が低いのに
対し、本研究で用いた 3 種の低水準消毒薬には感受性
が高い傾向が認められた。また、Chang conjunctiva 細胞
と Human Dermal Fibroblast 細胞の細胞生存率は、消毒薬
の種類によらず同程度の感受性が認められたが、Human
Dermal Fibroblast 細胞と FRSK 細胞の細胞生存率は、特
に低水準消毒薬と消毒用エタノールで 3 ～ 4 点が許容範

囲から外れ、感受性の異なるものが存在した。

細胞の由来に着目すると、ラット皮膚ケラチノサイ
トの FRSK 細胞とヒト皮膚線維芽細胞の Human Dermal
Fibroblast 細胞は感受性の異なる結果が得られた。一
方、同じヒト由来であるヒト皮膚線維芽細胞の Human
Dermal Fibroblast 細胞とヒト結膜上皮細胞の Chang
conjunctiva 細胞を比較すると、わずかに違いはあるもの

の消毒薬に対して類似した感受性が認められた。これは、いずれもヒト由来細胞により消毒薬感受性を予測できる可能性を示唆しているが、本研究で使用した細胞株数が限定的であるため、今後さらなる検討が必要である。

以上のように、ある特定の細胞株を使用しても生細胞数の評価方法で細胞生存率が異なることに加え、消毒薬と細胞間の感受性も異なることが明らかになった。本検討では、生体消毒薬と細胞と評価系の組み合わせを明示できていないが、安全性を評価する際には、評価対象に応じた系を選択する必要があることが示唆された。また、培養細胞は生体から分離された状態にあり、個別に培養されるため細胞を取り巻く環境の影響を受けやすい。培養細胞を用いた消毒薬の安全性評価として、消毒薬作用後の細胞生存率の低下から細胞毒性を評価するが、人体には多くの生体防御機構が働くため、単層培養細胞に対して毒性を示したからといって、人体に有毒な物質であると結論付けることはできない。培養細胞を用いて生体消毒薬の安全性を評価するためには、より生体に近い3次元培養モデルなどを用いることが有用であると考えられる。生体消毒薬がヒトに及ぼす影響を予測するために、細胞で得られた知見をどのように応用するかさらなる検討が必要である。

5. 結 論

消毒薬の毒性について培養細胞を用いて評価する際には、消毒薬の作用機序を勘案して適切な生細胞数の評価方法を選択する必要があることが示唆された。さらに、特定の培養細胞を使用しても、生細胞数の評価方法で細

胞生存率が異なることに加え、消毒薬と細胞間の感受性も異なることから、生体消毒薬の安全性を評価する際には、評価対象に応じた系を選択する必要があることが示唆された。

■ 引用文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局長. 医薬品の承認申請について. (2014). 薬食発 1121, 第2号. 1-8. <https://www.pmda.go.jp/files/000203240.pdf> (アクセス日: 2022.1.25)
- 2) 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部第三室. OECD テストガイドライン. OECD 毒性試験ガイドライン翻訳版. <https://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecdindex.html> (アクセス日 2022.6.10)
- 3) 環境省自然環境局 総務課動物愛護管理室. 動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針の改正について (2020). https://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/2_data/laws/guideline_r02.pdf (アクセス日 2022.6.10)
- 4) Müller G, Kramer A. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008; 61:1281-7.
- 5) Roth C, Beule AG, Kramer A, Hosemann W, Kohlmann T, Scharf C. Response analysis of stimulating efficacy of polyhexanide in an in vitro wound model with respiratory ciliary epithelial cells. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2010;23 Suppl:35-40
- 6) 三重正和、小島英理 バイオ関連分野での基礎—細胞数測定法. *Electrochemistry* 2008; 76: 924-7.
- 7) Munier, C.M.L., Zaunders, J.J., Ip, S., Cooper, D.A., Kelleher, A.D. A culture amplified multi-parametric intracellular cytokine assay (CAMP-ICC) for enhanced detection of antigen specific T-cell responses. *J. Immunol. Methods.* 2009; 345: 1-16.
- 8) F. Denizot and R. Lang Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* 1986; 89: 271-7.
- 9) 岩沢篤郎、中村良子 ポビドンヨード製剤添加物の殺菌効果・細胞毒性への影響. *環境感染* 2001; 16:179-83.
- 10) 岩沢篤郎、中村良子 ポビドンヨード製剤の細胞毒性とモルモット創傷部に対する影響. *感染症学雑誌* 2003; 77:316-22.

A study on the evaluation of safety of antiseptics using in vitro assay: Evaluation method of cell viability using four cultured cell lines and seven kinds of antiseptics

Mamiko Ikemoto^{1,2}, Yuriko Matsumura^{1*}, Atsuo Iwasawa¹, Satoshi Kimura¹

¹ Division of Infection Prevention and Control, Tokyo Healthcare University Postgraduate School

² FreeKira Pharmaceutical Co., Ltd.

Background

In the development of new antiseptics, the evaluation of toxicity using animal testing is needed. However, it has been public consensus that 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement) should be pursued for performing more humane animal research. This framework was developed over 40 years ago by David Smith. Since then, many studies have been reported how to apply alternative methods to reduce animal models. The alternatives to animal testing for the antiseptics, however, is not be put to practical use yet. The development of the evaluation system using cultured cell lines is expected.

Objective

In this study, in order to develop an *in vitro* test system for the safety of antiseptics as an alternative to animal testing, cell culture system was employed, and cell viability was estimated using MTT assay and NR assay.

Methods

Chang conjunctiva cells, HeLa cells, Human Dermal Fibroblast cells and FRSK cells were cultivated on 96 well plates to the confluency. Sodium hypochlorite solution (including Freekira STM), sodium chlorite solution, or low-level disinfectants (chlorhexidine gluconate solution, benzalkonium chloride

solution or benzethonium chloride solution) was added and incubated with cells for 2 additional days after the confluency. Ethanol was also tested. The cell viability was evaluated by MTT assay and NR assay.

Results

With chlorine-based antiseptics at final concentrations of 9 ppm or lower, the cell viability evaluated by the MTT assay and the NR assay was almost the same as the control regardless of the cell lines, except for sodium chlorite solution, which caused considerable decrease in cell viability for Chang conjunctiva cells, HeLa cells and Human Dermal Fibroblast cells at final concentration of 9 ppm. When low-level disinfectants were added at final concentration of 9 ppm, cell viability decreased regardless of cell lines, but there observed differences in cell viability between the method used for viability assays. Regardless of the assay method, ethanol when diluted 100-fold or more were added, the cell viability was almost 80% or higher.

Conclusions

It is suggested that it is necessary to select appropriate methods for evaluating cytotoxicity of antiseptics, taking into consideration of the mechanism of action of antiseptics.