

オゾンナノバブル水の ヒト培養皮膚モデルを用いる皮膚刺激性試験

試験機関：一般財団法人 日本食品分析センター

【試験目的】

検体について、OECD Guideline for Testing of Chemicals 439(2019)に準拠し、ヒト培養皮膚モデルにおける皮膚刺激性を調べる。

【試験条件】

- 1) 使用したヒト培養皮膚モデル
Labcyte EPI-MODEL24[株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング]
製造ロット：LCE24-200413-A
- 2) 培養条件
37°C、5%CO₂濃度とした。
なお、培養以外でのCO₂インキュベーター設定についても上記と同様とした。
培地はキット付属のアッセイ培地を用いた。

【予備試験】

- 1) 着色性の確認
検体 25 μ L 及び注射用水[光製薬株式会社]0.5mL を混合し、CO₂インキュベーターにて15分間静置後、目視で観察した。明らかな着色は見られなかったことから、ヒト培養皮膚モデル（以下「皮膚モデル」とする。）を着色する作用はないものと判定した。
- 2) MTT還元性の確認
検体 25 μ L 及びMTT[株式会社 同仁科学研究所]溶液(0.5mg/mL)0.5mL を混合し、CO₂インキュベーターにて1時間静置後、目視で確認した。明らかな着色は見られなかったことから、MTTを直接還元する作用はないものと判定した。

【本試験】

1) 試験方法

① 前培養

皮膚モデルを一晩培養した。

② 試験物質適用

1つの試験物質につき、皮膚モデル3個を用いた。皮膚モデルの表皮面に検体25 μ Lを添加した。陰性対照として注射用水、陽性対照として5%SL S[富士フィルム和光純薬株式会社]溶液をそれぞれ25 μ Lずつ適用した。各試験物質適用後、15分間静置した。

③ 洗浄

培養終了後、D-PBS(-)[富士フィルム和光純薬株式会社]を用いて皮膚モデルを洗浄した。

④ 後培養

洗浄後、42時間培養した。その後MTT溶液(0.5mg/mL)を添加し、3時間培養して染色した。

⑤ 色素抽出

皮膚モデルから培養表皮を取り出し、イソプロパノール[関東化学株式会社]を加え、冷蔵で一晩以上静置して色素を抽出した。色素抽出液についてマイクロプレートリーダー[SpectraMax M2e, Molecular Devices Corporation]を用いて吸光度を測定した(測定波長:570nm, 対照波長:650nm)。

2) 細胞生存率の算出方法

陰性対照の吸光度に対する試験物質の吸光度から、次式により細胞生存率を算出した。

$$\text{細胞生存率(\%)} = \frac{\text{Sa}}{\text{NC}} \times 100$$

Sa : 試験物質または陽性対照の吸光度

NC : 陰性対照の吸光度の平均値(n=3)

3) 試験の成立条件

- ① 陰性対照の吸光度(570nm-650nm)の平均値が 0.7 以上 2.5 以下であること
- ② 陽性対照の細胞生存率の平均値が 40%以下であること
- ③ 各試験物質における細胞生存率の標準偏差(n=3)が 18 以下であること

4) 評価方法

試験の成立条件を満たした試験物質について、細胞生存率の平均値(n=3)が 50%以下の場合は刺激性、50%を上回る場合は非刺激性と皮膚刺激性を評価した。

【試験結果】

試験結果を表-1 に示した。

陰性対照の吸光度の平均値(570nm-650nm)は 0.932、陽性対照の細胞生存率の平均値は 3.1%、各試験物質における細胞生存率の標準偏差(n=3)は 18 以下であり、試験成立条件を満たした。

細胞生存率の平均値は 50%を上回ったため、皮膚刺激性は非刺激性と評価された。

表-1 細胞生存率

試験物質	細胞生存率(%)					評価
	n=1	n=2	n=3	平均値	標準偏差	
検体	84.4	96.7	99.6	93.6	8.07	非刺激性
陰性対照	87.7	108.7	103.6	100	10.95	非刺激性
陽性対照	3.2	2.9	3.1	3.1	0.15	刺激性

【参考文献】

- ・ ヒト 3 次元培養表皮 LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激試験法

以上