

有機溶媒抽出物を用いたマウス Local Lymph Node Assay法の検討

高岡 裕¹, 藤田恵子¹, 関 剛幸¹, 田面喜之², 青木聡子¹, 森村智美¹

Study of a murine local lymph node assay for organic solvent extracts

Yutaka TAKAOKA¹, Keiko FUJITA¹, Takayuki SEKI¹, Yoshiyuki TAZURA², Satoko AOKI¹, Tomomi MORIMURA¹

緒言

マウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA) は、モルモットを用いる皮膚感作性試験の代替法である。LLNA の被験物質として、正確な結果が得られないことがある金属化合物、直ちに皮膚に吸収されない高分子化合物、偽陽性を呈する可能性がある強刺激性物質、耳介への適用が十分にできない物質、利用できるデータの限られている混合物などは適さないとされている¹⁾。しかし、動物福祉、定量性、試験期間短縮によるコスト削減などの理由から、上記のような LLNA に適さないとされている物質についても LLNA の利用が進みつつある。LLNA に適しないとされている被験物質のうち、高分子化合物または複数素材からなる医療機器は、LLNA を実施するために抽出操作を必要とすることが多い。

OECD Test Guideline 429²⁾ (OECD 429) では、LLNA で用いる被験物質の抽出方法は特に定められていない。今回の検討では、モルモットを用いる皮膚感作性試験で行われている抽出方法を参考にした。すなわち、ISO10993-12³⁾ に従った生理食塩水と植物油の二媒体で抽出する方法と、「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」⁴⁾ (医療機器審査 No.36) に従った有機溶媒で抽出する方法から選択することにした。このうち、高分子化合物を含む医療機器では、

ISO10993-12 に従った方法で抽出物が感作性を示さないほど微量である可能性がある⁴⁾。そのため、より多くの物質を抽出でき、より高濃度の検体で LLNA が実施できる可能性の高い抽出法として、医療機器審査 No.36 に従い、抽出溶媒を留去して得た抽出物を、投与溶媒に溶解または分散させる第 1 法を選択した。今回、被験物質としては、抽出物に感作性物質を含む複数物質が抽出される可能性があるポリ塩化ビニル製チューブと、高分子化合物の合成原料で感作性物質であるイソシアネートが残留している可能性があるポリウレタン製チューブを用いた。

上記の被験物質について抽出物を作製し、投与溶媒に溶解させて投与検体を調製した。これらの検体を用いて LLNA を実施することにより、混合物や高分子化合物の抽出物を用いた感作性の評価が可能であるか否かを検討した。

方法

1. LLNAにおける投与検体の調製

市販のポリ塩化ビニル製チューブ (PVC) およびポリウレタン製チューブ (PU) の抽出溶媒としてメタノール、アセトン、2-プロパノール/シクロヘキサン混液 (1:1) (混液) およびヘキサン (媒体はいずれも試薬特級、和光純薬工業、大阪) の 4 種類を用いた。

抽出は、以下の手順で行った。被験物質質量の 10 倍相当量の溶媒を加え、25℃で 24 時間振とう抽出した。抽出後、27℃で減圧濃縮してすべての溶媒を留去した。留去後 12 時間以上デシケー

1 毒性学第 2 研究室

2 基準毒性試験室

ター（シリカゲル入り）中で乾燥し、抽出物質量を秤量した。また、抽出物質量を被験物質質量で除して抽出率を算出した。

抽出物質量、抽出率、性状を表1に示す。両被験物質とも抽出率が最も高かった溶媒は、アセトンであった。PVCの抽出物の性状は、アセトンで強い粘性をもつ液体、メタノール、混液およびヘキサン抽出で液体であった。PUの抽出物の性状はいずれも固体であった。投与に用いる抽出物としてPVCでは抽出率が最も高いアセトン抽出物（PVC/A）と抽出原体で投与可能な性状の混液抽出物（PVC/C）を、PUでは最も抽出率が高いアセトン抽出物（PU/A）を選択した。

PVC/A および PU/A を投与溶媒に溶かして投与検体を調製した。投与溶媒には OECD 429 で推奨されているアセトン/オリブ油（4:1）液（AOO）を用いた。各抽出物の投与検体の最高濃度は、PVC/C は抽出原体で投与可能なため 100 w/v% で、PVC/A および PU/A は抽出物の性状からそのまま投与できないため投与可能な最高濃度である 50 w/v% とした。また、抽出物毎に最高濃度以下公比約 3 で除して 3 濃度を設定（PVC/C は 100, 30 および 10 w/v%, PVC/A ならびに

PU/A は 50, 15 および 5 w/v%）した。溶媒対照群には投与溶媒である AOO を、陽性対照群には 0.1 w/v% 2,4-ジニトロクロロベンゼン（DNCB）を用いた。

2. 動物

動物は OECD 429 に定められている CBA/J 系雌マウス（CBA/JNCrlj, 日本チャールス・リバー, 厚木）を 8 週齢で購入し、9 週齢から試験に用いた。使用動物数は 55 匹、群構成は PVC/C 投与群が 3 群（100, 30 および 10 w/v%）、PVC/A 投与群が 3 群（50, 15 および 5 w/v%）、PU/A 投与群が 3 群（50, 15 および 5 w/v%）、溶媒対照群および陽性対照群の計 11 群（各群 5 匹）とした。なお、すべての動物実験は、(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所の動物実験に関する指針に準じて実施（動物実験承認番号：1090247A）された。

3. LLNA試験

検体投与初日を処置第 1 日として、処置第 1 ～ 3 日の間、1 日 1 回ピペットを用いて両耳介に投与検体を塗布投与（片耳あたり 25 μL）した。処置第 6 日に ³H-methyl thymidine（パーキンエルマー・ジャパン, 横浜）液を尾静脈内投与（20 μCi/250 μL/ 匹）した。投与 5 時間後に両耳介リ

表 1 被験物質の抽出結果
塩化ビニル製チューブ

| 抽出溶媒 | 被験物質採取質量 (g) | 抽出物質量 (g) | 抽出率 (%) ^a | 抽出物の性状 |
|-----------------|--------------|-----------|----------------------|---------|
| メタノール | 2.181 | 0.414 | 18.9 | 液体 |
| アセトン | 2.175 | 0.829 | 38.1 | 強い粘性の液体 |
| 混液 ^b | 2.194 | 0.785 | 35.7 | 液体 |
| ヘキサン | 2.115 | 0.742 | 35.0 | 液体 |

ポリウレタン製チューブ

| 抽出溶媒 | 被験物質採取質量 (g) | 抽出物質量 (g) | 抽出率 (%) ^a | 抽出物の性状 |
|-----------------|--------------|-----------|----------------------|--------|
| メタノール | 1.915 | 0.011 | 0.5 | 固体 |
| アセトン | 2.060 | 0.030 | 1.4 | 固体 |
| 混液 ^b | 2.141 | 0.010 | 0.4 | 固体 |
| ヘキサン | 2.063 | 0.002 | 0.0 | 固体 |

a. 抽出率 = $\frac{\text{抽出物質量 (g)}}{\text{被験物質採取質量 (g)}} \times 100$

b. 2-プロパノール/シクロヘキサン混液（1:1）

ンパ節を抽出し、リン酸緩衝塩類溶液（三菱化学メディエンス，東京）2 mLで細胞浮遊液を調製した。調製した測定試料の放射活性を、液体シンチレーションカウンター（Tri-Carb 2910TR，パーキンエルマージャパン，横浜）にて測定した。測定した放射活性は、Dunnett法による多重比較検定（有意水準5%）を行った。

感作性の指標として、群毎の放射活性の平均値を溶媒対照群の放射活性の平均値で除してStimulation Index (SI)を求めた。SIが3以上の場合を陽性とした。また、個体毎の反応から陽性を示した動物の割合（陽性率）を求めた。感作性の有無の判断は、OECD 429を参考に、放射活性の統計解析結果、SIおよび陽性率のデータを総合的に評価して行った。

結果

SI、陽性率および統計解析結果を表2に示す。100 w/v% PVC/CではSIが3を上回り、陽性率は40%であった。また、SIは3を下回ったが、30 w/v% PVC/Cおよび50 w/v% PVC/Aで陽性率は40%、10 w/v% PVC/C、5 w/v% PVC/Aおよび15 w/v% PU/Aで陽性率はそれぞれ20%を

示した。また、放射活性を統計解析したところ、溶媒対照群と比較して100 w/v% PVC/C、50 w/v% PVC/A、50 w/v% PU/Aおよび15 w/v% PU/Aで有意差が認められた。

考察

PVCについては、PVC/CのSIが3を上回り、かつ用量相関関係も認められたため感作性を有すると判定し、この抽出条件で感作性を評価できると判断した。なお、PVC/AはSIが3を下回ったが、放射活性の統計解析で有意差が認められること、最高濃度（50 w/v% PVC/A）のSIが2.69と3に近く、陽性率は40%であることから感作性を有する可能性があるとして判断した。一方、PUについては、50 w/v% PU/AのSIが2を下回る値であることおよび陽性率が0%であったことから、感作性を有しないと判断した。しかし、PUについては50および15 w/v% PU/Aの放射活性で有意差が認められたこと、および15 w/v% PU/Aで陽性率が20%あることから偽陰性を疑い、今回の実験と同様の方法で作製したPU/Aを用いGuinea Pig Maximization Test (GPMT, 感作濃度10 w/v%, 惹起濃度10, 1および0.1 w/v%)

表2 LLNAの結果

| 群 | 動物数 | 放射活性 ^a | SI | 陽性率 (%) |
|----------------------|----------|-------------------|-------|---------|
| 溶媒対照 (AOO) | 5 | 174 ± 77 | - | 0 |
| PVC/C | 10 w/v% | 299 ± 135 | 1.72 | 20 |
| | 30 w/v% | 367 ± 175 | 2.11 | 40 |
| | 100 w/v% | 644 ± 301* | 3.70 | 40 |
| PVC/A | 5 w/v% | 364 ± 195 | 2.09 | 20 |
| | 15 w/v% | 278 ± 43 | 1.60 | 0 |
| | 50 w/v% | 468 ± 119* | 2.69 | 40 |
| PU/A | 5 w/v% | 283 ± 94 | 1.63 | 0 |
| | 15 w/v% | 411 ± 114* | 2.36 | 20 |
| | 50 w/v% | 340 ± 106* | 1.95 | 0 |
| 陽性対照 (0.1 w/v% DNCB) | 5 | 2224 ± 974 | 13.23 | 100 |

a, 平均±標準偏差

*, 対照群と比較して有意差 (5%) を示す。

AOO, アセトン/オリブ油 (4:1) 液

PVC/C, ポリ塩化ビニル製チューブの2-プロパノール/シクロヘキサン混液 (1:1) 抽出物

PVC/A, ポリ塩化ビニル製チューブのアセトン抽出物

PU/A, ポリウレタン製チューブのアセトン抽出物

DNCB, 2,4-ジニトロクロロベンゼン

を追加実施した。

その結果、惹起濃度 10 および 1 w/v % で感作性を示すことが確認された。よって、PU は LLNA で感作性陰性、GPMT で感作性陽性となり、結果が異なった。この相違は GPMT の結果が陽性であることおよび LLNA の放射活性に有意差がみられていることから、LLNA における PU/A の結果が偽陰性であることに起因したと考えられた。以上の結果、PU は感作性を有する可能性があると考えられた。なお、PU/A の LLNA 結果は、感作に十分な量の感作性物質が得られなかったことが偽陰性を引き起こした原因の一つだと考えられた。これは、投与に供する抽出物の性状が抽出原体（100 w/v%）の投与に適さなかったため、投与可能な濃度まで最高濃度を下げたことが関係しているかもしれない。

今回の実験は、有機溶媒による抽出操作が被験物質における LLNA 実施の可能性を示したと考えられる。しかし、LLNA と GPMT で結果が異なることもあるため、LLNA で陰性と判断された場合においても統計解析結果や陽性反応率を考慮し、感作性が示唆される場合は GPMT を実施するなど、偽陰性を除く工夫が必要であろう。ま

た、モルモットを用いる感作性試験では抽出率の最も高い抽出溶媒が選択される。しかし、LLNA においては、抽出物原体を投与する場合も想定して十分な暴露量を得られる抽出溶媒を選択する必要があるため、抽出率に加えて抽出物の性状も考慮に入れる必要があると考える。

文献

- 1) Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. ICCVAM. 2009
- 2) OECD : Guideline for the Testing of Chemicals, Guideline 429 : Skin Sensitisation : Local Lymph Node Assay, Organisation for Economic Cooperation and Development, 2002
- 3) ISO 10993-12 Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials, 2007.
- 4) 厚生労働省医薬局審査管理課:「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」, 2003