

normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: comparison with cytotoxicity to fibroblast L929 and V79 cells. Mater. Trans., 43:3155-3159 (2202).

- 11) Zahringer U, Lindner B, Rietschel ET. Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. Adv Carbohydr Chem Biochem 1994;50:211-276

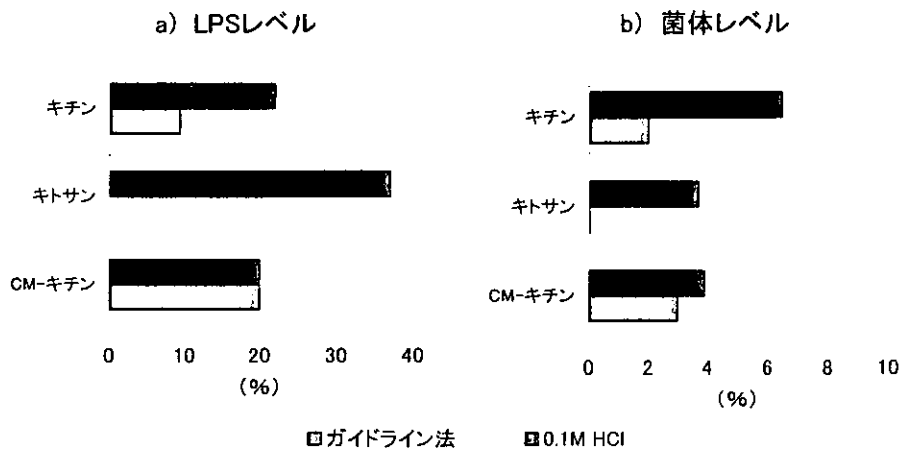


図1 エンドトキシン回収条件の検討

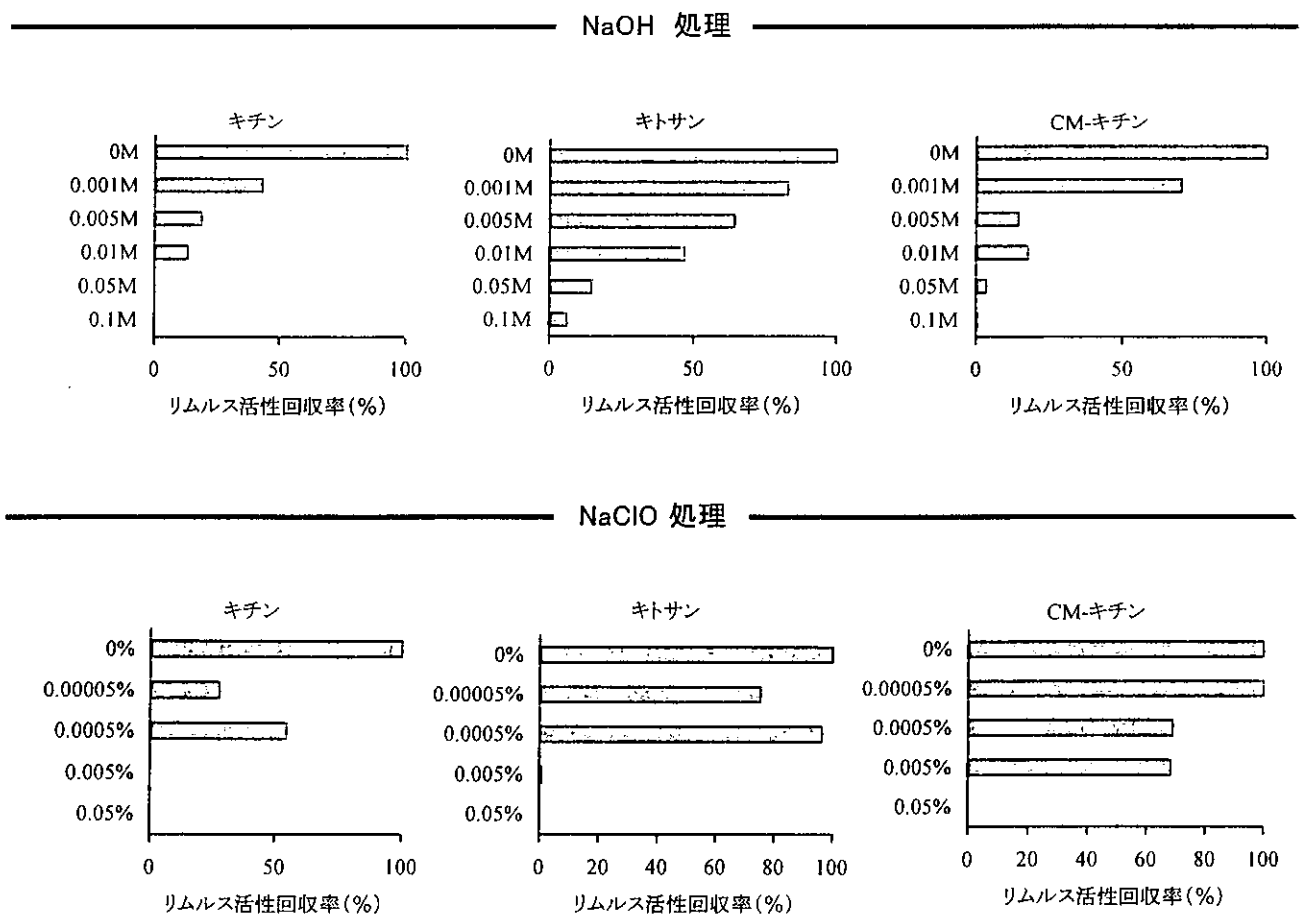
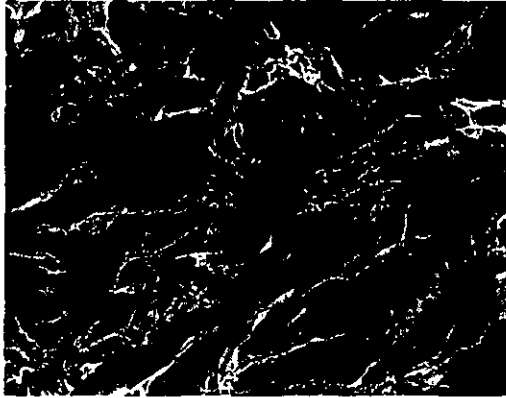
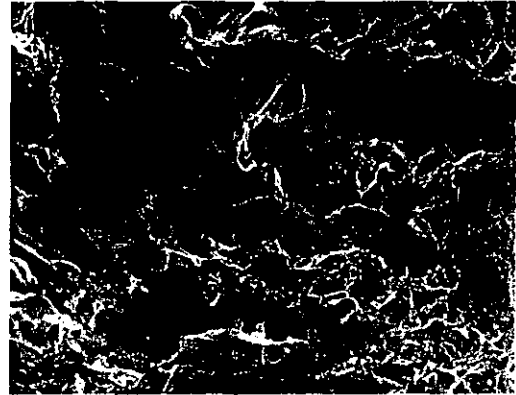


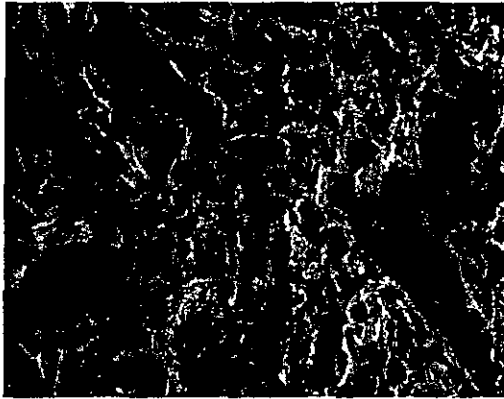
図2 LPS不活化条件の検索



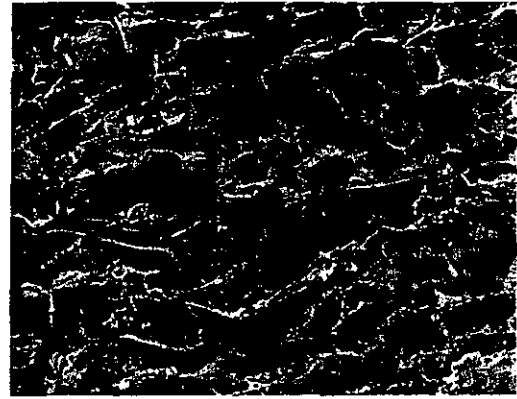
未処理



NaOH 0.1M 処理



NaOH 0.01M 処理

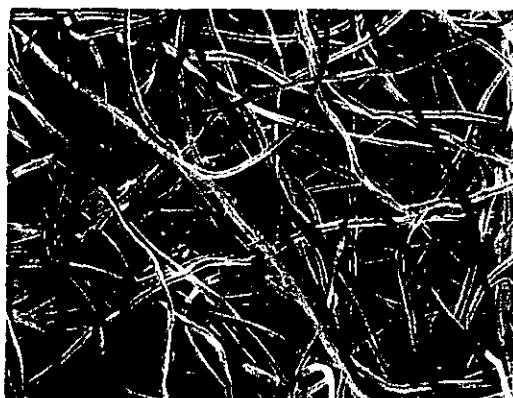


NaOH 0.005M 処理

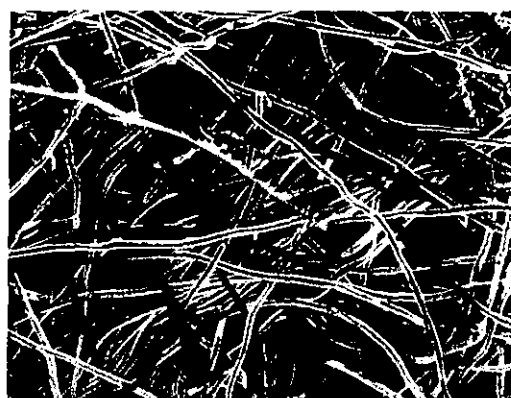


NaClO 0.5% 処理

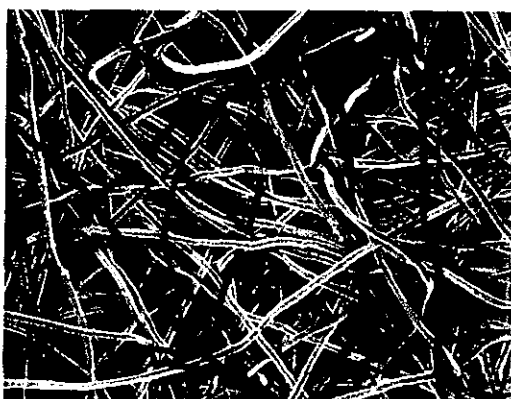
図 4 コラーゲンスポンジのSEM画像



未処理



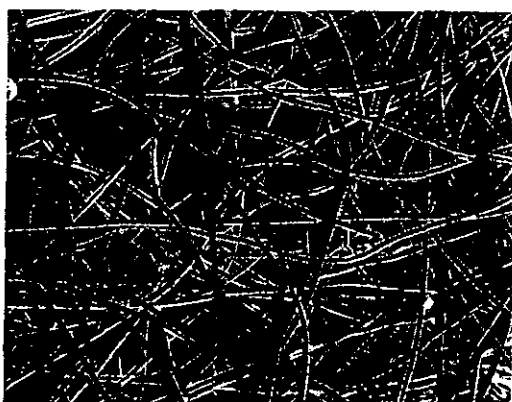
H₂O処理



NaOH 0.1M 処理



NaOH 0.01M 処理

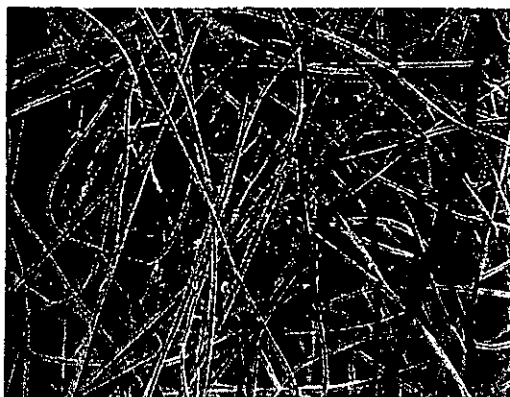


NaOH 0.005M 処理

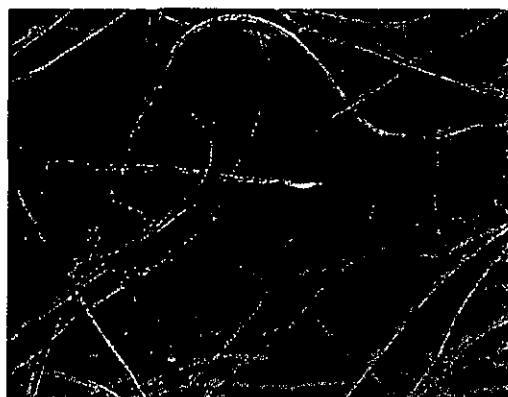


NaClO 0.5% 処理

図 5 ベスキチンのSEM画像



未処理



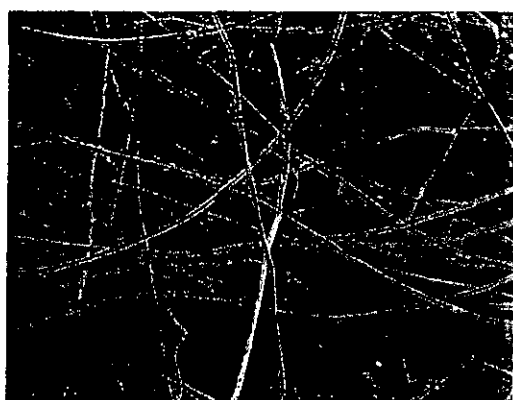
H₂O 処理



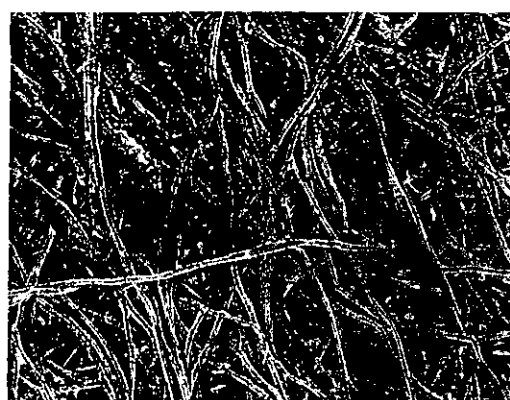
NaOH 0.1M 処理



NaOH 0.01M 処理



NaOH 0.005M 処理



NaClO 0.5% 処理

図 6 ソープサンのSEM画像

表1 各種スポンジのLPS含量

	コラーゲン (EU/mg)	ベスキチン (EU/mg)	ソープサン (EU/mg)
未処理	0.01	0.01	103
NaOH 0.1M	0.15	N.D.	18
NaOH 0.01M	0.01	N.D.	72
NaOH 0.005M	0.15	N.D.	79
NaClO 0.5%	0.05	N.D.	4

表2 アルカリ処理によるType I アテロコラーゲンの比旋光度と粘度変化

pH	比旋光度(°)	粘度(mPa·s)
Control	-395	35.20
11.5	-395	34.35
12.0	-392	34.56
13.0	-391	32.43

比旋光度は、不溶物を遠心除去した上清について測定した。

粘度は3mg/mlの濃度で測定。測定温度は20°C。

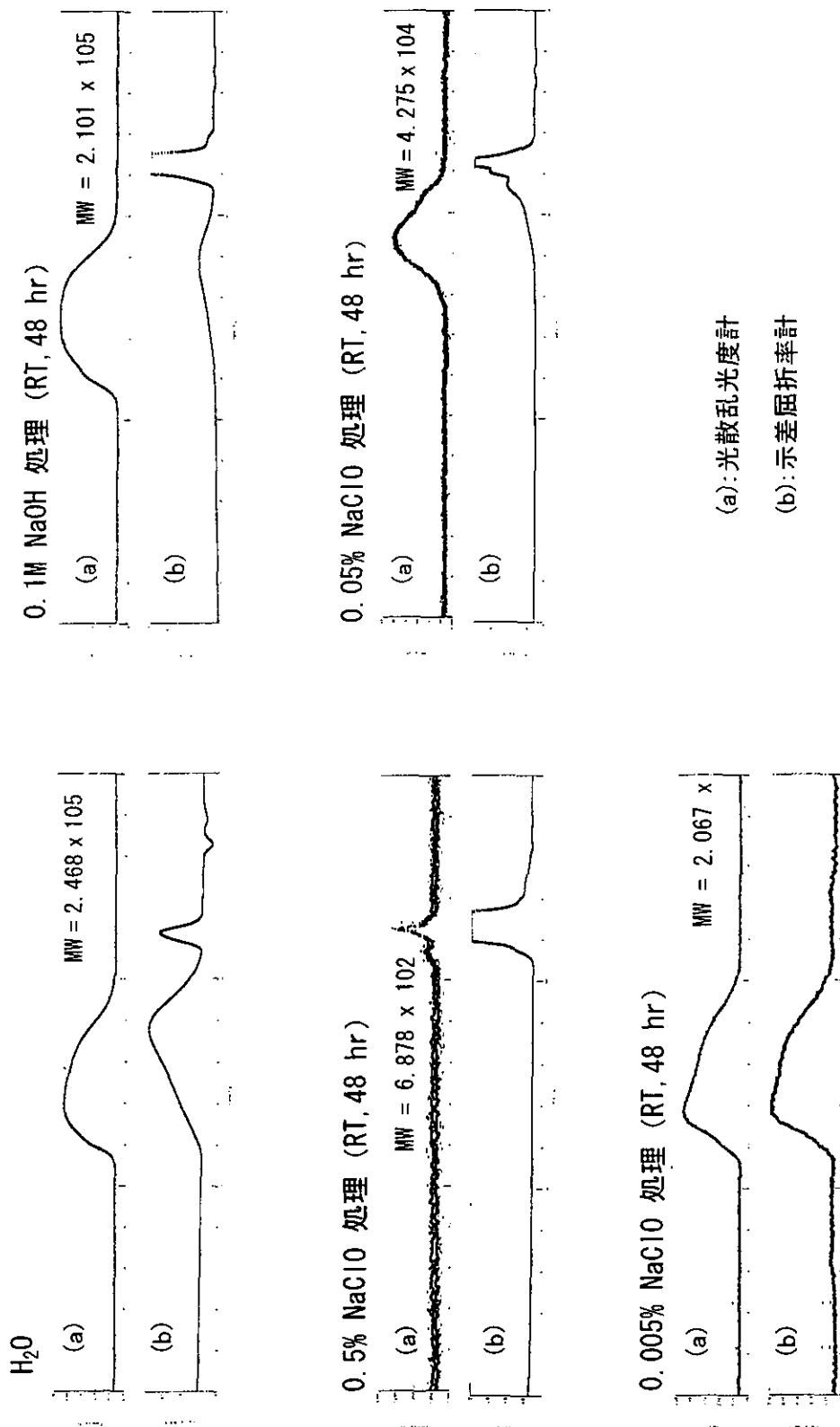


図3 CM-キチンの分子量変化

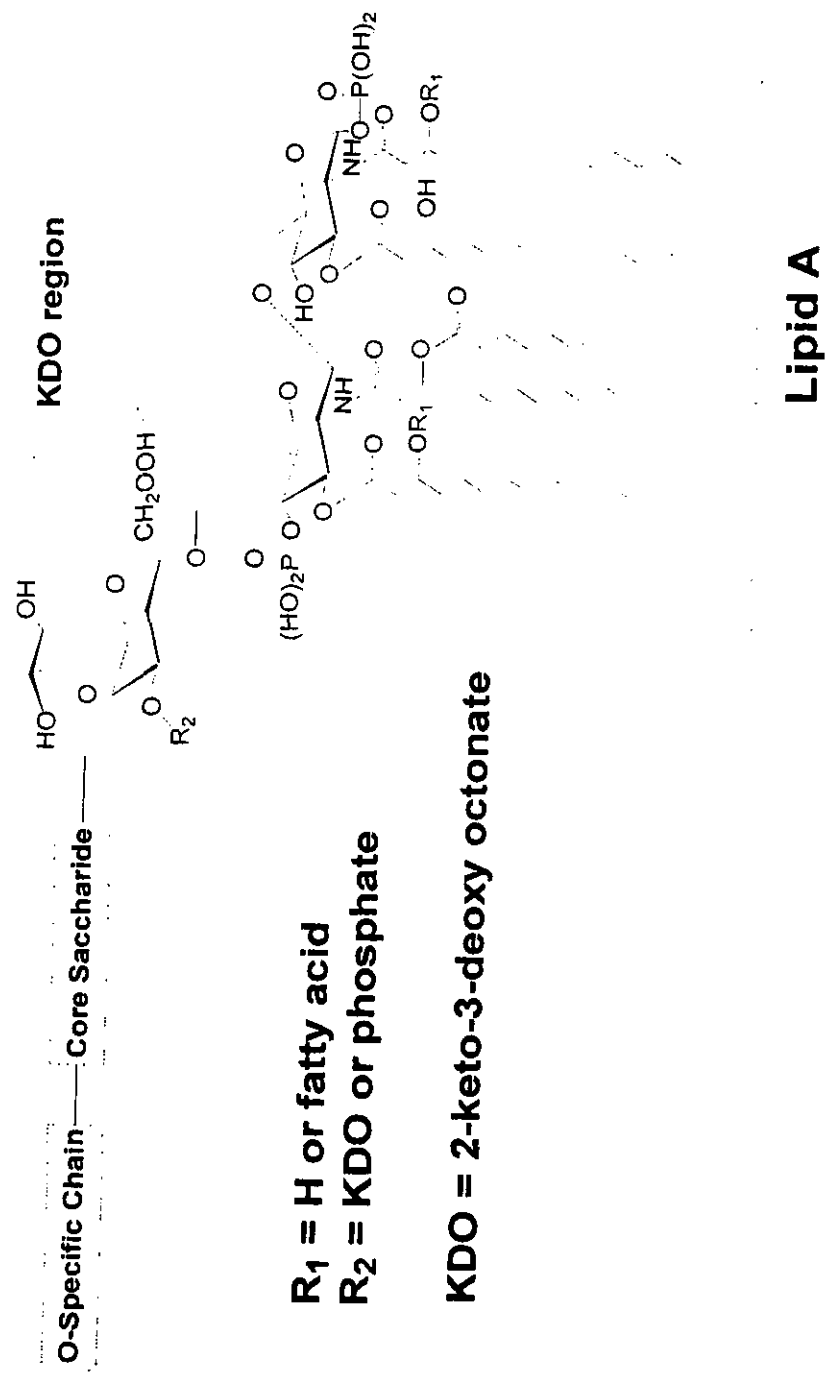


図13 エンドトキシンの一般的化学構造

2. 新規材料の免疫原性評価手法の開発に関する研究

五十嵐良明

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として、BALB/c系雌性マウスに試験物質を Alum アジュバントとともに腹腔内投与し、血清中 IgE 抗体価を ELISA で測定する方法を開発した。陽性タンパクアレルゲンとしてオボアルブミン(OVA)、トリプシンインヒビター、さらにウシ血清アルブミン(BSA)などについて試験したところ、溶媒群に比べて総 IgE 抗体価が上昇した。コラーゲンペプチドやゼラチンについては高い総 IgE 抗体価を示すものが見られたが、低分子量化学物質は反応を起こさなかった。IgE test ではタンパク質の種類によって、陽性反応を引き起こすのに必要な投与量、誘導される血清中総 IgE 抗体価、および高い IgE 値を示す動物数の割合に差があることから、それぞれのアレルギー性強度を順位づけられる可能性が示唆された。また、パーオキシダーゼのように分解性試験では陰性とされるものでも IgE 抗体が上昇することから、消化経路を通らずに使用される場合には感作が成立する可能性があり、医用材料のアレルギー性評価には *in vitro* 分解性試験だけでは十分ではないことがわかった。Popliteal lymph node assay (PLNA)についても、同様の試験物質を用いて検討した。ペニシラミンおよびペニシリン G をマウスの足蹠に注射し、7日後に膝窩リンパ節を取り出して重量および細胞数を測定したところ、溶媒投与の対照群に比べて 2 倍程度の増加を示し、陽性と判定された。高用量のタンパクアレルゲンは著しい増加を示した。しかし、タンパク質による PLNA の反応がアレルギーによるものではないことを証明するには、さらに検討が必要である。医用材料については素材としてのタンパク質と添加物としての化学物質の両方についてのアレルギー性を評価する必要がある。したがって、材料の性質を考えた抽出条件の選定とともに、それぞれに応じた適切な試験方法で評価する必要がある。

A. 研究目的

近年、コラーゲンなど天然由来材料を使用した医療機器が多くなっており、これらに使用されているタンパク質等のアレルギーに対して関心が高まっている。タンパク質のアレルギー性試験は遺伝子組換え食品で重要視されているが、天然由来医用材料はほとんどが動物由来タンパク質から作製され、使用に当たっては代謝を経ずに直接、組織と接触するため、同様に厳しい安全性評価が必要である。タンパク質のアレルギー性の有無については、*in vitro* 分解性試験で人工胃液などに対する安定性から予測するのが有用であるとされている。しかしながら、実際のアレルギー状態を観察できるモデルとして、動物を用いた試験方法の

開発が望まれている。

本研究は、医用材料の即時型アレルギー試験方法の確立を目的とした。昨年度までの検討によって、従来の IgE 試験を改良して、マウスに対して試験物質をアジュバントとともに腹腔内に複数回投与した後、血清総 IgE 抗体価を測定する方法が有用であることを明らかにした。また、マウスの足蹠に試験物質を投与後、膝窩リンパ節の重量および細胞数を測定する popliteal lymph node assay (PLNA)^{2,3)} の可能性について検討した。本年度は、種々の化学物質や医用材料についてこれらの方法を適用し、その有用性を確認した。

B. 研究方法

試薬：試験タンパク質として、オボアルブミン (ovalbumin, OVA, albumin, chicken egg, Grade V, Sigma Chemical Co., USA)、ウシ血清アルブミン(BSA, albumin, bovine fraction V solution 30%, Sigma Chemical)、ピーナツレクチン [lectin from *Arachis hypogaea*(peanut), Sigma-Aldrich Co., USA]、 β -ラクトグロブリン (β -lactoglobulin, from bovine milk, Sigma-Aldrich)、トリプシンインヒビター (trypsin inhibitor, from Soybean, Sigma Chemical)、パーオキシダーゼ(oxidase, from horseradish, Sigma-Aldrich)、コラーゲンペプチド、酵素分解品 (collagenpeptide, enzyme hydrolyzed, average molecular weight:2000, 和光純薬工業)およびウシ骨製ゼラチン (gelatin, from bovine bone, 和光純薬工業)を用いた。アレルギー性を有する化学物質として、シクロヘキシジン (CHG, cyclohexidine gluconate, 20%溶液, 和光純薬工業)、D-(-)-ペニシラミン (D-(-)-penicillamine, 和光純薬工業)、およびペニシリン G (penicillin G potassium salt, Sigma-Aldrich)を用いた。試験物質は生理食塩水に種々の濃度で溶解、希釈した。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。天然ゴム材料として、2-メルカプトベンゾチアゾール (2-mercaptobenzothiazole, MBT) およびジブチルジチオカルバミン酸亜鉛 (zinc dibutyldithiocarbamate, ZDBC)をそれぞれ加硫促進剤として作製したもの(Sample A および Sample C)を用いた。

動物：BALB/c 系雌性マウス (8~12 週齢、日本 SLC)を用いた。

IgE test：マウス (1 群 5 匹) に、試験物質と Alum 2 mg との混合溶液 200 μ l を 1 週間に 1 回腹腔内に注射し、同様の操作をさらに 2 回繰り返した。最終投与から 7 日後、心臓から採血した。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 抗体価は既報の ELISA 法¹⁾を若干改変した方法により測定した。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℃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 50 mM Tris-buffered saline (TBS) (Sigma Chemical) 280 μ l で、37℃、30 分間処理してブロッキングした後、個々の血清を 0.05 % Tween20 および 1% BSA を含有する 50 mM TBS (BSA-TBS, Sigma Chemical) 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℃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、TMB 基質溶液 (KPL, USA) 100 μ l を加え、10 分間置いた後、1 mol/l リン酸溶液 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。

別に総 IgG、IgG1、IgG2a および IgG2b についても測定を行った。それぞれの抗体用のマウス ELISA キット (Bethyl Laboratories, Inc.)を用い、段階的に血清を希釈したものについて、IgE 同様、TMB 基質溶液による発色に伴う吸光度を測定した。

Popliteal lymph node assay (PLNA)：マウスの片方の足蹠に 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、もう一方には溶媒のみ(生理食塩水)を注射して対照とする。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およ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. アレルギー性強度の順位づけ

OVA と BSA について IgE test で試験した。OVA は毎回 $10\mu\text{g}$ を Alum とともに、計 3 回投与し、BSA は 10 または $100\mu\text{g}$ を投与し、血清総 IgE 抗体価を測定した。Alum だけを投与した対照群と比較すると、OVA 群の動物はいずれも高い値を示すのに対し、BSA 群では 5 匹中 2 匹だけが対照群よりも高い値を示した(図 1)。また、この抗体価の上昇した動物でも投与量が多いほど、高い値を示した。各群の血清 IgE 抗体濃度の平均±標準偏差($\mu\text{g/ml}$)を求めたところ、Alum 群は 0.34 ± 0.33 、BSA $10\mu\text{g}$ 群は 0.92 ± 0.64 、BSA $100\mu\text{g}$ 群は 1.21 ± 0.82 と差があり、OVA は $10\mu\text{g}$ で 1.84 ± 0.71 であった。

2. IgE 以外の抗体価

IgE 以外の抗体価について測定し、即時型アレルギーを判定する上で有用な指標となりえるか検討した。先に示した OVA および BSA を投与して得た血清を用い、血中総 IgG、IgG1、IgG2a および IgG2b を ELISA で測定した。各動物の血清とも段階的に希釈して反応させたときの希釈度と吸光度曲線のグラフを図 2 に示した。IgG に関しては対照群に比べて、OVA 群はそれぞれの希釈度においても高い吸光度を示し、IgG が高レベルにあることが示された。BSA $100\mu\text{g}$ 群でもやはり高い吸光度を示したが、BSA $10\mu\text{g}$ 群は全体的に吸光度が低く、また、同じ処理群でも動物によって反応性の差が大きかった。

次に、IgG のサブクラス別に解析した。IgG1 は IgG と同様の傾向が認められた。一方、IgG2a は OVA、BSA 投与群と対照群との間でほとんど差は認めなかった。また、他の抗体価に比べ濃度が低かった。IgG2b についてもタンパク投与群と対照群とで変化は認めなかった。したがって、今回検討したサブクラスの中では総 IgG1 が最も感度が高く、免疫状態の変化を観察できた。

3. IgE test の種々の試験物質への適用

3-1. タンパクアレルギー

ピーナッツレクチン、 β -ラクトグロブリン、トリプシンインヒビターおよびパーオキシダーゼ

などの酵素類のいくつかはアレルギー性が知られている。⁴⁷⁾ これらのタンパク質について、それぞれ毎回 $100\mu\text{g}$ を Alum とともに投与した後、血清中の総 IgE 抗体価を測定した(図 3)。Alum だけの対照群の総 IgE 濃度($\mu\text{g/ml}$)は 0.29 ± 0.15 であり、最高値は 0.53 であった。ピーナッツレクチンを投与した群ではこの対照群の最高値を超えた動物数は 5 匹中 3 匹で平均値は 0.71 であった。一方、トリプシンインヒビターでは平均 0.40 で、対照群の最高値を超えたものは 1 匹のみであった。陽性アレルゲンと考えた β -ラクトグロブリン投与群の総 IgE 抗体価は対照群と差が認められなかった。また、*in vitro* 分解性が早く陰性対照と考えたパーオキシダーゼについては、逆に、 0.93 ± 0.40 と IgE 値は増加した。

3-2. 天然医用材料

医用機器の材料として使用されるコラーゲンについて試験した。コラーゲンは高分子量で水に不溶であるが、体内では種々の酵素によって分解すると考え、水溶性の低分子量コラーゲンペプチドを用いて検討した。ゼラチンについても医療分野でも使用されるため、これについても同時に試験し比較した(図 4)。先の酵素類と同様に対照群の総 IgE 最高値を超えた動物数を求めたところ、コラーゲンペプチド群では 1 匹、ゼラチン群では 2 匹であった。しかし、各試験群で特に高い値を示す 1 匹ずつを除いた 4 匹についてはほとんど対照群と差はなく、5 匹の平均値も試験群と対照群では有意な差はなかった。

3-3. 天然ゴム製品

手袋などの天然ゴム製品による即時型アレルギーはゴム製品中の水溶性タンパク質が原因である。⁸⁾ そこで、ゴム製品の水抽出液について試験した。抽出法は日本工業規格(JIS)⁹⁾ にしたがって、 1g に対して 10ml の水を加え、医療機器ガイドラインが推奨する条件¹⁰⁾のうち、タンパク質への影響が少ないと思われる 37°C 、72 時間抽出を選択した。この抽出液を分取し、そのまま Alum と混和して、動物に投与した。ゴム製品 A の抽出液投与群で高い IgE 値を示す動物が 1 匹認められたが、他は対照群とほとんど変化なかった(図 5)。

3-4. 化学物質

昨年度はシクロヘキシジンについて検討したが、今年度は薬物アレルギーの知られているペニシラ

ミン¹¹⁾についても試験した。ペニシラミン 200 μg を Alum とともに投与したが、血清総 IgE 抗体価は増加せず、IgE test では分子量の低い物質のアレルギー性を検出することはできないことを再度確認した(図 6)。こうした化学物質が抗体を産生させるためにはタンパク質との複合体を形成する、あるいは別の試験系が必要である。

4. PLNA

4-1. 化学物質

薬物アレルギーの症例がある薬剤¹¹⁻¹³⁾について検討した。ペニシラミンとペニシリンについて試験した結果、いずれもリンパ節重量については SI が 2 以上の値を示したが、リンパ節細胞数についてはペニシラミンが 1.9、ペニシリンが 1.3 程度の SI しか示さず、反応はそれほど強くなかった(表 1)。また、こうした反応を起こすには数 mg の注射量が必要であった。

4-2. タンパク質

PLNA が低分子量化学物質だけでなく、タンパクアレルゲンのような高分子物質にも適用できるかどうか検討した。市販されている動物皮膚抽出液(epidermal extracts, cattle epithelia 20000 PNU/ml, Greer Laboratories, Inc., USA)を陽性アレルゲンとして用い、BSA を同時に試験した。いずれも 10% 溶液を 50 μl 注射して、リンパ節の反応性を比較した。陽性対照は著しいリンパ節重量とリンパ節細胞数の増加を示した。BSA は陽性対照と比較すると反応性は小さいものの、リンパ節細胞の SI は 2.23 と陽性の判定がされた(表 2)。

次に、種々のタンパクアレルゲンについて試験した。OVA についても再度検討し、反応性を比較した(表 3)。酵素類 2 mg を投与したところ、いずれも強い反応を示した。リンパ節重量、細胞数とも SI が 2 以上の値を示し、陽性と判定された。ゼラチンとコラーゲンペプチドについては、酵素類に比べると反応性は低かった。ゼラチンは SI が 2 以上の値を示したが、コラーゲンペプチドは 1.3 であった。さらに、ゴム製品 A の水抽出液について、希釈することなくそのまま投与した。動物数が少ないため確かではないものの、試験した動物の間では、ゴム抽出液を投与した側のリンパ節の重量およびリンパ節細胞数は、生理食塩水を投与した側と比べて大きな変化はなかった。

D. 考察

タンパク質の種類によって、誘導されるアレルギー反応の強度が異なることが、マウスを用いた試験で報告されている。^{14,15)} OVA は即時型アレルギーの陽性対照アレルゲンとして用いられるように、アレルギーを誘導する性質が強い。そこで、開発したマウス IgE test を用いて種々のタンパクアレルゲンを試験し、それらに対する反応性を比較した。

OVA 10 μg 投与群の動物はいずれも高い IgE 値(1.84 \pm 0.71 $\mu\text{g/ml}$)を示すのに対し、BSA 群では 5 匹中 2 匹だけが対照群よりも高い値を示した(図 1)。また、BSA も投与量を変化させることによって、10 μg 群では 0.92 \pm 0.64 $\mu\text{g/ml}$ であるのに対し、100 μg 群では 1.21 \pm 0.82 となり、投与量が多いほど、高い値を示した。以上のように、投与量を変化させることにより得られる反応強度が変化すること、OVA と BSA では同じ濃度を投与したとしても血清 IgE 抗体価に差が生じることから、タンパク質によりアレルギー性強度が異なることが明らかとなった。よって、本指標を用いることで、タンパク質のアレルギー誘発能の強度を順位づけられることが示唆された。

ピーナッツレクチン、 β -ラクトグロブリンはそれぞれ豆、乳アレルギーの原因タンパク質として知られており、トリプシンインヒビターも豆由来アレルゲンとして知られている。一方、パーオキシダーゼは胃液などによる分解が早く、アレルギー性は弱いとされる。¹⁶⁾ ピーナッツレクチンを投与すると、対照群中の最高の総 IgE 値を超えるのは 5 匹中 3 匹で平均値は 0.71 であった。トリプシンインヒビターでは対照群の最高値を超えたのは 1 匹だけだった。このように、今回試験に供与した検体においては、ピーナッツレクチンの方がトリプシンインヒビターより強い反応を起こすことから、ピーナッツレクチンの方がアレルギー誘発性が強いと思われた。しかし、 β -ラクトグロブリンを投与した群は対照群と差が認められなかった。この結果については明らかではないが、アレルゲン性が強くない可能性もある。また、試験に用いた試薬のロット差や試験までの取り扱い方による影響も大きいと思われる。逆に、*in vitro* 分解性が早く陰性対照と考えたパーオキシダーゼについては総 IgE 値が増加した。食物の場合、胃

液などによって分解が早急に起これば、例え摂取してもアレルギー性は失われるが、今回のように分解経路を通らず直接体内に入った場合には、アレルギーを起こす可能性があることを示す。したがって、医用材料の場合、*in vitro* の分解性だけで安全性を評価するのは困難と思われる。

ゼラチンは過去に小児用ワクチンに使用されたが、ゼラチンに対するアレルギーの症例が増加したことが報告された。¹⁷⁾ 医療分野では他にインプラント用コラーゲンに対するアレルギーの事例も報告されている。¹⁸⁾ コラーゲンについては体内中で種々の酵素によって分解すると考えられるため、低分子量コラーゲンペプチドを用いて試験した。その結果、ゼラチン、コラーゲンペプチドとも数匹について総 IgE 抗体価が上昇した。さらに、天然ゴム製品をガイドライン^{9,10)} に従って抽出した溶液についても、高い総 IgE 抗体値を示す動物が 1 匹認められた。これらの上昇がアレルギー反応に直結するかどうかは、それぞれのタンパク質に特異的な IgE 抗体であるかどうかを確認する必要があるが、いずれの試験物質とも免疫系に影響を与える可能性があることがわかった。ただ、アレルギーによるものとは思われない抗体価の増加を示す動物もあり、抗原特異的 IgE を測定して確認するのが望ましいと思われる。

IgE 以外の血中総 IgG、IgG1、IgG2a および IgG2b を測定した。IgG に関しては対照群に比べて試験群は高レベルにあった。IgG1 は IgE 同様、Th1 タイプの反応に関係しているが、IgG と同様の傾向が認められた。IgG2b は試験群と対照群とで変化は認めなかった。IgG2a は Th2 タイプの反応に関連しているが、ほとんど差は認めなかった。今回検討したサブクラスの中では総 IgG1 が最も感度が高く、免疫状態の変化を観察できた。IgG1 は IgE と同様にアレルギーの投与によって変化するが、アレルギーによっては IgE 抗体の方が変化するとの報告があり、^{14, 19-21)} あえて IgE 以外を選択する必要はないと思われる。

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から、薬物アレルギーの試験法として期待されている。¹³⁾ IgE test では検出できない低分子化学物質について有効と思われる。ただ、リンパ節を破

碎し洗浄する際に細胞同士が凝集したりして細胞をロスすることがあるため、細胞数の増加率がリンパ節重量の増加率と比例しないことがあり、この点については改良する必要がある。

ペニシラミンとペニシリンについて試験した。いずれもリンパ節重量については SI が 2 以上の値を示したが、反応は強くなかった。これらの化学物質については、同様の順序を得ている結果が報告されている。¹³⁾

次に、PLNA がタンパクアレルギーのような高分子物質にも適用できるかどうか検討したところ、ほとんどの物質で SI が 2 以上の値を示した。OVA と BSA では OVA の方が強い反応が表れた。ゼラチンとコラーゲンペプチドとの比較では、ゼラチンの方が強い反応を起こすものの、酵素類に比べると反応性は低かった。PLNA による SI 値の差は明確なアレルギー性強度を示すものではないが、IgE test と類似した結果が得られた。

PLNA で反応を起こすには数 mg の試験物質が必要であることから、医療用具などの抽出物について試験するには大量の材料が必要となる。特に、人工高分子材料の場合、水ではほとんど溶出されないことから、有機溶剤を使用し濃縮して試験する等の工夫が必要である。PLNA のリンパ節細胞の増殖反応がアレルギー反応を示すのかどうかは議論がある。PLNA のタンパク質に対する適用例はないことから、今後、タンパク質の投与によって増加した細胞の種類などを解析して、PLNA が高分子材料にも適用できるかどうか判定することが望まれる。

E. 結論

医用材料による即時型アレルギーを評価する手法として、BALB/c 系雌性マウスに試験物質をアジュバントとともに腹腔内投与し、血清中総 IgE 抗体価を測定する方法を開発し、OVA、BSA、トリプシンインヒビターなどの酵素類、ゼラチン、コラーゲン等の医用材料について適用した。タンパク質によって、陽性反応を起こす投与量、IgE 抗体価および高い値を示す動物の割合に差があり、それぞれのアレルギー性強度を順位づけられる可能性があった。IgE 以外では、総 IgG、IgG1 値は増加したが、IgG2a、IgG2b は変化が少なく、IgE に勝る指標とは考えられなかった。また、得られ

た反応の原因物質を決定するには、特異的 IgE 抗体の定量が必要である。低分子量化学物質については、IgE test ではなく、popliteal lymph node assay (PLNA) が有用であった。タンパク質については偽陽性反応の可能性もあり、アレルギー反応と相関するかどうかはまだ多くの検討が必要である。また、PLNA では IgE test に比べて高用量の試験物質を投与する必要があり、医用材料の抽出段階での溶媒の選択など検討が必要とされる。医用材料にはタンパク質、人工高分子材料を始め、種々の化学物質が添加されていること、および試験法としての IgE test、PLNA はそれぞれ得意不得意分野があることから、アレルギー性の評価には適切な抽出条件と試験法との組み合わせが必要である。

F. 参考文献

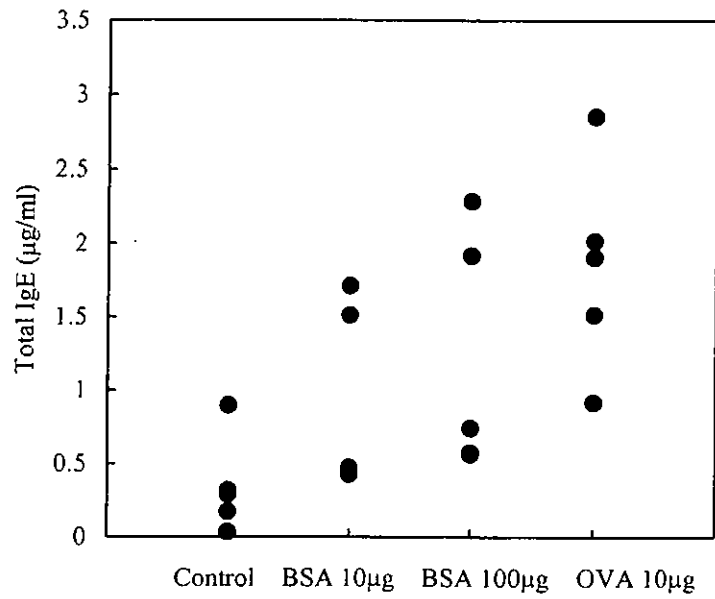
1. Hilton, J., Dearman, R.J., Basketter, D.A., Kimber, I. *Toxicol. Lett.*, 73, 43-53 (1994).
2. Kammuler, M.E., Thomas, C., De Bakker, J.M., Bloksma, N., Seinen, W., *Int. J. Immunopharm.* 11, 293-300 (1989).
3. Bloksma, N., Kubicka-Muranyi, M., Schuppe, H.-C., Gleichmann, E., Gleichmann, H. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 369-396 (1995).
4. Burks, AW., Cockrell, G., Connaughton, C., Guin, J., Allen, W., Helm, RM. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 105, 143-149 (1994)
5. Karine A-P., Christophe C., Herve, B., Gilles, C., Luc, N., Yveline, F., Jacques, G., Jean-Michel, W., Jean-Michel, C. *J. Immunol. Methods*, 235, 21-32 (2000)
6. Germole, D.R., Kimber, I., Goldman, L., Selgrade, MJK. *Environ. Health Perspect.*, 111, 1131-1139 (2003)
7. Morisset, M., Moneret-Vautrin, DA., Kanny, G., Guenard, L., Beaudouin, E., Flabbee, J., Hatahet, R. *Clin. Exp. Allergy*, 33, 1046-1051 (2003)
8. Levy, DA., Charprin, D., Peccquet, C., Leynaidier, F., Vervloet, D., *Allergy*, 47, 579-587 (1992)
9. 日本工業標準調査会. JIS T9010:1999. ゴム製品の生物学的安全性に関する試験方法. pp.27-28 (1999)
10. 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)
11. Hurtenbach, U., Gleichmann, H., Nagata, N., Gleichmann, E. *J. Immunol.*, 139, 411-416 (1987)
12. Descotes, J. *Immunotoxicology of Drug and Chemicals* (2nd ed.), Elsevier, Amsterdam, pp.19-111 (1988)
13. Aida, T., Kimura, T., Ishikawa, N., Shinkai, K. *J. Toxicol. Sci.* 23, 425-432 (1998).
14. Hilton, J., Dearman, RJ., Sattar, N., Basketter, DA., Kimber, I. *Fd. Chem. Toxicol.*, 35, 1209-1218 (1997)
15. Dearman, RJ., Caddick, H., Stone, S., Kenna, JG., Basketter, DA., Kimber, I. *Fd. Chem. Toxicol.*, 40, 625-633 (2002)
16. Teshima, R., Takagi, K., Okunuki, H., Nakamura, R., Hachisuka, A., Sawada, J. 第9回日本免疫毒性学会講演抄録集, pp.85 (2002)
17. Sakaguchi, M., Ogura, H., Inouye, S., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 96, 563-565 (1995)
18. DeLustro, F., Smith, ST., Sundsmo, J., Salem, G., Kincaid, S., Ellingsworth, L. *Plast. Reconstr. Surg.*, 79, 581-594 (1987)
19. Akiyama, H., Teshima, R., Sakushima, J., Okunuki, H., Goda, Y., Sawada, J., Toyoda, M. *Immunol. Lett.*, 78, 1-5 (2001).
20. Dearman, RJ., Skinner, RA., Herouet, C., Labay, K., Debruyne, E., Kimber, I. *Fd. Chem. Toxicol.*, 41, 1509-1516 (2003)
21. Dearman, R.J., Caddick, H., Basketter, D.A., Kimber, I. *Fd. Chem. Toxicol.*, 38, 351-360 (2000).

G. 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25回日本バイオマテリアル学会大会(2003.12)



Compound	Amount per time	Total IgE concentration (Mean \pm SD, $\mu\text{g/ml}$)
Saline (control)		0.34 ± 0.33
BSA	10	0.92 ± 0.64
BSA	100	1.21 ± 0.82
OVA	10	1.84 ± 0.71

図1. ウシ血清アルブミン(BSA)及びオボアルブミン(OVA)投与による血清総IgE抗体価の変化

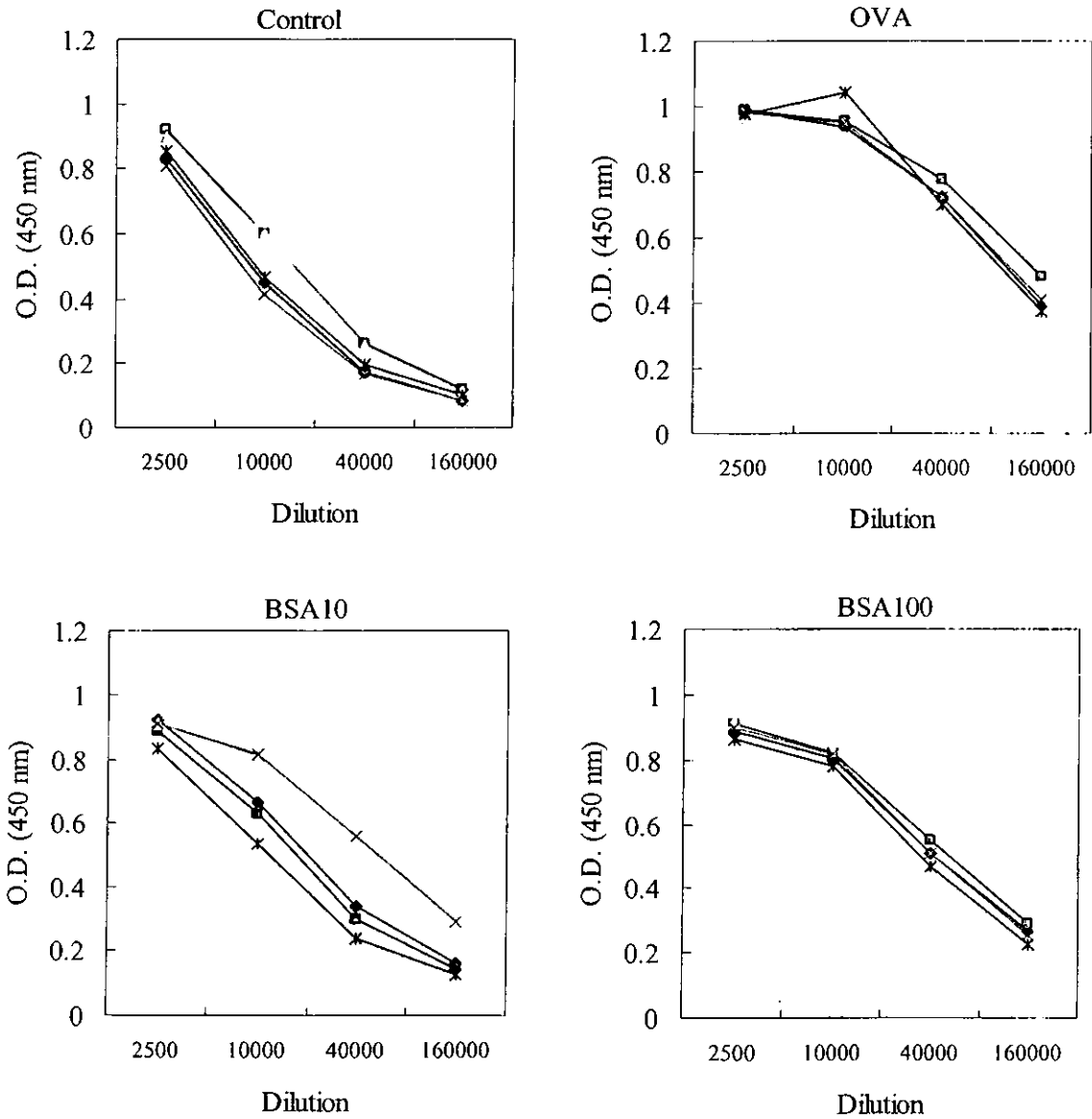


図2. 各種タンパク質による血清 IgG抗体価の変化 (1) IgG
 試験物質 (BSAは10または100 μ g、OVAは10 μ g)をAlumアジュバントとともに3回投与後、採血した。得られた血清を段階的に希釈して、ELISA法によって抗体価を測定した。希釈度を横軸に、その濃度に吸光度を縦軸にプロットした。

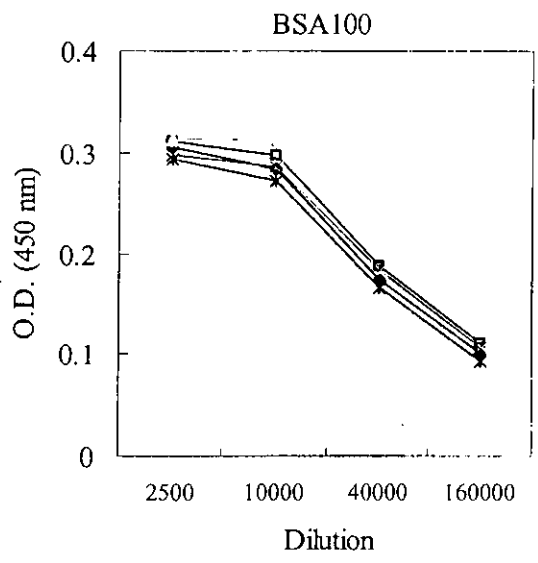
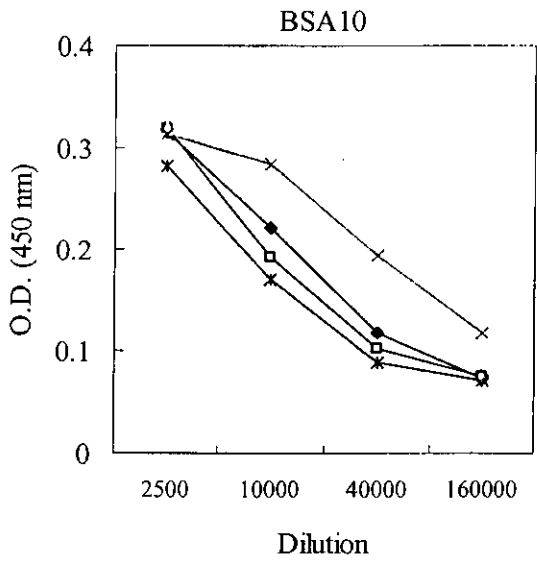
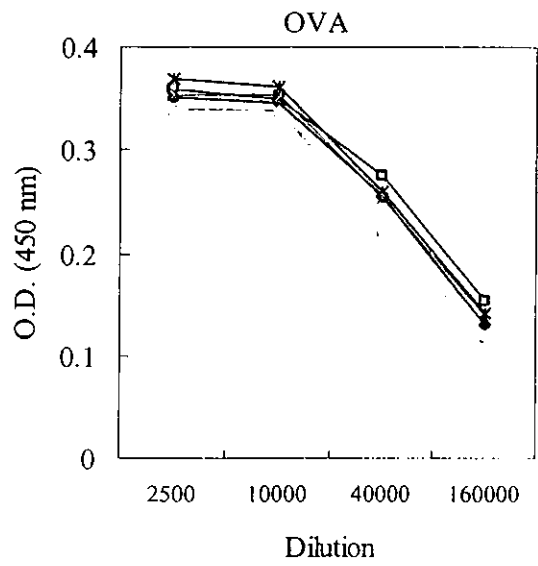
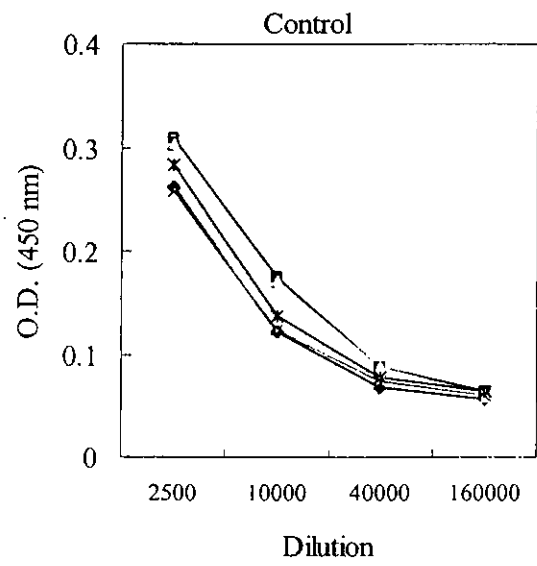


図2. 各種タンパク質による血清 IgG抗体価の変化 (2) IgG1

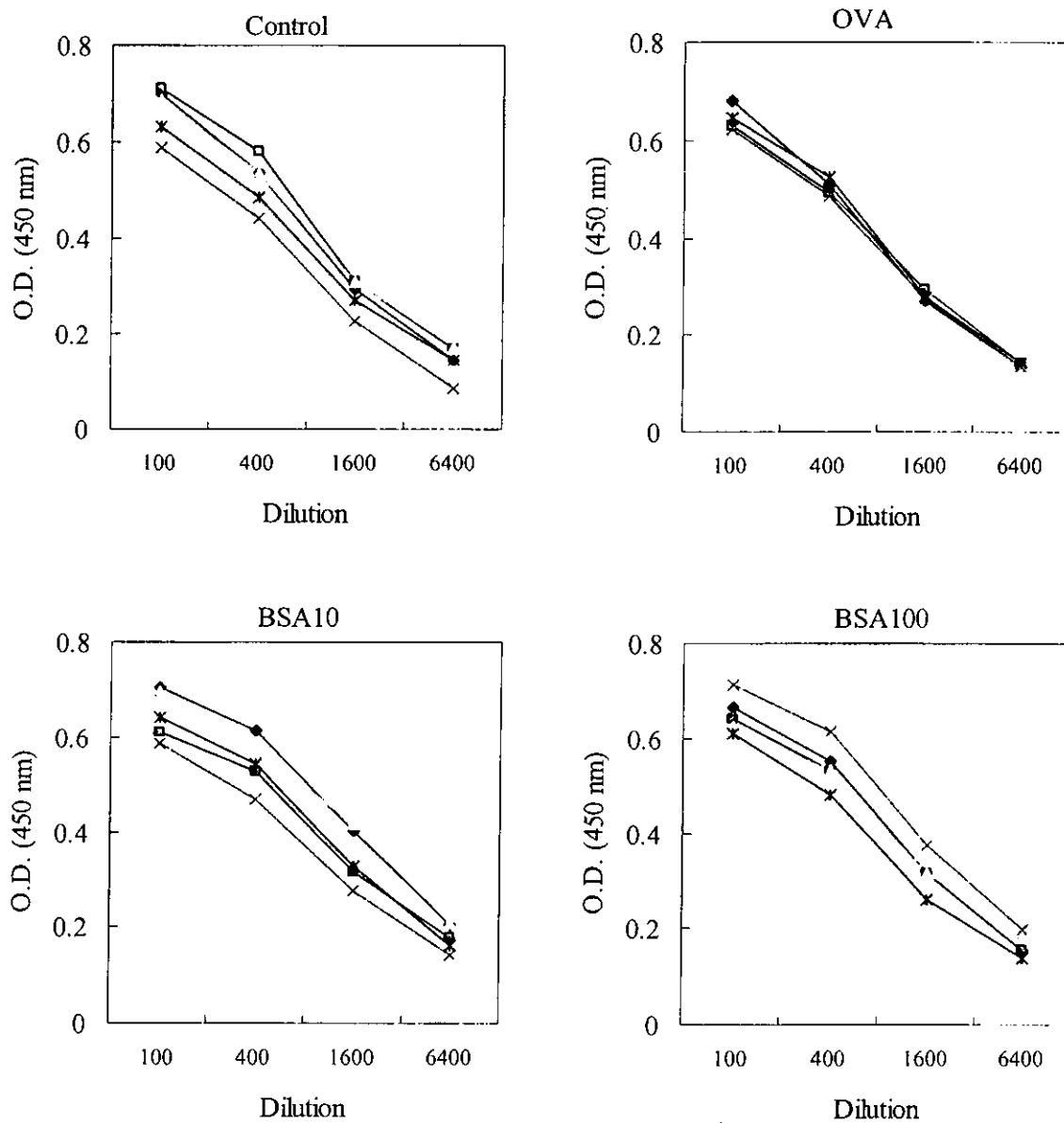


図2. 各種タンパク質による血清 IgG抗体価の変化 (3) IgG2a

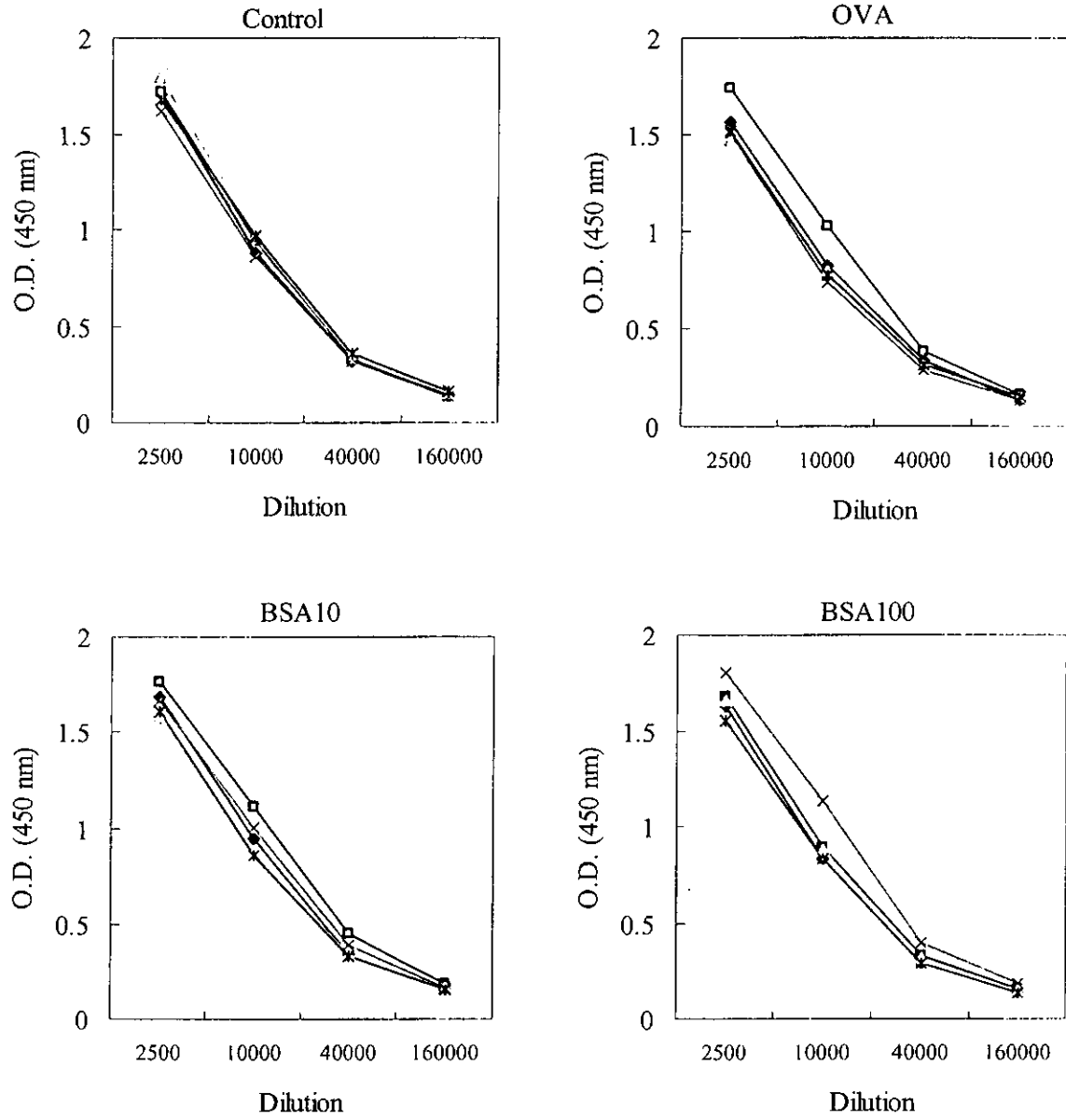


図2. 各種タンパク質による血清 IgG抗体価の変化 (4) IgG2b