

Japan
Food
Research
Laboratories

試験報告書

299080377-006 号

依頼者 アサヒブリテック株式会社

検体 アクアプロ21Rによる生成水

試験項目 モルモットを用いたMaximization法による皮膚感作性試験

平成 11 年 08 月 19 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。

平成 11 年 11 月 09 日

財団法人

日本食品分析センター

東京本部 〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
大阪支所 〒565-0051 大阪府吹田市豊津町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

モルモットを用いたMaximization法 による皮膚感作性試験

要 約

アクアプロ21Rによる生成水を検体として、Maximization法によりモルモットを用いて皮膚感作性試験を行った。

感作誘導処置として、試験動物10匹に検体を皮内注射し、その翌週に48時間閉鎖貼付した。この試験動物に対して、検体を用いて感作誘発を行った結果、誘発後48及び72時間の各観察時間において試験動物に皮膚反応は観察されなかった。このことから、検体はモルモットにおいて皮膚感作性を有さないものと結論された。

依 頼 者

アサヒプリテック株式会社

検 体

アクアプロ21Rによる生成水

試験実施期間

平成11年8月17日～平成11年11月9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

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

アクアプロ21Rによる生成水

備考：検体は、依頼者により設置されたアクアプロ21Rを用いて試験実施場所において調製した(設置日：平成11年8月20日)。また、対照として原水(水道水)を用いた。

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2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25匹使用した。試験動物はFRP製ケージに各5匹収容し、室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、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 試験液の調製及び有効塩素濃度の測定

検体及び原水(水道水)は適用前に採取し、検体についてはよう素滴定法により、有効塩素濃度を測定した。

5 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検体の刺激性の確認(予備試験1)

検体をあらかじめ体幹背部を剪毛したモルモット2匹に、1匹当たり1箇所、0.1 mLずつ皮内注射した。注射後24、48及び72時間に観察を行い、局所に出血、潰瘍及び壊死が認められないことを確認し、皮内注射による感作誘導に用いることとした。

② 貼付による感作誘導に用いる検体の刺激性の確認(予備試験2)

2 cm×2 cmのろ紙に検体を0.1 mL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匹に閉鎖貼付した。貼付後24時間に貼付部位を70 %エタノールで清拭した。貼付後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ことを確認した。

③ 貼付による感作誘発に用いる検体の刺激性の確認(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14日に側腹部を剪毛及び剃毛し、2 cm×2 cmのろ紙に検体0.1 mLを塗布したものを閉鎖貼付した。貼付後24時間に貼付部位を70 %エタノールで清拭した。貼付後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ことを確認した。

2) 試験結果

予備試験1においては、いずれの注射部位にも紅斑が認められたが、出血、潰瘍及び壊死は認められなかったため、皮内注射には検体を用いることとした。

予備試験2においては、いずれの貼付部位においても皮膚反応は認められなかったため、貼付による感作誘導には検体を用いることとした。

予備試験3においては、いずれの貼付部位においても皮膚反応は認められなかったため、貼付による感作誘発には検体を用いることとした。

* 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。

6 本試験

1) 群構成

試験群及び陰性対照群はそれぞれ10匹、陽性対照群(既知感作性物質処置群)には5匹の試験動物を使用した。試験開始時の体重範囲は372~399 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

C : 検体に等量のFCA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 : 原水

C : 原水に等量のFCAを加えて乳化させたもの

陽性対照群においては、

A : E-FCA

B : DNCB^{*1}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時間閉鎖貼付)

皮内注射後1週間に注射部位を再度剪毛し、ラウリル硫酸ナトリウム(ワセリン中10%)を塗布した。

塗布後24時間に塗布部位を70%エタノールで清拭し、試験群では検体、陰性対照群では原水、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時間閉鎖貼付した。

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、陰性対照群では原水、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貼付した。

なお、陰性対照群には試験群と同様に検体を貼付した^{*2}。

貼付(誘発)開始を0時間として、24時間後に貼付部位を70%エタノールで清拭した。誘発後48及び72時間に貼付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。

3) 試験結果及び結論

① 有効塩素濃度

結果を表-2に示した。

② 皮膚反応(表-3~8)

試験群では、誘発後48及び72時間の各観察時間において、いずれの貼付部位にも皮膚反応は観察されず、陽性率は誘発後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、誘発後48及び72時間の各観察時間において、原水貼付部位に皮膚反応は観察されず、陽性率は誘発後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、検体貼付部位においても皮膚反応は見られず、陽性率は誘発後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、誘発後48時間には壊死及び痂皮形成(ともに点数4)並びに浮腫(点数1)、72時間には痂皮形成が見られた。陽性率は誘発後48及び72時間でいずれも100%であった(平均評価点:4.4及び4.0)。

なお、すべての群において試験期間中の体重変化に異常は見られなかった。

以上のことから、検体はモルモットにおいて皮膚感作性を有さないものと結論された。

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

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

7 参考文献

- 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.
- 厚生省薬務局審査第一課監修：“医薬品毒性試験ガイドライン1990解説”，60-64 (1990)薬事日報社.
- 厚生省薬務局医療機器開発課監修：“医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン1995解説”，47-64 (1996)薬事日報社.
- “Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics” (1959) The Association of Food and Drug Officials of The United States.

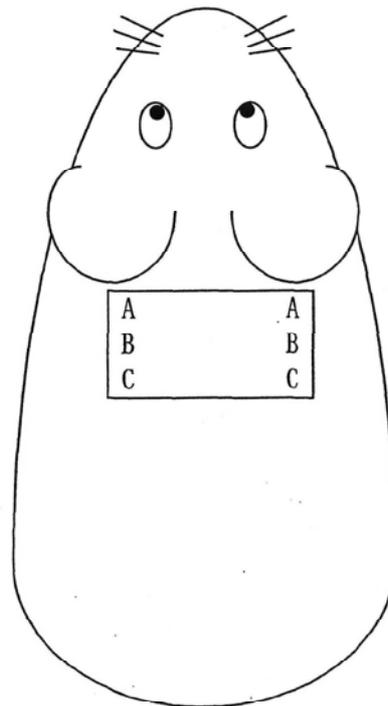


図-1 皮内注射及び貼付による感作誘導部位

A, B及びCは皮内注射部位， は貼付部位(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 検体の有効塩素濃度

使用目的		有効塩素濃度 (mg/L)
予備試験		24
感作誘導	皮内注射	43
	閉鎖貼付	28
感作誘発		30

表-3 感作誘発結果の総括

群	1群の動物数	誘発試料	観察時間 (時間)	陽性率 (%)	平均評価点
試験群	10	検 体	48	0	0
			72	0	0
陰性対照群	10	原 水	48	0	0
			72	0	0
		検 体*	48	0	0
			72	0	0
陽性対照群	5	0.1 %DNCB	48	100	4.4
			72	100	4.0

* false positive response確認結果

表-4 試験群の感作誘発結果

誘発試料	観察 ^{*1} 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 ^{*2}	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
検 体	48	0/0	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	0	0

*1 単位：時間

*2 動物番号

表-5 陰性対照群の感作誘発結果

誘発試料	観察 ^{*1} 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 ^{*2}	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
原 水	48	0/0	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	0	0

*1 単位：時間

*2 動物番号

表-6 陰性対照群における検体適用結果(false positive response確認結果)

適用試料	観察 ^{*1} 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 ^{*2}	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
検 体	48	0/0	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	0	0

*1 単位：時間

*2 動物番号

表-7 陽性対照群の感作誘発結果

誘発試料	観察 ^{*1} 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 ^{*2}	2	3	4	5		
0.1 % DNCB	48	4/0	4/0	4/0	4/1	4/1	100	4.4
	72	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	100	4.0

*1 単位：時間

*2 動物番号

表-8 体重変化

群	動物番号	試験開始時 (g)	試験終了時 (g)
試験群	1	391	473
	2	386	506
	3	373	436
	4	377	479
	5	373	433
	6	390	419
	7	394	499
	8	379	422
	9	398	408
	10	390	453
陰性対照群	1	389	449
	2	394	470
	3	386	474
	4	382	445
	5	372	428
	6	377	444
	7	388	424
	8	373	429
	9	379	408
	10	399	454
陽性対照群	1	382	449
	2	378	426
	3	389	422
	4	382	417
	5	398	467

以 上