



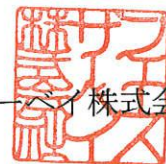
試験報告書

3次元培養モデル EPI-Ocular EIT 法
を用いた口腔粘膜刺激性代替試験

報告書 No. 4200907 (320201001B)

発行日：2020年10月12日

フェイスサーバイ株式会社



1. 試験結果の要約

口腔粘膜刺激性の代替法試験として3次元培養モデル Epi-Ocular を用いて試料の細胞毒性試験を被験品「HuFuferme (フフファーム)」に対して実施した。その結果、「無刺激性」と判断した。

2. 目的

試験品の口腔粘膜安全性試験については、角層のない3次元皮膚モデルである3次元培養モデル EpiOcular OCL-200 (MatTek 社製) を用いて試験を行うことを目的とした。原理は、3次元培養モデル EpiOcular に試験品または陽性対照、陰性対照を液体物質は30分間曝露し、120分間培養後、固体物質は90分間曝露し、18時間培養後の細胞生存率をMTTアッセイ法により判定する方法である。また、陽性対照は酢酸メチル、陰性対照は蒸留水を用いる。

また、本試験結果は、角層のない皮膚モデルを用いた試験であり、口腔粘膜など弱い組織の安全性評価に適していると考えられる。

3. 試験依頼者

名称：株式会社ケーツーカーコミュニケーションズ
住所：〒101-0047 東京都千代田区内神田1-13-1 豊島屋ビル7階
TEL：03-5281-8677 FAX：03-5281-8679

4. 試験受託機関

名称：フェースサーベイ株式会社
住所：〒530-0054 大阪府大阪市北区南森町1丁目4番32号
TEL：06-6362-6813 FAX：06-6364-8180

5. 試験実施機関

名称：関西福祉科学大学 健康福祉学部 福祉栄養学科 竹田研究室
住所：〒582-0026 大阪府柏原市旭ヶ丘3丁目11番1号
TEL：072-978-0088 (代) FAX：072-978-0377
担当者：竹田 竜嗣

6. 試験期間

2020年9月28日～2020年10月6日

7. 試験物質

1) 被験物質

HuFuferme (フフファーム)

2) 陽性対照

酢酸メチル Lot# 02283488

3) 陰性対照

蒸留水

8. 使用細胞モデルおよび培養液

細胞モデル：OCL-200 細胞モデル (MatTek 社製) Lot#291876, Kit A

培地：EPI-Ocular Assay 培地 (MatTek 社製) Lot#0291922TTB

9. 試験方法

試験は、Mattek 社がバリデーションを行っている EPI-Ocular EIT SOP を参考にして以下の要領で実施した。

- 1) 輸入後、破損のない培養モデルを室温にて 15 分静置した。
- 2) 破損のないことを確認し、培地を交換し、一晚 (16-24 時間) 前培養を行った。
- 3) 被験物質、陽性対照、陰性対照を正確に液体の場合は 30 分間、固体の場合は 90 分間培養モデルに曝露した。
※曝露量は、液体試料は 50 μ L、固体試料は 50mg と定められている。
- 4) 皮膚モデルを滅菌 PBS にて良く洗浄し試料を除去した。
- 5) 培地を交換し、12 分間室温にて培養した。
- 6) 培地をさらに交換し、液体試料は 120 分間、固体試料は 18 時間培養する。
- 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、表 1 の判定基準に基づいて試験結果を判定した。

表1 判定基準

陰性対照に対する細胞生存率	
無刺激性	> 60%
刺激性	\leq 60%

10. 試験成立条件

- ・陽性対照の細胞生存率が 60%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。

11. 結果

表 2 に示すように、被験物質の細胞生存率は >60% であり、かつ試験成立条件を満たしており、無刺激性と判定された。

表2 細胞生存率

物質名	細胞生存率 (%)	SD	区分
陰性対照 (蒸留水)	100	1.9	-
陽性対照 (酢酸メチル)	18.4	0.8	刺激性
HuFuferme (フフファーム)	86.9	0.9	無刺激性

12. 参考文献

1. EpiOcular EIT Standard Operation Procedure –Rev.7/1/11, Mattek
2. Test Submission Template (TST) for ECVAM submissions: Ocular Irritation Assay for Chemicals Using the Epiocular Human Cell Construct (revised submission September 11, 2008)
3. Ocular Irritation REACH Protocol (DRAFT), MatTek Corporation (workbook)
4. Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., Wang, R. (1996): The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* 4, 14-19.
5. Jester J. V., et al. (2006). Extent of initial corneal injury as a biomarker for hazard assessment and the development of alternative models to the Draize rabbit eye test. *Toxicology In Vitro* 15, 115-30

以上

上記報告書に相違ありません。

試験報告書作成者

関西福祉科学大学 健康福祉学部 福祉栄養学科 竹田研究室

竹田 竜嗣



試験報告書提出者 フェースサーベイ株式会社

美野田 一代

