

表 1. 合成した硫酸化 PU の元素分析と硫酸基の置換率

	元素組成[%](n=2)			
	C	H	N	S
Lot1	58.58	7.60	2.85	3.04
Lot2	63.35	8.23	3.34	1.45
Lot3	65.06	8.44	3.55	0.71

置換率	
$(S/32)/(N/14)$	
Lot1	0.46671793
Lot2	0.18993263
Lot3	0.08700635

## 第二章

### 組織細胞工学技術を用いる医療用具など の評価に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所 療品部長

中村晃忠

## I. はじめに

組織工学(Tissue Engineering)技術は医療に新しい展望を与えるものであり、この技術を応用して人の組織や器官の機能修復、維持、向上を目的とした製品開発が世界中で急速に進みつつある。日本も例外ではない。この技術の基にある科学は、細胞生物学、組織培養、器官形成、細胞分化、遺伝子工学、など多領域にわたり、利用する細胞・組織も自家(autologous)、同種(allogeneic)、異種(xenogeneic)だけでなく遺伝子組替え種(transgenic)の利用も考えられている。他方、これらの細胞・組織の採取、保存、維持管理、培養、製品化、臨床適用には独特の配慮がなされる必要があると思われる。その配慮には、倫理問題、感染症、プライバシー保護、なども含まれよう。このようなバックグラウンドを有する新しい技術が健全に遅滞なく発展するためには、それらを正当に評価する制度、体制、ガイドライン、支援技術などが適切に整備される必要がある。

本分担研究「組織細胞工学技術を用いた医療材料・用具の有効性、安全性、品質評価方法に関する研究」は、そのような整備についての提案を行おうとするものである。

## II. 研究方法

ア) 以下の3つのWGをつくり、当該課題についてまとめる。

WG1: ヒト組織の採取、管理、利用の原則とGTP (Good Tissue Practices) について

委員: 中村晃忠(リーダー)、蜂谷裕道、辻隆之、上田実、北村惣一郎、中島淳、増井徹、井上一知

WG2: 人工皮膚ガイドラインについて

委員: 黒柳能光(リーダー)、上田実、熊谷憲夫、土屋利江、配島由二、川原章、加藤賢三、増井徹、水沢博

WG3: 異種動物組織利用原則について

委員: 清水慶彦(リーダー)、岩田博夫、猪飼伊和夫、黒沢努、堀田知光、辻隆夫、上田重晴

イ) WG活動スケジュールは以下の通り

・平成10年10月から1回/月のペースでWG会議を開く。

・各WGは必要に応じて、他WGに意見を求める。

・平成11年3月と4月に全体会議を開き、まとめを行う。

・当班ホームページ <http://hayato.med.osaka-u.ac.jp/index/societies-j/tissue.html> にWG議事録を適宜掲載して情報の流通をはかる。

## III. 研究結果

C. 1 WG1はヒト組織細胞利用に関する規制枠組みとその原則についてまとめた。

### C. 1. 1 規制枠組み(案)

ヒト組織細胞を用いた医療技術に関する規制枠組み(案)を、[図1](#)に示した。

### C. 1. 2 ヒト組織細胞の利用に関する基本要件(案)

#### 1. 一般的要件

##### 1. 1 ヒト組織細胞利用の倫理

人の健康増進、疾病治療、生活(Quality of Life: QOL)の改善を目的としたもので、道徳的(倫理的)、社会的に許容されるものでなければならない。その妥当

性の判断は、倫理委員会などの開かれた委員会によってなされるべきである。

#### 1. 2 ヒト組織細胞の取扱い（廃棄を含む）

身体の部分、臓器、器官、組織、組織片、などは、そのレベルによって違いはあるにしても、敬意を払って取り扱われねばならない。

#### 1. 3 ヒト組織細胞の採取の同意（インフォームド・コンセント）

1. 3. 1 組織・細胞の採取にあたっては、被採取者または提供者の真の同意を得られるように、意図的でない適切な説明が行われた上で、同意書を得なければならない。説明において、同意を拒否または撤回する権利がある旨を明らかにせねばならない。

1. 3. 2 治療または診断の一環として採取した組織の利用に際しては、1) 医療行為が最優先されること、2) 組織の提供が医療行為へ影響を与えないこと（具体的には組織の研究・開発利用が採取の範囲を拡大することの無いこと）が重要である。このような条件の下で、患者から採取組織の処分、保存、利用に関する同意を得れば、医療・診断行為の終了後に、採取した組織の一部を、今後の医療の発展のために、研究、教育、医療製品開発などに利用することができる。

1. 3. 3 移植を目的として死体から組織を採取した場合、提供者又は遺族から採取組織の処分、保存、利用に関する同意を得るべきである。また、なんらかの理由でやむを得ず移植できない場合には、同意の下に採取した組織またはその一部を、今後

の医療の発展のために、研究、教育、医療製品開発などに利用することができる。

留意点：通常、身体廃棄物はここでいうヒト組織細胞に該当しないと考えられるが、どんなものが身体廃棄物とみなされるかは微妙である。

#### 1. 4 ヒト組織細胞の所有権

当該処置について与えられた同意（1. 3を参照）の本意を吟味することによって、採取された組織に関する権利請求の法的判断がなされるべきである。特に、医療への同意に限定すれば、治療の一環として採取された組織は放棄されたものとみなすべきであると考ええる。

備考：ナフィールド委員会報告では、所有権について次のような解決法を提言している。

ア) 治療の一環として組織採取を伴う処置に同意が得られた場合は、結果的に採取組織の権利を放棄したと認められる。

イ) 治療ではなく自発的な提供で採取された組織は贈り物とみなされる。同意を取った以外の目的に使用することについては、採取された人に権利が生ずる。この権利発生の有無は初めの同意の文言次第である。

ウ) 自発的に採取された組織で、それが提供者のために保管される場合（例、自己血輸血）、ドナーは、その保管の際の同意書に基づいて組織の所有権を主張できる。

エ) 明確な認識と同意がなく採取された場合、組織を採取された人の組織の利用に関するクレームは与えられた一般的同意の有効性に関わってくる。すなわち、採取と利用に合法性があるかどうか、といった点である。

#### 1. 5 プライバシーの保護

組織・細胞の提供者のプライバシー（遺伝情報も含む）は尊重され保護されねばならない。

#### 1. 6 ヒト組織細胞の無償提供

ヒト組織細胞の提供は原則として無償で行われるものとする。

#### 1. 7 ヒト組織細胞の採取・保存機関

ヒト組織細胞の採取および保存は非営利機関（医療機関を含む）によって行われねばならない。また、その第三者への譲渡には利益を目的とした対価を要求してはならない。

注1：このような機関は、なんらかの形で、認定、認証、あるいは届け出を要すると考える。

注2：“利益を目的とした対価を要求しない”とは、提供者から無料で得たものを売るべきではない、という考えから発する。しかし、当然のことながら、機関の維持費を含めた原価回収に必要な費用は請求できる。例えば、収集、処理、検査、保存、輸送、などにかかる諸費用である。

### 1. 8 ヒト組織細胞を利用した治療あるいは製品の有効性と安全性

#### 1. 8. 1 有効性

ヒト組織細胞を利用した治療あるいは製品は、人の健康増進、疾病治療、生活（QOE）の改善に必要なレベルの有効性を有さねばならない。

#### 1. 8. 2 リスク便益バランス

ヒト組織細胞を利用した治療あるいは製品によるリスクは、その利益に比べて受認できるものでなければならない。

#### 1. 8. 3 提供者へのトレーサビリティ

そこに使用した組織・細胞は、その提供者についての必要な記録が確認できるものでなければならない。

注：必要な記録とは、提供者個人を識別できるコード、同意書の内容、感染症チェック記録、などである。治療や製品の安全性保証や事後調査（モニタリング）のために、ある治療や製品に用いられたヒト組織や細胞の出所と品質に関わる記録をたどれるようにしておくことが必要である、という意味である。このことは、これらの情報の公開を意味するものではない。逆に、1. 5に記したように、プライバシー（個人情報）は守られねばならない。

#### 1. 8. 4 感染性物質からの危険性の排除

感染性物質からの危険性を回避するには、以下のような方策を適宜組み合わせて講ずるべきである：

ア) ドナーセレクション

イ) 組織採取の課程での汚染防止と適切な微生物クリアランス

ウ) 処理、製造過程での汚染防止と適切な微生物クリアランス

エ) 処理、製造の各段階での試験、検査などの実施

オ) 妥当性の確認された方法による不活化

カ) これらの記録の保存

#### 1. 8. 5 適用の妥当性

ヒト組織細胞を利用した治療あるいは製品の適用について、必要な場合は、適用基準を整備して適用すべきである。このような適用基準は専門的な団体によってつくられ、公表されねばならない。

#### 1. 8. 6 リスクの開示と適用に関する同意の取得

ヒト組織細胞を利用した治療および製品を適用する場合、適用される患者に対して考えられるリスクを開示して、同意を得るべきである。

#### 1. 8. 7 モニタリングと改善

ヒト組織細胞を利用した治療あるいは製品の有用性、安全性について、適切なモニタリング（ヴィジランス）体制を設立し、必要な改善をはかるべきである。

#### 1. 8. 8 レシピエントのトラッキング

ヒト組織細胞の利用した治療や製品を受けた患者（レシピエント）を把握する何らかの方策を準備すべきである。

#### 1. 9 ヒト組織細胞の品質システム

1. 9. 1 ヒト組織細胞の採取、幹旋、保存、培養、処理、加工、製造、頒布、輸送、ラベリング、などを行う機関は、その体制にふさわしい一貫性のある品質システム（例えば、ISO 9001）を構築すべきである。この品質システムは監査によって保証されねばならない。

留意点：品質システムとして ISO 10991 を取得することの妥当性について若干の議論があったが、研究班は、品質保証の信頼性を担保するためには、ISO 9001 取得は有用な手段であると考えている。ISO 9001 の硬直性および小規模な細胞バンクのようなものへの適用の困難性も指摘されたが、その点に関しては、以下の文書を拠り所として解決がはかれるものとする。

The Institute of Quality Assurance: Quality

Systems in the Small Firm - A guide to the use of the ISO 9000 series - Report of the ABCB/NACCB Small Firms Working Group - March 1995

（日本規格協会で購入可能）

1. 9. 2 このシステムは、当該技術に習熟した者の監督下に運営されねばならない。また、要員には適切な教育、訓練が定期的に施されねばならない。

#### 2. ヒト組織細胞由来医療用具に関する要件

2. 1 ヒト組織細胞由来の製品で医療用具に分類されるものは、「医療用具の基本要件に関する基準（案）」に適合せねばならない。

#### 3. ヒト組織の移植に関する要件

3. 1 自己組織以外のヒト組織の移植は、1. 一般的要件を満足する適切な自主基準に従って行われねばならない。なお、その自主基準は適切な専門家組織によって作られ公表されねばならない。

#### 4. 培養細胞の利用に関する要件

4. 1 培養細胞の利用に関する一般要件  
4. 1. 1 細胞の分離、培養に用いる試薬（例、トリプシン、血清、成長因子など）は、必要なレベルの純度があり感染性物質フリーでなければならない。

4. 1. 2 細胞は、クロスカルチャー・コンタミネーションのないように管理せねばならない。

4. 1. 3 細胞の分離、調製、培養、保存の一連の過程において、必要に応じて、細胞の生育能力 (viability)、活性 (potency)、

無菌性(sterility)、特性(identity)、同一性あるいは安定性(consistency)を試験し確認せねばならない。

4. 1. 4 組織の単離(tissue isolation)および細胞分離(cell separation)のプロセスは予備的操業によってヴァリデーションされねばならない。

4. 1. 5 細胞の分離、調製、培養、保存、管理は、3. 3. 1. 9に記述したような品質システムを有する体系(このようなものを細胞バンクと称する)を構築して実施せねばならない。また、このための標準手順書(SOP)を確立せねばならない。

注：通常は、マスターセルバンクと製造用のワーキングセルバンクを樹立する。

4. 2 自己の細胞を利用する場合の要件

(未完)

4. 3 他人の細胞を利用する場合の要件

(未完)

4. 3. 1 組織適合性(histocompatibility)の確認

(未完)

5. 人工材料とヒト培養細胞の併用に関する要件

5. 1 人工材料の安全性評価

人工材料の安全性評価は、「医療用具及び医用材料の基礎的な生物試験のガイドライン(薬機第99号：1995年6月27日)」に基づいて行う。

5. 2 人工材料と細胞との相互作用に関

する要件

5. 2. 1 人工材料が細胞の機能(function)、生育能力(viability)、活性(potency)、安定性(stability)に悪影響を与えてはならない。

5. 2. 2 人工材料との相互作用によって、細胞が形質転換(transformation)、変異(mutation)、脱分化することがあってはならない。

5. 2. 3 細胞との相互作用によって、人工材料の期待される性質が損なわれてはならない。

5. 2. 4 細胞との相互作用によって人工材料が分解する場合、その分解生成物が人体に悪影響を与えてはならない。

注：“悪影響を与えてはならない”とは、1. 8. 2に記述したリスク便益バランスを考慮して受認できないことを指す。

5. 3 細胞とホストを隔離する目的で人工材料を利用する場合の要件

人工材料を移植細胞とホストを隔離する目的で利用する場合は、例えば、(i)免疫隔離の程度、(ii)栄養および排泄物の拡散、(iii)移植細胞由来メディアータの膜透過キネティクスと薬理効果、(iv)ホスト由来のメディアータの細胞への毒性作用、など必要な評価を行わねばならない。

5. 4 細胞/人工材料複合体としての要件

細胞/人工材料複合体は、製造、貯蔵、輸送、臨床操作において、その目的にふさわしい機能、構造的健全性、無菌性を有さねばならない。

## 6. 培養細胞から抽出した物質の利用に関する要件

6. 1 培養細胞から抽出精製した物質を利用する場合は、「細胞培養技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について（昭和63年6月6日薬審1第10号）」に従うこと。

C. 2 WG2は、基本要件を踏まえて、人工皮膚に関する個別ガイドラインを検討した。現在は項目出しを終了した段階で、詳細は今後の検討に委ねることとした。

C. 3 WG3は異種動物由来細胞組織または臓器を利用した医療用具の安全性確保のガイドラインを検討し、以下の項目について報告書をまとめた。

1. ワーキンググループメンバー
2. 緒言
3. 異種細胞医療用具ガイドラインの必要性
4. 異種細胞医療用具の現行の分類と異種移植との安全性上の相違点
5. 異種細胞医療用具作成に用いるドナー動物
6. 異種細胞医療用具の加工製品化
7. 臨床的事項
8. 残された問題
9. 参考資料

特に、動物由来の”未知の”感染性病原性微生物やウイルスに関するリスクが議論の焦点になった。その点についてWG3報告書は以下のように記述している。

”上記の可能性を否定できないため、第一次ガイドライン案をまとめたものの、最も基本的な部分でさえ全委員の合意があるわけではない。委員から出された意見を列

挙すると、

1) 本医療用具に対しても、異種動物臓器の移植と同じガイドラインを適用すべきである。根拠：動物由来のレトロウイルスがヒト患者に感染する可能性を否定できない。

2) 本医療用具に対しては独自のガイドラインを作成すべきである。根拠1：レトロウイルスが通過できない半透膜を用いることが可能である。根拠2：動物のレトロウイルスがヒトに感染する可能性は極めて小さい。根拠3：免疫抑制されていない患者に適用されるため、レトロウイルス感染の可能性は異種臓器移植より小さい。

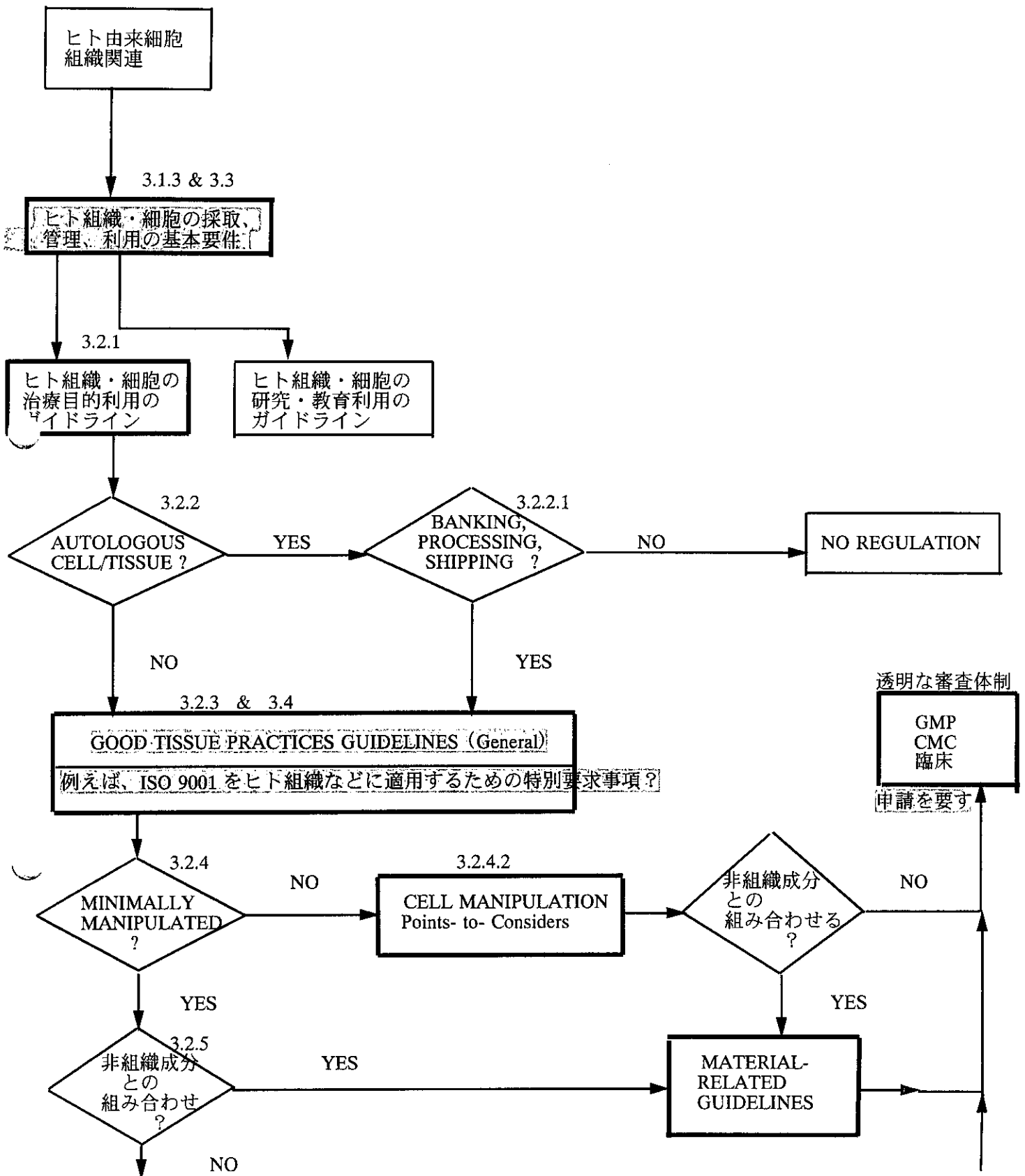
今後、移植学会異種移植WGと早川班から提出されるガイドラインとの整合性をとりつつ、本ガイドライン案の改良を進めていく必要がある。”

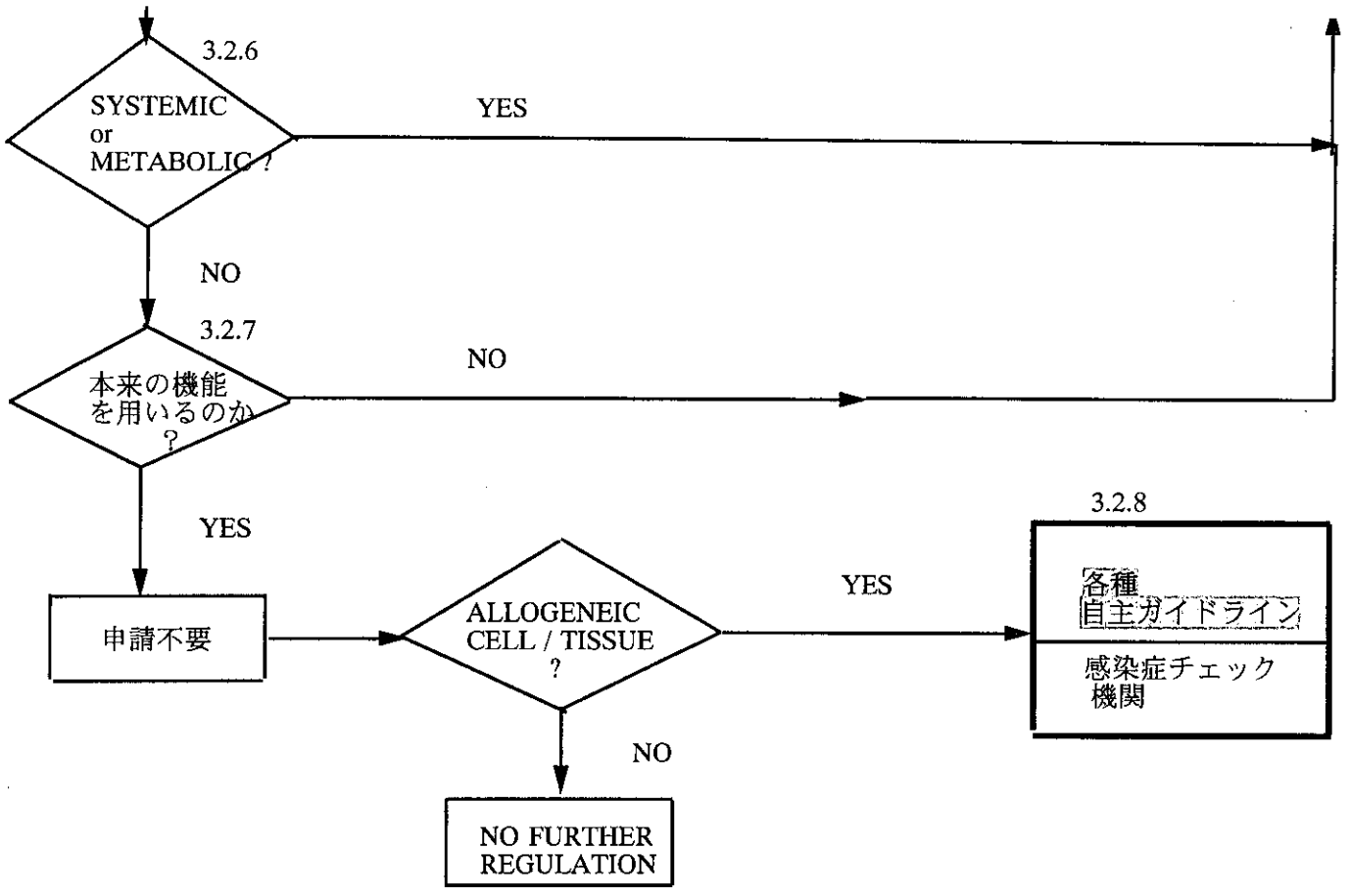
## IV. 考察

以上のように、この先端的分野の専門家および細胞バンク事業関係者、倫理問題に関心を持ち続けてきた専門家、感染症に関する専門家などによる熱心な討議の結果、一定の考えと枠組み（案）を提出することができた。詳細は、別途印刷物として提出するほか、本研究班ホームページに掲載して、世の批判を仰ぎたい。



ヒト細胞・組織を用いた医療技術に関する規制枠組み (案)





## 第三章

### 「天然医用材料の安全性評価に関する研究」

国立医薬品食品衛生研究所療品部

薮島 由二

## 1. はじめに

医用材料として種々の天然由来の材料が医療用具そのもの或いはその一部に利用されている。例えば、(1) コラーゲンやゼラチン（牛由来：止血剤、創傷被覆剤、人工血管副材料など）、(2) キチンおよびキトサン（蟹由来：止血剤、創傷被覆剤など）、(3) ペクチン（柑橘類由来：創傷被覆剤、人工肛門副材料など）、(4) アルギン酸類（海藻由来：創傷被覆剤など）、(5) ラテックスゴム（ゴム由来：手術用手袋、カテーテル、コンドーム、輸液セットなど）がある。これらは、それぞれ天然由来ゆえの利点と問題点を持っている。共通の問題点としては、(a) 原料に何らかの微生物汚染の可能性がある、(b) 抗原性や免疫系への影響がある、(c) 滅菌法が制限される、(d) 原料の品質保証が難しいことなどが挙げられる。また、その機構は明らかではないが、これらの材料を利用した医療用具の使用による、発熱や浸潤（ラテックス製品、コラーゲン或いはゼラチン被覆人工血管）、脳血腫（コラーゲン止血剤）、浸潤性脊髄圧迫（キチン止血剤）、アナフィラキシー（ラテックス製品）など種々の副作用が報告されている。

このような天然由来物質の医用材料への応用は、(1) コラーゲンなどの細胞外マトリックスが組織工学に積極的に利用されること、(2) 多糖類の積極的な免疫誘導性を利用しようとする戦略があること、(3) 生体内で分解するのことが多いことを理由に今後益々盛んになると思われる。

医療用具に用いる材料には生体適合性が必要である。生体適合性の良い医用材料を作る方法として、従来、主に3つの戦略があった。第1は、同種または異種動物の組織を利用しようとするものである。第2は、人工材料の物理的特性を維持したまま、特殊な材料設計に基づいて材料・組織界面の反応を制御しようとするものである。第3は、この両者を組み合わせることによって両者の欠点を相殺しようとする戦略（ハイブリッド化）である。最近、材料・組織界面反応の制御だけでなく、生化学の革命的な進展の成果を取り入れて積極的に治癒や代替を図ろうとする組織工学的アプローチも盛んになってきた。これは非常に望ましい方向であるが、そこには天然由来の材料が使われることになる。

天然由来材料の使用により起こる各種副作用の原因は未だほとんど解明されておらず、同材料或いは同材料から製造された医療用具の安全性を確保するため、早急にその実体を明らかにする必要がある。本研究では、天然医用材料の安全性確保は勿論、同材料を使用した各種製品、特に近年急速に進展してきた組織工学を利用した医療技術の発展に寄与することを目的とし、各種天然医用材料の生体影響、特に発熱を惹起する要因とメカニズムの解明を試みる。平成10年度の本研究では、第一のアプローチとして、ラテックス製医療用具により惹起される発熱と代表的な発熱性物質であるエンドトキシンとの相関性について、化学的・生物学的方法により詳細に検討した。

## 2. 材料および方法

### (1) 材料

4社のラテックス製手術用手袋中、平成9年度の調査により発熱が認められたB社の製品を発熱陽性手袋として使用した。発熱陰性対照試料としてはA社の製品を使用した。また、同調査により発熱性が認められたC社製のカテーテルは同社より分与された。

### (2) 試験液の調製

a) 生物試験用試料：試料をおよそ1 cm 四方または1 cm 間隔で無菌的に裁断し、1 gあたり10 mlの注射用蒸留水を用いて50℃で24時間抽出処理を行った後、メンブランフィルター濾過（孔径：0.45 mm）し、濾液を試験液として使用した。

b) 化学分析用試料：0.5 cm 四方に裁断したラテックス製手術用手袋（8セット：214.4 g）および0.5 cm 間隔で裁断したカテーテル（10セット：219.1 g）を分液ロートに入れ、80℃に加熱した注射用蒸留水を加えた後、室温にて16時間振とうした。抽出液を回収し、メンブランフィルター濾過（孔径：0.45 mm）し、透析後、透析内液をエバポレーターにより濃縮した。濃縮液中の不溶物を遠心分離により除去した後、遠心上清を凍結乾燥し、ラテックス手袋試料330 mg およびカテーテル試料31.0 mgを得た。

### (3) 化学分析

a) 脂肪酸分析<sup>1</sup>：ラテックス手袋試料（17.3 mg）およびカテーテル試料（5.5 mg）を4 M HCl中、100℃・4時間加水分解後、引き続き1 M NaOH中で100℃・2時間加水分解した。反応液を塩酸酸性とし、ジエチルエーテルにより遊離した脂肪酸を抽出し、有機層を窒素気流下に乾固した。残渣を再度、1 mlのジエチルエーテルに溶解し、ジアゾメタン処理（0℃・1分）した後、GC-MS分析に供した。対照には大腸菌O3:K2a2b:H3株由来エンドトキシンを使用した。

b) KDO（2-ケト-3-デオキシオクトン酸）分析<sup>2</sup>：ラテックス手袋試料（34.6 mg）およびカテーテル試料（9.2 mg）を1 M HCl/メタノール中、60℃・1時間処理後、窒素気流下に乾固させた。残渣をメタノールに溶解し、ジアゾメタン処理（0℃・1分）し、乾固後、ピリジン/無水酢酸（1:1）により80℃・30分間、アセチル化した。反応液を乾固後、再度、メタノール中でジアゾメタン処理し、GC-MS分析に供した。大腸菌O3:K2a2b:H3株由来エンドトキシンを対照として使用した。

c) GC-MS分析：装置はJEOL Automassを使用した。カラムはDB5MS（0.32 mm x 30 m, J & W Scientific）を使用し、1) KDO分析：140℃（3分）→3℃/分→250℃（15

分) および 2) 脂肪酸分析: 120 °C (3 分) → 3 °C/分 → 250 °C (15 分) の昇温条件で分析した。GC インジェクター温度、インターフェース温度、MS イオン源温度は、それぞれ 290 °C、250 °C、230 °C に設定した。イオン化電圧は -70eV、EI positive-ion モードで測定した。

#### (4) 発熱性物質試験

第 13 改正日本薬局方<sup>3</sup> の記載に従って以下のように行った。体重 1.5 kg から 2.7 kg の栄養状態のよい健康なウサギで、使用前一週間以上は一定飼料で飼育し、体重の減少を見なかったものを実験に使用した。試験動物は、試験前 1 ~ 3 日間、2 時間ごとに体温を 4 回測定した。1 試料あたり 3 匹のウサギを使用した。

試験液の注射前、体温を 1 時間間隔で 3 回測定し、第 2 回および第 3 回の測定体温がほとんど一致した時、第 3 回の値を対照体温とした。試験液は 37 °C に加温し、第 3 回の体温を測定した後、15 分間以内に耳静脈から注射した。注射試験液量は試験動物体重 1kg につき 10 ml とし、注射後の体温測定は注射後 1 時間間隔で 3 回行った。

注射後の体温上昇 0.6 °C 以上の試験動物が、2 匹または 3 匹のとき発熱性物質陽性と判定した。

#### (5) エンドトキシン、β-グルカンおよびペプチドグリカンの定量

エンドトキシンはエンドスペシー TM (生化学工業)、また、β-グルカンはファンギテック G テスト MKTM (生化学工業) を用いて定量した。ペプチドグリカンは、試料中の β-グルカンをグルカナーゼで消化した後、SLP 試薬 TM (和光純薬工業) を用いて定量した。エンドトキシンの定量に際しての対照には、大腸菌 (O55:B5) 由来の精製エンドトキシン (Sigma) を用いた。また、β-グルカンとペプチドグリカンについては、それぞれの定量キットに添付されている標品を対照物質とした。

#### (6) 炎症性サイトカイン産生誘導活性の測定<sup>4</sup>

細胞として、ヒトのマクロファージ様細胞株 Mono-Mac-6 からクローニングしたエンドトキシン高感度応答性の亜株 MM6-CA8 を用いた。この細胞を calcitriol (1,25-dihydroxy-vitamin D3; 10 ng/ml) で 72 時間刺激した後、 $1 \times 10^6$  cells / 0.9 ml / well となるように 24-well プレートに分注し、試料を 0.1 ml 添加して 17 時間培養した。その後、培養上清中の インターロイキン 1 (IL-1)、インターロイキン 6 (IL-6) および腫瘍壊死因子 (TNF) の濃度を市販の ELISA キット (R&D) を用いて測定した。

#### (7) 試料中のエンドトキシンの除去

市販のエンドトキシン除去カラム (デトキシゲル TM カラム、Pierce) を使用した。試

料 5 ml を同カラムに 5 回繰り返して通した後、注射用蒸留水 1 ml でカラムを洗浄し、この洗浄液を合わせてエンドトキシン除去試料とした。同カラムのエンドトキシン除去効果を確認するため、日本薬局方標準エンドトキシン (JPSE) 100 EU/ml (10.6 ng/ml) 溶液について上記の処理を行ったところ、処理後のエンドトキシン濃度は 0.004 EU/ml (0.0006 ng/ml) にまで減少した。

#### (8) エンドトキシンインヒビターを使用した阻害実験

a) 阻害剤：中和型エンドトキシンインヒビターである CAP-18<sup>5</sup> は平田博士（岩手医科大学細菌学教室）から分与された。競合型阻害剤である Suc-406 (2',3'-di-Suc-406) は常法<sup>6</sup>により化学合成した。非常に毒性が低く、その無作用量範囲においてエンドトキシン作用を競合的に阻害する Rhodobacter 属類縁合成リピド A<sup>7</sup> (B-464) は株式会社エーザイから分与を受けた。

b) リムルス活性<sup>8</sup>：日本薬局方標準エンドトキシン (JPSE, 100 EU/ml) およびラテックス製品抽出液を種々の濃度の CAP-18 と 2:1 (v/v) の割合で混合し、37℃で 30 分間インキュベート後、注射用蒸留水で 1000 倍希釈し、エンドスペシーを用いて測定した。

c) IL-6 産生誘導阻止活性：JPSE (1 EU/ml, 10 EU/ml) およびラテックス製品抽出液を種々の濃度の CAP-18 と混合し、37℃で 30 分間インキュベートした後、その混合液を MM5-CA8 細胞懸濁液に添加した。添加後、17 時間培養し、培養上清中に含まれる IL-6 量を ELISA キットにより測定した。競合型インヒビターを使用した IL-6 産生阻害実験は、同細胞の懸濁液 0.9 ml に各濃度に調製した阻害剤 (Suc-406, B-464) を 33 ml および試料 (JPSE 1 EU/ml および 10 EU/ml, ラテックス製品抽出液) 67 ml を添加し、37℃で 17 時間培養後、培養上清中に遊離された IL-6 量を ELISA により測定することにより行った。

### 3. 研究結果

#### (1) 3-ヒドロキシ脂肪酸および KDO の検出

本実験では、エンドトキシンに普遍的に存在する成分である KDO と 3-ヒドロキシ脂肪酸を、直接、化学分析により定性的に検出することを試みた。

対照として使用した大腸菌 O3:K2a2b:H3 エンドトキシンは生物活性を担うリピド A 部分に 4 分子の 3-ヒドロキシミリスチン酸 (3-OH C14:0) および各 1 分子ずつのミリスチン酸、ラウリン酸を含んでいる。このうち、3-ヒドロキシ脂肪酸である 3-OH C14:0 は GC-MS 分析において、メチルエステル誘導体として保持時間 21.5 分に検出された。図 1 にラテックス手袋試料およびカテーテル試料に関する脂肪酸分析の結果 (Total Ion Chromato, TIC) を示した。いずれの試料の分析においても保持時間 21.5 分付近に極めて小さいピークが検出された。これらのピークのマスペクトル (図 2) は、大腸菌エンド

トキシン由来の 3-OH C14:0 メチルエステルと非常に類似しており、3-ヒドロキシ脂肪酸メチルエステルに特異的なフラグメントイオン  $m/z$  103 (C1-C3 フラグメント) の他、 $m/z$  166、 $m/z$  208 などのフラグメントイオンが観測された。

大腸菌エンドトキシンのリピドAと多糖部分を連結している成分である KDO は、GC-MS 分析において、1-カルボキシメチル-4,5,7,8-テトラ-O-アセチル-2-メチルグリコシド誘導体として保持時間 26.5 分に検出された。カテーテル試料およびラテックス手袋試料の KDO 分析においても、ほぼ同様の保持時間に小さなピークが検出された (図 3)。図 4 に示すように、これらのピークのマススペクトルは、微量成分であるために検出感度が低いものの、大腸菌エンドトキシンから検出された KDO のアセチル・メチル誘導体のそれと非常に類似しており、C2-C8 フラグメントイオン (或いは M+H-AcOH フラグメントイオン) である  $m/z$  375 や同イオンから誘導される  $m/z$  213、 $m/z$  181 および  $m/z$  153 などの特徴的な各フラグメントイオンが観測された。

### (2) ラテックス製品抽出液のウサギに対する発熱性

過去の調査研究において発熱性物質試験陽性と判定された B 社のラテックス製手術用手袋抽出液と C 社のラテックス製カテーテル抽出液をウサギに投与し、惹起される発熱の強さと熱型を調べた。陰性対照として、発熱性物質試験陰性と判定された A 社のラテックス製手術用手袋抽出液を使用した。B 社製手術用手袋抽出液をウサギの体重 1 kg 当たり 10 ml (投与可能な最大量) 投与すると、投与後 2 時間をピークとする 1 峰性の発熱が惹起された (図 5-左)。A 社の手袋抽出液では有意な発熱は惹起されなかった。また C 社製カテーテル抽出液では、5 ml/kg の用量で投与後 1.5 時間および 3 時間をピークとする 2 峰性の発熱が惹起され、1 ml/kg の小用量投与では 1.5 時間をピークとする 1 峰性の発熱が惹起された (図 5-右)。これら B 社製手術用手袋抽出液および C 社製カテーテル抽出液によって惹起される発熱の熱型は、投与量によって 1 峰性または 2 峰性を示すエンドトキシン (大腸菌 O55:B5 株由来) による発熱の熱型 (図 6-A) と酷似していた。表 1 に、手袋およびカテーテル抽出液投与による最高体温上昇度 ( $\Delta T$  max) を示した。これらの体温上昇をもたらす抽出液中の発熱性物質量を図 6-B に示したエンドトキシンの用量-反応関係からエンドトキシン量に換算した場合、B 社の手袋抽出液および C 社のカテーテル抽出液中には、それぞれ 2.34 ng/ml および 72.7 ng/ml のエンドトキシンに相当する発熱性物質が含まれると算定された。

### (3) ラテックス製品抽出液中の細菌細胞壁成分の定量

各抽出液中のエンドトキシン濃度をリムルス試薬 (エンドスピー) を用いて測定した。その結果、A 社製の発熱陰性手術用手袋抽出液からは極微量のエンドトキシン (3 pg/ml) が検出されたのみであったが、B 社製手術用手袋抽出液および C 社製カテーテル抽出液からは、それ



ぞれ 3.20 ng/ml および 13.6 ng/ml のエンドトキシンが検出された (表 2)。大腸菌 O55:B5 精製エンドトキシンのウサギに対する最小発熱量は約 1 ng/kg であることから (図 6)、これら発熱陽性抽出液中のエンドトキシン濃度は、発熱を惹起するのに十分な濃度と考えられた。

グラム陰性細菌のエンドトキシン以外の細胞壁成分として、グラム陰性細菌および陽性細菌に共通する細胞壁成分であるペプチドグリカンと主に真菌の細胞壁成分である (1 → 3)-β-D-グルカン (β-グルカン) について検討した結果、各抽出液中におけるこれらの濃度はいずれも 1 ng/ml 未満であった (表 2)。

#### (4) ヒトマクロファージ様細胞株に対する炎症性サイトカイン産生誘導活性

生体内におけるエンドトキシンの主たる一次標的細胞はマクロファージであり、エンドトキシンによる発熱は、マクロファージが産生する IL-1、IL-6、あるいは TNF などの炎症性サイトカインがメディエーターとなって惹起されると考えられている。そこで、*in vitro* でエンドトキシンに応答して種々の炎症性サイトカインを定量的に産生するヒトマクロファージ様細胞株 MM6-CA8 に対するラテックス製品抽出物の炎症性サイトカイン産生誘導能を検討した。

表 3 に示したように、エンドトキシンは 5 pg/ml から 1,000 pg/ml の濃度範囲において MM6-CA8 細胞に対して IL-1、IL-6 および TNF の産生を濃度依存的に誘導した。ペプチドグリカンのサイトカイン産生誘導活性はエンドトキシンほど強力ではなく、100 ng/ml から比較的弱い産生誘導作用が認められた。また、β-グルカンにはサイトカイン産生誘導作用は認められなかった。発熱性の蛋白毒素である黄色ブドウ球菌発熱性外毒素 TSST-1 については、10 μg/ml という高濃度で弱いサイトカイン産生誘導活性が認められた。

発熱陽性の B 社製手袋抽出液を同細胞の培養液に 10% の割合で添加すると、各種のサイトカインの産生量が有意に増加し、また C 社製カテーテルの抽出液では更に多量のサイトカイン産生が誘導された (表 3)。一方、発熱陰性の A 社製手袋抽出液ではいずれのサイトカインの産生も誘導されなかった (表 3)。

#### (5) エンドトキシン除去処理によるサイトカイン産生誘導活性および発熱活性の消失

発熱陽性手袋抽出液およびカテーテル抽出液を市販のエンドトキシン吸着除去カラム (デトキシゲル TM カラム) 処理することにより、それぞれのサイトカイン産生誘導活性および発熱活性が減少するかどうか検討した。表 4 に、エンドトキシン溶液 (JPSE 1 EU/ml)、手袋抽出液、カテーテル抽出液それぞれについて、カラム処理の前後におけるエンドトキシン濃度をリムルス試薬 (エンドスペシー) によって測定した成績を示した。カラム処理後の各試料中のエンドトキシン濃度は、いずれも 1 pg/ml 程度であり、同カラ

ム処理により効率良くエンドトキシンが除去されていることが確認された。表5に、カラム処理前後における各試料のMM6-CA8細胞に対する炎症性サイトカイン誘導活性を示した。この成績から明らかなように、各試料のサイトカイン産生誘導活性はカラム処理により完全に消失した。更に、図7に示したように、C社製カテーテル抽出液について、その発熱活性がカラム処理により消失することが確認された。発熱活性の確認に大量のサンプル(10 ml/kg 投与)を必要とする手袋抽出液については、カラムで処理できる液量が限られているため、この検討を行わなかった。

#### (6) エンドトキシンインヒビターを使用したリムルス活性およびIL-6産生誘導活性阻害実験

エンドトキシン(JPSE)および発熱陽性のラテックス製品抽出物が示すリムルス活性およびMM6-CA8細胞からのIL-6産生誘導に対する各種阻害剤の効果を検討した。表6に示すように、エンドトキシン(100 EU/ml)のリムルス活性は1 µg/ml以上のCAP-18(中和型エンドトキシンインヒビター)により効率良く阻害された。発熱陽性のB社製手袋およびC社製カテーテル抽出液のリムルス活性は、1および10 µg/mlのCAP-18用量では影響を受けなかったが、100 µg/mlのCAP-18を添加することにより顕著に抑制された。

MM6-CA8細胞からのIL-6産生誘導活性阻害実験の結果を表7に示した。同細胞に対するエンドトキシン(JPSE 1 EU/ml)のIL-6産生誘導活性はCAP-18および競合型インヒビターであるSuc-406とB-464により効率的に抑制された。表には示していないが、10 EU/mlのエンドトキシンを使用した場合、CAP-18は100 µg/mlで、また、Suc-406とB-464は1 µg/mlの用量で十分な阻害活性を示した。発熱陽性のC社製カテーテル抽出液が示すIL-6産生誘導活性も、エンドトキシンの場合と同様に各種の阻害剤により顕著に抑制された(表7)。発熱陽性B社製手袋抽出液が示すIL-6産生誘導活性に対する各種インヒビターの効果は比較的弱く、MM6-CA8細胞からのIL-6産生は、10から100 µg/mlのインヒビターを使用した際に60から70%程度抑制された。

#### 4. 考察および結論

エンドトキシンはグラム陰性細菌細胞壁表層に局在するリポ多糖体である<sup>9</sup>。グラム陰性細菌は、水中(河川水および海水)、大気中、土壤中に広く分布している。それ故、天然由来医用材料は、原料自体がグラム陰性細菌により汚染されている可能性があると共に、その製造工程中での混入により、最終製品が同細菌により汚染されることも考えられる。細菌自体は各種の滅菌処理により殺滅或いは除去することが出来るが、菌体成分であるエンドトキシンは通例の滅菌条件では分解を受けず、また、その除去も困難である。これらの理由から、天然医用材料または同材料から製造された医療用具の使用によって惹起され

る発熱の要因を検討する場合、非常に高い発熱活性を持つエンドトキシンによる製品汚染を第一に考慮する必要がある。

ラテックス製手術用手袋に含まれるエンドトキシン量をリムルス試験により測定した研究や エンドトキシンの常成分である KDO をチオバルビツール酸比色反応により検出した論文が過去に報告されている<sup>10,11</sup>。しかし、リムルス試験は D-グルカン類やトリプシンなどエンドトキシン以外の物質<sup>12</sup>によっても陽性となる場合があると共に、チオバルビツール酸反応も KDO に特異的な反応ではない。また、エンドトキシンから調製したリピド A は、その構造を各種質量分析により直接知り得ることが可能であるが<sup>13</sup>、未処理のエンドトキシンを直接検出する方法は現在までに開発されていない。更に、エンドトキシンの構造は細菌の種類により異なると共に、同一の細菌から調製したエンドトキシン標品にも heterogeneity が存在するため<sup>14</sup>、種不明の微量のエンドトキシンの存在を化学的に直接証明することは不可能である。それ故、天然医用材料にエンドトキシンが存在することを証明するには、一つの試験を行うだけでは不十分であり、幾つかの間接的証拠の総合的評価から判断することが必要となる。

エンドトキシンは、生物活性を担う脂質部分（リピド A）と血清学的特異性を決定する多糖部分から構成されている<sup>9</sup>。KDO はエンドトキシンの多糖部分とリピド A 部分を結合する inner core 部分の常成分であり、幾つかの構造的な多様性が見られるものの、この成分を欠損しているエンドトキシンは現在までに発見されていない。また、3-OH C14:0 は大腸菌やサルモネラなどの腸内細菌属や Acinetobacter 属などのリピド A に含まれる脂肪酸である。KDO と同様に 3-ヒドロキシ脂肪酸もエンドトキシンの常成分であり、3-OH C14:0 の他、3-OH C10:0、3-OH C12:0、3-OH iC15:0、3-OH C16:0、3-OH iC17:0 ような 3-ヒドロキシ脂肪酸が様々なエンドトキシンから検出されている<sup>14</sup>。エンドトキシンの常成分であるこれらの KDO と 3-ヒドロキシ脂肪酸が、GC-MS 分析により、直接、発熱陽性のラテックス製品抽出物から定性的に検出されたことは、同サンプル中にエンドトキシンが存在していることを強く示唆している。

エンドトキシンをウサギに投与すると、投与量に応じて 1 峰性あるいは 2 峰性の発熱が惹起される<sup>15</sup>。ウサギでこのような 2 相性の発熱が惹起されるメカニズムは未だ十分解明されていないが、これはエンドトキシンの発熱作用の大きな特徴の一つと言える。発熱性物質試験陽性のラテックス製手術用手袋あるいは導尿カテーテルの抽出液をウサギに投与した際に惹起される発熱の熱型は、そのようなエンドトキシンによる発熱の熱型と酷似していた。このことから、これらの抽出液中に含まれる発熱性物質はエンドトキシンである可能性が示唆された。

リムルス試薬（エンドスペシー）を用いて抽出液中のエンドトキシン濃度を測定した結果、ラテックス製品抽出液中には ng/ml オーダーのエンドトキシンが検出され、発熱を惹起するのに十分な量のエンドトキシン汚染があることが判明した。エンドトキシン以外の

菌体成分で生物活性を示す物質としては、グラム陰性細菌と陽性細菌に共通する細胞壁成分であるペプチドグリカンや真菌の細胞壁成分である $\beta$ -グルカンが知られているが、ペプチドグリカンの発熱活性はエンドトキシンと比べて遥かに弱く、また、 $\beta$ -グルカンは発熱活性を示さないと考えられている。手袋およびカテーテル抽出液中のこれらの成分の濃度はエンドトキシン濃度よりも低く、いずれも pg/ml オーダーであった。

発熱性などに代表されるエンドトキシンの各種生物活性の発現には、生体内のマクロファージが重要な役割を担っている<sup>16</sup>。本研究において、エンドトキシンに高感度に応答するヒトマクロファージ様細胞株 MM6-CA8 に対するラテックス製品抽出液の作用を検討した結果、発熱陰性の手袋抽出液ではサイトカイン産生は全く誘導されなかったが、発熱陽性の手袋およびカテーテル抽出液では各種の炎症性サイトカインの産生が誘導された。このサイトカイン産生誘導活性は、エンドトキシンを効率良く吸着除去するデトキシゲル TM カラム（ポリミキシンB固定化アガロースアフィニティーカラム）を用いて各試料を処理することにより完全に消失したと共に、中和型および競合型エンドトキシンインヒビターにより顕著に抑制された。更に、デトキシゲル TM カラム処理した試料はウサギに対する発熱活性も消失し、また、各試料のリムルス活性は中和型のエンドトキシンインヒビターである CAP-18 により抑制された。ポリミキシン B<sup>17</sup> は、カチオン性の抗生物質であり、エンドトキシンに存在する陰性荷電基、主にリン酸基とイオン結合することによりエンドトキシンの活性を阻害する物質として良く知られている。CAP-18<sup>5,18</sup> は分子量 18 kDa の塩基性蛋白 (Cationic Antimicrobial Protein) であり、アルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸を含む親水性領域とフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシンなどの疎水性アミノ酸が、それぞれ片面に偏在する両親媒性の物質である。それ故 CAP-18 の塩基性部分のアミノ酸がリピドAのリン酸基にイオン結合し、疎水性アミノ酸部分がリピドAの脂肪酸部分と疎水結合することにより、エンドトキシンの作用を中和するものと考えられている。エンドトキシン活性の中和作用の原理上、ポリミキシンBと CAP-18 はエンドトキシンの特異的なインヒビターではなく、事実、CAP-18 は抗菌物質としてエンドトキシンを持たないグラム陽性細菌に対する抗菌活性を示す<sup>18</sup>。一方、Suc-406 および B-464 はリピドAと類似の構造を持つ競合的インヒビターであり、エンドトキシンに対する特異的なインヒビターである<sup>19,20</sup>。

本研究により得られたこれらの成績は、ラテックス製品中に存在する発熱性物質がエンドトキシンであることを明確に示している。但し、発熱陽性のラテックス製手袋抽出液のウサギ発熱活性、リムルス活性および各種サイトカイン産生誘導活性はデトキシゲル TM カラム処理により完全に消失したが、カテーテル抽出液の場合と異なり、MM6-CA8 細胞に対する IL-6 産生誘導活性は各種エンドトキシンインヒビターにより完全には抑制されなかった。この原因としては、同抽出液中に存在する物質（例えばタンパク類）により、各阻害剤の効果が抑制された可能性が考えられる他、ラテックス製手袋抽出液中にはエン