

試 験 報 告 書

依 頼 者 ナノ・グラス・コート・ジャパン株式会社

一般財団法人

日本食品分析センター

東京都渋谷区元代々木町52番1号



検 体 MR-43W (10%濃度)

表 題 モルモットを用いるMaximization法による皮膚感作性試験

2021 年 07 月 09 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をご報告いたします。

モルモットを用いるMaximization法による皮膚感作性試験

要 約

MR-43W (10%濃度)を検体として、モルモットを用いるMaximization法による感作性試験を行った。

一次感作として、検体原液をモルモットに皮内注射した。二次感作として、検体原液を約48時間閉塞貼付した。これらのモルモットに対して、検体原液、検体の注射用水による希釈系列(500及び100 mg/mL)及び注射用水を用いて惹起を行った。

その結果、いずれの適用部位においても皮膚反応は認められなかった。

以上のことから、検体は本試験条件下において感作性を有しないと評価された。

1 依頼者

ナノ・ガラス・コート・ジャパン株式会社

2 検 体

MR-43W (10%濃度)

3 試験実施施設

一般財団法人日本食品分析センター 千歳研究所
北海道千歳市文京2丁目3番

4 試験責任者

一般財団法人日本食品分析センター 千歳研究所
安全性試験部 安全性試験課
高木 悠

5 試験期間

2021年07月09日～2021年10月04日

6 試験目的

検体について、モルモットを用いるMaximization法による感作性試験を行う。

7 溶解性の検討

1) 試験方法

検体について、皮内注射又は閉塞貼付が可能な媒体に対する溶解性を確認した。

検体に生理食塩液又は注射用水を加えて500 mg/mLに調製した。検体の各媒体に対する溶解性(溶解、懸濁又は分離)を目視で確認した。

2) 試験結果

検体の各媒体に対する溶解性を表-1に示した。

表-1の結果から、皮内注射による一次感作の媒体には生理食塩液、閉塞貼付による二次感作及び惹起の媒体には注射用水を選択した。

表-1 溶解性の検討結果

媒体	溶解性	備考*
生理食塩液	溶解	皮内注射による一次感作
注射用水	溶解	閉塞貼付による二次感作及び惹起

* 感作性試験の操作ごとに使用できる媒体が異なるため、使用できる操作を記載した。

8 試験動物

4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、4日間以上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動物を予備試験に4匹(試験開始時5週齢)、本試験に20匹(一次感作開始時6週齢)使用した。本試験には一次感作開始時の体重が300 g～500 gの動物を使用した。試験動物はFRP製ケージに1又は2匹収容し、室温20℃～26℃、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[ウサギ・モルモット用ガンマ線照射飼料；LRC4，オリエンタル酵母工業株式会社]及び飲料水(水道水)は自由に摂取させた。

9 予備試験

1) 試験方法

① 予備試験1

皮内注射による一次感作に用いる試験液濃度を検討した。

試験動物2匹のあらかじめ剪毛及び剃毛した肩甲骨上背部に、検体原液、検体の生理食塩液による希釈系列(500, 250, 100及び50 mg/mL試験液)及び生理食塩液を0.1 mLずつ皮内注射した。注射後約24, 48及び72時間並びに7日に観察を行い、局所に潰瘍などの組織のはく離、脱落が認められない最高濃度を皮内注射による一次感作に用いることとした。

② 予備試験2

閉塞貼付による二次感作に用いる試験液濃度を検討した。

試験動物2匹(予備試験1で使用した動物)のあらかじめ剪毛及び剃毛した側腹部に、検体原液、検体の注射用水による希釈系列(500及び250 mg/mL試験液)及び注射用水を0.1 mLずつ約2 cm×2 cmのろ紙に塗布し、閉塞貼付した。適用後約24時間にろ紙を除去し、適用部位をWiSM消毒用アルコールライト[ヤクハン製薬株式会社]で清拭した。清拭後約24及び48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閉塞貼付による二次感作に用いることとした。

③ 予備試験3

閉塞貼付による惹起に用いる試験液濃度を検討した。

試験動物2匹を使用した。E-FCA*を皮内注射し、注射後21日に、あらかじめ剪毛及び剃毛した側腹部に、検体原液、検体の注射用水による希釈系列(500及び250 mg/mL試験液)及び注射用水を0.1 mLずつ約2 cm×2 cmのろ紙に塗布し、閉塞貼付した。適用後約24時間にろ紙を除去し、適用部位をWiSM消毒用アルコールライトで清拭した。清拭後約24及び48時間に観察を行い、局所に皮膚反応が認められない最高濃度を惹起における上限濃度として用いることとした。

- * 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。)及び生理食塩液の1:1(v/v)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、惹起の予備試験はFCA処置動物を用いて行った。

2) 試験結果

予備試験1においては、検体原液並びに500, 250及び100 mg/mL試験液注射部位において、皮膚反応が認められたが、潰瘍などの組織のはく離又は脱落は認められなかった。このことから、皮内注射による一次感作に用いる試験液濃度を検体原液とした。

予備試験2においては、いずれの適用部位においても皮膚反応は認められなかった。このことから、閉塞貼付による二次感作に用いる試験液濃度を検体原液とした。

予備試験3においては、いずれの適用部位においても皮膚反応は認められなかった。このことから、閉塞貼付による惹起に用いる試験液濃度の上限を検体原液とした。

10 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）にはともに5匹の試験動物を使用した。

2) 試験方法

① 一次感作（皮内注射）

各群について，あらかじめ剪毛した肩甲骨上背部の約2 cm×4 cmの範囲に，以下に示す各試験液を1箇所当たり0.1 mLずつ皮内注射した（図-1）。

試験群

A : E-FCA

B : 検体原液

C : 検体原液及びFCAの1:1 (v/v) 乳化物

陰性対照群

A : E-FCA

B : 生理食塩液

C : E-FCA

陽性対照群

A : E-FCA

B : DNCB*¹の1 mg/mLゴマ油溶液

C : DNCBの2 mg/mLゴマ油溶液，FCA及び生理食塩液の2:1:1 (v/v) 乳化物

② 二次感作（48時間閉塞貼付）

一次感作開始後6日に注射部位を剪毛及び剃毛し，ラウリル硫酸ナトリウム（ワセリン中10 %）を塗布した。翌日にラウリル硫酸ナトリウム塗布部位をWiSM消毒用アルコールライトで清拭し，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1 mg/mLゴマ油溶液をそれぞれ0.2 mLずつ約2 cm×4 cmのろ紙に塗布し，試験動物の皮内注射部位に閉塞貼付した（図-1）。適用後約48時間にろ紙を除去し，適用部位をWiSM消毒用アルコールライトで清拭した。

③ 惹起(24時間閉塞貼付)

二次感作開始後2週間に惹起を行った。

試験群及び陰性対照群*2では検体原液、検体の注射用水による希釈系列(500及び100 mg/mL試験液)及び注射用水、陽性対照群ではDNCBの0.1 %ワセリン混合物をそれぞれ0.1 mLずつ約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塞貼付した。

適用後約24時間にろ紙を除去し、適用部位をWiSM消毒用アルコールライトで清拭した。清拭後約24及び48時間に適用部位を肉眼的に観察し、Magnusson and Kligman scale(表-2)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。

なお、一次感作開始時及び皮膚反応の最終観察日に全ての試験動物の体重を測定した。

*1 2,4-dinitrochlorobenzene

*2 false positive response確認のため、陰性対照群においても試験群と同じ適用物質の曝露が必要である。

3) 惹起結果(表-3～6)

陽性対照群において、清拭後約24及び48時間で陽性率100 %(平均評価点:3.0)であった。

その他の各観察時間における適用部位の陽性率は0 %(平均評価点:0)であった。

なお、いずれの試験動物も惹起における最終観察日には、一次感作開始時よりも体重は増加していた。

以上のことから、検体は本試験条件下において感作性を有しないと評価された。

11 参考文献

- ・「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方についての改正について」(令和2年 薬生機審発0106第1号)の別添「医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス」。
- ・「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」(平成24年 薬食機発0301第20号)の別添「医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス」。

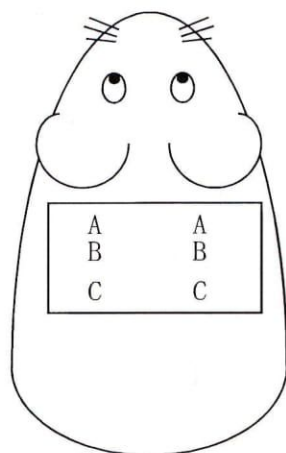


図-1 皮内注射及び閉塞貼付による感作部位

A, B及びCは皮内注射部位, は閉塞貼付部位(約2 cm×4 cm)を示す。

表-2 Magnusson and Kligman scale

視認できる変化なし		0
非常に軽度なあるいはパッチ状紅斑		1
中程度で一体化した紅斑		2
高度紅斑及びあるいは浮腫		3*

* 痂皮形成, 出血, 潰瘍及び壊死は深部損傷として点数3に分類する。

$$\text{平均評価点} = \frac{\text{各群の評価点の総計}}{\text{1群当たりの動物数}}$$

表-3 試験群の皮膚反応の採点値

適用物質	観察時間*	動物番号										陽性率 (%)	平均評価点
		T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8	T-9	T-10		
検体原液	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500 mg/mL 試験液	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100 mg/mL 試験液	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
注射用水	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* 単位：時間(清拭後)

表-4 陰性対照群の皮膚反応の採点値

適用物質	観察時間*1	動物番号					陽性率 (%)	平均評価点
		N-1	N-2	N-3	N-4	N-5		
検体原液*2	24	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0
500 mg/mL 試験液*2	24	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0
100 mg/mL 試験液*2	24	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0
注射用水	24	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0

*1 単位：時間(清拭後)

*2 false positive response

表-5 陽性対照群の皮膚反応の採点値

適用物質	観察時間*	動物番号					陽性率 (%)	平均評価点
		P-1	P-2	P-3	P-4	P-5		
DNCEBの0.1 % ワセリン 混合物	24	3	3	3	3	3	100	3.0
	48	3	3	3	3	3	100	3.0

* 単位：時間(清拭後)

表-6 体重変化

群	動物番号	一次感作開始時 (g)	皮膚反応の最終観察日 (g)
試験群	T-1	394.5	514.0
	T-2	394.9	513.4
	T-3	415.4	579.6
	T-4	414.1	558.9
	T-5	404.5	579.1
	T-6	429.5	604.7
	T-7	474.2	653.7
	T-8	428.8	570.8
	T-9	404.3	528.9
	T-10	395.3	536.2
陰性対照群	N-1	409.3	547.2
	N-2	373.5	483.5
	N-3	395.4	495.6
	N-4	454.0	616.9
	N-5	460.6	638.3
陽性対照群	P-1	413.3	545.7
	P-2	396.8	506.3
	P-3	401.5	567.6
	P-4	420.0	526.9
	P-5	420.3	528.5

以 上

本資料は、私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。

2021年10月04日