

再生医療イノベーションフォーラム勉強会

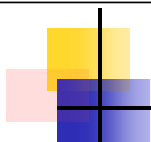
サポーティングインダストリー部会
器材・材料WG

再生医療におけるエンドトキシン

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



齋島 由二
haishima@nihs.go.jp



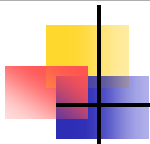
本日のアジェンダ

- ① 国立医薬品食品衛生研究所の紹介
- ② イントロダクション(研究背景)
- ③ in vitro エンドトキシン規格値の設定
- ④ in vivo エンドトキシン規格値の設定
- ⑤ プロセスバリデーションを行う際の留意点
- ⑥ 参考情報(エンドトキシン不活化を期待できる滅菌法)

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



齋島 由二
haishima@nihs.go.jp



国立医薬品食品衛生研究所の歴史

東京司薬場 神田和泉町(1974年8月29日)



司薬場創立当時より明治42年まで
(1874~1909)

【沿革】

- 明治 7年(1874年)東京司薬場(我が国最初の国立試験研究機関)
- 明治20年(1887年)東京衛生試験所
- 昭和24年(1949年)国立衛生試験所
- 昭和53年(1978年)安全性生物試験研究センター設立
- 平成 9年(1997年)国立医薬品食品衛生研究所と改称
医薬品医療機器審査センター設立
- 平成16年(2004年)上記審査センターは(独)医薬品医療機器総合
機構に統合
- 平成17年(2005年)大阪支所が廃止され(独)医薬基盤研究所設立
- 平成29年(2018年)川崎市殿町にある国際戦略拠点「キングスカイ
フロント」に移転



明治42年より昭和20年まで(1909~1945)

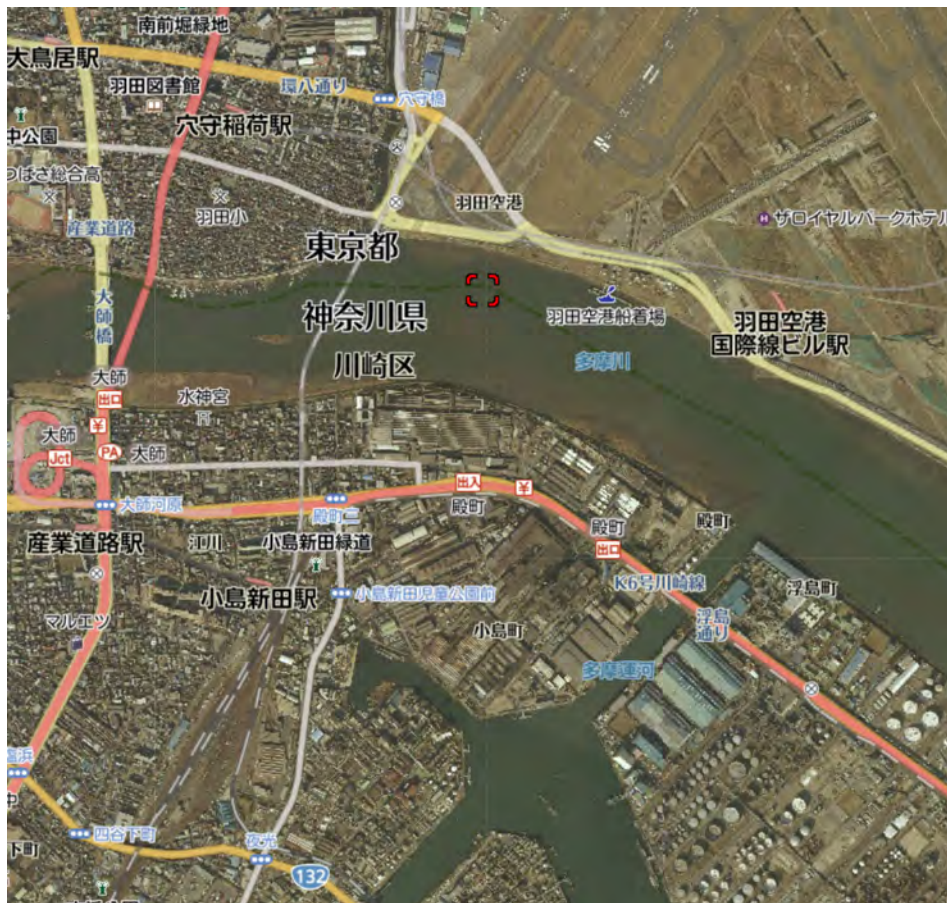
内務省から厚生省に移管されるとき東京衛生試験所 1907年

(内務省 衛生試験所沿革史 1907年)



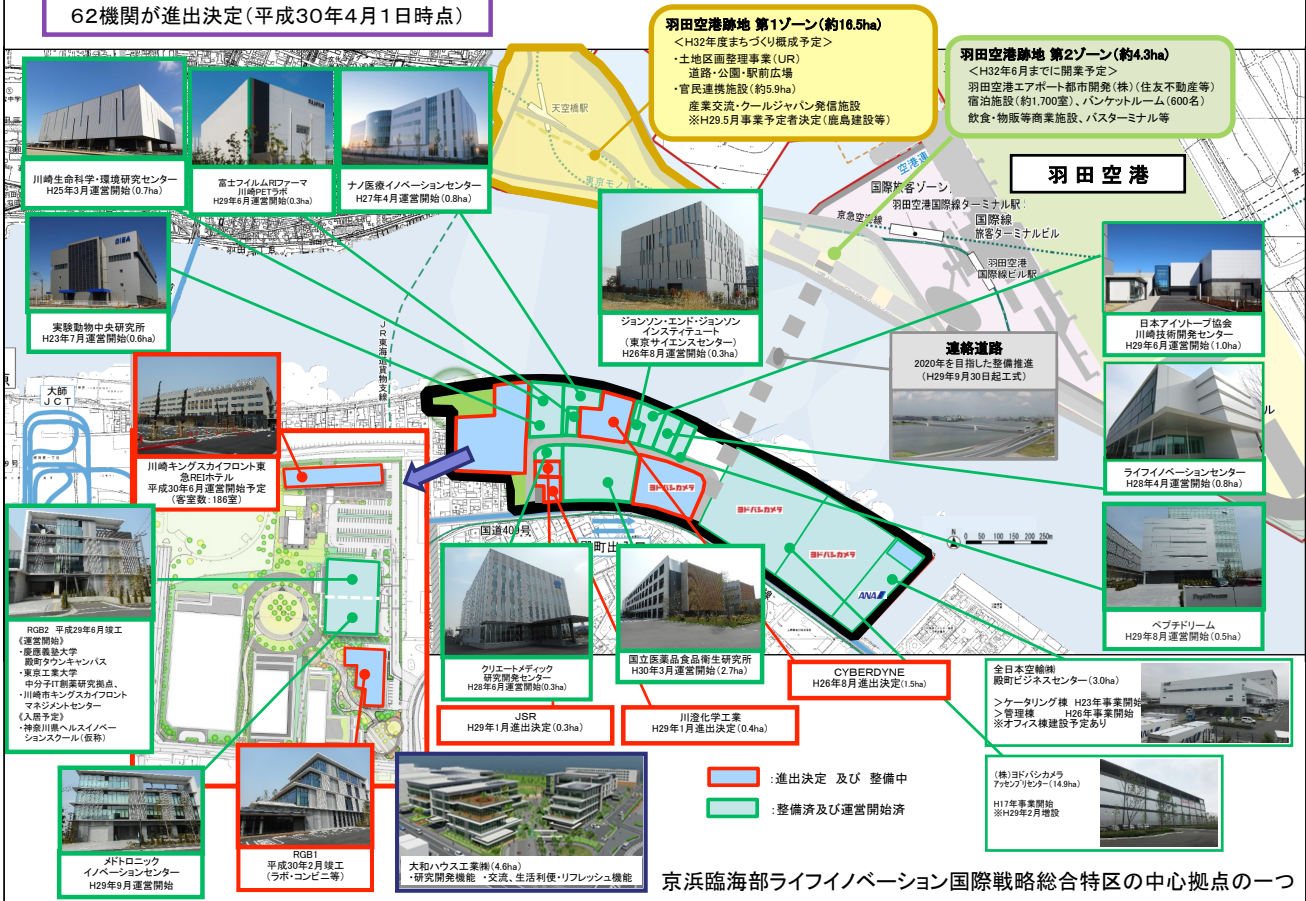
昭和21年(1946)から

殿町国際戦略拠点キングスカイフロントにおける拠点形成の状況について



殿町国際戦略拠点キングスカイフロントにおける拠点形成の状況について

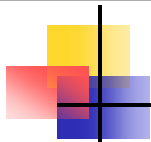
62機関が進出決定(平成30年4月1日時点)



国立衛研の使命と基本的役割



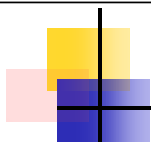
From 2018



国立衛研の使命と基本的役割

- 国立医薬品食品衛生研究所(国立衛研)は、医薬品、医療機器および再生医療等製品等の他、食品あるいは生活環境中に存在する化学物質の人間への影響について、**その品質、安全性および有効性を科学的に正しく評価するための試験・研究や調査(レギュラトリーサイエンス)**を行うことを任務とする機関であり、その成果を科学技術行政、特に厚生労働行政に反映させる使命を有しています。
- 国立衛研は、国民の生命、健康に直接影響を及ぼす医薬品、食品、化学物質等の安全にかかわる試験・研究および評価を行い、**公権力の行使や国の重大な健康危機管理に直結する業務**を行う厚生労働省直轄の試験研究機関です。

From 2018



レギュラトリーサイエンス(RS)

提唱: 内山 充 先生(第21代所長: 衛生支部ニュース 1987; No272: 1)

科学技術の進歩を真に人と社会に役立つ最も望ましい姿に調整(レギュレート)するための、**予測・評価・判断の科学**

- **基礎科学(Whyの科学)**
疑問に答え、機序・本質と法則性を解明
実証をもとに、新規性を求める ⇨ 正しい理論
- **応用科学(Howの科学)**
科学願望を実現し、技術と産物を創製
不可能を可能にし、有用性を求める ⇨ 新技術
- **レギュラトリーサイエンス(Whichの科学)**
技術を、人間と社会に最適化
既存の科学とは異なる価値尺度
科学的根拠による正確な予測・判断 ⇨ 適正な評価
研究面は評価科学
実践適用は行政規制や開発管理

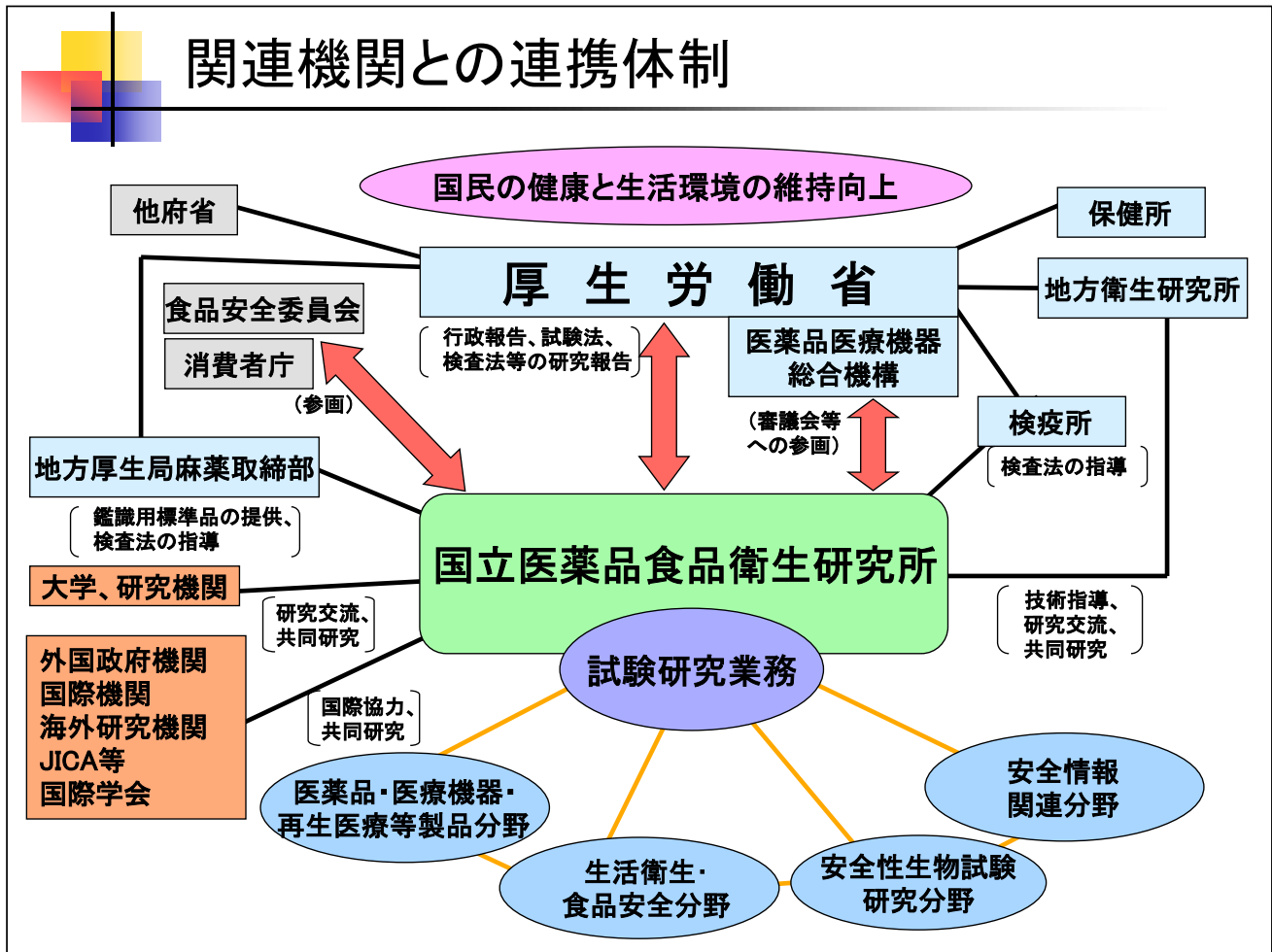
医療機器促進法

科学技術基本計画
日本再興戦略
健康医療戦略推進法

日本発の新薬・医療機器等の開発を効率的・効果的に行うため、RSを充実・強化し、医薬品・医療機器の評価、根拠に基づいた審査指針や基準策定等を推進

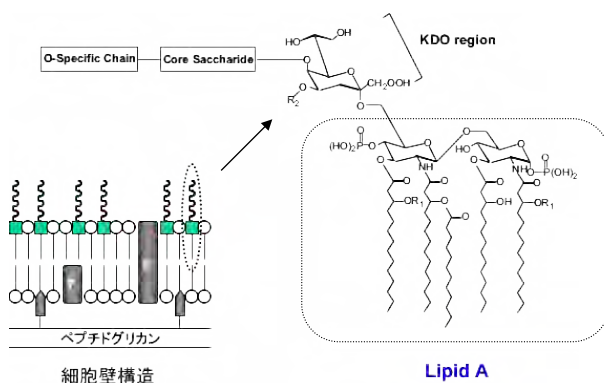
- 臨床試験のための条件(品質及び安全性の確認)の明確化とその手法の開発
- 医療における有用性を確認、確保するための評価法の開発及びその標準化
- 承認申請するにあたって考慮すべき要件の明確化及び基準の作成
- 問題が疑われる事例についての公的試験検査の実施
- 海外規制機関との連携協力によるグローバルな展開

関連機関との連携体制

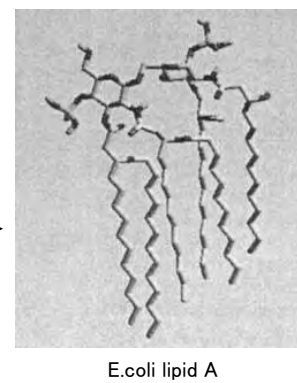


エンドキシン (Lipopolysaccharide, LPS) とは？

局在部位と化学構造



三次元構造



生物活性

生体レベル	細胞レベル	分子レベル
<p>発熱性, 致死毒性, ショック, トランス, 局所・全身シュワルツマン活性, 低血糖, 血清鉄減少反応, アジュバント活性, トロンボプラスチン産生, 抗腫瘍活性, 放射線障害防御能, アジュバント活性, 網内系殺菌力亢進, 骨髄反応</p>	<p>マクロファージ活性化能</p> <ul style="list-style-type: none"> ・サイトカイン産生 ・ケモカイン産生 ・食作用亢進 <p>マイトジェン活性</p> <p>細胞毒性</p>	<p>リムルス活性</p> <p>補体活性化能</p>

エンドキシン規格値：医薬品 vs 再生医療等製品

日本薬局方 — 注射剤のエンドキシン規格値の算出式 —

$$\text{エンドキシン規格値} = K / M$$

K: 発熱を誘起するといわれる体重 1 kg 当たりの
エンドキシン量 (EU/kg)
M: 体重 1 kg 当たり 1 時間以内に投与する最大
量 (mL/kg, mg/kg, U/kg, etc)

投与経路による区分 K (EU/kg)

静脈内	5.0
静脈内(放射性)	2.5
脊髄腔内	0.2

再生医療等製品の品質及び安全性の確保に関する指針

- 平成20年2月8日付薬食発第0208003号厚生労働省医薬食品局長通知
「ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」
- 平成20年9月12日付薬食発第0912006号厚生労働省医薬食品局長通知
「ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」

第2章: 製造方法/第3.最終製品の品質管理/(7)エンドキシン試験(抜粋)

規格値は必ずしも実測値によらず、**日本薬局方等で示されている最終製品の1回投与量を基にした安全域を考慮して設定すればよい。**

- ・ワーストケースを想定した概念(医療機器も同様)
 - ・日局の規格値は生体レベルの発熱誘導能に基づいて設定されている
 - ・再生医療等製品の場合、細胞への直接影響も考慮する必要がある?
 - ・プロセスバリデーションにおける方法論は適切か?(測定対象・回収法等)

エンドキシン等(TLRアゴニスト)の細胞影響(文献紹介)

論文報告	細胞種	アゴニスト	結果
Kadono et al. Infect Immun, 1999	ラット胎児頭蓋冠細胞 (骨芽前駆細胞)	P. gingivalis LPS	<ul style="list-style-type: none"> ・増殖活性に影響しない ・100ng/ml以上でALP活性及びCa産生を抑制
Yang et al. Phytother Res, 2002	ヒト皮膚繊維芽細胞 ヒト包皮ケラチノサイト	E. coli LPS	<ul style="list-style-type: none"> ・50ng/ml以上で増殖活性を増強する
Cho et al. Stem Cells, 2006	脂肪組織由来 ヒト幹細胞	TLRs リガンド	<ul style="list-style-type: none"> ・CpGDNA以外は増殖活性に影響しない ・LPS, PGNは骨分化を促進し、CpGDNAは抑制する ・Poly(I:C)はLPS, PGNの作用を相乗的に増強する
Fisher et al. Blood, 2007	骨髄由来ヒト幹細胞	Pam3Cys	<ul style="list-style-type: none"> ・IL-6産生とNF-κB転写を促進する ・増殖活性を増強する ・骨分化、軟骨分化、脂肪組織分化を抑制する

Pam3Cys: TLR2, Poly(I:C): TLR3, エンドキシン: TLR4, CpG DNA: TLR9, PGN: Nocth Signaling

- ・エンドキシン等の細胞影響は論文間に齟齬がある
- ・いずれも比較的高用量(50ng/mL ~ 1,000ng/mL)

ヒト間葉系幹細胞の増殖能に対する影響

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC)

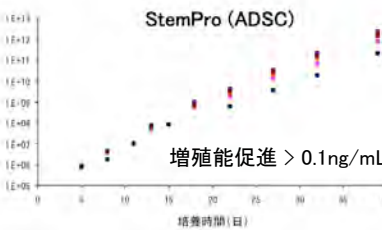
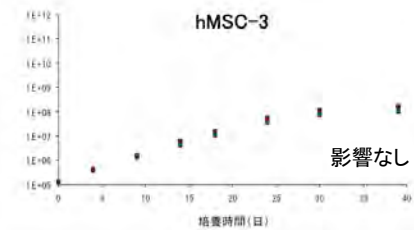
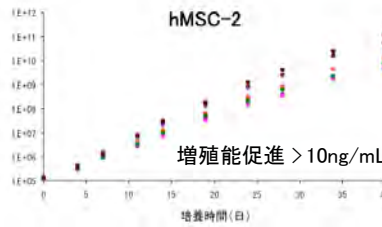
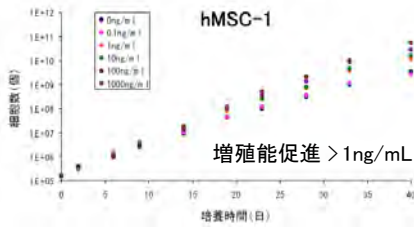
hMSC-1: #7F3914 21 years.M/B
hMSC-2: #7F3458 36 years.M/B
hMSC-3: #7F3753 43 years.M/C
増殖用培地: プレットキットMSCGM

ヒト脂肪組織由来幹細胞 (ADSC)

StemPro Human, Invitrogen
増殖用培地: MesenPRO RS medium kit

細胞培養

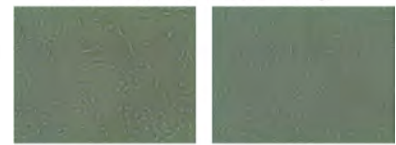
播種: 1.5×10^5 個
容器: 25 cm² フラスコ
培養: 1, 7, 14, 29, 43, 49 日間
LPS: 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 ng/mL
培地交換毎に用事添加



細胞形態: ADSC 27 day



細胞形態: ADSC 35 day



ヒト間葉系幹細胞増殖促進作用のメカニズム①

アポトーシス誘導蛋白質の変動

■: 5倍以上, ■: 2倍以上5倍未満, □: 0.5倍以下0.2倍未満, ●: 0.2倍未満, ○: Cont. 非発現, ○: Cont & Sample 非発現

Code	Protein ID Name	Score	Peptide count	Expression ratio [LPS #]/control					
				3D	7D	14D	22D	36D	49D
FSAL	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like	129.3	7	0.37	1.10	0.82	1.47	0.77	0.19
UN64B	Protein unc-84 hom obg B	119.7	5	0.43	1.07	1.44	0.96	1.98	0.47
FS42	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	74.9	6	0.40	1.14	1.02	1.44	1.04	0.24
PEF1	Pefin	102.9	4	0.36	1.09	0.94	0.96	0.79	0.62
KPC8	Protein kinase C beta type	100.1	2	0.34	0.64	0.73	1.06	1.14	0.49
SH32	Endophilin-1	37.2	2	0.39	-	0.58	-	1.07	0.54
SUGT1	Suppressor of G2 allele of SKP1 hom obg	56.9	4	0.48	0.86	0.64	1.37	0.49	0.18
RTL1	Retrospondin-like protein 1	30.9	2	0.36	0.98	0.58	1.28	0.49	0.66
PARVA	A beta-parvin	141.8	6	0.40	1.07	0.83	1.15	0.75	0.64
AD13	ADP/ATP translocase 3	302.3	11	0.43	1.10	0.77	1.04	0.82	0.67
CYFP2	Cytochrome c FMR1-interacting protein 2	72.9	2	0.28	1.08	1.08	1.00	1.57	0.80
TAN2	Protein TAN2	34.1	2	0.33	0.87	0.47	0.95	0.34	0.57
APAF	Apoptotic protease-activating factor 1	34.5	2	0.40	0.95	0.57	1.21	0.41	0.67
GSP	Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1395.0	30	0.38	1.10	1.06	1.12	1.09	0.88
VATL	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	72.9	2	0.31	-	1.40	1.50	1.09	0.17
BAX	Apoptosis regulator BAX	129.0	4	0.43	1.07	0.68	1.03	0.49	0.63
RUVB1	RuvB-like 1	79.1	5	0.48	0.54	0.87	1.52	0.88	0.63
RHOA	Transforming protein RhoA	89.2	8	0.45	1.01	0.81	1.24	0.68	0.45
STK25	Serine/threonine-protein kinase 25	81.8	4	0.58	1.47	0.49	1.02	1.28	0.52
RNU3	Regulator of microtubule dynamics protein 3	52.7	2	0.77	1.11	0.82	0.85	0.28	-
AFM1	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	66.0	3	0.59	0.98	1.38	0.81	1.92	0.21
PDCE1	Programmed cell death 6-interacting protein	290.7	19	0.51	0.87	0.70	1.03	0.66	0.48

アポトーシス抑制蛋白質の変動

Code	Protein ID Name	Score	Peptide count	Expression ratio [LPS #]/control					
				3D	7D	14D	22D	36D	49D
UBE2H	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 H (May mediate cell formation by the suppression of apoptosis)	31.9	2	0.52	1.25	-	3.09	-	-
TFP8	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	103.5	2	0.85	1.88	2.22	0.91	1.96	0.84

感染防御系蛋白質の変動

Code	Protein ID Name (function)	Score	Peptide count	Expression ratio [LPS #]/control					
				3D	7D	14D	22D	36D	49D
UCRP	Interferon-induced 17 kDa protein D (up by antiviral activity during viral infections)	66.3	2	9.61	-	2.75	4.79	-	-
SAS	Sialic acid synthase (Acts as a negative regulator of the Toll-like and TLR receptor signaling pathways)	53.0	5	0.58	2.56	1.41	1.14	2.21	0.34
FYN	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn (Promotes cell survival by phosphorylating AGAP2/PKFA and preventing its apoptotic cleavage)	25.7	2	-	2.17	-	-	-	-
BAT3	Large proline-rich protein BAT3 (Plays a key role in various processes such as apoptosis)	64.9	2	0.60	1.34	1.25	3.18	1.74	0.67
UBE2H	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 H (May mediate cell formation by the suppression of apoptosis)	31.9	2	0.52	1.25	-	3.09	-	-

細胞サイクル関連蛋白質の変動

Code	Protein ID Name (function)	Score	Peptide count	Expression ratio [LPS #]/control					
				3D	7D	14D	22D	36D	49D
FHL2	Four and a half LIM domains protein 2 (Negatively regulates the transcriptional repressor E4F1 and may function in cell growth)	43.2	3	5.21	0.77	0.63	1.02	0.50	0.79
SODM	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial (Specifically promotes splicing of many cell-cycle and DNA-repair transcripts)	243.8	8	2.76	7.74	5.38	12.19	7.56	3.43
FBL1	Fibronectin-like protein 1 (Regulate osteoblast proliferation and differentiation)	24.0	2	-	-	7.44	-	0.51	-
M3K15	Mitogen-activated protein kinase kinase 15 (Leads to apoptosis)	25.5	2	0.35	1.03	0.64	∞	-	-
ERF3A	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A (Regulator of mammalian cell growth)	95.3	4	0.56	1.04	1.00	6.67	0.48	0.33
NEDD8	NEDD8 (Plays an important role in cell cycle control)	104.7	2	0.08	1.43	4.07	1.08	5.79	0.08
LAP4	Protein LAP4 (function in cell proliferation regulating progression from G1 to S phase and as a positive regulator of apoptosis)	32.9	2	-	0.08	0.65	0.40	13.42	0.00
TES	Testin (Plays a role in the regulation of cell proliferation)	86.8	4	0.29	2.64	0.50	1.68	0.37	0.56
GRDN	Girdin (Regulates DNA replication and cell proliferation)	38.3	2	0.32	3.62	0.42	1.58	1.26	1.94
FYN	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn (Promotes cell survival by phosphorylating AGAP2/PKFA and preventing its apoptotic cleavage)	25.7	2	-	2.17	-	-	-	-
UBP7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7 (Involved in cell proliferation)	50.0	3	0.73	1.20	1.03	2.66	1.16	0.79
HAP28	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein (Enhances PDGFA-stimulated cell growth)	48.0	2	0.29	1.37	0.53	4.69	0.34	0.26
REEP5	Receptor expression-enhancing protein 5 (Stress protein involved in the control of bacterial proliferation)	50.9	2	0.10	0.96	1.67	3.38	0.71	0.14
AN32A	Acid leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A (Involved in cell proliferation, differentiation, and apoptosis)	125.0	5	0.78	1.47	1.02	3.36	0.62	0.71
ERF3B	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3B (Plays a role in cell cycle progression)	95.3	3	0.76	1.04	1.23	4.11	0.76	0.33
2ABD	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B delta isoform (Plays a key role in cell cycle)	69.5	2	0.33	0.99	1.65	0.51	2.14	0.43
AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (Mediates the antiapoptotic effects of BFL-1)	71.4	3	0.67	1.00	1.06	0.43	3.78	0.70
SFRS2	Splicing factor, arginine/serine-rich 2 (Involved in RNA processing in relation with cell proliferation)	61.8	3	0.50	1.17	0.59	1.06	0.47	2.32

- 細胞ペレットに細胞溶解液を添加
- Cold MeOH 精製
- 細胞溶解液に再溶解
- 還元、アルキル化、トリプシン消化
- 脱塩
- LC-MS/MS ショットガン解析
- Mascot/Sprot/i-RUBY 検索

ヒト間葉系幹細胞増殖促進作用のメカニズム②

細胞内SOD測定

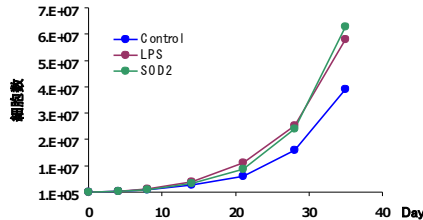
- (1) 細胞 6×10^5 個
- (2) PBS 洗浄後、ペレット化
- (3) M-PER 細胞溶解液に溶解
- (4) Human SOD1, 2 ELISA kit

Day	Control		LPS (+)	
	SOD1	SOD2	SOD1	SOD2
5	6.55	1.48	6.28	15.93
12	5.98	1.04	4.19	13.98
19	7.11	1.60	6.37	13.18
26	7.34	1.49	6.01	10.60

LPS添加→SOD2発現上昇

細胞培養

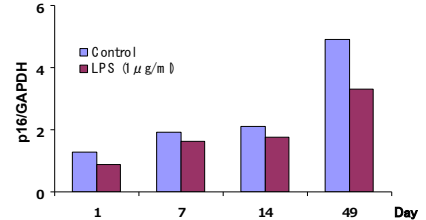
細胞:ヒト骨髓由来間葉系幹細胞(21Y)
 培地:MSCGM 培地
 播種: 1.5×10^5 個
 容器: 25 cm² フラスコ
 培養: 1, 7, 14, 29, 43, 49 日間
 LPS : 1 μ g/mL (+/-)
 SOD2: 90 μ g/フラスコ (+/-)



増殖能: Control < LPS = SOD2 添加群

RT-PCR測定

対象遺伝子: p16
 Forward: 5' - CACTCAGCCCTAAGC -3'
 Reverse: 5' - GCAGTGTGACTCAAGAGAA -3'
 測定装置: Roche Light Cycler



LPS添加→p16発現低下(老化抑制)

エンドキシンが示すhMSC等の増殖促進作用はエンドキシン刺激に対するストレス応答機構に由来する反応であり、少なくとも細胞内におけるSOD2の発現上昇及びアポトーシス抑制が密接に関与していることが示唆された。

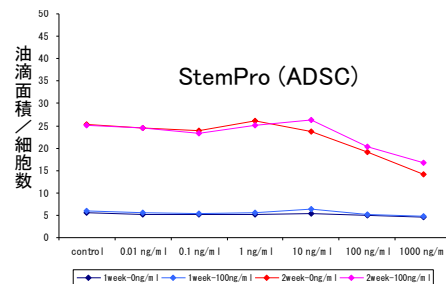
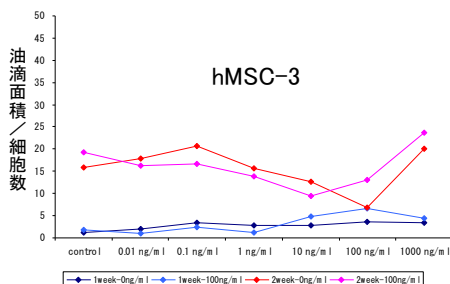
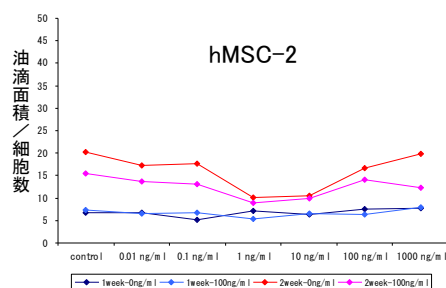
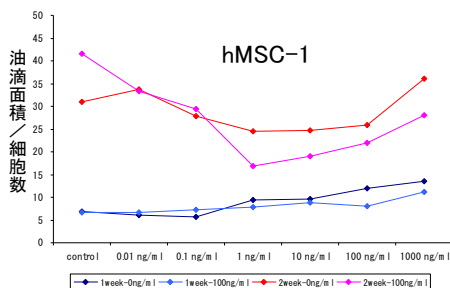
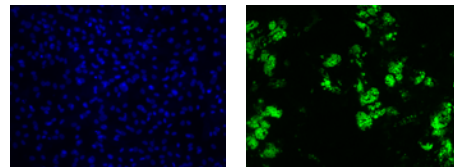
Wang ZJ, et al., Lipopolysaccharides can protect mesenchymal stem cells (MSCs) from oxidative stress-induced apoptosis and enhance proliferation of MSCs via Toll-like receptor(TLR)-4 and PI3K/Akt. Cell Biol Int, 33: 665-74 (2009).

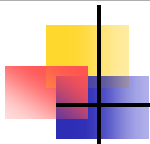
ヒト間葉系幹細胞の脂肪細胞分化に対する影響

骨髓由来間葉系幹細胞:
 hMSC-1 #7F3914 21 years.M/B
 hMSC-2 #7F3458 36 years.M/B
 hMSC-3 #7F3753 43 years.M/C
 増殖用培地: プレットキットMSCGM
 脂肪細胞分化用培地: プレットキット脂肪細胞分化用培地

脂肪組織由来幹細胞: StemPro Human, Invitrogen
 増殖用培地: MesenPRO RS medium kit
 脂肪細胞分化用培地: StemPro A1007001 Kit

核 Hoechst 33258
 油滴 BODIPY





小括① エンドキシンの細胞影響

ヒト間葉系幹細胞の増殖能に対する影響:NOAEL 0.01 ng/mL

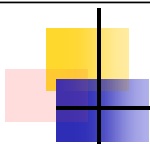
- ・細胞内SOD2の発現上昇が関与する
 - ・エンドキシンの増殖促進作用は細胞株により異なる
- | | |
|----------------------------------|----------------------------|
| hMSC-1 (21 years.M/B) 1 ng/mL以上 | hMSC-3 (43 years.M/C) 影響なし |
| hMSC-2 (36 years.M/B) 10 ng/mL以上 | StemPro Human 0.1 ng/mL以上 |

ヒト間葉系幹細胞の骨分化に対する影響:NOAEL 0.01 ng/mL

- ・エンドキシン刺激により、骨分化に関与する多くの経路が活性化される
 - ・エンドキシンの骨分化促進作用は細胞株により異なる
- | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| hMSC-1 (21 years.M/B) 0.1 ng/mL以上 | hMSC-3 (43 years.M/C) 100 ng/mL |
| hMSC-2 (36 years.M/B) 1 ng/mL以上 | StemPro Human 1000 ng/mL以上 |

ヒト間葉系幹細胞の脂肪細胞分化に対する影響

細胞株の種類を問わず、大きな影響はないと思われる。



In vivo エンドキシン規格値の設定

Point

エンドキシンの活性発現強度は適用部位毎に異なる。また、生体吸収性材料の場合、製品に混入しているエンドキシンが短時間に全量遊離されることはない。

製品・材料側要因

適用部位, 生分解速度

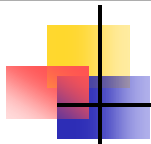
感染因子側要因

種類, 含量, 遊離速度,
生体内寿命等

菌体成分含有材料埋植試験における生体反応に対するエンドキシンの影響を評価



- (1) エンドキシン規格値を設定する必要性の判断
- (2) 要設定の場合、製品の用途に応じた規格値を設定



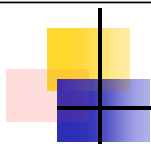
材料・方法

基 材	日本ハム製ブタ皮膚由来アテロコラーゲン
菌 体 成 分	(1)大腸菌 O3:K2a2b:H3 ATCC23501 株由来 エンドトキシン [1 ng=27.4 EU] (2)大腸菌 O111 株乾燥死菌体 [1 ng = 0.159 EU] (3)黄色ブドウ球菌 209P 株乾燥死菌体 [1 mg = 0.48 EU]
調製方法	直径 1.5 cm、厚さ 2 mm のディスク状スポンジを 作製し、過酢酸蒸気滅菌した。
使用動物	Fisher 系雄ラット (7 週齢)
症 例 数	各群 4-10 匹、期間 1-4 週
創傷被覆	背部 4 箇所 に 1 cm 角の大きさで真皮層に 至る深度まで皮膚を切除し、消毒後、コラー ゲンシートを被覆した。
大腿骨埋植	大腿骨を視認し、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。
頭蓋骨埋植	頭部正中を 3 cm 切開して骨膜を純的に剥離 した後、歯科用エンジンを用いて頭頂骨の両 側に 5×5 mm の骨欠損を作製し、窩洞部分 にコラーゲンシートを被覆し、皮膚縫合した。
腹腔内埋植	上腹部を 2.5 cm 切開し、肝臓表面にコラー ゲンシートを被覆した後、腹直筋および皮膚 を縫合した。
皮下埋植	背部正中を 3 cm 切開し、筋膜を純的に剥離 して空隙を作製し、左右各 1 箇所 にコラー ゲンシートを挿入後、皮膚縫合した。
病理観察	(1)HE 染色 (2)軟X線解析 (アルミステップウェッジ法)

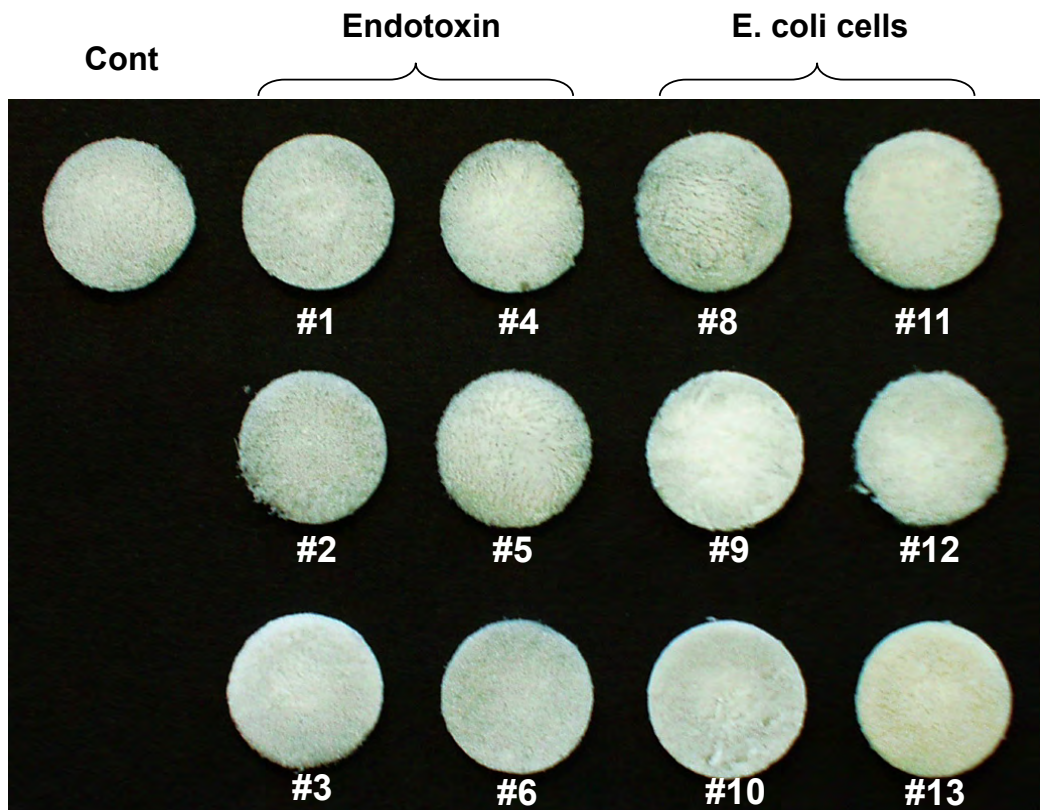
埋植材料の種類とエンドトキシン活性

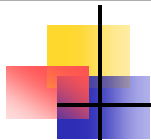
Bacterial component	Sheet No.	Amount spiked to collagen sheet		Measured value ¹⁾ (EU/mg)	Recovery (%)	Amount of IL-6 production (pg/mL) ²⁾
		ng/mg	EU/mg			
Control	—	—	—	0.13	—	12.0
Endotoxin ³⁾	1	0.039	1.07	1.03	96.5	550
	2	0.077	2.13	2.13	99.8	3211
	3	0.387	10.7	8.8	82.3	13640
	4	3.87	107	96.5	90.6	nt ⁶⁾
	5	38.7	1065	755	70.9	nt
	6	387	10650	9308	87.4	nt
	7	3873	106500	83283	78.2	nt
E. coli cell ⁴⁾	8	29.9	4.76	4.70	98.8	2245
	9	59.8	9.51	9.60	101	17370
	10	299	47.6	33.6	70.7	34660
	11	2991	476	434	91.2	nt
	12	8972	1427	1163	81.5	nt
	13	29906	4755	3101	65.2	nt
	14	299057	47550	35723	75.1	nt
S. aureus cell ⁵⁾	15	10	4.8 x 10 ⁻⁶	nt	—	12.2
	16	100	4.8 x 10 ⁻⁵	nt	—	16.6
	17	1000	4.8 x 10 ⁻⁴	nt	—	26.3
	18	10000	4.8 x 10 ⁻³	nt	—	81.0

¹⁾Measured by purified collagenase digestion-HCl extraction method. ²⁾IL-6 background: 4.8-7.5 pg/mL. ³⁾Purified endotoxin from E. coli O3:K2a:K2b:H3 ATCC strain. ⁴⁾Dried cell of heat-killed E. coli O111 strain. ⁵⁾Dried cell of heat-killed S. aureus 209P strain. ⁶⁾nt, not tested.



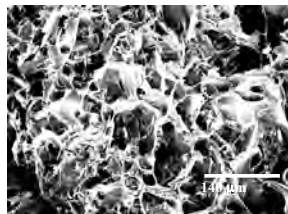
コラーゲンシートの外観



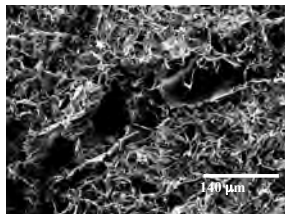


コラーゲンシートの形態

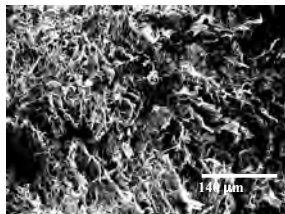
Control



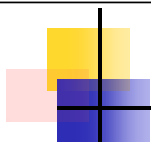
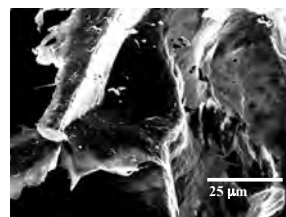
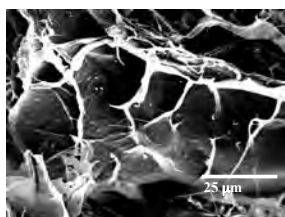
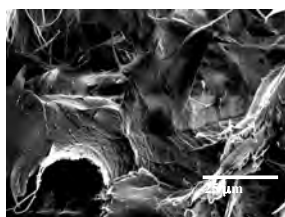
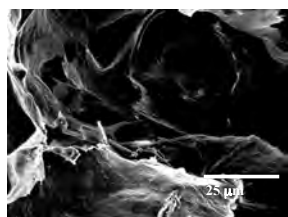
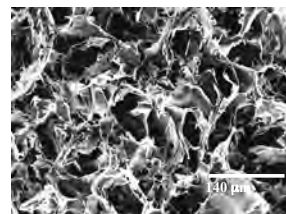
Endotoxin



E. coli cells

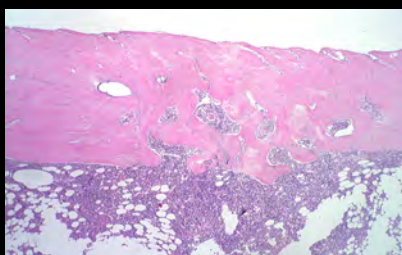


S. aureus cells



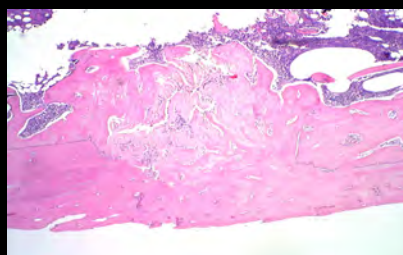
大腿骨埋植試験 (HE染色/術後4週)

良好な骨増生が認められる



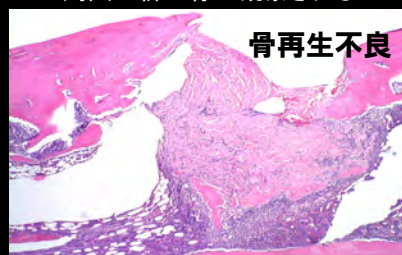
Control

良好な骨増生が認められる



9.6 EU/mg

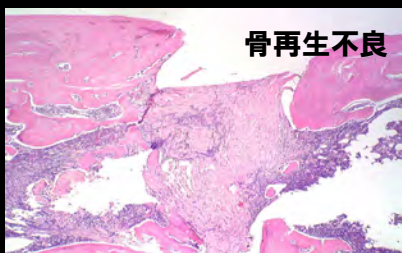
骨形成が認められず、コラーゲン
周囲に新生骨が観察される



骨再生不良

33.6 EU/mg

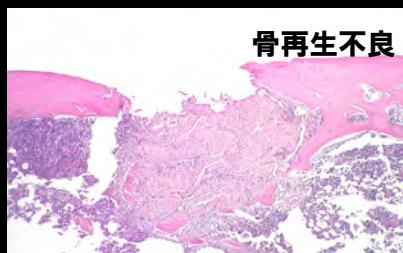
残存コラーゲンが多く、軽度の
リンパ球浸潤を認める



骨再生不良

433.8 EU/mg

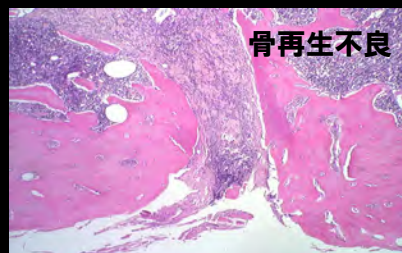
リンパ球浸潤の増加



骨再生不良

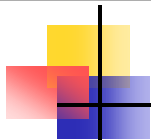
3100.9 EU/mg

リンパ球浸潤の増加



骨再生不良

35722.7 EU/mg



大腿骨埋植試験(軟X線解析)

対照群

実験群



埋植後1週目



埋植後4週目

4.7 EU/mg

9.6 EU/mg

33.6 EU/mg

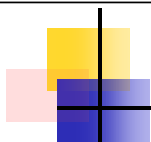
433.8 EU/mg

3100.9 EU/mg

35722.7 EU/mg



埋植後4週目

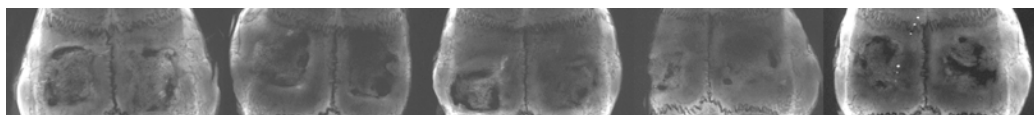


頭蓋骨埋植試験(軟X線解析)

(1)アルミステップウェッジと共に軟X線画像を撮影

(2)任意の領域を設定し、WinRoofにより骨濃度と骨総面積を計算

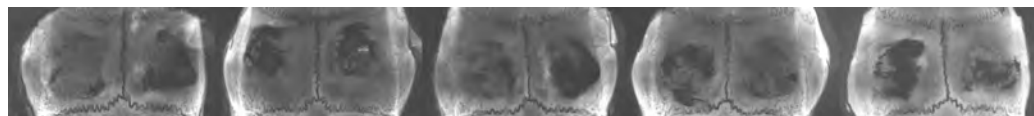
対照群



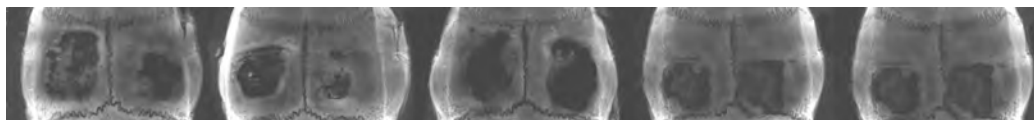
9.6 EU/mg

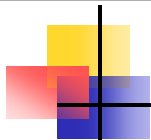


33.6 EU/mg



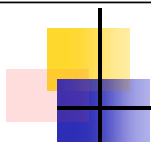
433.8 EU/mg





頭蓋骨埋植試験 (WinRoof 解析)

実験群	症例番号	骨濃度	骨総面積	実験群	症例番号	骨濃度	骨総面積
対照群	1	35	10717	33.6 EU/mg	1	20	2397
	2	34	6437		2	23	8819
	3	20	4573		3	21	2399
	4	21	7013		4	22	2028
	5	20	10059		5	20	200
	6	32	9247		6	23	5316
	7	21	1791		7	21	3181
	8	26	7804		8	25	7419
	9	37	3305		9	21	3695
	10	40	7788		10	23	1486
	平均値	28.6	6873.4		平均値	21.9	3694.0
	SD	7.8	2912.1		SD	1.6	2713.2
t-value	-	-	t-value	2.6500	2.5260		
危険率	-	-	危険率	0.0243	0.0211		
9.5 EU/mg	1	31	689	433.8 EU/mg	1	22	214
	2	37	8494		2	21	3852
	3	19	7544		3	29	6259
	4	22	4640		4	23	434
	5	21	9127		5	22	112
	6	24	10516		6	21	14
	7	20	7037		7	22	270
	8	19	7710		8	22	34
	9	35	10338		9	20	5441
	10	33	3814		10	18	3304
	平均値	26.1	6990.9		平均値	22.0	1993.4
	SD	7.1	3102.2		SD	2.8	2474.7
t-value	0.7473	0.0873	t-value	2.5057	4.0381		
危険率	0.4645	0.9314	危険率	0.0292	0.0008		



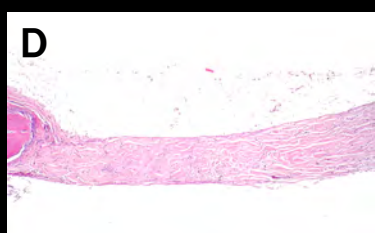
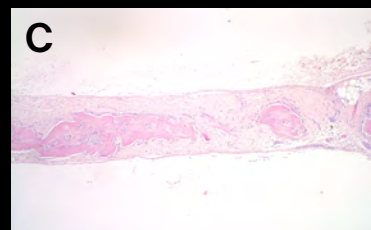
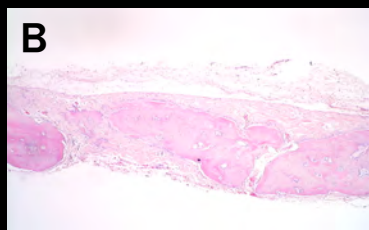
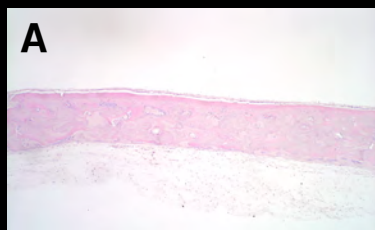
頭蓋骨埋植試験 (HE染色/術後4週)

A: 骨組織形成が良好な症例

B: 骨組織の一部に連続性が認められない症例

C: 骨形成量が少なく、連続性がない症例

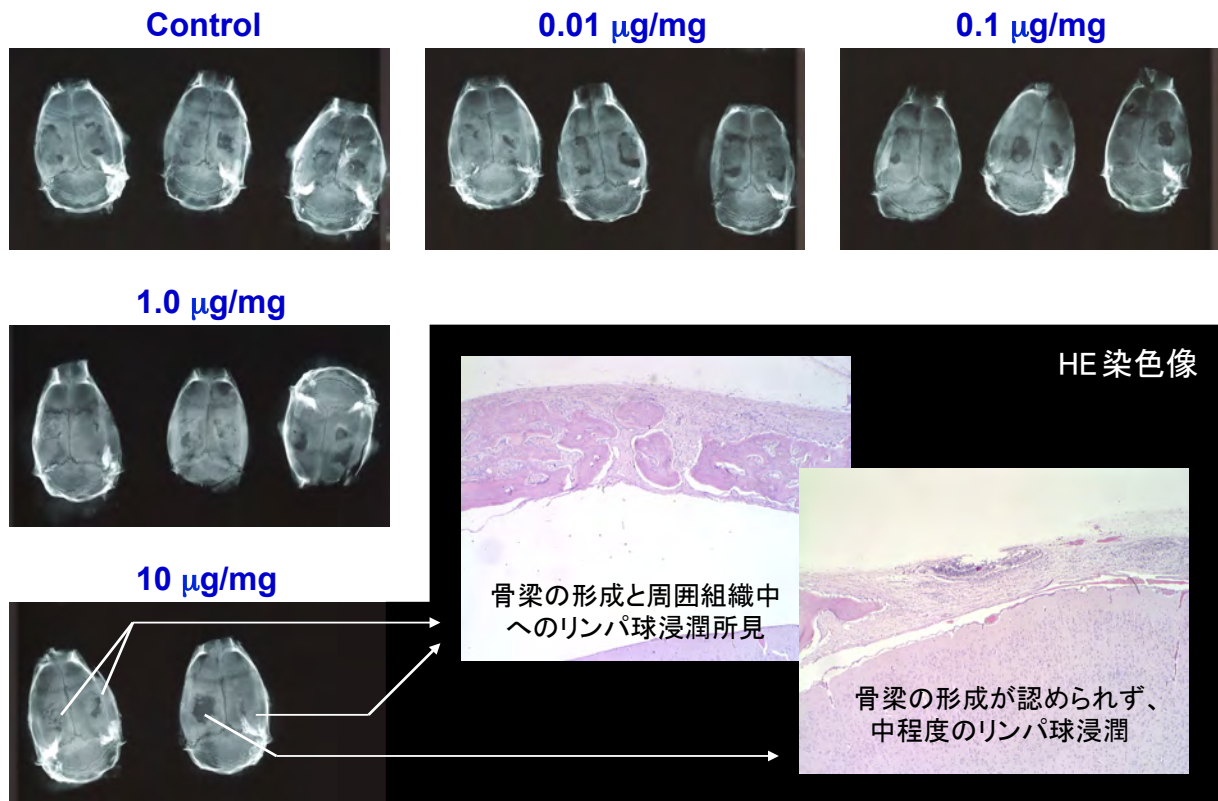
D: 骨形成が認められない症例



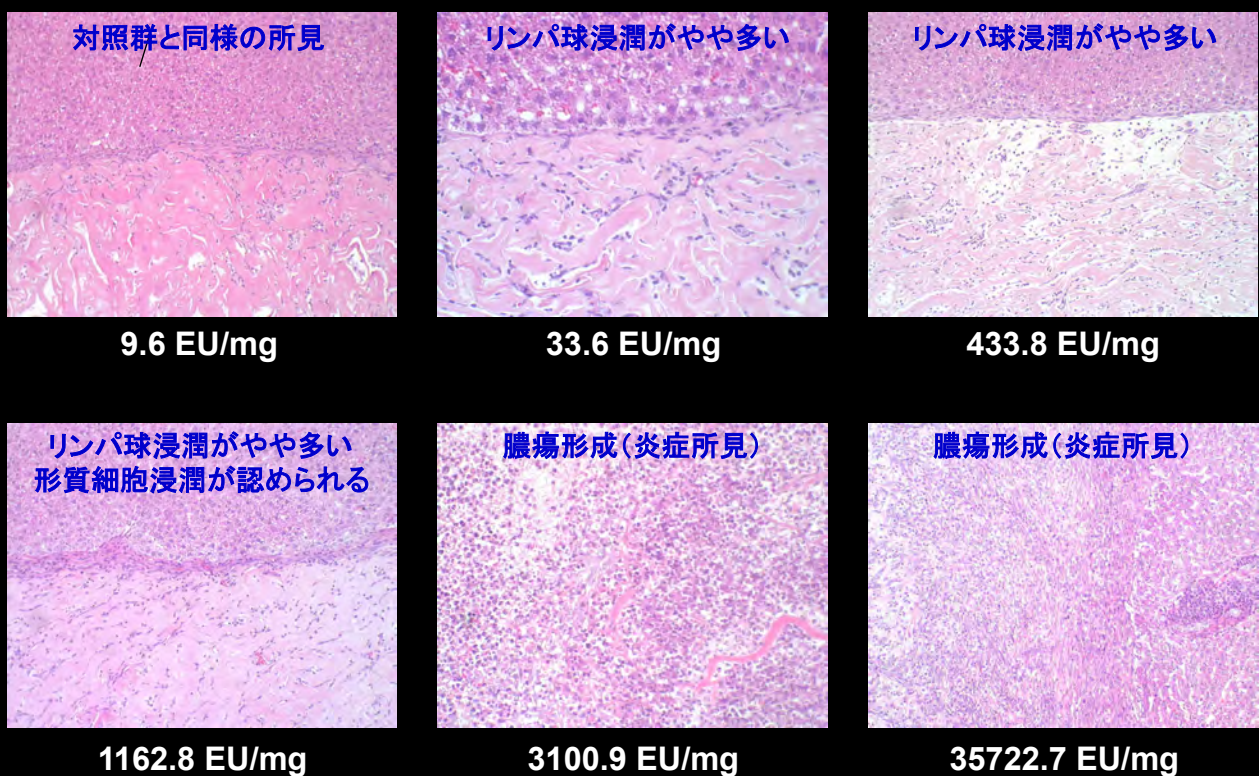
各埋植群における病理症例数

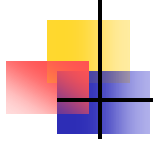
症例	埋植材料			
	対照群	9.6 EU/mg	33.6 EU/mg	433.8 EU/mg
A	8	4	1	0
B	2	2	1	3
C	0	4	7	4
D	0	0	1	3

頭蓋骨埋植試験 (209P/術後4週)

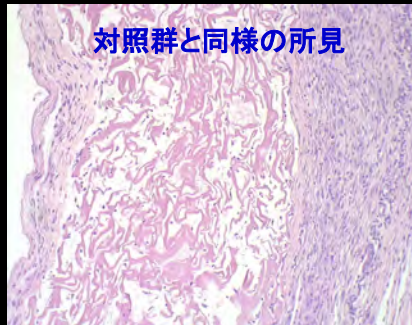


腹腔内埋植試験 (HE 染色/術後1週)

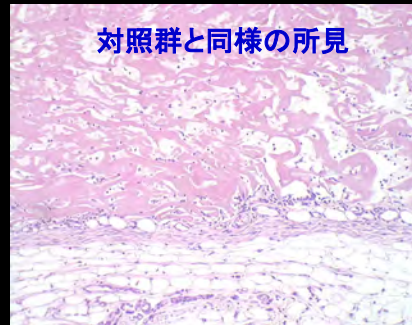




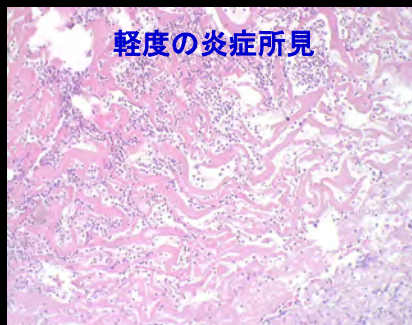
腹腔内埋植試験 (209P/HE染色/術後1週)



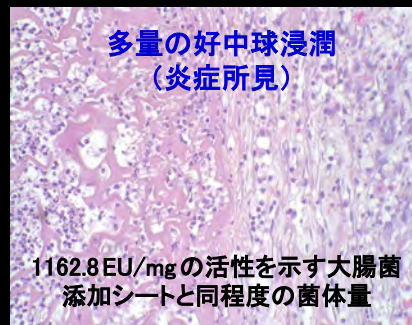
0.01 µg/mg



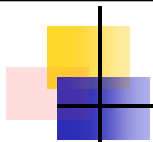
0.1 µg/mg



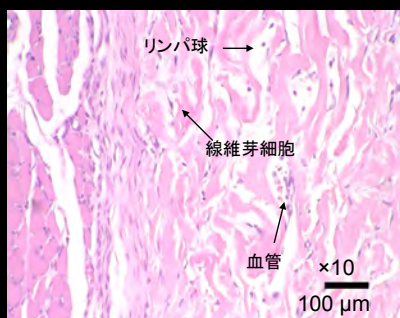
1.0 µg/mg



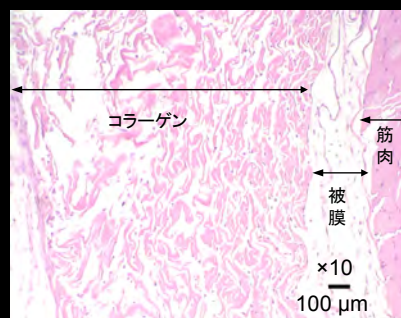
10 µg/mg



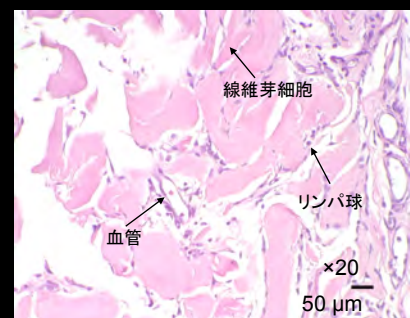
背部皮下埋植試験 (HE染色/術後1週)



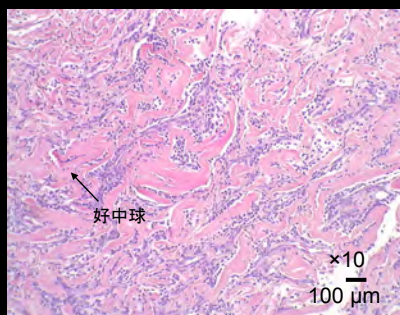
Control



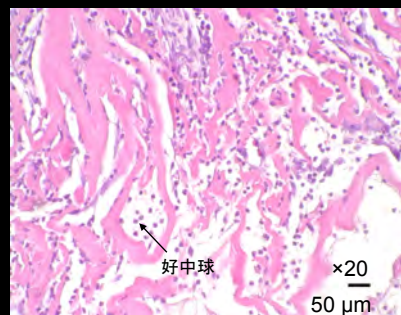
33.6 EU/mg



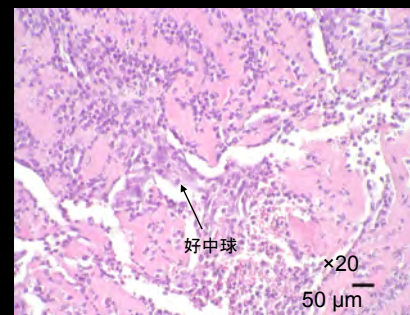
433.8 EU/mg



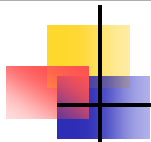
1,162.8 EU/mg



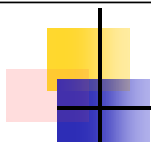
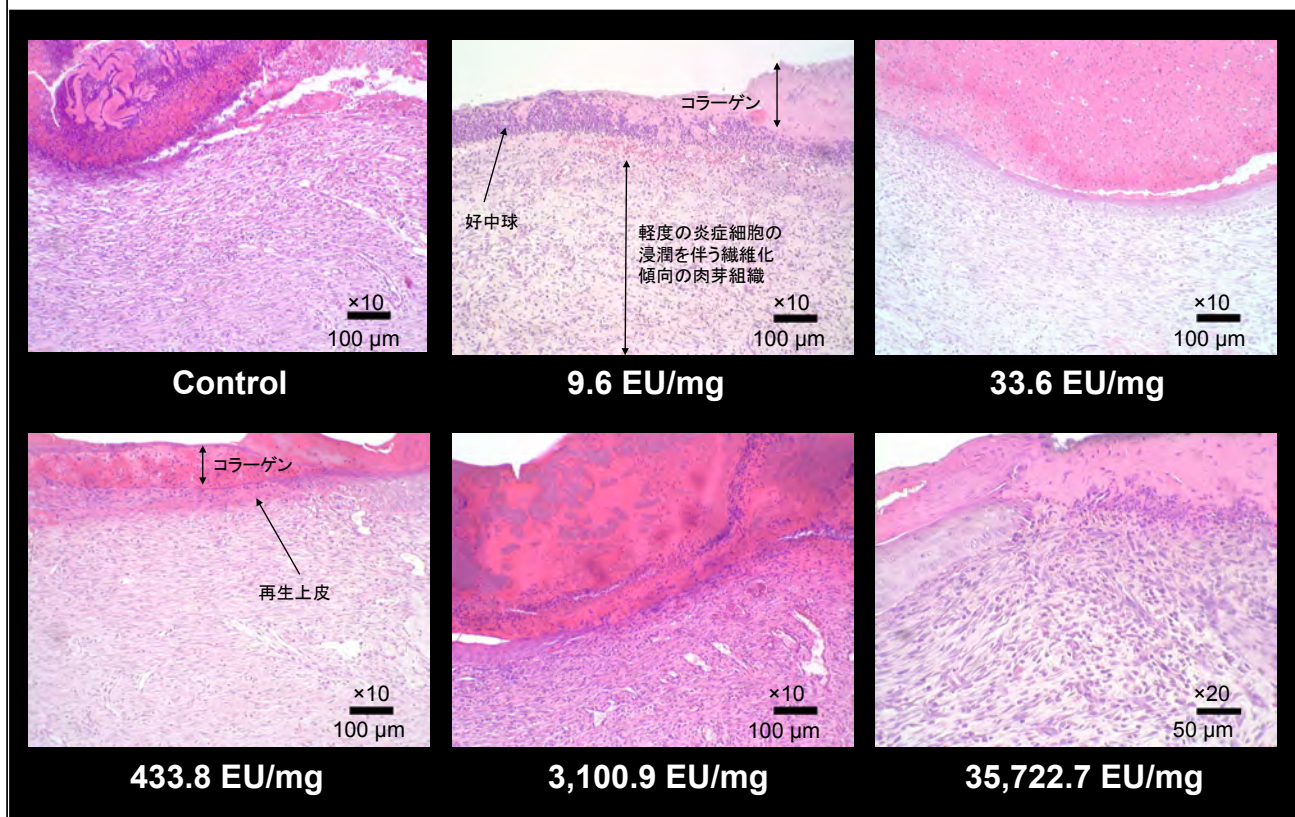
3,100.9 EU/mg



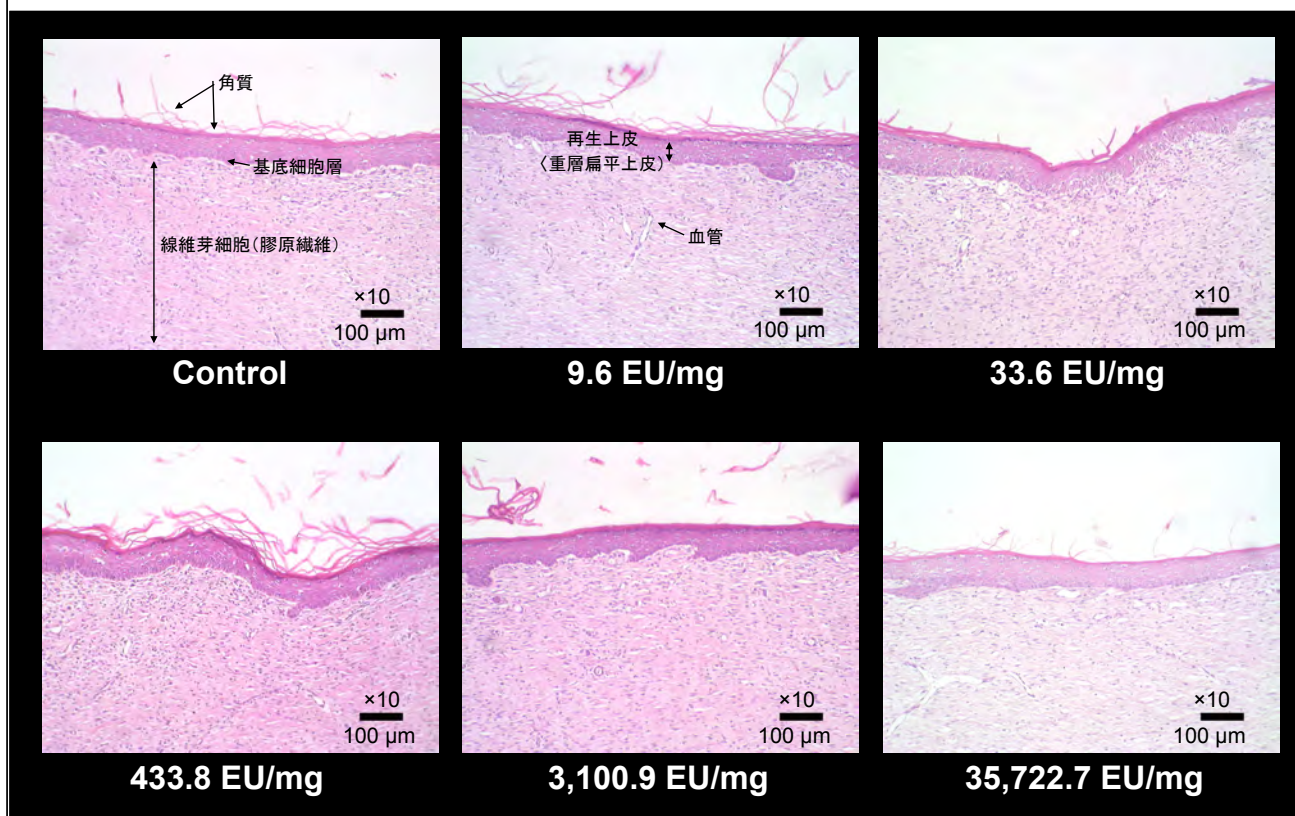
35,722.7 EU/mg



創傷被覆試験 (HE染色/術後1週)



創傷被覆試験 (HE染色/術後2週)



小括② In vivo エンドトキシン規格値

骨再生に対する影響:NOAEL 9.6 EU/mg

扁平骨である頭蓋骨再生と実骨である大腿骨再生ともに、同用量の菌体成分によって、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。

背部皮下及び腹腔内埋植時の影響:NOAEL 433.8 EU/mg

1162.8 から 3100.9 EU/mg のエンドトキシン活性を示すコラーゲンを埋植した時に炎症所見が観察されることから、皮下及び腹腔適用材料には、エンドトキシン規格値を設定する必要がある。

創傷被覆時の影響

創傷治癒に対する影響は観察されなかったことから、皮膚に適用する被覆材には、エンドトキシン規格値を設定する必要がないと思われる。

グラム陽性菌の生体影響

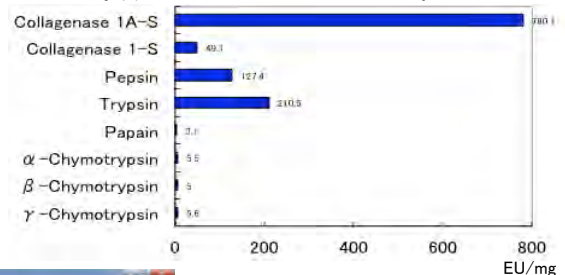
ラット背部皮下における炎症誘導能は大腸菌乾燥菌体と同程度であったが、骨再生に対しては顕著な影響が観察されなかった。

試薬・器具類のエンドトキシン汚染

ウシ胎児血清 Lot チェック

番号	製法元	販売元	ロット	エンドトキシン含量 EU/mL
#1	Hyclone	フナコシ	AXJ47554	N.D.
#2	Hyclone	フナコシ	AXE40802	N.D.
#3	SIGMA	ニチレイ	S.12H183	N.D.
#4	SIGMA	ニチレイ	S.12E183-A	8.588
#5	SAFC Biosciences	ニチレイ	S10J104	N.D.
#6	GIBCO	GIBCO	1256009	N.D.
#7	GIBCO	GIBCO	1221542	N.D.

市販プロテアーゼのエンドトキシン含量



ウェル/チップのエンドトキシン汚染



「エンドトキシンフリー」の表示の有無に拘わらず、まずはエンドトキシン汚染を疑い、使用する試薬・器具類を事前に評価！

エンドキシン試験を行う際の留意点(回収率)

金属, セラミック, プラスチック, 天然医用材料

(1) 乾燥に伴い、回収率が低下する。

(2) 水では効率良く回収できない。

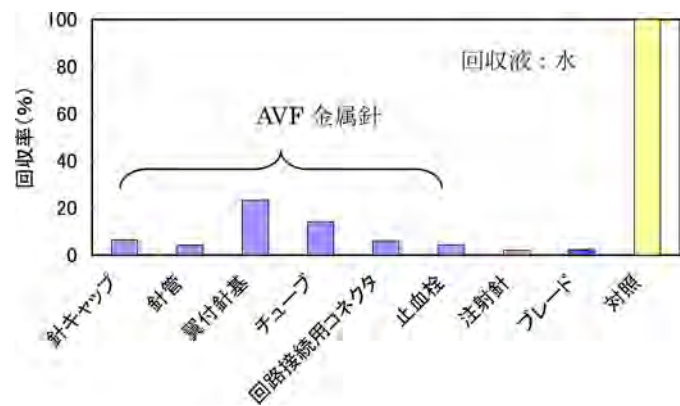
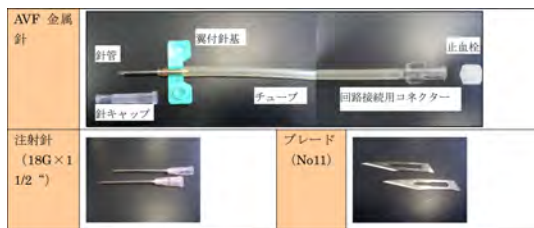
・プラスチック ⇒ PEG抽出

・金属, セラミック ⇒ EDTA抽出

・コラーゲン ⇒ コラゲナーゼ/塩酸抽出

・キチン, キトサン ⇒ 塩酸抽出

エンドキシン試験による添加回収試験



まとめ

ヒト間葉系幹細胞の増殖能と骨分化能

- ・0.1ng(1EU)/mL以上のエンドキシンにより増強される
- ・遺伝子レベルでは、より低用量で変化している可能性が高い
- ・細胞の安全性・同等性を考慮した場合のエンドキシン規格値は？

研究開発・製造工程における留意点

- ・プロセスバリデーションが重要
- ・試薬・器具類の「エンドキシンフリー」表示を一概に信用しない
- ・最終製品、製造工程のエンドキシン試験結果の解釈は要注意

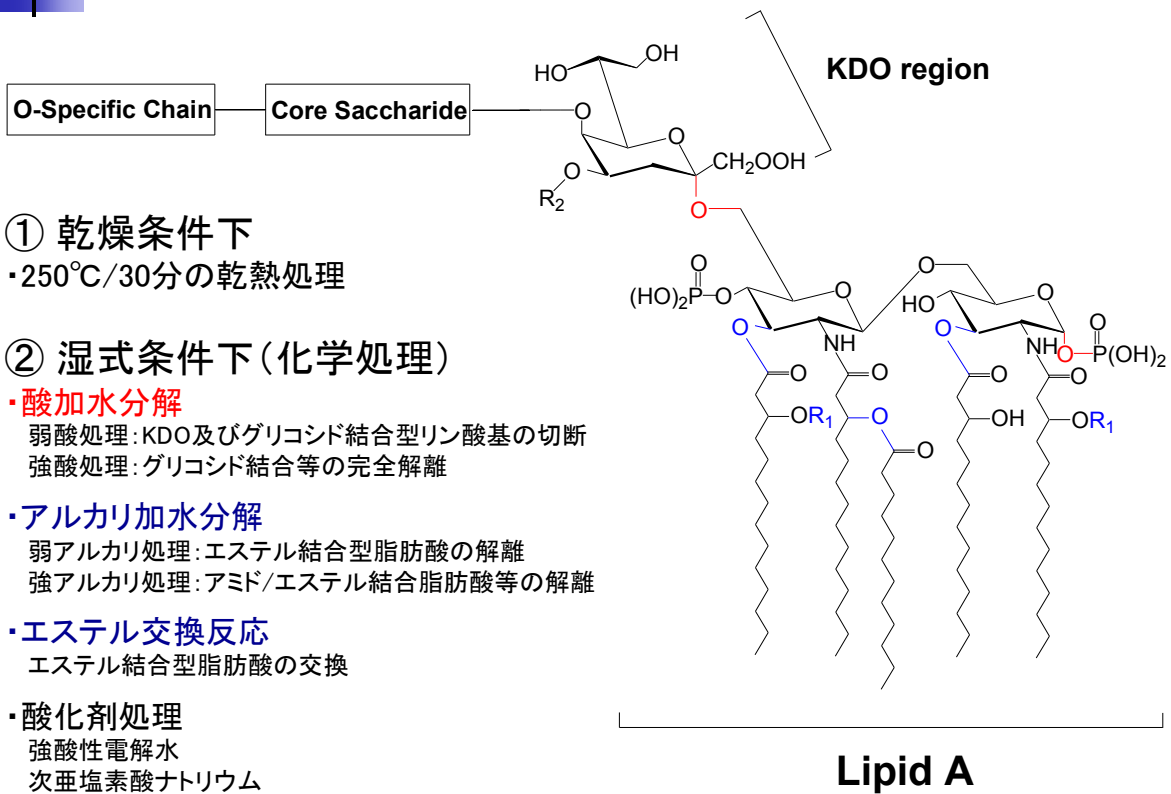
関連論文

in vitro 増殖能: Nomura Y. et al., Regenerative Therapy, 7:45-51 (2017).

in vitro 分化能: Nomura Y. et al., Regenerative Therapy, 8:46-57 (2018).

in vivo 骨分化: Haishima Y. et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 105:1514-1524 (2017).

参考情報(エンドキシンの不活化技術)

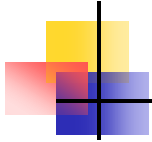


既存低温滅菌法によるエンドキシン不活化効率

方式	ガンマ線	電子線	EOG	高压蒸気	過酸化水素低温ガスプラズマ	過酸化水素/過酢酸低温ガスプラズマ
処理法	185TBq Co ⁶⁰	加速電圧4.8 MeV, ビーム電流20mA, 搬送速度11m/min	濃度600mg/L, 温度54℃, 湿度60%RH	温度121℃飽和水蒸気処理, 蒸気投入時間6秒間, 排気時間10-12秒間	濃度6mg/L, 温度24℃, 湿度60%RH, 時間75分, 3サイクル	温度33℃, 拡散時間20分, プラズマ時間10分, 12サイクル
結果	20kGyの照射で93%不活化	19kGyの照射で72%不活化	30分の暴露時間で76%不活化。120分まで暴露しても活性減少に変化なし。	2分間の処理で89%不活化。処理時間を増やしても活性減少に変化なし。	1サイクルで74%不活化。サイクル数を増やしても活性減少に変化なし。	6サイクルで95%不活化。サイクル数を増やしても活性減少に変化なし。
	93%	72%	76%	89%	74%	95%

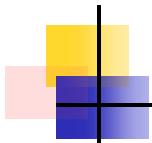
出典: 東京都立産業技術研究所研究報告 第2号: 126-129 (1999)

非耐熱性製品を被験物とした滅菌法のエンドキシン不活化効力は
 いずれも2桁減少に達しない



オゾン/過酸化水素混合ガス滅菌器の開発

Confidential 当日公開



終わりに

ご静聴ありがとうございました

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
Medical
Devices

薮島 由二
haishima@nihs.go.jp