

ヒト 3 次元培養表皮
LabCyte EPI-MODEL24 を用いた
皮膚刺激性試験法

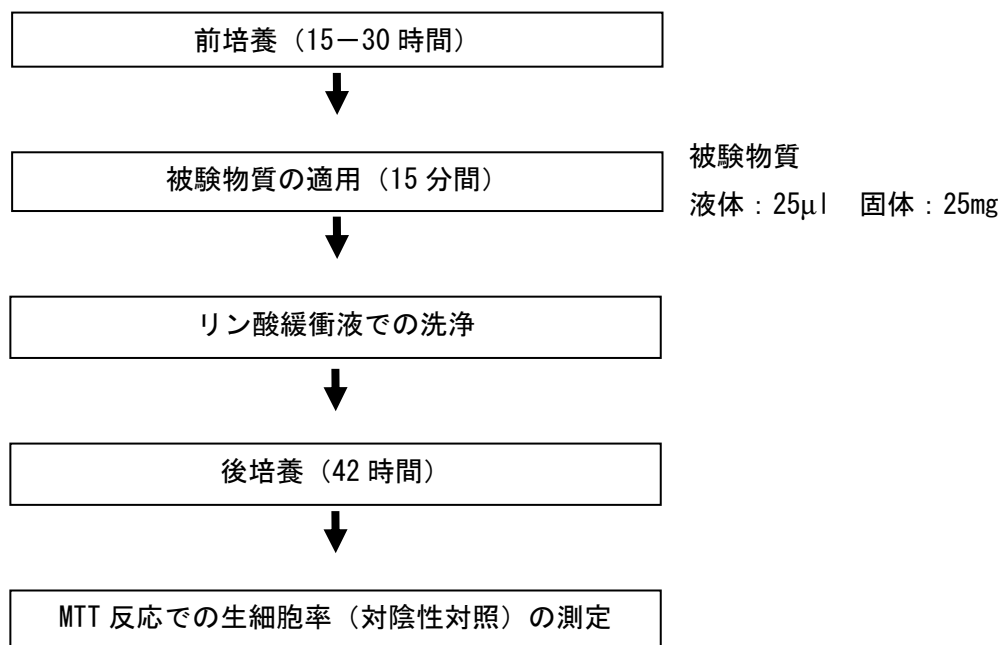
OECD TG439
(in vitro 皮膚刺激性試験)
収載

目次

1. 皮膚刺激性試験法について	1
1.1 試験の概要	1
1.2 作業スケジュール例	2
1.3 適用・洗浄のタイムスケジュール例	3
2. 準備	4
2.1 皮膚刺激性試験セット セット構成	4
2.2 LabCyte EPI-MODEL24 取扱い上の注意	4
2.3 消耗品	4
2.4 その他の必要物品	5
2.4.1 機器・器具類	5
2.4.2 消耗品類	5
3. 試験方法	6
3.1 事前準備	6
3.1.1 陽性対照	6
3.1.2 陰性対照	6
3.1.3 リン酸緩衝液充填 洗浄用ポリ洗浄ビン	6
3.1.4 MTT 培地	6
3.2 試験操作	7
3.2.1 培養表皮 LabCyte EPI-MODEL24 の準備（被験物質暴露前日（-1 日目））	7
3.2.2 被験物質の適用と洗浄（被験物質暴露日（0 日目））	8
3.2.3 後培養（被験物質暴露日～2 日後（0-2 日目））	10
3.2.4 MTT 試験（被験物質暴露 2 日後（2 日目））	10
3.2.5 MTT 反応産物（フォルマザン）の抽出と測定（被験物質暴露 2～3 日後（2-3 日目））	12
4. 評価	14
4.1 試験成立条件	14
4.2 判定基準	14
5. MTT 試験系に干渉する被験物質の検出試験	15
5.1 培養表皮を染色してしまう被験物質の検出	15
5.1.1 ステップ 1（予備検討）	15
5.1.2 ステップ 2（培養表皮を用いた検討）	15
5.2 MTT 還元作用のある被験物質の検出	16
5.2.1 ステップ 3（予備検討）	16
5.2.2 ステップ 4（培養表皮を用いた検討）	16

1. 皮膚刺激性試験法について

1.1 試験の概要



刺激性判定

生細胞率 \leq 50% → 刺激性
生細胞率 $>$ 50% → 非刺激性

J-TEC ホームページにて本プロトコールの手技ビデオの案内がございます。
ご参照ください。

http://www.jpte.co.jp/business/LabCyte/EPI_video

1.2 作業スケジュール例

	月	火	水	木	金	土	日	月	
8:00	出荷日	納品 (地域によって 午前または午後)	前培養 (15-30時間)	後培養 (42時間)	後培養 (42時間)	抽出	抽出	測定	
9:00					MTT反応 開始				
10:00					MTT反応 (3時間)				
11:00					抽出操作				
12:00					抽出 (15時間以上)				
13:00									
14:00									
15:00									
16:00					前培養開始				
17:00					前培養 (15-30時間)				後培養 (42時間)
18:00									
19:00									

 :作業時間

1.3 適用・洗浄のタイムスケジュール例

		被験物質											
サンプルNo.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0min													
1min		添加											
2min			添加										
3min				添加									
4min					添加								
5min						添加							
6min							添加						
7min								添加					
8min									添加				
9min										添加			
10min											添加		
11min												添加	
12min													添加
13min													
14min													
15min													
16min		洗浄											
17min			洗浄										
18min				洗浄									
19min					洗浄								
20min						洗浄							
21min							洗浄						
22min								洗浄					
23min									洗浄				
24min										洗浄			
25min											洗浄		
26min												洗浄	
27min													洗浄

作業の習熟度によって、1～3分間隔での操作をお奨めいたします。

■ 1人での作業の場合

1度に処理できる検体数は12検体です。各被験物質につき3個の培養表皮を使用します(N=3)。

このため、1人で1度に試験できる被験物質は4つです。

1プレート(24ウェル)では、上記操作を2回繰り返してください。

陰性・陽性対照は1回目で行うことで、2回目に行う必要はありません。

■ 2人での作業の場合

1人が適用、もう1人が洗浄を行うことで、1度に24検体を処理することが可能です。

2. 準備

2.1 皮膚刺激性試験セット セット構成

【皮膚刺激性試験セットの構成】

内容	数量	用途
LabCyte EPI-MODEL24 プレート	1	寒天培地中に固定された培養カップ上のヒト3次元培養表皮 24 個、常温保存
アッセイ培地 30m	2	培養用の基礎培地、冷蔵保存
24 ウェルアッセイプレート	4	試験用の空プレート、室温保存

2.2 LabCyte EPI-MODEL24 取扱い上の注意

LabCyte EPI-MODEL24 プレートは培養開始まで、未開封のまま**常温保存**してください。開封後は、すべての培養表皮の培養を開始してください。開封後の再保存はしないで下さい。

LabCyte EPI-MODEL24 に使用しているヒト表皮細胞は、HIV, HBV, HCV, HPV 陰性である健常ドナー由来の細胞を使用していますが、ヒト由来原材料を用いた製品であることから、LabCyte EPI-MODEL24 の取扱いには十分に注意していただき、各施設のバイオセーフティ基準に基づいて取り扱って下さい。

2.3 消耗品

本セットを用いて皮膚刺激性試験を行う際に必要な消耗品です。

【必要な消耗品】

消耗品	用途・ご用意いただく量の目安
SLS	陽性対照として使用。500mg/10ml: 5% w/v 溶液
蒸留水	陰性対照として使用。数 ml (1検体 25 μ l 必要)
リン酸緩衝液	被験物質の洗浄に使用。1L 程度 (1プレート分)
滅菌綿棒	洗浄後、培養カップを拭くのに使用。24 本(1プレート分)
MTT 試薬*	生細胞数測定に使用。6mg(1プレート分): 0.5mg/ml 溶液
イソプロパノール	MTT 反応後の抽出操作に使用。10ml 程度(1プレート分)
96 ウェル測定プレート*	マイクロプレートリーダーでの吸光度測定に使用。

※別売品として取り扱っております。

MTT 試薬(25mg) 型番: 403026

96 ウェル測定プレート(1 枚) 型番: 406096

2.4 その他の必要物品

2.4.1 機器・器具類

- ・安全キャビネット(又はクリーンベンチ)
- ・ウォーターバス(37°C)
- ・CO₂ インキュベーター(37°C、5%CO₂, 高湿度を維持可能であるもの)
- ・オートクレーブ
- ・96 ウェルマルチプレートリーダー(必要フィルター: 570nm、650nm)
- ・精密天秤(0.1mg)
- ・アスピレーター
- ・ストップウォッチ
- ・マイクロピペット(10-200μl, 200-1000μl)
- ・先の尖ったピンセット(滅菌済み)
- ・マイクロスパーテル(滅菌済み)
- ・ビーカー(容量1~2L: 滅菌済み)
- ・滅菌可能なポリ洗浄ビン(容量 500~1,000ml : 滅菌済み)

2.4.2 消耗品類

- ・マイクロピペット用チップ(滅菌済み: 10-200μl, 200-1000μl)
- ・マイクロチューブ(1.5ml)
- ・スカルペル

3. 試験方法

- ※ 3.1.1～3.1.4、3.2.1～3.2.4の操作はすべて、安全キャビネット(又はクリーンベンチ)内で無菌的に実施して下さい。
- ※ 上記以外は無菌操作の必要はありませんが、**2.2 項 LabCyte EPI-MODEL24 取扱い上の注意**を参照の上、試験を実施してください。

3.1 事前準備

3.1.1 陽性対照 (5% w/v SLS 溶液)

- ① SLS(500mg)を正確に秤量します。
- ② 蒸留水を添加して 10ml にメスアップし、陽性対照溶液を調製します(終濃度:5% w/v)。

3.1.2 陰性対照

- ① 蒸留水を使用します。

3.1.3 リン酸緩衝液充填 洗浄用ポリ洗浄ビン

- ① ポリ洗浄ビンを、オートクレーブで滅菌しておきます。
- ② 滅菌したポリ洗浄ビンに、リン酸緩衝液を無菌操作で充填します。

3.1.4 MTT 培地 (0.5mg/ml MTT培地)

- ① MTT(6mg)をアッセイ培地(12ml)に溶解して、MTT 培地を調製します(終濃度:0.5mg/ml)。必要に応じて、超音波洗浄装置やボルテックスミキサーなどを利用して完全に溶解してください。
※溶解後はディープフリーザーでの保存が可能です。常温・冷蔵での保存では反応性が失われますので、ご注意ください。

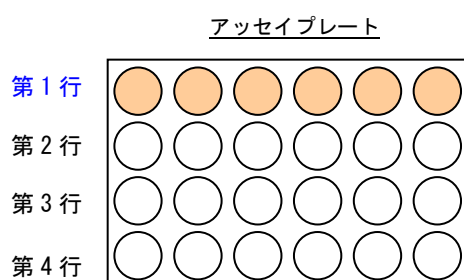
3.2 試験操作

EPI-MODEL24 の基本的な取扱い方法は「取扱説明書」もご参考ください。

3.2.1 無菌操作 培養表皮 LabCyte EPI-MODEL24 の準備(被験物質暴露前日(-1 日目))

- ① アッセイ培地を 37°C のウォーターバスで温めます。
- ② アッセイプレート第 1 行(被験物質暴露用)に温めたアッセイ培地を 0.5ml ずつ分注します。
各被験物質につき 3 個の培養表皮を使用します(N=3)。

【図1】



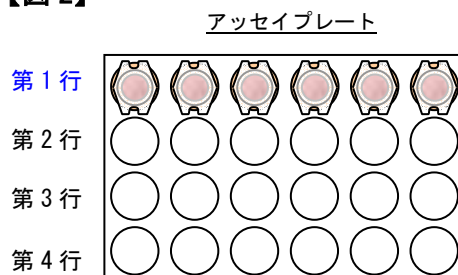
- ③ LabCyte EPI-MODEL24 プレートを実アルミ包装袋より取り出します。
- ④ プレートのフタを開け、培養表皮が入った培養カップを滅菌済みピンセットで取り出します。

注意点

- 培養カップ内の培養表皮表面には触れないように注意して下さい。
- 培養カップの外側に付着した寒天培地は、ピンセットなどで注意深く取り除いて下さい。

- ⑤ 培養カップをアッセイ培地の入った第 1 行(被験物質暴露用)の各ウェルに移します。

【図 2】



注意点

- 培養カップ底面と培地の上に気泡が入らないように注意して下さい。

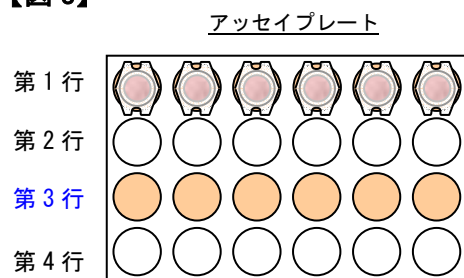
- ⑥ アッセイプレートにフタをして、CO₂ インキュベーターに入れます。
- ⑦ 3.2.2 項 被験物質の適用と洗浄まで、一晚(15~30 時間)静置します。

3.2.2 無菌操作 被験物質の適用と洗浄(被験物質暴露日(0日目))

3.2.2.1 後培養用ウェルの準備

- ① アッセイ培地を 37°C のウォーターバスで温めます。
- ② アッセイプレート を CO₂ インキュベーター から取り出します。
- ③ アッセイプレートのフタをあげ、第 3 行(後培養用)の各ウェルに、温めたアッセイ培地を 1.0ml ずつ分注します。

【図 3】



- ④ アッセイプレートにフタをして、CO₂ インキュベーターに入れます。
- ⑤ 被験物質の適用開始まで、静置します(0~12 時間位)。

3.2.2.2 被験物質の適用

- ① アッセイプレート を CO₂ インキュベーター から取り出します。
- ② 被験物質を、第 1 行(被験物質暴露用)の培養表皮の表皮組織表面に添加します。
各被験物質につき 3 個の培養表皮を使用します(N=3)。

液体の場合

マイクロピペットを用いて 25µl 添加します。

培養カップ内の培養表皮の中央部付近にチップを近づけ、注意深く添加してください。添加後、アッセイプレートにフタをして、プレート横側を軽くタッピングすることにより、全体にゆきわたらせます。

※粘性状液体の場合は、マイクロピペット用チップ セルセイバータイプ(広口)を使用して下さい。

【写真 1】

【写真 1】 粘性液体の適用チップ



被験物質の性状については、事前にピペット操作などで確認しておき試験に臨んでください。

固体の場合

精密天秤で 25mg(±1mg)を正確に事前に秤量しておきます。

まず蒸留水 25 μ l を添加し、その上に秤量した被験物質を培養表皮上に添加し、必要に応じてマイクロスポーテルで均等にゆきわたらせて下さい。【写真 2】

【写真 2】 固体の適用



- ③ 各被験物質は、ひとつの培養表皮につき、おおよそ 1~3 分間隔で適用します。

1.3 項 適用・洗浄のタイムスケジュール例を参照ください。

- ④ アッセイプレートにフタをして、15 分間、作業台上で静置します。

注意点

■作業時以外は、アッセイプレートには必ずフタをして下さい。

安全キャビネット(又はクリーンベンチ)内は空気循環されていますので、フタを空けたままでは添加した被験物質質量が変動する場合があります。

3.2.2.3 被験物質の洗浄

- ① 被験物質暴露 15 分(±30 秒)後、アッセイプレートのフタをあげ、培養カップを滅菌済みピンセットで取り出します。培養カップをビーカー上でタッピングして、培養カップ内の被験物質を廃棄します。
- ② リン酸緩衝液を充填した洗浄用ポリ洗浄ビンを用いて、ビーカー上でリン酸緩衝液を培養カップの壁面に当てながら、培養カップ内に充填します。【写真 3】

【写真 3】 洗浄



注意点

■リン酸緩衝液は組織に直接当てないようにしてください。表皮組織表面を傷つけないように注意しておこなってください。

- ③ 培養カップを傾けてカップ内のリン酸緩衝液をビーカー内に廃棄します。必要に応じて培養カップをビーカー上で1回タッピングしてカップ内のリン酸緩衝液を除去します。【写真4】
- ④ ②③の操作を15回以上(なるべく多く)繰り返し、培養カップ内部の被験物質を完全に取り除きます。最終洗浄後はタッピングを行わないで下さい。
- ⑤ 最終洗浄後に培養カップ外側に付着したリン酸緩衝液を、滅菌綿棒で取り除きます。【写真5】

【写真4】 リン酸緩衝液の廃棄



【写真5】 リン酸緩衝液の除去



注意点

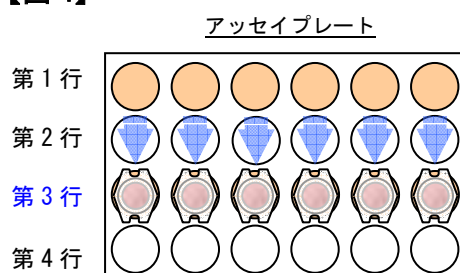
■培養カップ内には、滅菌綿棒を使用しないで下さい。

培養カップ内にリン酸緩衝液が残存しても、そのままにします。

ピンセットにリン酸緩衝液が付着した場合は、綿棒で拭き取ってください。

- ⑥ 洗浄した培養表皮を、第3行(後培養用)の対応する同じ列の各ウェルに移します。

【図4】



注意点

■培養カップ底面と培地の間に気泡が入らないように注意してください。

- ⑦ ①～⑥の洗浄操作は、各被験物質の添加順に、ひとつの培養表皮につき、おおよそ1～3分の間隔で洗浄します。

1.3項 適用・洗浄のタイムスケジュール例を参照ください。

3.2.3 **無菌操作** 後培養(被験物質暴露日～2日後(0-2日目))

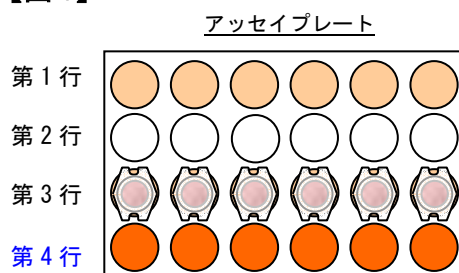
- ① 洗浄した培養表皮が入ったアッセイプレートにフタをして、CO₂インキュベーターに入れます。
- ② 42時間(±1時間)静置します。

3.2.4 **無菌操作** MTT試験(被験物質暴露2日後(2日目))

3.2.4.1 MTT 反応用ウェルの準備

- ① MTT 培地を 37°C のウォーターバスで温めます。
- ② アッセイプレート を CO₂ インキュベーター から取り出します。
- ③ アッセイプレートのフタをあげ、第 4 行 (MTT 反応用) に温めた MTT 培地を 0.5ml ずつ分注します。
- ④ アッセイプレート にフタをして、CO₂ インキュベーター に入れます。
- ⑤ MTT 反応開始まで静置します (0~12 時間位)。

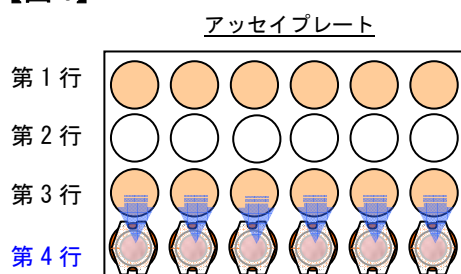
【図 5】



3.2.4.2 MTT 反応

- ① 後培養 42 時間 (±1 時間) 後のアッセイプレート を CO₂ インキュベーター から取り出します。
- ② 後培養の終了した培養表皮を第 3 行 (後培養用) から取り出し、第 4 行 (MTT 反応用) の対応する同じ列のウェルに移します。
- ③ 培養表皮を移したアッセイプレート にフタをして、CO₂ インキュベーター に入れます。
- ④ 3 時間 (±5 分) 静置します。

【図 6】



注意点

- 培養カップ底面の液垂れが、他のウェルに混入しないよう慎重に行ってください。
- 培養カップ底面と培地の間に気泡が入らないように注意してください。

3.2.5 MTT 反応産物(フォルマザン)の抽出と測定(被験物質暴露 2~3 日後(2-3 日目))

3.2.5.1 MTT 反応産物(フォルマザン)の抽出 (2 日目)

- ① MTT 反応 3 時間(±5 分)後、アッセイプレートから取り出します。
- ② アッセイプレートのフタをあげ、第 4 行(MTT 反应用)の各ウェルの培養カップ内の培養表皮をピンセットでつまんで取り出します。【写真 6】

【写真 6】 培養表皮の取り出し



注意点

■被験物質によって培養表皮組織構造が壊れてピンセットでつまめない場合、培養カップ底面のメンブランフィルターごとスカルペルなどで切り取る、又はマイクロスパーテルなどを用いて表皮組織をかき集めて下さい。

- ③ 培養表皮片を 1.5ml マイクロチューブに入れます。
- ④ マイクロチューブにイソプロパノール 300 μ l を入れ、培養表皮を完全に浸漬します。
- ⑤ 冷暗所(冷蔵庫内でも可)で一晩以上(約 15 時間以上)静置して色素を完全に抽出します。

注意点

- チューブを完全に密栓して下さい。
- 時々、振とうすることにより効果的に抽出をおこなうことができます。

3.2.5.2 抽出液の吸光度測定（3日目以降）

- ① マイクロチューブ内の溶液を良く混合します。

注意点

■ 細かな表皮組織片が浮遊している場合は、沈むまでしばらく静置するか、遠心装置があれば軽く遠心して下さい。

- ② マイクロチューブ内の溶液 200μl を 96 ウェルプレートの各ウェルに入れます。
 ブランクとして、イソプロパノール 200μl を設定します。

【96 ウェルプレートへの割り付け例】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ブランク											
B	蒸留水-1	被験物質 1-1	被験物質 3-1	被験物質 5-1								
C	蒸留水-2	被験物質 1-2	被験物質 3-2	被験物質 5-2								
D	蒸留水-3	被験物質 1-3	被験物質 3-3	被験物質 5-3								
E	5% SLS-1	被験物質 2-1	被験物質 4-1	被験物質 6-1								
F	5% SLS-2	被験物質 2-2	被験物質 4-2	被験物質 6-2								
G	5% SLS-3	被験物質 2-3	被験物質 4-3	被験物質 6-3								
H												

- ③ 96 ウェルマルチプレートリーダーを用いて、570nm、および 650nm の吸光度を測定し、吸光度 (570nm) から吸光度 (650nm) を差し引いた値を測定値とします。

測定値 = [検体の吸光度(570nm) - 検体の吸光度(650nm)] - [ブランクの吸光度(570nm) - ブランクの吸光度(650nm)]

- ④ 下記式より被験物質の生細胞率を計算します。

$$\text{生細胞率(\%)} = \frac{\text{被験物質の測定値平均}^*}{\text{陰性対照の測定値平均}^*} \times 100$$

* N=3 の試験から算出した平均値

4. 評価

4.1 試験成立条件

本法における試験成立条件は、下記条件にいずれも適合する場合とします。

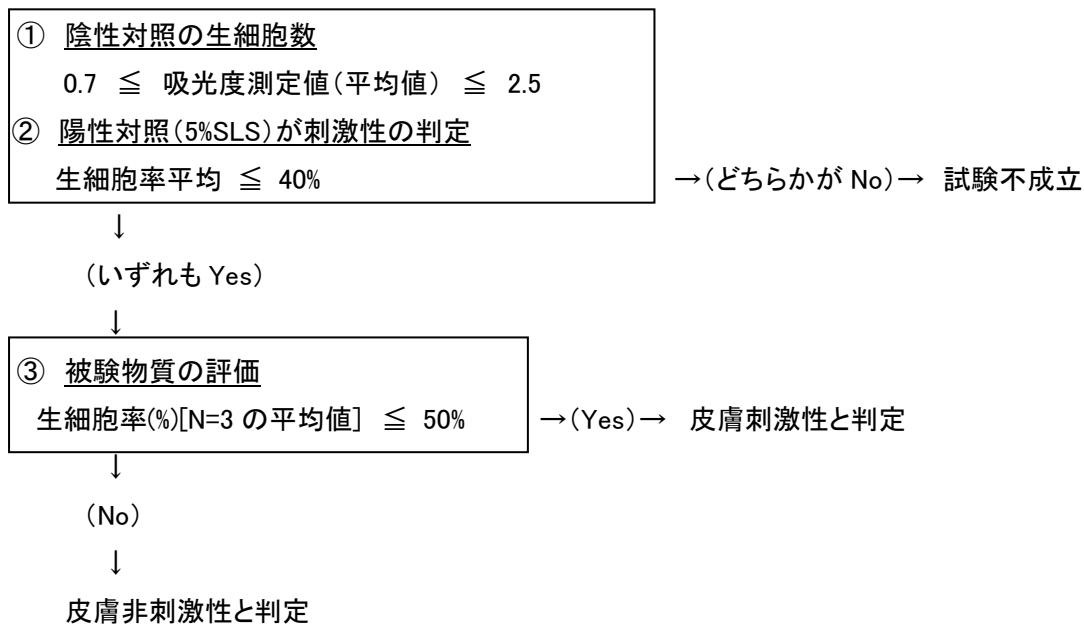
- ・ 生細胞数: $0.7 \leq$ 陰性対照の吸光度測定値平均 ≤ 2.5
- ・ 陽性対照: 5%SLS(陽性対照)の生細胞率 $\leq 40\%$
- ・ 陰性対照・陽性対照を含む各被験物質の生細胞率の SD $\leq 18\%$

4.2 判定基準

本法における判定基準を示します。

生細胞率	判定
生細胞率 $\leq 50\%$	刺激性
生細胞率 $> 50\%$	非刺激性

【判定フローチャート】



5. MTT 試験系に干渉する被験物質の検出試験

MTT 試験系を干渉する被験物質は、下記の 2 種類があります。

- ① 培養表皮を染色してしまう被験物質
- ② MTT 還元作用のある被験物質

培養表皮を染色する被験物質は、培養表皮から抽出液に移行して吸光度測定値に影響を及ぼす可能性があります。MTT 還元作用のある被験物質は、洗浄後の培養表皮に残留した被験物質が MTT を還元してフォルマザンが産生することにより、吸光度測定値に影響を及ぼす可能性があります。

これらの被験物質を検出する試験法を下記に示します。

5.1 培養表皮を染色してしまう被験物質の検出

5.1.1 ステップ 1(予備検討)

- ① 被験物質を液体の場合 25 μ l、固体の場合 25mg ずつ、0.5ml の蒸留水が入ったアッセイプレートに添加します。対照として、0.5ml の蒸留水が入ったウェルを準備します。
- ② アッセイプレートにフタをして、CO₂ インキュベーターに入れ、15 分間静置します。
- ③ 15 分後、プレートを手軽に攪拌し、目視で蒸留水の着色を確認します。
- ④ 明らかな着色が確認できる場合は、培養表皮を染色する可能性がある被験物質として、次にステップ 2 を実施します。明らかな着色を確認できない場合は、培養表皮を染色しない被験物質と判定します。

5.1.2 ステップ 2(培養表皮を用いた検討)

- ① 試験は、**3.2 項 試験操作**に従って実施します。
- ② **5.1.1 項 ステップ 1(予備検討)**で明らかな着色を示した被験物質を液体の場合 25 μ l、固体の場合 25mg、および陰性対照として蒸留水を 25 μ l、培養表皮上に添加します。
ただし、**3.2.4 項 MTT 試験**の操作では、組織の染色を確認するため、MTT 培地の代わりにアッセイ培地を添加します。
- ③ 下記計算式に従い、被験物質による培養表皮の染色率を計算します。

$$\text{被験物質染色率(\%)} = \frac{\text{被験物質の測定値(アッセイ培地)} - \text{陰性対照の測定値(アッセイ培地)}}{\text{陰性対照の測定値(MTT 培地)}} \times 100$$

- ④ 被験物質染色率が、5%未満の場合には、測定値を補正する必要はありません。
被験物質染色率が 5%以上 30%以下の場合には、下記式に従って、測定値を補正します。

$$\text{補正測定値} = \text{被験物質の測定値(MTT 培地)} - \text{被験物質の測定値(アッセイ培地)}$$

被験物質染色率が 30%より高い場合には、本試験法の適用範囲外の被験物質と判定します。ただし、**3.2.5.2 項 抽出液の吸光度測定**に従って算出した生細胞率(%)が 50%未満の場合には、刺激性と判定され、測定値の補正、あるいは本試験法の適用範囲外の物質と判定する必要はありません。

5.2 MTT 還元作用のある被験物質の検出

5.2.1 ステップ 1(予備検討)

- ① 被験物質を液体の場合 25 μ l、固体の場合 25mg ずつ、0.5ml の MTT 培地が入ったアッセイプレートに添加します。対照として、0.5ml の MTT 培地が入ったウェルを準備します。
- ② アッセイプレートにフタをして、CO₂ インキュベーターに入れ、1 時間静置します。
- ③ 1 時間後、プレートを静かに攪拌し、目視で MTT 培地の着色を確認します。
- ④ 明らかにフォルマザンの生成(青紫色の沈殿物)が確認できる場合は、培養表皮を染色する可能性がある被験物質として、次にステップ 2 を実施します。明らかなフォルマザンの生成を確認できない場合は、MTT還元作用のない被験物質と判定します。

5.2.2 ステップ 2(培養表皮を用いた検討)

- ① 試験は、**3.2 項 試験操作**に従って実施します。
- ② 培養表皮は、-20°C以下の冷凍庫で 24 時間以上静置して凍結し細胞死させたモデル(凍結死)を使用します。
- ③ **5.2.1 項 ステップ 1(予備検討)**で明らかな着色を示した被験物質を液体の場合 25 μ l、固体の場合 25mg、および陰性対照として蒸留水を 25 μ l、凍結死させた培養表皮上に添加します。
- ④ 下記計算式に従い、被験物質による培養表皮の染色率を計算します。

$$\text{被験物質染色率(\%)} = \frac{\text{被験物質の測定値(凍結死)} - \text{陰性対照の測定値(凍結死)}}{\text{陰性対照の測定値(生存)}} \times 100$$

- ⑤ 被験物質染色率が 30%以下の場合には、下記式に従って、測定値を補正します。

$$\text{補正測定値} = \frac{\text{被験物質の測定値(生存)} - (\text{被験物質の測定値(凍結死)} - \text{陰性対照の測定値(凍結死)})}{0.3}$$

被験物質染色率が 30%より高い場合には、本試験法の適用範囲外の物質と判定します。ただし、**3.2.5.2 項 抽出液の吸光度測定**に従って算出した生細胞率(%)が 50%未満の場合には、刺激性と判定され、測定値の補正、あるいは本試験法の適用範囲外の物質と判定する必要はありません。