

### 3. 医療機器に併用される抗血栓薬の適合性評価手法の開発

澤田留美

## 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業  
「医療機器・医用材料の安全性評価手法開発に関する研究」

## 分担研究課題名

医療機器に併用される抗血栓薬の適合性評価手法の開発

分担研究者 澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所療品部

### 〔研究要旨〕

心臓弁膜症は、人工弁置換手術による治療が行われている。人工心臓弁の機能不全の主な原因としては、血栓形成とパンヌス（心臓弁の周辺に発育する線維性の自己組織）形成が挙げられる。そこで本研究では、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、人工心臓弁の機能不全の患者さんおよび人工弁の不具合が認められない患者さんの血液を用いて両者を比較検討する。今年度はその対照データを得るために、健常人の血液由来の DNA を用いて検討した。本研究で用いた DNA は、PSC（ファルマ スニップ コンソーシアム）によって樹立された PSC 細胞株から調製された DNA で、100 検体用いて 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、 $\gamma$ -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。その結果、23SNP のうちの 2SNP（凝固因子第 10 の c.502+2115^2116 と c.502+2531A>G）は、100 検体全てが Wild Type であったが、他の 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。

### A. 研究目的

心臓弁膜症は、心臓病の最大の原因の一つとして挙げられ、人工弁置換手術による治療が行われている。現在、臨床的に用いられている人工弁は、1) 機械弁、2) 異種生体弁、3) 凍結保存同種弁である。しかし、それぞれの特徴として、機械弁は耐久性は高いが抗血栓性に大きな問題があり、

異種生体弁は抗血栓性は高いが耐久性が低く、凍結保存同種弁は抗血栓性、耐久性、抗感染性に優れているもののその提供数が圧倒的に不足しており、その性能はいずれも一長一短である。わが国における人工弁の利用は約 80%が機械弁、残り約 20%が異種生体弁である。米国においては約 50%が機械弁、約 45%が異種生体弁、3%が同種

弁、残りが自己弁であると報告されている。この様に現在国内外で最も多く利用されている人工弁は機械弁である。人工心臓弁の機能不全の主な原因としては、血栓形成とパルス（心臓弁の周辺に発育する線維性の自己組織）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生涯にわたり抗血液凝固薬及び抗血小板凝集薬服用が必要となるが、薬の作用の個体差により血栓が形成された場合には急速な人工心臓弁機能不全を招く恐れがある。大動脈弁の置換術後における人工弁機能不全は、患者の生命を危機に曝す重大な問題である。そこで本研究では、人工心臓弁を体に埋植した際の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て、人工心臓弁の機能不全の患者および人工弁の不具合が認められない患者の血液を用いて両者を比較検討する。また、対照として健常人についてもその血液由来の不死化細胞から得た DNA を用いて検討する。抗血液凝固薬であるワーファリンの関連遺伝子や、併用投与されている抗血小板凝集薬の関連遺伝子を対象とする。人工心臓弁機能不全発症の分子メカニズムは未知であり、予防法も開発されていないため、同定した遺伝子の多型と人工心臓弁の不具合発症との関連を調べ、予防法の確立を目指す。

## B. 研究方法

今年度は、人工心臓弁の機能不全の患者および人工弁の不具合が認められない患者の血液を用いた両者の比較検討に対する対照データを得るために、健常人の血液由来の DNA を用いて検討した。

本研究で用いた DNA は、PSC（ファルマ スニップ コンソーシアム）によって樹

立された PSC 細胞株から調製された DNA で、100 検体用いて実験を行った。用いた検体の由来は、男性 50 名（平均年齢  $52.3 \pm 8.1$  才）女性 50 名（平均年齢  $52.4 \pm 8.1$  才）で、それぞれ 40 代 20 名、50 代 20 名、60 代 10 名であった。

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、 $\gamma$ -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。

SNP タイピングは、SSP-SMFD（Sequence Specific Primer・Single Molecule Fluorescence Detection）法にて行った。まず、表 1 に示した 1st プライマーを用いて PCR を行い、ターゲットの SNP を挟む 300~400bp 程度の増幅産物を得た。PCR 反応は、95°C で 30 秒、それぞれのアニーリング温度（表 1）で 30 秒、72°C で 30 秒を 40 サイクル行った。次に、得られた増幅産物を表 2 に示したアレル特異的なプライマー（SSP）を用いて PCR を行った。PCR 反応は、95°C で 30 秒、それぞれのアニーリング温度（表 2）で 30 秒、72°C で 30 秒を 40 サイクル行った。SSP には蛍光分子（アレル A は TMRA でラベルして 543nm で励起。アレル B は Cy5 でラベルして 633nm で励起。）をラベルしておく。PCR 産物は、SMFD により測定した。SMFD は、溶液中に存在している蛍光分子の数と大きさを検出することができるため、PCR 反応液中に存在するプライマーと PCR 産物を識別し検出することができる。

## C. 研究結果

抗血液凝固薬であるワーファリンの関連遺伝子など、以下の7遺伝子について、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。

- ・ SERPINE1 (5SNP)
- ・ CYP2C9 (3SNP)
- ・ プロトロンビン (6SNP)
- ・ 凝固因子第 7 (1SNP)
- ・ 凝固因子第 9 (1SNP)
- ・ 凝固因子第 10 (6SNP)
- ・  $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼ (1SNP)

SNP タイピングの結果を表 3 にまとめた。解析した 23SNP のうちの 2SNP (凝固因子第 10 の c.502+2115<sup>A</sup>2116 と c.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。

#### D. 考察

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、 $\gamma$ -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、健常人 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。

#### E. 結論

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、 $\gamma$ -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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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. 学会発表

1) 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)

2) 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- $\beta$ の遺伝子発現解析について—」 第7回組織工学会 (2004. 7)

3) R. Sawada, T. Ito, Y. Matsuda, and T. Tsuchiya "Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal humanmesenchymal stem cells", 17th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT) (2004. 11)

4) 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)

5) 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)

表1. 1st PCR用のプライマーとアニーリング温度

SNP	1st Primer ( F )	1st Primer ( R )	Product	Annealing Temp.
SERPINE1-1	ACCTGCTTCCACCCTCTC	GCACGCATCTGACATTTCTTC	445	61.4
SERPINE1-2	GGGCTTAGAACCTGAACATGTC	CAATCTTGAATCCCATAGCTGC	440	64.0
SERPINE1-3	GGGCTTAGAACCTGAACATGTC	CAATCTTGAATCCCATAGCTGC	440	64.0
SERPINE1-4	TCCTGGTTCTGCCCAAGTAAG	CTCCGTCCTTGGGAAGTGATTTTC	411	64.0
SERPINE1-5	ATCCATTGCTACCAAGCTCC	TGAACTCATGGGCTCAAGTG	309	64.0
CYP2C9-1	GATCCATTGGAACCTTACATGTG	CAGCCTCAGTCCTATTGAACTAC	452	57.5
CYP2C9-2	ATTTTTCCTCTTTCCATCAGTTTTTAC	GGGACTTCGAAAACATGGAG	277	57.5
CYP2C9-3	CACACCTGGCCGTTTGTTA	TCCAGGCAAGAAAGAGGA	591	61.4
F2-1	AAGACTGCCTGTTCTGAGG	AGGTGATGTCTGAAGACTGTG	464	68.8
F2-2	TGAGCTAGCAGGGACAGGTAG	TCCATAGCTGGCACTCAATG	443	66.1
F2-3	ATTGAGTGCCAGCTATGGAG	AGCCAGTATTCTTGGTTCCC	367	64.0
F2-4	AAGCGTACCTCAAGCCCAAC	GCCAGTATTCTTGGTTCCCATC	276	66.1
F2-5	CACCAGATGCTTGTAGCTGAG	GGTGAATCACTTGAGGTCAAGG	382	66.1
F2-6	TGAGCAAAGTTGCCTAACCTC	ACTCCTGACCTCAAGTGATCTG	449	66.1
F7	CTTGTCCTTTGGATCAGTCC	ATAATCCGTTAGTGGACAGG	378	66.1
F9	GAGGCCATTGGAATAAGTCC	AGAACCAGTACTTACCAACCTGC	372	64.0
F10-1	AACTGTCTCTGGTGGATGG	AAAGCAGACAGTGACCGGTGC	320	66.1
F10-2	ATCCTCAAGGCCAGCTGTG	GCAGATGGCTAACTGTCCTGTGC	227	66.1
F10-3	CAGCTTGAGTCACCTTAATTATGG	GGTTACCTTAGTCGGGAATC	448	56.2
F10-4	ACATGGCAGTCAGGGAGCATAG	CGGCACCTGATGCCCTGTG	430	68.8
F10-5	AACTCAGAACTTGGAAAGGTGG	TTTCAGGGCAGAAGGAATGGC	396	66.1
F10-6	CTCCGGCCAGATGCATTC	GTCCGATCTGCAGGTGAGC	211	61.4
GGCX	CAAGTTTGCATAAAGTCACCTCC	GCTTCTTGGTTCTGCCTCAG	342	64.0

表2. SSP - PCR用のプライマーとアニーリング温度

SNP	Primer A(TAMRA)	Primer B(Cy5)	Annealing Temp.
SERPINE1-1	GTA AGC CCC GTA GTT CCA	GTA AGC CCC GTA GTT CCG	63.2
SERPINE1-2	GCC TAG TCC TGG GCC TGG	GCC TAG TCC TGG GCC TGA	68.7
SERPINE1-3	CAG ACC CTT CAC CAA AGA C	GCA GAC CCT TCA CCA AAG AT	59.4
SERPINE1-4	TTG AAT TTC CCA GAT CTG TGA C	GTT GAA TTT CCC AGA TOT GTG AT	53.7
SERPINE1-5	AGC TGG GCT TAG TGG CTC ACT	TGG GCT TAG TGG CTC ACA	63.2
CYP2C9-1	TGC CTG TGT ACA CCC TGC	AAT GCC TGT GTA CAC CCT GT	63.2
CYP2C9-2	GCA CGA GGT CCA GAG ATA CA	CAC GAG GTC CAG AGA TAC C	66.3
CYP2C9-3	AAG GAA GCC CTG ATT GAT CT	AGG AAG CCC TGA TTG ATC C	63.2
F2-1	AGA GAA GCA AGC GAG GAA T	AGA GAA GCA AGC GAG GAA C	66.3
F2-2	AAA TAT TCG CTA AGT GCC TAC CAT A	ATA TTC GCT AAG TGC CTA CCA TG	63.2
F2-3	GGT AGT GGA GTT GAT TCT GGA AC	GGT AGT GGA GTT GAT TCT GGA AG	63.2
F2-4	TGT AGC ACC AGG GTC CCA	TGT AGC ACC AGG GTC CCG	68.7
F2-5	GAG AGT CGC TTG AAC CCG	GAG AGT CGC TTG AAC CCA	66.3
F2-6	ACG TGA TAG GCG CTC AAT AAG	CGT GAT AGG CGC TCA ATA AA	56.2
F7	CGC TCC TGT CCG TGC CAC	CGC TCC TGT CCG TGC CAT	68.7
F9	GAT ATA GAA ATA TCT GAT GGT GTC TTC TTC A	ATA TCT GAT GCT GTC TTC TTC G	63.2
F10-1	AGG GTT TCT GTG GTG GAA CT	GGT TTC TGT GGT GGA ACC	53.7
F10-2	ACT GTG TOT CCG TTT CTC CT	CTG TGT CTC CGT TTC TCC C	63.2
F10-3	GAA TTT CCT TTC TGC TTT TGT TCT A	AAT TTC CTT TCT GCT TTT GTT CTC	56.2
F10-4	TGG ATG GAC GGA GCA GCG	TGG ATG GAC GGA GCA GCA	71.6
F10-5	GCC ATC CAT TCC CCC CTC	GCC ATC CAT TCC CCC CTT	51.8
F10-6	CCA GGC AGC GAG GGG AGT	CCA GGC AGC GAG GGG AGC	71.6
GGCX	GAA AAA CAG GAA AAA GCC G	CTG AAA AAC AGG AAA AAG CCA	59.4

表3. SNPタイピングの結果

Gene	Location		Type	Allele1 (frequency)	Allele2 (frequency)
SERPINE1 (PAI-1)	1	3'UTR c.1570C>T	SNP	C (0.545)	T (0.455)
	2	CDS (Ala/Thr) c.43G>A	SNP	G (0.925)	A (0.075)
	3	CDS (Ile/Val) c.49G>A	SNP	G (0.995)	A (0.005)
	4	INTRON c.700+1921C>T	SNP	C (0.545)	T (0.455)
	5	INTRON c.1087+859T>A	SNP	T (0.545)	A (0.455)
CYP2C9	1	INTRON c.1149+147C>T	SNP	C (0.705)	T (0.295)
	2	CDS (Ile/Leu) c.1075A>C	SNP	A (0.990)	C (0.010)
	3	CDS (Leu/Pro) c.269T>C	SNP	T (0.990)	C (0.010)
F2 (prothrombin)	1	INTRON c.240+83T>C	SNP	T (0.560)	C (0.440)
	2	INTRON c.316+2125C>T	SNP	C (0.580)	T (0.420)
	3	INTRON c.422+90G>C	SNP	G (0.635)	C (0.365)
	4	CDS (Met/Thr) c.494T>C	SNP	T (0.580)	C (0.420)
	5	INTRON c.1472+251C>T	SNP	C (0.635)	T (0.365)
	6	INTRON c.1654+290C>T	SNP	C (0.580)	T (0.420)
F7	CDS-synonymous c.525C>T	SNP	C (0.915)	T (0.085)	
F9	INTRON c.88+75A>G	SNP	A (0.890)	G (0.110)	
F10	1	CDS-synonymous c.792T>C	SNP	T (0.590)	C (0.410)
	2	INTRON c.70+270A>G	SNP	A (0.675)	G (0.325)
	3	INTRON c.256+98A>C	SNP	A (0.905)	C (0.095)
	4	INTRON c.231+64C>T	SNP	C (0.620)	T (0.380)
	5	INTRON c.502+2115~2116	INDEL	- (1.000)	T (0.000)
	6	INTRON c.502+2531A>G	SNP	A (1.000)	G (0.000)
GGCX	INTRON c.2084+408C>T	SNP	C (0.685)	T (0.315)	



4. 金属材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の開発  
に関する研究

伊佐間和郎

金属材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の開発に関する研究

分担研究者 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

金属は力学的強度が高く、骨接合用品や人工関節の材料として不可欠である。特に、チタン合金はチタンに様々な元素を添加して力学的性質を変えることができ、広範囲の医療機器への応用が期待できる。本研究では、Ti-6Al-4V、Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8Mo、Ti-15Mo-5Zr-3Al、Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd、CP-Ti、Ti-Zr、Ti-Zr-8Nb について、細胞毒性和骨組織適合性を評価した。細胞毒性は、直接接触法によるコロニー法で試験し、従来から医用材料として使用されている Ti-6Al-4V に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には細胞毒性が認められなかった。また、骨組織適合性は、正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化を指標として評価した。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。さらに、チタン合金の組成は、骨芽細胞の分化レベルには影響を及ぼさなかった。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、金属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る。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 の代替材料として有望である。

A. 研究目的

金属は現在用いられている医用材料の中でも最高の強度を有し、骨固定材や人工関節、人工歯根のように高い強度が望まれる部位に用いる埋植医療機器の材料として不可欠である。金属製医用材料には、ステンレス鋼（ニッケル・クロム・モリブデン鋼）、コバルト・クロム合金、チタン合金などが用いられているが、構造の複雑化や使用期間の長期化などの要因によって、不具合が増加する傾向にある<sup>1)</sup>。そのため、力学的特性や耐腐食性を高めるための研究が現在も活発に展開

されている。しかしながら、金属材料が適用される部位における安全性および有効性を評価するための試験法は不足している。特に近年、力学的特性に優れた様々な金属材料が開発され、臨床実態を反映する安全性および有効性評価手法の確立が強く望まれている。

埋植された医療機器が組織的・構造的のみならず機能的にも生体組織の一部となり得るためには、材料に接触する細胞がその機能を維持することが重要である。生体内に埋入された金属材料は、溶出する金属イオン及び金属の材料表面が、そ

れぞれ細胞の機能に影響を及ぼす。金属塩については、細胞毒性や骨芽細胞の機能に及ぼす影響が系統的に評価されてきた。しかし、金属材料については、骨芽細胞の機能に及ぼす影響について十分な評価が行われていない。

従来から医療用のチタン合金としては、Ti-6Al-4V が一般的に使用されてきた。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>2)</sup>、最近ではその安全性が疑われている<sup>3)</sup>。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<sup>4,5)</sup>。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。最近、ニオブを添加した Ti-Zr 基合金が開発された<sup>6)</sup>。特に、ニオブを 8% 以上添加した  $\beta$  型 Ti-Zr 基合金は、Ti 系金属材料としては弾性率が小さく、生体用金属材料として有望である<sup>7)</sup>。

本研究では、最近開発されたチタン系金属材料について、始めに細胞毒性を評価し、次に骨芽細胞を用いて骨組織適合性を評価した。

## B. 研究方法

### 1. 試験材料

チタン系金属材料として、Ti-6Al-4V、Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8Mo、Ti-15Mo-5Zr-3Al、Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd（以上、株式会社神戸製鋼所から供与）、CP-Ti、Ti-Zr、Ti-Zr-8Nb（以上、東京医科歯科大学生体材料工学研究所から供与）を用いた。

金属材料は直径 14.0 mm、厚さ 1.0 mm の円板状に加工し、細胞が接する表面は研磨処理した。さらに、アセトン、エタノール、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。

### 2. 細胞毒性試験

直接接触法によるコロニー法<sup>8)</sup>を用いて試験した。

#### 2-1) 試験操作

細胞はチャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞 V79 (JCRB0603) を、培地は 10% 牛胎児血清を含有する Earle 組成 Eagle's MEM 培地 (Invitrogen Corp.) を用いた。

試料の金属材料を 24 ウエルマルチプレートのウエルの底に密着させ、その上に 50 個の V79 細胞を播種した。コントロールとして、試料を入れていないウエルにも同様に V79 細胞を播種した。CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 6 日間培養した後、10% ホルマリン液を用いて細胞を固定し、リン酸緩衝液 (M/15、pH 6.4) で 20 倍に希釈したギムザ染色液を用いてコロニーを染色した。

#### 2-2) コロニー形成率の測定

試料に形成したコロニー数を数え、コ

ントロール群に形成したコロニー数に対する割合 (%) を求めた。

### 3. 骨芽細胞を用いた適合性試験

#### 3-1) 骨芽細胞の培養

骨芽細胞は正常ヒト骨芽細胞 NHOst (BioWhittaker, Inc.) を用い、培地は 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 (Invitrogen Corp.) を用いた。

試料の金属材料を、24 ウェルマルチプレートのウェルの底に密着させ、その上に 10,000 個の NHOst 細胞を播種した。CO<sub>2</sub> インキュベータ内で、培地を週 3 回の頻度で交換しながら、2 週間培養した。<sup>9,10)</sup>

#### 3-2) 細胞増殖の測定

骨芽細胞の増殖の指標として、細胞数、DNA 量およびたんぱく質量を測定した。

細胞数は、培地 1 ml 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、450 nm (対照波長 600 nm) での吸光度を測定して、相対細胞数を求めた。<sup>9,10)</sup>

DNA 量は、細胞をトリプシン処理して回収した後、0.2% Nonidet P-40 溶液 1 ml 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、PBS 2 ml 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、458 nm (励起波長 356 nm) での蛍光強度を測定して、ウェル当たりの DNA 量を求めた。<sup>10)</sup>

たんぱく質量は、BCA Protein Assay Kit (Pierce Chemical Company) を用いて、細胞破砕液 50  $\mu$ l に、BCA 測定液 400  $\mu$ l を加えて、37°C で 30 分間反応させた後、室温に戻して 562 nm での

吸光度を測定して、ウェル当たりのたんぱく質量を求めた。

#### 3-3) 分化指標の測定

骨芽細胞の分化の指標として、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性、カルシウム量およびオステオカルシン量を測定した。

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。4 mM パラニトロフェニルリン酸、10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 mM ZnCl<sub>2</sub> を含有する 0.1 M グリシン緩衝液 (pH 10.5) 1 ml を各ウェルに加え、37°C で 15 分間反応させた後、405 nm (対照波長 600 nm) 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ェル当たりの ALP 活性を求めた。<sup>9)</sup>

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、0.1 N 塩酸 1 ml を各ウェルに加え、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、0.88 M モノエタノールアミン緩衝液 (pH 11.0) 1 ml を加え、つぎに 0.63 mM オルトクレゾールフタレインコンプレクソン、69 mM 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、570 nm での吸光度を測定して、ウェル当たりのカルシウム量を求めた。<sup>9,11)</sup>

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、3-2 で調製した細

胞破碎液 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、450 nm での吸光度を測定して、ウェル当たりのオステオカルシン量を求めた。

#### 4. 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。細胞提供企業においてすでに提供者から同意が得られている細胞のみが頒布されている。また、当該企業から細胞提供者を特定するための情報は、研究者には一切知らされておらず、細胞提供者に対する人権は擁護されている。

なお、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。

### C. 研究結果

#### 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 1 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 NHOst 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 2 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。

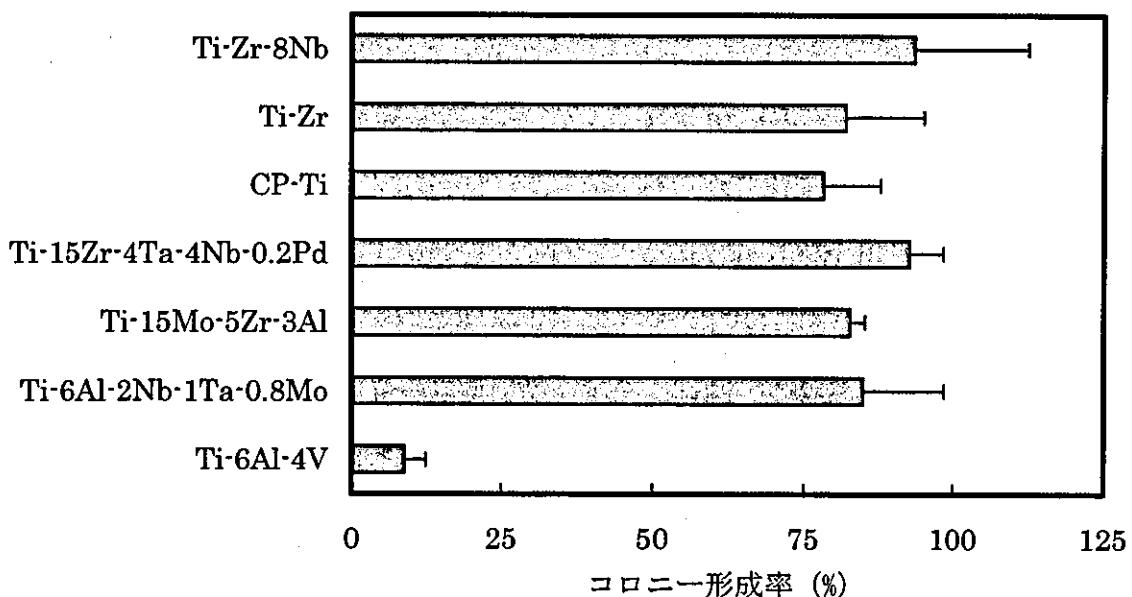


図 1. チタン系金属材料の細胞毒性

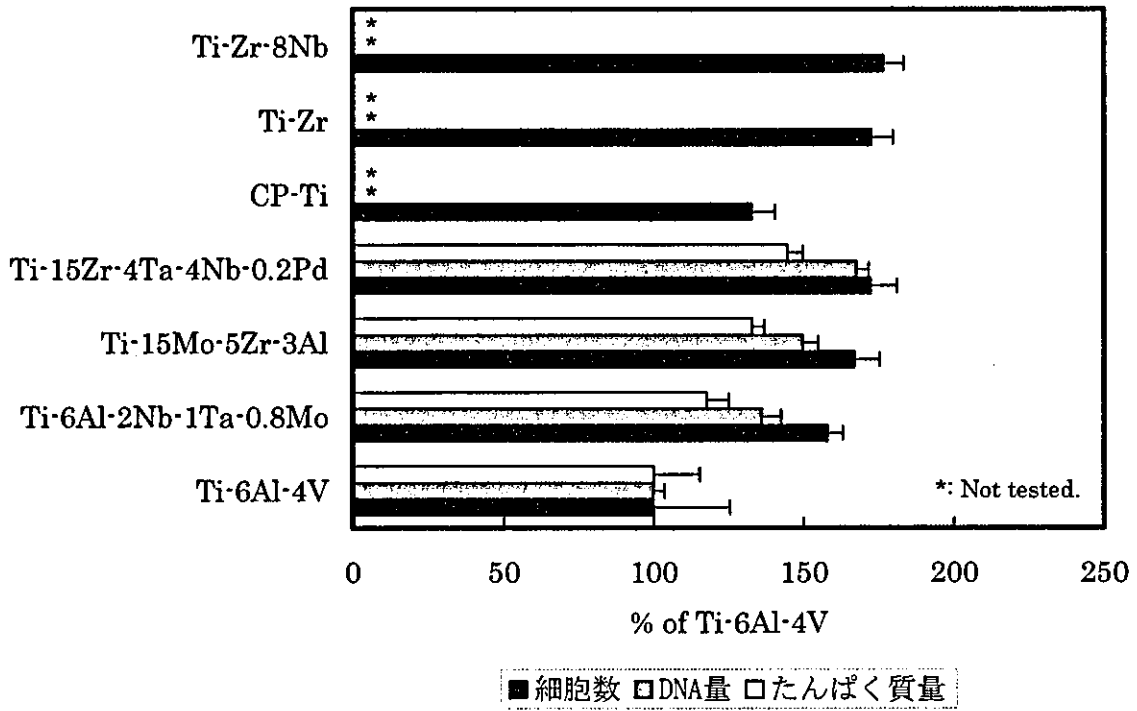


図 2. 骨芽細胞の増殖に及ぼすチタン系金属材料の影響

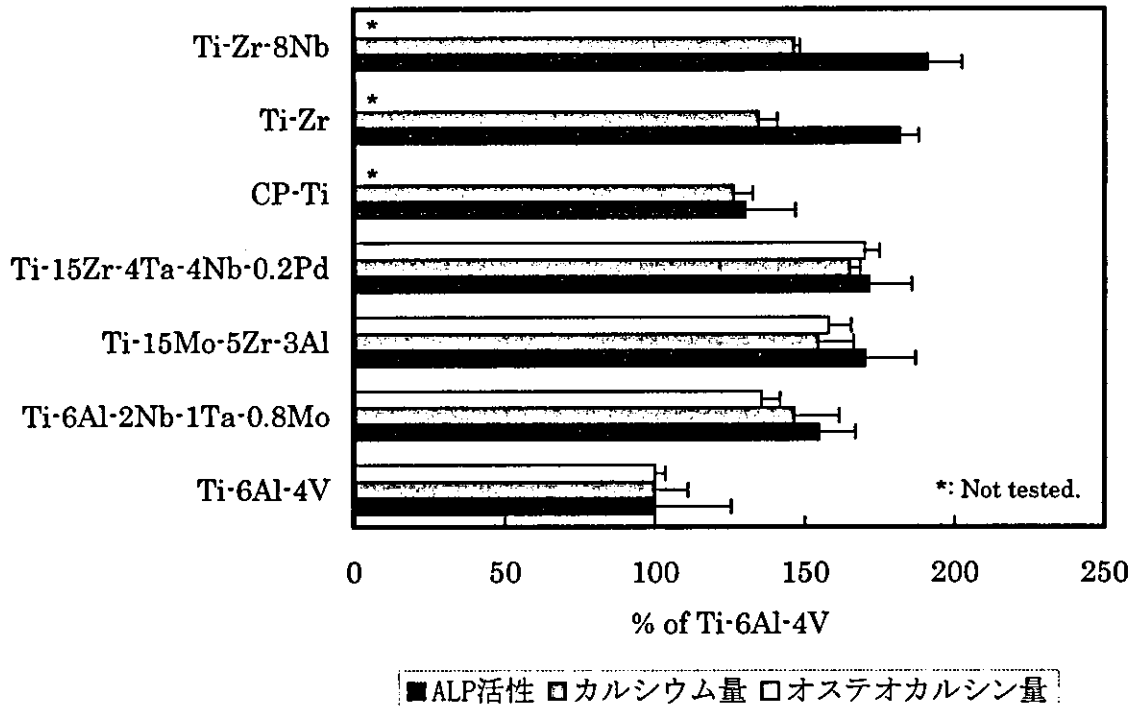


図 3. 骨芽細胞の分化に及ぼすチタン系金属材料の影響

### 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 NHOst 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。

NHOst 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 3 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。

#### D. 考察

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<sup>1)</sup>。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<sup>1,7)</sup>。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。

コロニー法を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<sup>8)</sup>。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<sup>2)</sup>。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 NHOst 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。NHOst 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

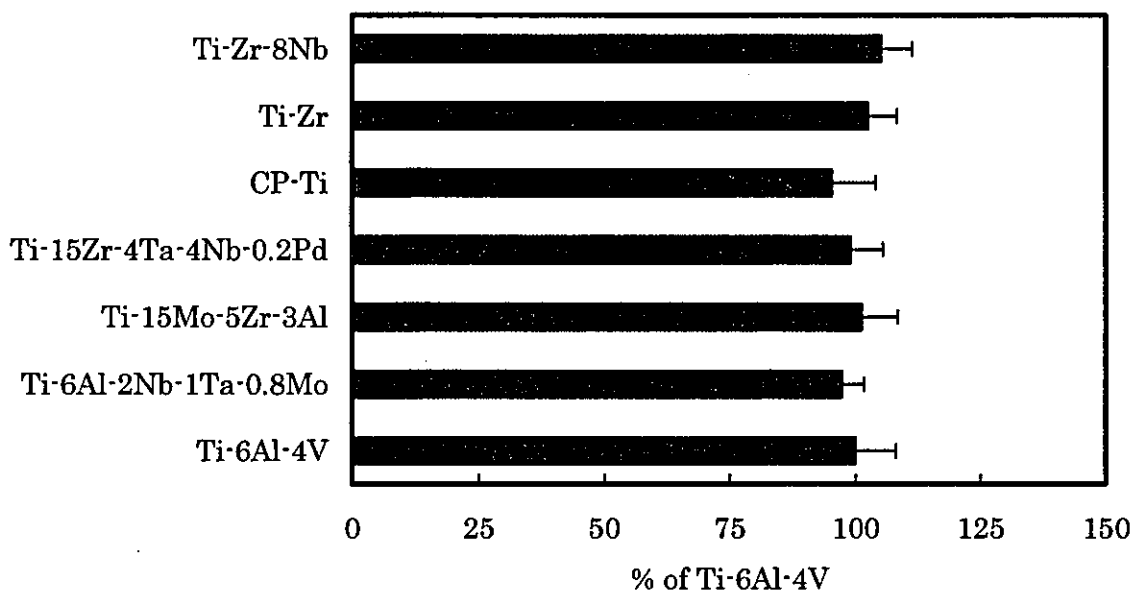


図 4. 骨芽細胞の分化レベルに及ぼすチタン系金属材料の影響

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 4)。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<sup>1,12)</sup>。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<sup>12)</sup>。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<sup>1,6,7,13)</sup>、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。

#### E. 結論

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。

#### F. 参考文献

- 1) 岡崎義光、整形外科用金属材料にみる標準化のメリット、バイオマテリアル、22、343-349 (2004)。
- 2) A. Yamamoto, R. Honma, M. Sumita, Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells, J. Biomed. Mater. Res., 39, 331-340 (1998)。
- 3) 松村英雄、柳田廣明、米山隆之、チタン合金の歯科補綴への応用、バイオマテリアル、20、403-407 (2002)。
- 4) 伊佐間和郎、土屋利江、遺伝子発現を指標とする化学物質の安全性評価法に関する研究：金属製医用材料のヒト骨芽細胞の骨分化機能に及ぼす影響評価、国立衛研報、121、111-112 (2003)。
- 5) 伊佐間和郎、土屋利江、金属イオン等と骨分化、医療材料・医療機器の安全性と生体適合性 (土屋利江編集)、シーエムシー出版、東京、230-234 (2003)。
- 6) E. Kobayashi, S. Matsumoto, H. Doi, T. Yoneyama, H. Hamanaka, Mechanical properties of the binary titanium-zirconium alloys and their potential for biomedical materials, J. Biomed. Mater. Res., 29, 943-950 (1995)。
- 7) 高橋正史、小林郁夫、土井寿、米山隆之、浜中人士、ニオブを添加した生体用β型チタン-ジルコニウム基合金の相安定性と力学的性質、日本金属学会誌、64、1120-1126 (2000)。
- 8) 厚生労働省医薬局審査管理課、生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について、医療機器審査 No.36 (平成 15 年 3 月 19 日)。
- 9) K. Isama, A. Matsuoka, Y. Haishima, T. Tsuchiya, Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity to fibroblast L929 and V79 cells, Mater. Trans., 43, 3155-3159 (2002)。
- 10) K. Isama, T. Tsuchiya, Effect of γ-ray irradiated poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells, J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 13, 153-166 (2002)。
- 11) K. Isama, T. Tsuchiya, Enhancing

effect of poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells, *Biomaterials*, **24**, 3303-3309 (2003).

12) Y. Okazaki, E. Gotoh, Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro, *Biomaterials*, **26**, 11-21 (2005).

13) 吉成正雄、歯科インプラントの現状と展望、*バイオマテリアル*、**20**、408-417 (2002)。

〔研究協力者〕

松下富春（日本メディカルマテリアル株式会社）

小林郁夫（東京医科歯科大学学生体材料工学研究所）

## 5. 金属材料の物理的安全性評価手法の開発

佐藤道夫

平成16年度厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品等医療技術リスク評価研究事業)  
分担研究報告書

**金属材料の物理的安全性評価手法の開発**  
(医療機器・医療材料の安全性評価手法の開発に関する研究)

分担研究者 佐藤 道夫 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 室長

**研究要旨：** 医療機器の安全性を評価するために、現行の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最終目的とする。その一環として、金属材料を使用した医療機器について、医療機器での不具合報告、安全性評価手法を検索すると共に、近年、広汎に使用されつつあるチタン・ニッケル(Ti/Ni)合金の安全性評価手法の開発を行う。まず、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。これらから、人工股・膝関節、プレート、スクリューに重点を置くべきと判断した。これらの情報を参考に、JISやISO、ASTMに掲載されている金属・合金に関する規格、試験法を調査した。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。

**A. 研究目的**

本研究では、医療機器の安全性を評価するために、現行の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最終目的とする。その一環として、金属材料を使用した医療機器について、医療機器での不具合報告、安全性評価手法を検索すると共に、近年、広汎に使用されつつあるチタン・ニッケル(Ti/Ni)合金の安全性評価手法の開発を行う。Ti/Ni合金は、形状記憶という優れた性能があるため、適用範囲がステントを含め、拡大しつつある。しかし、ニッケル(Ni)を多く含んでいるため、そのリスクの程度を評価できる手法を開発する必要がある。

**B. 研究方法**

米国の整形外科インプラントの不具合

報告については、平成13,14年度の厚生労働科学研究で報告<sup>1,2)</sup>したが、その中から、金属材料を使用した機器の破損、摩耗、ゆるみに関するものを抽出し、再整理する。

また、厚生労働省に報告された不具合報告<sup>3)</sup>の中で、金属部分の破損が他より多いと思われる整形外科インプラントに関するものを整理する。さらに、回収情報や安全性情報で、金属・合金に関するものを調査する。

これらの不具合等の情報を参考に、JISやISO、及び米国のASTMに掲載されている、金属・合金に関する試験法を調べる。

また、ニッケルのアレルギーに焦点を置いて、米国の整形外科インプラント不具合報告から事例を抽出すると共に、in vivoの動物実験で、生物学的・物理的・化学的