

添付資料4：皮膚腐食性試験バリデーション SOP

平成16年1月31日作成

1. 試験に使う器材及び試薬 (2キット使用：本試験の場合)

試験施設で準備するもの：ピペットマンまたはマイクロマン (100 μ L)、1 mL および 5 mL ピペッター、吸引除去装置、0.1 mg まで計れる化学天秤、時計、ストップウォッチまたはタイマー、20mL 容ビーカーまたは 6well プレート 12~24 個、ピンセット (先端が細いもの。但し、とがっていないもの)、絶縁テープ (シーリングテープ、パラフィルムでも良い)、ペーパータオル、イソプロパノール、蒸留水 (市販品、自家製の脱イオン水でも良い)、磷酸緩衝液 (PBS、0.01mol/L Phosphate Buffered Saline (-) 和光 164-1851、pH 7.4 であれば自家製のものや他社のものでも良い) 約 800 mL、MTT 溶液 (キットの培養液で 0.5 mg/mL にて必要量を用事調整)

大野より送付：MTT、陽性対照物質 (水酸化カリウム 10%水溶液、塩化ベンザルコニウム、20% SLS)、被験物質 (10 検体)、96 well、24 well、および 6 well プレート各 4~50 枚

クラボウより送付：EpiDerm™ 必要数、画鋲 (頭が Φ 7.7mm 以下で断端が若干膨らんでいるもの、6ヶづつ送付)、

ゲンゼより送付：Vitrolife-Ski™n 必要数、直径 6 mmポンチ、木槌、カッティングマット

2. 使用機器・場所

CO2 インキュベーター、冷蔵庫、マイクロプレートリーダー、クリーン度の高い場所、無菌操作は必ずしも行わなくてよい。

3 試験方法

1) EpiDerm™ の場合、送付されてきたキットの梱包を解き、培養皮膚モデル (以下、モデルと記す) の入った 24 well プレートの状態を確認する。使用まで冷蔵保管 (48 時間以内)。試験当日に、付属の培養液を 37℃で温める。6 well プレート 4 枚の well にそれぞれ培養液 1mL を加え、モデルを各 well に置き、37℃、CO2 インキュベーターにて 1 時間以上、培養する。(注意：モデルを 6 well プレートに移す際、モデルの下部に空気を入れないようにする。モデルに寒天が付着している場合は、ペーパータオルで拭き取る。)

2) Vitrolife-Skin™ の場合、送付されてきたキットの梱包を解き、モデルの入った 24 well プレートを 37℃、CO2 インキュベーターに入れる。付属の培養液を 37℃で温める。1 時間後、6 well プレート 4 枚の well にそれぞれ培養液 1 mL を加え、モデルを各 well に置く。カラーゲングルのみのモデルについても同様の操作を行う。当日試験を開始できない場合には、この状態で 1~2 日間 37℃、CO2 インキュベーターにて培養する。(注意：冷やしてはいけない)

以後は各モデル共通の操作となる。

3) 試験前のモデルの確認 (well に穴や明らかに薄い部分があるような異常な well は使用しない。また、水滴等があれば、モデルを傷つけないように濾紙等で除去する)

4) 被験物質を適用 (希釈等の操作は不要)

100 μ L 又は 100 mg をキット上部に適用。

N=2 に適用。Vitrolife-Skin™ ではカラーゲングルのみのモデル (n=1) にも適用する。これについての操作は細胞を含むモデルと同様に行う。

物性による適用方法：①粉体：被験物質を事前に計りこんで葉包紙に包んでおく (用時処理)。葉包紙等で作成した軽い漏斗を用いて well に適用後、画鋲の後ろで軽く押さえる。吸水性がある場合には、化学天秤上で計り込む。

②固体：(40-50℃の熱をかけて溶ける場合) 37℃前後で溶液ならば、溶液として適用する。

③固体 (その他)：乳鉢などを用いて均一な粉にし、①の方法で適用。

④クリーム・ゲル状 (低粘度)：マイクロマンなどで計り取る。マイクロマン未使用の場合には、被験物質を計りこんだ後、画鋲の後ろで軽く押さえる。

⑤クリーム・ゲル状 (高粘度)：被験物質を計りこんだ後、画鋲の後ろで軽く押さえる。

⑥溶液：ピペットマンを用いて 100 μ L 適用。

陰性対照：蒸留水、陽性対照液はピペットマンを用いて 100 μ L 適用。塩化ベンザルコニウムは①の

方法で適用。

- 5) 被験物質順に適用し、3分、60分間処理を行う。処理は常温(15-25℃)。
- 6) 10mL以上のPBSで2回洗浄。モデルをピンセットで摘み、かたむけて被験物質をペーパータオルにしませた後、2~3回PBS液中でふってすすぐ。これを2回繰り返す。PBSは被験物質、処理毎に交換する。3分処理の洗浄に用いたビーカーは、そのまま同じ物質であれば、次の60分間処理に用いても良いが、PBSは交換する。
- 7) モデルを0.3mLのPBSの入ったwellに移す。
- 8) 全被験物質の処理が終わった後モデルをペーパータオル上などでよくPBSを切る。
EpiDerm™の場合には、MTT 0.5 mg/mLを含む培養液 0.3 mLの入った24 wellプレートにモデルの下部に空気を入れずに移す。
Vitrolife-Skin™の場合には、MTT 0.5 mg/mLを含む培養液 1mLの入った24 wellプレートにモデル全体を沈める。
- 9) 37℃、CO2インキュベーターに3時間入れる。
- 10) モデルをWellから取り出し、10 mL以上のPBSの入った2つビーカー中で順次2回洗う。
- 11) EpiDerm™ではペーパータオル上でPBSをよく切り、別の24 wellプレートにモデルを移す。
Vitrolife-Skin™の場合には、移す前に直径6 mmのポンチで適用部を打ち貫き、ペーパータオル上でPBSをよく切り、別の24 wellプレートにモデルを移す。イソプロパノールをEpiDermの場合には2 mL、Vitrolife-Skinでは1mL加えて、フォルマザンを抽出する。
- 12) 水滴が入らないように、シールして冷蔵庫にて一晩保存。
- 13) ピペッティングにより均一化した抽出液を96 wellプレートに200 μL/wellずつ移す。
- 14) マイクロプレートリーダーを用いて、OD540または570の吸光度を測定。
イソプロパノールのみもwellに加え、ブランクとする。
- 15) 生データをデータシートに入力。陰性対照を100%として、3分、60分間処理における平均生存率を計算。

EpiDerm™の場合

$$\text{生存率} = 100 \times (\text{処理モデルの吸光度} - \text{blank}) / (\text{陰性対照の吸光度} - \text{blank})$$

Vitrolife-Skin™でコラーゲンゲルのみのモデルを併用する場合

$$\text{生存率} = 100 \times (\text{処理モデルの吸光度} - \text{被験物質を適用したコラーゲンゲルのみの吸光度}) / (\text{陰性対照の吸光度} - \text{陰性対照を適用したコラーゲンゲルのみの吸光度})$$

- 16) 判定モデル
腐食性有り：被験物質を適用した2つのwellの生存率を平均値が3分で生存率50%未満、或いは、3分で生存率50%以上、60分間で15%未満
吸光度と判定結果をデータシートに記載。

以上

<注意事項>

1. 無理な計画を立て、操作を誤らないようにする。
2. 分刻みとなる処理記録の記載を忘れずに。なお、処理モデルの洗いに時間がかかり、処理時間が延びてしまう場合もあります。そのような場合は正確に処理時間を記録する。
3. 計量による適用では100±5 mgの範囲を許容範囲とします。正確に適用量を記載する。
4. 液体の場合、その粘性や重みにより正確な量を適用できないことがあるので、そのような場合は注射用シリンジ等、正確な液量を適用できる器材を使用する。
5. wellへの薬物の適用間隔は30秒以上とることが望ましい。粉体は特に時間がかかる。
6. MTT溶液の作成に際しては超音波処理して完全に溶解する。
7. Vitrolife-Skin™では腐食性物質を適用した場合、リングがモデルからはずれることがある。その場合はゲルの端をピンセットで持ち、以後の操作を遂行する。

腐食性試験吸光度データシート(入力欄)

実験施設	データ記録者	記録月日
モデル名 EpiDerm	試験種類	波長

物質番号入力(下記の96穴プレートの吸光度入力欄の列に対応するよう物質番号を入力してください)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

96穴プレート吸光度入力欄(吸光度計で測定した吸光度を入力してください。欠測の場合は未記入としてください。)

黄色: ブランクの吸光度、水色: 上に入力した被験物質に対応する吸光度、ピンク: 陰性対照の吸光度

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ブラंक	3分	3分	60分	60分							
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

コメントのある方はここに記入して下さい。