

1. 感染因子含有材料の in vivo 動態評価手法の開発

齋島 由二

分担研究報告書

平成 17 年度厚生科学研究費補助金（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	齋島 由二	国立医薬品食品衛生研究所療品部
協力研究者	小園 知	神奈川歯科大学高次口腔科学研究所
	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
	平田 陸正	まつぞの薬局・自然免疫研究部門
	佐々木和夫	日本ハム（株）中央研究所
	畑江 和夫	コアフロント株式会社

研究要旨：平成 17 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、種々の量の菌体成分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、骨再生に対する影響について検討した。また、抗菌作用および LPS 中和活性を付与した新規抗菌材料の開発にも着手した。

実骨である大腿骨の再生は、頭蓋骨のような扁平骨と同様、菌体成分により遅延されることが判明した。頭蓋骨再生に対する影響を定量的に解析した結果、新生骨形成を抑制する菌体成分の最小用量は実測値として 33.6 EU/mg であることが判明した。GlaN 感作ラットの腹腔内に菌体含有コラーゲンを埋植した場合、顕著な致死毒性に加えて、エンドトキシンショック時の特徴である糖質代謝異常、脂質代謝異常、腎機能異常が観察され、腹腔内に適用する医用材料にも適切な LPS 規格値を設定する必要があることが判明した。菌体成分によって誘導される背部皮下における炎症反応は基材の生分解性が加速されることにより、減弱されることが示唆された。また、背部皮下において炎症反応を誘導する菌体成分の最小用量は実測値として 1,162.8 EU/mg であることが判明した。

新規抗菌材料の主剤として選択した CAP-18/LL-37 類縁体（18-mer LLKKK 置換体）は非常に高い抗 LPS 活性を示すと共に、黄色ブドウ球菌や緑膿菌に対して低濃度で抗菌活性を示し、抗菌・抗 LPS 剤として有用であることが判明した。同類縁体の担体として選択した酸処理ゼラチンは徐放性能に優れ、細胞毒性および染色体毒性を示さなかったが、ラット背部皮下および腹腔内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。この炎症反応は 18-mer LLKKK アナログにより抑制される傾向が認められた。

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、医療機器または医用材料

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)、ミトジェン活性、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、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、並びに組織工学的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機器の場合、公的なLPS規格値は設定されていないのが現状である。医療機器に関する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、医療機器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、製品の適用部位や生体内分解挙動などを評価する必要がある。

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するこ

とを目的として、種々の量の菌体成分を添加したコラーゲンシート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、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が判明した。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LPS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が、菌体成分を含有する医用材料は皮下埋植において顕著な炎症反応を誘導すると共に、新生骨形成を抑制することを見出した。

現在、再生医療分野においては、皮膚再生、角膜再生、心筋再生など様々な研究が進められており、骨再生に関する研究も重点項目の一つとなっている。そこで、平成17年度の本研究では、科学的根拠に基づいた骨再生用材料のLPS規格値を設定するため、菌体成分が及ぼす骨再生への影響を定量的に解析した。また、腹腔内に医用材料を適用する場合、何らかの臓器損傷を伴うため、肝損傷時における菌体成分の生体影響を評価したと共に、皮下埋植における材料の生分解速度と炎症反応の相関性についても検討した。

天然医用材料は、擦傷、火傷、糖尿病時の皮膚疾患の他、生体内の各種治療 (止血剤、組織再生用スキャホールドなど) にも多用されているが、患部への微生物感染が起これ、治癒の遅延が見られることが少なくない。そこで本研究では、LPS中和活性および様々な細菌に対する抗菌活性を持つ分子量18 kDaのヒトCationic Anti-microbial Proteinの活性ドメインペプチド (CAP-18/LL-37)⁴⁾ を利用した新しいタイプの抗菌材料の開発を目指し、化学合成したCAP-18/LL-37類縁体のin vitro

抗菌活性、LPS 中和活性を評価すると共に、徐放基材の生体適合性評価を行った。

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 株を普通ブイヨン培地中、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^{5,6)}、Dnase/RNase 処理後、超遠心分離の反復により精製した^{7,8)}。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) 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大腸菌 0111 株乾燥菌体を添加し、60°C で凍結乾燥後、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、同シートに 10 kGy/hr の速度でガンマ線を平面照射し、生分解速度の異なる試料を調製した。

(3) LPS 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 μ l 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 μ l 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。

正確に重量を測定したコラーゲンシート (10 mg) を HEPES 緩衝液 (5 mM, pH 7.3) 中、37°C で 16 時間、精製コラゲナーゼ (0.1 mg/ml) 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⁹⁾。

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^{10,11)}。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) 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。皮下への埋植は、pentobarbital sodium (30 mg/kg, IP 投与) 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、左右各 1 箇所コラーゲンシートを挿入後、皮膚縫合した。肝臓への被覆は、麻酔下、上腹部を 2.5 cm

切開し、肝臓表面に作製した直径 1 cm、深さ 2 mm 程度の欠損部位にコラーゲンシートを被覆した後、腹直筋および皮膚を縫合し、ガラクトサミン (GlaN) 塩酸塩 (200 µg/ml, 1 ml) を腹腔内投与した。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 (5 mm×5 mm) を被覆し、皮膚縫合した。大腿骨への埋植は、麻酔下、左右大腿部を切開して大腿骨を視認し、注射用水を滴下しつつ歯科用エンジンにより直径 1 mm の貫通欠損を作製した後、埋植材を充填し、皮膚縫合した。対照として被覆剤を埋植しない実験群も作製した。その他、滅菌生理食塩液または後述した 18-mer LLKKK アナログ溶液 (200 µg/ml) 中、4°C で一晩膨潤させたゼラチンハイドロゲルをラット背部皮下および腹腔内 (正常肝皮膜被覆) に埋植した際の生体反応を評価した。

試料を埋植した後、試験に応じて種々の期間で動物を屠殺した。皮下への埋植材は周囲組織と共に摘出し、10% 中性緩衝ホルマリンを用いて固定した。肝臓埋植群については、麻酔下で心臓採血を行った後、埋植材周囲の肝臓組織およびその他の腹部臓器 (胃・脾・小腸・脾・副腎・腎) を採取した。採取した血液から常法に従い血清を作製し、生化学検査を行ったと共に、各臓器は 10% 中性緩衝ホルマリンにより固定した。また、肝臓埋植群については、手術翌日に致死毒性を判定した。大腿骨および頭蓋骨への埋植を施した動物群は 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、骨周囲の軟組織による X 線の減弱や散乱行の影響を除く

ため頭蓋骨のみを切除し、撮影条件の均質化を得るためにサンプルをアルミステップウェッジと共に軟 X 線撮影した後、10% ギ酸により脱灰を行った。各埋植試験試料は、固定または脱灰終了後、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 (HE) 染色を施して病理組織学的に検索した。軟 X 線写真の解析には、WinROOF ソフトウェアを使用し、画像データ中に設定した関心領域 (Region of Interest, RIO) 内の任意に定めた閾値以上の最大平均ピクセル値を計測し、窩洞部に形成された新生骨量を数値化した。

(5) CAP-18 類縁体の化学合成

CAP-18 類縁体である 18-mer LLKKK 置換体 ($K^{15}LF KRI VKR ILK FLR KLV^{32}$) は、ペプチド合成機を使用して、Fmoc 基を用いる固相法により合成した。Resin には、Fmoc-Amide Resin (導用量: 0.65mmol/g, 311.8mg) を用い、0.2mM スケールで合成し、N 末端をアセチル化した。TFA およびスカベンジャー (H_2O 、結晶フェノール、ethane dithiol、thioanisole) を加えて切り出しを行った後、エーテルにより沈殿させた結晶を H_2O で溶解して凍結乾燥し、C 末端がアミド化された粗ペプチド (250.4mg) を得た。粗ペプチドを $AcOH/H_2O$ に溶解し、HPLC にて精製を行った (最終収量 103.1 mg、精製効率 41.2%、純度 95% 以上)。また、分子量の確認は AB4700 質量分析計 (アプライド製 MALDI TOF/TOF) により行った (Matrix = CHCA, Positive ion mode)。

(6) 抗菌力試験

菌株としては、黄色ブドウ球菌 209P 株および緑膿菌の 2 種を使用し、抗菌剤としては、CAP-18 類縁体 (18-mer LLKKK アナログ)、ポ

リミキシシン B、ストレプトマイシン、ペニシリン G の 4 種を使用した。NCCLS M7-A5¹²⁾の変法に基づき、滅菌生理食塩液を用いて、 1×10^6 個/ml の試験菌液を調製した。各種抗菌剤は Mueller Hinton II Broth を用いて、1 mg/ml から 0.025 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で 2 倍希釈系列を作製した。試験菌液 90 μl を U 字型 98 ウェルプレートに分注し、種々の濃度の抗菌剤 90 μl および AlamarBlue20 μl を添加し、ウェルシールを貼った後、37°C で 16 時間培養した。また、抗菌剤の代わりに Mueller Hinton II Broth のみを添加した試験群を陽性対照とした。培養終了後、遠心上清 100 μl を平底 98 ウェルプレートに分注し、プレートリーダーを用いて、570 nm および 600 nm における吸光度 (O. D.) を測定し、次式によって kill (%) を算出した。

Kill (%) =

$$\left[1 - \left(\text{O. D.}_{S570/600} / \text{O. D.}_{C570/600} \right) \right] \times 100$$

S570/600: 抗菌剤添加群の O. D. 比

C570/600: 抗菌剤非添加群の O. D. 比

(7) 抗 LPS 活性試験

18-mer LLKKK アナログと LPS または菌体を種々の濃度で 37°C、30 分間インキュベーションした後、リムルス活性と IL-6 産生誘導能を測定した。リムルス活性阻害の対照物質として、ポリミキシシン B を使用した。IL-6 産生誘導能の評価には、ヒト単球様細胞株 Mono-Mac-6 からクローニングした LPS 高感度応答性の亜株 MM6-CA8 を用いた¹³⁾。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 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。

(8) 18-mer LLKKK アナログ徐放試験

徐放基材として、8 種のゼラチンハイドロゲル (スルホアセチル化誘導体、コハク化誘導体、アルカリ処理ゼラチン [pI=5]、酸処理ゼラチン [pI=9]、アルキル化 (C11) 誘導体、エチレンジアミン導入アミノ化誘導体) を使用した。各ゼラチンハイドロゲル 2 mg をエッペンチューブに採取し、18-mer LLKKK アナログ水溶液 200 μl (100 $\mu\text{g/ml}$) を添加し、4°C で一晩膨潤させた後、過剰な 18-mer LLKKK アナログ溶液を除去した。同チューブに蒸留水 1 ml を添加し、30 分間緩やかに振とうした後、蒸留水を全量回収した。その後、同様の操作を繰り返し、1、2、4、8、16、24 時間後の溶出挙動を追跡した。18-mer LLKKK アナログの定量は LC-MS/MS (アプライド製 QTRAP 4000 Pro) を用いた MRM 分析 (ESI positive mode: Q1=469.0, Q3=84.2) により行った。HPLC カラムには Shodex RSpak DE-213 (2 x 150 mm) を使用し、溶離液には 0.1% ギ酸 (A 液) と 0.1% ギ酸含有アセトニトリル (B 液) を用いた (グラジエント条件: 18.8% \rightarrow 95% B 液 / 2 min, 流速 200 $\mu\text{l/min}$)。また、内部標準物質として、ポリミキシシン B を使用した (Q1=523.9, Q3=70.2)。

(9) 細胞毒性試験

V79 細胞に対する細胞毒性試験はガイドライン法に準拠して行った¹⁴⁾。試験液は細切試料 1 g 当たり 10 ml の M05 培地を用いて 37°C、24 時間抽出することにより調製し、プロビッ

ト法により IC₅₀ を算出した。

C. 研究結果

(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⁹⁾ (希釈用原液: 精製コラゲナーゼ 0.2 mg/ml, 3.123±0.13 EU/mg) 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 (希釈用原液: 精製コラゲナーゼ 0.05 mg/ml, 0.165±0.04 EU/mg)、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 0111 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的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 0111 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 0111 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 0111 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 GIaN 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 GIaN 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、GIaN 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、GIaN 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 0111 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 0111 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, IC_{50}) 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 IC_{50} 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 IC_{50} 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 (IC_{50}) は、それぞれ 0.01 および 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 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 03 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 IC_{50} は 5.82 $\mu\text{g/ml}$ であった。同アナログは大腸菌 0111 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 IC_{50} は 0.78 $\mu\text{g/ml}$ であった。一方、10 ng/ml の大腸菌 03 株 LPS が示すリムルス活性に対するポリミキシン B の IC_{50} は 61.1 $\mu\text{g/ml}$ 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、 IC_{50} 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）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。

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¹⁵⁾。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、医用材料に混在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

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 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¹⁶⁾。これを体重当りに換算すると、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¹⁷⁾、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、GlaN 感作により作製した肝障害モデル動物¹⁸⁾を使用する。GlaN 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、GlaN がその代謝経路において、UDP-GlaN 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、GlaN 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¹⁹⁾。そこで、GlaN 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 GlaN 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²⁰⁾。肝臓損傷ラットへの腹腔内埋植試験では、GlaN 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、GlaN 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⁴⁾。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²¹⁾。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²²⁾。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。

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-

- 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) 齋島由二. 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) Hirata M, Shimomura Y, Yoshida M, Morgan JG, Palings I, Wilson D, Yen MH and Larrick JW. Characterization of a rabbit cationic protein (CAP-18) with lipopoly- saccharide-inhibitory activity. Infect. Immun., 62:1421-1426 (1994).
 - 5) Westphal O, Luderitz O and Bister F. Über die Extraction von Bakterien mit Phenol/ Wasser. Z. Naturforsch 1952;7b: 148-155.
 - 6) Westphal O and Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol- water and further applications of the procedure. Methods carbohydra Chem 1965; 5:83-91.
 - 7) 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.
 - 8) 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).
 - 9) 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).
 - 10) 第 14 改正日本薬局方. 厚生労働省.
 - 11) Haishima Y., Hasegawa C., Yagami T., Tsuchiya T., Matsuda R. and Hayashi Y. Estimation of uncertainty in kinetic- colorimetric assay of bacterial endo- toxins. J. Pharm. Biomed. Anal., 32, 495-503 (2003).
 - 12) NCCLS M7-A5. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria test grow aerobically; Approved standard-fifth edition. ISSN 0273-3099, ISBN 1-56238-394-9, vol.2(2),2000.
 - 13) Nakagawa Y, Maeda H, Murai T. Evaluation of the in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release form human monocytes: Comparison with a human whole blood culture test system and with therabbit pyrogen test. Clin. Diang. Lab. Immunol., 9:585-597 (2002).
 - 14) 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).
 - 15) 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: 臨床的問題, pp. 349-355, 医歯薬出版株式会社 (1982).
 - 16) 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).
 - 17) 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).
 - 18) Galanos C, Freudenberg MA and Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5939-5943 (1979).

- 19) 吉田昌男. 3-1 内毒素の生物活性概説, 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3章: 内毒素の生物活性, pp. 141-158, 医歯薬出版株式会社 (1982).
- 20) 坂口 平. 3-12 内毒素と代謝, 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3章: 内毒素の生物活性, pp. 318-332, 医歯薬出版株式会社 (1982).
- 21) Yang D, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ and Chertov O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human periperal blood neutrophils, monocytes, and T cell. *J. Exp. Med.*, 192:1069-1074 (2000).
- 22) Nagaoka I, Kuwahara-Arai K, Tamura H, Hiramatsu K and Hirata M. Augmentation of the bactericidal activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by amino acid substitutions. *Inflamm. Res.*, 54:66-73 (2005),

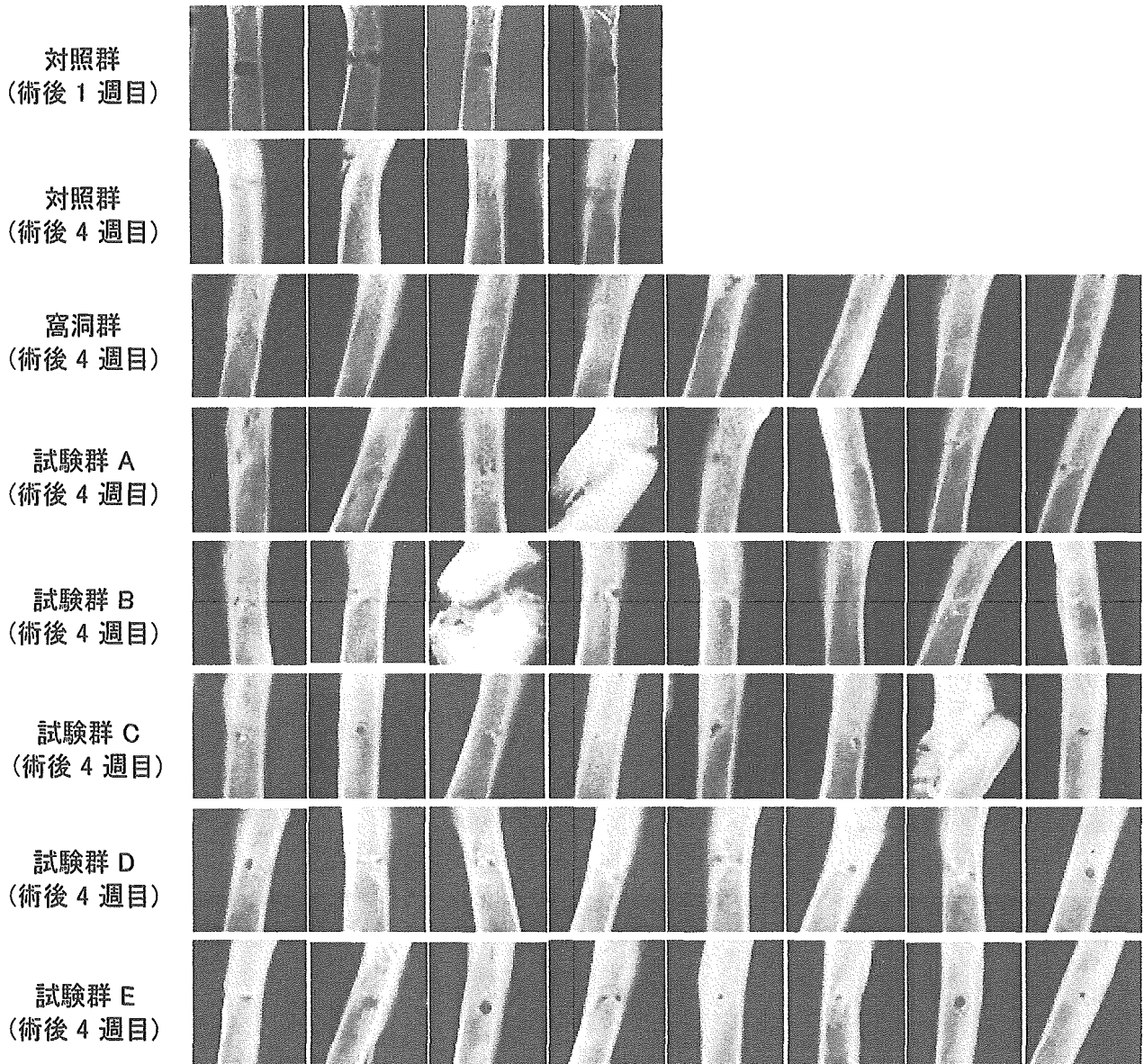


図1 大腿骨埋植試験における軟 X 線画像

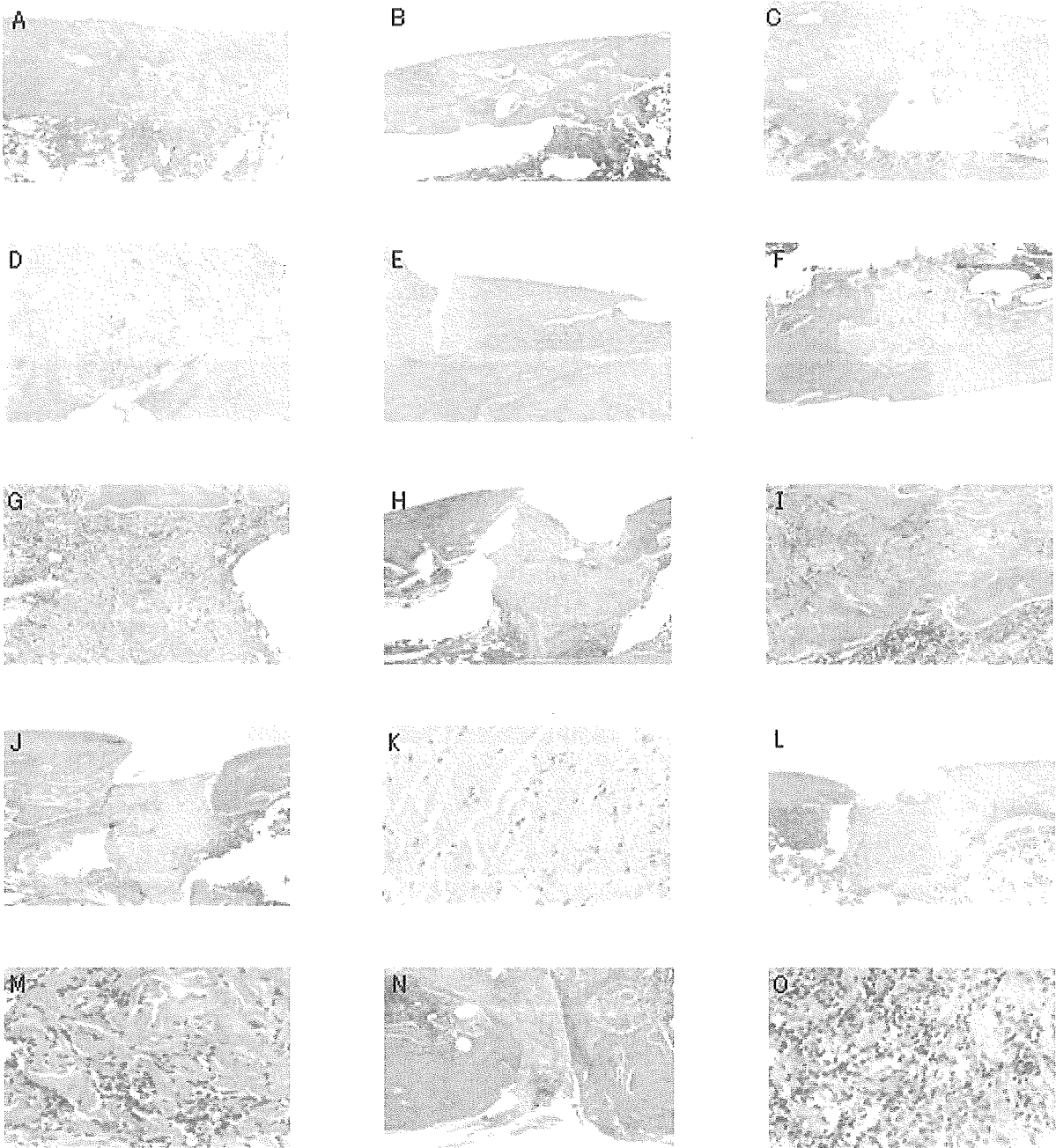


図2 大腿骨埋植試験における窩洞群、対照群および試験群の病理組織学的所見

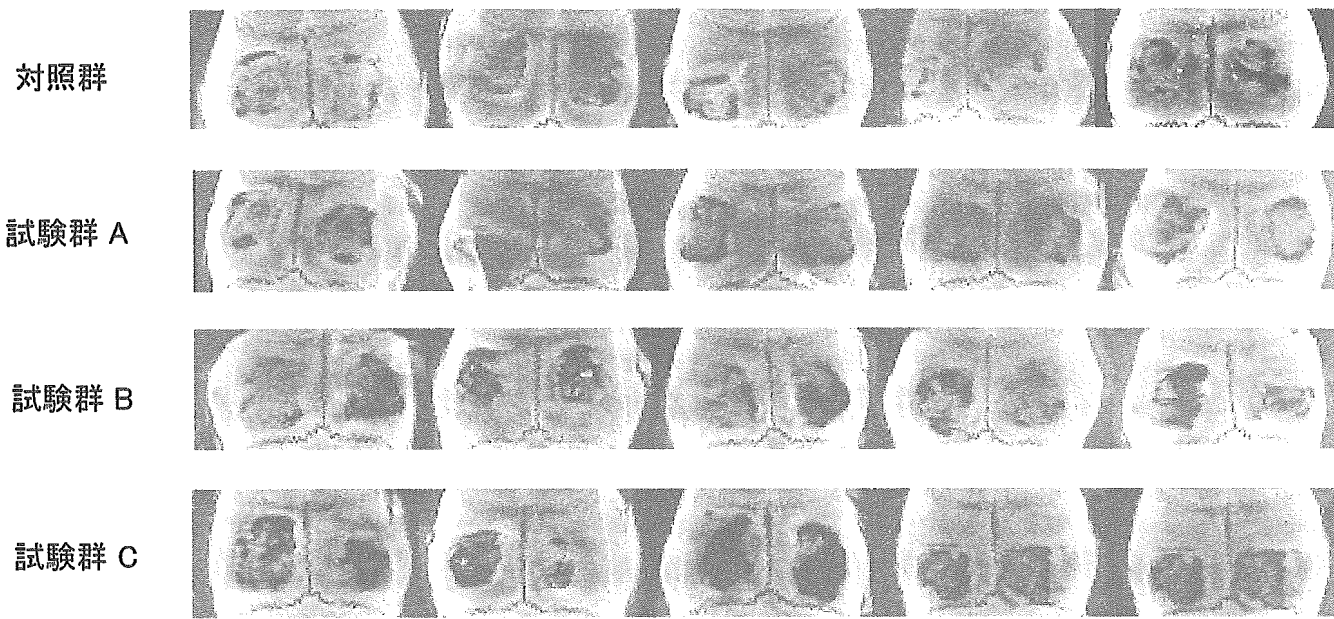


図3 頭蓋骨埋植試験における軟 X 線画像(埋植後 4 週目)

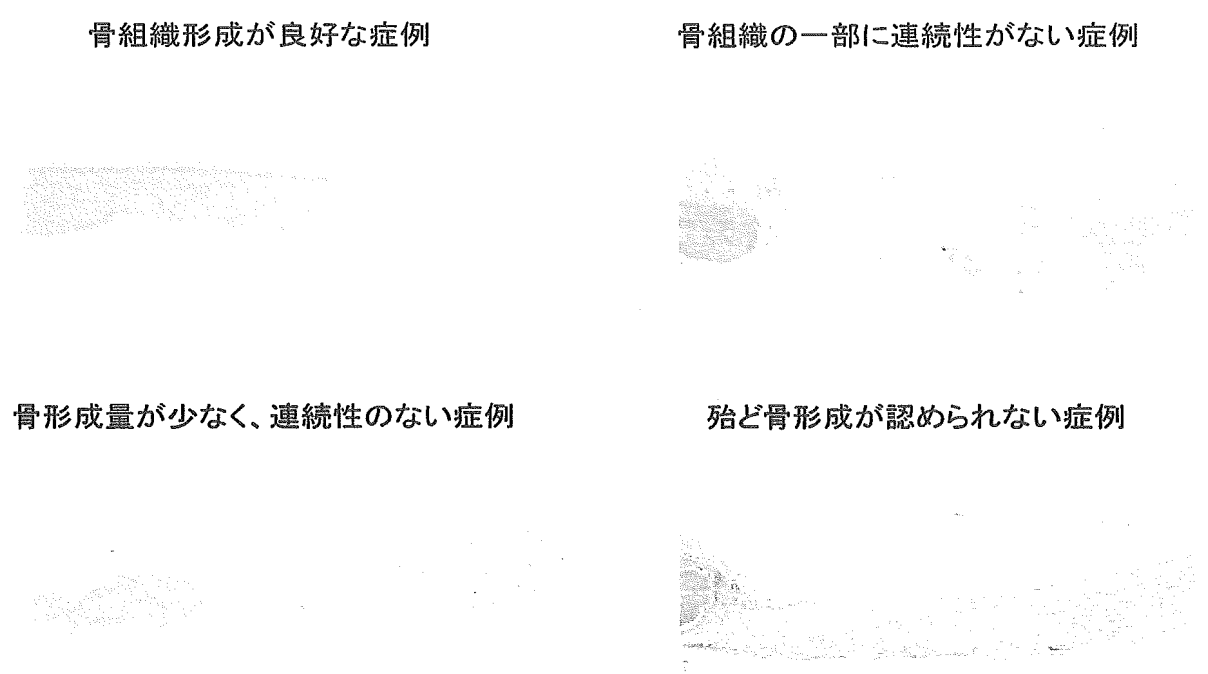


図4 頭蓋骨埋植試験において観察された典型的な病理組織学的所見