



試験結果報告書

細胞毒性代替試験

発行日：2020年10月5日

フェースサービス株式会社



1. 試験概要

試験品の急性毒性について、OECD GDNo.129 法に準拠した細胞毒性試験を実施した。評価の原理は、BALB/c 3T3 cells, clone 31 に対する試料の細胞毒性を指標としている。すなわち、細胞毒性は、試料試験時に同時に試験した SDS (Sodium dodecyl sulfate) に対する細胞毒性との相対比較により判定するとともに IC₅₀ 値から、急性毒性の指標である LD₅₀ 値を換算算出する方法である。

2. 試験依頼者

名称：株式会社ケーツ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

3. 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

4. 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
試験担当者：竹田 竜嗣

5. 試験サンプル名

- 1) 被験物質
HuFuferme (フフファーム)
- 2) 陽性対照
Sodium dodecyl sulfate (SDS) Sigma 社製 Lot No. WEL8881

6. 試験実施日

2020年9月8日～2020年9月29日

7. LD₅₀ 値換算式

下記の ICCVAM の換算式から LD₅₀ 値を算出した。

$$\log LD_{50} (\text{mg/kg}) = 0.372 \log IC_{50} (\mu\text{g/mL}) + 2.024 \text{ (ICCVAM, 2006a)}$$

※LD50 値のおおむねの目安

一般的な安全性試験の基準としては、マウスやラットを用いた急性毒性試験で LD₅₀ 値が 2000mg/kg 以上であれば概ね安全性に問題は無いと判断される。

8. 試験の概要

試験は、溶媒溶解テストの後、予備試験を実施し、本試験を実施した。
溶媒溶解テストの結果、20mg/ml を最高濃度として公比 1:10 で予備試験を実施した。

9. 予備試験の方法

- ①2.0-3.0×10³cells/well になるように、96 穴マイクロプレートに細胞を播種し、24 時間前培養した。
- ②前培養後、試験品 (10、1、0.1、0.01、0.001mg/ml) ,コントロール(培地のみ)を添加し、48 時間培養した。
- ③培養終了後、NR を含む培地に交換し、3 時間培養した。
- ④3 時間培養後、NR を含む培地を取り除き、PBS にて洗浄後、NR 抽出液を加え、マイクロプレートを 20-45 分振とう抽出する。
- ⑤540nm にて ABS を測定し、コントロールを 100 として、細胞毒性を IC₅₀ にて求めた。

10. 本試験の方法

予備試験によって、観察された IC₅₀ 値付近について、公比 2 にて 7 濃度の細胞毒性試験を実施した。試験方法は、予備試験の方法と同様で、試験物質に陽性対照である SDS を合わせて実施した。

11. 結果

下記の表 1, 2 に示したように被験物質の IC₅₀ は 1663.0μg/ml であった。

また、SDS の IC₅₀ 値は、42.2±3.4μg/ml であり、基準値範囲内であり、試験は成立した。
得られた IC₅₀ 値から LD₅₀ 値を算出すると下記の値となった。

$$\log LD_{50} (\text{mg/kg}) = 0.372 \log IC_{50} (\mu\text{g/mL}) + 2.024 = 3.402174$$

$$LD_{50} (\text{mg/kg}) = 2524.5$$

以上より、試験品の LD₅₀ 値は **2524.5mg/kg** であった。

本結果から、試験品の細胞毒性は無いと考えられる。

表1. 被験物質の細胞生存率 (Range Finder Test)

	濃度 (mg/mL)	濃度 (µg/mL)	生存率		
			%	SD	IC ₅₀ (µg/ml)
Control	0	0	100.0	1.45	
	0.00001	0.01	94.9	1.58	
	0.0001	0.10	91.2	0.66	
	0.001	1	87.5	4.06	
	0.01	10	86.9	2.15	1mg/ml以上
HuFuferme (フフファーム)	0.10	100	83.2	3.32	
	1.00	1000	52.6	1.36	
	10.00	10000	2.2	1.16	
	100.00	100000	1.6	0.53	

表2. 被験物質の細胞生存率 (Main Test)

	濃度 (µg/mL)	%	生存率		
			SD	IC ₅₀ (µg/ml)	LD ₅₀ (mg/kg)
Control	0	100.00	1.34	-	
	123.7	84.45	1.52		
	220.1	75.18	1.39		
	391.8	72.33	2.36		
HuFuferme (フフファーム)	697.4	59.56	3.28	1663.0	2524.5
	1241.4	47.83	3.63		
	2209.6	15.55	0.70		
	3933.2	1.30	0.67		

12. 結論

試験品である HuFuferme (フフファーム) の細胞毒性代替法試験を実施した。その結果、試験品の BALB/c 3T3 cells, clone 31 に対する IC₅₀ 値は 1663.0µg/ml であり、LD₅₀ 値に換算すると 2524.5mg/kg であった。この結果から一般的に安全性が高いとされる LD₅₀ 値の 2000mg/kg を上回っており試験品に対する細胞毒性は無いと考えられる。

以上

上記報告書に相違ありません。

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 

試験報告書確認・提出者 フェースサーベイ株式会社 美野田一代 