

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 土 屋 利 江

平成 16(2004)年 4 月

## 目次

### 単年度報告書（平成 15 年度）

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	65
	藪島由二	
2.	新規材料の免疫原性評価手法の開発に関する研究	83
	五十嵐良明	
3.	In vitro 発癌リスク評価手法の開発に関する研究	97
	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	105
	大庭耕輔	
5.	セラミックス関節摩耗試験法開発	107
	池内 健	
6.	非破壊・耐久性試験法の開発	111
	高久田和夫	
7.	人工関節の力学・組織評価法開発	117
	馬淵清資	
8.	微小（バイオ）軟骨組織・動脈瘤栓塞材とステントの力学試験・解析法開発	123
	堤 定美	
9.	生体材料、再生材料の評価試験法開発	135
	富田直秀	
10.	形状記憶合金の力学試験法開発	139
	小林郁夫	
11.	正常ヒト骨芽細胞を用いたチタン合金の骨組織適合性評価に関する研究	145
	伊佐間和郎	
12.	整形外科インプラントの不具合データに関する研究	153
	佐藤道夫	
III.	ガイドライン（案）	175
IV.	研究成果の刊行に関する一覧表	187
V.	研究成果の刊行物・別刷り	

# 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

土屋利江

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
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)天然医用材料の安全性確保および評価手法の開発に関する研究**

天然由来医用材料は高い生体適合性を持つことから、医療用具または医用材料として広く利用されている。しかし、同材料は天然物由来であるため品質管理が難しい欠点を持ち、特に、極微量で様々な生物活性を発現するエンドトキシン（lipopolysaccharide, LPS）の混入は品質管理上の大きな問題となる。平成15年度の本研究では、抗菌活性や免疫増強作用などを持つことから注目されているキチン類に混在するLPSの回収と不活化に関する改良点と問題点について検討した結果、キチン、キトサンからのLPS回収率は短時間の0.1M塩酸抽出を適用することにより飛躍的に改善されることが明らかになった。また、昨年度までの本研究において得られた知見を基礎として、LPS不活化処理を施した各種天然材料シートを作製し、不活化処理前後におけるLPS含量変化、ヒト正常骨芽細胞の増殖と分化に及ぼす影響、ラット皮下への埋植試験および不活化処理を施した材料の物理化学的变化に関して検討し、LPS不活化処理標品の有用性を評価した。その結果、アルカリ処理は各種スポンジの構造や機能を大きく変化させることなく、混在するLPS量を低減する処理法として有用であることが判明した。また、次亜塩素酸ナトリウム処理はスポンジ構造に影響を与えるが、LPS不活化効果に加え、材料の種類によっては分解性の向上、異物反応の低減などを期待できることが明らかになった。

### **2)新規材料の免疫原性評価手法の開発に関する研究**

医用材料による即時型アレルギーを評価する手法として、BALB/c系雌性マウスに試験物質をAlumアジュバントとともに腹腔内投与し、血清中IgE抗体価をELISAで測定する方法を開発した。陽性タンパクアレルゲンとしてオボアルブミン(OVA)、トリプシンインヒビター、さらにウシ血清アルブミン(BSA)などについて試験したところ、溶媒群に比べて総IgE抗体価が昇じた。コラーゲンペプチドやゼラチンについては高い総IgE抗体価を示すものが見られたが、

低分子量化学物質は反応を起こさなかった。IgE test ではタンパク質の種類によって、陽性反応を引き起こすのに必要な投与量、誘導される血清中総 IgE 抗体価、および高い IgE 値を示す動物数の割合に差があることから、それぞれのアレルギー性強度を順位づけられる可能性が示唆された。また、パーオキシダーゼのように分解性試験では陰性とされるものでも IgE 抗体が上昇することから、消化経路を通らずに使用される場合には感作が成立する可能性があり、医用材料のアレルギー性評価には *in vitro* 分解性試験だけでは十分ではないことがわかった。Popliteal lymph node assay (PLNA) についても、同様の試験物質を用いて検討した。ペニシラミンおよびペニシリン G をマウスの足跡に注射し、7 日後に膝窩リンパ節を取り出して重量および細胞数を測定したところ、溶媒投与の対照群に比べて 2 倍程度の増加を示し、陽性と判定された。高用量のタンパクアレルゲンは著しい増加を示した。医用材料についてはタンパク質と化学物質の両方についてのアレルギー性を評価する必要がある。したがって、材料の性質を考えた抽出条件の選定とともに、それぞれに応じた適切な試験方法で評価する必要がある。

### **3) *in vitro* 発癌リスク評価手法の開発に関する研究**

平成 13 年度に調製した、平均値 55  $\mu\text{m}$  粒径の粒子状ポリ乳酸 (PLLA) の *in vitro* 発癌活性を検討した。平成 14 年度に 1 mg までの PLLA をコートしたシャーレで実験を行なったが、細胞毒性も認められず、結果も陰性であったため、今年度はより高用量での試験を実施した。プラスチックシャーレに 1、5、10、20 および 40 mg の PLLA をコートし、そこにマウス BALB/3T3 細胞を播種するトランスフォーメーション試験を実施した。その結果、PLLA 処理群は最高処理用量で陰性対照の約 15 倍の形質転換率を、陽性対照群では約 10000 倍の形質転換率を示した。本研究で、粒子状 PLLA は、用量依存的にフォーカス数の有意な増加を示したことから、*in vitro* 発癌活性陽性と判定した。

### **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**

新規材料の化学的性質に起因する発癌の可能性が危惧されており、形状に起因する異物発癌なのか化学発癌なのか区別可能な発癌試験を開発する必要性が生じてきた。この研究では社会的ニーズの高い材料の発癌性リスク評価手法を進展させるため、変異原性のある添加剤として知られる 4,4'-ジアミノジフェニルメタン (MDA) を含有するポリウレタンフィルムならびにポリ乳酸化粉末 (PLLA) をラットに皮下埋植して発生する腫瘍の発生率を検索し化学発癌か異物発癌かを特定する。

### **5) セラミックス関節磨耗試験法開発**

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過大な摩耗が超薄膜摺動部の摩耗及びソケットのエッジ部における応力集中による破損を伴う摩耗であることを明らかにして、それらを再現する摩耗試験法としてエッジと円筒面を組み合わせた往復動試験機を開発した。その結果、応力集中化における関節用セラミックス材料の摩耗強度を正確に評価することが可能であることを確認し、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を示した。

## 6) 非破壊・耐久性試験法の開発

5種類の骨プレートについて、X線観察では内部欠陥は発見されなかった。表面観察でも、製品によっては細かな傷や凹凸が残っているものもあった。硬さ試験においては、特にプレートの折損の好発部位であるスクリュー孔側面においては、臨床的に破損事故の報告例の多い製品で硬さのばらつきが大きい傾向があり、製作時の機械加工あるいは表面仕上げに問題があるとも考えられた。

整形外科インプラントでは使用時のごく小さな傷も禁忌とされている。生体内で材料表面のごく小さな傷から損傷が開始する機構があることを示唆している。金属板に傷をつけ、ラット腹腔内マクロファージを培養する実験を行った結果、傷の周囲に選択的にマクロファージが集合する傾向を示すことが分かった。生体内では材料の傷をマクロファージが認識し、ラジカルなどを放出することにより損傷を加速するという機構により、材料の劣化が促進される可能性を示唆するものである。

## 7) 人工関節の力学・組織評価法開発

人工関節の深刻な合併症のひとつである固定部分に発生する緩みを防ぐには、適切な固定機構の構築が不可欠である。本分担研究課題においては、固定部分の接触圧力分布の安定性を尺度とした評価法および評価の尺度を考案し、ガイドラインとして提案することを目的とする。平成15年度においては、市販されているいくつかの人工股関節ステムについて、タクトイルセンサによるリアルタイム応力測定を行った。

## 8) 微小（バイオ）軟骨組織・動脈瘤栓塞材とステントの力学試験・解析法開発

再生医療用の細胞組織培養において、その成熟度の評価法の一つとして力学的性質を把握することは患部への移植適正時期を判定する上で重要である。通常の力学試験を用いるのではなく、体積と圧力の関係を用いて体積弾性率を測定する方法の開発を試みた。生体組織を対象とする測定の標準物質として、力学的物性値が既知であり生体軟組織のそれに近似している軟質シリコンゴムを選んだ。得られたシリコンゴムの体積弾性率は従来の機械式測定値とは-1.9%の誤差しか生じておらず、正確な値が得られた。

動脈瘤の治療は開頭しクリップで止める方法に代わってコイルや塞栓物質など血管内治療法が開発されてきている。血管内治療は低侵襲性など有利な点が多いが、医師は相当の技術が必要であり、*in vitro*での練習が不可欠である。また、新しい治療法の確立などのためにも、物性が血管に近いモデルは必要とされており、弾性率などの物性値が血管に近いPVA(ポリビニルアルコール)ハイドロゲルを用いて血管モデルの開発を試みた。できあがった血管モデルは人体の弾性率に近く、また透明であり、シリコンモデルと比べると低摩擦係数であった。血管モデルに関して必要とした技術はほぼ完成したと言える。ステントが血流に及ぼす影響はいまだ解明されておらず、血流のコンピュータシミュレーションをすることで、血管および動脈瘤内の血流状態が把握でき、さらに動脈瘤治療法の確立に貢献すると考えられる。本研究では、血流から受ける血管の拡張(膨張)を考え、流体(血流)と構造(血管)の相互作用を考慮した計算を行い、血流の違いを調べた。コンピュータシミュレーションの結果より、流体と構造の相互作用がある場合と無い場合では結果に差が生じ、この差は考慮するに値するほど大きいと考えられる。今後シミュレーションを進めていく上で相互作用を考慮していく必要があることが分かった。

### **9) 生体材料、再生材料の評価試験法開発**

再生軟骨の安全性・有効性評価として引き裂き強度試験，インデント試験，粘弾性試験，摩擦試験，摩耗試験を行った。再生軟骨の強度と摩擦特性は培養日数とともに成熟するものの，耐摩耗性，形状保持性は生体軟骨に遠く及ばず，今後これらの諸元の測定が重要であろうと思われた。ただし，今回行った方法は再生軟骨に直接接して測定する方法であるため，今後は非接触の測定法にて耐摩耗性，形状保持性を推定しなければならない。

### **10) 形状記憶合金の力学試験法開発**

動脈等の狭窄などの治療で動脈拡張用のステントを使うことがある。ステントには大きく分けて，バルーン拡張型と自己拡張型があるが，後者の力学的安全性，とくに疲労特性を調べるための適切な方法は確立されていない。本研究では，Ti-Ni 超弾性合金製自己拡張型ステントの力学的安全性評価の試験方法を開発することを目的とし，適切な疲労試験をよび腐食疲労試験の試験方法を開発し，その有効性を検討することとした。また，腐食疲労特性を評価するため，自己拡張型ステントの素材とされる Ti-Ni 超弾性合金の擬似生体環境中での耐食性の評価を行うこととした。試験部，拍動ポンプおよび循環試験溶液タンクからなる超弾性 Ti-Ni 合金製ステント用疲労試験機を試作し，疲労特性の評価が可能かどうか検討した。試験部はラテックスチューブを用い，コネクタと循環用シリコンチューブを経て拍動ポンプおよび溶液タンクに接続し，閉じた内循環系を構成した。疲労試験を試行し，内循環系を採用していることにより，試験溶液の管理が容易であること，空気圧駆動方式でないため，圧力負荷の信頼性が高いこと，供試体ステントに負荷する応力が実際の状況により近いことなどの点で，この試験機が優れている。さらに，1.0%乳酸水溶液中で 16 Ms（およそ 180 日）まで行った Ti-Ni 超弾性合金の溶出試験の結果（および SUS304 比較材の結果）から，Ti-Ni 超弾性合金の溶出挙動は，溶液浸漬時間の経過にほぼ比例して溶出量が増加し，本実験の範囲では保護的な皮膜による溶出の抑制は期待できないことが明らかとなった。

### **11) 正常ヒト骨芽細胞を用いたチタン合金の骨組織適合性評価に関する研究**

チタン合金は，骨固定材料や人工関節材料として用いられているが，こうした骨に接して埋植される医療材料の有効性や安全性を評価するためには，骨組織適合性を調べるのが不可欠である。本研究では，正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化を指標として，チタン合金の骨組織適合性を評価した。その結果，従来から一般的に使用されている Ti-6Al-4V は，骨芽細胞の増殖および分化を阻害した。一方，構成元素にバナジウムを含まない他のチタン合金は，Ti-6Al-4V と比べて骨芽細胞の増殖および分化を促進させた。バナジウムには強い細胞毒性があり，チタン合金からバナジウムを排除することは，チタン合金の骨組織適合性向上が期待できる。

### **12) 整形外科インプラントの不具合データに関する研究**

医療用具の不具合データの収集・解析は用具の安全対策，承認申請時に考慮すべき情報として非常に役立つと共に，より良い用具の発展にとって重要である。本年度は過去 20 年間の人工関節，接合材の破損，摩耗，ゆるみ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，その集計を行った。日本では人工股関節の報告が多いことがわかり，米国の膝関節が多いのと対照



的であった。股・膝関節の不具合報告数に関しては、日米とも、ほぼ市販数に比例していた。また、人工関節の破損、摩耗、ゆるみについては、日米で異なった。日本の股関節報告では、摩耗が増加傾向、ゆるみが減少傾向にあった。接合材ではプレートの破損報告が増加傾向にあり、米国でも傷害に繋がる破損報告が一番多いことと考え合わせると、プレートに最も注意を払うべきと考えられた。また、昨年度までに構築した米国の整形外科インプラント用具の不具合情報(16,620件)データベースについても、Web検索が可能なシステムを作成した。

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 室長  
 大庭耕輔 (財)食品農医薬品安全性評  
 価センター グループリーダー  
 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 生体機械  
 工学研究所 教授  
 馬淵清資 北里大学医療衛生学部 教授  
 堤定美 京都大学再生医科学研究所  
 教授  
 富田直秀 京都大学国際融合創造センタ  
 ー 教授  
 小林郁夫 東京医科歯科大学 生体材料  
 工学研究所 助手  
 伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所  
 療品部 主任研究官  
 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。

微小バイオ軟骨の成熟度の評価として力学的性質を非侵襲的に測定する方法の開発が望まれている。患部への移植適正時期の判断が可能となることから重要な研究課題である。血管内治療技術向上に有用な PVA ハイドロゲルからなる血管モデルの開発を行う。また、コンピューターシミュレーション技術により、医療機器のみでなく、使用実態に即した流体（血流）と構造（血管）の相互作用を考慮し、動脈瘤栓塞材およびステントの評価のためのシミュレーション技術を開発する。

金属材料の評価としてステント使用 Ni-Ti 形状記憶合金、人工骨使用合金材料の評価手法について検討した。

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。

## 1) 天然医用材料安全性確保・評価手法開発

コラーゲン、キチン、キトサンおよびアルギン酸塩などの医用材料は天然由来であるため品質管理が難しいという欠点を持っている。天然由来材料の使用により起こる各種副作用の原因は未だほとんど解明されておらず、天然由来材料或いは天然由来材料から製造された医療用具の安全性を確保するため、早急にその実体を明らかにする必要がある。グラム陰性細菌の菌体表層成分であるエンドトキシン (lipopolysaccharide, LPS) は、代表的な発熱性物質で、多臓器不全やエンドトキシンショックを惹起する原因物質であり、基材中の LPS 汚染状況は正確に評価されなければならない。

現在までにラテックス製品、コラーゲン製品およびアルギン酸塩類製品を中心に相当量の LPS 汚染があることを明らかにしている。平成 15 年度の本研究では、キチン類に混在する LPS の回収と不活化に関する改良点と問題点について検討した。LPS 不活化処理を施した各種天然材料シートを作製し、不活化処理前後における LPS 含量変化、ヒト正常骨芽細胞の増殖と分化に及ぼす影響、ラット皮下への埋植試験および不活化処理を施した材料の物理化学的変化に関して検討し、LPS 不活化処理標品の有用性を

評価した。

## 2) 新規材料の免疫原性評価手法開発

近年、コラーゲンなど天然由来材料を使用した医療機器が多くなっており、これらに使用されているタンパク質等のアレルギーに対して関心が高まっている。タンパク質のアレルギー性の有無については、アレルギー状態を観察できるモデルとして、動物を用いた試験方法の開発が望まれている。

本研究は、医用材料の即時型アレルギー試験方法の確立を目的とした。昨年度までの検討によって、従来の IgE 試験を改良して、マウスに対して試験物質をアジュバントとともに腹腔内に複数回投与した後、血清総 IgE 抗体価を測定する方法が有用であることを明らかにした。また、マウスの足蹠に試験物質を投与後、膝窩リンパ節の重量および細胞数を測定する popliteal lymph node assay (PLNA) の可能性について検討した。本年度は、種々の化学物質や医用材料についてこれらの方法を適用し、その有用性を確認した。

## 3) in vitro 発癌リスク評価手法

ポリ乳酸は生分解性で、組織工学材料や、整形外科領域では骨スクリューとして使われている。しかし、これまでにマウス細胞がポリ乳酸フィルム上で形質転換活性を示すことを、我々は明らかにした。また、フィルム状ポリ乳酸のラット皮下埋植試験で腫瘍の発生が報告されている。フィルムによる発癌が異物反応によるものか、あるいは、化学物質によるのかは、同フィルムの粒子で試験したとき、前者では発癌率は低下し、後者では発癌率が増加すると考えられている。今回は粒子状の材料を調製し、in vivo 埋植試験（次項）とともに、in vitro トランスフォーメーション試験を実施した。

## 4) in vivo 発癌実験

新規生分解性材料の化学的性質に起因する発癌の可能性が危惧されるため、形状に起因する異物発癌なのか化学発癌なのか区別可能な発癌試験を開発する必要がある。変異原性のある添加剤（4,4-ジアミノジフェニルメタン:MDA）含有材料の臨床への影響を評価する手法を明らかにする。

## 5) セラミックス関節磨耗試験法開発

現在、セラミックス/セラミック人工関節における材料の欠陥に起因する不具合に対して、体内環境を適切に再現できる磨耗試験機や関節シミュレータ人工関節用セラミックが存在しない。多くの人工関節はポリエチレンを使用しているため置換後20年程度で磨耗粉に対して生体反応が生じ、続いて骨吸収によってゆるみが生じて再置換を余儀なくされる場合が多い。ポリエチレンの磨耗を防止することが最も重要である。磨耗を正確に見積もる目的で各種の磨耗試験機及び関節潤滑シミュレータが用いられている。

一方、アルミナとジルコニアに代表されるバイオセラミックスは体内で安全な材料であるだけでなく、体内環境下で劣化せず耐摩耗性が高い。セラミック/セラミック人工股関節は実際には比較的初期に骨頭又はソケットの割れ、欠けなどの不具合が続出している。これらの不具合はポリエチレンの磨耗によるゆるみとは全く異なる原因、機構による。安全な人工関節を実現するためには、セラミック/セラミック人工股関節の体内における破損と磨耗の機構を再現できる試験法を開発して、人工関節用セラミックス材料を評価する試験法を開発して、ガイドラインを示すとともに、JIS及びISO規格の原案を提示することである。

## 6) 非破壊・耐久性試験法の開発

整形外科インプラントの中でも骨固定具は特に事故例が多く報告されている製品である。このような骨固定具の力学的安全性を保証するには、たかだか60症例程度と数が少なく、力学的条件も不明確な治験では不十分である。実験条件を規定でき、インプラントの破損状況を詳細に解析することのできる前臨床試験を厳密に行うことが、安全性を高める唯一の方法と考えられる。そこで本研究では、骨固定具の前臨床試験について基礎的な検討を行った。

## 7) 人工関節の力学・組織評価法開発

人工関節の初期固定に限定した場合の評価基準として一般の研究者が考えているのは、(1)人工材料と骨組織を可能な限り広い接触範囲で固定する、(2)接触応力をできるだけ小さく均一にするというものである。たとえば、接触面積の広さについては、

髓腔占拠率といった尺度が用いられる。髓腔占拠率は、骨髄腔の形状と人工関節の形状の一致の割合であり、これを高めることにより、広い接触面積を得られるので、望ましいと考える。また、応力の均一を求める際は、有限要素法などの理論応力解析により、その度合いを評価する方法が採られる。

こうした評価基準は、固定部分の接着、あるいは、人工材料と骨組織の一体化という考え方に基礎を置いている。しかし、人工関節には、体重の数倍にも及ぶ大きな荷重が負荷される。工学的な一般論からは、接着は低荷重における固定方法であり、高い荷重を支えるためには、ねじ、リベット、釘などの締結要素が用いられる。もちろん、溶融接合や化学反応は、接合する材料の性質が類似している場合のみに用いられるので、人工関節では採用できない。どんなに生体親和性の高い表面でも、一体化するものではない。骨セメントを用いる場合でも、接着の能力はなく、あくまでもスペーサとして機能する。こうした観点から、人工関節の固定を構造力学の問題として捉え直す必要がある。

二つの固体の接触問題を考える場合、3点固定で代表されるように、安定な固定を得るための接触点の数は、多すぎると不安定になることが知られている。また、その固定部分が広い範囲に分布することが必要である。この考え方を延長すると、固定力を伝える接触領域の広さではなく、適切な部位に荷重が伝えられているか否かを評価する必要があることがわかる。すなわち、接触応力の分布を求めて、高応力の範囲がどこに存在するかを議論しなければならない。そこで、本研究課題においては、荷重試験による接触圧力分布測定により、いろいろな接触状態にある人工関節と骨組織の界面の応力分布を求め、その時間的変動を解析することを目的とした。

本年度においては、本年度予算により購入したタクトイルセンサ（I-SCAN, ニッタ（株））を用いて、市販されているいくつかの種類の人股関節ステムの設置部分の接触圧力分布の測定を行った。

## 8) 微小（バイオ）軟骨組織・動脈瘤栓塞材とステントの力学試験・解析法開発

### I. 微小（バイオ）軟骨組織の力学試験法開発

軟骨や骨などの再生治療を目的とした細胞組織培養において、その成熟度の評価法の一つとして力学的性質を把握することは患部に移植するために適した時期を判定する上で重要である。しかしながら今まで、微小で軟らかい生体組織は歪や応力を正確に測定するための試験片として形状が整えられないため、通常の力学物性測定法では機械的性質は測定が困難であり、しかも測定によって組織が破壊するなどの損傷を受けるので、培養の途中段階で継続的に測ることができなかった。そこで、通常の力学試験を用いるのではなく、体積と圧力の関係を用いて体積弾性率を測定する方法を開発した。

### II. 動脈瘤栓塞材とステントの力学解析法開発

動脈瘤の治療は開頭シクリップで止める方法の他、近年ではコイルや塞栓物質など血管内治療法が開発されてきている。血管内治療は患者にとって低侵襲性など有利な点が多いが、医師は相当の技術が必要であり、*invitro*での練習が不可欠である。また、新しい治療法の確立などのためにも、物性が血管に近いモデルは必要とされている。これまで血管モデルはシリコンで作製されていたが、シリコンの摩擦係数が高く、また弾性率などの物性値が人体とは著しく異なる。一方、PVA（ポリビニルアルコール）ハイドロゲルは、水を溶媒する摩擦係数が非常に低い、透明性のある材料である。本研究ではPVAハイドロゲルを用いて血管モデルの開発を試みた。

近年、ステントを用いた治療方法は血管内治療法としても侵襲性が少なく、またコイルなどと比べ身体の治療能力を引き出した治療方法といえ、注目を浴びている。しかしながらステントが血流に及ぼす影響はいまだ解明されておらず、血流のコンピュータシミュレーションをすることで、血管および動脈瘤内の血流状態が把握でき、さらに動脈瘤治療法の確立に貢献すると考えられる。従来血管はガラスチューブのような歪みのないものとして計算されてきたが、血管本来の動きをシミュレートしていると

は言い難かった。そこで本研究では、血流から受ける血管の拡張(膨張)を考え、流体(血流)と構造(血管)の相互作用を考慮した計算を行い、血流の違いを調べた。

### **9) 生体材料、再生材料の評価試験法開発**

再生軟骨の安全性・有効性の評価手法を試行錯誤により開発する。再生軟骨においては特にその力学的性質の成熟を考慮した評価法の開発を目的とする。

### **10) 形状記憶合金の力学試験法開発**

動脈等の狭窄など、循環器疾患の中でも動脈硬化症や血管閉塞症、動脈瘤など血栓が関わる疾患は多い。動脈硬化による血管狭窄や血管の閉塞に対する治療としては、ステントによる狭窄部の拡張や人工血管への置換などが行われている。Ti-Ni 合金がその形状記憶特性からステントへの利用が検討されている。

本研究では、Ti-Ni 超弾性合金製自己拡張型ステントの力学的安全性評価の試験方法を開発することを目的とし、適切な疲労試験をよび腐食疲労試験の試験方法を開発し、その有効性を検討することを目的とする。

### **11) 正常ヒト骨芽細胞を用いたチタン合金の骨組織適合性評価に関する研究**

チタン合金は、耐腐食性や力学的強度、生体親和性に優れ、骨固定材料や人工関節材料として用いられている。こうした骨に接して埋植される医療材料の有効性や安全性を評価するためには、骨組織との適合性、すなわち骨芽細胞の機能に及ぼす影響を調べることが不可欠である。しかしながら、従来から行われている細胞毒性試験では、細胞の増殖を指標としているので、骨芽細胞の増殖には影響を及ぼさず、分化のみを阻害するような物質を検出することができない。したがって、骨芽細胞の増殖および分化に及ぼす影響を試験する方法の確立が求められている。

従来から医療用チタン合金としては、Ti-6Al-4V が一般的に使用されている。しかしながら、構成元素のバナジウムには強い細胞毒性があることから<sup>1)</sup>、最近ではその安全性が疑われている。我々は、金属塩を用いて、正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化に及ぼす影響を評価した。その結果、

バナジウムは骨芽細胞の増殖を最も強く阻害する金属のひとつであった。さらに、アルミニウムは骨芽細胞の増殖には影響を及ぼさないが、骨芽細胞の分化を強く阻害することが明らかになった。これらの結果から、Ti-6Al-4V は、バナジウムによる増殖阻害に加え、アルミニウムによる分化阻害を起こす可能性が示唆された。

近年、バナジウムを含まないチタン合金や、バナジウムとアルミニウムを両方とも含まないチタン合金が開発されている。これらの新規チタン合金は、骨芽細胞の増殖を阻害するバナジウムや、分化を阻害するアルミニウムを含まないので、骨組織適合性の向上が期待できる。しかしながら、バナジウムやアルミニウムに代わって配合される元素の影響も無視できない。そこで本研究では、正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化を指標として、従来から使用されているTi-6Al-4V と、これら新規チタン合金の骨組織適合性を比較した。

### **12) 整形インプラント製品の不具合情報公開データ・ベースの構築・解析・利用手法の開発**

不具合情報の収集・解析は安全対策に必須であるだけでなく、承認申請時に考慮すべき情報として非常に役立つと共に、より良い用具の発展にとって欠かせないものである。インプラントの長期成績や個々の事例の不具合などの学術誌への報告は各研究者によってなされており、文献を調査することで我が国の不具合状況の一端を掴むことは可能である。今年度は、人工関節、接合材の破損や感染例等について、国内文献検索を試みた。

一方、欧米では不具合データベースが作成されており、米国では公開も行われている。米国の公開データは膨大であるが、それ故に整形外科領域に限って整理把握することは困難である。前年度では、整形外科インプラントのデータのみを抽出して、その全体像と年度推移、及び細分類別傾向を把握することを試みたが、今年度は、ネットワークでのデータベース利用も可能にすることを目的とした。

また、英米の安全性情報や、英国・スウェーデンにおける人工関節の埋植後追跡結果についても調査を行う。

## B. 研究方法

### 1) 天然医用材料安全性確保・評価手法開発

本実験で使用したガラス製、金属製、テフロン製器具、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。

#### スパイク用 LPS および菌体の調製

大腸菌 0111 株を培養後、培養液の pH を中性に調整し、加熱して殺菌した。同加熱死菌体を蒸留水で 3 回洗浄後、アセトン乾燥菌体とした。大腸菌 03 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。

#### LPS および菌体スパイク標品の調製

キチン類としては、キチン (Sigma)、キトサン (片山化学) および CM-キチン (京セラ) を使用した。LPS および菌体スパイク標品は、材料の水溶液 (キチン、CM-キチン: 0.2%) や 1M 塩酸溶液 (キトサン: 0.2%) 600 ml に LPS (0.6 mg) または菌体 (60 mg) を添加し、キチンおよびキトサンは中和後、CM-キチンは直接凍結乾燥して調製した。

#### 抽出および前処理条件

キチン類からの LPS 抽出溶媒としては滅菌生理食塩水、注射用蒸留水、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、室温および加温条件下で種々の時間抽出操作を行った。0.1M 塩酸による 4℃、10 分間の超音波抽出、フェノール・水抽出、界面活性剤を利用した抽出、ガラスビーズ振とう抽出、ホモジナイズ処理および酵素処理 (卵白およびヒト白血球由来リゾチーム処理) を適用した。

コラーゲンスポンジおよびアルギン酸スポンジ (後述) からの LPS 回収試験は、平成 14 年度報告書に記載した方法に従った。キチンスポンジからの LPS 回収は試料を裁断後、塩酸抽出により行った。

#### 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ピーシー 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 055: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。

#### キチン類の化学処理に伴う LPS 活性と材料構造の変化

LPS または菌体をスパイクしたキチン類の化学処理は種々の濃度の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、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、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。カラムとしては TSKgel  $\alpha$  6000 および TSKgel PW5000 を用い、カラム温度 40℃、溶離液 1/15M リン酸緩衝液 (pH 7.4)、流速 1 ml/min の条件で分析した。

#### 各種シートと LPS 不活化処理

Type I アテロコラーゲン (日本ハム) を 60℃で凍結乾燥することにより、弱架橋した直径 1 cm、厚さ 2 mm のディスク状スポンジを調製した。アルカリ処理コラーゲンスポンジは、0.1M (pH 13.0)、0.01M (pH 12.0) および 0.005M (pH 11.5) 水酸化ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム処理スポンジは 0.5% 次亜塩素酸ナトリウムで同コラーゲンを室温下、48 時間処理後、中和、脱塩、凍結乾燥して調製した。アルカリ処理コラーゲンの分子量は SDS-PAGE により解析し、その他、比旋光度と粘度を測定した。各スポンジは過酢酸蒸気処理により滅菌した。アルギン酸 Ca 不織布およびキチンスポンジとしては、ソープサン (アルケア製) とベスキチン (ユニチカ製) を使用した。ベスキチンは 0.1M、0.01M、0.005M 水酸化ナトリウム、ソープサンは等量の塩化カルシウムを含む各濃度の水酸化ナトリウムに室温下、48 時間浸漬し、注射用水で十分洗浄した後、減圧乾燥し、直径 1 cm のディスク状スポンジとして裁断した。また、両材料を 0.5% 次亜塩素酸ナトリウムに浸漬後 (室温・48 時間)、等量のチオ硫酸ナトリウム溶液および注射用水で十分洗浄し、同様のスポンジを作製した。対照としては、未処理または注射用水に浸漬した材料を使用した。各種スポンジ材料には EOG 滅菌を施した。

## 骨組織再生に及ぼす影響評価

骨芽細胞としては、正常ヒト骨芽細胞 NH0st (BioWhittaker, Inc.) を用い、培地としては、5 mM  $\beta$ -グリセロリン酸ナトリウム及び10% 牛胎児血清を含有する  $\alpha$ -MEM 培地を使用した。未処理および各種の処理を施したコラーゲンスポンジ、ソープサンスポンジおよびベスキチンスポンジを細胞培養用 24 well プレート底部に入れた後、単層培養法により、NH0st 細胞を 2 週間培養した。NH0st 細胞の増殖は、生細胞測定用試薬 TetraColor ONE (生化学工業) および蛋白質測定用試薬 BCA Protein Assay Kit (PIERCE) を用いて測定した。また、パラニトロフェニルリン酸を基質としてアルカリホスファターゼ活性を測定し、NH0st 細胞の分化の指標とした。その他、分化マーカーとして、Ca 含量 (カルシウム C-テストワーク) とオステオカルシン含量 (Gla Type Osteocalcin EIA Kit) を測定した。

## ラット皮下埋植試験

実験動物としては、7 週齢の Fischer 系雄ラットを用いた。ラットを pentobarbital sodium (30 mg/kg) 麻酔下で背部正中を 2.5 cm 切開し、筋膜を鈍的に剥離して空隙を作製し、各種試験用スポンジを両側(右背部、左背部)に挿入後、皮膚縫合した。スポンジ材料挿入後 1 週および 2 週で動物を屠殺し、埋植材を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリンにより固定後、通法に従ってパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、病理組織学的に検索した。

## 電子顕微鏡解析

未処理および化学処理を施した各種スポンジを試料とし、JEOL Quick Auto Coater JFC-1500 により Au コーティングを行った後、JEOL JSM-5800LV 走査型電子顕微鏡を用いて倍率 120 倍で表面構造を観察した。

## 2) 新規材料の免疫原性評価手法開発

**試薬:** 試験タンパク質として、オボアルブミン (ovalbumin, OVA, albumin, chicken egg, Grade V, Sigma Chemical Co., USA)、ウシ血清アルブミン (BSA, albumin, bovine fraction V solution 30%, Sigma Chemical)、ピーナツレクチン [lectin from *Arachis hypogaea* (peanut), Sigma-Aldrich Co., USA]、 $\beta$ -ラクトグロブリン ( $\beta$ -lactoglobulin, from bovine milk,

Sigma-Aldrich)、トリプシンインヒビター (trypsin inhibitor, from Soybean, Sigma Chemical)、パーオキシダーゼ (peroxidase, from horseradish, Sigma-Aldrich)、コラーゲンペプチド、酵素分解品 (collagenpeptide, enzyme hydrolyzed, average molecular weight: 2000, 和光純薬工業) およびウシ骨製ゼラチン (gelatin, from bovine bone, 和光純薬工業) を用いた。アレルギー性を有する化学物質として、シクロヘキシジン (CHG, cyclohexidine gluconate, 20% 溶液, 和光純薬工業)、D-(-)-ペニシラミン (D-(-)-penicillamine, 和光純薬工業)、およびペニシリン G (penicillin G potassium salt, Sigma-Aldrich) を用いた。試験物質は生理食塩水に種々の濃度で溶解、希釈した。アジュバントとして、Alum (aluminum hydroxide hydrate  $[Al(OH)_3 \cdot x H_2O]$  gel suspension, LSL Co., Ltd.) を用いた。天然ゴム材料として、2-メルカプトベンゾチアゾール (2-mercaptobenzothiazole, MBT) およびジブチルジチオカルバミン酸亜鉛 (zinc dibutyldithiocarbamate, ZDBC) をそれぞれ加硫促進剤として作製したもの (Sample A および Sample C) を用いた。動物: BALB/c 系雌性マウス (8~12 週齢, 日本 SLC) を用いた。

**IgE test:** マウス (1 群 5 匹) に、試験物質と Alum 2 mg との混合溶液 200  $\mu$ l を 1 週間に 1 回腹腔内に注射し、同様の操作をさらに 2 回繰り返した。最終投与から 7 日後、心臓から採血した。血液を凝固させた後、3000 rpm で 5 分間遠心して血清を分離した。血清中の総 IgE 抗体価は既報の ELISA 法を若干改変した方法により測定した。ELISA 用 96 穴プレートに 2.5  $\mu$ g/ml rat-mono-clonal anti-mouse IgE antibody (Southern Biotechnology Associates Inc., AL, USA) の 0.1 mol/l 炭酸緩衝液 (pH 9.6) を 100  $\mu$ l 入れ、4 $^{\circ}$ C で一晩放置してコーティングした。Bovine serum albumin (BSA) を 1% 含有する 50 mM Tris-buffered saline (TBS) (Sigma Chemical) 280  $\mu$ l で、37 $^{\circ}$ C、30 分間処理してブロッキングした後、個々の血清を 0.05% Tween20 および 1% BSA を含有する 50 mM TBS (BSA-TBS, Sigma Chemical) で 100 倍希釈したもの、または種々の濃度の mouse mono-clonal IgE anti-dinitrophenyl (DNP) antibody

(clone SPE-7, Sigma Chemical) 標準溶液を 100  $\mu$ l 入れて、37°C で 2 時間静置した。次に、horseradish peroxidase (HRP) 標識した goat anti-mouse IgE (Nordic Immunology, Tilberg, The Netherlands) を BSA-TBS で 2000 倍希釈したものを 100  $\mu$ l 加えて、室温で 1 時間静置した。各インキュベーション操作の間は、プレートを TBS で 3 回洗浄した。その後、TMB 基質溶液 (KPL, USA) 100  $\mu$ l を加え、10 分間置いた後、1 mol/l リン酸溶液 100  $\mu$ l を入れて反応を止め、450 nm での吸光度を測定した。標準溶液から作製した検量線より、個々の血清中の総 IgE 抗体価を求めた。

別に総 IgG、IgG1、IgG2a および IgG2b についても測定を行った。それぞれの抗体用のマウス ELISA キット (Bethyl Laboratories, Inc.) を用い、段階的に血清を希釈したのについて、IgE 同様、TMB 基質溶液による発色に伴う吸光度を測定した。**Popliteal lymph node assay (PLNA)**

マウスの片方の足蹠に 27G 注射針のついた注射筒を用いて試験溶液 50  $\mu$ l を注入し、もう一方には溶媒のみ (生理食塩水) を注射して対照とする。投与 7 日目に頸椎脱臼によりマウスを安楽死させ、膝窩リンパ節を取り出して重量を測定した。金属メッシュを敷いた 24 穴ディッシュにリンパ節を入れ、少量の FCS-RPMI 培地を加えた後、注射筒のピストン部を用いてつぶし、リンパ節細胞を遊離させた。細胞浮遊液はナイロンメッシュを通して遠心チューブに移し、さらに穴を培養液で洗い合わせた。4°C、1500 rpm で遠心した後、上清を捨て、適宜希釈してコーンターカウンターを用いて、リンパ節 1 個当たりの細胞数を算出した。個体ごとに、試験物質を注射した側のリンパ節の対照側に対するリンパ節重量および細胞数の増加率を求め、2 倍以上の増加率を示すものを陽性 (即時型アレルギーを起こす可能性がある) と判定した。

### 3) in vitro 発癌リスク評価手法 細胞

マウス BALB/3T3 細胞の A31-1-1 株 (継代番号 9) を黒木登志夫博士 (東大医科研) より入手した。細胞を 10% 牛胎児血清を添加した MEM 培地で、5% 炭酸ガス、37°C 条件下で培養した。

### 高分子材料

ポリ L-乳酸 (PLLA) (重量平均分子量 20 万) を凍結粉碎器で粉末状とし、粒度分布平均値 55  $\mu$ m の粒子状 PLLA を調製した。**材料の培養シャーレへのコート方法の検討**

事前の予備的検討で、PLLA をシャーレにのせても、培地交換により PLLA の粒子ははがれ、古い培地とともにすてられてしまうことがわかったので、粒子形態を維持したままで PLLA をシャーレ底面に固定させるために、下記の 6 方法についてコート方法を検討した。メタノールに懸濁する方法が良好であったので、以下の方法で最終的に PLLA をシャーレにコートした。

PLLA 粒子をメタノール (和光純薬、試薬特級、フィルター滅菌済み) に懸濁し、プラスチックシャーレ (直径 6 cm) に静かにのせるように広げ、ドラフト中でメタノールを揮発させた。その後、真空ポンプで完全にメタノールを除去した後、トランスフォーメーション試験に供した。材料溶媒対照として、メタノールのみを同様に広げ、揮発させ、真空ポンプにかけたシャーレを作成した。

### トランスフォーメーション試験

液体窒素に凍結保存しておいた細胞を解凍し、2 日後増殖密度が 60-70% 程度に増殖した細胞を回収し、細胞毒性検定用シャーレと形質転換実験用シャーレに播種した。細胞毒性検定: 各群 3 枚のシャーレを準備し、シャーレあたり 200 細胞を播種した。24 時間後、陰性対照群と陽性対照群に、それぞれ、25  $\mu$ l の DMSO と 3-メチルコランズレン (3-MC) 溶液を添加した。播種後 4 日目にすべてのシャーレの培養液を正常培養液と交換した。播種後 10 日目に、培養液を除き、メタノール固定、ギムザ染色を行った。50 個以上の細胞よりなるコロニーを 1 個として、コロニー数を算定した。形質転換実験: 各群 15 枚のシャーレを準備し、シャーレあたり  $1 \times 10^4$  個の細胞を播種した。24 時間後、陰性対照群と陽性対照群に、それぞれ、25  $\mu$ l の DMSO と 3-MC 溶液を添加した。播種後 4 日目にすべてのシャーレの培養液を正常培養液と交換した。以後、週に 2 回培地交換を行い、6 週間培養を続けた。培養液を除き、メタノール固定、ギムザ染色を行った。形質転換フォーカスの分類は、長径 3 mm 以上のフォーカスについて、実体顕微鏡を用いて以下のように行



い、II と III を加えた数をフォーカス数とした。

I. 密集した細胞よりなる。塩基性は弱い。  
II. 密集した細胞が多層を形成する。配列異常があっても著しくなく、周辺部の criss-cross も顕著ではない。Type III より塩基性は弱い。

III. 密集した細胞が多層を形成する。配列異常があり、特に周辺部の criss-cross が著しい。塩基性に染まり、紡錘形を呈する細胞が多い。

#### 4) in vivo 発癌実験

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、PLLA 粉末 0.4 g、PLLA 粉末 2 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を行い、術後の経過を見るとともに 2 年間の飼育観察を行った。その間に定期的に体重測定、腫瘍の触診を行った。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した。

生存率および腫瘍発生率の検定は Fisher の確率計算法を、その他の定量データについては Bartlett の等分散検定を実施し、Dunnett の多重比較検定またはノンパラメトリック Dunnett の多重比較検定を用いて有意差を検定した。

#### 5) セラミックス関節磨耗試験法

##### 応力集中下における摩耗試験：

関節が可動域を超えるとインピンジメントと呼ばれる現象によってステムのネック部とソケットのエッジ部が接触する。また骨頭が亜脱臼した後に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することが知られている。それだけでなく、人工股関節では、歩行時などにマイクロセパレーションが定常的に生じると考えられるようになっている。いずれの場合にも、本来の摺動部以外の部位が接触するので応力集中のために激しい摩耗と破壊が生じることが知られている。応力集中化での摩耗現象を再現するために、円筒面と直方体試料のエッジの部分と接触させて往復運動を行わせる摩耗試験を行った。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。

##### 応力集中と衝撃荷重下での摩耗試験：

さらに過酷な条件下で摩耗試験を行うためにエッジと円筒面を組み合わせた往復動摩耗試験において直方体の上部試料を落下させる衝撃摩耗試験を行った。その他の試験と分析の方法は衝撃を伴わない応力集中化の摩耗試験と同一であった。

#### 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骨プレートとして粗悪とされるものから最高級とされるものまでの代表的な 4 種類を選択した。具体的には、

- ① プロミクロス
- ② キリカン
- ③ ミズホ医科工業
- ④ ペロー

である。このうち、①が粗悪品、④が最高級品として評価が定まっているものである。②、③の製品については、使用する獣医師により良し悪しの評価が様々であり、必ずしも一致した評価を得ていない。品質的には中位のものと考えられる製品である。

(2) 4 種類の骨プレートについて、X線による内部欠陥の観察と実体顕微鏡による表面欠陥の観察を行った。

(3) 同じく 4 種類の骨プレートについて、マイクロビッカース硬さ試験によりプレート表面の部位別の硬さ分布を調べた。このとき、骨プレートのスクリー孔付近について、孔外部のプレート横断方向、孔の側面縦方向、孔間を連結する縦方向の 3 箇所について、硬さの分布を調べた。

(4) 金属試料で表面の傷が生体側から攻撃される可能性について検討した。試験片には材質が SUS316L または CP Ti で、大きさが 5.0 x 5.0 x 0.1mm の試料を用いた。金属試料は 0.05 $\mu$ m のアルミナ粒子で研磨後、鋭利な鋼製ナイフにて傷をつけ、オートクレイブにて滅菌した。細胞にはラット腹腔内に流動パラフィンを注入し誘導された初代マクロファージを用いた。培地には MEM (10%FBS, テトラサイクリン 5mg/mL 添加) を用いた。培養実験では、 $7.5 \times 10^5 \sim 9.5 \times 10^5$  個/ml の細胞を含む培養液 2ml を金属試料を静置した培養ディッシュ (35mm)

に分注し、37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件でインキュベータにて培養し、培養日数1~7日間にて試験片表面の細胞を蛍光染色して共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

## 7) 人工関節の力学・組織評価法開発

各種人工股関節ステムの固定部周囲に発生する接触応力を実験計測によって求めた。固定部分の形状設計の異なる4種類の人工股関節ステムを対象とした。はじめに感圧フィルム(プレスケール、富士写真フィルム(株))を使用し骨-ステム間における高い応力部位を特定した。次に特定部位について詳細な応力変動を調べるため、応力分布測定システムにより経時的な接触応力の変化を測定した。応力分布測定システムは、厚さ0.1mmのシートに44x44個の荷重センサが配置されているタクタイルセンサシートとセンサコネクタ、PCIインターフェイスボード、ハードウェア、ソフトウェアにより構築した。ハードウェアとして計測制御用コンピュータ(PC-STATION, CPU 700MHz, SOTEC(株))、ソフトウェアとしてI-SCAN専用ソフトウェア(ニッタ(株))を用いた。タクタイルセンサシートを模擬大腿骨とステム間に装着し、人工股関節安定性試験器により応力分布の変動を定量的に求めた。両面から加えられる力により、感圧導電性インクが押し付けられ電気抵抗が変化することにより点荷重分布が得られ、それをソフトウェアで補間することにより、応力分布がリアルタイムにモニタできる。

人工股関節安定性試験器は、空気圧式コンプレッサー、荷重を大腿骨頭に伝えるシリンダー、圧力を測定する圧力ゲージ、模擬大腿骨を固定する支持部により構成した。模擬大腿骨は表面が硬質材料、内部が海綿構造からなる力学的性質の類似している人工骨(Form cortical shell, SEWBONE Co.)を掘削し、即時重合レジン(オストロン、ジーシーデンタルプロダクツ(株))を断面に塗布することで、ステムの外形状と髓腔内形状を一致させた。ホースバンドを用い近位と遠位の2箇所を締め付け固定した。人

工股関節安定性試験器の固定部に模擬大腿骨を挿入し、円周方向から放射線状に4箇所、高さ方向に3箇所、計12個所のネジによりスクリュー固定した。荷重は骨頭部に1500N、60秒間負荷し、測定は荷重負荷直後から開始した。

## 8) 微小(バイオ)軟骨組織・動脈瘤栓塞材とステントの力学試験・解析法開発

### I. 微小(バイオ)軟骨組織の力学試験法開発

差圧計の出力信号から、実際の差圧 $\Delta P_2 - \Delta P_1$ を表す有効出力 $Y_s$ を抽出する方法は以下のとおりである。測定用チャンバに検 bodies 体積 $X$ を投じたことで発生した差圧 $\Delta P_1 - \Delta P_2$ の出力信号は、結局、容積変化 $\Delta V$ を生ずるピストンの周期運動に応じた周波数の振動成分となる。

差圧計の出力をFFT(高速フーリエ変換)アナライザに入力し、得られた有効出力 $Y_s$ は、 $Y_s \propto \Delta P_1 - \Delta P_2$ として用いられる。次に、容積計自体を基準圧力 $P$ より高い気圧 $P'$ 下において、同様な容積変化 $\Delta V$ が適用される測定用チャンバ1内の、より高圧となった微振動圧 $P_1'$ 下において変化(収縮)した同一検体の体積 $X'$ を得る。

$$X' = V_1 - V_{X'} \quad \dots (7)$$

これらの試料体積 $X$ 及び $X'$ の値から、体積歪み $\varepsilon_v$ 及び体積弾性率 $K$ は、

$$\varepsilon_v = (X - X') / X \quad \dots (8)$$

及び

$$K = P / \varepsilon_v \quad \dots (9)$$

として算出することができる。

較正曲線の作成つぎに、未知試料についての差圧出力 $Y_s$ から、体積 $X$ を求めるための $Y_s - X$ 校正曲線を作成する。

今、式 $P_1 V_1^n = \text{Const} (1)$ が成り立つとし、

$$P_1 = P_2 = P, \Delta V_1 = \Delta V_2 = \Delta V \text{ であるとすると、}$$

$$\Delta P_1 - \Delta P_2 = \frac{n P \Delta V}{V_1 - V_x} - \frac{n P \Delta V}{V_2}$$

$V_x$ を順次増やしていくとともに、圧縮空気によって容器内圧力は $P + \Delta P$ へ上昇するので、上式は、

$$\Delta P_1 - \Delta P_2 = \frac{n(P+\Delta P)\Delta V}{V_1 - V_x} - \frac{n(P+\Delta P)\Delta V}{V_2} = n(P+\Delta P)\Delta V \left( \frac{1}{V_1 - V_x} - \frac{1}{V_2} \right)$$

ここで、 $n$ ：ポリトロープ指数、 $P$ ：大気圧、 $\Delta P$ ：圧縮空気によって加えられる圧力

$\Delta V$ ：ピストンによって与えられる容積変化、 $V_1, V_2$ ：チャンバ1, 2の容積（ただし、 $V_1:V_2=3:2$ ）

$V_x$ ：試料体積、 $n=1.4$ として、各々に適当な値を与え、 $\Delta P$ および $V_x$ をパラメータとして $\Delta P_2 - \Delta P_1$ を求めた。

加圧とともに、 $\Delta P_2 - \Delta P_1$ は低下する傾向を示し、試料体積の増加とともに直線の傾きは大きくなる傾向を示した。

## II. 動脈瘤栓塞材とステントの力学解析法開発

10wt%PVA ハイドロゲルの融点は約 70℃なので、融点が 55℃のワックスを用意した。まず、このワックスで血管モデルを作った (Fig. 1)。PVA (UF-170G, UNITIKALTD., D.P. =1700, saponification degree =99.5%) を (ジメチルスルホキシド：水 = 8：2) の溶媒を用いて 10wt% に調整し約 140 度で溶解させた。この PVA 溶液を約 30℃になるまで空冷し、ワックスモデルに注入した。その後 60℃でワックスを溶かし、除去した。

コンピュータシミュレーションには有限要素法を用いた。動脈瘤の存在を想定したチューブ状のモデルを構築し、流体と構造の相互作用がある場合と無い場合の計算を行い比較した。

### 9) 生体材料、再生材料の評価試験法開発

絹の主要蛋白成分であるフィブロインを担体として軟骨を再生し、その力学特性（引き裂き強度試験、インデインター試験、粘弾性試験、摩擦試験、摩耗試験）を計測した。暫時試行錯誤により計測・評価方法を改善した。

**引き裂き強度試験**：再生軟骨の縫合糸による固定を想定し、二本のピンにて再生軟骨を把持し、引き裂き試験を行った。

**インデインター試験**：純チタンビーズによってポーラスなインデインター

を作成し、液体の移動を考慮した試験法とした。測定にあたっては、一定荷重負荷後にその変形能、永久変形などを測定した。

**粘弾性試験**：市販の粘弾性試験器を用いて再生軟骨の圧縮粘弾性を測定した。

**摩擦試験、摩耗試験**：往復動型摩擦・摩耗試験器を作成し、比較的軽荷重における摩擦・摩耗特性を測定した。

### 10) 形状記憶合金の力学試験法開発

現在使用されている疲労試験方法が、必ずしも超弾性合金製ステントの評価に適切なものでないことに鑑み、新しい疲労試験機を試作し、その評価を行う。具体的には血管を想定したラテックスチューブの内側にステントを設置し、そこに一定の圧力変動を負荷する内循環方式の試験方法である。また、腐食疲労試験に先立って、ステント素材の Ti-Ni 超弾性合金の擬似生体環境中での静的な耐食性の評価を行った。ステントの素材を想定した直径約 0.35 mm、長さ約 20 mm の超弾性 Ti-Ni 合金線の表面をエメリー紙で表面を研磨した後、310 K の 1.0% 乳酸溶液中で溶出試験を行った。所定時間経過後に新しい溶液に試料を移して試験を続行し、試験を終えた溶液中のイオン濃度を ICP で分析し、その積算値を溶出量とした。

### 11) 正常ヒト骨芽細胞を用いたチタン合金の骨組織適合性評価に関する研究

**試験材料**：チタン合金として Ti-6Al-4V、Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8Mo、Ti-15Mo-5Zr-3Al および Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd を用いた。各チタン合金は直径 14.0 mm、厚さ 1.0 mm の円板状に加工し、表面を研磨処理した。なお、Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd のみ機械加工のままの試料も使用した。試料は、アセトン、エタノールおよび超純水の順に超音波洗浄した後、乾熱滅菌（180℃、2 時間）を施した。

**骨芽細胞の培養**：骨芽細胞には正常ヒト骨芽細胞 NH0st (BioWhittaker, Inc.) を用い、培地には 5 mM  $\beta$ -グリセロリン酸ナトリウムおよび 10% 牛胎児血清を含有する  $\alpha$ -MEM 培地を用いた。試料のチタン合金を、24 ウェルマルチプレートのウェル内に置き、

その上に10,000個のNH0st細胞を播種した。コントロールとして、チタン合金を置いていないウエルにもNH0st細胞を同様に播種した。培地は週3回の頻度で交換し、2週間培養した。

#### **細胞増殖の測定**

**細胞数**：培地1mlに対して生細胞測定用試薬TetraColor ONE(生化学工業)20 $\mu$ lを加えて2時間インキュベートした後、450nm(対照波長600nm)での吸光度を測定して、コントロールに対する相対細胞数を求めた。

**DNA量**：細胞をトリプシン処理して回収した後、0.2%Nonidet P-40溶液1mlを加え、超音波処理して細胞破砕液を調製した。この細胞破砕液20 $\mu$ lに、PBS2ml及び1 $\mu$ g/ml Hoechst 33258溶液100 $\mu$ lを加えて、室温で30分間反応させた後、458nm(励起波長356nm)での蛍光強度を測定して、ウエル当たりのDNA量を求めた。

**たんぱく質量**：BCA Protein Assay Kit(Pierce Chemical Company)を用いて、3-2で調製した細胞破砕液50 $\mu$ lに、BCA測定液400 $\mu$ lを加えて、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、室温に戻して562nmでの吸光度を測定して、ウエル当たりのたんぱく質量を求めた。

#### **分化指標の測定**

**アルカリホスファターゼ活性**：アルカリホスファターゼ(ALP)は、骨芽細胞の分化初期に発現し、石灰化に必要な無機リン酸を遊離する働きのある酵素である。4mMパラニトロフェニルリン酸、10mM MgCl<sub>2</sub>、0.1mM ZnCl<sub>2</sub>を含有する0.1Mグリシン緩衝液(pH10.5)1mlを各ウエルに加え、37 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた後、405nm(対照波長600nm)での吸光度を測定し、パラニトロフェノールの生成量としてウエル当たりのALP活性を求めた。

**カルシウム量**：分化後期の骨芽細胞は、細胞外に石灰化物を形成する。細胞を固定した後、Dahlのカルシウム染色法に従ってアリザリンレッドS染色して、細胞の石灰化を確認した。さらに、0.1N塩酸1mlを各ウエルに加え、室温で15時間放置して塩酸抽出液を得た。カルシウムC-テストワコー(和光純薬工業)を用いて、塩酸抽出液10 $\mu$ lに、0.88Mモノエタノールアミン緩衝液(pH11.0)1mlを加え、つぎに0.63mMオルトクレゾールフタレインコンプレクソン、69mM 8-キノリノール100 $\mu$ lを加えた。室温

で15分間反応させた後、570nmでの吸光度を測定して、ウエル当たりのカルシウム量を求めた。

**オステオカルシン量**：オステオカルシンは、骨中に存在する特異的なたんぱく質であり、骨芽細胞の分化後期に産生される。Gla Type Osteocalcin (Gla-OC) EIA Kit(タカラバイオ)を用いて、調製した細胞破砕液100 $\mu$ lを抗体プレートに加え、室温で2時間反応させた。PBSで3回洗浄後、標識抗体液100 $\mu$ lを加え、室温でさらに1時間反応させた。PBSで4回洗浄後、基質液100 $\mu$ lを加え、室温で15分間反応させた。反応停止液100 $\mu$ lを加え、450nmでの吸光度を測定して、ウエル当たりのオステオカルシン量を求めた。

#### **12) 整形インプラント製品の不具合情報公開データ・ベースの構築・解析・利用手法の開発**

医学中央雑誌検索によって、国内の過去20年間の人工関節、接合材(プレート[骨板]、髄内釘、釘、骨ねじ、接合材[固定材])の、「破損[破損、折損、亀裂、ひび]」「感染」「摩耗」「ゆるみ[ゆるみ、弛み、緩み、弛緩]」事例に絞ってデータ収集を行った。これらのデータについては、Accessを用いて、データベースに再構築し、データの集計はExcelで行った。個々のデータに、股関節、膝関節、接合材、感染、破損、摩耗、ゆるみなどの分類付けも付記した。さらに、整形外科学会の破損アンケート調査、米国の不具合集計データとの比較も試みた。また、国内の回収報告、及び用具の出荷数についても調査した。

米国の膨大なデータについては、前年度までに整形外科インプラントのみに整理したもの(16,620件)<sup>7)</sup>について、Web検索が可能なように検索プログラムを自作した。また、米国の安全性情報についても調査した。

英国、スウェーデンの事例については、それぞれの人工関節登録システムの報告に基づいて、紹介を試みた。さらに、英国の不具合報告状況についても調査を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、BioWhittaker社から研究用に市販されているヒト細胞を用いた。本研究は、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会にて承認済みである。