

動物実験については、動物愛護の精神を基本にし、動物実験倫理規定に従った。

C. 研究結果

1) 天然医用材料安全性確保・評価手法開発

(1) キチン類に混在する LPS の回収と不活化

1-1. LPS 回収条件の検討

既知量の精製 LPS をスパイクしたキチン材料を使用し、現行のガイドライン法（生理食塩水・室温・72 時間）に基づいて LPS 回収試験を行った結果、水溶性の高い CM-キチンでは 20% 程度の回収率が得られた。一方、ガイドライン法によるキチンおよびキトサンからの回収率は 9.0% および 0.01% であったが、0.1M 塩酸を使用して室温下短時間抽出（超音波処理、4℃、10 分間）することにより、それぞれの回収率は 20-30% 程度まで改善された（図 1a）。これに対し、菌体レベルの LPS 活性の回収率はいずれも低値であり、塩酸抽出を行った場合でも 5% 前後に留まった（図 1b）。同回収率を改善するため、加温抽出、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の他、前処理として酵素処理やホモジナイズ処理を施した抽出を試みたがいずれも無効であった。

1-2. LPS 不活化条件の検討と材料の分子量変化

LPS スパイク材料を種々の条件で化学処理し、キチン類に混在する LPS の生物活性を不活化する条件を検索した。その結果、キチン、キトサンおよび CM-キチンに混在する LPS の活性は、アルカリ処理により濃度依存的に不活化され、いずれの材料の場合でも 0.1-0.05M 程度の水酸化ナトリウム処理により 90% 以上不活化されることが判明した（図 2）。同活性は、次亜塩素酸ナトリウム処理によっても濃度依存的に不活化され、0.05% 次亜塩素酸ナトリウムを使用することより、ほぼ完全に不活化された（図 2）。また、これらの材料にスパイクした菌体レベルの LPS 活性の強度変化を追跡した結果、アルカリ処理の場合は精製 LPS スパイク標品とほぼ同様の結果が得られたが、次亜塩素酸ナトリウム処理により菌体レベルの LPS 活性を不活化するためには 0.5-5% 程度の濃度が必要であることが確認された。化学処理に伴う CM-キチンの分子量変化を追跡した結果、CM-キチンの分子量 ($2.468 \times$

10^5) は、0.005%、0.05% および 0.5% 次亜塩素酸ナトリウム処理により、それぞれ 2.067×10^5 、 4.275×10^4 、 6.878×10^2 となり、濃度依存的に減少して行くことが判明した（図 3）。一方、CM-キチンはアルカリ処理に対して高い抵抗性を示すことが確認され、0.1M 水酸化ナトリウム処理を施した場合でも 2.101×10^5 の分子量を保持していた（図 3）。

(2) LPS 不活化処理を施した各種シートの生物学的評価と構造解析

2-1. LPS 不活化処理に伴う LPS 活性の変化

表 1 に示したように、今回の実験に使用したコラーゲンおよびベスキチンは LPS 含量が低値であったため、化学処理を施した各種スポンジの LPS 含量にも大きな変化は認められなかった。一方、103 EU/mg の LPS を含んでいたソープサンはアルカリ処理により濃度依存的に LPS 活性が低下した（表 1）。LPS 活性の低下は 0.5% 次亜塩素酸ナトリウム処理を施した場合が最も顕著であり、ソープサンに含まれる LPS は同処理により 97% 不活化された（表 1）。

2-2. スポンジ構造の解析

図 4 に示したように、コラーゲンは小葉状の孔構造を呈し、ベスキチン（図 5）とソープサン（図 6）は繊維状構造からなることが確認された。各材料ともに、未処理品とアルカリ処理品との間に構造的な違いは殆ど認められなかった。一方、次亜塩素酸ナトリウム処理を施したコラーゲンスポンジは、未処理品と比較して、表面構造が明らかに異なり、色調も淡黄色に変色した（図 4）。次亜塩素酸ナトリウム処理によるスポンジ構造の変化はベスキチンとソープサンにも認められ、両材料ともに繊維密度の上昇と繊維の歪みを生じることが確認された（図 5, 6）。また、次亜塩素酸ナトリウム処理を施した各スポンジの柔軟性は未処理品と比較して肉眼的にも若干低下していた。

アルカリ処理 Type I アテロコラーゲンの分子量を SDS-PAGE により検討した結果、図 7 に示すように、0.01M および 0.005M 水酸化ナトリウム処理コラーゲンは未処理品と比較して大きな変化が認められなかった。一方、0.1M 水酸化ナトリウム処理コラーゲンでは $\alpha 1$ (III) 鎖の減少が観察された（図 7）。また、表 2 に示すように、Type I アテロコラーゲンの比旋光度と粘度は、アルカリ処理により濃度依存的に若干低下したが、

顕著な変化はないことが判明した。

2-3. 骨芽細胞の増殖と分化に及ぼす影響

正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化を指標として、アルカリ処理を施したコラーゲンスポンジおよびベスキチン（キチンスポンジ）の骨組織再生に及ぼす影響を評価した。増殖の指標として蛋白質含量、分化の指標としてアルカリホスファターゼ活性およびCa含量を図8（Type I アテロコラーゲン）と図9（ベスキチン）に示した。両図に見られるように、アルカリ処理スポンジ上で正常ヒト骨芽細胞を培養した際の増殖度と分化度は未処理品とほぼ同一であり、アルカリ処理は両材料が持つ骨組織適合性に大きな影響を与えないことが明らかになった。

アルギン酸Caスポンジ（ソープサン）および次亜塩素酸ナトリウム処理を施したコラーゲンスポンジとベスキチンは水溶性に富むため、これらの試験を実施しなかった。

2-4. ラット皮下埋植試験による生体適合性評価

各種スポンジ材料をラット背部皮下筋膜下へ外科的に埋植し、その生体親和性について病理組織学的に検索した。

2-4-1. コラーゲンスポンジ

埋植後1週の未架橋品では、リンパ球を主とした軽度の炎症細胞浸潤を伴う線維化傾向を示す肉芽組織により被包され、スポンジ内部に散在性に線維芽細胞と毛細血管の侵入がみられた（図10a）。2週後のものでは被膜は線維化し、スポンジ内に侵入した線維芽細胞と毛細血管の増加が認められた（図10b）。水酸化ナトリウム処理を施した各種スポンジの病理所見は、いずれの処理濃度においても埋植後1週および2週共に未処理スポンジと同様であり、アルカリ処理による生体親和性の変化は認められなかった（図10c, 10d）。一方、0.5%次亜塩素酸ナトリウム処理を施したコラーゲンスポンジは埋植後1週で完全に吸収され、線維性結合組織に置換されていた（図10e, 10f）。

2-4-2. ベスキチン（キチンスポンジ）

ベスキチンスポンジ（未処理）の埋植試験では、内部に多量の炎症性滲出液（血清/血漿成分）を含有した異物肉芽腫の壁からなる嚢胞様構造の所見が観察された（図11a）。ベスキチン繊維は異物巨細胞による貪食像が認められ、また滲出液中の繊維に

は軽度の大食細胞およびリンパ球、好中球の浸潤が見られた。これらの繊維の変性・溶解を示す所見は観察されなかった。埋植後2週では、炎症性滲出物は殆ど消失し（図11b）、大食細胞によるベスキチン繊維の吸収・消失が同様にみられ、結合繊維の増生を認めた（図11c）。しかし、残存したベスキチン繊維には大食細胞と異物巨細胞反応が未だ強く観察された（図11d）。ベスキチンの繊維吸収性と生体親和性は各種の化学処理により何ら影響を受けなかった。（図11e, 11f, 11g）。

2-4-3. ソープサン（アルギン酸Ca不織布）

ソープサンの埋植試験では、ベスキチンと同様、内腔に炎症性滲出物を含む嚢胞様構造の病理組織像が観察された（図12a）。嚢胞様構造の壁内には大食細胞とリンパ球の浸潤が観察され、ソープサン繊維に対する異物巨細胞反応が認められた（図12b）。埋植後2週においても高度の異物肉芽腫反応を呈し、貯留した滲出物の減少が認められた（図12a）。ソープサン繊維のアルカリ処理では、いずれの濃度のものでも対照群と比較して明らかな相違は認められなかった（図12c, 12d）。しかし、次亜塩素酸ナトリウム処理では、スポンジは吸収傾向を示し（図12e）、埋植後2週で殆ど吸収・消失され、僅かに残存が見られるのみとなり、結合組織繊維の増生が観察された（図12f）。

2) 新規材料の免疫原性評価手法開発

(1) アレルギー性強度の順位づけ

OVAとBSAについてIgE testで試験した。OVAは毎回10 μ gをAlumとともに、計3回投与し、BSAは10または100 μ gを投与し、血清総IgE抗体価を測定した。Alumだけを投与した対照群と比較すると、OVA群の動物はいずれも高い値を示すのに対し、BSA群では5匹中2匹だけが対照群よりも高い値を示した（図14）。また、この抗体価の上昇した動物でも投与量が多いほど、高い値を示した。各群の血清IgE抗体濃度の平均±標準偏差（ μ g/ml）を求めたところ、Alum群は0.34 \pm 0.33、BSA 10 μ g群は0.92 \pm 0.64、BSA 100 μ g群は1.21 \pm 0.82と差があり、OVAは10 μ gで1.84 \pm 0.71であった。

(2) IgE以外の抗体価

IgE以外の抗体価について測定し、即時型アレルギーを判定する上で有用な指標となりえるか検討した。先に示したOVAおよび

BSA を投与して得た血清を用い、血中総 IgG、IgG1、IgG2a および IgG2b を ELISA で測定した。各動物の血清とも段階的に希釈して反応させたときの希釈度と吸光度曲線のグラフを図 15 に示した。IgG に関しては対照群に比べて、OVA 群はそれぞれの希釈度においても高い吸光度を示し、IgG が高レベルにあることが示された。BSA 100 μ g 群でもやはり高い吸光度を示したが、BSA 10 μ g 群は全体的に吸光度が低く、また、同じ処理群でも動物によって反応性の差が大きかった。

次に、IgG のサブクラス別に解析した。IgG1 は IgG と同様の傾向が認められた。一方、IgG2a は OVA、BSA 投与群と対照群との間でほとんど差は認めなかった。また、他の抗体価に比べ濃度が低かった。IgG2b についてもタンパク投与群と対照群とで変化は認めなかった。したがって、今回検討したサブクラスの中では総 IgG1 が最も感度が高く、免疫状態の変化を観察できた。

(3) IgE test の種々の試験物質への適用

3-1. タンパクアレルギー

ピーナッツレクチン、 β -ラクトグロブリン、トリプシンインヒビターおよびパーオキシダーゼなどの酵素類のいくつかはアレルギー性が知られている。これらのタンパク質について、それぞれ毎回 100 μ g を Alum とともに投与した後、血清中の総 IgE 抗体価を測定した(図 16)。Alum だけの対照群の総 IgE 濃度(μ g/ml)は 0.29 ± 0.15 であり、最高値は 0.53 であった。ピーナッツレクチンを投与した群ではこの対照群の最高値を超えた動物数は 5 匹中 3 匹で平均値は 0.71 であった。一方、トリプシンインヒビターでは平均 0.40 で、対照群の最高値を超えたものは 1 匹のみであった。陽性アレルギーと考えた β -ラクトグロブリン投与群の総 IgE 抗体価は対照群と差が認められなかった。また、*in vitro* 分解性が早く陰性対照と考えたパーオキシダーゼについては、逆に、 0.93 ± 0.40 と IgE 値は増加した。

3-2. 天然医用材料

医用機器の材料として使用されるコラーゲンについて試験した。コラーゲンは高分子量で水に不溶であるが、体内では種々の酵素によって分解すると考え、水溶性の低分子量コラーゲンペプチドを用いて検討した。ゼラチンについても医療分野でも使用されるため、これについても同時に試験し比較

した(図 17)。先の酵素類と同様に対照群の総 IgE 最高値を超えた動物数を求めたところ、コラーゲンペプチド群では 1 匹、ゼラチン群では 2 匹であった。しかし、各試験群で特に高い値を示す 1 匹ずつを除いた 4 匹についてはほとんど対照群と差はなく、5 匹の平均値も試験群と対照群では有意な差はなかった。

3-3. 天然ゴム製品

手袋などの天然ゴム製品による即時型アレルギーはゴム製品中の水溶性タンパク質が原因である。そこで、ゴム製品の水抽出液について試験した。抽出法は日本工業規格(JIS)にしたがって、1 g に対して 10 ml の水を加え、医療機器ガイドラインが推奨する条件のうち、タンパク質への影響が少ないと思われる 37 $^{\circ}$ C、72 時間抽出を選択した。この抽出液を分取し、そのまま Alum と混和して、動物に投与した。ゴム製品 A の抽出液投与群で高い IgE 値を示す動物が 1 匹認められたが、他は対照群とほとんど変化なかった(図 18)。

3-4. 化学物質

昨年度はシクロヘキシジンについて検討したが、今年度は薬物アレルギーの知られているペニシラミン¹¹⁾についても試験した。ペニシラミン 200 μ g を Alum とともに投与したが、血清総 IgE 抗体価は増加せず、IgE test では分子量の低い物質のアレルギー性を検出することはできないことを再度確認した(図 19)。こうした化学物質が抗体を産生させるためにはタンパク質との複合体を形成する、あるいは別の試験系が必要である。

(4) PLNA

4-1. 化学物質

薬物アレルギーの症例がある薬剤について検討した。ペニシラミンとペニシリンについて試験した結果、いずれもリンパ節重量については SI が 2 以上の値を示したが、リンパ節細胞数についてはペニシラミンが 1.9、ペニシリンが 1.3 程度の SI しか示さず、反応はそれほど強くなかった(表 3)。また、こうした反応を起こすには数 mg の注射量が必要であった。

4-2. タンパク質

PLNA が低分子量化学物質だけでなく、タンパクアレルギーのような高分子物質にも適用できるかどうか検討した。市販されている動物皮膚抽出液(epidermal extracts,

cattle epithelia 20000 PNU/ml, Greer Laboratories, Inc., USA)を陽性アレルゲンとして用い、BSAを同時に試験した。いずれも10%溶液を50 μ l注射して、リンパ節の反応性を比較した。陽性対照は著しいリンパ節重量とリンパ節細胞数の増加を示した。BSAは陽性対照と比較すると反応性は小さいものの、リンパ節細胞のSIは2.23と陽性の判定がされた(表4)。

次に、種々のタンパクアレルゲンについて試験した。OVAについても再度検討し、反応性を比較した(表5)。酵素類2mgを投与したところ、いずれも強い反応を示した。リンパ節重量、細胞数ともSIが2以上の値を示し、陽性と判定された。

ゼラチンとコラーゲンペプチドについては、酵素類に比べると反応性は低かった。ゼラチンはSIが2以上の値を示したが、コラーゲンペプチドは1.3であった。さらに、ゴム製品Aの水抽出液について、希釈することなくそのまま投与した。動物数が少ないため確かではないものの、試験した動物の間では、ゴム抽出液を投与した側のリンパ節の重量およびリンパ節細胞数は、生理食塩水を投与した側と比べて大きな変化はなかった。

3) *in vitro* 発癌リスク評価手法

PLLAのコート方法の検討

(1) メタノールに懸濁させる方法

培地交換時に少しはPLLAが剥がれるが、他の方法よりはその量は少なかった。

(2) 水に懸濁させる方法

水にPLLA粒子を懸濁させると、水からはじかれるように液のすぐ上の容器壁面に付着してしまい、正確な濃度の懸濁液を調製することができなかった。

(3) culture insert (Nunc) にコートする方法

粒子状PLLAのメタノール懸濁液をculture insertに広げて底面にコートしたが、培地交換時にPLLAは剥がれてしまった。

(4) ジクロロメタンに溶解したPLLAをガラスシャーレ底面にまずコートし、ジクロロメタンが乾かないうちに粒子状PLLAを散布する方法

粒子の下部はジクロロメタンに溶けて底面に固定され上部はジクロロメタンに漬からず乾いた粒子状で存在することを期待したが、白い粉状のPLLAで覆われたシートも、

全体が乾燥するとシート全体がうねってしまい平面を保つことができなかった。

(5) メタノールに懸濁してコートし、培地交換時に廃棄する材料と培地を別のシャーレに移し培養を継続する方法

PLLAが剥がれてしまうのをやむを得ないことと考え、剥がれた材料と共に廃棄される細胞をできるだけ回収することを試みた。20、40、および80mg群についてこの方法を用いた結果、20、40mg群では回収した細胞のシャーレで陰性対照の4.4および2.2倍のフォーカスの出現が認められた。80mg群では毒性が強く、フォーカスの出現は認められなかった。一方、元のシャーレでは陰性対照以下のフォーカスしか観察されなかった。

(6) コラーゲンコートシャーレを用いる方法

コラーゲンコートシャーレ(IWAKI, collagen Type I)にメタノール懸濁PLLAを広げると、周辺より中心部が薄くコートされた。しかし、固定時にメタノールを添加すると底面に残っていたPLLAは剥がれてしまった。

以上のようにコート方法を検討したが、PLLAをしっかり容器底面に固定する方法はみつからなかった。そこで、比較的良好な結果が得られたメタノール懸濁液を用いる方法で、シャーレのコートを行ない、培地交換、固定、染色時の液交換を慎重に行なった。

細胞毒性検定:各群の算定したコロニー数とその平均値および播種細胞数(216細胞/シャーレ)より求めたコロニー形成率並びに陰性対照でのコロニー数を100%とした各処理群の相対コロニー形成率で示す。陽性対照群では、相対コロニー形成率が1.9%という強い細胞毒性が観察された。また、PLLAの懸濁に用いたメタノールのみでの処理シャーレでは62.0%の相対コロニー形成率を示し、PLLAをコートしたシャーレでは、10mg群までは用量依存的にコロニー形成率は増加し、陰性対照の最高約1.5倍のコロニー形成率を示した。しかし、20mg以上ではコロニー形成率は再び低下した。

形質転換実験:前述の分類に従って算定した形質転換フォーカスの数、その平均値 \pm SDおよび形質転換率で形質転換能を表した。形質転換率は播種細胞数をコロニー形成率で補正した生存細胞数当たりの形質転換フォーカスの割合として算出した。陰性対照

では、平均 0.067 個のフォーカスが出現したのに対し、陽性対照では平均 12.9 個のフォーカスが出現した。PLLA 処理群では 20 mg 群まで用量依存的にフォーカス数が増加し、最高用量の 40 mg 群では若干低下した。形質転換率で比較すると陽性対照は陰性対照の約 10000 倍の値を示し、明らかに陽性結果を示した。これに対して、メタノール処理群ではフォーカスの出現は認められず、PLLA 処理群では、最高用量 40 mg 群で陰性対照の約 15 倍の値を示し、用量依存性も明らかかなことから、結果は陽性と判定した。

4) in vivo 発癌実験

本年度で埋植後 2 年間の観察期間が終了した。PLLA 群では、2 g 群の 5 例が、埋植後 1 および 2 週に大量の異物投与に起因すると考えられるショック症状を示したため、いずれも切迫解剖した。また埋植後 1 週から PLLA 群のほぼ全例で埋植部位に流動性物質の貯留が観察された。この流動性物質量は埋植量に依存しており、流動性物質貯留は 0.4 g 群で埋植後 6 週、2 g 群で埋植後 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が 76 週まで認められるとともに、埋植後 18 週から触診により埋植部位の皮下に腫瘤が認められ、埋植後 42 週には 10 例まで増加した。

PLLA 粉末 2 g 群以外の埋植群の死亡または切迫解剖例は、埋植後 18 週から認められ始め、埋植後 104 週の集計では対照群、PU 群、0.4%MDA 添加 PU 群、4%MDA 添加 PU 群、PLLA 粉末 0.4 g 群および PLLA 粉末 2 g 群でそれぞれ 14、13、12、16、10 および 25 例が死亡または切迫解剖された。

血液学検査、血液生化学検査結果では、各埋植群とも対照群と差は認められなかった。

器官重量測定の結果、PU 群で脳および心臓相対重量が高値を示し、PLLA 粉末 2 g 群で心臓相対重量が高値を示した。PU 群の変化は平均体重が低値傾向を示したため、実重量に変化はなかった。PLLA 粉末 2 g 群の変化は検査対象 5 例中 1 例の変化が特に大きかったためであった。

剖検所見では、被験物質の埋植部位に塊が、PU 群 9 例 (40×35×20 mm~110×75×60 mm)、0.4%MDA 添加 PU 群で 7 例 (20×15×15 mm~105×75×50 mm)、4%MDA 添加 PU 群で 10 例 (25×22×17 mm~105×75×45

mm)、PLLA 粉末 0.4g 群で 25 例 (17×7×6mm~125×85×80mm)、PLLA 粉末 2g 群で 26 例 (25×20×3mm~115×65×50mm) に認められた。

いずれの腫瘤も背部または腰部に発症した。その他、心臓の白色斑点、脾臓の肥大、胸腺の萎縮、肝臓の褐色および白色斑点、腎臓の表面粗糙、精巣の萎縮、肥大および白色斑点、精囊の萎縮、下垂体の肥大および結節が対照群および各埋植群に多く観察された。これらの所見は本系統のラットにおいてよく観察される加齢性の所見であった。

5) セラミックス関節磨耗試験法開発 応力集中下における磨耗試験

磨耗面の観察結果によれば初期には全体的に比較的滑らかであるが、三体磨耗と思われる筋状の磨耗痕が見られる場合がある。また磨耗痕の周囲にはクラックが見られる。磨耗の進行につれて磨耗痕が徐々に消失した。6 時間以上磨耗試験を続けると、新しく筋状磨耗痕が出現することが少なくなるので、全体として表面が滑らかになった。

試験開始の初期 (5 分以内) に急速な磨耗が生じたが、時間の経過につれて磨耗率は減少した。磨耗による重量の減少から磨耗率を見積もる方法と磨耗面の幅から磨耗率を見積もる方法を試みたが、後者の方が再現性に優れていた。

牛血清水溶液を用いる試験に比べて蒸留水を用いる試験の磨耗量が少し多かった。また、まれに磨耗面の周辺部にはく離痕が現れた。

応力集中と衝撃荷重下での磨耗試験

下部試験片の円筒面において、上部試験片のエッジ部が落下する部分が著しく磨耗していた。それ以外の磨耗面における表面あらさは衝撃荷重の無い場合とあまり変わらなかった。筋状の磨耗痕の出現する確率は一定荷重下の磨耗試験より少なかった。

6) 非破壊・耐久性試験法の開発

(1) 骨プレートの X 線観察では内部欠陥は発見されなかった。骨プレートの実体顕微鏡観察による表面観察でも明確な傷は観察されなかったが、プロミクロス製品では細かな凹凸が表面全体にわたり観察され、キリカン製品では細かな傷が観察された。

しかしペロー製品では凹凸や傷は非常に少なかった。

(2) 硬さ試験においては、3部位について硬さを計測した。それぞれの製品の硬さ分布を測定した結果、プレートの部位による硬さの変化は顕著であり、特にプレートの折損の好発部位であるスクリー孔側面については、臨床的に破損事故の報告例の多いと評価されているプロミクロス製品で最大硬さ450に対し最小硬さ210と倍以上の変化があるなど、硬さのばらつきが大きい傾向がある。しかし臨床的に評価の高いペロー製品では、最大硬さ360に対し最小硬さ230と1.5倍程度にとどまっていた。

(3) 傷をつけた金属試験片上でラット腹腔内マクロファージを培養する実験を行った場合、金属表面の傷の周囲に選択的にマクロファージが集合していることが明らかになった。画像処理により細胞の占める面積を測定し、傷から距離で整理した結果では、培養時間の経過とともに傷周囲にマクロファージが集合していることが明らかになった。

7) 人工関節の力学・組織評価法開発

IMC stem (kyocera) においては経時的な接触応力の変動はわずかで、ステム本体部は均一な応力分布を呈した。一次元接触応力は全体的に低値を示し比較的高い応力は近位において目立った。Versysは荷重負荷後、応力部位の移動は見られず、内側と外側ともに均一な応力分布を呈した。一次元接触応力は近位において高い応力部位が1箇所現れた。PERFIX SVにおいては全面でフィットした人工股関節では見かけ上の広い領域での接触にもかかわらず、高い応力値を示す部分が4種のステムの中で最も多く偏在した。一次元接触応力においても高い応力が散在しどこで固定力が得られているか不明瞭であった。SUPER SECUR-FITステムの近位外側に現れた応力はわずかな周囲条件の変化によりその値が大きく変動した。一次元接触応力は外側の遠位に高い接触応力が認められた。ステムの近位外側および遠位内側で発生した高い値を持つ応力分布は角度変化にともないその応力部位が移動した。さらに遠位外側に高い接触応力の部位が認められた。

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。

そこで、通常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と評価できる。軟骨細胞の増殖・成熟によってスキャホールド全体の体積弾性率が上昇していることを定量的に評価できた。

II. 動脈瘤の栓塞材及びステントの評価用シミュレーション

動脈瘤の治療は開頭シ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、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。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。また、非常に柔らかいものから硬い物まで作製することができる。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。

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。

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。ロストワックス法による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。

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、インデンター試験、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。

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。

フィブロインを用いて作成した再生軟骨の粘弾性試験を行った。その結果、正常な関節軟骨が有する粘弾性特性には劣るものの、培養日数に伴い正常軟骨に近づく傾向がみられた。培養日数に伴う貯蔵弾性率 E' の経時的变化は、1 Hz, 10 Hz いずれの周波数においても、2種類のフィブロインスポンジともに培養日数に伴って E' が増加していた。培養後 14 日目で一時的に硫酸化フィブロインスポンジの E' の値が従来のフィブロインスポンジに比べて増加したが、28 日目では両者間に明らかな差を認めなかった。また、2種類のフィブロインスポンジともに培養日数に伴って $\tan \delta$ のピーク値が減少し、かつ低周波域に推移する傾向が見られた。

フィブロインを用いて作成した再生軟骨

のインデンテーション試験を行った。その結果、軟骨組織の成熟に従って永久変形量は減少した。しかし、14 日の培養後においても正常軟骨に匹敵する形状回復能は得られなかった。

10) 形状記憶合金の力学試験法開発

超弾性 Ti-Ni 合金製ステント用疲労試験機の試作

本研究計画で試作した超弾性 Ti-Ni 合金製ステント用疲労試験機を試作した。この試験機は、①試験部、②拍動ポンプおよび③循環試験溶液タンクからなっている。

試験部は内径 4 mm ラテックスチューブを用い、コネクター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ている。循環用シリコンチューブをコネクターから外し、そこから試験部に超弾性 Ti-Ni 合金製ステント（デリバリーカテーテル）を挿入する。

循環試験溶液タンクは容量およそ 8,100 ml の塩化ビニール製のタンクで、密封性の高い堅牢な容器（容器壁厚およそ 30mm）となっている。溶液温度を 310 K に保つ温調システムも搭載することができる。

拍動ポンプには市販の定量送液ポンプ（RP-1000, 東京理科器械）を用いた。このポンプの主要諸元は、最大吐出圧：137.3 kPa, 回転速度：0~450 rpm, 流量：0.7~138 l/h である。最大拍動数はおよそ 22.5 Hz となる。

この疲労試験機が、従来型の試験機に比べ優れている点を列記すると、①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、②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があげられる。

超純水を用いて可動試験を行った後、現在この試験機を使用して疲労試験を行っているところであるが、4億サイクルの疲労試験を行うには 17.8 Ms（約 206 日）の試験時間を要する。そのため、今後はより拍動数の高いポンプを使用した試験機を試作して、疲労試験に供することを計画している。

超弾性 Ti-Ni 合金製ステントの力学性評価

1.0%乳酸水溶液中で 16 Ms（およそ 180 日）まで Ti-Ni 超弾性合金の溶出試験を行

った。比較材として別にステンレス鋼 (SUS304) の試験を行った。

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た。これに対し、ステンレス鋼では放物線則に従うような溶出挙動を示した。このことから両合金では溶出のメカニズムが異なっていることが示唆される。すなわち前者は界面反応律則の反応、後者は拡散律則の反応であることが考えられる。界面反応律則の場合、保護的な皮膜による溶出の抑制は期待できず、試用期間中引き続いてイオンの溶出が起こることが考えられ、生体内で利用する場合際の懸念材料となる。

本研究の範囲では 1.0% 乳酸水溶液を溶出環境として採用しているが、今後より詳細に検討するためには、血清等、異なる環境での耐食性のデータを収集することが必要となるものと考えられる。

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 骨芽細胞の増殖に及ぼす影響

試料 A-E

A: Ti-6Al-4V, (粗さ 0.97 μ m)

B: Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8Mo (0.98 μ m)

C: Ti-15Mo-5Zr-3Al (1.07 μ m)

D: Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd (0.68 μ m)

E: Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd (4.68 μ m)

の上で 2 週間培養した NH0st 細胞の増殖に関する指標である細胞数、DNA 量およびたんぱく質を測定した。いずれもコントロールに対する相対値で比較した。これらの指標はいずれも同様な傾向を示し、試料 A ではコントロールと比べて低下し、試料 B ではコントロールと同程度であった。また、試料 C~E ではコントロールより増加し、試料 D および E において NH0st 細胞の増殖は最も促進した。チタン合金の上で培養した NH0st 細胞の増殖は、

試料 A < B < C < D = E

という傾向を示した。

骨芽細胞の分化に及ぼす影響

試料の上で 2 週間培養した NH0st 細胞のアリザリンレッド S 染色像を観察した。いずれの試料においても石灰化物の形成が確認された。試料 A では、コントロールと比べて染色部位が明らかに少なく観察された。また、試料 D および E では、コントロールと比べて染色部位が多く観察された。

NH0st 細胞の分化に関する指標である ALP 活性、カルシウム量およびオステオカルシン量の結果では、いずれもコントロールに対する相対値で比較した結果、いずれも同様な傾向を示した。試料 A ではコントロールと比べて低下した。また、試料 B~E ではコントロールより増加し、試料 E において NH0st 細胞の分化は最も促進した。チタン合金の上で培養した NH0st 細胞の分化は、

試料 A << B < C < D < E

という傾向を示した。

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

人工関節、接合材国内文献検索

検索でヒットしたものは、3,260 件に及んだが、内 1,190 件は感染のみであった。感染については、精査すると、「感染予防、感染なし、非感染性」が、40%程度は含まれており、実際には感染に至っていない事例が多かった。不具合(破損、摩耗、ゆるみ)と感染の複合例については、真の感染例のみに絞った。用具別の報告比率は股・膝関節が殆どであり、両者はほぼ同数であった。股・膝関節報告の年推移では、年と共に若干の増加傾向があることがわかる。

不具合(破損、摩耗、ゆるみ)の用具別報告比率については、同一報告内に複数種類の用具が記述されているものは、それぞれの用具に、1 報告として重複集計した。股関節が約半分を占め、ついで膝関節が 1/4、その他の関節、髄内釘、骨ねじ、プレート、釘の順であった。用具別の年推移は、人工関節においては、各年においても上記の順番はほぼ同様だが、1999 年から、股関節の報告が急増しているのが顕著である。接合材においては、髄内釘、骨ねじの報告が多いのは、同様だが、最近のプレート報告の増加が目立つところである。

不具合別の比率では、同一報告内に複数の不具合が記述されているものは、それぞれの不具合に 1 報告として重複集計した。3 不具合(破損、磨耗、ゆるみ)とも、ほぼ同数であった。各年ごとに若干の差はあるが、ほぼ同レベルであると思われる。

摩耗、ゆるみは人工関節についてのみの集計であるが、不具合別にみると、摩耗においては、全体の比率よりも股関節の比率

が多くなっている。年推移も不具合全体の推移と同様に、1999年から、股関節の報告が急増している。

一方、ゆるみについては、摩耗以上に股関節の報告比率が高くなっており、膝関節の3倍近くに及んでいる。年推移でも股関節が多いことに変わりはないが、最近になって、やや減少傾向がある。

他方、破損においては、人工関節と接合材とに2分され、人工関節では、股関節、膝関節がほぼ同数である。接合材では、髓内釘、骨ねじ、プレート、釘の順であった。年推移では、年によっては、膝と股の報告数は逆転している。接合材においては、髓内釘、骨ねじの報告が多いのは、同様だが、最近のプレート破損報告の増加が目立つところである。

股関節に限って、不具合別にみると、ゆるみの報告が一番多く、破損が少なかった。年推移でも、ゆるみが多い傾向はあるが、最近では、摩耗の方が多くなっている。一方、膝関節では、3不具合(破損、磨耗、ゆるみ)がほぼ同数になっている。しかし、その中でも股関節とは異なり、破損が一番多くなっていた。年推移では、年ごとの変動が激しいが、ほぼ同数の報告といえるであろう。

国内の回収報告

不具合に直接関連するものとして、国内の整形外科インプラントに関する回収報告を調べてみた。2000年より2003年度において、クラスII(中程度)の回収報告は、骨接合用品3件(ラベル不良等)、人工膝関節4件(緩んだプラグが脱落する可能性、脛骨インサートの早期磨耗の報告例、ピース焼結不良によるピース落屑の可能性)、人工股関節8件(臼蓋カップの破損例、大腿骨ステムの破損例、ジルコニア・セラミック・ヘッドの破碎例、PEの一部早期摩耗)などがあった。クラスIIIの報告(軽度)では、骨接合用品5件(ラベル不良)が挙げられる。整形外科インプラントではクラスI(重篤)に属する回収報告は上記期間に関する限りなかった。

米国の不具合情報

前年度までに作成した整形外科インプラントの不具合報告データベースについては、イントラネットでは既に検索可能であるが、インターネット上での検索が可能ないように整備した後で、当所の療品部のページに掲

載する予定である。

検索可能なデータベースは、①「FDA医療用具全体の一般的名称と分類」、②「FDA整形外科インプラントの一般的名称と分類」、③「FDA整形外科インプラントのMAUDE報告」の3種である。

なお、検索に際しては、ひらがな・カタカナ、全角・半角、大文字・小文字の区別はしておらず、いずれで入力しても同一結果となるようにしている。

①「FDA医療用具全体の一般的名称と分類」では、一般的名称(Device Name)、通知番号(Regulation Number)、分野コード(Medical Specialty Code)、分野名(Medical Speciality)、分類コード(Product Code)、クラス分類(Device Class)で、検索できる。

②「FDA整形外科インプラントの一般的名称と分類」では、一般的名称(Device Name)(原語)、通知番号(Regulation Number)、一般的名称に記載された材料(原語)、通知記載材料(和名)、通知の表題(原語)、通知の説明(原語)、セメント使用の有無[使用,両方,非]、用具分類(和名)、用具の使用部位(和名)、分類コード(Product Code,英3文字)、クラス分類[1,2,3]で検索できる。

検索結果は、一覧表示され、参照したい名称をクリックすることで、目的の詳細結果が表示される。ANDやNOT検索についても、検索可能である。

③最も肝心な、「FDA整形外科インプラントのMAUDE報告」では、商品名(Brand Name)、製造企業名、通称名(Generic Name)、一般的名称・分類(Device Name)、分類コード(Product Code)、通知番号(Regulation Number)、通知記載材料、分類(和名)、使用部位、報告年、セメント使用の有無[使用,両方,非]、不具合型[D,IN,M(死亡,傷害,機能不全)]、テキストの各項目で検索できる。

検索結果は、15症例ごとに区切って、No,和名分類、商品名、企業名、不具合程度、報告日が表示され、表示したいNoをクリックすることによって、その明細を知ることができる。なお、項目内の記載事項が空白の項目は表示せず、テキストに関しては、同一症例でコメント時期等の違いによる複数のテキストを含む場合もあるため、それらを併記表示するようにしている。原文で

はテキストは全て大文字だが、読みやすさを考慮して全てを小文字に変換して、表示させている。文頭も小文字にしている点は容赦願いたい。

また、明細表示の分類コードについては、「FDA 整形外科インプラントの一般的名称と分類」データベースにリンクさせて、この分類の説明を表示できるようにしており、さらに、その表示画面で分類コードをクリックすれば、その分類に属する不具合報告を一覧できるようにしている。

米国の安全性情報

FDA は、不具合データベース以外にも、各機器ごと、或いは一般的な情報として安全性情報を発出しており、年別件数は、1997～2002年において、各々、11、17、10、5、8、7件であった。その内、整形外科インプラントに関する通知を列挙すると、1997、2001年に人工股関節、2002年に骨セメントについての情報提供がなされている。具体的には、2002/10/31の Web Notification: Complications Related to the Use of Bone Cement in Treating Compression Fractures of the Spine (脊椎圧迫骨折への骨セメント使用における合併症)、1994/7/15の FDA Safety Alert: TMJ Implant (顎関節)による骨変成、2001/9/13の Recall 情報: ジルコニア製セラミック大腿骨頭、などである。TMJ Implant については、患者さんに重篤な被害を与えた例もあり、インプラントの評価をする際には必ずといって良いほど、引き合いに出される事例である。

英国の不具合情報

英国 MDA (Medical Device Agency、2003年4月より Medicines Control Agency と統合されて、Medicines and Healthcare products Regulatory Agency と改称)は、Adverse Incident Center を有し、広く英国及び海外からの情報を収集・解析しており、2002年からは Web サイトからも不具合情報を受け付けている。また、年度ごとの報告書も作成しており、Web サイトで入手可能である。

全機器の報告数の全数は毎年上昇しているが、非 CE マーク製品は報告数・比率ともに減少している。おそらく、非 CE マーク製品の市販数自身が減少傾向にあるためと推定される。報告元は、National Health

Service からが一番多いが、企業報告も徐々に増えている。

2002年の機器別の集計データでは、車いすの報告が最も多く、1,400件(全数の16%)にも及んでおり、次にインプラントの報告が1,200件弱(13.5%)と多い。これらの内、2%の報告が死亡に、8%が重篤な傷害に関連があった。また、報告の18%については MDA による徹底的な調査が、46%については MDA の指導によって企業による調査が行われている。全体の20%については特に対応を必要とせず、データベースへの記録のみに留められている。

不具合報告への対応策としては、56件の safety warning、42件の EU 当局への通知が発出されている。Safety warning の年推移(1999～2002年)は、58、53、56、56件であった。

また、385製品のリコール、306件の使用説明の改訂や研修勧告、1,176企業への設計・製造工程・品質システムなどの改良、が指示されている。不具合の原因の割合は、配送前(設計、製造、品質管理、包装)、配送後(性能/メンテナンス不良、劣化)、使用者エラー、非機器由来が、各々、36%、24%、17%、38%であった。年々、使用者エラー、非機器由来が増加傾向にある。

インプラント関係の2002年の Device Alert では、埋め込み薬液注入ポンプ、冠動脈ステント、内耳、人工股関節、ステントグラフト、足指関節について発出されており、同様に、Safety Notice では、埋め込み除細動器、人工股関節になされている。ペースメーカーについては、Pacemaker Technical Notes において毎年、不具合に限らず報告が行われている。

英国では、ペースメーカー、埋植心臓弁、人工乳房、人工関節などにおいて、各機器の登録制度(表2)10)が確立されており、全体の集計結果や傾向も明らかにされている。

英国 Trent 地区の人工関節登録制度

この制度の目的は、人工股・膝関節の使用と臨床成績のデータを集めることで、英国の1保健区(人口400万人、26の病院)だけを対象にしており、臨床的な診療方法に関する情報などもある程度収集することである。当初は、Trent 地区の整形外科医の希望によって、整形診療のやり方にばらつきが見られること、再置換例が多く機関によるばらつきも見られること、から1990年

より調査が開始された。

集積情報は、患者データ(年齢と性別)、インプラントのタイプ(メーカー、モデル)、置換手術の理由、入手可能な場合には摘出の理由、手術に関する情報(セメントの有無、併用薬、clean air 手術室使用の有無、術者の年齢・技術レベルなど)である。人工関節でのデータ収集方法は、用紙に記入して郵送し、センター病院で集計する方法を取っている。

股関節での集計を見ると、年齢、男女別は、60~70 才代が最も多く、60 才以上が8割近くを占め、女性の方が多。使用されているモデルは、セメントタイプ(79.6%)の方が、非使用タイプ(17%)より多い。術中合併症は5.2%(109/2114)で、セメント使用タイプ(4.2%)より、不使用タイプ(9.1%)の方が有意に多い。なお、術者のレベルによる有意差は見られない。再手術例は6.9%で、ゆるみ(50%)によるものが最も多く、次いで、感染(31%)、脱臼(20%)であり、セメントレスタイプで再手術比率が高かった。病院によって差はあるが、深部感染/施設比率が1.1%、ルースニング/施設比率は2.2%であった。

さらに、Charnley 型人工股関節置換の第1年目に登録(97%以上)された患者に対して、5年たった時点で第3者の医師によって調査が行われた。この調査に対して2,111患者の67%が協力し、1,080 股関節(90%)の臨床評価と499 例のレントゲン評価が行われた¹²⁾。その結果、5年間でルースニングの比率は2.3%、深部感染1.4%、脱臼5%、再置換3.2%であった。さらに、レントゲン評価によって判明した総不具合は5.2%であり、全不具合比率は実に約9%であった。この結果から、英国全体での登録制度の必要性を訴えている。

スウェーデンの人工膝関節登録

大学間の協力で、1975 から開始されており、目的は、統計学、疫学を用いた Swedish Knee Arthroplasty Register を確立して、人工膝関節の biofunction を探ることである。人工膝関節再建率への、デザインや材料の影響を調べ、デザイン以外のファクターの有無を検討し、また、人工膝関節置換による長期での副作用(発ガン)評価を行うことも視野に入れる。

1975~1996 の間に、55,000 関節のデータ

を解析し、5年間の累積再建率(CRR)は改善されており、同一モデルの下記のセメント使用例において、Marmor unicompartmental モデル(1,969 事例)では11%→5%に、Total Condylar arthroplasties モデル(376 事例)では10%→2%と良くなっていた。この改善においては、デザインの改良よりも、より良いガイド器具、手技、患者選択の効果が大きいと評価されている。

また、特定モデルにおいては、他社製品より6年間で2倍以上の不具合があったことも報告されている。

1983~1990 での、CRR の比較においては、PCA モデル(722 例)では、2年後に15%であったが、Marmor モデル(1,564 例)、及び、St.Georg モデル(1,441 例)では、5年後に5-7%であった。この理由は、大腿部のルースニングの差にあるとされている。

1976~1992 での、30,003 例の一次人工膝関節置換では、変形性関節症例の方が、慢性関節リウマチ症(RA)例より多く、RAでの置換は減少傾向であった。

unicompartment モデルと tricompartment モデルでの CRR を比較すると、明らかに tri-compartmental モデルの方が成績が良かった。また、膝関節置換によって、癌が増加するという事はなかった。

D. 考察

1) 天然医用材料安全性確保・評価手法開発

LPS はグラム陰性細菌の外膜表層に局在するリポ多糖体であり、基本的に、各種細菌の血清学的特異性を決定するO-特異糖鎖部分、様々な生物活性(発熱活性、マクロファージ活性化能、ショックなど)を発現するリポD部分および両者を結合するコア部分の3つの部位から構成されている(図13)。グラム陰性細菌は、水中(河川水および海水)、大気中、土壌中に広く分布している。それ故、天然由来医用材料は原料自体がグラム陰性細菌により汚染されている可能性があると共に、その製造工程中での混入により、最終製品が同細菌により汚染されることも考えられる。天然由来の医用材料は高い生体適合性を持つため、その用途は広く、血液に直接接触する医療用具やインプラント製品などの構成基材としても多用されている。しかし、LPS は極微量でも様々な生理活性を示すため、これら

の製品に使用する天然医用材料の安全性は十分評価される必要がある。

医療用具からの LPS 回収は用具の材質により問題を生じる場合がある。例えば、プラスチック製医療用具の場合、LPS がプラスチック表面に非特異的に吸着してしまうため、注射用蒸留水や生理食塩水による抽出では十分な回収率が得られない。天然医用材料から製造された各種製品からの LPS 回収においても同様な現象が見られ、特にコラーゲンは LPS との結合親和性が非常に高いため、その回収は困難となる。また、LPS の生物活性は加温処理により顕著に低下することに加え、酸・アルカリに対する安定性や抽出溶媒に対する溶解性などを考慮する必要があるため、医療用具や医用材料からの LPS 回収に適用できる抽出条件はかなり制限されてしまう。現行の「医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン」の場合、天然医用材料からの LPS 回収は生理食塩水を用いて、室温下、72 時間抽出を行う条件を基本としている。しかし、ガイドライン法によるコラーゲンからの LPS 回収率は LPS レベルおよび菌体レベルともに 1% に達しないことが昨年度の本研究により明らかとなっている。医療用具や医用材料に LPS 汚染がある場合、そこには遊離 LPS の他、死菌・生菌を問わず必ずグラム陰性細菌が存在することとなる。それ故、医療用具や医用材料から LPS を回収する際は LPS レベルの活性に加え、菌体レベルの LPS 活性も失活させない条件を採用する必要がある。今年度の本研究においてキチン類からの LPS 回収条件の最適化を試みた結果、ガイドライン法を適用した場合、比較的水溶性の高い CM-キチンでは 20% 程度の回収率が得られた。一方、キチンおよびキトサンからの回収率は低値であり、ガイドライン法では両材料中に混在する LPS 量を正確に評価できないことが判明した。しかし、LPS 抽出溶媒として 0.1M 塩酸を使用し、4℃で 10 分間超音波抽出することにより、キチンおよびキトサンからの LPS 回収率は 20-30% 程度まで改善された。これに対し、菌体レベルの LPS 活性の回収率はいずれの材料も低値であり、塩酸抽出を行った場合でも 5% 前後に留まった。同回収率を改善するため、様々な条件による抽出を試みたがいずれも無効であった。これらの成績は、キチン類のエンドトキシン試

験において検出される LPS は主に菌体から遊離した LPS に由来し、菌体に結合した状態の LPS は十分に回収されない可能性が高いことを意味している。

種々の天然由来 LPS および合成リポド A を使用した構造活性相関に関する長年の研究により、LPS が示す生物活性はリポド A 部分に存在する脂肪酸の種類、数、分布様式とリン酸基の数に大きく左右されることが明らかになっている。LPS の生物活性は酸処理およびアルカリ処理などにより低減させることが可能である。昨年度の本研究において、天然医用材料に混入している LPS を簡易且つ効率良く不活化する方法を開発するため、数種類の薬剤の LPS に対する不活化効力について検討した結果、LPS レベルおよび菌体レベルの活性は医用材料存在下でも次亜塩素酸ナトリウムおよび水酸化ナトリウム処理により濃度依存的に不活化されることが明らかとなった。そこで、今年度の本研究では、これらの化学処理を施した各種天然医用材料の化学的・生物学的性状を詳細に検討し、より安全性の高い製品の開発を行うための基礎データを収集した。その結果、アルギン酸 Ca 不織布（ソープサン）に含まれる LPS はアルカリ処理および次亜塩素酸ナトリウムにより濃度依存的に不活化されることが明らかとなった。また、アルカリ処理に伴う各種スポンジの構造変化を検討した結果、0.1M 水酸化ナトリウム処理を施したコラーゲンにおいて $\alpha 1$ (III) 鎖の減少が観察されたが、いずれの処理濃度において全試料ともスポンジ構造に大きな変化は認められなかった。正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化を指標として、アルカリ処理を施したコラーゲンスポンジおよびベスキチン（キチンスポンジ）の骨組織再生に及ぼす影響を評価した結果、アルカリ処理スポンジ上で正常ヒト骨芽細胞を培養した際の増殖度と分化度は未処理品とほぼ同一であり、アルカリ処理は両材料が持つ骨組織適合性に大きな影響を与えないことが明らかになった。また、ラット背部皮下筋膜下への埋植試験の結果、コラーゲン、ベスキチンおよびソープサンともに、アルカリ処理スポンジの生体親和性は未処理スポンジと同一であることが判明した。一方、次亜塩素酸ナトリウム処理の場合、各材料ともに未処理品と比較して明らかなるスポンジ構造の変化が認められた。埋植試

験による評価の結果、キチンスポンジであるベスキチンの生体親和性は次亜塩素酸ナトリウム処理に大きな変化を受けないが、同処理を施したコラーゲンスポンジでは生体吸収性が促進され、埋植部位における結合組織への置換が速やかに起こることが判明した。また、未処理のソープサンは吸収性に乏しいと共に、ラット皮下への生体適合性も低く、重度の異物反応を惹起したが、次亜塩素酸ナトリウム処理を施すことにより分解性が付与され、埋植後2週で僅かに残存が見られるのみとなり、結合組織線維の増生が観察された。これらの成績から、アルカリ処理は各種スポンジの機能を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。今後、両化学処理を施した各種スポンジを実験的に作製した損傷皮膚に適用し、創傷被覆剤としての機能を評価する予定である。

2) 新規材料の免疫原性評価手法開発

タンパク質の種類によって、誘導されるアレルギー反応の強度が異なることが、マウスを用いた試験で報告されている。OVAは即時型アレルギーの陽性対照アレルゲンとして用いられるように、アレルギーを誘導する性質が強い。そこで、開発したマウスIgE testを用いて種々のタンパクアレルゲンを試験し、それらに対する反応性を比較した。

OVA 10 μ g 投与群の動物はいずれも高いIgE値(1.84 \pm 0.71 μ g/ml)を示すのに対し、BSA群では5匹中2匹だけが対照群よりも高い値を示した(図14)。また、BSAも投与量を変化させることによって、10 μ g群では0.92 \pm 0.64 μ g/mlであるのに対し、100 μ g群では1.21 \pm 0.82となり、投与量が多いほど、高い値を示した。以上のように、投与量を変化させることにより得られる反応強度が変化すること、OVAとBSAでは同じ濃度を投与したとしても血清IgE抗体価に差が生じることから、タンパク質によりアレルギー性強度が異なることが明らかとなった。よって、本指標を用いることで、タンパク質のアレルギー誘発能の強度を順

位づけられることが示唆された。

ピーナッツレクチン、 β -ラクトグロブリンはそれぞれ豆、乳アレルギーの原因タンパク質として知られており、トリプシンインヒビターも豆由来アレルゲンとして知られている。一方、パーオキシダーゼは胃液などによる分解が早く、アレルギー性は弱いとされる。ピーナッツレクチンを投与すると、対照群中の最高の総IgE値を超えるのは5匹中3匹で平均値は0.71であった。トリプシンインヒビターでは対照群の最高値を超えたのは1匹だけだった。このように、今回試験に供与した検体においては、ピーナッツレクチンの方がトリプシンインヒビターより強い反応を起こすことから、ピーナッツレクチンの方がアレルギー誘発性が強いと思われた。しかし、 β -ラクトグロブリンを投与した群は対照群と差が認められなかった。この結果については明らかではないが、アレルゲン性が強くない可能性もある。また、試験に用いた試薬のロット差や試験までの取り扱い方による影響も大きいと思われる。逆に、*in vitro*分解性が早く陰性対照と考えたパーオキシダーゼについては総IgE値が増加した。今回のように分解経路を通らず直接体内に入った場合には、アレルギーを起こす可能性があることを示す。したがって、

医用材料の場合、*in vitro*の分解性だけで安全性を評価するのは困難と思われる。ゼラチンは過去に小児用ワクチンに使用されたが、ゼラチンに対するアレルギーの症例が増加したことが報告された。医療分野では他にインプラント用コラーゲンに対するアレルギーの事例も報告されている。コラーゲンについては体内中で種々の酵素によって分解すると考えられるため、低分子量コラーゲンペプチドを用いて試験した。その結果、ゼラチン、コラーゲンペプチドとも数匹について総IgE抗体価が上昇した。さらに、天然ゴム製品をガイドラインに従って抽出した溶液についても、高い総IgE抗体値を示す動物が1匹認められた。これらの上昇がアレルギー反応に直結するかどうかは、それぞれのタンパク質に特異的なIgE抗体であるかどうかを確認する必要があるが、いずれの試験物質とも免疫系に影響を与える可能性があることがわかった。ただ、アレルゲンによるものとは思われない抗体価の増加を示す動物もあり、抗原特

異的 IgE を測定して確認するのが望ましいと思われる。

IgE 以外の血中総 IgG、IgG1、IgG2a および IgG2b を測定した。IgG に関しては対照群に比べて試験群は高レベルにあった。IgG1 は IgE 同様、Th1 タイプの反応に関係しているが、IgG と同様の傾向が認められた。IgG2b は試験群と対照群とで変化は認めなかった。IgG2a は Th2 タイプの反応に関連しているが、ほとんど差は認めなかった。今回検討したサブクラスの中では総 IgG1 が最も感度が高く、免疫状態の変化を観察できた。IgG1 は IgE と同様にアレルゲンの投与によって変化するが、アレルゲンによっては IgE 抗体の方が変化するとの報告がある。

PLNA は自己免疫、アレルギーを誘発する多くの化学物質がマウスの足蹠皮下へ投与することによって、膝窩リンパ節細胞数の増加を起こすことから、薬物アレルギーの試験法として期待されている。IgE test では検出できない低分子化学物質について有効と思われる。ただ、リンパ節を破碎し洗浄する際に細胞同士が凝集したりして細胞をロスすることがあるため、細胞数の増加率がリンパ節重量の増加率と比例しないことがあり、この点については改良する必要がある。

ペニシラミンとペニシリンについて試験した。いずれもリンパ節重量については SI が 2 以上の値を示したが、反応は強くなかった。これらの化学物質については、同様の順序を得ている結果が報告されている。¹³⁾ 次に、PLNA がタンパクアレルゲンのような高分子物質にも適用できるかどうか検討したところ、ほとんどの物質で SI が 2 以上の値を示した。OVA と BSA では OVA の方が強い反応が表れた。ゼラチンとコラーゲンペプチドとの比較では、ゼラチンの方が強い反応を起こすものの、酵素類に比べると反応性は低かった。PLNA による SI 値の差は明確なアレルギー性強度を示すものではないが、IgE test と類似した結果が得られた。PLNA で反応を起こすには数 mg の試験物質が必要であることから、医療用具などの抽出物について試験するには大量の材料が必要となる。特に、人工高分子材料の場合、水ではほとんど溶出されないことから、有機溶剤を使用し濃縮して試験する等の工夫が必要である。PLNA のリンパ節細胞の増殖

反応がアレルギー反応を示すのかどうかは議論がある。PLNA のタンパク質に対する適用例はないことから、今後、タンパク質の投与によって増加した細胞の種類などを解析して、PLNA が高分子材料にも適用できるかどうか判定することが望まれる。

3) in vitro 発癌リスク評価手法

本研究で一番苦労したのは粒子の状態を維持しながら PLLA をシャーレ底面に固定するという技術的な事柄であった。フィルム状のものとの比較をすることが目的であるため、この点についていくつかの方法を試した。結果に述べたように、最終的にはメタノール懸濁による PLLA コートが培地交換時の PLLA のはがれが最も少ない方法であった。試みたコート法に、培地交換時に剥がれ、材料、培地とともに廃棄される細胞を回収して、培養を継続するという方法があった。結果として、回収した細胞を培養したシャーレで出現フォーカス数の増加が観察された。しかし、BALB 細胞は比較的種々の刺激に対して感受性が高い細胞であり、その取り扱いに注意を要するとされており、試験に使う時にも決して細胞同士が密着するまで増殖させてはならず、継代によって自然形質転換が起こる可能性もあることから、継代も最少限にとどめるよう推奨されている。剥がれた細胞を別のシャーレに移し、培養を続けるという上記の方法は、PLLA 処理により形質転換を起こしたのか、継代により生じた自然形質転換なのかを識別できず、この方法は最終的には用いなかった。

細胞毒性検定の結果で、メタノールのみでの処理シャーレで、62.0%というコロニー形成率に対し、PLLA 処理群では用量が高くなるにつれ、コロニー形成率が用量依存的に増加した。同様の結果は、他の 2 回の実験でも確認している。より高用量では PLLA の毒性が強く死んでしまった。

4) in vivo 発癌実験

2 年の観察期間が終了したが、病理組織学検査結果が出ていないので全てのデータが揃ってから考察したい。

5) セラミックス関節磨耗試験

アルミナ/アルミナ人工股関節は材料の耐久性と耐摩耗性から 50 年以上使用可能

な関節として高い期待のもとに臨床応用されたが、割れ、欠け、異常摩耗、ゆるみ、転位などの不具合が続出している。人工関節の摺動材料を評価するための従来の摩耗試験機および関節シミュレータは、ポリエチレンの摩耗を見積もるためには有効であるが、セラミック/セラミックの組み合わせには不適當である。安全で高耐久性の人工関節を実現するために、これまでに不具合により摘出された関節を分析してその原因を突き止め、その条件を再現する試験法を開発する必要があった。

セラミック/セラミック人工関節では応力集中を避けるために骨頭とソケットの半径差を小さくして形状適合性を高める必要があるが、このような関節では必然的にすきまが微小となり、少量の関節液が高いせん断率にさらされることになる。また、すきまがヒアルロン酸分子の寸法や高分子蛋白よりも小さい部分が存在するので、過酷な潤滑状態となる。平面間の摩擦試験によれば、アルミナのトライボ化学反応によって生じた水和物の潤滑効果により摩耗が抑制される。また、粒の脱落によって現れる摩耗面のくぼみに関節液がプールされて潤滑に貢献することがわかった。

不具合により摘出した人工股関節においては、ソケットのエッジ部分が激しく損傷し、同時に骨頭部にも激しいアブレシブ摩耗が生じる場合が多い。摘出された人工関節における損傷の激しさから判断すると、日常的にマイクロセパレーションを繰り返す患者がかなり存在するようである。本研究で提案した円筒面とエッジの間の摩耗試験は、骨頭球のマイクロセパレーションからのソケット内への復帰時のソケットのエッジ部における応力集中と摩耗の機構を再現することが可能である。この試験においてアルミナ製試料の摩耗面に人工股関節のソケット周辺のエッジ部に生じるものと類似したクラックを伴う摩耗痕が観察されており、本試験法の有効性が示されている。

牛血清水溶液の代わりに蒸留水を用いる場合にはく離が生じたことは重要である。これはまれな現象であったが、それを基点として破壊的な摩耗が生じる可能性があるため、人工関節の信頼性のために無視できないかもしれない。

衝撃摩耗試験の摩耗量は、一定荷重下の試験の場合とあまり変わらなかったことか

ら、必ずしも衝撃試験は必要ではないと思われる。

6) 非破壊・耐久性試験法開発

(1) X線観察では製品内の欠陥は観察されなかった。骨プレートの製造過程では、原材料を供給する鉄鋼メーカー厚板を購入し、切断、孔あけ、研磨、熱処理といった工程で製品が製造されることから、材料内部に顕著な材料欠陥が残っているとは考え難い。実験結果で、粗悪品、最高級品の区別なく内部欠陥がないことは、このような製造工程と整合的である。

(2) 表面の実体顕微鏡観察では、粗悪品では表面に顕著な凹凸が残っていたが、最高級品では表面は極めて滑沢であった。中級品では多少の傷が観察された。骨プレートの疲労破壊や腐食疲労では、表面の傷から破壊が進展すると考えられることから、表面の仕上げの程度が、製品の耐久性に影響を与えることが考えられる。したがって、表面の凹凸や傷の程度は製品を評価する上で重要な因子になるとも考えられる。

(3) 硬さ試験においては、プレートの部位による硬さの変化が顕著であった。特にプレートの折損の好発部位であるスクリ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った。硬さの変化は、素材から材料を切り出す際の機械加工、あるいはスクリー孔をドリルにより開ける際の残留ひずみに起因すると考えられる。このような残留ひずみの存在は材料の耐久性を低下させる不都合な内部応力の存在を示唆しており、製作時の機械加工、表面仕上げ、あるいは熱処理の過程における微妙な差異が、このような硬さのばらつきの差異として現れており、このばらつきの小さい製品の方が耐久性に優れている可能性があるとも考えられた。

(4) インプラントの破壊においては金属表面の傷から破壊が開始すると考えられ、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。工業用製品でも事情は同じであるが、機械の組み立てなどで小さな傷がつけられることが問題になっておらず、著しい相違である。このことは、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。そこで金属板に傷をつけ、その上でラット

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。マクロファージは生体防御機構の一部を担いラジカルなどを放出し細菌などを殺す能力を持っている。ラジカルは材料にも作用し、材料腐食を著しく加速する。したがって本実験結果によって、生体内で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材料の損傷を加速する可能性が示唆された。マクロファージが材料の傷を認識する機構は不明であるが、材料からの金属イオンによるケモタクシスや細胞接着などを介した機構が想定でできる。

7) 臨床使用状況を考慮した整形インプラントの力学的有効性・安全性評価

IMC ステム (Kyocera) における応力は、比較的均一な分布を呈した。ステム近位外側と遠位内側において過度の応力集中はなく、過重負荷後の応力分布の変化もわずかであった。この結果に至った要因として、横止めピンが近位における変位量を減少させたため、高い応力部位の移動が見られなかったと推測できる。すなわち、IMC ステムにおいては安定状態にあると考えた。IMC ステム横止めピン直下には大きい応力を生じる可能性がある。しかし、これまでの材料力学的実験から骨の破壊を招くような応力ではないことを確認しており、臨床上も問題は発生していない。

近位に鋭利な固定部位を設けた Versys (Zimmer) においても近位外側・遠位内側ともに均一な応力分布を呈した。この結果に至った要因として、放射状に4箇所設置されているフィンが大腸骨髄腔内の骨に噛み込むことで回旋安定性が増し、周囲条件の変化の際にも変位することなく安定した固定を保持できたと推測できる。

いわゆる Fit & Fill タイプあるいは press fit タイプと呼ばれる人工股関節は、骨とステムの接触面積を広げて応力分布を均一にすることが設計指針として挙げられている。しかし、本研究において示されたように、この指針をもつ PERFIX SV (Kyocera) においてその応力分布は均一にならず、わずかな周囲条件の影響を受けることが明らかになった。

SUPER SECUR-FIT においては遠位外側に

高い接触応力の部位が認められたことから遠位内側に固定力が伝達される危険性がある。これらの結果と考察から、生物学的な固定に到達する以前の初期段階においては、適切な位置に応力を集中させるという力学的な固定が望ましいことが明らかになった。そして、人工股関節ステムの固定部分の形状デザインを評価するためには、固定部分における接触応力分布の測定実験を行う必要がある。また、従来一般に信じられている均一で低応力という評価基準は、適切で流動的でない応力分布という基準に改めるべきである。

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の開発

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。

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%の誤差であった。

II. 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

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、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。また、非常に柔らかいものから硬い物まで作製することができる。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。

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。

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。ロストワックス法による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。

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性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。

フィブリンを用いて作成した再生軟骨の粘弾性試験を行った。その結果、正常な関節軟骨が有する粘弾性特性には劣るものの、培養日数に伴い正常軟骨に近づく傾向がみられた。培養日数に伴う貯蔵弾性率 E' の経時的变化は、1Hz, 10Hz いずれの周波数においても、2種類のフィブリンスポンジともに培養日数に伴って E' が増加していた。培養後14日目で一時的に硫酸化フィブ

ロインスポンジの E' の値が従来のフィブリンスポンジに比べて増加したが、28日目では両者間に明らかな差を認めなかった。また、2種類のフィブリンスポンジともに培養日数に伴って $\tan\delta$ のピーク値が減少し、かつ低周波域に推移する傾向が見られた。

フィブリンを用いて作成した再生軟骨のインデント試験を行った。その結果、軟骨組織の成熟に従って永久変形量は減少した。しかし、14日の培養後においても正常軟骨に匹敵する形状回復能は得られなかった。

10) 形状記憶合金の試験法の開発

ステントとはデリバリーカテーテルを用い血管の狭窄部や閉塞部に進入させ、そこでステントを拡張させることによって血管を押し広げて血流を回復させるものである。大動脈や末梢血管など、循環器系の様々な部位でステントを用いるが、これとは別に、食道や尿道、胆管などに腫瘍ができた場合にも同様ものを用いて管の機能の確保をはかることもある。

循環器で使う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の2種類がある。前者はステントを半径方向に押し縮め、カテーテルで病変部まで到達した後、ステント内側のバルーンを膨張ることによって必要な管径までステントを押し広げるタイプのもので、主としてステンレス鋼がその素材として使われている。一方後者は、Ti-Ni超弾性合金製で、カテーテル内に押し込めた状態で病変部まで到達し、そこでカテーテルから引き出すことによって元の形状に戻ることによって狭窄部の解消をはかるものである。いずれもチューブ状の素材からレーザー切断等の方法によって切り出して製造されるが、これらの他に、細線をメッシュ状に編んで製作するタイプのものもある。

循環器の中で長期間使用することを考えれば、生物学的安全性に加え、力学的安全性にも優れた者でなければならない。一般に力学的性質とは、引張試験、硬さ測定、衝撃試験、疲労試験などで材料(素材)の強さ、延性、硬さ、韌性、疲労強さなどを評価するものであるが、必要に応じて製品(部材)に加工したものの強さや延性や疲労寿命などを評価する場合もある。

ステントの承認に関して FDA (米国食品医薬品局) の基準は多岐にわたる。前臨床試験の前半部をなす *in vitro* 試験として要求されているものだけでも 1. Specification Conformance Testing, 2. Stent Integrity および 3. Stent/Catheter System Testing の三者に大別される。素材としての評価、ステント形状に加工してからの評価、ならびにデリバリー用のカテーテルやバルーンなども含めたシステム全体の評価におおむね対応する。それぞれの評価の中でさらにいくつかの試験項目が設定されているが、力学的試験にとくに関連する試験項目は、主として 1. Specification Conformance Testing と 2. Stent Integrity の中に含まれる。以下、両者で規定されている試験項目を列記する。

1. Specification Conformance Testing
 - (a) Material analysis
 - (b) Mechanical properties
 - (c) Corrosion
2. Stent Integrity
 - (a) Stent free-area percentage and dimensional change
 - (b) Stent uniformity testing
 - (c) Radial (hoop) strength
 - (d) Fatigue testing
 - (e) Stent recoil
 - (f) Magnetic resonance imaging
 - (g) Stent expansion
 - (h) Dimensional verification

素材の評価を期する 1. Specification Conformance Testing では、試験片を用いた評価を行うとしており、その内容も通常行われている一般的な評価法の範囲内にある。(b) Mechanical properties では試験片を用いて引張試験を行うこととしており、ASTM で規定した一般的な試験法が指示されている。

一方、2. Stent Integrity ではステントとして完成した製品を用いて評価を行うこととしている。ステント形状に関連する (a) Stent free-area percentage and dimensional change および (b) Stent uniformity testing に続く、(c) Radial (hoop) strength, (d) Fatigue testing および (e) Stent recoil の 3 項目が主として力学的試験に関連する項目である。

(c) Radial (hoop) strength はステントの周囲から圧力を加えたときの変形量を報告

することとなっている。(e) Stent recoil はステント拡張後の弾性反動 (スプリングバック) の評価を求めている。

ステントを長期にわたって使用する場合にもっとも重要な力学的安全性といえるのが (d) Fatigue testing に関連する力学的性質である。ここでは、何億回という応力サイクルを受けようともステントが暴露される動脈/静脈環境中で疲労や腐食がおこらないことを明確にするため、ステントの疲労特性の徹底的な検討が求められている。具体的には以下の 2 細目が要求されている。

(1) 有限要素法あるいはその他の応力解析により、生体環境中で想定されるもっとも過酷な荷重が加わった際のステント内の最大応力を検証すること。残留応力を計算し、安全率を見込んだ上で評価すること。この評価によって、ステントの全使用期間にわたって疲労破壊が生じないことを明らかにすること。

(2) 想定した最大径まで拡張したステント試料に対して血管内を模擬した条件下で、約 10 年間の使用に相当する *in vitro* 加速試験を行うこと。その試験プロトコルや試料準備を完全に明示すること。

これらの細目 (とくに加速試験の方) では、試験条件が具体的に示されていないので試験計画に試験者の裁量の幅があり、加速条件、試験環境などの設定に注意を払わなければならない。

10 年間の使用に相当する加速試験という条件により、およそ 4 億サイクルの試験を行うのが一般的となっているが、試験の周波数に関しては具体的な指示がない。実際の使用環境で起こる現象が単なる疲労ではなく腐食疲労であることを考慮に入れると、サイクル数のみを合わせた単純な加速試験では安全性が十分であるという証にはならない。

たとえば、実際に行われた疲労試験プロトコルの一例を見ると、①ステントをラテックスチューブ上に設置し、②リンゲル液を満たした密閉容器に入れる。③ラテックスチューブを圧力ラインにつなぎ、④空気圧によって最大 20 kPa (150 mmHg)、最小 6.7 kPa (50 mmHg) の拍動負荷をかける。⑤周波数は約 40 Hz、1 億サイクルごとにステントの様子を観察しながら、最大 4 億回まで繰り返すというものである。この方法によると、上述の腐食疲労の効果が見込まれな

いだけでなく、圧カラインやラテックスチューブの圧力応答性にも疑問が持たれ、所期の周波数、圧力の試験が実際に行われているか疑いがある。

さらに、この方法はバルーン拡張型ステントの疲労試験を想定したもので、Ti-Ni超弾性合金製の自己拡張型ステントの試験に適切な試験方法ではない。基本的に外循環系で構成され、ラテックスチューブの外側に供試体のステントを設置しているのがその理由で、外力を取り除くと元の直径まで広がる自己拡張型ステントではラテックスチューブから遊離してしまい、疲労応力を負荷することが不可能となる。

11) 人工関節の力学・組織評価方法開発

従来から医療材料として使用されているTi-6Al-4V (試料A) は、コントロールと比べて、正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化を抑制させた。一方、今回試験したその他の新規チタン合金は、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。この新規チタン合金による分化促進が、増殖の促進によってのみもたらされたのか、あるいは分化特異的な促進効果も働いたのかを明らかにするために、細胞の分化レベル、すなわち細胞数当たりのALP活性ならびにDNA量当たりのオステオカルシン含量を求めた。その結果、コントロールと比べて、Ti-6Al-4V を含めてすべてのチタン合金は骨芽細胞の分化レベルは促進させた。しかしながら、チタン合金間では差が認められなかった。この結果は、チタン合金の骨芽細胞に対する分化特異的な促進効果を支持するものであるが、チタン合金の組成は骨芽細胞の分化レベルには影響せず、骨芽細胞の増殖が骨組織適合性を決定することが示唆された。

Ti-6Al-4V は、今回試験したチタン合金で唯一バナジウムを含んでおり、バナジウムの細胞毒性によるものと考えられる骨芽細胞に対する増殖阻害を示した。一方、バナジウムを含んでいない他のチタン合金は、骨芽細胞の増殖を阻害せず、むしろ促進させた。これらの結果から、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を向上させる効果を期待できる。

Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd は、今回試験した試料の中では、最も骨組織適合性が優れ

ていた。しかしながら、その他の試料と比べて骨芽細胞の分化レベルには差がないことから、分化阻害のあるアルミニウムを含まないことは影響しないと考えられる。

試料DとEは、合金組成が同一で、表面粗さのみが異なる。骨芽細胞は滑面上と比べて粗面上でより増殖・分化するとされているが、今回の結果だけでは表面粗さの影響をはっきりとは確認できなかった。

本研究では、正常ヒト骨芽細胞を用いてチタン合金の骨組織適合性を評価したが、動物への埋入実験等による本評価法のさらなる検証が必要であろう。

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

国内文献検索
[感染]

人工関節の感染については、英国の人工股関節において、再置換の原因の30%を感染が占めていること、「膝関節置換術後深部感染に対し抗菌薬投与のみの保存的治療は無効である」、「ゆるみが認められる症例や慢性化した感染例では、炎症の鎮静化に人工関節や骨セメントの抜去が不可避である」などの意見も多く見られること、さらに、「感染による人工関節のルースニングにより、ピースの脱落及びアルミナセラミックスクリュウの破損が進み、人工関節の破壊、更には股関節の破壊へと進展した」など、感染によってゆるみ、さらには用具の破損に至る例もあること、など、人工関節手術において感染を防ぐことは、用具の不具合を避けるためにも大きな因子の一つといえる。

また、摩耗粉が感染に影響を与える可能性を示唆した報告もある。「人工関節摩耗粉(コバルトクロム合金、高密度ポリエチレン、メチルメタクリレートポリマー)による局所感染防御能の低下を確かめる実験によって、摩耗粉を食食後、細菌を添加した場合と摩耗粉を食食させずに、細菌を添加した場合、前者で低下が認められた」。

一方、感染性と非感染性の鑑別の試みも行われている「弛みを来たした人工関節例を感染例(A群)と非感染例(B群)に分けて関節液中のサイトカイン濃度を測定し、化膿性膝関節炎例(C群)、変形性膝関節症例(D群)と比較した。その結果、インターロイキ

ン(IL)-6濃度はA群及びC群がB群よりも50~60倍高く、IL-8も10~20倍高かった。D群はB群と同程度であった」17)。

なお、インプラント自身と感染の関連については、特定モデルのインプラントに起因することが明らかな例は殆どなく、初年度の報告で述べた、複雑な構造を有する用具のみ18)のようであった。

[手術手技]

手術手技に触れている報告も多く、「looseningの予防策として手術手技の習熟、RAのコントロールや日常生活上の指導が必要で、insertの摩耗の予防にも手術手技の習熟や適切なinsertの選択、生活上の指導が重要と考えられた。感染症では術中清潔操作、手術時間短縮を図ることが重要で感染症の早期発見が予後の上で非常に重要である」、「膝蓋骨脱臼の多くは、手術手技不良に由来すると考える。コンポーネントの弛み、磨耗や破損は、人工関節の機種、材質、患者の筋力や局所の状況にもよるが手術技術の善し悪しにも関連する」、などである。

[特定モデルでの不具合]

さらに、古い例ではあるが、特定モデルでの不具合も見つかっている「人工骨頭の特定の機種では、その特性によりHDPの異常摩耗が起り易いと考えられた21)」。

[用具の出荷数]

用具の実際の出荷数を知ることは不具合評価の上で非常に重要なことであり、今回調査できた部分を以下に示す。1995~2002年度での出荷数の総計は、人工股関節(THR、バイポーラ、単純人工骨頭の合計、462,345)、膝関節(231,529)、その他の関節(15,878[肩(6,569)、肘(3,482)、手足指関節(5,827)]、髓内釘(288,048)であった。接合材のデータについては髓内釘のみしか入手できなかったが、他の用具についても似かよった値と思われ、一症例で多数の接合材を使用することも少なくないため、人工関節以上の出荷数があると推定される。

なお、股関節の中でも、セメントタイプの股関節は、横ばいだが、セメントレスが徐々に増加していることが分かる。

[検索と集計]

検索において、「プレート」は、「マイクロプレート」に由来する検索ノイズが非常に多く、むしろ「骨板」の方が適切な結果を与えた。「ひび(3件)」「亀裂(5件)」では、該当数が少なかった。ゆるみにおいては、「弛み」「弛緩」でヒットしてくるものが360例もあり、これらは「ゆるみ」では、検索されないことに注意する必要がある。

集計解析については、文献に多くの事例が記されている場合もあるため、症例数とは一致しない。従って、あくまでも不具合の実数ではなく、傾向を掴むための数と捉える必要がある。

[集計結果の考察]

感染を含むグラフでは、非感染例も含まれているとはいえ、年々報告数が増加している。不具合と感染との複合事例でも、各年の報告数は多くはないが、やはり増加傾向にある。勿論、全体の使用数が増加していることも理由の一つと思われるが、感染への関心が高くなっていることもあり得る。理由に限らず、十分に留意する必要があることには異論はないであろう。

出荷数の関係もあろうが、他の関節より股・膝関節の方が多し。次の報告、「人工関節置換術は人工骨頭置換術よりも感染のリスクが大きい。これは前者の方がmassiveであることのほかに、骨セメント所要量も大きいし、摩耗粉を生じ易いためと思われる」のように、手術の規模の違いによるものもあり得る。このことは接合材の感染報告数の少なさからも伺われる。接合材では感染が起こることは人工関節に比べて少なく、さらに、感染が不具合に繋がることも少ないのであろう。また、出荷数に比べると股関節より膝関節の割合が多い用具の複雑さや手技の複雑さが関連している可能性も考えられる。

股・膝関節の比率は全体としては出荷数と相関しているように思われる。その他の関節の報告数が出荷比率に比べると多いが、この中には明示されてはいないものの、股・膝関節に関連するものも含まれている。逆に髓内釘では出荷数に比して少なめである。

近年では、出荷比率以上に膝より股関節の報告が多く、1999年からの増加が顕著である。出荷数が急増したわけではないため、理由は不明だが、各報告の内容と共に、今