

Version 1.81j, January 18, 2019, Prepared by Hiroyuki Yamaguchi <sup>1,2</sup> and Toshiaki Takezawa <sup>1</sup>, <sup>1</sup> Institute of Agrobiological Sciences, National Agriculture and Food Research Organization, <sup>2</sup>Kanto Chemical Co., Inc.

# Vitrigel-EIT 法標準作業手順書

Version 1.81j January 18, 2019

山口 宏之 <sup>1,2</sup> 竹澤 俊明 <sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門

<sup>2</sup>関東化学株式会社

Address correspondence to: Dr. Toshiaki Takezawa, Division of Biotechnology,  
Institute of Agrobiological Sciences, National Agriculture and Food Research Organization,  
1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.  
E-mail: t.takezawa@affrc.go.jp

## 1 原理

Vitrigel-EIT 法は、ヒト角膜上皮組織シート型培養モデルに被験物質を曝露した際の経上皮電気抵抗値の経時変化を指標として被験物質の眼刺激性の有無を判定する試験法である。以下に標準的な実験プロトコルを示す。

## 2 測定キット内容 (72 テスト分)

Name	Maker	Item code	Package contents	Storage temp.
12 Collagen vitrigel membrane (CVM) chambers set in a 12-well plate “ad-MED Vitrigel” 	Kanto	08360-96	6 plates	r.t. <sup>1)</sup>
培養液 (関東化学にて調製) 組成 D-MEM/F-12 5 % Fetal bovine serum 5 µg/ml Human insulin 10 ng/ml Human epidermal growth factor 2.5 % Dimethyl sulfoxide 100 U/ml Penicillin & 100 µg/ml streptomycin	LT <sup>2)</sup> Sigma LT LT Sigma LT	11330-032 F2442 12585-014 PHG0311 D2650 15140-148	1 bottle	2-8°C
トリプシン・EDTA 溶液 (0.05% Trypsin-0.02%EDTA-2Na)	LT	25300-054	10 bottles	under -20°C
PBS	Sigma	D8537	1 bottle	2-8°C
0.4% トリパンプルー溶液	LT	15250-061	1 vial	r.t.
陰性対照物質 (生理食塩水) (関東化学で調製)			1 vial	2-8°C
陽性対照物質 (塩化ベンザルコニウム)	Sigma	B6294	1 vial	r.t.
参照試料 (99.5%エタノール)	Kanto	14033-00	1 vial	r.t.
Dimethyl sulfoxide	Sigma	D2650	1 vial	r.t.
TEER 測定装置 (試作品)	Kanto		1 set	r.t.
T-75 培養用フラスコ	BD Falcon	353024	3 packages	r.t.
5ml ピペット	BD Falcon	357529	1 package	r.t.

15ml チューブ	BD Falcon	352096	1 package	r.t.
1.5ml チューブ	As one	1-7521-01		
血球計算版	TGK	OC-C-S02	1 package	r.t.
TEER 測定装置性能チェック用チャンバー (膜なし) と 12well プレート	Kanto		1 set	r.t.

\*試薬、器具は他の同等品も使用できる。

1) room temperature, 2) Life technologies

3 実施機関で用意していただくもの

- ・ HCE-T 細胞 (理研バイオリソースセンター RCB2280)
- ・ クリーンベンチ (または安全キャビネット)
- ・ CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5%CO<sub>2</sub>)
- ・ 倒立型位相差顕微鏡
- ・ ウォーターバス
- ・ 遠心分離機 (150×g で遠心可能なもの)
- ・ 安全ピペッター
- ・ マイクロピペット (1000μl, 100μl)
- ・ ピンセット
- ・ 消毒用エタノール
- ・ 天秤
- ・ パソコン (データ処理用、OS: Windows、USB ポート対応)
- ・ 細胞保存容器 (ローケーター)
- ・ pH 試験紙 UNIV (ADVANTEC, 07011030)

4 本試験法の適用範囲

以下に該当する被験物質は、本試験法から除外する。

1. 培養液に 2.5%になるよう混合したときの pH が 5 以下の物質 (pH 測定手順は 5.5.3 の 3 参照)。
2. 「logP 値が 2.5 以上であること」かつ「密度が 0.95g/cm<sup>3</sup> 未満、あるいは 1.10g/cm<sup>3</sup> を超えること」が知られている固体物質。

## 5 手順

### 5.1 HCE-T 細胞の解凍

1. 培養液は 37°C のウォーターバスで保温したものを使用する。
2. T-75 培養用フラスコ（以下、フラスコ）に培養液を 14ml 入れフラスコ底面に広げる。
3. HCE-T 細胞の入った凍結チューブを液体窒素から取り出し 37°C のウォーターバスに入れ素早く振って解凍する。
4. ピペットで凍結チューブの内容液を全量とり 2. のフラスコに入れ均一に混合した後、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置する。
5. 2 時間以上静置した後、位相差顕微鏡で細胞を観察する。細胞が図 1 のように接着していれば（未接着細胞がいてもよい）、フラスコの培養液全量を取り除き、新しい培養液 15ml を入れ、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置する。未接着細胞が多い場合は、培地交換までの時間を 6 時間まで延長できる。その時点で大部分の細胞が未接着は、別の凍結細胞を用いて手順 1 からやり直す。
6. 2~3 日後、細胞を位相差顕微鏡で観察し 80% コンフルエント~100% コンフルエント（図 2）程度まで増殖したら継代培養を行う。

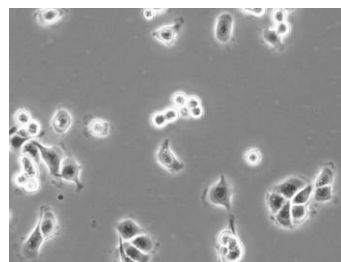


図 1 播種 2 時間後の細胞の位相差顕微鏡観察像

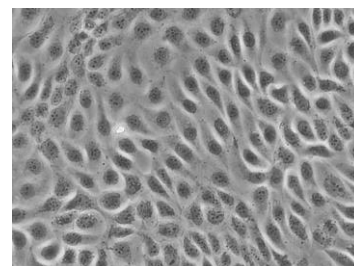


図 2 継代に適した細胞の位相差顕微鏡観察像

### 5.2 HCE-T 細胞の継代培養

1. T-75 フラスコ 4 本に培養液 14ml を入れる。
2. 培養液、PBS、トリプシン溶液は 37°C のウォーターバスで温めたものを使用する。
3. 80%-100% コンフルエントまで HCE-T 細胞を培養した T-75 フラスコの培養液を全量除き、PBS を 10ml 入れ底面全体に広げ、底面に残った培養液を洗い流す。

4. PBS を全量取り除き、トリプシン-EDTA 溶液 5ml をフラスコに入れ底面全体に広げた後、うち 4.3ml を除去する。CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5%CO<sub>2</sub>-Air) に入れ 5 分間静置する (余ったトリプシン溶液は冷凍で保存し再度使用してよい)。
5. フラスコの底面、側面を手でたたき細胞を分散させる (図 3)。
6. トリプシン-EDTA 溶液添加から 20 分以内 (早い方が望ましい) にフラスコに培養液 4ml を加え 10 回程度ピペッティングし混合する。
7. 1. で準備した培養液入りのフラスコに 6. の細胞懸濁液を 4 分の 1 量 (1ml ~ 1.2ml) ずつ加え 3 回程度ピペッティングし混合する。CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5%CO<sub>2</sub>-Air) 内に静置する。1 日おきに培養液を全量交換する。 (以上、4 倍希釈の場合)
8. 必要に応じて、2~8 倍希釈の範囲で継代培養してよい。

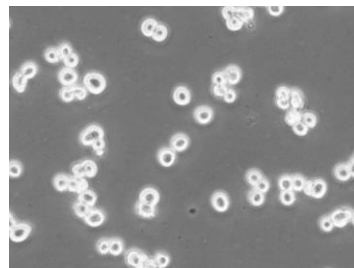


図 3 トリプシン処理後の細胞の位相差顕微鏡観察像

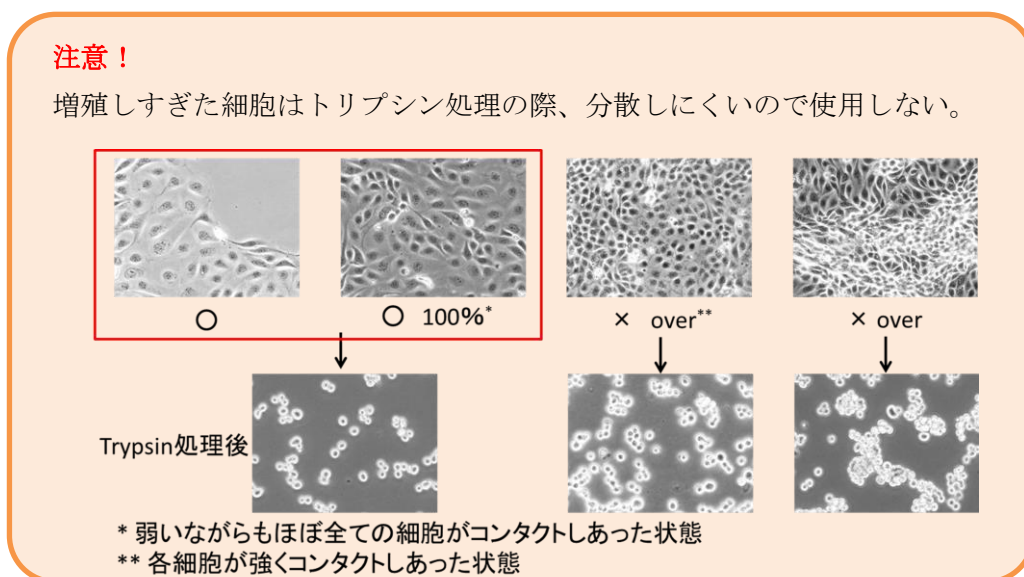
### 5.3 HCE-T 細胞の凍結保存

1. ここでは 80 %~100%コンフルエントの T-75 フラスコ 4 本から 8 本の凍結保存細胞を作成する手順を説明する。1 本の凍結チューブには 80 %~100%コンフルエントの T-75 フラスコの 1/2 量の細胞が保存される。
2. DMSO 0.8ml, 培養液 3.2ml をよく混合する (20%DMSO 添加培養液)。
3. 4 本のフラスコについて 4.2 HCE-T 細胞の継代培養の手順 2. から 6. まで実施する。
4. フラスコ 4 本の細胞懸濁液を 50ml チューブに集め 150×g, 3min 遠心する。
5. 上清を除き、チューブをクリーンベンチ机上に打ち付けて沈殿をほぐす。
6. 培養液 4ml を加えピペッティングで細胞塊が見られなくなるまで混合する。
7. 20%DMSO 添加培養液 4ml を加え穏やかに 2 回程度ピペッティングし混合する。速やかに凍結チューブ 8 本に細胞懸濁液を 1ml ずつ分注する。
8. 凍結チューブをおよそ 1°C/min の速度で-80°Cまで緩速冷却 (例えば、BICELL (日本フリーザー (株) 製に入れ-80°Cで 3 時間静置する等) した後、液体窒素中で保存する。

### 5.4 Vitrigel-HCE (human corneal epithelium)モデルの作製

1. 凍結保存した HCE-T 細胞を 4.1. の手順で解凍する。

2. 数日間培養し 50%~100%コンフルエントまで増殖させる。100%コンフルエントのフラスコ 1 本あたりモデル約 80 個分の細胞が採取できる。
3. 弱いながらもほぼ全ての細胞がコンタクトしあった状態の T-75 フラスコを用いて、4.2 HCE-T 細胞の継代培養の手順 2.から 6.まで行う。
4. 位相差顕微鏡で観察し、細胞が概ね 1~5 個以下の細胞塊に分散 (図 3 の状態) していれば次の工程に移る (めやすとして、細胞 6 個以上の細胞塊が全体 20%以内)。細胞 6 個以上の細胞塊が全体 20%以上みられる場合は、実験を中止し手順 4.4 からやり直す。



5. 細胞懸濁液を 50ml チューブに移す。ピペッティングにより均一に懸濁した状態の細胞懸濁液 100 $\mu$ l を 1.5ml チューブに入れる。
6. トリパンブルー溶液を 100 $\mu$ l 加え 10 回程度ピペッティングし混合する。血球計算版で生細胞と死細胞の数を計測する。細胞生存率が 95%未満の場合は実験を中止し手順 4.4 からやり直す。
7. コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを 12well プレートにセットし、培養液をウェル内に 1.5ml、チャンバー内に 0.5ml 入れ室温で 10 分以上 (2 時間以内) 静置する。

**注意！**

チャンバー内に培養液を注ぐときは、ピペットの先端が細胞や膜に触れないように、チャンバー側面のポートにピペットの先端を付けて行う。



8. 6.のチャンバー内の培養液を除き、 $1.2 \times 10^5$  cells/ml に調製した細胞懸濁液を 0.5ml ずつ分注し CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5%CO<sub>2</sub>-Air) 内に静置し 2 日間培養する。
9. 播種 2 日後にウェル内の培養液を交換する。同時に、チャンバー内の培養液を除き気相 - 液相界面培養を開始する。CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5%CO<sub>2</sub>-Air) 内で 4 日間培養する。
10. 播種後 5 日目にウェル内の培養液を全量交換する。
11. 播種後 6 日目のモデルのチャンバー内に培養液を 0.5ml 入れ、温度を 28°C ±2°C に調節する。TEER 測定用電極をチャンバーにセットし TEER 値を測定する。値をデータシートの「initial」欄に記入する。TEER 値が 140~220 Ω・cm<sup>2</sup> の範囲にあるモデルを合格とし試験に使用する。

12. 11 の基準に合格したモデルを用いて曝露試験を行う。モデルはその日のうちに使用する。

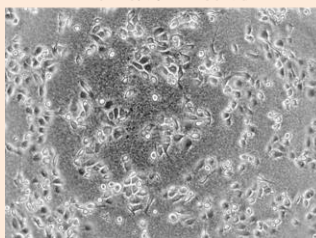
**注意！**

温度測定方法は任意だが、プレートの空きウェルに培養液を入れ、モデルと同一条件で温度調節した後、その培養液の温度を測定する方法を推奨する。

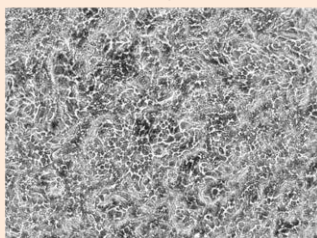
**注意！**

位相差顕微鏡観察で、左の写真のように均一に細胞が播種できていればよい。その後、HCE-T 細胞は経時的に多層化する。

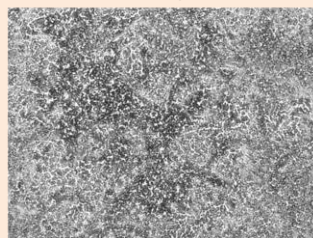
0日目(播種2時間後)



3日目



6日目



100  $\mu$  m

**TEER 測定時の注意！**

- ・電極ジグのスリットをチャンバーのハンガーにはめ込む。
- ・電極が垂直になるようにウェルの縁に電極ジグを水平にはめ込む。



スリット



○



×

スリットにハンガーがはまっていない



×

ジグが浮いている



×

電極が曲がっている

**注意！**

モデルの室温に置く時間はチャンバー内に培養液を入れた状態で、かつ、2時間以内とする。それ以上の場合はCO<sub>2</sub>インキュベーター内に保存する。



## 5.5 曝露試験

### 5.5.1. TEER 測定装置の性能チェック

1. キット付属の 12well プレートにチャンバー（膜なし）1 個をセットし、0.45%NaCl 水溶液（25°C±5°C）を 3ml 注ぐ。
2. 12well プレートの別のウェルにチャンバー（膜なし）1 個をセットし、0.9%NaCl 水溶液（25°C±5°C）を 3ml 注ぐ。
3. それぞれのウェルの TEER 値を測定し以下の条件を満たしていれば装置は正常に動作しているので、次のステップに移行する。

$$(0.45\%NaCl \text{ の TEER 値}) - (0.9\%NaCl \text{ の TEER 値}) \geq 60 \Omega \cdot \text{cm}^2$$

### 5.5.2. 陽性、陰性対照物質の測定と試験成立条件の判定

1. 試験に使用する培養液の温度を 22°C～30°C の範囲内に調節する。
2. キット添付の陽性対照物質（塩化ベンザルコニウム）、陰性対照物質（生理食塩水）および参照試料（99.5%エタノール）を用いる。それぞれの物質 0.1～0.2g を 15ml チューブに量りとり、2.5w/v%となるように培養液を添加し（対照物質の体積は無視する）手で転倒混和する。

#### 注意！

被験物質の揮散を防ぐため、15ml チューブに被験物質を量り採った後は、培養液添加時、2.5%被験物質溶液の採取時以外はチューブの蓋を密閉してください。

3. 2.で調製した 2.5%溶液の温度を 28°C±2°Cに調節する。

#### 注意！

被験物質 2.5%液（または同一環境に置いた培養液）に温度計を浸して温度を測定する。

4. 試験に使用するモデルの温度を 28°C±2°Cに調節する。
5. 4.4 の手順 12 のチャンバー内の培養液を除き、TEER 測定装置の電極を設置する。

#### 注意！

チャンバー内の培養液を除いたら 5 分以内に被験物質を添加してください。

6. 2.で調製した 2.5w/v%対照物質溶液 500 μl をチャンバー内に素早く（2秒以内）入れた後、2～5 秒後の間に PC 画面上の「スタート」ボタンを

押す (TEER 値が 10 秒毎に 3 分間自動的に記録される)。このとき、initial の TEER 値と測定開始時 (0 秒) の TEER 値との間に  $40\Omega \cdot \text{cm}^2$  以上の増減が生じた場合は、この結果を不採用とし、別のモデルを使って試験をやり直す。

7. TEER 値を陰性対照、陽性対照用および参照試料用のデータシート (EXCEL ワークシート) にコピーする。(4.5.4.の方法に従って自動的に解析が行われる。)
8. 陰性対照物質および陽性対照物質の測定結果が以下の試験成立条件を満たした場合は、ワークシートの判定欄に「Pass」の表示が出るので次のステップに移る。「NG」表示が出た場合は試験を中止する。
9. TEER 測定用電極を純水ですすぎ被験物質を洗い流した後、ペーパータオルで軽くふき取る。

#### 試験成立条件

- A) 陰性対照 (生理食塩水) の Plateau level が 5%以下である。
- B) 陽性対照 (塩化ベンザルコニウム) の Plateau level が 40%以上である。
- C) 参照試料 (エタノール) の Plateau level が 10%以上である。

#### 5.5.3. 被験物質の曝露試験

1. 試験に使用する培養液の温度を  $22^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$  の範囲内に調節する。
2. 15ml チューブに被験物質を 0.1~0.2g 秤量し 2.5w/v%となるよう培地を加える (被験物質の体積は無視する)。被験物質が溶解するまで最大 1min 転倒混和する (溶けた時点でやめる)。この段階で被験物質が溶解しないときは、Vortex (1min 以内)、超音波 (20min 以内)、加熱 ( $70^{\circ}\text{C}$ 以下) の順に処理する。各処理後に、2.5%被験物質液の温度を  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  に調節し、溶解もしくは均一に懸濁していれば、その後の処理は行わずに次に移行する。

#### 注意!

被験物質の揮散を防ぐため、15ml チューブに被験物質を量り採った後は、培養液添加時、2.5%被験物質液の採取時以外はチューブの蓋を密閉してください。

各溶解処理の程度 (時間、温度、強弱等) は、被験物質の物性を考慮して設定してください。

3. 2.5%被験物質液の pH を pH 試験紙で測定する。
4. 試験に使用するモデルの温度を  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  に調節する。

**注意！**

2.5%被験物質液（または同一環境に置いた培養液）に温度計を浸して温度を測定する。

5. 4.4 の手順 12 のチャンバー内の培養液を除き、TEER 測定装置の電極を設置する。
6. 1. で調製した 2.5w/v%被験物質液 500  $\mu$ l をチャンバー内に素早く（2秒以内）入れた後、2～5 秒後の間に PC 画面上の「スタート」ボタンを押す（TEER 値が 10 秒毎に 3 分間自動的に記録される）。このとき、initial の TEER 値と測定開始時（0 秒）の TEER 値との間に  $40 \Omega \cdot \text{cm}^2$  以上の増減が生じた場合は、この結果を不採用とし、別のモデルを使って試験をやり直す。

**注意！**

被験物質が培養液に溶解しない場合は、被験物質を手で振って目視で均一な懸濁液となっていることを確認した後、ピペットで採取し直ちにチャンバー内に注いでください。

7. TEER 値を陰性対照および陽性対照用のデータシート（EXCEL ワークシート）にコピーする。（4.5.4.の方法に従って自動的に解析が行われる。）
8. TEER 測定用電極を純水または消毒用エタノールですすぎ被験物質を洗い流した後、ペーパータオルで軽くふき取る。

5.5.4. データ解析方法（データシートで自動的に行われる）

1. 1 種類の被験物質について 3 個のモデルを用いて試験を行い、それぞれの TEER 値をデータシートのデータ入力領域にコピーする。すると、3 個のモデルの TEER 値の初期値に対する変化率の平均値のグラフがデータシートに表示される。また、眼刺激性の判定に使用する 3 つの指標の値が以下の計算手順で自動的に計算されデータシートに表示される。

計算手順

3 つの指標は以下の式から算出される（図 4 参照）

Time lag (sec) :  $t_1$

Intensity (%/sec) :  $-(P_2 - P_1)/(t_2 - t_1)$

Plate au level (%) :  $100 - P_2$

ただし、

$t_1$  (sec) : TEER 値の変化速度が  $0 \geq dP/dT > -0.03\%/sec$  の範囲内にある最大

の曝露時間

$t_2$  (sec) :  $t_1$  後、TEER 値の変化速度が  $dP/dT \leq -0.03\%/sec$  の条件を満たした後、 $0 \geq dP(P_3 - P_2)/dT(t_3 - t_2) > -0.03\%/sec$  の条件を満たした最初の曝露時間。

$t_3$  (sec) :  $t_3 = t_2 + 30$  sec

$P_1, P_2, P_3$  (%) : 曝露時間  $t_1, t_2, t_3$  の時 TEER 値の  $t_0$  時の TEER 値に対する百分率。

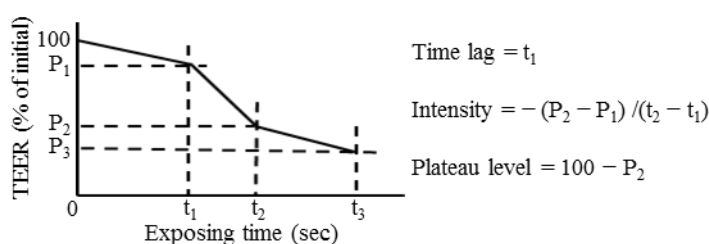


図 4 Schematic illustration for analyzing a time-dependent profile of TEER after exposing a model test chemical. Here, the times ( $t_1$ ) and ( $t_2$ ) represent time lag and starting time of plateau level, respectively. The time ( $t_3$ ) is defined as the equation ( $t_3 = t_2 + 30$  sec). The percentages ( $P_1$ ), ( $P_2$ ) and ( $P_3$ ) are the percentile against the initial TEER value at times ( $t_1$ ), ( $t_2$ ) and ( $t_3$ ), respectively.

## 2. 眼刺激性の判定基準

判定基準	判定
Time lag $\leq 180$ or Intensity $\geq 0.05$ or Plateau level $> 5.0$	刺激性 (I)
Time lag $> 180$ and Intensity $< 0.05$ and Plateau level $\leq 5.0$	非刺激性 (NI)

## 手順書改訂履歴

### Version 1.1

改定日：2013年6月6日

#### 改定内容

- ・キット構成を改訂
- ・HCE-T細胞の解凍、培養、凍結保存の手順を追加
- ・モデルの作製手順を改訂
- ・データ解析の項を追加

改訂理由：2013年5月22, 23日に実施した試験法講習会での指摘事項への対応

### Version 1.2

改定日：2013年6月24日

#### 改定内容

- ・試薬キット構成を改訂。冷蔵の温度範囲を局方に従い2-6°Cから2-8°Cに変更した。
- ・細胞継代、凍結保存、モデルの作製の手順を実際の作業に合わせてより具体的に記述した。曝露試験の手順を改訂した。実際の手順に従い、機器のチェック、陽性・陰性対照の測定と試験成立条件の判定、被験物質の曝露試験の順に記載した。
- ・試験判定基準の誤記を修正した。

改訂理由：プレバリデーション実施機関および2013年6月13日の打ち合わせにおける指摘事項への対応

### Version 1.3 (2013年6月～9月実施のPhase 0試験で使用)

改定日：2013年7月29日

#### 改定内容

- ・培養液、PBS、陰性対照物質の保存温度を2-6°Cから2-8°Cに変更した。
- ・HCE-T細胞解凍時の培地交換時間の許容範囲を設定した。
- ・HCE-T細胞のトリプシン処理時間の許容範囲を設定した。
- ・モデル作製工程のトリプシン処理時の細胞塊残存割合の許容範囲を設定した。
- ・TEER測定装置の性能チェックの判定方法を改訂した。
- ・曝露試験で、被験物質曝露から測定スタートするまでの時間の範囲を設定した。

改訂理由：実施機関からのご意見をもとに許容範囲が不明確だった箇所を追記した。また、TEER装置の性能チェックに関しては、従来は標準物質測定時のTEERの絶対値で判定していたが、装置の性能としてより重要な装置の感度をチェックするため2種類の標準物質のTEER値の差（レンジ）を用いて判定する方法に変更した。冷蔵試薬の保存条件を日本

薬局方の規定に合うように変更した。

Version 1.4j (2013/10/2,3 1<sup>st</sup> VMT 会議の決定事項を踏まえた修正)

改定日：2013年10月24日

改定内容

1. 改訂場所：2 測定キット内容  
メーカー名および商品コードを記載  
改訂理由：必要な情報の追加
2. 改訂場所：手順 4.1 の 3  
「サンプル」を「凍結チューブ」に変更  
改訂理由：誤記載の訂正
3. 改訂場所：図 1 説明  
「の位相差顕微鏡写真」を追記  
改訂理由：必要な情報の追加
4. 改訂場所：手順 4.1 の 4  
「均一に混合した後、」を追記  
改訂理由：必要な情報の追加
5. 改訂場所：手順 4.1 の 5  
「その時点で大部分の細胞が未接着の場合は、別の凍結細胞を用いて手順 1 からやり直す。」を追記  
改訂理由：必要な情報の追加
6. 改訂場所：図 2 説明  
「の位相差顕微鏡写真」を追記  
改訂理由：必要な情報の追加
7. 改訂場所：手順 4.2 の 7  
「1ml」を「4 分の 1 量 (1ml~1.2ml)」に変更  
改訂理由：必要な情報の追加 (フラスコの細胞を 4 等分すること)
8. 改訂場所：手順 4.3 の 1  
記述の変更

改訂理由：わかりにくい文章を修正

9. 改訂場所：手順 4.3 の 2

「4ml」を「3.2ml」に修正

改訂理由：誤記載の訂正

10. 改訂場所：手順 4.4 タイトル

「Vitrigel-HCE (human corneal epithelium)」を追記

改訂理由：必要な情報の追加

11. 改訂場所：手順 4.4 の 1

「バイアル」を「HCE-T 細胞」に修正

改訂理由：必要な情報の追加

12. 改訂場所：手順 4.4 の 3

「弱いながらもほぼ全ての細胞がコンタクトしあった状態の T-75 フラスコを用いて、」を追記

改訂理由：必要な情報の追加

13. 改訂場所：手順 4.4 の 3

「2 から」を追記

改訂理由：他の修正に伴う変更

14. 改訂場所：手順 4.4 の 4, 6

「手順 4.4 からやり直す」を追記

改訂理由：必要な情報の追加

15. 改訂場所：手順 4.4 の 6

「細胞数」を「生細胞と死細胞の数」に修正

改訂理由：必要な情報の追加

16. 改訂場所：手順 4.4 の 7

「(2 時間以内)」を追記

改訂理由：チャンバー静置時間の上限を記載

17. 改訂場所：手順 4.4 の 7 下の注意

文章の修正

改訂理由：わかりにくい文章の修正

18. 改訂場所：手順 4.4 の 9

文章の修正

改訂理由：わかりにくい文章の修正

19. 改訂場所：手順 4.5.1 の 1, 2

文章の修正

改訂理由：わかりにくい文章の修正

20. 改訂場所：手順 4.5.2 の 1

陽性対照物質をエタノールから塩化ベンザルコニウムに変更。エタノールは参照試料とした。

改訂理由：1<sup>st</sup> VMT 会議での決定事項の反映

21. 改訂場所：手順 4.5.2 の 1

「被験物質 0.125g を 50ml チューブに量り取る。塊状の物質は乳鉢などであらかじめ破砕しておく。培養液を 5ml 加え室温で 1 分間攪拌（転倒混和、ボルテックスミキサー等）する。」を「それぞれの物質 0.1~0.2g を 15ml チューブに量りとり、2.5w/v% となるように培養液を添加し（対照物質の体積は無視する）手で転倒混和する。」に変更。

改訂理由：修正前は、対照物質と被験物質の処理手順を一緒に書いていたが、修正後は、この項は対照物質の処理手順に限定した。また、操作を容易にするため物質の秤量手順を変更した。

22. 改訂場所：手順 4.5.2 の 2 下の注意

曝露試験を実施する際の室温の範囲を追記

改訂理由：必要な情報の追加

23. 改訂場所：手順 4.5.2 の 5

「および参照試料」を追記

改訂理由：他の修正にともなう変更

24. 改訂場所：手順 4.5.2 の 6

「陰性対照物質および陽性対照物質の測定結果が」を追記



改訂理由：必要な情報の追加

25. 改訂場所：手順 4.5.2 の 7, 4.5.3 の 5

曝露試験後の TEER 測定用電極の洗浄作業を追加

改訂理由：手順の改訂

26. 改訂場所：手順 4.5.3 の 1

被験物質の秤量手順を変更。物質の溶解方法を追記した。

改訂理由：操作を容易にするための変更および、溶解方法の修正。

27. 改訂場所：手順 4.5.4

データの解析方法に関する情報を追記

改訂理由：必要な情報の追加

Version 1.5j (Phase 0 追加試験で明らかになった課題に対する修正)

改定日：2014年2月3日

改定内容

1. 改訂場所：手順 4.5.2 の 1、および、4.5.3 の 1

旧手順 2 に記載していた内容を移動。

改訂理由：実際の試験手順に合わせて記載順を変更。

2. 改訂場所：手順 4.5.2 の 3、および、4.5.3 の 3

「1.で調製した 2.5%溶液または懸濁液の温度を試験場所の室温に慣らす。」を追記。

改訂理由：被験物質の温度条件が未記載であったため追記。

3. 改訂場所：手順 4.5.2 の 5、および、4.5.3 の 5

(陽性対照物質、陰性対照物質、参照試料 (4.5.2 の 2) ,および被験物質 (4.5.3 の 2) を)「チャンバー内に素早く (2秒以内) 入れる。」を追記。

改訂理由：チャンバーに被験物質を入れ始めてから全量入れ終えるまでの時間が未記であったため追記。

Version 1.51j (170217 の打ち合わせ合意事項の反映)

改定日：2014年2月17日

改定内容

4. 改訂場所：手順 4.5.2

参照試料の基準値 (暫定値) を Plateau level が「15%以上 30%以下」から「10%以上

30%以下」に変更

改訂理由：追加試験の結果を反映して変更した。

Version 1.60j (Phase 1 試験で明らかになった課題に対する修正)

改定日：2014年6月30日

改定内容

1. 改訂場所：手順 4.4. の 11、4.5.2 の 1, 3 および、4.5.3 の 1, 3  
「室温」を「(試験場所) 周囲温度」に変更。旧手順 2 に記載していた内容を移動。  
改訂理由：曝露試験等で TEER 値を測定する際、測定場所の温度が測定値に影響することから、測定場所の温度を規定範囲内に保つことが重要であるため。
2. 改訂場所：手順 4.5.2 の 1、および、4.5.3 の 1  
試験場所の周囲温度の範囲を変更  
変更前：18℃以上、30℃以下、変更後：22℃以上、30℃以下  
改訂理由：曝露試験を行う際の周囲温度が試験結果に影響するため。
3. 改訂場所：手順 4.5.2 の 7  
参照試料 (エタノール) の結果を試験成立条件に加えた。また、リードラボでの試験結果から試験成立条件を以下のように変更した。  
変更前：Plateau level 10%以上、30%以下、変更後：Plateau level 10%以上、40%以下  
改訂理由：2<sup>nd</sup> VMT 会議での合意事項。Phase 1 試験の結果、参照試料の結果が基準範囲を満たさない場合、被験物質の判定結果が異なったことから、参照試料の結果が試験成立の判定に重要と判断したため。
4. 改訂場所：手順 4.5.3 の 2 の第 2 文  
2.5w/v%被験物質液の調製方法に「のいずれか一つ以上を選択して」の文言を追加した。  
改訂理由：Phase 1 試験において、Vortex (1min 以内)、加熱 (70℃以下)、超音波 (20min 以内) の全てを行わなければならないとの誤解を与えてしまった場合があったため。
5. 改訂場所：手順 4.5.2 の 2、および、4.5.3 の 2  
「被験物質の揮散を防ぐため、15ml チューブに被験物質を量り採った後は、培養液添加時、2.5%被験物質溶液の採取時以外はチューブの蓋を密閉してください。」との注意書きを追加した。  
改訂理由：試験中に被験物質の揮散を防ぐための注意書きを追加した。

6. 改訂場所：手順 4.5.2 の 5、および、4.5.3 の 5

「このとき、initial の TEER 値と測定開始時 (0 秒) の TEER 値との間に  $40\Omega \cdot \text{cm}^2$  以上の増減が生じた場合は、この結果を不採用とし、別のモデルを使って試験をやり直す。」を追加した。

改訂理由：initial の TEER 値と測定開始時の TEER 値が大きく異なる場合は、手技上の失敗 (電氣的なノイズを拾ってしまった、電極の使用法の誤りがある等) が示唆されるため。

Version 1.70j (Phase II 試験で明らかになった課題に対する修正)

改定日：2014 年 10 月 15 日

改定内容

1. 改訂場所：手順 4.5.2 の 1 および、4.5.3 の 1

以下のように標記を修正した。

変更前：試験に使用する培養液の温度を試験場所の周囲温度と平衡化する。(周囲温度は  $22^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$  の範囲とする。)

変更後：試験に使用する培養液の温度を  $22^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$  の範囲内に調節する。

改訂理由：「周辺温度」という用語を削除した。

2. 改訂場所：手順 4.4 の 11、4.5.2 の 4 および、4.5.3 の 4

モデルの温度を「試験場所の周囲温度 ( $22^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ ) に合わせる」から「 $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  に調節する」に変更。温度測定方法に関する注意書きを 4.4 の 11 の後に記載。

改訂理由：正しい試験結果を得るには試験時のモデルの温度を厳密にコントロールすることが重要であるため。

3. 改訂場所：手順 4.5.2 の 3 および、4.5.3 の 3

被験物質の 2.5% 溶液または懸濁液の温度を「試験場所の周囲温度 ( $22^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ ) に合わせる」から「 $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  に調節する」に変更。温度測定方法に関する注意書きを手順 4.5.2 の 3 および、4.5.3 の 3 の後に記載。

改訂理由：正しい試験結果を得るには試験時の被験物質溶液の温度を厳密にコントロールすることが重要であるため。

4. 3. 改訂場所：手順 4.5.2 の 7

参照試料 (エタノール) の試験成立条件を以下のように変更した。

変更前：Plateau level 10% 以上、30% 以下、変更後：Plateau level 10% 以上

改訂理由：試験成立条件の下限は Phase I の結果から 10% と設定できたが、上限についてはデータが不足している。そこで、上限を排して Phase III 試験を行い、試験終了

後、それまでのデータを総合して上限を設定しプロトコルに記載することとした。

Version 1.80j (Phase III試験で明らかになった課題に対する修正)

改定日：2015年3月31日

改定内容

1. 改訂場所：手順3

pH試験紙 UNIV (ADVANTEC, 07011030) を追記した。

改訂理由：手順4 手順5.3.3の3で使用するため。

2. 改訂場所：手順4

新たに本試験法の適用範囲の記述を加えた。

改訂理由：PhaseIII後に行った適用範囲の設定を反映した。

3. 改訂場所：手順5

Ver.1.70jの手順4を手順5に変更した。

改訂理由：手順4 本試験法の適用範囲を挿入したため。

4. 改訂場所：手順5.3.3の2

以下のように標記を修正した。

変更前：この段階で被験物資が溶解しないときは、Vortex (1min 以内)、加熱 (70°C以下)、超音波 (20min 以内) のいずれか一つ以上を選択して実施し、このうち溶解もしくは均一に懸濁したものを曝露試験に使用する。以上のいずれの方法でも溶解または懸濁しない場合は、被験物質-培養液混合液を転倒混和し均一な懸濁液とした後、直ちに曝露する。

変更後：この段階で被験物資が溶解しないときは、Vortex (1min 以内)、超音波 (20min 以内)、加熱 (70°C以下) の順番で処理する。各処理後に、被験物質の温度を 28°C±2°C に調節し、溶解もしくは均一に懸濁していれば、その段階で処理を中断し、5.5.3の3に移行する。

改訂理由：PhaseIII試験で被験物質の溶解方法の違いによって試験結果が異なる場合があることが分かった。そこで、プロトコルで溶解方法の実施順を指定することにした。

5. 改訂場所：手順5.5.3の3

「2.5%被験物質液の pH を pH 試験紙で測定する。」という手順を追加した。

変更前：試験法の適用範囲の設定に対応して、2.5%被験物質液の pH 測定を手順に追加した。

Version 1.81j, January 18, 2019, Prepared by Hiroyuki Yamaguchi <sup>1,2</sup> and Toshiaki Takezawa <sup>1</sup>, <sup>1</sup> Institute of Agrobiological Sciences, National Agriculture and Food Research Organization, <sup>2</sup>Kanto Chemical Co., Inc.

Version 1.81j

改定日：2019年1月18日

改定内容

表紙を作製した。