

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 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 土 屋 利 江

平成 15 (2003) 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	71
	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	93
	五十嵐良明	
3.	発癌リスク評価手法開発	109
	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	119
	井上博之	
5.	セラミックス関節摩耗試験法開発	121
	池内健	
6.	非破壊・耐久性試験法の開発	125
	高久田和夫	
7.	人工関節の力学的, 組織学的研究	129
	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	133
	佐藤道夫	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	161
IV.	研究成果の刊行物・別刷り	

I 総括研究報告

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。下記の成果を得た。

- 1) 天然医用材料からのエンドトキシン回収条件の最適化および混入エンドトキシンの不活化法を開発を行った。その結果、コラーゲンからのエンドトキシン回収率は平成7年度のガイドライン法では1%未満であったが、前処理として精製コラーゲナーゼ処理を施すことにより著しく改善された。また、アルギン酸製品からのエンドトキシン回収は前処理としてホモジナイズ処理を行うことにより顕著に上昇した。天然医用材料に混在するエンドトキシンは低濃度の水酸化ナトリウム処理により材料の構造を維持した状態で不活化できる可能性を見出した。
- 2) 医用材料による即時型アレルギーを評価する手法の確立を目的として、試験物質の投与方法の違いによる各種指標の変化について検討した。陽性タンパク質 ovalbumin (OVA) をアジュバントとともに BALB/c 系マウスに腹腔内投与した。マウスの性差はなく、週齢による著しい反応強度の差はなかったが、若齢ではバラツキが少なかった。OVA 投与2回、最終投与から2週間後採血あるいは、投与3回、最終投与から1週間後採血すると血清 IgE 抗体価は上昇し、個体差が小さくなった。アレルギー性の判定指標としては、抗原特異的血清 IgE 抗体価測定が最も確実であるが、総 IgE 抗体価でも十分であった。抗原刺激による脾臓リンパ球の IL-4 および、IL-10 産生測定もアレルギー性評価に有効であった。mitogen 刺激による各種サイトカイン産生は免疫の有無に関係な

- かった。幼若化能の測定はアイソトープを使用した。別法として popliteal lymph node assay (PLNA)による検出法を検討した。OVA 及び抗菌剤 cyclohexidine gluconate 溶液をマウスの足蹠に注射し、1 週後の膝窩リンパ節の重量及び細胞数の増加率を求めた。いずれの物質においても 2 倍以上の増加があった。IgE 抗体試験等との比較を行い、アレルギー性検出法としての有用性を評価する。
- 3) 医用材料の *in vitro* 発癌評価法として、遺伝毒性試験の1つである染色体異常試験の有用性を検討した。4,4'-メチレンジアニリン (MDA) 含有ポリウレタン (PU) シートをモデル陽性対照材料として作成し、その培地抽出液の染色体異常試験を実施した。モデル陽性対照物質 MDA は代謝的活性化系存在下、0.4 mg/ml で染色体の構造異常および数的異常（核内倍加を含む）を誘発した。モデル材料の培地抽出液では、4%MDA 含有 PU を高圧蒸気滅菌後試験した結果、代謝的活性化系存在下、疑陽性であった。MDA 含有 PU の培地抽出および有機溶媒抽出物中の MDA と PTMG の溶出量を定量した。4%MDA 含有 PU の有機溶媒抽出では、培地抽出と比べると、MDA は 10 倍以上、PTMG は 1000 倍以上の溶出量であった。MDA 単独と PTMG 共存下では、染色体異常試験結果が異なることも明らかになった。医用材料の試験においては、材料に接着した細胞で貪食されるオリゴマーの影響をも考慮した抽出溶液で試験する必要性が示唆された。
 - 4) ポリ乳酸 (PLLA) 粒子埋植 2 g 群の 5 例が、埋植後 1-2 週でショック症状を示し、ほぼ全例で埋植部位に流動性物質の貯留が観察され、6-8 週までに消失した。2 g 群では、埋植後 8 週から体重増加抑制、18 週から埋植部位の皮下腫瘍が認められ、42 週には 10 例であった。同群では、埋植部位に腫瘍が認められた。PU 群では、埋植後 60 週までの皮下の腫瘍の発生数は、対照群 0 例、PU 群 2 例、PU+0.4%MDA 群 1 例、PU+4%MDA 群 2 例であった。
 - 5) セラミック製人工関節に、材質の欠陥による不具合が続出している。本研究では再置換の主な原因である超薄膜摺動部の異常摩耗及びソケットのエッジ部での摩擦による破損を再現する摩耗試験法を開発してアルミナ、ジルコニア及びそれらの複合材料について試験を行った。その結果、開発した 2 種類の試験法によって関節用セラミックス材料の耐摩耗性を正確に評価することが可能であり、試験結果は異常摩耗と破損を生じない安全な人工関節を実現するための材料選定のガイドラインとなりうることが示された。
 - 6) 2 種類のプレートについて、ASTM 規格にしたがって静的試験および疲労試験を行った。そして stair case 法に基づいて、106 回の繰返し荷重に耐える荷重を推定した。実験した 2 種類のプレートで、静的強度に約 5 倍の差異があったものが、疲労強度では 2

倍以下になるなど静的強度で疲労強度は推定できず、両方の試験が必須であることが分かった。また臨床上重要となるプレートの感染についても実験を行い、プレート上でぶどう球菌や緑膿菌を培養するとバイオフィームが形成され抗菌剤に対して抵抗性となること、このバイオフィーム形成はプレート材の表面処理で制御可能であることが分かった。さらに実際に獣医領域で使用され、感染および破壊を生じて抜去したプレートを手に入して検査したところ、材料表面にはバイオフィーム形成を認め、実際に臨床的にもプレートの感染はバイオフィーム形成によるものであることが確かめられた。

- 7) 人工関節の固定のメカニズムやそれに関わる人関節のデザインに関して、評価のための前臨床試験が必要である。前年度試作した人工股関節安定性試験器を用いて、固定部分の応力分布を求めることにより、望ましい人工関節のデザインについてのガイドラインを作成することができる。二年目の当該年度は、圧力分布の変動を尺度とした人工股関節固定法を評価するための試験器である人工股関節安定性試験器を構築できた。固定法のコンセプトが対照的に異なる2種類の人工関節システムの安定性を評価した。その結果、プレスフィット型人工股関節においては、接触圧力分布が、角度変化によって不安定に変動した。横止めピンを有した十字システムにおいては、接触部分を適切な部位に限定することでそれを回避することができることがわかった。接触圧力分布の不安定変動の発生の有無を尺度として人工股関節システムの固定法の評価が、可能であることを示すことができた。
- 8) 過去数年間の人工股・膝関節、接合材の破損に関する国内文献検索を行なってデータベースを作成すると共に、米国の整形外科インプラント用具の不具合情報についてもデータベースを作成し、様々な視点から集計処理を行った。不具合内容別では、膝・股関節では傷害報告が多かったが、接合材では機能不全と傷害がほぼ同数であった。破損に関しては、骨接合材(特にねじ、プレート)、人工関節(膝・股関節)、脊椎関連用具の順に報告が多かった。ゆるみでは股・膝関節に、摩耗では膝関節に報告が多かった。人工関節の破損と摩耗では、骨セメント使用型の用具分類で報告がやや多い傾向があるなど、用具の種類によって報告頻度が異なっていたが、ゆるみは全般的に生じていると考えられた。

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 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) 実験材料

大腸菌 O111 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。同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、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/RNase 処理後、超遠心分離の反復により精製した。

天然医用材料としては Type I 酸性コラーゲン（高研）およびアルギン酸ナトリウム（クラレメディカル）を使用した。LPS および菌体スパイク標品は、両材料の 0.2% 水溶液 (600 ml) に既知量の LPS (0.6 mg) または菌体 (60 mg) を添加し、コラーゲンは中和後、アルギン酸ナトリウムは直接凍結乾燥して調製した。市販製品としては、12 種類のコラーゲン製創傷被覆剤 (#1- #12) および 4 種類のアルギン酸塩製品 (#13 - #16) を使用した。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。

(2) 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。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 O55:B5 株 LPS）を用いた。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。

(3) 抽出および前処理条件

LPS 抽出溶媒としては滅菌生理食

塩水、注射用蒸留水、リン酸緩衝液 (pH 7.0)、ヒト血清アルブミン溶液（和光）および PEG 溶液（組成：0.4% polyethyleneglycol, 50mM EDTA, 1% Tween 20：使用時 100 倍希釈：生化学工業）を使用し、室温および 40℃において 0-72 時間回収処理を行った。酵素としては、デトキシゲルカラム (Piece) により精製したコラーゲナーゼ 1A-S (Sigma) および alginate lyase (Sigma) を使用した。ホモジナイズ処理はジェネレータ式ホモジナイザー (GLH 型・ヤマト科学) を使用した。各種創傷被覆剤製品からの LPS 回収は、無菌的に裁断後、製品 0.025 - 0.125 g あたり 1 - 5 ml の滅菌生理食塩水 (最終濃度 0.025 g/ml) を使用して行った。

(4) 化学処理に伴う活性／構造変化

LPS／菌体スパイクコラーゲンおよびアルギン酸ナトリウムの化学処理は種々の濃度の酸性電解水、水酸化ナトリウムおよび次亜塩素酸ナトリウム中、室温下、0-48 時間行った。処理後、注射用蒸留水で希釈し、リムルス活性を測定した。また、LPS／菌体非スパイク材料を同様の条件で処理し、中和および凍結乾燥後、各材料の絶対分子量をダイナミック光散乱光度計 (Wyatt Technology) および AS2000 オートサンプラーを接続した HLC-8020 GPC システム (東ソー) を使用して測定した。コラーゲンの測定は TSKgel α 6000 カラム、カラム温度 40℃、溶離液 0.01M 酢酸ナトリウム／塩酸緩衝液 (pH 2.0)、流速 1.0 ml/min の条件で行った。アルギン酸ナトリウムの測定には TSKgel α 6000 および TSKgel

PW5000 を用い、溶離液 1/15M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 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

試薬：タンパクアレルゲンは ovalbumin (OVA)、薬物アレルギーを起こす化学物質として、cyclohexidine gluconate (CHG) を用いた。アジュバントとして、Alum (aluminum hydroxide hydrate $[Al(OH)_3 \cdot x H_2O]$ gel suspension) を用いた。

免疫方法：BALB/c 系マウス (1 群 5 匹) に、OVA と Alum 2 mg の PBS 混合溶液 200 μ l を 1 週間に 1 回の割合で腹腔内に注射し、同様の操作を繰り返した。別の試験では、アジュバントと混和させない 2% OVA-PBS 溶液 250 μ l を注射した。対照は PBS またはアジュバントだけを注射した。最終投与から 7 日または 14 日後、体重を測定した後、心臓から採血し、脾臓を摘出して重量を測定した。

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。

サイトカインアッセイ：脾臓細胞を 5×10^6 個/1 ml ずつ 24 穴プレートに入れ、Con A 2 μ g/ml または OVA 100 μ g/ml を添加して 48 または 72 時間培養した。培養上清を回収し、IFN- γ 、IL-4 および IL-10 濃度を ELISA により定量した。

幼若化試験：上述の脾臓細胞を 5×10^5 個ずつ 96 穴プレートに入れ、各 mitogen (Con A 2 μ g/ml、LPS 1 μ g/ml 及び PHA 10 μ g/ml)、抗原として OVA 100 μ g/ml を添加して 48 ~ 72 時間培養した。培養終了 4 時間

前に 3 HTdR 0.25 μ Ci を添加して細胞内への 3 HTdR 取り込み量 (dpm) を測定した。また、AlamarBlue または WST-8 を添加し、吸光度の変化を測定した。

PLNA：マウスの片方の足蹠に試験溶液 50 μ l を注入し、もう一方には溶媒の生理食塩水を注入して対照とする。投与後 7 日目に膝窩リンパ節を取り出して重量を測定後、リンパ節細胞を遊離させ、リンパ節 1 個当たりの細胞数を算出し、対照リンパ節に対する増加率を求めた。

3) 発癌リスク評価手法開発

陽性対照物質：4,4'-メチレンジアニリン (MDA, CAS 登録番号 101-77-9 $C_{13}H_{14}N_2=198.27$) は、エポキシ樹脂や軟性ウレタンの硬化剤として用いられており、ポリウレタン (PU) 製造過程の中間物質でもある。その化学構造式を図 23 に示す。

陽性対照材料の作成：PU、0.4%MDA 含有 PU および 4%MDA 含有 PU の 1 mm 厚シートを作製した。

滅菌方法：高圧蒸気滅菌 121 $^{\circ}$ C、20 分間の高圧蒸気滅菌を行った。EOG 滅菌 EOG 滅菌後十分に脱気した。

陽性対照材料からの試験用試料の調製：

材料の培地による抽出 滅菌後、材料を無菌的に約 2 mm \times 15 mm 大に細切し、材料 0.2 g 当たり 1 ml の培地を添加し、炭酸ガス培養器中で 37 $^{\circ}$ C 48 時間浸漬した。

有機溶媒抽出 約 1 g の材料を正確に秤量し、約 2 mm \times 15 mm 大に細切し、材料 1 g 当たり 3 ml の有機

溶媒（メタノール、アセトン）を加えて、室温で 30 分間振盪した。抽出液を回収し、材料に新しい有機溶媒を加えて、同じ条件で振盪した。合計 5 回の抽出を行い、回収した抽出液をドラフト内で揮発させたのち、真空ポンプで完全に溶媒を除去した。抽出物重量を秤量後、最少量の DMSO に溶解した。

染色体異常試験：

細胞 チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL）を用いた。倍加時間は約 13 15 時間である。

培養液 Minimum Essential Medium (GIBCO 11095-080) に 56℃30 分間非働化した牛胎児血清を 10% 添加したものをを用いた。

S9 mix 試験物質の代謝的活性化を行うため、キッコーマン社（千葉県野田市）製の「染色体異常試験用凍結 S-9Mix」を購入し、使用直前に冷水中で解凍して用いた。S9 は、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボン投与した Sprague Dawley ラットの肝臓から調製されている。

処理方法 $1.5 \times 10^5 / 5 \text{ ml} / \text{plate}$ の細胞を播種し、翌日 S9 mix 存在下および非存在下、培地抽出液または有機溶媒抽出物で 6 時間処理した。培地抽出液での処理時には、細胞を培養していた培地を除き、培地抽出液 2.5 ml および S9 mix（または培地）0.5 ml を添加した。有機溶媒抽出物での処理時には、S9mix 添加群では、細胞を培養していた培地を 2.5 ml 除き、S9 mix 0.5 ml を加え、また、S9 mix 非添加群では、細胞を培養していた培地を 2 ml 除き、

そこへ、両処理群とも 15 μl の DMSO または抽出物の DMSO 溶液を添加した。6 時間後、処理液を新鮮な培地と交換し、さらに 18 時間培養後、染色体標本作製した。

染色体標本作製 標本作製 2 時間前に、分裂中期像を蓄積する目的でコルセミド (GIBCO 15210-040、最終濃度 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した。トリプシンで細胞を回収し、0.075 M KCl 溶液で 37℃、15 分間の低張処理を行った。固定液（氷酢酸：メタノール = 1 : 3 の混合液）で 3 回固定を行い、適切な濃度の細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を脱脂洗浄済みスライドグラスに滴下し、空気乾燥させた。翌日、作製した標本をギムザ溶液で染色した。

染色体異常の観察 光学顕微鏡（400 倍）で良く広がった分裂中期像 100 個について、染色体の構造異常および倍数体の観察を行った。分類した構造異常名およびその略号をその模式図と共に図 2 に示す。判定はこれまでの陰性対照群の背景データより、原則として異常頻度が 4 % までを陰性、5% から 9% までを疑陽性、10% 以上を陽性とした。

有機溶媒抽出物および培地抽出物中の MDA および PTMG の分析、定量： EOG 滅菌後の培地抽出物および有機溶媒抽出物について、MDA および PTMG オリゴマーの分析・定量を行った。以下に用いた機器および分析条件を示す。

分析装置：

HPLC Agilent 1100 Series
カラム CAPCELL PAK C8

UG120 (5 μm , 2 x 150 mm, Shiseido)

カラム温度 40℃
溶媒流速 0.2 ml/min
サンプル注入量 5 µl

MS JEOL AccuTOF JMS-T100LC
イオン化モード ESI-positive
イオンガイドピーク間電圧 1800 V
イオンガイドバイアス電圧 30 V
フォーカス電圧 -102 V
集束レンズ電圧 10 V
四重極レンズ電圧 20 V
左右レンズ電圧 -2 V
上下レンズ電圧 1 V
押し出しバイアス電圧 -0.42 V
リフレクトロン電圧 850 V
押し出し電圧 778 V
引き込み電圧 -778 V
飛行管電圧 -7000 V
ニードル電圧 2000 V
オリフィス1 電圧 85 V
オリフィス2 電圧 5 V
リングレンズ電圧 10 V
脱溶媒室温度 250℃
オリフィス1 温度 80℃

データ処理 MAY 2000 & Excel

MDA 分析:

有機溶媒抽出物

- 1) 有機溶媒抽出物をメタノールに溶解 (最終濃度 1-10 mg/ml)
- 2) メタノールで希釈
- 3) 上記希釈液に等量の 3,4'-diaminodiphenyl ether (20 ppm) を添加
- 4) LC-MS 分析: HPLC 溶媒 A 液 = 水、B 液 = MeOH

グラジエント条件:

25% B / 0-11 min

25→95% B / 11-12 min

95% B / 12-21 min

95→25% B / 21-22 min

25% B / 22-25 min

検量線は MDA 0.05-10 ppm の範囲で作製した。定量計算は MDA m/z 199.132、IS (3,4'-diaminodiphenyl ether) m/z 201.119 を使用した。

培地抽出物

- 1) Medium (3.75-4.0 ml) に 200 µl の 2M NaOH を添加
 - 2) ジエチルエーテルで 3 回抽出
 - 3) ジエチルエーテル層を N₂ 乾燥
 - 4) MeOH/THF (1:1) に溶解
 - 5) フラッシュした Sep-Pak C18 カートリッジを通過
 - 6) MeOH/THF (1:1) 20 ml で洗浄
 - 7) 通過液と洗浄液を集めエバポレーターで乾固
 - 8) IS 10 ppm 溶液 1 ml に溶解
 - 9) フィルター濾過し LC-MS 分析
- 培地抽出物からの MDA 回収率は 4 ml の培地に MDA 20 µg をスパイクした後、上記と同じ方法により実施した。

PTMG 分析:

有機溶媒抽出物

- 1) 有機溶媒抽出物をメタノールに溶解 (最終濃度 1-10 mg/ml)
- 2) メタノールで希釈 (最終濃度 Table 参照)
- 3) 上記希釈液に等量の 3,4'-diaminodiphenyl ether (20 ppm) を添加
- 4) LC-MS 分析: HPLC 溶媒 A 液 = 水、B 液 = MeOH/THF (1:1)

グラジエント条件:

40→95% B / 0-30 min

95% B / 30-35 min

95→40% B / 35-36 min

95% B / 36-40 min

検量線は作製せず、PTMG1000 に含まれる各種ポリマー成分のピーク面積から存在比率を求め、IS (3,4'-diaminodiphenyl ether) ピークとの MS 的検出感度の補正係数 (ファクター) を乗じて定量した。

培地抽出物

MDA と同じで、スパイク実験では MDA の代わりに PTMG1000 (20 μ g) を添加し、m/z 977 のポリマー成分を指標として計算した。

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 (PU)、0.4%MDA 添加 PU、4%MDA 添加 PU、PLLA0.4 g、PLLA2 g の 5 種類の材料をそれぞれラット背部皮下に埋植し、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 高用量埋植による発癌活性の変化を確認する。

5) セラミックス関節摩耗試験法開発

(1) 超薄膜潤滑における摩耗試験

セラミック/セラミック人工関節における潤滑膜厚さは 10 μ m 以下であるので、たとえすべり速度が低くてもせん断率と摩擦係数が高くなる。そのため、セラミック/セラミック人工関節の初期における関節のゆるみ、ソケットの転位、異常摩耗などの不具合が報告されている。本研究は人工関節内の超薄膜潤滑を再現するために、端面型摩擦試験機を用いる試験法を開発し、円筒状の試料の端面同士を接触させ、平面間の摩擦摩耗特性を調べた。潤滑液として 37°C の蒸留水及び牛血清の 30% 水溶液を用いて接触面圧 5, 10 MPa、すべり速度 40 mm/s の条件で摩耗試験を行った。総すべり距離は 10 km であった。

(2) 点接触下の摩耗試験

摺動面の加工精度が低い場合、あるいは摩耗粉が滑り面に混入した場合の応力集中を伴う摩擦を再現するために、平面と球面との間の摩耗を調べる試験法を開発した。ピン・オン・フラット摩擦試験機に試料として端面が球状のピンと平板を固定し、潤滑液として 37°C の蒸留水及び牛血清の 30% 水溶液を用いて初期接触面圧が 3 GPa、平均すべり速度 40 mm/s の条件で摩耗試験を行った。

(3) 線接触下の摩耗試験

関節が可動域を超えるとステムのネック部とソケットのエッジ部が接触し、また亜脱臼した骨頭が再嵌入するときには骨頭とソケットのエッジ部が接触しつつ摺動し、いずれの場

合にも激しい摩耗と破壊が生じることが知られている。ポリエチレンの摩耗を調べるために開発された従来の摩耗試験機及び関節シミュレータによってはこの異常な状態を再現できないので、平面と直方体試料のエッジの部分と接触させてピン・オン・フラット試験機を用いて往復運動下の摩耗試験を行った。潤滑液として37℃の蒸留水及び牛血清の30%水溶液を用い、平均すべり速度40 mm/sの条件で摩耗試験を行った。試験の前後に光学顕微鏡、走査電子顕微鏡、原子間力顕微鏡、X線回折装置によって摩耗面の形状とクラック、欠けを調べた。

6) 非破壊・耐久性試験法の開発

(1) 獣医用の整形外科インプラントであるプレートについて、代表的な製品として、ストレートプレート(プロミクロス社製、全長60mm、幅6mm、厚さ2mm、穴数6)およびスモールプレート(キリカン洋行社製、全長60mm、幅8mm、厚さ2.5mm、穴数7)の2種類を選択して、ASTMで規格化されている4点曲げ試験法である F382-99 Standard Specification and Test Method for Metallic Bone Plates にもとづく静的強度試験(インストロン材料試験機)、および疲労強度試験(MTS試験機)を行った。さらに規格で推奨されている stair case 法に基づいて、 10^6 回の繰返し荷重に耐えられる荷重推定を行った。

(2) 临床上重要となる、細菌感染が生じた際のプレートの感染源化についての実験として、理化学研究所微生物バンクより No.1649

Escherichia No.2151 Staphylococcus, No.2412 Pseudomonas, No.2414 Staphylococcus を選択し、(1)で使用した型式のプレート上で細菌培養の実験を行った。培地には日本製薬製 SCD 培地ダイゴを用い、必要な場合には培地にウサギ血漿(デンカ生研、乾燥ウサギ血漿)を添加した。次いで核染色(EtBr)および多糖類染色(FITC labeled Concanavalin A)を行って材料表面を蛍光顕微鏡観察(Leica CLSM)する実験を行った。さらに多糖類を染色することが知られているフクシンで染色し、肉眼観察を行った。

(3) バイオフィーム形成には細菌の材料表面への接着が必要となるとの考えから、バイオフィーム形成を阻害するためにプレート材を細胞非接着性とする表面処理を行った。処理剤にはリン脂質を含む細胞膜模倣合成モノマーである MPC(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)を利用した。表面処理は、通法として、表面洗浄、モノマー液浸漬、風乾で行った。

(4) 獣医領域において、骨折後にプレート固定を行ったが早期にプレートの破折と細菌感染をきたしプレート除去を行った例について、新鮮抜去インプラントを入手し解析する機会を得た。核染色および多糖類の染色を行って、細菌とバイオフィームの形成について調べた。

7) 人工関節の力学的、組織学的研究

人工股関節ステム周囲の圧力分布を求めるために、ヒトの歩行運

動時を想定し、屈曲角度を変えて最大 2000(N)まで荷重をかけることができる人工股関節安定性試験器 Femoral stem tester を試作した(図1)。測定対象として①プレスフィット型人工股関節ステム(PFステム, 広い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股関節), ②十字ステムモデル(IMCFステム, みかけの接触面積を限定する人工股関節)の2種類のモデルを用いた(図2)。即時重合レジン(オストロンII, ジーシーデンタルプロダクツ)を使用し, ヒト大腿骨の形状, 材質を模倣した樹脂モデルを作製した。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(極低圧用, ツーシートタイプ, 富士フィルム社)を用いた。測定圧力可能範囲は 0.2~0.6(MPa)で, 圧力を受けるとフィルム上に赤く発色し, 発色の濃度が圧力の大きさに応じて変化する。

まず, 圧力測定フィルムを短冊状にカットし, ステムの近位から遠位にかけて添付した。十字ステムについては横止めピン下部の接触圧力分布も測定した。次に二分割された樹脂モデルに人工股関節ステムを挿入し, 樹脂モデル側面にビス穴を作製することによって強固に固定した。そして樹脂モデル全体を装置に固定して, 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, 挿入後角度を 0~30° と変えて垂直圧縮荷重 1500(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。

測定結果として得られた赤色の濃淡分布から, 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, 定量的に求めた。

8) 整形外科インプラント不具合データに関する研究

国内の最近の人工股関節・膝関節の「破損」「感染」事例、接合材の破損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、医学中央雑誌から検索した過去4年間の人工股関節に関する論文から、タイトル及び抄録で破損、感染の条件に当てはまると判断したものを抽出した。また、1995年までに遡って、「人工股関節*感染」、「人工股関節*破損」という形で掛け合わせて検索した。同様に、人工膝関節に関しても、医学中央雑誌から過去4年間の、感染、破損を含む報告、膝関節ポリエチレンに起因する報告、破損を含む再置換報告について拾い上げた。接合材については破損・折損に関するものみに留めた。これら全てのデータについては、MS Access を用いて、データベースに再構築した。個々のデータに、股関節、膝関節、接合材、感染、破損などの分類付けも付記した。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最新版の不具合情報データについて、前年度同様、テキスト形式で圧縮されたものをダウンロードし、MS Access 上でデータベースを作成した。

その後、整形外科インプラントのデータのみを抽出し、年度別処理が可能になるように報告受付年月日に基づいて年度を付加した。また、種々の検索が可能ないように分類ごとの情報(クラス分け、通知番号、通知内に記載されている情報[使用材料、骨セメント使用の有無]、和名使用部位、和名中分類)を付加し、不要な情報は削除した。将来的には、Web 検索が可能にする予定である。

(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基づき、実験動物愛護に配慮する。

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) コラーゲンからの LPS 回収条件の最適化と応用

コラゲナーゼ処理条件の検討

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。そこで、昨年度の本研究において検討した各種プロテアーゼからコラゲナーゼを選択し、コラーゲンからの LPS 回収に対するコラゲナーゼ処理の効果を検討した。LPS スパイクコラーゲンを滅

菌生理食塩水中、種々の濃度の精製コラゲナーゼを用いて、37℃、0-24 時間処理した際の LPS 回収率(リムルス活性)の変化を図 1 に示した。コラゲナーゼ処理を施さない場合、同コラーゲンからの LPS 回収率は 1% 未満であったが、コラゲナーゼ濃度の上昇に比例して顕著に改善された。0.2 mg/ml のコラゲナーゼを使用した場合、コラーゲンの LPS 回収率は処理開始から 4 時間で 12% 程度までに急速に上昇した後、24 時間後まで非常に緩やかに上昇することが確認された。これらの結果から、コラーゲンからの LPS 回収に関する前処理法として、滅菌生理食塩水中、0.2 mg/ml のコラゲナーゼを用いて、37℃、16 時間処理する条件を採用した。バックグラウンドとして測定される 0.2 mg/ml のコラゲナーゼのリムルス活性は 3.9 ± 2.3 EU/ml である。

回収条件の選択

ガイドラインにおいて規定されている抽出条件(滅菌生理食塩水・室温・72 時間)により LPS および菌体スパイクコラーゲンからの LPS 回収を試みた結果、LPS 回収率は LPS レベルで 0.1%、菌体レベルでは 0.05% であった(図 2)。しかし、前処理としてコラゲナーゼ処理を行うことにより、両スパイクコラーゲンからの LPS 回収率は、それぞれ 13% (LPS レベル) および 23% (菌体レベル) に改善された。両スパイクコラーゲンを 0.1M HCl に溶解後、直ちにリムルス活性を測定した結果、前処理を行わなくとも、それぞれ 7% (LPS レベル) および 11% (菌体レベル) の LPS 活性が回収された(図 2)。また、これらの回収率はコラゲ

ナーゼによる前処理を施すことにより、それぞれ 30% および 20% に上昇した。LPS の塩型中、最も高い水溶性と生物活性を付与するトリエチルアミン (TEA) を回収溶媒とした際の回収率は、前処理を行わない場合、1% (LPS レベル) および 0.11% (菌体レベル)、前処理を行った場合、28% (LPS レベル) および 48% (菌体レベル) であった (図 2)。

LPS および菌体スパイクコラーゲンをコラゲナーゼ処理した後、PEG 溶液、ヒト血清アルブミン溶液、リン酸緩衝液、注射用蒸留水および滅菌生理食塩水を用い、室温および 40℃ 下、0-48 時間の抽出を行った際の LPS 回収率の変動状況を図 3 および図 4 に示した。スパイクコラーゲンからの LPS 回収率は、いずれの溶媒におい

ても抽出時間の延長に伴って低下する傾向が認められた。抽出温度については、室温および 40℃ ともに LPS 回収率に大きな差は認められなかったが、リン酸緩衝液中での加温抽出では時間経過に伴い LPS 回収率が顕著に低下することが判明した。

これらの結果およびウサギ発熱試験への試料の転用も考慮し、コラゲナーゼ処理後、直ちに滅菌生理食塩水により試料を希釈してリムルス活性を測定する条件を採用することとした。

ホモジナイズ処理の効果

LPS および菌体スパイクコラーゲンが凍結乾燥粉体であるのに対し、実際のコラーゲン製品は架橋化処理などにより適度な強度を付与しているものが多い。前述のとおり、コラーゲンからの LPS 回収にはコラゲナ

ーゼを利用した前処理が非常に有効であることを示したが、その他の前処理法として、LPS 回収率に対するホモジナイズ処理の効果を検討した。本研究で使用したコラーゲン製創傷被覆剤中、最も疎水性が高い試料の一つである製品#10 からの LPS 回収をガイドライン法 (滅菌生理食塩水・室温・72 時間抽出) で行った場合、同製品 (0.1 g/4 ml) から検出される LPS 量は 0.66 EU/ml であった (図 5)。一方、滅菌生理食塩水中で同製品をホモジナイズした後にガイドライン法を適用した場合、LPS 検出量は 1.59 EU/ml となり、ホモジナイズ処理によりコラーゲン製品からの LPS 回収率を若干増加させることができることが判明した (図 5)。平成 10-12 年度に行ったサーベイ試験において使用した加温抽出法 (注射用蒸留水・50℃ 24 時間) による製品#10 からの LPS 回収率はガイドライン法とほぼ同一であったが、ホモジナイズ処理は LPS 回収率に大きな影響を与えなかった。一方、図 5 に示したように、コラーゲン製品からの LPS 回収に関する前処理法としては、ホモジナイズ処理よりもコラゲナーゼ処理の方が遙かに優れていることが確認された。コラゲナーゼ処理とホモジナイズ処理を併用した場合に最も高い LPS 回収率が得られたが、ホモジナイズ処理は操作が煩雑である反面、LPS 回収率が僅かに改善されるのみであることから、コラーゲン製品からの LPS 回収試験における前処理法としてはコラゲナーゼ処理のみを採用することとした。

コラーゲン製品からの LPS 回収試験 裁断した 12 種類のコラーゲン製

品 0.025 - 0.1 g に 0.2 mg/ml のコラゲナーゼを含んだ滅菌生理食塩水を最終濃度 0.025 mg/ml になるように加え、37℃において 16 時間処理を行った際の各製品の性状変化を表 1 に示した。対照として、裁断した製品をガイドライン法（滅菌生理食塩水・室温・72 時間）および加温抽出法（注射用蒸留水・50℃24 時間）により処理した後の性状変化を示した。製品#1、製品#4、製品#5 および製品#9-12 の処理後の性状は、いずれの場合も同様であったが、製品#2 と製品#3 の場合、ガイドライン法および加温抽出法では単に崩壊するのみであったのに対し、コラゲナーゼ処理を施すことにより完全に溶解し、無色透明となった（表 1）。製品#6 と#7 の場合、ガイドライン法では膨潤するのみであったが、加温抽出法およびコラゲナーゼ処理においては無色透明または若干白濁した状態で溶解した。また、液体製品である製品#8 の場合、ガイドライン法ではコラーゲンが析出し、白色物となって浮遊していたが、その他の 2 法においては無色透明に溶解した。

各種製品からガイドライン法、加温抽出法およびコラゲナーゼ処理法によって回収した LPS 含有量の測定結果を図 6 に示した。ガイドライン法によって試験を行った場合、製品#10 および製品#11 から僅かに LPS が検出されるのみであったが、加温抽出法においては、製品#10 と製品#11 の他、製品#2、製品#5-7 および製品#9 から LPS が検出され、特に製品#7 からはウサギ発熱試験陽性と判定される量の LPS が検出された。一方、コラゲナーゼ処理法の場合、使用した精製コラゲナーゼ由来の

LPS 活性（バックグランド値 = 3.9 ± 2.3 EU/ml）を差し引いて評価した結果、製品#3、製品#5、製品#9、製品#11 および製品#12 は LPS 陰性、製品#10 は疑陽性となり、その他の製品は全て LPS 陽性と判定された。

(2) アルギン酸塩からの LPS 回収条件の最適化と応用

回収条件の検討

LPS および菌体をスパイクしたアルギン酸ナトリウムを試料とし、溶媒、温度、時間を変化させて LPS 回収率を比較検討した。図 7 に示したように、LPS スパイクアルギン酸ナトリウムからの LPS 回収は、いずれの溶媒を使用しても大きな差は認められなかったが、40℃抽出の場合、溶媒として注射用蒸留水を使用すると抽出時間の延長に伴って LPS 回収率が徐々に低下した。この現象は滅菌生理食塩水による 40℃抽出時にも認められた。一方、菌体スパイクアルギン酸ナトリウムの場合、試料を溶解した時点（抽出時間：0 時間）における LPS 回収率は PEG 溶液およびヒト血清アルブミン溶液が優れていたが、ヒト血清アルブミン溶液では 40℃抽出時、PEG 溶液では両温度条件において抽出時間の延長に伴い LPS 回収率が低下することが確認された（図 8）。時間変化に伴う LPS 回収率の低下は、リン酸緩衝液による室温および 40℃抽出、注射用蒸留水による室温抽出および滅菌生理食塩水による 40℃抽出時も認められたが、滅菌生理食塩水による室温抽出の場合、同回収率は 48 時間まで比較的保持される傾向が認められた。

これらの結果およびウサギ発熱試

験への試料の転用も考慮し、滅菌生理食塩水により試料を溶解し、室温において抽出処理を行った後、リムルス活性を測定する条件を採用することとした。

前処理法の検討

前記の実験で使用したアルギン酸ナトリウムは水溶性の凍結乾燥粉体であるが、実際の製品では架橋化処理により適度な強度が付加されている。また、アルギン酸カルシウムから作製した不織布製品なども市販されているため、LPS 抽出前に適当な前処理を施す必要があるか検討した。製品#14 を裁断後、ガイドライン法を適用した際の LPS 量は 5.38 EU/ml であったのに対し、裁断した製品を滅菌生理食塩水中でホモジナイズした後、ガイドライン法を適用した場合、LPS 回収率が飛躍的に上昇し、184.8 EU/ml に達する LPS が検出された (図 9)。ホモジナイズ処理による LPS 回収率の顕著な増加は、抽出溶媒として PEG 溶液を使用した場合と注射用蒸留水による加温抽出においても認められた。また、コラーゲン同様、酵素 (alginate lyase) を使用した前処理 (0.2 mg/ml 滅菌生理食塩水、37℃、16 時間 : LPS バックグラウンド = 4.3 EU/ml) によっても LPS 回収率は改善されるが、その度合いはホモジナイズ処理の方が遙かに優ることが確認された。これらの知見から、アルギン酸塩製品からの LPS 回収の前処理としては滅菌生理食塩水中でのホモジナイズ処理を採用することとした。

アルギン酸製品からの LPS 回収試験

4 種のアルギン酸塩製品からの

LPS 回収試験結果を図 10 に示した。製品#13 を裁断後、滅菌生理食塩水 (0.05 g/2 ml) を用いて 72 時間まで室温下に抽出処理を行うガイドライン法では、抽出開始後 0 時間、24 時間、48 時間および 72 時間において、それぞれ 50.5 EU/ml、38.6 EU/ml、45.0 EU/ml および 29.2 EU/ml の LPS が検出された。一方、裁断した試料 0.125 g に 5 ml の滅菌生理食塩水を加え、ホモジナイズ処理した後に回収試験を行った結果、LPS 回収率が顕著に上昇し、抽出開始後 0 時間、24 時間、48 時間および 72 時間において、それぞれ 757.7 EU/ml、344.4 EU/ml、386.7 EU/ml および 57.6 EU/ml の LPS が検出された。図 10 に示したように、ホモジナイズ処理による LPS 回収率の顕著な増加は製品#14、製品#15 および製品#16 においても認められ、アルギン酸塩製品からの LPS 回収試験に関し、ホモジナイズによる前処理は非常に有用であることが示された。

(3) LPS 不活化法の開発

医用材料存在下における LPS 不活化

平成 13 年度の本研究において、LPS レベルおよび菌体レベルの LPS 活性 (リムルス活性) は次亜塩素酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、強酸性および弱酸性電解水により顕著に不活化されることを見出した。本実験では、LPS と菌体をスパイクしたコラーゲンおよびアルギン酸ナトリウムを化学処理 (室温・48 時間) した際の LPS 活性変化を追跡した。表 2 に示したように、高濃度 (1,708 ppm) の強酸性電解水はアルギン酸

ナトリウムおよびコラーゲンにスパイクした LPS と菌体のリムルス活性を顕著に不活化した。一方、弱酸性電解水処理による不活化効率は強酸性電解水処理と比較して若干低く、高濃度 (1,484 ppm) の弱酸性電解水処理による不活化率は 61-77% 程度であった。低濃度の電解水処理の場合、LPS 活性の不活化効率に関して強酸性および弱酸性電解水処理間に大きな相違は認められず、同処理による LPS 不活化効率は、いずれの試料でも 30-60% 程度であった。例外として、LPS スパイクコラーゲンからのリムルス活性回収率が極端に低くなる現象が認められたが、これは両電解水によりコラーゲンが強固に凝集し、スパイクした LPS 自体の回収効率が低下したためと思われる。水酸化ナトリウム処理の場合、アルギン酸ナトリウムおよびコラーゲンにスパイクした LPS と菌体のリムルス活性は 0.025M まで顕著に不活化されることが判明した。また、表には示していないが、0.01M、0.005M および 0.001M 水酸化ナトリウム処理でも、それぞれ約 70-90%、40-70% および 20-40% のリムルス活性が不活化されることを確認している。次亜塩素酸ナトリウム処理の場合、LPS および菌体スパイクコラーゲンの溶解性が低く、コラーゲンが凝集してしまうため、両スパイクコラーゲンのリムルス活性を不活化するためには 0.5-1.0% 以上の次亜塩素酸ナトリウムを使用する必要があった。一方、次亜塩素酸ナトリウム溶液に対する溶解性が高いアルギン酸ナトリウムの場合、0.025-0.05% の濃度でも LPS 活性は顕著に不活化されることが判明した。

不活化処理に伴う医用材料の性状変化

種々の濃度の酸性電解水、水酸化ナトリウムおよび次亜塩素酸ナトリウム処理によるアルギン酸ナトリウムとコラーゲン自体の性状変化を検討するため、化学処理した両医用材料の絶対分子量を測定し、その結果を図 11 および図 12 に示した。図中、上段には分子量情報を示す光散乱光度計のクロマトグラフ、下段には濃度情報に相当する屈折率計のクロマトグラフを示した。また、コラーゲンは酸性電解水および次亜塩素酸ナトリウム処理により濃度依存的に塩酸不溶性物質を生じたため、同不溶物をメンブランフィルター濾過により除去し、塩酸可溶性成分の絶対分子量を測定した。化学処理を施さない対照 (H_2O ・室温・48 時間) のコラーゲンとアルギン酸ナトリウムの分子量は、それぞれ $3.061 \pm 0.1 \times 10^5$ および $4.066 \pm 0.2 \times 10^5$ であったが、両医用材料を 0.1% 次亜塩素酸ナトリウムに溶解または懸濁した直後に凍結乾燥した場合、処理済み材料中に高分子物質は検出されなくなることが判明した。低濃度の強酸性電解水 (pH 2.71, 320 ppm) と弱酸性電解水 (pH 5.98, 278 ppm) を用いて同様に処理 (室温・0 時間) した場合、光散乱光度計により高分子物質は検出されるが、その濃度は極端に低下する現象が認められた。また、両医用材料を高濃度の水酸化ナトリウム (0.5M) に溶解した直後に中和、凍結乾燥した場合でも同様の分解が生じた。一方、低濃度の水酸化ナトリウム (0.01-0.001M) 処理では材料の分子量が保持される傾向が強く

なり、特に 0.001M 水酸化ナトリウム処理の場合、室温下、48 時間まで処理を行っても両材料の分子量は殆ど変化しないことが明らかになった。

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) 投与量の影響と測定指標の選択

BALB/c 系マウス（雌性、8 週齢）に OVA を Alum アジュバントとともに 1 週間に 1 回の割合で 2 回腹腔内投与し、最終投与 1 週間目に採血および脾臓を採取した。その 1 回当たりの OVA 量を 0.1、1 及び 10 μg と変化させ、各指標に変化があるか検討した。

脾臓重量に関しては、OVA 1 μg 群で Alum 対照群に比べ減少が認められたが、感作反応に相関する物ではなく、偶発的なものと考えた。他の OVA 量に関しては対照群と変化はなかった(表 3)。

脾臓リンパ球幼若化反応を $^3\text{HTdR}$ 取り込み量から求めたところ、Alum 対照群に比べて OVA 投与群ではいずれの濃度でも反応が増加したが、OVA 1 μg でほぼ一定となり、10 μg でもこれ以上の増加はなかった(表 4)。次に、 $^3\text{HTdR}$ の代わりに alamarBlue や WST-8 などの試薬を用いて幼若化反応を検出することができるかどうか調べた。WST-8 試薬では Con A 刺激による吸光度の上昇は認められるものの、OVA 刺激による差は認めず、alamarBlue についてはほとんど差がなかった(表 5)。

脾臓細胞を Con A で 48 時間、または OVA で 72 時間刺激したときの IL-4 及び IFN- γ サイトカイン産生量を測定した。Con A 刺激ではい

れのサイトカイン産生量も対照群と OVA 投与群とで差はなかった。一方、OVA による IL-4 産生量は OVA 投与量の増加に伴って上昇した(図 14)。

血清 IgE 抗体価は、OVA 0.1 μg 投与群と対照群とで差はなく、総 IgE 抗体は 0.6 $\mu\text{g/ml}$ 程度の濃度であったが、1 μg 以上投与すると 1.4 $\mu\text{g/ml}$ と上昇が認められた。OVA 特異的 IgE 抗体に関しては、10 $\mu\text{g/ml}$ 投与群で吸光度が 4 倍程度になった(図 15)。総 IgE と特異的 IgE 抗体価との間では OVA 投与量によって若干差が認められた。

本 IgE アッセイが化学物質のアレルギー性についても検出できるかどうか検討した。医用材料に関するものとして、殺菌剤として含有させた cyclohexidine gluconate (CHG) によるアナフィラキシーショックが報告されていることから、これを試験物質とした。CHG を生理食塩水で希釈し、Alum と混合して、マウスの腹腔内に 2 回投与した。CHG の投与量を 2000 μg としたところ半数が死亡することから、200 μg を最高量とした。脾臓重量に CHG による増加傾向は認めなかった。血清総 IgE 抗体価は Alum 群と CHG 群とで差は認められず(平均 0.44 $\mu\text{g/ml}$ 及び 0.37 $\mu\text{g/ml}$)、本方法では CHG の感作性を検出できなかった(図 16)。

(2) マウスの週齢による変化

8 及び 34 週齢の雌性マウス（1 群 5 匹）に対して、Alum または OVA 10 μg を 2 回投与し、最終投与後 7 日目に採血し、脾臓を採取した。

週齢が高くなると体重も重くなるため脾臓の体重重量比は若年齢のものより小さい値であった。幼若化反