

図 17. 弱酸性電解除菌水 (pH 6.37) によるリムルス活性の不活化

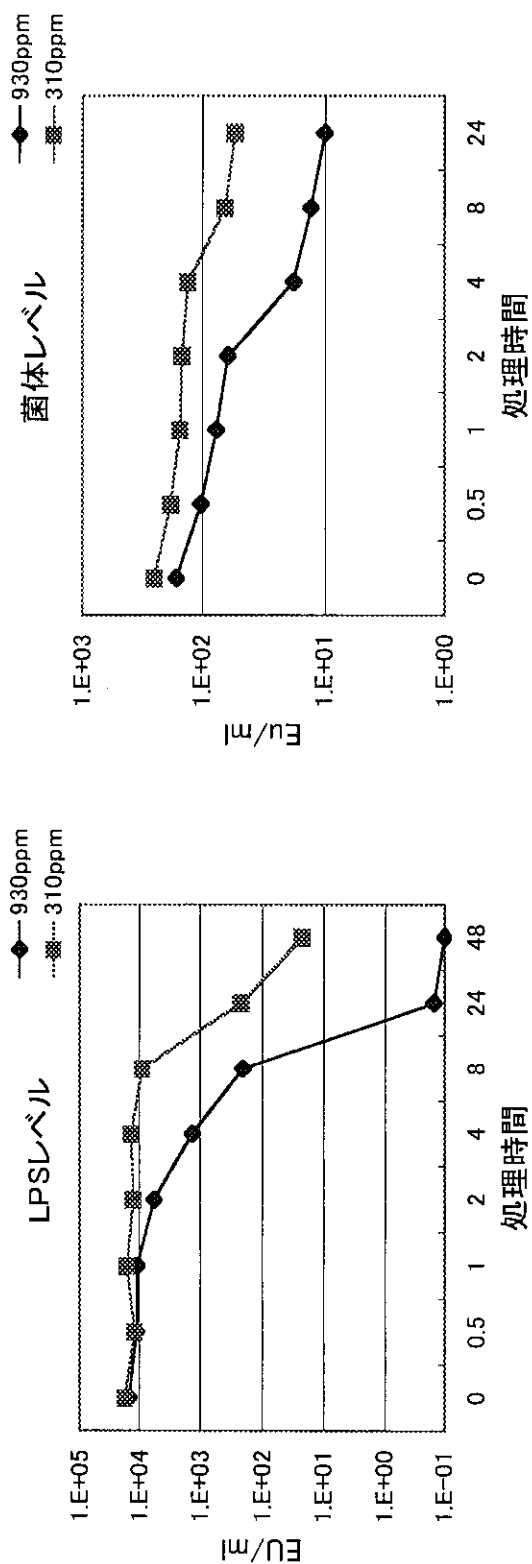


図18. リムルス反応に対する各種薬剤の影響

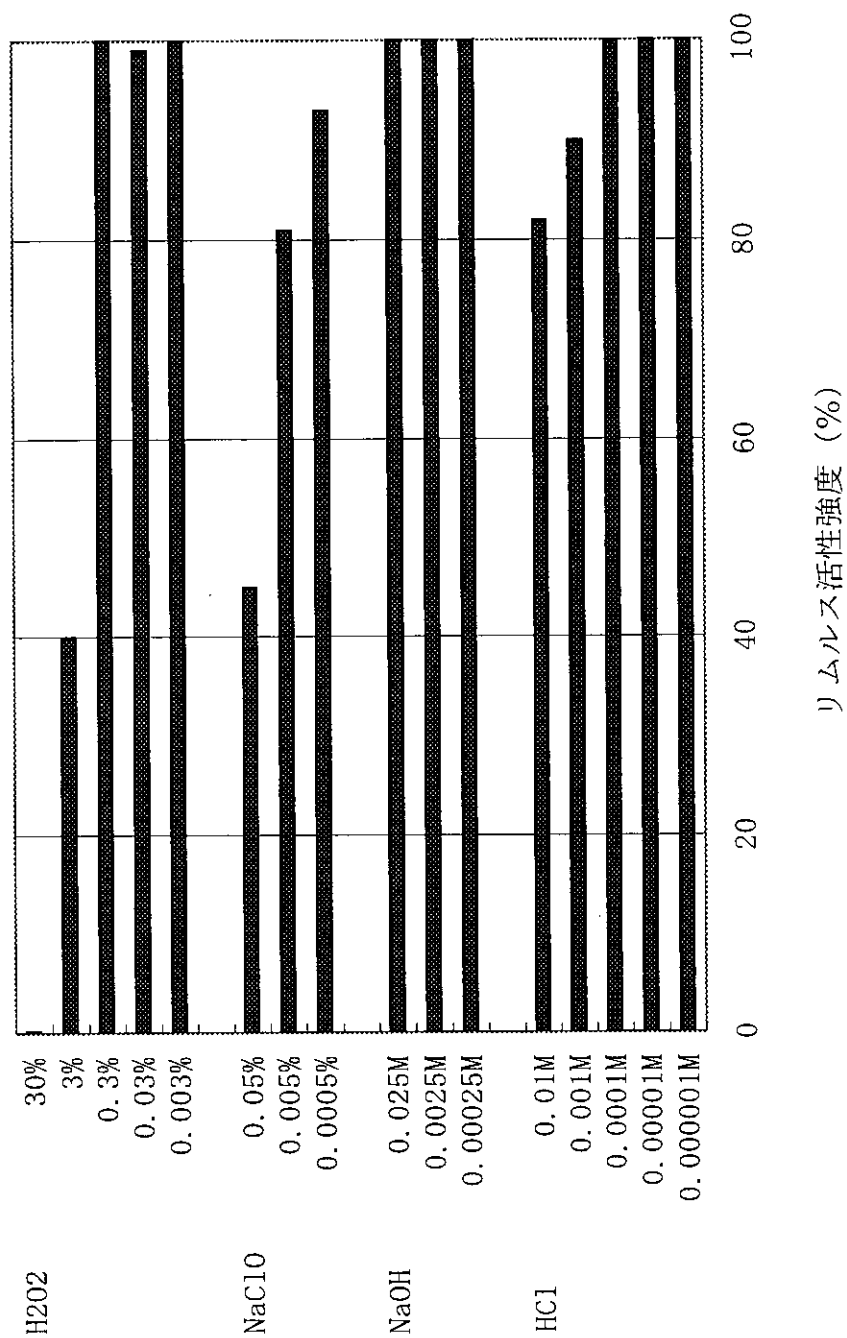


図19. LPSレベルのリムルス活性に対する各種薬剤の影響

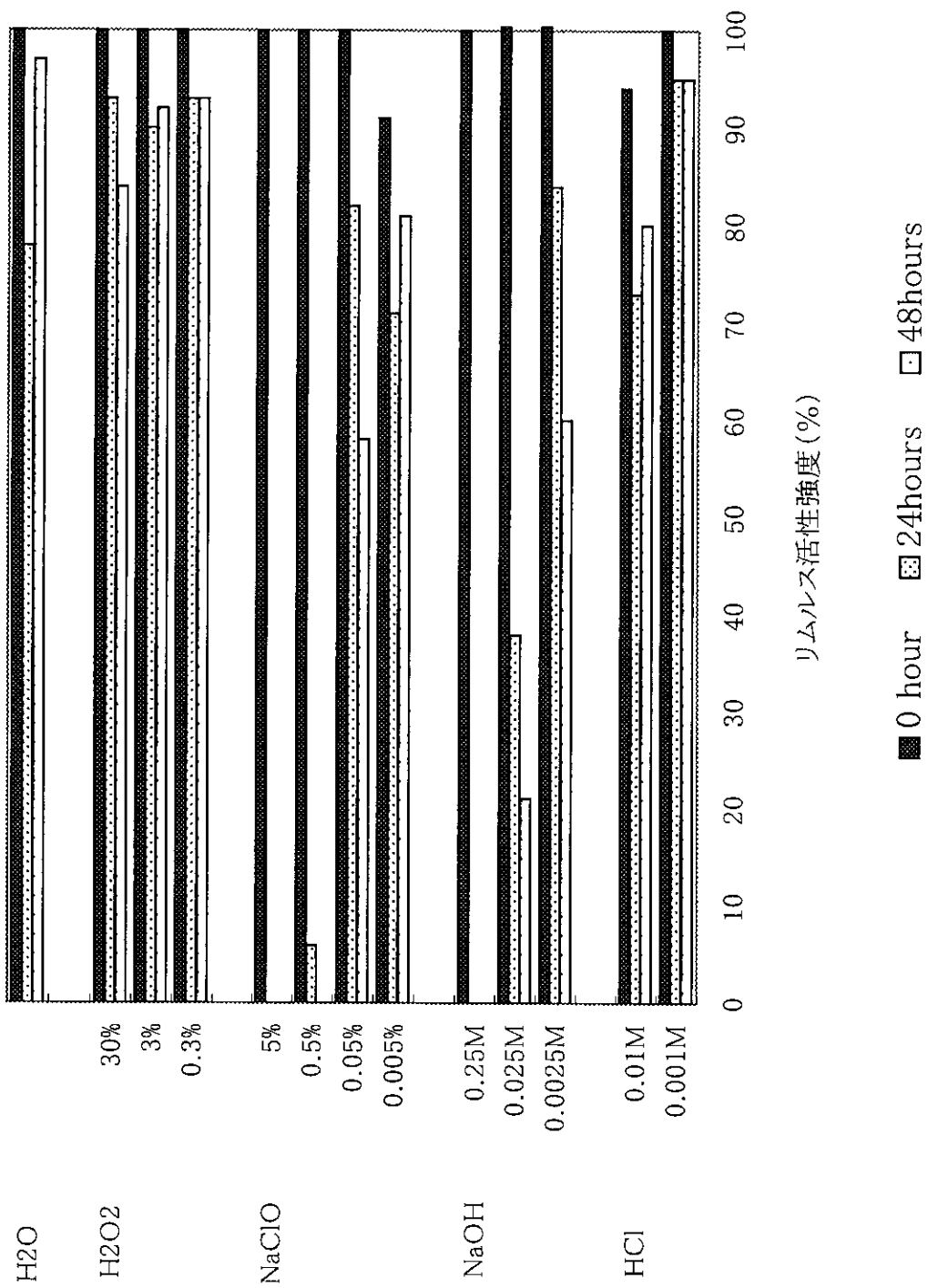


図20. 菌体レベルのリムルス活性に対する各種薬剤の影響

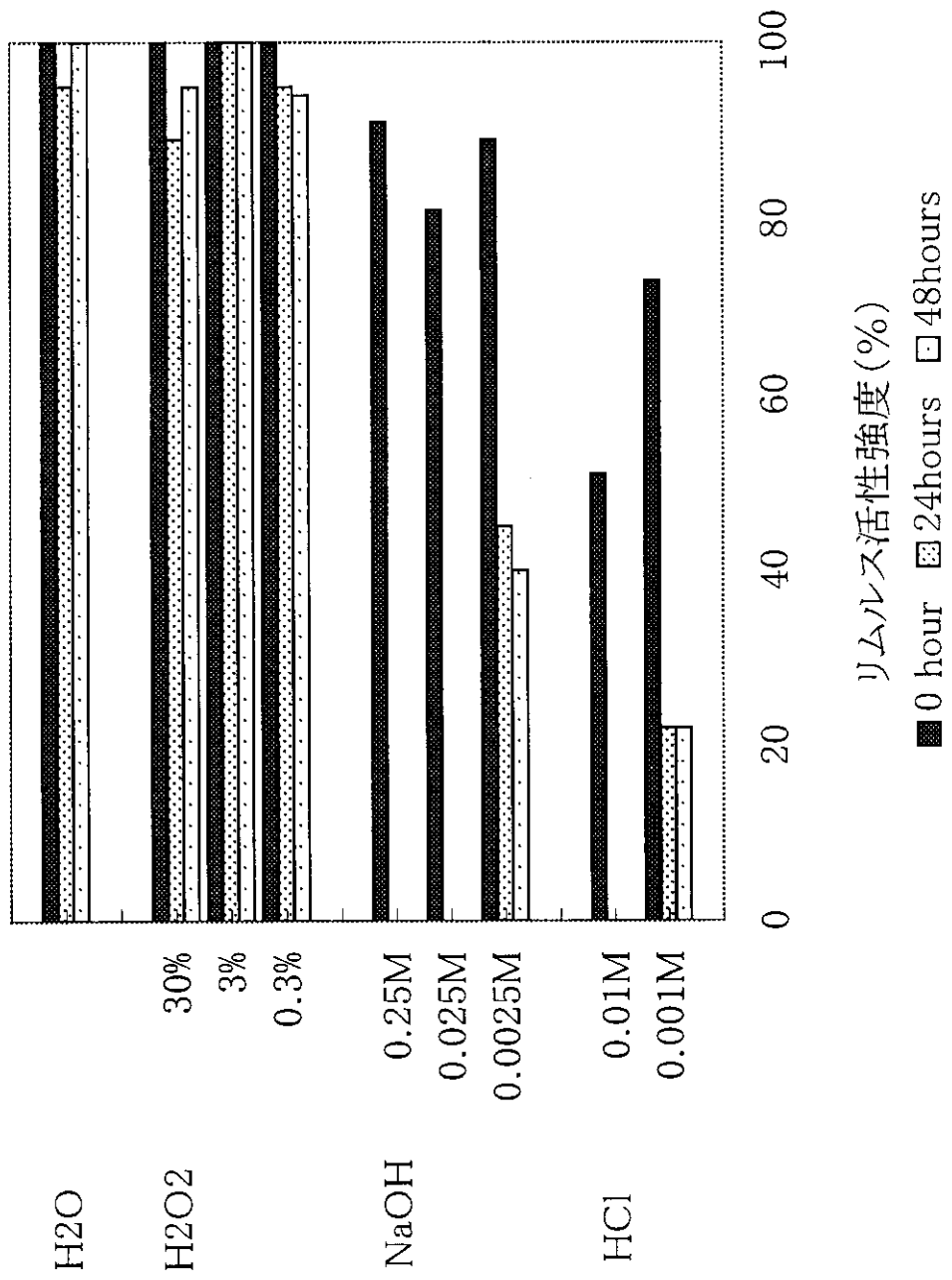


図21. リムルス活性に対する化学処理の影響

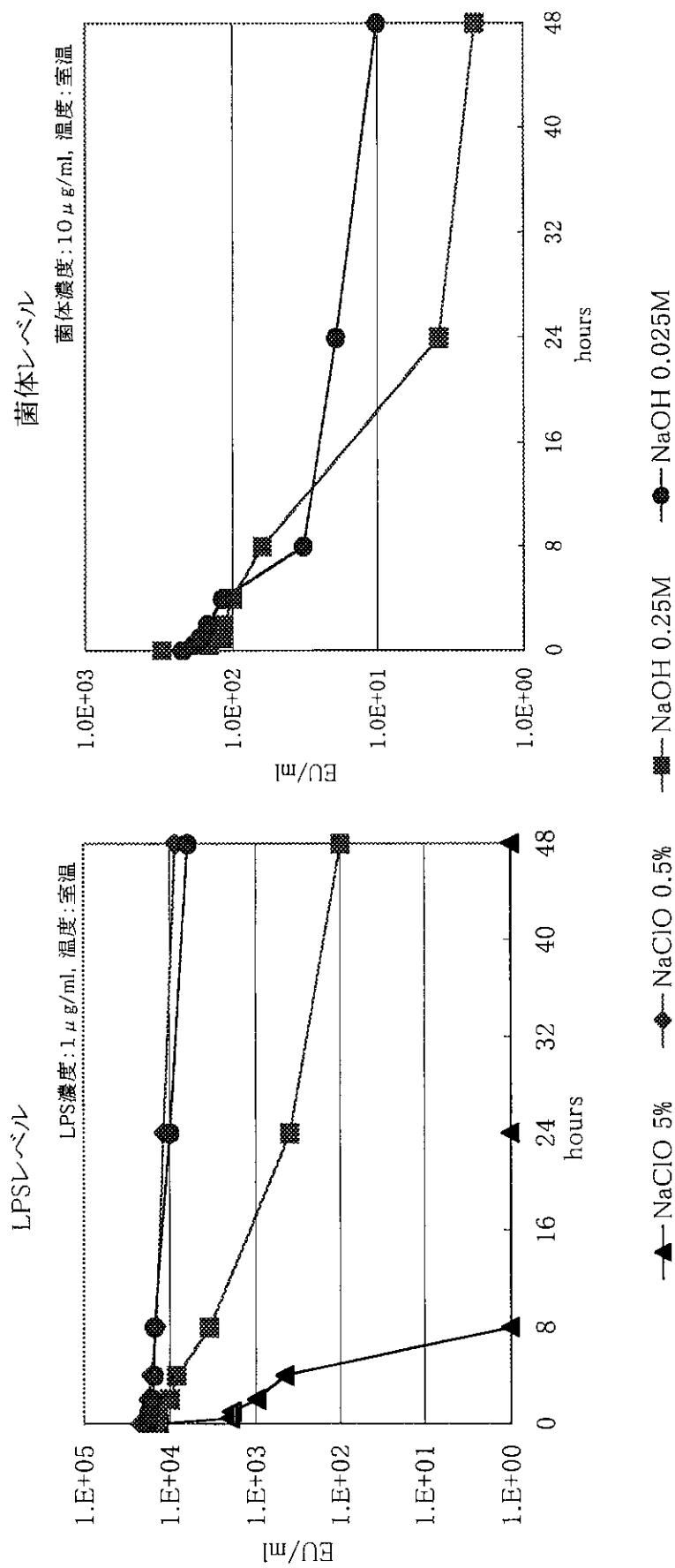


図 22. エンドトキシンの一般的化学構造

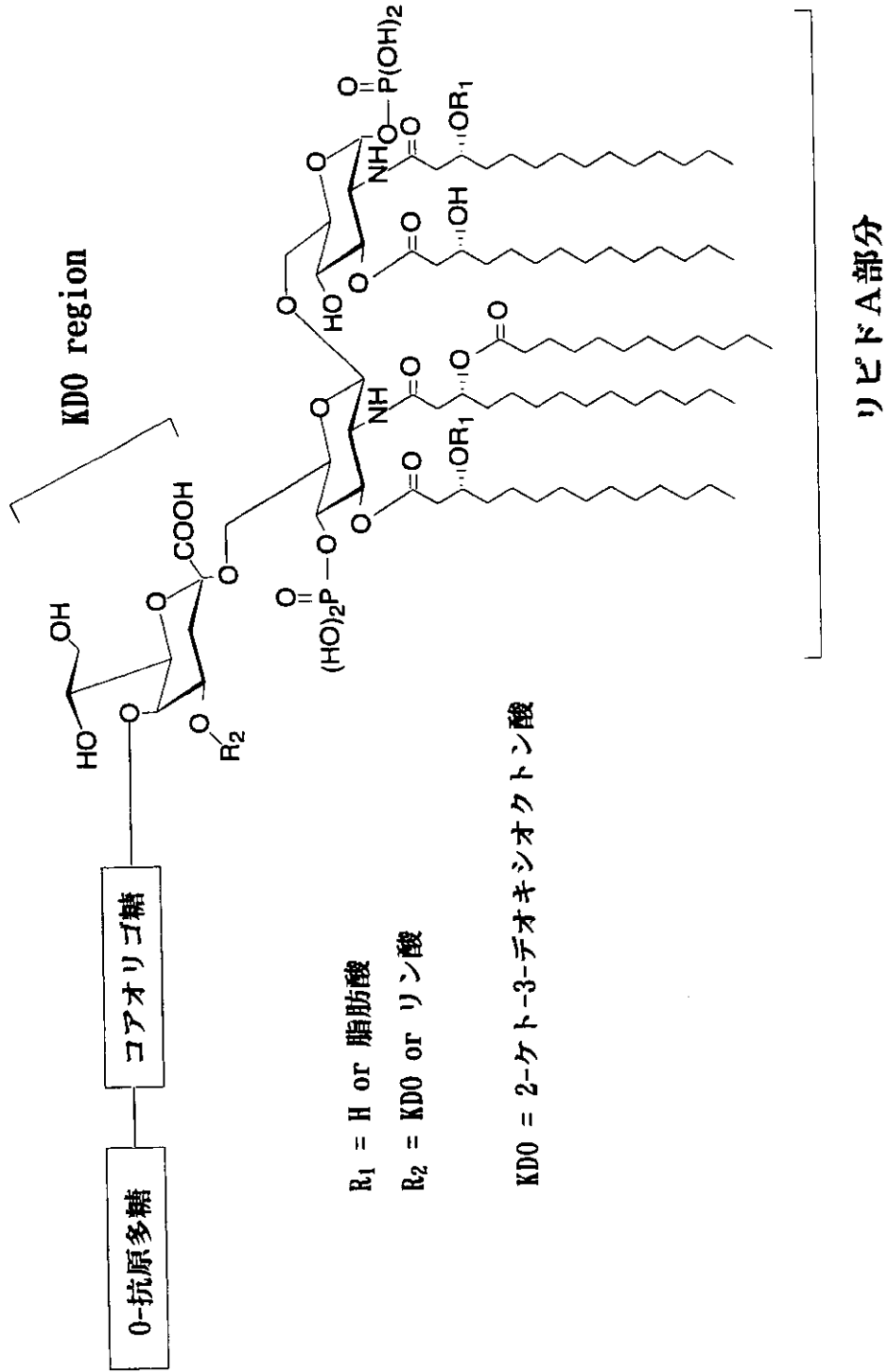


表1. 材料の組成

成分	(phr)		
	Sample A	Sample B	Sample C
NR	100	100	100
酸化亜鉛	5	5	5
ステアリン酸	1	1	1
充填剤	62	62	62
種黒サブ	5	5	5
サントイトS	1.3	1.3	1.3
硫黄	2.0	2.0	2.0
加硫促進剤			
MBT	2.0	0.2	-
ZDBC	-	-	0.5
合計	178.3	176.5	176.8

phr = parts per hundred parts of rubber.

NR = natural rubber.

サントイトS = selected microcrystalline wax, 表面亀裂防止剤(精工化学(株)).

表2. 皮膚反応の評点

(1) Erythema formation	
no erythema	0
very slight erythema	1
well-defined erythema	2
moderate to severe erythema	3
severe erythema with eschar formation	4
(2) Edema formation	
no edema	0
slight edema	1
moderate edema	2
severe edema	3
Total maximum	7

Sensitization rate = number of animals showing a positive reaction / number of animals tested.

Mean response = $\Sigma[(1) + (2)] / \text{number of animals tested.}$

表3. ゴム試料からのアセトン-クロロホルム抽出物とそのMBTおよびZDBC含量

(a) Sample A (MBT High)

Institute	Weight (g)		Extraction ratio		
	Sample	Extract	Extract/Sample	MBT/Extract (mg/g)	MBT/Sample (µg/g)
A	70	2.33	3.33%	50204 (5.0%)	1671 (0.17%)
B	20	0.83	4.38%	33385 (3.3%)	1355 (0.14%)
C	70	2.74	3.91%	45690 (4.6%)	1786 (0.18%)

(b) Sample B (MBT Low)

Institute	Weight (g)		Extraction ratio		
	Sample	Extract	Extract/Sample	MBT/Extract (mg/g)	MBT/Sample (µg/g)
A	70	2.29	3.27%	494 (0.049%)	16.16 (0.0016%)
B	20	0.74	3.70%	593 (0.059%)	22.64 (0.0023%)
C	70	2.74	3.92%	209 (0.021%)	8.17 (0.00082%)

(c) Sample C (ZDBC)

Institute	Weight (g)		Extraction ratio		
	Sample	Extract	Extract/Sample	ZDBC/Extract (mg/g)	ZDBC/Sample (µg/g)
A	70	1.87	2.67%	170269 (17.0%)	4549 (0.45%)
B	20	0.67	3.33%	68 (0.0068%)	2.24 (0.00022%)
C	70	2.18	3.11%	102 (0.0102%)	3.17(0.00032%)

表4. オリーブ油抽出液のモルモットMaximization test (GPMT) (機関A)

Sample	Mean response/positive rate			
	48 h		72 h	
A	2.4	100%	2.0	100%
B	2.4	100%	1.8	100%
C	0.4	20%	1.0	100%

Induction		Challenge (Mean response/positive rate)							
		A		B		C		Olive oil	
Olive oil	48 h	0.6	60%	0.6	60%	0.4	40%	0.2	20%
	72 h	0.8	80%	1.0	100%	0.8	80%	0.4	40%

抽出原液100%で感作した後、抽出原液をそのまま24時間閉塞パッチして惹起した。惹起後、48および72時間後の皮膚反応を観察した。

表5. アセトン-クロロホルム抽出物のモルモットMaximization test (GPMT)(機関A)

Sample	Challenge concentration (in vaseline, closed patch)									
	Mean response/positive rate									
	5%		1%		0.1%		0.01%		0.001%	
A	5.8	100%	3.8	100%	1.0	100%	0.2	20%	0	0%
B	4.2	100%	3.6	100%	1.0	100%	0.2	20%	0	0%
C	0.2	20%	0.2	20%	0	0%	0	0%	0	0%

抽出物を5%の濃度で感作した後、抽出物をワセリンに溶かして、24時間閉塞パッチして惹起した。惹起後、48時間後の皮膚反応を観察した。

表6. アセトン-クロロホルム抽出物のLocal lymph node assay (LLNA)(機関C)

Experiment 1							
Sample	Concentration	Lymph node weight		Cell number		³ HTdR incorporation	
		(mg)	SI	(x10 ⁶)	SI	(cpm)	SI
AOO		19.5		10.67		1241	
A	1%	24.5	1.26	13.32	1.25	2504	2.02
A	2.5%	22.1	1.13	13.12	1.23	3404	2.74
A	5%	23.6	1.21	14.58	1.37	4439	3.58
B	5%	23.8	1.22	19.20	1.80	4068	3.28
C	5%	20.4	1.05	14.10	1.32	1415	1.14
Experiment 2							
Sample	Concentration	Lymph node weight		Cell number		³ HTdR incorporation	
		(mg)	SI	(x10 ⁶)	SI	(cpm)	SI
AOO		19.4		13.36		1793	
A	5%	23.4	1.21	20.95	1.57	6769	3.78
B	1%	21.5	1.11	14.07	1.05	1030	0.57
B	2.5%	18.6	0.96	14.01	1.05	1432	0.80
B	5%	19.1	0.98	15.99	1.20	3720	2.08
C	1%	20.5	1.06	13.53	1.01	1057	0.59
C	2.5%	21.3	1.10	14.21	1.06	1787	1.00
C	5%	23.6	1.22	20.45	1.53	3573	1.99
Experiment 3							
Sample	Concentration	Lymph node weight		Cell number		³ HTdR incorporation	
		(mg)	SI	(x10 ⁶)	SI	(cpm)	SI
AOO		22.1		14.92		1647	
A	5%	23.1	1.05	20.64	1.38	4114	2.50
B	5%	23.6	1.07	17.36	1.16	4827	2.93
C	5%	20.7	0.94	9.38	0.63	1084	0.66

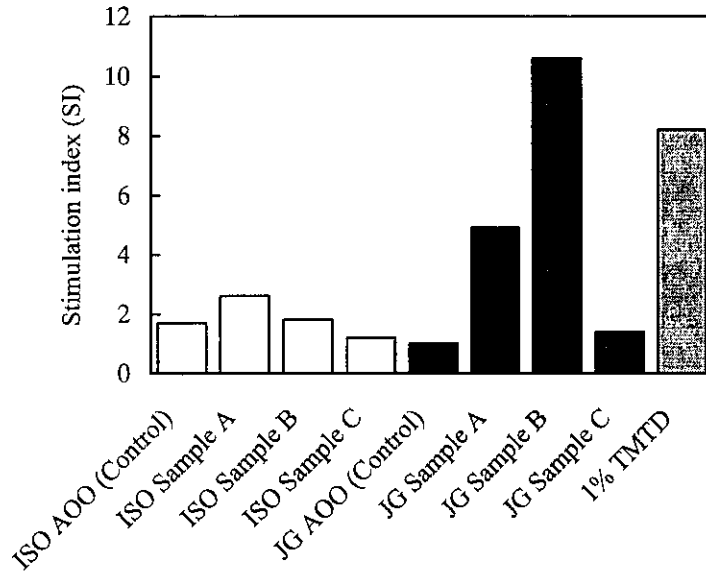


図 23. 機関 D における Local lymph node assay の結果

ISO=オリーブ油抽出液 100%原液.JG=アセトン-クロロホルム抽出物を 5%濃度
にアセトン-オリーブ油(AOO)に溶解したもの.TMTD=tetramethylthiurum
disulfide.

対照群(AOO)は 6 匹、試験群は 4 匹とした。上記試験物質の塗布前に、1% sodium
dodecylsulfate 溶液で耳を前処理した。試験溶液は 3 日間連続で耳に塗布した後、
最終塗布の 3 日後、耳介リンパ節を取り出し、動物ごとに分け、リンパ節細胞を遊
離、³HdR を加えて培養し、細胞の取り込まれた ³HdR(dpm)を測定した。

表7. BALB/cマウスへのovalbumin (OVA)の投与方法

Group	Injection chemical	Volume (μl)	Injection time
1	10 μg OVA + 2 mg Alum in PBS	200	1
2	2 mg Alum in PBS	200	2
3	10 μg OVA + 2 mg Alum in PBS	200	2
4	PBS	250	2
5	5 mg OVA in PBS	250	2

Groups of mice (n=5) were received each volume of test chemical dissolved in
phosphate-buffered saline (PBS) via intraperitoneal (i.p.) injection.

7 days later, the treatment was repeated in Groups 2-5.

Seven days after the final injection, blood and spleen per animal were collected.

表8. OVAを投与したマウスの脾臓重量と相当重量比

Group	Treatment	Body weight (g)	Spleen weight (g)	Spleen/Body (×1000)
1	10 µg OVA + 2 mg Alum, 1 time	N.D.	0.120 ± 0.021	N.D.
2	2 mg Alum, 2 times	20.17 ± 1.09	0.115 ± 0.019	5.70 ± 0.69
3	10 µg OVA + 2 mg Alum, 2 times	20.16 ± 0.67	0.117 ± 0.016	5.80 ± 0.65
4	PBS, 2 times	20.39 ± 0.86	0.097 ± 0.006	4.77 ± 0.34
5	5 mg OVA in PBS, 2 times	20.05 ± 0.66	0.120 ± 0.011 **	6.00 ± 0.50 *

N.D. = not determined.

OVA in PBS-treated group showed significant difference as compared to PBS-treated group

(* p < 0.05, ** p < 0.01).

表9. OVA投与したマウスの脾臓リンパ球の各種mitogenおよびOVAに対する幼若化反応

(a) with adjuvant

Stimulant	³ HTdR incorporation (dpm)	
	Control (Group 2)	OVA (Group 3)
—	510.8 ± 150.1	465.8 ± 108.1
ConA	22761.2 ± 7171.9	27303.7 ± 11392
LPS	16400.9 ± 3649.7	16088.8 ± 3345
PHA	19083.5 ± 4752.7	25537.7 ± 4153
OVA	2147.2 ± 803.7	7269.5 ± 3818 *

(b) without adjuvant

Stimulant	³ HTdR incorporation (dpm)	
	Control (Group 4)	OVA (Group 5)
—	595.4 ± 278.5	882.7 ± 221.2
ConA	34861.9 ± 9356.4	29438.6 ± 5218.6
LPS	13220.0 ± 2147.2	10244.3 ± 1932.4
PHA	17890.9 ± 4027.6	15598.9 ± 721.6
OVA	2699.2 ± 1662.7	5757.1 ± 1427.8 *

Groups of mice (n=5) received OVA or PBS with or without Alum adjuvant by intraperitoneal injection. Same treatment repeated 7 days after. Fourteen days after the initial treatment, mice were killed and spleen cells were corrected. These cells were restimulated with 2 µg/ml Con A, 1 µg/ml LPS, 10 µg/ml PHA or 100 µg/ml OVA at a final concentration at 37°C for 72 h. After incubation, the cells were pulsed for 4 h with ³HTdR, and ³HTdR incorporation was measured. Each value represent the mean±S.D..

* OVA-treated group showed significant difference as compared to control group (p < 0.05).

表10. OVAを投与したマウスの血清総IgE抗体価

Group	Treatment	Total IgE concentration ($\mu\text{g/ml}$, mean \pm S.D.)
1	10 μg OVA-Alum 1 week	1.341 \pm 1.186
2	Alum 2 weeks	0.624 \pm 0.190
3	10 μg OVA-Alum 2 week	3.082 \pm 0.907
4	PBS 2 weeks	0.544 \pm 0.154
5	5 mg OVA-PBS 2 weeks	0.494 \pm 0.192

n = 5.

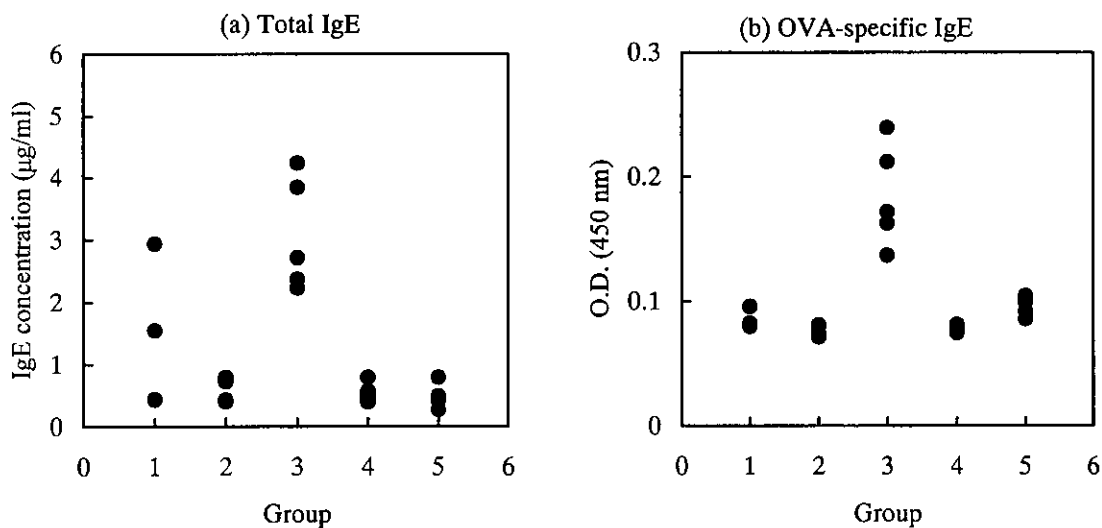


図 24. OVA を投与したそれぞれのマウスの血清総 IgE および OVA 特異的 IgE 抗体価

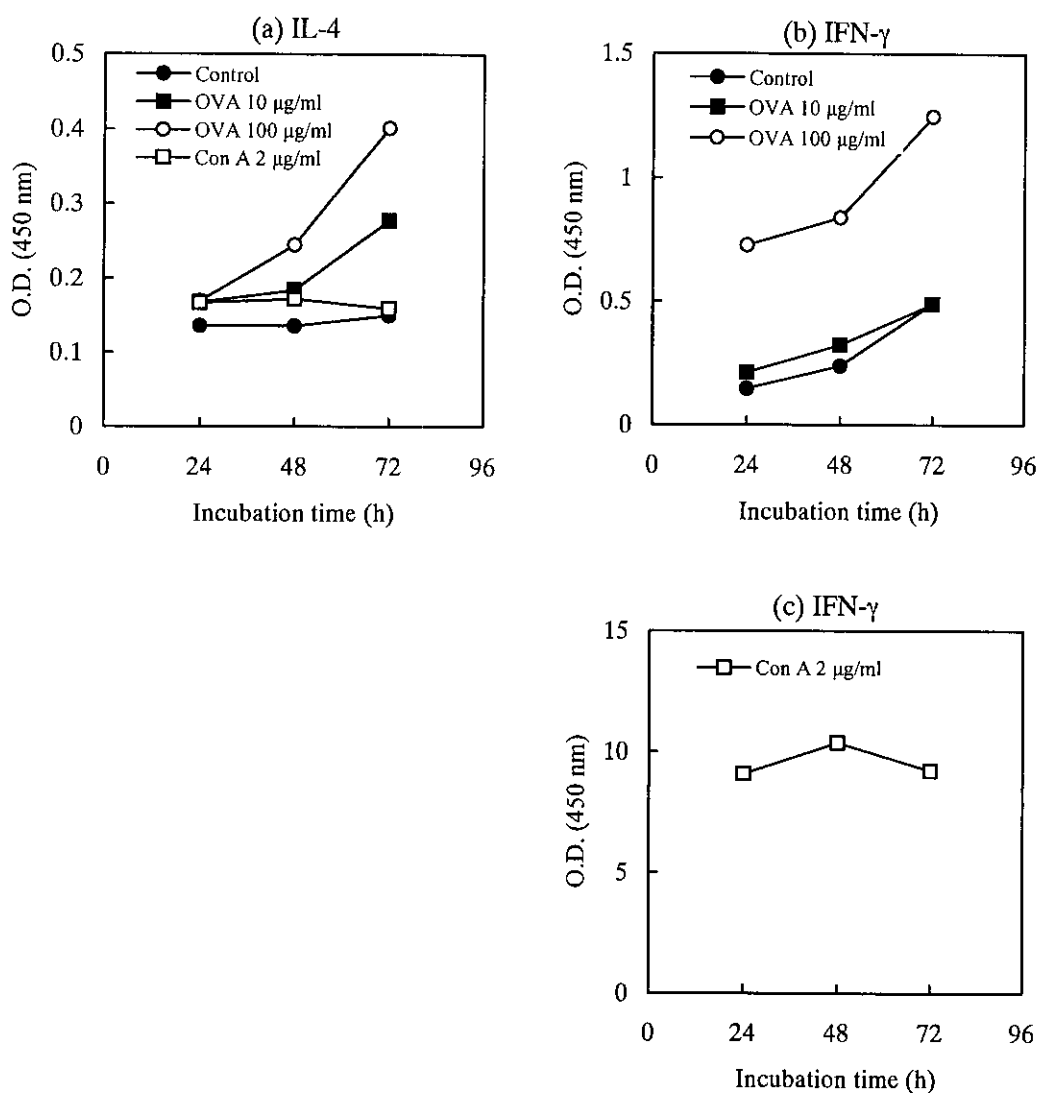


図 25. 脾臓リンパ球からのサイトカイン生産パターン

10 µg OVA + 2 mg Alum in PBS 200 µl をマウスに1週間に1回、計2回腹腔内注射した(Group 3)。最終投与から7日目、脾臓を取り出しリンパ球を遊離させて、 5×10^6 /mlの割合で24穴プレートに入れ、種々の濃度のOVAまたはCon A 2 µg/mlを添加して、24~72時間培養した。培養上清を遠心して集め、IL-4およびIFN-γ量をELISA法により定量した。

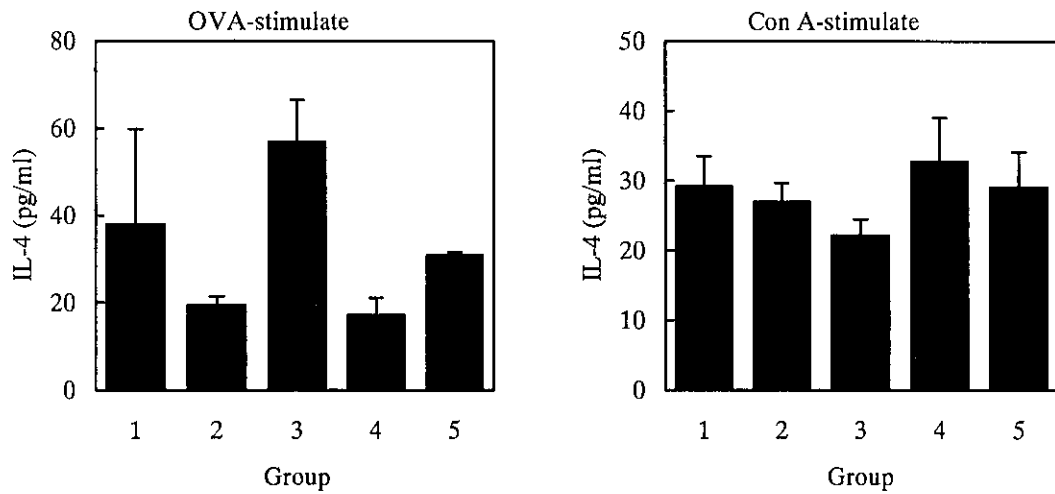


図 26. 各種条件で OVA を投与したマウス脾臓リンパ球の OVA または Con A 刺激による IL-4 産生

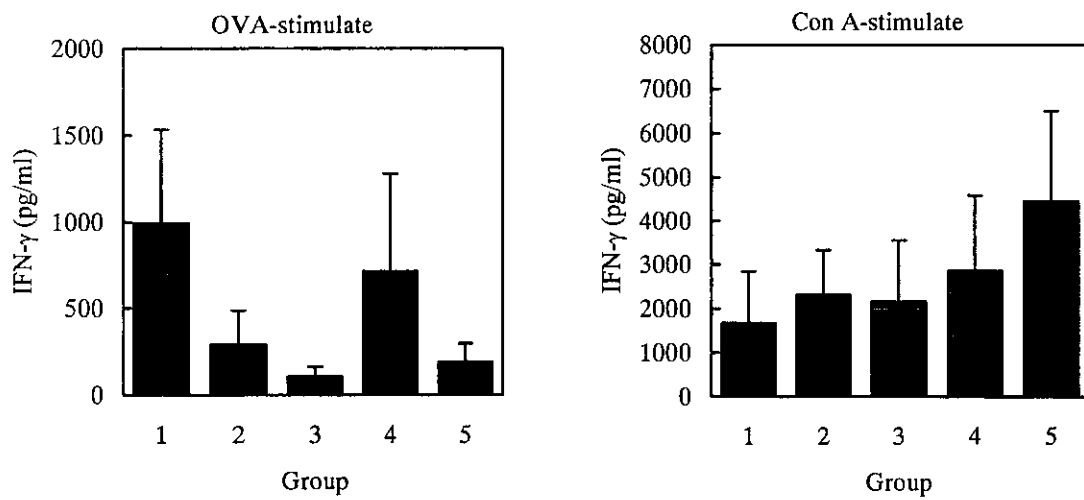


図 27. 各種条件で OVA を投与したマウス脾臓リンパ球の OVA または Con A 刺激による IFN- γ 産生

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確保および評価手法の開発に関する研究

分担研究者 ⁺配島 由二 国立医薬品食品衛生研究所療品部第一室

研究要旨：天然由来医用材料は、高い生体適合性を持つ反面、品質管理が難しい欠点がある。近年、我々は、ラテックス、コラーゲン、アルギン酸塩類などから製造された各種製品に相当量のエンドトキシン（lipopolysaccharide, LPS）汚染があることを証明したと共に、現行の生物学的試験ガイドラインに記載されている発熱性物質試験法では、同製品中のLPS量を正確に評価できないことを明らかにした。そこで、平成13年度の本研究では、LPSの熱安定性の再評価を行い、LPSを失活させずに回収する加温抽出条件について検討した。また、より安全性の高い製品開発に応用可能なLPSの不活化法を開発することを目的として、温和な化学処理によるLPSの活性変化についても検討した。

LPS回収法の開発に関する研究において、LPS活性は抽出温度の上昇に伴って顕著に低下することが確認された。この活性低下には、少なくともLPSの活性本体であるリポドA部分に存在するグリコシド結合型リン酸基の脱離が関与している。60℃以上の抽出では、いずれの溶媒を使用してもLPSの活性低下が観察された。しかし、40℃での抽出においては、0.1Mリン酸緩衝液（pH 7.0）、ヒト血清アルブミン溶液およびPEG溶液を使用すると同活性が比較的保持されることが判明し、特に、PEG溶液中では殆ど失活しないことが明らかになった。一方、LPSの不活化法の開発に関する研究において、LPSの生物活性は、有効塩素濃度300 ppm以上の酸性電解除菌水または0.25M水酸化ナトリウムを用いて、室温下、24-48時間処理すると顕著に抑制されることが明らかとなった。また、この活性低下は菌体レベルよりも、精製LPSレベルにおいて顕著に観察されたことから、同処理によるLPSの不活化は、混入している菌体をメンブランフィルター濾過により使用して事前に除去した後に行う方が効率的であることも明らかとなった。

A. 研究目的

コラーゲン、キチン・キトサンおよびアルギン酸塩などの天然由来物質は高い生体適合性を持つことから、医療用具または医用材料として広く利用されている。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行われており、細胞培養用マトリックスや人工臓器材料（肝臓細胞、膵臓細胞の封入用カプセル基材など）への応用など、天然由来材料の用途は益々多様化して来ている。その一方、これらの医用材料は天然由来ゆえの問題点を持っている。共通の問題点としては、1)原料に何らかの微生物汚染の可能性がある、2)滅菌法が制限される、3)抗原性や免疫系への影響がある、4)原料の品質保証が難しいなどが挙げられる。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、浸潤、脳血腫、浸潤性骨髄圧迫、胸水および腹水誘導による治癒の遅延やアナフィラキシーなど種々の副作用が報告されている。

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、天然由来材料或いは天然由来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。これらの諸問題を解決する第1のアプローチ

として、現在我々は、天然医用材料の安全性確保は勿論、天然由来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に関して検討している。

発熱性物質には、直接的に発熱中枢神経を刺激するもの、炎症性サイトカインやプロスタグランジンなどの内因性物質の産生を促進することにより発熱を誘導するもの、酸化リン酸化の脱共役により酸化的代謝を刺激し、生体の熱産生を促進させるものが存在する。中でも、グラム陰性細菌の菌体表層成分であるエンドトキシン (lipopolysaccharide, LPS) は極微量で強力な発熱活性を示す代表的な発熱性物質である¹⁾。LPSは、発熱活性に加え、マクロファージ活性化能(各種サイトカイン産生誘導能)、ミトジェン活性、シュワルツマン活性、致死毒性およびショックなどの様々な生物活性を示すことが知られており、医療分野において、代表的な発熱性物質であると共に、致命的疾患である多臓器不全やエンドトキシンショックを惹起する原因物質として周知されている²⁾。それ故、天然医用材料、特に血液に直接接触するまたは生体内で使用する製品材料、並びに組織工学用マトリックスとして細胞培養に使用する基材中のLPS汚染状況は正確に評価されなければならない。また、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できるが、菌体成分であるLPSは通例の滅菌条件では分解を受けず、その除去も困難である。通常、LPSの不活化は加熱処理(250℃・1時間)により行うが、同処理を天然医用材料の脱パイロジェン法として利用することは不可能である。しかし、より安全性の高い製品を開発するためには天然医用材料に混入するLPSを除去または不活化する必要性がある。

我々は、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ついて検討しており、現在までに、ラテックス製品の使用によって惹起される発熱が同製品中に混在するLPSに由来することを化学分析および各種生物試験により証明した³。また、各種の化学的・生物学的手法を用いて、コラーゲン、キチン・キトサン、アルギン酸塩類およびポリ-L-ロイシンなどから構成される20種類を越す医療製品のLPS汚染状況について詳細に検討し、コラーゲン製品およびアルギン酸塩類製品を中心に相当量のLPS汚染があることを明らかにしている⁴。これらのサーベイ試験において、現行の生物学的試験ガイドライン⁵に記載されている抽出方法(室温・72時間・放置)では発熱性陰性と判定される製品であっても、50℃・24時間加温振とう抽出すると顕著な発熱活性が観察されることを見出した。LPSはグラム陰性細菌の菌体表面に局在する耐熱性抗原であるが^{1,2}、低濃度のエンドトキシンは加熱により失活するという報

告があるため^{6,7}、現行のガイドラインでは室温抽出を行うように規定されている。しかし、本サーベイ試験の結果から判断する限り、現行の発熱性物質試験法において指定されている室温抽出では、同製品中のLPS量を正確に評価することは不可能である。そこで、平成13年度の本研究では、天然医用材料からのエンドトキシン回収法を確立するための基礎研究として、微量LPSの熱安定性の再評価を行い、LPSを失活させずに回収する加温抽出条件(溶媒、温度、時間)について検討した。また、アルギン酸ナトリウムなどの水溶性多糖類からのLPS回収は比較的容易であると思われるが、架橋化コラーゲンやキチンなど水溶性の低い医用材料の場合、事前に水溶性を高める前処理を行うとLPS回収が容易になるものと思われることから、コラーゲンからのLPS抽出における前処理法について検討した。更に、より安全且つ有用な製品開発に実際に応用できる温和な条件下でのLPS不活化法を開発するため、LPSの代表的な生物活性であるリムルス活性を指標として、酸性電解除菌水処理を初めとした幾つかの化学処理によるLPSの活性変化に関して検討した。

B. 研究方法

(1) 菌体およびLPSの調製

大腸菌 0111 株を普通ブイヨン培地中、37℃、16時間振とう培養後、培養

液の pH を中性に調整し、100℃、10 分間加熱して殺菌した。同加熱死菌体を遠心分離により集菌し、蒸留水で 3 回洗浄した後、アセトン乾燥菌体とした。大腸菌 03 K2a, K2b:H3 ATCC 株由来 LPS は、同様の方法により調製したアセトン乾燥菌体からフェノール/水法により抽出し、DNase および RNase 処理後、超遠心分離の反復により精製した^{8,9}。

(2) 隔膜式電気分解法による酸性電解除菌水の生成

2-1. 酸性電解除菌水の調製

図 1 に示したように、酸性電解除菌水は隔膜を介して食塩水を電気分解することにより調製した。アノード側では塩素イオンから Cl_2 が生成される。 Cl_2 は水と反応して、 HClO と HCl を生じ、酸性の HClO 溶液が生成される。一方、カソード側には、強アルカリ性の NaOH 溶液が生成される。

アノード側の強酸性水には ClO^- よりも除菌力が高い HClO が含まれ、カソード側の強アルカリ水を任意の割合で混合することにより、有効塩素濃度が高い pH 2~7 の酸性電解除菌水を調製することが可能となる。本実験では、有効塩素濃度 1,000 ppm 前後の強酸性 (pH 2) および弱酸性 (pH 6) 電解除菌水を調製した。調製した酸性電解除菌水は密封容器 (スミロンチューブ: 住友ベークライト社製) 中、冷暗所において保管し、可能な限り早急に実験に供した。

NaCl (試薬特級品)、ガラス製および金属製実験器具類は 250℃ (乾熱状態) で 1 時間加熱して脱パイロジェン処理した。また、プラスチック製実験器具類にはパイロジェンフリーの製品を使用した。

2-2. 有効塩素濃度および pH の測定

Mili-Q 水 30ml にヨウ化カリウム 2g および酢酸 3 ml を溶解し、被測定液である酸性電解除菌水 0.5 ml を加え、攪拌下、自動滴定装置 (平沼産業製 COM-450) を使用して、0.002 mol/l チオ硫酸ナトリウムによる滴定分析を行って有効塩素濃度を測定した。pH はガラス電極式水素イオン濃度計 (堀場製作所製 pH METER D-13) を用いて計測した。

(3) リムルス活性の測定

リムルス活性は、第 14 改正日本薬局方「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¹⁰。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 (大腸菌 055:B5 株 LPS) を用いた。測定装置としては、SK603 マイクロプレートリーダー (生化学工業) を使用した。反応干渉因子試験も日本薬局方の記載に準じて行った。

(4) 微量 LPS の熱安定性評価

試験溶媒として、注射用蒸留水（大塚製薬）、滅菌生理食塩水（大塚製薬）、0.1M リン酸緩衝液（pH 7.0）、0.1M リン酸二水素カリウム／ホウ砂緩衝液（pH 7.0）、0.1M リン酸二水素カリウム／水酸化ナトリウム緩衝液（pH 7.0）、0.1M トリメチルピリジン／塩酸緩衝液（pH 7.0）、0.1M トリス塩酸緩衝液（和光純薬）、ヒト血清アルブミン溶液（和光純薬）、PEG（0.004%ポリエチレングリコール／0.5 mM EDTA／0.01% Tween 60, 生化学工業）を使用した。各溶媒に LPS（10 EU/ml）または大腸菌 0111 菌体（1・g/ml）を溶解または懸濁させ、種々の温度で 0 - 72 時間インキュベートした後、リムルス活性を測定した。

(5) コラーゲンからの LPS 回収に関する前処理条件

プロテアーゼとして、Sigma 社製の collagenase 1-S, collagenase 1A-s, pepsin, papain, trypsin, α -chymotrypsin, β -chymotrypsin, γ -chymotrypsin を使用した。Collagenase 活性は FITC 蛍光標識コラーゲンを使用した I 型コラーゲナーゼ活性測定キットにより測定した。パピンの酵素活性は、0.05M トリス／塩酸緩衝液（pH 7.5）中、酵素分解によって、N- α -ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリンから生成する p-ニトロアニリンの量を 410nm における吸光度として測定した。また、その他の各種プロテアーゼの酵素活性は

ヘモグロビンを基質して測定した。各種プロテアーゼの不活化剤としては、種々の濃度の中性ホルマリリンとフェノールを使用し、また、これらの薬剤を使用することなく、40°C・24 - 48 時間の単純インキュベートによる酵素活性変化も追跡した。中性ホルマリリンおよびフェノール処理による LPS 活性の変化はリムルス試験により測定した。各種プロテアーゼの脱パイロジエン処理は LPS 除去カラム（デトキシゲルカラム, Pierce）を使用した行った¹¹。

(6) 化学処理による LPS の不活化実験

化学薬品として、弱酸性および強酸性電解除菌水、塩酸、水酸化ナトリウム、過酸化水素、次亜塩素酸ナトリウムを使用した。種々の濃度の各薬品に LPS または大腸菌 0111 菌体を溶解または懸濁させ、室温にて 24 - 48 時間インキュベートした後、処理液を注射用蒸留水で希釈し、リムルス活性を測定した。

(7) LSI-mass spectrometry

リピド A の liquid secondary ion (LSI)-マスマスペクトルは、VG analytical 社製 ZAB-2SEQ を使用し、negative ion mode、加速電圧 8 kV、分解能 1,000 で測定した。マトリックスとしては、m-ニトロベンジルアルコール／トリエタノールアミン混液（1:1, v/v）を使用した¹²。

C. 研究結果

(1) LPS の熱安定性に関する再評価

先に示したように、LPS は耐熱性の菌体抗原として知られているが^{1,2}、低濃度の LPS は加熱処理により失活することが報告されている^{6,7}。しかし、天然医用材料から製造された創傷被覆材の LPS 汚染サーベイ試験において、室温抽出よりも加温条件下にて抽出を行った方が効率よく LPS を回収できることが明らかになっていることから⁴、LPS の熱安定性について再評価を行った。

1-1. LPS 活性に対する加温処理の影響

予備試験として、生物学的試験ガイドライン⁵において抽出溶媒として指定されている滅菌生理食塩水、サーベイ試験で使用した注射用蒸留水の他、5種類の緩衝液と2種類の LPS 回収用溶媒（研究方法（4）参照）を使用して100℃、30分間加熱処理を行った結果、いずれの溶媒を使用しても LPS のリムルス活性は顕著に低下することが確認された。次いで、注射用蒸留水、滅菌生理食塩水、リン酸緩衝液、トリス/塩酸緩衝液、ヒト血清アルブミン溶液および PEG 溶液中、室温、40℃、60℃、80℃にて1時間処理した際のリムルス活性強度の変化を追跡した。図2に示したように、LPS レベルのリム

ルス活性は、トリス/塩酸緩衝液中、40℃で処理することにより、およそ50%まで低下し、60℃以上の処理では同活性が全く回収されないことが判明した。その一方、LPS 回収用溶媒であるヒト血清アルブミン溶液および PEG 溶液中における LPS の熱安定性は比較的優れており、ヒト血清アルブミン溶液では60℃、PEG 溶液では80℃までの処理を行っても LPS レベルのリムルス活性に影響を与えないことが明らかになった（図2）。また、注射用蒸留水、滅菌生理食塩水、リン酸緩衝液中における LPS の熱安定性は、これら2種類の LPS 回収用溶媒と比較して若干劣るものの、LPS レベルのリムルス活性は40℃での処理により、70 - 95%程度保持されることが確認された（図2）。

加温処理による菌体レベルのリムルス活性の変化について同様に検討し、その結果を図3に示した。菌体レベルのリムルス活性の熱安定性は LPS レベルと同じ傾向を示し、トリス/塩酸緩衝液中で加温処理を行うと顕著に低下することが判明した。その一方、ヒト血清アルブミン溶液および PEG 溶液中では比較的安定であり、加温温度を60℃まで上昇させても、ほぼ100%の活性が回収されることが明らかになった。注射用蒸留水の場合は40℃の処理では菌体レベルのリムルス活性に影響を与えないが、60℃以上の温度では同活性の回収率が徐々に低下する傾向が認められた。また、滅菌生理食塩水中では、40℃の処理により、リ