

図9. デトキシゲルカラム処理による酵素活性の回収率

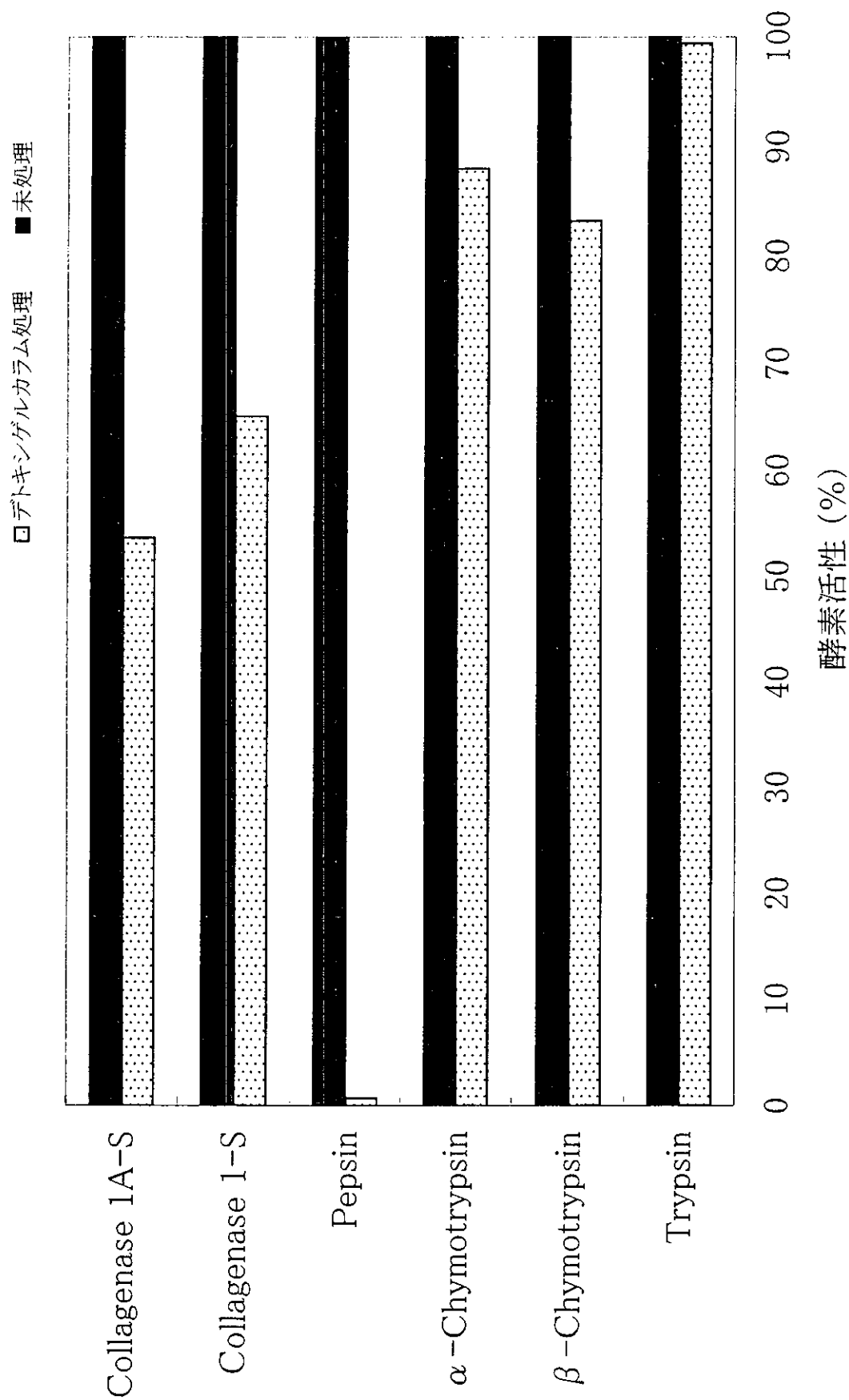
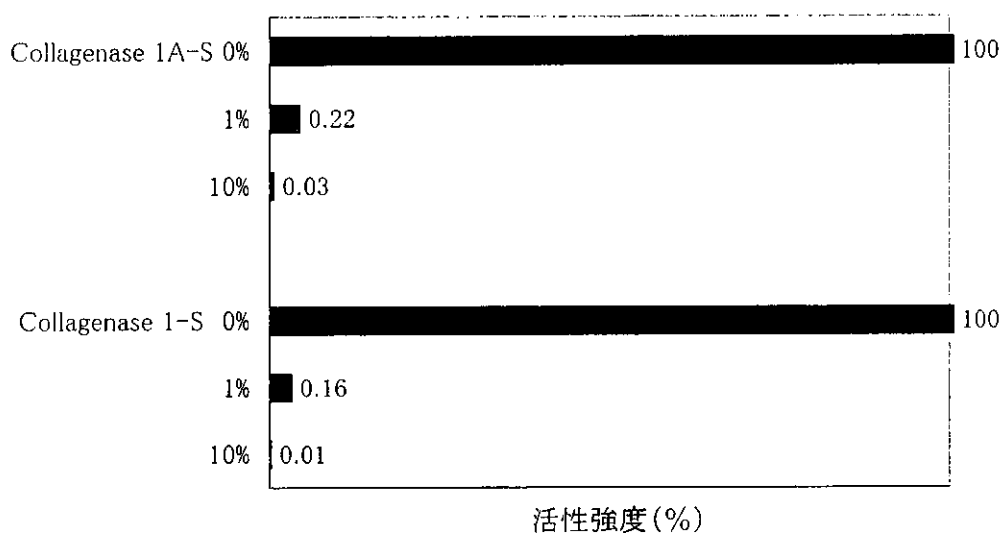


図10. コラゲナーゼ活性に対する化学処理の影響

a) ホルマリン処理



b) フェノール処理

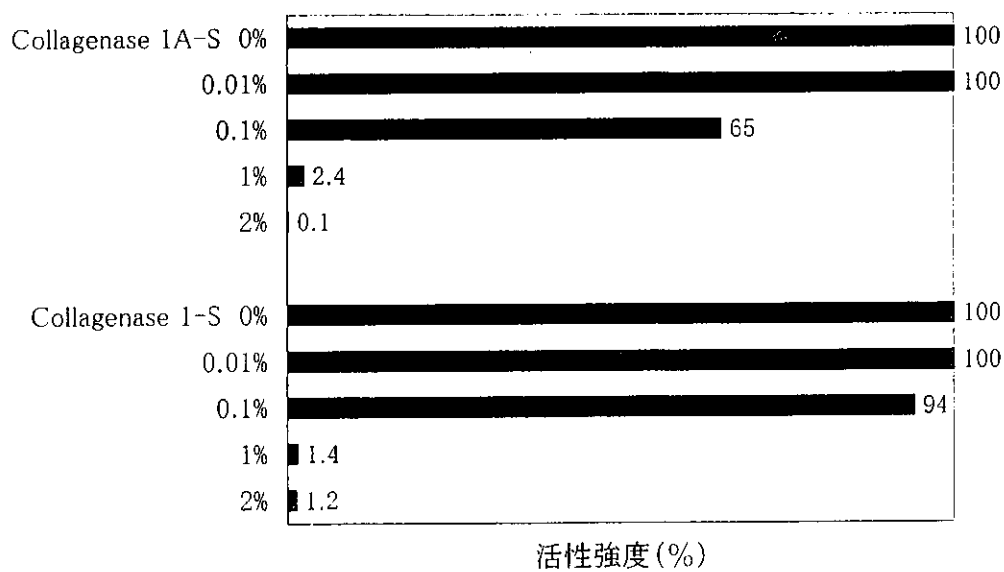


図11. 40°Cインキュベーションによるコラゲナーゼ活性の変化

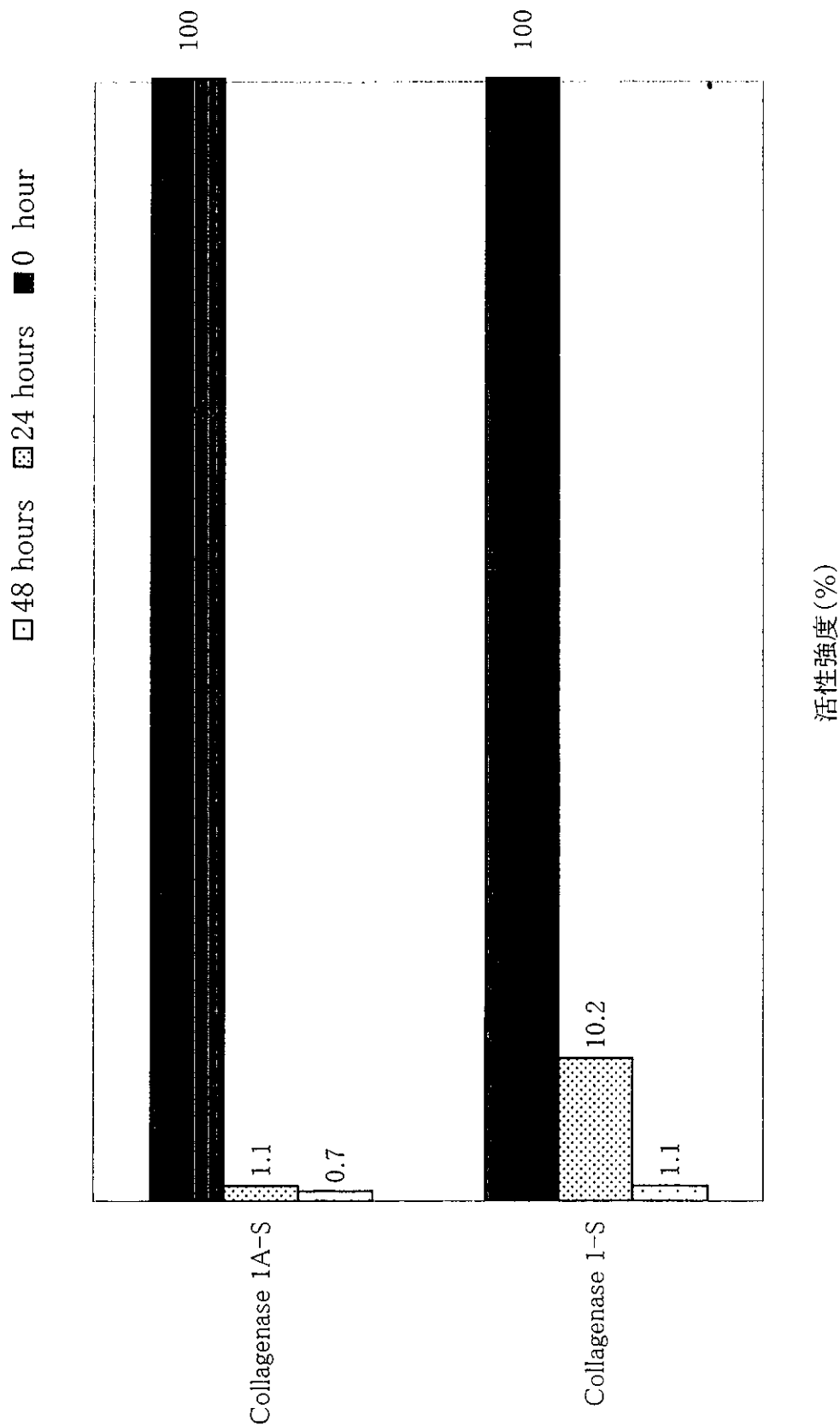
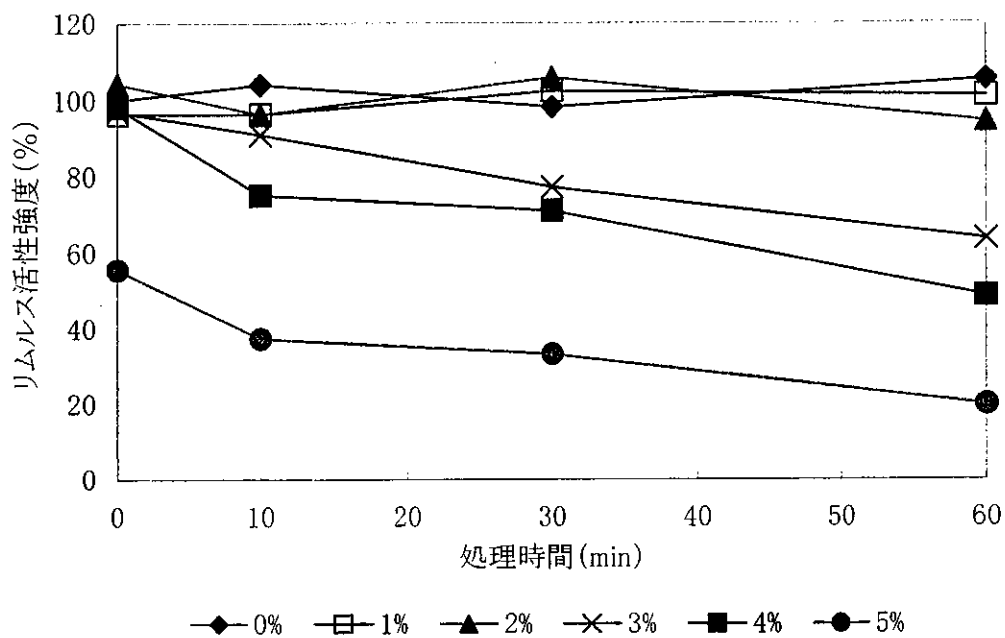


図12. LPS 活性に対する化学処理の影響

a) フェノール処理



b) ホルマリン処理

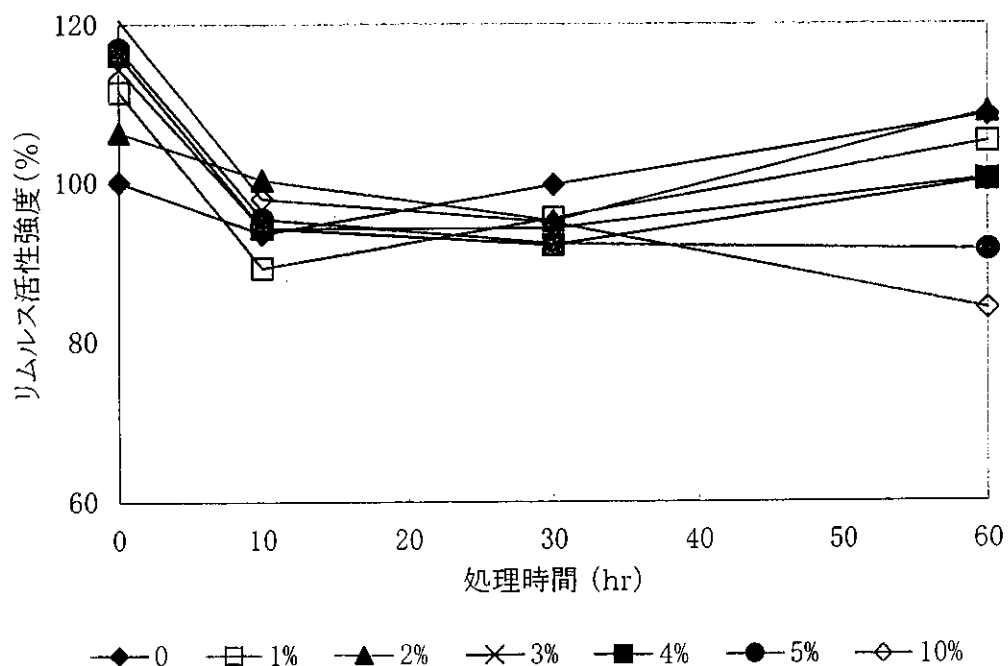


図13. リムルス試薬に対する酸性電解除菌水の影響

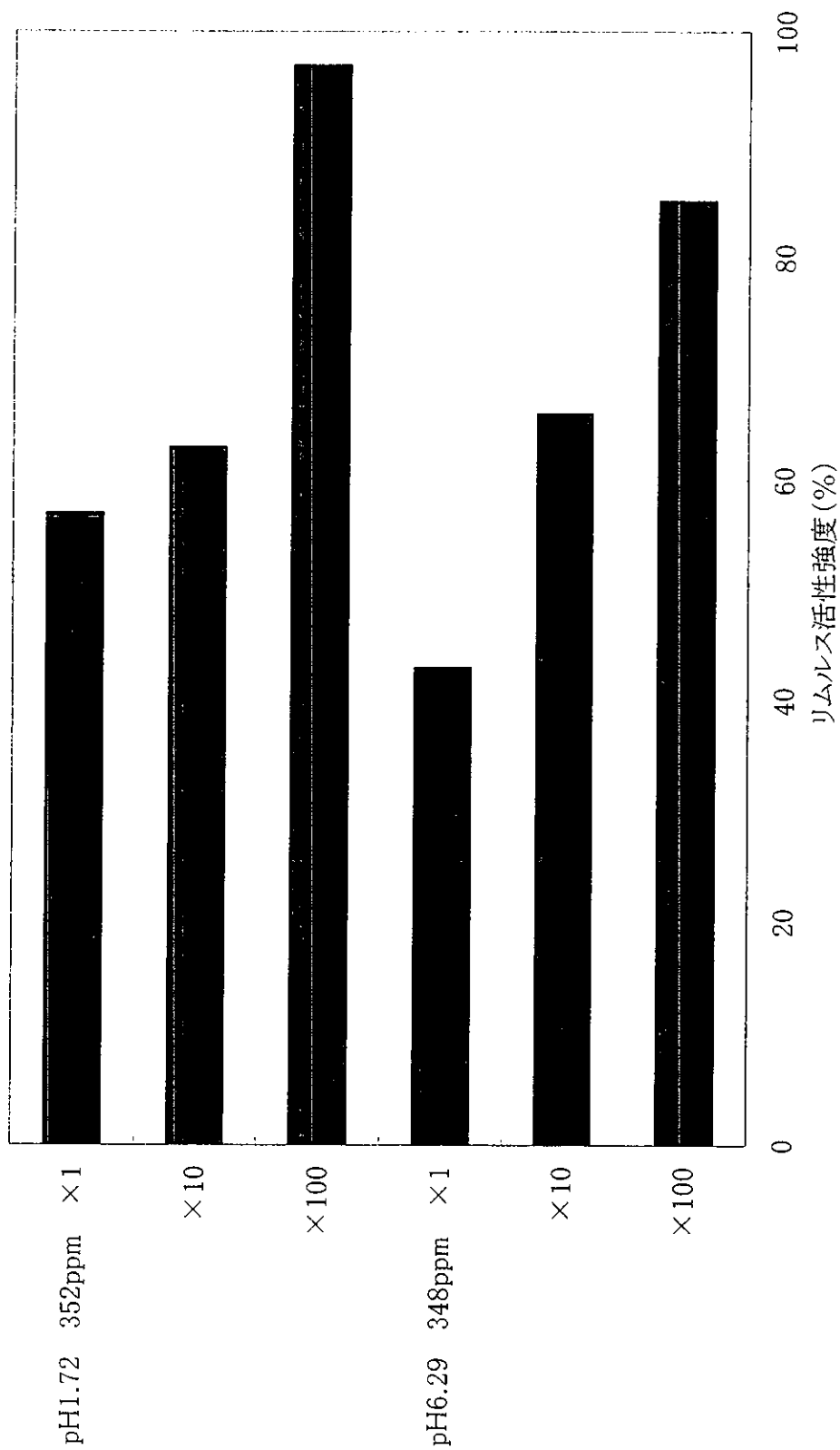


図14. リムルス活性に対する酸性電解除菌水の影響

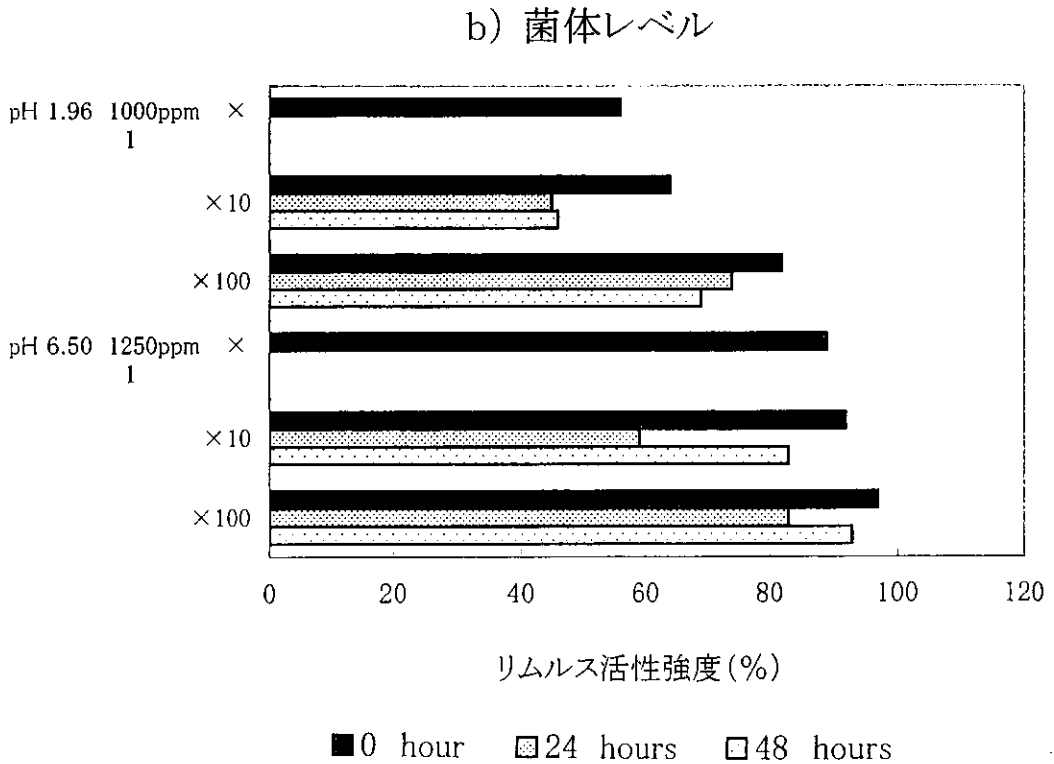
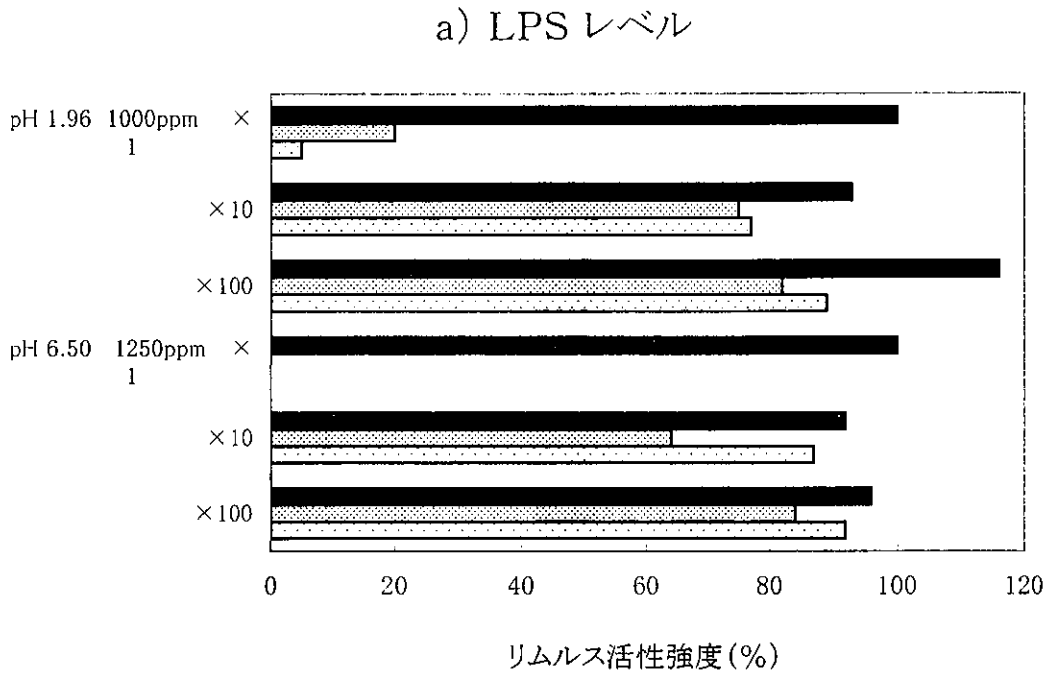


図 15. リムルス活性の消失と有効塩素濃度の相関性

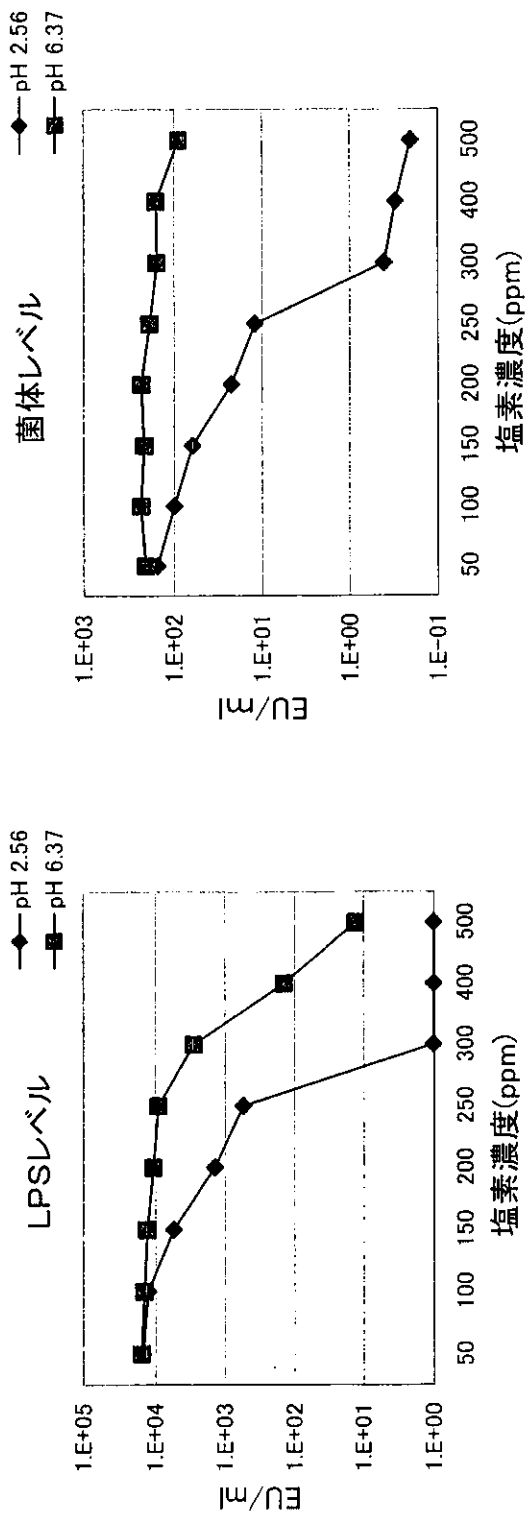


図 16. 強酸性電解除菌水 (pH 2.38) によるリムルス活性の不活化

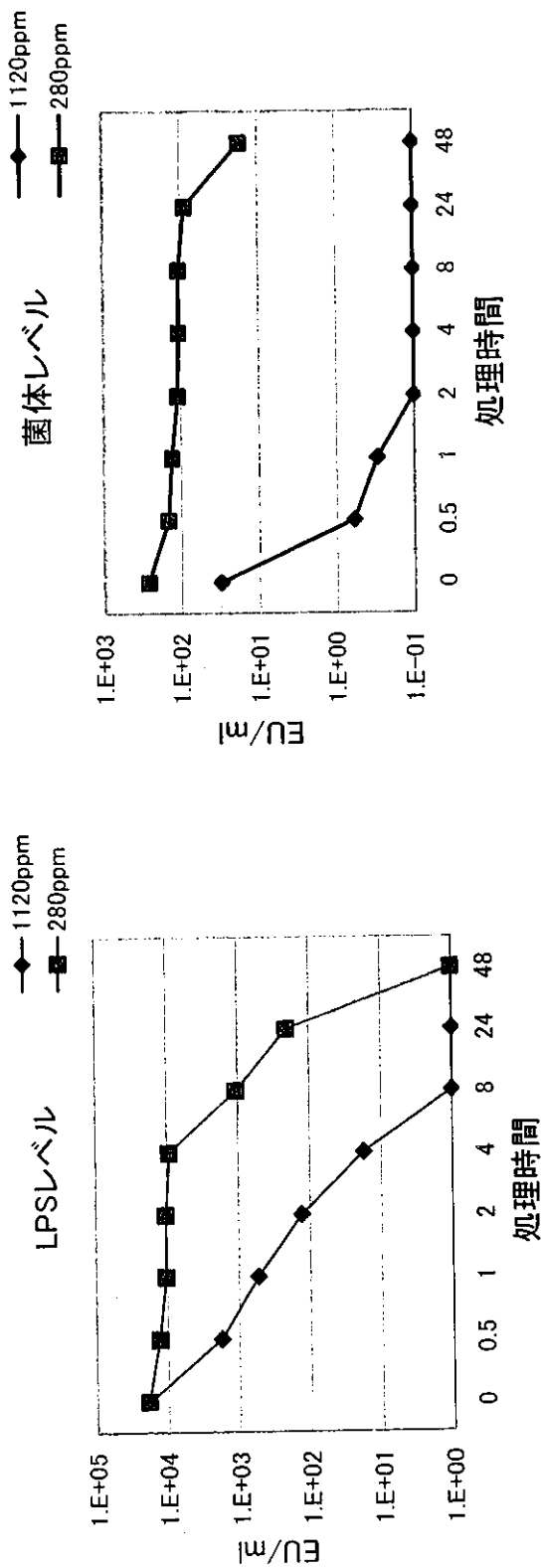


図 17. 弱酸性電解除菌水 (pH 6.37) によるリムルス活性の不活化

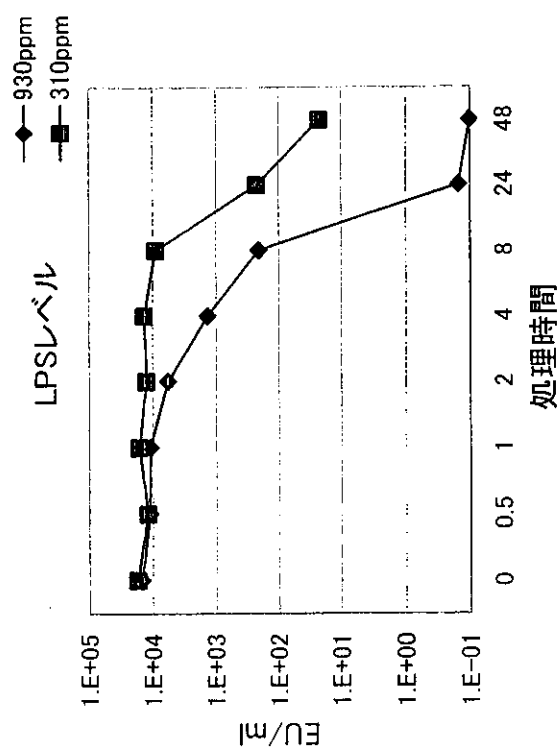
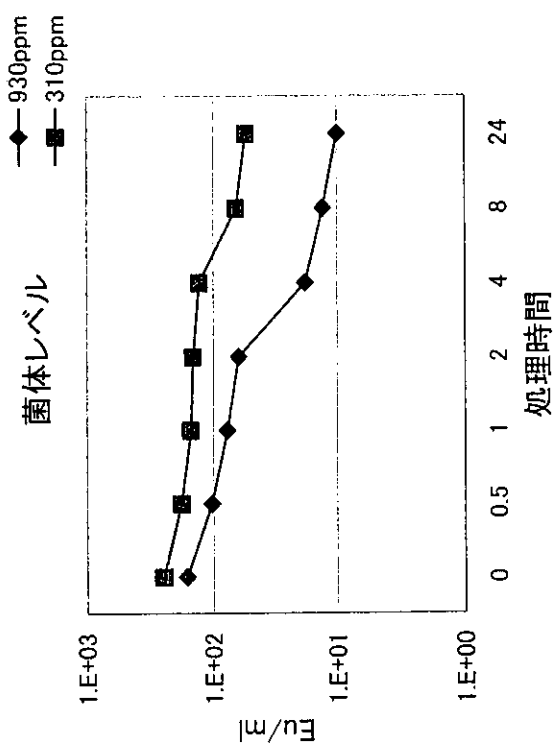


図18. リムルス反応に対する各種薬剤の影響

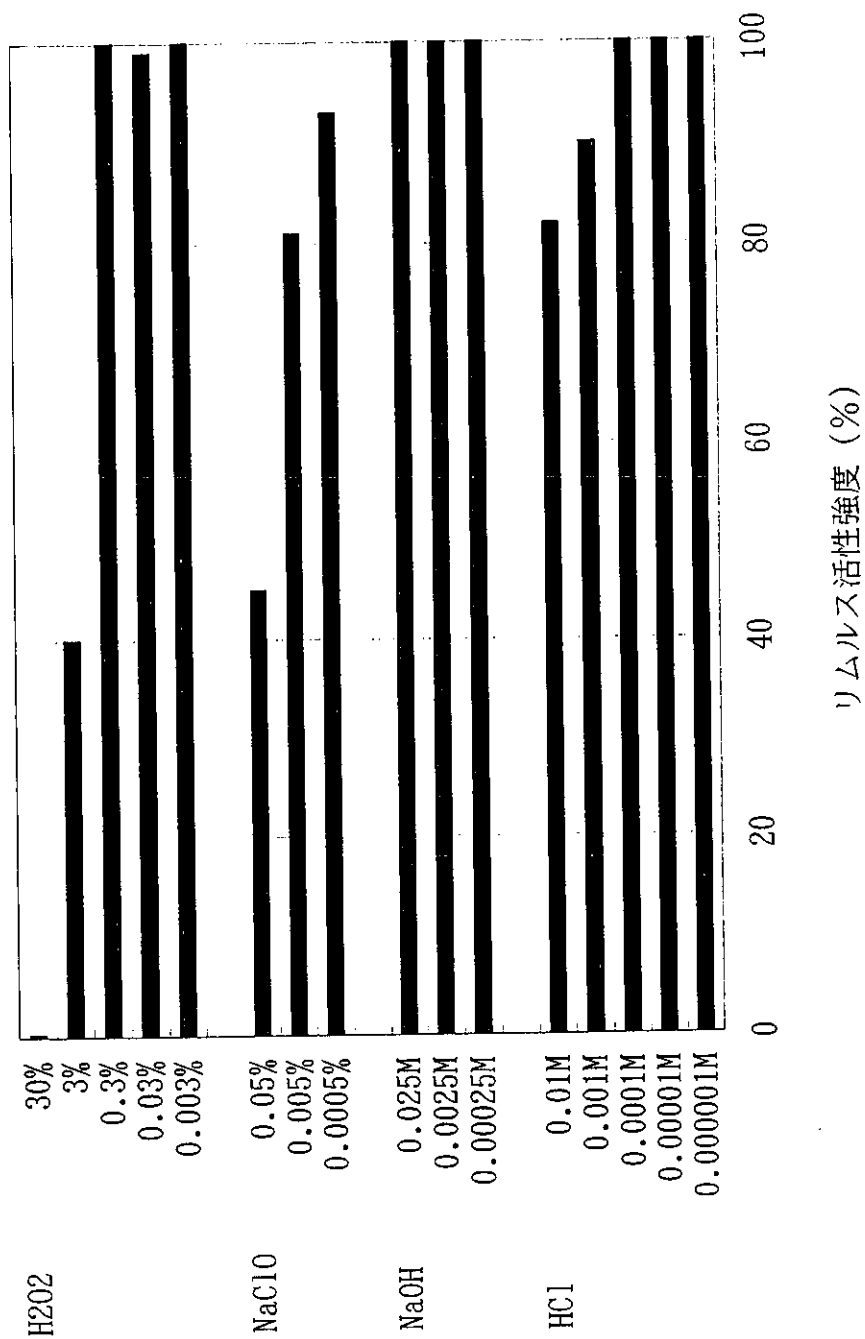


図19. LPSレベルのリムルス活性に対する各種薬剤の影響

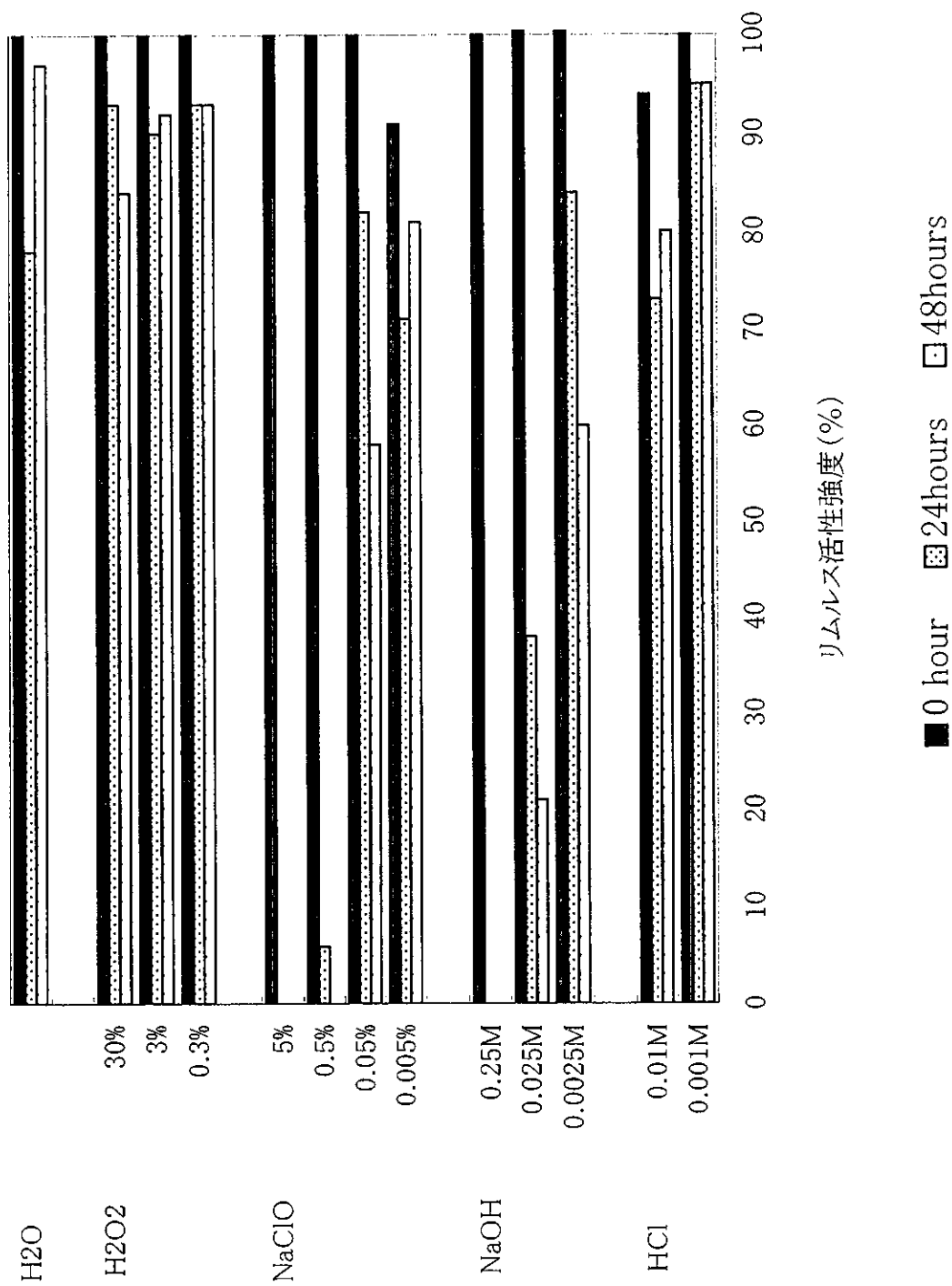


図20. 菌体レベルのリムルス活性に対する各種薬剤の影響

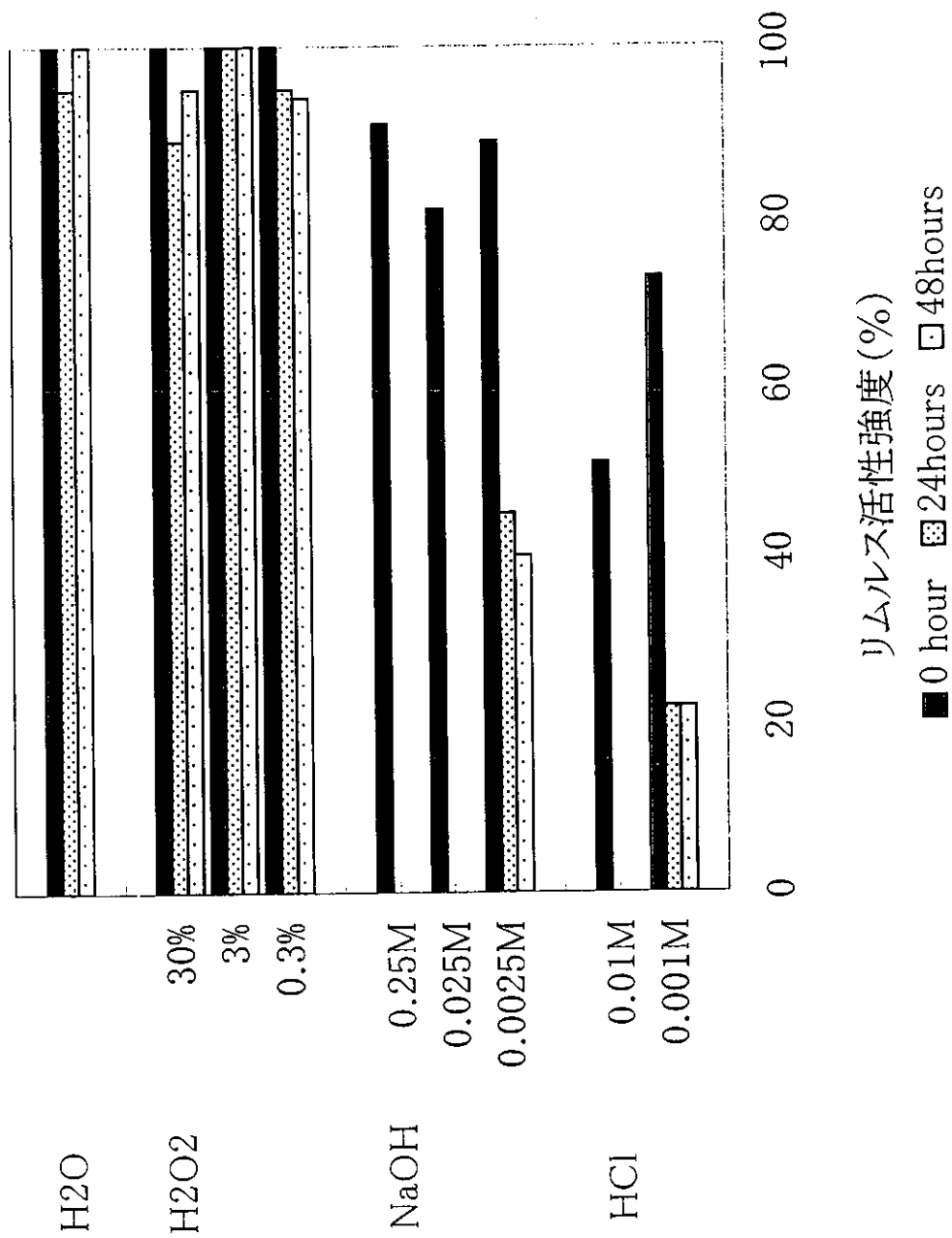


図21. リムルス活性性に対する化学処理の影響

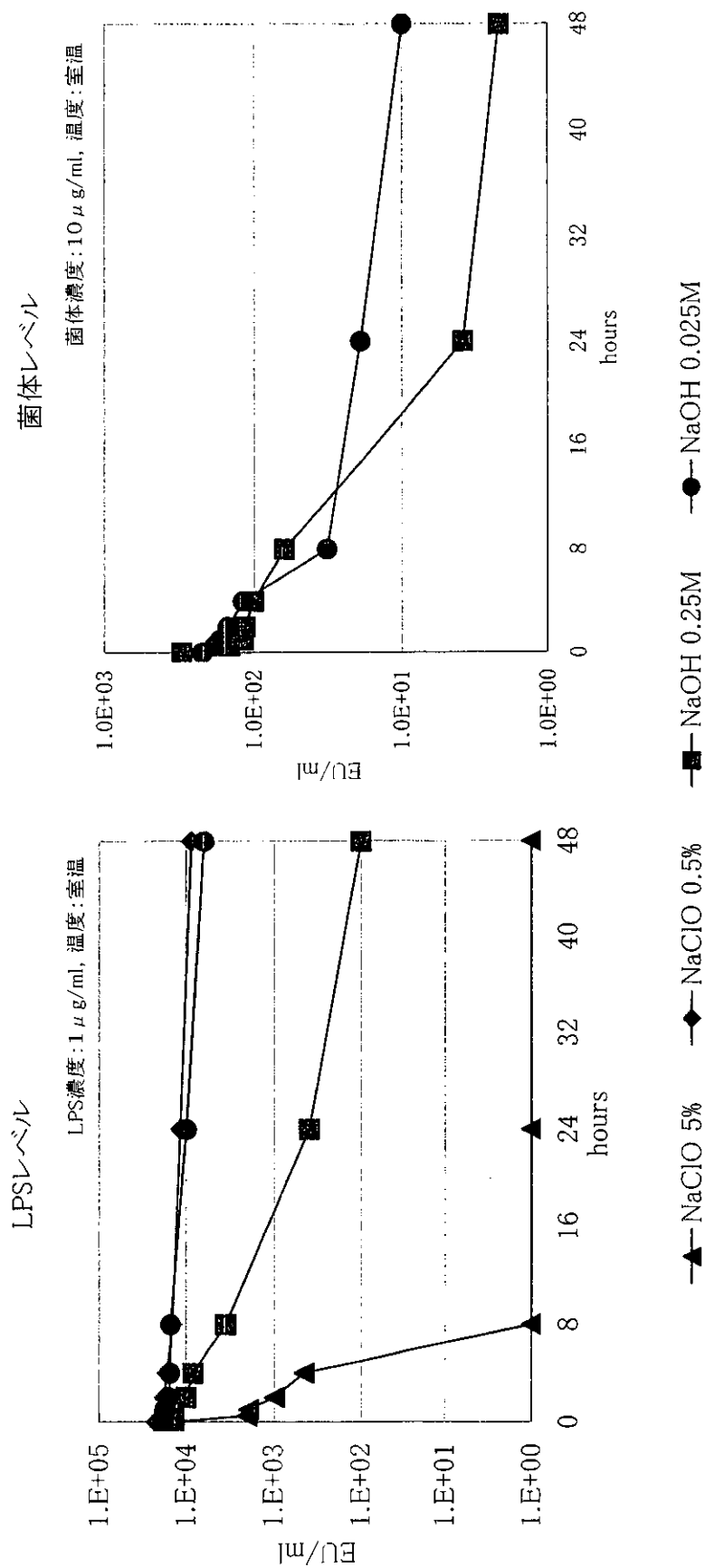
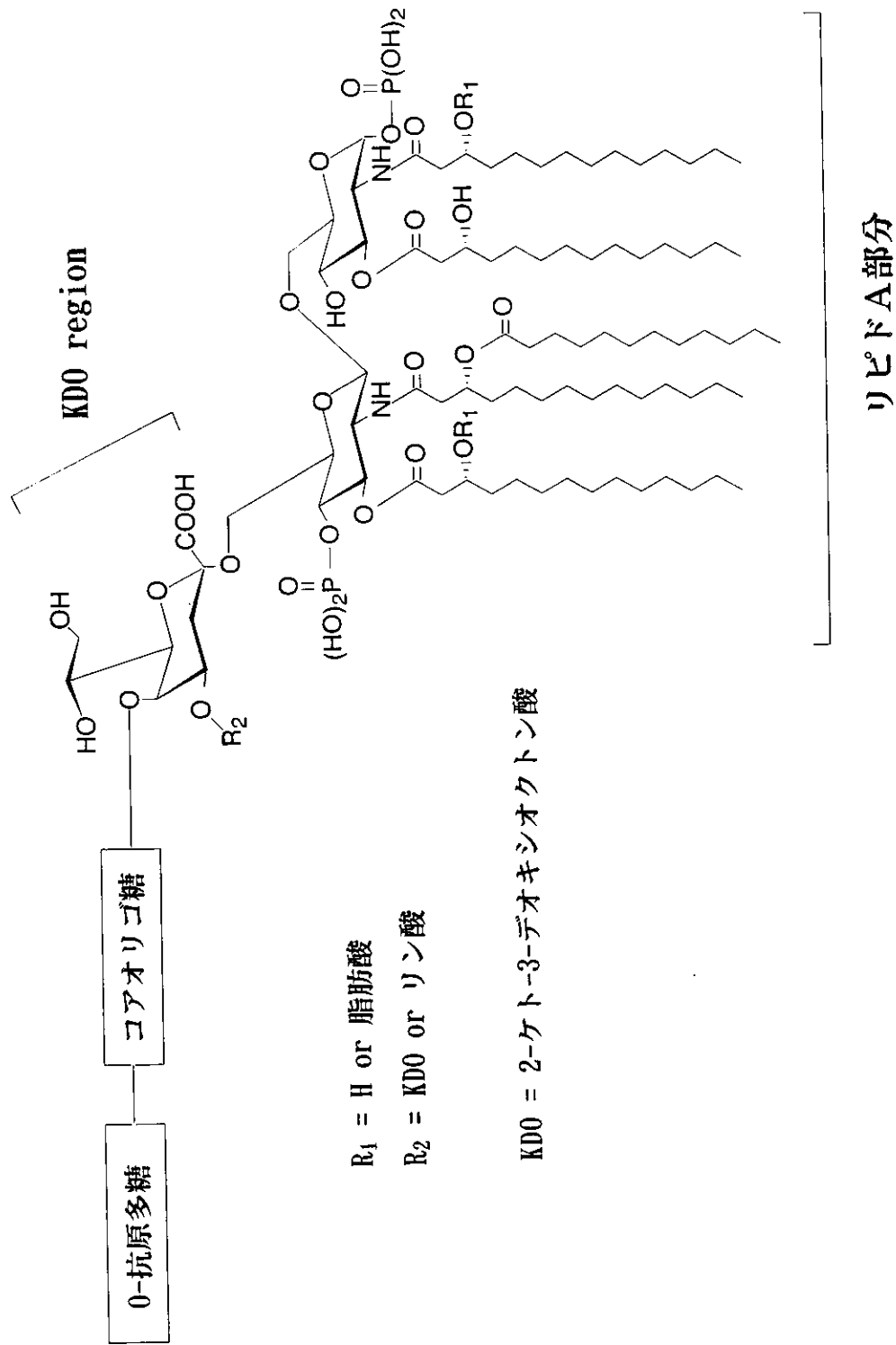


図 22. エンドトキシンの一般的化学構造



新規材料の免疫原性評価手法の開発に関する研究

分担研究者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 療品部主任研究官

研究要旨

医用材料の遅延型アレルギー性試験における、抽出法による結果の変化とモルモット試験の代替法としてマウス Local lymph node assay (LLNA)の可能性を見るため、加硫促進剤として 2-mercaptobenzothiazole (MBT)または zinc dibutyldithiocarbamate (ZDBC)を使用した感作性強度の異なる標準ゴム材料を作製して検討した。材料のアセトン-クロロホルムでは MBT や ZDBC が抽出されるのに対し、オリーブ油抽出ではほとんど検出できなかった。MBT 含有材料のアセトン-クロロホルム抽出物を試験した結果、モルモット Maximization test (GPMT)で強い皮膚反応、マウスにおいてはリンパ節の活性化が起こった。一方、ZDBC 含有材料の抽出物では反応が得られなかった。これらのオリーブ油抽出液の GPMT では、OVA 感作とは関係のない偽陽性の反応が得られ、LLNA ではいずれの材料も感作性反応が表れなかった。以上の結果、材料の感作性を評価する際の試験溶液としては、オリーブ油より有機溶媒による抽出物を用いるのが望ましいと考えられた。また、LLNA でも GPMT と同様の評価をすることが可能なことが示された。材料による即時型アレルギー試験の開発を目的として、陽性タンパク質 ovalbumin (OVA)を種々の条件下（アジュバントの有無、投与回数の違い）で BALB/c 系マウスに腹腔内投与し、免疫反応性を調べた。OVA をアジュバントなしで投与した場合、およびアジュバントだけを 2 回投与した動物群では、血清総 IgE 抗体の上昇は起こらなかった。OVA をアジュバントとともに 2 回投与した場合に最も強い反応を起こし、OVA 特異的 IgE 抗体の産生と著しい血清総 IgE 抗体値の増加を認めた。Mitogen による幼若化反応については OVA 投与の有無による変化は少ないが、OVA 刺激による幼若化反応は OVA 投与群で増加した。また、OVA 投与群の脾臓リンパ球を OVA で刺激して培養すると IL-4 の産生量が増加し、IgE 産生を増強するような液性免疫優位の状態が観察された。試験タンパク質はアジュバントとともに投与する方が免疫反応を引き起こしやすく、血清 IgE 抗体や脾臓リンパ球の抗原特異的活性化反応が、タンパク質の即時型アレルギーの指標となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

医用材料のアレルギー性の評価は、直接血液に接触し、長期間体内に埋植する材料及び器具の安全性を確保する上で重要である。こうしたアレルギー症状の発生は、一般に材料から溶出される物質によって引き起こされる場合が多く、我が国のガイドライン¹⁾でも、ヒトでの接触アレルギーのリスクを前臨床段階で予知するため、感作性試験を行うよう規定されている。このガイドラインは主として材料から遊離してくる化学物質の細胞免疫による遅延型アレルギーの検出を目的としており、モルモットを用いた方法が採用されている。しかし、溶出物の少ないプラスチック材料を試験するためには多量の検体が必要であり、コストや

時間の面で不可能なことが多い。また、抽出溶媒については、国内ガイドラインでは有機溶剤が推奨されているが、諸外国では一般に植物油が用いられている。こうした条件の違いによって試験結果が変化する可能性があるが、実際に検討した報告はない。

じんましんやアナフィラキシーショックなどは即時型アレルギーによる反応である。近年は、コーゲンなど天然材料を用いた医療器具も多くなっている。化学物質の中には即時型アレルギー性を誘発するものがあるが、材料に使用される異種タンパク質の大部分も、強弱の差はあるがアレルギーを起こすと考えられる。タンパク質などの抗原性試験は、特に、遺伝子組換え食品の安全性評

価で重要視されており、動物を用いた検討も行うよう提案されている。²⁾ マウスを用いた血清 IgE 抗体価の定量³⁾や皮内試験⁴⁾などが研究されているが、未だ研究段階で確立した方法はない。医用材料の場合、代謝を経ずに直接接触するため、食品とは別の面からも見る必要があるが、試験溶液の調製法、投与方法および検査指標など、ほとんど研究されていない。

本研究は、医用材料の即時型および遅延型アレルギー性試験法の開発を目的とする。遅延型アレルギー性については、モルモットの代替としてマウスを用いた試験法が可能であるか検討した。一定の感作強度を有する材料を作製し、これをモルモットおよびマウスを用いた試験法で行ったときの結果を比較した。即時型アレルギーについては、陽性対照タンパク質を用い、種々の条件下でマウスに投与し、種々の指標を測定した。

B. 研究方法

1. 遅延型アレルギーに関する研究

材料：2-Mercaptobenzothiazole (MBT) および zinc dibutyldithiocarbamate (ZDBC) を加硫促進剤とし、これらを種々の量添加して、3 種のゴム材料 [Sample A (MBT 高含有)、Sample B (MBT 低含有)、Sample C (ZDBC 含有)] を作製した。それぞれのゴム材料作製時の組成を表 1 に示す。

抽出法：国内ガイドライン⁵⁾および ISO 基準⁶⁾に従って、抽出物を得た。植物油での抽出は、試料 60 cm² をオリーブ油 20 ml に浸漬し、37°C で 72 時間抽出した。有機溶媒による抽出は、試料 70 g に対し、アセトン-クロロホルム (1:1) 200 ml を加えて、室温下、30 分間振とうした。抽出は計 5 回行った。抽出液はろ過、溶媒留去後、デシケータと真空ポンプを用いて乾燥して、残留物を得た。

抽出物中の加硫促進剤の分析：抽出液または抽出残留物中の MBT および ZDBC について、鹿庭らの方法^{6,7)}を若干変更して定量した。アセトン-クロロホルムによる抽出物中の MBT については、抽出物 0.001~0.005 g をジクロロメタン 1~2 ml に溶解し、以下の条件の HPLC に 5 μ l 注入した。オリーブ油抽出液については、抽出液をジクロロメタンで 10 倍希釈して、HPLC に注入した。

HPLC 条件

カラム	ODS (4.6 mm i.d. \times 150 mm)
カラム温度	35°C

移動相	アセトン-トリル：水 (65:35)
流速	1.0 ml/min
検出器	UV 検出器 (254 nm)

アセトン-クロロホルムによる抽出物中の ZDBC については、抽出物 0.002~0.006 g をジクロロメタン 2 ml に溶解し、1 mol/l CoCl₂ 溶液 1 ml と 30 分間振とう後、1 PS ろ紙を用いて有機溶媒層をメスフラスコに分取、定容し、HPLC に 5 μ l 注入した。オリーブ油抽出液については、0.1 ml にジクロロメタン 2 ml と CoCl₂ 溶液 1 ml を加えて振とうした後、HPLC 分析した。

HPLC 条件

カラム	ODS (4.6 mm i.d. \times 150 mm)
カラム温度	35°C
移動相	メタノール
流速	1.0 ml/min
検出器	UV 検出器 (320 nm)

動物：Hartley 系雌性モルモット (5 週齢) (日本 SLC) および BALB/c 系雌性マウス (6~8 週齢) (日本チャールス・リバー) を用いた。

Guinea pig maximization test (GPMT) :

Magnusson and Kligman の方法⁸⁾に準じて実施した。アセトン-クロロホルム抽出物は、5% の濃度でオリーブ油に溶かしてモルモット (1 群 5 匹) 頸部に皮内注射及び閉塞塗布を行って感作した。惹起は毛刈りした背部に 0.001~5% の濃度段階で抽出物をワセリンに混和して閉塞塗布し、48~72 時間後の皮膚反応を観察した。植物油抽出液については、希釈および濃縮することなくそのまま、上記と同様に感作惹起を行った。表 2 の評価基準による皮膚反応強度および感作率を求めた。

Local lymph node assay (LLNA) :^{9,10)} マウス (1 群 3 匹) の両耳に抽出物をアセトン-オリーブ油 (4:1) (AOO) 溶液に種々の濃度で溶解したものを、25 μ l ずつ 3 日間連続塗布した。対照群は AOO のみを同様に塗布した。最終塗布の翌日、耳介リンパ節を取り出し試験群ごとにまとめて重量を測定した後、200 mesh の金属メッシュ上でリンパ節を押しつぶしてリンパ節細胞 (lymph node cell, LNC) を分離し、ナイロンメッシュを通して 15 ml 遠心チューブに移し、Hanks 液で 1200 rpm で 5 分間遠心して洗浄した。2 回洗浄後、コールターカウンターによって細胞数を求めた。LNC は牛胎児血清 (FCS) を 10%、25 mmol/l HEPES、100

units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin を含有する RPMI1640 培地(FCS-RPMI)に浮遊させた後、 5×10^6 cells/ml の濃度に調製し、200 μ l ずつ 96 穴プレートの各穴に入れ (1 群 4 穴)、 ^3H -thymidine ($^3\text{HTdR}$) 0.5 μ Ci を添加して、37°C で 18 時間培養した。培養終了後、細胞内に取り込まれた $^3\text{HTdR}$ 量(dpm)を液体シンチレーションカウンターによって測定した。試験群ごとに、リンパ節重量、LNC 数、LNC 増殖反応について、溶媒のみを塗布した対照群との比を stimulation index (SI)として求めた。

2. 即時型アレルギーの検出に関する研究

試薬：陽性タンパクアレルギーとして、ovalbumin (OVA) (Albumin, chicken egg, Grade V, Sigma Chemical, MO, USA)を用いた。アジュバントとして、Alum(aluminum hydroxide hydrate [$\text{Al}(\text{OH})_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$] gel suspension, LSL Co., Ltd.)を用いた。OVA はリン酸緩衝液(PBS)に溶解した。

動物：BALB/c 系雌性マウス(6~8 週齢) (日本 SLC)を用いた。

免疫方法：マウス (1 群 5 匹) に、OVA 10 μ g と Alum 2 mg の PBS 混合溶液 200 μ l を腹腔内注射し、¹⁾ 1 週間後さらに同様の操作を繰り返した。別の試験では、アジュバントと混和させない 2% OVA-PBS 溶液 250 μ l を同様に注射した。²⁾ PBS またはアジュバントだけを注射したものを対照とした。

IgE アッセイ：最終免疫投与から 7 日後、心臓採血し、凝固後、3000 rpm で 5 分間遠心して血清を分離した。血清中の総 IgE 抗体価および OVA 特異的総 IgE 抗体価を、既報の ELISA 法^{3,11,12)} を若干改変した方法により測定した。総 IgE 抗体価については、ELISA 用 96 穴プレートに 2.5 μ g/ml rat-mono-clonal anti-mouse IgE antibody (Southern Biotechnology Associates Inc., AL, USA)の 0.1 mol/l 炭酸緩衝液(pH 9.6)を 100 μ l 入れ、4°C で一晩放置してコーティングした。0.1% casein-PBS 300 μ l で、37°C、30 分間処理してブロッキングした。個々の血清を 0.1% casein-PBS で 100 倍希釈したもの、または種々の濃度の mouse mono-clonal IgE anti-dinitrophenyl (DNP) antibody (clone SPE-7, Sigma Chemical, MO, USA) 標準溶液を 100 μ l 入れて、37°C で 2 時間静置した。次に、hourseradish peroxidase

(HRP)標識した goat anti-mouse IgE (Nordic Immunology, Tilberg, The Netherlands) を 1:2000 に 0.1% casein-PBS で希釈したものを 100 μ l 加えて、室温で 1 時間静置した。各インキュベーション操作の間では、プレートを 0.05% Tween 20-PBS で 4 回洗浄した。その後、o-phenylenediamine (OPD) peroxidase substrate (Sigma Chemical Co., MO, USA) 100 μ l を加え、暗所で 10 分間置いた後、0.5 mol/l citric acid 100 μ l を入れて反応を止めた。反応液の 450 nm での吸光度を測定し、標準抗体から作製した検量線より、個々の血清中の総 IgE 抗体価を求めた。OVA 特異的 IgE 抗体価は、プレートを OVA 100 μ g/ml を 100 μ l 加えて、4°C で一晩放置してコーティングした後、0.1% casein-PBS でブロッキングした。個々の血清を 0.1% casein-PBS で 20 倍希釈して、100 μ l ずつ入れて、37°C で 2 時間静置した。次に、mouse mono-clonal IgE anti-DNP antibody (clone SPE-7, Sigma Chemical, MO, USA)を 1:1000 に 0.1% casein-PBS で希釈したものを 100 μ l 加えて 1 時間室温で放置、以下、総 IgE 抗体の測定と同様に、HRP 標識 goat anti-mouse IgE とインキュベーションし、OPD と反応させて得られた 450 nm の吸光度を測定した。

リンパ球幼若化反応：¹³⁾ 最終投与から 7 日後、動物ごとに脾臓を取り出し、リンパ節と同様に細胞浮遊液を調製し、溶血後、FCS-RPMI 培地に浮遊させ、 5×10^5 個/200 μ l ずつ 96 穴プレートに入れた。種々の濃度の各 mitogen (Con A 2 μ g/ml、LPS 1 μ g/ml 及び PHA 10 μ g/ml)、抗原として OVA 100 μ g/ml を添加して 72 時間培養し、終了 4 時間前に $^3\text{HTdR}$ 0.25 μ Ci を添加して細胞内に取り込まれた $^3\text{HTdR}$ 量(dpm)を測定した。

サイトカインアッセイ：最終投与から 7 日後、脾臓リンパ球を 5×10^6 個/1 ml ずつ 24 穴プレートに入れ、Con A 2 μ g/ml または OVA 100 μ g/ml を添加して 24~72 時間培養した。培養上清を 3000 rpm で 5 分間遠心して回収し、IFN- γ および IL-4 濃度を市販 ELISA キット (BioSource International, Inc., Camarillo, CA, USA)により定量した。

C. 研究結果

1. 遅延型アレルギーに関する研究

1-1. ゴム抽出物の分析

3 研究機関でそれぞれ別に抽出したものを、本機関でまとめて分析した。A 機関については材料作製後 1 ヶ月以内に、残りの機関では約 1 年間保存後、抽出した。種々の濃度の MBT-ジクロロメタン溶液を調製し、HPLC に注入したところ、検出限界濃度は約 $0.2 \mu\text{g/ml}$ であった。MBT $0.2 \sim 40 \mu\text{g/ml}$ の濃度範囲でピーク高さとの間に良好な直線関係が得られた。ZDBC の検出限界濃度は約 $1 \mu\text{g/ml}$ であった。ZDBC 濃度 $1 \sim 4000 \mu\text{g/ml}$ の範囲で、ZDBC の Co 錯体のピーク高さとの間に良好な直線関係が得られた。オリーブ油 1 ml に ZDBC $4.5 \mu\text{g/ml}$ のジクロロメタン溶液 2 ml を添加し、 CoCl_2 溶液と振とうして得られたピーク面積を、オリーブ油がない状態で錯体化したときのピーク高さと比較した。その結果、3 回試験したときの平均は 37% と低い値しか示さなかった。従って、ZDBC の定量値は、実際に抽出されている量よりは若干低い値を与える可能性がある。機関 A で抽出に用いられたオリーブ油中の MBT 量は、Sample A で $7.7 \mu\text{g/ml}$ 、Sample B で $3.7 \mu\text{g/ml}$ であった。Sample C のオリーブ油抽出液中の ZDBC はごく小さなピークしか示さず、定量限界以下であった。いずれにしろ、本溶媒による抽出では、MBT および ZDBC は非常に少ないことがわかった。

アセトン-クロロホルムで得られた抽出物量およびその MBT、ZDBC 濃度を表 3 に示した。いずれのゴム試料からも約 3~4% 程度の量の抽出物が得られた。Sample A では、抽出物あたりの MBT 量は 3.34~5.02%、Sample B では 0.021~0.059% で、試験を行った機関による変化は少なく、定量的に抽出されることがわかった。Sample C については、機関 A では抽出物中の ZDBC 量は 17% 程度あるのに対し、約 1 年保存後、機関 B および C で抽出した物には 0.01% 未満とほとんど検出されなかった。

1-2. モルモット感作性試験

オリーブ油抽出液原液で感作し、惹起も同様に原液を閉塞パッチして皮膚反応を観察した。本条件では、Sample A および Sample B ともすべての動物が評点 2 程度の反応を示した。Sample C では 5 匹中 2 匹が評点 1 の反応を示した。しかし、オリーブ油だけで感作した動物に対して、これらの Sample の抽出液を塗布しても同様の反応率で皮膚反応を示した(表 4)。

アセトン-クロロホルム抽出物を 5% 濃度で感

作した後、抽出物を各種濃度でワセリンに混和したものを閉塞パッチして惹起した。Sample A および Sample B では、0.1% 以上の濃度ですべての動物が明らかな皮膚反応を示し、濃度が高いほど強い皮膚反応を示した。Sample A と Sample B とでは、ほとんど反応性に差はなかった。一方、Sample C では、0.1~5% の惹起で 5 匹中 1 匹が弱い反応を示し、前者に比べて明らかに感作率は低いことがわかった(表 5)。

1-3. マウス感作性試験

機関 C で行われた LLNA の 3 回の試験結果を表 6 に示した。アセトン-クロロホルム抽出物を AOO に溶解し、種々の濃度で塗布した。Sample A および B では、いずれも溶媒塗布群に比べて、リンパ節重量、LNC 細胞数および LNC 増殖反応が上昇した。いずれの試料とも塗布した濃度依存的にリンパ節の反応性は強くなった。測定した 3 つの項目のうちでは、LNC 増殖反応が最も高い SI 値を示した。Sample C は 1 度、5% で若干の増加が認められたが、他の試料に比べて上昇率は低かった。Sample A と Sample B とを比べると、5% での 3 回の試験結果の平均は Sample A の方がわずかに高い値を示した。より低い 1% 濃度では、Sample A は対照群と差が認められるが、B と C は対照群とほとんど差はなかった。別に、MBT および ZDBC 溶液について LLNA で試験した。5% 溶液塗布群のリンパ節反応性は AOO 群と変化なかった。

機関 D での方法は機関 C と適用方法が若干異なり、試験群ごとでなく 1 匹ずつの反応を見ている(図 1)。植物油抽出液ではいずれの Sample も著しい反応を示さなかった。一方、アセトン-クロロホルム抽出物では Sample A と Sample B で SI が 4 以上の高い値を示した。Sample C は対照群と変化はなかった。Sample B は高い SI 値を示したが、4 匹中 2 匹だけが非常に強い反応を示すように、バラツキが非常に大きいため、対照群と有意差は認めなかった。

2. 即時型アレルギーの検出に関する研究

表 7 に、今回検討した OVA の投与方法を示した。Group 1 は OVA を 1 回だけ投与し、他では 1 週間おきに 2 回投与した。Group 1 と 3 は OVA $10 \mu\text{g}$ を Alum アジュバントとともに注射し、Group 5 ではアジュバントなしで、5 mg の OVA を投与

した。いずれも最終投与から1週間後に採血および脾臓を採取し、それぞれの反応性を調べた。

脾臓重量に関して、アジュバントとともに投与した場合は OVA の有無による変化は認めなかった。アジュバントがない場合、溶媒群に比べ OVA 投与群の方が高い値を示した(表 8)。しかし、アジュバントだけでも同程度の脾臓重量が認められることから、本指標が OVA によるものと判定することは困難であった。

脾臓リンパ球の各 mitogen および OVA に対する幼若化反応を調べた。本検討は2回試験物質を投与した群間で比較した。アジュバントとともに OVA を投与した群は、PHA など一部の mitogen に対する反応性が溶媒群に比べてわずかに高い値を示すが、有意な差は認めなかった。アジュバントなしの場合では、OVA 投与した方がわずかに低い値を示すが、これも有意な差はなかった。一方、アジュバントの有無にかかわらず、OVA を投与した動物群の脾臓リンパ球に OVA を添加して培養すると、³HTdR の取り込みが増加し、OVA に対する特異的反応が有意に増加していることがわかった(表 9)。また、リンパ球の増殖反応を評価する上で、³HTdR の代わりに AlamarBlue 色素が使用できるかどうか検討するため、同じリンパ球集団を使用し、mitogen で刺激した。その結果、刺激前に比べて dpm 値は 40~50 倍となるが、AlamarBlue 色素の吸光度の変化は 6%以下であった。したがって、リンパ球の増殖反応を比較する上で、本色素は ³HTdR の代替としては十分とはいえなかった。

血清中総 IgE 抗体濃度を ELISA 法により測定した。Alum だけを投与した群の血清総 IgE 抗体価は PBS だけを投与した群とほとんど同等であり、アジュバントに対して IgE 抗体は産生されないことが確認された。また、アジュバントなしで OVA を2回投与しても、総 IgE 抗体値は増加しなかった。一方、アジュバント共存下の場合、Group 1 のように1回 OVA を投与するだけで数匹に IgE 抗体の増加が認められ、2回投与することにより(Group 3)、5匹すべての動物で総 IgE 抗体値が上昇することがわかった(表 10、図 2)。OVA 特異的 IgE 抗体に関しては吸光度で比較した。溶媒またはアジュバントだけを投与した群では吸光度は 0.076 程度であるが、OVA を投与された場合、アジュバント非共存下の Group 5 でも 0.096 と増加した。また、Group 1 は、総 IgE 抗

体価は高いものの、OVA 特異的 IgE 抗体に関してはそれほど高い値を示さなかった。アジュバントとともに OVA を2回投与した場合、すべての個体で明らかに高い吸光度を示した(図 2)。

脾臓リンパ球の培養上清のサイトカインを測定した。IL-4 と IFN- γ について産生パターンを見るため、Group 3 の OVA 感作リンパ球について Con A と OVA を添加して 24、48、72 時間培養時点でのサイトカイン量を ELISA 法により測定した。その結果、IL-4、IFN- γ とも、Con A 刺激によって産生される量は 24 または 48 時間培養した方が 72 時間培養した上清よりも高い値を示した。OVA 刺激の場合、OVA 濃度が高く、培養時間を長くした方が高い値を示した。OVA に比べて Con A 刺激の場合、IFN- γ は多量に産生されるが、IL-4 産生量はむしろ少ないことがわかった(図 3)。次に、各投与群のリンパ球に Con A または OVA を添加して 72 時間培養したときの IL-4 産生量を図 4 に示した。溶媒またはアジュバント群に比べ、OVA 投与群で OVA 刺激による IL-4 産生量が高い。OVA 刺激による IFN- γ に関しては、2 回投与した群同士で比較すると、OVA 投与群は溶媒群、アジュバント群に比べて低い値を示した(図 5)。一方、Con A で 48 時間刺激した上清への IL-4 および IFN- γ 産生量は OVA 投与の有無と関係して上昇、低下する傾向は認めなかった。

D. 考察

1. 遅延型アレルギー

医用材料の感作性試験が化学物質の試験と異なる点は、試験する材料からの溶出物についての評価となることである。各国では、種々の条件(溶媒、時間など)で抽出が行われており、こうした差が試験結果に影響を与えている。よって、適切な溶出法を設定するためには、対照となる材料を使用して検討するべきである。

ゴム材料はヒトでの皮膚感作例が報告されており、感作の原因物質がゴム製造に使用される加硫促進剤や老化防止剤であることがわかっている。^{6,7)} そこで、添加剤の種類と含有量を変化させれば感作強度の異なる材料を作製できるのではないかと考えた。加硫促進剤 MBT は、モルモット試験では中程度の強度を有する陽性物質の1つとして上げられている。⁸⁾ 一方で、アルキル鎖の長いジチオカーバメート系加硫促進剤に対しての感作はまれである。そこで、標準材料として、MBT

と ZDBC の含有量を変化させた 3 種の標準材料を作製した (表 1)。添加物質の感作性強度から、MBT を多く含有させた Sample A は強い感作性強度を有する材料、MBT 添加量の少ない Sample B は中程度、ZDBC を使用した Sample C は感作が起らない材料と予想した。

まず、各材料からの抽出条件による溶出量の違いを見た。ISO 基準では医用材料の抽出溶媒として、植物油を推奨溶媒の 1 つとしてあげている。⁶⁾ オリーブ油で抽出したときの各材料からの加硫促進剤の溶出量は分析の結果、非常に少ないことがわかった。一方、我が国ではアセトン・クロロホルムなどの有機溶媒を用いることとされ、¹⁾ Sample A では 1g あたり 1600 μ g 程度、Sample B では 1g あたり 16 μ g 程度の MBT が溶出した。Sample C については、製造直後の材料から ZDBC が 4500 μ g/g の割合で抽出された。このように、有機溶媒の方がオリーブ油に比べて抽出効率がよく、これによる抽出物は長期間使用する医用材料の感作性評価のための試料として適当と考えられる。また、材料作製時の添加量の差 (A と B では添加した MBT 量が 10 倍違う) が、抽出物中にもその割合で添加剤が含まれるわけではなかった (100 倍以上の違い)。加硫工程中に加硫促進剤はゴム中で分解され消費されるが、使われない分が残存し、これが抽出されてくる。Sample A では多量の MBT があるため、消費されずに残存するものがあると考えられるが、Sample B の場合、添加されたものの多くが消費され、MBT として残存している量はごく少なく、このような結果になるものと思われる。Sample C からの ZDBC 溶出量は、ゴム材料を作製し抽出するまでの時間によって大きく変化した。保存中に ZDBC は材料の中で徐々に分解していったものと考えられる。MBT に関しては、こうした抽出時期による違いはないことから、材料中でも比較的安定に存在していた。一定強度の標準材料を作製する上での課題として、感作性を示す物質が添加した分に比例して抽出されること、またその物質ができるだけ安定であることが望まれる。

GPMT において、Sample のオリーブ油抽出液で感作した動物は、惹起で陽性皮膚反応を示した。これらの抽出液の中には感作性を示す MBT などの含有量は極めて微量で、本皮膚反応を説明できるレベルではない。また、オリーブ油だけで感作した動物に対して、これらの Sample の抽出液を

塗布しても同等の反応率で皮膚反応を示した。ヒトにおいては、オリーブ油に対しての感作例も知られている。¹⁴⁻¹⁶⁾ モルモット試験法は、後述する LLNA より希薄な濃度で明らかな反応が認められ、検出感度は高いと思われる。しかし、対照群でも反応を起こすなど、オリーブ油自体による感作あるいは免疫活性化が疑われる。このように、オリーブ油抽出液をそのまま感作性試験に用いると目的成分以外に反応することもあり、不相当と考えられる。

Sample A および Sample B のアセトン・クロロホルム抽出物で感作したモルモットは、0.1% 以上の惹起濃度ですべての動物が明らかな皮膚反応を示した。Sample C では、前者に比べて明らかに弱い反応しか示さなかった。本溶媒での抽出では、予想したように感作性を検出することができ、植物油よりも適切な抽出法と考えられた。ただ、Sample A と B では抽出されてくる MBT 量の差にかかわらず、動物の反応性には差が認められず、両材料間の感作性強度の差を認めることはできなかった。この原因として、モルモットの反応がほぼ最高に近いぐらいに強く感作されてしまったこと、さらに、これが加硫促進剤だけではなくゴム材料中の他の成分も寄与している可能性を示唆する。

従来の医用材料に対するモルモット試験では、一定量の抽出物を得る必要があるが、¹⁾ 材料自体からの溶出物が極めて少ない場合には多量の試験材料と時間が必要であった。そのため、より少ない検体量で試験する方法も望まれている。そこで、短期間でかつ投与量の少なくてすむマウスを用いた試験 LLNA を検討した。アセトン・クロロホルム抽出物は、よく用いられている AOO を溶媒として、5% の濃度に加温して溶解させた。MBT などの加硫促進剤はこの濃度で AOO に溶解するが、抽出物の AOO 溶液は温度が下がると再び濁りが生じた。このことから、抽出物はさまざまなものが混雑し、その大部分は油などの高分子量の脂溶性物質と考えた。Sample A と B の抽出物は 5% の濃度で塗布するとリンパ節活性化が起こり、指標としては LNC 増殖反応を ³HTdR の取り込みで見える方法が最も感度が良かった (表 6)。これらの材料の抽出物による LNC 増殖反応は溶媒塗布群の 2~3 倍の値を示した。濃度反応関係を見ると、若干 Sample A の方が強い傾向が認められた。一方、Sample C の抽出物はこれらよりは弱い反応