

図3. 種々のタンパク質のIgE testによる結果

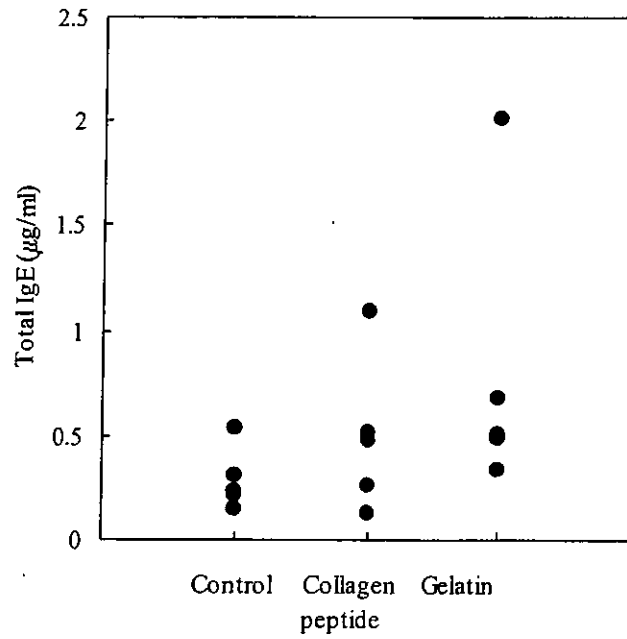


図4. 医用タンパク材料のIgE testの結果

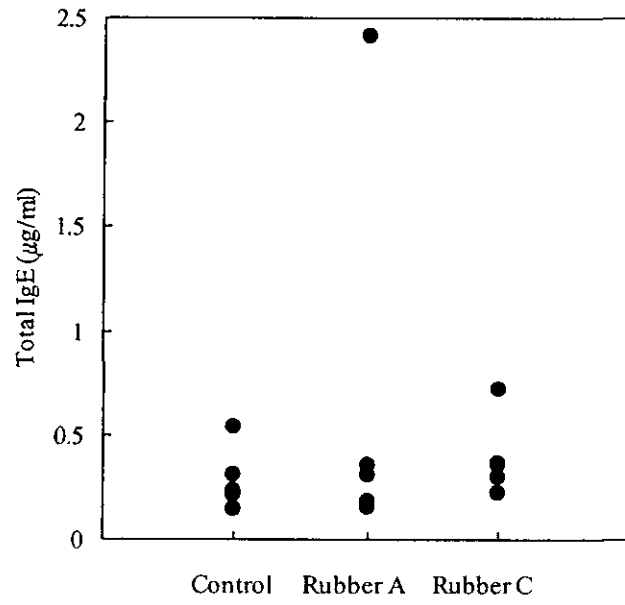


図5. 天然ゴム水抽出液のIgE testの結果

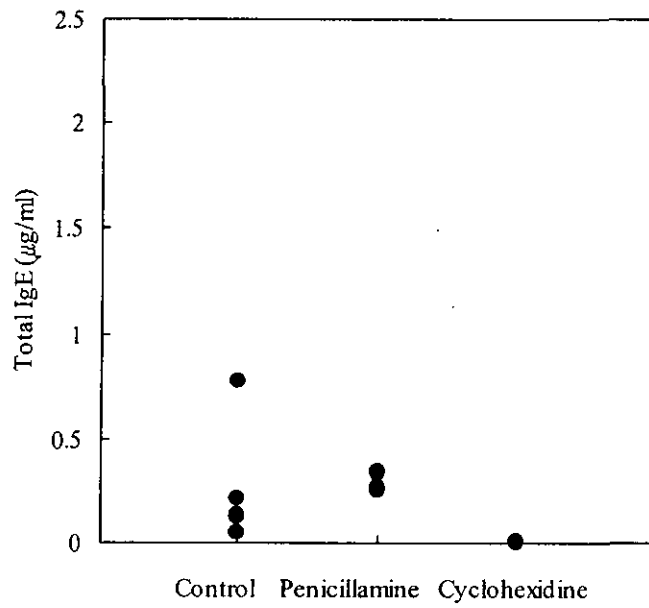


図6. 薬物のIgE testの結果

表1. Popliteal lymph node assay (PLNA)における薬剤の反応性

Compound	Dose (mg/mouse)	Popliteal lymph node(PLN)		PLN cellularity	
		weight (mg)	SI	(x106 cells)	SI
Vehicle control (saline)		1.6 ± 0.6		2.45 ± 0.76	
Penicillin G	5	4.2 ± 2.1	2.31 ± 1.10	3.97 ± 1.34	1.28 ± 0.26
Vehicle control (saline)		1.4 ± 0.5		1.21 ± 0.47	
D-Penicillamine	2	3.1 ± 0.3	2.49 ± 1.11	2.24 ± 0.7	1.93 ± 0.50

Results are expressed as mean SD (n=5).

表2. 陽性対照アレルゲン溶液(epidermal extracts)とBSAのPLNAでの結果

Compound	Popliteal lymph node(PLN)		PLN cellularity	
	weight (mg)	SI	(x106 cells)	SI
Vehicle control (saline)	2.7 ± 0.4		1.93 ± 0.30	
Epidermal extracts	6.0 ± 1.5	2.21 ± 0.56	7.12 ± 1.76	3.70 ± 0.82
Vehicle control (saline)	2.9 ± 1.0		2.34 ± 0.66	
BSA 5 mg	4.8 ± 0.4	1.81 ± 0.72	5.02 ± 1.12	2.23 ± 0.65

表3. 各種タンパク質及び材料抽出液のPLNAでの結果

Compound	Amount (mg/mouse)	Number of animals	SI (mean±SD)	
			PLN weight	PLN cellularity
OVA	2	3	3.19 ± 1.48	2.30 ± 0.64
Trypsin inhibitor	2	5	3.24 ± 1.51	3.77 ± 0.80
β-Lactoglobulin	2	5	3.42 ± 1.55	4.25 ± 1.51
Peroxidase	2	5	2.78 ± 0.49	4.76 ± 2.01
Gelatin	2.5	5	2.19 ± 0.79	2.50 ± 0.40
Collagenpeptide	2.5	5	1.36 ± 0.62	1.30 ± 0.27
Rubber A extract		3	1.49 ± 0.48	1.00 ± 0.41

### 3. In vitro 発癌リスク評価手法の開発に関する研究

松岡厚子

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

発癌リスク評価手法の開発

分担研究者: 松岡厚子 国立医薬品食品衛生研究所療品部第三室室長  
協力研究者: 中岡竜介 国立医薬品食品衛生研究所療品部主任研究官  
松田良枝 国立医薬品食品衛生研究所療品部

研究要旨

平成13年度に調製した、平均値 55  $\mu$ 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。

キーワード: ポリ乳酸、マウス BALB/3T3 細胞、形質転換フォーカス

A. 研究目的

ポリ乳酸は生分解性の良さから、組織工学、特に整形外科領域で骨スクリューや骨固定プレートとして使われているが、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<sup>1</sup>。また、これまでに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<sup>2</sup>。そこで、ポリ乳酸が化学発癌としての性質を示すのか、材料発癌としての性質を示すのかを明らかにするために、今回は粒子状の材料を調製し、*in vivo* 埋植試験とともに、*in vitro* トラン

スフォーメーション試験を実施した。

B. 研究方法

1. 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。

2. 高分子材料

メディカルグレードのポリ L-乳酸(PLLA)を

凍結粉碎器で粉末状とし、粒度分布平均値 55  $\mu\text{m}$  の粒子状 PLLA を調製した。

### 3. 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 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。

- 1) メタノールに懸濁させる方法
- 2) 水に懸濁させる方法
- 3) culture insert (Nunc) にコートする方法
- 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
- 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させる方法
- 6) コラーゲンコートシャーレを用いる方法

上記の検討を行なった結果(詳細は C. 結果の項に記載)、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。

### 4. 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  $\mu\text{l}$  の DMSO と 3-メチルコランスレン(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  $\mu\text{l}$  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。

## C. 結果

### 1. 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。(図 1. a, b)

#### 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。(図 1. c, d)

#### 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 80 mg 群についてこの方法を用いた結果、20、40 mg 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。80 mg 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、比較的良好な結果を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。

## 2. 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を表1に示す。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 の懸濁液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、10 mg 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、20 mg 以上ではコロニー形成率は再び低下した。

## 3. 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±SD および形質転換率を表2に示す。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ことから、結果は陽性と判定した。

## D. 考察

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液による 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が、せつかく6週間の試験終了時まで維持されていた PLLA も、メタノール固定時に剥がれてしまうなど、粒子状物質のトランスフォーメーション試験の技術的困難さを痛感した。

また、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するという、解釈しにくい現象が現れた。同様の結果は、他の2回の実験でも確認している。これは、細胞が PLLA を足場として利用し、基質面への接着をより強固にできたためではないかと考えている。より高用量では PLLA の毒性が強くなり死んでしまったと考えている。

#### E. 結論

これまでに実施された、フィルム状の PLLA による *in vitro* 発癌活性およびラット皮下埋植試験での *in vivo* 発癌活性が、化学発癌によるものか材料発癌によるものかを調べるために、本研究で粒子状の PLLA を用いてトランスフォーメーション試験を実施した。その結果、粒子状 PLLA の *in vitro* 発癌活性は陽性であった。この結果から PLLA の発癌活性は化学的なものであることが示唆された。

しかしながら、最終結論をだすためには、粒子状 PLLA の *in vivo* 試験の結果をも含めた総合的な判断が必要と考えられる。

#### F. 研究発表

1. Matsuoka A, Tsuchiya T. Gene expression profiling of BALB/3T3 transformants induced by poly(L-lactic acid) or polyurethane films *in vitro*: more potent osteosarcoma-like gene expression by the former than by the latter. *J Biomed Mater Res* 2004; in press.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

#### H. 文献

1. Matsuoka A, Tsuchiya T. Gene expression profiling of BALB/3T3 transformants induced by poly(L-lactic acid) or polyurethane films *in vitro*: more potent osteosarcoma-like gene expression by the former than by the latter. *J Biomed Mater Res* 2004; in press.

2. Nakamura T, Shimizu Y, Okumura N, Matsui T, Hyon S-H, Shimamoto T. Tumorigenicity of poly-L-lactide (PLLA) plates compared with medical-grade polyethylene. *J Biomed Mater Res* 1994;28:17-25.

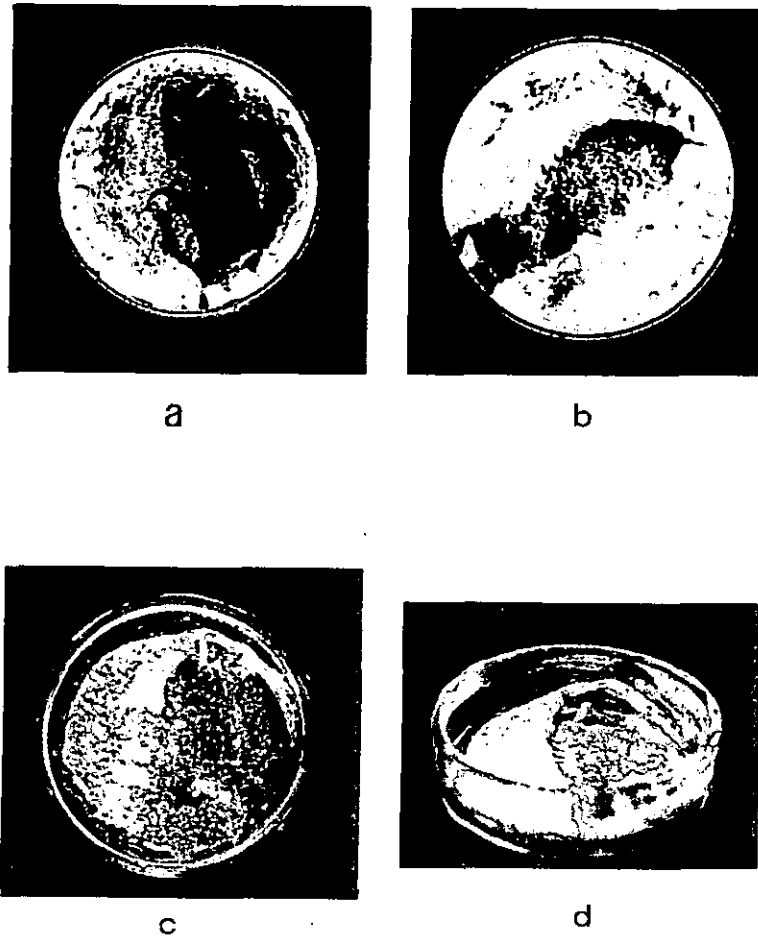


図1. PLLAのコート方法の検討

- a: メタノール懸濁 PLLA を 40 mg コートしたシャーレ
- b: メタノール懸濁 PLLA を 80 mg コートしたシャーレ
- c: ジクロロメタン溶解シートに粒子状 PLLA を散布したシャーレ (真上から)
- d: c をななめ上から見たところ。添加した培地はうねっているシートの下にたまっている。

表 1. 細胞毒性検定結果

処理条件	コロニー数			平均値	コロニー形 成率 (%)	相対コロニー 形成率 (%)
陰性対照 (DMSO)	63	72	67	67.3	31.2	100
メタノール	51	34	40	41.7	19.3	62.0
PLLA						
1 mg/シャーレ	57	74	69	66.7	30.9	99.1
5 mg/シャーレ	108	88	89	95.0	44.0	141.2
10 mg/シャーレ	114	84	103	100.3	46.4	149.0
20 mg/シャーレ	62	80	63	68.3	31.6	101.5
40 mg/シャーレ	41	32	24	32.3	15.0	48.0
陽性対照						
3-MC 0.5 µg/ml	2	0	2	1.3	0.6	1.9

表 2. 形質転換実験結果

処理条件	foci/シャーレ														平均値±SD	形質転換率 (×10 <sup>-4</sup> )	
陰性対照 (DMSO)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.067±0.26	0.21
メタノール	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLLA																	
1 mg/シャーレ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.067±0.26	0.22
5 mg/シャーレ	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.13±0.35	0.30
10 mg/シャーレ	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.27±0.46	0.58
20 mg/シャーレ	3	1	1	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0.80±0.94	2.53
40 mg/シャーレ	1	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.47±0.74	3.13
陽性対照																	
3-MC 0.5 µg/ml	8	14	20	13	8	9	11	14	13	12	17	11	18	11	15	12.9±3.5	2150

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

大庭耕輔

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

分担研究者 大庭 耕輔 （財）食品農医薬品安全性評価センター

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。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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0.4g、PLLA粉末2g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。

ラットに対し埋植処置を行い、長期に飼育を行ったため、動物実験倫理規定に配慮した。

C. 試験結果

本年度で埋植後2年間の観察期間が終了した。

PLLA群では、2g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0.4g群で埋植後6週、2g群で埋植後8週までに消失した。2g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（Fig. 2）、埋植後18週から触診により埋植部位の皮下に腫瘍が認められ、埋植後42週には10例まで増加した。

PLLA粉末2g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（Fig. 1）、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0.4g群およびPLLA粉末2g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。いずれの腫瘍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、精巢の萎縮、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。

#### D. 考察

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。

#### E. 結論

最終的な結論はまだ得られていない。

#### F. 研究発表

##### 1.論文発表

なし。

##### 2.学会発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1.特許取得

なし。

##### 2.実用新案登録

なし。

##### 3.その他

なし。

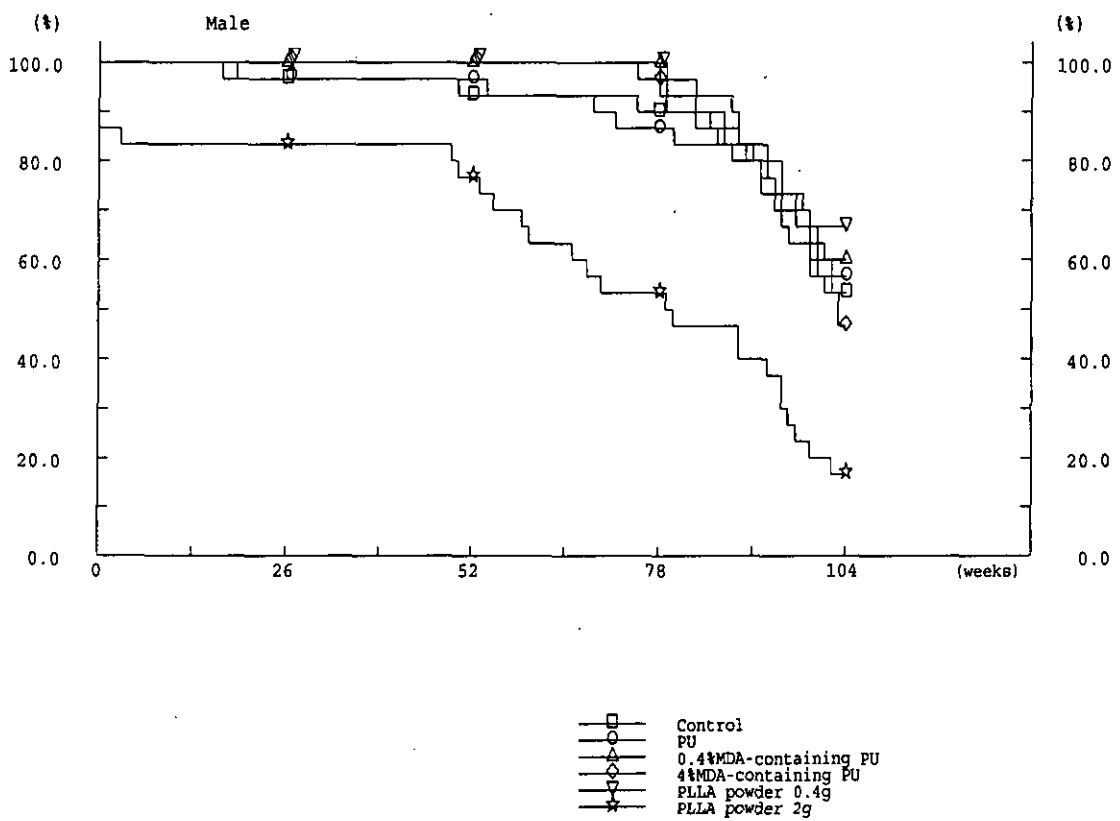


Figure 1. Survival ratio of rats with medical materials implanted into subcutaneous tissue in long-term study of foreign-body tumorigenesis

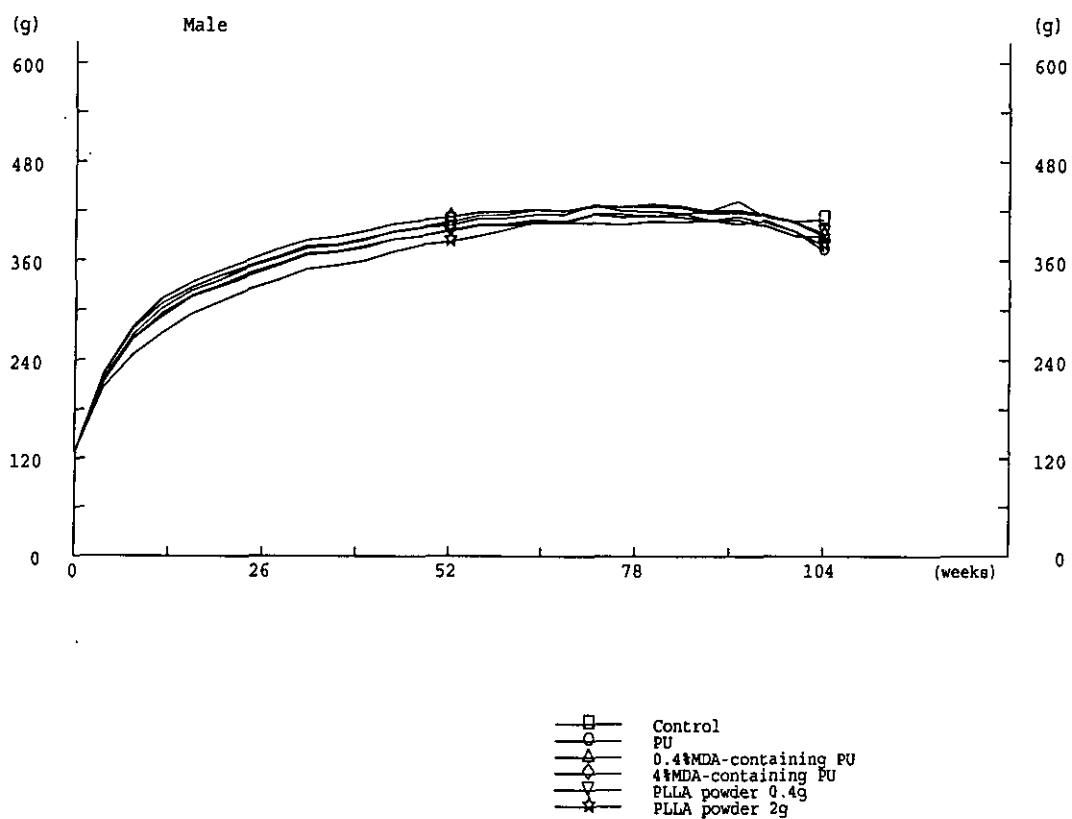


Figure 2. Body weight of rats with medical materials implanted into subcutaneous tissue in long-term study of foreign-body tumorigenesis



厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)  
分担研究報告書(平成15年度)

セラミックス関節摩耗試験法開発

分担研究者 池内 健 京都大学再生医科学研究所教授

研究要旨

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。

A. 研究目的

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摩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ので、安全性の高い材料を選定し、検査するのが困難である。従来から用いられている多くの人工関節はポリエチレンを使用しているので置換後20年程度で摩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。この対策としてポリエチレンの摩耗を防止することが最も重要である。関節内におけるポリエチレンの摩耗を正確に見積もる目的で各種の摩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。そこで、ポリエチレンを使用しないセラミック/セラミック人工股関節が開発され、臨床応用されている。セラミック/セラミック人工股関節は耐久性が高いために長期間使用可能であると期待されているが、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摩耗によるゆるみとは全く異なる原因、機構によるので、従来の試験法によって人工関節用セラミックの評価をすることは不可能であり、安全な人工関節を実現するためには新しい材料試験の方法を開発しなければならない。

本研究の目的はセラミック/セラミック人工股関

節の体内における破損と摩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、それをもとにしたJIS及びISO規格の原案を提示することであった。

B. 研究方法

1. 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く。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を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。

2. 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。

### C. 研究結果

#### 1. 応力集中下における摩耗試験

摩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、三体摩耗と思われる筋状の摩耗痕が見られる場合がある。また摩耗痕の周囲にはクラックが見られる。摩耗の進行につれて摩耗痕が徐々に消失した。6時間以上摩耗試験を続けると、新しく筋状摩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)に急速な摩耗が生じたが、時間の経過につれて摩耗率は減少した。摩耗による重量の減少から摩耗率を見積もる方法と摩耗面の幅から摩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摩耗量が少し多かった。また、まれに摩耗面の周辺部にはく離痕が現れた。

#### 2. 応力集中と衝撃荷重下での摩耗試験

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摩耗していた。それ以外の摩耗面における表面あらかさは衝撃荷重の無い場合とあまり変わらなかった。筋状の摩耗痕の出現する確率は一定荷重下の摩耗試験より少なかった。

### D. 考察

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る。

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。

### E. 結論

1. 人工関節用ポリエチレンを対象とする従来の摩耗試験法はセラミック/セラミック人工股関節の材料を評価するためには不適當である。
2. 繰り返し亜脱臼やインピンジメントによる破壊的な摩耗に対するセラミックスの信頼性を評価するためにエッジと円筒面を組み合わせた往復動試験摩耗試験を提案した。この場合には蒸留水を用いることができ、短時間の試験で十分である。
3. 以上2種類の極端に異なる試験を併用することによって長寿命で信頼性の高い人工関節用セラミックを開発することが可能である。

### F. 健康危険情報

セラミック/セラミック人工股関節における亜脱臼の繰り返しによる破壊的摩耗に対して材料の安全性を評価するためには本研究で提案するエッジと円筒面を組み合わせたの摩耗試験が有効である。

### G. 研究発表

該当なし

## 1. 論文発表

- 1) Ikeuchi, K., Morita, Y., Nakata, K., Kim, Y, H., Sekino, T., Niihara, K.: Wear of alumina/zirconia nano-composite for ceramic/ceramic joint prostheses. Tribological Research and Design for Engineering Systems. : 257-261 (2003)
- 2) Shibata, N., Tomita, N., Ikeuchi, K. : Gamma-irradiation aggravates stress concentration along subsurface grain boundary of ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) under sliding fatigue environment. Biomed Mater Eng. 13 : 35-45 (2003)
- 3) Shibata, N., Tomita, N., Ikeuchi, K., : Microscopic destruction of ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) under uniaxial tension. Biomed Mater Eng. 13 : 47-57 (2003)
- 4) Shibata, N., Tomita, N., Onmori, N., Kato, K., Ikeuchi, K. : Defect initiation at subsurface grain boundary as a precursor of delamination in ultrahigh molecular weight polyethylene. J Biomed Mater Res. 67A : 276-284 (2003)
- 5) 池内 健 : 人工関節用ポリエチレンの摩耗試験. 「医療材料・医療機器の安全性と生体適合性」(土屋利江 編、シーエムシー出版、東京) 59-63 (2003)
- 6) 池内 健 : セラミック/セラミック人工股関節用材料の摩耗試験. 「医療材料・医療機器の安全性と生体適合性」(土屋利江 編、シーエムシー出版、東京) 64-67 (2003)

## 2. 学会発表

- 1) Kumatani, I., Hyon, S., Hayami, T., Matsumura, K., Morita, Y., Ikeuchi, K., Sakaguchi, K., Tutumi, S. : Effects of watercontents of poly (vinyl alcohol) hydrogel as an artificial articular cartilage on damage degree of natural articular cartilage. Fukuoka International Forum: Biotribology 2003 (2003.8.30 福岡)
- 2) Mackova, H., Morita, Y., Kim, Y., Sekino, T., Niihara, K., Ikeuchi, K. : Wear test simulating concentrated contact during relocation after microseparation in all-ceramic hip joint. Fukuoka International Forum: Biotribology 2003 (2003.8.30 福岡)
- 3) 池内 健 : 生物とトライボロジー 「トライボロジー研究会 第14回講演会」(2003.1.24 横浜)
- 4) 池内 健, 富田直秀 : 関節軟骨の測定と潤滑機能評価、医療機器フォーラム設立記念シンポジウム「21世紀の医療機器 Tissue Engineering -開発と評価」(2003.10.25 東京)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

## 6. 非破壊・耐久性試験法の開発

高久田和夫