

直径 1.6 cm、厚さ 1.5 mm の弱架橋化コラーゲンシートを調製した。また、同量の LPS および菌体を添加したコラーゲンに多孔性ハイドロキシアパタイト (HA: 東芝セラミックス製 NEOBONE: 粒径 0.5-1.0 mm, 孔径 150 μm) を重量比 3:5 の割合で混合した後、同様に処理してコラーゲン/HA コンポジットシートを調製した。対照用として、LPS および菌体非添加シートを作製した。各シートは過酢酸蒸気法により滅菌した。各種シートの整理番号と LPS および菌体添加量を表 1 および表 2 に示した。

(3) LPS 含量の測定

正確に重量を測定したコラーゲンシートおよびコラーゲン/HA コンポジットシートを生理食塩液中、37°C で 16 時間、精製コラーゲナーゼにより消化した。処理液を塩酸酸性とし、氷冷下、10 分間超音波処理後、その遠心上清を原液として注射用蒸留水を用いて希釈系列を作製した⁸。

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^{9,10}。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) を使用した。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) 走査型電子顕微鏡 (SEM) 解析

コラーゲンおよびコラーゲン/HA コンポジットシートを試料とし、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 40、120、700 および 2,000 倍で表面構造を観察した。

(5) 埋植試験および病理学的診断

実験動物としては、7 週齢の Fischer 系雄ラットを用いた。皮下への埋植 (図 1) は、pentobarbital sodium (30 mg/kg) 麻酔下でラット背部正中を 3 cm 切開し、筋膜を鈍的に剥離して空隙を作製し、4 箇所のコラーゲンシートを挿入後、皮膚縫合した。肝被膜への埋植 (図 2) は、上腹部を 2.5 cm 切開し、肝臓を視認して、肝被膜表面 2 箇所にコラーゲンシートを埋植した後、腹直筋および皮膚を縫合した。ラット皮膚創傷部へのコラーゲンシート被覆 (図 1) は、同様の麻酔下でラット背部皮膚をおよそ 1 cm 角で真皮層に至る深度で 4 箇所切除した後、被覆材と皮膚とを縫合した。ラット頭蓋骨の窩洞は、麻酔下、背位に固定し、頭部正中を 3 cm 切開して骨膜を鈍的に剥離した後、歯科用エンジンを用いて頭頂骨の両側に 5 mm×5 mm の骨欠損として形成した。窩洞部分には、コラーゲンシートおよびコラーゲン/HA コンポジットシート (5 mm×5 mm) を被覆した後、皮膚縫合した。また、対照として被覆剤を埋植しない実験群も作製した。

コラーゲンシートを埋植した後、1 週および 2 週で動物を屠殺し、皮下および肝被膜への埋植材を周囲組織と共に摘出した。肝被膜に埋植した動物群については同時に腹部臓器 (胃・膵・小腸・脾・副腎・腎) を採取した後、10% 中性緩衝ホルマリンにて固定を行った。皮膚創傷被覆を施した動

物群は、被覆 1 週および 2 週後、5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU, 0.1 mg/B. W., Sigma) を腹腔内に投与した 2 時間後に屠殺し、創傷部を採取し、材料を半割して片方をホルマリン固定、もう片側を 70%エタノール固定した。頭蓋骨への埋植を施した動物群は、2 週および 4 週後に屠殺し、頭蓋骨を採取して 10%中性緩衝ホルマリンにより固定し、軟 X 線写真を撮影した後、試料の脱灰を行った。各埋植試験試料は、固定又は脱灰終了後、常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て病理組織学的に検索した。創傷部被覆材料については、Anti-porcine Type I collagen PoAB (LSL, Japan) を用いた免疫染色により、残存コラーゲンの同定を行った。また、エタノール固定材料は、Anti-BrdU MoAB を用いた免疫染色を施し、被覆上皮の増殖活性を検討した。

C. 研究結果

(1) 各種シートの構造解析

1,000 倍量の菌体を添加したコラーゲンおよびコラーゲン/HA コンポジットシートの色調は淡黄色であったが、その他の各シートは、いずれも白色のディスク状スポンジとなった。電子顕微鏡により表面構造を観察した結果、図 4 に示したように、対照コラーゲンシートは典型的な小葉状の孔構造を呈していた。LPS および菌体を添加したコラーゲンシート (シート#5, #12) の表面構造は非添加品と同一であり、菌体成分の添加による相違は観察されなかった (図 4)。コラーゲン/HA コンポジットシートの表面構造は基本的にコラーゲンシートと同一であったことから、HA 表面がコラー

ゲンにより被覆されているものと判断された (図 5)。また、LPS および菌体添加標品 (シート#18, 25) の表面構造は、コラーゲンシートの場合と同様、非添加品と比較して大きな差異が認められなかった (図 5)。

(2) 各種シートからの LPS 回収試験

種々の量の LPS および菌体を添加したコラーゲンシートとコラーゲン/HA コンポジットシートの精製コラゲナーゼ間処理法を利用したエンドトキシン試験を実施し、その結果を表 1 および表 2 に示した。各シートから検出されるエンドトキシン活性 (リムルス活性) は LPS および菌体の添加量に比例して増加した。一方、LPS および菌体添加量とエンドトキシン活性の実測値から算出した回収率は、菌体成分の添加量が増加するに従って低下する傾向が認められた。

過去に実施したサーベイ試験⁸において、最も高いエンドトキシン汚染が認められたコラーゲン製品とアルギン酸製品から回収されるエンドトキシン活性は、それぞれ実測値として 3.6 EU/mg および 30.3 EU/mg であることから、本研究において調製した各シート中、LPS 添加コラーゲンシート#1-4、菌体添加コラーゲンシート#8-11、LPS 添加コラーゲン/HA コンポジットシート#14-18 および菌体添加コラーゲン/HA コンポジットシート#21-24 のエンドトキシン含量は市販製品と同程度であると判断された。

(3) 生体に対する影響評価

3-1. 皮下埋植

埋植後 1 週目の所見において、対照群および比較的少量の菌体を添加したコラーゲンシート#8-11 (表 1) は、ひ薄な線維性結

合組織に被包されており、散在的に線維芽細胞と毛細血管の侵入が認められた。僅かにリンパ球の浸潤が認められたが、特筆すべき炎症所見は観察されなかった（図 6）。しかし、比較的少量の菌体を添加したコラーゲンシート#12 では、多数の好中球と軽度のリンパ球浸潤が認められ、線維化を示す炎症性肉芽で被包された所見を呈していた（図 6）。更に菌体添加量の高いコラーゲンシート#13 では、同シート内により高度の好中球の浸潤が観察された（図 6）。一方、LPS 添加群（シート#1-7）では、コラーゲンシート内に少数の線維芽細胞と軽度の好中球およびリンパ球、形質細胞の浸潤が認められるのみであった。

埋植後 2 週目の所見において、対照群および菌体添加コラーゲンシート#8-11 では、毛細血管の侵入と線維芽細胞の増加が観察された（図 7）。各シート内へのリンパ球の浸潤は極僅かであり、炎症所見は認められなかった。しかし、菌体添加コラーゲンシート#12 では、埋植したシート周辺に多数のマクロファージの浸潤が認められた（図 7）。更に少量の菌体を添加したシート#13 では、マクロファージと共に好中球の浸潤が観察され、埋植したコラーゲン線維の変性を示す所見を呈していた（図 7）。一方、LPS 添加群（シート#1-7）では、炎症所見は認められず、埋植したシート内に毛細血管の侵入と線維芽細胞の増加が観察された（図 8）。

3-2. 腹腔埋植

3-2-1. 肝臓

肝被膜表面へ外科的に添付したコラーゲンシートは、埋植 1 週および 2 週後、対照

群と実験群（シート#1-13）共に、薄い線維性結合組織により肝被膜と接着しており、コラーゲン線維内に線維芽細胞の侵入が認められた（図 9,10）。炎症所見は殆ど観察されなかったが、埋植 1 週後、比較的少量の菌体を添加したコラーゲン（シート#12,13）を埋植した実験群では、肝被膜線維性結合組織の軽度の肥厚が見られた。しかし、全例共に肝実質には炎症性変化、或いは幹細胞の変性や壊死などの組織学的変化は全く認めなかった。

3-2-2. その他の腹部臓器

肝被膜に埋植したコラーゲンシートから遊離する LPS および菌体は腹水（又は血液）を經由して腹腔内の各臓器に影響を与える可能性があると考えられたため、肝臓の他、胃、小腸、膵臓、腎臓、脾臓、副腎の組織学的所見を検討した。肝被膜への埋植を施した実験動物の各種臓器を調べた結果、脾臓と腎臓に軽度のうっ血が認められたが、LPS 添加群および菌体添加群共に、腹水誘導や炎症所見は全く観察されず、その他の組織学的な著変も認められなかった（図 11-16）。

3-3. 皮膚創傷被覆

術後 1 週目の所見において、対照群、LPS 添加群および菌体添加群の全例共に、被覆したコラーゲンシートは滲出液の浸漬によって皮膚創傷面に接着していた（図 17）。また、創面からの著しい好中球浸潤が観察され、創面側のコラーゲン線維は融解・消失を生じていた。被覆材下は、軽度の炎症細胞の浸潤を伴う線維の増生を示す肉芽組織から構成され、また、創傷部位辺縁では

上皮の再生が観察された。対照群と実験群において、病理組織学的相違は認められなかった。

術後 2 週目の所見において、対照群と実験群共に切除部は薄い重層扁平上皮により被覆されており、上皮下は膠原線維の増生が認められた (図 18, 19)。

3-4. 骨埋植

3-4-1. 軟 X 線所見

術後 2 週目の所見において、材料を被覆しなかった実験群 (Control A 群) には、骨欠損部の一部に新生骨の形成を示す軽度の軟 X 線不透過像が観察された (図 20)。LPS および菌体を含まないコラーゲンシートを被覆した実験群 (Control B 群) では、Control A 群と比較して、軽度ながら広範囲に軟 X 線不透過像が認められた (図 20)。LPS および菌体を含まないコラーゲン/HA コンポジットシート (Control C 群) および菌体を添加した同シート#21-23 では、窩洞形成部に強い軟 X 線不透過像を呈する HA 顆粒の周囲に新生骨の形成を示す軽度の軟 X 線不透過像が観察された (図 20, 21)。しかし、菌体添加コラーゲン/HA コンポジットシート#24 および#25 を埋植した窩洞形成部位は、Control C 群と比較して軟 X 線透過性が高いことが確認された (図 21)。また、菌体添加コラーゲン/HA コンポジットシート#26 実験群では、HA 顆粒以外の軟 X 線不透過像が観察されなかった (図 21)。一方、LPS を添加したコラーゲン/HA コンポジットシート#14-20 を被覆した各実験群には、Control C 群と比較して、軟 X 線像に相違は認められず、実験的骨欠損部に新生骨の形成を示す不透過像が観察された

(図 22)。

術後 4 週目の所見において、Control A 群は、2 週目所見と比較して、軟 X 線不透過性が増強されたが、透過性を呈する領域も広く観察された (図 20)。Control B 群、Control C 群および菌体添加コラーゲン/HA コンポジットシート#21-23 実験群では窩洞形成部のごく一部に透過像が認められたが、新生骨の軟 X 線不透過性は周囲骨と同程度にまで増強された (図 20, 21)。菌体添加コラーゲン/HA コンポジットシート#24 および#25 実験群においても新生骨の形成に伴う軟 X 線不透過像が観察されたが、添加した菌体量に依存した強い軟 X 線透過性を示すことが確認された (図 21)。また、菌体添加コラーゲン/HA コンポジットシート#26 実験群の窩洞形成部は軟 X 線透過像を呈していた (図 21)。一方、LPS 添加コラーゲン/HA コンポジットシート#14-20 を埋植した各実験群の軟 X 線像は、Control C 群と同一であった (図 22)。

3-4-2. 病理組織学的所見

術後 2 週目の所見において、窩洞部には、新生骨を含む線維性結合組織の形成が認められた。Control A 群においても骨の形成が認められたが、新生骨のみられない極めて薄い結合組織からなる領域が観察された (図 23)。Control B 群 (図 23)、Control C 群 (図 23)、LPS 添加コラーゲン/HA コンポジットシート#14-20 実験群 (図 24) および菌体添加コラーゲン/HA コンポジットシート#21-23 実験群 (図 25) は、組織学的に類似した所見を呈しており、線維性結合組織の増生した不規則な形状の骨梁が窩洞部全域に認められた。新生骨は、窩洞辺縁部

に認められる他、結合組織内にも線維性骨（膜内骨化）の形成が観察された。また、HA に隣接した骨形成が認められた。一方、菌体添加コラーゲン/HA コンポジットシート#24 および#25 実験群では、Control C 群と比較して新生骨が少ないことが確認された（図 25）。また、菌体添加コラーゲン/HA コンポジットシート#26 実験群では、窩洞辺縁からの連続した骨形成が認められたが、骨欠損部は結合組織により形成されており、明らかな骨形成の所見が観察されなかった（図 25）。各 Control 群および実験群共に炎症所見は全く観察されなかったが、LPS 添加コラーゲン/HA コンポジットシート#20 および菌体コラーゲン/HA コンポジットシート#24-26 実験群において、HA に対する異物巨細胞による組織反応が観察された（図 23-25）。

術後 4 週目の所見において、Control A 群では、欠損部に形成された骨量が増加していたが、骨形成のみられない薄い線維性結合組織の領域も観察された（図 23）。Control B 群（図 23）、Control C 群（図 23）、LPS 添加コラーゲン/HA コンポジットシート#14-20 実験群（図 26）および菌体添加コラーゲン/HA コンポジットシート#21-23 実験群（図 27）では、新生骨の一部に不連続領域が観察されたが、2 週目と比較して明らかな骨量の増加が認められた。新生骨の不連続領域の多くは、複合材の HA 周囲に認められた。菌体添加コラーゲン/HA コンポジットシート#24 および#25 実験群においても骨量の増加が認められたが、骨が形成されていない領域も広く観察された（図 27）。菌体添加コラーゲン/HA コンポジットシート#26 実験群では、Control A 群と異

なり、厚い結合組織の形成が認められたが、骨の形成は窩洞辺縁部にのみ観察された（図 27）。また、炎症所見は観察されなかったが、HA に対する異物巨細胞反応が Control C 群と LPS および菌体を添加したコラーゲン/HA コンポジットシートを埋植した全実験群に認められた（図 23, 26, 27）。

D. 考察および結論

敗血症時に見られるエンドトキシンショックとは、腹膜炎や急性胆管炎などの経過中に悪寒、発熱、発汗などと共に、血管平滑筋の弛緩による急激な血圧低下や末梢循環不全が発生する状態を意味する。エンドトキシンショックからの回復は困難であるが、たとえショックから回復したとしても、肺、腎臓、肝臓、心臓や消化器粘膜の障害、更には中枢神経系の障害が同時又は続発する多臓器不全症を引き起こす症例が見られる¹¹⁾。このように、多量のエンドトキシンが循環血液中に入ると、発熱の他、様々な組織や臓器に影響を与えることが明らかになっているが、血管投与以外の非経口的ルートによりエンドトキシンを投与した時の生体影響は詳細に検討されていない。

医療用具および医用材料の使用法は症例や利用目的により様々である。また、生分解性医用材料を生体内外に適用した際、同材料に混入する LPS が瞬時に放出されることはない。すなわち、医療用具又は医用材料に混入する LPS の生体影響を正確に評価するためには、同用具又は材料の適用部位、生分解性、LPS 含量や種類など幾つかの要因を考慮する必要がある。そこで本研究では、医用材料に混入する LPS の生体に対する実際のリスク強度を正確に判定し、適用

例毎に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 および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。アルギン酸製品には、ヒト細胞に対して活性を示さない種類の LPS が存在することが知られているが⁸、本研究では、ヒトを含めた各動物種に対して典型的なエンドトキシン活性を示す大腸菌由来 LPS¹² および大腸菌死菌体を使用した。

ラット皮下埋植試験において、LPS 添加コラーゲン（シート#1-7）と低濃度の菌体を含むコラーゲン（シート#8-11）を埋植した実験群では、対照群と同様、炎症性変化が惹起されることはなかったが、高濃度の菌体を含むコラーゲン（シート#12, 13）では、強い化膿性炎症の誘発を生じ、シート#13 を埋植した実験群では、埋植後 2 週に至っても好中球浸潤が観察された。これら 2 つの実験群に認められたマクロファージの浸潤は好中球の残差と変性したコラーゲン線維に対する異物反応と考えられる。

肝皮膜へのコラーゲンシートの添付による肝臓の組織学的変化は全く認められなかった。多量の菌体を含むコラーゲンシート#12 および#13 の埋植後 1 週目の所見において認められた肝被膜結合組織の増生は、2 週群では観察されなかったことから、菌体成分に由来する組織変化ではない。

実験的皮膚創傷被覆において観察されたコラーゲン線維の融解・消失は、好中球の壊死に伴う酵素反応に由来すると考えられる。また、創傷部の炎症性変化が比較的少ないことから、被覆したコラーゲンシートは外界からの感染を効果的に防御したもの

と示唆された。対照群、LPS 添加群および菌体添加群共に組織学的相違は認められず、皮膚創傷治癒に対する菌体成分の影響はないものと判断された。創傷部位では、組織内から創傷面に向かって体液が浸潤するため、被覆剤に LPS や死菌体が混在していたとしても、菌体成分が体内に吸収される可能性は低いものと考えられる。

頭頂骨などの扁平骨は、結合組織内の間葉組織が緻密され、細胞間隙に不規則に配列する線維束が発達し、骨基質となる線維性骨となる、いわゆる膜内骨化によって形成される。ラット頭頂骨欠損部への埋植試験において、多くの実験群では窩洞中央部の骨形成が膜内骨化により生じると共に、窩洞辺縁に頭頂骨膜由来の骨芽細胞が発達した骨形成が観察された。しかし、比較的少量の菌体を添加した実験群（シート#24-26）では、菌体添加量依存的に膜内骨化の形成不良が認められた。特に、最も多量の菌体を添加した実験群（シート#26）では、術後 4 週目においても窩洞辺縁部に骨形成が認められるのみであった。

図 28 に示したように、骨芽細胞に LPS を作用させると、LPS レセプターである TLR4 を介して、最終的に OPG 活性が低下する共に、RANKL 活性が上昇し、結果として破骨細胞の分化が誘導される¹³。また、破骨細胞の細胞膜上にも LPS、IL-1 や TNF に対するレセプターが存在し、それらの各成分により破骨細胞の活性化が起こる。菌体添加実験群（シート#24-26）において観察された新生骨形成の遅延には、このようなメカニズムに基づいて活性化された破骨細胞が関与している可能性もある。しかし、各病理所見において、破骨細胞の出現が認めら

れておらず、最も多量の菌体を添加した実験群（シート#26）においても窩洞辺縁からの連続した骨形成が観察されたことから、新生骨形成の遅延は、菌体成分が欠損部を被覆した結合組織の発達を抑制し、間葉系細胞の増殖・分化（膜内骨化）を阻害することに由来するものと推察される。また、菌体を添加した幾つかの実験群において HA に対する異物巨細胞反応が観察されたが、骨形成を示す Control C 群と LPS 添加群にも同様な所見が認められたことから、コラーゲン/HA コンポジットシートの埋植に伴う異物巨細胞反応は菌体および LPS の影響ではないものと推察される。

興味あることに、精製 LPS を添加したシートを埋植した各種試験における病理組織学的所見は、対照群と比較して大きな差異が認められなかった。この現象には、材料からの LPS 遊離速度や活性を保持している生体内寿命などが関与しているものと思われるが、少なくとも医用材料に混在し得る量の遊離 LPS 自体は、正常な皮下および腹腔の他、創傷治療および骨再生に対して大きな影響を及ぼさないことが明らかになった。しかし、医療用具や医用材料に LPS 汚染がある場合、そこには死菌・生菌を問わず必ずグラム陰性細菌が存在するケースが多い。それ故、医用材料から検出されるエンドトキシン活性はグラム陰性細菌汚染の程度を反映しているものと判断されるべきである。

各種埋植試験の結果から判断すると、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ものと思われる。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明らかとなった。しかし、肝切除などの臓器欠損を伴う場合や肝臓機能障害を誘発する疾病又は投薬を受けている症例などについては、別途、モデル実験系を組んで検討する必要がある。一方、整形外科領域などにおいて、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（コラーゲンシート#12）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から、LPS 規格値を設定する必要があることが判明した。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（コラーゲン/HA コンポジットシート#24）は新生骨形成を抑制することが判明したことから、骨再生医療に使用する各種スキャホールドにも一定の LPS 規格値を設定する必要がある。

本研究で得られた実験値をヒトに対する安全基準値として外挿する場合は幾つかの不確実係数を乗じる必要がある。不確実係数としては、動物種（感受性および耐性）の相違（UF1）、材料の分解速度（換言すれば菌体成分遊離速度）と材料内部への細胞浸潤性の相違（UF2）および混入している微生物種の相違（UF3）などが考えられる。本研究で使用したコラーゲンシートの生体内における分解吸収性はラットとヒトにおいて大差がないと考えられるため、UF2 の値は 1 となる。また、本研究では、ヒトに対して最も高い活性を示す代表的なエンドトキシンである大腸菌 LPS および大腸菌死菌体を使用していることから、UF3 も 1 となる。従って、本研究において得られた実験

値をヒトの安全性評価に外挿するために考慮すべき不確実係数は UF1 のみとなる。仮に、UF1 を 10 とした場合、皮下および骨再生に適用するコラーゲン材料自体の LPS 規格値は、シート#12 および#24 のエンドトキシン活性実測値を基準として、それぞれ 75 EU/mg および 4 EU/mg に設定することができるものと思われる。また、皮下埋植試験において、50 EU/g (シート#12 実測値 750 EU/mg、シート重量 10 mg、ラット体重 150 g) 以上で炎症反応が認められたことから、UF1 を 10 として、ヒトへの使用量の限度値を算出すると 5,000 EU/kg となる。同様に骨再生に利用するコラーゲン材料のヒトへの使用量の限度値を計算すると、160 EU/kg (シート#24 実測値 40 EU/mg、埋植重量 6 mg、ラット体重 150 g、UF1 = 10) となる。

LPS の活性強度は、生物活性の発現本体であるリポド A 部分の化学構造、換言すれば微生物種によって異なる¹¹⁾。医用材料に混入している微生物種を同定することは難しいが、大腸菌 LPS を標準品として、試験品のヒト細胞に対する炎症性サイトカイン産生誘導能などの活性を測定することにより、UF3 の値を求めることは可能である。また、医用材料の生分解性は埋植試験により確認することが可能である。エステル系合成高分子であるポリ乳酸やポリグリコール酸はコラーゲンと比較して遙かに生分解性が遅いため、UF2 の値は 1 よりも小さくなる。

マウスやラットのような齧歯類は、ヒトと比較して、活性発現に関する LPS の構造要求性が低く、様々な LPS に対して感受性を示すが、LPS 致死毒性に対する高い抵抗性を持つ。ヒトの場合、血中 LPS 濃度が

0.001-0.08 µg/ml に達すると致死的なエンドトキシンショックを誘発することが知られている¹⁴⁾。これを体重当たりに換算すると、0.067-5.3 µg/kg (血液総量 4L、体重 60 kg) になる。一方、正常ラットに対する LPS 致死量は 1 µg/g 程度であることから¹⁵⁾、LPS に対する耐性はラットの方が遙かに高いことが分かる。このように、UF1 の値には LPS に対する感受性と耐性の強度が複雑に関与しているため、同値を正確に求めるのは困難となる。今後、よりヒトに近い免疫系を持つ動物種を用いて菌体成分の生体影響や炎症性サイトカインの血中動態などを評価し、より正確な LPS 規格値の設定法を確立する必要があるものと思われる。

E. 研究発表

- 1) 齧島由二, エンドトキシン汚染: 測定のポイントについて. 第 2 回医療機器フォーラム (2004 年 10 月・東京).
- 2) 齧島由二, 長谷川千恵, 小園 知, 伊佐間和郎, 佐々木和夫, 矢上 健, 土屋利江. エンドトキシン不活化処理を施した天然医用材料の生体親和性評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004 年 11 月・筑波).
- 3) 伊佐間和郎, 齧島由二, 長谷川千恵, 小園 知, 佐々木和夫, 土屋利江. ガンマ線照射天然医療材料の生体適合性評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2003 年 12 月・大阪).

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-andrzewski E, Ulmer AJ, Flad HD, Brade H. Chemical structure and biological activity of lipopoly- saccharides. 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) 藪島由二. 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 (監修: 土屋利江), pp. 37-42, シーエムシー出版 (2003).
- 4) Westphal O, Lüderitz O and Bister F. Über die Extraction von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z. Naturforsch 1952;7b: 148-155.
- 5) Westphal O and Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods carbohydra Chem 1965; 5:83-91.
- 6) 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.
- 7) 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).
- 8) 藪島由二. 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. 平成 14 年度厚生労働科学研究費医薬安全総合研究事業「医療用具の有効性・安全性評価手法の開発に関する研究 (主任研究者: 土屋利江)」総括・分担研究報告書, pp.71-91 (2002).
- 9) 第 14 改正日本薬局方. 厚生労働省.
- 10) 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).
- 11) 磯山 徹, 玉熊正悦. 5-1 内毒素の病理的意義. 内毒素: その構造と活性 (監修: 本間 遜, 岩永貞昭, 丹波 允, 吉田昌男), 第 5 章臨牀的問題, pp. 349-355, 医歯薬出版株式会社 (1982).
- 12) Zähringer U, Lindner B, Rietschel ET. Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. Adv Carbohydr Chem Biochem 1994;50:211-276.
- 13) 高橋直之, 小林泰浩, 宇田川信之. 骨吸収を促進する炎症性サイトカインと細菌菌体成分の作用機構. エンドトキシン研究 6 (編集: 日本エンドトキシン研究会, 楠本正一, 小玉正智, 横地高志, 谷 徹), pp. 36-42, 医学図書出版株式会社 (2002).

- 14) 門奈丈之, 吉村良之介, 岡 博子, 山本裕夫.
5-2 内科領域: 肝・胆道疾患を中心として.
内毒素: その構造と活性 (監修: 本間 遜,
岩永貞昭, 丹波 允, 吉田昌男), 第5章臨床
的問題, pp. 356-367, 医歯薬出版株式会社
(1982).
- 15) 加納晴三郎. 第4章: 薬学的意義. 内毒素:
その構造と活性 (監修: 本間 遜, 岩永貞昭,
丹波 允, 吉田昌男), pp. 333-348, 医歯薬
出版株式会社 (1982).

表1. コラーゲンシートへの菌体成分添加量と
エンドトキシン回収試験結果

シート番号	添加量 (EU/mg)		エンドトキシン 活性実測値 (EU/mg)	回収率(%)*
	LPS	菌体		
Control	—	—	0.48	—
LPS 添加標品 #1	1.1	—	0.62	12.5
#2	2.1	—	0.91	20.2
#3	10.7	—	1.2	7.2
#4	106.5	—	10.8	9.7
#5	1065.0	—	148.2	13.9
#6	10650.0	—	1621.4	15.2
#7	106500.0	—	14558.6	13.7
菌体添加標品 #8	—	3.8	2.0	40.0
#9	—	7.6	4.5	53.0
#10	—	38.1	16.4	41.7
#11	—	381.0	44.7	11.6
#12	—	3810.0	751.5	19.7
#13	—	38100.0	5848.7	15.3

*回収率：(添加標品実測値-Control実測値)×100

表2. コラーゲン/HA コンポジットシートへの菌体成分添加量と
エンドトキシン回収試験結果

シート番号	添加量 (EU/mg)		エンドトキシン 活性実測値 (EU/mg)	回収率(%)*
	LPS	菌体		
Control	—	—	0.16	—
LPS 添加標品 #14	0.4	—	0.44	69.8
#15	0.8	—	0.6	60.9
#16	4.0	—	1.1	23.7
#17	39.9	—	8.6	21.1
#18	399.5	—	53.5	13.4
#19	3994.5	—	554.1	13.9
#20	39945.0	—	2328.6	5.8
菌体添加標品 #21	—	1.4	0.9	53.5
#22	—	2.9	1.5	46.3
#23	—	14.3	6.0	40.9
#24	—	142.9	38.2	26.6
#25	—	1428.8	160.4	11.2
#26	—	14287.5	1457.9	10.2

*回収率：(添加標品実測値-Control実測値)×100

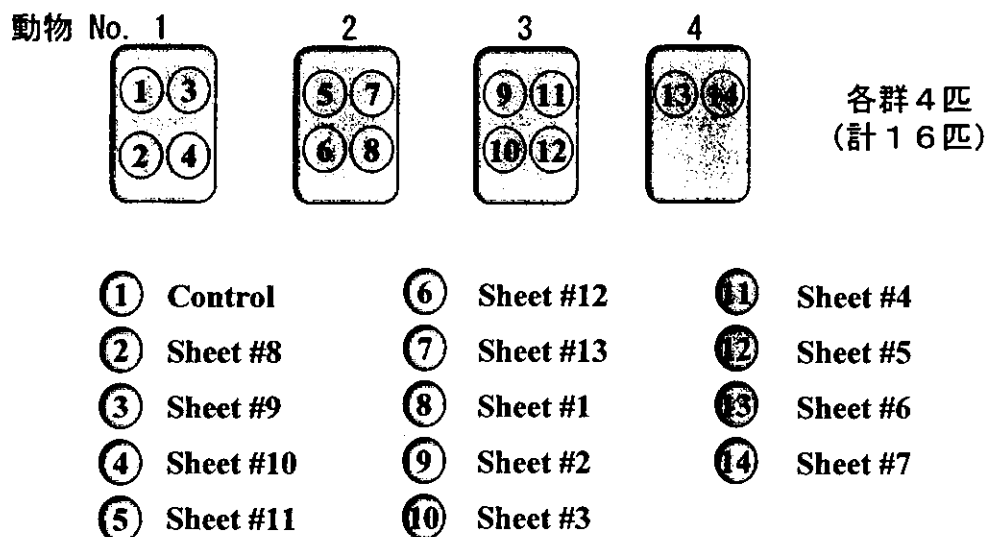


図 1. ラット皮下埋植および皮膚創傷被覆試験のシート配置

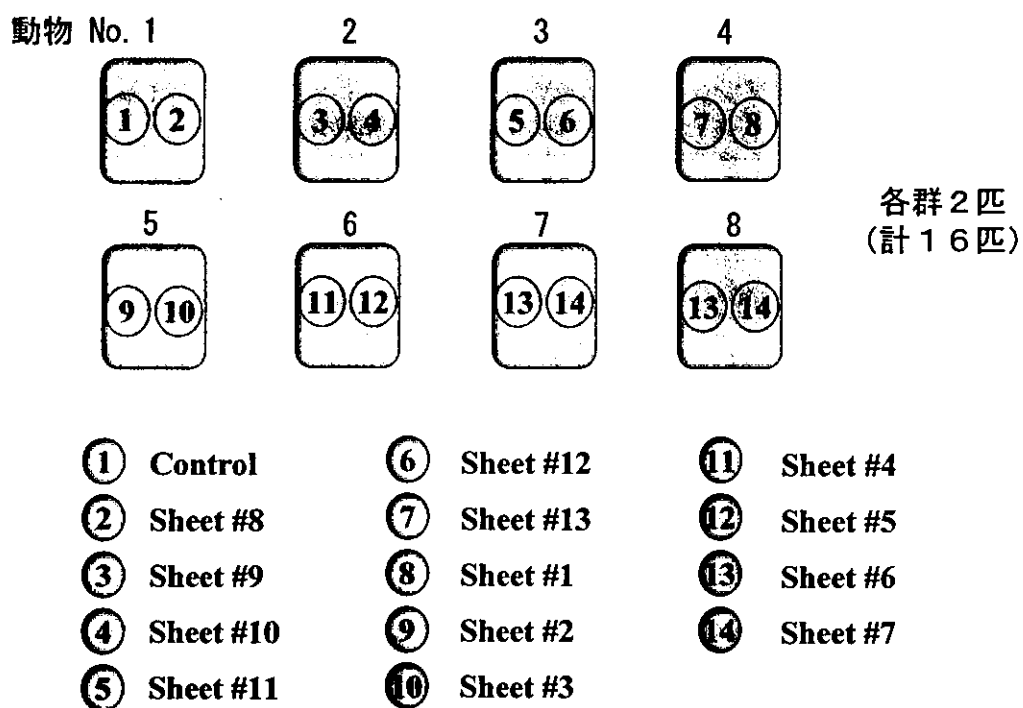
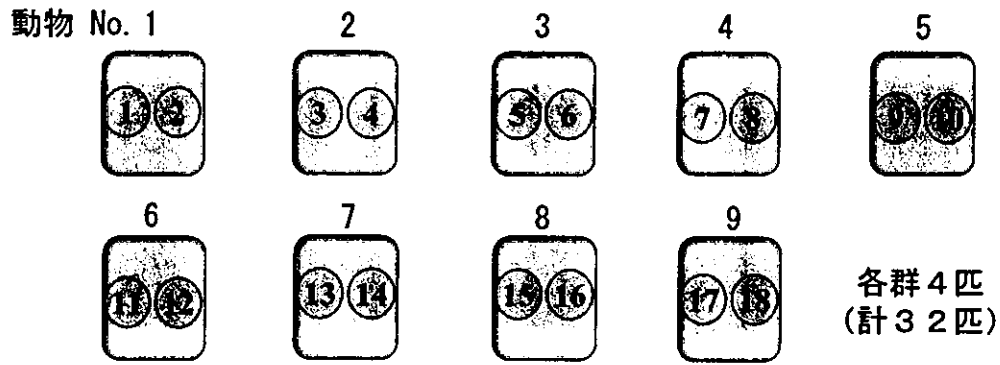


図 2. ラット肝被膜埋植試験におけるシート配置



- | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|
| ① Control | ⑥ Sheet #25 | ⑪ Sheet #17 | ⑬ Non |
| ② Sheet #21 | ⑦ Sheet #26 | ⑫ Sheet #18 | ⑭ Collagen |
| ③ Sheet #22 | ⑧ Sheet #14 | ⑬ Sheet #19 | ⑮ Collagen |
| ④ Sheet #23 | ⑨ Sheet #15 | ⑭ Sheet #20 | |
| ⑤ Sheet #24 | ⑩ Sheet #16 | ⑮ Non | |

図 3. ラット頭蓋骨埋植試験におけるシート配置

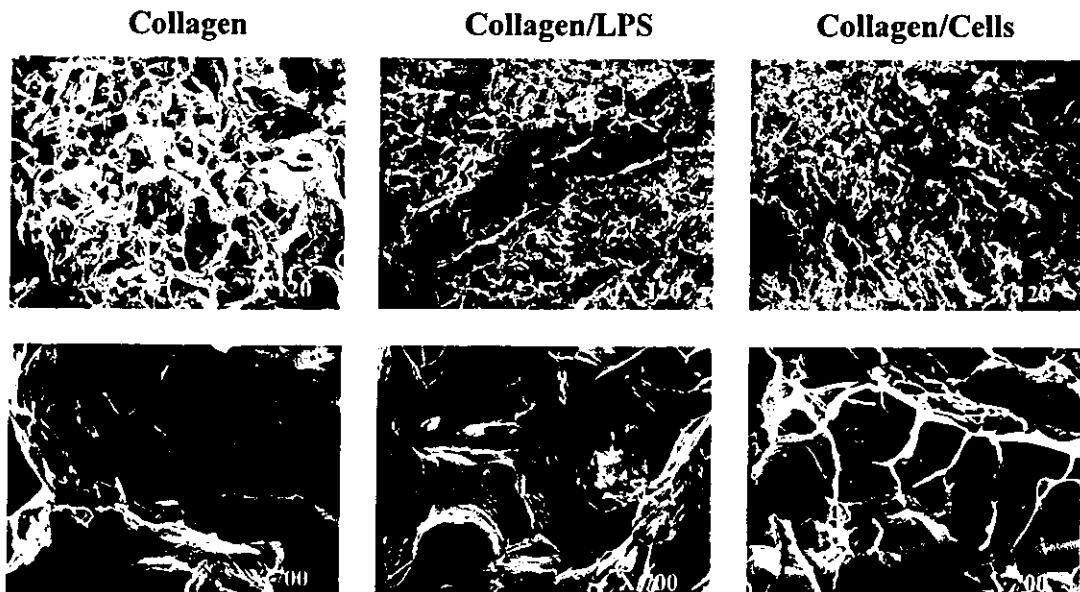


図 4. コラーゲンシートのSEM画像

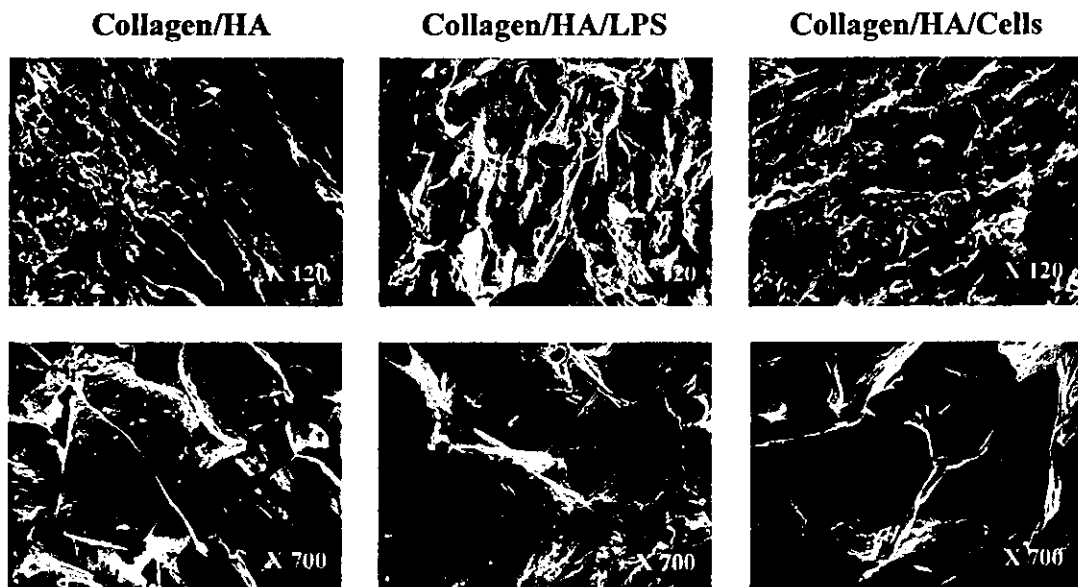


図5. コラーゲン/HAコンポジットシート of SEM画像

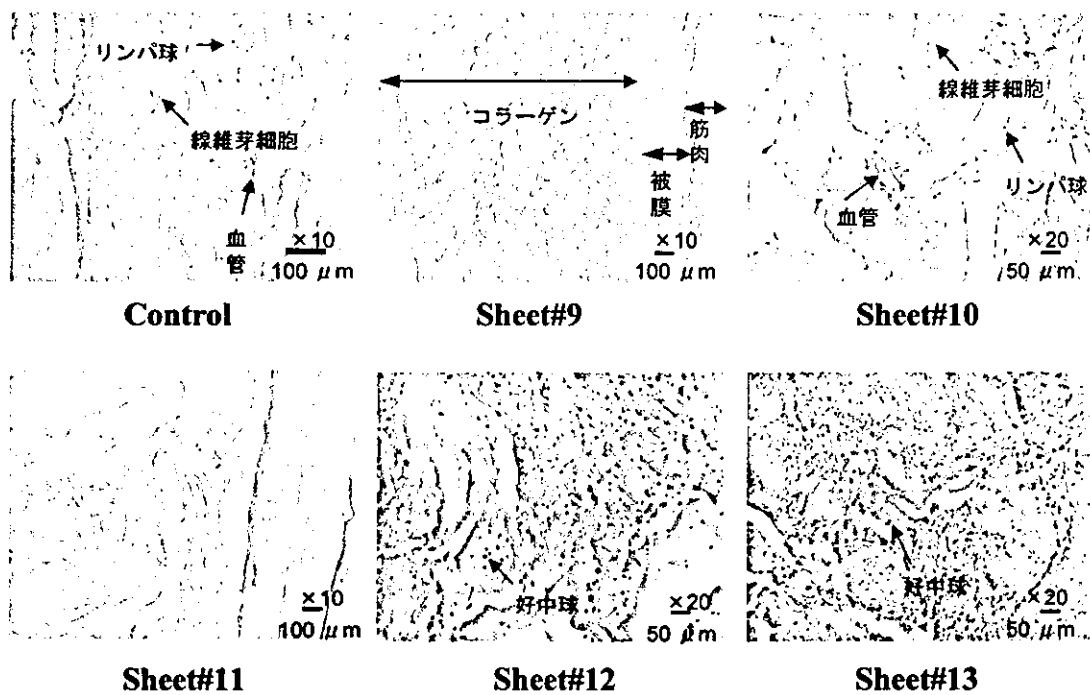


図6. 菌体添加コラーゲンシートの皮下埋植試験における病理組織学的所見 (第1週目)

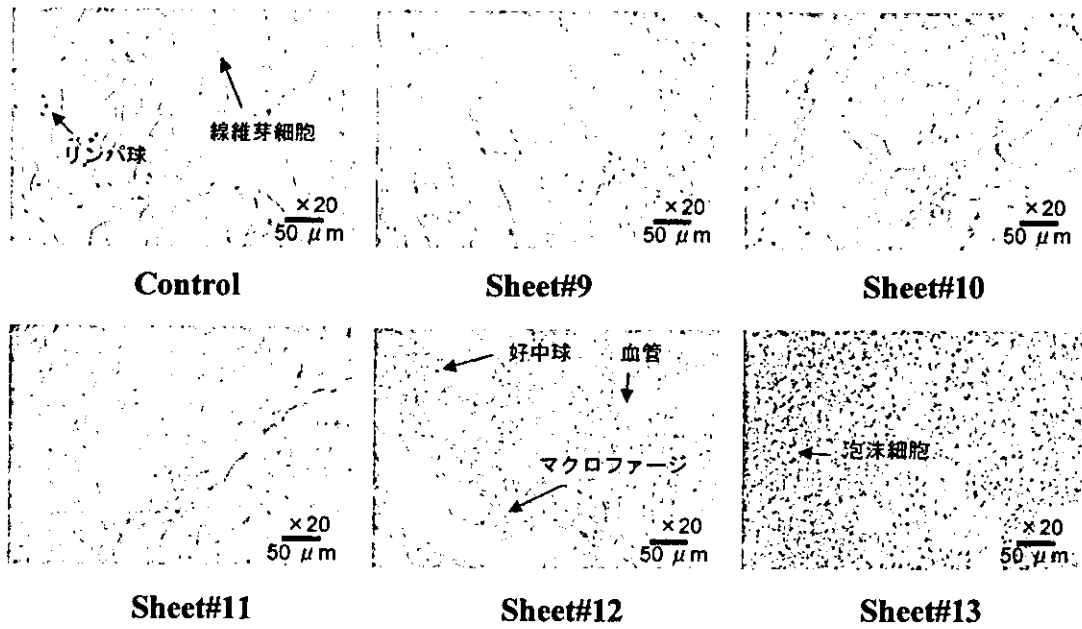


図7. 菌体添加コラーゲンシートの皮下埋植試験における病理組織学的所見 (第2週目)

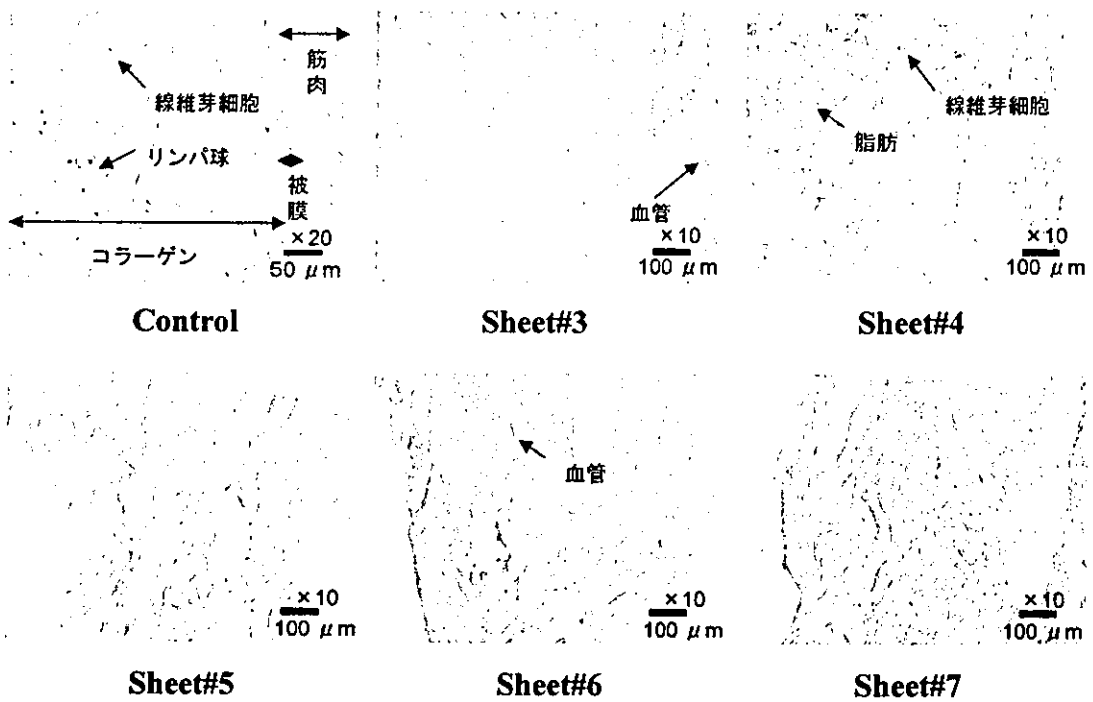


図8. LPS添加コラーゲンシートの皮下埋植試験における病理組織学的所見 (第2週目)

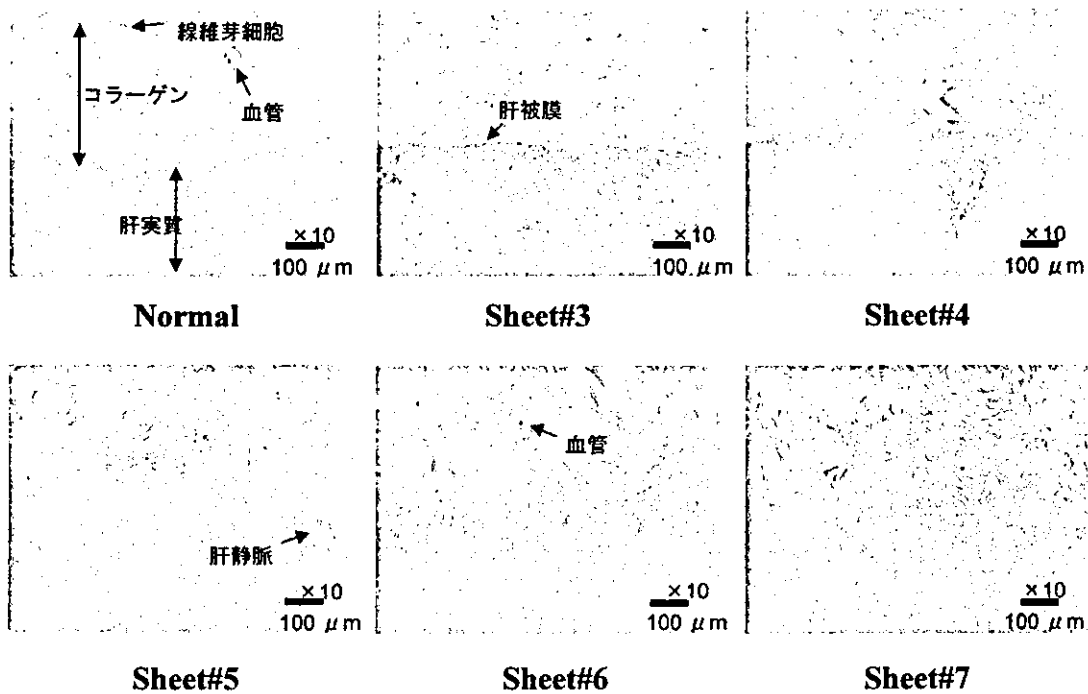


図9. LPS添加コラーゲンシートの肝被膜埋植試験における肝臓の病理組織学的所見（第2週目）

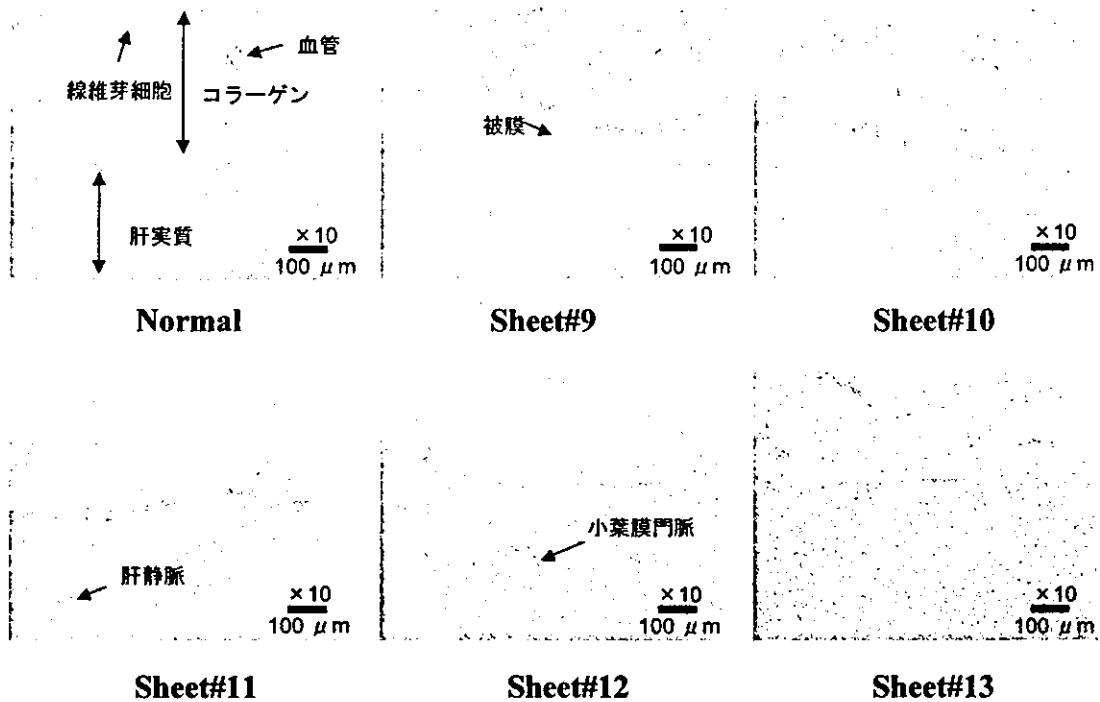


図10. 菌体添加コラーゲンシートの肝被膜埋植試験における肝臓の病理組織学的所見（第2週目）

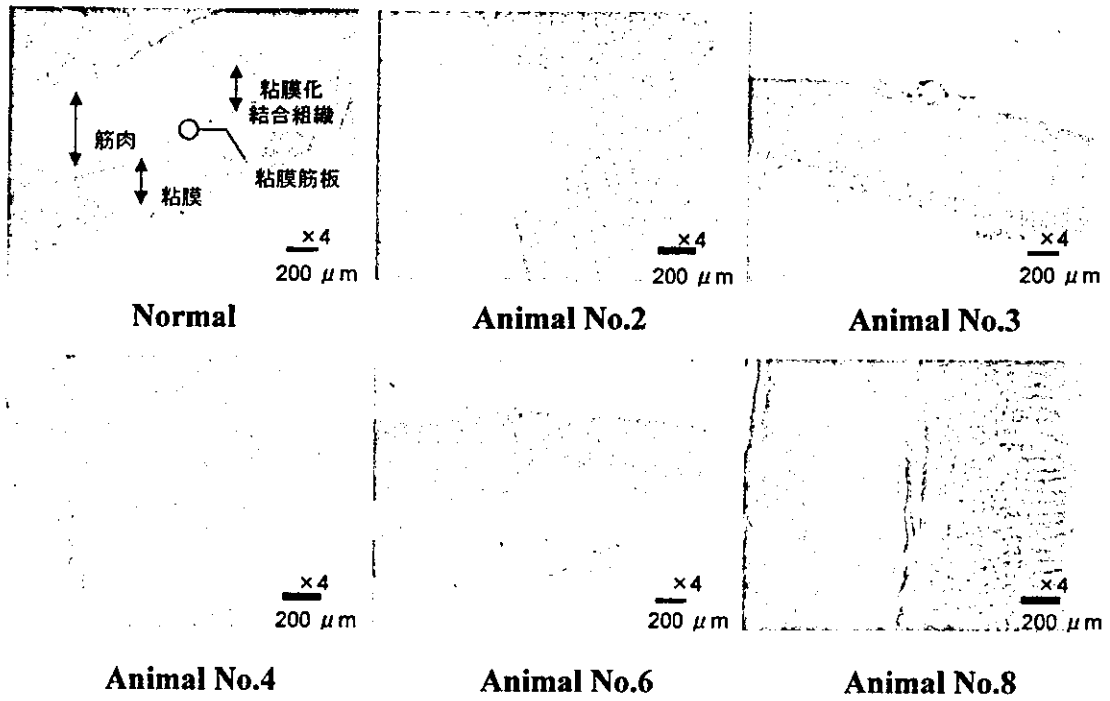


図 1 1. 菌体成分添加コラーゲンシートの肝被膜埋植試験における胃の病理組織学的所見 (第 2 週目)

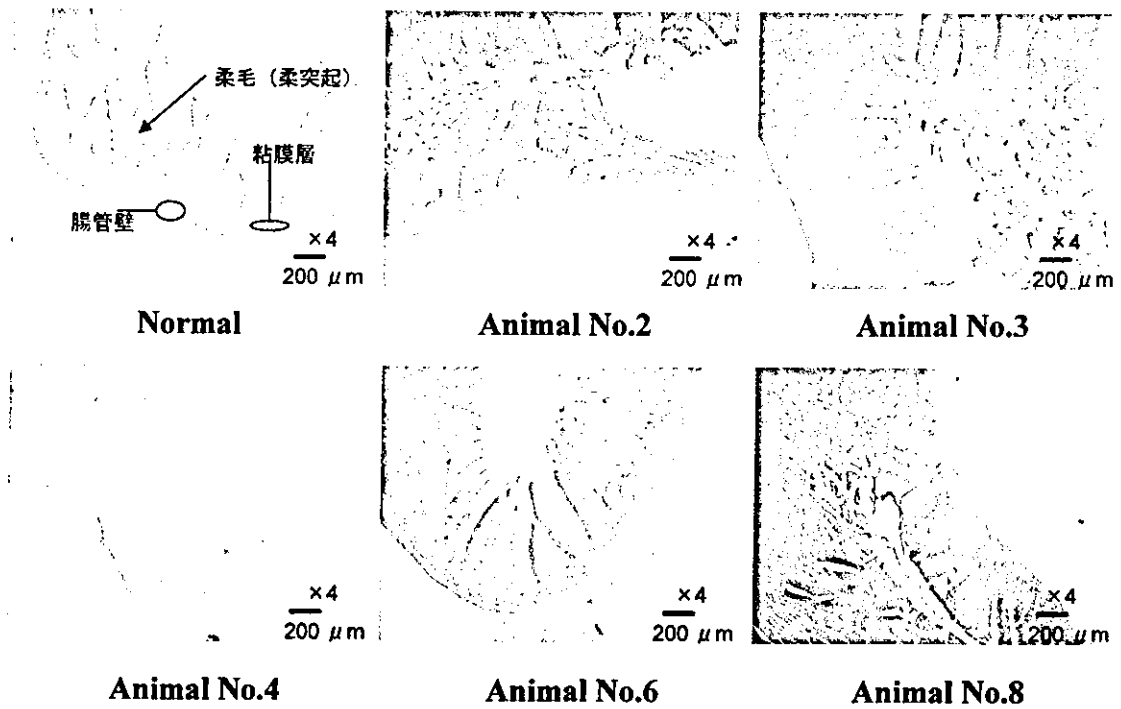


図 1 2. 菌体成分添加コラーゲンシートの肝被膜埋植試験における小腸の病理組織学的所見 (第 2 週目)

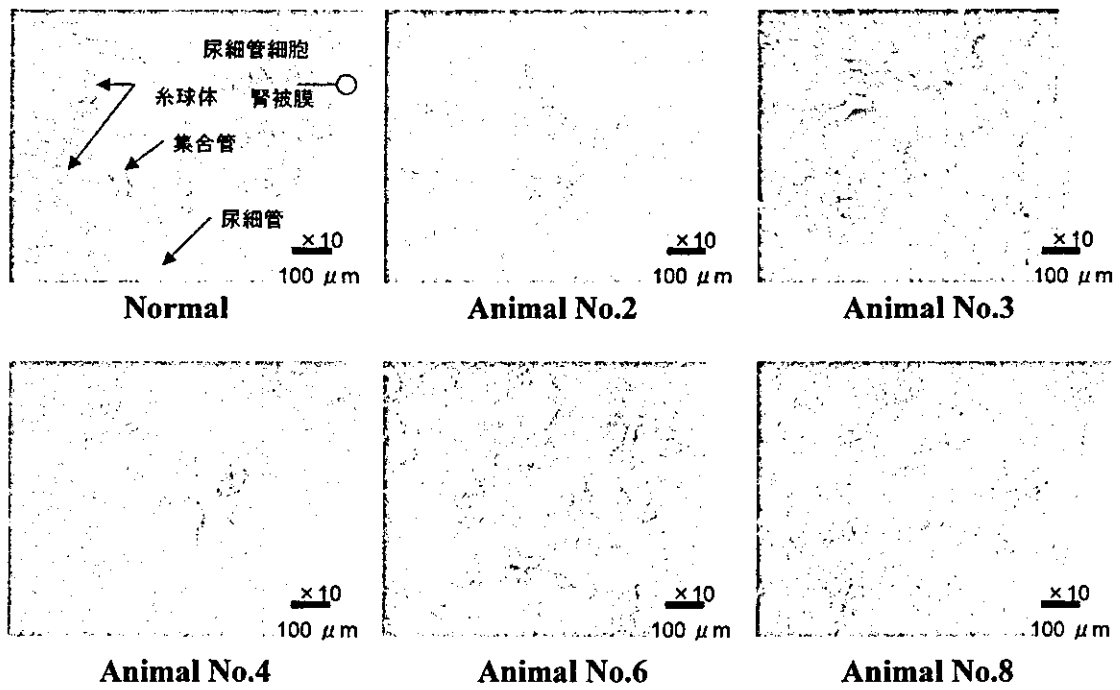


図 13. 菌体成分添加コラーゲンシートの肝被膜埋植試験における腎臓の病理組織学的所見 (第 2 週目)

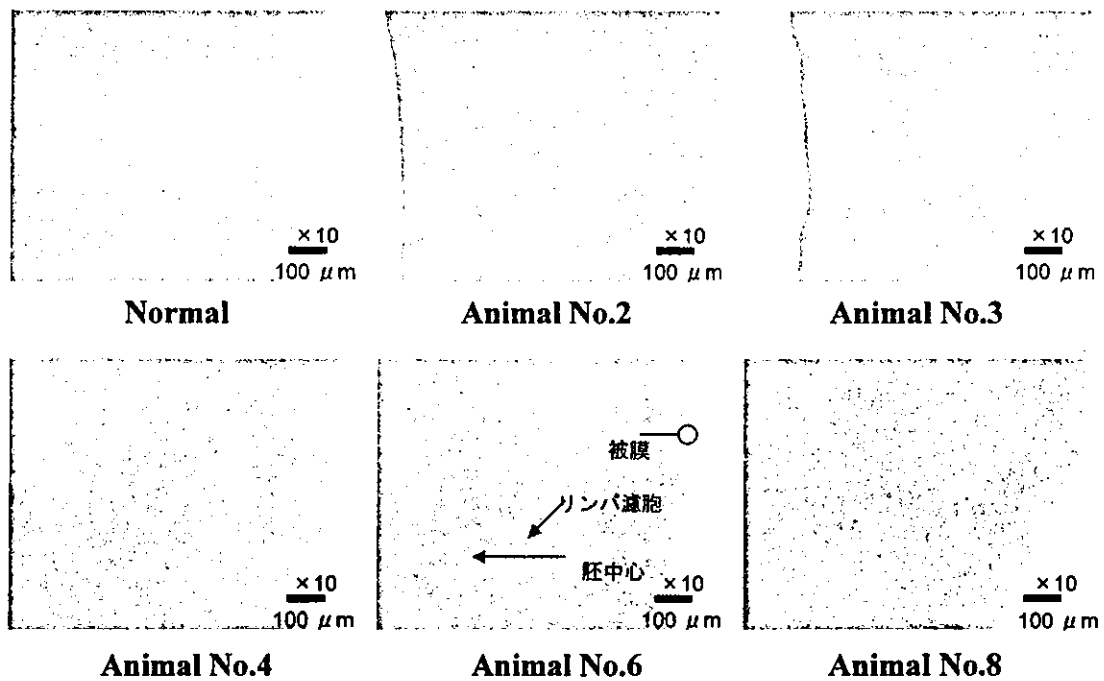


図 14. 菌体成分添加コラーゲンシートの肝被膜埋植試験における脾臓の病理組織学的所見 (第 2 週目)

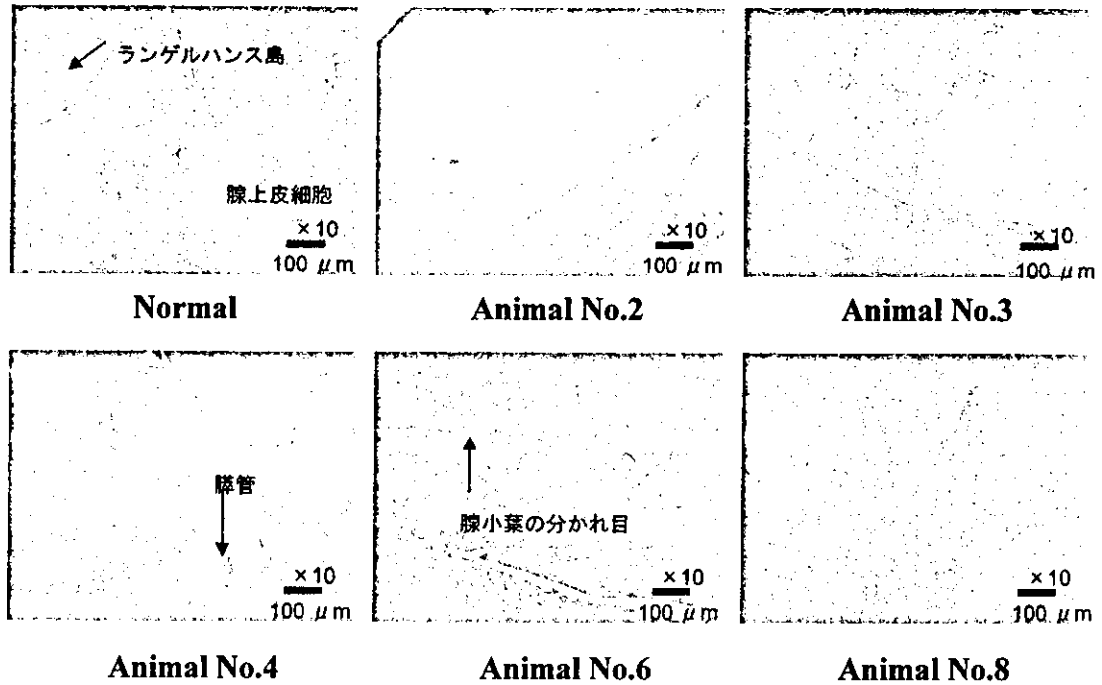


図 15. 菌体成分添加コラーゲンシートの肝被膜埋植試験における膵臓の病理組織学的所見 (第2週目)

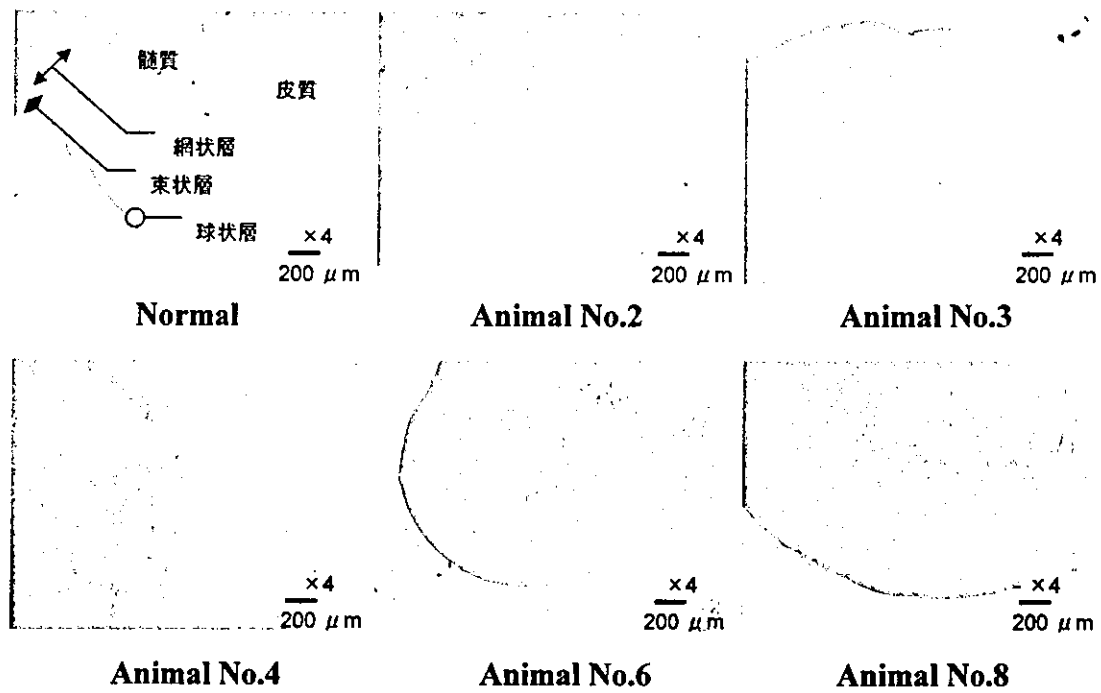


図 16. 菌体成分添加コラーゲンシートの肝被膜埋植試験における副腎の病理組織学的所見 (第2週目)

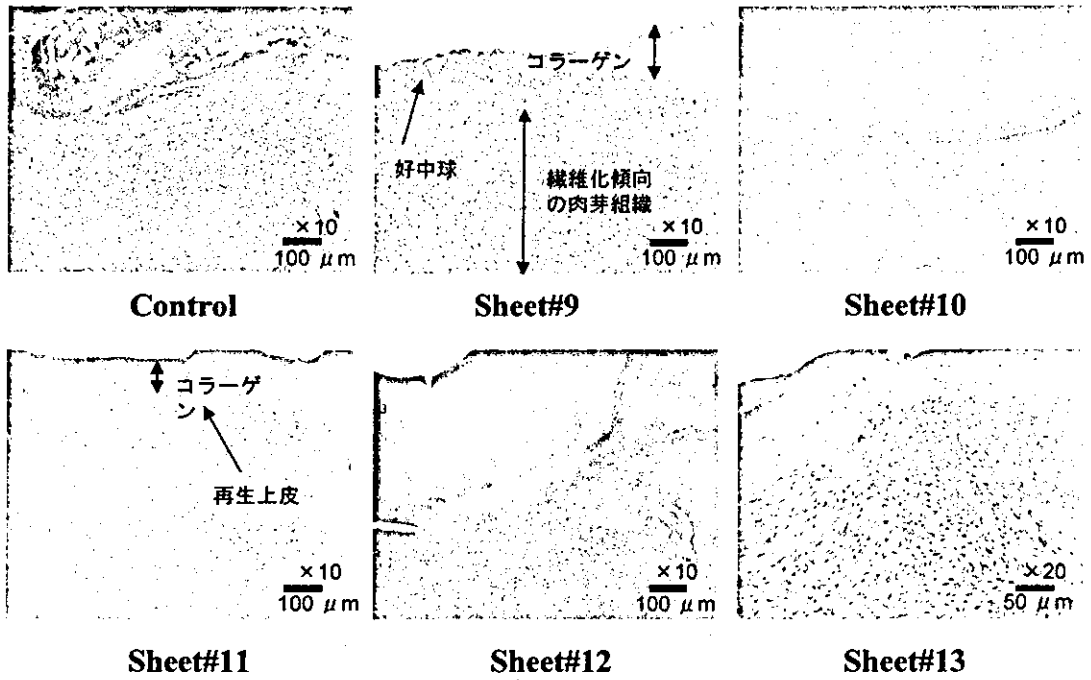


図 17. 菌体添加コラーゲンシートの皮膚創傷被覆試験における創傷部の病理組織学的所見（第 1 週目）

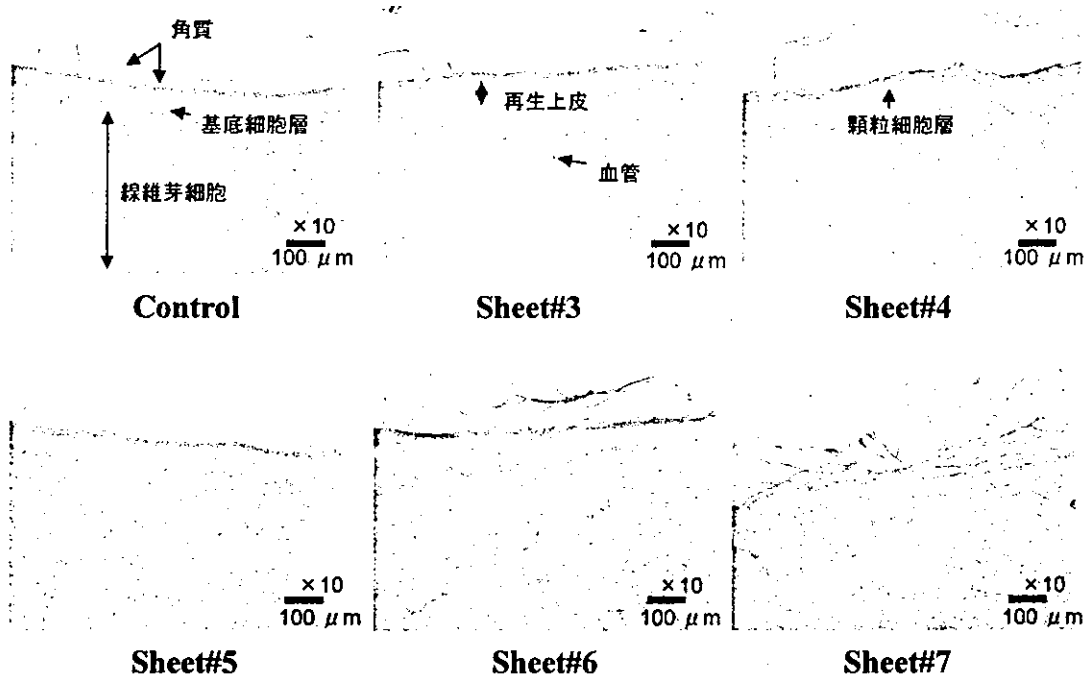


図 18. LPS 添加コラーゲンシートの皮膚創傷被覆試験における創傷部の病理組織学的所見（第 2 週目）