

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬安全総合研究事業

医療用具の有効性、安全性評価手法に関する
国際ハーモナイゼーション研究

平成14年度総括・分担研究報告書

主任研究者 桜井靖久

平成15（2003）年3月

目 次

I. 総括研究報告書	1
桜井靖久	
II. 分担研究報告書	
生物安全性試験その他前臨床試験一般に関する研究	9
土屋利江	
医療用具の臨床試験に関する基準（G C P）に関する研究	51
上田慶二	
細胞組織利用医療用具評価手法に関する研究	83
岡野光夫	
承認申請時に用いる基準・資料の要求範囲に関する研究	147
および海外調査	
吉田正人	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	173
IV. 研究成果の刊行物・別刷	175

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

平成14年度総括研究報告書

医療用具の有効性、安全性評価手法に関する国際ハーモナイゼーション研究

主任研究者 桜井靖久 東京女子医科大学名誉教授、早稲田大学大学院客員教授

研究要旨

有効性・安全性に優れた新しい医療用具の研究開発を促進し、医療の向上のため、できるだけ速やかに世界中の多くの人々にそれが適用されるようにするために、医療用具承認申請などに関する国際協調が必要であり、その推進のための協議がISO、GHTFなどにおいて進められている。日本としても、これらの国際協調に対して、国益ということを中心に十分を考慮しつつ、科学的及び理論的裏づけのもとに、米欧に伍した討論を展開していくことが必要である。本研究においては、産官学が協力して以下の課題に実学的見地から取り組み、下記の如く第2年度の成果を得た。

1) 生物安全性試験その他前臨床試験一般に関する研究

材料による感作性試験と細胞毒性試験について、国内外の現行法等について実験的評価を行ない、研究班において討議の上、鋭敏にしてヒトへの外挿性に優れた評価法の選択を行ない。適切な試験法のプロトコールを提供した。

2) 医療用具の臨床試験に関する基準（GCP）に関する研究

日本では医療用具 GCP は平成4年7月に通知されているが、現在ISOにおいて医療用具GCPの国際協調が検討されている。また、医薬品についてはICH GCPに基づく新しい基準が実施されている。これらの事実を踏まえ、産官学13名の研究協力者の討議により、医療機器の治験に特徴的な点に配慮し、また医師主導の臨床試験の問題点を検討し、平成14年7月の薬事法改正に伴う新しい法制化・省令の基礎づくりをなし得た。

3) 細胞・組織利用医療用具評価手法に関する研究

細胞・組織を利用した tissue engineering 等の今後の急速な進

歩・普及に対応すべく、本年度は産官学19名の研究協力者により、国内外の細胞・組織利用医療用具技術の現状を把握し、安全性・有効性の評価法を検討し、日米欧における規制、ガイドライン等について、ISO/TCにおける討論を踏まえて国際標準化に向けての問題点を抽出した。

4) 承認申請時に用いる基準・資料の要求範囲に関する研究および海外調査

欧米の各種基準、数百種類の一覧表を作成した。GHTFで技術概要文書(STED)の指針が作成されたことを踏まえて、わが国の承認申請時審査への導入検討を行ない、我が国においても、欧州、カナダ、豪州を同様にSTEDの試行を開始した。

分担研究者

土屋利江	国立医薬品・食品衛生研究所	療品部長
上田慶二	東京都多摩老人医療センター	名誉院長
	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	顧問
岡野光夫	東京女子医科大学先端生命医科学研究所	所長、教授
吉田正人	日本医療機器関係団体協議会	国際部長

A. 研究目的

医療用具に関する技術進歩・急速な国際化に対応し、有益な医療技術が迅速に実用化・普及化するためには、安全性試験の評価法、臨床試験に関する基準(GCP)の整備、新しい細胞・組織利用医療用具の評価法、承認申請の効率化などについて、十分な科学的検討を加えて、GHTF、ISO、IEC等の国際ガイドラインとの整合性を得るための科学的基盤を確立することが、目下の我が国にとって必要性の高い急務である。本研究においては、国内外の現状

の調査・把握と検討・整理・学識者との意見討議、実証的実験等を通じて、我が国の基盤を固め、医療用具の安全性、有効性、品質の評価・保証を高め、その上で国際整合を図ることを目的としている。

B. 研究方法

分担研究者ごとに産官学の専門家から成る研究会を数回開催し、課題の討議と研究内容の分担をきめ、文献、ヒアリング、国内外調査、実験等の方法を用いて、研究を実施した。また、研究班の分担研究者等が一堂に会して、

国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センターにおいて、平成14年12月6日に総会を開催し、全体の意見交換と調整を行った。

(倫理面への配慮)

医療用具承認申請資料の国際ハーモナイゼーションの推進により、不必要な動物実験の重複を避けることが可能となり、本研究によって適切な感度の生物安全性試験の選択が可能となり、安全な医療用具の迅速な患者への提供に資するものである。

研究協力者

1)「生物安全性試験その他前臨床試験一般に関する研究」

分担研究者：土屋利江

国立医薬品食品衛生研究所 療品部
伊佐間和郎

国立医薬品食品衛生研究所 療品部
松岡厚子

国立医薬品食品衛生研究所 療品部
配島由二

国立医薬品食品衛生研究所 療品部
林 達也

(株)メニコン

中田和彦

(株)メニコン

松岡哲也

ボゾリサーチセンター

大庭耕輔

(財)食品農医薬品安全性
評価センター

片桐丈弘

(財)民生科学協会

2)「医療用具の臨床試験に関する基準(GCP)に関する研究」

分担研究者：上田慶二

東京都多摩老人医療センター

名誉院長

医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構顧問 顧問

赤松功也

山梨医科大学名誉教授

伊藤公一

日本大学歯学部教授

打田日出夫

大雄会病院IVRセンター室長

金井 淳

東京都江東高齢者医療センター

副院長

川田志明

慶応大医学部名誉教授

鈴木博昭

東京慈恵会医科大学客員教授

妙中義之

国立循環器病センター人工臓器部長

外 須美夫

北里大学医学部教授

上野紘機

東レ医薬・医療開発センター理事

小野 清

ボストンサイエンティフィックジャ

パン薬事部臨床開発マネージャー

中崎知道

ジンマー株式会社品質保証・薬事

開発部長代行

野田義寛

テルモ研究開発センターQSチーム

主任部

山本芳子
スリーエムヘルスケア薬事部
担当部長

3) 「細胞組織利用医療用具評価手法に関する研究」

分担研究者：岡野光夫
東京女子医科大学
石川 烈
東京医科歯科大学歯学部
上田 実
名古屋大学大学院医学研究科、頭頸部感覚器外科

大串 始
ティッシュエンジニアリングセンター
大野邦夫
旭メディカル（株）

小川哲朗
ペンタックス（株）ライフケア事業本部

片倉建男
テルモ（株）研究開発センター

久保木芳秀
（株）デビュージャパン

熊谷憲夫
聖マリアンナ医科大学形成外科

黒田 亨
（株）ジャパンティッシュエンジニアリング

澤 芳樹
大阪大学大学院医学系研究科
臓器制御外科

篠崎尚史
東京歯科大学角膜センター

清水達也
東京女子医科大学

先端生命医科学研究所
土屋利江
国立医薬品食品衛生研究所療品部
堤 定美

京都大学再生医科学研究所
寺岡 慧
東京女子医科大学腎センター
麻坂美智子
日本メドトロニック(株)薬事総括部
大和雅之

東京女子医科大学
先端生命医科学研究所

4) 「承認申請時に用いる基準、資料の要求範囲に関する研究および海外調査」

分担研究者：吉田正人
日本医療機器関係団体協議会
国際部長

豊島聰
医薬品医療機器審査センター長
俵木登美子

医薬品医療機器審査センター
審査第4部審査管理官

中井 清人
医薬品医療機器審査センター
審査第4部審査官

松谷 剛志
医薬品医療機器審査センター
調査役

三浦重孝
GE横河メディカルシステム(株)

内藤正章
日本光電工業(株)

浅井英規
（株）日立ハイテクノロジーズ

川口 広
旭メディカル(株)
黒岩隆広
川澄化学工業(株)
麻坂美智子
日本メドトロニック(株)
石川 廣
(株) 東芝医用システム社

C. 研究結果

本研究においては、分担する研究項目ごとに独自性があるので、それぞれの項目別に以下に概要を記す。

1) 生物安全性試験その他前臨床試験一般に関する研究 (分担研究者・土屋利江)

有機溶媒抽出がヒトの感作性反応の予測に適切な感度を示すこと、ポリウレタン (PU) やポリメチルメタクリレート (PMMA) に低分子量の感作性物質を含有させたモデル材料で GPM (モルモット・マキシミゼーション) テストを行い、感作強度と抽出濃度の間に dose response が得られたこと、細胞毒性試験では米国の MEM Elution 法はコロニー法に比べて検出感度が低かった等、これらの結果は適切な試験法のプロトコールを提供するものである。

2) 臨床部門 医療用具の臨床試験に関する基準 (GCP) に関する研究 (分担研究者・上田慶二)

医療用具の治験についての基準 (医療用具 GCP) は平成 4 年 7 月に通知されているが、現在 ISO において国際ハーモナイゼーションが検討されつつある。また、医薬品の治験については、ICH

GCP に基づく新しい基準が既に実施されている。これらを基礎として国際調和に適した医療用具の新しい GCP についてその案を検討する事が、本研究の目標である。

医療用具は医薬品とは本質的な違いがあり、その差異をよく分析した上で、不具合、予想される有害事象、保守管理、耐用期限、リスクの軽重、取扱説明等による情報提供等をも視野に入れた安全性の確保が必要となる。医療用具についてはそのリスクの程度に応じて、クラス分類がなされることになっており (改正薬事法)、医療用具の臨床試験の適用範囲についても、このクラス分類を考慮に入れて、薬事法上の「高リスク医療機器」や「新規の機器」などをその対象と考えることが適切と思われる。また医師主導の臨床試験についても、その問題点を十分に検討した。それらの成果は平成 14 年 7 月の薬事法改正に伴う新しい法制化・省令の基礎として有用である。

3) 細胞・組織利用医療用具評価手法に関する研究 (分担研究者・岡野光夫)

細胞・組織を利用した医療用具 tissue engineering は、今後急速に進歩・普及していくものと思われる。そこで、本研究ではまず国内外の現状を十分に調査把握し、ガイドラインづくりの推進を目標として、日米 EU 等における規制内容、基準、ガイドライン等の作成状況を比較検討した。皮膚、骨、軟骨、角膜、心臓弁、血管についてはすでに臨床応用がされており、また細胞移植治療も脳、心筋、閉塞性動

脈硬化症等の虚血部位に対して臨床応用されている。ISO・TC150 においても組織工学についての国際標準化の WG 設置が進められつつある。基準等については、日欧米の対比により、共通点と相違点が指摘できた。本分野の開発・実用化は日進月歩であり、既に臨床応用されているものについては問題点をさらに詳細に分析し、今後必要となる安全性・機能性の評価法の検討、不測の事態への柔軟・迅速な対応システム等についての国際標準化の可能性が必要とされる。

4) 承認申請時に用いる基準・資料の要求範囲に関する研究および海外調査
(分担研究者・吉田正人)

医療用具の審査にあたって、不要な動物実験と臨床試験の重複などを省き、効率的・迅速に進歩した最新の機器を国際的な規模で実地に供して医療の質の向上をはかるためには、合理性のある国際協調が不可欠である。本研究においては、まず、数百種類におよぶ欧米の各種基準の一覧表を整理・作成し、それらの間の重複や重要性などを検討するための便益とした。

GHTF において技術概要文書 (STED) のガイダンス・ドキュメントが作成されたことを踏まえて、わが国の医療用具承認審査への STED 導入方策を検討するため、現行資料概要との比較検討を行ない、欧州、カナダ、豪州と同様の STED の試行を開始した。STED 導入は国際的整合性の上からも重要ではあるが、一方で申請者側の作業負担も増大し、なお、決定までには

試行錯誤の繰り返しが必要とされるものと思われた。

D. 考察

医薬品については ICH が中心となって国際的協調を進めつつあるが、医療用具については ICH とは別の系統の IEC、ISO、GHTF 等の複数の組織がからんでおり、また、国内における問題点検討のための産学官が協力した仕組みも十分とはいえない。健康および医療の質の重視、安全性への配慮、市場流通の加速、医療におけるコンシューマー志向の増大という一連の流れから、国際協調は今後ますます重要な課題となる。その際に、日本として十分に科学性、論理性、合理性に立脚した素案や解釈を持つことが、国益の点からも大切である。本研究においては、市販前の基礎的テスト、臨床試験、承認申請のための手続き上の問題、さらに今後の大きな発展が見込める組織工学的問題等について、産学官が一つの場で問題点を調査、討論し、国内における基準づくりと国際ハーモナイゼーションにおける論理構築とに資する枠組みをつくり上げていくことを目標としており、初年度は実験的・文献資料的調査を実施して問題点を洗い出し、一部試行した。

次年度以降はさらに調査研究を継続し、行政、臨床、工学、企業側に有効な基礎的情報を提供し得るものとする。

E. 結論

各国で個別に実施された医療用具の試験データ等の相互受け入れを可能にして、迅速な開発・普及をはかるためには、十分に科学的・文化的に整合性のとれた国際協調が不可欠である。ISO、GHTF、IEC 等の国際ガイドライン作成に、わが国から根拠のある基盤データや論理を提供することは国益の点からもきわめて重要である。医療用具の有効性・安全性評価手法、承認基準等について産官学の討論を深めて、科学的基盤を構築することが本研究によって実施でき、行政・企業・臨床・研究側等にも有用な情報を提供し得た。

医療用具の有効性、安全性についての基礎的および臨床的評価方法やGCP、承認申請手続き、細胞等を用いた組織工学的用具についての現状と必要とされる評価法等について、実験的および文献資料情報調査等の方法を用いて調査研究し、協力班員をも含めて討議を行なった。日本では2002年に薬事法が大幅改正される時期にも当たっており、また、国際ハーモナイゼーションの重要性が急速に増大する時期でもあり、医療用具について、産官学が一体となって協力して、その有効性・安全性評価手法を検討することは、国内規制に対しても、国際ハーモナイゼーションに対しても極めて有用であり、従来に見られなかった重要な研究であると結論づけられた。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（医薬安全研究事業）
分担研究報告書

生物安全試験その他前臨床試験一般に関する研究

分担研究者 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所 療品部長

研究要旨 抽出方法の異なる感作性試験方法の感度を比較するために、同一の感作性材料について比較試験を行った結果、ヒトで明らかに感作性を有するゴム材料において、米国の生食抽出法では、陰性、綿実油抽出では、弱い陽性反応を示した。日本の有機溶媒抽出法で得られた結果は、ヒトでの感作性の強度を予測するのに適切な感度を示すことが明らかになった。試験試料調製に必要な材料量を従来に比べて少量、かつ適切な感作性評価を行える試験法のプロトコール（案）を提示できた。感作性物質含有ゴム材料や PMMA および PU 材料を用いて、モルモット筋肉内埋植試験、モルモット皮下埋植試験、ウサギ眼装用試験を実施し、感作性物質含有した各種ベース材料や接触あるいは埋植した組織部位により、皮膚や組織反応が異なることを明らかにした。細胞毒性のある金属を多く含む合金材料について、日本のコロニー法および米国での Elution test method を用いて比較した結果、L929 血清含有 MEM Elution method では、細胞毒性を検出できなかったが、V79 colony assay では、細胞毒性を検出できた。高分子材料のみならず、金属材料においても、血清含有培地で抽出しコロニー法で試験する方が、細胞毒性の検出感度が高いことを明らかにした。

A. 研究目的

医療材料の感作性試験は、材料からの試験溶液調製法と試験方法により、検出感度が異なる。医療材料のヒトへの安全性を評価する上で、第一に試験感度の適切性と、第二に試験に必要な材料量の適切性が求められている。2 種の高分子材料に感作性物質を含有した材料を作製し、Guinea pig maximization test (GPMT) および Adjuvant and patch test (A &P) の 2 種の試験系で、検出感度の比較、試験に必要な最小必要量および試験材料

の調製方法について検討することを目的とした。さらに感作性物質含有材料を用いて、モルモット筋肉内、皮下組織埋植、ウサギ眼装用試験を実施し、皮膚、筋肉、皮下、眼組織間の反応を比較し、接触あるいは埋植した組織部位による反応の違いを明らかにすることを目的とした。

医療材料の細胞毒性試験は、高分子材料以外の、金属材料（歯科鑄造合金）の細胞毒性試験について、USP XXII の MEM Elution test と日本のガイドラインの V79 Colony assay に

従った方法で、試験溶液を調製し、細胞毒性を評価し、試験法間の検出感度を比較することを目的とした。得られた科学的データに基づいて、試験法を改訂することにより、安全性の高い医療機器・材料の市場化を適正に推進できる。

B. 研究方法

(被験試料) 強感作性物質であるメルカプトベンゾチアゾール (MBT) を含有するゴム材料 A (Material A) およびゴム材料 A が含有する濃度の 1/10 量の MBT を含有するゴム材料 B (Material B) と、弱い感作性物質である zinc dibutyldithiocarbamate (ZDBC) を含有するゴム材料 C (Material C) を用いた。シートの厚さは、1mm であった。

Polymethylmethacrylate (PMMA) および polyurethane (PU) に 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) を添加した材料 (PMMA-DNCB および PU-DNCB) を作製した。Material-B は、微細粉にした材料についても試験試料として用いた。

細胞毒性試験では、JIS 適合品 (13Au-58Ag-21-Pd) と不純物が多い JIS 不適合品 (10Au-62Ag-13Pd) である歯科鑄造用金銀パラジウム合金を試験材料とした。

(感作性試験) Material B、PMMA-DNCB は、有機溶媒、生食および綿実油で抽出した各溶液について、GPMT または Adjuvant and patch (A & P)

試験を行った。PMMA レンズに、PU-DNCB をコートしたコンタクトレンズを作製し、DNCB で感作したウサギ眼への装用試験を行った。GPMT および A&P 試験は、1 群 5 匹のモルモットを用いて定法により試験した。

(埋植試験) Material A、B、C、日本ガイドライン埋植試験用陽性 (Posi-Cont.) および陰性対照材料 (Nega-Cont.) を筋肉内と皮下組織内へ 4 週間埋植した。日本のガイドラインの方法に従って、埋植した材料周囲の組織反応および炎症領域の幅を測定した。

(ウサギ眼コンタクトレンズ装用試験) DNCB 含有ポリウレタン (DNCB-PU) をコンタクトレンズにコートし、日本白色種ウサギ眼に装用し、眼粘膜に及ぼす影響を観察した。ウサギは、予め、DNCB で感作させたウサギ 4 匹と非感作のウサギ 2 匹を使用した。片眼に、PMMA のみをコートしたコンタクトレンズを、他眼には、種々の量の DNCB を含有する PU をコートしたコンタクトレンズを装用し、眼刺激性をドレイズスコアで評価した。

(細胞毒性試験) JIS 適合および不適合の 2 種の金銀パラジウム合金を L929 細胞用には 10% 血清含有 MEM 培地を用いて、V79 細胞用には、5% 血清含有 GMNP 培地を用いて抽出した。材料表面積と抽出液の割合は、3 あるいは 6 cm²/ml で 37°C、24 あるいは 72 時間抽出した溶液について、

米国の方法である MEM Elution test と日本の方法であるコロニー法を用いて比較した。

C. 研究結果

昨年度の研究結果から提案した抽出方法 (Fig. 1) に従って調製した溶液について感作性試験を実施した。Material B について、GPMT で試験した結果を Fig. 2-4 に示した。材料 7g に含まれる抽出物を 7ml に調製して得た抽出物濃度を B 濃度とした。B 濃度で誘発したモルモットについて、B、B/2、B/4 の 3 段階の惹起濃度で皮膚反応を評価した (Fig. 2)。陽性率 100% で、平均評価点は、いずれの惹起濃度でも同レベルの 3.0 以上を示した (Fig. 2)。Material s B からの抽出物濃度は比較的高いので、次に、倍希釈した抽出物濃度 B/2 で誘発したモルモットについて、B、B/2、B/4、B/8 の 4 段階の惹起濃度で皮膚反応を評価した (Fig. 3)。陽性率 100% で、平均評価点は、いずれも 3.0 以上を示した。また、惹起濃度 B/4 以上ではほぼ一定の平均評価点を示した (Fig. 3)。そこで、反応が飽和している可能性があるため、更に抽出物濃度を 4 倍希釈した B/4 濃度で誘発したモルモットについて、B、B/2、B/4、B/8 の 4 段階の惹起濃度で皮膚反応を評価した (Fig. 4)。陽性率 100% で、平均評価点は、Fig. 3 とほぼ同様であった。従って、この材料は、4 倍希釈しても同レベルの皮膚反応を示す材料であることが明らかになった。Material B は、

皮膚感作性のための標準材料としては、適切でないことが明らかになった。GPMT と Adjuvant and patch test の感度比較を行うために、Fig 1 のプロトコールに従って Material B から調製した B 抽出物濃度液について、Adjuvant and patch test を行った (Fig. 5)。誘発濃度を B、惹起濃度は、B、B/2、B/4 の 3 段階で行った結果、陽性率は 100%、平均評価点は、いずれも 3 以下で、B 溶液で誘発した GPMT での結果 (Fig. 2) に比べ、平均評価点が低く、検出感度は低いことが判明した (Fig. 5)。

次に、DNCB 含有 PMMA 材料 (Material-PD) を作製し、Fig. 1 のプロトコールに従って調製した抽出物濃度の PD 溶液で誘発し、GPMT を行った (Fig. 6)。惹起濃度 PD、PD/2、PD/4、PD/8 の 4 段階で試験した結果、平均評価点は 3.6、2.2、1.2、1.0 と希釈濃度に応じて減少した。次に、誘発濃度 PD/4 で GPMT 試験を行い、惹起濃度を PD/4 で試験すると、PD 濃度で誘発した場合に比べ、平均評価点は 0.4 と明らかに減少した (Fig. 6)。従って、標準材料としては、DNCB 含有ポリマーが候補となる。次に、PMMA、0.01%DNCB 含有 PMMA、0.1%DNCB 含有 PMMA を作製し、感作性について検討した (Table 1)。0.1%DNCB PMMA を米国の抽出方法である生食、綿実油で抽出した溶液について試験した結果、平均評価点は 0.6 から 0.8 で低かった。一方、3 箇所ラボで、Fig. 1 のプロトコールに

従ってアセトンで抽出し試験した結果、48時間での平均評価点は、3.6-4.8の範囲であり、米国法に比べて高かった (Table 1)。

次に、感作性物質含有材料を皮下および筋肉内に埋植した時の組織反応について比較した (Fig.7-10)。動物は、モルモットを用いた。Material Bの抽出溶液であらかじめ感作させたモルモットについても埋植し、非感作群での組織反応と比較した。Fig.7は、皮下に5種の方法を埋植し、病理学的組織反応をスコアで表示した。材料を埋植した群では、Material Aと陽性対照材料が平均スコア 4.8、Material Bが 4.2を示したが、そのほかの材料は陰性対照とほぼ同レベルであった (Fig. 7)。感作性処理をした群では、平均スコアは2倍程度高くなった。従って、感作している動物では、感作性材料を皮下に埋植するとその組織反応が強くなることが明らかになった (Fig. 7)。次に、モルモットの筋肉内に4種の方法を4週間埋植したときの組織反応の平均スコアを示した (Fig.8)。皮下組織の場合に比べ、組織反応の程度は筋肉組織の場合の方が強いことが明らかになった (Fig. 8)。あらかじめ Material B の抽出液で感作させたモルモットに4種の方法を筋肉内埋植すると、平均スコアは、陰性対照材料以外は、非感作群とほぼ同レベルであった (Fig.8)。

日本のガイドラインに記載されている埋植試験の評価指標である炎症領域の幅について測定した (Fig.9)。

皮下組織では、MaterialA がもっとも大きく、ついで陽性対照材料、Material B、Material C、陰性対照材料の順であった (Fig. 9)。感作処理をしたモルモットでは、Material A、Material B、および陽性対照材料で炎症領域の幅は2倍近く増加した。皮下反応は、感作した動物では、非感作群に比べ、病理学的スコアおよび炎症領域の幅ともに増加し、組織反応が増悪することが明らかになった (Fig. 9)。

モルモット筋肉内に4種の方法を埋植し、炎症領域の幅を測定した (Fig.10)。炎症領域の幅は、Material A がもっとも大きく、ついで Material B、Material C、陰性材料の順であった。予め Material B 抽出液で感作させた群では、炎症領域の幅は、Material Cを除いて約2倍増加し、組織炎症反応が増強することが明らかになった (Fig.10)。

次に、モルモットの皮膚感作性反応と組織反応との関係を調べた結果を Fig.11-14 に示した。Material A を埋植した時の皮下組織での炎症領域の幅と皮膚感作性強度との関係を調べた結果、skin reaction でのスコアが高いモルモットほど、炎症領域の幅は、増加する事が明らかになった (Fig.11)。陰性材料では、皮膚反応と炎症領域の幅との間に相関性はなかった (Fig.11)。病理学的スコアと皮膚反応との関係を Fig.12 に示した。Material A を皮下に埋植した場合、8以上のスコアを示すが、skin

reaction との間に相関性は認められなかった。陰性材料では、skin reaction 5 を示し、皮膚感作性の反応が強かった個体をのぞき、いずれも、スコアは7以下であった (Fig.12)。

モルモットの皮膚感作性と、Material A を筋肉内に埋植したときの炎症領域の幅との関係を調べた結果を Fig.13 に示した。Material A での炎症領域の幅は、皮膚反応が強い個体で増加した。また、皮下組織での炎症領域での幅に比べ、筋肉内に埋植した場合、増加レベルが高いことも明らかになった (Fig.11、13)。陰性材料では、炎症領域の幅と皮膚反応強度との相関性は認められなかった (Fig.13)。Material A を筋肉内に埋植した時の病理学的スコアと、皮膚反応との関係を調べた (Fig.14)。病理学的スコアは高い傾向が認められたが、皮膚反応との相関性はなかった。陰性材料を筋肉内に埋植した場合にも皮膚反応との間に相関性はなく、Material A に比べ、病理学的スコアが低い傾向を認めた (Fig.14)。

ウサギ眼刺激性試験では、DN CB を $10\mu\text{g}$ 以下含有するコンタクトレンズでは、最高 10 日間観察期間では、PU のみをコートしたレンズ装用眼と比べて、ドレイズスコアに差異は認められなかった。しかし、DN CB $100\mu\text{g}$ を含有する PU でコートしたコンタクトレンズでは、明らかな眼刺激性を認めた。1 匹のウサギでは、装用開始 6 時間で、ドレイズスコア 48 を示し、強い眼刺激性を認めたため、試験を中

止した。感作した動物にアレルゲンを溶出するコンタクトレンズを装用すると、眼粘膜に炎症反応を惹起することを確認できた。非感作のウサギでは、DN CB $100\mu\text{g}$ -PU をコートしたレンズを装用しても、感作動物で観察された強い眼刺激性反応はあらわれなかった。

2 種の合金材料の細胞毒性について、米国の MEM Elution test 法を用いて評価した結果、5% FCS-MEM 抽出液で、 $6\text{cm}^2/\text{ml}$ の割合で 37°C で 24 および 48 時間抽出した溶液を試験し、ニュートラルレッド法で評価した結果、2 種の合金ともに細胞毒性は検出されなかった (Fig.15)。次に、10%FCS-MEM 培地で、2 種の合金を 3 あるいは $6\text{cm}^2/\text{ml}$ の割合で 24 あるいは 72 時間抽出した溶液を L929 細胞によるコロニー法で試験した。 $6\text{cm}^2/\text{ml}$ の割合で 72 時間抽出した時、不純物の多い 10Au-62Ag-13Pd 合金の 100%抽出液でのみ、コロニー形成率が有意に低下した (Fig.16)。次に、2 種の合金材料を 5%FCS-GMNP 培地で抽出した溶液について、V79 コロニー法で細胞毒性を調べた (Fig.17)。 $3\text{cm}^2/\text{ml}$ では、72 時間抽出した 10Au-62Ag-13Pd 合金 100%抽出液で有意なコロニー数の減少を認めた。 $6\text{cm}^2/\text{ml}$ では、24 時間、72 時間抽出液ともに、同合金の 50%抽出液濃度以上でコロニー数の減少を観察した (Fig.17)。JIS 規格に適合した 13Au-58Ag-21Pd 合金では、いずれの抽出条件でも細胞毒性

は検出されなかった (Fig.15-17)。Table 2は、2種の合金材料のコロニー法での IC50(%)を示した。L929 細胞は感度が低く、V79 細胞を用いたコロニー法が、溶出した金属イオンの細胞毒性を検出する上で感度が高いことが明らかになった。

D. 考察

ゴム材料からの抽出率は、3%以上を示し、比較的抽出物量の多い材料であった。この材料の場合、皮膚反応による GPMT 感作性試験は、4倍希釈した溶液を用いても原液と同じ強さの感作性強度を示したが、材料からの抽出物が多く、試験溶液の調製段階で沈殿を生じやすかった。従って、原液、4倍希釈液でも、皮膚を透過する感作性物質や、抗原提示細胞への取り込み量がほとんど同レベルのために、強い感作性材料でも、平均評価点が最高5レベルで留まったものと考えられる。

感作性物質を多く添加した Material A、および、その 10 分の 1 量を添加した Material s B では、皮下組織に埋植した時、炎症領域の幅は、添加量の多い方が大きい値を示した。埋植後、経過時間とともに炎症性物質が材料周囲から溶出し、炎症組織の範囲が広がっていくものと推測される (Fig.9)。また、皮下埋植では、感作処理した動物では、組織炎症反応も増悪することが明らかになった (Fig.7)。一方、筋肉内埋植では、病理学的スコアは、感作、非感作に関わらず、同レベルであったが、炎症領域の幅は、感

作処理動物で大きい値を示した (Fig.8,10)。筋肉内では、皮下組織のように、材料からの溶出物が拡散しにくいいため、材料周囲の病理学的スコアは、感作、非感作した動物に関わらず、同レベルのスコア値を示したものと考えられる (Fig.8)。しかし、炎症領域の幅は、感作した動物群で大きい値を示したことより、材料から筋肉中へ拡散していく感作性物質が拡散し濃度が次第に低下しても、動物個体が感作しているため、組織内で再度で接触したアレルゲンに対し、memory T 細胞が活性化し、炎症反応が惹起されたものと考えられる (Fig.10)。このことは、皮下埋植、筋肉内埋植いずれにおいても、skin reaction においてスコアが高い程、即ち、強く感作した動物ほど、炎症領域の幅が大きいことから推察できる (Fig.11、13)。

感作性物質を涙液等に溶出するコンタクトレンズを装用した場合、同物質に感作している動物では、眼粘膜上でも惹起反応をおこすことが明らかになった。

医療用具生物試験ガイドラインに基づく細胞毒性試験において、血清含有培地で抽出し、V79 コロニー法で試験した場合、細胞毒性のある金属を多く含有する合金材料において、細胞毒性を検出できたが、米国の L929 MEM elution test では、血清含有培地で抽出しても、試験法の感度が低いため、細胞毒性を全く検出できなかった。キャピラリー電気泳動による分析値から、細胞毒性物質として、JIS

不適合材料に多く存在する銅が原因であることを明らかにしている。また、この銅イオンの溶出性は、血清含有培地で溶出性が高いことも確認している。金属材料の細胞毒性は、通常、生食や血清不含培地で抽出を行いがちであるが、血清含有培地の方が金属イオンの溶出性も高いことを分析実験で確認している。

表 3 に ISO、日本、米国の感作性試験と細胞毒性試験法の違いと特徴についてまとめた。

E. 結論

材料 7g で、ヒト臨床で生じる皮膚反応を予測できる抽出方法を確立した。材料中に存在する抽出物濃度の 10 倍濃度で感作性実験をすることにより、感作性のリスクを定量的に評価できるものと考えられる。材料からの抽出物のロス等を考慮すると 90 g の材料があれば、試験群、コントロール群各 10 匹のモルモットについて試験実施が可能である。

感作性物質を含有する材料は、感作している動物で、眼粘膜の炎症を惹起するのみならず、皮下組織、筋肉内においても、炎症反応を増悪することが明らかになった。

細胞毒性試験の抽出液として、高分子材料のみならず、金属材料においても、血清含有培地は金属イオンの溶出性がたかく、抽出液として適していた。細胞毒性試験法として、MEM elution 法に比べ、コロニー法は検出

感度が高い。また、L929 細胞に比べて、V79 細胞の方が検出感度の高い細胞である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Y. Ikarashi, M. Kaniwa, T. Tsuchiya
Sensitization potential of gold sodium thiosulfate in mice and guinea pigs.

Biomaterials 23, 4907-4914 (2002).

K. Isama, A. Mastuoka, Y. Haishima, T. Tsuchiya

Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity using fibroblast L929 and V79 cells. Mater Trans. 43, 3155-3159 (2002).

Y. Ikarashi, T. Tsuchiya, K. Toyoda, E. Kobayashi, H. Doi, T. Yoneyama, H. Hamanaka . Tissue reactions and sensitivity to iron-chromium alloys.

Mater. Trans. 43, 3065-3071 (2002).

Toshie Tsuchiya , Yoshiaki Ikarashi, Takao Uchima , Hisashi Doi, Akitada Nakamura, Yuichi Ohshima, Masato Fujimaki, Kazuhiro Toyoda, Michihito

Takahashi, Takayuki Yoneyama and Hitoshi Hamanaka, A method to monitor corrosion of chromium iron alloys by monitoring the chromium ion concentration in urine, *Material Trans.* 43, 3058-3064 (2002).

Taizo Sumide, Toshie Tsuchiya, Effects of Multipurpose Solutions (MPS) for Hydrogel Contact Lenses on Gap-Junctional Intercellular Communication (GJIC) in Rabbit Corneal Keratocytes. *J. Biomed Mater. Res, PartB:Appl Biomater* 64B,57-64 (2003).

2. 学会発表

伊佐間和郎、配島由二、土屋利江
歯科鑄造用金銀パラジウム合金の *in vitro* 毒性評価—JIS 不適合品の細胞毒性と骨芽細胞機能影響
全国衛生化学技術協議会 2002 年

伊佐間和郎、松岡厚子、配島由二、土屋利江
歯科鑄造合金の正常骨芽細胞を用いる毒性試験：L929 及び V79 細胞毒性試験との比較
日本トキシコロジー学会 2002 年

土屋利江、林 達也、大庭耕輔、松岡哲也、片桐丈弘、中田和彦
医療用具の生物学的試験の標準化に関する研究：医療材料の感作性試験(その2)

第 24 回日本バイオマテリアル学会
松岡厚子、土屋利江
医療用具の生物学的試験の標準化に関する研究：医療材料の染色体異常試験

第 24 回日本バイオマテリアル学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

協力研究者

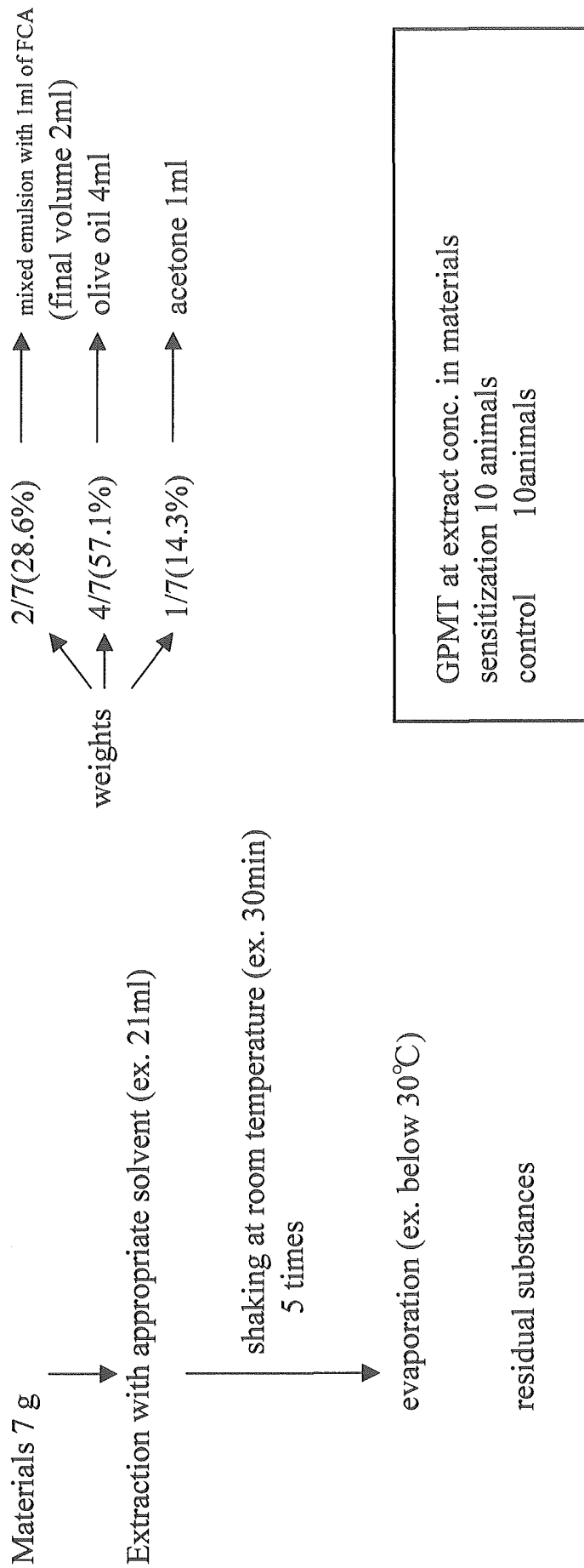
国立医薬品食品衛生研究所 療品部
伊佐間和郎、松岡厚子、配島由二

メニコン (株)
林 達也、中田和彦

ボゾリサーチセンター
松岡哲也

(財) 安評センター
大庭耕輔

(財) 民生科学協会
片桐丈弘



Objects: minimize the amounts of materials used in GPMT to maintain the similar sensitization responses in human cases.

Fig 1. Sample preparation procedure for GPMT.

Extraction solvent : acetone-chloroform Open patch (48h)
 B induction

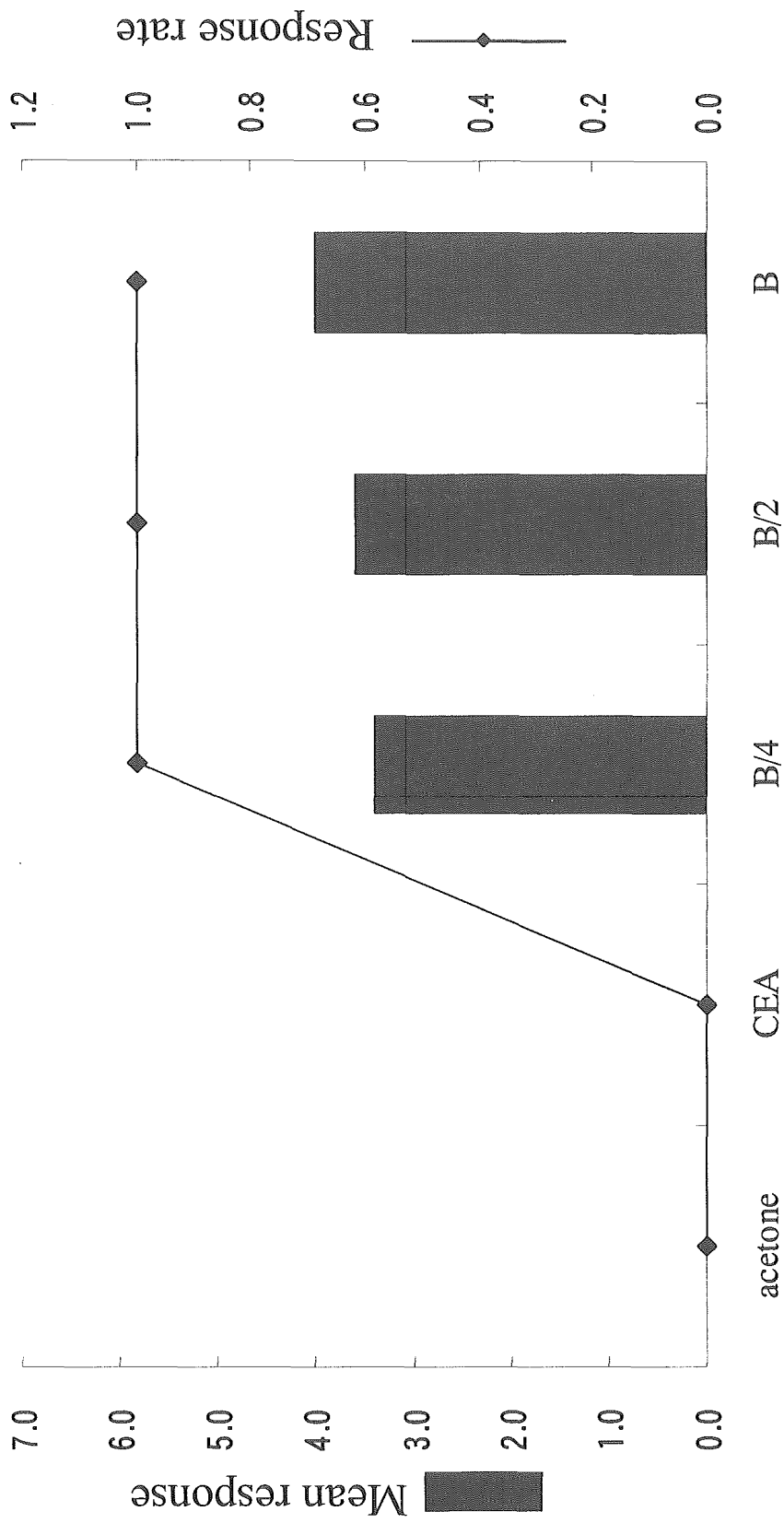


Fig 2. Comparison of the GPMT data among various challenge concentrations prepared from material-B using organic solvent- extraction method under the open patch condition.

Extraction solvent : acetone-chloroform Open patch (48h)
B/2 induction

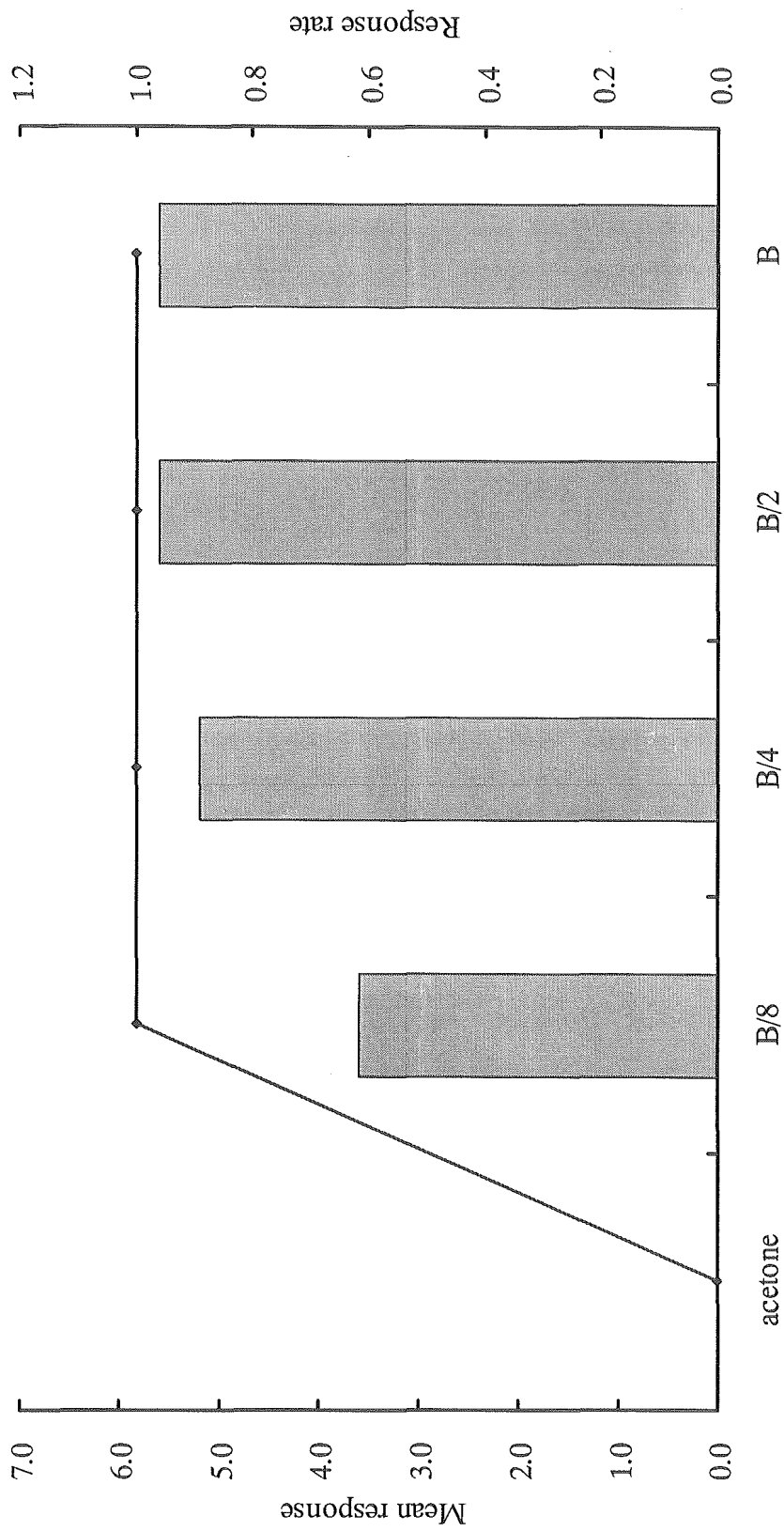


Fig 3. Comparison of the GPMT data among various challenge concentrations prepared from material-B using organic solvent- extraction method under the open patch condition.