

厚生労働科学研究費補助金
医薬品等医療技術リスク評価研究事業

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15年度総括・分担研究報告書

主任研究者 桜井靖久

平成16（2004）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	11
土屋利江	
細胞組織利用医療用具評価手法に関する研究	49
岡野光夫	
医療用具の臨床試験に関する基準（GCP）に関する研究	81
上田慶二	
承認申請時に用いる基準・資料の要求範囲に関する研究	201
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	233
IV. 研究成果の刊行物・別刷	235

厚生科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）

平成15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

医療用具に関する技術進歩・急速な国際化に対応して、有益な医療技術が迅速に実用化・普及化し世界中の人々に恩恵を行き届かせるためには、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、その上で国益を考慮しつつ米欧に伍した討論を展開して、国際整合を図ることに取り組んでいる。

本研究においては、産官学が協力して実学的な見地から研究した。分担項目ごとに独自性があるので、それぞれについて以下に成果の概要を記す。

（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）：前臨床試験に関して、材料による感作性試験、細胞毒性試験、遺伝毒性試験等についての国内外の現行法等について実験的評価を加え、鋭敏にしてかつヒトへの外挿性に優れた方法を評価し、日本発の標準材料、試験法の国際提案の基盤をつくることができた。

（2）細胞組織医療用具に関する研究（分担研究者・岡野光夫）：細胞・組織を利用した医療用具は今後急速に進展していくものと思われるが、ここではまず国内外の各種細胞・組織の臨床応用及び研

究開発の現状を調査した。現場の理解のため、医師・研究者・企業向けの規制・手順等のガイダンスを作成、さらに事前相談や審査迅速化の要望をつくった。

(3) 医療用具の臨床分野に関する研究(分担研究者・上田慶二)：医療機器 GCP を、医薬品についての ICH-GCP や改正される薬事法等と整合させ、かつ ISO 等との国際協調性を検討するため、医療機器の特性を踏まえ、また医師主導の試験を含め、問題点等について討議研究し、薬事法改正に伴う新しい省令、通知等の基礎となる案を検討した。

(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(分担研究者・吉田正人)：承認申請資料の国際整合性をはかるため、欧米の数百種類におよぶ各種基準の一覧表を作成し、GHTF における技術概要文書(STED)の日本への導入を検討し、承認審査の参考となる FDA ガイダンス、ANSI、ASTM 等の規格を収集翻訳し、ニーズの高い9品目を選んで基準づくりを進め、さらにそれを見本として、約800のハイリスク品目の中の約130の承認基本案作成を開始した。

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
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
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
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内医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構分室において、平成16年1月21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
松岡厚子

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

配島由二

国立医薬品食品衛生研究所 療品部

林 達也

株式会社メニコン

中田和彦

株式会社メニコン

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

2) 細胞組織利用医療用具に関する研究
分担研究者：岡野光夫

東京女子医科大学 先端生命医科学
研究所

石川 烈

東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科生体硬組織再生学講座

上田 実

名古屋大学大学院医学研究科 頭頸部感覚器外科学講座

大串 始

産業技術総合研究所

大野邦夫

旭メディカル株式会社

小川哲朗

ペンタックス株式会社

片倉建男

テルモ株式会社

久保木芳秀

東レ株式会社

熊谷憲夫

聖マリアンナ医科大学 形成外科

黒田 亨

株式会社ジャパンティッシュエンジニアリング

澤 芳樹
大阪大学医学部大学院 機能制御外
科学
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式会社
大和雅之
東京女子医科大学 先端生命医科学
研究所

3) 医療用具の臨床分野に関する基準
(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
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
阿部 寛
フィリップスメディカルシステムズ
事業部長
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
野田義寛
テルモ研究開発センターQ Sセンタ
ー主任
山本芳子
スリーエムヘルスケア薬事部
担当部長

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

分担研究者：吉田正人
中井 清人
医薬品・医療機器審査センター
松谷 剛志
(財)医療機器センター
三浦 重孝
ジーイー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
黒岩 隆広
川澄化学工業(株)

川口 広
旭メディカル(株)
麻坂 美智子
日本メドトロニック(株)
石川 廣
東芝メディカルシステムズ(株)

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)

感作性試験における抽出法の差を、GPMT(モルモットによる感作性試験)を用いて評価し、少量の試料で適切な感度を持つ試験法のプロトコルを提示した。また、検体材料のウサギ眼装用試験、筋肉内・皮下埋植試験と皮膚感作テストとの関係を明らかにした。感作試験用標準材料のバリデーション・テストを3ヶ所の試験機関で実施した。細胞毒性試験については標準材料、抽出法等について検討し、USP elution テスト法と比較した。遺伝毒性試験のモデル材料の抽出物を Ames test 等で評価し、ハザードを検出できる抽出法を提示した。得られた科学的データに基づいて、感作性試験と細胞毒性試験のガイドラインを平成14年度改訂した。最終年度(平成15年度)は、感作性試験用標準材料の作製とそのバリデーション試験、および、ISO/TC194でも検討課題となっている遺伝毒性試験用サンプル調製方法につ

いてモデル材料を用いて評価した。これらの研究成果を基に、日本発国際標準材料の提供と国際標準試験法を提案する。試験方法と各試験に適切な陽性・陰性材料の国際標準化により、安全な医療用具・材料の開発段階に活用できるのみでなく、実用化に必要な審査・承認段階においても、各国の相互理解に基づいた国際規準のもと、迅速に推進可能な環境の整備に活用できる。

2) 細胞組織医療用具に関する研究(分担研究者・岡野光夫)

本研究では大学、企業、国立研究所に所属する専門家からなる細胞組織医療用具委員会を組織し細胞組織医療用具に関する現状調査・議論を行った。本年度は国内において細胞組織医療用具を臨床応用する際に生じる問題点を抽出しその解決策について議論した。また議論の中で行政と医療現場との考え方や知識の隔たりが指摘されたことから、医師・研究者・企業向けの細胞・組織医療用具に関する規制・手順などに関するガイダンス的なパンフレットを作製して広く情報を提供していくこととなった。一方、既存の規制や組織における問題点を抽出しその改善策を厚生労働省側に要望した。また、本研究終了後も本委員会のメンバーを中心として各学会とも連携し、細胞・組織医療用具に関する臓器ごとのワーキング・グループの構築を目指していく。

3) 医療用具の臨床分野に関する研究(分担研究者・上田慶二)

前年に引き続き、経験ある産学関係者13名からなる研究班を組織し、平

平成17年4月施行の医療機器の臨床試験に関する基準 GCP 省令案、その施行・運用についての局長・課長通知案の内容について、ICH の医薬品 GCP や欧米の関連規定等を参考にして討論した。その際、医療機器に付随した特徴点や医師主導型治験についても、その問題点を検討した。今回の研究により提供された医療機器の臨床試験の基準（案）に基づいて、厚生労働省において省令等が作成されると期待される。この省令は薬事法の改正に基づいて平成17年度より実施されるので、本案は医療機器の特性を踏まえ、世界的な基準と協調したものをめざした。

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（分担研究者：吉田正人）

i) 国際的に整合された規格基準の情報収集作業は、まず、欧米の認定規格リストづくりから出発し、その中から必要と思われる規格を選択し、国際規格（一部対訳版）の収集、FDAガイダンスの和訳、米国認定基準（一部和訳）の収集というステップで作業を進めて行った。また、これらの情報を基本に、承認基準の作成フォーマットも検討し、代表品目9種の承認基準案づくりの作業を行った。① 当研究班で作成した代表的9品目の承認基準案は、各工業会において雛形として活用されており、今後の承認基準案づくりに、はずみがつくものと期待される。② 平成15年度に収集した約100種の米国認定規格は、過年度で収集した国際規格及び米国FDAガイダンスと共に、改正薬事法の

もとでの新たな承認審査及び承認基準づくりにおいて、審査当局及び製造業者の参考になるものと思われる。

ii) 承認申請の資料要求範囲は、国際的に整合された GHTF ガイダンス文書の STED を基本にして、わが国の資料要求範囲との比較検討から出発し、日本の要求事項を加味した資料概要の検討に着手し、その後、資料概要の要求範囲のフォームづくりを行った。代表的品目として透析器を選択し、国際的に整合された資料概要づくりの実務作業を行った。今後これを基本とした申請の手引き作りに役立つことが期待される。

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いる。3年間の調査研究の継続と産官学の密接な討議を通じて、行政、臨床、工学、企業側に有効な基礎的情報を提供し得たものと考えらる。

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。日本ではすでに平成14年度の薬事法の大幅改正、平成17年度からの省令等の実施という節目の時期にもあたっており、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、医療機器について産官学が一体となって協力して、その迅速なる安全性、有効性評価手法を検討することは国内規制にとっても、国際整合にとっても極めて有用であり、従来にないユニークな重要研究課題であったと結論付けられよう。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) A. Matsuoka, Y. Haishima, C. Hasegawa, T. Tsuchiya.:

Positive reference materials and ways of sample preparation for the in vitro chromosome aberration test. Biomaterials. (in submission)

2) T. Tsuchiya, Y. Ikarashi, T. Uchima, H. Doi, A. Nakamura, Y. Ohshima,

M. Fujimaki, K. Toyoda, E. Kobayashi, T. Yoneyama and H. Hamanaka.:

A method to monitor corrosion of chromium iron alloys by monitoring the chromium ion concentration in urine. Mater Trans, 43, 3058-3064, 2002

3) S. Ahmed, T. Tsuchiya. : A novel mechanism of tumorigenesis: Increased TGF- β 1 suppresses the expression of Connexin43 in BALB/cJ mice after implantation of PLLA. J. Biomed. Mater. Res. (accepted)

4) 土屋利江：第7章 再生医療とその周辺 再生医療をとりまく規制とその現状・今後。立石 哲也, 田中 順三 編著、図解 再生医療工学、工業調査会、(印刷中)

5) 土屋利江：細胞組織医療機器等の製品化のためのガイドライン・環境整備について。高分子, 53 巻, 3月号, 144-146, 2004

6) 土屋利江：細胞組織医療機器等の品質・安全性確保について 再生医療, 3

卷, 2月号, 107-110, 2004

7) A. Matsuoka, T. Tsuchiya: Gene expression changes in Balb/3T3 transformants induced by poly(L-lactic acid) or polyurethane films. *J. Biomed. Mater. Res*, 68A, 376-382, 2004

8) A. Nakamura, Y. Kanazawa, H. Sato, T. Tsuchiya, Y. Ikarashi, W. Jong, K. Andersen, B Knusen.: Evaluation of allergic potential of rubber products: Comparison of sample preparation methods for the testing of polymeric medical devices. *J Toxicology*, 22, 169-185, 2003

9) Y. Ikarashi, M. Kaniwa, T. Tsuchiya.: Sensitization potential of gold sodium thiosulfate in mice and guinea pigs. *Biomaterials*, 23, 4907-4914, 2002

10) U. Jeong and T. Tsuchiya.: Tumor-promoting activity of 48 kDa molecular mass hyaluronic acid. *Materials Transactions*, 43, 3128-3130, 2002

11) K. Isama, A. Matsuoka, Y. Haishima and 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

12) Y. Ikarashi, T. Tsuchiya, K. Toyoda,

E. Kobayashi, H. Doi, T. Yoneyama and H. Hamanaka.: Tissue reactions and sensitivity to iron chromium alloys, *Mater. Trans*, 43, 3065-3071, 2002

学会発表

1) 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 日本バイオマテリアル学会 2002

2) 松岡厚子、配島由二、長谷川千恵、土屋利江：医用材料関連物質による核内倍加の誘発 日本環境変異原学会第32回大会 2003

3) 土屋利江：「医療機器及び細胞組織医療製品の安全性・有効性の基本的な考え方」2nd BMC-NIMS シンポジウム 平成16年3月 つくば

4) 土屋利江：「再生医療のための細胞の評価と標準化」第4回分子・細胞医療におけるME研究会 平成16年2月 東京

5) T. Tsuchiya : Standards and guidelines for the second development of the medical devices and tissue engineered products. High-level workshop on international standards for medical technologies 2004. 2. Geneva, Switzerland

6) 土屋利江：「医療機器、細胞組織医療機器の製品化のための規制環境の整備について」日中シンポジウム 平成16年2月 北京、中国

7) 土屋利江：「再生医療実用化への課題」第3回再生医療学会総会「再生

医療フォーラム」平成16年3月 幕張

8) 土屋利江：「医療機器、細胞組織医療機器の製品化のための規制環境の整備について」第3回再生医療学会総会パネルディスカッション 平成16年3月 幕張

9) S. Ahmed, T. Tsuchiya : Studies on the different tumorigenic activities of PLLA between two strains of mice 第3回再生医療学会総会 平成16年3月 幕張

10) 松岡厚子、配島由二、長谷川千恵、土屋利江：医療材料関連物質による核内倍加の誘発 第32回日本環境変異原学会 平成15年11月 津

11) 土屋利江：「組織工学材料と細胞組織医療機器の標準化：国際的な動向とわが国の現在・近未来について」第3回日本バイオマテリアル学会シンポジウム 平成15年9月 札幌

12) S, Ahmed, T, Tsuchiya : The different effects of PLLA plates on surrounded tissues between two strains of mice 第25回日本バイオマテリアル学会大会 平成15年12月 大阪

13) 土屋利江：医療機器に関連した薬事法改正と有効性・安全性・品質確保の考え方について 第133回日本金属学会2003年秋季大会 平成15年10月 札幌

G. 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

協力研究者：

松岡厚子
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
配島由二
国立医薬品食品衛生研究所 療品部
林 達也
メニコン（株）
中田和彦
メニコン（株）
松岡哲也
ボゾリサーチセンター
大庭耕輔
（財）安評センター

研究要旨

感作性試験用標準材料を作製するために、ポリウレタン(PU)にジニトロクロロベンゼン(DNCB)を添加した材料(0.1%DNCB-PU)を作製した。昨年度、提案した試験溶液調製方法に従って感作性試験を3試験機関で実施した。Guinea Pig maximization Test (GPMT)で感作性試験を行った結果、いずれの機関ともに、100%陽性率を示し、平均評価点は4.4～6.0の範囲であった。この結果は、0.1%DNCB-PUが感作性試験用標準材料として使用できることを示している。

遺伝毒性試験であるAmes testと染色体異常試験のための試験溶液調製方法を検討した。遺伝毒性試験用材料として4,4'-メチレンジアニリン(MDA)を0.4%および4%含有ポリウレタン(PU)シ

ートを作成した。Ames test では、DMSO、生理食塩水、cotton seed oil の3種類の抽出溶媒を用いた。いずれの抽出液とも遺伝子突然変異を示したが、DMSO 抽出液が復帰突然変異コロニー数が多くコロニーの判定が容易であった。高分子材料の Ames test 試験では、DMSO 抽出が適切であると考えられる。一方、染色体異常試験では、ISO に記載されている培地抽出液と有機溶媒抽出物について試験した。高濃度の4%MDA を含有した材料でも、培地抽出では毒性も、陽性反応も示さなかった。材料の有機溶媒抽出物で CHL 細胞を処理すると、4%MDA 含有 PU からの抽出物では明らかな染色体異常誘発性陽性の結果が得られた。有機溶媒抽出の場合、添加した MDA だけでなく、同時に抽出された材料由来のオリゴマーとの複合効果を検出できることも判明した。培地抽出液と有機溶媒抽出物では、染色体異常試験の結果は異なり、リスク評価のためのハザード検出を行なうためには、有機溶媒抽出の実施が必要である。

A. 研究目的

医療材料の細胞毒性試験、及び埋植試験のための標準材料は既に作製し、販売されているが、医療材料の感作性試験のための標準材料は現在ない。今回感作性試験用標準材料を開発し、複数の機関でのバリデーション試験および組織反応を明らかにすることを第一の目的とした。

遺伝毒性試験には、標準材料がないため試作し、3種類の試験調製法で得られた抽出液、抽出物について、Ames test と染色体異常試験を行い、材料の遺伝毒性を評価するために適切な抽出方法を明らかにすることを第二の目的とした。

B. 研究方法

(感作性標準材料の調製)

ポリウレタン (PU) は、(PTMO1000/MDA/BD) からなるセグメント化ポリウレタンで、無触媒合成を行い、数平均分子量は、 $M_n=63,800$ および重量平均分子量は、 $M_w=172,000$ を得た。酸化防止剤などは添加されていない PU である。この PU 材料に 2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB) を 0.1% 添加して作製した材料 (0.1% DNCB-PU) と無添加の PU 材料を作製した。シートの厚さは、1mm である。

(感作性試験の試験溶液調製法)

昨年度提案した方法に従って抽出した。すなわち、材料5グラムを細切し、50ml のアセトンを加え、室温にて30分間以上振とうし24時間抽出した。この操作を5回繰り返し、5回分の抽出液を併せ、減圧下で、30℃以下に保持された水槽中でロータリー・エバポレーターを用い溶媒を留去

した。一晚真空乾燥機にいれ、留去物質の重量を測定した。抽出物をアセトン5mlにとかし(a)1.11ml、(b)2.22ml、(c)3.33mlの三つに分けて、アセトンを留去後(a)olive oil 0.55mlを加えて溶解後、FCA 0.55mlを加えた等量乳化物、(b)olive oil を 2.22ml、(c)acetone を 1.67ml 各抽出物に加えて溶かした溶液を100%抽出液として、Guinea Pig Maximization Test (GPMT)に使用した。

(感作性試験) PU, 0.1%DNCB-PU から、前述したプロトコールに従ってアセトンで抽出した各抽出物溶液について、GPMT 試験を行った。1群5匹のモルモットを用いてガイドライン記載の方法により試験した。

(埋植試験)

日本ガイドライン埋植試験用陽性(0.75%ZDEC-PU: Posi-Cont.)および陰性対照材料(high-density polyethylene: Nega-Cont.)、PU, 0.01%DNCB-PU、0.1%DNCB-PU、1%DNCB-PU をウサギ筋肉内に4週間埋植した。判定方法は、日本のガイドラインの方法に従い、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。

(遺伝毒性試験用材料の調製)

PUは、感作性標準材料と同一のPUを使用した。このPUに4,4'-メチレンジアニリン(MDA)を0.4%、と4%含有PU(0.4%MDA-PU、4%MDA-PU)を作製した。1mm厚のシートを作製した。

(Ames Test 試験の試験溶液調製法)

PU, 0.4%MDA-PU および4%MDA-PU フィルムを細切後、DMSO を用い材料 0.2g/ml ならびに0.5g/ml の条件で37℃、48あるいは72時間抽出した。遺伝子突然変異誘発性を検討するため抽出原液を100%液として復帰突然変異スクリーニング試験を行った。

生理食塩溶液と cotton seed oil (綿実油)を用いて、DMSO と同様の抽出方法で抽出した溶液についても検討した。

(染色体異常試験の試験溶液調製法) 培地抽出:

エチレンオキサイドガス滅菌したPU、0.4%MDA-PU、4%MDA-PU フィルムを十分脱気し、材料を無菌的に約2mmx15mmに切断し、材料0.2gあたり1mlの培地を添加(0.2g/ml)し、炭酸ガス培養器中で37℃、48時間浸漬した。材料を除いた培地を100%抽出液とし、新鮮培地で希釈した。試験試料液の調製が有機溶媒抽出とは異なるため、試験結果を相互に比較するために相当材料重量(g)を算出した。最終処理プレートに含まれる抽出物が由来する元の材料重量を示している。

有機溶媒抽出:

約1gの材料を正確に秤量し、約2mmx15mm大に細切し、15mlのプラスチックチューブに移し、材料1g当たり3ml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 に溶解したものを 100%液とし、DMSO で希釈した。また、最終処理プレートに含まれる抽出物が由来する元の材料重量も並記した。

(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-ベンゾフラボンと投与した Sprague Dawley ラットの肝臓から調製されている。

処理方法：

1.5×10^5 / 5 ml / 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 ?l の DMSO または抽出物の DMSO 溶液を添加した。6 時間後、処理液をすべて除き新鮮な培地を添加し、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 ?g/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。構造異常は、染色分体および染色体ギャップ (ctg)、染色分体切断 (ctb)、染色分体交換 (cte)、断片化 (f)、染色体切断 (csb) および染色体交換 (cse) に分類した。判定はこれまでの陰性対照群の背景データより、異常頻度 5%未満を陰性、5%以上 10%未満までを疑陽性、10%以上を陽性とした。

C. 研究結果

(感作性試験)

GMPT 試験で 0.1%DNCB-PU 抽出液で感作させたモルモットに同抽出液で惹起した時の皮膚反応の写真を示した (Fig.1, photograph2)。このとき、0.1%DNCB 溶液も同じ動物の皮膚に塗布して反応を観察した。いずれも、陽性率は 100%、平均評価点は 5.0 示し、0.1%DNCB-PU 抽出液での 24 時間後の反応では、0.1%DNCB-PU と同程度の反応を示すことが明らかになった。しかし、0.1%DNCB-PU の場合、48 時間、72 時間と時間が経過するにつれて、反応が少しずつ弱くなる傾向がみられた。一方、PU 中の DNCB は、100% 近くアセトンで抽出できることを HPLC 分析で確認している。従って、今回、同程度の反応を示したのは、抽出液中の DNCB 濃度がほぼ 0.1% と同濃度であったことを示唆している結果と考えられる。Fig. 1 の Photograph 1 は、PU 材料からの抽出液で誘発し、惹起させた 24 時間後の皮膚の写真である。PU 単独で作製した材料では、皮膚反応は、本来陰性であるが皮膚反応陽性を認めた。そこで、材料の調製から試験までの段階で DNCB 汚染があった可能性を明確にするために分析した結果、PU 単独であるはずのフィルムから、DNCB を検出した。DNCB は PU 中にあっても脱気の過程で飛散し横に並べてあった PU 材料に付着したものと考えられる。

PU ペレットから直接抽出液を調製し、再度惹起した場合、惹起による皮

膚反応は、いずれも陰性であった。

0.1%DNCB-PU 材料について、3 機関で GMPT 感作性試験を行った。ほぼ同じ抽出プロトコールで実験した。48 時間後の皮膚反応の平均評価点を示した (Table1)。A、B、M の 3 機関による平均評価点は、各々 4.4、5.2、6.0 であった。最大と最小で 1.6 程度の違いはあったが、いずれも、明瞭な反応であり、3 つの機関の陽性率は 100% であった。

次に、0.01%DNCB-PU、0.1%DNCB-PU および 1%DNCB-PU の埋植試験を実施した。Fig.3 は、0.1%DNCB-PU と 1%DNCB-PU フィルムをウサギ筋肉内へ埋植したときの周囲組織の HE 染色像である (Fig.3)。フィルムと接した組織での細胞の浸潤が認められている (Fig.3)。次に、日本の埋植試験に採用されている炎症領域の幅について測定した (Table 2)。ポリウレタン材料がもっとも弱く、ついで、high-density polyethylene と 0.75%ZDECpolyurethane であった。0.75%ZDECpolyurethane は、埋植 3 日、7 日目の組織反応を観察するときの陽性対照として決められたものであり、1ヶ月後には、細胞毒性のある ZDEC が溶出してしまうため、陰性対照である high-density polyethylene と同レベルの炎症領域の幅を示した。PU 単独では、PU が柔らかいため、組織反応も弱いものと考えられた。陰性対照である high-density polyethylene では、材料

がPUに比べて固いため、組織との反応性が高く、結果として炎症領域の幅がPU単独材料に比べて大きいものと考えられる(Table 2)。

一方、0.01%DNCB-PU、0.1%DNCB-PU、1%DNCB-PUとDNCBの濃度が上昇するにつれて、炎症領域の幅が狭くなることが明らかになった。しかし、PU単独材料に比べてDNCB含有PUは、いずれもより大きな炎症領域の幅を示した(Table 2)。

次に埋植試験におけるもう一つの評価法について検討した(Table 3)。病理組織所見7項目について、その程度に応じて1段階(1項目のみ)から3段階に分け、スコア表示(Table 3)し、その結果を各試料についてまとめた(Table 4)。

スコア表示(total score:スコアの合計)では、high-density polyethylene(0.8), 0.75%ZDEC-PU(2.4), PU(0.8), 0.01%DNCB-P(2.4), 0.1%DNCB-PU(1.8), および 1%DNCB-PU (2.0)であった(Table 4)。

この結果は、材料の固さによる組織反応は、炎症領域の幅で検出されること。PUにZDECやDNCBを添加するとPU単独に比べてスコア値は2倍以上増加することが明らかになった。また、スコア値においてもDNCBの濃度が上昇するに伴い、スコア値が減少する傾向が認められた。組織病理を示す標本の結果から、DNCBのよ

うな物質が高濃度で接触すると、材料周辺の巨細胞の出現が抑えられ、筋繊維が崩壊してしまうことを示している(Table 4)。

(Ames test)

まずはじめにPUに添加する化学物質であるMDAの変異原性をTA100とTA98の2種の試験菌株で調べた(Fig. 4)。TA100およびTA98のいずれにおいても代謝活性化系存在下で陰性対照と比較して顕著な復帰突然変異コロニーの誘発が認められた。誘発のピークでは、TA100で陰性対照の6.60倍、TA98で4.28倍であった。代謝活性化系非存在下(S9処理)では復帰突然変異コロニー数の明確な増加傾向は見られなかった。

4%MDA-PU材料0.2g/mlの割合でDMSOを加え、37℃で48時間から72時間抽出する。この溶液を100%抽出液とした。DMSOで2倍希釈した溶液は50%溶液、4倍希釈した溶液は25%溶液となる。100%、50%、25%溶液、対照溶媒であるDMSO溶液について試験し復帰変異コロニー数を数えた(Fig.5)。材料の抽出液においてもS9存在下で試験したとき、復帰変異コロニー数が増加した(Fig.5)。また、48時間抽出と72時間抽出ではほとんど復帰変異コロニー数に変化はみられなかった(Fig.5)。

PU材料0.5g/mlの割合でDMSO抽出しても、材料が多く抽出液を得られなかった。

次に、生理食塩水で4%MDA-PU材料0.2g/mlの割合で、37℃72時間抽

出した溶液について、同様に試験した結果、S9 存在下で 100~25%溶液で検出できることが明らかになった (Fig. 6)。

さらに、cotton seed oil (綿実油) についても 4%MDA-PU 材料を 0.2g/ml の割合で、37℃、72 時間抽出し、100~25%溶液で試験した結果も S9 存在下で復帰変異コロニー数が増加した (Fig.7)。

次にこれら 3 種の抽出溶媒について検出感度を比較した結果を Fig. 8 にまとめた。いずれも 4%MDA-PU を用いて試験した結果である。DMSO と cotton seed oil は、同程度の復帰変異コロニー数であったが、生理食塩水では低いコロニー数を示し、検出感度が低いことが示唆された (Fig.8)。Fig. 9 は、cotton seed oil を抽出溶媒としたときのデッシュの写真である (Fig. 9)。白いものが、細菌からなるコロニーで、それに比べて少し透明性の高いものは、油滴であり、判別に時間がかかる。また、機械での自動測定では、区別が難しくなり、手作業で確認しながら、コロニーを数えることとなる。

DMSO ではコロニーを容易に判別でき、水溶性脂溶性の両性質を有することから、抽出効率も良く、4%MDA-PU では検出感度が高いものとおもわれる。

(染色体異常試験)

陽性対照物質 MDA の染色体異常試験

Table 5 に示すように、MDA は S9

mix 非存在下では陰性であったが、S9 mix 存在下、0.4 mg/ml で染色体の構造異常 (ctg, ctb, cte 等)、数的異常 (倍数体) を誘発し、特徴的なことは倍数体の中でも核内倍加と呼ばれる形態が観察されたことである。倍数体および核内倍加とも染色体の数的異常に分類されるが、倍数体では染色体が散在しているのに対し、核内倍加では 2 倍になった染色体が対を形成している。Figure10. に構造異常 (cte) および核内倍加を示す。

培地抽出液の染色体異常試験

Table 6~8 に EOG 滅菌処理後培地抽出液による結果を示す。PU の培地抽出液では S9 mix 存在下の 12.5% 処理でのみ 8% の倍数体の出現が認められたが、濃度依存性は認められなかった。0.4%MDA および 4%MDA 含有 PU の培地抽出液では最高濃度の 100% 処理でも陽性結果は得られなかった。

有機溶媒抽出物の染色体異常試験

Table 9 に各材料から有機溶媒抽出によって得られた抽出物の量を示す。メタノール抽出では材料によって抽出物量が大きく異なったが、アセトン抽出では抽出物量はメタノール抽出時ほどの違いはなかった。MDA を含まない PU からの抽出では、アセトン抽出はメタノール抽出の約 7 倍相当の抽出物が得られ、抽出効率はアセトンの方が高かった。

Table 10~15 に有機溶媒抽出物の染色体異常試験の結果を示す。表中、% で記載している濃度は抽出物を

最少量の DMSO に溶解して得られた溶液を 100%とし、以下、DMSO で希釈したことを示す。相当材料重量 (g) は、各プレートに添加された抽出物量が由来する、元の材料重量を示している。

Table10~12 に、メタノール抽出物の、Table13~15 にアセトン抽出物の結果を示す。抽出溶媒の種類に拘わらず、PU および 0.4%MDA 含有 PU では、最高用量でも特に細胞毒性は認められず、明らかな陽性結果も得られなかった。4%MDA 含有 PU からは強い細胞毒性と染色体異常誘発性陽性の結果を得た。特に、メタノール抽出物では、0.4%MDA 含有 PU の 100%および 4%MDA 含有 PU の 50%処理で、S9 mix 存在下、核内倍加を含む倍数体の出現が認められ、MDA が抽出されたことが示唆された。また、抽出溶媒にかかわらず、4%MDA 含有 PU 抽出物の 50%処理で、S9 mix 非存在下、染色分体型交換 (cte) をメインとする構造異常が有意に誘発された。MDA 単独では、S9 mix 非存在下染色体異常は誘発されない (Table 5 参照) ため、有機溶媒で抽出された他の成分との相乗作用の可能性が示唆された。

D. 考察

(感作性試験)

標準材料を作製するときには、特に添加した陽性物質が他の材料に移染しないことを確認しつつ調製する必要がある。移染する可能性は、材料の調製、滅菌、減圧脱気乾燥の段階が考

えられるが、本研究での移染は、減圧脱気乾燥の段階であった。

PU 材料、0.1%DNCB-PU 材料からのアセトン抽出溶媒としたときの抽出率は 2 機関で、PU の場合、5.26~6.92%、0.1%DNCB-PU の場合、7.41~8.65%であった。従って、2 つの機関でも抽出率はそれほど大きな差はなかった。また、抽出率の高いものほど感作性の強度を示す平均評価点が高いとはいえないことも明らかになった。また、皮膚反応による感作性強度と埋植試験による材料周囲の組織反応とは、炎症領域の幅や組織病理所見の程度とは相関しないことも明らかになった。細胞毒性物質による組織炎症反応と感作性物質による組織炎症反応では、様相が異なることを示している。すなわち、細胞毒性物質の場合には、細胞毒性強度が強いほど炎症反応は強い。しかし、感作性物質の場合には、感作性強度のレベルと組織反応レベルとは、必ずしも相関しないこと。むしろ炎症領域の幅や組織病理学的スコアでは、逆相関している傾向を示す結果が得られた (Table 2, Table 4)。

以上の結果から、感作性強度は、GPMT による皮膚反応で評価すべきである。埋植試験で病理学的所見のレベルが悪くなくても、皮膚では、炎症反応を生じる可能性を示唆している。この結果は、金属材料でインプラント部位でのアレルギー性が観察される頻度よりも同一患者での皮膚反応による所見がアレルギーを検出する上

で感度が高いことを示している。

前年度の研究では、ゴム材料に感作性物質を添加し、その抽出液によるGPM T感作性試験、埋植試験を行った。この場合には、GPM Tでの皮膚反応による感作性強度と筋肉内埋植試験による炎症領域の幅には、感作させた群では、相関性が認められている。

本研究から、感作性物質は、GPM Tによること。組織病理のレベルと感作性強度とは必ずしも相関しないことが明らかになった。前年度の研究で、感作させたモルモットに、感作性物質を含むゴム材料を埋植し、皮膚反応を調べると感作性物質を埋植した群では、非埋植群に比べて弱い皮膚反応を観察した。従って、生体内での感作性も強すぎると複数種の細胞が関与する免疫応答において、逆に抑制系の反応を示し、皮膚反応が低下することを示唆している。留意すべき点である。

(Ames test)

Ames testのための試験溶液としては、高分子の場合、USPに記載されている2種類の溶媒(生理食塩抽出、植物油)による抽出溶液での試験結果に比べ、DMSO抽出のみで、試験しても、感度も高く、判定も容易であることが判明した。

(染色体異常試験)

本研究での抽出法は日本のガイドラインに従って実施した。ISO 10993-12 Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materialsに記載されている抽出方法と比較す

ると、培地による抽出は simulated-use extraction に、有機溶媒による抽出は exaggerated extraction に該当すると考えられる。

MDA 処理で核内倍加という数的異常が観察されたが、これは CHL 細胞では非常に稀なことで、陰性対照ではこれまでに観察されたことはない。MDA による影響を示す良い指標になると考えられたが、同時に MDA は陽性反応を示す濃度域が狭いという欠点も判明した。

Table 13 より、アセトン抽出物では MDA を含まない PU でも MDA 含有 PU とあまり変わらない重量の抽出物が調製されており、抽出物の主成分は PU から由来する物質であることが推測される。さらに、アセトン抽出物の染色体異常試験ではいずれの材料からも最高用量では約 0.05g の材料からの抽出物で処理しているが、4%MDA 含有 PU でのみ強い細胞毒性が認められた。これらを考え合わせると、PU 由来の抽出物は染色体異常試験では陽性結果を示さないと考えられる。しかしながら、4%MDA 含有 PU 抽出物で、S9 mix 非存在下 50% 濃度で染色体の構造異常が観察されたが、これは充分量抽出された MDA と、PU から抽出されたオリゴマーとの相乗作用ではないかと示唆される。

培地抽出と有機溶媒抽出では、たとえば、4%MDA 含有 PU からの抽出(物)の染色体異常試験の最高処理濃度で比較した時、培地抽出の方が約 10 倍の重量の材料からの抽出物で処