

図7. hMSC, HOS, OUMS-27におけるTGFβ1(A) と TGFβ2(B)のmRNA発現

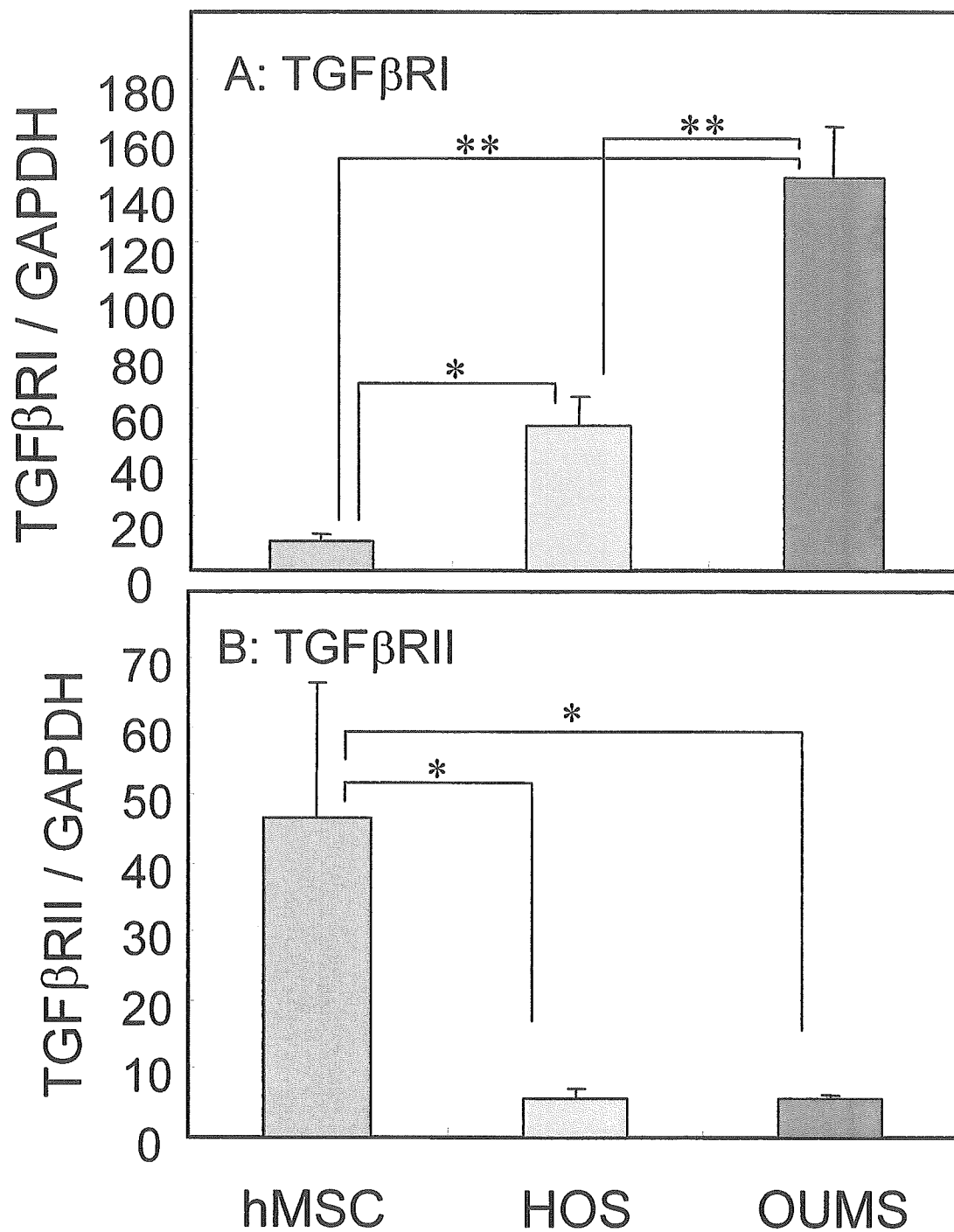


図8. hMSC, HOS, OUMS-27におけるTGFβRI(A) と TGFβRII(B)のmRNA発現

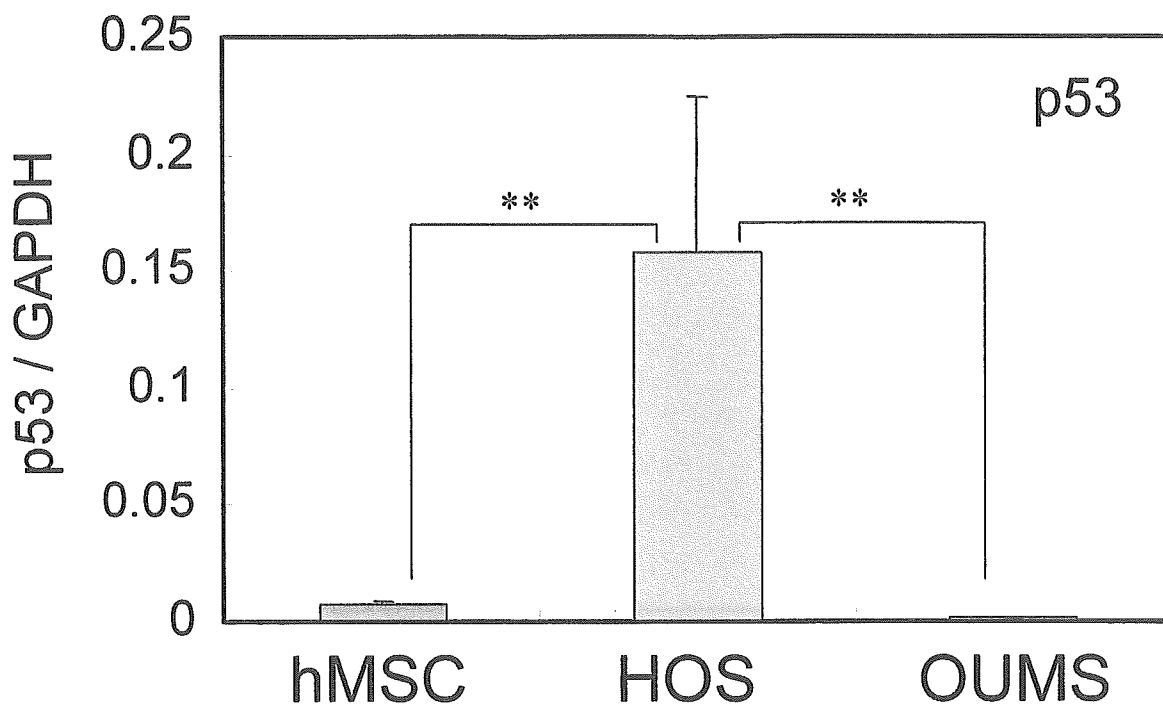


図9. hMSC, HOS, OUMS-27におけるp53 mRNA発現

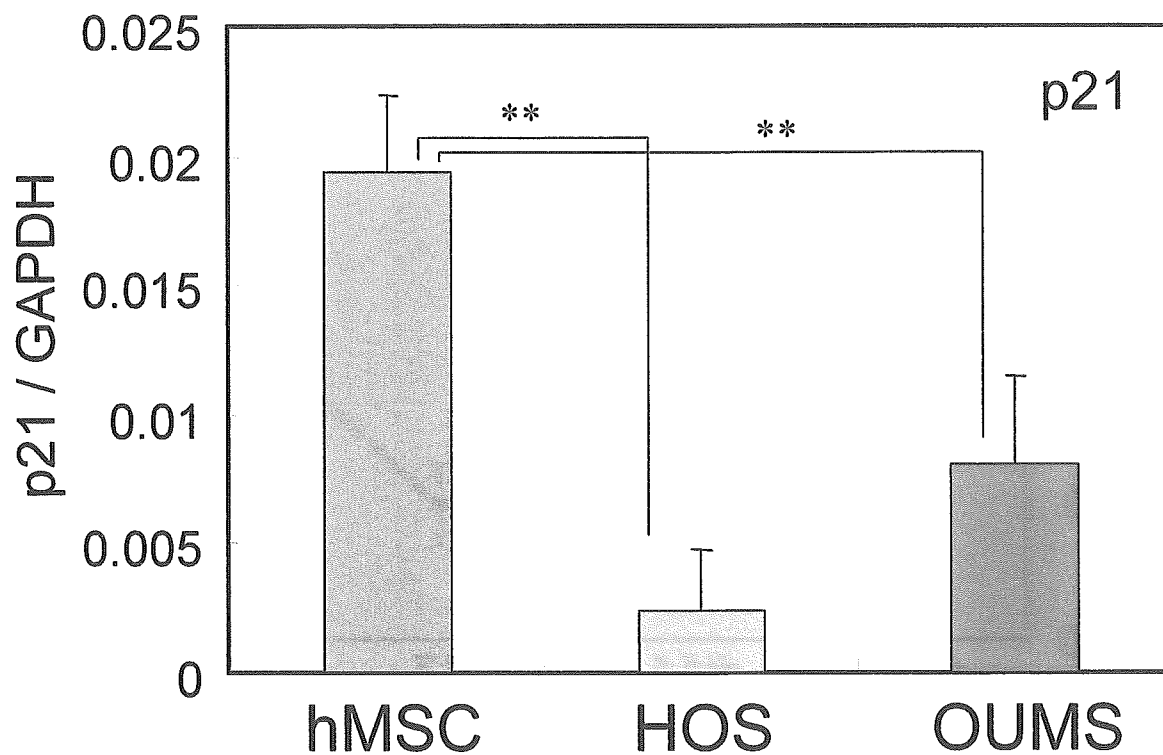


図10. hMSC, HOS, OUMS-27におけるp21 mRNA発現

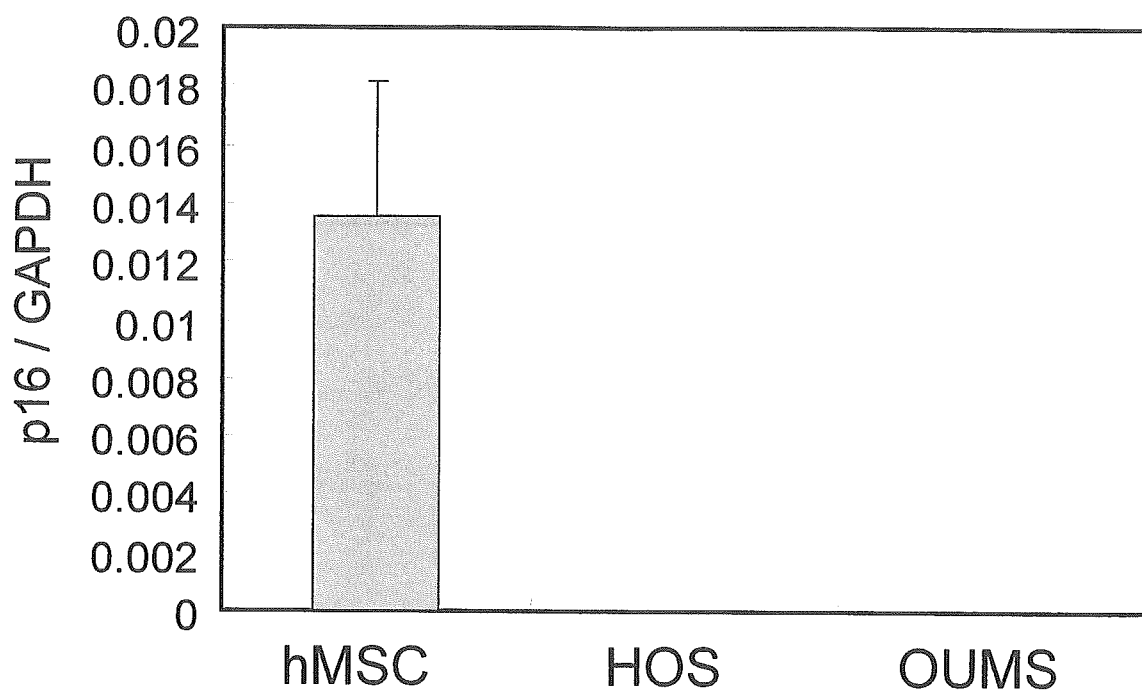


図11. hMSC, HOS, OUMS-27におけるp16 mRNA発現

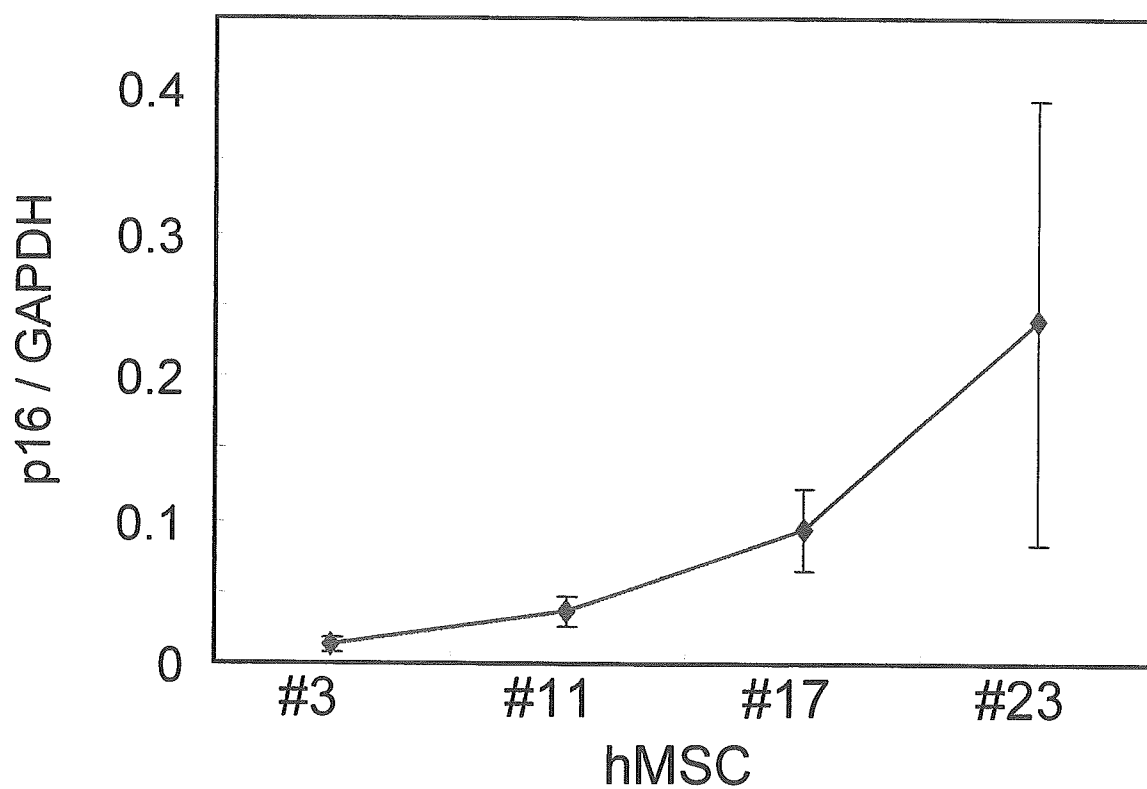


図12. hMSCのin vitro培養によるp16 mRNA発現レベルの変化

2. 組織工学用スキャホールドの エンドトキシン試験法の確立と感染リスクの排除

薮島 由二

分担研究報告書

平成 17 年度厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等）研究事業

「感染リスクの排除、同一性の確保、免疫反応、がん化等の抑制、及び培地等による有害作用の防止に関する研究」（H17-再生-022）

分担研究課題名

組織工学用スキャホールドのエンドトキシン試験法の確立と感染リスクの排除

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	長谷川千恵	国立医薬品食品衛生研究所療品部
	佐々木和夫	日本ハム株式会社中央研究所
	村井 敏美	日本公定書協会
	中川ゆかり	日本公定書協会

研究要旨：本研究では、現在市販されている三次元培養基材（スキャホールド）の微生物汚染状況を従来法により評価したと共に、同基材への LPS 吸着能に関して検討した。また、スキャホールドの微生物学的品質を評価する *in vitro* 試験法 (Human Cell Pyrogen Assay, HCPA) の開発を目指し、ヒト単球様 MM6-CA8 細胞に対する各種菌体成分の反応性を評価した。

従来法により、市販スキャホールドに混在するエンドトキシン (lipopolysaccharide, LPS)、 β -グルカン類およびペプチドグリカン定量した結果、微生物学的な品質はいずれの製品ともに大きな問題がないことが判明した。しかし、A 社製骨再生用基材は非常に高い LPS 吸着能を持つ可能性が示唆され、今後、同製品やその他の類似製品からの LPS 回収法に関して検討する必要がある。HCPA に関する予備的検討の結果、LPS や大腸菌乾燥菌体と同様、黄色ブドウ球菌乾燥菌体も MM6-CA8 細胞に対する顕著な IL-6 産生誘導能を示したことから、同測定法はグラム陽性細菌汚染の検出法としても有益であることが判明した。菌体成分含有シートを直接的に MM6-CA8 細胞と共培養した際、菌体成分添加量に比例した IL-6 産生が誘導された。また、大腸菌 LPS 含有コラーゲンシートからの LPS 回収率は、いずれの添加量でもエンドトキシン試験の回収率を上回っていたことから、HCPA では煩雑な前処理や抽出操作を行う必要がないことも明らかとなった。HCPA は、感度的にリムルス試験と大差がなく、種々の発熱性物質を探知できる利点を持つと共に、試料に対するヒト免疫担当細胞の応答性を指標としているため、スキャホールドをヒトに適用した際の生体反応を予測する方法として非常に有益であると思われる。今後、HCPA の有用性を確認するための総合的な研究を実施する。

A. 研究目的

組織工学を基礎とする細胞を用いた再生医療技術の発展には、培養細胞の効果的な利用技術と高度な分化機能を示す細胞を大量に獲得するための足場となる培養担体（スキャ

ホールド）の開発が必須である。高度先端医療として期待が高まる再生医療工学で必要となるスキャホールドとしては、コラーゲンなどの天然由来材料のほか、生分解性材料を含めた合成高分子やセラミックなど様々な担

体が考案されている。スキャホールドの機能については開発段階において活発な基礎研究が成されているが、その品質は十分に評価されていないのが現状である。

グラム陰性細菌の表層抗原であるエンドトキシン (lipopolysaccharide, LPS) は極微量で発熱や炎症反応を惹起する強力な生理活性物質であり¹⁾、組織工学製品の安全性を評価する上で重要な感染因子の1つとなる。天然材料から構成されるスキャホールドには、その起源上、LPSを初めとした様々な菌体成分が混入している可能性が高いことに加え、合成高分子や無機材料のLPS汚染は未知な部分が多い。また、細胞培養時に使用する血清に含まれるLPSの材料への吸着性については全く検討されていない。

医用材料の発熱原性を評価する手法として、現在、ウサギ発熱試験とエンドトキシン試験を利用することができる^{2,3)}。ウサギ発熱試験は発熱性物質によって誘導される生体発熱反応の真の強度を測定する *in vivo* 試験法であり、基本的に全ての発熱性物質の検出に利用できる反面、動物を使用する点と検出感度が比較的低い欠点を持っている。エンドトキシン試験は、カプトガニ血清中に存在する凝固系蛋白質のゲル化をマーカーとして、LPSを高感度で検出する *in vitro* 試験法であり、手軽に測定できるメリットがある反面、LPS以外の発熱性物質を検出できない欠点を持っている。

現在、動物愛護の観点から、動物を利用した幾つかの試験法は *in vitro* 代替法に移行される方向にある。ウサギを使用する発熱性物質試験に関しても欧州を中心にヒト末梢血細胞またはヒト由来のライン化細胞を利用した新しい評価法 (Human Cell Pyrogen Assay,

HCPA) の開発が進められている⁴⁻⁹⁾。HCPAの利点と欠点を表1に示した。エンドトキシン試験において検出される発熱性物質はLPSのみであるのに対し、HCPAではTNF α 、IL-1 β 、IL-6などの内因性発熱物質を介して発熱を惹起する全ての発熱性物質を検出できる利点がある。この評価法では、発熱性物質により活性化されたマクロファージや単球細胞から遊離される炎症性サイトカインを発熱指標として定量的に測定するため、検出感度も比較的高い。

HCPAにおいては、ヒト末梢血細胞とライン化細胞を使用することができる。末梢血は発熱性物質と反応する全ての血中成分を通常の生理学的比率で含んでいる利点があるが、その安全性、品質管理、供給面での問題が課題となる。一方、ヒト由来マクロファージ様THP-1ライン化細胞やヒト由来単球様MM6ライン化細胞の場合、供給面や安全性に関する障壁はないが、試験に供するまでに数週間の培養期間が必要であると共に、継代による性状変化や発熱性物質に対する反応性の変化などを確認する必要が生じる欠点を持っている。

HCPAは医薬品に混入する発熱性物質の検出を行うことを主目的としているが、医療機器への応用も十分可能であり、現在までに、アルギン酸塩 (マイクロカプセル基材)、リン酸カルシウム (bone replacement)、血液透析膜やエアフィルターなどへの応用例が報告されている。過去、我々の研究グループも天然医用材料から製造された創傷被覆剤に含まれる発熱性物質の検出にHCPAを応用し、エンドトキシン試験、ウサギ発熱試験との相関性について検討した¹⁰⁾。同研究では、エンドトキシン試験とウサギ発熱試験が陽性である一方、HCPAが陰性となる製品の存在を明らかにしてお

り、HCPA がヒトに対する現実的な安全性を評価する上で非常に有用であることを見出している。

本研究では、組織工学製品の上市化に寄与することを目的とし、我々の過去の研究成果を基礎として、HCPA を利用した各種スキャホールドの微生物学的安全性評価法の確立を目指す。従来の分析法では、材料からの菌体成分回収率を向上させる必要があるが、本法は固形物自体を試験材料として利用できる可能性が高く、生体へのスキャホールド適用時と類似した条件で試験を行うことが可能となり得る。また、前述のとおり、この試験法はウサギ発熱試験の代替法としてヨーロッパを中心に使用され始めており、将来、我が国にも導入される可能性があるため、その有効性を事前に評価しておくことにも大きな意義がある。平成 17 年度の本研究では、現在市販されているスキャホールドの微生物汚染状況を従来法により評価したと共に、材料への LPS 吸着能に関して検討した。また、スキャホールドの微生物学的品質を評価する *in vitro* 試験法として HCPA が利用可能であるか判断するため、ヒト単球様 MM6 細胞から誘導した LPS 高感受性株である MM6-CA8 細胞に対する各種菌体成分の反応性を評価した。

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℃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。

(1) スパイク用 LPS および菌体の調製

大腸菌 0111 株および黄色ブドウ球菌 209P 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。同加熱死菌体を連続遠心分離により集菌し、蒸留水で 3 回洗浄した後、エタノール、アセトンおよびジエチルエーテルにより順次脱脂し、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^{11,12)}、Dnase/RNase 処理後、超遠心分離の反復により精製した¹³⁾。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 27.5 EU/ng および 0.159 EU/ng であった。

(2) 市販スキャホールド

本研究に使用した市販スキャホールドの性状を表 2 に示した。A 社製スキャホールドは同社から分与を受け、その他の製品は購入した。

(3) LPS 吸着能の評価

10% 牛胎児血清および 1% ペニシリンを含む α -MEM 培地に FITC 標識大腸菌 LPS (FITC-LPS, Sigma) を 1 μ g/ml の濃度で溶解した。コラーゲン/HA 複合体から成る A 社製スキャホールドを同培地 5 ml に浸漬し、37℃で 1 時間緩やかに振とうした。培地からスキャホールドを取り出し、洗浄することなく FITC-LPS 非含有 α -MEM 培地 5 ml に移し、再度、37℃で 1 時間緩やかに振とうした。同操作を更に 2 回繰り返した後、各培地中に含まれる FITC 蛍光強度を測定した (Ex 520 nm, Em 495 nm)。検量線は 0.01 - 5 μ g/ml の濃度範囲で作製した ($r=0.999$)。また、大腸菌 03 株 LPS (1 μ g/ml-PBS 緩衝液) を用いて同様の操作を行い、各処理を施したスキャホールドを

凍結乾燥した後。無菌的に粉碎し、後述したコラーゲンからの LPS 回収法に従ってリムルス活性を測定した。

(4) 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) と多孔性ハイドロキシアパタイト (HA, 東芝セラミックス製ネオボーン: 粒径 0.5-1.0 mm, 孔径 150 μm) を使用した。同コラーゲンに種々の量の大腸菌 03 株 LPS、大腸菌 0111 株乾燥菌体および黄色ブドウ球菌 209P 株乾燥菌体を添加し、凍結乾燥後、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、同様の方法により、各種の菌体成分を含むコラーゲン/HA シート (重量比 3:5) を作製した。

(5) 菌体成分含量の測定

コラゲナーゼ (Sigma 社製 Type 1A-S) 溶液 1 ml (1 mg/ml in 5mM HEPES Buffer) を平衡化した Profos 社製 EndoTrap Blue ゲル 100 μl 入りの試験管に加え、4°C で 8 時間、ロータリーシェーカーを使用して緩やかに攪拌した後、同混合液の全量をもう 1 本の EndoTrap Blue ゲル 100 μl 入りの試験管に移した。引き続き、4°C で 16 時間、同様にインキュベーションした後、遠心して上清を採取し、精製コラゲナーゼ溶液とした。

LPS 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^{15,16)}。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標準エンドトキシン (JPSE, 大腸菌 055:B5 株 LPS) 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。LPS 含量測定用試験原液は下記のように調製した。

コラーゲン材料は正確に重量を測定した後、1 ml の HEPES 緩衝液 (5 mM, pH 7.3) 中、37°C で 16 時間、精製コラゲナーゼにより消化した。処理液を塩酸酸性 (pH 3, 最終容量 2 ml) 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¹⁴⁾。無機系材料は無菌的に粉碎した後、PEG 溶液 (0.4% polyethyleneglycol, 50mM EDTA, 1% Tween 20: 使用時 100 倍希釈: 生化学工業) により、室温下、1 時間緩やかに振とう抽出して、試験液を調製した。合成ポリマー材料は PEG 溶液中、ホモジナイザーにより破碎した後、室温下、1 時間緩やかに振とう抽出して、試験液を調製した。

β -グルカン類はファンギテック G テストTM (生化学工業) を用いて定量した。ペプチドグリカンは SLP 試薬 (和光純薬工業) を用いて定量した。 β -グルカンおよびペプチドグリカン含量測定用試験原液は、正確に秤量した各試料に 1mM KOH (1 ml) を加え、10 分間超音波処理後、100°C・15 分間加熱し、再度 10 分間超音波処理して調製した。

いずれの測定も SK603 マイクロプレートリーダー (生化学工業) を使用して行った。

(6) IL-6 産生誘導活性の測定

試料としては、大腸菌 03 株 LPS、大腸菌 0111 株乾燥菌体、黄色ブドウ球菌 209P 株乾燥菌体および各菌体成分を含有したコラーゲンシートとコラーゲン/HA の他、ペプチドグリカン (BioChemika)、 β (1 \rightarrow 3)-D-グルカン (和光純薬)、黄色ブドウ球菌由来外毒素 TSST-1 (Sigma)、ネオボーンおよび市販スキャホー

ルドを使用した。ペプチドグリカンおよび TSST-1 は EndoTrap Blue (バッチ法) により精製した。β (1→3)-D-グルカンは 0.3 M KOH に溶解後、1 mM KOH により希釈系列を作製した。

細胞としては、ヒトの単球様細胞株 Mono-Mac-6 からクローニングした LPS 高感度応答性の垂株 MM6-CA8 を用いた¹⁷⁾。同細胞を calcitriol (1,25-dihydroxy- vitamin D3; 10 ng/ml) により 72 時間刺激した後、 1×10^6 cells / 0.9 ml / well となるように 24-well プレートに分注し、試料を 0.1 ml または 1 mg 添加して 17 時間培養した。その後、培養上清中のインターロイキン 6 (IL-6) の濃度を市販の ELISA キット (R&D) を用いて測定した。

C. 研究結果

(1) 菌体成分汚染サーベイ試験

本研究で使用した 5 種類の製品に含まれる LPS、β-グルカンおよびペプチドグリカン量を従来法により測定した結果を表 3 に示した。C 社製コラーゲン製品からは僅かに LPS が検出されたが、無機材料およびポリ乳酸により構成される製品からは、微生物汚染の指標であるこれら 3 種の菌体成分が検出されなかった。また、A 社製スキャホールドからは極微量の β-グルカンが検出された。A 社製製品に LPS 汚染は認められなかったが、後述するように、同製品は非常に高い LPS 吸着能を示す可能性が示唆された。

(2) LPS 吸着能の評価

FITC-LPS を使用してコラーゲンと HA から構成される A 社製スキャホールドに対する LPS 吸着能を評価し、その結果を図 1 に示した (FITC-LPS 初濃度 1 μg/ml、培地量 5 ml)。

スキャホールドを浸漬させた後の培地上清の FITC-LPS 濃度は 0.94 μg/ml であったことから、同スキャホールドには 0.3 μg の FITC-LPS が含浸されたことが明らかとなった。FITC-LPS 含有培地に浸漬したスキャホールドを通常の培地に移して洗浄操作を行った結果、同スキャホールドからはキャリアオーバー分を含めて 0.85 μg の FITC-LPS が回収された。同様に、2 回目および 3 回目の洗浄では、それぞれ 0.25 μg および 0.15 μg の FITC-LPS が回収された。3 回目抽出後の培地中に含まれる FITC-LPS 濃度は 0.03 μg/ml であり、初濃度の 3.0%に相当した。

FITC-LPS の代わりに大腸菌 O3 株 LPS を使用して同様の実験を行い、スキャホールドに吸着した LPS 量を精製コラゲナーゼ消化/塩酸法を併用したエンドトキシン試験により測定した結果、LPS 含有 PBS 緩衝液 (1 μg/ml) に浸漬させたスキャホールドおよび 1 回から 3 回洗浄処理したスキャホールドともに、LPS 活性が全く検出されなかった。

(3) 菌体成分に対する MM6-CA8 細胞の応答性評価

3-1. 菌体成分

本実験で使用した各種菌体成分の LPS 含量を表 4 に示した。β (1→3)-D-グルカンの LPS 含量はリムルス試験の検出限界以下であった。また、黄色ブドウ球菌乾燥菌体の LPS 含量は 0.48 EU/mg (1 ng LPS = 5 EU として 96 pg/mg 相当) であった。一方、TSST-1 とペプチドグリカンは、それぞれ 74.9 EU/mg および 102 EU/mg の LPS を含んでおり、MM6-CA8 細胞に対する IL-6 産生誘導能を評価する上で支障を来す恐れがあったため、EndoTrap 処理による LPS 除去を試みた。その結果、両者の LPS 含

量は、それぞれ 0.16 pg/ml (1 ng LPS = 5 EU として 32 pg/ml 相当) および検出限界以下まで低下した。

MM6-CA8 細胞に対する種々の菌体成分の IL-6 産生誘導能を評価し、その結果を図 2 に示した。いずれの菌体成分も混入している LPS の影響が観測されない濃度範囲において試験を実施した。JPSE と大腸菌 O3 株 LPS は同細胞に対して極微量で IL-6 産生誘導能を示し、JPSE では 0.05 EU/ml (1 ng LPS = 5 EU として 10 pg/ml 相当)、大腸菌 O3 株 LPS では 5 pg/ml 以上の濃度で用量依存的に IL-6 産生誘導能が上昇した。大腸菌 O111 株乾燥菌体および黄色ブドウ球菌乾燥菌体は 1 ng/ml または 10 ng/ml 以上の濃度範囲において用量依存的に IL-6 産生誘導能を示した。また、ペプチドグリカンにも IL-6 産生誘導能が認められたが、大腸菌 O111 株菌体や黄色ブドウ球菌菌体と比較して、その強度は劣っていた。一方、黄色ブドウ球菌が産生する外毒素の 1 つである TSST-1 は IL-6 産生誘導能を示さなかった。また、 β (1 \rightarrow 3)-D-グルカンには 100 ng/ml 以上の濃度で弱い IL-6 産生誘導能が認められた。

3-2. 菌体成分含有コラーゲンシート

種々の量の菌体成分を含むコラーゲンシート 1 mg を試料とし、抽出操作を行うことなく、直接、MM6-CA8 細胞と共培養した時の IL-6 産生量を評価した。表 5 に示したように、菌体成分を含まないコラーゲンシートによって誘導される IL-6 量はバックグラウンド値 (7.5 pg/ml) を多少上回る程度であったが、コラーゲンに大腸菌 O3 株 LPS、大腸菌 O111 株乾燥菌体および黄色ブドウ球菌乾燥菌体をスパイクしたシートでは、添加量に比例して IL-6 産

生量が顕著に増加した。同様にコラーゲン/HA シートを試料とした場合も菌体成分の添加量に比例して IL-6 産生量が増加したが、コラーゲン/HA シート自体によっても 51.0 pg/ml の IL-6 が産生された。一方、コラーゲン/HA シートの HA 原材料であるネオボーン自体には、顕著な IL-6 産生誘導能が認められなかった。

3-3. 市販スキャホールド

使用する細胞数と試料重量の相関性や判定に使用するマーカー検索など、反応系の最適化に関する実験は行っていないが、予備的に C 社製コラーゲン製品を試料として、IL-6 産生誘導能を指標とした HCPA を適用した。その結果、同スキャホールド (1 mg) は MM6-CA8 細胞から 14.1 pg/ml (IL-6 産生バックグラウンド 4.8 pg/ml) の IL-6 産生を誘導した。

D. 考察および結論

LPS はグラム陰性細菌細胞壁表層に局在するリポ多糖体である¹⁾。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。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。我々は、過去に実施した市販創傷被覆剤の微生物汚染サーベイ試験において、アルギン酸製品およびコラーゲン製品の幾つかに相当量の菌体成分汚染があることを見出している^{10,14)}。そこで、現在市販されている組

織工学用スキャホールドの微生物汚染状況を従来法により評価した結果、無機製品および合成ポリマー製品からはLPS、 β -グルカン類、ペプチドグリカンが検出されず、微生物学的な品質に問題ないことが明らかになった。また、C社製コラーゲン製品からは極微量のLPSが検出されたが、単位重量当たりの検出量は大きな問題となり得ないことが判明した。A社製スキャホールドからは微量の β -グルカンが検出された。通常、 β -グルカン汚染が認められる製品にはLPS汚染も観察されるが、同製品からLPSが検出されなかったことは非常に興味深い結果である。

患者由来の自己血清を用いて細胞培養を行う場合は感染リスク因子による汚染の問題を考慮する必要はないが、その他の場合は培養時に使用する血清の品質を確保する必要があると共に、スキャホールド上で細胞を培養する場合はスキャホールド自体への感染リスク因子の吸着挙動も評価しておく必要がある。FITC標識LPSを使用してA社製スキャホールドへのLPS吸着能を評価した結果、浸漬後3回洗浄した培地上清へのLPS溶出量はキャリアオーバー分を含めて初濃度の3%程度であった。しかし、大腸菌O3株LPSを含むPBS緩衝液に浸漬後、洗浄および凍結乾燥した各試料からはLPS活性が全く検出されなかった。精製コラーゲナーゼ消化/塩酸法を併用したエンドトキシン試験ではコラーゲナーゼに残存するLPS活性がバックグラウンドとして検出されるが、これらの試料のエンドトキシン試験では同バックグラウンドも検出されなかった。前処理として実施した精製コラーゲナーゼ消化中の反応液のpHは中性であり、LPSが処理中に分解する可能性が否定されたことから、A社製スキャホールドに含浸させた高濃度のLPSが

検出不能となった要因として、同製品が非常に高いLPS吸着能を持つことが示唆された。A社製スキャホールドは未焼成のHAを構成成分として含むため、蛋白質を初めとした様々な物質を吸着すると共に、マグネシウムイオンやリン酸イオンなどの交換能を持つことが推測される。一方、LPSは血清学的抗原性を決定する多糖部分および生物活性を担うリピドA部分にリン酸基を有するため、HAに吸着される可能性がある。先に実施した従来法による菌体成分汚染サーベイ試験において、A社製スキャホールドからLPSが検出されなかった原因もHAの吸着能が関与している可能性が強く示唆された。このように、市販製品の中にはLPS吸着性を持つ可能性が示唆される製品が存在するため、初期培養に使用する培地中に含まれるLPS量は正確に把握しておく必要がある。今回の実験では、コラーゲン/HAから構成されるA社製骨再生用スキャホールドについて検討したが、次年度以降、その他の製品のLPS吸着能についても検討する。また、A社製スキャホールドは従来法によりLPS含量を測定することが不可能であり、同製品やその他の類似製品の品質を評価するためには新しい分析法の開発が必須となる。この点についても、HCPAの応用可能性に期待が持たれる。

HCPA自体は、LPSを初めとした様々な生理活性物質の生物学的性状を評価する一手法として、基礎研究レベルで古くから使用されており、既に確立された測定法である。最近、ヨーロッパを中心にウサギ発熱試験の代替法として利用されているヒト全血細胞を使用したWhole Blood Test (WBT)はHCPAの応用例の1つである。WBTを行う場合、ヒト全血細胞の安全性、個体による反応性の相違、安定

供給などが問題であったが、近年、商品名 PyroCheck という測定キットが市販されるに至り、これらの諸問題は解消された。

MM6-CA8 細胞に対する LPS、 β (1→3)-D-グルカンおよびペプチドグリカンの IL-6 産生誘導能は過去の報告¹⁷⁾とほぼ一致していた。グラム陰性細菌である大腸菌 0111 株乾燥菌体は勿論のこと、グラム陽性細菌である黄色ブドウ球菌乾燥菌体も顕著な IL-6 産生誘導能を示したことから、HCPA はグラム陽性細菌汚染の検出法としても有益であることが判明した。また、菌体成分をスパイクしたシートを直接的に MM6-CA8 細胞と共培養した際、菌体成分添加量に比例した IL-6 産生誘導能が観察されたのは興味深い結果である。コラーゲン/HA シートの IL-6 産生バックグラウンドが若干高い結果が得られたが、HA の原材料であるネオボーン顆粒自体は顕著な IL-6 産生誘導能を示さなかったことから、この現象は円柱状の凍結乾燥品からシートを切り出す際に発生した HA 顆粒の微粉末を MM6-CA8 細胞が貪食したことに由来するものと思われる。

エンドトキシン試験および HCPA における大腸菌 03 株 LPS をスパイクしたコラーゲンシートからの LPS 活性回収率を表 6 に示した。エンドトキシン試験用の試料は、同シートを精製コラゲナーゼにより 37°C、16 時間消化し、塩酸により pH 3 に調製後、4°C で 10 分間超音波処理した溶液を原液として希釈系列を作製した。一方、HCPA では前述したように前処理を行うことなく、同シート 1 mg を 24 ウェルプレートに直接採取し、同ウェル中で MM6-CA8 細胞を培養した。精製コラゲナーゼ消化/塩酸法¹⁴⁾は、コラーゲン製品からの LPS 回収法として過去に我々が開発した方法であり、従来のガイドライン法^{14, 18)}と比較して LPS 回収

率が飛躍的に改善されている。しかし、IL-6 /LPS 検量線 (5 - 100 pg/ml. $r=0.989$) に基づいて HCPA によって得られた LPS 回収率は、いずれの添加量の場合でもエンドトキシン試験の回収率を上回っていた。HCPA 用の細胞としてライン化された保存株を使用する場合、試験に要する細胞数を得るまでに分化刺激の時間を含めて通常 2 週間程度の準備期間が必要になるが、試験液を調製する必要がない、換言すれば抽出効率を考慮する必要がないことは大きな利点である。前述のとおり、検出感度もエンドトキシン試験と大きな差異がなく、HCPA では LPS も含めてサイトカインネットワークを介して発熱を惹起する全ての発熱性物質を検出できる利点もある。生体適合性の劣る材料や微生物学的汚染度の高い材料などを生体内に埋植した際に誘導される炎症反応は好中球やマクロファージなどの免疫担当細胞により惹起される。HCPA では試料に対するヒト免疫担当細胞の応答性を指標としているため、ヒトに対するリスクを直接評価でき、スキャホールドをヒトに適用した際の生体反応を予測する方法として非常に有益である。

予備的に C 社製コラーゲン製品を試料として IL-6 産生誘導能を指標とした HCPA を適用した結果、同製品は MM6-CA8 細胞に対して大腸菌 03 株 LPS 4.3 pg/mg に相当する IL-6 産生誘導能を示した。同製品の LPS 含量は 0.006 EU/mg (1 ng LPS = 5 EU として 30 pg/mg) であり、エンドトキシン試験と HCPA との相関性は低いですが、LPS には種特異性があり、今回試験に供した C 社製コラーゲン製品に混在する LPS は、アルギン酸由来創傷被覆剤の場合と同様¹⁰⁾、ヒト細胞に対する反応性が大腸菌 LPS よりも劣ることが示唆された。

今後、試料重量と細胞数の相関性や細胞の

継代による反応性変化などを検討した後、天然材料から製造された市販創傷被覆剤に対する MM6-CA8 細胞の反応性を評価し、過去に実施した同製品に関する菌体成分汚染サーベイ試験の結果と比較検討する予定である。この際、LPS が活性を発現するための種特異性を評価するため、MM6-CA8 細胞の他、マウス由来マクロファージ様 J774.1 細胞を合わせて使用する。また、MM6-CA8 細胞から誘導される IL-6 以外の炎症性サイトカインおよびその他のケモカインに関する網羅的解析を実施することにより、各種菌体成分および材料に対する同細胞の反応挙動の評価や発熱マーカーの特定を行う。その他、粒径の異なる無機材料を使用して、貧食作用による MM6-CA8 細胞の活性化能を検討することにより、HCPA の有用性を総合的に評価する予定である。最終的には、現在市販されているスキャホールドに反応系を最適化した HCPA を適用し、従来法により評価した試験結果と比較検討する。

E. 研究発表

- 1) 齧島由二. 感染因子含有材料の *in vivo* 動態評価手法の開発. 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・医用材料の安全性評価手法開発に関する研究」成果発表会 (2006 年 3 月・東京).
- 2) 齧島由二, 長谷川千恵, 小園 知, 佐々木和夫, 矢上 健, 土屋利江. 菌体成分含有コーゲンの生体親和性と組織再生に対する影響. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005 年 11 月・京都).

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, pp. 5-18 (1990).
- 2) 齧島由二. 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 (監修: 土屋利江), pp. 37-42, シーエムシー出版 (2003).
- 3) 齧島由二. 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. 43-50, シーエムシー出版 (2003).
- 4) Hartung T, Aaberge I, Berthold S, Carlin G, Charton E, Coecke S, Fennrich S, Fischer M, Gommer M, Halder M, Haslov K, Jahnke M, Montag-Lessing T, Poole S, Schechtman L, Wendel A and Werner-Felmayer G. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. ATLA, 29:99-123 (2001).
- 5) Hartung T and Wendel A. Detection of pyrogen using human whole blood. In Vitro Toxicology, 9(4):353-359 (1996).
- 6) Fennrich S, Fischer M, Hartung T, Lexa P, Montag-Lessing T, Sonntag HG, Weigandt M and Wendel A. Detection of endotoxins and other pyrogens using human whole blood. In: Brown F, Hendriksen C and Sesardic D, eds. Alternatives to animals in the development and control of biological products for human and veterinary use. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger, vol 101, pp. 131-139 (1999).
- 7) Fennrich S, Wendel A and Hartung T. New applications of the human whole blood pyrogen assay (PyroCheck). ALTEX, 16:146-149 (1999).
- 8) Jahnke M, Weigand M and Sonntag HG. Comparative testing for pyrogens in parenteral drugs using the human whole blood pyrogen test, the rabbit *in vivo*

- pyrogen test and the LAL test. Eur. J. Paren. Sci., 5(2):39-44 (2000).
- 9) Petri E, Ploeg A, Habermaier B and Fennrich S. Improved detection of pyrogenic substances on polymer surfaces with an ex vivo human whole-blood assay in comparison to the limulus amoebocyte lysate test. In: Balls M, Zeller AM and Halder ME, eds. Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation. Elsevier Science B.V., pp. 339-345 (2000).
- 10) 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).
- 11) Westphal O, Luderitz O and Bister F. Über die Extraction von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z. Naturforsch, 7b:148-155 (1952).
- 12) Westphal O and Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods carbohydra. Chem., 5:83-91 (1965).
- 13) Haishima Y, Murai T, Nakagawa Y, Hirata M, Yagami T and Nakamura A. Chemical and biological evaluation of endotoxin contamination on natural rubber latex products. J. Biomed. Mater. Res., 55:424-432 (2001).
- 14) 齋島由二. 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).
- 15) 第 14 改正日本薬局方. 厚生労働省.
- 16) 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).
- 17) Nakagawa Y, Maeda H, Murai T. Evaluation of the in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: Comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test. Clin. Diag. Lab. Immunol., 9:585-597 (2002).
- 18) 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).

表1 ヒト細胞を利用した in vitro 発熱性物質試験法(HCPA)の利点と欠点

利 点	欠 点
動物を使用せず、ヒトにおける反応(発熱)強度を直接試験できる	サイトカインネットワークを介さない機序により発熱を誘導する物質を検出することができない
エンドキシン以外の発熱性物質も検出可能である	ヒト単球やマクロファージに作用する薬物などを測定することができない(例: サイトカイン受容体阻害剤、細胞毒性物質、非生理的溶液、リコンビナント INF- γ)
検出感度も比較的高く、IL-1 および IL-6 を指標とした場合の検出限界はエンドキシン量として、それぞれ <50 pg/ml、3 pg/ml 程度である	発熱性物質に対する反応性が末梢血ドナーまたは細胞の状態により変動する
ウサギ発熱試験およびリムルス試験において評価できない発熱性の検出が可能である(例: リムルス反応阻害・促進剤、固体試料など)	ヒト末梢血の安全性と安定供給に関する問題
基本的に発熱性物質の抽出操作を必要としない	
コストパフォーマンスと操作性に優れている	

参照資料 2 から引用

表2 市販スキャホールドの性状

販売会社名	材質	平均重量 (mg)	体積 (cm ³)	ポアサイズ (mm)
A 社	コラーゲン/HA	148.3	1.0	150-300
B 社	β -TCP	51.0	0.125	100-400
C 社	コラーゲン	3.5	0.039	100-200
C 社	リン酸カルシウム	45	0.058	200-400
C 社	ポリ乳酸	5.2	0.039	100-200

表3 市販スキャホールドの微生物汚染サーベイ試験

販売会社名	材 質	菌体成分		
		LPS (EU/mg)	β -グルカン (pg/mg)	ペプチドグリカン (pg/mg)
A 社	コラーゲン/HA	nd*	0.19	nd
B 社	β -TCP	nd	nd	nd
C 社	コラーゲン	0.006	nd	nd
C 社	リン酸カルシウム	nd	nd	nd
C 社	ポリ乳酸	nd	nd	nd

*nd, not detected (検出限界以下)

表4 各種菌体成分の LPS 含有量

菌体成分	LPS 含量(EU/mg)	
	Endo Trap 処理前	Endo Trap 処理後
β (1→3)-D-グルカン	nd*	nt**
ペプチドグリカン	102.0	nd
TSST-1	74.9	0.16
黄色ブドウ球菌菌体	0.48	nt

*nd, not detected(検出限界以下), **nt, not tested

表5 MM6-CA8 細胞に対する固形試料の IL-6 産生誘導能

材 料	菌体成分	添加量 (EU/mg)	IL-6 産生量 (pg/ml)
コラーゲンシート	大腸菌 O3 LPS	0	12.0
		1.1	550
		2.1	3,211
		10.7	13,640
	大腸菌 O111 菌体	0	12.0
		3.8	2,245
		7.6	17,370
		38.1	34,660
	黄色ブドウ球菌菌体*	0	12.0
		0.1	16.6
		1.0	26.3
		10.0	81.0
コラーゲン/HA 複合シート	大腸菌 O3 LPS	0	51.0
		0.4	248
		0.8	1,603
		4.0	2,220
	大腸菌 O111 菌体	0	51.0
		1.4	7,620
		2.9	9,220
		14.3	35,000
ネオポーン	—	—	11.9

IL-6 産生バックグラウンド 7.5 pg/ml, *黄色ブドウ球菌菌体添加量 $\mu\text{g}/\text{mg}$

表6 LPS 含有コラーゲンシートからのリムルス試験と HCPA による LPS 回収率

LPS 添加量 (pg/mg)	LPS 活性回収量			
	リムルス試験*		HCPA**	
	実測値 (pg/mg)	回収率(%)	実測値 (pg/mg)	回収率(%)
0	4.4	—	5.0	—
40.0	31.6	68.2	38.0	82.5
80.0	61.8	71.8	98.0	116.3
400.0	134.5	32.5	213	52.0

*リムルス試験: EndoTrap 精製コラゲナーゼ消化/HCl (pH 3) 法

**HCPA: 固形試料 1 mg により直接測定

大腸菌 O3 株 LPS: 1 ng = 27.5 EU

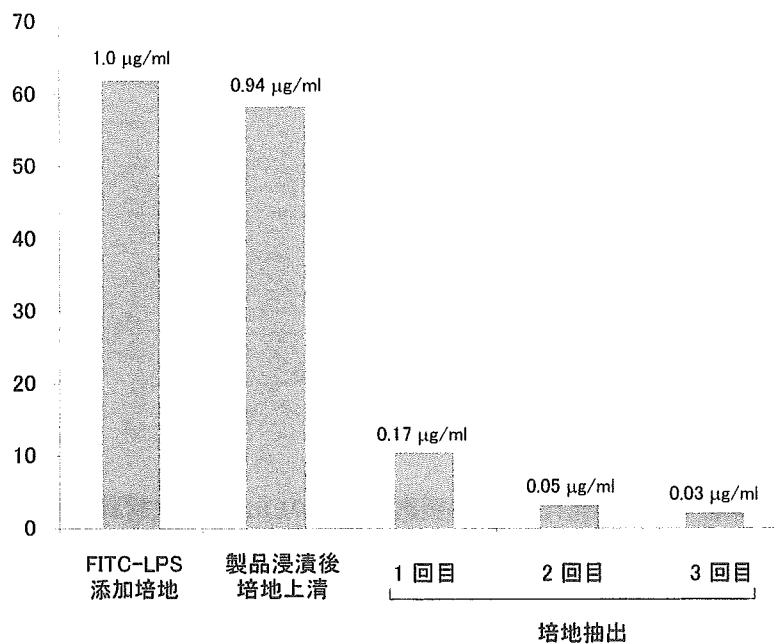


図1 FITC 標識 LPS を使用した A 社製スキャホールドに対する LPS 吸着能の評価

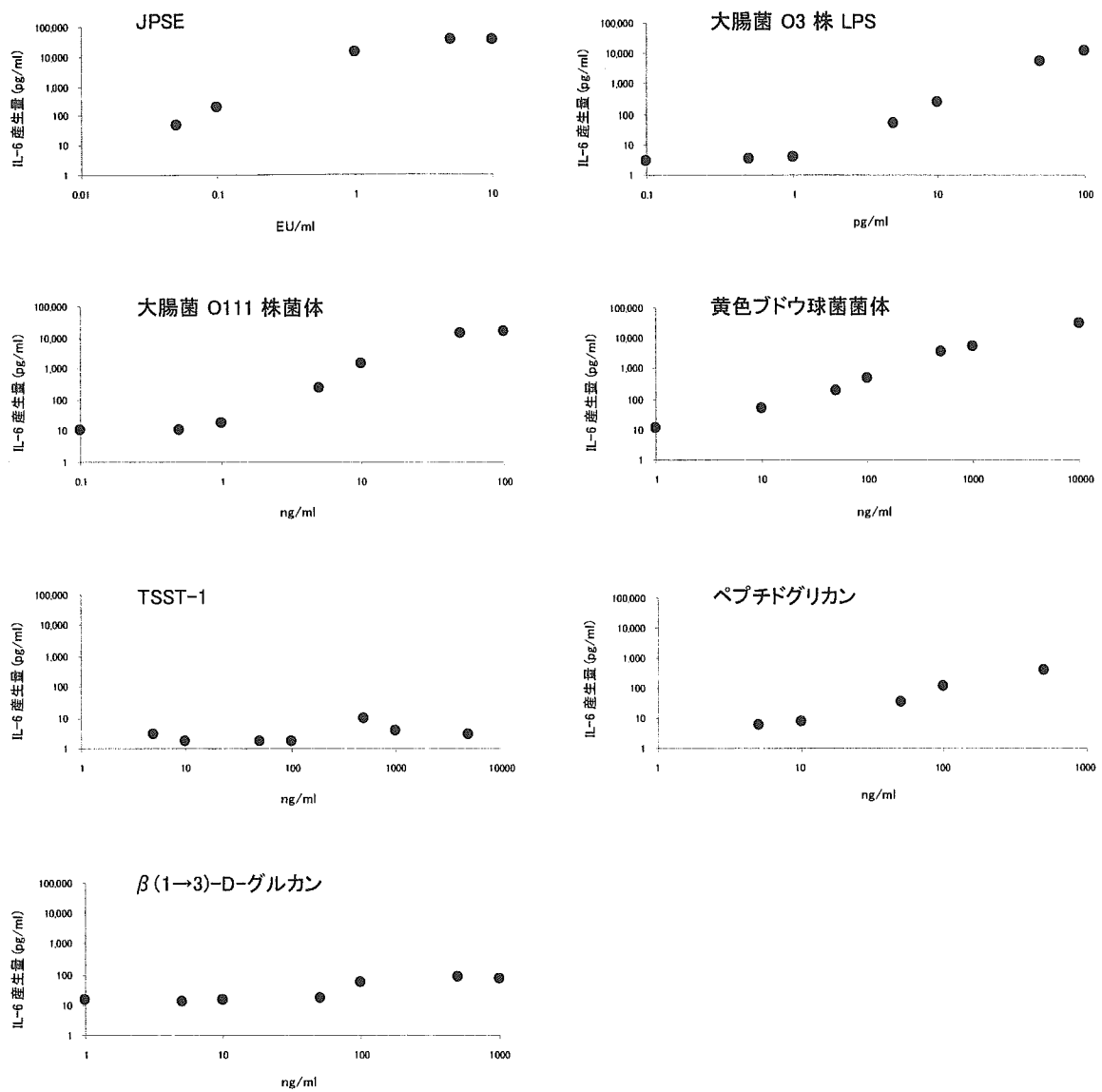


図2 MM6-CA8 細胞に対する各種菌体成分の IL-6 産生誘導能の評価

3. 間葉系幹細胞の均質性／同一性、および
品質検査法の開発

加藤 幸夫