



生物学的安全性試験

皮膚刺激性試験

報告書

合同会社STH殿

株式会社メイプルバイオラトリーズ

化粧品製造業許可12C Z 200259、

化粧品製造販売業許可12C O X 10014

〒270-1402 千葉県白井市平塚2802-1

電話 04-7100-0001

e-mail; inquiry@maple-biolab.com

2021年6月26日

目的

合同会社STH殿が開発した製剤（CLEANEST NFE2）の生物学的安全性（皮膚刺激性）試験を行う。

試験期間

2021年6月14日から6月25日

試験方法

試験方法は OECD TG439 に準拠した。

試験結果

試験に使用された検体（合同会社 STH 殿提供の CLEANEST NFE2）には皮膚刺激性は確認されなかった。



生物学的安全性試験 皮膚刺激性試験 報告書

合同会社 STH 殿

株式会社メイプルバイオラボラトリーズ

化粧品製造業許可12C Z 200259、

化粧品製造販売業許可12C O X 10014

〒270-1402 千葉県白井市平塚2802-1

電話 04-7100-0001

e-mail; inquiry@maple-biolab.com

2021年6月26日

1. 目的（皮膚刺激性試験）

合同会社STH殿が開発した製剤（CLEANEST NFE2）の生物学的安全性（皮膚刺激性）試験を行う。

2. 試験方法

試験期間；2021年6月14日から6月25日

合同会社 STH 殿が開発した製剤（CLEANEST NFE2）を、皮膚刺激性試験（OECD TG439）のプロトコールに従って試験し、細胞生存率から生物学的安全性（皮膚刺激性）を判定する。

株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング（愛知県蒲郡市）より皮膚刺激性試験キット（LabCyte EPI-Model）を購入し、使用した。

キットの内容； LabCyte EPI-Model プレート
アッセイ培地
24 ウエルアッセイプレート

その他の試薬類； ラウリル硫酸ナトリウム（SLS）
蒸留水
リン酸緩衝液
滅菌綿棒
MTT 試薬
イソプロパノール
マイクロチューブ
炭酸ガス培養用パック（アネロパック・CO2）

使用機器； インキュベーター（FUKUSHIMA）
分光光度計（日立 U-2900）

3. 試験溶液の調製

陽性対照の調製； SLS500mg を秤量した。
滅菌蒸留水を添加して 10mL とした。
陰性対照； 滅菌蒸留水
リン酸緩衝液； 50mM リン酸緩衝液（pH7.2）を調整し、滅菌したポリ洗浄瓶に充填した。
MTT 培地； MTT 試薬（6mg）をアッセイ培地（12mL）に溶解した。

MTT 試薬 = [3-(4,5-Dimethylthial-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]
淡黄色の基質で、生細胞のミトコンドリアにより開裂して晴青色のホルマザンを生成する（死細胞では開裂しないため無色）。このホルマザンの生成量は生細胞数と相関している。

4. 皮膚刺激性試験

試験検体は合同会社 STH 殿が開発した製剤（CLEANEST NFE2）と陰性対照（滅菌精製水）及び陽性対照（SLS）を使用した。

5. 試験操作

アッセイ培地を 37℃のウオーターバスで加温した。
アッセイプレート（4 行 x 6 列）の 1 行目にアッセイ培地を 0.5mL ずつ分注した。
LabCyte EPI-Model の中から培養カップを取り出し、アッセイ培地を分注したアッセイプレートのウェルに移した。
炭酸ガス培養用パックを入れた密閉容器の中にアッセイプレートを入れ、25℃インキュベーターで 18 時間培養した。
インキュベーターから取り出したアッセイプレートの第 3 行目に、ウオーターバスで 37℃に加温したアッセイ培地を 1.0mL ずつ分注した。
炭酸ガス培養用パックを入れた密閉容器の中にアッセイプレートを入れ、25℃インキュベーターで 3 時間培養した。

被験物質（CLEANEST NFE2、陽性対照、陰性対照）から 25 μ L ずつをピペットで取り、第 1 行にある培養表皮表面に滴下した（n = 3）。

各ウエルに被験物質を滴下する時はタイマーを使用して 1 分ごとに滴下した。

被験物質暴露 15 分後、培養カップをピンセットで取り出し、リン酸緩衝液でカップ内を洗浄した。

15 回洗浄を繰返した後、カップ外側を滅菌綿棒で余分のリン酸緩衝液を拭取った。

洗浄した培養表皮の入ったカップを第 3 行の培養液中に移した。

培養後のアッセイプレートインキュベーターから取り出し、第 4 行目のウエルに 37 $^{\circ}$ C ウォーターバスで温めた MTT 培地を 0.5mL ずつ分注した。

炭酸ガス培養用パックを入れた密閉容器の中にアッセイプレートを入れ、25 $^{\circ}$ C インキュベーターで 42 時間培養した。

培養表皮を第 3 行から取り出し、MTT 培地の入った第 4 行のウエルに移した。

炭酸ガス培養用パックを入れた密閉容器の中にアッセイプレートを入れ、25 $^{\circ}$ C インキュベーターで 3 時間培養した。

反応後第 4 行の各ウエル内の培養表皮をピンセットでつまみ取り出し 1.5mL マイクロチューブに入れた。

イソプロパノール 300 μ L を入れ、培養表皮を完全に浸漬した。

冷蔵庫内で放置し色素を抽出した。

48 時間後に吸光度を測定した。

マイクロチューブの抽出液を、分光光度計を用いて 570nm、及び 650nm の吸光度を測定した。

生細胞率は以下の式にあてはめて算出した。

$$\begin{aligned} \text{測定値} &= \{ \text{検体の吸光度 (570nm)} - \text{検体の吸光度 (650nm)} \} \\ &\quad - \{ \text{ブランクの吸光度 (570nm)} - \text{ブランクの吸光度 (650nm)} \} \end{aligned}$$

$$\text{生細胞率} = \frac{\text{被験物質の測定値平均}}{\text{陰性対照の測定値平均}} \times 100$$

(測定値平均は n = 3 の試験で測定した値の平均値)

6. 判定基準

生細胞率 50%以下 … 刺激性ありと判定される。

生細胞率 50%より高い … 非刺激性と判定される。

7. 結果； 吸光度の測定結果は以下の表-1 の通り。

表-1. 検体の吸光度と生細胞率

被験物質名	サンプル No.	検体の吸光度 (570nm)	検体の吸光度 (650nm)	ブランクの吸光度 (570nm)	ブランクの吸光度 (650nm)	測定値	測定値平均	生細胞率 (%)	判定
滅菌精製水 (陰性対照)	(-) -1	1.556	0.226	0.000	0.000	1.330	1.314	100.00%	非刺激性
	(-) -2	1.539	0.223	0.000	0.000	1.316			
	(-) -3	1.693	0.397	0.000	0.000	1.296			
5% SLS 溶液 (陽性対照)	(+) -1	0.389	0.303	0.000	0.000	0.086	0.079	6.04%	刺激性
	(+) -2	0.275	0.199	0.000	0.000	0.076			
	(+) -3	0.302	0.226	0.000	0.000	0.076			
STH クリーンIST NFE 2	①-1	1.513	0.225	0.000	0.000	1.288	1.371	104.36%	非刺激性
	①-2	1.691	0.249	0.000	0.000	1.442			
	①-3	1.737	0.353	0.000	0.000	1.384			

図-1 検体の吸光度



滅菌精製水（陰性対照）の生細胞率を 100%とし、非刺激性とする。

5% SLS 溶液（陽性対照）の生細胞率は 6.04%であり、刺激性と判定される。

試験検体（STH クリーンIST NFE 2）の生細胞率は 104.36%であり、非刺激性と判定される。

判定

試験に使用された検体（合同会社 STH 殿提供の CLEANEST NFE2）には皮膚刺激性は確認されなかった。

2021年6月26日

株式会社メイプルバイオラボラトリーズ