

高いアルギン酸ナトリウムの場合、0.025-0.05%の濃度でもLPS活性は顕著に不活化されることが判明した。

3-2. 不活化処理に伴う医用材料の性状変化

種々の濃度の酸性電解水、水酸化ナトリウムおよび次亜塩素酸ナトリウム処理によるアルギン酸ナトリウムとコラーゲン自体の性状変化を検討するため、化学処理した両医用材料の絶対分子量を測定し、その結果を図11および図12に示した。図中、上段には分子量情報を示す光散乱光度計のクロマトグラフ、下段には濃度情報に相当する屈折率計のクロマトグラフを示した。また、コラーゲンは酸性電解水および次亜塩素酸ナトリウム処理により濃度依存的に塩酸不溶性物質を生じたため、同不溶物をメンブランフィルター濾過により除去し、塩酸可溶性成分の絶対分子量を測定した。化学処理を施さない対照(H₂O・室温・48時間)のコラーゲンとアルギン酸ナトリウムの分子量は、それぞれ $3.061 \pm 0.1 \times 10^5$ および $4.066 \pm 0.2 \times 10^5$ であったが、両医用材料を0.1%次亜塩素酸ナトリウムに溶解または懸濁した直後に凍結乾燥した場合、処理済み材料中に高分子物質は検出されなくなることが判明した。低濃度の強酸性電解水(pH2.71, 320 ppm)と弱酸性電解水(pH5.98, 278 ppm)を用いて同様に処理(室温・0時間)した場合、光散乱光度計により高分子物質は検出されるが、その濃度は極端に低下する現象が認められた。また、両医用材料を高濃度の水酸化ナトリウム(0.5M)に溶解した直後に中和、凍結乾燥した場合でも同様の分解が生じた。一方、低濃度の水酸化ナトリウム(0.01-0.001M)処理では

材料の分子量が保持される傾向が強くなり、特に0.001M水酸化ナトリウム処理の場合、室温下、48時間まで処理を行っても両材料の分子量は殆ど変化しないことが明らかになった。

D. 考察および結論

LPSはグラム陰性細菌の外膜表層に局在するリポ多糖体であり、基本的に、各種細菌の血清学的特異性を決定するO-特異糖鎖部分、様々な生物活性(発熱活性、マクロファージ活性化能、ショックなど)を発現するリポD部分および両者を結合するコア部分の3つの部位から構成されている(図13)^{1,2}。グラム陰性細菌は、水中(河川水および海水)、大気中、土壤中に広く分布している。それ故、天然由来医用材料は原料自体がグラム陰性細菌により汚染されている可能性があると共に、その製造工程中での混入により、最終製品が同細菌により汚染されることも考えられる。天然由来の医用材料は高い生体適合性を持つため、その用途は広く、血液に直接接触する医療用具やインプラント製品などの構成基材としても多用されている。しかし、LPSは極微量でも様々な生理活性を示すため、これらの製品に使用する天然医用材料の安全性は十分評価される必要がある。

医療用具からのLPS回収は用具の材質により問題を生じる場合がある。例えば、プラスチック製医療用具の場合、LPSがプラスチック表面に非特異的に吸着してしまうため、注射用蒸留水や生理食塩水による抽出では十分な回収率が得られない。この場合、抽出溶媒としてヒト血清アルブミン溶液やPEG溶液を使用すると比較的効率良

く LPS を回収できることが知られている。天然医用材料から製造された各種製品からの LPS 回収においても同様な現象が見られ、特にコラーゲンは LPS との結合親和性が非常に高いため、その回収は困難となる。また、LPS の生物活性は加温処理により顕著に低下することに加え、酸・アルカリに対する安定性や抽出溶媒に対する溶解性などを考慮する必要があるため、医療用具や医用材料からの LPS 回収に適用できる抽出条件はかなり制限されてしまう。現行の「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」の場合、天然医用材料からの LPS 回収は生理食塩水を用いて、室温下、72 時間抽出を行う条件を基本としている。しかし、ガイドライン法によるコラーゲンからの LPS 回収率は LPS レベルおよび菌体レベルともに 1% に達しないことが本研究により明らかとなった。医用材料非存在下の場合、精製 LPS の活性は溶媒の種類により 40℃までの加温に耐えることが確認されているが、菌体レベルのリムルス活性および医用材料存在下における LPS 活性は加温処理に伴い低下する傾向があることが確認された。医療用具や医用材料に LPS 汚染がある場合、そこには遊離 LPS の他、死菌・生菌を問わず必ずグラム陰性細菌が存在することとなる。それ故、医療用具や医用材料から LPS を回収する際は LPS レベルの活性に加え、菌体レベルの LPS 活性も失活させない条件を採用する必要がある。また、リムルス反応を利用したエンドトキシン試験においては比較的多様な溶媒を使用することが可能であるが、ウサギを用いる発熱性物質試験で使用できる溶媒は生理食塩水にほぼ限定される。本研究では、現行

ガイドラインの問題、菌体レベルおよび医用材料存在下での LPS 活性の回収、並びにエンドトキシン試験用試料の発熱性物質試験への転用の可能性を考慮して、医用材料からの LPS 回収条件の最適化を試みた。その結果、コラーゲン製品からの LPS 回収に関しては、試料を裁断し、生理食塩水中でコラゲナーゼ処理を施した後、抽出操作を行うことなく生理食塩水を用いて希釈系列を作製しエンドトキシン試験に供すると、ガイドライン法と比較して飛躍的に LPS 回収率が上昇することが明らかとなった。コラーゲン製品の場合、経験的知見として、トリプシンなどのプロテアーゼを用いて前処理を行った場合、試験した全ての試料から相当量の LPS が検出されることが知られていたが、プロテアーゼの LPS 含有量やリムルス反応に対する影響などは十分評価されていなかった。昨年度の本研究において、これらの事項について検討した結果、試験に供した全てのプロテアーゼには相当量の LPS が混入していると共に、トリプシンはリムルス試験に対して擬陽性を示すことが確認された。これらの成績は、コラーゲンから LPS を回収するためにプロテアーゼを使用して前処理を行う場合、適切なプロテアーゼを選択し、同プロテアーゼに含まれる LPS を除去する必要があることを意味している。そこで、本研究では、前処理用酵素としてコラゲナーゼを選択し、同酵素に含まれる LPS をポリミキシン B 固定化アガロースゲルによるアフィニティークロマトグラフィーにより除去した精製コラゲナーゼを使用した。本前処理法をコラーゲン製品に適用した場合、LPS 陽性と判断される製品に加え、LPS 陰性と評価される製品も

存在したことから、製品へのLPS混入量に応じた判定が可能であることが明らかとなった。一方、アルギン酸製品からのLPS回収は現行のガイドライン法によっても可能であるが、試料を裁断後、前処理としてホモジナイズすることによりLPS回収率が顕著に増加することが確認された。また、アルギン酸製品の場合、ホモジナイズ処理後、室温下での抽出時間の延長に伴い、LPS回収率が上昇する製品(#14)、減少する製品(#13)および抽出時間による影響を受けない製品(#15, #16)が存在することが判明した。この成績は、アルギン酸製品からのLPS回収実験を行う際、各製品によって抽出時間の最適化を行う必要があることを意味している。

種々の天然由来LPSおよび合成リピドAを使用した構造活性相関に関する長年の研究により、LPSが示す生物活性はリピドA部分に存在する脂肪酸の種類、数、分布様式とリン酸基の数に大きく左右されることが明らかになっている¹¹。LPSの生物活性は酸処理およびアルカリ処理により低減させることが可能である。LPSを1%酢酸、100℃、1-2時間加熱処理すると、多糖部分とリピドAを結合しているKDO分子のケトシド結合が切断され(図13)、活性本体であるリピドAが遊離するが、このリピドA分子は水溶性に欠けるため、トリエチルアミンを使用して可溶化しない限り、見かけの生物活性強度は低下する。また、LPSを0.1M塩酸で100℃、15分程度加水分解すると、リピドAが遊離すると共に、リピドAに存在するグリコシド結合型リン酸が解離し、生物活性が減弱される^{1,2}。一方、LPSを0.25M水酸化ナトリウム中、56℃、

30分処理すると、リピドAに存在するエステル結合型脂肪酸が解離することにより、LPSの生物活性はほぼ完全に消失することも知られている^{1,2}。

この他、LPSの不活化法または除去法としては、250℃での加熱処理の他、逆浸透、カチオン性メンブランフィルター濾過、活性炭フィルター濾過およびポリミキシンB固定化アガロースゲルアフィニティクロマトグラフィーなどがあるが、いずれの方法も適用範囲が限られている。そこで、本研究では天然医用材料に混入しているLPSを簡易且つ効率良く不活化する方法を開発するため、酸性電解除菌水を初めとした幾つかの薬剤のLPSに対する不活化効力について検討した。その結果、医用材料存在下において、LPSレベルおよび菌体レベルの活性は酸性電解水、次亜塩素酸ナトリウムおよび水酸化ナトリウム処理により顕著に不活化されることが明らかとなった。しかし、酸性電解水処理、次亜塩素酸ナトリウム処理および高濃度の水酸化ナトリウム処理の場合、医用材料自体の構造も破壊されてしまうことが判明した。一方、0.01-0.001Mの水酸化ナトリウム処理の場合、医用材料の構造を保持した状態で混入するLPSの活性のみを低下させることができる可能性が示された。化学処理によるLPSの不活化は菌体レベルよりもLPSレベルの方が容易であるため、事前に試料をメンブランフィルター濾過し、菌体を除去した後に低濃度のアルカリ処理を施すことにより、混入するLPSを効率良く除去、不活化できるものと思われる。今後、これらの処理を施した各種天然医用材料の生体適合性をin vitroおよびin vivoレベルで検討し、より安全性の

高い製品の開発を試みる。

14年8月30日)。

E. 研究発表

- 1) 長谷川千恵、松田りえ子、林 謙、矢上 健、土屋利江、・島由二。比濁法リムルス試験の分析精度とその保証。日本薬学会第123年会(2003年3月・長崎)。
- 2) ・島由二、長谷川千恵、矢上 健、鳥鷹幸弘、伊藤 博、片倉健男、土屋利江。天然医用材料に混在するエンドトキシンの不活化法の開発。第24回日本生バイオマテリアル化学学会大会(2002年11月・東京)。
- 3) ・島由二、長谷川千恵、矢上 健、伊藤博、片倉健男、田村弘志、土屋利江。天然医用材料からのエンドトキシン回収法の開発。第24回日本生バイオマテリアル化学学会大会(2002年11月・東京)。
- 4) ・島由二、長谷川千恵。FUMI理論によるリムルス試験の精度予測。第75回日本細菌学会総会(2002年4月・神奈川)。
- 5) Haishima Y., Hasegawa C., Yagami T., Tsuchiya T., Matsuda R. and Hayashi Y. Estimation of uncertainty in kinetic colorimetric assay of bacterial endotoxins. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, in press (2003).
- 6) Nakagawa Y., Murai T., Hasegawa C., Hirata M., Tsuchiya T., Yagami T. and Haishima Y. Endotoxin contamination in wound dressings made of natural biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater.*, in press (2003).

F. 特許関係

- 1) 酸性電解除菌水処理によるエンドトキシンの不活化。国立医薬品食品衛生研究所/ダイキン工業(株)共同出願(平成

G. 参照論文

- 1) Rietschel ET, Brade L, Schade U, Seydel U, Zähringer U, Lindner B, Morgan AP, Kulshin VA, Haishima Y, Holst O, Rohrscheide-andrzejewski E, Ulmer AJ, Flad HD, Brade H. Chemical structure and biological activity of lipopolysaccharides. In: Baumgartner JD, Calandra T, Carlet J, editors. *Endotoxin from pathophysiology to therapeutic approaches*. Paris: Flammarion Medicine-Sciences; 1990. p.5-18.
- 2) Rietschel ET, Mayer H, Wollenweber HW, Zähringer U, Lüderitz O, Westphal O, Brade H. Bacterial lipopolysaccharides and their lipid A component. In: Homma JY, Kanegasaki S, Lüderitz O, Shiba T, Westphal O, editors. *Bacterial endotoxin: Chemical, biological and clinical aspects*. 1984. p.11-22.
- 3) Haishima Y, Murai T, Nakagawa Y, Hirata M, Yagami T, Nakamura A. Chemical and biological evaluation of endotoxin contamination on natural rubber latex products. *J Biomed Mater Res* 2001; 55:424-432.
- 4) Nakagawa Y, Murai T, Hasegawa C, Hirata M, Tsuchiya T, Yagami T, Haishima Y. Endotoxin contamination in wound dressings made of natural biomaterials. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)*, 2003; in press.
- 5) 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。厚生省薬務

- 局医療機器開発課監修. 薬事日報社.
(1996).
- 6) Kanoh S, Mochida K and Ogawa Y.
Studies on heat-inactivation of pyrogen
from Escherichia coli. Biken J;13:233-239
(1970).
 - 7) 小川義之, 村井敏美, 川崎浩之進. 医療用具
のエンドトキシン試験法: リムルス試験と発
熱試験の関係. 防菌防ばい;19:561-566
(1991).
 - 8) Westphal O, Luderitz O and Bister F.
Über die Extraction von Bakterien mit
Phenol/Wasser. Z Naturforsch 1952;7b:
148-155.
 - 9) Westphal O and Jann K. Bacterial
lipopolysaccharides. Extraction with
phenol-water and further applications of
the procedure. Methods carbohydra
Chem 1965;5:83-91.
 - 10) 第14改正日本薬局方. 厚生労働省.
 - 11) Zahringer U, Lindner B, Rietschel ET.
Molecular structure of lipid A, the
endotoxic center of bacterial lipopoly-
saccharides. Adv Carbohydr Chem
Biochem 1994;50:211-276

【協力研究者】

長谷川千恵 (国立医薬品食品衛生研究所)
鳥鷹 幸弘 (株式会社ダイキン環境研究所)
田村 弘志 (生化学工業)
創傷被覆材部会

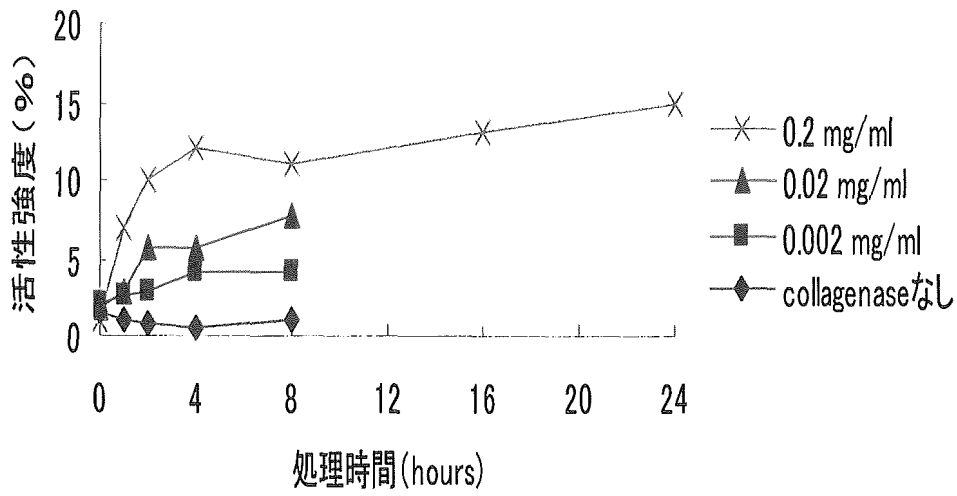


図1. コラゲナーゼ処理条件の検討

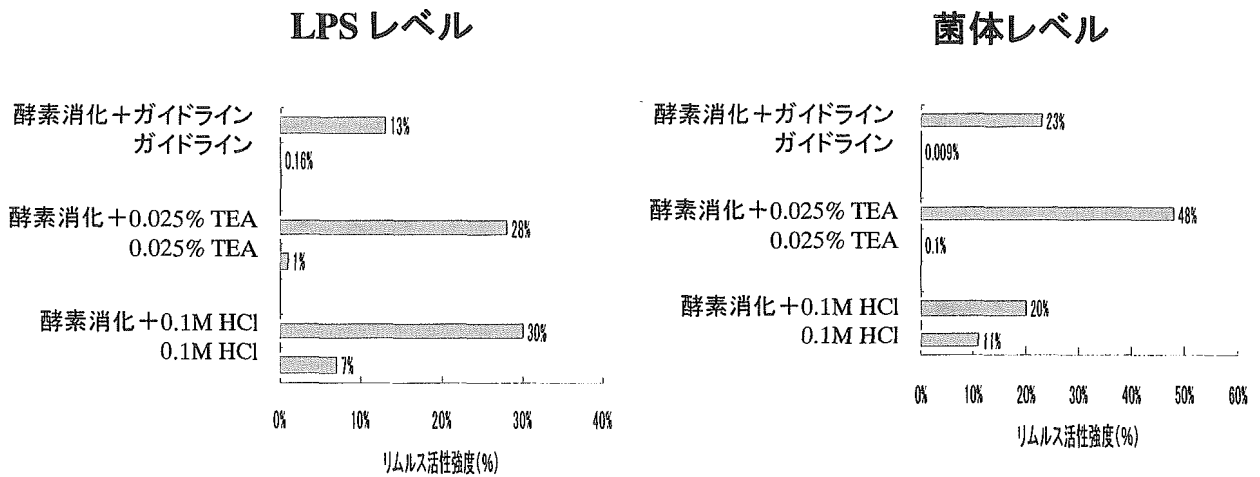


図2. コラーゲンからのエンドトキシン回収 (1)

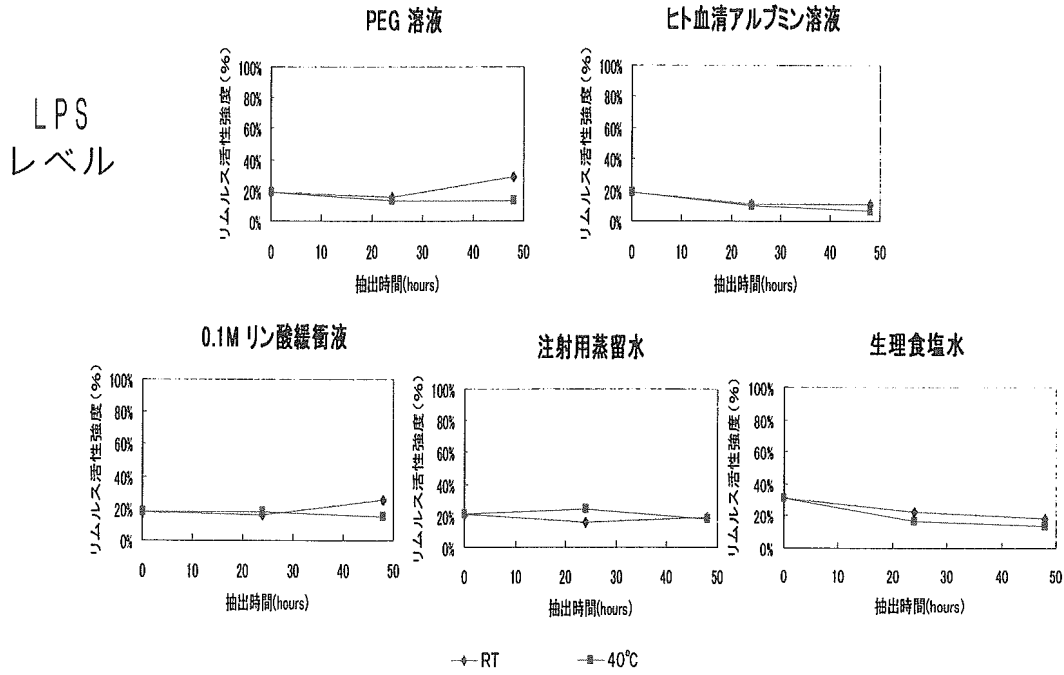


図3. コラーゲンからのエンドトキシン回収 (2)

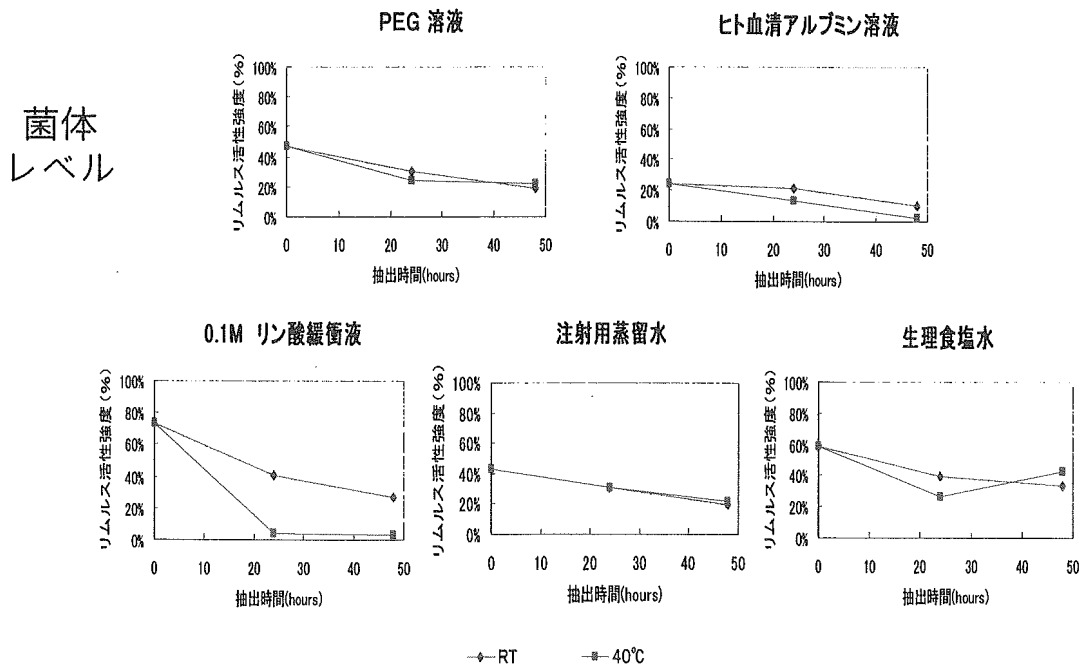


図4. コラーゲンからのエンドトキシン回収 (3)

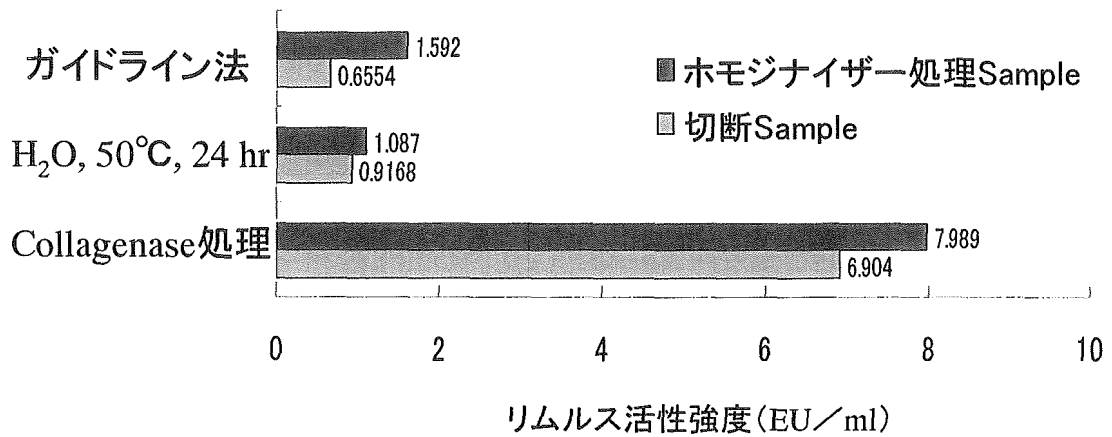


図5. コラーゲンからのエンドトキシン回収に関するホモジナイズ処理の影響

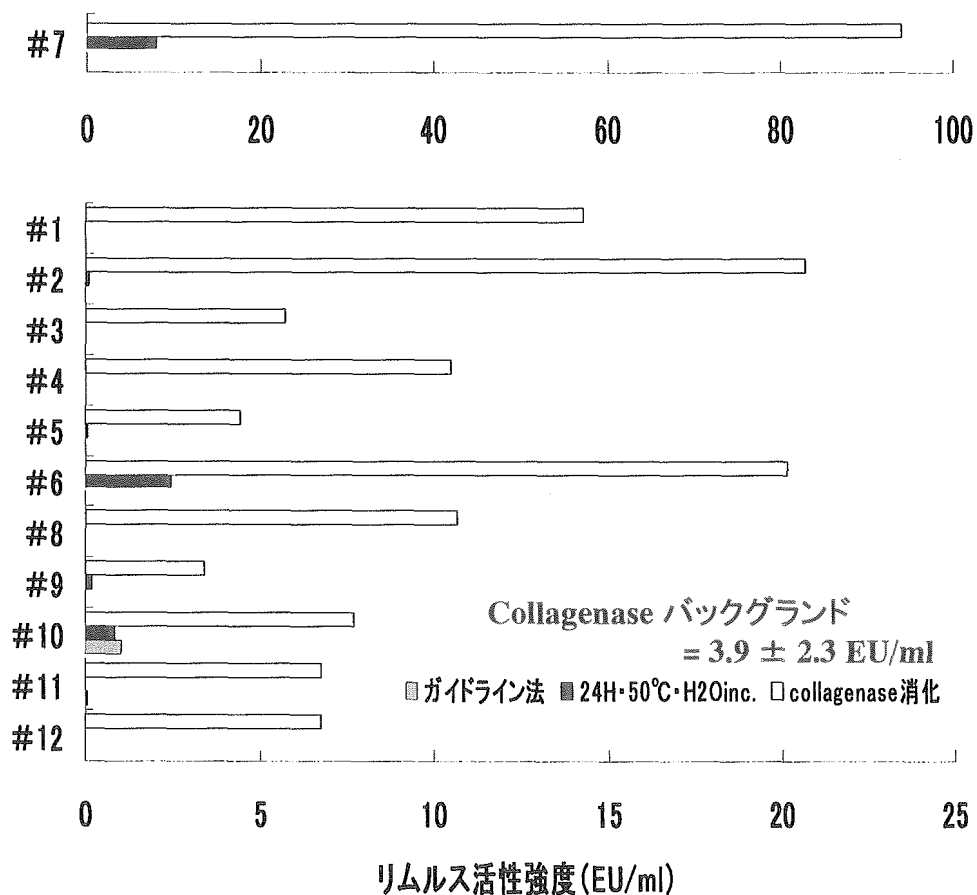


図6. コラーゲン製品からのエンドトキシン回収

LPS
レベル

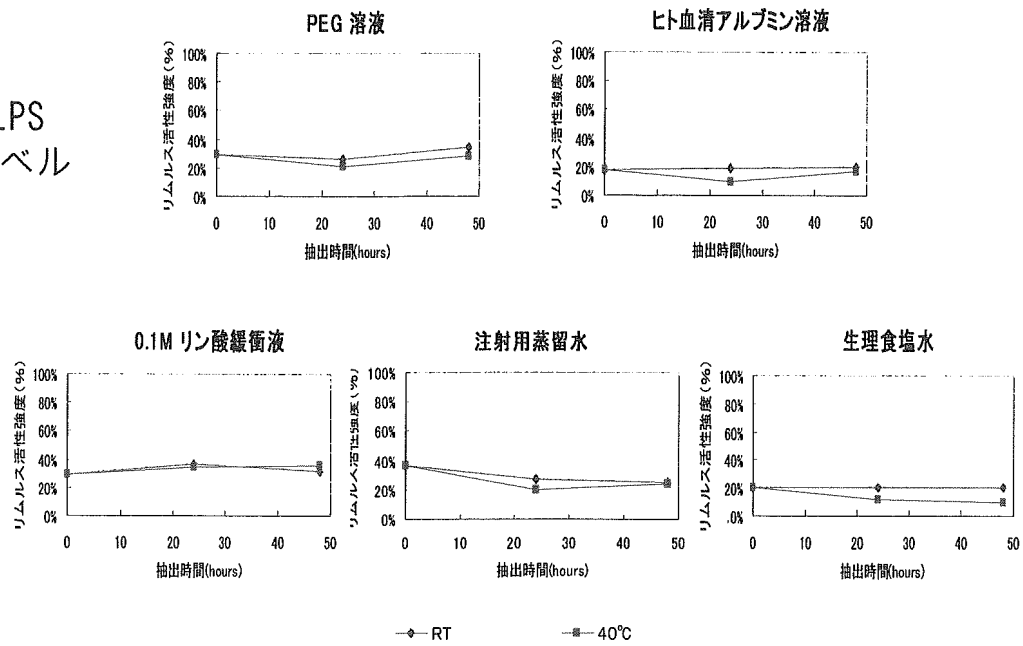


図7. アルギン酸からのエンドトキシン回収 (1)

菌体
レベル

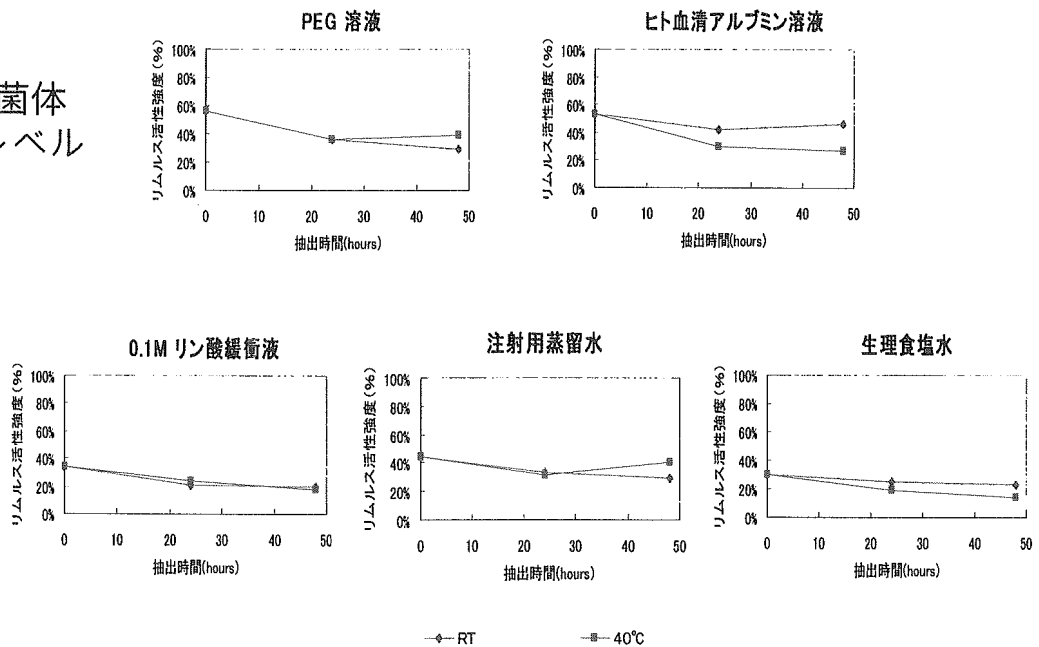


図8. アルギン酸からのエンドトキシン回収 (2)

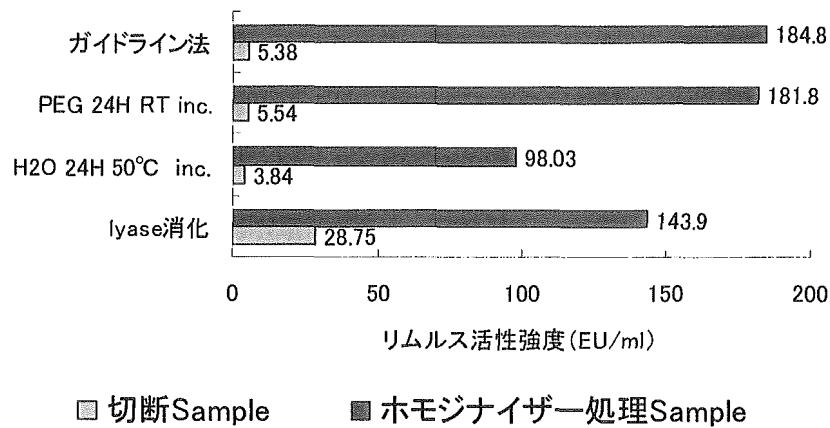


図9. アルギン酸からのエンドトキシン回収に関するホモジナイズ処理の影響

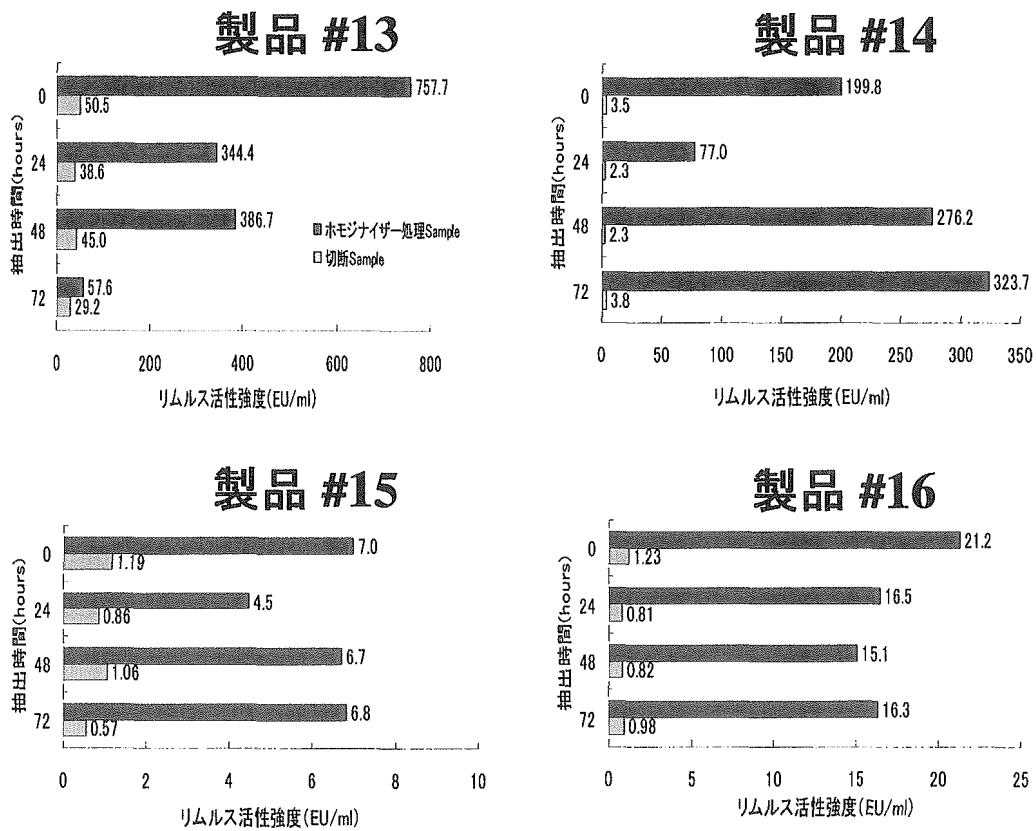


図10. アルギン酸製品からのエンドトキシン回収

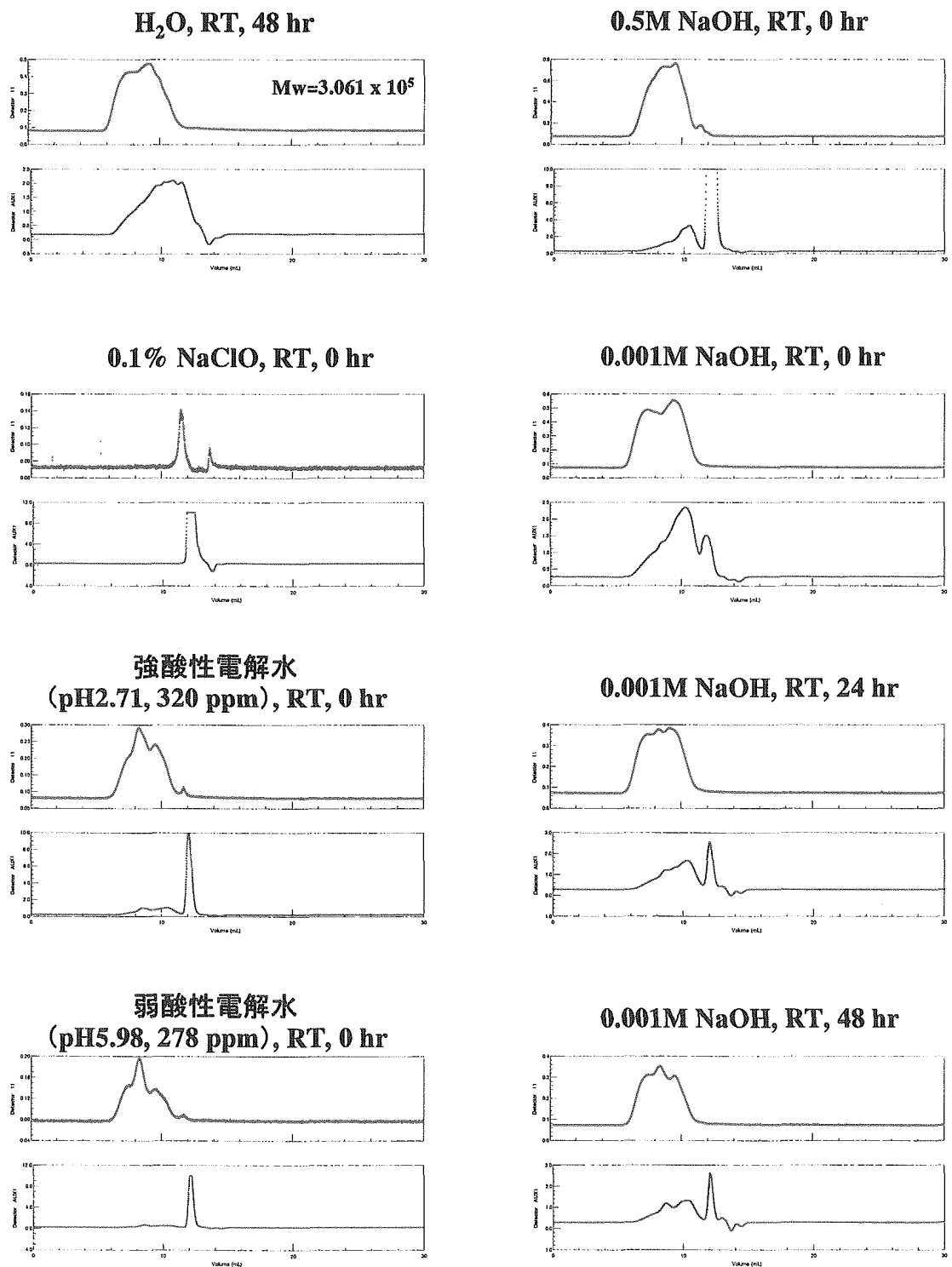


図11. 化学処理によるコラーゲンの分子量変化

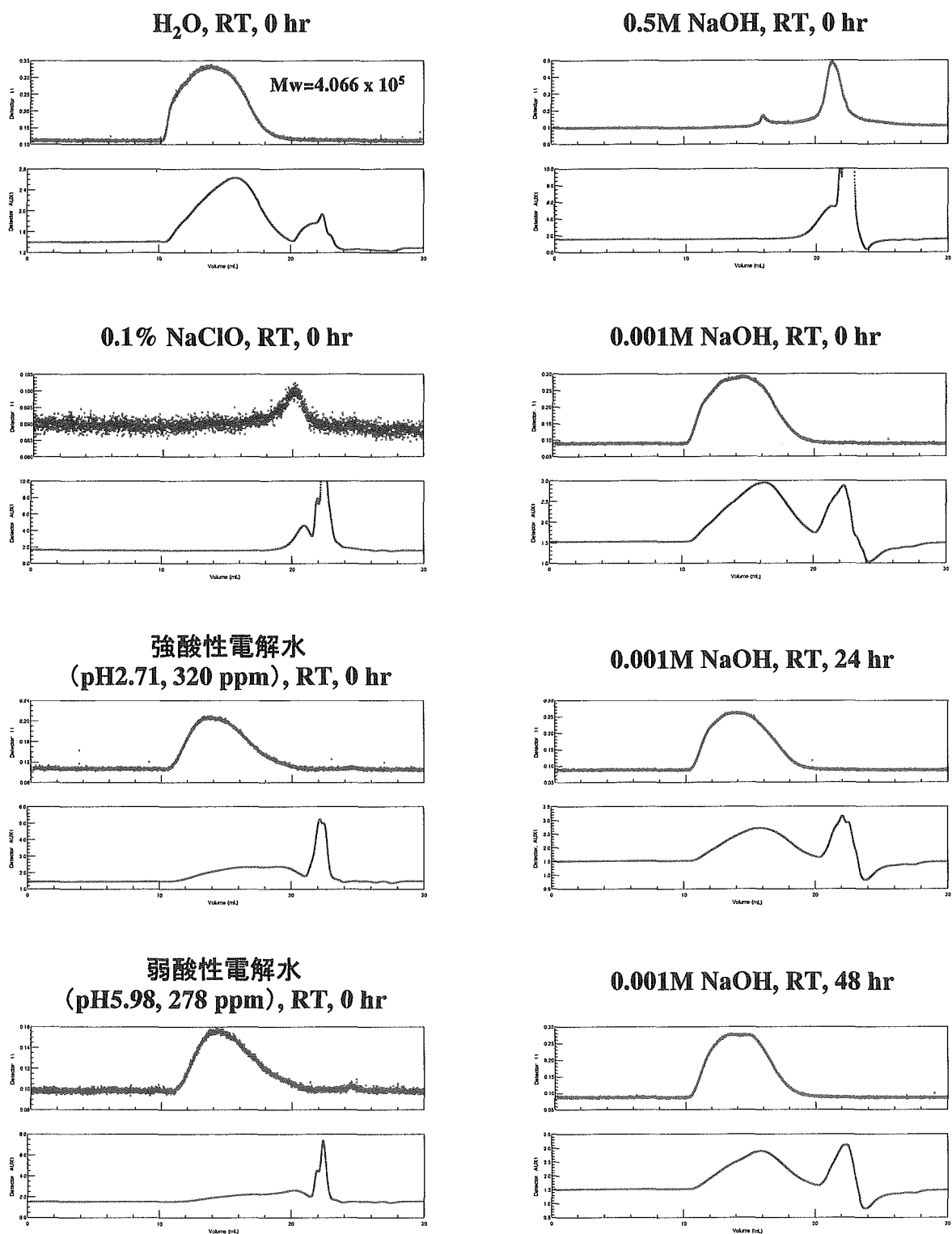


図12. 化学処理によるアルギン酸塩の分子量変化

表1. 各抽出条件におけるコラーゲン製品の性状変化

製品番号	抽出濃度	ガイドライン法	24H・50°C・H2Oinc.	collagenase消化
#1	0.1g/4ml	崩壊	膨潤・粘性あり	崩壊
#2	0.1g/4ml	崩壊	崩壊	溶解・無色透明
#3	0.05g/2ml	崩壊	崩壊	溶解・無色透明
#4	0.1g/4ml	変化なし	変化なし	変化なし
#5	0.1g/4ml	膨潤	膨潤・粘性あり	膨潤
#6	0.05g/2ml	膨潤	溶解・凝固・やや白濁	溶解・無色透明
#7	0.05g/2ml	すこし膨潤	溶解・凝固・やや白濁	ほとんど溶解・やや白濁
#8	0.1ml+4ml	白い物が浮遊	無色透明	無色透明
#9	0.025g/1ml	崩壊・粘性あり・凝固	溶解・凝固・やや白濁	崩壊・粘性あり
#10	0.05g/2ml	変化なし・凝固	変化なし・やや凝固	変化なし
#11	0.1g/4ml	変化なし	変化なし・粘性あり	変化なし
#12	0.05g/2ml	膨潤	膨潤・粘性あり・凝固	膨潤

表2. 化学処理によるリムルス活性の変化

		アルギン酸ナトリウム				コラーゲン			
		LPSレベル		菌体レベル		LPSレベル		菌体レベル	
		EU/ml	回収率(%)	EU/ml	回収率(%)	EU/ml	回収率(%)	EU/ml	回収率(%)
H ₂ O		8203	100	3791	100	1027	100	1178	100
強菌生菌液 ^{*1}	1708 ppm	596	7	1510	40	0.2	0.02	82	7
	341 ppm	3679	45	2222	59	0.3	0.03	639	54
弱菌生菌液 ^{*2}	1484 ppm	1901	23	1267	33	ND.		457	39
	297 ppm	2939	36	2263	60	0.2	0.02	834	71
NaOH	0.5 M	5	0.06	1.6	0.04	ND.	0	0.084	0.01
	0.25 M	2	0.02	3.4	0.09	ND.	0	ND.	0
	0.1 M	2	0.03	2.8	0.07	ND.	0	ND.	0
	0.05 M	2	0.03	4	0.1	0.07	0.01	ND.	0
	0.025 M	5	0.06	13	0.3	0.81	0.08	0.077	0.007
NaOCl	5%	5	0.06	ND.	0	ND.	0	ND.	0
	1%	8	0.09	4	0.1	ND.	0	ND.	0
	0.5%	37	0.5	12	0.3	487.5	47	90	8
	0.1%	320	4	611	16	475.1	46	116	10
	0.05%	415	5	626	17				
	0.025%	669	8	4269	113				
	0.01%	2144	26	1259	33				
0.005%	2923	36	1834	48					

*1: pH2.63 *2: pH5.81

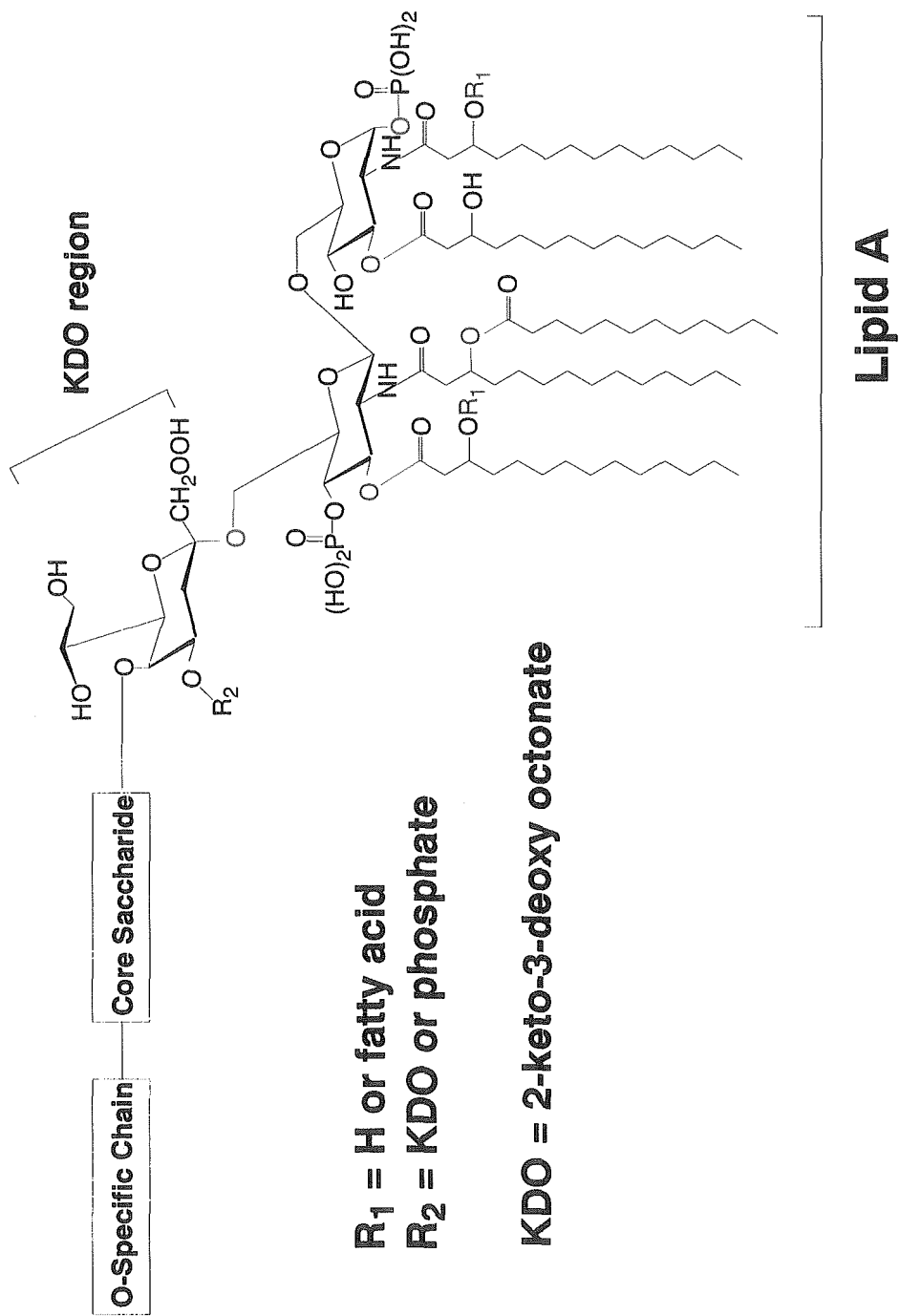


図13. エンドトキシンの一般的化学構造

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

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

医用材料による即時型アレルギーを評価する手法の確立を目的として、試験物質の投与方法の違いによる各種指標の変化について検討した。陽性タンパク質 ovalbumin (OVA) をアジュバントとともに BALB/c 系マウスに腹腔内投与したところ、免疫反応を観察するには 1 回当たり 1~10 μ g 必要であった。マウスの週齢によって反応強度に著しい違いは認めなかったが、ばらつきの点から若齢のものが良いように思われた。性差についても有意な差はなかった。OVA の投与回数を 2 回とし、最終投与から採血までの期間を 1 週間後から 2 週間後にしたところ、血清 IgE 抗体価は上昇した。また、投与回数を 3 回にして最終投与から 1 週間後に同指標を測定したところ、同様に値が増加し、かつばらつきが少なくなった。感作性の判定指標としては、抗原特異的血清 IgE 抗体価の測定が最も確実であるが、総 IgE 抗体価でも十分であった。抗原刺激による脾臓リンパ球の IL-4 産生、IL-10 産生の測定も感作性の評価に有効であった。一方、mitogen 刺激による各種サイトカイン産生は免疫の有無に関係しなかった。幼若化能の測定はアイソトープを使用することから、あえて行う必要はないと考えた。検出法の別法として popliteal lymph node assay (PLNA) について検討した。OVA 及び抗菌剤 cyclohexidine gluconate 溶液をマウスの足蹠に注射し、1 週間後に膝窩リンパ節の重量及び細胞数の増加率を求めた。いずれの物質においても溶媒投与に比べて 2 倍以上の増加があった。しかし、これらの反応がアレルギー反応を表しているのか、感作性強度の点からも不明な点も多く、今後、IgE 抗体試験との比較などが必要と思われた。

A. 研究目的

近年、コラーゲンなど天然材料由来の医療材料、器具も多くなっており、これらに使用されているタンパク質に対するアレルギーの問題に関心が高まっている。これら異種タンパク質の大部分はそのまま多量に接触すれば、強弱の差はあるが即時型アレルギーを起こすと考えられる。最も重篤なものはアナフィラキシーショックである。タンパク質の抗原性試験は、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、*in vitro* の安定性試験などが行われている。医用材料の場合、使用部位によっては代謝を経ずに直接接触するため、食品とは別の面からの安全性評価も必要である。

マウスを用いた即時型アレルギーの試験方法としては皮内反応の観察¹⁾や血清 IgE 抗体価の定量²⁾、さらに薬物アレルギーの分野では popliteal lymph node assay (PLNA)^{3,4)}といった方法が検

討されているが、未だ研究段階で確立した方法はない。医用材料の場合も同様に、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、医用材料のための即時型アレルギー試験法の確立を目的とした。陽性対照タンパク質を用いて種々の条件下でマウスに投与し、即時型アレルギーに関する種々の指標を測定するとともに、材料からの試験溶液の調製法などを決定し、最も感度良く検出できる試験条件を探索する。本年度は、昨年度からの投与方法に関する検討をさらに進めるとともに、PLNA を用いた検討も行った。

B. 研究方法

試薬：タンパクアレルギーは、ovalbumin (OVA, albumin, chicken egg, Grade V, Sigma Chemical, MO, USA) を用いた。薬物アレルギー

を起こす化学物質として、cyclohexidine gluconate (CHG、20%溶液、和光純薬工業)について試験した。アジュバントとして、Alum(aluminum hydroxide hydrate $[Al(OH)_3 \cdot x H_2O]$ gel suspension, LSL Co., Ltd.)を用いた。OVA はリン酸緩衝液(PBS)で、CHGは生理食塩水で希釈して投与した。

動物: BALB/c系マウス(日本 SLC)を用いた。

免疫方法: マウス(1群5匹)に、OVAと Alum 2 mg の PBS 混合溶液 200 μ l を1週間に1回腹腔内に注射し、同様の操作を繰り返した。⁵⁾ 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 を注射した。²⁾ 対照は PBS またはアジュバントだけを注射した。最終投与から7日または14日後、体重を測定した後、心臓から採血し、脾臓を摘出して重量を測定した。

IgE アッセイ: 心臓採血して得た血液を凝固させた後、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^{2,5,6)}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-monoclonal 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。Bovine serum albumin (BSA)を 1%含有する 0.05% Tween20 - Tris-buffered saline (TBS) (BSA-TBS, Sigma Chemical) 300 μ l で、37°C、30分間処理してブロッキングした後、個々の血清を BSA-TBS で 100 倍希釈したもの、または種々の濃度の mouse monoclonal IgE anti-dinitrophenyl (DNP) antibody (clone SPE-7, Sigma Chemical) 標準溶液を 100 μ l 入れて、37°Cで2時間静置した。次に、horseradish peroxidase (HRP)標識した goat anti-mouse IgE (Nordic Immunology, Tilberg, The Netherlands) を BSA-TBS で 2000 倍希釈したものを 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は、プレートを TBS で3回洗浄した。その後、o-phenylenediamine (OPD) peroxidase substrate (Sigma Chemical) 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、450 nm での吸光度を測定した。標準溶液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、プレートに OVA 100 μ g/ml の 0.1 mol/l 炭酸緩衝液(pH 9.6)を 100 μ l 入れて、4°Cで一晩放置してコーティングした後、BSA-TBS 300 μ l でブロッキングした。個々の血清を BSA-TBS で 20 倍希釈したものを 100 μ l ずつ入れて、37°Cで2時間静置した。次に、mouse monoclonal IgE anti-DNP antibody を 1:1000 に BSA-TBS 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。

サイトカインアッセイ: 脾臓を 200 mesh のステンレスメッシュを敷いたプラスチックディッシュに入れ、ハンクス液を加えた後、押しつぶして、細胞を遊離させ、ナイロンメッシュを通して遠心チューブに移し、4°C、1500 rpm で遠心した。上清を捨て、ペレットを溶血処理後、ハンクス液を加えて再度遠心して洗浄後、10%牛胎児血清(FCS)、25 mM HEPES を含有する RPMI 1640 培地(FCS-RPMI)に浮遊させた。コールターカウンターを用いて細胞数を数えた後、 5×10^6 個/ml の濃度に調製した。この細胞浮遊液を 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 48~72 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 、IL-4 および IL-10 濃度を ELISA キット (BioSource International, Inc., Camarillo, CA, USA)により定量した。

幼若化試験: 上述の細胞浮遊液を 200 μ l (5×10^5 個)ずつ 96 穴プレートに入れ、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)、または抗原として OVA 100 μ g/ml を添加して 48 及び 72 時間培養した。⁷⁾ 培養終了4時間前に 3H TdR 0.25 μ Ci を添加して細胞内に取り込まれた 3H TdR 量(dpm)を測定した。また、各種増殖反応測定試薬として alamarBlue (Trek Diagnostic Systems, Inc., USA)または WST-8 (和光純薬工業)を添加し、吸光度の変化を測定した。

Popliteal lymph node assay (PLNA)^{3,4)}: マウスの片方の足蹠(food pad)に 27G 注射針のついた注射筒を用いて試験溶液 50 μ l を注入し、もう一方には溶媒(生理食塩水)を注入して対照とする。投与7日目に頸椎脱臼によりマウスを安楽死させ、膝窩リンパ節を取り出して重量を測定した。金属

メッシュを敷いた 24 穴ディッシュにリンパ節を入れ、少量の FCS-RPMI 培地を加えた後、注射筒のピストン部を用いてつぶし、リンパ節細胞を遊離させた。細胞浮遊液はナイロンメッシュを通して遠心チューブに移し、さらに穴を培養液で洗い、合わせた。4℃、1500 rpm で遠心した後、上清を捨て、適宜希釈してコールターカウンターを用いて、リンパ節 1 個当たりの細胞数を算出した。個体ごとに、試験物質を注射した側のリンパ節の対照側に対するリンパ節重量及び細胞数の増加率を求め、2 倍以上の増加率を示すものを陽性（即時型アレルギーを起こす可能性がある）と判定した。

C. 研究結果

1. 投与量の影響と測定指標の選択

BALB/c 系マウス（雌性、8 週齢）に OVA を Alum アジュバントとともに 1 週間に 1 回の割合で 2 回腹腔内投与し、最終投与 1 週間目に採血および脾臓を採取した。その 1 回当たりの OVA 量を 0.1、1 及び 10 μg と変化させ、各指標に変化があるか検討した。

脾臓重量に関しては、OVA 1 μg 群で Alum 対照群に比べ減少が認められたが、感作反応に相関する物ではなく、偶発的なものと考えた。他の OVA 量に関しては対照群と変化はなかった(表 1)。

脾臓リンパ球幼若化反応を $^3\text{HTdR}$ 取り込み量から求めたところ、Alum 対照群に比べて OVA 投与群ではいずれの濃度でも反応が増加したが、OVA 1 μg ではほぼ一定となり、10 μg でもこれ以上の増加はなかった(表 2)。次に、 $^3\text{HTdR}$ の代わりに alamarBlue や WST-8 などの試薬を用いて幼若化反応を検出することができるかどうか調べた。WST-8 試薬では Con A 刺激による吸光度の上昇は認められるものの、OVA 刺激による差は認めず、alamarBlue についてはほとんど差がなかった(表 3)。

脾臓細胞を Con A で 48 時間、または OVA で 72 時間刺激したときの IL-4 及び IFN- γ サイトカイン産生量を測定した。Con A 刺激ではいずれのサイトカイン産生量も対照群と OVA 投与群とで差はなかった。一方、OVA による IL-4 産生量は OVA 投与量の増加に伴って上昇した(図 1)。

血清 IgE 抗体価は、OVA 0.1 μg 投与群と対照群とで差はなく、総 IgE 抗体は 0.6 $\mu\text{g/ml}$ 程度の濃度であったが、1 μg 以上投与すると 1.4 $\mu\text{g/ml}$

と上昇が認められた。OVA 特異的 IgE 抗体に関しては、10 $\mu\text{g/ml}$ 投与群で吸光度が 4 倍程度になった(図 2)。総 IgE と特異的 IgE 抗体価との間では OVA 投与量によって若干差が認められた。

本 IgE アッセイが化学物質のアレルギー性についても検出できるかどうか検討した。医用材料に関するものとして、殺菌剤として含有させた cyclohexidine gluconate (CHG) によるアナフィラキシーショックが報告されていることから、⁸⁾ これを試験物質とした。CHG を生理食塩水で希釈し、Alum と混合して、マウスの腹腔内に 2 回投与した。CHG の投与量を 2000 μg としたところ半数が死亡することから、200 μg を最高量とした。脾臓重量に CHG による増加傾向は認めなかった。血清総 IgE 抗体価は Alum 群と CHG 群とで差は認められず(平均 0.44 $\mu\text{g/ml}$ 及び 0.37 $\mu\text{g/ml}$)、本方法では CHG の感作性を検出できなかった(図 3)。

2. マウスの週齢による変化

8 及び 34 週齢の雌性マウス（1 群 5 匹）に対して、Alum または OVA 10 μg を 2 回投与し、最終投与後 7 日目に採血し、脾臓を採取した。

週齢が高くなると体重も重くなるため脾臓の体重重量比は若年齢のものより小さい値であった。幼若化反応については、老齢群は若齢群に比べて Control 値が高かったが(表 4)、各 mitogen に対してはいずれも良好に反応した(表 5)。

血清 IgE 抗体値は、若齢よりも老齢のマウスの方が Alum 又は OVA 投与群とも高い値を示した。しかし、総 IgE 抗体値を測定したときに、老齢 Alum 群の 1 匹に高い値を示すものがあり、バラツキが見られた(図 4)。

3. 投与方法の改良による検出感度の向上

Alum アジュバントを使用する投与方法には生理的条件でないとの批判もある。そこで、アジュバントを用いずに、試験物質の投与回数の増加や試験期間を変化させるなどすることによってアレルギーを検出できるかどうか検討した(図 5)。脾臓重量は 4 回繰り返して投与すると増加した。脾臓細胞の OVA 刺激による IL-4 産生は増加し、アジュバントとともに投与した時と同様の变化を示したが、IFN- γ 産生も増加し、これはアジュバントと投与した場合には低下したのと対照的であった(表 6)。アジュバントを共存させずに OVA を繰り返し投与した場合、総血清 IgE 値の上昇はわずかであるが、OVA 特異的 IgE 抗体値は溶媒投与し

た場合に比べ2倍程度増加した。しかし、アジュバントとともに投与したときの増加率に比べて低値であった(図6)。

次に、これまでのアジュバントを用いた方法でさらなる検出感度の向上をめざし、先と同様の検討を加えた。すなわち、OVAを週1回で2回投与後2週間目に解剖する試験群、OVAを3回投与して1週間後に解剖する試験群をそれぞれ設定し、これまでの2回投与して1週間後に解剖する試験群との反応性を比較した(図7)。

脾臓重量に関しては群間で明確な差は認めなかった(表7)。血清IgE抗体価については、従来法に比べていずれも高い値を示し、対照群と有意な差を生じた。また、2回投与群より3回投与群の方が、総IgE、OVA特異的IgE抗体値とも群内でのバラツキが少なかった(図8)。脾臓細胞のIL-4産生はどの投与方法でも高い値を示したが、3回投与した群で最も高値を示した。投与後2週間後に採取したものでは、同じ2回投与で1週間後に採取した群よりも低値しか示さず、このサイトカイン産生には最終投与から解剖採取までの期間が影響した(表8)。IFN- γ については、これまで同様、OVA投与との明らかな関係は認めなかったが、IL-10産生量はOVA投与により増加し、その傾向はIL-4とよく一致した。

4. 性差の影響

先に設定された条件で各性のマウス、1群5匹を処理し、脾臓重量、血清IgE抗体値を比較した。脾臓体重比については、雄性マウスの方が体重が重いため低い値を示した。総血清IgE抗体値は、雄に比べて雌の方がバラツキは少なく、わずかに高い値を示す(図9)。一方、OVA特異的IgEは逆に雄の方が高かった。

5. PLNA法による検討

BALB/c系マウス(雌性、7週齢)の足蹠にOVAを0.02~0.2mg投与した。その結果、OVA投与量依存的にリンパ節重量の増加と細胞数の増加が認められた。Indexが2以上を示すOVA量は2mgであった(表9)。

次に、CHG溶液を生理食塩水で0.4%に希釈し、50 μ l(CHG量0.2mg)を投与したところ、リンパ節の重量が生理食塩水を注射した対照リンパ節側に比べ3.8倍になった。細胞数についても同様に著しい増加(7.4倍)が認められた(表10)。

D. 考察

昨年度は比較的短期間に即時型アレルギーを検出できるように検討した結果、試験物質はアジュバントとともに2回投与し、1週間後にIgE抗体価などで判定するのが良いとした。一般的に抗原を長期間に渡って複数回投与した方が確実に感作が成立すると考えられる。また、長期間に渡る方法では、アジュバントを用いず生理的な条件でアレルギーを投与することでも感作が成立することが報告されている。⁹⁾今年度はこれをもとに、投与方法による違い、濃度や採取時期などについて、さらに検討を加えた。

OVAをアジュバントとともに腹腔内投与した場合、免疫反応を観察できる量は1~10 μ gであった。アジュバントを用いずとも繰り返し投与することにより対照群との差は認められるが、OVAのような典型的なアレルギーでさえ数mgの量を多回投与することが必要で、得られる反応レベルも低い。実際、医用材料から多量のタンパクアレルギーが溶出することはなく、高濃度の試験溶液を調製することは困難である。よって、以後、試験物質はアジュバントとともに投与方法とした。

試験に供するマウスの週齢の影響を調べたが、加齢による低下や年齢による反応強度に差はなかった。しかし、老齢群でのバラツキが若干多いことから、10週齢までの若齢マウスを用いるのが適当と思われた。一般的に感作性試験では雌性の動物が用いられている。この理由にはモルモット試験¹⁰⁾での経験が関係していると思われる。すなわち、皮膚反応で判定する上で、雌の皮膚状態が良いこと、雌の方がおとなしく扱いやすいことが上げられる。後述する条件になるが性差について検討した。総血清IgE抗体値は雌雄でわずかに差が認められたが、今回は、1群当たりの個体数が少なく明確に判定することは困難であった。したがって、試験する際にどちらかに統一すればよいと思われる。

検出感度をさらに高めるため、投与回数と解剖時期について検討した。これまで最終投与から1週間後に採血し測定していたが、⁹⁾採取時期を2週間後にした例も報告されている。¹¹⁾そこで、2回投与2週間後に解剖という方法を1つ、3回投与して1週間後に解剖するという計2つの試験方法を新たに設け、これらの結果を比較した。

脾臓重量に関してはアレルギーを検出するのに十分ではなく、幼若化反応もアイソトープを使用

し実施場所が制限される問題があり WST-8 などの試薬が $^3\text{HTdR}$ の代替としては感度が不十分であることから、あえてこれを測定する必要はないと判断した。

OVA 刺激による IL-4 産生は、3 回投与後 1 週間目に解剖した群で最も高い値を示した。投与後 2 週間後に解剖したものでは、同じ 2 回投与で 1 週間後に解剖した群よりも低い値しかとらず、投与から脾臓採取までの期間が影響した。IL-10 も IL-4 と同様に液性免疫に関与することが知られているが、¹²⁾ その産生傾向は IL-4 と良く一致した。CD4⁺ T helper(Th)細胞は Th1 と Th2 の 2 つのグループに分けられ、Th1 サイトカイン IFN- γ は IgE 抗体産生を抑制し、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。したがって、IL-4 が優勢なら Th2 優勢の状態に傾くと考えられる。¹²⁾ 気道アレルギーを起こす trimellitic anhydride (TMA)などをマウスに投与すると、IgE 抗体値が増加し、IL-4 や IL-10 の産生が増加することが報告されている。¹³⁾ 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。

血清総 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が、時に総 IgE 抗体価は高いものの特異的 IgE 抗体価はそれほど高くない場合もある。血清総 IgE 抗体価は OVA を 1 μg 以上投与すると上昇が認められる。一方、OVA 特異的 IgE 抗体に関しては、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で対照群と差が生じる。この原因として、少量のアレルゲンに対してまず IgE 全体のレベルが上がり、その後に特異的なものが出てくるためではないかと考えている。投与回数や解剖までの期間を変更した結果、従来法に比べていずれも血清 IgE 抗体価のさらなる上昇を認めた。また、平均値ではほぼ同程度であったが、2 回投与群より 3 回投与群の方が群内でのバラツキが少なかった。

以上の結果から、腹腔内注射を用いた最終的な評価は、試験物質 (1 μg 以上) を Alum アジュバントとともに週 1 回の割合で 3 回投与した後、1 週間後に採血、解剖して脾臓を摘出する。感作性の判定は、血清中の総 IgE および抗原特異的 IgE 抗体価、脾臓からの抗原特異的刺激による IL-4 または IL-10 サイトカイン産生を指標とすることとした。ただ、医用材料の場合、溶出する抗原の

種類については不明なときがほとんどである可能性が高いので、実際には血清中の総 IgE 抗体価を測定するのが適切であると思われる。タンパクアレルゲンの種類によって、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。¹⁴⁾ 次年度は、医用材料へ応用するための抽出条件などについても検討し、これら実際の抽出物、並びに種々のタンパクについて試験を行う。

PLNA は自己免疫、アレルギーを誘発する多くの化学物質がマウスの足蹠皮下へ投与することによって、膝窩リンパ節細胞数の増加を起こすことを利用している。^{3,4)} 投与が 1 回で短期間に結果が得られる簡便性から、薬物アレルギーの試験法として検討されている。¹⁵⁾ 今回は、本試験がタンパクアレルゲンへの応用が可能かどうか検討した。OVA の投与量依存的に膝窩リンパ節重量の増加と細胞数の増加が認められた。次に、CHG について検討したところ、0.2 mg で著しい重量と細胞数の増加が起こった。しかし、CHG のアレルギーについてはごくまれで、OVA に比べて強度も強いとは考えられない。CHG を 2 回腹腔内投与したとき IgE 抗体価は起こらなかった。このように、PLNA はアレルギーの実態数以上に高い判定値を示している可能性やこれらの反応が必ずしもアレルギー反応を表していない可能性がある。今後、他のタンパクアレルゲン、薬物アレルギーを起こす物質などいくつか試験をし、IgE 試験との比較が必要である。また、PLNA では多量の試験試料が必要となることから、実際の医用材料からの抽出物量との結果を合わせて試験方法を開発することが重要であろう。

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。陽性タンパク質 OVA をアジュバントとともに BALB/c 系マウスに腹腔内投与し、免疫反応を観察するには 1 回当たりの投与量は 1 μg 、明らかに検出するには 10 μg 以上必要であった。マウスの週齢や性別によって反応強度に著しい違いは認めなかったが、ばらつきの点から 10 週齢までの若齢のものがよいように思われた。試験物質の投与は週 1 回の割合で 3 回行い、1 週間後に解剖して測定したところ、各指標ともばらつきが少なく、対照群と大きな差が認められた。測定指標については、抗原特異的血清 IgE 抗体価が最も対照との差も出る

が、総 IgE 抗体価でも十分と考えられた。抗原刺激による脾臓リンパ球の IL-4 産生及び IL-10 産生の測定も有効であった。一方、mitogen 刺激による各種サイトカイン産生は免疫の有無に関係しなかった。幼若化反応の測定はアイソトープを使用すること、またその代替試薬の感度が十分でないことから必要ないと思われた。医用材料の場合、溶出する抗原の種類については不明なことがほとんどである可能性が高いので、実際には血清中の総 IgE 抗体価を測定するのが適切であると思われる。一方で、即時型アレルギーの検出法として薬剤の分野で適用されつつある PLNA を検討した。マウスの足に注射し、1 週間後に膝窩リンパ節細胞数の増加率を求めた。OVA は溶媒投与に比べて 2 倍以上の増加があった。しかし、PLNA では多量の試験試料が必要となること、また、CHG のような化学物質に関しては、アレルギーの実態数以上に高い判定値を示すことから、これらの反応が必ずしもアレルギー反応を表していない可能性があり、今後、IgE 試験との比較など検討が必要である。

6. 参考文献

1. 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2000，金原出版，p.236-238 (2000)
2. Hilton, J., Dearman, R.J., Basketter, D.A., Kimber, I. *Toxicol. Lett.*, 73, 43-53 (1994).
3. Kammuler, M.E., Thomas, C., De Bakker, J.M., Bloksma, N., Seinen, W., *Int. J. Immunopharm.* 11, 293-300 (1989).
4. Bloksma, N., Kubicka-Muranyi, M., Schuppe, H.-C., Gleichmann, E., Gleichmann, H. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 369-396 (1995).
5. Akiyama, H., Hoshino, K., Tokuzumi, M., Teshima, R., Mori, H., Inakuma, T., Ishiguro, Y., Goda, Y., Sawada, J., Toyoda, M. *Biol. Pharm. Bull.*, 22, 551-555 (1999).
6. Teshima, R., Kawase, M., Tanaka, T., Hirai, K., Sato, M., Sawada, J., Ikebuchi, H., Ichinoe M., Terao, T. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1618-1622 (1990).
7. Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Nakamura, A., Beppu, M., Kikugawa, K. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 44, 225-236 (1998).
8. <http://www1.mhlw.go.jp/houdou/0908/h0814-2.html>
9. Akiyama, H., Teshima, R., Sakushima, J., Okunuki, H., Goda, Y., Sawada, J., Toyoda, M. *Immunol. Lett.*, 78, 1-5 (2001).
10. Magnusson, B., Kligman, A.M. *J. Invest. Dermatol.*, 52, 268-276 (1969).
11. Hilton, J., Dearman, R.J., Sattar, N., Basketter, D.A., Kimber, I. *Fd. Chem. Toxicol.*, 35, 1209-1218 (1997).
12. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L. *J. Immunol.*, 136, 2348-2357 (1986).
13. Dearman, R.J., Basketter, D.A., Kimber, I. *Immunology*, 86, 545-550 (1995).
14. Dearman, R.J., Caddick, H., Basketter, D.A., Kimber, I. *Fd. Chem. Toxicol.*, 38, 351-360 (2000).
15. Aida, T., Kimura, T., Ishikawa, N., Shinkai, K. *J. Toxicol. Sci.* 23, 425-432 (1998).

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

五十嵐良明、鹿庭正昭、土屋利江：第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会(2002.6)
 五十嵐良明、鹿庭正昭、土屋利江：第 24 回日本バイオマテリアル学会大会(2002.11)