

ヒト 3 次元培養角膜上皮
LabCyte CORNEA-MODEL を用いた
眼刺激性試験法

OECD TG492
(*in vitro* 培養角膜組織眼刺激性試験法 収載)

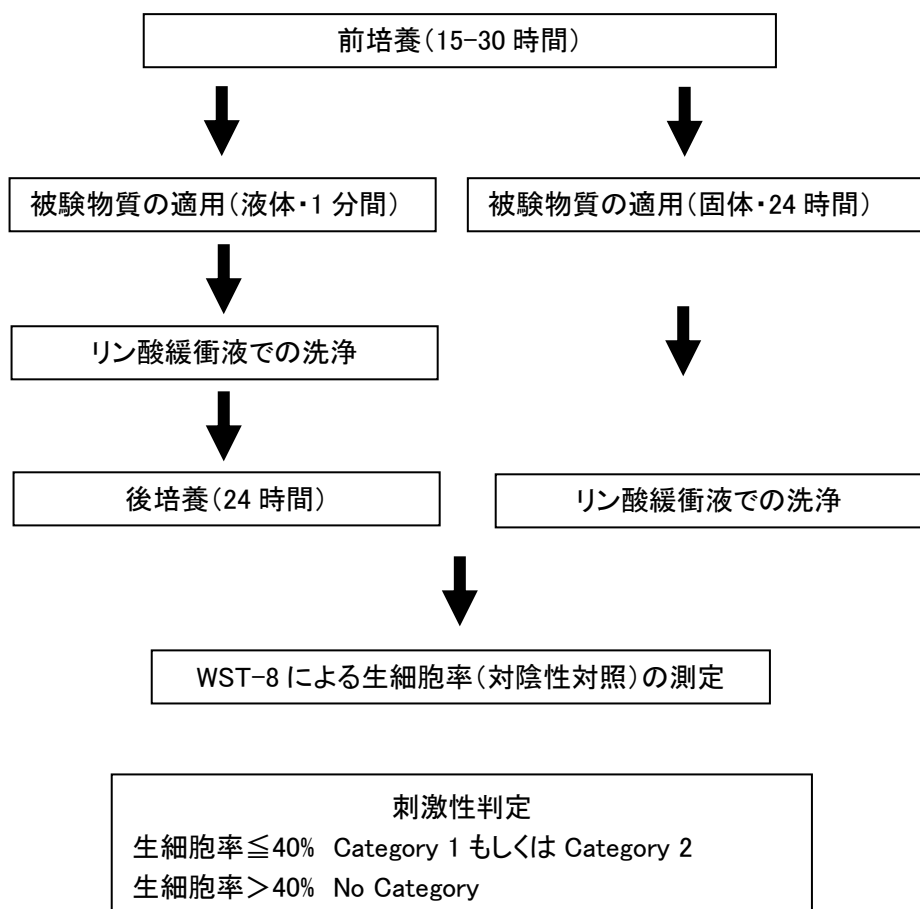
目次

1. 眼刺激性試験法について
 - 1.1 試験の概要
 - 1.2 作業スケジュール例
 - 1.3 適用・洗浄のタイムスケジュール例
2. 準備
 - 2.1 眼刺激性試験セット 製品構成内容
 - 2.2 LabCyte CORNEA-MODEL24 取扱い上の注意点
 - 2.3 消耗品
 - 2.4 その他必要機器・器具・消耗品
3. 試験方法
 - 3.1 事前準備
 - 3.1.1 陽性対照
 - 3.1.2 陰性対照
 - 3.1.3 リン酸緩衝液充填 洗浄用ポリ洗浄ビン
 - 3.2 試験操作
 - 3.2.1 LabCyte CORNEA-MODEL24 の準備
 - 3.2.2 被験物質(液体)の適用・洗浄・後培養
 - 3.2.3 被験物質(固体)の適用・洗浄
 - 3.2.4 WST-8 試験の準備
 - 3.2.5 WST-8 反応
 - 3.2.6 WST-8 反応液の測定
4. 評価
 - 4.1 試験成立条件
 - 4.2 判定基準
5. WST-8 試験系に干渉する被験物質の検出試験
 - 5.1 培養組織を染色する被験物質の検出
 - 5.1.1 ステップ 1(予備検討)
 - 5.1.2 ステップ 2(培養組織を用いた検討)
 - 5.2 WST-8 還元作用のある被験物質の検出
 - 5.2.1 ステップ 3(予備検討)
 - 5.2.2 ステップ 4(凍結死させた培養組織を用いた検討)

正式な S.O.P は英語版になります。

1. 眼刺激性試験法について

1.1 試験の概要



1.2 作業スケジュール例

<被験物質が液体の場合>

	月	火	水	木
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(24時間)
9:00				
10:00				
11:00			適用・洗浄	
12:00				
13:00			後培養(24時間)	WST-8反応開始 (4時間±20分)
14:00				
15:00				
16:00		前培養開始		吸光度測定
17:00		前培養 (15-30時間)		
18:00				
19:00				

<被験物質が固体の場合>

	月	火	水	木
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)	暴露(24時間)
9:00				
10:00				
11:00				
12:00			適用	
13:00				
14:00		暴露(24時間)	洗浄	
15:00				
16:00			前培養開始	
17:00				
18:00				
19:00				

1.3 適用・洗浄のタイムスケジュール例

＜全被験物質が液体の場合＞

サンプルNo.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
0min																									
1min	添加																								
2min	洗浄																								
3min		添加																							
4min		洗浄																							
5min			添加																						
6min			洗浄																						
7min				添加																					
8min				洗浄																					
9min					添加																				
10min					洗浄																				
11min						添加																			
12min						洗浄																			
13min							添加																		
14min							洗浄																		
15min								添加																	
16min								洗浄																	
17min									添加																
18min									洗浄																
19min										添加															
20min										洗浄															
21min											添加														
22min											洗浄														
23min												添加													
24min												洗浄													
25min													添加												
26min													洗浄												
27min														添加											
28min														洗浄											
29min															添加										
30min															洗浄										
31min																添加									
32min																洗浄									
33min																	添加								
34min																	洗浄								
35min																		添加							
36min																		洗浄							
37min																			添加						
38min																			洗浄						
39min																				添加					
40min																				洗浄					
41min																					添加				
42min																					洗浄				
43min																						添加			
44min																						洗浄			
45min																							添加		
46min																							洗浄		
47min																								添加	
48min																								洗浄	

1 度に 24 検体を処理できます。各被験物質につき 3 個の培養角膜上皮組織を使用します (N=3)。

1 プレートで試験を実施できる被験物質は、陰性対照と陽性対照を含めて 8 つです。作業の習熟度によって、1 ～3 分間隔での操作をお薦めいたします。

固体の場合は、順に被験物質を適用した後、CO₂ インキュベーターに移して被験物質の暴露を 24 時間行ってください。

2. 準備

2.1 眼刺激性試験セット 製品構成

名称	数量	保存方法
LabCyte CORNEA-MODEL プレート 24	1	寒天培地中に固定された培養カップ上のヒト 3 次元培養角膜上皮 24 個、常温保存(出荷日含め 5 日間)
アッセイ培地 (30ml)	2	試験用の培地、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 Corning 社製:BD Falcon 353047

2.2 LabCyte CORNEA-MODEL24 取り扱い上の注意点

LabCyte CORNEA-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。保存期間は出荷日含めて 5 日間です。保存期限は製品裏面に記載しております。開封後は全ての培養角膜上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ください。

LabCyte CORNEA-MODEL24 に使用しているヒト角膜上皮は、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 CORNEA-MODEL24 の取り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お取扱ください。

2.3 消耗品

本セットを用いて眼刺激性試験を行う時に必要な消耗品です。

消耗品	用途・ご用意いただく量の目安
エタノール	陽性対照(液体)として使用。数 mL 程度。
リン酸緩衝液	陰性対照(液体)として使用。また被験物質の洗浄に使用。1L 程度(1 プレート分)。
ラウリン酸	陽性対照(固体)として使用。10mg × 3 培養カップ分。
滅菌綿棒	洗浄後、培養カップを拭くために使用。24 本(1 プレート分)
WST-8	Cell Counting Kit-8, 100 test(同仁化学:CK04)
EBSS	Earle balanced salt solution (シグマ-アルドリッチ: E3024) 10mL 程度。
ディッシュ	ディッシュ(10cm)2 枚、PBS を 20mL ずつ入れて培養カップの洗浄に使用。
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。

※別売品として取扱っております。

96 ウェル測定プレート(1 枚)型番:406096

2.4 その他必要機器・器具・消耗品

- ・安全キャビネット(またはクリーンベンチ)
- ・ウォーターバス(37℃)
- ・CO₂ インキュベーター(37℃、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: 450nm、650nm)
- ・精密天秤(0.1mg)
- ・ストップウォッチ
- ・マイクロピペット(10–200 μ L, 200–1000 μ L)
- ・先の尖ったピンセット(滅菌済)
- ・スパーテル(滅菌済)
- ・ビーカー(1–2L: 滅菌済)
- ・滅菌可能な広口ポリ洗浄ビン(容量 500–1,000mL、口径 > 3mm)
- ・乳鉢・乳棒
- ・ポジティブディスプレイメントピペット(10–100 μ L)

3.試験方法

3.1.1～3.2.6 の操作は安全キャビネット(又はクリーンベンチ)内で無菌的に実施してください。
各被験物質、N=3 で実施いただきます。

3.1 事前準備

3.1.1 陽性対照

液体:エタノール

固体:ラウリン酸(予め 10mg をマイクロチューブに測りとおきます)

3.1.2 陰性対照

液体:リン酸緩衝液

固体:未処理

3.1.3 リン酸緩衝液充填 洗浄用ポリ洗浄ビン

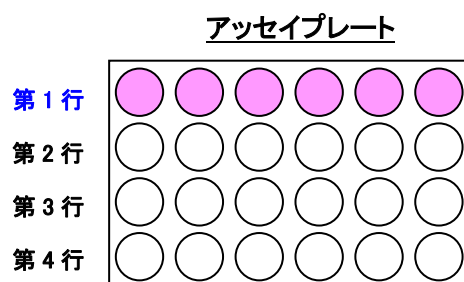
- ① ポリ洗浄ビンオートクレーブで滅菌しておきます。
- ② 滅菌済みのポリ洗浄ビンにリン酸緩衝液を無菌操作で充填します。

3.2 試験操作

3.2.1 無菌操作 LabCyte CORNEA-MODEL24 の準備

- ① アッセイ培地を 37°Cウォーターバスで 30 分温めます。
- 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。
1 つの被験物質につき、3 個の培養角膜上皮組織(培養組織)を使用します(N=3)。

【図 1】

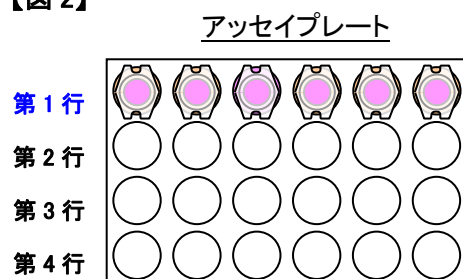


- ③ LabCyte CORNEA-MODEL24 プレートを実用包装より取り出します。
- ④ プレートの蓋を開け、培養組織が入った培養カップを滅菌済みピンセットで取り出します。
- ⑤ 培養カップをアッセイ培地の入った第 1 行目(前培養・被験物質暴露用)の各ウェルに移します。

注意点

- 培養カップ内の培養組織表面には触れないよう注意してください。
- 培養カップの外側に付着した寒天培地は、ピンセットなどで取り除いてください。

【図 2】



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。

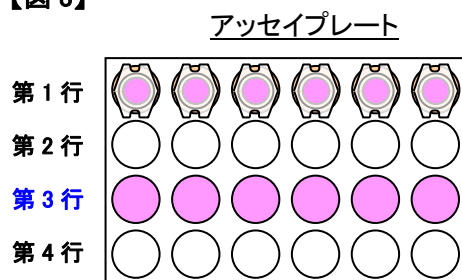
- ⑥ アッセイプレートに蓋をして、CO₂ インキュベーターに入れます。
- ⑦ 3.2.2、3.2.4 項 被験物質の適用と洗浄まで、一晚(15~30 時間)静置します(前培養)。

3.2.2 無菌操作 被験物質(液体)の適用・洗浄・後培養

3.2.2.1 後培養用ウェルの準備

- ① アッセイ培地を 37°Cウォーターバスで 30 分温めます。
- ② 前培養を終了した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開け、第 3 行(後培養用)の各ウェルに、温めたアッセイ培地を 0.5mL ずつ分注します。

【図 3】



3.2.2.2 被験物質の適用

被験物質を第 1 行(被験物質暴露)の培養組織の表面に添加します。各被験物質につき 3 個の培養組織を使用します(N=3)。

マイクロピペットを用いて 50 μ L を添加します。

培養カップ内の培養組織の中央部付近にチップを近付け、注意深く適用してください。適用後、アッセイプレートに蓋をしてプレート横側を軽くタッピングすることにより、培養組織表面全体にゆきわたらせます。被験物質適用後はアッセイプレートの蓋を閉じて 60 $\pm$ 10 秒間暴露させます。

必要に応じて、スパーテルを使用して被験物質を広げます。スパーテルで培養組織を押し付けないように注意してください。粘度の高い物質の場合、セルセイバータイプ(広口)もしくはポジティブディスプレイメントピペットを使用してください。

セルセイバータイプチップ(広口) ポジティブディスプレイメントピペット用チップ



注意点

- 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。
- 被験物質の適用時以外は、アッセイプレートの蓋を閉めて試験を実施してください。

3.2.2.3 被験物質の洗浄

- ① 被験物質暴露 60 $\pm$ 10 秒後、アッセイプレートの蓋を開け、培養カップを滅菌済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使用し、ビーカー上でリン酸緩衝液を培養カップ内の培養組織表面に当てながら、培養カップ内に満たしてください。



注意点

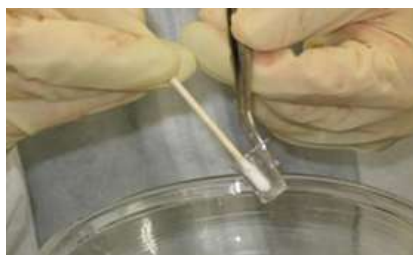
■強い流れで組織にダメージを与えないよう、洗浄ビンは広口タイプをご使用ください(口径は 3mm 以上)。

- ③ 培養カップ内のリン酸緩衝液をビーカーに廃棄します。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リン酸緩衝液を完全に除去します。



- ④ ②③の操作を少なくとも 10 回繰り返し、培養組織表面の被験物質を除去します。被験物質の性状により洗浄中に泡が発生することがあります。泡が完全になくなるまで洗浄してください。

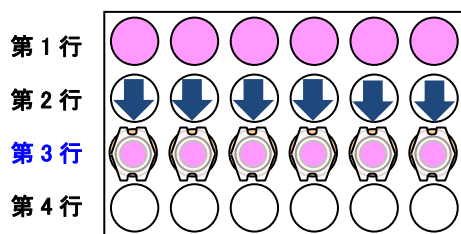
- ⑤ 滅菌綿棒で培養カップ内側と外側に残存したリン酸緩衝液を軽く除去してください。滅菌綿棒を培養組織表面に押し付けないようにご注意ください。



- ⑥ 培養カップを、予めアッセイ培地を入れておいた 3 行目のウェルに移します。

【図 4】

アッセイプレート

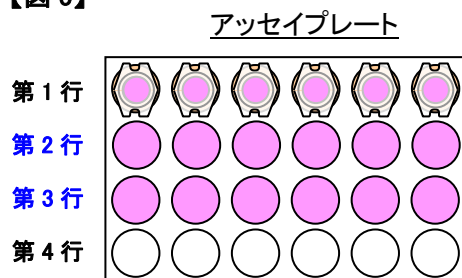


- ⑥ ①～⑤の作業を 1 分から 3 分間隔で実施してください。
 ⑦ 培養組織が入ったアッセイプレートに蓋をして、CO₂ インキュベーターに入れます。
 ⑧ 24 時間±1 時間静置します。(後培養)

3.2.3 無菌操作 被験物質(固体)の適用・洗浄

- ① アッセイ培地を 37°Cウォーターバスで 30 分温めます。
- ② 前培養を終了したアッセイプレートに 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蓋を開け、第 2 行と第 3 行の各ウェルに、温めたアッセイ培地を 0.5mL ずつ分注します。

【図 5】

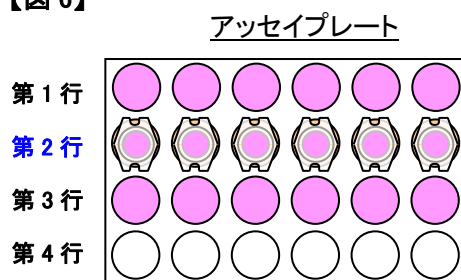


- ④ 予め測り取った固体 10±2mg を培養カップ内の培養組織表面に適用します。
必要な場合、固体を乳鉢ですりつぶし微粉碎します。また被験物質をスパーテルで培養組織表面全体にゆきわたらせます。各被験物質につき 3 個の培養組織を使用します (N=3)。



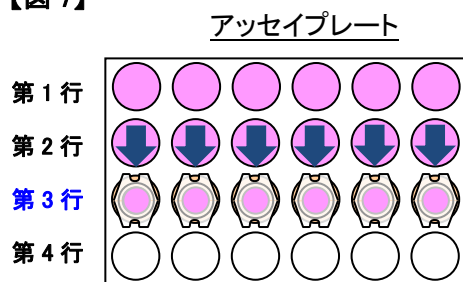
- ⑤ 被験物質適用後は、培養カップを第 1 行から第 2 行に移します。

【図 6】



- ⑥ 培養組織が入ったアッセイプレートに蓋をして、CO₂ インキュベーターに入れます。
- ⑦ 24 時間±1 時間静置します。
- ⑧ 暴露終了後、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。
- ⑨ 暴露終了後のサンプルをピンセットで取り出し、液体の被験物質の洗浄と同様(3.2.2.3 被験物質の洗浄)にリン酸緩衝液を充填した洗浄用ポリ洗浄ビンを使用して培養組織表面の被験物質を完全に洗い流します。
- ⑩ 洗浄後のサンプルを、全て第 3 行目のウェルに移します。

【図 7】



3.2.4 WST-8 試験の準備

- ① 予め EBSS を 37℃ウォーターバスで 30 分温めます。
- ② CCK-8 (WST-8 ストック液) を EBSS で希釈し (CCK-8:EBSS = 1:10)、WST-8 反応液を調製します。
- ③ 液体被験物質もしくは固体被験物質適用用のアッセイプレートをインキュベーターから取り出します。
- ④ WST-8 反応液を 0.3mL ずつ、アッセイプレートの第 4 行目に入れます。

注意点

■吸光度測定用にblankを設定します。

WST-8 反応液をアッセイプレートに 0.3mL 入れて、3.2.5 WST-8 反応⑤に従ってインキュベーションします。

3.2.5 WST-8 反応

- ① 20mL の PBS を入れたディッシュを 2 枚準備します。



- ② 液体被験物質・固体被験物質を適用したアッセイプレートのフタを開け、滅菌済みピンセットで培養カップを取り出します。
- ③ 培養カップに付着した液体培地を除去するため、ディッシュ 1 とディッシュ 2 で培養カップ外側を洗浄し、ペーパータオルで培養カップ周辺の PBS を除去します。

①ディッシュ 1 で培養カップを洗浄



②ディッシュ 2 で培養カップを洗浄

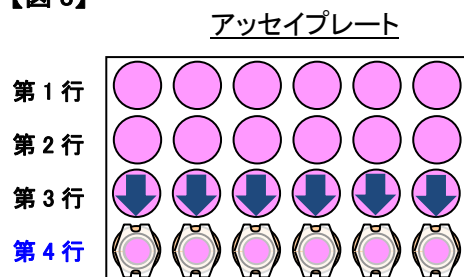


③ペーパータオルで PBS の除去



- ④ PBS で洗浄・除去を行った培養カップを、第 4 行目に入れます。
底面に気泡が入らないようにしてください。

【図 8】



- ⑤ アッセイプレートのフタを閉め、4 時間±20 分 CO₂ インキュベーターに入れます。

3.2.6 WST-8 反応液の測定

- ① 反応時間終了後、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 アッセイプレートのフタを開けて、第 4 行目の培養カップを取り除きます。
- ③ 十分に攪拌した後、200 μL を吸光度測定用 96 ウェルプレートに入れます。
- ④ 96 ウェルプレートリーダーを用いて、450nm および 650nm の吸光度を測定し、吸光度(450nm)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(450nm)-検体の吸光度(650nm)】-【ブランクの吸光度(450nm)-ブランクの吸光度(650nm)】

- ⑤ 下記式より被験物質の生細胞率を計算します。

$$\text{生細胞率(\%)} = \frac{\text{被験物質の測定値平均}^{\ast}}{\text{陰性対照の測定値平均}^{\ast}} \times 100 \quad \text{※N=3 の試験から算出した平均値}$$

4. 評価

4.1 試験成立条件

本試験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： $0.5 \leq$ 陰性対照の吸光度測定値平均 ≤ 1.6
- ・陽性対照： エタノール(液体)、ラウリン酸(固体)の生細胞率 $\leq 40\%$
- ・陰性対照・陽性対照、及び各被験物質の生細胞率の SD $\leq 18\%$

4.2 判定基準

生存率	予測
$\leq 40\%$	カテゴリー1 もしくは 2
$> 40\%$	区分外

5. WST-8 試験系に干渉する被験物質の検出試験

WST-8 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 培養組織を染色してしまう被験物質
- ② WST-8 還元作用のある被験物質

培養組織を染色する被験物質は、培養組織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。WST-8 還元作用のある被験物質は、洗浄後の培養組織に残留した被験物質が WST-8 を還元してフォルマザンを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 培養組織を染色する被験物質の検出

5.1.1 ステップ 1(予備検討)

- ① 被験物質を液体の場合 50 μ L、固体の場合 10mg 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、被験物質が液体の場合は 50 μ L の PBS を 0.5ml の蒸留水が入ったウェルに添加します。被験物質が固体の場合は、蒸留水 0.5ml をそのまま対照としてお使いください。
- 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、プレートを静かに攪拌し、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、培養組織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、培養組織を染色しない被験物質と判定します。

5.1.2 ステップ 2(培養組織を用いた検討)

- 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 50 μ L、固体の場合 10mg、および陰性対照として PBS 50 μ L を培養組織上に添加します。3.2 項試験の操作に従って試験を実施します。ただし、WST-8 試験の操作では、培養組織の染色を確認するため、WST-8 反応液の代わりに、EBSS を用いて 4 時間培養します。
- ③ 補正された吸光度は、以下の式を使用して計算されます。
補正された吸光度 = $A - (B - C)$
A: 被験物質で暴露し、WST-8 反応させた培養組織の吸光度値
B: 被験物質で暴露し、EBSS のみで反応させた培養組織の吸光度値
C: 陰性対照で暴露し、EBSS のみで反応させた培養組織の吸光度値
- ④ 補正された吸光度値が 0 以下の場合は、0 とみなします。
- ⑤ 3.2.6 WST-8 反応液の測定に記載された手順に従って算出された生細胞率が 40% 以下の場合、被験物質の刺激物質 (GHS カテゴリー 1 もしくは 2) であると予測され、補正吸光度を算出する必要はありません。

5.2 WST-8 還元作用のある被験物質の検出

5.2.1 ステップ 3(予備検討)

- ① CCK-8(WST-8 ストック溶液)を EBSS で希釈して(CCK:EBSS=1:10)、WST-8 反応液を調製します。
- ② WST-8 反応液を、24 ウェルアッセイプレートに 0.3mL ずつ入れます。
- ③ 被験物質を液体の場合 50 μ L、固体の場合 10mg ずつ希釈した WST-8 培地に入れます。
- ④ アッセイプレートのフタを閉めて、4 時間 CO₂ インキュベーターで培養します。
- ⑤ インキュベーション後、静かにアッセイプレートを撈拌し、目視で WST-8 反応液の染色を確認する。
- ⑥ 被験物質により WST-8 反応液が著しく着色する場合、ステップ 4 に進みます。

5.2.2 ステップ 4(凍結死させた培養組織を用いた検討)

- ① 希釈した WST-8 反応液を明らかに着色する、被験物質(液体の場合 50 μ L、固体の場合 10mg)を②の凍結死させた培養組織表面に適用します。対照については、液体の場合は PBS、固体の場合は未処理の培養組織をお使いください。
- ② **3.2 項 試験操作の手順**に従います。生存した培養組織の代わりに、-80℃以下で 30 分凍結死させた培養組織を使用します。
- ③ 補正された吸光度値は以下の計算式で算出します。

補正された吸光度値=A-(B-C)

A: 被験物質で暴露し、WST-8 反応させた培養組織の吸光度値

B: 被験物質で暴露し、凍結死させた培養組織の吸光度

C: 陰性対照で暴露し、凍結死させた培養組織の吸光度

- ④ 補正された吸光度が 0 以下の場合、吸光度は 0 とみなします。
- ⑤ 試験方法に従って生細胞率が 40%以下の時、その被験物質は刺激性(GHS カテゴリー1 もしくは 2)とみなします。