

胞を回収し移植に使用した。

担体内に細胞が分散され、担体に接着したことを確認して、移植に使用した。細胞濃度は 5×10^6 個/ml であった。

全身麻酔下、ミニブタの膝関節を傍膝蓋内側切開で展開し、大腿骨膝蓋骨溝に、直径 12mm、深さ 3mm の骨軟骨欠損を作成した。コントロール群は欠損部を放置、担体を作成し、それぞれ細胞の無い担体のみ、あるいは担体に自己骨髄細胞を入れたものを移植した。移植後 6 ヶ月で欠損部を採取し、組織標本を作製し、比較した。

C. 研究結果

1. 感染因子含有材料の *in vivo* 動態評価手法の開発

(1) 菌体含有コラーゲンシートの LPS 活性

デトキシゲルカラム (PIERCE) を使用して LPS を除去したコラゲナーゼと比較して、EndoTrap Blue (バッチ法) により精製したコラゲナーゼは LPS 残存量が低く、且つ処理前とほぼ同様の酵素活性を保持していた。本精製コラゲナーゼを使用して大腸菌 O111 株乾燥菌体含有コラーゲンシートの LPS 活性を再測定した結果を表 1 に示した。昨年度の報告書に示したように、デトキシゲルカラム精製コラゲナーゼ前処理法を用いた菌体成分含有コラーゲンシートからの LPS 活性回収試験では菌体成分添加量の増加に伴い、LPS 活性回収率が 10% 程度まで低下する傾向が認められた。しかし、EndoTrap Blue 精製コラゲナーゼを使用した場合、いずれの添加量においても比較的良好な回収率が得られた。それ故、菌体含有コラーゲンシートから検

出される LPS 活性実測値は昨年度に測定した値を使用せず、表 1 に示した数値を新たに採用することとした。表 1 に示した実測値 1,162.8 EU/mg のシートは新規作成品であるが、その他のシートは菌体添加量の低い順に、昨年度の報告書に記述したシート No.#8-13 に相当する。

(2) 骨再生用材料の LPS 規格値設定

2-1. 大腿骨再生への影響

本実験では、実骨である大腿骨再生に対する菌体成分の影響を評価し、昨年度実施した扁平骨 (頭蓋骨) 再生の結果と比較検討した。本実験では、実測値として 33.6 (試験群 A)、433.8 (試験群 B)、1,162.8 (試験群 C)、3,100.9 (試験群 D)、35,722.7 (試験群 E) EU/mg の LPS 活性を示す大腸菌 O111 株乾燥菌体含有コラーゲンシートを埋植基材として使用した。埋植期間は 4 週を基本とした。

大腿骨埋植試験における軟 X 線解析画像を図 1 に示した。術後 1 週目の対照群 (菌体非添加シート埋植群) では骨形成が認められず、窩洞が明瞭に観察されたが、術後 4 週目では顕著な骨形成が起こり、窩洞部分が不透過像として観察された。また、骨欠損部にコラーゲンシートを埋植していない窩洞群においても顕著な骨再生が認められた。一方、菌体添加群では、添加量の少ない実験群では窩洞部の軟 X 線透過率が低く、その周囲に不透過像が観察されたが、菌体含量の高い実験群では窩洞形成部に明瞭な軟 X 線透過像が見られた。

病理組織学的診断結果を図 2 に示した。窩洞群では骨欠損部は観察されず、緻密骨 (皮質骨) の一部 (窩洞相当部位) に不規則な骨の増生が認められた (図 2-A)。

術後 4 週目の対照群 3 例の所見は窩洞群と同様であったが (図 2-B)、1 例のみ窩洞部に結合組織の増生した骨欠損が観察され、埋植したコラーゲンが残存していた (図 2-C)。その辺縁部では、骨髓腔に突出した骨増生が認められ (図 2-D)、緻密骨の外側に手術時に飛散した骨破片の壊死像 (腐骨) が少量観察された (図 2-E)。試験群 A では、緻密骨から骨髓腔に突出した不規則な骨の増生が認められた (図 2-F)。また、試験群 A の 1 例では、骨髓腔内に少量のコラーゲンが残存しており、その隣接部分に新生骨形成が観察された (図 2-G)。試験群 B では、窩洞部緻密骨に骨形成が認められず、埋植したコラーゲンが残存していたが (図 2-H)、骨髓腔内のコラーゲン周囲には新生骨が観察された (図 2-I)。試験群 C は、試験群 B とほぼ同様の所見を示したが、試験群 B と比較して、コラーゲン残量が多いことが確認された (図 2-J)。残存コラーゲンには線維芽細胞の侵入が認められ、軽度の炎症細胞浸潤が観察された (図 2-K)。試験群 D の所見は試験群 C と同様であり (図 2-L)、埋植したコラーゲンへのリンパ球浸潤が認められた (図 2-M)。試験群 E は、試験群 D と同様の所見を示したが (図 2-N)、試験群 D と比較して、より多くのリンパ球浸潤が観察された (図 2-O)。

2-2. 新生骨形成を抑制する菌体量の解析

昨年度の本研究において、大腸菌 O111 株乾燥菌体を含むコラーゲン/HA シートを埋植した試験群に顕著な骨再生の遅延が認められたことから、本実験では実測値として、9.6 (試験群 A)、33.6 (試験群 B) および 433.8 (試験群 C) EU/mg

の LPS 活性を示すシートを用いて同様の実験を行い、新生骨形成を抑制する菌体量を解析した。HA は軟 X 線解析において不透過像として観察され、WinRoof による解析を妨害することから、菌体成分の担体としてはコラーゲンシートを使用した。症例数は 1 群 10 例とした。

図 3 に示したように、コラーゲンシートにより被覆した実験的骨欠損部には、種々の程度に骨梁構造を示す軟 X 線不透過像が観察された。対照群 (菌体非添加シート埋植群) および試験群 A の多くは、ほぼ窩洞部全体に梁状の不透過像が観察されたが、試験群 B および試験群 C では不透過像が部分的であり、軟 X 線透過領域が広く観察された。窩洞部分に形成された新生骨の濃度と総面積を WinRoof により解析した結果を表 2 に示した。新生骨の骨濃度と骨総面積は大腸菌乾燥菌体の添加量に比例して減少する傾向が認められた。t 検定の結果、対照群と比較して、試験群 A は骨濃度、骨総面積ともに有意差が認められなかったが、試験群 B および試験群 C の骨濃度には有意差 ($p < 0.05$) が認められた。また、骨総面積についても、試験群 B ($p < 0.05$) および試験群 C ($p < 0.01$) ともに有意差が認められた。

病理組織学的評価において、コラーゲン材料を被覆した窩洞部には種々の程度の新生骨形成が認められた。しかし、新生骨の連続性がなく、線維性結合組織により被覆された領域も観察された。窩洞部の骨組織形成が良好な症例、窩洞部に形成された骨組織の一部に連続性が認められなかった症例、骨形成量が少なく、連続性が見られない症例および殆ど骨形成が認められず、線維性結合組織により

被覆された症例の典型的な HE 染色画像を図 4 に示した。窩洞部の骨組織形成が良好な症例は、対照群：8 例、試験群 A：4 例、試験群 B：1 例であった。また、窩洞部に形成された骨組織の一部に連続性が認められなかった症例は、対照群：2 例、試験群 A：2 例、試験群 B：1 例、試験群 C：3 例に観察された。骨形成量が少なく、連続性が見られない症例は、試験群 A：4 例、試験群 B：7 例、試験群 C：4 例であった。窩洞部に殆ど骨形成が認められず、線維性結合組織により被覆された症例は、試験群 B：1 例、試験群 C：3 例に観察された。

(3)肝臓損傷ラットに対する菌体成分の影響評価

3-1.致死毒性

肝臓損傷ラットに対する大腸菌 O111 株乾燥菌体含有コラーゲンシート（添加量 = 47,550 EU/mg, 回収試験におけるリムルス活性実測値 = 35,722.7 EU/mg) の致死毒性試験の結果を表 3 に示した。試験は 4 群に分けて行った。肝臓に作製した損傷部位を菌体成分非含有コラーゲンシート（対照シート）により被覆した動物群を対照群 A とし、皮膚縫合後、腹腔内に GlaN を投与した動物群を対照群 B とした。また、試験群 A は肝臓損傷部を上記の菌体含有コラーゲンシートにより被覆した動物群であり、試験群 B は試験群 A に GlaN を投与した動物群に相当する。これらの動物群の中で顕著な致死活性が認められたのは試験群 B のみであり、その他の動物群の生存率はいずれも 100%であった。

3-2.血液生化学検査

肝臓損傷ラットに菌体含有コラーゲンシート（LPS 活性実測値 35,722.7 EU/mg) を腹腔内埋植した際の全身的な影響を評価するため、血液を採取して生化学検査を行った。表 4 に示したように、GlaN 感作を行っていない対照群 A と試験群 A は非手術群と同様の検査結果が得られた。一方、GlaN 感作を行った対照群 B と試験群 B では、ビリルビンの他、GOT、GPT、LD、ALP および γ -GPT が高値を示し、肝障害が誘導されていることが判明した。試験群 B では尿素窒素、カリウム、無機リンの上昇も認められており、腎臓も障害を受けていることが推察された。糖質代謝を反映するグルコース値は対照群 B および試験群 B とともに非手術群と比較して低値を示し、特に試験群 B では顕著に低下していた。両群ともに総コレステロール値に大きな変化はなかったが、エステル型コレステロールが低下し、遊離型コレステロールが増加しており、結果としてコレステロールエステル比が顕著に低下していた。また、試験群 B ではリン脂質と遊離脂肪酸が高値を示すなど、脂質代謝異常も観察された。

しかし、対照群 B に認められた血液組成の異常は術後 6 日目までに改善され、全検査項目ともに正常範囲内の値となった（表 4）。試験群 B は埋植翌日までに 6 匹中 5 匹死亡したため、術後 2 日以降の血液検査を実施できなかった。

3-3.病理組織学的評価

手術後 2 日目の所見において、対照群 A の肝切除の組織は凝固壊死に陥っており（図 5-A）、被覆したコラーゲンとの間隙に出血巣（凝血塊）が認められた（図 5-B）。凝固壊死部に好中球とリンパ球浸

潤が観察された共に、被覆コラーゲン線維にも同様の炎症細胞の浸潤が認められた(図 5-C)。対照群 B では、肝実質の凝固壊死が広範囲に認められ(図 5-D)、出血と好中球浸潤が観察された(図 5-E)。コラーゲン線維間(図 5-F) およびコラーゲンが被覆されていない凝固壊死に陥った肝実質表面に細菌感染が認められた(図 5-G)。試験群の所見は対照群と同様であり、出血と広範囲の肝実質の凝固壊死が観察された(図 5-H)。また、試験群 B においても、出血と広範囲に肝実質の凝固壊死が認められた他(図 5-I)、被覆コラーゲン表面に細菌感染が観察された(図 5-J)。

埋植後 6 日目の所見において、対照群 A では、コラーゲン被覆下に肝細胞の変性・壊死、著明な好中球浸潤が認められた(図 5-K)。被覆コラーゲン線維間には、繊維性結合組織の増生が認められ、同様に好中球浸潤が観察された(図 5-L)。対照群 B は対照群 A とほぼ同様の所見を呈したが、炎症細胞浸潤は比較的軽度であった(図 5-M)。また、実験群 A も対照群とほぼ同様の所見を呈し、被覆コラーゲンにも著しい好中球浸潤が認められた(図 5-N)。

いずれの実験群においても、肝臓以外の腹腔内臓器に病理組織学的な異常は観察されなかった。

(4) 生分解速度と炎症反応の相関性

表 5 にガンマ線照射を施した菌体成分含有コラーゲンシートの LPS 含量を示した。種々の線量のガンマ線を照射したシートから検出された LPS 活性はガンマ線未照射シートの約 80-130% の範囲であり、ガンマ線照射による大腸菌 O111

株乾燥菌体の LPS 活性の減衰は認められなかった。

ガンマ線未照射シートと種々の線量のガンマ線を照射したシートをラット背部皮下に 1 週間埋植し、生体適合性を評価した。ガンマ線を照射しない場合、実測値として 33.6 EU/mg の LPS 活性を示す大腸菌 O111 株乾燥菌体を添加したシートを埋植した実験群(試験群 A) の所見は対照群と同様であり、埋植したコラーゲンシートは結合組織に被包され、線維芽細胞および毛細血管の侵入が観察された他、血管周囲に極軽度のリンパ球浸潤が認められた(図 6-A)。実測値 433.8 EU/mg のシートを埋植した実験群(試験群 B) では、毛細血管および線維芽細胞の侵入の他、より多くのリンパ球と大食細胞の浸潤が観察された(図 6-B)。実測値 1,162.8 EU/mg の実験群(試験群 C) では、コラーゲン線維間へのリンパ球浸潤と極軽度の好中球浸潤が認められる所見 1 例(図 6-C)、好中球浸潤が観察される水腫性変化を示す所見 2 例(図 6-D) と部位的に両者の所見を認めるものが 1 例観察された。実測値 3,100.9 EU/mg の実験群(試験群 D) では、コラーゲン線維間隙に高度の好中球、リンパ球と大食細胞の浸潤が認められた(図 6-E)。

5 kGy のガンマ線を照射した場合、試験群 A はガンマ線未照射時とほぼ類似の所見を呈し、コラーゲン線維間隙に軽度のリンパ球浸潤が観察された。同様の所見が試験群 B でも観察された。試験群 C では、コラーゲン線維間隙に多数の好中球浸潤が認められる所見(図 6-F) と軽度のリンパ球浸潤のみ観察される所見が認められた(図 6-G)。試験群 D では、0 kGy 群と類似した所見 2 例、好中球浸潤

が軽度となり、リンパ球浸潤が主体となる所見 2 例 (図 6-H) が観察された。

15 kGy のガンマ線を照射した場合、試験群 A では 1 例のみ軽度のリンパ球浸潤を伴うコラーゲンシートが少量確認された。試験群 B では、線維芽細胞と毛細血管の侵入が認められ、軽度のリンパ球浸潤が観察された。試験群 C の場合、4 例中 3 例はコラーゲンシートが確認されなかったが、残存が認められた 1 例では、コラーゲン繊維の吸収が進んでおり、軽度のリンパ球浸潤が観察された (図 6-I)。試験群 D は、残存したコラーゲンシートの器質化が進んだ所見を呈し、多数のリンパ球浸潤が観察される所見 1 例 (図 6-J)、軽度のリンパ球浸潤が観察された所見 1 例 (図 6-K)、一部に滲出物が貯留した所見 2 例が観察された。滲出物が貯留した 1 症例では、リンパ球を主体として、その他、少数の好中球浸潤および形質細胞を伴う炎症細胞浸潤が認められたが (図 6-L)、もう 1 症例は肉芽組織に被包され、軽度の炎症細胞浸潤が認められるのみであった (図 6-M)。

25 kGy のガンマ線を照射した場合、試験群 A と試験群 B では、全例ともにコラーゲンシートは吸収されており、埋植部位に線維性組織の増生が観察された (図 6-N)。試験群 C においても、コラーゲンシートは観察されなかったが、埋植部位に膠原繊維の増生した所見が認められ (図 6-O)、その中に極軽度のリンパ球浸潤の認められる症例が観察された (図 6-P)。試験群 D もシート自体は吸収されていたが、埋植部位に高度のリンパ球浸潤を伴う慢性炎症性肉芽の形成が認められた所見 (図 6-Q)、軽度 (図 6-R) 或いは中等度 (図 6-S) のリンパ球浸潤

を伴う線維化傾向を示す肉芽組織が構成された所見、炎症所見が殆どなく膠原繊維が増生した所見が観察された (図 6-T)。

(5)18-mer LLKKK アナログの性状評価

5-1. 抗菌活性

18-mer LLKKK アナログおよび対照として使用した抗生物質の抗菌力試験結果を表 6 に示した。黄色ブドウ球菌に対する 18-mer LLKKK アナログの 50% 発育阻止濃度 (50% Inhibitory Concentration, IC₅₀) は 1.09 nM であり、グラム陽性菌に対して強い抗菌力を示すペニシリン G と比較すると劣るものの、ポリミキシン B、ストレプトマイシンと同等以上の抗菌活性を示した。各種の抗生物質に抵抗性を示す緑膿菌に対する同アナログの IC₅₀ は 41.0 nM であり、ストレプトマイシンとほぼ同等の抗菌力を示した。一方、緑膿菌に対して高い抗菌活性を示すことが知られているポリミキシン B の IC₅₀ は 4.6 nM であった。

5-2. 18-mer LLKKK アナログの LPS 中和活性

抗 LPS 活性試験の結果を表 7 に示した。1 EU/ml の JPSE (日本薬局方標準エンドトキシン) が示すリムルス活性と MM6-CA8 細胞に対する IL-産生誘導能は 18-mer LLKKK アナログにより効率良く阻害され、両活性を 50% 阻害する同アナログの濃度 (IC₅₀) は、それぞれ 0.01 および 0.05 µg/ml であった。また、10 EU/ml の JPSE が示す活性も同様に効率良く抑制された共に、この抑制効果は 1% 血清存在下でインキュベーションを行った場合にも認められた。大腸菌 O3 株 LPS が示すリムルス活性も 18-mer

LLKKK アナログにより濃度依存的に顕著に抑制され、10,000 ng/ml (275,000 EU/ml 相当) の同 LPS が示すリムルス活性に対する IC₅₀ は 5.82 µg/ml であった。同アナログは大腸菌 O111 株乾燥菌体が示すリムルス活性も顕著に抑制し、30,000 ng/ml (4,775 EU/ml 相当) の菌体に対する IC₅₀ は 0.78 µg/ml であった。一方、10 ng/ml の大腸菌 O3 株 LPS が示すリムルス活性に対するポリミキシン B の IC₅₀ は 61.1 µg/ml であった(表 7)。

5-3.徐放システムの確立

8 種類のゼラチンハイドロゲルに含浸させた 18-mer LLKKK アナログの溶出挙動を検討し、その結果を表 8 に示した。エチレンジアミン化ゼラチンは 18-mer LLKKK アナログの保持能力が弱く、含浸させた大部分の同アナログが 30 分以内に放出した。一方、スルホアセチル化ゼラチンとアルカリ処理ゼラチンは同アナログとの結合親和性が比較的高く、24 時間までの放出率がそれぞれ 72.2%と 55.6%であった。コハク化ゼラチン、酸処理ゼラチンおよびアルキル化ゼラチンでは、含浸させた同アナログの約半量が 30 分以内に放出されたが、24 時間後でも 5%前後の放出率が得られた。これら 3 種のゼラチン誘導体中、1 時間以降の 18-mer LLKKK アナログ放出量が最も高いのは、最も高い含浸量を持つ酸処理ゼラチンであったことから、同ゼラチンを徐放基材として選択し、生体適合性を評価した。

5-4.生体適合性評価

酸処理ゼラチンの細胞毒性試験の結果を図 7 に示した。同ゼラチンから調製し

た 100%抽出液は僅かな細胞毒性 (コロニー形成率 17.6%) を示したが、IC₅₀ は 82.5%であり、細胞毒性に関して大きな問題は認められなかった。

ラット背部皮下埋植後 1 週目の所見において、滅菌生理食塩液を含浸させた対照群は著しい好中球の浸潤を伴った膿瘍形成が認められた(図 8-A)。一方、18-mer LLKKK アナログ (200 µg/ml) を含浸させた実験群では、対照群と同様の好中球浸潤が観察された所見(図 8-B)の他、好中球浸潤が殆どなく、大食細胞により取り囲まれた異物肉芽腫の所見(図 8-C)が観察された。埋植後 2 週目の所見において、対照群では好中球の浸潤が殆ど認められず、埋植したゼラチン周囲に多数の大食細胞、異物巨細胞が認められる異物肉芽腫の所見を呈していた(図 8-D)。そのうちの 1 例では、ゼラチン周囲に異物巨細胞反応と結合組織の増殖の高度な硬化性肉芽腫巣が観察された(図 8-E)。一方、実験群は、対照群と同様に異物肉芽腫の所見(図 8-F)が観察されたが、対照群と比較してゼラチンの吸収が進行していた(図 8-G)。また、ゼラチン周囲に異物巨細胞反応と結合組織の増殖の高度な硬化性肉芽腫巣が観察された(図 8-H)。

ラット腹腔内(肝皮膜被覆)埋植後 1 週目の所見において、対照群では埋植材に対する著しい好中球浸潤を呈する慢性化膿性肉芽によって肝実質と接着した所見が観察された(図 9-A)。接着部の肝細胞には、変性と壊死が認められ(図 9-B)、この領域と共に近傍のグリソン鞘に軽度のリンパ球浸潤が観察された(図 9-C)。一方、18-mer LLKKK アナログを含浸させた実験群では、好中球浸潤は殆ど無く、

大食細胞により取り囲まれた異物肉芽腫の所見が観察され、その周囲を軽度にリンパ球浸潤のある線維性結合組織が取り囲み肝被膜と癒着していた。肝実質に著変は認められなかった(図 9-D)。埋植後 2 週目の所見において、実験群ではゼラチンの吸収が進み、繊維性結合組織への置換が観察された(図 9-E)。残存した埋植材には、異物巨細胞反応が観察された(図 9-F)。

皮下および腹腔内埋植試験の結果から、18-mer LLKKK アナログは酸処理ゼラチンによって誘導される炎症反応を抑制し、異物巨細胞による埋植材の吸収を早期に誘導すること示唆された。

2. 再現性のある滅菌バリデーション達成法に関する研究

1. 乾熱滅菌

健常菌である初発菌の場合、培地メーカー間に顕著な差が認められなかった。

160°Cで 3 分間乾熱滅菌した損傷菌の場合は、培地メーカー間に抛る生育性能の差が認められた。

SCDA 培地に 0.5%グルコースを添加すると、損傷回復菌数が増加し、同時に培地メーカー間の生育性能に有意差がなくなった。

160°Cで 6 分間乾熱滅菌した場合は、0.5%グルコースを添加することで回復菌数が増加するが、3 分間暴露の場合と比べ、損傷の程度が増すとある特定培地メーカーの培地が他の培地メーカーの培地に比べ生育性能が低下していた。このことは滅菌バリデーションで培地生育性能を検討するに際しては健常菌ではなく、損傷菌を用いることが不可欠となる科学的根拠を示している。

160°Cで 5 分間暴露され損傷した乾熱滅菌の BI に炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、カザミノ酸、パンビタン、L-アラニン、D-アラニン、L-セリン、塩化マグネシウム、複合アミノ酸、ピルビン酸、リゾチームならびに ATP を添加すると、炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、L-アラニン、複合アミノ酸、ピルビン酸の場合に損傷回復が認められた。L-セリン、塩化マグネシウム、リゾチーム、ATP では顕著な損傷回復効果が認められず、D-アラニンは反対に阻害効果が認められた。

2. 高圧蒸気滅菌

健常菌である初発菌の場合、培地メーカー間に顕著な差が認められなかった。

121°Cで 3 分間高圧蒸気滅菌した損傷菌の場合は、培地メーカー間に抛る生育性能の差が認められた。

SCDA 培地に 0.5%グルコースを添加することで損傷回復菌数が増加したが、低生育数を示した培地については他の培地メーカーに比べて生育性能が落ちていた。

121°Cで 5 分間高圧蒸気滅菌により暴露損傷した菌の場合は、培地メーカー間に抛る生育性能に顕著な差が認められた。SCDA 培地に 0.5%グルコースを添加したところ、損傷回復菌数が増加したが、3 分間暴露の場合と同様、ある特定のメーカーの培地が他のメーカーの培地に比べ生育性能が落ちるていた。これは培地の中に含まれる他の損傷回復成分が欠如しているためと推察される。このことは滅菌バリデーションで培地生育性能を検討するに際しては損傷菌を用いることが必要になることが示唆されている。また、グルコースに替えてピルビン酸を添加し

た場合についても、同様であった。

121°Cで4分間暴露され損傷した乾熱滅菌のBIに乳酸カルシウム、ジピコリン酸、パンビタン、複合アミノ酸、リゾチーム、ATP、酵母エキス、可溶性でんぷん、カタラーゼ、グルコースならびにピルビン酸を添加した場合、乳酸カルシウム、パンビタン、複合アミノ酸、可溶性でんぷん、グルコースならびにピルビン酸添加で損傷回復が認められるが、他の成分添加の場合には顕著な損傷回復が認められなかった。

カルシウム、蛋白、グルコースなどの複合体として考えられるミルクの添加も有効であったが、ミルクの中でも液体ミルクより粉ミルクの方が有効であることが判明した。

損傷菌の場合には培養温度が低い方が生育菌数が多いことが分かった。

3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

1. LLNAにおける試験スケジュールの最適化と各種指標の比較

BALB/cマウスに対し、LLNA法に従って0.5% DNCBを3日間連続塗布した後、図10に示す各スケジュールで耳介リンパ節を摘出し(5,6または7日目)、各種項目を測定した。更にBrdUの取り込み量を測定する場合は、BrdUを腹腔内に注射後4時間または24時間後にリンパ節を摘出した。それぞれの結果を表10に示した。7日目にリンパ節を摘出した場合、5日目または6日目に比べてリンパ節重量は少なかった。リンパ節細胞数及びalarBlue取り込み量についても、7日目に摘出した時の値は6日目に摘出した時に比べて低い値を示した。BrdUの取り込み指標である吸光度は

BrdU注射後5時間でリンパ節を取り出して測定した場合が、注射後24時間経過して測定した場合よりも高い値を示した。

免疫抑制作用や刺激性が知られるDBTについて試験した。3日間塗布して6日目にリンパ節を採取した。DBTの2.5%溶液を塗布した場合は塗布から3日目には3匹すべてのマウスが、1%溶液を塗布した場合は4日目に1匹が死亡した。DBT 0.5%及び1%溶液を塗布して生存した動物で各項目を測定したところ、いずれもコントロールよりも増加した(表11)。

感作性を有しない刺激性物質のMS及び気道アレルギーを引き起こすとされているTMAについて試験した。TMAは著しいリンパ節活性化反応を起こしたが、MSについては同濃度で適用しても、いずれの指標ともSI値は1.8程度であった(表12)。

BALB/c系とCBA/N系のretireマウスに対して、DNCB及びHCAを塗布したときの反応性を比較した。BALB/c系マウスのリンパ節の大きさはCBA/N系よりも大きく、溶媒塗布のコントロール群でも大きな値をとった。そのため、DNCB等を塗布した場合のSI値は低くなった。しかし、他の指標に関しては両系統で著しい違いは認めなかった(表13)。

試験物質の塗布回数を1回増加させた時の各種指標をLLNA原法でのそれと比較した。7日目に再度塗布した後、翌日にリンパ節を取り出して測定した結果、各指標とも著しい増加を示した。その効果はHCAよりもDNCBで見られた。リンパ節活性化を評価する指標として高いSI値を示すものは、ATP含有量と

alamarBlue 取り込み量で、リンパ節細胞数も高い値を示した。これらに比べると BrdU 取り込み量の SI 値はかなり低い値しか示さず、HCA についての SI 値は 3 以下であった(表 14)。

2. フローサイトメトリー解析

リンパ節細胞の蛍光標識抗体染色は前年度で決定した条件で行った。すなわち、各群のマウスのリンパ節細胞をまとめ、1 チューブあたり 10^6 個の細胞を入れ、抗体の Fc γ III と Fc γ II レセプターへの抗原非特異的結合を阻害する anti-mouseCD16/CD32(Fc γ III/II receptor) monoclonal antibody (2.4G2)²⁰⁾ でブロッキング後、5 倍に希釈した市販 FITC 及び PE 標識の各抗体で染色し、T/B 細胞及び T 細胞サブポピュレーション比率を求めた。

まず、マウス系統によって細胞比率に違いがあるかどうか、BALB/c と CBA/N 系で比較した。BALB/c 系マウスの耳介リンパ節中の CD3 陽性の T 細胞数は全体の約 80~90% であるのに対し、CBA/N 系マウスの T 細胞数の比率は 93% と高かった。ヘルパー T 細胞が全 T 細胞中に占める割合は BALB/c 系マウスで 70% 程度、CBA/N 系マウスで 65% 程度であった。DNFB 及び HCA を塗布すると B 細胞数の増加が認められたが、HCA では DNFB よりも増加率は少なかった。DNFB 等の感作性物質による B 細胞比率の増加の程度は BALB/c 系統の方が CBA/N 系統よりも高かった。T 細胞サブポピュレーションについては BALB/c 系マウスに DNFB を塗布したときに若干ヘルパー T 細胞の割合が増加するが、CBA/N 系マウスでは変化を認めなかった(表 15)。

BALB/c 系マウスに DBT を塗布した場合、T 細胞の比率の増加と B 細胞の比率の減少が認められた。この傾向は DNFB と同様であった。T 細胞のうちヘルパー T 細胞の占める割合は DNFB 群では 67% とコントロール群と変化はなかったのに対し、高濃度 DBT 群では 60% へと減少した(表 16)。

TMA については B 細胞数が著しく増加した。それに伴って T 細胞比率は低下するが、ヘルパー T 細胞/細胞傷害性 T 細胞比は変化しなかった。刺激性物質 MS についてリンパ節細胞数に大きな変化はないものの、他の試験物質と同様に B 細胞比率が増加した。しかし、ヘルパー T 細胞/細胞傷害性 T 細胞比はコントロール群と変化は認めなかった(表 17)。

4. 医療機器に併用される抗血栓薬の適合性評価手法の開発

以下の 4 遺伝子について、これまでに公表されている計 6 SNP を選択し、タイピングを行った。

- ・ VAMP8 (2SNP)
- ・ TGF β 1 (1SNP)
- ・ TGF β RI (1SNP)
- ・ TGF β RII (2SNP)

SNP タイピングの結果を表 18 にまとめた。解析した 6 SNP のうちの 3 SNP (VAMP8 の c.201A>G と c.138C>T 及び TGF β 1 の c.29C>T) は、すでに日本人での SNP が報告されているものであり、今回の検討においても全て mutant が検出された。男女別の結果も major と minor の比率に性別間の差は認められなかった。一方、残りの 3 SNP は日本人での SNP 報告がこれまでにないものであり、やはり今回の検討においても 100 検

体全てが Wild Type であった。

今年度までに得られたデータを対照として、来年度以降、人工心臓弁を使用中の患者さんの血液サンプルを用いて合計 29SNP についてタイピングを行い、それぞれの結果を比較することによって人工心臓弁を体に埋植した際の血栓形成の原因となる遺伝子多型を探索していく予定である。

5. 金属材料の安全性評価手法の開発

【米国の不具合報告】

機器全体の使用後の健康被害は 1/3 に留まっている。機器に起因するとは限らないが、総死亡例は一万 2 千件に及んでいる。埋植機器に関しては、死亡例は機器全体とほぼ同割合であったが、それでも総計で五千件を超えている。また、機器全体と異なって、傷害例が最も多く、機器の不具合で留まっている例(24%)より、健康被害を与えている例(58%)が倍以上であった。

機器の分野別の報告比率を、機器全体と埋植機器で見ると、両者共に、循環器系が最も多く、2 番目に、一般手術・形成外科が多くなっている。埋植機器では、この 2 分野で報告の半分以上を超えている。次いで、整形外科の比率が大きいのが埋植機器の特徴であろうか。

機器全体の一般的名称分類別の集計結果を見ると、最も報告数が多いのは、臨床検査用ヘキソキナーゼであり突出していた。次いで、注入ポンプ、腹腔鏡が目立つ。注入ポンプは、インスリン注入ポンプと合わせると総数でもヘキソキナーゼに匹敵する多さである。腹腔鏡は、1997~2000 年に多数の報告(各年 3 千件以上)があった。最近では定常状態であるが、

それでも千件近辺である。手術用縫合器の報告も多く、何故か腹腔鏡と同様の年推移を示していた。総報告数の上位 10 機器では、これらの 4 機器以外は、全て埋植機器であった。次いで、除細動器、大動脈バルーン、インスリン注入ポンプ、人工呼吸器の報告数が多い。これらは、大動脈バルーン(腹腔鏡と同傾向)を除いて、最近でも定常的に報告が多い。

埋植機器の一般的名称分類別の集計結果において、他を圧倒しているのが埋め込み型除細動器である。定常的に 2 千件を超えており、今後も多数の報告が続くと見られる。2 番目の人工歯根は、1997 年を中心に 13,500 件あまりの報告があったため、総報告数としては多いが、最近では 100 件以下であり、増加傾向は見られない。次いで、ペースメーカー電極であるが、最近では定常的に千件を超えている。ペースメーカー自身の報告も 6 番目に多く、両者を合わせると除細動器をはるかに超えてしまう。ペースメーカーは 1997 年には 3 千件を超えていたが、最近では減少傾向であるものの、依然として 5 百件近くある。眼内レンズは定常的に千件から 2 千件の報告がある。シリコン乳房は、1997, 1998 年には 3 千件を超えていたが、最近では百件程度に留まっている。食塩水乳房については 1999, 2000 年に千 5 百件を超えていたが、やや減少傾向で 5 百件近くである。薬物放出冠動脈ステントは、2003 年に上市されてから、最近では、埋植機器の中では最も報告が多い機器である。冠動脈ステントも定常的に 7 百件以上の報告がある。インポテンス機器は 1997 年の 4 千件を超える報告が全体数を引き上げているが、現在も 4 百件を超える報告が続いている。また、人

工内耳が定常的に9百件を超えるようになってきている。

整形外科領域では、全体的に膝関節の報告数が股関節よりも1.5倍多く、年々顕著に増加傾向にある。骨接合材では、スクリューが最近では定常的に2百件以上の報告があり、プレートも定常的に2百件近くの報告が続いている。脊椎関係では、椎間固定具が2000年と2005年の3百件余りの報告の他にも定常的に百件以上の報告があった。

【薬事・食品衛生審議会への不具合報告】

平成15年7月30日より施行された改正薬事法において、不具合等の報告状況については、薬事・食品衛生審議会に報告することとされている。それらの報告(H15.7.30～H17.11.30、855日間)の総計は28,087件であった。内、健康被害なしは77%であった。

回収情報や安全性情報については、手動式医薬品注入器が全報告の一割近くを占めている。この内、健康被害なしは84%であった。次いで、透析器、眼内レンズ、血管用カテーテルと続いている。透析器は初回の報告で特定モデルの寄与が多く、最近では100件近辺に留まっている。カテーテルは定常的に100件程度の報告がある。人工呼吸器においても、定常的に30～60件の報告がある。

埋植機器で最も報告数が多い眼内レンズは、今回の不具合数に関しては、特定モデルの集中報告が総数を押し上げている。コンタクトレンズは、4回目の400件を超える同一製品の報告のために総数が多くなっている。人工股関節、骨接合用品、人工骨、人工膝関節などの整形外科分野の報告も多い。人工股関節について

は、特定モデルの280件を超える報告が総数を押し上げている。ペースメーカー、導線、除細動器などの心臓関連の機器は明らかな増加傾向を示している。ペースメーカーでは、外国で生じた不具合報告ではあるが、67件の集中報告がある。

【金属アレルギーなど金属関連例】

この章のFDAのデータはオンライン検索によるもので、2005年6月までのデータに基づいている。

2001年までは、天然ゴム・ラテックスに関するアレルギーが大半を占めていた。次に、ニッケルを含有しているために、ニッケル・アレルギーの懸念が完全には払拭できないTi/Ni合金に焦点を当ててみた。Ti/Ni合金の一種として良く知られた市販材料商品名について検索してみたところ、“allergy”を同時に含む事例はなかった。

“nickel”若しくは“metal”と、“allergy”を同時に含む報告の集計結果を見ると、絶対数は多くはないが、若干の増加傾向が見られる。

2005年における米国の不具合情報には18例の金属アレルギー関連の事例が報告されている。その内、14例は薬物放出冠動脈ステントによるものであり、上記の最後の事例と同様の報告である。他には、各1例であるが、歯科矯正用機器(Niアレルギー：ステンレス)、胸部バイオプシー・マーカー(金属アレルギー：摘出で軽快)、避妊器具(Niアレルギー、除去で軽快)、グルコース・モニター機器(Niアレルギー)等の報告がなされていた。

国内の不具合報告の中で、金属アレルギーとされているものはステントの1例のみで、ステントは除去せざるを得なか

ったようであった。さらに、多くの機器で、折損、破損、摩耗、針の折れ、ワイヤーの断裂、リードの断線などの報告があり、金属材料が関係していると思われる。

回収での金属に関するものとしては、金属疲労による破損などがあつた。安全性情報では金属関連で特記するものはなかった。

6. 金属材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の開発に関する研究

1. 細胞毒性試験

V79細胞を用いた抽出法によるコロニー法において、一部の試料でコロニーサイズの小型化が観察されたものの、いずれの試料もIC₅₀は>100%となり、細胞毒性は無いか非常に弱いことが確認された。

次に、直接接触法によるコロニー法で試験した試料のコロニー形成率は、Ti-6Al-4Vにおいては8%で弱い細胞毒性が認められたが、Ti-Zr基合金では97%~102%の範囲内で、Nb含量にかかわらずいずれも細胞毒性は認められなかった。また、純金属のTi、Zr、Nbのコロニー形成率はそれぞれ103%、98%、105%で、いずれも細胞毒性は認められなかった。しかし、Alのコロニー形成率は74%で非常に弱い細胞毒性が認められた。

2. 骨芽細胞適合性試験

試料の上で2週間培養したNHOst細胞の細胞数をTi-6Al-4Vにおける細胞数に対する相対値で検討したところ、Ti-Zr基合金の上で培養した骨芽細胞の細胞数は、Ti-6Al-4Vと比べて、Nb含量にかか

わらずいずれも増加した。また、純金属ではAlだけが、Ti-6Al-4Vと比べて、細胞数が減少した。

試料の上で2週間培養したNHOst細胞をアリザリンレッドS染色したところ、いずれの試料においても暗赤色に染色された石灰化ノジュールが明瞭に観察され、NHOst細胞は正常な骨分化機能を維持していることが確認された。Ti-Zr基合金の上で培養した骨芽細胞のALP活性およびCa量は、Ti-6Al-4Vと比べて、Nb含量にかかわらずいずれも増加した。Ti-6Al-4Vと比べて、Ti、Zr、Nbの上で培養した骨芽細胞のALP活性およびCa量はいずれも増加したが、Alの上ではALP活性およびCa量はどちらも低下した。特に、AlにおけるCa量の低下が顕著であった。

7. Ti-Ni合金の安全性評価手法の開発

純Niからの溶出量は0.05~0.08 mgm⁻²であり、2週間溶出のデータに若干の低下が見られるものの、おおむね試験期間の増加に従って溶出量が増加していた。Ti-Ni合金とTi-6Al-4V合金の場合は、ICPの検出感度限界付近の検出量だったため、事実上ほとんど溶出していないことがわかった。1.0%乳酸中での溶出試験では、もっとも大きな溶出量を示した純Niと比較すると、0.9%NaCl水溶液の場合と比べ、単位表面積あたりの溶出量が一桁大きくなっている。Ti-Ni合金とTi-6Al-4V合金からの溶出量はここでも純Niよりも小さかった。

0.05%塩酸中での溶出試験では、純Niの溶出量は1~1.2 mgm⁻²と3種類の合金の中でもっとも大きな溶出量を示した。ここでもTi-Ni合金とTi-6Al-4V合金の

耐食性は良好で、純 Ni と同じスケールの比較ではいずれも 0 に近いが、スケールを拡大すると、Ti-Ni 合金に比べ Ti-6Al-4V 合金の耐食性がさらに優れていることが明らかとなる。Ti-6Al-4V 合金の構成元素のうち、主成分の Ti は検出されたものの、Al や V は検出限界値以下であった。

8. 医歯科材料・インプラントによる皮膚科的症例の安全性評価手法の開発

(1) 金属製インプラントによる皮膚科的不具合例の文献収集

金属のアレルギーによると確定できた症例の多くは、インプラントと皮膚、すなわち表皮と真皮が近接している部位にインプラントを挿入している症例が多かった。本邦においても、海外と同様に下腿の骨接合用金属によるものが最も多く、原因の金属としては、ニッケル、クロム、コバルト、マンガン、銅の確実例が報告されていた。

チタンの症例は散見されるが、パッチテストの方法の詳細が記載されておらず、陽性と述べているだけでは、刺激反応が除外できず確実例と判断できる症例はなかった。

組織学的な検討がなされている報告があり、特徴としては、表皮に変化をきたしたものは少なく、真皮の炎症性細胞浸潤が見られ、浸潤している細胞は、リンパ球、好酸球、形質細胞であった。X線マイクロアナライザーによる金属の局在は、関連性が強く示唆された症例でも組織中に原因の金属が証明できない例が多かった。

なお、インプラントの金属アレルギーによる症例と診断するには、診断基準が

Rostoker らならびに岡田から提唱されている。

(2) 慢性再発性インスメント再狭窄における金属アレルギー反応の検討

ステンレス鋼のステントを使用して治療していた症例のなかで、二度以上再狭窄をしている群と、再狭窄が 50%未満の群に分けてみると、背景因子には差がなく、血管には差を認めた。

ステントのサイズには差があり再狭窄を起こした場合は直径が 3.08mm と細いことが明らかとなった。再狭窄例はニッケルに 30%陽性、狭窄例では 8.8%が陽性だった。

(3) 当科における金属パッチテストの陽性率の検討

ジャパニーズスタンダードシリーズのパッチテスト陽性率上位 10 位内に金属アレルギーが 7 種も含まれた。nickel sulfate と gold sodium thiosulfate は、統計学的にも女性に優位に多いアレルギーであった。

金の女性優位の現象について、われわれは動物モデルを作成し、7 週齢の B6C3F1 雌雄マウスを用いて、5%金チオ硫酸ナトリウム溶液にて感作後惹起し、マウスの耳介の厚さを経時的に測定したところ、惹起 48 時間後に雌の方が雄よりも優位に強い耳介腫脹を示した。マウスモデルを用いた金チオ硫酸ナトリウムの感作試験は成立し、その反応も雌の方が雄よりも優位に強く、ヒトパッチテストの結果と同様であり、金チオ硫酸ナトリウムの反応性に雌雄差があることを明らかにした。その後さらに性ホルモンの関与を検討した結果、金接触感作反応は、

エストラジオールが反応の強さを増強する抗原の1つであると結論した。

(4) 藤田保健衛生大学病院におけるインプラントによる皮膚不具合例の検討

当科において1998年から2005年までの8年間にインプラントが原因と疑われ金属等のパッチテストを行った症例の臨床経過とパッチテスト結果を検討し、その関連性を評価した。その結果、該当する症例は10例であった。原因と疑われたインプラントは人工膝関節3例、ペースメーカー2例、人工大腿骨頭1例、下腿髓内ワイヤー1例（同時に創外固定ワイヤー装着）、漏斗胸のプレート1例、中足骨骨折時のワイヤー1例、股関節ワイヤー1例であった。金属のパッチテストは5例が陽性であったが、うちニッケルが陽性であった1例は、ステンレスの下腿髓内ワイヤーを埋植した時期には皮膚障害はなく、ステンレスの創外固定ワイヤーを装着後重度の接触皮膚炎を生じた。ニッケル陽性の他の1例はクロム・コバルト合金釘が大腿骨に埋植されていたが、これらには陰性であった。コバルトが陽性の1例はコバルト・クロム合金人工膝関節を埋植していたが、これを除去せずに症状が消失した。他の2例はインプラントに含まれない金属に陽性であった。

9. 神経機能に及ぼす人工脳硬膜の安全性評価手法の開発

1) 埋め込み手術後の経過及び実験終了後の脳の肉眼解剖所見、膜の変化

埋め込み後の各群の餌の摂取量について、ケージ毎の値から一日毎に一匹当たりの摂取量の平均値を計算し、群間で比較したが、どの群でも1匹当たり30g前

後で、群間で有意性を示さなかった。

埋め込み後の各群の水の摂取量についてもケージ毎の測定値を基に1匹当たりの摂取量を計算した。手術後23日目に有意性を示し、平均値±標準誤差はcontrol 70.0±3.4ml, 人工硬膜埋め込み群76.2±4.3ml, DBT含有膜埋め込み群58.0±5.1mlで、DBT含有膜埋め込み群の平均値が人工硬膜群に比べて有意に低かった(p=0.013)。

手術後の体重に関して、一日ごとに平均値を算出したが群間で有意性はなかった。PPI test 実施時の体重はcontrol 494.8±5.9g, 人工硬膜埋め込み群496.8±10.8g, DBT含有膜埋め込み群504.2±12.3gであった。

肉眼的観察により膜の状態を確認した。膜が、手術時にかぶせた頭蓋骨と新生した頭蓋骨の間にはさまれていた例は人工硬膜で5例、DBT含有膜で7例であった。そのうち、完全に骨間に埋め込まれる形になったのが、人工硬膜で3例、DBT含有膜で3例で、残りは頭蓋骨の内側が完全に再生骨で覆われている訳ではなく、小さな穴が開いている部分があった。回収できた膜の重さについては、人工硬膜の平均値±標準誤差が1.17±0.27mg、DBT含有膜が0.93±0.21mgであった。

大脳表面に関しては、圧迫された印象があるものもあったが、顕著な変化は見られなかった。

2) Prepulse inhibition (PPI) test

%PPI at PP80について、DBT含有膜を埋め込んだ群で、control群及び人工硬膜埋め込み群に比べて、有意に%PPIの平均値が低かった。%PPI at PP70, %PPI at PP75については、群間で有意性を示さなかったが、平均値の値自体は、DBT含有

膜を埋め込んだ群で他の2群に比べて%PPIの平均値が低いという結果になった。

3) オープンフィールド試験

オープンフィールド試験の移動距離((A)時間区分別の移動距離、(B)観察期間全体の移動距離)は、どの時間帯でも観察期間全体の総移動距離でも群間で有意性を示さなかった。群別の(A) wall rearing, center rearing, FW, BW の回数、脱糞数、排尿数、(B)グルーミングの開始までの時間について、全ての指標に関して群間で有意な差はなかった。

10. 脊椎固定器具等の力学的安定性評価手法の開発

1. 実験結果との比較

有限要素解析結果の妥当性を検証するために、スクリーネジを長軸方向に1.3mm 変位させたときのスクリーに生じる反力について、前報(平成16年度報告)における実験結果と今回の有限要素解析結果を比較した。その結果、有限要素解析結果における反力は実験結果に比べて12%低い。これは実験結果の誤差範囲であることから、有限要素解析結果と実験結果は良く一致しており、モデルが妥当であると言える。

2. 有限要素解析結果

応力は、スクリーの遠位端と中央部分において高くなっていた。歪エネルギーも応力同様、スクリーの遠位端において最も高く、破損の危険性を示唆している。

変位量分布はスクリーの遠位であるほど少なく、ネック周りが最も大きな変位を示した。

ガイドホールの有無による影響を検討した結果、ガイドホールが有る場合の歪エネルギーが低く、破損の危険性が低い。しかし、引抜反力も低下しており、安定性の低下も示唆している。しかし、これらの許容範囲の閾値については不明であり、今後、シミュレーションと実験による検討が必要と考えられる。

11. 軟骨修復のヒト臨床使用類似モデルによる有効性・安全性評価手法の開発

1. 肉眼的所見

欠損放置群では、軟骨欠損部は何らかの修復組織で覆われているが、陥凹しており、修復は不十分であった。担体SZのみでは、軟骨欠損部は周辺の性状軟骨と同じレベルまで修復組織で覆われていた。しかし、修復部の表面は不整であった。担体+骨髄間葉系細胞群では、軟骨欠損部は周囲の正常軟骨と類似した性状を持つ組織で覆われており、表面も整であった。

2. 組織学的所見(トルイジンブルー染色)

担体のみでは、欠損部の深部はメタクロマジーを示す組織で埋められているが、鏡面の染色性は悪く、表層は不整であった。周辺の正常軟骨部に変性が認められた。担体+骨髄細胞では、表層のメタクロマジーが悪いものの、欠損部全体にメタクロマジーが認められた。表層も整であった。周辺の正常軟骨部は痛んでいなかった。

D. 考察

1. 感染因子含有材料のin vivo 動態評価手法の開発

敗血症時に見られるエンドトキシンシ

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または続発する多臓器不全症を引き起こす症例が見られる。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 LPS を投与した時の生体影響は詳細に検討されていない。

医療機器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、医療機器また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、同機器または材料の適用部位、生分解性、菌体成分含量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菌体成分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、種々の量の大腸菌死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、並びに骨再生に対する影響について検討した。

ラット大腿骨窩洞部への埋植試験において、実測値として 433.8 EU/mg 以上の LPS 活性を示すコラーゲンシートを埋植した実験群は、コラーゲンの生体吸収性

が不良であり、骨髄腔内に残存する所見が多く観察された。これらの実験群では緻密骨窩洞部に骨形成が認められず、添加した菌体量に依存して骨増生が抑制された。本埋植試験において観察された菌体成分による新生骨形成の抑制は頭蓋骨欠損部への埋植試験とほぼ同様の用量依存性を示したことから、試験の容易な頭蓋骨埋植試験により、新生骨形成に影響を与える菌体成分量を定量的に解析した。その結果、実測値 33.6 EU/mg 以上のコラーゲンシートを骨欠損部に埋植した場合、新生骨再生が顕著に遅延されることが明らかになった。この値を基本として、骨再生用材料のヒトに対する LPS 規格値を試算した結果を表 9 に示した。安全係数 100 を乗じた場合、同規格値は 13.4 EU/kg と試算された。但し、この値はコラーゲン製品からの LPS 回収率が高い EndoTrap 精製コラーゲナーゼ消化/HCl (pH 3) 法により LPS 含量を測定した結果から誘導されたものであり、ガイドライン法など、その他の測定法により得られた数値をこの規格値と比較することはできない。また、その他の材料についても、抽出条件を最適化し、LPS 回収率を高める必要がある。骨再生用材料の LPS 規格値を 13.4 EU/mg に設定した場合、微生物学的汚染度の低い無機材料や合成ポリマーから構成される骨再生用基材は問題ないが、コラーゲン製品などの場合、原材料の微生物学的な品質や生体への適用量に依存して、同規格値を超える可能性があるものと思われる。今後、安全係数の設定法に関して議論を深めて行く予定である。

マウスやラットのような齧歯類由来の細胞は、ヒト由来細胞と比較して、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、齧歯類は 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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。これを体重当たり換算すると、0.067-5.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (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 $\mu\text{g}/\text{g}$ 程度であることから、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。それ故、齧歯類を使用して LPS の致死毒性を評価する場合は、通常、GalN 感作により作製した肝障害モデル動物を使用する。GalN による肝障害のメカニズムは未だ完全に解明されていないが、現時点では、GalN がその代謝経路において、UDP-GalN から UDP-GlcN に変換され、UTP を捕捉することにより、肝細胞内の UTP、UDP、UMP 或いは UDP-グルコース、UDP-グルクロン酸が減少し、核酸、タンパク質および脂質代謝能が阻害されることに起因すると考えられている。LPS は TNF- α を介する肝障害作用により致死的作用を示すが、GalN 感作を行った場合、齧歯類の LPS に対する感受性は 1~3 万倍程度増強される。そこで、GalN 感作ラットを使用して、菌体含有コラーゲンの腹腔内埋植試験を行った結果、人工的に作製した肝臓損傷部位に菌体含有シートを被覆し、且つ GalN 感作を行った試験群のみに明瞭な致死活性が認められた。エンドトキシンショック時には、肝機能障害の他、糖質代謝異常、脂質代謝異常、腎機能障害なども誘発されることが知られている。肝臓損傷ラットへの腹腔内埋植試験では、GalN 感作により肝障害が誘発されることから、試験群 B は勿論、対照群 B もビ

リルビン、GOT、GPT、 γ -GTP などが高値を示したが、試験群 B では低血糖、高遊離脂肪酸、高尿素窒素など、エンドトキシンショック特有の性状が顕著に観察された。昨年度の本研究において、正常な状態であれば、多量の菌体成分を含有するコラーゲンシートを腹腔内に埋植しても、病理組織学的には各種臓器に対する影響がないことを確認しているが、今回の実験結果から判断する限り、菌体成分は腹腔内投与でも生体に影響を及ぼすことが明らかとなった。今後、医用材料を腹腔内に適用する際の適切な LPS 規格値を設定するため、GalN 感作ラットに対する致死毒性を指標として詳細な実験を行う予定である。

ガンマ線照射により生分解性を高めたコラーゲンシートを使用して、菌体成分によって誘導される炎症反応と材料の吸収速度の相関性について検討した。菌体含有コラーゲンシートをラット背部皮下に埋植した際、菌体添加量に依存して炎症反応が強くと認められたが、ガンマ線照射を施したシートは、照射線量の増加に伴い吸収性が向上し、それに比例して炎症反応の減弱が観察された。これは、基材であるコラーゲンの生分解性が増すことにより、菌体成分が早期に徐放された結果、菌体に対する組織反応の修復も加速されたことに起因するものと思われる。

昨年度実施したラット背部皮下埋植実験において、実測値として 3,100.9 EU/mg 以上の LPS 活性を示すコラーゲンシート (デトキシゲルカラム精製コラーゲナーゼ消化法による LPS 活性実測値：751.5 EU/mg) は顕著な炎症反応を誘導することが判明している。今回実施した炎症反応と生分解速度の相関性を追跡した実験に

においても同様の結果が得られたが、今回、実測値 1,162.8 EU/mg のシートを埋植した実験群にも炎症反応の徴候が観察されたことから、この値 (1,162.8 EU/mg) を基準として皮下適用材料のヒトに対する LPS 規格値を試算した結果を表 9 に示した。安全係数 100 を乗じた場合の同規格値は 775.2 EU/kg となるが、皮下適用材料の LPS 許容値は大きく、現在市販されている製品が同値を超える例はないものと思われる。また、本規格値を基準として製品の安全性を評価する際は、骨再生用材料の場合と同様、材料からの LPS 抽出法を最適化する必要がある。

CAP-18 は好中球に存在する分子量 18 kDa の塩基性の生体防御蛋白であり、ウサギ CAP-18 は 142 アミノ酸残基、ヒト CAP-18 は 140 アミノ酸残基から構成される。抗菌作用および LPS 中和作用を示す活性ドメインはアルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸とフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシンなどの疎水性アミノ酸を含む C 末端側の 37 残基である。この活性ドメインは好中球、単球、T 細胞に対して走化性を示し、ディフェンシンと同様に獲得免疫の誘導にも関与している。CAP-18 ペプチドは、 α -ヘリックス構造を持っており、親水性部分と疎水性部分がそれぞれ LPS の活性部位であるリピド A のリン酸基と脂肪酸に強固に結合することによって、LPS と LBP (LPS Binding Protein) との結合を阻害し、LPS の標的細胞に存在するレセプターへの結合と活性化を抑制する。グラム陰性細菌に対しては、細胞壁外膜に存在する LPS が一次標的となり、外膜および内膜が障害されることにより抗菌活性が発現される。グラム陽性菌では、陰電荷を持つタ

イコ酸、リポタイコ酸やリン脂質などとの結合を介して膜障害が起こる。現在までの構造活性相関に関する研究により、活性を発現する最小単位は 18 残基ペプチドであることが明らかにされている。また、18 残基ペプチドの E22 と K31 をロイシンに、また Q28、D32 および N36 をリジンに置換した修飾ペプチド (18-mer LLKKK アナログ) が類縁ペプチドの中で最も強い抗菌活性と LPS 中和作用を示すことが判明していることから、本研究では、生体内での酵素分解に対する抵抗性を付与する目的で、C 末端をアミド化、N 末端をアセチル化した同アナログを化学合成し、その性状を評価した。その結果、18-mer LLKKK アナログは非常に高い抗 LPS 活性を示し、CAP-18 ファミリーと同様に抗菌・抗 LPS 活性を持つ抗生物質であるポリミキシン B よりも遙かに強力な抗リムルス活性を示すことが明らかとなった。また、院内感染の主な原因菌である黄色ブドウ球菌や緑膿菌に対しても低濃度で抗菌活性を示したことから、同アナログは抗菌・抗 LPS 剤として有益であることが判明した。18-mer LLKKK アナログを生体に適用するための担体として選択した酸処理ゼラチンは同アナログの徐放性能に優れ、細胞毒性および染色体毒性を示さなかったが、ラット背部およびラット腹腔埋植試験において顕著な炎症反応を惹起することが確認された。興味深いことに、酸処理ゼラチンによって誘導される炎症反応は 18-mer LLKKK アナログにより、抑制される傾向が認められたことから、同ゼラチンの微生物学的な品質を評価した結果、酸処理ゼラチンは 4.52 EU/mg の LPS を含むと共に、ヒト単球様 MM6-CA8 細胞に対する顕著な IL-6

産生誘導能を示した（データ非公開）。これは、酸処理ゼラチンに相当量の微生物汚染が存在することを意味しているため、今後、同ゼラチンの精製を試みると共に、新たな徐放基材を探索する予定である。

2. 再現性のある滅菌バリデーション達成法に関する研究

1 乾熱滅菌の場合

健常菌の場合には培地メーカーに拠る顕著な生育菌数の差は認められないが、3 分間暴露損傷させた場合には培地メーカーに生育性能の差が認められた。しかし生育培地に 0.5%グルコースを添加すると培地メーカー間の生育性能に顕著な差が認められず、また生育菌数も増大した。6 分間の暴露の場合にも 3 分間暴露の場合と同様に培地メーカーに生育性能の差が認められた。そこに 0.5%グルコースを添加すると生育菌数は増大したが、特定の培地メーカーには他のメーカーに比べて生育性能が悪いことが分かった。

160°Cで 5 分間暴露された損傷菌生育培地に種々の損傷回復剤を添加した結果、カルシウム、L-アラニン、複合アミノ酸、ピルビン酸が損傷回復に有効であることが分かった。D-アラニンは阻害に作用した。このことは芽胞のエキソスポアに存在するアラニンラセマーゼの作用で生成した D-アラニンが L-アラニンの損傷回復作用を阻害した可能性が考えられる。

またカルシウムが損傷回復に有効であったこととは異なり、リボゾームの構造維持や ATP の補酵素として必要なマグネシウムが損傷回復に殆ど有効に作用しなかった理由については現時点では良く分からない。

2 高圧蒸気滅菌の場合

健常菌の場合には培地メーカーに拠る顕著な生育菌数の差は認められないが、3 分間暴露損傷させた場合には培地メーカーに生育性能の差が認められた。乾熱滅菌の場合と異なる点は、3 分間暴露損傷させた菌の生育培地に 0.5%グルコースを添加しても菌数の増加は認められるが、ある特定の培地メーカーの生育性能が劣っていることが確認された。5 分間の暴露の場合にも 3 分間暴露の場合と同様に培地メーカーに生育性能の差が認められ、そこに 0.5%グルコースあるいはピルビン酸を添加した場合、生育菌数は増大したが、それらを添加したとしても特定の培地メーカーには他のメーカーに比べて生育性能が悪いことが分かった。

その意味で滅菌効果を過大評価しないためと正確な滅菌バリデーションを行うためには培地性能試験は健常菌ではなく損傷菌を用いて行う意義がある。

121°Cで 4 分間暴露された損傷菌生育培地に種々の損傷回復剤を添加した結果、カルシウム、パンビタン、複合アミノ酸、可溶性でんぷん、ピルビン酸、グルコースが損傷回復に有効であることが分かった。複合アミノ酸の中の最大の寄与は L-アラニンの存在と思われる。

損傷菌については培養温度が低く、長い期間培養することで損傷回復がはかれると期待される。その理由としては損傷菌の回復に要する誘導期間（lag phase）が長いことが考えられる。

3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

LLNAにおいてリンパ節活性化反応の各種指標を最も感度高く検出するようにリンパ節採取時期及び BrdU 投与時期を

検討した。BALB/c マウスに対し 0.5% DNCB を塗布し 7 日目にリンパ節の摘出を行った場合、5 日目または 6 日目に比べて重量は少なかった。リンパ節細胞数及び alamarBlue 取り込み量についても、7 日目に摘出した時の値は 6 日目に摘出した時に比べて低い値を示した。BrdU 取り込み試験では、BrdU 注射して 5 時間後にリンパ節を摘出した場合、注射後 24 時間経過して摘出した場合よりも吸光度は高い値を示した。今回は溶媒塗布のコントロール群において BrdU 注射 5 時間経過後のリンパ節について試験は行っていないため、このときの吸光度に対する増加率は明らかではないが、コントロール群ではリンパ節の活性化は起こっていないことを考えると、吸光度は Method 1 での AOO の値と同程度と思われる。したがって、注射後 5 時間で摘出したときの方が SI 値は高くなると考えられた。これらの結果より、リンパ節の摘出は試験物質塗布から 7 日目に行うとリンパ節活性化反応の各指標を感度良く検出できると思われた。更に、BrdU 取り込み量を測定する場合は、注射後 5 時間でリンパ節を摘出する方が良いが、解剖からリンパ節細胞の調製等の操作を考えると、24 時間経過した後に摘出する方が試験は容易である。

今回検討した BrdU 取り込み量、ATP 量及び alamarBlue 取り込み量は原理は異なるもののほぼ細胞数に比例し、リンパ節重量で見た SI 値よりは大きな値となった。エンドポイントの発色・発光量での変化は、血球計算盤を使用して細胞数を測定するよりも簡単であり有用と思われた。ATP はリンパ節細胞の摘出後の時間に影響されやすいが、標識物質の注

射や細胞培養の必要がなく簡単に短時間に測定できた。alamarBlue 取り込み量の測定はプレートリーダーで短時間に、かつ同時に多検体を処理できる利点がある。BrdU 取り込み量の測定は原理的には最も LLNA 原法に近いものであるが、吸光度のダイナミックレンジが影響するため、他の指標と比べ低い SI 値しか得られなかった。よって、検出感度の面を考慮すると、ATP 発光測定法または alamarBlue 蛍光測定法が RI に代わる指標として優れているのではないかと考えた。

Woolhiser らは LLNA におけるマウス系統差について検討し、BALB/c 系よりも CBA 系マウスがより高い SI 値を示すと報告している。Takeyoshi らも同様に、CBA/J 系マウスが BALB/c 系マウスよりも感度が高いことを示し、さらに CBA/N 系マウスが CBA/J 系マウスよりも高い感受性を持つとしている。したがって、今回検討している BALB/c 系マウスも CBA 系マウスに変更することによって SI 値も増加するのではないかと考えた。BALB/c 系マウスのリンパ節の大きさは CBA/N 系マウスのリンパ節は BALB/c 系マウスのそれよりも小さく、コントロール値が低くなるため、試験群の SI 値が高くなる傾向があるが、今回 DNCB 及び HCA 1 濃度での結果では、両系統で著しい違いは認めなかった。試験物質の用量を変化させ、それぞれでの SI 値を比較して感度の差を見る必要があるかもしれない。

LLNA-DA では試験物質の投与回数を増加させることによって検出感度の上昇を図っている。DNCB と HCA の塗布回数を増加させた結果、いずれの指標とも