

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（H17・医薬-24）
分担研究報告書

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

分担研究者 松永佳世子 藤田保健衛生大学医学部 皮膚科講座教授

研究要旨

本研究では医歯科材料・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。平成 17 年度は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。その結果、該当する症例は 10 例であった。原因と疑われたインプラントは人工膝関節 3 例、ペースメーカー 2 例、人工大腿骨頭 1 例、下腿髄内ワイヤー 1 例（同時に創外固定ワイヤー装着）、漏斗胸のプレート 1 例、中足骨骨折時のワイヤー 1 例、股関節ワイヤー 1 例であった。金属のパッチテストは 5 例が陽性であったが、うちニッケルが陽性であった 1 例は、ステンレスの下腿髄内ワイヤーを埋植した時期には皮膚障害はなく、ステンレスの創外固定ワイヤーを装着後重度の接触皮膚炎を生じた。ニッケル陽性の他の 1 例はクロム・コバルト合金釘が大腿骨に埋植されていたが、これらには陰性であった。コバルトが陽性の 1 例はコバルト・クロム合金人工膝関節を埋植していたが、これを除去せずに症状が消失した。他の 2 例はインプラントに含まれない金属に陽性であった。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。

A. 研究目的

医歯科材料・インプラントによる皮膚科的不具合事例は、主に金属アレルギーの観点から国内・国外において報告されている¹⁻¹⁸⁾。インプラント機器による皮膚科的不具合には腐食などによる皮膚刺激と、金属によるアレルギー反応が推定される。したがって、その発症機序を明らかにするために、インプラントによって皮膚に生じた病変を組織学的に検討することがなされてきた。病理組織学的に表皮での海綿状態、真皮ならびに皮下脂肪組織における好酸球、リンパ球、形質細胞などの炎症細胞の種類によって、アレルギーが関

与した反応であるのか検討がなされてきた。

近年、インプラント近傍の障害皮膚に金属が存在するのか、X線マイクロアナライザーによる分析が行われ、その関連性を裏付ける検査方法となっている^{9,12,15,16)}。インプラントの金属材料によるアレルギー反応を証明する確実な方法は現在もパッチテストと呼ばれる皮膚テストである。パッチテストに適した金属の化合物の種類と濃度ならびに基剤を決定することは、発症機序解明に不可欠であり、より安全な材料改良に貢献することが期待される。

金属は組織のなかで溶出しイオン化することがアレルギー反応の条件になる。このこと

は下腿など骨接合用金属が皮膚(表皮と真皮)に近く接する部位の症例が障害例として多く報告されているからも支持される。原因金属としてはコバルト、ニッケル、クロムの症例が多い。これらの金属は装身具などによる陽性例も多く、インプラント装着前に装身具などによって感作が成立していた症例も少なくないことが推測される。コバルト、ニッケル、クロムについてはパッチテストの至適濃度も決定され試薬も入手しやすい。しかし近年インプラントとして使用頻度が増加しているチタン合金の成分はアレルギー症例が極めて稀であるために、これを証明するパッチテストの方法がまだ確立されていない金属も存在する。また、チタンのアレルギーであったとする文献においてもパッチテストの方法を詳しく述べていないために、接触アレルギーを明らかにできたのか、判断できない報告が多い。

本研究はインプラント機器による皮膚科的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。

平成 17 年度は(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、(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を検討したデータの紹介、(3)当科における金属パッチテストの陽性率の検討、(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を具体的な目標とした。

B. 研究方法

(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 Dermatitis²¹⁾、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（図29・図30）。

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。

C. 研究結果

(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

国内、海外のインプラントの金属が関与したと考えられる症例の文献の抜粋を表1に示した。

金属のアレルギーによると確定できた症例の多くは、インプラントと皮膚、すなわち表皮と真皮が近接している部位にインプラントを挿入している症例が多かった。本邦においても、海外と同様に下腿の骨接合用金属によるものが最も多く、原因の金属としては、ニッケル、クロム、コバルト、マンガン、銅の確実例が報告されていた。

チタンの症例は散見されるが、パッチテストの方法の詳細が記載されておらず、陽性と述べているだけでは、刺激反応が除外できず確実例と判断できる症例はなかった。

組織学的な検討がなされている報告があり、特徴としては、表皮に変化をきたしたものは

少なく、真皮の炎症性細胞浸潤が見られ、浸潤している細胞は、リンパ球、好酸球、形質細胞であった。X線マイクロアナライザーによる金属の局在は、関連性が強く示唆された症例でも組織中に原因の金属が証明できない例が多かった。

なお、インプラントの金属アレルギーによる症例と診断するには、表2のような診断基準がRostokerら¹⁸⁾ならびに岡田から提唱されている¹⁷⁾。

(2)慢性再発性インステント再狭窄における金属アレルギー反応の検討

ステンレス鋼のステント（Palmaz-Shatz, MultiLink, Nir, GFX）を使用して治療していた症例のなかで、二度以上再狭窄をしている群と、再狭窄が50%未満の群に分けてみると、背景因子には差がなく、血管には差を認めた。

ステントのサイズには差があり再狭窄を起こした場合は直径が3.08mmと細いことが明らかとなった。再狭窄例はニッケルに30%陽性、狭窄例では8.8%が陽性だった（図1-28）¹⁹⁾。

(3)当科における金属パッチテストの陽性率の検討

ジャパニーズスタンダードシリーズのパッチテスト陽性率上位10位内に金属アレルギーが7種も含まれた(表3)。nickel sulfateとgold sodium thiosulfateは、統計学的にも女性に優位に多いアレルギーであった(表4・5)。

金の女性優位の現象について、われわれは動物モデルを作成し、7週齢のB6C3F₁雌雄マウスを用いて、5%金チオ硫酸ナトリウム溶液にて感作後惹起し、マウスの耳介の厚さを経時的に測定したところ、惹起48時間後に雌の方が雄よりも優位に強い耳介腫脹を示した（図31）。マウスモデルを用いた金チオ硫酸ナトリウムの感作試験は成立し、その反応も雌の方が雄よりも優位に強く、ヒトパッチテストの結果と同様であり、金チオ硫酸ナトリウムの反応性に雌雄差があることを明らかにした。その後さらに性ホルモンの関与を検討した結果、金接触感作反応は、エストラジオールが反応の強さを増強する抗原の1つであ

ると結論した(図3 2)²⁰⁾。

(4) 藤田保健衛生大学病院におけるインプラントによる皮膚不具合例の検討

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。その結果、該当する症例は10例であった。原因と疑われたインプラントは人工膝関節3例、ペースメーカー2例、人工大腿骨頭1例、下腿髓内ワイヤー1例(同時に創外固定ワイヤー装着)、漏斗胸のプレート1例、中足骨骨折時のワイヤー1例、股関節ワイヤー1例であった(表6)。金属のパッチテストは5例が陽性であったが、うちニッケルが陽性であった1例は、ステンレスの下腿髓内ワイヤーを埋植した時期には皮膚障害はなく、ステンレスの創外固定ワイヤーを装着後重度の接触皮膚炎を生じた(図3 3)。ニッケル陽性の他の1例はクロム・コバルト合金釘が大腿骨に埋植されていたが、これらには陰性であった。コバルトが陽性の1例はコバルト・クロム合金人工膝関節を埋植していたが、これを除去せずに症状が消失した。他の2例はインプラントに含まれない金属に陽性であった。

E. 考察とまとめ

本邦においても、ニッケル、クロム、コバルト、マンガン、銅による皮膚不具合例は、臨床経過、組織学的検討、X線マイクロアナライザーによる組織内金属の検出、パッチテスト結果、原因インプラント除去による皮膚症状の改善効果などによって、アレルギー機序による因果関係が明確な症例が報告されている。したがって、これらの金属ではパッチテスト試料が決定できており、ヒトにおける安全性評価方法の基本的評価法は確保されていると言える。しかし、近年汎用されるようになったチタンをはじめとするアレルギー症例が極めて稀な金属については、金属のアレルギーを証明する確実な評価法がまだ確立できていない。今後ともにパッチテスト至適濃

度について検討していく予定である。

インプラントによる皮膚障害の診断基準を作成することが、安全性評価法開発のゴールドスタンダードとなる。この点については、岡田ら¹⁷⁾あるいはRostokerら¹⁸⁾の提唱した診断基準がある。後者の基準の金属除去後2カ月で治癒するとする条件は、これまでの報告例の臨床経過をみると、短い可能性が高い。本研究において、さらに多くの症例を集積して、診断基準を提案したい。

慢性再発性インスメント再狭窄における金属アレルギー反応においては、冠動脈ステントは常に血管内を流れる炎症細胞と直接接触する機会が多いと推測される。そのような状況下で、ステンレススチールから腐食し溶出したニッケル、コバルト、クロムなどがマクロファージに抗原提示され感作が成立する、あるいはアレルギー反応を惹起して、再狭窄や再々狭窄を引き起こす可能性がある。今回のわれわれの研究結果も、ニッケルのアレルギーが再狭窄あるいは再々狭窄に関与していることを明らかにした。冠動脈は生命に関わる重要かつ緊急性に富む部位である。したがって、金属アレルギー発症が少ない、チタン合金などのより安全なインプラント材料へ変更が必要と考えた。

当科で1994年から2000年までの7年間に施行した1302例(男性323例、女性979例)のジャパニーズスタンダードシリーズ25種と金チオ硫酸ナトリウムのパッチテストの結果、当科でも上位10位内に金属アレルギーが7種も含まれ、いかに金属アレルギーがわれわれの日常生活に密着したアレルギーであるかが伺える。またnickel sulfateとgold sodium thiosulfateは、統計学的にも女性に優位に多いアレルギーであった。

陽性頻度の高かった金属アレルギーについて、それぞれ性別、年代別の比較では、cobalt chlorideはいずれの年代層においても、パッチテスト陽性率が高く、統計学的に性差はみられなかったが、生活密着型アレルギーの様相を呈していると考えられる。Nickel sulfateは、20歳代の女性に優位に陽性率が高かった。これは、ピアスやイヤリングなどの装身具の

使用頻度ももちろん関係するが、カーラー、ビューラー、ブラジャーのワイヤーなどのように、直接皮膚に接触する器具を連日使用する機会が男性より多いことも一要因と考えられる。Potassium dichromate は、30 歳代以降はすべて男性の陽性率の方が高く、特に 30 歳代と 70 歳代以降に優位差がみられた。セメントの改良により、依然ほどセメント皮膚炎と診断する機会は少なくなっているが、職業性の関与が考えられる。

Gold sodium thiosulfate は、従来の報告通り女性の方がパッチテスト陽性率は高く、特に 20、60 歳代の女性に優位に陽性率が高かった。20 歳代の女性に金感作が多いことは、ピアスの普及が一因をなしていると思われる。Mercuric chloride は、60 歳代以降の男性に優位に陽性頻度が高かった。Mercuric chloride は、殺菌、消毒剤として、依然家庭で使用されてきた赤ちんやマーキュロクロムに含有されていたが、幼少時に使用した可能性の高い世代の男性が、パッチテスト陽性率が高いと思われる。Ammoniated mercuric chloride は、50、60 歳代の男性に陽性頻度が高かった。Thimerosal は、60 歳代男性に優位に陽性頻度が高かった。

パッチテスト陽性上位アレルゲンは、時代の変遷と共に変化してきており、当科のパッチテスト結果から見た大きな変化は、金属アレルゲンの陽性率が上昇していることである。従来の上位アレルゲンと入れ替わり 10 位の中に 7 種もの金属アレルゲンが含まれており、いかに金属アレルゲンが日常生活に密着したアレルゲンであるかが伺えた。

金の女性優位の現象についてのマウスモデルによる研究から、ヒトのアレルゲン陽性率が、その接触機会にのみならず、性差および性ホルモンなどの影響を強く受けることが明らかになった。インプラントの安全性評価においても、年齢、性差、基礎疾患などの患者個々のリスクファクターの検討も必要と考えられる。

藤田保健衛生大学病院は病床数 1505 床の最大規模の病院である。平成 16 年度の実績では循環器では年間心臓カテーテル検査は

1600 件、ステント 257 件、ペースメーカー植え込み手術 59 件、植え込み型除細動機植え込み手術 10 件、整形外科での人工股関節置換術は 88 件、人工膝関節置換術は 42 件、人工骨頭置換術は 32 件である。今回の当科で把握しているインプラントによる皮膚科的症例は過去 8 年間に 10 例であった。そのうちで金属のアレルギー機序で発症したと考える症例は確実 1 例、可能性 2 例であり、全体に占める割合は少ない。

しかし、インプラントは生体内に長く埋め込まれ、その安全性が患者一人一人の生命と健康に直接大きく関与するものであり、より良い製品の開発は国民の健康と QOL(Quality of life)の向上に極めて重要な課題といえる。平成 18 年度はさらに残された課題に取り組む予定である。

F.参考文献

1. Hasan I.Abdallah, Rohinton K. Balsara, Anna C. O'Riordan: Pacemaker contact sensitivity :Clinical recognition and management. Ann Thorac Surg 57:1017-1018, 1994
2. Brun R, Hunziker N: Pacemaker dermatitis. Contact Dermatitis 6:212-213,1980
3. Peters MS, Schroeter AL, Van Hale HM, Broadbent JC: Pacemaker contact sensitivity. Contact Dermatitis 12:14-18, 1984
4. Landwehr AJ, Van Ketel WG: Pompholyx after implantation of a nickel containing pacemaker in a nickel allergic patient. Contact Dermatitis 9:147, 1983
5. Verbov J: Pacemaker contact sensitivity. Contact Dermatitis 12:173, 1985
6. Knit A, Vermanderer F: Reticular telangiectatic erythema after implantation of a pacemaker. Dermatologica 166: 322-324, 1983
7. Viraben R, Boulinguez S, Alba C: Granulomatous dermatitis after implantation of a titanium-containing pacemaker. Contact Dermatitis 33: 437, 1995
8. Rueda MJ, Pons-Guiraud A: Allergie au pace maker. Nouv Dermatol 13:183-187, 1994

9. Tan M, Suzuki H: Usefulness of titanium implants for systemic contact dermatitis due to orthopaedic prostheses. *Contact Dermatitis* 33:202, 1995
10. Holgers KM, Roupe G, Tjellström A, Bjursten LM: Clinical, immunological and bacteriological evaluation of adverse reactions to skin-penetrating titanium implants in the head and neck region. *Contact Dermatitis* 27: 1-7, 1992
11. Hashimoto R, Hayakawa R, Kato Y, Sugiura M :A case of contact dermatitis due to nickel in an orthopedic implant. *Environ Dermatol* 7: 164-168, 2000
12. 望月恵子、本田まり子、新村真人：骨接合金属による接触皮膚炎。 *皮膚病診療* 8: 751-754, 1986
13. Ishii A, Nakayama H: A case of nickel dermatitis due to metal implant. *Environ Dermatol* 1: 123-127, 1994
14. Hayashi S, Dekio S, Honda S, Jidori J: Contact dermatitis from a metallic splint. *Environ Dermatol* 32: 33-36, 1996
15. 望月恵子、始関玲子、山口万里子、上出良一、新村真人、上野博嗣：骨接合金属による接触皮膚炎。 *皮膚* 32: 増 8: 91-95, 1990
16. 谷川英子、井料香代子、中野俊二、笹川陽一郎、樋口富士男：骨接合金属によると考えられる接触皮膚炎。 *皮膚* 31: 増 7:257-262, 1989
17. 岡田恭司、荒井三千雄、水谷洋一、山本正洋：骨接合金属によるアレルギー症状を呈した脛骨骨折例。 *整形外科* 36: 551-556, 1985
18. Rostoker G, Robin J: Dermatitis due to orthopaedic implants. *J Bone Jt Surg* 69A: 1408-1412, 1987
19. Saito T, Hokimoto S, Oshima S, Moriyama Y, Yamamoto K, Noda K, Kojyo Y, Matsunaga K : Metal allergic reaction in chronic refractory instent restenosis. Scientific Session 2001, Anaheim, California November 11-14, 2001
20. 鶴田京子：金アレルギーの性差の臨床的背景とマウスモデルによる発症機序の検討。 *藤田学園医学会誌, 臨時増刊学位論文集* 20(2): 479-493, 2001
21. Rietschel RL, Fowler JF: Dermatitis from medical devices, implants, and equipment, Fisher's Contact Dermatitis, 5th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001, pp321-342

表1. インプラントによる皮膚科的症例: 文献より抜粋(その1)

No	Authors	Reported year	Journal	Responsible metals	Claimed implants	Age	Gender	Underlying disease	Skin manifestations
1	Hasan I, Abdullah, Robinton K, Balsara, Anna C, O'Riordan	1994	Ann Thorac Surg 57:1017-8	Ti	pacemaker: Medtronic Spectrax pacemaker; model 8423, Medtronic, Minneapolis, MN	10	female	vasovagal syncope and sinus pauses	no manifestation
2	Brun R, Hunziker N	1980	Contact Dermatitis 6:212-213	Hg	pacemaker				
3	Peters MS, Schroeter AL, Van Hale HM, Broadbent JC	1984	Contact Dermatitis 12:14-8	Ti	pacemaker				4 times, 5 months, 3 weeks, 17 months, 6 weeks after implantations
4	Landwehr AJ, Van Ketel WG,	1983	Contact Dermatitis 9:147	Ni	pacemaker				
5	Verbov J	1985	Contact Dermatitis 12:173	Ti	pacemaker	76	male		persistent pyoderma at sites of insertion of pacemakers 4 times
6	Knit A, Vermandere F	1983	Dermatologica 166:322-4	Ti	pacemaker				
7	Viraben R, Boulinguez S, Albu C	1995	Contact Dermatitis 33:437	Ti	pacemaker: Medtronic	75	male	complete heart block	2 months later, non-puritic dermatitis over the site of implantation, slowly extending to the right arm and trunk
8	Ruedo MJ, Pons-Guiraud A	1994	Nouv Dermatol 13:183-7	Ti	pacemaker				
9	Tan M, Suzuki H	1995	Contact Dermatitis 33:202	Ni, Cr	orthopaedic prostheses: stainless steel, Al, 316Cr 16-8%, Ni 10-14%, Mo 3%, Fe 60%, S 0.03%, P 0.04%	56	male	fracture of the left tibia	eczema appeared along the surgical scar and on his trunk 6 months later
10	Holgors KM, Roupe G, Tjellström A, Bjursten LM	1992	Contact Dermatitis 27:1-7	Ti	skin-penetrating titanium implants for anchorage of facial prostheses or bone-conducting hearing aids				Gothenburg, 1977-1989, 445 cases. 9 cases had clinical histories of adverse skin reactions around the titanium implants. 9 cases without adverse reactions
11	Hashimoto R, Hayakawa R, Kato Y, Sugitara M	2000	Environ Dermatol 7:164-8, 2000	Ni	orthopaedic implant of the left tibia; fracture	44	female	fracture of the left tibia	erythematous, itchy eruption appeared on her left leg where the metal was implanted. Gradually the eruption spread to the extremities
12	Mochizuki K, Honda M, Niimura M, Sugiyama H	1986	HIFUBUYOH-SHINRYOH 8:751-4	Mn	orthopaedic implant	36	male	bone fracture of the left tibia	one year and 9 months later, erythema, vesicles developed on the extensor part of the left leg
13	Tanikawa E, Iryo K, Nakano S, et al	1989	Skin Research 31:257-62, 1989	Cr	orthopaedic implant: Robert-Mulhys SMO, Ni 10-14%, Cr 16-18%, Mn 2%, Fe 67%, Mo 2-3%, Si 1%, C 0.03%	38	male	bone fracture of the right tibia	18 years later, erythema and scaling on the right periorbital area, and erythema, papules developed on the extensor site of the right leg
14	Mochizuki K, Shiseki R, Yamaguchi M, et al	1990	Skin Research 32:91-5	Cr, Cu	orthopaedic metal implant: 22A C 0.02%, Si 0.8%, Mn 2.5-3.5%, P 0.04%, S 0.03%, Ni 21-23%, Cr 19-21%, Mo 1.75-2.75%, Cu 1.75-2.75%, Fe 45-50%, Ni, Cr, Mn, Mo, Fe SEA-200	44	male	bone fracture of the right tibia	Refractory manifestations erythema, seropapules, and erosion on the operation wound 3 months after the operation, and spread to the face, trunk and extremities
15	Ishii A, Nakamura H	1993	Environ Dermatol 1:123-127	Ni		59	male	VSD	erythema, infiltration, granulation, fistula on the chest over the wiring sites
16	Hayashi S, Dekio S, Honda S, et al	1996	Environ Dermatol 3:33-6	Ni, Cr	metallic splint Ni pin 12-15%, Cr 16-50%, Mo 2-3%	74	female	osteoarthritis	erythematous, itchy eruption on her right thigh

表1. インプラントによる皮膚科的症例 文献より抜粋 (その2)

No	Pathology	Other conditions	Removal of the implant	Patch test results	Patch test materials	Discussion
1		at 3 months later syncope recurred; pacemaker malfunction due to current-out-pul loss; the pacemaker pocket contained sterile serous fluid	3 times pacemakers were implanted and then removed because of the fluids in the pockets	titanium and polyurethane	not described	patch test results are not described; no skin lesion; possible
2						
3				2+ reaction to titanium	?	
4						
5				not tested		the cause; not specified
6						
7	nodular infiltrate of histiocytes and giant cells; non-casening tuberculoid granuloma		Spontaneous resolution of the pruritus. The eruption finally completely cleared up without recurrence	no reactions to titanium case, platinum electrodes, silicone cap, standard series, metals series, including titanium dioxide 1% pet		electron probe micro analysis was performed on the skin biopsy, detecting titanium restricted to the granuloma area.
8						
9	L.T.T. Ni 743+ X-ray microanalysis showed large amounts of nickel on point analysis.		Replaced the stainless-steel implants with pure titanium substitutes. 6 months later, the skin lesion disappeared and have no recurrence	Positive to NiSO ₄ , K ₂ Cr ₂ O ₇ , MnCl ₂ , ZnCl ₂	not described	
10				none reacted to titanium	titanium disc, titanium peroxy gel as is, titanium peroxy gel 1:10, titanium peroxy gel 1:100, Termeridil with Polymyxin B Standard series of 31 allergens and 14 dental allergens	irritant reactions were seen in the group of Staphylococcus infection with history of prior skin disorders such as seborrheic dermatitis
11			Removed, 4 months later her leg eruption disappeared.	positive reactions to nickel sulphate 2.5% pet and cobalt chloride 1% pet	positive reactions to nickel sulfate 2.5% pet and cobalt chloride 1% pet	
12	acanthosis of the epidermis, hyperpigmentation of the basal layer, no spongiosis, superficial perivascular lymphocytic infiltration X-ray microanalysis did not demonstrate manganese or other metals.	no other manifestation	after removal of the metal plate, the skin lesion once exacerbated for a few days, then subsided two months later	manganese chloride(++) zinc chloride(+), urushiol(+)	manganese chloride 2% aq zinc chloride 2% aq	22 cases of contact dermatitis from orthopedic prostheses: Ruses from Co, 5 cases from nickel, 2 cases from chromium, one case from cobalt, and nickel, chromium, molybdenum, cobalt, palladium, and 6 cases did not react to either of cobalt, nickel and chromium
13	degeneration of the bone and sclerosis around the metal screw. No granulomatous change or inflammatory change were not seen X-ray microanalysis did not demonstrate chromium.		Removal of the metal implant was removed	potassium dichromate 2% aq(+)	Ni, Cu, Sb, Fe, Pt, Au, Pd Co: irritant reactions	Rostoker Criteria for diagnosis of metal allergy from implants 1) skin lesion develops after metal implantation 2) no other causes 3) chronic 4) subside in two months 5) corrosion is necessary but difficult to observe macroscopically
14	acanthosis, spongiosis eosinophils and plasma cells and lymphocytes X-ray microanalysis did not show metal components of the implant		Removal of the plate was performed Transient exacerbation was developed but subsided in 3 months with pigmentation.	potassium dichromate(0.4% aq(++)), Copper sulfate 2% aq(+)		
15	No findings of spongiosis, acanthosis, or exocytosis. Superficial and deep perivascular lymphocytic and neutrophilic infiltration was seen in the dermis and subcutis. Plasma cells were seen in the vicinity of the wire Not taken		Removal of the wires were done. 6 months later the skin lesions were subsided	Nickel sulfate 2% aq(++)		
16			No: plastic brace	Nickel sulfate 2% aq(+), Potassium dichromate 0.4% aq(+), scratch patch		not by joint prosthesis but splint

表2. インプラントの金属による皮膚炎と診断する基準

Rostoker らの診断基準	
1)	皮膚炎が金属挿入の後に発症する。
2)	他の原因がない。
3)	慢性である。
4)	抜去後2カ月以内に治癒する。
5)	金属の腐食が必要だが肉眼的には見えにくい。
岡田らの診断基準	
1)	手術前に尋麻疹など、アレルギー反応を起こすという既往がない。
2)	皮膚症状が長く続き、通常の治療で治りにくい。
3)	金属除去後、速やかに症状が消滅する。
4)	金属成分のあるものに対し、パッチテストが陽性になる。
5)	末梢血に好酸球増多の見られることがある。

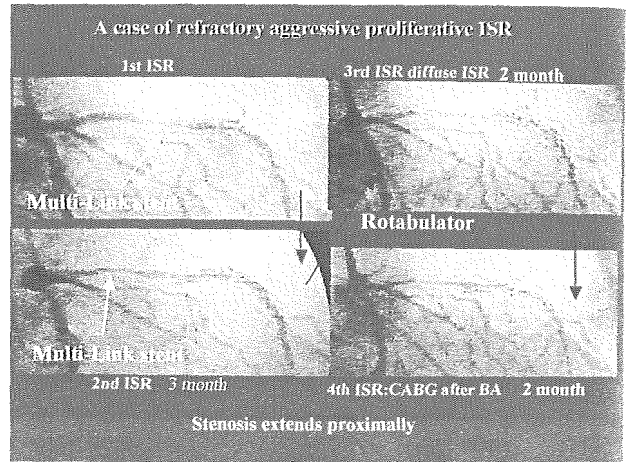


図3 増殖性冠動脈ステント再狭窄症例

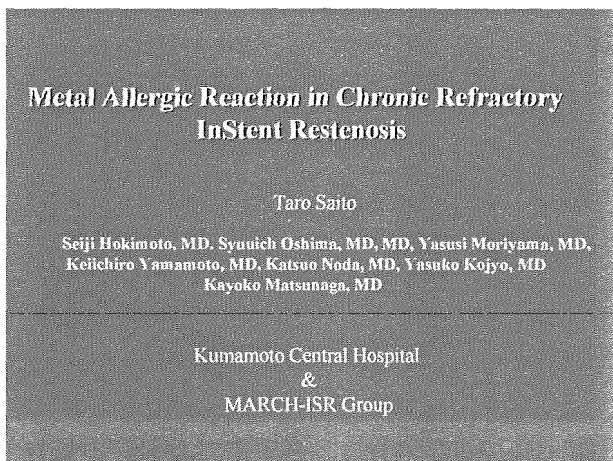


図1. 慢性再発性冠動脈ステント再狭窄における金属アレルギー反応の共同研究者

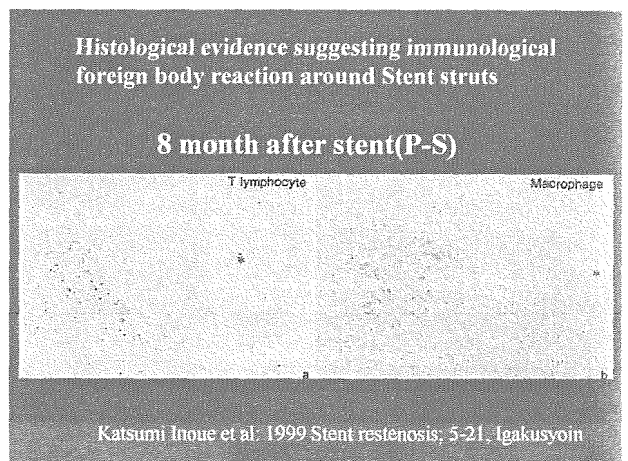


図4. ステント周囲の免疫学的異物反応の病理組織学的所見

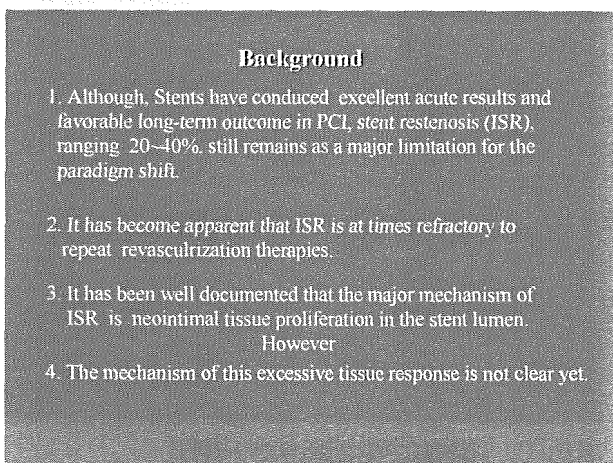


図2. 冠動脈ステント再狭窄研究の背景

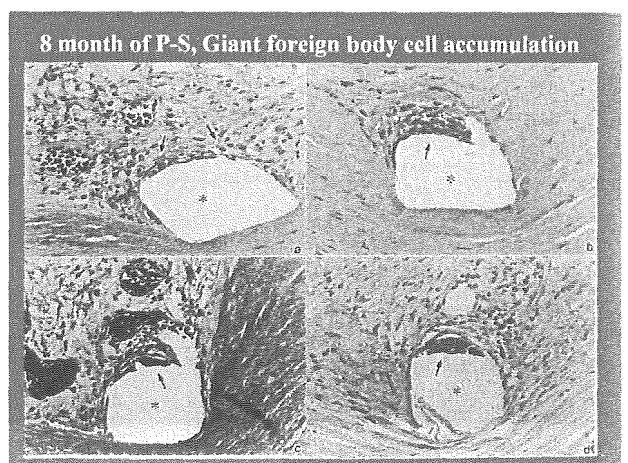


図5. 狭窄後8カ月後巨異物細胞が集積

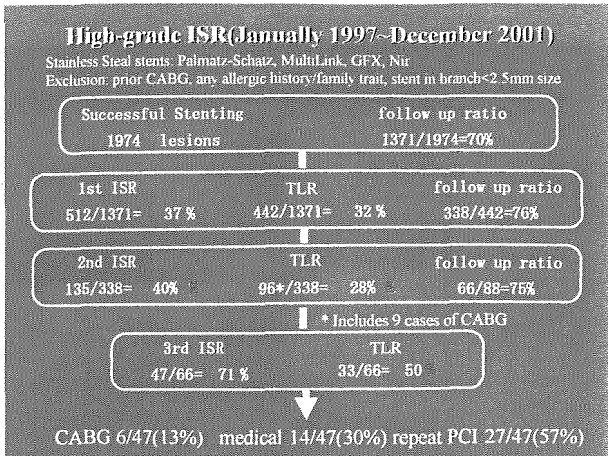


図 6. 1997-2001 の冠動脈ステント再狭窄例のフローチャート

Patient Baseline Characteristics

	CR-ISR (n=109)	Non CR-ISR (n=184)	p
male	76 (70%)	148 (81%)	ns
age	67 ± 8.4	65 ± 9.2	ns
DM	52 (47%)	57 (31%)	p<0.005
HL	48 (44%)	81 (44%)	ns
HT	81 (74%)	148 (80%)	ns

図 9. 両群比較で再狭窄例には糖尿病が多くみられた

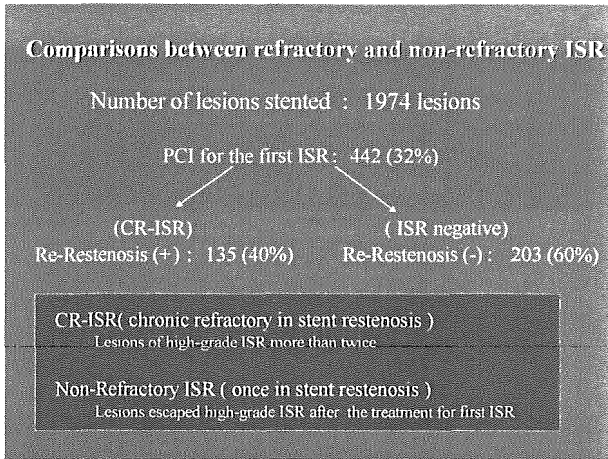


図 7. ステント挿入後の経過

Lesion characteristics ①

	CR-ISR (n=135)	non CR-ISR (n=203)	p
Target vessel			
LAD	70 (52%)	110 (54%)	ns
LCX	27 (20%)	40 (20%)	ns
RCA	34 (25%)	44 (22%)	ns
AHA/ACC			
A/B1	0/7	0/7	
B2/C	78/50 (95%)	125/71 (96%)	ns
Lesion length	14.7 ± 6.9	10.6 ± 6.7	
<15mm	66	139	
15-20	29	21	
20-25	16	15	
>25mm	24 (30%)	7 (11%)	p<0.0001

図 10. 病変の特性：再狭窄では病変の長さが有意にながかった。

CR-ISR v.s. Non CR-ISR

CR-ISR: n=109 patients, 135 lesions
non CR-ISR: n=184 patients, 203 lesions

Treatment for 1st Stent Restenosis

	CR-ISR (n=135)	non CR-ISR (n=203)	p
BA	97 (72%)	147 (72%)	ns
Rotablator	36 (27%)	48 (24%)	ns
Stent	2 (1%)	8 (4%)	ns

図 8. 両群の指標の比較

Lesion characteristics ②

	CR-ISR (n=135)	Non CR-ISR (n=203)	p
Reference vessel	2.9 ± 0.37 (mm)	2.9 ± 0.36 (mm)	ns
Calcification			
none	15	31	
mild	58	80	
moderate	48	65	
severe	14 (46%)	27 (45%)	ns
Bending			
none	106	136	
mild	2	19	
moderate	25	45	
severe	5 (22%)	3 (24%)	ns

図 11. 両群に特に差がない項目

	CR-ISR (n=135)	Non CR-ISR (n=203)	p
MultiLink	23	29	-
Palmatz-Schatz	36	91	-
Nir	32	23	-
Gfx	39	50	-
その他	5	10	-
Multiple Stent (more than 2)	25 (19%)	39 (19%)	ns

図 1 2. ステンツの性状は特に差はなかつた

	CR-ISR (n=135)	Once ISR (n=203)	p
Stent size	3.1±0.28	3.1±0.33	ns
2.5mm	38 (28%)	29 (14%)	p<0.005
3mm~	97	174	
Stent length	20.7±8.7	20.2±8.5	ns
>20mm	52 (38%)	72 (35%)	ns
<20mm	83	131	

図 1 3. ステンツの種類は径が小さいものを再狭窄の症例では使用していた

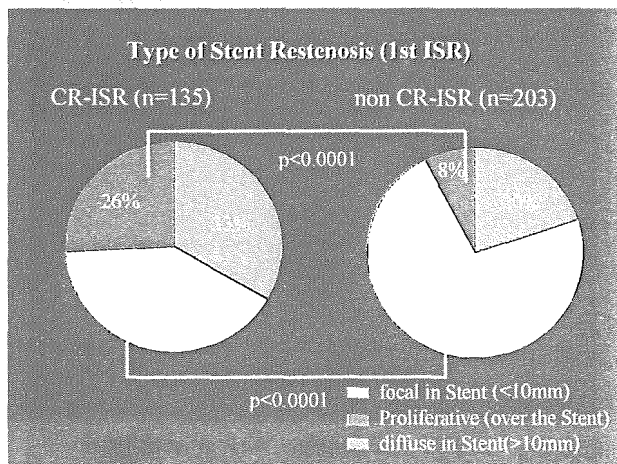


図 1 4. 再狭窄例では広範囲の狭窄がみられた

Conclusion

The characteristic morphological pattern of CR-ISR group was the diffuse aggressive proliferation of neointimal tissue, which sometimes extends over stented portion.

It can be postulated that the delayed type hypersensitivity may play a role in this continuous tissue proliferation.

図 1 5. 再狭窄では遅延型の過敏症が関連している可能性が示唆された

Study Purpose

To examine the relationship between chronic refractory instent restenosis (CR-ISR) and the delayed type hypersensitivity to the metal components of stainless steel stent (316L).

図 1 6. そこでステンレス鋼の遅延型の過敏症を検討することにした

Method 1

1. Patient Enrollment (based on voluntary basis)

- * Among the patients who received tubular type stainless steel stents (Palmatz-Schatz, MultiLink, Nir, GFX) successfully in major coronary arteries, two groups were compared as follows
- * CR-ISR group: Patients who had high-graded ISR at least twice
- * Control group: Patients who escaped high-grade restenosis at 6 months fu

2. Patient Exclusion

- * Patients who received bypass surgery or any surgery with metal material implant.
- * Patients who has any known allergic disease
- * Patients who received stent implantation in branch arteries with 2.5mm size.

図 1 7. 方法 1 対象

Method 2

Skin patch test (voluntary basis)

- * Five hospitals which has both cardiology and dermatology departments were participated.
- * Core dermatology department prepared skin patch reagents of 316L stainless steel stents (5% nickel sulfate, 0.5% potassium chloride, 5% manganese) and delivered to each dermatologists with the consented ICDRG evaluation criteria.
- * Patients visited site dermatologist for evaluation 3 days and 7 days after the skin patch. Test was performed in a blind fashion.
- * Slides carefully took by dermatologists were sent to core-lab and final evaluation was performed by contact dermatitis specialists also in a blind manner.
- * Only the skin reaction lasted for 7 days were judged as positive.

図 1 8. パッチテスト方法

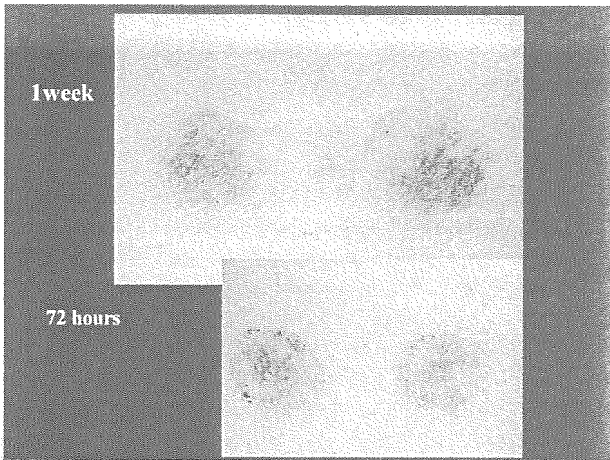


図 1 9. パッチテスト陽性反応

	CR-ISR (n=60)	ISR negative (n=68)	p
male	52 (87%)	52 (76%)	0.097
age	68±7.9	67±8.3	0.391
DM	37 (62%)	50 (73.5%)	0.151
HL	28 (46.7%)	43 (63.2%)	0.060
HT	23 (38.3%)	33 (48.5%)	0.246
Obesity	50 (83.3%)	64 (94.1%)	0.086
Smoking	38 (63.3%)	45 (66.2%)	0.737

図 2 0. 対象の背景

	CR-ISR (n=60)	ISR negative (n=68)	p
Target vessel			
LAB	36	25	<0.05
LOX	11	12	ns
RCA	13	31	p<0.01
AHA/ACC			
A / B1	8 / 16	4 / 21	
B2 / C	19 / 17 (60%)	35 / 8 (65%)	ns
Lesion length			
<15mm	30	41	
15-20	14	9	
20-25	3	4	ns
>25mm	13 (27%)	14 (26%)	

図 2 1. 病変の特徴 1

	CR-ISR (n=60)	ISR negative (n=68)	p
RVD (mm)	2.94 ±0.43	3.24 ±0.41	0.0001
Calcification			
none	45	56	
mild	6	4	
moderate	3	4	
severe	5 (13%)	4 (12%)	ns
Bending			
none	36	42	
mild	12	16	
moderate	11	9	
severe	1 (20%)	1 (15%)	ns

図 2 2. 病変の特徴 2

	CR-ISR (n=60)	ISR negative (n=68)	p
Stent size	3.08±0.30	3.31 ±0.38	0.0001
2.5mm	5 (8%)	2 (3%)	ns
3mm~	55	66	
Stent length	20.5±8.87	18.18±5.6	0.083
>20mm	23 (38%)	21 (31%)	ns
<20mm	37	47	ns

図 2 3. ステンツの特徴 サイズが関連

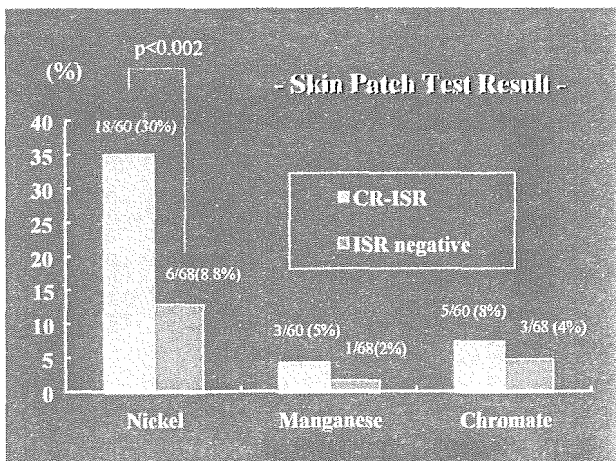


図 2 4 . ニッケルの陽性率が再再狭窄で高い結果であった

Conclusions

1. LAD lesion, Reference vessel size and Stent size were significantly related to chronic refractory ISR (CR-ISR)
2. Delayed type allergic skin patch test to Nickel was also more frequently observed in CR-ISR group than control.
3. It was suggested that Nickel allergy could be one of the mechanisms for CR-ISR.
4. It is mandatory to conduct the prospective randomized study to confirm the Nickel contribution to ISR.

図 2 7 . 結論

Multiple Stepwise Regression Analysis

Parameters	Parameter estimates	SE	P value	R	Odds (95%CI)
Reference vessel diameter	-1.7403	0.5286		-0.22	0.18 (0.06-0.49)
Stent length	0.0553	0.0318	0.0813	0.08	1.06 (0.99-1.12)
Male gender	0.9650	0.5550	0.0821	0.08	2.62 (0.88-7.79)
Nickel positive	1.6887	0.5742		0.19	5.41 (1.75-16.66)
Hyperlipidemia	0.9193	0.4250		0.12	2.51 (1.09-5.77)
Obesity	1.3293	0.7452	0.0744	0.08	3.78 (0.88-16.28)

図 2 5 . 多変量解析結果

Diverse Directions to reduce Instant Restenosis

1. Drug therapy
 - *Oral drug therapy suppressive for tissue growth
 - *Local drug delivery using gene or suppressive drug
2. Radiation therapy
 - *Brachytherapy
 - *Radioactive stent
3. Stent deployment strategy
 - *Direct stenting
 - *Dilating stenting
4. New stent
 - *Stent design

図 2 8 . ステンツの再狭窄を防ぐには新しい素材とデザインが必要である

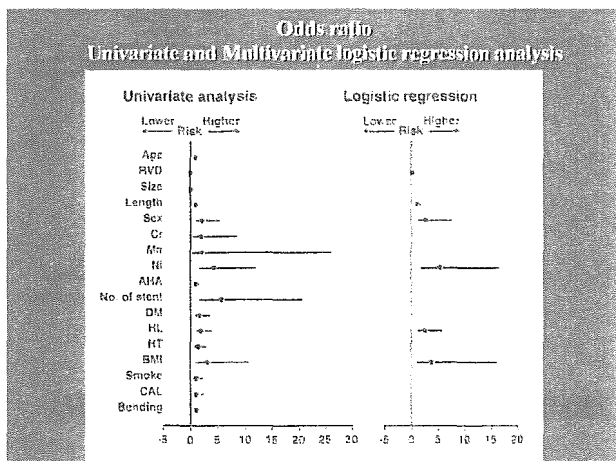


図 2 6 . オッズ比

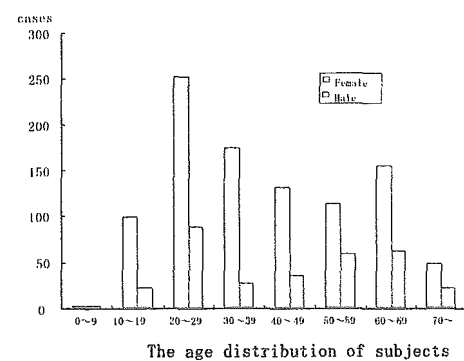


図 2 9 . パッチテスト施行例の背景

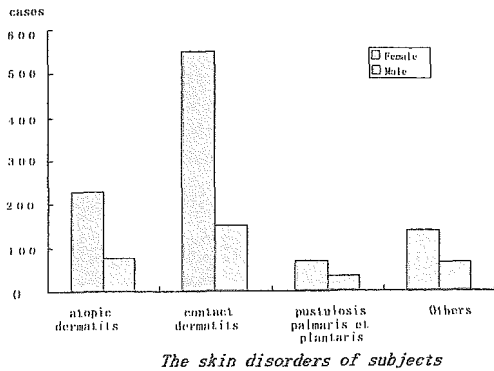


図30. パッチテスト施行例の疾患

1	Cobalt chloride	1.0%pet.	15	Lanolin alcohol	30.0%pet.
2	Nickel sulfate	2.5%pet.	16	PPH-FE	1.0%pet.
3	Potassium dichromate	0.3%pet.	17	Ethylbenzothion 20%	1.0%pet.
4	Thiram mix	1.25%pet.	18	Prurin	0.01%pet.
5	PPH-black rubber mix	0.6%pet.	19	Urushiol	0.02%pet.
6	Mercuric mix	2.0%pet.	20	Thimerosal	0.1%pet.
7	Cafine mix	7.0%pet.	21	Ammoniated mercury	1.0%pet.
8	Fradiomycin sulfate	20.0%pet.	22	Petro-latum	as is
9	Ralsol of Paru	25.0%pet.	23	Formaldehyde	1.0%aq
10	Rosin	20.0%pet.	24	Kathon FG	0.01%aq
11	Fragrance mix	8.0%pet.	25	gold sodium thiosulfate	0.5%pet.
12	Bithiocarbamate mix	2.0%pet.	26	Thimerosal	0.05%pet.
13	Paraben mix	15.0%pet.	27	Mercuric chloride	0.05%aq
14	Paraphenylenediamine	1.0%pet.	28	Distilled water	as is

pet. = patch test, aq. = aqueous solution, FE = formaldehyde

表3. ジャパニーズスタンダードシリーズ

rank	Total (n=1302)	%	F (n=979)	%	M (n=323)	%			
1	cobalt chloride	208	16	cobalt chloride	152	15.5	cobalt chloride	56	17.3
2	nickel sulfate	164	12.6	nickel sulfate	142	14.5*	potassium dichromate	50	15.5
3	gold sodium thiosulfate	142	10.9	gold sodium thiosulfate	108	10.8*	PPD	32	9.9
4	potassium dichromate	128	9.9	potassium dichromate	79	8.1	urushiol	32	9.9
5	fradiomycin sulfate	83	6.4	fradiomycin sulfate	60	6.1	thimerosal	26	8
6	PPD	78	6	PPD	46	4.7	fradiomycin sulfate	23	7.1
7	urushiol	72	5.5	urushiol	40	4.1	nickel sulfate	22	6.8
8	ammoniated mercuric chloride	58	4.6	Mercuric chloride	34	3.5	ammoniated mercuric chloride	18	5.6
9	mercuric chloride	48	3.7	ammoniated mercuric chloride	32	3.3	gold sodium thiosulfate	14	4.3
10	thimerosal	44	3.4	thimerosal	26	2.7	mercuric chloride	14	4.3

* p < 0.05

表4. パッチテスト陽性率上位10種

Allergens	21	48	72	96	120	144
Cobalt chloride	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Nickel sulfate	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Potassium dichromate	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Gold sodium thiosulfate	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Ammoniated mercuric chloride	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Mercuric chloride	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Thimerosal	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

* p < 0.05
** p < 0.01
*** p < 0.001

表5. 年齢別、性別陽性率

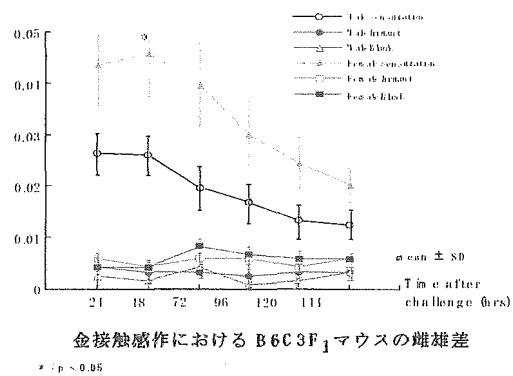


図31. マウスにおける金感作の性差

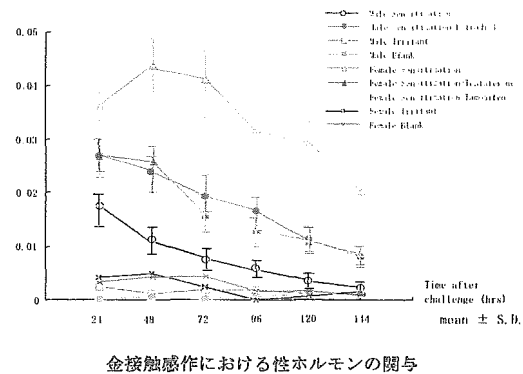


図32. 金感作における性ホルモンの関与

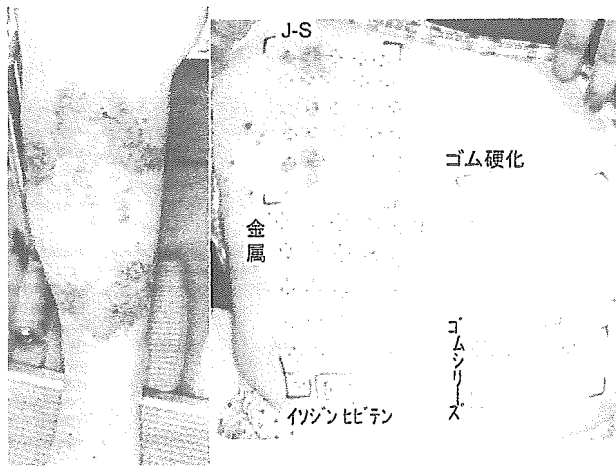


図 3 3 . 18 歳の女性。骨形成不全の
雨に髓内ワイヤーを入れているが、緩
んできたために、創外ワイヤーを装着
したところ 3 週後に写真左下腿に紅
斑、丘疹、浸出液を認める重度の接触
皮膚炎を発症した。

表6. 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

No	初診年	年齢	性別	基礎疾患	インプラント種類	皮膚障害部位	発症	症状	パッチテスト結果	インプラント除去	その後の経過
1	2000	18	女性	骨形成不全	髓内釘: SUS316Ni 10~14%, Cr 16~18%, Mo 2~3%, Mn 2%と削外固定ハーフピン: Ti-6Al-4V, 削外固定ワイヤー: SUS316Ni 10~14%, Cr 16~18%, Mo 2~3%, Mn 2%を使用	右大腿	削外固定ワイヤー装着後3週間後	激しい痒みを伴う湿疹反応	Ni, Hg, Co陽性	髓内釘はそのまま、削外固定ハーフピンとワイヤーを除去	3週間後略治・ニッケルアレルギー しかし髓内釘は皮膚病変惹起せず
2	2000	46	女性	左変形性股関節症	Co/Cr合金 人工関節	左大腿伸側	釘を入れて1か月後	軽度の痛みを伴う紅斑	Ni, Pd, Ptに陽性でCo, Crは陰性	除去術が行われている	調査中
3	2000	48	男性	拘束型心筋症	Ti coating ベースメーカー	両下腿	2週後より好酸球増多・皮膚病変出現	痒みを伴う紅斑 休診	すべて陰性	そのまま	好酸球増多あり 薬剤のアレルギーの可能性あり 1か月で改善・感染あるいは廃食などか
4	2001	73	女性	左変形性膝関節症	Co/Cr合金 人工膝関節	左膝から下腿	3日後	発赤	Co陽性	除去せず	1ヶ月で改善・原因特定できず 10日後に改善
5	2001	35	女性	左大腿骨頭壊死	Ti合金	全身	翌日より出現	痒みを伴う皮疹	Ni, Au陽性, Ti陰性	そのまま	1ヶ月で改善・原因特定できず 10日後に改善
6	2002	70	女性	右変形性股関節症	Ti合金	右大腿・臀部	3日後	両下肢	Cr, Isodine 陽性	そのまま	2週後軽快
7	2002	32	男性	右中足骨骨折	不詳	右足から下腿へ拡大	抜釘後体幹へ拡大	痒みを伴う紅斑と丘疹	チメロサルに陽性、その他の金属は陰性	そのまま	2週後軽快
8	2004	78	女性	完全房室ブロック	Ti製 ベースメーカー	埋め込み部の皮膚	2週後	痒みと紅斑	陰性	そのまま	2回ベースメーカーを挿入 その都度2週後にベースメーカー挿入皮膚に紅斑が出現 略治 抜去まで痛みが続いた・抜去後 その後の経過は不明
9	2004	4	男性	漏斗胸	ステンレススチール ASTM F-138	前胸部プレートの上の皮膚	6週後	痛み、発赤 発熱CRP高値	すべて陰性	抜去	抜去まで痛みが続いた・抜去後 その後の経過は不明
10	2005	77	女性	左変形性膝関節症	コバルトクロム合金	左膝	6週後から	溼潤を酷める苔癬化した暗赤色の紅斑を認め	すべて陰性	抜去	不明

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

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、健康人の血液由来の 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。

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、その治療として人工弁置換手術が行われている。現在、臨床的に用いられている人工弁は、機械弁、異種生体弁、凍結保存同種弁であるが、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。一方、人工心臓弁の機能不全についての報告もあり、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）形成が挙げられている。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。昨年度は、その対照として健常人についてその血液由来の不死化細胞から得た DNA を用いて検討した。昨年度は抗血液凝固薬であるワーファリンの薬効に関連する遺伝子を対象として、これまでに日本人で報告されている SNP を中心に SNP タイピングを行った。今年度は昨年度に引き続き、対照としての健常人のデータの蓄積として、さらに生体における免疫系や炎症反応に関わる transforming growth factor β (TGF β) に着目し、TGF β とそのレセプターの SNP について検索してタイピングを行った。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、今後遺伝子の多型を同定し、人工心臓弁の不具合発症との関連を調べることによって予防法の確立を目指していく。

B. 研究方法

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 ± 8.1 才) 女性 50 名 (平均年齢 52.4 ± 8.1 才) で、それぞれ 40 代 20 名、50 代 20 名、60 代 10 名であった。

今回ターゲットとした遺伝子は、VAMP8、TGF β 1、TGF β レセプター I (TGF β RI)、TGF β レセプター II (TGF β RII) の 4 遺伝子で、計 6SNP を選択し、タイピングを行った。SNP-ID は、IMS-JST041766、IMS-JST085287 (VAMP8) 、IMS-JST096736 (TGF β 1)、rs7861780 (TGF β RI)、rs3209742, rs1050833 (TGF β RII)。

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、IMS-JST096736 (TGF β 1) 以外の 5SNP については、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。IMS-JST096736 (TGF β 1) 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。

C. 研究結果

以下の4遺伝子について、これまでに公表されている計6SNPを選択し、タイピングを行った。

- ・ VAMP8 (2SNP)
- ・ TGFβ1 (1SNP)
- ・ TGFβRI (1SNP)
- ・ TGFβRII (2SNP)

SNPタイピングの結果を表3にまとめた。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。男女別の結果もmajorとminorの比率に性別間の差は認められなかった。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合計29SNPについてタイピングを行い、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

心臓弁膜症の治療の一つとして、現在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の生命を危機にさらす重大な問題である。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。まず昨年度は、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薬効関連遺伝子として7遺伝子 (SERPINE1、CYP2C9、プロトロンビン、凝固因子第7、凝固因子第9、凝固因子第10、γ-グルタミルカルボキシラーゼ) 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。引き続き今年度は、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。VAMP8は、昨年度検討したγ-グルタミルカルボキシラーゼと同じ2番染色体上にあり、両者は近くの位置の裏表の関係にあるが、場所は重なっていない。しかし、日本人のSNPデータベースであるJSNPにおいてγ-グルタミルカルボキシラーゼについて検索したときに得られたSNPのリストにはVAMP8上の2つのSNPが含まれていたため、今年度は引き続きVAMP8のSNPであるIMS-JST041766、IMS-JST085287についてタイピングを行った。さらに、生体における免疫系、創傷治療や発癌など様々な環境下で重要な役割を果たしているTGFβに着目し、TGFβとそのレセプターについてSNPを検索したところ、TGFβ1は日本人におけるSNPの報告 (IMS-JST096736)があったものの、TGFβRI及びTGFβRIIでは日本人における報告はなかったため、他人種での報告によるSNPのうちコーディング領域でアミノ酸変異の伴うものを中心に選択しタイピングを行った。TGFβ2についても検