

厚生科学研究費補助金

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

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 土屋 利江

平成 14(2002)年 4 月

目次

I.	総括研究報告	
	医療用具の有効性・安全性評価手法の開発に関する研究	1
	土屋 利江	
II.	分担研究報告	
1.	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	73
	配島由二	
2.	新規材料の免疫原性評価手法の開発に関する研究	113
	五十嵐良明	
3.	発癌リスク評価手法開発	131
	松岡厚子	
4.	4,4'-ジアミノジフェニルメタン添加ポリウレタンならびに ポリ乳酸化粒子の癌原性評価に関する研究	134
	井上博之	
5.	セラミックス関節摩耗試験法開発	136
	池内健	
6.	非破壊・耐久性試験法の開発	141
	高久田和夫	
7.	人工関節の力学的, 組織学的研究	143
	馬淵清資	
8.	整形外科インプラントの不具合データに関する研究	148
	佐藤道夫	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	162
IV.	研究成果の刊行物・別刷り	

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
平成 13 年度総括研究報告書

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 国立医薬品食品衛生研究所 療品部長

研究要旨 創傷被覆材、カテーテル等医療機器に用いられている原材料について、添加剤を含め、発ガン性、免疫原性、エンドトキシンの検出方法など、材料の適用方法、特性を踏まえた適切な評価方法の開発と材料開発のスピードに取り残されない迅速かつ感度の良好な評価方法の確立が求められている。また、整形インプラントでは、磨耗、腐食、破損など性能の劣化が進行するが、これらを長期的に推測する手法は未だ十分確立しているとはいえない。

本研究では、評価試験法の開発と共に、既存の材料における実際の臨床上の安全性との関係についても検討を実施し、臨床との相関性をもった試験方法、ガイドラインを開発する。下記の如く初年度の成果を得た。

- 1) エンドトキシンを失活させない抽出溶媒、抽出条件について検討し、エンドトキシン回収法を開発した。更に、天然由来材料中のエンドトキシンを酸性電解水で不活化する方法を開発した。
- 2) 医療材料の免疫原性評価手法を検討するために、材料からの試験溶液の調製法を検討した。更に、マウスに対する試験溶液の投与方法（経路、部位、期間）と、有用な測定指標について検討した。
- 3) 新規材料および変異原性物質含有材料の *in vivo* 発癌実験のための材料調製を行なった。
- 4) 4,4'-ジアミノフェニルメタン添加ポリウレタンならびにポリ乳酸粒子の *in vivo* 癌原性試験を開始した。
- 5) ピンオンディスク、ボールオンディスク及び端面型の磨耗試験機でセラミックスとポリエチレンの磨耗試験を行い磨耗量を比較した。
- 6) 獣医用の整形外科インプラントについて、獣医師を対象に聞き取り調査を実施し、不具合の発生状況について調べた。破損事故が最も多く、しかも人畜共通に使用されるプレートおよびスクリューを選択した。粗悪とされる製品、およびヒト用として認可されている製品を選び、インスロンおよび MTS 試験機を用いて力学試験を実施した。
- 7) 人工関節の固定部分のデザインや理念を評価する実験的な方法を構築

するために、感圧試験紙をセンサに用いた予備実験を行った。装置全体を、金属フレームによって構成し、市販の人工関節の固定部分表面に感圧試験紙を添付して、静止荷重 50kgf のもとでの接触応力の分布を測定した。

- 8) 整形外科インプラントの市販後の不具合データ収集を目的として国内外の文献調査を行った。初年度は国内の最近の股・膝関節の事例に絞ってデータ収集を行うと伴に、米国の整形外科分野不具合情報データについて種々の検索が可能ないように加工し、検索プログラムを作成した。

分担研究者

土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 部長

配島 由二 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 室長

五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 主任研究官

松岡 厚子 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 主任研究官

井上 博之 (財)食品農医薬品安全性評価センター 部長

池内 健 京都大学再生医科学研究 研究所 教授

高久田和夫 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 助教授

馬淵 清資 北里大学医療衛生学部 教授

佐藤 道夫 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 室長

A. 研究目的

本研究は、医療用具の有効性・安全性を評価するために、現行の厚生労働省ガイドラインには、記載されていない新しい手法の開発を行うことを、第一の目的とする。すなわち、新しいタイプの材料(天然由来材料を含む)について評価可能な方法および臨床実態に近い評価手法を開発する。

第二の目的は、整形インプラント製品の力学的試験の厚生労働省ガイドラインを作成することである。具体的には、セラミックス製の股・膝関節の安全性と耐久性を予測できる信頼性の高い磨耗試験方法の開発、整形インプラントの非破壊検査法・耐久性試験方法の確立、人工関節固定部の形状設計コンセプトについての評価理論の確立である。

整形インプラントの破損例は、プレート、スクリューが最も多く、固定材がそれについている。人工関節が市場に出荷される際に、本体の構造材料については、いくつか規定がある。しかし、形状や固定方法に関しては、評価する方法が整備されていないので、固定部分の緩みが人工関節の重要な合

併症であるにもかかわらず、ガイドラインがない。この点について検討し、固定法を評価する方法と装置を開発する。

第三の目的は、整形インプラント分野で、同一事故発生防止に有用な情報提供・利用システムを開発することである。

B. 研究方法

1) 天然由来材料中のエンドトキシン回収・不活化法に関する研究

(1) 菌体および LPS の調製

大腸菌 O111 株の加熱死菌体を集菌し、蒸留水で洗浄後、アセトン乾燥菌体とした。大腸菌 O3 K2a,K2b:H3 ATCC 株由来 LPS は、同様の方法により調製したアセトン乾燥菌体からフェノール／水法により抽出し、DNase および RNase 処理後、超遠心分離により精製した。

(2) 隔膜式電気分解法による酸性電解除菌水の生成

図 1 に示したように、酸性電解除菌水は隔膜を介して食塩水を電気分解することにより調製した。アノード側では酸性の HClO 溶液が生成される。一方、カソード側には、強アルカリ性の NaOH 溶液が生成される。

アノード側の強酸性水には除菌力が高い HClO が含まれ、カソード側の強アルカリ水を混合することにより、有効塩素濃度 1,000 ppm 前後の強酸性 (pH 2) および弱酸性 (pH 6) 電解除菌水を調製した。

(3) リムルス活性の測定

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。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) 微量 LPS の熱安定性評価

試験溶媒として、注射用蒸留水、滅菌生理食塩水、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1M リン酸二水素カリウム／ホウ砂緩衝液 (pH 7.0)、0.1M リン酸二水素カリウム／水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、0.1M トリメチルピリジン／塩酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1M トリス塩酸緩衝液、ヒト血清アルブミン溶液、PEG (0.004% ポリエチレングリコール／0.5 mM EDTA／0.01% Tween 60) を使用した。各溶媒に LPS (10 EU/ml) または大腸菌 O111 菌体 (1 µg/ml) を溶解または懸濁させ、種々の温度でインキュベートした後、リムルス活性を測定した。

(5) コラーゲンからの LPS 回収に関する前処理条件

プロテアーゼとして、collagenase 1-S, collagenase 1A-s, pepsin, papain, trypsin, α-chymotrypsin, β-chymotrypsin, γ-chymotrypsin を使用した。Collagenase 活性は I 型コラゲナーゼ活性測定キットにより測定した。パパインの酵素活性は、酵素分解によって、N-α-ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリンから生成する p-ニトロアニリンの量を吸光度として測定した。その他の各種プロテアーゼ活性はヘモグロビンを

基質として測定した。プロテアーゼの不活化剤として、中性ホルマリンとフェノールを使用し、また、40℃での単純インキュベートによる酵素活性変化も追跡した。LPS 活性の変化はリムルス試験により測定した。

(6) 化学処理による LPS の不活化実験

化学薬品として、弱酸性および強酸性電解除菌水、塩酸、水酸化ナトリウム、過酸化水素、次亜塩素酸ナトリウムを使用した。種々の濃度の各薬品に LPS または大腸菌 O111 菌体を溶解または懸濁させ、室温でインキュベートした後、リムルス活性を測定した。

(7) LSI-mass spectrometry

リピド A の liquid secondary ion (LSI)-マススペクトルは、VG analytical 社製 ZAB-2SEQ を使用し、negative ion mode、加速電圧 8 kV、分解能 1,000 で測定した。マトリックスとしては、m-ニトロベンジルアルコール/トリエタノールアミン混液 (1:1, v/v) を使用した。

2) 新規材料からの免疫原性評価手法の開発に関する研究

(1) 遅延型アレルギーに関する研究

材料：2-Mercaptobenzothiazole (MBT) および zinc dibutyldithiocarbamate (ZDBC) を加硫促進剤とした厚さ 1mm のゴム材料〔Sample A (MBT 高含有)、Sample B (MBT 低含有)、Sample C (ZDBC 含有)〕を作製した (表 1)。

抽出法：植物油での抽出は、試料 60 cm² (片面) をオリーブ油 20 ml に浸漬し、37℃で 72 時間抽出した。有機溶媒による抽出は、試料 70 g に対しアセトнокロロホルム (1:1) 200 ml を加えて、室温下、30 分間振とうした。抽出は計 5 回行い、抽出液は溶媒留去して残留物を得た。

加硫促進剤の分析：抽出物および抽出液中の MBT については、それぞれジクロロメタンで希釈して、HPLC に注入して分析した。ZDBC については、抽出物をジクロロメタン 2 ml に溶解し、1 mol/l CoCl₂ 溶液 1 ml と 30 分間振とう後、有機溶媒層をメスフラスコに分取定容し、これを HPLC 分析した。

Guinea pig maximization test (GPMT)：アセトнокロロホルム抽出物は 5% の濃度で Hartley 系雌性モルモット (5 週齢) に皮内注射及び閉塞塗布を行って感作した。惹起は 0.001~5% で抽出物をワセリンに混和して閉塞塗布し、皮膚反応を観察した (表 2)。植物油抽出液については、希釈および濃縮することなく感作、惹起を行い、皮膚反応強度および感作率を求めた。

Local lymph node assay (LLNA)：BALB/c 系雌性マウス (6~8 週齢) (1 群 3 匹) の両耳に、抽出物をアセトнокロロホルム-オリーブ油 (4:1) (AOO) に溶解したものを 25 μl ずつ 3 日間連続塗布した。対照群は AOO のみを塗布した。最終塗布の翌日、耳介リンパ節を群ごとにまとめて重量を測定した後、

リンパ節細胞(LNC)数を求めた。LNC は 1×10^6 個ずつ ^3H -thymidine ($^3\text{HTdR}$) $0.5 \mu\text{Ci}$ と 18 時間培養し、取り込まれた $^3\text{HTdR}$ 量(dpm)を測定した。試験群ごとに各指標の対照群に対する比 stimulation index (SI)を求めた。

(2) 即時型アレルギーの検出に関する研究

投与方法： BALB/c 系雌性マウス(6~8 週齢)(1 群 5 匹)に、ovalbumin (OVA) $10 \mu\text{g}$ と Alum アジュバント (aluminum hydroxide hydrate $[\text{Al}(\text{OH})_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}]$ gel suspension) 2mg の PBS 混液 $200 \mu\text{l}$ を腹腔内注射し、1 週間後同様の操作を繰り返した。別の試験では、2% OVA-PBS 溶液 $250 \mu\text{l}$ を注射した。PBS または Alum だけを注射したものを対照とした。最終免疫投与から 7 日後、採血、脾臓を採取した。

IgE アッセイ：血清中の総 IgE 抗体価および OVA 特異的総 IgE 抗体価を ELISA 法により測定した。総 IgE 抗体価は標準溶液の検量線から絶対値を、OVA 特異的 IgE 抗体価は吸光度の比較をした。

リンパ球幼若化反応：脾臓リンパ球 5×10^5 個に各 mitogen (Con A $2 \mu\text{g/ml}$ 、LPS $1 \mu\text{g/ml}$ 及び PHA $10 \mu\text{g/ml}$)、抗原 OVA $100 \mu\text{g/ml}$ を添加して 72 時間培養した。培養終了 4 時間前に $^3\text{HTdR}$ $0.25 \mu\text{Ci}$ を添加して細胞内に取り込まれた $^3\text{HTdR}$ 量(dpm)を測定した。

サイトカインアッセイ：脾臓リン

パ球 5×10^6 個に Con A $2 \mu\text{g/ml}$ または OVA $100 \mu\text{g/ml}$ を添加して 24~72 時間培養した。培養上清を回収し、IFN- γ および IL-4 濃度を ELISA 法により定量した。

3) 発癌リスク評価手法開発

試料ペレットを乳鉢ですり潰して粉末状とした後、ふるいにかけて分級した。粒度分布測定は、島津レーザー回折式粒度分布測定装置 SALD-2100 を用いた。試料をターンテーブルを回転させながら、ターンテーブル上の溝に充填し、その後、試料導入用のバルブを開放して、測定部に試料を噴射し測定した。試料に吸湿性が認められたので、測定は、複数回行ない、凝集と推察される分布が認められたデータは除いた。

4) 4,4'-ジアミノジフェニルメタン添加ポリウレタンならびにポリ乳酸粒子の癌原性評価に関する研究

生後 4 週の Wistar[SPF]雄ラットを 220 匹購入し、14 日間馴化後 30 匹ずつ 6 群に分け、ポリウレタンフィルム、0.4%MDA 添加ポリウレタンフィルム、4%MDA 添加ポリウレタンフィルム、ポリ乳酸粒子低用量、および高用量群の 5 群について、フィルム ($1\text{cm} \times 2\text{cm} \times 0.1\text{cm}$) 状および粒子状材料 (ラット 1 匹に対して 0.4g (低用量) および 2g (高用量) 埋植) をそれぞれラット背部皮下に埋植した。

対照群には手術処置のみ行い、術後

の経過を見るとともに 2 年間の飼育観察を行う。その間に定期的に体重測定、腫瘍の触診を行う。また、観察期間終了時には血液学検査、血液生化学検査、病理組織学検査を実施する。高濃度 MDA 添加ならびに PLLA 粒子高用量埋植による発癌活性の変化を確認する。

(倫理面への配慮)ラットに対し埋植処置を行い、長期に飼育を行うため、動物実験倫理規定に配慮する。

5) セラミックス関節摩耗試験法開発

(1) 摩擦試験における潤滑剤の影響について

セラミックスの摩耗量に及ぼす潤滑材の影響を調べるために端面型摩耗試験機を用いて摩耗試験を行った。セラミックスの試料としてアルミナ、ジルコニア、窒化珪素、炭化珪素を用い、上部の円筒形試料と下部の円板形試料を同種材料で製作し、それらの端面同士を摺動させて摩耗量を測定した。溶液として蒸留水、1%アルブミン水溶液、1%ヒアルロン酸水溶液、30%牛血清水溶液を用いて摩擦係数と摩耗量を比較した。すべり速度は36mm/s、面圧は2MPaであった。実験中には水温を37℃に保った。摩耗試験後の重量減から比摩耗量を計算した。

(2) 摩耗に及ぼすすべり方向変化の影響

摩耗に及ぼす、すべり方向の影響を調べるために2種類の摩擦試験機を

製作した。ひとつは通常のピンオンディスク摩擦試験機で、下部の円板が水槽とともに回転し、上部のアームに取り付けられたピンとの間ですべり運動を生じる。他の試験機の円板は偏心した2個のスラスト軸受で支えられている。下部の軸が回転すると円板は自転をせずに公転運動のみを行う。2種類の試験機を用いて同一条件下で摩耗試験を実施した。試験溶液として30%牛血清水溶液を37℃に保ったものを用いた。すべり速度は36mm/s、面圧は2MPaであった。実験中には水温を37℃に保った。

(3) 異種セラミックを組み合わせた摩耗試験

端面型の摩耗試験機を用い、アルミナ製とジルコニア製の試料を組み合わせ、30%牛血清水溶液中で摩耗試験を行った。すべり速度は36mm/s、面圧は2MPaであった。実験中に水温を37℃に保った。面圧を5MPa又は10MPaとし、すべり速度を40mm/sとした。総すべり距離は10kmであった。

6) 非破壊・耐久性試験法の開発

試験方法の妥当性を証明するには、科学的な合理性を備えていることはもちろん、最終的には臨床で良いと評価される製品と悪いと評価される製品の比較試験を行い、両者の鑑別が正確に行えるかどうかを確かめる必要がある。しかしながらヒト用に認可されている製品はそれなりの品質を備えており、粗悪な製品で試験を行うこ

とは困難である。そこで獣医用の整形外科インプラントを取り上げ、それを用いて力学的試験を行うこととした。

(1) まず獣医用整形外科インプラントでどのような破損事故が生じているかを調べるために、3名の獣医師を対象に聞き取り調査を実施し、不具合の発生状況について調べた。

(2) 破損した獣医用整形外科インプラントを入手し、肉眼観察などにより破損原因を推定した。

(3) これら整形外科インプラントについて、ASTM 規格およびISO規格に基づく実験室での力学的試験の実験方法を調査した。

(4) 粗悪とされる製品、およびヒト用として認可されている製品の数種類を選び、実験室における力学試験を実施した。試験機には現有のインストロン試験機およびMTS試験機を利用した。試験方法としては、試験方法として規定されている4点曲げ試験、およびより臨床に近い条件である、骨モデルへの装着による軸負荷の2種類を試みた。

7) 人工関節の力学的、組織学的研究

実験用人工股関節ステムをヒト大腿骨の形状、材質を模倣した樹脂モデルに挿入して、種々の人工股関節ステムの固定部分の力学的安定性を実験的に評価した。荷重装置として人工股関節安定性試験器を試作した。人工関節ステム表面に感圧紙を添付することにより、圧力分布の変動をモニター

した。みかけの接触面積の広さを種々に変化させた場合の接触部分のカオス的不安定振動の発生を計測した。

人工股関節には①Fit & Fill Type (全表面で接触するように骨髓腔の形状と同じ形に加工した人工関節)、②十字ステム(みかけの接触面積を限定する人工関節)の2種類を用いた。歯科用即時重合レジンを使用し、大腿骨樹脂モデルを作製した。重合レジンには付形性が優れており、硬化収縮も少なく人工股関節ステム周囲の接触部を確実に再現できる。ステム周囲の接触圧力分布を調べるために、圧力測定フィルムを用いた。測定圧力可能範囲は0.2~0.6(MPa)である。

まず、大腿骨樹脂モデルと人工股関節との間に圧力測定フィルムを挿入し固定した。そして樹脂モデル全体を振り子装置に固定して、骨頭部に荷重を負荷した。実験は、圧力測定フィルムを挿入しただけで荷重を加えない場合と、挿入後垂直圧縮荷重600(N)を骨頭部に負荷した場合について行った。荷重を加えない条件での接触圧力分布を基準とし、荷重負荷時の接触圧力分布と比較した。その後、定量的な圧力値を求めるために画像解析ソフトウェア(Scion Image for windows)を用いて接触圧力分布を解析した。

8) 整形外科インプラントの不具合データに関する研究

整形外科インプラントの市販後の不具合データ収集を目的として国内

の文献調査を行う。初年度は、過去の2度にわたる整形外科学会のアンケートを紹介すると共に、数値をグラフ化して解析を加えた。さらに、国内の最近の人工股関節・膝関節の「破損」「感染」事例に絞ってデータ収集を行った。人工股関節に関しては、医学中央雑誌から過去3年間の人工股関節に関する約2,500編の論文を、タイトル及び抄録から人工股関節の破損、感染の条件に当てはまると判断したものを抽出した。同様に、人工膝関節に関しても、医学中央雑誌から過去3年間の、破損、感染、破損を含む再置換報告について拾い上げた。これらの両者については、Microsoft Access 2002を用いて、データベースに再構築した。

米国の膨大なデータについては、FDAがインターネットのWebページで公開している全医療用具の不具合情報データについて、テキスト形式で圧縮されたものをダウンロードし、Microsoft Access 2002上でデータベースを作成した。その後、整形外科分野のデータのみを抽出し、種々の検索が可能ないように加工した。将来的には、Web検索が可能にする。

C. 研究結果

1) 天然由来医用材料からのエンドトキシン回収、不活化の開発に関する研究

(1) LPSの熱安定性に関する再評価

LPSは耐熱性の菌体抗原として知られているが、低濃度のLPSは加熱

処理により失活することが報告されている。しかし、天然医用材料から製造された創傷被覆材のLPS汚染サーベイ試験において、室温抽出よりも加温条件下にて抽出を行った方が効率よくLPSを回収できることが明らかになっていることから、LPSの熱安定性について再評価を行った。

1-1. LPS活性に対する加温処理の影響

予備試験として、生物学的試験ガイドラインにおいて抽出溶媒として指定されている滅菌生理食塩水、サーベイ試験で使用した注射用蒸留水の他、5種類の緩衝液と2種類のLPS回収用溶媒を使用して100℃、30分間加熱処理を行った結果、いずれの溶媒を使用してもLPSのリムルス活性は顕著に低下することが確認された。

次いで、注射用蒸留水、滅菌生理食塩水、リン酸緩衝液、トリス/塩酸緩衝液、ヒト血清アルブミン溶液およびPEG溶液中、室温、40℃、60℃、80℃にて1時間処理した際のリムルス活性強度の変化を追跡した。図2に示したように、LPSレベルのリムルス活性は、トリス/塩酸緩衝液中、40℃で処理することにより、およそ50%まで低下し、60℃以上の処理では同活性が全く回収されないことが判明した。

その一方、LPS回収用溶媒であるヒト血清アルブミン溶液およびPEG溶液中におけるLPSの熱安定性は比較的優れており、ヒト血清アルブミン溶液では60℃、PEG溶液では80℃

までの処理を行っても LPS レベルのリムルス活性に影響を与えないことが明らかになった (図 2)。また、注射用蒸留水、滅菌生理食塩水、リン酸緩衝液中における LPS の熱安定性は、これら 2 種類の LPS 回収用溶媒と比較して若干劣るものの、LPS レベルのリムルス活性は 40℃での処理により、70 - 95%程度保持されることが確認された (図 2)。

加温処理による菌体レベルのリムルス活性の変化について同様に検討し、その結果を図 3 に示した。菌体レベルのリムルス活性の熱安定性は LPS レベルと同じ傾向を示し、トリス/塩酸緩衝液中で加温処理を行うと顕著に低下することが判明した。

その一方、ヒト血清アルブミン溶液および PEG 溶液中では比較的安定であり、加温温度を 60℃まで上昇させても、ほぼ 100%の活性が回収されることが明らかになった。注射用蒸留水の場合は 40℃の処理では菌体レベルのリムルス活性に影響を与えないが、60℃以上の温度では同活性の回収率が徐々に低下する傾向が認められた。また、滅菌生理食塩水中では、40℃の処理により、リムルス活性の回収率がおよそ 60%まで低下した (図 3)。

これらの成績から、加温処理による LPS 活性への影響が比較的少ないと思われるリン酸緩衝液、ヒト血清アルブミン溶液および PEG 溶液について更に詳細に検討した。

図 4 に示したように、LPS レベルのリムルス活性は、これら 3 種類の

溶媒中、室温で 72 時間放置しても、ほぼ完全に保持された。その一方、同活性は処理温度を上昇させるに従って徐々に低下し、LPS レベルのリムルス活性の回収率は、60℃・24 時間の処理により、リン酸緩衝液では 10% (図 4a)、ヒト血清アルブミンでは 40% (図 4b)、PEG 溶液では 60% (図 4c) まで低下した。また、80℃での処理の場合、同活性はいずれの溶媒を用いても 24 時間後には検出限界以下まで低下した。

しかし、40℃での加温条件下では、LPS 活性が保持される傾向が見られ、リン酸緩衝液では 24 時間、ヒト血清アルブミン溶液では 48 時間、PEG 溶液では 72 時間まで処理してもリムルス活性の回収率に大きな変化は認められなかった (図 4)。

1-2. 加温処理による LPS の構造変化

LPS のリムルス活性は加温処理により低下することが確認されたが、この活性低下を招く要因を LPS の構造変化を追跡することにより検討した。大腸菌型合成リピド A (506) をリン酸緩衝液に溶解し、室温、40℃、60℃、80℃、100℃で 1 時間処理した後の LSI-マススペクトルを図 5 に示した。

506 の分子量は 1,797 であり、未処理の場合は m/z 1,796 [M-H]⁻ および m/z 1,928 [M-H+Cs]⁻ が分子イオンとして観測されると共に、グリコシド結合の解離に基づく娘イオンが m/z 692, m/z 710, m/z 738 に検出される。また、リン酸緩衝液中で処理を行うと、[M-H]⁻イオンに加え、Na が付加した

分子イオンが m/z 1,818 に観測されるようになる。

図 5 に示したように、リン酸緩衝液中、室温で 1 時間放置しても 506 の LSI-マススペクトルは未処理の 506 と同様であり、構造的な変化は認められなかった。しかし、処理温度を上昇させると、分子イオンが徐々に減少し、100℃で処理した 506 では分子イオンが殆ど観測されなかった。また、イオン強度は低いものの、処理温度が上昇するに従って、分子イオンからリン酸基が脱離した m/z 1,716 が検出された。

大腸菌 LPS について同様な実験を行った結果、いずれの処理温度においても LPS インナーコア部分に存在する KDO (2-keto-3-deoxy-octonate) 分子のケトシド結合の解離に基づくりピドA分子 (m/z 1,796 [M-H]) の遊離は認められなかった (図 6)。

(2) コラーゲンからの LPS 回収に関する前処理法の検討

コラーゲンは LPS との結合親和性が高いと共に、中性付近における水溶性が低い性質を持つため、コラーゲンから LPS を効率良く回収するには、少なくとも水溶性を上昇させるなどの前処理を施す必要がある。

コラーゲンを低分子化し、その水溶性を上昇させる手法としては酵素消化が第一に考えられるが、リムルス反応はプロテアーゼにより惹起される一連の酵素反応であるため、コラーゲンを消化するためにプロテアーゼを使用する場合は各酵素標品の LPS

混入状況を調べると共に、酵素自体のリムルス反応に対する影響を検討する必要がある。

そこで、コラーゲンからの LPS 回収に関する前処理法を開発する目的で、各種プロテアーゼのリムルス活性、LPS 活性に影響を与えない各種プロテアーゼの不活化法などについて検討した。

2-1. 各種プロテアーゼのリムルス活性

高濃度のプロテアーゼ、特にトリプシンはリムルス反応に大きな影響を与えることが確認されたことから、反応干渉因子試験を行い、リムルス反応に影響を与えない濃度まで希釈した後、各プロテアーゼ中に含まれる LPS 量を測定した。

図 7 に示したように、コラゲナーゼ、ペプシンおよびトリプシンの LPS 含量は非常に高く、特に、コラゲナーゼ 1A-S 標品は 780.1 EU/mg の LPS を含んでいることが判明した。また、ペプシン、 α -キモトリプシン、 β -キモトリプシン、 γ -キモトリプシンも 3.1 – 5.6 EU/mg の微量の LPS を含んでいた。

デトキシゲルカラムを使用して各プロテアーゼに混入している LPS の除去を試みた結果、図 8 に示したように、コラゲナーゼ 1A-S 標品に含まれる LPS は同カラム処理により 99% 程度除去できることが判明した。しかし、デトキシゲルカラム処理による LPS の除去効果はプロテアーゼの種類によって異なり、 α -キモトリプシ

ンおよび β -キモトリプシンでは、およそ84%のLPSが除去されるが、コラゲナーゼ1-Sおよびトリプシンの場合、それぞれ42%および35%のLPSが残存することが明らかとなった。

また、同カラム処理による各酵素の回収率にも差異があることが認められた。図9に示したように、トリプシンはデトキシゲルカラム処理を行ってもほぼ全量回収されるが、 α -キモトリプシン、 β -キモトリプシン、コラゲナーゼ1-Sおよびコラゲナーゼ1A-Sの回収率は、それぞれ88%、83%、65%、54%であった。また、ペプシンは本カラム処理により、殆ど回収不能となることが明らかとなった。

2-2. 各種プロテアーゼの不活化とLPS活性への影響

コラーゲンからのLPS抽出の前処理として酵素消化を利用する場合、相当量の酵素を使用するため、酵素処理後、適当な方法により酵素活性を失活させてから、リムルス試験によりLPS量を測定する必要がある。

そこで、主にコラゲナーゼに関し、酵素活性およびLPS活性に対する中性ホルマリンとフェノール処理の影響について検討した。中性ホルマリンおよびフェノールのリムルス反応に対する影響を調べた結果、ホルマリンでは0.01%以下、フェノールでは0.05%以下まで濃度を希釈すると阻害反応を受けることなくリムルス活性を測定できることが確認された。

コラゲナーゼ活性に対するホルマ

リン処理(20℃・30分)およびフェノール処理(37℃・10分)の影響を検討した結果、コラゲナーゼ1-Sおよび1A-Sの活性は1%ホルマリン処理または1%フェノール処理により、失活させることが可能であった(図10a, 10b)。また、図11に示したように、これらの薬剤を使用しなくとも、コラゲナーゼ1-Sおよび1A-Sの酵素活性は40℃で24-48時間インキュベートすることにより99%程度失活させることも可能であった。

次いで、LPS活性に対する種々の濃度のホルマリン処理およびフェノール処理の影響を検討した結果、図12に示したように、フェノール処理の場合、2%以下の濃度であれば、60分までのインキュベーションにより、LPS活性に影響を与えないことが判明した(図12a)。また、LPS活性はホルマリン処理に対して比較的安定であり、4%程度までは殆ど影響を与えず、10%まで濃度を上昇させても80%程度のLPS活性が回収されることが明らかとなった(図12b)。

(3) 温和な化学処理によるLPS不活化法の開発

3-1. リムルス試薬に対する酸性電解除菌水の影響

リムルス反応は一連の酵素反応であるため、温度およびpHにより大きく影響されると共に、プロテアーゼ阻害剤、金属、界面活性剤、高濃度の塩類および糖質などによる阻害または促進効果を受けることが知られている。そこで、種々の濃度の有効塩素を

含有する酸性電解除菌水に既知量のエンドトキシンをスパイクしてリムルス活性を測定し、リムルス反応に影響を及ぼさない酸性電解除菌水濃度を求めた。

スパイクしたエンドトキシンのリムルス活性の回収率は、注射用蒸留水にスパイクした既知量のエンドトキシンが示すリムルス活性を 100% として算出した。

図 13 に示したように、強酸性水 (pH 1.72・有効塩素濃度 352 ppm) および弱酸性水 (pH 6.29・有効塩素濃度 348 ppm) 原液にスパイクしたエンドトキシンのリムルス活性強度は対照の 40–60% 前後であり、両原液共にリムルス反応の阻害作用を示したが、いずれの電解除菌水も希釈により有効塩素濃度を 3 ppm 程度まで減少させるとリムルス反応に対する阻害効果を示さないことが明らかとなった。

本結果より、各サンプルのリムルス活性は有効塩素濃度が 3 ppm 以下になるように希釈した後、測定することとした。

3-2. LPS および菌体に対する酸性電解除菌水の影響

酸性電解除菌水により LPS を不活化することが可能か判断するための予備試験として、LPS および菌体を種々の濃度の酸性電解除菌水中、室温にて 2 日間インキュベートし、24 時間および 48 時間後にリムルス活性を測定した。

図 14a に示したように、強酸性水

(pH 1.96・有効塩素濃度 1,000 ppm) および弱酸性水 (pH 6.50・有効塩素濃度 1,250 ppm) 共に、原液を使用した場合、LPS レベルのリムルス活性は 24 時間の処理でほぼ完全に失活したが、10 倍および 100 倍希釈液は 48 時間処理においても LPS に対する不活化効果を示さなかった。

また、図 14b に示したように、菌体レベルのリムルス活性に対する影響を検討した結果でも同様の成績が得られたことから、一定濃度以上の有効塩素を含有する酸性電解除菌水は LPS 活性を不活化する効力を持つことが明らかとなった。

3-3. リムルス活性の消失と有効塩素濃度の相関性

LPS および菌体を種々の濃度の酸性電解除菌水で処理 (室温・24 時間) し、両サンプルのリムルス活性を不活化させるために必要な有効塩素濃度に関して検討し、その結果を図 15 に示した。

強酸性電解除菌水 (pH 2.56) は有効塩素濃度 250~300 ppm 付近で LPS レベルのリムルス活性を顕著に不活化することが判明した (図 15 左)。また、弱酸性電解除菌水 (pH 6.37) も LPS の不活化能力を示すが、その効果は強酸性電解除菌水と比較して若干低く、LPS のリムルス活性を消失させるためには 400~500 ppm 以上の有効塩素濃度を必要とした (図 15 左)。

図 15 右に示したように、強酸性電解除菌水 (pH 2.56) は LPS の場合

と同様、有効塩素濃度 300 ppm 程度で菌体レベルのリムルス活性を顕著に不活化した。一方、弱酸性電解除菌水 (pH 6.37) は有効塩素濃度を 500 ppm まで上昇させても菌体レベルのリムルス活性強度に影響を与えなかった。

3-4. リムルス活性の消失と酸性電解除菌水による処理時間の相関性

本実験では、酸性電解除菌水による処理時間 (室温下) と LPS レベルおよび菌体レベルのリムルス活性の強度変化を検討した。

図 16 左に示したように、LPS レベルのリムルス活性は、室温下、有効塩素濃度 1,120 ppm の強酸性電解除菌水 (pH 2.38) 中で 8 時間インキュベートすることにより検出限界以下となり、未処理時のリムルス活性強度と比較して 4 桁以上低下することが明らかとなった。また、リムルス活性の消失速度は有効塩素濃度に依存しており、同濃度 280 ppm の強酸性電解除菌水では、LPS レベルのリムルス活性を完全に消失させるまでに 48 時間のインキュベートを要した。

図 16 右に示したように、有効塩素濃度 1,120 ppm の強酸性電解除菌水は、LPS レベルと同様、菌体レベルのリムルス活性も顕著に不活化し、2 時間の処理により同活性を検出限界以下まで低下させた。一方、低濃度の強酸性電解除菌水 (有効塩素濃度 280 ppm) 処理の場合、菌体レベルのリムルス活性は 48 時間インキュベート後も 1 桁減少するのみであり、同活

性の消失速度は、LPS レベルの場合と比較して、有効塩素濃度に対する依存性がより高いことが明らかとなった。

同様の実験を弱酸性電解除菌水 (pH 6.37) を用いて行った結果を図 17 に示した。LPS レベルのリムルス活性は、塩素濃度 930 ppm の弱酸性電解除菌水中、2 時間程度処理することにより低下し始め、24 時間後に 5 桁減少し、48 時間後には検出限界以下となった (図 17 左)。弱酸性電解除菌水によるリムルス活性の消失速度も有効塩素濃度に依存しており、同濃度 310 ppm の弱酸性電解除菌水中で処理した場合、LPS レベルのリムルス活性強度は 8 時間後まで変化せず、24 時間処理で 2 桁減少したのみであり、48 時間処理しても検出限界以下まで同活性を低下させることはできなかった (図 17 右)。

一方、図 17 右に示したように、菌体レベルのリムルス活性は、930 ppm の有効塩素を含む弱酸性電解除菌水中で 24 時間処理しても 1 桁減少するにとどまった。また、有効塩素濃度 310 ppm の弱酸性電解除菌水処理の場合、リムルス活性強度は殆ど変化せず、菌体レベルのリムルス活性は 24 時間までの弱酸性電解除菌水処理により大きな影響を受けないことが明らかになった。

3-5. その他の化学処理による LPS の不活化

酸性電解除菌水と同様の方法により、その他の薬剤による LPS 活性の

不活化に関して検討した。

リムルス試薬に対する各種薬剤の影響を図 22 に示した。過酸化水素原液 (30%) にスパイクした LPS のリムルス活性強度は対照のおよそ 1/100 であったが、過酸化水素濃度を減少させて行くに従って、リムルス活性の回収率は増加し、0.3%以下の過酸化水素濃度であれば、スパイク LPS のリムルス活性を全量回収できることが判明した。

次亜塩素酸ナトリウム、水酸化ナトリウムおよび塩酸について同様な実験を行った結果、次亜塩素酸ナトリウムは 0.0005%以下、水酸化ナトリウムは 0.025M 以下、塩酸は 0.0001M 以下まで希釈することにより、リムルス反応に影響を与えることなく、スパイク LPS の同活性を測定できることが明らかになった (図 18)。各サンプルのリムルス活性は各種薬剤がリムルス反応に影響を与えない濃度になるように希釈した後、測定した。

各種薬剤により LPS を不活化することが可能か判断するために、LPS および菌体を種々の濃度の薬剤中、室温にてインキュベートし、24 時間および 48 時間後にリムルス活性を測定した。

図 19 に示したように、0.3 - 30% 過酸化水素および 0.01 - 0.001M 塩酸は LPS レベルのリムルス活性に影響を与えないことが確認された。次亜塩素酸ナトリウムの場合、0.5%以上の濃度では LPS レベルの同活性を顕著に不活化することが判明した。また、

水酸化ナトリウムも濃度依存的に LPS レベルのリムルス活性を抑制することが認められ、0.25M 水酸化ナトリウムで 24 時間処理することにより、顕著に低下することが明らかになった (図 19)。

同様に菌体レベルのリムルス活性に対する影響を調べた (図 20)。菌体レベルの同活性も過酸化水素処理により殆ど影響を受けないことが確認された。水酸化ナトリウム処理では 0.025M 以上、塩酸処理では 0.01M の濃度でインキュベートすることにより菌体レベルのリムルス活性を効率良く低下させることが明らかになった (図 20)。

これらの成績から、水酸化ナトリウム処理および次亜塩素酸ナトリウム処理が LPS 活性の不活化に利用できる可能性が示唆されたため、更に詳細に検討した。LPS レベルのリムルス活性は 5%次亜塩素酸ナトリウム中、室温にて 8 時間処理すると完全に消失するが、0.5%の濃度では 48 時間処理しても同活性強度に影響を与えないことが判明した (図 21)。

また、LPS レベルのリムルス活性、0.025M 水酸化ナトリウム処理により影響を受けなかったが、0.25M 水酸化ナトリウム中、48 時間処理することにより 2 桁程度抑制されることが明らかとなった。一方、菌体レベルのリムルス活性は、48 時間の 0.025M 水酸化ナトリウム処理により 1 桁、0.25M 水酸化ナトリウム処理により 2 桁程度減少することが判明した。図

22 にエンドトキシンの化学構造を示した。

2) 新規材料からの免疫原性評価手法の開発に関する研究

(1) 遅延型アレルギーに関する研究

1-1. ゴム抽出物の分析

3 研究機関でそれぞれ別に抽出したものを、本機関でまとめて分析した(表 3)。A 機関については材料作製後 1 ヶ月以内に、残りの機関では約 1 年間保存後、抽出した。種々の濃度の MBT-ジクロロメタン溶液を調製し、HPLC に注入したところ、検出限界濃度は約 $0.2 \mu\text{g/ml}$ であった。MBT $0.2 \sim 40 \mu\text{g/ml}$ の濃度範囲でピーク高さとの間に良好な直線関係が得られた。ZDBC の検出限界濃度は約 $1 \mu\text{g/ml}$ であった。ZDBC 濃度 $1 \sim 4000 \mu\text{g/ml}$ の範囲で、ZDBC の Co 錯体のピーク高さとの間に良好な直線関係が得られた。

オリーブ油 1 ml に ZDBC $4.5 \mu\text{g/ml}$ のジクロロメタン溶液 2 ml を添加し、 CoCl_2 溶液と振とうして得られたピーク面積を、オリーブ油がない状態で錯体化したときのピーク高さと比較した。その結果、3 回試験したときの平均は 37% と低い値しか示さなかった。

従って、ZDBC の定量値は、実際に抽出されている量よりは若干低い値を与える可能性がある。

機関 A で抽出に用いられたオリーブ油中の MBT 量は、Sample A で $7.7 \mu\text{g/ml}$ 、Sample B で $3.7 \mu\text{g/ml}$ であ

った。Sample C のオリーブ油抽出液中の ZDBC はごく小さなピークしか示さず、定量限界以下であった。いずれにしろ、本溶媒による抽出では、MBT および ZDBC は非常に少ないことがわかった。

アセトン-クロロホルムで得られた抽出物量およびその MBT、ZDBC 濃度を表 3 に示した。

いずれのゴム試料からも約 3~4% 程度の量の抽出物が得られた。Sample A では、抽出物あたりの MBT 量は 3.34~5.02%、Sample B では 0.021~0.059% で、試験を行った機関による変化は少なく、定量的に抽出されることがわかった。Sample C については、機関 A では抽出物中の ZDBC 量は 17% 程度あるのに対し、約 1 年保存後、機関 B および C で抽出した物には 0.01% 未満とほとんど検出されなかった。

1-2. モルモット感作性試験

オリーブ油抽出液原液で感作し、惹起も同様に原液を閉塞パッチして皮膚反応を観察した(表 2)。本条件では、Sample A および Sample B ともすべての動物が評点 2 程度の反応を示した。Sample C では 5 匹中 2 匹が評点 1 の反応を示した。しかし、オリーブ油だけで感作した動物に対して、これらの Sample の抽出液を塗布しても同様の反応率で皮膚反応を示した(表 4)。

アセトン-クロロホルム抽出物を 5% 濃度で感作した後、抽出物を各種濃度でワセリンに混和したものを閉

塞パッチして惹起した。Sample A および Sample B では、0.1%以上の濃度ですべての動物が明らかな皮膚反応を示し、濃度が高いほど強い皮膚反応を示した。

Sample A と Sample B とでは、ほとんど反応性に差はなかった。一方、Sample C では、0.1~5%の惹起で5匹中 1 匹が弱い反応を示し、前者に比べて明らかに感作率は低いことがわかった(表 5)。

1-3. マウス感作性試験

機関 C で行われた LLNA の 3 回の試験結果を表 6 に示した。アセトнокロロホルム抽出物を AOO に溶解し、種々の濃度で塗布した。Sample A および B では、いずれも溶媒塗布群に比べて、リンパ節重量、LNC 細胞数および LNC 増殖反応が上昇した。いずれの試料とも塗布した濃度依存的にリンパ節の反応性は強くなった。

測定した 3 つの項目のうちでは、LNC 増殖反応が最も高い SI 値を示した。Sample C は 1 度、5%で若干の増加が認められたが、他の試料に比べて上昇率は低かった。Sample A と Sample B とを比べると、5%での 3 回の試験結果の平均は Sample A の方がわずかに高い値を示した。1%濃度では、Sample A は対照群と差が認められるが、B と C は対照群とほとんど差はなかった。

機関 D での方法は機関 C と適用方法が若干異なり、試験群ごとでなく 1 匹ずつの反応を見ている(図 23)。植物油抽出液ではいずれの Sample も著

しい反応を示さなかった。一方、アセトнокロロホルム抽出物では Sample A と Sample B で SI が 4 以上の高い値を示した。Sample C は対照群と変化はなかった。Sample B は高い SI 値を示したが、4 匹中 2 匹だけが非常に強い反応を示すように、バラツキが非常に大きいため、対照群と有意差は認めなかった。

(2) 即時型アレルギーの検出に関する研究

表 7 に、今回検討した OVA の投与方法を示した。Group 1 は OVA を 1 回だけ投与し、他では 1 週間おきに 2 回投与した。Group 1 と 3 は OVA 10 μ g を Alum アジュバントとともに注射し、Group 5 ではアジュバントなしで、5 mg の OVA を投与した。いずれも最終投与から 1 週間後に採血および脾臓を採取し、それぞれの反応性を調べた。

脾臓重量に関して、アジュバントとともに投与した場合は OVA の有無による変化は認めなかった。アジュバントがない場合、溶媒群に比べ OVA 投与群の方が高い値を示した(表 8)。しかし、アジュバントだけでも同程度の脾臓重量が認められることから、本指標が OVA によるものと判定することは困難であった。

脾臓リンパ球の各 mitogen および OVA に対する幼若化反応を調べた。本検討は 2 回試験物質を投与した群間で比較した。アジュバントとともに OVA を投与した群は、PHA など一部

の mitogen に対する反応性が溶媒群に比べてわずかに高い値を示すが、有意な差は認めなかった。

アジュバントなしの場合では、OVA 投与した方がわずかに低い値を示すが、これも有意な差はなかった。一方、アジュバントの有無にかかわらず、OVA を投与した動物群の脾臓リンパ球に OVA を添加して培養すると、³HTdR の取り込みが増加し、OVA に対する特異的反応が有意に増加していることがわかった(表 9)。

また、リンパ球の増殖反応を評価する上で、³HTdR の代わりに AlamarBlue 色素が使用できるかどうか検討するため、同じリンパ球集団を使用し、mitogen で刺激した。その結果、刺激前に比べて dpm 値は 40~50 倍となるが、AlamarBlue 色素の吸光度の変化は 6%以下であった。したがって、リンパ球の増殖反応を比較する上で、本色素は³HTdR の代替としては十分とはいえなかった。

血清中総 IgE 抗体濃度を ELISA 法により測定した。Alum だけを投与した群の血清総 IgE 抗体価は PBS だけを投与した群とほとんど同等であり、アジュバントに対して IgE 抗体は産生されないことが確認された。

また、アジュバントなしで OVA を 2 回投与しても、総 IgE 抗体値は増加しなかった。一方、アジュバント共存下の場合、Group 1 のように 1 回 OVA を投与するだけで数匹に IgE 抗体の増加が認められ、2 回投与することにより(Group 3)、5 匹すべての動物で

総 IgE 抗体値が上昇することがわかった(表 10、図 24(a))。

OVA 特異的 IgE 抗体に関しては吸光度で比較した。溶媒またはアジュバントだけを投与した群では吸光度は 0.076 程度であるが、OVA を投与された場合、アジュバント非共存下の Group 5 でも 0.096 と増加した。また、Group 1 は、総 IgE 抗体価は高いものの、OVA 特異的 IgE 抗体に関してはそれほど高い値を示さなかった。アジュバントとともに OVA を 2 回投与した場合、すべての個体で明らかに高い吸光度を示した(図 24(b))。

脾臓リンパ球の培養上清のサイトカインを測定した。IL-4 と IFN- γ について産生パターンを見るため、Group 3 の OVA 感作リンパ球について Con A と OVA を添加して 24、48、72 時間培養時点でのサイトカイン量を ELISA 法により測定した。

その結果、IL-4、IFN- γ とも、Con A 刺激によって産生される量は 24 または 48 時間培養した方が 72 時間培養した上清よりも高い値を示した。OVA 刺激の場合、OVA 濃度が高く、培養時間を長くした方が高い値を示した。OVA に比べて Con A 刺激の場合、IFN- γ は多量に産生されるが、IL-4 産生量はむしろ少ないことがわかった(図 25)。次に、各投与群のリンパ球に Con A または OVA を添加して 72 時間培養したときの IL-4 産生量を図 26 に示した。溶媒またはアジュバント群に比べ、OVA 投与群で OVA 刺激による IL-4 産生量が高い。OVA 刺

激による IFN- γ に関しては、2 回投与した群同士で比較すると、OVA 投与群は溶媒群、アジュバント群に比べて低い値を示した(図 27)。一方、Con A で 48 時間刺激した上清への IL-4 および IFN- γ 産生量は OVA 投与の有無と関係して上昇、低下する傾向は認めなかった。

3) 発癌リスク評価手法開発

粉末化した MD-PLLA の粒度分布を測定した。凝集を認めなかった測定値から粒子の大きさを測定した結果、粒度分布曲線に関して累積分が 50% になる粒径を示すメディアン径は、61 μm であった。

粒度分布曲線における最大値を示す、即ち、最頻値を示す粒径であるモード径は、83 μm であった。粒径と個数から計算した平均値は、55 μm であった。

4) 4,4'-ジアミノジフェニルメタン添加ポリウレタンならびにポリ乳酸粒子の癌原性評価に関する研究

埋植後 10 週間が経過した。PLLA 高用量群 (2 g 埋植群) の 5 例が、埋植後 1 および 2 週に大量の異物投与に起因すると考えられるショック症状を示したため、いずれも切迫解剖した。

また埋植後 1 週から PLLA 埋植群のほぼ全例で埋植部位に流動性物質の貯留が観察された。この流動性物質量は埋植量に依存しており、流動性物質貯留は PLLA 低用量群で埋植後 6

週、PLLA 高用量群で埋植後 8 週までに消失した。PLLA 埋植群以外では術後の経過がすべて良好であり、いずれの群にも一般状態に異常を示す動物は認められていない。通常、腫瘍は 1 年を経過した頃から発生がみられるので、慎重な観察を行いたい。

5) セラミックス関節摩耗試験法開発

(1) 摩擦試験における潤滑剤の影響について

セラミックの摩耗量に及ぼす潤滑材の影響を調べるために端面型摩耗試験機を用いて摩耗試験を行った。セラミックの試料としてアルミナ、ジルコニア、窒化珪素、炭化珪素を用い、上部の円筒形試料と下部の円板形試料を同種材料で製作し、それらの端面同士を摺動させて摩耗量を測定した。

溶液として蒸留水、1%アルブミン水溶液、1%ヒアルロン酸水溶液、30%牛血清水溶液を用いて摩擦係数と摩耗量を比較した。すべり速度は 36 mm/s、面圧は 2 MPa であった。実験中には水温を 37°C に保った。摩耗試験後の重量減から比摩耗量を計算した。

(2) 摩耗に及ぼすすべり方向変化の影響

摩耗に及ぼす、すべり方向の影響を調べるために 2 種類の摩擦試験機を製作した。ひとつは通常のピンオンディスク摩擦試験機で、下部の円板が水槽とともに回転し、上部のアームに取り付けられたピンとの間ですべり運