

LabCyte EPI-MODEL 24を用いた JIS L 1918「繊維製品の皮膚一次刺激性試験」

渡辺美香, 小林美和子, 生悦住茉友, 山影康次

Primary skin irritation test of textile products according to JIS L 1918 using LabCyte EPI-MODEL 24

Mika WATANABE, Miwako KOBAYASHI, Mayu IKEZUMI, Kohji YAMAKAGE

緒言

欧州連合(EU)では、1986年以降、動物実験の規制が段階的に強化され、2013年3月11日からは、EU内で動物実験を用いて開発された化粧品の販売が全面禁止となっている。その禁止措置には、製造元がEU加盟国以外の製品も含まれており、すべての化粧品に適用されている。昨今、こうした海外の動きの影響によって、日本でも動物実験廃止を求める声が少しずつ広がりを見せてきたことから、動物を用いない動物実験代替法による安全性評価が強く求められている。

この様な状況の中で、日本工業規格JIS L 1918¹⁾においても、2005年に繊維製品の皮膚への一次刺激性を予測・予知するための培養ヒト3次元皮膚(Reconstructed human Epidermis, RhE)モデルによる*in vitro*試験方法が制定されている。しかし、このJIS規格制定時にRhEモデルとして皮膚貼付試験との対比試験が行われたのはEpiDerm EPI-200, Testskin LSEおよびVitrolifeのみで、これら以外のRhEモデルを使用する場合には、JIS L 1918に規定された試験成立条件を満たす必要がある。そこで著者らは日本国内で入手が容易なRhEモデルであるLabCyte EPI-MODEL²⁾について、JIS L 1918に規定される試料を用いて試験成立条件を満たすための条件検討を行った。

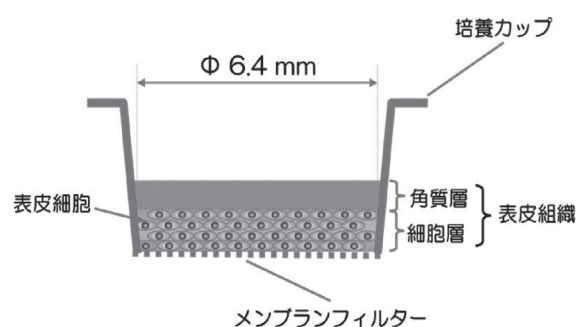


図1 LabCyte EPI-MODEL 24 模式図

ヒト正常表皮細胞を重層培養したヒト3次元培養表皮モデルである。ヒト皮膚構造に類似し、高度に分化、重層化した3次元構造をとっている。

材料および方法

RhE モデル

LabCyte EPI-MODEL 24はヒト正常表皮細胞を重層培養したRhEモデルであり(図1)、2013年7月26日に経済協力開発機構(OECD)のテストガイドライン439³⁾(*in vitro*皮膚刺激性再生ヒト表皮試験法)にも掲載されている。この試験にはLabCyte EPI-MODEL 24とキットに付属のアッセイ培地[EPI-MODEL]とともに株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング(愛知)より購入して使用した。

基準布

試験に用いる基準布を作製するために、JIS L 0803⁴⁾で規定された染色堅ろう度用添付白布の綿を、60°Cに保持して10分間湯洗いし、5分間のすすぎを2回行い、これを10回繰り返したものを沸騰水中で30分間処理し、精製水で3回のすすぎを行い、風乾した。この基準布をRhEモ

表1 コントロール試料の分類

コントロール試料の分類	しみ込ませる溶液
コントロール試料O(24/48時間貼付用)	人工汗液 ¹⁾
コントロール試料A(24時間貼付用)	SLS ²⁾ (10 g/L)
コントロール試料B(24時間貼付用)	SLS(1 g/L)
コントロール試料C(48時間貼付用)	SLS(5 g/L)
コントロール試料D(48時間貼付用)	SLS(0.1 g/L)

¹⁾ 人工汗液: L-ヒスチジン塩酸塩一水和物(0.5 g/L), 塩化ナトリウム(5.0 g/L), リン酸二水素ナトリウム二水和物(2.2 g/L)を含む水溶液[pH5.5 ± 0.2(25℃)]. JIS L 0848⁵⁾で規定された酸性人工汗液.

²⁾ SLS: SLS原液(10 g/L)を調製し, 基準布の貼付時間によって異なる濃度に希釈した.

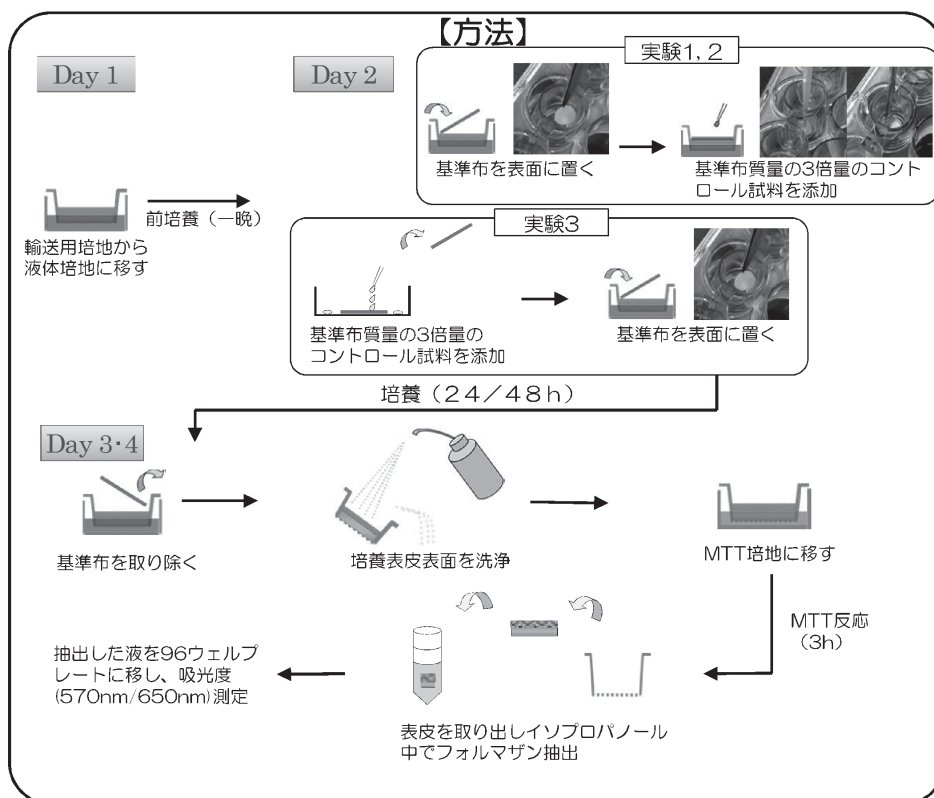


図2 LabCyte EPI-MODEL 24を用いた試験操作の流れ

デルのサイズに合わせて打抜きポンチで直径6 mm以上(6または7 mm)の円形に打抜き, 使用前にオートクレーブ滅菌した(121℃, 15分).

コントロール試料

JIS L 1918に従い, 人工汗液および濃度の異なるラウリル硫酸ナトリウム水溶液(以下, SLS) 4種類を, それぞれ別々の基準布に基準布質量の3倍量しみ込ませたものをコントロール試料とした. 試験成立の判定に用いた5種類のコントロール試料を表1に示した.

試験方法

試験の流れを図2に示した. 入手したLabCyte EPI-MODEL 24の培養カップを, アッセイ培地0.5 mLを入れた24ウェルアッセイプレートに移し, 37℃, 5% CO₂条件下で前培養した. 前培養後, 基準布による処理を行うが, 処理方法と処理時間の検討を行った. 処理方法については, 前培養を約24時間行った後, 培養表皮表面にコントロール試料を貼付(実験1および実験2)するか, もしくは, 培養表皮表面に基準布を貼付して人工

表2 評価基準

細胞生存率(%)		皮膚一次刺激性の分類
24時間貼付試験	48時間貼付試験	
50.0未満	—	陽性
50.0以上, 80.0未満	50.0未満	弱陽性
50.0以上, 80.0未満	50.0以上	陰性
80.0以上	—	陰性

24時間貼付試験で、細胞生存率が80.0%以上を示した場合は、被験試料の皮膚への一次刺激性は陰性に分類し、50.0%未満を示した場合は陽性に分類する。24時間貼付試験で、細胞生存率が50.0%以上、80.0%未満を示した場合は、さらに48時間貼付試験を実施し、細胞生存率が50.0%未満の場合は弱陽性に分類し、50.0%以上の場合は陰性に分類する(JIS L 1918:2011より転記)。

汗液またはSLSを滴下(実験3)させた。このとき、試料を貼付しない培養表皮を未貼付試料として用意した。いずれもn=3で行った。新たにアッセイ培地をそれぞれ0.5 mL(24時間)または1 mL(48時間)を加えたウェルに培養カップを移して、24時間または48時間貼付試験を実施した。

24時間または48時間培養した後、基準布を除去して培養表皮表面をPBSで洗浄し、培養表皮を0.5 mg/mL MTT含有アッセイ培地0.5 mLが入ったウェルに入れ、3時間培養した。その後、培養表皮をチューブに移し、イソプロパノール300 µLに浸漬した。チューブを冷蔵庫で24時間以上静置して、MTT反応生成物(ホルマザン)を抽出(MTT抽出液)した。

MTT抽出液を200 µLずつ96ウェルプレートに移し、マイクロプレートリーダーで測定波長570 nm、参照波長650 nmにおける吸光度を測定した。ブランクはイソプロパノールとし、測定値から生細胞数(吸光度平均値)および細胞生存率 $\{(\text{各群の吸光度平均値} / \text{各対照群の吸光度平均値}) \times 100\}$ を算出した。なお、コントロール試料Oの場合は未貼付試料、コントロール試料A~Dの場合はコントロール試料Oをそれぞれの対照群とした。

なお、実際に被験試料(繊維製品)を試験する際には、被験試料をコントロール試料と同じサイズに打ち抜き、人工汗液を滴下したものについて同様な操作を実施し、表2の評価基準より刺激性について分類することになる。

試験成立条件

JIS L 1918に従い、コントロール試料群が下

記条件にいずれも適合する場合、試験が成立したものとした。

未貼付試料の生細胞数 ≥ 0.7 ^注

コントロール試料Oの細胞生存率 $\geq 80.0\%$

コントロール試料Aおよびコントロール試料Cの細胞生存率 $< 20.0\%$

コントロール試料Bおよびコントロール試料Dの細胞生存率 $\geq 80.0\%$

注：LabCyte EPI-MODEL 24を用いた*in vitro*皮膚刺激性試験における陰性対照の判定基準を未貼付試料への判定基準として採用した。

結果および考察

ヒト3次元培養表皮モデルLabCyte EPI-MODEL 24がJIS L 1918に適合するモデルであるか検討するため、JIS L 1918に規定されるコントロール試料を用いて*in vitro*皮膚刺激性試験を実施した。

実験1では、直径6 mmのコントロール試料を培養表皮表面に貼付し、24時間または48時間培養した結果(表3)、コントロール試料Oの細胞生存率は94.0%(24時間)および105%(48時間)であった。コントロール試料Aおよびコントロール試料Cの細胞生存率は43.8%および61.8%、コントロール試料Bおよびコントロール試料Dの細胞生存率は92.0%および97.9%であった。

コントロール試料O、コントロール試料Bおよびコントロール試料Dは試験成立条件($\geq 80.0\%$)を満たしたが、コントロール試料Aおよびコントロール試料Cはいずれも条件($< 20.0\%$)を満たさなかった。コントロール試料Aおよびコントロール試料CはMTT含有培地で培

表3 直径6 mmのコントロール試料を培養表皮表面に24時間または48時間貼付した結果

試料名	培養24時間						培養48時間					
	生細胞数(OD ₅₇₀₋₆₅₀)					細胞生存率 (%)	生細胞数(OD ₅₇₀₋₆₅₀)					細胞生存率 (%)
	1	2	3	平均	S.D.		1	2	3	平均	S.D.	
未貼付試料	1.359	1.056	-	1.208	± 0.214	100	0.955	0.946	-	0.951	± 0.006	100
コントロール試料O	1.056	1.203	1.149	1.136	± 0.074	94.0	0.989	0.967	1.029	0.995	± 0.031	105
コントロール試料A/C	0.476	0.615	0.401	0.497	± 0.109	43.8	0.639	0.552	0.655	0.615	± 0.055	61.8
コントロール試料B/D	1.093	1.024	1.017	1.045	± 0.042	92.0	0.976	0.974	0.971	0.974	± 0.003	97.9

■ 網掛け部：試験成立条件を満たさなかった。

表4 直径6または7 mmのコントロール試料を培養表皮表面に24時間貼付した結果

試料名	培養24時間						
	生細胞数(OD ₅₇₀₋₆₅₀)					細胞生存率 (%)	
	1	2	3	平均	S.D.		
未貼付試料	1.018	0.925	0.970	0.971	± 0.047	100	
コントロール試料O	0.901	1.013	1.014	0.976	± 0.065	101	
コントロール試料A(直径6 mm)	0.176	0.314	0.212	0.234	± 0.072	24.0	
コントロール試料A(直径7 mm)	0.198	0.260	0.348	0.269	± 0.075	27.6	

■ 網掛け部：試験成立条件を満たさなかった。

表5 直径6 mmの基準布を培養表皮に貼付後、人工汗液またはSLSを基準布にしみ込ませた結果

試料名	培養24時間						培養48時間					
	生細胞数(OD ₅₇₀₋₆₅₀)					細胞生存率 (%)	生細胞数(OD ₅₇₀₋₆₅₀)					細胞生存率 (%)
	1	2	3	平均	S.D.		1	2	3	平均	S.D.	
未貼付試料	0.849	0.791	0.832	0.824	± 0.030	100	0.801	0.899	0.745	0.815	± 0.078	100
コントロール試料O	0.765	0.716	0.764	0.748	± 0.028	90.8	0.840	0.789	0.760	0.796	± 0.041	97.7
コントロール試料A/C	0.041	0.026	0.129	0.065	± 0.056	8.69	0.054	0.057	0.297	0.136	± 0.139	17.1
コントロール試料B/D	0.720	0.745	0.783	0.749	± 0.032	100	0.810	0.768	0.725	0.768	± 0.043	96.5

養後、培養表皮のふちが紫色となって吸光度が高くなり、細胞生存率が成立条件を上回った可能性が考えられたことから、基準布のサイズが小さかったことが原因と考えられた。

実験2では、直径6 mmまたは7 mmのコントロール試料Oおよびコントロール試料Aを、培養表皮表面に貼付して24時間培養した結果(表4)、コントロール試料Oの細胞生存率は101%(24時間)、コントロール試料Aの細胞生存率は24.0%(直径6 mm)および27.6%(直径7 mm)であった。

コントロール試料Oは試験成立条件(≥80.0%)を満たしたが、コントロール試料Aはいずれも条件を満たさなかった。MTT含有培地で培養後、実験1と同様に、培養表皮は基準布の直径に関わらずふちが円形状に紫色であった。これは、LabCyte EPI-MODEL 24の培養表皮の直径

が6.4 mmであるため、基準布が6 mmの場合は全体を覆わず、7 mmの場合は培養カップの縁で布が捲れ上がり、培養表皮の端に基準布が接触しなかったと考えられた。基準布のサイズを調節するのは困難であるため、試料の貼付方法を変更することを考えた。

実験3では、あらかじめ直径6 mmの基準布を培養表皮に貼付後、人工汗液またはSLSを基準布に基準布質量の3倍量滴下し、24時間または48時間培養した。その結果(表5)、コントロール試料Oの細胞生存率は90.8%(24時間)および97.7%(48時間)であった。コントロール試料Aおよびコントロール試料Cの細胞生存率は8.69%および17.1%、コントロール試料Bおよびコントロール試料Dの細胞生存率は100%および96.5%であった。いずれのコントロール試料

とも試験成立条件を満たした。

あらかじめ基準布に試料をしみ込ませた後に培養表皮に貼付する方法では、基準布が培養表皮の全体を覆わず、コントロール試料Aおよびコントロール試料Cは試験成立条件を満たさなかった。しかし、基準布を培養表皮に貼付してから試料を滴下することで、試料を培養表皮の全体に処理することができた。この様に、試料貼付の方法を変更することで、培養表皮に試料がより適切に接触するようになり、コントロール試料Aおよびコントロール試料Cも条件を満たしたと考えられた。

以上の結果から、適切な実験条件を設定することでヒト3次元培養表皮モデルLabCyte EPI-MODEL 24はJIS L 1918に適合すると判断された。

文献

- 1) 日本工業標準調査会審議: JIS L 1918「繊維製品の皮膚一次刺激性試験方法－培養ヒト皮膚モデル法」, 日本規格協会, 2011
- 2) Katoh M, Hata K: Refinement of LabCyte EPI-MODEL 24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439. *AATEX*. 2011; **16**: 111-122
- 3) OECD: Guideline for the Testing of Chemicals, Guideline 439: *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. 2010
- 4) 日本工業標準調査会審議: JIS L 0803「染色堅ろう度試験用添付白布」, 日本規格協会, 2011
- 5) 日本工業標準調査会審議: JIS L 0848「汗に対する染色堅ろう度試験方法」, 日本規格協会, 2004