



薬生薬審発 0422 第1号
令和3年4月22日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長
（公印省略）

医薬部外品・化粧品の単回投与毒性評価のための複数の安全性データを
組み合わせた評価体系に関するガイダンスについて

今般、「医薬品等の安全性評価に関する in vitro 試験（代替法）の開発、国際標準化及び普及促進に関する研究」（日本医療研究開発機構研究費（医薬品等規制調和・評価研究事業、代表研究者 小島肇））において、医薬部外品・化粧品の単回投与毒性評価のための複数の安全性データを組み合わせて評価するフローを示し、留意点をまとめたガイダンスを別添のとおり作成されたので、貴管下関係業者に対して周知願います。

医薬部外品・化粧品の単回投与毒性評価のための
複数の安全性データを組み合わせた評価体系に関するガイダンス

単回投与毒性は、被験物質を単回投与することにより生じる致死を含めた一般状態の変化を指標とする毒性反応である。単回投与毒性試験は、化学物質の毒性の量的及び質的な強さの把握のため、更にはヒトが化学物質を誤飲・誤食した場合に急性毒性反応を起こす量や症状等を予測するために実施される^{1,2)}。

医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請では、従来、誤飲・誤食した場合に急性毒性反応を起こす量や症状等を予測するためにラット又はマウスによる単回投与毒性試験が、原則として強制経口投与で実施されてきた。動物を用いた急性経口毒性試験は、毒性の弱い物質では 2000mg/kg の 1 用量で行うが、一方で 1 用量での試験で被験物質と関連した死亡を生じた場合には急性の毒性兆候を把握できる適切な用量段階を設定する²⁾。経済協力開発機構 (OECD : Organisation for Economic Co-operation and Development) の試験法ガイドライン (TG: Test Guideline) では固定用量法 (TG420)、急性毒性等級法 (TG423)、上げ下げ法 (TG425) の 3 種類が、動物数の削減と苦痛を回避するように改良された代替法として採択されている³⁻⁵⁾。しかしながら、いずれも動物愛護の面から動物試験を置換する代替法の確立が望まれている。

マウス線維芽細胞由来の細胞株である BALB/c 3T3 細胞を用いた Neutral Red Uptake (3T3-NRU) 細胞毒性試験は、細胞毒性を評価する方法として広く利用されており (補遺 1)、急性経口毒性を予測する能力についても、他の細胞毒性試験と共に研究された⁶⁾。NICETAM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) と EURL ECVAM (EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing、以下 ECVAM ともいう) は共同で急性毒性試験の開始用量を求める 3T3-NRU 細胞毒性試験のバリデーション研究を実施し、開始用量の評価に利用可能であることを示した^{7,8)}。この成果に基づき、2011 年に OECD ガイダンスドキュメント (GD: Guidance Document) No.129 「急性経口全身毒性試験の開始用量を評価する細胞毒性試験」が公表されている⁹⁾。その内容は、3T3-NRU 細胞毒性試験を用いて被験物質の細胞毒性を評価した 50% 阻害濃度 (IC₅₀: Half maximal Inhibition Concentration) とデータベースから得られた *in vivo* 試験の半数致死量 (LD₅₀: Median Lethal Dose) の相関関係に注目し、その回帰分析によって得られた関係式から LD₅₀ を予測し、*in vivo* 急性毒性試験を実施する際の開始用量を決定するというものであった。開始用量を 3T3-NRU 細胞毒性試験により予測することで動物数の削減が可能となった。日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) においてもこの試験法の評価が行われ、その有用性が確認された^{10,11)}。

その後、ECVAM はここで得られたデータを参考にフォローアップバリデーション研究を進め、LD₅₀ >2000 mg/kg の物質の判別に 3T3-NRU 細胞毒性試験が有用であることを示し^{12,13)}、2013 年に「急性経口毒性試験のための 3T3 Neutral Red Uptake 細胞毒性試験に関する

EURL ECVAM 勧告」を公表した¹⁴⁾。その内容は、3T3-NRU 細胞毒性試験により LD₅₀ が 2000 mg/kg を超える物質を判別することが可能であるが、神経や心臓に特異的な毒性を発現する物質や代謝活性化によって毒性発現する物質はこの細胞毒性試験により評価できないため、評価にあたっては、3T3-NRU 細胞毒性試験単独ではなく、他の情報と常に合わせて用いるべきというものであった。JaCVAM においてもこの LD₅₀>2000mg/kg を予測する 3T3-NRU 細胞毒性試験についての評価が行われ、信頼性の高い他の情報と組み合わせて科学的証拠の重みづけ (WoE: Weight of Evidence) による評価を行うことが推奨された^{15, 16)}。なお、WoE とは、一つのデータから明確にならない結論を得るための根拠として、収集した情報の強みと弱みを利用 (総合評価) する方法を意味する⁹⁾。

本ガイダンスでは、3T3-NRU 細胞毒性試験を含む安全性データを組み合わせた単回投与毒性評価を WoE により評価するフローを示し、留意点をまとめた。

1. WoE 評価を用いる単回投与毒性評価体系の基本的な考え方

単回投与毒性は *in vivo* 試験の十分なデータがあれば単独で評価が可能であるが、前述の細胞毒性試験のように単独で評価できない安全性データについては、被験物質及び/又はその類似物質の単回投与毒性に関連するデータ等を組み合わせて WoE による評価を行う。なお、類似物質のデータを活用する場合には、類似物質の選定経緯を説明し、その選定が適切であることを示す必要がある。

2. 具体的事例：3T3-NRU 細胞毒性試験及びその他の安全性データを組み合わせた医薬部外品の添加物の単回投与毒性評価系

2-1. 基本的な考え方

単回投与毒性について 3T3-NRU 細胞毒性試験は単独で評価できないため、被験物質及び/又はその類似物質の単回投与毒性関連の安全性データと組み合わせる必要がある。また、*in vivo* 試験といえどもデータが不十分な場合には単独で評価できないこともあり得る。

単回投与毒性の評価を *in vivo* 試験データに基づいて行う場合、詳細な試験条件や結果、すなわち、動物飼育条件、詳細な投与条件、体重、一般状態、剖検結果等を確認することが必要である。これらのデータが揃っていれば、当該被験物質について単回投与毒性の評価が単独で可能である。しかし、単回投与毒性を情報検索で得たデータで評価する場合、すなわち原著論文、毒性のデータベース、CIR (Cosmetic Ingredient Review)¹⁷⁾等からのデータを用いる場合、要約された試験条件と結果が記載されていて、詳細なデータの入手が困難なことが多い。このような状況で、最低限の情報として、①ラット又はマウスの動物種、②経口による投与経路、③LD₅₀>2000 mg/kg の結果、④出典の情報がある場合は、これを「*in vivo* 試験結果概要」として、本 WoE 評価のための有力なデータの一つと位置づける。一方、*in vitro* 試験である 3T3-NRU 細胞毒性試験は、比較的容易に試験データの取得が可能であり、その際に詳細な試験記録や結果が得られている場合、本 WoE 評価のための有力なデータの一つ

と位置づける。ただし、この細胞毒性試験単独では単回投与毒性の評価を完結させることはできない。その他に食経験、ヒト使用実績、毒性学的懸念の閾値（TTC: Threshold of Toxicological Concern）^{18, 19)}に基づく考察等も WoE 評価のための有力なデータとなる可能性がある。

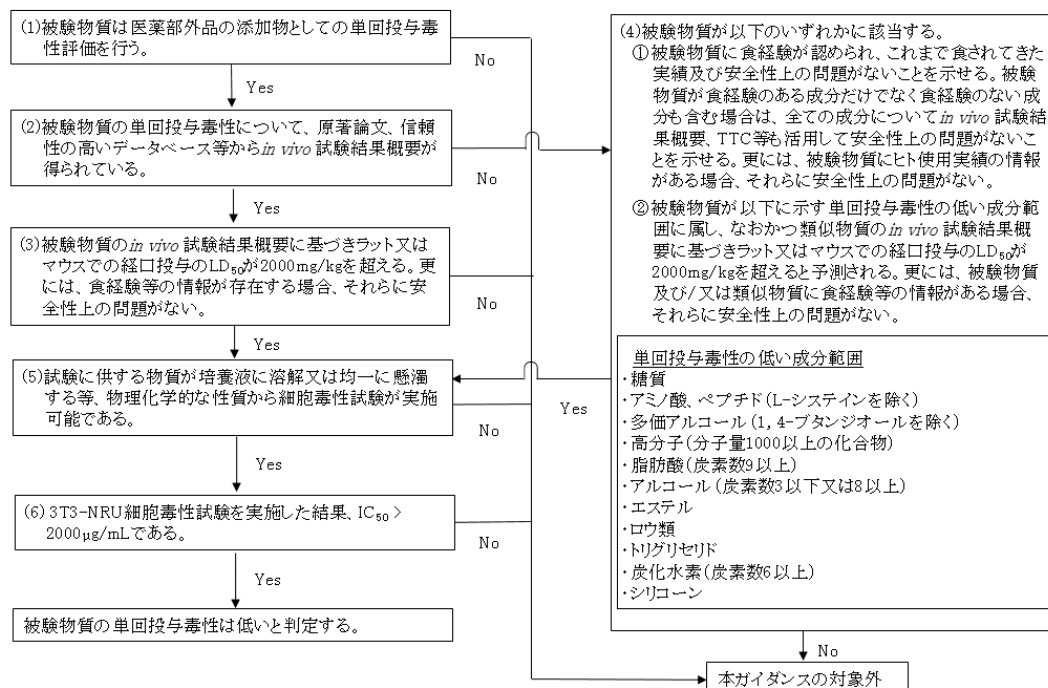
また、被験物質そのものの *in vivo* 試験結果概要がない場合でも、あらかじめ設定した単回投与毒性の低い成分範囲に属する物質（表 1 参照）であれば、化学構造及び機能が類似した物質の *in vivo* 試験結果概要を本 WoE 評価のための有力なデータの一つと位置づける。

本評価系は、これらの有力なデータを組み合わせることにより単回投与毒性の評価を完結させることができるという考え方である。なお、本評価系の適用範囲については、医薬部外品の添加物に限定した。医薬部外品の有効成分及び化粧品基準改正要請を必要とする成分については、WoE による評価の完結に関して更に慎重な検討が必要と考え、現時点では除外した。

2-2. 評価手順

「3T3-NRU 細胞毒性試験及びその他の安全性データを組み合わせた医薬部外品の添加物の単回投与毒性評価」は、以下の手順で行う（図 1）。

図 1 3T3-NRU 細胞毒性試験及びその他の安全性データを組み合わせた医薬部外品の添加物の単回投与毒性評価系



- (1) 被験物質について、医薬部外品の添加物としての評価を行うことを確認する。該当する場合は、次へ進む。該当しない場合は、本評価系の対象外となる。

注 1) 本評価系は医薬部外品の有効成分、化粧品基準改正要請を必要とする成分については対象外とする。

- (2) 被験物質の単回投与毒性について、既存のデータ、すなわち原著論文、信頼性の高いデータベース等から *in vivo* 試験結果概要が得られているかを確認する。該当する場合は、次へ進む。該当しない場合は、(4)へ進む。

注 1) 既存のデータの調査段階、すなわち(2)、(3)、(4)において「被験物質」は、「被験物質を構成する全ての成分」と読み替えることができる。したがって、被験物質そのもので実施された試験データだけでなく、被験物質と同じ成分で試験されたデータについても活用することができる。被験物質が複数の成分から成る場合には、各成分についてのデータを活用することができる。なお、成分が一つの成分名で示されていたとしても、分子量分布があるもの（例えば、ヘキサデカノール）や含有される不純物に留意すべきもの（例えば、ポリアクリル酸ナトリウム）等がある。成分名にとらわれず、成分を構成している実際の化学物質について考慮する。

注 2) 既存のデータの調査では、可能な限り詳しい情報の入手に努める。

注 3) 「信頼性の高いデータベース」とは、公的なデータベース、専門家によるデータの評価後に収載されるデータベース等である。例えば、既存化学物質毒性データベース(JECDB: Japan Existing Chemical Database)²⁰⁾、有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS: Hazard Evaluation Support System Integrated Platform)²¹⁾、OECD QSAR Toolbox²²⁾、RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances)²³⁾、ECHA (European Chemicals Agency) - Information on Chemicals²⁴⁾、ChemIDplus²⁵⁾、CIR¹⁷⁾のデータベース等が挙げられる。我が国での毒物劇物指定のための有害性情報の収集・評価に使用されているデータベースは、信頼性が高いと考えられ、参考になる²⁶⁾。

注 4) 「*in vivo* 試験結果概要」とは、最低限、①ラット又はマウスの動物種、②経口の投与経路、③LD₅₀>2000mg/kgの結果、④出典のデータを必要とする。

注 5) 被験物質の単回投与毒性の評価に参考となる *in vivo* 反復投与毒性試験等のデータの存在を認めたならば、「*in vivo* 試験結果概要」のデータとして用いる。

- (3) 被験物質の *in vivo* 試験結果概要に基づきラット又はマウスでの経口投与の LD₅₀ が 2000mg/kg を超えることを確認する。更には、被験物質に食経験等の情報が存在する場合、それらに安全性上の問題がないことを確認する。該当する場合は、(5)へ進む。該当しない場合は、本評価系の対象外となる。

注 1) この段階での評価は、特に神経や心臓に特異的な毒性を発現しないこと、代謝活性化による毒性発現の懸念がないことの確認が重要である。この方法の一つが、

in vivo 試験にて、ラット又はマウスでの経口投与の LD₅₀ が 2000mg/kg を超えることを確認する方法である。被験物質が特異的なメカニズムや代謝活性化により単回投与毒性を示す物質であるならばこのラット又はマウスにおける LD₅₀ 値に毒性が反映するので、被験物質の LD₅₀ が 2000mg/kg を超えるということは被験物質が特異的なメカニズムや代謝活性化により単回投与毒性を示すことはないと考えられる。

注 2) *in vivo* 試験結果概要のデータとして、*in vivo* 反復投与毒性試験等のデータからの単回投与毒性の予測データを用いることができる。Bulgheroni ら²⁷⁾は、ラット経口 28 日間反復投与毒性試験の無毒性量 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level) が 200mg/kg 以上であれば、ラット経口 LD₅₀>2000mg/kg であると予測できると報告しており、単回投与毒性に問題のないこと、特に特異的なメカニズムや代謝活性化により単回投与毒性を示す物質でないことを確認する上で参考になる^{15,16)}。

注 3) 情報が存在する場合に評価するデータとして、食経験、ヒト使用実績がある。「食経験がある」とは、当該食品について、原料・加工方法等を変えずに、同じ製品（関与成分）が食生活の一環として長期にわたって食されてきた実績があると社会一般的に認められるような場合であって、かつ、これまで安全性上の問題がない場合である。この場合には、その食品は安全であると評価できる²⁸⁾。したがって、食経験は被験物質の単回投与毒性を評価するための有力な情報となる可能性がある。なお、食経験に基づいて得たい情報は、生体への単回投与において毒性のないこと、特に神経や心臓に特異的な毒性を発現しないこと、代謝活性化による毒性発現がないことであるため、それを担保できる内容であるかについて情報の質と量（食経験の期間を含む）を評価する。

一方、ヒト使用実績については、多くの場合、化粧品のヒト使用実績が想定される。化粧品の場合、経皮又は経粘膜適用で安全に使用されたとしても、経口での安全性情報としては不十分なため、単回投与毒性を評価するための情報としての重要度は、通常、食経験よりも低いと考えられる。

また、成分の安全性評価を行う場合には TTC に基づく考察を用いることができる。

注 4) 食経験は、単回投与毒性の評価に活用できる可能性がある。被験物質に関連する食品について、これまでの我が国又は他の地域における使用状況、すなわち、調理・加工方法、成分組成、摂取形態、摂取方法、摂取量、摂取地域、摂取集団、摂取期間、有害性情報等を調査し、得られたデータが本評価系でターゲットとしている医薬部外品添加物の単回投与毒性の評価に活用可能か否かを評価する²⁹⁾。

注 5) ヒト使用実績の情報は、ヒトがどれだけ経口曝露されたかを示すデータと共に、安全性情報、特に誤飲・誤食関連の詳細なデータが存在すれば有用である。

注 6) TTC は、あらゆる化学物質についてそれ以下の曝露量では明らかな有害影響が現れないとするヒト曝露の閾値である。したがって、成分の単回投与毒性の評価を

行う場合に活用できる可能性がある。欧州委員会（EC: European Commission）の消費者安全科学委員会（SCCS: Scientific Committee on Consumer Safety）は TTC の基準値を評価している¹⁸⁾。また、医薬品規制調和国際会議（ICH: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use）は「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドライン」において TTC に基づく許容摂取量を定めている^{30, 31)}。医薬部外品添加物の安全性評価において、遺伝毒性（の警告部分構造）がない物質は 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日に相当する 90 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ が TTC の基準として参考になる。DNA 反応性発がん物質となる可能性のある物質は 0.025 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日に相当する 1.5 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ が基準として参考になる。なお、成分の安全性評価を TTC に基づく考察を用いて行う場合には、対象が TTC の適用範囲内であることを確認する必要がある。TTC の適用外となる物質は、アフラトキシン様化合物、アゾキシ化合物、N-ニトロソ化合物、ベンジジン、ヒドラジン、無機化合物、金属及び有機金属、タンパク質、ステロイド、生物蓄積性が既知又は予測される物質（ポリハロゲン化ダイオキシン/ジベンゾフラン及びダイオキシン様ポリハロゲン化ビフェニル）、ナノ物質、放射性物質、未知の化学構造を含む物質の混合物である。ただし、化学構造の不明な化学物質の混合物の TTC による安全性評価については、欧州食品安全機関（EFSA: European Food Safety Authority）のガイダンスに基づき、適用外となるカテゴリーの物質が含まれていないという十分な情報又は分析があれば、混合物成分の合計に TTC を適用できるとされているので参考になる³²⁾。具体的な TTC の活用法としては、一般的な分析機器により被験物質を分析し、TTC 基準以下の含有成分量において、安全性に問題がないとした事例があり、参考になる^{33, 34)}。

(4) 被験物質が以下のいずれかに該当することを確認する。

- ①被験物質に食経験が認められ、これまで食されてきた実績及び安全性上の問題がないことを示せる。被験物質が食経験のある成分だけでなく食経験のない成分も含む場合は、全ての成分について *in vivo* 試験結果概要、TTC 等も活用して安全性上の問題がないことを示せる。更には、被験物質にヒト使用実績の情報がある場合、それらに安全性上の問題がないとする。
- ②被験物質が表 1 に示す単回投与毒性の低い成分範囲に属し、なおかつ類似物質の *in vivo* 試験結果概要に基づきラット又はマウスでの経口投与の LD₅₀ が 2000mg/kg を超えると予測される。更には、被験物質及び/又は類似物質に食経験、ヒト使用実績等の情報がある場合、それらに安全性上の問題がないとする。該当する場合は、(5)へ進む。該当しない場合は、本評価系の対象外となる。

注 1) (4)の①の食経験による評価においては、被験物質 2000mg/kg を人が経口摂取した時の単回投与毒性について、食経験により毒性がないことを示すことができる

かを検討する。比較的多量の投与で特異的なメカニズムや代謝活性化により単回投与毒性を示す物質でないことが 3T3-NRU 細胞毒性試験による評価へ進む要件である。

- 注 2) 評価者は類似物質の選定経緯を示す。なお、被験物質を構成する一部の成分が評価対象の場合には「類似成分」を選定する。類似物質は「類似成分」と読み替えることができる。
- 注 3) ここで言う類似物質とは、化学構造、物理的及び化学的特性、機能が類似し、更に *in vivo* 試験結果概要等で単回投与毒性の問題がないことが判明している物質である。化学構造が僅かに異なることに対しての類似性の説明は、物理的及び化学的特性、機能が類似していることを示す。例えば、炭素鎖のみが異なる物質で、C16 の被験物質を C14 と C18 を類似物質として評価する場合、様々な特性値が C14 と C18 の間に入ることを示せば、類似物質として選定できると考えられる。
- 注 4) 類似物質のうち少なくとも 1 物質は *in vivo* 試験結果概要が存在する物質を選定する。
- 注 5) 表 1 に示す単回投与毒性の低い成分範囲に関して、原則として特別な官能基や化学構造を追加した場合は除外するので留意する。例えば、L-システインは単回投与毒性の低い成分に属するが、アセチル化した N-アセチル L-システインは化学構造、物理的及び化学特性、機能が異なっており、単回投与毒性の低い成分から除外する。
- 注 6) 情報が存在する場合に評価するデータとして、食経験、ヒト使用実績がある。また、成分の安全性評価を行う場合には TTC に基づく考察を用いることができる。
- 注 7) *in vivo* 試験結果概要がない被験物質が化粧品でのヒト使用実績を有する場合、単回投与毒性が問題ないとの評価に至る根拠を示す。ヒトでの使用へ移行するための安全性評価が妥当性を欠いていた場合には、得られた使用実績は妥当な資料として認められないので注意する。

表 1 単回投与毒性の低い成分範囲

No.	分類	本評価における単回投与毒性の低い成分範囲 ³⁶⁻³⁸⁾	例
1	糖質 ³⁹⁾	カルボニル基又はアルデヒド基を一つ持ち、二つ以上のヒドロキシ基を持つ炭素数 3 以上 6 以下の化合物 (単糖類) 及びそれらがグリコシド結合で二つ以上結合した化合物 (二糖類、少糖類、多糖類)。また、単糖類のカルボニル基が還元され、ヒドロキシ基になった化合物 (糖アルコール)	グリセルアルデヒド、ジヒドロキシアセトン (三単糖)、D-リボース (五単糖)、D-グルコース (六単糖)、D-スクロース (二糖類)、グルコマンナン (多糖類) キシリトール (糖アルコール)
2	アミノ酸、ペプチド	アミノ基とカルボキシ基の両方を持つ化合物 (アミノ酸)。また、アミノ酸をモノマーとしてペプチド結合により鎖状につながった化合物 (ペプチド)。ただし、L-システインを除く。	タンパク質を構成する 20 種のアミノ酸のうち L-システインを除く 19 種のアミノ酸 (アミノ酸)、海苔オリゴペプチド (オリゴペプチド)
3	多価アルコール	炭化水素の二つ以上の水素原子をヒドロキシ基で置換した構造を持つ化合物。ただし、1,4-ブタンジオールを除く。	1, 2-エタンジオール、1, 3-ブタンジオール、1, 6-ヘキサンジオール (二価アルコール)、グリセロール (三価アルコール)
4	高分子 (分子量 1000 以上)	分子量 1000 以上の化合物 ^{40, 41)}	様々な分子量のポリエチレングリコール (PEG-32, PEG-75, PEG-150, PEG-20M)
5	脂肪酸 (炭素数 9 以上)	炭化水素の水素原子をカルボキシ基で置換した構造を持つ化合物で、炭素数 9 個以上のもの	ノナン酸 (C9)、デカン酸 (C10)、ドデカン酸 (C12)、ヘキサデカン酸 (C16)
6	アルコール (炭素数 3 以下又は 8 以上)	炭化水素の一つの水素原子をヒドロキシ基で置換した構造をもつ化合物で、炭素数 3 以下又は 8 以上のもの	メタノール (C1)、エタノール (C2)、イソプロパノール (C3)、オクタノール (C8)、ドデカノール (C12)、ヘキサデカノール (C16)
7	エステル	酸とアルコールの脱水反応により得られる化合物。酸としては脂肪酸、アルコールとしては、一価又は多価アルコール。	ミリスチン酸イソプロピル、ラウリン酸グリセリル (エステル油)、酢酸エチル
8	ロウ類	高級脂肪酸 (通常、炭素数 12 以上) と高級アルコール (通常、炭素数 6 以上) がエステル結合した化合物。この他に遊離の脂肪酸、高級アルコール、炭化水素等が含まれている。	キャンデリラロウ、ホホバ油、ラノリン
9	トリグリセリド	1 分子のグリセロールに 3 分子の脂肪酸がエステル結合した化合物	トリヘプタノイン、トリイソステアリン
10	炭化水素 (炭素数 6 以上)	炭素と水素からなる化合物で、炭素数 6 以上のもの	ヘキサン (C6)、イソドデカン (C12)、イソヘキサデカン (C16)、スクワラン (C30)、ポリイソブテン
11	シリコーン	酸化ケイ素を基本骨格にしたポリマー	ポリジメチルシロキサン、ドデカメチルシクロヘキサシロキサン

注 1) 単回投与毒性の低い 11 分類に属する成分の例及びこの 11 分類内で単回投与毒性の低い成分範囲から除外する成分のデータは、補遺 2 に示した。

(5) 3T3-NRU 細胞毒性試験の実施にあたり、試験に供する物質が培養液に溶解又は均一に懸濁する¹⁵⁾等、物理化学的な性質から試験が実施可能であることを確認する。該当する場合は、次へ進む。該当しない場合は、本評価系の対象外となる。

注 1) 予め試験に供する物質について溶解性試験を行い、試験が実施可能であることを確認するが、最終的には細胞毒性試験において被験物質の適用終了まで溶解又は均一に懸濁した well のデータのみを採用する。

(6) 3T3-NRU 細胞毒性試験を実施し、 $IC_{50} > 2000 \mu\text{g/mL}$ である時、被験物質の単回投与毒性は低いと判定する。 $IC_{50} \leq 2000 \mu\text{g/mL}$ の時は、評価不能であり、本評価系の対象外となる。

2-3. 細胞毒性試験による単回投与毒性の予測についての原理

in vitro 細胞毒性試験のエンドポイントは細胞死である。Ekwall は、この細胞死について基本的な細胞機能への非特異的な影響の結果 (Basal cytotoxicity) であり、化学物質による細胞死が誘発される血中濃度域においては、細胞死と同様のメカニズムが *in vivo* でも働くと提唱している³⁵⁾。すなわち、いずれの細胞にも共通して存在する構造や機能、例えば細胞膜及び細胞骨格の正常性が損なわれ、代謝能及び合成能が阻害され、細胞構成物質の分解や

機能の障害、細胞内外イオン濃度の調節及び細胞分裂に障害が生ずると細胞死に至る。細胞死が広範囲に生じると重篤な組織障害を引き起こし、結果として物質に曝露されていない臓器にも影響し個体死に至る。

一方で、神経や心臓に特異的な毒性を発現する物質、代謝活性化によって毒性発現する物質については、3T3-NRU 細胞毒性試験では評価できない^{10, 11)}。神経の受容体やイオンチャネルに特異的に作用する物質は、細胞毒性を生じることなく個体死を引き起こすことがある。例えば、フグ毒のテトロドトキシン (TTX: Tetrodotoxin) やトリカブトに含まれるアコニチンは TTX 感受性ナトリウムチャネルに作用し、呼吸抑制により個体死を引き起こす。これらの物質では細胞死と個体死のメカニズムは異なり、Basal cytotoxicity が発現する濃度域より遥かに低い濃度域において個体死を引き起こす。

このようなことから、未知の物質の単回投与毒性を評価する場合には、特異的なメカニズムに基づく毒性、代謝活性化に基づく毒性を発現する可能性を考慮する必要がある。ただし、LD₅₀ のカットオフを 2000mg/kg として予測性を検討した場合、*in vitro* 細胞毒性試験は、特異的なメカニズムや代謝活性化に関わらず、何らかの毒性作用を細胞毒性として捉えており、*in vitro* 細胞毒性で LD₅₀ ≤ 2000mg/kg の毒性を見落とす可能性は低いという知見が得られている¹⁵⁾。

未知物質の単回投与毒性評価にあたっては、細胞毒性からの予測と信頼性の高い他の情報を組み合わせて WoE 評価を行うことにより、評価を完結させることができると考えられる。

3. 本ガイダンスの留意点

本ガイダンスで示した事例「3T3-NRU 細胞毒性試験及びその他の安全性データを組み合わせた医薬部外品の添加物の単回投与毒性評価系」は、単回投与毒性を評価できる WoE 評価の一例である。医薬部外品の有効成分及び化粧品基準改正要請を必要とする成分についても、今後、評価法の種類及びそれらを用いて評価できる組合せのガイダンス化を検討すべきである。

4. 引用文献

- 1) 日本化粧品工業連合会 (2015) 化粧品の安全性評価に関する指針 2015, 薬事日報社, 東京.
- 2) 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック検討会 (2017) 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2017, 薬事日報社, 東京.
- 3) OECD (2002) Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure. Available at:
https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl420.pdf
- 4) OECD (2002) Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. Available at:
https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl423.pdf

- 5) OECD (2008) Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. Available at:
<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oeed/oeedtg425.pdf>
- 6) Halle, W. (2003) The registry of cytotoxicity: Toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD₅₀) and to reduce testing in animals, *Alternatives to Laboratory Animals*, 31, 89-198.
- 7) NICEATM, NIEHS (2006) *In vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity BACKGROUND REVIEW DOCUMENT. Available at:
<https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/test-method-evaluations/acute-systemic-tox/in-vitro-validation/index.html>
- 8) ICCVAM, NICEATM (2006) ICCVAM TEST METHOD EVALUATION REPORT *In Vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Testing. Available at:https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/brd_tmer/at-tmer-complete.pdf
- 9) OECD (2010) Guidance Document on using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests. Series on Testing and Assessment No. 129. Available at:
<https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/test-method-evaluations/acute-systemic-tox/in-vitro-validation/index.html>
- 10) JaCVAM 急性毒性試験代替法評価委員会, 急性毒性試験代替法の第三者評価報告書 評価対象試験: *In vitro* 細胞毒性試験による急性経口毒性試験の初回投与量設定試験(2011年1月14日) Available at: https://www.jacvam.jp/files/list/07/07_01_C1.pdf
- 11) JaCVAM 評価会議, 単回投与毒性試験代替法の評価会議報告書(2011年4月20日). Available at: https://www.jacvam.jp/files/list/07/07_01_B1.pdf
- 12) ECVAM (2011) Follow-up study on the predictive capacity of the 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity assay to correctly identify substances not classified for acute oral toxicity under the EU CLP system (LD₅₀>2000mg/kg) Final study report. Available at:
<https://www.jacvam.jp/list.html>
- 13) Prieto P., Cole T., Curren R., Gibson R. M., Liebsch M., Raabe H., Tuomainen, A. M., Whelan, M. and Kinsner-Ovaskainen, A. (2013) Assessment of the predictive capacity of the 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity test method to identify substances not classified for acute oral toxicity (LD₅₀>2000 mg/kg): results of an ECVAM validation study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65(3) 344-365.
- 14) EURL ECVAM (2013) EURL ECVAM Recommendation on the 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay for Acute Oral Toxicity. Available at:
<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-3t3-neutral-red-uptake-cytotoxicity-assay-acute-oral-toxicity>
- 15) JaCVAM 急性毒性試験資料編纂委員会, 評価報告書 急性経口毒性を予測するための *In vitro* 細胞毒性試験(2018年12月11日). Available at:

- https://www.jacvam.jp/files/list/07/07_02_C1.pdf
- 16) JaCVAM 評価会議, 評価会議報告書 急性経口毒性を予測するための *In vitro* 細胞毒性試験 (2019年4月24日). Available at: https://www.jacvam.jp/files/list/07/07_02_B1.pdf
 - 17) Cosmetic Ingredient Review. Available at: <https://www.cir-safety.org/ingredients>
 - 18) Scientific Committee on Consumer Safety (2018) The SCCS notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation 10th revision. Available at: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_224.pdf
 - 19) 株式会社三菱化学テクノロジーサーチ (2015) 毒性学的懸念の閾値 (TTC) を用いたリスク評価手法に関する調査報告書. Available at: <http://www.fsc.go.jp/fsciis/survey/show/cho20150030001>
 - 20) Japan Existing Chemical Database (既存化学物質毒性データベース) Available at: http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp
 - 21) Hazard Evaluation Support System Integrated Platform (有害性評価支援システム統合プラットフォーム) Available at: <https://www.nite.go.jp/chem/qsar/hess.html>
 - 22) OECD QSAR Toolbox. Available at: <http://www.qsartoolbox.org>
 - 23) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) Available at: <https://www.cdc.gov/niosh/rtecs/RTECSaccess.html>
 - 24) European Chemicals Agency (ECHA) - Information on Chemicals. Available at: <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals>
 - 25) ChemIDplus. Available at: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/>
 - 26) 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部, 毒劇物指定のための有害性情報の収集・評価. Available at: <http://www.nihs.go.jp/law/dokugeki/hyoukaindex.html>
 - 27) Bulgheroni, A., Kinsner-Ovaskainen, A., Hoffmann, S., Hartung, T. and Prieto, P. (2009) Estimation of acute oral toxicity using the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) from the 28 days repeated dose toxicity studies in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 53, 16-9. PMID: 18977273
 - 28) 新開発食品専門調査会 (2004) 特定保健用食品の安全性評価に関する基本的考え方. Available at: https://www.fsc.go.jp/senmon/sinkaihatu/tokuho_kangaekata.pdf
 - 29) 財団法人日本健康・栄養食品協会 健康食品安全性評価に係る検討委員会 (2008) 健康食品の安全性評価ガイドライン. Available at: <http://www.jhnfa.org/topic76.pdf>
 - 30) 厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課長 (2015) 潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性 (変異原性) 不純物の評価及び管理ガイドラインについて, 薬生審査発 1110 第 3 号, 平成 27 年 11 月 10 日. Available at: <https://www.pmda.go.jp/files/000208287.pdf>
 - 31) ICH (2014) Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7. Available at: <https://www.pmda.go.jp/files/000208234.pdf>
 - 32) EFSA Scientific Committee (2019) Guidance on the use of the Threshold of Toxicological

- Concern approach in food safety assessment. Available at:
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5708>
- 33) Scientific Committee on Consumer Safety (2019) Opinion on tetrabromophenol blue, 4,4'-(4,5,6,7-tetrabromo-1,1-dioxido-3H-2,1-benzoxathiol-3-yliden)bis-2,6-dibromophenol (C183) - Submission IV -. Available at:
https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_232.pdf
- 34) Koster, S., Boobis, A. R., Cubberley, R., Hollnagel, H. M., Richling, E., Wildemann, T., Würtzen, G. and Galli, C. L. (2011) Application of the TTC concept to unknown substances found in analysis of foods, *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1643-1660.
- 35) Ekwall B., Clemenson, C., Crafoord, B., Ekwall, B., Hallander, S., Walum, E and Bondesson, I. (1998) MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity: Part V. Rodent and Human Toxicity Data for the 50 Reference Chemicals. *Alternative to Laboratory Animals.*, 26 Suppl 2, 571-616. PMID: 26042662.
- 36) 日本化粧品工業連合会(2013)付録・化粧品原料の規格作成の手引き第二版、日本化粧品成分表示名称辞典第3版, 薬事日報社.
- 37) 大木道則, 大沢利昭, 田中元治, 千原秀昭(1994)化学辞典, 東京化学同人.
- 38) 日本化粧品技術者会(2003)化粧品事典.
- 39) 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所, 炭水化物と糖類について. Available at:
https://www.nibiohn.go.jp/eiken/kenkounippon21/download_files/other/topics_02.pdf
- 40) Kimura, T., Sudo, K., Kanzaki, Y., Miki, K., Takeichi, Y., Kurosaki, Y. and Nakayama, T. (1994) Drug absorption from large intestine: physicochemical factors governing drug absorption, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17 (2) 327-333. PMID: 8205133.
- 41) Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. and Feeney, P. J. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3-25. PMID: 11259830.

補遺 1

3T3-NRU 細胞毒性試験

1. 目的

本試験法の目的は、被験物質が BALB/c 3T3 細胞を障害する能力を NR の取り込みを測定することにより半数致死濃度 (IC₅₀) として取得し、その値が 2000µg/mL を超えた場合に、単回投与毒性の弱い物質 (ラット経口 LD₅₀>2000mg/kg) であると評価することである。

なお、最終的な被験物質の単回投与毒性の評価は本細胞毒性試験単独ではなく、他の安全性データと合わせて WoE により評価を行う¹⁻³⁾。

2. 試験系について⁴⁾

2-1. BALB/c 3T3 細胞

細胞は不死化したマウス線維芽細胞系である BALB/c 3T3 細胞を用いる。線維芽細胞系は特定の分子ターゲットとの相互作用に関係した作用機構は知られていない。そのため細胞毒性に関わる毒性機構 (*in vitro* で細胞死を起こす化学物質は、*in vivo* でも血中で細胞死を引き起こす濃度になると障害が起き、個体死に至る同様のメカニズムが働く。このような毒性機構) に基づいた単回投与毒性評価への応用が考えられる。すなわち、神経又は心臓の受容体、イオンチャネル等への作用を捉えることはできない。更に、第 I 相及び第 II 相の代謝能を欠いている。したがって親化学物質によって誘導される細胞毒性に対して感受性があり、その代謝物に対しては細胞毒性を評価していない。このような限界を理解したうえで、BALB/c 3T3 細胞を単回投与毒性の評価に用いていくことになる。

2-2. NR の取り込み

NR は水溶性の弱陽イオン超生体染色色素である。正常な細胞では、NR は細胞形質膜を透過して陰イオン性のライソゾームマトリクスに結合して濃縮されるが、化学物質によって細胞毒性が生じた場合には取り込まれる NR が減少する。NR の取り込み量と生細胞数が比例関係にあることを利用して細胞毒性の評価が可能である。

3. 3T3-NRU 細胞毒性試験手順概要の作成経緯

3T3-NRU 細胞毒性試験の手順は、「急性経口毒性試験のための 3T3 Neutral Red Uptake 細胞毒性試験に関する EURL ECVAM 勧告」¹⁾で示されている「DB-ALM Protocol n°139」⁴⁾に基づいた。ただし、このプロトコルは、急性毒性試験の開始用量を求めることを目的としているので、細胞毒性が IC₅₀>2000µg/mL で単回投与毒性の弱い物質 (ラット経口 LD₅₀>2000 mg/kg) であることを評価するプロトコルに改変した。被験物質液の調製及び試験成立基準については、ECVAM によるフォローアップバリデーション研究で用いられたプロトコル「HIVS Protocol No. SP100084」⁵⁾を参考とした。試験の繰り返しについては、「試験は 2 回を繰り返して行い、その結果に基づき評価する。この独立した 2 回の評価結果が異なった場合

には3回目を実施し、2回の同じ評価結果を採用し、その結果に基づき評価する。」とした。

本ガイダンス作成時に設定した判定基準 $IC_{50}>2000\mu\text{g/mL}$ の予測性は、ECVAM によるフォローアップバリデーション研究のデータ⁵⁾に基づいて再解析した。このバリデーション研究は56種類の被験物質を用いて3施設で行われた。一致率は3施設それぞれで60%(24/40)、61%(28/46)、57%(27/47)、感度は100%(17/17)、95%(21/22)、100%(23/23)、特異度は30%(7/23)、29%(7/24)、17%(4/24)であった。偽陰性は、アセトフェノンの IC_{50} を $2184.5\mu\text{g/mL}$ とした1施設であった。他の2施設は 132.2 、 $265.0\mu\text{g/mL}$ で陽性と判定した(表2参照)。結論として、 $IC_{50}>2000\mu\text{g/mL}$ の判定基準については、偽陰性の懸念は極めて低いことが示唆された。

表2 判定基準 $IC_{50}>2000\mu\text{g/mL}$ の予測性

実施施設*1	HSL	JRC	IIVS
N	40	46	47
一致率	60% (24/40)	61% (28/46)	57% (27/47)
感度	100% (17/17)	95% (21/22)	100% (23/23)
特異度	30% (7/23)	29% (7/24)	17% (4/24)
偽陽性率	70% (16/23)	71% (17/24)	83% (20/24)
偽陰性率	0% (0/17)	5% (1/22)	0% (0/23)
偽陰性物質	なし	アセトフェノン	なし

*1 HSL: Health and Safety Laboratory, UK

JRC: Institute for Health and Consumer Protection, European Commission Joint Research Centre, Italy

IIVS: Institute for *In Vitro* Sciences, Inc., USA

なお、本試験手順に類似した方法が、NICEATM と ECVAM による急性毒性試験の開始用量を求めるバリデーション研究のプロトコル^{6,7)}、OECD GDN_{0.129}に記載されているプロトコル概要⁸⁾、ECVAM によるフォローアップバリデーション研究の最終報告書に添付されたプロトコル⁵⁾及び JaCVAM の報告書に記載されているプロトコル概要^{2,3)}にある。これらはいずれも、細胞毒性が $IC_{50}>2000\mu\text{g/mL}$ で単回投与毒性の弱い物質(ラット経口 $LD_{50}>2000\text{mg/kg}$)であると評価する部分等を導入することにより、ここに示す試験手順と同等に扱うことが可能である。

4. 3T3-NRU 細胞毒性試験手順概要⁴⁾

試験方法の概要

96well マイクロプレートで培養した株化細胞に被験物質を48時間曝露させる。その後、NRを培養液に添加し、3時間インキュベーションした後、細胞内に取り込まれたNRを抽出してプレートリーダーで測定する。細胞生存率をコントロールの吸光度値に対する割合

から求め、更に各濃度における細胞生存率から IC₅₀ を算出する。

被験物質の IC₅₀ が 2000µg/mL を超えた場合に、ラット経口 LD₅₀>2000mg/kg と予測し、被験物質の単回投与毒性評価のための一つのデータとして用いる。

細胞と培養液

細胞は BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞 (3T3 細胞) を使用する。3T3 細胞の継代のための培養液は、10% 新生仔牛血清(NBCS/NCS: Newborn Calf Serum)、4 mM グルタミンを添加した DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) を使用する。被験物質希釈用の培養液は、4 mM グルタミン、200 IU/mL ペニシリン、200 µg/mL ストレプトマイシンを添加した DMEM を用いる。NR 希釈用の培養液は、5 % NBCS/NCS、4 mM グルタミン、100 IU/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した DMEM を用いる。培養液は 2-8°C で保存し、2 週間以内に使用する。

NR を含む培養液

液体組織培養グレードの NR 原液 は、アッセイを実行するための第一の選択肢となる (例: Sigma-Aldrich #N2889、3.3mg/mL)。液体組織培養グレードの NR 原液は、製造業者が推奨する保管条件で保管、及び有効期間を遵守する。

NR 保存液 0.758 mL (3.3 mg NR dye/mL 溶液) を予め 37°C に加温した 99.242 mL NR 希釈用培養液と混合する。NR の結晶を除くため、フィルター(例: ミリポア、サイズは 0.2-0.45 µm) でろ過する。この培養液 (NR 染色液) は細胞へ添加する前に温水浴槽で 37°C に保温し、30 分以内に使用する。温水浴槽より取り出してからは 15 分以内に使用する。なお、NR 染色液は NR を最終濃度として 25µg/mL 含む。

被験物質の調製

被験物質は、室温に置いた後、溶解及び希釈を行う。使用直前に被験物質液を調製する。以後の試験に使用するための作り置きをしない。被験物質液は、溶解又は均一に懸濁していなければならない²⁾。被験物質液の調製は原則として重量対容量 (w/v) で行う。被験物質のための適切な溶媒の選択、溶解性の測定をするために溶解性試験を行う。溶解性の判定は肉眼観察により行う。溶解性試験は、被験物質希釈用培養液に 40mg/mL で溶解又は均一に懸濁するか否か、続いて 4mg/mL で溶解又は懸濁するか否か、これらが困難な場合には、DMSO (Dimethyl sulfoxide) 又はエタノール溶液に 400mg/mL で溶解又は均一に懸濁するか否かを確認する。いずれの条件でも溶解又は均一に懸濁しない場合、被験物質は本試験による細胞毒性の測定ができない物質であると判定する。

(1) 被験物質希釈用の培養液に 40mg/mL で溶解又は均一に懸濁する被験物質については、40mg/mL での被験物質原液を調製する。この時、細胞に適用される濃度は、well 中の細胞を含む培養液 50 µL に、被験物質液 50 µL を添加し全 100 µL とするため、20mg/mL で

ある。続いて、7 濃度の希釈系列を公比 2 で調製する。

- (2) 40mg/mL で溶解又は均一に懸濁しない場合には、4mg/mL 以上で被験物質希釈用培養液に溶解又は均一に懸濁する最高濃度で被験物質原液を調製する。この時、細胞に適用される最高適用濃度は 2mg/mL 以上である。続いて、7 濃度の希釈系列を公比 2 で調製する。なお、4mg/mL 未満の被験物質原液では、細胞に適用される濃度が 2mg/mL 未満となり、単回投与毒性の評価ができない範囲となるため、有機溶媒の使用を検討する必要がある。
- (3) 上記の調製が不可能で、DMSO 又はエタノールに溶解させる物質については、400mg/mL の DMSO 又はエタノール溶液を調製する。続いて、7 濃度の希釈系列を公比 2 で調製する。全 8 濃度の希釈系列は、被験物質希釈用培養液で 100 倍に希釈する。この時、4mg/mL の被験物質液には DMSO 又はエタノールが 1% (v/v) 含まれている。細胞に適用される被験物質の濃度は、well 中の細胞を含む培養液 50 μ L に、被験物質液 50 μ L を添加し全 100 μ L とするため、2mg/mL である。この時、DMSO 又はエタノールの濃度は 0.5% (v/v) である。有機溶媒に溶解した被験物質は、培地に添加した時に沈殿する可能性がある。この場合を含め、全ての被験物質添加 well において、沈殿が認められた濃度での結果は試験から除外する。

対照物質

(1) 陽性対照物質 (PC: Positive Control)

PC としてドデシル硫酸ナトリウム (SDS: Sodium Dodecyl Sulfate) を用い、被験物質と同様に調製する。

(2) 溶媒対照物質 (VC: Vehicle Control)

VC として NR 希釈用の培養液を用いる。被験物質の溶解に DMSO 又はエタノールを使用した場合は、VC として有機溶媒 0.5% (v/v) を含む培地を用いる (50 μ L の被験物質液中に有機溶媒 1% 及び 50 μ L の細胞懸濁液中に 0% により、有機溶媒の最終濃度は 0.5% (v/v))。

被験物質の適用

(1) 細胞の播種及び前培養

3T3 細胞は、96-well マイクロプレートに 2.0-3.0x10³ 個/100 μ L/well 播種後 37°C、5%CO₂ で 24 時間培養する。

(2) 被験物質の添加

24 時間の前培養後、培養液を除去する。すぐに、37°C に温めた新鮮な培養液をそれぞれの well に 50 μ L 添加した後、被験物質液を 50 μ L 添加する。添加後 48 時間培養する。1 用量当たりの well 数は N=6 とする。

細胞毒性の測定

被験物質の曝露後、位相差顕微鏡で細胞を観察して、細胞の播種エラー及び細胞増殖の程度を確認する。被験物質の毒性によって生じた細胞の形態変化も記録する。ただし、この記録は、細胞毒性の評価には使用しない。その後、well の培養液を除去し、D-PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) で洗浄後、NR 染色液を 250 μ L 添加して 37°C、5% CO₂ で 3 時間培養する。NR 染色液を除去して D-PBS で洗浄後 100 μ L の用時調製した NR 抽出液 (水 : エタノール : 氷酢酸 = 49 : 50 : 1) を添加しプレートシェイカーで 20-45 分間振盪して NR を抽出する。振盪後、プレートは少なくとも 5 分間放置する。測定は、NR 抽出液を添加してから 60 分以内に実施する。泡を取り除き、プレートリーダーで 540 nm の吸光度を測定する。

試験成立基準

試験結果が妥当であるためには、全ての成立基準 (すなわち、判定基準(1) 及び(2))を満たさなければならない。

- (1) PC である SDS の IC₅₀ は、試験施設により設定された過去の平均値の ± 2.5 標準偏差以内でなければならない。
- (2) 各プレートにおいて、VC の左右の平均値は、全 VC の平均の 15%を超える差はない。

データ解析

生物学/科学的な判断により、評価に適していない well はデータ解析から、理由を記録のうえ、除外可能である。

被験物質の各濃度における平均細胞生存率は、ブランクの値を差し引いた後、VC の平均の細胞生存率に対する割合として算出する。IC₅₀ は表計算ソフト (例 : Microsoft EXCEL®) を用い、直線内挿により得る。又は統計学的ソフト (例 : GraphPad PRISM®) を用いて、Hill 式の解析から IC₅₀ を得る。

評価

- (1) 試験は 2 回を繰り返して行い、その結果に基づき評価する。この独立した 2 回の評価結果が異なった場合には 3 回目を実施し、2 回の同じ評価結果を採用し、その結果に基づき評価する。
- (2) 被験物質の IC₅₀ が 2000 μ g/mL を超えた場合に、ラット経口 LD₅₀>2000mg/kg で、単回投与毒性は低いと予測する。すなわち、被験物質は国連による化学品の分類および表示に関する世界調和システム (UN GHS: The United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) においては急性毒性ハザード区分 5 又は区分外に相当すると予測する。また、医薬部外品の添加物として単回投与毒性に問題はないと予測する。なお、IC₅₀ が 2000 μ g/mL 以下の結果を得た場合には、他の評価法を実施して単回投与毒性を検討することもできる。

- (3) 上記の評価は細胞毒性試験からの評価であり、最終的な被験物質の単回投与毒性の評価は他の安全性情報と合わせて WoE 評価により判定する。

5. 3T3-NRU 細胞毒性試験における留意点

5-1. 試験実施における注意事項

新たに 3T3-NRU 細胞毒性試験を実施する試験施設では、OECD GD No.129⁸⁾の ANNEX8 に記載されているデータ等を活用し、精度の向上に努める。

5-2. 試験法の限界

本試験法は以下のような物理化学的性質を有する物質は適用範囲外である。

(1) 細胞培養液に不溶な物質

細胞培養液に溶解するか又は均一に懸濁する場合には評価が可能であるが、沈殿を生じる場合には評価が不可能であり、適用除外となる。

(2) 細胞培養液と反応する物質

(3) 揮発性の高い物質

25°Cにおける飽和蒸気圧が 4kPa を超える物質は適用除外となる可能性がある。このような物質を評価する場合には、妥当な評価が行われたことを説明する必要がある。

(4) 細胞に残留する性質を有する赤色、あるいは NR の吸光度測定を阻害する有色の物質

5-3. 偽陰性を示す可能性がある物質

本試験法は以下のような毒性発現機序や細胞機能への影響を有する場合は偽陰性が生じることがあるので注意が必要である。

(1) 代謝により活性化されて毒性を発現する物質

(2) 神経毒性や心臓毒性等、臓器特異的な作用機序により毒性を発現する物質

(3) 細胞周期、ライゾゾームに特異的な影響を与える物質、細胞肥大作用のある物質

(3)の物質は、3T3-NRU 細胞毒性試験による細胞生存率の結果が(画像解析装置を用いて)細胞数を直接カウントした時の結果に比較して高値を示すという報告があり、該当する物質を同定する時の参考になる²⁾。

引用文献

- 1) EURL ECVAM (2013) EURL ECVAM Recommendation on the 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay for Acute Oral Toxicity. Available at:
<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-3t3-neutral-red-uptake-cytotoxicity-assay-acute-oral-toxicity>
- 2) JaCVAM 急性毒性試験資料編纂委員会, 評価報告書 急性経口毒性を予測するための *In vitro* 細胞毒性試験 (2018年12月11日). Available at:
https://www.jacvam.jp/files/list/07/07_02_C1.pdf
- 3) JaCVAM 評価会議 評価会議報告書 急性経口毒性を予測するための *In vitro* 細胞毒性試験 (2019年4月24日). Available at: https://www.jacvam.jp/files/list/07/07_02_B1.pdf
- 4) EURL ECVAM, DB-ALM Protocol n°139: BALB/c 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay (3T3 NRU). Available at:
http://cidportal.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM_docs/139_P_BALBc%20T3%20Neutral%20Red%20Uptake%20Cytotoxicity%20Assay.pdf
ECVAM (2011) Follow-up study on the predictive capacity of the 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity assay to correctly identify substances not classified for acute oral toxicity under the EU CLP system (LD₅₀>2000mg/kg) Final study report. Available at:
<https://www.jacvam.jp/list.html>
- 5) NICEATM, NIEHS (2006) *In vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity BACKGROUND REVIEW DOCUMENT. Available at:
<https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/test-method-evaluations/acute-systemic-tox/in-vitro-validation/index.html>
- 6) ICCVAM, NICEATM (2006) ICCVAM TEST METHOD EVALUATION REPORT *In vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Testing. Available at: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/brd_tmer/at-tmer-complete.pdf
- 7) OECD (2010) Guidance Document on using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests. Series on Testing and Assessment No. 129. Available at:
<https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/test-method-evaluations/acute-systemic-tox/in-vitro-validation/index.html>

補遺 2

単回投与毒性の低い成分範囲のデータについて

単回投与毒性の低い成分範囲の 11 分類について、それらの範囲に含まれる成分例のデータを（例外のデータを含めて）表 3 に示した。ここでは、ラット経口の LD₅₀ (mg/kg) のデータを基本とし、その値が 2000mg/kg を超える場合を単回投与毒性が低い成分とした。LD₅₀ が 2000mg/kg 以下のデータが認められた成分については、単回投与毒性の低い成分範囲の例外とした。

同一成分で複数のデータが存在する場合には、最も強い毒性が認められたデータを表中に示した。ただし、単回投与毒性の低い成分範囲から除く成分（例外成分）については、複数のデータを表中に示し、LD₅₀ が 2000mg/kg 以下のデータを下線で示した。このように提示した理由は、例外成分の多くで LD₅₀ が 2000mg/kg 以下だけでなく 2000mg/kg を超えるデータも認められたためである。また、2000mg/kg 以下の LD₅₀ を示したとしても、300mg/kg 以下の更に強いレベルの毒性を有する成分は認められなかった。これらのことは、単回投与毒性の低い成分範囲として選定した 11 分類が妥当性であることを示している。

なお、ラット経口 LD₅₀ が入手できなかったものについては、代わりに活用可能と考えられるデータ（①ラット経口の最小致死量として報告されたデータ、②ラット反復投与毒性試験の最小毒性量（TDL₀: Toxic Dose Lowest）、③ラット生殖発生毒性試験の TDL₀、④マウス経口 LD₅₀）を用いた。このうち②及び③については、1 日当たりの TDL₀ を算出し、単回投与毒性の低いことを確認した（表 3 の注 6）。

以上、表 3 に示された 11 分類は一部を除き単回投与毒性の低い成分範囲として本ガイダンスにおける 3T3-NRU 細胞毒性試験での評価へ進むための評価に活用できると考えられる。本ガイダンスに基づく評価にあたっては、単回投与毒性の低い成分範囲に属することに加えて、「類似物質の *in vivo* 試験結果概要に基づきラット又はマウスでの経口投与の LD₅₀ が 2000mg/kg を超えると予測される」という制限を組み合わせるので、この評価段階における十分な単回投与毒性の予測を行うことができると考えられる。すなわち、この表で示した成分以外にも例外成分が認められる可能性を否定できないが、これについては実際の評価において類似物質を用いた予測で対応するという考え方である。

表3 単回投与毒性の低い成分範囲のデータ

No.	分類	成分名	CAS	ラット経口 LD ₅₀ (mg/kg) ただし、異なる場合は()内に記載	引用文献
1	糖質	グリセルアルデヒド	367-47-5	(最小致死量のデータ) 5000	1)
		ジヒドロキシアセトン	96-26-4	>16000	2)
		D-リボース	50-69-1	(反復投与毒性試験のデータ, 最小毒性量TDL0=55580 mg/kg/7D-C)	3)
		D-グルコース	50-99-7	25800	4)
		D-スクロース	57-50-1	29700	5)
		グルコマンナン	11078-31-2	>5000	6)
		キシリトール	87-99-0	>4000	7)
2	アミノ酸、 ペプチド	L-アラニン	56-41-7	>5110	8)
		L-アルギニン	74-79-3	>5110	9)
		L-アスパラギン	70-47-3	>16000	10)
		L-アスパラギン酸	56-84-8	>2000	11)
		L-システイン	52-90-4	1890, 5850-Female, 6350-Male	12),13)
		L-グルタミン	56-85-9	7500	14)
		L-グルタミン酸	56-86-0	>5110	15)
		グリシン	56-40-6	7930	16)
		L-ヒスチジン	71-00-1	>5110	17)
		L-イソロイシン	73-32-5	>2000-Female	18)
		L-ロイシン	61-90-5	(最小致死量のデータ) >2000	19)
		L-リジン	56-87-1	(生殖発生毒性試験のデータ, TDL0=72450mg/kg (10-20 pregnant)) (L-リジン塩酸塩 (CAS:657-27-2)のラット経口LD ₅₀ =10600mg/kg)	20), 21)
		L-メチオニン	63-68-3	>10000	22)
		L-フェニルアラニン	63-91-2	ca.16000	23)
		L-プロリン	147-85-3	>5110	24)
		L-セリン	56-45-1	>2000	25)
		L-スレオニン	72-19-5	>2000	26)
		L-トリプトファン	73-22-3	>2000	27)
		L-チロシン	60-18-4	>5110	28)
		L-バリン	72-18-4	>2000-Female	29)
海苔オリゴペプチド	-	>5000	30)		
3	多価アル コール	1, 2-エタンジオール	107-21-1	4700	31)
		1,3-ブタンジオール	107-88-0	18610	32)
		1,4-ブタンジオール	110-63-4	1500, 1550, 1780, 1830-Male, 2000-Female	33)
		1,6-ヘキサンジオール	629-11-8	ca.3000	34)
		グリセロール	56-81-5	>2530	35)
4	高分子	様々な分子量のポリエチレング リコール (PEG-32, PEG-75, PEG-150, PEG-20M)	25322-68-3	>16000	36)
5	脂肪酸	酢酸 (C2)	64-19-7	0.4-3.2 (mL/kg), 3310, 3530	37), 38)
		ブタン酸 (C4)	107-92-6	1500, 1630, 2000, 2940, 8790-Female	39), 40), 41)
		ヘキサン酸 (C6)	142-62-1	1900, 3000, 5970, 6440-Male	42), 43)
		オクタン酸 (C8)	124-07-2	1283, >2000, >5000, >10000, 10080	44), 45), 46)
		ノナン酸 (C9)	112-05-0	>2000	47)
		デカン酸 (C10)	334-48-5	>2000	48)
		ドデカン酸 (C12)	143-07-7	>5000	49)
		ヘキサデカン酸 (C16)	57-10-3	>5000	50)
6	アルコール	メタノール (C1)	67-56-1	5600	51)
		エタノール (C2)	64-17-5	7000	52)
		イソプロパノール (C3)	67-63-0	5000	53)
		ブタノール (C4)	71-36-3	790, ca.2292-Female, 2510, 4360	54), 55)
		イソペンタノール (C5)	123-51-3	1300, 1300-Male, 3488, 4000-Female, 4300, >5000, ca.5726	56), 57)
		ヘキサノール (C6)	111-27-3	710, 720, >2000, 3210, >5000, >10000, >15800	58), 59), 60)
		ヘプタノール (C7)	111-70-6	500, 5500-Female, 6200-Male	61), 62)
		オクタノール (C8)	111-87-5	>2000	63)
		ドデカノール (C12)	112-53-8	>2000	64)
		ヘキサデカノール (C16)	36653-82-4	>2000	65)
7	エステル	ミスチン酸イソプロピル	110-27-0	>2000	66)
		ラウリン酸グリセリル	142-18-7	>2000	67)
		酢酸エチル	141-78-6	5620	68)
8	ロウ類	キャンデリラロウ	8006-44-8	>5000	69)
		ホホバ油	61789-91-1	>21.5 (mL/kg)	70)
		ラノリン	8006-54-0	>64 (mL/kg)	71)
9	トリグリセリ ド	トリヘプタノイン	620-67-7	>4820	72)
		トリオステアリン	26942-95-0	>2000	73)
10	炭化水素	ペンタン (C5)	109-66-0	400, >2000	74), 75)
		ヘキサン (C6)	110-54-3	15840	76)
		イソドデカン (C12)	7045-71-8	(マウスのデータ) >2000	77)
		イソヘキサデカン (C16)	4390-04-9	>2000	78)
		スタウラン (C30)	111-01-3	>50 (mL/kg)	79)
		ポリイソブテン	9003-27-4	>15400	80)
11	シリコーン	ポリジメチルシロキサン	63148-62-9	>17000	81)
		ドデカメチルシクロヘキサシロキサン	540-97-6	>2000	82)

- 注1) 本ガイダンスにおける「単回投与毒性の低い成分」の例外となる成分は、下線で示した。
- 注2) 同一成分で複数のデータが存在する場合には、最も強い毒性のデータを示した。ただし、単回投与毒性の低い成分範囲の例外となる成分については、複数のデータを示し、LD₅₀が2000mg/kg以下のデータを下線で示した。なお、同一成分内で同一の数値となったデータの繰り返しの記載は省略した。
- 注3) LD₅₀が2000mg/kgを超えるか否かを判断できないデータ、例えばLD₅₀>1000mg/kgのようなデータは採用しなかった。
- 注4) 雄性、雌性のいずれかによりLD₅₀を求めた記載のあるデータについては、それぞれ-Male、-Femaleを付けて区別した。
- 注5) グリセルアルデヒドとL-ロイシンのデータはラット経口の最小致死量として報告されたデータである。
- 注6) リボースのデータはラット反復投与毒性試験のデータ、L-リジンのデータはラット生殖発生毒性試験のデータである。反復投与毒性試験の投与条件の略号7D-Cは、7日間連続投与を意味する。生殖発生毒性試験の10-20 pregnantは、妊娠10~20日目の連続投与である。反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験のデータについては、全ての投与の総計のTDL₀を投与日数で除して1日当たりのTDL₀を算出可能である。リボースは7940mg/kg/日、L-リジンは6586mg/kg/日であった。これらの成分の単回投与毒性は低いと考えられた。
- 注7) L-リジンは、L-リジン塩酸塩(CAS: 657-27-2)のラット経口LD₅₀(mg/kg)のデータも参考として示した。
- 注8) ポリエチレングリコール(CAS: 25322-68-3)4成分のそれぞれの平均分子量は、計算上、PEG-32は1426、PEG-75は3318、PEG-150は6618、PEG-20Mは880018である。これらのうちの最も強い毒性のデータを示した。
- 注9) イソドデカンのデータはマウス経口LD₅₀(mg/kg)のデータである。
- 注10) 略号のca.は「約」という意味である。

引用文献

- 1) National Institute for Occupational Safety and Health (1987) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances 1985-86 Edition, Vol. 3, p.2535.
- 2) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 202-494-5.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/1158/7/3/2>
- 3) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. VJ2275000.
- 4) U.S. National Library of Medicine, ChemIDplus.
Available at: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/50-99-7>
- 5) U.S. National Library of Medicine, ChemIDplus.
Available at: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/57-50-1>
- 6) Cosmetic Ingredient Review (2015) Safety assessment of polysaccharide gums as used in cosmetics. Available at: <https://www.cir-safety.org/sites/default/files/plpogu092015final.pdf>
- 7) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 201-788-0.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/13631/7/3/2>
- 8) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-273-8.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14143/7/3/2>
- 9) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-811-1.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/13725/7/3/2>
- 10) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-735-9.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/21618/7/3/2>
- 11) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-291-6.
Available at: <https://echa.europa.eu/ro/registration-dossier/-/registered-dossier/14876/7/3/2>
- 12) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. HA1600000.
- 13) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-158-2.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/12475/7/3/2>
- 14) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. MA2275100.
- 15) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-293-7.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/12560/7/3/2>
- 16) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. MB7600000.
- 17) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-745-3.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/21605/7/3/2>
- 18) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-798-2.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/20720/7/3/2>
- 19) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-522-0.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/11897/7/3/2>
- 20) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. OL5540000.

- 21) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 211-519-9.
Available at: <https://echa.europa.eu/ro/registration-dossier/-/registered-dossier/12220/7/3/2>
- 22) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-562-9.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/19745/7/3/2>
- 23) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-568-1.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/16991/7/3/2>
- 24) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 205-702-2.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/13104/7/3/2>
- 25) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-274-3.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/5558/7/3/2>
- 26) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-774-1.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/16986/7/3/2>
- 27) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-795-6.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/10835/7/3/2>
- 28) U.S. National Library of Medicine, Pubchem.
Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tyrosine#section=Acute-Effects>
- 29) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-773-6.
Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14506/7/3/2>
- 30) 食品安全委員会 (2004) 食品健康影響評価の結果について, 府食第 637 号, 平成 16 年 6 月 10 日. Available at: <https://www.fsc.go.jp/fscii/evaluationDocument/show/kya20040119160>
- 31) U.S. National Library of Medicine, ChemIDplus. Available at:
<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/107-21-1>
- 32) U.S. National Library of Medicine, ChemIDplus. Available at:
<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/107-88-0>
- 33) Cosmetic Ingredient Review (2018) Safety Assessment of alkane diols as used in cosmetics.
Available at: https://www.cir-safety.org/sites/default/files/alkane%20diols_0.pdf
- 34) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 211-074-0. Available at:
<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15109/7/3/235>
- 35) Cosmetic Ingredient Review (2015) Safety Assessment of glycerin as used in cosmetics.
Available at: https://www.cir-safety.org/sites/default/files/glycer_122014_FR.pdf
- 36) Cosmetic Ingredient Review (2010) Final report of the cosmetic ingredient review expert panel, Amended safety assessment of triethylene glycol and polyethylene glycols (PEGs) -4, -6, -7, -8, -9, -10, -12, -14, -16, -18, -20, -32, -33, -40, -45, -55, -60, -75, -80, -90, -100, -135, -150, -180, -200, -220, -240, -350, -400, -450, -500, -800, -2M, -5M, -7M, -9M, -14M, -20M, -23M, -25M, -45M, -65M, -90M, -115M, -160M and -180M and any PEGs ≥ 4 as used in cosmetics.
- 37) Cosmetic Ingredient Review (2012) Final report of the cosmetic ingredient review expert panel

- on the safety assessment of methyl acetate, International Journal of Toxicology, 31 (Supplement 1) 112S-136S.
- 38) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-580-7. Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15549/7/3/2>
 - 39) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. ES5425000.
 - 40) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 203-532-3. Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/13507/7/3/2>
 - 41) U.S. National Library of Medicine, ChemIDplus. Available at: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/107-92-6>
 - 42) 三菱化学テクノロジーリサーチ(2015)平成 27 年度報告毒物劇物指定のための有害性情報の収集・評価 物質名 : ヘキサン酸. Available at: <http://www.nihs.go.jp/law/dokugeki/hyouka/2015/142-62-1.pdf>
 - 43) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 205-550-7. Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14271/7/3/2>
 - 44) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. RH0175000.
 - 45) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 204-677-5. Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15370/7/3/2>
 - 46) U.S. National Library of Medicine, ChemIDplus. Available at: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/124-07-2>
 - 47) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 203-931-2. Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/13098/7/3/2>
 - 48) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 206-376-4. Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/18512/7/3/2>
 - 49) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 205-582-1. Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15262/7/3/2>
 - 50) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-312-9. Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15218/7/3/2>
 - 51) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. PC1400000.
 - 52) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. KQ6300000.
 - 53) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. NT8050000.
 - 54) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. EO1400000.
 - 55) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 200-751-6. Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15322/7/3/2>
 - 56) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. EL5425000.
 - 57) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 204-633-5. Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/13936/7/3/2/>

- 58) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. MQ4025000.
- 59) U.S. National Library of Medicine, ChemIDplus. Available at:
<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/111-27-3>
- 60) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 203-852-3. Available at:
<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/13265/7/3/2>
- 61) U.S. National Library of Medicine, ChemIDplus. Available at:
<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/111-70-6>
- 62) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 203-897-9. Available at:
<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/5921/7/3/2>
- 63) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 203-917-6. Available at:
<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15210/7/3/2>
- 64) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 203-982-0. Available at:
<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15424/7/3/2>
- 65) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 253-149-0. Available at:
<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15942/7/3/2>
- 66) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 203-751-4. Available at:
<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/16077/7/3/2>
- 67) Cosmetic Ingredient Review (2000) Final report, Safety assessment of glyceryl laurate, glyceryl laurate SE, glyceryl laurate/oleate, glyceryl adipate, glyceryl alginate, glyceryl arachidate, glyceryl arachidonate, glyceryl behenate, glyceryl caprate, glyceryl caprylate, glyceryl caprylate/caprate, glyceryl citrate/lactate/linoleate/oleate, glyceryl cocoate, glyceryl collagenate, glyceryl erucate, glyceryl hydrogenated rosinatate, glyceryl hydrogenated soyate, glyceryl hydroxystearate, glyceryl isopalmitate, glyceryl isostearate, glyceryl isostearate/myristate, glyceryl isostearates, glyceryl lanolate, glyceryl linoleate, glyceryl linolenate, glyceryl montanate, glyceryl myristate, glyceryl isotridecanoate/stearate/adipate, glyceryl oleate SE, glyceryl oleate/elaidate, glyceryl palmitate, glyceryl palmitate/stearate, glyceryl palmitoleate, glyceryl pentadecanoate, glyceryl polyacrylate, glyceryl rosinatate, glyceryl sesquioleate, glyceryl/sorbitol oleate/hydroxystearate, glyceryl stearate/acetate, glyceryl stearate/maleate, glyceryl tallowate, glyceryl thiopropionate, and glyceryl undecylenate.
- 68) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. AH5425000.
- 69) Cosmetic Ingredient Review (1984) Final report on the safety assessment of candelilla wax, carnauba wax, Japan wax, and beeswax, *Journal of the American College of Toxicology*, 3 (3) 1-41.
- 70) Cosmetic Ingredient Review (2008) Safety Assessment of *Simmondsia Chinensis* (Jojoba) Seed Oil, *Simmondsia Chinensis* (Jojoba) Seed Wax, Hydrogenated Jojoba Oil, Hydrolyzed Jojoba Esters, Isomerized Jojoba Oil, Jojoba Esters, *Simmondsia Chinensis* (Jojoba) Butter, Jojoba

Alcohol, and Synthetic Jojoba Oil.

- 71) Cosmetic Ingredient Review (1980) Final report of the safety assessment for acetylated lanolin alcohol and related compounds, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology* 4(4), 63-92.
- 72) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 210-647-2. Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/13795/7/3/2>
- 73) Cosmetic Ingredient Review (2018) Amended safety assessment of triglycerides as used in cosmetics.
- 74) U.S. National Library of Medicine, ChemIDplus. Available at: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/109-66-0>
- 75) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. RZ9450000.
- 76) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) No. MN9275000.
- 77) Cosmetic Ingredient Review (2012) Safety assessment of isoparaffins as used in cosmetics, *International Journal of Toxicology*, 31(Supplement 3) 269S-295S.
- 78) Japan Existing Chemical Database, Single dose toxicity test of 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane in rats. Available at: https://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/paper/paper4390-04-9a.html
- 79) Cosmetic Ingredient Review (1982) Final report on the safety assessment of squalane and squalene, *Journal of the American College of Toxicology*, 1 (2) 36-56.
- 80) Cosmetic Ingredient Review (2020) Safety assessment of polyene group as used in cosmetics, *International Journal of Toxicology*, 39 (Supplement 2) 59S-90S.
- 81) U.S. National Library of Medicine, ChemIDplus. Available at: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/63148-62-9>
- 82) European Chemicals Agency, Information on chemicals, EC No. 208-762-8. Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15811/7/3/2>