

- 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).
27. 齋島由二, 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).
 28. 新谷英晴 (2006) 加熱滅菌での滅菌バリデーションに於いて損傷菌を考慮する意義について, 日本防菌防黴学会
 29. 新谷英晴 (2007) EOG 滅菌あるいは照射滅菌での滅菌バリデーションに於いて損傷菌を考慮する意義について, 日本防菌防黴学会
 30. 五十嵐良明, 劉麗, 鹿庭正昭, 土屋利江. Local lymph node assay におけるアイトープを用いない各種エンドポイントの比較. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2006)
 31. 大森崇, 出原賢治, 小島肇, 寒水孝司, 有馬和範, 後藤浩彦, 花田智彦, 五十嵐良明, 猪田健人, 金澤由基子, 小阪忠司, 牧栄二, 森本隆史, 篠田直樹, 武吉正博, 田中正志, 浦谷衛, 宇佐美雅仁, 山中淳, 米田知史, 吉村功, 湯浅敦子. 皮膚感作性試験代替法 (LLNA-DA 法)バリデーション研究. 日本動物実験代替法学会第 20 回大会(2006)
 32. Idehara K., Omori T., Kojima H., Sozu T., Arima K., Goto H., Hanada T., Ikarashi Y., Inoda T., Kanazawa Y., Kosaka T., Maki E., Morimoto T., Shinoda S., Shinoda N., Takeyoshi M., Tanaka M., Uratani M., Usami M., Yamanaka A., Yoneda T., Yoshimura I., Yuasa A. Validation of LLNA-DA assay for assessing skin sensitization potential. 46th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2007)
 33. 佐藤道夫, 土屋利江: 医療機器の不具合報告について(2), 第 43 回全国衛生化学技術協議会年会(H18.11.2).
 34. 伊佐間和郎, 小林郁夫: 有効性・安全性に優れた新規チタン合金の開発と評価手法の開発, 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研究成果発表会 (2006 年 3 月 10 日, 東京)
 35. 小林郁夫, 清水めぐみ, 土居 壽, 米山隆之, 小林雅博, 埴 隆夫: ステン用 Au-Pd 系合金の力学的性質, 日本金属学会 2006 年秋期 (第 139 回) 大会, 2006 年 9 月 16 日~9 月 18 日, 新潟大学五十嵐キャンパス.
 36. 小林郁夫, 伊藤知佳, 土居 壽, 米山隆之, 小林雅博, 埴 隆夫: ステン用 Au-Pd 系合金の耐生体環境性と血液適合性, 同会.
 37. 小林郁夫, 清水めぐみ, 伊藤知佳, 埴 祐介, 土居 壽, 米山隆之, 小林雅博, 埴 隆夫: ステン用 Au-Pd 系合金の力学的性質と血液適合性, 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会, 2006 年 11 月 27 日~11 月 28 日, アルカディア市ヶ谷.
 38. 小林郁夫: Au を主成分とする新しいステン用合金の特性評価, 5th IBB BioFuture Research Encouragement Prize 研究発表会, 2007 年 1 月 30 日, 東京医科歯科大学生体材料工学研究所.
 39. 中川真美子, 矢上晶子, 鷺見康子, 清水善徳, 松永佳世子: 医用材料・インプラントによる皮膚障害が疑われた 10 症例の検討, 第 36 回日本皮膚アレルギー学会・第 31 回日本接触皮膚炎学会, 2006 年 7 月 15-16 日,

40. 中川真美子、矢上晶子、鷺見康子、清水善徳、松永佳世子：医用材料・インプラントによる皮膚障害が疑われた 10 症例の検討、藤田学園医学会第 38 回総会、2006 年 10 月 5-7 日、豊明市
41. 中川真美子、矢上晶子、鷺見康子、清水善徳、松永佳世子：医用材料・インプラントによる皮膚障害が疑われた 10 症例の検討、第 18 回藤田保健衛生大学アレルギー勉強会、2006 年 10 月 2 日、豊明市
42. T. Ito, R. Sawada, Y. Fujiwara, T. Tsuchiya 「TGF- β gene expresiion analysis in the human mesenchymal stem cells (hMSCs) —Relation between TGF- β and hMSCs multidifferntiation—」 The 19th annual and international meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (2006. 9)
43. 澤田留美、土屋利江「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を目指した SNP 解析」第 44 回日本人工臓器学会 (2006. 11)
44. 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)
45. 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)
46. Wakitani S. Repair of articular cartilage defects with growth factors. Cartilage Symposium. 29th Annual Scientific Meeting of Singapore Orthopaedic Association, Nov 10-11, 2006, Singapore
47. Wakitani S. Articular cartilage repair with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation. Cartilage Symposium. 29th Annual Scientific Meeting of Singapore Orthopaedic Association, Nov 10-11, 2006, Singapore
48. Wakitani S. Articular cartilage repair with bone marrow mesenchymal cell transplantation. 大阪スポーツ医学シンポジウム, Nov 21, 2006, Osaka
49. 山本貴士、鄭徳泳、中井隆介、Ron Sekel, 丘進卿、堤定美. 人工股関節まわりの骨リモデリングのシミュレーション. 日本機会学会第 18 回バイオエンジニアリング講演会、平成 18 年 1 月 13—14 日、新潟
50. 村上成道、山崎宏、中村恒一、井坪俊郎、加藤博之、脇谷滋之、町田浩子、大串始. 離断性骨軟骨炎に対する自己骨髄間葉系細胞移植による軟骨欠損修復. 第 18 回日本肘関節学会、平成 18 年 1 月 27 日、名古屋
51. 加藤博之、脇谷滋之、村上成道、山崎宏、中村恒一、町田浩子、大串始. 上腕骨離断性骨軟骨炎に対する骨髄間葉系細胞移植の試み. 第 44 回信州上肢の外科学会. 平成 18 年 2 月 15 日、松本
52. 高木睦、近藤真一、小泉覚、梅津洋介、藤原政司、脇谷滋之. 顕微鏡画像による間葉系幹細胞からの軟骨細胞への分化度診断の試み. 第 5 回日本再生医療学会、平成 18 年 3 月 8—9 日、岡山
53. 鍵田恵梨奈、藤原政司、脇谷滋之、高木睦. 軟骨細胞三次元培養におけるプロテオグリカン関連糖の添加効果. 日本農芸化学会

- 2006 年度大会、平成 18 年 3 月 25-28 日、
京都女子大学
54. 脇谷滋之. 軟骨再生の現状と将来 (シンポジウム S4 レギュラトリーサイエンス部会細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性とその有用性の評価). 第 126 年会日本薬学会、平成 18 年 3 月 28 日-30 日、仙台
55. 脇谷滋之. 軟骨再生医療の現状と将来 (シンポジウム 3 運動器移植・再生医療の現状と展望、全国アンケート調査を含めて). 第 79 回日本整形外科学会、平成 18 年 5 月 18 日-21 日、横浜
56. 脇谷滋之. 関節軟骨再生の現状と問題点 (ミニシンポジウム). 第 24 回日本骨代謝学会、平成 18 年 7 月 5 日-7 日、東京
57. 細谷明宏、中村浩彰、二宮禎、吉羽邦彦、脇谷滋之、山田博仁、笠原悦男、小澤英浩. α -平滑筋アクチンの歯周組織発生過程における局在と歯槽骨形成との関連. 第 24 回日本骨代謝学会、平成 18 年 7 月 5 日-7 日、東京
58. 細谷明宏、中村浩彰、吉羽邦彦、岡部高弘、脇谷滋之、小澤英浩. ラット臼歯皮下移植実験モデルにおける歯槽骨再生に関する免疫組織化学的研究. 第 9 回日本組織工学会、平成 18 年 9 月 7 日-8 日、京都
59. 韓東旭、Bae Young Yoon、松村和明、脇谷滋之、縄田昌司、玄丞然. Cold preservation of human osteochondral tissues in EGCC-added storage solution. 第 9 回日本組織工学会、平成 18 年 9 月 7 日-8 日、京都
60. 梅津洋介、藤原政司、脇谷滋之、高木睦. 間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化誘導における播種細胞密度の影響. 日本生物工学会平成 18 年度大会、平成 18 年 9 月 11 日-13 日、阪大豊中 campus
61. 鍵田恵梨奈、藤原政司、脇谷滋之、高木睦. 軟骨細胞三次元培養におけるグリコサミノグリカン関連糖の添加効果. 日本生物工学会平成 18 年度大会、平成 18 年 9 月 11 日-13 日、阪大豊中 campus
62. 北林孝之、上野貢生、三澤弘明、細川陽一郎、増原宏、脇谷滋之、藤原政司、高木睦. フェムト秒レーザーを利用した単一接着細胞の遺伝子発現解析. 日本生物工学会平成 18 年度大会、平成 18 年 9 月 11 日-13 日、阪大豊中 campus
63. 脇谷滋之. 軟骨 (パネルディスカッション). 第 25 回日本運動器移植・再生医学研究会. 平成 18 年 9 月 23 日. 東京国際フォーラム
64. 脇谷滋之. 骨髄間葉系細胞移植にいおる関節軟骨再生 (特別シンポジウム 2 関節軟骨の再生) 第回日本リウマチ関節外科学会、平成 18 年 11 月 11 日、朱鷺メッセ
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) 特許
1. 出願国：米国
公開番号：US-2006-0115458-A1

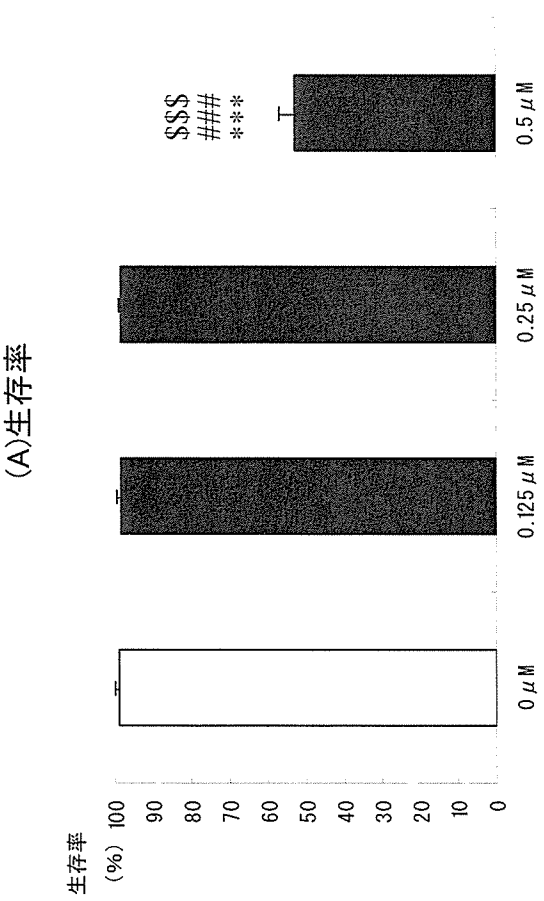
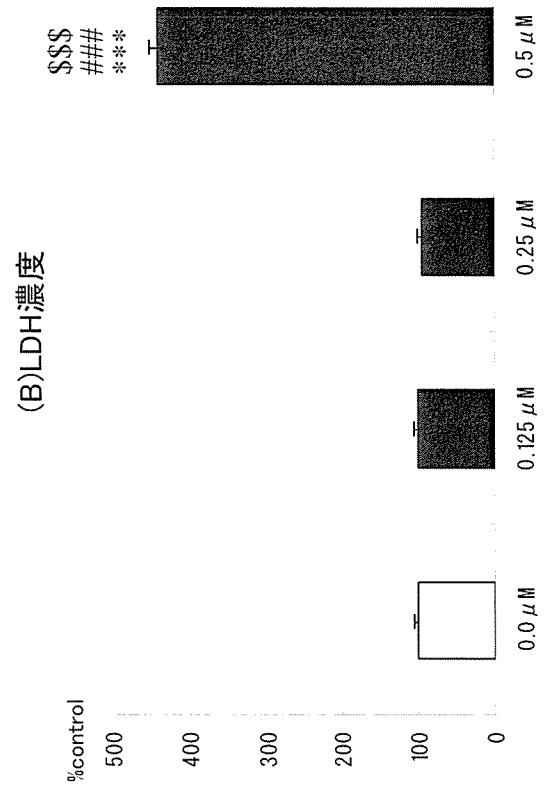
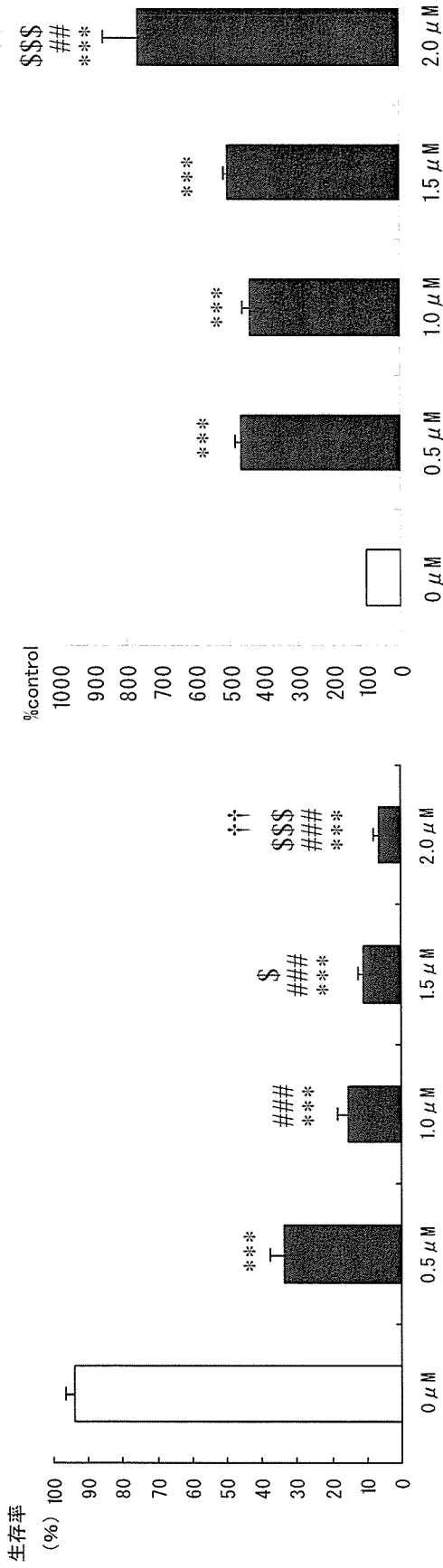


図10. DBTを曝露したアストロサイト系細胞の生存率及び上清中LDH濃度

注) 平均値±標準誤差で示す。 ***: p<0.001 (0.0 μMとの比較)、##: p<0.01、###: p<0.001 (0.5 μMとの比較)
 \$: p<0.05、\$\$: p<0.001 (1.0 μMとの比較)、††: p<0.01 (1.5 μMとの比較)

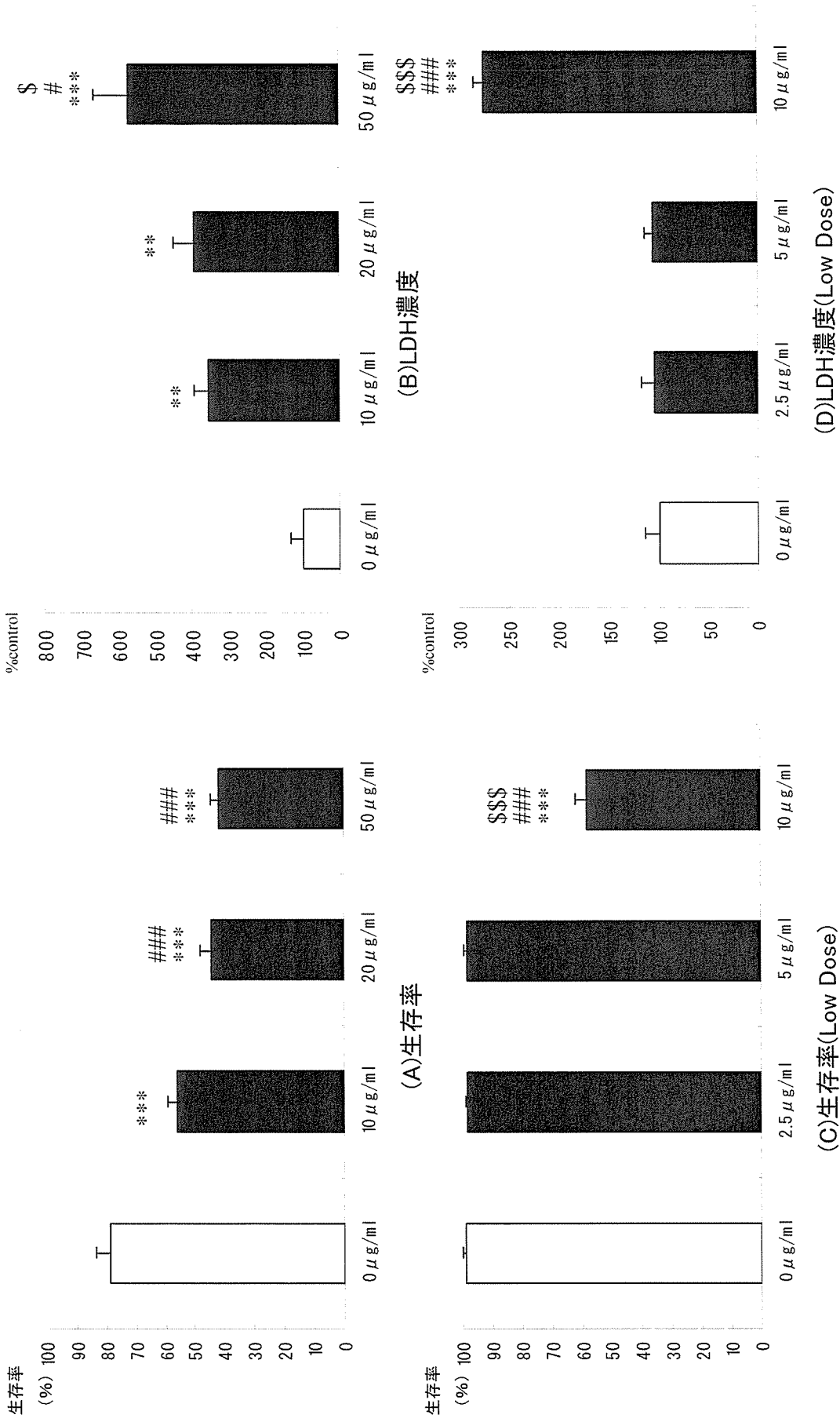
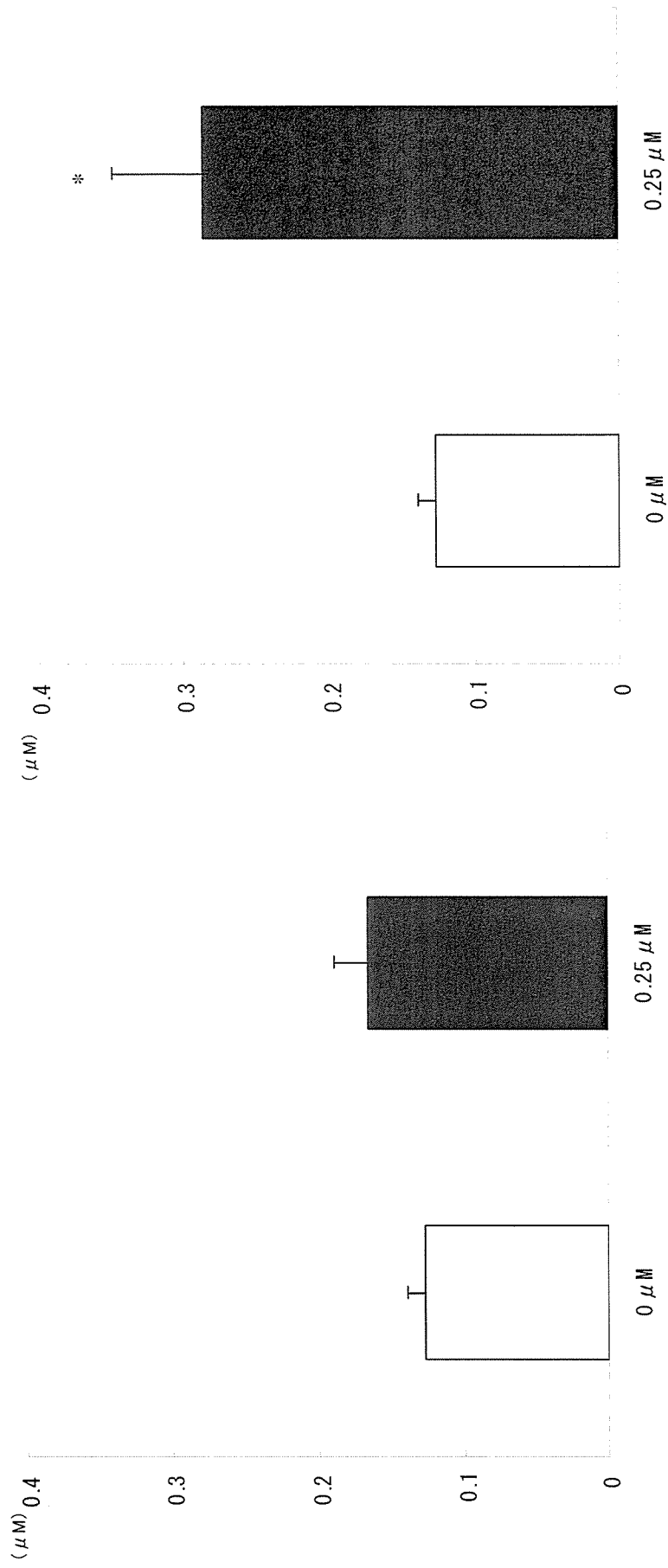


図11. S3を曝露したアストロサイト系細胞の生存率及び上清中LDH濃度

注) 平均値±標準誤差で示す。**: p<0.01, ***: p<0.001 (0 μg/mlとの比較)、#: p<0.05, ###: p<0.001 (10 μg/mlとの比較)、\$: p<0.05 (20 μg/mlとの比較)、\$\$\$: p<0.001 (5 μg/mlとの比較)

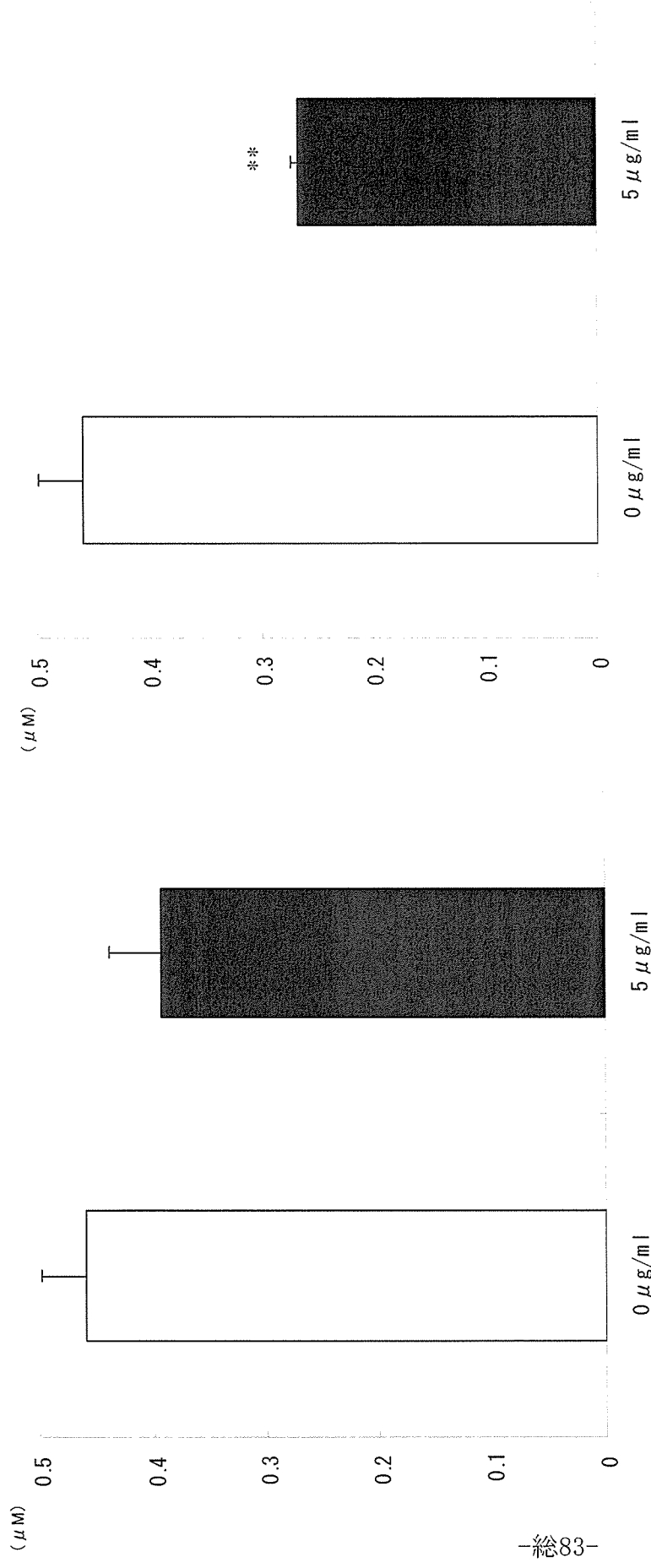


(A)1時間後

(B)2時間後

図12. DBTを曝露したアストロサイト系細胞の上清中グルタミン酸濃度

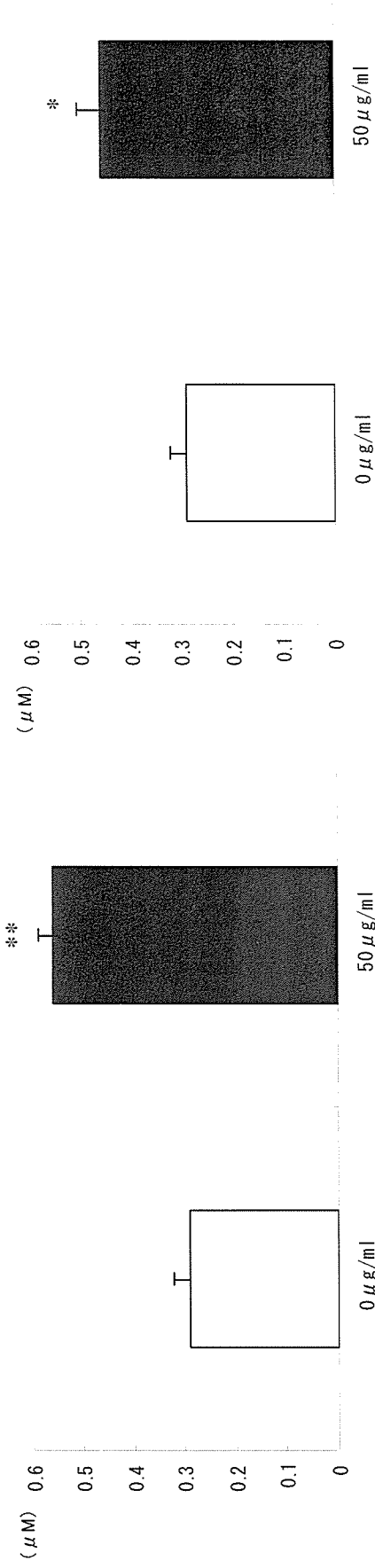
注) 平均値 ± 標準誤差で示す。*: p<0.05(0.00 μMとの比較)



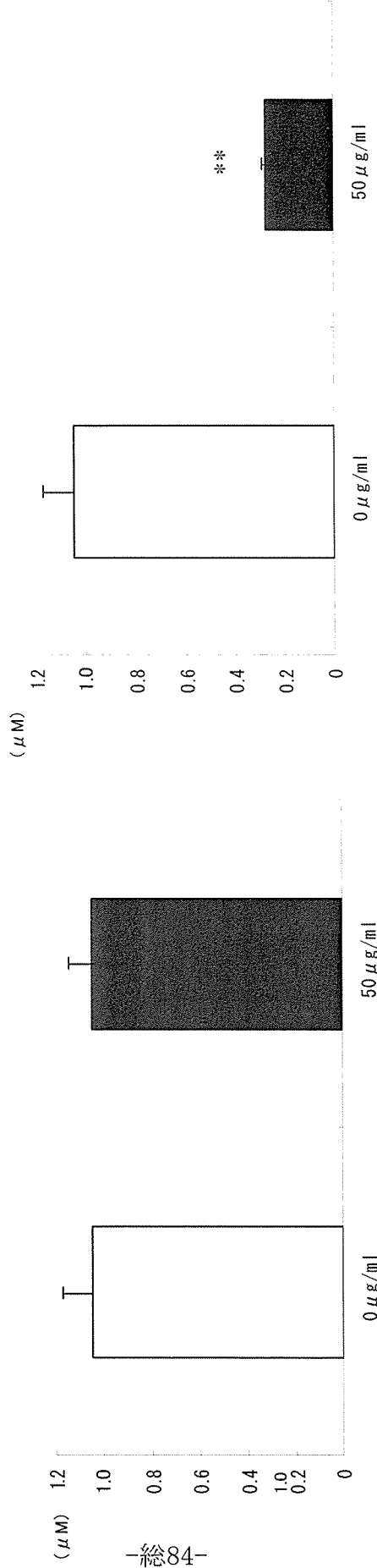
(A)1時間後 (B)2時間後

図13. S3を曝露したアストロサイト系細胞の上清中グルタミン酸濃度

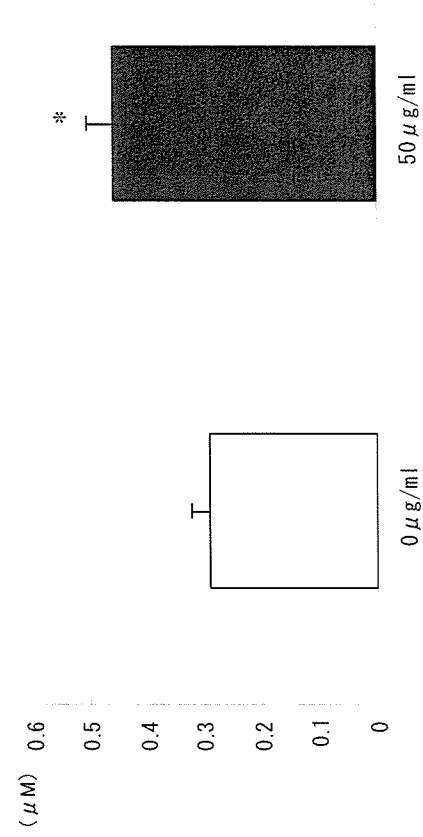
注) 平均値±標準誤差で示す。**: p<0.01(0 μg/mlとの比較)



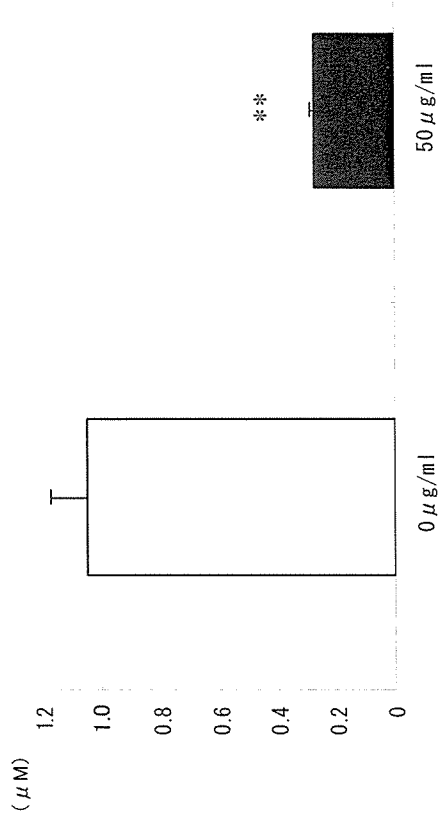
(A)ゲル層PLLAオリゴマー 3時間後



(C) 弾性形状維持層PLLAオリゴマー 3時間後



(B)ゲル層PLLAオリゴマー 6時間後



(D)弾性形状維持層PLLAオリゴマー 6時間後

図14. . ゲル層PLLAオリゴマー、弾性形状維持層PLLAオリゴマーを曝露したアストロサイト系細胞の上清中グルタミン酸濃度

注) 平均値±標準誤差で示す。*: p<0.05、**: p<0.01(0 μg/mlとの比較)

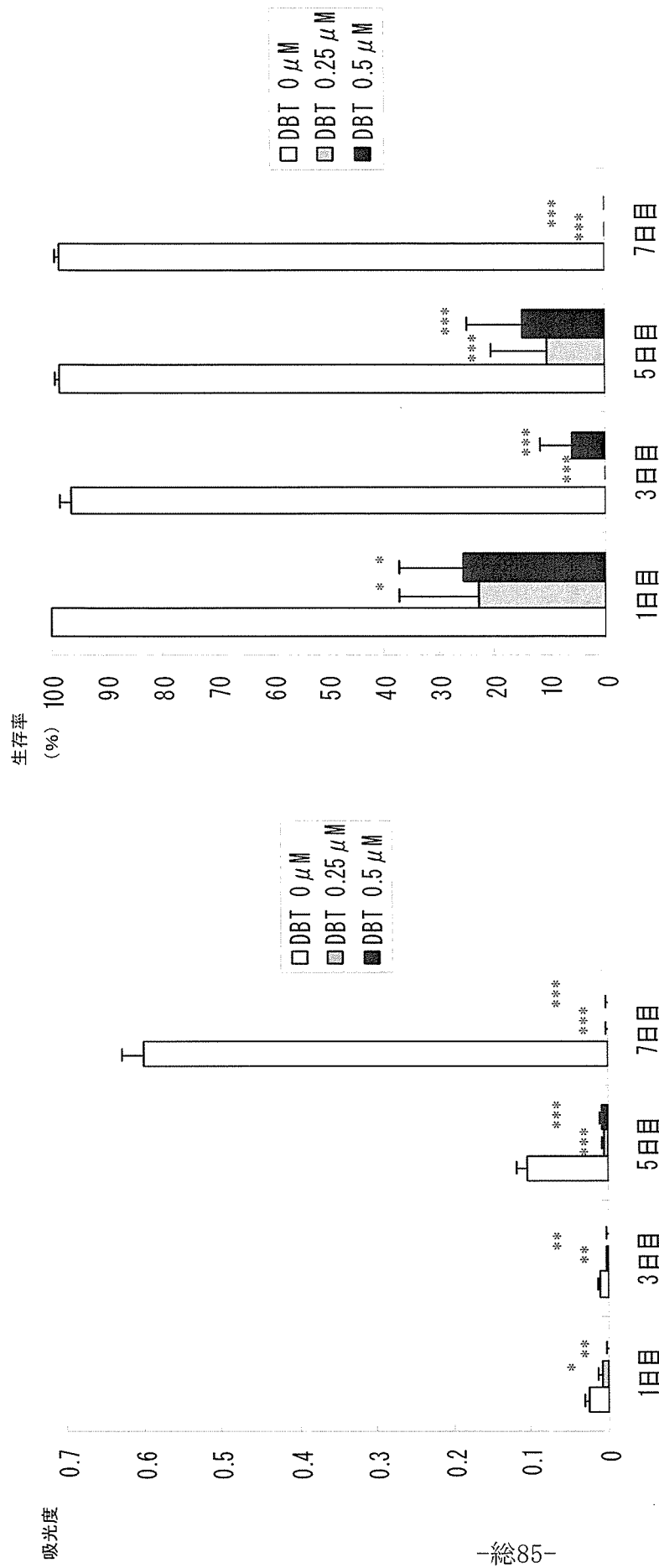
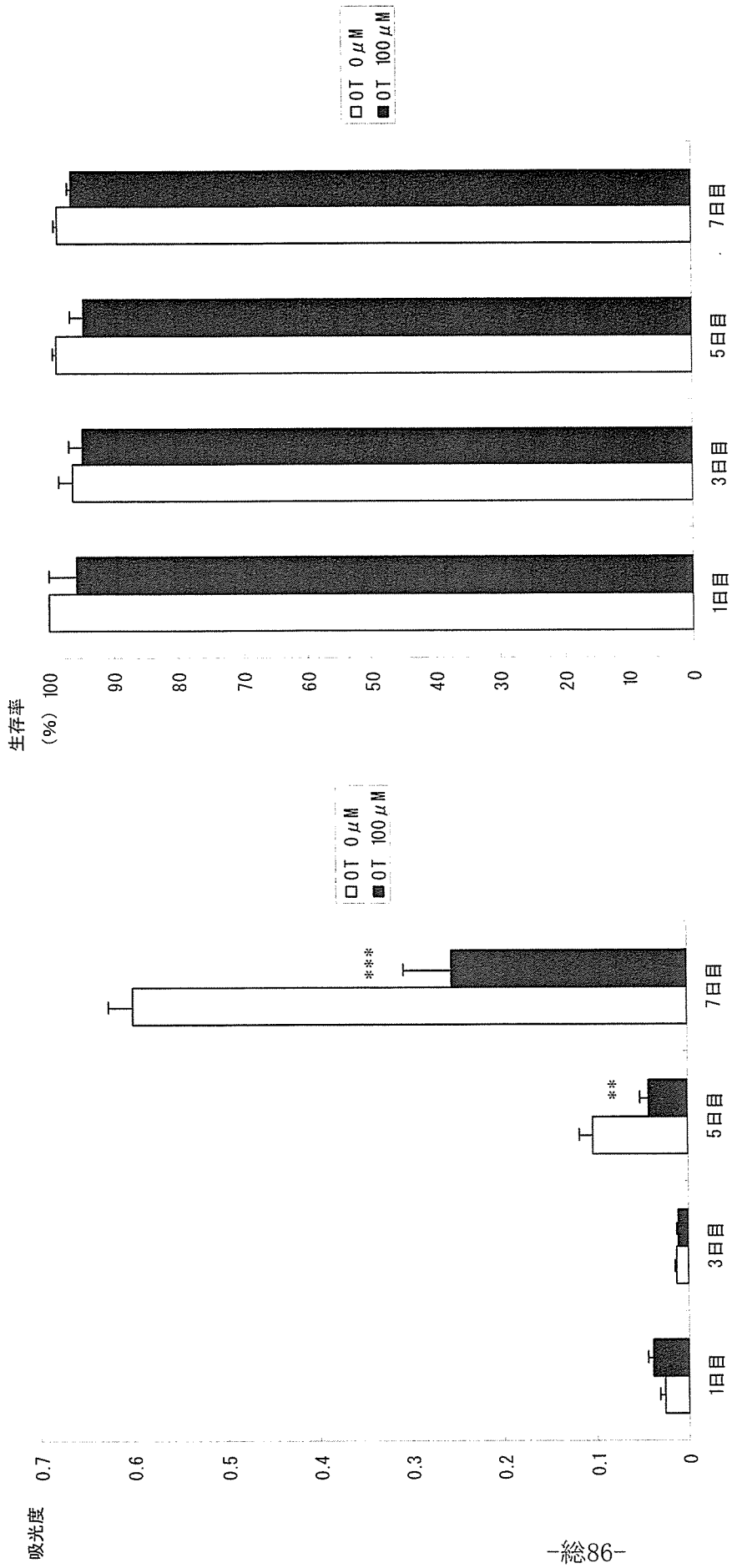


図15. DBTを曝露したアストロサイト系細胞の増殖評価
(TetraColor ONE取り込み、生存率)

注) 平均値±標準誤差で示す。*: p<0.05、**: p<0.01、***: p<0.001 (0 μMとの比較)



**図16. . OTを曝露したアストロサイト系細胞の増殖評価
(TetraColor ONE取り込み、生存率)**

注) 平均値±標準誤差で示す。 **:p<0.01、***:p<0.001 (0 μMとの比較)

表 2 SNPタイピングの結果

Gene	Location		Type	Healthy volunteers (PSC Cell)		Patients													
				Allele1 (frequency)	Allele2 (frequency)	adverse events	no adverse events												
SERPINE1 (PAI-1)	1	3'UTR	c.1570C>T	SNP	C (0.545)	T (0.455)	TT	TC	CC	TC	CC	TC	CC	TC	TT	CC	CC		
	2	CDS (Ala/Thr)	c.43G>A	SNP	G (0.925)	A (0.075)	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GG		
	3	CDS (Ile/Val)	c.49G>A	SNP	G (0.995)	A (0.005)	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	
CYP2C9	4	INTRON	c.700+1921C>T	SNP	C (0.545)	T (0.455)	TT	TC	CC	TC	CC	TC	CC	TC	TT	TT	CC	CC	
	5	INTRON	c.1087+859T>A	SNP	T (0.545)	A (0.455)	AA	AT	TT	AT	TT	AT	AA	AA	AA	AA	TT	TT	
	1	INTRON	c.1149+147C>T	SNP	C (0.705)	T (0.295)	CC	CC	CT	CT	CC	CT	CT	CT	CT	CT	CT	TT	
	2	CDS (Ile/Leu)	c.1075A>C	SNP	A (0.990)	C (0.010)	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	
	3	CDS (Leu/Pro)	c.269T>C	SNP	T (0.990)	C (0.010)	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	
F2 (prothrombin)	1	INTRON	c.240+83T>C	SNP	T (0.560)	C (0.440)	TT	CC	CT	CC	CT	CT	TT	TT	TT	TT	CC	CT	
	2	INTRON	c.316+2125C>T	SNP	C (0.580)	T (0.420)	CC	TT	TC	TC	TC	TC	CC	CC	CC	CC	TT	TC	
	3	INTRON	c.422+90G>C	SNP	G (0.635)	C (0.365)	GG	CC	CG	CG	CG	CG	CG	GG	GG	GG	CC	GG	
	4	CDS (Met/Thr)	c.494T>C	SNP	T (0.580)	C (0.420)	TT	CC	CT	CT	CT	CT	CT	TT	TT	TT	CC	CT	
	5	INTRON	c.1472+251C>T	SNP	C (0.635)	T (0.365)	CC	TT	TC	TC	TC	TC	CC	CC	CC	CC	CC	TT	CC
	6	INTRON	c.1654+290C>T	SNP	C (0.580)	T (0.420)	CC	TT	CT	CT	CT	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT
F7	CDS-synonymous		c.525C>T	SNP	C (0.915)	T (0.085)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	
F9	INTRON		c.88+75A>G	SNP	A (0.890)	G (0.110)	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	
F10	1	CDS-synonymous	c.792T>C	SNP	T (0.590)	C (0.410)	TC	CC	TC	TC	TC	TC	TC	TC	TC	TC	TC	TC	
	2	INTRON	c.70+270A>G	SNP	A (0.675)	G (0.325)	AG	AA	AA	AA	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AA	GG	
	3	INTRON	c.256+98A>C	SNP	A (0.905)	C (0.095)	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	
	4	INTRON	c.231+64C>T	SNP	C (0.620)	T (0.380)	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	
	5	INTRON	c.502+2115~2116	INDEL	- (1.000)	T (0.000)	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	
	6	INTRON	c.502+2531A>G	SNP	A (1.000)	G (0.000)	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	
GGCX	INTRON		c.2084+408C>T	SNP	C (0.685)	T (0.315)	CC	CC	CC	CT	CC	CT	CT	CT	CT	CT	CC	CT	
VAMP8	1	CDS-synonymous	c.201A>G	SNP	A (0.605)	G (0.395)	AG	GG	GG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	GG	AG	
	2	CDS-synonymous	c.138C>T	SNP	C (0.680)	T (0.320)	CC	CC	CC	CT	CC	CT	CC	CT	CT	CT	CC	CT	
TGFβ1	CDS-synonymous		c.29C>T	SNP	T (0.535)	C (0.465)	CC	CT	CC	CT	TT	CC	TT	CC	TT	CT	CC	CC	
TGFβRI	CDS-synonymous		c.1125A>C	SNP	A (1.000)	C (0.000)	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	
TGFβRII	1	CDS(Glu/Val)	c.946A>T	SNP	A (1.000)	T (0.000)	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	
	2	CDS(Ala/Val)	c.1606T>C	SNP	T (1.000)	C (0.000)	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	

II 分担研究報告

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

厚生労働科学研究費補助金（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）
分担研究報告書

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	齧島 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
	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
	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

研究要旨：本研究では、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、菌体成分含有コラーゲンシートを試料としたラット埋植試験を行い、組織や臓器への影響を評価すると共に、抗菌・抗 LPS 活性を持つ新しいタイプの抗菌材料の開発を行っている。

大腸菌乾燥菌体コラーゲンシートを腹腔内（肝皮膜貼付）に埋植した時の生体影響を定量的に解析した結果、精製コラーゲナーゼ/塩酸法適用時の実測値として 433.8 EU/mg (NOAEL 値) を越える LPS 活性を示すシートを埋植した実験群では、菌体添加量に比例して炎症反応が増強されることが明らかとなり、腹腔内適用材料にも適切な LPS 規格値を設定する必要があることが判明した。大腸菌乾燥菌体含有コラーゲンシートを背部皮下に埋植した際に誘導される炎症反応は菌体重量として同用量の黄色ブドウ球菌乾燥菌体によっても惹起されることが確認された。一方、大腸菌乾燥菌体含有コラーゲンシートを骨欠損部に埋植した時に観察される骨再生の顕著な遅延は LPS を持たない黄色ブドウ球菌乾燥菌体含有コラーゲンシートでは起こらないことが明らかとなった。

生体適合性を改善した高純度酸処理ゼラチンシートを徐放担体として使用し、in vivo 抗菌試験を実施した結果、CAP-18/LL-37 類縁体（18-mer LLKKK 置換体）は、黄色ブドウ球菌及び緑膿菌に対して顕著な抗菌活性を示し、新規抗菌成分として有効であることが確認された。

A. 研究目的

コラーゲン、キチン、キトサン及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、医療機器又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療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

キシシ（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、致死毒性及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命的疾患である多臓器不全症やエンドトキシシ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、並びに組織工学用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。

これらの背景から本研究では、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、創傷治癒及び骨再生に対する影響について検討している。現在までの成果として、菌体成分は皮膚創傷の治療に大きな影響を与えないことから、皮膚適用材料には LPS 規格値を設定する必要がないことが判明している。一方、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が確認されており、皮下適用材料と骨再生用材料の場合、適切な LPS 規格値を設定する必要があることが明らかになっている。

平成 18 年度の本研究では、菌体成分含有材料を腹腔内に埋植した際の生体影響を定量的に解析し、腹腔内適用材料に LPS 規格値を設定する必要性の有無について検討した。また、LPS を持たない黄色ブドウ球菌含有材料を皮下及び骨欠損部に埋植した際の生体影響についても検討した。

創傷被覆剤は、擦傷、火傷、糖尿病時の皮膚疾患のほか、生体内に適用する止血剤などにも多用されているが、患部への微生物感染が起り、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 中和活性及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行っている。現在までに、CAP-18 類

縁体である 18-mer LLKKK 置換体の化学合成、in vitro 抗菌試験、in vitro LPS 中和試験、各種ゼラチンシートからの徐放試験及び徐放基材の生体適合性評価が終了していることから、平成 18 年度は生体内での有効性を評価するため、ゼラチンシートを担体として 18-mer LLKKK 置換体の in vivo 抗菌試験を実施した。

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 及び菌体の調製

大腸菌 0111 株及び黄色ブドウ球菌 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。加熱死菌体を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て乾燥菌体とした。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 及び大腸菌 0111 乾燥菌体の LPS 活性強度は、それぞれ 27.5 EU/ng 及び 0.159 EU/ng 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 であった。

(2) 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 株乾燥菌体及び黄色ブドウ球菌乾燥菌体を添加し、60℃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。

(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 (精製コラゲナーゼ消化/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^{9,10)}。定量試薬としてエンドスペシー ES-50M (エンドトキシン特異的リムルス試薬: 生化学工業) を用い、標準品として日本薬局方エンドトキシン標準品 (大腸菌 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、精製コラゲナーゼ消化/塩酸抽出法のほか、ガイドライン法¹¹⁾ (生理食塩液・室温・72 時間) 及び塩酸抽出法 (HCl/pH3・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) 埋植試験及び病理学的診断

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、ペントバルビタールナトリウム (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。肝被膜への埋植は、上腹部を 2.5 cm 切開し、肝臓を視認して、肝被膜表面にコラーゲンシートを埋植した後、腹直筋及び皮膚を縫合した。ラット頭蓋骨の窩洞は、麻酔下、背位に固定し、頭部正中を 3 cm 切開して骨膜を鈍的に剥離した後、歯科用エンジンを用いて頭頂骨の両側に 5 mm \times 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 \times 5 mm) を被覆し、皮膚縫合した。

試験に応じて種々の期間で動物を屠殺した。皮下埋植群 (症例数 n=4) は周囲組織と共に材料を摘出し、また、肝臓埋植群 (症例数 n=4) については埋植材周囲の肝臓組織を摘出した後、10% 中性緩衝ホルマリンを用いて固定した。頭蓋骨埋植群 (症例数 n=6) については、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、固定又は脱灰終了後、常法に従ってパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を施して病理組織学的に検索した。

(5) in vivo 抗菌試験

実験動物としては、7 週齢の Fischer 系雄ラットを用いた。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てコラーゲンシートを挿入後、 1×10^5 個の緑膿菌を接種した。同シート上に種々の濃度の 18-mer LLKKK アナログ及びポリミキシン B を含浸させた酸処理ゼラチンシート (コアフロント社製: 含水量 75.4 \pm 7.2 mg) を被覆し、皮膚縫合した (各群 3 匹)。翌日、動物を屠殺し、背部を切開して埋植材料を回収した後、材料周囲の組織を滅菌脱脂綿で 2 回拭い、回収材料と共に滅菌生理食塩液 (10 ml) 中に浸漬した。同液を緩やかに 10 分間振とうした後、10 倍希釈系列を調製し、各試験液 50 μ l を SCD 寒天

平板培地に展開(n=2)して37℃で24時間培養し、形成されたコロニー数を計数した。

C. 研究結果

(1) 腹腔内埋植試験

種々の量の大腸菌乾燥菌体を含むコラーゲンシートを肝被膜表面に埋植し、術後1週間目の生体影響を病理学的に診断した結果を図1に示した。精製コラゲナーゼ/塩酸抽出法を適用した際の実測値として、4.7及び9.6 EU/mgのリムルス活性を示すコラーゲンシートを埋植した実験群の病理所見は対照群と同様であり、埋植したシートは肝被膜と線維性結合組織によって癒着しており、その隣接部に少数の毛細血管及び線維芽細胞の侵入と軽度のリンパ球浸潤が観察された(図1A)。実測値33.6 EU/mgのシートを埋植した実験群の病理所見は先の2群とほぼ同様であったが、リンパ球浸潤が若干多く観察された(図1B)。また、433.8及び1162.8 EU/mgの活性を示すシートを埋植した実験群の場合、シート内への毛細血管と線維芽細胞の侵入がやや増加し、リンパ球と少数の形質細胞浸潤が観察された(図1C, 1D)。一方、3100.9及び35722.7 EU/mgの活性を示すシートを埋植した実験群には膿瘍形成が認められ、埋植シートはリンパ級、好中球及びマクロファージの浸潤を伴う慢性化膿性肉芽により肝表面に癒着した所見が観察された(図1E, 1F)。

(2) グラム陽性菌による生体影響評価

2-1. 皮下埋植試験

種々の量の黄色ブドウ球菌乾燥菌体を含有するコラーゲンシートをラット背部皮下に埋植し、術後1週間目の生体影響を評価した(図2)。0.01及び0.1 µg/mgの同菌体を含むシートを埋植した実験群の病理所見は対照群と同様であり、埋植シートはいずれも薄い線維性結合組織に被包され、散在的に線維芽細胞と毛細血管の侵入が認められた(図2A, 2B)。僅かにリンパ球の浸潤が認められたが、特筆すべき炎症所見は観察されなかった。1

µg/mgの菌体を含むシートを埋植した実験群の3症例では、コラーゲンシートに軽度なリンパ球浸潤が観察され、シート周囲が慢性炎症性肉芽により被包された所見を呈していたが、残りの1症例では慢性炎症性肉芽で被包されたコラーゲンシートに多量の好中球浸潤が観察された(図2C)。この炎症所見は10 µg/mgの菌体を含有するコラーゲンシートを埋植した実験群の全症例に観察された(図2D)。

2-2. 頭蓋骨埋植試験

頭蓋骨に形成した窩洞部分に種々の量の黄色ブドウ球菌乾燥菌体を含むコラーゲンシートを被覆し、術後4週間目における骨再生の状況を軟X線解析及び病理学的診断により評価した(図3)。菌体成分非添加のコラーゲンシートを埋植した対照群では、頭蓋骨欠損部の全範囲に骨再生が認められたが、骨再生の過程に相当する膜性骨化の所見が部分的に観察された(図3A)。また、6症例中1例は骨再生が不十分であり、被覆したシート内に非連続性の骨組織形成が観察された。0.01及び0.1 µg/mgの黄色ブドウ球菌乾燥菌体を含むシートを埋植した実験群の病理所見は対照群と同様であった(図3B, 3C)。また、1 µg/mg実験群の場合、6症例中5例は対照群と同様な結果が得られたが、1例では骨形成が認められず、硝子化した結合組織によって形成される部位に極めて軽度のリンパ球浸潤が観察された(図3D)。10 µg/mg投与群では、4症例中3例に不規則な骨梁形成が認められ、周囲結合組織中にリンパ球浸潤が観察された(図3E)。残りの1例では、骨形成が殆ど観察されず、被覆したシートに中等度のリンパ球浸潤が観察された。

(3) CAP-18 類縁体の in vivo 抗菌活性

3-1. 酸処理ゼラチンシートの生体適合性

昨年度使用した酸処理ゼラチンシートは微生物汚染が疑われ、ラット背部皮下埋植試験において顕著な炎症反応を誘導した。そこで、メンブランフィルター濾過後にシート化した酸処理ゼラチン

の生体適合性を同様に評価し、その結果を図4に示した。埋植後1週間目の病理所見において、埋植シートは線維性結合組織に被包されており、軽度のリンパ球浸潤が認められるほか(図4A)、結合組織に接する部位に変性が観察された(図4B)。埋植後2週間目の所見では埋植材の吸収が進み、少量残存していたゼラチンシートは軽度のリンパ球浸潤を示す結合組織によって被包されており、大食細胞反応が観察された(図4C)。

3-2. 抗菌試験

予備試験の結果、18-mer LLKKK アナログは *in vivo* においても黄色ブドウ球菌及び緑膿菌に対する抗菌活性を示したが、*in vitro* 抗菌力と同様、緑膿菌に対する活性発現には、より高い濃度を要することが確認された。そこで、対象細菌として緑膿菌を選択し、18-mer LLKKK アナログの *in vivo* 抗菌活性を定量的に解析し、その結果を表1に示した。

緑膿菌非接種の陰性対照群からは生菌が回収されなかったが、抗菌剤を添加していない陽性対照群では平均値として約 6.5×10^6 個/ラットの生菌が回収された。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は試験に供した濃度範囲(3.9-388 μM)において顕著な活性を示した。一方、18-mer LLKKK アナログは427.5 μM まで顕著な抗菌活性を示したが、42.8 μM 実験群では生菌の存在が認められ、約 1.2×10^5 個/ラットの生菌が回収された。42.8 μM 実験群の生菌回収率は1.9%であり、緑膿菌に対する18-mer LLKKK アナログの *in vivo* 50%発育阻止濃度(IC_{50})は同濃度未満であることが確認された。

3-3. 病理学的診断

図5に示したように、抗菌剤を添加していない陽性対照群の病理所見ではコラーゲンシート全体に多数の好中球浸潤が認められた(図5A)。1710 μM の18-mer LLKKK アナログを含浸させた実験群の病理所見は陽性対照群と類似していたが、好中球浸

潤は少ない傾向を示した(図5B)。また、388 μM のポリミキシンB投与群における好中球浸潤は明らかに少ない所見を呈していた(図5C)。

D. 考察

敗血症時に見られるエンドトキシンショックとは、腹膜炎や急性胆管炎などの経過中に悪寒、発熱、発汗などと共に、血管平滑筋の弛緩による急激な血圧低下や末梢循環不全が発生する状態を意味する。エンドトキシンショックからの回復は困難であるが、たとえショックから回復したとしても、肺、腎臓、肝臓、心臓や消化器粘膜の障害、更には中枢神経系の障害が同時又は続発する多臓器不全症を引き起こす症例が見られる¹²⁾。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。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を評価した。

ラット腹腔内埋植試験において、精製コラーゲンゼ/塩酸抽出法を適用した時の実測値として3100.9 EU/mg以上のリムルス活性を示す大腸菌乾燥菌体添加コラーゲンシートを埋植した実験群に顕著な炎症反応が誘導されたことから、皮下適用材料や骨再生用材料と同様、腹腔内適用材料にも適切なLPS規格値を設定する必要があることが判明した。

本年度の研究では、菌体外膜成分としてLPSを持たないグラム陽性細菌による生体影響を埋植試験により評価した。種々の量の黄色ブドウ球菌乾燥菌体を添加したコラーゲンシートを背部皮下に埋植した場合、1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 実験群の1例に炎症所見が認められ、10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 実験群では全例ともに顕著

な炎症が誘導された。過去に実施した大腸菌乾燥菌体含有コラーゲンシートの皮下埋植試験では、実測値として1162.8 EU/mgのLPS活性を示すシートを埋植した実験群に顕著な炎症反応が認められている。同シートへの大腸菌乾燥菌体の添加量は9 µg/mgであったことから、黄色ブドウ球菌は大腸菌と同等の皮下炎症誘導能を持つことが明らかとなった。

過去に実施した頭蓋骨埋植試験において、大腸菌乾燥菌体は33.6 EU/mg（菌体0.3 µg/mg コラーゲン）以上の用量で骨再生を顕著に遅延することが確認されている。一方、黄色ブドウ球菌乾燥菌体添加シートを使用した実験では、1 µg/mg 実験群では対照群と同等の骨再生が認められた。また、10 µg/mg 実験群の場合、慢性炎症性細胞浸潤が観察されたが、4 症例中 3 例に明瞭な骨形成が誘導されていた。これらの結果から、大腸菌と異なり、黄色ブドウ球菌は試験に供した用量範囲において骨再生に大きな影響を与えないことが判明し、グラム陰性細菌の細胞外膜成分であるLPSが骨再生の過程において何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

本研究3年間の成果として、皮膚に適用する創傷被覆基材には、特段、LPS規格値を設定する必要はないが、皮下、腹腔内及び骨再生用材料には適切なLPS規格値を設ける必要があることが明らかとなった。ラット埋植試験におけるNOAEL値に基づいてヒトに対するLPS規格値を試算した結果を表2に示した。本研究では、回収率を最適化した精製コラゲナーゼ/塩酸抽出法を適用して大腸菌乾燥菌体添加シートのLPS含量を測定したが、塩酸抽出法とガイドライン法により定量した際の実測値及びそれらの値から誘導したヒトに対するLPS許容値も合わせて表記した。医療機器や医用材料の特性に合わせてLPS規格値を設定する試みは初めてのことであり、今後、安全係数の設定法などに関して議論を深めて行く予定である。

昨年度の本研究において、CAP-18/LL-37類縁体の1つである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、同アナログは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。抗菌剤の徐放基材として使用した酸処理ゼラチンはメンブランフィルター濾過を施すことによりラット埋植試験における生体適合性が向上したことから、同材料を抗菌剤担体として緑膿菌に対するラット *in vivo* 抗菌試験を実施した。その結果、18-mer LLKKKアナログは *in vivo* においても *in vitro* と同等の抗菌力を発現することが確認された。また、病理組織学的診断の結果、抗菌剤非添加の陽性対照群に観察された急性炎症反応は抗菌剤を添加することにより緩和される傾向が認められたことから、18-mer LLKKKアナログは抗菌・抗LPS剤として有益であることが明らかになった。

E. 結論

大腸菌乾燥菌体コラーゲンシートの腹腔内埋植試験を行った結果、菌体添加量に比例して炎症反応が増強されることが明らかとなり、腹腔内に適用する生体材料にも適切なLPS規格値を設定する必要があることが判明した。

大腸菌乾燥菌体含有コラーゲンシートを背部皮下に埋植した際に誘導される炎症反応は菌体重量として同用量の黄色ブドウ球菌乾燥菌体によっても惹起されることが確認された。一方、大腸菌乾燥菌体含有コラーゲンシートを骨欠損部に埋植した時に観察される骨再生の顕著な遅延はLPSを持たない黄色ブドウ球菌乾燥菌体含有コラーゲンシートでは起こらないことが明らかとなった。

生体適合性を改善した高純度酸処理ゼラチンシートを徐放担体として使用し、*in vivo* 抗菌試験を実施した結果、CAP-18/LL-37類縁体（18-mer LLKKK置換体）は、黄色ブドウ球菌及び緑膿菌に対して顕著な抗菌活性を示し、新規抗菌成分として有効であることが確認された。

F. 研究発表

- 1) 齧島由二, 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) 齧島由二, 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; 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) 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. 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 lipopolysaccharide-inhibitory activity. Infect. Immun., 62:1421-1426 (1994).
- 5) Westphal O, Lüderitz 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) 第15改正日本薬局方. 厚生労働省.
- 10) Haishima Y., Hasegawa C., Yagami T., Tsuchiya T., Matsuda R. and Hayashi Y. Estimation of uncertainty in kinetic-colorimetric assay of bacterial endotoxins. J. Pharm. Biomed. Anal., 32, 495-503 (2003).
- 11) 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).
- 12) 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).