

しか示さなかった。ただし、機関 C の LLNA で用いた Sample C の抽出物には ZDBC がほとんどないことから、機関 A で使用したようなゴム製造後、すぐに抽出した検体について試験を行い、同様の結果が得られるか確かめるべきである。機関 D で行われた LLNA では、Sample A と B のアセトシクロホルム抽出物では LNC 増殖反応が増加し、Sample C の抽出物ではそうした反応は起こらなかった。Sample A では Welch's t-test で対照群と 5% で有意差が認められた。オリーブ油抽出ではいずれの材料とも感作性反応が表れなかった。このように、マウスを用いた LLNA でもモルモット試験と同等に、適切な抽出溶媒での試験溶液を用いて材料の感作性を評価できると考えられた。

5% MBT 溶液を試験したところ、マウスに反応を起こすことができなかった。以前の LLNA では、SI 値が 3 以上の反応を起こさせるには、高濃度、例えば 25% で適用する必要があった。¹⁰⁾ 抽出物中の MBT 含量の分析結果から、本試験では先のような濃度の MBT は塗布されていない。さらに、MBT 添加ゴム材料 2 種に対しては同等の反応を示し、著しい違いが認められないことから、LLNA における抽出物での反応が MBT や ZDBC の単独作用によるものとは考えられない。ただ、添加剤によって反応性に変化があることから、これらの分解物あるいは他の含有物質との反応物などが何らかの影響をおよぼしていると思われる。この点は、抽出物の分画などから、反応を起こす主因となる物質を特定できるかもしれない。また、この反応が遅延型反応だけによるものか確認する上では、血清抗体値や LNC のサイトカイン産生などについて分析することが望まれる。

2. 即時型アレルギー

即時型アレルギーの実験的誘発には、アレルゲンをアジュバントとともに投与するのが一般的である。しかし、食物アレルギーの動物実験では、生理的な条件をもとに、アジュバントを用いずに、長期間経口で与える方法も取られている。^{17,18)} また、腹腔内注射によっても感作が成立すると報告もある。^{3,19,20)} そこで、アジュバントの有無、投与回数を変化させた種々の条件で OVA を腹腔内投与したときに、明確な感作性反応をとらえることができるかどうか検討した。

脾臓重量および脾臓リンパ球の各 mitogen に対

する幼若化反応に関しては、OVA 投与によるものと思われる変化は少なかった。一方、アジュバントの共存の有無にかかわらず、OVA を投与した群の脾臓リンパ球は OVA の添加により幼若化反応が増加し、この反応は OVA 感作の指標となりえると考えられた(表 9)。

血清中総 IgE 抗体濃度は化学物質の気道アレルギー性、すなわち、即時型アレルギー性誘発能の評価にも使用される。²¹⁾ 文献の方法³⁾で、アジュバントなしで OVA を 2 回投与したが、IgE 抗体の上昇は認めなかった。一方、アジュバント共存下で OVA を投与すると、総 IgE 抗体量の上昇が認められた(表 10)。OVA 特異的 IgE 抗体に関しては、OVA を投与した群で産生が認められた。総 IgE 値と OVA 特異的 IgE 値の関係は、一方が高いと他方も高くなるというようにほぼ同様の傾向がある。しかし、Group 1 のように、総 IgE 抗体価は高いものの、OVA 特異的 IgE 抗体はそれほど高い値を示さないなど若干差が認められた(図 2)。したがって、タンパク質の即時型アレルギー性を評価する上で、血清中の総 IgE 抗体価の測定は有用であるが、特異的抗体価を測定する方が目的タンパクによるアレルギーかどうかを判定するのに適切と考えられた。試験検体はアジュバントとともに 2 回投与すると最も IgE 抗体を産生すると考えられたが、投与方法による違い、濃度変化や採取時期などについて、さらに検討する予定である。

脾臓リンパ球の培養上清のサイトカイン産生パターンを観察した。IL-4、IFN- γ とも、Con A で 24 または 48 時間刺激した時、また、OVA 100 μ g/ml で 72 時間刺激培養した時の産生量が高かった(図 3)。この結果を踏まえ、各サイトカインの最も産生量が高くなる条件における培養上清をとり、分析した。OVA 刺激による IL-4 産生量は、溶媒またはアジュバント群に比べ、OVA 投与群で高くなった(図 4)。また、OVA 投与群は溶媒群、アジュバント群に比べて OVA 刺激による IFN- γ 産生が低下した(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。CD4+ T helper(Th)細胞は Th1 と Th2 の 2 つのグループに分けられ、これらの細胞から産生されるサイトカインは免疫反応の維持に重要である。²²⁾ Th1 サイトカイン IFN- γ は IgE 抗体産生を抑制し、²³⁾ Th2 サイトカイン IL-4 は IgE

抗体反応の促進と維持に関係する。^{24,25)}したがって、IFN- γ 産生が増加すれば、Th1/Th2 バランスがTh1 優勢に、IL-4 が優勢なら Th2 優勢の状態に傾くと考えられる。化学物質においても、気道アレルギーを起こす trimellitic anhydride (TMA)や toluene diisocyanate (TDI)をマウスに投与すると、IgE 抗体値が増加し、Th2 細胞からのサイトカインIL-4やIL-10の産生が増加することが報告されている。一方、接触皮膚炎を起こす2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)はTh1 優位のIFN- γ を産生すると報告されている。^{21,26,27)} 本実験系におけるサイトカインの産生状態も、液性免疫優位の状態を意味し、OVA 投与による IgE 抗体産生の増加を支持する。したがって、サイトカインの産生動態もタンパク質アレルギーによる感作性を検出する 1 つの指標となり得る。ただ、サイトカイン産生動態については、培養上清の採取時期によって定量値が異なることから、²⁷⁾ 最もアレルギーの状態を反映する条件設定について今後さらに検討する必要がある。また、タンパク質の種類によって、感作性強度の違い、IgE や IgG 抗体の産生パターンが異なることが知られている。^{19,20)} 動物への投与方法が決定した後、タンパクの種類による免疫変化について、加えて、医用材料へ応用するための条件設定(タンパク質の抽出溶媒や条件)についても検討する必要がある。

E. 結論

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して研究を行った。遅延型アレルギー性については、加硫促進剤の種類を変化させて感作性強度の異なる標準ゴム材料を製造した。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、GPMT で強い感作を起こし、マウスの LNC 活性化反応が起こった。一方、これらのオリーブ油抽出液および ZDBC 含有材料のアセトン-クロロホルム抽出物については、LLNA では反応が得られず、GPMT ではオリーブ油に対して偽陽性の反応が起こった。よって、材料の感作性を評価する上では、オリーブ油より有機溶媒による抽出物を試験するのが望ましいと考えられた。また、マウス LLNA でも GPMT と同様の判定をすることができる可能性を示した。標準材料としてのゴム材料

については、MBT はゴム中で比較的安定に存在するのに対し、ZDBC は製造後、経時変化を受けやすいこと、添加量と抽出量との関係がとりにくいこと、さらに、これらの化学物質以外にも多量の抽出物が得られ活性を示すことから、改善の必要があると思われた。

即時型アレルギー試験に関しては、OVA を種々の条件で BALB/c 系マウスに腹腔内投与し、免疫反応性を調べた。OVA をアジュバントとともに 2 回投与した場合が最も反応性が高く、著しい血清総 IgE 抗体値の増加と OVA 特異的 IgE 抗体の産生を認めた。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上昇した。また、OVA 刺激による IL-4 サイトカイン産生が増加し、液性免疫優位の反応が得られた。以上の点を踏まえ、さらに投与方法や指標の選択について検討を加えていく予定である。

謝辞

ゴム材料は、鹿庭正昭先生(国立医薬品食品衛生研究所)、中村晃忠先生(元国立医薬品食品衛生研究所)の助言のもと、アトム(株)の北嵐俊明氏から製造、提供していただきました。ゴム材料の抽出には、食品農薬安全性評価センターおよび食品薬品安全センター秦野研究所に参加いただきました。食品薬品安全センター秦野研究所の金澤由基子先生および National Institute of Public Health and Environment, The Netherlands の W. de Jong 先生からは動物試験データの一部を頂きました。以上、ご協力いただいた方々に感謝いたします。

参考文献

1. 厚生省薬務局医療機器開発課監修, 医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン 1995 解説, 薬事日報社, 東京, 1996.
2. FAO/WHO: Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome (2001).
http://www.who.int/fsf/GMfood/Consultation_Jan2001/report20.pdf
3. Hilton, J., Dearman, R.J., Basketter, D.A., Kimber, I.: Serological responses induced in mice by immunogenic proteins and protein

- respiratory allergens. *Toxicol. Lett.*, 73, 43-53 (1994).
4. 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2000, 金原出版, p.236-238 (2000)
 5. ISO/CD 10993-12: Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials (1996).
 6. 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 中村晃忠, 関東裕美, 伊藤正俊, 石原 勝：市販ゴム手袋中のジチオカーバメート系加硫促進剤の分析およびパッチテスト陽性率. *衛生化学*, 32, 197-211 (1986).
 7. 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 中村晃忠, 関東裕美, 伊藤正俊, 石原 勝：市販ゴム手袋中のメルカプトベンゾチアゾール系加硫促進剤の分析およびパッチテスト陽性率. *衛生化学*, 33, 140-148 (1987).
 8. Magnusson, B., Kligman, A.M.: The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test., *J. Invest. Dermatol.*, 52, 268-276 (1969).
 9. Kimber, I., Weisenberger, C.: A murine local lymph node assay for the identification of chemical allergens. Assay development and results of an initial validation study. *Arch. Toxicol.*, 63, 274-282 (1989).
 10. Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Nakamura, A.: Evaluation of contact sensitivity of rubber chemicals using murine local lymph node assay. *Contact Dermatitis*, 28, 77-80 (1993).
 11. Akiyama, H., Hoshino, K., Tokuzumi, M., Teshima, R., Mori, H., Inakuma, T., Ishiguro, Y., Goda, Y., Sawada, J., Toyoda, M.: The effect of feeding carrots on immunoglobulin E production and anaphylactic response in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 22, 551-555 (1999).
 12. Teshima, R., Kawase, M., Tanaka, T., Hirai, K., Sato, M., Sawada, J., Ikebuchi, H., Ichinoe M., Terao, T.: Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains of mice. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1618-1622 (1990).
 13. Y. Ikarashi, T. Tsuchiya, A. Nakamura, M. Beppu, K. Kikugawa: Effect of vitamin E on contact sensitization responses induced by 2,4-dinitrochlorobenzene in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 44, 225-236 (1998).
 14. Isaksson, M., Bruze, M.: Occupational allergic contact dermatitis from olive oil in a masseur. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 41, 312-315 (1999).
 15. Malmkvist Padoan S., Pettersson A., Svensson A.: Olive oil as cause of contact allergy in patients with venous eczeme, and occupationally. *Contact Dermatitis*, 23, 73-76 (1990).
 16. de Boer E.M., van Ketel W.G.: Contact allergy to an olive oil containing ointment. *Contact Dermatitis*, 128-129 (1984).
 17. Akiyama, H., Teshima, R., Sakushima, J., Okunuki, H., Goda, Y., Sawada, J., Toyoda, M.: Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains of mice. *Immunol. Lett.*, 78, 1-5 (2001).
 18. Dearman, R.J., Caddick, H., Stone, S., Basketter, D.A., Kimber, I.: Characterization of antibody responses induced in rodents by exposure to food proteins: influence of route of exposure. *Toxicology*, 167, 217-231 (2001).
 19. Hilton, J., Dearman, R.J., Sattar, N., Basketter, D.A., Kimber, I.: Characteristics of antibody responses induced in mice by protein allergens. *Fd. Chem. Toxicol.*, 35, 1209-1218 (1997).
 20. Dearman, R.J., Caddick, H., Basketter, D.A., Kimber, I.: Divergent antibody isotype responses induced in mice by systemic exposure to proteins: a comparison of ovalbumin with bovine serum albumin. *Fd. Chem. Toxicol.*, 38, 351-360 (2000).
 21. Dearman, R.J., Basketter, D.A., Kimber, I.: Variable effects of chemical allergens on serum IgE concentration in mice: Preliminary evaluation of a novel approach to the identification of respiratory sensitizers. *J. Appl. Toxicol.*, 12, 317-323 (1992).

22. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L.: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 136, 2348-2357 (1986).
23. Finkelman, F.D., Katona, I.M., Mosmann, T.R., Coffman, R.L.: IFN- γ regulates the isotopes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunol.*, 140, 1022-1027 (1988).
24. Finkelman, F.D., Katona, I.M., Urban, J.F.Jr., Snapper C.J., Ohara, J., Paul, W.E.: Suppression of in vitro polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B cell stimulatory factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9675-9678 (1986).
25. Finkelman, F.D., Katona, I.M., Urban, J.F.Jr., Holmes, J., Ohara, J., Tung, A.S., Samples, J.G., Paul, W.E.: IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J. Immunol.*, 141, 2335-2341 (1988).
26. Dearman, R.J., Basketter, D.A., Kimber, I.: Differential cytokine production following chronic exposure of mice to chemical respiratory and contact allergens. *Immunology*, 86, 545-550 (1995).
27. Dearman, R.J., Basketter, D.A., Kimber, I.: Characterization of chemical allergens as a function of divergent cytokine secretion profiles induced in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 138, 308-316 (1996).

表1. 材料の組成

成分	(phr)		
	Sample A	Sample B	Sample C
NR	100	100	100
酸化亜鉛	5	5	5
ステアリン酸	1	1	1
充填剤	62	62	62
種黒サブ	5	5	5
サントライトS	1.3	1.3	1.3
硫黄	2.0	2.0	2.0
加硫促進剤			
MBT	2.0	0.2	-
ZDBC	-	-	0.5
合計	178.3	176.5	176.8

phr = parts per hundred parts of rubber.

NR = natural rubber.

サントライトS = selected microcrystalline wax, 表面亀裂防止剤(精工化学(株)).

表2. 皮膚反応の評点

(1) Erythema formation	
no erythema	0
very slight erythema	1
well-defined erythema	2
moderate to severe erythema	3
severe erythema with eschar formation	4
(2) Edema formation	
no edema	0
slight edema	1
moderate edema	2
severe edema	3
Total maximum	7

Sensitization rate = number of animals showing a positive reaction / number of animals tested.

Mean response = $\Sigma[(1) + (2)] / \text{number of animals tested.}$

表3. ゴム試料からのアセトン-クロロホルム抽出物とそのMBTおよびZDBC含量

(a) Sample A (MBT High)

Institute	Weight (g)		Extraction ratio		
	Sample	Extract	Extract/Sample	MBT/Extract (mg/g)	MBT/Sample (µg/g)
A	70	2.33	3.33%	50204 (5.0%)	1671 (0.17%)
B	20	0.83	4.38%	33385 (3.3%)	1355 (0.14%)
C	70	2.74	3.91%	45690 (4.6%)	1786 (0.18%)

(b) Sample B (MBT Low)

Institute	Weight (g)		Extraction ratio		
	Sample	Extract	Extract/Sample	MBT/Extract (mg/g)	MBT/Sample (µg/g)
A	70	2.29	3.27%	494 (0.049%)	16.16 (0.0016%)
B	20	0.74	3.70%	593 (0.059%)	22.64 (0.0023%)
C	70	2.74	3.92%	209 (0.021%)	8.17 (0.00082%)

(c) Sample C (ZDBC)

Institute	Weight (g)		Extraction ratio		
	Sample	Extract	Extract/Sample	ZDBC/Extract (mg/g)	ZDBC/Sample (µg/g)
A	70	1.87	2.67%	170269 (17.0%)	4549 (0.45%)
B	20	0.67	3.33%	68 (0.0068%)	2.24 (0.00022%)
C	70	2.18	3.11%	102 (0.0102%)	3.17(0.00032%)

表4. オリーブ油抽出液のモルモットMaximization test (GPMT)(機関A)

Sample	Mean response/positive rate			
	48 h		72 h	
A	2.4	100%	2.0	100%
B	2.4	100%	1.8	100%
C	0.4	20%	1.0	100%

Induction		Challenge (Mean response/positive rate)							
		A		B		C		Olive oil	
Olive oil	48 h	0.6	60%	0.6	60%	0.4	40%	0.2	20%
	72 h	0.8	80%	1.0	100%	0.8	80%	0.4	40%

抽出原液100%で感作した後、抽出原液をそのまま24時間閉塞パッチして惹起した。惹起後、48および72時間後の皮膚反応を観察した。

表5. アセトン-クロロホルム抽出物のモルモットMaximization test (GPMT)(機関A)

Sample	Challenge concentration (in vaseline, closed patch)									
	Mean response/positive rate									
	5%		1%		0.1%		0.01%		0.001%	
A	5.8	100%	3.8	100%	1.0	100%	0.2	20%	0	0%
B	4.2	100%	3.6	100%	1.0	100%	0.2	20%	0	0%
C	0.2	20%	0.2	20%	0	0%	0	0%	0	0%

抽出物を5%の濃度で感作した後、抽出物をワセリンに溶かして、24時間閉塞パッチして惹起した。惹起後、48時間後の皮膚反応を観察した。

表6. アセトン-クロロホルム抽出物のLocal lymph node assay (LLNA)(機関C)

Experiment 1

Sample	Concentration	Lymph node weight		Cell number		³ HTdR incorporation	
		(mg)	SI	(x10 ⁶)	SI	(cpm)	SI
AOO		19.5		10.67		1241	
A	1%	24.5	1.26	13.32	1.25	2504	2.02
A	2.5%	22.1	1.13	13.12	1.23	3404	2.74
A	5%	23.6	1.21	14.58	1.37	4439	3.58
B	5%	23.8	1.22	19.20	1.80	4068	3.28
C	5%	20.4	1.05	14.10	1.32	1415	1.14

Experiment 2

Sample	Concentration	Lymph node weight		Cell number		³ HTdR incorporation	
		(mg)	SI	(x10 ⁶)	SI	(cpm)	SI
AOO		19.4		13.36		1793	
A	5%	23.4	1.21	20.95	1.57	6769	3.78
B	1%	21.5	1.11	14.07	1.05	1030	0.57
B	2.5%	18.6	0.96	14.01	1.05	1432	0.80
B	5%	19.1	0.98	15.99	1.20	3720	2.08
C	1%	20.5	1.06	13.53	1.01	1057	0.59
C	2.5%	21.3	1.10	14.21	1.06	1787	1.00
C	5%	23.6	1.22	20.45	1.53	3573	1.99

Experiment 3

Sample	Concentration	Lymph node weight		Cell number		³ HTdR incorporation	
		(mg)	SI	(x10 ⁶)	SI	(cpm)	SI
AOO		22.1		14.92		1647	
A	5%	23.1	1.05	20.64	1.38	4114	2.50
B	5%	23.6	1.07	17.36	1.16	4827	2.93
C	5%	20.7	0.94	9.38	0.63	1084	0.66

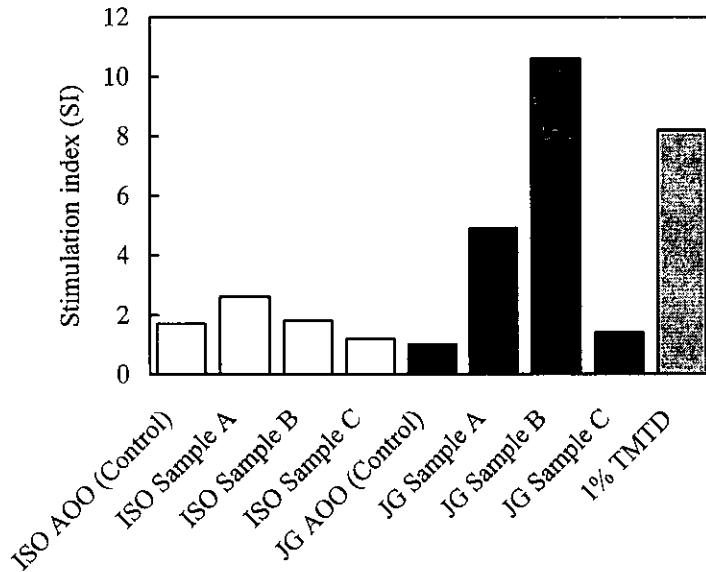


図1. 機関DにおけるLocal lymph node assayの結果

ISO = オリーブ油抽出液100% 原液. JG = アセトン-クロロホルム抽出物を5% 濃度にアセトン-オリーブ油(AOO)に溶解したもの. TMTD = teteramethylthiurum disulfide.

対照群(AOO)は6匹、試験群は4匹とした。上記試験物質の塗布前に、1% sodium dodecylsulfate溶液で耳を前処理した。試験溶液は3日間連続で耳に塗布した後、最終塗布の3日後、耳介リンパ節を取り出し、動物ごとに分け、リンパ節細胞を遊離、³HTdRを加えて培養し、細胞の取り込まれた³HdR(dpm)を測定した。

表7. BALB/cマウスへのovalbumin (OVA)の投与方法

Group	Injection chemical	Volume (μl)	Injection time
1	10 μg OVA + 2 mg Alum in PBS	200	1
2	2 mg Alum in PBS	200	2
3	10 μg OVA + 2 mg Alum in PBS	200	2
4	PBS	250	2
5	5 mg OVA in PBS	250	2

Groups of mice (n=5) were received each volume of test chemical dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) via intraperitoneal (i.p.) injection.

7 days later, the treatment was repeated in Groups 2-5.

Seven days after the final injection, blood and spleen per animal were collected.

表8. OVAを投与したマウスの脾臓重量と相当重量比

Group	Treatment	Body weight (g)	Spleen weight (g)	Spleen/Body (×1000)
1	10 µg OVA + 2 mg Alum, 1 time	N.D.	0.120 ± 0.021	N.D.
2	2 mg Alum, 2 times	20.17 ± 1.09	0.115 ± 0.019	5.70 ± 0.69
3	10 µg OVA + 2 mg Alum, 2 times	20.16 ± 0.67	0.117 ± 0.016	5.80 ± 0.65
4	PBS, 2 times	20.39 ± 0.86	0.097 ± 0.006	4.77 ± 0.34
5	5 mg OVA in PBS, 2 times	20.05 ± 0.66	0.120 ± 0.011 **	6.00 ± 0.50 *

N.D. = not determined.

OVA in PBS-treated group showed significant difference as compared to PBS-treated group

(* p < 0.05, ** p < 0.01).

表9. OVA投与したマウスの脾臓リンパ球の各種mitogenおよびOVAに対する幼若化反応

(a) with adjuvant

Stimulant	³ HTdR incorporation (dpm)	
	Control (Group 2)	OVA (Group 3)
—	510.8 ± 150.1	465.8 ± 108.1
ConA	22761.2 ± 7171.9	27303.7 ± 11392
LPS	16400.9 ± 3649.7	16088.8 ± 3345
PHA	19083.5 ± 4752.7	25537.7 ± 4153
OVA	2147.2 ± 803.7	7269.5 ± 3818 *

(b) without adjuvant

Stimulant	³ HTdR incorporation (dpm)	
	Control (Group 4)	OVA (Group 5)
—	595.4 ± 278.5	882.7 ± 221.2
ConA	34861.9 ± 9356.4	29438.6 ± 5218.6
LPS	13220.0 ± 2147.2	10244.3 ± 1932.4
PHA	17890.9 ± 4027.6	15598.9 ± 721.6
OVA	2699.2 ± 1662.7	5757.1 ± 1427.8 *

Groups of mice (n=5) received OVA or PBS with or without Alum adjuvant by intraperitoneal injection. Same treatment repeated 7 days after. Fourteen days after the initial treatment, mice were killed and spleen cells were corrected. These cells were restimulated with 2 µg/ml Con A, 1 µg/ml LPS, 10 µg/ml PHA or 100 µg/ml OVA at a final concentration at 37°C for 72 h. After incubation, the cells were pulsed for 4 h with ³HTdR, and ³HTdR incorporation was measured. Each value represent the mean±S.D..

* OVA-treated group showed significant difference as compared to control group (p < 0.05).

表10. OVAを投与したマウスの血清総IgE抗体価

Group	Treatment	Total IgE concentration ($\mu\text{g/ml}$, mean \pm S.D.)
1	10 μg OVA·Alum 1 week	1.341 \pm 1.186
2	Alum 2 weeks	0.624 \pm 0.190
3	10 μg OVA·Alum 2 week	3.082 \pm 0.907
4	PBS 2 weeks	0.544 \pm 0.154
5	5 mg OVA·PBS 2 weeks	0.494 \pm 0.192

n = 5.

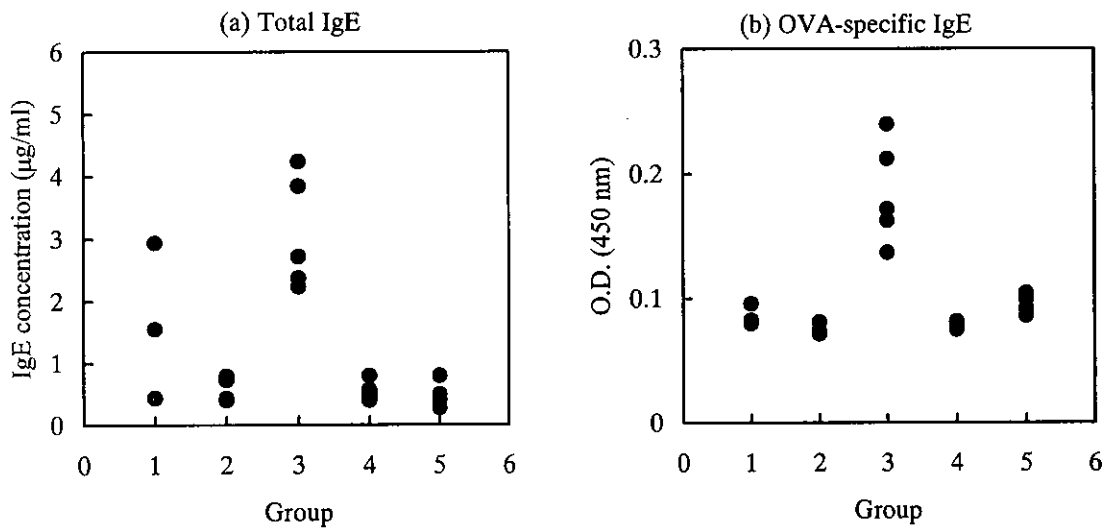


図2. OVAを投与したそれぞれのマウスの血清総IgEおよびOVA特異的IgE抗体価

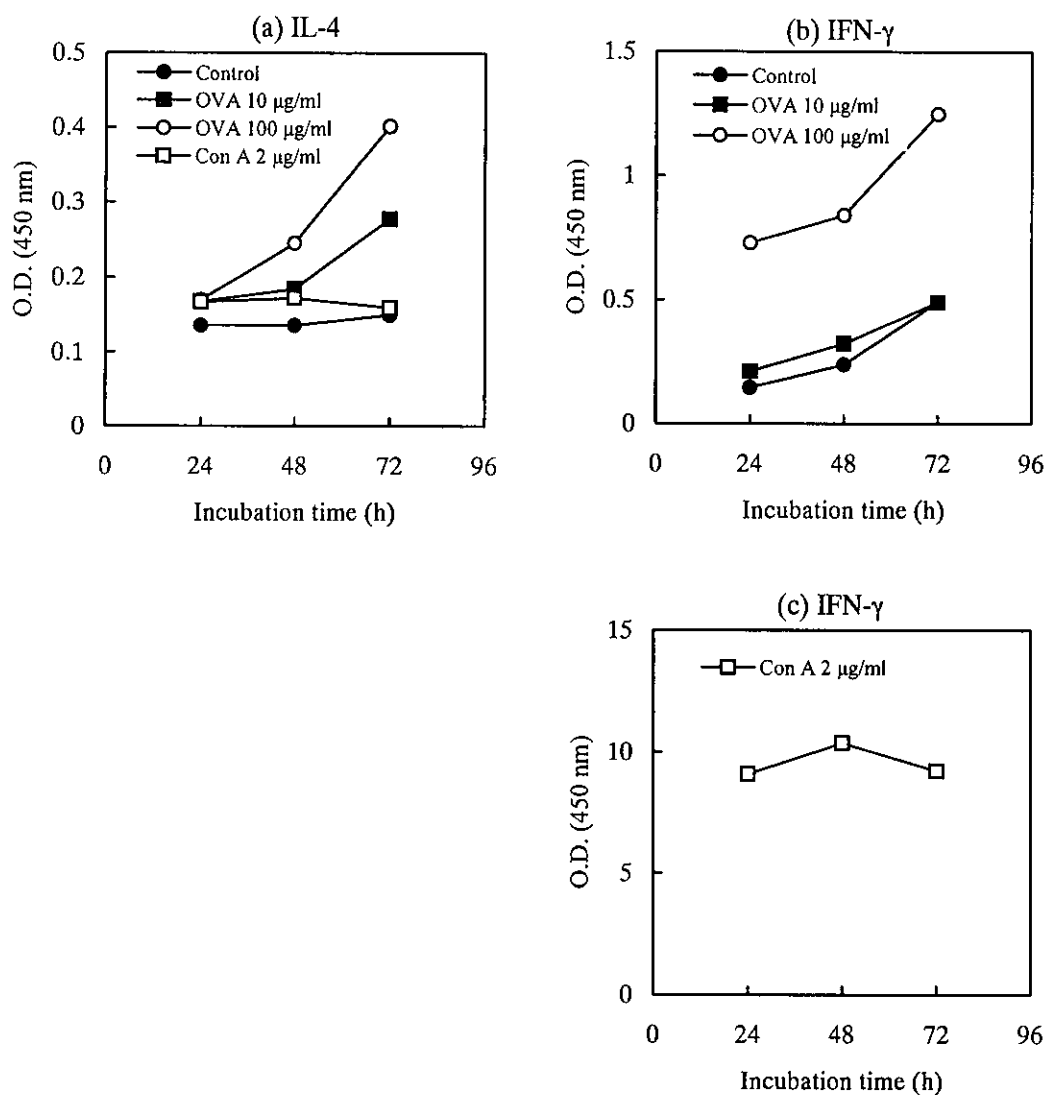


図3. 脾臓リンパ球からのサイトカイン産生パターン

10 μ g OVA + 2 mg Alum in PBS 200 μ lをマウスに1週間に1回、計2回腹腔内注射した(Group 3)。最終投与から7日目、脾臓を取り出しリンパ球を遊離させて、5 \times 10⁶/mlの割合で24穴プレートに入れ、種々の濃度のOVAまたはCon A 2 μ g/mlを添加して、24~72時間培養した。培養上清を遠心して集め、IL-4およびIFN- γ 量をELISA法により定量した。

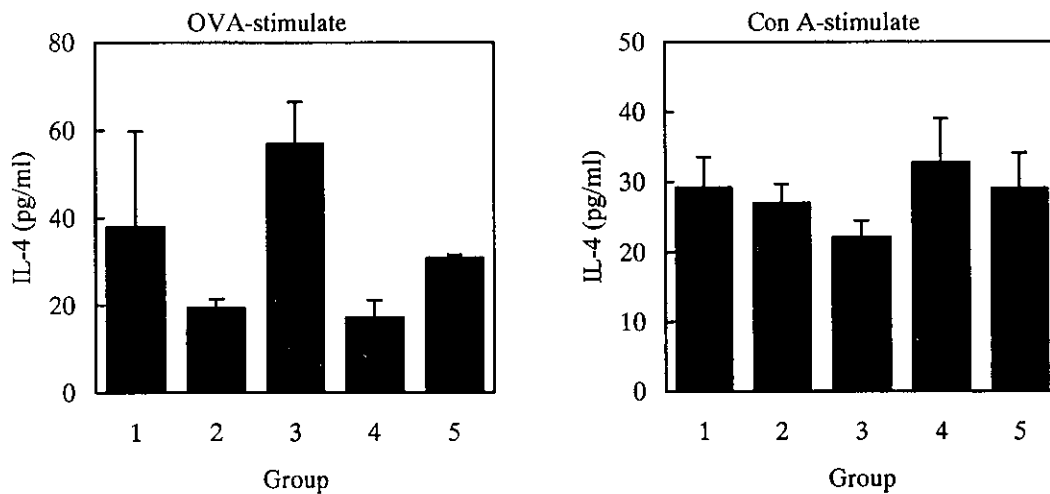


図4. 各種条件でOVAを投与したマウス脾臓リンパ球のOVAまたはCon A刺激によるIL-4産生

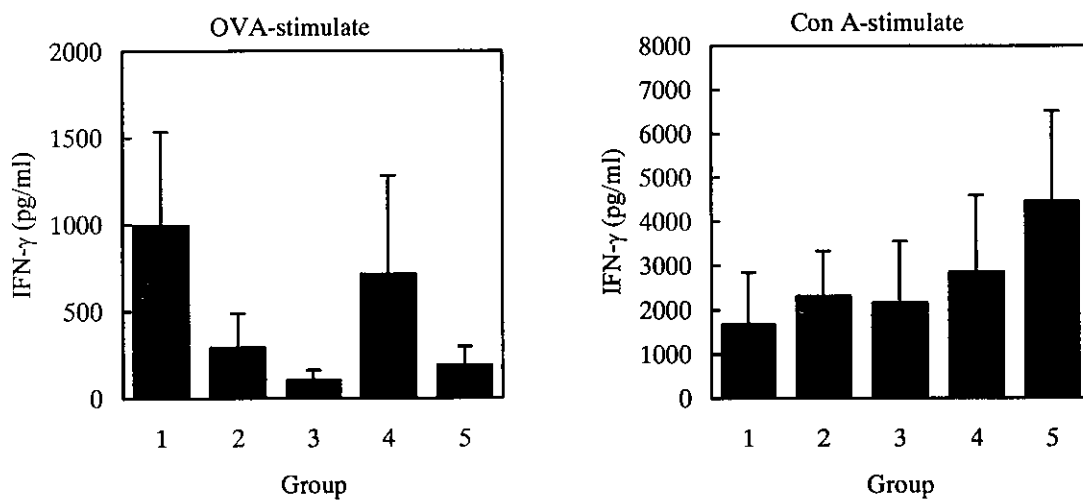


図5. 各種条件でOVAを投与したマウス脾臓リンパ球のOVAまたはCon A刺激によるIFN- γ 産生

厚生科学研究費補助金（医薬安全研究事業）
分担研究報告書

発癌リスク評価手法開発

分担研究者 松岡 厚子 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 主任研究官

研究要旨 メディカルグレードのポリ L-乳酸（MD-PLLA）を
から、粒子を調製し、粒度分布を測定した結果、平均値が
54. μ m のサイズの粒子を調製できた。

A. 研究目的

組織工学に使用される生分解性材料が、マウス細胞で形質転換活性を示すことが、我々の研究で明らかになった。そこで、生分解性材料が化学発癌としての性質を示すのか、あるいは、材料発癌としての性質を示すのかについて明らかにするために、粒子状の生分解性材料を動物に埋植し、インビボでの発癌活性の有無を評価する。そのために、今年度は、メディカルグレードのポリ L-乳酸（MD-PLLA）から粒子を調製し、*in vivo* および *in vitro* 実験用粒子状試料を調製することを目的とした。

B. 研究方法

試料ペレットを凍結粉碎器で、粉末状とした。粒度分布測定は、分析装置として、島津レーザー回折式粒度分布測定装置 SALD-2100 を用いて測定した。

測定方法は、試料をターンテーブルを回転させながら、ターンテーブル上の溝に充填し、その後、試料導入用のバルブを開放して、測定部に試料を噴射し測定した。試料に吸湿性が認められたので、測定は、複数回行ない、凝集と推察される分布が認められたデー

タは、除いた。

C. 研究結果

粉末化した MD-PLLA の粒度分布を測定した結果を図 1 に示した。凝集を認めなかった測定値から粒子の大きさを測定した結果を表 1 にまとめた。粒度分布曲線に関して累積分が 50% になる粒径を示すメディアン径は、61 μ m であった（図 1、表 1）。粒度分布曲線における最大値を示す、即ち、最頻値を示す粒径であるモード径は、83 μ m であった（図 1、表 1）。粒径と個数から計算した平均値は、55 μ m であった。

D. 考察

細胞が直接食食できる大きさではないが、粒子径平均値が 55 μ m の MD-PLLA を調製することができた。この調製試料を EOG 滅菌後、動物への埋食用試料とした。

E. 結論

近年、組織工学用材料や、人工骨として使用されている MD-PLLA の化学発癌の可能性を明らかにするために、粒子状試料を調製した結果、平均粒径 55 μ m の粒子を作製できた。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

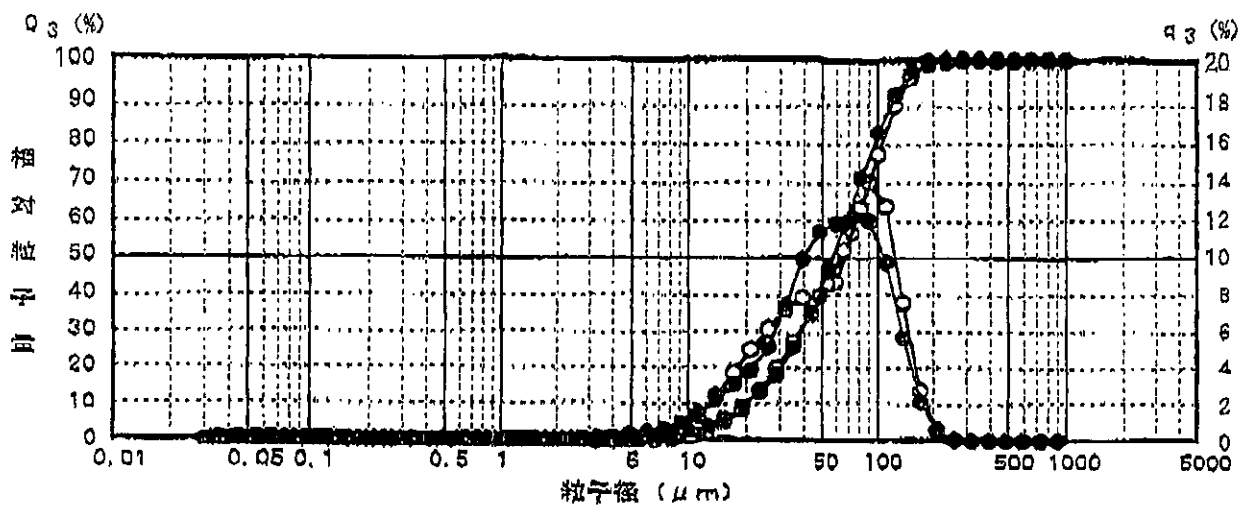


図1 MD-PLLAの粒度分布

表1 MD-PLLAの粒度分布測定結果

	メディアン径	モード径	平均値	標準偏差	10.0%D	50.0%D	90.0%D
1	64.522	91.146	56.227	0.308	20.140	64.522	127.690
2	57.606	74.008	52.805	0.307	20.041	57.606	120.154
平均値	61.064	82.577	54.516	0.3075	20.0905	61.064	123.922

4,4'-ジアミノジフェニルメタン添加ポリウレタンならびにポリ乳酸化粒子の
癌原性評価に関する研究

分担研究者 井上 博之 (財) 食品農医薬品安全性評価センター

新規材料の化学的性質に起因する発癌の可能性が危惧されており、形状に起因する異物発癌なのか化学発癌なのか区別可能な発癌試験を開発する必要性が生じてきた。この研究では社会的ニーズの高い材料の発癌性リスク評価手法を進展させるため、変異原性のある添加剤として知られる4,4'-ジアミノジフェニルメタン(MDA)を含有するポリウレタンフィルムならびにポリ乳酸化粒子(PLLA)をラットに皮下埋植し発生する腫瘍の発生率を検索し化学発癌か異物発癌かを特定する。

A. 研究目的

新規材料の化学的性質に起因する発癌の可能性が危惧されるため、形状に起因する異物発癌なのか化学発癌なのか区別可能な発癌試験を開発する必要がある。変異原性のある添加剤含有材料の臨床への影響を評価する手法を明らかにする。

B. 研究方法

生後4週のWistar [SPF]雄ラットを220匹購入し、14日間馴化後30匹ずつ6群に分け、ポリウレタンフィルム、0.4%MDA添加ポリウレタンフィルム、4%MDA添加ポリウレタンフィルム、ポリ乳酸化粒子0.4g、ポリ乳酸化粒子2gの5種類の材料をそれぞれラット背部皮下に埋植し、対照群には手術処置のみを行い、術後の経過を見るとともに2年間の飼育観察を行う。その間に定期的に体重測定、腫瘍の触診を行う。また、観察期間終了時には血液学検査、血液生化学検査、病理組織学検査を実施する。高濃度MDA添加ならびにPLLA高用量埋植による発癌活性の変化を確認する。(倫理面への配慮)

ラットに対し埋植処置を行い、長期に飼育を行うため、動物実験倫理規定に配慮する。

C. 試験結果

埋植後10週間が経過した。PLLA高用量群(2g埋植群)の5例が、埋植後1および2週に大量の異物投与に起因すると考えられるショック症状を示したため、いずれも切迫解剖した。また埋植後1週からPLLA埋植群のほぼ全例で埋植部位に流動性物質の貯留が観察された。この流動性物質量は埋植量に依存しており、流動性物質貯留はPLLA低用量群で埋植後6週、PLLA高用量群で埋植後8週までに消失した。PLLA埋植群以外では術後の経過がすべて良好であり、いずれの群にも一般状態に異常を示す動物は認められていない。通常、腫瘍は1年を経過した頃から発生がみられるので、慎重な観察を行いたい。

D. 考察

2年の観察期間が終了し、病理組織学検査結果が出てから考察したい。

E. 結論

試験開始後間もないため結論を出す段階ではない。

F. 研究発表

1. 論文発表

試験開始後間もないため研究発表はない。

2. 学会発表

試験開始後間もないため研究発表はない。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

セラミックス関節摩耗試験法開発

分担研究者 池内 健 京都大学再生医科学研究所教授

研究要旨

1. 生理食塩水、牛血清、ヒアルロン酸水溶液中においてセラミック／セラミックの摩耗試験を実施した結果、摩耗量が溶液成分に影響されることがわかった。特にセラミック同士の組み合わせにおいては微小すきま内で液が高いせん断を受けるのでヒアルロン酸やタンパクが摩擦、摩耗を増加させることがわかった。人工関節材料の摩耗試験にはタンパクを含み、置換後の2次関節液に近い成分の牛血清の使用を原則とすべきであると結論した。

2. 人工関節におけるすべり方向の変化をシミュレートするため、すべり方向が連続的に変化する摩耗試験機を開発し、一定方向にすべる従来の摩擦試験機による結果と比較した。アルミナと炭化珪素セラミックを試料として摩耗試験を行った結果、ポリエチレンの場合と異なり、すべり方向の変化はほとんど摩耗量には影響しなかった。しかし、すべり方向が変化しない場合にはアブレーションによる摩耗痕が観察されたのにたいして、すべり方向を変化させた場合には摩耗面は等方的であった。方向すべりの変化によって表面あらさが小さくなるので、人工関節に流体潤滑効果が現われて摩耗が減少する可能性がある。

3. アルミナは低摩耗であるが、強度が低く、ジルコニア／ジルコニアの組み合わせは摩耗が多い。そこでアルミナとジルコニアの組み合わせについて実験を行った結果、ジルコニア同士の場合に比べて摩耗量が1／100以下になり、人工関節として実用可能であることがわかった。またアルミナに集中荷重が加わると脆性破壊から摩耗が進行するが、応力の高い側をジルコニアとすると安全な作動が可能であった。

A. 研究目的

現在、多くの人工関節はポリエチレンを使用しているが、使用後、20年程度で摩耗粉に対して生体反応に続いて骨吸収が生じる結果、ゆるみのために再置換を余儀なくされることが多い。したがって若い患者に置換しても安全に長期間使用できる関節材料が要求されている。Co-Cr-Mo合金を組み合わせた場合には摩耗粉の問題は少ないが、全身に移動する金属イオンの長期的な安全性についてはまだ確認されていない。

一方、アルミナとジルコニアに代表されるセラミックスは体内で安全な材料で

あることが確認されている。アルミナは体内ではほとんど劣化、摩耗しないために人工関節に用いられている。臨床応用される総セラミック人工股関節は全てアルミナ／アルミナの組み合わせである。しかし、アルミナはセラミックのうちでは強度が低いので、脱臼やインピンジメントなどの異常な応力状態ではまれにはあるが破損する可能性がある。一方、ジルコニアは強度が高い安全なセラミックであるが、同種材料を組み合わせた場合には摩耗が著しく高いので、セラミック／セラミック人工関節には用いられていない。

本研究では、安全で強度、耐摩耗性、耐久性の高いセラミック/セラミック人工関節を実現するために新しい摩耗試験機と摩耗試験法を開発することを目的としている。そして次のことを明らかにするために研究を行った。

1. 摩擦試験における潤滑剤の影響

生理食塩水、牛血清、牛血清の水溶液(30%)で摩耗試験を行い、いずれの液が体内における二次関節液中での摩耗を再現できるかを調べる。

2. 摩耗に及ぼすすべり方向変化の影響

ポリエチレンにおいてはすべり方向が変化すると一方向すべりの場合よりも摩耗量が数十倍になるので、股関節の耐摩耗試験では摩擦方向を変化させなければならぬ。そこで、セラミックス同士の摩擦試験においても同様の結果が得られるかどうかを調べるため、すべり方向を変化させて摩耗量と表面粗さを調べる。

3. 異種セラミックを組み合わせた摩耗試験

アルミナセラミックは耐摩耗性が高い反面、割れやすい。そこでアルミナとジルコニアを組み合わせる人工関節が考えられている。そこで、異種材料を組み合わせて摩耗試験を行う場合の摩耗量の計測法と摩耗粉の分析方法について研究する。

B. 研究方法

1. 摩擦試験における潤滑剤の影響について

セラミックの摩耗量に及ぼす潤滑材の影響を調べるために端面型摩耗試験機を用いて摩耗試験を行った。セラミックの試料としてアルミナ、ジルコニア、窒化珪素、炭化珪素を用い、上部の円筒形試料と下部の円板形試料を同種材料で製作し、それらの端面同士を摺動させて摩耗量を測定した。溶液として蒸留水、1%アルブミン水溶液、1%ヒアルロン酸水溶液、30%牛血清水溶液を用いて摩擦係数と摩耗量を比較した。すべり速度は36 mm/s、面圧は2 MPaであった。実験中には水温を37℃に保った。摩耗試験後の重量減から比摩耗量を計算した。

2. 摩耗に及ぼすすべり方向変化の影響
摩耗に及ぼす、すべり方向の影響を調べるために2種類の摩擦試験機を製作した。ひとつは通常のピンオンディスク摩擦試験機で、下部の円板が水槽とともに回転し、上部のアームに取り付けられたピンとの間ですべり運動を生じる。他の試験機の円板は偏心した2個のスラスト軸受で支えられている。下部の軸が回転すると円板は自転をせずに公転運動のみを行う。そのためピンから見れば円板のすべり方向が周期的に変化することになる。2種類の試験機を用いて同一条件下で摩耗試験を実施した。試験溶液として30%牛血清水溶液を37℃に保ったものを用いた。すべり速度は36 mm/s、面圧は2 MPaであった。実験中には水温を37℃に保った。

3. 異種セラミックを組み合わせた摩耗試験

端面型の摩耗試験機を用い、アルミナ製とジルコニア製の試料を組み合わせて30%牛血清水溶液中で摩耗試験を行った。すべり速度は36 mm/s、面圧は2 MPaであった。実験中に水温を37℃に保った。面圧を5 MPa又は10 MPaとし、すべり速度を40 mm/sとした。総すべり距離は10 kmであった。

C. 研究結果

1. 摩擦試験における潤滑剤の影響

(1) 全ての水溶液中での試験において窒化珪素の摩耗量が最大であった。その摩耗面には周期の長いうねりが観察された。蒸留水の場合、試験後の溶液はアルカリ性を示した。

(2) 窒化珪素に次いで比摩耗量が高いのがジルコニアである。特に潤滑効果の乏しい蒸留水中では高い比摩耗量を示している。試験後の摩耗面には周期が短くて鋭い表面あらさが観察された。オージェ分光分析において摩耗痕の周辺部で正方晶から単斜晶への遷移が観測された。

(3) あらゆる溶液中でもっとも比摩耗量が低いのはアルミナであった。試験後にも摩擦面はほとんど変化しなかったが、

表面には多数のくぼみが分布しており、その外周部が欠けて脱落することにより摩耗が生じた。

(4) アルミナについて炭化珪素の比摩耗量が低かった。特に体内環境に近い牛血清水溶液中ではアルミナに匹敵する低比摩耗量を示す。炭化珪素は窒化珪素と同様に非酸化セラミックであるが、窒化珪素ほど激しい反応を生じないので摩耗の劇的な増加は見られない。

2. 摩耗に及ぼすすべり方向変化の影響
摩耗試験後にアルミナと炭化珪素の表面に欠けによる粒子の脱落が観察された。摩耗面の微視的な形状はすべり方向が一定の場合とすべり方向を変化させた場合においてほぼ同一である。また、摩耗粉の大きさや形状もすべり方向変化の影響を受けない。一方、周期の長いうねりに相当する表面形状はすべり方向の変化に影響される。すなわち一定方向すべりの場合には、すべり方向に平行なすじ状の摩耗痕が現われたが、すべり方向を変化させた場合には表面あらさ、うねりの形状には方向性は見られなかった。

3. 異種セラミックを組み合わせた摩耗試験

面圧 5 MPa の試験ではアルミナ/アルミナ、アルミナ/ジルコニアの組み合わせで比摩耗量が低いのにに対し、ジルコニア/ジルコニアを組み合わせた場合には比摩耗量は前者の 100 倍に達する。これよりさらに過酷な面圧 10 MPa における摩耗試験では、アルミナ/アルミナの比摩耗量に変化しないのに対して、アルミナ/ジルコニアの比摩耗量は面圧 5 MPa の比摩耗量の 100 倍にまで上昇する。さらに、ジルコニア/ジルコニアの組み合わせでは比摩耗量は 5 MPa における比摩耗量の 10,000 倍に上昇し、その値はポリエチレンの比摩耗量に匹敵する高いものである。一方、アルミナとジルコニアを組み合わせた場合にはアルミナ側の比摩耗量が同種材料を組み合わせた場合より上昇するのに対してジルコニア側の比摩耗量は低下し、両面の比摩耗量はほぼ同じとなる。ジルコニア/ジルコニア

の組み合わせた場合の摩耗面では表面あらさが大きくなり、激しい凝着のあとが見られる。これに対し、他の組み合わせではすじ状の摩耗痕が観察され、その周辺部には多数のクラック及び剥離痕が存在する。ジルコニア/ジルコニアの組み合わせでは他の場合と摩耗の機構が異なり、応力が高くなると激しい凝着のために比摩耗量が極端に上昇するのに対し、アルミナ/ジルコニアのように異種材料組み合わせでは比摩耗量の上昇は少ない。またアルミナ/アルミナの組み合わせでは荷重が増加しても比摩耗量は上昇しない。

D. 考察

1. 摩擦試験における潤滑剤の影響

窒化珪素は摩擦により水と反応してアンモニアと 2 酸化珪素を生成する。その高い比摩耗量はこのようなトライボケミカル反応のためと考えられる。特に 10 MPa の高荷重下では比摩耗量はポリエチレンとほぼ同じ値にまで上昇するが、生成物(珪酸、アンモニア)は代謝可能であり、ポリエチレンのように蓄積しないので、骨吸収によりゆるみが生じることは無いと思われる。したがって、期間の限られた条件下では窒化珪素/窒化珪素人工関節を使用できるかもしれない。しかし、基本的には窒化珪素は人工関節には向かないと思われる。

一方、ジルコニア同士を組み合わせた場合には、激しい凝着が生じる結果、高い比摩耗量と周期が短くて鋭い表面あらさが生じる。人工関節においては特に良好な潤滑状態を保てる場合に限りてジルコニア/ジルコニアの組み合わせが使用可能である。

アルミナが低比摩耗量である理由は、表面に分布するくぼみの部分に潤滑液を保持してその潤滑効果によって凝着を防止するためである。また摩耗にともなって微量の水和物が生成され、潤滑状態の向上と摩擦の低減をもたらす。このようにアルミナは理想的な耐摩耗性材料であり、人間の寿命を考えると人工関節に用