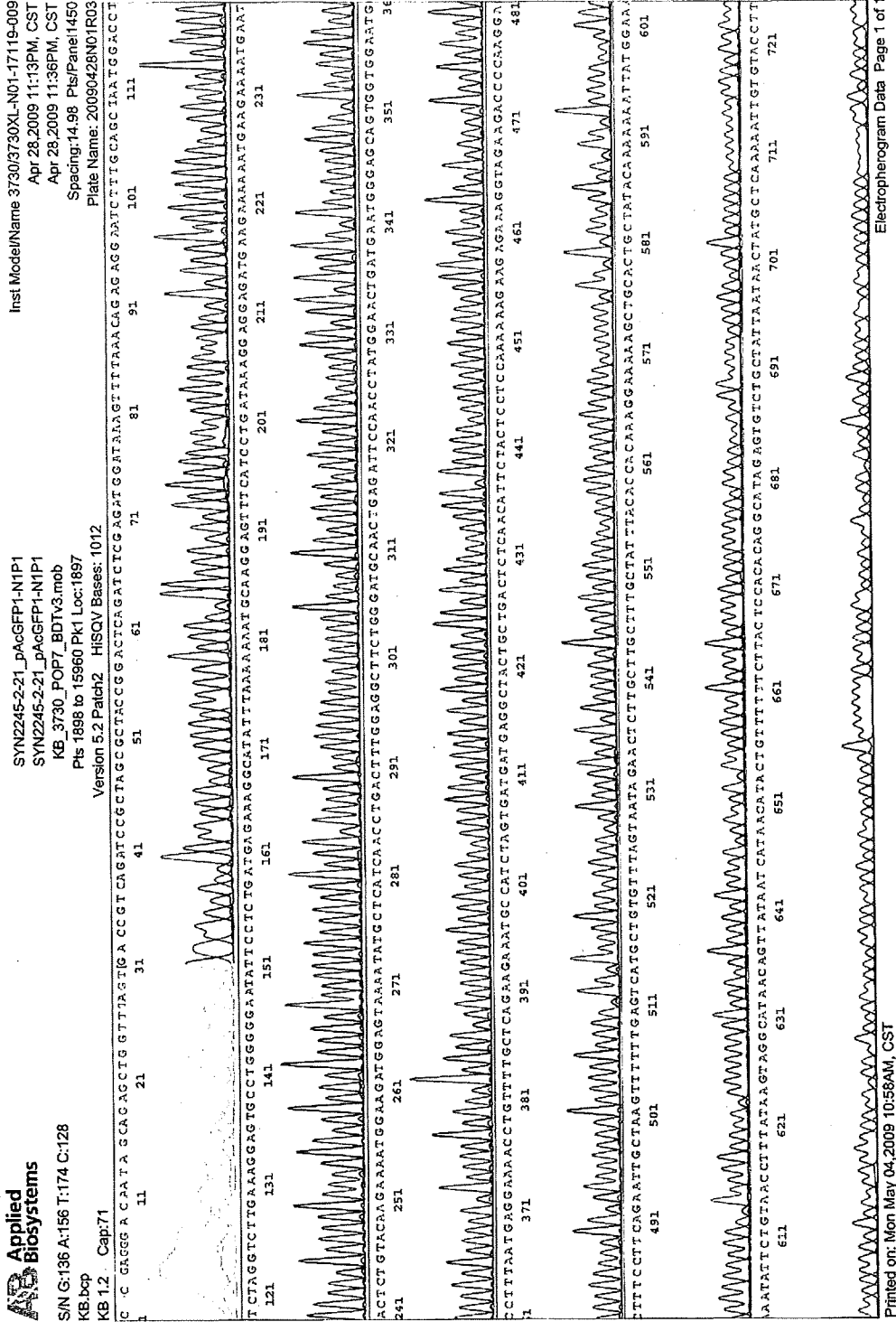


SV40 Large T antigen ORF (SYN-2245-2) のシーケンス片鎖解析





S/N G:207 A:197 T:264 C:166

KB.bcp

KB 1.2 Cap:69

SYN2245-2-21_SYN2245P2

SYN2245-2-21_SYN2245P2

KB 3730 POP7_BD1V3.mob

Pls 1881 to 15960 Pk1 Loc:1880

Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 999

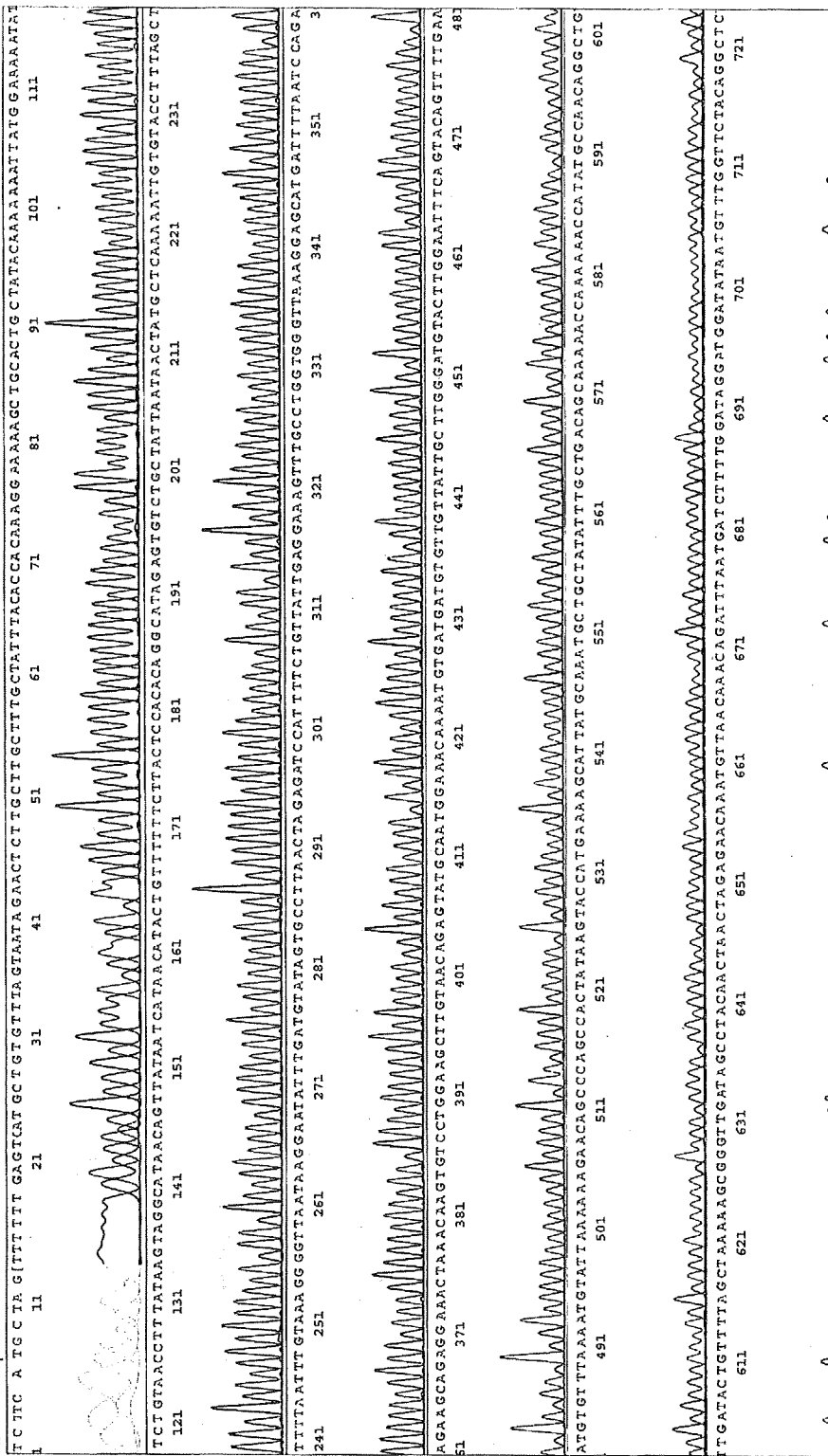
Inst Model/Name 3730/3730XL-N01-17119-009

Apr 28, 2009 11:13PM, CST

Apr 28, 2009 11:36PM, CST

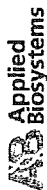
Spacing:15.01 Pls/Panel1450

Plate Name: 20090428N01R03



Printed on: Mon May 04, 2009 10:58AM, CST

Electropherogram Data Page 1 of 1



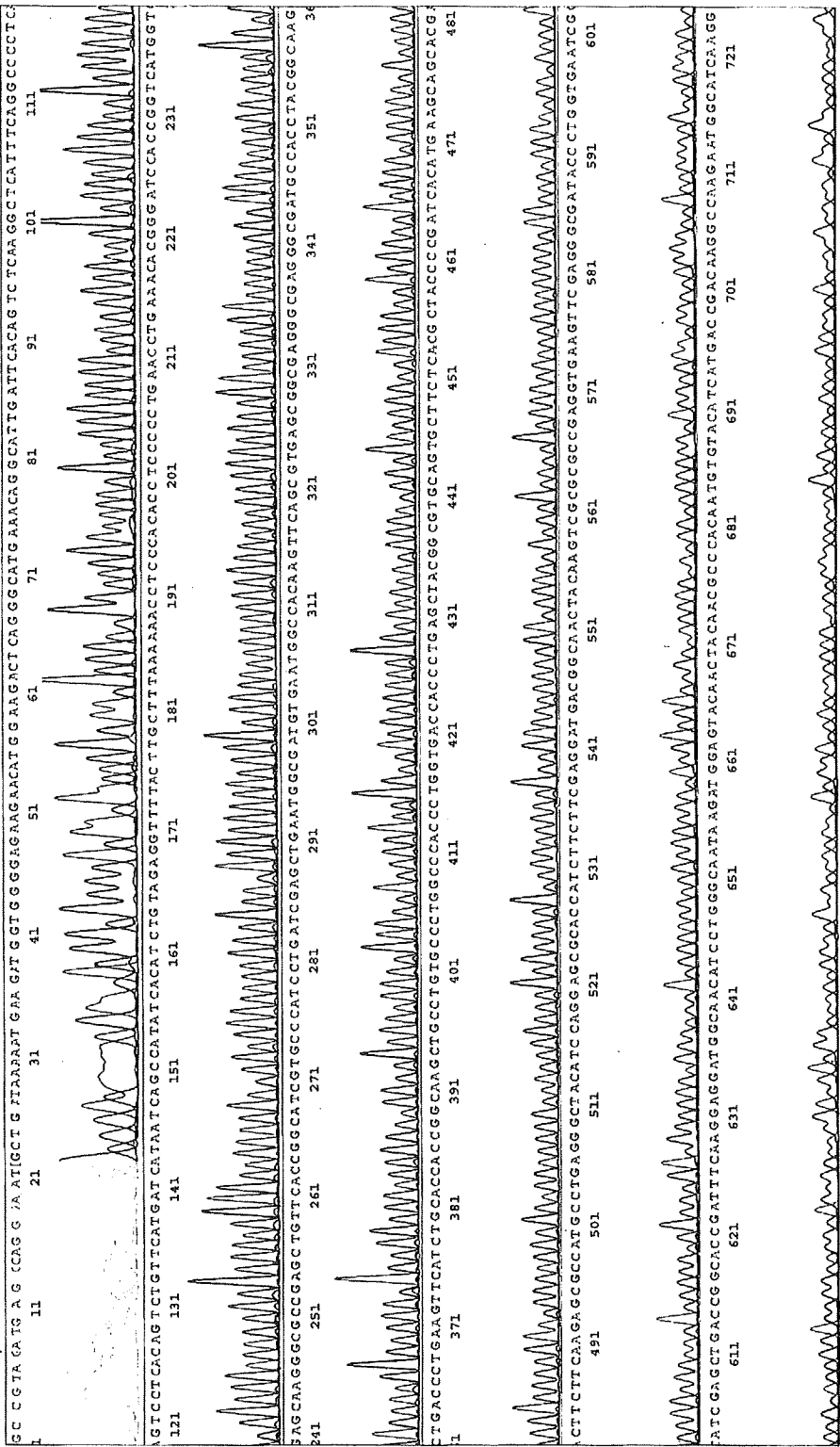
Inst Model/Name 3730/3730XL-N01-17119-009
 Apr 28, 2009 11:13PM, CST
 Spacing: 15.03 Pts/Panel1450
 Plate Name: 20090428N01R03

SYN2245-2-21_SYN2245P5
 SYN2245-2-21_SYN2245P5
 KB_3730_POPT7_BDTV3.mob
 PIs 1903 to 15960 Pk1 Loc:1902
 Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 988

SIN G:169 A:145 T:144 C:198

KB.bcp

KB 1.2 Cap:67



Printed on: Mon May 04, 2009 10:58AM, CST

Electropherogram Data Page 1 of 1



S/N G:185 A:174 T:244 C:225

KB.bcp

KB 1.2

Cap65

SYN2245-2-21_SYN2245P6

SYN2245-2-21_SYN2245P6

KB_3730_POPT_BDIv3.mob

Pls 1929 to 19960 Pk1 Loc:1928

Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 991

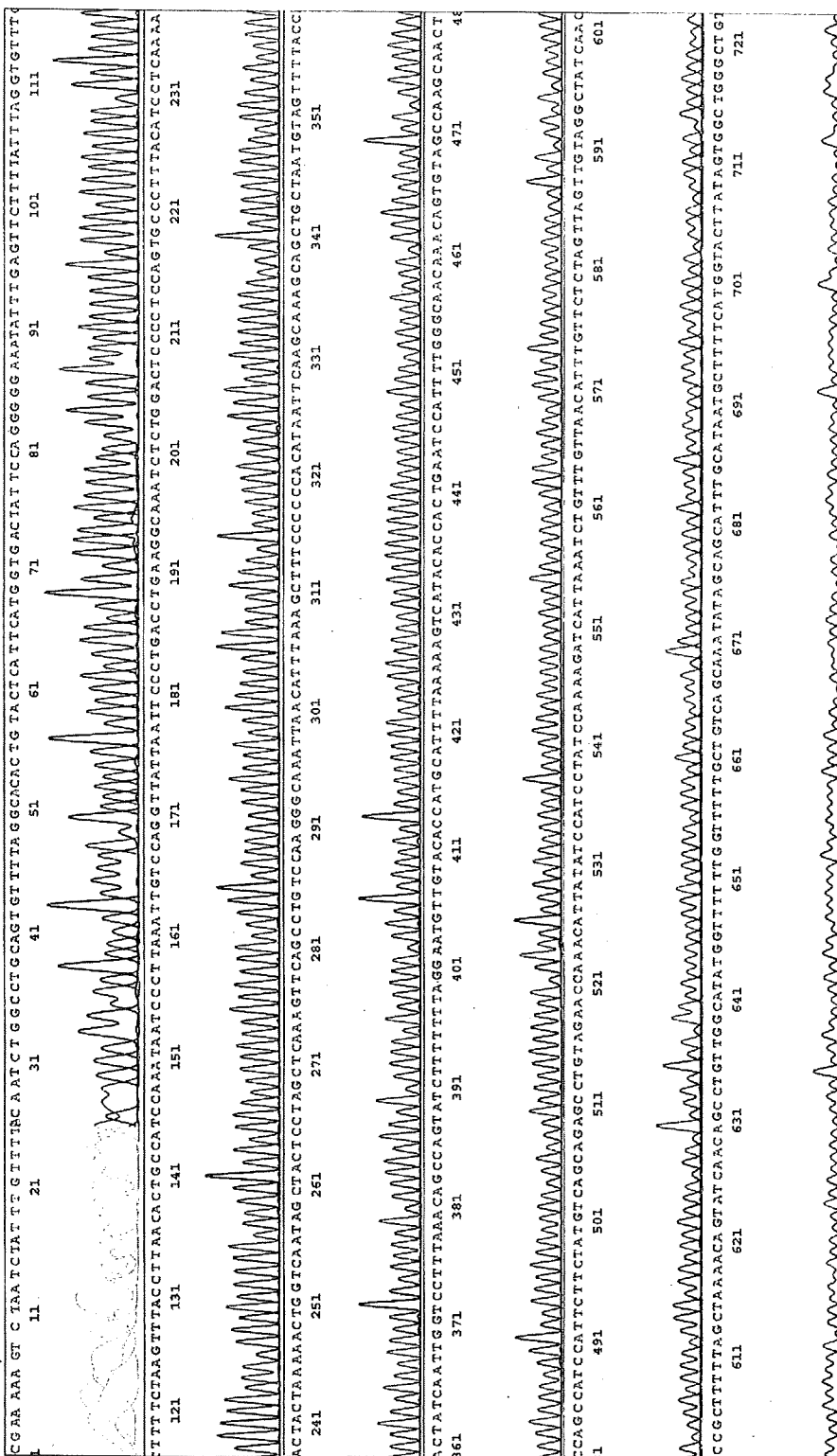
Inst Model/Name 3730/3730XL-N01-17119-009

Apr 28, 2009 11:13PM, CST

Apr 28, 2009 11:36PM, CST

Spacing: 15.2 Pts/Panel/1450

Plate Name: 20090428N01R03



Printed on: Mon May 04, 2009 10:58AM, CST

Electropherogram Data Page 1 of 1



SIN C:231 A:217 T:216 C:149

KB.bcp

KB 1.2

Cap:73

SYN2245-2-21_SYN2245P7

SYN2245-2-21_SYN2245P7

KB_3730_POP7_BD1V3.mob

Pts 1902 to 15960 Pk1 Loc:1901

Version 5.2 Patch2 HSQV Bases: 1011

Inst ModelName 3730/3730XL-N01-17119-009

Apr 28.2009 11:13PM, CST

Apr 28.2009 11:36PM, CST

Spacing:14.98 Pts/Panel1450

Plate Name: 20090428N01R03

```

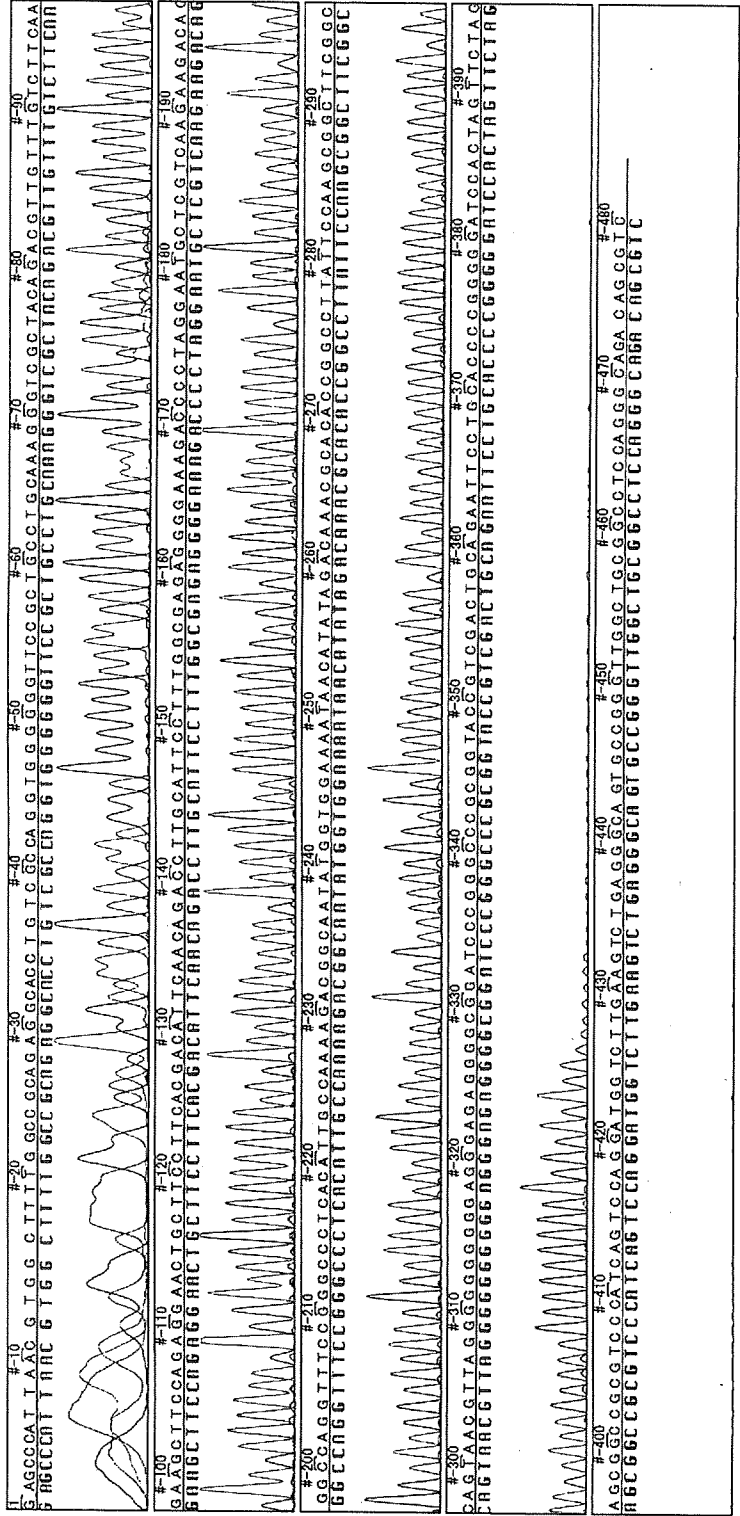
A 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

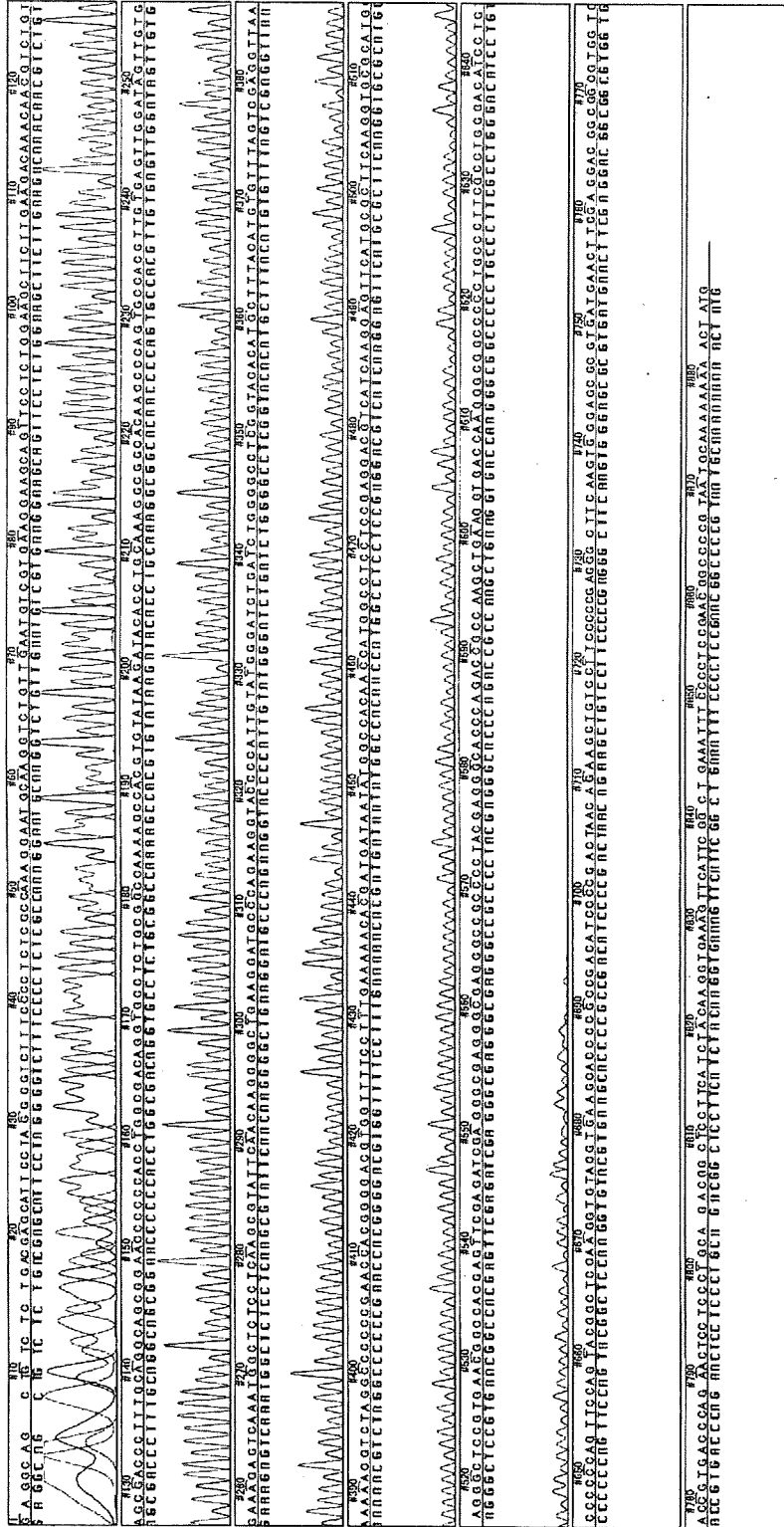
```

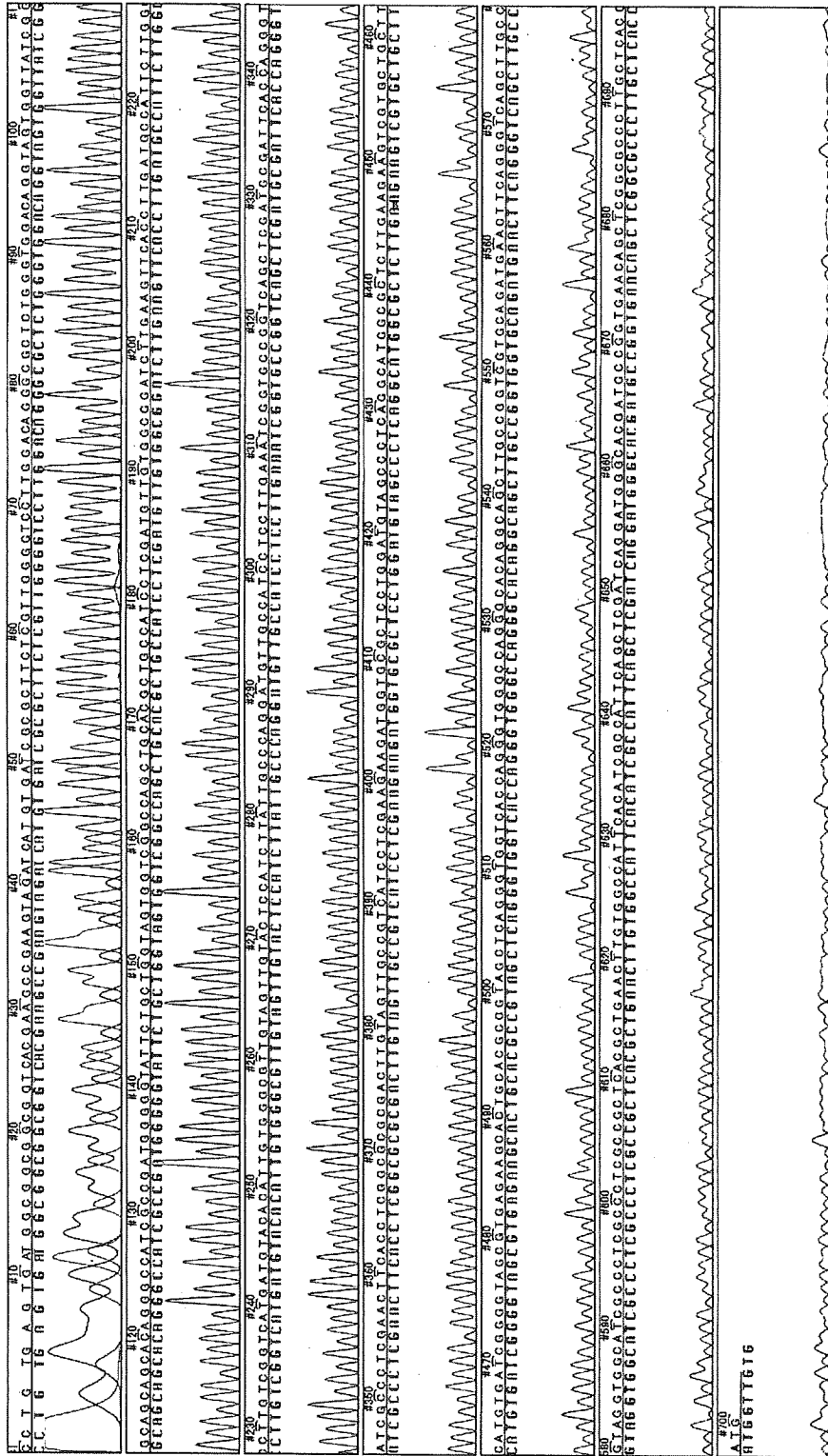
Printed on: Mon May 04, 2009 10:58AM, CST

Electropherogram Data Page 1 of 1

(Experimental data) SYN2142-1-5 SYN2142-1P1
 Sequenchrct (tm) "SYN2142_SFF"







Cell surface marker of corneal epithelium stem cells and culture condition.

Naoki YAMAMOTO¹⁾, Koki TANIGUCHI¹⁾, KojiHIRANO²⁾, Masayuki HORIGUCHI³⁾, Masakazu KATOH⁴⁾, Ken-ichiro HATA⁵⁾ and Hajime KOJIMA⁶⁾

¹⁾Laboratory of Molecularbiology and Histocchemistry, Fujita Health University, Joint Research Laboratory, Aichi, JAPAN

²⁾Department of Ophthalmology, Fujita Health University, School of Medicine, Aichi, JAPAN

³⁾Japan Tissue Engineering Co., Ltd, Aichi, JAPAN

⁴⁾Division of Pharmacology, National Institute of Health Science, N-15, Tokyo, JAPAN

● FUJITA HEALTH UNIVERSITY JOINT RESEARCH LABORATORY

Introduction

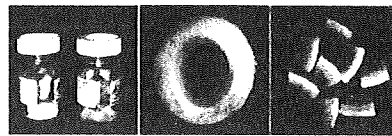
- Human corneal epithelial cells were difficult to culture.
- Many commercially available corneal epithelial cell lines were not undifferentiated because the cells were cultured at different times points.
- Therefore we investigated culture conditions that could maintain separation of undifferentiated cells including the corneal epithelial stem cells
- We also developed a method to transfected the immortalization gene to human corneal epithelial cells, which generated a stable human corneal epithelial cell line that could be used in an eye irritation assay.

Purpose

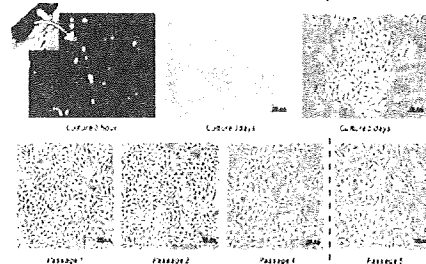
- We examined the expression of the tissue stem cell marker (p75NTR, CD271) in corneal epithelial stem cells of the human corneal limbus.
- We investigated a primary method for the culture of corneal epithelial cells and developed a process for generating new immortalized human corneal epithelial cells

Materials and Methods

- We purchased a human cornea tissue from an American eye bank for using of research
- The human cornea tissue was fixed by SUPER FIX (KURABO, JAPAN, YAMAMOTO N. et al. Japan patent NO. 3723204) made the paraffin specimen, and immunostained by using p75NTR and p63 antibody
- The cornea tissue including the corneal limbus was cut about 5 mm size, treated using enzyme and cultured at serum free medium on coating dish
- Serum free medium: EGF, bFGF, Insulin, Hydrocortisone, Transferrin, Ascorbic acid et al. (Reference: Ogasawara, S. et al.)

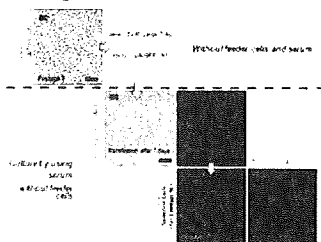


Result-2 Culture of human corneal epithelial cells



- The polygonal cell form was maintained under passage 5
- At passage 6, cell form was changed by cell differentiation: hypertrophy or extension

Making of immortalization human corneal epithelial cells



- We succeeded transfection of the immortalization gene (SV40 Large T Ag) into normal human corneal epithelial cells by the electroporation method
- The immortalization cells were keratin 3 positive (The keratin 3 is one of the specific markers of human corneal epithelial cell)

What's p75NTR ?

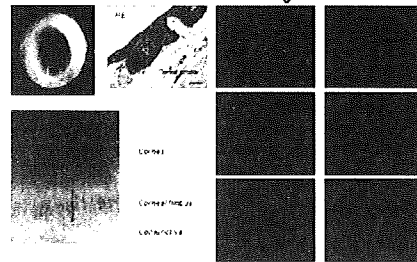
The Official name : low affinity p75 Neurotrophin receptor

Accession: p75 Neurotrophin Receptor [p75NTR]
 GI Number: 37162271

- Neurotrophin family
- Neuro Growth Factor: NGF
- Brain-Derived Neurotrophic Factor: BDNF
- Neurotrophin-3: NT-3
- Neurotrophin-4.5: NT-4.5

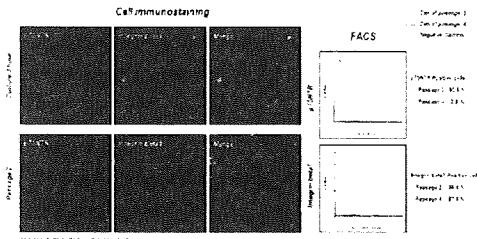
- 7749598 at The epithelial stem cell marker
 Kusunuma C, Yamamoto N, et al. Oculogyne 17, 157-158, 1998
 Yamamoto N et al. Exp Cell Res Commun 24, 2005
 Yamamoto N et al. Med Mol Morphol 41, 83-91, 2008
 Yamamoto N et al. Under submitted of Japan Patent NO. 2006-279917
- 7749598 at The primary corneal epithelial stem cell marker
 Yamamoto N et al. J Dermatol Sci 48, 43-51, 2007
 Yamamoto N et al. Under submitted of Japan Patent NO. 2006-087384
 Yamamoto N et al. Under submitted of Japan Patent NO. 2006-202335

Result-1 Immunohistostaining of Corneal limbus



- p75NTR positive cells were observed around epithelial cell base of the corneal limbus
- The p75NTR positive cells were with positive of p63 which expressed at the corneal epithelial stem cell

Result-3 Analysis of human corneal epithelial cells



- Many of culture cells were p75NTR-positive at passage 2, but became almost negative at passage 4
 - On the other hand, integrin beta1 was almost positive by passage 4
- These results show that culture cells were maintained with a comparatively undifferentiation by passage 2

Discussion

- The tissue stem cells from the cornea, the crystalline lens, and the iris were found to be p75NTR-positive cells. (Reference: Yamamoto N. et al. Med Mol Morphol. 41, 83-91, 2008). In this report, we describe the development of a new method of cell isolation and culture conditions which made it possible to culture corneal epithelial cells without using feeder cells and serum.
- The polygonal cell form of normal corneal epithelial cells could not maintain the form over passage 6.
- However, the immortalized cells maintained the polygonal cell form and stained positive for keratin 3 over passage 10.
- Future studies will focus on using the new immortalized human corneal epithelial cell line as a standard reagent in the eye irritation assay.

This article is copyrighted as indicated in the article. Reuse of AIP content is subject to the terms at: http://scitation.org/termsconditions. Downloaded to IP: 129.173.125.100 On: Tue, 23 May 2017 12:00:00

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等バイオリーサイエンス総合研究事業）
動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究

分担研究年度終了報告書

感作性試験代替法の開発

分担研究者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者 足利太可雄、坂口齊、岡本賢二、水野誠、加藤義直、稲葉宏幸、
中村恒彰、佐藤淳、岡本裕子、桑原裕史、小坂七重、菌さき子

研究要旨

ヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞の CD86 及び CD54 の発現亢進を指標にした感作性試験代替法 (human Cell Line Activation Test: h-CLAT) が日本において開発されてきた。これまでの検討により、既知化合物に関する *in vivo* との対応性や、施設間再現性が良好であることを明らかにしてきた。本試験法を国際的な標準試験法とすることを目的とし、さらに試験法の改良および背景データの蓄積を行った。まず初年度において、予測モデル、陽性対照物質の適用濃度、及び CD86/CD54 発現亢進最小濃度 (EC150, 200) の算出方法の改良を行い、試験法の信頼性を向上させた。続いて次年度では主に化粧品原料として用いられている化合物を h-CLAT により評価した。その結果本試験法は、今回検討した範囲では化粧品原料の感作性評価に有用であると考えられたが、難溶性物質評価時の分散状態の違いが細胞毒性結果に与える影響など、今後実用化に当たっての課題も見出された。さらに最終年度では h-CLAT の信頼性を高めることを目的として、実際に試験を行う際に重要な知見となる試験条件の背景データの収集を行った。具体的には、①細胞選択時の対照物質である Ni および SLS の推奨濃度の決定、②細胞継代方法の違いが結果に与える影響、③測定に用いるフローサイトメーターの精度管理に関する基礎的研究、を行った。その結果、Ni および SLS の推奨濃度をそれぞれ決定し、プロトコルに記載した。また継代時に細胞を遠心分離するかどうかは結果に大きく影響しないことを明らかにした。さらにフローサイトメーター用の標準ビーズを用いた検討では、検討を行った 3 施設では機器の感度に大きな違いがないことを確認した。

以上の研究より h-CLAT のプロトコルが最適化され、化粧品原料における有用性も示された。今後はバリデーションによりその有用性を検証していきたい。

A. 研究目的

我々はランゲルハンス細胞の代替としてヒト単球細胞株である THP-1 細胞を用い、CD86 と CD54 の発現亢進を指標とした試験法 (h-CLAT) を開発してきた^{1, 2, 3)}。その後国内 7 施設による共同研究を実施した結果、本試験法は技術移転が容易であり、基本的に施設間再現性が良好であることを明らかにした⁴⁾。さらに本試験法の汎用性を向上させることを目的として、細胞と血清のロット差及び前培養条件に関する検討^{5, 6, 7)}を行ってきた。

一方これまでの研究によりいくつかの課題が明らかになり、試験法の改良を行うこと

とした。具体的には、予測モデル、陽性対照物質 (DNCB) の適用濃度、及び CD86/CD54 発現亢進最小濃度 (EC150, 200) の算出方法の見直しを行った。こうした研究により本試験法の頑強性、信頼性が向上し、将来の目標である公的バリデーションに向けた有用なデータが得られるものと期待できる。

また特に化粧品業界においては、感作性試験代替法の実用化が強く期待されていることから、化粧品原料に関する h-CLAT の有用性と適用限界を明らかにすることを目的として研究を行った。具体的には防腐剤、染毛剤および香料 30 品を評価し、h-CLAT の有用

性を検討した^{8, 9, 10)}。

さらに本試験法の信頼性をさらに向上させることを目的として、残された課題と考えられる3つのテーマについて背景データの取得を行った。具体的には、①細胞選択時の対照物質であるNiおよびSLSの推奨濃度の決定、②細胞継代方法の違いが結果に与える影響、③測定に用いるフローサイトメーターの精度管理に関する基礎的研究である。こうした情報の取得は信頼性の高い試験法の確立に寄与するものと考えられる。

B. 研究方法

試験方法：細胞は、ヒト単球由来の細胞株であるTHP-1細胞をATCCより購入して使用した。CD86及びCD54の発現は、上記の細胞に被験物質を24時間処理し、細胞生存率とともにフローサイトメトリーを用いて測定した。細胞株、血清、抗体については標準プロトコールに記載した基準を満たしたものを使用した。適用濃度は、予め予備試験として細胞毒性試験を行い、生存率が75%に相当する濃度(CV75 (=IC25)と定義)を基準に、公比1.2で8濃度(1.2x, 1x, 1/1.2x, 1/1.2²x, 1/1.2³x, 1/1.2⁴x, 1/1.2⁵x及び1/1.2⁶x CV75)設定した。試験は3回を行い、コントロールと比較してCD86/CD54どちらかの発現量がそれぞれ1濃度でも150, 200%を超えた試験が2回以上あった場合を陽性とした。

解析に用いた試験データ：過去に学会等で発表したものから、同一プロトコールにより評価したものを選択して解析に用いた。予測モデルの見直しについては、10施設における施設間再現性の検討結果と、2施設で取得した既知化合物の評価結果を合わせた144試験のデータを用い解析した。陽性対照物質(DNCB)の適用濃度の検討には10施設における施設間再現性の検討結果のデータを用いた。さらにCD86/CD54発現亢進最小濃度(EC150, 200)算出法の検討には、2施設で取得した既知陽性化合物41品の結果を用いた。

被験物質：代表的な感作性物質としてDNCBおよびNiを、代表的な非感作性物質としてSLSを用いた。また化粧品原料にも使用される被験物質としてin vivo感作性試験結果のある化粧品原料(防腐剤、香料及び染毛剤)の中から30品を選択し、試験を行った。

化粧品原料の施設間再現性：防腐剤、香料及び染毛剤それぞれについて2施設で試験を行った。さらに溶媒の影響、超音波処理に

よる被験物質の分散状態の影響や、原体と三量体との比較など、h-CLATの実用化に向けた追加検討も行った。

また、細胞選択時に用いるNi、SLSの固定濃度の検討、細胞培養条件の検討、およびフローサイトメーターの精度管理に関する検討方法の詳細はそれぞれの項目に記載した。各検討においては、施設間再現性も確認する目的で、複数の施設で試験を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は感作性試験代替法を開発することで実験動物の福祉向上を目指すものであるためin vitroの実験のみを行っており、ヒトや動物の権利や福祉に抵触するところはない。

C. 研究結果及び考察

C-1 予測モデルの改良

C-1-1 イントロダクション

これまでCD86あるいはCD54の発現量は、独立した3回の試験データの平均値を適用濃度ごとに算出し、いずれかの平均値がカットオフ値(CD86は150%、CD54は200%)を超えれば陽性と判断していた。しかし、本予測モデルでは、たとえ3回の試験でカットオフ値を超えても、超えた時の濃度が試験ごとに異なれば、平均値としては全ての濃度でカットオフ値を超えない場合もあり得る。また、用量-反応性が試験ごとに異なる可能性のある生物反応を指標とするアッセイ系において、同一濃度で平均値を求めることが果たして適切かどうかという問題点も指摘されていた。こうしたことから、予測モデルを改良するため、これまでに同一プロトコールで評価された144試験のデータを解析した。

なお、本研究において東京理科大学名誉教授吉村功先生の多大なるご指導をいただいた。

C-1-2 結果及び考察

今回は4つのポイント(①平均値が個別値か、②偽陰性を可能な限り減少させる、③用量依存性考慮の必要性、④グレーゾーン設定の必要性)について検討を行った。

その結果、本試験系のような生物反応では、試験ごとに陽性となる濃度が異なることは十分に考えられるため、試験ごとに1濃度でもカットオフ値を超えるかどうかを判定し、3回の試験のうち2回以上カットオフ値を超

えた場合を陽性とする、「個別値評価の多数決」で判定することとした。また用量依存性の考慮は、定義が困難で統計的手法を用いる必要があるなど実用性の観点から採用しないこととした。さらに、stand alone の試験法として、グレーゾーンの設定はせず、陽性か陰性のどちらかに判定すべきと考えた。

以上のポイントから、144 試験について従来の平均値による評価（平均データ解析）と個別値評価の多数決（個別データ解析）との比較を行った。In vivo との一致率は、平均データ解析の 87.5% と比べて個別データ解析の 88.2% ほうがわずかに高かった。しかし最も注目すべき点は、個別データ解析により偽陰性の数が 16 から 12 と大きく減少したことである。本結果より、従来の平均データ解析では誤って陰性と判断される試験を個別データ解析により正しく評価できる可能性が高まると考えられた。特異性 (specificity) の値は個別データ解析に変更することで若干減少した。以上より、本改良により偽陰性が減少し、偽陽性が増加する可能性が考えられたが、本試験系の安全性試験としての目的を考えると、偽陽性は増えても偽陰性を減少させる改良は適当と考えられた。

以上の解析により、予測モデルを個別データ解析に変更することとした。

C-2 陽性対照物質 (DNCB) の適用濃度

C-2-1 イントロダクション

本試験法では、試験ごとに代表的感作物質である DNCB (Dinitrochlorobenzene) を陽性対照として設定し、陽性対照の CD86/54 のいずれもがカットオフ値を超えず、しかも生存率が 50-90% の間に入らなかった試験は、正しく実施できなかつたと判断し、その結果を採用しないこととした。DNCB は THP-1 細胞の CD86/CD54 の発現を共に強く亢進させるが、その濃度の範囲は約 2-6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の間と比較的狭いことがわかっている。従来の試験法では、DNCB の濃度をやや細胞生存率の低下が認められる 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と設定してきたが、試験条件（細胞の調子やロットなど）のわずかな違いにより細胞生存率が 50% を下回り、結果的に試験が不成立になる事例が散見された。そこで、過去の多施設間共同研究の結果より、DNCB が安定して陽性となる濃度を見直すこととした。さらに 1 施設において、新たに見出した適用濃度の有用性を確認することとした。

C-2-2 結果及び考察

まず、これまでのべ 12 施設で行った DNCB の評価結果をまとめた。1 施設あたり 3 回の試験を実施しているため、試験の合計回数は 36 回となった。低濃度側の 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では多くの施設で陰性と評価されたが、この時の細胞生存率はほぼ 90% 以上であり、DNCB の適用濃度としては低すぎると考えられた。一方、高濃度側の 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でも同様に陰性と評価された場合が多かったが、こちらの場合細胞生存率は 50-60% と低く、細胞毒性によりタンパクの発現が抑制された可能性が考えられたため、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は DNCB の適用濃度として高すぎると考えられた。さらに従来の設定濃度である 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でも陰性となる例が散見され、必ずしも適用濃度としては適切でない可能性が示された。施設間の評価結果をまとめると、4.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において陽性となる確率が最も高く (35/36)、その次が 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった (34/36)。以上の解析より、陽性対照である DNCB の適用濃度として、4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が最適であると判断した。

次に、設定濃度としての 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の試験結果の安定性を検証するために、1 施設において DNCB を 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 2 濃度設定し、17 回試験を実施した。4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では実施した全ての試験で DNCB の CD86 と CD54 の値がカットオフ値を超え、陽性と判断された。一方、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 17 回の試験のうち 1 回が陰性となった。さらにばらつきを示す CV 値も、4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合と比較して小さく、安定性は良好と判断された。以上の検討より、今後陽性対照である DNCB の適用濃度を 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と変更することとした。ただし、試験条件によっては 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では不適當の場合も考えられるため、そうした場合には各施設で CV75 を決定し、陽性対照の適用濃度としてその濃度を用いることも可能とした。

C-3 CD86/CD54 発現亢進最小濃度 (EC150, 200)

C-3-1 イントロダクション

これまで我々は CD86/CD54 の発現がそれぞれのカットオフ値 (CD86 は 150%、CD54 は 200%) を超えるのに必要な最小濃度をそれぞれ EC150、EC200 と定義し、LLNA における感作性強度の指標である EC3 との対応性を検討してきた。従来は各濃度における CD86/CD54 発現量の平均値を基に EC150/200

を計算してきたが、予測モデルを個別データ解析に変更することに伴い、EC150/200の値の算出方法も見直すこととした。

C-3-2 結果及び考察

算出値の候補としては、試験ごとに算出したEC150/200の平均値、最高値、中央値、最低値が考えられ、それぞれについて算出可能な化合物数及び値の妥当性を検証することとした。まず既知感作性物質41品の結果について、個別に評価した場合どの程度EC150/200が算出可能かを検討した。CD86が陽性であった化合物は31品あり、そのうち23品が3回の試験ともいずれかの濃度において150%のカットオフ値を超えていたが、この23品のうち3回ともEC150を算出できたのはわずかに8品のみであった。その8品以外の15品については、最低濃度でもカットオフ値を超えているなどの理由で、EC150を算出できない試験があった。CD54についても、陽性は29品あったが、そのうち3回ともEC150を算出できたのは17品のみであった。したがって個別にEC150/200を算出しても、EC150/200の3回の個別値が揃わず、平均値を算出できないケースが多々あることが明らかとなった。予測モデルを個別データ解析にした理由の1つは、ばらつきのある生物反応は平均値よりも個別に評価すべきとの考え方であった。そこでばらつきへの配慮から、3回の値の中央値がより適切と考え、平均値の代わりに中央値によりEC150/200を求めたところ、算出可能な化合物の数は増加した。これは3回の試験のうち1回が陰性となった場合は、その試験は設定した8濃度より高い濃度で陽性になると考え、陽性となった2回のうち高い方を中央値と定義することで、算出可能な化合物の数を増やすことができたためである。さらに、中央値により算出したEC150/200とLLNAのEC3との対応性は、従来の平均値により算出したEC150/200とEC3の対応性と大きな違いは認められなかった。以上の結果より、算出方法の変更によるin vivoとの対応性に変化がなく、より多くの化合物のEC150/200を算出できる中央値をEC150/200算出に用いることとした。なお、生物反応のばらつきを考慮できるという観点から、中央値を選択すべきと考えた。

また、中央値を用いる場合にしても、3回の試験結果だけではEC150/200が算出できない場合がある。例えば3回の試験のうち最

低濃度においてもカットオフ値を下回らない場合が2回以上の場合である。こうした場合、従来はより低濃度で追加試験を行い、EC150/200を算出することとしていた。しかしLLNAの場合では、用量-反応性から外挿法により追加試験を行わずにEC3を算出しており、h-CLATにおいても同様の手法を用いることが可能と考えられた。そこで中央値としてのEC150/200が算出できない場合、まず外挿法によりEC150/200を算出することとし、濃度依存性がないなど外挿法による算出が不可能な場合のみ追加濃度による再試験を実施することとした。以上の算出フローにより算出したEC150/200それぞれのEC3との相関係数は、0.800/0.531と従来の平均値による算出の相関係数である0.785/0.428とほぼ同程度であり、予測モデルの変更ともなう算出方法のこのような変更は妥当と考えられた。

C-4 防腐剤の検討

C-4-1 イントロダクション

化粧品原料として使用される防腐剤の感作性評価におけるh-CLATの有用性を調べるために、防腐剤16品（動物試験において感作性が陽性の物質13品と陰性の物質3品）を評価し、動物試験結果との対応性を検証した。また、現在のところh-CLATで使用可能な2種類の溶媒である生理食塩水(Saline)とDMSO(dimethyl sulfoxide)の違いが試験結果に与える影響についても検討した。さらに、h-CLATの結果からin vivo感作性強度を予測することができるかを調べるために、イソチアゾリン系骨格を有する防腐剤のin vivo感作性強度とh-CLATの結果を比較した。試験は施設間再現性を評価するために、2施設において同様に実施した。

C-4-2 結果及び考察

防腐剤16品を評価した。動物試験結果との一致率については、施設Aが81%、施設Bは75%であった。陽性物質の検出率は施設Aが92%、施設Bは85%と良好であった。一方、陰性物質の検出率は施設A、Bとも33%であった。また、施設間再現性については16品のうち15品で一致し、良好と考えられた。

偽陰性物質は2品存在した。Clotrimazole(2施設ともに陰性)には、物質自身の蛍光が測定結果に影響を与えた可能性が考えられた。Chlorhexidine digluconate(1施設で偽陰性)については、モルモットで陰性の

報告やヒトにおける陽性率の低さから、感作性ポテンシャルは弱いと考えられ、感度の観点から h-CLAT では正しく評価できなかった可能性が考えられた。一方、偽陽性も 2 品存在した。Benzyl alcohol はヒトによる試験である HRIPT (Human Repeat Insult Patch Testing) では陽性であるとの報告¹ もあり、ヒトにおける感作性ポテンシャルを h-CLAT は捉えている可能性が考えられた。Phenol が 2 施設共に陽性になった原因は現時点では不明である。

以上、防腐剤の評価について、偽陽性率が高い傾向があるものの、動物試験結果との一致率、陽性の検出率及び施設間再現性は良好であったことから、*in vitro* の試験系として h-CLAT は有用であると考えられた。

次に、溶媒の違いが試験の結果に与える影響について検討した。2 施設共に感作陽性を正しく評価できた防腐剤 5 品について、被験物質を培地に溶解させるために調製する stock solution を Saline と DMSO それぞれで調製し、試験を行った。まず、細胞毒性試験により求めた CV75 について見ると、いずれの溶媒を用いても結果はほぼ同様であった。また、細胞毒性試験の結果に基づいて実施した本試験についても、2 施設共に、溶媒の違いによる判定結果の差はなかった。以上より、h-CLAT において stock solution 調製の際の溶媒の違いが結果に影響する可能性は低いと考えられた。このことは、溶媒選択の判断により h-CLAT の結果が異なる可能性が低いこと、すなわち本試験法の再現性が高いことを示唆するものである。しかし評価する物質の物性によっては、溶媒への溶解性が著しく異なることも考えられ、そうした場合についての検討が今後必要と考えられる。

最後に、イソチアゾリン骨格を有する防腐剤の感作性強度と h-CLAT の結果の比較を行った。MCI と MI の構造の違いは、置換基としての塩素を含んでいるかどうかのみである。まず *in vivo* における感作性強度では、LLNA と HRIPT の閾値 (いずれも値が低いほど感作性ポテンシャルが高い) のどちらの結果も MCI/MI (4:1 の混合物) が MI より強い感作性ポテンシャルを有していることを示していた。ここで、h-CLAT の結果では CD86 の閾値である EC150 の値が MCI/MI より MI のそれより数倍高く *in vivo* の感作性ポテンシャルと対応していたことから h-CLAT は分子内塩素原子の有無により生じた感作性ポテ

ンシャルの差を検出できた可能性が考えられた。今後は、さらに感作性物質の *in vivo* 感作性ポテンシャルと h-CLAT の結果の対応性を解析することで、h-CLAT が感作陽性・陰性の区別だけでなくポテンシャルまで予測可能であるかを検討する必要があると考える。

C-5 染毛剤の評価

C-5-1 イントロダクション

化粧品原料として使用される染毛剤の感作性評価における h-CLAT の有用性を調べるために、染毛剤 7 品 (全て LLNA による感作陽性物質) を評価し、LLNA 結果との対応性を検討した。また、染毛剤のうち PPD (p-Phenylene diamine) は自身で蛍光を発することが知られている。このような自身の蛍光を有する化合物の非特異的な細胞膜への結合は、蛍光抗体により特異的な蛋白発現量を測定するフローサイトメトリー解析の結果に影響を与える可能性があるため、フローサイトメトリーの励起波長 488nm により励起させた PPD の蛍光スペクトルを測定した。さらに、細胞に PPD を 24 時間適用したアイソタイプコントロール (測定時に CD86 または CD54 抗体処理を行わないコントロール) の蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定し、測定結果に自家蛍光が影響するかどうかを検討した。最後に、PPD の 3 量体であり、LLNA において感作性ポテンシャルが高いとされる Bandrowski's Base についても h-CLAT による評価を行い、PPD との比較を行った。

C-5-2 結果及び考察

染毛剤 7 品の評価を行った。施設 C、D ともに評価可能であった 6 品全てが陽性となり、LLNA との一致率は、100%と非常に良好であった。また細胞毒性試験についても 2 施設でほぼ同様の結果が得られた。ただし、2, 5-Diaminotoluene sulfate については、指定溶媒 (Saline あるいは DMSO) に対する溶解性が非常に悪く、h-CLAT では評価不可能と判断した。

次に PPD について、フローサイトメトリーのレーザー光 (励起波長 488nm) と同じ励起波長による蛍光スペクトルを測定したところ、フローサイトメトリーの検出波長である 530nm 付近において蛍光が認められた。このことは、PPD を処理した細胞のアイソタイプコントロールの蛍光の濃度依存的増加が PPD

自身の蛍光によるものであることを示すものと考えられる。このような自家蛍光を有する PPD でも、h-CLAT は陽性と評価しており、これは CD86 および CD54 の相対発現量を計算する際抗体処理サンプルの平均蛍光強度からアイソタイプ抗体処理サンプルの平均蛍光強度を引くことで補正が可能であるためと考えられた。

以上より、染毛剤において、LLNA との一致率および施設間再現性は非常に良好であったことから、*in vitro* の試験系として h-CLAT は有用であると考えられた。一方で、溶解性の悪い物質についての評価は、適切な溶媒の選択など今後の課題と考えられた。

最後に、PPD の 3 量体である Bandrowski's Base (以下 BB) を h-CLAT で評価し、PPD との比較を行った。細胞毒性については、BB は PPD よりも強かった。BB はその subtoxic な濃度において CD86/CD54 の発現をともに亢進させたが、その発現亢進の程度は PPD よりも強かった。特に CD54 については PPD が cut off point である 200% を超えなかったのに対して、BB は最大 3000% を超える大幅な発現亢進があった。PPD の酸化物である BB は LLNA における感作性ポテンシャルが高いことが知られており、h-CLAT のこうした結果は *in vivo* における感作性ポテンシャルの違いを裏付けるものと考えられた。

C-6 香料の検討

C-6-1 イントロダクション

化粧品原料として使用される香料の感作性評価における h-CLAT の有用性を調べるために、香料 7 品 (LLNA による感作陽性物質 4 品と感作陰性物質 3 品) を評価し、LLNA 結果との対応性を検討した。また香料は揮発性であり、細胞に適用後に揮発してコントロールなど他の測定サンプルに影響を与える可能性がある。そこで培養プレートをシールすることで揮発を防ぎ、結果に違いがあるかどうか調べた。さらに、被験物質を培地にけん濁させた状態での超音波処理 (ソニケーション) 条件が結果に影響を与えるかどうかを検討した。試験は施設間再現性を評価するために、2 施設において同様に実施した。

C-6-2 結果及び考察

香料 7 品を評価した。LLNA との一致率については、施設 E、F ともに 86% であった。陽性物質の検出率は施設 E、F ともに 100% 非常に良好であり、陰性の検出率は施設 E、F

とも 67% であった。また、施設間再現性については検討した 7 品全てについて一致し、非常に良好と考えられた。

今回検討した感作性陽性の 4 品のうち、偽陰性となった物質は存在しなかった。偽陽性物質は、2 施設とも Diethylphthalate のみであった。Diethylphthalate はヒトにおいてパッチテスト陽性との報告が複数あることから、h-CLAT は LLNA では捉えられなかったヒトにおける感作性ポテンシャルを捉えている可能性が考えられた。

さらに、揮発物質である香料の他の well への影響をなくすために被験物質適用時に培養プレートをシールした場合でも、結果は通常の場合と同じであった。また濃度設定のための細胞毒性試験においてもシールの有無は結果に殆ど影響しなかった。揮発性物質を細胞に適用した場合、培養の間に揮発して CO2 インキュベーターなどの培養環境に影響を与える可能性がある。今回の結果より、揮発性物質を評価する場合はプレート表面をシールすることで結果に影響を与えずに培養環境への影響をなくすことが可能であることが明らかとなった。

また、細胞毒性試験について見た場合、特に溶解性が悪かった Methyl-2-nonynoate と Diethylphthalate の 2 品の施設による違いが大きかった。この結果の違いは、施設 E が被験物質を培地に懸濁させるためにソニケーションを行ったのに対し、施設 F はしていなかったためと考えられた。そこで Methyl-2-nonynoate を培地に加えた後、ソニケーションの時間により濁度と細胞毒性がどのように変化するかを検討した。その結果、ソニケーション 10 秒後より濁度は増加し、細胞毒性も強くなっていた。本結果から、ソニケーションにより被験物質の分散状態が良くなることで細胞との接触機会が増加した結果毒性が強まったと考えられた。さらに Methyl-2-nonynoate についてソニケーションの時間を変化させ、濁度と CD86 および CD54 の発現量が変化するかどうか検討した。その結果ソニケーション時間が長くなるにつれて濁度が上昇したが、CD86 および CD54 の発現量には大きな変化は見られなかった。したがって、難溶性物質を培地に懸濁させる場合、分散状態によって細胞毒性試験の結果に違いが生じる可能性があるが、それに応じて濃度を設定すれば h-CLAT は陰性・陽性を適切に評価可能と考えられた。

以上揮発性や難溶性などの特徴を有するものが多い香料において、LLNA との一致率および施設間再現性は良好であったことから、*in vitro* の試験系として h-CLAT は有用であると考えられた。

C-7 細胞選択時に用いる Ni、SLS の固定濃度の検討

C-7-1 イントロダクション

h-CLAT を適切に行なうためには、適切な THP-1 細胞を用い試験を行なう必要がある。そのためには、THP-1 細胞を選択する基準が重要となるが、以前の厚生労働科学研究で行なった細胞選択の検討においては、DNCB、Ni、SLS を CV75 (予備の PI assay より細胞生存率が 75% になると予想される濃度) で評価し、その結果で判断していた。その後 DNCB に関しては 4.0 μg/mL が陽性対照として適切な濃度であることが判明し、現在では細胞の選択の際、および試験毎のポジティブコントロールとして DNCB はこの濃度で CD86、CD54 とともに陽性であることで評価されている。一方で、Ni と SLS についてはこれまで CV75 での評価しか行なったことがなかった。しかし、PI assay を行なわずに、固定濃度での細胞の採用可否を判断できる事が望まれ、Ni 及び SLS についても評価することとした。

C-7-2 方法

共同研究に参加している施設の中から、3 施設が本検討に参加した。

Ni に関しては、厚生労働科学研究として以前同一試験濃度で行なった 7 施設での結果から、今回評価する固定濃度として 100 μg/mL に決定した。SLS に関しては急激に細胞毒性の変化が認められる事から、55、60、65 μg/mL の 3 濃度において試験を行いデータを蓄積することとした。これら固定濃度に関して、まず 1 施設で 10 回のデータを取得し、3 施設での評価に適用することができる濃度であるかの予備評価を行った。

その後 3 施設において、細胞を新たに播種し、培養 3~5 週間に 3 回の試験を行い、Ni に関しては CD86、CD54 共に陽性となるかどうか、そして SLS に関しては細胞生存率 < 90 % で CD86、CD54 共に陰性となるかを判断基準とし、評価した。

C-7-3 結果及び考察

1) 1 施設での予備評価

Ni の 1 濃度 (100 μg/mL) と SLS の 3 濃度

(50、55、60 μg/mL) の 10 回の試験を行った。Ni (100 μg/mL) に関しては、① 10 回の試験すべてで CD86、CD54 が共に陽性基準値を超えて陽性と判定された、② 細胞生存率 (平均値 ± SD) は 83.1 ± 2.9 % であった。SLS (50、55、60 μg/mL) に関しては、① 10 回の試験すべてでいずれの濃度でも、CD86、CD54 が共に陽性基準値を超えずに陰性と判定された。② 細胞生存率 (平均値 ± SD) は 50 μg/mL は 93.8 ± 1.7、55 μg/mL は 87.5 ± 4.2、60 μg/mL は 72.0 ± 10.4 であった。以上の結果から、1 施設で評価した固定濃度は細胞選択の際に有用となる可能性が考えられ、以下の 3 施設間での再現性も含めた評価に移行することとした。

2) 3 施設での評価

2-1) Ni (100 μg/mL) の評価

Ni (100 μg/mL) について 3 施設で 3 回ずつ試験を行った。3 施設ともに 3 回の試験において CD86 及び CD54 が陽性判基準値を超え、すべて陽性と判定された。また 3 施設の平均細胞生存率は 86.0% ± 2.3 であった。評価結果及び細胞生存率の施設内及び施設間再現性は高かった。

2-2) SLS (50、55、60 μg/mL) の評価

SLS 3 濃度 (50 μg/mL、55 μg/mL、60 μg/mL) の試験を行った。すべての濃度において、3 施設とも 3 回の試験において陰性の結果が得られ、いずれの濃度においても再現性が確認できた。一方細胞生存率に関しては、施設 2 の 60 μg/mL において、3 回の試験中 1 回の試験で 50% を下回る結果が得られた。細胞生存率が 50% 未満の場合、試験は不成立と判断することになっているため、SLS の固定濃度としては、ある程度の毒性が認められるものの、陰性の結果が得られた 55 μg/mL が適切な固定濃度と考えられた。

以上の結果から、DNCB の 4.0 μg/mL に加え、Ni の 100 μg/mL そして SLS の 55 μg/mL を細胞の反応性確認時の固定適用濃度として、h-CLAT の最終プロトコールに記載する予定である。

C-8 細胞培養条件の検討

C-8-1 イントロダクション

これまで、h-CLAT の試験結果の施設間再現性を高めるために前培養条件や細胞及び血清ロットの選択基準などプロトコールの精緻化に向けた検討を行い、その結果をプロ

トコールに反映させ実験手法を統一化することで精度の高い h-CLAT 試験法を目指してきた。一方で、より洗練された手法になるにつれ施設間の違いが存在することが明らかとなり、実験者の手技・手法による影響も試験結果に少なからず寄与していることが考えられた。THP-1 細胞は浮遊状態で培養するが、その継代方法についてはプロトコールで規定されていないため施設によって異なる方法、すなわち“遠心分離による方法”と“希釈による方法”の 2 種類の手法で実施されていることが判明した。そして、希釈による方法は遠心による方法に比較して細胞の老廃物や代謝物を多く含む細胞培養液を継代時に多く持ち込むことになり、その結果希釈による方法を繰り返すことで培養液中に老廃物等が蓄積し、長期間培養した場合に細胞の性情に影響を与える可能性が考えられた。そこで、継代方法の違いが h-CLAT の結果に与える影響について検討を行った。

C-8-2 方法

共同研究に参加している施設の中から、5 施設が本検討に参加した。

各施設では、細胞を播種して約一週間培養した後、“遠心分離による方法”及び“希釈による方法”の 2 つのラインに分割して継代を行った。“遠心分離による方法”では、細胞培養液及び細胞を培養フラスコより全量回収し、遠心分離により細胞を回収し適切な濃度になるように培養液で希釈し継代した。“希釈による方法”では、細胞培養液及び細胞を培養フラスコより一部回収し、適切な濃度になるように培地で希釈し継代した。

その後、2 つのラインでそれぞれ 8 週間目まで継代し、その間に培養前期の細胞として 3 および 4 週目の細胞について、また培養後期の細胞として 8 週目の細胞について、陽性物質の DNCB (4 μ g/ml)、及び媒体の DMSO を用いて CD86/CD54 の発現量を比較した。

C-8-3 結果と考察

3 週目および 4 週目の細胞に DNCB を暴露させた場合の CD86/CD54 の RFI 値に対して、8 週目の細胞に DNCB を暴露させた場合の CD86/CD54 の RFI 値の増減を、各施設における変化率 (%) として算出した。その結果、施設によってその変化の傾向が異なっていた。すなわち、施設 C、D および E では 3 週目または 4 週目から 8 週目への変化率が、CD86 および CD54 のいずれにおいても減少していた。一方、施設 A では 3 週目または 4 週

目から 8 週目への変化率が、CD86 においてはいずれも減少していたのに対して、CD54 においては増加していた。また、施設 B では 3 週目または 4 週目から 8 週目への変化率は CD86 および CD54 のいずれにおいても増加していた。

さらに、DNCB に対する反応性を遠心分離による方法と希釈による方法で比較した結果、CD86 および CD54 の発現量に大きな差が認められた。すなわち、施設 B では 3 週目と 4 週目の CD54 発現量が、施設 C では 3 週目の CD86 発現量が、施設 D では 4 週目の CD86 発現量が、施設 E では 3 週目と 4 週目の CD86 発現量が、2 つの継代方法で異なる傾向を示した。また、継代方法が異なることで RFI 値の増加あるいは減少率が大きく違う場合と、RFI 値の変化率の正負が逆となる場合もあった。

このように、DNCB に対する細胞の反応性が様々な様相を示す原因がどこにあるのかを調べるため、CD86 および CD54 の発現量に大きな差が認められた施設 B、C、D および E において、CD86 または CD54 の発現状況を DMSO および DNCB の MFI 値で比較した。その結果、上述の変化率が異なった原因として、施設 B では遠心分離による方法で継代した細胞に DMSO を暴露させたときの CD54 の MFI 値が低下したことに起因していることがわかった。また、施設 C では、4 週目及び 8 週目における DMSO の CD86 の MFI 値が希釈による方法で継代した細胞において高い傾向が認められた。施設 D では、8 週目において希釈による方法で継代した細胞における DMSO の CD86 の MFI 値が顕著に増加しており、結果として RFI 値が減少していたことがわかった。施設 E では、8 週目において希釈による方法で継代した細胞における DNCB の CD86 の MFI 値が顕著に減少していた。これらのことより、長期培養を行うことで THP-1 細胞の反応性が低下する可能性が見出された。

以上より、長期間の継代培養を行うことで THP-1 細胞の DNCB に対する反応性や CD86 および CD54 の定常発現量に違いが出る可能性が考えられた。一方、遠心分離による方法あるいは希釈による方法の違いが試験結果に影響している可能性も考えられたが、今回の検討では施設間の再現性が得られなかったため明確に結論づけることはできなかった。しかしながら、施設内で継代方法を統一することで試験結果のバラつきを最小限に抑え

ることは可能であり、細胞培養時に CD54 および CD86 の定常発現量を常にモニターすることで h-CLAT の高い精度や再現性を得ることができると考えられた。

C-9 フローサイトメーターの精度管理に関する検討

C-9-1 イントロダクション

h-CLAT では、THP-1 細胞表面に発現する CD86/CD54 の発現量を測定するのに、フローサイトメーターを使用する。そのため、フローサイトメーターは本試験法には欠かせない重要な精密機器であるが、機種の違い、設定、施設の環境、メンテナンスの状況、測定日などにより、個々の施設で機器の精度が異なることが予想された。そのため、本試験法の信頼性を保証するためにも、フローサイトメーターの精度管理方法の確立は必要であると考えた。そこで、フローサイトメーターの精度管理法を確立することを目的に 3 施設で検討を行った。

C-9-2 方法

検討には、フローサイトメーターによる抗原定量分析システムである、Dako 社製 QIFIKIT® を使用した。QIFIKIT® とは、陰性と陽性 2 種類のピークを検出するためのセットアップビーズと、細胞表面マーカーの発現数を定数化することを従来の使用目的とし、5 段階の蛍光強度の異なるビーズにより検量線を作成し発現数を算出するキャリブレーションビーズの二つのビーズセットからなる製品である。本検討は、本キットの本来の目的である定量化を目的としないが、これらセットアップビーズと、キャリブレーションビーズを用いて、各施設の陰性・陽性ピークのずれの確認や、各施設の値のずれを調整可能かどうか検証することとした。共同研究に参加している施設の中から、3 施設が本検討に参加した。

各施設のフローサイトメーターは同メーカー、同機種であったが、購入年度に違いがある施設もあった。(施設 2) QIFIKIT® は、各施設で同ロット品を購入し使用した。

具体的には以下のように研究を行った。

1) h-CLAT 設定条件の施設間の差を確認するため、各施設でセットアップビーズおよびキャリブレーションビーズにより、陰性・陽性のピークの値を測定した。2) ピークの値を統一するために、セットアップビーズを使い陰性ピークを統一した条件で、セットア

ップビーズおよびキャリブレーションビーズにより施設間の感度差の確認をした。3) セットアップビーズの陰性ピークを統一した条件で、DNCB 処理の THP-1 細胞で 3 施設の値を比較した。DNCB の最大濃度を 7.2 μg/mL とし、公比 1.2、8 濃度とポジティブコントロールの濃度である 4 μg/mL で試験を実施した。

C-9-3 結果と考察

1) 各施設の h-CLAT の設定条件で、セットアップビーズの蛍光量を測定し、現状の施設間差を確認した。陰性ピークと陽性ピークの比率は、施設 1 と施設 3 はほぼ同様の値であったが、施設 2 は若干低かった。これは、施設 2 のみ他の 2 施設より機器の購入時期が 9 年早いため、機器の使用年月が長いほど強い蛍光に対する感度に影響を及ぼしている可能性があると考えられた。ただし、セットアップビーズにより測定した陽性ピークは、通常 h-CLAT で検出する領域よりもかなり高い蛍光領域を測定している。そのため、本試験法の感度調整を行うには、キャリブレーションビーズにより弱い蛍光のピークで比較する方が適当であると考えた。そこで、キャリブレーションビーズで検出された 5 つの陽性ピークのうち蛍光の低い 2 つのピークと、セットアップビーズで測定した陰性ピークとの比率を算出し各施設の値を比較した。施設 3 のみピーク 2 と陰性ピークの比率が若干低かったが、3 施設ともほぼ同じ値であった。これより、3 施設の感度はほぼ同様であることが示唆された。

2) 次に、3 施設の陰性ピークを同一設定に揃えることで、陽性ピークの MFI 値を揃えることが可能かどうか検証した。h-CLAT の設定条件で、施設 2 と施設 3 の陰性ピークの MFI 値はほぼ同じであったため、施設 1 でこの値に揃うように設定をし、陽性ピークのデータを比較した(表 8)。陰性ピークを揃えても、陽性ピークの値はほぼ変化せず 3 施設の値に大きな差は認められなかった。

3) 施設 1 の陰性ピークの条件を統一後(1.78)、DNCB に対する CD86/54 の発現量(RFI 値)を 3 施設で測定した。施設 1 では、CD86 の方が全体的に発現が強い傾向が認められたが、施設 2 では CD54 の方が発現が強い傾向であった。施設 3 は、他の 2 施設に比べ、全体的に発現が弱く、CD86/CD54 ともに発現量は同等であった。全ての施設で CD86/CD54 ともに陽性となったが、RFI 値は