

ン、D-アラニン、アミノ酸混合液、ピルビン酸ナトリウム、グルコースなどを用い、損傷回復能の違いについて検討した。

2) ガンマ線滅菌の場合

レーベン社から購入したガンマ線滅菌用生物指標菌 (BI) *Bacillus pumilus* 芽胞 (初期菌数、 2.0×10^6 CFU/担体) ならびに *Bacillus megaterium* 芽胞 (初期菌数、 1.4×10^6 CFU/担体) を用い *Bacillus pumilus* の場合には 5kGy の照射、*Bacillus megaterium* の場合には 2kGy あるいは 5kGy 照射して損傷菌を得た。*Bacillus megaterium* はショルダーを示すが、*Bacillus pumilus* はショルダーを示さない。両方ともかつてはガンマ線滅菌用生物指標菌 (BI) と考えられていた芽胞菌である。

Bacillus megaterium 芽胞 は 2kGy 照射近辺ではショルダーを示すため、同じ損傷菌でも 2kGy 照射と 5kGy 照射との間に差があるか否かについても検討した。損傷菌は BBL 社製の SCDA 培地で培養させた。

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。

ガンマ線滅菌で損傷した 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-アラニン、D-アラニン、アミノ酸混合液、ピルビン酸ナトリウム、可溶性でんぷん、

活性炭、グルコースなどを用い、損傷回復能の違いについて検討した。

3) 電子線滅菌の場合

レーベン社から購入した電子線滅菌用生物指標菌 (BI) *Bacillus megaterium* 芽胞 (初期菌数、 1.4×10^6 CFU/担体) を用い、それに 4.5kGy 照射して損傷菌を得た。損傷菌は BBL 社製の SCDA 培地で培養させた。

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。

電子線滅菌で損傷した 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-アラニン、D-アラニン、アミノ酸混合液、ピルビン酸ナトリウム、グルコースなどを用い、損傷回復能の違いについて検討した。

3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

1) 試薬

α -n-ヘキシルけい皮酸 (α -n-hexyl cinnamic aldehyde, HCA) は東京化成工業から、アセトン、プロピレングリコール (PG)、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS)、Tween80 (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate, T80)、Tween20、カルボキシメチルセルロースナトリウム塩 (CMC)、

2,4-ジニトロクロロベンゼン(DNCB)、トリメリト酸無水物(trimellitic anhydride, TMA)及び硫酸ニッケル六水和物(NiSO_4)は和光純薬工業から、pluronic L92 (PL92)はBASF社から入手した。綿実油はMP Biomedicals社から、生理食塩水は大塚製薬から購入した。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。Ovalbumin(OVA, albumin chicken egg, Grade V)、RPMI-1640 培地、1% globlins(Cohn fraction II, III)溶液、0.1 mol/l 炭酸緩衝液(pH 9.6)、Tris-buffered saline(TBS)及び3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, (TMB)基質溶液はSigma-Aldrich社から入手した。牛血清アルブミン(bovine serum albumin, BSA)としてalbumin, bovine fraction V solution (30%)を、IgE標準液としてmouse monoclonal IgE anti-dinitrophenyl (DNP) antibody (clone SPE-7)をSigma-Aldrich社から入手した。牛胎児血清(fetal bovine serum, FBS)、2-mercaptoethanol、penicillin G-streptomycin 溶液及びリン酸塩緩衝液(phosphate buffered saline, pH 7.2, PBS)は invitrogen 社のものを用いた。アジュバンドとして Alum (aluminum hydroxide hydrate $[\text{Al}(\text{OH})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}]$ gel suspension)をLSL社から購入した。Rat-monoclonal anti-mouse IgE antibodyはSouthern Biotechnology Associates社から入手した。Hourseradish peroxidase labeled goat anti-mouse IgEはNordic Immunology社から入手した。

IgG、IgG 定量試薬キットはBethyl社から購入した。BrdU 測定用 ELISA キットはRoche Diagnostics GmbH 社の Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)を用いた。ATP 測定にはキッコーマン社の試薬キット(Luciferol 250 Plus)を用いた。TetraColor ONEは生化学工業から購入した。FITC 標識抗 CD86 抗体(B70/B7-2)、FITC 標識マウス IgG1, κ (isotype control)及び1%パラホルムアルデヒド溶液(CellFIX)はBD Pharmingen社、FITC 標識抗 CD54 抗体(clone 6.5B5)はDako社から入手した。

医療機器として、市販ゴム手袋、止血用ゼラチンスポンジ(スポンゼル、アステラス製薬)、コラーゲン使用吸収性局所止血材として、インテグランシート(日本臓器製薬)およびアビテン(ゼリア新薬工業)を用いた。

2) 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。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。

3) 細胞

THP-1細胞はATCCから購入し、FBS 10%、penicillin G 100 units/ml、streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び 2-mercaptoethanol 55 $\mu\text{mol}/\text{l}$ を含有したRPMI-1640培地(FBS-RPMI)で培養した。

4) 医療機器の抽出

試料を細切した後、30 ml 容量のスクリーキャップ付きガラス瓶に入れ、表面積 6 cm^2 当たり 1 ml になるように抽出溶媒を入れ、37°C恒温槽中に72時間静置し

て抽出した。浮遊物があるときは、抽出液を 3500 rpm で 10 分間遠心して上清を採取して試験溶液とした。ゴム手袋については別に、1g に対し 10 ml となるよう生理食塩水を入れ、同様に抽出した。これらは孔径 0.45 μm の滅菌フィルターを通した後、試験まで冷蔵庫に保管した。

5) Local lymph node assay (LLNA)

マウスの両耳裏側に試験溶液を 25 μl ずつ 3 日間連続塗布した (Day 1, 2 及び 3)。対照群は溶媒のみを同様に塗布した。試験物質の前処理効果を見る場合は、毎回、感作性物質及び溶媒を塗布する 1 時間前に、各溶媒に溶解した試験物質を 25 μl ずつ両耳に塗布した。リンパ節細胞の BrdU 取り込み量を測定する場合は、Day 5 または Day 6 に BrdU 溶液 500 μl をマウスの腹腔内に注射した。Day 6 または Day 7 (BrdU 注射した場合は、その 3 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。リンパ節は孔径 200 mesh のステンレスメッシュ上に置き、PBS を加え押しつぶしてリンパ節細胞 (lymph node cell, LNC) を遊離させ、LNC 数を数えた。

6) リンパ節細胞の反応性の測定

6-1) ATP 量

Yamashita らの方法を若干変更した。リンパ節を押しつぶして PBS 1 ml で調製した LNC 懸濁液から 20 μl とり、PBS で 100 倍希釈した。この希釈細胞浮遊液について、市販 ATP 測定キットを用いて ATP 量を測定した。希釈した LNC 浮遊液 100 μl を 100 μl の ATP 抽出液が入ったルミノメ

ーター用測定チューブ (Lumi Tube、キッコーマン) に加えて混合し、20 秒間静置した後、発光試薬 100 μl 加えてすばやく攪拌し、ルミノメーター (LUMITESTER C-100、キッコーマン) を用いて 10 秒間の発光量 (relative light unit, RLU) を読み取った。

6-2) BrdU 取り込み量

Takeyoshi らの方法に従って実施した。ATP 測定後、残った LNC をナイロンメッシュに通して遠心管に移し、整理食塩水で 1 匹当たりのリンパ節の LNC 浮遊液が 15 ml 容量となるよう希釈した。100 μl ずつ 96 穴プレートの各穴に入れ (1 匹当たり 3 穴)、4°C、300 \times g で 10 分間遠心した後、各穴から上清を除き、ドライヤーを用いて乾燥した。ブランクとして、生理食塩水 100 μl を各穴に入れ、同様に乾燥したものを用いた。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 60 分間、室温で放置した。上清を除き、洗浄後、TMB 基質溶液 100 μl を加えて 15 分放置後、プレートリーダー (SpectraMax M5、Molecular Devices 社) 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_2SO_4 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。

リンパ節重量、LNC 数、BrdU 取り込み量、ATP 量について、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。

7) h-CLAT

7-1) 細胞毒性試験

THP-1 細胞を FBS-RPMI で希釈して 4×10^5 cells/ml とし、50 μ l ずつ 96 穴プレートの各穴に入れ、種々の濃度の試験溶液 50 μ l (1 濃度 4 穴) を加えて、37°C 炭酸ガスインキュベータ中で 24 時間培養した。試験物質の代わりに培地を加えたものをコントロールとした。TetraColor ONE を 10 μ l ずつ加えて、37°C 炭酸ガスインキュベータ中で更に 3 時間培養し、対照波長 600 nm、測定波長 450 nm における吸光度をプレートリーダーで測定した。各試験物質についてそれぞれ濃度ごとにコントロールに対する吸光度の割合 (%) を求め、グラフから吸光度をコントロールの 50% にする試験物質の濃度 IC50 (μ g/ml) を求めた。

7-2) 染色

24 穴プレートの各穴に培地に懸濁させた細胞 1×10^6 個及び試験溶液を総量 1 ml となるように入れ、24 時間培養した。試験物質の最終濃度は IC50 の 0.1 倍、0.5 倍、1 倍及び 2 倍の計 4 段階を設定した。培養終了後、細胞をラウンドチューブに移し、0.1% BSA 含有 PBS 1~2 ml を加え、4°C、1600 rpm で 5 分間遠心し、上清を除いた。この洗浄操作を更に 2 回繰り返した。細胞は 0.1% BSA 含有 PBS 150 μ l に再懸濁して、50 μ l ずつラウンドチューブに分けた。0.1% globlins (Cohn fraction II, III) -PBS 溶液 5 μ l を加えて氷上で 10 分間処理 (FcR ブロッキング) した後、0.1% BSA 含有 PBS で洗浄し、再度 0.1% BSA 含

有 PBS 50 μ l に再懸濁した。各チューブにそれぞれ FITC 標識抗 CD86 抗体 (clone 6.5B5) 6 μ l、FITC 標識抗 CD54 抗体 3 μ l または FITC 標識マウス IgG1, κ (原液を 5 倍希釈したもの) 3 μ l を入れ、氷上で 30 分間置いて染色した。染色後、0.1% BSA 含有 PBS で細胞を 2 回洗浄し、1% パラホルムアルデヒド溶液 1 ml を加え細胞を固定した。細胞浮遊液はセルストレーナーを通してラウンドチューブに移した。フローサイトメーターを用いて細胞 10000 個の CD54 及び CD86 発現量を測定し平均蛍光強度として求めた。

8) 血清抗体価の定量

8-1) 試験物質の投与と採血

生理食塩水で調製した試験溶液または医療機器抽出液は Alum 溶液 (20 mg/ml) と等量の割合で混合し、200 μ l を 1 週間に 1 回マウスの腹腔内に注射した。注射は計 3 回行い、最終投与から 7 日後、心臓から採血し、3000 rpm で 5 分間遠心して血清を分離した。

8-2) IgE の定量

血清中の総 IgE 抗体価は既報の ELISA 法¹⁴⁾を若干改変した方法により測定した。ELISA 用 96 穴プレートの各穴に 2.5 μ g/ml rat-monoclonal anti-mouse IgE antibody の 0.1 mol/l 炭酸緩衝液 (pH 9.6) 溶液を 100 μ l ずつ入れ、4°C で一晩放置してコーティングした。各穴を 0.05% Tween20 を含有する TBS で 3 回洗浄後、1% BSA 及び 0.05% Tween20 を含有する TBS (BSA-TBS) 300 μ l を加えて 37°C で 30 分間放置してブロッキングした。洗浄後、個々の血清を BSA-TBS で 100 倍希釈した

もの (1 匹当たり 3 穴)、または種々の濃度の IgE 標準液を 100 μ l 入れて、37°C で 2 時間静置した。洗浄後、BSA-TBS で 200 倍希釈した HRP 標識 anti-mouse IgE 溶液 100 μ l を加えて、室温で 1 時間静置した。各穴を洗浄後、TMB 溶液 100 μ l を加えて暗所で 15 分間静置し、2 mol/l H_2SO_4 溶液 100 μ l を加えて反応を停止した。450 nm における吸光度を測定し、IgE 標準液から作成した検量線を用いて、血清中の総 IgE 抗体価 (μ g/ml) を求めた。

8-3) IgG の定量

市販 IgG 測定試薬キットを用い、プロトコールに従って操作した。96 穴プレート各穴に 0.1 mol/l 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で 1/100 に希釈した goat x-mouse IgG-Fc-affinity purified 溶液 100 μ l を入れ、4°C で一晩放置してコーティングした。洗浄、ブロッキングした後、BSA-TBS で 2500 倍、10000 倍、40000 倍、160000 倍に希釈した血清、または種々の濃度の IgG 標準液 100 μ l を入れて、室温で 1 時間静置した。洗浄後、goat x-mouse IgG-Fc-HRP 溶液 100 μ l を入れ、室温で 1 時間静置した。洗浄後、TMB 溶液を加えて 15 分静置し、2 mol/l H_2SO_4 溶液で反応を停止させ、450 nm における吸光度を測定した。検量線の範囲にある適切な希釈液を用いて、血清中の総 IgG 抗体価 (μ g/ml) を求めた。

4. Ti-Ni 合金材料の安全性評価手法の開発

【埋植合金材料の作製】In vivo で動物の背部皮下に埋植し、生体適合性等を評価

する目的で、形状記憶性能を有する Ti/Ni 合金材料を製造依頼した。形状は、当部で既に研究を行っている新規合金材料との比較への利用を考慮して、14mm ϕ の円形板 (厚さ 1mm) を選択した。

素材の Ti/Ni 合金材料の組成は、Ni: 55.2%, O: 0.035%, H: 0.0006%, C: 0.05%, Ti: 残部であり、これを、750°C、1 時間熱処理後、空冷し、丸棒加工したものを、Wire Cut で、板スライスにした。なお、比較のために、純ニッケル (Ni、JIS 一級) [Cu: 0.01%, Fe: 0.01%, Mn: 0.02%, Si: 0.01%] 円板、及び純チタン (Ti、JIS 一級) [H: 0.013%, O: 0.15%, N: 0.05%, Fe: 0.20%] 円板も、各平板からの打ち抜きで製造した。また、対照 Ti 合金として、整形外科領域で汎用されている、Ti-6Al-4V 合金製の円板も用いた。これらの円板をシリコンカーバイド研磨紙を用いて研磨し、アセトン、エタノール、超純水の順に超音波洗浄し、埋植前に高圧蒸気滅菌 (121°C、20 分) を施した。

【合金材料の埋植に関する検討】

使用動物は、Fisher F344 ラット雌、7 週齢、1 群 5 匹とし、飼育、埋植、病理検索は、神奈川歯科大学で行った。pentobarbital sodium (30mg/kg) 麻酔下で背部正中を 3 cm 切開し、筋膜を鈍的に剥離して空隙を作製後、背部皮下に 1 検体/1 動物で埋植材料を挿入後、ナイロン製縫合糸を用いて皮膚縫合した。ナイロンを使用した理由は、金属製ステープルによる金属の影響、絹糸による異物反応を避けるためである。抜糸は術後 1 週で行

った。

4週、8週、16週経過後に、エーテル麻酔で致死後、体重測定を行い、皮下への埋植材は周囲組織と共に摘出し、10%中性緩衝ホルマリンを用いて固定した。また、アレルギー反応を想定して影響を受ける可能性がある臓器（肝臓、腎臓、脾臓、胸腺）の重量測定を行った。

固定された試験検体は、金属材料を除いた後、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。回収した金属材料は表面観察を行った。

【合金材料からの溶出試験】

埋植材料と同じロットの円板(Ti/Ni, Ni, Ti-6Al-4V)を、600番耐水研磨紙で研磨し、溶出試験に供した。今回の研究で採用したデータは、昨年度報告書に用いたデータを抽出再加工したものである。

【チタン・アレルギーに着目した米国不具合報告の検索】

米国の不具合報告については、2006年末までの最新のデータ(約77万件)を入手し、特にチタン・アレルギーに注目して、調査した。不具合データの集計・整理については、別途、報告書に記述した方法で、FDAのManufacturer and User Facility Device Experience Database(MAUDE)から、ファイルをダウンロードして、MS Access形式に変換し、独自のデータベースを作成した後に行った。

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に関する研究

1) 試験材料

Ti-Zr基合金として、TiとZrの原子比が1:1であるTi-Zr並びに主成分であるTiとZrの原子比を1:1に固定し、それにβ相安定化元素のひとつであるNbを添加したTi-Zr-4Nb、Ti-Zr-8Nb、Ti-Zr-16NbおよびTi-Zr-24Nbを用いた。Ti-Zr基合金の化学組成を表1に示した。また、純金属として、Ti、Zr、NbおよびAlを用いた。

いずれの試料も直径1.0mm、長さ7.0mmのロッド状に加工し、#400(A1のみ#1200)のエメリー紙を用いてほぼ同じ表面粗さになるように研磨仕上げを施した。その後、酢酸エチル、アセトン、エタノール、超純水の順に超音波洗浄し、高圧蒸気滅菌(121°C、20分)を施した。

2) ラット大腿骨埋植試験

2-1) 埋植操作

フィッシャー系雄ラット(7週齢)をペンタバルビタールナトリウム(30mg/kg)麻酔下で腹位に固定し、大腿部皮膚を約3cm切開、さらに内側広筋を切開して大腿骨を露出した後、歯科用エンジンを用いて大腿骨骨幹部に直径1.0mmの窩洞を形成し、窩洞部へ試料を挿入した(図1)。その後、筋肉および皮膚を縫合した。

2-2) 軟X線撮影

試料埋植後1、2および4週で動物を屠殺し、大腿骨を採取して10%中性緩衝ホルマリン液を用いて固定した。その後、軟X線撮影装置を用いて大腿骨を撮影し

た。

2-3) 病理組織検索

軟 X 線撮影後に大腿骨を脱灰し、通法に従い、パラフィン包埋薄切切片を作製し、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。また、HE 標本像を用いて、骨髓腔に形成された新生骨梁の窩洞部から大腿骨長軸方向に進展した最大長さを測定した。

2-4) 引抜強度の測定

試料埋植後 4 週で動物を屠殺し、大腿骨を採取して 10% 中性緩衝ホルマリン液を用いて固定した。その後、精密万能試験機 AUTOGRAPH AG-20kNG および 50 N ロードセル (いずれも島津製作所) を用いて、大腿骨に埋植した試料の引抜速度 1.0 mm/min における荷重変位曲線を測定し、試料の引抜強度を求めた。

3) 統計学的検定

統計学的検定には JSTAT Version 10.0 を用いて、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い、有意差が認められた場合には、Tukey-Kramer 法による群間の多重比較を行った。いずれの検定においても有意水準は危険率 5% 未満とした。

4) 倫理面での配慮

本研究ではより臨床実態に近い評価が得られる骨組織適合性試験の確立を目指している。そのため、本研究においては、動物実験の必要性があった。動物福祉・愛護の精神に基づき、実験に使用する動物数は必要最小限にするとともに、動物に与える苦痛を最小限に抑えた。

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

1) 合金の溶製と試料の作成

Au 地金 (純度 99.99%, 石福金属興業), Pd 地金 (石福金属興業), Ag (石福金属興業) を用いて、所定の合金組成の割合になるよう秤量した。非消耗電極式アルゴンアーク溶解炉を用いて、各合金とも 100 g のボタン状インゴットを 2 個ずつ溶製した。各インゴットを厚さ 1 mm まで冷間圧延し、面積約 50 cm² の薄板 2 枚を得る。この薄板から、ワイヤーカット放電加工で引張試験片、溶出試験片、血液適合性試験片を作製した。

2) 力学的性質の評価

上述のように作製した引張試験片 (平行部の幅 4 mm, 同厚さ 1 mm, 同長さ 14 mm) を用いて、引張試験により力学的性質の評価を行った。引張試験はモデル 858 卓上型材料試験システム (MTS) をもちいて、クロスヘッド速度 1.0 mm min⁻¹ で行った。ひずみはアクチュエータから出力した変位より、応力はロードセルの出力を試験片断面積で除したものをを用いた。

3) 溶出試験による耐食性の評価

耐食性評価のための溶出試験は、各合金の溶出試験用試験片 (直径 10 mm, 厚さ 1 mm) を 10 ml の 0.9%NaCl 水溶液とともにポリエチレン密封容器中に入れ、37°C 恒温槽中で 3 週間行った。試験期間中はポリエチレン容器を常時振揺させた。いずれの合金も試料数は N=5 とした。比較のため、同じ形状の Ti-Ni 超弾性合金と Ti-6Al-4V 合金の溶出試験も行った。前者は自己拡張型ステント用の素材としてす

で市販されており、後者は整形外科用生体材料として多くの使用実績がある。

3週間経過後、溶液から試料を取り出し、残った溶液に溶け出した金属イオンの濃度を ICP 発光分光分析 (PS-1000, Leeman Labs) で測定した。測定したイオン濃度は、単位試料表面積あたりの溶出量に換算して比較した。また、取り出した試料の表面状態を観察した。

4) アノード分極試験による耐食性の評価

溶出試験と平行して、アノード分極試験による耐食性の評価を行った。試料は溶出試験用試験片と同じもの(直径10 mm, 厚さ1 mm)を鏡面研磨して使用し、37°Cの0.9%NaCl水溶液中でアノード分極試験を行った。試験装置の外観と試料を保持する試料ホルダーの様子を図6に示す。N₂ガスバブルで30min脱気後、ポテンシヨスタット(HZ-3000, 北斗電工)を用い、掃引速度 $2 \times 10^{-3} \text{ V s}^{-1}$ で分極試験を行った。対極にはPt電極、参照極には飽和カロメル電極(SCE)を用いた。比較のためAu(純金)、Cuの試料も試験に供した。

5) 血小板粘着試験

健康な被験者から採取した血液(45 ml)に凝固防止剤(クエン酸ナトリウム)を5 ml添加した後、遠心分離(800 rpm, 15 min)して血球成分を分離し、多血小板血漿(PRP: Platelet rich Plasma)を得た。残った血漿をさらに遠心分離機(2500 rpm, 10 min)にかけ、血小板が少量浮遊する血漿(PPP: platelet poor plasma)とした。両者の血小板数を計測した後、両者を適量混合することによって血小板数を

3.9×10^5 個/ μL に調整し、 0.25 mol L^{-1} の塩化カルシウムを添加(混合溶液2 mlに対して0.17 mlの塩化カルシウムを添加)した血小板溶液を実験に用いた。

この血小板溶液200 μL を鏡面研磨した試料(5 mm \times 5 mm, 厚さ1 mm)の上に滴下し、37°Cのインキュベータ中に所定時間(5 min, 20 min)保存した。所定のインキュベーション時間経過後、PBS(-)で洗浄し、グルタルアルデヒドに浸漬して2 day固定したものをPBS(-)で再び洗浄し、乾燥後、濃度(50%, 70%, 90%, 100%)の異なるアルコールで順次脱水したものに、厚さ約25 nmのAuを蒸着してSEM観察した。

比較材として、ステント合金として使用されているTi-Ni超弾性合金と316L型のステンレス鋼、ならびに生体用合金として使用されている純TiとCo-Cr合金を同時に試験に供した。

(倫理面への配慮)

この研究の一部には、健康なボランティアから採取したヒト全血から調整した多血小板血漿を使用している。多血小板血漿を使用した実験については、東京医科歯科大学生体材料工学研究所の倫理審査委員会に審査を申請し、ヘルシンキ宣言の趣旨を尊重した実施計画書に基づいた実験の実施に関する承認を得ている。この実施計画書の中では、研究協力者に対して、文書によって説明し、同意を得ることが明記されており、倫理面で最大限の配慮がなされている。

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

まず、研究に先立ち、匿名化などによる個人情報保護に努め、研究内容の説明同意を得ることなど、厚生労働省医薬品食品衛生試験所における倫理委員会に試験の承認を得、また、藤田保健衛生大学病院においても倫理委員会において審査を受け、患者さんには具体的な説明を行い、同意を得るなど倫理的な配慮のもとに研究を行った。

1) 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。

2) 医学中央雑誌、MEDLINEにより、インプラントによる皮膚不具合例の収集を行った。

3) 金属パッチテスト試料をドイツのBrial社、スウェーデンChemotechnique社より購入し、また、日本大学松戸歯学部歯科生体材料学講座、早川徹先生よりニッケルとチタンの錯体のパッチテスト試料の提供を受けた。これらによる皮膚反応の差異を見当した。

さて、ニッケルの錯体の濃度を見当するにあつて、

Nickel sulfate (2.5%pet)

分子量 154.75

$0.025 \div 154.75 = 0.00016155 \text{mol}$

0.16155mol

ニッケル錯体含有水溶液 0.38mmol/g を

0.16155mmol にするためには

$0.16155 \div 0.38 = 0.423$

42.3%に希釈した。

Titanium (20%pet)

分子量 47.867

$0.2 \div 47.867 = 0.0041782 \text{mol}$

4.178mmol

チタン錯体含有水溶液 0.033mmol/g

を4.178mol にするためには

$4.178 \div 0.033 = 126.60$

に濃縮しなければならない。

もしくはチタン錯体含有水溶液のモル数にチタンのモル数を合わせるなら

$47.867 \times 0.000033 = 0.001579611 \text{g}$

チタンを0.157%に希釈する。

4) THP-1細胞を用いた感作性代替法 (h-CLAT) とヒト末梢血細胞を用いた感作性代替法

現在、資生堂、花王をはじめメナードなど国内7社のring studyでも行っているin vivo感作性試験h-CLATは、ヒトの単級由来細胞であるTHP-1 (human monocytic leukemia cell line)の細胞を用いた試験管レベルでの感作試験である。

その具体的な手順は文献(足利太可雄、坂口 齊:ヒト細胞株(THP-1)を用いた感作性試験代替法の開発と2施設間バリデーション、FRAGRANCE JOURNAL 2004-8:108-111)に準じて行った。すなわち、

(1)細胞毒性試験によるIC50を基準に被験物質曝露4濃度(0.1XIC50, 0.5XIC50, IC50, 2XIC50)を決定

- (2) 48 時間あるいは 72 時間培養
- (3) THP-1 細胞を 1×10^6 /ml/well にて播種
- (4) THP-1 細胞に被験物質を 24 時間曝露
- (5) ヒトグロブリンを用いて Fc レセプターブロック
- (6) 抗 CD86 抗体 (BD-PharMingen 社製、クローン: FUN-1), 抗 CD54 抗体 (Dako 社製、クローン: 6.5B5) およびアイソタイプコントロール (Isotype control, Dako 社製) による細胞染色
- (7) フローサイトメトリーによる発現量測定
- (8) 相対発現量の計算

相対発現量 = (被験物質処理細胞の MFI - 被験物質処理細胞での Isotype control の MFI) / (溶媒処理細胞の MFI - 溶媒処理細胞での Isotype control の MFI) X 100

MFI: Mean fluorescence Intensity

さらにヒト末梢血から単球細胞を用いた h-CLAT を施行した。

5) 日本国内の皮膚科的症例の集積と解析

平成 17 年度に作成した、インプラントによる皮膚障害症例に関するアンケート用紙を使用して、平成 18 年度は日本皮膚科学会会員ならびに日本全国の大学病院にインプラント機器による皮膚科的不具合事例を調査した。

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

血液採取

久留米大学医学部外科学講座において、人工心臓弁置換手術を過去に施された患者のうち、人工心臓弁の機能不全が認め

られる患者 2 名および人工弁の不具合が今のところ認められない患者 8 名からの血液を PAXgene Blood DNA Tubes (パクスジーン社) を用いて 8.5mL 採血した。検体として採取した血液は、久留米大学医学部外科学教室において患者の自由意志に基づくインフォームド・コンセントが得られた患者より定期検診日に提供されたものである。

DNA 抽出

QIAamp Blood Mini KIT (QIAGEN) を用いて、採取した血液より DNA を抽出した。

SNP タイピング

ターゲットとした遺伝子は、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として、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の 7 遺伝子について、これまでに日本人で報告されている SNP を中心に計 23SNP と、さらに 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、総計 29SNP についてタイピングを行った。

SNP タイピングは、以下に記す方法で行った。まず、表 1 に示したプライマーを用いて PCR を行い、ターゲットの SNP を挟む 200~400bp 程度の増幅産物を得た。PCR 反応は、94°C で 2 分の後、94°C で 20 秒、55°C で 30 秒、72°C で 30 秒を 35 サイクル行い、最後に 72°C で 7 分間おいた。プロトロンビンの 1SNP (F2-5) のみ 55°C のアニーリングを 60°C で行った。得られた PCR 産物を Template として用いて、次の Typing PCR を行った。表 2 に示した各アレル特異的 Primer を用いて行った。PCR のサイクルプログラムは下記の 4 プログラムのうちの 1 つを用いた。使用したプログラムはそれぞれ表 2 に示した。PCR の酵素は、Go Taq Flexi DNA Polymerase

(Promega) を用いた。電気泳動にてバンドの有無を確認して判定した。プライマー設計及び PCR 条件設定は株式会社イムノダイアグノスティックラボラトリーにて行われた。

9. 人工関節用 UHMWPE の疲労特性評価手法の開発

薬事承認などでの応用が考えられるため、以下のような点を考慮した。第一に、特殊な技術や装置を必要としないことである。特殊な技術や専用の装置が必要な評価方法では、メーカーなどにとって大きな負担になるため、一般的な試験機により実施可能な試験方法を検討した。第二に、小さなサンプルで評価可能なことである。整形インプラントの場合、不具合などによって抜去された製品や市場の製品を分析することが重要であることから、製品から試験用サンプルが作製可能であることが望ましいため、小さなサンプルで評価可能な試験方法を検討した。第三に絶対評価は必ずしも求めないことである。絶対評価が可能になれば文献値などとの比較による評価が可能になるなど便利であるが、一方で絶対評価に必要な理想的な力学状態を実現しようとする試片寸法や試験方法が制限されてしまい、上述の要件が満たされなくなってしまう。そこで、医療機器の場合、従来品との比較により新規開発品の評価を行うことが一般的であることから、力学的に正しい絶対値を求めるのではなく、対象試料との相対評価ができることを目標とした。

1) 材料

人工関節用 UHMWPE で、現在あるいは過去に本邦で市販されているもののうち代表的な製品の製造方法と類似した方法でサンプルを作製した。また、抗酸化能が高い材料として近年研究されているビタミン E 添加 UHMWPE (VEPE) も対象とした。製造方法の概略を図 1 に示す。サンプル A は成型された UHMWPE をそのまま用いたもので、比較のために使用した。B はエチレンオキサイドガス (EOG) 滅菌を行ったもの、C は空気中でガンマ線滅菌を行ったもの、D は窒素ガス中でガンマ線滅菌を行ったものである。H は抗酸化能が高いとされるビタミン E 添加 UHMWPE (VEPE) で、通常の UHMWPE パウダーに 0.3% のビタミン E を添加し成型したものに EOG 滅菌を行った。

2) 加速酸化

UHMWPE の酸化劣化は、製造後数年から数十年をかけて徐々に進行していくため、長期間の埋植を評価するためには加速試験を行う必要がある。加速酸化の方法はいくつか提案されているが、そのうち二つの方法が 2000 年に ASTM に規格化された。Method A は 80°C の空気中で 21 日間加速酸化するものであり、Method B は 70°C、5 気圧の純酸素中で 14 日間加速酸化するものである。これらの試験法の問題点として、施設間における大きなばらつき、様々な試験条件の違いにより結果が大きく左右されることが指摘されている。しかし、本研究の目的は相対評価を可能にすることであることから、試験条件の違いによる影響はないと考え、これ

らの加速酸化方法を採用した。なお、これらの試験方法のうち Method A は 2002 年版では削除されたが、耐圧容器を必要とせず簡便な方法であるため、Method B とあわせ、二つの方法で加速酸化を行った。

Method A はガスクロマトグラフィー(ヒューレットパッカー、5890 Series II) のオーブンを使用し、室温から毎分 0.5°C の割合で 80°C まで昇温を行った。Method B は耐圧ガラス容器(耐圧硝子工業株式会社 ハイパーグlastar-TEM-V1000N) を使用し、70°C で 5 気圧となるよう酸素を容器内へ導入後、室温から毎分 1°C の割合で 70°C まで昇温を行った。加速酸化はそれぞれ 21 日、14 日間行い、加速酸化終了後は自然放冷により室温まで冷却した。

加速酸化後のサンプルはマイクロトーム(大和光機工業株式会社、小型回転式マイクロトーム PR-50) でおよそ 100 マイクロメートルの薄片を作製し、フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR、日本電子株式会社、SPX200) に顕微ユニット(日本電子株式会社、顕微赤外ユニット IR-MAU110) を取り付け、透過モードで酸化度を測定した。アパーチャーサイズを 100x100 マイクロメートル、スキャン回数を 8 回とし、酸化度の計算方法は ASTM 規格を参考にした。表面から 100 マイクロメートル毎に測定を行い、深さ方向のプロファイルを作成した。

3) 疲労試験

疲労試験は油圧サーボ式疲労試験機(株式会社島津製作所、サーボパルサー EHF-LV010K1-A10) を使用した。なお、加

速酸化したサンプルについては全て上記 Method B で加速酸化を行った。

試験は以下の三種類の方法で行った。

(1) 引張疲労試験

圧縮成型により製作された JIS K7113 に規定されるダンベル状の 2 号型試験片を使用した。試験片の厚さは 3mm であった。チャック間距離 20mm で引張試験用治具に固定し、最大荷重 360N (平均応力 20MPa)、応力比 0.1、周波数 1Hz の正弦波の繰り返し荷重を加えた。試験は 300 万サイクルまで行った。

(2) CCT 試験

平板状の試験片の中央にクラックのある試験片 (Centre cracked tensile、CCT) を用いた疲労試験を行った。試験片の寸法は 4x8x24mm であった。中央部にドリルで直径 2mm の穴を作製後、医療用のメスで穴の両端に長さ 0.5mm のクラック (合計でクラック長は 3mm) を作製した。試験片の両端 5mm をチャックし、最大荷重 320N (平均応力 10MPa)、応力比 0.1、周波数 1Hz の正弦波の繰り返し荷重を加えた。試験終了後、デジタルマイクロスコープ (KEYENCE、VH-8000C) と走査型電子顕微鏡 (SEM、日本電子株式会社、JSM-5800LV) により破断面の観察と初期クラックの正確な長さの計測を行った。

CCT 試験片の K 値の計算は以下の式に従って行った。初期クラックがクラック成長方向に対して垂直でなかった場合は、両端および中央部の長さの平均値を初期クラック長とした。

$$K = \sigma (\pi a)^{0.5} F(x)$$

$$F(x) = (1 - 0.025x^2 + 0.06x^4) (\cos \beta)^{-0.5}$$

ただし、

2a : クラック長

W : 試験片幅

$$x = a/W$$

$$\beta = \pi x/2$$

(3) ECT試験

平板状の試験片の片側にクラックのある試験片 (Eccentrically cracked tensile, ECT) を用いた疲労試験を行った。試験片の寸法は 4x8x24mm であった。試験片の片側にカッターと医療用のメスで長さ 1mm のクラックを作製した。試験片の両端 5mm をチャックし、最大荷重 40N (平均応力 1.25MPa) から 480N (平均応力 15MPa)、応力比 0.1、周波数 1Hz の正弦波の繰り返し荷重を加えた。試験終了後、デジタルマイクロスコープにより初期クラックの正確な長さの計測を行った。また、SEM により破断面の観察を行った。

ECT試験片のK値の計算は以下の式に従って行った。初期クラックがクラック成長方向に対して垂直でなかった場合は、両端および中央部の長さの平均値を初期クラック長とした。

$$K = \sigma (\pi a)^{0.5} F(x)$$

$$F(x) = (\beta^{-1} \tan \beta)^{0.5} (0.752 + 2.02 x + 0.37 (1 - \sin \beta)^3) (\cos \beta)^{-1}$$

ただし、

a : クラック長

W : 試験片幅

$$x = a/W$$

$$\beta = \pi x/2$$

ECT試験では、試験開始時の応力拡大係数 K_0 を変化させ、破断までのサイクル数

で結果を整理した。また、試験は 10 万サイクルまで行った。これは、UHMWPE の場合クラックが成長する限界値 K_{th} 付近でのクラック成長速度 da/dN が急激に変化し、およそ $10^{-4} \sim 10^{-5} \text{mm/Cycle}$ になることから決定した。これにより、試験開始時の K 値 K_0 が K_{th} よりわずかでも大きければ 10 万サイクルの試験でクラックが 1mm 以上成長することになり、破壊に至ることになる。一方、10 万サイクルで破壊されない場合は、試験開始時の K 値 K_0 が K_{th} より小さかったと判断し、より大きな K_0 で再度試験を行った。これにより、材料毎の K_{th} の値の推定を行った。

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

1) 被験物質

触媒として使われる物質として、DBT dichloride (和光、大阪)、OT (和光) の 2 つについて検討した。無機スズを含んだ PLLA として、Nacalai 社製の PLLA 5000 (poly-L-lactic acid 5000、Sn<10ppm)、テラーメードで製造を依頼した PLLA でスズ化合物を含まないものとして PLLA 3000、PLLA で大量のスズを含んだものとして S3 (分子量 11,000、Sn=590ppm) の三つについて検討した。また、ゲル状の PLLA オリゴマー、弾性形状が維持されている PLLA オリゴマーを製造依頼し、それらについても検討した。

2) 細胞

マウスのアストロサイト系培養細胞として、CRL-2534 Astrocyte type III (The American Type Culture Collection、

Manassas, VA)を使用した。

3) 培養条件

37°C、5%CO₂の条件下で、10% fetal bovine serum (HyClone、Logan、UT) 入り Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen、Grand Island、NY) にペニシリン (明治製菓、東京) を 75U/ml、ストレプトマイシン (明治製菓) を 75 μg/ml となるように調製したものを培養液として培養した。細胞生存率に関しては 24well の plate に各 2.5 × 10⁵ cells/well、グルタミン酸放出量に関しては 6well の plate に各 1.0 × 10⁶ cells/well、細胞増殖評価に関しては、24well の plate に各 1.0 × 10⁴ cells/well の条件で、被験物質を曝露後、評価を行った。

4) 曝露及び各指標の評価

細胞生存、グルタミン酸産生及び細胞増殖について、以下のように曝露し評価を行った。

4-1) 細胞生存

TBT に関する先行研究 (Nakano et al., 2004) を参考に、DBT については、エタノールに溶かしたものを曝露用の原液として使用し、最終濃度 0、0.5、1.0、1.5、2.0 μM となるように添加した。さらに、DBT に関しては、最終濃度を 0、0.125、0.25、0.5 μM とする低濃度曝露についても検討した。OT については、エタノールに溶かした曝露用の原液を、最終濃度 0、25、50、75、100 μM となるように添加した。DBT、OT 共に培養液中のエタノールの最終濃度は、0.1%とした。

PLLA 各種、人工硬膜用 PLLA オリゴマー

各種については、ジメチルスルホキシド (以下 DMSO、Nacalai tesque、京都) に懸濁させ、超音波を用いてなるべく細かい懸濁液を作製した。懸濁液を曝露用の原液として使用し、最終濃度 0、10、20、50 μg/ml となるように添加した。また、S3 に関しては、最終濃度を 0、2.5、5、10 μg/ml とする低濃度曝露についても検討した。DMSO の培養液中の最終濃度は 0.5%とした。

細胞生存の評価は、トリパンブルー色素排除法、及び、細胞上清中 LDH 定量の二つの方法で行った。培養後、細胞上清の一部を LDH 測定用の試料として採取し、LDH 測定用キット CytoTox96 (Promega、Madison、WI) を用いて、492nm の波長で分光光度計 (TOSOH Corporation、東京) によって定量を行った。アストロサイトは細胞突起がちぎれやすいため、0.05% トリプシン-EDTA (GIBCO) を用いてはがし採取し、トリパンブルー色素排除法を用いて細胞の生存率を検討した。

4-2) 上清中グルタミン酸濃度

DBT についてはエタノールに溶かし、0.25 μM を最終濃度とし、曝露を行った。OT についてはエタノールに溶かし、100 μM を最終濃度とし、曝露用の原液として使用した。培養液中のエタノールの最終濃度は、DBT、OT 共に細胞の生存評価と同様 0.1%とした。PLLA5000、PLLA3000、人工硬膜用 PLLA オリゴマー各種については、DMSO 懸濁液を作製し、50 μg/ml を最終濃度として使用した。また、S3 については DMSO に溶かし、5 μg/ml を最終濃度とした。DMSO の培養液中の最終濃度も、

細胞の生存評価と同様に 0.5%とした。

グルタミン酸産生の評価は、Aoyagi and Takahashi (2001)の方法に基づいて、グルタミン酸の放出量を、細胞上清中の濃度として定量した。DBT、S3 に関しては、曝露直後、1 時間、2 時間の時点、OT、PLLA5000、PLLA3000、ゲル層または弾性形状維持層 PLLA オリゴマーに関しては、曝露直後、3 時間、6 時間経過した時点で、予め 37°C に暖めておいた Dulbecco's phosphate buffered saline (以下 PBS、Sigma, St. Louis, MO) で、1 分間を 5 回、最初の 2 回は培養液よりも多い量で洗い、後の 3 回は 1ml で洗った。最後に PBS を 1ml 加え 3 分間静置し、上清を採取して測定試料とした。試料採取の前後で細胞数が減少していないことを光学顕微鏡により確認した。採取した試料をコスモナイスフィルター W (0.45 μ m) (Nacalaitesque) でろ過した後、グルタミン酸含有量を、Crestpak C18S カラム (4.6 \times 150mm) (Jasco、東京) を用い、カラム温度を 20°C として逆相 HPLC (Jasco) で測定した。Buffer A (50mM CH₃COONa、pH6.0) : Buffer B (methanol:tetrahydrofruan=9:1) =2 : 1 で混合したものを開始時の移動相とし、8 分~16 分は Buffer B のみ、16 分~20 分までは再び開始時の比率を移動相として、流速 1.0ml/min で試料を流した。オートサンプラーによる試料注入時に蛍光試薬としてオルトフタルアルデヒド (和光) を加え、検出器は蛍光検出器 (FP-920、Jasco) を用い測定した。

4-3) 細胞増殖

DBT については、エタノールに溶かし、最終濃度 0.25、0.5 μ M となるように添加した。OT については、最終濃度 100 μ M となるように添加した。培養液中のエタノールの最終濃度は、細胞の生存評価、グルタミン酸産生評価のときと同様に 0.1% とした。

細胞の増殖評価は、形態観察、細胞生存率及び TetraColor ONE (SEIKAGAKU Corporation、東京) を用いての定量で検討した。1 週間培養のうち、1 日後、3 日後、5 日後、7 日後に TetraColor ONE を 6 μ l 添加し 2 時間、37°C でインキュベートした後、細胞上清を採取して、TetraColor ONE の取り込みを生成ホルマザン量を指標に分光光度計を用い、450nm の波長で測定した。また、光学顕微鏡による形態観察で細胞の増殖率を比較し、トリパンブルー色素排除法で生存率を評価することで細胞が弱ったために増殖抑制が起きたのではないことを同時に確認した。

5) 統計解析

細胞生存率評価、DBT の細胞増殖への影響に関しては、群毎に平均値を算出、LDH については%control としたうえで平均値を算出し、一元配置分散分析で比較した。Post hoc test には Fisher の PLSD 法を用いた。また、グルタミン酸放出量、OT の細胞増殖への影響に関しては、2 群間の比較を、t 検定、または、Mann-Whitney の U 検定を用いて行った。統計ソフトは、Statview version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いた。

11. 脊椎固定器具の力学的安全性評価手法の開発

脊椎を固定器具で固定した状態を想定した力学的安定性について、有限要素法による応力解析および数値シミュレーションによる疲労寿命評価を行った。ASTM F1717-04 に基づき、脊椎固定器具を脊椎に装着した場合の力学安定性を評価する実験モデルを有限要素モデル化した（図2）。実験モデルは左右対称であるため、有限要素モデルは半分をモデル化した。

スクリューネジと UHMWPE（超高分子量ポリエチレン）間の摩擦係数、スクリューネジの材質、荷重の大きさをパラメータとして、Z 軸方向への圧縮荷重による鉛直方向への変位を比較した。有限要素モデルの要素は 8 節点ソリッドとし、スクリューネジと UHMWPE ブロック界面に摩擦（摩擦係数 $\mu = 0.3 \sim 0.6$ ）を考慮した非線形要素を導入した。荷重条件として、上側 UHMWPE ブロックの上面から Z 軸下向きの荷重を与えた。有限要素モデルは、実験モデルの半分をモデル化したため、荷重は実験（100N, 200N）の半分の荷重（50N, 100N）とした。拘束条件として、上側 UHMWPE ブロックの X-Y 方向と、下側 UHMWPE ブロックの X-Y-Z 方向を全方位固定とした。モデルに用いた材料特性を表 1 に示す。数値計算には汎用有限要素解析プログラム ANSYS10.0 を使用した。

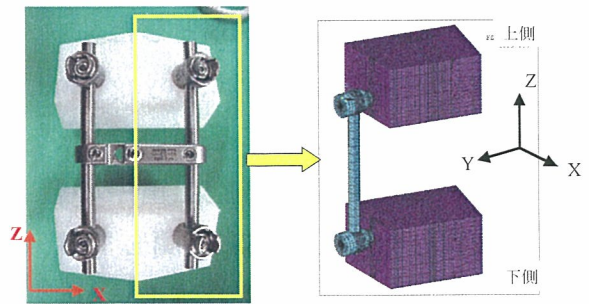


図2 脊椎固定器具(左)と有限要素モデル(右)

表1 有限要素モデルに用いた材料特性値

器具	E [GPa]	ポアソン比
スクリューネジ	114	0.3
UHMWPE	0.7~1.0	0.3

次に、脊椎固定器具の力学的耐久性を評価するために、有限要素解析による疲労寿命推定シミュレーションを行った。ASTM F1717-04 では UHMWPE ブロックにスクリューネジを挿入して実験を行うため、UHMWPE ブロックの材料特性や、スクリューネジと UHMWPE との界面における摩擦が結果に影響を及ぼすと考えられる。そこで本研究では、これらのパラメータに影響されないように、Model-A としてスクリューネジのみ、Model-B としてスクリューネジと結合アームのみをモデル化してシミュレーションを行った。図3に疲労寿命推定シミュレーションモデルを示す。Model-A は、ネジ部分の端点二箇所を支持固定し、ネジ中央から荷重をかける三点曲げ式荷重によるシミュレーションを行い、疲労寿命を推定した。次に、Model-B

では、スクリーネジ部分を全方位拘束し、アーム断面から荷重をかけることによって、実験よりもさらに大きな荷重が器具にかかる状態でシミュレーションを行った。荷重は両モデルとも 100~500 [N] とした。器具の材質は Ti-15Mo-5Zr-3Al を想定した。材料の疲労強度特性を図 4 に示す。

本研究では脊椎固定器具の力学的安定性を評価する方法として、実験的手法においては、脊椎の代わりに UHMWPE を用いており、また、数値シミュレーションによる評価であるため、倫理面において何ら問題は無いと考えられる。

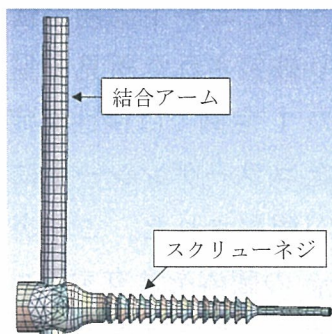


図 3 疲労強度推定シミュレーションモデル

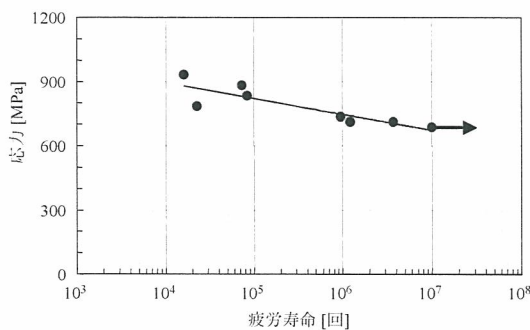


図 4 Ti-15Mo-5Zr-3Al の疲労特性

前年までの症例 6 頭にさらに症例を追加 (生後約 12 ヶ月、体重約 30kg のオスのミニブタ 10 頭)、最長で 12 ヶ月まで観察した。

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

ミニブタからの骨髓血の採取、細胞増殖、多孔質担体への播種、移植手術は前回と同様である。その方法を簡単に以下に示す。

【ミニブタ骨髓間葉系細胞の採取】

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

【多孔質担体への細胞の播種】

まず多孔質体に生食をしみこませ、ろ紙に水をすわせて脱水した後、細胞の入った培養液をしみこませた。これにより細胞が担体に接着することは確認済みである。

細胞濃度は 5×10^6 個/ml であった。

【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 3 mm 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髓細胞を入れたものを移植した。

移植後6ヶ月あるいは12ヶ月で大腿骨遠位部を採取し、Magnetic resonance imaging (MRI)を撮影後、ホルマリン固定し組織標本を作製し、比較した。

C. 研究結果

1. 感染因子含有材料の *in vivo* 動態評価手法の開発

1) 腹腔内埋植試験

種々の量の $\text{大腸菌乾燥菌体を含むコラーゲンシート}$ を肝被膜表面に埋植し、術後1週間目の生体影響を病理学的に診断した。精製コラーゲナーゼ/塩酸抽出法を適用した際の実測値として、4.7及び9.6 EU/mgのリムルス活性を示すコラーゲンシートを埋植した実験群の病理所見は対照群と同様であり、埋植したシートは肝被膜と線維性結合組織によって癒着しており、その隣接部に少数の毛細血管及び線維芽細胞の侵入と軽度のリンパ球浸潤が観察された。実測値33.6 EU/mgのシートを埋植した実験群の病理所見は先の2群とほぼ同様であったが、リンパ球浸潤が若干多く観察された。また、433.8及び1162.8 EU/mgの活性を示すシートを埋植した実験群の場合、シート内への毛細血管と線維芽細胞の侵入がやや増加し、リンパ球と少数の形質細胞浸潤が観察された。一方、3100.9及び35722.7 EU/mgの活性を示すシートを埋植した実験群には膿瘍形成が認められ、埋植シートはリンパ級、好中球及びマクロファージの浸潤を伴う慢性化膿性肉芽により肝表面に癒着した所見が観察された。

2) グラム陽性菌による生体影響評価

2-1) 皮下埋植試験

種々の量の $\text{黄色ブドウ球菌乾燥菌体を含むコラーゲンシート}$ をラット背部皮下に埋植し、術後1週間目の生体影響を評価した。0.01及び0.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ の同菌体を含むシートを埋植した実験群の病理所見は対照群と同様であり、埋植シートはいずれもひ薄な線維性結合組織に被包され、散在的に線維芽細胞と毛細血管の侵入が認められた。僅かにリンパ球の浸潤が認められたが、特筆すべき炎症所見は観察されなかった。1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ の菌体を含むシートを埋植した実験群の3症例では、コラーゲンシートに軽度なリンパ球浸潤が観察され、シート周囲が慢性炎症性肉芽により被包された所見を呈していたが、残りの1症例では慢性炎症性肉芽で被包されたコラーゲンシートに多量の好中球浸潤が観察された。この炎症所見は10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ の菌体を含むコラーゲンシートを埋植した実験群の全症例に観察された。

2-2) 頭蓋骨埋植試験

頭蓋骨に形成した窩洞部分に種々の量の $\text{黄色ブドウ球菌乾燥菌体を含むコラーゲンシート}$ を被覆し、術後4週間目における骨再生の状況を軟X線解析及び病理学的診断により評価した。菌体成分非添加のコラーゲンシートを埋植した対照群では、頭蓋骨欠損部の全範囲に骨再生が認められたが、骨再生の過程に相当する膜性骨化の所見が部分的に観察された。また、6症例中1例は骨再生が不十分であり、被覆したシート内に非連続性の骨組

織形成が観察された。0.01 及び 0.1 μ g/mg の黄色ブドウ球菌乾燥菌体を含むシートを埋植した実験群の病理所見は対照群と同様であった。また、1 μ g/mg 実験群の場合、6 症例中 5 例は対照群と同様な結果が得られたが、1 例では骨形成が認められず、硝子化した結合組織によって形成される部位に極めて軽度のリンパ球浸潤が観察された。10 μ g/mg 投与群では、4 症例中 3 例に不規則な骨梁形成が認められ、周囲結合組織中にリンパ球浸潤が観察された。残りの 1 例では、骨形成が殆ど観察されず、被覆したシートに中等度のリンパ球浸潤が観察された。

3) CAP-18 類縁体の in vivo 抗菌活性

3-1) 酸処理ゼラチンシートの生体適合性

昨年度使用した酸処理ゼラチンシートは微生物汚染が疑われ、ラット背部皮下埋植試験において顕著な炎症反応を誘導した。そこで、メンブランフィルター濾過後にシート化した酸処理ゼラチンの生体適合性を同様に評価した。埋植後 1 週間目の病理所見において、埋植シートは線維性結合組織に被包されており、軽度のリンパ球浸潤が認められるほか、結合組織に接する部位に変性が観察された。埋植後 2 週間目の所見では埋植材の吸収が進み、少量残存していたゼラチンシートは軽度のリンパ球浸潤を示す結合組織によって被包されており、大食細胞反応が観察された。

3-2) 抗菌試験

予備試験の結果、18-mer LLKKK アナロ

グは in vivo においても黄色ブドウ球菌及び緑膿菌に対する抗菌活性を示したが、in vitro 抗菌力と同様、緑膿菌に対する活性発現には、より高い濃度を要することが確認された。そこで、対象細菌として緑膿菌を選択し、18-mer LLKKK アナログの in vivo 抗菌活性を定量的に解析し、その結果を表 1 に示した。

緑膿菌非接種の陰性対照群からは生菌が回収されなかったが、抗菌剤を添加していない陽性対照群では平均値として約 6.5×10^6 個/ラットの生菌が回収された。緑膿菌に対して高い抗菌活性を示すことが知られているポリミキシン B は試験に供した濃度範囲 (3.9-388 μ M) において顕著な活性を示した。一方、18-mer LLKKK アナログは 427.5 μ M まで顕著な抗菌活性を示したが、42.8 μ M 実験群では生菌の存在が認められ、約 1.2×10^5 個/ラットの生菌が回収された。42.8 μ M 実験群の生菌回収率は 1.9% であり、緑膿菌に対する 18-mer LLKKK アナログの in vivo 50% 発育阻止濃度 (IC_{50}) は同濃度未満であることが確認された。

3-3) 病理学的診断

図 5 に示したように、抗菌剤を添加していない陽性対照群の病理所見ではコーゲンシート全体に多数の好中球浸潤が認められた。1710 μ M の 18-mer LLKKK アナログを含浸させた実験群の病理所見は陽性対照群と類似していたが、好中球浸潤は少ない傾向を示した。また、388 μ M のポリミキシン B 投与群における好中球浸潤は明らかに少ない所見を呈していた。

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

EOG 滅菌の場合、Biological Indicator から回収された損傷芽胞の生残菌数をメーカーが異なる培地 (BBL, MERCK, 日水) で測定した。その結果、培地による差が示された。一番多く生残菌数を示したのが BBL であり MERCK、日水の順であった。

一番少ない損傷回復を示した日水の SCDA 培地に損傷回復剤を添加して損傷回復剤の効果を調べた。その結果、3 分間暴露と 10 分間暴露とで損傷回復剤に若干の相違があるが、概ね乳酸カルシウムとグルコース添加に拠って損傷の回復が認められることが分かった。

放射線滅菌され損傷を受けた生物指標菌に対しては、乳酸カルシウム、L-Alanine, D-Alanine、アミノ酸混合液、グルコース添加に拠って損傷回復効果が認められた。

電子線滅菌された *Bacillus megaterium* の場合は、試験した何れの薬剤も多少の差はあれ、損傷回復能を示した。その中で特に乳酸カルシウム、グルコース、D-alanine、アミノ酸混合液が顕著な損傷回復能を示した。

3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

1) 塗布溶媒の影響

1-1) 有機溶媒による差

LLNA における塗布溶媒としては、アセトンとオリーブ油を 4:1 の比で混合した A00 (4:1) が一般的に用いられている。医療機器の抽出溶媒には植物油や生理食塩水が用いられ、この抽出液をそのまま動

物試験に用いてきた。ここでは、抽出に用いた植物油が LLNA においてリンパ節活性化反応に影響なく、塗布溶媒としてそのまま使用できるかどうか検討した。植物油としてはオリーブ油を用い、アセトンへの混合比を変えて LLNA に従ってマウスに塗布した。A00 (1:4) 及びオリーブ油塗布群でわずかにリンパ節重量及び ATP 量が高い値をとるが、有意な差はなかった。次に、それぞれの溶媒に中程度感作性物質 HCA を 25% 含有させ、これを塗布してリンパ節活性化の程度を比較した。いずれの溶媒でも大きな反応性の差はないが、アセトンよりもオリーブ油が入った方が値は高くなる傾向があった。リンパ節重量及び ATP 量の SI 値は A00 (4:1) を溶媒とした時が最も高く、それぞれ 1.6、2.08 であった。

1-2) 水溶性物質塗布のための添加剤の効果

水溶液は表面張力が高いため脂溶性の耳への塗布が困難であり、界面活性剤、糊剤あるいは有機溶媒を混合して塗布する必要がある。添加剤として、界面活性剤 SLS、PL92 及び T80 を、糊剤としては CMC を選び、それぞれ 1% の濃度にした。PG、DMF 及び DMSO の有機溶媒については水と混合して 50% 溶液とした。A00 を基準に ATP 量の SI 値を算出したところ、50%PG と 1% PL92 は A00 よりも反応性は低いか同程度であるものの、残りの溶媒については SI 値が 1.0 よりも大きくなり、SLS 溶液が最も高い値を示した。

HCA を A00、DMF、DMSO、または 1%T80 溶液に溶解させて試験し、反応性を比較