

TGF- β and hMSCs multidifferentiation
—」 The 19th annual and international
meeting of the Japanese Association for
Animal Cell Technology (2006. 9)

2) 澤田留美、伊藤友実、土屋利江「幹細胞を用いた細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性評価に関する研究」 第6回日本再生医療学会 (2007. 3)

3) 伊藤友実、澤田留美、藤原葉子、土屋利江「ヒト間葉系幹細胞の増殖機構に及ぼす低酸素培養の影響について」 第6回日本再生医療学会 (2007. 3)

協力研究者

伊藤 友実 (国立医薬品食品衛生研究所)

表1. リアルタイム(RT)-PCRに用いたプライマーの配列

Gene name	Primer orientation	Nucleotide sequence
p16	Forward	5'- CAC TCA CGC CCT AAG C-3'
	Reverse	5'-GCA GTG TGA CTC AAG AGA A-3'
p21	Forward	5'- TTG ATT AGCAGC GGA ACA -3'
	Reverse	5'- GGA GAA ACG GGA ACC AG-3'

表2. hMSCのドナーに関する情報

	Lot No.	Age	Race	Sex
hMSC-A	3F0664	19Y	African American	F
hMSC-B	4F1560	23Y	African American	F
hMSC-C	5F0138	19Y	African American	M
hMSC-D	5F0972	20Y	African American	M

Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.

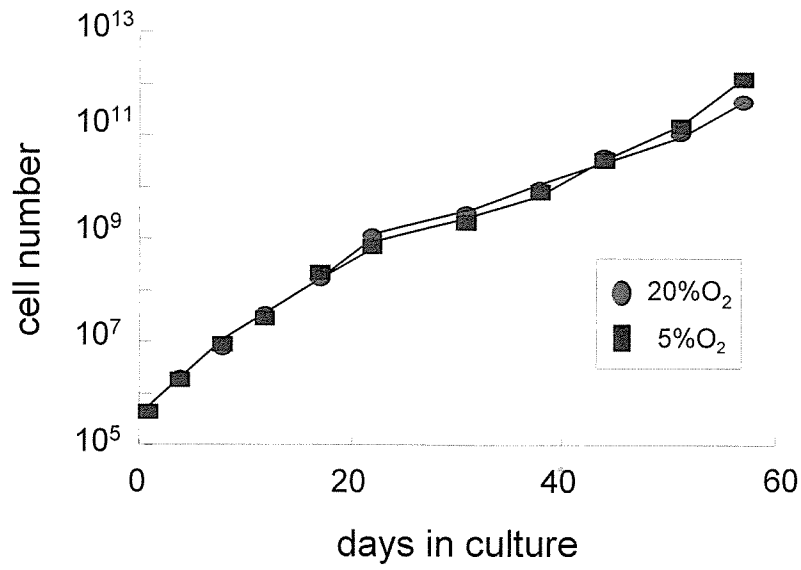


図1. hMSCの増殖に及ぼす酸素濃度の影響

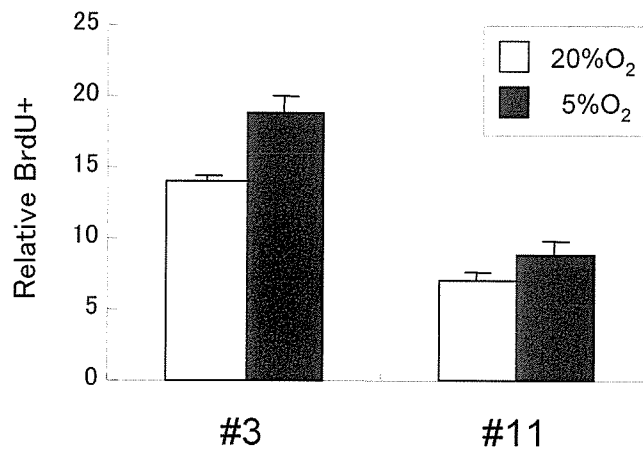


図2. hMSCのDNA複製能に及ぼす酸素濃度の影響

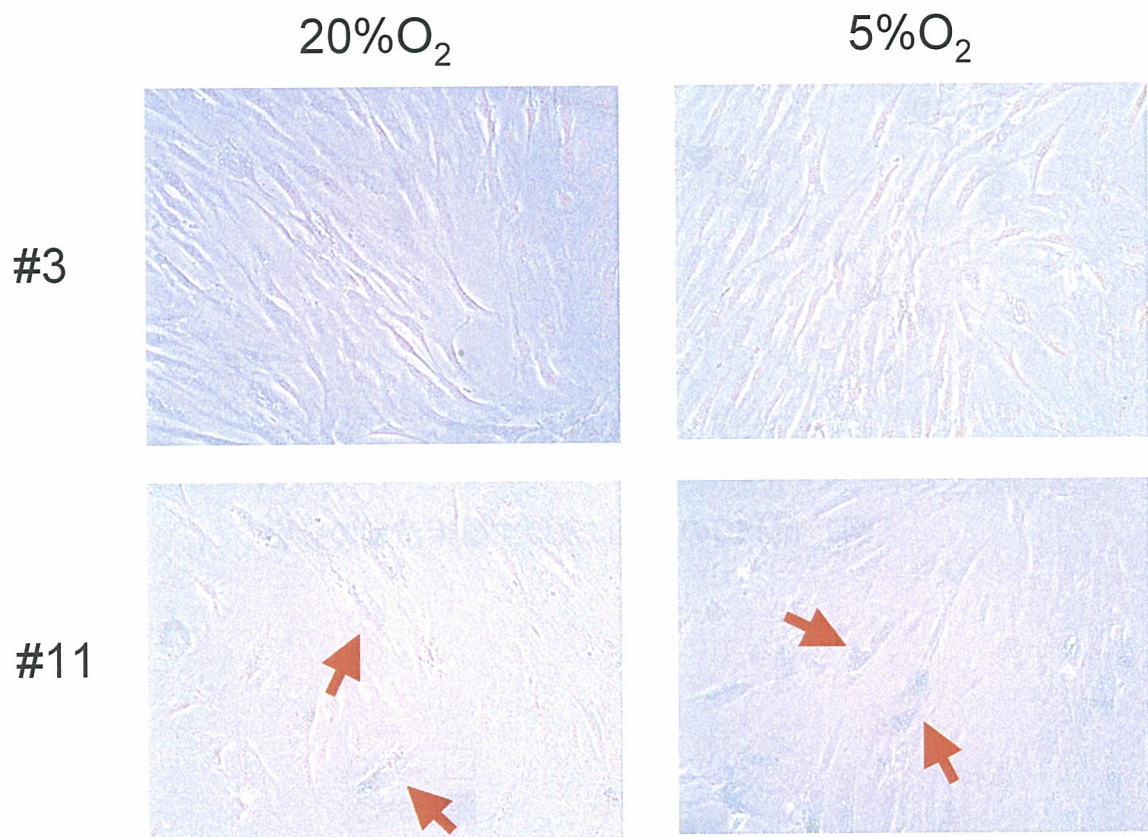


図3. hMSCの細胞老化に及ぼす酸素濃度の影響

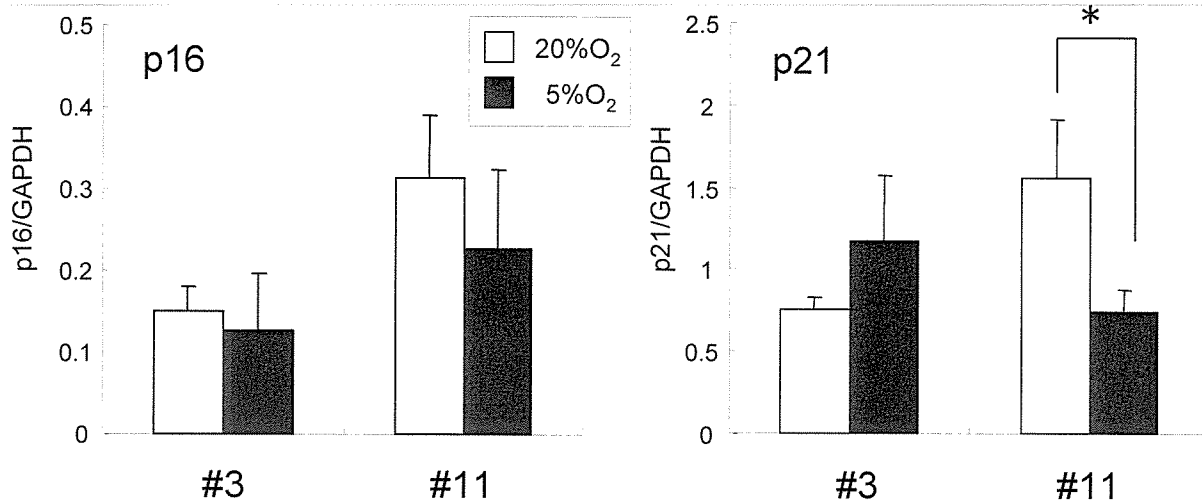


図4. hMSCのp16, p21のmRNA発現に及ぼす酸素濃度の影響

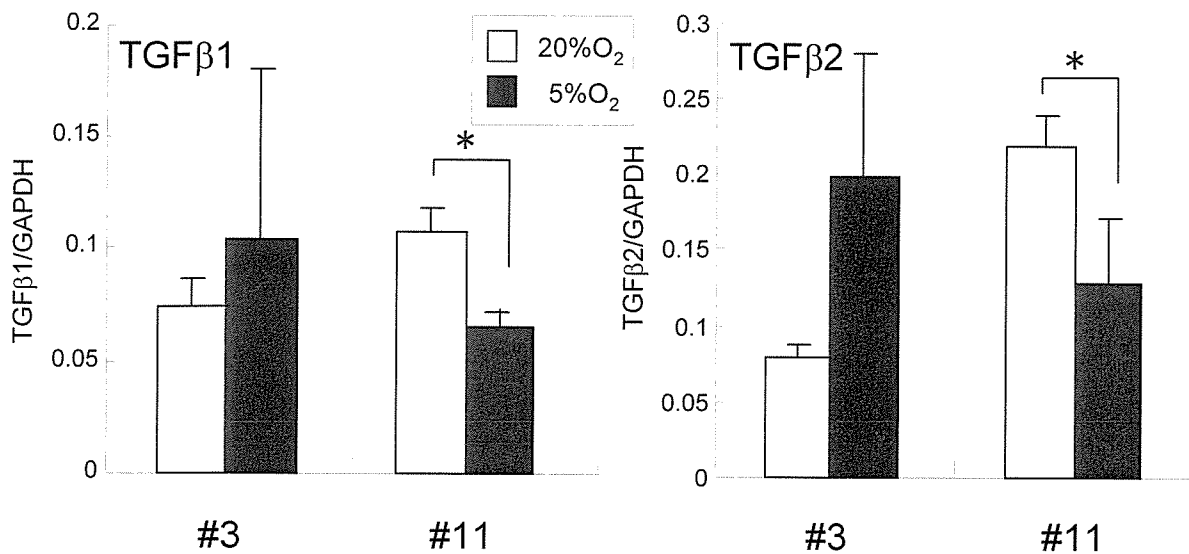


図5. hMSCのTGFβ1, TGFβ2のmRNA発現に及ぼす酸素濃度の影響

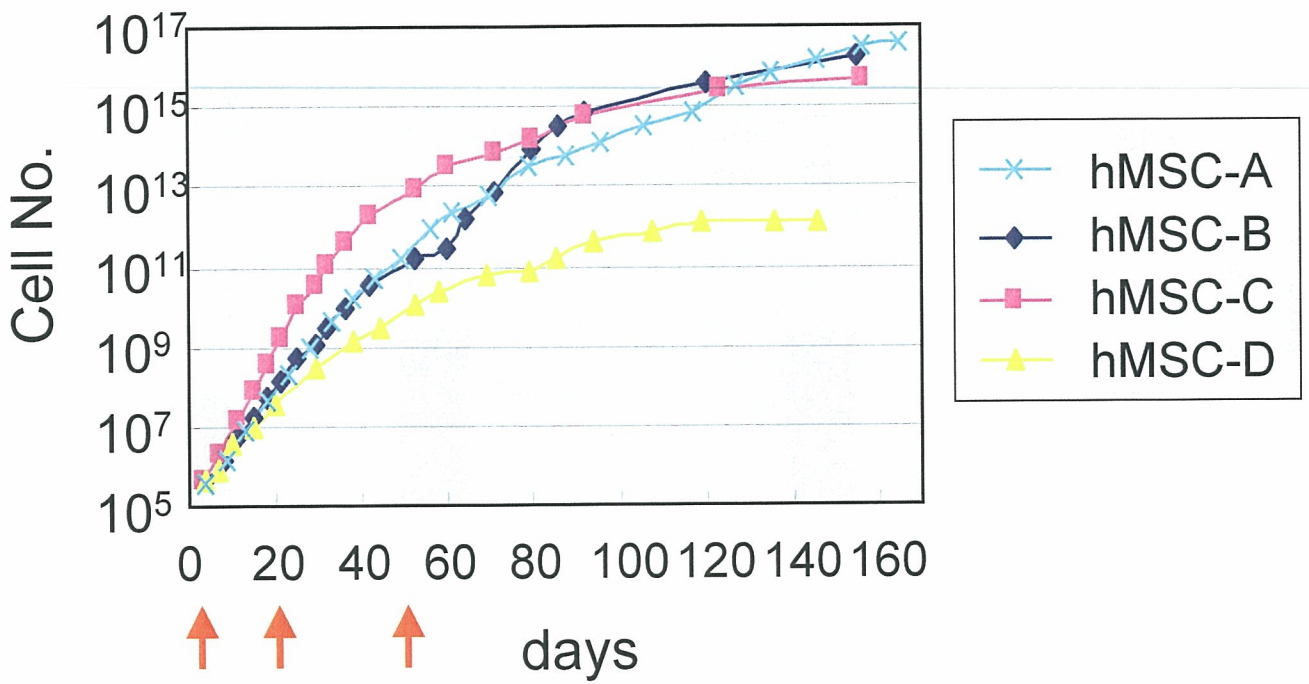


図6. 4ドナー由来のhMSCの増殖

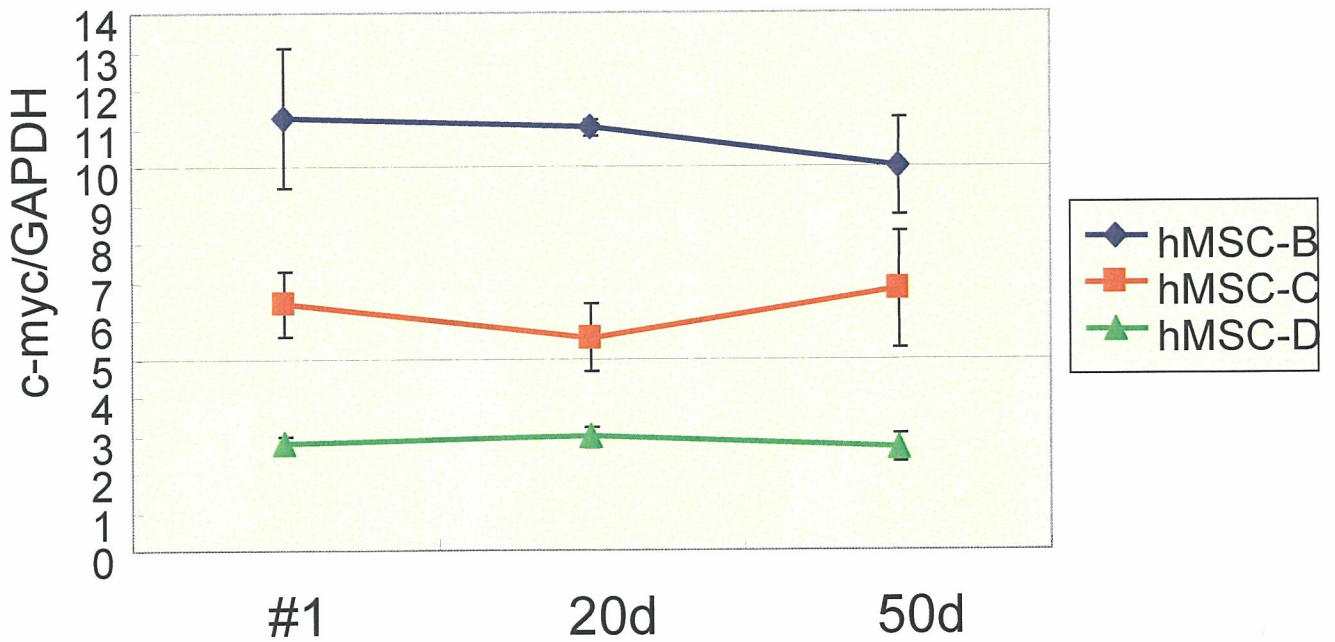


図7. hMSCの*in vitro*培養期間におけるc-mycのmRNA発現の変化

表3. hMSCの*in vitro*培養50日以内にmRNA発現に変化のなかった1,898遺伝子のうち機能や疾病に有意に関わる528遺伝子について

Category	Significance	Associated Genes
Relevant Functions & Diseases		528
Protein Synthesis	6.79E-16	96
Molecular Transport	1.06E-07	64
Protein Trafficking	1.06E-07	41
Protein Degradation	1.92E-05	32
Post-Translational Modification	2.67E-05	104
Cellular Assembly and Organization	4.68E-05	99
Lipid Metabolism	1.02E-04	29
Small Molecule Biochemistry	1.02E-04	85
Gene Expression	2.13E-04	28
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	4.55E-04	39
Gastrointestinal Disease	5.57E-04	7
Nervous System Development and Function	5.57E-04	11
Organismal Injury and Abnormalities	5.57E-04	3
Cell Death	5.81E-04	132
Cell Morphology	5.98E-04	35
RNA Post-Transcriptional Modification	5.98E-04	27
Cancer	6.22E-04	75
Connective Tissue Disorders	6.22E-04	48
Cellular Compromise	1.30E-03	15
Hematological Disease	2.09E-03	17
Hematological System Development and Function	2.09E-03	10
Immune and Lymphatic System Development and Function	2.09E-03	7
Immunological Disease	2.09E-03	13
Cellular Function and Maintenance	2.66E-03	46
Connective Tissue Development and Function	2.91E-03	38
Protein Folding	4.15E-03	12
Skeletal and Muscular Disorders	5.31E-03	23
Tumor Morphology	6.40E-03	18
Amino Acid Metabolism	6.77E-03	50
Cardiovascular System Development and Function	6.77E-03	21
Cell Cycle	6.77E-03	84
Cellular Development	6.77E-03	25
Embryonic Development	6.77E-03	13
Genetic Disorder	6.77E-03	13
Tissue Development	6.77E-03	16
Viral Function	6.77E-03	11
Visual System Development and Function	6.77E-03	2
Respiratory Disease	9.21E-03	6
Metabolic Disease	9.42E-03	6
Cellular Movement	1.00E-02	41
Neurological Disease	1.00E-02	11
Reproductive System Disease	1.00E-02	38
Organ Development	1.51E-02	5
Organ Morphology	1.51E-02	18
Energy Production	1.64E-02	5
Immune Response	1.79E-02	4
Carbohydrate Metabolism	1.92E-02	2
Cardiovascular Disease	1.92E-02	9
Developmental Disorder	1.92E-02	4
Hepatic System Disease	1.92E-02	2
Reproductive System Development and Function	1.92E-02	5
Respiratory System Development and Function	1.92E-02	4
Vitamin and Mineral Metabolism	1.92E-02	2
DNA Replication, Recombination, and Repair	2.23E-02	15
Dermatological Diseases and Conditions	2.27E-02	3
Cellular Growth and Proliferation	2.55E-02	146
Renal and Urological Disease	2.99E-02	8
Cell Signaling	3.21E-02	5
Digestive System Development and Function	3.63E-02	2
Nucleic Acid Metabolism	3.63E-02	5
Tissue Morphology	3.63E-02	2
Renal and Urological System Development and Function	3.81E-02	6
RNA Damage and Repair	4.58E-02	4

表4. hMSCの*in vitro*培養50日以内にmRNA発現に変化のなかった遺伝子のうち癌に有意に関わる75遺伝子について

Relevant Functions & Diseases (Cancer ; 75 genes)		Associated Genes	
tumorigenesis	tumorigenesis of fibroblast cell lines	8	8
size	size of leukemia cell lines	3	3
cell death	cell death of bone cancer cell lines	14	33
	cell death of breast cancer cell lines	22	
volume	volume of tumor	4	4
	volume of papilloma	2	
multiple hamartoma syndrome	multiple hamartoma syndrome	2	2
neoplasia	neoplasia of lymphoid organ	2	7
	neoplasia of organ	6	
	neoplasia of leukemia cell lines	2	
transformation	transformation of lymphoblastoid cell lines	2	4
	transformation of carcinoma cell lines	2	
vascularization	vascularization of papilloma	2	2
adhesion	adhesion of lung cancer cells	3	4
	adhesion of carcinoma cell lines	3	
	adhesion of lung cancer cell lines	3	
interphase	arrest in interphase of melanoma cell lines	3	3
cell movement	cell movement of cervical cancer cell lines	5	5
migration	migration of bone cancer cell lines	3	3
autophagy	autophagy of breast cancer cell lines	2	3
	autophagy of tumor cell lines	3	
cytostasis	cytostasis of hepatoma cell lines	2	2
detachment	detachment of cervical cancer cell lines	2	2
G1/S phase transition	G1/S phase transition of cervical cancer cell lines	2	2
juvenile intestinal polyposis	juvenile intestinal polyposis	2	2
latency	latency of lymphoma	2	2
formation	formation of lymphoma	6	6
binding	binding of tumor cells	5	5
	binding of cancer cells	4	
bladder tumor	bladder tumor	4	4
anoikis	anoikis of tumor cell lines	5	5
growth	delay in growth of tumor	3	3
apoptosis	delay in apoptosis of leukemia cell lines	2	21
	apoptosis of bone cancer cell lines	10	
	apoptosis of B cell lymphoma cells	3	
	apoptosis of prostate cancer cell lines	15	
attachment	attachment of melanoma cell lines	2	2
endometrioid carcinoma	endometrioid carcinoma	2	2
G1 phase	arrest in G1 phase of melanoma cell lines	2	2
gliosarcoma	gliosarcoma	2	2
invasion	invasion of kidney cancer cell lines	2	2
polarization	polarization of leukemia cell lines	2	2
progression	progression of gastric carcinoma	2	2
homing	homing of breast cancer cell lines	4	4
colonic polyposis	colonic polyposis	3	3
shape change	shape change of breast cancer cell lines	3	3
cell cycle progression	cell cycle progression of leukemia cell lines	4	4

Geneの中にMYCが含まれているもの

表5. hMSCの *in vitro* 培養50日以内にmRNA発現に変化のなかった遺伝子のうち細胞周期に有意に
関わる84遺伝子について

Relevant Functions & Diseases (Cell Cycle ; 84 genes)		Associated Genes
cell cycle progression	arrest in cell cycle progression of B lymphocytes	2
	arrest in cell cycle progression of blood platelets	2
	cell cycle progression of leukemia cell lines	4
duplication	duplication of cells	3
G1/S phase transition	G1/S phase transition of cervical cancer cell lines	2
	remodeling of chromatin	8
modification	modification of chromatin	9
G1 phase	arrest in G1 phase of melanoma cell lines	2
	initiation of cell stage	7
cell stage	cell stage	70
	length of telomeres	5

 Geneの中にMYCが含まれているもの

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

薮島 由二

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

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	薮島 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
	岡野 理紗	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：平成 18 年度の本研究では、ヒト細胞を使用した *in vitro* 発熱試験（Human Cell-based Pyrogen Test, HCPT）に使用するヒト単球様 MM6-CA8 細胞の特性を評価したと共に、同細胞と類似した特徴を持つ THP-1 細胞の反応性を検討した。また、HCPT を LPS 吸着性材料と市販創傷被覆剤に適用し、その有用性を評価した。

TLR4 リガンドである LPS に対する応答性を評価した結果、MM6-CA8 細胞は THP-1 細胞と比較して非常に高い反応性を示すことが確認された。また、MM6-CA8 細胞は TLR2（TLR2/1 及び TLR2/6）リガンドも高感度で認識するが、TLR3、TLR7、TLR9 を発現していない可能性が示唆された。MM6-CA8 細胞の継代安定性を評価した結果、細胞形態や老化の指標となる β -ガラクトシダーゼ染色性は 30 代目まで大きな差異はないが、IL-6 産生誘導能については、継代数の増加に伴い応答性が低下する傾向が認められた。

エンドトキシン試験において、LPS 吸着性材料であるコラーゲン/HA 骨充填剤からの LPS 回収率は、氷冷下、1M 塩酸中で短時間超音波抽出することにより大きく改善された。また、同骨充填剤及び 14 種類の市販創傷被覆剤に direct HCPT を適用し、過去に実施したサーベイ試験の成績と比較した結果、エンドトキシン試験及びウサギ発熱試験との相関性が認められたと共に、混入する LPS の種特異性に関する情報も得られた。以上の結果から、天然医用材料のヒトに対する微生物学的安全性は煩雑な抽出操作を行わなくとも、固形試料を用いる direct HCPT により評価できることが明らかとなった。

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ス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又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-based Pyrogen Test, HCPT) の開発が進められている⁴⁻⁹⁾。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、HCPT 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。

HCPT 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おり、各種の検証実験も終了している¹⁰⁾。また、バリデーションは終了していないが、HCPT は医療機器への応用も十分可能であり、近年、金属及びプラスチック表面からの菌体成分の検出に HCPT を適用した研究が報告された¹¹⁾。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 HCPT 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¹²⁾。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、HCPT が陰性となる製品の存在を明らかにしており、HCPT 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、HCPT 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いると共に、ISO/TC194 において国際標準化作業が進められていることから、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、市販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 HCPT が利用可能であるか判断するため、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。平成 18 年度は、MM6-CA8 細胞の特性を評価したと共に、同細胞と類似した特徴を持つ THP-1 細胞の LPS 応答性を検討した。また、HCPT を LPS 吸着性材料と市販創傷被覆剤に適用し、その有用性を評価した。

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°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) 乾燥菌体及び大腸菌 O3 株 LPS の調製

大腸菌 O3 K2a, K2b:H3 ATCC 23501 株及び黄色ブドウ球菌 209P 株を普通ブイヨン培地中、37°C で 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、アセトン及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 株 LPS は、乾燥菌体からフェノール/水法により抽出し^{13,14)}、Dnase/RNase 処理後、超遠心分離の反復により精製した (LPS 比活性: 27.5 EU/ng)¹⁵⁾。

(2) LPS スパイク標品の調製

コラーゲン/ハイドロキシアパタイト (HA) から構成される生体置換型有機無機複合人工骨はペンタックス株式会社から供与された。大腸菌 03 株 LPS 水溶液 (2 µg/ml) 5 ml に同人工骨 2 ピース (重量: 299.3 mg) を 37°C で 1 時間浸漬した後、ウェット重量を測定し (吸水量: 1.557 g/2 ピース)、洗浄することなく凍結乾燥した。その後、2 ピース合わせて無菌的に破砕し、試料とした (LPS 含量理論値: 286.1 EU/mg)。

(3) LPS 含量の測定

コラーゲナーゼ (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、精製コラーゲナーゼ溶液とした。リポタイコ酸も同様に EndoTrap 処理を行った。

正確に重量を測定したコラーゲン製品を HEPES 緩衝液 (5 mM, pH 7.3) 中、37°C で 16 時間、精製コラーゲナーゼ (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 (精製コラーゲナーゼ/塩酸抽出法)、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。

リムルス活性は第 15 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^{16,17)}。定量試薬としてエンドスぺ

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。また、精製コラーゲナーゼ/塩酸抽出法のほか、ガイドライン法¹⁸⁾ (生理食塩液・室温・72 時間) 及び塩酸抽出法 (HCl/pH 1-3・4°C・10 分間超音波処理) によって調製した試験液のリムルス活性も同様に測定し、抽出法の違いによる LPS 回収率を比較した。

(4) IL-6 産生誘導能の測定

菌体成分としては、大腸菌及び黄色ブドウ球菌乾燥菌体のほか、大腸菌 03 株 LPS、ペプチドグリカン、リポタイコ酸、合成リポ蛋白質、ウイルス由来の二本鎖 RNA (Poly(I:C)、合成抗ウイルス分子及び大腸菌 DNA) を使用した。市販製品としては、ペンタックス製人工骨のほか、コラーゲン製創傷被覆剤 12 種及びアルギン酸製創傷被覆剤 3 種を使用した (表 4)。

細胞としては、ヒト単球様 THP-1 細胞¹⁹⁾ と MM6-CA8 細胞²⁰⁾ を用いた。MM6-CA8 細胞の培養には、10%ウシ胎児血清、非必須アミノ酸 (1 mM)、ピルビン酸ナトリウム (1 mM)、ウシインシュリン (9 µg/ml)、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (10 µg/ml) 及びアンホテリシン B (0.25 µg/ml) を含む RPMI1640 培地を用いた。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 又は 1 mg 添加して 17 時間培養した。THP-1 細胞の培養には、10%ウシ胎児血清、2-メルカプトエタノール (50 µM)、HEPES (5 mM)、ペニシリン (100 U/ml) 及びストレプトマイシン (100 µg/ml) を含む RPMI1640 培地を使用した。 2×10^5 cells/ml/well となるように同細胞を 24-well プレートに分注し、PMA (100 µg/ml)

及び calcitriol (0.1 μ M) を添加した。37°C で 72 時間培養した後、培地で 2 回洗浄し、培地 (0.9 ml) 及び試料 (0.1 ml 又は 1 mg) を添加して 24 時間培養した。

培養上清中のインターロイキン 6 (IL-6) の濃度は市販 ELISA キット (R&D) を用いて測定した。

(5) β -ガラクトシダーゼ染色

種々の期間培養した MM6-CA8 細胞を PBS 緩衝液で 2 回洗浄し、10%ホルマリン含有 PBS 緩衝液で固定した後、更に PBS 緩衝液で 2 回洗浄し、Senescence Detection Kit (Oncogene Research Products) を用いて pH 6.0 における β -ガラクトシダーゼ活性を染色法により測定した。

C. 研究結果

(1) THP-1 細胞の反応性

IL-6 産生誘導能を指標として MM6-CA8 細胞及び THP-1 細胞の LPS 応答性を評価した。表 1 に示したように、MM6-CA8 細胞は、非常に高い LPS 応答性を示し、5 pg/ml 以上の LPS 濃度範囲において用量依存的に IL-6 産生量が顕著に増加した。また、100 pg/ml の LPS 刺激によって同細胞が産生する IL-6 量は約 14000 pg/ml に達した。

表 1 に示したように、THP-1 細胞からの IL-6 産生量も LPS 濃度に比例して増加したが、IL-6 産生を誘導するために必要な LPS の最小濃度は 50 pg/ml 程度であった。また、IL-6 産生量も最大で 1300-1400 pg/ml 程度であったことから、THP-1 細胞の LPS 応答性は MM6-CA8 細胞と比較して非常に低いことが判明した。

(2) TLR リガンドに対する応答性

LPS を初めとした各種の微生物成分は感染に対する宿主の初期免疫応答に関与する生体防御蛋白質群である Toll-like Receptor (TLR) family によって認識される。そこで、種々の TLR リガンドの IL-6 産生誘導能を指標として、MM6-CA8 細胞及び THP-1 細胞の TLR 発現状況を評価し、そ

の結果を表 2 に示した。いずれのリガンドも混入している 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。リポタイコ酸は EndoTrap 処理により精製した後でも 18.3×10^2 EU/mg の LPS が残存していたため、試験対象から削除した。

大腸菌と黄色ブドウ球菌の乾燥菌体は種々の成分を含んでいるため、複数の TLR により認識される。IL-6 産生を誘導する大腸菌乾燥菌体の最小用量は MM6-CA8 細胞及び THP-1 細胞ともに 1 ng/ml であった。しかし、黄色ブドウ球菌乾燥菌体については応答性に相違が見られ、MM6-CA8 細胞では 5 ng/ml 以上、THP-1 細胞では 500 ng/ml 以上の同菌体により IL-6 産生が誘導された。また、両乾燥菌体により誘導される IL-6 産生量にも相違が認められ、MM6-CA8 細胞の方が高い応答性を示すことが判明した。ペプチドグリカンに対する両細胞の応答性はほぼ同等であり、5-10 ng/ml 以上の濃度で IL-6 産生が誘導された。また、合成リポ蛋白質は 0.1-1 μ g/ml 以上の濃度で両細胞に対する IL-6 産生誘導能を示した。一方、Poly(I:C) に対する応答性には相違が認められ、THP-1 細胞は 10 μ g/ml 以上の濃度で IL-6 を産生するのに対し、MM6-CA8 細胞の場合、試験に供した濃度範囲では IL-6 産生が誘導されなかった。また、R837 及び大腸菌 DNA は両細胞に対する IL-6 産生誘導能を示さないことが確認された。

(3) 継代に伴う MM6-CA8 細胞の性状変化

HCPT においてライン化細胞を使用する場合、試験に供する細胞数を得るために時間を要することが欠点の 1 つに挙げられる。この問題は細胞を常時継代することにより回避できるが、継代に伴って菌体成分に対する細胞応答性が変化する可能性がある。そこで、MM6-CA8 細胞の継代安定性を評価した結果、図 1 に示したように、細胞形態や老化の指標となる β -ガラクトシダーゼ染色性は 30 代目まで大きな差異が観察されなかった。一方、図 2 に示したように、LPS 刺激に対する IL-6 産生能は、8 代目以降、継代数の増加に伴って応答性

が低下する傾向が認められた。

(4) コラーゲン/HA 人工骨からの LPS 回収

コラーゲンは LPS 吸着能が高いと共に、HA も様々な物質を吸着する性質を持っていることから、昨年度、コラーゲン/HA 製骨充填剤の LPS 吸着能を評価した。その結果、同材料の LPS 吸着能は非常に高く、精製コラゲナーゼ/塩酸法を適用したエンドトキシン試験では人工的に添加した LPS が殆ど回収されないことを見出した。

本年度、適切な評価法を確立するため、前処理法に関して検討した結果、表 3 に示したように、LPS を添加した同材料からの LPS 回収率は氷冷下で短時間超音波処理する塩酸抽出法を適用することにより改善されることが判明した。また、LPS 回収率は塩酸濃度の上昇に伴って増加すると共に、希釈溶媒として Tris 緩衝液を使用した際に高い値が得られることも確認された。

一方、抽出操作を行うことなく、固形（粉体）試料 1 mg 相当を直接的に MM6-CA8 細胞と共培養する direct HCPT を適用した時の LPS 回収率は 23.8% であり、1M 塩酸抽出/Tris 緩衝液希釈法を用いたエンドトキシン試験と同等であることが確認された（表 3）。

(5) HCPT による市販創傷被覆剤の微生物学的安全性評価

5-1. コラーゲン製品

表 4 に示したように、温水抽出（50℃・24 時間・注射用水）を用いた過去のサーベイ試験において、テルダーミス及びテルプラグはエンドトキシン試験、ウサギ発熱試験、抽出液を用いた HCPT とともに陽性結果が得られている。その他、アロアスク及びノバコールからも僅かに LPS が検出されたが、アロアスクのみが HCPT 陽性となる結果が得られていた。ガイドライン法（室温・72 時間・生理食塩液）を適用したエンドトキシン試験では、アロアスクを除き、大部分が LPS 陰性と判定されるが、抽出条件を最適化した精製コラゲナーゼ/塩酸法

を用いて試験を行うことにより、テルダーミス及びテルプラグからの LPS 回収率は飛躍的に改善される。また、同法を適用した場合、ガイドライン法及び温水抽出法において陰性又は擬陽性を示したアビテン、インテگران、ヘリテンからも相当量の LPS が検出される。

これらの性状を示す試料各 1 mg 相当を直接的に MM6-CA8 細胞と共培養した結果、表 4 に示したように、エンドトキシン試験において多量の LPS 汚染が認められたインテگران、テルダーミス、テルプラグは direct HCPT においても顕著な LPS 活性（IL-6 産生能）を示した。アロアスクの LPS 含量は 37.9 EU/g（精製コラゲナーゼ/塩酸法適用時）であったが、direct HCPT では比較的高い活性が認められた。一方、エンドトキシン試験において顕著な LPS 汚染が観察されたアビテンとヘリテンは direct HCPT 陰性と判定された。

5-2. アルギン酸製品

表 4 に示したように、温水抽出を用いた過去のサーベイ試験では、いずれの製品からも相当量の LPS が検出された。アルギン酸製品の LPS 含量はガイドライン法を用いたエンドトキシン試験によっても測定可能であるが、事前にホモジナイズ処理を施すことにより回収率が改善される。ソープサンはエンドトキシン試験、ウサギ発熱試験及び抽出液を用いた HCPT とともに陽性反応を示す。一方、カルトスタットには相当量の LPS が混入しており、ウサギ発熱試験も陽性となるが、HCPT は陰性を示すことが判明している。また、アルゴダームの場合、エンドトキシン試験及び HCPT とともに陽性となり、特に HCPT では高い活性が観察されるが、ウサギ発熱試験における ΔT_{max} は 0.56℃ であり、擬陽性と判定される。

このような性状を示す試料各 1 mg 相当を direct HCPT により評価した結果、表 4 に示したように、ソープサン及びアルゴダームは非常に高い IL-6 産生誘導能を示すことが確認された。一方、カルトスタットの IL-6 産生誘導能は比較的低く、過去

の成績と相関性が認められた。

D. 考察

TLR family は微生物感染に対する宿主の初期免疫応答を制御する生体防御蛋白質²¹⁾であり、肺、胃腸管のような外部環境に接する組織やマクロファージのような免疫応答細胞に優先的に発現している。生体内における LPS の一次標的はマクロファージであり、血中に投与された LPS は TLR4 を介して発熱をはじめとした様々な生理活性を発現する。TLR2 は TLR1 や TLR6 と二量体を形成することにより、グラム陽性細菌の細胞外膜に局在するリポタイコ酸や細胞膜の構成成分であるリポ蛋白質などを認識し、その他、ウイルス由来の二本鎖 RNA、細菌鞭毛、細菌 DNA はそれぞれ TLR3、TLR5 及び TLR9 を介して生物活性を発現することが知られている。TLR7 及び TLR8 のリガンドは同定されていないが、合成抗ウイルス分子に対する親和性を持つことが知られている²²⁾。また、細菌類の細胞壁成分であるペプチドグリカン は TLR2 リガンドとして作用すると考えられていたが、近年、精製したペプチドグリカン は TLR2 を介さずに活性を発現することが報告され、NOD1 や NOD2 などのその他の蛋白質の関与が示唆されている^{23,24)}。

これらの菌体成分が TLR に認識されると、セリンキナーゼ (IL-1-R-associated kinase, IRAK) の活性化や NF- κ -B 転写因子の活性化など一連のシグナルカスケードを経て、最終的に TNF α 、IL-1 β や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が誘導される。活性発現の強度はそれぞれ異なるが、TLR family に認識されるこれらの菌体成分はいずれも発熱性物質となる。

HCPT においては、ヒト血液 (末梢血細胞) とライオ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、ヒト由来単球様細胞である MM6、THP-1、U937 及び HL-60 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などを確認する必要が生じる欠点を持っている。本研究において、MM6-CA8 細胞と THP-1 細胞の TLR リガンドに対する応答性を評価した結果、TLR2、TLR2/1、TLR2/6 リガンドに対する応答性は、黄色ブドウ球菌乾燥菌体と合成リポ蛋白質の認識性を除き、両細胞ともにほぼ同等であるが、MM6-CA8 細胞は TLR4 リガンドである LPS に対して非常に高い応答性を示すことが判明した。しかし、THP-1 細胞は TLR3 リガンドである Poly(I:C) を認識したのに対し、MM6-CA8 細胞は同リガンドに対する応答性を欠如していた。また、MM6-CA8 細胞は TLR7 リガンドである R837 と TLR9 リガンドである大腸菌 DNA を認識しなかったことから、同細胞は TLR3、TLR7、TLR9 を発現していない可能性が示唆された。本実験では IL-6 産生誘導能を指標として評価したため、その他のサイトカイン類の誘導状況は不明である。今後、サイトカイン及びケモカインの一斉分析を行い、各種 TLR リガンドに対する MM6-CA8 細胞の応答性を再評価すると共に、発熱マーカーの検索を行う。また、同細胞における各種 TLR の発現状況については、mRNA 及び蛋白質レベルでも評価する予定である。

材料の微生物汚染が細菌類に由来する場合、TLR5、TLR7、TLR8 及び TLR9 を発現していなくとも、TLR2、TLR2/1、TLR2/6 及び TLR4 を介して微生物の混入を検出することは可能である。ウイルスの場合、核酸を保護するカプシトとそれを取り巻くエンベロープは一般的にそれぞれ蛋白質及びリポ多糖体蛋白質から構成されている。それ故、HCPT において使用する細胞がウイルス由来の二本鎖 RNA を認識する TLR3 を欠損していても、材料のウイルス汚染は TLR2 を介して検出することが可能と思われる。しかし、HCPT においては、各種の微生物成分を包括的に検出することができれば理想的であるため、今後、MM6-CA8 細胞を親株として、欠損が疑われた TLR の遺伝子を導入した亜株

の作製を試みる予定である。また、ヒト末梢血細胞の TLR リガンドに対する応答性に関しても評価する予定である。

MM6-CA8 細胞の継代安定性を評価した結果、細胞形態や老化の指標となる β -ガラクトシダーゼ染色性は 30 代目まで大きな差異が認められなかった。しかし、IL-6 産生誘導能については、8 代目以降、継代数の増加に伴い応答性が低下する傾向が認められた。本実験で使用した MM6-CA8 細胞は 4 代目を保存株としている。通常、試験には 8-10 代目を使用するが、LPS 応答性を見る限り、7 代目までは本試験に使用できないことも明らかとなった。

エンドトキシン試験において、コラーゲン製品からの LPS 回収率は、我々が過去に開発した精製コラーゲナーゼ/塩酸法を前処理として適用することにより飛躍的に改善される。しかし、HA、特に未焼成 HA との複合材料の場合、同法を適用しても LPS 回収が困難であることを昨年度に見出した。生体内適用材料の場合、いかなる材料でも微生物学的安全性を評価する必要があるため、LPS 吸着能の高いコラーゲン/HA 骨充填剤のエンドトキシン試験法に関して検討した結果、同材料からの LPS 回収率は 1M 塩酸を使用して氷冷下、短時間の超音波抽出を行うことにより大きく改善されることが判明した。

エンドトキシン試験では、原理上、試験液を調製するために材料からの抽出操作が必須となるが、昨年度、少なくともコラーゲン製品の微生物学的安全性については、煩雑な抽出操作を行うことなく、固形材料を用いた direct HCPT により評価できることを明らかにした。そこで、上記のコラーゲン/HA 骨充填剤に direct HCPT を適用した結果、エンドトキシン試験とほぼ同等の LPS 回収率が得られた。

エンドトキシン試験に用いるリムルス反応における LPS の構造要求性は比較的低く、同反応においては広範な種類の LPS が活性を示すことが知られている。また、LPS には種特異性があり、動物

の種類によって発現される活性強度が異なる。市販創傷被覆剤の微生物学的安全性を direct HCPT により評価し、過去に実施したサーベイ試験と比較検討した結果、多くの試料はエンドトキシン試験、ウサギ発熱試験、direct HCPT の間に相関性が認められたことから、天然由来医用材料の微生物学的安全性は固形試料を用いた direct HCPT により評価できることが明らかとなった。また、アピテン、ヘリテン及びカルトスタットのように、エンドトキシン試験では陽性を示すが、direct HCPT では陰性となる試料のほか、アロアスクやアルゴダームのように、エンドトキシン試験の結果と対比した場合、direct HCPT において比較的高い活性が認められる試料が存在したことから、HCPT は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も判明した。

HCPT においてライン化細胞を使用する場合、試験に要する細胞数を得るまでに分化刺激の時間も含めて通常 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、HCPT は、検出感度もエンドトキシン試験と大きな差異がなく、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。HCPT 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。

今後、前述のとおり、MM6-CA8 細胞から誘導される IL-6 以外のサイトカイン及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、各種の TLR リガンドに対する応答性の再評価と発熱マーカーの最適化を行う。また、TLR リガンドに対するヒト末梢血細胞の反応性を評価すると共

に、貧食作用による MM6-CA8 細胞の活性化能を検討するほか、TLR 遺伝子を導入した亜株の作製を試みるなど、HCPT の有用性を総合的に評価する予定である。

E. 結 論

TLR4 リガンドである LPS に対する応答性を評価した結果、MM6-CA8 細胞は THP-1 細胞と比較して遙かに高い反応性を示すことが確認された。また、MM6-CA8 細胞は TLR4 リガンドのほか、TLR2 (TLR2/1 及び TLR2/6) リガンドを高感度で認識するが、TLR3、TLR7、TLR9 を発現していない可能性が示唆された。

MM6-CA8 細胞の継代安定性を評価した結果、細胞形態や老化の指標となる β -ガラクトシダーゼ染色性は 30 代目まで大きな差異が認められなかった。しかし、IL-6 産生誘導能については、継代数の増加に伴い応答性が低下する傾向が認められた。

LPS 吸着性材料であるコラーゲン/HA 骨充填剤からの LPS 回収率は、氷冷下、1M 塩酸中で短時間超音波抽出することにより大きく改善された。同材料に direct HCPT を適用した結果、エンドトキシン試験と同等の LPS 回収率が得られた。また、direct HCPT を市販創傷被覆剤に適用し、過去に実施したサーベイ試験結果と比較した結果、ウサギ発熱試験及びエンドトキシン試験との相関性が確認されたと共に、混入する LPS の種特異性に関する情報も得られた。これらの結果から、天然医用材料の微生物学的安全性は煩雑な抽出操作を行わなくとも、固形試料を用いる direct HCPT により評価できることが明らかとなった。

F. 研究発表

- 1) 靛島由二, 小園 知, 長谷川千恵, 岡野理紗, 村松知明, 佐々木和夫, 土屋利江. 医療機器・医用材料の適用例に応じてエンドトキシン規格値の設定. 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会 (2006 年 11 月・東京).
- 2) 靛島由二, 長谷川千恵, 岡野理紗, 村松知明,

村井敏美, 中川ゆかり, 土屋利江. ヒト細胞を使用した *in vitro* 発熱性物質試験法の有用性評価. 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会 (2006 年 11 月・東京).

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

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-andrzweski 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) 靛島由二. 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) 靛島由二. 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, Henriksen 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) Hoffmann S, Peterbauer A, Schindler S, Fennrich S, Ploeg S, Mistry Y, Montag-Lessing T, Spreitzer I, Loschner B, Aalderen M, Bos R, Gommer M, Nibbeling R, Werner-Felmayer G, Loitzl P, Jungi T, Brcic M, Brugger P, Frey E, Bowe G, Casado J, Coecke S, Lange J, Mogster B, Naess LM, Aaberge IS, Wendel A and Hartung T. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. *J. Immunol. Method*, 298:161-173 (2005).
- 11) Hasiwa M, Kullmann K, von Aulock S, Klein C and Hartung T. An in vitro pyrogen test for immune-stimulating components on surfaces. *Biomaterials*, 28:1367-1375 (2007).
- 12) 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).
- 13) Westphal O, Luderitz O and Bister F. Über die Extraction von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z. Naturforsch*, 7b:148-155 (1952).
- 14) Westphal O and Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods carbohydra. Chem.*, 5:83-91 (1965).
- 15) 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).
- 16) 第15改正日本薬局方. 厚生労働省.
- 17) 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).
- 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).
- 19) Tanamoto K, Kato H, Haishima Y and Azumi S. Biological properties of lipid A isolated from *Flavobacterium meningosepticum*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8:522-527 (2001).
- 20) 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. Diagn. Lab. Immunol.*, 9:585-597 (2002).
- 21) 三宅健介. エンドトキシン (LPS) 認識分子機構. エンドトキシン研究 6, p.23-30, 医学図書出版株式会社 (2003).
- 22) Hemmi H, Kashiho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K and Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.*, 3:196-200 (2002).
- 23) Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, Blanot D, Nahori MA, Werts C and Boneca IG. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.*, 5:1000-1006 (2004).
- 24) Girardin SE, Jehanno M, Mengin-Lecreulx D, Sansonetti PJ, Alzari PM and Philpott DJ. Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1. *J. Biol. Chem.*, 18:38648-38656 (2005).

表1. MM6-CA8 細胞及び THP-1 細胞の LPS 応答性

細胞株	LPS 濃度 (pg/ml)	IL-6 産生量 (pg/ml)
MM6-CA8	0	34.0 ± 0.4
	0.1	36.5 ± 1.1
	0.5	36.9 ± 1.0
	1.0	37.4 ± 2.4
	5.0	44.7 ± 3.8
	10	83.5 ± 4.4
	50	5773 ± 375
	100	14325 ± 389
	THP-1	0
50		12.2 ± 1.6
100		24.1 ± 2.9
1 × 10 ³		51.6 ± 5.4
5 × 10 ³		97.5 ± 2.2
1 × 10 ⁴		131 ± 18
5 × 10 ⁴		217 ± 12
1 × 10 ⁵		258 ± 15
5 × 10 ⁵		602 ± 69
1 × 10 ⁶		854 ± 32
5 × 10 ⁶		1369 ± 68
1 × 10 ⁷		1313 ± 121