

図19. アジュバントを用いずに投与回数を増加した場合の血清IgE抗体価

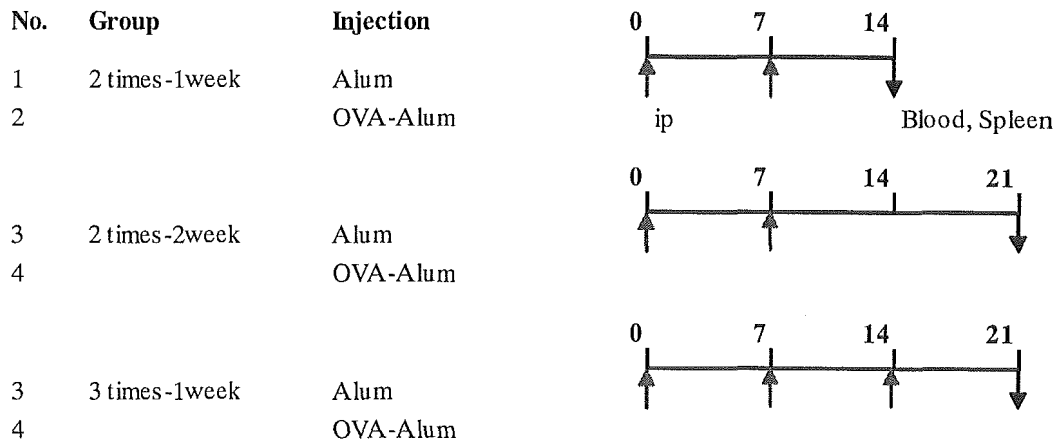
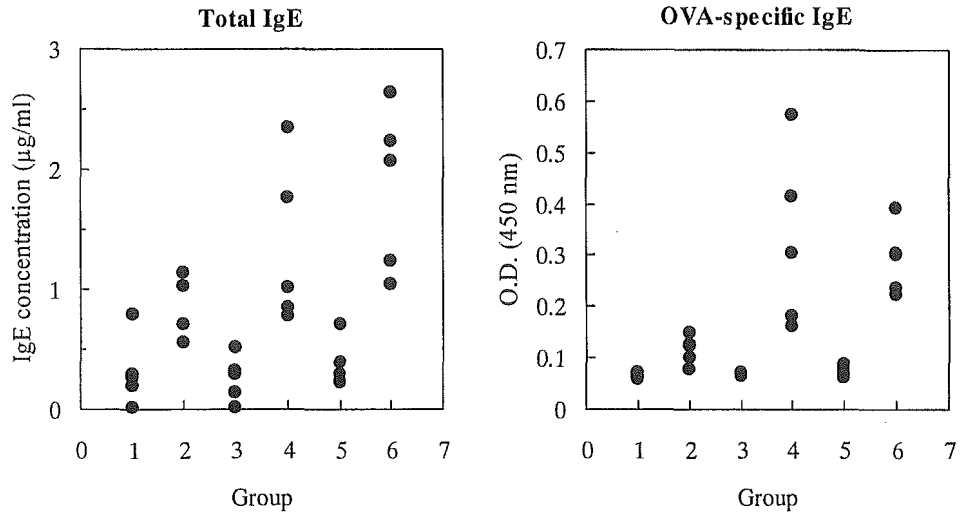
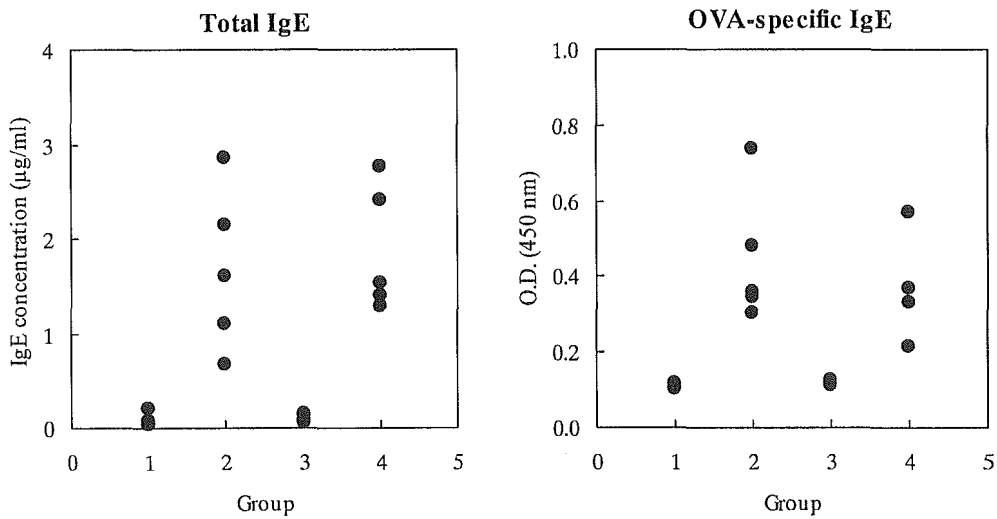


図20. 投与方法の検討(2) アジュバントを使用した投与での注射回数と解剖までの期間の差
 Alum = Alum 2 mg in PBS 200 µl.
 OVA-Alum = OVA 10 µg + Alum 2 mg in PBS 200 µl.



No.	Group	Chemical	Treatment		Total IgE (µg/ml)	OVA-specific IgE (O.D. 450 nm)
			Time	Interval		
1	2 times-1week	Alum	2 times	1 week	0.31 ± 0.29	0.063 ± 0.005
2		OVA-Alum	2 times	1 week	0.89 ± 0.24	0.116 ± 0.027
3	2 times-2week	Alum	2 times	2 weeks	0.25 ± 0.19	0.067 ± 0.002
4		OVA-Alum	2 times	2 weeks	1.35 ± 0.68	0.327 ± 0.171
5	3 times-1week	Alum	3 times	1 week	0.37 ± 0.20	0.073 ± 0.011
6		OVA-Alum	3 times	1 week	1.84 ± 0.68	0.291 ± 0.067

図21. アジュバントを使用した投与での注射回数と解剖までの期間が血清IgE抗体価に及ぼす影響



Group	Sex	Injection
No. 1	Male	Alum 2 mg
2		OVA 10 µg + Alum 2 mg
3	Female	Alum 2 mg
4		OVA 10 µg + Alum 2 mg

図22. 血清IgE抗体価に及ぼすマウスの性差の影響

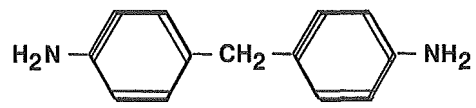


図23 4,4'-メチレンジアニリン (MDA) の構造式

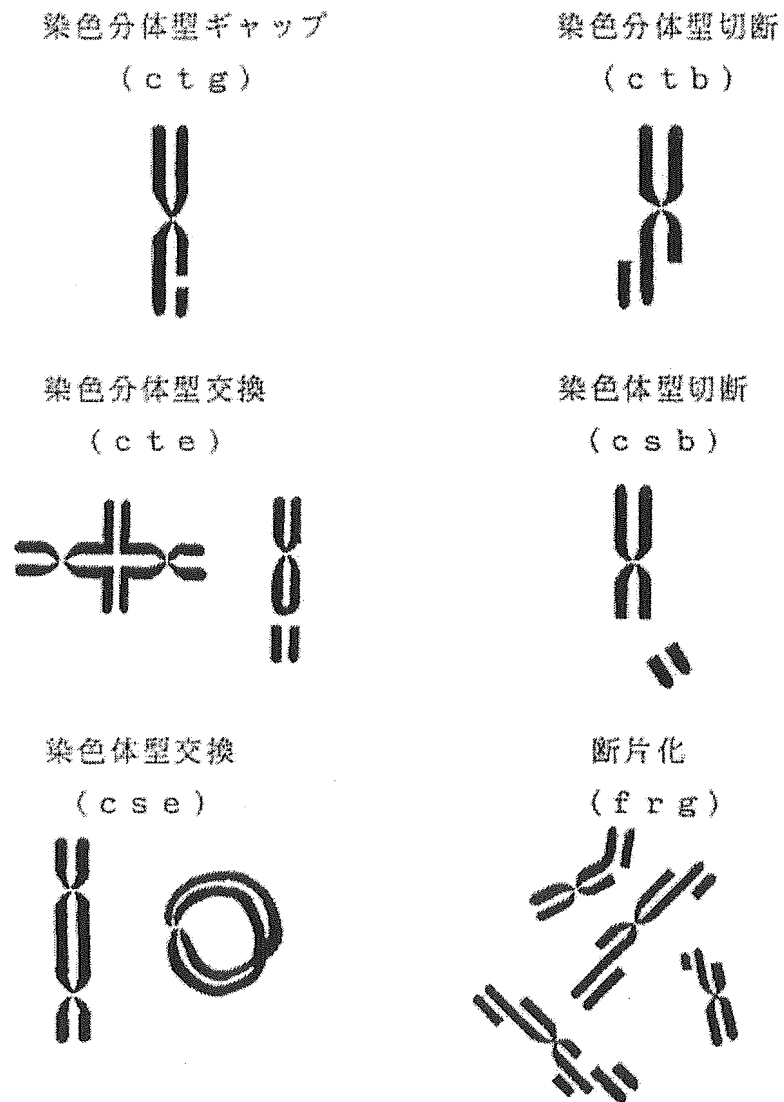


図24 染色体異常の模式図

図25 MDA処理後CHL細胞で観察された染色体異常

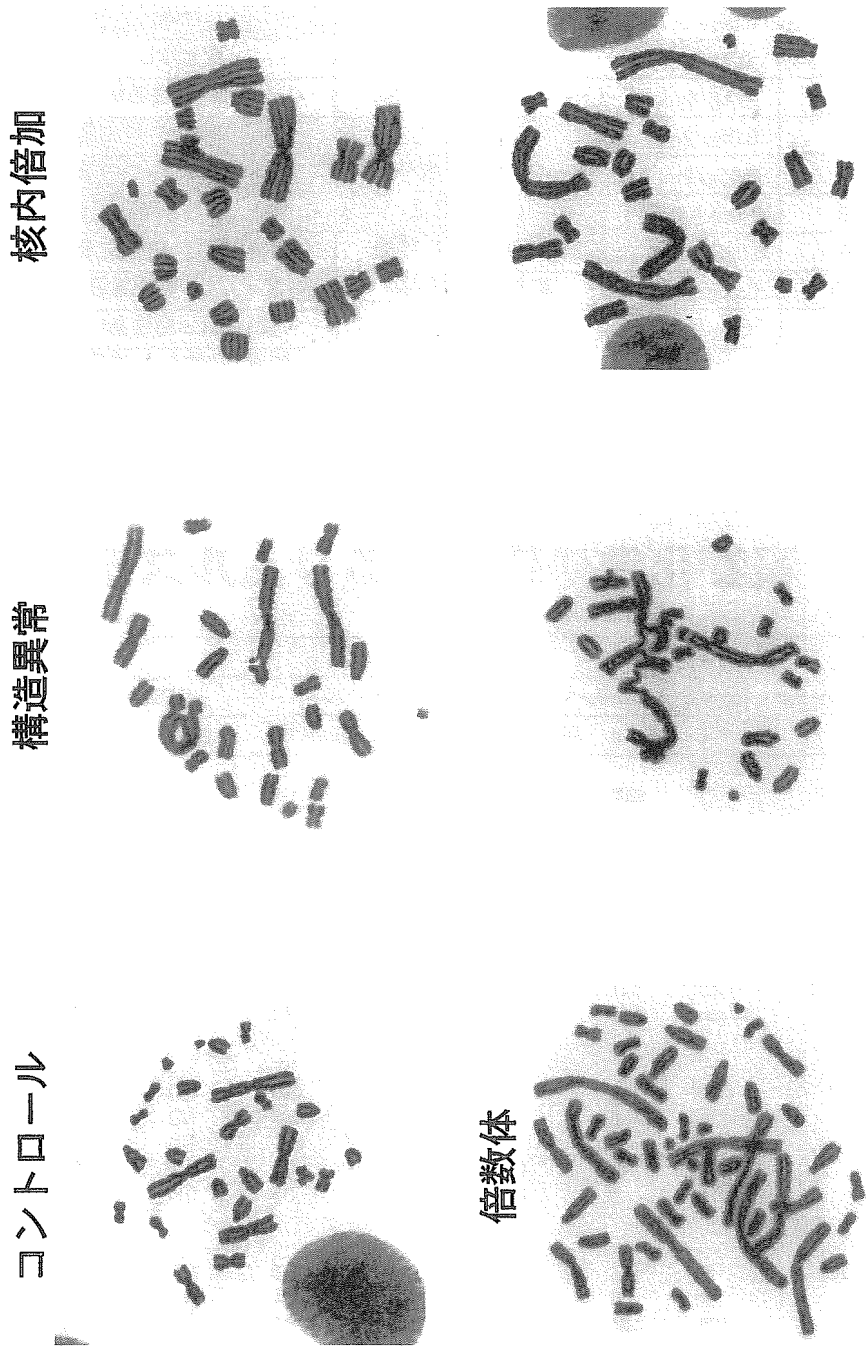


表1. 各抽出条件におけるコラーゲン製品の性状変化

製品番号	抽出濃度	ガイドライン法	24H・50°C・H2Oinc.	collagenase消化
#1	0.1g/4ml	崩壊	膨潤・粘性あり	崩壊
#2	0.1g/4ml	崩壊	崩壊	溶解・無色透明
#3	0.05g/2ml	崩壊	崩壊	溶解・無色透明
#4	0.1g/4ml	変化なし	変化なし	変化なし
#5	0.1g/4ml	膨潤	膨潤・粘性あり	膨潤
#6	0.05g/2ml	膨潤	溶解・凝固・やや白濁	溶解・無色透明
#7	0.05g/2ml	すこし膨潤	溶解・凝固・やや白濁	ほとんど溶解・やや白濁
#8	0.1ml+4ml	白い物が浮遊	無色透明	無色透明
#9	0.025g/1ml	崩壊・粘性あり・凝固	溶解・凝固・やや白濁	崩壊・粘性あり
#10	0.05g/2ml	変化なし・凝固	変化なし・やや凝固	変化なし
#11	0.1g/4ml	変化なし	変化なし・粘性あり	変化なし
#12	0.05g/2ml	膨潤	膨潤・粘性あり・凝固	膨潤

表2. 化学処理によるリムルス活性の変化

	アルギ酸ナトリウム				コラーゲン				
	LPSレベル		菌体レベル		LPSレベル		菌体レベル		
	EU/ml	回収率(%)	EU/ml	回収率(%)	EU/ml	回収率(%)	EU/ml	回収率(%)	
H ₂ O	8203	100	3791	100	1027	100	1178	100	
強菌生電解水 ^{*1}	1708 ppm	596	7	1510	40	0.2	0.02	82	7
	341 ppm	3679	45	2222	59	0.3	0.03	639	54
弱菌生電解水 ^{*2}	1484 ppm	1901	23	1267	33	ND		457	39
	297 ppm	2939	36	2263	60	0.2	0.02	834	71
NaOH	0.5 M	5	0.06	1.6	0.04	ND	0	0.084	0.01
	0.25 M	2	0.02	3.4	0.09	ND	0	ND	0
	0.1 M	2	0.03	2.8	0.07	ND	0	ND	0
	0.05 M	2	0.03	4	0.1	0.07	0.01	ND	0
	0.025 M	5	0.06	13	0.3	0.81	0.08	0.077	0.007
NaClO	5%	5	0.06	ND	0	ND	0	ND	0
	1%	8	0.09	4	0.1	ND	0	ND	0
	0.5%	37	0.5	12	0.3	487.5	47	90	8
	0.1%	320	4	611	16	475.1	46	116	10
	0.05%	415	5	626	17				
	0.025%	669	8	4269	113				
	0.01%	2144	26	1259	33				
0.005%	2923	36	1834	48					

*1: pH2.63 *2: pH5.81

表3. Ovalbumin (OVA)投与量と脾臓重量の変化

Group	Body weight (g)	Spleen weight (g)	Relative weight (Spleen/Body ×1000)
Alum alone	18.03 ± 0.99	0.117 ± 0.024	6.48 ± 1.03
OVA 0.1 μg	17.61 ± 0.98	0.099 ± 0.003	5.63 ± 0.40
OVA 1 μg	17.72 ± 0.61	0.087 ± 0.011 *	4.90 ± 0.51 *
OVA 10 μg	18.40 ± 1.52	0.118 ± 0.008	6.47 ± 0.69

Groups of mice (n=5) received 200 μl of 10 mg/ml Alum adjuvant - PBS solution containing various amount of OVA by intraperitoneal injection. Same treatment repeated 7 days after. Fourteen days after the initial treatment, spleen was corrected. Each value represent the mean ± standard deviation (SD). * OVA-treated group showed significant difference as compared to Alum-control group (p < 0.05).

表4. OVA投与量の違いが脾臓リンパ球幼若化反応に及ぼす影響

Group	³ HTdR incorporation (dpm)		
	—	ConA	OVA
Alum alone	148 ± 32	1291 ± 536	382 ± 132
OVA 0.1 μg	178 ± 38	1727 ± 891	432 ± 101
OVA 1 μg	180 ± 30	2046 ± 393	565 ± 115
OVA 10	154 ± 32	1981 ± 456	524 ± 127

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 stimulated with 2 μg/ml Con A or 100 μg/ml OVA at a final concentration at 37°C for 48 h. After incubation, the cells were pulsed for 4 h with ³HTdR, and ³HTdR incorporation was measured. Each value represents te mean ± SD.

表5. リンパ球増殖反応測定試薬の違いによる結果の変化

(a) WST-8

	Alum (animal 3)		OVA 10 μ g (animal 5)	
	O.D.	% of control	O.D.	% of control
- (Control)	0.326		0.423	
Con A	0.481	147.5	0.642	151.7
OVA	0.373	114.5	0.485	114.6

(b) alamarBlue

	Alum (animal 3)		OVA 10 μ g (animal 5)	
	O.D.	% of control	O.D.	% of control
- (Control)	0.519		ND	
Con A	0.543	104.6	0.496	
OVA	0.537	103.5	0.490	

(c) 3 HTdR

	Alum (animal 3)		OVA 10 μ g (animal 5)	
	dpm	% of control	dpm	% of control
- (Control)	125.4		155.4	
Con A	1823.1	1453.8	2087.7	1343.4
OVA	239.2	190.7	515.6	331.8

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 collected. These cells were stimulated with 2 μ g/ml Con A or 100 μ g/ml OVA or PBS at a final concentration or PBS alone (control) at 37°C for 48 h. After incubation, the cells were pulsed for with 3 HTdR, WST-8 or alamarBlue dyes, and 3 HTdR incorporation or absorbance was measured.

表6. マウスの週齢の違いがOVAによる脾臓重量の変化に及ぼす影響

Group	Animal age	Injection	Body weight (g)	Spleen weight (g)	Spleen/Body×1000
34w-Alum	34 weeks old	Alum 2 mg / PBS 200 μ l	24.19 \pm 1.16	0.123 \pm 0.016	5.08 \pm 0.53
34w-OVA	34 weeks old	OVA 10 μ g + Alum 2 mg / PBS 200 μ l	25.27 \pm 1.00	0.142 \pm 0.013	5.69 \pm 0.73
8w-Alum	8 weeks old	Alum 2 mg / PBS 200 μ l	20.17 \pm 1.09	0.115 \pm 0.019	5.70 \pm 0.69
8w-OVA	8 weeks old	OVA 10 μ g + Alum 2 mg / PBS 200 μ l	20.16 \pm 0.67	0.117 \pm 0.016	5.80 \pm 0.65

Each value represent the mean \pm SD (n = 5).

表7. マウスの週齢差と脾臓リンパ球幼若化反応性

Group	Animal age	Injection	³ HTdR incorporation (dpm)			
			Con A	OVA	LPS	PHA
34w-Alum	34 weeks old	Alum 2 mg / PBS 200 μ l	2293 \pm 700	2623 \pm 281	12058 \pm 2586	17507 \pm 3120
34w-OVA	34 weeks old	OVA 10 μ g + Alum 2 mg / PBS 200 μ l	1921 \pm 928	7758 \pm 541 **	8422 \pm 1476	28487 \pm 8649
8w-Alum	8 weeks old	Alum 2 mg / PBS 200 μ l	511 \pm 150	2147 \pm 804	16401 \pm 3650	19083 \pm 4753
8w-OVA	8 weeks old	OVA 10 μ g + Alum 2 mg / PBS 200 μ l	466 \pm 108	7270 \pm 3818 *	11392 \pm 16089 \pm 3345	25538 \pm 4153

Groups of mice (n=5) received OVA or PBS with Alum adjuvant by intraperitoneal injection. Same treatment repeated 7 days after. Fourteen days after the initial treatment, mice were killed and spleens were collected. Spleen cell suspension was prepared and stimulated with 2 μ g/ml Con A, 1 μ g/ml PHA or 100 μ g/ml OVA at a final concentration at 37°C for 48 and 72 h. After incubation, the cells were pulsed for 5 h with ³HTdR, and ³HTdR incorporation was measured. Each value represent the mean \pm SD. OVA-treated group showed significant difference as compared to Alum-treated (control) group of the same age (* p < 0.05, ** p < 0.01).

表8. アジュバントを用いず投与回数を増加した場合のサイトカイン産生

No.	Group	IL-4 (pg/ml, mean±SD)			
		Con A-stimulate		OVA-stimulate	
1	PBS	24.6 ±	1.7	16.1 ±	0.3
2	OVA 2 times	23.4 ±	1.8	31.7 ±	3.9
3	OVA 4 times	31.1 ±	3.8	54.9 ±	19.8
4	Alum	28.2 ±	3.9	17.2 ±	1.8
5	OVA-Alum	26.1 ±	3.5	56.3 ±	17.1

No.	Group	IFN-γ (pg/ml, Mean±SD)			
		Con A-stimulate		OVA-stimulate	
1	PBS	1233 ±	716	396 ±	216
2	OVA 2 times	2588 ±	261	984 ±	463
3	OVA 4 times	1926 ±	416	477 ±	229
4	Alum	991 ±	429	391 ±	137
5	OVA-Alum	882 ±	298	265 ±	120

Groups of mice (n=5) received OVA or PBS with or without Alum adjuvant by intraperitoneal injection. Same treatment repeated several times at 7 days interval. Seven days after the final treatment, mice were killed and spleen cells were corrected. These cells (5×10^6 cells/1 ml medium) were stimulated with 2 μg/ml Con A or 100 μg/ml OVA at a final concentration at 37°C for 48 or 72 h. After incubation, the supernatant was collected and the concentrations of IL-4 and IFN-γ were measured. Each value represent the mean ± SD.

表9.. アジュバントを使用した投与での注射回数と解剖までの期間が脾臓重量に及ぼす影響

No.	Group	Treatment			Body weight (g)	Spleen weight (g)		Spleen/Body×1000	
		Chemical	Number of times	Interval					
1	2 times-1week	Alum	2 times	1 week	20.21 ± 0.62	0.106 ±	0.020	5.23 ±	0.99
2		OVA-Alum	2 times	1 week	19.69 ± 1.05	0.108 ±	0.015	5.52 ±	0.81
3	2 times-2week	Alum	2 times	2 weeks	21.00 ± 1.01	0.114 ±	0.009	5.43 ±	0.22
4		OVA-Alum	2 times	2 weeks	19.67 ± 0.67	0.112 ±	0.021	5.69 ±	0.89
5	3 times-1week	Alum	3 times	1 week	19.96 ± 0.76	0.117 ±	0.010	5.84 ±	0.39
6		OVA-Alum	3 times	1 week	19.48 ± 1.13	0.120 ±	0.008	6.19 ±	0.74

Each value represent the mean ± SD (n = 5).

表10. アジュバントを使用した投与での注射回数と解剖までの期間がサイトカイン産生に及ぼす影響

Group	Treatment	Number of		IL-4 ($\mu\text{g/ml}$)	IFN- γ ($\mu\text{g/ml}$)	IL-10 ($\mu\text{g/ml}$)
No.	Chemical	times	Interval			
1	Alum	2 times	1 week	7.59 \pm 1.56	79.25 \pm 83.89	17.91 \pm 3.82
2	OVA-Alum	2 times	1 week	66.02 \pm 24.74	91.71 \pm 39.85	200.57 \pm 84.15
3	Alum	2 times	2 weeks	3.16 \pm 1.26	41.93 \pm 27.01	13.25 \pm 4.40
4	OVA-Alum	2 times	2 weeks	22.93 \pm 12.21	22.85 \pm 18.38	82.49 \pm 41.61
5	Alum	3 times	1 week	3.71 \pm 0.79	36.13 \pm 26.09	13.69 \pm 4.61
6	OVA-Alum	3 times	1 week	98.50 \pm 59.65	31.63 \pm 10.63	250.68 \pm 132.28

Groups of mice (n=5) received OVA or PBS with or without Alum adjuvant by intraperitoneal injection. Same treatment repeated several times at 7 days interval. One week or two weeks after the final treatment, mice were killed and spleen cells were collected. These cells (5×10^6 cells/1 ml medium) were stimulated with 100 $\mu\text{g/ml}$ OVA at a final concentration at 37°C for 72 h. After incubation, the supernatant was collected and the concentrations of IL-4, IFN- γ and IL-10 were measured. Each value represent the mean \pm SD.

表11. OVA投与量の違いによる膝窩リンパ節重量および細胞数の増加率の変化

Amount of OVA (mg)	Stimulation index	
	Lymph node weight	Cell number
0.02	0.80 \pm 0.20	1.1 \pm 0.6
0.2	1.08 \pm 0.47	1.3 \pm 0.3
2	1.56 \pm 0.52	2.1 \pm 0.3

Each value represent the mean \pm SD (n = 5).

Weight of popliteal lymph node (PLN) after treatment with saline (control) was 2.23 \pm 0.64 (n = 15).

Number of PLN cells of control was 1.81 \pm 0.69.

表12. PLNAにおけるcyclohexidine gluconate (CHG)及びovalbumin (OVA)の膝窩リンパ節(PLN)反応

Treatment	Number of animal	Weight of PLN (mg)	Stimulation index	Number of PLN cell ($\times 10^6$)	Cellularity index
-	2	2.4 \pm 0.6		2.95 \pm 0.13	
Saline	2	1.5 \pm 0.5		2.11 \pm 0.85	
Saline (control)	5	2.1 \pm 1.1		2.29 \pm 0.89	
CHG 0.2 mg	5	8.2 \pm 1.9	4.8 \pm 2.4	15.54 \pm 2.81	7.4 \pm 2.2
Saline (control)	5	2.8 \pm 0.9		3.48 \pm 1.95	
OVA 2mg	5	4.5 \pm 1.3	1.6 \pm 0.2	7.95 \pm 2.36	3.2 \pm 2.7

Stimulation and cellularity index were mean \pm SD calculated from the values of the tested vs. control PLN of individual animal.

表13 陽性対照物質MDAの染色体異常試験結果

S9	濃度 (mg/ml)	倍数体	染色体構造異常の頻度 (%)							判定
			ctg	ctb	cte	f	csb	cse	total	
—	0 (DMSO)	0	1	1	0	0	0	0	2	
	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	—
	0.2	0	4	1	0	0	1	0	6	±
	0.4	1	1	1	0	0	0	1	3	—
	0.8								Tox	
+	0 (DMSO)	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.1	0	1	0	0	0	0	1	2	—
	0.2	1	1	1	0	0	1	0	3	—
	0.4	8 (3)	4	2	9	0	0	0	14	+
	0.8								Tox	

倍数体の項の括弧内の数字は核内倍加の数を示している。

表14 4%MDA/PU 高圧蒸気滅菌後培地抽出液

S9	濃度 (%)	倍数体	染色体構造異常の頻度 (%)							判定
			ctg	ctb	cte	f	csb	cse	total	
—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	12.5	0	1	0	0	0	0	0	1	—
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	—
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	—
	100	6	1	0	1	0	1	0	3	±P
+	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
	12.5	0	1	1	0	0	0	0	2	—
	25	2 (1)	0	0	1	0	0	1	2	—
	50	1	0	0	0	0	0	0	0	—
	100	1 (1)	1	0	8	0	0	0	9	±

倍数体の項の括弧内の数字は核内倍加の数を示している。
判定の項のPは、倍数体の結果を表示していることを示す。

表15 抽出液(物)中のMDA,PTMGの定量

試料	材料重量 (g)	抽出物量 (mg)	抽出液量 (ml)	MDA溶出量 (mg/g材料)	PTMG溶出量 (mg/g材料)
EOG 滅菌後培地抽出液					
PU	6.2285		31.142	N.D.	0.0125
0.4%MDA含有PU	3.0864		15.43	0.24	0.0178
4%MDA含有PU	3.1975		15.985	0.902	0.0111
メタノール抽出物					
PU	0.8709	2.1		0.00024	2.6
0.4%MDA含有PU	0.9972	6.3		1.08	5.2
4%MDA含有PU	0.862	34.9		13.7	16.9
アセトン抽出物					
PU	0.92	22.8		0.00035	5.6
0.4%MDA含有PU	0.9628	25.3		1.28	7.7
4%MDA含有PU	0.8376	53.5		14.2	10.0

N.D., 検出限界以下

表16 MDAとPTMG-1000の複合効果

Sg	MDA (mg/ml)	PTMG-1000 (mg/ml)	倍数体	染色体構造異常の頻度(%)							判定
				cig	cib	cte	f	csb	cse	total	
—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0.05	2	0	0	0	0	0	0	0	—
	0	0.1	1	0	0	0	0	0	0	0	—
	0	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	—
	0	0.4	0	0	0	1	0	0	0	1	—
	0.4	0	1(1)	1	0	0	0	0	0	1	—
	0.4	0.05	0	2	2	3	0	0	0	7	±
	0.4	0.1	0	2	7	11	0	0	0	18	+
	0.4	0.2								Tox	
	0.4	0.4								Tox	
+	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
	0	0.05	3	2	0	0	0	0	0	2	—
	0	0.1	2	1	1	0	0	0	0	2	—
	0	0.2	12(7)	1	0	0	0	0	0	1	+P
	0	0.4	9(3)	1	0	0	0	0	0	1	±P
	0.4	0	2(1)	1	0	2	0	0	0	3	—
	0.4	0.05	7(7)	1	1	2	0	0	0	4	±P
	0.4	0.1	8(4)	1	4	10	0	0	0	14	+
	0.4	0.2								Tox	
	0.4	0.4								Tox	

Tox:細胞死、倍数体の項の括弧内の数字は核内倍加の数を示している。

II 分担研究報告

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 靛島 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。しかし、同材料は天然物由来であるため品質管理が難しい欠点を持ち、特に、極微量で様々な生物活性を発現するエンドトキシンの混入は品質管理上の大きな問題となる。平成 14 年度の本研究では、昨年度に得られた知見を基礎として、天然医用材料からのエンドトキシン回収条件の最適化および混入エンドトキシンの不活化法の開発を行った。その結果、コラーゲンからのエンドトキシン回収率は現行のガイドライン法では 1% 未満であったが、前処理として精製コラゲナーゼ処理を施すことにより著しく改善された。また、アルギン酸製品からのエンドトキシン回収は前処理としてホモジナイズ処理を行うことにより顕著に上昇した。一方、天然医用材料に混在するエンドトキシンは低濃度の水酸化ナトリウム処理により材料の構造を維持した状態で不活化できる可能性を見出した。

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であるため品質管理が難しいという欠点を持っている。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。

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、酸化的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)、マイトジェン活性、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又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抽出法では、同製品中のLPS量を正確に評価することは不可能である。

このような背景の中、平成13年度の本研究では、1)微量LPSの熱安定性の再評価、2)前処理法の基礎的検討、3)LPS活性に対する化学処理の影響を評価した。平成14年度は、これらの知見を基礎として、天然医用材料由来製品からのLPS回収条件の最適化を行ったと共に、より安全且つ有用な製品開発に応用できる温和な条件下でのLPS不活化処理条件について検討した。

B. 研究方法

(1) 実験材料

大腸菌 O111 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 O3 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/RNase処理後、超遠心分離の反復により精製した^{8,9}。

天然医用材料としてはType I酸性コラーゲン（高研）およびアルギン酸ナトリウム（クラレメディカル）を使用した。LPS および菌体スパイク標品は、両材料の 0.2% 水溶液（600 ml）に既知量の LPS（0.6 mg）または菌体（60 mg）を添加し、コラーゲンは中和後、アルギン酸ナトリウムは直接凍結乾燥して調製した。市販製品としては、12 種類のコラーゲン製創傷被覆剤（#1-#12）および 4 種類のアルギン酸塩製品（#13-#16）を使用した。本実験で使用したガラス製、金属製、テフロン製器具は使用前に 250℃で 2 時間加熱処理を行った。また、プラスチック製器具はパイロジェンフリーの製品を使用した。

(2) 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、カイン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 O55: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。

(3) 抽出および前処理条件

LPS 抽出溶媒としては滅菌生理食塩水、注射用蒸留水、リン酸緩衝液（pH 7.0）、ヒト血清アルブミン溶液（和光）および PEG 溶液（組成：0.4% polyethyleneglycol, 50mM EDTA, 1% Tween 20：使用時 100 倍希釈：生化学工業）を使用し、室温およ

び 40℃において 0-72 時間回収処理を行った。酵素としては、デトキシゲルカラム（Piece）により精製したコラゲナーゼ 1A-S（Sigma）および alginate lyase（Sigma）を使用した。ホモジナイズ処理はジェネレータ式ホモジナイザー（GLH 型・ヤマト科学）を使用した。各種創傷被覆剤製品からの LPS 回収は、無菌的に裁断後、製品 0.025・0.125 g あたり 1-5 ml の滅菌生理食塩水（最終濃度 0.025 g/ml）を使用して行った。

(4) 化学処理に伴う活性／構造変化

LPS／菌体スパイクコラーゲンおよびアルギン酸ナトリウムの化学処理は種々の濃度の酸性電解水、水酸化ナトリウムおよび次亜塩素酸ナトリウム中、室温下、0-48 時間行った。処理後、注射用蒸留水で希釈し、リムルス活性を測定した。また、LPS／菌体非スパイク材料を同様の条件で処理し、中和および凍結乾燥後、各材料の絶対分子量をダイナミック光散乱光度計（Wyatt Technology）および AS2000 オートサンプラーを接続した HLC-8020 GPC システム（東ソー）を使用して測定した。コラーゲンの測定は TSKgel α 6000 カラム、カラム温度 40℃、溶離液 0.01M 酢酸ナトリウム／塩酸緩衝液（pH 2.0）、流速 1.0 ml/min の条件で行った。アルギン酸ナトリウムの測定には TSKgel α 6000 および TSKgel PW5000 を用い、溶離液 1/15M リン酸緩衝液（pH 7.4）を使用した。

C. 研究結果

(1) コラーゲンからの LPS 回収条件の最適化と応用

1-1. コラゲナーゼ処理条件の検討

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。そこで、昨年度の本研究において検討した各種プロテアーゼからコラゲナーゼを選択し、コラーゲンからのLPS回収に対するコラゲナーゼ処理の効果を検討した。LPSスパイクコラーゲンを滅菌生理食塩水中、種々の濃度の精製コラゲナーゼを用いて、37℃、0-24時間処理した際のLPS回収率（リムルス活性）の変化を図1に示した。コラゲナーゼ処理を施さない場合、同コラーゲンからのLPS回収率は1%未満であったが、コラゲナーゼ濃度の上昇に比例して顕著に改善された。0.2 mg/mlのコラゲナーゼを使用した場合、コラーゲンのLPS回収率は処理開始から4時間で12%程度までに急速に上昇した後、24時間後まで非常に緩やかに上昇することが確認された。これらの結果から、コラーゲンからのLPS回収に関する前処理法として、滅菌生理食塩水中、0.2 mg/mlのコラゲナーゼを用いて、37℃、16時間処理する条件を採用した。バックグラウンドとして測定される0.2 mg/mlのコラゲナーゼのリムルス活性は 3.9 ± 2.3 EU/mlである。

1-2. 回収条件の選択

ガイドラインにおいて規定されている抽出条件（滅菌生理食塩水・室温・72時間）によりLPSおよび菌体スパイクコラーゲン

からのLPS回収を試みた結果、LPS回収率はLPSレベルで0.1%、菌体レベルでは0.05%であった（図2）。しかし、前処理としてコラゲナーゼ処理を行うことにより、両スパイクコラーゲンからのLPS回収率は、それぞれ13%（LPSレベル）および23%（菌体レベル）に改善された。両スパイクコラーゲンを0.1M HClに溶解後、直ちにリムルス活性を測定した結果、前処理を行わなくとも、それぞれ7%（LPSレベル）および11%（菌体レベル）のLPS活性が回収された（図2）。また、これらの回収率はコラゲナーゼによる前処理を施すことにより、それぞれ30%および20%に上昇した。LPSの塩型中、最も高い水溶性と生物活性を付与するトリエチルアミン（TEA）を回収溶媒とした際の回収率は、前処理を行わない場合、1%（LPSレベル）および0.11%（菌体レベル）、前処理を行った場合、28%（LPSレベル）および48%（菌体レベル）であった（図2）。

LPSおよび菌体スパイクコラーゲンをコラゲナーゼ処理した後、PEG溶液、ヒト血清アルブミン溶液、リン酸緩衝液、注射用蒸留水および滅菌生理食塩水を用い、室温および40℃下、0-48時間の抽出を行った際のLPS回収率の変動状況を図3および図4に示した。スパイクコラーゲンからのLPS回収率は、いずれの溶媒においても抽出時間の延長に伴って低下する傾向が認められた。抽出温度については、室温および40℃ともにLPS回収率に大きな差は認められなかったが、リン酸緩衝液中での加温抽出では時間経過に伴いLPS回収率が顕著に低下することが判明した。

これらの結果およびウサギ発熱試験への

試料の転用も考慮し、コラゲナーゼ処理後、直ちに滅菌生理食塩水により試料を希釈してリムルス活性を測定する条件を採用することとした。

1-3. ホモジナイズ処理の効果

LPS および菌体スパイクコラーゲンが凍結乾燥粉体であるのに対し、実際のコラーゲン製品は架橋化処理などにより適度な強度を付与しているものが多い。前述のとおり、コラーゲンからの LPS 回収にはコラゲナーゼを利用した前処理が非常に有効であることを示したが、その他の前処理法として、LPS 回収率に対するホモジナイズ処理の効果を検討した。本研究で使用したコラーゲン製創傷被覆剤中、最も疎水性が高い試料の一つである製品#10 からの LPS 回収をガイドライン法（滅菌生理食塩水・室温・72 時間抽出）で行った場合、同製品（0.1 g / 4 ml）から検出される LPS 量は 0.66 EU / ml であった（図 5）。一方、滅菌生理食塩水中で同製品をホモジナイズした後にガイドライン法を適用した場合、LPS 検出量は 1.59 EU / ml となり、ホモジナイズ処理によりコラーゲン製品からの LPS 回収率を若干増加させることができることが判明した（図 5）。平成 10-12 年度に行ったサーベイ試験^{3,4}において使用した加温抽出法（注射用蒸留水・50℃24 時間）による製品#10 からの LPS 回収率はガイドライン法とほぼ同一であったが、ホモジナイズ処理は LPS 回収率に大きな影響を与えなかった。一方、図 5 に示したように、コラーゲン製品からの LPS 回収に関する前処理法としては、ホモジナイズ処理よりもコラゲナーゼ処理の方が遙かに優れていることが確認された。

コラゲナーゼ処理とホモジナイズ処理を併用した場合に最も高い LPS 回収率が得られたが、ホモジナイズ処理は操作が煩雑である反面、LPS 回収率が僅かに改善されるのみであることから、コラーゲン製品からの LPS 回収試験における前処理法としてはコラゲナーゼ処理のみを採用することとした。

1-4. コラーゲン製品からの LPS 回収試験

裁断した 12 種類のコラーゲン製品 0.025・0.1 g に 0.2 mg / ml のコラゲナーゼを含んだ滅菌生理食塩水を最終濃度 0.025 mg / ml になるように加え、37℃において 16 時間処理を行った際の各製品の性状変化を表 1 に示した。対照として、裁断した製品をガイドライン法（滅菌生理食塩水・室温・72 時間）および加温抽出法（注射用蒸留水・50℃24 時間）により処理した後の性状変化を示した。製品#1、製品#4、製品#5 および製品#9-12 の処理後の性状は、いずれの場合も同様であったが、製品#2 と製品#3 の場合、ガイドライン法および加温抽出法では単に崩壊するのみであったのに対し、コラゲナーゼ処理を施すことにより完全に溶解し、無色透明となった（表 1）。製品#6 と#7 の場合、ガイドライン法では膨潤するのみであったが、加温抽出法およびコラゲナーゼ処理においては無色透明または若干白濁した状態で溶解した。また、液体製品である製品#8 の場合、ガイドライン法ではコラーゲンが析出し、白色物となって浮遊していたが、その他の 2 法においては無色透明に溶解した。

各種製品からガイドライン法、加温抽出法およびコラゲナーゼ処理法によって回収した LPS 含有量の測定結果を図 6 に示した。

ガイドライン法によって試験を行った場合、製品#10 および製品#11 から僅かに LPS が検出されるのみであったが、加温抽出法においては、製品#10 と製品#11 の他、製品#2、製品#5-7 および製品#9 から LPS が検出され、特に製品#7 からはウサギ発熱試験陽性と判定される量の LPS が検出された。一方、コラゲナーゼ処理法の場合、使用した精製コラゲナーゼ由来の LPS 活性（バックグランド値 = 3.9 ± 2.3 EU/ml）を差し引いて評価した結果、製品#3、製品#5、製品#9、製品#11 および製品#12 は LPS 陰性、製品#10 は擬陽性となり、その他の製品は全て LPS 陽性と判定された。

(2) アルギン酸塩からの LPS 回収条件の最適化と応用

2-1. 回収条件の検討

LPS および菌体をスパイクしたアルギン酸ナトリウムを試料とし、溶媒、温度、時間を変化させて LPS 回収率を比較検討した。図 7 に示したように、LPS スパイクアルギン酸ナトリウムからの LPS 回収は、いずれの溶媒を使用しても大きな差は認められなかったが、40℃抽出の場合、溶媒として注射用蒸留水を使用すると抽出時間の延長に伴って LPS 回収率が徐々に低下した。この現象は滅菌生理食塩水による 40℃抽出時にも認められた。一方、菌体スパイクアルギン酸ナトリウムの場合、試料を溶解した時点（抽出時間：0 時間）における LPS 回収率は PEG 溶液およびヒト血清アルブミン溶液が優れていたが、ヒト血清アルブミン溶液では 40℃抽出時、PEG 溶液では両温度条件において抽出時間の延長に伴い LPS 回収率が低下することが確認された

（図 8）。時間変化に伴う LPS 回収率の低下は、リン酸緩衝液による室温および 40℃抽出、注射用蒸留水による室温抽出および滅菌生理食塩水による 40℃抽出時も認められたが、滅菌生理食塩水による室温抽出の場合、同回収率は 48 時間まで比較的保持される傾向が認められた。

これらの結果およびウサギ発熱試験への試料の転用も考慮し、滅菌生理食塩水により試料を溶解し、室温において抽出処理を行った後、リムルス活性を測定する条件を採用することとした。

2-2. 前処理法の検討

前記の実験で使用したアルギン酸ナトリウムは水溶性の凍結乾燥粉体であるが、実際の製品では架橋化処理により適度な強度が付加されている。また、アルギン酸カルシウムから作製した不織布製品なども市販されているため、LPS 抽出前に適当な前処理を施す必要があるか検討した。製品#14 を裁断後、ガイドライン法を適用した際の LPS 量は 5.38 EU/ml であったのに対し、裁断した製品を滅菌生理食塩水中でホモジナイズした後、ガイドライン法を適用した場合、LPS 回収率が飛躍的に上昇し、 184.8 EU/ml に達する LPS が検出された（図 9）。ホモジナイズ処理による LPS 回収率の顕著な増加は、抽出溶媒として PEG 溶液を使用した場合と注射用蒸留水による加温抽出においても認められた。また、コラーゲン同様、酵素（alginate lyase）を使用した前処理（ 0.2 mg/ml 滅菌生理食塩水、37℃、16 時間：LPS バックグランド = 4.3 EU/ml）によっても LPS 回収率は改善されるが、その度合いはホモジナイズ処理の方が遙かに

優ることが確認された。これらの知見から、アルギン酸塩製品からのLPS回収の前処理としては滅菌生理食塩水中でのホモジナイズ処理を採用することとした。

2-3. アルギン酸製品からのLPS回収試験

4種のアルギン酸塩製品からのLPS回収試験結果を図10に示した。製品#13を裁断後、滅菌生理食塩水(0.05 g/2 ml)を用いて72時間まで室温下に抽出処理を行うガイドライン法では、抽出開始後0時間、24時間、48時間および72時間において、それぞれ50.5 EU/ml、38.6 EU/ml、45.0 EU/mlおよび29.2 EU/mlのLPSが検出された。一方、裁断した試料0.125 gに5 mlの滅菌生理食塩水を加え、ホモジナイズ処理した後に回収試験を行った結果、LPS回収率が顕著に上昇し、抽出開始後0時間、24時間、48時間および72時間において、それぞれ757.7 EU/ml、344.4 EU/ml、386.7 EU/mlおよび57.6 EU/mlのLPSが検出された。図10に示したように、ホモジナイズ処理によるLPS回収率の顕著な増加は製品#14、製品#15および製品#16においても認められ、アルギン酸塩製品からのLPS回収試験に関し、ホモジナイズによる前処理は非常に有用であることが示された。

(3) LPS不活化法の開発

3-1. 医用材料存在下におけるLPS不活化

平成13年度の本研究において、LPSレベルおよび菌体レベルのLPS活性(リムルス活性)は次亜塩素酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、強酸性および弱酸性電解水により顕著に不活化されることを見出した。本実験では、LPSと菌体をスパイクしたコ

ラーゲンおよびアルギン酸ナトリウムを化学処理(室温・48時間)した際のLPS活性変化を追跡した。表2に示したように、高濃度(1,708 ppm)の強酸性電解水はアルギン酸ナトリウムおよびコラーゲンにスパイクしたLPSと菌体のリムルス活性を顕著に不活化した。一方、弱酸性電解水処理による不活化効率は強酸性電解水処理と比較して若干低く、高濃度(1,484 ppm)の弱酸性電解水処理による不活化率は61.77%程度であった。低濃度の電解水処理の場合、LPS活性の不活化効率に関して強酸性および弱酸性電解水処理間に大きな相違は認められず、同処理によるLPS不活化効率は、いずれの試料でも30-60%程度であった。例外として、LPSスパイクコラーゲンからのリムルス活性回収率が極端に低くなる現象が認められたが、これは両電解水によりコラーゲンが強固に凝集し、スパイクしたLPS自体の回収効率が低下したためと思われる。水酸化ナトリウム処理の場合、アルギン酸ナトリウムおよびコラーゲンにスパイクしたLPSと菌体のリムルス活性は0.025Mまで顕著に不活化されることが判明した。また、表には示していないが、0.01M、0.005Mおよび0.001M水酸化ナトリウム処理でも、それぞれ約70-90%、40-70%および20-40%のリムルス活性が不活化されることを確認している。次亜塩素酸ナトリウム処理の場合、LPSおよび菌体スパイクコラーゲンの溶解性が低く、コラーゲンが凝集してしまうため、両スパイクコラーゲンのリムルス活性を不活化するためには0.5-1.0%以上の次亜塩素酸ナトリウムを使用する必要があった。一方、次亜塩素酸ナトリウム溶液に対する溶解性が