

視力補正を目的としないおしゃれ用カラーコンタクトレンズの細胞毒性

中岡竜介[#], 松本富美子^{*}, 宗林さおり^{*}, 柳橋哲夫^{*}, 土屋利江

Cytotoxicity of Various Non-corrective and Decorative Contact Lenses

Ryusuke Nakaoka, Tomiko Matsumoto^{*}, Saori Sourin^{*}, Tetsuo Yanahashi^{*}, and Toshie Tsuchiya

Abstract

Non-corrective and decorative contact lenses can be purchased as sundries without the guidance of medical doctor. Recently, many cases of eye injury by utilizing these lenses have been reported. To estimate their cytotoxic potential to cause eye injury, cytotoxicity tests of the commercially available non-corrective and decorative contact lenses were performed utilizing the V79 cell colony assay. By the colony assays of the lenses and their extracts, it was suggested that two tested lenses out of the ten are cytotoxic. Although preservatives for these lenses in the products showed cytotoxicity, the cytotoxicity of the two lenses is suggested to be ascribed to un-identified materials, which can be extracted to a cell culture medium from them. The results of this study indicate that cytotoxicity of the non-corrective and decorative contact lenses would be better to be evaluated for estimating their biological safety.

Keywords: non-corrective and decorative contact lens, cytotoxicity, extract, preservative

1. 緒言

現在、視力補正を目的としない場合、すなわちファッション目的で目の色を変えるためのおしゃれ用カラーコンタクトレンズには、薬事法が適用されず規制対象外となっているため、インターネットショップや雑貨店を通じた購入が可能となっている。しかしながら、目に装用して使用するという使用法は、視力補正を目的としたものと同様である。よって、コンタクトレンズの使用未経験者が専門家の適切な指導を受けないまま、また、それら製品の適切な安全性評価・管理がなされないままそれらのレンズを使用するケースが数多く存在する。PIO-NET（全国消費生活情報ネットワーク・システム）には、おしゃれ用カラーコンタクトレンズを用いた結果生じた炎症や角膜障害などの不具合を中心とした申し出情報が寄せられている¹⁾。また、米国においても同様の障害が報告されている²⁾。

視力補正を目的としないものであっても、コンタクトレンズである以上、本来はその適切な装用法や管理手段の指導を受けるべきであり、報告された不具合はその不適切な使用法が一因であることが大いに考えられる。加えて、その製造や販売にあたり使用部位を考えた場合に行うべき安全性評価・管理がなされないまま、流通していることも予想される。すなわち、PIO-NETに報告されている不具合の原因がおしゃれ用カラーコンタクトレンズ自体の生物学的安全性欠如であることも予想される。

そこで、本研究では、現在入手可能で、ある程度その製造者や材料などが特定できるおしゃれ用カラーコンタクトレンズ10種類を対象として、それらが眼組織に障害を与える可能性を検討するために、眼組織刺激性との相関が報告されている細胞毒性³⁾を評価する試験を行ったので、それらの結果について報告する。

2. 実験

2. 1 試料

今回対象としたおしゃれ用カラーコンタクトレンズをTable 1に示す。対象としたレンズは、全て国内で購入可能なものであり（個人輸入を含む）、青系4銘柄、茶系4銘柄、それらの色以外の2銘柄、合計10銘柄を入手した。

[#]To whom correspondence should be addressed:

Ryusuke Nakaoka; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9264; Fax: 03-3707-6950; Email: nakaoka@nihs.go.jp

^{*} 独立行政法人国民生活センター商品テスト部 Products Testing Department, National Consumer Affairs Center of Japan

Table 1. A list of non-corrective and decorative contact lenses utilized for this study

Sample No.	Color	Made in	Materials and Water contents	Basecurve (mm)	Diameter (mm)	Su
1		South Korea	Polymacon : 62% Water : 38%	8.6	14	
2		South Korea	PHEMA Water : Unknown	8.6	14	
3	Blue	Un-identified*	Co-polymer : 58% (HEMA & MMA) Water : 42%	8.6	14	
4		Taiwan	PHEMA Water : Unknown	8.6	14	
5		UK	Methafilcon A : 45% Water : 55%	8.7	14.4	
6		Un-identified*	Co-polymer : 58% (HEMA & MMA) Water : 42%	8.6	14	
7	Brown	UK	Filcon 1B : 45% Water : 55%	8.8	14.4	
8		Singapore	HEMA Co-polymer : 45% Water : 55%	8.6	14.2	
9	Violet	UK	Filcon 1B : 45% Water : 55%	8.8	14.4	
10	Red	UK	Filcon 1B : 45% Water : 55%	8.8	14.4	

* "Materials from USA" is only described on the package of the product.

HEMA: 2-Hydroxyethyl methacrylate
MAA: Methacrylic acid
PHEMA: Poly HEMA
Polymacon: PHEMA (USAN)
Methafilcon A, Etafilcon A: Copolymer of HEMA and MAA (USA)
Filcon 1B: ISO category of hydrogel material made from copolymer
Phemfilcon A: Copolymer of HEMA and EOEMA (USAN)
EOEMA: 2-Ethoxyethyl methacrylate

2. 2 細胞毒性試験

細胞毒性試験は、厚生労働省の生物学的安全性試験ガイドライン⁴⁾、ISO関連文書⁵⁾及び細胞毒性試験に関する報告^{3, 6, 7)}を参考にして、承認申請時に求められるものに準拠した方法で行った。細胞はChinese hamster lung fibroblasts (V79細胞)を用い、Eagle's minimal essential mediumに10 %のウシ胎児血清 (FCS) を加えたもので、37°C、5 % CO2培養器中で継代したものを実験に使用した。

具体的な細胞毒性試験手法を以下に示す。試験には、Earleの平衡塩類溶液培地に非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム (0.11 g/l)、L-グルタミン (0.292 g/l)、炭酸水素ナトリウム (2.2 g/l)、ペニシリン・ストレプトマイシン及びFCS 5 %を含んだ培地 (M05培地) を使用した。24-well プレート (Corning Inc., Corning, NY) に静置した孔径0.4 µmの tissue culture insert (Nunc A/S, Rockledge, Denmark) 中にV79細胞を約25個懸濁させた500 µlのM05培地を加え、さらにinsertを入れたwellに500 µlのM05培地を加え4時間培養して細胞をinsertに接着させた。検体となるコンタクトレンズは、予め別の24-wellプレート中に静置して準備しておいた。V79細胞が接着したinsertを内部の培地を除いた後に速やかに検体入りのプレートに移し、well中及びinsert中にそれぞれ500 µl、合計1 mlのM05培地を加えてさらに培養を行った。1週間後、Giemsa染色を行い、染色されたコロニー数を計測した。なお、試験の検出感度と精度を確認する目的で、細胞毒性試験用の陰性対照材料及び陽性対照材

料を用いての試験も同時に行った。陰性対照材料としては組織培養用プラスチックシート (和光純薬製) を、陽性対照材料としては0.1 % zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) 含有ポリウレタンフィルム (PU) (陽性対照材料A)、0.25 % zinc dibutyldithiocarbamate (ZDBC) 含有PU (陽性対照材料B) を (財) 食品薬品安全センター秦野研究所より入手して用いた。コンタクトレンズの細胞毒性は検体の入っていないinsert中でのコロニー数を100 %として、各insert中に観察されたコロニー数を比較することで評価した。

次に、上記の方法で細胞毒性があることが疑われたレンズを中心にいくつかのおしゃれ用カラーコンタクトレンズを選び、滅菌プラスチックチューブにそれらのレンズ各10枚を入れレンズ表面積に対して6 cm²/mlになる量のM05培地を加えた。それらのチューブを24時間細胞培養器中に静置することでレンズ抽出液を調製した。24-well プレートにV79細胞を50個/well/500 µl M05培地で播種して4時間培養を行った後に培地を捨て、調製したレンズ抽出液をM05培地で段階希釈したものを500 µl加えてさらに培養した。1週間培養後に形成されたコロニー数を計測し、抽出液未添加の場合に計測されたコロニー数と比較することで調製したレンズ抽出液の細胞毒性を評価した。

また、各製品のパッケージ中にレンズ保存用としてレンズと共に入っていた保存液の毒性は以下の方法で評価した。24-wellプレートにV79細胞を50個/well/500 µl M05培地で添加して4時間培養後培地を捨て、回収した保存液を添加して段階希釈したM05培地を加えて1週間培養後の形成コロニー数からその毒性を評価した。抽出液及び保存液の試験では、前記2種類の陽性対照材料A及びB、陰性対照材料に加えて陽性対照物質であるZDBCとを試験系の感度及び精度確認のために使用した。

なお、得られたデータはDunnnettの多重比較による検定を行い、検体を加えていないコントロール群との有為差を必要に応じて示した。

3. 結果及び考察

コンタクトレンズの使用法を考慮した場合、細胞と直接接触させてその細胞毒性を検討する直接接触法を行うことが理想ではあるが、今回の対象レンズが全てソフトコンタクトレンズのため細胞接着性が低いこと、またレンズ自体は平面でなく眼球に合わせた曲率を持ち材料への均一な細胞播種が不可能であるため、実際のコンタクトレンズ承認申請時にも使用されているtissue culture insertを利用した試験を行った。

Table 2に、コロニー法を用いて算出した細胞毒性試験の結果を示す。

Table 2. Cytotoxicity of various non-corrective and decorative contact lenses estimated by V79 cell colony assay utilizing a tissue culture insert (All data are expressed as an average percent ratio against that of a control group $\pm$ S.D. (n=3))

Sample No.	Viability of V79 cells (% vs control)
1	119.6 $\pm$ 12.9
2	117.5 $\pm$ 12.4
3	96.9 $\pm$ 9.4
4	101.0 $\pm$ 21.7
5	105.2 $\pm$ 16.4
6	33.0 $\pm$ 19.9 *
7	113.4 $\pm$ 28.6
8	101.0 $\pm$ 12.9
9	113.4 $\pm$ 9.4
10	94.8 $\pm$ 21.7
Negative Reference Material Polystyrene	84.5 $\pm$ 7.1
Positive Reference Materials	
ZDEC	0.0 $\pm$ 0.0 *
ZDBC	0.0 $\pm$ 0.0 *
Control	100.0 $\pm$ 18.1

Italic number: Observed colonies are very small compared to that observed in a control group
* p<0.01 against a control group

コロニー形成率の明らかな低下が認められたものはNo.6のみで、その他のコンタクトレンズではコロニー形成率の低下は認められなかった。

No.6のレンズによるコロニー形成率低下の原因に関してさらに検討を加える目的で、No.6を含めていくつかのレンズを選び、それらのレンズから調製した培地抽出液の毒性を検討した (Fig.1)。なお、別に細胞代謝活性評価を行ってその低下が認められなかったレンズ (No.1,

2及び7) は細胞への悪影響がないと判断し (未公開データ)、この検討からは除いている。Fig.1から明らかなように、No.3及び6の抽出液においてコロニー形成率の低下が認められ、算出したそれぞれのIC50は約80 %, 89 %であった。

Table 2に示されるinsertを用いた試験ではNo.3の細胞毒性が検出されなかったが、これはこの試験での抽出条件が3.5から4.2 cm²/mlの表面積/抽出培地比であり、レンズ抽出液調製時と比較して表面積/抽出培地比が小さい抽出条件下であったことが一因と考えられる。Fig.1において、この比に相当する抽出液濃度 (58 %) でのコロニー形成率は No.3では同レベルであったが、No.6では高くなっている。このことから、No.6では時間とともに多くの細胞毒性物質が培地中に溶出されており、その結果、Table 2で示されたように毒性が検出されたと考えられる。よって、表面積/培地比を同じにすることが可能であれば、insertを用いた試験法は抽出液を用いた手法よりも感度が高い手法であると考えられるが、insertを用いた試験法で評価する場合、IC50で細胞毒性強度を定量的に示しうる抽出液を用いた試験法との併用が望ましいことも示された。

抽出液でコロニー形成率の低下が認められたNo.3及び6と形成率低下が認められなかったもののうち No.5及び10の保存液の細胞毒性を検討した (Fig.2)。その結果、No.3及び6の保存液でコロニー形成率の減少が認められ、これらの保存液に細胞毒性があることが示された。製品パッケージや説明書にはこの保存液の詳細に関する記述はないが、長期保存を可能にするための防腐剤などが含まれている可能性があり、レンズ中に残存している保存

Fig.1. Cytotoxicity of extracts prepared from various non-corrective and decorative contact lenses. All data are expressed as average percent ratio against that of a control group (without adding the extracts) $\pm$ S.D. (n= 4).

* p< 0.01 against the result obtained from a control group

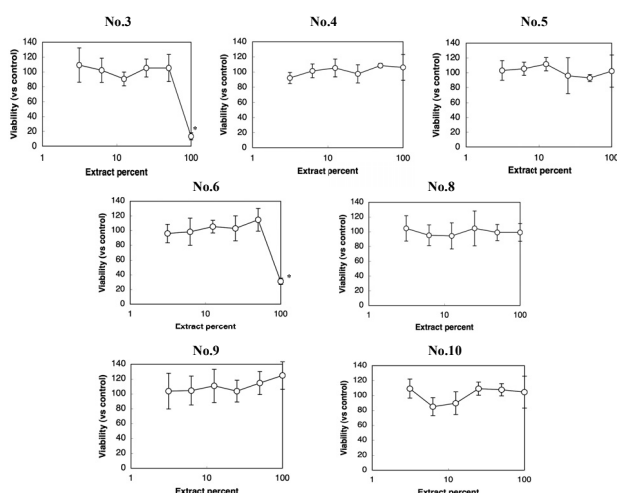
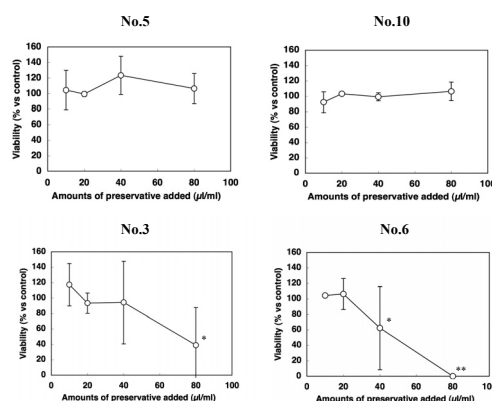


Fig.2. Cytotoxicity of preservatives for various non-corrective and decorative contact lenses. All data are expressed as average percent ratio against that of a control group (without adding preservatives) $\pm$ S.D. (n= 3). Upper figures are results of preservatives of the lenses from which extracts did not show cytotoxicity. Lower figures are results of preservatives of the lenses from which extracts showed cytotoxicity

* p< 0.05, ** p< 0.01 against the result obtained from a control group



液中の防腐剤に起因した細胞毒性のためにコロニー形成率が低下している可能性は否定できない。このレンズの正確な含水量は不明であるが、今回用いたレンズで含水率が明記されていたもので最も高い含水率 55 % のレンズの場合には、そのレンズ中の保存液量は多く見積もっても 19.9 μ l 程度となることが分かっている。抽出液は 10 枚のレンズに対して 6.9 ml の培地を加えて調製していることから、含水率 55 % の 100 % レンズ抽出液中の保存液の濃度は約 28.0 μ l/ml と算出できる。No.3 及び 6 のレンズ含水率は 42 % であるため、上述したレンズ抽出液と比べ、保存液濃度は低いと考えて差し支えない。よって、含水率 55 % での最大濃度である 28.0 μ l/ml を超えることは考えられず、No.3 及び 6 の保存液濃度がその濃度 (28.0 μ l/ml) であっても 100 % 抽出液で見られたようなコロニー形成率の大きな低下は認められないことから、No.3 及び 6 の抽出液で示されたコロニー形成率の低下は、保存液中にもともと含まれている可能性のある防腐剤などではなく、レンズ材料から抽出される物質、すなわちコンタクトレンズ自体に起因したものであることが予想される。

では、このコロニー形成率の低下を示した物質は何であろうか？ 保存液中の溶出物に関して検討した結果、ほぼ全てのレンズの保存液中にメタクリル酸モノマーが検出されること、しかしながら、メタノールを用いた溶出試験からメタクリル酸モノマーのさらなる溶出はなかったこと、一方、細胞毒性が示唆された No.3 及び 6 と細胞毒性が認められなかった No.9 及び 10 ではいずれも色素が溶出することが報告されている¹⁾。Fig.2 の結果と報告されているモノマー量¹⁾との間には相関が見られなかったことから、メタクリル酸モノマーが細胞毒性の原因である可能性は小さい。しかしながら、メタクリル酸やメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルモノマー、あるいはこれらのモノマーからなる低分子量のオリゴマーが培地中に溶出している可能性は否定できない。また、溶出が認められた色素の毒性に関しては全く未知であるが、No.3 及び 6 に使用されている色素が細胞毒性試験中に培地中に溶出してくることによりこれらのレンズが細胞毒性を示している可能性もある。特に、血清含有培地での抽出では、水溶液での抽出に比べてより脂溶性の高い物質が溶出されることもあり、No.3 及び 6 には細胞毒性のある何らかの物質が材料中に残存している可能性が考えられ、さらに詳細な分析を行う必要がある。

以上、本研究に用いた検体中でコンタクトレンズ自体に細胞毒性があると考えられるものは No.3 と 6 であった。おしゃれ用カラーコンタクトレンズの使用に伴う不具合の症状は詳細に報告されているものの、今回用いたレンズが実際に不具合を起こしたものと同じであるかは不明

である。

また、一部のコンタクトレンズ製品中の保存液には細胞毒性が認められた。今回認められたコンタクトレンズの細胞毒性との関連性はほとんどないと判断されたものの、その組成に関する詳細な記載がないことから、保存液で観察された毒性の原因について判断及び考察を行うことができなかった。防腐剤などが添加されていることは、有効期限が数年になるものもあることから容易に想像はできるものの、その化学物質が目への適用が認められているかどうかなどが明らかにされていないことは、規制対象外の製品とはいえ問題である。毒性物質のレンズへの吸着による眼粘膜への毒性作用の持続なども危惧されるため、レンズの保存液に関しても、今後は詳細な記載を要望するなど何らかの対応が必要かもしれない。

おしゃれ用カラーコンタクトレンズによる不具合は、これらの細胞毒性だけでなく材質の様々な特性にも起因する可能性が、本研究で細胞毒性が示されなかったレンズを用いての装用試験によって示唆されている¹⁾。角膜層はデリケートな部位のためレンズの物性や形状によっては簡単に障害を生じることを考慮すると、おしゃれ用カラーコンタクトレンズの使用には様々なリスクが潜在していると思われるため、今回行ったような細胞毒性試験を含む生物学的安全性評価を行うことが望ましいのではないだろうか。

参 考 文 献

- 1) 独立行政法人国民生活センター報道発表資料「おしゃれ用カラーコンタクトレンズの安全性 - 視力補正を目的としないものを対象に -」平成 18 年 2 月
- 2) FDA News for immediate release P02-43, October 21, 2002
- 3) Tsuchiya, T., Arai, T., Ohhashi, J., Imai, K., Kojima, H., Miyamoto, S., Hata, H., Ikarashi, Y., Toyoda, K., Takahashi, M. and Nakamura, A.: J. Biomed Mater Res., 27, 885-893 (1993)
- 4) Guidelines for preclinical biological evaluation of medical materials and devices. Ministry of Health, Labour and Welfare memorandum, JIMURENRAKU Iryokiki-Shinsa No. 36 (2003.3.19).
- 5) ISO10933-5: 1999, Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity
- 6) Tsuchiya, T., Ikarashi, T., Arai, T., Ohhashi, J. and Nakamura, A.: J Appl Biomater., 5, 361-367 (1994)
- 7) Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Arai, T., Ohhashi, J., Isama, K. and Nakamura, A.: Clinical Mater., 16, 1-8 (1994)