J·TEC

LabCyte

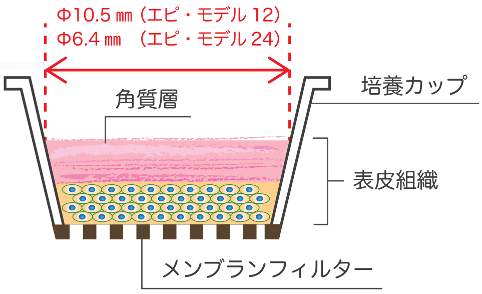
ラボサイト製品とアプリケーション

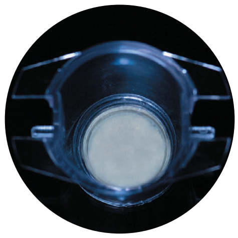
ヒト3次元培養表皮
LabCyte EPI-MODEL（ラボサイト　エピ・モデル）

LabCyte EPI-MODEL（ラボサイト　エピ・モデル）は、ヒト正常表皮細胞を重層培養したヒト３次元培養表皮です。
本製品は、主として実験動物による皮膚刺激性試験の代替材料として開発されました。
ヒト細胞を用いているため、動物実験と比較して種差がないほか、ウェル間、ロット間のバラツキが少なく、再現性の高い試験結果を得ることができます。
本モデルは、MTTアッセイを用いて生細胞数を測定することによりさまざまな被験物質の毒性や刺激性評価に利用できます。また、細胞が代謝活性を保持しているため、炎症性因子や細胞成長因子の産生量測定等の皮膚科学研究、各種薬物の薬理研究等に利用できます。

ヒト皮膚表皮に類似した3次元構造

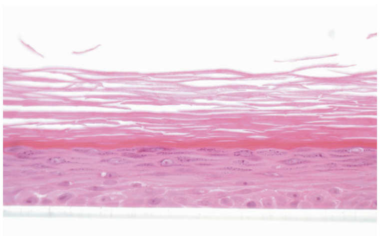
モデルの構成



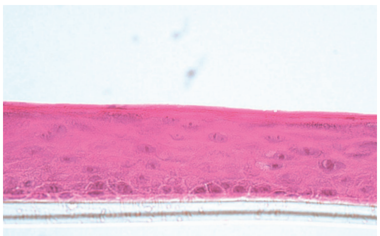


組織構造（H&E染色）

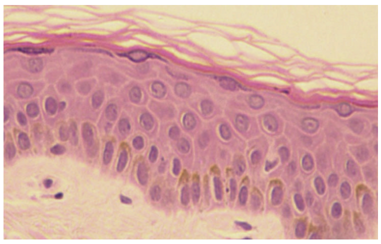
LabCyte EPI-MODEL



LabCyte EPI-MODEL 6D



正常ヒト表皮組織（前腕）



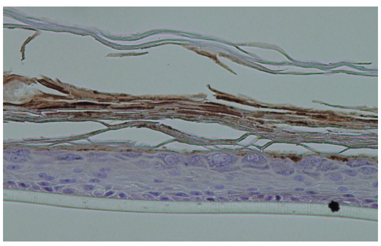
形態的にヒト皮膚に類似した構造を呈しており、基底層・有棘層・顆粒層・角質層を有します。EPI-MODEL 6Dは角質層が形成初期の状態です。

岐阜大学大学院医学系研究科皮膚病態学
北島康雄先生 提供

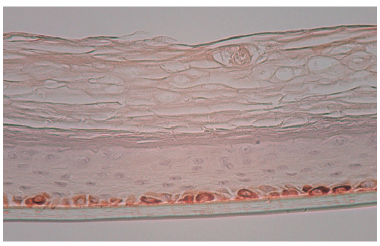
局所発現タンパク質評価

角質層や基底膜構成タンパク質の局在を確認しています。

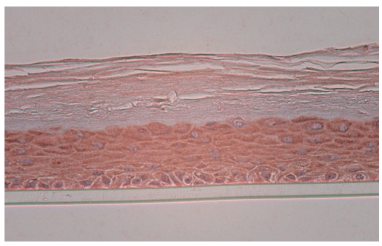
角質層（Filaggrin）



基底膜（Laminin）



表皮分化マーカー（Transglutaminase）



きめ細かいサポート

（株）ジャパン・ティッシュエンジニアリングでは開発から製造・販売まですべて自社で行っているため、お客様への幅広いサポートが可能です。技術担当者へのご相談・お問い合わせなどきめ細かに対応させていただきます。

ヒト皮膚刺激性試験等のさまざまなアプリケーション

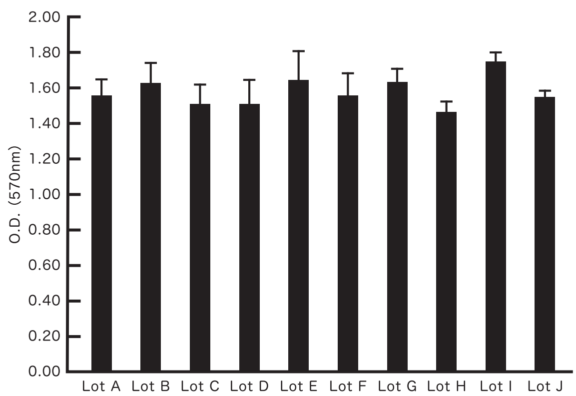
LabCyte EPI-MODELは実験動物による皮膚刺激性試験の代替材料として、MTTアッセイを用いた皮膚刺激性・毒性試験に用いることができる他、さまざまな薬理研究、皮膚科学研究等にご利用いただけます。EPI-MODEL 6Dは角質層が形成初期のため、弱刺激性試験や角質層セラミドの評価にご使用いただけます。

優れた製造技術による再現性の高いモデル

LabCyte EPI-MODELは、高い技術を有した専任の製造技術者によって製造されています。厳しい基準の品質管理を行い、弊社が定める基準に適合した製品のみを出荷いたします。

（社内データ）＊EPI-MODELのデータです。

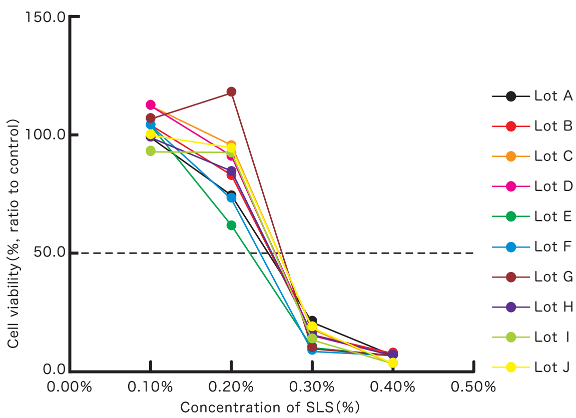
生細胞数（ロット内・ロット間変動）



	Lot A	Lot B	Lot C	Lot D	Lot E	Lot F	Lot G	Lot H	Lot I	Lot J
平均	1.56	1.63	1.51	1.51	1.65	1.56	1.64	1.47	1.75	1.55
SD	0.09	0.12	0.11	0.15	0.16	0.12	0.08	0.06	0.05	0.04
CV(%)	5.8	7.4	7.1	9.8	9.7	7.9	4.6	4.2	3.0	2.9

ロット内、ロット間ともにバラツキが小さく、高い再現性を示します。

バリア機能評価（SLS 18 時間曝露）

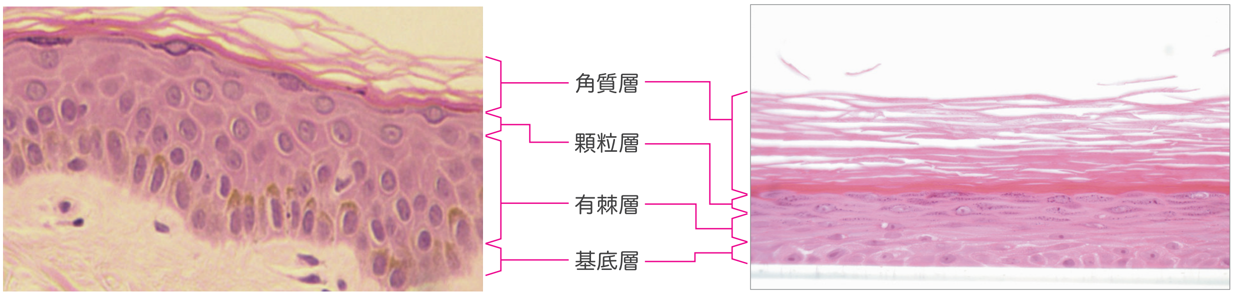


	Lot A	Lot B	Lot C	Lot D	Lot E	Lot F	Lot G	Lot H	Lot I	Lot J
IC50	0.25	0.25	0.26	0.25	0.22	0.24	0.26	0.25	0.25	0.26

バリア機能評価でもロット間のバラツキは小さく、再現性の高い結果を得ています。

組織構造

LabCyte EPI-MODEL(ラボサイト エピ・モデル)は、正常ヒト表皮組織と近似した構造を有し、基底層、有棘層、顆粒層、角質層を形成しています。



正常ヒト表皮組織(前腕)

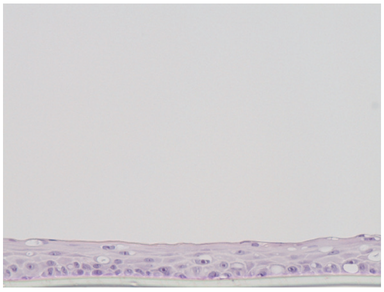
LabCyte EPI-MODEL

監修:岐阜大学大学院 医学系研究科皮膚病態学 北島 康雄先生

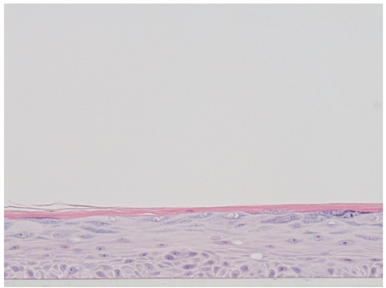
培養経過に伴う基底層・有棘層・顆粒層・角質層からなる組織構造の形成を確認しています。

1日目

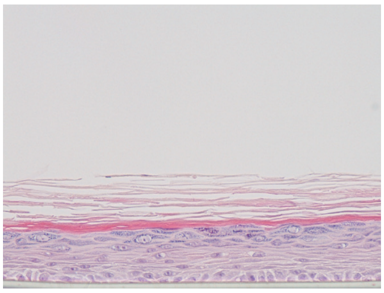
4日目



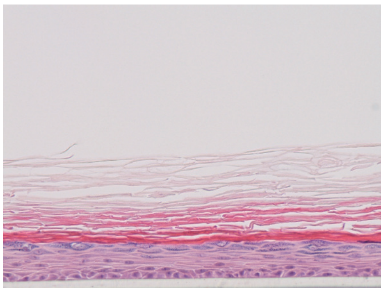
7日目



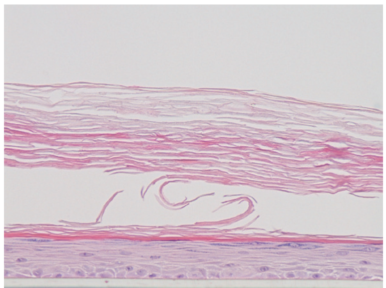
10日目



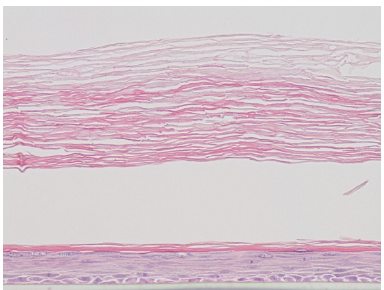
14日目



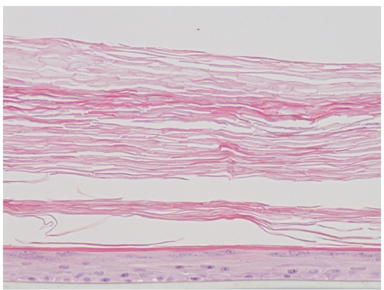
18日目



21日目



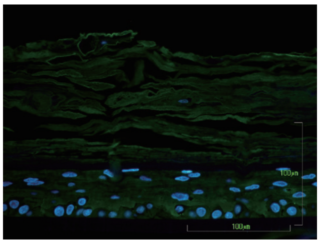
28日目



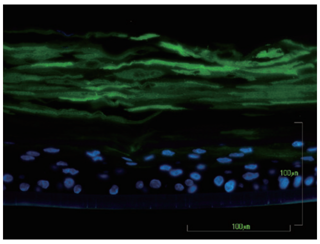
免疫染色

角質層や細胞層を構成するタンパク質の局在を確認しています。

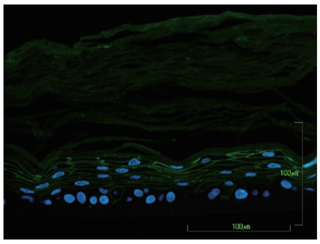
Involucrin



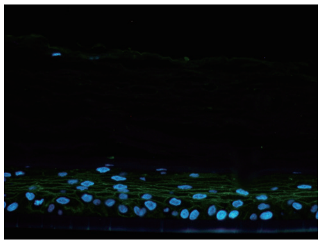
Cytokeratin-1／10



Transglutaminase

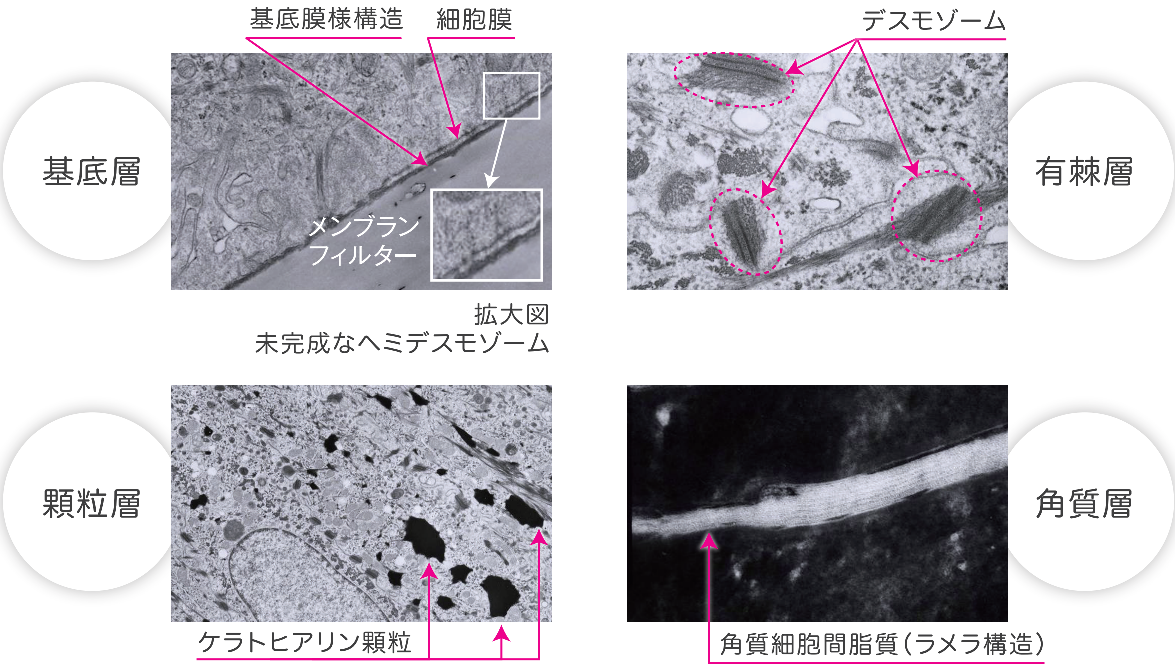


Claudin-1



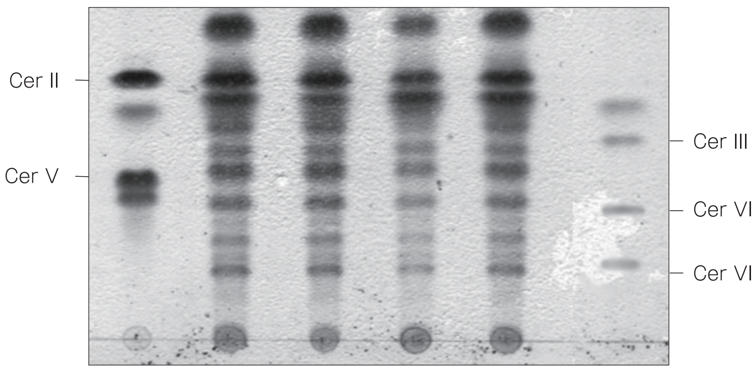
微細構造

透過型電子顕微鏡によりケラチノサイト各層に特有の微細構造を確認しています。



セラミド解析

EPI-MODELは多くのセラミドを含有しています。



データ提供：城西大学 薬学部　徳留 嘉寛先生
Skin Pharmacol Physiol 2011;24:218-223

エピ・モデルを継続培養し、各タンパク質の局在を確認しています。

試験方法
パラフィン包埋

①培養カップごと表皮組織を4%パラホルムアルデヒド(PFA)に浸漬させます。

②4℃で一晩静置し、表皮組織を固定します。

③メンブレンごと実験用メスで表皮組織を取り出し、DPBSで洗浄し置換します。

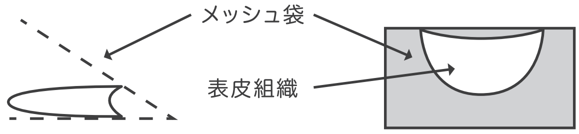
④4%伊那寒天カリコリカン溶液を6ウェルプレートに適量注ぎます。

⑤寒天がやや固まったら、切り出した表皮組織を置きます。

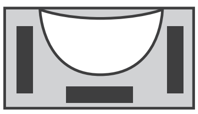
⑥4%伊那寒天カリコリカン溶液を適量重層し、寒天が固まるまで待ちます。

⑦実験用メスで余分な寒天を取り除きます。

⑧メッシュの袋を適当な大きさに切り、表皮組織を挟むようにして配置します。



⑨表皮組織の周囲をホッチキスで留めます。



⑩メッシュの袋に入った表皮組織をティシュ―・テックフォーム・バイオプシー・シートに挟みます。

⑪ユニカセットに入れ、ユニカセットを検体籠に入れます。

⑫検体籠より高さがある容器内に検体籠を置き、水道水を注ぎます。

⑬検体籠に金網の蓋をします。

⑭検体籠の水気をよく切ります。

⑮パラフィン包埋工程に入ります。

パラフィン包埋プログラム(例) ご使用の製品のプログラムをご利用ください。

①70%エタノール	1時間
②100%エタノール	1.5時間×5回
③キシレン	1時間×4回
④パラフィン(63℃)	45分×4回

切片の作製

①パラフィン包埋ブロック作製装置の使用プロトコールに従って、パラフィンブロックを作製します。

②ブロックが固まったら、4℃で保存します。

③ミクロトームの使用プロトコールに従って、切片を作製します。

④40－65℃で一晩静置して、乾燥します。

⑤ミクロトームで3μm切片を作製します。

免疫染色

脱パラフィン

①パラフィン切片を乗せたスライドグラス(以下、スライドグラス)を
　キシレンに2分間×3回浸漬します。
②スライドグラスをエタノールに1分間×3回浸漬します。
③スライドグラスを純水に1分間×1回浸漬します。
④スライドグラスを純水に浸漬します。

抗原賦活化処理

❶熱による抗原賦活化を行う場合

①スライドグラスを、抗原賦活化液に浸漬します。
　(抗原賦活化液は抗体による)
　・pH6の場合:Target Retrieval Solution, Citrate pH 6(ダコ)
　・pH9の場合:Target Retrieval Solution, Tris-EDTA pH 9(ダコ)

②給湯器内で95℃加熱します(加熱時間は抗体による)。
③抗原賦活化液に浸漬したまま、ゆっくり室温に戻します。
④スライドグラスをDPBSに浸漬します。
⑤PAPペンで組織の周囲を囲います。

❷Proteinase Kによる抗原賦活化を行う場合

①スライドグラスをDPBSに浸漬します。
②PAPペンで組織の周囲を囲います。
③スライドグラスを湿潤箱に入れます。
④ProteinaseK溶液(ダコ)を滴下します。
⑤室温でインキュベートします。
⑥スライドグラスをDPBS-Tで2分間×3回洗浄します。

内在性ペルオキシダーゼの不活性化

①スライドグラスを0.3%過酸化水素水に浸漬し、
　室温で30分間インキュベートすることで内在性ペルオキシダーゼを不活性化します。
②スライドグラスをDPBS-Tで2分間×3回洗浄します。

ブロッキング

①スライドグラスを湿潤箱に入れます。

②Blocking One(ナカライテスク)を100μL添加します。

③室温で30分以上ブロッキングします。

一次抗体反応

①一次抗体をDako REAL抗体希釈液(ダコ)で希釈します。

②ブロッキング溶液を除き、一次抗体溶液を100μL 添加します。

③室温で1時間インキュベートします。

二次抗体反応

二次抗体溶液

・抗ウサギ二次抗体(HRP-conjugate)

ImmPRESS Reagent, Anti-Rabbit Ig(VECTOR)

・抗マウス二次抗体(HRP-conjugate)

ImmPRESS Reagent, Anti-Mouse Ig(VECTOR)

①スライドグラスをDPBS-Tで2分間×3回洗浄します。

②二次抗体溶液を100μL添加します。

③室温で30分間インキュベートします。

④スライドグラスをDPBS-Tで2分間×3回洗浄します。

⑤スライドグラスをDPBSで2分間×1回洗浄します。

⑥Histogreen(AbCys)による発色

⑦Histogreen-Buffer(No.2) 1mLにHistogreen-Chromogen(No.1)2滴を添加し、混合します。

⑧さらにH_2O_2(No.3)を2滴添加し、混合し、Histogreen発色液とします。

⑨HistoGreen 発色液を100μL 添加します。

⑩室温で1 ～ 5分間反応させます。

⑪スライドグラスをDPBSで2分間×3回洗浄します。

⑫純水に(短時間)浸漬します。

脱水・透徹・封入

①エタノールに30秒間×3回浸漬します。

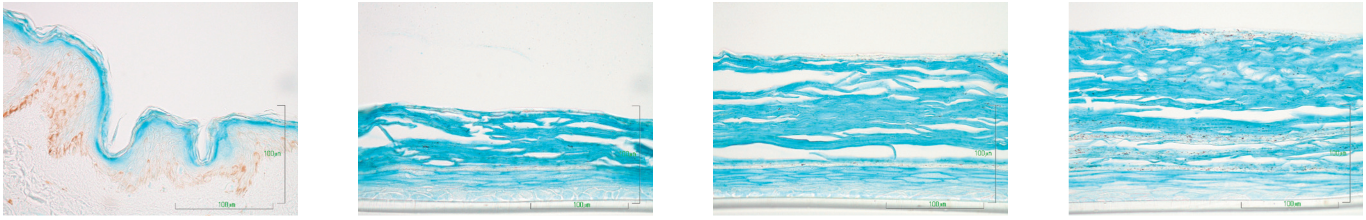
②エタノール:キシレン=1:1溶液に30秒間×1回浸漬します。

③キシレンに30秒間×3回浸漬します。

④VectaMount™ Permanent Mounting Medium(Vector)で封入します。

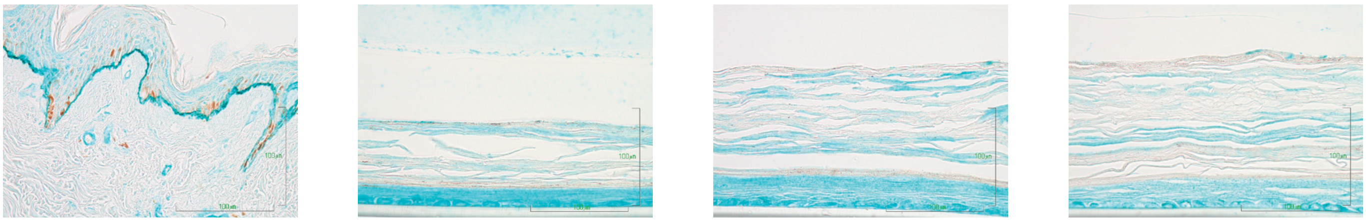
ヒト皮膚	EPI-MODEL24		
	0日（納品時）	3日	7日

Transglutaminase



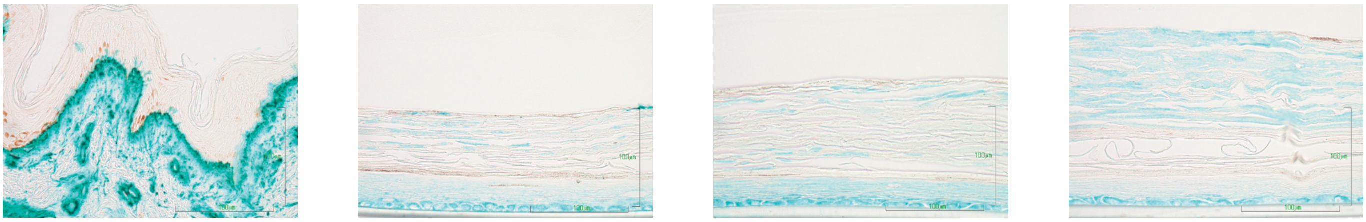
有棘層から角質層に発現が認められた。

Laminin-332



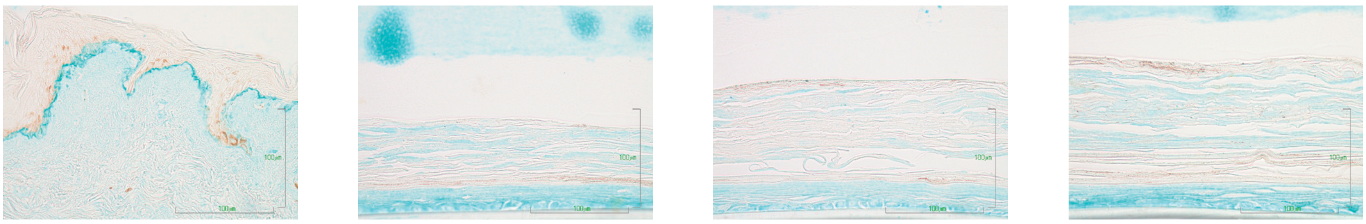
培養経過とともに基底層から有棘層に発現が認められた。

Collagen Ⅳ



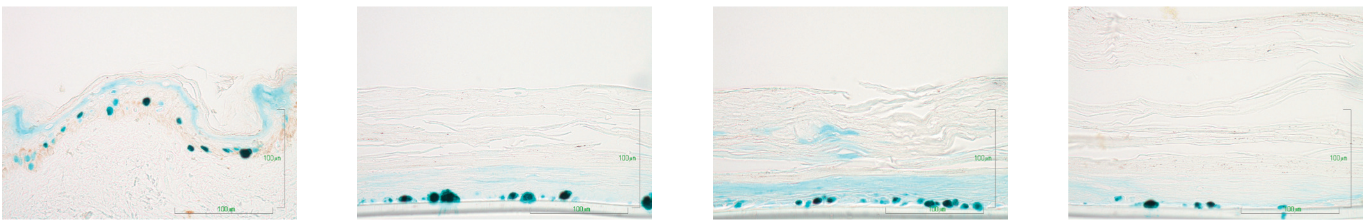
基底層に発現が認められた。

Collagen Ⅶ



基底層に発現が認められた。

Ki-67

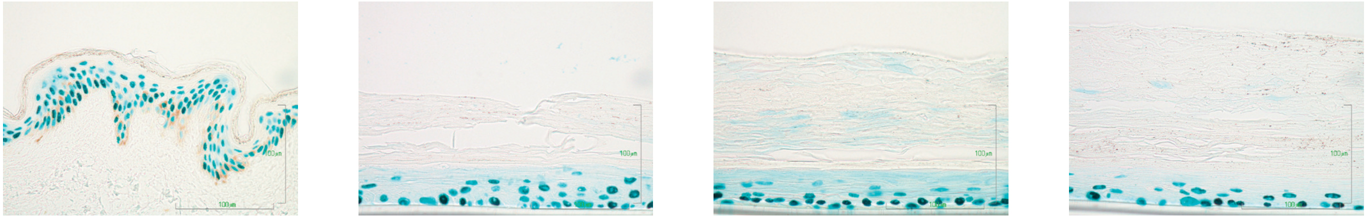


Ki-67は増殖マーカーとして使用されている。
ヒト皮膚同様、基底層の細胞で発現が認められた。

EPI-MODEL　ヒト3次元培養表皮

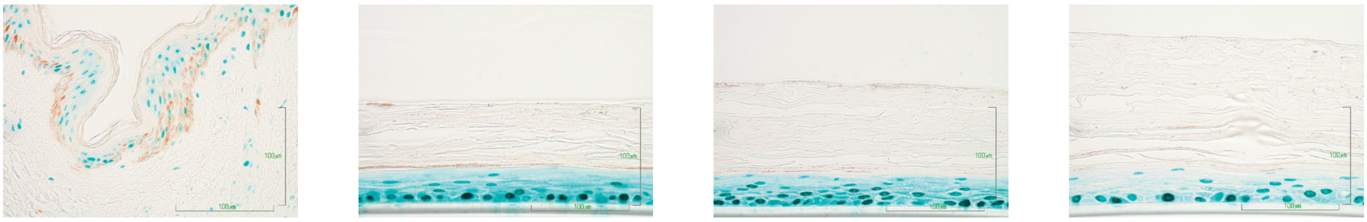
ヒト皮膚	EPI-MODEL24		
	0日（納品時）	3日	7日

p63



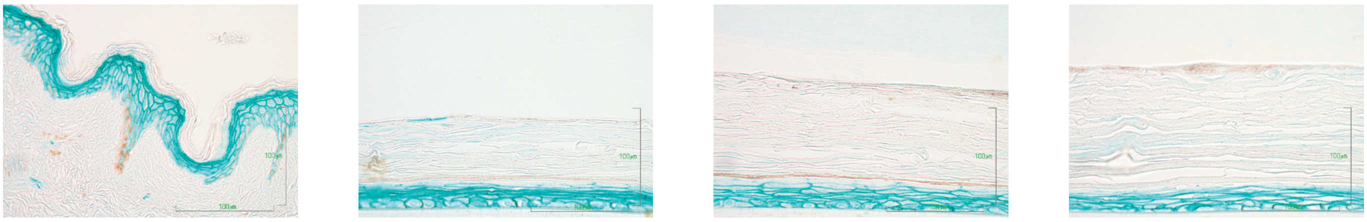
p63は表皮幹細胞のマーカーとして使用されている。
ヒト皮膚同様、基底層と一部の有棘層の細胞で発現が認められた。

PCNA



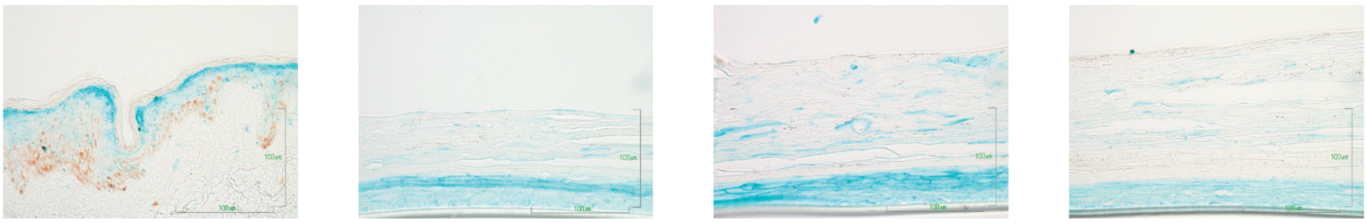
PCNAは増殖マーカーとして使用されている。
ヒト皮膚同様、基底層の細胞で発現が認められた。

Claudin-1



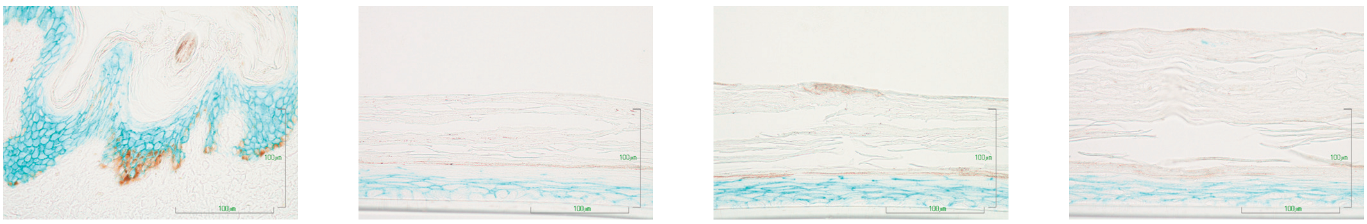
タイトジャンクションマーカー。
ヒト皮膚と同様に基底層から顆粒層に発現が認められた。

Claudin-4



タイトジャンクションマーカー。
ヒト皮膚と同様に基底層から顆粒層に発現が認められた。

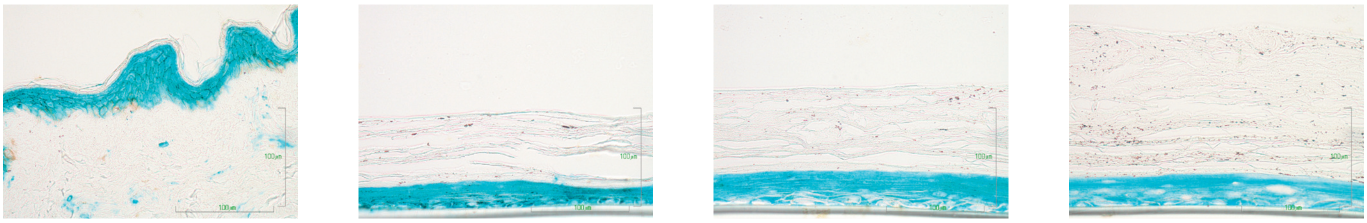
E-cadherin



接着結合マーカー。
ヒト皮膚と同様に基底層から顆粒層に発現が認められた。

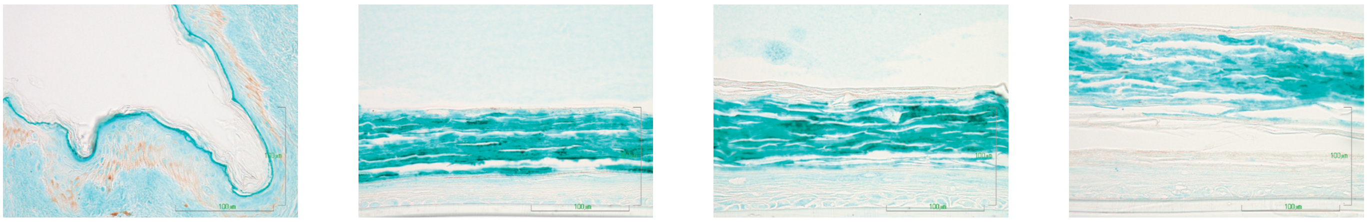
ヒト皮膚	EPI-MODEL24		
	0日（納品時）	3日	7日

Desmoglein 1



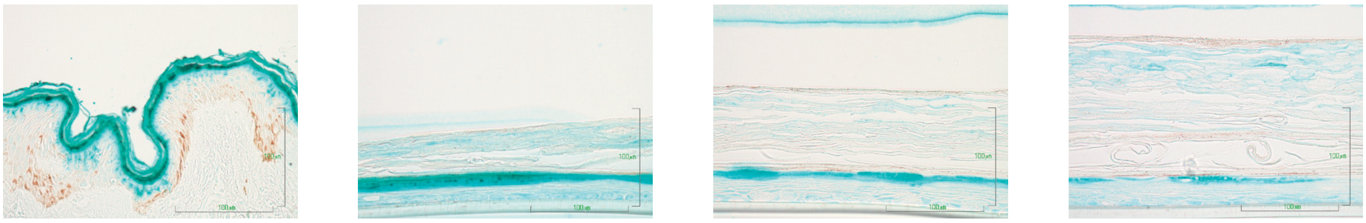
デスモソームマーカー。
ヒト皮膚と同様に基底層から顆粒層に発現が認められた。

Filaggrin



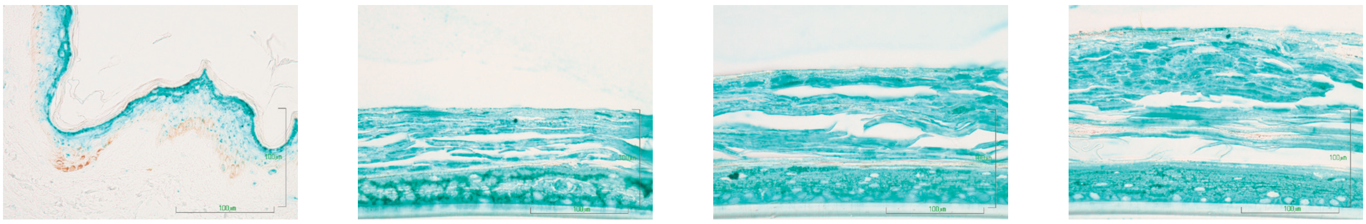
ヒト皮膚と同様に顆粒層から角質層に発現が認められた。

Loriclin



ヒト皮膚と同様、顆粒層に発現が認められた。

Involucrin



分化した表皮層マーカー。
ヒト皮膚とは異なり、基底層から顆粒層に発現が認められた。

Keratin 1

分化した表皮層マーカー。
ヒト皮膚と同様に有棘層から角質層に発現が認められた。

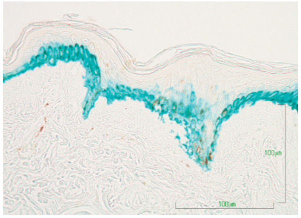
EPI-MODEL　ヒト3次元培養表皮

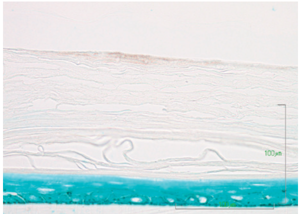
ヒト皮膚

EPI-MODEL24

0日（納品時）　3日　7日

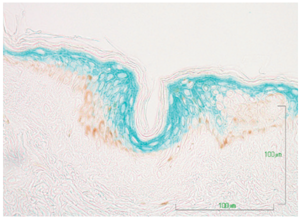
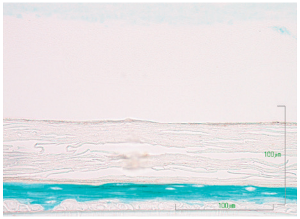
Keratin 5

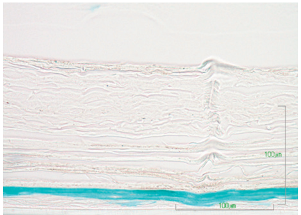


基底層マーカー。
ヒト皮膚と同様に基底層に発現が認められた。

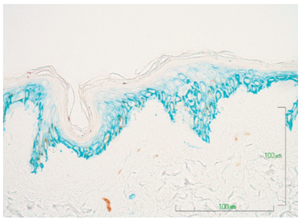
Keratin 10

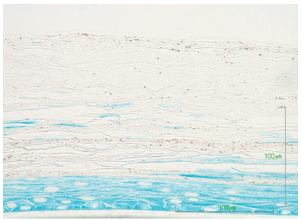





分化した表皮層マーカー。
ヒト皮膚と同様に有棘層から顆粒層に発現が認められた。

Keratin 14



基底層〜有棘層マーカー。
ヒト皮膚と同様に基底層から有棘層に発現が認められた。

エピ・モデルを継続培養し、各タンパク質の発現を イムノブロッティングで確認しています。

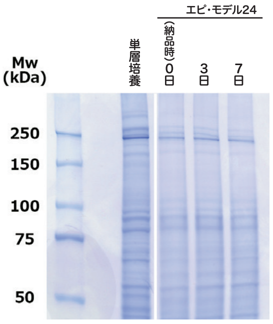
タンパク抽出（例）

①組織をDPBSでリンス後、実験用メスでメンブレンごと切り抜きます。
②組織を1.5mLチューブに移します。
③必要に応じて、-80℃以下で凍結保存します。
④組織を氷上で解凍します。
⑤組織を10cmディッシュに移し、実験用メスで細切します。
⑥細切した組織を新しい1.5mLチューブに移します。
⑦チューブに1組織あたり200 ～ 300μLのRIPAバッファーを添加します。
⑧BioMasher®II（ニッピ）でホモジナイズします。
⑨超音波処理（37W、30分）します。
⑩15,000 × g、4℃で10分間遠心します。
⑪上清を新しい1.5mLチューブに移します。
⑫15,000 × g、4℃で再度10分間遠心します。
⑬上清を新しい1.5mLチューブに移します。
⑭BCAアッセイ等でタンパク質濃度を定量します。

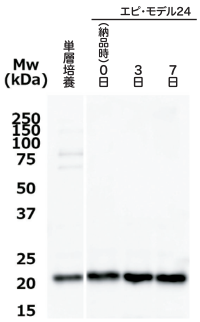
イムノロッティング（例）

①10μgのタンパク質を等量の
　サンプルバッファー，レムリー 2×濃度（SIGMA-ALDRICH）と混合します。
②100℃で2分間加熱します。
③チューブをスピンダウンします。
④定電流15mA/ 1mmゲル/枚でTris/Gririne/SDS-PAGEを行います。
⑤泳動終了後のゲルをTris/Gricineバッファーに10分間浸漬します。
⑥その間にAmersham Hybond P PVDF 0.45（GEヘルスケア）を
　メタノールに1分間浸漬後、蒸留水で5分間浸漬します。
⑦Amersham Hybond P PVDF 0.45にゲルを乗せ、定電圧30V、4℃で16時間転写します。
⑧転写後のメンブレンを5%スキムミルク（ディフコ） in TBS-Tでブロッキングします。
　（室温、1時間以上）
⑨一次抗体を5%スキムミルク in TBS-Tに希釈します。
⑩メンブレンを一次抗体溶液に浸漬し、4℃で一晩インキュベートします。
⑪メンブレンを5%スキムミルク in TBS-Tで15分間×3回洗浄します。
⑫メンブレンをTBS-Tで5分間×1回洗浄します。
⑬二次抗体をTBS-Tに希釈します。
⑭メンブレンを二次抗体溶液に浸漬し、室温で2時間インキュベートします。
⑮メンブレンをTBS-Tで15分間×3回洗浄します。
⑯メンブレンをECL Western Blotting Detection Reagents（GEヘルスケア）に浸漬します。
⑰LAS4000等で発光を検出します。

CBB染色

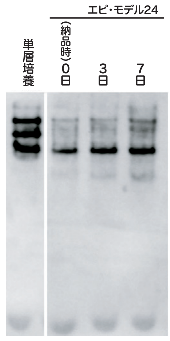


Claudin-1

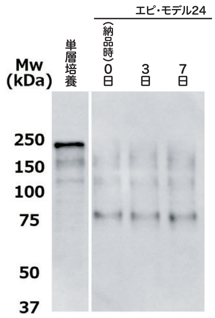


タイトジャンクションの
存在を示している

Collagen Ⅳ

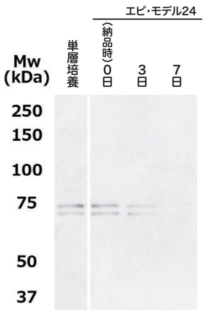


Native-PAGE



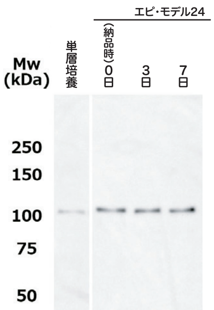
コラーゲンⅣの
存在を示している

Collagen XⅦ



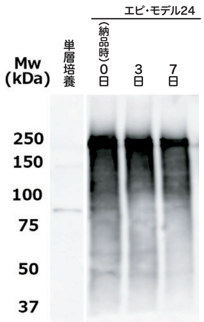
コラーゲンXVIIの
存在を示している

E-Cadherin



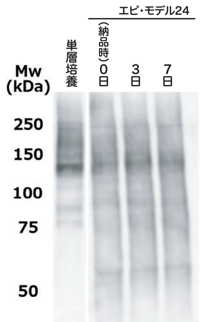
接着結合の
存在を示している

Filaggrin



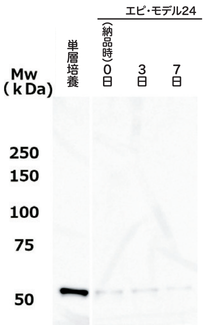
分化に伴う角質の
成熟化を示している

Involucrin



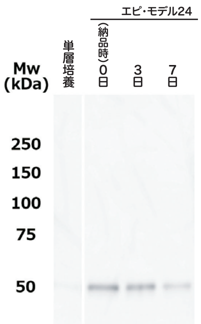
分化に伴う角質の
成熟化を示している

Keratin 5



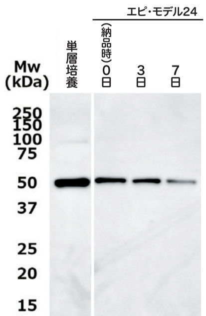
培養経過に伴い、
基底層が維持されている

Keratin 10



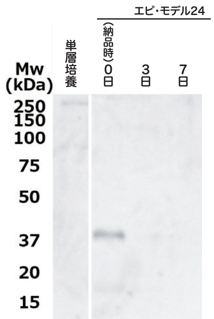
三次元培養による、
表皮層の分化を示している

Keratin 14



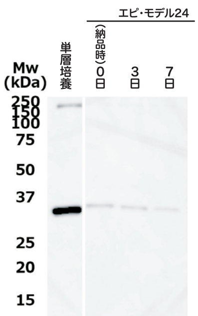
培養経過に伴い、
基底層が維持されている

Loriclin



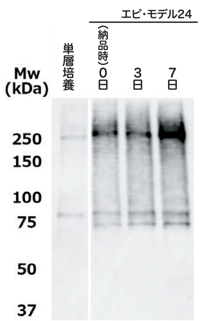
三次元培養による、
表皮層の分化を示している

PCNA



培養経過に伴い、
増殖細胞が減少している

Transglutaminase



分化に伴う角質の
成熟化を示している

遺伝子解析:エピ・モデルを継続培養し、遺伝子発現についてqRT-PCRで確認しています。

RNA抽出

①表皮組織をDPBSでリンスします。

②実験用メスでメンブレンごと切り抜き、表皮組織を1.5mLマイクロチューブに移します。

③必要に応じて、-80℃以下で凍結保存できます。

④表皮組織を氷上で解凍します。

⑤表皮組織を10cmディッシュに移し、実験用メスで細切します。

⑥細切した表皮組織を新しい1.5mLマイクロチューブに移します。

⑦PureLink®RNA Mini Kit(サーモフィッシャー)を用いてRNAを抽出します。

⑧チューブに1組織あたり200μLのLysis buffer
(1/100量の2-メルカプトエタノールを事前に添加しておく)を添加します。

⑨BioMasher®II(ニッピ)でホモジナイズします。

⑩21Gの針をつけたシリンジに10回通します。

⑪12,000 × g、室温で2分間遠心します。

⑫上清を新しい1.5mLチューブに移し、等量の70%エタノールを添加し、
ボルテックス等で良く混合します。

⑬700μLの上記混合液をスピンカラムにアプライします。(A)

⑭12,000 × g、室温で15秒間遠心し、ろ液を捨てます。

⑮必要に応じて、Aを繰り返します。

⑯350μLのWash buffer Iを添加します。

⑰濾液を捨て、スピンカラムを新しい1.5mLチューブに移します。

⑱80μLのPureLink®DNase mixtureを添加します。

⑲室温で15分間インキュベートします。

⑳350μLのWash buffer Iを添加します。

㉑12,000 × g、室温で15秒間遠心し、ろ液を捨てます。

㉒500μLのWash buffer IIを添加します。

㉓12,000 × g、室温で15秒間遠心し、ろ液を捨てます。

㉔500μLのWash buffer IIを添加します。

㉕12,000 × g、室温で15秒間遠心し、ろ液を捨てます。

㉖12,000 × g、室温で1分間遠心し、ろ液を捨てます。

㉗スピンカラムを新しい1.5mLマイクロチューブに移します。

㉘50μLのRNase-free waterをスピンカラムの中央に添加します。

㉙室温で1分間インキュベートします。

㉚12,000 × g、室温で2分間遠心し、RNA抽出液とします。

㉛Quant-iT™ RNA Assay Kit(サーモフィッシャー)等を用いてRNAを定量します。

逆転写・qPCR

①100ngのRNA溶液をPCRチューブに移します。

②SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit(サーモフィッシャー)を用いて
逆転写反応を行います。

温度	時間
25℃	10分
42℃	60分
85℃	5分

③反応産物に注射用水を添加して希釈し、cDNA溶液とします。

④必要に応じてcDNA溶液を分注します。

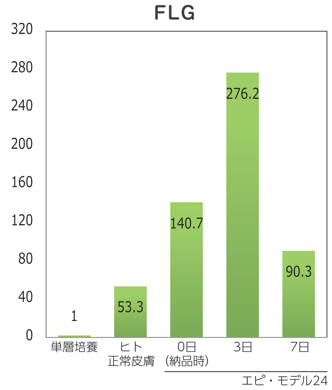
⑤5〜10ng相当のcDNAとPower SYBR® Green PCR Master Mix(サーモフィッシャー)を
用いてqPCR反応を行います。

<table>
<tr><th>温度</th><th>時間</th><th>サイクル数</th></tr>
<tr><td>95℃</td><td>10分</td><td>1サイクル</td></tr>
<tr><td>94℃</td><td>15秒</td><td rowspan="2">40サイクル</td></tr>
<tr><td>60℃</td><td>1分</td></tr>
</table>

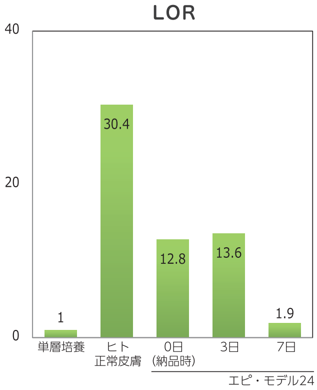
プライマーは、以下のサイトを用いて設計しました。

https://qpcr.probefinder.com/input.jsp?organism=h_sap

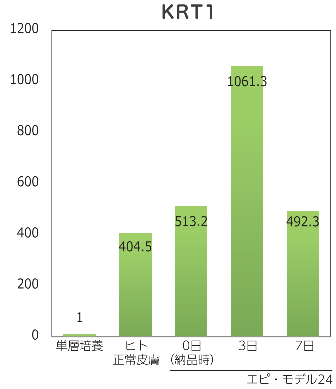
Fold of Control



分化に伴う角質の
成熟化を示している

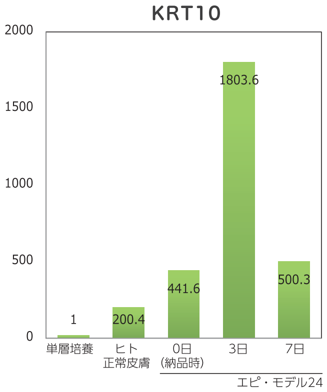


分化に伴う角質の
成熟化を示している

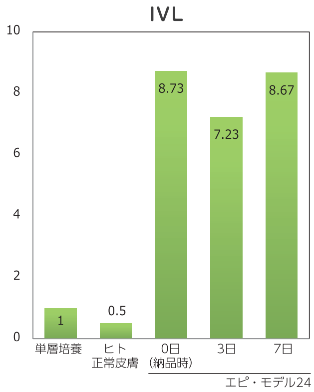


分化に伴う角質の
成熟化を示している

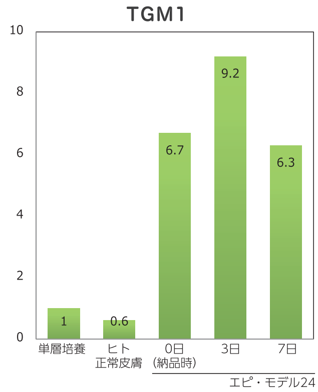
Fold of Control



分化に伴う角質の
成熟化を示している

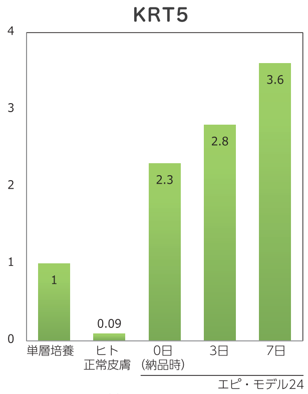


分化に伴う角質の
成熟化を示している

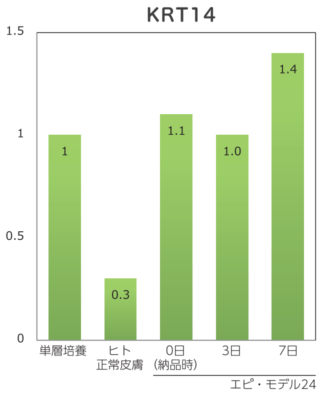


分化に伴う角質の
成熟化を示している

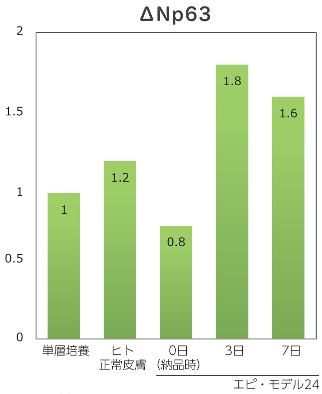
Fold of Control



培養経過に伴う
基底層の維持を示している

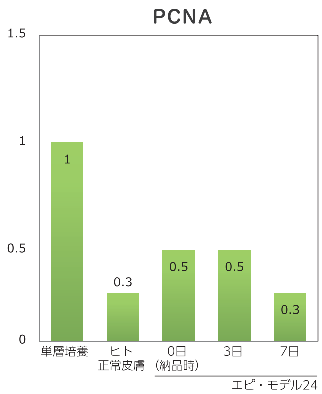


培養経過に伴う
基底層の維持を示している

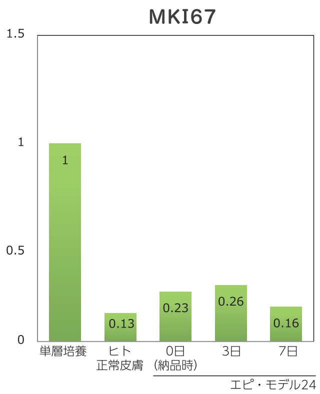


培養経過に伴う表皮幹細胞の
維持を示している

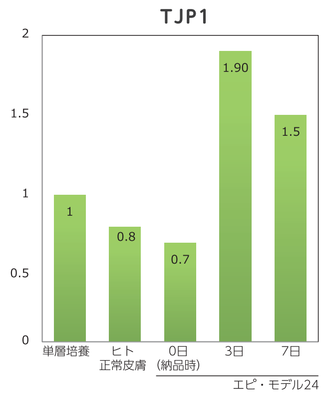
Fold of Control



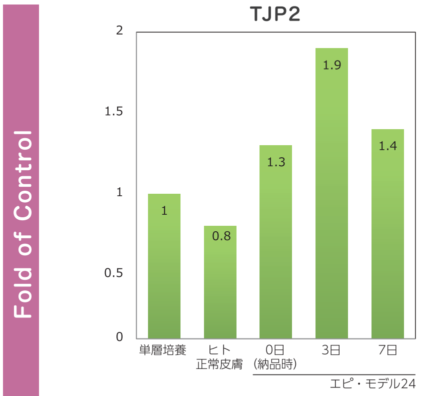
培養経過に伴う増殖細胞の
減少を示している



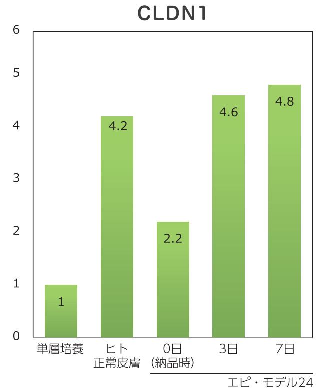
培養経過に伴う増殖細胞の
減少を示している



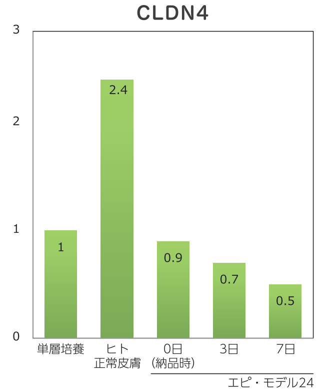
培養経過に伴うタイトジャンクションの
発達を示している



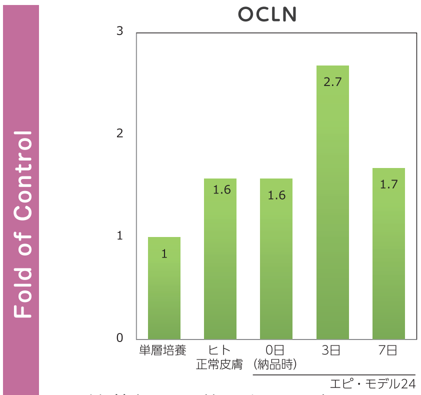
培養経過に伴うタイトジャンクションの発達を示している



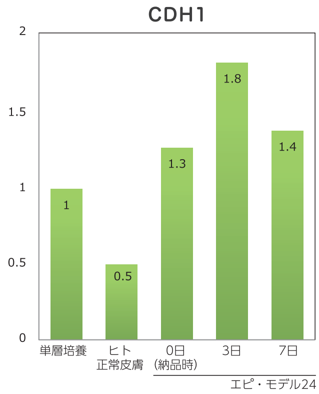
培養経過に伴うタイトジャンクションの発達を示している



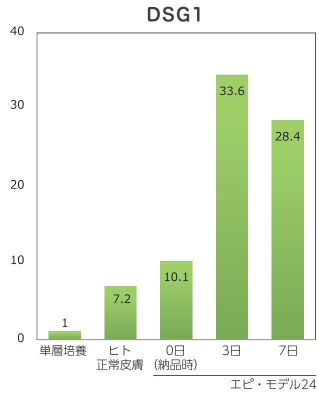
培養経過に伴うタイトジャンクションの発達を示している



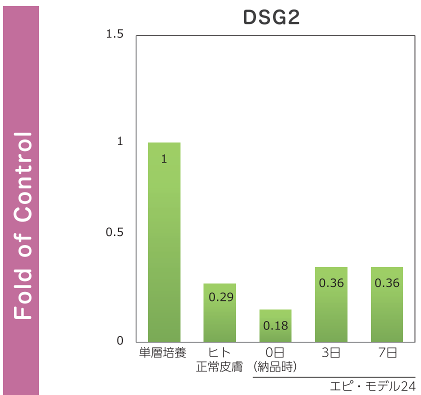
培養経過に伴うタイトジャンクションの発達を示している



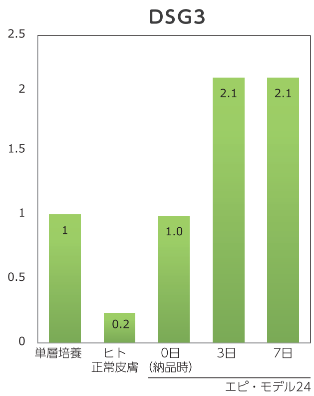
培養経過に伴う接着結合の発達を示している



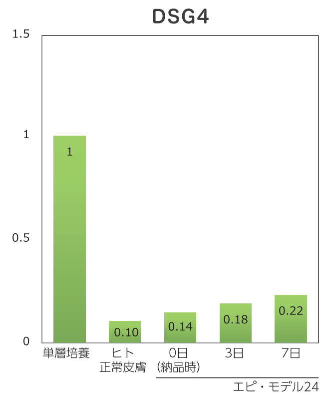
培養経過に伴うデスモソームの発達を示している



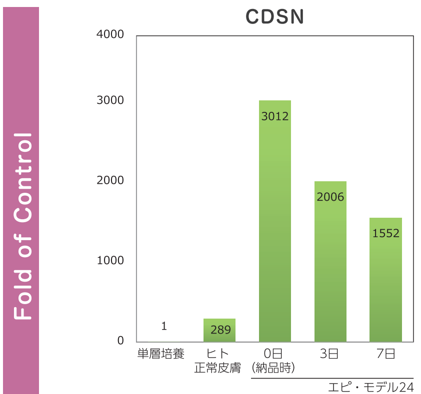
培養経過に伴うデスモソームの発達を示している



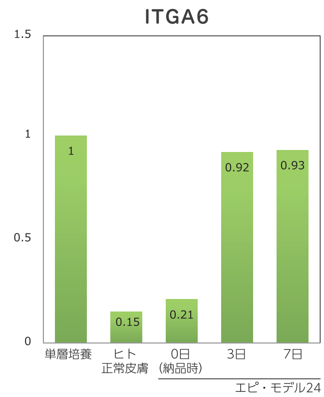
培養経過に伴うデスモソームの発達を示している



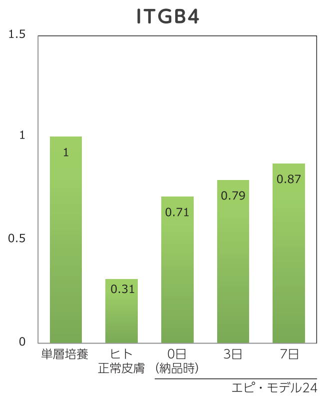
培養経過に伴うデスモソームの発達を示している



培養経過に伴うデスモソームの発達を示している

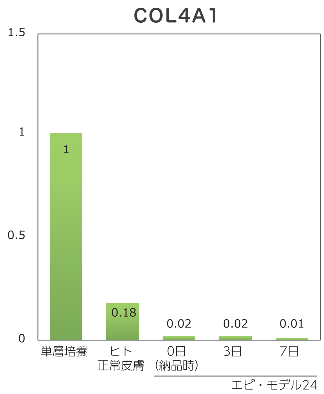


培養経過に伴う基底層の維持を示している

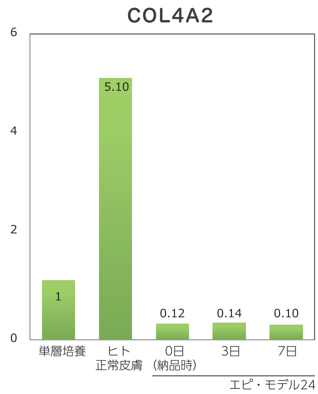


培養経過に伴う基底層の維持を示している

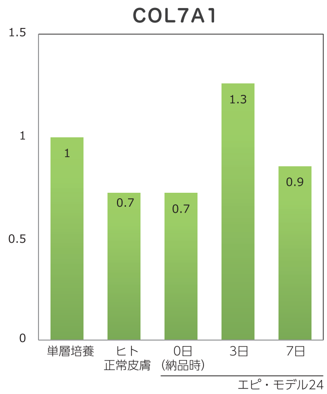
Fold of Control



コラーゲン4A1の発現が
認められた

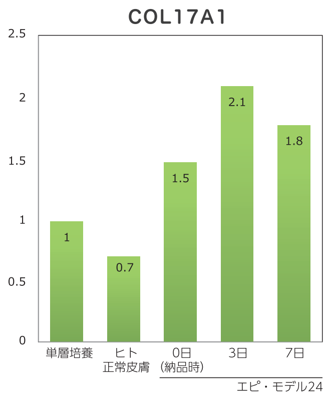


コラーゲン4A2の発現が
認められた

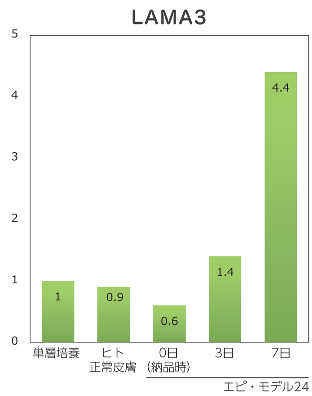


コラーゲン7A1の発現が
認められた

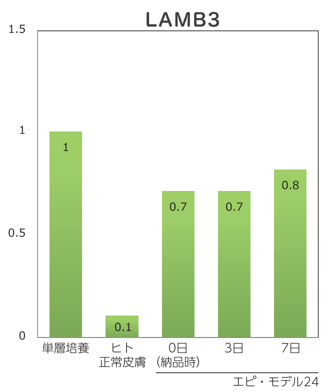
Fold of Control



コラーゲン17A1の発現が
認められた

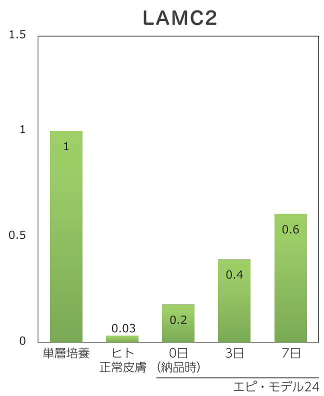


培養経過に伴い、Laminin-332を
構成するLAMA3の発現が認められた

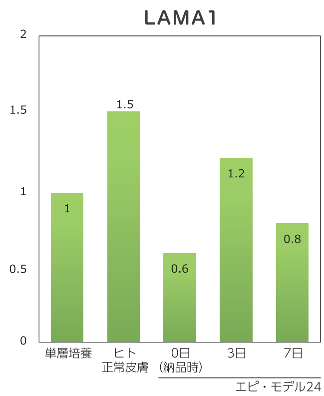


培養経過に伴い、Laminin-332を
構成するLAMB3の発現が認められた

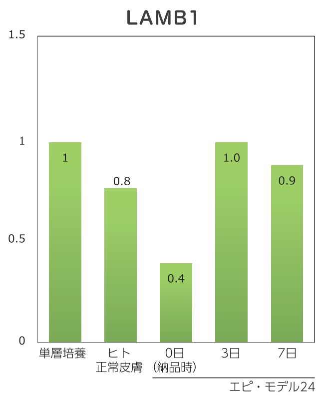
Fold of Control



培養経過に伴い、Laminin-332を
構成するLAMC2の発現が認められた

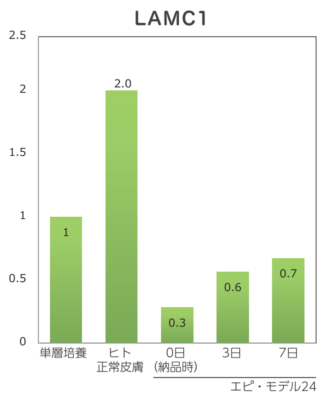


培養経過に伴い、Laminin-111を
構成するLAMA1の発現が認められた



培養経過に伴い、Laminin-111を
構成するLAMB1の発現が認められた

Fold of Control



培養経過に伴い、Laminin-111を
構成するLAMC1の発現が認められた

OECD TG439 収載モデル

in vitro 皮膚刺激性試験
OECD 試験ガイドライン　No.439収載

LabCyte EPI-MODEL24はOECDテストガイドライン439収載モデルです。
OECDテストガイドラインとは、化学物質の特性や安全性を評価する試験方法を国際的に共通化することを目的として収集したものです。
OECDテストガイドライン439は、ヒト表皮の生化学的・生理学的特性にきわめて類似するよう設計されたヒト表皮モデルを用いて化学物質の皮膚刺激性を評価する試験法です。

皮膚刺激性試験セット
（製品コード：401151）

試験の概要

①前培養
②被験物質の暴露・洗浄
③42時間培養
④生細胞率の測定
⑤試験成立条件の確認
❶生細胞数：0.7≦陰性対照の吸光度測定値平均≦2.5
❷陽性対照：5%SLS（陽性対照）の生細胞率≦40%
❸陰性対照・陽性対照を含む各被験物質の吸光度値のSD≦18%

刺激性判定
生細胞率≦50%　刺激性
生細胞率>50%　非刺激性

詳しい試験方法は、弊社ホームページのビデオをご参照ください。
http://www.jpte.co.jp/business/LabCyte/EPI_video.html

in vitro / *in vivo* 皮膚刺激性予測の相関

		in vivo classification		
		irritant	Non-irritant	Total
in vitro prediction	irritant	16	11	27
	Non-irritant	1	26	27
	Total	17	37	54
Sensitivity(%)		94.1		
Specificity(%)		70.3		
Accuracy(%)		77.8		

OECD
TG431
収載モデル

in vitro 皮膚腐食性試験
OECD 試験ガイドライン　No.431収載

LabCyte EPI-MODEL 24 は OECD テストガイドライン 431 収載モデルです。
EPI-MODEL 24 を用いて化学物質の皮膚腐食性を評価することができます。

試験の概要

①前培養

②被験物質の適用（3 分および 60 分）・洗浄

③生細胞率の測定

④試験成立条件の確認

❶生細胞数：0.7≦ 陰性対照の吸光度測定値平均 ≦　2.5

❷陽性対照：8mol/L KOH の生細胞率　≦ 15%

❸陰性対照・陽性対照を含む各被験物質を適用したウェル間の生細胞率の差 ≦ 30%

ステップ1（腐食性の判定）	
3分適用時の生存率：＜50%	腐食性
3分適用時の生存率：≧50%　且つ 60分適用時の生存率：＜15%	腐食性
3分適用時の生存率：≧50%　且つ 60分適用時の生存率：≧15%	非腐食性
ステップ2（腐食性の区分）	
3分適用時の生存率：＜15%	1A
3分適用時の生存率： ≧15%	1B/C

in vitro/*in vivo*皮膚腐食性予測の相関

		in vivo classification			
		1A	1B/C	Non-corrosive	Total
in vitro prediction	1A	31	27	3	61
	1B/C	5	63	21	89
	Non-corrosive	0	0	87	87
	Total	36	90	111	237

Correct Classifications:	
1A correctly classified	86.1%
1B-and-/1C correctly classified	70.0%
NC correctly classified	78.4%
Overall Accuracy	76.4%

OECD TG442D 収載モデル

in vitro 皮膚感作性試験
OECD 試験ガイドライン　No.442D収載

Epidermal Sensitization Assay（EpiSensA）は花王株式会社がEPI-MODELを使用して開発した *in vitro* 皮膚感作性試験です。本試験法はOECD 試験ガイドライン No.442D に収載されています。EpiSensA は皮膚感作性の有害性発現機序（AOP）のKey Event 2 である表皮角化細胞の活性化を検出し、4つのマーカー遺伝子の発現変動を指標に感作性の判定を行います。

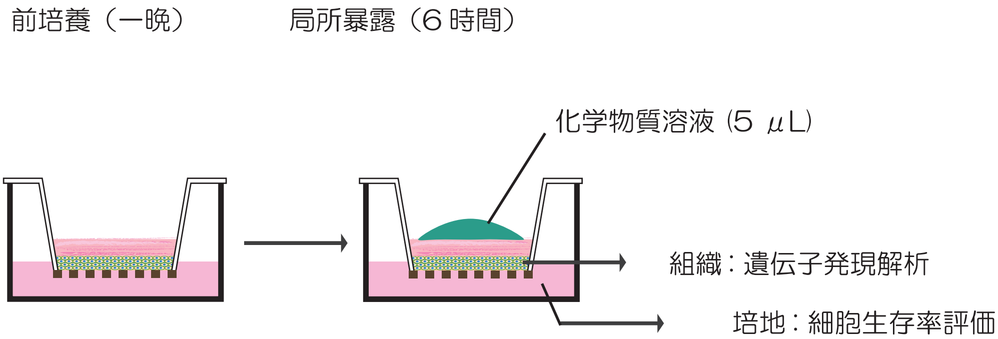
EpiSensA の危害予測性

Methods	Local Lymph Node Assay (LLNA)	Human data
No. of chemicals	136	80
Sensitivity	88.1%	97.9%
Specificity	65.7%	50.0%
Accuracy	82.4%	78.8%

出典：Mizumachi *et al.*, J. Appl. Toxicol., 2024.（一部改変）

皮膚感作性の AOP

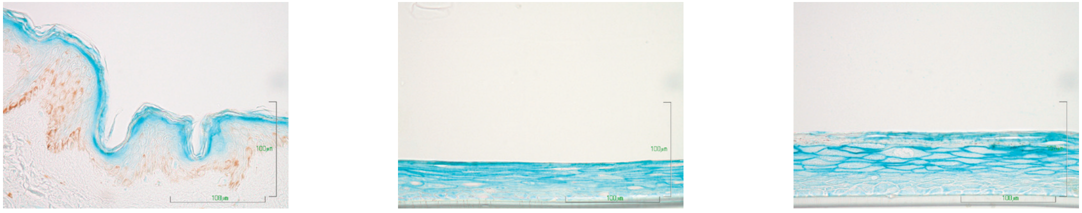
EpiSensA の試験方法概要



エピ・モデル 6Dを継続培養し、各タンパク質の局在を確認しています。

ヒト皮膚	EPI-MODEL24 6D	
	0日（納品時）	3日

Transglutaminase



有棘層から角質層に発現が認められた。

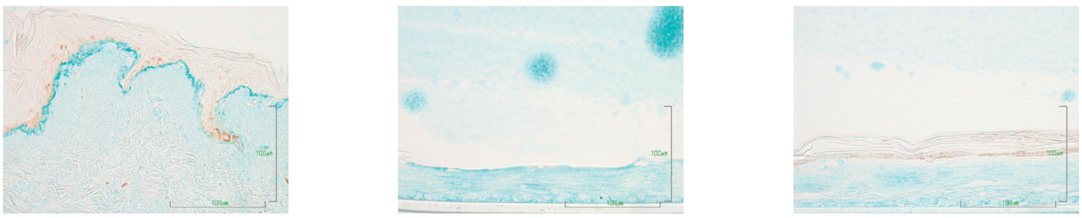
Laminin-332

培養経過とともに基底層から有棘層に発現が認められた。

Collagen Ⅳ

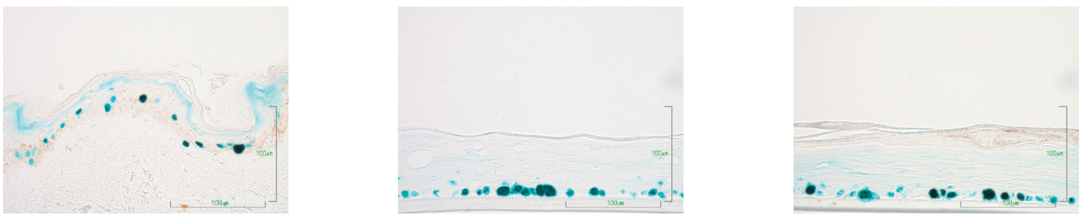
基底層に発現が認められた。

Collagen Ⅶ



基底層に発現が認められた。

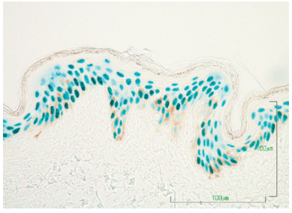
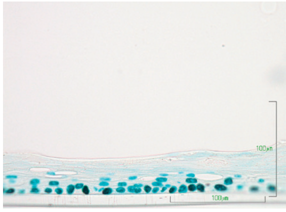
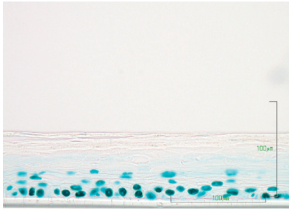
Ki-67



Ki-67は増殖マーカーとして使用されている。
ヒト皮膚同様、基底層の細胞で発現が認められた。

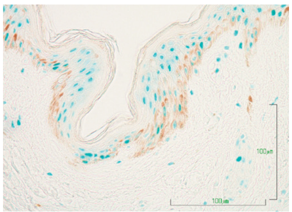
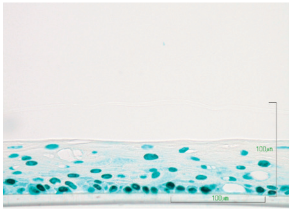
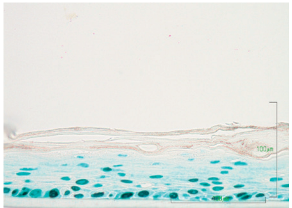
ヒト皮膚	EPI-MODEL24 6D	
	0日（納品時）	3日

p63

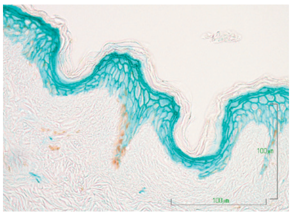
p63は表皮幹細胞のマーカーとして使用されている。
ヒト皮膚同様、基底層と一部の有棘層の細胞で発現が認められた。

PCNA

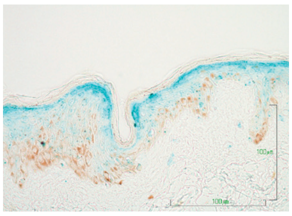
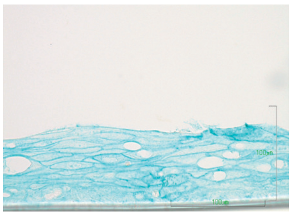
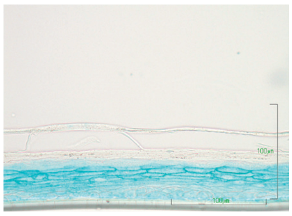
増殖マーカー。
ヒト皮膚同様、基底層の細胞で発現が認められた。

Claudin-1



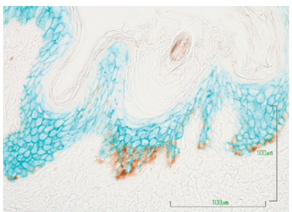
タイトジャンクションマーカー。
ヒト皮膚と同様に基底層から顆粒層に発現が認められた。

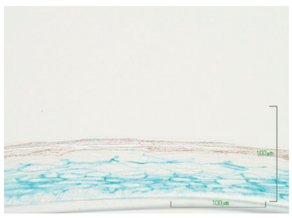
Claudin-4

基底層から顆粒層に発現が認められた。

E-cadherin

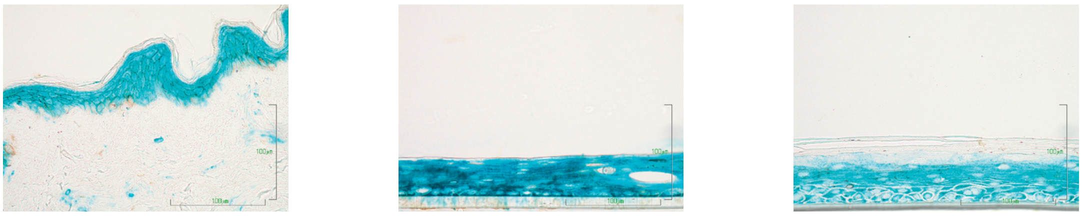




接着結合マーカー。
ヒト皮膚と同様に基底層から顆粒層に発現が認められた。

ヒト皮膚	EPI-MODEL24 6D	
	0日(納品時)	3日

Desmoglein 1

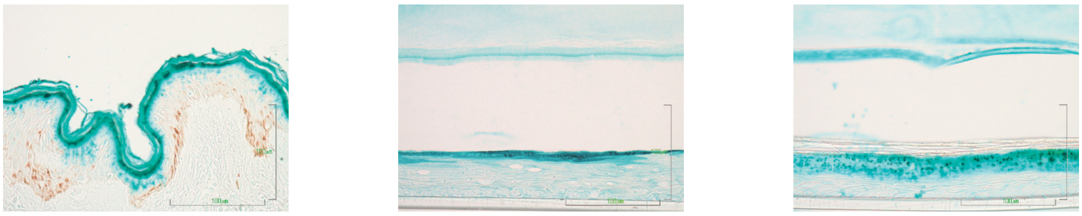


デスモソームマーカー。
ヒト皮膚と同様に基底層から顆粒層に発現が認められた。

Filaggrin

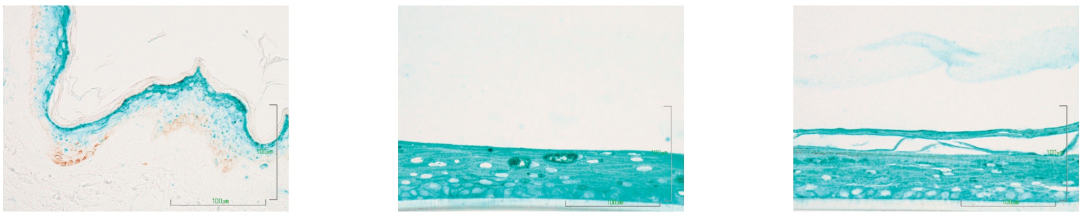
顆粒層に発現が認められた。

Loriclin



ヒト皮膚と同様、課粒層に発現が認められた。

Involucrin



分化した表皮層マーカー。
ヒト皮膚とは異なり、基底層から顆粒層に発現が認められた。

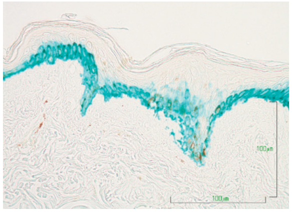
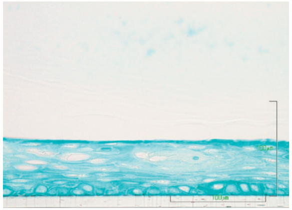
Keratin 1

分化した表皮層マーカー。
ヒト皮膚と同様に有棘層から角質層に発現が認められた。

EPI-MODEL 6D ヒト3次元培養表皮

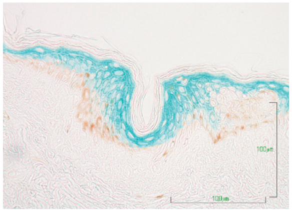
ヒト皮膚	EPI-MODEL24 6D	
	0日（納品時）	3日

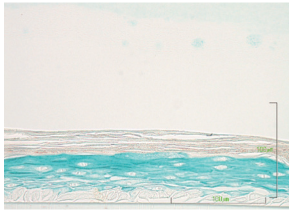
Keratin 5


基底層マーカー。
ヒト皮膚と同様に基底層に発現が認められた。

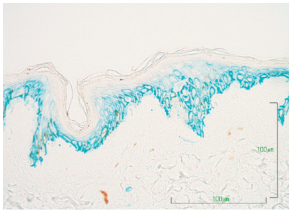
Keratin 10





分化した表皮層マーカー。
ヒト皮膚と同様に有棘層から顆粒層に発現が認められた。

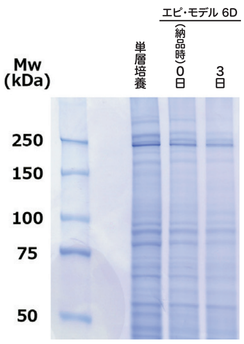
Keratin 14



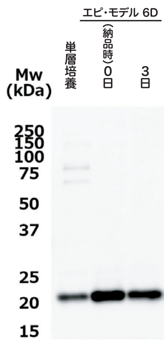
基底層～有棘層マーカー。
ヒト皮膚と同様に基底層から有棘層に発現が認められた。

エピ・モデル6Dを継続培養し、各タンパク質の発現をイムノブロッティングで確認しています。

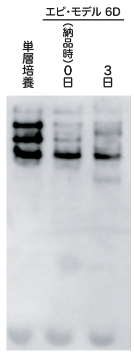
CBB染色



Claudin-1

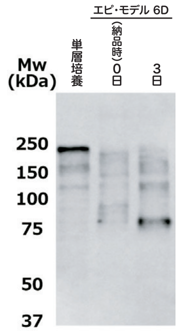


タイトジャンクションの
存在を示している



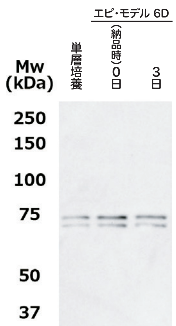
Native-PAGE

Collagen Ⅳ



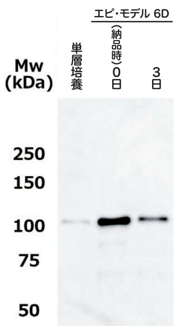
コラーゲンIVの
存在を示している

Collagen XⅦ



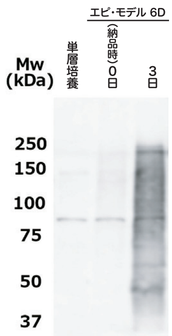
コラーゲンXVIIの
存在を示している

E-Cadherin



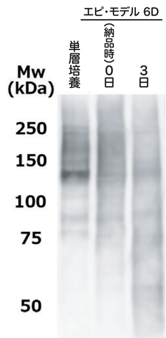
接着結合の
存在を示している

Filaggrin



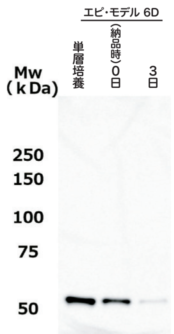
分化に伴う角質の
成熟化を示している

Involucrin



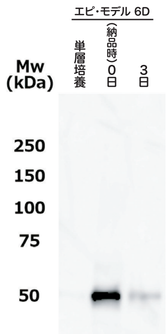
分化に伴う角質の
成熟化を示している

Keratin 5



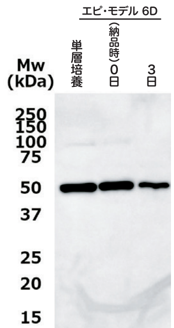
培養経過に伴い、
基底層が維持されている

Keratin 10



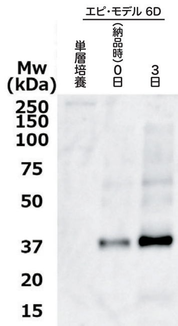
三次元培養による、
表皮層の分化を示している

Keratin 14



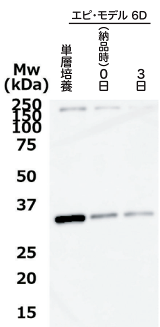
培養経過に伴い、
基底層が維持されている

Loriclin



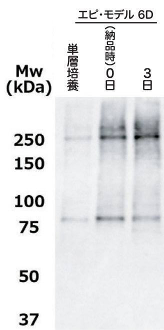
三次元培養による、
表皮層の分化を示している

PCNA



培養経過に伴い、
増殖細胞が減少している

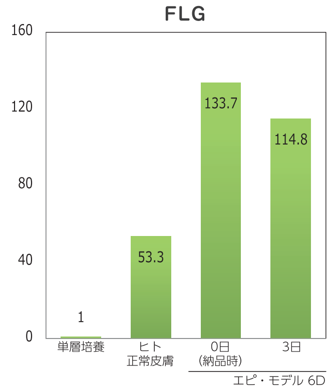
Transglutaminase



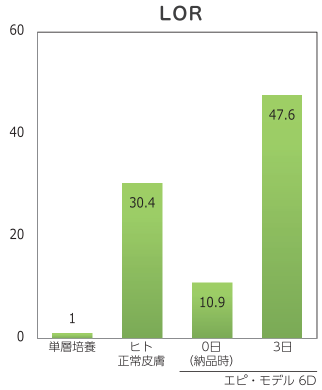
分化に伴う角質の
成熟化を示している

エピ・モデル6Dを継続培養し、各遺伝子の発現についてqRT-PCRで確認しています。

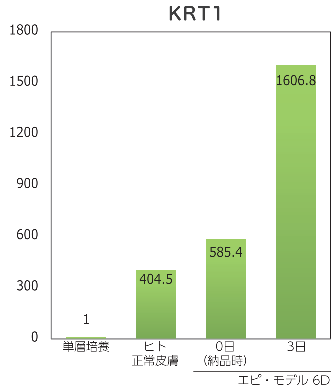
Fold of Control



分化に伴う角質の成熟化を示している

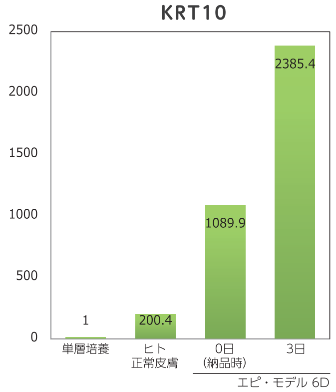


分化に伴う角質の成熟化を示している

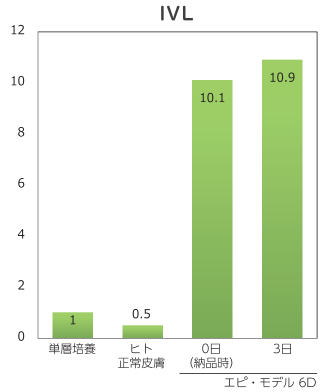


分化に伴う角質の成熟化を示している

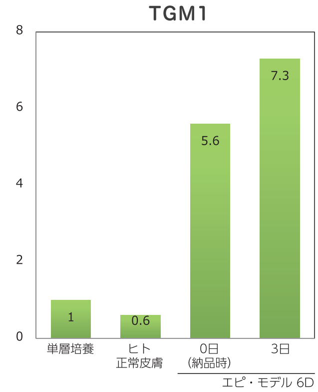
Fold of Control



分化に伴う角質の成熟化を示している

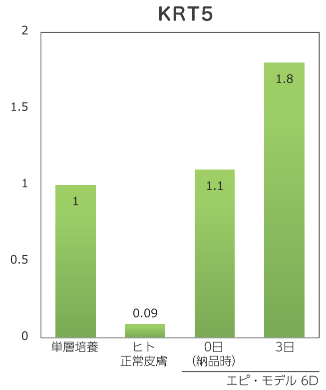


分化に伴う角質の成熟化を示している

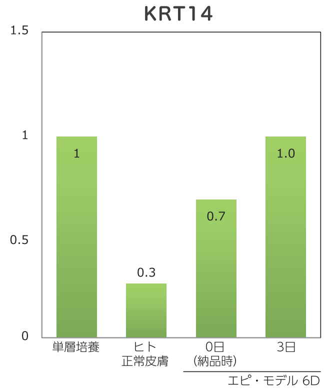


分化に伴う角質の成熟化を示している

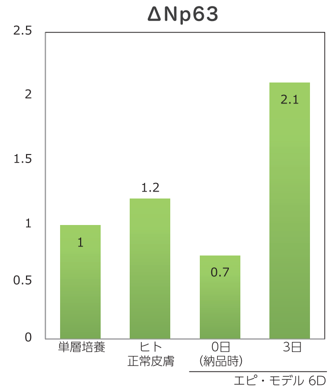
Fold of Control



培養経過に伴う基底層の維持を示している

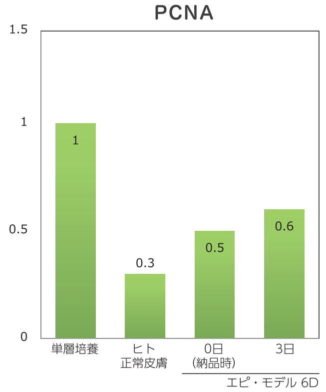


培養経過に伴う基底層の維持を示している

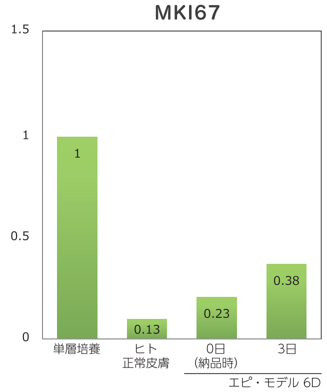


培養経過に伴う表皮幹細胞の維持を示している

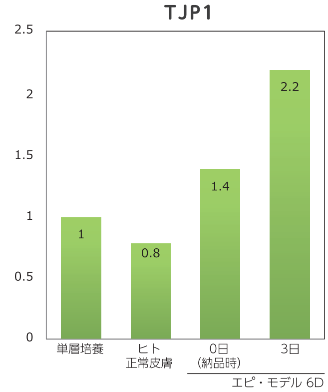
Fold of Control



培養経過に伴う増殖細胞の増加を示している

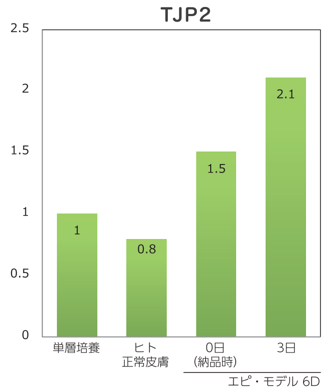


培養経過に伴う増殖細胞の増加を示している

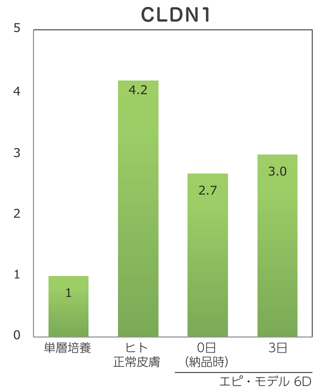


培養経過に伴うタイトジャンクションの発達を示している

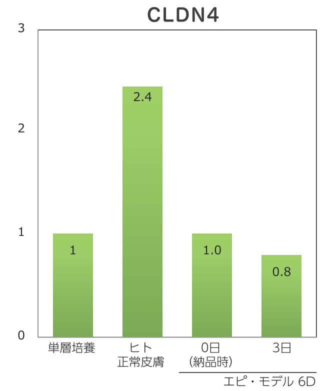
Fold of Control



培養経過に伴うタイトジャンクションの
発達を示している

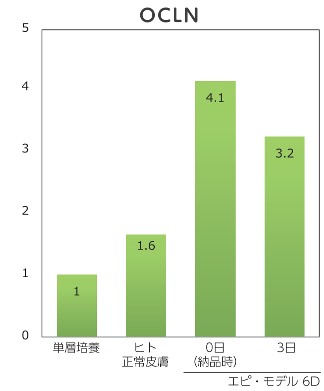


培養経過に伴うタイトジャンクションの
発達を示している

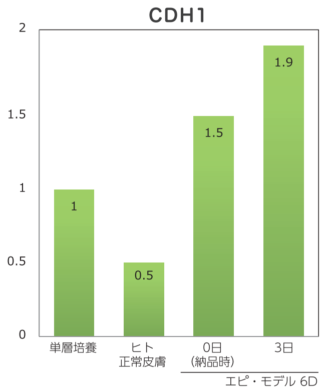


培養経過に伴うタイトジャンクションの
発達を示している

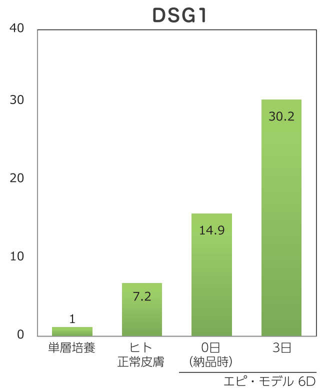
Fold of Control



培養経過に伴うタイトジャンクションの
発達を示している

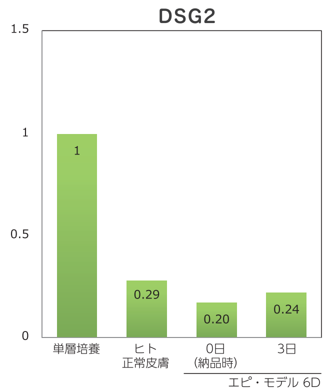


培養経過に伴う
接着結合の発達を示している

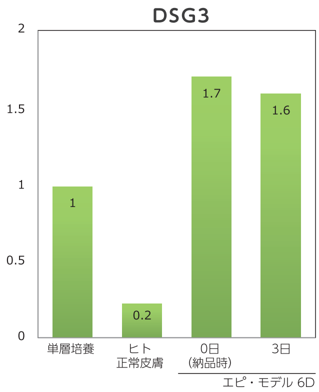


培養経過に伴う
デスモソームの発達を示している

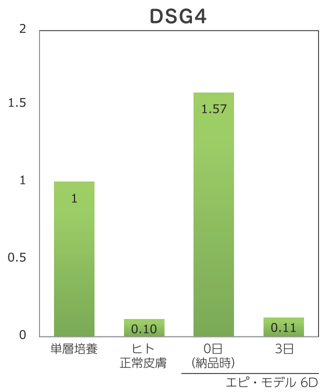
Fold of Control



培養経過に伴う
デスモソームの発達を示している

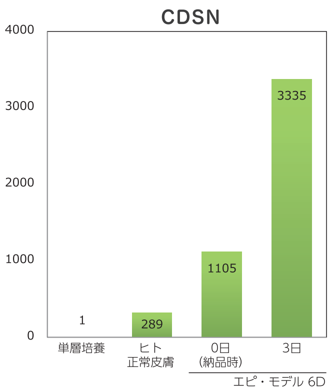


培養経過に伴う
デスモソームの発達を示している

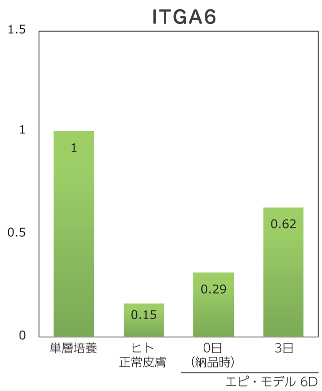


培養経過に伴う
デスモソームの発達を示している

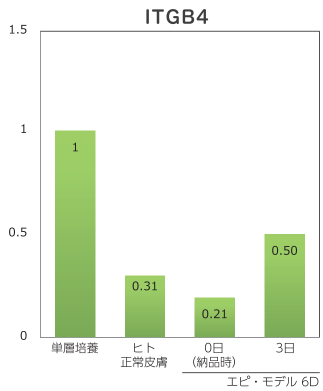
Fold of Control



培養経過に伴う
デスモソームの発達を示している

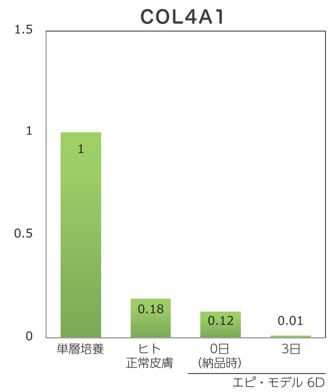


培養経過に伴う
基底層の維持を示している

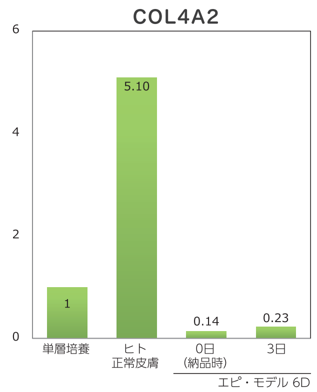


培養経過に伴う
基底層の維持を示している

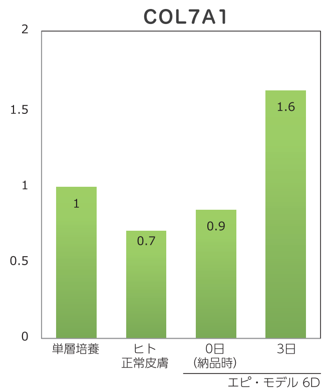
Fold of Control



コラーゲン4A1の
発現が認められた

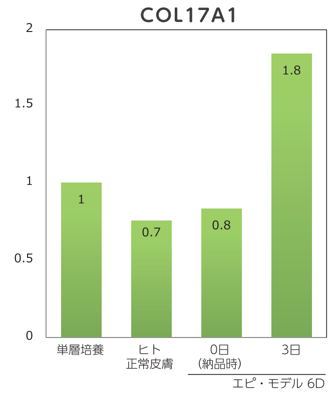


コラーゲン4A2の
発現が認められた

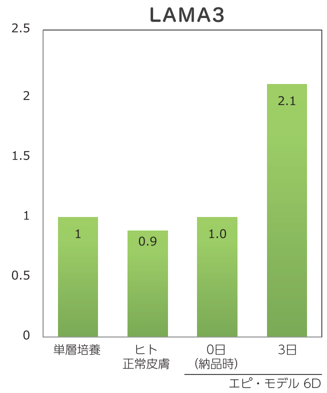


コラーゲン7A1の
発現が認められた

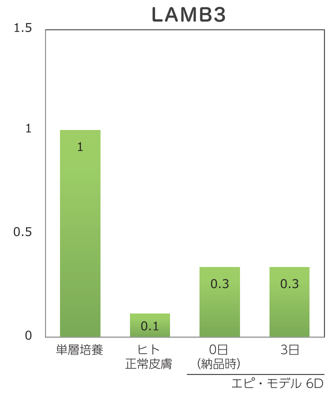
Fold of Control



コラーゲン17A1の
発現が認められた

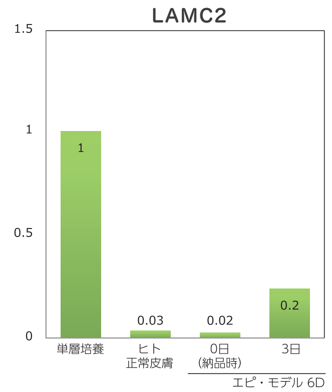


培養経過に伴い、Laminin-332を
構成するLAMA3の発現が認められた

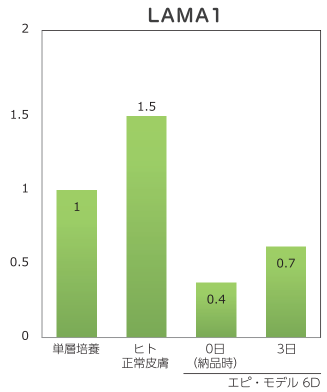


培養経過に伴い、Laminin-332を
構成するLAMB3の発現が認められた

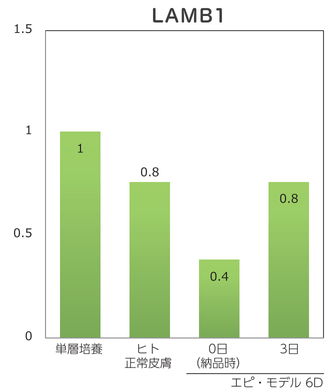
Fold of Control



培養経過に伴い、Laminin-332を
構成するLAMC2の発現が認められた

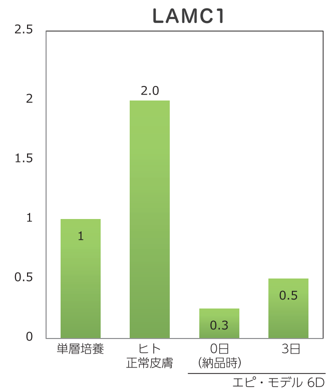


培養経過に伴いLaminin-111を
構成するLAMA1の発現が認められた



培養経過に伴いLaminin-111を
構成するLAMB1の発現が認められた

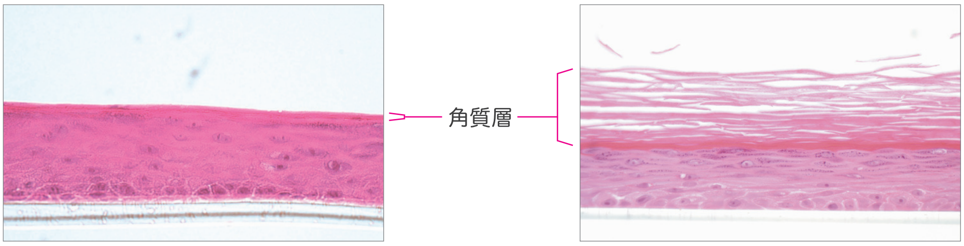
Fold of Control



培養経過に伴い、Laminin-111を
構成するLAMC1の発現が認められた

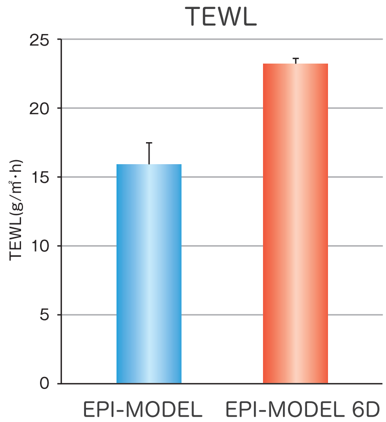
弱刺激性試験

組織切片像

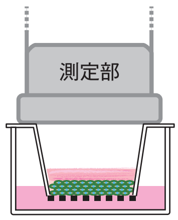


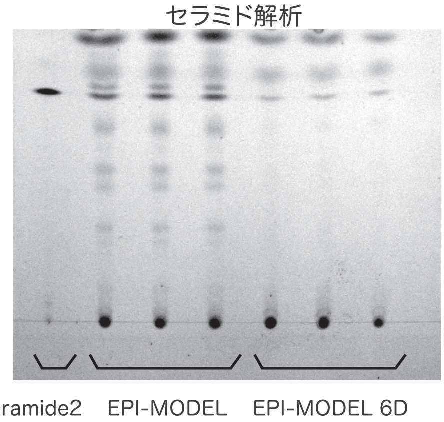
LabCyte EPI-MODEL 6D　　LabCyte EPI-MODEL

バリア機能評価



水分蒸散量計





データ提供:日本コルマー株式会社様
(日本化粧品技術者会誌 2013,Vol.47,No.1)

界面活性剤を用いた検討・結果

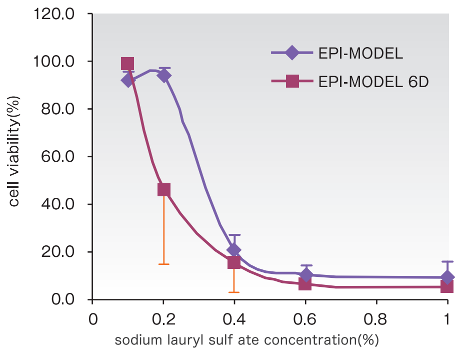
被検物質:Sodium lauryl sulfate(SLS)　Polyoxyethylene(10)octylphenyl ethel(Triton X-100)
方　　法:15分暴露、42時間後培養

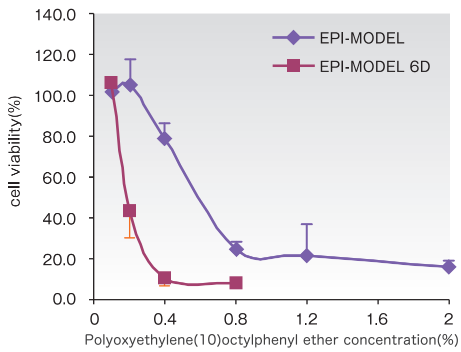
SLS

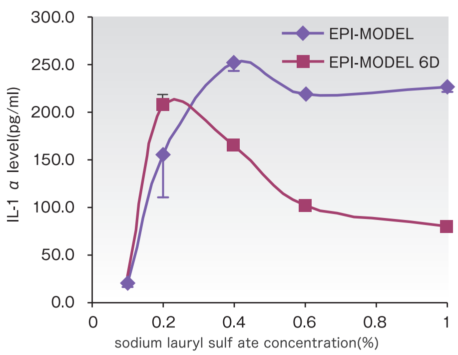
IC50　EPI-MODEL:0.32%
　　　EPI-MODEL 6D:0.19%

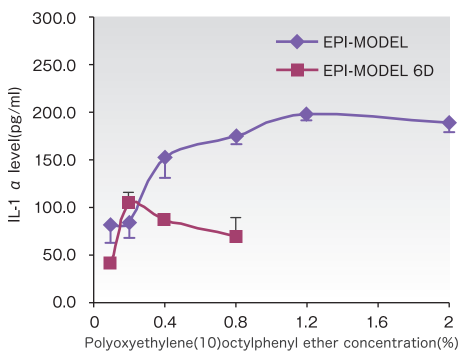
Triton X-100

IC50　EPI-MODEL:0.61%
　　　EPI-MODEL 6D:0.19%









データ提供:日本コルマー株式会社様
(日本化粧品技術者会誌 2013,Vol.47,No.1)

弱刺激性試験

化粧品製剤を用いた検討・結果

■ 被験物質

被験物質	24hrs閉塞ヒトパッチテスト刺激指数
ローション①	10
ローション②	0
ローション③	1.3
エッセンス①	3.8
エッセンス②	1.3
エッセンス③	0
クリーム①(w/o)	0
クリーム②(o/w)	0
クリーム③(w/o)	2.5

ローション

層	原料	配合量(%)
A	BG	9
	PEG-8	3
	PEG-60 水添ヒマシ油	0.5
	※(メチルパラベン)	(0.2)
	(フェノキシエタノール)	
	(ペンチレングリコール)	
	(エチルヘキシルグリセリン)	
	クエン酸	0.01
	クエン酸 Na	0.09
	精製水	残
		100

※:フェノキシエタノール配合時のみ配合

クリーム(o/w)

層	原料	配合量(%)
A	イソステアリン酸ポリグリセリル-2	2
	パルミチン酸デキストリン	1
	ワセリン	2
	ミネラルオイル	40
	ミツロウ	2
	(エチルヘキシルグリセリン)	
B	グリセリン	10
	グリタミン酸 Na	1
	※(メチルパラベン)	(0.2)
	(フェノキシエタノール)	
	(ペンチレングリコール)	
	精製水	残
		100

クリーム(w/o)

層	原料	配合量(%)
A	ミリスチン酸ポリグリセリル-10	2.1
	水添レシチン	0.6
	ベヘニルアルコール	1.6
	ステアリン酸	0.5
	エチルヘキサン酸セチル	6.6
	ミネラルオイル	2
	ジメチコン	0.2
	グリセリン	5
	※(メチルパラベン)	(0.2)
	(フェノキシエタノール)	
	(ペンチレングリコール)	
	(エチルヘキシルグリセリン)	
B	精製水	残
C	カルボマー	0.1
	精製水	10
D	水酸化 Na	0.04
	精製水	4.96
		100

■ 暴露時間の変更

被験物質:【材料】ヒトパッチテスト指数が既知の処方
方　　法:24時間暴露プロトコール

被験物質	15min暴露-42hrs post incubation-MTT				24hrs暴露-MTT			
	EPI-MODEL		EPI-MODEL 6D		EPI-MODEL		EPI-MODEL 6D	
	Cell viability(%)		Cell viability(%)		Cell viability(%)		Cell viability(%)	
	Mean±SD	Judge	Mean±SD	Judge	Mean±SD	Judge	Mean±SD	Judge
ローション①	99.8±9.8	NI	85.2±15.1	NI	12.5±2.0	I	5.8±0.5	I
ローション②	101.9±9.7	NI	89.8±11.3	NI	107.4±3.6	NI	34.2±24.7	I
ローション③	98.5±4.6	NI	88.5±15.7	NI	125.5±13.4	NI	78.2±11.6	NI
エッセンス①	103.2±6.9	NI	105.5±7.1	NI	40.0±34.0	I	5.5±3.8	I
エッセンス②	105.0±8.7	NI	93.9±27.5	NI	36.3±16.3	I	17.4±8.5	I
エッセンス③	103.3±1.8	NI	96.0±8.3	NI	107.6±12.0	NI	104.6±9.1	NI
クリーム①(w/o)	95.1±16.6	NI	100.9±0.7	NI	108.9±13.0	NI	86.3±29.0	NI
クリーム②(o/w)	102.7±7.4	NI	98.6±7.4	NI	66.4±33.3	NI	17.3±2.9	I
クリーム③(w/o)	106.5±6.5	NI	99.1±0.5	NI	121.4±7.4	NI	63.1±15.4	NI

刺激性判定
生細胞率≦50%刺激性
生細胞率>50%非刺激性

データ提供:日本コルマー株式会社様
（日本化粧品技術者会誌 2013,Vol.47,No.1）

■ 各種防腐剤配合処方への応用

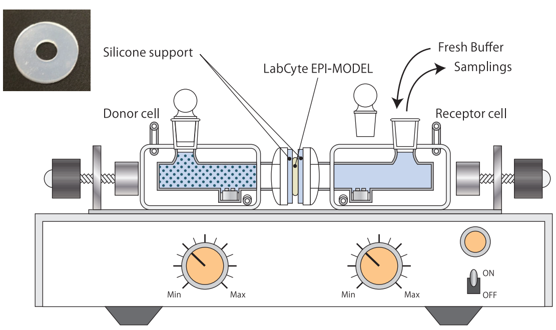
被験物質:【材料】試作品(各種防腐剤配合処方)ヒトパッチテスト未実施
方　　法:24時間暴露プロトコール

化粧品原料	配合量&剤形	24hrs暴露-MTT			
		EPI-MODEL		EPI-MODEL 6D	
		Cell viability(%)		Cell viability(%)	
		Mean±SD	Judge	Mean±SD	Judge
フェノキシエタノール (全ての剤形にメチルパラベン0.2%も配合)	0.5%配合ローション	113.6±27.8	NI	74.7±35.6	NI
	0.1%配合ローション	122.5±3.7	NI	119.1±16.3	NI
	0.5%配合クリーム(o/w)	78.6±7.7	NI	19.6±5.6	I
	0.1%配合クリーム(o/w)	115.0±10.0	NI	52.0±18.3	NI
	0.5%配合クリーム(w/o)	74.3±24.7	NI	64.8±23.4	NI
	0.1%配合クリーム(w/o)	107.7±13.3	NI	107.5±11.8	NI
ペンチレングリコール	5%配合ローション	111.4±16.1	NI	33.9±6.9	I
	2%配合ローション	108.2±13.9	NI	107.0±3.5	NI
	5%配合クリーム(o/w)	113.8±14.6	NI	49.5±4.0	I
	2%配合クリーム(o/w)	98.7±10.1	NI	113.9±10.9	NI
	5%配合クリーム(w/o)	104.1±16.4	NI	112.5±4.6	NI
	2%配合クリーム(w/o)	97.0±11.7	NI	107.0±4.2	NI
エチルヘキシルグリセリン	0.1%配合ローション	102.5±3.7	NI	55.1±4.6	NI
	0.02%配合ローション	102.5±8.6	NI	109.1±6.2	NI
	0.1%配合クリーム(o/w)	107.8±4.7	NI	107.2±10.3	NI
	0.02%配合クリーム(o/w)	101.0±5.3	NI	108.6±5.1	NI
	0.1%配合クリーム(w/o)	92.2±2.8	NI	94.4±2.3	NI
	0.02%配合クリーム(w/o)	94.2±6.2	NI	92.6±4.7	NI

透過性試験

■ LabCyte EPI-MODELでのin vitro皮膚透過性試験

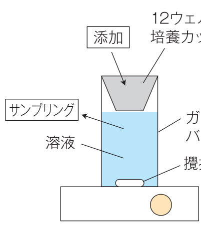
エピ・モデルにシリコーンサポートを利用し水平型拡散セルにセットすると、透過性試験を実施いただけます。

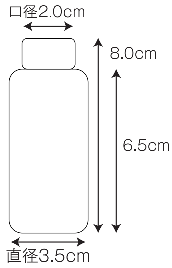


情報提供:九州工業大学大学院 情報工学研究院
引間 知広 先生　Biol. Pharm. Bull. 2012,Vol.35,362

簡易経皮吸収測定法

培養カップをガラスバイアルにセットするだけで、
簡単に経皮吸収測定を実施いただけます。



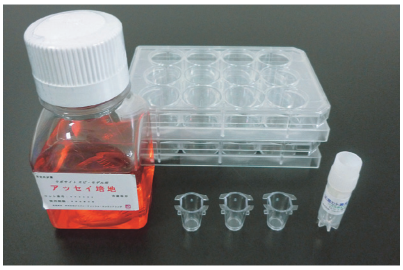


ガラスバイアル

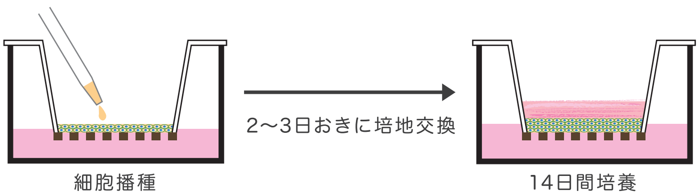
12ウェル培養カップで
ご使用いただけるサイズです。

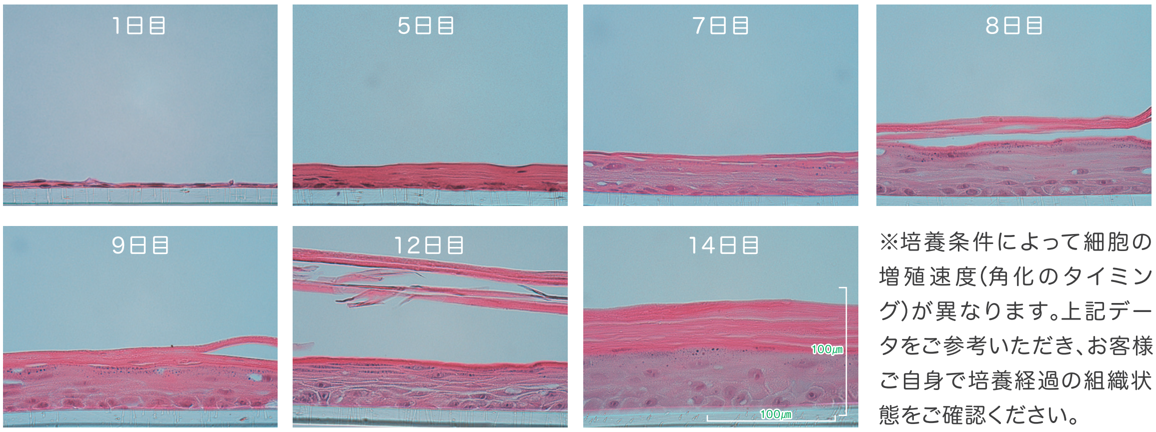
情報提供:神戸学院大学 薬学部　福島 昭二 先生

表皮細胞を培養カップに播種し、培地交換を続けるだけで簡便にヒト表皮モデルが作製できます。



EPI-KIT（ヒト表皮モデル作製キット）
［製品コード：401810］

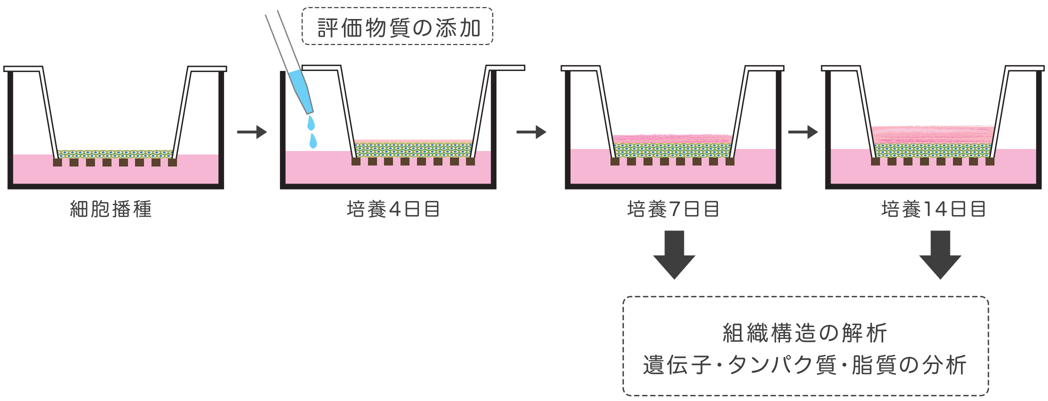




※培養条件によって細胞の増殖速度(角化のタイミング)が異なります。上記データをご参考いただき、お客様ご自身で培養経過の組織状態をご確認ください。

アプリケーション例

■目的のタイミングで物質を添加、またはモデルを解析することができます。



LabCyte EPI-KIT を用いた特定遺伝子をノックダウンした表皮モデルの作製【検討例】

はじめに

このご案内は、論文情報※を元にLabCyte EPI-KITを用いて特定の遺伝子（フィラグリン）をノックダウンする方法をご紹介するものです。本検討をご参考に、お客様が標的とする遺伝子をノックダウンした表皮モデルの作製にもご活用いただけます。

■参考文献
Journal of Investigative Dermatology vol.130 2286-2294 (2010)
Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases UV sensitivity in a human skin model.
Mildner M et., al.

■準備

2本鎖RNA
RNA を受託合成しているメーカーに合成を依頼します。（本検討ではSIGMA を利用しました。）
本検討では、論文情報に基づいて以下の2本鎖RNA を準備しました。

siRNA-1（フィラグリンをターゲットとするsiRNA 1）
sence：5-GAGGUGGUCUGGGUCUGCUUCCAGA-3
antisence：5-UGGAAGCAGACCCAGACCACCUCUC-3

siRNA-2（フィラグリンをターゲットとするsiRNA 2）
sence ：5-ACAGAAAGCACAGUCAUCAUGAUAA-3
antisence：5-AUCAUGAUGACUGUGCUUUCUGUGC-3

siRNA-3（フィラグリンをターゲットとするsiRNA 3）
sence ：5-GAGGUUGUCUGGGUCUGCUUCCAGA-3
antisence：5-UGGAAGCAGACCCAGACAACCUCUC-3

ctl-siRNA（コントロール用siRNA）
sence ：5-GAGUGGGUCUGGGUCUUCCCGUAGA-3
antisence：5-UACGGGAAGACCCAGACCCACUCUC-3

Opti-MEM®
Life Technologies, Code 31985-070, 500ml

Lipofectamine®2000 Transfection Reagent
Life Technologies, Code11668-027, 0.75ml

■試験操作

以下の操作は1プレート（24ウェル）分の表皮細胞を
1つのsiRNA で処理する条件で記述しております。
少ないウェルでの処理については、液量を調整ください。

1.siRNA混合液の調製

（1）以下の組成で、無菌的に混合液を調製します。15mlチューブを使用すると良いでしょう。
siRNA混合液
5ml OPTI-MEM®
50μl Lipofectamine®2000
26μl 100μM siRNA
※ここで、siRNAを混合しないMockを必要であれば設定します。
（2）siRNA混合液を室温で30分静置します。

2.siRNA混合液と表皮細胞の混和

(1)EPI-KITの凍結表皮細胞を、製品添付のEPI-KIT取扱説明書に従い解凍します。

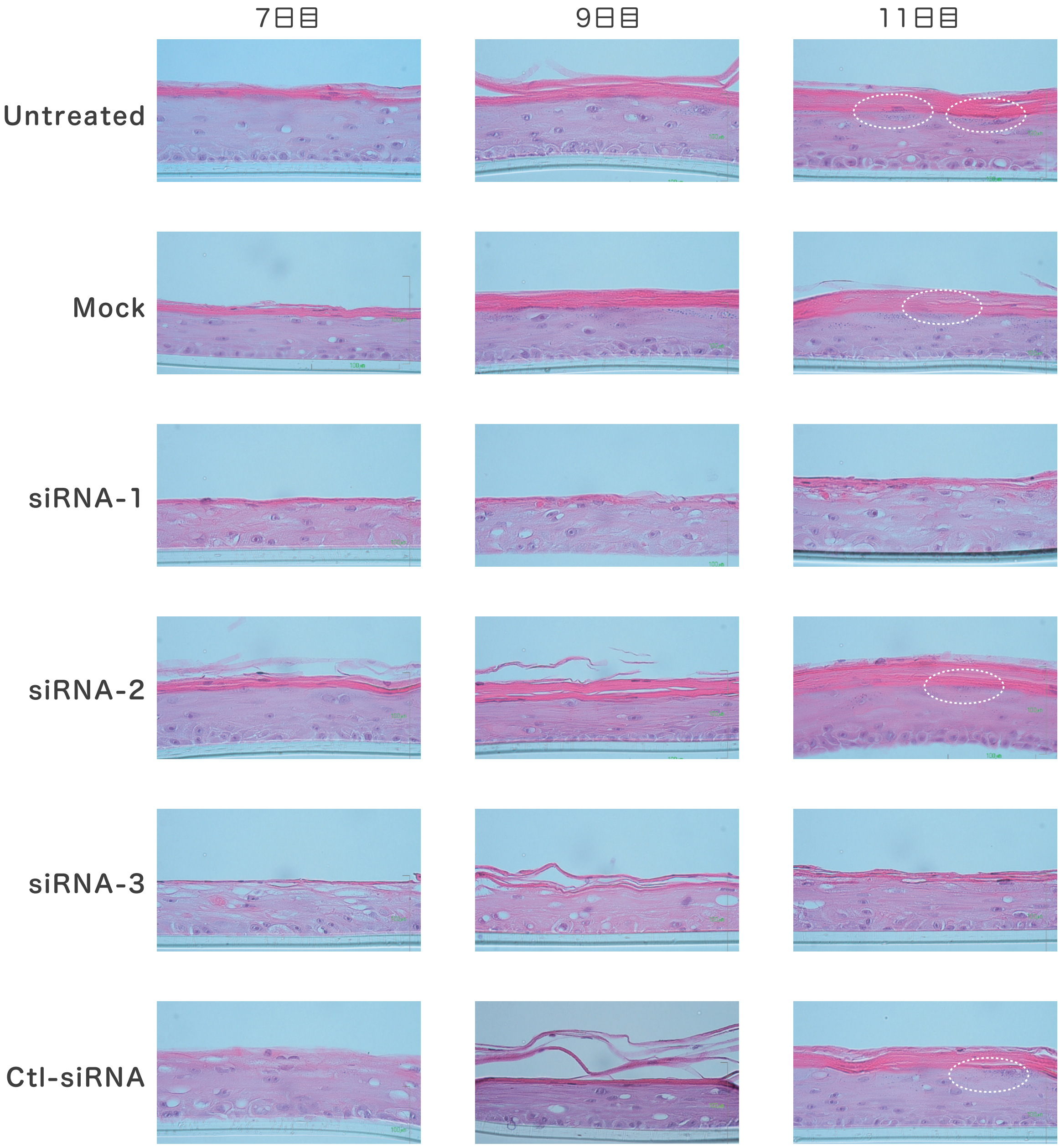
(2)siRNA混合液に7mlのアッセイ培地を添加し、充分に混合します。

(3)解凍した表皮細胞を(2)のsiRNA混合液に添加します。

(4)(3)の細胞懸濁液をおだやかに混和した後、セルカルチャーインサートに0.5mlずつ播種します。

3.モデル作製の培養

EPI-KIT取扱説明書の記載に従い、インサート内の培地除去および培地交換を実施します。



各培養日数(7日、9日、11日)の表皮モデルをホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋し、組織切片を作製しました。切片をヘマトキシリン・エオジン染色しました。

Untreated:siRNA混合液も使用せず、通常のプロトコールに従って作製した表皮モデル

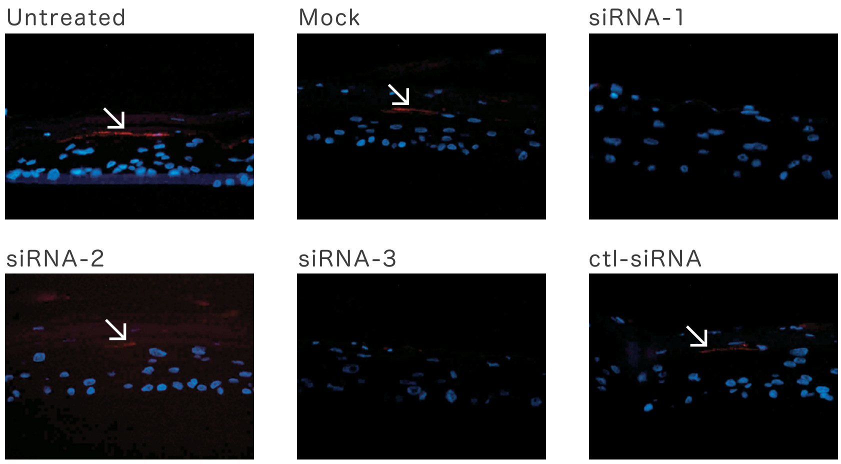
Mock:siRNA混合液の調製時に、siRNAを添加しなかった表皮モデル

siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3、ctl-RNA:各siRNAを用いて作製した表皮モデル

点線の丸囲みは、ケラトヒアリン顆粒を示しています。

siRNA-1、siRNA-3で処理したモデルでは、ケラトヒアリン顆粒が認められませんでした。

弱刺激性試験



培養11 日目のモデルを使用して、免疫組織染色を行いました。

フィラグリン染色（赤色）白矢印で示しています。

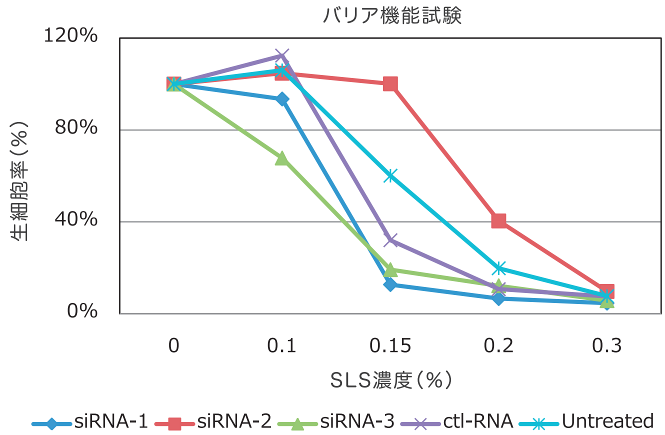
1 次抗体：抗フィラグリン抗体（Neuromics MO20041）

2 次抗体：Alexa FluorR 546 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)(Life technologies A-11030)

核染色（青色）

Hoechst 33258

siRNA-1、siRNA-3で処理したモデルでは、フィラグリンの染色が認められませんでした。



作製した表皮モデル（13日目）を用いて、バリア機能試験を実施しました。

DPBSにSLS（0%、0.1%、0.15%、0.2%、0.3%）を添加した溶液をモデルに25μl添加し、

37℃CO_2インキュベーターに18時間静置しました（N=3）。

18時間後、モデルをDPBSで洗浄しました（カップに0.5mlのDPBSを添加して除去を3回繰り返します）。洗浄したモデルをMTT反応し、0%SLSの結果を生細胞率100%として各SLS濃度の生細胞率を算出しました。グラフはN=3の平均値で示しています。

	siRNA-1	siRNA-2	siRNA-3	ctl-RNA	Untreated
IC50	0.13	0.19	0.12	0.14	0.16

siRNA-1、siRNA-3で処理したモデルでは、バリア機能の低下が認められました。

siRNA-2で処理したモデルでは、未処理のモデルよりもバリア機能が向上していました。

（注記）

参照した論文では、siRNA-2でもsiRNA-1、siRNA-3と同等の結果が示されていましたが、

本検討では異なる結果を得ました。

LabCyte CORNEA-MODEL(ラボサイト　角膜モデル)は、ヒト正常角膜上皮細胞を重層培養したヒト3次元培養角膜上皮です。
当社がこれまで培った培養技術を活用して角膜上皮細胞を分化・重層化することで、実際のヒト角膜上皮に類似した構造を持つモデルを作製する事に成功しました。
角膜モデルは、化合物の眼刺激性試験に利用できます。また、ムチンなどのタンパク質の発現や細胞間接着構造などを確認していますので、角膜上皮の分子生物学的解析にご利用いただけます。

特徴

ヒト正常角膜上皮細胞を使用した３次元モデル

眼刺激性試験に利用可能
角膜上皮発現タンパク質を指標に解析可能

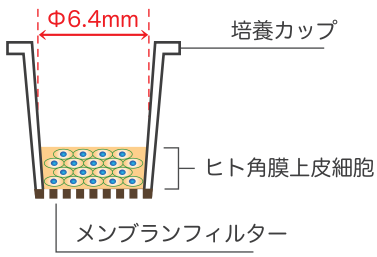
低いバッチ間・ロット間差を実現

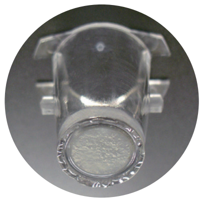
これまで表皮細胞モデルで培った細胞培養技術を活用して
自社で開発・製造

毎週月曜日に発送可能

受注締切日は出荷日の４週間前
※詳しくは出荷予定表をご覧ください。

モデルの構成



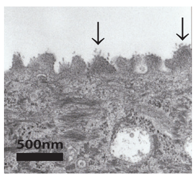


モデル外観

角膜上皮構造を再現

H&E 染色像

細胞の重層化、翼状層から最表層に移行するに従い細胞が扁平化しています。

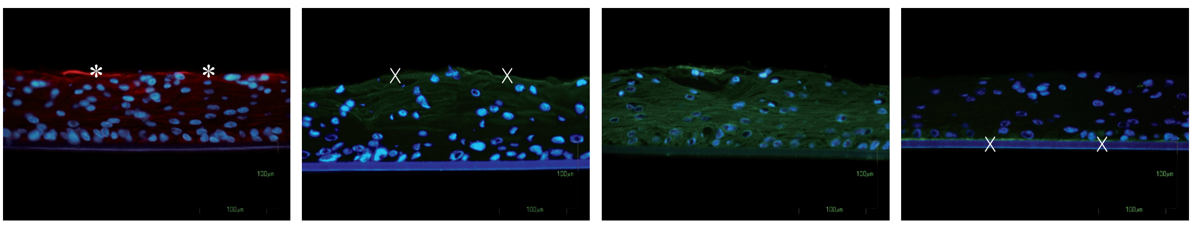


透過型電子顕微鏡像

微絨毛、およびその上部に多糖外被の存在(↓)を確認しました。

免疫染色像　角膜上皮を構成するタンパク質の局在を確認しています。

最表層　細胞間　基底膜



Mucin-1　Mucin-16　Desmoglein-3　Laminin V

OECD TG492 収載モデル

OECD TG492収載　眼刺激性試験

LabCyte CORNEA-MODELはOECDテストガイドライン492収載モデルです。
OECDテストガイドラインとは、化学物質の特性や安全性を評価する試験方法を国際的に共通化することを目的として収集したものです。
OECDテストガイドライン492は、ヒト角膜上皮の生化学的・生理学的特性にきわめて類似するように設計されたヒト角膜上皮モデルを用いて化学物質の皮膚刺激性を評価する試験方法です。

眼刺激性試験セット
(製品コード：401351)

試験の概要

① 前培養
② 披検物質の暴露・洗浄
　(被検物質の物理性状によって試験工程が異なります。)
③ 生細胞率の測定　(WST-8試験)
④ 試験成立条件の確認
❶ 生細胞数: 0.5 ≦ 陰性対照の吸光度測定値平均(A450/650) ≦ 1.6
❷ 陽性対照: 陽性対照の生細胞率≦ 40%
❸ 陰性対照・陽性対照を含む各被検物質の吸光度値の平均 ≦ 18

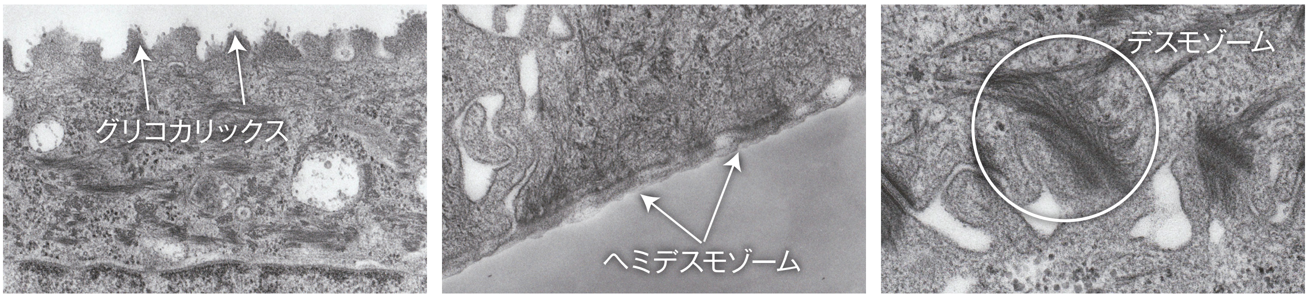
刺激性判定
生細胞率 ≦ 40%　刺激性
生細胞率 ＞40%　非刺激性

in vitro / *in vivo* 皮膚刺激性予測の相関

		in vivo classification		
		irritant	Non-irritant	Total
in vitro prediction	irritant	76	17	93
	Non-irritant	0	46	46
	Total	76	63	139
Sensitivity(%)		100		
Specificity(%)		73.0		
Accuracy(%)		87.8		

角膜モデルは角膜上皮の組織学的な解析にご使用いただけます。

角膜モデルは角膜上皮の微細構造を再現しています。

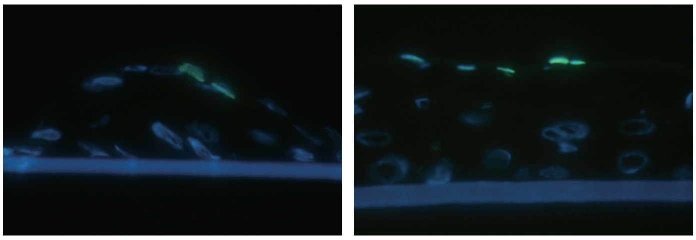


塩化ベンザルコニウム添加によるアポトーシス誘導（TUNEL染色法）の評価

塩化ベンザルコニウム（適用濃度）

0.005%　0.05%

TUNEL
/
Hoechst



塩化ベンザルコニウム添加による角膜モデル組織の細胞間結合の崩壊

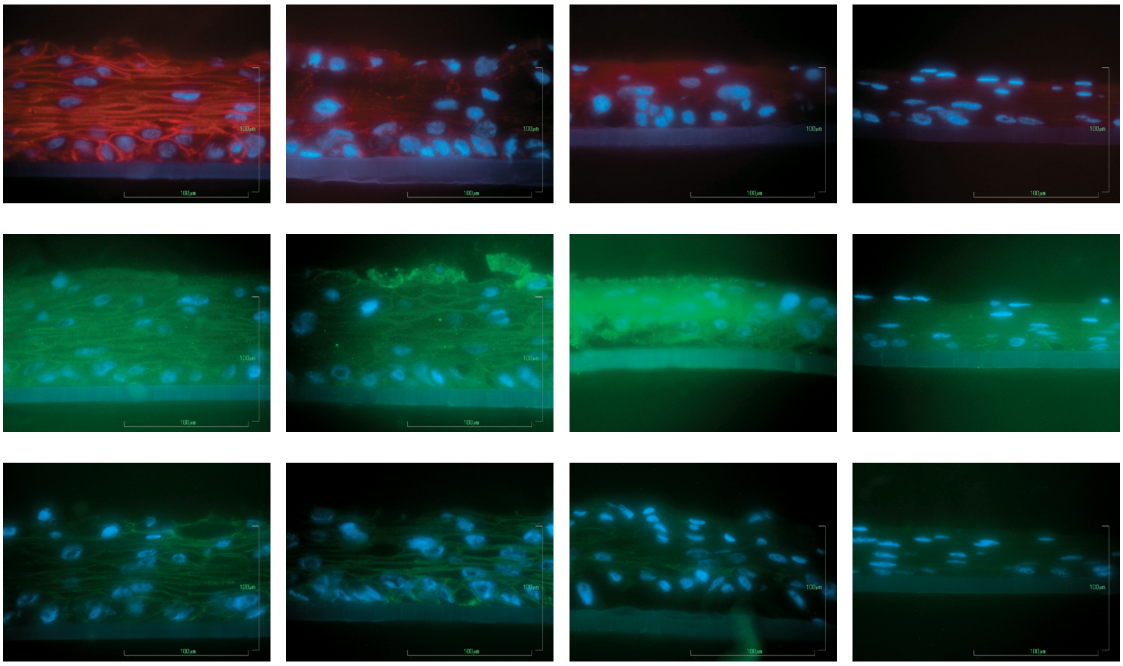
塩化ベンザルコニウム

PBS　0.1%　1%　10%

Claudin-1
Tight Junction
構成因子

Desmoglein-3
Desmosome
構成因子

E-cadherin
Adherence
Junction
構成因子



塩化ベンザルコニウム濃度に依存して細胞間結合が崩壊

このカタログの掲載内容は2024年11月現在のものです。
このカタログに掲載の製品の仕様は、品質向上などのため予告なく変更することがあります。

J-TEC は再生医療技術を通じて動物実験代替法の発展に貢献したいと考えています。

株式会社ジャパン・ティッシュエンジニアリング

〒443-0022　愛知県蒲郡市三谷北通６丁目209番地の１
代表　TEL: 0533-66-2020　FAX: 0533-66-2018

J-TEC

http://www.jpte.co.jp

2024 1118 400