

解析した 23SNP のうちの 2SNP (凝固因子第 10 の c.502+2115~2116c.502+2531A>G) は、100 検体全てが Wild Type であった。一方、残りの 21SNP はそれぞれ mutant が検出され、その頻度は Wild Type が 54.5%~99.5% とそれぞれの SNP により異なった。

今年度得られたこのデータを対照として、来年度以降、人工心臓弁を使用中の患者さんの血液サンプルを用いて同様の SNP タイピングを行い、それぞれの結果を比較することによって人工心臓弁を体に埋植した際の血栓形成の原因となる遺伝子多型を探索していく予定である。

4. 人工骨用合金の骨形成能評価手法の開発

(1) コロニー法による細胞毒性試験

V79 細胞の直接接触法を用いて試験した、チタン系金属材料のコロニー形成率の結果を図 33 に示した。Ti-6Al-4V のコロニー形成率は 9% で、弱い細胞毒性が認められた。しかし、その他のチタン系金属材料のコロニー形成率は、いずれも 80%~90% 程度で、細胞毒性は認められなかった。

(2) 骨芽細胞の増殖に及ぼす影響

チタン系金属材料の上で 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量の結果を図 34 に示した。いずれも従来から使用されている Ti-6Al-4V に対する相対値で示した。これらの指標はいずれも同様な傾向を示し、細胞数で比較すると、Ti-6Al-4V<CP-Ti<Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8Mo<Ti-15Mo-5Zr-3Al<Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd = Ti-Zr < Ti-Zr-8Nb となった。

(3) 骨芽細胞の分化に及ぼす影響

チタン系金属材料の上で 2 週間培養し

た NH0st 細胞をアリザリンレッド S 染色したところ、いずれの材料においても石灰化物の形成が確認された。

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を図 35 に示した。いずれも Ti-6Al-4V に対する相対値で示した。これらの指標はいずれもほぼ同様な傾向を示し、ALP 活性で比較すると、Ti-6Al-4V<CP-Ti<Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8Mo<Ti-15Mo-5Zr-3Al=Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd < Ti-Zr < Ti-Zr-8Nb となった。

5. 人工骨用合金の生物学的・物理的・化学的安全性評価手法の開発

米国の不具合報告

整形外科インプラントの不具合報告を使用材料 (FDA の分類の説明の中に材料の記述があるもの) の観点から整理してみると、膝関節では、どの報告においても、材料が合金のみか、或いは合金 + UHMWPE (超高分子量ポリエチレン) が殆どである。総報告と比べると大きな違いは見られないが、破損、ゆるみ、摩耗の 3 者共に、UHMWPE 併用タイプの比率が総報告より高くなっていた。

膝関節の材料別の年度推移では、合金タイプの破損が 1997 年をピークとして近年は減少傾向にあった。

股関節では、総報告では合金のみと合金 + UHMWPE とでは、差がなかったが、破損において、合金のみの倍以上に合金 + UHMWPE に報告が多かった。逆に「合金 + UHMWPE、Coating」タイプでは破損比率が総報告より顕著に小さかった。

接合材は、合金のみの事例である。接合材の機器分類別の年度推移では、ねじ、プレートの破損報告が多いが、髄内ロッド、釘の報告も常に何件か存在している。

接合材の破損機器分類別にみると、総報告とほぼ類似しているが、釘の破損比率がやや多くなっている。破損機器分類別の円グラフを、さらに不具合別に集計

してみると傷害を生ずる破損では、プレートが一番多く、他はほぼ破損全報告に準じていた。逆に、機能不全では、ねじが他を圧倒していて、プレートは4位に下がっていた。

医療機器回収の概要

わが国の回収報告の中で、金属または合金の語を含むものの内、金属に関係すると思われるものの、一例として、人工股関節ステムでは、「大腿骨ステムの一部について、破損するという症例が報告されています。ステムネック部切り欠き部の仕上がり状態の違い、及び製造における熱処理工程による影響が破損製品に共通する要因として挙げられます。その他、患者さん特有の体重及び活動性、手術時の手術器具等とステムネック部の接触による損傷等も関連要因として推定されています。」と報告されている。なお、安全性情報では、金属材料に関係するものはなかった。

平成15年7月30日より施行された改正薬事法において、不具合等の報告及び回収の報告の状況については、薬事・食品衛生審議会に報告することとされている。

それらの報告(H15.7.30~H16.3.31)の内、整形外科インプラントに関するもので情報には、材料についての詳細は記されていないが、金属材料に関係すると思われる中には、破損や折損の報告が目立っている。なお、同一症例で不具合数が多い例は、不具合時期が上記期間に限らず、過去のもものがまとめて報告された可能性もある。

ニッケルアレルギー関連例

米国の不具合情報での整形外科インプラントでは、下記のような事例が報告されています。

○人工膝関節

患者のニッケル・アレルギーのために、

全膝関節再置換術が行われた。摘出された大腿インプラント上に黒い縞が観察された。機器を光学顕微鏡、及びSEMで観察した結果、過剰量の骨セメントがベースプレート上にあった。これがこの不具合を引き起こした一因の可能性はある。

○人工膝関節

痛みのため、膝関節再置換術を行う。医師はニッケルアレルギーを疑っている。

○脊椎固定機器

脊柱側弯症治療手術、数ヶ月後、背部に痛みと出血があった。金属アレルギーのテストを行った結果、ニッケルとエポキシ樹脂に陽性であったため、機器を除去した。

○脊椎固定機器

ステンレス製のインプラントを埋植され、蕁麻疹が起こった。患者はニッケルとホワイト・ゴールドアレルギーがあった。ステンレスによるアレルギーを疑ったが、特に治療は要しなかった。

○脊椎固定機器

アレルギー反応のため、インプラントを抜去。ステンレスによるニッケルアレルギーと判定。抜去されたインプラント自身には特に問題はなかった。

埋植する合金材料の作製

In vivo で動物の皮下に埋植し、生体適合性等を評価する目的で、形状記憶性能を有するNi/Ti合金材料を製造依頼した。出来上がったNi/Ti合金材料の組成は、Ni: 55.2%、O: 0.035%、H: 0.0006%、C: 0.05%であった。なお、比較のために、純ニッケル(Cu: 0.01%、Fe: 0.01%、Mn: 0.02%、Si: 0.01%)も製造した。

形状は、細胞試験等への利用、及び当部で既に研究を行っているTi/6Al/4V合金や新規合金材料との比較を行うこと、から14mmφの円形板(厚さ1mm)を選択した。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ものでなければならない。

6. Ti-Ni 合金の安全性評価手法の開発

昨年まで厚生労働科学研究費を受けて進めた研究では、自己拡張型ステントの生物学的安全性と力学的安全性の評価法の開発を目指した研究を行った。前者の評価法として、1.0% 乳酸溶液中での溶出試験を提案した。この方法での評価によると、Ti-Ni 合金の耐食性はステンレス鋼のそれに比べて劣っていることが明らかで、試験時間に比例して合金から金属イオンが溶出していることが見いだされた。とくにこの合金の主要成分のひとつである Ni にはアレルギー性が報告されており、この溶出イオンが生体為害性の原因となることも考えられ、生体適合性を損ねる可能性も考えられる。そこで、Ti-Ni 合金の生体為害性についてより詳細な調査を行う必要性が高いことを指摘した。

また一方で、同合金をステントとして使用する際の力学的安全性を評価法の開発を目的として、超弾性 Ti-Ni 合金製ステント用疲労試験機の試作を行った。これは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るもので、試験部は内径 4 mm 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ている。現段階では試作の域を出ないが、市販の定量送液ポンプ (RP-1000、東京理科器械) を用いることにより、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 が達成された。

以上のような研究成果と新たに浮かび上がった問題点を考慮に入れ、本研究計画ではステントやその他部位での生体内で長期にわたって使用する際の生体安全性を、主として生体適合性と生物学的安全性の観点から詳細に検討することとした。

まずは Ti-Ni 形状記憶合金の表面に表

面改質を行い生態適合性の改善をはかることとした。具体的には、擬似体液浸漬によるハイドロキシアパタイト (HA) の形成を検討した。

ついで、同合金の生物学的安全性を客観的に評価する手法の開発を目的として、種々の擬似生体溶液を環境とした評価を行うこととした。これは別に行う *in vivo* 試験の結果と対比させることを目的としており、結果として Ti-Ni 合金の生学的安全性を簡便に評価できる方法を開発する。これまでに行ってきた 1.0% 乳酸溶液中での溶出試験に加え、その他の擬似生体環境中での溶出試験、各種溶液中でのアノード分極試験、X 線光電子分光分析 (XPS) による表面分析などを行う。比較のため同合金以外の生体用合金も試験に供した。

Ti-Ni 合金表面へのアパタイト形成

試験片は Ti-Ni 合金 (Ti-50.85mol%Ni、古河電工製) および純 Ti 製円盤状試験片 ($\phi 8$ mm、厚さ 3 mm) とし、600 番のエメリー紙で研磨し、アルカリ処理として 60°C の 5M NaOH 水溶液中に 24 時間浸漬した。浸漬後の洗浄には、①3 秒間リンスと②1 時間攪拌の 2 条件を試み、40°C で 24 時間乾燥後、電気炉にて 600°C まで 5°C/min の速度で昇温させ、1 時間保持したものを炉内で自然冷却させた。この手順で準備した試験片を、擬似体液 (1.5SBF、pH 7.4) に浸漬し 36.5°C のインキュベーター内で最大 7 日間まで保持した。

1.5SBF に 7 日間浸漬後のアパタイト形成の SEM 観察で確認した。アルカリ処理後、1h 攪拌洗浄したほうが、アパタイトの形成が早かったが、7 日後には顕著な差は見られない。

表面に形成したアパタイト層の SEM/EDX 分析の結果、洗浄時間攪拌 1h の条件では 1 日目から微量ではあるが、Ca のピークが確認された。各試料とも浸漬期間が長くなるにつれて HA が形成され、3 日目までに試料表面に数 μm 程度の HA

層が形成されていることが分かる。

以上の結果から、Ti-Ni合金を用いて簡便な化学処理、加熱処理、擬似体液(1.5SBF)浸漬により、以下のことが明らかになった。

Ti-Ni合金にアルカリ処理および加熱処理を施すと、その表面に非晶質のチタン酸ナトリウム層が形成され、SEM観察およびXRDにより、いずれの試料表面上にも $1\sim 4\mu\text{m}$ の球状のHAが析出していることが確認された。

Ti-Ni合金において3日以内にその表面にHAを形成することが確認された。形成されたHAは浸漬期間を長くするにつれ徐々に成長し7日目には厚さが $3\sim 4\mu\text{m}$ になるのが確認された。

また、攪拌1hの洗浄条件で初期のHA形成能が高かったことから、前処理の違いがHAの析出能に影響していると考えられる。

7. 神経機能に及ぼす人工脳硬膜の安全性評価手法の開発

本研究では、培養フラスコで培養細胞を継代培養し、一定の細胞数となったところで、培養プレートで被験物質に曝露しているが、培養プレートに細胞を移す時点での生存率は、J774.1細胞、CRL-2534ともに90%を上回っていた。

DBT dichlorideの曝露によるJ774.1細胞の生存率(トリパンブルー色素排除法による)への影響を調べた。曝露後18時間培養では、全ての曝露群で対照群より有意に生存率が低下していた。生存率は、曝露濃度が高まるにつれて低下しており、 $2.0\mu\text{M}$ 曝露群では、他の全ての群に比べても有意な平均値の低下を示した。18時間培養後、LPS添加し6時間培養した実験でも、全ての曝露群で対照群に比べて、有意な生存率の低下を示し、 $2.0\mu\text{M}$ 曝露群では、他の全ての群に比べても有意な平均値の低下を示した。18時間培養後、LPS添加し24時間培養した実験では、全

ての曝露群で対照群に比べて、有意な生存率の低下を示したが、高濃度曝露群の生存率の低下は、より顕著となり、 1.0 、 1.5 、 $2.0\mu\text{M}$ 曝露群では、 $0.5\mu\text{M}$ 曝露群と比べても生存率の有意な低下を示した。 $2.0\mu\text{M}$ 曝露群では、同様に他の全ての群に比べても有意な平均値の低下を示している。

DBT dichloride添加によるアストロサイトの生存について調べた。トリパンブルー色素排除法による生存率の検討では、 $1.5\mu\text{M}$ 曝露群、 $2.0\mu\text{M}$ 曝露群で、対照群、 0.5 、 $1.0\mu\text{M}$ 曝露群に比べて有意な生存率の低下を示した。 $2.0\mu\text{M}$ 曝露群では $1.5\mu\text{M}$ 曝露群と比べても有意な生存率の低下を示した。上清中LDH濃度については、 $1.5\mu\text{M}$ 曝露群、 $2.0\mu\text{M}$ 曝露群で、対照群、 0.5 、 $1.0\mu\text{M}$ 曝露群に比べて有意な平均値の上昇を示した。

OTの曝露とアストロサイトの生存率について調べた。生存率、上清中LDH、共に群間で有意性を示さなかった。

PLLA 5000の曝露とアストロサイトの生存率について調べた。細胞生存率については、 $20\mu\text{g/ml}$ 、 $50\mu\text{g/ml}$ 曝露群で、対照群、 $10\mu\text{g/ml}$ 曝露群と比べて、有意な生存率の平均値の上昇を示した。上清中LDHについては群間で有意性を示さなかった。

100-3の曝露によっても、アストロサイトの生存率、上清中LDH共に群間で有意性を示さなかった。

S3の曝露とアストロサイトの生存に関して調べた。細胞生存率については、 $20\mu\text{g/ml}$ 、 $50\mu\text{g/ml}$ 曝露群で、対照群、 $10\mu\text{g/ml}$ 曝露群と比べて有意な生存率の低下を示した。上清中LDHについては、 $20\mu\text{g/ml}$ 曝露群で平均値の有意な低下を示したが、 $50\mu\text{g/ml}$ 曝露群では、他の全ての群に対して有意な平均値の上昇を示した。

8. 脊椎固定器具等の力学的安全性評価手法の開発

得られた結果は以下の通りである。

(1) それぞれの脊椎スクリューにおける最大引き抜き強さを比較した。最も高い最大引き抜き強さを示したのは、bicortical 技法におけるタイプ C スクリューであり、unicortical 技法で最も高い最大引き抜き強さを示したのは、タイプ A であり、タイプ B およびタイプ C ではそれぞれ 26% および 13% 低くなった。

(2) 最大引き抜き強さは、スクリューのねじ山形状よりも骨密度 (BMD) の変化に対し指数的に相関した。特に、タイプ C スクリューは低い骨密度 (BMD が $1.0\text{g}/\text{cm}^2$ 未満) の場合でもタイプ A やタイプ B スクリューよりもより高い引き抜き強さを示した。

(3) 有限要素法による応力解析の結果は *in vitro* テストの結果と一致する傾向を示した。

9. 軟骨修復のヒト臨床使用類似動物モデルにおける安全性・有効性評価手法の開発

まず、ミニブタの関節軟骨欠損の自然修復を確認した。

4 匹のミニブタの大腿骨顆間溝に直径 10mm の骨軟骨欠損を 5 つ作成し、2 ヶ月後に採取し観察した。直径 10mm の骨軟骨欠損を作成した大腿骨顆間部において軟骨欠損作成後 2 ヶ月では、欠損部は、周囲の正常軟骨と色調の異なる、組織で充填されていた。大きさはヒトの半分弱であるが、大腿骨の形状はヒトに類似している。すべて軟骨欠損作成後 2 ヶ月の修復組織のサフラニン O 染色をした結果、修復組織 1 では、中央部に一部でメタクロマジーを示す軟骨組織を認めるが、他は線維組織で修復されている。修復組織 2 では、欠損部の両端に部分的に軟骨を認めるが中央部は線維組織である。修復組織 3 では、欠損部の左端に軟骨組織を認めるが、他は線維組織である。修復組織 4 では、欠損部の右半分は軟骨組織を認めるが、関節面、および左半分は線維組織

である。修復組織 5 では、ほぼ全域が軟骨様組織で充填されているが、中央部はやや陥凹し、軟骨組織でなく、正常軟骨との境界にはギャップがある。

従って、5 例中、1 例にやや良好な修復 (修復組織 5) を認めたが、3 例は悪く、残りの 1 例はその中間であり (修復組織 4)、ミニブタの大腿骨顆間部の直径 10mm の関節軟骨欠損は、自然には修復されないと考えてよいと判断した。

一例だけやや良好な修復であったが、この修復の違いについては、現在、検討中であり、場合によっては追加実験を行う予定である。

移植実験を 3 匹のミニブタに施行。3 ヶ月の経過観察の予定であり、まだ屠殺しておらず、データが得られていない。歩行は正常である。

さらに 2 匹に手術を施行し、長期の経過を見る予定である。

D. 考察

1. 敗血症時に見られるエンドトキシンショックとは、腹膜炎や急性胆管炎などの経過中に悪寒、発熱、発汗などと共に、血管平滑筋の弛緩による急激な血圧低下や末梢循環不全が発生する状態を意味する。エンドトキシンショックからの回復は困難であるが、たとえショックから回復したとしても、肺、腎臓、肝臓、心臓や消化器粘膜の障害、更には中枢神経系の障害が同時又は続発する多臓器不全症を引き起こす症例が見られる。このように、多量のエンドトキシンが循環血液中に入ると、発熱の他、様々な組織や臓器に影響を与えることが明らかになっているが、血管投与以外の非経口的ルートによりエンドトキシンを投与した時の生体影響は詳細に検討されていない。

医療用具および医用材料の使用法は症例や利用目的により様々である。また、生分解性医用材料を生体内外に適用した際、同材料に混入する LPS が瞬時に放出

されることはない。すなわち、医療用具又は医用材料に混入する LPS の生体影響を正確に評価するためには、同用具又は材料の適用部位、生分解性、LPS 含量や種類など幾つかの要因を考慮する必要がある。そこで本研究では、医用材料に混入する LPS の生体に対する実際のリスク強度を正確に判定し、適用例毎に科学的根拠に基づいた LPS 規格値を設定することを目的として、種々の量の LPS および菌体を添加したコラーゲンを試料としてラット埋植試験を行い、組織や臓器への影響、創傷治癒および骨再生に対する影響について検討した。アルギン酸製品には、ヒト細胞に対して活性を示さない種類の LPS が存在することが知られているが、本研究では、ヒトを含めた各動物種に対して典型的なエンドトキシン活性を示す大腸菌由来 LPS および大腸菌死菌体を使用した。

ラット皮下埋植試験において、LPS 添加コラーゲン（シート#1-7）と低濃度の菌体を含むコラーゲン（シート#8-11）を埋植した実験群では、対照群と同様、炎症性変化が惹起されることはなかったが、高濃度の菌体を含むコラーゲン（シート#12、13）では、強い化膿性炎症の誘発を生じ、シート#13 を埋植した実験群では、埋植後 2 週に至っても好中球浸潤が観察された。これら 2 つの実験群に認められたマクロファージの浸潤は好中球の残差と変性したコラーゲン線維に対する異物反応と考えられる。

肝皮膜へのコラーゲンシートの添付による肝臓の組織学的変化は全く認められなかった。多量の菌体を含むコラーゲンシート#12 および#13 の埋植後 1 週目の所見において認められた肝被膜結合組織の増生は、2 週群では観察されなかったことから、菌体成分に由来する組織変化ではない。

実験的皮膚創傷被覆において観察されたコラーゲン線維の融解・消失は、好中球の壊死に伴う酵素反応に由来すると考

えられる。また、創傷部の炎症性変化が比較的少ないことから、被覆したコラーゲンシートは外界からの感染を効果的に防御したものと示唆された。対照群、LPS 添加群および菌体添加群共に組織学的相違は認められず、皮膚創傷治癒に対する菌体成分の影響はないものと判断された。創傷部位では、組織内から創傷面に向かって体液が浸潤するため、被覆剤に LPS や死菌体が混在していたとしても、菌体成分が体内に吸収される可能性は低いものと考えられる。

頭頂骨などの扁平骨は、結合組織内の間葉組織が緻密され、細胞間隙に不規則に配列する線維束が発達し、骨基質となる線維性骨となる、いわゆる膜内骨化によって形成される。ラット頭頂骨欠損部への埋植試験において、多くの実験群では窩洞中央部の骨形成が膜内骨化により生じると共に、窩洞辺縁に頭頂骨膜由来の骨芽細胞が発達した骨形成が観察された。しかし、比較的多量の菌体を添加した実験群（シート#24-26）では、菌体添加量依存的に膜内骨化の形成不良が認められた。特に、最も多量の菌体を添加した実験群（シート#26）では、術後 4 週目においても窩洞辺縁部に骨形成が認められるのみであった。

図 28 に示したように、骨芽細胞に LPS を作用させると、LPS レセプターである TLR4 を介して、最終的に OPG 活性が低下する共に、RANKL 活性が上昇し、結果として破骨細胞の分化が誘導される。また、破骨細胞の細胞膜上にも LPS、IL-1 や TNF に対するレセプターが存在し、それらの各成分により破骨細胞の活性化が起こる。菌体添加実験群（シート#24-26）において観察された新生骨形成の遅延には、このようなメカニズムに基づいて活性化された破骨細胞が関与している可能性もある。しかし、各病理所見において、破骨細胞の出現が認められておらず、最も多量の菌体を添加した実験群（シート#26）においても窩洞辺縁からの連続した骨形

成が観察されたことから、新生骨形成の遅延は、菌体成分が欠損部を被覆した結合組織の発達を抑制し、間葉系細胞の増殖・分化（膜内骨化）を阻害することによって由来するものと推察される。また、菌体を添加した幾つかの実験群においてHAに対する異物巨細胞反応が観察されたが、骨形成を示す Control C 群と LPS 添加群にも同様な所見が認められたことから、コラーゲン/HA コンポジットシートの埋植に伴う異物巨細胞反応は菌体および LPS の影響ではないものと推察される。

興味あることに、精製 LPS を添加したシートを埋植した各種試験における病理組織学的所見は、対照群と比較して大きな差異が認められなかった。この現象には、材料からの LPS 遊離速度や活性を保持している生体内寿命などが関与しているものと思われるが、少なくとも医用材料に混在し得る量の遊離 LPS 自体は、正常な皮下および腹腔の他、創傷治療および骨再生に対して大きな影響を及ぼさないことが明らかになった。しかし、医療用具や医用材料に LPS 汚染がある場合、そこには死菌・生菌を問わず必ずグラム陰性細菌が存在するケースが多い。それ故、医用材料から検出されるエンドトキシン活性はグラム陰性細菌汚染の程度を反映しているものと判断されるべきである。

各種埋植試験の結果から判断すると、LPS および死菌体成分は皮膚創傷の治療に大きな影響を与えないことから、皮膚に適用する被覆剤の場合、LPS 規格値を設定する必要はないものと思われる。また、欠損を伴わない正常な状態であれば、実測値として 10,000 EU/mg を超えるエンドトキシン活性を示す医用材料を腹腔内に適用しても、各種臓器に対する影響はないことが明らかとなった。しかし、肝切除などの臓器欠損を伴う場合や肝臓機能障害を誘発する疾病又は投薬を受けている症例などについては、別途、モデル実験系を組んで検討する必要がある。一

方、整形外科領域などにおいて、医用材料を皮下に適用する場合は、実測値として約 750 EU/mg（コラーゲンシート#12）に相当する菌体成分が存在すると顕著な炎症反応が惹起されることから、LPS 規格値を設定する必要があることが判明した。また、実測値として約 40 EU/mg のエンドトキシン活性が検出される材料（コラーゲン/HA コンポジットシート#24）は新生骨形成を抑制することが判明したことから、骨再生医療に使用する各種スキャホールドにも一定の LPS 規格値を設定する必要がある。

本研究で得られた実験値をヒトに対する安全基準値として外挿する場合は幾つかの不確実係数を乗じる必要がある。不確実係数としては、動物種（感受性および耐性）の相違（UF1）、材料の分解速度（換言すれば菌体成分遊離速度）と材料内部への細胞浸潤性の相違（UF2）および混入している微生物種の相違（UF3）などが考えられる。本研究で使用したコラーゲンシートの生体内における分解吸収性はラットとヒトにおいて大差がないと考えられるため、UF2 の値は 1 となる。また、本研究では、ヒトに対して最も高い活性を示す代表的なエンドトキシンである大腸菌 LPS および大腸菌死菌体を使用していることから、UF3 も 1 となる。従って、本研究において得られた実験値をヒトの安全性評価に外挿するために考慮すべき不確実係数は UF1 のみとなる。仮に、UF1 を 10 とした場合、皮下および骨再生に適用するコラーゲン材料自体の LPS 規格値は、シート#12 および#24 のエンドトキシン活性実測値を基準として、それぞれ 75 EU/mg および 4 EU/mg に設定することができるものと思われる。また、皮下埋植試験において、50 EU/g（シート#12 実測値 750 EU/mg、シート重量 10 mg、ラット体重 150 g）以上で炎症反応が認められたことから、UF1 を 10 として、ヒトへの使用量の限度値を算出すると 5,000 EU/kg となる。同様に骨再生に利用するコラーゲ

ン材料のヒトへの使用量の限度値を計算すると、160 EU/kg (シート#24 実測値 40 EU/mg、埋植重量 6 mg、ラット体重 150 g、UF1 = 10) となる。

LPS の活性強度は、生物活性の発現本体であるリポド A 部分の化学構造、換言すれば微生物種によって異なる。医用材料に混入している微生物種を同定することは難しいが、大腸菌 LPS を標準品として、試験品のヒト細胞に対する炎症性サイトカイン産生誘導能などの活性を測定することにより、UF3 の値を求めることは可能である。また、医用材料の生分解性は埋植試験により確認することが可能である。エステル系合成高分子であるポリ乳酸やポリグリコール酸はコラーゲンと比較して遙かに生分解性が遅いため、UF2 の値は 1 よりも小さくなる。

マウスやラットのような齧歯類は、ヒトと比較して、活性発現に関する LPS の構造要求性が低く、様々な LPS に対して感受性を示すが、LPS 致死毒性に対する高い抵抗性を持つ。ヒトの場合、血中 LPS 濃度が 0.001-0.08 $\mu\text{g/ml}$ に達すると致死的なエンドトキシンショックを誘発することが知られている。これを体重当りに換算すると、0.067-5.3 $\mu\text{g/kg}$ (血液総量 4L、体重 60 kg) になる。一方、正常ラットに対する LPS 致死量は 1 $\mu\text{g/g}$ 程度であることから、LPS に対する耐性はラットの方が遙かに高いことが分かる。このように、UF1 の値には LPS に対する感受性と耐性の強度が複雑に関与しているため、同値を正確に求めるのは困難となる。今後、よりヒトに近い免疫系を持つ動物種を用いて菌体成分の生体影響や炎症性サイトカインの血中動態などを評価し、より正確な LPS 規格値の設定法を確立する必要があるものと思われる。

2. LLNA はモルモット感作性試験法の持つ主観的要素の入る判定評価、試験操作の煩雑性等の問題点を改良しているが、RI を動物に注射するため実施できる試験

機関が限られていた。非 RI エンドポイントでの評価を目指したいくつかの試みがなされているが、感度や再現性ができるだけ高いものが望まれる。ここでは、LLNA 原法に従って操作して得たリンパ節の活性をこれらの非 RI 法で測定、*in vitro* RI 法と比較した。試験物質として、非常に強い感作性が知られる DNCB と、OECD で陽性対照として推奨されている中程度レベルの HCA を用いた。

非 RI 法ではそれぞれ原理は異なるものの生細胞数に比例してエンドポイントの発色・発光量に変化し、血球計算盤を使用して細胞数を測定したときとほぼ同様の SI 値が得られた。0.5% DNCB で SI 値は 5 程度、25% HCA では 3~4 の値であり、リンパ節重量で見た SI 値よりは大きな値となった。ATP はリンパ節細胞の摘出後の時間に影響されやすいことから、1 匹ずつの測定になるが、標識物質の注射や細胞培養の必要がなく簡単に測定できた。alarBlue の取り込み量は細胞自体の活性化の程度にも影響されるのか、細胞数測定よりも大きな SI 値が得られた。BrdU 法は原理的には最も LLNA 原法に近いものである。LLNA 原法では $^3\text{HTdR}$ を尾静脈から注射するのに対し BrdU は腹腔内注射で簡便にできる利点がある。BrdU は $^3\text{HTdR}$ と同様に、DNA 合成が行われている細胞ほど取り込みが多くなる。よって、こうした反応は刺激を受けた細胞群だけに起こり A00 対照群では少ないため、バックグラウンドは低く、結果的に差が大きくなるのではないかと思われた。しかし、BrdU-ELISA では吸光度のダイナミックレンジが影響するのか、低い SI 値しか得られなかった。また、ELISA 操作ではプレートの洗浄やインキュベーション時間等、細胞活性以外のところでの測定誤差の要因も多いと思われた。

HCA は DNCB よりも高濃度で投与しているにもかかわらず低い値しか得られないことから、感作性強度は DNCB に比べて弱いことがわかる。DNCB と HCA の SI 値の大

きさに関しては非 RI のいずれの指標とも同様の順序となっており、相対的な強度比較はどの指標を用いても評価できた。LLNA では SI 値 3 以上を示す試験物質を陽性とし、感作性物質として判定する。

今回の非 RI 法の各指標は、 $^3\text{HTdR}$ 取り込みの指標に比べるとまだ若干感度が低い、中程度の感作性強度を持つ物質の判定には十分ではないかと思われた。また、プレートリーダーでの発光あるいは発色測定は、血球計算盤での細胞数の肉眼計測よりは簡単であり、短時間にかつ同時に実施できる利点もある。Woolhiser らは LLNA におけるマウス系統差について検討し、BALB/c 系よりも CBA 系マウスがより高い SI 値を示すと報告している。

したがって、BALB/c 系マウスから CBA 系マウスに変更することにより感度も改良されると思われる。山下らは試験物質の投与回数を増やすことによって試験法の感度を上げており、これらの組み合わせも含めて、今後検討を進める予定である。

リンパ節及び溶血処理した後の脾臓からの細胞浮遊液はリンパ球がほとんどであるが、若干ではあるが他細胞の混入もあると思われる。フローサイトメトリーでの細胞の大きさと内部構造によるドットプロットでもばらつきのある部分が見られる。こうした中でリンパ球集団を選択（ゲーティング）し、これらに対して表面抗原を解析することとなる。リンパ球は T または B リンパ球のどちらかに分類されること、ダブルポジティブのリンパ球は存在しないことから、検討の結果、R1 に設定した部分が目的とするリンパ球集団であり、この部分の表面抗原解析することとした（図 3）。ブロッキング処理は非特異的に染色された細胞によるプロットによるバックグラウンドの上昇を抑える。ブロッキングしない場合は陽性と陰性領域を分けるマーカー設定値を高くする必要があり、境界付近の細胞も見られた。染色に用いる抗体濃度について検討

した結果、市販 FITC 標識抗体原液 0.5 mg/ml、PE 標識抗体原液 0.2 mg/ml を 5~10 倍希釈して、 10^6 cells/100 μl の細胞に対してそれぞれ 5 μl 添加した場合に最もよいプロットが得られた。したがって、 10^6 個の細胞あたり FITC 標識抗体は 0.25~0.5 μg 、PE 標識抗体は 0.1~0.2 μg を加えて染色することとした。

未処置マウスの耳介リンパ節及び脾臓リンパ球について T/B 細胞及び T 細胞サブポピュレーション比率を測定した結果、CD3 陽性の T 細胞数はリンパ節中では約 73% であるのに対し、脾臓リンパ球中では 33% の比率となった。B 細胞のマーカーである CD19 陽性と B220 陽性の細胞比率はほぼ同じような値を示し、その陽性細胞数は脾臓の方がリンパ節よりも多かった。今回は週齢の多い retire BALB/c 系マウスを用いてのデータを示したが、CBA/J マウスでの報告と比べると若干 B 細胞の比率が高い。これが、系統や週齢の違いによるのか、あるいは抗体濃度の違いによる染色技術による差からくるのか、今後検討する。Gerberick らは B220 陽性細胞が感作性物質の投与によりリンパ節中に多く出現すると報告し、これが LLNA での刺激性物質と感作性物質を区別するための有用な指標ではないかとしている。また、CD4、CD8 陽性細胞の比率も変化すると報告もある。フローサイトメーター測定の定量性も含め、これらが非 RI-LLNA の指標として有用であるか検討していく必要がある。

3. 心臓弁膜症の治療として人工弁置換手術が行われている。人工心臓弁の機能不全、不具合は直ちに患者の生命を危機にさらす重大な問題である。機能不全の主な原因としては血栓形成とパンヌス形成が挙げられる。機械弁を用いた場合、血栓形成を抑えるために、置換手術後は抗血液凝固薬及び抗血小板薬を服用し続けなければならないが、服用していても機能不全につながる血栓が形成される

こともある。それは個人の遺伝的背景の違いによって、薬に対する感受性の違いが見られるのかもしれない。そこで本研究は、人工心臓弁の機能不全を未然に防ぐために、血栓形成の原因となり得る遺伝子多型を探索することを目的とした。まず、抗血液凝固薬として人工弁置換術後服用するワーファリンの関連遺伝子として7遺伝子（SERPINE1、CYP2C9、プロトロンビン、凝固因子第7、凝固因子第9、凝固因子第10、 γ -グルタミルカルボキシラーゼ）を選択し、それぞれ日本人で報告されているSNPを中心に計23SNPについてタイピングを行った。今年度は、広く日本人の対照データを得るために、健康人100名（男性50名、女性50名）由来のDNAを用いて検討し、それぞれのwild/mutantの頻度をまとめた。今回、日本人での報告がなされているSNPを中心に検討したためか、23SNP中21SNPでmutantが確認された。しかし一方で、今回調べたSNPはアミノ酸変異を伴うようなコーディング領域でのSNP数は少ないため、今後、同じターゲットの遺伝子（7遺伝子）について、さらにアミノ酸変異を伴うようなSNP（他人種等ですでに報告されているSNP）をいくつか選択してタイピングを行い、日本人における多型を確かめていく必要があるであろう。来年度以降、実際に人工心臓弁使用者の血液サンプルを用いて今年度と同じ23SNPについてタイピングを行い、比較検討を行う予定である。wild/mutantの頻度に差が出てくるSNPがあれば、血栓形成による人工心臓弁機能不全の原因となり得る遺伝的背景を探る手がかりとなるであろう。今年度の23SNPに加え、さらにワーファリンと併用投与されている抗血小板薬集薬の関連遺伝子のSNPタイピングも進める予定である。血液検査等で機能不全に陥る可能性を予測することができるようになれば、それを防ぐための処置を予め行うことができ、再手術といった患者さんの負担の軽減が期待できるであろう。

4. 金属材料は、骨スクリュー、骨プレート、CHS、 γ ネイル、髄内釘、人工関節ステム、人工歯骨など、高い力学的強度が必要な埋植医療機器に使用されている。しかしながら、不具合の報告数は増加傾向にあり、その内、人工関節では約20%、骨接合用品では約70%が破損による不具合である。こうした臨床状況から、現在でも力学的特性に優れた金属材料の開発研究が盛んに行われている。特にチタン合金は、 α 相である純Tiに、 α 相安定化元素（Al、Oなど）と β 相安定化元素（Mo、Nb、Taなど）を適量添加することによって相安定性を変化させ、 α - β 二相組織もしくは β 単相組織を得ることができる。 α - β 構造は引張強度が高く、疲労特性にも優れ、 β 構造は弾性率が低く、加工性に優れるといった特長があるので、チタン合金は広範囲の医療機器への応用が期待できる。そのため、金属材料の中でもチタン合金の開発研究は旺盛である。しかしながら、物理的および化学的評価法に比べ、臨床実態を反映する安全性および有効性評価法は十分に整備されていない。臨床実態を反映する評価法を確立するためには、in vivo試験の結果とin vitro試験の結果との相関性を明らかにすることが必要である。そこで、初年度はチタン系金属材料のin vitro試験について検討を行い、次年度以降に実施予定であるin vivo埋植試験に資した。

コロニー法による細胞毒性試験には、試料から抽出した抽出液の細胞毒性を確認する抽出法と、試料の上に直接細胞を播種して細胞毒性を確認する直接接触法がある。今回の試料であるチタン系金属材料は細胞毒性がないか、又は細胞毒性が弱いことが予測された。そこで、細胞毒性の検出感度が一般的に高いとされている直接接触法によるコロニー法を採用した。

従来から医療材料として使用されているTi-6Al-4Vは弱い細胞毒性が認められたが、その他のチタン系金属材料はいず

れも細胞毒性が認められなかった。今回用いたチタン系金属材料を構成する元素のうち、バナジウムは最も細胞毒性が強く、その他の構成元素の細胞毒性はいずれもバナジウムより 2-3 桁以上弱いことが確認されている。今回用いたチタン系金属材料の内、構成元素としてバナジウムを含むものは Ti-6Al-4V のみであり、唯一細胞毒性を示した。やはり従来から指摘されているとおり、Ti-6Al-4V は構成元素のバナジウムに起因すると考えられる細胞毒性が認められた。

次に、正常ヒト骨芽細胞 NH0st の増殖および分化に及ぼすチタン系金属材料の影響について検討を行った。NH0st 細胞の増殖と分化は、ほぼ同様な傾向を示し、Ti-6Al-4V が最も低く、Ti-Zr-8Nb が最も高くなった。CP-Ti より骨芽細胞の増殖が劣るチタン合金は Ti-6Al-4V のみであり、Ti-6Al-4V だけが細胞毒性を示したというコロニー法による細胞毒性試験の結果とよく一致した。また、Ti-6Al-4V を除くチタン合金は、CP-Ti に比べて、いずれも骨芽細胞の増殖および分化を増加させた。これら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 活性を求めた (図 36)。その結果、Ti-6Al-4V を含めてすべてのチタン系金属材料間で差は認められなかった。この結果から、チタン系金属材料の組成は骨芽細胞の分化レベルには影響せず、骨芽細胞の増殖がチタン系金属材料の骨組織適合性を決定することが示唆された。

CP-Ti に比べて骨芽細胞の増殖を増加させたチタン合金には、Mo、Zr、Nb、Ta のいずれかが添加されている。これらの元素はチタン合金の不動態皮膜中で安定な酸化物となり、不動態皮膜をより強固にするため、金属イオンの溶出を抑える働きがある。実際、Ti-15Zr-4Ta-4Nb からのチタンイオン溶出量は、Ti-6Al-4V や

CP-Ti の 1/3 程度に抑えられている。チタン合金の骨組織適合性を向上させるためには、バナジウムのような細胞毒性を示す元素を排除した上で、金属イオンの溶出を抑えるために不動態皮膜安定化元素を添加することが有効であろう。

今回試験したチタン系金属材料の内、Ti-6Al-4V 以外のチタン合金は、いずれも細胞毒性がなく、骨組織適合性に優れていた。また、これらのチタン合金は、Ti-6Al-4V と比べて、力学的性質も同等以上であり、Ti-6Al-4V の代替材料として有望である。

本研究では、チタン系金属材料の細胞毒性および骨組織適合性を、*in vitro* 試験を用いて評価した。今後これらの結果を基にさらに検討を加え、動物を用いた *in vivo* 埋植実験を計画している。そして、*in vitro* 評価結果と *in vivo* 評価結果との相関性を明らかにし、金属材料の臨床実態を反映する安全性および有効性評価法を確立したい。

5. 米国の整形外科インプラントの不具合報告では、膝関節の材料別の年度推移において、合金タイプの破損が 1997 年をピークとして近年は減少傾向にあったが、合金のみの関節の最近の使用数が減っている可能性もある。また、股関節では、合金のみの倍以上に合金+UHMWPE に破損報告が多かったが、合金より UHMWPE 部分での破損が起こりやすいことを反映しているものと思われる。なお、材料が「合金」タイプのものは、股関節の大腿側のみ、若しくは白蓋のみの機器である。全股関節型のもの、合金以外に UHMWPE、或いはセラミックを使用しているか、両者が併用されている。接合材の破損に関しては、プレートに最も注意を払うべきと思われる。また、釘の全報告数に対する破損比率は接合材の中で最も多いことから、接合材では、プレート、ねじ、釘に留意すべきと考えられる。

薬事・食品衛生審議会への不具合報告の金属材料に関係すると思われる中には、破損や折損の報告が目立っていた。不具合は、実際の使用数に比べれば少数であり、力学的負荷も大きく、手術適用や術後ケアの影響も大きいため一概には言えないものの、銘記しておくべきであろう。

金属関連の規格としては、今回は、JIS、ISO、ASTM における金属関連の規格、及び試験法を列挙するに留めたが、今後、規格等を作成する上で、これらとの整合性も図ってゆく必要がある。

ニッケルアレルギーは成書にあるように、医療機器だけではなく、家庭用品での接触皮膚炎としてもよく知られている。東京医科歯科大学歯学部附属病院の歯科アレルギー外来に来院した患者さんのパッチテスト陽性元素(2000年)のグラフでは、ニッケルでの陽性反応が一番多く、かつ強陽性例も多い。米国の医療機器の不具合情報でも、ステンレス中のニッケルによるアレルギーの報告が散見されるところである。Ti/Ni合金によるアレルギーの報告はまだ見られないが、インプラントにおいては、ニッケルによるアレルギーと判明すれば、現状では抜去するしか有効な手立てはないため、安全性を確認しておくことは重要なことである。

今後、埋植する合金材料として、Ti/Ni合金と、純Ni(陽性対照)に加えて、Ti/6Al/4V合金(ニッケルを含まない陰性対照)、及び、安全性において将来有望と考えられる開発中合金、も同時に埋植することによって、これらの合金の相対比較が可能と思われる。次年度以降に、動物に種々の合金を埋植し、過去の研究とも比較しながら、動物での組織反応と摘出した合金材料の物理的・化学的試験を行う予定である。

6. 昨年度まで行ってきた Ti-Ni合金およびステンレス鋼の溶出試験(1.0%乳酸)での成果をベースとして、Ti-Ni合金、Ti

合金、Ti-Zr合金、ステンレス鋼などの種々の生体用合金を用いて、以下のような各種の試験を行う。

溶出試験に用いる擬似生体環境としては、1.0%乳酸のほか、0.9%NaCl溶液、Hnak's液などを予定している。また同じ溶液を使用して、アノード分極を行う。溶出試験後、あるいはアノード分極後の表面分析をX線光電子分光分析(XPS)で行う。

現在は Ti-Ni合金の試験に先立って、Ti合金、および Ti-Zr合金の評価を行っている。各種生体用合金の0.9%NaCl溶液、1.0%乳酸溶液中でのアノード分極曲線では、最大5Vまで不働態を維持している。今後は、Ti-Ni合金を用いて同じ試験を行うとともに、Hank's液での試験も追加する。

7. 毒性の評価に培養細胞を使う手法は、その簡便性で有用とされているが、神経毒性に関しては、確立されたものは少ない。頻用されているものとして、本来は神経系の細胞でない褐色細胞腫由来のPC-12細胞があり、その発生段階の由来の同一性と、カテコールアミンの産生から、神経細胞のモデルとして使われている。

今回、実際の神経系の細胞由来の培養細胞として、アストロサイト系細胞、CRL-2534を用いた。CRL-2534は、生後8日目のマウスの小脳の培養から、自然にtransformationが発生し確立された培養系で、type III(核周囲に膜上の細胞質を形成する)のアストロサイトである(Alliot and Pessac, 1984)。この細胞について毒性評価に使えるか検討した。そのために、まず細胞死に関して検討することとし、トリパンプルー色素排除法に加えて、細胞の突起などの形態から顕微鏡によるカウントが困難である可能性を考え、培養上清中LDHについても細胞生存の指標として使用した。

本研究では、先行研究との比較を考え、DBTに関して、その主要な毒性である免疫

毒性の評価に使用され、かつ TBT の毒性を評価したマクロファージ系細胞、J774.1 細胞への毒性をまず、評価した。それをふまえて、アストロサイト系細胞の曝露濃度を決定した。

OT に関しては、触媒として使用された場合の濃度の高さと、比較的神経毒性が低いという報告（ラット線条体スライスから得たパンチに対する *ex vivo* 曝露実験におけるカテコールアミン産生への影響、Filipov and Tsunoda, 2004）から、曝露濃度は DBT に比べ高値に設定した。

乳酸ポリマーに関しては、スズとの相互作用を考慮して、市販の製品に加えて、スズを含まないもの、大量にスズを含むものをテーラーメイドにて入手し、比較したが、先行の報告に加えて濃度を設定した。

DBT のマクロファージに対する影響は、0.5 μM 曝露群から生存率の低下がおこった。TBT についての先行研究 (Nakano, et al., 2004) では 1.0 μM 曝露群で、18 時間曝露 + LPS による活性化後 6 時間曝露の条件で生存率の低下が起こっているの、その毒性は TBT より強い可能性がある。今回の曝露では、18 時間曝露 + LPS による活性化後 24 時間曝露の条件では、より顕著な低下が起こり、TBT で TNF α の細胞死への関与が指摘される (Nakano, et al., 2004) ように、活性化による何らかの蛋白の発現が毒性を強める可能性もある。いずれにせよ、DBT のマクロファージ系細胞への影響は強いことが示唆されたので、同様の濃度でアストロサイトへの曝露を行った。

DBT の曝露によって、アストロサイト系細胞は、1.5 μM 曝露群より、対照群に比べて、細胞の生存の有意な低下が生存率からも上清 LDH からも示された。1.5 μM は J774.1 細胞における DBT が有意に生存率の低下を誘導する濃度よりも高いものの、比較可能なレベルではあり、DBT はアストロサイトに関しても、このレベルで毒性をもつことが示唆された。

一方、OT は、100 μM のレベルでも有意な死亡率の変化は起きなかった。このレベルになると、培養液中に OT の析出が顕著となる。OT のアストロサイト系細胞への毒性は低いことが示唆された。

乳酸ポリマーの実験では、市販の乳酸ポリマーでは、LDH に変化はないものの、細胞の生存率は対照群より有意に上昇し、またスズを含まないポリマーでは、群間で有意性を示さなかった。一方、スズを大量に含んだ乳酸ポリマーでは、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 曝露群では、細胞生存率と LDH の結果が相反するものの、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 曝露群では一致して、細胞生存の有意な低下を示した。この毒性はスズによることが示唆され、上記の毒性の差から DBT による毒性が示唆される。

アストロサイト系細胞の細胞死を指標とした評価について、トリパンプルー色素排除法については、細胞カウントの難しさが、これが、LDH と結果が一致しない一因となっている可能性がある。また、培養フラスコでは 90% 以上の生存率を示すものの、培養プレートでは、対照群の生存率が 80% 前後、低いときには 70% 未満の場合もあり、添加に用いたエタノールや DMSO の影響を含めて検討の余地がある。アストロサイト系細胞は、簡便性から神経毒性を評価することに有用と考えられるが、今後、細胞死以外の指標、例えば、グルタミン添加時のグルタミン酸産生 (Alliot et al., 1996) など機能面の指標となりうるものも含め、検討すべきであろう。

神経毒性の評価には、まだ仮題が多い。合成硬膜を含む人工医療材料は、実際に生体内に埋め込まれるので、その評価には、*in vivo* 試験、例えば神経行動学的試験などを検討する必要がある。

8. 今回得られた結果から、脊椎スクリュエーの固定性と剛性に影響を与える最も重要な因子は、形態的因子よりも骨密度 (BMD) であった。外科技法については、

bicortical 技法の方が unicortical 技法よりも引き抜き強さは一般に高かった。

例外的に、円錐形のスクリュー（タイプ A）だけが uni-と bicortical の両技法においても引き抜き強さが変化せずにとどまった。

しかしながら、これらの引き抜き強さと応力レベルは、脊椎スクリューの植立直後の初期強度を保証もしくは見積もることができるけれども、長期の臨床経過における脊椎スクリュー周囲の骨吸収による緩み（loosening）やスクリューとの界面にある海綿骨の破壊、さらにはスクリューの疲労破壊などが発生して、脊椎スクリュー固定術の寿命が短命に終わるリスクシミュレーションについては今後の研究課題であり、特に、骨粗鬆症を持つ患者においては、繰り返し負荷条件の下でのリスクが予想以上に高い恐れがあるので、究明を急ぐべきである。

9. ミニブタの大腿骨の大きさはヒトの大きさの約半分ではあるが、形状はヒトのそれに類似しており、類似モデルとして使用可能と考えた。今回のように、ヒトと同じ手術を施行すること、および手術手技向上のための練習を行うことも可能であり、さらにそれらの評価も可能であると考えられる。評価については、今後、研究方法に記した評価を行う予定である。

また、関節鏡視下手術が可能かどうか、今後検討する予定である。

American Society for Testing and Material (ASTM) の Standard Guide for the in vivo assessment of implantable devices intended to repair or regenerate articular cartilage では、使用動物の特徴、動物の種類別の自己修復されない軟骨欠損の大きさ、使用すべき動物の大きさ、欠損の部位、年齢が記されている。

家兎を使った軟骨欠損修復の実験はこれまでたくさん行われてきた。しかしながら、家兎の場合には移植物の固定方法

がヒトと大きく異なり、実用的ではない。また家兎を使った論文では、論文により修復成績が異なることが指摘されてきた。その原因のひとつとして、個体により修復が大きく異なっていたことがあげられる。動物の年齢、欠損の大きさ、部位などにより、修復が異なるためと考えられる。ASTM のガイドラインにのっとる必要がある。しかし ASTM のガイドラインにて記されている兎は New Zealand white rabbit であり、わが国で通常使われる日本白色家兎とは異なる種であるために、修復も異なる可能性がある。ASTM のガイドラインには日本白色家兎についての記載はない。

ミニブタについての記載も ASTM のガイドラインにはないために、修復能力を新たに確認する必要があった。十分な修復は得られていなかったが、それでも個体差があり、その原因を明らかにする必要があり、現在計画途中である。

現在進行中の実験では、自己骨髄間葉系細胞を移植しており、細胞なしの担体みの修復と比較する予定である。その際、研究方法に記した様々なデータを採取し、細胞移植の有無での成績を比較するとともに、ヒトの臨床データの照らし合わせることで、ヒト関節欠損修復の評価が可能になる指標が無いかを検討する。

ヒトの関節軟骨欠損の患者臨床症状を検討したところ、患者がもっとも困っているのは疼痛、機能など、患者立脚評価である。しかしながら疼痛などは客観的評価が出来ず、評価とはなりにくい。また、関節軟骨欠損があっても痛くない患者もあることから、疼痛だけでは評価が困難である。動物モデルの場合にも、痛みは評価できない。そこで機能評価をすることになる。我々は、ミニブタの歩行時の荷重のかけ方を検討する予定である。

MRI 像、関節鏡視所見、生検による組織像なども修復を反映するが、臨床症

状と結びつかない。そこで我々は、これらの客観的評価法と、患者立脚型の評価を結びつけることの重要性を考え、本研究を立ち上げた。まだ結果が出ていないが、これが可能になると、ある程度の客観的評価が出来るのでは無いかと考える。

E. 結論

1. LPS 規格値を種差、個体差を考慮して求めた結果、皮下適用材料は、7.5 EU/mg(使用限度値 500 EU/kg 体重)、骨再生用材料は、0.4 EU/mg (使用限度値 16 EU/kg 体重)と試算された。

2. LLNA に従って、DNCB 及び HCA を BALB/c マウスに 3 日間塗布した後、6 日目に耳介リンパ節を取り出し、リンパ節重量、LNC 数、BrdU 取り込み量、ATP 量及び alamarBlue 取り込み量を測定した。DNCB を投与した場合、溶媒対照群に比べてリンパ節重量の増加率(SI 値)は 3.1、細胞数、ATP 量及び alamarBlue 取り込み量の SI 値は 5 程度になった。HCA の場合、リンパ節重量の SI 値は 2.2、他の指標では 3~4 となった。一方、BrdU 取り込み量は他の指標より低い値しか得られなかった。これらの指標は RI と比べると若干感度が低いですが、短時間にかつ同時に実施できる利点があり、中程度の感作性強度を持つ物質の評価には十分と思われた。フローサイトメーターによる解析の前段階として、脾臓細胞と LNC の蛍光標識抗体での染色条件について検討した。その結果、T 及び B 細胞を効率良く染色する抗体濃度などの至適条件が設定できた。

3. 人工心臓弁を体に埋植した際の血栓形成の原因となる遺伝子多型を探索することを目的として、今年度は対照データを得るために、健常人の血液由来の DNA (100 検体) を用いて SNP 解析を行った。ターゲットとした遺伝子は、抗血液凝固薬であるワーファリンの関連遺伝子など

(SERPINE1、CYP2C9、プロトロンビン、凝固因子第 7、凝固因子第 9、凝固因子第 10、 γ -グルタミルカルボキシラーゼ) 7 遺伝子で、これまでに日本人で報告されている SNP を中心に計 23SNP を選択し、タイピングを行った。そして、23SNP それぞれの wild/mutant の頻度をまとめた。今年度得られたこのデータを対照として、来年度以降、人工心臓弁を使用中の患者さんの血液サンプルを用いて同様の SNP タイピングを行い、それぞれの結果を比較することによって人工心臓弁を体に埋植した際の血栓形成の原因となる遺伝子多型を探索していく。

4. コロニー法による細胞毒性試験において、従来から医療材料として使用されている Ti-6Al-4V には細胞毒性が認められたが、その他のチタン系金属材料には細胞毒性が認められなかった。また、正常ヒト骨芽細胞を用いた骨組織適合性試験において、Ti-6Al-4V は、CP-Ti に比べて、骨芽細胞の増殖および分化を抑制した。しかし、その他のチタン合金は、CP-Ti に比べて、骨芽細胞の増殖および分化を促進した。

今回試験したチタン合金の内、Ti-6Al-4V 以外のチタン合金は、いずれも細胞毒性がなく、CP-Ti に比べて骨組織適合性にも優れ、Ti-6Al-4V の代替材料として期待できる。

5. 米国の整形外科インプラントの不具合報告から、金属に関係するものを抽出し、再整理した。また、厚生労働省に報告された不具合報告や回収情報の中で整形外科インプラントや金属・合金に関するものをリストアップした。これらの情報を参考に、JIS や ISO、ASTM に掲載されている金属・合金に関係する規格、試験法を調査し、さらに、ニッケルのアレルギーに関して、米国の不具合情報を調査すると共に、動物に

埋植する金属材料の選択、製造を行った。

6. Ti-Ni 合金は、形状記憶能から、扱いやすいため、拡大使用される。Ni 高含量ゆえに、安全性が懸念される。平成 16 年度は、材料の選定と複数の *in vitro* 環境条件を決定し、腐食試験等を実施した。

7. 人工硬膜などの合成に触媒として使用される、ジブチルスズやオクチル酸スズ、人工硬膜の材料である乳酸ポリマーの市販品、触媒なしの乳酸ポリマー、スズを大量に含んだ乳酸ポリマーについて、アストロサイトへの影響を調べた。ジブチルスズは強い細胞毒性を示したが、オクチル酸スズは細胞毒性を示さなかった。乳酸ポリマーでは、スズを大量に含んだもののみ細胞生存率の低下が見られた。以上より、人工硬膜を合成した場合、ジブチルスズの毒性が問題になることが示唆された。アストロサイト系細胞は神経毒性の評価に使用しうると考える。

8. 脊椎スクリューの固定性と剛性に影響を与える最も重要な因子は、形態的因子よりも骨密度であった。外科技法については、bicortical 技法の方が unicortical 技法よりも引き抜き強さは一般的に高かった。

9. ミニプタをヒト類似動物モデルとして使用できるかを評価した。

1. ミニプタの大腿骨顆間部の大きさ、形状は、ヒトに対する処置を行うことが可能であった。
2. ミニプタの関節軟骨欠損の自然修復は完全ではなく、修復実験モデルとして使用可能と考えた。ミニプタで関節軟骨欠損を修復する目的で自己骨髄間葉系細胞移植を施行し、ヒトと同じ評価を行う実験を進行中である。

F. 健康危険情報

骨粗しょう症を持つ患者において、脊

椎固定器具の繰り返し負荷条件の下でのリスクが予想以上に高い恐れがあるので、究明を急ぐべきである。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) R. Sawada, T. Ito, Y. Matsuda, and T. Tsuchiya "Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells", *Animal cell technology*, in press
- 2) Wakitani S, Aoki H, Harada Y, Sonobe M, Morita Y, Mu Y, Tomita N, Nakamura Y, Takeda S, Watanabe T, Tanigami A. Embryonic stem cells form articular cartilage, not teratomas, in osteochondral defects of rat joints. *Cell Transplant* 13 (4) :331-336, 2004
- 3) Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, Toritsuka Y, Nakamura Y, Horibe S. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: Two case reports. *Cell Transplant* 13(5): 595-600, 2004
- 4) Yamamoto T, Wakitani S, Imoto K, Hattori T, Nakaya H, Saito M, Yonenobu K. Fibroblast growth factor-2 promotes repair of partial thickness defects of immature rabbits but not in mature rabbits. *Osteoarthritis Cart* 12(8):636-641, 2004
- 5) Katayama R, Wakitani S, Tsumaki N, Morita Y, Matsushita I, Gejo R, Kimura T. Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone

- marrow. *Rheumatology (Oxford)* 43(8):390-395, 2004
- 10) Takagi M, Fukui Y, Wakitani S, Yoshida T. Effect of poly DL-lactic-co-glycolic acid mesh on a three-dimensional culture of chondrocytes. *J Biosci Bioeng* 98(6):477-481, 2004
 - 11) 脇谷滋之。関節軟骨再生現状と展望。分子リウマチ 1(2):47-52(119-124)、2004
 - 12) 服部高子、脇谷滋之。骨髄間葉系細胞移植
 - 13) 関節外科 23(5):96-99(688-691)、2004
 - 14) 天正恵治、中谷宏幸、岡部高弘、脇谷滋之。変形性関節症の軟骨再生の現状と将来。 *Journal of Clinical Rehabilitation* 13: 436-442、2004
 - 15) 縄田昌司、脇谷滋之。軟骨再生 I。臨床スポーツ医学 21(6):605-610、2004
 - 16) 岡部高弘、中谷宏幸、天正恵治、脇谷滋之。種々細胞利用による関節軟骨修復法の現状。 *Clinical Calcium* 14: 1116-1121、2004
 - 17) Wakitani S, Aoki H, Harada Y, Sonobe M, Morita Y, Mu Y, Tomita N, Nakamura Y, Takeda S, Watanabe T, Tanigami A. Embryonic stem cells form articular cartilage, not teratomas, in osteochondral defects of rat joints. *Cell Transplant* 13 (4) :331-336、2004
 - 18) Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, Toritsuka Y, Nakamura Y, Horibe S. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: Two case reports. *Cell Transplant* 13(5): 595-600、2004
 - 19) Yamamoto T, Wakitani S, Imoto K, Hattori T, Nakaya H, Saito M, Yonenobu K. Fibroblast growth factor-2 promotes repair of partial thickness defects of immature rabbits but not in mature rabbits. *Osteoarthritis Cart* 12(8):636-641、2004
 - 20) Katayama R, Wakitani S, Tsumaki N, Morita Y, Matsushita I, Gejo R, Kimura T. Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow. *Rheumatology (Oxford)* 43(8):390-395、2004
 - 21) Takagi M, Fukui Y, Wakitani S, Yoshida T. Effect of poly DL-lactic-co-glycolic acid mesh on a three-dimensional culture of chondrocytes. *J Biosci Bioeng* 98(6):477-481、2004
 - 22) 脇谷滋之。関節軟骨再生現状と展望。分子リウマチ 1(2):47-52(119-124)、2004
 - 23) 服部高子、脇谷滋之。骨髄間葉系細胞移植
 - 24) 関節外科 23(5):96-99(688-691)、2004
 - 25) 天正恵治、中谷宏幸、岡部高弘、脇谷滋之。変形性関節症の軟骨再生の現状と将来。 *Journal of Clinical Rehabilitation* 13: 436-442、2004
 - 26) 縄田昌司、脇谷滋之。軟骨再生 I。臨床スポーツ医学 21(6):605-610、2004
 - 27) 岡部高弘、中谷宏幸、天正恵治、脇谷滋之。種々細胞利用による関節軟骨修復法の現状。 *Clinical Calcium* 14: 1116-1121、2004
- ## 2. 学会発表
- 1) 靛島由二。エンドトキシン汚染：測定のポイントについて。第2回医療機器フォーラム(2004年10月・東京)。
 - 2) 靛島由二、長谷川千恵、小園知、伊佐間和郎、佐々木和夫、矢上健、土屋利江。エンドトキシン不活化処理を

- 施した天然医用材料の生体親和性評価。日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004年11月・筑波)。
- 3) 伊佐間和郎、齋島由二、長谷川千恵、小園 知、佐々木和夫、土屋利江。ガンマ線照射天然医療材料の生体適合性評価。日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2003年12月・大阪)。
 - 4) 澤田留美、伊藤友実、松田良枝、土屋利江「細胞組織医療機器の有効性・安全性・品質評価に関する研究(2) — 遺伝子発現解析によるヒト間葉系幹細胞とポリ乳酸の相互作用について —」 第7回組織工学会 (2004。7)
 - 5) 伊藤友実、澤田留美、松田良枝、松岡厚子、土屋利江「細胞組織医療機器の有効性・安全性・品質評価に関する研究(3) — ヒト間葉系幹細胞における TGF- β の遺伝子発現解析について —」 第7回組織工学会 (2004。7)
 - 6) R. Sawada, T. Ito, Y. Matsuda, and T. Tsuchiya "Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells", 17th Annual and
 - 7) International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT) (2004。11)
 - 8) 澤田留美、李 玉萍、土屋利江「ヒト心線維芽細胞における物理的ストレスに応答する分子メカニズムの解明」 第4回再生医療学会 (2005。3)
 - 9) 伊藤友実、澤田留美、土屋利江「ヒト間葉系幹細胞の増殖における b-FGF の影響」 第4回再生医療学会 (2005。3)
 - 10) Wakitani S. Autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for cartilage repair. International Cartilage Symposium Hiroshima, 2004。2。12, Hiroshima
 - 11) 縄田昌司、脇谷滋之、中谷宏幸、中村幸男、天正恵治、岡部高弘、加藤博之、高岡邦夫。BMP と diffusion chamber による異所性軟骨誘導と骨軟骨欠損修復への応用。第17回日本軟骨代謝学会、2004年3月 新宿
 - 12) 縄田昌司、脇谷滋之、中谷宏幸、中村幸男、天正恵治、岡部高弘、加藤博之、高岡邦夫。BMP と diffusion chamber による異所性軟骨誘導。第3回日本再生医療学会、2004年3月 幕張
 - 13) 中嶋正明、脇谷滋之、原田恭治、園部正人、谷上信、富田直秀。肺性幹細胞 (ES 細胞) 移植後の関節運動が関節軟骨の再生に及ぼす影響 (part1)。第3回日本再生医療学会、2004年3月 幕張
 - 14) 原田恭治、富田直秀、中嶋正明、脇谷滋之。肺性幹細胞 (ES 細胞) 移植後の関節運動が関節軟骨の再生に及ぼす影響 (part2: 正常修復との対比)。第3回日本再生医療学会、2004年3月 幕張
 - 15) 脇谷滋之。骨髄間葉系細胞による関節軟骨の再生。第32回日本リウマチ関節外科学会、2004年10月 奈良
 - 16) 脇谷滋之。ES 細胞からの軟骨分化。第19回日本整形外科学会基礎学術集会、2004年10月 高輪

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表1. コラーゲンシートへの菌体成分添加量と
エンドトキシン回収試験結果

シート番号	添加量 (EU/mg)		エンドトキシン 活性実測値 (EU/mg)	回収率(%)*
	LPS	菌体		
Control	—	—	0.48	—
LPS 添加標品 #1	1.1	—	0.62	12.5
#2	2.1	—	0.91	20.2
#3	10.7	—	1.2	7.2
#4	106.5	—	10.8	9.7
#5	1065.0	—	148.2	13.9
#6	10650.0	—	1621.4	15.2
#7	106500.0	—	14558.6	13.7
菌体添加標品 #8	—	3.8	2.0	40.0
#9	—	7.6	4.5	53.0
#10	—	38.1	16.4	41.7
#11	—	381.0	44.7	11.6
#12	—	3810.0	751.5	19.7
#13	—	38100.0	5848.7	15.3

*回収率：(添加標品実測値－Control実測値) ×100

表2. コラーゲン/HA コンポジットシートへの菌体成分添加量と
エンドトキシン回収試験結果

シート番号	添加量 (EU/mg)		エンドトキシン 活性実測値 (EU/mg)	回収率(%)*
	LPS	菌体		
Control	—	—	0.16	—
LPS 添加標品 #14	0.4	—	0.44	69.8
#15	0.8	—	0.6	60.9
#16	4.0	—	1.1	23.7
#17	39.9	—	8.6	21.1
#18	399.5	—	53.5	13.4
#19	3994.5	—	554.1	13.9
#20	39945.0	—	2328.6	5.8
菌体添加標品 #21	—	1.4	0.9	53.5
#22	—	2.9	1.5	46.3
#23	—	14.3	6.0	40.9
#24	—	142.9	38.2	26.6
#25	—	1428.8	160.4	11.2
#26	—	14287.5	1457.9	10.2

*回収率：(添加標品実測値－Control実測値) ×100

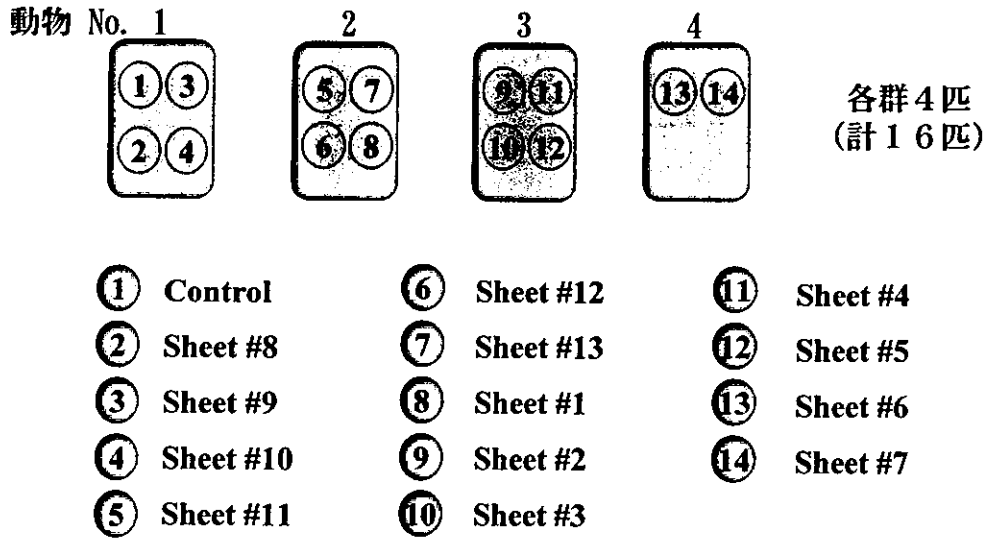


図 1. ラット皮下埋植および皮膚創傷被覆試験のシート配置

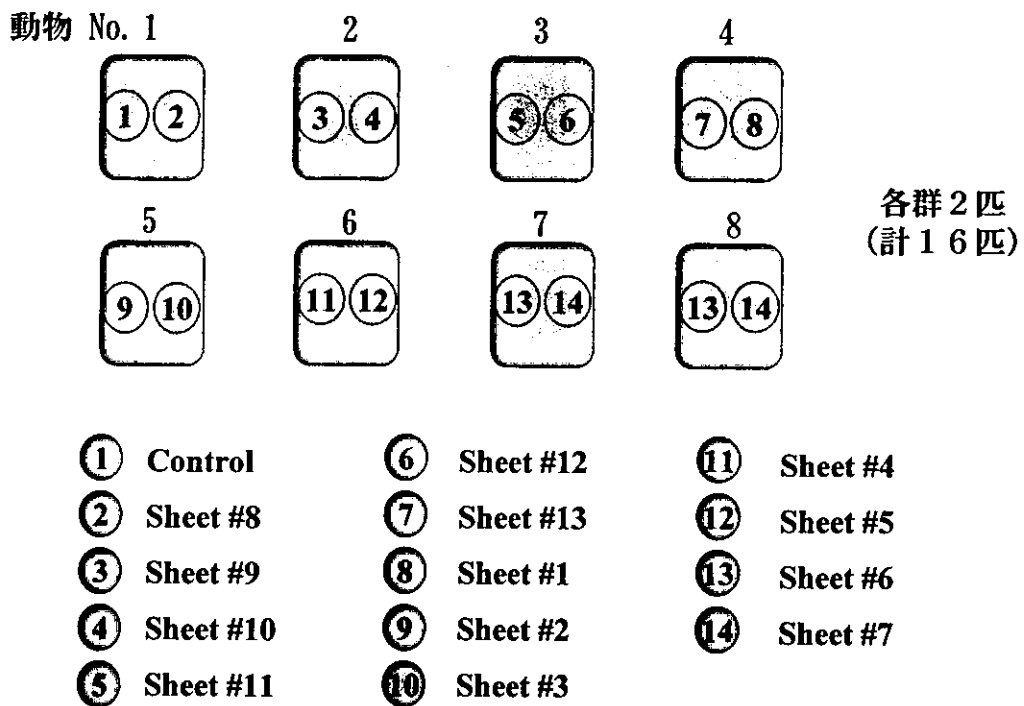


図 2. ラット肝被膜埋植試験におけるシート配置