

東京医療保健大学大学院

医療保健学研究科 医療保健学専攻 博士課程

動物実験代替法を指向した
生体消毒薬における毒性評価に関する検討

2022年度入学

2025年3月12日 博士

医療保健学研究科 医療保健学専攻 感染制御学

学籍番号 HD022001 氏名 池本真実子

研究指導教員 松村 有里子

副研究指導教員 岩澤 篤郎・森屋 恭爾

論文題目	動物実験代替法を指向した生体消毒薬における毒性評価に関する検討
氏 名	池本真実子
所 属	東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 医療保健学専攻 博士課程
助 成 金	なし

東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 医療保健学専攻
学位論文 要旨

動物実験代替法を指向した
生体消毒薬における毒性評価に関する検討

東京医療保健大学大学院
医療保健学研究科 医療保健学専攻
博士課程
領 域 名 感染制御学
学籍番号 HD022001
氏 名 池本真実子

背景 (Background)

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試験が行われている。近年、実験動物の基準理念である 3R の原則の徹底がはかられ、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現時点ではない。

目的 (Objective)

日本における動物実験代替法の研究の推移を明らかにし、消毒薬の毒性に関する *in vitro* 試験系の指標を見出す。

方法 (Methods)

邦文の文献レビューは、1800 年から 2023 年を対象に、「動物実験代替法」と「消毒」、「消毒薬」、「消毒剤」をキーワードとして検討した。消毒薬の毒性は、4 種類の培養細胞を用いて、3 種の塩素系消毒薬、3 種の低水準消毒薬、および消毒用エタノールに対する細胞生存率について 4 種類のアッセイ系で評価した。

結果 (Results)

動物実験代替法による消毒薬の評価に関する邦文報告例は、擦式アルコール手指消毒薬の *in vitro* 皮膚刺激性試験が唯一であった。

細胞に対する感受性は、Chang conjunctiva 細胞では、いずれの消毒薬でも MTT アッセイが最も高かった。次いでニュートラルレッド (NR) アッセイと LDH アッセイが同程度であった。HeLa 細胞では、塩素系消毒薬と低水準消毒薬はレサズリンアッセイが最も感受性が高かったが、消毒用エタノールは MTT アッセイが最も高かった。Human Dermal Fibroblast 細胞では、いずれの消毒薬でも MTT アッセイの感受性が最も高く、消毒用エタノールは MTT アッセイと NR アッセイが同程度であった。FRSK 細胞では、塩素系消毒薬と消毒用エタノールで MTT アッセイが最も高い感受性であったが、低水準消毒薬では NR アッセイの感受性が LDH アッセイと MTT アッセイよりわずかに高かった。細胞種を限定しない場合の感受性は、塩素系消毒薬では MTT アッセイ>>NR アッセイ>レサズリンアッセイ、LDH アッセイの順、低水準消毒薬では MTT アッセイ

イ>>NR アッセイ、LDH アッセイ>レサズリンアッセイの順、消毒用エタノールは MTT アッセイ>>NR アッセイ>>LDH アッセイ>>レサズリンアッセイの順であった。

結論 (Conclusions)

邦文の文献レビューから消毒薬を評価する代替法の報告はほとんどなかった。検討した細胞種において消毒薬の毒性評価には MTT アッセイが有効である場合が多く、塩素系消毒薬は Chang conjunctiva 細胞と MTT アッセイ系の組合せが、低水準消毒薬は HeLa 細胞とレサズリンアッセイの組合せが、消毒用エタノールは HeLa 細胞と MTT アッセイの組合せが有効であった。特に、皮膚障害については、ラット表皮由来である FRSK 細胞を使用した場合、今回検討した消毒薬すべてにおいて MTT アッセイか NR アッセイが有用であり、今後数多くの皮膚障害検討の場面においてこの 2 つのアッセイが有用である可能性が示唆された。

キーワード (Key Words)

生体消毒薬 (Antiseptics)、動物実験代替法 (Alternative to Animal Testing)、培養細胞 (Cultured cells)、MTT アッセイ (MTT Assay)、LDH アッセイ (Lactate Dehydrogenase Assay)、ニュートラルレッドアッセイ (Neutral Red Assay)、レサズリンアッセイ (Resazurin Assay)

目次

第1章 序 論.....	1
1.1. はじめに	2
1.2. 引用文献.....	4
第2章 動物実験代替法に関する邦文レビュー	7
2.1. 緒言	8
2.2. 方法	8
2.2.1. 文献の検索	8
2.2.2. 文献のスクリーニングと分類.....	8
2.3. 結果	8
2.3.1. 文献のスクリーニング結果	8
2.3.2. 総説のスクリーニング結果	8
2.3.3. 原著論文と速報のスクリーニング結果	9
2.3.4. 実践報告の結果	10
2.4. 考察	10
2.5. 結論	11
2.6. 引用文献.....	12
第3章 培養細胞を用いた毒性評価方法の検討	17
3.1. 緒言	18
3.2. 方法	18
3.2.1. 材料.....	18
3.2.2. 細胞生存率	18
3.2.2.1. MTT アッセイ	18
3.2.2.2. NR アッセイ.....	18
3.2.2.3. レサズリンアッセイ.....	18
3.2.2.4. LDH アッセイ	19
3.2.2.5. 細胞生存率の算出方法.....	19
3.3. 結果	20
3.3.1. MTT アッセイによる細胞生存率	20
3.3.2. NR アッセイによる細胞生存率.....	20
3.3.3. レサズリンアッセイによる細胞生存率	21
3.3.4. LDH アッセイによる細胞生存率	22
3.4. 考察	23
3.5. 引用文献.....	26
第4章 結 語.....	49

第1章 序 論

1.1. 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の 2 種類がある。しかし、同成分を含有している、薬機法による承認を受けていないものは雑品の扱いとなり、除菌剤等として販売されている。薬機法による承認を受けるために行う医薬品申請には、「イ. 起原又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料」、「ロ. 製造方法並びに規格及び試験方法等に関する資料」、「ハ. 安定性に関する資料」、「ニ. 薬理作用に関する資料、吸収、分布、代謝、排泄に関する資料」、「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」、「ヘ. 臨床試験の成績に関する資料」、「ト. 法第五十二条第一項に規定する添付文書等記載事項に関する資料」が必要である¹⁾。この中で、ヒトに対する安全性を確保するための「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」の作成には、実験動物を用いた毒性試験を実施する必要がある。しかし近年、動物福祉や倫理の観点から動物を用いない代替法による試験へ移行してきている。この動物福祉について、社会の責任において動物を保護した最初の国がイギリスであり、1876 年に最も厳しいとされている「動物虐待禁止法」が制定されている²⁾。1959 年には英国の研究者 W. M. S. Russell と R. L. Burch により、代替法における削減 (Reduction Alternatives)、代替法における純化 (Refinement Alternatives)、代替法における置き換え (Replacement Alternatives) を動物実験の基本理念とした「人道的な実験技術の原則 (The Principles of Humane Experimental Technique)」が提唱された³⁾。この理念は、1978 年に D. Smyth により、特定の量および精度の情報を得るのに必要な動物数を減らすための手段である代替法における削減 (Reduction)、動物使用が避けられないときにその使用方法について非人道的な操作を減らしたりその残酷さを減らすことに役立つ全ての進歩である純化 (Refinement)、動物実験の歴史において行われてきた意識を有する生きた脊椎動物を用いる方法を感覚のない材料を用いる科学的方法に置き換える全ての方法である置き換え (Replacement) として定義された⁴⁾。現在、Replacement: 代替法の活用、Reduction: 使用数の削減、Refinement: 苦痛の軽減の頭文字をとり、世界的な動物実験の基準理念である「3R の原則」として知られている。

1980 年代には動物実験反対運動が欧米各地に広がり、研究界でも「動物はモノではない」と認識せざるを得ない状況になった。市場に流通させる化学物質ごとに情報の登録を求める欧州連合 (EU) の Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH) 規制⁵⁾では、動物に対する不必要な実験を避け、代替試験方法を推進するために化学物質の安全性テストの法律を採択した。

以上の背景をもとに、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 (Organization for Economic Co-operation and Development: OECD) テストガイドライン⁶⁾には、動物実験にかわる代替試験法が皮膚腐食性試験、皮膚刺激性試験、光毒性試験、眼刺激性試験、皮膚感作性試験、皮膚透過性試験 (皮吸収試験)、内分泌かく乱スクリーニング、遺伝毒性試験、形質転換試験、発がん性スクリーニングが収載されている (表 1)。しかし、動物実験による試験法も残っている。

日本でも、2005 年の「動物の愛護及び管理に関する法律」の改正を受けて、日本動物実験代替法評価センター (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods: JaCVAM) が国立医薬品食品衛生研究所内に設置された。法を施行する環境省は 2006 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」を定め、2013 年の改正を経て 2020 年の最終改正では、「3R の原則」、飼養保管等基準の周知及び遵守の関係機関への徹底を進めるとともに、当該基準の遵守状況について定期的な実態把握及び適切な方法による公表及び、代

替法の活用、使用数の削減等による動物の適正な利用の在り方について検討を加えることが規定された⁷⁾。これまでに、培養細胞を用いた *in vitro* 試験系での動物実験代替法に関する研究が進められてきており、細胞株や組織サンプル、バクテリアなどの代替生物を用いた試験法、3次元モデリングやバイオプリンティング法などのオルガンオンチップ法、コンピューターモデリング法等の代替試験法の開発が課題となっている⁸⁾。*in vitro* 試験法では、多能性幹細胞を用いた検討^{9,10)}や肺由来の細胞を用いたエアロゾルに対する毒性評価に関する報告¹¹⁾があり、バクテリアなどの代替生物を用いた試験法では、代替生物から抽出した遺伝子を用いた検討が行われている¹²⁾。人間の生理機能を捉えたマルチオルガンオンチップ法では、経口暴露時に血液に到達する特定の化合物の濃度や腎排泄薬についてヒトと動物の腎クリアランスを比較した検討が行われている¹³⁾。しかし、これらの代替試験法の開発にあたり、動物実験により得られた結果が人に対する影響を必ずしも反映するものではないことも問題点としてあげられている¹⁴⁾。

しかし、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。動物実験代替法は主に化粧品分野において実用化されているが、消毒薬の評価において代替試験法として実用化されている方法は現時点ではない。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や PCR を用いた RNA の定量、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¹⁵⁾、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¹⁶⁾、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 アッセイや MTT アッセイ¹⁶⁾等を用いて行われている。また、OECD テストガイドライン(OECD TG 432)で認可された *in vitro* 試験法による光毒性試験では生細胞数の評価に NR アッセイが用いられている¹⁷⁾。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 2025 年 1 月現在まで調べた限りではない。

そこで本研究では消毒薬の評価において日本における動物実験代替法の研究の推移を明らかにした上で、代替法となり得る消毒薬の毒性に関する *in vitro* 試験系の指標を見出すこととした。

第 2 章では日本における動物実験代替法に関する研究の推移を明らかにするために、邦文に絞って文献レビューを行った。

第 3 章では由来の異なる 4 種の細胞株を使用して、生体消毒薬の毒性評価に用いることのできる評価系の指標を見出すこととした。

第 4 章では、第 2 章と第 3 章より得られた結果を総括し、今後の展望を述べる。

1.2. 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:2025.1.6)
- 2) 高橋千太郎. 英国における動物実験の法的規制と動物実験反対運動. ラボラトリーアニマル 1986; 3(4): 3-6.
- 3) Russell, W. M. S., Burch, R. L. “The principles of humane experimental technique. Author Affiliation” Dep. Zool. Comp. Anat., Univ. Coll., London. Book 1959. <https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>. (アクセス日:2025.1.6)
- 4) Smyth, D. Alternatives to Animal Experiments. (1978). London: Scolar Press.
- 5) Alternatives to animal testing under REACH. European Chemicals Agency. (アクセス日:2022.1.25)
- 6) 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:2025.1.6)
- 7) 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:2025.1.6)
- 8) Van Norman GA. Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Part 2: Potential Alternatives to the Use of Animals in Preclinical Trials. *J. Am. Coll. Cardiol. Basic Trans Sci.* 2020; 5(4): 387–397.
- 9) Kima TW, Cheb JH, Yun JW. Use of stem cells as alternative methods to animal experimentation in predictive toxicology. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2019; 105: 15-29.
- 10) 斎藤 幸一、鈴木 紀之、小林 久美子. 多機能性幹細胞を用いた動物実験代替法開発. *日薬理誌* 2018; 151: 62-68.
- 11) Daniel Primavessy, Julia Metz, Sabrina Schnur, Marc Schneider, Claus-Michael Lehr, Marius Hittinger. Pulmonary *in vitro* instruments for the replacement of animal experiments. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2021;168: 62-75.
- 12) Brandon D Gaytan and Chris D. Vulpe. Functional Toxicology: tools to advance the future of toxicity testing. *Front. Genet.* 2014; 5: Article110(1-10).
- 13) Damien van Berlo, Evita van de Steeg, Hossein Eslami Amirabadi, Rosalinde Masereeuw. The potential of multi-organ-on-chip models for assessment of drug disposition as alternative to animal testing. *Curr. Opin. Toxicol.* 2021; 27: 8-17.
- 14) Van Norman, G. A. Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials. Is it Time to Rethink Our Current Approach? *J. Am. Coll. Cardiol. Basic Trans Sci.* 2019; 4(7): 845–854.
- 15) 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(12): 924-927.
- 16) 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.
- 17) 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: 271-277.

表1-1 OECD テストガイドラインに収載されている動物試験代替法⁶⁾

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 Photo reactivity	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 Sensitisation, Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)	DPRA 法 (ペプチド結合性試験)
TG442D	In Vitro Skin Sensitisation, 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 Sensitisation	<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 Sensitisation	皮膚感作性試験の確定方式 (DA)

表1-1 OECD テストガイドラインに収載されている動物試験代替法⁶⁾(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)、BG1 Luc 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	CERI In Vitro 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)

第2章

動物実験代替法に関する邦文レビュー

2.1. 緒言

W. M. S. Russell と R. L. Burch により 1959 年に「3R の原則」が提唱されて以来¹⁾、国際的に、実験動物の飼育や保管を適切に行い、動物実験を「3R の原則」に配慮して適切に実施することが原則となった。特に 1980 年代には、ヨーロッパにおいて国際的な法律や協定が導入され、1993 年には動物実験が行われた原料を配合する化粧品の EU 域内での販売を 1998 年以降禁止することが決められた。販売禁止は数度にわたり延期されたものの、動物実験代替法に関する研究は加速した。日本でも、2005 年の「動物の愛護及び管理に関する法律」の改正後に環境省により 2006 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」が定められ、2020 年の最終改正で「3R の原則」の順守と動物実験代替法の活用など動物の適正な利用の在り方について検討を加えることが規定されている。そこで、本章では、日本における動物実験代替法に関する研究の推移を明らかにするとともに、本研究の主眼とする消毒薬の評価における動物実験代替法について、日本における現状を把握する為、邦文に絞って文献レビューを行った。

2.2. 方法

2.2.1. 文献の検索

検索エンジンとして Google Scholar を用いた。対象期間は研究の始まりを見落とすことがないよう 1800 年以降とし、できる限り最新まで含めるため 2023 年までとした。検索式は、「“動物実験代替法”」、「“動物実験代替法” AND “消毒”」、「“動物実験代替法” AND “消毒薬”」、「“動物実験代替法” AND “消毒剤”」とした。

2.2.2. 文献のスクリーニングと分類

一次スクリーニングにて重複した検索結果を除外し、原著論文、実践報告、速報、レビュー論文、その他に分類した。投稿規定に論文種別の記載のないものは、投稿規定から査読の有る論文を採用した。ここで社会技術研究論文集、Electrochemistry、横浜市立大学論叢、佐賀大学海浜台地生物環境研究センターの紀要、同朋大学論叢に掲載されている紀要、論説、および報文は投稿規定により査読つき論文であった為、原著論文に分類した。

2.3. 結果

2.3.1. 文献のスクリーニング結果

文献のスクリーニング結果を図 2-1 に示す。4 つの検索式でヒットした総数は 535 件であり、重複していた検索結果は 44 件であった。重複結果を除外した 491 件を論文種別で分類したところ、総説が 29 報、原著論文が 31 報、速報が 5 報、実践報告が 1 報であり、その他の分類として 425 件あり、内容はセミナー、レクチャーの案内、シンポジウムのタイトル、紀要、学位論文、書籍、一般雑誌、セッション、報告書であった。検索結果の中で、消毒薬に関連する結果は 23 報あり、重複結果を除外した 16 報を論文種別で分類したところ、総説が 2 報、原著論文が 3 報、速報が 1 報、その他の分類として 10 件あり、内容はセミナー、レクチャーの案内、シンポジウムのタイトル、紀要、学位論文、技術資料であった。

2.3.2. 総説のスクリーニング結果

総説の内容は、開発・評価 14 報、歴史・今後の動向 12 報、倫理に関する総説 3 報に大別された。日本で最初に報告された総説は、1986 年に生活衛生に報告された総説 2 報であり、菅原努氏は動物実験代替法について問題の発端から意義について解説し²⁾、森田茂氏は化学物質の安全性評価とその動向について化学物質を規制する主な法律別に解説していた³⁾。これらの総説は、本章において「歴史・今後の動向」に分類された。

「歴史・今後の動向」に分類された総説は、その後、1990 年に毒性学における動物実験の代替を行うことの役割と利益について報告され、広く社会に啓蒙する必要性が述べられた⁴⁾。1996 年には *in vitro* 系における毒性データに毒物動態などのデータを組み合わせることで動物実験を行わずに毒性のリスク評価が可能となる仮説が示された⁵⁾。2008 年には薬学研究の観点から 4 報の総説が報告され、動物実験の重要性とその問題点⁶⁾、動物実験反対テロリズム⁷⁾、安全性評価⁸⁾

および生殖発生毒性試験としての代替法⁹⁾について概説された。その後 10 年間総説の報告はなく、2018 年に培養細胞の観察における基本原則の提案¹⁰⁾、2019 年には多能性幹細胞培養の留意点が提案され¹¹⁾、最近の報告は、よりアプリケーションに近い原則や留意点に関する総説へと変遷していた。2022 年には一般財団法人食品薬品安全センターにおける代替法研究が紹介され¹²⁾、動物実験代替法として経皮吸収型製剤の開発において⁹⁾ 三次元培養ヒト表皮モデルを使用した経皮吸収実験が紹介されていた¹³⁾。

倫理に関する総説は 2001 年に医学部における動物実験での倫理性と技術について述べられ¹⁴⁾、2010 年に研究施設の中の動物の苦痛の軽減について述べられた¹⁵⁾。2021 年には動物福祉畜産の過去、現在、未来への流れが概観され¹⁶⁾、10 年に 1 報の間隔で倫理に関する総説が報告されていた。

開発・評価に関する総説では、毒性評価に関するものが 6 報あり、次いで、三次元培養皮膚モデルに関する総説が 2 報、再生医療に関する総説が 2 報、それ以外の研究分野からそれぞれ 1 報の報告があった。

毒性評価に関する研究分野では、主に化粧品分野とその他の毒性研究分野からの報告であり、1996 年に化粧品に用いる界面活性剤の安全試験代替法に関する内容の総説が報告され¹⁷⁾、今後 21 世紀に動物実験代替法の開発に取り組むべきであることが述べられていた。

毒性研究分野からの総説では、培養細胞を用いた毒性試験方法について概説され¹⁸⁾、細胞培養による代替実験法は社会的責任と応用性の高さから非常に大切な基礎研究であることが述べられていた。いずれの総説からも、EU における規制に対応できる動物実験代替法の開発が急務である時代背景が読み取れた。2008 年には気体状または経口的に体内に取り込まれた化学物質の *in vitro* 臓器モデルによる評価系の開発とマイクロ化が概説され¹⁹⁾、2011 年に ES 細胞の分化を用いた毒性評価系について概説された²⁰⁾。2020 年には化粧品の安全性に関わる変遷から実際の安全性評価について基本となる情報が幅広く紹介され²¹⁾、翌年には光安全性評価の現状と課題について概説され²²⁾、毒性評価に関する動物実験代替法の適用が化粧品分野以外にも波及しているものと考えられた。三次元培養皮膚モデルに関する総説では、皮膚刺激性や皮膚腐食性試験などの動物実験代替法への応用が 2005 年に概説され²³⁾、生体内の疑似環境を創出する構想に基づいて開発した培養モデルの特徴と創薬研究への応用が 2008 年に概説された²⁴⁾。再生医療に関する総説では、2008 年に組織病理学用の切片を担体として利用した培養システムが紹介され²⁵⁾、2015 年には歯科領域において幹細胞を使用した再生医療への開発技術が紹介された²⁶⁾。これら 4 報の総説から、皮膚等の生体に模した環境として培養モデルが醸成されていたと考えられた。さらに、1997 年に薬理試験における反復測定データの解析法の紹介²⁷⁾、2004 年に細胞や組織の機能を計測する様々なバイオセンシング技術の紹介²⁸⁾、2008 年に質量分析法を用いたグライコミクスによる糖タンパク質医薬品開発の紹介²⁹⁾、2016 年には新しいヒト三次元生体組織モデルの構築に細胞のインクジェットプリント法と細胞積層法および細胞集積法を活用した 3D 細胞プリンター技術が紹介され、この技術を薬剤効果判定と毒性評価に応用できることが概説された³⁰⁾。以上のように、動物実験代替法として培養以外の手法を用いたアプローチが行われていたことがわかる。

消毒薬に関する総説としてヒットした 2 報は、実験動物の感染症予防策として衛生管理を行う上で飼育器材などの消毒が述べられていた報告¹⁵⁾と、経皮吸収型製剤の評価において動物の皮膚表面に生じる生物学的反応を評価する際に皮膚表面に存在する可能性のある物質として例示¹³⁾されているのみであり、消毒薬の評価に関する論文ではなかった。

2.3.3. 原著論文と速報のスクリーニング結果

原著論文を内容で分類すると 3 つのカテゴリーに分類され、開発・評価 26 報、歴史・今後 4 報、基本原則の提案 1 報であった。開発・評価のカテゴリーの 26 報をさらに分類すると、培養細胞を用いた論文が 4 報、三次元培養皮膚モデルを用いた論文が 5 報、歯科領域の応用展開を用いた論文が 3 報、モデル製作に関連する論文が 6 報、バイオセンシングに関する論文が 4 報、実態調査に関する論文が 1 報、その他の内容が 3 報であった。

開発・評価のカテゴリーの中で培養細胞を用いた論文では、毒性に関する報告が 1988 年に初めて報告され、それ以降 2017 年までに 4 報の論文が報告され、培養細胞を使用してコンポジットレジン³¹⁾やラウリルイミノジカルボン酸塩³²⁾の毒性が評価された他、全身毒性を予知する為に ES 細胞の分化能を利用した発生毒性評価法の開発³³⁾や、複数の試験法を組み合わせる難水溶性物質を含めた幅広い物質に適用可能な光毒性評価体系の構築に関する開発³⁴⁾であった。また速報は 2 報あり、1997 年にサイトカインアッセイによる界面活性剤を用いた毒性試験³⁵⁾と、化学発光法を用いた細胞毒性試験の検討³⁶⁾であった。

三次元培養皮膚モデルを用いた報告は化学物質の皮膚腐食性試験に三次元培養皮膚モデルを利用できることが 2005 年に初めて報告された³⁷⁾。それ以降 2023 年までに界面活性剤の皮膚一次刺激性の評価³⁸⁾、衣類の安全性試験³⁹⁾や、敏感肌を対象とした皮膚刺激性試験⁴⁰⁾があり、2023 年には擦式アルコール手指消毒薬の皮膚刺激性試験に関する報告⁴¹⁾の合計 5 報が報告された。また 2010 年に速乾性擦式アルコール手指消毒剤の皮膚刺激性評価における動物実験代替法の開発に関する速報が 1 報あった⁴²⁾。

歯科領域の応用展開を用いた報告はわずか 3 報であったが、1989 年に歯科材料の生物学的評価法としてのコラーゲンゲル培養法⁴³⁾が初めて報告され、1993 年に無血清培養下における細胞毒性試験⁴⁴⁾、2003 年には歯周包帯剤の開発に関する報告⁴⁵⁾が行われた。

モデル製作に関する報告は 1992 年から 2017 年までに 6 報あり、薬剤感受性試験への応用に向けたヒト正常細胞と腫瘍細胞の組織再構築に関する報告⁴⁶⁾、口腔粘膜モデルとして細胞毒性試験法への適用に向けた検討⁴⁷⁾やヒト歯肉由来細胞を用いた検討⁴⁸⁾、*in silico* 安全性予測システムの構築に関する報告⁴⁹⁾、コンピューターによる計算を駆使した有害性評価手法の開発に関する報告⁵⁰⁾、輸液用動物代替モデルの作製とその有用性に関する報告⁵¹⁾があった。また、2015 年にネコ触診モデルのシュミレーション教材の開発と有効性の検討⁵²⁾と 2021 年にイムノクロマト法による二枚貝の麻痺性貝毒迅速スクリーニング法の構築⁵³⁾が速報として報告された。

バイオセンシングに関する報告は 1999 年から 2010 年までに 4 報あり、酵母解糖系振動及び真性粘菌を用いた毒性のバイオセンシングに関する報告⁵⁴⁾、*in situ* NO センサの開発に関する報告⁵⁵⁾、テラヘルツ波による生体組織内の水分分布測定に関する報告⁵⁶⁾、細胞活性をオンライン計測する為のデバイスの開発に関する報告⁵⁷⁾であった。

カテゴリー化されなかった原著論文として、1995 年にヘモグロビン変性試験法による活性剤と眼刺激性の構造活性相関に関する報告⁵⁸⁾、1997 年に薬物代謝シミュレータの開発に関する報告⁵⁹⁾、2009 年にインスリン分泌促進活性物質探索用の細胞株の樹立に関する報告⁶⁰⁾があった。また 2023 年にグアニジン系加硫促進剤の感作性に関する実態調査が報告された⁶¹⁾。

歴史・今後のカテゴリーでは、1993 年にがん原性物質検出のための試験方法に関して報告された⁶²⁾。2006 年には動物の権利に関して報告され⁶³⁾、2008 年にはイギリス及びアメリカにおける動物実験規制に関して報告された⁶⁴⁾。また、2006 年には、インドの医学部における動物実験と薬理学教育について学生の視点から見た状況が報告された⁶⁵⁾。

最後に基本原則の提案のカテゴリーでは、細胞培養における基本概念を共有するために、培養細胞の脆弱性、入手先の信頼性と使用方法の妥当性、汚染防止、適切な管理と記録、作業者の安全と環境への配慮、の 5 条項から構成される「細胞培養における基本原則」案が作成され、2017 年に原著論文として報告された⁶⁶⁾。

2.3.4. 実践報告の結果

実践報告では 2023 年に 3R の原則をすべて満たすことができたフルオンラインによる遠隔実習用の資料から動画や記録波形を用いた報告が 1 報あった⁶⁷⁾。

2.4. 考察

動物実験代替法に関する邦文について文献レビューを行った結果について、発行年ごとの報告数を動物実験代替法に関する主な出来事とともに表 2-1 に示す。邦文での報告は、1956 年に「3R の原則」が提唱された約 30 年後にあたる 1986 年に発行された動物実験代替法の歴史と今後の動向に関する総説 2 報に始まった。その後、日本では動物実験代替法の開発研究が活発に

行われるようになり、原著論文として毎年報告され、2005 年には JaCVAM が設立され、日本での研究がより活発になったといえる。1996 年には 3 報の総説が報告されていたが、2008 年には 8 報となり、動物実験代替法への関心が高まっているといえる。2005 年以降は、特に化粧品分野での関心が高まり、三次元培養皮膚モデルの活用が主な研究対象であった。2013 年の OECD テストガイドラインに収載された皮膚に関する代替法は、日本で開発されたものが多く存在し、日本が三次元培養皮膚モデルに関する研究を牽引していたものと考えられた。実験動物の代替として培養細胞を用いることが一般的な研究の流れとなっている。特に化学物質の毒性試験に対して培養細胞を用いられることが多く、近年では培養細胞の中でも ES 細胞や iPS 細胞を用いた検討が行われている。これは、2012 年に山中伸弥博士が「成熟細胞が初期化され多能性をもつことの発見」においてノーベル生理学・医学賞を受賞したことにより、動物実験代替法としての展開にも注目されたためと解釈された。世界的な潮流として、実験動物を用いない代替法の活用が主流となっている中、法規制されているのは化粧品分野にとどまっている。しかし、動物福祉の観点から、代替法の活用分野が広がっていくものと予想される。研究の限界として、本論文では、邦文のみを対象とした文献レビューであり、グローバル誌を対象としていないことから、日本での研究の流れを総括できていないことが挙げられる。動物実験代替法による消毒薬の評価に関する邦文での報告例は、3 次元皮膚モデルを用いた擦式アルコール手指消毒薬の *in vitro* 皮膚刺激性試験が 2023 年原著論文として報告されているのみであり、今後の研究展開が期待される。

2.5. 結論

消毒薬の評価における動物実験代替法について邦文の文献レビューを行ったが、消毒薬の評価に関する邦文での報告例は、3 次元皮膚モデルを用いた擦式アルコール手指消毒薬の *in vitro* 皮膚刺激性試験が唯一であった。邦文のみを対象とした文献レビューの為、研究の流れを総括することはできなかったと思われる。今後、グローバル誌を対象とした文献レビューを行うことで、日本での動物実験代替法の研究の流れを総括することが必要である。

2.6. 引用文献

- 1) Russell, W. M. S., Burch, R. L. “The principles of humane experimental technique. Author Affiliation” Dep. Zool. Comp. Anat., Univ. Coll., London. Book 1959.
<https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>. (アクセス日: 2025.1.6)
- 2) 菅原努. 動物実験代替法について. *生活衛生* 1986; 30(3): 126-132.
- 3) 森田茂. 化学物質の安全性評価とその動向. *生活衛生* 1986; 30(6): 348-357.
- 4) 鈴木邦夫. 毒性発現とその予測に関する研究方法論. *Exp. Anim.* 1990; 39(4): 497-505.
- 5) 佐藤温重. 動物実験代替法: どこまで可能となったか. *J. Toxicol. Sci.* 1996; 21(4): 189-196.
- 6) 大野泰雄. 薬学研究における動物実験代替法研究の重要性とその問題点. *薬学雑誌* 2008; 128(5): 735-740.
- 7) 黒澤努. 動物実験代替法と動物実験反対テロリズム. *薬学雑誌* 2008; 128(5): 741-746.
- 8) 小島肇夫. 安全性評価と動物実験代替法の現状. *薬学雑誌* 2008; 128(5): 747-752.
- 9) 秋田正治. 生殖・発生毒性試験の代替法 (現状と近未来) *薬学雑誌* 2008; 128(5): 765-772.
- 10) 中村和昭、諫田泰成、山崎大樹ら. 「培養細胞の観察の基本原則」の提案. *組織培養研究* 2018; 37: 123-131.
- 11) 青井貴之、浅香勲、阿久津英憲ら. 「多能性幹細胞培養の留意点」の提案. *組織培養研究* 2019; 38(3): 135-143.
- 12) 小島肇夫、渡辺美香. 一般財団法人食品薬品安全センターにおける代替法研究. *秦野研究所年報* 2022; 20: 8-17.
- 13) 杉林堅次. 経皮吸収型製剤: 黎明・揺籃期から発展・成熟期へ, そしてこれから. *薬学雑誌* 2022; 142(11): 1227-1253.
- 14) 権田辰夫. 医学部における動物実験—実験者に求められる倫理性と技術—. *島根医科大学紀要* 2001; 24: 59-72.
- 15) 久保薫. 研究施設の中の動物たちとリファインメント. *J. Nara Med. Ass.* 2011; 62(1-2): 1-10.
- 16) 竹村勇司. 動物福祉を基盤とする畜産の進展. *日本生気象学会雑誌* 2021. 58(1): 3-15.
- 17) 林俊克. 化粧品に用いる界面活性剤の安全試験代替法. *日本油化学会誌* 1996; 45(10): 1179-1188.
- 18) 梅田誠. 培養細胞を用いた毒性テストについて. *衛生化学* 1996; 42(6): 443-452.
- 19) 小森喜久夫、名田順、宮島翔太郎ら. 体内動態を考慮する新たな毒性評価系の開発. *薬学雑誌* 2008; 128(1): 29-35.
- 20) 三村純代、相原祐子、木村直大ら. マウス ES 細胞由来神経堤細胞の毒性評価系応用への可能性. *組織培養研究* 2011; 30(2+3+4): 159-168.
- 21) 植木拓朗. 化粧品の使用場面にあわせた品質保証に必要な観点. *日本化粧品技術者会誌* 2020; 54(4): 309-314.
- 22) 尾上誠良、上月裕一、豊田明美ら. 光安全性評価の現状と課題. *薬学雑誌* 2021; 141(1): 111-124.
- 23) 森川訓行、諸田勝保、富畑賢司ら. 再生医療研究に利用可能な三次元培養皮膚モデル. *日本再生歯科医学会誌* 2005; 3(1): 12-22.
- 24) 竹澤俊明、竹内朋代、柳原佳奈ら. 動物組織を薄切した切片担体及びコラーゲンビトリゲル薄膜担体を利用した培養モデルの特徴と創薬研究への応用構想. *薬学雑誌* 2008; 128(1): 51-60.
- 25) 竹澤俊明、竹内朋代、落谷孝広ら. 組織病理学用の切片を動物細胞の培養担体に利用した先端研究. *Organ Biol.* 2008; 15(2): 107-114.
- 26) 今井弘一. 再生医療の新しい研究ターゲット. *日本再生歯科医学会誌* 2015; 13(1): 15-26.
- 27) 池野慎也、春山哲也. 細胞・組織バイオセンシング技術の進展. *分析化学* 2004; 53(3): 135-146.
- 28) 吉村功、大森崇. 薬理試験における統計解析の Q&A—反復測定データの解析法への一提案—薬理試験における統計解析の Q&A. *日本薬理学雑誌* 1997; 110(6): 333-340.

- 29) K. Nana, I. Satsuki, H. Noritaka. 糖タンパク質医薬品の特性・品質評価における *Trend. Glycosci. Glycotechnol.* 2008; 20(112): 97-116.
- 30) 松崎典弥. 3D 細胞プリンター. *日本印刷学会誌* 2016; 53(4) 254-260.
- 31) 黒木賀代子、内山長司、岡知子ら. コンポジットレジンの定量的細胞毒性試験法. *歯科材料・器械* 1988; 7(4): 545-551.
- 32) 嶋田昌彦、竹内球. 細胞毒性試験によるラウリルイミノジカルボン酸塩の毒性に関する評価. *日本油化学会誌* 1997; 46(9): 1011-1018.
- 33) 今井弘一、中村和昭、田上昭人. 代謝活性因子を含めた *in vitro* 発生毒性評価法の開発. *バイオインテグレーション学会誌* 2012; 2(1): 91-96.
- 34) 藍澤早希子、鶴巻実香、今井教安ら. 動物実験代替法を用いた光毒性評価フローの開発. *日本化粧品技術者会誌* 2017; 51(4): 293-299.
- 35) 嶋田昌彦、竹内球. サイトカインアッセイによるラウリルイミノジカルボン酸塩の毒性に関する評価. *日本油化学会誌* 1997; 46(11): 1403-1406.
- 36) 北村和子、諏訪良秀. 化学発光法を用いた細胞毒性試験法の検討 *食品衛生学雑誌* 1997; 38: 446-451.
- 37) N. Morikawa, K. Morota, M. Suzuki, *et al.* Experimental Study on a Novel Chemical Application Procedure for *in vitro* Skin Corrosivity Testing Using the Vitrolife-Skin™ Human Skin Model. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* 2005; 11(1): 68-78.
- 38) 内田恵美子、筏義人. 培養皮膚モデルを用いた界面活性剤の皮膚一次刺激性の評価. *日本家政学会誌* 2007; 58(4): 197-202.
- 39) 内田恵美子. 三次元培養皮膚を用いた衣服の安全性試験法. *奈良教育大学紀要* 2007; 56(2)(自然): 29-33.
- 40) 池田英史、西浦英樹. 敏感肌を対象とした *in vitro* 皮膚刺激性試験の検討. *日本化粧品技術者会誌* 2013; 47(1): 9-181.
- 41) 坂本晴世. 3 次元皮膚モデルを用いた擦式アルコール手指消毒薬の *in vitro* 皮膚刺激性試験. *日本環境感染学会誌* 2023; 38(4): 173-180.
- 42) 山本宣之. 速乾性擦式アルコール手指消毒剤の皮膚刺激性評価における動物実験代替法の開発. *薬学雑誌* 2010; 130(8): 1069-1073.
- 43) 川原大. 歯科材料の生物学的評価法としてのコラーゲングル培養法の有用性 (*in vitro*). *歯科材料・器械* 1989; 8(4): 499-516.
- 44) 武田昭二、橋本典也、三浦康伸、ら. 無血清培養下における歯科用モノマーの細胞毒性試験 (*in vitro*). *歯科材料・器械* 1993; 1(12): 5613-5619.
- 45) 小佐田義久、今井弘一、中村正明. 歯周包帯剤が臍帯静脈内皮由来細胞による管腔様構造の形成に及ぼす影響. *歯科医学* 2003; 66(2): 167-175.
- 46) 岩井峯子. ヒト正常および腫瘍細胞の三次元培養による組織再構築に関する研究. *奈良医学雑誌* 1992; 43(2): 94-103.
- 47) 今井弘一、加山勝敏、竹田真人ら. 組織モデルによる細胞毒性試験の試み -TEST SKIN 2™ について-. *歯科材料・器械* 1995; 14(5): 499-503.
- 48) 増田一郎. ヒト歯肉由来細胞より再構築された *in vitro* 口腔粘膜モデル. *口腔病学会雑誌* 1996; 63(2):334-353.
- 49) 上月裕一. *In silico* 安全性予測システムの開発—皮膚刺激性予測モデルの開発— *日本化粧品技術者会誌* 2009; 43(4): 254-259.
- 50) 桑詩野、吉田喜久雄、益永茂樹. 吸入した揮発性有機物質の年齢群別生物学的有効用量推定システムの検証とパラメータ推定方法の見直し-信頼性と使いやすさを目指して. *日本リスク研究学会誌* 2012; 22(2): 99-109.
- 51) 荒川真希、播本千穂、花田道子. 動物看護教育のための輸液用動物代替モデルの作製とその有用性. *Vet. Nurs.* 2016; 21(2): 27-34.
- 52) 阿部仁美、川村和美、小沼守、ら. 動物医療用シミュレーターの学習効果 (ネコ触診モデル). *Vet. Nurs.* 2015; 20(2): 27-32.

- 53) 上野健一、細川葵、橋本諭ら. イムノクロマト法による二枚貝の麻痺性貝毒迅速スクリーニング法の構築. *食品衛生学雑誌* 2021; 62(3): 85-93.
- 54) 鈴木正康. 新しい生物材料を用いた毒性測定を試み. *Electrochemistry* 1999; 67(5): 475-479.
- 55) 春山哲也、相澤益男. 培養細胞を用いた循環器系作用薬剤スクリーニングを目的とした *in situ* NO センサの開発. *Electrochemistry* 1999; 67(5): 484-487.
- 56) 碓智文、南出泰重、伊藤弘昌ら. テラヘルツ波による生体薄切片試料の含有水分の 2 次元分布測定法. *日本赤外線学会誌* 2008; 12(18): 1-4.
- 57) 木村啓志、庄野裕基、山本貴富喜ら. オンチップグルコースセンサによる細胞活性オンライン計測の検討. *電気学会論文誌* 2010; 130(10): 476-483.
- 58) 林俊克、板垣宏、田村宇平ら. ヘモグロビン変性試験法による活性剤と眼刺激性の構造活性相関に関する研究. *日本化粧品技術者会誌* 1995; 28(4): 344-349.
- 59) 中澤浩二、水本博、井嶋博之ら. PUF/肝細胞スフェロイド培養法を利用した薬物代謝シミュレータの開発—人工肝臓装置によるアセトアミノフェン代謝の研究—. *人工臓器* 1997; 26(3): 713-718.
- 60) 亀井勇統. インスリン分泌促進活性物質探索用の低濃度牛胎児血清培地順応 Beta-TC-6 細胞株の樹立. *佐賀大学海浜台地生物環境研究センター* 2009; 14: 49-55.
- 61) 清水久美子、秋山卓美、伊佐間和郎、ら. グアニジン系加硫促進剤の感作性評価と家庭用ゴム製品の実態調査. *国立医薬品食品衛生研究所報告* 2016; 134: 42-49.
- 62) 梅田誠. がん原性物質検出のための変異原性試験と培養内形質転換試験法. *横浜市立大学論叢自然科学系列* 1993; 44(1.2): 1-11.
- 63) 中神洋子. 「動物の権利」をめぐる論争の考察:「人間中心主義」のパラダイムを超えられるのか. *同朋大学論叢* 2006; 90(6): 92-61.
- 64) 大上泰弘、神里彩子、城山英明. イギリス及びアメリカにおける動物実験規制の比較分析 日本規制体制への示唆. *社会技術研究論文集* 2008; 5: 132-142.
- 65) Mandeep Singh Dhirra, Amandeep Singh, Jatinder Singh. Animal Experiments and Pharmacology Teaching at Medical Schools in India: A Student's Eye View. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* 2006; 11(3): 185-191.
- 66) 諫田泰成、中村和昭、山崎大樹. 「細胞培養における基本原則」の提案. *組織培養研究* 2017; 36(2): 13-192.
- 67) 佐藤寛栄、椎橋実智男. フルオンラインによる生理学実習代替の試み. *医学教育* 2023; 54(4): 400-405.

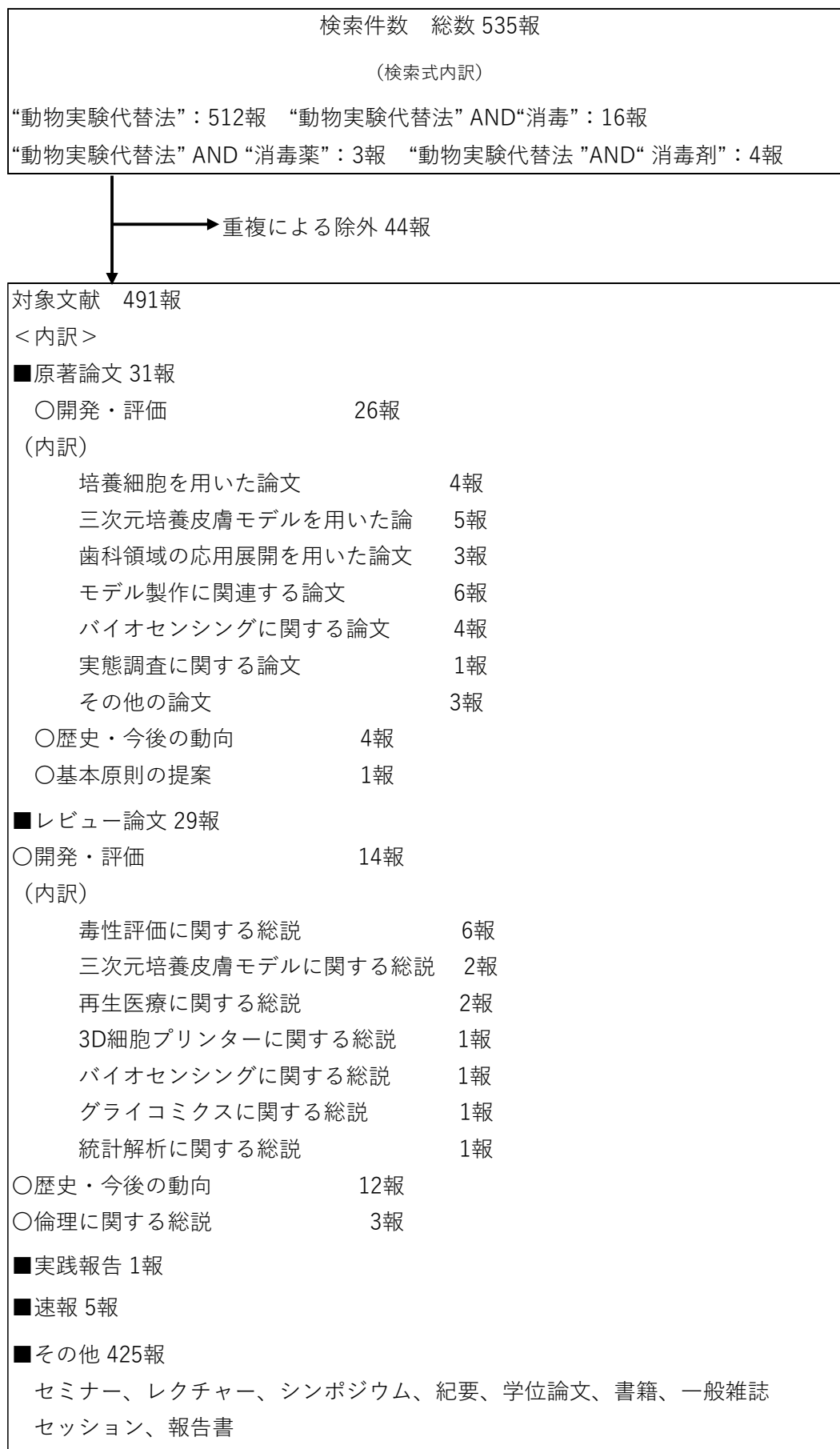


図 2-1 動物実験代替法に関する対象文献の内訳

表 2-1 動物実験代替法に関する主な出来事と総説および原著論文の年別報告数

海外での主な出来事	日本での主な出来事	年	総説				原著論文				
			総数	開発・評価	歴史・今後の動向	倫理	総数	開発・評価	歴史・今後の動向	基本原則の提案	
3Rの原則の提唱 REACH規制		1959									
		：									
		1980									
		1986	2		2						
		1987									
		1988					1	1			
		1989					1	1			
		1990	1		1						
		1991									
		1992					1	1			
	1993					2	1	1			
	1994										
	1995					1	1				
	1996	3	3			2	2				
	1997	1	1			2	2				
	1998										
	1999					2	2				
	2000										
	2001	1			1						
	2002										
	2003					1	1				
EU/化粧品の動物実験禁止を発表	JaCVAMの創設 「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」	2004	1	1							
		2005	1	1			1	1	2		
		2006					2				
		2007					2	2			
		2008	8	4	4		2	1	1		
EU/化粧品成分のテストを停止		2009					2	2			
		2010					1	1			
		2011	2	1		1					
		2012					2	2			
EU/化粧品の販売を完全禁止	OECDテストガイドラインへの動物実験代替法の収載	2013					1	1			
		2014									
		2015	1	1							
		2016	1	1			2	2			
		2017					2	1		1	
		2018	1		1						
		2019	1		1						
欧州委員会が化学物質戦略（CSS）を発表	「3Rの原則」飼養保管等基準の周知及び遵守の関係機関への徹底	2020	1	1							
		2021	2	1		1					
		2022	2		2			1	1		
		2023									
		合計	29	15	11	3	31	26	4	1	

第3章

培養細胞を用いた毒性評価方法の検討

3.1. 緒言

第 2 章で示されたように、日本における動物実験代替法による消毒薬の評価報告は極めて少ないことが判明した。そこで、由来の異なる 4 種類の培養細胞に対して、各種消毒薬(3 種の塩素系消毒薬、3 種の低水準消毒薬、および消毒用エタノール)に対する細胞生存率を異なる 4 種類のアッセイ系それぞれで行い比較検討した。

3.2. 方法

3.2.1. 材料

培養細胞は、Chang conjunctiva 細胞(ヒト成人結膜由来、Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctiva、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。細胞はそれぞれ以下に示す培地を用い、常法に従って培養した。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、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、Human Dermal Fibroblast 細胞と FRSK 細胞にはダルベッコ MEM 培地(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。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)を、MilliQ 水により 260 ppm に調整して用いた。亜塩素酸ナトリウム水溶液は、亜塩素酸ナトリウム(Sigma-Aldrich)から、グルコン酸クロロヘキシジン水溶液は 20%グルコン酸クロロヘキシジン溶液(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(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(東京化成工業株式会社)から、MilliQ 水によりそれぞれ 100 ppm に調整して用いた。

3.2.2. 細胞生存率

消毒薬は MilliQ 水で希釈系列を作成し、実験に供試した。細胞株は、96 ウェルプレート内の各ウェルに約 10^4 cells/100 μ L の細胞懸濁液 100 μ L を播種し、5% CO₂ インキュベーター内で 2 日間培養した後、実験に供試した。消毒薬の作用後の細胞生存率は、所定のウェルに消毒薬を 10 μ L 添加したのち 5% CO₂ インキュベーター内で 2 日間培養後、以下に示す各アッセイを用いて求めた。なお、コントロールには MilliQ 水を用いた。各実験は n=8 として行った。

3.2.2.1. MTT アッセイ

5 mg/mL の MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, SIGMA)を各ウェルに 10 μ L 添加した後、5% CO₂ インキュベーター内で 4 時間培養後、析出した難溶性の沈殿物を 0.04 mol/L 塩酸-イソプロパノール溶液を 100 μ L 添加して溶解した。この溶液を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 iMarkTM)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。

3.2.2.2. NR アッセイ

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 時間培養した。MilliQ 水で洗浄し、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。MilliQ 水で洗浄後、50%エタノール-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。

3.2.2.3. レサズリンアッセイ

Cell Viability Assay Kit(コスモ・バイオ株式会社)を用いて生細胞が成長する時にレサズリンをレゾルフィンに還元する原理を利用して細胞生存率を測定した。レサズリン溶液を各ウェルに 10

μL 添加して 5% CO₂ インキュベーター内で Chang conjunctiva 細胞、HeLa 細胞、および FRSK 細胞は 3 時間培養し、Human Dermal Fibroblast 細胞は 5 時間培養した。対照波長を 630 nm とし、570 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。

3.2.2.4. LDH アッセイ

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (Dojindo) を用いてノンホモジニアスアッセイにて実施した。消毒薬作用後の培養上清 10 μL を測定用の 96 ウェルプレートに移し、Working Solution を 100 μL 添加して遮光下の室温で 30 分間呈色反応を行った。細胞中の全 LDH 活性を示す高コントロールの測定には、消毒薬を作用していない細胞を用いて、消毒薬の代わりに Lysis Buffer を 20 μL 添加して 30 分間培養後の上清 10 μL を使用し、上述と同様の操作を行った。消毒薬無添加細胞から自然放出される LDH 活性を示す低コントロールの測定には、消毒薬無添加細胞の培養上清 10 μL を使用し、上述と同様の操作を行った。各ウェルに Stop Solution を 50 μL 添加して、490 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、それぞれ Abs_{薬剤処理}、Abs_{高コントロール}、Abs_{低コントロール} とした。

3.2.2.5. 細胞生存率の算出方法

MTT アッセイ、NR アッセイおよびレサズリンアッセイにおける薬剤処理後の細胞生存率は、Abs_{薬剤処理} とコントロールとして MilliQ 水を用いた時の吸光度 (Abs_{未処理}) を用いて、式 1 により算出した。

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

LDH アッセイにおける薬剤処理後の細胞生存率は、Abs_{薬剤処理}、Abs_{高コントロール}、Abs_{低コントロール} を用いて式 2 により算出した。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = \left(1 - \frac{(\text{Abs}_{\text{薬剤処理}}) - (\text{Abs}_{\text{低コントロール}})}{(\text{Abs}_{\text{高コントロール}}) - (\text{Abs}_{\text{低コントロール}})} \right) \times 100 \quad (\text{式 2})$$

3.3. 結果

3.3.1. MTT アッセイによる細胞生存率

各細胞において 7 種の消毒薬を作用した時の MTT アッセイにより得られた細胞生存率を図 3-1(a)～図 3-7(a)に示す。

検討したすべての培養細胞において微弱酸性次亜塩素酸水溶液と次亜塩素酸ナトリウム水溶液では、濃度によらず細胞生存率はほぼ 100%であった(図 3-1(a)、3-2(a))。

亜塩素酸ナトリウム水溶液添加では、濃度によらず FRSK 細胞の生存率はほぼ 100%であった。一方、Chang conjunctiva 細胞、HeLa 細胞、Human Dermal Fibroblast 細胞では、亜塩素酸ナトリウム水溶液を 10 倍希釈以下の濃度で作用させると細胞生存率はほぼ 100%であったのに対し、原液の 100 ppm(最終濃度 9 ppm)では Chang conjunctiva 細胞は 43%、HeLa 細胞は 37%、Human Dermal Fibroblast 細胞は 26%に減少した(図 3-3(a))。

グルコン酸クロルヘキシジン水溶液添加では、100 倍希釈以下の濃度で、検討したすべての培養細胞において細胞生存率はほぼ 100%であった。一方 Human Dermal Fibroblast 細胞に対する細胞生存率は 10 倍希釈のグルコン酸クロルヘキシジン水溶液において 94%であったが、原液の 100 ppm(最終濃度 9 ppm)では 6%まで減少した。Chang conjunctiva 細胞、HeLa 細胞、FRSK 細胞では 10 倍希釈のグルコン酸クロルヘキシジン水溶液において細胞生存率は 21～31%に減少し、原液の 100 ppm(最終濃度 9 ppm)を作用させるとさらに 8%未満となった(図 3-4(a))。

4 種の培養細胞において、100 倍希釈以下の濃度の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添加では細胞生存率は 78%以上であったが、10 倍希釈および原液の 100 ppm(最終濃度 9 ppm)添加により細胞生存率は 9%未満となった(図 3-5(a)、図 3-6(a))。

Human Dermal Fibroblast 細胞に対して消毒用エタノール 10 倍希釈以下の濃度では細胞生存率はほぼ 100%であったが、原液では 62%であった。FRSK 細胞においても消毒用エタノール 10 倍希釈以下の濃度では、細胞生存率は 83%以上であったが、原液では 6%となった。Chang conjunctiva 細胞と HeLa 細胞では消毒用エタノールをさらに低濃度の 100 倍希釈以下の濃度で作用させると、細胞生存率は 87%以上であったが、10 倍希釈の濃度では Chang conjunctiva 細胞に対する細胞生存率は 70%、HeLa 細胞に対する細胞生存率は 66%となり、原液では Chang conjunctiva 細胞に対する細胞生存率は 26%、HeLa 細胞に対する細胞生存率は 32%に減少した(図 3-7(a))。

3.3.2. NR アッセイによる細胞生存率

各細胞において NR アッセイにより得られた 7 種の消毒薬に対する細胞生存率を図 3-1(b)～図 3-7(b)に示す。

HeLa 細胞、Human Dermal Fibroblast 細胞と FRSK 細胞では微弱酸性次亜塩素酸水溶液に対していずれの濃度でも細胞生存率は 100%であったが、Chang conjunctiva 細胞は原液では 79%に減少した(図 3-1 (b))。

次亜塩素酸ナトリウム水溶液添加では、Chang conjunctiva 細胞と Human Dermal Fibroblast 細胞と FRSK 細胞に対していずれの濃度でも細胞生存率は 100%であったが、HeLa 細胞では原液の 100 ppm(最終濃度 9 ppm)添加時に 79%となった(図 3-2(b))。

FRSK 細胞は亜塩素酸ナトリウム水溶液に対し検討したいずれの濃度でも細胞生存率は 100%であった。一方、Chang conjunctiva 細胞、HeLa 細胞、Human Dermal Fibroblast 細胞では亜塩素酸ナトリウム水溶液 10 倍希釈以下の濃度で細胞生存率は 100%であった。一方原液の 100 ppm(最終濃度 9 ppm)添加では Human Dermal Fibroblast 細胞では 35%、Chang conjunctiva 細胞と HeLa 細胞では 27%に減少した(図 3-3(b))。

グルコン酸クロルヘキシジン水溶液は、すべての細胞において 100 倍希釈以下の濃度では細胞生存率は 100%であった。10 倍希釈では、Human Dermal Fibroblast 細胞における細胞生存率は 59%、HeLa 細胞では 21%、Chang conjunctiva 細胞と FRSK 細胞では 17%にまで減少した。また原液の 100 ppm(最終濃度 9 ppm)を作用させた場合、Human Dermal Fibroblast 細胞では 36%、HeLa 細胞では 25%、Chang conjunctiva 細胞では 38%、FRSK 細胞では 10%であった(図 3-4(b))。

Chang conjunctiva 細胞と HeLa 細胞と Human Dermal Fibroblast 細胞において塩化ベンザルコ

ニウム水溶液 1000 倍希釈以下の濃度での検討では細胞生存率はほぼ 100%であった。100 倍希釈では HeLa 細胞の細胞生存率は 82%、Human Dermal Fibroblast 細胞は 72%、Chang conjunctiva 細胞は 44%に減少した。10 倍希釈での検討では、細胞生存率はさらに減少し、HeLa 細胞では 16%、Human Dermal Fibroblast 細胞では 35%、Chang conjunctiva 細胞では 12%であった。原液 100 ppm (最終濃度 9 ppm)における細胞生存率は HeLa 細胞では 35%、Human Dermal Fibroblast 細胞では 37%、Chang conjunctiva 細胞では 43%になった。特に FRSK 細胞の塩化ベンザルコニウム水溶液添加による細胞生存率は他の細胞と異なり 10000 倍希釈において 89%であったが、1000 倍希釈において 69%、100 倍希釈では 48%まで低下し、10 倍希釈では 6%、原液の 100 ppm (最終濃度 9 ppm)では 8%であった(図 3-5(b))。

すべての細胞において塩化ベンゼトニウム水溶液 1000 倍希釈以下の濃度では、細胞生存率 87%~94%であったが、100 倍希釈の時点で Chang conjunctiva 細胞での生存率は 58%まで低下していた。塩化ベンゼトニウム水溶液 100 倍希釈添加時の HeLa 細胞の細胞生存率は 85%、Human Dermal Fibroblast 細胞は 72%、FRSK 細胞は 71%であった。10 倍希釈において Human Dermal Fibroblast 細胞は 33%、HeLa 細胞は 18%、FRSK 細胞は 8%、Chang conjunctiva 細胞は 11%とそれぞれの細胞生存率はかなり低下した。原液の 100 ppm (最終濃度 9 ppm)で作用させた場合の細胞生存率は、Human Dermal Fibroblast 細胞では 36%、HeLa 細胞では 23%、FRSK 細胞では 10%であったが、Chang conjunctiva 細胞では 31%であった(図 3-6(b))。

すべての細胞において消毒用エタノール 100 倍希釈に対し細胞生存率は 88%以上であった。10 倍希釈の場合、Chang conjunctiva 細胞、HeLa 細胞、Human Dermal Fibroblast 細胞では細胞生存率は 87%以上であったが、FRSK 細胞では 77%であった。原液を作用させると、細胞生存率は Human Dermal Fibroblast 細胞では 69%、HeLa 細胞では 39%、Chang conjunctiva 細胞では 37%、FRSK 細胞では 9%であった。(図 3-7(b))。

3.3.3. レサズリンアッセイによる細胞生存率

すべての細胞において微弱酸性次亜塩素酸水溶液では検討したいずれの濃度においても生存率はほぼ 100%であった(図 3-1(c))。

Chang conjunctiva 細胞、Human Dermal Fibroblast 細胞、FRSK 細胞は次亜塩素酸ナトリウム水溶液添加ではいずれの濃度においても細胞生存率はほぼ 100%であったが、HeLa 細胞においては約 80%だった(図 3-2(c))。

すべての細胞種で亜塩素酸ナトリウム水溶液 10 ppm (最終濃度 0.9 ppm)以下では細胞生存率はほぼ 100%だったが、100 ppm (最終濃度 9 ppm)では HeLa 細胞ではほぼ 100%、Chang conjunctiva 細胞では 88%、Human Dermal Fibroblast 細胞では 84%であったのに対し FRSK 細胞では 50%まで低下した(図 3-3(c))。

Human Dermal Fibroblast 細胞と FRSK 細胞ではグルコン酸クロルヘキシジン水溶液 10 ppm (最終濃度 0.9 ppm)以下の細胞生存率がほぼ 100%であった。しかし 100 ppm (最終濃度 9 ppm)においては Human Dermal Fibroblast 細胞での細胞生存率は 22%、FRSK 細胞は 17%と低下した。Chang conjunctiva 細胞ではグルコン酸クロルヘキシジン水溶液 1 ppm (最終濃度 0.09 ppm)以下では細胞生存率は 92%以上であったが、10 ppm (最終濃度 0.9 ppm)では 57%、100 ppm (最終濃度 9 ppm)では 19%であった。HeLa 細胞においては 1 ppm (最終濃度 0.09 ppm)以下では 70%以上の細胞生存率だったが、10 ppm (最終濃度 0.9 ppm)の濃度では 51%、100 ppm (最終濃度 9 ppm)では 35%であった(図 3-4(c))。

すべての細胞種において塩化ベンザルコニウム水溶液 1 ppm (最終濃度 0.09 ppm)以下で細胞生存率はほぼ 90%以上であったが、10 ppm (最終濃度 0.9 ppm)では HeLa 細胞は 65%まで低下し、100 ppm (最終濃度 9 ppm)では 34%まで低下した。Human Dermal Fibroblast 細胞、Chang conjunctiva 細胞、および FRSK 細胞は 10 ppm (最終濃度 0.9 ppm)以上の濃度で約 40%であった(図 3-5(c))。

すべての細胞種において塩化ベンゼトニウム水溶液 1 ppm (最終濃度 0.09 ppm)以下では細胞生存率は 75%以上であったが、10 ppm (最終濃度 0.9 ppm)以上の濃度では 25%以下であった。(図 3-6(c))。

Human Dermal Fibroblast 細胞、HeLa 細胞、Chang conjunctiva 細胞は原液濃度を含めた消毒用エタノールに対して細胞生存率はほぼ 100%であったが、FRSK 細胞のみ原液に対して細胞生存率は 43%に減少した(図 3-7(c))。

3.3.4. LDH アッセイによる細胞生存率

すべての細胞種に対して微弱酸性次亜塩素酸水溶液と次亜塩素酸ナトリウム水溶液添加ではいずれの濃度においても細胞生存率はほぼ 100%以上であった(図 3-1(d)、図 3-2(d))。

同様にすべての細胞において亜塩素酸ナトリウム水溶液 10 ppm(最終濃度 0.9 ppm)以下では細胞生存率はほぼ 100%であったが、100 ppm(最終濃度 9 ppm)では、Chang conjunctiva 細胞では 86%、Human Dermal Fibroblast 細胞では約 80%、特に FRSK 細胞においては 58%にまで細胞生存率は減少した(図 3-3(d))。

すべての細胞においてグルコン酸クロルヘキシジン水溶液を 1 ppm(最終濃度 0.09 ppm)以下で添加した場合の細胞生存率はほぼ 100%であったが、100 ppm(最終濃度 9 ppm)では HeLa 細胞の生存率は 0%であった(図 3-4(d))。

すべての細胞で塩化ベンザルコニウム水溶液 0.1 ppm(最終濃度 0.009 ppm)以下で添加すると細胞生存率はほぼ 100%であったが、1 ppm(最終濃度 0.09 ppm)においては Chang conjunctiva 細胞における細胞生存率のみ 73%に低下し、100 ppm(最終濃度 9 ppm)では Chang conjunctiva 細胞において 8%、Human Dermal Fibroblast 細胞において 13%、FRSK 細胞において 2%、HeLa 細胞においては 0%であった(図 3-5(d))。

すべての細胞において塩化ベンゼトニウム水溶液 1 ppm(最終濃度 0.09 ppm)以下では細胞生存率は 90%以上であったが、10 ppm(最終濃度 0.9 ppm)で HeLa 細胞は 0%であった(図 3-6(d))。

FRSK 細胞を除く細胞種において消毒用エタノール添加では原液から 10 倍希釈まで細胞生存率はほぼ 100%であったが、FRSK 細胞においてのみ原液での細胞生存率が 46%であった(図 3-7(d))。

3.4. 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いる。しかし動物を用いない代替試験法として多くの検討がなされているものの実用化されたものはない。本研究では各種消毒薬を各種培養細胞に添加しその生存率を評価する試験法について検討を行った。

まず2つの細胞毒性試験の結果をXおよびY軸によって表記し、一つの図で感受性を比較した(図3-8～図3-11)。細胞生存率をそれぞれプロットし回帰直線から10%乖離したものを p 値0.1、20%乖離したものを p 値0.2として点線を引き、 $p<0.2$ までを許容範囲とすることによりそれぞれX軸、Y軸方向へのずれによって異なる細胞の消毒薬への感受性の差異を簡便に示すことが可能となった。

細胞生存率の測定には細胞増殖の停止や低下、細胞膜の破綻による細胞内酵素漏出、代謝活性低下、ミトコンドリア機能低下が測定されている。今回アッセイ系の違いによる消毒薬細胞障害評価の差異を検討するため、次の4つのアッセイをそれぞれ細胞種ごとに比較検討した。

具体的には1)細胞膜障害により培地中に放出されたLDHを測定することにより障害を受けた細胞数を評価するLDHアッセイ、2)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吸光度測定によりミトコンドリア機能を指標に生細胞数を計測するMTTアッセイ、3)生細胞の細胞膜の能動輸送により細胞内に取り込まれたニュートラルレッドの総量を測定することにより生細胞数を計測するNRアッセイ、4)細胞増殖時に、細胞内に取り込まれたレサズリンが酸化還元反応によって還元されたレゾルフインを比色測定し細胞増殖を測定するレサズリンアッセイを選択した。

MTTアッセイを用いた各細胞の毒性試験の結果を比較すると、消毒薬の種類によらずChang conjunctiva細胞とHeLa細胞(図3-8(b))、Chang conjunctiva細胞とFRSK細胞(図3-8(c))、HeLa細胞とFRSK細胞(図3-8(e))がいずれの消毒薬に対してもほぼ同程度の感受性を示した。その中でも、塩素系消毒薬では微弱酸性次亜塩素酸水溶液を作用させた場合、HeLa細胞よりChang conjunctiva細胞の方が高い感受性を示し(図3-8(c))、次亜塩素酸ナトリウム水溶液を作用させた場合、FRSK細胞よりHuman Dermal Fibroblast細胞の方が高い感受性を示した(図3-8(f))。一方、亜塩素酸ナトリウム水溶液を作用させるとChang conjunctiva細胞よりFRSK細胞の方が、HeLa細胞よりFRSK細胞の方が高い感受性を示した(図3-8(c)、(e))。低水準消毒薬のグルコン酸クロルヘキシジン水溶液を作用させた場合、Human Dermal Fibroblast細胞よりChang conjunctiva細胞、HeLa細胞、およびFRSK細胞の方が高い感受性を示した(図3-8(a)、(d)、(f))。消毒用エタノールを作用させるとHuman Dermal Fibroblast細胞よりChang conjunctiva細胞、HeLa細胞、およびFRSK細胞の方が高い感受性を示した(図3-8(a)、(d)、(f))。

NRアッセイを用いて比較すると、消毒薬の種類によらず同程度の感受性を示す細胞の組み合わせはなかった(図3-9)。消毒薬の分類ごとに比較すると、塩素系消毒薬では微弱酸性次亜塩素酸水溶液を作用させるとHuman Dermal Fibroblast細胞よりChang conjunctiva細胞の方が高い感受性を示し(図3-9(a))、亜塩素酸ナトリウム水溶液を作用させるとFRSK細胞よりChang conjunctiva細胞(図3-9(c))、HeLa細胞(図3-9(e))、またはHuman Dermal Fibroblast細胞(図3-9(f))の方が高い感受性を示した。低水準消毒薬ではHuman Dermal Fibroblast細胞よりChang conjunctiva細胞(図3-9(a))またはFRSK細胞(図3-9(f))の方が高い感受性を示し、グルコン酸クロルヘキシジン水溶液作用時にはさらにHeLa細胞が高い感受性を示した(図3-9(d))。消毒用エタノールを作用させるとHuman Dermal Fibroblast細胞よりChang conjunctiva細胞(図3-9(a))とHeLa細胞(図3-9(d))の方が高い感受性を示し、Chang conjunctiva細胞よりFRSK細胞の方が(図3-9(c))、HeLa細胞およびHuman Dermal Fibroblast細胞よりFRSK細胞の方が高い感受性を示した(図3-9(e)、(f))。

レサズリンアッセイを用いて細胞の感受性を比較すると、消毒薬の種類によらず同程度の感受性を示す細胞の組み合わせはなかった(図3-10)。消毒薬の分類ごとに比較すると、塩素系消毒薬では微弱酸性次亜塩素酸水溶液と次亜塩素酸ナトリウム水溶液はいずれの細胞を用いても同程度の感受性を示したが、亜塩素酸ナトリウム水溶液を作用させるとHeLa細胞よりChang conjunctiva細胞(図3-10(b))、Human Dermal Fibroblast細胞(図3-10(d))、またはFRSK細胞(図3-10(e))の方が、Chang conjunctiva細胞よりHuman Dermal Fibroblast細胞(図3-10(a))また

は FRSK 細胞 (図 3-10(c)) の方が高い感受性を示した。低水準消毒薬ではグルコン酸クロルヘキシジン水溶液を作用させると Human Dermal Fibroblast 細胞より Chang conjunctiva 細胞 (図 3-10(a)) または HeLa 細胞 (図 3-10(d)) の方が高い感受性を示し、FRSK 細胞より Chang conjunctiva 細胞 (図 3-10(c)) または HeLa 細胞 (図 3-10(e)) の方が高い感受性を示した。塩化ベンザルコニウム水溶液または塩化ベンゼトニウム水溶液を作用させるといずれの細胞を用いてもほぼ同程度の感受性を示したが、塩化ベンザルコニウム水溶液作用時に HeLa 細胞より Chang conjunctiva 細胞 (図 3-10(b)) または Human Dermal Fibroblast 細胞 (図 3-10(d)) の方が高い感受性を示すものがあつた。消毒用エタノールを作用させると Chang conjunctiva 細胞、HeLa 細胞、および Human Dermal Fibroblast 細胞より FRSK 細胞の方が高い感受性を示すものがあつた (図 3-10(c)、(e)、(f))。

LDH アッセイを用いて細胞の感受性を比較すると、消毒薬の種類によらず Human Dermal Fibroblast 細胞は Chang conjunctiva 細胞 (図 3-11(a)) または HeLa 細胞 (図 3-11(d)) と同程度の感受性を示した。消毒薬の分類ごとに比較すると、塩素系消毒薬では微弱酸性次亜塩素酸水溶液と次亜塩素酸ナトリウム水溶液はいずれの細胞を用いても同程度の感受性を示したが、亜塩素酸ナトリウム水溶液を作用させると HeLa 細胞より FRSK 細胞の方が高い感受性を示した (図 3-11(e))。低水準消毒薬では Chang conjunctiva 細胞と FRSK 細胞が同程度の感受性を示したが (図 3-11(c))、グルコン酸クロルヘキシジン水溶液を作用させると Chang conjunctiva 細胞より HeLa 細胞の方が高い感受性を示し (図 3-11(b))、HeLa 細胞または Human Dermal Fibroblast 細胞より FRSK 細胞の方が高い感受性を示した (図 3-11(e)、(f))。消毒用エタノールを作用させると Chang conjunctiva 細胞、HeLa 細胞、および Human Dermal Fibroblast 細胞より FRSK 細胞の方が高い感受性を示した (図 3-11(c)、(e)、(f))。

次に細胞種ごとに各アッセイ系の感受性を比較するために、同一細胞種における細胞毒性試験の結果をXおよびY軸によって表記し (図 3-12～図 3-17)、前述のアッセイ系ごとに細胞間の感受性を比較した許容範囲と同様とした。

MTT アッセイと NR アッセイを用いて細胞の感受性を比較すると、Chang conjunctiva 細胞では 3 種類の低水準消毒薬と消毒用エタノールが MTT アッセイの方が高い感受性を示す傾向にあつたものの、一部低水準消毒薬に NR アッセイの方が高い感受性を示すものがあつた (図 3-12(a))。HeLa 細胞 (図 3-12(b)) と Human Dermal Fibroblast 細胞 (図 3-12(c)) ではいずれのアッセイ系でもほぼ同程度の感受性を示した。FRSK 細胞では亜塩素酸ナトリウム水溶液で MTT アッセイの方が高い感受性を示すものがあつたのに対し、塩化ベンザルコニウム水溶液で NR アッセイの方が高い感受性を示すものがあつた (図 3-12(d))。

MTT アッセイとレサズリンアッセイを用いて細胞の感受性を比較すると、いずれの細胞種においても MTT アッセイの方が高い感受性を示す傾向にあつた (図 3-13)。特に、Chang conjunctiva 細胞と HeLa 細胞では微弱酸性次亜塩素酸水溶液、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、および消毒用エタノールが高い感受性を示した (図 3-13(a)、(b))。一方 NR アッセイの方が高い感受性を示したのは、Chang conjunctiva 細胞に塩化ベンゼトニウム水溶液を添加した場合 (図 3-13(a))、HeLa 細胞に次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、または塩化ベンゼトニウム水溶液を添加した場合 (図 3-13(b)) であつた。

MTT アッセイと LDH アッセイを用いて細胞の感受性を比較すると、いずれの細胞種においても MTT アッセイの方が高い感受性を示す傾向にあつた (図 3-14)。特に、Chang conjunctiva 細胞では 3 種類の塩素系消毒薬、グルコン酸クロルヘキシジン水溶液、および消毒用エタノールで (図 3-14(a))、HeLa 細胞と Human Dermal Fibroblast 細胞では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、塩化ベンゼトニウム水溶液、および消毒用エタノールで高い感受性を示し (図 3-14(b)、(c))、FRSK 細胞においては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、および消毒用エタノールが高い感受性を示した (図 3-14(d))。

NR アッセイとレサズリンアッセイを用いて細胞の感受性を比較すると、いずれの細胞種においても NR アッセイの方が高い感受性を示す傾向にあつた (図 3-15)。特に、Chang conjunctiva 細胞

胞、HeLa 細胞、および FRSK 細胞に対して 3 種類の低水準消毒薬と消毒用エタノールを添加したときに高い感受性を示した(図 3-15(a)、(b)、(d))。亜塩素酸ナトリウム水溶液を Human Dermal Fibroblast 細胞または FRSK 細胞に添加した一部の結果においてレサズリンアッセイの方が高い感受性を示した(図 3-15(c)、(d))。

NR アッセイと LDH アッセイを用いて細胞の感受性を比較すると、いずれの細胞種においても LDH アッセイの方が高い感受性を示す傾向にあった(図 3-16)。特に、Chang conjunctiva 細胞では 3 種の塩素系消毒薬と塩化ベンザルコニウム水溶液および消毒用エタノールの一部の結果で(図 3-16(a))、HeLa 細胞では 3 種の塩素系消毒薬と消毒用エタノールの一部の結果で(図 3-16(b))、Human Dermal Fibroblast 細胞では亜塩素酸ナトリウム水溶液の一部の結果で(図 3-16(c))、FRSK 細胞では 3 種類の低水準消毒薬と消毒用エタノールの一部の結果で(図 3-16(d)) 高い感受性を示した。Chang conjunctiva 細胞に塩化ベンザルコニウム水溶液を添加した場合、HeLa 細胞に 3 種類の低水準消毒薬を添加した場合、FRSK 細胞に亜塩素酸ナトリウム水溶液を添加した場合に NR アッセイの方が高い感受性を示す結果もあった(図 3-16(a)、(b)、(d))。

レサズリンアッセイと LDH アッセイを用いて細胞の感受性を比較すると、Chang conjunctiva 細胞、Human Dermal Fibroblast 細胞、および FRSK 細胞では、いずれのアッセイ系でもほぼ同程度の感受性を示した(図 3-17(a)、(c)、(d))。一部、低水準消毒薬で LDH アッセイの方が高い感受性を示す結果もあった。一方 HeLa 細胞では、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を添加したときに LDH アッセイの方が高い感受性を示し、3 種の塩素系消毒薬、グルコン酸クロルヘキシジン水溶液、および消毒用エタノールを添加したときにレサズリンアッセイの方が高い感受性を示した(図 3-17(b))。

細胞種ごとの感受性をまとめると、Chang conjunctiva 細胞ではいずれの消毒薬でも MTT アッセイによる細胞毒性感度が最も高く有用性が強く示唆された(表 3-1)。次いで NR アッセイと LDH アッセイの細胞毒性感受性は同程度であった。

HeLa 細胞では、塩素系消毒薬と低水準消毒薬はレサズリンアッセイが最も感受性が高かったが、広く使用されている消毒用エタノールは MTT アッセイの細胞毒性感受性が最も高かった(表 3-2)。

Human Dermal Fibroblast 細胞では、いずれの消毒薬でも MTT アッセイの感受性が最も高く、消毒用エタノールでは NR アッセイが MTT アッセイと同程度であった(表 3-3)。

FRSK 細胞では、塩素系消毒薬と消毒用エタノールで MTT アッセイが最も高い感受性であり、低水準消毒薬では MTT アッセイと LDH アッセイが NR アッセイの感受性よりわずかに劣るものの有用性が示唆された(表 3-4)。

細胞種を限定しない場合の感受性は、表 3-5 に示すように、塩素系消毒薬では MTT アッセイ>>NR アッセイ>レサズリンアッセイ、LDH アッセイの順、低水準消毒薬では MTT アッセイ>>NR アッセイ、LDH アッセイ>レサズリンアッセイの順、消毒用エタノールは MTT アッセイ>>NR アッセイ>>LDH アッセイ>>レサズリンアッセイの順であり、やはり MTT アッセイが消毒薬の細胞毒性検討を行う際に第一に選択されうるアッセイ系であることが今回示唆された。

今回の検討により皮膚、網膜に関する動物培養細胞について消毒薬の毒性検討には、2 次元データによる解析の有用性と細胞種、消毒薬種類によりアッセイ系選択が重要であることが示された。消毒薬をはじめとする化学物質はこれらが最初に接触する皮膚、及び空気中に噴霧された場合には網膜に作用する可能性がある。さらには吸入により気管や肺胞にも消毒薬が作用する可能性もありさらに体内に取り込まれた消毒薬や化学物質は肝臓で代謝されて腎臓で排泄される。そのため、皮膚、網膜、肺、肝臓、腎臓それぞれの培養細胞において各消毒薬について各アッセイ系でさらなる細胞毒性検討が培細胞による消毒薬毒性評価に必要である。

今後、培養細胞を用いた方法とそれ以外の手法を用いたアプローチを複合し検討を重ねことで、3Rs の実現が行われるよう研究を重ねていく。

3.5. 引用文献

- 1) CytoSelect™ MTT 細胞増殖アッセイ. コスモバイオ株式会社.
https://www.cosmobio.co.jp/product/detail/cbl-20140522-1.asp?entry_id=12700 (アクセス日 : 2025.1.12)
- 2) ニュートラルレッド Neutral Red - 試薬 - FUJIFILM Wako. 富士フイルム和光純薬株式会社
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01W0114-0093.html#:~:text=> (アクセス日 : 2025.1.12)
- 3) 細胞増殖アッセイ alamarBlue. バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社 https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/japan/japanese/literature/C12170L_alamarBlue.pdf (アクセス日 : 2025.1.12)
- 4) Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST - 細胞毒性測定キット. Dojindo.
<https://www.dojindo.co.jp/products/CK12/> (アクセス日 : 2025.1.12)

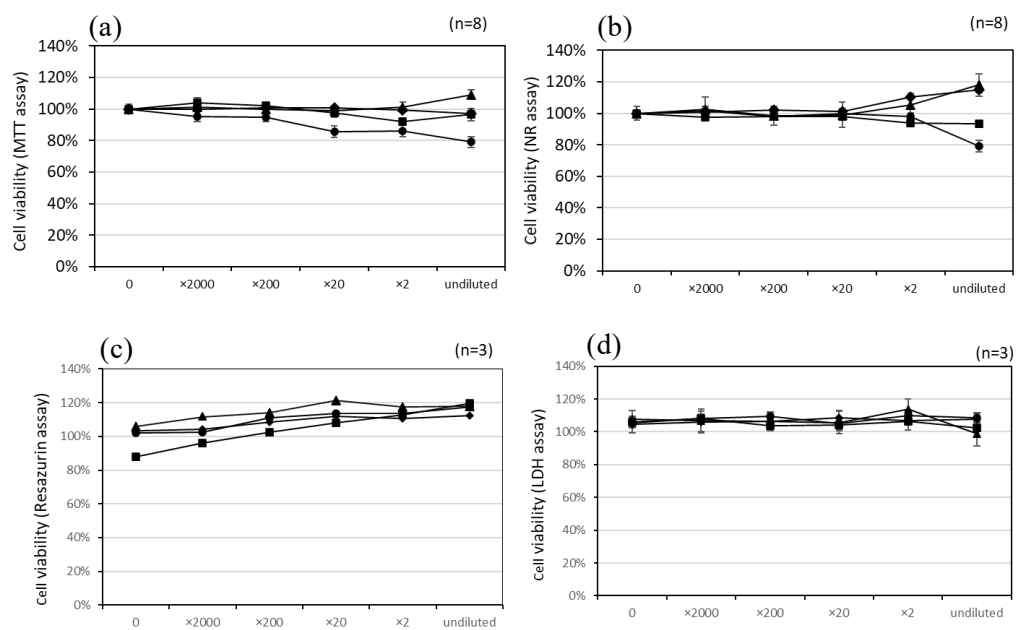


図 3-1 微弱酸性次亜塩素酸水溶液に対する細胞生存率

(a) MTT アッセイ、(b) NR アッセイ

(c) レサズリンアッセイ、(d) LDH アッセイ

ネガティブコントロールは MilliQ 水とした。

- : Chang conjunctiva 細胞
- : HeLa 細胞
- ◆: Human Dermal Fibroblast 細胞
- ▲: FRSK 細胞

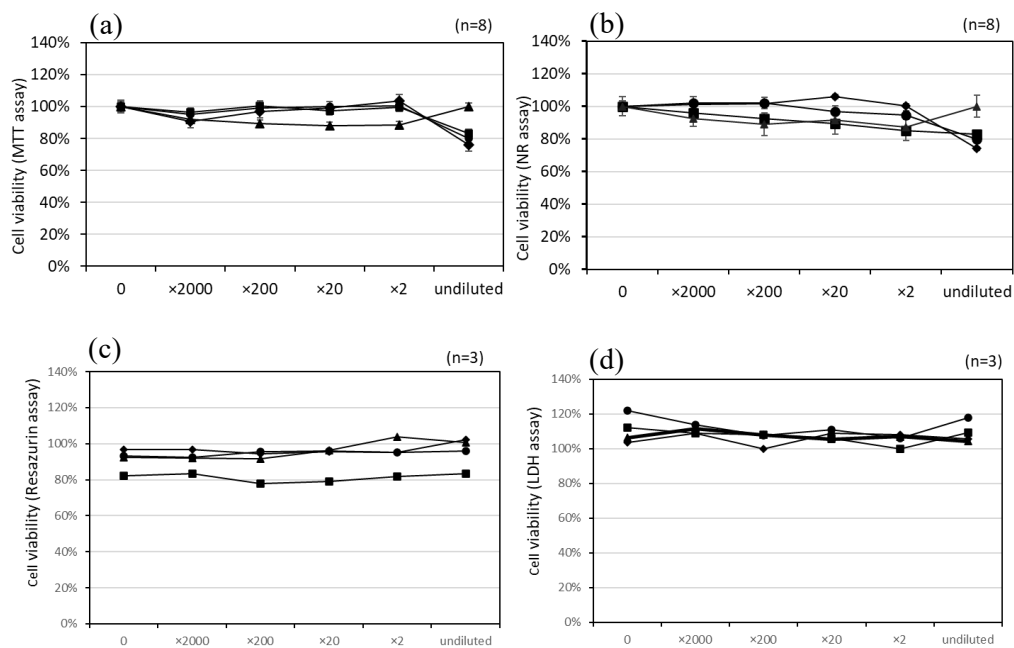


図 3-2 次亜塩素酸ナトリウム水溶液に対する細胞生存率

(a) MTT アッセイ、(b) NR アッセイ

(c) レサズリンアッセイ、(d) LDH アッセイ

ネガティブコントロールは MilliQ 水とした。

- : Chang conjunctiva 細胞
- : HeLa 細胞
- ◆: Human Dermal Fibroblast 細胞
- ▲: FRSK 細胞

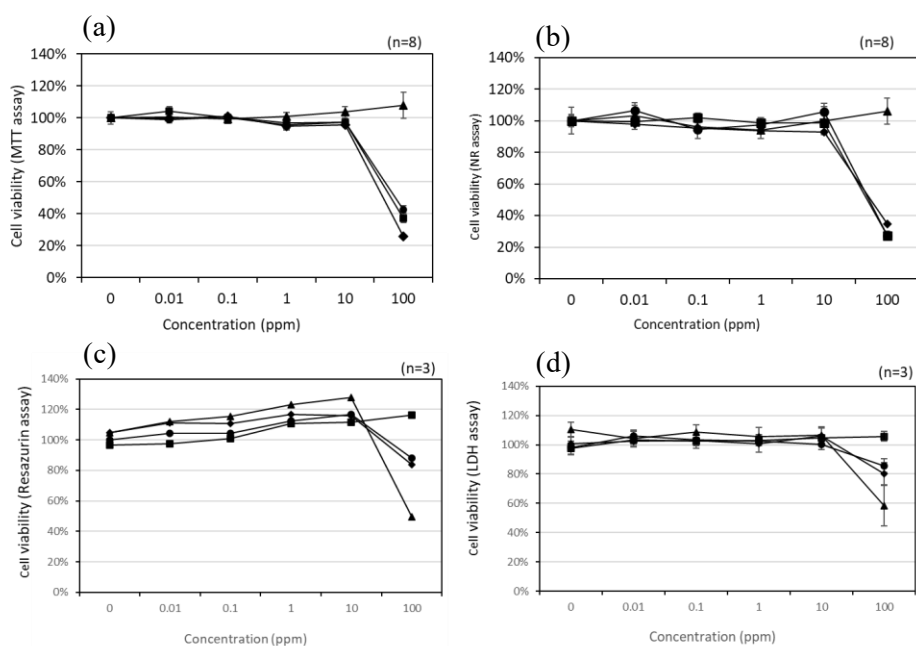


図 3-3 亜塩素酸ナトリウム水溶液に対する細胞生存率

(a) MTT アッセイ、(b) NR アッセイ

(c) レサズリンアッセイ、(d) LDH アッセイ

ネガティブコントロールは MilliQ 水とした。

●: Chang conjunctiva 細胞

■: HeLa 細胞

◆: Human Dermal Fibroblast 細胞

▲: FRSK 細胞

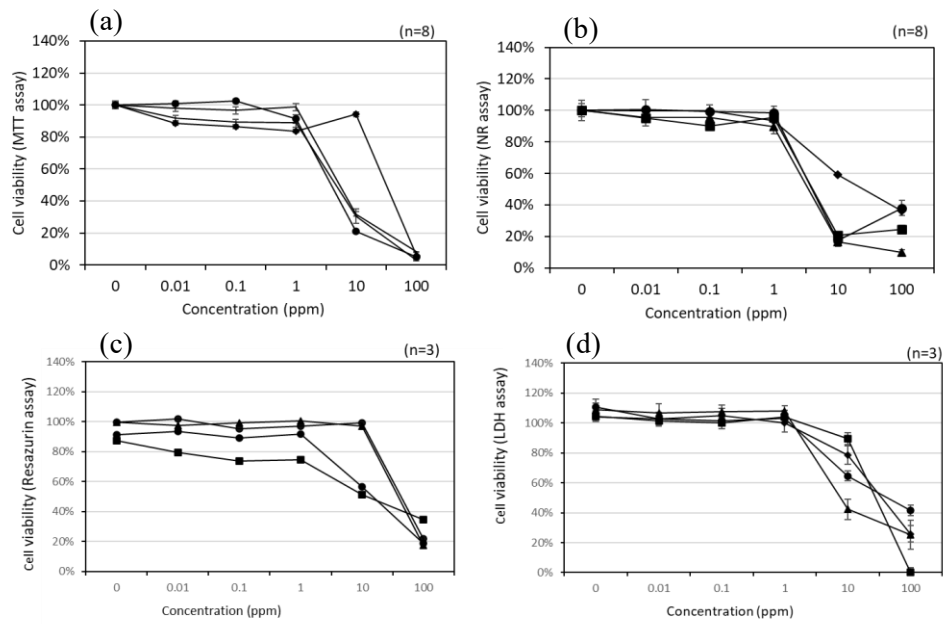


図 3-4 グルコン酸クロルヘキシジン水溶液に対する細胞生存率

(a) MTT アッセイ、(b) NR アッセイ

(c) レサズリンアッセイ、(d) LDH アッセイ

ネガティブコントロールは MilliQ 水とした。

- : Chang conjunctiva 細胞
- : HeLa 細胞
- ◆: Human Dermal Fibroblast 細胞
- ▲: FRSK 細胞

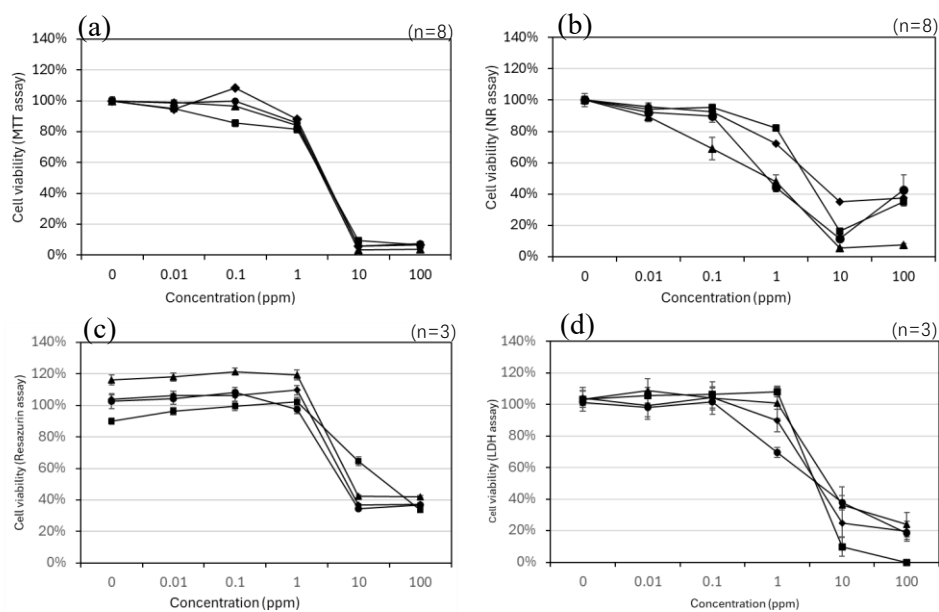


図 3-5 塩化ベンザルコニウム水溶液に対する細胞生存率

(a) MTT アッセイ、(b) NR アッセイ

(c) レサズリンアッセイ、(d) LDH アッセイ

ネガティブコントロールは MilliQ 水とした。

●: Chang conjunctiva 細胞

■: HeLa 細胞

◆: Human Dermal Fibroblast 細胞

▲: FRSK 細胞

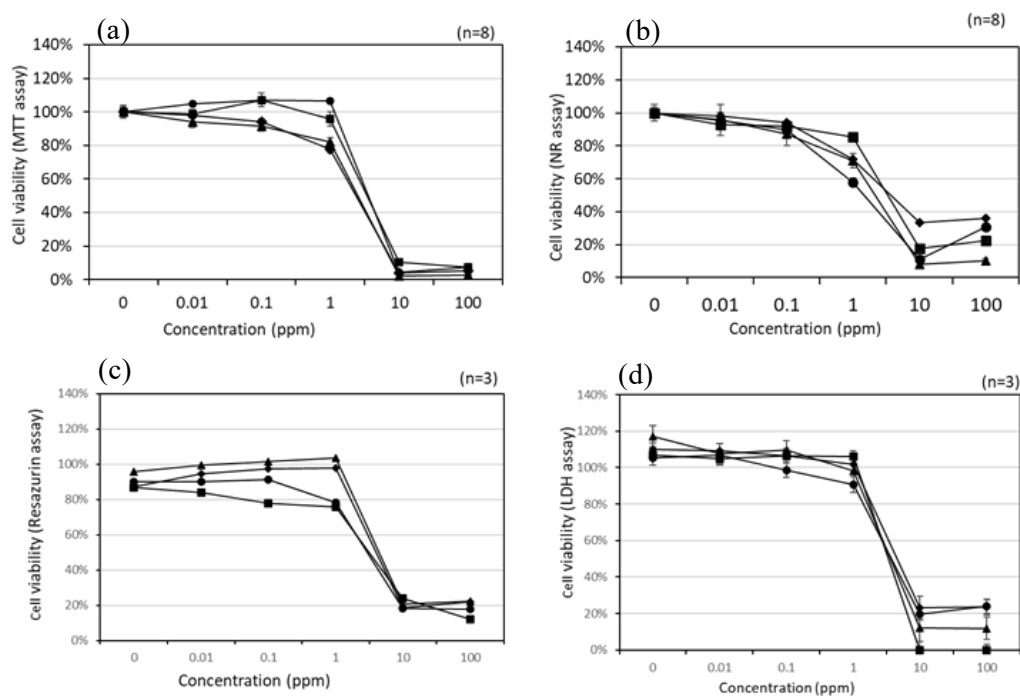


図 3-6 塩化ベンゼトニウム水溶液に対する細胞生存率

(a) MTT アッセイ、(b) NR アッセイ

(c) レサズリンアッセイ、(d) LDH アッセイ

ネガティブコントロールは MilliQ 水とした。

- : Chang conjunctiva 細胞
- : HeLa 細胞
- ◆: Human Dermal Fibroblast 細胞
- ▲: FRSK 細胞

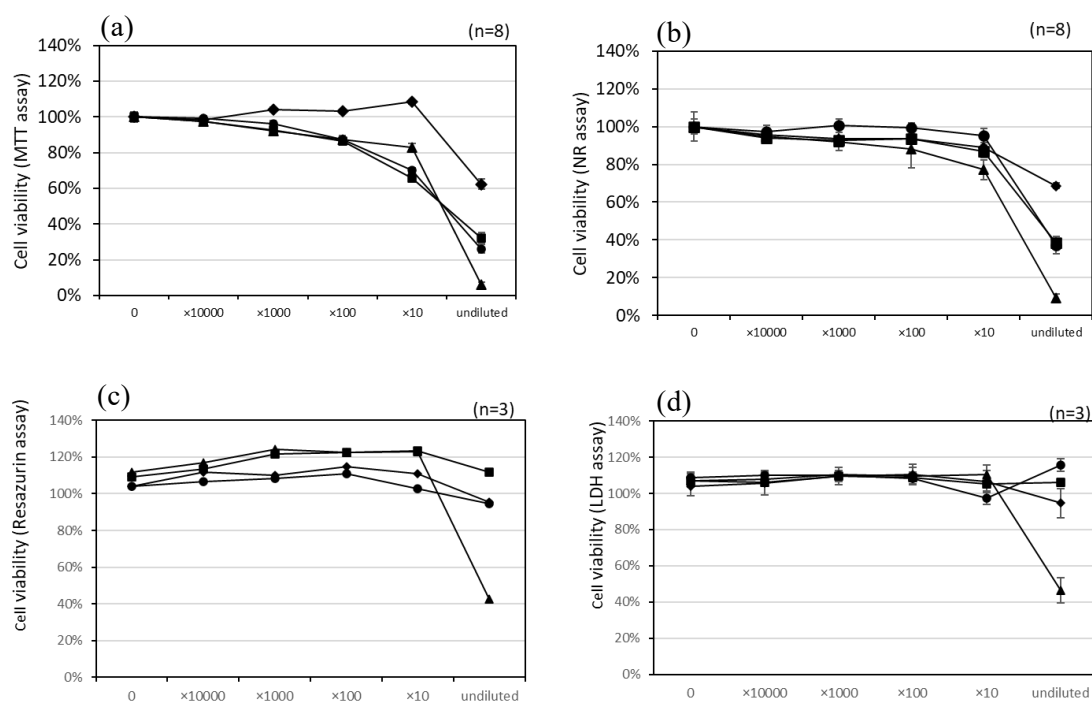


図 3-7 消毒用エタノールに対する細胞生存率

(a) MTT アッセイ、(b) NR アッセイ

(c) レサズリンアッセイ、(d) LDH アッセイ

ネガティブコントロールは MilliQ 水とした。

- : Chang conjunctiva 細胞
- : HeLa 細胞
- ◆: Human Dermal Fibroblast 細胞
- ▲: FRSK 細胞

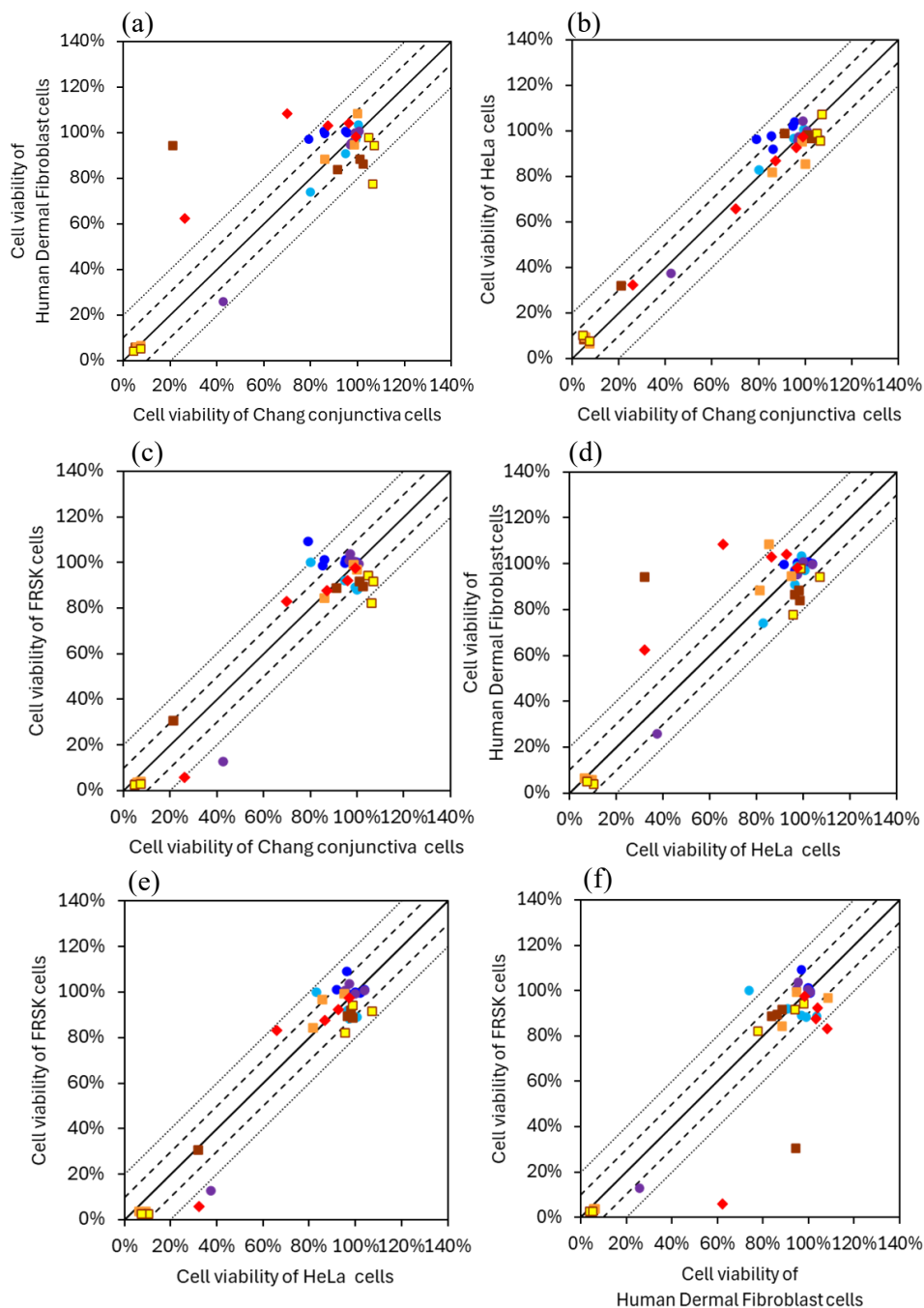


図 3-8 MTT アッセイにおける細胞間の感受性比較

- (a) Chang conjunctiva 細胞(●) と Human Dermal Fibroblast 細胞(◆)の比較
 (b) Chang conjunctiva 細胞(●) と HeLa 細胞(■) の比較
 (c) Chang conjunctiva 細胞(●) と FRSK 細胞(▲) の比較
 (d) HeLa 細胞(■) と Human Dermal Fibroblast 細胞(◆) の比較
 (e) HeLa 細胞(■) と FRSK 細胞(▲)の比較
 (f) Human Dermal Fibroblast 細胞(◆) と FRSK 細胞(▲) の比較
- 青: 微弱酸性次亜塩素酸水溶液、水色: 次亜塩素酸ナトリウム水溶液
 紫: 亜塩素酸ナトリウム水溶液、茶: グルコン酸クロルヘキシジン水溶液
 橙: 塩化ベンザルコニウム水溶液、黄: 塩化ベンゼトニウム水溶液
 赤: 消毒用エタノール

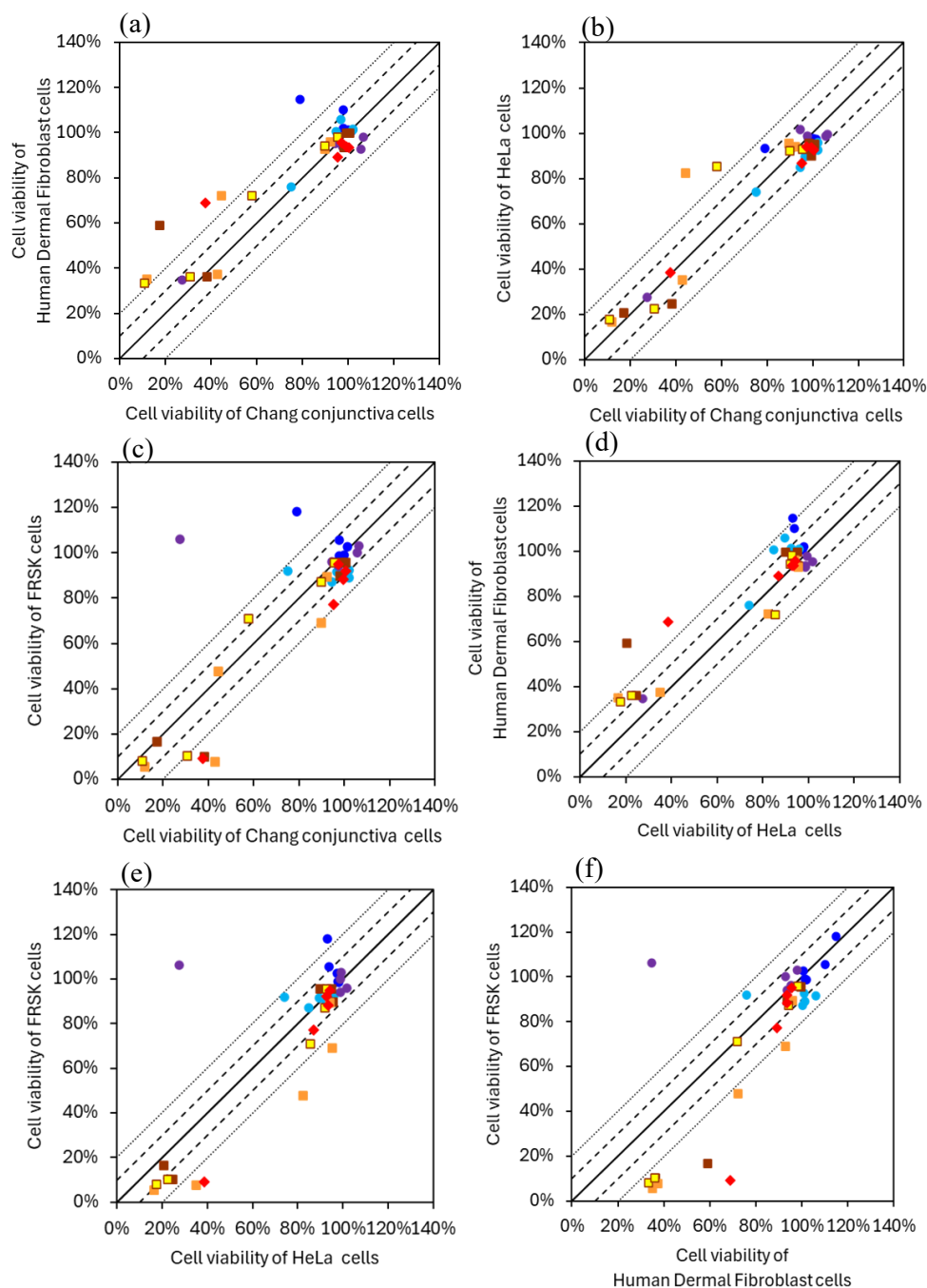


図 3-9 NR アッセイにおける細胞間の感受性比較

(a) Chang conjunctiva 細胞(●) と Human Dermal Fibroblast 細胞(◆)の比較

(b) Chang conjunctiva 細胞(●) と HeLa 細胞(■) の比較

(c) Chang conjunctiva 細胞(●) と FRSK 細胞(▲) の比較

(d) HeLa 細胞(■) と Human Dermal Fibroblast 細胞(◆) の比較

(e) HeLa 細胞(■) と FRSK 細胞(▲)の比較

(f) Human Dermal Fibroblast 細胞(◆) と FRSK 細胞(▲) の比較

青:微弱酸性次亜塩素酸水溶液、水色:次亜塩素酸ナトリウム水溶液

紫:亜塩素酸ナトリウム水溶液、茶:グルコン酸クロルヘキシジン水溶液

橙:塩化ベンザルコニウム水溶液、黄:塩化ベンゼトニウム水溶液

赤:消毒用エタノール

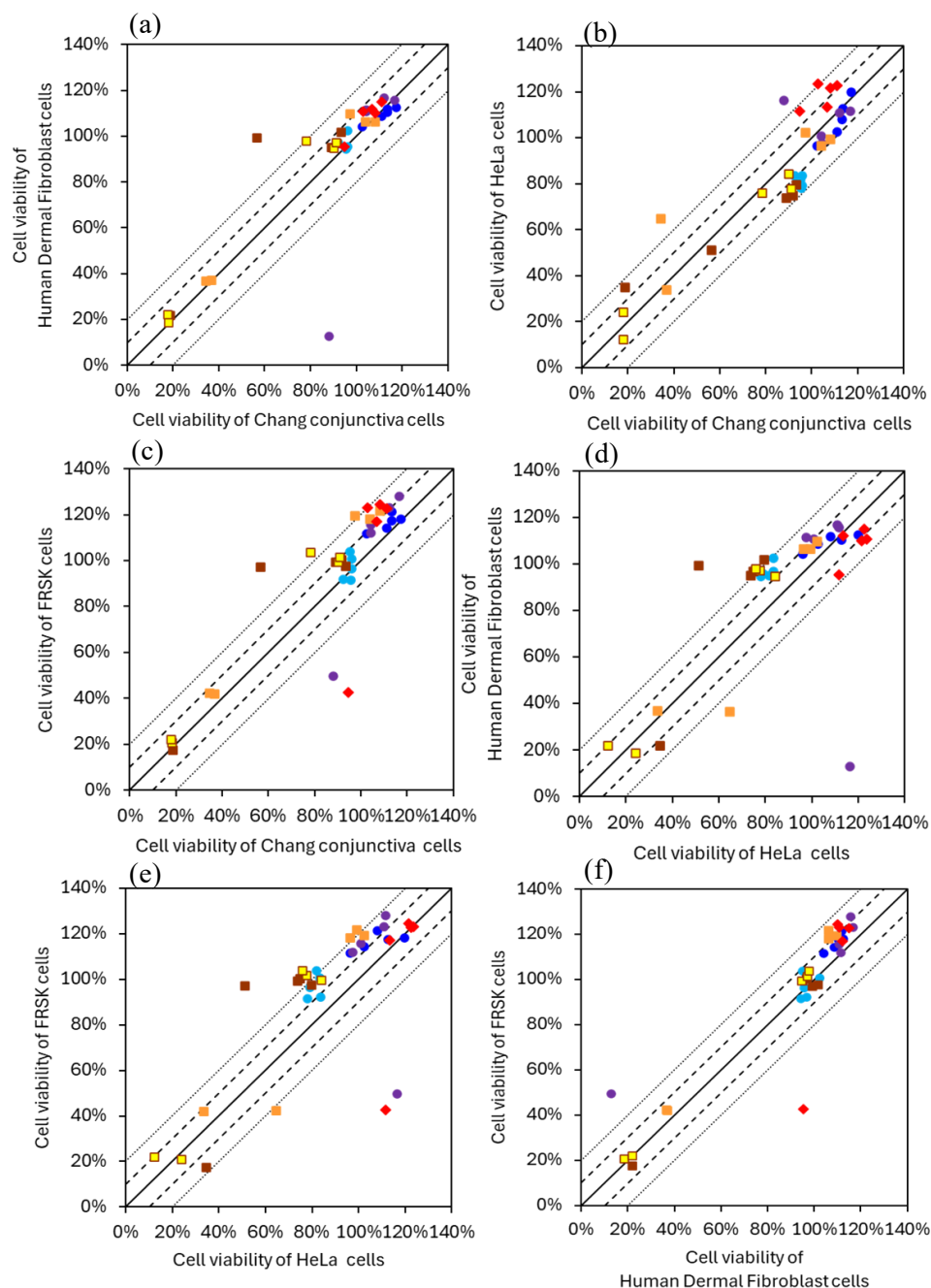


図 3-10 レサズリンアッセイにおける細胞間の感受性比較

(a) Chang conjunctiva 細胞(●) と Human Dermal Fibroblast 細胞(◆)の比較

(b) Chang conjunctiva 細胞(●) と HeLa 細胞(■) の比較

(c) Chang conjunctiva 細胞(●) と FRSK 細胞(▲) の比較

(d) HeLa 細胞(■) と Human Dermal Fibroblast 細胞(◆) の比較

(e) HeLa 細胞(■) と FRSK 細胞(▲)の比較

(f) Human Dermal Fibroblast 細胞(◆) と FRSK 細胞(▲) の比較

青:微弱酸性次亜塩素酸水溶液、水色:次亜塩素酸ナトリウム水溶液

紫:亜塩素酸ナトリウム水溶液、茶:グルコン酸クロルヘキシジン水溶液

橙:塩化ベンザルコニウム水溶液、黄:塩化ベンゼトニウム水溶液

赤:消毒用エタノール

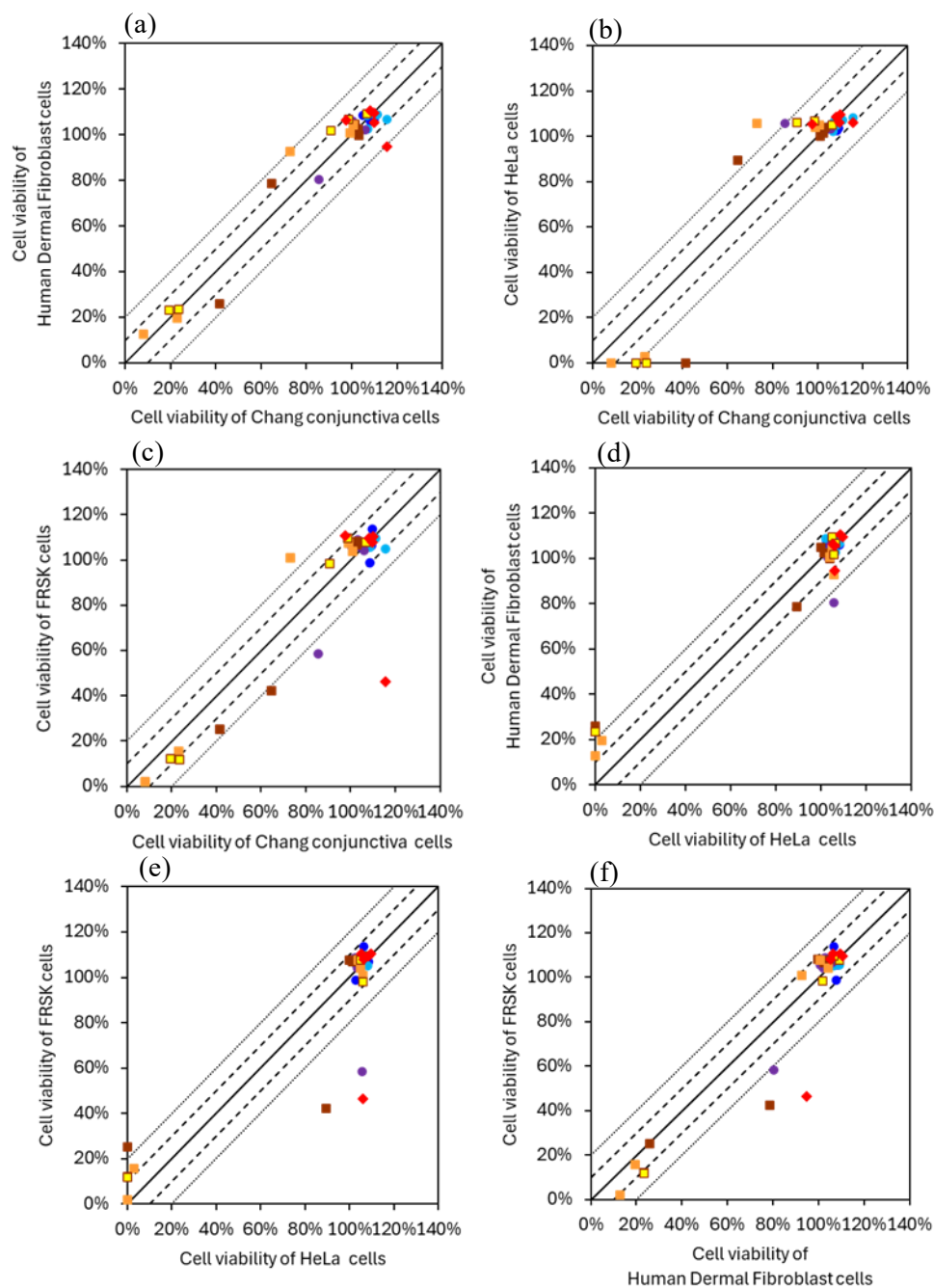


図 3-11 LDH アッセイにおける細胞間の感受性比較

- (a) Chang conjunctiva 細胞(●) と Human Dermal Fibroblast 細胞(◆)の比較
- (b) Chang conjunctiva 細胞(●) と HeLa 細胞(■) の比較
- (c) Chang conjunctiva 細胞(●) と FRSK 細胞(▲) の比較
- (d) HeLa 細胞(■) と Human Dermal Fibroblast 細胞(◆) の比較
- (e) HeLa 細胞(■) と FRSK 細胞(▲)の比較
- (f) Human Dermal Fibroblast 細胞(◆) と FRSK 細胞(▲) の比較

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

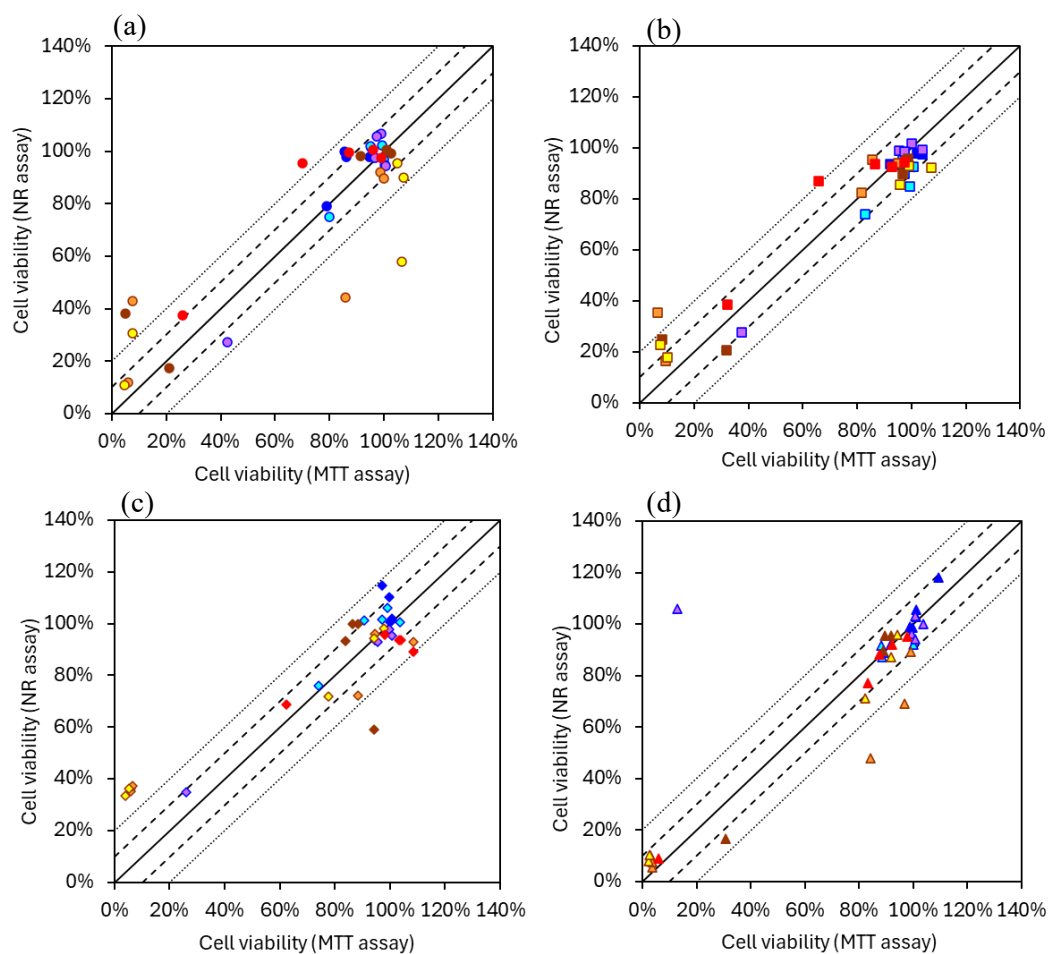


図 3-12 同一細胞種における MTT アッセイと NR アッセイの感受性比較

(a) Chang conjunctiva 細胞

(b) HeLa 細胞

(c) Human Dermal Fibroblast 細胞

(d) FRSK 細胞

青:微弱酸性次亜塩素酸水溶液、水色:次亜塩素酸ナトリウム水溶液

紫:亜塩素酸ナトリウム水溶液、茶:グルコン酸クロルヘキシジン水溶液

橙:塩化ベンザルコニウム水溶液、黄:塩化ベンゼトニウム水溶液

赤:消毒用エタノール

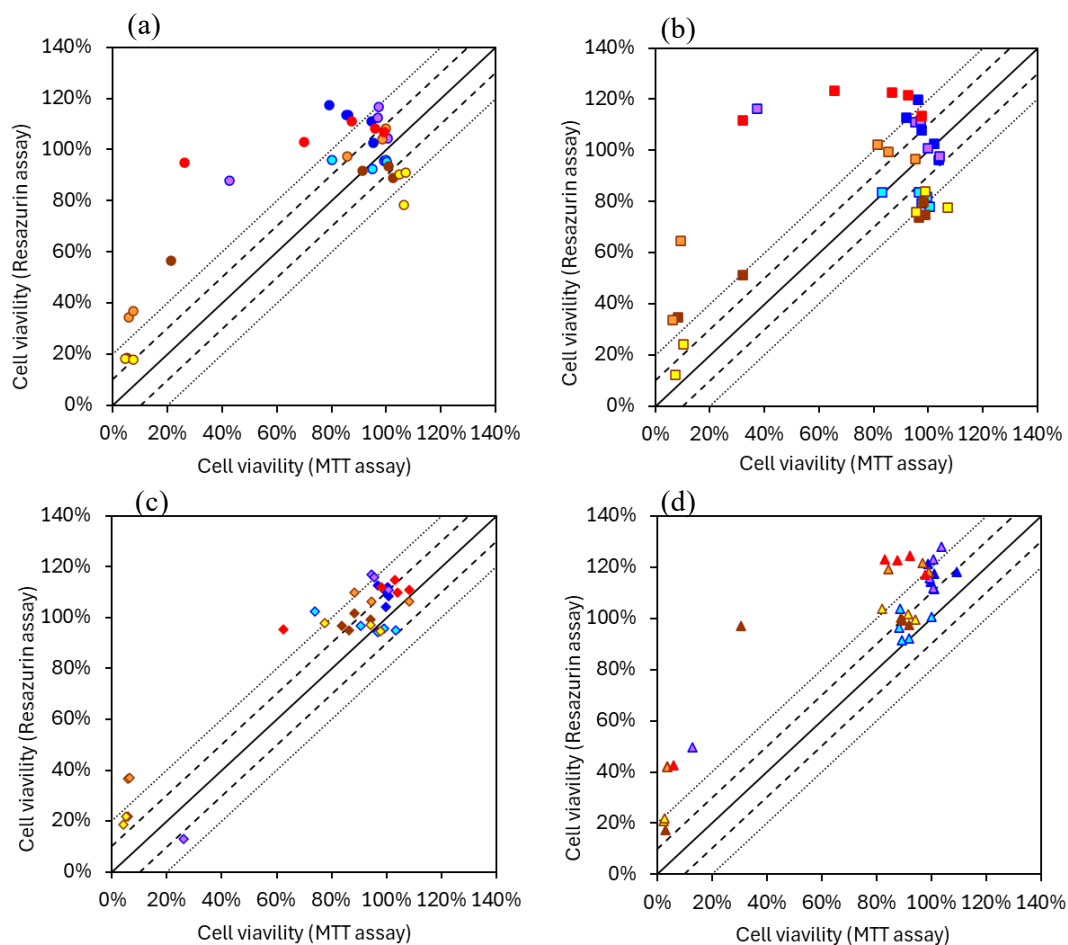


図 3-13 同一細胞種における MTT アッセイとレサズリンアッセイの感受性比較

(a) Chang conjunctiva 細胞

(b) HeLa 細胞

(c) Human Dermal Fibroblast 細胞

(d) FRSK 細胞

青: 微弱酸性次亜塩素酸水溶液、水色: 次亜塩素酸ナトリウム水溶液

紫: 亜塩素酸ナトリウム水溶液、茶: グルコン酸クロルヘキシジン水溶液

橙: 塩化ベンザルコニウム水溶液、黄: 塩化ベンゼトニウム水溶液

赤: 消毒用エタノール

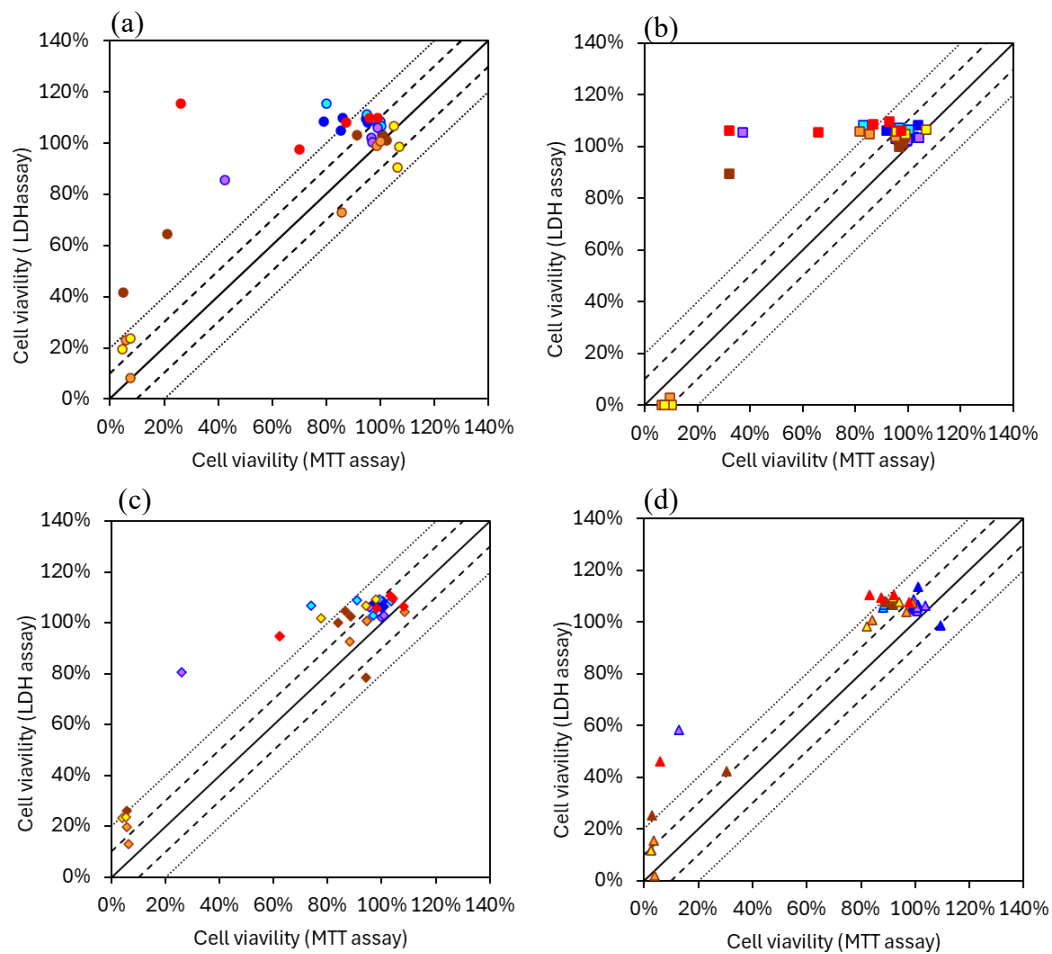


図 3-14 同一細胞種における MTT アッセイと LDH アッセイの感受性比較

(a) Chang conjunctiva 細胞

(b) HeLa 細胞

(c) Human Dermal Fibroblast 細胞

(d) FRSK 細胞

青:微弱酸性次亜塩素酸水溶液、水色:次亜塩素酸ナトリウム水溶液

紫:亜塩素酸ナトリウム水溶液、茶:グルコン酸クロルヘキシジン水溶液

橙:塩化ベンザルコニウム水溶液、黄:塩化ベンゼトニウム水溶液

赤:消毒用エタノール

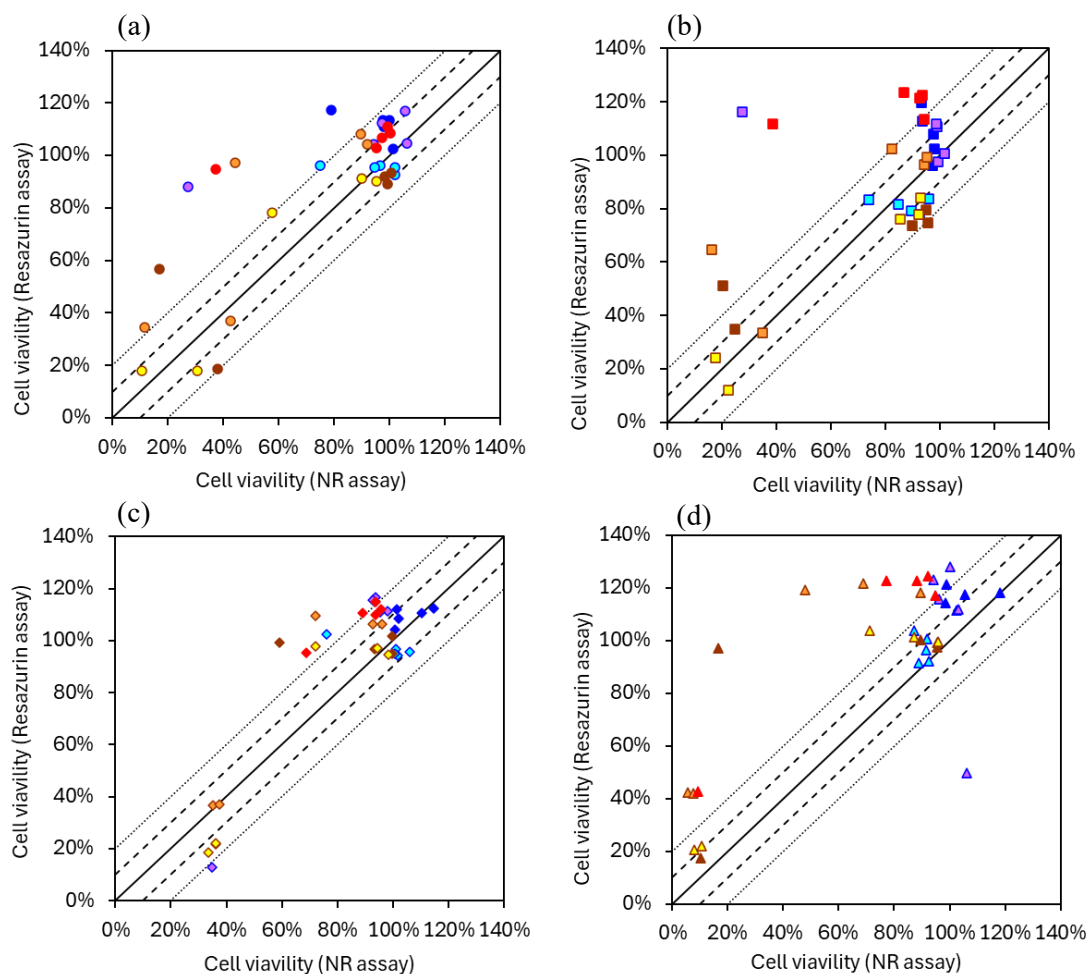


図 3-15 同一細胞種における NR アッセイとレサズリンアッセイのアッセイの感受性比較

(a) Chang conjunctiva 細胞

(b) HeLa 細胞

(c) Human Dermal Fibroblast 細胞

(d) FRSK 細胞

青:微弱酸性次亜塩素酸水溶液、水色:次亜塩素酸ナトリウム水溶液

紫:亜塩素酸ナトリウム水溶液、茶:グルコン酸クロルヘキシジン水溶液

橙:塩化ベンザルコニウム水溶液、黄:塩化ベンゼトニウム水溶液

赤:消毒用エタノール

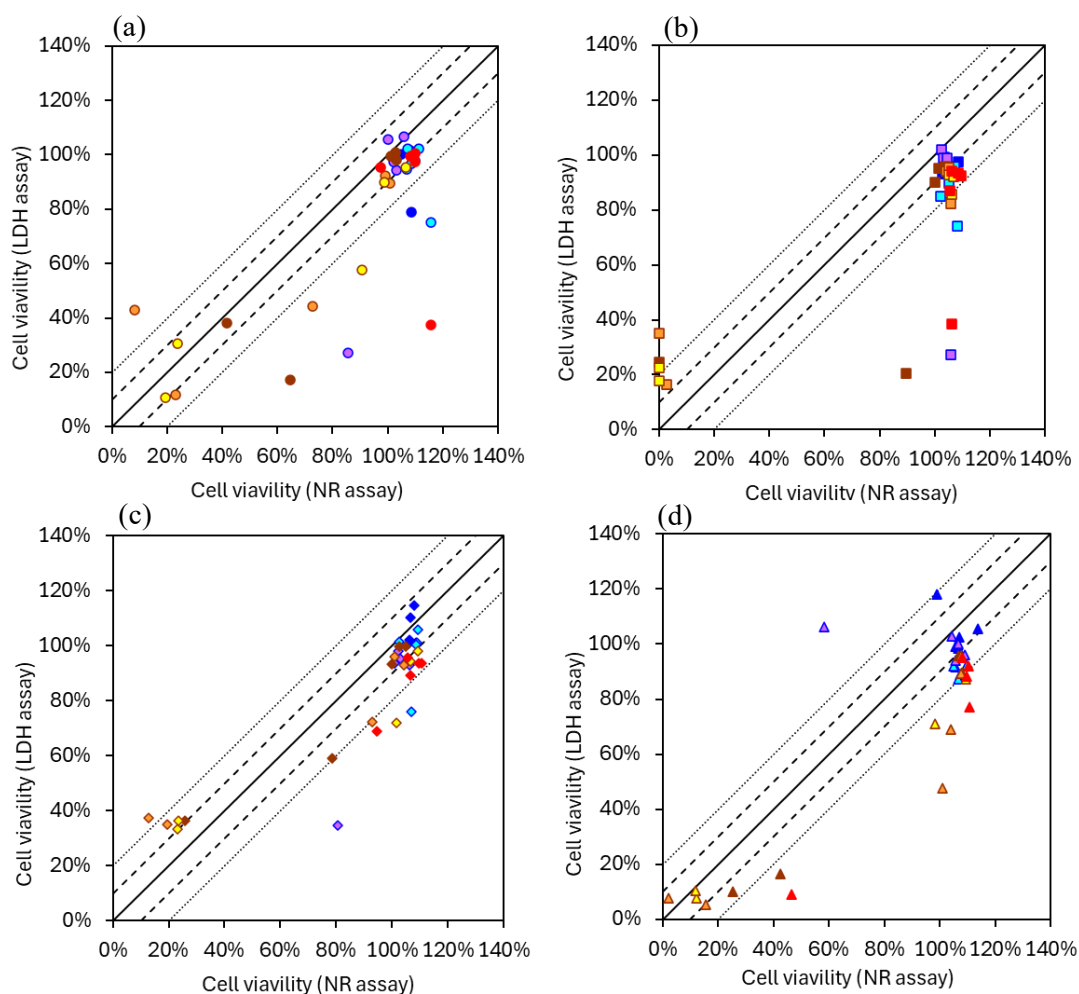


図 3-16 同一細胞種における NR アッセイと LDH アッセイの感受性比較

- (a) Chang conjunctiva 細胞
- (b) HeLa 細胞
- (c) Human Dermal Fibroblast 細胞
- (d) FRSK 細胞

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

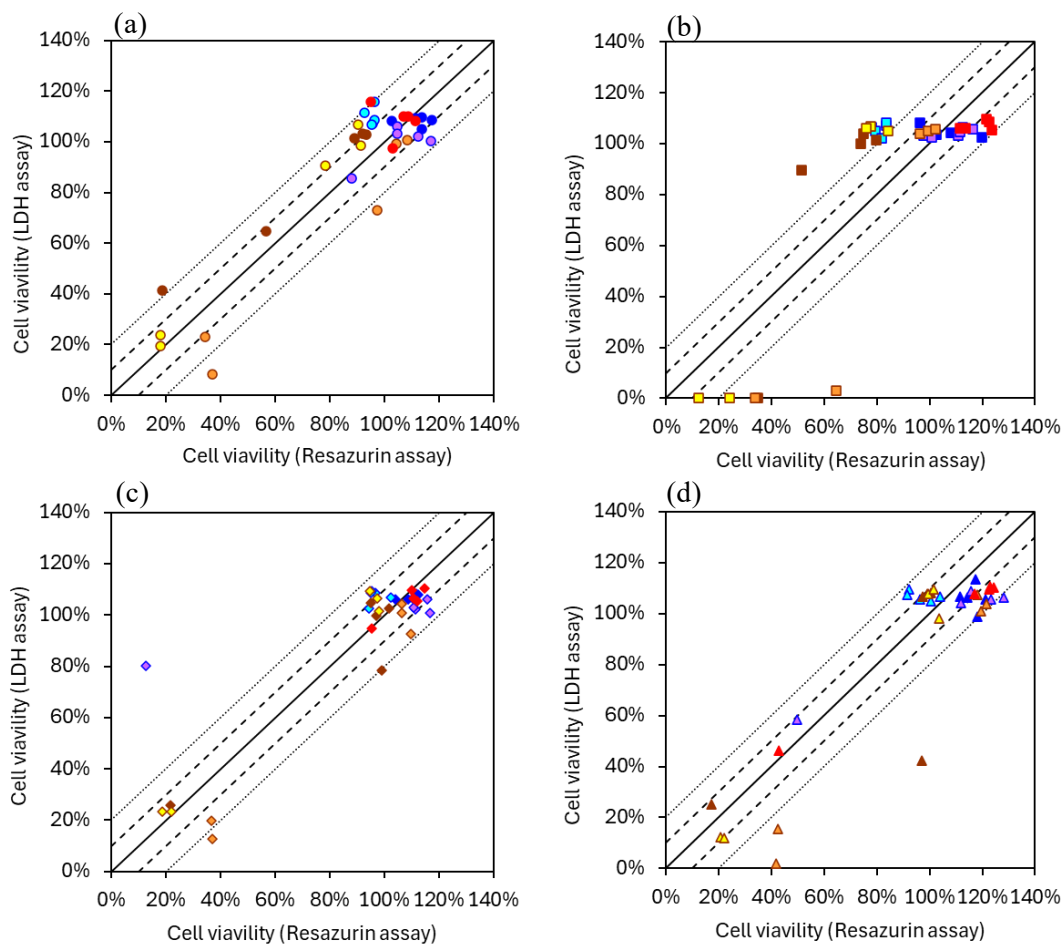


図 3-17 同一細胞種におけるレサズリンアッセイと LDH アッセイの感受性比較

- (a) Chang conjunctiva 細胞
 (b) HeLa 細胞
 (c) Human Dermal Fibroblast 細胞
 (d) FRSK 細胞

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

表 3-1 (a) Chang conjunctiva 細胞において感受性の高いアッセイ系

Chang conjunctiva細胞		MTT	NR	MTT	Resazurin	MTT	LDH	NR	Resazurin	NR	LDH	Resazurin	LDH
微弱酸性次亜塩素酸水溶液	×2000												
	×200												
	×20			●									
	×2					●							
	undiluted			●		●		●			●		
次亜塩素酸ナトリウム水溶液	×2000												
	×200												
	×20												
	×2												
	undiluted					●		●			●		
亜塩素酸ナトリウム水溶液	0.01												
	0.1												
	1												
	10												
	100			●		●		●			●		
グルコン酸クロルヘキシジン水溶液	0.01												
	0.1												
	1												
	10			●		●		●			●		
	100	●				●						●	
塩化ベンザルコニウム水溶液	0.01												
	0.1												
	1		●					●			●		●
	10			●				●					
	100	●		●						●			●
塩化ベンゼトニウム水溶液	0.01												
	0.1												
	1		●		●			●			●		
	10												
	100	●											
消毒用エタノール	×10000												
	×1000												
	×100			●		●							
	×10	●		●		●							
	undiluted			●		●		●			●		

MTT アッセイと NR アッセイ間、MTT アッセイとレサズリンアッセイ間、MTT アッセイと LDH アッセイ間、NR アッセイとレサズリンアッセイ間、NR アッセイと LDH アッセイ間、レサズリンアッセイと LDH アッセイ間で比較したときに感受性の高い方に印を付した。

表 3-1 (b) アッセイ系ごとに感受性の高かった結果の総数

消毒薬分類	MTT	NR	Resazurin	LDH
塩素系消毒薬	7	3	0	3
低水準消毒薬	8	7	2	5
消毒用エタノール	7	1	0	1
合計	22	11	2	9

表 3-1(a) において各アッセイ系で付された印の総数

表 3-2 (a) HeLa 細胞において感受性の高いアッセイ系

HeLa細胞		MTT	NR	MTT	Resazurin	MTT	LDH	NR	Resazurin	NR	LDH	Resazurin	LDH
微弱酸性次亜塩素酸水溶液	×2000												
	×200												
	×20												
	×2			■									
	undiluted			■				■					
次亜塩素酸ナトリウム水溶液	×2000											■	
	×200				■							■	
	×20											■	
	×2											■	
	undiluted					■					■	■	
亜塩素酸ナトリウム水溶液	0.01												
	0.1												
	1												
	10												
	100			■		■		■			■		
グルコン酸クロロヘキシジン水溶液	0.01											■	
	0.1				■							■	
	1				■				■			■	
	10					■		■			■	■	
	100			■						■			■
塩化ベンザルコニウム水溶液	0.01												
	0.1												
	1			■		■							
	10			■				■					■
	100	■		■						■			■
塩化ベンゼトニウム水溶液	0.01											■	
	0.1				■							■	
	1				■						■	■	
	10												
	100									■			■
消毒用エタノール	×10000												
	×1000			■				■					
	×100			■		■		■					
	×10	■		■		■		■					
	undiluted			■		■		■			■		

MTT アッセイと NR アッセイ間、MTT アッセイとレサズリンアッセイ間、MTT アッセイと LDH アッセイ間、NR アッセイとレサズリンアッセイ間、NR アッセイと LDH アッセイ間、レサズリンアッセイと LDH アッセイ間で比較したときに感受性の高い方に印を付した。

表 3-2 (b) アッセイ系ごとに感受性の高かった結果の総数

消毒薬分類	MTT	NR	Resazurin	LDH
塩素系消毒薬	5	2	6	2
低水準消毒薬	7	5	12	7
消毒用エタノール	8	4	0	1
合計	20	11	18	10

表 3-2(a) において各アッセイ系で付された印の総数

表 3-3(a) Human Dermal Fibroblast 細胞において感受性の高いアッセイ系

Human Dermal Fibroblast細胞		MTT	NR	MTT	Resazurin	MTT	LDH	NR	Resazurin	NR	LDH	Resazurin	LDH
微弱酸性次亜塩素酸水溶液	×2000												
	×200												
	×20												
	×2												
	undiluted												
次亜塩素酸ナトリウム水溶液	×2000												
	×200												
	×20												
	×2												
	undiluted			◆		◆		◆			◆		
亜塩素酸ナトリウム水溶液	0.01												
	0.1												
	1			◆				◆					
	10			◆				◆					
	100					◆			◆		◆		
グルコン酸クロルヘキシジン水溶液	0.01												
	0.1												
	1												
	10		◆					◆					◆
	100	◆				◆							
塩化ベンザルコニウム水溶液	0.01												
	0.1												
	1			◆				◆			◆		
	10	◆		◆									
	100	◆		◆						◆			◆
塩化ベンゼトニウム水溶液	0.01												
	0.1												
	1			◆		◆		◆			◆		
	10	◆											
	100	◆											
消毒用エタノール	×10000												
	×1000												
	×100							◆					
	×10	◆						◆					
	undiluted			◆		◆		◆			◆		

MTT アッセイと NR アッセイ間、MTT アッセイとレサズリンアッセイ間、MTT アッセイと LDH アッセイ間、NR アッセイとレサズリンアッセイ間、NR アッセイと LDH アッセイ間、レサズリンアッセイと LDH アッセイ間で比較したときに感受性の高い方に印を付した。

表 3-3 (b) アッセイ系ごとに感受性の高かった結果の総数

消毒薬分類	MTT	NR	Resazurin	LDH
塩素系消毒薬	5	3	2	2
低水準消毒薬	11	5	0	4
消毒用エタノール	3	3	0	1
合計	19	11	2	7

表 3-3(a) において各アッセイ系で付された印の総数

表 3-4 (a) FRSK 細胞において感受性の高いアッセイ系

FRSK細胞		MTT	NR	MTT	Resazurin	MTT	LDH	NR	Resazurin	NR	LDH	Resazurin	LDH
微弱酸性次亜塩素酸水溶液	×2000												
	×200												
	×20			▲				▲					
	×2												
	undiluted												
次亜塩素酸ナトリウム水溶液	×2000												
	×200												
	×20												
	×2												
	undiluted												
亜塩素酸ナトリウム水溶液	0.01												
	0.1												
	1			▲				▲					
	10			▲				▲					▲
	100	▲		▲		▲		▲	▲	▲			
グルコン酸クロロヘキシジン水溶液	0.01												
	0.1												
	1												
	10			▲				▲			▲		▲
	100					▲							
塩化ベンザルコニウム水溶液	0.01							▲					
	0.1		▲	▲				▲			▲		
	1		▲	▲				▲			▲		
	10			▲				▲					▲
	100			▲				▲					▲
塩化ベンゼトニウム水溶液	0.01												
	0.1										▲		
	1			▲				▲			▲		
	10												
	100												
消毒用エタノール	×10000							▲					
	×1000			▲				▲					
	×100			▲		▲		▲			▲		
	×10			▲		▲		▲			▲		
	undiluted			▲		▲		▲			▲		

MTT アッセイと NR アッセイ間、MTT アッセイとレサズリンアッセイ間、MTT アッセイと LDH アッセイ間、NR アッセイとレサズリンアッセイ間、NR アッセイと LDH アッセイ間、レサズリンアッセイと LDH アッセイ間で比較したときに感受性の高い方に印を付した。

表 3-4 (b) アッセイ系ごとに感受性の高かった結果の総数

消毒薬分類	MTT	NR	Resazurin	LDH
塩素系消毒薬	6	4	1	1
低水準消毒薬	7	9	0	8
消毒用エタノール	7	5	0	3
合計	20	18	1	12

表 3-4(a) において各アッセイ系で付された印の総数

表 3-5 各消毒薬分類において感受性の高かった結果の数

消毒薬分類	MTT	NR	Resazurin	LDH
塩素系消毒薬	23	12	9	8
低水準消毒薬	33	26	14	24
消毒用エタノール	25	13	0	6
合計	81	51	23	38

表 3-1(b)～表 3-4(b)の総数の合計

第4章

結 語

本研究では、消毒薬の評価における動物実験代替法について邦文の文献レビューと動物実験代替法を指向した生体消毒薬における毒性評価に関する検討を行った。

邦文の文献レビューから消毒薬を評価する代替法の報告はほとんどなかった。

動物実験代替法について邦文の文献レビューは邦文のみを対象とした文献レビューの為、研究の流れを総括することはできなかったと思われる。今後、グローバル誌を対象とした文献レビューを行うことで、日本での動物実験代替法の研究の流れを総括することが必要である。

動物実験代替法を指向した生体消毒薬における毒性評価に関する検討においては、MTT アッセイが有効である場合が多く、塩素系消毒薬は Chang conjunctiva 細胞と MTT アッセイ系の組合せが、低水準消毒薬は HeLa 細胞とレサズリンアッセイの組合せが、消毒用エタノールは HeLa 細胞と MTT アッセイの組合せが有効であった。特に、皮膚障害は、消毒薬の種類によらず FRSK 細胞を用い、MTT アッセイか NR アッセイによる評価を中心に検討することが有効である可能性が示された。培養細胞を用いた毒性評価方法の検討については、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、生体消毒薬における毒性評価する際には、評価対象及び生体消毒薬に応じたアッセイ系を選択する必要があることが示唆された。今後、培養細胞を用いた方法とそれ以外の手法を用いたアプローチを複合することで、解決されることを期待する。また今回見出した生体消毒薬の毒性評価方法を今度の動物実験代替法に活用してもらえることを願う。

謝辞

本論文は著者が東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 博士課程在学中の研究成果をまとめたものです。

研究活動全般にわたり、東京医療保健大学医療保健学研究科の松村有里子准教授に終始熱心にご指導いただきました。心より感謝申し上げます。

実験全般にわたって懇切丁寧にご指導いただいた同医療保健学研究科の岩澤篤郎教授、博士論文執筆にあたり、知識や見解を基にご指導いただいた同医療保健学研究科の感染制御学教育研究センター長 森屋恭爾先生に心より感謝申し上げます。

東京医療保健大学 木村哲名誉学長には修士課程において主指導教員としてご指導いただき、博士課程では心温まる励ましとご教示をいただき、心より感謝の意を表します。

その他、感染制御学領域の吉田理香教授、菅原えりさ教授にも心温まる励ましをいただきました。心より感謝申し上げます。

また社会人大学院生として共に頑張ってきた鷗野美奈子さんはじめ、先輩、後輩方にはいつも励ましていただきました。心より感謝申し上げます。

株式会社フリーキョ製薬の池本慶且社長には、業務が忙しい中、大学院で学ぶ機会をいただくとともに、研究を行う時間を捻出していただいたことに厚く御礼申し上げます。

最後にサポートしてくれた家族に心より感謝申し上げます。

Abstract

Study on toxicity evaluation of biological disinfectants toward alternative methods to animal testing

Mamiko Ikemoto

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

Background

To ensure safety in humans, toxic studies are conducted using laboratory animals. In recent years, the “3R principle,” the standard philosophy for laboratory animals, has been thoroughly promoted, and alternative test methods have been used for evaluation. However, there are currently no alternative test methods in practical use for disinfectant toxicity.

Objective

Identification of the transition of research on alternative methods of torso experimentation in Japan and finding an index of in vitro test systems for disinfection by toxicity.

Methods

The Japanese literature review covered the years 1800-2023, with the key words “alternative methods of animal testing” and “disinfection” “disinfectants (shoudokuyaku)” and “disinfectants (shoudokouzai)”. Disinfectant toxicity was evaluated in four assay systems for cell viability to three chlorinated disinfectants, three low-level disinfectants, and disinfectant ethanol using four different cultured cell types.

Results

The only Japanese report on the evaluation of disinfectants using alternative methods to animal testing was an in vitro skin irritation study of rubbing alcohol hand sanitizers.

The sensitivity to cells was highest in the MTT assay for both disinfectants in Chang conjunctiva cells. The neutral red (NR) assay was next, followed by the LDH assay, which was comparable. In HeLa cells, chlorine and low-level disinfectants were most sensitive to the Resazurin assay, while disinfectant ethanol was most sensitive to the MTT assay. In Human Dermal Fibroblast cells, the MTT assay was highest for both disinfectants, and the MTT and NR assays were comparable for disinfectant ethanol. FRSK cells were most sensitive to the MTT assay for chlorinated disinfectants and disinfectant ethanol, while the NR assay was slightly more sensitive than the LDH assay and MTT assay for low-level disinfectants. Sensitivities when not restricted to cell types are MTT assay >> NR assay >> Resazurin assay and LDH assay for chlorine disinfectants, MTT assay >> NR assay, LDH assay >> Resazurin assay for low-level disinfectants, and MTT assay >> NR assay>LDH assay>Resazurin assay for ethanol for disinfection, in that order.

Conclusions

Few alternative methods of evaluating disinfectants were reported from the Japanese literature review. In the cell types examined, the MTT assay was often effective in assessing disinfectant toxicity. Chlorinated disinfectants were effective in combination with Chang conjunctiva cells and the MTT assay system, low-level disinfectants were effective in combination with HeLa cells and the Resazurin assay system, and disinfectant ethanol was effective in combination with HeLa cells and the MTT assay. In particular, for skin damage, when FRSK cells derived from rat epidermis were used, the MTT or NR assay was useful for all disinfectants examined in this study, indicating that these two assays may be useful in many future skin damage studies.