

図15. 各種タンパク質による血清総IgG抗体価の変化 (3) IgG2a

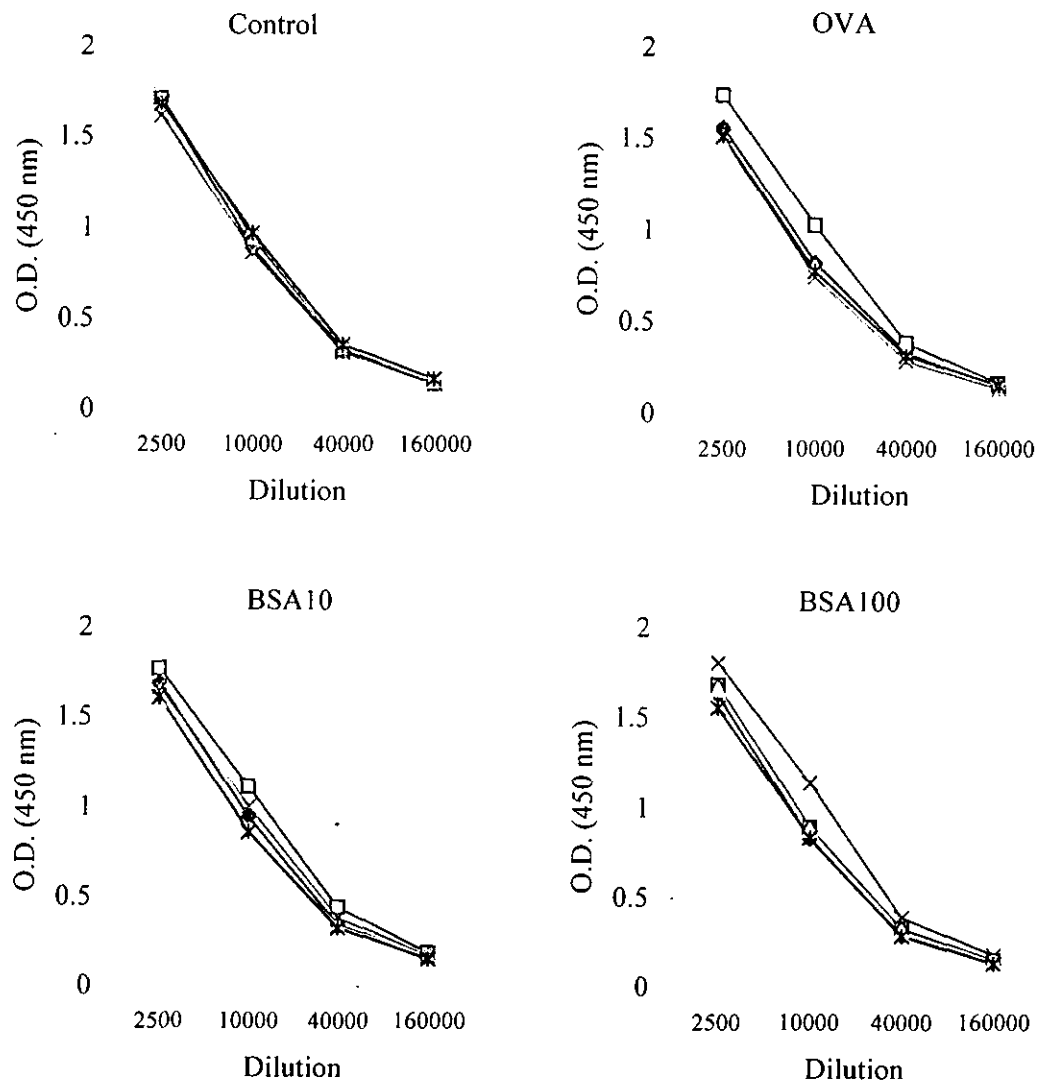


図15. 各種タンパク質による血清総IgG抗体価の変化 (4) IgG2b

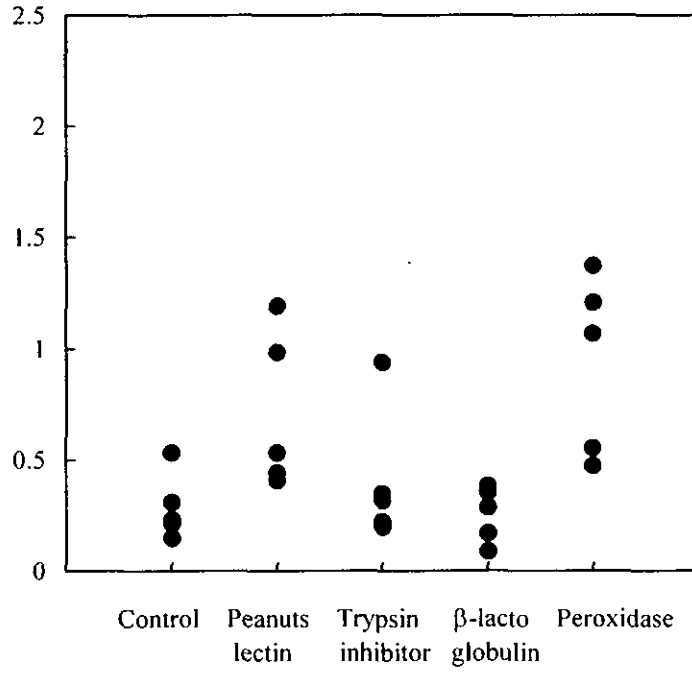


図16. 種々のタンパク質のIgE testによる結果

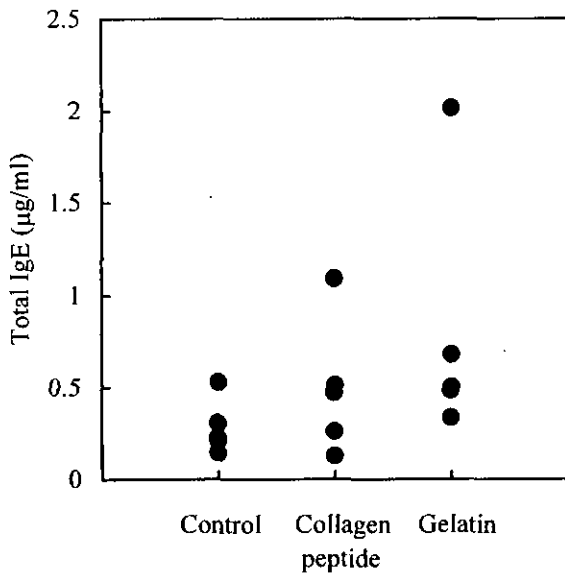


図17. 医用タンパク材料のIgE testの結果

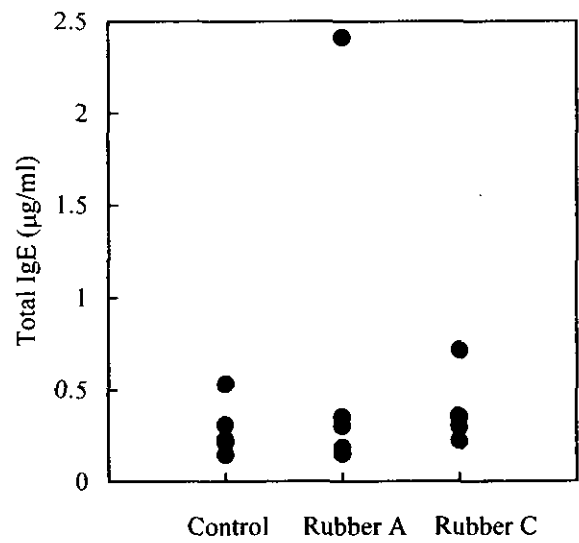


図18. 天然ゴム水抽出液のIgE testの結果

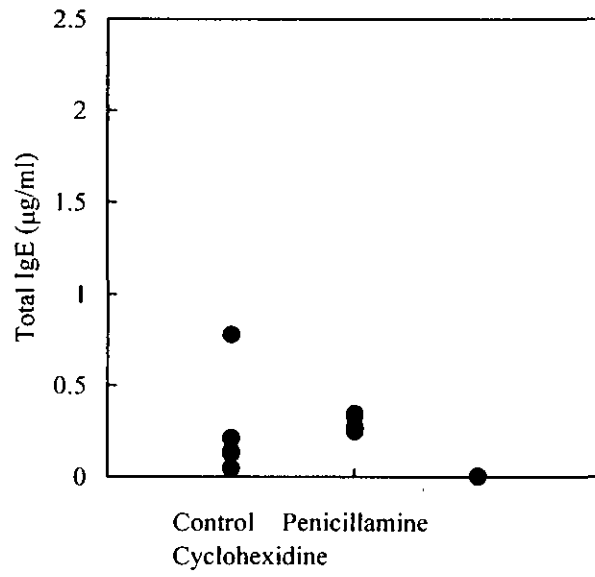


図19. 薬物のIgE testの結果

表1 各種スポンジのLPS含量

	コラーゲン (EU/mg)	ペスキチン (EU/mg)	ソーブサン (EU/mg)
未処理	0.01	0.01	103
NaOH 0.1M	0.15	N.D.	18
NaOH 0.01M	0.01	N.D.	72
NaOH 0.005M	0.15	N.D.	79
NaClO 0.5%	0.05	N.D.	4

表2 アルカリ処理によるType I アテロコラーゲンの比旋光度と粘度変化

pH	比旋光度(°)	粘度(mPa·s)
Control	-395	35.20
11.5	-395	34.35
12.0	-392	34.56
13.0	-391	32.43

比旋光度は、不溶物を遠心除去した上清について測定した。

粘度は3mg/mlの濃度で測定。測定温度は20°C。

表3. Popliteal lymph node assay (PLNA)における薬剤の反応性

Compound	Dose (mg/mouse)	Popliteal lymph node(PLN)		PLN cellularity	
		weight (mg)	SI	(x106 cells)	SI
Vehicle control (saline)		1.6 ± 0.6		2.45 ± 0.76	
Penicillin G	5	4.2 ± 2.1	2.31 ± 1.10	3.97 ± 1.34	1.28 ± 0.26
Vehicle control (saline)		1.4 ± 0.5		1.21 ± 0.47	
D-Penicillamine	2	3.1 ± 0.3	2.49 ± 1.11	2.24 ± 0.7	1.93 ± 0.50

Results are expressed as mean SD (n=5).

表4. 陽性対照アレルゲン溶液(epidermal extracts)とBSAのPLNAでの結果

Compound	Popliteal lymph node(PLN)		PLN cellularity	
	weight (mg)	SI	(x10 ⁶ cells)	SI
Vehicle control (saline)	2.7 ± 0.4		1.93 ± 0.30	
Epidermal extracts	6.0 ± 1.5	2.21 ± 0.56	7.12 ± 1.76	3.70 ± 0.82
Vehicle control (saline)	2.9 ± 1.0		2.34 ± 0.66	
BSA 5 mg	4.8 ± 0.4	1.81 ± 0.72	5.02 ± 1.12	2.23 ± 0.65

表5. 各種タンパク質及び材料抽出液のPLNAでの結果

Compound	Amount (mg/mouse)	Number of animals	SI (mean±SD)	
			PLN weight	PLN cellularity
OVA	2	3	3.19 ± 1.48	2.30 ± 0.64
Trypsin inhibitor	2	5	3.24 ± 1.51	3.77 ± 0.80
β-Lactoglobulin	2	5	3.42 ± 1.55	4.25 ± 1.51
Peroxidase	2	5	2.78 ± 0.49	4.76 ± 2.01
Gelatin	2.5	5	2.19 ± 0.79	2.50 ± 0.40
Collagenpeptide	2.5	5	1.36 ± 0.62	1.30 ± 0.27
Rubber A extract		3	1.49 ± 0.48	1.00 ± 0.41

II. 分担研究報告

1. 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

藪島由二

分担研究報告書

平成 15 年度厚生科学研究費補助金（医薬等医療技術リスク評価研究事業）
「医療用具の有効性・安全性評価手法の開発に関する研究」

分担研究課題名

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

主任研究者	土屋 利江	国立医薬品食品衛生研究所療品部
分担研究者	齋島 由二	国立医薬品食品衛生研究所療品部
協力研究者	伊佐間和郎	国立医薬品食品衛生研究所療品部
	長谷川千恵	国立医薬品食品衛生研究所療品部
	小園 知	神奈川歯科大学高次口腔科学研究所
	佐々木和夫	日本ハム（株）中央研究所

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（lipopolysaccharide, LPS）の混入は品質管理上の大きな問題となる。平成 15 年度の本研究では、抗菌活性や免疫増強作用などを持つことから注目されているキチン類に混在する LPS の回収と不活化に関する改良点と問題点について検討した結果、キチン、キトサンからの LPS 回収率は短時間の 0.1M 塩酸抽出を適用することにより飛躍的に改善されることが明らかになった。また、昨年度までの本研究において得られた知見を基礎として、LPS 不活化処理を施した各種天然材料シートを作製し、不活化処理前後における LPS 含量変化、ヒト正常骨芽細胞の増殖と分化に及ぼす影響、ラット皮下への埋植試験および不活化処理を施した材料の物理化学的变化に関して検討し、LPS 不活化処理標品の有用性を評価した。その結果、アルカリ処理は各種スポンジの構造や機能を大きく変化させることなく、混在する LPS 量を低減する処理法として有用であることが判明した。また、次亜塩素酸ナトリウム処理はスポンジ構造に影響を与えるが、LPS 不活化効果に加え、材料の種類によっては分解性の向上、異物反応の低減などを期待できることが明らかになった。

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、3次元培養用基材や DDS 担体への応用など、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。

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。また、平成 14 年度の本研究において、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) と比較して、コラーゲン製品の場合は精製コラゲナーゼ処理、アルギン酸製品の場合はホモジナイズ処理を前処理として施すと LPS 回収率が飛躍的に上昇することを見出した。その他、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 不活化法の開発について検討し、処理前後における LPS 含量変化と材料の物性変化を評価している。平成 15 年度の本研究では、抗菌活性や免疫増強作用などを持つことから注目されているキチン類に混在する LPS の回収と不活化に関する改良点と問題点について検討した。また、昨年度までの本研究において得られた知見を基礎として、LPS 不活化処理を施した各種天然材料シートを製し、不活化処理前後における LPS 含量変

化、ヒト正常骨芽細胞の増殖と分化に及ぼす影響、ラット皮下への埋植試験および不活化処理を施した材料の物理化学的变化に関して検討し、LPS 不活化処理標品の有用性を評価した。

B. 研究方法

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°C で 2 時間加熱処理を行った。また、プラスチック製器具はピロジェンフリーの製品を使用した。

(1) スパイク用 LPS および菌体の調製

大腸菌 0111 株を普通ブイオン培地中、37°C、16 時間振とう培養後、培養液の pH を中性に調整し、100°C、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/RNase 処理後、超遠心分離の反復により精製した^{6,7}。

(2) LPS および菌体スパイク標品の調製

キチン類としては、キチン (Sigma)、キトサン (片山化学) および CM-キチン (京セラ) を使用した。LPS および菌体スパイク標品は、これらの材料の水溶液 (キチン、CM-キチン: 0.2%) または 1M 塩酸溶液 (キトサン: 0.2%) 600 ml に既知量の LPS (0.6 mg) または菌体 (60 mg) を添加し、キチンおよびキトサンは中和後、CM-キチンは直接凍結乾燥して調製した。

(3) 抽出および前処理条件

キチン類からの LPS 抽出溶媒としては滅菌生理食塩水、注射用蒸留水、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、室温および加温条件下で種々の時間抽出操作を行った。その他、0.1M 塩酸による 4°C、10 分間の超音波抽出、フェノール・水抽出、界面活性剤を利用した抽出、ガラスビーズ振とう抽出、ホモジナイズ処理および酵素処理 (卵白およびヒト白血球由来リゾチーム処理) を適用した。

コラーゲンスポンジおよびアルギン酸スポンジ (後述) からの LPS 回収試験は、平成 14 年度報告書に記載した方法に従って行った。キチンスポンジ (後述) からの LPS 回収は試料を裁断後、塩酸抽出により行った。

(4) 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^{8,9}。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。

(5) キチン類の化学処理に伴う LPS 活性と材料構造の変化

LPS または菌体をスパイクしたキチン類の化学処理は種々の濃度の水酸化ナトリウ

ムおよび次亜塩素酸ナトリウム中、室温下、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、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。カラムとしては TSKgel α 6000 および TSKgel PW5000 を用い、カラム温度 40°C、溶離液 1/15M リン酸緩衝液 (pH 7.4)、流速 1 ml/min の条件で分析した。

(6) 各種シートと LPS 不活化処理

Type I アテロコラーゲン (日本ハム) を 60°C で凍結乾燥することにより、弱架橋した直径 1 cm、厚さ 2 mm のディスク状スポンジを調製した。アルカリ処理コラーゲンスポンジは、0.1M (pH 13.0)、0.01M (pH 12.0) および 0.005M (pH 11.5) 水酸化ナトリウム、また、次亜塩素酸ナトリウム処理スポンジは 0.5% 次亜塩素酸ナトリウムにより同コラーゲンを室温下、48時間処理した後、中和、脱塩、凍結乾燥して調製した。アルカリ処理コラーゲンの分子量は SDS-PAGE により解析し、その他、比旋光度と粘度を測定した。各スポンジは過酢酸蒸気処理により滅菌した。アルギン酸 Ca 不織布およびキチンスポンジとしては、ソープサン (アルケア製) とベスキチン (ユニチカ製) を使用した。ベスキチンは 0.1M、0.01M、0.005M 水酸化ナトリウム、ソープサンは等量の塩化カルシウムを含む各濃度の水酸化ナトリウムに室温下、48時間浸漬し、注射用水で十分洗浄した後、減圧乾燥し、直径

1 cm のディスク状スポンジとして裁断した。また、両材料を 0.5% 次亜塩素酸ナトリウムに浸漬後 (室温・48 時間)、等量のチオ硫酸ナトリウム溶液および注射用水で十分洗浄し、同様のスポンジを作製した。対照としては、未処理または注射用水に浸漬した材料を使用した。各種スポンジ材料には EOG 滅菌を施した。

(7) 骨組織再生に及ぼす影響評価¹⁰

骨芽細胞としては、正常ヒト骨芽細胞 NH0st (BioWhittaker, Inc.) を用い、培地としては、5 mM β -グリセロリン酸ナトリウム及び 10% 牛胎児血清を含有する α -MEM 培地を使用した。未処理および各種の処理を施したコラーゲンスポンジ、ソープサンスポンジおよびベスキチンスポンジを細胞培養用 24 well プレート底部に入れた後、単層培養法により、NH0st 細胞を 2 週間培養した。NH0st 細胞の増殖は、生細胞測定用試薬 TetraColor ONE (生化学工業) および蛋白質測定用試薬 BCA Protein Assay Kit (PIERCE) を用いて測定した。また、パラニトロフェニルリン酸を基質としてアルカリホスファターゼ活性を測定し、NH0st 細胞の分化の指標とした。その他、分化マーカーとして、Ca 含量 (カルシウム C-テストワコー) とオステオカルシン含量 (Gla Type Osteocalcin EIA Kit) を測定した。

(8) ラット皮下埋植試験

実験動物としては、7 週齢の Fischer 系雄ラットを用いた。ラットを pentbarbital sodium (30 mg/kg) 麻酔下で背部正中を 2.5 cm 切開し、筋膜を鈍的に剥離して空隙を作製し、各種試験用スポンジを両側 (右背部、

左背部)に挿入後、皮膚縫合した。スポンジ材料挿入後1週および2週で動物を屠殺し、埋植材を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンにより固定後、通法に従ってパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、病理組織学的に検索した。

(9) 電子顕微鏡解析

未処理および化学処理を施した各種スポンジを試料とし、JEOL Quick Auto Coater JFC-1500によりAuコーティングを行った後、JEOL JSM-5800LV走査型電子顕微鏡を用いて倍率120倍で表面構造を観察した。

C. 研究結果

(1) キチン類に混在するLPSの回収と不活化

1-1. LPS回収条件の検討

既知量の精製LPSをスパイクしたキチン材料を使用し、現行のガイドライン法(生理食塩水・室温・72時間)に基づいてLPS回収試験を行った結果、水溶性の高いCM-キチンでは20%程度の回収率が得られた。一方、ガイドライン法によるキチンおよびキトサンからの回収率は9.0%および0.01%であったが、0.1M塩酸を使用して室温下短時間抽出(超音波処理、4℃、10分間)することにより、それぞれの回収率は20-30%程度まで改善された(図1a)。これに対し、菌体レベルのLPS活性の回収率はいずれも低値であり、塩酸抽出を行った場合でも5%前後に留まった(図1b)。同回収率を改善するため、加温抽出、フェノール・水抽出、界面活性剤を利用した抽出、ガラスビーズ振とう抽出の他、前処理として酵素処理や

ホモジナイズ処理を施した抽出を試みたがいずれも無効であった。

1-2. LPS不活化条件の検討と材料の分子量変化

LPSスパイク材料を種々の条件で化学処理し、キチン類に混在するLPSの生物活性を不活化する条件を検索した。その結果、キチン、キトサンおよびCM-キチンに混在するLPSの活性は、アルカリ処理により濃度依存的に不活化され、いずれの材料の場合でも0.1-0.05M程度の水酸化ナトリウム処理により90%以上不活化されることが判明した(図2)。同活性は、次亜塩素酸ナトリウム処理によっても濃度依存的に不活化され、0.05%次亜塩素酸ナトリウムを使用することより、ほぼ完全に不活化された(図2)。また、これらの材料にスパイクした菌体レベルのLPS活性の強度変化を追跡した結果、アルカリ処理の場合は精製LPSスパイク標品とほぼ同様の結果が得られたが、次亜塩素酸ナトリウム処理により菌体レベルのLPS活性を不活化するためには0.5-5%程度の濃度が必要であることが確認された。

化学処理に伴うCM-キチンの分子量変化を追跡した結果、CM-キチンの分子量(2.468×10^5)は、0.005%、0.05%および0.5%次亜塩素酸ナトリウム処理により、それぞれ 2.067×10^5 、 4.275×10^4 、 6.878×10^2 となり、濃度依存的に減少して行くことが判明した(図3)。一方、CM-キチンはアルカリ処理に対して高い抵抗性を示すことが確認され、0.1M水酸化ナトリウム処理を施した場合でも 2.101×10^5 の分子量を保持していた(図3)。

(2) LPS 不活化処理を施した各種シートの生物学的評価と構造解析

2-1. LPS 不活化処理に伴う LPS 活性の変化

表 1 に示したように、今回の実験に使用したコラーゲンおよびベスキチンは LPS 含量が低値であったため、化学処理を施した各種スポンジの LPS 含量にも大きな変化は認められなかった。一方、103 EU/mg の LPS を含んでいたソープサンはアルカリ処理により濃度依存的に LPS 活性が低下した (表 1)。LPS 活性の低下は 0.5% 次亜塩素酸ナトリウム処理を施した場合が最も顕著であり、ソープサンに含まれる LPS は同処理により 97% 不活化された (表 1)。

2-2. スポンジ構造の解析

図 4 に示したように、コラーゲンは小葉状の孔構造を呈し、ベスキチン (図 5) とソープサン (図 6) は繊維状構造からなることが確認された。各材料ともに、未処理品とアルカリ処理品との間に構造的な違いは殆ど認められなかった。一方、次亜塩素酸ナトリウム処理を施したコラーゲンスポンジは、未処理品と比較して、表面構造が明らかに異なり、色調も淡黄色に変色した (図 4)。次亜塩素酸ナトリウム処理によるスポンジ構造の変化はベスキチンとソープサンにも認められ、両材料ともに繊維密度の上昇と繊維の歪みを生じることが確認された (図 5, 6)。また、次亜塩素酸ナトリウム処理を施した各スポンジの柔軟性は未処理品と比較して肉眼的にも若干低下していた。

アルカリ処理 Type I アテロコラーゲンの分子量を SDS-PAGE により検討した結果、図 7 に示すように、0.01M および 0.005M 水酸化ナトリウム処理コラーゲンは未処理品と

比較して大きな変化が認められなかった。

一方、0.1M 水酸化ナトリウム処理コラーゲンでは $\alpha 1$ (III) 鎖の減少が観察された (図 7)。また、表 2 に示すように、Type I アテロコラーゲンの比旋光度と粘度は、アルカリ処理により濃度依存的に若干低下したが、顕著な変化はないことが判明した。

2-3. 骨芽細胞の増殖と分化に及ぼす影響

正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化を指標として、アルカリ処理を施したコラーゲンスポンジおよびベスキチン (キチンスポンジ) の骨組織再生に及ぼす影響を評価した。増殖の指標として蛋白質含量、分化の指標としてアルカリホスファターゼ活性および Ca 含量を図 8 (Type I アテロコラーゲン) と図 9 (ベスキチン) に示した。両図に見られるように、アルカリ処理スポンジ上で正常ヒト骨芽細胞を培養した際の増殖度と分化度は未処理品とほぼ同一であり、アルカリ処理は両材料が持つ骨組織適合性に大きな影響を与えないことが明らかになった。

アルギン酸 Ca スポンジ (ソープサン) および次亜塩素酸ナトリウム処理を施したコラーゲンスポンジとベスキチンは水溶性に富むため、これらの試験を実施しなかった。

2-4. ラット皮下埋植試験による生体適合性評価

各種スポンジ材料をラット背部皮下筋膜下へ外科的に埋植し、その生体親和性について病理組織学的に検索した。

2-4-1. コラーゲンスポンジ

埋植後 1 週の未架橋品では、リンパ球を主とした軽度の炎症細胞浸潤を伴う線維化

傾向を示す肉芽組織により被包され、スポンジ内部に散在性に線維芽細胞と毛細血管の侵入がみられた (図 10a)。2 週後のものでは被膜は線維化し、スポンジ内に侵入した線維芽細胞と毛細血管の増加が認められた (図 10b)。水酸化ナトリウム処理を施した各種スポンジの病理所見は、いずれの処理濃度においても埋植後 1 週および 2 週共に未処理スポンジと同様であり、アルカリ処理による生体親和性の変化は認められなかった (図 10c, 10d)。一方、0.5% 次亜塩素酸ナトリウム処理を施したコラーゲンスポンジは埋植後 1 週で完全に吸収され、線維性結合組織に置換されていた (図 10e, 10f)。

2-4-2. ベスキチン (キチンスポンジ)

ベスキチンスポンジ (未処理) の埋植試験では、内部に多量の炎症性滲出液 (血清/血漿成分) を含有した異物肉芽腫の壁からなる囊胞様構造の所見が観察された (図 11a)。ベスキチン繊維は異物巨細胞による貪食像が認められ、また滲出液中の繊維には軽度の大食細胞およびリンパ球、好中球の浸潤が見られた。これらの線維の変性・溶解を示す所見は観察されなかった。埋植後 2 週では、炎症性滲出物は殆ど消失し (図 11b)、大食細胞によるベスキチン繊維の吸収・消失が同様にみられ、結合組織線維の増生を認めた (図 11c)。しかし、残存したベスキチン繊維には大食細胞と異物巨細胞反応が未だ強く観察された (図 11d)。ベスキチンの繊維吸収性と生体親和性は各種の化学処理により何ら影響を受けなかった。(図 11e, 11f, 11g)。

2-4-3. ソープサン (アルギン酸 Ca 不織布)

ソープサンの埋植試験では、ベスキチンと同様、内腔に炎症性滲出物を含む囊胞様構造の病理組織像が観察された (図 12a)。囊胞様構造の壁内には大食細胞とリンパ球の浸潤が観察され、ソープサン繊維に対する異物巨細胞反応が認められた (図 12b)。埋植後 2 週においても高度の異物肉芽腫反応を呈し、貯留した滲出物の減少が認められた (図 12a)。ソープサン繊維のアルカリ処理では、いずれの濃度のもので対照群と比較して明らかな相違は認められなかった (図 12c, 12d)。しかし、次亜塩素酸ナトリウム処理では、スポンジは吸収傾向を示し (図 12e)、埋植後 2 週で殆ど吸収・消失され、僅かに残存が見られるのみとなり、結合組織線維の増生が観察された (図 12f)。

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) を発現するリポド A 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 13)^{1,2}。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。

医療用具からの LPS 回収は用具の材質により問題を生じる場合がある。例えば、プラスチック製医療用具の場合、LPS がプラスチック表面に非特異的に吸着してしまうため、注射用蒸留水や生理食塩水による抽出では十分な回収率が得られない。天然医用材料から製造された各種製品からの LPS 回収においても同様な現象が見られ、特にコラーゲンは LPS との結合親和性が非常に高いため、その回収は困難となる。また、LPS の生物活性は加温処理により顕著に低下することに加え、酸・アルカリに対する安定性や抽出溶媒に対する溶解性などを考慮する必要があるため、医療用具や医用材料からの LPS 回収に適用できる抽出条件はかなり制限されてしまう。現行の「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」の場合、天然医用材料からの LPS 回収は生理食塩水を用いて、室温下、72 時間抽出を行う条件を基本としている。しかし、ガイドライン法によるコラーゲンからの LPS 回収率は LPS レベルおよび菌体レベルともに 1% に達しないことが昨年度の本研究により明らかとなっている。医療用具や医用材料に LPS 汚染がある場合、そこには遊離 LPS の他、死菌・生菌を問わず必ずグラム陰性細菌が存在することとなる。それ故、医療用具や医用材料から LPS を回収する際は LPS レベルの活性に加え、菌体レベルの LPS 活性も失活させない条件を採用する必要がある。今年度の本研究においてキチン類からの LPS 回収条件の最適化を

試みた結果、ガイドライン法を適用した場合、比較的水溶性の高い CM-キチンでは 20% 程度の回収率が得られた。一方、キチンおよびキトサンからの回収率は低値であり、ガイドライン法では両材料中に混在する LPS 量を正確に評価できないことが判明した。しかし、LPS 抽出溶媒として 0.1M 塩酸を使用して 4°C で 10 分間超音波抽出することにより、キチンおよびキトサンからの LPS 回収率は 20-30% 程度まで改善された。これに対し、菌体レベルの LPS 活性の回収率はいずれの材料も低値であり、塩酸抽出を行った場合でも 5% 前後に留まった。同回収率を改善するため、様々な条件による抽出を試みたがいずれも無効であった。これらの成績は、キチン類のエンドトキシン試験において検出される LPS は主に菌体から遊離した LPS に由来し、菌体に結合した状態の LPS は十分に回収されない可能性が高いことを意味している。

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の数に大きく左右されることが明らかになっている¹¹。LPS の生物活性は酸処理およびアルカリ処理などにより低減させることが可能である。昨年度の本研究において、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、数種類の薬剤の LPS に対する不活化効力について検討した結果、LPS レベルおよび菌体レベルの活性は医用材料存在下でも次亜塩素酸ナトリウムおよび水酸化ナトリウム処理により濃度依存的に不活化されることが明らかとなった。そこで、今

年度の本研究では、これらの化学処理を施した各種天然医用材料の化学的・生物学的性状を詳細に検討し、より安全性の高い製品の開発を行うための基礎データを収集した。その結果、アルギン酸Ca不織布（ソープサン）に含まれるLPSはアルカリ処理および次亜塩素酸ナトリウムにより濃度依存的に不活化できることが明らかとなった。また、アルカリ処理に伴う各種スポンジの構造変化を検討した結果、0.1M水酸化ナトリウム処理を施したコラーゲンにおいて $\alpha 1$ (III) 鎖の減少が観察されたが、いずれの処理濃度において全試料ともスポンジ構造に大きな変化は認められなかった。正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化を指標として、アルカリ処理を施したコラーゲンスポンジおよびベスキチン（キチンスポンジ）の骨組織再生に及ぼす影響を評価した結果、アルカリ処理スポンジ上で正常ヒト骨芽細胞を培養した際の増殖度と分化度は未処理品とほぼ同一であり、アルカリ処理は両材料が持つ骨組織適合性に大きな影響を与えないことが明らかになった。また、ラット背部皮下筋膜下への埋植試験の結果、コラーゲン、ベスキチンおよびソープサンともに、アルカリ処理スポンジの生体親和性は未処理スポンジと同一であることが判明した。

一方、次亜塩素酸ナトリウム処理の場合、各材料ともに未処理品と比較して明らかなスポンジ構造の変化が認められた。埋植試験による評価の結果、キチンスポンジであるベスキチンの生体親和性は次亜塩素酸ナトリウム処理に大きな変化を受けないが、同処理を施したコラーゲンスポンジでは生体吸収性が促進され、埋植部位における結合組織への置換が速やかに起こることが判

明した。また、未処理のソープサンは吸収性に乏しいと共に、ラット皮下への生体適合性も低く、重度の異物反応を惹起したが、次亜塩素酸ナトリウム処理を施すことにより分解性が付与され、埋植後2週で僅かに残存が見られるのみとなり、結合組織線維の増生が観察された。これらの成績から、アルカリ処理は各種スポンジの機能を変化させることなく、混在するLPS量を低減する処理法として有用であることが判明した。また、次亜塩素酸ナトリウム処理はスポンジ構造に影響を与えるが、LPS不活化効果に加え、材料の種類によっては分解性の向上、異物反応の低減などを期待できることが明らかになった。今後、両化学処理を施した各種スポンジを実験的に作製した損傷皮膚に適用し、創傷被覆剤としての機能を評価する予定である。

E. 研究発表

- 1) 伊佐間和郎, 齋島由二, 長谷川千恵, 佐々木和夫, 土屋利江. ガンマ線照射コラーゲンスポンジの骨芽細胞に及ぼす影響. 第3回日本再生医療学会総会 (2004年3月・幕張).
- 2) 齋島由二, 長谷川千恵, 矢上 健, 土屋利江. キチン類に混在するエンドトキシンの回収と不活化. 第25回日本バイオマテリアル学会大会 (2003年12月・大阪).
- 3) 伊佐間和郎, 齋島由二, 土屋利江. ガンマ線照射コラーゲンの骨芽細胞に及ぼす影響. 第25回日本バイオマテリアル学会大会 (2003年12月・大阪).
- 4) Haishima Y., Hasegawa C., Yagami T., Tsuchiya T., Matsuda R. and Hayashi Y. Estimation of uncertainty in kinetic-colorimetric assay of

bacterial endotoxins. J. Pharm. Biomed. Anal., 32, 495-503 (2003).

5) Nakagawa Y., Murai T., Hasegawa C., Hirata M., Tsuchiya T., Yagami T. and Haishima Y. Endotoxin contamination in wound dressings made of natural biomaterials. J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater., 66B, 347-355 (2003).

6) 萩島由二. 発熱性物質試験. 医療材料・医療機器の安全性と生体適合性 (土屋利江監修), シーエムシー出版, p. 37-42 (2003).

7) 萩島由二. エンドトキシン試験. 医療材料・医療機器の安全性と生体適合性 (土屋利江監修), シーエムシー出版, p. 43-50 (2003).

F. 特許関係
特になし。

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-andrzejewski 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) Nakagawa Y., Murai T., Hasegawa C., Hirata M., Tsuchiya T., Yagami T. and Haishima Y. Endotoxin contamination in wound dressings made of natural biomaterials. J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater., 66B, 347-355 (2003).
- 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) Westphal O, Luderitz O and Bister F. Über die Extraction von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z Naturforsch 1952;7b: 148-155.
- 7) Westphal O and Jann K. Bacterial lipopoly-saccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods carbohydra Chem 1965;5:83-91.
- 8) 第 14 改正日本薬局方. 厚生労働省.
- 9) Haishima Y., Hasegawa C., Yagami T., Tsuchiya T., Matsuda R. and Hayashi Y. Estimation of uncertainty in kinetic-colorimetric assay of bacterial endotoxins. J. Pharm. Biomed. Anal., 32, 495-503 (2003).
- 10) Isama K, Matsuoka A, Haishima Y and Tsuchiya T. Proliferation and differentiation of