

試験番号：NDR-0008139
株式会社ニコダームリサーチ発行



NDR
NIKODERM RESEARCH

試験報告書

2020年12月18日

【 表 題 】 In vitro 安全性評価

【 試 験 名 】 代替法による眼刺激性試験

【 試 験 委 託 者 】 株式会社ENJIN

大阪府中央区南久宝寺町3-2-7 南久宝寺町ビル203

Tel: 06-6654-5453 / Fax: 06-6654-5863

【 試 験 実 施 機 関 】 株式会社コスモステクニカルセンター

東京都板橋区蓮根3-24-3

Tel: 03-3966-7755 / Fax: 03-3966-7307

【 試 験 期 間 】 2020年12月3日 ～ 2020年12月18日

【 試 験 責 任 者 】 有用性・安全性評価部 部長 藤代 美有紀

株式会社コスモステクニカルセンター

東京都板橋区蓮根3-24-3

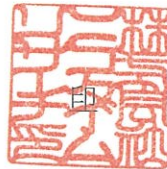
Tel: 03-3966-7755 / Fax: 03-3966-7307

【 運 営 責 任 者 】 代表取締役社長 京谷 大毅

株式会社ニコゲームリサーチ

大阪府大阪市中央区安土町1-6-14

Tel: 06-6125-3501 / Fax: 06-6125-3530



※報告書内容に関するお問合せは、
株式会社ニコゲームリサーチ 営業部(上記代表番号)までご連絡下さい。

1. 試験試料

株式会社 ENJIN より供与された、下記 1 検体。

ジヨキピカ (e.07) の 0.01%希釈物

*ワセリンによって 0.01%になるように希釈した。

2. 試験目的

SkinEthic™ HCE 法による眼刺激性試験代替法を用い、試験試料の眼刺激性を評価する。

3. 試験方法

本試験は、OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS Test No.492¹および EYE IRRITATION TEST METHOD: SOLID *IN VITRO* PREDICTION ASSAY FOR ACUTE OCULAR IRRITATION OF SOLID CHEMICALS-Standard Operating Procedure (S.O.P)²)に準じて実施した。眼刺激性評価の原理は、MTT 法による角膜上皮再生モデルの細胞生存率 (MTT viability(%))を指標とした。

SkinEthic™ HCE (角膜上皮再生モデル) を、維持培地にて一昼夜プレインキュベートし、試料を上皮側から暴露した。なお、陰性コントロールとして PBS(-)、刺激性コントロールとして Methyl acetate を用いた。陰性コントロールおよび刺激性コントロールは、30 μL を暴露した。試験試料は上皮側を 30μL の PBS(-)で湿らせた後、30 mg を暴露した。その後、新鮮な維持培地にて 4 時間培養した。培養後、PBS(-)による洗浄操作により試料を完全に除去し、角膜上皮モデルを新鮮な維持培地に浸漬させ 30 分間培養した。さらに、新鮮な維持培地にて 18 時間の後培養を行った。その後、角膜上皮再生モデルを 1.0 mg/mL の 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) を含有する維持培地に移し、3 時間培養した。その後、角膜上皮再生モデルをイソプロパノールに 2 時間以上浸漬してブルーホルマザンを抽出し、マイクロプレートリーダーにて 570 nm における吸光度を測定した。

MTT viability (%) は、陰性コントロールを暴露した角膜上皮再生モデルの吸光度に対する百分率で表した。試験成立の判定基準および試料の刺激性判定基準は Table 1 および Table 2 にそれぞれ示した。

Table 1 試験成立の判定基準

| | Raw data (O.D.=570 nm) | MTT viability (%) | Difference ¹⁾ of MTT viability |
|----------------------------|---------------------------|----------------------|--|
| 陰性コントロール (PBS(-)) | ≥1.000 | - | ≤20.0 |
| 刺激性コントロール (Methyl acetate) | - | ≤20% | ≤20.0 |
| 試験試料 | - | - | ≤20.0 |

1) 2モデル間における MTT viability (%) の差

Table 2 眼刺激性の判定基準

| MTT viability (%) | 分類 |
|----------------------|------|
| ≤50% | 刺激性 |
| >50% | 無刺激性 |

4. 結果および判定

得られた陰性および刺激性コントロールの結果は Table 1 に示した試験成立判定基準を全て満たしていたことから、本試験は適正に行われたと判断した。試料暴露後の細胞生存率および吸光度を Table 3 に示した。Table 2 に示す判定基準よりジョキピカ (e.07) の 0.01%希釈物は無刺激性と判定された (Table 4)。

Table 3 MTT 試験による細胞生存率 (n=2)

| 試料名 | MTT viability (%) | | Raw data (O.D.= 570 nm) | | |
|----------------------------|-------------------|------------|-------------------------|----------|-------|
| | Mean | Difference | Tissue 1 | Tissue 2 | Mean |
| N.C. ¹⁾ | 100.0 | 0.9 | 1.860 | 1.843 | 1.852 |
| P.C. ²⁾ | 14.7 | 1.9 | 0.289 | 0.254 | 0.272 |
| ジョキピカ (e.07) の 0.01%希釈物 | 93.7 | 0.9 | 1.726 | 1.743 | 1.735 |

1) 陰性コントロール：PBS(-)

2) 刺激性コントロール：Methyl acetate

Table 4 眼刺激性の判定結果

| 試験試料 | 判定 |
|-------------------------|------|
| ジョキピカ (e.07) の 0.01%希釈物 | 無刺激性 |