

試験方法

試験動物種；

マウス CBA/J（日本チャールスリバー社より 2021 年 6 月 3 日に 25 匹購入）
株式会社蛋白精製工業（伊勢崎市）のマウス飼育室にて飼育を依頼した。
（温度 22℃、湿度 60%、人工照明にて 12 時間間隔で照明）

リンパ球 ATP 含量の測定；

試験検体をマウスの耳に塗布し、8 日間飼育した後、耳介リンパ節を摘出して、ATP 濃度を測定した。

測定器（ルミノメーター）はキッコーマン C-110 を使用した。

皮膚感作性を判断するためにリンパ球 ATP 含量を測定する根拠は以下の通り。

感作物質を適用した耳介に關与するリンパ節（耳介リンパ節）では、リンパ球の増殖が誘導される。それに伴ってリンパ球起源の ATP 濃度が上昇するという基本原理に基づいている。この上昇は、用量と適用アレルゲンの効力に比例しており、それにより感作能を定量的に測定できる。

試験手順

試験検体；CLEANEST NFE2（室内用）（合同会社 STH 様から送付された抗菌性光触媒溶液）

陽性対照（PC）；25%ヘキシルシンナムアルデヒド

溶媒；アセトン：オリーブ油（4：1 v/v）

アセトン；関東化学（試薬特級）

オリーブ油；日光ケミカルズ（化粧品グレード）

試験動物数；

試験群；5 群、マウス（CBA/J）1 群 5 匹（合計 25 匹）

試験材料の調整

5 匹 5 群のマウスに投与する試験材料は各群に対して以下の通りに調製した。

第 1 群；陰性対照（NC）；（アセトン：オリーブ油（4：1 v/v））

第 2 群；被験物質、濃度 100%

第 3 群；被験物質、濃度 75%（アセトン：オリーブ油（4：1 v/v）で希釈）

第 4 群；被験物質、濃度 50%（アセトン：オリーブ油（4：1 v/v）で希釈）

第 5 群；陽性対照（PC）；25%ヘキシルシンナムアルデヒド

（アセトン：オリーブ油（4：1 v/v）で希釈）

紅斑スコアは OECD TG442A の規格に従い、以下のように設定した。

表1. 紅斑スコア	スコア
紅斑なし	0
ごく軽度の紅斑（かろうじて識別できる）	1
はっきりした紅斑	2
中等度から重度の紅斑	3
重度の紅斑（ビート様の色）から紅斑の採点ができないほどの痂皮形成	4

試験スケジュール

1 日目；

個体の識別；各試験群の 5 匹のマウスの尻尾部分に油性マーカーを用いて、黒色 1 本（番号①）、黒色 2 本（番号②）、赤色 1 本（番号③）、赤色 2 本（番号④）、青色 1 本（番号⑤）の線を引き個体の識別を行った。

体重測定；各マウスの体重および一般状態を記録した。

試験検体の塗布；1%ラウリル硫酸ナトリウム（SLS）水溶液を 25 μ L ずつ各マウスの左右の耳介に塗布した。1 時間後に各群の 5 匹のマウスに、第 1 群には陰性対照（NC）としてアセトン：オリーブ油（4：1 v/v）を、第 2 群には被験物質の濃度 100%液を、第 3 群には被験物質の濃度 75%液を、第 4 群には被験物質の濃度 50%液を、第 5 群には陽性対照（PC）として 25%ヘキシルシナムアルデヒドを 25 μ L ずつ滴下し、塗布した。

2 日目、3 日目、7 日目；

1 日目に実施した 1%SLS 溶液による前処理及び試験検体の適用操作を繰り返した。

8 日目；

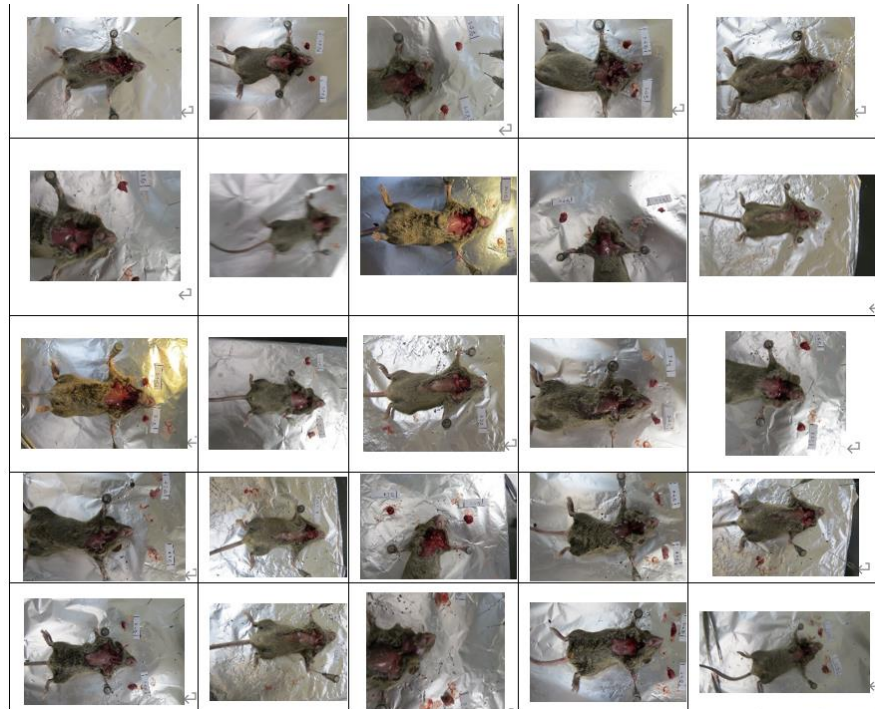
各マウスの体重および耳介の紅斑程度を記録した。

頸椎を脱臼することによりマウスを安楽死させた後、耳介リンパ節を摘出した。

細胞懸濁液の調製

採取した耳介リンパ節をビニール袋に入れ、二枚のライドグラスに挟んで細胞組織を破碎した後 1mL の PBS を加えて溶解した。この液から 20 μ L を取り 1.98mL の PBS に溶解し、1 匹当たり 2 試料を調製した。

リンパ節切除時の試験マウスの写真



リンパ球 ATP 含量の測定

ルミテスターはキックマン C110 を使用した。



細胞懸濁液 100 μ L をルミチューブにとり、ATP 発光抽出試薬 100 μ L を添加した。
30 分後に ATP 発光試薬を 100 μ L 添加し、20 秒後に発光強度を測定した。

1. 試験結果

表2. 体重 (g)、耳介厚さ (mm)、紅斑スコア、ATP 濃度 (RLU)

処置	番号	1日目		2日目		3日目		7日目		8日目				ATP 右 (RLU)	ATP 左 (RLU)	
		体重 (g)	耳介厚 右 (mm)	耳介厚 左 (mm)	耳介厚 右 (mm)	耳介厚 左 (mm)	耳介厚 右 (mm)	耳介厚 左 (mm)	耳介厚 右 (mm)	耳介厚 左 (mm)	耳介厚 右 (mm)	耳介厚 左 (mm)	体重 (g)			紅斑スコア
NC	1 1	20.81	0.25	0.24	0.29	0.24	0.19	0.19	0.27	0.25	0.25	0.26	21.57	0	31,075	55,715
	1 2	23.99	0.28	0.20	0.25	0.29	0.22	0.29	0.25	0.25	0.29	0.26	24.42	0	34,276	28,919
	1 3	22.45	0.32	0.20	0.29	0.29	0.32	0.20	0.21	0.27	0.27	0.25	22.53	0	73,810	44,033
	1 4	21.36	0.27	0.25	0.36	0.27	0.24	0.28	0.27	0.29	0.15	0.21	22.32	0	25,465	67,232
	1 5	21.92	0.22	0.20	0.19	0.21	0.26	0.28	0.27	0.27	0.25	0.25	22.92	0	99,946	48,103
50%	2 1	21.59	0.25	0.23	0.32	0.24	0.24	0.28	0.25	0.31	0.26	0.34	21.64	0	97,493	55,880
	2 2	21.77	0.24	0.24	0.25	0.20	0.19	0.26	0.23	0.29	0.18	0.28	23.10	0	55,682	92,136
	2 3	21.03	0.26	0.28	0.21	0.22	0.21	0.22	0.29	0.23	0.26	0.30	22.91	0	52,470	62,898
	2 4	23.84	0.27	0.26	0.20	0.24	0.22	0.22	0.23	0.25	0.26	0.24	24.90	0	46,134	28,831
	2 5	25.87	0.28	0.34	0.26	0.23	0.28	0.26	0.30	0.33	0.19	0.34	27.12	0	47,542	35,519
75%	3 1	22.74	0.21	0.28	0.25	0.25	0.25	0.21	0.30	0.30	0.22	0.35	23.51	0	75,944	55,704
	3 2	22.56	0.23	0.19	0.27	0.22	0.22	0.18	0.23	0.19	0.26	0.21	23.86	0	49,610	80,025
	3 3	22.51	0.23	0.27	0.19	0.22	0.24	0.22	0.23	0.26	0.21	0.33	23.52	0	24,310	38,038
	3 4	21.25	0.21	0.19	0.23	0.25	0.23	0.25	0.20	0.27	0.24	0.31	22.06	0	59,895	72,831
	3 5	23.50	0.23	0.22	0.28	0.24	0.22	0.22	0.24	0.22	0.26	0.26	23.26	0	34,155	40,645
100%	4 1	23.56	0.26	0.30	0.24	0.25	0.22	0.23	0.37	0.26	0.30	0.20	24.23	0	75,603	85,217
	4 2	21.10	0.26	0.18	0.23	0.26	0.24	0.23	0.27	0.28	0.15	0.23	20.86	0	46,959	33,715
	4 3	24.32	0.22	0.19	0.25	0.22	0.23	0.28	0.23	0.24	0.31	0.32	24.12	0	53,416	24,926
	4 4	22.16	0.21	0.26	0.22	0.21	0.23	0.26	0.21	0.25	0.24	0.19	22.85	0	54,967	41,657
	4 5	23.51	0.39	0.25	0.26	0.25	0.22	0.23	0.25	0.27	0.26	0.36	24.45	0	49,368	31,526
PC	5 1	22.29	0.24	0.23	0.31	0.22	0.28	0.24	0.31	0.29	0.56	0.37	22.28	1	92,356	110,957
	5 2	23.27	0.23	0.24	0.24	0.21	0.24	0.30	0.29	0.31	0.23	0.39	23.61	1	121,187	118,954
	5 3	22.95	0.25	0.23	0.27	0.32	0.20	0.23	0.31	0.24	0.29	0.32	24.06	1	120,780	100,958
	5 4	24.48	0.31	0.23	0.24	0.26	0.23	0.22	0.36	0.35	0.35	0.31	24.77	1	117,876	122,265
	5 5	25.85	0.24	0.37	0.20	0.29	0.22	0.27	0.33	0.37	0.37	0.33	26.28	1	157,069	159,005

図-1. 塗布による耳介厚さの変化 (mm)

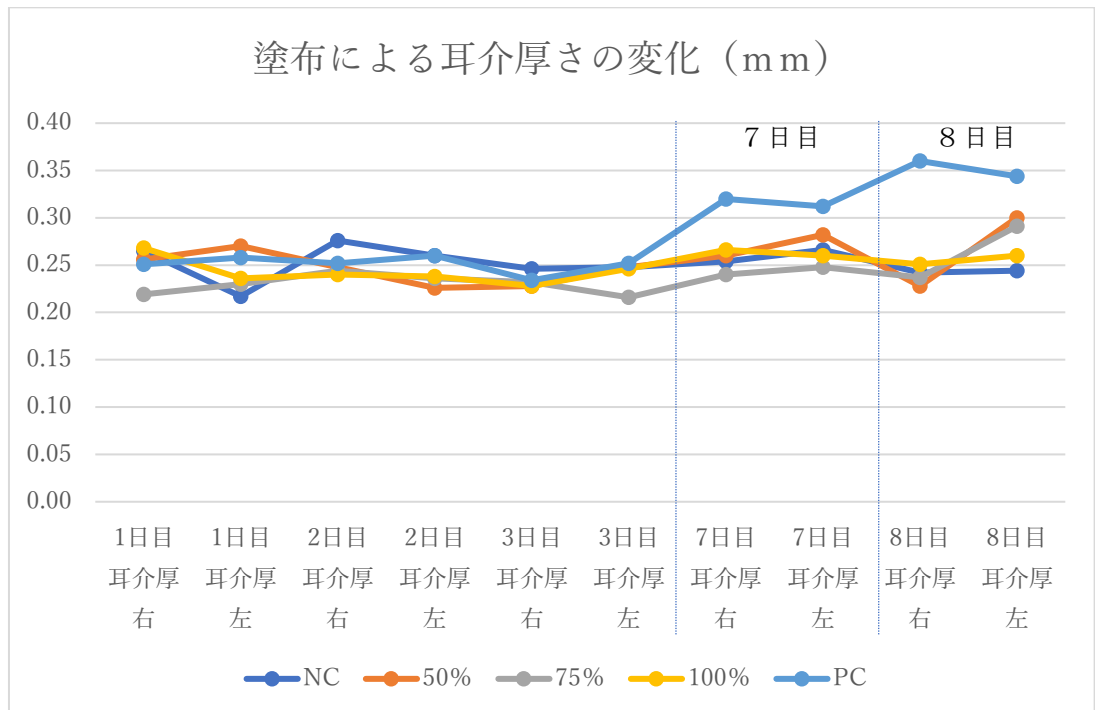
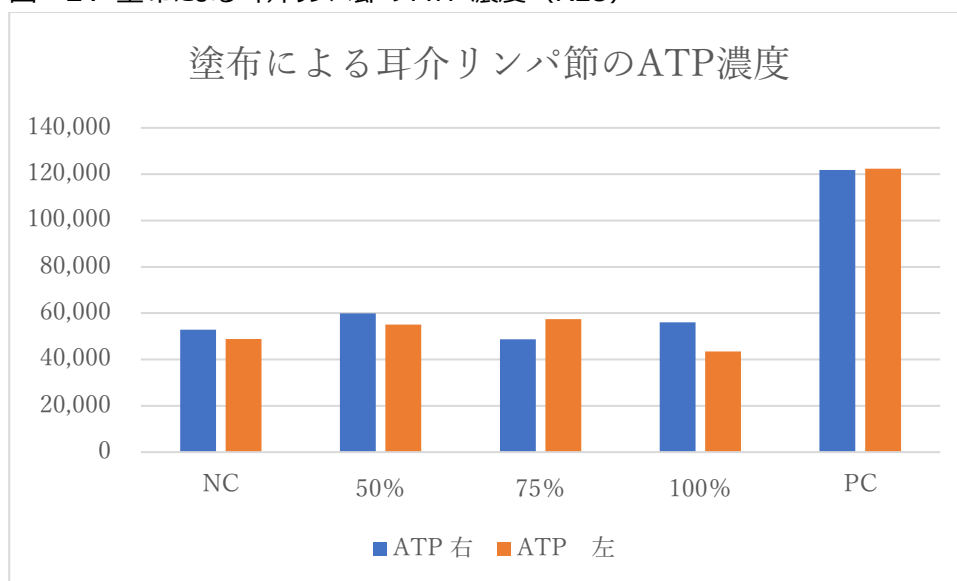


図-2. 塗布による耳介リンパ節のATP濃度 (RLU)



5. 考察

塗布による耳介厚の変化

製品 (50%、75%、100%) を塗布した左右の耳介厚は 8 日目でも陰性コントロールと同程度であった。

陽性コントロールは 7 日目、及び 8 日目に耳介厚が増加傾向を示していた。

塗布による耳介紅斑

製品 (50%、75%、100%) を塗布した左右の耳の紅斑は確認されなかった。

陽性コントロールの紅斑は 8 日目ですべてのマウスで辛うじて確認できる程度 (スコア 1) であった。

塗布によるATP濃度の変化

製品 (50%、75%、100%) を塗布した左右の耳介リンパ節のATP濃度は陰性コントロールと同程度であった。

陽性コントロールのATP濃度は増加していることが確認された。

6. 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 (室内用)) には皮膚感作性は確認されなかった。

試験担当者

大西 守 (資格 ; 理学博士)、持田 弘 (資格 ; 理学博士)、長田健司 (資格 ; 臨床検査技師)
株式会社メイプルバイオラボトリーズ