

### 3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

五十嵐良明

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
分担研究報告書

医療材料の免疫毒性評価手法の開発

分担研究者 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

研究要旨

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<sup>3</sup>HTdR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、本研究では、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ったが、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。

A. 研究目的

国際標準化機構技術委員会(ISO/TC194)は、「医療用具の生物学的評価」の国際規格 10993 シリーズに、「医療用具の免疫毒性試験の考え方と方法」に関する文書を新たに追加することで検討が進められている。<sup>1)</sup> この中では免疫毒性を免疫抑制(immunosuppression)、免疫増強(immunostimulation)、感作(hypersensitivity)、慢性炎症(chronic inflammation)及び自己免疫(autoimmunity)に分けて考え、それぞれの発症機構と原因が確認されている材料や添加剤、並びにこれらの試験法について記載されている。

皮膚感作性試験については、モルモット maximization test などが確立した方法として、医療用具の国際規格の標準試験法、<sup>2)</sup> 及び我が

国の医療用具ガイドラインとして採用されている。<sup>3)</sup> また、新たに local lymph node assay (LLNA)<sup>4,5)</sup> がバリデーション評価の結果、独立した試験法と認められ<sup>6,8)</sup>、OECD ガイドラインに採用された。<sup>9)</sup> 医療材料についても国際標準規格(ISO)の改定版ではこれを採用する動きがある。しかし、LLNAはラジオアイソトープ(radioisotope, RI)を用いるため日本の検査機関では十分に行われているとはいえず、日本のガイドラインへの採用は見送られている。このため、RIを用いない指標を採用した変法 LLNA が提案されているが、<sup>10-14)</sup> 十分なバリデーションは行われておらず、RI法と比較して検出感度が同等かどうかは不明である。ISO/PTDS 10993-20は、フローサイトメトリーを用いた細

胞表面抗原の解析を免疫毒性評価の assay として取り上げ、ある種の表面抗原を有する細胞数の比率の変化によって、免疫反応の増強または抑制、及びアレルギー反応の判別ができると考えている。こうしたリンパ球サブポピュレーションの解析は LLNA における非 RI の判定指標としても期待されており、B220 陽性細胞、CD4 あるいは CD8 陽性細胞比率の増加によって、感作性と刺激性を区別できると報告されている。<sup>15-19)</sup>

昨年度は、LLNA 原法の操作に従って同一の動物から得たリンパ節について、それぞれの非 RI 指標を用いた評価を行い、比較した。山下らは、試験物質の塗布回数を増加させることで反応性を上げることができたと報告している。<sup>13,14)</sup> そこで本年度は、試験物質のこうした投与法の違いやリンパ節採取の時期について更に検討を加えるとともに、用いるマウスの系統の違いについても検討した。また、昨年度最適化した細胞表面抗原の染色法を用いてリンパ節細胞比率が感作性物質を投与した場合と刺激性物質等を投与した場合とで変化があるかどうかフローサイトメトリーを用いて解析した。

## B. 研究方法

### 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)<sup>9)</sup>

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。<sup>12)</sup>

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)<sup>13,14)</sup> 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<sup>12)</sup>

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 (最終的に、個体ごと 2 個の耳介リンパ節からのリンパ節細胞を 15 ml PBS に分散したことに相当)。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 (Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Cat.No. 1 647 229, Roche Diagnostics GmbH) 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×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 µl 入れ、室温で 30 分間置いた後、上清を除き、抗 BrdU-POD 溶液を 100 µl 加えて 90 分間、室温で放置した。上清を除き、各穴を 250 µl の PBS 洗浄液で 3 回洗浄した。Tetramethylbenzidine (TMB)基質溶液 100 µl 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<sup>14)</sup>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 (Luciferol 250 Plus, Code. No. 60312, Kikkoman Corp.)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 (Lumacuvette Cat.No. 9200-0, Lumac)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 (Lumac®/3M Biocounter M2010)を用いて発光量 (relative light unit, RLU)を測定した (25°C、10 秒間)。

#### 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™ (Biosource International, Inc.)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 (CytoFluor® II, Fluorescence multi-well plate reader system, Applied Biosystems Japan)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 (CellWASH™, BD Biosciences) (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 (rat anti-mouse CD16/CD32 (Fc γ III/II receptor) monoclonal antibody, Mouse BD Fc Block™, 2.4G2, BD Biosciences Pharmingen) 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、下記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。1 × 10<sup>6</sup> cells/tube の染色に用いた各抗体量は次のとおり。

Fluorescein	isothiocyanate
(FITC)-conjugated hamster anti-mouse CD3ε (CD3 ε chain) monoclonal antibody (145-2C11) 0.25 µg,	R-phycoerythrin (PE)-conjugated rat anti-mouse CD19 monoclonal antibody (1D3) 0.1 µg,
PE-conjugated rat anti-mouse CD4 (L3T4) monoclonal antibody (H129.19) 0.1 µg,	PE-conjugated rat anti-mouse CD8α (Ly-2) monoclonal antibody (53-6.7) 0.1 µg,
PE-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220 monoclonal antibody (RA3-6B2) 0.1 µg.	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 IgG2a, 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(#1 ~ #5)によって以下の細胞比率を求められる。
#1: IgG1*, κ FITC/IgG2a, κ PE (適切な negative/positive 領域を分けるマーカー設定に必要な陰性コントロール)、	#2: anti CD3ε FITC/anti CD19 PE (T 細胞と B 細胞の比率測定)、
#3: antiCD3ε FITC/anti CD4 PE (正確	

なヘルパーT細胞の測定)、#4: CD3e FITC/anti CD8a PE (正確な細胞障害性T細胞の測定)、#5: CD3e FITC/anti CD45R/B220 PE (T細胞とB細胞の比率、#2とは別抗原による測定)。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(CellFIX™, BD Biosciences)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(Cat.No.358235, BD Bioscience)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(FACSCalibur™, BD Biosciences)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alarmarBlue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。

## C. 研究結果

### 1. LLNAにおける試験スケジュールの最適化と各種指標の比較

BALB/cマウスに対し、LLNA法に従って0.5% DNCBを3日間連続塗布した後、図1に示す各スケジュールで耳介リンパ節を摘出し(5、6または7日目)、各種項目を測定した。更にBrdUの取り込み量を測定する場合は、BrdUを腹腔内に注射後4時間または24時間後にリンパ節を摘出した。それぞれの結果を表1に示した。7日目にリンパ節を摘出した場合、5日目または6日目に比べてリンパ節重量は少なかった。リンパ節細胞数及びalarmarBlue取り込み量についても、7日目に摘出した時の値は6日目に摘出した時に比べて低い値を示した。BrdUの取り込み指標である吸光度はBrdU注射後5時間でリンパ節を取り出して測定した場合が、注射後24時間経過して測定した場合よりも高い値を示した。

免疫抑制作用や刺激性が知られるDBTにつ

いて試験した。3日間塗布して6日目にリンパ節を採取した。DBTの2.5%溶液を塗布した場合は塗布から3日目には3匹すべてのマウスが、1%溶液を塗布した場合は4日目に1匹が死亡した。DBT 0.5%及び1%溶液を塗布して生存した動物で各項目を測定したところ、いずれもコントロールよりも増加した(表2)。

感作性を有しない刺激性物質のMS及び気道アレルギーを引き起こすとされているTMAについて試験した。TMAは著しいリンパ節活性化反応を起こしたが、MSについては同濃度で適用しても、いずれの指標ともSI値は1.8程度であった(表3)。

BALB/c系とCBA/N系のretireマウスに対して、DNCB及びHCAを塗布したときの反応性を比較した。BALB/c系マウスのリンパ節の大きさはCBA/N系よりも大きく、溶媒塗布のコントロール群でも大きな値をとった。そのため、DNCB等を塗布した場合のSI値は低くなった。しかし、他の指標に関しては両系統で著しい違いは認めなかった(表4)。

試験物質の塗布回数を1回増加させた時の各種指標をLLNA原法でのそれと比較した。7日目に再度塗布した後、翌日にリンパ節を取り出して測定した結果、各指標とも著しい増加を示した。その効果はHCAよりもDNCBで見られた。リンパ節活性化を評価する指標として高いSI値を示すものは、ATP含有量とalarmarBlue取り込み量で、リンパ節細胞数も高い値を示した。これらに比べるとBrdU取り込み量のSI値はかなり低い値しか示さず、HCAについてのSI値は3以下であった(表5)。

### 2. フローサイトメトリー解析

リンパ節細胞の蛍光標識抗体染色は前年度で決定した条件で行った。すなわち、各群のマウスのリンパ節細胞をまとめ、1チューブあたり10<sup>6</sup>個の細胞を入れ、抗体のFcγIIIとFcγIIレセプターへの抗原非特異的結合を阻害するanti-mouseCD16/CD32(FcγIII/II receptor) monoclonal antibody (2.4G2)<sup>20)</sup>でブロッキング後、5倍に希釈した市販FITC及びPE標識の各抗体で染色し、T/B細胞及びT細胞サブpopulation比率を求めた。

まず、マウス系統によって細胞比率の違いが

あるかどうか、BALB/c と CBA/N 系で比較した。BALB/c 系マウスの耳介リンパ節中の CD3 陽性の T 細胞数は全体の約 80~90%であるのに対し、CBA/N 系マウスの T 細胞数の比率は 93%と高かった。ヘルパーT 細胞が全 T 細胞中に占める割合は BALB/c 系マウスで 70%程度、CBA/N 系マウスで 65%程度であった。DNFB 及び HCA を塗布すると B 細胞数の増加が認められたが、HCA では DNFB よりも増加率は少なかった。DNFB 等の感作性物質による B 細胞比率の増加の程度は BALB/c 系統の方が CBA/N 系統よりも高かった。T 細胞サブポピュレーションについては BALB/c 系マウスに DNFB を塗布したときに若干ヘルパーT 細胞の割合が増加するが、CBA/N 系マウスでは変化を認めなかった(表 6)。

BALB/c 系マウスに DBT を塗布した場合、T 細胞の比率の増加と B 細胞の比率の減少が認められた。この傾向は DNFB と同様であった。T 細胞のうちヘルパーT 細胞の占める割合は DNFB 群では 67%とコントロール群と変化はなかったのに対し、高濃度 DBT 群では 60%へと減少した(表 7)。

TMA については B 細胞数が著しく増加した。それに伴って T 細胞比率は低下するが、ヘルパーT 細胞/細胞傷害性 T 細胞比は変化しなかった。刺激性物質 MS についてリンパ節細胞数に大きな変化はないものの、他の試験物質と同様に B 細胞比率が増加した。しかし、ヘルパーT 細胞/細胞傷害性 T 細胞比はコントロール群と変化は認めなかった(表 8)。

#### D. 考察

LLNA においてリンパ節活性化反応の各種指標を最も感度高く検出するようにリンパ節採取時期及び BrdU 投与時期を検討した。BALB/c マウスに対し 0.5% DNFB を塗布し 7 日目にリンパ節の摘出を行った場合、5 日目または 6 日目に比べて重量は少なかった。リンパ節細胞数及び alamarBlue 取り込み量についても、7 日目に摘出した時の値は 6 日目に摘出した時に比べて低い値を示した。BrdU 取り込み試験では、BrdU 注射して 5 時間後にリンパ節を摘出した場合、注射後 24 時間経過して摘出した場合よ

りも吸光度は高い値を示した。今回は溶媒塗布のコントロール群において BrdU 注射 5 時間経過後のリンパ節について試験は行っていないため、このときの吸光度に対する増加率は明らかではないが、コントロール群ではリンパ節の活性化は起こっていないことを考えると、吸光度は Method 1 での AOO の値と同程度と思われる。したがって、注射後 5 時間で摘出したときの方が SI 値は高くなると考えられた。これらの結果より、リンパ節の摘出は試験物質塗布から 7 日目に行うとリンパ節活性化反応の各指標を感度良く検出できると思われた。更に、BrdU 取り込み量を測定する場合は、注射後 5 時間でリンパ節を摘出する方が良いが、解剖からリンパ節細胞の調製等の操作を考えると、24 時間経過した後に摘出する方が試験は容易である。

今回検討した BrdU 取り込み量、ATP 量及び alamarBlue 取り込み量は原理は異なるもののほぼ細胞数に比例し、リンパ節重量で見た SI 値よりは大きな値となった。エンドポイントの発色・発光量での変化は、血球計算盤を使用して細胞数を測定するよりも簡単であり有用と思われた。ATP はリンパ節細胞の摘出後の時間に影響されやすいが、標識物質の注射や細胞培養の必要がなく簡単に短時間に測定できた。alamarBlue 取り込み量の測定はプレートリーダーで短時間に、かつ同時に多検体を処理できる利点がある。BrdU 取り込み量の測定は原理的には最も LLNA 原法に近いものであるが、吸光度のダイナミックレンジが影響するため、他の指標と比べ低い SI 値しか得られなかった。よって、検出感度の面を考慮すると、ATP 発光測定法または alamarBlue 蛍光測定法が RI に代わる指標として優れているのではないかと考えた。

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。<sup>21)</sup> Takeyoshi らも同様に、CBA/J 系マウスが BALB/c 系マウスよりも感度が高いことを示し、<sup>22)</sup> さらに CBA/N 系マウスが CBA/J 系マウスよりも高い感受性を持つとしている。<sup>23)</sup> したがって、今回検討している BALB/c 系マウスも CBA 系マウスに変更することによって SI 値も

増加するのではないかと考えた。BALB/c 系マウスのリンパ節の大きさは CBA/N 系マウスのリンパ節は BALB/c 系マウスのそれよりも小さく、コントロール値が低くなるため、試験群の SI 値が高くなる傾向があるが、今回 DNCB 及び HCA 1 濃度での結果では、両系統で著しい違いは認めなかった。試験物質の用量を変化させ、それぞれでの SI 値を比較して感度の差を見る必要があるかもしれない。

LLNA・DA では試験物質の投与回数を増加させることによって検出感度の上昇を図っている。<sup>13,14</sup> DNCB と HCA の塗布回数を増加させた結果、いずれの指標とも高い SI 値を示した。更に多くの物質について検討する必要がある。

医療機器の感作性を評価するには、その抽出物を用いて試験するのが一般的である。各溶媒での抽出物には、感作性物質以外にも刺激性を有する物質や免疫抑制作用を示すような物質も溶出してくる可能性もある。したがって、こうした物質について、あるいはこれらが複雑に混和されている場合についての反応性についても調べておく必要がある。今回は、刺激性物質 MS、免疫抑制作用のある DBT、及び液性免疫の気道アレルギーを起こす TMA について試験した。

薄い濃度の DBT を塗布し生存したマウスのリンパ節の各種指標はいずれもコントロールよりも増加した。TMA は著しいリンパ節活性化反応を起こしたが、MS についてはいずれの指標とも SI 値は 1.8 程度と陽性にはならなかった。このように、リンパ節細胞の増殖に伴う指標の変化を追う限り、TMA と DNCB の違い、あるいは DBT による活性化のメカニズム等については解釈が難しい。

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。<sup>16)</sup> また、CD4、CD8 陽性細胞の比率も変化すると報告もある。<sup>19)</sup>

フローサイトメトリーによる解析では、DNCB、DBT、TMA 及び MS を塗布したとき B 細胞比率は程度の差はあるが増加し、必ずしも B 細胞の出現が感作性を意味するものではな

いのではないかとされた。しかし、TMA については著しい B 細胞の増加があり、これは液性免疫を誘発しやすいという評価になるのではないかと考えられた。B 細胞数の増加に伴い T 細胞比率は減少するが、T 細胞サブpopulation 比率は試験物質によって違いが認められた。DNCB ではヘルパー T 細胞の増加と細胞傷害性 T 細胞の減少、DBT では逆にヘルパー T 細胞の減少が起こった。一方、TMA 及び MS は T 細胞サブセットの比率に対し変化を示さなかった。したがって、こうした T 細胞サブセットの比率は感作性物質や刺激性物質との区別に有用な指標となるかもしれない。フローサイトメーター測定 of 定量性については試験ごとにかんがりの差があるため、まだルーチン的に確固たる指標とするには問題があるが、LLNA で偽陽性や偽陰性になった物質について評価、解析に有用ではないかと思われる。

今後は、これまで開発した非 RI 指標を用いて、種々の物質について用量反応性を調べる。更には、感作性物質と刺激性物質、あるいは感作性物質と免疫抑制剤などのように抽出物で認められるような混合物での試験を行う必要がある。

## E. 総括

LLNA に従って DNCB 及び HCA などの感作性物質を塗布したときのリンパ節活性化の非 RI 指標として、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、alarBlue 色素取り込み量及び BrdU 取り込み量を測定した。リンパ節の摘出は塗布後 7 日目に行い、試験物質の塗布を一定期間後に 1 回追加すると著しく反応性が増加した。検討した指標のうちでは、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 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population 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 DBT 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。今後は、種々の物質について用量反応性を調べるとともに、感作性物質と刺激性物質、あるいは感作性物質と免疫抑制剤など混合物系での試験を行う必要がある。

#### F. 参考文献

1. ISO/PDTS 10993-20: Biological evaluation of medical devices-Part 20: Principles and methods for immunotoxicology testing of medical devices
2. ISO 10993-10: 2002, Biological evaluation of medical devices-Part 10: Tests for irritation and delayed type hypersensitivity
3. 厚生省薬務局医療機器開発課監修. 医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン 1995 解説. 薬事日報社, 東京 (1996)
4. Kimber, I., Basketter, D.A. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 165-169 (1992)
5. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W., Basketter, D.A. *Toxicology* 93, 13-31 (1994)
6. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 249-257 (2001)
7. Dean, J.H., Twerdok, L.T., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 258-273 (2001)
8. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274-286 (2001)
9. OECD, 2002. Guidelines for testing of chemicals. Guideline 429. skin sensitisation: local lymph node assay
10. Hatao, M., Hariya, T., Katsumura, Y., Kato, S. *Toxicology* 98, 15-22 (1995)
11. Suda, A., Yamashita, M., Tabei, M., Taguchi, K., Vohr, H-W., Tsutsui, N., Suzuki, R., Kikuchi, K., Sakaguchi, K., Mochizuki, K., Nakamura, K. *J. Toxicol. Sci.*, 27, 205-218 (2002)
12. Takeyoshi, Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M., Kimber, I. *Toxicol. Lett.*, 191, 203-208 (2001)
13. 山下邦彦, 出原賢治, 福田徳夫, 山岸 学, 河田直紀. 第 10 回日本免疫毒性学会学術大会講演要旨集, p.70 (2003)
14. Yamashita, K., Idehara, K., Fukuda, N., Yamagishi, G., Kawada, N. *AATEX*, 11, 136-144 (2005)
15. Gerberick, G.F., Cruse, L.W., Miller, C.M., Sikorski, E.E., Ridder, G.M. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 146, 1-10 (1997)
16. Gerberick, G.F., Cruse, L.W., Ryan, C.A., Hulette, B.C., Chaney, J.C., Skinner, R.A., Dearman, R.J., Kimber, I. *Toxicol. Sci.*, 68, 420-428 (2002)
17. Gerberick, G.F., Cruse, L.W., Miller, C.M., Ridder, G.M. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 159, 142-151 (1999)
18. Manetz, T.S., Meade, B.J. *Toxicol. Sci.*, 48, 206-217 (1999)
19. Humphreys, N.E., Dearman, R.J., Kimber, I. *Toxicol. Sci.*, 73, 80-89 (2003)
20. BD Bioscience Pharmingen. Technical Data Sheet. Purified rat anti-mouseCD16/CD32(Fc $\gamma$  III/II receptor) monoclonal antibody (Mouse BD Fc Block™)
21. Woohhiser, M.R., Munson, A.E., Meade, B.J. *Toxicology* 146, 221-227 (2000)
22. Takeyoshi, M., Noda, S., Yamasaki, K., *Exp. Anim.*, 53, 171-173 (2004)
23. Takeyoshi, M., Noda, S., Yamasaki, K., Kimber, I. *J. Appl. Toxicol.*, 26, 5-9 (2006)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ikarashi, Y., Toyoda, K., Kobayashi, E., Doi, H., Yoneyama, T., Hamanaka, H., Tsuchiya, T. Improved biocompatibility of titanium-zirconium (Ti-Zr) alloy: Tissue reaction and sensitization to Ti-Zr alloy compared with pure Ti and Zr in rat implantation study. *Materials Transactions*



46, 2260-2267 (2005)

2. 学会発表

五十嵐良明、鹿庭正昭、土屋利江. マウスを用いた医用材料のアレルギー性評価法に関する検討. 第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会

(2004).

五十嵐良明、鹿庭正昭、土屋利江. マウスを用いたタンパク材料の即時型アレルギー性評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004.

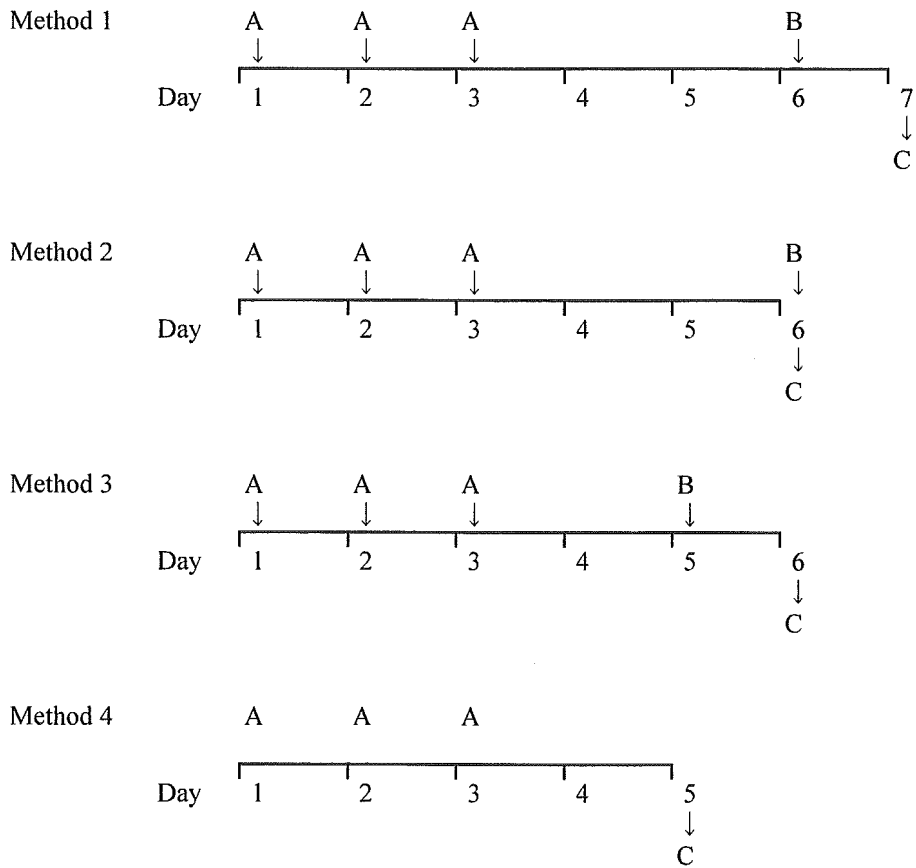


図1. LLNAにおけるリンパ節採取時期決定のための試験デザイン  
A: application of test chemical.  
B: BrdU injection  
C: collection of lymph nodes.

表1. 各種投与方法での各種指標値の結果

Method	Chemical	Animal No.	Lymph node weight (mg)			Cell number ( $\times 10^5$ cells)			BrdU Absorbance			alamarBlue Fluorescence		
			Mean	SD		Mean	SD		Mean	SD		Mean	SD	
1	AOC	1	7.9	6.3	1.4	137	106	27	0.271	0.190	0.074	6294	4471	1621
		2	5.7			89			0.125			3191		
		3	5.4			92			0.175			3927		
1	0.5% DNCB	1	22.1	22.1	3.7	579	605	122	0.387	0.414	0.087	32569	30807	6371
		2	18.4			498			0.343			23740		
		3	25.8			738			0.511			36112		
2	0.5% DNCB	1	28.4	23.5	3.6	714	740	191	0.649	0.638	0.054	37299	34920	2918
		2	23.3			884			0.667			37409		
		3	19.7			479			0.559			31526		
		4	22.6			882			0.678			33447		
3	0.5% DNCB	1	23.6	23.3	0.9	498	614	82	0.550	0.457	0.070	45381	38577	4698
		2	24.2			692			0.382			36432		
		3	23.1			630			0.444			34755		
		4	22.1			636			0.451			37740		
4	0.5% DNCB	1	25.5	24.1	3.5	764	699	76	NT			NT		
		2	22.4			681			NT			NT		
		3	20.1			600			NT			NT		
		4	28.2			753			NT			NT		

Method 1~4の試験物質の投与スケジュールはFig.1の通り。  
NT =not tested.

表2. Dibutyltin chloride (DBT)のLLNAでの結果

Concentration (%)	Animal No.	Body weight (g)			Lymph node weight (mg)			Cell number ( $\times 10^5$ cells)					
		Mean	SD		Mean	SD	SI	Mean	SD	SI			
0 (AOC)	1	20.02	20.28	1.45	5.8	7.2	1.5	-	87	101	14	-	
	2	21.41			8.7				114				
	3	19.42			7.1				103				
0.5	1	19.87	19.65	1.18	15.4	14.8	1.2	2.1	457	374	89	3.7	
	2	21.57			13.4				280				
	3	17.51			15.5				386				
1	1	20.86	20.79	0.07	11.3	11.4	0.1	1.6	201	184	25	1.8	
	2	20.72			11.4				166				
	3	death											
2.5	1	death											
	2	death											
	3	death											

Concentration (%)	Animal No.	alamarBlue Fluorescence			ATP content				
		Mean	SD	SI	Mean	SD	SI		
0 (AOC)	1	1572	1872	411	-	4596	4469	826	-
	2	2341				5225			
	3	1704				3587			
0.5	1	8532	8062	912	4.3	12503	11567	1281	2.6
	2	7010				12093			
	3	8643				10107			
1	1	4882	4642	339	2.5	8844	7578	1790	1.7
	2	4402				6313			
	3	death							
2.5	1	death							
	2	death							
	3	death							

表3. 各種試験物質のLLNAでの結果

Chemical	Numner of animal	Lymph node weight (mg)			Cell number ( $\times 10^5$ cells)		
		Mean	SD	SI	Mean	SD	SI
AOO	3	7.9	1.7	-	88	38	-
25% MS	3	9.1	0.3	1.1	155	60	1.8
25% TMA	2	17.8	0.4	2.2	391	205	4.4

Chemical	alamarBlue Fluorescence			ATP content		
	Mean	SD	SI	Mean	SD	SI
AOO	2716	1227		2884	1016	
25% MS	4903	755	1.8	4821	754	1.7
25% TMA	11803	1288	4.3	9100	1157	3.2

表4 マウス系統差による反応性の違い

Strain	Chemical	Lymph node weight (mg)			Cell number ( $\times 10^5$ cells)			
		Mean	SD	SI	Mean	SD	SI	
BALB/c	Exp.1	AOO	6.6	0.8	-	95	17	-
		0.5% DNCB	20.1	2.6	3.0	478	90	5.0
		25% HCA	14.7	1.1	2.2	336	38	3.5
	Exp.2	AOO	6.1	0.9	-	109	23	-
		0.5% DNCB	21.4	3.0	3.5	490	54	4.5
	CBA/N	AOO	4.7	0.7	-	96	11	-
0.5% DNCB		23.8	3.7	5.1	611	74	6.4	
25% HCA		10.3	8.4	2.2	264	27.8	2.8	

Strain	Chemical	BrdU Absorbance			alamarBlue Fluorescence			
		Mean	SD	SI	Mean	SD	SI	
BALB/c	Exp.1	AOO	0.397	0.163	- *	2618	279	-
		0.5% DNCB	1.554	0.320	3.9 *	14538	3109	5.6
		25% HCA	0.566	0.211	1.4 *	10205	1000	3.9
	Exp.2	AOO	0.267	0.062	-	1301	413	-
		0.5% DNCB	0.792	0.032	3.0	10873	2440	8.4
	CBA/N	AOO	0.264	0.027	-	7165	1456	- **
0.5% DNCB		0.685	0.147	2.6	45274	2499	6.3 **	
25% HCA		0.468	0.063	1.8	25588	1132	3.6 **	

**BrdU Absorbance**

\*: TMB基質溶液を加えて10分後に1 mol/l硫酸溶液を加えた後、450 nmにおける吸光度を測定した。  
 無印: TMB基質溶液を加え15分後に400 nmの吸光度を測定した。

**alamarBlue Fluorescence**

\*\* : リンパ節細胞を遊離し、PBSで希釈して5 ml 細胞懸濁液とした後、100  $\mu$ l ずつ96穴プレートに入れた。  
 無印: PBS 15 mlの細胞懸濁液とし、100  $\mu$ l ずつ入れた。

表5. LLNA法及びLLNA-DA法での各種感作性物質の反応性の比較

Method	Chemical Application	Collect lymph nodes	Chemical	Lymph node weight (mg)			Cell number ( $\times 10^5$ cells)			BrdU Absorbance			
				Mean	SD	SI	Mean	SD	SI	Mean	SD	SI	
LLNA	Day 1,2,3	Day 6	AOO	6.6	0.8	-	95	17	-	0.397	0.163	*	-
			0.5% DNCB	20.1	2.6	3.0	478	90	5.0	1.554	0.320	*	3.9
			25% HCA	14.7	1.1	2.2	336	38	3.5	0.566	0.211	*	1.4
LLNA-DA	Day 1,2,3,7	Day 8	AOO	5.1	1.9	-	94	16	-	0.170	0.028	-	-
			0.5% DNCB	36.1	5.5	7.1	774	161	8.2	0.611	0.057	-	3.6
			25% HCA	13.0	2.0	2.5	321	83	3.4	0.452	0.077	-	2.7

Method	Chemical Application	Collect lymph nodes	Chemical	alamarBlue Fluorescence			ATP content		
				Mean	SD	SI	Mean	SD	SI
LLNA	Day 1,2,3	Day 6	AOO	2618	279	-	3254	1006	-
			0.5% DNCB	14538	3109	5.6	16878	4311	5.2
			25% HCA	10205	1000	3.9	11266	2560	3.5
LLNA-DA	Day 1,2,3,7	Day 8	AOO	1578	272	-	2154	551	-
			0.5% DNCB	19332	2508	12.3	29339	3262	13.6
			25% HCA	8181	1548	5.2	10043	438	4.7

BrdU Absorbance

\*: TMB基質溶液を加えて10分後に1 mol/l硫酸溶液を加えた後、450 nmにおける吸光度を測定した。  
無印: TMB基質溶液を加え15分後に400 nmの吸光度を測定した。

表6. LLNA法での感作性物質投与によるT細胞/B細胞比率変化のマウス系統差

Strain	Chemical	Ratio (%)			
		T cells			B cells
			Th	Ts	
BALB/c	AOO	81.8	55.2	26.8	17.2
	DNCB 0.5%	63.8	45.1	18.5	34.9
	HCA 25%	71.7	50.3	22.5	28.0
CBA/N	AOO	93.2	59.2	33.3	5.4
	DNCB 0.5%	89.4	56.8	31.9	9.2
	HCA 25%	94.0	60.9	32.9	5.2

Strain	Chemical	T cells SI*	Ratio to total T cells		B cells SI
			Th	Ts	
			BALB/c	AOO	
	DNCB 0.5%	0.8	0.71	0.29	2.0
	HCA 25%	0.9	0.70	0.31	1.6
CBA/N	AOO	-	0.64	0.36	-
	DNCB 0.5%	1.0	0.64	0.36	1.7
	HCA 25%	1.0	0.65	0.35	1.0

\*SI = AOO群に対する各試験物質群のTまたはB細胞数の全リンパ球中の割合についての増加率

表7. Dibutyltin chloride (DBT)のフローサイトメトリーの結果

Chemical	Ratio (%)			B cells
	T cells			
		Th		
AOO	87.3	58.2	29.3	12.1
DBT 0.5%	74.4	49.6	24.5	24.4
DBT1%	75.9	45.7	30.2	23.5

Chemical	T cells SI	Ratio to total T cells		B cells SI
		Th	Ts	
		AOO	-	
DBT 0.5%	0.9	0.67	0.33	2.0
DBT1%	0.9	0.60	0.40	1.9

表8. 各種試験物質のフローサイトメトリーによる結果

Chemical	Ratio (%)			B cells
	T cells			
		Th		
AOO	85.7	57.0	27.7	9.7
MS 25%	76.1	52.1	24.6	18.8
TMA 25%	71.2	47.6	24.0	25.6

Chemical	T cells SI	Ratio to total T cells		B cells SI
		Th	Ts	
		AOO	-	
MS 25%	0.9	0.68	0.32	1.9
TMA 25%	0.8	0.67	0.34	2.6

#### 4. 金属材料の安全性評価手法の開発

佐藤 道夫

平成17年度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

## 金属材料の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。

### 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。その一環として、現状を把握するために、医療機器全体での不具合報告を検索すると共に、金属材料を使用した医療機器に焦点を置いて調査・解析を行う。同時に、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目指す。

### B. 研究方法

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<sup>1,2)</sup>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<sup>3)</sup>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。

### C. 研究結果

#### 【米国の不具合報告】

FDAはManufacturer and User Facility Device Experience Database (MAUDE)<sup>4)</sup>という不具合情報収集システムを確立し、企業からの不具合情報提供を義務づけていると共に、広く情報を集めている。収集された情報はインターネットで公開しており、Webページでのオンライン検索と共に、データを圧縮したファイル形式で入手することも可能としている。1991年末から2005年までの14年間で64万件以上に及

ぶ報告を収集しており、市販後評価の貴重な資料となる。今回はファイルをダウンロードして、Access 形式に変換し、独自のデータベースを作成した。

データは、不具合マスター情報、機器情報、具体的な不具合説明などが、別々のデータ【表 1】になっており、さらに時期別に分けられていたため、全てを結合させて、大容量のデータベースとした後に、解析に必要なデータのみを抽出・再加工した。こうして作成したデータベースに、機器のクラス分類の情報を付加し、報告された日付から年を取り出して、年別推移分析が可能ないようにした。

また、埋植機器の有無に関する情報が新たに付け加えられたため、この情報を基にして埋植機器を抽出した。機器全体では、644,855 件、埋植機器は 240,071 件(37%)の報告があった。なお、一部の不具合報告には、この付加情報が記載されていない。また、同一の機器分類の中でも、個別の機器によって埋植の有無が異なっている例もあった。

機器の分野やクラスの情報もクラス分類から、入手できるため、分野別、クラス別の集計も行った。1996 年以降には健康被害の有無に関する情報も記載されており、これらの情報も可能な場合は利用した。基本的に、機器分類と年のクロス集計表を作成して、解析を行った。

医療機器全体と埋植機器の報告総数の年推移と各年の埋植機器の比率を【図 1】に示した。また、機器のクラス別の報告比率を、【図 2】(機器全体)と【図 3】(埋植機器)に示した。機器全体ではクラスⅡが多かったのに対して、埋植機器ではクラスⅢの方が多かった。

さらに、機器のクラス別の年推移を、

【図 4】(機器全体)と【図 5】(埋植機器)に示した。2002～2003 年に機器全体のクラスⅡにピークがあることと、2004 年に埋植機器のクラスⅢにピークが見られることを除いて、全体的な傾向は同様であった。機器全体でのクラスⅠ機器に関しては、横ばい傾向にあった。

機器全体の使用後の転帰(健康被害の有無)の推移を【図 6】に示す。これらの情報については、企業報告にのみ付加されているため、1996 年後半以降のデータに限られている。報告の半数が不具合のみで、健康被害は 1/3 に留まっている。18%はその他・不明となっている。機器に起因するとは限らないが、総死亡例は一万二千件に及んでいる。

埋植機器に関しては【図 7】に示す通りである。死亡例は機器全体とほぼ同割合であったが、それでも総計で五千件を超えている。また、機器全体と異なって、傷害例が最も多く、機器の不具合で留まっている例(24%)より、健康被害を与えている例(58%)が倍以上であった。

機器の分野別の報告比率を、【図 8】(機器全体)と【図 9】(埋植機器)に示した。両者共に、循環器系が最も多く、2 番目に、一般手術・形成外科が多くなっている。埋植機器では、この 2 分野で報告の半分を超えている。次いで、整形外科の比率が大きいのが埋植機器の特徴であろうか。

機器全体の一般的名称分類別の集計結果を【図 10】(総計)と【図 11】(年推移)に示す。図 10 中の煉瓦印は、埋植機器を表している。最も報告数が多いのは、臨床検査用ヘキソキナーゼであり突出していた。2002～2003 年にピークがあったが、現在でも報告は引き続き多い。次いで、注入ポンプ、腹腔鏡が目立つ。注入ポンプは、



2002年には5500件近くに達し、2004年に一時減少したものの、2005年には、機器の中で最多の報告数となっている。インスリン注入ポンプと合わせると総数でもヘキサキナーゼに匹敵する多さである。腹腔鏡は、1997～2000年に多数の報告(各年3千件以上)があった。最近は定常状態であるが、それでも千件近辺である。手術用縫合器の報告も多く、何故か腹腔鏡と同様の年推移を示していた。総報告数の上位10機器では、これらの4機器以外は、全て埋植機器であった。埋植機器については後述する。次いで、除細動器、大動脈バルーン、インスリン注入ポンプ、人工呼吸器の報告数が多い。これらは、大動脈バルーン(腹腔鏡と同傾向)を除いて、最近でも定常的に報告が多い。

埋植機器の一般的名称分類別の集計結果を【図12】(総計)と、【図13】及び【図14】(年推移)に示す。図14は、図13の表示形式を変えたものである。循環器系と整形外科系は煉瓦印と斜線で区別している。他を圧倒しているのが埋め込み型除細動器である。定常的に2千件を超えており、今後も多数の報告が続くと見られる。2番目の人工歯根は、1997年を中心に13,500件あまりの報告があったため、総報告数としては多いが、最近では100件以下であり、増加傾向は見られない。次いで、ペースメーカー電極であるが、最近では定常的に千件を超えている。ペースメーカー自身の報告も6番目に多く、両者を合わせると除細動器をはるかに超えてしまう。ペースメーカーは1997年には3千件を超えていたが、最近では減少傾向であるものの、依然として5百件近くある。眼内レンズは定常的に千件から2千件の報告がある。シリコン乳房は、1997、1998年には3千件を超えていたが、

最近では百件程度に留まっている。食塩水乳房については1999、2000年に千5百件を超えていたが、やや減少傾向で5百件近くである。薬物放出冠動脈ステントは、2003年に上市されてから、最近では、埋植機器の中では最も報告が多い機器である。冠動脈ステントも定常的に7百件以上の報告がある。インポテンス機器は1997年の4千件を超える報告が全体数を引き上げているが、現在も4百件を超える報告が続いている。また、人工内耳が定常的に9百件を超えるようになってきている。

【図15】(総計)と【図16】(年推移)に、整形外科関連埋植機器についてまとめたものを示す。整形外科領域では、全体的に膝関節の報告数が股関節よりも1.5倍多く、特にPatellofemoralタイプ(膝関節)の報告数が目立つと共に、年々顕著に増加傾向にある。一般的にどのタイプにおいても2005年に増加している。2001年に膝(Knee, Hemi-, Tibial, Resurfacing)と股(Hip, Semi- Constrained)の1種類ずつに関して急増しているのが見受けられる。骨接合材では、スクリューが最近では定常的に2百件以上の報告があり、プレートも定常的に2百件近くの報告が続いている。脊椎関係では、椎間固定具が2000年と2005年の3百件余りの報告の他にも定常的に百件以上の報告があった。

一方、2006年からMAUDEには、不具合が何かを記述した項目が追加された。全ての報告に記載されているわけではなく、機器全体の176,055件に記載があり、全記載項目は249,061件に及ぶことから、内3割は1報告に複数の不具合が記述されていることになる。今回は、「Device breakage」「Device failure」「Mechanical failure」「Structural failure」「Loose」の5不

具合について集計した。17,940 報告に対して、18,226 件 (breakage 7798 件, Device failure 8239 件, Mechanical 567 件, Structural 33 件, Loose 1589 件) が相当し、これら 5 不具合内容については、わずか 286 件 (1.6%) の重複しかなかった。以下、これらについて解析を行った。

【図 17】(分野別)と【図 18】(機器別)に機器全体の集計結果を示す。分野別では、一般手術・形成外科分野での「Device failure」の多さは突出している。一方、「Device breakage」については、循環器系が最も多く、次いで整形外科、一般手術・形成外科であった。「Loose」に関しては、整形外科分野で突出していた。「Mechanical failure」は、循環器系で多かった。「Structural failure」とされているのは非常に少なく、生体人工弁(8 例)、機械弁(4 例)、骨プレート(3 例)等が報告されている。機器別では、腹腔鏡と縫合器の「Device failure」が非常に多く、これが一般手術・形成外科分野に反映している。「Device breakage」では、血管用カテーテル、冠動脈血管形成術用カテーテル、吸引装置での破損が目立っている。

【図 19】(分野別)と【図 20】(機器別)に埋植機器の集計結果を示す。「Loose」に関しては、整形外科分野に特徴的といっ  
て良い。「Device breakage」に関しても、整形外科分野で一番多く、次いで一般手術・形成外科、循環器分野となっていた。「Device failure」では、機器全体とは異なって、循環器、耳鼻科、整形外科の順であった。機器別では、「Device failure」では、人工内耳が非常に多く、これが耳鼻科領域での多さの主因であった。次いで、除細動器、食塩水人工乳房に多かった。「Loose」では、人工膝関節、次いで股関

節に、その報告が多い。「Device breakage」においては、ポリプロピレン製縫合糸と埋め込み型血管内カテーテル、そして骨スクリューの 3 機器が最も多く、次いで、冠動脈ステント、埋め込み型ポート・カテーテル、骨プレート、骨固定用ファスナーなどが続いていた。

【図 21】(機器全体)と【図 22】(埋植機器)に不具合別の年推移を示す。機器全体では、「Device failure」が集計を取り始めてから減少傾向であるのが目立つ。「Device breakage」では最近はやや減少傾向であるが、ほぼ定常状態であり、「Mechanical failure」にも大きな変化はない。一方、埋植機器では、「Mechanical failure」が若干増加傾向であり、「Loose」を除いては、やや減少気味ではあるものの、ほぼ定常状態とあって良い。しかし、「Loose」では、漸増の傾向があり、特に 2005 年の報告の多さは異常に感じられる。

#### 【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~H17. 11. 30、855 日間) の総計は 28,087 件であった。内訳を表 2 に示す。2 回目の報告以降には健康被害項目が記載されているため、健康被害がないものを別途集計したが、初回分を含めない全報告数は 26,299 件で、内、健康被害なしは 77%であった。

回収情報や安全性情報については、医療機器センターが運用している JAAME Search を利用して検索を行った。

【図 24】(総計)と【図 25】(報告回数別推移)に機器全体の集計結果を示す。回数

別推移については等間隔で行われていないため、別途、日割りで計算した推移【図 26】を付した。

図の中で、楕円で囲んだ機器分類は埋植機器と見なしたものである。顕著な機器は、手動式医薬品注入器である。これが全報告の一割近くを占めている。この内、健康被害なしは 84%であった。次いで、透析器、眼内レンズ、血管用カテーテルと続いている。透析器は初回の報告で特定モデルの寄与が多く、最近では 100 件近辺に留まっている。不具合内容は「中空糸破損による血液リーク」が殆どである。カテーテルは定常的に 100 件程度の報告がある。不具合内容は、「バルーンカテーテル先端チップの破損(72 件)」、「バルーンリーク」「ガイドワイヤーの断裂」などが主である。人工呼吸器においても、定常的に 30~60 件の報告がある。不具合内容は、「作動停止」が多い。血液凝固分析装置は、70 件を超える特定モデルの「空冷ファンの能力不足による温度上昇(製品回収報告)」が数を引き上げていた。

【図 27】(総計)と【図 28】(報告回数別推移)及び【図 29】(報告回数別日割り推移)に埋植機器の集計結果を示す。最も報告数が多い眼内レンズは、今回の不具合数に関しては、特定モデルの集中報告が総数を押し上げている。コンタクトレンズは、4 回目の 400 件を超す同一製品の報告のために総数が多くなっている。人工股関節、骨接合用品、人工骨、人工膝関節などの整形外科分野の報告も多い。人工股関節については、特定モデルの 280 件を超す報告が総数を押し上げている。ペースメーカー、導線、除細動器などの心臓関連の機器は明らかな増加傾向を示している。ペースメーカーでは、外国で生じた不具合報告ではあるが、

67 件の集中報告がある。

#### 【金属アレルギーなど金属関連例】

この章の FDA のデータはオンライン検索によるもので、2005 年 6 月までのデータに基づいている。

まず、アレルギー(allergy)について集計してみた。【図 33】に示すように、相当多数の事例がヒットしたが、2001 年までは、天然ゴム・ラテックスに関するアレルギーが大半を占めていた。ラテックス以外の”allergy”という語を含む報告も定常的に 200 件程度は存在していた。なお、これらには、「アレルギー症状はなかった」という報告も含まれている。

次に、ニッケルを含有しているために、ニッケル・アレルギーの懸念が完全には払拭できない Ti/Ni 合金に焦点を当ててみた。Ti/Ni 合金の一種として良く知られた市販材料商品名について検索してみたところ、当該語を含む報告数(980 件)は多いが、社名や商品名に当該語が使用されているため、”allergy”を同時に含む事例はなかった。

“nickel”若しくは”metal”と、“allergy”を同時に含む報告の集計結果を【図 34】に示す。絶対数は多くはないが、若干の増加傾向が見られる。また、以下に、整形外科領域(前回報告)を除いた具体例のいくつかの概要を示す。

#### ○骨接合材(初期の例):(1996)

患者は側弯症に対する手術を受け、数ヶ月後に背中痛みと出血を生じた。患者は機器によるものと考え、メーカーにサンプルの提供を要求したが断られた。医師がサンプルを提供し、アレルギー専門医が 2 日間の試験を行ったところ、Ni とエポキシ

樹脂に陽性であった。2年間の患者の証明努力によって、医師は機器を取り除くことに同意した。

○ステント:(1997)

冠動脈ステントが成功裡に留置された6ヶ月後に、患者が危篤状態と報告を受けた。間欠性低体温と30kgの体重減少が起こっていた。医師は、316Lステンレス中のNiアレルギー反応ではないかと考えている。(企業意見:これまでに、316Lステンレス製ステント中のNiに対する陽性反応の記述はなかった。ステンレスのNiによるアレルギーは胸骨ワイヤーで知られていたが、このタイプの反応は肋間筋と胸板に限られていて、全身性のもではなかった。ステントは手術クリップの様なサイズで、全金属量は胸板を閉じるのに使用されるワイヤーよりもずっと少ない。患者は紅斑や、丘疹皮膚反応も示していた。以前から医師にかかっている、急性でなく、慢性的なもので緊急を要するものではなかった。低体温や体重減少はアレルギーの症状と異なる。また、皮膚発疹は接触皮膚炎かもしれない。ロットNoは不明であった。事実が明らかになれば、是正措置を取る)

○縫合具:(1998)

開心術で機器を除去後、Niアレルギーのために、患者は重度の皮疹を頭部、首、顔、胸、鼠蹊部領域に生じ、体温上昇、下痢を伴った。胸骨はステンレス鋼材で閉じられていた。家族は、Niレベルが、術前と術後で、術後の方が高かったと報告した。患者は、再入院し post pericardial syndrome と診断された。患者は高熱状態である。家族は、パッチテストが術前になされて、Ni と thimerosal に強度のアレルギーであることが分かっていた、と述べた。患者からはワイヤーが除去された。(企業

意見:患者は Ni アレルギーであることが知られていた。機器の添付文書には、316Lステンレスや、Cr や Ni にアレルギーを有する患者は禁忌としていた)

○歯科矯正機器:(2001)

歯科矯正治療を始めた患者がアレルギー反応を起こした。パッチテストでは、Ni に強度のアレルギー陽性を示した。抗ヒスタミン剤とステロイドが処方された。

○カテーテル:(2003)

患者が、機器の初回使用時に、針穿刺部位にアレルギー反応を起こした。皮膚は、穿刺部位周辺に発赤を生じ、かゆみ、痛みを伴っていた。針は除去され、医薬品が処方された。アレルギー・テストで、患者は Ni アレルギーであることが分かった。患者は、別のカテーテルに変更後、完全に回復した。

○ペースメーカー:(2004)

患者は Ni アレルギーであることが分かった。医師は Ti アレルギーも疑っている。局所的な赤みやかゆみがペースメーカー・ポケット周辺に観察された。血液検査では感染には陰性であった。

○ステント:(2005)

冠動脈用薬物放出ステントを埋植された患者で過敏反応を経験した。患者は2つのステントを2004年に埋め込まれていた。さらに3つめのステントを処置された。その後、1週以内に、患者のまぶたに腫れ、腕と足に発疹を生じた。心臓病医は医薬品に対する反応と考え、医薬品を変更したが、症状はむしろ悪化した。皮膚科医の判断で、別の医薬品が投与され、数日後に、症状は消失した。心臓病医はステントやコーティング薬物に起因するものとは思わなかった。最近、患者は Ni アレルギーであると診断された。ステンレス・スチール製のス