

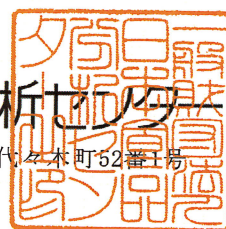
試 験 報 告 書

依 頼 者 株式会社 ビオスタ

一般財団法人

日本食品分析センター

東京都渋谷区元代々木町52番1号



検 体 アレスタ

表 題 ヒト培養皮膚モデルを用いる皮膚刺激性試験

2024 年 01 月 18 日当センターに提出された上記検体について試験した結果をご報告いたします。

ヒト培養皮膚モデルを用いる皮膚刺激性試験

1 依頼者

株式会社 ビオスタ

2 検体

アレスタ

性状：液体

3 試験実施施設

一般財団法人日本食品分析センター 多摩研究所

東京都多摩市永山6丁目11番10号

4 試験期間

2024年01月18日～2024年04月02日

5 試験目的

検体について、OECD Guideline for Testing of Chemicals 439(2021)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。

6 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：LCE24-240226-A

2) 培養条件

37℃, 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。

7 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]0.5 mL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 同仁化学研究所]溶液(0.5 mg/mL)0.5 mLを混合し、CO₂インキュベーターにて1時間静置後、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、MTTを直接還元する作用はないものと判定した。

8 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 %SLS[富士フイルム和光純薬株式会社]溶液をそれぞれ25 μ Lずつ添加した。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(-)[富士フイ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(0.5 mg/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: 570 nm, 対照波長: 650 nm)。

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。

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

S_a : 試験物質または陽性対照の吸光度

N_C : 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 (570 nm-650 nm) 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 %以下の場合には刺激性、50 %を上回る場合は非刺激性と皮膚刺激性を評価した。

9 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 (570 nm-650 nm) は1.008, 陽性対照の細胞生存率の平均値は1.9 %, 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、検体の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	93.4	97.5	102.4	97.8	4.51	非刺激性
陰性対照	104.4	97.7	97.9	100.0	3.81	非刺激性
陽性対照	1.3	2.1	2.4	1.9	0.57	刺激性

10 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