

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 土屋利江

平成19年（2007）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  |
| 藪島 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-12 |
| 新谷 英晴                                     |      |
| 3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発 .....                 | 分-23 |
| 五十嵐良明                                     |      |
| 4. 金属材料の安全性評価手法の開発 .....                  | 分-39 |
| 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-61 |
| 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-75 |
| 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-84 |
| 松永佳世子                                     |      |
| 8. 医療機器(人工心臓弁)の機能不全発症に関わる遺伝子の探索 .....     | 分-95 |
| 澤田 留美                                     |      |

9. 人工関節用 UHMWPE の疲労特性評価手法の開発 ..... 分-107

迫田 秀行

10. 人工硬膜の主成分であるポリ乳酸ラクチド及び合成時の触媒であるジブチルスズ、  
オクチル酸スズのアストロサイト系細胞に対する毒性評価 ..... 分-123

角田 正史

11. 脊椎固定器具等の力学的安定性評価手法の開発 ..... 分-142

堤 定美

12. 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-146

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

# 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)  
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

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

大腸菌乾燥菌体コラーゲンシートの腹腔内埋植試験を行った結果、菌体添加量に比例して炎症反応が増強され、腹腔内に適用材料に適切な LPS 規格値を設定する必要がある。大腸菌乾燥菌体含有コラーゲンシートを骨欠損部に埋植した時に観察される骨再生の顕著な遅延は LPS を持たない黄色ブドウ球菌乾燥菌体含有コラーゲンシートでは起こらなかった。生体適合性を改善した高純度酸処理ゼラチンシートを徐放担体として使用し、*in vivo* 抗菌試験を実施した結果、CAP-18/LL-37 類縁体 (18-mer LLKKK 置換体) は、黄色ブドウ球菌及び緑膿菌に対して顕著な抗菌活性を示し、新規抗菌成分として有効であることが確認された。

2. 再現性のある滅菌バリデーション達成法

健全菌の場合には培地メーカーに拠る顕著な生育菌数の差は認められない。損傷菌生育培地に、カルシウム、L-アラニン、複合アミノ酸、ピルビン酸、グルコース添加が損傷回復に有効で、培地メーカー間の生育性能の差を少なくさせる。損傷菌については培養温度が低く、長い期間培養する必要がある。滅菌方法ならびに菌、暴露時間 (損傷の程度) に拠って損傷回復に要する回復剤が異なる。複合アミノ酸の主たる効果は L-アラニンに拠ると考えられる。加熱滅菌での損傷回復の場合にはピルビン酸も損傷回復に有効であったが EOG ならびに放射線滅菌ではピルビン酸の有効性は余り認められなかった。

3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

LLNA における各種非 RI 指標について検出感度を比較した。感作性物質をマウスの耳に塗布した後、耳介リンパ節の重量、リンパ節細胞数、BrdU 取り込み量、ATP 量及び alamarBlue 取り込み量を測定し、SI 値を求めた。リンパ節細胞数、ATP 量及び alamarBlue 取り込み量の SI 値は、BrdU 取り込み量やリンパ節重量の SI 値に比べ高い値を示した。検討した中では Tween 80 を添加して塗布する方法が最も SI 値が高くなった。コラーゲンを主とする医療機器の抽出液について試験したが感作性は認めなかった。タンパクアレルギーをアジュバントと混合して投与すると、血中総 IgE 抗体価の著しい上昇を示し、即時型アレルギー性の有無の評価と相関性が認められた。OVA では著しい抗体価の増加を認めたが、BSA による増加は少なかった。また、タンパク製医療機器の生理食塩水抽

出液では抗体価は増加せず、即時型アレルギーを起こす可能性は低いと考えられる。

#### 4. Ti-Ni 合金材料の安全性評価手法の開発

米国の整形外科インプラントの不具合報告から、金属に関係するものを抽出し、再整理した。厚生労働省に報告された不具合報告や回収情報の中で金属・合金に関するものをリストアップし、全不具合報告を整理し、機器分類別に集計して、その傾向を掴んだ。動物に埋植する金属材料円板の製造を行い、最大 16 週間の背部皮下埋植を行った。また、比較のために溶出試験との対比を行った。Ni の毒性が顕著であることを再確認したが、Ti/Ni 合金においては、特段の毒性現象は認められなかった。対照として用いた Ti-6Al-4V 合金では、Ti によると思われるアレルギー症状を観察した。これらのことから、従来検出が難しかった金属材料のアレルギー反応を、今回の埋植方法で検知できる可能性が示唆された。

#### 5. Ti 合金材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の開発

細胞毒性試験において、Ti-6Al-4V には細胞毒性が認められたが、その他の Ti 系金属材料には細胞毒性が認められなかった。また、骨芽細胞適合性試験において、Ti-6Al-4V は、CP-Ti に比べて、骨芽細胞の増殖および分化を抑制した。しかし、その他の Ti 合金は、CP-Ti に比べて、骨芽細胞の増殖および分化を促進した。ラット大腿骨埋植試験において、Nb 含量にかかわらず Ti-Zr 基合金は、いずれも組織に炎症反応が無く、窩洞部の骨形成も自然であった。また、純金属もいずれも組織に炎症反応がなかったが、Nb において引抜強度の増加傾向および Al において引抜強度の低下傾向がみられた。埋植試験における試料の引抜強度は、*in vitro* 試験の直接接触法による繊維芽細胞 V79 のコロニー形成率および正常ヒト骨芽細胞の石灰化物生成量と相関した。直接接触法による細胞毒性試験および骨芽細胞を用いた適合性試験の有用性が確認された。Ti-Zr-Nb 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、埋植医療機器への応用が大いに期待できる。

#### 6. ステント用合金の力学的・耐食性・血液適合性評価手法の開発

ステント用 Ti-Ni 合金の溶接材の 1.0%乳酸溶液中での耐食性は、非溶接材のそれと同程度であった。このことからレーザー微細溶接による耐食性得の影響は大きくないと結論付けた。しかしながら、Ti-Ni 合金の各種試験溶液中での溶出挙動は、溶液浸漬時間の経過にほぼ比例して溶出量が増加した。これに対し、ステンレス鋼では放物線則に従うような溶出挙動を示した。このことから同合金は生体適合性には優れているものの、生体内で溶出が続き、長期間に及べば生体への為害性の懸念が生じることが示唆された。

#### 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

金属アレルギーのためにインプラントによる皮膚科的症例をきたす頻度は極めて低い。金属アレルギーによる皮膚症状を発症させるためには、金属は溶出し、イオン化している必要がある。チタンのパッチテストは純チタンプレート、酸化チタン、錯体でも作成できる可能性が高い。ヒト単球を用いた感作性代替法は、今後の研究の発展が期待できる。

## 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

人工心臓弁を体に埋植した際の血栓形成やパルプ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、健常者 100 名の血液由来 DNA と人工心臓弁使用者 10 名の血液を用いて、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や生体における炎症反応などに関連する遺伝子など 11 遺伝子について計 29SNP を選択し、タイピングを行った。引き続き人工心臓弁使用患者からの血液検体を集め、SNP タイピングを行い最終的な解析を行っていく予定である。

## 9. 人工関節用 UHMWPE の疲労特性評価手法の開発

人工膝関節のデラミネーション破壊や高機能化、架橋ポリエチレンの臨床応用、長寿命化のニーズなどを背景に、UHMWPE の疲労特性評価の重要性が増している。本研究で、適切かつ迅速に UHMPE の疲労特性を評価できる ECT 試験法を新規に開発した。ECT 試験法は、簡便であるだけでなく、抜去品や製品からも試験片を作製可能であるなど応用範囲が広く、また、Kth など疲労特性パラメータの推定も可能であった。

## 10. 神経機能に及ぼす人工脳硬膜の安全性評価手法の開発

DBT については低濃度での神経毒性が示され、注意が必要ではあるが、人工硬膜については使用量等を考慮して、リスクを判断する。また、アストロサイトを使った神経系毒性評価は、細胞死の他、機能面、増殖の検討も有用と考える。

## 11. 脊椎固定器具等の力学的安全性評価手法の開発

三次元有限要素モデルを用いた数値シミュレーションによる脊椎固定器具の力学的安定性評価法を提案した。有限要素モデルを用いることで、実験では評価できない詳細な応力状態が評価可能となるため、力学的安定性を改善するための有効な設計指針が得られる。次に、疲労寿命推定シミュレーションを行い、部材ごとの疲労寿命評価を行った。時間的・コスト的にも大きな負担となる疲労強度評価を、短時間に、簡便に評価できる可能性を示した。さらに、数値シミュレーションを用いれば、様々な荷重条件が設定でき、実験では困難な検討が可能となり、さらに優れた性能を持つ器具へ改良するための有効な手段となる。

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

ミニブタ膝関節に骨軟骨欠損を作成し、欠損放置、担体移植、および担体+細胞移植群を作成して、肉眼的、組織学的小および MRI による評価を行った。従来の MRI 撮影法でも修復組織の評価が可能であり、組織学的评价と比較可能であった。

### 分担研究者

|      |                        |       |                            |
|------|------------------------|-------|----------------------------|
| 土屋利江 | 国立医薬品食品衛生研究所<br>療品部 部長 | 五十嵐良明 | 国立医薬品食品衛生研究所<br>環境衛生化学部 室長 |
| 齋島由二 | 国立医薬品食品衛生研究所<br>療品部 室長 | 佐藤道夫  | 国立医薬品食品衛生研究所<br>療品部 室長     |
| 新谷英晴 | 国立医薬品食品衛生研究所<br>療品部 室長 | 伊佐間和郎 | 国立医薬品食品衛生研究所<br>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  
澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 主任研究官  
迫田秀行 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 研究員  
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

## 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12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

コラーゲン、キチン、キトサン及びアルギン酸塩などの天然由来物質は高い生体適合性を持つことから、医療機器又は医用材料として広く利用されている。3次元培養用基材やDDS担体への応用など、天然由来材料の用途は益々多様化して来ている。その一方、これらの医用材料は天然由来であるため品質管理、特に微生物学的安全性の制御が難しいという欠点を持っている。

グラム陰性細菌の菌体表層成分である

エンドトキシン (lipopolysaccharide, LPS) は極微量で強力な発熱活性を示す代表的な発熱性物質である。LPSは、発熱活性に加え、マクロファージ活性化能(各種サイトカイン産生誘導能)、ミトジェン活性、シュワルツマン活性、致死毒性及びショックなどの様々な生物活性を示すことが知られており、敗血症時などに見られる致命的疾患である多臓器不全症やエンドトキシンショックを惹起する原因物質として周知されている。それ故、天然医用材料、特に血液に直接接触する又は生体内で使用する製品材料のLPS汚染状況は正確に評価されなければならない。

注射用医薬品のLPS規格値は適用部位に応じて日本薬局方により定められている。一方、医薬品と比較して複雑な組成を持ち、適用部位も様々である医療機器の場合、公的なLPS規格値は設定されていないのが現状である。医療機器に関するLPS規格値は注射用医薬品の同規格値を参考として、製品中のLPS総含量に基づいて自主的に設定される例が多い。しかし、医療機器や医用材料に混在するLPSの生体に対する実際のリスク強度を正確に判定するためには、製品の適用部位や生体内分解挙動などを評価する必要がある。

これらの背景から本研究では、医用材料のグラム陰性細菌汚染による生体影響を評価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シート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、創傷治癒及び骨再生に



対する影響について検討している。現在までの成果として、菌体成分は皮膚創傷の治療に大きな影響を与えないことから、皮膚適用材料には LPS 規格値を設定する必要がないことが判明している。一方、菌体成分を含有する医用材料は皮下埋植において顕著な炎症反応を誘導すると共に、新生骨形成を抑制することが確認されており、皮下適用材料と骨再生用材料の場合、適切な LPS 規格値を設定する必要があることが明らかになっている。

平成 18 年度の本研究では、菌体成分含有材料を腹腔内に埋植した際の生体影響を定量的に解析し、腹腔内適用材料に LPS 規格値を設定する必要性の有無について検討した。また、LPS を持たない黄色ブドウ球菌含有材料を皮下及び骨欠損部に埋植した際の生体影響についても検討した。

創傷被覆剤は、擦傷、火傷、糖尿病時の皮膚疾患のほか、生体内に適用する止血剤などにも多用されているが、患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少なくない。そこで本研究では、LPS 中和活性及び様々な細菌に対する抗菌活性を持つ分子量 18 kDa のヒト Cationic Anti-microbial Protein の活性ドメインペプチド (CAP-18/LL-37) を利用した新しいタイプの抗菌材料の開発を行っている。現在までに、CAP-18 類縁体である 18-mer LLKKK 置換体の化学合成、*in vitro* 抗菌試験、*in vitro* LPS 中和試験、各種ゼラチンシートからの徐放試験及び徐放基材の生体適合性評価が終了していることから、平成 18 年度は生体内での有効性を評価するため、ゼラチンシー

トを担体として 18-mer LLKKK 置換体の *in vivo* 抗菌試験を実施した。

## 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

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 EOG, ガンマ線あるいは電子線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を用いて損傷回復剤の効果を検討した。

得られた結果は再現性の良い滅菌バリデーション方法の開発に繋がる。

## 3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

医療機器及び材料のアレルギー性を評価するには、原則として試料の抽出を行い、得られた抽出物について試験することになる。医療機器は生体に使われるものから、抽出溶媒としては体液に類似した溶媒を用いることが求められる。我が国の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では、抽出条件として溶媒/試料比、抽出時間及び温度を記しているが、溶媒については国際標準規格 ISO 10993 シリーズに順ずると

して明確な記載はされていない。ISO 10993-12 では、極性及び非極性溶媒をそれぞれで抽出することとされ、生理食塩水や植物油などが上げられ、エタノール溶液などの有機溶媒も追加で提案されている。そのため、抽出溶媒によって試験結果が変化する可能性がある。皮膚感作性試験 local lymph node assay (LLNA) では水系溶媒での抽出液は動物への塗布が困難であり、なんらかの工夫が必要となる。有機溶媒についてもそれ自体の刺激性の影響や浸透性によって反応性が変化する可能性があるが、皮膚感作性試験についてこれらの可能性を十分検討した例はない。

医療機器の抽出物は、製造の際に加えられた添加剤や高分子材料の分解物が含まれた混合物と考えられる。従って、抽出物の試験は複数の化学物質の併用と言える。界面活性剤は洗剤などに使われ、プラスチックなど高分子材料には酸化防止剤や紫外線吸収剤が配合されており、接触頻度が多く、他の化学物質との複合曝露が多いと考えられる。そこで、これらとアレルゲンを併用したときにアレルギー反応が影響を受けるかどうか検討した。

医療機器によるアナフィラキシーショックは生命の危機に直結する重大な問題である。アナフィラキシーショックは即時型アレルギーによるものであるが、これを評価するような動物を用いる確立した試験法はない。近年、タンパクアレルギ-の評価指標として血清抗体価を測定するのが有用ではないかと考えられてい

る。ここでは、いくつかのタンパクアレルゲンと医療機器の生理食塩水による抽出液を投与し血清抗体価を測定することにより、試験法の確立に向けた基礎的データを収集した。

#### 4. Ti-Ni 合金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、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行う。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評価できる手法を開発する必要がある。平成 16 年度では、米国の整形外科インプラントの不具合報告から、金属に関係するものを抽出し、再整理した。また、厚生労働省に報告された不具合報告や回収情報の中で整形外科インプラントや金属・合金に関するものをリストアップした。さらに、Ni のアレルギーに関して、米国の不具合情報を調査した。昨年度は、米国の全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。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、その傾向を掴んだ。今年度

は、Ti/Ni 合金を含む関連金属の動物への埋植、及び溶出試験などを総合して、試験法の総括を行う。また、チタン(Ti)を使用した医療機器についての米国でのアレルギー不具合報告を検索する。

## 5. Ti 合金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

金属材料は現在用いられている医用材料の中でも最高レベルの強度を持ち、人工関節や骨固定材、人工歯根などのような高い力学的強度が要求される埋植医療機器の材料として無くてはならない。これらの用途に使用される医用金属材料としてステンレス鋼 (Ni-Cr-Mo 鋼)、Co-Cr 合金、Ti 合金などがあるが、構造の複雑化や使用期間の長期化など様々な要因によって、不具合の報告件数は年々増加傾向にある。そのため、力学的強度や耐腐食性能を高めるための研究が活発に展開されている。しかしながら、生物学的安全性や有効性を向上させることを目的とする研究は十分に進んでいないのが現状である。特に近年、優れた力学的特性を持つ医用金属材料が数多く開発され、臨床実態を反映するような生物学的安全性および有効性評価手法の確立が強く望まれている。

埋植された医療機器が組織的・構造的のみならず機能的にも生体組織の一部となり得るためには、材料に接触する細胞や組織がその機能を維持することが重要である。金属材料が生体に埋入されると、溶出する金属イオンおよび材料表面そのものが、材料近傍の細胞や組織の機能に

影響を及ぼすと考えられる。金属塩については、細胞毒性や骨芽細胞の機能に及ぼす影響が系統的に評価されてきた。しかしながら、金属材料そのものについては、十分な生物学的評価が行われていない。

従来から埋植医用機器に使用される Ti 合金としては、Ti-6Al-4V が一般的に使用されてきた。しかしながら、構成元素のひとつである V に強い細胞毒性があることから、最近ではその安全性が疑問視されている。我々は様々な金属塩の正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化に及ぼす影響を評価した。その結果、V 塩は骨芽細胞の増殖を最も強く阻害する金属塩のひとつであった。さらに、Al 塩は、骨芽細胞の増殖には全く影響を及ぼさない濃度で、分化を強く阻害することが明らかになった。これらの結果から、Ti-6Al-4V は、V による骨芽細胞の増殖阻害に加え、Al による分化阻害を起こす可能性が強く示唆された。

近年、構成元素に V を含まない Ti 合金や、V と Al を両方とも含まない Ti 合金が開発されている。さらに、骨芽細胞の増殖および分化を促進させるような元素を配合すれば、Ti-6Al-4V より骨組織適合性を向上させることも可能だろう。

我々は、培地に添加した Nb 塩が正常ヒト骨芽細胞の分化を促進させることを明らかにした。さらに、ハイドロキシアパタイトに添加した Nb イオンが、骨芽細胞のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を促進させることも確認した。一方、Nb を添加した Ti-Zr 基合金が最近開発され、

特に Nb を 8 mol% 以上添加した  $\beta$  型 Ti-Zr-Nb 合金は、Ti 系金属材料としては弾性率が小さく、生体用金属材料として力学的に興味がある。

我々は、各種チタン合金の細胞毒性および骨芽細胞適合性について検討してきた。昨年度の研究では、直接接触法によるコロニー法を用いた細胞毒性試験において、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 および 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。さらに、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する骨芽細胞適合性試験において、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 Ti、Zr および 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。Ti-Zr-Nb 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ることを確認した。

今年度は、Ti-Zr-Nb 合金の生物学的安全性および有効性を in vivo で評価するために、ラット大腿骨埋植試験を実施し、炎症反応、骨組織適合性および引抜強度について検討を行った。

## 6. ステント用合金の力学的・耐食性・血液適合性評価手法の開発

Au-Pd 二元系状態図 (図 1) によれば、Au-Pd 二元系は全率固溶体を形成するものの、低温に  $Au_3Pd$  相, AuPd 相,  $AuPd_3$  相の三種類のダルトナイド型金属間化合物相が存在するとされている。いずれも高温からの冷却時、不規則固溶体相から規則-不規則変態によって出現する。この系の状態図は Au-Cu 二元系のそれに類似しており、 $Au_3Pd$  相の結晶構造は、Au-Cu 二元系中に存在する  $Au_3Cu$  相と同様に、 $L1_2$  型規則構造であると報告されている。 $L1_2$  型規則構造は fcc を基調とした規則構造で、面心立方晶の面心位置に Au 原子が、

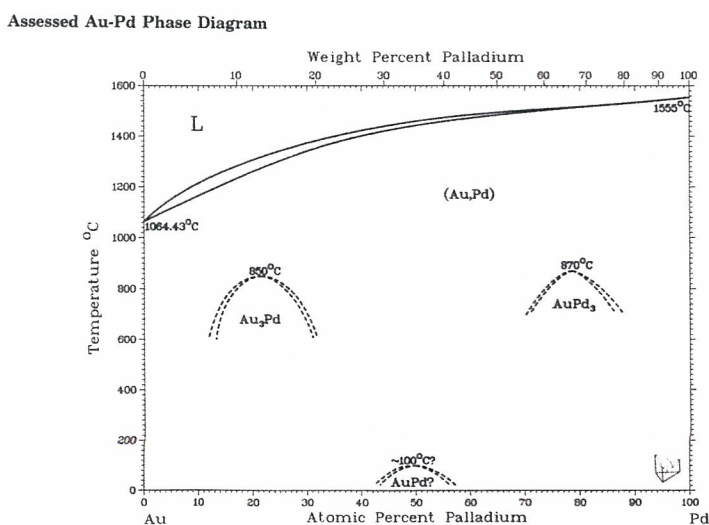


図 1 Au-Pd 二元系状態図 (Binary Alloy Phase Diagram, ASM より)

コーナーの位置にPd原子を配した規則構造である。この結晶構造が高温相（母相）である不規則固溶体のfccに近いこと、整合な析出が期待され、市販の歯科用合金（タイプ3、タイプ4）で熱処理（時効）硬化を担っているAu<sub>3</sub>Cu相と同様の効果が期待できる。

この状態図情報は確定的なものではなく、相境界などは破線で示されているが、Au<sub>3</sub>Pd相の組成幅は化学量論組成の25%を中心に12~32%まで広がっているとされており、その外側に二相共存領域（不規則固溶体相/Au<sub>3</sub>Pd相）がある。本研究計画では母相中にAu<sub>3</sub>Pd相が析出した組織の合金開発を目指すので、低Pd濃度側の二相共存領域周辺を研究対象とし、Au-8%PdからAu-16%Pdまでを実験の対象とすることとした。

また、三元合金はAu-10%Pdを基本組成とし、1~3%のAgをAuに置換する形で添加することとした。主としてAgの添加による延性改善を期待している。

本研究で使用するAu-Pd二元合金、ならびにAu-Pd-Ag三元合金の合金組成を表1に示す。

## 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

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。インプラント機器による皮膚科的な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。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い

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18年度は(1)当科におけるインプラントによる皮膚科的症例の調査、(2)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、(3)金属パッチテスト試料の見当、(4) human Cell Line Activation Test (h-CLAT) およびヒト末梢血そのものを用いた金属の感作性評価方法を開発することを目的とした。(5)さらに症例の集積を測るために日本接触皮膚炎学会会員、および全国の大学病院皮膚科に対して、インプラント機器による皮膚科的不具合事例があるかアンケート調査を行った。

## 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

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。しかしながら、人工心臓弁の機能不全についての報告もあり、その主な原因としては、血栓形成とパルナス（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。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。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。また、パルナスの形成についてはそのメカニズムは明らかにされておらず、体質（個体差）による可能性も否定できない。

そこで本研究では、人工心臓弁を体に埋植した際の血栓やパルナスの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、人工心臓弁使用者の中で人工心臓弁の機能不全が認められる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。昨年度までに、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。まず、血栓形成の原因を探るために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。さらに、パルナス形成の原因を探ることを目指して、生体における免疫系や炎症反応に関わる transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) 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。今年度は、実際に人工心臓弁を使用中の患者の血液サンプルを用いて上記の 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やパルプの形成の原因となる遺伝子多型を探索していく。

## 9. 人工関節用 UHMWPE の疲労特性評価手法の開発

人工関節置換術は変形性関節症や関節リウマチの患者で非侵襲的治療が困難な場合に使用される。本邦では年間約 10 万例が行われており、一般的に広く普及した治療法と言える。

それに伴い、人工関節の再置換例も増加している。医薬品医療機器総合機構（以下、「機構」とする）のホームページにおいて機構が医療機器企業から受け取った平成 16 年 4 月～平成 17 年 6 月分の不具合報告から「関節」で検索を行ったところ、ヒットした不具合報告はわずか約 200 件であった。しかし、再置換の原因がインプラントの不具合として捉えられることは稀であり、矢野経済研究所の市場調査によると、2004 年度の再置換人工関節の市場規模は、股関節が 1,765 ユニット、膝関節が 593 ユニットであり、それぞれ市場の 2.5%、1.5%を再置換人工関節が占めるまでになっている。

再置換術は患者にとって大きな負担となる。不具合を起こしたインプラントの抜去が必要であることや、インプラントを支える骨の量が初回の手術に比べ減少

しているなどの理由で、再置換術は初回の手術に比べ困難な手術となり、成功率も低下すると言われている。従って、再置換の原因を分析し、再置換の必要のないインプラントの開発が急務となっている。

人工関節の再置換の原因は、合併症や転倒事故による骨折など患者に起因するものや、設置位置不良など手術手技に起因するものなども考えられるが、インプラントに起因するものとしては、摺動面に使用される超高分子量ポリエチレン（Ultra-high molecular weight polyethylene、以下、「UHMWPE」とする）部品の耐久性が問題になることが多い。

例えば、人工膝関節の場合、デラミネーション破壊と呼ばれる疲労破壊が問題になっている。近年では UHMWPE 製コンポーネントがポスト部を持った、PS タイプと呼ばれる人工膝関節も多く使用されているが、この部分は特に力学的に過酷な条件となるため、UHMWPE の疲労特性の重要性は高まっていると思われる。

一方、人工股関節の場合、従来、摩耗粉の発生に起因するゆるみが最大の問題として研究が行われてきた。人工股関節の摺動面で発生する UHMWPE 摩耗粉により関節周囲のマクロファージが活性化され、最終的に関節周囲の骨溶解に至ることが知られてきたのである。その結果、人工股関節インプラントを支える周囲の骨がなくなってしまい、緩みを生じ、人工関節の機能低下や疼痛により再置換に至るのである。

これらの研究の過程で、滅菌のために

行われるガンマ線照射により UHMWPE 内部に発生したフリーラジカルが長年にわたる酸化劣化の原因になること、酸化劣化により摩耗量が大幅に増大すること、引張特性などの機械的性質も低下することなどがわかってきた。そこで現在では、空気中におけるガンマ線照射は行われなくなり、不活性ガスを充填した密封包装を使用するなどの酸素非存在下でガンマ線照射を行うなどの対策を行っている。しかし、UHMWPE 内部に発生したフリーラジカルが除去されるわけではないので、長期の埋植期間中に酸化劣化が進行する可能性も否定できない。

また、1990 年代後半より摩耗と摩耗粉の発生を抑制するため、架橋ポリエチレン (Highly cross-linked polyethylene、以下「HXLPE」とする) と呼ばれる材料が開発され、市場に投入された。この材料は UHMWPE にガンマ線や電子線などの放射線を照射することで UHMWPE の分子鎖に架橋を施し、耐摩耗性を向上させたものである。しかし、放射線照射で発生したフリーラジカルは酸化劣化の原因になるため、これらの材料では架橋を施す放射線照射の工程と、発生したフリーラジカルを除去するための熱処理の工程が必要となる。従って、これらの材料では、製造方法によっては十分にフリーラジカルを除去できない可能性があること、熱処理により UHMWPE の機械的強度が低下することが、問題点として指摘されている。臨床においても、HXLPE を用いた人工股関節の短期の臨床研究において、酸化劣化の進行や疲労破壊と思われる観察結果が報

告されている。

以上のように、人工膝関節、人工股関節の両分野において UHMWPE の疲労特性の評価の重要性が高まっている。

プラスチック材料、特に人工関節用 UHMWPE は金属材料に比べて、破断伸びが大きく、粘弾性の特性を示すなど、金属材料を対象とした疲労試験をそのまま適用することは困難である。また、製品の分析や抜去品の分析など、小試験片での試験が行えることが望ましく、既存の規格や従来試験法の枠にとらわれない新しい試験方法が必要である。

以上のような理由により、本研究では人工関節用 UHMWPE の疲労特性評価法の開発を目指した。

## 10. 神経機能に及ぼす人工脳硬膜の安全性評価手法の開発

近年、ポリ乳酸ラクチド (以下 PLLA) を主成分とする生体吸収性の人工硬膜が開発された (Yamada et al., 1997)。脳外科手術後に、この人工硬膜を使用すると、膜は一定の期間、弾性の構造を保ち機能を果たした後、ゲル状になり吸収される。以前から問題とされてきた再手術のリスクは、吸収性であるためなくなり、また人工材料であるため、ウイルス感染などのリスクも避けることができる (宮本、他、2001)。臨床で吸収性の人工硬膜を使用するにあたっては、安全性を毒性学の見地から評価しなければならない。しかし、安全評価の適当な方法は確立していないのが現状である。



PLLA 等、合成高分子材料の合成時の触媒として、ジブチルスズ (dibutyltin, DBT) が使われる (荒川, 2000, Boyer, 1989, 和田, 1985)。また、オクチル酸スズ (octyl acid tin (tin(II) 2-ethylhexanoate), OT) も多く使われている (筏, 1993)。これらは合成後も人工硬膜に残存する。

DBT の主な毒性として、免疫毒性が挙げられ、胸腺に対する毒性が指摘されてきた (荒川, 2000, Comment et al., 1992, Whalen et al., 2001)。これまでに、DBT の低濃度曝露での胸腺リンパ球に対する傷害が報告されている。DBT は、極性が比較的高く、血液脳関門への透過性は低い (荒川, 2000, 和田, 1985) ため、その神経毒性の評価は行われてこなかった。しかし、人工硬膜が生体吸収性であるため、臨床使用の際には人工硬膜内に含まれている DBT は脳内に溶解し、神経系への直接的な曝露が考えられる。このような状況が考えられる以上、DBT の神経系の影響を検討する必要がある。

また、神経毒性が主要な毒性であるトリブチルスズ (tributyltin, TBT) は、生体中で DBT に分解される (荒川, 2000)。TBT を経口投与したラットの脳内で DBT が検出されたとする報告 (和田, 1985) があり、TBT の神経毒性が、脳内の代謝によって生じた DBT による可能性もあり、DBT の神経毒性の評価の必要性を示唆する。

OT についての神経毒性は知られていないが、よく使用される触媒の組成は、DBT : OT = 1 : 9 (w/w) であり、OT はより多量に使用されているため、人工硬膜吸収による直接曝露の可能性がある限り、

OT の神経毒性を評価する必要がある。また、人工硬膜製品や、PLLA が本当に神経毒性を示さないか、スズとの相互作用により毒性が生じないかを確かめておく必要があるため、人工硬膜や各種 PLLA の神経毒性評価も重要である。この場合、製品に加えて、スズを高濃度を含む PLLA と含まない PLLA を検討すれば、PLLA 自体の毒性や大量のスズによる影響を評価できる。また、形態を維持している PLLA とゲル状の PLLA の神経毒性の違いも検討すべきである。

一般に毒性の評価法として、培養細胞を利用する方法がある。培養細胞を用いることによって、より簡便に毒性評価を行うことができるが、神経毒性に関しては、評価が確立している培養細胞は少ないのが現状である。アストロサイトはマクログリアのひとつであり、神経系の構成要素として重要である (Alliot and Passac, 1984, Alliot et al., 1996)。マウスのアストロサイト系細胞として CRL-2534 Astrocyte type III (Alliot and Passac, 1984, Alliot et al., 1996) が商業的に利用可能であり、この培養細胞を用いて神経毒性をより簡便に評価できるか検討する価値がある。アストロサイトはグルタミン酸をグルタミンに代謝する機能を持ち、CRL-2534 Astrocyte type III はこの機能を保持している (Alliot et al., 1996)。グルタミン酸の細胞外への放出を検討することで、アストロサイト機能が化学物質曝露で損なわれていないか調べることが可能と考える。

一般に化学物質は細胞に対して、細胞死を引き起こすに至らないまでも、細胞増殖を抑制する可能性がある。また、DBTのように毒性が強いと想定される化学物質だけでなく、OTのように毒性が知られていない化学物質でも、細胞死が起きないレベルで細胞増殖抑制を起こす可能性がある。そこで、細胞死に至らない濃度で、比較的長期に曝露し、増殖評価を検討することも意義がある。

以上により、PLLA 及び触媒である DBT、OT の細胞の生存への影響、グルタミン酸の放出量の変化を指標とする機能面への影響を検討した。さらに、比較的濃度での DBT、OT の細胞増殖への影響をマウスのアストロサイト系細胞を用いて評価した。アストロサイト系細胞を用いた DBT、OT、各種 PLLA の神経毒性の評価方法を確立することが本研究の目的である。

## 11. 脊椎固定器具の力学的安全性評価手法の開発

現在、脊椎の整形外科的治療法には、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、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した研究を行った。

## 12. 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

関節軟骨欠損修復の実験動物として、家兎が多く使用されてきた。安価であること、おとなしく扱いやすいこと、麻酔がかけやすいこと、5mm 程度の欠損を作成できることなど、有利な点が多いからである。しかしながら、自然修復能力が大きいこと、欠損が 5mm では小さすぎてヒトに行う検査のうちいくつかは施行できないなどの適さない点もある。より、ヒトに近いモデルの開発が望まれる。ミニブタは膝関節の形状がヒトに類似していること、大きさがヒトに近いことなど利点があるが、その自然修復能力など明らかにされていないことが多い。今回、ミニブタに対して膝関節軟骨欠損を作成し、軟骨欠損修復法の有効性・安全性を評価できるかを明らかにする目的で実験を行った。

## 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℃ 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 及び菌体の調製

大腸菌 0111 株及び黄色ブドウ球菌 209P 株を普通ブイヨン培地中、37℃、16 時間振とう培養後、培養液の pH を中性に調整し、100℃、10 分間加熱して殺菌した。加熱死菌体を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、アセトン及びジエチルエーテルにより順次脱脂して乾燥菌体とした。大腸菌 03 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 03 K2a, K2b:H3 由来 LPS 及び大腸菌 0111 乾燥菌体の LPS 活性強度は、それぞれ 27.5 EU/ng 及び 0.159 EU/ng であった。また、黄色ブドウ球菌乾燥菌体の LPS 含量は 0.48 EU/mg であった。

## 2) 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 大腸菌 0111 株乾燥菌体及び黄色ブドウ球菌乾燥菌体を添加し、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。

## 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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。処理液を塩酸性 (pH 3, 最終容量 2 ml) とし、氷冷下、10 分間超音波処理後 (精製コラゲナーゼ消化/塩酸抽出法)、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 15 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 055: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。また、精製コラゲナーゼ消化/塩酸抽出法のほか、ガイドライン法 (生理食塩液・室温・72 時間) 及び塩酸抽出法 (HCl/pH3・4°C・10 分間超音波処理) によって調製した試験液のリムルス活性も同様に測定し、抽出法の違いによる LPS 回収率を比較した。

## 4) 埋植試験及び病理学的診断

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、ペントバルビタールナトリウム (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 箇所のコラーゲンシートを挿入後、皮膚縫合した。肝被膜への埋植は、上腹部を 2.5 cm 切開し、肝臓を視認して、肝被膜表面にコラーゲンシートを埋植した後、腹直筋及び皮膚を縫合した。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。

試験に応じて種々の期間で動物を屠殺した。皮下埋植群 (症例数 n=4) は周囲組織と共に材料を摘出し、また、肝臓埋植群 (症例数 n=4) については埋植材周囲の肝臓組織を摘出した後、10%中性緩衝ホルマリンを用いて固定した。頭蓋骨埋植群 (症例数 n=6) については、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、固定又は脱灰終了後、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。

#### 5) in vivo 抗菌試験

実験動物としては、7 週齢の Fischer 系雄ラットを用いた。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てコラーゲンシートを挿入後、 $1 \times 10^5$  個の緑膿菌を接種した。同シート上に種々の濃度の 18-mer LLKKK アナログ及びポリミキシン B を含浸させた酸処理ゼラチンシート (コアフロント社製: 含水量  $75.4 \pm 7.2$  mg) を被覆し、皮膚縫合した (各群 3 匹)。翌日、動物を屠

殺し、背部を切開して埋植材料を回収した後、材料周囲の組織を滅菌脱脂綿で 2 回拭い、回収材料と共に滅菌生理食塩液 (10 ml) 中に浸漬した。同液を緩やかに 10 分間振とうした後、10 倍希釈系列を調製し、各試験液 50  $\mu$ l を SCD 寒天平板培地に展開 (n=2) して 37°C で 24 時間培養し、形成されたコロニー数を計数した。

## 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) EOG 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、 $3.5 \times 10^6$  CFU/担体) を用いて  $600 \pm 30$  mg/L,  $60 \pm 10\%$  RH,  $54 \pm 1^\circ\text{C}$ ) に 3 分間ならびに 10 分間暴露させて損傷芽胞を得た。

EOG 滅菌で暴露後 3 種の培地メーカー (メルク, BBL, 日水) の Soybean Casein Digest Agar (SCDA) 培地で培養させ、各培地メーカー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。

照射後の BI 菌数の測定方法としては、BI の 3 枚を裁断し、0.1% Tween 80 添加リン酸緩衝液 30ml を加え、冷却しながら攪拌後、検液を回収、この操作を 3 回繰り返して BI の芽胞数を段階希釈法を用いて測定した。

EOG 滅菌で損傷した BI 菌に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。試験した薬剤としては複合ビタミン、炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、L-アラニ