

- ウスリンパ節増殖法 (non-RI LLNA 法) の妥当性の検討. 第 42 回全国衛生化学技術協議会年会 (2005.11、東京).
57. 齧島由二、伊佐間和郎、松岡厚子、長谷川千恵、松田良枝、柚場俊康、中橋敬輔、矢上健、土屋利江. 表面改質処理を施した軟質 PVC シートの化学的・生物学的特性評価. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11、京都).
 58. 伊佐間和郎、齧島由二、松岡厚子、長谷川千恵、松田良枝、柚場俊康、土屋利江. 紫外線照射処理を施した PVC 製医療機器の化学的・生物学的特性. 日本薬学会第 126 年会 (2006.3、仙台).
 59. 佐藤道夫、土屋利江: 医療機器の不具合報告について、第 42 回全国衛生化学技術協議会年会(H17.11.18).
 60. Ryusuke Nakaoka and Toshie Tsuchiya, Enhancement of differentiation and homeostasis of human osteoblasts by interaction with hydroxyapatite in microsphere form. *Bioceramics* 18, 2005.12, Kyoto.
 61. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics. *Bioceramics* 18, 2005.12, Kyoto.
 62. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya, Novel calcium phosphate ceramics: The remarkable promoting action on the differentiation of the normal human osteoblasts. *Bioceramics* 18, 2005.12, Kyoto.
 63. 賀喜白乙、中岡竜介、土屋利江、吸収性局所止血材料と吸収性癒着防止材料の安全性に関する研究 (1) 細胞毒性試験による評価、第 43 回日本人工臓器学会大会(2005.12)、東京
 64. 賀喜白乙、中岡竜介、土屋利江、外科手術材料の安全性に関する研究 (1): 細胞毒性試験による評価、第 27 回日本バイオマテリアル学会大会(2005.11)、京都
 65. 中岡竜介、土屋利江、ナノ蛍光イメージングによる細胞-多糖 Scaffold 間相互作用観察の試み、第 27 回日本バイオマテリアル学会大会(2005.11)、京都
 66. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, In vitro study on the osteogenesis of normal human osteoblasts cultured on the discs of various kinds of calcium phosphate ceramics. *Asian BioCeramics Symposium 2005*, 2005.10, Sapporo.
 67. 中岡竜介、土屋利江、軟骨組織再生を目指した新規アルギン酸ゲルの in vitro 評価、第 8 回日本組織工学会 (2005.9)、東京
 68. 脇谷滋之. 骨髄間葉系細胞移植移植による関節軟骨欠損の修復の成績を臨床評価の問題点. 第 30 回日本関節学会、平成 17 年 2 月 東京
 69. 天正恵治、中村幸男、岡部高弘、中谷宏幸、脇谷滋之. 軟骨修復における BMP-2 と FGF-2 の相互作用の検討. 第 4 回日本再生医療学会、平成 17 年 3 月 大阪
 70. 中嶋正明、秋山純一、脇谷滋之、山本浩司、闕上凱、富田直秀. 胚性幹細胞 (ES 細胞) 移植後の関節運動が関節軟骨の再生に及ぼす影響 (Part 3). 第 4 回日本再生医療学会、平成 17 年

- 3月 大阪
71. 山本浩司、中嶋正明、原田恭治、脇谷滋之、門林義幸、富田直秀. 胚性幹細胞 (ES 細胞) 移植後の関節運動が関節軟骨の再生に及ぼす影響 (Part 4:環境設定の指針) 第4回日本再生医療学会、平成17年3月 大阪
72. 高木睦、近藤真一、服部裕美、梅津洋介、藤原政司、脇谷滋之. 間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化培養における細胞形態によるアグリカン発現率の診断. 第4回日本再生医療学会、平成17年3月 大阪
73. 天正恵治、中村幸男、岡部高弘、中谷宏幸、脇谷滋之. 異所性骨形成における Bone Morphogenetic Protein -2 と Fibroblast Growth Factor-2 の相互作用の検討. 第18回日本軟骨代謝学会、平成17年3月 吹田
74. 脇谷滋之、中村幸男、天正恵治、岡部高弘、中谷宏幸. 成長因子投与による関節軟骨欠損修復. 第78回日本整形外科学会、平成17年5月 横浜
75. 脇谷滋之. 関節軟骨の再生 (ワークショップ 再生医療は今 ~世界の現状~). 第26回日本炎症再生学会、平成17年7月 新宿
76. 中谷宏幸、清水富長、岡部高弘、高岡邦夫、吉川秀樹、脇谷滋之. Sonoporation (超音波遺伝子導入法) を用いた家兎関節炎モデル炎症滑膜への MTX 導入による抗炎症効果. 第20回日本整形外科学会基礎学術集会、平成17年10月 伊勢
77. 中谷宏幸、寺本彰、岡部高弘、吉川秀樹、阿部康次、脇谷滋之. 多材高分子複合スポンジを用いた Scaffold による軟骨欠損修復. 第20回日本整形外科学会基礎学術集会、平成17年10月 伊勢
78. 五十嵐昇、富田直秀、遠藤ミゲル雅崇、脇谷滋之、山本浩司、寺村聡、勝呂徹. 骨髄間葉系幹細胞採取針の開発 (Part1). 第20回日本整形外科学会基礎学術集会、平成17年10月 伊勢
79. 脇谷滋之、村上成道、山崎宏、加藤博之、大串始、高倉義典. 骨髄間葉系細胞による関節の再建 (パネルディスカッション 関節の再生). 第32回日本股関節学会、平成17年11月 新潟
80. 五十嵐昇、富田直秀、脇谷滋之、山本浩司、玉田靖、勝呂徹. 生体環境設計による軟骨再生 (シンポジウム 軟骨再生の実現可能性). 第27回日本バイオマテリアル学会大会、平成17年11月 京都
81. 脇谷滋之、増田茂樹、富田直秀、土屋利江. 関節軟骨欠損修復評価法の問題点 (シンポジウム 軟骨再生の実現可能性) 第27回日本バイオマテリアル学会大会、平成17年11月 京都
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 特願 2003-008855 ギャップ機能抑制剤
- 特願 2004-193233 ギャップ機能抑制剤、細胞増殖促進剤および硫酸化ポリフコース
- 特願 2004-167632 生体吸収性を有する新規材料、その製造方法、及びその用途
- 特願 2004-234069 生体組織補填材および生体組織補填体

特願 2005-126591 生体組織補填材の製造方法

特願 2005-025603 ヒトの細胞の培養方法、培養容器および生体組織補填体

特願 2005-294058 生体組織補填材とその製造方法

特許出願準備中 細胞の増殖を促進し、かつ炎症を抑制する人工器官

米国出願 Material for repairing biological tissues, product for repairing biological tissues, and method of manufacturing material for repairing biological tissues (2005.11.8).

欧州出願 Material for repairing biological tissues, product for repairing biological tissues, and method of manufacturing material for repairing biological tissues. 05024220.5, (2005.11.7).

米国出願準備中 1件

欧州出願準備中 1件

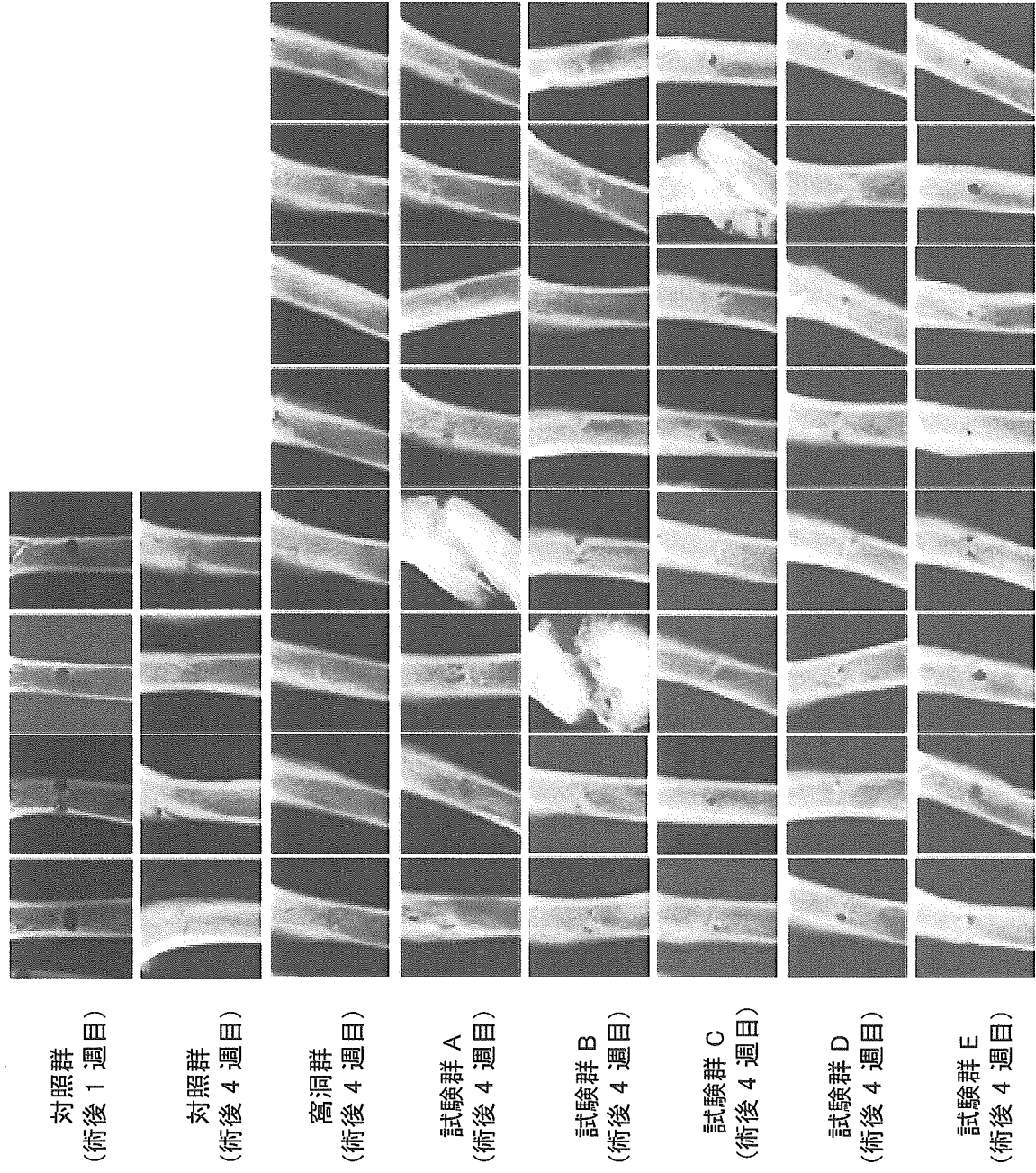


図1 大腿骨埋植試験における軟 X 線画像

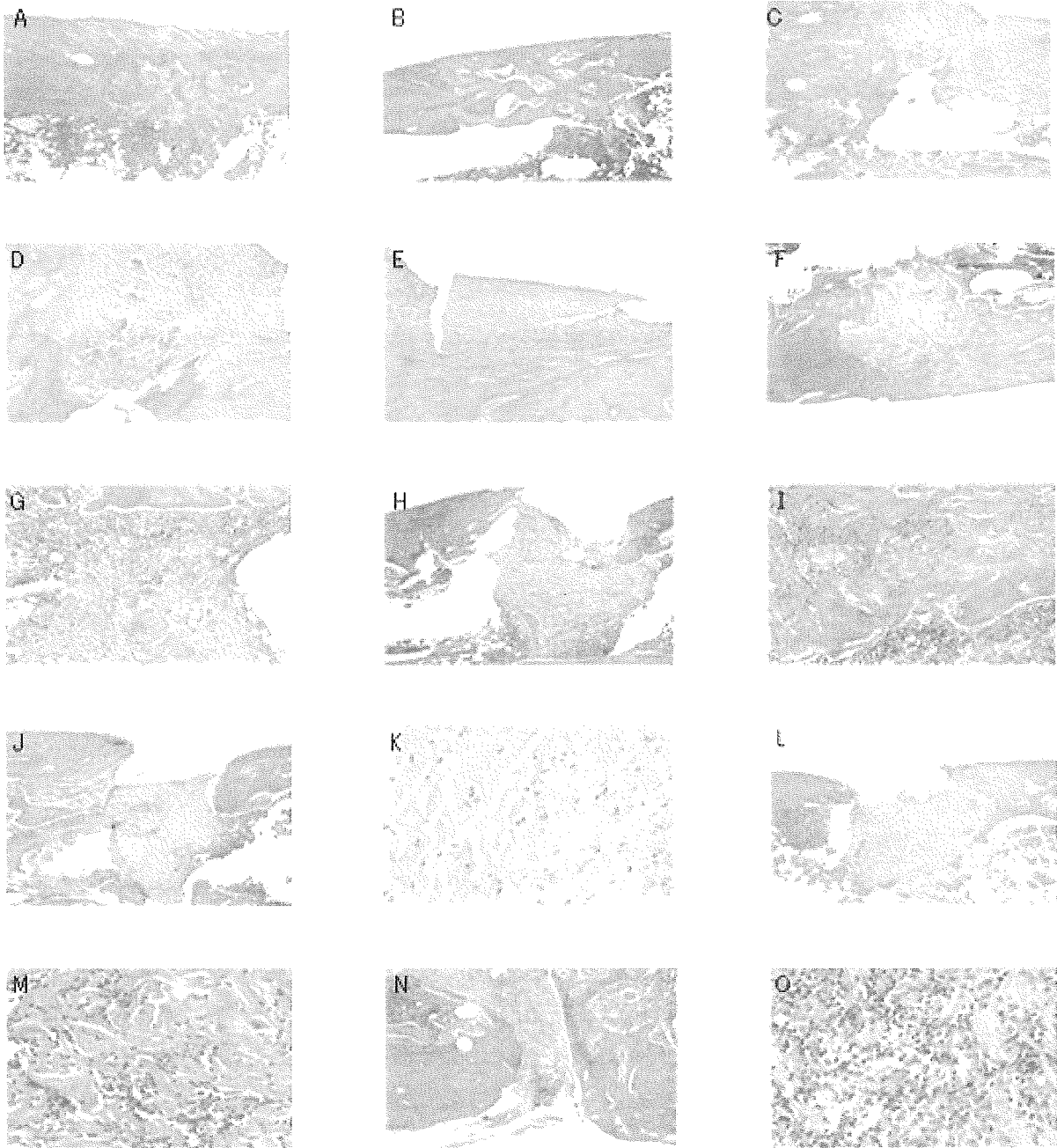


図2 大腿骨埋植試験における窩洞群、対照群および試験群の病理組織学的所見

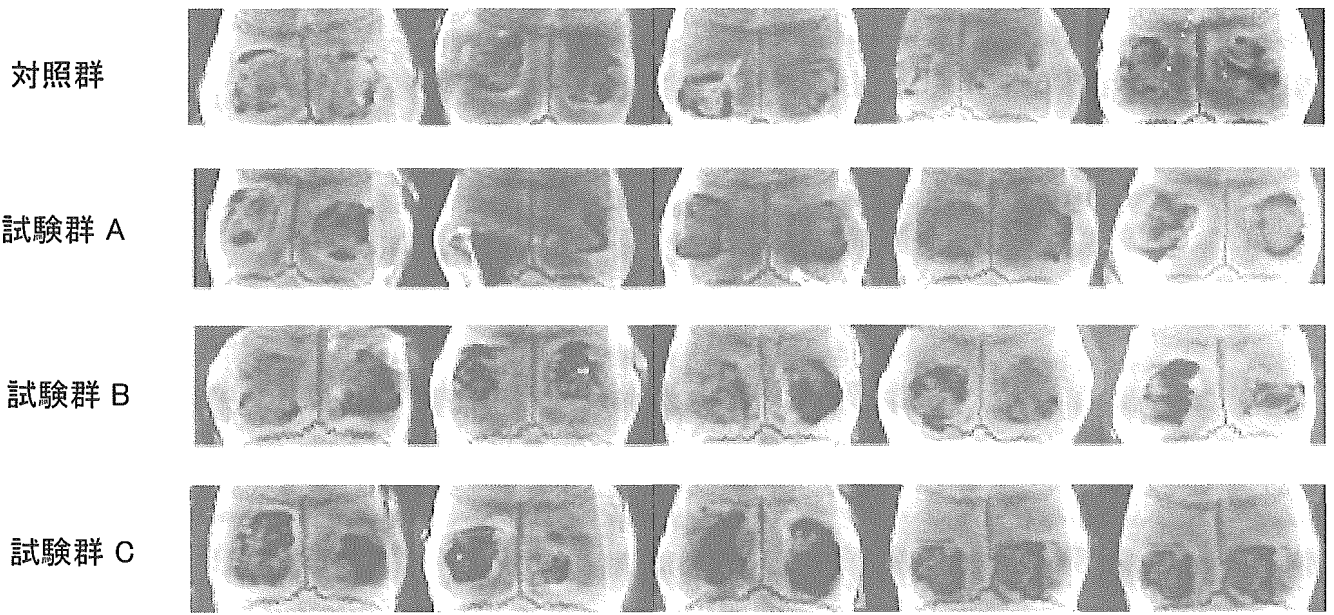


図3 頭蓋骨埋植試験における軟 X 線画像(埋植後 4 週目)

骨組織形成が良好な症例



骨組織の一部に連続性がない症例



骨形成量が少なく、連続性のない症例



殆ど骨形成が認められない症例



図4 頭蓋骨埋植試験において観察された典型的な病理組織学的所見

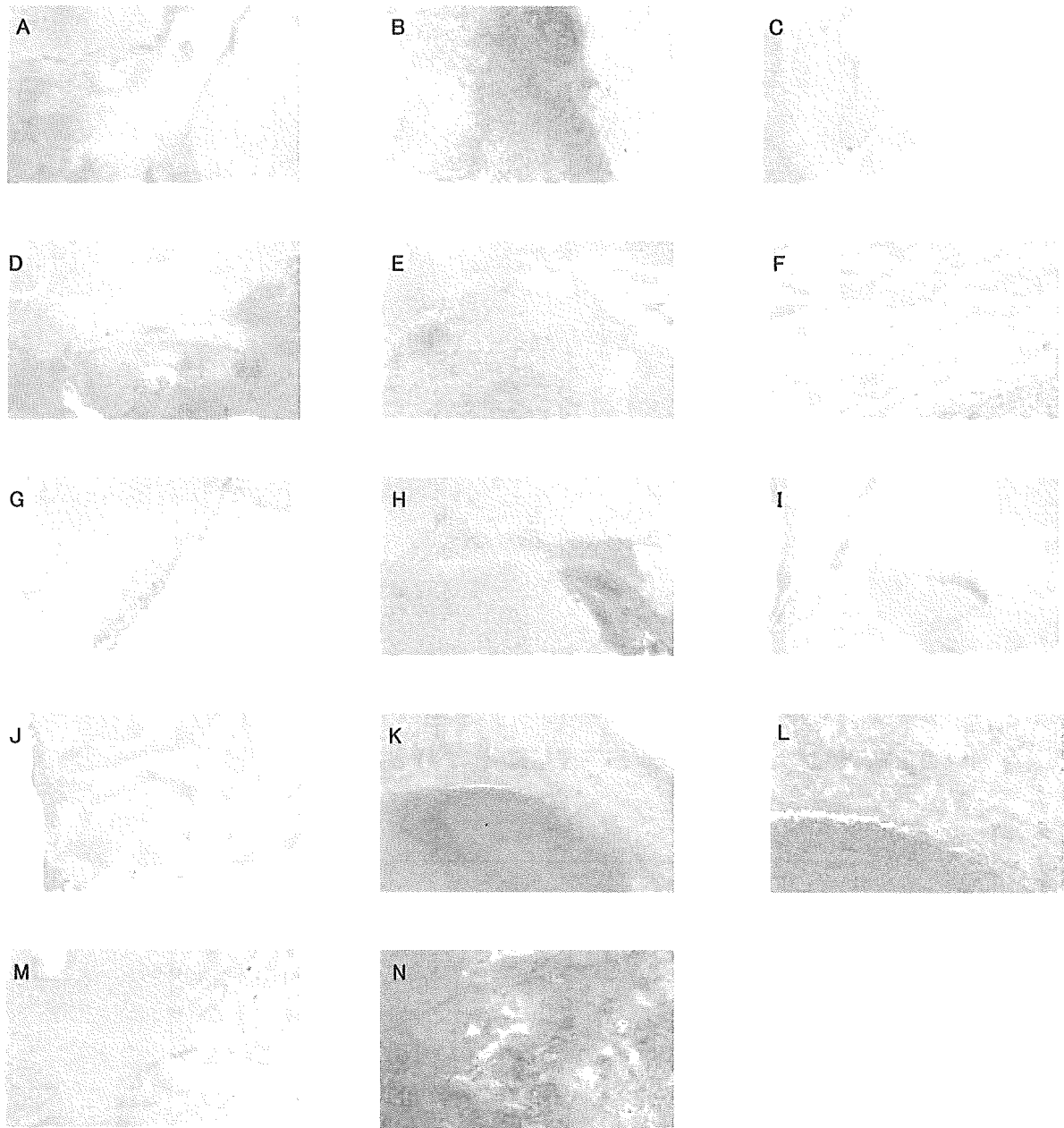


図5 GlaN 感作ラット腹腔内埋植試験における肝臓の病理組織学的所見

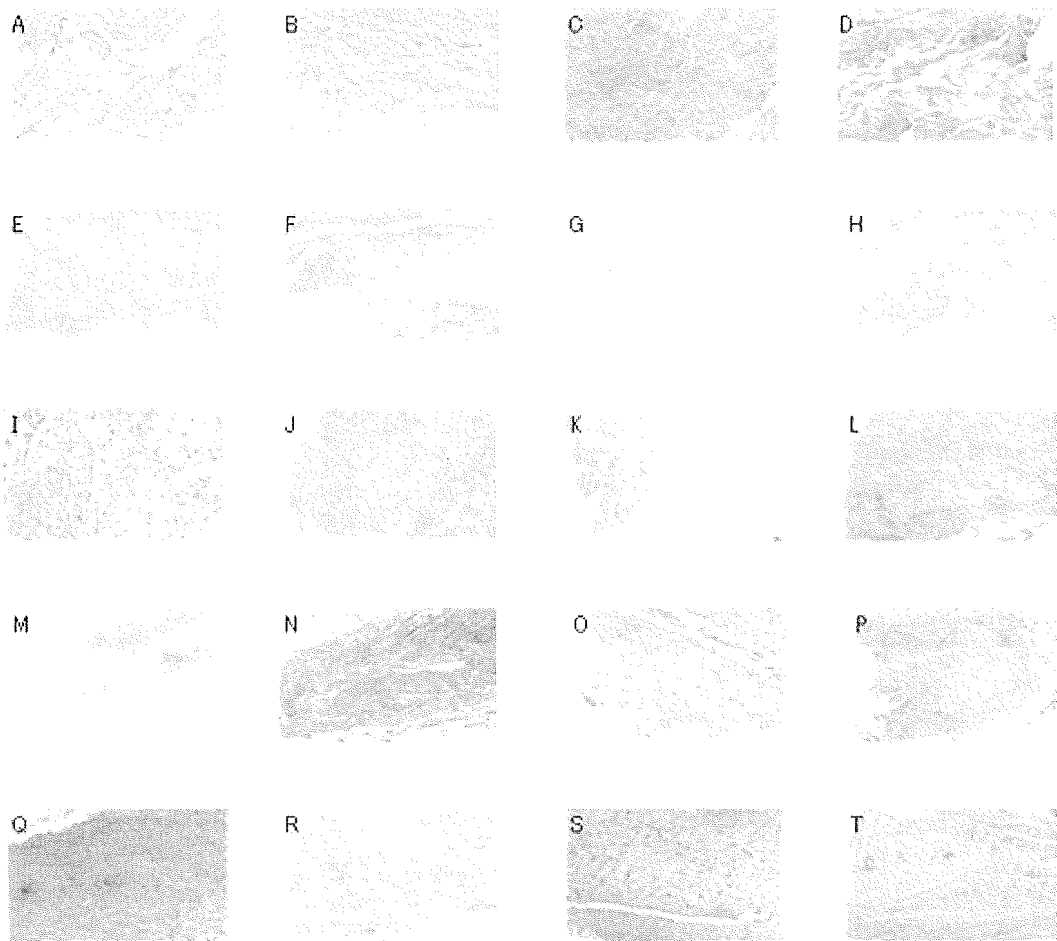


図6 ガンマ線照射コラーゲンシート皮下埋植試験における病理組織学的所見

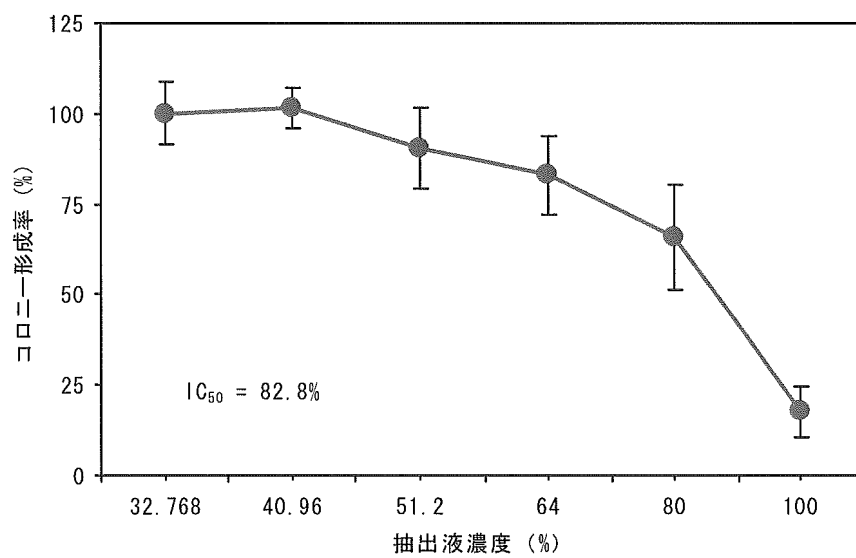


図7 酸処理ゼラチン(pH=9)の細胞毒性試験

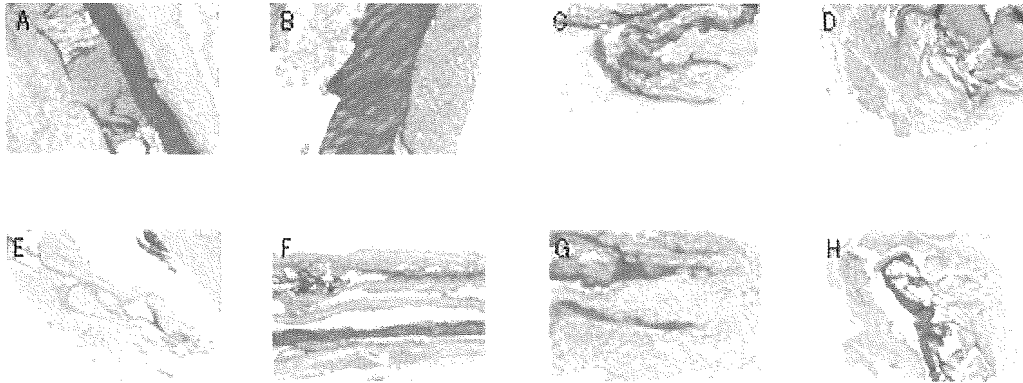


図8 酸処理ゼラチンのラット皮下埋植試験における病理組織学的所見

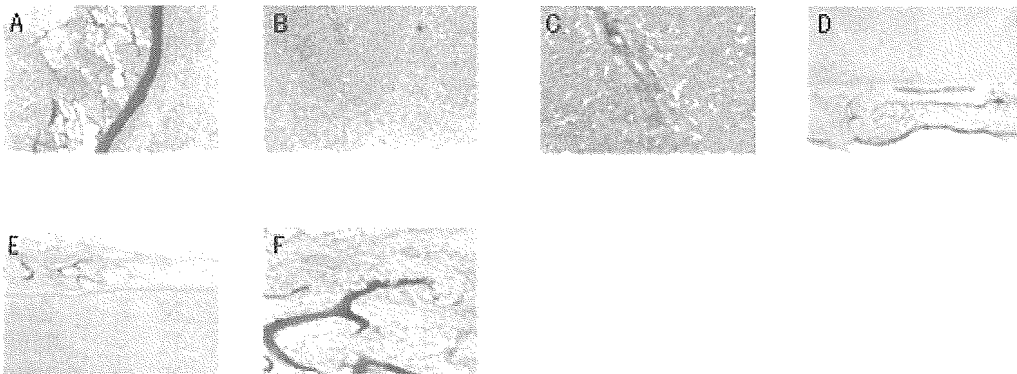


図9 酸処理ゼラチンのラット腹腔内埋植試験における病理組織学的所見

表1 大腸菌O111株乾燥菌体含有コラーゲンシートからの LPS 活性回収率

菌体添加量 (EU/ng)	LPS 活性 実測値 (EU/mg)	回収率 (%)
control	0.13	-
4.8	4.7	96.1
9.5	9.6	99.6
47.6	33.6	70.4
475.5	433.8	91.2
1426.5	1162.8	81.5
4755.0	3100.9	65.2
47550.0	35722.7	75.1

EndoTrap 精製コラーゲナーゼ消化/HCl (pH 3) 法

表2 頭蓋骨欠損部に形成された新生骨量の評価

実験群	症例番号	骨濃度	骨総面積	実験群	症例番号	骨濃度	骨総面積
対照群	1	35	10717	試験群 B	1	20	2397
	2	34	6437		2	23	8819
	3	20	4573		3	21	2399
	4	21	7013		4	22	2028
	5	20	10059		5	20	200
	6	32	9247		6	23	5316
	7	21	1791		7	21	3181
	8	26	7804		8	25	7419
	9	37	3305		9	21	3695
	10	40	7788		10	23	1486
	平均値	28.6	6873.4		平均値	21.9	3694.0
	SD	7.8	2912.1		SD	1.6	2713.2
	t-value	-	-		t-value	2.6500	2.5260
危険率	-	-	危険率	0.0243	0.0211		
試験群 A	1	31	689	試験群 C	1	22	214
	2	37	8494		2	21	3852
	3	19	7544		3	29	6259
	4	22	4640		4	23	434
	5	21	9127		5	22	112
	6	24	10516		6	21	14
	7	20	7037		7	22	270
	8	19	7710		8	22	34
	9	35	10338		9	20	5441
	10	33	3814		10	18	3304
	平均値	26.1	6990.9		平均値	22.0	1993.4
	SD	7.1	3102.2		SD	2.8	2474.7
	t-value	0.7473	0.0873		t-value	2.5057	4.0381
危険率	0.4645	0.9314	危険率	0.0292	0.0008		

表3 肝臓損傷ラットに対する菌体含有コラーゲンシートの致死毒性

動物群	肝臓損傷	対照シート被覆	菌体含有シート被覆	GalN 感作	生存数/試験数	生存率(%)
対照群 A	+	+	?	?	6/6	100
対照群 B	+	+	?	+	6/6	100
試験群 A	+	?	+	?	6/6	100
試験群 B	+	?	+	+	1/6*	16.7

*生存ラットは極度に衰弱

表4 肝臓損傷埋植試験群の血液生化学検査

検査項目	単位	術後 2 日目										
		非手術群		対照群 A		対照群 B		試験群 A		試験群 B		対照
		平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	測定値**	SD	
総蛋白	g/dL	6.1	0.55	6.0	1.1	3.4	0.3	6.05	0.21	4.4	nc***	5.8
A/G比		2.2	0.32	1.6	0.5	4.2	1.7	1.05	0.071	2.1	nc	1.75
アルブミン	g/dL	4.2	0.23	3.6	0.2	2.7	0	3.1	0	3	nc	3.7
総ビリルビン	mg/dL	0.04	0.006	0.07	0.04	2.18	0.28	0.045	0.007	2.16	nc	0.035
直接ビリルビン	mg/dL	0.03	0.012	0.06	0.03	1.64	0.14	0.04	0	1.56	nc	0.035
間接ビリルビン	mg/dL	0.003	0.006	0.01	0.01	0.54	0.14	0.005	0.007	0.6	nc	nd****
グルコース	mg/dL	150	14	143	37	79	53	145	9.9	31	nc	182
トリグリセライド	mg/dL	107	26	33	0.71	62	26	42.5	4.9	42	nc	112
リン脂質	mg/dL	135	16	127	11	188	47	130.5	0.7	274	nc	128
遊離脂肪酸	μEQ/L	558	365	404	187	603	334	285.5	13.4	989	nc	357
総コレステロール	mg/dL	64	7.2	75	14	78	6.4	77.5	3.5	92	nc	58
エステル型コレステロール	mg/dL	51	5.6	59	7.1	12	2.12	61	2.8	9	nc	44.5
遊離型コレステロール	mg/dL	13	1.7	16	7.1	66	8.5	16.5	0.7	83	nc	13.5
コレステロールエステル比	%	80	0.58	79	5.7	15	4.2	79	0	10	nc	76.5
尿素窒素	mg/dL	18	2.09	21	1.3	51	4.7	21.4	1.1	96.6	nc	19.1
クレアチニン	mg/dL	0.2	0.02	0.19	0.05	0.265	0.035	0.215	0.007	0.25	nc	0.21
ナトリウム	mEQ/L	141	0.58	141	2.8	136	0.71	139.5	0.71	135	nc	140
クロール	mEQ/L	98	0.58	100	0.7	89	1.41	99	1.41	96	nc	102
カリウム	mEQ/L	9	1.79	9	3.0	8.3	0.42	8.1	0.28	12.5	nc	9.45
カルシウム	mg/dL	11	0.29	11	0.14	7.3	0.85	10.55	0.21	7.8	nc	10.5
無機リン	mg/dL	12	2.136	11	2.8	11	0.78	7.95	0.78	16.6	nc	11.0
GOT	IU/L	385	363	462	332	10004	3078	199	49.5	9622	nc	309
GPT	IU/L	82	66	99	36	8259	2176	89	24	8172	nc	70
LD	IU/L	3790	2769	4094	2963	14508	5617	1466	216	18400	nc	3044
ALP	IU/L	1673	221	905	277	2044	909	677.5	35	1792	nc	1426.5
γ-GTP	IU/L	<2	nc	3	nc	15	9.9	3	nc	20	nc	3
コリンエステラーゼ	IU/L	7	3	8	nc	9	4.2	5.5	0.71	7	nc	6.5

*試験群 B は全匹死亡. **測定値 n=1. ***nc, not calculated. ****nd, not detected (検出限界以下)

表5 ガンマ線照射した大腸菌O111株乾燥菌体含有コラーゲンシートのLPS含量

菌体添加量 (EU/mg)	LPS 活性実測値 (EU/mg)*			
	0 kGy	5 kGy	15 kGy	25 kGy
47.6	33.6	28.9	45.2	46.0
475.5	433.8	424.3	436.8	502.2
1426.5	1162.8	919.8	1257.0	1217.5
4755.0	3100.9	2519.5	3510.8	2499.6

*EndoTrap 精製コラーゲナーゼ消化/HCl (pH 3) 法

表6 抗菌力試験

抗菌剤	50% 発育阻止濃度 (IC ₅₀ nM)	
	黄色ブドウ球菌	緑膿菌
18-mer LLKKK	1.09	41.0
ポリミキシン B	3.49	4.60
ストレプトマイシン	5.96	57.5
ペニシリン G	0.18	無効

表7 抗 LPS 活性試験

菌体成分	50% 阻害濃度 (18-mer LLKKK IC ₅₀ µg/ml)	
	リムルス活性	IL-6産生誘導能
JPSE		
	1 EU/ml	0.01
	10 EU/ml	0.05
JPSE + 1% Serum		
	1 EU/ml	0.05
	10 EU/ml	0.10
大腸菌 O3 LPS		
	1 ng/ml	0.07
	10 ng/ml	0.40
	100 ng/ml	0.59
	1,000 ng/ml	1.59
	10,000 ng/ml	5.82
大腸菌 O111 菌体		
	30 ng/ml	0.01
	300 ng/ml	0.11
	3,000 ng/ml	0.55
	30,000 ng/ml	0.78

nt, not tested.

大腸菌 O3 LPS: 1 ng = 27.5 EU

大腸菌 O111 菌体: 1 ng = 0.127 EU

ポリミキシン B の抗リムルス活性:

大腸菌 O3 LPS 10 ng/ml = IC₅₀ 61.1 µg/ml

表8 ゼラチンハイドロゲルからの 18-mer LKKKK アナログ徐放試験

材 料	乾燥重量 (mg)	含水重量 (mg)	18-mer LKKKK 含浸量 (ng)	18-mer LKKKK 溶出量 ng (放出率%)					放出総量 ng (放出率%)		
				0.5 hr	1 hr	2 hr	4 hr	8 hr		12 hr	24 hr
スルホアセチル化ゼラチン	2.4	13.1	1,070	293 (27.4)	156 (14.6)	116 (10.8)	62 (5.8)	59 (5.5)	44 (4.1)	43 (4.0)	773 (72.2)
コハク化ゼラチン	2.3	10.2	790	431 (54.6)	97 (12.3)	76 (9.6)	47 (5.9)	44 (5.6)	39 (4.9)	37 (4.7)	771 (97.6)
アルカリ処理ゼラチン	2.3	32.2	2,990	937 (31.3)	221 (7.4)	119 (4.0)	104 (3.5)	108 (3.6)	103 (3.4)	70 (2.3)	1,662 (55.6)
酸処理ゼラチン	1.9	57.8	5,590	3,340 (59.7)	367 (6.6)	304 (5.4)	289 (5.2)	291 (5.2)	284 (5.1)	256 (4.6)	5,131 (91.8)
アルキル化ゼラチン	2.0	10.4	840	349 (41.5)	129 (15.4)	87 (10.4)	77 (9.2)	73 (8.7)	70 (8.3)	58 (6.9)	843 (100.4)
エチレンジアミン化ゼラチン	1.9	103.3	10,140	7,972 (78.6)	906 (8.9)	397 (3.9)	204 (2.0)	182 (1.8)	98 (1.0)	87 (0.9)	9,846 (97.1)

表9 ラット埋植試験結果から試算したヒトに対する LPS 規格値

適用部位	ラット埋植試験				ヒトへの外挿				
	陽性反応が 認められた LPS実測値 (EU/mg)*	埋植重量 (mg)	体 重 (kg)	体 重 当 た り の LPS 量 (EU/kg)	安全係数				
					UF1	UF2	UF3	UF4	
皮下	1,162.8	10.0	0.15	77,520	10	10	1	1	775.2
骨再生	33.6	6.0	0.15	1,344	10	5	1	1	1,550
					5	5	1	1	3,100
骨再生	33.6	6.0	0.15	1,344	10	1	1	1	7,752
					10	10	1	1	13.4
骨再生	33.6	6.0	0.15	1,344	10	5	1	1	26.9
					5	5	1	1	53.8
骨再生	33.6	6.0	0.15	1,344	10	1	1	1	134.4
					10	1	1	1	134.4

*EndoTrap 精製コラゲナーゼ消化/HCl (pH 3) 法

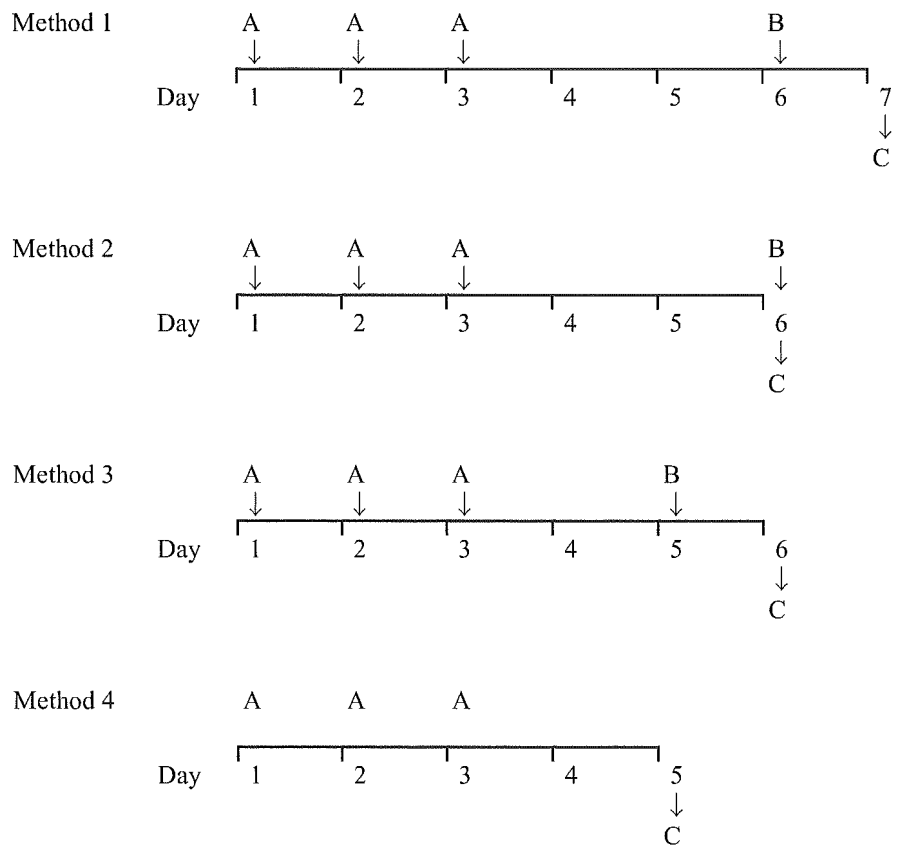


図 10 LLNAにおけるリンパ節採取時期決定のための試験デザイン
 A: application of test chemical.
 B: BrdU injection
 C: collection of lymph nodes.

表 10 各種投与方法での各種指標値の結果

Method	Chemical	Animal No.	Lymph node weight (mg)			Cell number ($\times 10^5$ cells)			BrdU Absorbance			alamarBlue Fluorescence		
			Mean	SD	SI	Mean	SD	SI	Mean	SD	SI	Mean	SD	SI
1	AOC	1	7.9	6.3	1.4	137	106	27	0.271	0.190	0.074	6294	4471	1621
		2	5.7			89			0.125			3191		
		3	5.4			92			0.175			3927		
1	0.5% DNCB	1	22.1	22.1	3.7	579	605	122	0.387	0.414	0.087	32569	30807	6371
		2	18.4			498			0.343			23740		
		3	25.8			738			0.511			36112		
2	0.5% DNCB	1	28.4	23.5	3.6	714	740	191	0.649	0.638	0.054	37299	34920	2918
		2	23.3			884			0.667			37409		
		3	19.7			479			0.559			31526		
		4	22.6			882			0.678			33447		
3	0.5% DNCB	1	23.6	23.3	0.9	498	614	82	0.550	0.457	0.070	45381	38577	4698
		2	24.2			692			0.382			36432		
		3	23.1			630			0.444			34755		
		4	22.1			636			0.451			37740		
4	0.5% DNCB	1	25.5	24.1	3.5	764	699	76	NT			NT		
		2	22.4			681			NT			NT		
		3	20.1			600			NT			NT		
		4	28.2			753			NT			NT		

Method 1~4の試験物質の投与方法はFig.1の通り。
NT =not tested.

表 11 Dibutyltin chloride (DBT)のLLNAでの結果

Concentration (%)	Animal No.	Body weight (g)			Lymph node weight (mg)			Cell number ($\times 10^5$ cells)				
		Mean	SD	SI	Mean	SD	SI	Mean	SD	SI	SI	
0 (AOC)	1	20.02	20.28	1.45	5.8	7.2	1.5	-	87	101	14	-
	2	21.41			8.7				114			
	3	19.42			7.1				103			
0.5	1	19.87	19.65	1.18	15.4	14.8	1.2	2.1	457	374	89	3.7
	2	21.57			13.4				280			
	3	17.51			15.5				386			
1	1	20.86	20.79	0.07	11.3	11.4	0.1	1.6	201	184	25	1.8
	2	20.72			11.4				166			
	3	death										
2.5	1	death										
	2	death										
	3	death										

Concentration (%)	Animal No.	alamarBlue Fluorescence			ATP content				
		Mean	SD	SI	Mean	SD	SI		
0 (AOC)	1	1572	1872	411	-	4596	4469	826	-
	2	2341				5225			
	3	1704				3587			
0.5	1	8532	8062	912	4.3	12503	11567	1281	2.6
	2	7010				12093			
	3	8643				10107			
1	1	4882	4642	339	2.5	8844	7578	1790	1.7
	2	4402				6313			
	3	death							
2.5	1	death							
	2	death							
	3	death							

表 12 各種試験物質のLLNAでの結果

Chemical	Number of animal	Lymph node weight (mg)			Cell number ($\times 10^5$ cells)		
		Mean	SD	SI	Mean	SD	SI
AOO	3	7.9	1.7	-	88	38	-
25% MS	3	9.1	0.3	1.1	155	60	1.8
25% TMA	2	17.8	0.4	2.2	391	205	4.4

Chemical	alamarBlue Fluorescence			ATP content		
	Mean	SD	SI	Mean	SD	SI
AOO	2716	1227		2884	1016	
25% MS	4903	755	1.8	4821	754	1.7
25% TMA	11803	1288	4.3	9100	1157	3.2

表 13 マウス系統差による反応性の違い

Strain	Chemical	Lymph node weight (mg)			Cell number ($\times 10^5$ cells)			
		Mean	SD	SI	Mean	SD	SI	
BALB/c	Exp.1	AOO	6.6	0.8	-	95	17	-
		0.5% DNCB	20.1	2.6	3.0	478	90	5.0
		25% HCA	14.7	1.1	2.2	336	38	3.5
	Exp.2	AOO	6.1	0.9	-	109	23	-
		0.5% DNCB	21.4	3.0	3.5	490	54	4.5
	CBA/N	AOO	4.7	0.7	-	96	11	-
0.5% DNCB		23.8	3.7	5.1	611	74	6.4	
25% HCA		10.3	8.4	2.2	264	27.8	2.8	

Strain	Chemical	BrdU Absorbance			alamarBlue Fluorescence			
		Mean	SD	SI	Mean	SD	SI	
BALB/c	Exp.1	AOO	0.397	0.163	-	* 2618	279	-
		0.5% DNCB	1.554	0.320	3.9	* 14538	3109	5.6
		25% HCA	0.566	0.211	1.4	* 10205	1000	3.9
	Exp.2	AOO	0.267	0.062	-	1301	413	-
		0.5% DNCB	0.792	0.032	3.0	10873	2440	8.4
	CBA/N	AOO	0.264	0.027	-	7165	1456	-
0.5% DNCB		0.685	0.147	2.6	45274	2499	6.3	**
25% HCA		0.468	0.063	1.8	25588	1132	3.6	**

BrdU Absorbance

*: TMB基質溶液を加えて10分後に1 mol/l硫酸溶液を加えた後、450 nmにおける吸光度を測定した。
 無印: TMB基質溶液を加えて15分後に400 nmの吸光度を測定した。

alamarBlue Fluorescence

** : リンパ節細胞を遊離し、PBSで希釈して5 ml 細胞懸濁液とした後、100 μ l ずつ96穴プレートに入れた。
 無印: PBS 15 mlの細胞懸濁液とし、100 μ l ずつ入れた。

表 14 LLNA法及びLLNA-DA法での各種感作性物質の反応性の比較

Method	Chemical Application	Collect lymph nodes	Chemical	Lymph node weight (mg)			Cell number ($\times 10^5$ cells)			BrdU Absorbance			
				Mean	SD	SI	Mean	SD	SI	Mean	SD	SI	
LLNA	Day 1,2,3	Day 6	AOO	6.6	0.8	-	95	17	-	0.397	0.163	*	-
			0.5% DNCB	20.1	2.6	3.0	478	90	5.0	1.554	0.320	*	3.9
			25% HCA	14.7	1.1	2.2	336	38	3.5	0.566	0.211	*	1.4
LLNA-DA	Day 1,2,3,7	Day 8	AOO	5.1	1.9	-	94	16	-	0.170	0.028	-	-
			0.5% DNCB	36.1	5.5	7.1	774	161	8.2	0.611	0.057	-	3.6
			25% HCA	13.0	2.0	2.5	321	83	3.4	0.452	0.077	-	2.7

Method	Chemical Application	Collect lymph nodes	Chemical	alamarBlue Fluorescence			ATP content		
				Mean	SD	SI	Mean	SD	SI
LLNA	Day 1,2,3	Day 6	AOO	2618	279	-	3254	1006	-
			0.5% DNCB	14538	3109	5.6	16878	4311	5.2
			25% HCA	10205	1000	3.9	11266	2560	3.5
LLNA-DA	Day 1,2,3,7	Day 8	AOO	1578	272	-	2154	551	-
			0.5% DNCB	19332	2508	12.3	29339	3262	13.6
			25% HCA	8181	1548	5.2	10043	438	4.7

BrdU Absorbance

*: TMB基質溶液を加えて10分後に1 mol/l硫酸溶液を加えた後、450 nmにおける吸光度を測定した。
無印: TMB基質溶液を加え15分後に400 nmの吸光度を測定した。

表 15 LLNA法での感作性物質投与によるT細胞/B細胞比率変化のマウス系統差

Strain	Chemical	Ratio (%)			
		T cells			B cells
			Th	Ts	
BALB/c	AOO	81.8	55.2	26.8	17.2
	DNCB 0.5%	63.8	45.1	18.5	34.9
	HCA 25%	71.7	50.3	22.5	28.0
CBA/N	AOO	93.2	59.2	33.3	5.4
	DNCB 0.5%	89.4	56.8	31.9	9.2
	HCA 25%	94.0	60.9	32.9	5.2

Strain	Chemical	T cells SI*	Ratio to total T cells		B cells SI
			Th	Ts	
			BALB/c	AOO	
	DNCB 0.5%	0.8	0.71	0.29	2.0
	HCA 25%	0.9	0.70	0.31	1.6
CBA/N	AOO	-	0.64	0.36	-
	DNCB 0.5%	1.0	0.64	0.36	1.7
	HCA 25%	1.0	0.65	0.35	1.0

*SI=AOO群に対する各試験物質群のTまたはB細胞数の全リンパ球中の割合についての増加率

表 16 Dibutyltin chloride (DBT)のフローサイトメトリーの結果

Chemical	Ratio (%)			B cells
	T cells			
		Th	Ts	
AOO	87.3	58.2	29.3	12.1
DBT 0.5%	74.4	49.6	24.5	24.4
DBT1%	75.9	45.7	30.2	23.5

Chemical	T cells SI	Ratio to total T cells		B cells SI
		Th	Ts	
AOO	-	0.67	0.34	-
DBT 0.5%	0.9	0.67	0.33	2.0
DBT1%	0.9	0.60	0.40	1.9

表 17 各種試験物質のフローサイトメトリーによる結果

Chemical	Ratio (%)			B cells
	T cells			
		Th	Ts	
AOO	85.7	57.0	27.7	9.7
MS 25%	76.1	52.1	24.6	18.8
TMA 25%	71.2	47.6	24.0	25.6

Chemical	T cells SI	Ratio to total T cells		B cells SI
		Th	Ts	
AOO	-	0.67	0.32	-
MS 25%	0.9	0.68	0.32	1.9
TMA 25%	0.8	0.67	0.34	2.6

表18. SNPタイピングの結果

Gene	Location		Type	Allele1 (frequency)	Allele2 (frequency)	Male		Female		
VAMP8	1	CDS-synonymous	c.201A>G	SNP	A (0.605)	G (0.395)	A (0.57)	G (0.43)	A (0.64)	G (0.36)
	2	CDS-synonymous	c.138C>T	SNP	C (0.680)	T (0.320)	C (0.65)	T (0.35)	C (0.71)	T (0.29)
TGFβ1		CDS-synonymous	c.29C>T	SNP	T (0.535)	C (0.465)	T (0.51)	C (0.49)	T (0.56)	C (0.44)
TGFβRI		CDS-synonymous	c.1125A>C	SNP	A (1.000)	C (0.000)	A (1.00)	C (0.00)	A (1.00)	C (0.00)
TGFβRII	1	CDS(Glu/Val)	c.946A>T	SNP	A (1.000)	T (0.000)	A (1.00)	T (0.00)	A (1.00)	T (0.00)
	2	CDS(Ala/Val)	c.1606T>C	SNP	T (1.000)	C (0.000)	T (1.00)	C (0.00)	T (1.00)	C (0.00)

II 分担研究報告