

モルモットを用いる感作性試験変法の検討

高岡 裕, 磯江孝治, 松岡千明

Modified methods of guinea pig sensitization testing

Yutaka TAKAOKA, Kohji ISOE, Chiaki MATSUOKA

緒言

遅延型アレルギーを調べる *in vivo* 皮膚感作性試験には Murine Local Lymph Node Assay, Guinea Pig Maximization Test (GPMT), Adjuvant and Patch Test (A&P), Buehler Test などがあり, OECD テストガイドラインや ISO 基準, 薬食機発 0301 第 20 号に記載されている。

これらの公的試験法は, 一般的な化学物質溶液や医療機器からの抽出液を用いて評価することを前提とした試験方法であるため, 物性や使用方法が特殊な化学物質や医療機器の評価には不適切な場合がある。

例えば, 臨床使用濃度において刺激性のある物質の場合, 感作性試験の惹起濃度の設定が刺激性を示す濃度以上になり, 刺激性による皮膚反応が感作性評価に影響を及ぼすことが想定される。また, 臨床使用部位が腹腔内等に限定された医療機器の場合, 曝露経路が公的試験法の適用部位と異なることから, 感作性試験結果をそのまま実臨床の安全性評価に用いることが適切か判断に迷うことがある。

今回, 刺激性物質については A&P, 曝露部位が公的試験法の適用部位と異なる医療機器については GPMT の試験方法を一部変更することにより感作性の評価が可能となるか検討した。なお, 皮膚反応は薬食機発 0301 第 20 号に掲載されている判定基準(表 1)で評価した。

1. 刺激性物質の評価

過酸化水素を含む歯のホワイトニング剤などには, 実使用濃度で刺激性を有するものがある。過酸化水素以外にも種々の化学物質を含む最終製品の感作性を評価するために通常の感作性試験を実施すると, 検体(実使用濃度以上)を適用した部位に皮膚の紅斑が認められることになる。この場合, 刺激性以外に感作性による反応も含まれているか判断できず, 感作性の評価が困難となる。しかし, 適用濃度を下げてしまえば, 実際の使用濃度未満となり, 安全性を適切に評価することにはならない。

刺激性物質では陰性対照群でも皮膚反応が認められること, 皮膚反応の程度には個体差があること, 陰性対照群の動物数が少ないことなどから, 陰性対照群と被験物質適用群の反応を平均評価点と比較して同等と評価しきれない場合も考えられる。

臨床適用濃度が確定しており, 濃度を下げるこ

表 1 皮膚(皮内)反応の評点付けシステム (ISO 10993-10, 6 Irritation tests)

反応	評点
紅斑および痂皮の形成	
紅斑なし	0
非常に軽度な紅斑(かろうじて認識できる)	1
はっきりした紅斑	2
中程度ないし高度紅斑	3
高度紅斑からわずかな痂皮の形成(深部損傷まで)	4
	(最高点 4 点)
浮腫の形成	
浮腫なし	0
非常に軽度な浮腫(かろうじて認識できる)	1
軽度な浮腫(はっきりとした膨隆による明確な縁が識別できる)	2
中程度浮腫(約 1 mm の膨隆)	3
高度浮腫(1 mm 以上の膨隆と暴露範囲を超えた広がり)	4
	(最高点 4 点)
	(紅斑痂皮及び浮腫の合計点数の最高点 8 点)

とが望ましくない場合、惹起時の曝露時間を短くすることで刺激性の発現を抑え、感作性のみを検出する可能性を検証した。

なお、この検証は刺激性物質の評価であることから、皮内投与を必要とするGPMTを避け、かつ免疫増強剤(FCA)を用いることで感度を高めているA&Pを基に実施した。

また、A&Pの試験条件を変更するにあたっては、事前に刺激性物質の皮膚反応と曝露時間の関係を検討し、刺激性の発現しない最大時間(15分)を確認した。また陽性対照物質として汎用されている1-Chloro-2,4-dinitrobenzene(富士フィルム和光純薬、大阪、以下DNCB)を用い、惹起時間15分で陽性の皮膚反応が認められることを確認した。

1.1 材料および方法

30%過酸化水素(試薬特級、富士フィルム和光純薬、大阪)を用いて惹起時の曝露時間を15分に変更したA&Pを実施した。すなわち、モルモットの肩甲骨上部皮膚の約2×4 cmの4隅にFCAを皮内投与し、その部位に24時間30%過酸化水素を閉塞貼付し、これを3日間連続で実施した。初

回投与開始後1週間目に皮内投与部位を含む2×4 cmの領域に10%ラウリル硫酸ナトリウム(媒体：白色ワセリン)を塗布し、その24時間後に30%過酸化水素を48時間閉塞貼付した。初回投与開始後3週目に30%過酸化水素をモルモットの側腹部に15分間閉塞貼付し、貼付物を除去後24、48および72時間に貼付部の皮膚反応を観察した。陰性対照として注射用水、陽性対照として0.1%DNCBを用いた。なお、DNCBは感作ではゴマ油、惹起ではアセトンに溶解した。実験は3群構成とし、動物数は陰性対照群3例、試験群3例、陽性対照群1例とした。

1.2 結果および考察(表2)

陰性対照群全例で、30%過酸化水素惹起部に皮膚反応は認められなかった。試験群の30%過酸化水素惹起部では評点1の紅斑が全例に、評点1の浮腫が1例に認められた。陽性対照群のDNCB惹起部では評点2の紅斑、評点1の浮腫が認められた。

陰性対照群の30%過酸化水素惹起部では全例で皮膚反応は認められず、試験群の30%過酸化

表2 A&P変法の結果表

群	判定時間 (貼付物除去後)	動物番号	惹起部位							
			30%過酸化水素		注射用水		0.1%DNCB		アセトン	
			紅斑	浮腫	紅斑	浮腫	紅斑	浮腫	紅斑	浮腫
陰性対照	24時間	1	0	0	0	0	-	-	-	-
		2	0	0	0	0	-	-	-	-
		3	0	0	0	0	-	-	-	-
	48時間	1	0	0	0	0	-	-	-	-
		2	0	0	0	0	-	-	-	-
		3	0	0	0	0	-	-	-	-
	72時間	1	0	0	0	0	-	-	-	-
		2	0	0	0	0	-	-	-	-
		3	0	0	0	0	-	-	-	-
試験	24時間	4	1	0	0	0	-	-	-	-
		5	1	0	0	0	-	-	-	-
		6	1	1	0	0	-	-	-	-
	48時間	4	1	0	0	0	-	-	-	-
		5	1	0	0	0	-	-	-	-
		6	1	1	0	0	-	-	-	-
	72時間	4	1	0	0	0	-	-	-	-
		5	1	0	0	0	-	-	-	-
		6	1	1	0	0	-	-	-	-
陽性対照	24時間	7	-	-	-	-	2	1	0	0
	48時間	7	-	-	-	-	2	1	0	0
	72時間	7	-	-	-	-	2	1	0	0

-、該当なし

水素惹起部では全例で皮膚反応が認められたことから、30%過酸化水素は感作性陽性であることが示された。また、この結果から曝露時間を調整することによって刺激性と感作性を分けることができる可能性が示唆された。また、陽性対照動物においては、弊所での通常のA&Pの0.1%DNCB惹起部に痂皮が認められる(紅斑の評点4)ことが多いことから、曝露時間の短縮により反応性は下がったと考えられた。

刺激性を示す30%過酸化水素を用いて惹起の曝露時間を15分に変更したA&Pにおいて、陰性対照動物に皮膚反応を示さず、試験動物にのみ皮膚反応を得ることができたことから、曝露時間の調整により、刺激性と感作性を分けることが可能であると考えられた。一方、短時間曝露による反応性の低下も発生することに留意する必要があると考えられた。

2. 腹腔内投与のGPMT

公的試験法としてガイドラインに記載されているGPMTは、皮内投与および経皮投与によって感作し、経皮の惹起反応により感作性を評価する試験法である。したがって、腹腔内限定で使用する医療機器を想定した場合、試験適用部位と臨床使用部位とが異なることから、感作性のリスクを適切に評価できない恐れがある。通常と異なる曝露部位における感作性の反応を検証するため、感作投与経路を腹腔内に変更したGPMTを実施し

た。抗原提示細胞は全身に分布しているため、曝露部位が異なる場合でも感作性の評価が可能であると考えた。

2.1 材料および方法

実験には感作性陽性物質であるDNCBを用いた。なお、腹腔内では腹水による濃度低下が考えられることから、通常感作性を示す濃度である0.1%に加え、0.5%DNCB投与群を設定した。DNCBは感作ではオリブ油、惹起ではエタノールに溶解した。

投与開始日にFCAを肩甲骨上部に0.2 mL皮内投与し、各濃度のDNCB 0.4 mLを腹腔内投与した。投与開始後1週目に各濃度のDNCB 0.4 mLを再び腹腔内投与し、投与開始後3週目に各濃度のDNCBを側腹部に24時間閉塞貼付し、貼付物除去後24および48時間に貼付部位の皮膚反応を観察した。なお、実験は2群構成とし、0.1%DNCB投与群3例、0.5%DNCB投与群3例とした。

2.2 結果および考察(表3)

0.1%DNCB投与群全例の0.1%DNCB惹起部位に皮膚反応は認められなかったが、0.5%DNCB投与群全例の0.5%DNCB惹起部位で評点2または3の紅斑、評点1の浮腫が認められた。

0.5%DNCB惹起部位に紅斑が認められたことから、腹腔内投与によっても感作が成立することが確認された。一方、通常の適用部位であれば感作性を示す0.1%DNCB惹起部位で皮膚反応が認められなかったことから、腹腔内投与感作におい

表3 GPMT変法の結果表

群	判定時間 (貼付物除去後)	動物番号	惹起部位					
			0.1%DNCB		0.5%DNCB		エタノール	
			紅斑	浮腫	紅斑	浮腫	紅斑	浮腫
0.1%DNCB 投与	24時間	1	0	0	-	-	0	0
		2	0	0	-	-	0	0
		3	0	0	-	-	0	0
	48時間	1	0	0	-	-	0	0
		2	0	0	-	-	0	0
		3	0	0	-	-	0	0
0.5%DNCB 投与	24時間	4	-	-	2	1	0	0
		5	-	-	2	1	0	0
		6	-	-	2	1	0	0
	48時間	4	-	-	2	1	0	0
		5	-	-	2	1	0	0
		6	-	-	3	1	0	0

- , 該当なし

では感作性が弱くなることが示された。

今回の実験から投与経路を変更しても感作性を検出できることが確認できた。すなわち、腹腔内にのみ接触する物質においては実臨床使用における感作性のリスクを評価できる可能性が示唆された。

結論

刺激性が強い物質については30%過酸化水素を用いた惹起の曝露時間を短縮したA&Pの変法において刺激性と感作性を分けて評価できた。また、曝

露部位がガイドラインの試験法と異なる物質については、感作投与経路を腹腔内投与に変更したGPMTの変法において感作性を評価できた。しかし、A&Pの変法およびGPMTの変法の両変法ともに通常の方法に比べて検出感度が低くなることから、新規物質のハザードの特定ではなく、臨床使用時のリスク評価として利用することが望ましいと考えられた。また、両変法は実施した物質数が少ないことから、さらなる検討が必要と考えられた。