

図19. 菌体添加コラーゲンシートの皮膚創傷被覆試験における創傷部の病理組織学的所見（第2週目）

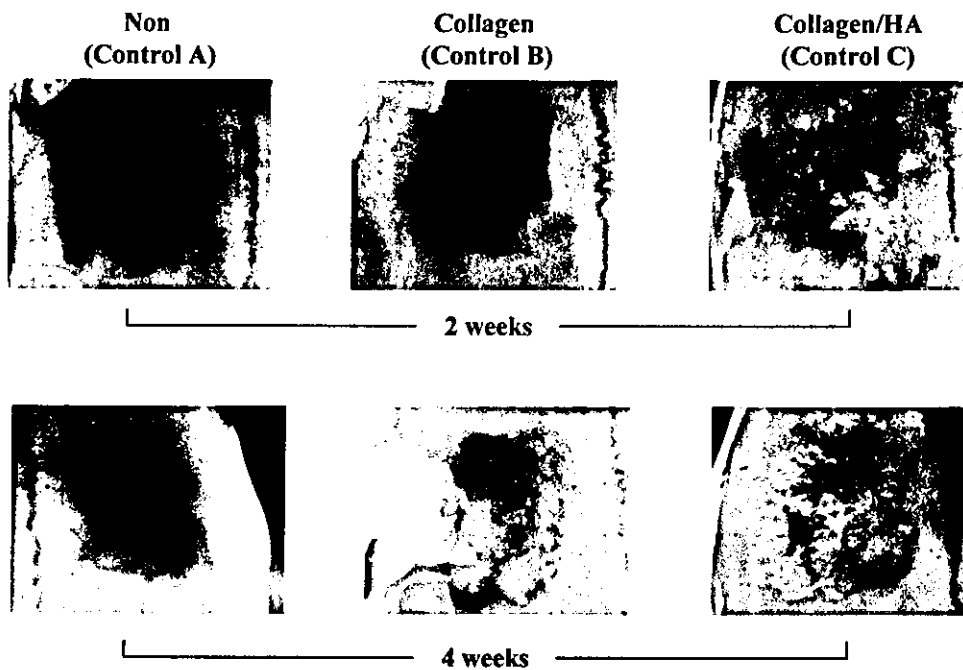


図20. ラット頭蓋骨埋植試験における各種対照群の軟X線所見

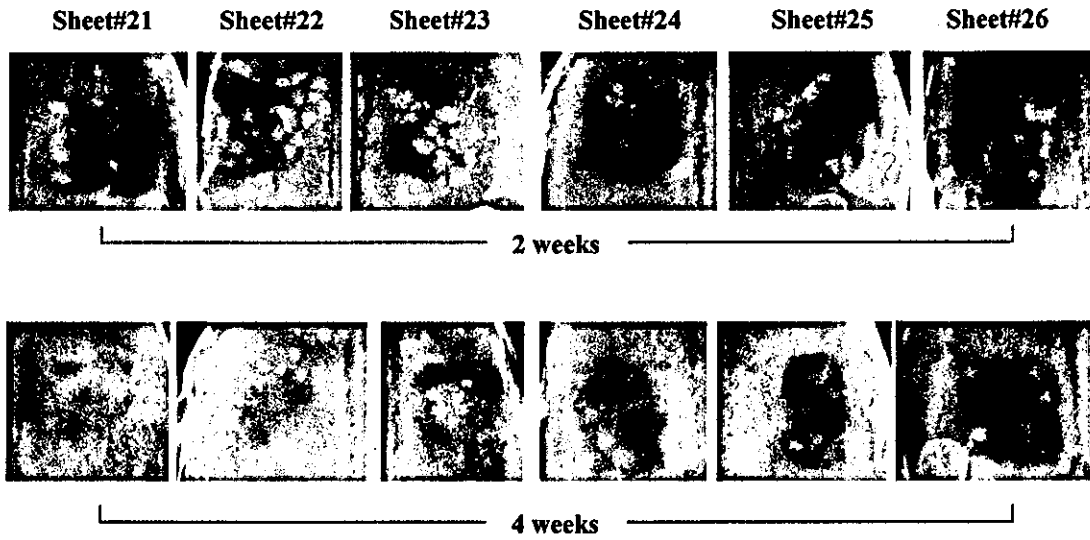


図 2 1. ラット頭蓋骨欠損部への菌体添加コラーゲン／HAコンポジットシート埋植試験における軟X線所見

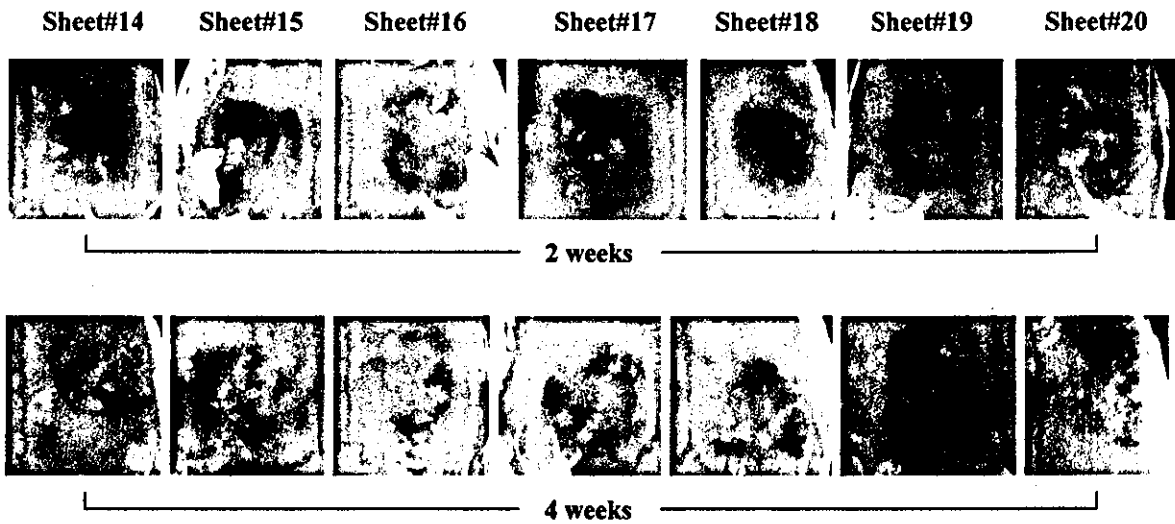


図 2 2. ラット頭蓋骨欠損部へのLPS添加コラーゲン／HAコンポジットシート埋植試験における軟X線所見

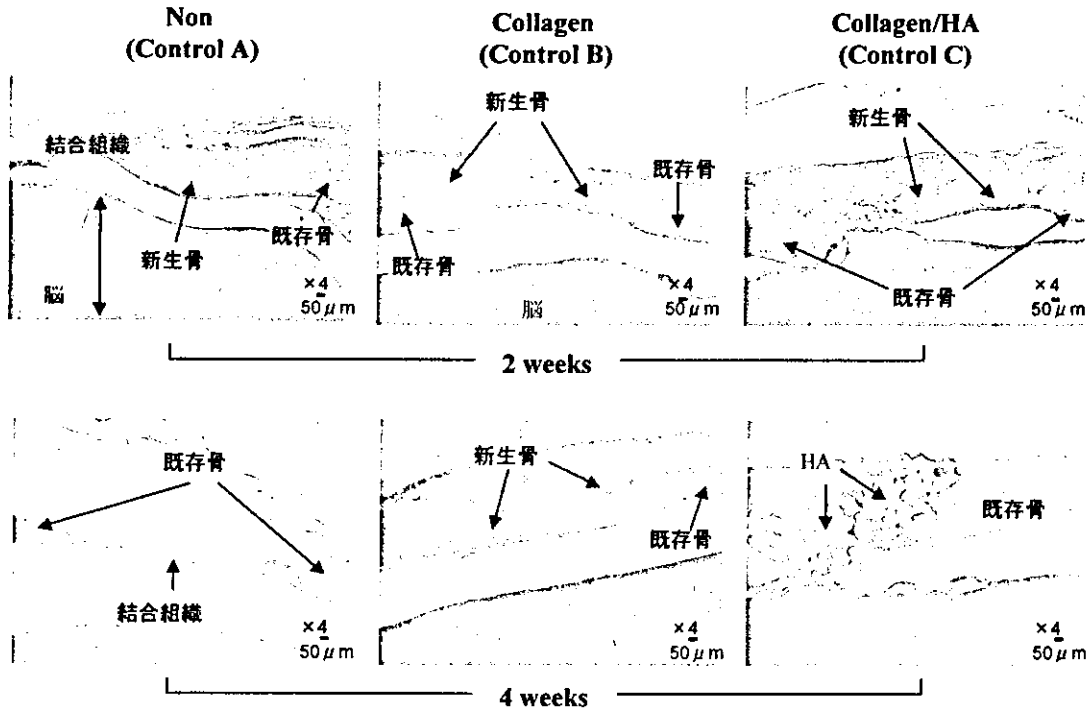


図 2 3. ラット頭蓋骨埋植試験における対照群骨欠損部の病理組織学的所見

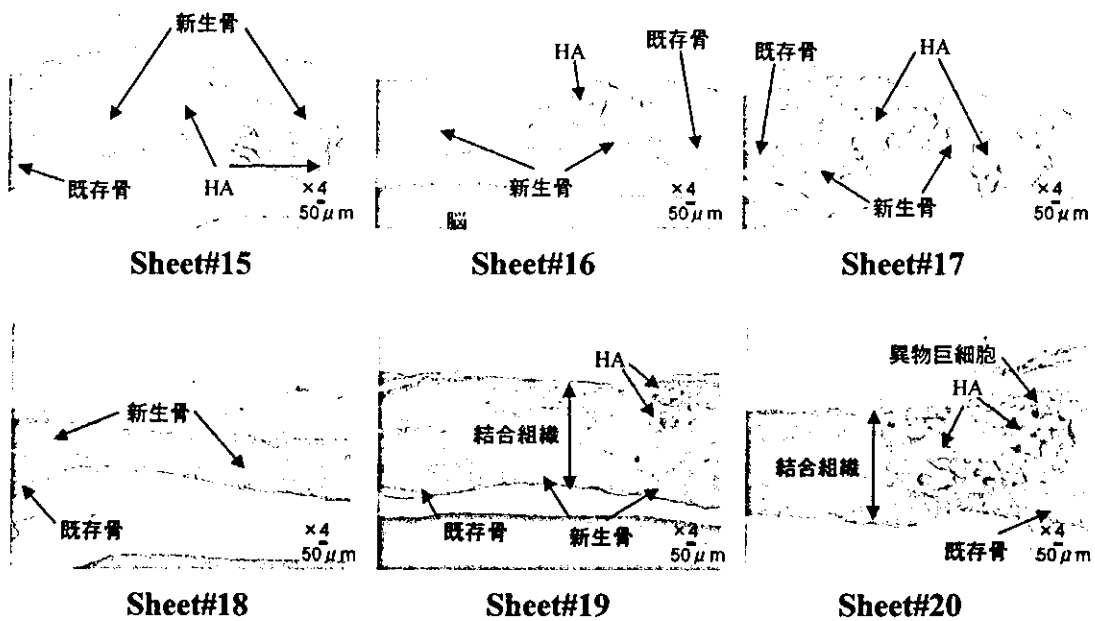


図 2 4. LPS 添加コラーゲン/HA コンポジットシートのラット頭蓋骨埋植試験における骨欠損部の病理組織学的所見 (第 2 週目)

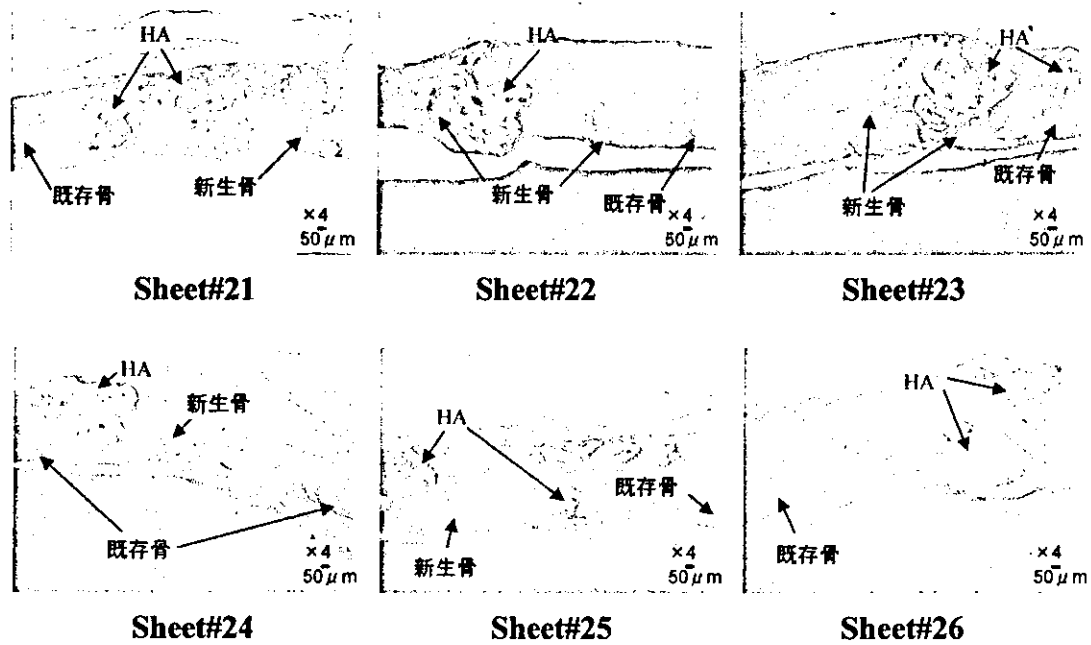


図 25. 菌体添加コラーゲン/HAコンポジットシートのラット頭蓋骨埋植試験における骨欠損部の病理組織学的所見 (第2週目)

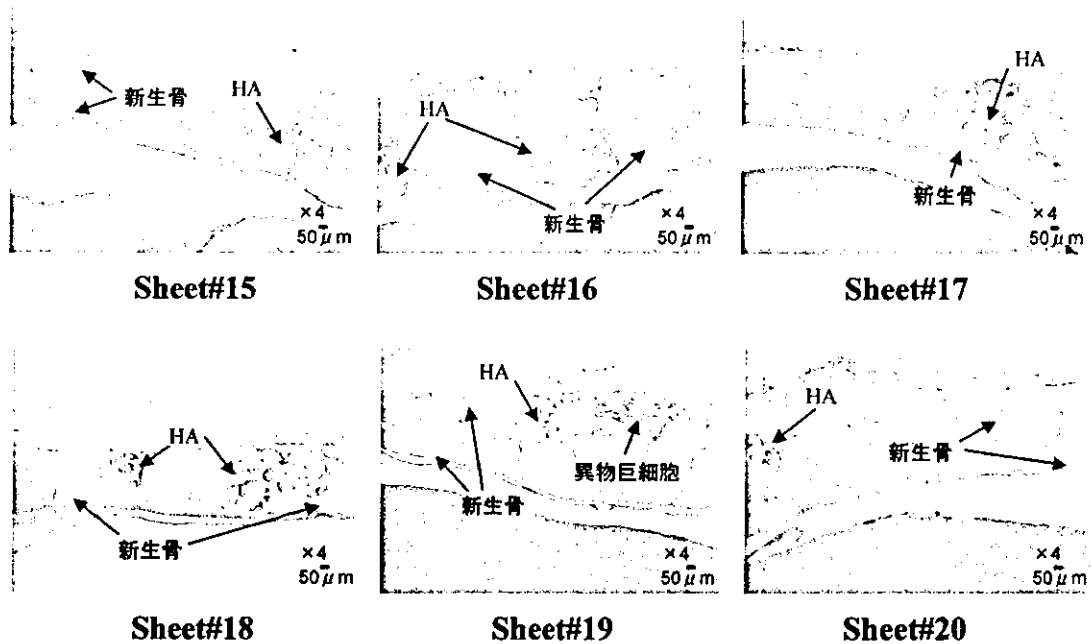


図 26. LPS添加コラーゲン/HAコンポジットシートのラット頭蓋骨埋植試験における骨欠損部の病理組織学的所見 (第4週目)

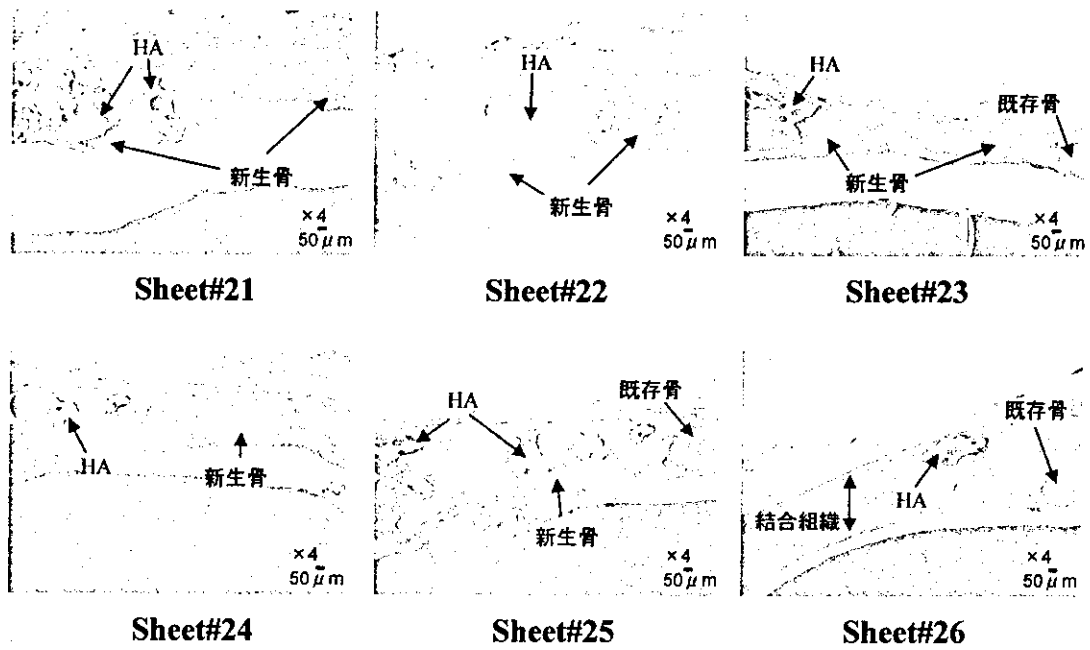


図 27. 菌体添加コラーゲン／HAコンポジットシート of ラット頭蓋骨埋植試験における骨欠損部の病理組織学的所見（第4週目）

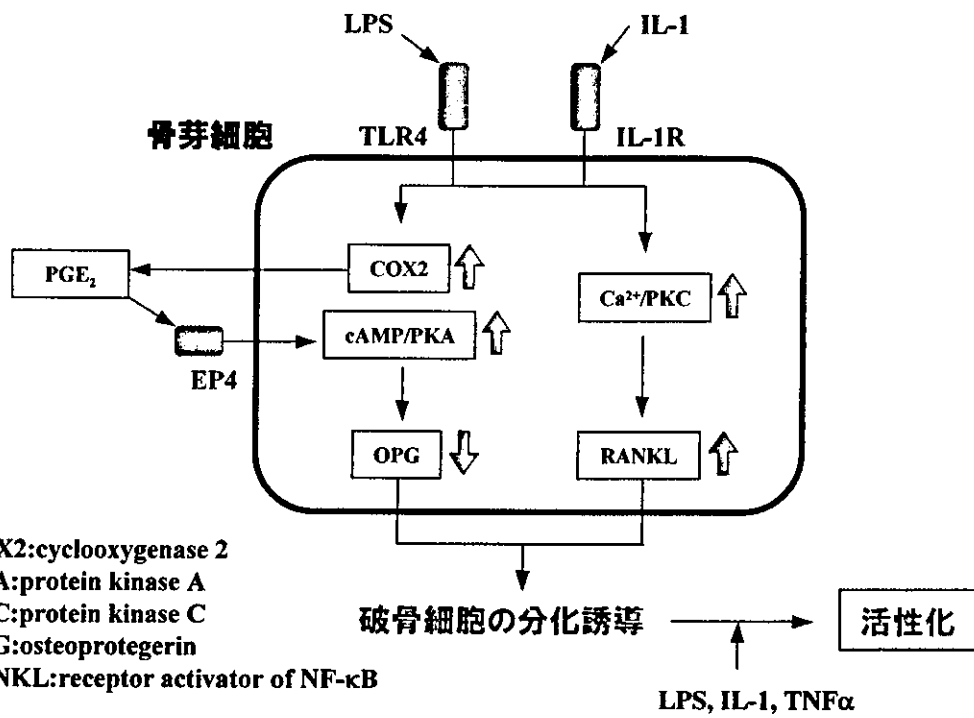


図 28. 骨芽細胞におけるRANKLとOPGの発現に対するLPSとIL-1の作用

## 2. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

五十嵐良明

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
分担研究報告書

医療材料の免疫毒性評価手法の開発

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

Local lymph node assay (LLNA)は試験物質の皮膚感作性を検出方法として新たにOECDガイドラインに採用された。本研究では、LLNAによる感作性物質のリンパ節活性化反応を、ラジオアイソトープ(RI)を用いずに判定できる非RI-LLNAの確立を目的として、種々の非RI-LLNAの感度を比較した。2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)及びhexyl cinnamic aldehyde (HCA)をBALB/cマウスに3日間塗布した後、6日目に耳介リンパ節を取り出し、リンパ節重量、リンパ節細胞数、BrdU取り込み量、ATP量及びalamarBlue取り込み量を測定し、溶媒塗布対照群のそれらに対する増加率(stimulation index, SI)を求めた。DNCBを投与した場合、リンパ節重量は溶媒対照の3.1倍になり、細胞数、ATP量及びalamarBlue取り込み量は5倍以上になった。HCAの場合、リンパ節重量におけるSI値は2.2で、他の測定指標では3~4となった。一方、BrdU取り込み量での判定は他の非RI指標よりは低いSI値しか得られなかった。非RI-LLNAは、<sup>3</sup>HTdR取り込みで評価するLLNAに比べるとまだ若干感度は低い、短時間にかつ同時に実施できる利点があり、中程度の感作性強度を持つ物質の評価には十分と思われた。次に、フローサイトメーターによる細胞表面抗原の解析が感作性評価に有効かどうか確認するため、脾臓及びリンパ節細胞の表面抗原の染色条件について検討した。その結果、T細胞及びB細胞を選択的に分離染色できる至適条件を設定した。

A. 研究目的

国際標準化機構技術委員会(ISO/TC194)は、「医療用具の生物学的評価」の国際規格 10993シリーズに、「医療用具の免疫毒性試験の考え方と方法」に関する文書を新たに追加することで検討が進められている。<sup>1)</sup> この中では免疫毒性を免疫抑制(immunosuppression)、免疫増強(immunostimulation)、感作(hypersensitivity)、慢性炎症(chronic inflammation)及び自己免疫(autoimmunity)に分けて考え、それぞれの発症機構と原因が確認されている材料や添加剤、並びにこれらの試験法について記載されている。

感作性は免疫毒性の中で最も報告がされている事例で、医療材料に使われた添加剤による接触皮膚炎やゴムタンパク質によるアナフィラキシーショックなどが大きな問題となっている。

IgE抗体が関与する即時型アレルギーの評価法としては受動アナフィラキシー試験が行われているが、必ずしも十分とはいえない。一方、遅延型アレルギーについては、モルモット maximization testなどが確立した方法として、医療用具の国際規格の標準試験法、<sup>2)</sup> 及び我が国の医療用具ガイドラインとして採用されている。<sup>3)</sup> 近年、Kimberらは、マウスを用いた新たな感作性試験法として local lymph node assay (LLNA)を開発した。<sup>4,5)</sup> LLNAはバリデーション評価の結果、独立した試験法と認められ<sup>6,7)</sup>、OECDガイドラインに採用されている。<sup>9)</sup> しかし、LLNAはラジオアイソトープ(radioisotope, RI)を用いるため実施できる施設が限られ、我が国ではガイドラインへの採用は見送られている。このため、RIを用いない指標

を採用した変法 LLNA が提案されているものの、<sup>10-12)</sup> これらの感度については十分な評価は得られていない。山下らはリンパ球の増殖活性として細胞内 ATP 量を指標とした結果、LLNA 原法と同等の感度が得られたと報告している。<sup>13)</sup> しかし、LLNA 原法とは試験物質の投与方法などに違いがあり、感度の向上に ATP 量という指標の選択が有効なのか、投与方法の改良が有効なのか明らかではない。ここでは、最も感度良く検出できる非 RI 指標を選択することを目的として、LLNA 原法の操作に従って同一の動物から得たリンパ節について、それぞれの非 RI 指標を用いた評価を行い、比較した。

ISO/PTDS 10993-20 は、フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原の解析を、免疫毒性を評価する上での non-functional assays として取り上げている。<sup>1)</sup> ある種の表面抗原を有する細胞数の比率の変化によって、免疫反応の増強または抑制、及びアレルギー反応の判別ができると考えている。こうしたリンパ球サブポピュレーションの解析は LLNA における非 RI の判定指標としても期待されており、B220 陽性細胞、CD4 あるいは CD8 陽性細胞比率の増加によって、感作性と刺激性を区別できると報告されている。<sup>14-18)</sup> そこで、細胞表面抗原解析が感作性の評価に有効であるかどうかを確認するため、今年度は前段階として、フローサイトメトリー操作技術の習得と、脾臓細胞とリンパ節細胞を用いて抗体での染色条件の最適化を行った。

## B. 研究方法

### 1. 動物

雌性 BALB/c 系マウス(7~10 週齢)を日本 SLC から購入して用いた。

### 2. 試験物質

2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) 及び hexyl cinnamic aldehyde (HCA) は和光純薬工業から購入した。DNCB 及び HCA は acetone-olive oil (4:1, v/v)(AOO)に溶解して、0.5% 及び 25% の濃度で用いた。5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)はナカライテスクから入手し、生理食塩水に溶解して 10

mg/ml とした。

## 3. Local lymph node assay (LLNA)

### 3-1. 被験物質の投与<sup>4,5,7,9)</sup>

マウス(1 群 4 匹)の両耳裏側に試験溶液を 25  $\mu$ l ずつ 3 日間連続塗布した(Day 1,2,3)。対照群は溶媒(AOO)を同様に塗布した。Day 5 に BrdU 溶液 500  $\mu$ l をマウス腹腔内に注射した。

### 3-2. リンパ節細胞浮遊液の調製

Takeyoshi らの方法<sup>12)</sup>に準じ、BrdU 溶液を注射して 24 時間後(Day 6)に、各個体ごとに両方の耳下リンパ節を摘出して重量を測定した。孔径 200 mesh のステンレスメッシュを入れた 24 穴マイクロプレートの各穴に個体ごとにリンパ節を入れ、PBS を 500  $\mu$ l を加えた後、注射筒シリンジを用いてリンパ節を押しつぶし、リンパ節細胞(lymph node cell, LNC)を遊離した。

### 3-3. BrdU incorporation<sup>12)</sup>

LNC 懸濁液はナイロンメッシュを通して 15 ml 遠心管に移し、プレートの各穴を PBS で数回洗ったものを合わせ、総量 5 ml とした。これを、PBS を用いてさらに 3 倍希釈した(最終的に、個体ごと 2 個の耳介リンパ節からのリンパ節細胞を 15 ml PBS に分散したことに相当)。血球計算盤を用いて細胞数を数え、個体ごとに得られた細胞数を求めた。この細胞浮遊液を 100  $\mu$ l ずつ 96 穴プレートの各穴に入れ(1 群 3~4 穴)、市販測定キット(Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Cat.No. 1 647 229, Roche Diagnostics GmbH)に従って操作して、BrdU 取り込み量を測定した。すなわち、プレートを 4°C、300 $\times$ g で 10 分間遠心した後、各穴から上清を除き、ドライヤーを用いて乾燥した。プレートはシールして試験時まで 4°C で保存した。プレートの各穴に FixDenat 200  $\mu$ l 入れ、室温で 30 分間置いた後、上清を除き、抗 BrdU-POD 溶液を 100  $\mu$ l 加えて 90 分間、室温で放置した。上清を除き、各穴を 250  $\mu$ l の PBS 洗浄液で 3 回洗浄した。Tetramethylbenzidine (TMB)基質溶液 100  $\mu$ l を加え、室温で 15 分間放置後、プレートリーダー(Microplate reader Model 550, Bio-Rad Laboratories)で吸光度を測定した(測定波長



400 nm、対照 490 nm)。または、基質溶液を加え 10 分間放置後、1 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液を 25  $\mu$ l 加えた後、吸光度を測定した (測定波長 450 nm、対照 595 nm)。

#### 3-4. ATP content

山下らの方法<sup>13)</sup>を若干変更した。PBS 500  $\mu$ l を入れた 24 穴マイクロプレートの各穴に個体ごとにリンパ節を入れ、押しつぶして調製した LNC 懸濁液から 5  $\mu$ l をとり、PBS でさらに 1000 倍希釈する。この希釈細胞浮遊液について、市販測定キット (Luciferol 250 Plus, Code. No. 60312, Kikkoman Corp.) で ATP 量を測定した。すなわち、細胞浮遊液 10  $\mu$ l をとり、90  $\mu$ l の ATP 抽出液が入った機器専用の測定チューブ (Lumacuvette Cat.No. 9200-0, Lumac) に加えて混合し、20 秒間置いた後、反応液 90  $\mu$ l を加えて攪拌し、即座にルミノメーター (Lumac®/3M Biocounter M2010) を用いて発光量 (relative light unit, RLU) を測定した (25°C、10 秒間)。

#### 3-5. alamarBlue™ uptake

BrdU assay で調製した総量 5 ml の細胞浮遊液について、fetal bovine serum (FBS) を 10% 添加した RPMI1640 培地 (FBS-RPMI) でさらに 3 倍に希釈した。この希釈細胞浮遊液を 100  $\mu$ l ずつ 96 穴プレートの各穴に入れた後、さらに alamarBlue™ (Biosource International, Inc.) を 10  $\mu$ l 加えて 37°C 炭酸ガスインキュベーター中で 3 時間培養した。蛍光プレートリーダー (CytoFluor® II, Fluorescence multi-well plate reader system, Applied Biosystems Japan) を用いて各穴の励起波長 530 nm、測定波長 590 nm における蛍光強度を測定した。

#### 3-6. <sup>3</sup>H-thymidine incorporation (in vitro)

alamarBlue uptake と同様に、BrdU assay で調製した総量 5 ml の細胞浮遊液について FBS-RPMI で 3 倍に希釈した。これを 100  $\mu$ l ずつ 96 穴プレートの各穴に入れた後、<sup>3</sup>H-thymidine (<sup>3</sup>HTdR) 0.5  $\mu$ Ci を添加して、37°C で 3 時間培養した。培養終了後、セルハーベスターを用いてガラスフィルターに細胞を回収し、5 ml のシンチレーション溶液を加えた後、液体シンチレーションカウンターによって細胞内に

取り込まれた <sup>3</sup>HTdR 量 (dpm) を測定した。

#### 3-7. 判定方法

リンパ節重量、LNC 数、BrdU 等の取り込み量及び ATP 量などの各指標について、被験物質を投与した試験群と溶媒のみを塗布した対照群との値の比を stimulation index (SI) として求めた。

#### 4. フローサイトメトリー分析

耳介リンパ節及び脾臓をステンレスメッシュ上に置き、少量の PBS を入れ、押しつぶして細胞を遊離させた。ナイロンメッシュを通して 15 ml の遠心管に移し、4°C、1200 rpm で 5 分間遠心した。LNC については、上清を除いた後、PBS を加えて再度遠心して洗浄した。脾臓細胞については、上清を除いた後、PBS 1 ml 及び 1.66% NH<sub>4</sub>Cl 溶液 1 ml を加えて攪拌し、37°C で 5 分間静置して赤血球を溶血させた。PBS を加えて攪拌し 2 回遠心して洗浄した。LNC 及び脾臓細胞は 1% bovine serum albumin (BSA) を加えた PBS (CellWASH™, BD Biosciences) (BSA-PBS) に浮遊させ、血球計数盤を用いて細胞数を数えた。その後、BSA-PBS を用いて 1 $\times$ 10<sup>7</sup> cells/ml の濃度に調製した。これらの細胞浮遊液 100  $\mu$ l を、Fc ブロッカー (rat anti-mouse CD16/CD32 (Fc  $\gamma$  III/II receptor) monoclonal antibody, Mouse BD Fc Block™, 2.4G2, BD Biosciences Pharmingen) 1  $\mu$ g の入れたチューブに入れ、遮光下、氷上で 5 分間静置した。次に、各抗マウスモノクローナル抗体 (BD Biosciences) を至適量添加し、氷上で遮光下 30 分間インキュベートして細胞を染色した。用いた抗体は次のとおり。Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated hamster anti-mouse CD3e (CD3  $\epsilon$  chain) monoclonal antibody (145-2C11), R-phycoerythrin (PE)-conjugated rat anti-mouse CD19 monoclonal antibody (1D3), PE-conjugated rat anti-mouse CD4 (L3T4) monoclonal antibody (H129.19), PE-conjugated rat anti-mouse CD8a (Ly-2) monoclonal antibody (53-6.7), PE-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220 monoclonal antibody (RA3-6B2)。また、isotype control として、FITC-conjugated

hamster IgG1\*,  $\kappa$  monoclonal immunoglobulin isotype control (anti-trinitrophenol) (A19-3) 及び PE-conjugated rat IgG2a,  $\kappa$  monoclonal immunoglobulin isotype control (R35-95)。インキュベート終了後、BSA-PBS 1 ml を加え、4°C、500×g で 5 分間遠心して洗浄した。上清を捨て、再度 BSA-PBS 1 ml を加えて洗浄し、上清を除いた後、1%パラホルムアルデヒド溶液(CellFIX™, BD Biosciences)を 0.5~1 ml 加えて混和し、細胞を固定した。固定した細胞浮遊液はメッシュを通し、解析まで遮光下 4°C で保存した。フローサイトメーター(FACSCalibur™, BD Biosciences)を用いて 10000 個の細胞を測定し、FACSComp 及び CELLQuest (BD Biosciences)の 2 つのソフトウェアを用いて、フローサイトメーターの機器設定及びデータ解析を行った。

## C. 研究結果

### 1. LLNA の評価指標の比較

BALB/c系マウスに DNCB 及び HCA の AOO 溶液を 3 日間連続塗布した後、耳下リンパ節を摘出して個体ごとに重量、細胞数及び増殖度を測定した(表 1)。0.5% DNCB を塗布するとリンパ節重量は溶媒対照の 3 倍程度大きくなり、リンパ節細胞数も 5 倍程度となった。HCA は 25%で塗布した場合、重量が 2 倍、細胞数は 3 倍となった。BrdU 取り込み量を ELISA の吸光度変化によって判定した場合、DNCB 群では 4 倍となるが、HCA では 1.4 倍と少なく、血球計算盤での細胞数測定よりも SI 値は低くなった。ATP 量を発光量で測定した場合は、細胞数測定と同等の SI 値を示した。alamarBlue の取り込み量を蛍光強度で測定した場合、より高い SI 値が得られた。同じ細胞浮遊液に <sup>3</sup>HTdR を *in vitro* で添加して取り込み量を測定した場合、非 RI の各指標に比べて SI 値は若干高く、DNCB で 7.9、HCA で 4.9 の値が得られた(図 1)。

### 2. フローサイトメトリー解析

T 細胞と B 細胞の比率、及び各 T 細胞サブセット比を見るための蛍光標識抗体による染色条件の検討を行った。未処理マウスから耳介リン

パ節及び脾臓を摘出し細胞を遊離させ、#1~#5 の抗体の組み合わせで染色を行った。#1: IgG1\*,  $\kappa$  FITC/IgG2a,  $\kappa$  PE (適切な negative/positive 領域を分けるマーカー設定に必要な陰性コントロール)、#2: anti CD3e FITC/anti CD19 PE (T 細胞と B 細胞の比率測定)、#3: antiCD3e FITC/anti CD4 PE (正確なヘルパー T 細胞の測定)、#4: CD3e FITC/anti CD8a PE (正確な細胞障害性 T 細胞の測定)、#5: CD3e FITC/anti CD45R/B220 (T 細胞と B 細胞の比率の別抗原による測定)。これらすべての染色を行うには LNC の場合、マウス 1 匹だけの耳介リンパ節からの細胞数では少ないので、数匹分のリンパ節をまとめる必要があった。脾臓の場合は 1 匹からの細胞で多くの染色パターンの組み合わせができ、1 群に数匹用いることにより統計解析が可能であった。

フローサイトメトリーでの細胞の大きさと内部構造によるドットプロットで、リージョン設定部分の違い (Region 1 (R1), Region 2(R2) 及び Region 3(R3)) によって細胞染色の様子に差があるか T 細胞と B 細胞の分布比から検討した(図 2)。最も細胞数の多い R1 ではほとんどが CD3 陽性の T 細胞か、CD19 陽性の B 細胞のいずれかに区別されているが、R2 ではわずかながらダブルポジティブの細胞が見られる。R3 では R2 同様にダブルポジティブに弱く染色された細胞が見られるのに加えて、ダブルネガティブの染色されない細胞も多くあった。

Anti-mouseCD16/CD32(Fc $\gamma$  III/II receptor) monoclonal antibody (2.4G2)はマウス Fc $\gamma$  III と Fc $\gamma$  II レセプターの細胞外ドメイン上の一一般的な nonpolymorphic エピトープと反応し、抗体の Fc $\gamma$  III と Fc $\gamma$  II レセプターへの抗原非特異的結合を阻害する。<sup>19)</sup> 染色前にブロッキングすると非特異的染色される細胞プロットのバックグラウンドが低くなるとされている。この効果を確認するため、細胞をブロッキング剤で処理し標識抗体を加えたものと、ブロッキング処理せずに染色したものととの染色像を比較した(図 3)。細胞の染色程度には両者とも差がないものの、陽性/陰性領域を分けるマーカー設定値を同じにしてゲーティングすると、ブロッキン

グ剤がない場合、陰性から陽性になる細胞数が多くなり、区別のためにはマーカー設定値を高くする必要があった。特に、①ではこうしたあいまいな領域の細胞が多くなった。

抗体メーカーからのデータシートでは、染色に用いる抗体濃度を  $10^6$  個の細胞あたり  $<1 \mu\text{g}$  と設定している。市販 FITC 標識抗体原液は  $0.5 \text{ mg/ml}$ 、PE 標識抗体原液は  $0.2 \text{ mg/ml}$  であるため、 $10^6$  個の細胞に対してそれぞれ 2 及び  $5 \mu\text{l}$  添加した場合に  $1 \mu\text{g}$  になる。染色に至適の抗体濃度を決定するため、まず、 $10^6$  個/ $100 \mu\text{l}$  の細胞浮遊液に  $0.2 \text{ mg/ml}$  に希釈した Blocker 溶液  $5 \mu\text{l}$  を添加した後、以下の濃度の FITC 及び PE 標識抗体溶液をそれぞれ  $5 \mu\text{l}$  添加して反応させ、プロット像を比較した(図 4)。Dilution  $\times 1$ (市販原液): FITC-conjugated antibody  $500 \mu\text{g/ml}$ /PE-conjugated antibody  $200 \mu\text{g/ml}$ 、Dilution  $\times 5$ (市販 5 倍希釈): FITC-conjugated antibody  $100 \mu\text{g/ml}$ /PE-conjugated antibody  $40 \mu\text{g/ml}$ 、Dilution  $\times 10$ (市販 10 倍希釈): FITC-conjugated antibody  $50 \mu\text{g/ml}$ /PE-conjugated antibody  $20 \mu\text{g/ml}$ 。#1 の陰性コントロールでは、Dilution  $\times 1$  では他の条件に比べて若干 upper 領域の細胞数が多くなり、PE に非特異的に染色されている細胞数が多いことがわかる。他の条件では著しい違いはない。#2 では T 細胞を FITC 標識、B 細胞を PE 標識するが、リンパ球はどちらかに分類される。Dilution  $\times 1$  ではダブル染色された UR 領域にあるもの数が多く、細胞が非特異的に染色されているといえる。希釈度が上がるにつれ、この領域の数が少なくなるが、今回示した条件よりさらに希釈した抗体を使用した場合、FITC 標識される程度が低くなり、標識されていない LL と LR 領域との境界域が狭くなった。

未処置マウスの耳介リンパ節及び脾臓リンパ球についてブロッキング後、5 倍に希釈した市販 FITC 及び PE 標識の各抗体で染色し、T/B 細胞及び T 細胞サブポピュレーション比率を求めた(表 2)。CD3 陽性の T 細胞数はリンパ節中では約 73% であるのに対し、脾臓リンパ球中では 33% の比率となった。CD4 陽性のヘルパー T 細胞はリンパ節中では 46% で、T 細胞のうち

63% を占める。脾臓における T 細胞中のヘルパー T 細胞の割合も同様であった。B 細胞比率は脾臓の方がリンパ節よりも多かった。B 細胞のマーカーである CD19 陽性と B220 陽性の細胞比率はほぼ同じような値を示した。

#### D. 考察

LLNA はモルモット感作性試験法の持つ主観的要素の入る判定評価、試験操作の煩雑性等の問題点を改良しているが、<sup>4,5)</sup> RI を動物に注射するため実施できる試験機関が限られていた。非 RI エンドポイントでの評価を目指したいくつかの試みがなされているが、<sup>10-12)</sup> 感度や再現性ができるだけ高いものが望まれる。ここでは、LLNA 原法に従って操作して得たリンパ節の活性をこれらの非 RI 法で測定、*in vitro* RI 法と比較した。試験物質として、非常に強い感作性が知られる DNCB と、OECD で陽性対照として推奨されている中程度レベルの HCA を用いた。<sup>9,20,21)</sup>

非 RI 法ではそれぞれ原理は異なるものの生細胞数に比例してエンドポイントの発色・発光量に変化し、血球計算盤を使用して細胞数を測定したときとほぼ同様の SI 値が得られた。0.5% DNCB で SI 値は 5 程度、25% HCA では 3~4 の値であり、リンパ節重量で見た SI 値よりは大きな値となった。ATP はリンパ節細胞の摘出後の時間に影響されやすいことから、1 匹ずつの測定になるが、標識物質の注射や細胞培養の必要がなく簡単に測定できた。alamarBlue の取り込み量は細胞自体の活性化の程度にも影響されるのか、細胞数測定よりも大きな SI 値が得られた。BrdU 法は原理的には最も LLNA 原法に近いものである。LLNA 原法では <sup>3</sup>HTdR を尾静脈から注射するのに対し BrdU は腹腔内注射で簡便にできる利点がある。BrdU は <sup>3</sup>HTdR と同様に、DNA 合成が行われている細胞ほど取り込みが多くなる。よって、こうした反応は刺激を受けた細胞群だけに起こり AOO 対照群では少ないため、バックグラウンドは低く、結果的に差が大きくなるのではないかと思われた。しかし、BrdU-ELISA では吸光度のダイナミックレンジが影響するのか、低い

SI 値しか得られなかった。また、ELISA 操作ではプレートの洗浄やインキュベーション時間等、細胞活性以外のところでの測定誤差の要因も多いと思われた。

HCA は DNCB よりも高濃度で投与しているにもかかわらず低い値しか得られないことから、感作性強度は DNCB に比べて弱いことがわかる。DNCB と HCA の SI 値の大きさに関しては非 RI のいずれの指標とも同様の順序となっており、相対的な強度比較はどの指標を用いても評価できた。LLNA では SI 値 3 以上を示す試験物質を陽性とし、感作性物質として判定する。<sup>4,5,7,9)</sup> 今回の非 RI 法の各指標は、<sup>3</sup>H TdR 取り込みの指標に比べるとまだ若干感度が低い、中程度の感作性強度を持つ物質の判定には十分ではないかと思われた。また、プレートリーダーでの発光あるいは発色測定は、血球計算盤での細胞数の肉眼計測よりは簡単であり、短時間にかつ同時に実施できる利点もある。Woolhiser らは LLNA におけるマウス系統差について検討し、BALB/c 系よりも CBA 系マウスがより高い SI 値を示すと報告している。<sup>22)</sup> したがって、BALB/c 系マウスから CBA 系マウスに変更することにより感度も改良されると思われる。山下らは試験物質の投与回数を増やすことによって試験法の感度を上げており、<sup>13)</sup> これらの組み合わせも含めて、今後検討を進める予定である。

リンパ節及び溶血処理した後の脾臓からの細胞浮遊液はリンパ球がほとんどであるが、若干ではあるが他細胞の混入もあると思われる。フローサイトメトリーでの細胞の大きさや内部構造によるドットプロットでもばらつきのある部分が見られる。こうした中でリンパ球集団を選択（ゲーティング）し、これらに対して表面抗原を解析することとなる。リンパ球は T または B リンパ球のどちらかに分類されること、ダブルポジティブのリンパ球は存在しないことから、検討の結果、R1 に設定した部分が目的とするリンパ球集団であり、この部分の表面抗原解析することとした(図 1)。ブロッキング処理は非特異的に染色された細胞によるプロットによるバックグラウンドの上昇を抑える。ブロッキングし

ない場合は陽性と陰性領域を分けるマーカー設定値を高くする必要があり、境界付近の細胞も見られた。染色に用いる抗体濃度について検討した結果、市販 FITC 標識抗体原液 0.5 mg/ml、PE 標識抗体原液 0.2 mg/ml を 5~10 倍希釈して、 $10^6$  cells/100  $\mu$ l の細胞に対してそれぞれ 5  $\mu$ l 添加した場合に最もよいプロットが得られた。したがって、 $10^6$  個の細胞あたり FITC 標識抗体は 0.25~0.5  $\mu$ g、PE 標識抗体は 0.1~0.2  $\mu$ g を加えて染色することとした。

未処置マウスの耳介リンパ節及び脾臓リンパ球について T/B 細胞及び T 細胞サブpopulation 比率を測定した結果、CD3 陽性の T 細胞数はリンパ節中では約 73% であるのに対し、脾臓リンパ球中では 33% の比率となった。B 細胞のマーカーである CD19 陽性と B220 陽性の細胞比率はほぼ同じような値を示し、その陽性細胞数は脾臓の方がリンパ節よりも多かった。今回は週齢の多い retire BALB/c 系マウスを用いてのデータを示したが、CBA/J マウスでの報告<sup>15)</sup> と比べると若干 B 細胞の比率が高い。これが、系統や週齢の違いによるのか、あるいは抗体濃度の違いによる染色技術による差からくるのか、今後検討する。Gerberick らは B220 陽性細胞が感作性物質の投与によりリンパ節中に多く出現すると報告し、これが LLNA での刺激性物質と感作性物質を区別するための有用な指標ではないかとしている。<sup>15)</sup> また、CD4、CD8 陽性細胞の比率も変化すると報告もある。<sup>18)</sup> フローサイトメーター測定の定量性も含め、これらが非 RI-LLNA の指標として有用であるか検討していく必要がある。

## E. 総括

LLNA に従って、DNCB 及び HCA を BALB/c マウスに 3 日間塗布した後、6 日目に耳介リンパ節を取り出し、リンパ節重量、LNC 数、BrdU 取り込み量、ATP 量及び alamarBlue 取り込み量を測定した。DNCB を投与した場合、溶媒対照群に比べてリンパ節重量の増加率(SI 値)は 3.1、細胞数、ATP 量及び alamarBlue 取り込み量の SI 値は 5 程度になった。HCA の場合、リンパ節重量の SI 値は 2.2、他の指標では 3~

4 となった。一方、BrdU 取り込み量は他の指標より低い値しか得られなかった。これらの指標は RI と比べると若干感度が低い、短時間にかつ同時に実施できる利点があり、中程度の感作性強度を持つ物質の評価には十分と思われた。フローサイトメーターによる解析の前段階として、脾臓細胞と LNC の蛍光標識抗体での染色条件について検討した。その結果、T 及び B 細胞を効率良く染色する抗体濃度などの至適条件が設定できた。

#### F. 参考文献

1. ISO/PDTS 10993-20: Biological evaluation of medical devices-Part 20: Principles and methods for immunotoxicology testing of medical devices
2. ISO 10993-10: 2002, Biological evaluation of medical devices-Part 10: Tests for irritation and delayed type hypersensitivity
3. 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)
4. Kimber, I., Basketter, D.A. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 165-169 (1992)
5. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W., Basketter, D.A. *Toxicology* 93, 13-31 (1994)
6. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 249-257 (2001)
7. Dean, J.H., Twerdok, L.T., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 258-273 (2001)
8. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274-286 (2001)
9. OECD, 2002. Guidelines for testing of chemicals. Guideline no.429. skin sensitization: local lymph node assay
10. Hatao, M., Hariya, T., Katsumura, Y., Kato, S. *Toxicology* 98, 15-22 (1995)
11. Suda, A., Yamashita, M., Tabei, M., Taguchi, K., Vohr, H.W., Tsutsui, N., Suzuki, R., Kikuchi, K., Sakaguchi, K., Mochizuki, K., Nakamura, K. *J. Toxicol. Sci.*, 27, 205-218 (2002)
12. Takeyoshi, M., Sawaki, M., Yamasaki, K. *Toxicology* 191, 259-263 (2003)
13. 山下邦彦, 出原賢治, 福田徳夫, 山岸 学, 河田直紀. 第 10 回日本免疫毒性学会学術大会講演要旨集, p.70 (2003)
14. Gerberick, G.F., Cruse, L.W., Miller, C.M., Sikorski, E.E., Ridder, G.M. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 146, 1-10 (1997)
15. Gerberick, G.F., Cruse, L.W., Ryan, C.A., Hulette, B.C., Chaney, J.C., Skinner, R.A., Dearman, R.J., Kimber, I. *Toxicol. Sci.*, 68, 420-428 (2002)
16. Gerberick, G.F., Cruse, L.W., Miller, C.M., Ridder, G.M. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 159, 142-151 (1999)
17. Manetz, T.S., Meade, B.J. *Toxicol. Sci.*, 48, 206-217 (1999)
18. Humphreys, N.E., Dearman, R.J., Kimber, I. *Toxicol. Sci.*, 73, 80-89 (2003)
19. BD Bioscience Pharmingen. Technical Data Sheet. Purified rat anti-mouse CD16/CD32 (Fc $\gamma$  III/II receptor) monoclonal antibody (Mouse BD Fc Block™)
20. Basketter, D.A., Sholes, E.W. *Toxicology* 30, 65-69 (1992)
21. Basketter, D.A., Blaikie, L., Dearman, R.J., Kimber, I., Ryan, C.A., Gerberick, G.F., Harvey, P., Evans, P., White, I.R., Rycroft, R.J.G. *Contact Dermatitis* 42, 344-348 (2000)
22. Woohhiser, M.R., Munson, A.E., Meade, B.J. *Toxicology* 146, 221-227 (2000)

表1. LLNAで2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)及びhexyl cinnamic aldehyde (HCA)を塗布したときのリンパ節の活性化反応

Chemical	Lymph node weight (mg)		Lymph node cell number ( $\times 10^6$ )		BrdU labeling index (O.D.)	
	Mean $\pm$ SD	SI	Mean $\pm$ SD	SI	Mean $\pm$ SD	SI
AOO	6.63 $\pm$ 0.76		9.53 $\pm$ 1.65		0.397 $\pm$ 0.163	
0.5% DNCB	20.50 $\pm$ 2.64	3.1	47.81 $\pm$ 8.99	5.0	1.554 $\pm$ 0.320	3.9
25% HCA	14.67 $\pm$ 1.14	2.2	33.58 $\pm$ 3.79	3.5	0.566 $\pm$ 0.211	1.4

Chemical	ATP content (RLU)		alamarBlue uptake (FI)		$^3$ HTdR incorporation (dpm)	
	Mean $\pm$ SD	SI	Mean $\pm$ SD	SI	Mean $\pm$ SD	SI
AOO	3254 $\pm$ 1066		2618 $\pm$ 279		201 $\pm$ 27	
0.5% DNCB	16878 $\pm$ 4311	5.2	14538 $\pm$ 3109	5.6	1584 $\pm$ 315	7.9
25% HCA	11266 $\pm$ 2560	3.5	10205 $\pm$ 1000	4.1	991 $\pm$ 197	4.9

AOO = acetone:olive oil (4:1).

各指標の値は4匹のマウスの平均(mean) $\pm$ 標準偏差 (SD) を示した。

各stimulation index (SI)は溶媒対照(AOO)群に対する各試験物質処理群の平均値の増加率を示す。

表2. マウスリンパ節及び脾臓リンパ球のT細胞及びB細胞の比率

	B cells		T cells		
	CD19+ (%)	B220+ (%)	CD3+ (%)	CD3+CD4+ (%)	CD3+CD8+ (%)
Lymph node	28.2	23.3	73.1	46.5	24.7
Spleen	56.3	60.4	33.2	21.3	11.0

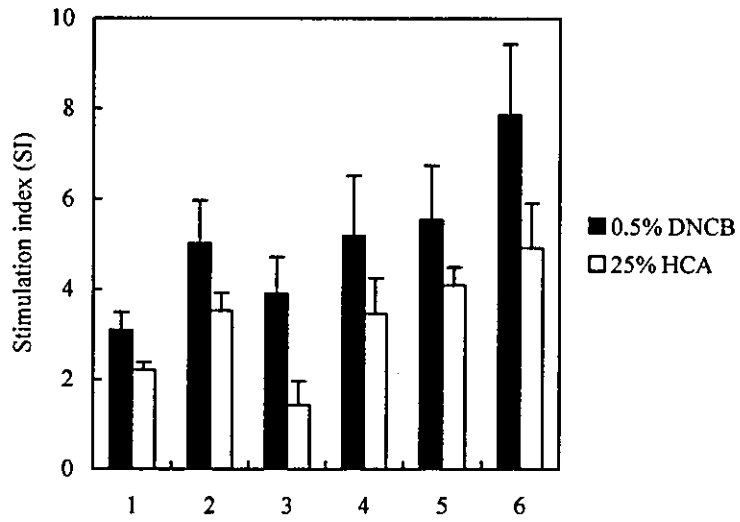


図1. LLNAにおける各指標のstimulation index (SI)値

- 1. lymph node weight
- 2. lymph node cell number
- 3. BrdU incorporation
- 4. ATP content
- 5. alamarBlue uptake
- 6. <sup>3</sup>HTdR incorporation

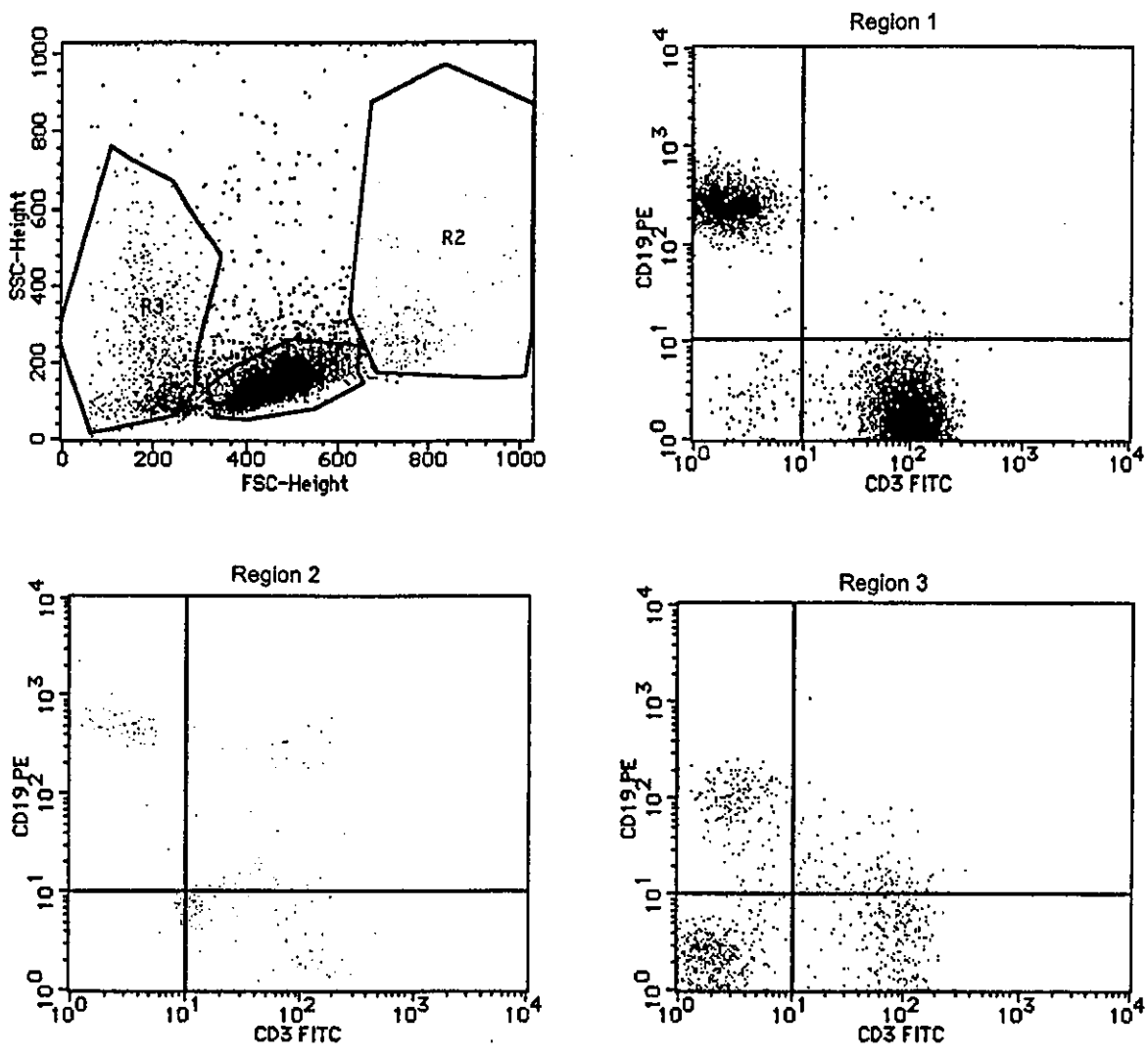


図2. マウスリンパ節細胞のリージョン設定の違いによる T 及び B 細胞分布の変化  
 細胞の大きさ(FSC)と内部構造(SSC)によって脾臓細胞を3つのリージョン (R1, R2, R3)  
 に分け、それぞれの領域における FITC 標識抗 CD3 抗体及び PE 標識抗 CD19 抗体で染色  
 された細胞の分布を示した。抗 CD3 抗体は T 細胞、抗 CD19 抗体は B 細胞を認識する。



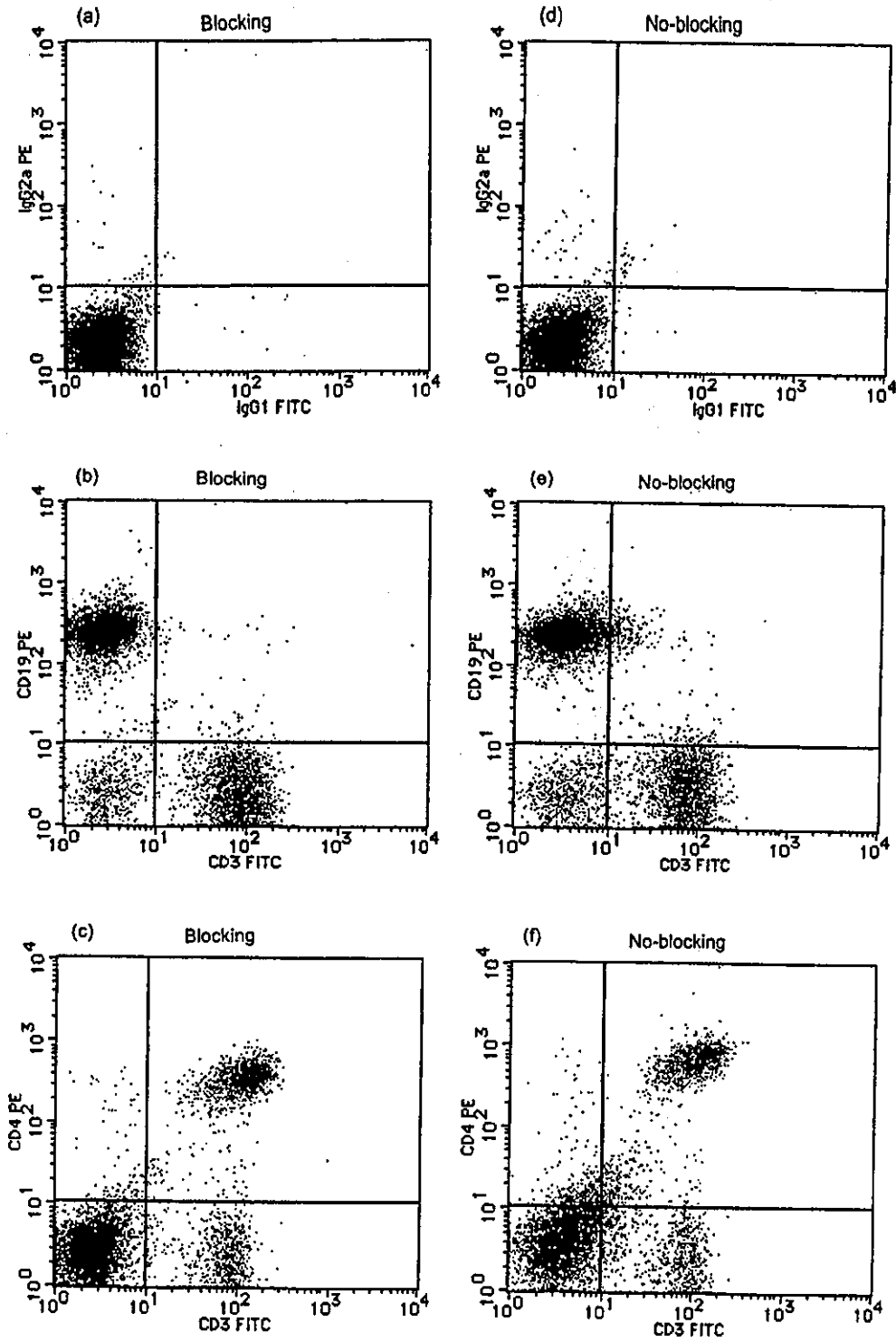


図 3. 細胞染色時におけるブロッキング剤の有無の効果  
 細胞浮遊液に抗マウス CD16/CD32(FC $\gamma$  III/II receptor)抗体を加え、遮光下、氷上で 5 分間インキュベートしてブロッキング(Blocking)した。その後、これに FITC 及び PE 標識した各抗マウス抗体を加えて 30 分間インキュベートして染色した(a,b,c)。ブロッキング剤を添加せずに、直ぐに抗体で処理したものを No-blocking 群とした(d,e,f)。  
 (a), (d) : IgG1-FITC / IgG2a-PE で染色、 (b), (e) : CD3-FITC / CD19-PE で染色  
 (c), (f) : CD3-FITC / CD4-PE で染色

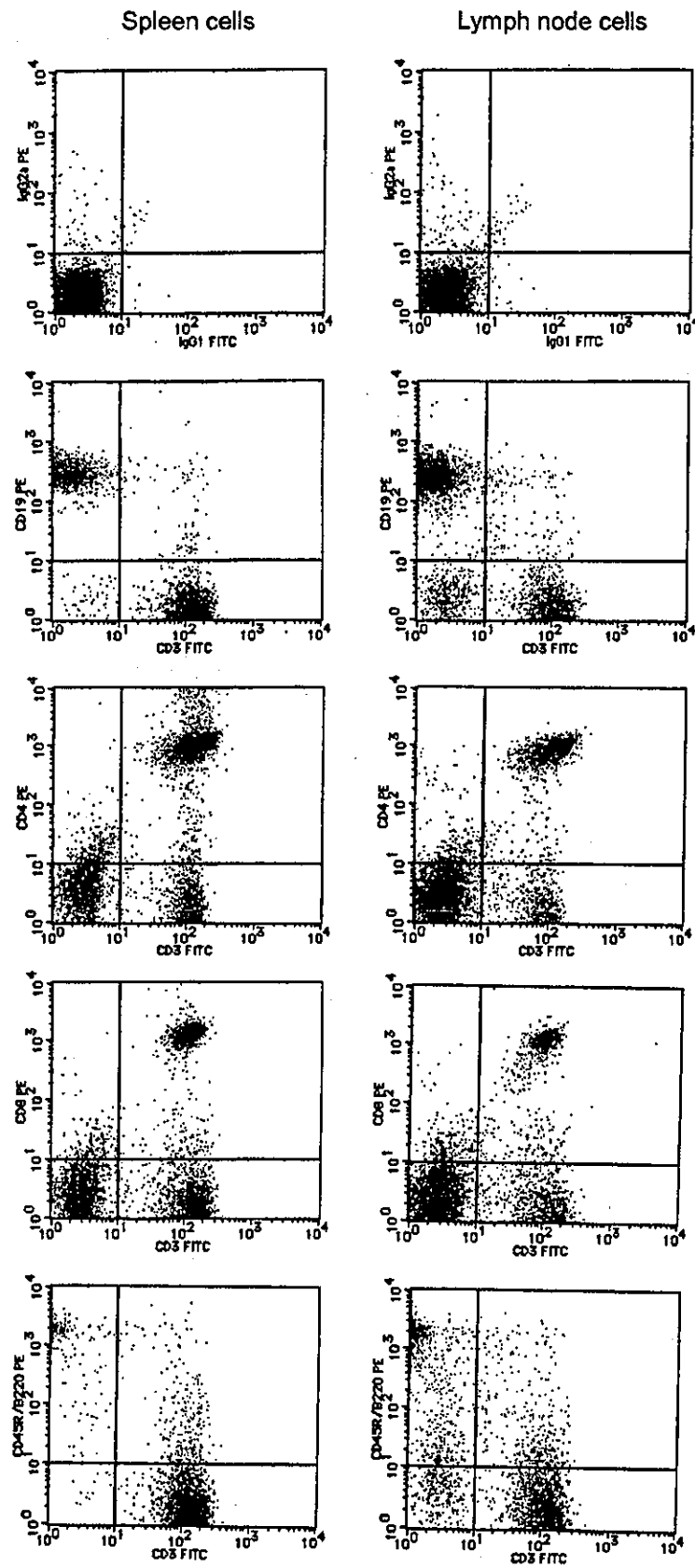


図 4. 抗体濃度と染色像 (dilution×1)  
 市販の各 FITC 及び PE 標識抗体を希釈した。細胞にそれぞれの抗体を添加して染色後、  
 フローサイトメトリーで解析した。

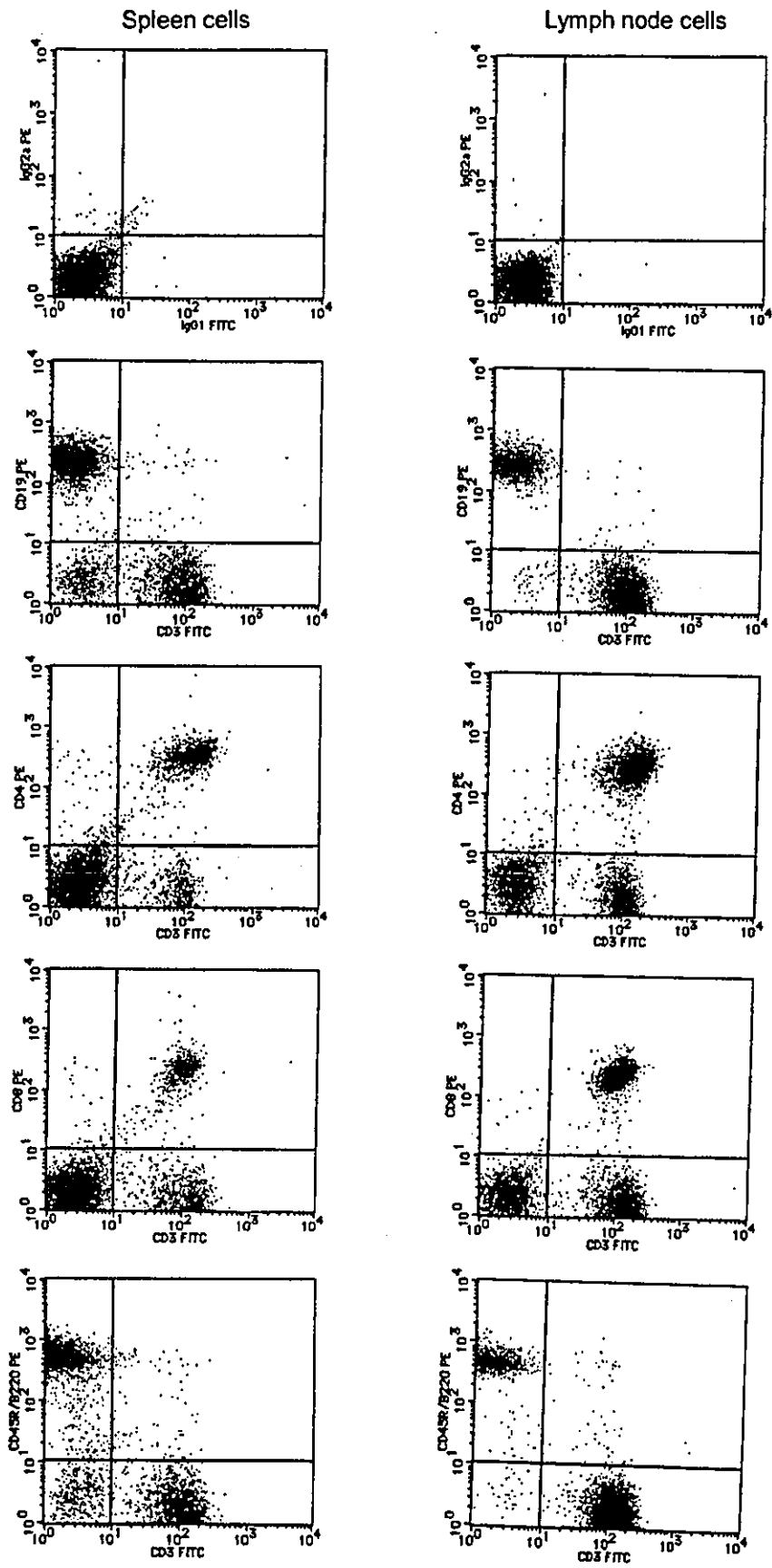


図 4. 続き (dilution×5)

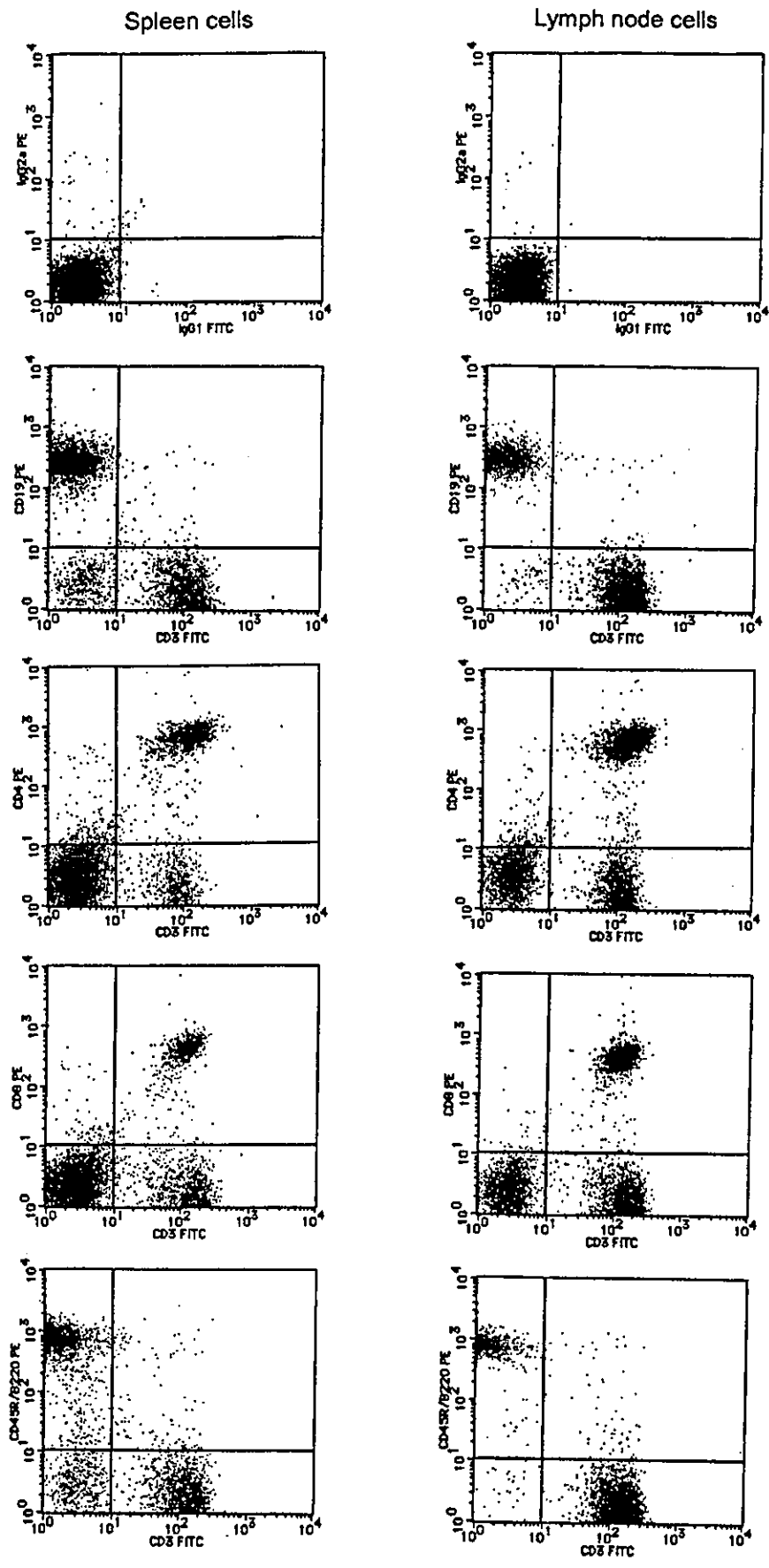


図 4. 続き (dilution × 10)