

試験実施報告書

試験表題

3次元培養皮膚モデルを用いた
皮膚一次刺激性評価試験 (*in vitro*)

1. 試験計画の概要

試験表題	3次元培養皮膚モデルを用いた皮膚一次刺激性評価試験 (<i>in vitro</i>)
試験品名	試験品：屋久島地杉幹精油、屋久島地杉幹アロマ水、屋久島地杉幹パウダー 陰性対象：PBS(-) 陽性対象：Methyl Acetate
測定項目	MTTアッセイ法にて細胞生存率を測定する。
試験使用3次元培養皮膚モデル	EPI-200SIT MatTek社製
試験目的	試験品の皮膚一次刺激性を評価することを目的に、欧州代替法バリデーションセンター (ECVAM) で承認されたEPI-200SIT法によって刺激性を判定する方法で実施した。
試験方法	3次元培養皮膚モデル上に試験品を通常条件下で30分曝露した後、速やかに3次元培養皮膚モデルを洗浄し、MTTアッセイを用いて細胞生存率を測定する。得られた細胞生存率を基にし、試験品の皮膚一次刺激性を判定する。

2. 試験背景

化粧品や化学物質の安全性を確認する皮膚一次刺激性試験は、ウサギを用いた方法が一般的な試験方法であるが、近年、動物福祉の観点から *in vitro* 皮膚一次刺激性試験が検討されている。

本試験法は、欧州代替法バリデーションセンター (ECVAM) で承認されたEPI-200SIT法に準拠した方法である。使用する皮膚モデルは、ヒト正常皮膚細胞を重層、培養したMatTek社のEpi-Dermを使用した。本試験法は、3次元培養皮膚モデルに試験品を直接曝露した後、MTTアッセイを用いて細胞生存率を測定した。その結果、得られた細胞生存率を基に、試験品の皮膚一次刺激性を判定した。

3. 試験実施体制

有限会社あきゅらいず
〒181-0014
東京都三鷹市野崎三丁目9番27号
TEL：0422-39-1967/FAX：0422-39-1968
担当：篠塚 宏明

4. 試験品

4.1 評価する試験品

屋久島地杉幹精油（液体）、屋久島地杉幹アロマ水（液体）、屋久島地杉幹パウダー（粉末）

4.2 試験品の取り扱い

試験品は受領後、遮光下、4°Cで保存した。

5. 試験方法

5.1 使用3次元培養皮膚モデルおよび培養液

細胞モデル：Epi-Derm EPI-200SIT (MatTek社製) Lot# 24338, Kit D

培地：EPI-Ocular Assay 培地 (MatTek社製) Lot# 081716CMHB

5.2 培養条件

37°C・CO₂ 5%濃度

5.3 陽性対照

SDS (MatTek社製) Lot#10516ACD

5.4 使用測定試薬

MTT-100-JP MTTアッセイキット

5.5 試験方法

- 1) 輸入後、破損のない皮膚モデルを60分間培地にて培養した。
- 2) 破損のないことを確認し、培地を交換し、さらに18時間前培養を行った。
- 3) 被験物質、陽性対照、陰性対照を正確に60分間皮膚モデルに曝露した。
※曝露量は、液体試料は30μL、固体試料は25mgと定められている。
- 4) 3次元培養皮膚モデルを滅菌PBSにてよく洗浄し試料を除去した。
- 5) 培地を交換し、24時間培養した。
- 6) 培地をさらに交換し、24時間培養した。
- 7) MTT溶液に交換し、3時間培養を行った。
- 8) イソプロパノールにて2時間3次元培養皮膚モデルからMTTを抽出した。
- 9) 抽出したMTTをマイクロプレートリーダーにて570nmにて吸光度を測定した。
- 10) 測定した結果は、陰性対照を100%として陽性対照および被験物質の細胞毒性率を算出し、以下の判定基準に基づいて試験結果を判定した。
細胞生存率 (%) >50%：無刺激性、≤50%：刺激性あり

5.6 試験成立条件

- ・ 陽性対照の細胞生存率が50%未満であること。
- ・ 被験物質、陽性対照物質および陰性対照物質の細胞生存率のSDが18未満であること。

6. 試験期間

2016年8月22日～2016年8月31日

7. 結果

表1に試験結果を示した。試験成立条件を満たしており、屋久島地杉幹アロマ水、屋久島地杉幹パウダーは原体にて、無刺激性であった。屋久島地杉幹精油は、原体では刺激性、5%PBS希釈にて無刺激性であった。

表1 細胞生存率

物質名	細胞生存率 (%)	SD	区分
陰性対照 (蒸留水)	100.0	1.7	-
陽性対照 (酢酸メチル)	4.9	1.3	刺激性
屋久島地杉幹精油 (液体、原体)	6.8	1.2	刺激性
屋久島地杉幹精油 (5%PBS希釈、液体)	74.1	3.0	無刺激性
屋久島地杉幹アロマ水 (原体、液体)	95.7	2.5	無刺激性
屋久島地杉幹パウダー (原体、粉末)	103.8	1.3	無刺激性