

Japan  
Food  
Research  
Laboratories

## 試験報告書

第 107024587-005号

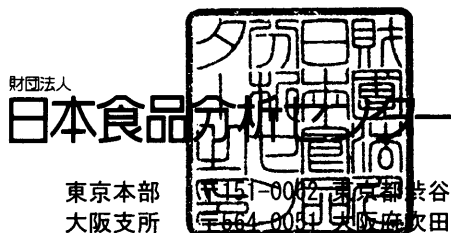
2007年(平成19年)05月15日

依頼者 株式会社 アメニティーズフォーユー

検体 MRA500-01-02

表題 モルモットを用いたMaximization法による皮膚感作性試験

2007年(平成19年)02月26日当センターに提出された  
上記検体について試験した結果は次のとおりです。



東京本部 〒151-0042 東京都渋谷区元代々木町52番1号  
大阪支所 〒564-0051 大阪府茨田市豊津町3番1号  
名古屋支所 〒460-0011 名古屋市中区大須4丁目5番13号  
九州支所 〒812-0034 福岡市博多区下呉服町1番12号  
多摩研究所 〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号  
千歳研究所 〒066-0052 北海道千歳市文京2丁目3番  
彩都研究所 〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目4番41号

## モルモットを用いたMaximization法 による皮膚感作性試験

依頼者

株式会社 アメニティーズフォーユー

検 体

MRA500-01・02

試験実施期間

平成19年03月12日～平成19年05月15日

試験実施場所

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所  
東京都多摩市永山6丁目11番10号

試験責任者

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所  
安全性試験部 安全性試験課  
嶋崎 智子

試験実施者

永井 武 , 川本 康晴 , 小澤 美来 , 鈴木 美そら

## 要 約

MRA500-01・02を検体として、Maximization法によりモルモットにおける皮膚感作性を調べた。

感作誘導処置として、試験動物10匹に検体の5 w/v%オリーブ油懸濁液を皮内注射し、その翌週に検体の10 %ワセリン混合物を48時間閉鎖適用した。この試験動物に対して、検体の5及び0.5 %ワセリン混合物を用いて閉鎖適用による感作誘発を行った。その結果、検体の5 %ワセリン混合物適用部位では陽性率が20 % (適用後48及び72時間の最高値)となり、その時の平均評価点は0.2であった。検体の0.5 %ワセリン混合物適用部位では皮膚反応は見られなかった(陽性率：0 %，平均合計評点：0)。

一方、陰性対照群(検体で感作誘導していない動物)においても、検体の5 %ワセリン混合物適用部位で紅斑が見られたが、0.5 %の適用部位では皮膚反応は見られなかった。試験群及び陰性対照群において検体の5 %ワセリン混合物適用部位で見られた皮膚反応は、程度及び陽性率ともに試験群及び陰性対照群で同程度だった。このことから、試験群及び陰性対照群で見られた皮膚反応は、いずれもFCA処置によって皮膚一次刺激反応の閾値が低下したことに起因する一次刺激反応(false positive response)と考えられた。

以上のことから、検体は本試験条件下では感作性を有さないものと結論された。

## 1 試験目的

検体について、Maximization法によりモルモットにおける皮膚感作性を調べる。

## 2 検 体

MRA500-01-02

性状：オフホワイト粉末

## 3 試験動物

5週齢のHartley系雌モルモットを日本エスエルシー株式会社から購入し、約1週間予備飼育を行って一般状態に異常のないことを確認した後、皮膚に異常の認められない動物を予備試験に6匹、本試験に20匹使用した。試験動物はFRP製ケージに各5匹収容し、室温22℃±2℃、照明時間12時間/日に設定した飼育室において飼育した。飼料はモルモット用固型飼料[ラボGスタンダード、日本農産工業株式会社]を給与し、飲料水は水道水を自由摂取させた。

## 4 予備試験

### 1) 試験方法

#### ① 皮内注射による感作誘導に用いる試験液濃度の確認(予備試験1)

検体の10, 5, 2.5, 1, 0.5及び0.1 w/v%オリブ油懸濁液を、あらかじめ側腹部を剪毛及び剃毛したモルモット2匹に、1匹当たり1箇所、各濃度0.1 mLずつ皮内注射した。注射後24, 48及び72時間並びに7日に観察を行い、局所に潰瘍などの組織のはく離、脱落が見られない最高濃度を皮内注射による感作誘導に用いることとした。

#### ② 閉鎖適用による感作誘導に用いる試験液濃度の確認(予備試験2)

検体の10, 5及び2.5 %ワセリン混合物を各濃度0.1 mLずつ2 cm×2 cmのろ紙に塗布し、あらかじめ側腹部を剪毛及び剃毛したモルモット2匹に閉鎖適用した。適用後24時間に適用部位を70 %エタノールで清拭した。適用後48及び72時間に観察を行い、局所に高度な皮膚反応が認められない最高濃度を閉鎖適用による感作誘導に用いることとした。

#### ③ 閉鎖適用による感作誘発に用いる試験液濃度の確認(予備試験3)

モルモット2匹にE-FCA\*を皮内注射した。注射後21日に検体の10, 5及び2.5 %ワセリン混合物を各濃度0.1 mLずつ2 cm×2 cmのろ紙に塗布し、あらかじめ剪毛及び剃毛した側腹部に閉鎖適用した。適用後24時間に適用部位を70 %エタノールで清拭した。適用後48及び72時間に観察を行い、局所に皮膚反応が認められない最高濃度を上限濃度として用いることとした。

## 2) 試験結果

予備試験1においては、10 w/v%の注射部位で組織の脱落、2.5 w/v%以上の注射部位で痂皮形成、0.5 w/v%以上の注射部位で壊死、0.1及び0.5 w/v%の注射部位で紅斑、加えてすべての濃度の注射部位で硬結が見られた。10 w/v%の注射部位において組織の脱落が見られたが、5 w/v%以下の注射部位において潰瘍などの組織のはく離、脱落は認められなかったことから、皮内注射による感作誘導には検体の5 w/v%オリーブ油懸濁液を用いることとした。

予備試験2においては、いずれの濃度においても皮膚反応は認められなかった。このことから、閉鎖適用による感作誘導には検体の10 %ワセリン混合物を用いることとした。

予備試験3においては、10 %ワセリン混合物適用部位で紅斑が見られたが、5及び2.5 %ワセリン混合物適用部位では皮膚反応は認められなかった。このことから、閉鎖適用による感作誘発には5 %を上限濃度として用いることとした。

- \* フロイントの完全アジュバント (FCA ; 流動パラフィン, 界面活性剤及び結核死菌からなる。) [Difco Laboratories] と生理食塩液の1:1油中水型 (W/O) 乳化物。FCA処置により、皮膚一次刺激反応の閾値が低下するために、無処置動物では刺激性を示さない濃度であってもFCA処置動物では刺激反応が認められることがある (false positive response)。したがって、感作誘発の予備試験はFCA処置動物を用いて行うことが望ましい。

## 5 本試験

### 1) 群構成

試験群には10匹、陰性対照群及び陽性対照群 (既知感作性物質処置群) にはそれぞれ5匹の試験動物を使用した。試験開始時の体重範囲は359~400 gであった。

### 2) 試験方法

#### ① 感作誘導1 (皮内注射)

試験群、陰性対照群及び陽性対照群それぞれについて、試験動物の体重を測定した後、肩甲骨上を電気バリカンで剪毛した。図-1に示したように、左右各1箇所、

試験群においては、

A : E-FCA

B : 検体のオリーブ油懸濁液 (5 w/v%)

C : 検体のFCA懸濁液 (10 w/v%) に等量の生理食塩液を加えて乳化させたもの

陰性対照群においては、

A : E-FCA

B : オリーブ油

C : E-FCA

陽性対照群においては、

A : E-FCA

B : DNCB<sup>\*1</sup>のオリブ油溶液(0.1 w/v%)

C : DNCBのFCA溶液(0.2 w/v%)に等量の生理食塩液を加えて乳化させたもの

をそれぞれ0.1 mLずつ皮内注射した。

② 感作誘導2(48時間閉鎖適用)

皮内注射開始後1週間に注射部位を剪毛及び剃毛し、ラウリル硫酸ナトリウム(ワセリン中10%)を適用した。

ラウリル硫酸ナトリウム適用後24時間に適用部位を70%エタノールで清拭し、試験群では検体の10%ワセリン混合物、陰性対照群ではワセリン、陽性対照群ではDNCBの0.1%ワセリン混合物をそれぞれ0.2 mLずつ2 cm×4 cmのろ紙に塗布し、試験動物の皮内注射部位に48時間閉鎖適用した。適用後48時間に適用部位を70%エタノールで清拭した。

③ 感作誘発及びその観察・判定法

感作誘導2終了後2週間に感作誘発処理を行った。

試験群では検体の5及び0.5%ワセリン混合物、陰性対照群ではワセリン、また、陽性対照群ではDNCBの0.1%ワセリン混合物をそれぞれ0.1 mLずつ2 cm×2 cmのろ紙に塗布し、あらかじめ剪毛及び剃毛した側腹部に閉鎖適用した。

なお、陰性対照群には試験群と同様に検体の5及び0.5%ワセリン混合物を適用した<sup>\*2</sup>。適用開始を0時間として、24時間後に適用部位を70%エタノールで清拭した。適用後48及び72時間に適用部位を肉眼的に観察し、Draize法の基準(表-1)に従って皮膚反応の採点を行い、その平均値を算出した(平均評価点)。また、各観察時間における陽性率[% : (陽性動物数/1群の動物数)×100]を求めた。

試験終了時に試験動物の体重を測定した。

\*1 2,4-dinitrochlorobenzene [和光純薬工業株式会社]

\*2 false positive response確認のため、陰性対照群においても試験群と同じ誘発物質の曝露が必要である。

### 3) 試験結果(表-2~7)

試験群では、5 %ワセリン混合物適用部位において、適用後48時間に紅斑(点数1)が見られた。陽性率は適用後48及び72時間で20及び0 %であった(平均評価点：0.2及び0)。また、0.5 %ワセリン混合物適用部位では皮膚反応は観察されず、陽性率は適用後48及び72時間でいずれも0 %であった(平均評価点：いずれも0)。

陰性対照群では、適用後48及び72時間の各観察時間において、ワセリン適用部位に皮膚反応は観察されず、陽性率は適用後48及び72時間でいずれも0 %であった(平均評価点：いずれも0)。また、検体の5 %ワセリン混合物適用部位において、適用後48時間に紅斑(点数1)が見られた。陽性率は適用後48及び72時間で20及び0 %であった(平均評価点：0.2及び0)。0.5 %ワセリン混合物適用部位では皮膚反応は観察されず、陽性率は適用後48及び72時間でいずれも0 %であった(平均評価点：いずれも0)。

一方、陽性対照群では、適用後48及び72時間に痂皮形成(点数4)が見られた。陽性率は適用後48及び72時間でいずれも100 %であった(平均評価点：いずれも4.0)。

なお、すべての群において試験期間中の体重変化及び一般状態に異常は見られなかった。

### 4) 考察及び結論

感作誘導処置として、試験動物10匹に検体の5 w/v%オリブ油懸濁液を皮内注射し、その翌週に検体の10 %ワセリン混合物を48時間閉鎖適用した。この試験動物に対して、検体の5及び0.5 %ワセリン混合物を用いて閉鎖適用による感作誘発を行った。その結果、検体の5 %ワセリン混合物適用部位では陽性率が20 % (適用後48及び72時間の最高値)となり、その時の平均評価点は0.2であった。検体の0.5 %ワセリン混合物適用部位では皮膚反応は見られなかった(陽性率：0 %，平均合計評点：0)。

一方、陰性対照群においても、検体の5 %ワセリン混合物適用部位で紅斑が見られたが、0.5 %の適用部位では皮膚反応は見られなかった。試験群及び陰性対照群において検体の5 %ワセリン混合物適用部位で見られた皮膚反応は、程度及び陽性率ともに試験群及び陰性対照群で同程度だった。このことから、試験群及び陰性対照群で見られた皮膚反応は、いずれもFCA処置によって皮膚一次刺激反応の閾値が低下したことに起因する一次刺激反応(false positive response)と考えられた。

以上のことから、検体は本試験条件下では感作性を有さないものと結論された。

## 6 参考文献

- ・ 佐藤悦久, 勝村芳雄, 市川秀之, 小林敏明 : 皮膚, 23, 461-467(1981).
- ・ Sato, Y., Katsumura, Y., Ichikawa, H., Kobayashi, T., Kozuka, T., Morikawa, F. and Ohta, S. : Contact Dermatitis, 7, 225-237(1981).
- ・ Magnusson, B. and Kligman, A.M. : J. Invest. Dermatol., 52, 268-276(1969).
- ・ Magnusson, B. : Contact Dermatitis, 6, 46-50(1980).
- ・ 佐藤ら編 : “医・歯科用バイオマテリアルの安全性評価法”, 93-96(1987)サイエンスフォーラム.
- ・ “Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics” (1959) The Association of Food and Drug Officials of the United States.

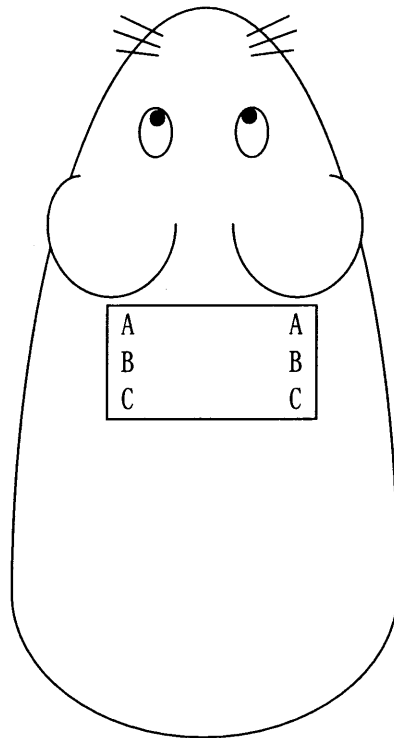


図-1 皮内注射及び閉鎖適用による感作誘導部位

A, B及びCは皮内注射部位,  は適用部位(2 cm×4 cm)を示す。



表-1 皮膚反応の評価

紅斑及び痂皮の形成

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| 紅斑なし                    | 0      |
| 非常に軽度な紅斑(かろうじて識別できる)    | 1      |
| はっきりした紅斑                | 2      |
| 中等度ないし高度紅斑              | 3      |
| 高度紅斑からわずかな痂皮の形成(深部損傷まで) | 4*     |
|                         | [最高点4] |

\* 出血、潰瘍及び壊死は深部損傷として点数4に分類した。

浮腫の形成

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| 浮腫なし                        | 0      |
| 非常に軽度な浮腫(かろうじて識別できる)        | 1      |
| 軽度浮腫(はっきりした膨隆による明確な縁が識別できる) | 2      |
| 中等度浮腫(約1 mmの膨隆)             | 3      |
| 高度浮腫(1 mm以上の膨隆と曝露範囲を超えた広がり) | 4      |
|                             | [最高点4] |

[紅斑・痂皮及び浮腫の合計点数の最高点8]

$$\text{平均評価点} = \frac{\Sigma(\text{紅斑} \cdot \text{痂皮} + \text{浮腫})}{1 \text{群当たりの動物数}}$$

表-2 感作誘発結果の総括

| 群     | 1群の動物数 | 適用濃度 (%)          | 観察時間 (時間) | 陽性率 (%) | 平均評価点 |
|-------|--------|-------------------|-----------|---------|-------|
| 試験群   | 10     | 5                 | 48        | 20      | 0.2   |
|       |        |                   | 72        | 0       | 0     |
|       |        | 0.5               | 48        | 0       | 0     |
|       |        |                   | 72        | 0       | 0     |
| 陰性対照群 | 5      | 0 <sup>*1</sup>   | 48        | 0       | 0     |
|       |        |                   | 72        | 0       | 0     |
|       |        | 5 <sup>*2</sup>   | 48        | 20      | 0.2   |
|       |        |                   | 72        | 0       | 0     |
|       |        | 0.5 <sup>*2</sup> | 48        | 0       | 0     |
|       |        |                   | 72        | 0       | 0     |
| 陽性対照群 | 5      | 0.1 <sup>*3</sup> | 48        | 100     | 4.0   |
|       |        |                   | 72        | 100     | 4.0   |

\*1 基材として用いたワセリンを適用した。

\*2 false positive response確認結果(検体適用濃度)

\*3 DNCBのワセリン混合物

表-3 試験群の感作誘発結果

| 適用濃度 (%) | 観察 <sup>*1</sup> 時間 | 個々の動物の採点値(紅斑・痂皮/浮腫) |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 陽性率 (%) | 平均評価点 |
|----------|---------------------|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-------|
|          |                     | 1 <sup>*2</sup>     | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  |         |       |
| 5        | 48                  | 1/0                 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 1/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 20      | 0.2   |
|          | 72                  | 0/0                 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0       | 0     |
| 0.5      | 48                  | 0/0                 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0       | 0     |
|          | 72                  | 0/0                 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0       | 0     |

\*1 単位：時間

\*2 動物番号

表-4 陰性対照群の感作誘発結果

| 適用物質 | 観察 <sup>*1</sup> 時間 | 個々の動物の採点値(紅斑・痂皮/浮腫) |     |     |     |     | 陽性率 (%) | 平均評価点 |
|------|---------------------|---------------------|-----|-----|-----|-----|---------|-------|
|      |                     | 1 <sup>*2</sup>     | 2   | 3   | 4   | 5   |         |       |
| ワセリン | 48                  | 0/0                 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0       | 0     |
|      | 72                  | 0/0                 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0       | 0     |

\*1 単位：時間

\*2 動物番号

表-5 陰性対照群における検体適用結果(false positive response確認結果)

| 適用濃度<br>(%) | 観察 <sup>*1</sup><br>時間 | 個々の動物の採点値(紅斑・痂皮/浮腫) |     |     |     |     | 陽性率<br>(%) | 平均<br>評価点 |
|-------------|------------------------|---------------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----------|
|             |                        | 1 <sup>*2</sup>     | 2   | 3   | 4   | 5   |            |           |
| 5           | 48                     | 0/0                 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 1/0 | 20         | 0.2       |
|             | 72                     | 0/0                 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0          | 0         |
| 0.5         | 48                     | 0/0                 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0          | 0         |
|             | 72                     | 0/0                 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0          | 0         |

\*1 単位：時間

\*2 動物番号

表-6 陽性対照群の感作誘発結果

| 適用物質                        | 観察 <sup>*1</sup><br>時間 | 個々の動物の採点値(紅斑・痂皮/浮腫) |     |     |     |     | 陽性率<br>(%) | 平均<br>評価点 |
|-----------------------------|------------------------|---------------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----------|
|                             |                        | 1 <sup>*2</sup>     | 2   | 3   | 4   | 5   |            |           |
| 0.1 %<br>DNCB <sup>*3</sup> | 48                     | 4/0                 | 4/0 | 4/0 | 4/0 | 4/0 | 100        | 4.0       |
|                             | 72                     | 4/0                 | 4/0 | 4/0 | 4/0 | 4/0 | 100        | 4.0       |

\*1 単位：時間

\*2 動物番号

\*3 ワセリン混合物

表-7 体重変化

| 群     | 動物番号 | 試験開始時<br>(g) | 試験終了時<br>(g) |
|-------|------|--------------|--------------|
| 試験群   | 1    | 390          | 452          |
|       | 2    | 377          | 465          |
|       | 3    | 362          | 424          |
|       | 4    | 392          | 469          |
|       | 5    | 386          | 481          |
|       | 6    | 364          | 438          |
|       | 7    | 393          | 487          |
|       | 8    | 373          | 443          |
|       | 9    | 388          | 467          |
|       | 10   | 372          | 417          |
| 陰性対照群 | 1    | 359          | 432          |
|       | 2    | 380          | 430          |
|       | 3    | 383          | 430          |
|       | 4    | 383          | 423          |
|       | 5    | 379          | 454          |
| 陽性対照群 | 1    | 384          | 411          |
|       | 2    | 400          | 431          |
|       | 3    | 367          | 411          |
|       | 4    | 385          | 413          |
|       | 5    | 397          | 422          |

以 上