

中性電解水「AP水」

Neutral Electrolysed Water 「AP water」

【基礎データ集】

■ 項目

- 1) 抗ネコカリシウイルス活性および抗ヒトロタウイルス活性
(試験機関：鳥取大学 獣医感染症学)
- 2) H I V - 1 不活化試験 (試験機関：名古屋大学大学院 医学研究科)
- 3) ウィルス不活化試験 (試験機関：財団法人 日本食品分析センター)
 - ・インフルエンザウイルス
 - ・単純ヘルペスウイルス
 - ・アデノウイルス
 - ・ポリオウイルス
- 4) 微生物の消長 (試験機関：財団法人 日本食品分析センター)
 - ・枯草菌 (芽胞)
 - ・大腸菌／大腸菌 (O 1 5 7 : H 7)
 - ・緑膿菌
 - ・サルモネラ
 - ・黄色ブドウ球菌
 - ・M R S A
 - ・化膿連鎖球菌
 - ・腸炎ビブリオ
 - ・黒こうじカビ
 - ・カンジダ
- 5) マウスを用いた急性経口毒性試験 (試験機関：財団法人 日本食品分析センター)
- 6) ウサギを用いた眼刺激性試験 (試験機関：財団法人 日本食品分析センター)
- 7) 細菌を用いる復帰突然変異試験 (試験機関：財団法人 日本食品分析センター)
- 8) 培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験 (試験機関：財団法人 日本食品分析センター)
- 9) モルモットを用いたMaximization法による皮膚感作性試験
(試験機関：財団法人日本食品分析センター)
- 10) ウサギを用いた累積皮膚刺激性試験 (試験機関：財団法人 日本食品分析センター)

APアクアKSより生成された電解水の抗ネコカリシウイルス活性
および抗ヒトロタウイルス活性

平成19年10月24日
鳥取大学農学部
獣医感染症学
實方 剛

1. 供試品：

アサヒプリテック株式会社製APアクアKSにより生成された電解水
(pH7.5, 遊離塩素濃度: 30ppm)

2. 試験実施年月日

平成19年4月16日～平成19年8月10日

3. 試験目的

供試品の抗ネコカリシウイルスおよび抗ヒトロタウイルス活性の検討

4. 材料および方法

1) 供試品

2007年7月10日および27日に生成後、試験に供するまで室温に保存した。試験には原液、滅菌蒸留水を用いて10倍および100倍に希釀したもの用いた。

2) ネコカリシウイルス (FCV F4株)

CRFK細胞で培養した3,000mlのウイルス培養液を20%Sucrose cushion法で濃縮・精製をおこなった後、沈渣に2mlの蒸留水を加えてウイルス浮遊液を調整した。ウイルス浮遊液を0.45μmのメンブランフィルターで濾過滅菌し、使用時まで-80°Cに凍結保存した。

3) ヒトロタウイルス (Wa株)

MA-104細胞で培養した3,000mlのウイルス培養液を20%Sucrose cushion法で濃縮・精製をおこなった後、沈渣に2mlの蒸留水を加えてウイルス浮遊液を調整した。ウイルス浮遊液を0.45μmのメンブランフィルターで濾過滅菌し、使用時まで-80°Cに凍結保存した。

5. 供試品とのウイルス感作

各濃度の供試品270μlと各ウイルス懸濁液30μlを混和後、15、30、60、120、180および240秒後に感作ウイルス液の30μlを採取し、270μlの10%FCS添加イーグルMEMを用いて10倍希釀列を調整した。ウイルス対照は供試品の代わりに蒸留水を用いて試験を行った。

6. ウィルスの感染価 (TCID₅₀) の測定

1) ネコカリシウイルス

96wellのマイクロプレートにCRFK細胞(50 μ l/well)を培養した後、感作したウイルス液を接種(50 μ l/well, 4 well/dilution($10^1\sim 10^8$)し、37°CのCO₂孵卵器で4日間培養を行い、CPEの観察を行った。TCID₅₀はKerberの公式から算出した。

$$\log \text{TCID}_{50} = -L - d(S - 0.5)$$

L=最少累积倍数

d=累积倍数

S=各希釈倍数における CPE 陽性率

2) ヒトロタウイルス

96wellのマイクロプレートにMA-104細胞(50 μ l/well)を培養した後、感作したウイルス液を接種(50 μ l/well、4well/dilution(10¹～10⁸)し、60分間ウイルスの吸着を行った後、MEMで洗浄し、さらにイーグルMEMを加え、37°Cの5%炭酸ガス培養器で24時間培養した。培養後、抗ロタウイルスWa株モルモット免疫血清およびFITC標識抗モルモットIgG免疫血清を用いた蛍光抗体法によりロタウイルスの感染細胞の観察を行った。TCID₅₀はKerberの公式から算出した。

7. 結果

供試品の抗ネコカリシウイルス活性および抗ヒトロタウイルス活性を検討した結果、以下の成績を得た。

1) 供試品の抗ネコカリシウイルス活性

ネコカリシウイルスに原液を15秒間感作させた場合、ウイルス感染価は $\text{Log}_{10}^{6.75}$ から $\text{Log}_{10}^{2.5}$ に、また120秒間の感作では $\text{Log}_{10}^{0.5}$ に低下した。供試品を10倍希釈した場合には60秒間および180秒間の感作により、ウイルス感染価はそれぞれ $\text{Log}_{10}^{2.75}$ および $\text{Log}_{10}^{1.25}$ に低下した(表1)。

2) 供試品の抗ヒトロタウイルス活性

ヒトロタウイルスに原液を 15 秒間感作させた場合、ウイルス感染価は $\text{Log}_{10}^{5.0}$ から $10^{0.6}$ 以下に低下した。供試品を 10 倍希釈した場合には 15 秒間および 180 秒間の感作により感染価はそれぞれ $\text{Log}_{10}^{3.0}$ および $\text{Log}_{10}^{1.5}$ に低下した。(表 2)。

表1. 電解水の抗ネコカリシウイルス活性 (Log TCID₅₀/50ul)

電解水	感作時間(秒)						
	0	15	30	60	120	180	240
原液	$10^{6.75}$	$10^{2.5}$	$10^{2.5}$	$10^{1.25}$	$10^{0.5}$	$10^{0.5}$	$10^{0.5}$
10倍希釈	$10^{6.76}$	$10^{6.0}$	$10^{4.76}$	$10^{2.76}$	$10^{2.0}$	$10^{1.25}$	$10^{1.25}$
100倍希釈	$10^{6.75}$	$10^{5.25}$	$10^{6.25}$	$10^{5.25}$	$10^{5.5}$	$10^{5.5}$	$10^{5.5}$

表2. 電解水の抗ヒトロタウイルス活性 (Log TCID₅₀/50ul)



NAGOYA UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE
DEPARTMENT OF INTERNATIONAL HEALTH

試験報告書

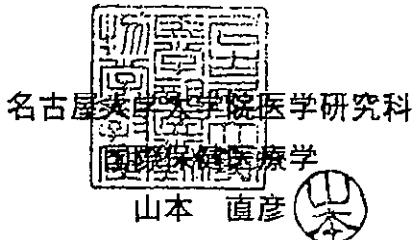
依頼者：アサヒプリテック株式会社

検体：AP アクア 21R による生成水

試験項目：HIV-1 不活化試験

平成12年7月21日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12年11月7日



HIV-1不活化試験

1. 依頼者：アサヒプリテック株式会社

2. 検体：APアクア21Rによる生成水

備考：検体は名古屋大学大学院医学研究科にて調製した。

尚、検体は依頼者によって設置されたAPアクア21Rを用いて
調製した

3. 試験実施場所

名古屋大学大学院医学研究科

名古屋市昭和区鶴舞町 6 5

4. 試験担当責任者

名古屋大学大学院医学研究科 国際保健医療学

助教授 山本 直彦

5. 試験実施年月日

平成12年8月31日～平成12年9月5日

6. 試験目的

検体にHIV-1浮遊液を接種し、経時的にウイルス感染価を測定する。

7. 試験概要

検体1.8mlにHIV-1浮遊液0.2mlを加え攪拌し、攪拌直後、3、5及び10分後にウイルス感染価を室温にて測定した。尚、検体のかわりに精製水(GIBCO ultra PURE)を用いた対照試験も同時に実施した。また、検体の有効塩素濃度は、アサヒプリテック株式会社に検体を氷冷で送付し測定した。

8. 試験結果

結果を表1に示した。

表-1 試験液のウイルス感染価測定結果

試験液	有効塩素濃度 (mg/L)	log TCID ₅₀ / ml *1			
		HIV-1 *2 搅拌直後	3分後	5分後	10分後
AP水	30.8	5.4	3.6	<2.0	<2.0
精製水(GIBCO)	0	5.4	4.8	4.7	4.6

*1 試験液1ml当たりの50%組織培養感染量(TCID₅₀)の対数値

*2 ウィルス浮遊液の50%組織培養感染量を測定し、試験液1ml当たりに換算した。

9. 試験方法

1) 使用ウイルス

HIV-1 (III B株) 国立感染症研究所より分与されたものを使用した。

2) 使用細胞

MT-4細胞 国立感染症研究所より分与されたものを使用した。

3) 使用培地

RPMI 1640 (GIBCO)に牛胎児血清を10%加えたものを使用した。

4) ウィルス浮遊液の調製

HIV-1 (III B株)をMT-4細胞に接種し、3~5日37°C炭酸ガスインキュベーター-(CO₂濃度：5%)内で培養し、その培養上清をウィルス浮遊液とした。

5) 試験操作

検体1.8mlにウイルス浮遊液0.2mlを加え攪拌し、室温で保存した。
(以下試験液)攪拌直後、3、5及び10分後にウイルス浮遊液0.2mlを分取し、1.8mlの使用培地に添加した。また、対照の精製水についても同様に実施した。

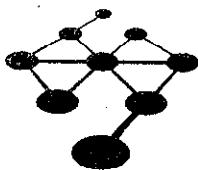
6) ウイルス感染価の測定

各試験液の10倍階段希釈列を 10^{-5} 希釈まで作成した。96穴平底培養プレートに、対数増殖期にあるMT-4細胞を遠心分離により集め、MT-4細胞が $2 \times 10^5 / ml$ となる様に細胞浮遊液を作成し、各穴 $100 \mu l$ を分注した。試験液の各希釈列につき10穴、プレートに用意したMT-4細胞に各希釈液 $100 \mu l$ を分注した。混和後、5日間 37°C 炭酸ガスインキュベーター(CO_2 濃度：5%)内で培養した。培養後、倒立位相差顕微鏡を用いてCPE(細胞変性効果)の有無を観察し、Reed-Muench法により各試験液の50%組織培養感染量(TCID_{50})を算出し、各試験液 1ml あたりのウイルス感染価に換算した。

以上

本資料は、私（他1名）が実施した試験に基づいて作成されたものに相違ありません。

名古屋大学大学院医学研究科
国際保健医療学
山本直彦



Japan
Food
Research
Laboratories

試験報告書

第 299091403-002 号

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(30ppm)

試験項目 ウイルス不活化試験

平成 11 年 08 月 20 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 12 年 02 月 17 日

財団法人
日本食品分析センター

東京本部 〒154-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
大阪支所 〒554-0051 大阪府吹田市豊津町3番1号
名古屋支所 〒460-0011 愛知県名古屋市中区大須4丁目5番13号
九州支所 〒812-0034 福岡市博多区下呂服町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

ウイルス不活性化試験

1 依頼者

アサヒプリテック株式会社

2 検体

アクアプロ21Rによる生成水(30ppm)

備考：検体は財団法人 日本食品分析センターにて調製した。

なお、検体は依頼者により設置されたアクアプロ21Rを用いて調製した
(設置日：平成11年8月20日)。

3 試験実施場所

財団法人 日本食品分析センター 大阪支所
大阪府吹田市豊津町3番1号

4 試験担当責任者

財団法人 日本食品分析センター 大阪支所
微生物部 微生物試験課

5 試験実施年月日

平成11年11月15日～平成12年2月17日

6 試験目的

検体にウイルス浮遊液を接種し、経時的にウイルス感染価を測定する。

7 試験概要

検体0.9 mlにウイルス浮遊液0.1 mlを接種(以下「試験液」という。)し、室温に保存した。
保存3、5及び10分後に試験液中のウイルス感染価を測定した。
また、検体の有効塩素濃度を測定した。

8 試験結果

結果を表-1に示した。

表-1 試験液のウイルス感染価測定結果

試験ウイルス	有効塩素濃度 (mg/L)	log TCID ₅₀ /ml ^{*1}		
		開始時 ^{*2}	3分	5分
インフルエンザウイルス	45	5.3	<1.7	<1.7
単純ヘルペスウイルス	45	6.0	<1.7	<1.7
アデノウイルス	35	4.3	2.0	<1.7
ポリオウイルス	35	4.7	2.0	<1.7

*1 試験液1 ml当たりの50 %組織培養感染量(TCID₅₀)の対数値

*2 ウィルス浮遊液の50 %組織培養感染量を測定し、試験液1 ml当たりに換算した。

9 試験方法

1) 試験ウイルス

- ① インフルエンザウイルスA型(H1N1)
- ② 単純ヘルペスウイルス1型
- ③ アデノウイルス5型
- ④ ポリオウイルス2型

2) 使用細胞

- ① インフルエンザウイルス：MDCK(NBL-2)細胞 ATCC CCL-34株 [大日本製薬株式会社]
- ② 単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス及びポリオウイルス：Hep-2細胞 ATCC CCL-23株 [大日本製薬株式会社]

3) 使用培地

① 細胞増殖培地

Eagle MEM[日水製薬株式会社, 0.06 mg/mlカナマイシン含有]に新生コウシ血清[ICN]を10 %加えたものを使用した。

② 細胞維持培地

MDCK細胞については、以下の組成の培地を使用した。

Eagle MEM	1,000 ml
7.0 %NaHCO ₃	32 ml
L-グルタミン(29.2 g/L)	10 ml
100×MEM用ビタミン液	30 ml
10 %アルブミン	20 ml
トリプシン(5 mg/ml)	2 ml

Hep-2細胞については、Eagle MEMに新生コウシ血清を1 %加えたものを使用した。

4) ウィルス浮遊液の調製

① 細胞の培養

細胞増殖培地を用い、MDCK細胞又はHep-2細胞を組織培養用フラスコ内に単層培養した。

② ウィルスの接種

単層培養後にフラスコ内から細胞増殖培地を除き、各ウィルスを接種した。次に、細胞維持培地を加えて炭酸ガスインキュベーター(CO₂濃度：5 %)内でインフルエンザウィルス(MDCK細胞)は34℃3～5日間、単純ヘルペスウィルス、アデノウィルス及びポリオウィルス(Hep-2細胞)は37℃7～10日間培養した。

③ ウィルス浮遊液の調製

培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞の形態を観察し、80 %以上の細胞に形態変化(細胞変性効果)が起こっていることを確認した。次に、凍結融解を1～3回行った後、培養液を遠心分離(3,000 rpm, 10分間)し、得られた上澄み液をウィルス浮遊液とした。

5) 試験操作

検体0.9 mlに各ウィルス浮遊液0.1 mlを接種、かくはんした後室温で保存した。保存3, 5及び10分後に各試験液0.1 mlを分取し、各細胞維持培地0.9 mlに添加した。

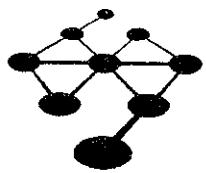
6) ウィルス感染価の測定

細胞増殖培地を用い、MDCK細胞又はHep-2細胞を組織培養用マイクロプレート(96穴)内で単層培養した後、細胞増殖培地を除き各細胞維持培地を0.1 mlずつ加えた。次に、各試験液を添加した細胞維持培地及びその希釈液0.1 mlを4穴ずつに接種し、炭酸ガスインキュベーター(CO_2 濃度：5 %)内でインフルエンザウィルス(MDCK細胞)は34°C 3～5日間、単純ヘルペスウィルス、アデノウイルス及びポリオウイルス(Hep-2細胞)は37°C 7～10日間培養した。

培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて各細胞の形態変化(細胞変性効果)の有無を観察し、Reed-Muench法により50 %組織培養感染量(TCID₅₀)を算出して試験液 1 ml当たりのウィルス感染価に換算した。

また、検体の有効塩素濃度をヨウ素滴定法により測定した。

以上



Japan
Food
Research
Labs

試験報告書

第 299091403-001 号

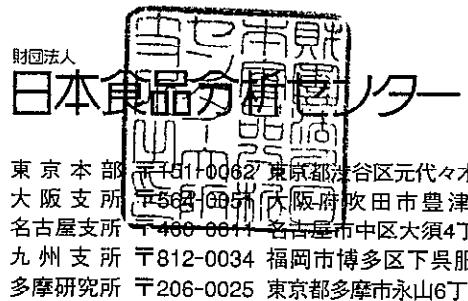
依頼者 アサヒプリテック株式会社

検体 アクアプロ21Rによる生成水(30ppm)
次亜塩素酸ナトリウム(100ppm)
塩化ベンザルコニウム(0.05%)

試験項目 微生物の消長

平成 11 年 08 月 20 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 12 年 01 月 14 日



微生物の消長

1 依頼者

アサヒプリテック株式会社

2 検体

- 1) アクアプロ21Rによる生成水(30ppm)
- 2) 次亜塩素酸ナトリウム(100ppm)
- 3) 塩化ベンザルコニウム(0.05%)

備考：検体は財団法人 日本食品分析センターにて調製した。

なお、検体1)は依頼者により設置されたアクアプロ21Rを用いて調製した
(設置日：平成11年8月20日)。

3 試験実施場所

財団法人 日本食品分析センター 大阪支所
大阪府吹田市豊津町3番1号

4 試験担当責任者

財団法人 日本食品分析センター 大阪支所
微生物部 微生物試験課

5 試験実施年月日

平成11年10月5日～平成12年1月14日

6 試験目的

検体に微生物の菌液を接種し、その消長を調べる。

7 試験概要

検体に枯草菌(芽胞)、大腸菌、大腸菌(O157:H7)、綠膿菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、化膿連鎖球菌、腸炎ビブリオ、黒こうじカビ又はカンジダの菌液を接種(以下「試験液」という。)後、20℃で保存し、経時的に各試験液中の生菌数を測定した。

また、検体1)及び2)の有効塩素濃度を測定した。

8 試験結果

結果を表-1に示した。

表-1-1 試験液1 ml当たりの生菌数測定結果

試験菌	対象	有効塩素濃度 (mg/L)	試験液1 ml当たりの生菌数				
			開始時	30秒	1分	3分	5分
枯草菌 (芽胞)	検体1)	37	***	2.5×10^5	2.2×10^5	8.8×10^4	1.2×10^4
	検体2)	100	***	3.1×10^5	2.0×10^5	1.9×10^5	2.4×10^5
	検体3)	***	***	2.0×10^5	2.2×10^5	2.0×10^5	2.1×10^5
	対照	***	2.5×10^5	***	***	***	2.5×10^5
	検体1)	40	***	<10	<10	<10	<10
	検体2)	100	***	<10	<10	<10	<10
大腸菌	検体3)	***	***	<10	<10	<10	<10
	対照	***	4.2×10^5	***	***	***	3.8×10^5
大腸菌 (O157 : H7)	検体1)	40	***	<10	<10	<10	<10
	検体2)	100	***	<10	<10	<10	<10
	検体3)	***	***	<10	<10	<10	<10
	対照	***	2.3×10^5	***	***	***	2.3×10^5
緑膿菌	検体1)	40	***	<10	<10	<10	<10
	検体2)	100	***	<10	<10	<10	<10
	検体3)	***	***	4.3×10^3	1.3×10^2	<10	<10
	対照	***	1.7×10^5	***	***	***	1.8×10^5
サルモネラ	検体1)	40	***	<10	<10	<10	<10
	検体2)	100	***	<10	<10	<10	<10
	検体3)	***	***	<10	<10	<10	<10
	対照	***	3.9×10^5	***	***	***	4.7×10^5
黄色 ブドウ球菌	検体1)	40	***	<10	<10	<10	<10
	検体2)	100	***	<10	<10	<10	<10
	検体3)	***	***	<10	<10	<10	<10
	対照	***	2.8×10^5	***	***	***	3.2×10^5
MRSA	検体1)	40	***	<10	<10	<10	<10
	検体2)	100	***	<10	<10	<10	<10
	検体3)	***	***	<10	<10	<10	<10
	対照	***	2.4×10^5	***	***	***	2.1×10^5

<10 : 検出せず *** : 試験実施せず 対照 : 精製水

試験菌	対象	有効塩素濃度 (mg/L)	試験液1 ml当たりの生菌数				
			開始時	30秒	1分	3分	5分
化膿連鎖球菌	検体1)	37	***	<10	<10	<10	<10
	検体2)	100	***	<10	<10	<10	<10
	検体3)	***	***	<10	<10	<10	<10
腸炎ビブリオ	対照	***	2.5×10^5	***	***	***	2.5×10^6
	検体1)	37	***	<10	<10	<10	<10
	検体2)	100	***	<10	<10	<10	<10
黒こうじカビ	検体3)	***	***	<10	<10	<10	<10
	対照	***	1.1×10^5	***	***	***	9.3×10^4
	検体1)	40	***	2.5×10^4	2.8×10^2	20	<10
カンジダ	検体2)	100	***	2.1×10^5	3.5×10^5	2.3×10^4	2.6×10^3
	検体3)	***	***	1.6×10^5	8.4×10^4	3.2×10^3	3.8×10^2
	対照	***	1.7×10^5	***	***	***	1.7×10^6
	検体1)	40	***	<10	<10	<10	<10
	検体2)	100	***	2.8×10^5	1.3×10^5	<10	<10
	検体3)	***	***	80	<10	<10	<10
	対照	***	3.4×10^5	***	***	***	2.7×10^5

<10 : 検出せず *** : 試験実施せず

対照 : 精製水 (腸炎ビブリオは3 % 塩化ナトリウム溶液)

表-1-3 試験液1 ml当たりの生菌数測定結果

試験菌	対象	有効塩素濃度 (mg/L)	試験液1 ml当たりの生菌数		
			開始時	5分	10分
枯草菌 (芽胞)	検体1)	44	***	1.4×10^3	<10
	検体2)	100	***	1.7×10^5	2.0×10^5
	検体3)	***	***	2.1×10^5	2.1×10^5
	対照	***	2.0×10^5	***	***
					1.9×10^5

<10 : 検出せず *** : 試験実施せず 対照 : 精製水

9 試験方法

1) 試験菌株

細菌：

- ① *Bacillus subtilis* IFO 3134(枯草菌)
- ② *Escherichia coli* IFO 3972(大腸菌)
- ③ *Escherichia coli* ATCC 43888(大腸菌O157:H7, ベロ毒素非產生株)
- ④ *Pseudomonas aeruginosa* IFO 13275(緑膿菌)
- ⑤ *Salmonella enteritidis* IFO 3313(サルモネラ)
- ⑥ *Staphylococcus aureus* IFO 12732(黄色ブドウ球菌)
- ⑦ *Staphylococcus aureus* IID 1677(MRSA)
- ⑧ *Streptococcus pyogenes* IID 712(化膿連鎖球菌)
- ⑨ *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210100(腸炎ビブリオ)

カビ：

Aspergillus niger IFO 4407(黒こうじカビ)

酵母：

Candida albicans IFO 1594(カンジダ)

2) 菌数測定用培地及び培養条件

細菌①～⑧：SCDLP寒天培地[日本製薬株式会社], 35℃ 2日間

細菌⑨：3%塩化ナトリウム加SCDLP寒天培地, 35℃ 2日間

カビ及び酵母：GPLP寒天培地[日本製薬株式会社], 25℃ 7日間

3) 試験菌液の調製

細菌①：

試験菌株をトリプトソイ寒天培地[栄研化学株式会社]で30℃7日間培養した後, 菌体を生理食塩水に浮遊させ, 70℃20分間処理し, 遠心分離した後, 上澄みを取り除いて沈さを生理食塩水に再浮遊させて冷蔵にて保存し, 芽胞液とした。冷蔵保存しておいた芽胞液を生理食塩水で菌数が約10⁷/mlとなるように調製し, 試験菌液とした。

細菌②～⑦：

各試験菌株を普通寒天培地[栄研化学株式会社]で35℃18～24時間培養した後, 生理食塩水で菌数が約10⁷/mlとなるように調製し, 試験菌液とした。

細菌⑧：

試験菌株をBrain Heart Infusion Agar[Difco Laboratories Incorporated]で35℃18～24時間培養した後, 生理食塩水で菌数が約10⁷/mlとなるように調製し, 試験菌液とした。

細菌⑨：

試験菌株を3%塩化ナトリウム加普通寒天培地で35℃18~24時間培養した後、3%塩化ナトリウム溶液で菌数が約 $10^7/ml$ となるように調製し、試験菌液とした。

カビ：

試験菌株をポテトデキストロース寒天培地[栄研器材株式会社]で25℃で7~10日間培養した後、胞子(分生子)を0.005%スルホコハク酸ジオクチルナトリウム溶液に浮遊させ、ガーゼでろ過後、菌数が約 $10^7/ml$ となるように調製し、試験菌液とした。

酵母：

試験菌株をポテトデキストロース寒天培地で25℃48時間培養後、生理食塩水で菌数が約 $10^7/ml$ となるように調製し、試験菌液とした。

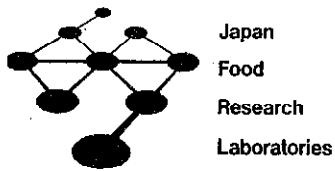
4) 試験操作

検体20mlに試験菌液を0.1ml接種し、試験液とした。これらを20℃で保存し、保存30秒、1、3及び5分後又は保存5、10及び30分後に試験液1mlをSCDLP培地(細菌⑨は3%塩化ナトリウム加SCDLP培地)[日本製薬株式会社]に添加し、試験液中の生菌数を菌数測定用培地を用いた混釀平板培養法により測定した。

なお、対照として、精製水(細菌⑨は3%塩化ナトリウム溶液)を用いて同様に試験し、試験開始時及び5又は30分後に試験液中の生菌数を測定した。

また、検体1)及び2)の有効塩素濃度をヨウ素滴定法により測定した。

以 上



Japan
Food
Research
Labs

試験報告書

第 299080377-003 号

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

試験項目 マウスを用いた急性経口毒性試験

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 10 月 15 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 〒553-0053 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 福岡市博多区下呂駅町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

マウスを用いた急性経口毒性試験

要 約

アクアプロ21Rによる生成水を検体として、OECD化学物質毒性試験指針(1987)に準拠し、マウスを用いた急性経口毒性試験(限度試験)を行った。

試験群には50 mL/kgの用量の検体を、対照群には原水(水道水)を雌雄マウスに単回経口投与した。その結果、試験動物に異常及び死亡例は認められなかった。したがって、検体のマウスにおける単回経口投与によるLD50値は、雌雄ともに50 mL/kg以上であるものと考えられた。

依 賴 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9月21日～平成11年10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

1 試験目的

検体について、OECD化學物質毒性試験指針(1987)に準拠し、マウスにおける急性経口毒性を調べる。

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)。

3 試験液の調製及び有効塩素濃度の測定

検体及び原水は単回経口投与前に採取し、検体についてはヨウ素滴定法により、有効塩素濃度を測定した。

4 試験動物

4週齢のICR系雌雄マウスを日本エスエルシー株式会社から購入し、約1週間の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、試験に使用した。試験動物はポリカーボネート製ケージに各5匹収容し、室温 $23\pm2^{\circ}\text{C}$ 、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[マウス、ラット用固型飼料；ラボMRストック、日本農産工業株式会社]及び飲料水(水道水)は自由に摂取させた。

5 試験方法

試験群及び対照群ともに雌雄それぞれ10匹を用いた。

投与前に約4時間試験動物を絶食させた。体重を測定した後、試験群には検体を、対照群には原水(水道水)を、雌雄ともに50 mL/kgの用量で胃ゾンデを用いて強制単回経口投与した。

観察期間は14日間とし、投与日は頻回、翌日から1日1回の観察を行った。投与後7及び14日に体重を測定し、t-検定により有意水準5 %で群間の比較を行った。観察期間終了時に動物すべてを剖検した。

6 試験結果

1) 有効塩素濃度

測定値は38 mg/Lであった。

2) 死亡例

雌雄ともに観察期間中に死亡例は認められなかった。

3) 一般状態

雌雄ともに観察期間中に異常は認められなかった。

4) 体重変化(表-1及び2)

投与後7及び14日の体重測定では、雌雄ともに各群間で体重増加に差は見られなかった。

5) 剖検所見

観察期間終了時の剖検では、雌雄ともにすべての試験動物の主要臓器に異常は見られなかった。

7 考 察

検体について、OECD化学物質毒性試験指針(1987)に準拠し、マウスを用いた急性経口毒性試験(限度試験)を実施した。

検体を50 mL/kgの用量で雌雄マウスに単回経口投与した結果、死亡例は見られず、剖検時にも異常は見られなかった。したがって、検体のマウスにおける単回経口投与によるLD50値は、雌雄ともに50 mL/kg以上であるものと考えられた。

表-1 体重変化(雄)

投与群	投与前	投与後(日)	
		7	14
試験群	26.6±0.8 (10)	33.1±1.4 (10)	37.6±1.4 (10)
対照群	26.6±0.7 (10)	32.9±1.8 (10)	36.2±2.2 (10)

体重は平均値±標準偏差で表した(単位:g)。

括弧内に動物数を示した。

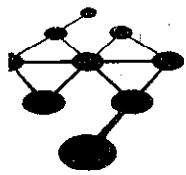
表-2 体重変化(雌)

投与群	投与前	投与後(日)	
		7	14
試験群	23.7±1.0 (10)	26.8±1.2 (10)	29.3±1.7 (10)
対照群	23.8±0.9 (10)	27.0±1.4 (10)	29.0±1.9 (10)

体重は平均値±標準偏差で表した(単位:g)。

括弧内に動物数を示した。

以 上



Japan
Food
Research
Laboratories

試験報告書

第 299080377-001 号

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

試験項目 ウサギを用いた眼刺激性試験

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 10 月 15 日



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 〒556-0044 大阪府吹田市豊津町3番1号
名古屋支所 〒460-0044 愛知県名古屋市中区大須4丁目5番13号
九州支所 〒812-0034 福岡市博多区下呂服町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

ウサギを用いた眼刺激性試験

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9月6日～平成11年10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

試験担当責任者

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

要 約

アクアプロ21Rによる生成水を検体として、Federal Register(§ 163, August, 1978)に準拠し、ウサギを用いた眼刺激性試験を行った。

試験動物をⅠ群(非洗浄群6匹)及びⅡ群(洗浄群3匹)に分け、片眼に検体、他眼に対照として原水(水道水)を0.1 mL点眼した。その後Ⅰ群は非洗眼とし、Ⅱ群は30秒後に1分間眼洗浄を行った。その結果、Ⅰ群(非洗浄群)では点眼後1時間に2例の試験眼及び対照眼で眼瞼結膜の発赤が見られたが、24時間に消失した。Ⅱ群(洗浄群)では点眼後24時間に2例の試験眼及び対照眼、48時間に1例の試験眼、72時間に1例の対照眼で眼瞼結膜の発赤が見られたが、4日以降には刺激反応は見られなかった。

観察結果から得られた試験眼及び対照眼の平均合計評点の最高値(点眼後24時間以降)は、Ⅰ群では試験眼及び対照眼ともに0、また、Ⅱ群では試験眼及び対照眼ともに1.3(点眼後24時間)となった。

以上の結果から、検体はウサギを用いた眼刺激性試験において、「無刺激物」の範疇に入るものと認められた。

1 試験目的

検体について、Federal Register(§ 163, August, 1978)に準拠し、ウサギにおける眼刺激性を調べる。

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）。

3 試験液の調製及び有効塩素濃度の測定

検体及び原水は点眼前に採取し、検体についてはヨウ素滴定法により、有効塩素濃度を測定した。

4 試験動物

日本白色種雄ウサギを北山ラバース株式会社から購入し、1週間以上の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、9匹を試験に使用した。試験動物はFRP製ケージに個別に収容し、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。飼料はウサギ用固型飼料[CR-3、日本クレア株式会社]を制限給与し、飲料水は水道水を自由摂取させた。

5 試験方法

各試験動物の両眼を、試験開始前24時間以内にフルオレセインナトリウムを用いて検査し、異常のないことを確かめた。

体重測定後、試験動物をⅠ群(6匹)とⅡ群(3匹)に分け、各試験動物の片眼結膜囊内に検体、他眼に原水(水道水)0.1 mLを点眼した。この後、Ⅰ群は非洗浄群とし、Ⅱ群は30秒後に精製水を用いて1分間眼洗浄を行い、洗浄群とした。他眼はⅠ群では無処置、Ⅱ群では試験眼と同様に洗眼処置を行い、それぞれ対照とした。観察は点眼後1, 24, 48, 72時間及び4, 7日に、スリットランプ(×10)[興和株式会社]を用いて角膜、虹彩及び結膜について行い、表-1に示した基準に従って眼刺激性の程度を採点した。刺激反応が点眼後7日で認められた場合は、21日を限度として反応が消失するまで観察を続けた。

なお、Ⅱ群では点眼後1時間においては眼洗浄の影響が残るため、結膜の発赤は採点しなかった。

得られた採点値を用いて各試験動物の合計評点を表-2に示した式から計算し、各観察時間ごとにⅠ、Ⅱ群それぞれについて平均合計評点を求めた。観察期間中の平均合計評点の最高値から、表-3に示した基準に基づき、検体の眼刺激性について評価を行った(ただし、点眼後1時間の採点結果は評価に含めない*)。

* Federal Register (§ 163, August, 1978) では第1回目の観察時間を点眼後24時間と指定しているため、点眼後1時間の採点結果は評価対象から除外した。

6 試験結果

1) 有効塩素濃度

測定値は46 mg/Lであった。

2) 眼刺激反応(表-4~8)

Ⅰ群： 点眼後1時間に2例の試験眼(試験動物①及び④)及び対照眼(④及び⑤)で眼瞼結膜の発赤(点数1)が見られたが、24時間に消失した。残る3例では、観察期間を通して刺激反応は見られなかった。

観察結果から得られた平均合計評点の最高値(点眼後24時間以降)は、試験眼及び対照眼ともに0となった。

Ⅱ群： 点眼後24時間に2例(⑦及び⑨)の試験眼及び対照眼に眼瞼結膜の発赤(点数1)が見られたが、72時間までに消失した。また、72時間に他の1例(⑧)の対照眼で、一過性に眼瞼結膜の発赤(点数1)が見られた。

観察結果から得られた平均合計評点の最高値(点眼後24時間以降)は、試験眼及び対照眼ともに1.3(点眼後24時間)となった。

7 評 値

検体について、Federal Register (§ 163, August, 1978)に準拠し、ウサギを用いた眼刺激性試験を行った。片眼に検体、他眼に対照として原水(水道水)を点眼した。その結果、I群(非洗浄群)では点眼後1時間に2例の試験眼及び対照眼で眼瞼結膜の発赤が見られたが、24時間に消失した。II群(洗浄群)では点眼後24時間に2例の試験眼及び対照眼、48時間に1例の試験眼、72時間に1例の対照眼で眼瞼結膜の発赤が見られたが、4日以降には刺激反応は見られなかった。

観察結果から得られた試験眼及び対照眼の平均合計評点の最高値(点眼後24時間以降)は、I群では試験眼及び対照眼ともに0、また、II群では試験眼及び対照眼ともに1.3(点眼後24時間)となった。

以上の結果から、検体はウサギを用いた眼刺激性試験において「無刺激物」の範疇に入るものと認められた。

表-1 眼障害の評価

(1) 角 膜

(A) 混濁の程度(最も濃い領域を判定する)

透明, 混濁なし	0
散在性及び漫性混濁, 虹彩細部は明瞭に認める	1
半透明で容易に識別可, 虹彩細部はやや不明瞭	2
乳濁, 虹彩紋理認めず, 瞳孔の大きさをやっと認める	3
白濁, 虹彩は認めない	4

(B) 角膜混濁部の面積(S)

$0 < S \leq 1/4$	1
$1/4 < S \leq 1/2$	2
$1/2 < S \leq 3/4$	3
$3/4 < S \leq 4/4$	4

[評点 = A × B × 5] 最高評点 80]

(2) 虹 彩

(A) 正 常 0

正常以上のひだ, うっ血, 腫脹, 角膜周囲充血の1つ	
又はいくつかを認めるが, 少しとも対光反射はある	1
対光反射なし, 出血, 著しい組織破壊の1つ又は	
いくつかを認める	2

[評点 = A × 5] 最高評点 10]

(3) 結 膜

(A) 眼瞼結膜及び眼球結膜の発赤

血管は正常	0
明らかに血管充血	1
び漫性, 深紅色で個々の血管は識別しにくい	2
び漫性の牛肉様の赤色	3

(B) 結膜の浮腫

腫脹なし	0
いくぶん腫脹(瞬膜を含む)	1
明らかな腫脹, 眼瞼が少し外反	2
腫脹, 眼瞼半分閉じる	3
腫脹, 眼瞼半分以上閉じる	4

(C) 分泌物

認めない	0
少し認める	1
分泌物で眼瞼とそのすぐ近くの毛を濡らす	2
分泌物で眼瞼と周囲の毛のかなりの部分を濡らす	3

[評点 = (A + B + C) × 2] 最高評点 20]

表-2 合計評点の算出方法

部 位	計算式	最高評点
(1) 角 膜	A×B×5	80
(2) 虹 彩	A×5	10
(3) 結 膜	(A+B+C)×2	20
(1)+(2)+(3)=合計評点*		110

A, B, Cは、表-1における(A), (B), (C)の採点値を示す。

* 各観察時間ごとに算出する。

表-3 眼刺激性の評価

平均合計評点の最高値	区 分
0 ~ 5.0	無刺激物
5.1 ~ 15.0	軽度刺激物
15.1 ~ 30.0	刺激物
30.1 ~ 60.0	中等度刺激物
60.1 ~ 80.0	中～強度刺激物
80.1 ~ 110.0	強度刺激物

表-4 試験動物の体重(試験開始時)

	試験動物	体重(kg)
I	①	3.46
	②	3.19
	③	2.81
	④	2.95
	⑤	3.40
	⑥	3.36
II	⑦	3.30
	⑧	3.30
	⑨	3.58

表-5 合計評点の経時的推移及び眼刺激性の評価(Ⅰ群)

試験動物	各観察時間における合計評点					
	1時間	24時間	48時間	72時間	4日	7日
①	2(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
②	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
③	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
④	2(2)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
⑤	0(2)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
⑥	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
平均合計評点	0.7(0.7)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
眼刺激性の評価	無刺激物					

括弧内に対照眼の結果を示した。

点眼後1時間の採点結果は評価に含めなかった。

表-6 合計評点の経時的推移及び眼刺激性の評価(Ⅱ群)

試験動物	各観察時間における合計評点					
	1時間	24時間	48時間	72時間	4日	7日
⑦	—	2(2)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
⑧	—	0(0)	0(0)	0(2)	0(0)	0(0)
⑨	—	2(2)	2(0)	0(0)	0(0)	0(0)
平均合計評点	—	1.3(1.3)	0.7(0)	0(0.7)	0(0)	0(0)
眼刺激性の評価	無刺激物					

括弧内に対照眼の結果を示した。

—：点眼後1時間では眼洗浄の影響が残るため、結膜の発赤は採点せず。したがって合計評点も算出しなかった。

表-7-1 試験動物①の採点結果

観察部位		採点結果				
		1時間	24時間	48時間	72時間	4日
(1)角膜	混濁の程度 (A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	混濁部面積 (B)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
(2)虹彩	(A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
(3)結膜	発赤 (A)	1(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	浮腫 (B)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	分泌物 (C)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(1)=A×B×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(2)=A×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(3)=(A+B+C)×2		2(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
合計評点[(1)+(2)+(3)]		2(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

括弧内に対照眼の結果を示した。

-：判定せず

表-7-2 試験動物②の採点結果

観察部位		採点結果				
		1時間	24時間	48時間	72時間	4日
(1)角膜	混濁の程度 (A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	混濁部面積 (B)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
(2)虹彩	(A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
(3)結膜	発赤 (A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	浮腫 (B)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	分泌物 (C)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(1)=A×B×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(2)=A×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(3)=(A+B+C)×2		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
合計評点[(1)+(2)+(3)]		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

括弧内に対照眼の結果を示した。

-：判定せず

表-7-3 試験動物③の採点結果

観察部位		採点結果					
		1時間	24時間	48時間	72時間	4日	7日
(1) 角膜	混濁の程度 (A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	混濁部面積 (B)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
(2) 虹彩	(A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
(3) 結膜	発赤 (A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	浮腫 (B)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	分泌物 (C)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(1)=A×B×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(2)=A×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(3)=(A+B+C)×2		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
合計評点[(1)+(2)+(3)]		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

括弧内に対照眼の結果を示した。

- : 判定せず

表-7-4 試験動物④の採点結果

観察部位		採点結果					
		1時間	24時間	48時間	72時間	4日	7日
(1) 角膜	混濁の程度 (A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	混濁部面積 (B)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
(2) 虹彩	(A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
(3) 結膜	発赤 (A)	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	浮腫 (B)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	分泌物 (C)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(1)=A×B×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(2)=A×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(3)=(A+B+C)×2		2(2)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
合計評点[(1)+(2)+(3)]		2(2)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

括弧内に対照眼の結果を示した。

- : 判定せず

表-7-5 試験動物⑤の採点結果

観察部位		採点結果				
		1時間	24時間	48時間	72時間	4日
(1) 角膜	混濁の程度 (A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	混濁部面積 (B)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
(2) 虹彩	(A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
(3) 結膜	発赤 (A)	0(1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	浮腫 (B)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	分泌物 (C)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(1)=A×B×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(2)=A×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(3)=(A+B+C)×2		0(2)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
合計評点[(1)+(2)+(3)]		0(2)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

括弧内に対照眼の結果を示した。

- : 判定せず

表-7-6 試験動物⑥の採点結果

観察部位		採点結果				
		1時間	24時間	48時間	72時間	4日
(1) 角膜	混濁の程度 (A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	混濁部面積 (B)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
(2) 虹彩	(A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
(3) 結膜	発赤 (A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	浮腫 (B)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	分泌物 (C)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(1)=A×B×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(2)=A×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(3)=(A+B+C)×2		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
合計評点[(1)+(2)+(3)]		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

括弧内に対照眼の結果を示した。

- : 判定せず

表-8-1 試験動物⑦の採点結果

観察部位		採点結果					
		1時間	24時間	48時間	72時間	4日	7日
(1)角膜	混濁の程度 (A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	混濁部面積 (B)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
(2)虹彩	(A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
(3)結膜	発赤 (A)	-	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	浮腫 (B)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	分泌物 (C)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(1)=A×B×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(2)=A×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(3)=(A+B+C)×2		-	2(2)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
合計評点[(1)+(2)+(3)]		-	2(2)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

括弧内に対照眼の結果を示した。

- : 判定せず

- : 点眼後1時間では眼洗浄の影響が残るため、結膜の発赤は採点せず。したがって合計評点も算出しなかった。

表-8-2 試験動物⑧の採点結果

観察部位		採点結果					
		1時間	24時間	48時間	72時間	4日	7日
(1)角膜	混濁の程度 (A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	混濁部面積 (B)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
(2)虹彩	(A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
(3)結膜	発赤 (A)	-	0(0)	0(0)	0(1)	0(0)	0(0)
	浮腫 (B)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	分泌物 (C)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(1)=A×B×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(2)=A×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(3)=(A+B+C)×2		-	0(0)	0(0)	0(2)	0(0)	0(0)
合計評点[(1)+(2)+(3)]		-	0(0)	0(0)	0(2)	0(0)	0(0)

括弧内に対照眼の結果を示した。

- : 判定せず

- : 点眼後1時間では眼洗浄の影響が残るため、結膜の発赤は採点せず。したがって合計評点も算出しなかった。

表-8-3 試験動物⑨の採点結果

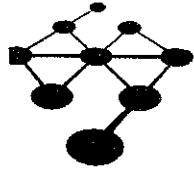
観察部位		採点結果					
		1時間	24時間	48時間	72時間	4日	7日
(1)角膜	混濁の程度 (A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	混濁部面積 (B)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
(2)虹彩	(A)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
(3)結膜	発赤 (A)	-	1(1)	1(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	浮腫 (B)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	分泌物 (C)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(1)=A×B×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(2)=A×5		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
評点(3)=(A+B+C)×2		-	2(2)	2(0)	0(0)	0(0)	0(0)
合計評点[(1)+(2)+(3)]		-	2(2)	2(0)	0(0)	0(0)	0(0)

括弧内に対照眼の結果を示した。

-: 判定せず

-: 点眼後1時間では眼洗浄の影響が残るため、結膜の発赤は採点せず。したがって合計評点も算出しなかった。

以 上



Japan
Food
Research
Labs

試験報告書

第 299080377-004 号

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

試験項目 細菌を用いる復帰突然変異試験

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 10 月 25 日

財団法人
日本食品安全検査センター

東京本部 〒153-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
大阪支所 〒554-0051 大阪府吹田市豊津町3番1号
名古屋支所 〒466-0061 愛知県名古屋市中区大須4丁目5番13号
九州支所 〒812-0034 福岡市博多区下呂服町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

細菌を用いる復帰突然変異試験

要 約

アクアプロ21Rによる生成水の突然変異誘起性を調べる目的で厚生省薬務局薬審1第24号(平成元年9月11日)の変異原性試験法に従い、試験を実施した。

被験物質について、*Escherichia coli* WP2 *uvrA*株及び*Salmonella typhimurium* TA系4菌株を用いて代謝活性化を含む復帰突然変異試験を100～500 μL/平板の用量で行ったところ、いずれの場合においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。以上のことから、本試験条件下における被験物質の突然変異誘起性は陰性と結論した。

依頼者

アサヒプリテック株式会社

被験物質

アクアプロ21Rによる生成水

試験実施期間

平成11年8月26日～平成11年10月25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

被験物質の突然変異誘起性を調べるために、厚生省薬務局薬審1第24号(平成元年9月11日)の変異原性試験法に従い、*Escherichia coli* WP2 *uvrA*株及び*Salmonella typhimurium* TA系4菌株を用いて、代謝活性化を含む復帰突然変異試験を行う。

2 被験物質

アクアプロ21Rによる生成水

備考：被験物質は、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)。

3 試験方法

1) 試験液の調製

被験物質は試験当日に採取し、よう素滴定法により有効塩素濃度を測定した。用量設定試験及び本試験とともに、被験物質を口径0.45 μmのメンブランフィルターを用いてろ過滅菌したものを試験液とした。また、注射用水(日本薬局方)[大塚製薬株式会社、製造番号9B83P]0.1 mLを陰性対照とした。

2) 試験用量

用量設定試験

500, 400, 300, 200及び100 μL/平板

本試験

用量設定試験と同じ用量に設定した。

3) 陽性対照物質及び陽性対照物質を溶解する溶媒

① 陽性対照物質と用量

S9 (-)

S9 (+)

strain	陽性対照物質	用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	strain	陽性対照物質	用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
TA100	AF-2	0.01	TA100	2-AA	1
TA98	AF-2	0.1	TA98	2-AA	0.5
TA1535	ENNG	5	TA1535	2-AA	2
TA1537	9-AA	80	TA1537	2-AA	2
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.01	WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	10

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

ENNG : N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

9-AA : 9-aminoacridine

2-AA : 2-aminoanthracene

② 陽性対照物質及び陽性対照物質を溶解する溶媒

物質名		製造元	Lot No.	グレード	純度(%)	溶媒名
陽性対照	AF-2	NIHSから分与されたもの	—	—	—	DMSO
	ENNG	ナカライトスク株式会社	V8G4785	—	97	エタノール
	9-AA	Aldrich	TT00220MJ	—	98	DMSO
	2-AA	和光純薬工業株式会社	AWL2898	—	90	DMSO
溶媒	DMSO	和光純薬工業株式会社	KSR1987	生化学用	99.5以上	—
	エタノール	関東化学株式会社	101G1708	残留農薬試験用	99.5以上	—

陽性対照物質溶液の調製保存等；分注保存(保存温度 -20°C)

NIHS : 国立医薬品食品衛生研究所

Aldrich : Aldrich Chemical Company, Inc.

DMSO : ジメチルスルホキシド

4) 使用菌株

① 入手方法等

菌株名	入手先	入手年月日	試験に使用した保存ロットの特性検査日
TA100	Bruce N. Ames	昭和55年12月11日	平成11年7月9日
TA98	Bruce N. Ames	昭和55年12月11日	平成11年7月28日
TA1535	Bruce N. Ames	昭和55年12月11日	平成11年7月9日
TA1537	Bruce N. Ames	昭和55年12月11日	平成11年7月28日
WP2 <i>uvrA</i>	東京大学医科学研究所	昭和56年1月12日	平成11年4月26日

② 保存方法

保存方法	分注凍結	保存液組成	菌懸濁液	0.8 mL
保存温度	-80°C		DMSO	0.07 mL
保存機器名	超低温フリーザー サンヨー MDF-291AT			

5) 菌の前培養

Nutrient broth No. 2 (OXOID, Lot No. 60435) を 10 mL 分注した L 字型試験管に、菌分注凍結保存液を解凍して 20 μL 接種した。菌を接種した L 字型試験管は振とうを始めるまで氷冷し、試験開始までに 37°C で約 10 時間振とう培養した。菌懸濁液は分光光度計で吸光度を計測し、所定の範囲に到達したところで培養を止めた。

振とう培養装置の型式及び製造元	ユニットシェーカーモノシンⅡ ^A タイトック株式会社
振とう方法(振とう型式・振とう数等)	モノ一型式・36回/分
培養容器(形状・容量・栓)	L字管・30 mL・モルトン栓

6) S9及びS9Mix

① S9の入手先、保存方法等

製造元	キッコーマン株式会社	保存温度	-80°C
製造年月日	平成11年7月16日		
購入年月日	平成11年8月24日	保存機器名 及び型式名	超低温フリーザー ^一 サンヨー MDF-291AT
Lot No.	RAA-409		

② S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統性	ラット・SD系雄	名称	フェノバルビタール(PB) 5, 6-ベンゾフラボン(5, 6-BF)
週齢	7週	投与方法	腹腔内投与
体重	209~243 g	投与期間 及び投与量 (mg/kg体重)	1日目：PB30 mg/kg, 2日目：PB60 mg/kg 3日目：PB60 mg/kg+5, 6-BF80 mg/kg 4日目：PB60 mg/kg

③ S9Mixの組成

成分	S9Mix(1 mL) 中の量	成分	S9Mix(1 mL) 中の量
S9	0.1 mL	NADH	4 μmol
MgCl ₂	8 μmol	NADPH	4 μmol
KCl	33 μmol	Na-リン酸緩衝液 (pH7.4)	100 μmol
G-6-P	5 μmol		

7) 最少グルコース寒天平板培地

名称	クリメディアAM-N培地		
製造元	オリエンタル酵母工業株式会社	使用寒天	
製造年月日	平成11年5月20日	名称	OXOID AGAR No.1
購入年月日	平成11年7月9日	製造元	OXOID LTD.
Lot No.	AN290E0	Lot No.	802436
備考：直径100 mmの滅菌平板1枚当たり30 mLを分注して固化させたもの			
組成(培地1 L当たり)			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g	クエン酸·H ₂ O	2 g
K ₂ HPO ₄	10 g	NH ₄ H ₂ PO ₄	1.92 g
NaOH	0.66 g	グルコース	20 g
寒天	15 g		

8) トップアガーの組成

Bacto agar [DIFCO, Lot No. 121826JA]	0.6 %
NaCl	0.5 %

9) 試験操作法

プレインキュベーション法(代謝活性化法によらない場合及び代謝活性化法による場合の両条件)により試験を行った。

試験液、S9Mix又は0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液(pH7.4)0.5 mL及び菌懸濁液0.1 mLを順次滅菌小試験管に加えた。37℃の恒温槽中で20分間振とう(プレインキュベーション)した後、これにトップアガー2 mL(*S. typhimurium* TA系4菌株については、別に滅菌した0.5 mmol/L L-ヒスチジン-0.5 mmol/L D-ビオチン溶液を1/10容量、また、*E. coli* WP2 *uvrA*株については、0.5 mmol/L L-トリプトファン溶液を1/10容量加えたもの。)を加え混合して、最少グルコース寒天平板培地上に一様に広げ固化させた。37℃の恒温器中で48時間培養し、復帰突然変異により出現したコロニーを計数した。

① 自動コロニーカウンターの計数方法(陽性対照の平板のみ計測した。)

機種：コロニーカウンター OL-502A[吉川工業株式会社]

測定面積5,027.5の条件で、平板当たりのコロニー数が約1,500までは面積補正として係数1.1を用いた。1,500以上では、数え落としが認められたので係数1.2を用いた。

② 菌の生育阻害のチェック方法

- a) 復帰変異コロニー数の減少の有無
- b) 目視によるバックグラウンドの観察
- c) 実体顕微鏡によるバックグラウンドの観察

10) 無菌試験

試験液は0.1 mL、S9Mixは0.5 mLを滅菌小試験管にそれぞれ2本分注し、トップアガー2 mLを加え混合して、最少グルコース寒天平板培地上に一様に広げ固化させた。37℃の恒温器中で48時間培養し、菌の発育の有無を観察した。

11) 統計処理

実施しなかった。

12) 判定基準

コロニー数の平均値が、陰性対照と比較して試験区で2倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性が認められた場合に陽性と判定する。

4 試験結果

1) 有効塩素濃度

用量設定試験の測定値は36 mg/L、本試験の測定値は35 mg/Lであった。

2) 細菌を用いる復帰突然変異試験

試験結果を試験結果表1及び2に示した。被験物質は、用量設定試験及び本試験のいずれの場合においても、陰性対照に比べ復帰変異コロニー数を増加させなかつた。以上のことから、本試験条件下における被験物質の突然変異誘起性は陰性であると結論した。

無菌試験ではS9Mixに菌の発育は観察されなかつた。

陽性対照として用いた2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine及び9-aminoacridineでは、陰性対照と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加を認めた。また、2-aminoanthraceneはS9Mix存在下で、著明な復帰変異を誘起した。

試験結果表1(用量設定試験)

被験物質: アクアプロ21Rによる生成水

代謝活性化の有無	用 量 (μ L/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型		フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照	122 95 (109)	6 8 (7)	35 29 (32)	25 29 (27)	2 4 (3)
	100	106 102 (104)	9 7 (8)	30 16 (23)	37 19 (28)	3 8 (6)
	200	102 99 (101)	6 11 (9)	36 20 (28)	15 16 (16)	13 8 (11)
	300	109 101 (105)	8 9 (9)	26 21 (24)	20 18 (19)	9 6 (8)
	400	111 104 (108)	11 10 (11)	21 16 (19)	11 22 (17)	9 9 (9)
	500	102 117 (110)	6 9 (8)	29 12 (21)	18 16 (17)	5 6 (6)
	陰性対照	95 109 (102)	6 7 (7)	15 25 (20)	33 32 (33)	17 26 (22)
	100	96 77 (87)	11 10 (11)	11 23 (17)	37 24 (31)	32 23 (28)
	200	80 78 (79)	6 6 (6)	24 29 (27)	19 25 (22)	21 22 (22)
	300	88 93 (91)	9 6 (8)	22 19 (21)	32 27 (30)	30 24 (27)
S9Mix (+)	400	82 88 (85)	9 6 (8)	27 24 (26)	20 28 (24)	23 25 (24)
	500	90 87 (89)	7 8 (8)	24 19 (22)	24 31 (28)	20 33 (27)
陽性としているもの	S9Mix 名称 用 量(μ g/プレート)	AF-2 0.01	ENNG 5	AF-2 0.01	AF-2 0.1	9-AA 80
		コロニー数 /プレート	855 809 (832)	7861 6868 (7365)	100 110 (105)	690 655 (673)
	S9Mix 名称 用 量(μ g/プレート)	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 10	2-AA 0.5	2-AA 2
		コロニー数 /プレート	1497 1470 (1484)	238 290 (264)	1069 1199 (1134)	609 404 (507)
対照とするもの	S9Mix 名称 用 量(μ g/プレート)	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 10	2-AA 0.5	2-AA 2
		コロニー数 /プレート	1497 1470 (1484)	238 290 (264)	1069 1199 (1134)	609 404 (507)

括弧内は各プレートのコロニー数の平均値を示す。

陰性対照: 注射用水

試験結果表2(本試験)

被験物質: アクアプロ21Rによる生成水

代謝活性化の有無	用 量 (μ L/ペレット)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型		WP2 uvrA	フレームシフト型	
		TA100	TA1535		TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照	95 101 (98)	4 8 (6)	11 25 (18)	16 14 (15)	13 11 (12)
	100	79 86 (83)	3 6 (5)	18 18 (18)	12 13 (13)	7 4 (6)
	200	103 96 (100)	12 10 (11)	24 10 (17)	13 18 (16)	12 10 (11)
	300	110 93 (102)	5 6 (6)	24 17 (21)	19 18 (19)	3 12 (8)
	400	120 100 (110)	12 8 (10)	17 18 (18)	15 21 (18)	8 13 (11)
	500	82 105 (94)	5 6 (6)	14 18 (16)	25 27 (26)	4 9 (7)
	陰性対照	85 89 (87)	9 11 (10)	26 31 (29)	29 26 (28)	15 17 (16)
	100	97 83 (90)	10 8 (9)	27 24 (26)	28 28 (28)	19 14 (17)
	200	98 98 (98)	5 8 (7)	21 26 (24)	25 24 (25)	16 19 (18)
	300	93 88 (91)	10 4 (7)	26 20 (23)	21 20 (21)	14 12 (13)
	400	103 105 (104)	6 4 (5)	17 22 (20)	27 35 (31)	15 21 (18)
	500	92 96 (94)	11 9 (10)	13 24 (19)	19 22 (21)	12 12 (12)
陽性对照	S9Mix 名称	AF-2	ENNG	AF-2	AF-2	9-AA
	を必要とする量(μ g/ペレット)	0.01	5	0.01	0.1	80
対照	S9Mix 名称	コロニー数/ プレート	745 748 (747)	7939 9319 (8629)	151 163 (157)	669 573 (621)
	を必要とする量(μ g/ペレット)	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
照とするもの	コロニー数/ プレート	1405 1421 (1413)	280 273 (277)	1379 1290 (1335)	397 408 (403)	196 189 (193)

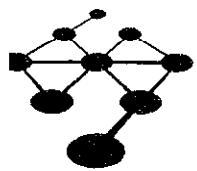
括弧内は各プレートのコロニー数の平均値を示す。

陰性対照: 注射用水

5 参考文献

- Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. : Cancer Lett., 1, 91-96(1975).
- Maron, D. M. and Ames, B. N. : Mutat. Res., 113, 173-215(1983).
- 労働省化学物質調査課編：“化学物質の有害性調査制度関係法令の解説”(1986)
中央労働災害防止協会.
- 労働省化学物質調査課編：“安衛法における変異原性試験”(1991)
中央労働災害防止協会.
- 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”(1996) 薬事日報社.

以 上



Japan
Food
Research
Labs

試験報告書

第 299080377-005 号

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

試験項目 培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験

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 10 月 29 日

財団法人
日本食品分析センター

東京本部 〒152-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
大阪支所 〒564-0051 大阪府吹田市豊津町3番1号
名古屋支所 〒460-0071 愛知県名古屋市中区大須4丁目5番13号
九州支所 〒812-0034 福岡市博多区下呂服町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

培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験

要 約

アクアプロ21Rによる生成水を検体として、「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」(平成7年薬機第99号別添)に準拠して、V79細胞を用いてコロニー形成阻害試験(直接曝露法及び培養液混合法)を行った。その結果、直接曝露法では、濃度依存的にコロニー形成を阻害し、その50 %コロニー形成阻害濃度(IC50)は試験-1では約15.1 %、試験-2では約12.6 %であった。また、培養液混合法でも、濃度依存的にコロニー形成を阻害し、その50 %コロニー形成阻害濃度(IC50)は試験-1では約27.1 %、試験-2では約19.7 %であった。

依頼者

アサヒプリテック株式会社
兵庫県神戸市西区室谷1-6-3 ハイテクパーク内

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24日～平成11年10月29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

検体を用いて、「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」(平成7年薬機第99号別添)に準拠して、V79細胞を用いたコロニー形成阻害試験を行う。

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)。

3 試験方法

1) 細胞の種類及び培養条件

細胞名	V79	入手先	理化学研究所	
種	チャイニーズ・ハムスター	入手年月日	1998年7月1日	
培養液(MEM)	イーグルMEM①*	製造元	日水製薬株式会社	
血清(濃度)	牛胎児血清(10 vol%)	製造元(Lot No.)	ICN(94998)	
細胞倍加時間	約14時間	凍結条件	-80°C	
試験に用いた細胞の継代数	直接曝露法：22代目 培養液混合法：19代目	培養条件	容器	プラスチックシャーレ
継代間隔	3～4日間		温度	37°C
備考	* Eagle's Minimum Essential Medium, 0.06 mg/mLカナマイシン含有		CO ₂ 濃度	5 %

2) 試験実施時の培養液(M05), 血清及び培養容器

培養液	MEMアール	製造元		コージン・バイオ株式会社	
		備考		非必須アミノ酸含有, 1 mmol/Lピルビン酸及び0.05 mg/mLカナマイシンを添加。	
血清	牛胎児血清	製造元	ICN	添加濃度	5 vol%
		Lot No.	94998		
培養容器[製造元]		ファルコン組織培養用プラスチックプレート24穴 [ペクトンディッキン]			

3) 試験に用いた試薬の組成

① 細胞の播種に用いる試薬

リン酸緩衝生理食塩液[PBS(-)](1 L)			トリプシン溶液[PBS(-)中]	
NaCl	8.0	g	2.5 %トリプシン(1:250)溶液 [コスモ・バイオ株式会社]	0.05 vol%
KCl	0.2	g		
Na ₂ HPO ₄	1.15	g	EDTA	0.02
KH ₂ PO ₄	0.2	g	(Ethylenediaminetetraacetic acid)	vol%

② 細胞の固定及び染色に用いる試薬

10 %中性リン酸緩衝ホルマリン溶液(1 L)		0.1 %メチレンブルー溶液(1 L)	
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	4.4	g	
Na ₂ HPO ₄	6.5	g	Methylene blue·4H ₂ O
ホルマリン液	100	mL	1.0 g

③ 標準物質

標準物質	名称	製造元	グレード	ロット
	Zinc diethyldithiocarbamate(ZDEC)	東京化成工業株式会社	1級	FBV01
	Zinc dibutyldithiocarbamate(ZDBC)	和光純薬工業株式会社	1級	PDL1635

4) 試験液の調製及び有効塩素濃度の測定

① 直接曝露法

依頼者により設置されたアクアプロ21Rを用いて試験直前に検体を採取し、よう素滴定法により、有効塩素濃度を測定した。

採取した検体と10倍濃度のPBS(-)を9:1の割合で混合したものを調製し、試験原液(100 %)とした。これをPBS(-)で希釈して0.5, 1, 5, 10, 50及び100 %の計6濃度の検体試験液を調製した。

また、陰性対照試験液としてはPBS(-)を、無処理試験液としてはM05培地を用いた。

② 培養液混合法

依頼者により設置されたアクアプロ21Rを用いて試験直前に検体を採取し、よう素滴定法により、有効塩素濃度を測定した。

採取した検体と2倍濃度のM05培地を等量混合して、試験原液(50 %)とした。これをM05培地で希釈して12.5, 25及び50 %の計3濃度の検体試験液を調製した。

また、無処理試験液としてはM05培地を用いた。

5) 試験操作法

単層に増殖したV79細胞をトリプシン処理によりはく離し、M05培地を用いて100個/mLの細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液を組織培養用プレートの各ウエルに0.5 mLずつ播種し、37°Cの5 %CO₂インキュベーター中で約6時間培養した後、以下の方法で試験を実施した。

① 直接曝露法

培養後、細胞がウエルの底面に接着していることを確認してから培地を除き、各濃度の検体試験液、陰性対照試験液及び無処理試験液を各々4個のウエルに0.5 mLずつ加え、37°Cの5 %CO₂インキュベーター中で30分間培養した。培養後、全てのウエルを新しい培養液に交換し、37°Cの5 %CO₂インキュベーター中で6日間培養した。培養終了後、各ウエルを10 %中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で30分間固定し、0.1 %メチレンブルー溶液で15分間染色して、細胞数50個以上のコロニーを計数した。

なお、検体については試験を2回繰り返して行い、それぞれ試験-1及び2とした。

② 培養液混合法

培養後、細胞がウエルの底面に接着していることを確認してから培地を除き、各濃度の検体試験液及び無処理試験液を各々4個のウエルに0.5 mLずつ加え、37°Cの5 %CO₂インキュベーター中で6日間培養した。培養終了後、各ウエルを10 %中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で30分間固定し、0.1 %メチレンブルー溶液で15分間染色して、細胞数50個以上のコロニーを計数した。

なお、検体については試験を2回繰り返して行い、それぞれ試験-1及び2とした。

4 試験結果及び考察

1) 有効塩素濃度

測定値は32 mg/L(直接曝露法)及び37 mg/L(培養液混合法)であった。

2) コロニー形成阻害試験

試験結果を表-1及び2、図-1及び2並びに写真-1及び2に示した。

直接曝露法では、検体試験液は濃度依存的にコロニーの形成を阻害し(写真-1)、陰性対照試験液におけるコロニー形成率を100 %とした時、Van der Waerden法で計算した50 %コロニー形成阻害濃度(IC50)は、試験-1において約15.1 %、試験-2において約12.6 %であった。また、陰性対照試験液におけるコロニー形成率は、無処理試験液に比べると低下していた。

培養液混合法でも、検体試験液は濃度依存的にコロニーの形成を阻害し(写真-2)、Van der Waerden法で計算した50 %コロニー形成阻害濃度(IC50)は、試験-1において約27.1 %、試験-2において約19.7 %であった。

直接曝露法で、陰性対照試験液は細胞毒性を示さないリン酸緩衝生理食塩液であることから、陰性対照試験液でのコロニー形成率が無処理試験液に比べて低下した理由として、①細胞がウエル底面に接着して間もない時期に試験液が交換されたために物理的に細胞がはがれた、②接着後間もない時期に栄養を含まない塩類溶液に交換されたため、接着不完全の細胞が浮き上がってしまった、などの要因が考えられた。

以上のことから、本試験条件下において、検体には濃度依存的な細胞毒性が認められた。なお、標準物質を用いてコロニー形成阻害試験を行った結果を表-3及び4並びに図-3及び4にそれぞれ示した。

表-1 検体のコロニー形成阻害試験の結果(直接曝露法)

濃度(%)	コロニー数/ウエル				平均	コロニー形成率(%) (無処理=100)	IC50(%)	
試験-1	0.5	44	39	48	40	42.8	97.7	15.1
	1	45	38	38	45	41.5	94.7	
	5	38	55	49	51	48.3	110.3	
	10	31	33	28	35	31.8	72.6	
	50	0	0	0	0	0.0	0.0	
	100	0	0	0	0	0.0	0.0	
試験-2	0.5	48	35	43	49	43.8	100.0	12.6
	1	44	38	35	36	38.3	87.4	
	5	33	36	36	46	37.8	86.3	
	10	34	40	28	32	33.5	76.5	
	50	0	0	0	0	0.0	0.0	
	100	0	0	0	0	0.0	0.0	
陰性対照 無処理		45	39	42	49	43.8	100.0	
		50	47	49	59	51.3	-	

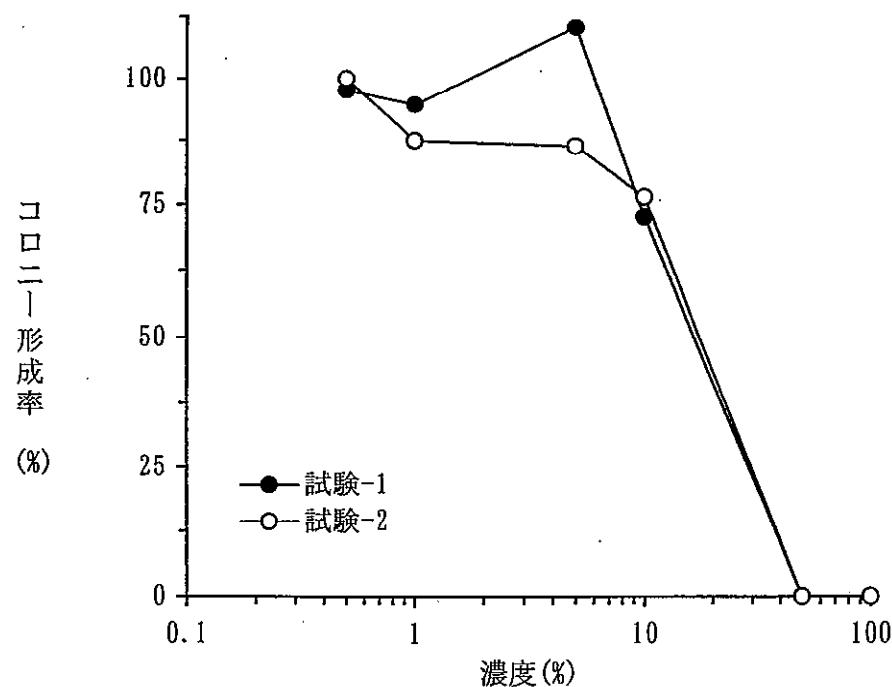


図-1 検体の用量反応

表-2 検体のコロニー形成阻害試験の結果(培養液混合法)

濃度(%)	コロニー数/ウェル				平均	コロニー形成率(%) (空抽出=100)	IC50(%)
試験-1	12.5	56	54	45	50.8	100.6	
	25	42	23	31	31.0	61.4	27.1
	50	0	0	0	0.0	0.0	
試験-2	12.5	38	45	41	44.5	88.1	
	25	10	15	9	13.8	27.3	19.7
	50	0	0	0	0.0	0.0	
無処理	45	53	53	51	50.5	100.0	

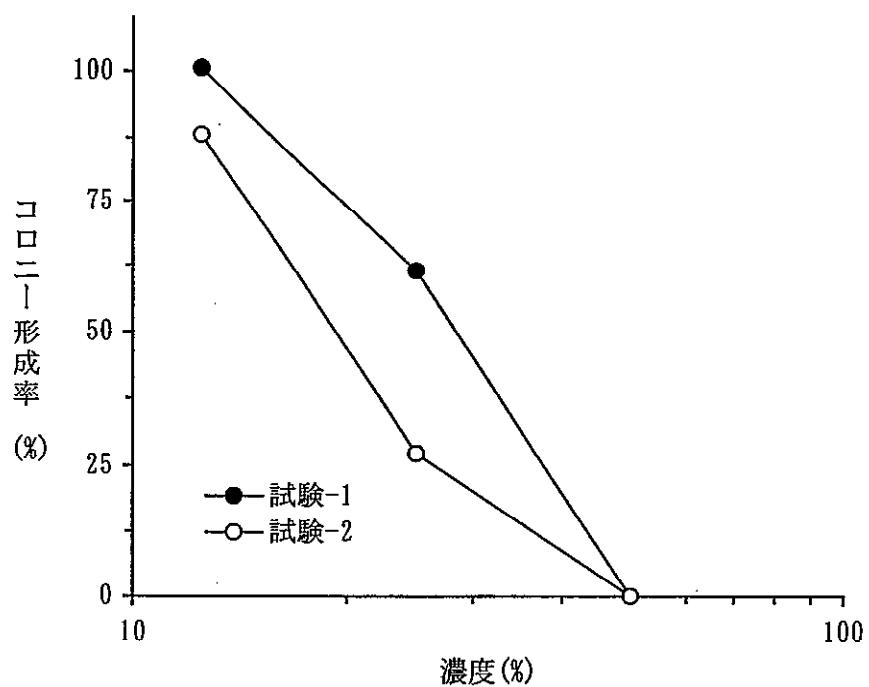


図-2 検体の用量反応

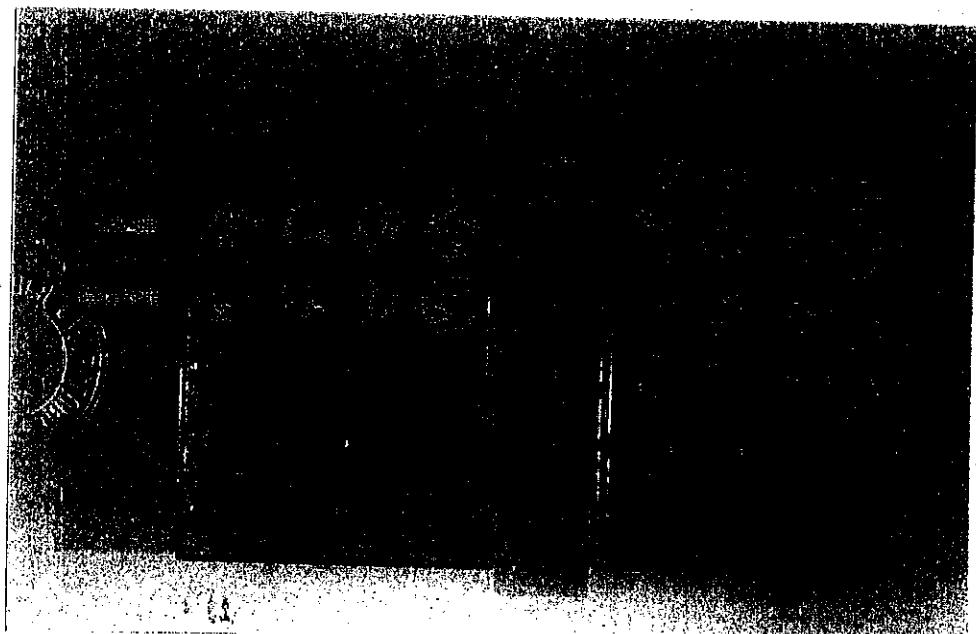


写真-1 コロニーの肉眼像(直接曝露法)

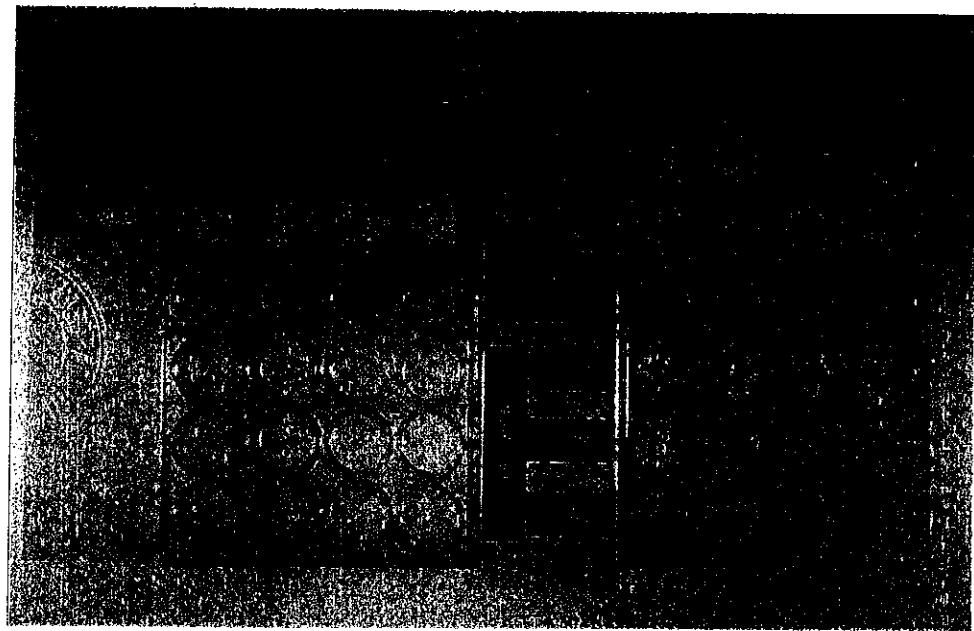


写真-2 コロニーの肉眼像(培養液混合法)

表-3 標準物質を用いたコロニー形成阻害試験の結果(22代目)

濃度(μg/mL)	コロニー数/ウェル			平均	コロニー形成率(%) (無処理=100)	IC50(μg/mL)
ZDEC	0.005	46	52	45.7	93.8	0.01
	0.01	30	33	29.3	60.2	
	0.02	0	0	0.0	0.0	
ZDBC	1	38	48	42.7	87.7	1.64
	2	11	17	14.0	28.7	
	5	0	0	0.0	0.0	
無処理	47	48	51	48.7	100.0	

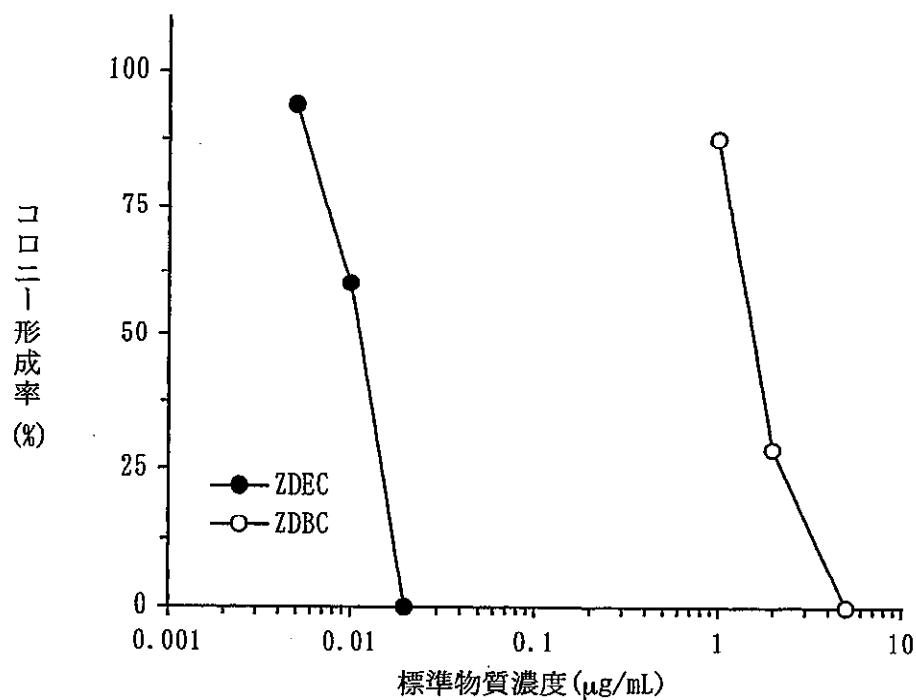


図-3 標準物質の用量反応

表-4 標準物質を用いたコロニー形成阻害試験の結果(19代目)

濃度(μg/mL)	コロニー数/ウェル			平均	コロニー形成率(%) (無処理=100)	IC50(μg/mL)
ZDEC	0.005	49	58	52.0	103.4	0.011
	0.01	32	33	33.7	67.0	
	0.02	0	0	0.0	0.0	
ZDBC	1	44	49	46.7	92.8	1.74
	2	19	12	16.0	31.8	
	5	0	0	0.0	0.0	
無処理	42	51	58	50.3	100.0	

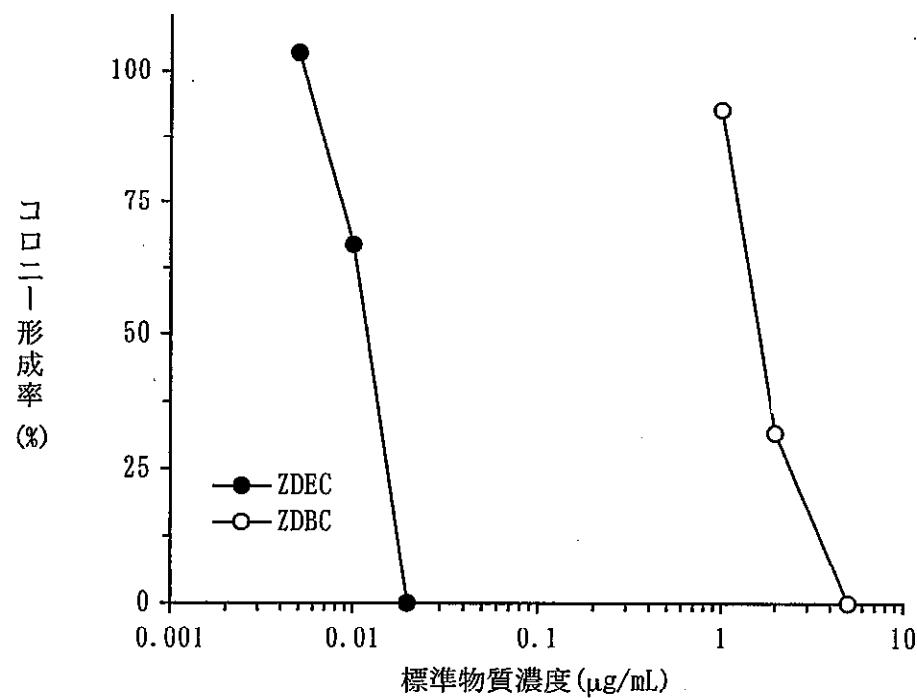
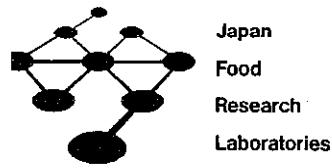


図-4 標準物質の用量反応

以 上



Japan
Food
Research
Labs

試験報告書

299080377-006 号

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 〒568-0050 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 福岡市博多区下呂服町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、検体についてはヨウ素滴定法により、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、潰瘍及び壞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を塗布したものを作成した。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、潰瘍及び壞
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箇所に、

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時間には壞死及び痂皮形成(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.

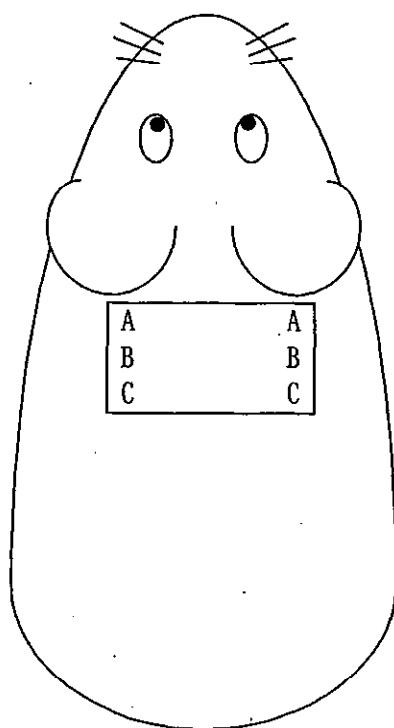


図-1 皮内注射及び貼付による感作誘導部位

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(からうじて識別できる)	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、潰瘍及び壞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(からうじて識別できる)	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]

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

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
	10	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
	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-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
	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-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
	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-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 %	48	4/0	4/0	4/0	4/1	4/1	100	4.4
DNCB	72	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	100	4.0

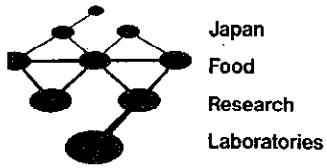
*1 単位: 時間

*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



Japan
Food
Research
Labs

試験報告書

第 299080377-002 号

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

試験項目 ウサギを用いた累積皮膚刺激性試験

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 10 月 15 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 〒554-0055 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 福岡市博多区下呂服町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

ウサギを用いた累積皮膚刺激性試験

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23日～平成11年10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

要 約

アクアプロ21Rによる生成水を検体として、MarzulliとMaibach(1975)の方法に準拠してウサギを用いた累積皮膚刺激性試験を行った。

検体及び原水(水道水)を試験液として、ウサギ7匹の無傷及び有傷皮膚に1日1回7時間、半閉鎖適用した。この操作を週に5回、3週間にわたって実施した(ただし、最後の週は4回)。

その結果、初回適用開始後7時間では、1例の原水適用部位(有傷皮膚)に非常に軽度な紅斑が見られたのみで、このほかの適用部位には刺激反応は認められなかった。このことから、本試験条件下では検体及び原水とともにウサギの皮膚に対する一次刺激性はほとんどないものと考えられた。その後適用を繰り返しても、いずれの試験液も散発的又は断続的に非常に軽度～はっきりした紅斑が観察されるにとどまり、刺激反応の程度に増強は見られず、試験液間に著差はなかった。以上のことから、本試験条件下において検体及び原水とともに、ウサギの皮膚に対する明らかな累積刺激性はないものと考えられた。

1 試験目的

検体について、MarzulliとMaibach(1975)¹⁾の方法に準拠し、ウサギにおける累積皮膚刺激性を調べる。

2 試験条件の設定

検体は医療施設などにおいて、施設、医療機器及び手指の消毒などに使用される。本試験ではヒトの実労働時間を考慮し、7時間適用とした。また、作業者が着用する手袋の内側に検体が入って手指が曝露されることや、ガーゼなどに浸み込ませて皮膚に適用する可能性を考え、これに近い条件である半閉鎖適用を選択した。また、検体と刺激性を比較する目的で、原水(水道水)を対照として使用した。

3 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)。

4 試験液の調製及び有効塩素濃度の測定

検体及び原水は毎日適用前に採取し、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 試験動物

日本白色種雄ウサギを北山ラバース株式会社から購入し、1週間以上の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、7匹を使用した。試験動物はFRP製ケージに個別に収容し、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。飼料はウサギ用固型飼料[CR-3、日本クレア株式会社]を制限給与し、飲料水は水道水を自由摂取させた。

6 試験方法

試験前に各試験動物の体幹背部被毛を剪毛した。体重測定後、試験動物1匹につき、直径約1.6 cmの円形の面積で4箇所を設定し、そのうち2箇所には18ゲージの注射針を用いて、真皮までは達しないように角化層に井げた状のすり傷を付け(有傷皮膚)，他の2箇所を無処置(無傷皮膚)とした。

インジェクションパッド[パッドの直径：約1.6 cm, パッドの厚さ：約0.3 cm, ニチバン株式会社]に0.5 mLの検体を含浸させ、無傷及び有傷皮膚の各1箇所ずつに貼付した。対照の原水についても同様に貼付した。また、パッドが皮膚と接触するように、更にナイロン製のネットで保持した。

適用時間は7時間とし、パッドが乾燥しないよう、適用開始後約4時間に各試験液0.3 mLを注射器を用いて追加注入した。適用時間終了後、適用部位を精製水で清拭した。これを3週間にわたって計14回実施した。すなわち、はじめの2週間は月から金曜日までの5日間、第3週は月から木曜日までの4日間適用を行った。なお、すり傷は各回の適用直前に付けた。また、ウサギが適用部位を舐めないよう、適用中は首かせ式固定器で固定した。適用開始後7時間(パッド除去直後)及び24時間並びに第2及び3週の月曜日の適用前に観察を行い、表-1に示したDraize法²⁾の基準に従って「紅斑及び痂皮の形成」並びに「浮腫の形成」の2項目について刺激反応の採点を実施した。初回適用開始後7時間の採点値を合計し、更に7匹の平均値を算出して一次刺激性インデックス(P.I.I.)とした。また、各試験動物について初回適用開始後7時間から最終適用開始後24時間までの採点値を合計して合計評点とし、更に7匹の平均を算出して平均合計評点を求めた。

なお、最終適用開始後24時間で刺激反応が認められた場合は、これが消失するまで当該部位について観察を続けた(回復期間)。

7 試験結果

1) 有効塩素濃度

結果を表-2に示した。

2) 皮膚刺激反応(表-3~7)

① 検体適用部位

無傷皮膚では、初回適用開始後7時間にいずれの適用部位にも刺激反応は見られなかった(P.I.I.=0)。その後1例(試験動物No.2)で2週目以降、他の1例(No.7)で3週目に散発的に非常に軽度～はっきりした紅斑(点数1～2)が見られたが、刺激反応の増強は認められなかった。残る5例では、試験期間を通して刺激反応は見られなかった。平均合計評点は0.9であった。

有傷皮膚では、初回適用開始後7時間にいずれの適用部位にも刺激反応は見られなかった(P.I.I.=0)。その後3例(No.1, 2及び7)で2週目以降、散発的又は断続して適用部位全体あるいはすり傷に限局して非常に軽度～はっきりした紅斑が認められ、また、1例(No.3)では最終適用開始後7時間にすり傷に限局して非常に軽度な紅斑が見られたが、刺激反応の増強は認められなかった。残る3例では、試験期間を通して刺激反応は見られなかった。平均合計評点は2.9であった。

② 原水適用部位

無傷皮膚では、初回適用開始後7時間にいずれの適用部位にも刺激反応は見られなかった(P.I.I.=0)。その後2例(No.2及び7)で2週目以降、他の2例(No.1及び4)では3週目から散発的又は断続して非常に軽度～はっきりした紅斑が見られたが、刺激反応の増強は認められなかった。残る3例では試験期間を通して刺激反応は見られなかった。平均合計評点は1.7であった。

有傷皮膚では、初回適用開始後7時間で1例(No.2)に非常に軽度な紅斑が見られた(P.I.I.=0.1)。その後1週目では、すべての試験動物で刺激反応が見られなかつたが、2週目以降5例(No.1, 2, 5～7)で、散発的又は断続して、適用部位全体あるいはすり傷に限局して非常に軽度～はっきりした紅斑が見られたが、刺激反応の増強は認められなかつた。残る2例では試験期間を通して刺激反応は見られなかつた。平均合計評点は3.7であった。

8 考 察

ウサギ7匹の無傷及び有傷皮膚に、検体及び原水(水道水)を1日1回7時間、半閉鎖適用した。この操作を週に5回、3週間にわたって実施した(ただし、最後の週は4回)。

その結果、初回適用開始後7時間では、1例の原水適用部位(有傷皮膚)に非常に軽度な紅斑が見られたのみで、このほかの適用部位には刺激反応は認められなかった。このことから、本試験条件下では検体及び原水ともにウサギの皮膚に対する一次刺激性はほとんどないものと考えられた。その後適用を繰り返しても、いずれの試験液も散発的又は断続的に非常に軽度～はっきりした紅斑が観察されるにとどまり、刺激反応の程度に増強は見られず、試験液間に著差はなかった。以上のことから、本試験条件下において検体及び原水とともに、ウサギの皮膚に対する明らかな累積刺激性はないものと考えられた。

なお、無傷皮膚と有傷皮膚を比較すると、いずれの試験液においても有傷皮膚の方が刺激反応の出現率が高いことから、角質層が除去された皮膚に対して刺激を生じやすい傾向にあるものと考えられた。

9 参考文献

- 1) F.N. Marzulli and H.I. Maibach: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 13, 533-540 (1975).
- 2) "Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics" (1959)
The Association of Food and Drug Officials of The United States.

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、潰瘍及び壞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]

表-2 検体の有効塩素濃度

適用回数 (回目)	有効塩素濃度 (mg/L)
1	37
2	37
3	29
4	36
5	32
6	27
7	24
8	35
9	32
10	43
11	46
12	32
13	35
14	29

表-3 試験動物の体重(試験開始時)

試験動物No.	体重(kg)
1	3.12
2	2.90
3	3.55
4	3.49
5	3.23
6	3.20
7	3.20

表-4 検体適用部位(無傷皮膚)の採点結果^{*1}

適用回数 (回目)	観察時間 (時間) ^{*2}	試験動物						
		1	2	3	4	5	6	7
1	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
2	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
3	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
4	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
5	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	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
6	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
7	7	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
8	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
9	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
10	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	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
11	7	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
12	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
13	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
14	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
合計評点 ^{*3}		0	2	0	0	0	0	4
P. I. I. ^{*4}					0			
平均±標準偏差 ^{*5}					0.9±1.6			

*1 数値は「紅斑・痂皮/浮腫」の順に示した。

*2 各回の適用開始後の観察時間を示した。

*3 初回適用開始後7時間から最終適用開始後24時間の採点値合計を示した。

*4 皮膚一次刺激性インデックス

*5 7匹の平均合計評点と標準偏差を示した。

表-5 検体適用部位(有傷皮膚)の採点結果^{*1}

適用回数 (回目)	観察時間 (時間) ^{*2}	試験動物						
		1	2	3	4	5	6	7
1	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
2	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
3	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
4	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
5	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	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
6	7	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0
	24	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
7	7	1 [#] /0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
8	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
9	7	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
10	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0
	24	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
11	7	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0
12	7	1 [#] /0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
13	7	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
14	7	0/0	0/0	1 [#] /0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
合計評点 ^{*3}		4	7	1	0	0	0	8
P. I. I. ^{*4}					0			
平均士標準偏差 ^{*5}					2.9±3.5			

*1 数値は「紅斑・痂皮/浮腫」の順に示した。

*2 各回の適用開始後の観察時間を示した。

*3 初回適用開始後7時間から最終適用開始後24時間の採点値合計を示した。

*4 皮膚一次刺激性インデックス

*5 7匹の平均合計評点と標準偏差を示した。

#：すり傷に限局して見られたことを示した。

表-6 原水適用部位(無傷皮膚)の採点結果^{*1}

適用回数 (回目)	観察時間 (時間) ^{*2}	試験動物						
		1	2	3	4	5	6	7
1	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
2	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
3	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
4	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
5	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	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
6	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
7	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
8	7	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
9	7	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
10	7	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0
	24	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
11	7	1/0	1/0	0/0	1/0	0/0	0/0	2/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0
12	7	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0	1/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
13	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
14	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
合計評点 ^{*3}		1	4	0	2	0	0	5
P.I.I. ^{*4}					0			
平均±標準偏差 ^{*5}					1.7±2.1			

*1 数値は「紅斑・癢皮/浮腫」の順に示した。

*2 各回の適用開始後の観察時間を示した。

*3 初回適用開始後7時間から最終適用開始後24時間の採点値合計を示した。

*4 皮膚一次刺激性インデックス

*5 7匹の平均合計評点と標準偏差を示した。

表-7 原水適用部位(有傷皮膚)の採点結果^{*1}

適用回数 (回目)	観察時間 (時間) ^{*2}	試験動物						
		1	2	3	4	5	6	7
1	7	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
2	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
3	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
4	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
5	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	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
6	7	1 [#] /0	1/0	0/0	0/0	1/0	0/0	1/0
	24	1 [#] /0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
7	7	1 [#] /0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	1 [#] /0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
8	7	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
9	7	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
10	7	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0
	24	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
11	7	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/0
	24	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
12	7	0/0	1/0	0/0	0/0	1/0	0/0	2/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
13	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
14	7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	24	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
合計評点 ^{*3}		4	11	0	0	2	1	8
P. I. I. ^{*4}		0.1						
平均士標準偏差 ^{*5}		3.7±4.3						

*1 数値は「紅斑・痂皮/浮腫」の順に示した。

*2 各回の適用開始後の観察時間を示した。

*3 初回適用開始後7時間から最終適用開始後24時間の採点値合計を示した。

*4 皮膚一次刺激性インデックス

*5 7匹の平均合計評点と標準偏差を示した。

#：すり傷に限局して見られたことを示した。

以上