

理されているにもかかわらず、細胞毒性は全く観察されなかった。それに対して有機溶媒抽出では明らかな細胞毒性が認められ、その半分の濃度では S9 mix 非存在下明らかな染色体異常も観察されている。これは、有機溶媒による抽出の方が、量、種類とも多いことを示唆していると考えられる。その結果、同じ材料を用いた時、simulated-use extraction に相当する培地抽出では、毒性も認められず、exaggerated extraction に相当する有機溶媒抽出では陽性結果と、異なる試験結果を得たことになる。4%もの MDA を含有する材料を用いても培地抽出では陽性結果を得られなかった。医療器具の試験において、臨床使用ではヒトの体液と長期間接触するが、製造工程での不十分な制御等により予期せず混入した各種薬剤等の影響をも含めた、リスク評価のためのハザード検出には有機溶媒による抽出を考慮する必要がある。

E. 結論

感作性試験のための標準材料として 0.1%DNCB-PU 材料を提案する。

遺伝毒性試験である Ames test に使用する試験溶液としては、高分子材料の場合には、DMSO を抽出溶媒として使用し、材料 0.2g/ml の割合で 37℃で 48～72 時間の抽出条件が適切である。

染色体異常試験では、高分子材料に含まれているハザードを検出するためには、メタノール等の有機溶媒抽出

物で試験する。

F. 健康危険情報

なし

G. 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 巻, 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. Park 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
- 2) 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.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得予定

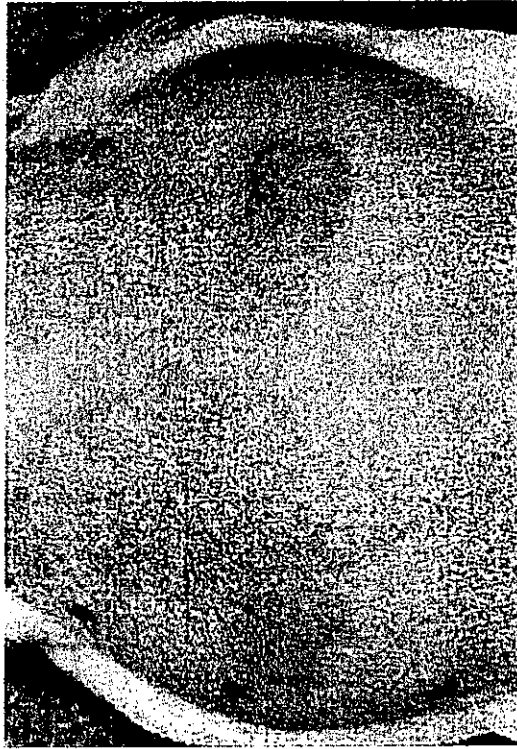
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



photograph 2

animal ID No. 2205, 24 hours after challenge

extractant: acetone

induction : extract of 0.1% DNCB polymethane in vehicle

challenge skin site challenge erythema/edema

challenge skin site	challenge	erythema/edema
1	extract of polyurethane in acetone	1/0
2	extract of 0.1% DNCB polyurethane in acetone	2/3
3	extract of acetone in acetone	0/0
4	acetone	0/0
5	0.1% DNCB acetone	2/3



photograph 1

animal ID No. 2101, 24 hours after challenge

extractant: acetone

induction : extract of polyurethane in vehicle

challenge skin site challenge erythema/edema

challenge skin site	challenge	erythema/edema
1	extract of polyurethane in acetone	2/1
2	extract of 0.1% DNCB polyurethane in acetone	2/2
3	extract of acetone in acetone	0/0
4	acetone	0/0
5	0.1% DNCB acetone	2/2

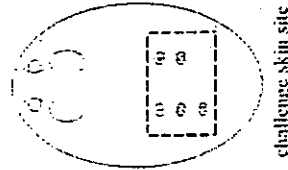
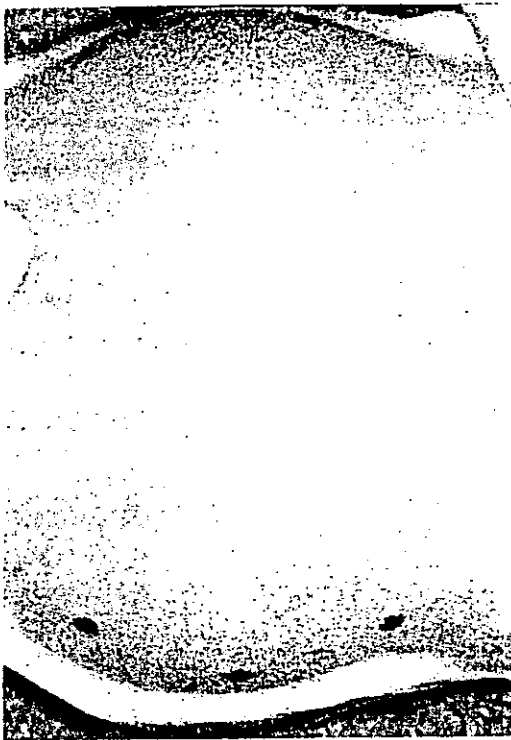


Fig.1 Skin reactions in the experimental groups after Guinea pig maximization test.



photograph 3

animal ID No. 2302, 24 hours after challenge

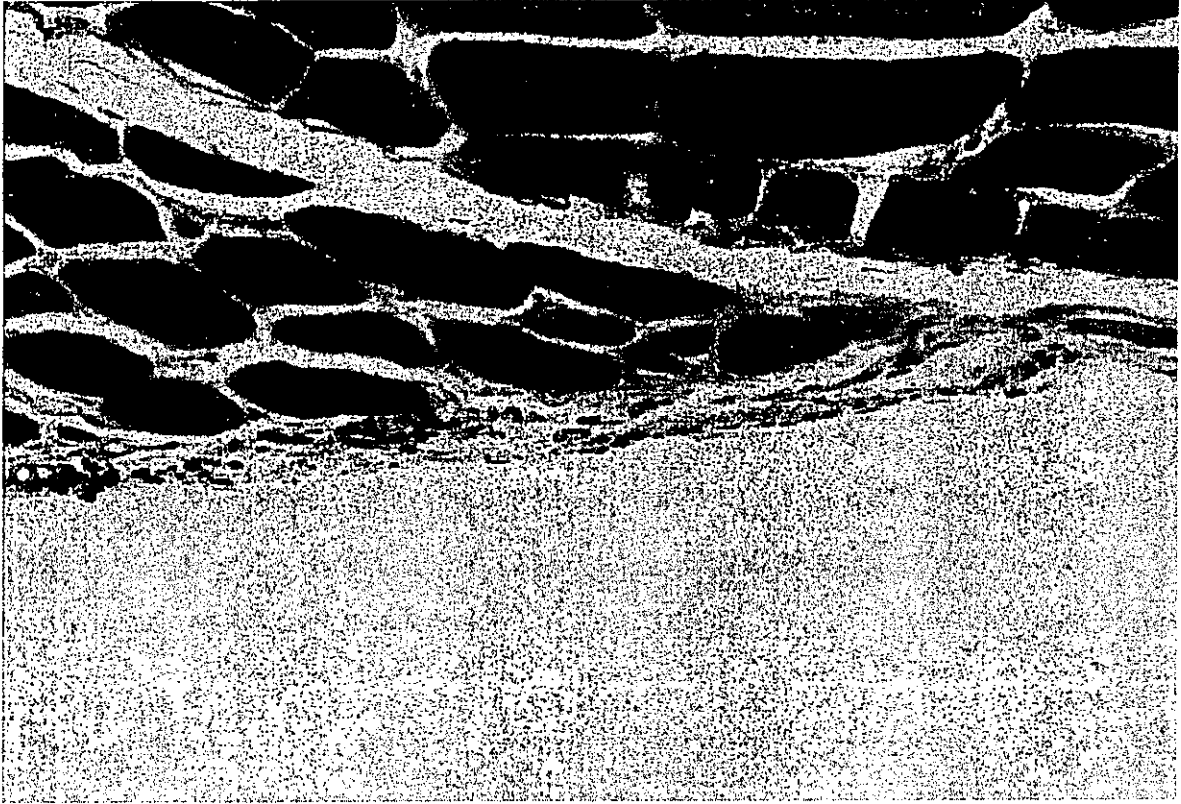
EXTRACTANT: olive oil

challenge skin site	challenge	erythema/edema
1	extract of polyurethane in acetone	0/0
2	extract of 0.1% DNCB polyurethane in acetone	0/0
3	extract of acetone in acetone	0/0
4	acetone	0/0
5	0.1% DNCB acetone	0/0

challenge skin site

Fig.2 Skin reactions in the control group after Guinea pig maximization test.

1% DNCB-PU



0.1% DNCB-PU

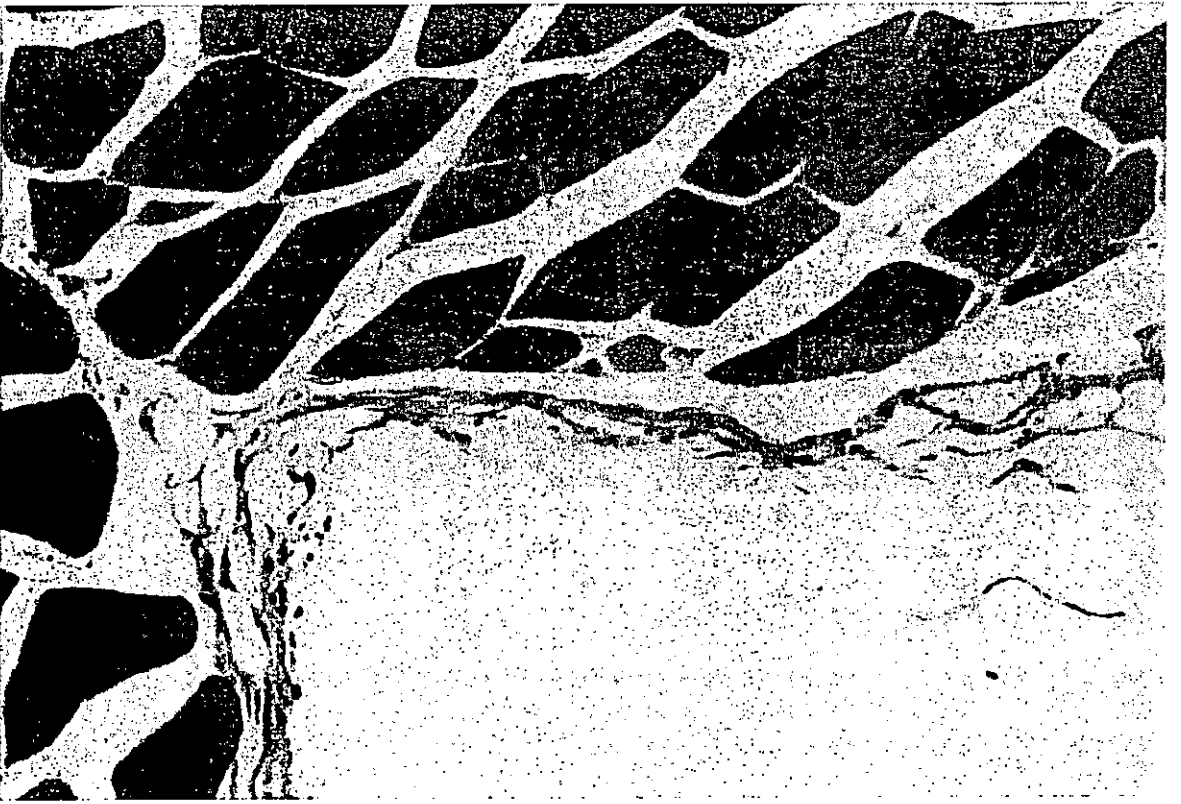
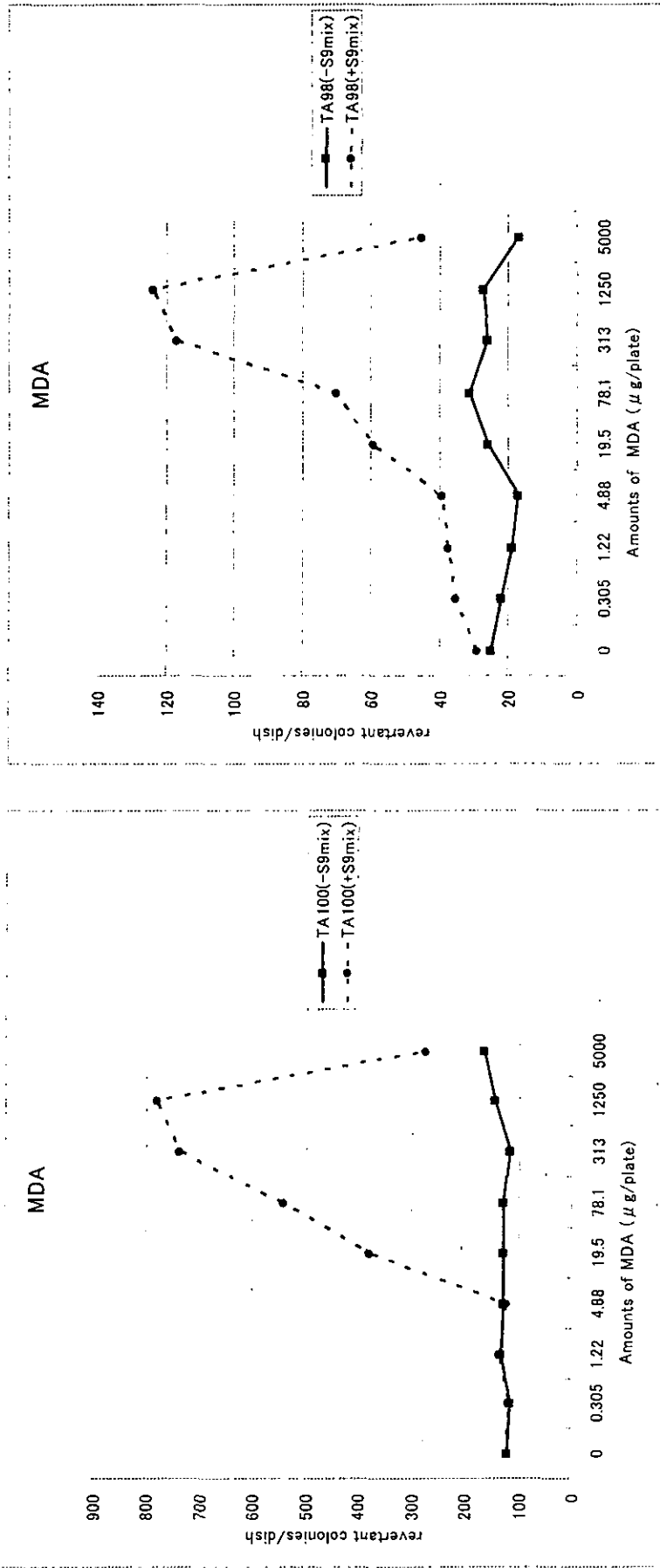


Fig.3 Histological images of tissues after HE staining in the implantation study.



MDA: 4,4'-diamino diphenylmethane

Fig.4 Mutagenicity of MDA by Ames test using TA100 and TA98.

4%MDA - PU Extraction : DMSO 0.2g/ml, 37°C, 48h-72h

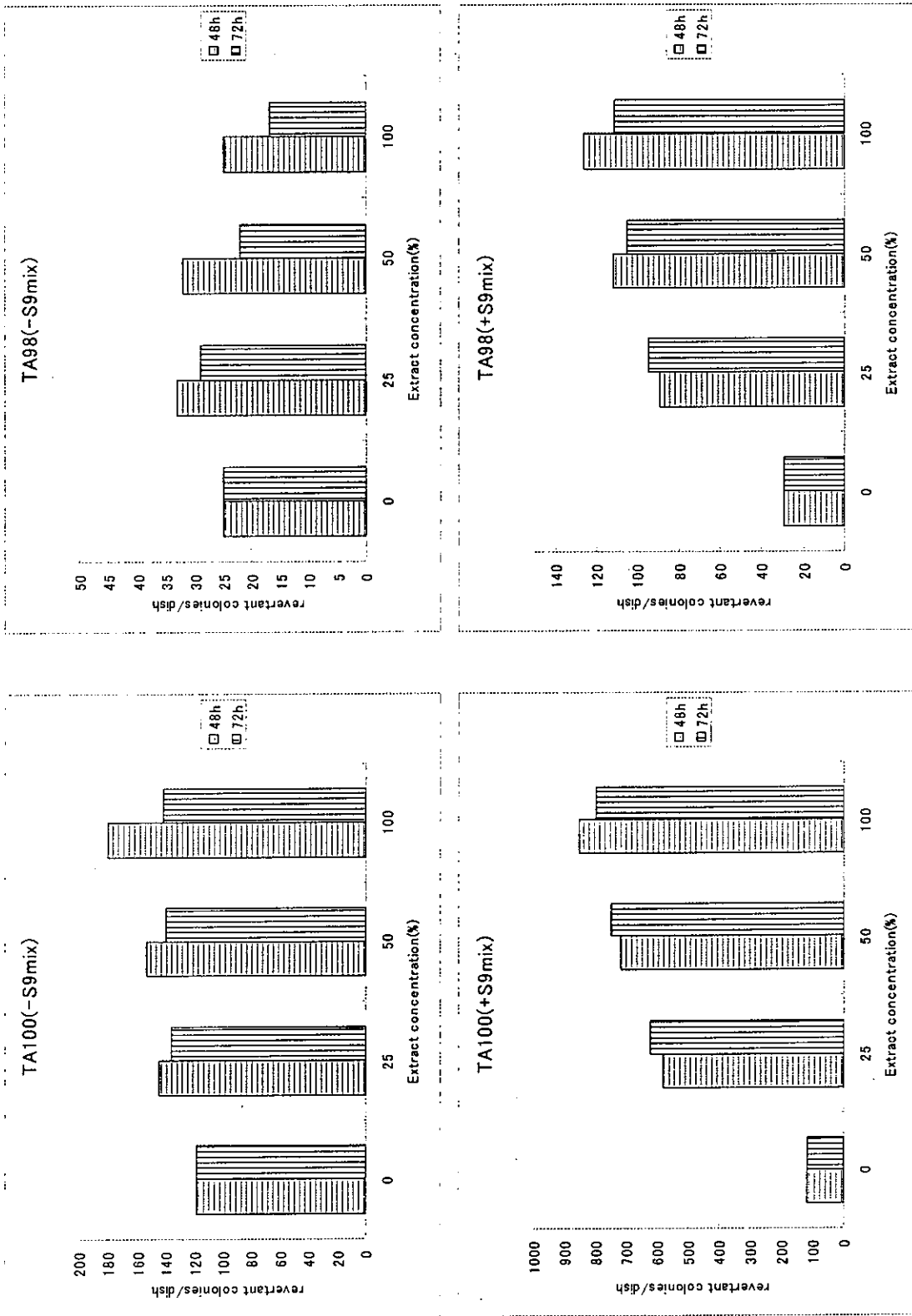


Fig.5 Mutagenicity of DMSO-solution extracted from 4% MDA-PU in Ames test.

4%MDA – PU Extraction: physiological saline 0.2g/ml, 37°C, 72h

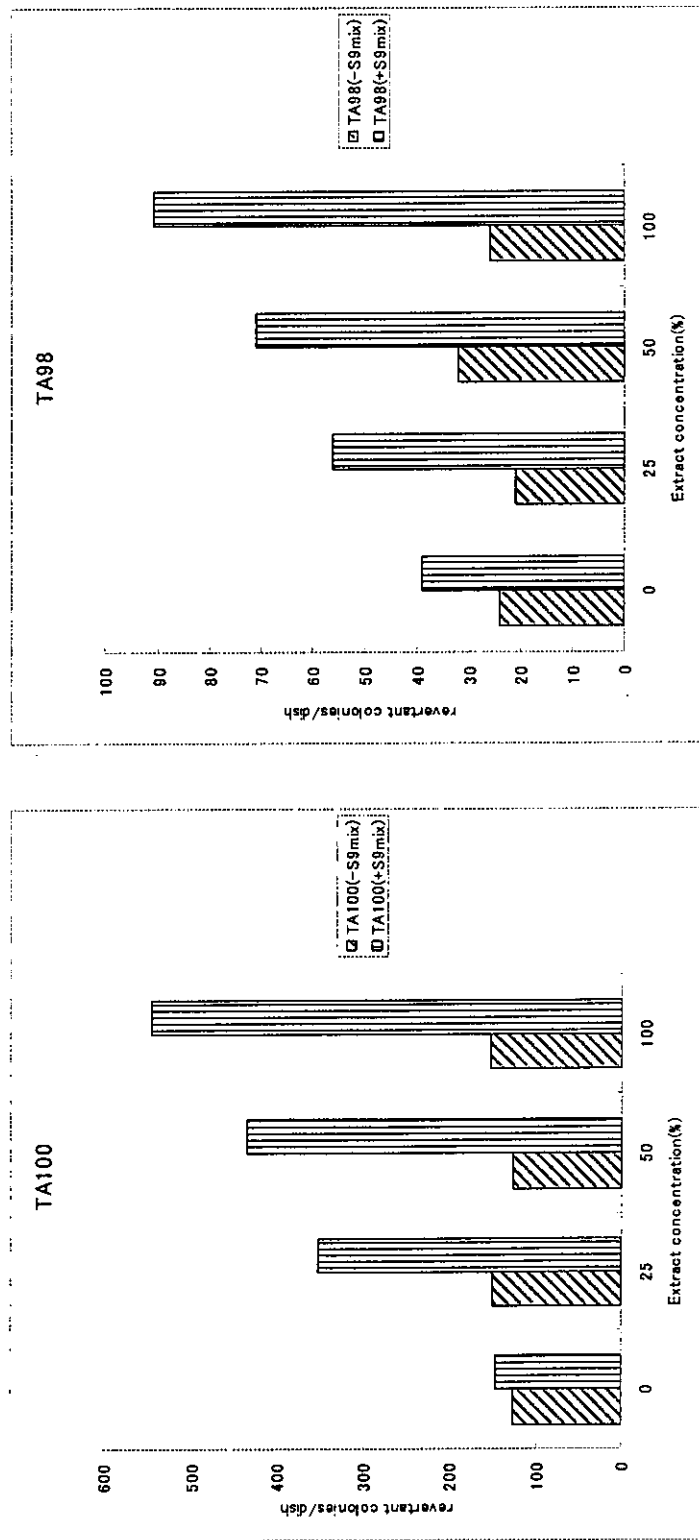


Fig.6 Mutagenicity of physiological saline solution extracted from 4% MDA-PU in Ames test.

4%MDA - PU Extraction: cotton seed oil 0.2g/ml, 37°C, 72h

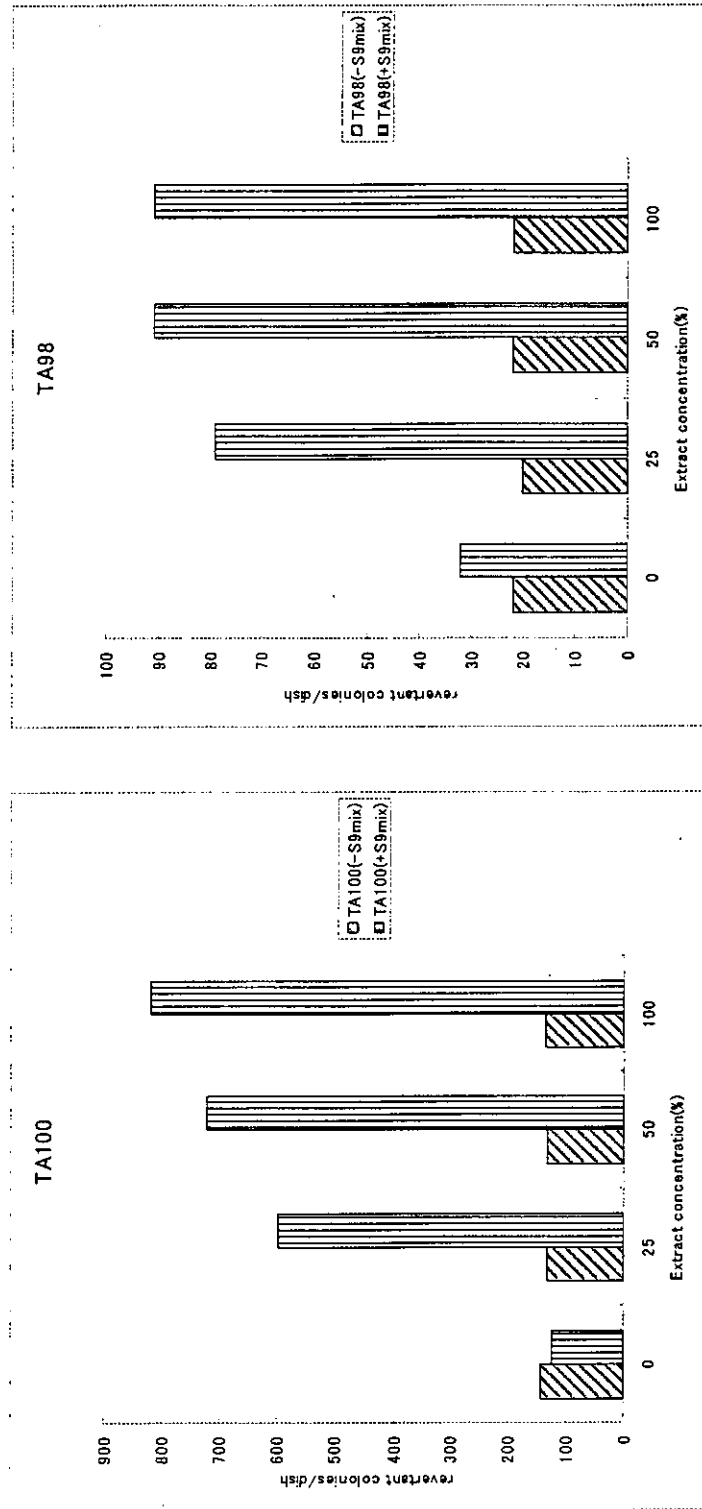


Fig.7 Mutagenicity of cotton seed oil solution extracted from 4% MDA-PU in Ames test.

TA100(+S9 mix) Extraction: 0.2g/ml, 37°C, 72h

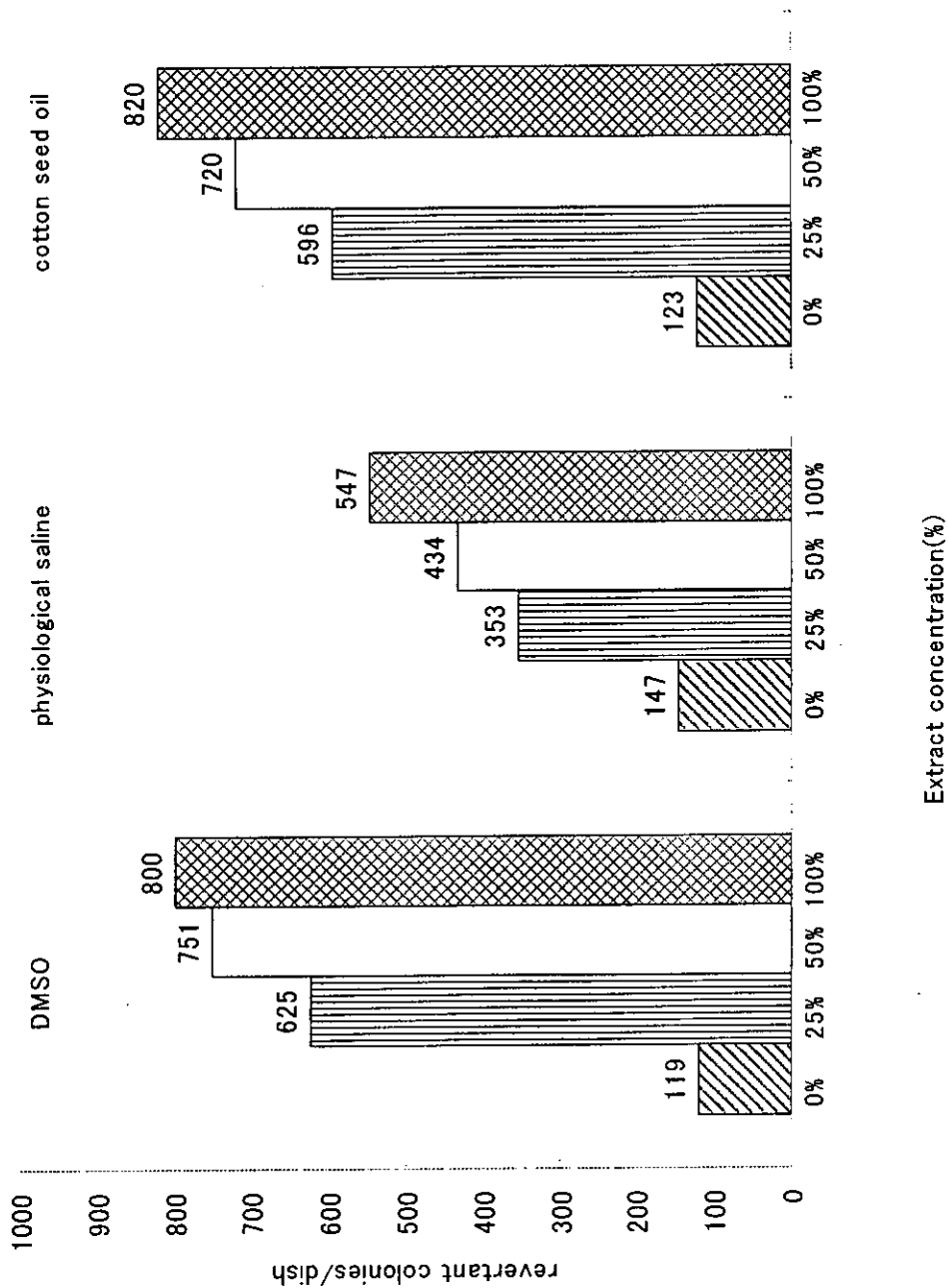


Fig.8 Comparison of the mutagenicity among DMSO, physiological saline and cotton seed oil extract-solutions in Ames test.

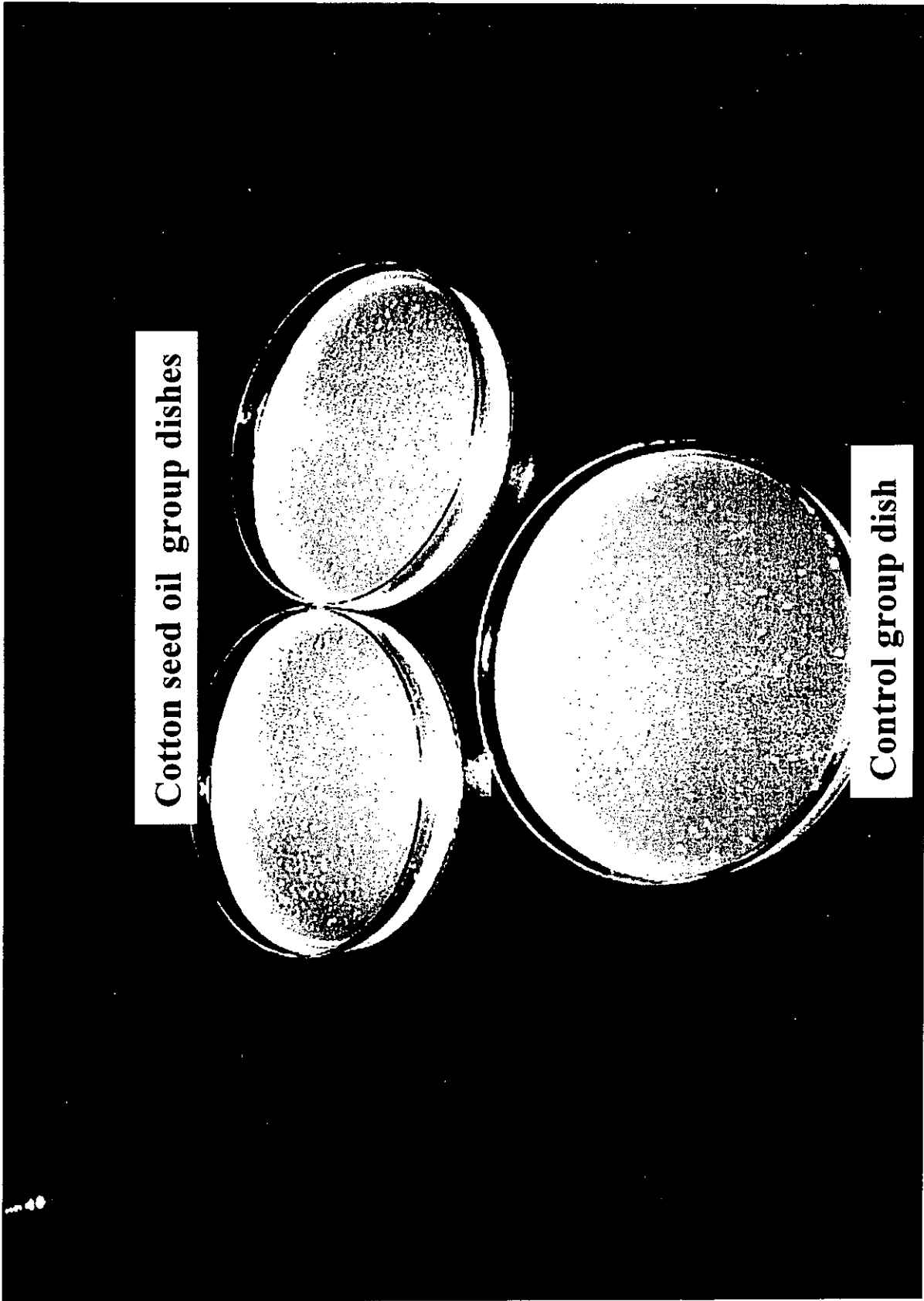


Fig.9 Appearance of the control and cotton seed oil extracts dishes in Ames test.

Table.1 Results of Standard Reference Materials in Guinea Pig Maximization Test.

0.1%DNCB	laboratory		
	A	B	M
mean response	4.4	5.2	6.0
response ratio	100%	100%	100%

Five animals were used per group.

48hr

Table.2 Measurement of widths of inflammatory regions in the implantation study.

Implants	Number of each implant	mean width at inflammatory regions (μ m)
high-density polyethylene	2	35
0.75% ZDEC polyurethane	4*	34*
polyurethane	3*	17*
0.01% DNCB polyurethane	5*	52*
0.1% DNCB polyurethane	5*	47*
1% DNCB polyurethane	5*	28*

* Widths measured in one animal (ID-No. 2101) were not calculated because of abnormal sensitivity for implants.

Table.3 Histopathological scoring system in the tissues in the implantation study.

所見名	略語	程度	程度の略	程度の診断基準
cellular infiltration, lymphocyte	lym.	slight moderate marked	+ ++ +++	リンパ球浸潤が観察される。局所的もしくは試料の全周囲に観察されても軽度である。試料の全周囲にリンパ球浸潤が観察され、明らかにslightよりも浸潤の程度が高い。試料の全周囲にリンパ球浸潤が観察され、ある部分では細胞巣を形成する。
cellular infiltration, pseudoeosinophilic cell	p-eos.	slight moderate marked	+ ++ +++	偽好酸球浸潤が観察される。局所的もしくは試料の全周囲に観察されても軽度である。試料の全周囲に偽好酸球浸潤が観察され、明らかにslightよりも浸潤の程度が高い。試料の全周囲に偽好酸球浸潤が観察され、ある部分では細胞巣を形成する。
appearance of giant cell	giant.	slight moderate marked	+ ++ +++	巨細胞の出現が5個未満。 巨細胞の出現が5個以上10個未満。 巨細胞の出現が10個以上。
fibrosis	fib.	slight moderate marked	+ ++ +++	線維芽細胞が出現し、試料全周囲に薄い被膜を形成している。 試料の全周囲を線維芽細胞が被い、明らかに被膜の厚さがslightよりも厚い。 被膜の厚さがmoderateよりも厚く、周囲の筋組織へも広がる。
degeneration, muscle fiber	deg.	slight moderate marked	+ ++ +++	筋線維の変性が局所的に観察される。 試料の全周囲に筋線維の変性が観察される。 試料の全周囲に筋線維の変性が観察される。 *炎症領域内に見られるもののみ所見として取上げる。
regeneration, muscle fiber	reg.	slight moderate marked	+ ++ +++	筋線維の再生が局所的に観察される。 試料の全周囲に筋線維の再生が観察される。 試料の全周囲に筋線維の再生が観察される。 *炎症領域内に見られるもののみ所見として取上げる。
foreign body	for.	slight	+	異物の混入が観察された場合に所見として記載する。切れ方もあるのでslight以外の程度分けは行わない。

Table.4 Summary of histopathological findings in rabbits.

Implants	A			B			C			D			E			F		
No. of treatment areas	2/5			3/5			2/5			4/5			4/5			4/5		
Grade of findings	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Findings																		
cellular infiltration, lymphocyte	1	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
cellular infiltration, pseudococciophilic cell	0	0	0	3	0	0	1	0	0	3	0	0	2	0	0	3	0	0
fibrosis	1	0	1	3	0	0	2	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0
appearance of giant cell	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
degeneration, muscle fiber	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
regeneration, muscle fiber	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
foreign body	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0

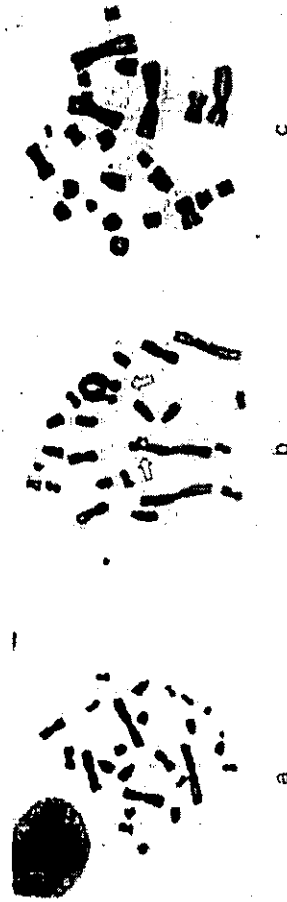
1: slight 2: moderate 3: marked

A: high-density polyethylene B: 0.75% ZDEC polyurethane C: polyurethane D: 0.01% DNCB polyurethane E: 0.1% DNCB polyurethane F: 1% DNCB polyurethane

Table.5 Chromosome aberration test of MDA.

S 9	濃度 (m.g./m.l.)	倍数体	染色体構造異常の頻度 (%)						判定	
			c.1e	c.1b	c.1c	f	c.s.b	c.s.e		to.ta.l
--	0 (DMSO)	0	1	1	0	0	0	0	2	
	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.2	0	4	1	0	0	1	0	6	±
	0.4	1	1	1	0	0	0	1	3	
	0.8								tox	
+	0 (DMSO)	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.1	0	1	0	0	0	0	1	2	
	0.2	1	1	1	0	0	1	0	3	
	0.4	8 (3)	4	2	9	0	0	0	14	
	0.8								tox	+

倍数体の項の括弧内の数字は核内倍加の数を示している。



MDA処理後CHL細胞で観察された染色体異常

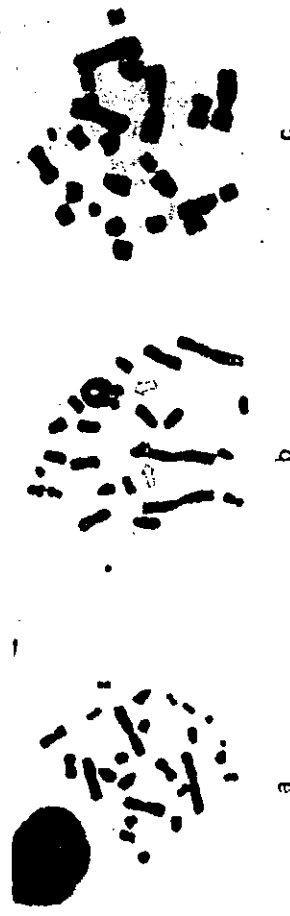
- a) 陰性対照: 25本の染色体が観察される。
- b) cte型の構造異常(矢印)が観察される。
- c) 核内倍加: 25組の染色体のペアが観察される。

Fig.10 Appearance of chromosome aberration induced by MDA in CHL cells.

Table.5 Chromosome aberration test of MDA.

S 9	濃度 (mg/ml)	倍数体	染色体構造異常の種類 (%)						判定	
			c.te	c.tb	c.te	f.c.s.b	c.s.e	total		
-	0 (DMSO)	0	1	0	0	0	0	0	2	-
	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.2	0	4	1	0	0	1	0	6	±
	0.4	1	1	1	0	0	0	1	3	-
	0.8								Tox	
+	0 (DMSO)	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	0.1	0	1	0	0	0	0	1	2	-
	0.2	1	1	1	0	0	1	0	3	-
	0.4	8 (3)	4	2	9	0	0	0	14	+
	0.8								Tox	

倍数体の項の括弧内の数字は核内倍加の数を示している。



MDA処理後CHL細胞で観察された染色体異常

- a) 陰性対照: 25本の染色体が観察される。
- b) cte型の構造異常(矢印)が観察される。
- c) 核内倍加: 25組の染色体のペアが観察される。

Fig.10 Appearance of chromosome aberration induced by MDA in CHL cells.

Table.6 Chromosome aberration test of medium-extracts from EO-sterilized PU.

S9	濃度 (%)	相当材料重量 (g)	倍數体	染色体構造異常の頻度 (%)							判定	
				ctg	ctb	cte	f	csb	cse	total		
-	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
	12.5	0.0625	4	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	0.125	2	1	0	0	0	0	0	0	1	
	50	0.25	3	0	1	0	0	0	0	0	1	
	100	0.5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
+	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
	12.5	0.0625	8 (1)	1	0	0	0	0	0	0	1	±P
	25	0.125	1	0	1	1	0	0	0	0	1	
	50	0.25	2	1	0	0	0	0	0	0	1	
	100	0.5	4	1	1	0	0	0	0	0	2	

倍數体の項の括弧内の数字は核内倍加の数を示している。
 判定の項のPは、倍數体の結果を表示していることを示す。

Table.7 Chromosome aberration test of medium-extracts from EO-sterilized 0.4% MDA-PU.

S9	濃度 (%)	相当材料重量 (g)	倍數体	染色体構造異常の頻度 (%)							判定	
				ctg	ctb	cte	f	csb	cse	total		
-	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
	12.5	0.0625	5	0	1	0	0	0	0	0	1	±P
	25	0.125	3	0	0	0	0	0	0	1	1	
	50	0.25	5	0	0	0	0	0	0	0	0	±P
	100	0.5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
+	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
	12.5	0.0625	3	0	1	0	0	0	0	0	1	
	25	0.125	2	1	1	2	0	0	0	0	3	
	50	0.25	1	1	0	0	0	0	0	0	1	
	100	0.5	5	2	1	0	0	0	0	0	3	±P

判定の項のPは、倍數体の結果を表示していることを示す。

Table.8 Chromosome aberration test of medium-extracts from 4% MDA-PU.

S9	濃度 (%)	相当材料重量 (g)	倍数体	染色体構造異常の頻度 (%)							判定	
				cb	cb	cte	f	csb	cse	total		
-	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	12.5	0.0625	1	0	1	0	0	0	0	0	1	
	25	0.125	3	1	0	1	0	0	0	0	2	
	50	0.25	5	0	0	0	0	1	0	0	1	
	100	0.5	1	0	0	1	0	0	0	0	1	
+	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	12.5	0.0625	2	2	0	0	0	0	0	0	2	
	25	0.125	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	50	0.25	1	0	2	0	0	0	0	0	2	
	100	0.5	2	0	1	0	0	0	0	0	1	

判定の項のPは、倍数体の結果を表示していることを示す。

Table.9 Organic solvent extract-weights and yields obtained from PU, 0.4% MDA-PU and 4% MDA-PU.

抽出溶媒	材料	材料 (g)抽出物 (mg)抽出率 (%)
メタノール	PU	0.7973 2.8 0.35
	0.4% MDA 含有PU	0.9972 6.3 0.63
	4% MDA 含有PU	0.8620 34.9 4.05
アセトン	PU	0.9200 22.8 2.48
	0.4% MDA 含有PU	0.9628 25.3 2.63
	4% MDA 含有PU	0.8376 53.5 6.39