



最終報告書

件名：アトピー性皮膚炎モデルを用いたファムズベビー皮膚保護効果による
自然治癒力の評価試験

試験施設	株式会社 ケー・エー・シー 生物科学センター
試験表題	NC マウスを用いた皮膚アトピー性皮膚炎モデルにおける 被験物質の薬効評価試験
試験番号	1901021

1. 試験番号

1901021

2. 試験表題

NC マウスを用いた皮膚アトピー性皮膚炎モデルにおける被験物質の薬効評価試験

3. 試験目的

NC マウスにダニ抗原を反復皮内投与することで慢性皮膚炎症状を惹起し、皮膚症状のスコア並びに耳介部の厚みを指標に被験物質の有効性（治療効果）を検討した。

4. 試験委託者

名称 : 株式会社ハプロファーマ
所在地 : 〒103-0027 東京都中央区日本橋 3-2-9 三晶ビル 4F
試験委託責任者 : 岩本 恭典
(TEL : 03-3274-5070、FAX: 03-3527-9019)

(依頼元)

名称 : 株式会社 Fam's
所在地 : 〒150-0034 東京都渋谷区代官山町 1-8-1F
代表取締役 : 吉田 さとし
(TEL : 03-3462-0666、FAX : 03-5489-3866)

5. 試験施設

名称 : 株式会社 ケー・エー・シー 生物科学センター
所在地 : 〒520-3001 滋賀県栗東市東坂 91 番地
(TEL : 077-558-3980、FAX : 077-558-3982)

6. 試験責任者

氏名 : 神名 祥史
所属 : 株式会社 ケー・エー・シー バイオサイエンス事業部
受託試験部 第一薬理グループ
(TEL : 077-558-3980、FAX : 077-558-3982)

7. 主な試験従事者

実験動物管理者 : 谷口 佳史
試験担当者 : 下平 龍太郎、中嶋 和佳子、岡本 美樹

8. 試験の実施基準

本試験は、「申請資料の信頼性の基準」の適用外として実施した。

9. 試験期間

試験開始日 : 2019年2月4日
試験日程
動物入手 : 2019年2月5日
ダニ抗原投与 : 2019年2月11日～2月25日 (Day 0～14)
群分け : 2019年2月26日 (Day 15)
被験物質投与 : 2019年2月26日～3月11日 (Day 15～28)
試験終了日 : 2019年3月20日 (最終報告書作成日)

10. ワセリン

名称 : プロペト
Lot No. : 84121
性状 : 軟膏
保管条件 : 室温 (1～30℃)
保管場所 : 本館試薬保管室
供給元 : 丸石製薬株式会社

11. 被験物質

名称 : ファムズスキンフォーム
Lot No. : 8F18
性状 : ムース状
保管条件 : 室温 (1～30℃)
保管場所 : 本館試薬保管室
供給元 : 試験委託者

12. 症状惹起物質

12.1 ダニ抗原

名称 : Mite Extract-DP
ロット番号 : 113031
性状 : 粉末
保管条件 : 冷凍 (-20℃以下)
保管場所 : 本館中央実験室-40℃フリーザー (型式：MDF-U441 (三洋電機㈱))

供給元 : コスモ・バイオ株式会社

12.2 媒体

名称 : 注射用生理食塩液
ロット番号 : K7G97
性状 : 液体
保管条件 : 室温 (1~30°C)
保管場所 : 本館試薬保管室
供給元 : 株式会社大塚製薬工場

13. ダニ抗原投与液の調製

調製濃度 : 10 mg protein /10 mL [投与用量 : 50 µg/50 µL(/mouse)]
調製方法 : 注射用生理食塩液に溶解させた。
保管 : 調製後、マイクロチューブに分注後冷凍保管 (保管場所 : 本館中央実験室
-40°Cフリーザー (型式 : MDF-U441 (三洋電機株)) し、用時室温に戻して
使用した。

14. 試験系

14.1 使用動物

動物種 : マウス
系統 : NC/Nga slc
微生物学的グレード : SPF
性別 : 雌
入手時週齢 : 7 週齢
群分け時週齢 : 8 週齢
発注動物数 : 32 匹
使用動物数 : 30 匹
供給元 : 日本エスエルシー株式会社

14.2 試験系選択の理由

当モデル試験において汎用されている動物であり、背景データも揃っているため。

14.3 入手、検収及び馴化

検収 : 入手・検収時に動物種、系統、週齢、性別に間違いのないこと、並びに動物の一般状態を観察して異常の認められないことを確認してから飼育室に収容した。
馴化期間 : 入手日を含めて 6 日間とする。馴化期間中は、毎日の一般状態の観察及び入手日に電子天秤 (型式 : ENTRIS2201-

1S、ザルトリウス) を用いて体重測定を行い、供試動物選択の指標とした。

14.4 識別方法

- 個体識別 : 動物の尾部に油性ペンで印を付け、識別した。群分け後は個体識別番号と動物番号との対応表を用いて識別した。
- ケージ識別 : 馴化飼育中は、1) 試験番号、2) 系統名、3) 性別雌雄、4) 個体識別番号を記載した。群分け後は、1)~4) に加え、試験群名及び動物番号を記載した。

15. 飼育条件

15.1 飼育室の環境条件

- 飼育室 : 第4 動物棟 B 室
- 温度 : 18~28℃ (許容範囲)
- 湿度 : 30~80% (許容範囲)
- 換気方法 : オールフレッシュ・エアー方式
- 照明時間 : 12 時間/日 (明 : 7~19 時)

15.2 収容方法

- ラックの種類 : オープンラック
- ケージ : ポリオレフィン (TPX) 製ケージ
(180 × 240 × 130 mm、日本クレア(株))
- 収容匹数/ケージ : 1 匹/ケージ
- ケージ交換頻度 : 1 回/週

15.3 飼料

- 種類 : 固形飼料 CRF-1
- 供給元 : オリエンタル酵母工業株式会社
- 給餌方法 : ケージ蓋の給餌部に入れて自由に摂取させた。
- 汚染物質の確認 : 飼料業者が発行するロット毎に分析した分析成績書を入手し、結果が基準の範囲内にあることを確認した。

15.4 飲料水

- 種類 : 水道水 (栗東市)
- 給水方法 : 次亜塩素酸 (2~10 ppm) を添加した水道水を消毒 (300 倍希釈したピューラックス消毒液に浸漬後乾燥) 済みの給水瓶に入れ、金属製ノズルより自由摂取させる。給水瓶及び給水ノズルは各週に 1 回の頻度で交換した。
- 水質の確認 : 水質検査項目及びその水質基準は「水質基準に関する省令

(平成 15 年 5 月 30 日厚生労働省令第 101 号、最終改正：平成 30 年 3 月 28 日厚生労働省令第 138 号)」に従った。
水質検査書を定期的に入手した。

15.5 床敷

商品名 : LIGNOCEL flake
供給元 : レッテンマイヤージャパン株式会社
滅菌方法 : 高圧蒸気滅菌 (121℃、20 分) した。
汚染物質の確認 : 床敷業者が発行するロット毎に分析した分析成績書を入手し、結果が基準の範囲内にあることを確認した。

16. 試験群構成

試験群	動物数	動物番号
コントロール群	10	101～110
ワセリン群	10	201～210
被験物質群	10	301～310

17. 供試験動物の群分け方法 (SOP/操作/002)

最終ダニ抗原投与の翌日 (Day 15) に動物の右耳介部厚及び右耳介部スコアを測定し、各群の右耳介部厚及び右耳介部スコア平均値がなるべく均等になるように、EXSUS (Version10.0.0、(株)CAC クロア) を用いて層別割付法で、各群 10 匹の 3 群に群分けした。

18. ダニ抗原投与液投与 (症状惹起)

投与経路 : 右耳介部皮内投与
投与用量 : 5 μ L / 右耳介部
投与方法 : 小動物用簡易吸入麻酔装置 (NARCOBIT-E (II 型)、(株)夏目製作所) を用いたイソフルラン吸入麻酔下で 30G ニードル及びガラスシリンジを用いて、マウス右耳介部に皮内投与した。
投与日 : Day 0、3、7、10 及び 14
投与頻度 : 1 回/日
投与群 : 全ての試験群に投与を行った。

19. 塗布投与

19.1 コントロール群

コントロール群には塗布投与は行わなかった。

19.2 ワセリン群

投与経路	: 塗布投与
投与用量	: 約 20 mg /右耳介部
投与方法	: 約 20 mg をスパーテルすりきりで計量し、ゴム手袋をはいた指で薄く延ばすように右耳介部に塗布投与した。
投与期間	: Day 15～28
投与回数	: 2 回/日
投与タイミング	: 午前と午後（6 時間以上の間隔をあけた）
最終日	: 最終日（Day 28）は午後の投与は実施しなかった。

19.3 被験物質群

投与経路	: 塗布投与
投与用量	: 約 20 mg /body 右耳介部
投与方法	: 約 20 mg をスパーテルすりきりで計量し、ゴム手袋をはいた指で薄く延ばすように右耳介部に塗布投与した。
投与期間	: Day 15～28
投与回数	: 2 回/日
投与タイミング	: 午前と午後（6 時間以上の間隔をあけた）
最終日	: 最終日（Day 28）は午後の投与は実施しなかった。

20. 一般状態観察

観察期間	: Day 0～Day 28
観察頻度	: 1 日 1 回
観察方法	: 全例について個体別に、一般状態の項目は、外観、体位、意識・態度、行動、神経系、呼吸、心・血管系、体温、被毛及び皮膚、局所的症状の項目は、頭部・頸部、眼、耳、鼻、口、腹部、外陰部及び排泄を観察した。

21. 体重測定

測定頻度	: Day 0 に 1 回、その後は 1 回/週の頻度。
測定方法	: 全例について、電子天秤（型式：ENTRIS2201-1S、ザルトリウス）を用いて測定した。

22. 症状評価

以下の症状評価を午前塗布と午後塗布の間に行った。

22.1 皮膚症状スコア

ダニ抗原投与開始日 (Day 0) に 1 回、その後 Day 15 (群分け時)、18、22、25 及び Day 28 に、右耳介部における以下に示す皮膚症状を肉眼で観察し、それらの強さを無症状 (0 点)、軽度 (1 点)、中度 (2 点)、重度 (3 点) にスコア化して評価した (別表 2 参照)。

- A) 発赤・紅潮
- B) 痂皮・表皮剥離
- C) 出血・血塊
- D) 硬化

22.2 耳介部厚

ダニ抗原投与開始日 (Day 0) に 1 回、その後 Day 15 (群分け時)、18、22、25 及び Day 28 に、イソフルラン麻酔下でマウスの右耳介部の厚みを測定した。計測には、アップライトゲージ (型式：R1-A、PEACOCK(株)) を使用した。また、各々の測定日における耳介部厚測定値から Day 0 における耳介部厚測定値 (Pre 値) を差し引いて、耳介部厚変化値を算出した。

23. 写真撮影

Day 15 及び Day 28 の評価直後に、イソフルラン吸入麻酔下でマウスの右耳介部をデジタルカメラ (型式：X-M1、富士フイルム(株)) を用いて撮影した。

24. 安楽死

Day 28 の写真撮影後に、頸椎脱臼させることでマウスを安楽死させた。

25. データの解析

試験で得られた結果は、平均値±標準誤差 (Mean±SE) で表記した。さらに、耳介部厚変化値について、コントロール群とワセリン群あるいは被験物質群との 2 群間比較は、F 検定を行って等分散であれば Student の t 検定を、不等分散であれば Aspin-Welch の t 検定を用いて平均値の差を検定した。また、皮膚症状スコアについて、コントロール群とワセリン群あるいは被験物質群との 2 群間比較では、Mann-Whitney の U 検定を用いて平均値の差を検定した。いずれも両側検定で実施して、有意水準は 5%とし、各統計解析には EXSUS (Version10.0.0、(株)CAC クロア) を用いた。

26.結果・考察

皮膚炎症状評価を行った結果、コントロール群と比較して被験物質群では耳介厚変化値については Day 25 において、皮膚症状スコアについては Day 28 において統計学的に有意な低値が認められた。(図 1、2 及び表 1、2)

以上の結果から、被験物質は慢性皮膚炎症状に対して抑制作用を示す可能性が示唆された。

27.試験関係資料の保存

本試験に関する以下の試験関係資料は、試験終了後 5 年間、試験施設の資料保存施設に保存する。5 年経過後の保存については試験委託者と協議する。

- 1) 試験計画書 (写し)
- 2) 被験物質に関する記録
- 3) 試験系に関する記録
- 4) 試験で得られた全ての生データ
- 5) 試験委託者よりの全ての通知書及び両者間で交わした交信記録
- 6) 最終報告書 (写し)

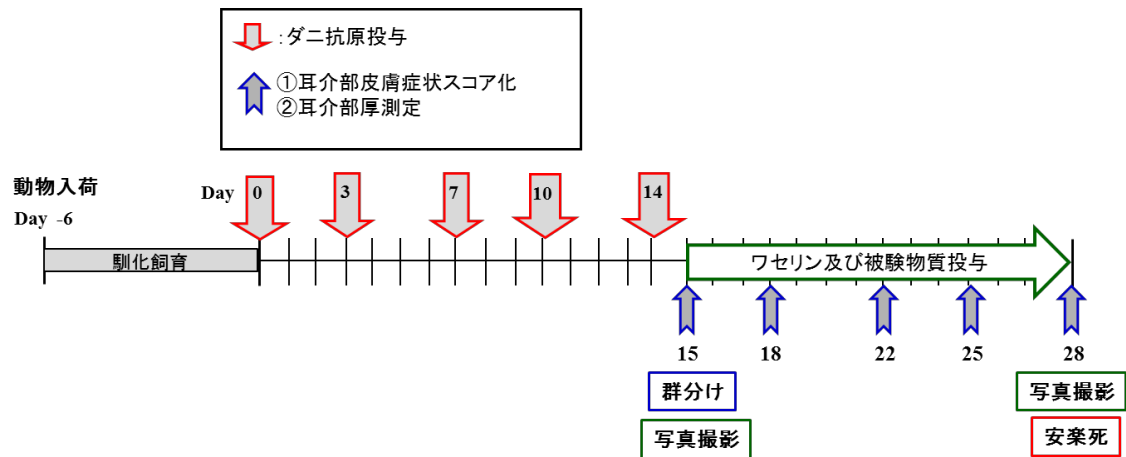
その他、試験から発生した全ての記録類

28.動物実験倫理

本試験は、株式会社ケー・エー・シーの動物実験規程、動物実験委員会規定及び動物実験承認規定を遵守して適正に実施した (承認番号：19-0122)。

別表 1：実験スケジュール

※入手日を Day -6 とし、馴化飼育 6 日間の後、ダニ抗原投与開始日を Day 0 とする。



別表 2：皮膚症状スコア

スコア化項目	軽度 (1点)	中度 (2点)	重度 (3点)
A：発赤・紅潮	血管の拡張を主体とする血管に沿った線の発赤	血管のラインから広がった面の発赤・紅潮	耳介部の面積の半分以上を占める面の発赤・紅潮
B：痂皮・表皮剥離	1箇所面の痂皮・表皮剥離あるいは2箇所程度の点の痂皮・表皮剥離	2箇所以上の面の痂皮・表皮剥離あるいは複数の点の痂皮・表皮剥離	耳介部の面積の半分以上を占める痂皮・表皮剥離
C：出血・血塊	1箇所以上の出血・血塊	複数あるいは面の出血・血塊	耳介部の面積の1/3以上を占める出血・血塊
D：硬化	耳介部を指で折り曲げて確認する、1箇所以上の硬化	耳介部を指で折り曲げて確認する、広範囲におよぶ硬化	耳介部の面積の半分以上を占める硬化

図 1：皮膚症状スコア

* : P < 0.05 vs. コントロール群

平均値±標準誤差

n = 8

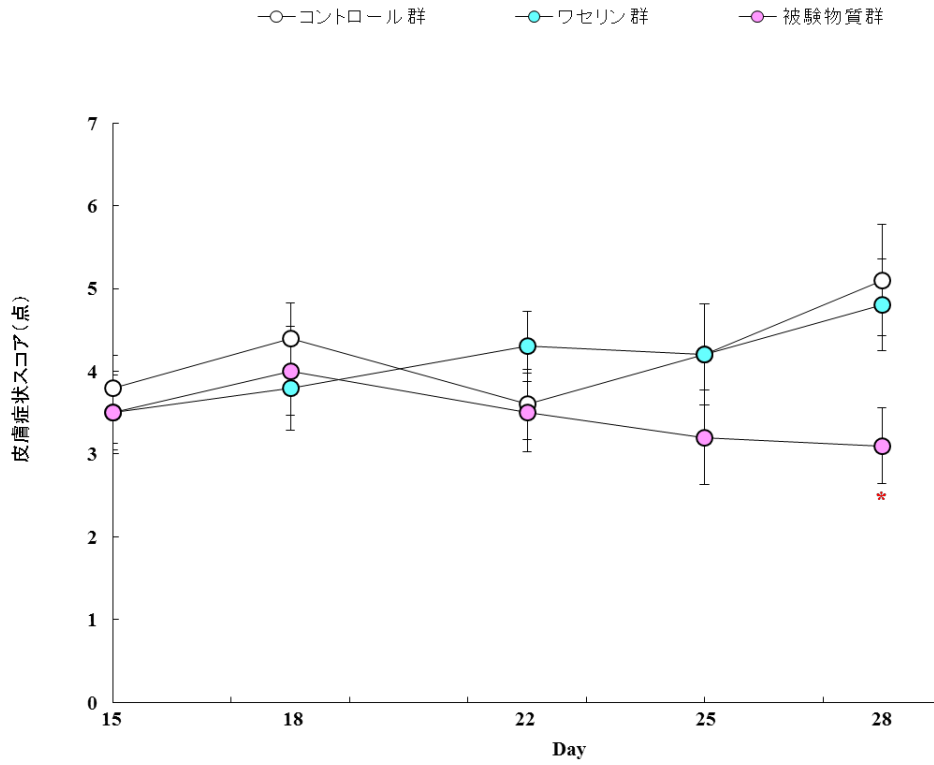


図 2：耳介厚変化値

* : P < 0.05 vs. コントロール群

平均値±標準誤差

n = 8

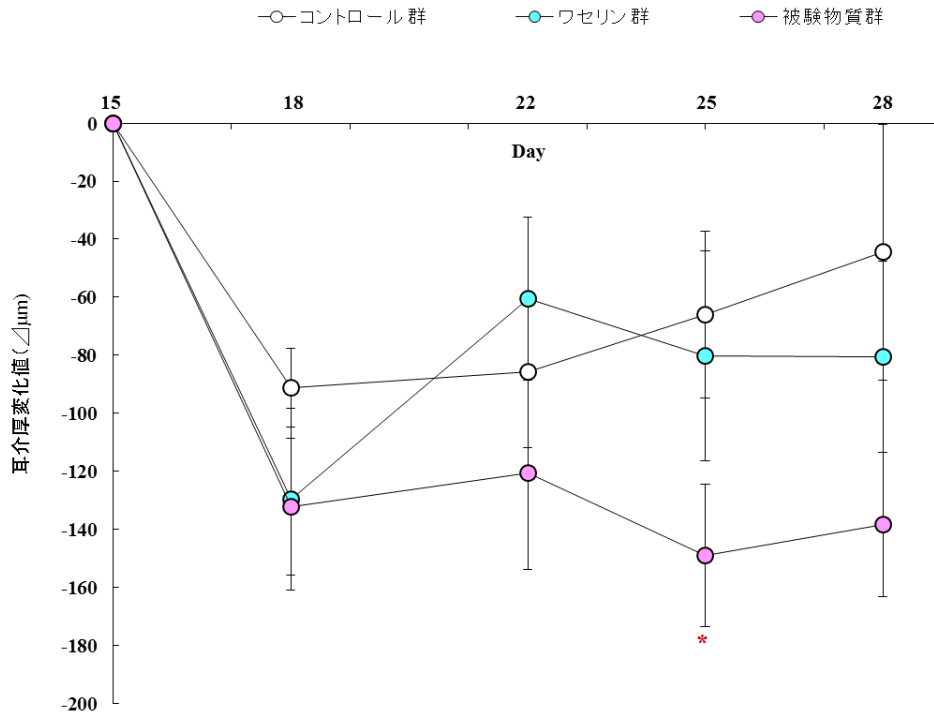


表 1：皮膚症状スコア

試験群名	皮膚症状スコア(点)					
	Day 15	Day 18	Day 22	Day 25	Day 28	
コントロール群	平均値	3.8	4.4	3.6	4.2	5.1
	標準誤差値	0.4	0.4	0.4	0.6	0.7
	検査例数	10	10	10	10	10
ワセリン群	平均値	3.5	3.8	4.3	4.2	4.8
	標準誤差値	0.5	0.5	0.4	0.6	0.6
	P値vs.コントロール群	0.7556	0.4624	0.2614	1.0000	1.0000
	検査例数	10	10	10	10	10
被験物質群	平均値	3.5	4.0	3.5	3.2	3.1
	標準誤差値	0.4	0.5	0.5	0.6	0.5
	P値vs.コントロール群	0.6596	0.3240	0.7261	0.2305	0.0229 *
	検査例数	10	10	10	10	10

検定結果・・・*: p<0.05

Mann-WhitneyのU検定を用いて統計学的解析を行った。

表 2：耳介厚変化値

試験群名	耳介厚変化値(Δμm)				
	Day 18	Day 22	Day 25	Day 28	
コントロール群	平均値	-91.2	-85.8	-66.0	-44.5
	標準誤差値	13.6	26.1	28.8	44.2
	検査例数	10	10	10	10
ワセリン群	平均値	-129.7	-60.6	-80.2	-80.6
	標準誤差値	31.3	28.1	36.1	33.0
	P値vs.コントロール群	0.2803 ¹⁾	0.5189	0.7620	0.5214
	検査例数	10	10	10	10
被験物質群	平均値	-132.3	-120.6	-149.0	-138.4
	標準誤差値	23.5	33.3	24.5	24.9
	P値vs.コントロール群	0.1479	0.4213	0.0415 *	0.0807
	検査例数	10	10	10	10

検定結果・・・*: p<0.05

1)と印したところはAspin-Welchのt検定を用い、その他はStudentのt検定を用いて統計学的解析を行った。