

図2. PU および HPBD-PU (47) コート上で代謝協同阻害試験後
のコロニーのギムザ染色写真 (倍率 x7.5)

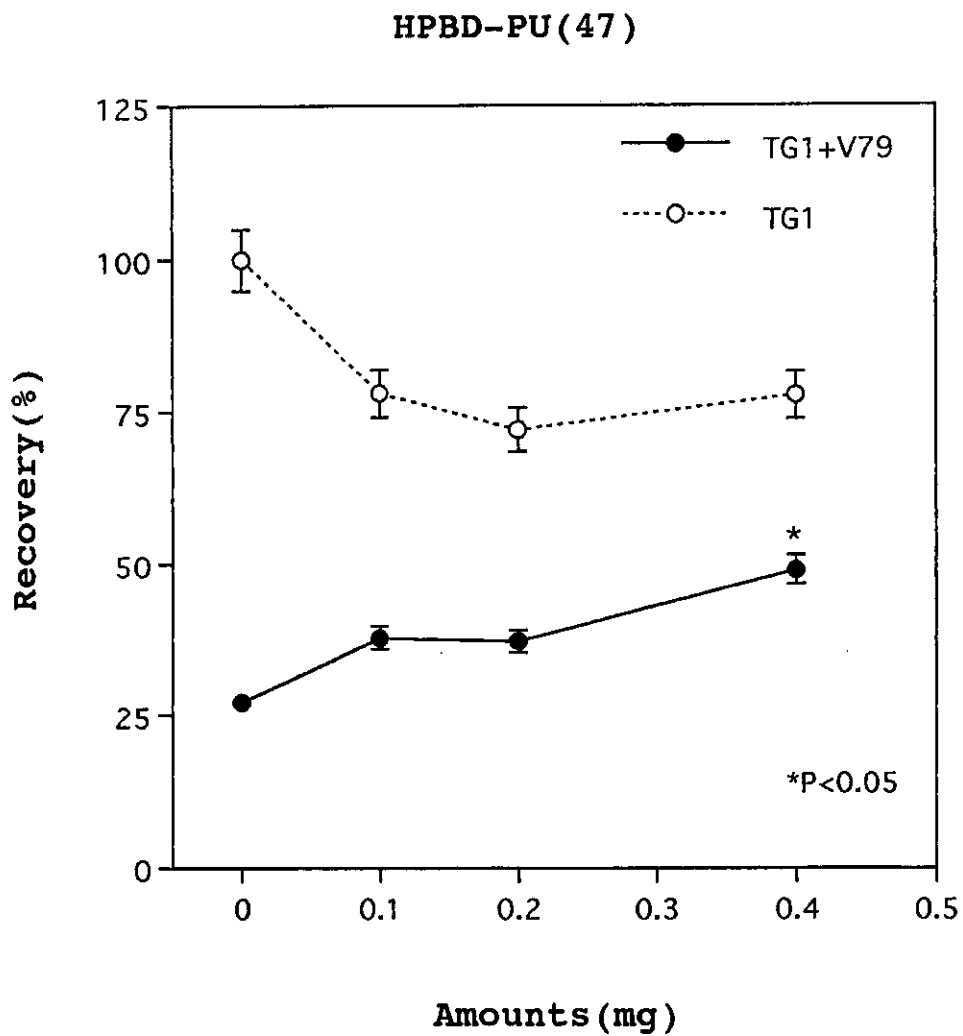


図 3. HPBD-PU (47) のコート量と V79 代謝協同阻害との関係

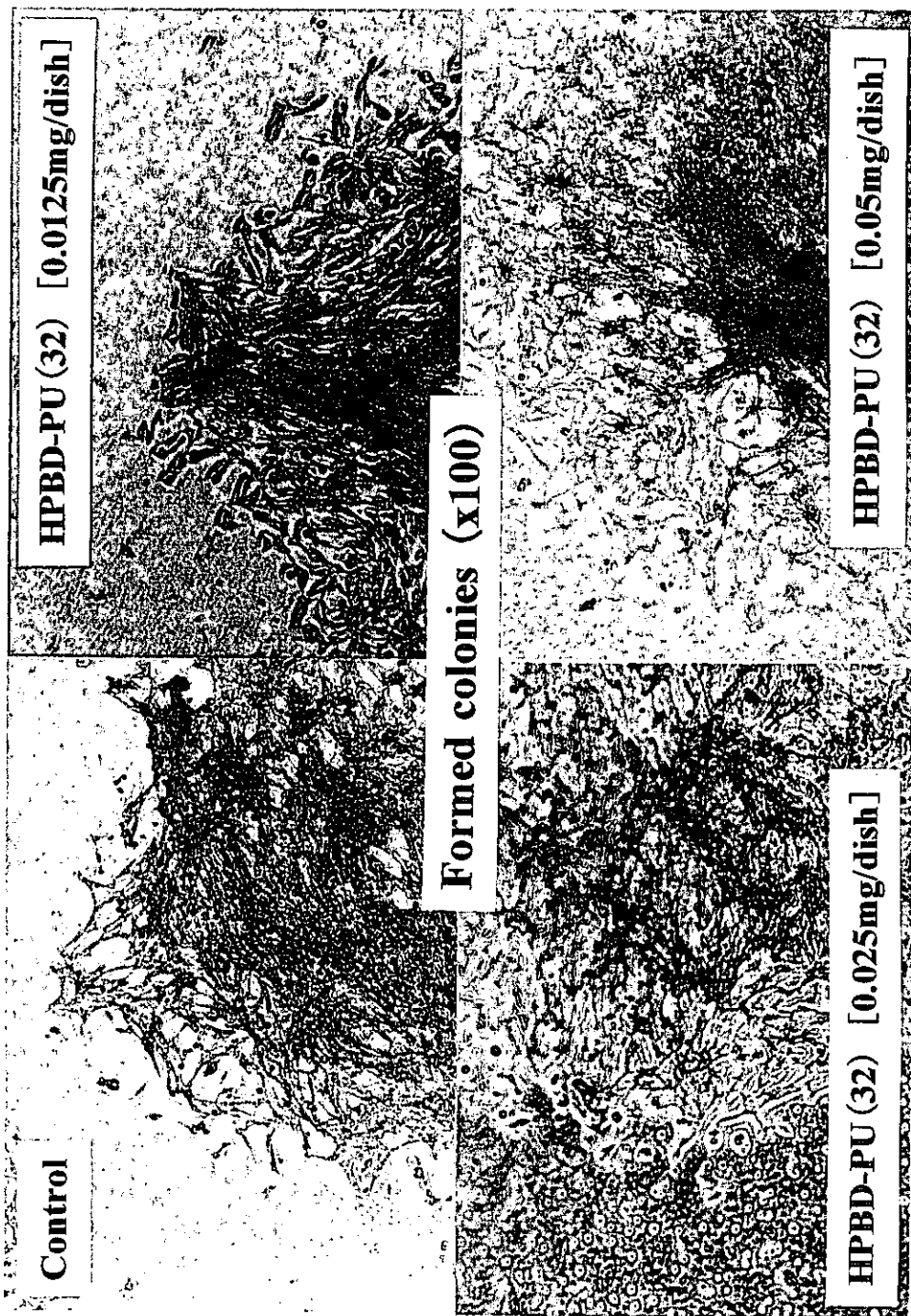


図4. HPBD-PU (32) コート上で細胞毒性試験後のコロニーのギムザ染色写真 (倍率 x100)

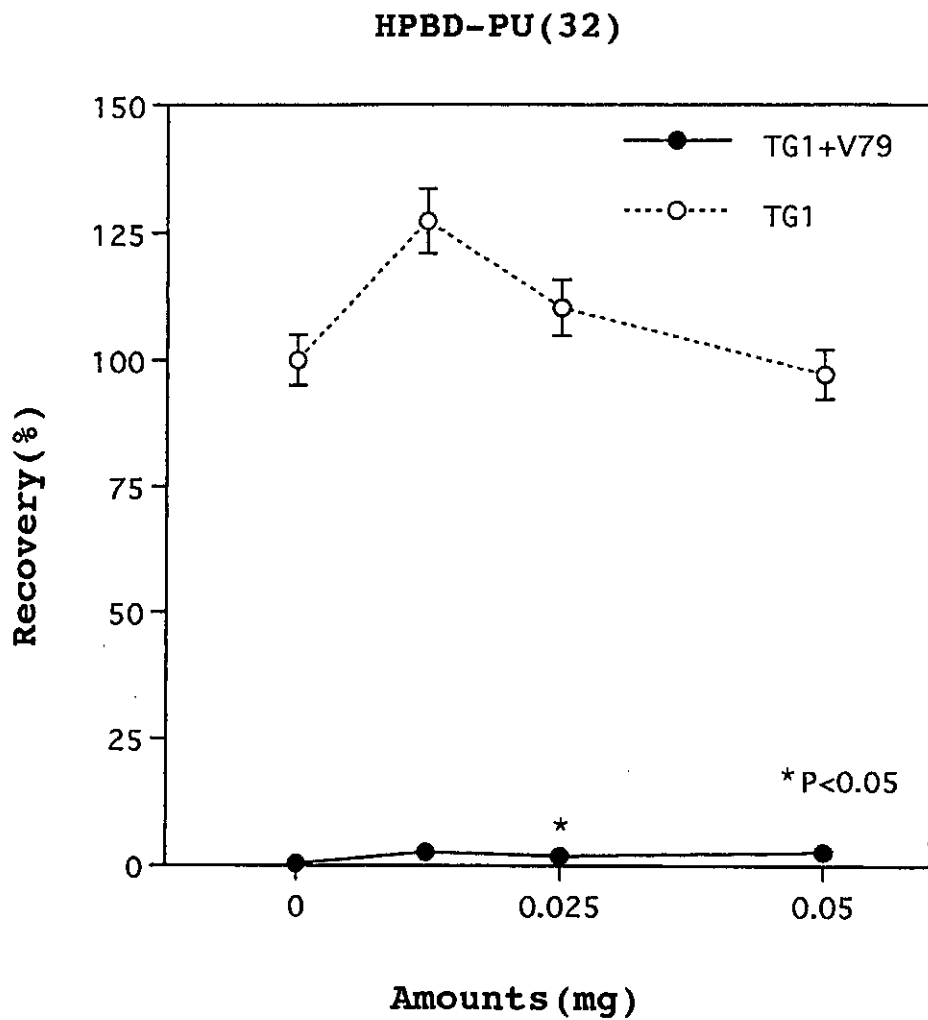


図 5. HPBD-PU (32) のコート量と V79 代謝協同阻害との関係

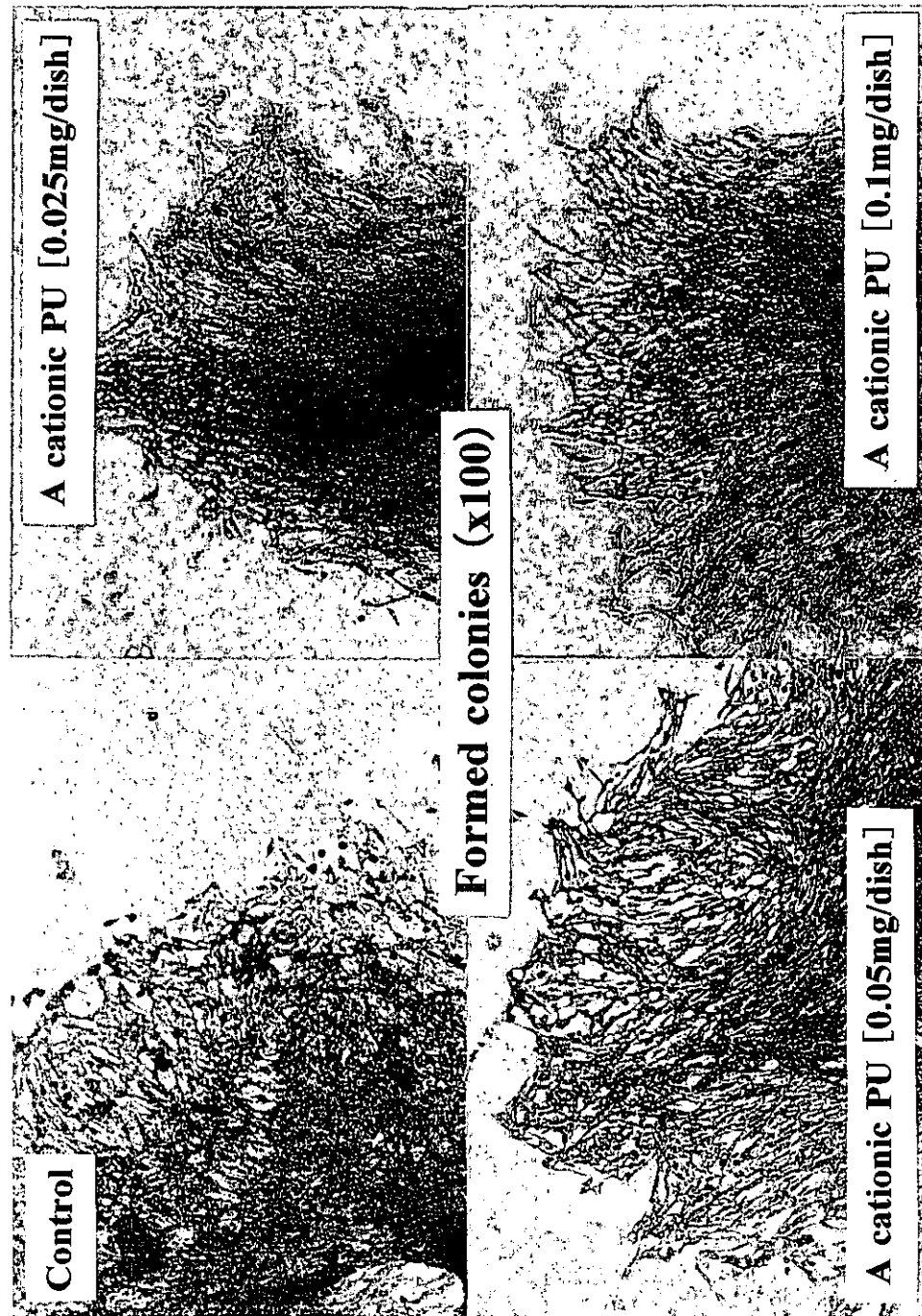


図6. カチオン化PUコート上での細胞毒性試験後のコロニーのギムザ染色写真 (倍率 x100)

A cationic PU

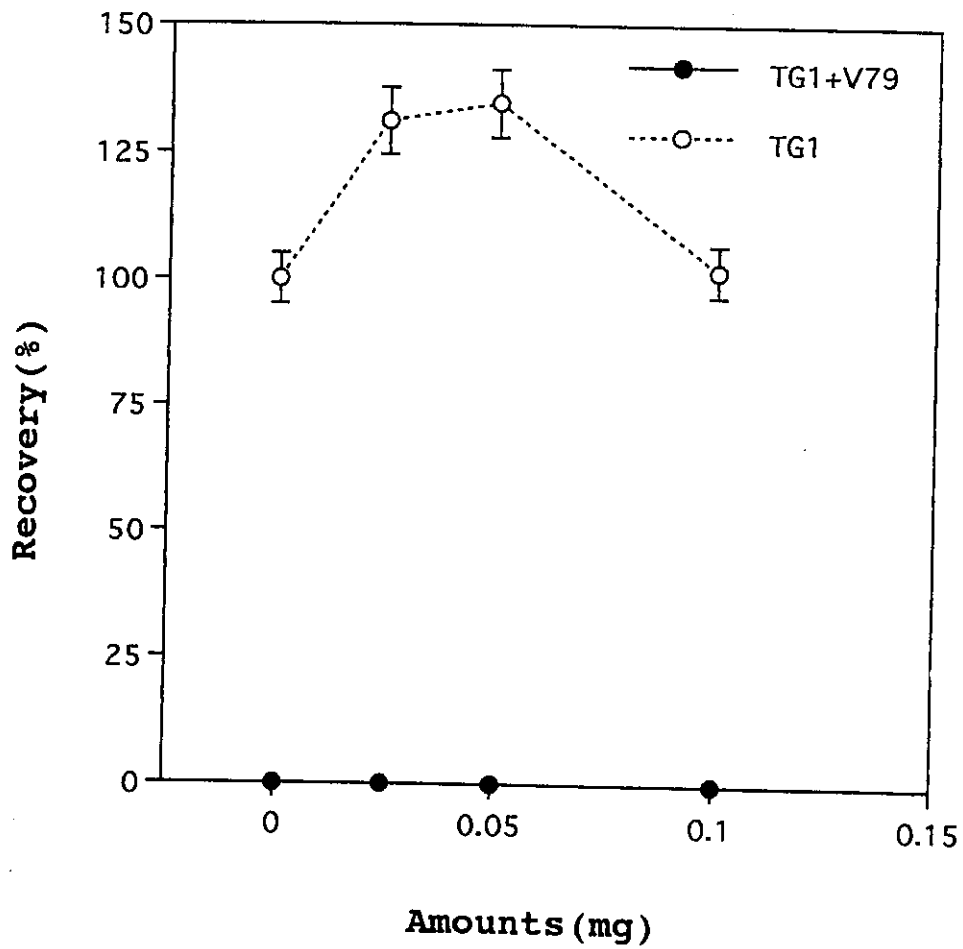


図 7. カチオン化 PU のコート量と V79 代謝協同阻害との関係

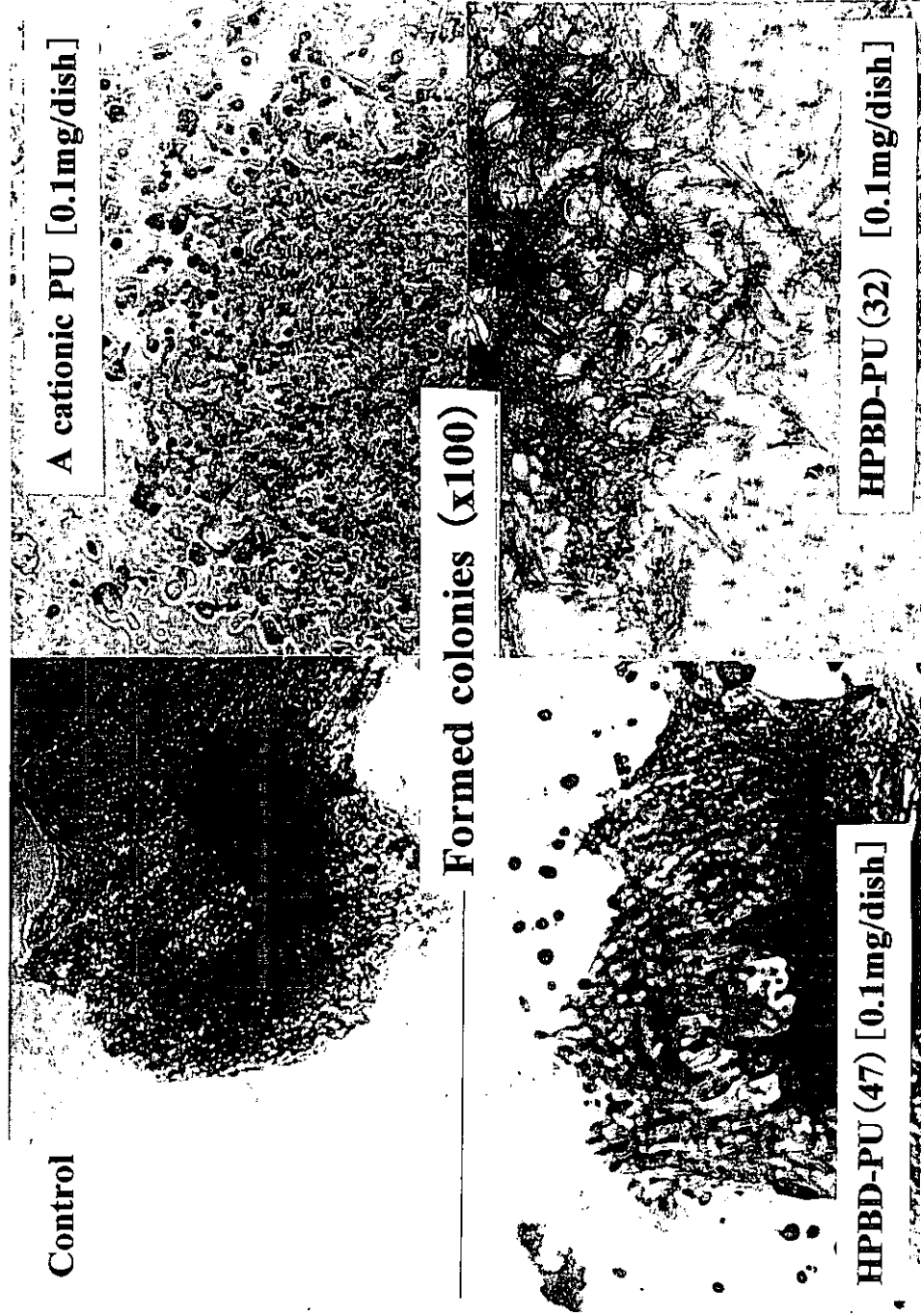


図 8(a)種々の PU コート上での細胞毒性試験後のコロニーのギムザ染色写真 (倍率 x100)

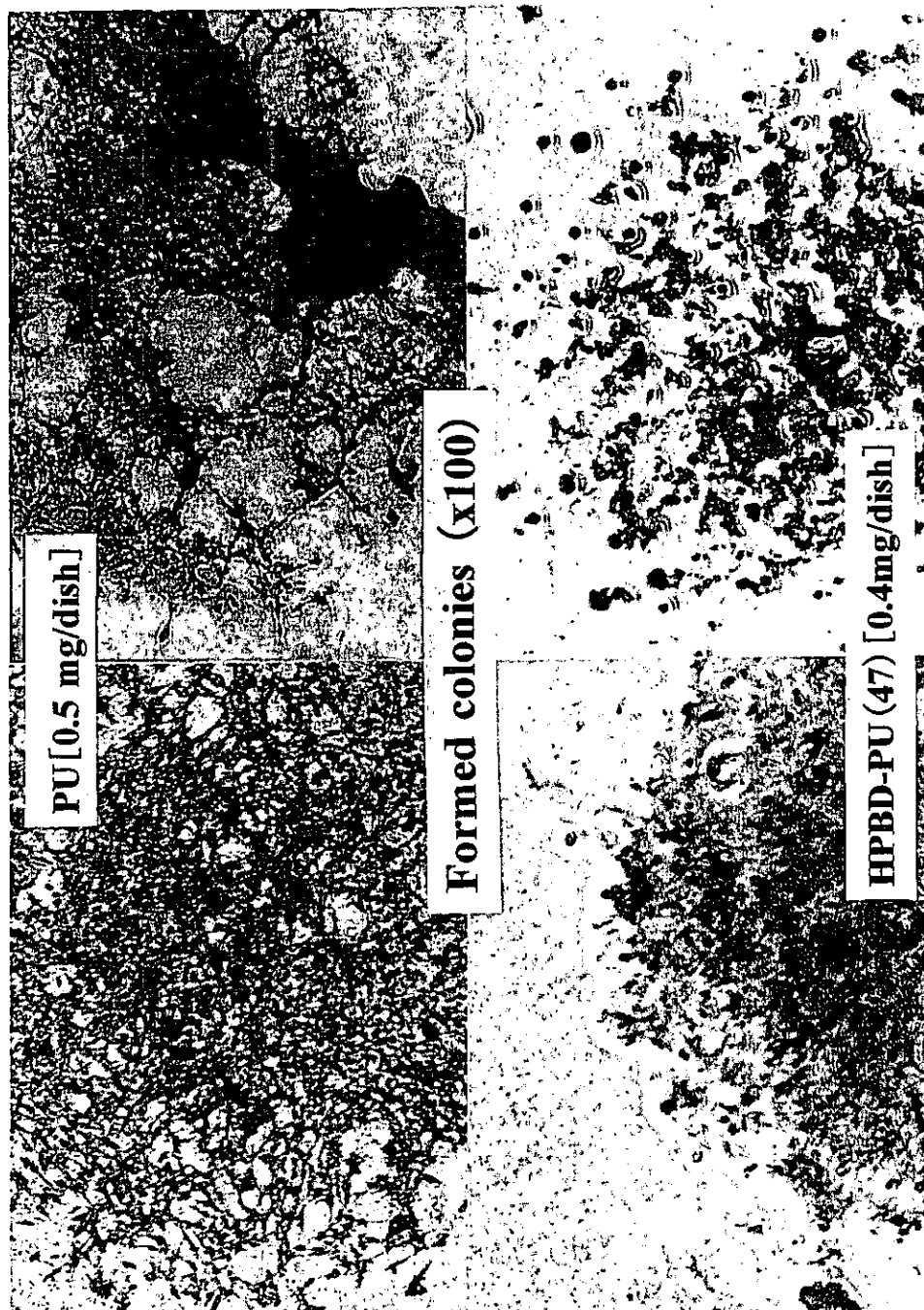


図8(b)種々のPUコート上での細胞毒性試験後の
コロニーのギムザ染色写真 (倍率 x100)

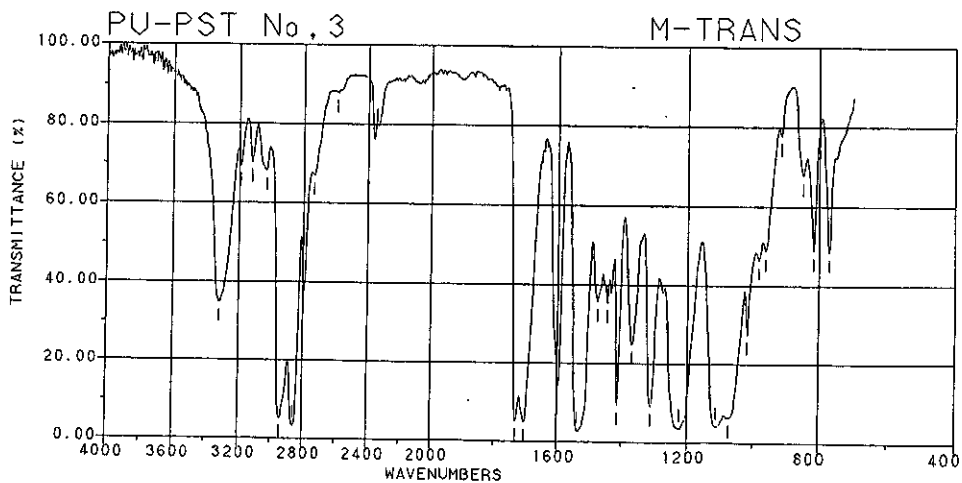
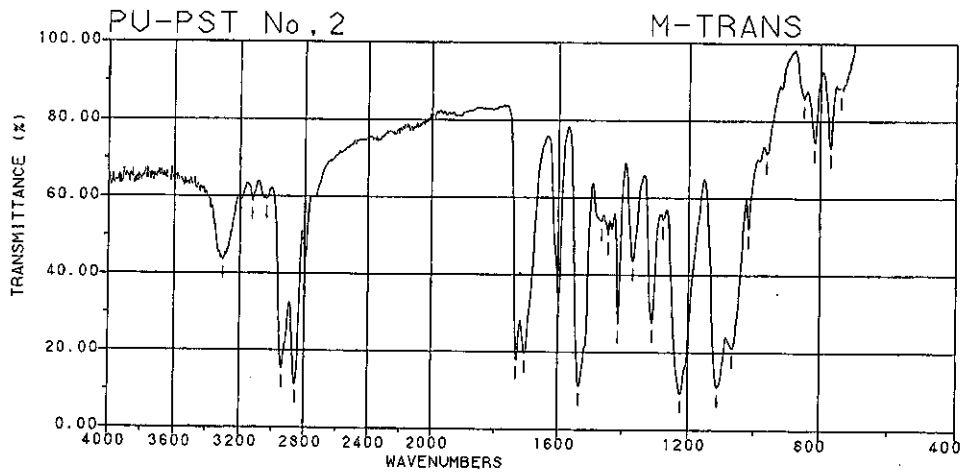
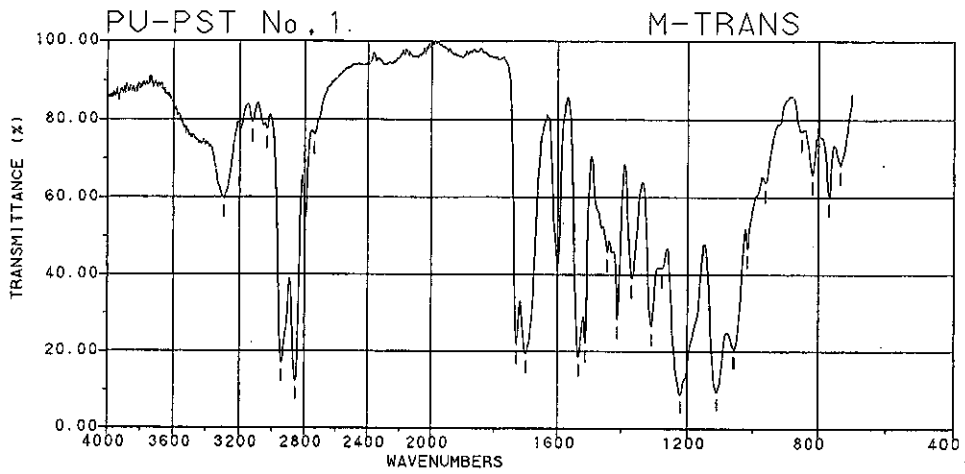
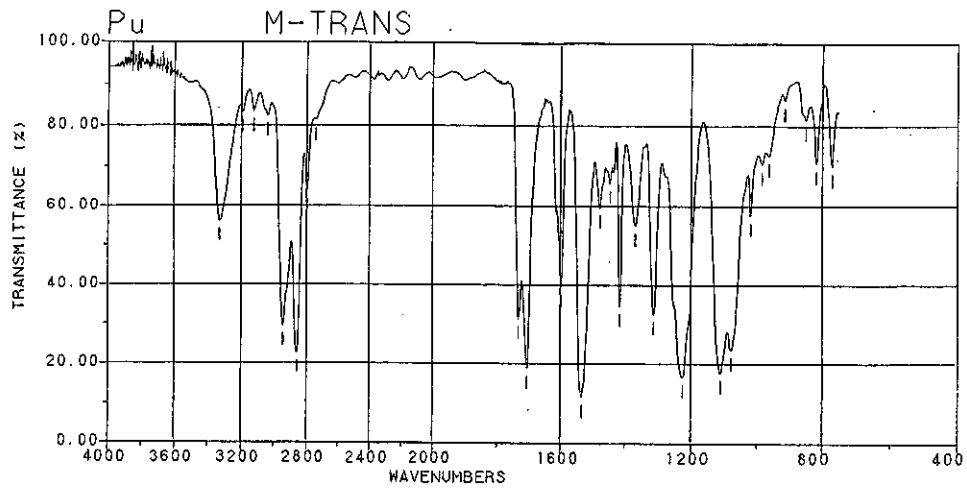


図 9. PU および合成した 3 種の硫酸化 PU (PU-PST) の FT-IR スペクトル

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

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

「医療用具・医療材料の有効性・安全性・品質評価に関する研究」

主任研究官：土屋利江（国立医薬品食品衛生研究所療品部）

平成10年度分担研究報告書

分担研究課題

「天然医用材料の安全性評価に関する研究」

薮島 由二

国立医薬品食品衛生研究所療品部

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

天然医用材料の安全性評価に関する研究

分担研究者 藪島 由二 国立医薬品食品衛生研究所療品部第一室

研究要旨：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。天然由来の材料は生体適合性が高いなど幾つかの利点がある一方で、その起源や品質をコントロールすることが難しいという欠点もあり、事実、天然由来材料を使った承認済み医療用具による原因不明の様々な副作用が現実に報告されている。平成 10 年度の本研究では、天然由来医用材料の安全性を調査する第一のアプローチとして、ラテックス製医療用具の使用により惹起される発熱の要因とメカニズムの解明について検討した。ラテックス製品から調製した抽出物の化学分析および各種生物学的試験の結果、ウサギ発熱試験陽性のラテックス製品はエンドトキシンにより汚染されており、同製品により惹起される発熱がエンドトキシンに由来することが明らかになった。

主任研究者 土屋利江

国立医薬品食品衛生研究所療品部第三室

A. 研究目的

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（海草由来：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。最近では、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。

B. 研究方法

(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

フィルタ濾過（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¹：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²：ラテックス手袋試料（34.6mg）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℃（3 分）→ 3℃/分 → 250℃（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℃、250℃、230℃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³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⁴

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、 1×10^6 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-18⁵ 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⁶

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 A⁷ (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⁸：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、エンドスピー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。

C. 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、手術およびカテーテル抽出液投与による最高体温上昇度（ ΔT_{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（エンドスペシー）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 μ g/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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ の CAP-18 用量では影響を受けなかったが、100 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ で、また、Suc-406 と B-464 は 1 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 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。

D. 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⁹。グラム陰性細菌は、水中 (河川水および海水)、大気中、土壌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 KD 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^{10,11}。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¹²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ポド 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¹³、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¹⁴、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⁹。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¹⁴。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¹⁵。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 β -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、 β -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¹⁶。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