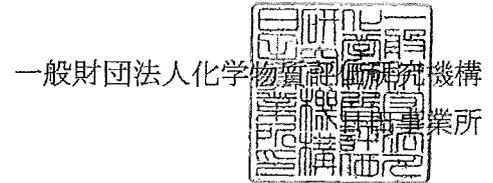


最終報告書



1. 表題

HARDOLASS (ハドラス) のマウスを用いる皮膚感作性試験 (Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA)

2. 要約

CBA/J マウス (雌) を用いて OECD TG442B を参考に Local Lymph Node Assay (LLNA): BrdU-ELISA を実施し、Stimulation Index (SI) を指標に被験物質抽出液の皮膚感作性の有無を判定した。

被験物質を両面に塗布したアルミシートを 30 cm² (両面の面積の合計) に切り出し、5 mL のアセトンを追加して 37°C で 72 時間振盪させた後、1 mL に濃縮及び定容して抽出原液とした。また、抽出原液をアセトンで 2 及び 4 倍に希釈し、合計 3 濃度の被験物質液を調製した。被験物質群のほか、アセトン塗布する媒体対照群及びアセトンで調製した 25.0 w/v% の α -ヘキシルシナナムアルデヒド液を塗布する陽性対照群を設定した。各群 4 匹のマウスを用い、媒体、陽性対照物質液及び被験物質液を、1 日 1 回 3 日間連続で塗布し、一般状態観察及び体重測定を実施した。最終感作の約 48 時間後に 5-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU) を投与し、さらに約 24 時間後に耳介リンパ節を採取して、リンパ節内の BrdU 取込み量から SI を算出した。

その結果、被験物質抽出原液、2 倍希釈液及び 4 倍希釈液の SI は、それぞれ 1.15、1.25 及び 1.13 であり、すべての濃度で SI が 1.6 を下回ったため、被験物質抽出液は感作性を有さないものと考えられた。したがって、本試験条件下において、アルミシートに塗布された HARDOLASS (ハドラス) からの抽出液は「感作性なし」と判定された。

3. 試験委託者

名称

所在地

4. 試験施設

名称

一般財団法人化学物質評価研究機構 日田事業所

所在地

〒877-0061 大分県日田市石井町 3-822

5. 最終報告書作成者の署名

2018 年 9 月 13 日

試験責任者

小林 俊夫

所属

日田事業所 試験第二課

本文書は正本を正確に転写したものです。
 一般財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所
 2018 年 9 月 13 日
 試験責任者 小林 俊夫

6. 試験目的

Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA を用いて、HARDOLASS（ハドラス）を塗布したアルミシートからの抽出液の、皮膚感作性の有無を判定する。

7. 試験法

OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No.442B, July 22, 2010, “Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA”を参考に試験を行った。

抽出法は、「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（薬食機発 0301 第 20 号、平成 24 年 3 月 1 日）」を参考とした。

8. GLP 基準

適用しなかった。

9. 動物愛護

以下の法律、指針、基準等を参考に当試験施設が作成した「日田事業所動物実験に関する規程」に従って実施した。

- a) 「動物の愛護及び管理に関する法律」（法律第 105 号、昭和 48 年）
- b) 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（環境省、平成 18 年）
- c) 「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」（厚生労働省、平成 18 年）
- d) 「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（農林水産省、平成 18 年）
- e) 「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（文部科学省、平成 18 年）
- f) 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（日本学術会議、平成 18 年）

10. 試験日程

試験開始日	2018年	7月	27日	
動物入荷日	2018年	7月	31日	
感作期間	2018年	8月	8日	～ 8月 10日
BrdU 投与日	2018年	8月	12日	
耳介リンパ節採取日	2018年	8月	13日	
BrdU 取込み量測定日	2018年	8月	14日	
試験終了日	2018年	9月	13日	

11. 試験関係者

試験責任者	小林 俊夫	(所属 試験第二課)
試験担当者	谷川 久子	(所属 試験第二課)

12. 試資料の保管

試験計画書、最終報告書、生データ、試験委託書、被験物質調査票及びその他の記録は当試験施設に保管する。保管期間は試験終了後 3 年間とする。保管期間終了後の処置（継続保管、廃棄又は返却）は、試験委託者の承認を得る。

13. 試験材料

13.1 被験物質

a) 名称（試験委託者提供情報）

HARDOLASS（ハドラス）

b) 提供源及びロット番号（試験委託者提供情報）

提供源 ヤマモトホールディングス株式会社

ロット番号 TGDS20180713

c) 供試試料

両面に HARDOLASS（ハドラス）を塗布したアルミシート

d) 純度（試験委託者提供情報）

100%

e) 物理化学的性状（試験委託者提供情報）

常温における性状 無色透明固体

安定性 保管条件下で安定

f) 保管条件

密閉した袋に入れ、被験物質保管室にて室温（許容範囲 10～30℃）で保管した。

g) 取扱い上の注意

皮膚、目への接触及び吸入をさけるため、手袋、マスク、帽子、保護めがね及び白衣を着用した。

13.2 陽性対照物質

a) 名称等

名称 α -ヘキシルシンナムアルデヒド（HCA）

CAS 番号 101-86-0

b) 選択理由

HCA は OECD TG442B において陽性対照物質として推奨されているため。

c) 製造元、グレード及びロット番号

製造元 富士フイルム和光純薬

グレード 一級

ロット番号 LKN5905

d) 純度

97.8%

e) 保管条件

遮光気密容器に入れ、被験物質保管室にて室温（許容範囲 10～30℃）で保管した。

f) 取扱い上の注意

皮膚、目への接触及び吸入をさけるため、手袋、マスク、帽子、保護めがね及び白衣を着用し、黄色灯下で取り扱った。

13.3 媒体

a) 名称

アセトン

b) 選択理由

「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」において、適切な抽出媒体として例示されているため。

c) 製造元、グレード、ロット番号及び保管

製造元	富士フイルム和光純薬
グレード	特級
ロット番号	APP0488
保管場所	試薬保管室
保管温度	室温（許容範囲 10～30℃）

13.4 使用動物

7週齢の雌のCBA/Jマウス（SPF）を、日本チャールス・リバー厚木飼育センターから21匹入荷した。CBA/JマウスはOECD TG 442Bで推奨されているCBA/JNマウスの亜系統であり、当試験施設で背景データを有している系統である。

入荷した動物のうち、実験動物管理者が外観及び行動に異常が無いと判定した動物のみを受け入れ、動物には入荷動物番号を割り付けて体重を測定した。入荷6日後まで検疫・馴化を行った後、再び体重を測定した。すべての動物の一般状態及び体重変動に異常はみられなかったため、検疫を終了し、体重層別無作為抽出法で1群4匹の5群に群分けして本試験に使用した。なお、群分けした個体の体重が全体の平均体重の±20%の範囲内であることを確認し、群分けにより外れた余り動物1匹は本試験系から除外した。感作開始時の動物は8週齢であった。

受入れから感作開始日までは毎日1回以上、動物の一般状態及び排泄物を観察した。動物は、群分け前は赤色油性インクを尾部に塗布し、群分け後は赤色以外の油性インクを尾部に塗布して識別した。ケージにはラベルを貼り付け、ラックには試験番号を表示して識別した。

13.5 飼育環境

動物は、検疫・馴化期間中を含む全飼育期間を通して、温度21～25℃、相対湿度40～70%、換気回数10～15回/時間、明暗サイクル12時間間隔（7時点灯、19時消灯）に設定したバリアーシステムの飼育室（検疫期間中は検疫室2、検疫終了後は飼育室5）に収容した。

群分け前は265W×426D×150H mm、群分け後は210W×320D×130H mmのポリカーボネイト製ケージに、床敷（サンフレーク、日本チャールス・リバー、ロット番号180529）を入れて飼育した。飼育密度は、群分け前は10匹以下/ケージ、群分け後は4匹/ケージとし、床敷及びケージは、検疫終了時（群分け時）及び搬出時に交換した。

飼料は実験動物用固型飼料（MF、オリエンタル酵母工業、ロット番号180327）を、飲料水は塩素濃度が3～5 ppmとなるように次亜塩素酸ナトリウムを日田市上水道水に添加し給

水びんに入れて、いずれも自由摂取させた。飼料、床敷及び飼育器材はオートクレーブ滅菌（121°C、30分間）して使用した。

14. 試験方法

14.1 感作濃度設定

感作には被験物質の抽出液を用いた。被験物質を塗布したアルミシート 30 cm²（両面の合計面積）をアセトン 5 mL で抽出後、1 mL 以下まで濃縮し、1 mL に定容したものを抽出原液として高濃度群の被験物質液とした。また、抽出原液をアセトンで 2 及び 4 倍に希釈して、3 段階の感作濃度を設定した。

14.2 群構成

被験物質の 3 濃度群の他に、媒体のみを塗布する媒体対照群及び陽性対照物質を塗布する陽性対照群を設置した。動物は各群 4 匹を使用した。

試験群		感作濃度 (w/v%) 又は希釈倍率	動物数 (動物番号)
媒体対照群		-	4 (1 - 4)
陽性対照群		25.0	4 (5 - 8)
被験物質	低濃度群	4 倍希釈液	4 (9 - 12)
	中濃度群	2 倍希釈液	4 (13 - 16)
	高濃度群	抽出原液	4 (17 - 20)

14.3 被験物質液、陽性対照物質液及び BrdU 液の調製

a) 被験物質液の調製

感作開始日の 3 日前に、供試試料を 15 cm²（両面で 30 cm²）となるように 3 片切り出し、それぞれガラス容器に入れて各感作日の抽出に使用した。実際の供試試料の重量はいずれも 0.24 g であった。各感作の 3 日前にガラス容器にアセトンを 5 mL 添加し、37°C で 72 時間振盪した。その後、抽出液を別のガラス容器に移して窒素パージにより 1 mL 以下になるまで濃縮し、アセトンで 1 mL に定容して高濃度群の被験物質液（抽出原液）を得た。抽出原液をアセトンで 2 及び 4 倍希釈し、中及び低濃度の被験物質液を得た。

a) 陽性対照物質液の調製

感作開始日に 0.25022 g の HCA を採取し、アセトンを加えて溶解させた後、1 mL に定容して 25.0 w/v% の HCA 液を調製した。なお、調製は黄色灯下で実施した。調製した陽性対照物質液は 3 個の気密容器に小分けし、使用時まで遮光して冷所（許容範囲 1~10°C）に保管した。

b) BrdU 液の調製

投与 2 日前に、0.50002 g の 5-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU、ナカライテスク、ロット番号 M7R1872) を採取し、生理食塩液（大塚製薬工場、ロット番号 K7F97 及び K8D75）を加え、超音波処理して溶解させた後、50 mL に定容して 10 mg/mL 液 (BrdU 液) を調製した。BrdU 液は滅菌濾過フィルター (DISMIC®-25AS、孔径 0.20 µm) を用いて濾過滅

菌し、滅菌容器に入れて投与日まで冷所（許容範囲 1～10°C）に保管した。なお、調製は黄色灯下で実施し、濾過滅菌以降の操作はクリーンベンチ内で行った。

14.4 感 作

媒体、被験物質液及び陽性対照物質液を、マイクロピペットを用いて動物の両耳介にそれぞれ 25 μ L ずつ塗布した。塗布は 1 日 1 回、3 日間連続してほぼ一定の時刻に行った。

14.5 BrdU 液の投与

注射針及び注射筒（テルモ）を用いて、最終感作の約 48 時間後に 0.5 mL の BrdU 液を各動物の腹腔内に単回投与した。

14.6 一般状態観察

全例について、感作開始日から最終感作日の 3 日後まで、1 日 1 回以上観察した。

14.7 体重測定

全例について、感作開始日（感作前）及び最終感作日の 3 日後に、電子上皿天秤（ザルトリウス）を用いて体重測定を行った。さらに、各測定日での各試験群の体重の平均値及び標準偏差を算出した。

14.8 耳介リンパ節の採取及び重量測定

BrdU 投与の約 24 時間後に、動物を頸椎脱臼により安楽死させた後、左右の耳介リンパ節を採取した。周囲組織を取り除き、電子分析天秤（ザルトリウス）を用いて両側耳介リンパ節を一括して重量測定した。また、各試験群の耳介リンパ節重量の平均値及び標準偏差を算出した。重量測定後、個体ごとにバイオメディカルフリーザーで凍結（許容範囲-30～-10°C）保管した。

14.9 BrdU 取込み量の測定

凍結保管した耳介リンパ節を室温に戻した後、生理食塩液（大塚製薬工場、ロット番号 7D90N）を加え、潰しながら懸濁させた。この懸濁液をセルストレーナーで濾過した後、個体ごとに 3 well ずつ 96 well マイクロプレート（Costar）に分注し、ELISA 法により BrdU 取込み量を測定した。試薬は Cell Proliferation ELISA キット（BrdU colorimetric, Roche Diagnostics, ロット番号 29134900）を使用し、マルチプレートリーダー（FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH）を用いて測定した各個体の吸光度（ $OD_{370\text{ nm}} - OD_{492\text{ nm}}$ 、BrdU 取込み量）について、3 well の平均値（BrdU 測定値）を算出した。

14.10 死亡動物及び瀕死動物の取扱い

死亡動物及び瀕死動物は発生しなかった。

14.11 結果の評価

a) Stimulation Index の算出

各個体の BrdU 測定値を媒体対照群の BrdU 測定値の平均値で除して各個体の Stimulation Index (SI) を算出した。なお、各個体の SI は小数点以下第二位を四捨五入して小数点以下第一位まで表示した。各試験群の SI は、各個体の SI の平均値とし、さらに標準誤差も算出した。

$$SI = \frac{\text{各個体の BrdU 測定値 (3 well の平均)}}{\text{媒体対照群の BrdU 測定値の平均値 (4 匹の平均)}}$$

b) 評価方法

被験物質群の SI が 2.0 以上を示した場合は「感作性あり」、1.6 未満を示した場合は「感作性なし」と判定し、1.6～1.9 の場合は、用量反応性及び統計学的有意性を考慮して判定を行うこととした。なお、すべての濃度で SI が 1.6～1.9 の範囲外であったため、統計処理は実施しなかった。

14.12 試験の成立条件

陽性対照群の SI が 1.6 以上であることを試験の成立条件とした。

15. 試験計画書からの逸脱

試験計画書からの逸脱は認められなかった。

16. 試験成績

16.1 一般状態 (Table 1)

すべての被験物質群、媒体対照群及び陽性対照群で、全身毒性又は強い刺激性を示唆する異常は認められなかった。

16.2 体重 (Table 2)

すべての被験物質群で、全身毒性を示唆する体重の変動は認められなかった。また、すべての被験物質群及び陽性対照群で、媒体対照群と比較し明らかな体重の変動はみられなかった。

16.3 耳介リンパ節重量 (Table 3)

媒体対照群では平均 4.3 mg であり、被験物質抽出原液、2 倍希釈液及び 4 倍希釈液ではそれぞれ 5.1、5.1 及び 4.6 mg であった。また、陽性対照群では 10.4 mg であった。

16.4 BrdU 測定値及び SI (Table 4)

媒体対照群の BrdU 測定値は 0.1423 であり、被験物質抽出原液、2 倍希釈液及び 4 倍希釈液ではそれぞれ 0.1650、0.1798 及び 0.1570 であった。また、陽性対照群の BrdU 測定値は 0.4535 であった。

BrdU 測定値から算出した被験物質抽出原液、2 倍希釈液及び 4 倍希釈液の SI は、それぞれ 1.15、1.25 及び 1.13 であった。また、陽性対照群の SI は 3.20 であった。

17. 評価及び考察

実験期間を通して、すべての被験物質群で感作性評価に影響するような全身毒性や強度の刺激性を示唆する変化は認められなかった。したがって、すべての動物を感作性評価に適用した。

その結果、被験物質抽出原液、2 倍希釈液及び 4 倍希釈液の SI は、それぞれ 1.15、1.25 及び 1.13 であり、すべての濃度で SI が 1.6 を下回ったため、被験物質抽出液は感作性を有さないものと考えられた。また、陽性対照群の SI は 3.20 であり、試験の成立条件 ($SI \geq 1.6$) を満たした。

以上より、本試験条件下において、HARDOLASS (ハドラス) を塗布したアルミシートからの抽出液は「感作性なし」と判定された。

Table 1 Clinical signs

Exp. Group			Animal No.	Observation period					
Group	Substance name	Concentration (w/v%) or dilution rate		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
Vehicle control	Acetone		1	-	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-
			4	-	-	-	-	-	-
Positive control	HCA	25.0	5	-	-	-	-	-	-
			6	-	-	-	-	-	-
			7	-	-	-	-	-	-
			8	-	-	-	-	-	-
Test substance	HARDOLASS	1/4	9	-	-	-	-	-	-
			10	-	-	-	-	-	-
			11	-	-	-	-	-	-
			12	-	-	-	-	-	-
		1/2	13	-	-	-	-	-	-
			14	-	-	-	-	-	-
			15	-	-	-	-	-	-
			16	-	-	-	-	-	-
		Extract	17	-	-	-	-	-	-
			18	-	-	-	-	-	-
			19	-	-	-	-	-	-
			20	-	-	-	-	-	-

HCA: α -hexylcinnamaldehyde

-: no abnormalities detected.

Table 2 Body weights

Exp. Group			Animal No.	Body weights (g)			
Group	Substance name	Concentration (w/v%) or dilution rate		Day 1		Day 6	
				Individual	Mean \pm S.D.	Individual	Mean \pm S.D.
Vehicle control	Acetone		1	20.2	19.9 \pm 1.2	20.7	20.4 \pm 0.7
			2	20.5		20.6	
			3	20.8		20.8	
			4	18.1		19.3	
Positive control	HCA	25.0	5	20.7	20.5 \pm 0.8	21.2	21.2 \pm 0.5
			6	21.4		21.7	
			7	20.4		20.6	
			8	19.5		21.1	
Test substance	HARDOLASS	1/4	9	21.3	21.4 \pm 1.1	21.1	21.3 \pm 1.0
			10	22.9		22.4	
			11	21.3		21.6	
			12	20.1		20.1	
		1/2	13	20.8	20.8 \pm 0.7	21.3	21.3 \pm 0.7
			14	21.7		22.2	
			15	20.2		20.9	
			16	20.3		20.6	
		Extract	17	20.4	21.0 \pm 1.1	21.9	22.0 \pm 0.5
			18	22.6		22.7	
			19	20.5		21.4	
			20	20.5		21.9	

S.D.: standard deviation

HCA: α -hexylcinnamaldehyde

Table 3 Lymph node weights

Exp. Group			Animal No.	Lymph node weights (mg)	
Group	Substance name	Concentration (w/v%) or dilution rate		Individual	Mean \pm S.D.
Vehicle control	Acetone		1	4.2	4.3 \pm 0.5
			2	4.1	
			3	5.1	
			4	3.9	
Positive control	HCA	25.0	5	7.6	10.4 \pm 2.1
			6	11.6	
			7	12.2	
			8	10.0	
Test substance	HARDOLASS	1/4	9	4.8	4.6 \pm 0.5
			10	3.9	
			11	5.1	
			12	4.6	
		1/2	13	5.5	5.1 \pm 0.4
			14	5.2	
			15	5.2	
			16	4.6	
		Extract	17	4.1	5.1 \pm 1.0
			18	4.3	
			19	5.6	
			20	6.2	

S.D.: standard deviation

HCA: α -hexylcinnamaldehyde

Table 4 BrdU labelling indices and stimulation indices

Exp. Group			Animal No.	BrdU labelling indices		Stimulation indices	
Group	Substance name	Concentration (w/v%) or dilution rate		Individual	Mean \pm S.E.	Individual	Mean \pm S.E.
Vehicle control	Acetone		1	0.127	0.1423 \pm 0.0062	0.9	1.00 \pm 0.04
			2	0.155		1.1	
			3	0.138		1.0	
			4	0.149		1.0	
Positive control	HCA	25.0	5	0.314	0.4535 \pm 0.0473	2.2	3.20 \pm 0.34
			6	0.492		3.5	
			7	0.524		3.7	
			8	0.484		3.4	
Test substance	HARDOLASS	1/4	9	0.172	0.1570 \pm 0.0050	1.2	1.13 \pm 0.03
			10	0.152		1.1	
			11	0.151		1.1	
			12	0.153		1.1	
		1/2	13	0.200	0.1798 \pm 0.0126	1.4	1.25 \pm 0.09
			14	0.158		1.1	
			15	0.203		1.4	
		Extract	16	0.158	0.1650 \pm 0.0160	1.1	1.15 \pm 0.12
			17	0.149		1.0	
			18	0.150		1.1	
			19	0.148		1.0	
			20	0.213		1.5	

S.E.: standard error

HCA: α -hexylcinnamaldehyde