

C. 研究結果

【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【図1】と比べると大きな違いは見られないが、破損【図2】、ゆるみ【図3】、摩耗【図4】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【図5】では、

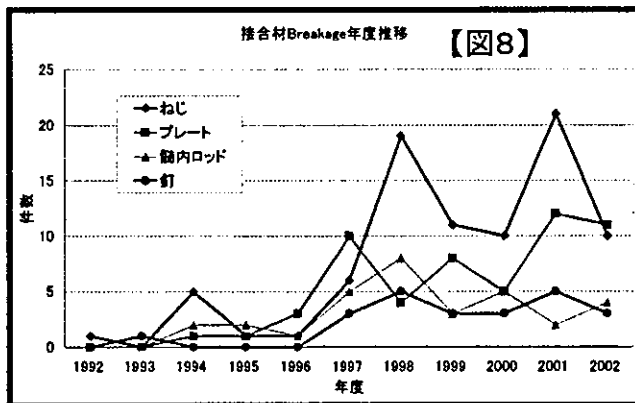
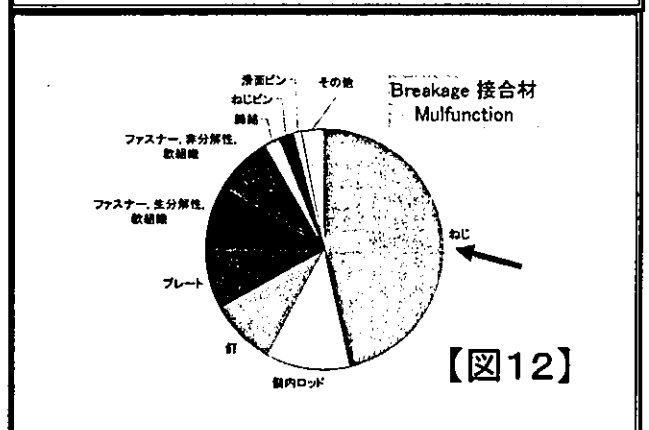
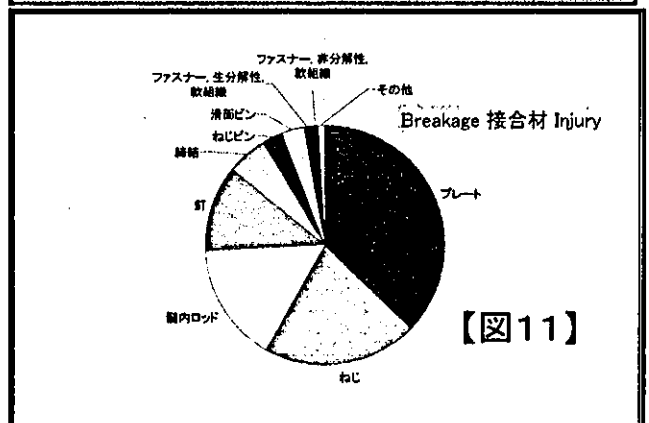
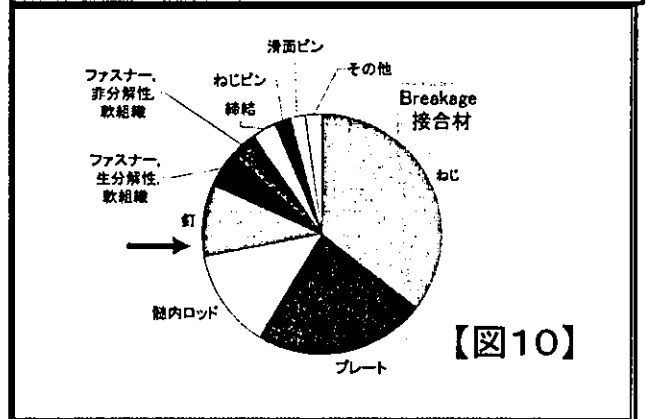
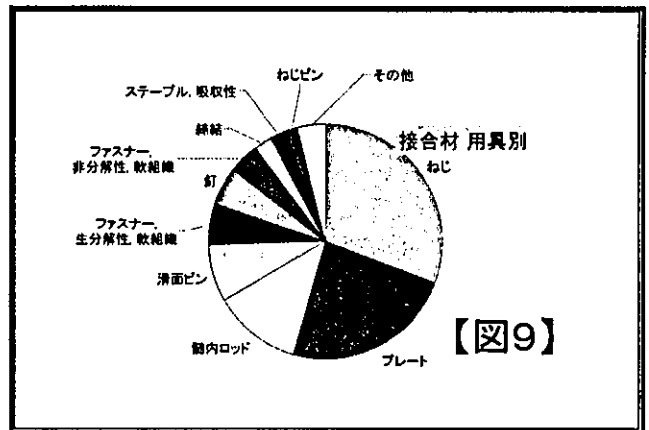
観点から総合的に評価することを目指して、動物に埋植する各種金属材料の選択、製造を行う。

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【図 6】では合金のみと合金+UHMWPE とでは、差がなかったが、破損【図 7】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【図 8】では、ねじ、プレートの破損報告が多いが、髓内ロッド、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【図 9】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【図 10】。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【図 11】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【図 12】では、ねじが他を圧倒して、プレートは 4 位に下がっていた。



【薬事・食品衛生審議会への不具合報告】

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を【表1】に示した。この情報には、材料に

についての詳細は記されていないため、リストアップに留めたが、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、過去のものがまとめて報告された可能性もある。

【表1】 整形外科インプラントに関する不具合報告

一般的名称	販売名	不具合等状況	健康被害状況	参考
一般的名称	脊椎固定システム	メッシュの破損	歩行不能	
	鎖骨プレート	プレートの破損	再手術	
	ポーンプレート	プレートの折損		
	スパイナルシステム	不明		
	骨接合用内副子	製品の破損		
	ステンレス製ワイヤー	縫合針が折損し、胸骨内に残留してしまった		
	骨接合用プレート	骨接合用プレートの破損		他同一不具合:1症例
	チタン骨ネジ	スクリューの折損	スクリュー入れ替え	他同一不具合:5症例
	チタン骨ネジ	スクリューの折損	再手術	他同一不具合:1症例
	フェモラルネイルシステム	9mmARTフェモラルネイルの折損		
	ヒップスクリュー システム	キャプチャードスクリューによる臼蓋穿孔	ワイヤー締結によるキャプチャードスクリュー進入防止装置の再手術	
	ネイル システム	不明	不明	他同一不具合:1症例
	ロッキングネイルシステム	ネイルの破損	不明	他同一不具合:1症例
	ロッキングネイルシステム	遠位スクリューネールの方向違い	なし	他同一不具合:1症例
	スパインシステム	ロッドの破損	不明	
	ヒップスクリューシステムインプラント	プレート折損	再手術	
	ミニフラグメントシステムインプラント	スクリューの折損	スクリュー先端部体内遺残	
	ロッキング コンプレッションプレート システム	プレート折損	再手術	
	ロッキング コンプレッションプレート システム	スクリュー緩み、抜け	再手術	
	スモールフラグメントシステムインプラント	プレート折損	再手術	
フェモラルネイルシステム	折損			
マンディブラーシステムインプラント	プレート折損	再手術		
一般的名称	販売名	不具合等状況	健康被害状況	参考
人工股関節	インターオベカップリビジョン	ルースニング		
	カップ用インサート	インサートの脱転		
	カップシステム	インサートの脱転	なし	
	カップ	アルミナセラミック製インサートの破損		他同一不具合:1症例
	人工股関節システム	ハイポールカップとヘッドの分離	再手術	
	ヒンジニー	モジュラスシステムエクステンションと大腿骨コンポーネントの分離 脛骨インサートの摩耗		
	ステム	製品の破損	人工関節の機能不全又は機能低下	
	ステム	製品の破損	人工関節の機能不全又は機能低下	他同一不具合:2症例
	ボール	製品の破損	人工関節の機能不全又は機能低下	
	ステム	製品の破損		
ハイポール	製品の破損			
臼蓋カップ	製品の破損	人工関節の機能不全又は機能	他同一不具合:52症例	
臼蓋カップ	製品の破損		他同一不具合:10症例	
一般的名称	販売名	不具合等状況	健康被害状況	参考
人工膝関節	人工膝関節	脛骨インサートの摩耗		他同一不具合:2症例
	人工膝関節	脛骨インサートの摩耗	不明	他同一不具合:1症例
	人工膝関節	脛骨インサートの摩耗	疼痛	
一般的名称	販売名	不具合等状況	健康被害状況	参考
人工肘関節	人工肘関節	製品の破損	人工関節の機能不全又は機能	

【医療機器回収の概要】

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を【表2】に示した。

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。

【JIS, ISO, ASTMにおける金属関連の規格】

【表3】、【表4】、【表5-1】、【表5-2】に、それぞれ、JIS, ISO, ASTMにおける金属関連の規格、及び試験法を列挙した。

【表2】 回収報告の記述中に、金属または合金の語を含むものの例

クラス	一般的名称
II	体外型ペースメーカ
II	歯科用インプラント材
II	セラミックス製人工骨及び補綴材料
II	心臓ペースメーカの付属品(電気生理検査用、一時的ペーシング用カテーテル電極)
II	歯科一般用ユニット
I	ステント
II	1)滅菌済み中心静脈注射用チューブ及びカテーテル 2)その他のディスポーザブルチューブ、カテーテル及び周辺関連器具
II	人工股関節
II	人工肺用血液回路
II	膜型人工肺
II	その他の除細動器及び関連機器(除細動器用使い捨て電極)
II	機械的人工心臓弁
III	歯科鑄造用金合金
III	歯列矯正用金属器材
II	植込み型心臓ペースメーカ
II	歯科非鑄造用チタン合金
III	他に分類されない歯科用金属
II	骨接合用品(ワイヤー及び付属品)
II	その他の滅菌済み血管用チューブ及びカテーテル(大動脈内バルーンカテーテル)
	その他の骨接合用品(骨接合ワイヤー)
	滅菌済み体内植込みチューブ及びカテーテル
	金属製人工関節

【表3】 JISでの金属・合金に関する試験の例

規格番号	表題	
JIS T 0302:2000	金属系生体材料のアノード分極試験による耐食性の評価方法	Testing method for corrosion resistance of metallic biomaterials by anodic polarization measurement
JIS T 0304:2002	金属系生体材料の溶出試験方法	Testing method for metal release from metallic biomaterials
JIS T 0305:2002	擬似体液中での異種金属間接触腐食試験方法	Testing method for galvanic corrosion in pseudo physiological solution
JIS T 0306:2002	金属系生体材料の不動態皮膜のX線光電子分光法(XPS)による状態分析	Analysis of state for passive film formed on metallic biomaterials by X-ray photoelectron spectroscopy
TR T 0001:1997	金属系インプラント材料の細胞適合性評価方法	Evaluation of cytocompatibility for implant alloys
TR T 0002:1997	金属系インプラント材料の耐食性の電気化学的評価方法	Electrochemical evaluation of corrosion resistance for implant alloys

【表4】 ISOでの金属・合金に関する試験の例

規格番号	表題	
ISO 5835:1991	Implants for surgery — Metal bone screws with hexagonal drive connection, spherical under-surface of head, asymmetrical thread — Dimensions	外科用インプラント—六角の駆動接続部、ヘッドのき—球形下面、非対称形のねじを持つ骨用金属ねじ—寸法
ISO 5836:1988	Implants for surgery — Metal bone plates — Holes corresponding to screws with asymmetrical thread and spherical under-surface	外科用インプラント—骨用金属板—非対称形のねじ及び球形下面を持つねじの穴
ISO 6475:1989	Implants for surgery — Metal bone screws with asymmetrical thread and spherical under-surface — Mechanical requirements and test methods	外科用インプラント—ねじ山が非対称計で仮面が球形の金属製骨用ねじ—機械的要求事項及び試験方法
ISO 7206-2:1996	Implants for surgery — Partial and total hip joint prostheses — Part 2: Articulating surfaces made of metallic, ceramic and plastics materials	・外科用インプラント—人工骨頭及び全人工股関節—第2部:金属、セラミック及びプラスチック部材の摺動部表面
ISO 7207-2:1998	Implants for surgery — Components for partial and total knee joint prostheses — Part 2: Articulating surfaces made of metal, ceramic and plastics materials	・外科用インプラント—人工骨頭及び全人工膝関節—第2部:金属、セラミック及びプラスチック部材の摺動部表面
ISO 9268:1988	Implants for surgery — Metal bone screws with conical under-surface of head — Dimensions	外科用インプラント—頭部円錐内面を持つ金属骨ねじ—寸法
ISO 9269:1988	Implants for surgery — Metal bone plates — Holes and slots corresponding to screws with conical under-surface	外科用インプラント—金属骨プレート—円錐内面を持つねじに対応する穴及びすりわり
ISO 9583:1993	Implants for surgery — Non-destructive testing — Liquid penetrant inspection of metallic surgical implants	・外科用インプラント—非破壊検査—金属製外科用インプラントの液浸透探傷検査
ISO 9584:1993	Implants for surgery — Non-destructive testing — Radiographic examination of cast metallic surgical implants	・外科用インプラント—非破壊検査—鑄造金属製外科用インプラントの放射線撮影試験
ISO 12891-2:2000	Retrieval and analysis of surgical implants — Part 2: Analysis of retrieved metallic surgical implants	・外科用インプラントの抽出及び解析—第2部:抽出した金属外科用インプラントの解析
ISO 15142-1:2003	Implants for surgery — Metal intramedullary nailing systems — Part 1: Intramedullary nails	外科用インプラント—髓内金属釘固定法—第2部:髓内ピン
ISO 15142-2:2003	Implants for surgery — Metal intramedullary nailing systems — Part 2: Locking components	外科用インプラント—髓内金属釘固定法—第2部:固定部品
ISO 15142-3:2003	Implants for surgery — Metal intramedullary nailing systems — Part 3: Connection devices and reamer diameter measurements	外科用インプラント—髓内金属釘固定法—第3部:結合装置及びリーマ直径の測定
ISO 16429:2004	Implants for surgery — Measurements of open-circuit potential to assess corrosion behaviour of metallic implantable materials and medical devices over extended time periods	外科用インプラント—金属インプラント材料及び医療用具の長期間にわたる腐食挙動を評価するための開放電位差の測定
ISO 17853:2003	Wear of implant materials — Polymer and metal wear particles — Isolation, characterization and quantification	インプラント材料の磨耗—重合体及び金属磨耗粒子—分離、特性付け及び定量化

【表 5 - 1】 ASTM での金属・合金に関する試験の例

Test Method
F2129-04 Standard Test Method for Conducting Cyclic Potentiodynamic Polarization Measurements to Determine the Corrosion Susceptibility of Small Implant Devices
F2131-02 Standard Test Method for In Vitro Biological Activity of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) Using the W-20 Mouse Stromal Cell Line
F2149-01 Standard Test Method for Automated Analyses of Cells—the Electrical Sensing Zone Method of Enumerating and Sizing Single Cell Suspensions
F2182-02a Standard Test Method for Measurement of Radio Frequency Induced Heating Near Passive Implants During Magnetic Resonance Imaging
F2183-02 Standard Test Method for Small Punch Testing of Ultra-High Molecular Weight Polyethylene Used in Surgical Implants
F2193-02 Standard Specifications and Test Methods for Components Used in the Surgical Fixation of the Spinal Skeletal System
F2213-04 Standard Test Method for Measurement of Magnetically Induced Torque on Passive Implants in the Magnetic Resonance Environment
F2214-02 Standard Test Method for In Situ Determination of Network Parameters of Crosslinked Ultra High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE)
F2255-03 Standard Test Method for Strength Properties of Tissue Adhesives in Lap-Shear by Tension Loading
F2256-03 Standard Test Method for Strength Properties of Tissue Adhesives in T-Peel by Tension Loading
F2258-03 Standard Test Method for Strength Properties of Tissue Adhesives in Tension
F2259-03 Standard Test Method for Determining the Chemical Composition and Sequence in Alginate by Proton Nuclear Magnetic Resonance (1H NMR) Spectroscopy
F2260-03 Standard Test Method for Determining Degree of Deacetylation in Chitosan Salts by Proton Nuclear Magnetic Resonance (1H NMR) Spectroscopy
F2267-04 Standard Test Method for Measuring Load Induced Subsidence of an Intervertebral Body Fusion Device Under Static Axial Compression
F2345-03 Standard Test Methods for Determination of Static and Cyclic Fatigue Strength of Ceramic Modular Femoral Heads
F2381-04 Standard Test Method for Evaluating Trans-Vinylene Yield in Irradiated Ultra-High-Molecular-Weight Polyethylene Fabricated Forms Intended for Surgical Implants by Infrared Spectroscopy
F2382-04e1 Standard Test Method for Assessment of Intravascular Medical Device Materials on Partial Thromboplastin Time (PTT)
F2385-04 Standard Test Method for Determining Femoral Head Penetration into Acetabular Components of Total Hip Replacement Using Clinical Radiographs
F2392-04 Standard Test Method for Burst Strength of Surgical Sealants
F382-99(2003) Standard Specification and Test Method for Metallic Bone Plates
F384-00 Standard Specifications and Test Methods for Metallic Angled Orthopedic Fracture Fixation Devices
F543-02 Standard Specification and Test Methods for Metallic Medical Bone Screws
F564-02 Standard Specification and Test Methods for Metallic Bone Staples
F640-79(2000) Standard Test Methods for Radiopacity of Plastics for Medical Use
F732-00 Standard Test Method for Wear Testing of Polymeric Materials for Use in Total Joint Prostheses
F746-87(1999) Standard Test Method for Fitting or Crevice Corrosion of Metallic Surgical Implant Materials
F748-04 Standard Practice for Selecting Generic Biological Test Methods for Materials and Devices
F895-84(2001)e1 Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity
F897-02 Standard Test Method for Measuring Fretting Corrosion of Osteosynthesis Plates and Screws

【表 5 - 2】 ASTM での金属・合金に関する試験の例

Test Method
F1044-99 Standard Test Method for Shear Testing of Calcium Phosphate Coatings and Metallic Coatings
F1089-02 Standard Test Method for Corrosion of Surgical Instruments
F1147-99 Standard Test Method for Tension Testing of Calcium Phosphate and Metal Coatings
F1160-00e1 Standard Test Method for Shear and Bending Fatigue Testing of Calcium Phosphate and Metallic Medical and Composite Calcium Phosphate/Metallic Coatings
F1223-04a Standard Test Method for Determination of Total Knee Replacement Constraint
F1264-03 Standard Specification and Test Methods for Intramedullary Fixation Devices
F1325-91(2002) Standard Specification for Stainless Steel Suture Needle Holders-General Workmanship Requirements and Corresponding Test Methods
F1536-95(1999) Standard Test Method for Determining Strength and Setting Time of Synthetic Water-Activated Polyurethane Fiberglass Orthopaedic Casting Tape
F1541-02 Standard Specification and Test Methods for External Skeletal Fixation Devices
F1635-04 Standard Test Method for in Vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants
F1659-95 Standard Test Method for Bending and Shear Fatigue Testing of Calcium Phosphate Coatings on Solid Metallic Substrates
F1717-04 Standard Test Methods for Spinal Implant Constructs in a Vertebroectomy Model
F1800-04 Standard Test Method for Cyclic Fatigue Testing of Metal Tibial Tray Components of Total Knee Joint Replacements
F1820-97(2003) Standard Test Method for Determining the Axial Disassembly Force of a Modular Acetabular Device
F1829-98(2003) Standard Test Method for Static Evaluation of the Glenoid Locking Mechanism in Shear
F1854-01 Standard Test Method for Stereological Evaluation of Porous Coatings on Medical Implants
F1874-98(2004) Standard Test Method for Bend Testing of Needles Used in Surgical Sutures
F1926-03 Standard Test Method for Evaluation of the Environmental Stability of Calcium Phosphate Coatings
F1978-00e1 Standard Test Method for Measuring Abrasion Resistance of Metallic Thermal Spray Coatings by Using the Taber™ Abraser
F2004-03 Standard Test Method for Transformation Temperature of Nickel-Titanium Alloys by Thermal Analysis
F2009-00 Standard Test Method for Determining the Axial Disassembly Force of Taper Connections of Modular Prostheses
F2028-02 Standard Test Methods for the Dynamic Evaluation of Glenoid Loosening or Disassociation
F2052-02 Standard Test Method for Measurement of Magnetically Induced Displacement Forces on Medical Devices in the Magnetic Resonance Environment
F2077-03 Test Methods For Intervertebral Body Fusion Devices
F2079-02 Standard Test Method for Measuring Intrinsic Elastic Recoil of Balloon-Expandable Stents
F2082-03 Standard Test Method for Determination of Transformation Temperature of Nickel-Titanium Shape Memory Alloys by Bend and Free Recovery
F2118-03 Test Method for Constant Amplitude of Force Controlled Fatigue Testing of Acrylic Bone Cement Materials
F2119-01 Standard Test Method for Evaluation of MR Image Artifacts from Passive Implants

【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る。

○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がある。

○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。

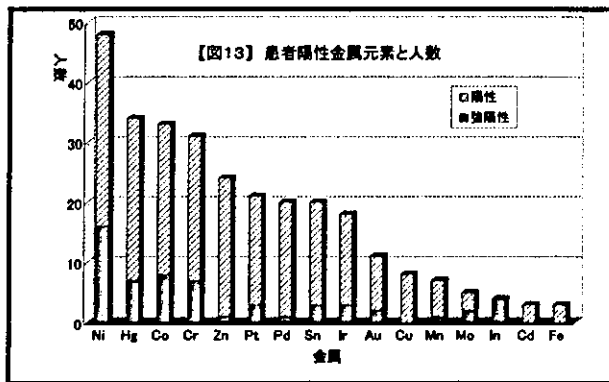
D. 考察

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、若しくは臼蓋のみの機器である。全股関節型のもは、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⁴⁾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⁵⁾を【図13】に示したが、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⁶⁾とも比較しながら、動物での組織反応と抽出した合金材料の物理的・化学的試験を行う予定である。

E. 結論

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。

F. 参考文献

1. 佐藤道夫、整形外科インプラントの不具合情報データに関する研究、平成13年度厚生労働科学研究報告書(2002)
2. 佐藤道夫、整形外科インプラントの不具合情報データに関する研究、平成14年度厚生労働科学研究報告書(2003)
3. 薬事・食品衛生審議会(H16.1.28、H16.11.29)会議資料から抜粋
4. チェアーサイドの歯科とアレルギーガイドブック、デンタルダイヤモンド社、海老原全他編著(2004)、p.41の図5よりデータのみを抜粋
5. 歯科と金属アレルギー、デンタルダイヤモンド社、井上昌幸他編著(1993)、p.112-115
6. Y. Ikarashi, T. Tsuchiya et al, Tissue Reactions and Sensitivity to Iron-Chromium Alloys, Materials Transactions, 43, 3065-3071 (2002)

6. Ti-Ni 合金の安全性評価手法の開発

小林郁夫

厚生科学研究費補助金(医薬品安全総合研究事業)
研究分担報告

Ti-Ni 合金の安全性評価手法の開発

分担研究者:小林郁夫(東京医科歯科大学生体材料工学研究所)

研究要旨

ステントをはじめとする種々の医療用具に Ti-Ni 合金を使用することが増えてきている。しかしながら、Ti-Ni 合金の主要成分のひとつである Ni にはアレルギー性などが指摘されており、生物学的安全性を詳しく調べる必要性は高い。本研究では、Ti-Ni 合金の擬似生体環境中での耐環境性評価を中心とした、種々の調査を行い、同合金の安全性を評価するとともに、最終的には有効な安全性評価手法の確立を目的としている。そのためには、Ti-Ni 合金以外の生体用合金まで対象を広げて比較検討を行う。擬似生体環境中も腐食性の度合いの異なる環境を用意し、相互に比較検討する。最終的な目標達成のため、別に行う *in vivo* の成果と比較参照し、有効な安全性評価プロトコルの確立をはかる。

1. 研究目的

医療用具・医療器具に使われる生体用金属材料には種々の材料がある。Co-Cr合金、ステンレス鋼、チタン合金などがその代表であるが、これらの合金は構造用材料として十分な特性を有しており、生体内やさまざまな医療現場で広く使われている。

一方で、生体内で使用される機能性金属材料の代表として Ti-Ni 形状記憶合金が知られている。この材料の持つ形状記憶特性や超弾性特性などといった特殊な物性を医療用具として有効に利用しようというのがその目的である。すでに歯科矯正用ワイヤー、根管治療用ファイル、カテーテル用ガイドワイヤなどに使用されている。この合金のもつ優れた耐摩耗性に着目して、人工関節などに応用しようとい

うアイデアも提案されている。

近年、低侵襲医療技術の開発と応用が注目を集めているが、現在一般的に行われている低侵襲医療技術の代表としてステントによる動脈形成がある。心筋梗塞などを引き起こす動脈等の狭窄に対する治療として、ステントによる狭窄部の拡張を行うものである。ステントとは Fig. 1 に示したような筒状の金属メッシュで、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。

ここでも Ti-Ni 形状記憶合金が利用されていて、自己拡張型と呼ばれるタイプのものは、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もと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。

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。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、Fig. 2 に示したような結果を得ている。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 Fig. 3 に示したよう

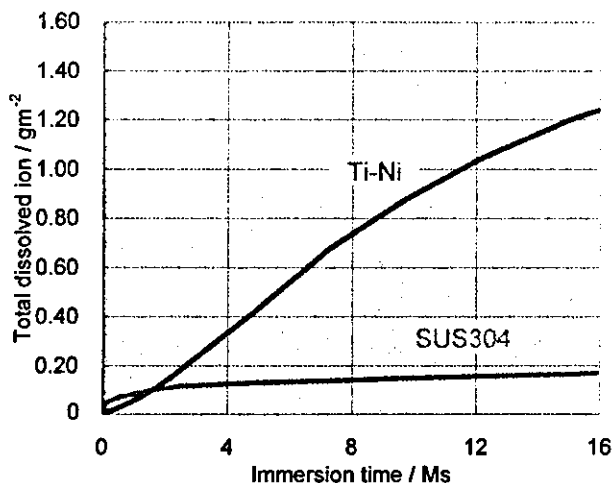


Fig. 2 超弾性 Ti-Ni 合金細線の溶出試験の結果。1.0%乳酸水溶液中。

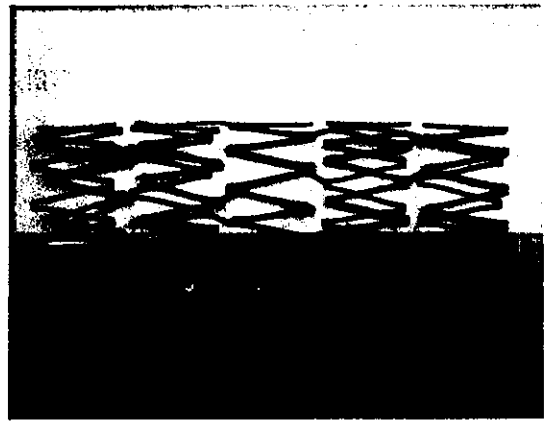


Fig. 1 超弾性 Ti-Ni 合金製冠動脈用ステント(φ=約 3 mm)。

な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。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,

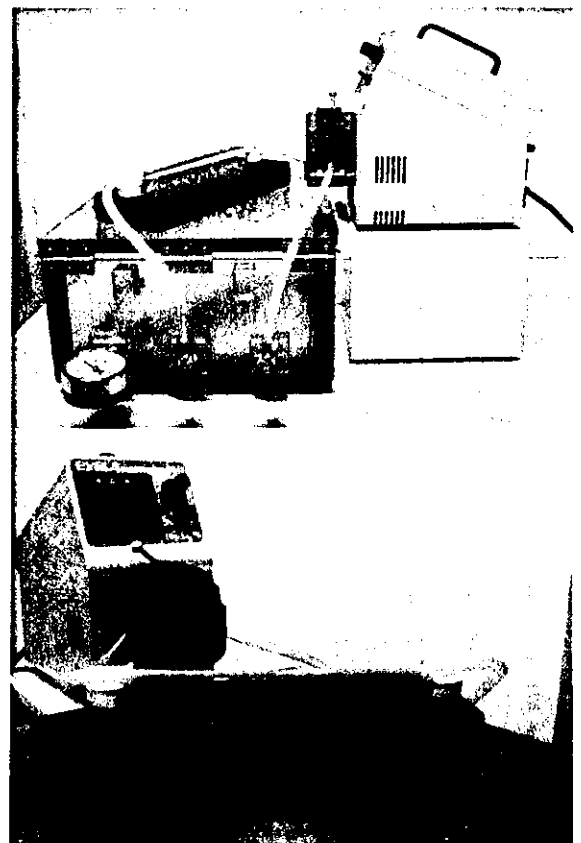


Fig. 3 超弾性 Ti-Ni 合金製ステント用疲労試験機(試作品)。上:側面からの全体像, 下:試験部付近の拡大図

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

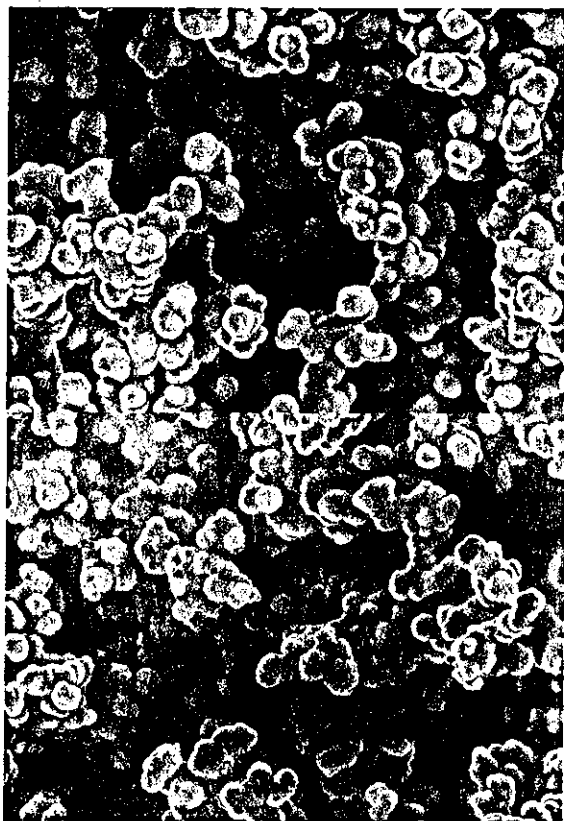


Fig. 4 SBF 浸漬7日後におけるTi-Ni合金表面のSEM写真(上) リンス3s, (下)攪拌1h.

る方法を開発することを最終目的としている。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。

2. 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(φ8 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観察結果をFig. 4に示す。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分析の結果をFig. 5に示す。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1~4 μm 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3~4 μm 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。

3. 種々の生体環境中でのTi-Ni合金の耐食性評価

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

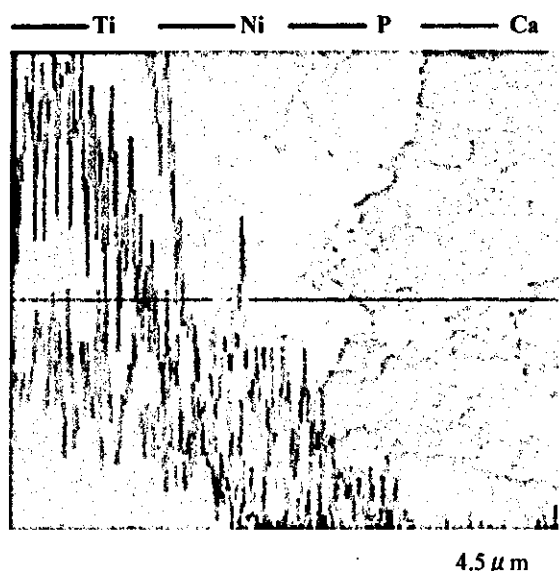


Fig. 5 SBF 浸漬3日後におけるTi-Ni合金表面のSEM-EDX結果(攪拌1h)。

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。Fig.6に各種生体用合金の0.9%NaCl溶液、1.0%乳酸溶液中でのアノード分極曲線を示す。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。

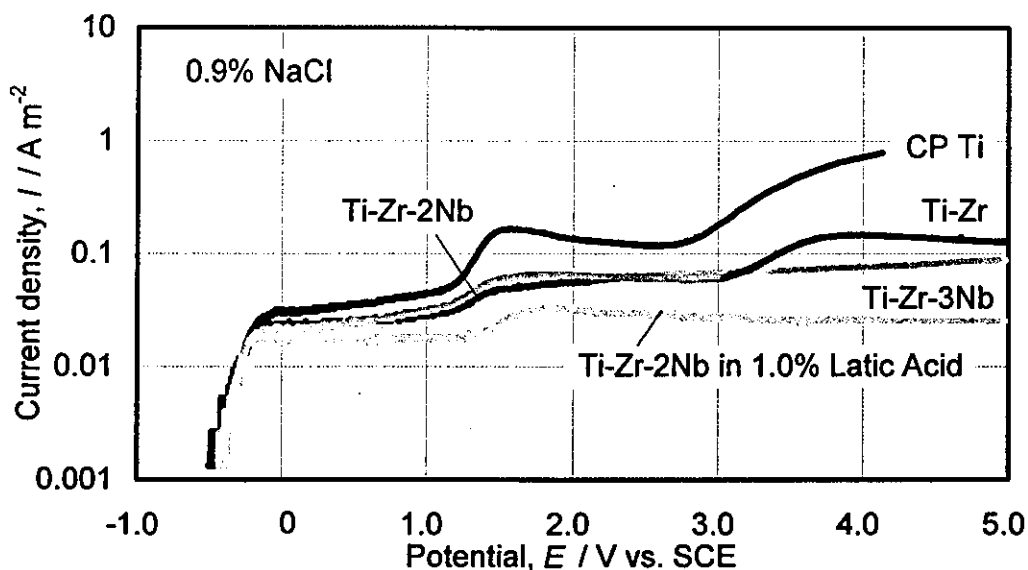


Fig. 6 0.9%NaCl溶液、1.0%乳酸溶液中での各種生体用合金のアノード分極曲線。

7. 人工硬膜に使用される触媒(ジブチル酸スズ、オクチル酸スズ)、及び人工硬膜材料(乳酸ポリマー)のアストロサイトの生存率
に及ぼす影響に関する研究

角田正史

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)
分担研究報告書

人工硬膜に使用される触媒（ジブチルスズ、オクチルスズ）、及び人工硬膜材料（乳酸ポリマー）のアストロサイトの生存率に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 角田 正史 北里大学医学部助教授

研究要旨：人工硬膜などの合成に触媒として使用される、ジブチルスズ化合物やオクチルスズ化合物の神経系への影響を評価するために、アストロサイト系培養細胞の生存に対する影響を調べた。また人工硬膜の材料である乳酸ポリマーについて、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も、アストロサイトへの影響を調べた。ジブチルスズは標的臓器である免疫細胞と比較可能なレベル（1.5 μ M）で細胞生存率の低下を示したが、オクチルスズは 100 μ M の曝露でも生存率の低下を示さなかった。乳酸ポリマーでは、スズを大量に含んだものでのみ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。

角田正史 北里大学医学部衛生学
公衆衛生学助教授

A. 研究目的

20 世紀初頭から様々な合成医療材料が使用されてきており、近年、合成生体吸収性人工硬膜が開発された。脳外科手術後にこの製品を使用するならば、以前から問題とされている慢性炎症やウイルス感染などのリスクを避けることができ、使用する利益がある。吸収性人工硬膜を臨床使用するにあたっては人工硬膜の安全性を毒性学の見地から評価しなければならない。しかしながら、現時点では、安全性を評価するのに適当な方法は確立していない。

人工硬膜は乳酸ポリマーの重合体から構成されているものが開発され

ている。乳酸ポリマーの重合に、触媒、ジブチルスズ (DBT) 化合物およびオクチルスズ (2-エチルヘキサン酸スズ) (OT) は必須である。これらのスズ化合物は人工硬膜に残存する。人工硬膜が生体内に埋入され、分解すると脳組織はこれらの化合物に直接曝露されることになる。直接的にこれらの化合物が脳組織に曝露されることが従来は想定されておらず、これらの化合物についての神経毒性は評価されていなかった。DBT 化合物は、血液-脳関門を通過しないとされているので、経口投与などの実験では、その神経毒性は評価されていなかったのである。DBT の主要な毒性としては免疫毒性が指摘されてきた。

一方、トリブチルスズ (TBT) 化合物については神経毒性が主要な毒性の

一つである。TBT のマウスへの亜急性経口投与により、125 ppm の TBT 摂取群では中脳のドーパミン代謝が変化することが報告されている (Tsunoda, et al., 2004)。TBT は、脳内で DBT に分解されることが知られており、この神経毒性に DBT が関与している可能性がある。DBT は脳内に入れば、神経毒性を示す可能性があるのである。つまり、触媒である DBT について神経毒性を評価することは重要なことである。また、通常、触媒としての使用に関しては、DBT:OT=1:9 として使用されるので、OT についても神経毒性を評価する必要がある。

また、人工硬膜の製品自体については、乳酸ポリマー自体の毒性の可能性や、スズとの相互作用で製品中で毒性が上がる可能性があるため、人工硬膜自体の毒性評価も重要である。

毒性の評価法の一つとして、培養細胞を利用する方法がある。培養細胞は、その簡便さから、毒性評価に使えるとすると、その意義は大きい。神経毒性については、評価が確立している培養細胞は少ない。マウスのアストロサイト系細胞として、CRL-2534 (Alliot and Pessac, 1984, Alliot et al., 1996) が開発されている。この細胞を使用して、神経毒性が評価できるかは検討する価値がある。

今回の研究では、DBT について、アストロサイトと同じマクロファージ系の細胞で、免疫毒性の評価に頻用されている J774.1 細胞について、DBT の毒性を把握した上で、DBT のアストロサイト系細胞への毒性を、生

存についてトリパンブルー色素排除法及び培養上清中 LDH で評価した。また、OT についても同様の評価を行った。更に乳酸ポリマーの毒性を、スズとの関連で検討するため、市販の既知のスズ含有乳酸ポリマーに加えて、触媒 (スズ) を使用しない乳酸ポリマー、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毒性を評価した。以上の評価を通じて、合成人工硬膜の触媒である DBT, OT, 材料である乳酸ポリマーの安全性を、アストロサイト系細胞で評価する方法を確立することを本調査の目的とした。

B. 研究方法

被験物質

以下の物質について、細胞の生存率を評価した。触媒として使われる物質として、ジブチルスズジクロリド (di-*n*-butyltin (IV) dichloride (DBT dichloride, 二塩化ジ-*n*-ブチルスズ (IV)、和光、大阪)、オクチル酸スズ octyl acid tin (OT, 2-エチルヘキサノ酸スズ tin(II) 2-ethylhexanoate, 和光) の2つについて検討した。乳酸ポリマーとしては、市販の PLLA 5000 (poly-L-lactic acid 5000, Sn<10ppm, nacalai tesque, 京都)、テラメードで製造を依頼した乳酸ポリマーで触媒 (スズ化合物) を含まないものとして 100-3 (PLLA 3000 触媒なし)、乳酸ポリマーで大量のスズを含んだものとして S3 (PLLA, 分子量 11,000、スズ 590ppm) の3つについて検討した。

細胞及び培養条件

J774.1 細胞：マクロファージ系細胞として、マウスのマクロファージ系細胞である J774.1 細胞 (東北大学加齢研

究所、仙台)を使用した。37℃、5%CO₂の条件下で、5% fetal bovine serum (JRH Bioscience, Lenexa, KS)入り RPMI1640 溶液 (ペニシリン G 100U/ml, ストレプトマイシン 100µg/ml 含有、日研、京都)にて培養を行った。アストロサイト:アストロサイトとして、マウスのアストロサイト系細胞である CRL-2534 (ATCC, Manassas, VA) (Alliot and Pessac, 1984, Alliot et al., 1996)を使用した。37℃、5%CO₂の条件下で、10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA)入り Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen)にペニシリン G (明治製菓、東京) 75U/ml, ストレプトマイシン (明治製菓) 75µg/ml となるように調製したものを培養液として ATCC のプロトコールに従って培養を行った。

曝露

DBT, OT についてはエタノールに溶かしたものを曝露用の原液として使用した。培養液中のエタノールの最終濃度は、0.1%とした。乳酸ポリマーについては、DMSO (細胞培養用、nacalai tesque)に懸濁させ、sonication を用いて溶解、懸濁させたものを曝露用の原液として使用した。DMSO の培養液中の最終濃度は、0.5%とした。

J774.1 細胞への曝露: J774.1 細胞については、TBT に関する先行研究 (Nakano et al., 2004)を参考に、24well の細胞培養プレートに 1×10^6 /well となるように細胞懸濁液を入れ、DBT dichloride を 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 µM の濃度で添加した。群毎の n 数は n=6 とした。DBT 曝露後 18 時間培養した実験、曝露後 18 時間にリポポリサッカライド(LPS)を添加し活

性化後 6 時間培養した実験、曝露後 18 時間に LPS を添加し活性化後 24 時間培養した実験それぞれについて、細胞の生存率を検討した。

アストロサイト系細胞への曝露:アストロサイト系細胞、CRL-2534 については、 2.5×10^5 /well の条件で検討した。群毎の n 数は n=6 とした。被験物質を曝露後、24 時間後に細胞生存率の評価を行った。DBT dichloride については 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 µM の濃度で、OT については、0, 25, 50, 75, 100 µM の濃度で、乳酸ポリマーについては、0, 10, 20, 50 µg/ml の濃度で曝露を行った。

細胞生存の評価

細胞生存の評価は、J774.1 細胞については、トリパンブルー色素排除法で細胞生存率を評価し、アストロサイトについてはトリパンブルー色素排除法及び細胞上清中 LDH 定量の 2 つの方法で行った。培養後、まず細胞上清の一部を採取し、LDH 測定の試料とした。残りの細胞及び上清を懸濁し、トリパンブルー色素排除法を用いて細胞の生存率を検討した。LDH については、乳酸脱水素酵素測定用 ラクテートデヒドロゲナーゼ CII-テストワコー (乳酸基質・テトラゾリウム塩法) (和光) を用い、プロトコールに従い最終的に 560nm の波長で分光光度計を用いて定量を行った。

統計解析

群毎に平均値を算出 (LDH については%control とした上で平均値を算出) し、一元配置分散分析 (ANOVA) で比較した。Post hoc test には Fisher の PLSD 法を用いた。統計ソフトは Statview version 5.0 (SAS Institute, Cary, NC)を用いた。

C. 研究結果

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）への影響を図 1 に示した。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（図 1(A)）。生存率は、曝露濃度が高まるにつれて低下しており、2.0 μM 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 μM 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（図 1(B)）。18 時間培養後、LPS 添加し 24 時間培養した実験（図 1(C)）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 μM 曝露群では、0.5 μM 曝露群と比べても生存率の有意な低下を示した。2.0 μM 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。

図 2 に DBT dichloride 添加によるアストロサイトの生存について示した。トリパンブルー色素排除法による生存率の検討（図 2(A)）では、1.5 μM 曝露群、2.0 μM 曝露群で、対照群、0.5, 1.0 μM 曝露群に比べて有意な生存率の低下を示した。2.0 μM 曝露群では 1.5 μM 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 μM 曝露群、2.0 μM 曝露群で、対照群、0.5, 1.0 μM

曝露群に比べて有意な平均値の上昇を示した。

図 3 に OT の曝露とアストロサイトの生存率について示した。生存率（図 3(A)）、上清中 LDH（図 3(B)）、共に群間で有意性を示さなかった。

図 4 に PLLA 5000 の曝露とアストロサイトの生存率について示した。細胞生存率（図 4(A)）については、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 曝露群で、対照群、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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（図 4(B)）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（図 5(A)）、上清中 LDH（図 5(B)）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は図 6 に示した。細胞生存率（図 6(A)）については、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 曝露群で、対照群、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 曝露群と比べて有意な生存率の低下を示した。上清中 LDH（図 6(B)）については、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 曝露群で平均値の有意な低下を示したが、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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。

D. 考察

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、トリパンブ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あった。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きているので、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れ、TBT で $\text{TNF}\alpha$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 曝露群では、細胞生存率と LDH の結果が相反するものの、50 $\mu\text{g/ml}$ 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、トリパンブルー色素排除法については、細胞カウントの難しさがあり、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。