

ムルス活性の回収率がおよそ 60%まで低下した (図 3)。

これらの成績から、加温処理による LPS 活性への影響が比較的少ないと思われるリン酸緩衝液、ヒト血清アルブミン溶液および PEG 溶液について更に詳細に検討した。図 4 に示したように、LPS レベルのリムルス活性は、これら 3 種類の溶媒中、室温で 72 時間放置しても、ほぼ完全に保持された。その一方、同活性は処理温度を上昇させるに従って徐々に低下し、LPS レベルのリムルス活性の回収率は、60℃・24 時間の処理により、リン酸緩衝液では 10% (図 4a)、ヒト血清アルブミンでは 40% (図 4b)、PEG 溶液では 60% (図 4c) まで低下した。また、80℃での処理の場合、同活性はいずれの溶媒を用いても 24 時間後には検出限界以下まで低下した。しかし、40℃での加温条件下では、LPS 活性が保持される傾向が見られ、リン酸緩衝液では 24 時間、ヒト血清アルブミン溶液では 48 時間、PEG 溶液では 72 時間まで処理してもリムルス活性の回収率に大きな変化は認められなかった (図 4)。

#### 1-2. 加温処理による LPS の構造変化

上記の成績により、LPS のリムルス活性は加温処理により低下することが確認されたが、この活性低下を招く要因を LPS の構造変化を追跡することにより検討した。大腸菌型合成リピド A (506) をリン酸緩衝液に溶解し、室温、40℃、60℃、80℃、100℃で 1 時間処理した後の LSI-マススペクト

ルを図 5 に示した。506 の分子量は 1,797 であり、未処理の場合は  $m/z$  1,796  $[M-H]^-$  および  $m/z$  1,928  $[M-H+Cs]^-$  が分子イオンとして観測されると共に、グリコシド結合の解離に基づく娘イオンが  $m/z$  692,  $m/z$  710,  $m/z$  738 に検出される。また、リン酸緩衝液中で処理を行うと、 $[M-H]^-$  イオンに加え、Na が付加した分子イオンが  $m/z$  1,818 に観測されるようになる。図 5 に示したように、リン酸緩衝液中、室温で 1 時間放置しても 506 の LSI-マススペクトルは未処理の 506 と同様であり、構造的な変化は認められなかった。しかし、処理温度を上昇させると、分子イオンが徐々に減少し、100℃で処理した 506 では分子イオンが殆ど観測されなかった。また、イオン強度は低いものの、処理温度が上昇するに従って、分子イオンからリン酸基が脱離した  $m/z$  1,716 が検出された。

大腸菌 LPS について同様な実験を行った結果、いずれの処理温度においても LPS インナーコア部分に存在する KDO (2-keto-3-deoxy-octonate) 分子のケトシド結合の解離に基づくリピド A 分子 ( $m/z$  1,796  $[M-H]^-$ ) の遊離は認められなかった (図 6)。

#### (2) コラーゲンからの LPS 回収に関する前処理法の検討

コラーゲンは LPS との結合親和性が高いと共に、中性付近における水溶性が低い性質を持つため、コラーゲンから LPS を効率良く回収するには、少

なくとも水溶性を上昇させるなどの前処理を施す必要がある。コラーゲンを低分子化し、その水溶性を上昇させる手法としては酵素消化が第一に考えられるが、リムルス反応はプロテアーゼにより惹起される一連の酵素反応であるため、コラーゲンを消化するためにプロテアーゼを使用する場合は各酵素標品のLPS混入状況を調べると共に、酵素自体のリムルス反応に対する影響を検討する必要がある。そこで、コラーゲンからのLPS回収に関する前処理法を開発する目的で、各種プロテアーゼのリムルス活性、LPS活性に影響を与えない各種プロテアーゼの不活化法などについて検討した。

#### 2-1. 各種プロテアーゼのリムルス活性

高濃度のプロテアーゼ、特にトリプシンはリムルス反応に大きな影響を与えることが確認されたことから、反応干渉因子試験を行い、リムルス反応に影響を与えない濃度まで希釈した後、各プロテアーゼ中に含まれるLPS量を測定した。図7に示したように、コラーゲナーゼ、ペプシンおよびトリプシンのLPS含量は非常に高く、特に、コラーゲナーゼ1A-S標品は780.1 EU/mgのLPSを含んでいることが判明した。また、ペプシン、 $\alpha$ -キモトリプシン、 $\beta$ -キモトリプシン、 $\gamma$ -キモトリプシンも3.1 - 5.6 EU/mgの微量のLPSを含んでいた。デトキシゲルカラムを使用して各プロテアーゼに混入しているLPSの除去を試みた結果、図8に

示したように、コラーゲナーゼ1A-S標品に含まれるLPSは同カラム処理により99%程度除去できることが判明した。しかし、デトキシゲルカラム処理によるLPSの除去効果はプロテアーゼの種類によって異なり、 $\alpha$ -キモトリプシンおよび $\beta$ -キモトリプシンでは、およそ84%のLPSが除去されるが、コラーゲナーゼ1-Sおよびトリプシンの場合、それぞれ42%および35%のLPSが残存することが明らかとなった。また、同カラム処理による各酵素の回収率にも差異があることが認められた。図9に示したように、トリプシンはデトキシゲルカラム処理を行ってもほぼ全量回収されるが、 $\alpha$ -キモトリプシン、 $\beta$ -キモトリプシン、コラーゲナーゼ1-Sおよびコラーゲナーゼ1A-Sの回収率は、それぞれ88%、83%、65%、54%であった。また、ペプシンは本カラム処理により、殆ど回収不能となることが明らかとなった。

#### 2-2. 各種プロテアーゼの不活化とLPS活性への影響

コラーゲンからのLPS抽出の前処理として酵素消化を利用する場合、相当量の酵素を使用するため、酵素処理後、適当な方法により酵素活性を失活させてから、リムルス試験によりLPS量を測定する必要がある。そこで、主にコラーゲナーゼに関し、酵素活性およびLPS活性に対する中性ホルマリンとフェノール処理の影響について検討した。中性ホルマリンおよびフェノールのリムルス反応に対する影響を調べ

た結果、ホルマリンでは 0.01%以下、フェノールでは 0.05%以下まで濃度を希釈すると阻害反応を受けることなくリムルス活性を測定できることが確認された。コラゲナーゼ活性に対するホルマリン処理 (20℃・30 分) およびフェノール処理 (37℃・10 分) の影響を検討した結果、コラゲナーゼ 1-S および 1A-S の活性は 1%ホルマリン処理または 1%フェノール処理により、失活させることが可能であった (図 10a, 10b)。また、図 11 に示したように、これらの薬剤を使用しなくとも、コラゲナーゼ 1-S および 1A-S の酵素活性は 40℃で 24 - 48 時間インキュベートすることにより 99%程度失活させることも可能であった。次いで、LPS 活性に対する種々の濃度のホルマリン処理およびフェノール処理の影響を検討した結果、図 12 に示したように、フェノール処理の場合、2%以下の濃度であれば、60 分までのインキュベーションにより、LPS 活性に影響を与えないことが判明した (図 12a)。また、LPS 活性はホルマリン処理に対して比較的安定であり、4%程度までは殆ど影響を与えず、10%まで濃度を上昇させても 80%程度の LPS 活性が回収されることが明らかとなった (図 12b)。

### (3) 温和な化学処理による LPS 不活化法の開発

#### 3-1. リムルス試薬に対する酸性電解除菌水の影響

リムルス反応は一連の酵素反応で

あるため、温度および pH により大きく影響されると共に、プロテアーゼ阻害剤、金属、界面活性剤、高濃度の塩類および糖質などによる阻害または促進効果を受けることが知られている<sup>13-26</sup>。そこで、種々の濃度の有効塩素を含有する酸性電解除菌水に既知量のエンドトキシンをスパイクしてリムルス活性を測定し、リムルス反応に影響を及ぼさない酸性電解除菌水濃度を求めた。スパイクしたエンドトキシンのリムルス活性の回収率は、注射用蒸留水にスパイクした既知量のエンドトキシンが示すリムルス活性を 100%として算出した。

図 13 に示したように、強酸性水 (pH 1.72・有効塩素濃度 352 ppm) および弱酸性水 (pH6.29・有効塩素濃度 348 ppm) 原液にスパイクしたエンドトキシンのリムルス活性強度は対照の 40 - 60% 前後であり、両原液共にリムルス反応の阻害作用を示したが、いずれの電解除菌水も希釈により有効塩素濃度を 3 ppm 程度まで減少させるとリムルス反応に対する阻害効果を示さないことが明らかとなった。本結果より、各サンプルのリムルス活性は有効塩素濃度が 3 ppm 以下になるように希釈した後、測定することとした。

#### 3-2. LPS および菌体に対する酸性電解除菌水の影響

酸性電解除菌水により LPS を不活化することが可能か判断するための予備試験として、LPS および菌体を種々の濃度の酸性電解除菌水中、室温にて

2日間インキュベートし、24時間および48時間後にリムルス活性を測定した。

図14aに示したように、強酸性水(pH 1.96・有効塩素濃度1,000 ppm)および弱酸性水(pH 6.50・有効塩素濃度1,250 ppm)共に、原液を使用した場合、LPSレベルのリムルス活性は24時間の処理でほぼ完全に失活したが、10倍および100倍希釈液は48時間処理においてもLPSに対する不活化効果を示さなかった。また、図14bに示したように、菌体レベルのリムルス活性に対する影響を検討した結果でも同様の成績が得られたことから、一定濃度以上の有効塩素を含有する酸性電解除菌水はLPS活性を不活化する効果を持つことが明らかとなった。

### 3-3. リムルス活性の消失と有効塩素濃度の相関性

LPSおよび菌体を種々の濃度の酸性電解除菌水で処理(室温・24時間)し、両サンプルのリムルス活性を不活化させるために必要な有効塩素濃度に関して検討し、その結果を図15に示した。

強酸性電解除菌水(pH 2.56)は有効塩素濃度250~300 ppm付近でLPSレベルのリムルス活性を顕著に不活化することが判明した(図15左)。また、弱酸性電解除菌水(pH 6.37)もLPSの不活化能力を示すが、その効果は強酸性電解除菌水と比較して若干低く、LPSのリムルス活性を消失させるためには400~500 ppm以上の有効

塩素濃度を必要とした(図15左)。

図15右に示したように、強酸性電解除菌水(pH 2.56)はLPSの場合と同様、有効塩素濃度300 ppm程度で菌体レベルのリムルス活性を顕著に不活化した。一方、弱酸性電解除菌水(pH 6.37)は有効塩素濃度を500 ppmまで上昇させても菌体レベルのリムルス活性強度に影響を与えなかった。

### 3-4. リムルス活性の消失と酸性電解除菌水による処理時間の相関性

本実験では、酸性電解除菌水による処理時間(室温下)とLPSレベルおよび菌体レベルのリムルス活性の強度変化を検討した。

図16左に示したように、LPSレベルのリムルス活性は、室温下、有効塩素濃度1,120 ppmの強酸性電解除菌水(pH 2.38)中で8時間インキュベートすることにより検出限界以下となり、未処理時のリムルス活性強度と比較して4桁以上低下することが明らかとなった。また、リムルス活性の消失速度は有効塩素濃度に依存しており、同濃度280 ppmの強酸性電解除菌水では、LPSレベルのリムルス活性を完全に消失させるまでに48時間のインキュベートを要した。

図16右に示したように、有効塩素濃度1,120 ppmの強酸性電解除菌水は、LPSレベルと同様、菌体レベルのリムルス活性も顕著に不活化し、2時間の処理により同活性を検出限界以下まで低下させた。一方、低濃度の強酸性電解除菌水(有効塩素濃度280 ppm)

処理の場合、菌体レベルのリムルス活性は 48 時間インキュベート後でも 1 桁減少するのみであり、同活性の消失速度は、LPS レベルの場合と比較して、有効塩素濃度に対する依存性がより高いことが明らかとなった。

同様の実験を弱酸性電解除菌水 (pH 6.37) を用いて行った結果を図 17 に示した。LPS レベルのリムルス活性は、塩素濃度 930 ppm の弱酸性電解除菌水中、2 時間程度処理することにより低下し始め、24 時間後に 5 桁減少し、48 時間後には検出限界以下となった (図 17 左)。弱酸性電解除菌水によるリムルス活性の消失速度も有効塩素濃度に依存しており、同濃度 310 ppm の弱酸性電解除菌水中で処理した場合、LPS レベルのリムルス活性強度は 8 時間後まで変化せず、24 時間処理で 2 桁減少したのみであり、48 時間処理しても検出限界以下まで同活性を低下させることはできなかった (図 17 左)。

一方、図 17 右に示したように、菌体レベルのリムルス活性は、930 ppm の有効塩素を含む弱酸性電解除菌水中で 24 時間処理しても 1 桁減少するにとどまった。また、有効塩素濃度 310 ppm の弱酸性電解除菌水処理の場合、リムルス活性強度は殆ど変化せず、菌体レベルのリムルス活性は 24 時間までの弱酸性電解除菌水処理により大きな影響を受けないことが明らかになった。

### 3-5. その他の化学処理による LPS の不活化

酸性電解除菌水と同様の方法により、その他の薬剤による LPS 活性の不活化に関して検討した。

リムルス試薬に対する各種薬剤の影響を図 22 に示した。過酸化水素原液 (30%) にスパイクした LPS のリムルス活性強度は対照のおよそ 1/100 であったが、過酸化水素濃度を減少させて行くに従って、リムルス活性の回収率は増加し、0.3%以下の過酸化水素濃度であれば、スパイク LPS のリムルス活性を全量回収できることが判明した。次亜塩素酸ナトリウム、水酸化ナトリウムおよび塩酸について同様な実験を行った結果、次亜塩素酸ナトリウムは 0.0005%以下、水酸化ナトリウムは 0.025M 以下、塩酸は 0.0001M 以下まで希釈することにより、リムルス反応に影響を与えることなく、スパイク LPS の同活性を測定できることが明らかになった (図 18)。以下に示す各サンプルのリムルス活性は各種薬剤がリムルス反応に影響を与えない濃度になるように希釈した後、測定することとした。

これらの各種薬剤により LPS を不活化することが可能か判断するための予備試験として、LPS および菌体を種々の濃度の薬剤中、室温にて 2 日間インキュベートし、24 時間および 48 時間後にリムルス活性を測定した。図 19 に示したように、0.3 - 30% 過酸化水素および 0.01 - 0.001M 塩酸は LPS レベルのリムルス活性に影響を与えないことが確認された。次亜塩素酸ナトリウムの場合、0.05%以下の濃度

ではLPSのリムルス活性強度に殆ど影響を与えないが、0.5%以上の濃度ではLPSレベルの同活性を顕著に不活化することが判明した。また、水酸化ナトリウムも濃度依存的にLPSレベルのリムルス活性を抑制することが認められ、0.25M水酸化ナトリウムで24時間処理することにより、同活性が顕著に低下することが明らかになった（図19）。同様に菌体レベルのリムルス活性に対する影響を調べた結果、図20に示したように、LPSレベルのリムルス活性と同じく、菌体レベルの同活性も過酸化水素処理により殆ど影響を受けないことが確認された。その一方、水酸化ナトリウム処理では0.025M以上、塩酸処理では0.01Mの濃度でインキュベートすることにより菌体レベルのリムルス活性を効率良く低下させることが明らかになった（図20）。また、理由は明らかではないが、菌体レベルのリムルス活性は次亜塩素酸ナトリウム処理により、見かけ上、増強されることが判明したため試験対象外とした。

これらの成績から、水酸化ナトリウム処理および次亜塩素酸ナトリウム処理がLPS活性の不活化に利用できる可能性が示唆されたため、両薬剤のLPSに対する影響を更に詳細に検討した。その結果、図21に示したように、LPSレベルのリムルス活性は5%次亜塩素酸ナトリウム中、室温にて8時間処理すると完全に消失するが、0.5%の濃度では48時間処理しても同活性強度に影響を与えないことが判明した。ま

た、LPSレベルのリムルス活性、0.025M水酸化ナトリウム処理により影響を受けなかったが、0.25M水酸化ナトリウム中、48時間処理することにより2桁程度抑制されることが明らかとなった。一方、菌体レベルのリムルス活性は、48時間の0.025M水酸化ナトリウム処理により1桁、0.25M水酸化ナトリウム処理により2桁程度減少することが判明した。

#### D. 考察および結論

LPSはグラム陰性細菌の外膜表層に局在するリポ多糖体であり、基本的に、各種細菌の血清学的特異性を決定するO-特異糖鎖部分、様々な生物活性（発熱活性、マクロファージ活性化能、ショックなど）を発現するリポD部分および両者を結合するコア部分の3つの部位から構成されている（図22）<sup>1,2</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。天然由来の医用材料は高い生体適合性を持つため、その用途は広く、血液に直接接触する医療用具やインプラント製品などの構成基材としても多用されている。しかし、LPSは極微量でも様々な生理活性を示すため、これらの製品に使用する天然医用材料の安全性は十分評価される

必要がある。

本研究では、まず第一に、LPS の熱安定性の再評価を行い、LPS を失活させずに効率良く回収するための加温抽出条件について検討した。その結果、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。LSI-MS 解析の成績から、この活性低下には、少なくとも LPS の活性本体であるリピド 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ことが判明したが、506 分子からリン酸基が脱離したリピド A 種の分子イオン ( $m/z$  1,716) の検出強度が低かったことから、加熱処理による LPS の活性低下には、リン酸基の脱離以外の構造的要因も関与していることが示唆された。種々の処理温度における LPS 活性の変動を検討した結果、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。また、加温処理後、リムルス活性を測定する際、0.025% トリエチルアミン水溶液を希釈液として使用すると、見かけ上、LPS の回収率が上昇することも確認している。菌体レベルのリムルス活性に対する加温処理の影響に関する詳細実験は現在進行中である。

次いで、コラーゲンから効率良く LPS を回収するための前処理法につい

て検討した結果、前処理に利用する各種プロテアーゼには LPS が混入していることが判明した。しかし、コラゲナーゼ 1A-S を初めとした幾つかのプロテアーゼに混入している LPS はデトキシゲルカラム処理により効率良く除去されると共に、酵素活性の回収率も比較的高いことから、コラーゲンからの LPS 回収に関する前処理として、これらの精製プロテアーゼを利用することができるものと思われる。また、コラゲナーゼの酵素活性は 1% 中性ホルマリン処理および 1% フェノール処理により失活させることが可能である。LPS 活性は、これらの化学処理による影響を受けないことも確認されたことから、前処理として酵素消化を行った後、これらの薬剤を利用して処理し、抽出操作を行うようにすれば、酵素の影響を受けることなく、リムルス活性を測定することが可能となる。但し、コラゲナーゼの酵素活性は 40℃において 24 - 48 時間インキュベートすることにより顕著に低下することから、酵素処理後、ホルマリンおよびフェノール処理を行わず、直接、40℃での加温抽出を行っても問題なくリムルス試験を行うことができるものと思われる。今回、データは示していないが、コラゲナーゼ以外にもペプシンおよびパパインの活性は 40℃・24 時間のインキュベーションにより顕著に低下することも確認している。また、フェノール処理による酵素活性の不活化はコラゲナーゼのみに有効であり、フェノール濃度を 5%

まで上昇させても、その他のプロテアーゼの活性を失活させることはできなかった。今後、これらの知見を基にして、酵素処理や粉碎などの前処理、室温および40℃における加温抽出、溶媒効果など、実際の天然医用材料からのLPS回収に関する各種条件を色々に変化させて検討することにより、同材料から効率良くLPSを回収できる諸条件を明らかにする。

種々の天然由来LPSおよび合成リピドAを使用した構造活性相関に関する長年の研究により、LPSが示す生物活性はリピドA部分に存在する脂肪酸の種類、数、分布様式とリン酸基数に大きく左右されることが明らかになっている<sup>27</sup>。LPSの生物活性は酸処理およびアルカリ処理により低減させることが可能である。LPSを1%酢酸、100℃、1 - 2時間加熱処理すると、多糖部分とリピドAを結合しているKD0分子のケトシド結合が切断され、活性本体であるリピドAが遊離するが、このリピドA分子は水溶性に欠けるため、トリエチルアミンを使用して可溶化しない限り、見かけの生物活性強度は低下する。また、LPSを0.1M塩酸で100℃、15分程度加水分解すると、リピドAが遊離すると共に、リピドAに存在するグリコシド結合型リン酸が解離し、生物活性が減弱される<sup>1,2</sup>。一方、LPSを0.25M水酸化ナトリウム中、56℃、30分処理すると、リピドAに存在するエステル結合型脂肪酸が解離することにより、LPSの生物活性はほぼ完全に消失することも知

られている<sup>1,2</sup>。

この他、LPSの不活化法または除去法としては、250℃での加熱処理の他、逆浸透、カチオン性メンブランフィルター濾過、活性炭フィルター濾過およびポリミキシンB固定化アガロースゲル(デトキシゲル)アフィニティークロマトグラフィーなどがあるが、いずれの方法も適用範囲が限られている。そこで、本研究では天然医用材料に混入しているLPSを簡易且つ効率良く不活化する方法を開発するため、酸性電解除菌水を初めとした幾つかの薬剤のLPSに対する不活化効力について検討した。その結果、精製LPSレベルのリムルス活性は有効塩素濃度300 ppm以上の強酸性および弱酸性電解除菌水により効率良く不活化されることが明らかとなった。一方、菌体レベルのリムルス活性を不活化するためには、精製LPSレベルの場合よりも高い有効塩素濃度が必要であることが判明した。また、高濃度の強酸性電解除菌水は菌体レベルの活性を不活化する効力を持つが、同活性に対する弱酸性電解除菌水の影響は比較的少ないことも明らかとなった。以上の成績から、酸性電解除菌水によりLPSの活性を不活化する際は、事前に試料をメンブランフィルター濾過し、菌体を除去した後に処理を行う必要があるものと思われる。また、酸性電解除菌水処理の他、0.025 - 0.25M水酸化ナトリウム処理もLPS活性を不活化する効果があることが明らかになった。その他、LPS活性は次亜塩素酸ナトリウム処理



によっても不活化可能であるが、同処理により LPS 活性を不活化するためには 5% という高濃度を必要とするため実用的ではないことが判明した。

以上、天然医用材料に混入する LPS は酸性電解除菌水処理または水酸化ナトリウム処理により不活化できる可能性が示された。現在までの予備試験において、コラーゲンに含まれる LPS は酸性電解除菌水により不活化可能であることを確認しているが、今後、各種の天然医用材料を使用して、より詳細に検討して行く予定である。また、酸性電解除菌水に含まれる有効塩素や水酸化ナトリウム添加による pH の上昇は天然医用材料自体の構造や機能にも影響を与える可能性があるため、これらの処理を施した各種天然医用材料の構造変化を追跡すると共に、その生体適合性を *in vitro* および *in vivo* レベルで検討する。

#### E. 研究発表

- 1) ・島由二、村井敏美、中川ゆかり、平田陸正、長谷川千恵、矢上 健。創傷被覆材におけるエンドトキシン汚染の実態調査。第 23 回バイオマテリアル学会大会(2001 年・京都)。
- 2) 川崎ナナ、・島由二、太田美矢子、伊藤さつき、日向昌司、日向須美子、早川堯夫。LC/MS 及び NMR を用いたエリスロポエチンの硫酸化糖鎖の解析。第 74 回日本生化学学会大会(2001 年・京都)
- 3) ・島由二、林 讓、松田りえ子、長谷川千恵、土屋利江。エンドトキシン試験法の分析バリデーション(2)。日本薬学会第 122 年会(2002 年・千葉)。
- 4) 林 讓、松田りえ子、・島由二、長谷川千恵、土屋利江。エンドトキシン試験法の分析バリデーション(1)。日本薬学会第 122 年会(2002 年・千葉)。
- 5) Tanamoto K, Iida T, Haishima Y, and Azumi S. Endotoxic properties of lipid A from *Comamonas testosteroni*. *Microbiol*, 147: 1087-1094 (2001).
- 6) Tanamoto K, Kato H, Haishima Y and Azumi S. Biological property of lipid A isolated from *Flavobacterium meningosepticum*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8: 522-527 (2001).
- 7) Kawasaki N, Haishima Y, Ohta M, Itoh S, Hyuga M, Hyuga S and Hayakawa T. Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin. *Glycobiol*, 11: 1043-1049 (2001).
- 8) Hayashi Y, Matsuda R, Haishima Y, Yagami T and Nakamura A. Validation of HPLC and GC-MS systems for bisphenol-A leached from hemodialyzers on the basis of FUMI theory. *J Pharm Biomed Anal*, in press (2002).

#### F. 特許関係

- 1) 酸性電解除菌水処理によるエンドトキシンの不活化. 国立医薬品食品衛生研究所/ダイキン工業(株)共同出願準備中.

#### G. 参照論文

- 1) Rietschel ET, Brade L, Schade U, Seydel U, Zähringer U, Lindner B, Morgan AP, Kulshin VA, Haishima Y, Holst O, Rohrscheide-andrzeweski E, Ulmer AJ, Flad HD, Brade H. Chemical structure and biological activity of lipopolysaccharides. In: Baumgartner JD, Calandra T, Carlet J, editors. Endotoxin from pathophysiology to therapeutic approaches. Paris: Flammarion Medicine-Sciences; 1990. p. 5-18.
- 2) Rietschel ET, Mayer H, Wollenweber HW, Zähringer U, Lüderitz O, Westphal O, Brade H. Bacterial lipopolysaccharides and their lipid A component. In: Homma JY, Kanegasaki S, Lüderitz O, Shiba T, Westphal O, editors. Bacterial endotoxin; Chemical, biological and clinical aspects. 1984. p. 11-22.
- 3) Haishima Y, Murai T, Nakagawa Y, Hirata M, Yagami T, Nakamura A. Chemical and biological evaluation of endotoxin contamination on natural rubber latex products. J Biomed Mater Res 2001;55:424-432.
- 4) 萩島由二. 天然医用材料の安全性評価に関する研究. 平成12年度厚生科学研究費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」(主任研究者・土屋利江)分担研究報告書(2001).
- 5) 医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン1995解説. 厚生省薬務局医療機器開発課監修. 薬事日報社.(1996).
- 6) Kanoh S, Mochida K and Ogawa Y. Studies on heat-inactivation of pyrogen from Escherichia coli. Biken J;13:233-239 (1970).
- 7) 小川義之, 村井敏美, 川崎浩之進. 医療用具のエンドトキシン試験法: リムルス試験と発熱試験の関係. 防菌防ばい;19:561-566 (1991).
- 8) Westphal O, Luderitz O and Bister F. Über die Extraction von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z Naturforsch 1952;7b:148-155.
- 9) Westphal O and Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods carbohydra Chem 1965;5:83-91.

- 10) 第14改正日本薬局方. 厚生労働省.
- 11) Savelkoul HF, Vossen AC, Breedland EG, Tibbe GJ. Semi-preparative purification and validation of monoclonal antibodies for immunotherapy in mice. *J Immunol Methods* 1994;172:33-42.
- 12) Iida T, Haishima Y, Tanaka A, Nishiyama K, Saito S, Tanamoto K. Chemical structure of lipid A isolated from lipopolysaccharide of Comamonas testosteroni. *Eur J Biochem* 1996;237:468-475.
- 13) Iwanaga S. The limulus clotting reaction. *Curr Opin Immunol* 1993;5:74-82.
- 14) Tokunaga F, Nakajima H, Iwanaga S. Further studies on lipopolysaccharide-sensitive serine protease zymogen (factor C): Its isolation from Limulus polyphemus hemocytes and identification as an intracellular zymogen activated by  $\alpha$ -chymotrypsin, not by trypsin. *J. Biochem* 1991;109:150-157.
- 15) Guideline on validation of the Limulus amoebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. USA: Food and Drug Adm 1987.
- 16) Twohy CW, Duran AP, Munson TE. Endotoxin contamination of parenteral drugs and radiopharmaceuticals as determined by the limulus amoebocyte lysate method. *J Parenter Sci Technol* 1984;38:190-201.
- 17) David SA, Silverstein R, Amura CR, Kielian T, Morrison DC. Lipopolyamines: novel antiendotoxin compounds that reduce mortality in experimental sepsis caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:912-929.
- 18) Hollander A, Heederik D, Versloot P, Douwes J. Inhibition and enhancement in the analysis of airborne endotoxin levels in various occupational environments. *Am Ind Hyg Assoc J* 1993;54:647-653.
- 19) Tanaka S, Aketagawa J, Takahashi S, Shibata Y, Tsumuraya Y, Hashimoto Y. Inhibition of high-molecular-weight-(1-3)- $\beta$ -D-glucan-dependent activation of a limulus coagulation factor G by laminaran oligosaccharides and

- curdian degradation products. Carbohydr Res 1993;244:115-127.
- 20) Artenstein AW, Cross AS. Inhibition of endotoxin reaction by aminoglycosides. J Antimicrob Chemother 1989;24:826-828.
- 21) Marcum JA, Levin J. Heparin inhibition of endotoxin-dependent Limulus amoebocyte lysate coagulation. Thromb Haemost 1989;61:294-287.
- 22) Guyomard S, Darbord JC. Quantitative determination of bacterial endotoxins by the chromogenic limulus method: critical analysis and study of interactions between 3 divalent cations. Ann Inst Pasteur Microbiol 1985;136B:49-55.
- 23) Liang SM, Liu TY. Studies on the Limulus coagulation system: inhibition of activation of the proclotting enzyme, by dimethyl sulfoxide. Biochem Biophys Res Commun 1982;105:553-559.
- 24) Murata H, Kobayashi M, Iio M, Yamada H, Chilba K. Sensitivity of the Limulus test and inhibitory factors in the radiopharmaceuticals. J Nucl Med 1976;17:1088-1092.
- 25) Ochiai M, Tamura H, Yamamoto A, Tanaka S, Horiuchi Y. Polymyxin B-resistant limulus amoebocyte lysate (LAL) activating activity found in biological products. J End Res 1996;3:51.
- 26) Ochiai M, Tamura H, Yamamoto A, Aizawa M, Kataoka M, Toyozumi H, Horiuchi Y. A LAL assay for discriminating endotoxin and polymyxin B resistant LPS activity in biological products. The 5th Conference of International Endotoxin Society 1998:131.
- 27) Zahringer U, Lindner B, Rietschel ET. Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. Adv Carbohydr Chem Biochem 1994;50:211-276.

【協力研究者】

- 長谷川千恵 (国立医薬品食品衛生研究所療品部)
- 宮下 洋一 (株式会社ダイキン環境研究所)
- 栗間 孝一 (株式会社ダイキン環境研究所)
- 烏鷹 幸弘 (株式会社ダイキン環境研究所)
- 伊藤 宏幸 (株式会社ダイキン環境研究所)

図1. 隔膜式電気分解法による酸性除菌水の調製

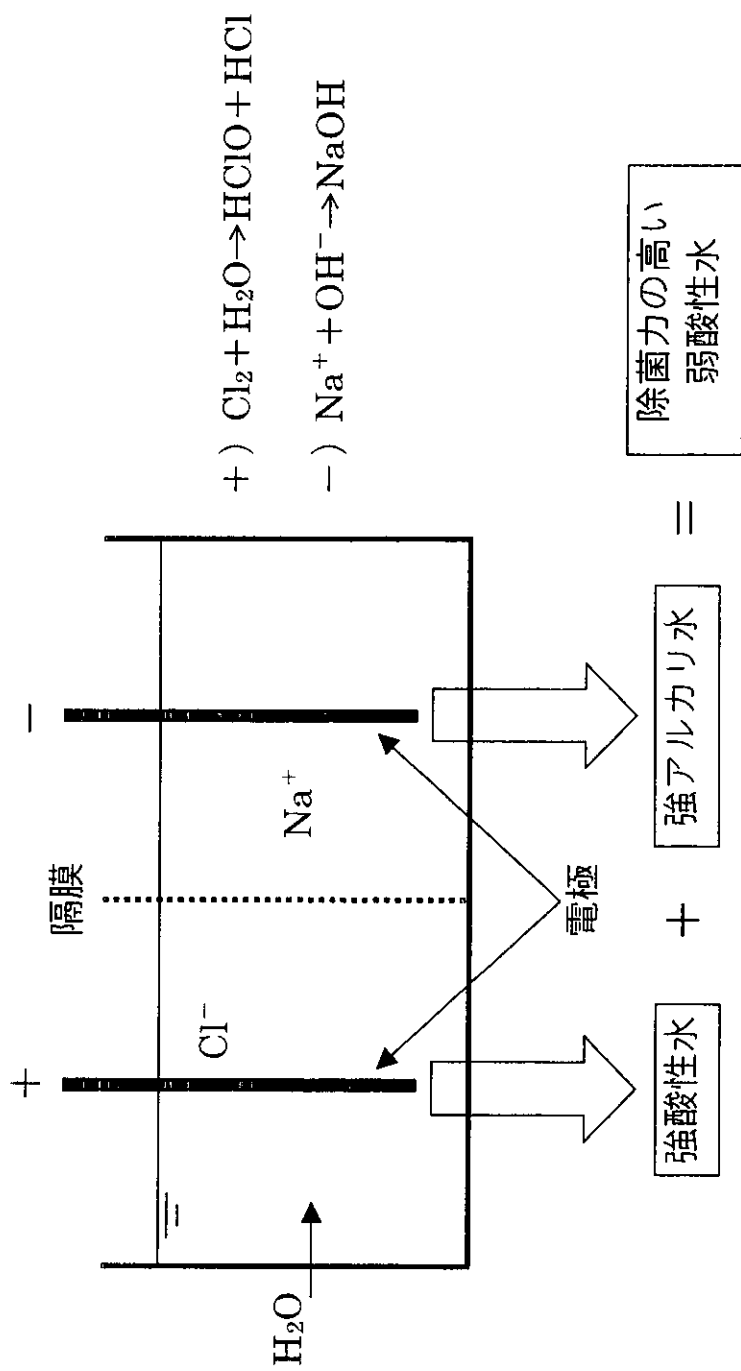


図2. LPSレベルのリムルス活性に対する加温処理の影響

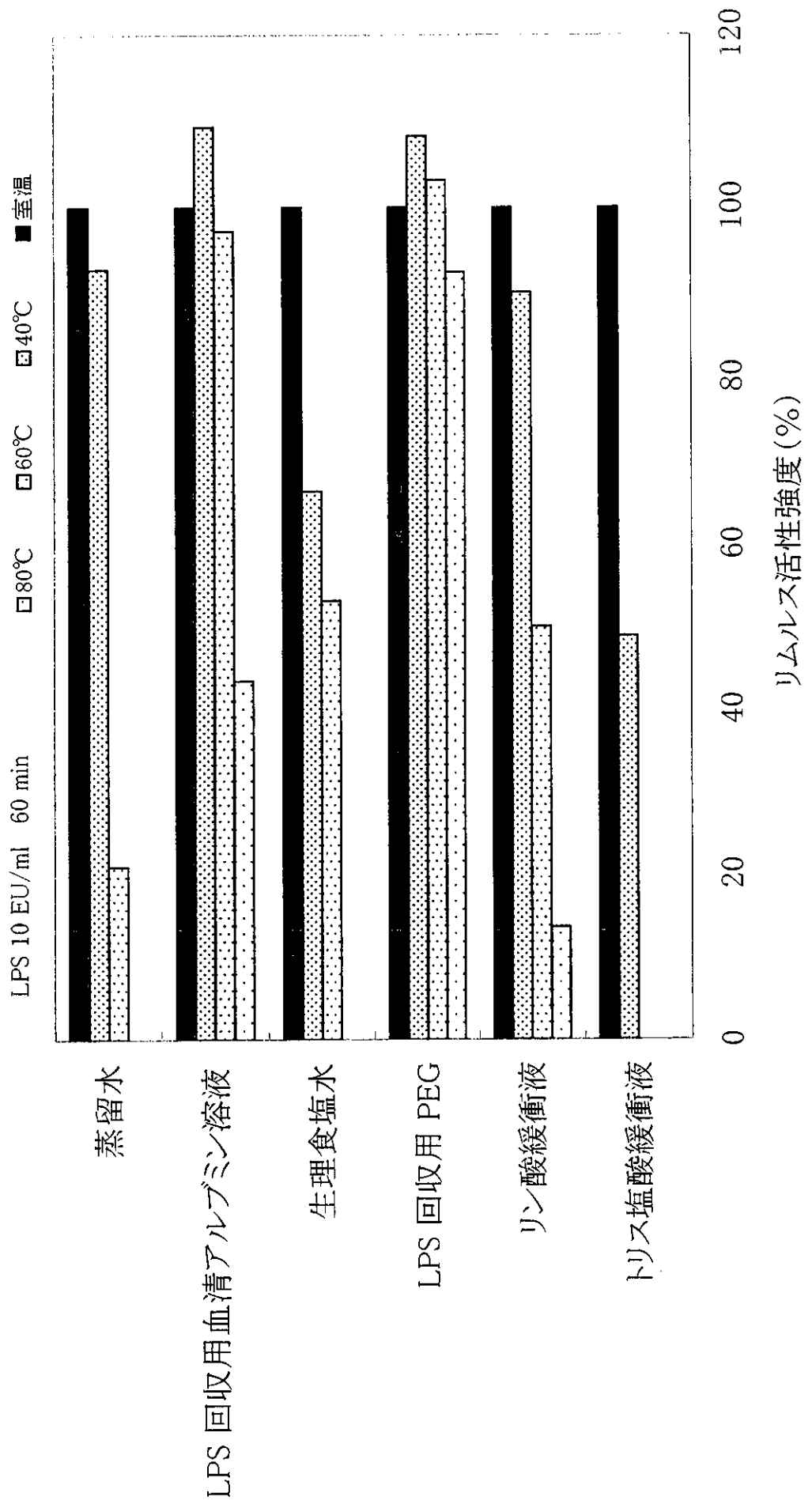


図3. 菌体レベルのリムルス活性に対する加温処理の影響

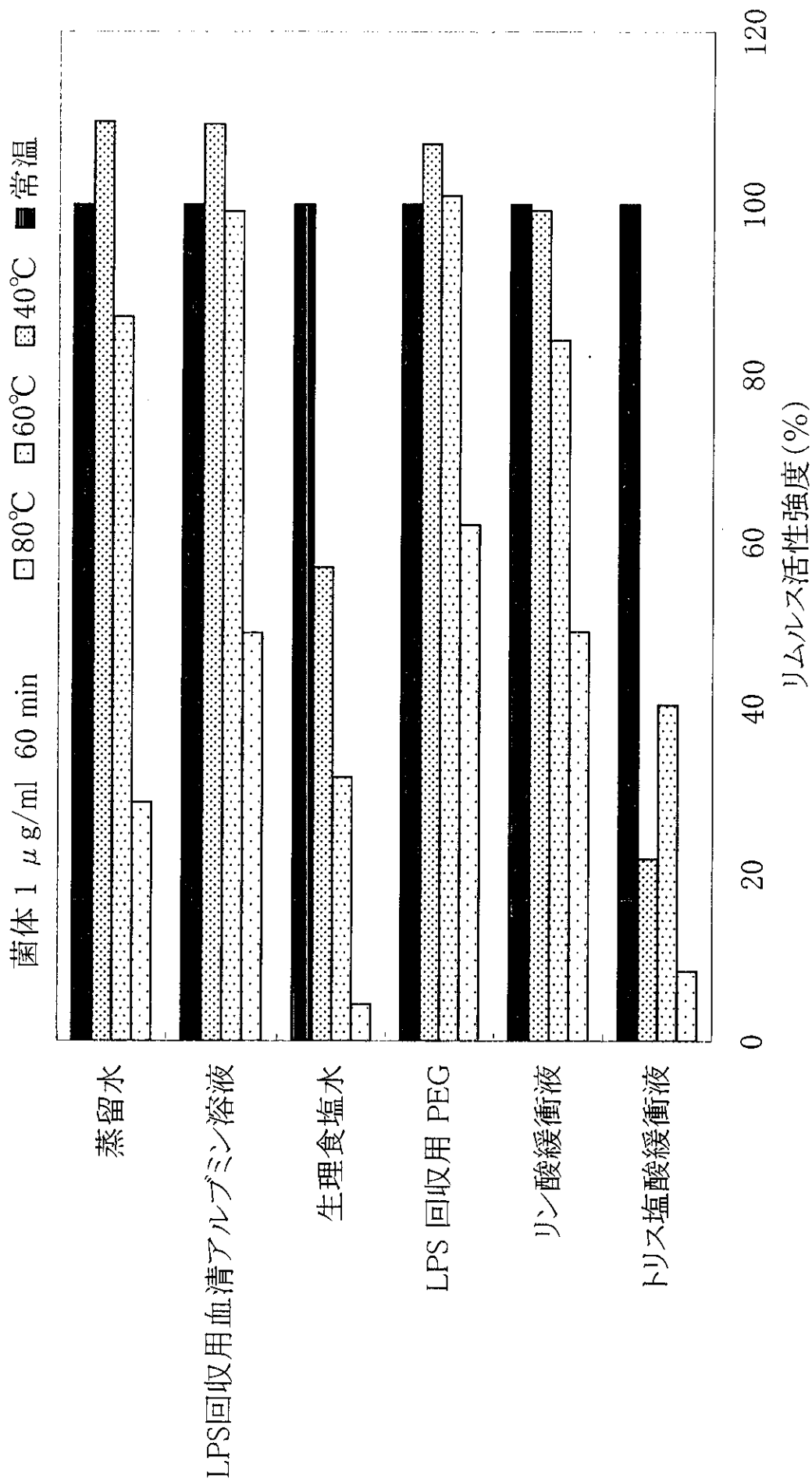


図4. リムルス活性に対する加温処理の影響

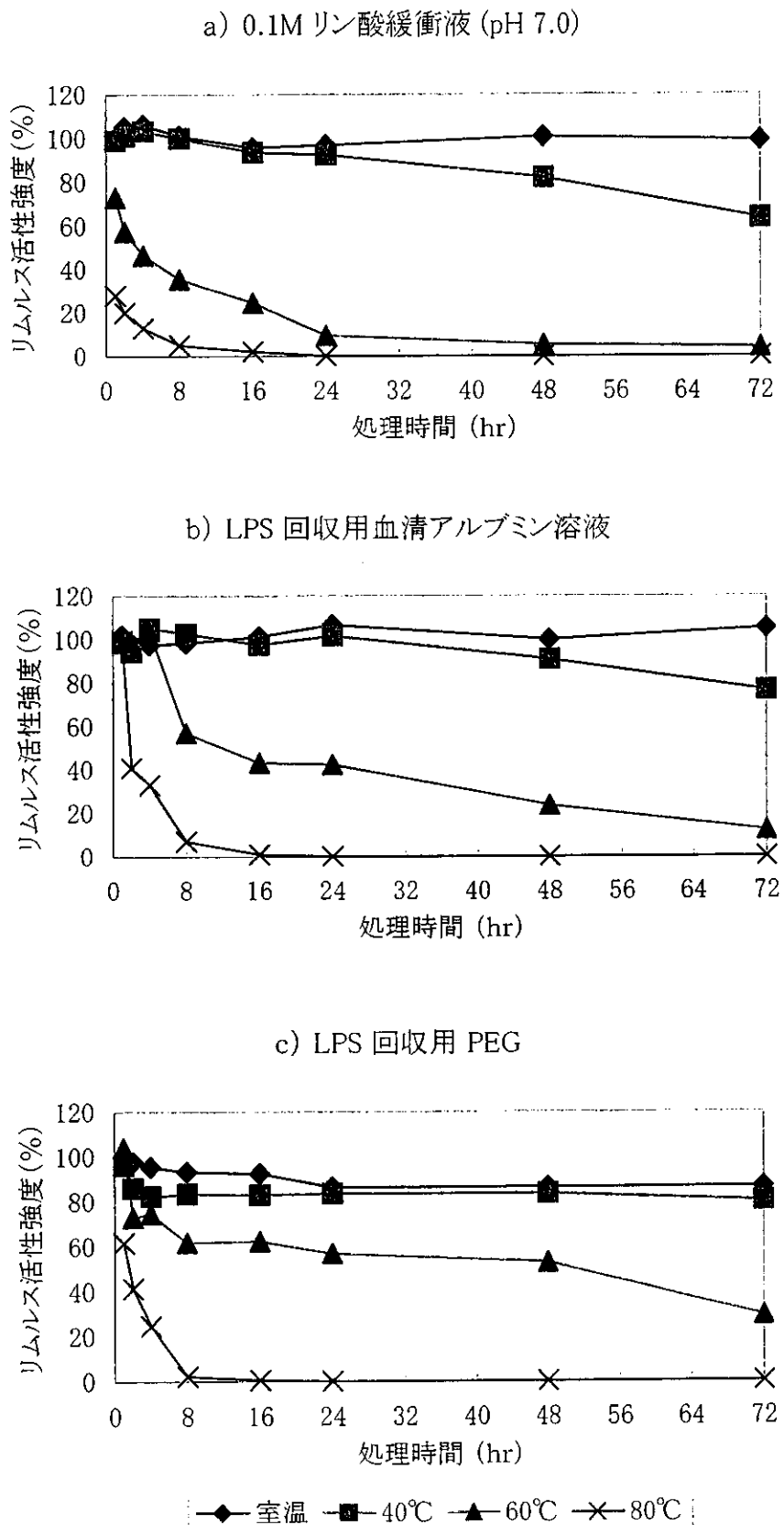




図5. 大腸菌リポドAのLSI - マスペクトル (1)

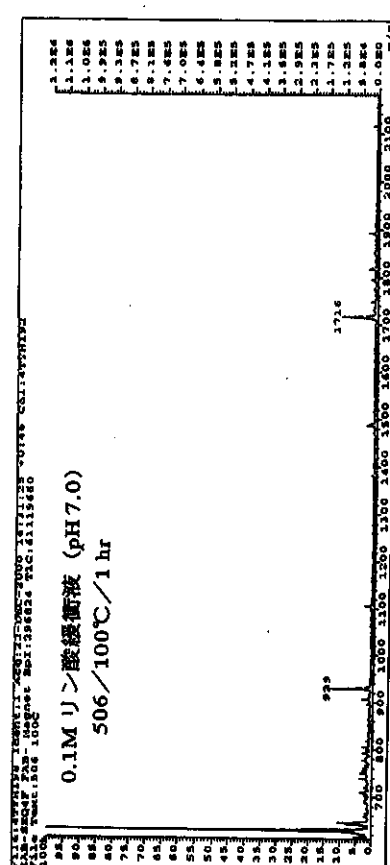
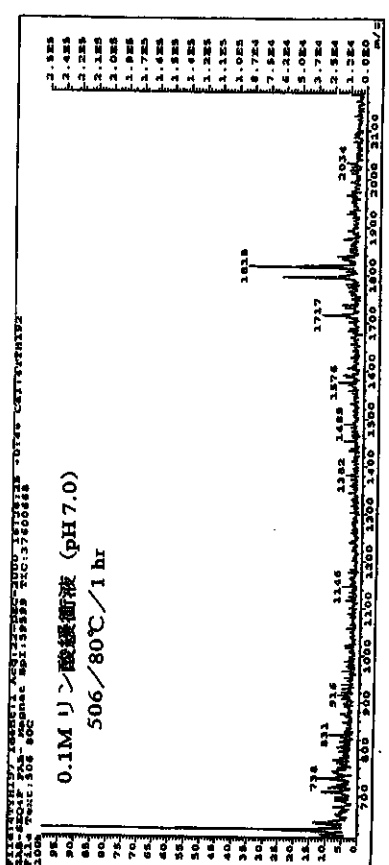
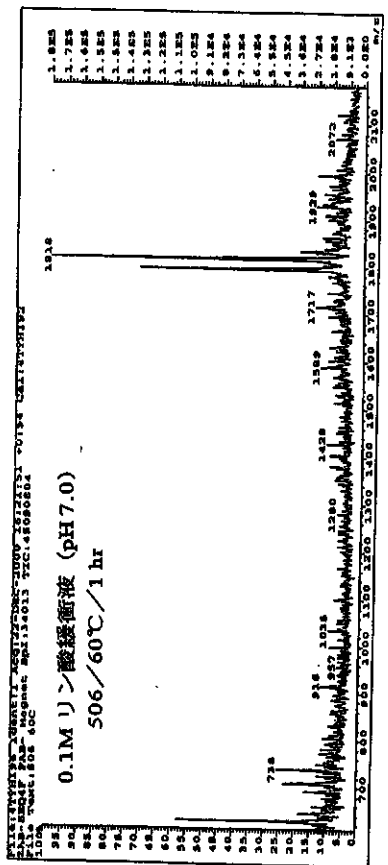
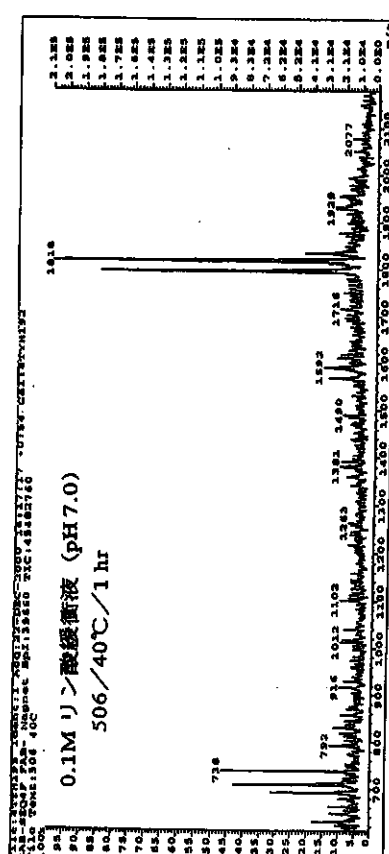
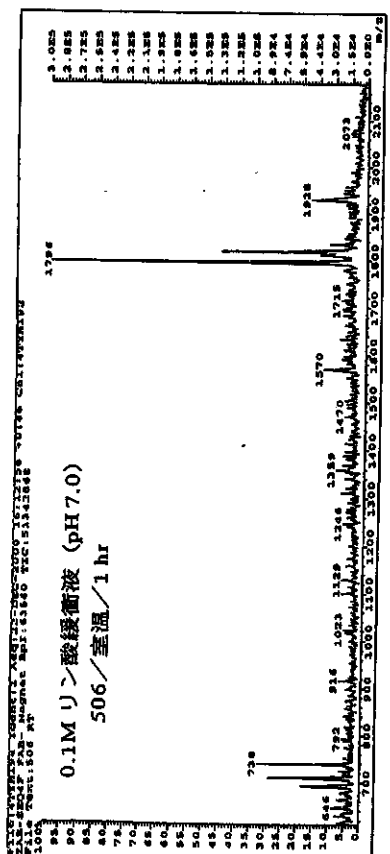
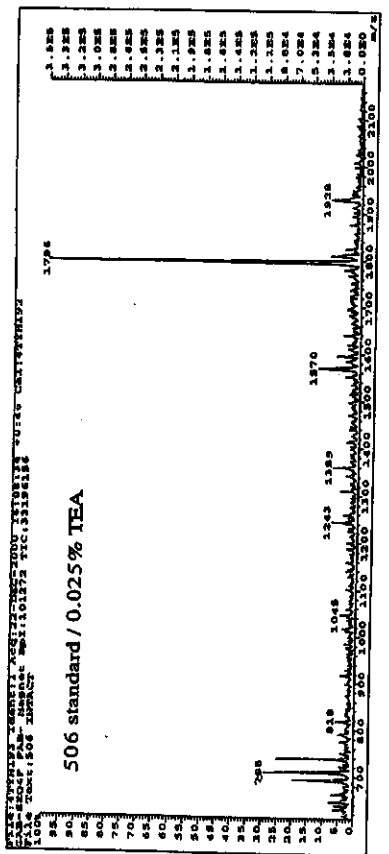


図6. 大腸菌リピドAのLSI-マスペクトル (2)

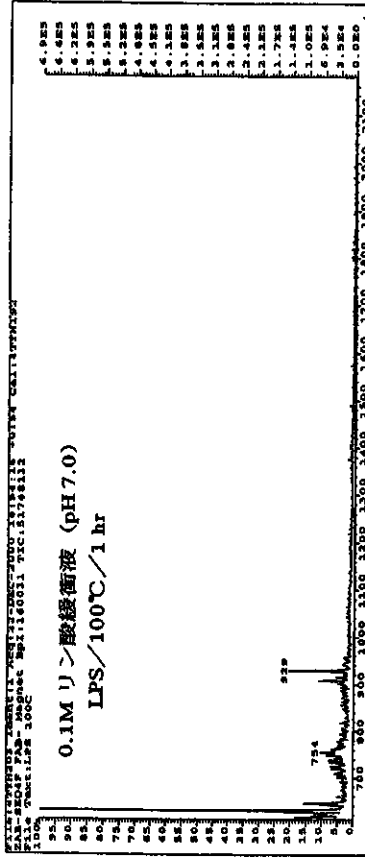
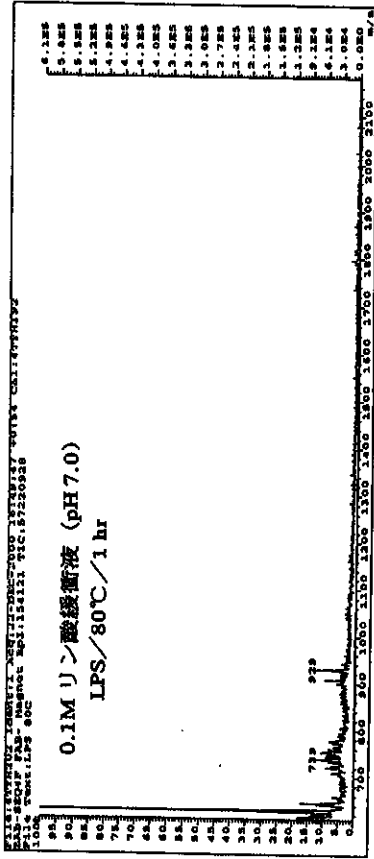
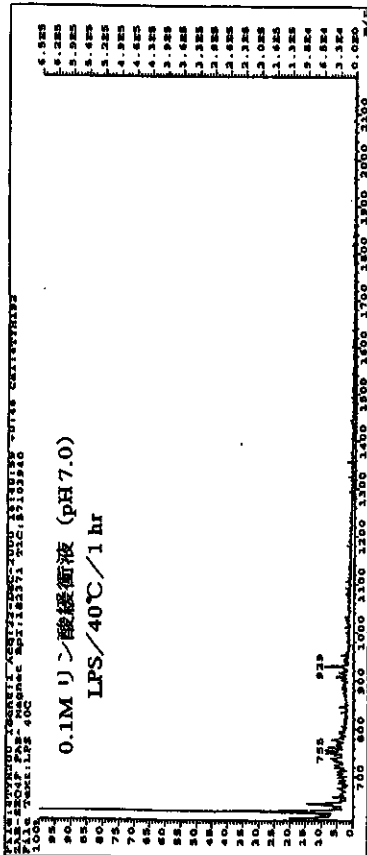
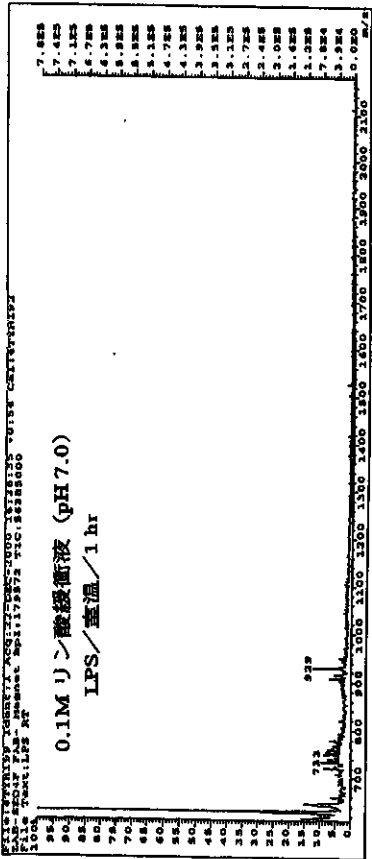


図7. 各種プロテアーゼのリムルス活性

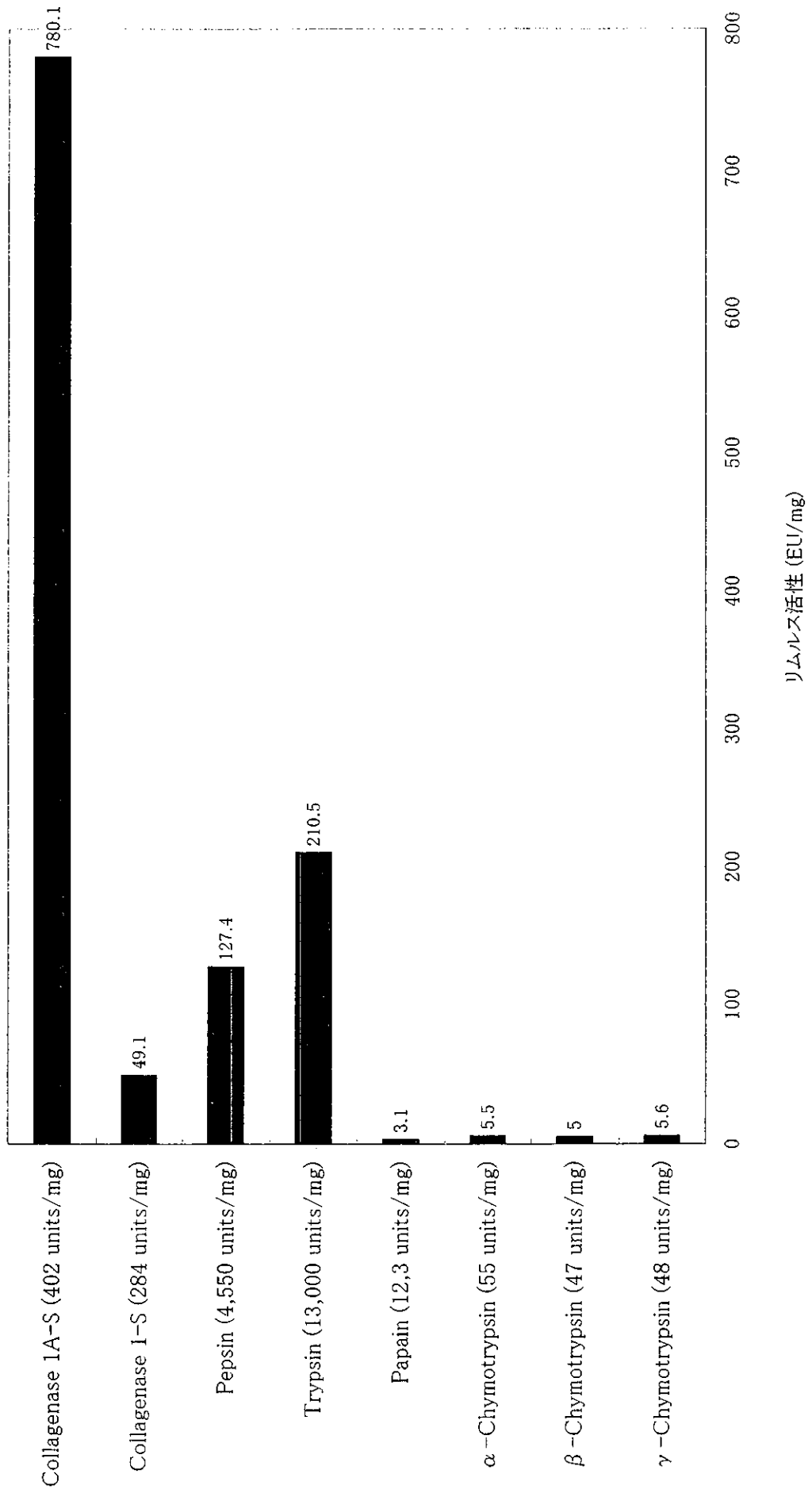


図8. デトキシゲルカラム処理によるLPSの除去効果

