

ヒト三次元培養表皮

LabCyte EPI-MODEL24 を用いた

医療機器抽出物の皮膚刺激性試験

国内 Round Robin Study

本試験用プロトコル Ver.1.1

2022 年 8 月 17 日

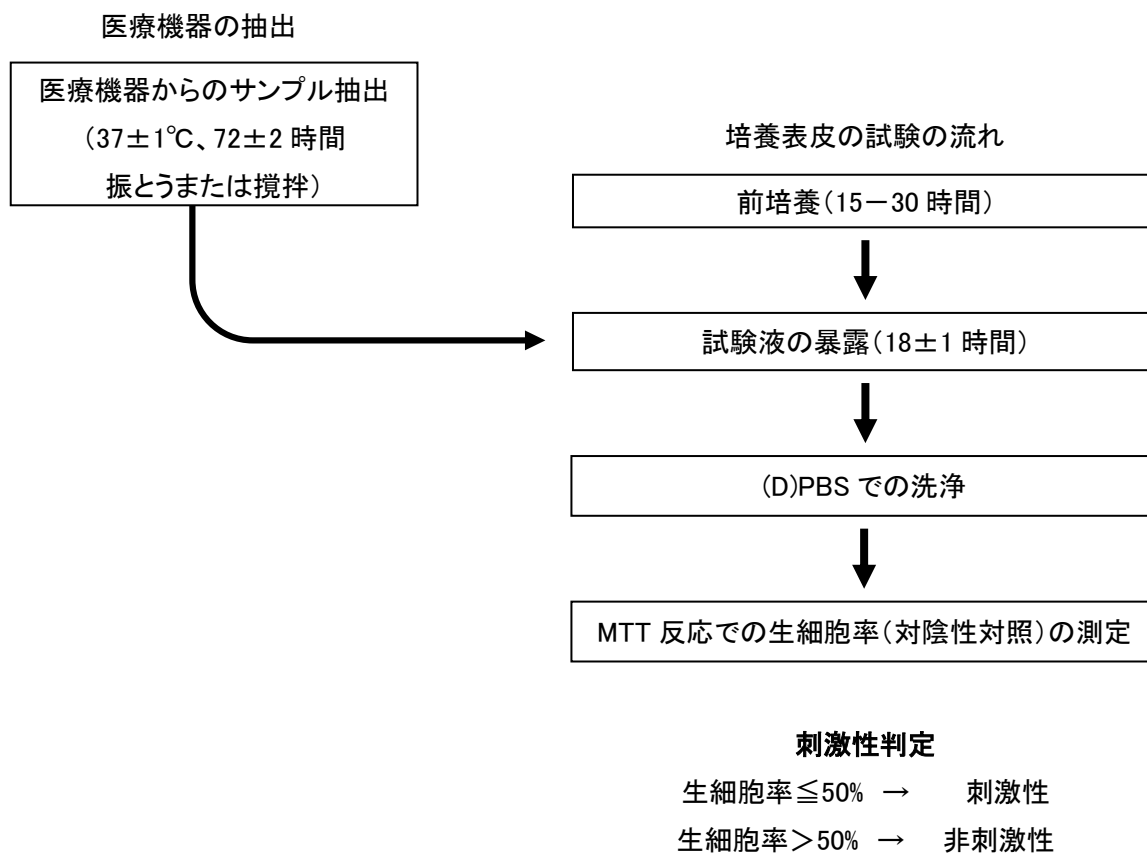
内容

1. 目的	1
1.1 試験の概要	1
1.2 作業スケジュール例	2
1.3 試験液の曝露・洗浄のタイムスケジュール例	2
<マイクロピペットを使用する場合>	2
<ポリ洗浄ビンを使用する場合>	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 皮膚刺激性試験セットの配送について	4
2.3 LabCyte EPI-MODEL24 取扱い上の注意	4
2.4 消耗品	5
2.5 その他の必要物品	5
2.5.1 機器・器具類	5
2.5.2 消耗品類	6
3. 試験方法	6
3.1 無菌操作 事前準備	6
3.1.1 陽性対照 (1% SDS 溶液)	6
3.1.2 陰性対照	7
3.1.3 溶媒対照	7
3.1.4 試験液の準備	7
3.1.5 (D)PBS 充填 洗浄用ポリ洗浄ビン	7
3.1.6 MTT 培地 (1mg/mL MTT培地)	7
3.2 試験操作	8
3.2.1 無菌操作 培養表皮 LabCyte EPI-MODEL24 の準備 (Day 3)	8
3.2.2 無菌操作 試験液の曝露 (Day 4)	9
3.2.3 MTT 試験 (Day 5)	13
3.2.4 MTT 反応産物(フォルマザン)の抽出と測定	13
4. 評価	16
4.1 試験成立条件	16
4.2 判定基準	16

1. 目的

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた医療機器抽出物の皮膚刺激性試験の国内ラウンドロビン研究(RRS)を実施するにあたって、以下にプロトコルを示します。

1.1 試験の概要

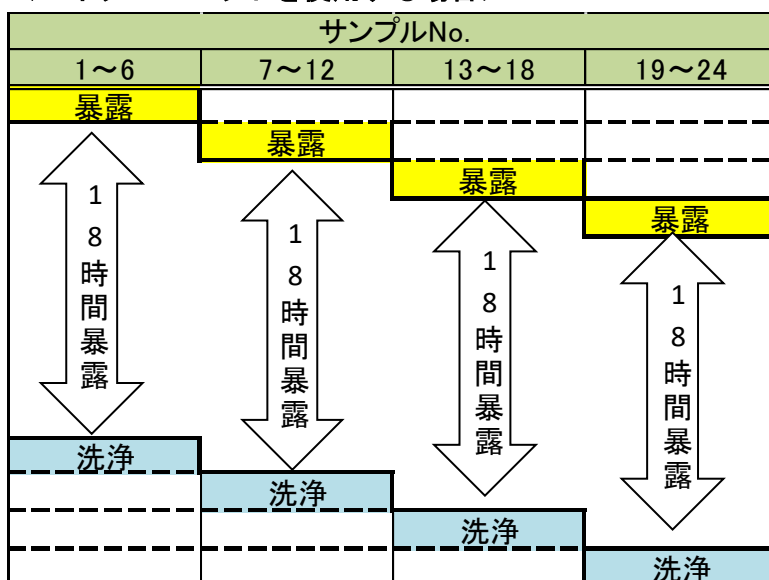


1.2 作業スケジュール例

	月 (Day 1)	火 (Day 2)	水 (Day 3)	木 (Day 4)	金 (Day 5)
	エピ・モデル出荷	エピ・モデル納品 (15-25°Cで保管)			MTT培地を調整し、 37±1°Cで温める
10:00					洗浄・上清回収
10:30					
11:00					MTT試験開始 (3時間+5分)
11:30					
12:00					
12:30					
13:00	ゴマ油を室温へ				
13:30					
14:00			アッセイ培地を 37±1°Cで温める	0.3%, 0.5%, 1% SDS調整	MTT抽出開始 (振とう・室温・2時間以上)
14:30					
15:00	試験試料に 溶媒を添加				
15:30					
16:00	抽出開始 (37±1°C、72±2時間)		前培養開始 (15-30時間)	試験液の暴露 (培養18±1時間)	OD ₅₇₀₋₆₅₀
16:30					
17:00					
17:30					

1.3 試験液の曝露・洗浄のタイムスケジュール例

＜マイクロピペットを使用する場合＞



※6 ウェル単位で試験液の曝露・洗浄作業を行ってください。

※2 枚目のプレート(サンプル No. 25～48)も同様に洗浄を行ってください。

<ポリ洗浄ビンを使用する場合>

サンプルNo.	1	2	3	22	23	24
0 min	暴露						
1 min		暴露					
2 min			暴露				
⋮							
⋮							
⋮							
⋮							
⋮							
21 min					暴露		
22 min						暴露	
23 min							暴露
作業時間	↑ 1 8 時間 暴露 ↓						
18h 0min	洗浄						
18h 1min		洗浄					
18h 2min			洗浄				
⋮							
⋮							
⋮							
⋮							
⋮							
18h 21min					洗浄		
18h 22min						洗浄	
18h 23min							洗浄

※作業例は1プレートの場合を示してありますが、サンプル数によって作業時間を適宜変更してください。

※作業の習熟度によって、曝露は1~3分間隔での操作をお奨めいたします。

※2枚目のプレート(サンプル No. 25~48)も同様に洗浄を行ってください。

2. 準備

2.1 皮膚刺激性試験セット セット構成

本試験に用いる皮膚刺激性試験セットの構成を以下にお示します。

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 (15°C~25°C)
アッセイ培地 30 mL	2	培養用の基礎培地、冷蔵保存
24 ウェルプレート	4	試験用の空プレート、室温保存

本プロトコルに従って、RRS 本試験を行う場合、1 回の試験につき上記の皮膚刺激性試験セットを 2 キット使用します。専用のご注文書にご記入のうえ、代理店様にご提出ください。

2.2 皮膚刺激性試験セットの配送について

皮膚刺激性試験セットは、特殊梱包容器(アイコンポ/日通航空(株))に格納して、日通航空(株)により配送されます。受領後、アイコンポ内を確認して、ロット番号、使用期限を確認してください。必要事項を作業記録用紙の 3 に記入して下さい。

2.3 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 (15°C~25°C)** 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ください。

LabCyte EPI-MODEL24 に使用しているヒト表皮細胞は、HIV, HBV, HCV, 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ください。

2.4 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
ゴマ油	30 mL 程(1 試験分)医療機器の抽出溶媒。 Sigma-Aldrich #85067 もしくは日本薬局方を使用する。
生理食塩液	30 mL 程(1 試験分)医療機器の抽出溶媒。大塚製薬 #10095-3
SDS	陽性対照として使用。20% SDS 溶液は参加施設へ配布します。
DPBS(陰性対照用)	陰性対照として使用。陰性対照の DPBS は参加施設へ配布します。
(D)PBS(洗浄用)	試験液の洗浄に使用。2 L 程度(2 プレート分)参加施設でご用意ください。
滅菌綿棒	洗浄後、培養カップを拭くのに使用。48 本(2 プレート分)
MTT 試薬※	16 mg(2 プレート分)生細胞率測定に使用。
イソプロパノール	MTT 反応後の抽出操作に使用。24 mL 程度(2 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 (25 mg) 型番: 403026

96 ウェル測定プレート(1 枚) 型番: 406096

24 ウェルプレート(1 枚) 型番: 353047

2.5 その他の必要物品

2.5.1 機器・器具類

- ・安全キャビネット(又はクリーンベンチ)
- ・CO₂ インキュベーター(37±1°C、5%CO₂、高湿度を維持可能であるもの)
- ・温度管理可能な振とう機(37±1°C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: 570 nm、650 nm)
- ・精密天秤(1 mg 以上を正確に測りとれるもの)
- ・ストップウォッチ
- ・マイクロピペット(100 µL-1,000 µL を正確に測りとれるもの)
- ・ポジティブディスプレイメントピペット(100 µL-1,000 µL を正確に測りとれるもの)
- ・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)(MTT アッセイ後、崩れた組織を回収するときに使用)
- ・ビーカー(容量1~2 L)
- ・ポリ洗浄ビン(容量 500~1,000 mL)(試験液洗浄時に使用します。マイクロピペットを使用して洗浄を行う場合は不要)

2.5.2 消耗品類

- ・マイクロピペット用チップ(滅菌済み: 100 μ L-1,000 μ L を測りとれるもの)
- ・ポジティブディスプレイメントピペット用チップ(滅菌済み: 100 μ L-1,000 μ L)
- ・滅菌ピペット(10 mL、25 mL)
- ・マイクロチューブ(1.5 mL、48 個 : 培養液回収用(24 個)、MTT 抽出用(24 個))
- ・スカルペル(実験用メス: MTT 抽出時、組織が崩れやすい場合、メンブレンごと切り出すときに使用する。)

3. 試験方法

※ 3.1.1~3.1.6、3.2.1~3.2.2 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ください。

※ 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 **無菌操作** 事前準備

3.1.1 陽性対照 (1% SDS (v/v)溶液)

① 20% SDS を下記のように生理食塩液で希釈して 1% SDS (v/v)溶液を調製します。

20% SDS 100 μ L
生理食塩液 1.9 mL

② 1% SDS 溶液を更に生理食塩液で下記のように希釈し、0.5%溶液と 0.3%溶液を調製します。

0.5% SDS (v/v)
1% SDS 500 μ L
生理食塩液 500 μ L

0.3% SDS (v/v)
1% SDS 300 μ L
生理食塩液 700 μ L

③作業記録用紙に調製方法を記録してください(作業記録用紙: 4-1 陽性対照)

* 溶解後は冷暗所で保存し、24 時間以内に使用してください。

3.1.2 陰性対照

- ① 配布された DPBS を使用します。

3.1.3 溶媒対照

- ① 1 mL 生理食塩液と 1 mL ゴマ油を、それぞれ褐色ビンに入れて試験液の抽出方法と同条件 ($37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 72 ± 2 時間振とうまたは攪拌) で調製します。
詳細は ISO 10993-12 の「EXTRACTION PROCEDURE」を参照。

3.1.4 試験液の準備

- ① 詳細は ISO 10993-12 の「EXTRACTION PROCEDURE」を参照してください。
- ③ 極性溶媒として生理食塩液、非極性溶媒としてゴマ油を使用してください。
- ④ 抽出条件は $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 72 ± 2 時間で行ってください。
- ⑤ 抽出液は室温で保存し、24 時間以内に使用してください。
- ⑥ 作業記録用紙に試験試料の情報を記入してください。(作業記録用紙 2)

1 mL 生理食塩液と 1 mL ゴマ油をそれぞれ入れて、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 72 ± 2 時間振とうまたは攪拌して使用してください (Day 1)。作業記録用紙に振とう器のメーカー、振とう条件を記入してください。(作業記録用紙 2)

試験試料名: 試験試料は、コード化された褐色ビンに入っています。「-」の後の数字が「1」の試験試料については生理食塩液で抽出、「-」の後の数字が「2」の試験試料についてはゴマ油で抽出してください。

(例) A111-1 は生理食塩液、A555-2 についてはゴマ油で抽出してください。

3.1.5 (D)PBS 充填 洗浄用ポリ洗浄ビン

- ① ポリ洗浄ビンで洗浄する場合、(D)PBS をポリ洗浄ビンに充填します。

3.1.6 MTT 培地 (1 mg/mL MTT 培地)

- ① MTT 試薬 (16 mg) をアッセイ培地 (16 mL) に溶解して、MTT 培地を調製します (終濃度: 1 mg/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。
- ② 作業記録用紙に調製方法を記録してください (作業記録用紙: 4-2 MTT 試薬)。

MTT 試薬を 25 mg で調整する場合、アッセイ培地 (25 mL) に溶解してください。

※溶解後は -20°C で 6 か月保存できます。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

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

3.2.1 無菌操作 培養表皮 LabCyte EPI-MODEL24 の準備 (Day 3)

- ① アッセイ培地を $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で温めます。
- ② 24 ウェルプレートに温めたアッセイ培地を $500 \mu\text{L}$ ずつ分注します。
- ③ LabCyte EPI-MODEL24 プレートを実験室より取り出します。
- 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、ピンセットなどで注意深く取り除いてください。

- ⑤ 培養カップをアッセイ培地の入った各ウェルに移します。

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ください。
- 気泡がある場合、一度培養カップを取り出します。その後、培養カップを斜めに傾けて、気泡が培養カップ底面に入らないよう、24 ウェルプレートに戻します。

- ⑥ 24 ウェルプレート(前培養開始前)にフタをして、 CO_2 インキュベーターに入れます。
- ⑦ **3.2.2 項 試験液の曝露**まで、一晩(15~30 時間)静置します。
- ⑧ 作業記録用紙に作業内容を記録してください(作業記録用紙: 5-1 前培養)。

3.2.2 無菌操作試験液の曝露 (Day 4)

3.2.2.1 曝露の準備

- ① アッセイ培地を 37±1°Cで温めます。
- ② 温めたアッセイ培地を 24 ウェルプレート(試験液の曝露用)に 500 μL ずつ分注します。
- ③ 作業記録用紙に作業内容を記録してください(作業記録用紙:5-2 試験液の曝露)。

3.2.2.2 試験液の曝露

- ① 前培養を行った 24 ウェルプレート(前培養終了済)を CO₂ インキュベーターから取り出します。
- ② 以下の図のように陰性対照、陽性対照、溶媒対照、試験液を 100 μL、表皮組織表面に添加します。各試験液につき 3 個の培養表皮を使用します。陽性対照の濃度検討について、0.5%および 0.3% SDS についても曝露してください。

【試験液配置図】

コード化された試験試料については、各施設で配置を設定してください。

PLATE 1

1	2	3	4	5	6	生食抽出群
-----	NC (DPBS)	-----	-----	VC-1	-----	
7	8	9	10	11	12	
-----	A111-1	-----	-----	A222-1	-----	
13	14	15	16	17	18	
-----	A333-1	-----	-----	A444-1	-----	
19	20	21	22	23	24	
-----	PC (1% SDS)	-----	-----	0.5% SDS	-----	

PLATE 2

25	26	27	28	29	30	ゴマ油抽出群
-----	NC (DPBS)	-----	-----	VC-2	-----	
31	32	33	34	35	36	
-----	A555-2	-----	-----	A666-2	-----	
37	38	39	40	41	42	
-----	A777-2	-----	-----	A888-2	-----	
43	44	45	46	47	48	
-----	PC (1% SDS)	-----	-----	0.3% SDS	-----	

例としてコード番号を掲載しています。作業記録用紙 5-2 には、各施設へ送付された試験液のコード名を記載してください。

NC: 陰性対照
 PC: 陽性対照
 VC: 溶媒対照

注意点

- 試験液が培養カップ内の組織全体に広がっているか目視で確認してください。
- 試験液が組織全体に広がっていない場合は、プレートまたは培養カップを傾けて全体に広げてください。

- ③ 試験液を曝露した培養カップを 3.2.2.1 で準備した 24 ウェルプレート(試験液の曝露用)に移します。

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ください。
- 気泡がある場合、一度培養カップを取り出します。その後、培養カップを斜めに傾けて、気泡が培養カップ底面に入らないよう、24 ウェルプレートに戻します。

- ④ 24 ウェルプレート(試験液を曝露済)にフタをして CO₂ インキュベーターに入れ、18±1 時間静置します。
- ⑤ 作業記録用紙に作業内容を記録してください(作業記録用紙:5-2 試験液の曝露)。

3.2.2.3 洗浄作業前の準備 (Day 5)

- ① アッセイ培地を $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 30 分間温めます。
- ② アッセイ培地を 24 ウェルプレート(洗浄用)の各ウェルに 500 μL ずつ分注します。
- ③ CO_2 インキュベーターから 18 ± 1 時間試験液を曝露した 24 ウェルプレート(試験液曝露済)を取り出し、培養カップを 24 ウェルプレート(洗浄用)に移します。
- ④ 培養カップを移した後の 24 ウェルプレート(試験液曝露済)については、培養上清の回収まで、氷上または冷蔵庫で保管します。
- ⑤ 24 ウェルプレート(洗浄用)にフタをして洗浄作業(3.2.2.4)に進みます。
- ⑥ 作業記録用紙に作業内容を記録してください(作業記録用紙:5-3 洗浄前の準備)。

3.2.2.4 洗浄

洗浄はマイクロピペット等またはポリ洗浄ビンを使用して行ってください。

<マイクロピペット等を使用する場合>

6 ウェル単位で洗浄を行ってください。

- ① 18 ± 1 時間 試験液曝露後、試験液をマイクロピペットで除去します。
- ② マイクロピペットで(D)PBS を 500 μL /ウェルを添加します。
- ③ マイクロピペットで培養カップ内の(D)PBS を吸い取ります。
- ④ ②③の操作を 10 回以上繰り返し、培養カップ内部の試験液を完全に除去します。
- ⑤ 作業記録用紙に作業内容を記録してください(作業記録用紙:5-4 洗浄)。

<ポリ洗浄ビンを使用する場合>

- ① (D)PBS を充填した洗浄用ポリ洗浄ビンを用いて、ビーカー上で(D)PBS を培養カップの壁面や組織に当てながら、培養カップ内に充填します。**【写真 1】**
組織への障害を防ぐため、(D)PBS の水流を激しくあてることは避けてください。
- ② 培養カップを傾けてカップ内の(D)PBS をビーカー内に廃棄し、試験液を除去します。必要に応じて培養カップをビーカー上でタッピングしてカップ内の試験液を(D)PBS で除去します。**【写真 2】**
- ③ ①②の操作を 10 回以上繰り返し、培養カップ内部の試験液を完全に除去します。最終洗浄後はタッピングにより培養カップ内部の(D)PBS を除いてください。
- ④ 最終洗浄後に培養カップに付着した(D)PBS を、滅菌綿棒で取り除きます**【写真 3】**。
- ⑤ 作業記録用紙に作業内容を記録してください(作業記録用紙:5-4 洗浄)。

【写真 1】 洗浄



【写真 2】 (D)PBS の廃棄



【写真 3】 (D)PBS の除去



注意点

■培養カップ内に(D)PBS の水滴が認められる場合は、培養カップを傾けて(D)PBS の水滴を綿棒で吸い上げてください。ただし、綿棒が培養表皮に直接触れないように注意してください。培養カップ内に洗浄液((D)PBS)の残存量が多いと、キャリーオーバーにより MTT 溶液が希釈され吸光度が低くなる可能性があります。

3.2.2.5 炎症性サイトカイン測定用の培養液のサンプリングと保存

氷上または冷蔵庫に保存してあった 18 ± 1 時間曝露後の培養液を 1.5 mL マイクロチューブに移し、 -20°C 以下の冷凍庫で保存します。(メディカルフリーザーをお持ちの場合は、そちらに保存ください。)作業者が一人であるなど、MTT 反応に速やかに進めない場合は、3.2.3.2 MTT 反応の 3 時間の間に回収してください。

なお、サンプルは 12 ヶ月保存可能です。

3.2.3 MTT 試験 (Day 5)

3.2.3.1 MTT 試験の準備

- ① 3.1.6 で調製した MTT 培地を $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 30 分間温めます。
- ② マイクロピペットを使用して温めた MTT 培地を 24 ウェルプレート (MTT 反应用) の各ウェルに $300 \mu\text{L}$ ずつ分注します。
- ③ 24 ウェルプレート (MTT 培地添加済) にフタをして CO_2 インキュベーターに移します。
- ④ MTT 反応を始めるまで、インキュベーターの中で静置します。
- ⑤ 作業記録用紙に作業内容を記録してください (作業記録用紙: 4-2 MTT 培地の調製)。

3.2.3.2 MTT 反応

- ① 全洗浄操作終了後、培養カップを 3.2.3.1 で準備した 24 ウェルプレート (MTT 培地添加済) に移します。培養カップの外側に培養液が付着している場合は、キムタオル等で拭き取ってください。
- ② 培養表皮を移した 24 ウェルプレートにフタをして、 CO_2 インキュベーターに入れます。
- ③ 3 時間 (± 5 分) 静置します。
- ④ 作業記録用紙に作業内容を記録してください (作業記録用紙: 5-5 MTT 試験)。

* 洗浄後、速やかに培養上清を回収できない場合は、MTT 反応時間中に回収してください。

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。
- 気泡がある場合、一度培養カップを取り出します。その後、培養カップを斜めに傾けて、気泡が培養カップ底面に入らないよう、24 ウェルプレートに戻します。

3.2.4 MTT 反応産物 (フォルマザン) の抽出と測定

3.2.4.1 MTT 反応産物 (フォルマザン) の抽出

- ① MTT 反応 3 時間 (± 5 分) 後、24 ウェルプレートを CO_2 インキュベーターから取り出します。
- ② 24 ウェルプレート (MTT 反応済) のフタをあけ、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 4】



注意点

■試験液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ください。

- ③ 培養表皮片を 1.5 mL 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 500 μ L を入れ、培養表皮を完全に浸漬します。
- ⑤ 少なくとも 2 時間遮光して振とうし完全に抽出させる、もしくは一晩以上、室温で暗所に静置して色素を完全に抽出します。

注意点

- チューブをパラフィルムなどで密栓してください。
- 一晩以上抽出する場合、陰性対照のフォルマザンが白く抜けるまで振とうしてください。

- ⑥ マイクロチューブ内の溶液をよく混合して均一にします。
- ⑦ マイクロチューブ内の溶液 200 μ L を以下の配置図の通り、96 ウェルプレートの各ウェルに入れます。コード化された試験試料は B3~G3、B4~G4、B5~G5、B6~G6 に配置してください(作業記録用紙 5-7 測定に作業内容を記入してください)。陽性対照の濃度検討を行わない場合は、B8~G8 のウェルは不要となります。

マイクロチューブ 1 本から 2 ウェルに分注します。

ブランクとして、イソプロパノール 200 μ L (8 ウェル分)を設定します。

PLATE 1: 生理食塩液抽出群

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK				
B	陰性対照① (DPBS)	Vehicle control ① (saline)	A111-1①	A222-1①	A333-1①	A444-1①	陽性対照① (1% SDS)	0.5% SDS ①				
C												
D	陰性対照② (DPBS)	Vehicle control ② (saline)	A111-1②	A222-1②	A333-1②	A444-1②	陽性対照② (1% SDS)	0.5% SDS ②				
E												
F	陰性対照③ (DPBS)	Vehicle control ③ (saline)	A111-1③	A222-1③	A333-1③	A444-1③	陽性対照③ (1% SDS)	0.5% SDS ③				
G												
H												

PLATE 2: ゴマ油抽出群

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK				
B	陰性対照① (DPBS)	Vehicle control ① (sesame oil)	A555-2①	A666-2①	A777-2①	A888-2①	陽性対照① (1% SDS)	0.3% SDS ①				
C												
D	陰性対照② (DPBS)	Vehicle control ② (sesame oil)	A555-2②	A666-2②	A777-2②	A888-2②	陽性対照② (1% SDS)	0.3% SDS ②				
E												
F	陰性対照③ (DPBS)	Vehicle control ③ (sesame oil)	A555-2③	A666-2③	A777-2③	A888-2③	陽性対照③ (1% SDS)	0.3% SDS ③				
G												
H												

注意点

■ 細かな表皮組織片が浮遊している場合は、組織片を吸い取らないようにしてください。

- ⑧ プレートリーダーを使用して、570 nm および 650 nm の吸光度値を測定します。
- ⑨ 今回の試験では、専用のエクセルシートに測定値を入力することで、計算結果を得ることができます。

ご参考までに、以下に生存率の計算方法をお示しいたします。

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

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

下記式より試験液の生細胞率を計算します。

$$\text{生細胞率 (\%)} = \frac{\text{試験液の測定値平均}^*}{\text{陰性対照の測定値平均}^*} \times 100$$

* N=3×2 ウェル分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。

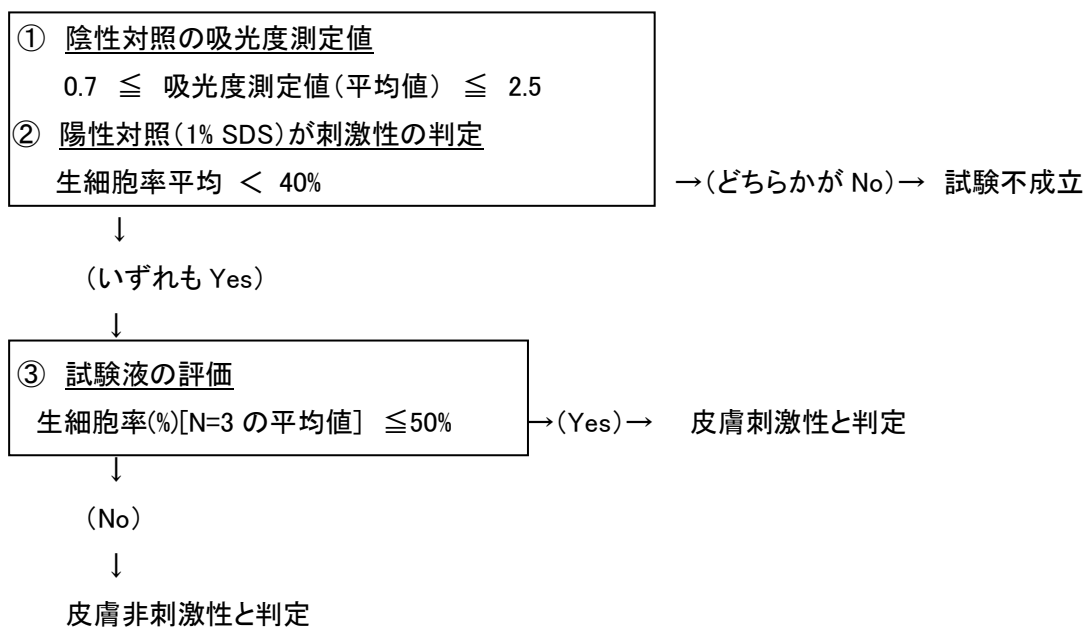
- ・ 吸光度値: $0.7 \leq$ 陰性対照の吸光度測定値平均 ≤ 2.5
- ・ 陽性対照: 1% SDS(陽性対照)の生細胞率 $< 40\%$
- ・ 陰性対照・陽性対照を含む各試験液の生細胞率のSD $\leq 20\%$
- ・ 溶媒対照: 陰性対照の $80\% <$ 溶媒対照の平均生細胞率 $<$ 陰性対照の 120%

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】



作業記録用紙 Ver. 1.3 : MDS

施設番号 :	施設名 :
--------	-------

実験スケジュール

Test schedule

手順 Procedure	実施日 Date (yy/mm/dd)	Plate 1 (Saline)		Plate 2 (Sesame oil)	
		Starting time	Ending time	Starting time	Ending time
前培養 (15-30 hrs) Pre-incubation					
曝露 (18±1 hr) Exposure					
洗浄 Rinsing					
MTT 試験 (3 hrs±5 mins) MTT test					
抽出 (2 hrs) Extraction at least 2 hrs					
測定 Measurement					

1. 使用機器のチェック (担当者名: _____ 確認日: _____)
 Equipments check Operator Date

37°Cインキュベーターのメーカー名: _____ 型式: _____
 Manufacturer name of CO₂ incubator Model

- CO₂濃度が 5±1%である。
 The concentration of CO₂ is 5±1%
- 温度が 37±1°Cである。
 The temperature of incubator is 37±1°C
- リザーバーに水が入っている。
 The reservoir in incubator is filled with water

冷蔵庫のメーカー名: _____ 型式: _____
 Manufacturer name of refrigerator Model

- 温度が 5±2°Cである。
 The temperature of refrigerator is 5±2°C

マイクロピペット

Check of micropipettes

- 蒸留水をピペットで測り取り、チューブ等に入れます。
 Transfer each volume of distilled water to each tubes using micropipettes
- 精密天秤で測定し、測りとった量と質量 (g) が一致しているか確認します。
 Confirm the consistency of the volume transferred by micropipette and weight measured by precision balance

上記の作業を3回繰り返し、ピペットの正確性を確認します。

Repeat 3 times above procedures and confirm the accuracy of the micropipettes

本作業は試験の開始前に毎回行ってください。

Operator must confirm the accuracy of micropipettes before every experiments.

	2 mL	900 μ L	300 μ L	200 μ L	100 μ L
1					
2					
3					
Average					
SD					
Tolerance	5%	5%	5%	5%	5%

最上段の の欄にピペット名を記載してください。

Filled the name of micropipettes in gray columns

ポジティブディスプレイメントピペット用

For positive displacement pipette

	2 mL	900 μ L	300 μ L	200 μ L	100 μ L
1					
2					
3					
Average					
SD					
Tolerance	5%	5%	5%	5%	5%

最上段の の欄にピペット名を記載してください。

Filled the name of micropipettes in gray columns

2. 試験試料の情報 (試験担当者名:

The information of test samples Operator

、確認日

Date

施設番号:

Number of laboratory

試験番号:

Test No.

生理食塩液

Saline

メーカー:

Manufacturer name of saline

ロット番号:

Lot. No.

使用期限:

Expiration date

ゴマ油(選択してください)

Sesame oil

日局メーカー: 小堺製薬株式会社 ロット番号: BC-18 使用期限: 2026年3月
Manufacturer name of sesame oil Lot No. Expiration date

欧局メーカー: シグマアルドリッチ ロット番号: BCCG0778 使用期限: 2022年12月
Manufacturer name of sesame oil Lot No. Expiration date

振とうで抽出 (条件 rpm)
Extraction by shaker Condition rpm

振とう器のメーカー名: _____ 型式: _____
Manufacturer name of shaker Model

攪拌で抽出 (攪拌回数 回)
Extraction by hand mixing Number of mixing Times

37°Cインキュベーターのメーカー名: _____ 型式: _____
Manufacturer name of incubator Model

試験液の調製

試験試料名 Name of samples	抽出溶媒 Vehicle	抽出液量 Volume of vehicle (mL)	使用インキュベーター Name of used incubator	開始日 Starting date	終了日 Ending date	抽出前後の外観 Gross appearance after extraction
				振とう・静置 開始時間 Starting time	振とう・静置 終了時間 Ending time	
溶媒対照 Vehicle control (生理食塩液) Saline	Saline					
	Saline					
	Saline					
	Saline					
溶媒対照 Vehicle control (ゴマ油) Sesame oil	Sesame oil					
	Sesame oil					
	Sesame oil					
	Sesame oil					
	Sesame oil					

3. ラボサイト エピ・モデル 24 の受領 (担当者名:)
 Receipt of EPI-MODEL24 Operator

施設番号: _____
 Number of laboratory

試験番号: _____
 Test No.

受取日: _____
 Date of receipt

ロット No. _____
 Lot No.

使用期限: _____
 Expiration date

アッセイ培地: (ロット No. _____ 使用期限: _____)
Assay media Lot No. Expired date

外観の異常: なし あり (概要: _____)
Defective appearance No Yes Outline of defective

試薬の準備

Preparation of reagents

4-1 陽性対照 1% SDS の調製 (試験担当者名: _____ 、調製日 _____)
Preparation of 1% SDS as positive control Operator Preparation date

・1% SDS 溶液
1% SDS solution

20% SDS 溶液 _____ μ L
20% SDS solution

生理食塩液 _____ mL
Saline

・0.5% SDS 溶液
0.5% SDS solution

1% SDS 溶液 _____ μ L
1% SDS solution

生理食塩液 _____ μ L
Saline

・0.3% SDS 溶液

1% SDS 溶液 _____ μ L
1% SDS solution

生理食塩液 _____ μ L
Saline

4-2 MTT 培地の調製 (試験担当者名: _____ 、調製日 _____)
MTT solution Operator Preparation date

MTT 試薬をアッセイ培地で溶解して 1.0 mg/mL に調製します。

Dissolve MTT in assay media to prepare 1.0mg/mL of MTT solution

(推奨: MTT 試薬を 16 mg 測りとり、アッセイ培地 16 mL で溶解してください)

(Recommend: Dissolve the 16 mg of MTT with 16 mL of assay media)

メーカー: _____
Supplier:

ロット番号: _____
Lot No.

MTT 試薬 _____ mg

Weight of MTT

アッセイ培地 _____ mL

Assay media

5. 試験スケジュール

Test schedule

5-1. 前培養(15~30 時間) (担当者名: _____)

Pre-incubation (15-30 hr) Operator

使用前にアッセイ培地を $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で温めた。

Pre-incubated the assay media at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ before use

37°Cのインキュベーターのメーカー: _____

Manufacturer name of incubator

型式: _____

Model

アッセイ培地を 500 μL ずつ各ウェルに分注した。

Added 500 μL /well of assay media

開始日(時間): _____ (: ~)

Starting time

終了日(時間): _____ (~ :)

Ending time

5-2. 試験液の曝露 (18 \pm 1 時間) (担当者名: _____)

Exposure of test sample (18 \pm 1hr) Operator

使用前にアッセイ培地を温めた。

Pre-incubated the assay media at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ before use

曝露用のウェルにアッセイ培地を 500 μL ずつ各ウェルに分注した。

Added 500 μL /well of assay media to the 24-well assay plate prepared for exposure

試験液を 100 μL ずつ、培養カップの表皮組織上に曝露した。

Added 100 μL of test sample to the surface of tissues

【試験液配置図：Layout】

PLATE 1

NC (DPBS)			VC (Saline)			Extracted by Saline	
A	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L		<input type="checkbox"/> 100 μ L
Code name ()			Code name ()				
B	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L		<input type="checkbox"/> 100 μ L
Code name ()			Code name ()				
C	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L		<input type="checkbox"/> 100 μ L
PC(1%SDS)			Sample name ()				
D	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L		<input type="checkbox"/> 100 μ L

PLATE 1 培養開始時間: _____

Starting incubation time of PLATE 1

PLATE 1 培養終了時間: _____

Ending incubation time of PLATE 1

PLATE 2

NC (DPBS)			VC (Sesame oil)			Extracted by sesame oil	
A	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L		<input type="checkbox"/> 100 μ L
Code name ()			Code name ()				
B	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L		<input type="checkbox"/> 100 μ L
Code name ()			Code name ()				
C	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L		<input type="checkbox"/> 100 μ L
PC(1%SDS)			Sample name ()				
D	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L	<input type="checkbox"/> 100 μ L		<input type="checkbox"/> 100 μ L

NC: 陰性対照、Negative control

PC: 陽性対照、Positive control

VC: 溶媒対象、Vehicle control

PLATE 2 培養開始時間: _____

Starting incubation time of PLATE 1

PLATE 2 培養終了時間: _____

Ending incubation time of PLATE 1

18±1 時間曝露後の外観異常がない。

Abnormal appearance is not coccured in the tissues after sample exporure for 18±1 hr.

外観異常がある場合は備考欄に記入してください。

Fill in the remarks column if there is any abnormal appearance

備考 例:しわが寄り過ぎている、表皮組織がめくれている

Remarks.

5-3 洗浄前の準備

Preparation before rinse

使用前にアッセイ培地を 37°Cで温めた。

Pre-incubated the assay media at 37±1°C before use

24 ウェルプレート(洗浄用)にアッセイ培地を 500 µL ずつ各ウェルに分注した。

Added 500 µL/well of assay media to the assay plate prepared for rinsing

培養カップを移した後の 24 ウェルプレート(試験液曝露済)は、培養上清回収まで氷上または冷蔵庫で保管した。

24-well assay plates after cell culture inserts transferred were stored on ice or at refrigerated.

氷上

On ice

冷蔵庫

Refrigerator

5-4 洗浄

Rinsing

PBS メーカー名: _____

Supplier:

ロット番号: _____

Lot No.

ピペットで洗浄

Rinsing by micropippeter

ポリ洗浄ビンで洗浄

Rinsing by poly wash bottle

洗浄を 10 回以上行った

Rinsing more than 10 times

PLATE 1 開始日(時間): _____ (: ~)

Starting time of PLATE 1

PLATE 1 終了日(時間): _____ (~ :)

Ending time

PLATE 2 開始日(時間): _____ (: ~)

Starting time of PLATE 1

PLATE 2 終了日(時間): _____ (~ :)

Ending time

洗浄後に組織の剥がれ等がある場合、以下の欄に記入してください。

Fill in the remarks column if there are any issues. For example, the tissues are detached from culture inserts.

備考: 例：1% SDS（陽性対照）は3ウェルとも剥がれた。

Remarks

5-5 MTT 試験（3時間±5分）

MTT test

使用前に MTT 培地を $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で温めた。

Preincubated MTT solution at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ before use

MTT 培地 300 μL を 24 ウェルプレートに添加した。

Added 300 μL /well of MTT solution to the 24-well assay plate

PLATE 1 インキュベート開始時間: (: ~)

Starting time of incubation of PLATE 1

PLATE 1 インキュベート終了時間: (~ :)

Ending time for incubation of PLATE 1

PLATE 2 インキュベート開始時間: (: ~)

Starting time of incubation of PLATE 2

PLATE 2 インキュベート終了時間: (~ :)

Ending time for incubation of PLATE 2

5-6 抽出 (最低 2 時間)

Extraction (at least 2 hours)

組織を 500 μ L のイソプロパノールに完全に浸した。

Soaked each tissues in 500 μ L of iso-propanol

振とうを行った(一晩以上抽出した場合はチェック不要)。

Shaked during extraction (Not needed this item if extraction is proceded overnight)

振とう器メーカー名:

Manufacturer name of shaker

型式:

Model

抽出中は遮光した。

Shaded during extraction

振とう・静置 開始日(時間): (: ~)

Starting time

振とう・静置 終了日(時間): (~ :)

Ending time

5-7 測定

Mesurement

96 ウェルプレートの配置は以下となっている。

Layout of 96 well plate is as below.

(B3~G3、B4~G4、B5~G5、B6~G6 にはコード化された試験試料名を配置・記入してください。

陽性対照の濃度検討を行わない場合は、B8~G8 のウェルは不要となります。)

Write down the coded sample names in B3~G3, B4~G4, B5~G5, B6~G6. The culum of B8~G8 is unnecessary if the examination for the concentration of positive control is not performed.

PLATE 1: 生理食塩液抽出群												
For saline extracts												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK				
B	陽性対照 ① (DPBS)	Vehicle control ① (saline)					陽性対照 ① (1% SDS)	0.5% SDS ①				
C												
D	陽性対照 ② (DPBS)	Vehicle control ② (saline)					陽性対照 ② (1% SDS)	0.5% SDS ②				
E												
F	陽性対照 ③ (DPBS)	Vehicle control ③ (saline)					陽性対照 ③ (1% SDS)	0.5% SDS ③				
G												
H												

PLATE 2: ゴマ油抽出群												
For sesame oil extracts												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK				
B	陽性対照 ① (DPBS)	Vehicle control ① (sesame oil)					陽性対照 ① (1% SDS)	0.3% SDS ①				
C												
D	陽性対照 ② (DPBS)	Vehicle control ② (sesame oil)					陽性対照 ② (1% SDS)	0.3% SDS ②				
E												
F	陽性対照 ③ (DPBS)	Vehicle control ③ (sesame oil)					陽性対照 ③ (1% SDS)	0.3% SDS ③				
G												
H												

測定波長は 570 nm および 650 nm を使用した。

OD values were measured at 570 nm and 650 nm

プレートリーダーメーカー名: _____ 型式: _____
Manufacture name of microplate reader Model

測定開始日(時間): _____ (: ~)
Starting time

測定終了日(時間): _____ (~ :)
Ending time

5-8 培養上清の回収 Supernatants collection

回収した培養上清は-20℃以下で保存している。
Collected supernatants are stored below -20℃.

回収日: _____
Collection date

保存開始時間(冷凍庫に入れた時間): _____
Starting time of storage

フリーザーのメーカー名: _____ 型式: _____
Manufacture name of freezer Model

作業記録用紙 変更履歴

Rev.	変更内容	日付
Ver. 1.1	1) 初版	2022年8月17日
Ver. 1.2	1) 表紙に日付を追記 2) 施設番号・施設名を記入する欄を作成 3) 実験スケジュールの項目を作成し、作業時間を記入する欄を作成。 4) プレート2枚(生理食塩液・ゴマ油)に分けた記入欄を作成 5) 生理食塩液のメーカー、ロット番号、使用期限を記入する欄を作成 6) ゴマ油を日本薬局方と欧州薬局方を選択する欄を作成 7) 各使用機器の型式を記入する欄を作成 8) 試験液の調製欄を変更 9) プレートレイアウトを生理食塩液群とゴマ油群に分けた 10) プレートをインキュベーターに入れる培養開始時間と培	2022年9月7日

	<p>養終了時間の記入欄を作成</p> <p>11) MTT 試験の反応開始時間・終了時間をプレート毎に記入する欄を作成</p>	
Ver. 1.3	<p>1) 表紙の日付を修正</p> <p>2) 表紙に記載された Ver. を修正</p> <p>3) 【作業記録用紙:MDS】1. 使用機器のチェックの項に 37°C インキュベーターと冷蔵庫のメーカー・型番を記入する欄を追記。</p> <p>4) 【作業記録用紙:MDS】5-4 洗浄の項に PBS のメーカー、ロット番号を記入する欄を追記。</p> <p>5) 【作業記録用紙:MDS】5-8 培養上清の回収の項にプレートリーダー、フリーザーのメーカー・型番を記入する欄を追記。</p>	2022 年 9 月 16 日