

## 5 予備試験

### 1) 着色性の確認

検体25  $\mu$ L及び注射用水[光製薬株式会社]0.5 mLを混合し、CO<sub>2</sub>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  $\mu$ 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、CO<sub>2</sub>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。

## 6 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  $\mu$ 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[和光純薬工業株式会社]溶液を同様に適用した。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(-)[和光純薬工業株式会社]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)。