

図8. PHMO の V 7 9 代謝協同阻害作用

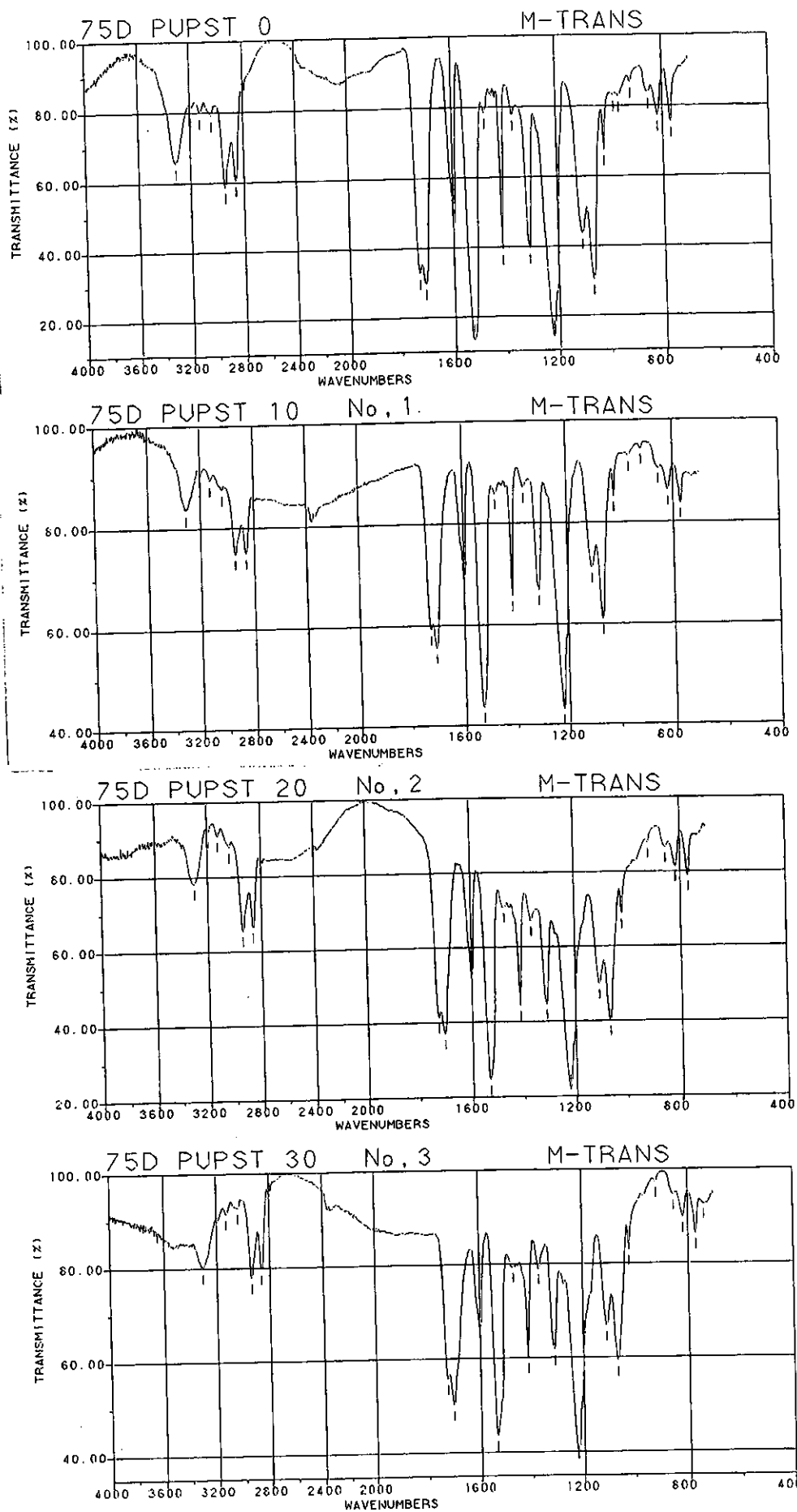


図9. PU および合成した3種の硫酸化PU (PU-PST)のIRスペクトル

## 1. 論文発表

- [1] 土屋利江(1998) 高分子材料の in vitro 発癌プロモーション活性 高分子論文集 55, 314-322.
- [2] T.Tsuchiya and A.Nakamura (1999) Effect of material difference on inhibition of gap-junctional intercellular communication (GJIC) as an index of tumor promotion. IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 74 Foreign bodies, surgical implants and prosthetic devices. pp.290-294.
- [3] 土屋利江、安全性評価 発癌性・変異原性・催奇形性：金属系バイオマテリアルの基礎と応用（筏 義人、立石哲也、角田芳衛 編）アイピーシー、印刷中
- [4] T.Tsuchiya: A useful marker for evaluating the safety of tissue engineering products: Estimation of gap-junctional intercellular communication using V79 metabolic cooperation and cellular differentiation using rat embryonic mid brain cells. submitted.
- [5] R.Nakaoka, T.Tsuchiya, and A. Nakamura (2000) Studies on the mechanisms of tumorigenesis induced by polyetherurethane in rats: Production of superoxide, tumor necrosis factor, and interleukin 1 from macrophages cultured on different polyetherurethanes. J. Biomed.Mater. Res. 49, 99-105.
- [6] T.Tsuchiya, M.A.Sayed, and A.Nakamura (1999) Tumor promoting mechanisms of biomaterials: No involvement of mutation in cx43 gene in the tumorigenesis induced by polyurethanes in vitro. Animal Cell Technology pp.181-185.

## 2. 学会発表

T.Tsuchiya, Md.Abu Sayed and A.Nakamura (1999) Role of connexins in tumors induced by biomaterials. International Symposium "Cell adhesion and communication in growth control and cancer". IARC, Lyon, France 19-21, January.

市川 明、土屋利江、中村晃忠：ポリウレタンの発癌性の分子機構 コネキシン遺伝子発現の解析 第21回日本バイオマテリアル学会大会 1999年11月

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	64.40	7.37	5.89	0.83
Lot2	62.90	7.40	5.42	1.64
Lot3	58.68	7.13	4.92	2.74

置換率	
$(S/32) / (N/14)$	
Lot1	0.0616511
Lot2	0.1323800
Lot3	0.2436484

## 第二章

### 硫酸化ポリウレタンの 発癌性評価に関する研究

食品農医薬品安全性評価センター

井上博之

## 1.はじめに

フィルム状材料をラット皮下に埋植したときの局所の腫瘍発生率は、材料上での細胞間連絡協同の阻害作用に起因する発癌プロモーション作用との差と関係があるとの新仮説が主任研究者から出された、その新仮説から、発癌性が低いと判定された硫酸化ポリウレタンについて、初めてラットでの長期実験を行うものであり、硫酸化ポリウレタンの低あるいは非発癌性がインビボで証明されれば、安全なカテーテルや人工血管を医療現場に提供可能となる。主任研究者による異物発癌現象に関する新仮説から、発癌性が低いと判定した低および高硫酸化ポリウレタンをラット背部皮下に埋入し、2年間飼育観察を行い、観察終了時に病理組織学検査を実施して硫酸化修飾による発癌活性を確認する。

## 2. 研究方法

生後4週 of Wistar [SPF] 雄ラットを150匹購入し、8日間馴化後30匹ずつ4群に分け、ポリウレタンフィルム、ポリウレタン硫酸化10%フィルム、ポリウレタン硫酸化20%フィルムの3種類の材料をそれぞれラット背部皮下に埋植し、対照群には手術処置のみを行い、術後の経過を見るとともに2年間の飼育観察を行う。その間に定期的に体重測定、腫瘍の触診を行う。また、観察期間終了時には血液学的検査、血液生化学検査、病理組織学検査を実施する。  
(倫理面への配慮)

ラットに対し埋植処置を行い、長期に飼育を行うため、動物実験倫理規定に配慮する。

## 3. 試験結果

埋植後1週間が経過した。術後の経過はすべて良好であり、いずれの群にも一般状態に異常を示す動物は認められていない。通常、腫瘍は1年を経過した頃から発生がみられるので、慎重な観察を行いたい。

## 4. 考察

2年の観察期間が終了し、病理組織学検査結果が出てから考察したい。

## 5. 結論

試験開始後間もないため結論を出す段階ではない。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

試験開始後間もないため研究発表はない。

### 2. 学会発表

試験開始後間もないため研究発表はない。

## 7. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし。

### 2. 実用新案登録

なし。

### 3. その他

なし。

## 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

齋島 由二

## 1. 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、その機構は明らかになっていないが、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に関して検討している。平成10年度の本研究では、医療用ラテックス製品により惹起される発熱とエンドトキシン汚染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、同製品中に混在するエンドト



キシシが発熱を惹起する原因物質であることを明らかにした。そこで、平成 11 年度の本研究では、現在市販されている各種コラーゲン製品のエンドトキシシ汚染状況に関して検討した。

## 2. 研究方法

### (1) 材料

コラーゲシを材料とする市販医療用具として、吸収性局所止血剤 4 製品、創傷被覆保護材 2 製品、真皮欠損用グラフト 2 製品、抜歯創用保護材 1 製品、皮内注入剤 1 製品、計 10 製品（製品 1～10）を試料とした。

### (2) 試験液の調製

a) 生物試験用試料：スポンジあるいはメッシュ状の製品については、製品の吸湿性に応じて、製品 1 g 当たり 24 ml ～ 130 ml の注射用蒸留水に浸漬し、50℃で 24 時間振とう抽出した。得られた抽出液を滅菌フィルター（孔径 0.45 μm）で濾過して試料液とした。なお、肉薄のシート状製品は 5 mm x 5 mm 大に、肉厚シート状製品は 3 mm x 3 mm x 3 mm 大に無菌的に細切してから抽出を行った。液状の製品はそのまま試料液とした。

b) 化学分析用試料：製品 9（150 個分：6.62 g）を 0.2 cm 四方に裁断して試料とした。

### (3) 化学分析

a) 2-ケト-3-デオキシオクトン酸（KDO）の分析<sup>1</sup>：製品 9（6.62 g）を 1 M HCl/メタノール中、60℃・1 時間処理後、減圧下に濃縮乾固させた。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、ピリジシ/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、メタノール中でジアゾメタン処理し、再度、減圧下に乾固させた後、クロロホルムに懸濁させ、不溶物を遠心分離に除去し、上清を濃縮乾固して GC-MS 分析用試料とした。対照には大腸菌 O3:K2a2b:H3 株由来エンドトキシシを使用した。

b) 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、140℃（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) 発熱活性の測定

基本的操作は第 13 改正日本薬局方<sup>2</sup>の記載に従って行った。体重 2.0 kg から 3.0 kg の栄養状態のよい健康な雄性ウサギを使用し、試料を耳静脈より 1 ml/kg 投与後、体温上昇を投与後 5 時間まで計測した。ウサギ体温の測定は自動体温測定装置を用いて行った。

#### (5) エンドトキシンおよびβ-グルカンの定量

試料液中のエンドトキシン濃度は、第 13 改正日本薬局方（日局）「エンドトキシン試験法」に準拠し、カイネティック比色法により定量した。定量試薬としてエンドスペシー ES-50M（エンドトキシン特異的リムルス試薬：生化学工業）を用い、標準品として日本薬局方エンドトキシン標準品（JPSE）を用いた。β-グルカン濃度の測定には、(1→3)-β-D-グルカンに特異的に反応するリムルス試薬（ファンギテック G テスト：生化学工業）を用いた。標準品は試薬に添付されている標品を用い、試薬使用説明書に従って定量した。

#### (6) インターロイキン 6（IL-6）産生誘導活性の測定<sup>3</sup>

細胞として、エンドトキシン高感度応答性のヒト単球様細胞株 MM6-CA8 を用いた。同細胞を calcitriol (1,25-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>; 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 IL-6 濃度を市販の ELISA キット（R&D）を用いて測定した。

#### (7) 試料液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（デトキシゲルカラム、Pierce）を使用した。試料 5 ml を同カラムに 4 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液とした。

#### (8) エンドトキシンインヒビターを使用した阻害実験

中和型エンドトキシンインヒビターである CAP-18<sup>4,5</sup> は平田博士（岩手医科大学細菌学教室）から分与された。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>6</sup> (B-464) は株式会社エーザイから分与を受けた。

CAP-18 を使用した阻害実験は、試料液 2 容に対し CAP-18 溶液（1~100 μg/ml）1 容の割合で混合し、37℃で 30 分間インキュベートした後、混合液のリムルス活

性および IL-6 産生誘導活性を測定した。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 (B-464 : 1~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 33  $\mu\text{l}$  および試料液 67  $\mu\text{l}$  を添加し、37°C で 17 時間培養後、IL-6 産生誘導活性を測定して行った。

### 3. 研究結果

#### (1) 抽出による試料液の調製

スポンジあるいはメッシュ状の製品 (製品 1~9) について、50°C で 24 時間抽出を行ったところ、表 1 に示したように、製品 9 は完全に融解し、また製品 7 はシリコン膜以外全て融解した。製品 1、2 および 4 は抽出によって形が崩壊し、一部融解している可能性が考えられたが外観からは判定できなかった。これら以外の固形製品は抽出によって全く融解せず、外観上の変化は認められなかった。これら融解しなかった製品について、抽出温度を 85°C まで上げて融解するかどうか検討したが、いずれにも融解は認められなかった。

#### (2) エンドトキシン濃度および $\beta$ -グルカン濃度の測定

日局エンドトキシン試験法に従って、製品 1~9 の抽出液および製品 10 (液状製品) のリムルス活性を測定した結果、表 1 に示したように、製品 7 および製品 9 の抽出液は 10.3 EU/ml (242 EU/g 製品) および 73.4 EU/ml (2,200 EU/g 製品) のエンドトキシン量に相当する活性を示した。その他の製品については、検出限界以下、または極微量の活性が検出されたのみであった。製品 7 および製品 9 の抽出液中には、 $\beta$ -グルカンも高濃度で検出された (それぞれ 700 pg/ml および 1,350 pg/ml) (表 1)。また、製品 6 の抽出液中にも  $\beta$ -グルカンが若干高い濃度 (119 pg/ml) で検出されたが、その他の試料液中の  $\beta$ -グルカン濃度は 1.5 pg/ml から 22.3 pg/ml の範囲であった (表 1)。

#### (3) 試料液の IL-6 産生誘導活性

製品 1~9 の抽出液および製品 10 を MM6-CA8 細胞の培養液に 10% の割合で添加し、IL-6 の産生が誘導されるか否かについて検討した結果、強いリムルス活性および高い  $\beta$ -グルカン含量を示した製品 7 および製品 9 の抽出液が有意な IL-6 産生誘導活性を示した (表 1)。一方、リムルス活性を示さない、または非常に弱い活性しか示さないその他の製品抽出液の場合、IL-6 産生は誘導されなかった (表 1)。

#### (4) コラーゲン製品抽出液の発熱活性

高いリムルス活性を示した製品 7 および製品 9 の抽出液をウサギに投与し、発熱

が惹起されるかどうか検討した結果、図 1 に示すように、製品 7 の抽出液では 1 峰性の発熱（最高体温上昇度 1.05℃）、製品 9 の抽出液では 2 峰性の発熱（最高体温上昇度 1.68℃）が認められた。一方、対照に使用したりムルス活性陰性である製品 4 の抽出液はウサギに対する発熱活性を示さなかった。

#### (5) エンドトキシン除去処理による発熱活性の変動

製品 7 および製品 9 の抽出液に認められた発熱活性がエンドトキシン由来であるか否かを調べるため、これらの抽出液をエンドトキシン除去カラム（デトキシゲルカラム）により処理し、発熱活性がどのように変動するか検討した。図 2 および表 2 に示したように、両抽出液の発熱活性は、デトキシゲルカラム処理により、およそ 1/2 程度に減弱したが、完全には消失しなかった。一方、対照として使用した JPES 500 EU/ml 溶液の発熱活性はデトキシゲルカラム処理により完全に消失した。この成績から、コラーゲン製品抽出液中にはエンドトキシン以外の発熱性物質が含まれている可能性も考えられたが、経験上、デトキシゲルカラムによるエンドトキシン除去効率は多様な蛋白質の共存により低下することが知られているため、カラム処理前後における試料のりムルス活性を測定し、同カラムのエンドトキシン除去効率を確認した。その結果、表 2 に示したように、JPES 溶液ではカラム処理によってエンドトキシンが完全に除去されるのに対し、製品 7 および製品 9 の抽出液では 1/2 程度の活性が残存することが判明した。また、りムルス活性を示さなかった製品 4 の抽出液に JPES（終濃度 500 EU/ml）を添加した後、デトキシゲルカラム処理を行った結果、添加したエンドトキシンは完全には除去されず、カラム通過液には相当量の発熱活性（図 3）が残存していると共に、りムルス試験により 102 EU/ml のエンドトキシンが検出された。これらの結果から、デトキシゲルカラムによるコラーゲン製品抽出液のエンドトキシン除去は、同抽出液中に存在する何らかの物質、恐らくコラーゲン自体により妨害されることが明らかになった。

#### (6) エンドトキシンインヒビターによる IL-6 産生誘導活性の阻害

コラーゲン製品 7 および 9 の抽出液中の IL-6 産生誘導活性に対するエンドトキシンインヒビターの阻害効果を検討した。表 3 に示すとおり、中和型インヒビターである CAP-18 では最高濃度 100 µg/ml で IL-6 産生誘導活性が有意に抑制されたが、完全には消失せず、相当量の活性が残存した。しかし、対照として使用した JPES 溶液（500 EU/ml）の活性も 100 µg/ml の CAP-18 により完全には消失しなかったことから、CAP-18 処理後のコラーゲン製品抽出液中に残存する IL-6 産生誘導活性は、中和されずに残ったエンドトキシンによるものと考えられた。事実、CAP-18 処理後の抽出液中のりムルス活性を測定した結果、表 4 に示すように、相当量

の活性が残存していることが確認された。

これに対し、エンドトキシン特異的な競合型インヒビターである B-464 は、1~10  $\mu\text{g/ml}$  の添加濃度において、製品 7 および製品 9 の抽出液が示す IL-6 産生誘導活性を完全に抑制した (表 3)。また、対照として用いた JPES 溶液 (500 EU/ml) の IL-6 産生誘導活性も 1  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で完全に阻害された。

#### (7) エンドトキシン常成分の検出

エンドトキシンに普遍的に存在する成分である KDO を化学分析により定性的に検出することを試みた。大腸菌エンドトキシンのリポド 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 27.0 分に検出された。コラーゲン製品 9 の KDO 分析においても、ほぼ同様の保持時間に極めて小さなピークが検出された (図 4)。図 5 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。

#### 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>7</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。

天然医用材料であるラテックスから製造された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>8,9</sup>。しかし、リムルス試験は D-グルカン類 (前世代のリムルス試験) やトリプシンなどエンドトキシン以外の物質<sup>10</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分離し

たりピド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>11</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>12</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>7</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。エンドトキシンの常成分である KDO が、GC-MS 分析により、直接、各種生物活性陽性のコラーゲン製品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。

阻害・促進物質の存在や蛋白質分解酵素による擬陽性など若干の問題は残るが、D-グルカン類により活性化されるカスケード反応系（Factor G）を除去したリムルス試薬は、多くの場合において特異的にエンドトキシンを検出・定量することができる。このリムルス試薬（エンドスペシー）を使用して、10種類のコラーゲン製品に含まれるエンドトキシン量を測定した結果、製品7および製品9の抽出液中に高濃度のエンドトキシンが検出された。その他の製品では、検出限界以下または極微量のエンドトキシンが検出されたのみであった。エンドトキシンが高濃度に検出された2製品は、抽出操作によって製品が融解し、混在しているエンドトキシンが比較的効率良く抽出されたものと考えられるが、融解しなかった製品については、汚染エンドトキシンが十分に回収されなかった可能性が残る。従って、抽出方法については今後更に検討する必要があるものと思われる。また、エンドトキシンの抽出効率および蛋白質との結合などを考慮した場合、高濃度のエンドトキシンが検出された2製品中に存在する実際のエンドトキシン量は、本実験で得られた定量値よりも更に高いものと推察される。

エンドトキシンが高濃度に検出された製品7および9の抽出液中には、D-グルカンも高濃度に検出された。エンドトキシンはグラム陰性細菌由来であり、D-グルカンは主に真菌に由来することから、これら2製品の原料は細菌および真菌の両者により汚染されていたことが推察される。D-グルカンは発熱活性を示さないとされているが<sup>13</sup>、エンドトキシンと共存した場合にエンドトキシンの毒性を増強する可能性が指摘されている<sup>14</sup>ことから、留意することが必要である。

エンドトキシンの生体内における主な標的はマクロファージであり<sup>15</sup>、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 や IL-6 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。ヒト単球様細胞株 MM6-CA8 に対する各コラーゲン製品の IL-6 産生誘導能を検討したところ、高濃度のエンドトキシンが検出された製品 7 および 9 の抽出液にのみ IL-6 産生誘導活性が認められた。次いで、製品 7 および 9 の抽出液をウサギに投与した結果、製品 7 では中程度の 1 峰性の発熱、製品 9 では強い 2 峰性の発熱が惹起された。対照として検討した製品 4 の抽出液では発熱が惹起されなかった。エンドトキシンのウサギに対する最小発熱量は 5 EU/kg とされており、製品 7 および 9 の抽出液中のエンドトキシン濃度はそれぞれ 10.3 EU/ml および 73.4 EU/ml であることを考慮すると、この成績は妥当なものと考えられる。また、これらの抽出液で惹起された発熱の熱型は、低用量で 1 峰性、高用量で 2 峰性となるエンドトキシンによる発熱の熱型<sup>16</sup>と良く一致していた。これらの成績は、コラーゲン製品中に含まれる発熱性物質がエンドトキシンであることを示唆している。

コラーゲン製品中の発熱性物質がエンドトキシンであるか否かを更に明確化するため、抽出液中のエンドトキシンをデトキシゲルカラム（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）を用いて吸着除去し、それに伴う発熱活性の変化を検討した。しかし、本実験では、抽出液中に存在する何らかの物質によりエンドトキシン除去が阻害されることが判明し、確定的な結果を得ることができなかった。そこで、MM6-CA8 細胞に対する IL-6 産生誘導活性を *in vitro* での発熱活性の指標とし、2 種類のエンドトキシンインヒビターを使用して IL-6 産生誘導能阻害実験を行った。その結果、中和型インヒビターである CAP-18 は、その阻害効果に限界があるが、製品 7 および製品 9 の抽出液が示す IL-6 産生誘導活性を用量依存的に抑制することが確認された。また、CAP-18 は、両製品抽出液が示すリムルス活性も IL-6 産生誘導阻害と同様に抑制した。一方、強力な競合型インヒビターである B-464 は、いずれの製品の抽出液についても、IL-6 産生誘導活性を完全に阻害した。これらの成績から、抽出液中の IL-6 産生誘導物質はエンドトキシンであること、すなわち、両コラーゲン製品中に存在する発熱性物質は混入しているエンドトキシンであることがほぼ確実となった。

デトキシゲルカラムに固定化されたポリミキシン B<sup>17</sup> は、カチオン性の蛋白性抗生物質であり、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>4,5,18</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。エンドトキシンは様々な蛋白質と複合体を形成することが知られており、反応系にポリミキシンBやCAP-18よりも結合親和性の高い蛋白質が存在すれば、これらの中和型インヒビターの作用が減衰されることが容易に予測される。エンドトキシン吸着除去試験、IL-6産生誘導阻害試験およびリムルス活性阻害試験において、デトキシゲルカラムおよびCAP-18が十分な効果を発揮しなかった理由は、製品本体であるコラーゲンと中和型インヒビターとの両者にエンドトキシンが吸着・結合しているためと思われる。また、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、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強力かつ特異的なインヒビターである。

本研究により得られたこれらの成績は、コラーゲン製品7および製品9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。

## 5. 研究発表

- 1) 齋島由二、村井敏美、中川ゆかり、平田陸正、矢上 健、中村晃忠。天然医用材料の安全性評価に関する研究。第21回バイオマテリアル学会大会（1999年・京都）。
- 2) 齋島由二、村井敏美、中川ゆかり、平田陸正、矢上 健、中村晃忠。医療用ラテックス製品に含まれる発熱性物質の同定。日本薬学会第120年会（2000年・岐阜）。

## 6. 参考文献

- [1] H. Kumada, S. Kondo, T. Umemoto and K. Hisatsune. (1993). Chemical structure of the 2-keto-3-deoxyoctonate (KDO) region of lipopolysaccharide isolated from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. FEMS Microbiol. Lett., 108, 75-80.
- [2] 第13改正日本薬局方。厚生省。
- [3] D.D. Groote, P.F. Zangerle, Y. Gevaert, M.F. Fassotte, Y. Beguin, F. Noizat-Pirenne, J. Pirenne, R. Gathy, M. Lopez, I. Dehart, D. Igot, M. Baudrihay, D. Delacroix and P. Franchimont. (1992). Direct stimulation of cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2, IFN- $\gamma$  and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. Cytokine, 4, 239-248.
- [4] M. Hirata, Y. Shimomura, M. Yoshida, J.G. Morgan, I. Palings, D. Wilson, M.H. Yen, S.C. Wright and J.W. Larrick. (1994). Characterization of a rabbit cationic protein (CAP18) with



- lipopolysaccharide-inhibitory activity. *Infect. Immun.*, 62, 1421-1426.
- [6] W.J. Christ, O. Asano, A.L. Robidoux, M. Perez, Y. Wang, G.R. Dubuc, W.E. Gavin, L.D. Hawkins, P.D. McGuinness, M.A. Mullarkey, M.D. Lewis, Y. Kishi, T. Kawata, J.R. Bristol, J.R. Rose, D.P. Rossignol, S. Kobayashi, I. Hishinuma, A. Kimura, N. Asakawa, K. Katayama and I. Yamatsu. E5531, a pure endotoxin antagonist of high potency. *Science*, 268, 80-83.
- [5] M. Hirata, S.C. Wright and J.W. Larrick. (1996). Endotoxin-neutralizing proteins for sepsis and endotoxin shock, p. 109-115. In K. Okada and H. Ogata (eds), *Shock from Molecular and Cellular Level to Whole Body*, Proceedings of the Third International Shock Congress, Elsevier.
- [7] E.T. Rietschel, L. Brade, U. Schade, U. Seydel, U. Zahringer, S. Kusumoto and H. Brade. (1988). Bacterial endotoxins: properties and structure of biologically active domains, p. 1-41, In E. Schinner, M.H. Richmond, G. Seibert and U. Schwarz (eds.), *Surface structures of microorganisms and their interactions with the mammalian host*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany.
- [8] L. Holmdahl and N. Chegini. (1977). Endotoxin and particulate matter on surgical gloves. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, 7, 225-234.
- [9] P.B. Williams and J.F. Halsey. (1997). Endotoxin as a factor in adverse reactions to latex gloves. *Annals of Allergy, Asthma, & Immunology*, 79, 303-310.
- [10] 森田隆司, 岩永貞昭. (1982). 第 3 章内毒素の生物活性: *Limulus test* の反応機構. 本間 遜, 岩永貞昭, 丹羽 允, 吉田昌男 (編集), *内毒素: その構造と活性*. 医歯薬出版.
- [11] T. Iida, Y. Haishima, A. Tanaka, K. Nishiyama, S. Saito and K. Tanamoto. (1996). Chemical structure of lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Comamonas testosteroni*. *Eur. J. Biochem.*, 237, 468-475.
- [12] U. Zahringer, B. Lindner and E.T. Rietschel. (1994). Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 50, 211-276.
- [13] D.L. Williams, E.R. Sherwood, I.W. Browder, R.B. McNamee, E.L. Jones and N.R. DiLuzio. (1988). Pre-clinical safety evaluation of soluble glucan. *Int. J. Immunopharmacol.*, 10, 405-414.
- [14] N. Ohno, N. Asada, Y. Adachi and T. Yadomae. (1995). Enhancement of LPS triggered TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) production by (1 $\rightarrow$ 3)-b-D-glucans in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 126-133.
- [15] C. Galanos and M.A. Freudenberg. (1990). Endotoxin: sensitization and mechanisms of host-response, p. 20-29, In J.D. Baumgartner, T. Calandra and J. Carlet (eds.), *Endotoxin from pathophysiology to therapeutic approaches*. Flammarion Medecine-Sciences, France.
- [16] A. Morimoto, T. Nakamori, T. Watanabe, T. Ono and N. Murakami. (1988). Pattern differences in experimental fevers induced by endotoxin, endogenous pyrogen, and prostaglandins. *Am. J.*

Physiol., 254, R633-R640.

[17] D.R. Storm, K.S. Rosenthal and P.E. Swanson. (1977). Polymyxin and related peptide antibiotics. *Ann. Rev. Biochem.*, 46, 723-763.

[18] 平田陸正. (1998). 顆粒球由来の生体防御因子：抗菌性ペプチドを中心として. *Minophagen Medical Review*, 43, 1-15.

【協力研究者】

村井 敏美 (国立医薬品食品衛生研究所大阪支所生物試験部第一室)

中川ゆかり (国立医薬品食品衛生研究所大阪支所生物試験部第一室)

平田 陸正 (岩手医科大学医学部細菌学講座)

矢上 健 (国立医薬品食品衛生研究所療品部)

中村 晃忠 (国立医薬品食品衛生研究所療品部)

表1. 各種コーラゲン製品のエンドトキシン汚染サーベイ成績

製品番号	用途 (形状)	コーラゲンの 由来	製品1g当たりの 抽出溶媒量 (ml)	抽出操作による 製品の形態変化	抽出液中の		製品の		抽出液中の		抽出液中の IL-6 産生誘導活性 (pg/ml) *2
					エンドトキシン濃度 (EU/ml)	エンドトキシン汚染濃度 (EU/g)	β-グルカン濃度 (pg/ml)	IL-6 産生誘導活性 (pg/ml) *2			
1	吸収性局所止血剤 (スポンジシート状)	ウシ真皮	29	崩壊	N.D.*1	-	10.2	N.D.*3			
2	吸収性局所止血剤 (スポンジシート状)	ウシ真皮	44	崩壊	N.D.	-	22.3	N.D.			
3	吸収性局所止血剤 (スポンジシート状)	ウシ	130	なし	0.016	2.1	1.5	N.D.			
4	吸収性局所止血剤 (粉体)	ウシ	28	崩壊	N.D.	-	20.5	N.D.			
37 5	創傷被覆材 (メッシュシート状)	不明	30	なし	0.021	0.6	6.8	N.D.			
6	創傷被覆剤 (スポンジシート状)	ウシ真皮	30	なし	0.07	2.1	119	N.D.			
7	真皮欠損用グラフト (スポンジシート状)	仔ウシ	24	シリコン膜以外融解	10.3	242	700	304			
8	真皮欠損用グラフト (スポンジシート状)	ブタ腱	27	なし	0.22	6.0	13.7	N.D.			
9	抜歯創用保護材 (スポンジプラグ状)	不明	30	完全融解	73.4	2,200	1,350	337			
10	皮内注入剤 (液体)	仔ウシ真皮	-	-	0.5/製品1ml	0.5	10.5/製品1ml	N.D.			

\*1, 検出限界以下 (<0.016 EU/ml) ; \*2, MM6-CA8 細胞培養上清中の IL-6 濃度 ; \*3, 検出限界以下 (<0.7 pg/ml)

表2. デトキシゲルカラム処理の効果

試料	エンドトキシン活性			
	発熱活性 (最高体温上昇度、℃)		リムルス活性 (EU/ml)	
	処理前	処理後	処理前	処理後
エンドトキシン 500 EU/ml 溶液	1.66	0.16	500	N.D.*
製品7	1.05	0.90	10.30	3.65
製品9	1.68	1.50	73.36	42.68

\*、検出限界以下 (<0.016 EU/ml)