

による白斑様病態形成のメカニズム」について

カネボウ化粧品による非臨床試験において(参考資料)、ロドデノールが褐色モルモットの皮膚基底層のメラノサイトやメラニン顆粒を減少させて色素脱失を形成すること、作用は可逆的であることが確認され、臨床での知見が実験的に裏付けられた。可逆的な皮膚色素脱失は、ロドデノールと構造が類似する 4-TBP でも報告されているが、MBEH を含め過去の報告は黒色モルモットが使われており、また塗布溶剤も異なることから、ロドデノールと強度の比較は難しい。

In vitro においてロドデノールはメラノサイトにチロシナーゼ活性に応じた毒性を示し、メラノサイト選択的な傷害が皮膚脱色素斑形成に直接寄与する可能性が示唆された。ロドデノールのメラノサイト毒性発現はチロシナーゼ活性に大きく依存する。また分担研究報告書IIに後述するように、本研究班においても、メラノサイトやチロシナーゼにより水酸化体に代謝され、より強い毒性を発揮することを確認している。4-TBP や MBEH とは異なり、ロドデノール処理メラノサイトに ROS は検出されないが、両化合物と同様に小胞体ストレス応答を誘導した。このような異同に基づきメカニズムを解明するためには、同一実験内での比較検討が必要と思われる。ロドデノールのメラノサイト生存率への影響は、高感受性群でも IC₅₀ が数百 μM と 4-TBP や MBEH と同程度であることから、色素脱失には免疫系が大きく寄与することも予想される。今回の報告では遅延型アレルギーを評価する感作性や光感作性試験が行われている。5 種類中 4 種類の試験において、皮膚色素脱失を確認した褐色モルモットが用いられ、4 種類の試験で陰性であった。感作性試験 CCET では疑わしい皮膚反応が認められた。連続貼付の影響が考察されており、臨床におけるアレルギー反応の検討結果が期待される。一方、4-TBP や MBEH と同様に免疫増強につながる小胞体ストレス応答が誘導されている。今後、4-TBP や MBEH で報告されているように、ロドデノールが細胞死を誘導するか否か、チロシナーゼ代謝により生じ得るオルトキノン体(図2)が付加体ーハプテン抗原を形

成するかについて明らかにされれば、(自己)免疫誘導の予測につながる可能性があり、引き続き検討が必要と思われる。

ヒト由来メラノサイトはチロシナーゼ活性の高いロドデノール高感受性群と低い低感受性群の2群に分かれ、感受性の個人差が示唆される。チロシナーゼのみが感受性の違いをもたらすのか、さらなる解明が必要と思われる。

E. 結論

ヒトや実験動物で白斑様症状を誘導する化学物質の代表的なクラスが「パラ位に脂肪族/芳香族側鎖を持つフェノール/カテコール類」であることが報告されている。特に効果が強力な 4-TBP と MBEH について、皮膚メラノサイトへの直接作用と免疫系を介する二相性の機序がメラノサイト消失をもたらすと想定されており、メカニズムが研究されている。4-TBP と MBEH については、チロシナーゼ代謝による細胞内の酸化ストレス増加、代謝物の SH 基やチロシナーゼへの付加、細胞死や小胞体ストレス応答の誘導など、ハプテン抗原やメラノサイト抗原の形成・提示から免疫誘導につながる報告がなされている。

ロドデノールについては、褐色モルモットを用いて皮膚色素脱失作用が示され、皮膚感作性や光感作性はほぼ陰性であることが示された。メラノサイトに対してチロシナーゼ活性に大きく依存する毒性を示し、メラノサイト選択性が示唆された。また小胞体ストレス応答の誘導が示された。免疫誘導の可能性については今後の検討が必要と思われる。

[引用文献]

- Becker JC, Schrama D. *J Invest Dermatol* 2011; 131:1185-7.
Bleehen SS, Pathak MA, Hori Y, Fitzpatrick TB. *J Invest Dermatol* 1968; 50:103-17
Boissy RE, Manga P. *Pigment Cell Res.* 2004 ; 17: 208-14
Casarett & Doull's, *Toxicology: The Basic Science of Poisons* 8th Edition, pp851-852
Cummings MP, Nordlund JJ. *Am J of Contact Dermatitis* 1995; 6: 122-7
Dell'anna ML, Picardo M. *Pigment Cell Res* 2006; 19:

406-11

- Fukuda Y, Nagano M, Futatsuka M. *J Occup Health* 1998; 40: 118-122
- Gellin GA, Possick PA, Perone VB. *J Invest Dermatol* 1970; 55: 190-7
- Hariharan V, Klarquist J, Reust MJ, Koshoffer A, McKee MD, Boissy RE, Le Poole IC. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 211-20
- Hariharan V, Toole T, Klarquist J, Mosenson J, Longley BJ, Le Poole IC. *Melanoma Res* 2011; 21: 115-26.
- Ito Y, Jimbow K, Ito S. *J Invest Dermatol* 1987; 88: 77-82
- James O, Mayes RW, Stevenson CJ. *Lancet* 1977; 2: 1217-9
- Kroll TM, Bommasamy H, Boissy RE, Hernandez C, Nickoloff BJ, Mestrlil R, Caroline Le Poole I. *J Invest Dermatol* 2005;124:798-806
- Le Poole IC, Wańkiewicz-Kalińska A, van den Wijngaard RM, Nickoloff BJ, Das PK. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2004; 9:68-724
- Lerner AB, Fitzpatrick TB. *JAMA* 1953; 152:577-82
- Manga P, Sheyn D, Yang F, Sarangarajan R, Boissy RE. *Am J Pathol.* 2006;169:1652-62.
- Manga P, Orlow SJ. *J Invest Dermatol.* 2012; 132: 1752-5.
- Manini P, Napolitano A, Westerhof W, Riley PA, d'Ischia M. *Chem Res Toxicol.* 2009; 22:1398-405.
- Nordlund JJ, Forget B, Kirkwood J, Lerner AB. *Arch Dermatol.* 1985; 121:1141-4.
- Passeron T, Ortonne JP. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 2502-4
- Peck SM, Sobotka H, *J Invest Dermatol* 1941; 4: 325-329
- Solano F, Briganti S, Picardo M, Ghanem G. *Pigment Cell Res.* 2006; 19: 550-71.
- Thörneby-Andersson K, Sterner O, Hansson C. *Pigment Cell Res* 2000 ; 13:33-8.
- Toosi S, Orlow SJ, Manga P. *J Invest Dermatol* 2012 ; 132:2601-9
- van den Boorn JG1, Konijnenberg D, Tjin EP, Picavet DI, Meeuwenoord NJ, Filippov DV, van der Veen

JP, Bos JD, Melief CJ, Luiten RM. *PLoS One.* 2010; 5:e10626.

- van den Boorn JG, Picavet DI, van Swieten PF, van Veen HA, Konijnenberg D, van Veelen PA, van Capel T, Jong EC, Reits EA, Drijfhout JW, Bos JD, Melief CJ, Luiten RM. *J Invest Dermatol.* 2011; 131:1240-51
- van den Boorn JG, Melief CJ, Luiten RM. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011; 24:673-9.
- Yang F, Boissy RE. *Pigment Cell Res.* 1999; 12: 237-45.
- Yang F, Sarangarajan R, Le Poole IC, Medrano EE, Boissy RE. *J Invest Dermatol.* 2000; 114:157-64.
- Zimerson E, Bruze M, Goossens A. *J Occup Environ Med* 1999; 41:23-8.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

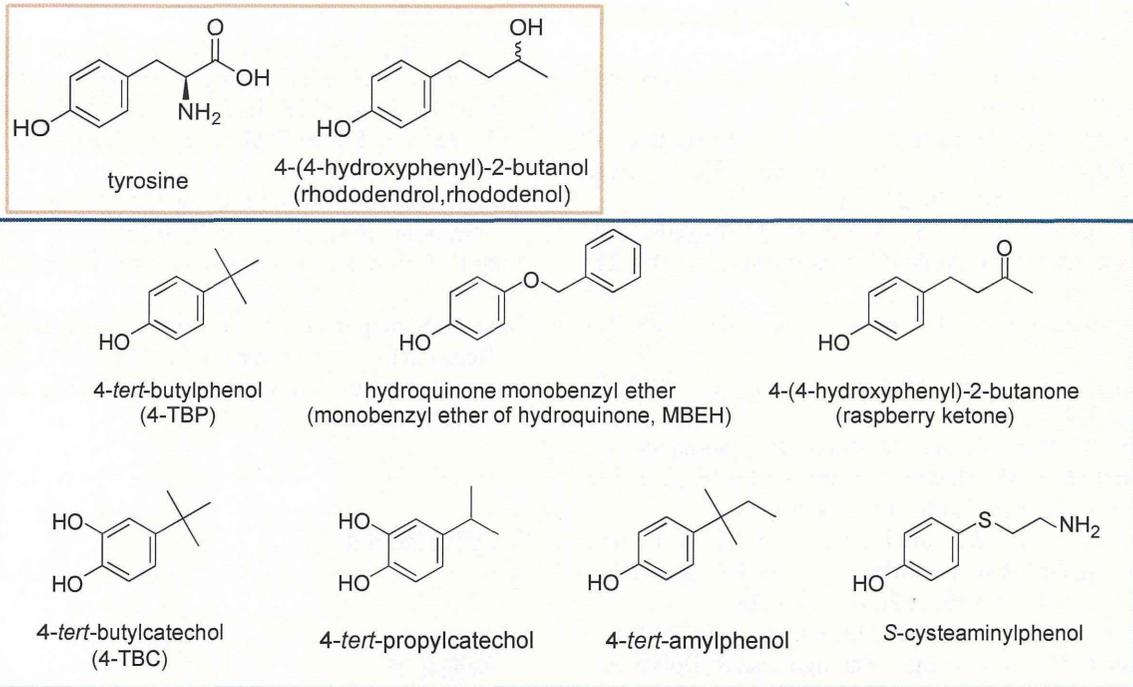


図1 チロシン、ロドデノール、および職業性白斑や皮膚色素脱失を起こす化合物
 (Peck 1941, Bleehe 1968, Gellin 1970, James 1977, Ito 1987, Fukuda 1998, Cummings 1995, Boissy 2004, Solano 2006)

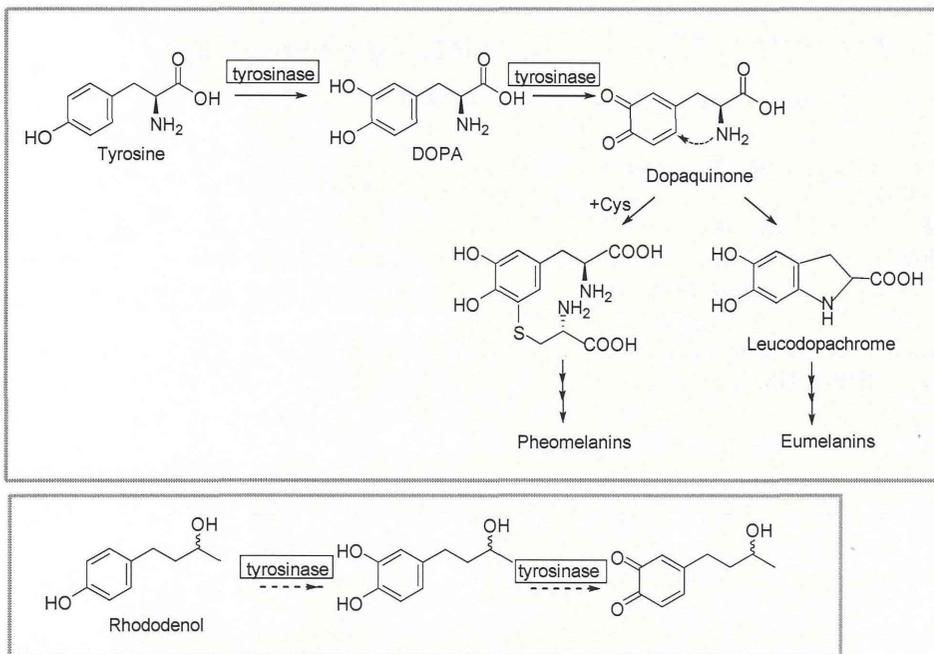
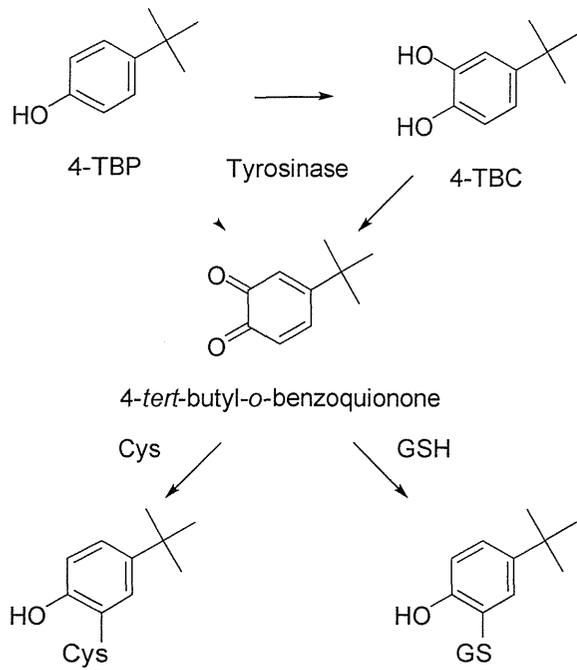
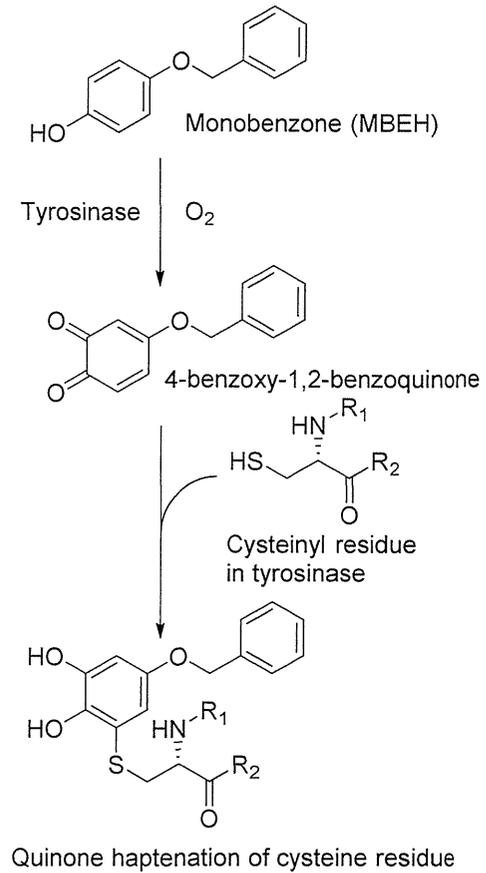


図2 メラニン合成経路および
 ロドデノールのチロシナーゼによる想定代謝経路



Thornerby-Anderson, *Pigment Cell Res* 2000



van den Boorn, *J Invest Dermatol* 2011

図3 4-TBPとMBEHのオルトキノン体への代謝とSH基との反応

報告書

ロドデノール配合化粧品の使用による 白斑様症状の病態形成メカニズムに関する研究

株式会社カネボウ化粧品

目次

1. 目的
2. 検討内容
 - 2-1 in vivoでの病態形成能の再確認
 - 2-1-1 有色動物を用いたロドデノールによる色素脱失形成の検討
 - 2-1-2 有色動物を用いた感作性・光感作性試験再評価
 - 2-2 細胞を用いた病態形成メカニズムの検討
 - 2-2-1 表皮細胞への障害性及び炎症性サイトカイン等の分泌誘導能の検討
 - 2-2-2 色素細胞チロシナーゼ依存的に生じる細胞障害性評価
 - 2-2-2-1 チロシナーゼ活性と細胞障害性との関連性
 - 2-2-2-2 チロシナーゼ活性の個体差と細胞障害性の関連性
 - 2-3 ロドデノールによる細胞障害性発現メカニズムの解析
 - 2-3-1 ロドデノール代謝物の細胞障害性の確認
 - 2-3-2 活性酸素の関与の検討
 - 2-3-3 小胞体ストレス応答の関与の検討
3. まとめ
4. 引用文献

1. 目的

ロドデノール配合化粧品の使用による白斑様症状について、動物モデルおよび培養色素細胞を用いた非臨床試験を実施することにより病態形成メカニズムについて検討を行う。

2. 検討内容

2-1 in vivo での病態形成能の再確認

2-1 in vivo での病態形成能の再確認

2-1-1 有色動物を用いたロドデノールによる色素脱失形成の検討

○材料および方法

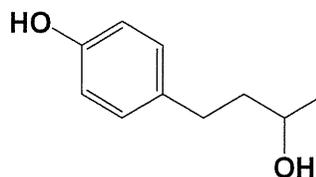
[被験物質]

ロドデノール（4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166）は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。

分子式：C₁₀H₁₄O₂、分子量：166.22

Lot. 002002

純度：100%



化学構造

[被験動物]

褐色モルモット（Kw1:A-1、東京実験株式会社）、雌、5匹

[試験方法]

・累積塗布

背部被毛を毛刈り、剃毛し、2cm×2cmの区画を背骨を挟んで対になるように6箇所確保した。このうち2対、4箇所（a）、a'）、c）、c'））には塗布開始5日前にUV-B照射を0.75 Joule/cm²行った。このうち1対（a）、a'））を試料塗布部とした（図1参照）。塗布は、K166 30%液（溶媒：50%エタノール液）、20 μLを1日に3回（9:00、13:00、17:00）塗布した。

塗布期間中に肉眼判定において色素脱失（++：高度な白色化を認める、下記皮膚色の判定方法参照）が確認された場合は、色素脱失反応の可逆性を観察するため、個体毎に塗布30日（個体No.1）、40日（個体No.2）、50日（個体No.5）、60日（個体No.4）または97日（個体No.3）で継続的に塗布を休止することとした。また、塗布休止期間は、肉眼判定を継続し、色素脱失が認められなくなり（-：皮膚に変化を認めない）、且つ同動物のUV-B非照射部皮膚と肉眼判定において差が認められなくなるまでとした。

・皮膚色の判定方法

1日1回（毎朝）、塗布前に以下の判定基準に従って皮膚白色化と皮膚刺激反応について皮膚判定を行った。塗布開始翌日（Day 2）より、皮膚の白色化および刺激性反応の有無を以下の基準に基づいて肉眼判定を行った。

<皮膚の白色化¹⁾>

- ：皮膚に変化を認めない
- ±：軽度の白色化を認める
- +：中程度の白色化を認める
- ++：高度な白色化を認める

<皮膚刺激>

- ：反応は認められない
- ±：かすかな紅斑

- + : 明瞭な紅斑
- ++ : 浮腫を伴った明瞭な紅斑
- +++ : 痂皮、壊死

・皮膚色の測定：L*値

試験開始前（Day 0）から回復までの週1回以上、試料塗布部位、UV-B 照射無処置部位、UV-B非照射部位について、色彩色差計（CR-300、MINOLTA、測定条件：C光源、2°視野）を用いて皮膚色L*a*b*表色系（CIE 1976）のL*値（明-暗）を測定した。色彩色差計の測定項目の条件設定は、L*a*b*測定値を3回測定した値の平均値が表示されるように設定した。

・皮膚標本の作製および観察方法

① 褐色モルモットの皮膚採取は、試験前（UV-B照射部）、色素脱失形成時（試料塗布部位、UV-B照射無処置部位及びUVB非照射部位）、回復時（試料塗布部位、UVB照射無処置部位及びUVB非照射部位）に吸入麻酔剤（フローレン吸入麻酔液、アボットジャパン㈱）にて麻酔後、直径5mmの皮膚トレパン（デルマパンチ、ニプロ医工㈱）で行った。DOPA陽性メラノサイト数の計測用として表皮剥離標本を、組織学的検査用としてパラフィン包埋標本を作製した。

② 表皮剥離標本

採取した皮膚は、2N-Na Brで37℃、2時間処理後に表皮を剥離し、DOPA染色（0.1% L-DOPA / PBS、37℃、2時間）を行った。その後10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定、脱水、封入して表皮剥離標本を作製した。標本は光学顕微鏡を用いて観察し、全視野のDOPA陽性メラノサイト数を計測後、1mm²当たりのメラノサイト数を算出した。

③ パラフィン包埋標本

10%中性リン酸緩衝ホルマリン液にて固定後、定法に従ってパラフィン包埋し、組織切片を作製した。組織学的観察用としてヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）を、メラノサイト観察用としてS-100免疫染色を、メラニン顆粒観察用としてフォンタナ・マッソン染色（FM染色、核染：ケルンエヒトロート）を施し、光学顕微鏡を用いて観察した。

○結果

[皮膚色の肉眼判定]

褐色モルモットのK166塗布部位において、Day 9よりごく軽度の皮膚の白色化が4例にみられ、Day 21には高度な白色化が全例となった。塗布終了後も白色化が続いたが、徐々に回復し、Day 75~141に変化なしとなった（表1参照）。刺激性反応はみられなかった。代表例として動物番号2番の写真を示した（写真1（Day0）、写真2（Day41）、写真3（Day78））。

[皮膚色のL*値]

褐色モルモット皮膚色の皮膚明度（L値）については、塗布14日頃よりUV照射無処置部に比べ有意にL値が上昇した。塗布28日目には、UV照射無処置部、UV非照射無処置部（地肌部）に比べて有意にL値が高くなった。塗布部のL値は、28日目以降、試験試料の塗布を休止するまで高値のまま推移した（図2参照）。

[DOPA 陽性メラノサイト数]

褐色モルモットのDOPA 陽性メラノサイト数を表2 に示した。

メラノサイト数の平均値は、試験前は84.1 個/mm² 個であったが、K166 30%塗布部位において色素脱失形成期で1.3 個/mm² に減少したが、回復期では22.5 個/mm² となった。無処置部位では色素脱失形成期、回復期の順に33.0、25.9 個/mm²、非照射部位では同様に12.8、14.9 個/mm² であった。

[HE 染色]

褐色モルモットのK166 30%塗布部位の色素脱失形成期において軽度の表皮の肥厚が全例、ごく軽度～軽度の表皮および毛包上皮の変性が各1 例にみられた。表皮基底層のメラニン顆粒は色素脱失形成期でごく軽度が2 例、変化なしが3 例であったが、回復期では軽度が全例となった。無処置および非照射部位においても、軽度の表皮の肥厚が色素脱失形成期の無処置部位に1 例、ごく軽度の表皮および毛包上皮の変性が色素脱失形成期の無処置部位に3 例、回復期の非照射部位に1 例みられた。表皮基底層のメラニン顆粒は色素脱失形成期、回復期ともにごく軽度～軽度が全例にみられた（写真4参照）。

[Fontana-Masson 染色]

褐色モルモットのK166 30%塗布部位の色素脱失形成期において、メラニン顆粒は表皮基底層でごく軽度～中等度、有棘層および角層でごく軽度～軽度、毛包部では変化なし～軽度であった。回復期において、表皮基底層で中等度、有棘層、角層および毛包部では軽度であった。無処置および非照射部位では色素脱失形成期、回復期ともに、表皮基底層で軽度～中等度、有棘層、角層および毛包部で変化なし～中等度であった（写真5参照）。

[S-100 免疫染色]

褐色モルモットのK166 30%塗布部位において、基底層のメラノサイト数は、色素脱失形成期で0～9、回復期で4～18であった。毛包部のメラノサイトは色素脱失形成期、回復期ともに軽度であった。無処置部位において、基底層のメラノサイト数は色素脱失形成期で4～10、回復期で7～16、毛包部のメラノサイトは色素脱失形成期、回復期ともに軽度であった。非照射部位において、基底層のメラノサイト数は色素脱失形成期で3～5、回復期で3～17、毛包部のメラノサイトは色素脱失形成期、回復期ともに軽度であった（写真6参照）。

○考察

本試験では、メラニン色素を有する褐色モルモットを用いて、K166を累積塗布した場合の色素脱失形成及び塗布を休止した場合の回復過程について評価検討を行った。K166 30%溶液の累積塗布を1日3回、20日以上にわたって継続して行った。試料濃度としては30%液を塗布し続けたが、紅斑や浮腫などの皮膚刺激性は発現せず、皮膚色が抜けていくような白色化が徐々に進行し、肉眼観察においても容易に区別出来る色素脱失が形成された。

この色素脱失形成部の皮膚組織では、色素細胞である表皮基底部のメラノサイト、Dopa陽性メラノサイト及び表皮全体のメラニン顆粒の減少が認められた。K166の塗布を休止すると、肉眼観察及び機器測定においても白色化の度合いが弱まり、個体差はあるものの1～2か月ほどかけて、試験開始時の測定値を示すまでに回復した。組織学的には、色素脱失形成時に減少あるいは消失していた色素細胞が回復時には非塗布部とほぼ同等数確認出来た。この色素細胞の再生には、周囲の毛包バルジに存在する色素幹細胞が大きく関与していると考えられ^{2)、3)}、色素幹細胞からメラノサイト前駆体であるメラノブラストに分化成長し、皮膚基底層に移動しながらさらに分化しメラノサイトになり補完されるのではと考えられた。

図1. 累積塗布方法(褐色モルモット)

塗布部位: 1区画(2 cm×2 cm)の6区画

- a) 試料塗布部位(色素脱失形成時皮膚組織採取)
- a)' 試料塗布部位(回復性観察部位)
- b) UV非照射部位(色素脱失形成時皮膚組織採取)
- b)' UV非照射部位(回復性観察部位)
- c) UV照射部位(色素脱失形成時皮膚組織採取)
- c)' UV照射部位(回復性観察部位)

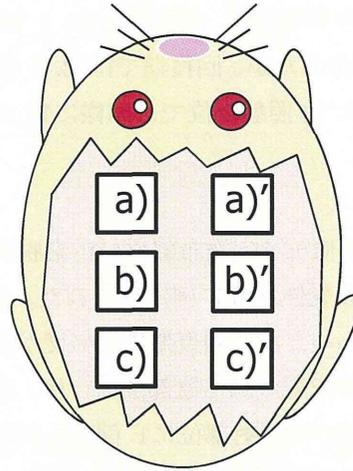


表1. 褐色モルモットのK166塗布部の白色化スコアの推移

動物番号	軽度の白色化(±)を示すまでの日数 ¹⁾	高度白色化(++)を示すまでの日数 ²⁾	白色化症状が消失した日数 ³⁾
No.1	9日	21日	82日
No.2	9日	17日	75日
No.3	9日	17日	141日
No.4	11日	21日	91日
No.5	9日	21日	91日

- 1) 塗布を開始してから軽度白色化(±)を示すまでの日数
- 2) 塗布を開始してから高度白色化(++)を示すまでの日数
- 3) 試験開始から、地肌色に回復するまでの日数

表 2 K166 30%群におけるDOPA陽性メラノサイト数

動物 番号	DOPA陽性メラノサイト数 / mm ²									
	試験開始前	白斑形成期					回復期			
	(Day 0)	stage	塗布部位	無処置	非照射	非照射 (尾部)	stage	塗布部位	無処置	非照射
1	74.8	Day31	0.3	50.5	3.5	ND	Day91	18.3	22.7	15.2
2	99.4	Day41	0.7	49.4	13.6	ND	Day78	31.2	13.2	23.8
3	115.5	Day98	0.1	19.6	7.4	16.1	Day141	45.2	57.6	7.1
4	45.7	Day61	2.5	27.0	22.0	ND	Day98	4.2	18.1	11.5
5	85.2	Day51	3.2	18.4	17.4	ND	Day98	13.4	17.9	16.7
mean±S.D.	84.1 ± 26.4		1.3 ± 1.4	33.0 ± 15.9	12.8 ± 7.4	-		22.5 ± 16.0	25.9 ± 18.0	14.9 ± 6.2

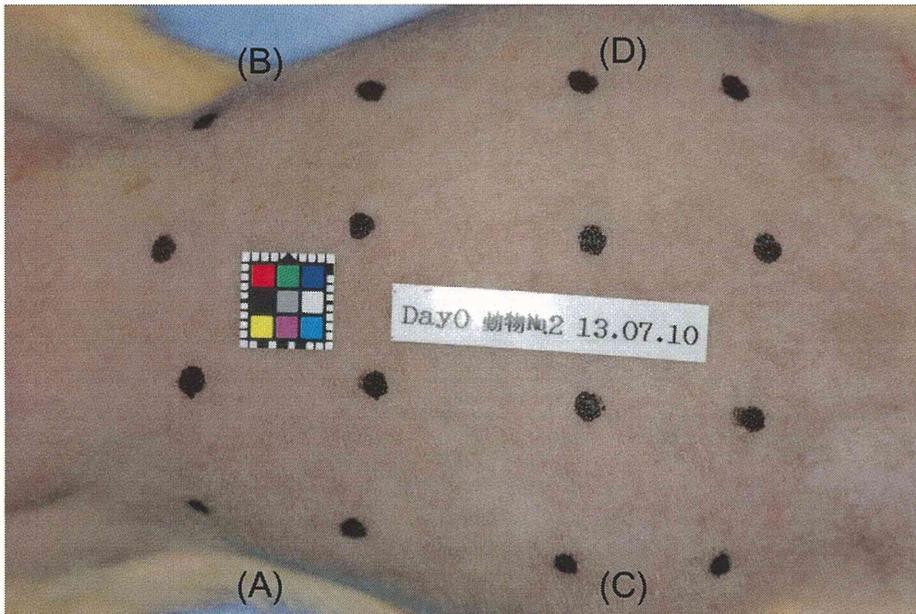


写真 1 K166 (30%) 群 動物番号2 Day 0 (' 13.07.10)

- (A) 塗布部位L : 白色化(-)、皮膚刺激(-)
- (B) 塗布部位R : 白色化(-)、皮膚刺激(-)
- (C) 無処置部位L
- (D) 無処置部位R

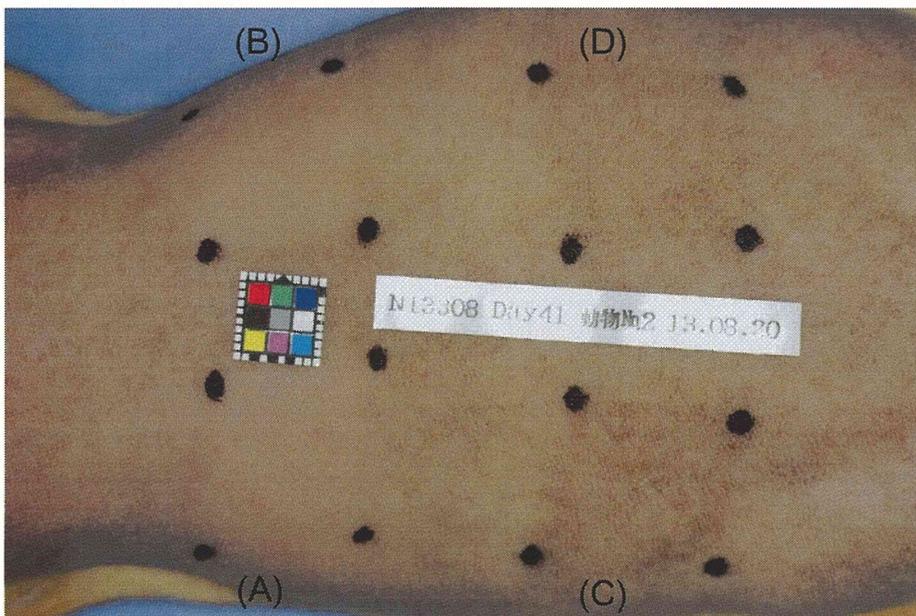


写真 2 K166 (30%) 群 動物番号2 Day 41 (' 13.08.20)

- (A) 塗布部位L : 白色化(++)、皮膚刺激(-)
- (B) 塗布部位R : 白色化(++)、皮膚刺激(-)
- (C) 無処置部位L
- (D) 無処置部位R

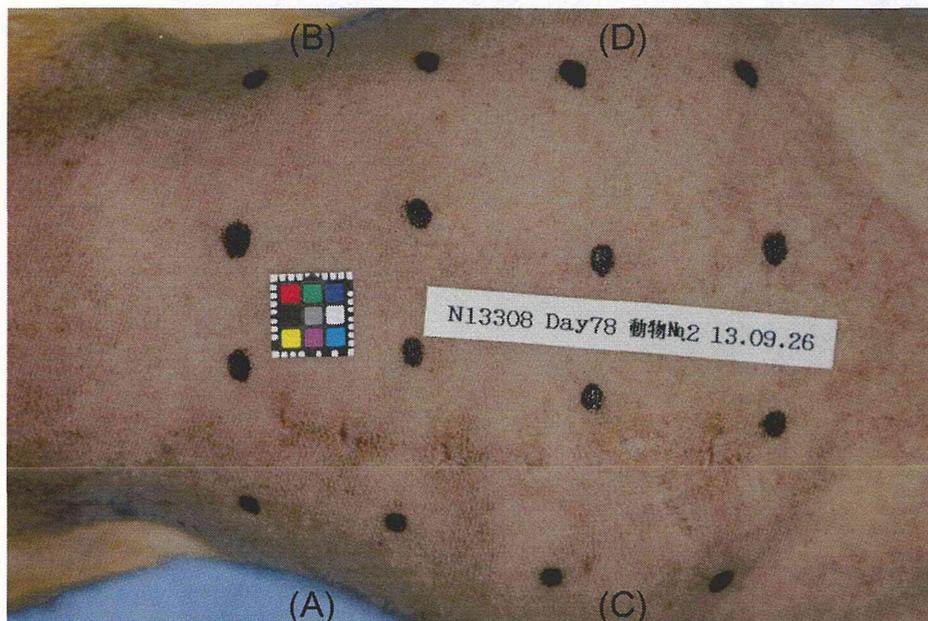


写真 3 K166 (30%) 群 動物番号2 Day 78 (' 13.09.26)

- (A) 塗布部位L : 白色化(ND)、 皮膚刺激(ND)
- (B) 塗布部位R : 白色化(-)、 皮膚刺激(-)
- (C) 無処置部位L
- (D) 無処置部位R



写真 4-1 動物番号 2 K166 30%
白斑形成期 Day 41
HE 染色 ×40

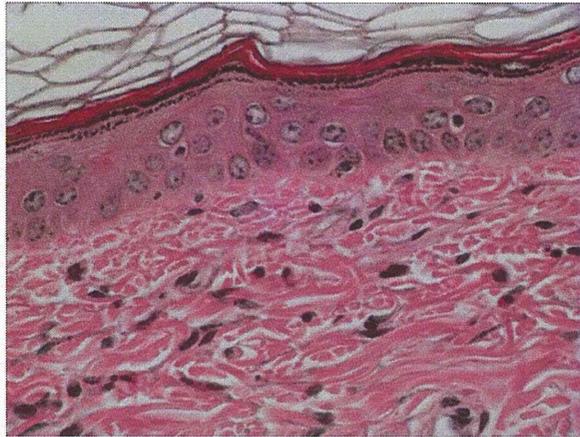


写真 4-2 動物番号 2 K166 30%
回復期 Day 78
HE 染色 ×40

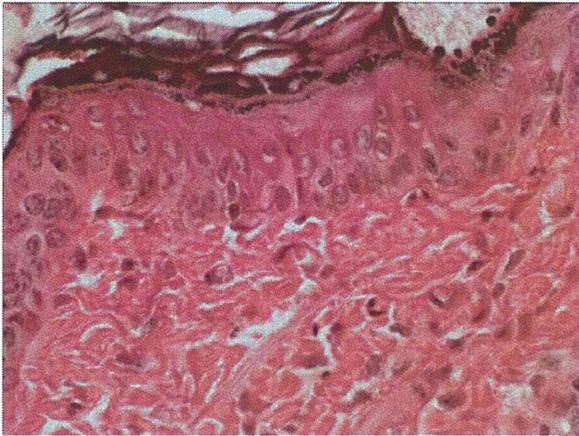


写真 4-3 動物番号 2 無処置部位
白斑形成期 Day 41
HE 染色 ×40

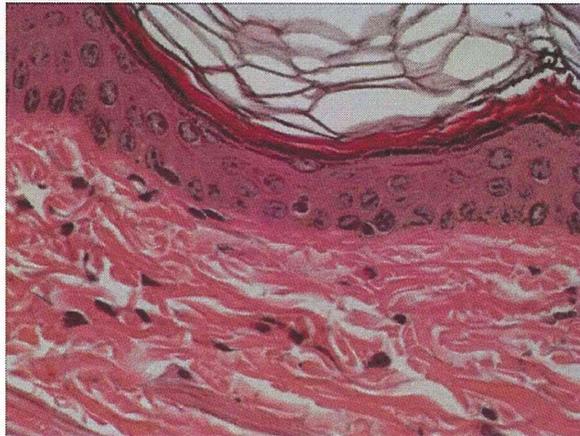


写真 4-4 動物番号 2 無処置部位
回復期 Day 78
HE 染色 ×40

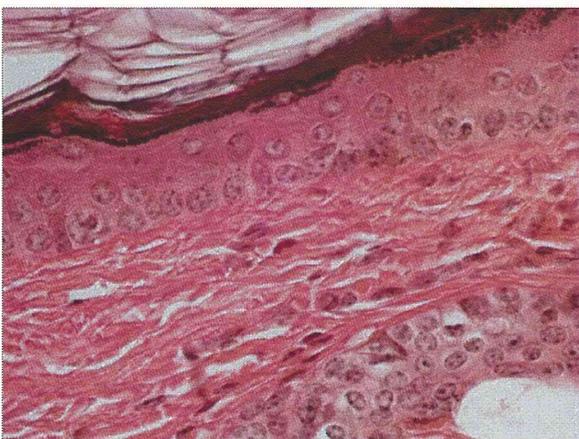


写真 4-5 動物番号 2 非照射部位
白斑形成期 Day 41
HE 染色 ×40



写真 4-6 動物番号 2 非照射部位
回復期 Day 78
HE 染色 ×40

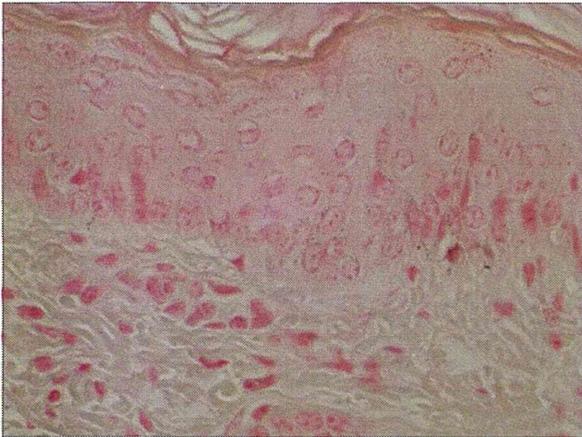


写真 5-1 動物番号 2 K166 30%
白斑形成期 Day 41
Fontana-Masson 染色 ×40

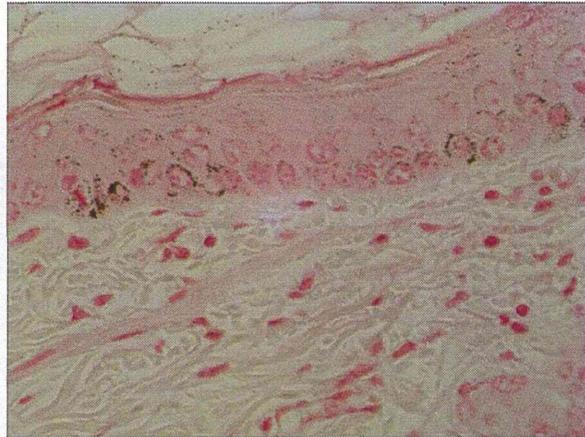


写真 5-2 動物番号 2 K166 30%
回復期 Day 78
Fontana-Masson 染色 ×40

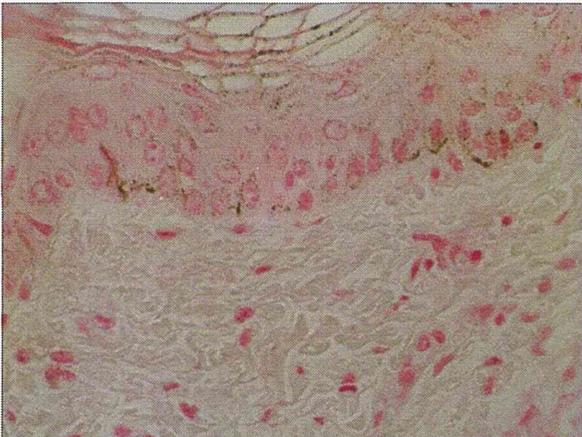


写真 5-3 動物番号 2 無処置部位
白斑形成期 Day 41
Fontana-Masson 染色 ×40

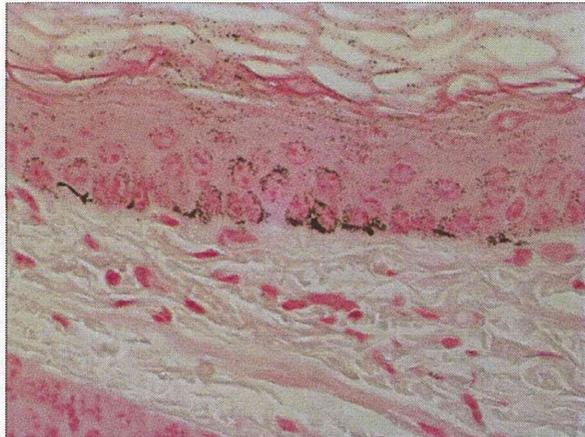


写真 5-4 動物番号 2 無処置部位
回復期 Day 78
Fontana-Masson 染色 ×40

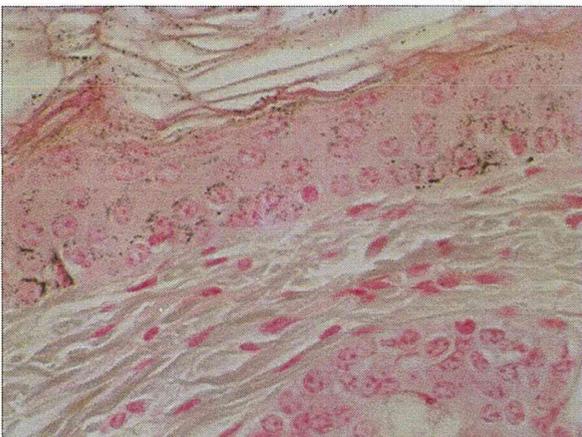


写真 5-5 動物番号 2 非照射部位
白斑形成期 Day 41
Fontana-Masson 染色 ×40

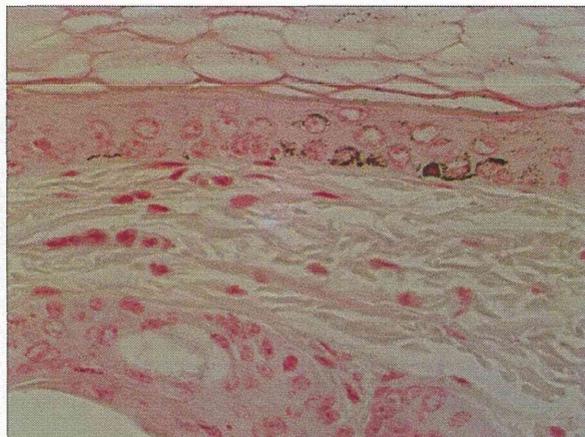


写真 5-6 動物番号 2 非照射部位
回復期 Day 78
Fontana-Masson 染色 ×40

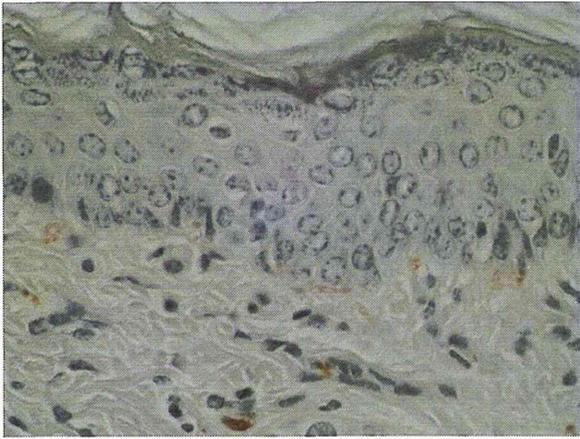


写真 6-1 動物番号 2 K166 30%
 白斑形成期 Day 41
 S-100 免疫染色 ×40

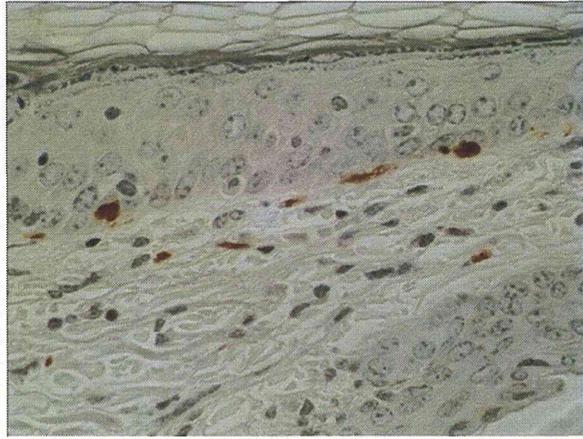


写真 6-2 動物番号 2 K166 30%
 回復期 Day 78
 S-100 免疫染色 ×40

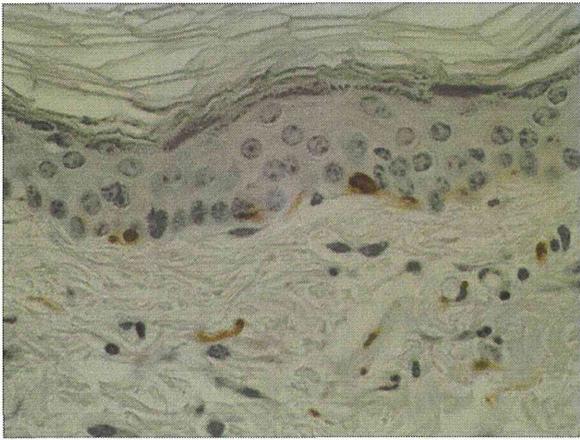


写真 6-3 動物番号 2 無処置部位
 白斑形成期 Day 41
 S-100 免疫染色 ×40

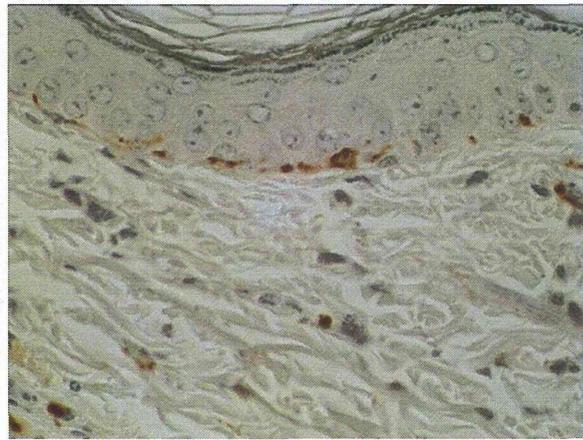


写真 6-4 動物番号 2 無処置部位
 回復期 Day 78
 S-100 免疫染色 ×40



写真 6-5 動物番号 2 非照射部位
 白斑形成期 Day 41
 S-100 免疫染色 ×40

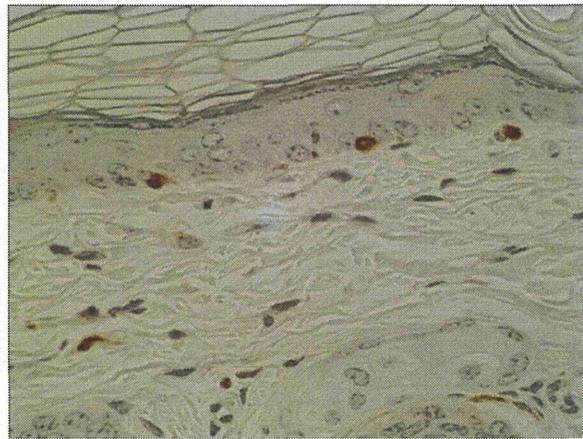


写真 6-6 動物番号 2 非照射部位
 回復期 Day 78
 S-100 免疫染色 ×40

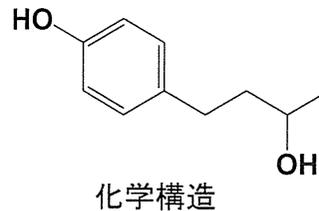
2-1-2 有色動物を用いた感作性・光感作性試験再評価

○材料及び方法

[被験物質]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。

分子式： $C_{10}H_{14}O_2$ 、分子量：166.22
Lot.002002
純度：100%



[皮膚感作性評価]

・GPMT (Guinea pig Maximization Test) ⁴⁾

1) 動物種および群構成

褐色モルモット (Kw1:A-1、雌、東京実験株式会社、感作群 10 匹、対照群 5 匹)

2) 試料および調製方法

下記の濃度に用時調製した。

① 感作試料

- a: FCA と生理食塩液の等量 v/v 乳化物
- b: K166 の 0.8 w/w%液 (溶媒：生理食塩液)
- c: K166 の 1.6 w/w%液 (溶媒：生理食塩液) と FCA の等量 (v/v) 乳化物
- d: 生理食塩液
- e: K166 の 50 w/w%液 (溶媒：50%エタノール水)
- f: 50%エタノール水

② 惹起試料

- g: K166 の 50、30、10、5、3、1 w/w%液 (溶媒：50%エタノール水)

3) 感作方法

① 皮内感作

投与部位は除毛した頸部背側皮膚 (約 4×6 cm) とした。0 日目 (感作開始日) に、感作群は投与試料 a、b、c の順に、対照群には投与試料 a、d、a の順に左右 2 ヶ所 (但し、投与試料 a と b、a と d の投与間隔を縮める) にそれぞれ 0.1 mL 皮内投与した。

② 接触感作

投与部位は、除毛した皮内投与部位とした。なお、除毛は電気バリカンを用いて感作前日までに行い、感作日にシェーバーにて剃毛した。8 日目に感作群は投与試料 e、対照群は投与試料 f を 2×4 cm のリント布 (西尾衛生材料㈱) に 0.2 mL 含浸させ、無浸透性絆創膏 (ブレンダーーム：3M 社) 及び粘着性伸縮包帯 (シルキーテックス 3 号：アルケア㈱) を用いて 48 時間閉塞貼付を行った。なお、閉塞貼付 24 時間前に 10%ドデシル硫酸ナトリウムのワセリン混合物約 0.5 g を皮内投与部位に開放塗布し、8 日目にエタノールを用いて除去後に閉塞貼付を行った。

4) 惹起方法

投与部位は、除毛した側腹部皮膚とした。除毛は電気バリカンを用いて行い、惹起日にシェーバーにて剃毛した。感作開始 21 日目に投与試料 g を 1.5×1.5 cm のリント布に 0.1 mL ずつ含浸させ、無浸透性絆創膏を用いて 24 時間閉塞貼付を行った。密着性を良くするために無浸透性絆創膏の外側を更に粘着性スポンジ絆創膏（マイクロフォーム：3M 社）と粘着性伸縮包帯（シルキーテックス 5 号）で固定した。なお、反応の差を平均化させるために、投与部位は動物ごとにローテーションさせた。

5) 判定方法

惹起貼付除去 3、24 及び 48 時間後に下記の Draize 法の基準で判定した。

<紅斑・痂皮形成>

0：紅斑なし

1：ごく軽度の紅斑（かすかに認められる程度）

2：明らかな紅斑

3：中等度から強い紅斑

4：深紅色の強い紅斑に軽い痂皮形成（傷害は深部に及ぶ）

<浮腫形成>

0：浮腫なし

1：ごく軽度の浮腫（かすかに認められる程度）

2：軽度の浮腫（周囲と明らかに区分可能）

3：中等度の浮腫（1 mm 程盛り上がっている）

4：強い浮腫（1 mm 以上盛り上がり、周囲にも広がる）

・ CCET (Cumulative contact enhancement Test)⁵⁾

1) 試験群および動物数

褐色モルモット (Kw1:A-1、雌、東京実験株式会社、感作群 10 匹、対照群 5 匹)

2) 試料および調製方法

下記の濃度に用時調製した。

① 感作試料

感作群： K166 の 50 w/w%液（溶媒：50%エタノール水）

対照群： 50%エタノール水

② 21 日目惹起試料

K166 の 50、30、10、5、3、1、0.5 及び 0.3 w/w%液（溶媒：50%エタノール水）

3) 感作方法

① 投与部位

除毛した後背部皮膚とした。なお、除毛は電気バリカンを用いて感作前日までに行い、感作日にシェーバーにて剃毛した。