

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

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 土屋 利江

平成 18(2006 年)年 4 月

## 目次

### I. 総括研究報告

|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| 医療機器・医用材料の安全性評価手法開発に関する研究..... | 総-1 |
| 土屋 利江                          |     |

### II. 分担研究報告

|  |       |
|--|-------|
| 1. 感染因子含有材料の in vivo 動態評価手法の開発.....      | 分-1   |
| 齧島 由二                                    |       |
| 2. 再現性のある滅菌バリデーション達成法に関する研究.....         | 分-27  |
| 新谷 英晴                                    |       |
| 3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発.....                 | 分-39  |
| 五十嵐良明                                    |       |
| 4. 金属材料の安全性評価手法の開発.....                  | 分-51  |
| 佐藤 道夫                                    |       |
| 5. 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-79  |
| 伊佐間和郎                                    |       |
| 6. Ti-Ni 合金の物理的・化学的安全性評価手法の開発.....       | 分-90  |
| 小林 郁夫                                    |       |
| 7. 医歯科材料・インプラントによる皮膚科的症例の安全性評価手法の開発..... | 分-94  |
| 松永佳世子                                    |       |
| 8. 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-110 |
| 澤田 留美                                    |       |

9. 神経機能に及ぼす人工脳硬膜の安全性評価手法の開発

ー人工硬膜頭蓋内埋め込みラットの行動学試験による神経毒性評価ー ..... 分-115  
角田 正史

10. 脊椎固定器具等の力学的安定性評価手法の開発 ..... 分-124  
堤 定美

11. 軟骨修復のヒト臨床使用類似モデルによる有効性・安全性評価手法の開発 ..... 分-128  
脇谷 滋之

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

# I 総括研究報告

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)

平成17年度総括研究報告書

医療機器・医療材料の安全性評価手法開発に関する研究

主任研究者 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所 療品部長

研究要旨：

本研究では、評価試験系の開発と共に、既存の材料における実際の臨床上の安全性との関係についても検討を実施し、臨床との相関性を持った試験方法、ガイドラインを開発する。具体的には、次の課題について取り組み、以下の研究成果を得た。

1. 感染因子含有材料の *in vivo* 動態評価手法の開発

医用材料のグラム陰性細菌汚染による生体影響を評価し、科学的根拠に基づいたエンドトキシン (lipopolysaccharide、LPS) 規格値を設定することを目的として、種々の量の菌体成分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、骨再生に対する影響について検討した。また、抗菌作用および LPS 中和活性を付与した新規抗菌材料の開発にも着手した。

新規抗菌材料の主剤として選択した CAP-18/LL-37 類縁体 (18-mer LLKKK 置換体) は非常に高い抗 LPS 活性を示すと共に、黄色ブドウ球菌や緑膿菌に対して低濃度で抗菌活性を示し、抗菌・抗 LPS 剤として有用であることが判明した。同類縁体の担体として選択した酸処理ゼラチンは徐放性能に優れ、細胞毒性および染色体毒性を示さなかったが、ラット背部皮下および腹腔内埋植試験において顕著な炎症反応を惹起することが確認された。この炎症反応は 18-mer LLKKK アナログにより抑制される傾向が認められた。

2. 再現性のある滅菌バリデーション達成法に関する研究

医療用具に対して最終滅菌を行い、その効果の判定を生物指標の死滅などから評価し、文書化して後、製品が出荷される。これが滅菌バリデーションである。滅菌バリデーション実施後に生残する生物指標菌は損傷菌である。損傷菌は健常菌とは生育性能や栄養要求が異なる。損傷菌の生育を判定できる方法を確立しないと滅菌後に損傷菌が生存したとしてもその生育を確認できないことになる。つまり滅菌効果を過大評価することになる。このことは医療用具の安全性を確保する意味で無視できない。そこで損傷菌の生育性能回復に有効な薬剤の評価、損傷菌の迅速な回復ならびに培地メーカー間の変動をなくすことが普遍的な滅菌バリデーションの確立にとって不可欠となる。本年は乾熱滅菌ならびに高圧蒸気滅菌での生物指標菌でそれらの滅菌で損傷

を受けた生物指標菌を用いて検討した。

### 3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

Local lymph node assay (LLNA)は化学物質の皮膚感作性をリンパ節中の細胞増殖を RI の 3HTdR の取り込み指標として検出する方法である。近年は、RI を使用しない改変法が提案されており、これらの非 RI-LLNA 変法の検出感度を比較した。試験物質をマウスに連続塗布した後、耳介リンパ節の重量及びリンパ節細胞数、リンパ節細胞の ATP 量、alamarBlue 色素取り込み量及び BrdU 取り込み量を測定した。更に、細胞表面抗原を染色し、T 細胞及びサブセット、B 細胞比率をフローサイトメーターによって分析した。試験物質適用群における各反応について溶媒塗布対照群のそれらと比較した増加率(stimulation index、SI)を求めた。リンパ節の摘出時期については塗布後 7 日目に行った場合、活性化率が最も高かった。試験物質の塗布を通常の 3 回連続した場合に加え一定期間後に再度 1 回適用すると、著しく活性化率が増加した。検討した指標のうちリンパ節細胞数、ATP 量及び alamarBlue 取り込み量の SI 値は、BrdU 取り込み量や B 細胞数比率に比べると高い値を示した。感作性物質と刺激性物質は表面抗原の解析による B 細胞の出現率から区別することは困難であつが、リンパ球サブセット比率に関しては若干の変化が認められた。免疫抑制作用を有する dibutyltin chloride は低濃度ではリンパ節細胞の増殖を起こすが、ヘルパー T 細胞比率の低下など溶媒対照群とは変化が生じた。リンパ節細胞の T 及び B 細胞比率の変化は試験物質の作用機構の違いを解析するのに有用かもしれないが、定量性や判定基準の設定など更に検討が必要である。

### 4. 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

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が、人工心臓弁の機能不全は直ちに患者さんの命に関わる重大な問題である。そこで本研究では、人工心臓弁を体に埋植した際の機能不全の原因の一つである血栓形成について、そ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。今年度は昨年度に引き続き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 検体を用いて SNP タイピングを行った。ターゲットとした遺伝子は、VAMP8、TGFβ1、TGFβレセプター I (TGFβRI)、TGFβレセプター II (TGFβRII) の 4 遺伝子、計 6SNP を選択しタイピングを行った。その結果、解析した 6SNP のうちの 3SNP (VAMP8 の c.201A>G と c.138C>T 及び TGFβ1 の c.29C>T) は、すでに日本人での SNP が報告されているものであり、今回の検討においても全て mutant が検出された。一方、残りの 3SNP は日本人での SNP 報告がこれまでにないものであり、やはり今回の検討においても 100 検体全てが Wild Type であった。今年度までに得られた 29SNP 分のデータを対

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。

#### 5. 金属材料の安全性評価手法の開発

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金属材料の安全性評価手法の開発を行うことを最終目的とする。現状を把握するために、米国の医療機器不具合報告を集計し、機器全体、及び埋植機器に関して、各治療分野、機器分類別の総報告数、年推移、不具合内容について解析を行い、各機器の不具合傾向を明らかにした。また、金属アレルギーについても検索を行った。さらに、厚生労働省に報告された不具合報告を整理し、機器分類別に集計して、その傾向を掴むと共に、金属・合金に関するものをリストアップした。

#### 6. 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

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、Ti 合金は一般的に高強度で、耐食性も高く、広範囲の医療機器に応用できる。今年度は、Nb を添加した Ti-Zr 基合金について、細胞毒性および骨芽細胞適合性を評価した。Ti-6Al-4V に弱い細胞毒性が認められたが、Nb 含量にかかわらず Ti-Zr 基合金にはいずれも細胞毒性が認められなかった。また、純金属の Ti、Zr、Nb には細胞毒性が認められなかったが、Al に非常に弱い細胞毒性が認められた。骨芽細胞適合性は、試料の上で直接培養した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。Nb 含量にかかわらず Ti-Zr 基合金は、Ti-6Al-4V と比べて、いずれも骨芽細胞の増殖および分化を促進させた。純金属の Zr、Nb も骨芽細胞の増殖および分化を促進させた。一方、Al は骨芽細胞の増殖を抑制し、分化を顕著に阻害した。Nb を添加した Ti-Zr 基合金は、構成元素の純金属も含めて、いずれも細胞毒性が無く、従来から使用されている Ti-6Al-4V と比べて骨芽細胞適合性にも優れていた。Nb を添加した Ti-Zr 基合金は力学的性質にも特徴があり、生物学的安全性および有効性の高い金属材料として有望である。

#### 7. Ti-Ni 合金の安全性評価手法の開発

Ti/Ni 合金は、形状記憶効果、超弾性特性という性質を有し、歯科矯正用ワイヤーやステントなどの適用範囲が拡大しつつある。しかし、成分元素のおよそ半分が Ni であるため、そのリスクの程度を評価する手法を開発する必要がある。最終的には生体埋入試験を多用せずに材料の安全性を評価する簡易な *in vitro* 試験法を開発し、材料の評価を行う際の判断基準のひとつとすることを目指す。

#### 8. 医歯科材料・インプラントによる皮膚科的症例の安全性評価手法の開発

医歯科材料・インプラントによる皮膚科的症例の安全性評価手法の開発を目的とし

た。まず、金属製インプラントに的を絞り皮膚科的症例の情報を収集した。平成 13 年に筆者らが多施設で共同研究した、ステンレス製冠動脈ステントによる再狭窄例がニッケルの金属アレルギーと関連性を有した結果を紹介した。つぎに当科における金属パッチテストの結果を解析し金属アレルギーの背景を調査した。さらに当科において 1998 年から 2005 年までの 8 年間にインプラントが原因と疑われ金属等のパッチテストを行った症例の臨床経過とパッチテスト結果を検討し、その関連性を評価した。インプラントの金属による皮膚障害を疑った 10 例のうち、金属アレルギーが関与したと確実に考えられるのは 1 例であり、インプラントに含まれる金属にパッチテスト陽性であっても、イオンとして溶出しにくい状況では、皮膚に障害を発症しないことが示唆された。インプラントによる皮膚安全性評価手法を開発するためには、今後より多くの施設に調査を依頼して、retrospective ならびに prospective な皮膚障害例の収集が必要と考えた。

#### 9. 神経機能に及ぼす人工脳硬膜の安全性評価手法の開発

人工硬膜及びジブチルスズ (DBT) を約 300ng 含んだポリ乳酸ラクチドポリマーの膜を、ラットの頭蓋内に手術で埋め込み、神経系への影響を代表的な行動学試験、オープンフィールド試験及び prepulse inhibition (PPI) test で検討した。DBT を 300ng 含む膜を埋め込んだ群では、80dB の prepulse があつた際の反応の抑制率 (%PPI at PP80)が、対照群に比べ有意に低かつた。一方、オープンフィールド試験では、対照群、人工硬膜群、DBT 膜群で有意な差がなかつた。DBT 膜群では、認知機能、学習機能が傷害されていることが示唆され、また PPI test は有効な安全性評価手法である可能性があつた。

#### 10. 脊椎固定器具等の力学的安定性評価手法の開発

現在、脊椎の整形外科的治療法において、スクリューネジを用いた様々な固定器具が用いられており、これらの力学的安定性は ASTM, ISO などで定められた規格による実験的手法によって評価されている。しかし、こうした実験的手法は時間とコストがかかるだけでなく、統計的誤差も大きい。そこで、本研究では、有限要素法を利用した数値シミュレーションによって、脊椎固定器具の力学的安定性を評価する新しい技術の開発を目的とする。

#### 11. 軟骨修復のヒト臨床使用類似モデルによる有効性・安全性評価手法の開発

ヒト臨床類似モデルとして、ミニブタの膝関節軟骨欠損修復モデルを作成した。この動物モデルでは、ヒトと同じ手術を施行可能であり、同じ評価を行え、ヒトのデータとの比較が可能となる。ミニブタ膝関節大腿骨膝蓋溝に作成した直径 12mm 深さ 3mm の骨軟骨欠損を作成し、欠損放置群、担体充填群、担体+骨髄細胞移植群を作成し、6ヶ月後に組織学的に比較した。担体+骨髄細胞移植群が最も優れた修復を示した。



## 分担研究者

土屋利江 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 部長

齋島由二 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 室長

新谷英晴 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 室長

五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所  
環境衛生化学部 室長

澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 主任研究官

佐藤道夫 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 室長

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

小林郁夫 東京医科歯科大学  
生体材料工学研究所 助手

松永佳世子 藤田保健衛生大学  
医学部 教授

角田正史 北里大学 医学部 助教授

堤 定美 京都大学再生医科学研究所  
ナノ再生医工学研究センター 教授

脇谷滋之 大阪市立大学  
医学部 講師

## 協力研究者

迫田秀行 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 研究員

### A. 研究目的

医療機器・医療材料の安全性評価試験系の開発と、既存の材料における実際の臨床上の安全性との関係についても検討を実施し、臨床との相関性を持った試験方法、ガイドラインを開発することを目的とする。具体的には、以下の11課題について取り組む。

### 1. 感染因子含有材料の *in vivo* 動態評価手法の開発

エンドトキシン規格値は製品中のエンドトキシン総含量に基づいて設定されているため実際のリスク強度を反映していない場合が多い。本研究では、材料の適用部位、生体内分解挙動、エンドトキシンの遊離速度や生体内寿命等を評価し、科学的根拠に基づいたエンドトキシン規格値設定法の開発を試みる。また、創傷皮膚治療では損傷部への微生物感染が起こり、治癒の遅延が見られることが多い。そこで本研究では、エンドトキシン中和活性および様々な細菌に対する抗菌活性を持つペプチドを利用した新しいタイプの抗菌創傷被覆剤の開発も目指す。

### 2. 再現性のある滅菌バリデーション達成法に関する研究

医療用品は安全性を求めるために最終滅菌され、一定の無菌性保証が確保され、その結果は再現されなければならない。生物指標を用いる無菌性保証の結果は使用される培地性能に拠って影響を受け、また生物指標の滅菌後の損傷の程度に拠って得られる培地性能の結果が異なる。そこで異なる培地メーカーならびに損傷の程度が異なる生物指標を用いて再現性の得られる無菌性保証法の確立方法について検討した。本報告では乾熱滅菌ならびに高圧蒸気滅菌での生物指標菌を用い、それらの滅菌で損傷を受けた生物指標菌について検討した。

### 3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

モルモット感作性試験の評価は客観性に欠けることからマウス LLNA 法が開

発されたが、アイソトープを用いて評価するため、試験を実施できる施設が限られていた。アイソトープを用いない新たな指標と方法について検討するために、添加剤等の溶出によるアレルギーの誘発能を鋭敏かつ特異的に判定する指標を検索する。増殖反応を検出する新しい色素の使用や関与する表面抗原の検索とそれらの比較をする。

#### 4. 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

人工心臓弁置換に伴い血栓形成を抑制するために医療機器と併用される抗血液凝固薬の効果に対する個人差の原因を明らかにし、医療機器の不具合を起こす原因因子を探ることによって、生死に関わる重大なリスクの低減化を図る。

#### 5. 金属材料の安全性評価手法の開発

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した。近年、広汎に使用されつつあるチタン・ニッケル(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最終的に評価できる手法を開発する。

#### 6. 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

既存の合金材料に比べて格段に優れた新規合金材料を用いて、人工骨としての

安全性・有効性を評価できる手法を開発し、優れた製品の上市化を促進する必要がある。そこで、人工骨用金属合金の安全性・有効性評価において臨床実態に近い評価手法を開発する。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する。

#### 7. Ti-Ni 合金の安全性評価手法の開発

本研究ならびに別途行う *in vivo* 試験の結果を総合することにより、超弾性型 Ti-Ni 合金の安全性評価法を開発を行う。最終的には生体埋入試験を多用せずに材料の安全性を評価する簡易な *in vitro* 試験法を開発し、材料の評価を行う際の判断基準のひとつとすることを目指す。

#### 8. 医歯科材料・インプラントによる皮膚科的症例の安全性評価手法の開発

本研究はインプラント機器による皮膚科的な不具合事例を臨床データおよび障害皮膚の病理組織学的検討を行い、パッチテストなどによる皮膚アレルギー検査によって、不具合の原因、インプラントの組織適合性評価を行うことによって、インプラントによる皮膚科的症例の安全性評価手法の開発を行うことを目的とした。

#### 9. 神経機能に及ぼす人工脳硬膜の安全性評価手法の開発

感染性がなく、安全かつ有効な人工硬膜を提供できるようにする必要があるため、生分解性材料からなる人工硬膜の中枢神経系に及ぼす影響を調べることが目的である。本研究により、細胞や動物実験を使った脳神経毒性の試験方法を確立する。

## 10. 脊椎固定器具等の力学的安定性評価手法の開発

脊椎固定用ネジの長期埋入によるネジ周囲の骨吸収と、ネジの疲労破壊に影響を及ぼす力学的設計因子を明らかにすることで、長期に安定して埋入できるネジの評価法に関する標準化を提言する。

### 11. 軟骨修復のヒト臨床使用類似モデルによる有効性・安全性評価手法の開発

軟骨修復法の安全性あるいは有効性の評価方法が確立されていない。軟骨修復法の評価法を確立するためのヒト臨床使用擬似動物モデル作成し、各種方法の安全性および有効性を評価する。

## B. 研究方法

### 1. 感染因子含有材料の *in vivo* 動態評価手法の開発

本実験で使用したガラス製、金属製、テフロン製器具は使用前に 250°C で 2 時間加熱処理を行った。また、プラスチック製器具はパイロジェンフリーの製品を使用した。

#### (1) スパイク用 LPS および菌体の調製

大腸菌 O111 株を普通ブイヨン培地中、37°C、16 時間振とう培養後、培養液の pH を中性に調整し、100°C、10 分間加熱して殺菌した。同加熱死菌体を連続遠心分離により集菌し、蒸留水で 3 回洗浄した後、エタノール、アセトンおよびジエチルエーテルにより順次脱脂し、乾燥菌体とした。大腸菌 O3 K2a,K2b:H3 ATCC 株由来 LPS は、同様の方法により調製した乾燥菌体からフェノール/水法により抽出し、Dnase/RNase 処理後、

超遠心分離の反復により精製した。調製した大腸菌 O3 K2a,K2b:H3 由来 LPS および大腸菌 O111 菌体の LPS 活性強度は、それぞれ 27.5 EU/ng および 0.159 EU/ng であった。

#### (2) LPS および菌体スパイク標品の調製

医用材料としては、ブタ皮膚由来アテロコラーゲン (Type I & Type III : 日本ハム製) を使用した。同コラーゲンに種々の量の O111 株乾燥菌体を添加し、60°C で凍結乾燥後、直径 1.6 cm、厚さ 1.5 mm の弱架橋化コラーゲンシートを調製した。また、同シートに 10 kGy/hr の速度でガンマ線を平面照射し、生分解速度の異なる試料を調製した。

#### (3) LPS 含量の測定

コラゲナーゼ (Sigma 社製 Type 1A-S) 溶液 1 ml (1 mg/ml in 5mM HEPES Buffer) を平衡化した Profos 社製 EndoTrap Blue ゲル 100 µl 入りの試験管に加え、4°C で 8 時間、ロータリーシェーカーを使用して緩やかに攪拌した後、同混合液の全量をもう 1 本の EndoTrap Blue ゲル 100 µl 入りの試験管に移した。引き続き、4°C で 16 時間、同様にインキュベーションした後、遠心して上清を採取し、精製コラゲナーゼ溶液とした。

正確に重量を測定したコラーゲンシート (10 mg) を HEPES 緩衝液 (5 mM, pH 7.3) 中、37°C で 16 時間、精製コラゲナーゼ (0.1 mg/ml) により消化した。処理液を塩酸酸性 (pH 3, 最終容量 2 ml) とし、氷冷下、10 分間超音波処理後、その遠心上清を原液として注射用蒸留水を用いて希釈系列を作製した。

リムルス活性は第 14 改正日本薬局方「エンドトキシン試験法」に準拠し、カイネティック比色法により定量した。定量試薬としてエンドスペシー ES-50M (エンドトキシン特異的リムルス試薬：生化学工業) を用い、標準品として日本薬局方エンドトキシン標準品 (大腸菌 O55:B5 株 LPS) を使用した。測定装置としては SK603 マイクロプレートリーダー (生化学工業) を使用した。反応干渉因子試験も日本薬局方の記載に準じて行った。

#### (4) 埋植試験および病理学的診断

実験動物としては、7 週齢の Fischer 系雄ラットを用いた。皮下への埋植は、pentobarbital sodium (30 mg/kg, IP 投与) 麻酔下でラット背部正中を 3 cm 切開し、筋膜を鈍的に剥離して空隙を作製し、左右各 1 箇所 to コラーゲンシートを挿入後、皮膚縫合した。肝臓への被覆は、麻酔下、上腹部を 2.5 cm 切開し、肝臓表面に作製した直径 1 cm、深さ 2 mm 程度の欠損部位にコラーゲンシートを被覆した後、腹直筋および皮膚を縫合し、ガラクトサミン (GlaN) 塩酸塩 (200 µg/ml, 1 ml) を腹腔内投与した。ラット頭蓋骨の窩洞は、麻酔下、背位に固定し、頭部正中を 3 cm 切開して骨膜を鈍的に剥離した後、歯科用エンジンを用いて頭頂骨の両側に 5 mm×5 mm の骨欠損として形成した。窩洞部分には、コラーゲンシート (5 mm×5 mm) を被覆し、皮膚縫合した。大腿骨への埋植は、麻酔下、左右大腿部を切開して大腿骨を視認し、注射用水を滴下しつつ歯科用エンジンにより直径 1 mm の貫通欠損を作製した後、埋植材を充填し、皮膚縫合した。対照と

して被覆剤を埋植しない実験群も作製した。その他、滅菌生理食塩液または後述した 18-mer LLKKK アナログ溶液 (200 µg/ml) 中、4°C で一晚膨潤させたゼラチンハイドロゲルをラット背部皮下および腹腔内 (正常肝皮膜被覆) に埋植した際の生体反応を評価した。

試料を埋植した後、試験に応じて種々の期間で動物を屠殺した。皮下への埋植材は周囲組織と共に摘出し、10% 中性緩衝ホルマリンを用いて固定した。肝臓埋植群については、麻酔下で心臓採血を行った後、埋植材周囲の肝臓組織およびその他の腹部臓器 (胃・膵・小腸・脾・副腎・腎) を採取した。採取した血液から常法に従い血清を作製し、生化学検査を行ったと共に、各臓器は 10% 中性緩衝ホルマリンにより固定した。また、肝臓埋植群については、手術翌日に致死毒性を判定した。大腿骨および頭蓋骨への埋植を施した動物群は 4 週後に屠殺し、頭蓋骨を採取して 10% 中性緩衝ホルマリンにより固定し、骨周囲の軟組織による X 線の減弱や散乱行の影響を除くため頭蓋骨のみを切除し、撮影条件の均質化を得るためにサンプルをアルミステップウェッジと共に軟 X 線撮影した後、10% ギ酸により脱灰を行った。各埋植試験試料は、固定または脱灰終了後、常法に従ってパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を施して病理組織学的に検索した。軟 X 線写真の解析には、WinROOF ソフトウェアを使用し、画像データ中に設定した関心領域 (Region of Interest, RIO) 内の任意に定めた閾値以上の最大平均ピクセル値を計測し、窩洞部に形成された新生骨量を数値化した。

#### (5) CAP-18 類縁体の化学合成

CAP-18 類縁体である 18-mer LLKKK 置換体 (K<sup>15</sup>LF KRI VKR ILK FLR KLV<sup>32</sup>) は、ペプチド合成機を使用して、Fmoc 基を用いる固相法により合成した。Resin には、Fmoc-Amide Resin (導入量: 0.65mmol/g, 311.8mg) を用い、0.2mM スケールで合成し、N 末端をアセチル化した。TFA およびスカベンジャー (H<sub>2</sub>O、結晶フェノール、ethane dithiol、thioanisole) を加えて切り出しを行った後、エーテルにより沈殿させた結晶を H<sub>2</sub>O で溶解して凍結乾燥し、C 末端がアミド化された粗ペプチド (250.4mg) を得た。粗ペプチドを AcOH/H<sub>2</sub>O に溶解し、HPLC にて精製を行った (最終収量 103.1 mg、精製効率 41.2%、純度 95%以上)。また、分子量の確認は AB4700 質量分析計 (アプライド製 MALDI TOF/TOF) により行った (Matrix = CHCA、Positive ion mode)。

#### (6) 抗菌力試験

菌株としては、黄色ブドウ球菌 209P 株および緑膿菌の 2 種を使用し、抗菌剤としては、CAP-18 類縁体 (18-mer LLKKK アナログ)、ポリミキシン B、ストレプトマイシン、ペニシリン G の 4 種を使用した。NCCLS M7-A5 の変法に基づき、滅菌生理食塩液を用いて、1 x 10<sup>6</sup> 個/ml の試験菌液を調製した。各種抗菌剤は Mueller Hinton II Broth を用いて、1 mg/ml から 0.025 µg/ml の濃度範囲で 2 倍希釈系列を作製した。試験菌液 90 µl を U 字型 98 ウェルプレートに分注し、種々の濃度の抗菌剤 90 µl および AlamarBlue20 µl を添加し、ウェルシー

ルを貼った後、37°C で 16 時間培養した。また、抗菌剤の代わりに Mueller Hinton II Broth のみを添加した試験群を陽性対照とした。培養終了後、遠心上清 100 µl を平底 98 ウェルプレートに分注し、プレートリーダーを用いて、570 nm および 600 nm における吸光度 (O.D.) を測定し、その比から kill(%) を算出した。加群の O.D. 比

#### (7) 抗 LPS 活性試験

18-mer LLKKK アナログと LPS または菌体を種々の濃度で 37°C、30 分間インキュベーションした後、リムルス活性と IL-6 産生誘導能を測定した。リムルス活性阻害の対照物質として、ポリミキシン B を使用した。IL-6 産生誘導能の評価には、ヒト単球様細胞株 Mono-Mac-6 からクローニングした LPS 高感度応答性の亜株 MM6-CA8 を用いた。同細胞を calcitriol (1,25-dihydroxy- vitamin D<sub>3</sub>; 10 ng/ml) により 72 時間刺激した後、1 × 10<sup>6</sup> cells / 0.9 ml / well となるように 24-well プレートに分注し、試料を 0.1 ml 添加して 17 時間培養した。その後、培養上清中のインターロイキン 6 (IL-6) の濃度を市販の ELISA キット (R&D) を用いて測定した。

#### (8) 18-mer LLKKK アナログ徐放試験

徐放基材として、8 種のゼラチンハイドロゲル (スルホアセチル化誘導体、コハク化誘導体、アルカリ処理ゼラチン [pI=5]、酸処理ゼラチン [pI=9]、アルキル化 (C11) 誘導体、エチレンジアミン導入アミノ化誘導体) を使用した。各ゼラチンハイドロゲル 2 mg をエッペンチューブに採取し、18-mer LLKKK アナロ

グ水溶液 200  $\mu\text{l}$  (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加し、4°Cで一晩膨潤させた後、過剰な 18-mer LLKKK アナログ溶液を除去した。同チューブに蒸留水 1 ml を添加し、30 分間緩やかに振とうした後、蒸留水を全量回収した。その後、同様の操作を繰り返し、1、2、4、8、16、24 時間後の溶出挙動を追跡した。18-mer LLKKK アナログの定量は LC-MS/MS (アプライド製 QTRAP 4000 Pro) を用いた MRM 分析 (ESI positive mode: Q1=469.0, Q3=84.2) により行った。HPLC カラムには Shodex RSpak DE-213 (2 x 150 mm) を使用し、溶離液には 0.1%ギ酸 (A 液) と 0.1%ギ酸含有アセトニトリル (B 液) を用いた (グラジエント条件: 18.8% → 95% B 液 / 2 min, 流速 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ )。また、内部標準物質として、ポリミキシン B を使用した (Q1=523.9, Q3=70.2)。

#### (9) 細胞毒性試験

V79 細胞に対する細胞毒性試験はガイドライン法に準拠して行った。試験液は細切試料 1 g 当たり 10 ml の M05 培地を用いて 37°C、24 時間抽出することにより調製し、プロビット法により IC<sub>50</sub> を算出した。

### 2. 再現性のある滅菌バリデーション達成法に関する研究

#### 1. 乾熱滅菌の場合

レーベン社から購入した乾熱滅菌用生物指標菌 (BI) *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 芽胞 (初期菌数、 $3 \times 10^6$  CFU/担体) を用いて乾熱滅菌で暴露後 6 種の培地メーカーで同一培地である Soybean Casein Digest Agar (SCDA) 培地で培養させ、各培地の培地性能の違いに拠って生育菌数

に差が生ずるか否かについて検討した。

BI を乾熱滅菌器にて暴露させ生残菌を回収後、SCDA 培地にて生残菌数を測定した。また、損傷を受けた芽胞の損傷回復に必要なグルコースを各培地に 0.5% 添加し、添加前後での菌数の比較を行った。

また同時に損傷した BI 菌にグルコース以外の種々の損傷回復剤を添加し、どの薬剤が損傷回復に有効に作用するかについて検討した。

#### 2. 高圧蒸気滅菌の場合

レーベン社から購入した高圧蒸気滅菌用生物指標菌 (BI) *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 芽胞 (初期菌数、 $1 \times 10^6$  CFU/担体) を用いて高圧蒸気滅菌で暴露後 6 種の培地メーカーで同一培地である Soybean Casein Digest Agar (SCDA) 培地で培養させ、各培地の培地性能の違いに拠って生育菌数に差が生ずるか否かについて検討した。

BI を高圧蒸気滅菌器にて暴露させ、生残菌を回収後、SCDA 培地にて生残菌数を測定した。また損傷を受けた芽胞の損傷回復剤としてグルコースあるいはピルビン酸を各培地に 0.5% 添加し、添加有無での生育菌数の比較を行った。

同時に損傷した BI 菌にグルコースあるいはピルビン酸以外の種々の損傷回復剤を添加し、どの薬剤が損傷回復に有効に作用するかについて検討した。

### 3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

#### 1. 動物

雌性 BALB/c 系および CBA/N マウスは日本 SLC から購入し、8~12 週齢で試験に用いた。一部の試験では retire マウ

スを用いた。マウスには餌及び飲料水は自由に摂取させ、1群3または4匹とした。

## 2. 試薬

2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)、hexyl cinnamic aldehyde (HCA)、dibutyl tin chloride (DBT)、methyl salicylate (MS) 及び trimellitic anhydride (TMA) は和光純薬工業から購入した。試験物質はいずれも acetone-olive oil (4:1, v/v) (AOO) に溶解した。5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) はナカライテスクから入手し、生理食塩水に溶解して 10 mg/ml とした。

## 3. 試験物質での処理

### 3-1. Local lymph node assay (LLNA)

試験物質を AOO に溶かし、種々の濃度に調製した。マウスの両耳裏側に試験溶液を 25  $\mu$ l ずつ 3 日間連続塗布した (Day 1, 2 及び 3)。対照群は AOO を同様に塗布した。

リンパ節細胞の BrdU 取り込み量を測定する場合は、Day 5 または Day 6 に BrdU 溶液 500  $\mu$ l をマウスの腹腔内に注射した。

### 3-2. LLNA 改変法

山下らによる方法 (LLNA-DA) を若干改変した。マウスの両耳裏側に試験溶液を 25  $\mu$ l ずつ 3 日間連続塗布し (Day 1, 2, 3)、Day 7 に再度塗布した。対照群は溶媒を同様に塗布した。

BrdU 取り込み量を測定する場合は、Day 7 の最終塗布後に BrdU 溶液を腹腔内に注射した。

## 4. リンパ節細胞浮遊液の調製

LLNA 法では Day 5、6 または Day 7 (BrdU 注射した場合は、その 4 時間または 24 時間後) にマウスを安楽死させ、

両方の耳下リンパ節を摘出して各個体ごとにリンパ節重量を測定した。LLNA-DA 法で試験物質を投与した場合は Day 8 にリンパ節を採取し、リンパ節重量を測定した。24 穴マイクロプレートの各穴に孔径 200 mesh のステンレスメッシュを入れておき、個体ごとにリンパ節を移し入れ、PBS を 500  $\mu$ l を加えた後、注射筒シリンジ部分を用いてリンパ節を押しつぶし、リンパ節細胞 (lymph node cell, LNC) を遊離した。

## 5. リンパ節細胞活性反応の測定

### 5-1. BrdU incorporation

細胞浮遊液はナイロンメッシュを通して 15 ml 遠心管に移し、プレートの各穴を PBS で数回洗ったものを合わせ、総量 5 ml とした。これを、PBS を用いてさらに 3 倍希釈した。この細胞浮遊液について血球計算盤を用いて細胞数を数え、個体ごとに LNC 数を求めた。この細胞浮遊液を 100  $\mu$ l ずつ 96 穴プレートの各穴に入れ (1 群 3~4 穴)、市販測定キットを用いて BrdU 取り込み量を測定した。すなわち、プレートを 4°C、300  $\times$  g で 10 分間遠心した後、各穴から上清を除き、ドライヤーを用いて乾燥した。プレートはシールして試験時まで 4°C で保存した。プレートの各穴に FixDenat 200  $\mu$ l 入れ、室温で 30 分間置いた後、上清を除き、抗 BrdU-POD 溶液を 100  $\mu$ l 加えて 90 分間、室温で放置した。上清を除き、各穴を 250  $\mu$ l の PBS 洗浄液で 3 回洗浄した。Tetramethylbenzidine (TMB) 基質溶液 100  $\mu$ l を加えて 15 分放置後、プレートリーダー (Model 550, Bio-Rad Laboratories) を用いて波長 400 nm (対照 490 nm) における吸光度を測定した。また別の試験では、TMB 基質溶液添加

して 10 分間放置後、1 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液を 25 μl 加えて反応を停止させ、吸光度（測定波長 450 nm、対照 595 nm）を測定した。

#### 5-2. ATP content

山下らの方法を若干変更した。PBS 500 μl を入れた 24 穴マイクロプレートの各穴に個体ごとにリンパ節を入れ、押しつぶして調製した LNC 懸濁液から 5 μl をとり、PBS でさらに 1000 倍希釈する。この希釈細胞浮遊液について、市販測定キットで ATP 量を測定した。すなわち、90 μl の ATP 抽出液が入った機器専用の測定チューブに細胞浮遊液 10 μl を加えて 20 秒間置いた後、反応液 90 μl を加えて攪拌し、即座にルミノメーターを用いて発光量を測定した。

#### 5-3. alamarBlue™ uptake

BrdU assay で調製した総量 5 ml の細胞浮遊液、または fetal bovine serum (FBS) を 10% 添加した RPMI1640 培地 (FBS-RPMI) で 3 倍に希釈した。細胞浮遊液を 100 μl ずつ 96 穴プレートの各穴に入れた後、alamarBlue™ を 10 μl 加えて 37°C 炭酸ガスインキュベータ中で 3 時間培養した。蛍光プレートリーダーを用いて各穴の励起波長 530 nm、測定波長 590 nm における蛍光強度を測定した。

また別の実験では、24 穴マイクロプレート中の細胞懸濁液から直接 5 μl をとり、195 μl の FBS-RPMI が入った 96 穴プレートの各穴に入れ、alamarBlue を 10 μl 加えて 3 時間培養して蛍光強度を測定した。

#### 5-4. フローサイトメトリー

群ごとに細胞浮遊液 15 ml の遠心管にまとめ、4°C、1200 rpm で 5 分間遠心した。上清を除いた後、LNC は 1% bovine

serum albumin (BSA) を加えた PBS (BSA-PBS) に浮遊させ、血球計数盤を用いて細胞数を数えた。BSA-PBS を用いて 1×10<sup>7</sup> cells/ml の濃度に調製し、その 100 μl を Fc ブロッカー 1 μg/4 μl の入ったチューブに入れ、遮光下、氷上で 5 分間静置した。次に、抗マウスモノクローナル抗体溶液 (BD Biosciences) を 5 μl ずつ添加し、氷上で遮光下 30 分間静置して染色した。また、isotype control として、FITC-conjugated hamster IgG1\*, κ monoclonal immunoglobulin isotype control (anti-trinitrophenol) (A19-3) 0.25 μg 及び PE-conjugated rat IgG<sub>2a</sub>, κ monoclonal immunoglobulin isotype control (R35-95) 0.1 μg を用いた。それぞれの抗体の組み合わせによって細胞比率を求められる。静置終了後、BSA-PBS 1 ml を加え、4°C、500×g で 5 分間遠心して上清を捨て、再度 BSA-PBS 1 ml を加えて遠心した。上清を除いた後、1% パラホルムアルデヒド溶液を 1 ml 加えて混和し、細胞を固定した。細胞浮遊液はメッシュを通して測定チューブに移し、解析まで遮光下 4°C で保存した。フローサイトメーターを用いて 10000 個の細胞についてそれぞれの表面抗原発現量を測定し、T/B 細胞比及びヘルパー T 細胞 (Th)/細胞障害性 T 細胞 (Ts) 比を求めた。

#### 6. 判定方法

リンパ節重量、LNC 数、BrdU 及び alamarBlue 取り込み量、ATP 量及び各リンパ球細胞比率の各指標について、被験物質を投与した試験群と溶媒のみを塗布した対照群との値の比を stimulation index (SI) として求めた。



#### 4. 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

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。

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DNA100検体を用いた。

ターゲットとした遺伝子は、VAMP8、TGFβ1、TGFβレセプター I (TGFβRI)、TGFβレセプター II (TGFβRII) の4遺伝子で、計6SNP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、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で30秒、72°Cで30秒を40サイクル行った。次に、IMS-JST096736 (TGFβ1) 以外の5SNPについては、得られた増幅産物を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。

IMS-JST096736 (TGFβ1) については、SSP反応では判定が困難であったため、1stプライマーのforwardプライマーを用いてダイレクトシーケンスにて検討した。プライマー設計及びPCR条件設定は(株)ノバスジーンにて行われた。

#### 5. 金属材料の安全性評価手法の開発

米国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したが、データがやや古くなったため、最新のデータを入手し、全体像を掴むと共に、埋植医療機器を抽出し、それらの中の金属アレルギー関連報告を整理する。

また、厚生労働省に報告された不具合報告を機器の種類別に整理し、金属関連報告を抽出する。さらに、回収情報や安全性情報で、個別機器の不具合や、金属・合金に関係するものを調査する。

#### 6. 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

Ti-Zr基合金として、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-Zr-8Nb、Ti-Zr-16Nb、Ti-Zr-24Nbを用いた。比較対照としてTi-6Al-4Vを使用した。また、これら合金の構成元素の純金属として、Ti、Zr、Nb、Alを用いた。試料は直径14.0mm、厚さ1.0mmの円板状に加工し、シリコンカーバイド研磨紙を用いてほぼ同じ表面粗さになるように研磨した。その後、アセトン、エタノール、超純水の順に超音波洗浄し、乾熱滅菌(180°C、2時間)または高压蒸気滅菌(121°C、20分)を施した。

試料の細胞毒性は、医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い、抽出法によるコロニー法および直接接触法によるコロニー法を用いて試験した。

試料の上で直接骨芽細胞を培養し、骨芽細胞の増殖および分化をそれぞれ指標として、試料の骨芽細胞適合性を評価した。

## 7. Ti-Ni 合金の安全性評価手法の開発

試料には、Ni 濃度の異なる 3 種類の試料を用意した。すなわち、純 Ni、Ni をおよそ 50%含む Ti-Ni 超弾性合金、ならびに Ni を含まないチタン合金 (Ti-4Al-4V 合金) である。純 Ni を生体内で使用することはないが、Ti-Ni 超弾性合金と Ti-4Al-4V 合金は生体用合金として使用例がある。

いずれの合金も圧延材から直径 14mm、厚さ 1mm の円盤状試験片を切り出し (N=5)、600 番耐水研磨紙で研磨し、溶出試験に供した。溶出試験の溶液は、体液、口腔内、胃液を模擬することとし、それぞれ 310K の 0.9%NaCl 水溶液、1.0%乳酸、0.05%塩酸、10ml 中で溶出試験を行った。溶出試験は、1 週間、2 週間、3 週間連続で行うこととし、所定の試験期間経過後溶液中に溶出したイオン濃度を ICP 発光分光分析で定量評価した。各合金の耐環境性は試験片単位表面積あたりの溶出イオン量で評価した。

## 8. 医歯科材料・インプラントによる皮膚科的症例の安全性評価手法の開発

### (1) 金属製インプラントによる皮膚科的不具合例の文献収集

Fisher's Contact Dermatitis、Medline 検索、医学中央雑誌を検索し金属製インプラント機器による皮膚科的不具合事例を収集し、臨床データおよび障害皮膚の病理組織学的所見、パッチテスト結果、インプラントの種類、除去処置

などによる皮膚の改善効果、臨床経過から、インプラントと皮膚症状との関連性を文献より評価した。

### (2) 冠動脈ステント挿入術後慢性再発性再狭窄における金属アレルギーの関連性検討の紹介

平成 12 年 11 月から 13 年 3 月の間、熊本中央病院循環器内科斉藤太郎班長のもと国立病院九州循環器病センター循環器科、新古賀病院循環器科、藤田保健衛生大学第一病院循環器内科、同じく第二病院循環器内科、松江赤十字病院循環器科、山形県立中央病院循環器科の多施設で 316L ステンレス冠動脈ステントによる再狭窄がステンレス金属成分によるアレルギー反応と関連性を有するか調査した。

対象は 1) 冠動脈バイパス移植などの手術歴のない症例、2) アレルギー既往歴のない症例、3) 皮膚試験に際して、担当医師に適切と判断された症例で、本試験についての十分な説明を受け同意の得られたものを対象とした。なお、本研究に際しては藤田保健衛生大学医学部倫理委員会において承認を得た。

試験開始時に、狭窄率を測定し、コントロール群：初回のステント治療後、狭窄率 50%未満の症例あるいは初回の再狭窄治療後狭窄率 50%未満の症例と、In Stent Restenosis(ISR)群：再狭窄治療後の狭窄率が 50%以上の症例の両群にパッチテストを行った。試験試料は Potassium dichromate 0.5% pet, Nickel sulfate 2.5% と 5% pet を Finn chamber で背部に 48 時間閉鎖貼布し、貼布より 48 時間後、72 時間後、1 週間後に国際接触皮膚炎研究班の判定基準に

より判定した。

再狭窄率と皮膚所見の関連性をISR群とコントロール群で比較検討した。データは背景因子、狭窄率、皮膚試験結果について解析を行った。

### (3)当科における金属パッチテストの陽性率の検討

当科における金属パッチテストの結果をジャパニーズスタンダードシリーズのパッチテスト結果から解析し、接触アレルギーのなかで金属アレルギーの占める位置、背景を調査した。

対象：1994年から2000年までの7年間に当科を受診した患者の中で、何らかの接触アレルギーの原因検索が必要と考えられた1302例（男性323例、平均年齢48.7歳、女性979例、平均年齢32.6歳）を対象としてパッチテストを施行した。

貼布方法と判定：ジャパニーズスタンダードならびに金硫酸ナトリウムを研究(2)で述べたパッチテスト方法で行った。

統計解析：Fisherの直接確率計算法に基づき、危険率5%以下を有意差ありと判定した。解析は年代、性別、金属アレルギーの3項目について行った。

### (4)当科におけるインプラントによる皮膚科的症例の調査

当科において1998年から2005年までの8年間にインプラントが原因と疑われ金属等のパッチテストを行った症例の臨床経過とパッチテスト結果を検討し、その関連性を評価した。

## 9. 神経機能に及ぼす人工脳硬膜の安全性評価手法の開発

雄のWistar系ラット（9週令）をcontrol（手術のみを行う群）、人工硬膜埋め込み群、DBT含有膜埋め込み群の3群にそれぞれ10匹ずつ分けた。

埋め込み用の人工硬膜は、三重膜の構造をもった厚さ300 $\mu$ mのもので、触媒としてのオクチル酸スズであった。DBT含有膜は、同様に構造は三重膜で、厚さは300 $\mu$ mとし、DBT含有膜としてテーラーメイドで作成した。二種類の膜ともに、清潔下に5mm四方に切り出した後、角を切り落として八角形にして、埋め込み用試料とした。

ラットに腹腔内投与ネンブタール麻酔（ペントバルビタール量として用量50mg/kg）を行い、頭毛を剃った後、脳定位固定装置（SR-6R, Narishige, 東京）に固定し、ラット用補助イヤバーは先端がとがっていないものを使用した。ラットの頭蓋骨を露出し、電動式手術器械と内径5mmのボーントレフィンバーを用いて、頭蓋骨から、直径5mmの円形の頭蓋骨片をくり抜いた。出来た穴より、人工硬膜か、DBT含有膜を頭蓋内に入れ、上からくり抜いた頭蓋骨片をかぶせた。control群に関しては頭蓋骨片を戻すのみとした。骨膜及び皮膚を、針付きナイロン縫合糸を用いて縫合した。

手術後4週間、同じ群から2匹ずつ一つのケージに入れ、飼育した。ケージ毎の水、餌の摂取量を毎日測定し、またラットの体重も、行動学試験のためのハンドリングを兼ねて毎日測定した。

手術の4週間後、PPI testを行った。ラットは円筒状のラットホルダーにセットされ、試験セッションが始まる5分前にチェンバーの中に入れられ環境に慣らされた（アクリメーション）。バックグラ

ウンド音はアクリメーション、試験セッションを通じて、白色騒音65dBと設定した。試験セッションに関してはプログラムを設定し、最初に40msecの120dBの単独音響刺激を5回繰り返した後、ランダムに、40msecの120dBのみ (P alone)、prepulseとして20msecの70dBか75dBか80dBの刺激があった80msec後の40msecの120dB刺激(それぞれPP70&P, PP75&P, PP80&P)、聴覚刺激を加えない場合を組み合わせた。刺激回数はP alone 11回、PP70&P 11回、PP75&P 11回、PP80&P 10回、刺激なし10回、計53回であった。最終的にP alone の刺激の場合の動物が聴性驚愕反応を示した場合の電子秤の測定値の平均値と、PP70&P, PP75&P, PP80&Pそれぞれについて測定した電子秤の測定値の平均値を算出し、percent prepulse inhibition (%PPI)を計算した。

PPI testの翌朝、オープンフィールド試験を行った。ラットは新規環境として1m四方の白色のボックス(深さ40cm)に置かれた。ラットを30分間動画で記録すると共に観察を行った。動画の記録を専用の解析ソフトで解析し、総行動距離を算出する。最初に3秒以上のグルーミングを行った時点までの時間も計算した。また探索行動としてのrearing(壁に向かって行った場合のwall rearing 中心に向かって独立して行った場合のcenter rearing)の回数を記録した。他に情動性の測定として、face washing (FW)の回数、body washing (BW)の回数、排便数、排尿数を記録した。

オープンフィールド試験終了後、ラットを断頭により安楽死させた後、脳を摘出した。その際、頭蓋骨の状況を観察し、膜の回収を行い、また脳表面を観察した。

## 10. 脊椎固定器具等の力学的安定性評価手法の開発

骨内に固定されたスクリーネジを一定荷重で引き抜くときの引抜強度と、皮質骨・界面骨における応力分布状態について調べた。スクリーネジは一般的に市販されているタイプのものをモデル化した。

スクリーを挿入する際のガイドホルの影響について検討するため、ガイドホルの有無による二つのモデルを作成した。ガイドホルによって、脊椎内により正確にスクリーを挿入できるが、スクリー内が空洞となるため、強度及び安定性が損なわれる可能性があるため、その影響を評価した。骨は単純円筒形とし、長軸方向にスクリーを挿入するものとした。要素は8節点 SOLID とし、骨とスクリー界面には摩擦(摩擦係数 $\mu=0.3\sim0.6$ )を考慮した非線形接触要素を導入した。スクリーは円筒の長軸方向に沿って引抜かれる。引抜速度はASTM F543-02に従い、1mm/minとした。拘束条件として、円筒の底辺部を全方位固定とした。数値計算には汎用有限要素解析プログラム ANSYS9.0 を使用した。

## 11. 軟骨修復のヒト臨床使用類似モデルによる有効性・安全性評価手法の開発

6頭の、生後約12ヶ月、体重約30kgのオスのミニブタを使用した。

移植の約2週間前に、ミニブタに全身麻酔をかけ、脛骨近位部から骨髓穿刺針で約4mlの骨髓血をヘパリン加で採取した。接着細胞を増殖させた。約1週間後、播きなおし増殖させ、移植の日に細