

索を行ったが今のところ SNP の報告がなく、今回のタイピングの対象とはならなかった。今年度も昨年度に引き続き、広く日本人の対照データを得るために、健常人 100 名(男性 50 名、女性 50 名)由来の DNA を用いて検討し、それぞれの wild / mutant の頻度をまとめた。今回、日本人での報告がなされている 3SNP は、全て mutant が確認された。VAMP8 の SNP は両者とも γ -グルタミルカルボキシラーゼの SNP タイピング結果と個人レベルでの関連が認められた (data not shown)。このため、両遺伝子は同じ染色体上の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ため違う遺伝子ではあるものの、両者には機能的に関連があるのかもしれない。一方、これまでに日本人での報告がなされていない 3SNP については全て Wild Type であった。来年度以降、実際に人工心臓弁使用者の血液サンプルを用いて今年度までに行った 29SNP についてタイピングを行い、健常人との比較検討を行う予定である。wild / mutant の頻度に差が出てくる SNP が特定できれば、血栓形成による人工心臓弁機能不全の原因となり得る遺伝的背景を探る手がかりとなるであろう。今年度は本来、実際に人工心臓弁使用者の血液サンプルを用いてタイピングを行う予定であった。しかし、血液サンプルを提供していただく予定であった久留米大学における倫理審査委員会の承認が残念ながら遅れたため、今年度内の人工心臓弁使用者における SNP タイピングができなかった。現在はサンプルの収集が始まっており、来年度には報告できる予定である。

E. 結論

人工心臓弁を体に埋植した際の血栓形成

の原因となる遺伝子多型を探索することを目的として、今年度は昨年度に引き続き対照データを得るために、健常人の血液由来の DNA (100 検体) を用いて SNP タイピングを行った。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、計 6SNP を選択しタイピングを行った。そして、6SNP それぞれの wild / mutant の頻度をまとめた。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、人工心臓弁使用中の患者さんの血液サンプルを用いて同様の SNP タイピングを行い、それぞれの結果を比較することによって人工心臓弁を体に埋植した際の血栓形成の原因となる遺伝子多型を探索していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) R. Sawada, T. Ito, Y. Matsuda, and T. Tsuchiya “Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells”, *Animal cell technology*, in press
- 2) N. Bauu, T. Tsuchiya, and R. Sawada “Effects of a biodegradable polymer synthesized with inorganic tin on the chondrogenesis of human articular chondrocytes, *J. Biomed. Mater. Res*, in press

2. 学会発表

- 1) 伊藤友実、澤田留美、土屋利江「ヒト間葉系幹細胞の細胞老化におけるFGF-2のTGF- β 発現への影響」第8回日本組織工学会 (2005. 9)

- 2) 澤田留美、伊藤友実、土屋利江「細胞組織医療機器に利用される幹細胞の安全性評価に関する研究」 第42回幹細胞研究会 (2005. 11)
- 3) 伊藤友実、澤田留美、土屋利江「ヒト間葉系幹細胞の細胞老化に関する研究—FGF-2による増殖能上昇機構の解明—」第27回日本バイオマテリアル学会 (2005. 11)
- 4) 澤田留美、土屋利江「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—ワーファリンの薬効関連遺伝子に関するSNP解析—」 第43回日本人工臓器学会 (2005. 12)
- 5) 伊藤友実、澤田留美、藤原葉子、脊山洋右、土屋利江「ヒト間葉系幹細胞におけるTGF- β の関与する増殖機構に関する研究」第5回日本再生医療学会 (2006. 3)
- 6) 澤田留美、伊藤友実、土屋利江「細胞組織医療機器に利用される幹細胞の品質及び安全性評価」日本薬学会第126年会 (2006. 3)

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

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)
医療機器・医用材料の安全性評価手法に開発に関する研究
分担研究報告書

神経機能に及ぼす人工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

分担研究者 角田 正史 北里大学助教授

人工硬膜及びジブチルスズ (DBT) を高濃度(100ppm)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100ppm含む膜を埋め込んだ群では、80dBのprepulseがあった際の反応の抑制率(%PPI at PP80)が、対照群に比べ有意に低かった。一方、オープンフィールド試験では、対照群、人工硬膜群、高濃度DBT膜群で有意な差がなかった。高濃度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った。

A. 研究目的

近年、開発された合成生体吸収性人工硬膜は、脳外科手術後にこの製品を使用するならば、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、特に吸収性ということから中枢神経組織が化学物質に曝されることとなり、その安全性を毒性学の見地から評価しなければならない。

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酸スズ(2-エチルヘキサン酸スズ)(OT)が使われ、これらのスズ化合物は人工硬膜に残存する。これらの物質の神経毒性については不明の点が多いため、昨年度の研究では、マウスのアストロサイト系細胞である CRL-2534 細胞を用いて、細胞生存率を指標に *in vitro* での検討を行った。その結果、DBT

の神経毒性が示唆された。

化学物質の毒性を評価する場合には、*in vitro* の検討のみならず、*in vivo* の検討が必要である。神経毒性を評価する方法の代表的なものに行動学試験法がある。環境中ではDBTの親化合物であり、体内でもDBTに代謝されるトリブチルスズ(TBT)化合物による行動の変化は二世曝露実験の先行研究で示唆されている(粟生、他、2000)。

実際の手術のモデルとして実験を行うには、実験動物に頭蓋内埋め込み手術を行わなければならないという困難性はあるが、適切な埋め込み手術を行うことが出来れば、行動学試験は人工硬膜の評価法として有効である可能性がある。

行動学試験の代表的なもので特にスクリーニングに使用されるものとして、オープンフィールド試験とprepulse inhibition (PPI) testがある。オープンフィールド試験は主に移所運動活性を測定し、あわせて一

般適応行動変化を捉えるために古くから行われている方法である(高田、1990)。PPI test は聴性驚愕反応を用いた試験法で、認知機能、学習機能を測定する(Inada, et al. 2003, Kobayashi et al. 2004)。

本年度の研究では、control 群、実際の人工硬膜埋め込み群、高濃度DBT(100ppm)含有ポリ乳酸ラクチド埋め込み群を設定し、それぞれに頭蓋に手術を行い、1月経過後にオープンフィールド試験及びPPI testを用いて行動毒性を評価した。以上の実験により、人工硬膜の安全性評価手法を確立することを試みた。

B. 研究方法

1) 実験動物

雄のWistar系ラット(日本クレア、東京)の9週令を購入して使用した。ラットをcontrol(手術のみを行う群)、人工硬膜製品埋め込み群、高濃度DBT含有ポリ乳酸ラクチド膜埋め込み群の3群にそれぞれ10匹ずつ分けた。ラットはポリカーボネート製のケージに同じ群のラットを2匹ずつ組みにして飼われ、餌と水を自由に摂取した。飼育室の環境条件は14時間/10時間のlight/darkサイクルで、温度は22℃、湿度は45%であった。ラットは埋め込み手術前、1週間飼育室で慣らされた。動物の扱い及び処置に関しては、北里大学医学部動物実験・倫理委員会のガイドラインに従い、委員会ですべての許可を受けた。

2) 埋め込み用人工硬膜、ポリ乳酸ラクチド膜

埋め込み用の人工硬膜は、市販の三重膜の構造をもった厚さ300 μ mのもので、触媒としてのオクチル酸スズの濃度は最大20ppmであった。高濃度DBT含有ポリ乳酸ラクチド膜は、同様に構造は三重膜で、厚さは300 μ mとし、DBT

の濃度を100ppm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。人工硬膜の埋め込み用試料の重量の平均値 \pm 標準誤差は2.73 \pm 0.25mg、高濃度DBT含有ポリ乳酸ラクチド膜の重量の平均値 \pm 標準誤差は2.40 \pm 0.26mgであった。

3) ラットへの手術の方法、観察機関

埋め込み手術時のラットの群別の平均体重 \pm 標準誤差は、control 384.8 \pm 5.9g、人工硬膜埋め込み群382.2 \pm 4.9g、高濃度DBT含有ポリ乳酸ラクチド膜埋め込み群383.2 \pm 7.4gであった。

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(ドリルシステム) Osada Success 40M2(オサダメディカル、東京)を用い、内径5mmのボートレフィンバーBTB-60(長谷川メディカル、東京)を用いて、頭蓋骨から、直径5mmの円形の頭蓋骨片をにくり抜いた。出来た穴より、人工硬膜か、高濃度DBT含有ポリ乳酸ラクチド膜を頭蓋内に入れ、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6-0黒(河野製作所、市川)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。

4) Prepulse inhibition (PPI) test

手術の4週間後、PPI test を先行研究 (Inada, et al., 2003, Kobayashi, et al., 2004) を参考に行った。ラットは飼育施設から実験場所に移され、約1時間慣らされた。使用器械はSan Diego Instruments製の小動物驚愕反応測定装置、Startle Response System SR-LAB ABS system (San Diego Instruments, San Diego, CA, USA) であった。装置の驚愕反応チェンバーは、床面に電子秤を装備し、床面から24cmのところに音響刺激を発生するスピーカーが付いている。

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、以下の計算式によりpercent prepulse inhibition (%PPI)を計算した。

$$\begin{aligned} \%PPI \text{ at PP70} &= (1 - PP70\&P/Palone) \times 100 \\ \%PPI \text{ at PP75} &= (1 - PP75\&P/Palone) \times 100 \\ \%PPI \text{ at PP80} &= (1 - PP80\&P/Palone) \times 100 \end{aligned}$$

5) オープンフィールド試験

Kobayashi et al. (2004)の方法を参考にオープンフィールド試験を行った。PPI testの翌朝、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(Image Open Field 2.15r, 小原医科産業、東京)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。以上を指標として、各群の平均値を算出した。

6) 試験後の脳の肉眼解剖観察

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。

7) 統計解析

群間の平均値を一元配置分散分析(ANOVA)で比較し、post hoc testにはFisherのPLSD法を用いた。

C. 研究結果

1) 埋め込み手術後の経過及び実験終了後の脳の肉眼解剖所見、膜の変化

実験終了後の脳の肉眼解剖所見で、高濃度 DBT 含有膜埋め込み群の一例に膜が頭蓋骨外に排出されていたため、その一例は除くこととした。

埋め込み後の各群の餌の摂取量について、ケージ毎の値から一日毎に一匹当たりの摂取量の平均値を計算し、群間で比較したが、どの群でも1匹当

たり30 g前後で、群間で有意性を示さなかった。

埋め込み後の各群の水の摂取量についてもケージ毎の測定値を基に1匹当たりの摂取量を計算した。手術後23日目に有意性を示し、平均値±標準誤差はcontrol 70.0±3.4ml, 人工硬膜埋め込み群76.2±4.3ml, 高濃度DBT含有膜埋め込み群58.0±5.1mlで、高濃度DBT含有膜埋め込み群の平均値が人工硬膜群に比べて有意に低かった(p=0.013)。

手術後の体重に関して、一日ごとに平均値を算出したが群間で有意性はなかった。PPI test 実施時の体重はcontrol 494.8±5.9 g, 人工硬膜埋め込み群496.8±10.8 g, 高濃度DBT含有膜埋め込み群504.2±12.3 gであった。

肉眼的観察により膜の状態を確認した。膜が、手術時にかぶせた頭蓋骨と新生した頭蓋骨の間にはさまれていた例は人工硬膜で5例、高濃度DBT含有膜で7例であった。そのうち、完全に骨間に埋め込まれる形になったのが、人工硬膜で3例、高濃度DBT含有膜で3例で、残りは頭蓋骨の内側が完全に再生骨で覆われている訳ではなく、小さな穴が開いている部分があった。回収できた膜の重さについては、人工硬膜の平均値±標準誤差が1.17±0.27 mg、高濃度DBT含有膜が0.93±0.21mgであった。

大脳表面に関しては、圧迫された印象があるものもあったが、顕著な変化は見られなかった。

2) Prepulse inhibition (PPI) test

図1にPPI testの結果を示した。%PPI at PP80について、高濃度DBT含有膜を埋め込んだ群で、control群及び人工硬膜埋め込み群に比べて、有意に%PPIの平均値が低かった。%PPI at PP70, %PPI at PP75については、群間で有意性を示さなかったが、平均値の値

自体は、高濃度DBT含有膜を埋め込んだ群で他の2群に比べて%PPIの平均値が低いという結果になった。

3) オープンフィールド試験

図2にオープンフィールド試験の移動距離 ((A)時間区分別の移動距離、(B)観察期間全体の移動距離)の結果を示した。どの時間帯でも観察期間全体の総移動距離でも群間で有意性を示さなかった。図3にオープンフィールド試験における群別の(A) wall rearing, center rearing, FW, BW の回数、脱糞数、排尿数、(B)グルーミングの開始までの時間の平均値を示した。全ての指標に関して群間で有意な差はなかった。

D. 考察

吸収性人工硬膜の開発は、脳外科手術において再手術の必要性をなくすメリットがあるが、その一方で溶けて吸収されることから、化学物質(特に触媒として使用されるDBT, OT)の新たな曝露を起こすものでもあり、その臨床適用にあたっては、事前に適切な毒性学的評価をなさなければならない。触媒として使われているスズ化合物については、TBTの神経毒性が先行研究で懸念され、また昨年度の我々の研究でもアストロサイトへのDBTの毒性が示されているために、特に神経毒性学的な視点での評価が必要である。行動学試験は、神経毒性を評価する手法の一つで、今回用いたオープンフィールド試験とPPI testは、その中でも代表的なスクリーニングに用いる試験として知られている。

今回の研究では、実際の手術を念頭においたモデルとして、ラットを用い人工硬膜を頭蓋内に埋め込み、一定時間経過した後に、評価を行うこととした。手術後、餌、水の摂取量は、水について術後23日目に群間で有意性が見られた他は、群間で有意差が見られ

なかった。また体重に関しても手術後の観察期間に群間で有意な差が見られなかった。また術後の脳表面の観察からも、特に埋め込み群に顕著な所見はなかった。以上から手術の手技としては問題がなかったと考える。

PPI testでは人工硬膜埋め込み群についてcontrol群と差がない一方、高濃度DBT含有膜埋め込み群では、80dBのprepulseがあった場合に対照群及び人工硬膜群に有意に%PPIの平均値が低いという結果となった。Prepulseが70dB, 75dBでも群間で有意性を示さないものの、平均値自体は同様に高濃度DBT含有膜埋め込み群で低かった。Prepulseが80dBであった場合が、差を検出するには感度が高く、一番適当であった。PPI testは認知機能、学習機能を評価するものである。DBTが、高い濃度で膜中に存在すると認知機能、学習機能を傷害する可能性が示唆された。人工硬膜の埋め込みによっては差がなかったが、DBTの量が多くなると神経毒性を示すことが示唆されたことより、埋め込み膜の量が多くなるとどうなるか、更に検討する必要があると考える。

オープンフィールド試験は、主に新規環境下での移所運動活性を測定し、あわせて一般適応行動変化を捉えるために古くから行われている方法である。移動距離で移所運動活性を判定し、探索行動としてrearingの回数、情動性の測定としてのface washing, body washingの回数、排便数、排尿数を指標とする。また適応行動としてラットが移所に適応し、落ち着いた時点を示す指標として、最初にグルーミングを始める時間を測定する。またbody washingの回数もラットの適応を示すものと考えることができる。以上を指標として、運動活性と一般適応行動の変化を判定する訳であるが、今

回の実験の群間では、差が見られなかった。但し広く行動変化を見るためのスクリーニング方法であるので、人工医療材料に関する行動神経毒性の評価法としては、意義があると考ええる。

今回の実験の限界として、実際の手術のモデルとして埋め込み手術を行ったものの、ラットは骨の再生が盛んであるために、膜の内側から骨が再生し、手術時に切り出して元に戻した骨片と、再生骨がサンドイッチのように膜を挟み込んだという問題があった。完全に骨内に封入された場合であっても、それまでは頭蓋内で吸収されているので、一定のモデルの役割を果たしているとは言えるが、現実とは異なる。骨の再生が盛んであっても、もう少し埋め込んだ膜が長期間脳内にとどまり溶出し続ける状態を作るためには、より大きな骨片を切り出す必要があると考える。今回のように4週間で評価する場合には、例えば今回の倍の直径の1cmの円形の骨片を切り出すのが有効と考える。穴が大きくなれば、より膜の投与量が多くできるという利点もある。

行動学試験に加え、病理学的な検討や、今までの神経毒性の評価に使われてきた神経伝達物質及びその代謝産物の測定も有効かもしれない。今後の更なる研究が必要である。

E. 結論

人工硬膜に含まれているDBTの濃度が高いと認知機能、学習機能を傷害する可能性がある。PPI testは吸収性人工硬膜の神経毒性の評価法として感度が高く、適当である可能性が示唆された。

謝辞

手術手技にご指導頂いた大阪市立大学医学部、脇谷滋之先生、行動学試

験について、ご指導頂いた北里大学医療衛生学部、佐治眞理先生に深謝申し上げます。

参考文献

粟生修司、久保和彦、尾方里香、大村実、大嶋雄治、島崎洋平、堀哲郎 (2000) 有機スズ二世世代長期曝露の行動学的影響、Biomedical Research on Trace Elements, 11, 253-258.

高田孝二. 行動毒性試験の概要 一般行動観察による方法 脊椎動物. 柳田知治編、毒性試験講座 8 薬物依存、行動毒性. 地人書館、東京、pp.198-212, 1990.

Inada, K., Ishigooka, J., Anzai, T., Suzuki, E., Miyaoka, H. and Saji, M. (2003) Antisense hippocampal knockdown of

NMDA-NR1 by HVJ-liposome vector induces deficit of prepulse inhibition but not of spatial memory. Neuroscience Research, 473-481.

Kobayashi, R., Sekino, Y., Shirao, T., Tanaka, S., Ogura, T., Inada, K. and Saji, M. (2004) Antisense knockdown of drebrin A, a dendric spine protein, causes stronger preference, impaired pre-pulse inhibition, and an increased sensitivity to psychostimulant. Neuroscience Research, 49, 205-217.

F. 研究発表:
特になし。

G. 知的所有権の取得状況:
特になし。

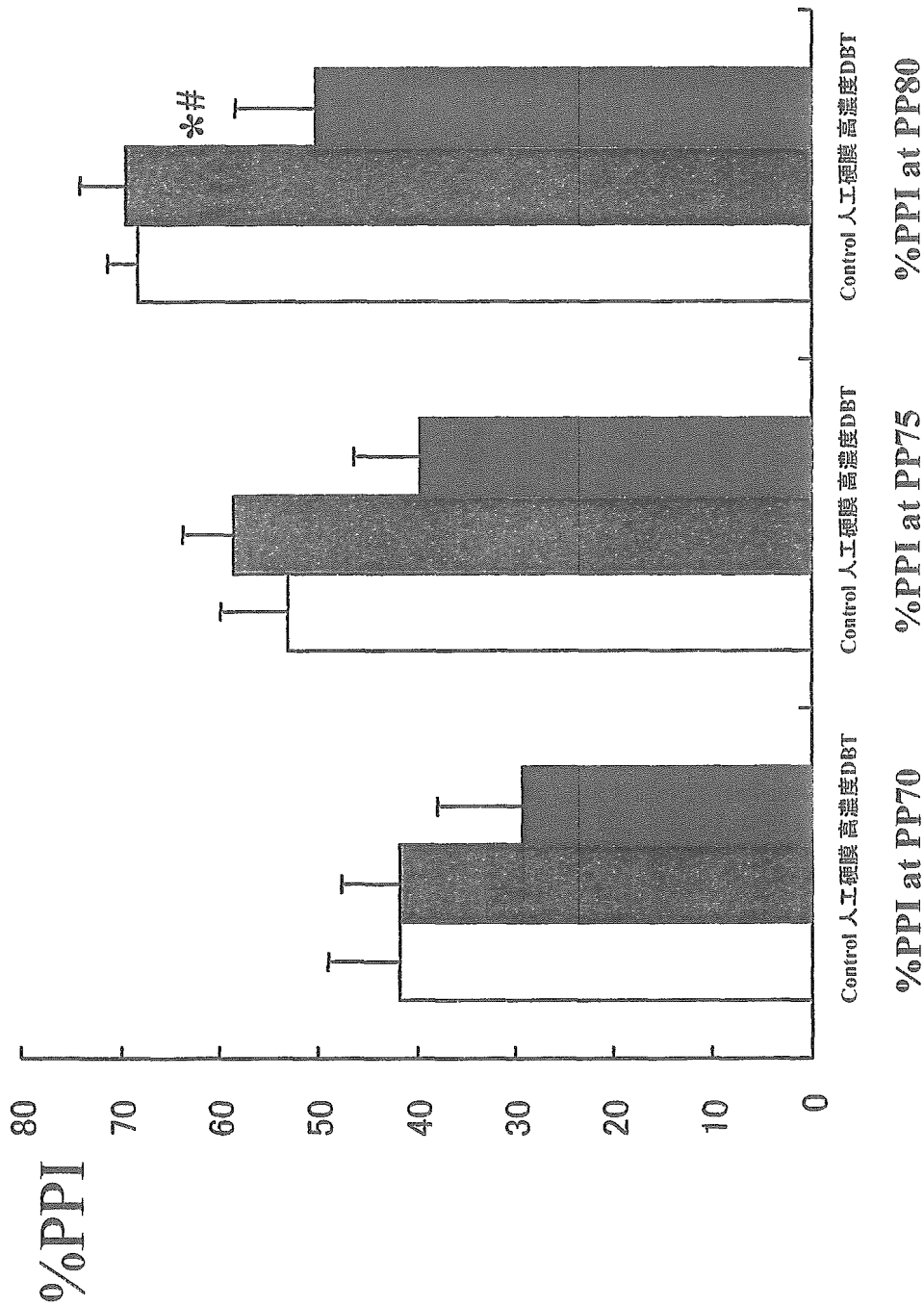
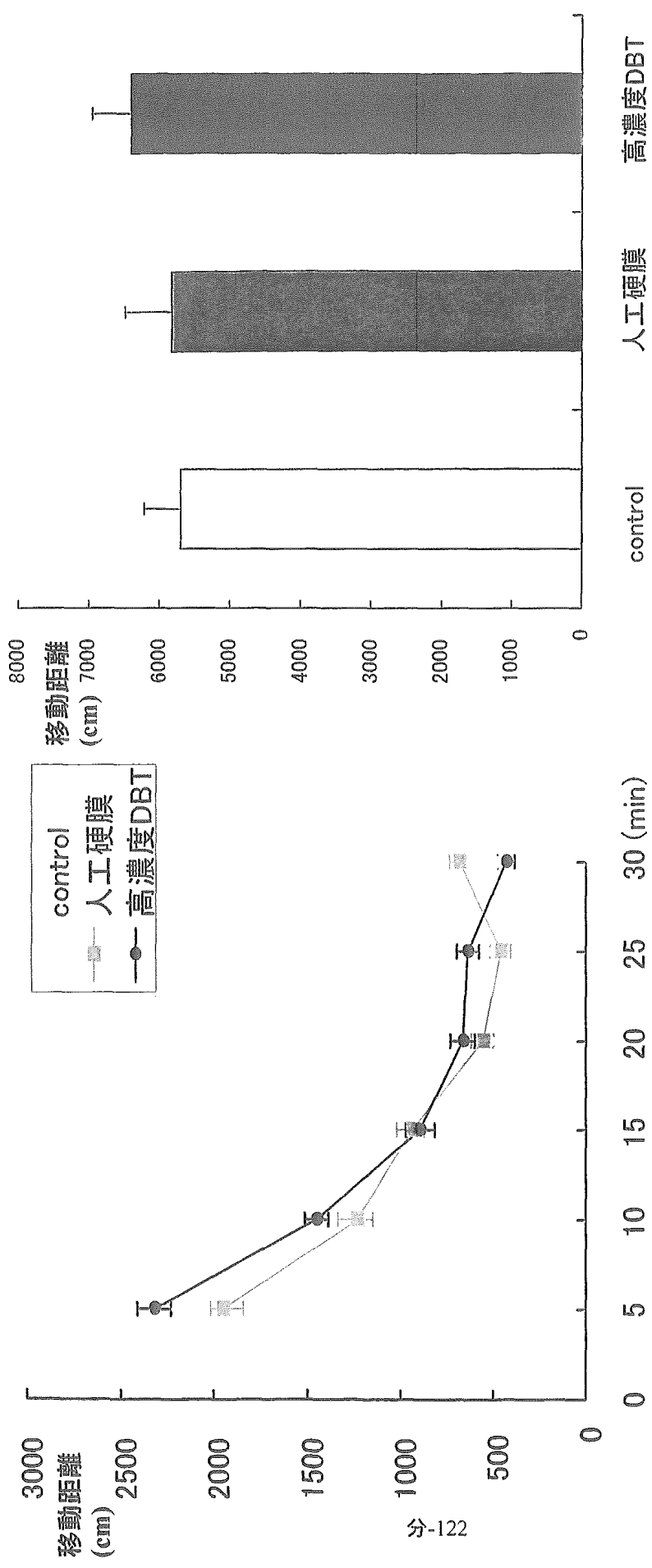


図1 人工硬膜または高濃度DBT含有膜を頭蓋内に埋め込んだラットの聴性驚愕反応のPPIの抑制

注) 平均値±標準誤差で示す。P=0.403 by ANOVA for %PPI at PP70, p=0.125 by ANOVA for %PPI at PP75, p=0.037 by ANOVA for %PPI at PP80 (*; p<0.05 compared to the control, #; p<0.06 (人工硬膜埋め込み群と比較して))



A)時間別移動距離

(B)総移動距離

図2 人工硬膜または高濃度DBT含有膜を頭蓋内に埋め込んだラットの

オープンフィールド試験における移動距離

注) 平均値±標準誤差で示す。(A)時間別(5分毎)に各移動距離を集計、(B)観察期間全体の移動距離

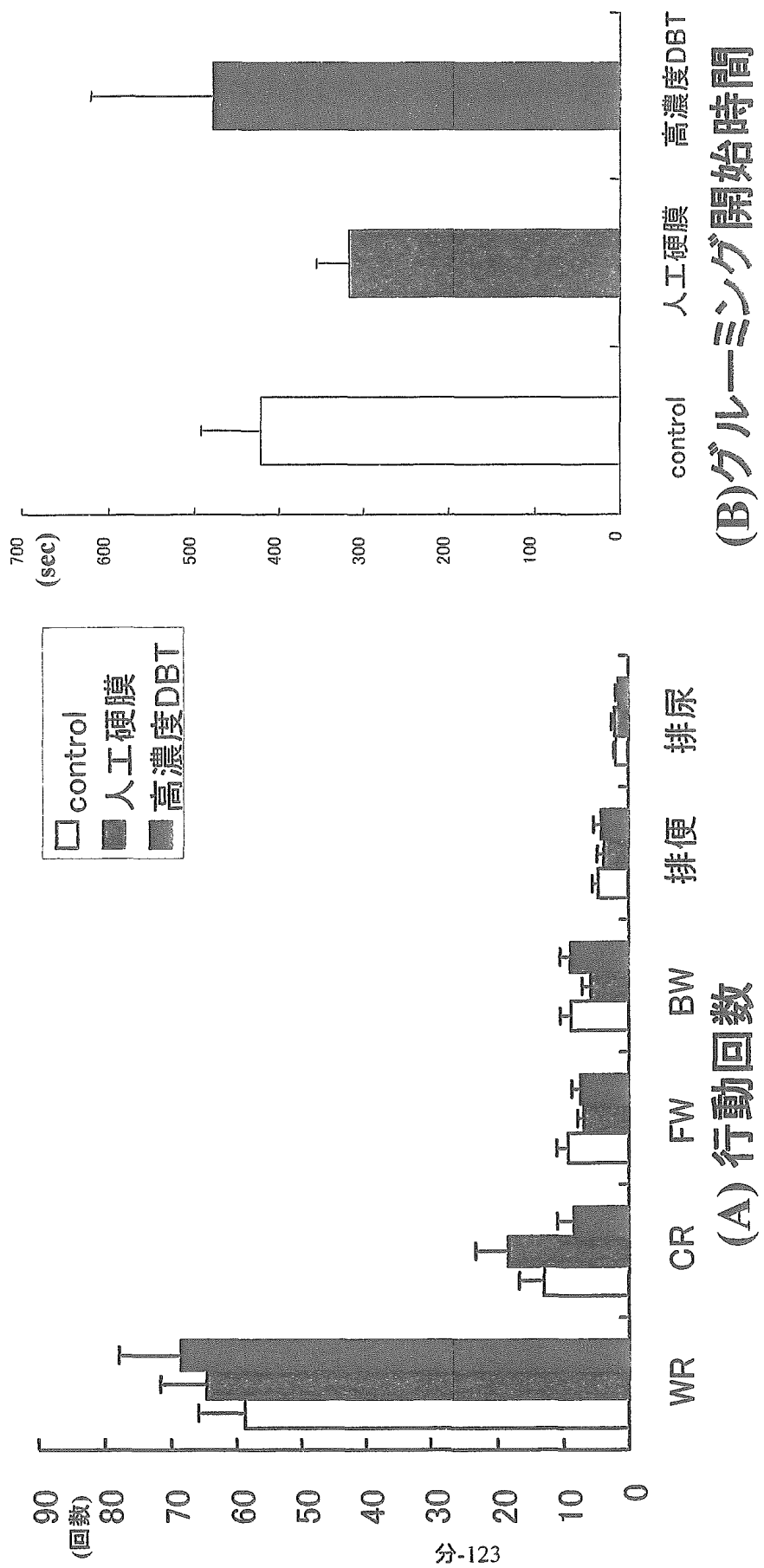


図3 人工硬膜または高濃度DBT含有膜を頭蓋内に埋め込んだラットのオープンフィールド試験における各種行動の回数及びグルーミング開始時間

注) 平均値±標準誤差で示す。WR; wall rearing, CR; center rearing, FW; face washing, BW; body washing

10. 脊椎固定器具等の力学的安定性評価手法の開発

堤 定美

分担研究報告書

脊椎固定器具等の力学的安定性評価手法の開発

分担研究者 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

1. 目的

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。

2. 有限要素解析

骨内に固定されたスクリュ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。スクリューネジは一般的に市販されているタイプ(Fig. 1)のものをモデル化した。

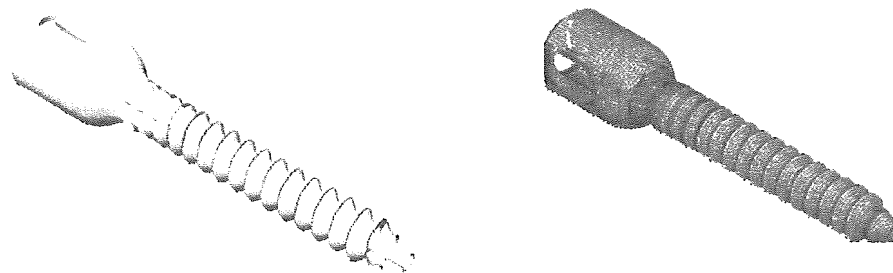


Fig. 1 スクリューネジ形状及び有限要素モデル

スクリューを挿入する際のガイドホールの影響について検討するため、Fig. 2 に示すように、ガイドホールの有無による二つのモデルを作成した。ガイドホールによって、脊椎内により正確にスクリューを挿入できるが、スクリュ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 Fig. 3 に示すような単純円筒形とし、長軸方向にスクリューを挿入するものとした。要素は 8 節点 SOLID とし、骨とスクリュー界面には摩擦（摩擦係数 $\mu = 0.3 \sim 0.6$ ）を考慮した非線形接触要素を導入した。スクリュ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。Table. 1 に有限要素モデルに用いた材料の物性値を示す。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。

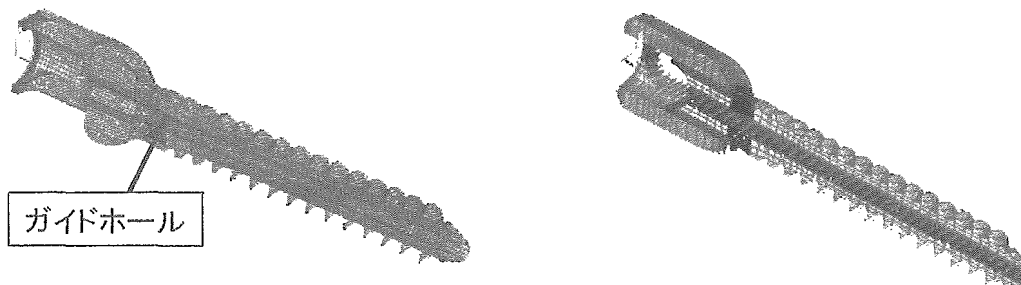


Fig. 2 スクリューネジ有限要素モデル：(左) ガイドホール有り (右) ガイドホール無し

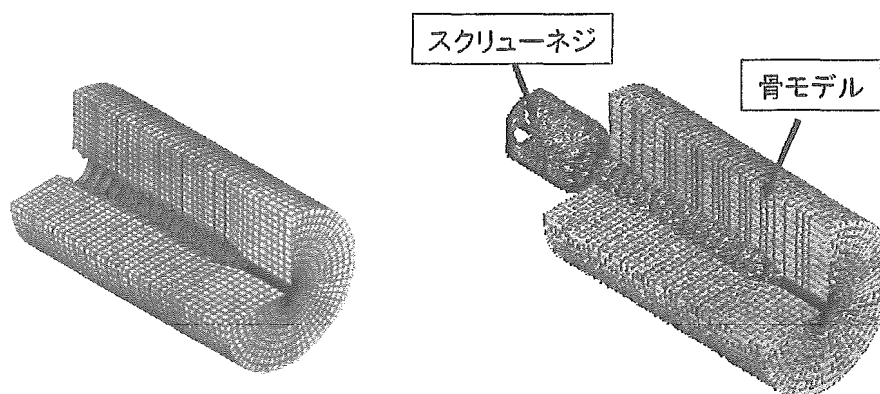


Fig. 3 (左) 円筒形骨モデル (右) 及びスクリューネジ挿入モデル

Table 1. 有限要素モデルに適用した材料物性値

	Elastic Modulus (MP)	Poisson's Ratio
Pedicle Screw	114,000	0.3
Bone Analog	137.5	0.3

3. 結果

3.1 実験結果との比較

有限要素解析結果の妥当性を検証するために、スクリューネジを長軸方向に 1.3mm 変位させたときのスクリューに生じる反力について、前報（平成 16 年度報告）における実験結果と今回の有限要素解析結果を比較した。その結果を Table. 2 に示す。有限要素解析結果における反力は実験結果に比べて 12%低い、これは実験結果の誤差範囲であることから、有限要素解析結果と実験結果は良く一致しており、モデルが妥当であると言える。

Table 2. 実験結果と有限要素解析結果の比較

Test Type	Displacement (mm)	Reaction Force (N)	Force/Disp. (N/mm)
Results of Experimental Test	1.3	1016 (±116)	782 (±109)
FEM Results	1.3	890	593

3.2 有限要素解析結果

Fig. 4 にスクリー内の von Mises 応力分布と歪エネルギー分布状態を示す。応力は、スクリーの遠位端と中央部分において高くなっていた。歪エネルギーも応力同様、スクリーの遠位端において最も高く、破損の危険性を示唆している。

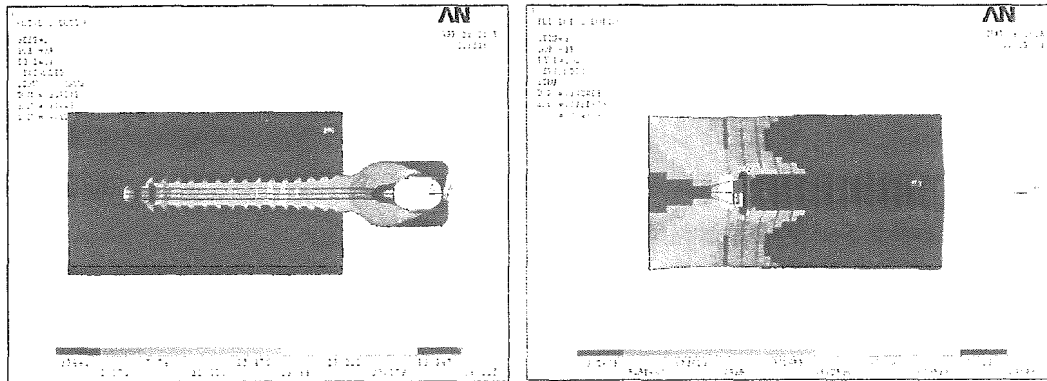


Fig. 4 有限要素解析結果：(左) スクリューの von Mises 応力分布 (右) 歪エネルギー分布

変位量分布は Fig. 5 に示されるようにスクリーの遠位であるほど少なく、ネック周りが最も大きな変位を示した。

ガイドホールの有無による影響を検討した結果、ガイドホールが有る場合の歪エネルギーが低く、破損の危険性が低い。しかし、引抜反力も低下しており、安定性の低下も示唆している。しかし、これらの許容範囲の閾値については不明であり、今後、シミュレーションと実験による検討が必要と考えられる。

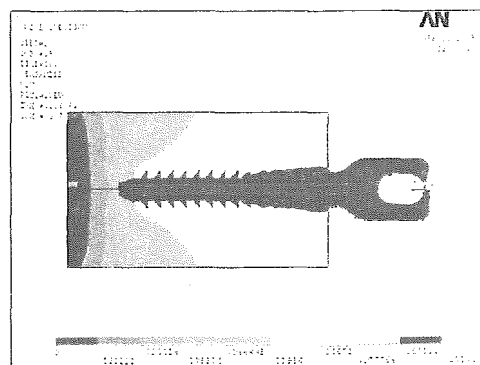


Fig. 5 変位量分布

Table 3. ガイドホールの有無による影響

	Total Reaction Force (N)	Total Strain Energy (mJ)
Screw <u>with</u> guiding hole	73.3	3408.8
Screw <u>without</u> guiding hole	81.1	3718.4

4. 考察と結論

現在、有限要素解析は、実験が不可能な場合や、実験前の予備検討などの目的で様々な分野で用いられている。有限要素解析における結果は、各因子の影響を相対的に比較・検討できる。一方、インプラントの力学的安定性を評価するためには、応力や歪などの相対的な比較よりも、実験との一致性が確認されたモデルによる絶対値的な評価が重要となる。本研究では、まず三次元有限要素モデルによって得られた引抜強度を実験結果と比較し、妥当性を評価した結果、実験結果の誤差範囲内に収まり、モデルの妥当性が確認された。脊椎固定器具をはじめとする、インプラントの実験手法による安定性評価は大変難しく、誤差も大きい。有限要素解析を用いれば、時間的・コスト的な面だけでなく、同じ条件下において様々なパラメータの影響を考慮した解析が可能である。

特にインプラントの長期安定性に関しては、ルーズニングなどの重要な問題が生じるにも関わらず、評価法が無い。現在、本研究グループにおいて骨のリモデリング現象を考慮した有限要素解析が確立されつつあり、この技術を用いて、スクリューの設計パラメータと生体への影響を考慮した評価シミュレーションを行う予定である。

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

脇谷 滋之

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

分担研究者 脇谷 滋之 大阪市立大学医学部 整形外科 講師

研究要旨

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 SZ 充填群、担体 SZ+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 SZ+骨髄細胞移植群が最も優れた修復を示した。

A. 研究目的

関節軟骨欠損修復のために様々な方法が動物実験で研究され、中には臨床応用されているものもある。しかしながら、その有用性については未だに結論を得ていない。手術適応が不明確であること、および評価方法が確立されていないことがその原因であると考えられ、それらの確立が急がれる。

ヒトに対しては侵襲の大きな検査は施行できないために、ヒトと同じ手術を施行し、同じ検査を可能であり、しかも最終的には組織を採取できる実験モデル動物の開発が重要である。

我々はミニブタに注目した。膝関節の形状がヒトに類似し、しかも大きさが近いために、ヒトと同じ手術、評価が可能である。

ミニブタの膝関節に直径 12mm、深さ 3mm の骨軟骨欠損作成し、いくつかの修復方法を施行し、自然修復と比較した。

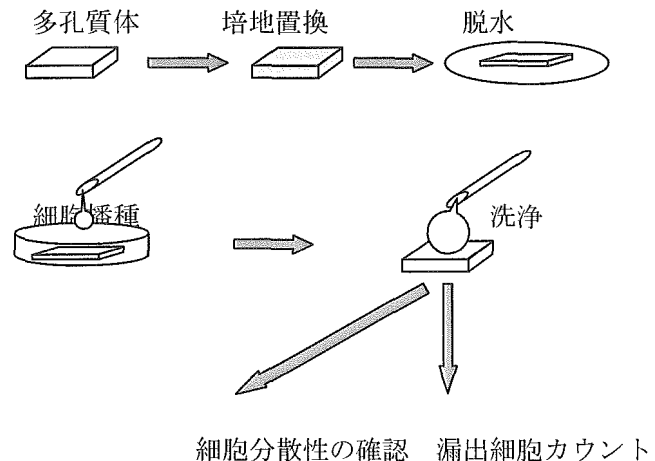
B. 研究方法

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。

【ミニブタ骨髄間葉系細胞の採取】

移植の約 2週間前に、ミニブタに全身麻酔をかけ、脛骨近位部から骨髄穿刺針で約 4ml の骨髄血をへ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、移植の日に細胞を回収し移植に使用した。

【多孔質担体への細胞の播種】



担体内に細胞が分散され、担体に接着したことを確認して、移植に使用した。

細胞濃度は 5×10^6 個/ml

【ミニブタへの移植手術】

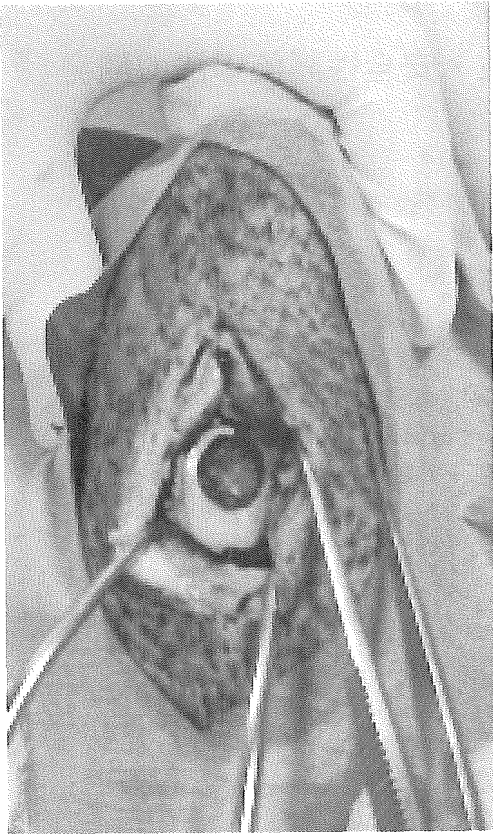
全身麻酔下、ミニブタの膝関節を傍膝蓋内側切開で展開し、大腿骨膝蓋骨溝に、直径 12mm、深さ 3mm の骨軟骨欠損を作成した。

コントロール群は欠損部を放置、担体として SZ を作成し、それぞれ細胞の無い担体のみ、あるいは担体に自己骨髄細胞を入れたものを移植した。

移植後 6ヶ月で欠損部を採取し、組織標本を作製し、比較した。

【軟骨欠損】

ミニブタの大腿骨膝蓋骨溝に作成した直径 12mm、
深さ 3mm の骨軟骨欠損



【担体 SZ のみ】



【担体 SZ + 骨髄細胞】



C. 研究結果

肉眼的所見

【欠損放置群】

欠損作成後 6 ヶ月

