

データ解析担当者は、データ解析の結果を中間報告会及び最終報告会で報告する。

本実行委の委員長は、各施設から送られてきた GLP 準拠の記録のコピー、データベース、データ解析結果等を、バリデーション研究の成果が社会的に承認されたと、本学会バリデーション委員会が判断するまで保管する。

13. 中間報告会

データベースが固定され、一通りのデータ解析ができた段階で、実行委員長は固定されたデータの確認と解析結果の検討を行うために、本実行委の委員と実験担当者が参加する中間報告会を開催する。

14. 結果の公表

実行委員長は、中間報告会の討論結果をふまえた最終報告書を作成し、最終報告会を開催する。

実行委員長は最終報告書を本学会バリデーション委員会に提出する。

本実行委は、研究結果を学会報告、学術論文として公表する。公表の際の著者名と報告書作成担当者については、本実行委で決定する。

15. 各種問い合わせ先

実験内容と SOP : 加藤雅一 「masakazu_katoh@jpte.co.jp」

被験物質、試料、共通消耗品 : 小島肇 「h-kojima@nihs.go.jp」

データシートとその送付 : 宮岡悦良 「miyaoka@rs.kagu.tus.ac.jp」 および 大森崇
「omori@pbh.med.kyoto-u.ac.jp」

計画書、報告書、その他一般事項 : 小島肇 「h-kojima@nihs.go.jp」

以上

Ver.2.0 修正事項一覧

- 1) 1. 研究目的 「EPISKIN で得られた判定結果とどの程度一致するか (代替可能性)、という2つの課題」を「EPISKIN で得られた判定結果とどの程度一致するか (同等性)、動物実験結果とどの程度一致するか (代替可能性)、という3つの課題」に変更
- 2) 2. 実行組織 「被験物質選考担当者 海外の専門家に打診するとともに、日本での搬入経路、費用などを考慮して本バリデーション研究に最適な被験物質を選定する。」を加筆
- 3) 2. 実行組織 「試料手配担当者 割付デザインと SOP に従って試料を調製し。」を「試料手配担当者 割付デザインに従って試料を」に変更
- 4) 研究日程 第1パラグラフを第2パラグラフの後に移動。「2008年3月末までに研究計画書を確定し」を「2008年4月末までに研究計画書を確定し」に変更
- 5) 実験参加施設 (1)「原則として LabCyte-MODEL24 を使用した経験がある」を削除
- 6) 8. 試料の準備 「各実験施設に関連試料と共に」を「各実験施設に関連試料および資料と共に」に変更
- 7) 9. 経費 「本学会バリデーション委員会委員以外」を「本学会バリデーション委員および委員長が依頼した者以外」に変更
- 8) 12. データ解析 (1)「施設間ばらつきの評価」を「施設内および施設間ばらつき」に変更
「(3) EPISKIN との同等性評価」を加筆
- 9) 結果の公表 「研究結果を厚生労働科学研究班報告書、学会報告、学術論文として公表する。」を「研究結果を学会報告、学術論文として公表する。」に変更
- 10) 15. 各種問合わせ 「データシートとその送付：寒水孝司「sozu@ms.kagu.tus.ac.jp」
計画書、報告書、その他一般事項：大森崇「omori@pbh.med.kyoto-u.ac.jp」を
「データシートとその送付：宮岡悦良「miyaoka@rs.kagu.tus.ac.jp」
計画書、報告書、その他一般事項：小島肇「h-kojima@nihs.go.jp」」に変更

Ver.3.0 修正事項一覧

- 1) 2. 実行組織、2) 技術担当：若干名
技術研修担当者：技術研修の準備を行い、試験法の内容、SOP、記録用紙等の説明を行い、実技指導を行う。の「SOP」を「プロトコール」に変更
- 2) 2. 実行組織、2) 技術担当：若干名
実験担当者：(具体的人名は、参加施設から提案) 技術研修を受け、試料等手配担当者から送付された試料等を用いて、SOP に従った実験を行い、実験結果をデータ解析担当者に送付する。の「SOP」を「プロトコール」に変更
- 3) 2. 実行組織、2) 技術担当：若干名
「実験担当者：被験物質割付担当者：選定された被験物質を各施設に割り付けるための割付デザインを作成し、試料等手配担当者に知らせる、割付の根拠を研究結果が確定して公表されるまで保管する。」を削除
- 4) 2. 実行組織、2) 技術担当：若干名
「試料等手配担当者：割付デザインに従って試料をコード化して実験参加施設に、関連する機材と共に送付する。割付表、コード表を研究結果が確定して公表されるまで保管する。」
「割付デザインに従って」「割付表」を削除
- 5) 3. 培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験の実験手順
「LabCyte EPI-MODEL24 の開発者が用意している説明は、資料1「培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験プロトコール」の通りである。

実験担当者は、これに基づいて本実行委で作成した資料 2「培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験 SOP」を用いて、」を

「実験担当者は、本実行委で作成した資料 1「培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験プロトコル」を用いて、」に変更

6) 4. 研究日程

「実験担当者は、2008 年 6 月末までに各施設で予備実験を行い、本研究計画書及び、実験 SOP の改訂についての意見を提出する。本実行委はこれらの意見に基づいて、SOP の改訂を行う。さらに、委員となる参加施設代表者を確定する。

実験担当者は 2008 年 7 月末より実験を開始し、2008 年 9 月末までに実験結果をデータ解析担当者に報告する。

本実行委は 2008 年 11 月に中間報告会を開催する。

本実行委は 2009 年 1 月末までに報告書をまとめ、最終報告会を開催し、最終報告書を本学会バリデーション委員会に提出する。」を

「実験担当者は、2008 年 7 月末までに各施設で予備実験を行い、本研究計画書及び、実験プロトコルの改訂についての意見を提出する。本実行委はこれらの意見に基づいて、プロトコルの改訂を行う。さらに、委員となる参加施設代表者を確定する。

実験担当者は 2008 年 9 月中旬より実験を開始し、2008 年 12 月末までに実験結果をデータ解析担当者に報告する。

本実行委は 2009 年 1 月に中間報告会を開催する。

本実行委は 2009 年 3 月末までに報告書をまとめ、最終報告会を開催し、最終報告書を本学会バリデーション委員会に提出する。」

7) 6. 被験物質

「被験物質選定担当者は EPISKIN performance standard のリストから、既知データに基づいて、皮膚刺激性が弱度、中度、強度のものが含まれるように、被験物質を選定し、選定結果を被験物質割付担当者に知らせる。」を

「被験物質選定担当者は資料 2 EPISKIN performance standard のリストから、既知データに基づいて、皮膚刺激性が弱度、中度、強度のものが含まれるように、最大 20 被験物質を選定し、選定結果を被験物質割付担当者に知らせる。」と「資料 2」「最大 20」を加える

8) 7. 被験物質の実験参加施設への割付

「本実行委は、表 1 に概念的に示すように、被験候補物質の内の 2 物質を標準被験物質とし、標準被験物質を全参加施設に割り付ける。その他の被験物質は、被験物質割付担当者が実験参加施設の規模・能力に応じて割り付ける。被験物質コードと実験参加施設への割付、被験物質溶液の配布は、試料等手配担当者が行ってその記録を管理する。」を

「本実行委は、被験候補物質の内の 12 物質を標準被験物質とし、他の施設は残りのすべての被験物質を実験に用いる。被験物質コードと被験物質溶液の配布は、試料等手配担当者が行ってその記録を管理する。」に変更

9)

表 1 被験物質の割付方針の概念図

	参加施設 A	参加施設 B	参加施設 C	・・・
標準被験物質 1	○	○	○	○
標準被験物質 2	○	○	○	○
被験物質 3	○			
被験物質 4	○			
被験物質 5		○		
被験物質 6		○		
被験物質 7			○	
被験物質 8			○	
・・・				

を削除。

10) 8. 試料の準備

「試料等手配担当者は、皮膚刺激性の強度に応じて各被験物質を各実験参加施設に関連試料および資料と共に実験参加施設に送付する。」を

「試料等手配担当者は、各被験物質を各実験参加施設に関連試料および資料と共に実験参加施設に送付する。」に変更

11) 11. データ管理

実験担当者は、以下の記録・結果を所定の記録用紙に記録する。

「(1) 被験物質、溶媒、陽性対照物質溶液の調製記録」を「(1) 器材の点検記録および陽性対照物質溶液の調製記録」に変更

12) 15.各種問い合わせ先

データシートとその送付：宮岡悦良「miyaoka@rs.kagu.tus.ac.jp」に

大森崇「omori@pbh.med.kyoto-u.ac.jp」を追加

皮膚刺激性試験バリデーション予定被験物質

No.	試薬名	CAS number	EU		性状	購入元			
			Level	In vivo score		製造元	Cat.No	容量	定価(税込み)
1	1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	no	0	液体	和光純薬	024-11372	25mL	4620
2	diethyl phthalate	84-66-2	no	0	液体	和光純薬	053-01656	500mL	1680
3	di-propylene glycol	25265-71-8	no	0	液体	和光純薬	046-28985	500mL	1260
4	naphthalen acetic acid	86-87-3	no	0	固体	和光純薬	148-00092	25g	2625
5	allyl phenoxy-acetate	7493-74-5	no	0.3	液体	和光純薬	012-11992	25mL	3570
6	isopropanol	67-63-0	no	0.3	液体	和光純薬	164-08335	500mL	1701
7	4-methyl-thio-benzaldehyde	3446-89-7	no	1	液体	和光純薬	130-11242	25mL	2415
8	methyl stearate	112-61-8	no	1	固体	関東化学	25344-31	25g	2100
9	allyl heptanoate	142-19-8	no	1.7	液体	和光純薬	015-11982	25mL	2730
10	heptyl butyrate	5870-93-9	no	1.7	液体	SIGMA取扱いファンケル薬部		1kg	8600+TAX
11	hexyl salicylate	6259-76-3	R38	2	液体	SIGMA/Fluka	84280	250mL	6584
12	terpinyl acetate	80-26-2	R38	2	液体	Alfa Aesar	A17952	100g	5712
13	tri-isobutyl phosphate	126-71-6	R38	2	液体	SIGMA取扱いレアクミカル			問い合わせ中
14	1-decanol	112-30-1	R38	2.3	液体	和光純薬	046-24921	100nL	1995
15	cyclamen aldehyde	103-95-7	R38	2.3	液体	和光純薬	091-03591	5mL	1260
16	1-bromohexane	111-25-1	R38	2.7	液体	和光純薬	083-00532	25g	1418
17	α -terpineol	98-55-5	R38	2.7	液体	関東化学	40022-31	25mL	1050
18	di-n-propyl disulphide	629-19-6	R38	3	液体	和光純薬	164-06711	10g	5880
19	butyl methacrylate	97-88-1	R38	3	液体	和光純薬	027-03753	25mL	1313
20	heptanal	111-71-7	R38	4	液体	関東化学	18566-31	25mL	1575
NC	注射用水				液体	大塚製薬	36A1X00001	20mLx5	546
PC.5(W/V%) SLS		151-21-3			液体	SIGMA	L4390	25g	4610

LabCyte/バリデーション研究 コード表

No.	試薬名	CAS number	施設名						
			愛研	小林製薬	(財)残留農薬研究所	ファンケル	富士ファイル	丸石製薬	薬物安全研究所
1	1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	A-01	B-099	C-077	D-115	E-133	F-031	G-049
2	diethyl phthalate	84-66-2	A-02	B-100	C-078	D-116	E-134	F-032	G-050
3	di-propylene glycol	25265-71-8	A-03	B-081	C-079	D-117	E-135	F-033	G-051
4	naptalen acetic acid	86-87-3	A-04	B-082	C-080	D-118	E-136	F-034	G-052
5	allyl phenoxy-acetate	7493-74-5	A-05	B-083	C-061	D-119	E-137	F-035	G-053
6	isopropanol	67-63-0	A-06	B-084	C-062	D-120	E-138	F-036	G-054
7	4-methyl-thio-benzaldehyde	3446-89-7	A-07	B-085	C-063	D-101	E-139	F-037	G-055
8	methyl stearate	112-61-8	A-08	B-086	C-064	D-102	E-140	F-038	G-056
9	allyl heptanoate	142-19-8	A-09	B-087	C-065	D-103	E-121	F-039	G-057
10	heptyl butyrate	5870-93-9	A-10	B-088	C-066	D-104	E-122	F-040	G-058
11	hexyl salicylate	6259-76-3	A-11	B-089	C-067	D-105	E-123	F-021	G-059
12	terpinyl acetate	80-26-2	A-12	B-090	C-068	D-106	E-124	F-022	G-060
13	5(W/V %) SLS	151-21-3	A-13	B-091	C-069	D-107	E-125	F-023	G-041
14	1-decanol	112-30-1	A-14	B-092	C-070	D-108	E-126	F-024	G-042
15	cyclamen aldehyde	103-95-7	A-15	B-093	C-071	D-109	E-127	F-025	G-043
16	1-bromohexane	111-25-1	A-16	B-094	C-072	D-110	E-128	F-026	G-044
17	α -terpineol	98-55-5	A-17	B-095	C-073	D-111	E-129	F-027	G-045
18	di-n-propyl disulphide	629-19-6	A-18	B-096	C-074	D-112	E-130	F-028	G-046
19	butyl methacrylate	97-88-1	A-19	B-097	C-075	D-113	E-131	F-029	G-047
20	heptanal	111-71-7	A-20	B-098	C-076	D-114	E-132	F-030	G-048

**培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた
皮膚刺激性試験プロトコール**

Ver. 5.01

目次

1. 目的	1
2. 準備	1
2.1 LabCyte EPI-MODEL24	1
2.1.1 LabCyte EPI-MODEL24 キット構成	1
2.1.2 LabCyte EPI-MODEL24 の配送について	1
2.1.3 LabCyte EPI-MODEL24 取扱い上の注意	2
2.2 IL-1 α ELISA kit	2
2.2.1 本研究で使用する IL-1 α ELISA kit	2
2.2.2 IL-1 α ELISA kit 構成	2
2.3 被験物質	3
2.4 一括準備消耗品	3
2.5 その他	3
2.5.1 機器・器具類	3
2.5.2 消耗品類	4
3. 試験方法	4
3.1 事前準備	4
3.1.1 MTT 培地	4
3.1.2 陽性対照物質	4
3.1.3 陰性対照物質	5
3.1.4 リン酸緩衝液充填洗浄用ポリ洗浄ピン	5
3.2 試験操作	5
3.2.1 培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 の準備 (被験物質暴露前日 (-1 日目))	5
3.2.2 被験物質の適用と洗浄 (被験物質暴露日 (0 日目))	6
3.2.3 後培養 (被験物質暴露日~2 日後 (0-2 日目))	8
3.2.4 MTT 試験と培養上清サンプリング (被験物質暴露 2 日後 (2 日目))	8
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))	9
3.2.6 培養上清中の IL-1 α 量の測定	11
4. 評価	15
4.1 試験成立条件	15
4.2 判定基準	15
作業記録シート 1: LabCyte EPI-MODEL24 受領記録	16
作業記録シート 2: 培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 の準備 (3.2.1 項)	17
作業記録シート 3/1: 被験物質の適用と洗浄、後培養 (3.2.2 項~3.2.3 項)	18
作業記録シート 3/2: 被験物質の適用と洗浄、後培養 (3.2.2 項~3.2.3 項)	19
作業記録シート 4: MTT 試験と培養上清サンプリング (3.2.4 項)	20
作業記録シート 5: MTT 反応産物 (フォルマザン) の抽出と測定 (3.2.5 項)	21
作業記録シート 6: 培養上清中の IL-1 α 産生量の測定 (3.2.6 項)	22
改定履歴	23

1. 目的

培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験のパリテーション研究を実施するにあたって、LabCyte EPI-MODEL24 皮膚刺激性試験プロトコールを示します。

2. 準備

2.1 LabCyte EPI-MODEL24

2.1.1 LabCyte EPI-MODEL24 キット構成

皮膚刺激性試験に用いる LabCyte EPI-MODEL24 の構成を示します【表 1】。

【表 1】 LabCyte EPI-MODEL24 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 次元培養表皮組織 24 個 (有効面積: 0.3cm ²)、冷蔵保存
アッセイ培地	1	培養用の基礎培地 (30mL)、冷蔵保存
24 ウェルアッセイプレート	1	アッセイ用の空プレート、室温保存

本プロトコールに従って、被験物質 20 種類の試験を 1 回実施する場合、3kit 必要となります。その他、下記の別売品が必要となりますので同梱発送致します。

- ・アッセイ培地 100mL (別売品: 402250) 1 本
- ・MTT25mg (別売品: 403026) 1 本

2.1.2 LabCyte EPI-MODEL24 の配送について

LabCyte EPI-MODEL24 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、構成品 (LabCyte EPI-MODEL24 プレート、アッセイ培地、24 ウェルアッセイプレート) が発注キット数分格納されていること、および、ロット番号、使用期限を確認して下さい。必要事項を、作業記録シートに記入して下さい。

アイコンポは、後日 (通常配送翌日)、日通航空株が引き取りに伺いますので、受領書、蓄温剤とともに返却願います。

2.1.3 LabCyte EPI-MODEL24 取扱い上の注意

LabCyte EPI-MODEL24 プレートは、未開封のまま、培養開始まで冷蔵保存してください。開封後は、すべての培養表皮モデル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。

2.2 IL-1 α ELISA kit

2.2.1 本研究で使用する IL-1 α ELISA kit

商品名: Interleukin-1 Alpha (IL-1 α) ELISA kit (96 Test kit)
 製品番号: 01-031-078 (品種コード: KAC1191)
 販売元: 旭テクノグラス 製造元: Invitrogen, Biosource™
 感度: 1 pg/mL 検出範囲: 3.9 ~ 250 pg/mL

2.2.2 IL-1 α ELISA kit 構成

本研究で使用する IL-1 α ELISA kit の構成を示します【表2】。

【表2】 IL-1 α ELISA kit の構成

名称	数量	内容
HuIL-1 α Standard	2vial	標準曲線作成用組換えヒト IL-1 α
Standard Diluent Buffer	1本	組換えヒト IL-1 α 希釈溶液
HuIL-1 α Antibody-coated wells	1枚	抗 IL-1 α 抗体コートプレート (96well plate)
HuIL-1 α Biotin conjugate	1本	ビオチン標識抗 IL-1 α 抗体 (2次抗体)
Incubation buffer	1本	
Streptavidin-Peroxidase (HRP)	1vial	発色用酵素 (HRP) 標識ストレプトアビジン
HRP Diluent	1本	HRP 希釈溶液
Wash Buffer Concentrate (x25)	1本	洗浄用溶液濃縮液 (x25)
Stabilized Chromogen	1本	発色用基質溶液
Stop Solution	1本	反応停止液
Plate Covers	3枚	反応時のプレートカバー用シート

本プロトコールに従って、被験物質 20 種類全てについて試験を実施する場合、79 ウェル (79

test) 分必要となります。

2.3 被験物質

被験物質は、コード化された試料として、資料等手配担当者から各施設に送付されます。

2.4 一括準備消耗品

一括購入して、各試験施設に配布する消耗品を示します。

* 数量は、一施設当りの配布量で、被験物質数 20 物質の試験を 3 回実施できる必要量となっています。

- ・ マイクロピペット用チップセルセイバー(広口) タイプ (滅菌済み) 96 本入り 1 箱
- ・ 24 ウェルアッセイプレート (Becton, Dickinson and Company : 353047) 27 枚
- ・ 96 ウェル測定プレート (Becton, Dickinson and Company : 353072) 3 枚
- ・ リン酸緩衝液 500mL (Invitrogen : 14190-144) 12 本
- ・ イソプロパノール 500mL (和光純薬 : 164-08335) 1 本
- ・ SLS 25g (SIGMA:L4390) 1 本
- ・ 注射用水 20mL (大塚製薬 : 36A1X00001) 5 本
- ・ 滅菌綿棒 (日本綿棒 : 10A754D) 1 箱

2.5 その他

その他、各試験施設で準備していただくものを示します。

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)
- ・ 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, 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）

2.5.2 消耗品類

- ・マイクロピペット用チップ（滅菌済み：10-200 μ L, 200-1000 μ L）
- ・マイクロチューブ（1.5mL）
- ・スカルペル（ケイセイ医科工業：ケイセイスカルペル 11A）

3. 試験方法

- *3.1.1～3.1.4、及び3.2.1～3.2.3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、2.1.3 LabCyte EPI-MODEL24の取扱い上の注意項を参照の上、試験を実施して下さい。

3.1 事前準備

3.1.1 MTT 培地

- ① MTT をアッセイ培地に溶解して、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下さい。
*溶解後は冷暗所で保存し、24時間以内に使用して下さい。
- ② ①の作業について、必要事項を作業記録シート4に記録します。

3.1.2 陽性対照物質

- ① SLS（500mg）を正確に秤量します。
- ② メスシリンダー、あるいはメスフラスコ内に秤量したSLSを入れて、注射用水を添加して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）。
*溶解後は冷暗所で保存し、24時間以内に使用して下さい。
- ③ ①～②の作業について、必要事項を作業記録シート3に記録します。

3.1.3 陰性対照物質

- ① 注射用水を使用します。

3.1.4 リン酸緩衝液充填洗浄用ポリ洗浄ピン

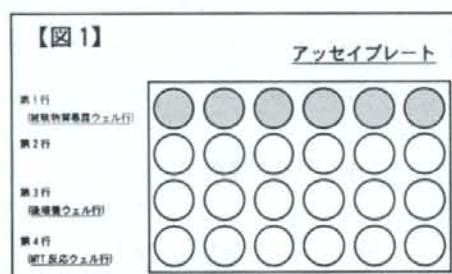
- ① ポリ洗浄ピンを、オートクレーブで滅菌しておきます。
- ② 滅菌したポリ洗浄ピンに、リン酸緩衝液（無菌）を無菌操作で充填します。

3.2 試験操作

3.2.1 培養表皮モデル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℃のウォーターバスで約 30 分間温めます。
- ② 24 ウェルアッセイプレート第 1 行（被験物質暴露ウェル行）の各 6 ウェルに温めたアッセイ培地を 0.5mL ずつ分注します（アッセイプレート）。

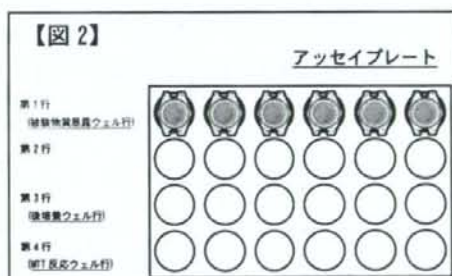
→ 【図 1】



- ③ LabCyte EPI-MODEL24 プレートを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、培養表皮モデル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。
* 培養カップ内の培養表皮モデル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ている寒天培地は、ピンセットなどで注意深く取り除いて下さい。

- ⑤ 培養表皮モデルをアッセイ培地の入った被験物質暴露ウェル行の各ウェルに移します。

→ 【図 2】



- 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 時間位）静置します。
- ⑧ ①～⑦の作業について、必要事項を作業記録シート 2 に記録します。

3.2.2 被験物質の適用と洗浄（被験物質暴露日（0日目））

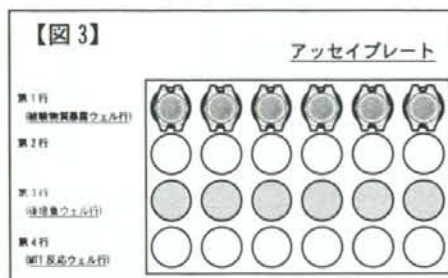
3.2.2.1 後培養用ウェル行の準備

- ① アッセイ培地を 37℃ のウォーターバスで約 30 分間温めます。
- 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（後培養用ウェル行）の各ウェルに、温めたアッセイ培地をマイクロピペットを用いて 1.0mL ずつ分注します。

→ 【図 3】

* 添加培地量は 1L-1α 量の定量値に影響しますので、正確に添加します。

- 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 被験物質の適用開始まで、静置します（0～12 時間位）。
- ⑥ ①～⑤ の作業について、必要事項を作業記録シート 3 に記録します。



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、被験物質暴露用ウェル行の培養表皮モデルの表皮組織表面に添加します。各被験物質につき 3 個の培養表皮モデルを使用します（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モデル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、安全キャビネット（又はクリーンベンチ）外で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。必要に応じて、マイクロスポーテルを用いて液面をゆきわたっていない部分に誘導することにより、全面にゆきわたらせます。この際、培養皮膚表面にマイクロスポーテルを強く接触させないように注意してください。

* 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（広口）タイプを使用して下さい。

→ 【写真 1】

被験物質の性状については、事前に実際にピペット操作等で確認しておき、試験に臨んで下さい。

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。まず注射用水 25μL を添加し、秤量した被験物質を培養表皮モデル上に添加し、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

【写真 1】粘性液体の適用チップ



さい。

→ 【写真2】

*一枚のアッセイプレートに適用する被験物質は2種類です。

→ 【図4】

(2物質(被験物質) x 3(N) = 6(培養モデル))。

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

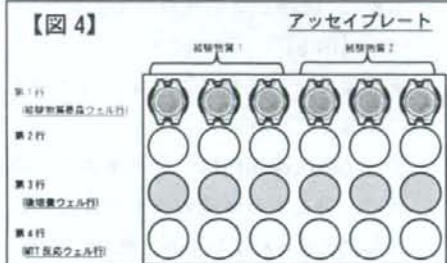
*作業時以外は、アッセイプレートには必ずフタをして下さい。安全キャビネット(又はクリーンベンチ)内は空気循環されていますので、フタを空けたままでは添加した被験物質質量が変動する場合があります。

- ⑤ ①~④の作業について、必要事項を作業記録シート3に記録します。

【写真2】 固体の適用



【図4】



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、培養カップを滅菌したピンセットで取り出します。
- ② リン酸緩衝液充填ボリ洗浄ピンを用いて、ビーカー上で培養カップ内にリン酸緩衝液を培養表皮モデル表皮表面に直接吹き付けるようにして、培養カップ内に充填します。

→ 【写真3】

*表皮組織表面を傷つけないように注意しておこなって下さい。

- ③ 培養カップを傾けて培養カップ内のリン酸緩衝液をビーカー内に廃棄します。培養カップをビーカー上でタッピングして極力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10回以上繰り返し、培養カップ内部の被験物質をほぼ完全に取り除きます。

【写真3】 洗浄①



【写真4】 洗浄②



- ⑤ 最終洗浄後に培養カップ内、培養カップ底に附着したリン酸緩衝液は、滅菌綿棒で丁寧に取り除きます。

→ 【写真 5】

- ⑥ 培養表皮モデル表面に被験物質が残存する場合には、滅菌綿棒などを用いて培養表皮モデル表面を傷つけないように取り除き、再度②～⑤洗浄を行って下さい。

- ⑦ 後培養用ウェル行の対応する同じ列の各ウェルに、洗浄した培養表皮モデルを移します。

→ 【図 5】

*培養カップ底面に気泡が入らないように注意して下さい。

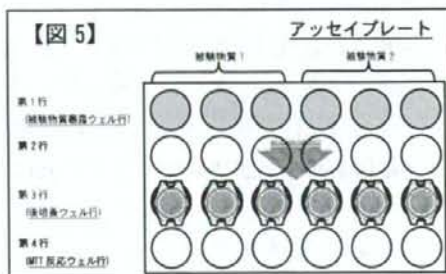
- ⑧ ①～⑦の洗浄操作は、各被験物質の添加順に、ひとつの培養表皮モデルにつき、おおよそ1～3分の間隔で洗浄します。

- ⑨ ①～⑧の作業について、必要事項を作業記録シート3に記録します。

【写真 5】 洗浄③



【図 5】



3.2.3 後培養（被験物質暴露日～2日後（0-2日目））

- ① 洗浄した培養表皮モデル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。
- ② 42 時間静置します。

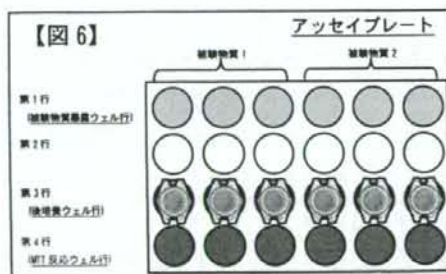
3.2.4 MTT 試験と培養上清サンプリング（被験物質暴露 2 日後（2日目））

3.2.4.1 MTT 反作用ウェル行の準備

- ① MTT 培地を 37℃ のウォーターバスで約 30 分間温めます。
- 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け、第 4 行（MTT 反作用ウェル行）の各ウェルに温めた MTT 培地を 0.5mL ずつ分注します。

→ 【図 6】

【図 6】

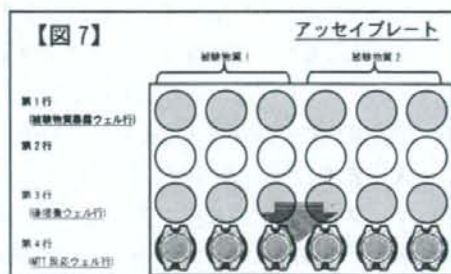


- ③ アッセイプレートにフタをして、CO₂インキュベーターに入れます。
- ④ MTT 反応開始直前まで静置します (0~12 時間位)。
- ⑤ ①~④の作業について、必要事項を作業記録シート 4に記録します。

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モデルを後培養用ウェル行から取り出し、MTT 反应用ウェル行の対応する同じ列の各ウェルに移します。

→ 【図 7】



- * 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。
- * 培養カップ底面に気泡が入らないように注意して下さい。

- ③ 培養表皮モデル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 時間静置します。
- ⑤ ①~④の作業について、必要事項を作業記録シート 4に記録します。

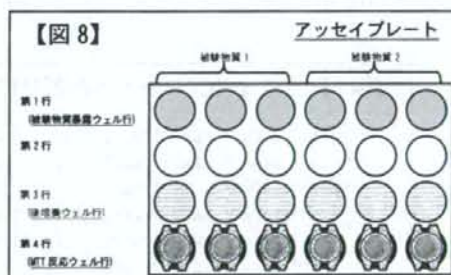
3.2.4.3 培養上清サンプリング

- ① 3.4.3.2 MTT 反応②項の操作後の後培養用ウェル行のウェル内の培養上清全量を 1.5mL マイクロチューブにサンプリングします。

→ 【図 8】

- * サンプリング前にプレートを揺すり、培地が均一になるようにして下さい。

- ② マイクロチューブは-20℃以下で IL-1 α 量を測定するまで保管します。
- ③ ①~②の作業について、必要事項を作業記録シート 4に記録します。



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

- ① MTT 反応 3 時間 (±5 分) 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あげ、後培養用ウェル行の各ウェルの培養カップ内の培養表皮モデルをピンセットでつまんで取り出します。

→ 【写真6】

* 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、マイクロスポーテルなどを用いて表皮組織をかき集める、又は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って下さい。

【写真6】 培養表皮モデル剥離



- ③ 培養表皮モデル片を 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、培養表皮モデル片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。

* 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。

- ⑥ マイクロチューブ内の溶液を良く混合します。

* 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。

- ⑦ 各マイクロチューブ内の溶液 200 μ L を 96 ウェルプレート内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 200 μ L を設定します。

* 【図9】に 96 ウェルプレートへの割り付け例を示します。

【図9】 96 ウェルプレートへの割り付け

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ブランク											
B	注射用水 1-1	被験物質 2-1	被験物質 3-1	被験物質 4-1	被験物質 5-1	被験物質 6-1	被験物質 7-1	被験物質 8-1	被験物質 9-1	被験物質 10-1	被験物質 11-1	被験物質 12-1
C	注射用水 2-2	被験物質 3-2	被験物質 4-2	被験物質 5-2	被験物質 6-2	被験物質 7-2	被験物質 8-2	被験物質 9-2	被験物質 10-2	被験物質 11-2	被験物質 12-2	
D	注射用水 3-3	被験物質 4-3	被験物質 5-3	被験物質 6-3	被験物質 7-3	被験物質 8-3	被験物質 9-3	被験物質 10-3	被験物質 11-3	被験物質 12-3		
E	0% RL-1 4-1	被験物質 5-1	被験物質 6-1	被験物質 7-1	被験物質 8-1	被験物質 9-1	被験物質 10-1	被験物質 11-1	被験物質 12-1			
F	0% RL-2 5-2	被験物質 6-2	被験物質 7-2	被験物質 8-2	被験物質 9-2	被験物質 10-2	被験物質 11-2	被験物質 12-2				
G	0% RL-3 6-3	被験物質 7-3	被験物質 8-3	被験物質 9-3	被験物質 10-3	被験物質 11-3	被験物質 12-3					
H												

- ⑧ ①～⑦の作業について、必要事項を作業記録シート5に記録します。

3.2.5.2 抽出液の吸光度測定

- ① 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。
下記に計算値を示します。

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

*96 ウェルマルチプレートリーダーが自動計算する場合は、プレートリーダーの計算値を測定値とします。

- ② 下記式より被験物質の生細胞率を計算します。
 ③ ①～②の作業について、必要事項を作業記録シート5に記録します。

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

3.2.6 培養上清中の IL-1 α 量の測定

IL-1 α ELISA kit を使用して、注射用水（陰性対照）、あるいは各被験物質の培養上清中の IL-1 α 産生量を測定します。

3.2.6.1 IL-1 α ELISA 調製試薬

3.2.6.1.1 IL-1 α 標準液（希釈系列）

- ① 10,000pg/mL とラベルした 1.5mL マイクロチューブ内で、HuIL-1 α Standard を Standard Diluent Buffer で希釈し、IL-1 α 標準液 (10,000pg/mL) を調製します。希釈率は、HuIL-1 α Standard のラベルに記載の指示に従ってください。攪拌後、約 10 分間静置して、完全に溶解してください。
- ② 250pg/mL とラベルした 1.5mL マイクロチューブ内に、IL-1 α 標準液 (10,000pg/mL) を 10 μ L、Standard Diluent Buffer を 390 μ L、それぞれ添加して、IL-1 α 標準液 (250pg/mL) を調製します。
- ③ 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9 pg/mL とラベルした 1.5mL マイクロチューブ（計 6 本）に、Standard Diluent Buffer を 200 μ L ずつ加えます。
- ④ 下記表に従って、IL-1 α 標準液希釈系列を調製します【表3】。

【表3】IL-1 α 標準液希釈系列の調製

IL-1 α 標準液(希釈系列)	添加	マイクロチューブ内
250pg/mL	②で調製	
125pg/mL	250pg/mL IL-1 α 標準液 (200 μ L)	<u>Standard Diluent Buffer</u> (200 μ L)
62.5pg/mL	125pg/mL IL-1 α 標準液 (200 μ L)	<u>Standard Diluent Buffer</u> (200 μ L)
31.3pg/mL	62.5pg/mL IL-1 α 標準液 (200 μ L)	<u>Standard Diluent Buffer</u> (200 μ L)
15.6pg/mL	31.3pg/mL IL-1 α 標準液 (200 μ L)	<u>Standard Diluent Buffer</u> (200 μ L)
7.8pg/mL	15.6pg/mL IL-1 α 標準液 (200 μ L)	<u>Standard Diluent Buffer</u> (200 μ L)
3.9pg/mL	7.8pg/mL IL-1 α 標準液 (200 μ L)	<u>Standard Diluent Buffer</u> (200 μ L)

- ⑤ ①～④の作業について、必要事項を作業記録シート 6 に記録します。

3.2.6.1.2 HRP 希釈液

- ① 適当な容器（例えば 15mL 遠心用チューブ）に、Streptavidin-Peroxidase (HRP) を HRP Diluent で 100 倍希釈し、HRP 希釈液を調製します。
- ② 調製量は、使用するウェル数により調整します。
陽性対照物質、陰性対照物質、被験物質 20 物質を全て試験する場合は、合計 79 ウェル（IL-1 α 標準液希釈系列 16 ウェル分を含む）を使用しますので、Streptavidin-Peroxidase (HRP) (120 μ L) を HRP Diluent (12mL) で希釈して、HRP 希釈液を調製します。
- ③ ①～②の作業について、必要事項を作業記録シート 6 に記録します。

3.2.6.1.3 ELISA 洗浄液

- ① 適当な容器（例えば 1L ガラスボトル）に、Wash Buffer Concentrate (x25) を蒸留水（あるいはイオン交換水）で 25 倍希釈し、ELISA 洗浄液を調製します。ELISA 洗浄液は、調製後 14 日間保存可能です。
- ② 調製量は、実験計画により調整します。
1 プレートを洗浄する際に必要な ELISA 洗浄液は約 400mL です。
- ③ ①～②の作業について、必要事項を作業記録シート 6 に記録します。

3.2.6.2 培養上清の添加、および 2 次抗体の添加

- ① 3.2.4.3 項の操作でサンプリングした培養上清を凍結保存してある場合には、自然解凍しておきます。
- ② HuIL-1 α Antibody-coated wells ストリップ (8well 単位) を必要分、フレームにセットします。【図 10】に ELISA プレートへの割り付け例を示します。

【図 10】 ELISA プレートへの割り付け

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ブランク	ブランク	注射用水	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質		
B	IL-1 α 2.0 μ g/mL	IL-1 α 4.0 μ g/mL	注射用水	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質		
C	IL-1 α 7.0 μ g/mL	IL-1 α 14.0 μ g/mL	注射用水	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質		
D	IL-1 α 18.0 μ g/mL	IL-1 α 36.0 μ g/mL	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質		
E	IL-1 α 31.0 μ g/mL	IL-1 α 62.0 μ g/mL	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質		
F	IL-1 α 42.0 μ g/mL	IL-1 α 84.0 μ g/mL	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質		
G	IL-1 α 120.0 μ g/mL	IL-1 α 240.0 μ g/mL	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質		
H	IL-1 α 250.0 μ g/mL	IL-1 α 500.0 μ g/mL	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質	被験物質		

- ③ 割り付け例に従い、IL-1 α 標準液（希釈系列）、Standard Diluent Buffer（ブランク）、あるいは各被験物質の培養上清をそれぞれ 50 μ L ずつ各ウェルに添加します。
- ④ Incubation Buffer を 50 μ L ずつ各ウェルに添加します。
- ⑤ HuIL-1 α Biotin conjugate を 50 μ L ずつ各ウェルに添加します。