

Japan
Food
Research
Laboratories

試験報告書

第 505030712-004 号

2005年(平成17年)07月20日

依頼者 株式会社 ビッグバイオ

検体 BB菌

表題 モルモットを用いたAdjuvant and Patch Test法による皮膚感作性試験

2005年(平成17年)03月21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。

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 〒564-0051 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
千歳研究所 〒066-0052 北海道千歳市文京2丁目3番

モルモットを用いた Adjuvant and Patch Test 法による皮膚感作性試験

要 約

BB菌を検体として、Adjuvant and Patch Test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匹にフロイントの完全アジュバントと生理食塩液の乳化物を皮内注射した後、検体原液を注射部位に3日間連続して24時間閉鎖適用した。その翌週に検体原液を48時間閉鎖適用した。この試験動物に対して、検体の50及び5 w/v%希釈液を用いて感作誘発を行った。その結果、適用後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

株式会社 ビッグバイオ

検 体

BB菌

試験実施期間

平成17年5月20日～平成17年7月20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
勝田 真一

試験実施者

嶋崎 智子 , 永井 武 , 深井 純 , 川本 康晴

1 試験目的

検体について、Adjuvant and Patch Test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

BB菌

性状：黄色透明液体

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2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 $22\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、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 予備試験(感作誘導及び感作誘発に用いる試験液濃度の確認)

1) 試験方法

検体原液並びに検体の50及び25 w/v%希釈液を各濃度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感作誘導に用い、また、皮膚反応が認められない最高濃度を上限濃度として感作誘発に用いることとした。

2) 試験結果

検体原液適用部位において紅斑が見られたが、50 w/v%以下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導には検体原液、感作誘発には50 w/v%を上限濃度として検体の希釈液を用いることとした。

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352~383 gであった。

2) 感作誘導1

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、更に電気剃刀で剃毛した。図-1に示したように、剃毛部の2 cm×4 cmの四隅に、E-FCA^{*1}を0.1 mLずつ皮内注射した。この上に注射針で井げた状に擦過傷を設け、試験群では検体原液、陰性対照群では注射用水、陽性対照群ではDNCB^{*2}の0.1 %ワセリン混合物をそれぞれ0.1 mLずつ直径1.5 cmのパッチ[パッチテスト用絆創膏, 鳥居薬品株式会社]に塗布し、皮内注射部位4箇所³に24時間閉鎖適用した。この操作を1日1回、3日間連続して実施した。ただし、2回目の操作からE-FCAの皮内注射は行わなかった。

なお、2及び3回目の適用前に適用部位を70 %エタノールで清拭した。

3) 感作誘導2

感作誘導1開始後1週間に肩甲骨上を剪毛及び剃毛し、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、試験群では検体原液、陰性対照群では注射用水、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、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。

4) 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50及び5 w/v%希釈液、陰性対照群では注射用水、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適用した。陰性対照群には試験群と同様に検体の50及び5 w/v%希釈液を適用した^{*3}。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。

5) 試験結果及び結論(表-2~7)

試験群では、適用後48及び72時間の各観察時間において、検体の50及び5 w/v%希釈液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)。

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、注射用水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50及び5 w/v%希釈液適用部位においても皮膚反応は見られず、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時間に壊死及び痂皮形成(ともに点数4)並びに浮腫(点数1)、72時間に壊死及び痂皮形成が見られた。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：4.2及び4.0)。

なお、陽性対照群の1例で試験期間中に体重減少が認められたが、一般状態に異常は見られなかった。その他の試験動物においては試験期間中の体重変化に異常は見られず、一般状態にも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 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。
- *2 2,4-dinitrochlorobenzene [和光純薬工業株式会社]
- *3 false positive responseの確認のため、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。

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.

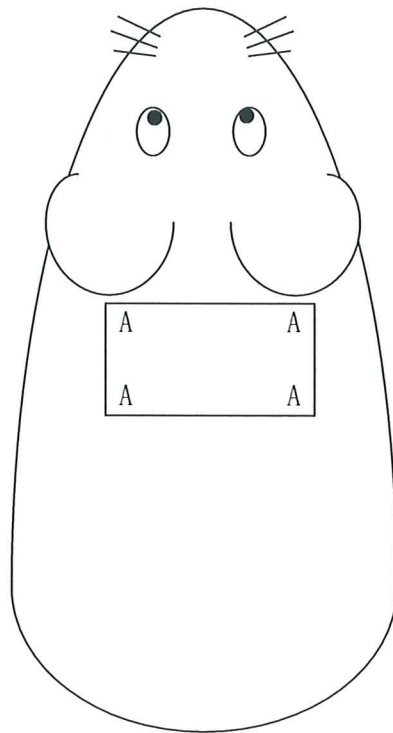


図-1 皮内注射及び閉鎖適用による感作誘導部位
AはE-FCA皮内注射部位, は適用部位 (2 cm×4 cm) を示す。

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 (w/v%)	観察時間 (時間)	陽性率 (%)	平均評価点
試験群	10	50	48	0	0
			72	0	0
		5	48	0	0
			72	0	0
陰性対照群	5	0 ^{*1}	48	0	0
			72	0	0
		50 ^{*2}	48	0	0
			72	0	0
		5 ^{*2}	48	0	0
			72	0	0
陽性対照群 ^{*3} (DNCB)	5	0.1	48	100	4.2
			72	100	4.0

*1 溶媒として用いた注射用水を適用した。

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

*3 ワセリン混合物(%)

表-3 試験群の感作誘発結果

適用濃度 (w/v%)	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			
50	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
5	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-4 陰性対照群の感作誘発結果

適用物質	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		
注射用水	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 (w/v%)	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		
50	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
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 ^{*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 ^{*3}	48	4/0	4/0	4/0	4/1	4/0	100	4.2
	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 (g)	試験終了時 (g)
試験群	1	369	478
	2	367	430
	3	369	426
	4	352	426
	5	383	477
	6	383	458
	7	377	470
	8	367	467
	9	372	451
	10	363	415
陰性対照群	1	358	423
	2	373	404
	3	366	428
	4	374	392
	5	356	366
陽性対照群	1	355	410
	2	356	389
	3	364	432
	4	359	367
	5	382	371

以 上