

ザヨンeナラ脱毛防止剤の実験報告書

1. 養毛及び脱毛防止剤効能試験評価

(忠北大 薬品資源開発研究所)

2. 安全性試験

(株式会社ケムオン- うさぎを利用した皮膚刺激試験)

養毛及び脱毛防止剤Dream毛効能試験評価

2004年9月15日

忠北大学校 薬品資源開発研究所

提出文

(株) ザヨンeナラ

本資料を(株) ザヨンeナラの“養毛及び脱毛防止剤Dream毛効能試験評価”の報告書として提出します。

2004年9月15日

研究機関名： 忠北大学校 薬品資源開発研究所
所長 Yoon, Yeo Pyo

研究責任者： 忠北大学校 薬学大学
教授 Hong, Jin Tae

最終報告書

| | | |
|-------|-----------------------------|----------------------|
| 試験依頼者 | 試験依頼者：(株) ザヨンeナラ | 代表理事：Hwang, In Myung |
| | 注所：仁川広域市 延壽区 青鶴洞 ザヨンeナラビル1階 | |

| | |
|------|------------------|
| 試験題目 | (株) ザヨンeナラ効能試験評価 |
|------|------------------|

| | |
|------|--|
| 試験目的 | (株) ザヨンeナラで開発された養毛及び脱毛防止剤Dream毛を実験動物モデルを利用して養毛効きを評価する。 |
|------|--|

| | |
|------|--------------------------|
| 試験機関 | 機関名称：忠北大学校 薬品資源開発研究所 |
| | 所在地：忠北 清州市 興徳区 開山洞 山48番地 |
| | 試験機関長名：Yoon, Yeo Pyo (印) |

| | |
|-------|-------------------|
| 試験責任者 | 責任者：Hong, Jin Tae |
| | 所属：忠北大学校 薬学大学 |

| | |
|-------|---------------------------------|
| 主任試験者 | Lee, Seung Ho : 忠北大学校 薬学大学 研究教授 |
|-------|---------------------------------|

| | |
|-------|----------------------------------|
| 試験担当者 | Lee, Sang Min : 忠北大学校 生命科学大学 4年 |
| | Son, Dong Joo : 忠北大学校 薬学大学 専任研究員 |
| | Lee, Yoot Mo : 忠北大学校 薬学大学 修士2年 |
| | Park, Mi Hee : 忠北大学校 薬学大学 修士1年 |

| | |
|---------|--------------------------------|
| 病理組織責任者 | Nam, Sang Yoon : 忠北大学校 獣医科大学教授 |
|---------|--------------------------------|

| | |
|---------|-------------------------------------|
| 資料保管責任者 | Baek, In Jeong : 忠北大学校 獣医科大学 博士課程1年 |
|---------|-------------------------------------|

| | |
|---------|---------------------------------|
| 資料保管責任者 | Lee, Seung Ho : 忠北大学校 薬学大学 研究教授 |
|---------|---------------------------------|

| | |
|-----|-------------------------|
| 試験日 | 動物入手日：2004年6月1日 |
| | 投与前順化開始日：2004年6月1日-6月7日 |
| | 投与開始日：2004年6月9日 |
| | 試験終了日：2004年7月10日 |
| | 最終報告書提出日：2004年9月15日 |

| | |
|----|---------------------------------------|
| 承認 | 忠北大学校 薬品資源開発研究所 所長：Yoon, Yeo Pyo |
| | 試験依頼者：(株) ザヨンeナラ 代表理事：Hwang, In Myung |

目 次

要 約

| | |
|-------------|---|
| I. 前書き | 1 |
| II. 材料及び方法 | 3 |
| III. 結果及び考察 | 5 |
| IV. 結論 | 7 |
| V 参考文献 | 8 |

要約文

I. 題目

(株) ザヨンeナラの養毛及び脱毛防止剤Dream毛の効能試験評価

II. 研究の目的及び重要性

発毛、養毛及び脱毛予防は昔から多い関心の対象で、これら現象は遺伝的な要因、生活スタイルまたは環境的要因などと関連されていると思われるし、最近には脱毛対象が中年層男性だけではなく、青少年層とか女性層でも頻発するなどだんだん増える態様を見せている。従って、養毛或いは脱毛防止効きが期待される薬物及び製品に対する社会的需要がだんだん増える趨勢であり、それによる研究開発の重要性も大きくなっている。

本試験では(株) ザヨンeナラの養毛及び脱毛防止剤Dream毛の養毛効きを評価した。評価方法は既存の液状剤形の評価に使用された方法と同一の方法を使った。即ち、養毛効果の評価にあまねく使用されるC57BL/6二十日鼠を利用した効き評価方法を使って効きを評価した。

III. 研究内容及び範囲

C57BL/6二十日鼠雌雄各々の背中の毛をanimal clipperを利用して除毛して、試験薬(Dream毛)と上記試験薬の中で溶剤及び可溶化剤だけを含める対照薬を毎日6回/1週経皮塗布し、毎7日おきに4週間養毛の効果を写真撮影の後、肉眼で比較判定した。また、成長部位及び非成長部位での組織学的な観察を実施した。

IV. 研究結果

試験薬の処理群は対照薬の処理群に比べて処理後約15日ごろから毛髪成長が早く進むと観察されて、3週及び4週目には対照群に比べてもっと有意な養毛効果の違いを見せることが観察された。また毛包の形態を見せていることが確認された。

1. 前書き

人の毛髪は脳とそれを囲っている頭蓋骨保護のような本来の機能以外にも美容的な面で大きい機能をしていて、発毛、養毛及び脱毛予防は昔から多い関心の対象になっている。最近には既存の中年男性だけではなく若い層と女性層でも脱毛予防と養毛などに対する関心が増えている。これは男性で発生する遺伝的な要因以外に現代社会に立ち入りながら女性達の社会活動増加、入試とか職場でのストレス増加及び西欧化された食事習慣から来る栄養のアンバランスなど脱毛に直、間接的に影響を及ぼせる多い社会文化的な要因の変化から基づくと思われる。

発毛、養毛及び脱毛予防に対する研究は昔から始まったがいまだに発毛及び脱毛の仕組みに対しては明かになっていない状況だ。しかし、最近全世界的に多い大学及び企業研究所などで毛髪成長と脱落に対する細胞学的、生化学的または分子生物学的研究が活発に進んでいて¹⁾、脱毛治療及び毛髪成長を促進させられる薬物の開発にも多い努力を続けている。^{2, 3)} 現在、毛髪成長を促進する薬物にはアメリカFood & Drug Administration (FDA) から公認されたminoxidil とfinasterideの二種類だけがある。Pharmacia & Upjohn社のminoxidilは最初には高血圧治療のための血管拡張剤として開発されたが、不作用として多毛症が報告されてから発毛剤として開発された。⁴⁾ Minoxidilの発毛効果に対する作用仕組みは現在まで明かにならなかったが、血管拡張を通じる栄養供給の増加及びpotassium channel opening効果などが毛髪成長を導くと思われる。^{5, 6)} また最近Merck社で開発したfinasterideは男性ホルモン代謝に働く酵素である5- α reductaseの活性を抑制させる物質だ。⁸⁾

発毛、養毛及び脱毛予防研究に利用される実験法としては実験動物を利用したin vivo評価⁹⁾と毛包細胞及び組織培養を利用したin vitro評価^{10, 11)}などが主に利用されている。1980年代に入って毛包を構成している核心細胞である真皮乳頭細胞(dermal papilla cell)と外毛根鞘細胞(outer root sheath cell)の培養法が開発されてから¹²⁻¹⁴⁾毛包からの分化仕組みに対する研究が活発になった。以後毛包組織の培養法が開発されてから¹⁵⁾発毛養毛及び脱毛防止などの研究に有用な評価モデルと活用できる可能性を見せた。最近には生化学的、分子生物学的実験方法を利用して毛髪成長と係わった各種成長因子とか遺伝子の動静、作用仕組みの研究及び薬物探索の研究が活発に進んでいる。⁷⁾ しかし、このようなin vitro培養技法を利用した評価は毛包組織内での細胞間相互作用と毛包組織と周囲を囲った真皮組織との相互作用、それから血行が排除されるなど、毛髪成長に直、間接的に影響を及ぼせる多い要素が排除されていて限界性を持っている。従って、各種生化学的評価を通じて探索される多い薬物の実際効果を検証するためにはいまだに実験動物を利用した効果評価及び臨床実験などが主に利用されている実情だ。発毛、養毛及び脱毛防止などの効果を評価するために利用される実験動物モデルには赤いしっぽ猿(stump tailed macaque)、⁹⁾ うさぎ(rabbit)、ハムスター(hamster)¹⁶⁾、二十日鼠

(mouse)^{3, 16)}などがある。

本試験では液状剤形の養毛剤(Dream毛)の養毛効きを評価した。評価方法は既存に一般的にあまねく使用されている方法を使った。即ち、養毛効果の評価にあまねく使用されるC57BL/6二十日鼠を利用した効き評価方法を使って効きを評価した。C57BL/6二十日鼠は体毛が黒色で、自発的脱毛(spontaneous alopecia)が起きる特徴を持っている。また、melanocyteが毛包にのみ限定的に存在してmelaninの合成が毛髪成長周期(hair growth cycle)と一致されて肌色で毛髪の成長周期を判定できる長所を持ち、毛髪生理研究にあまねく利用されている。¹⁷⁾

本研究で生後6週になったC57BL/6二十日鼠雌雄各々の背中の毛をanimal clipperを利用して除毛して試験薬及び対照薬を毎日6回/1週の間経皮塗布して7日おきに4週まで養毛効果を肉眼で比較判定した。また、成長部位及び非成長部位での組織学的な観察を実施した。

11. 実験材料及び方法

1. 実験試料

(株) ザヨンeナラから依頼を受けた試験薬 (Dream 毛頭皮ローションは主成分としてL-Mentol (エルメントール)、サリチル酸 (salicylic acid)、D-Panthenol (ディパンテノール)、Herbal extract (漢方抽出物) などを含有している。(表2) 養毛実験は試製品原液を塗布した。

2. 実験動物

1) C57BL/6 二十日鼠

2) 実験動物

生後5週になった雌雄C57BL6二十日鼠を(株)大韓バイオリンクから購入して1週間動物飼育室の環境で適応させた後、実験に使った。動物飼育室の温度は $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度は $50\% \pm 10\%$ 、照明時間は午前7時-午後7時、12時間ずつ日夜を保ったし、照度は150-200Luxとした。実験群は雌雄各々3個で全部6個群として1群当り10匹ずつ全部60匹を使った。実験動物は隔離用マウスケージ[(株)三光]で飼育して、実験動物用飼料(サムヤン飼料)を自由に給与した。

2) 試料処理

6週令の雌雄二十日鼠の背中の中毛をanimal clipperを利用して除いた。視標塗布は除毛の翌日から30日間除毛部位に対して毎日1回ずつ、月曜日から土曜日まで実施した。1回塗布量は除毛された背中の面積 10cm^2 当り約0.2mlだった。全ての実験はほかの胚の二十日鼠をpoolingして平均体重と分散が均質するように仕分けた後、実施した。

3) 体重測定

体重測定は発毛試験物質の塗布直前から測定して実験終了時まで一定な時間に毎週測定した。

4) 効果判定

実験開始日から7日が経過した後から4週まで実験動物をエーテルで麻酔させて写真撮影した。試験薬及び対照薬による養毛効果は写真上で視標塗布部位に生い立った毛の程度(背中の毛の除去面積の中で、試料処理の後毛が生い立った面積の比)を肉眼でscoringした。(表1)、

各郡間の比較はstudent t-testで統計処理した。

5) 組織学的分析

試験開始30日目に養毛剤処理群と対照群の皮膚組織は解剖機を利用して摘出した後、formalinで据え付けた。段階別でalcoholとxyleneで脱水処理してパラフィン包埋した後、microtomeを利用して5 μ mの切片を制作し、またalcoholとxyleneでパラフィンを除いた。Hematoxylin & eosin染めの後、光学顕微鏡下で毛包の形態を観察した。

表1. 養毛効果と判定基準

| 毛髪成長程度 | Scoring |
|------------|---------|
| 毛が生い立っていない | 0 |
| 30%未満 | 1 |
| 30%-70% | 2 |
| 70%以上 | 3 |

III. 実験結果と考察

C57BL/6二十日鼠は生後からすべての毛包が毛髪成長周期の成長期に入って毛が生い立ち始めてから生後約3週頃休止期に転移された後、すぐに2次成長期に差し掛かって6-8週頃またすべての毛包が休止期に転移されて約4週間以上持続されるので、実験物質の効果を評価するための時間的なゆとりがあるという長所を持つ。¹⁸⁾ またmelanocyteが毛包にのみ限定的に存在しているし、melanin合成が毛髪成長周期とよく一致されて休止期の場合は背中中の肌色が桃色を帯びて、成長期の場合はチャコールグレーを帯びて肌色で毛髪の成長周期を判定できる長所を持って毛髪生理研究にあまねく利用されてある。¹⁹⁾ 即ち、C57BL/6二十日鼠は初期毛髪成長周期synchronizedされており、約7週令二十日鼠は休止期が長くて薬効性物質の毛髪成長効果を評価するのに良い実験モデルとしてあまねく利用されて、本実験にも6週令二十日鼠を利用して試験試料の養毛効果を評価した。

各々試料を投じた二十日鼠は対照群に比べて特別な症状は観察されなかった。各々の試料を投じた二十日鼠の体重の変化は雌のDream毛郡で対照群に比べて少し減る傾向を見せたが、雄では体重の変化を観察できなかった(図1及び2)。一般的に成長期へ履行される肌色の变化速度は雄二十日鼠より雌二十日鼠ではやく起きて、雌の肌色の变化が雄に比べて明らかに出るのを観察した。

試験郡と対照群を比べる時、雌雄全部試験薬を塗布した各試験郡は試験開始10-15日頃から肌色が灰色にはやく変り始めて、何日の後、二十日鼠背中的一部分または全体的に青色に変わりながらはやい時間内に毛が生い立つのが観察された。毛の成長速度も雄二十日鼠より雌二十日鼠ではやく起きたが有意な違いは出なかった。試験郡と対照群を比べる時、雌雄全部試験郡では実験開始20日頃には試験郡の1/2以上で黒い毛が生い立つと確認されたが、対照群では毛の成長速度がこれよりもっと落ちるのが観察された(図3及び4)。これを表1に準じてscoringして養毛効果を比べればDream毛は陽性対照群であるminoxidilに比べて肌色の变化と毛の成長時期が多少遅いが、陰性対照群に比べて雌と雄で著しく毛の成長を促進したし、各試験郡全部が対照群と比べて統計的に有意な水準($p < 0.001$)の優秀な養毛効果を表した。

対照群と試験郡での毛包の形態学的な変化をよく見るために実験開始30日目二十日鼠を頸椎屠殺して得た皮膚組織をhematoxylin & eosinで染めて光学顕微鏡で毛包の形態を観察した。その結果、試験薬の処理郡は全部対照群に比べて皮膚の厚さが厚くて毛包組織の長さが一般的に長く、皮膚奥深く位置し、毛包の形態をしていた。組織切片上で毛包の長さや位置などは毛

髪成長周期で毛包の状態を判定する重要なパラメーターで、³⁾この結果は試験薬処理群の毛包が対照群に比べて成長期への転移が早く進んだことを意味する(図5及び6)

脱毛は男性に発生する遺伝的な要因以外にも現代社会に立ち入りしてから女性達の社会活動増加、入試とか職場でのストレス増加及び西欧化された食事習慣から来る影響のアンバランスなど脱毛に直、間接的に影響を及ぼせる多い社会文化的な要因の変化に基づくと思われる。現在、毛髪成長を促進する薬物にはアメリカFood and Drug Administration(FDA)で公認されたminoxidilとfinasteride二種類だけがある。Minoxidilの発毛効果に対する作用仕組みは現在まで明かになっていないが、血管拡張を通じる栄養供給の増加及びpotassium channel opening効果などが毛髪成長を導くと思われる。^{5、6)}また、最近Merck社で開発したfinasterideは男性ホルモン代謝に働く酵素である5- α reductaseの活性を抑制させる物質だ。⁸⁾Dream毛頭皮ローションは民間の薬としてとても重要な生薬としてあまねく使われていて、毒性がないことと知られている甘草、當歸、菖蒲、川芎、何首烏、薏苡仁を湿潤剤として使った(表2)。伝統的また科学的な根拠によって明かになったこの薬材の効きは大部分コレステロール抑制による動脈硬化予防、血栓溶解、血圧降下、末梢血管拡張などの効きを持っている。Dream毛頭皮ローションの作用はこのような効きを持っている抽出物を含有しているため、毛根細胞への栄養供給と酸素供給を助けられると予想されるし、このような作用は毛根細胞成長に重要だと一般的に知られている。Dream毛頭皮ローションに湿潤剤中の一つである薏苡仁は脂肪油の主成分がmyristic acid、 β -sitosterol、campesterol、stigmasterolなどで構成されているし、この主要成分の中でmyristic acidと β -sitosterolは5- α -reductaseを抑えると報告されている。²⁰⁾甘草は主要成分がterpenoidであるglycyrrhetic acidとglycyrrhetizin、それからflavonoid等で構成されているが、これら化合物の中glycyrrhetic acidとglycyrrhetizin²¹⁾はまた5- α -reductaseを抑えると報告されている。このような報告はDream毛頭皮ローションが男性と女性の禿と主要原因である男性ホルモン分泌調節を通じて養毛の効きを持てる可能性を後押ししてくれる。この実験でいろいろな文献の報告と考察を通じて、それからこの実験からの結果を元でDream毛頭皮ローションは有意性を持つ養毛効果があることを確かめられた。

IV. 結論

(株) ザヨンeナラで開発した養毛剤(Dream毛)の効果を評価するために養毛剤の効き評価にあまねく利用されるC57BL/6二十日鼠の背中の毛をanimal clipperで除いて試験薬(Dream毛)を4週間経皮塗布した結果、試験薬処理群は対照群に比べて処理の後約15日頃から毛髪成長が早く進むと観察されたし、3週及び4週には対照群に比べてもっと有意な養毛効果の違いを見せるのが観察された。Dream毛は陽性対照群であるminoxidilに比べて肌色の変化と毛の成長時期が多少遅いが、陰性対照群に比べて雌と雄で著しく毛の成長を促進したし、各試験群全部対照群と比べて統計的に有意な水準($p < 0.001$)の優秀な養毛効果を表した。また、塗布開始30日経過後、二十日鼠の皮膚組織を凍結切片して観察した結果、試験薬処理群は全部対照群に比べて皮膚厚さが厚くて毛包組織の長さが全般的に長い、皮膚奥深く位置している毛包の形態を見せていることが確認された。

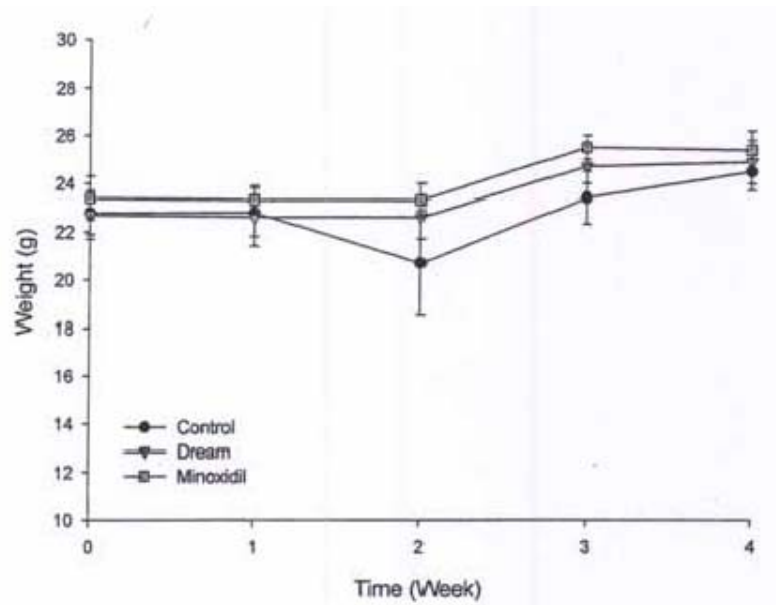


図1。4週間試験薬を局所処理した後、雄C57BL6二十日鼠脱毛モデルの体重の変化。DW(陰性対照群)、Dream毛、それから3% MXD(Minoxidil)。

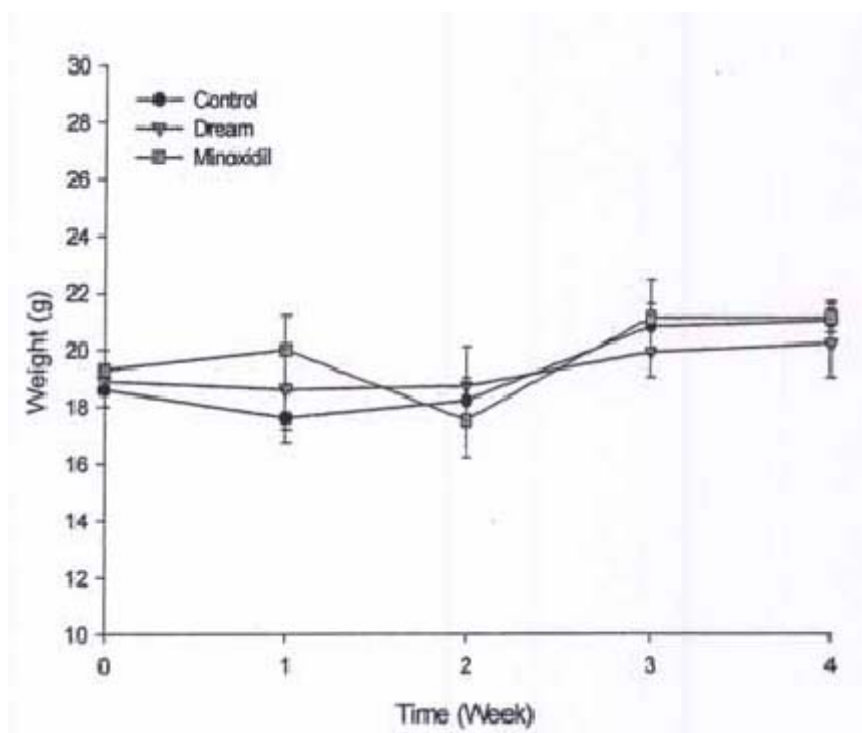


図2。4週間試験薬を局所処理した後、雌C57BL6二十日鼠脱毛モデルの体重の変化。DW(陰性対照群)、Dream毛、それから3% MXD(Minoxidil)。

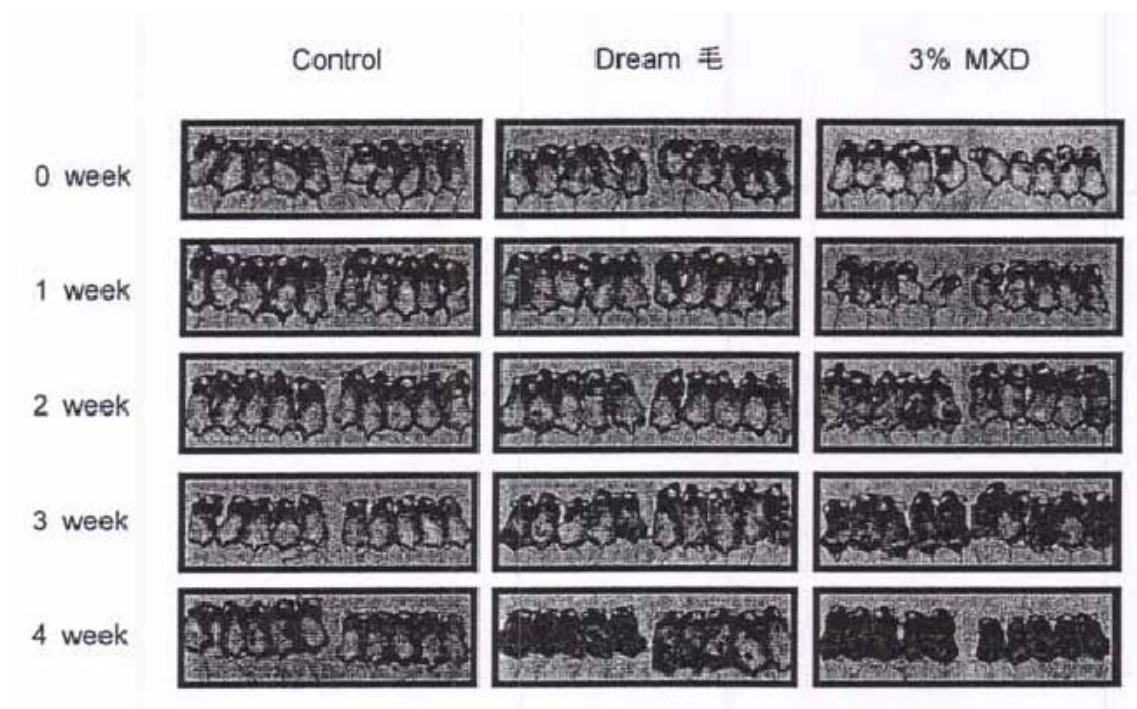


図3. 4週間Dream毛の局所塗布後、雄C57BL/6二十日鼠脱毛モデルの発毛率の変化。

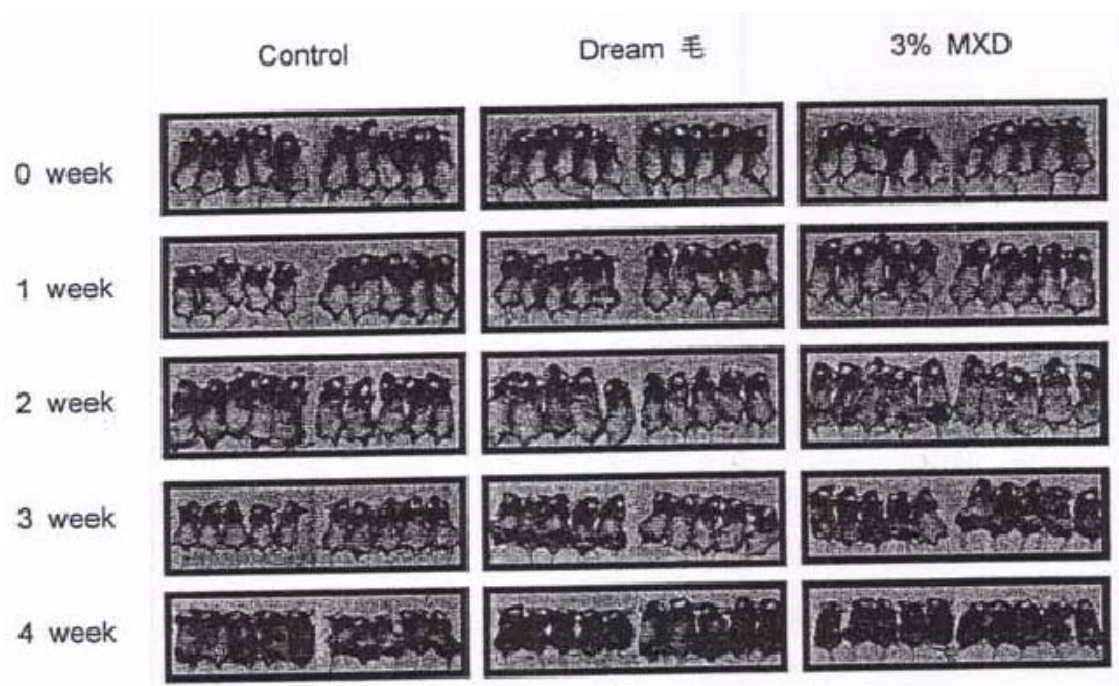


図4. 4週間Dream毛の局所塗布後、雌C57BL/6二十日鼠脱毛モデルの発毛率の変化。

表 1. 雄 C57BL/6 二十日鼠脱毛モデルの発毛記録 (n=10)

| | 対照群 | Dream毛 | Minoxidil |
|----|-----|--------|-----------|
| 0週 | 0 | 0 | 0 |
| 1週 | 0 | 0 | 0.8 |
| 2週 | 0 | 0.7 | 2.5 |
| 3週 | 0 | 1.4 | 2.8 |
| 4週 | 0 | 2.5 | 3.0 |

- 養毛判定基準: 毛が生い立たない;0, 30%未満;1, 30-70%;2, 70%以上;3

- 肉眼判定 Score/個体数=判定点数

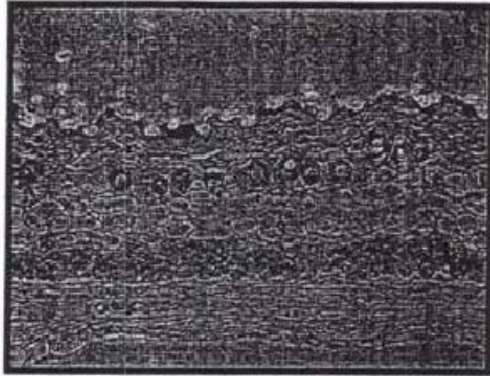
表2. 雌C57BL/6 二十日鼠脱毛モデルの発毛記録 (n=10)

| | 対照群 | Dream毛 | Minoxidil |
|----|-----|--------|-----------|
| 0週 | 0 | 0 | 0 |
| 1週 | 0 | 0.1 | 0.6 |
| 2週 | 0 | 0.4 | 1.9 |
| 3週 | 0.1 | 1.6 | 2.9 |
| 4週 | 1.5 | 2.6 | 3.0 |

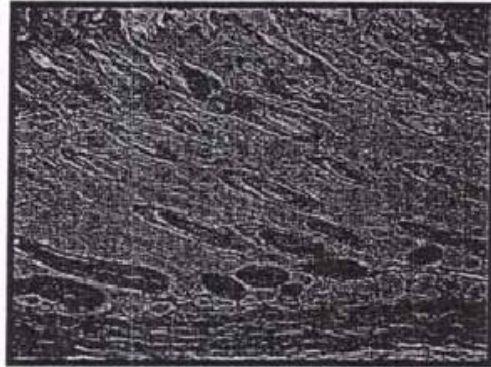
- 養毛判定基準: 毛が生い立たない;0, 30%未満;1, 30-70%;2, 70%以上;3

- 肉眼判定 Score/個体数=判定点数

Control



Dream 毛



3% MXD

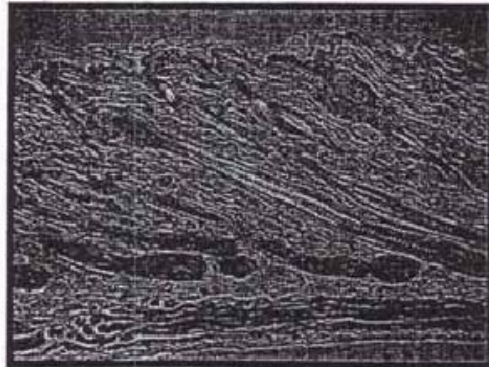
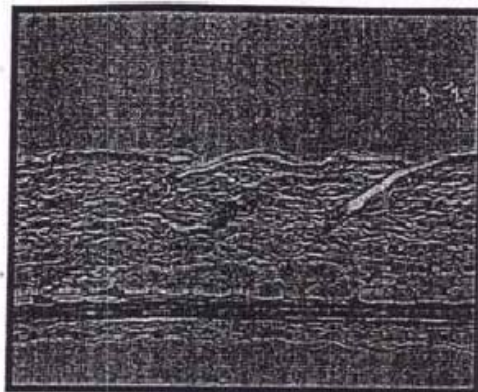
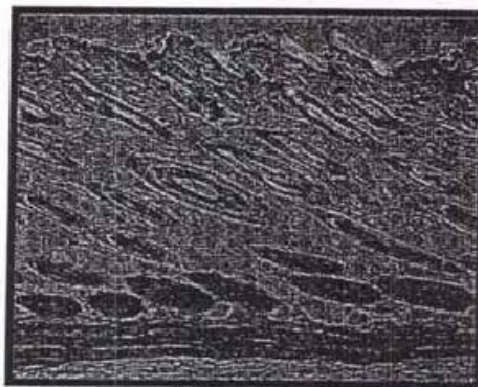


図5. 除毛した後、4週間試験薬を局所適用した雄C576BL二十日鼠脱毛モデルでの発毛に関する組織学的な観察。H&E、X40、DW(陰性的対照群)、Dream毛、それから3%MXD(Minoxidil)

Control



Dream 毛



3% MXD

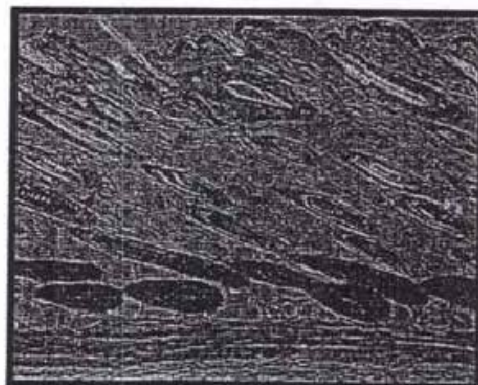


図6. 除毛した後、4週間試験薬を局所適用した雌C576BL二十日鼠脱毛モデルでの発毛に関する組織学的な観察。H&E、X40、DW(陰性的対照群)、Dream毛、それから3%MXD(Minoxidil)

最終報告書 2005. 01. 31

Dream毛液のウサギを利用した皮膚刺激試験

| | |
|-------|------------------------------------|
| 試験責任者 | Lee, Jeong Sook |
| 試験機関 | 株式会社ケムオン前臨床研究センター |
| 試験番号 | 04-BL-313 |
| 試験機関 | 2004. 12-24-2005. 01. 31 |
| 試験依頼者 | (株) ソウル化粧品[製品技術元及び販売元: (株) ザヨンeナラ] |
| 依頼責任者 | Han, Kwang Seok |

Chemon Tel 031)329-9900 / Fax 031)329-9901
E-mail jslee@chemon.co.kr

陳 述 書

試験番号：04-BL-313

試験題目：Dream毛液のウサギを利用した皮膚刺激試験

上記試験は食品医薬品安全庁 告示 第1999-61戸(1999年12月22日)‘医薬品などの毒性試験基準’及び食品医薬品安全庁 告示 第2000-63戸(2000年12月11日)‘非臨床試験管理基準’に準じて実施した。

2005年1月31日
株式会社 ケムオン前臨床研究センター
運営責任者 Park, Chan Koo (印)

信頼性保証確認書

試験番号：04-BL-313

試験題目：Dream毛液のウサギを利用した皮膚刺激試験

試験機関：2004. 12. 24-2005. 01. 31

試験依頼：(株) ソウル化粧品

| 点検内容 | 点検実施日 | 試験責任者通報日 | 運営責任者報告日 |
|------------------------|-----------------|--------------|--------------|
| 事業計画書 | 2004. 12. 27 | 2004. 12. 27 | 2004. 12. 27 |
| 動物入手及び検疫 | 2004. 12. 28/30 | 2004. 12. 29 | 2004. 12. 31 |
| 試験物質/対象物質保管 | 2004. 01. 04 | 2004. 01. 05 | 2004. 01. 05 |
| 試験物質/対象物質調剤 | 2004. 01. 04 | 2004. 01. 05 | 2004. 01. 05 |
| 投与及び動物飼育 | 2004. 01. 04 | 2004. 01. 05 | 2004. 01. 05 |
| 動物飼育室内観察及び検査(一般症状観察など) | 2004. 01. 05 | 2004. 01. 06 | 2004. 01. 06 |
| 皮膚反応の評価 | 2004. 01. 05 | 2004. 01. 06 | 2004. 01. 06 |
| 最終報告書(案)及び試験基礎資料 | 2004. 01. 20-28 | 2004. 01. 21 | 2004. 01. 28 |
| 最終報告書 | 2004. 01. 31 | - | - |

上記の点検で本報告書の試験方法が食品医薬品安全庁告示第1999-61号(1999年12月22日)「医薬品等の毒性試験基準」によって行われたごとと該当試験の実施過程で発生した試験基礎資料が報告書に正確に反映されたし、本試験が食品医薬品安全庁告示第2000-63号(2000年12月11日)「非臨床試験管理基準」に準じて実施されたことを証明する。

2005年01月31日

株式会社 ケムオン前臨床研究センター

信頼性保証責任者 Lee, Hyun Geol

試験概要

| | |
|---------|--|
| 試験題目 | Dream毛液のウサギを利用した皮膚刺激試験 |
| 試験番号 | 04-BL-313 |
| 試験目的 | Dream毛液のウサギにおける皮膚刺激性反応を調査するために実施した。 |
| 試験方法 | 上記試験は食品医薬品安全庁告示第1999-61号(1999年12月22日)‘医薬品等の毒性試験基準’によって行われた。 |
| 試験日程 | 1) 試験開始日:2004年12月24日 2) 動物入手日:2004年12月28日(実験開始日) 3) 順化期間:2004年12月28日-2005年01月03日 4) 適用日:2005年01月04日 5) 評価日:2005年01月05日-2005年01月07日(実験終了日) 6) 最終報告書(案)提出日:2005年01月21日 7) 最終報告書提出日:2005年01月31日 |
| 試験依頼者 | 名称:(株)ソウル化粧品[製品技術元及び販売元:(株)ザヨンeナラ] 所在地:仁川広域市 南洞区 古棧洞 718-8 依頼責任者:Han, Kwang Seok 連絡先:02-6671-0707(電話), 02-6671-0706(ファックス) |
| 試験機関 | 名称:(株)ケムオン 前臨床研究センター 所在地:京畿道 竜仁市 陽智面 第一理 334番地 運営責任者:Park, Chan Koo 連絡先:031-329-9900(電話), 031-329-9901(ファックス) |
| 動物飼育室 | 第一動物飼育区域7互室 |
| 試験物質の保管 | 本試験に使用した試験物質は室温保管した。 |
| 試験試料の保管 | 本試験の試験基礎資料及び関係資料は登録許可の後5年まで株式会社ケムオンの前臨床研究センターの中央試料保管室に保管した。 |
| 試験試料の保管 | 本試験の試験基礎資料及び関係資料は登録許可の後5年まで株式会社ケムオンの前臨床研究センターの中央試料保管室に保管する。最終報告書提出後、保管する資料は次のようだ。 1) 試験計画書及び関連書類、試験基礎資料(文書、ディスク、検体) 2) 最終報告書及び関連書類 |

試験関係者

| 部 門 | 責任者 | 担当者 |
|--------------------------|---|------------------------------------|
| 動物実験 投与試験物質調剤 試料保管 | Gil, Ki Hyun Lee, Jeong Sook Hwang, Young Eun | Choi, Jin Seong Kang, Jeong Hye |

試験関係者署名

| | | |
|--------|---|-------------|
| 試験物質調剤 | _____ Lee, Jeong Sook, MS, DVM 試験物質調剤/保管責任者 | _____ 日付 |
| 動物実験 | _____ Gil, Ki Hyun, 実験動物技術士 動物実験責任者 | _____ 日付 |
| 試料保管 | _____ Hwang, Young Eun 試料保管責任者 | _____ 日付 |
| 試験責任者 | _____ Lee, Jeong Sook, MS, DVM | _____ 日付 |

目 次

| | |
|--------------------------------------|----|
| 陳述書 | 1 |
| 信頼性保証確認書 | 2 |
| 試験概要 | 3 |
| 試験関係者署名 | 5 |
| 1. 要約 | 7 |
| 2. 試験物質 | 8 |
| 3. 材料及び方法 | 9 |
| 4. 結果 | 13 |
| 5. 考察及び結論 | 14 |
| 6. 参考文献 | 15 |
| 7. 表(団体要約) | |
| 表 1. Dream毛液適用の後、雄ウサギの死亡と臨床徴候 | 16 |
| 表 2. Dream毛液適用の後、雄ウサギの体重の変化 | 16 |
| 表 3. Dream毛液適用の後、雄ウサギの紅斑と痂皮形成 | 17 |
| 表 4. Dream毛液適用の後、雄ウサギの浮腫 | 17 |
| 表 5. Dream毛液適用の後、雄ウサギの炎症の評価 | 18 |
| 8. 付録(個別データ) | |
| 付録 1. Dream毛液適用の後、雄ウサギの死亡と臨床徴候 | 19 |
| 付録 2. Dream毛液適用の後、雄ウサギの体重の変化 | 19 |
| 付録 3. Dream毛液適用の後、雄ウサギの紅斑と痂皮形成 | 20 |
| 付録 4. Dream毛液適用の後、雄ウサギの浮腫 | 21 |
| 付録 5. Dream毛液適用の後、雄ウサギの炎症の評価 | 22 |
| 9. 写真 | |
| 写真 1. Dream毛液処理の後、24時間目に適用部位での皮膚反応の例 | 23 |
| 写真 2. 24時間目に対照群の皮膚反応の例 | 23 |
| 写真 3. Dream毛液処理の後、72時間目に適用部位での皮膚反応の例 | 24 |
| 写真 4. 72時間目に対照群の皮膚反応の例 | 24 |
| 10. 添付資料 | 25 |
| 添付資料 1. 試験物質成績書 | |
| 添付資料 2. 試験系の病源体検査成績書 | |
| 添付資料 3. 動物飼育室の環境証明書 | |
| 添付資料 4. 飼料成分分析成績書(供給元資料) | |
| 添付資料 5. 水の水質検査成績書 | |
| 添付資料 6. 試験計画書(写本) | |

1. 要約

本試験は試験物質Dream毛液 (scalp lotion) の皮膚刺激性を調べるためにニュージーランドホワイト系白色うさぎの健康な皮膚及び擦過皮膚に適用した後、試験物質を適用しなかった健康な皮膚及び擦過皮膚と反応を比較評価した。

1. 一般症状で試験物質投与による異常は観察されなかった。
2. 体重の変化で異常変化は観察されなかった。
3. 試験物質適用後、正常部位では何の異常も観察されなかった。擦過部位では弱い紅斑及び軽微な紅斑が観察されたが、時間の経過によって大部分回復することを見せた。皮膚刺激性の評価で本試験物質の1次皮膚刺激指数は0.46で非刺激性物質に該当した。

以上の結果から見た本試験条件の下でDream毛液のニュージーランドホワイト系白色うさぎの皮膚に対する1次皮膚刺激指数は0.46で非刺激性に該当した。

2. 試験物質

- (1) 名称: Dream毛液(添付資料1)
- (2) ロット番号: Pilot1
- (3) 入手量: 120ml
- (4) 入手日: 2004年12月23日
- (5) 外観及び性状: 薄茶色の液体
- (6) 純度: L-メントール:109.31%, サリチリ酸:103.41%, D-パンテノール:106.20%
- (7) 保管条件: 室温保管(第2保管庫, CM-083-01)
- (8) 安定性: 依頼者側から提供しなかった。
- (9) 取り扱い時の注意事項: 特異事項無し
- (10) 供給者: (株)ソウル化粧品

3. 試料及び方法

1) 試験系

(1) 種及び系統

ニュージーランドホワイト系統の特定病原菌不在 (SPF) うさぎ (Sam: (NZW) fBR)

(2) 供給元 : (株) セムタコ BIO KOREA (京畿道 烏山市 ソラン洞 77-1)

(3) 試験系の選択理由

本試験に使用されたうさぎは皮膚刺激試験に適当な実験動物としてあまねく使用されている。また豊かな試験基礎資料が蓄積されていて試験結果の解釈及び評価にこのような資料が利用できる。

(4) 週令及び体重範囲

入手時動物数 : 雄8匹

入手時体重: 1.884kg-2.033kg

適用時動物数: 雄6匹

適用時体重: 2.131kg-2.302kg

(5) 検疫及び順化 (添付資料 2)

動物入手時、供給元から提供した試験系の病原体検査の成績書を参考として入手動物の検数検疫を実施した。動物入手後、7日間試験を実施する動物室の内で順化させた。順化期間中の一般症状を観察して健康な動物だけを試験に提供した。

2) 飼育環境

(1) 環境条件

本試験は温度 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $55\pm 15\%$ 、換気回数10-20回/hr、照明時間12時間 (午前8時点灯-午後8時消灯) 及び照度150-330Luxと設定した株式会社ケムオンの前臨床研究センター第1動物飼育区域7号室で遂行した。試験者は全部滅菌消毒した作業服と保護装具を着て作業を実施した。

(2) 飼育環境モニタリング (添付資料3)

試験期間中、動物室の温、湿度はコンピュータシステムを利用した自動温、湿度測定器で毎時間ごとに測定したし、換気回数及び照度などの環境条件は定期的に測定した。環境測定結果、上記の設定範囲を4時間以上外れる異常は観察されなかった。

(3) 飼育箱、飼育密度及び識別方法

動物はステンレス製の網飼育箱 (405W*605L*320Hmm) に1匹ずつ飼育した。

(4) 飼料及び水の給与方法(添付資料4-5)

飼料は盛土用固形飼料(ピュウリナ)を自由に摂取させた。お水は地下水を紫外線殺菌機及び微細濾過装置で消毒した後、水差しを利用して自由に摂取させた。

3) 適用量及び識別方法

(1) 適用量

Draize方法により皮膚刺激試験に一般的に使用される容量である部位別0.5mlを適用した。

(2) 動物識別

個体識別は順化期間中には左側耳介内部に赤色油性マジックで、試験機間中には右側耳介内部に黒色マジックで動物番号を印した。飼育箱には試験番号及び動物番号を書き入れた個体識別カードを組み付けて仕分けた。使用動物室の入口には試験番号、試験題目、動物室の使用期間、試験責任自名及び試験者名などを印した動物室使用記録紙を添えた。

4) 試験物質の適用

(1) 試験物質調剤法

別途の調剤なしに依頼者から提供された試験物質をそのまま使用した。

(2) 適用部位及び適用方法

試験物質適用24時間前に電気除毛機を利用してうさぎの皮膚に傷つかないように横縦約10cmずつの除毛された健康な皮膚を作った。除毛された皮膚は左右に分けて左を適用区画、右を対照区画として適用区画と対照区画の正常皮膚或いは擦過皮膚がお互いに対角線で分布するように仕分けて2.5cm*2.5cmの正常(非擦過)皮膚2カ所と擦過皮膚2カ所を油性ペンで印した。擦過皮膚は表皮は傷ついても真皮は傷つかないように血が出ないくらいで擦過傷をつけて作った。適用方法としては2.5cm*2.5cmの適用区画皮膚上に0.5mlずつの試験物質を適用したガーゼを覆って試験物質と皮膚がよく触れ合えるようにした。ガーゼの上には試験物質の蒸発を防ぐために浸透性がなくて刺激性が低いテープで巻いてくれた。

(3) 適用回数及び適用期間

1回適用して24時間保った。

5) 試験方法及び試験項目

(1) 一般症状観察

全ての動物に対して毎日1回以上症状観察を実施した。

(2) 体温測定

試験物質適用日及び判定日に体重を測定した。

(3) 皮膚反応の判定

試験物質は適用24時間経過後に除いて試験物質が残らないように蒸留水とか生理食塩水で軽く洗い上げた。試験物質適用後24時間(試験物質除去30分後)及び72時間目に塗布所部位に紅斑、浮腫、出血、痂皮形成などの変化を肉眼的に観察した。紅斑と痂皮形成及び浮腫の出現は炎症反応を基づいて判定することで紅斑は肉眼的に浮腫は軽い促進を併行して判定した。皮膚反応の程度は投与後24時間及び72時間に皮膚反応基準によって採点して記録した。

*皮膚反応評価基準

① 紅斑と痂皮の形成

| 反応 | 程度 |
|----------------------------------|----|
| 紅斑が全然なし | 0 |
| とても軽い紅斑(肉眼でわずかに職別できるくらい) | 1 |
| 明らかな紅斑 | 2 |
| 少しひどい紅斑 | 3 |
| ひどい紅斑(赤大根色の発赤)と軽い程度の痂皮形成(深部損傷)まで | 4 |

② 浮腫形成

| 反応 | 程度 |
|-------------------------------------|----|
| 浮腫が全然なし | 0 |
| とても軽い浮腫(肉眼でわずかに職別できるくらい) | 1 |
| 軽い浮腫(明らかに腫れ上がって辺縁部が明らかに区別される場合) | 2 |
| 普通の浮腫(凡そ1mm程度腫れ上がった場合) | 3 |
| ひどい浮腫(1mm以上腫れ上がって、露出部位の外にまで拡張された状態) | 4 |

(4) 皮膚反応成績の評価

皮膚反応を採点したことを利用して試験物質適用の後24時間と72時間の時の紅斑評点と浮腫評点を加えて平均値を産み出して、この数値で皮膚刺激性を評価した。この時、試験物質の刺激性は1次皮膚刺激指数外にも試験機間中観察された一般症状などを考慮して評価した。

* 皮膚1次刺激表

| 1次皮膚刺激指数 ¹⁾ | 区分 |
|------------------------|--------|
| 0.0-0.5 | 非刺激性 |
| 0.6-2.0 | 弱い刺激性 |
| 2.1-5.0 | 中等度刺激性 |
| 5.1-8.0 | 強い刺激性 |

P. I. I (Primary Irritation Index: 一次刺激指数、個体別平均の合を4に分けた値)

4. 結果

1) 一般症状観察(表1と付録1)

全ての試験機関の間、死亡動物は観察されなかった。

2) 体重変化(表2と付録2)

体重変化で試験物質適用以後1日目にすべての動物で一時的な体重の減少が観察されたが3日目は正常的な成長が観察された。

3) 皮膚反応(表3, 4と付録3, 4)

(1) 紅斑と痂皮の形成

試験物質適用24時間目に適用区画の正常部位では6例のすべてから何の異常も観察されなかった。擦過部位では弱い紅斑(mild redness)が4例及び軽微な紅斑(slight redness)が2例観察された。対照区画では6例のすべてから擦過部でのみ軽微な紅斑が観察された。

試験物質の適用72時間目に適用区画の正常部位では何の異常も観察されなかった。擦過部位では1例でのみ軽微な紅斑が観察された。対照区画では6例全部何の異常も観察されなかった。

(2) 浮腫

全ての観察期間の間、対照区画と適用区画の正常及び擦過部で浮腫は観察されなかった。

4) 刺激性の判定(表5と付録5)

皮膚反応を根拠とした刺激性の判定結果、一次皮膚刺激指数(P. I. I)は対照区画の場合0.25と非刺激性、適用区画の場合0.46と非刺激性に該当した。

5. 考察及び結論

本試験は試験物質Dream毛液の皮膚刺激性を調べるためにニュージーランドホワイト系の白色うさぎの健康な皮膚及び擦過皮膚に適用した後、試験物質を適用しなかった健康な皮膚及び擦過皮膚と反応を比較評価した。

試験結果一般症状の変化は観察されなかった。

体重変化で試験物質適用の1日目にすべての動物で閉鎖適用によるストレスに基づいたことと見える一時的な体重減少が観察されたが3日目は正常的な成長が観察された。

試験物質適用後、皮膚反応は主に紅斑が観察され、時間の経過によって漸次的に緩和される傾向を見せた。正常皮膚では試験物質適用による異常は観察されなかった。擦過皮膚では24時間目に軽微な紅斑及び弱い紅斑が観察されたが、72時間以後には但し1例でのみ軽微な紅斑が観察されたし、残りでは全部回復した。浮腫の場合、正常皮膚はもちろん擦過皮膚でも観察されなかった。

皮膚刺激性の評価で本試験物質の1次皮膚刺激指数は0.46で非刺激性物質に該当した。

Dream毛製品の紹介

製品コンセプト

毛筋は頭皮に根を置いて血液を通じて栄養とその構成成分を供給させられて育ち、一定な周期に成長と退行、脱毛それからまた誕生して育つライフサイクル(毛周期)を持つ一つの生命体です

多様な原因によって脱毛が進むが、毛細血管が縮小されて血液を通じた栄養成分の供給が阻害されたり、毛根で毛筋構造物を作る過程が順調ではなかったり、一つの毛筋が寿命をつくした後、新しい毛筋を誕生させる毛乳頭が自分の機能を発揮できないなどの理由で脱毛は知らない内に進みます。

ある瞬間から頂とかおでこ部位を中心に毛筋が細くなって力が無くなって、結局その寿命が短くなって早期に毛筋が抜けて逃げるようになります。一日に抜ける毛筋の数字が増えて、このように長い時間が流れれば私たちの頭皮はその厚さが薄くなって毛細血管が縮小されて毛筋がろくに育たない状態が固着化されてしまいます。

本製品は東醫に基づいて頭髪頭皮健康に役に立つ生薬草の抽出物を頭に適用しやすいようにシャンプーとスプレー液の形態で開発したものです。生薬草が持っている固有な効きが複合的に働いて頭皮の調子を根本的に改善して健康に培ってくれて脱毛はもちろんふけ、かゆみ症など各種頭皮トラブルが改まります。

メントール - 毛孔拡張、毛細血管拡張

サリチル酸 - かゆみ症解消、殺菌

パンテノール - 保湿

當歸 - 鎮静、鎮痙作用

川芎 - 毛細血管拡張、血圧降下による血行促進

何首烏 - 強壮、補血

(初めて見つけた人の頭が黒くなったということからその名前が由来)

菖蒲 - 鎮静/鎮痙作用、殺菌、殺虫

薏苡仁 - 主成分であるmyristic acidと β -sitosterolが男性ホルモンによる脱毛症予防

甘草 - 抗炎症、抗潰瘍

主成分であるglycyrrhetic acidとglycyrrhizinが男性ホルモンによる脱毛症予防

特徴

本製品は誰でも家で便利に頭髪と頭皮を管理できるように作られました。脱毛者の方々または頭皮トラブルがひどい方はシャンプーとDream毛液を一緒に使ってくださって、この製品をお使いになってある程度回復してその状態を保とうとする方はシャンプーだけお使いになってもよいです。

Dream毛シャンプー

1. 生薬草抽出物の機能が複合的に働いて頭皮の状態を根本的に改善する頭皮健康漢方シャンプーです。
2. 頭皮の異物質と皮脂、角質を除いて殺菌、消炎効果があって頭皮をしずめてこざっぱりと維持させます。
3. 毛細血管と毛孔を拡張させてDream毛液の効果をもっと高めてくれるからDream毛液の使用前にお使いになればよいです。
4. メントール、サリチル酸などの成分が清涼感を付与してかゆみ症を緩和させてくれます。
5. シリコンエマルションが毛筋をやんわり維持させます。
6. 脱毛を予防しようとしたりふけ、かゆみ症、脂性/乾性頭皮など頭皮トラブルでお悩みになる方に勧めて上げます。持続的にお使いになれば頭皮が健康になってつやつやして豊かな髪を作ってくれます。

Dream毛ローション

1. 漢方抽出物が頭皮と毛根に栄養を供給して毛筋の成長を助けます。
2. パンテノール、プロテイン等が毛筋に柔軟性と保湿性を付与して柔らかな髪で維持させてくれます。
3. 漢方抽出物が複合的に働いて頭皮健康の調子を根本的に改善するから脱毛の根本的な代案になります。
4. 毛根を活性化させて丈夫に育成して毛筋を太くて健康に培ってくれます。
5. ある程度脱毛状態が改まった後にはシャンプーだけをお使いになっても維持されます。

使用方法

Dream毛シャンプー

- * ほかのシャンプーとかせっけんと併用しないで下さい。
- * 毎日1回以上温いお湯でシャンプー
- * 泡を出して頭全体に付けて指でマッサージするようにゆっくり擦ってシャンプー時間は5分程度で長く。
- * シャンプー後、十分に漱いだ次に、綿タオルでぎゅっと押えるようにして水気を除いて乾かします。

Dream毛液 (scalp lotion)

- * Dream毛液は最小1日1回以上ぱらつき、一度だけ使うと就寝前Dream毛シャンプーで髪を洗った後、水気を十分に乾かした次に使用をお奨めします。
- * Dream毛液は毛筋ではなくて頭皮肌につくようにぱらつけなければならないので、毛筋を反らしながらその下の部分にぱらついた後、指でそろそろ擦って頭皮に吸収されるようにします。

頭皮マッサージ方法

- * 本製品の使用とともに暇々に頭皮マッサージを併行すると効果がもっと良いです。
- * 頭皮マッサージは頭皮に血行が促進されるように物理的に手伝うことで頭皮健康が改まります。
- * 両指で側頭を押えて頭皮が頭蓋骨と分けられて動くように頭皮を振ります。この作業を耳上の部分から始めて頂の方にまたは前おでこから頂の方に移動して数回(約5分間)実施します。

期待効果

* 使用1ヶ月以内

- 抜けた毛筋が止まる
- ふけ緩和
- かゆさ、炎症など頭皮トラブル緩和

* 3ヶ月以内

- 新しい毛筋が起こり始まる
- 小さくて細かい毛筋を目で確かめれる状態になる
- 既存の毛筋は太くて丈夫になる

* 6ヶ月以後

- 新たに出た毛筋が養毛、育毛に進んでもっと太くて丈夫になります。