

評価報告書

口腔粘膜刺激性試験代替法 EpiOral 法

口腔粘膜刺激性試験資料編纂委員会

令和 8 年 5 月 8 日

委員名：

小 島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所、山口東京理科大学：委員長)

小川久美子 (国立医薬品食品衛生研究所、星薬科大学)

筒井 健夫 (日本歯科大学)

西村 拓也 (国立医薬品食品衛生研究所)

本橋 慧樹 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)

山田 久陽 (メディフォード株式会社)

添付資料

1. 試験方法の詳細
2. ヒト 3 次元培養口腔粘膜モデルを用いた *in vitro* 口腔粘膜刺激性試験代替法 試験プロトコル (Version 2.0)
3. ヒト 3 次元培養口腔粘膜モデルを用いた *in vitro* 口腔粘膜刺激性試験研究報告書 (原料の評価) (Version 3.0)
4. ヒト 3 次元培養口腔粘膜モデルを用いた *in vitro* 口腔粘膜刺激性試験研究報告書 (製剤の評価) (Version 3.0)
5. Aizawa, S., et al. (2023) Development of an oral mucosal irritation test using a three-dimensional human buccal oral mucosal model, *Toxico.in Vitro*, 87, 105519
6. 技術移転報告書
7. 20 物質評価リスト

略号集

CTFA: Cosmetic Toiletry and Fragrance Association

CV: Coefficient of Variation

DPBS: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

ELISA: Enzyme-linked immuno-sorbent assay

ET50: Half-maximum Exposure Time

IL: Interleukin

MTT: 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NC: Negative Control

OD: Optical Density

OECD: Organisation for Economic Cooperation and Development

PC: Positive Control

PCPC: The Personal Care Products Council

SD: Standard Deviation

SLS: Sodium Lauryl Sulfate

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

TUNEL: TdT-mediated digoxigenin (biotin)-dUTP nick end labeling

UN GHS: United Nation Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals

要旨

口腔粘膜刺激性は、本邦ではオーラルケア製品等、口腔適用の医薬部外品の安全性評価として検討が必要な項目の一つである。医薬部外品として前例のない添加物が製品に配合されている場合、その原料に対して **Cosmetic Toiletry and Fragrance Association (CTFA)** 法¹⁾に準拠したラット、モルモット等の動物を使用した口腔粘膜刺激性試験の実施が必要とされている²⁾。一方、EU ではオーラルケア製品等の口腔適用の製品は化粧品の取り扱いであり、EU 化粧品規制 (EC No 1223/2009)³⁾に基づき、動物実験を行った場合は当該製品の販売は禁止となる。近年、このような動物愛護、実験動物に関する世界の流れから、動物を使用しない動物実験代替法(以下、「代替法」)の開発が積極的に進められているが、経済協力開発機構 (Organisation for Economic Cooperation and Development: OECD) や日本国内で公的に認められた口腔粘膜刺激性試験の代替法はいまだ確立されていない。

このような状況下で、花王株式会社、サンスター株式会社、ライオン株式会社の3施設による共同研究にて、口腔粘膜刺激性試験の代替法として、MatTek 社製のヒト3次元培養口腔粘膜モデルである EpiOral^{4,5)}を用いた *in vitro* 試験法(以下、「EpiOral 法」)が開発された(添付資料 5⁶⁾)。この EpiOral 法は、評価対象となる被験物質曝露後、MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) アッセイにより算出された細胞生存率を刺激性の評価指標(エンドポイント)とする方法である。試験の条件設定においては、口腔用途製剤において最も汎用性の高い原料であり、刺激性物質として知られるラウリル硫酸ナトリウム (Sodium Lauryl Sulfate: SLS) や他の4原料を用いた検討が行われた。また、眼刺激性が既知の口腔用途原料および United Nation Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS) 眼刺激性区分に分類を有する物質を用いて、EpiOral 法での刺激性又は非刺激性を判断するための陽性基準が定められた。さらに、開発者グループは共同研究にて、眼刺激性物質を用いて EpiOral 法プロトコルの再現性を評価し、高い施設内および施設間再現性を確認した。

ただし、本委員会としては、現行プロトコルの陽性基準(細胞生存率 60%)には同意できないと判断した。正確性の評価に用いられた口腔粘膜刺激性物質のうち細胞生存率 60%前後の値を示したものは SLS のみであり、陽性基準の妥当性が不十分であると考えた。陽性基準の妥当性を判断するために、複数の既知の口腔粘膜刺激性物質を用いた濃度依存的な検討から細胞生存率 60%前後の値を示す物質を増やす必要があると考えた。さらに、代替法としての科学的な妥当性を検証するためには、細胞毒性だけではなく、病理学的または RNAseq 解析などの機序に基づく検討を行うべきと考えている。

以上の結果の蓄積により、科学的な妥当性が明確であり、複数の被験物質を用いた濃度依存性試験から陽性基準を検証した EpiOral 法の新たなプロトコルが開発されることを期待している。

1. 序論

化粧品など皮膚に接触した場合の安全性評価の一つとして皮膚刺激性試験があるように、口腔に接触する可能性のある製品については、口腔粘膜刺激性を評価することは重要である。「医薬部外品の製造販売承認申請および化粧品基準改正要請に添付する資料に関する質疑応答集(Q&A について(その2))」(令和元年10月15日付事務連絡)によると⁷⁾、申請にはCTFA 法⁸⁾などの方法に準拠し、主にラットもしくはモルモットを用いた口腔粘膜刺激性データの取得が要求されている。

EU 域内では2003年3月に化粧品に関する法律(EU 化粧品指令第7次改正、DIRECTIVE 2003/15/EC)が公布され³⁾、2009年以降には動物実験を禁止することなどが定められ、現在に至っている。口腔用途原料および製品は、EU では化粧品の扱いであり、法規上、被験物質および製品の動物実験を行った場合は当該製品の販売は禁止となる。

このような動物愛護、動物実験に関する世界の流れを鑑みて、国内においても動物実験禁止等の将来的な法規制に向けた迅速な対応が必要であり、口腔用途原料および製品を評価できる口腔粘膜刺激性試験の代替法開発が必要不可欠と考えられる。一方で、OECD や日本国内も含め、公的に認められた口腔粘膜刺激性試験代替法は、いまだ確立されていない。

このような状況の下、花王株式会社、サンスター株式会社、ライオン株式会社の3施設による共同研究により、口腔粘膜刺激性試験の代替法として、MatTek 社製のヒト3次元培養口腔粘膜モデルである EpiOral を用いた EpiOral 法が開発された⁶⁾。

本報告書は、EpiOral 法の口腔粘膜刺激性試験の代替法としての科学的妥当性、再現性および正確性について、添付資料1~7などをもとに、本委員会の意見をまとめたものである。

2. 試験法の位置づけ

ヒトの頬粘膜あるいは歯肉を由来とし、細胞を重層培養によって多層化したヒト3次元培養口腔粘膜モデルが MatTek 社^{4,5)}や EPISKIN 社⁸⁾から複数市販されている。これらのヒト3次元培養口腔粘膜モデルは、Personal Care Products Council: PCPC (旧 CTFA)の安全性評価ガイドラインの口腔粘膜刺激性試験の項目にも記載されている⁹⁾。

上記の状況下において、EpiOral 法は原料および製剤の口腔粘膜への刺激性、無刺激性を区分できる代替試験法として開発された。

3. 試験法の原理と手順

米国 MatTek 社製の品質管理をクリアした EpiOral (ORL 200)がヒト3次元培養口腔粘膜モデルとして使用される。本モデルは正常ヒト口腔上皮細胞を由来とし、8~11細胞層の非角化組織を有する重層化モデルである(6ウェルプレートで出荷)。EpiOral には、ヒト上皮細胞と同様にサイトケラチン K13、K14 のタンパク発現が認められること、組織学的にもヒト口腔組織に類似した構造を有していることから、口腔粘膜刺激性試験に用いるモデルとして妥当であると報告されている^{4,5)}。さらに、MatTek 社製および EPISKIN 社製のヒト3次

元培養口腔モデルの比較評価から、口腔粘膜モデル、歯肉モデル、いずれのモデルも口腔粘膜刺激性評価に適しているが、口腔粘膜モデルの方が口腔用途原料およびモデル歯磨剤に対して感受性が高いと報告されている⁹⁾。

EpiOral 法では、6 ウェルプレート中のこのモデルに被験物質(液体:0.1 mL、固体:50 mg(超純水 0.02 mL 滴下後))を処理し、120 分間曝露処理する。曝露終了後、被験物質を洗浄し、MTT アッセイにより細胞生存率を算出する。また、必要に応じて、組織片を 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液で固定後、常法に従ってパラフィン包埋し、組織学的評価も可能である。

なお、製剤の評価については、実使用条件下における唾液量と使用量¹⁰⁾から各種製剤の使用量や適用方法を考慮し、各種製剤ごとに希釈率を設定し製剤評価を実施した。

口腔粘膜刺激性試験EpiOral法のプロトコルの概略を図1に示す。詳細は、学術論文⁹⁾を参照されたい。

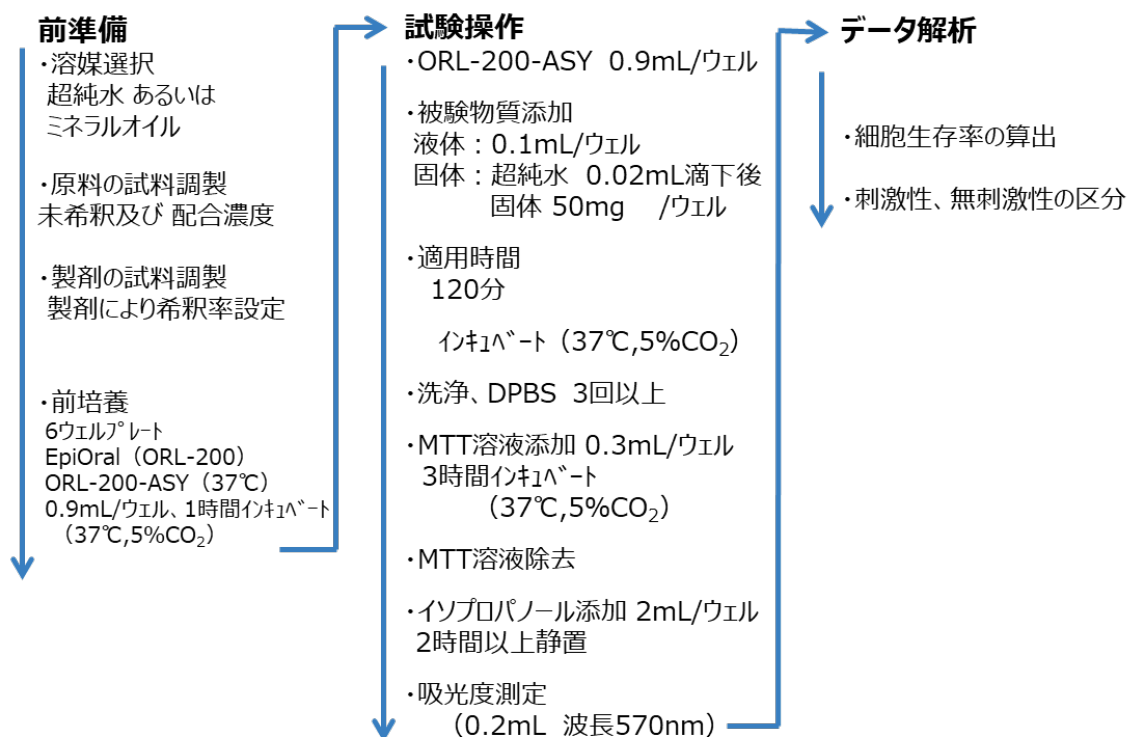


図1. EpiOralを用いた口腔粘膜刺激性試験 (EpiOral法) プロトコルの概要

4. 試験法の科学的妥当性

過去に得られた界面活性剤SLSおよび非公開の4成分を用いたモルモット口腔粘膜刺激性試験スコアをもとにEpiOral法が開発された。

EpiOral 法のエンドポイントとして、モルモット口腔粘膜刺激性試験スコアとの間に相関性が認められた細胞生存率を設定すると共に、無刺激性と考えられるスコア 0～1 未満と、刺激性と考えられるスコア 1 以上を区分できるクライテリアの設定を目指し、検討が進められた。動物試験による刺激性スコアと *in vitro* 試験における細胞生存率の関連性についてはいくつかの報告があり^{11,12)}、細胞生存率をエンドポイントとすることは妥当であると開発者は考察している。

曝露時間は、細胞生存率 60%の陽性基準を仮に設定することにより、口腔粘膜刺激スコア 1 である SLS 0.25%を刺激性と区分することが可能な 120 分を設定した。ヒト 3 次元培養角膜モデルである EpiOcular を用いた眼刺激性試験代替法 RhCE test (OECD TG 492) では、曝露時間は 30 分に設定されている。EpiOral と EpiOcular のロット毎の品質管理データによると、EpiOral では Triton X-100 1%に対する ET50 値 (Half-maximum Exposure Time) は 34.8～105.8 分⁴⁾であるが、EpiOcular では Triton X-100 0.3%に対する ET50 値は 12.2～37.5 分¹³⁾である。これらより EpiOral 法では EpiOcular を用いた試験よりも曝露時間を長くすることによって刺激性を精度良く検出できると考えられた。

EpiOral 法の陽性基準は、口腔粘膜刺激性が確認されている 5 つの濃度の SLS および非公開の 1 成分、無刺激性であることが確認されている非公開である 3 成分のモルモット口腔粘膜刺激スコアとこれらの物質の細胞生存率を基準に、線形回帰分析から設定された。CTFA 法での判定基準では、軽度の発赤が認められた場合、口腔粘膜刺激性スコア 1 と判定するため、この口腔粘膜刺激性スコア 1 を口腔粘膜刺激性があると定義した。その結果、3 施設の実験結果から、口腔粘膜刺激スコアが 1 である SLS 0.25%の細胞生存率は 48.7%であった。

以上の結果と試験結果のばらつきを考慮し、口腔粘膜刺激性を確実に評価する基準として、120 分曝露において細胞生存率 60%の陽性基準が設定された。モルモット口腔粘膜刺激性スコアが実際に 1 である 0.25% SLS を曝露した EpiOral 法の細胞生存率は 60%以下であり、設定した陽性基準は適切であると開発者は判断した。

EpiOral の利用にあたり、SLS で曝露した際の組織学的変化についても検証した。SLS は、上皮の剥離が生じる可能性¹⁴⁾、ヒト口腔粘膜の浸透性バリアの障害¹⁵⁾、ヒト 3 次元培養口腔粘膜モデルにおいて、口腔粘膜モデルの最上層に細胞死が生じることが報告されている¹⁶⁾。EpiOral を SLS で曝露した際の組織学的解析でも、陰性対照 (超純水 (Negative Control: NC)) では認められなかった表層上皮細胞の剥離が SLS 濃度依存的に認められ、細胞生存率を指標とすることの妥当性が確認された。

EpiOral を用いて SLS を曝露した際の Tumor Necrosis Factor alpha (TNFα) および Interleukin (IL)-1α、β の産生量を Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) にて解析している。TNFα では、NC 群における TNFα 産生量と全ての SLS 曝露群との間に有意差は認められなかった。IL-1α では、NC 群における IL-1α 産生量と全ての SLS 曝露群との間に有意差が認められ、SLS 0.25%から SLS 1.0%までは SLS 濃度依存的に有意な IL-1α 産生量の増加が認めら

れた。IL-1 β については、NC 群における IL-1 β 産生量と SLS 0.5%曝露群から SLS 2.0%との間に有意差が認められたが、SLS 0.25%曝露群との間には有意差が認められなかった。また、TdT-mediated digoxigenin (biotin)-dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色では SLS 曝露群において TUNEL 陽性細胞は認められなかった。以上の結果から、EpiOral の使用は科学的に妥当と開発者は考察している。

SLS 1%は、Draize 眼刺激性試験に基づく UN GHS 眼刺激性区分では No Cat に分類されるが¹⁷⁾、曝露回数と曝露処理を繰り返し行う試験特徴から、モルモットを用いた口腔粘膜刺激性試験および EpiOral 法において刺激性と判定された。これらの結果より、EpiOral 法において設定した陽性基準によって口腔粘膜刺激性を正確に予測できるとされている。

5. 試験法の信頼性

5.1 技術移転性

本試験の実施経験のない小林製薬株式会社が技術移転性の確認に参加した。開発者より、トレーニングを受けた後、日本動物実験代替法評価センター(Japanese Center for the Validation of Alternative Methods: JaCVAM)がコード化して配布した 6 物質を用いて 2 回の試験が実施され、再現性を確認した。その結果、添付資料 6 に示すように、刺激性と無刺激性を判定できる再現性のある結果が得られた。

ただし、2 回の試験結果が揃っていた訳ではなく、同じ被験物質であっても、EpiOral のロット差または試験の手技により、細胞生存率が約 15%変動する可能性が示唆された。

なお、この技術移転での指摘事項を踏まえ、プロトコルはマイナーな改定がなされた。

5.2 再現性試験

開発者3施設の共同研究が以下の目的で実施された。

- 1) 陽性対照および陰性対照物質を用いた3施設での施設内および施設間再現性確認
- 2) UN GHS眼刺激性区分に分類を有する32物質を用いた3施設での施設間再現性確認

5.2.1 施設内再現性

陰性対照物質 (NC) として超純水および陽性対照物質 (Positive Control: PC) として SLS 0.5%を用い、120分曝露条件下で3施設により得られたブランク減算後の吸光度 (Optical Density: OD) 570の標準偏差 (Standard Deviation: SD) および変動係数 (Coefficient of Variation: CV) から評価された。上限許容限界と下限許容限界は3SDで設定した。

全試験ロットにおける3施設ごとの陰性対照および陽性対照の平均値、SDおよびCVから検証した結果、3施設の陰性対照および陽性対照の吸光度のばらつきの程度は、ほぼ全て設定した陰性対照物質および陽性対照物質の上限および下限許容限界内に入っていた。

5.3 施設間再現性

EpiOral法の施設間再現性は、UN GHS眼刺激性区分に分類を有する32物質の刺激性、無刺激性区分の3施設間での判定一致性から検証した。その結果、3施設での判定は全て一致した。

6. 試験法の正確性

6.1 試験 1

開発者 3 施設において、正確性の評価が、SLS、UNGHS 眼刺激性区分に分類を有する 32 物質、口唇用途原料 15 原料および市販製剤 57 種（歯みがき剤、口中清涼剤、リップクリーム等）を用いて実施された。

開発者は、口腔粘膜に対する刺激性と無刺激性を区分する上で、眼粘膜刺激性データを用いて検証することは妥当であると考えた。製剤の評価については、開発者は製剤 57 品を市場において安全性の面で問題なく消費者に使用されているものであるとの認識で使用了。製剤 11 品において細胞生存率が 60% 以下となり刺激性と区分された。この理由として、開発者は、刺激性と区分された製剤は全て歯みがき製剤であり、処方中に複数の界面活性剤が存在していることが影響していると考えしている。

しかし、本委員会は、眼刺激性 32 物質および口唇用途 15 原料の動物実験結果は眼刺激性試験によるものであり、口腔粘膜刺激性との関係性を示す科学的な裏付けが十分示されず、製剤 57 種についても処方 は 公開されておらず、いずれも参考値に過ぎないと判断した。また、EpiOral 法の条件設定に当たり、CTFA 法を一部改変したモルモット口腔粘膜刺激性試験の刺激スコアを元データとして用いたが、この試験法は被験物質を 1 日 4 回、4 日間連続曝露した結果から、口腔粘膜刺激性をスコア化するものである。一方で、Draize 眼刺激性試験は、1 回の曝露で得られた結果から眼粘膜刺激性をスコア化している。これらのことから、モルモットを用いた口腔粘膜刺激性試験はウサギを用いる Draize 眼刺激性試験よりも感度高く刺激性を検出する可能性が示唆されるため、正確性を求めるために眼刺激性結果を用いることは妥当と判断できないと考えた。

6.2 試験 2

本委員会からの物性や刺激強度などをもとに推奨した物質に関する意見を参考に、開発者 3 施設は 20 物質を選定し、3 施設で正確性を確認するための試験を実施した。添付資料 7 に示すように、口腔粘膜に対する刺激性と無刺激性を区分できる妥当な結果が得られた。

ただし、本委員会は 20 物質の中に 60% 前後の細胞生存率を示す物質が少なく、小林製薬株式会社の結果ではロット間または手技から細胞生存率 15% 前後の差が生じたこともある。経験の少ない施設がこのような物質の刺激性を明確に区分できる方法とは言い難い。さらに、20 物質のうち、13 物質は希釈されているが、1 濃度でしか実施されておらず、濃度と細胞生存率の関係が評価されていない。そのため、本プロトコルでは細胞生存率 60% 以下とする陽性基準がデータをもとに十分に示されているとは判断できないと考えた。

7. 本試験法設定の問題点

- 口腔粘膜モデル：開発者は、モデルの妥当性を検証するため、口腔粘膜と同様に非角化

重層扁平上皮を有する眼粘膜に着目した。粘膜組織は、粘膜表層構造や粘膜表面に発現する抗体の種類から2種類に分類され、眼と口腔は同じタイプに分類される¹⁹⁾。また、ウサギの結膜や角膜にはKeratin-3、4、13が発現しており、これらも口腔粘膜と共通している²⁰⁾。しかし、組織が異なるため、同等の反応を示すとは断言できない。本実験を適切に判断するための*in vivo* 実験データが十分に提出されていないため、口腔粘膜刺激性評価に対する本モデルの妥当性は不明である。また、EpiOral を口腔粘膜刺激代替法に用いることの妥当性として、ヒト3次元培養歯肉モデル EpiGingival と比較し EpiOral の感受性が高いことを根拠としている²¹⁾。これを検証するための科学的データを開発者に求めたが、科学的根拠を裏付ける十分なデータが提出されなかった。よって、EpiGingival との比較が適正と判断できず、EpiOral のみを口腔粘膜刺激性試験の代替法に使用することが妥当とは判断し難い。

- 溶媒の妥当性：水やミネラルオイルに溶解もしくは均一に分散しない物質、並びに対象物質および類似物質の物性・溶解性・毒性情報などから濃度依存性がないと予想される物質について、EpiOral 法が適用可能かどうか検討されていない。なお、ミネラルオイルに懸濁した被験物質で刺激性を示した被験物質は示されていないことから、EpiOral 法において難水溶性で刺激性を有する被験物質に対する溶媒としてミネラルオイルが適当な溶媒であるか疑義はあるが、今後の事例の集積がまたれる。溶媒の種類および濃度を含め、製剤を適正に評価するため科学的データを開発者に求めたが、データは十分に提出されておらず、前実験結果としては参考になるが、原料や製剤の評価基準と定めるための科学的根拠となるデータが不足している。
- 陽性基準の根拠：EpiOral 法の設定にあたり、濃度依存的な刺激を細胞生存率の変化として検出できることが確認されているのは SLS のみである。したがって、SLS 以外の刺激性物質について、段階的に希釈して刺激性の認められない許容濃度を評価することが可能とは判断できない。現状のデータでは複数の口腔粘膜刺激性物質における濃度依存的なデータがないため、非刺激性物質で確認された細胞生存率と、軽度の刺激性物質の細胞生存率の変動範囲が重ならないのか不明確であり、陽性基準の根拠が不明瞭である。
- 陽性基準値：細胞生存率 60%前後の値が出た場合、ばらつきを考慮すると被験物質による口腔粘膜刺激性の解釈が難しいと考えた。陽性基準を得られているデータに則して高く設定してはどうかとの提案もあった。

以上の問題点をもとに、本委員会は、陽性基準の妥当性を判断するために、複数の既知の口腔粘膜刺激性物質を用いた濃度依存的な検討から細胞生存率 60%前後の値を示す物質を増やす必要があると考えた。

機序の検討：作用機序の検討は SLS のみで実施されいるが、その結果も科学的妥当性が乏しい。本委員会は、細胞毒性だけでなく、病理学的、または RNAseq 解析などの科学的な機序に基づく追加検討を実施するよう複数回要望してきた。また、予測性の評価において眼刺

激性物質の結果を採用するのであれば、眼と口腔の構造や刺激性感度の差などを文献で調べ、科学的な説明を行うよう求めたが、開発者からの回答はなかった。

このような状況下、細胞生存率 60%前後の値が出た場合、最終判断のための追試験（再現性の確認や濃度依存的な検討、病理学的、または RNAseq 解析などの機序に基づく検討）が必要と追記されたプロトコルが 2025 年 7 月に開発者から届いた。これに対し、本委員会は、代替法としてのプロトコルの妥当性を科学的に検証するために、濃度依存的な細胞毒性試験結果に加え、病理学的や RNAseq 解析など、機序に基づく結果を蓄積し、現行プロトコルの改良を行うべきと結論した。

8. 適用範囲と留意点

EpiOral 法の適用範囲又は試験実施に関して、以下の点に留意する必要がある。

- 試験原理について：MTT アッセイは生細胞中のミトコンドリアの脱水素酵素活性の低下を測定することで細胞生存率を算出する方法であり、還元作用を有する物質、着色された物質、細胞増殖性を引き起こす物質は、EpiOral 法において *in vivo* での刺激性を反映しない結果が得られる可能性がある。昨今、汎用されている WST-1 などの利用も考えるべきである。
- 連続投与の評価：EpiOral 法は、MTT アッセイによる細胞生存率を指標に刺激性を評価する試験法であり、口腔粘膜に用いる新規原料の単回投与時の刺激性（一次刺激性）を評価できる可能性はある。しかし、*in vivo* 試験で求められている連続投与した際の連続口腔粘膜刺激性については、*in vivo* データとの関連性に関するデータが十分存在しない。よって、EpiOral 法を用い、連続投与による口腔粘膜刺激性について評価することが妥当とは判断できない。
- 製剤の評価：開発者は、EpiOral 法を製剤の評価に適用する場合は、口腔内への適用量や剤型に応じた唾液の希釈率（例えば練り歯みがきは 20.0%希釈）を設定した上で 120 分を曝露時間として設定している。

しかし、製剤の実使用時には設定された希釈率よりも高濃度で口腔内に曝露される可能性が否定できないこと、*in vivo* データとの関連性について当該設定が妥当と判断できるデータが十分存在しない。よって、製剤の評価に当該試験法を適用することは妥当と判断できない。

9. 結論

ヒト頬粘膜由来のモデル EpiOral を用いた口腔粘膜試験代替法（EpiOral 法）は、医薬部外品の口腔粘膜適用製品に用いる添加剤の口腔粘膜刺激性を評価するために開発された。EpiOral 法の再現性評価は開発者グループで実施され、高い施設内および施設間再現性が認められている。

ただし、本委員会としては、現行プロトコルの陽性基準（細胞生存率 60%）には同意できないと判断した。正確性の評価に用いられた口腔粘膜刺激性物質のうち細胞生存率 60% 前後の値を示したものは SLS のみであり、陽性基準の妥当性が不十分であると考え。陽性基準の妥当性を判断するために、複数の既知の口腔粘膜刺激性物質を用いた濃度依存的な検討から細胞生存率 60% 前後の値を示す物質を増やす必要があると考えた。さらに、代替法としてのプロトコルの科学的な妥当性を明確にするためには、細胞毒性だけではなく、病理学的または RNAseq 解析など、機序に基づく検討を行うべきと考えている。

以上の結果の蓄積により、科学的な妥当性が明確であり、複数の被験物質を用いた濃度依存性試験から陽性基準を検証した EpiOral 法の新たなプロトコルが開発されることを期待している。

10. 参考文献（令和 8 年 4 月 1 日時点）

- 1) Cosmetic Toiletry and Fragrance Association: CTFA safety testing guidelines; Guidelines for evaluation mucous membranes irritation, 1981.
- 2) 厚生労働省医薬食品局審査管理課：医薬部外品の製造販売承認申請に関する質疑応答集（Q&A）について（その 1），平成 26 年 11 月 25 日
- 3) REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 30 November 2009 on cosmetic products (recast) (Text with EEA relevance)
- 4) Klausner M., Aychunie S, Breyfogle BA, Wertz PW, Bacca L, Kubilus J.: Organotypic human oral tissue models for toxicological studies. *Toxicology In Vitro*, 21:938 949, 2007.
- 5) Klausner M., Handa Y., Aizawa S.: In vitro three dimensional organotypic culture models of the oral mucosa. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 57(2):148 159, 2021.
- 6) Aizawa S, Yoshida H, Umeshita K, Watanabe S, Takahashi Y, Sakane S, Sakaguchi H, Kataoka S.: Development of an oral mucosal irritation test using a three-dimensional human buccal oral mucosal model. *Toxicol In Vitro* 87, 105519, 2023.
- 7) 厚生労働省医薬食品局審査管理課：医薬部外品の製造販売承認申請および化粧品基準改正要請に添付する資料に関する質疑応答集（Q&A について（その 2）），令和元年 10 月 15 日
- 8) SkinEthic HOE / Oral Epithelium, Available at: <https://www.episkin.com/HOE-Oral-Epithelium>
- 9) Personal Care Products Council: PCPC 2014 Safety evaluation guidelines, 2014.
- 10) Dong C, Puckett AD Jr, Dawes C.: The effects of chewing frequency and duration of gum chewing on salivary flow rate and sucrose concentration. *Arch Oral Biol.*, 40(7):585-8, 1995.
- 11) Spielmann H., Hoffmann S., Liebsch M., Botham P., Fentem J.H., et al.: The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test. *Altern. Lab. Anim.* 35:559 601, 2019.

- 12) Faller C., Bracher M., Dami N., Roguet R.: Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. *Toxicology In Vitro*. 16:557-572, 2002.
- 13) Kaluzhny Y., Kandárová H., Hayden P., Kubilus J., d'Argembeau Thornton L., Klausner M.: Development of the EpiOcular™ eye irritation test for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals in response to the requirements of the EU cosmetics Directive and REACH legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39:339-364, 2011.
- 14) Searls J.C., Berg C.A.: The influence of dentifrice detergents on oral epithelial slough. *Dent Hyg.* 60:20-23, 1986.
- 15) Healy C., Cruchley A., Thornhill M., Williams D.: The effect of sodium lauryl sulphate, triclosan and zinc on the permeability of normal oral mucosa. *Oral Dis.* 6:118-123, 2000.
- 16) Neppelberg E., Costea D.E., Vintermyr O.K., Johannessen A.C.: Dual effects of sodium lauryl sulphate on human oral epithelial structure. *Exp. Dermatol.* 16:574-579, 2007.
- 17) Barroso J., Pfannenbecker U., Adriaens E., Alépée N., Cluzel, M., et al.: Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test reference database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91:521-547, 2017.
- 18) Pfannenbecker U., Bessou Touya S., Faller C., Harbell J., Jacob T., et al.: Cosmetics Europe multi laboratory pre validation of the EpiOcular™ reconstituted human tissue test method for the prediction of eye irritation. *Toxicol. In Vitro*. 27:619-626, 2013.
- 19) Iwasaki, A.: Mucosal dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol* 25:381-418, 2007.
- 20) Nakamura T., Endo K.I., Cooper L.J., Fullwood N.J., Tanifuji N., et al.: The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:106-116, 2003.
- 21) EpiOral™ & EpiGingival™, Available at <https://www.mattek.com/mattekproduct/epioral-epigingival/>