

図 32. 続き (dilution×10)

表3 LLNAで2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)及びhexyl cinnamic aldehyde (HCA)を塗布したときのリンパ節の活性化反応

Chemical	Lymph node weight (mg)		Lymph node cell number (x10 ⁶)		BrdU labeling index (O.D.)	
	Mean ± SD	SI	Mean ± SD	SI	Mean ± SD	SI
AOO	6.63 ± 0.76		9.53 ± 1.65		0.397 ± 0.163	
0.5% DNCB	20.50 ± 2.64	3.1	47.81 ± 8.99	5.0	1.554 ± 0.320	3.9
25% HCA	14.67 ± 1.14	2.2	33.58 ± 3.79	3.5	0.566 ± 0.211	1.4

Chemical	ATP content (RLU)		alamarBlue uptake (FI)		³ HTdR incorporation (dpm)	
	Mean ± SD	SI	Mean ± SD	SI	Mean ± SD	SI
AOO	3254 ± 1066		2618 ± 279		201 ± 27	
0.5% DNCB	16878 ± 4311	5.2	14538 ± 3109	5.6	1584 ± 315	7.9
25% HCA	11266 ± 2560	3.5	10205 ± 1000	4.1	991 ± 197	4.9

AOO = acetone:olive oil (4:1).

各指標の値は4匹のマウスの平均(mean)±標準偏差 (SD)を示した。

各stimulation index (SI)は溶媒対照(AOO)群に対する各試験物質処理群の平均値の増加率を示す。

表4. マウスリンパ節及び脾臓リンパ球のT細胞及びB細胞の比率

	B cells		T cells		
	CD19+ (%)	B220+ (%)	CD3+ (%)	CD3+CD4+ (%)	CD3+CD8+ (%)
Lymph node	28.2	23.3	73.1	46.5	24.7
Spleen	56.3	60.4	33.2	21.3	11.0

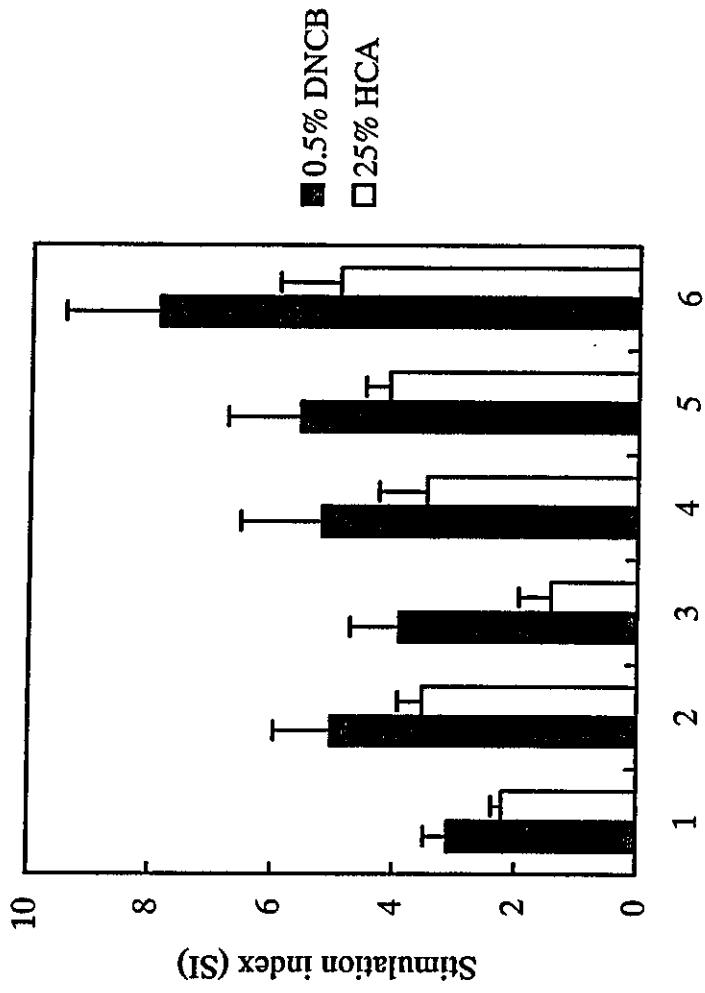


図 29 . LLNAにおける各指標のstimulation index (SI)値

1. lymph node weight
2. lymph node cell number
3. BrdU incorporation
4. ATP content
5. alamarBlue uptake
6. ³HTdR incorporation

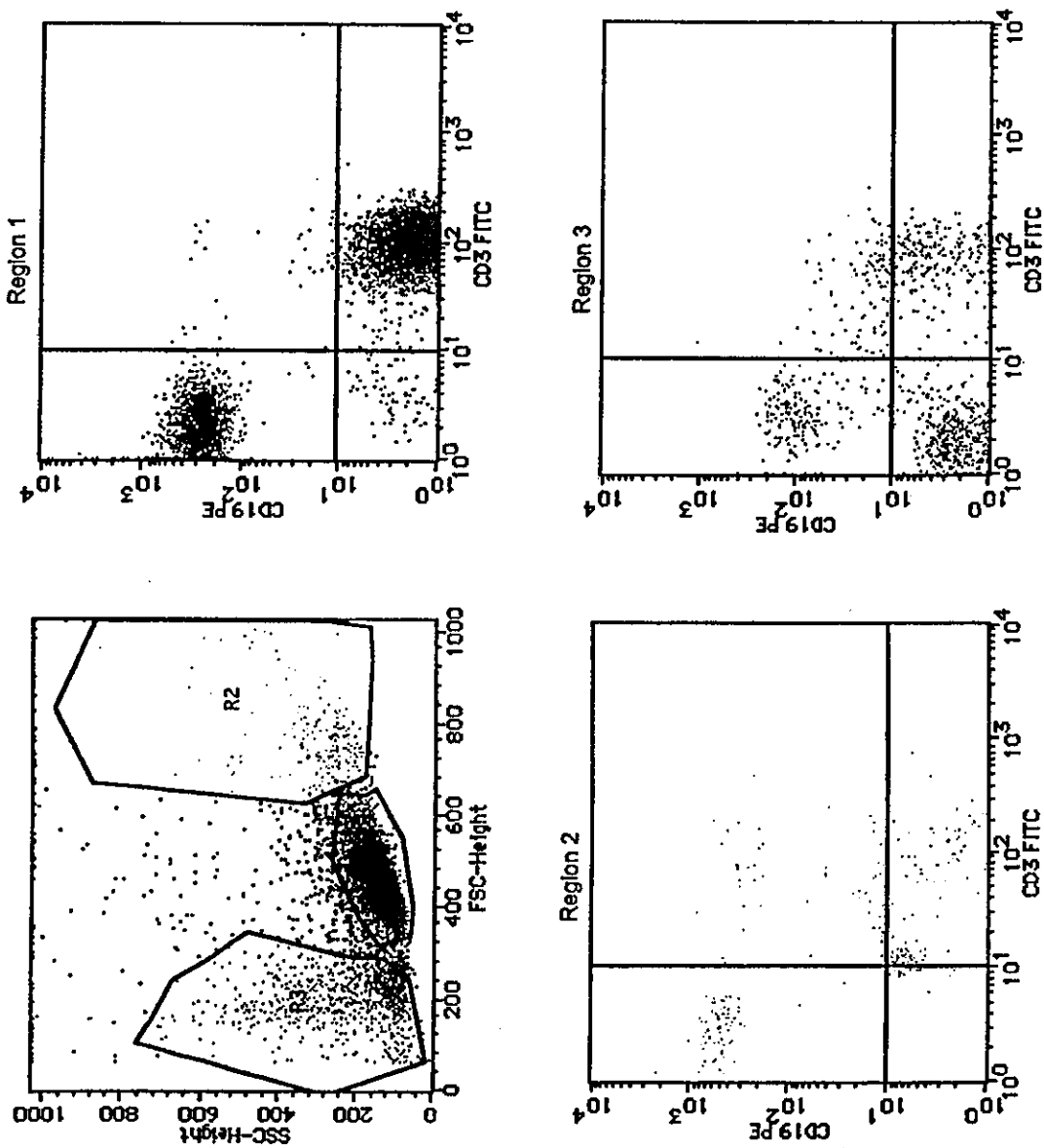


図30 マウスリンパ節細胞のリージョン設定の違いによるT及びB細胞分布の変化
 細胞の大きさ(FSC)と内部構造(SSC)によって脾臓細胞を3つのリージョン(R1、R2、R3)
 に分け、それぞれの領域におけるFITC標識抗CD3抗体及びPE標識抗CD19抗体で染色
 された細胞の分布を示した。抗CD3抗体はT細胞、抗CD19抗体はB細胞を認識する。

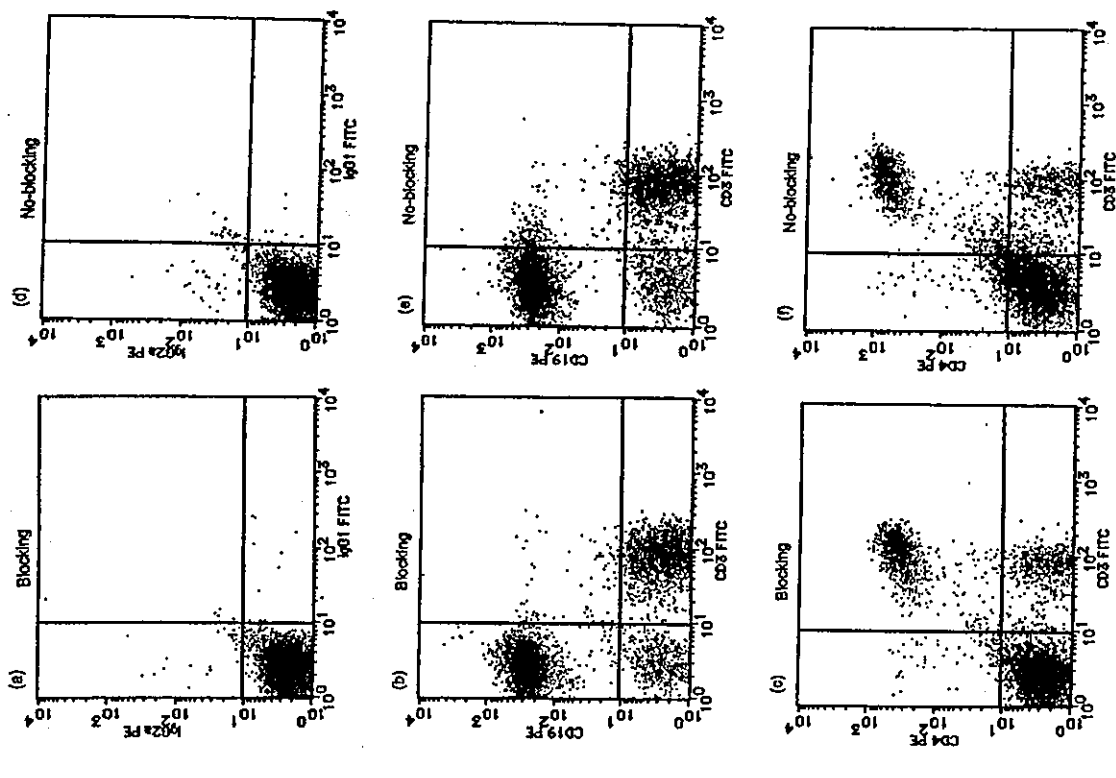


図 31 細胞染色時におけるブロッキング剤の有無の効果

細胞懸液に抗マウス CD16/CD32(FC γ RIIIb receptor)抗体を加え、避光下、氷上で5分間インキュベートしてブロッキング(Blocking)した。その後、これに FITC 及び PE 標識した各抗マウス抗体を加えて30分間インキュベートして染色した(a,b,c)。ブロッキング剤を添加せずに、直ぐに抗体で処理したものを No-blocking 群とした(d,e,f)。

(a), (d): IgG1-FITC / IgG2a-PE で染色、(b), (e): CD3-FITC / CD19-PE で染色
(c), (f): CD3-FITC / CD4-PE で染色

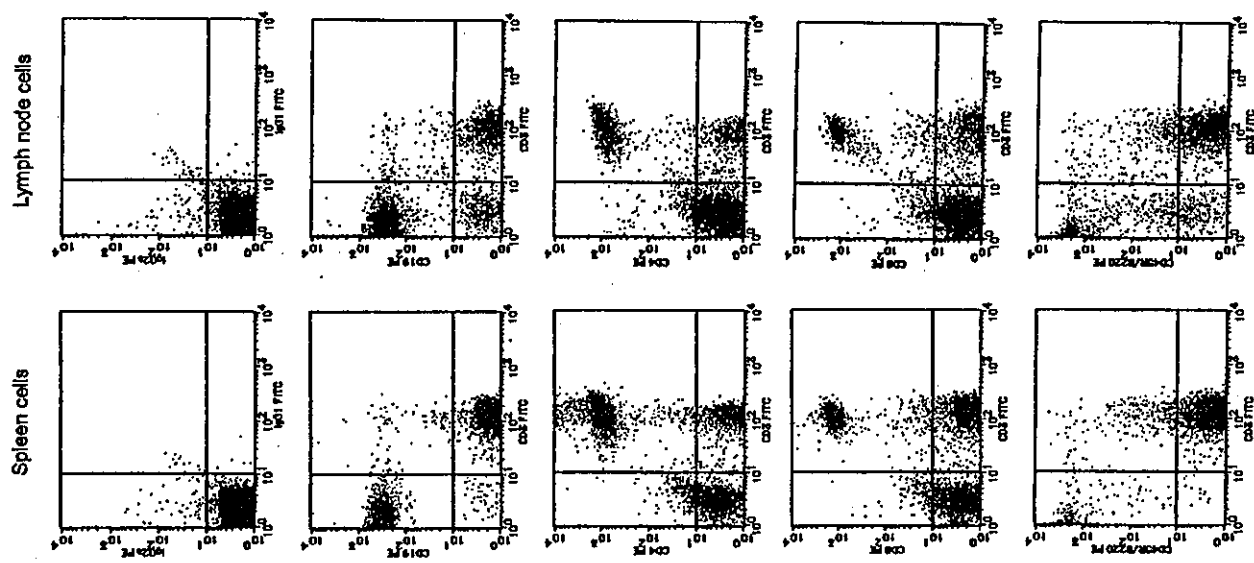


図 32 抗体濃度と染色像 (dilution×1)
 市販の各 FITC 及び PE 標識抗体を希釈した。細胞にそれぞれの抗体を添加して染色後、
 フローサイトメトリーで解析した。

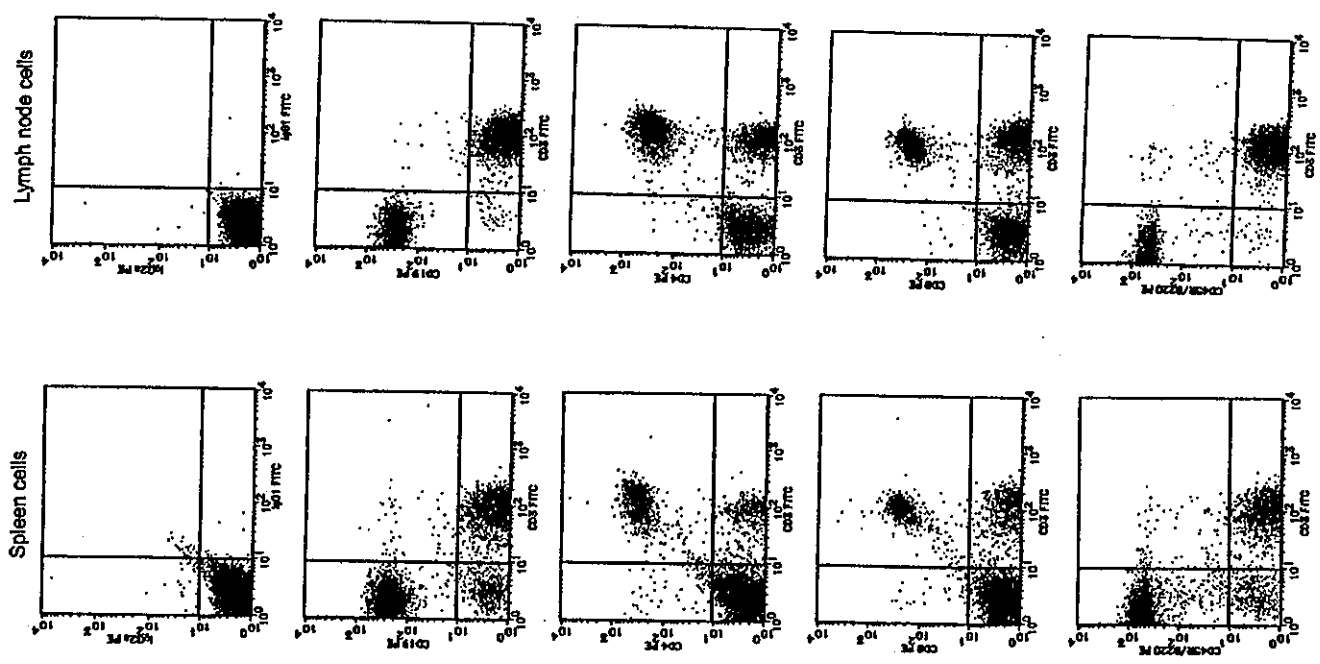


図 32. 統計 (dilution×6)

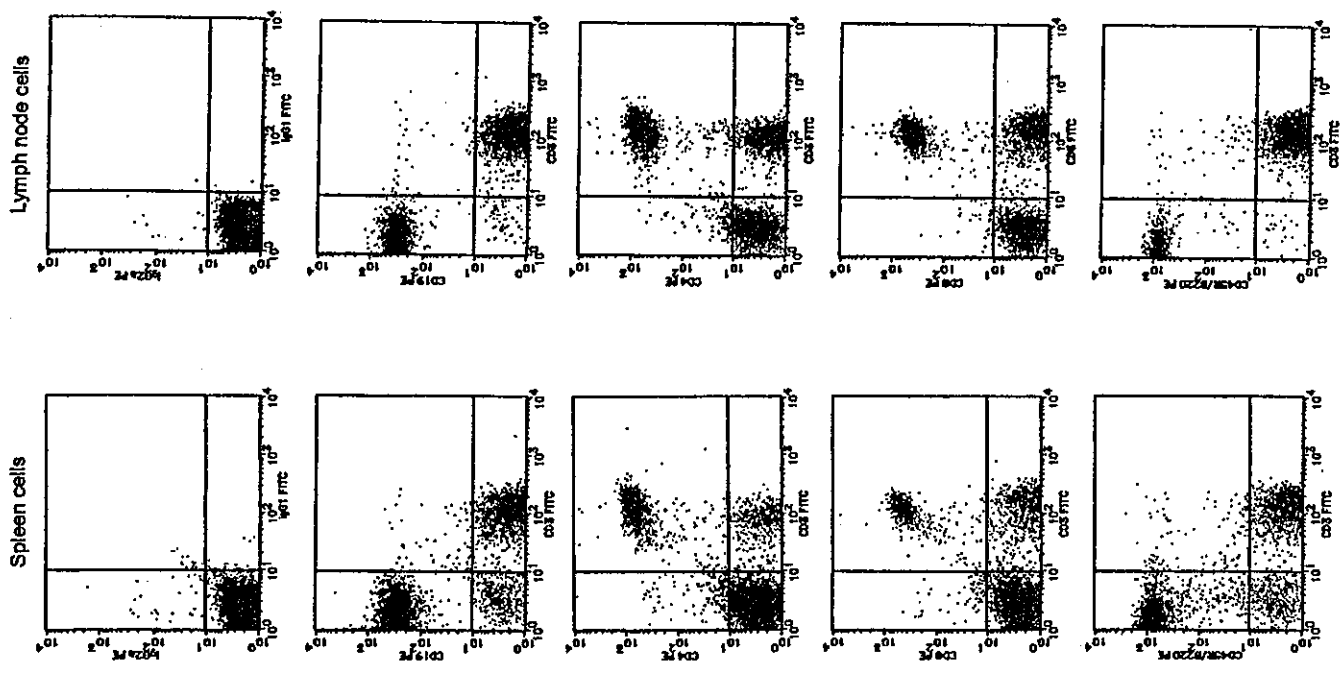


図 32. 続き (dilution×10)

表5. 1st PCR用のプライマーとアニーリング温度

SNP	1st Primer (F)	1st Primer (R)	Product	Annealing Temp.
SERPINE1-1	ACCTGCTTCCACCCGTCTC	GCACGCATCTGACATTTCTTC	445	61.4
SERPINE1-2	GGCTTAGAACCTGAACATGTC	CAATCTTGAATCCCATAGCTGC	440	64.0
SERPINE1-3	GGCTTAGAACCTGAACATGTC	CAATCTTGAATCCCATAGCTGC	440	64.0
SERPINE1-4	TCCTGGTTCTGCCCAAGTAAG	CTCCGTCTTGGAAAGTGATTC	411	64.0
SERPINE1-5	ATCCATTGCTACCAAGCTCC	TGAACTCATGGGCTCAAGTG	309	64.0
CYP2C9-1	GATCCATTGGAACCTTACATGTG	CAGCCTCAGTCTTATTGAACCTAC	452	57.5
CYP2C9-2	ATTTTCTCCTTTTCCATCAGTTTTTAC	GGGACTTCGAAAACATGGAG	277	57.5
CYP2C9-3	CACACCTGGCCGTTTGTTA	TCCCAGGCAAGAAAGAGGA	591	61.4
F2-1	AAGACTGCCTGTTCTCTGAGG	AGGTGGATGCTCTGAAGACTGTG	464	68.8
F2-2	TGAGCTAGCAGGGACAGGTAG	TCCATAGCTGGCACTCAATG	443	66.1
F2-3	ATTGAGTGCCAGCTATGGAG	AGCCAGTATTCTTGGTTCCC	367	64.0
F2-4	AAGCGTACCTCAAGCCCAAC	GCCAGTATTCTTGGTTCCC	276	66.1
F2-5	CACCAGATGCTTGTAGCTGAG	GGTGAATCACTTGAGGTCAGG	382	66.1
F2-6	TGAGCAAGTTGCCTAACCTC	ACTCCTGACCCTCAAGTGATCTG	449	66.1
F7	CITGTCCITTTGGATCAGTCC	ATAATCCGTAGTGGGACAGG	378	66.1
F9	GAGGCCATTGGAAATAGTCC	AGAACCAGTACTTACCAACCTGC	372	64.0
F10-1	AACTGTCCITTTGGTGGATGG	AAAGCAGACAGTGACCGGTGC	320	66.1
F10-2	ATCCTCAAGGCCAGCTGTG	GCAGATGGCTAACTGTCCTGTC	227	66.1
F10-3	CAGCTTGAGTCACTTAATTATGG	GGTTACCTTAGTCGGGAATC	448	56.2
F10-4	ACATGGCAGTCAAGGAGCATAG	CGGCACCTGATGCCCTGTG	430	68.8
F10-5	AACTCAGAAGTGGAAAGGGTGG	TTTCAGGCAGAAAGGAATGGC	396	66.1
F10-6	CTCCGGCCAGATGCATTC	GTCGGATCTGCAGGTGAGC	211	61.4
GGCX	CAAGTTTGCATAAAGTCACCTCC	GCTTCTTGTCTGCCTCAG	342	64.0

表6. SSP - PCR用のプライマーとアニーリング温度

SNP	Primer A(TAMRA)	Primer B(Oy5)	Annealing Temp.
SERPINE1-1	GTA AGC CCC GTA GTT CCA	GTA AGC CCC GTA GTT CCG	63.2
SERPINE1-2	GCC TAG TCC TGG GCC TGG	GCC TAG TCC TGG GCC TGA	68.7
SERPINE1-3	CAG ACC CTT CAC CAA AGA C	GCA GAC COT TCA CCA AAG AT	59.4
SERPINE1-4	TTG AAT TTC CCA GAT CTG TGA C	GTT GAA TTT CCC AGA TCT GTG AT	53.7
SERPINE1-5	AGC TGG GCT TAG TGG CTC ACT	TGG GCT TAG TGG CTC ACA	63.2
CYP2C9-1	TGC CTG TGT ACA CCC TGC	AAT GCC TGT GTA CAC CCT GT	63.2
CYP2C9-2	GCA CGA GGT CCA GAG ATA CA	CAC GAG GTC CAG AGA TAG C	66.3
CYP2C9-3	AAG GAA GCC CTG ATT GAT CT	AGG AAG CCC TGA TTG ATC C	63.2
F2-1	AGA GAA GCA AGC GAG GAA T	AGA GAA GCA AGC GAG GAA C	66.3
F2-2	AAA TAT TCG CTA AGT GCC TAC CAT A	ATA TTC GCT AAG TGC CTA CCA TG	63.2
F2-3	GGT AGT GGA GTT GAT TCT GGA AC	GGT AGT GGA GTT GAT TCT GGA AG	63.2
F2-4	TGT AGC ACC AGG GTC CCA	TGT AGC ACC AGG GTC CCG	68.7
F2-5	GAG AGT CGC TTG AAC CCG	GAG AGT CGC TTG AAC CCA	66.3
F2-6	ACG TGA TAG GCG CTC AAT AAG	CGT GAT AGG CGC TCA ATA AA	56.2
F7	CGC TCC TGT CGG TGC CAC	CGC TCC TGT CGG TGC CAT	68.7
F9	GAT ATA GAA ATA TCT GAT GCT TTC TTC A	ATA TCT GAT GCT GTC TTC TTC G	63.2
F10-1	AGG GTT TCT GTG GTG GAA CT	GGT TTC TGT GGT GGA ACC	53.7
F10-2	ACT GTG TCT CCG TTT CTC CT	CTG TGT CTC CGT TTC TCC C	63.2
F10-3	GAA TTT CCT TTC TGC TTT TGT TCT A	AAT TTC CTT TCT GCT TTT GTT CTC	56.2
F10-4	TGG ATG GAC GGA GCA GCG	TGG ATG GAC GGA GCA GCA	71.6
F10-5	GCC ATC CAT TCC CCC CTC	GCC ATC CAT TCC CCC CTT	51.8
F10-6	CCA GGC AGC GAG GGG AGT	CCA GGC AGC GAG GGG AGC	71.6
GGCX	GAA AAA CAG GAA AAA GCC G	CTG AAA AAC AGG AAA AAG CCA	59.4

表7. SNPタイピングの結果

Gene	Location		Type	Allele1 (frequency)	Allele2 (frequency)
SERPINE1 (PAI-1)	1	3'UTR c.1570C>T	SNP	C (0.545)	T (0.455)
	2	CDS (Ala/Thr) c.43G>A	SNP	G (0.925)	A (0.075)
	3	CDS (Ile/Val) c.49G>A	SNP	G (0.995)	A (0.005)
	4	INTRON c.700+1921C>T	SNP	C (0.545)	T (0.455)
	5	INTRON c.1087+859T>A	SNP	T (0.545)	A (0.455)
CYP2C9	1	INTRON c.1149+147C>T	SNP	C (0.705)	T (0.295)
	2	CDS (Ile/Leu) c.1075A>C	SNP	A (0.990)	C (0.010)
	3	CDS (Leu/Pro) c.269T>C	SNP	T (0.990)	C (0.010)
F2 (prothrombin)	1	INTRON c.240+83T>C	SNP	T (0.560)	C (0.440)
	2	INTRON c.316+2125C>T	SNP	C (0.580)	T (0.420)
	3	INTRON c.422+90G>C	SNP	G (0.635)	C (0.365)
	4	CDS (Met/Thr) c.494T>C	SNP	T (0.580)	C (0.420)
	5	INTRON c.1472+251C>T	SNP	C (0.635)	T (0.365)
	6	INTRON c.1654+290C>T	SNP	C (0.580)	T (0.420)
F7	CDS-synonymous c.525C>T	SNP	C (0.915)	T (0.085)	
F9	INTRON c.88+75A>G	SNP	A (0.890)	G (0.110)	
F10	1	CDS-synonymous c.792T>C	SNP	T (0.590)	C (0.410)
	2	INTRON c.70+270A>G	SNP	A (0.675)	G (0.325)
	3	INTRON c.256+98A>C	SNP	A (0.905)	C (0.095)
	4	INTRON c.231+64C>T	SNP	C (0.620)	T (0.380)
	5	INTRON c.502+2115~2116	INDEL	- (1.000)	T (0.000)
	6	INTRON c.502+2531A>G	SNP	A (1.000)	G (0.000)
GGCX	INTRON c.2084+408C>T	SNP	C (0.685)	T (0.315)	

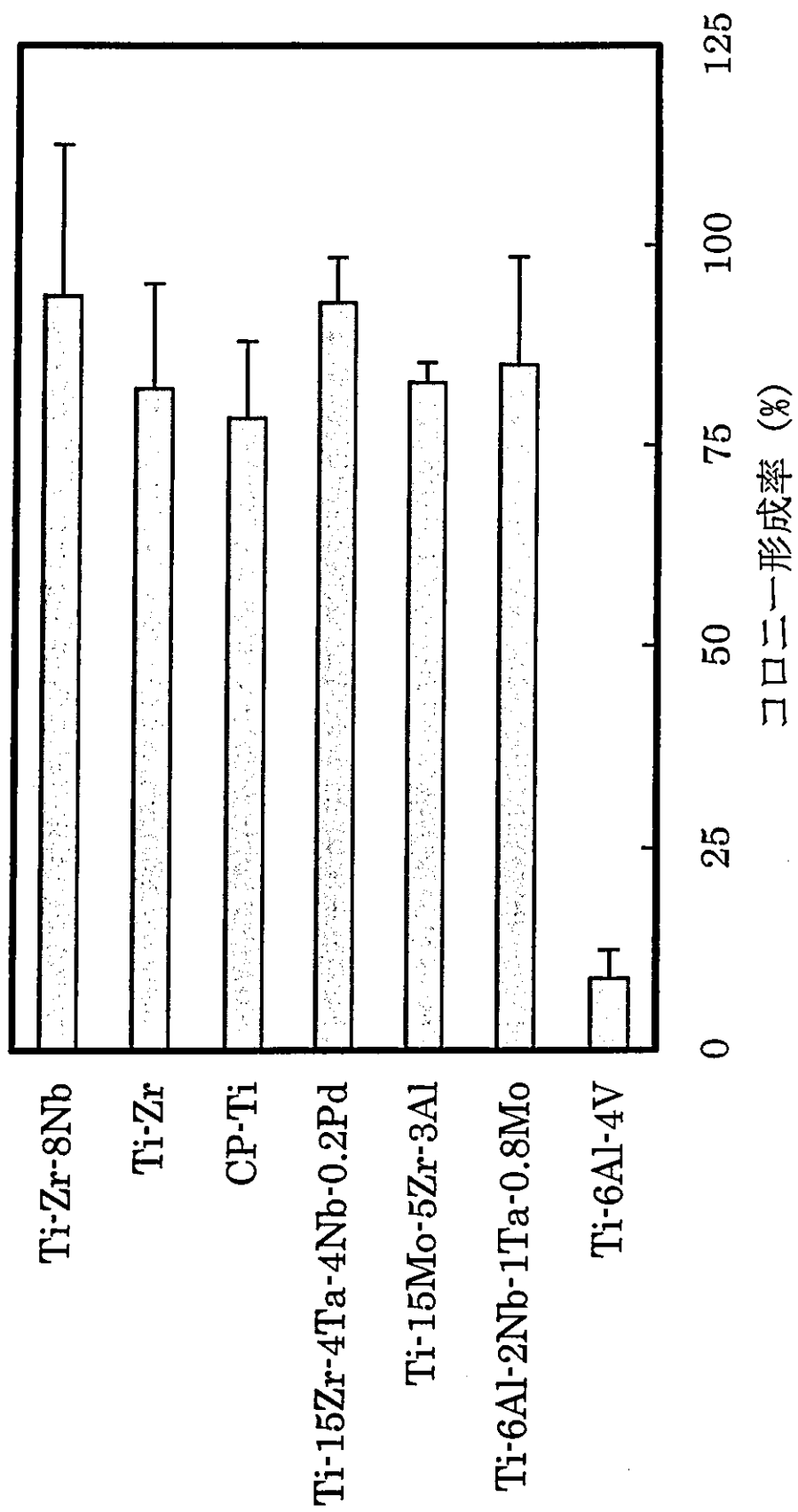


図 33. チタン系金属材料の細胞毒性

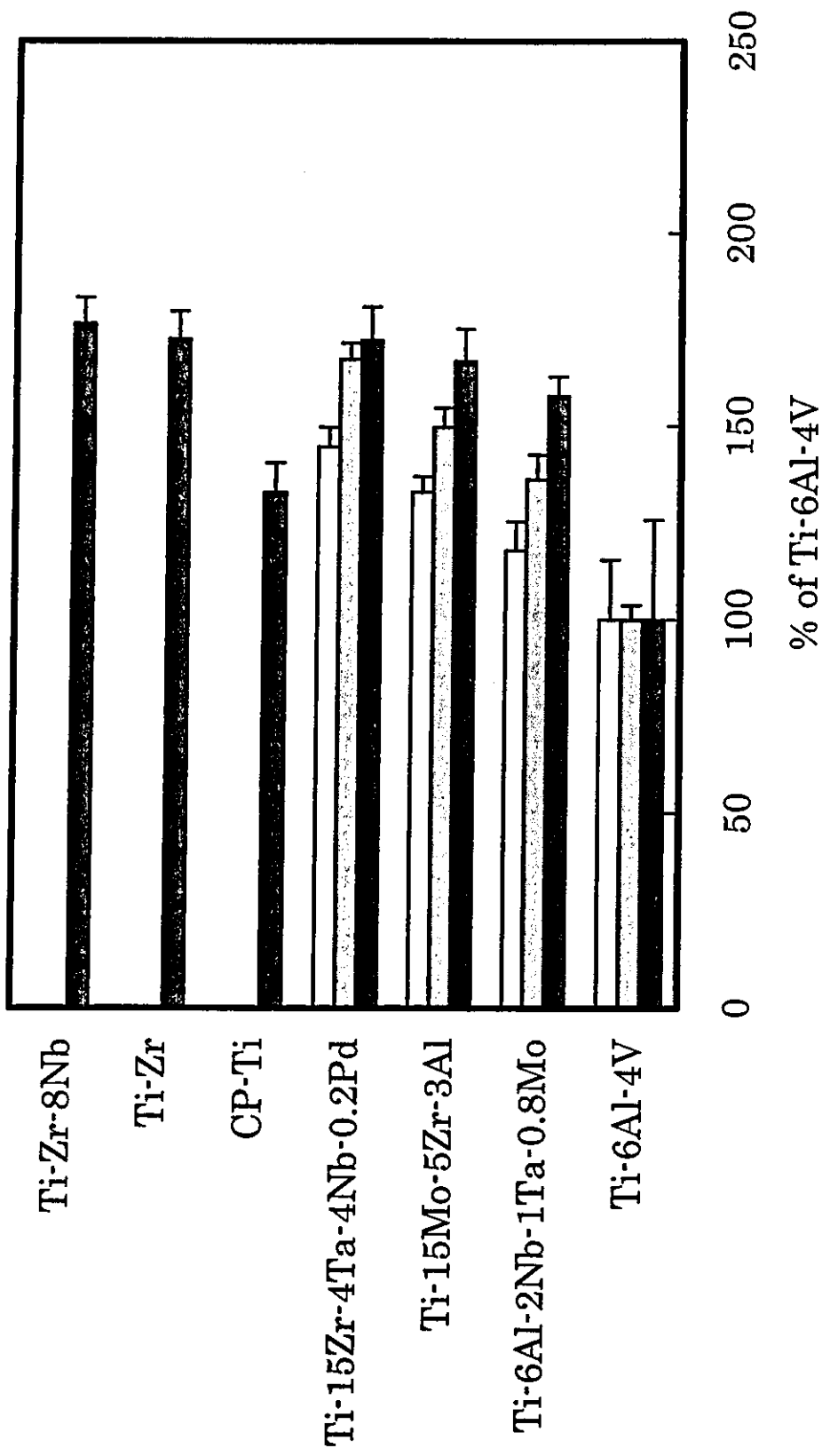


図 34. 骨芽細胞の増殖に及ぼすチタン系金属材料の影響

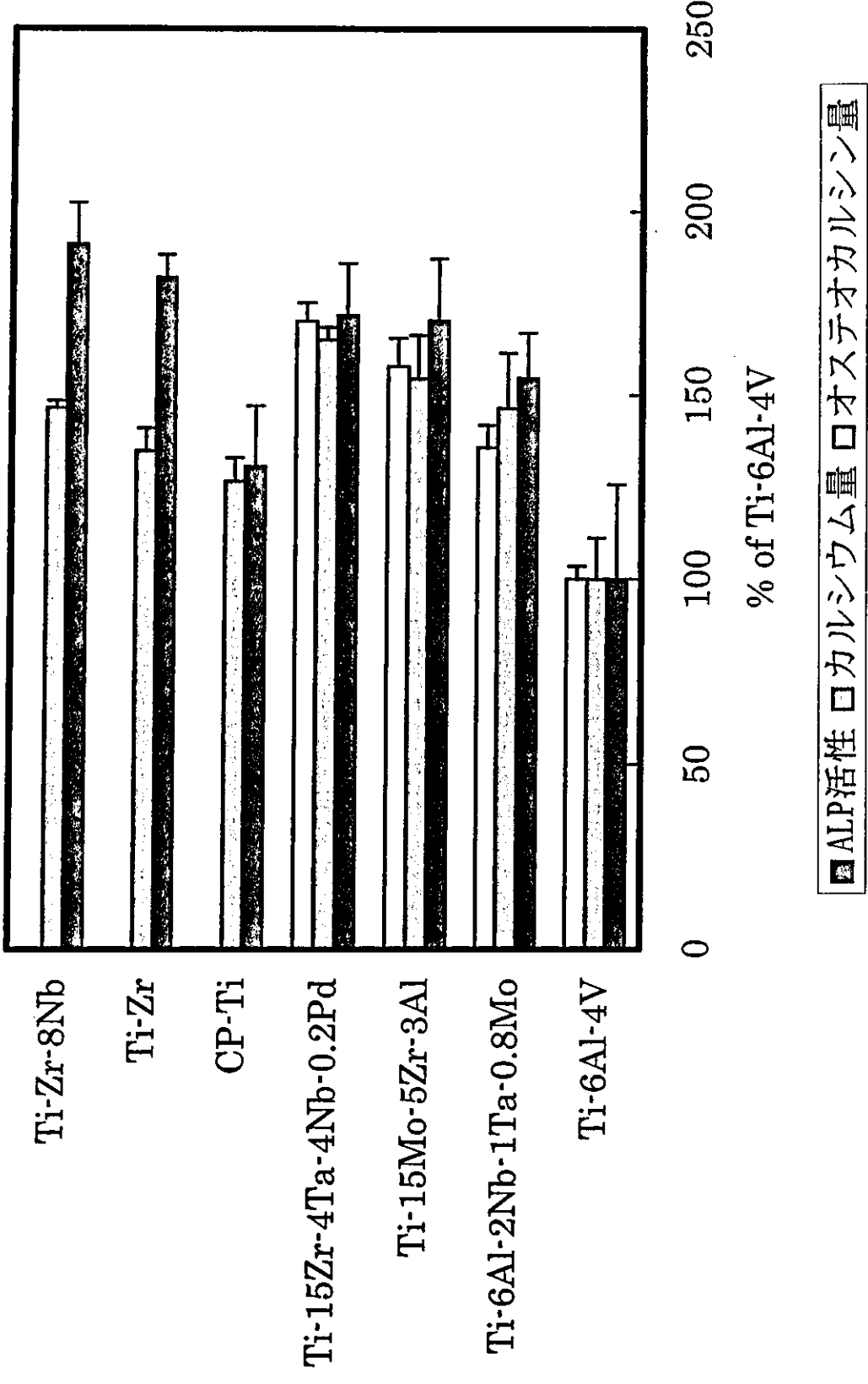


図 35 骨芽細胞の分化に及ぼすチタン系金属材料の影響

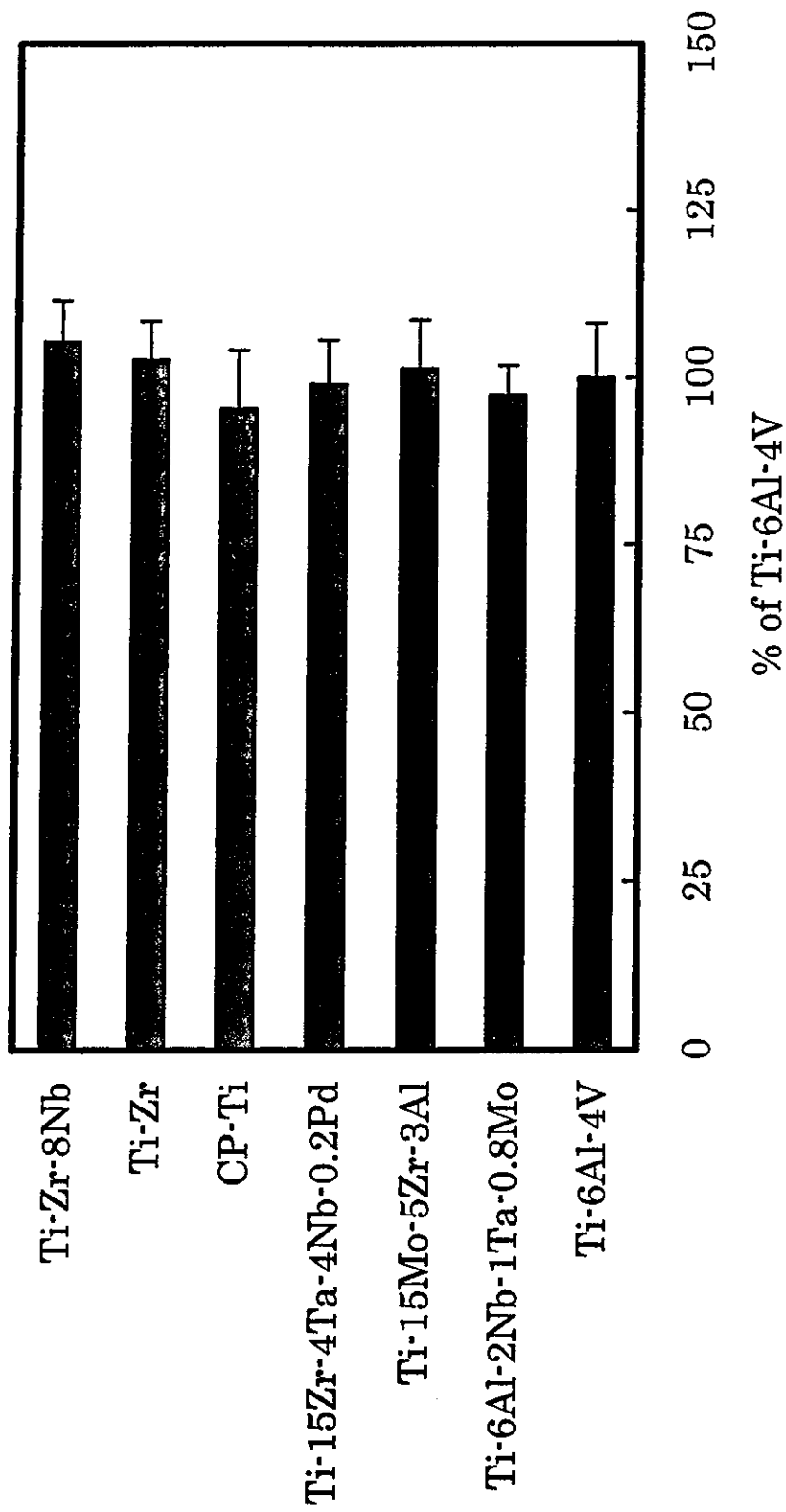


図 36 . 骨芽細胞の分化レベルに及ぼすチタン系金属材料の影響

II 分担研究報告

1. 感染因子含有材料の in vivo 動態評価手法の開発

配島由二

分担研究報告書

平成 16 年度厚生科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

「医療機器・医療材料の安全性評価手法の開発に関する研究」

(H16-医薬-009)

分担研究課題名

感染因子含有材料の in vivo 動態評価手法の開発

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	鮎島 由二	国立医薬品食品衛生研究所療品部
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
	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：平成 16 年度の本研究では、医用材料のグラム陰性細菌汚染による生体影響を評価し、科学的根拠に基づいたエンドトキシン（lipopolysaccharide, LPS）規格値を設定することを目的として、種々の量の LPS 又は菌体を添加したコラーゲンを試料としてラット埋植試験を行い、組織や臓器への影響、創傷治癒および骨再生に対する影響について検討した。その結果、LPS および死菌体成分は皮膚創傷の治療に大きな影響を与えないことから、皮膚に適用する被覆剤の場合、LPS 規格値を設定する必要はないことが明らかとなった。また、欠損を伴わない正常な状態であれば、実測値として 10,000 EU/mg を超えるエンドトキシン活性を示す医用材料を腹腔内に適用しても、各種臓器に対する影響はないことが確認された。一方、医用材料を皮下に適用する場合は、実測値として約 750 EU/mg に相当する菌体成分が存在すると顕著な炎症反応が惹起されることが判明した。また、実測値として約 40 EU/mg のエンドトキシン活性が検出される材料は新生骨形成を抑制することが明らかとなった。ヒトに対する安全基準値として外挿するため、これらの実験値に不確実係数を乗じて LPS 規格値を求めた結果、皮下適用材料は 75 EU/mg（使用限度値 5,000 EU/kg 体重）、骨再生用材料は 4 EU/mg（使用限度値 160 EU/kg 体重）と試算された。

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、特に微生物学的安全性の制御が難しいという欠点を持っている。

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、シユワルツマン活性、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、敗血症時などに見られる致死性疾患である多臓器不全症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、並びに組織工學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。

注射用医薬品の LPS 規格値は適用部位に応じて日本薬局方により定められている。一方、医薬品と比較して複雑な組成を持ち、適用部位も様々である医療用具の場合、公的な LPS 規格値は設定されていないのが現状である。医療用具に関する LPS 規格値は注射用医薬品の同規格値を参考として、製品中の LPS 総含量に基づいて自主的に設定される例が多い³。しかし、医療用具や医用材料に混在する LPS の生体に対する実際のリスク強度を正確に判定するためには、製品の適用部位、生体内分解挙動、LPS の遊離速度や生体内寿命などを評価する必要がある。

ある。平成 16 年度の本研究では、医療用具のグラム陰性細菌汚染による生体影響を評価し、科学的根拠に基づいた LPS 規格値を設定することを目的として、種々の量の LPS 又は菌体を添加したコラーゲンを試料としてラット埋植試験を行い、組織や臓器への影響、創傷治癒および骨再生に対する影響について検討した。

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℃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℃、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。同加熱死菌体を連続遠心分離により集菌し、蒸留水で 3 回洗浄した後、アセトンおよびジエチルエーテルにより脱脂し、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乾燥菌体からフェノール/水法により抽出し^{4,5}、Dnase/RNase 処理後、超遠心分離の反復により精製した^{6,7}。調製した大腸菌 03 K2a, K2b:H3 由来 LPS および大腸菌 0111 菌体の LPS 活性強度は、それぞれ 26.6 EU/ng および 0.127 EU/ng であった。

(2) LPS および菌体スパイク標品の調製

医用材料としては、ブタ皮膚由来アテロコラーゲン (Type I & Type III : 日本ハム製) を使用した。同コラーゲンに種々の量の LPS および菌体を添加し、60℃で凍結乾燥後、