

した。ATP 量を指標として見ると、HCA の A00 溶液でばらつきが多いものの、どの溶媒に溶かしても同等の発光量を示した。溶媒単独では DMSO での発光量が大きく、結果として HCA の DMSO 溶液で SI 値は低くなった。

2) 医療機器抽出物の皮膚感作性

コラーゲン使用吸収性局所止血材アビテン及びインテグランをアセトン、綿実油または生理食塩水で抽出して LLNA を行った。アセトン及び綿実油での抽出液はそのままマウスに塗布し、生理食塩水抽出液は界面活性剤として T 80 を 1% 添加してから塗布した。アビテンのアセトン抽出液はリンパ節重量及び ATP 量の SI 値が 0.5~0.9、綿実油抽出液では 0.8~1.0 と、それぞれ溶媒だけを塗布したときよりも反応性は低下した。生理食塩水抽出液の SI 値は 1.1~1.2 であり、いずれの抽出物を用いてもリンパ節の反応は増加しなかった。インテグランにおける抽出液でも同様に、溶媒と反応性の変化はなかった。

3) メトキシけい皮酸 2-エチルヘキシル (EMC) の影響

3-1) EMC の皮膚感作性

EMC の感作性を LLNA 及び h-CLAT で評価した。50%、25%及び 10%EMC-A00 溶液をマウスに塗布し、耳介リンパ節 LNC の ATP 量を測定した。10%で SI 値は 1.0、25 及び 50%で 1.3~1.4 と、いずれの濃度においても明らかな増加は認めなかった。

EMC の細胞毒性試験での IC50 は 250 µg/ml であった。本濃度で EMC を 24 時間曝露させた THP-1 細胞の CD54 及び CD86

発現量はコントロールの 155%及び 108% であり、SLS は 72 µg/ml で 144%及び 132% であった。EMC 及び SLS のどちらも CD54 発現量は増加したが、CD86 発現量は変化なかった。

3-2) 他物質の皮膚感作性反応に及ぼす影響

10% EMC で前処理してから 25%または 50% HCA を適用した時の感作性反応を LLNA で検討し、前処理せず直接 HCA を塗布したもの、A00 または 1% SLS 水溶液で前処理後 HCA を同様に塗布したものと比較した。直接 HCA を塗布したときのリンパ節重量の SI 値は 25%で 1.51、50%で 2.16 であった。EMC 前処理した場合、リンパ節重量の SI 値は 25% HCA で 1.43、50%では 1.68 とほとんど変化なく、ATP 量を指標とした場合についても同様に増加は認めなかった。一方、SLS を前処理した場合、25% HCA のリンパ節重量及び ATP 量の SI 値は 1.86 と増加した。

4) h-CLAT

h-CLAT で試験する濃度を決定するため、細胞毒性試験を行った。非水溶性の強感作性物質 DNCB の IC 50 値は 3.5 µg/ml と強い細胞毒性を示したが、中程度の感作性強度を有する HCA は 50 µg/ml であった。DMSO 及び DMF の IC 50 値は約 3 µg/ml であった。界面活性剤の IC50 置は SLS と比べて T80 が高く、PL92 は低かった。

DNCB による CD54 及び CD86 の発現量は試験濃度の増加とともに上昇し、最大値は 6 µg/ml でそれぞれコントロールの 181%及び 192%であった。SLS は IC50 値 72 µg/ml で CD54 及び CD86 の発現量が 144%、

132%となった。NiSO₄ は IC₅₀ 値で著しく発現量が増加し、CD54 は 684%となった。

5) 各種タンパク質による血清抗体価の変化

OVA は 1 回当たり 10 µg、BSA は 100 µg を Alum アジュバントとともに 3 回投与し、血清総 IgE 及び総 IgG 抗体価を定量した。脾臓重量は、投与した試験物質群の間で大きな違いは見られなかった。OVA 群の平均総 IgE 抗体価は 4.38 ~7.66 µg/ml と対照群に比べて上昇した。OVA は総 IgG 抗体価も上昇させた。BSA 投与群の平均総 IgE 抗体価 (0.96 µg/ml) は対照群に比べてわずかに増加した。FBS についてもばらつきは見られるものの総 IgE 抗体価が上昇した (4.38 µg/ml)。なお、BSA と FBS については、ELISA による洗浄液や試験液の希釈液に BSA が含有されているため、総 IgG 抗体の定量はしなかった。

6) 医療機器の即時型アレルギー性の評価

ガイドラインに沿って、試料の表面積 6 cm² 当たり 1 ml になるよう生理食塩水を入れ、37°C で 72 時間静置して抽出した。それぞれを投与した時の総 IgE 抗体価は、止血用ゼラチンスポンジの抽出液を投与した動物 1 匹で総 IgE が高いものが見られたが、他の同試料、ゴム製品、コーラゲン使用吸収性局所止血材 2 種については溶媒対照群と有意な差は認められなかった。

4. Ti-Ni 合金材料の安全性評価手法の開発

【埋植した合金材料の検討】

○肉眼観察、体重、臓器重量変化

Ni 埋植群では、1 週間後から既に背部に膨隆が見られ、4 週間後には顕著になっていた。しかし、16 週間後には大部分 (4/5) が膨隆していなかった。8 週間後、Ni 材料を包含した血液性色の大きな固まりが見て取れる。同様に摘出物の写真では、厚さが 1cm にも達する弾力のある固まりとなっていた。

一方、Ti/Ni 合金群では、16 週間後でも、金属光沢がそのまま残っており、周辺に炎症の徴候は見られなかった。これは、純 Ti 群、Ti-6Al-4V 合金群でも同様であった。

4 週間後の各群の固定後の摘出組織の切片写真を示すが、Ni 群のみ肥厚していることが明白であった。炎症領域厚さの測定も試みたが、Ni 群以外の群間の差は特に見られず、Ni 群の炎症が際だっていた。

4 週間後の体重変化は、Ni 群と Ti-6Al-4V 合金群に有意差があり、8 週間後では、Ni 群と Ti 群に有意差があった。4、8 週間共に、Ni 群以外の群間の差はなかった。16 週間後は Ni 群のバラツキが大きく、後述する理由で Ni 群を含めて統計処理をする意義が認められないため、Ni 群以外を比較したが、体重変化に特に有意差は見られなかった。

臓器/体重比については、4 週間後では差はなく、8 週間後の肝臓で Ni 群がやや他群に比べて小さかった (Ni 群 ←→ Ti/Ni 群間, Ni ←→ Ti-6Al-4V 群間に有意差があった)。

16 週後での Ni 群以外の群間については、Ti 群の肝臓が、他群に比べて有意に小さかった。肝臓以外の 3 臓器では、各週共に、特に差は見られなかった。

ホルマリン固定後に回収された金属円板については、摘出時にも体内に存在した Ni 円板材料は、表面が組織で厚く覆われた状態であった。一方、他の金属材料においては、周辺組織の被覆も薄くまばらな状態であった。他方、体外に排出された Ni 材料は、金属光沢を有し、表面被覆物は全く見られなかった。

○埋植後の組織変化

埋植後 4 週の結果

・[純 Ni] : 埋植材料は、多量の血性滲出物内に存在していた。この血性滲出物を含有した壁は、内側に線維素の析出した層がみられ、連続して崩壊した好中球を含む壊死層、肉芽組織層、線維化（癒痕）層よりなる嚢胞様構造を呈していた。線維化の進んだ肉芽組織内には、ヘモジデリンの沈着、およびヘモジデリンを含有したマクロファージが観察された。

・[純 Ti] : 埋植材料は、線維化傾向を示す肉芽組織によって被包されており、軽度のリンパ球浸潤が観察された。1 例 (No. 7) では、他の症例に比べ、肉芽組織の壁内に多数のリンパ球浸潤が観察された。

・[Ti/Ni 合金] : 埋植材料は、線維化した結合組織（癒痕組織）によって被包されており、この結合組織性被膜は皮膚側と腹側で厚さが異なり、前者で薄く、後者で厚い所見であった。また、

被膜内および周囲結合組織内に軽度のリンパ球浸潤を認められたものが 3 例 (No. 13-15) 観察された。

・[Ti-6Al-4V 合金] : 埋植材料は、Ti/Ni 合金埋植群と同様に癒痕化した結合組織によって被包された所見を示していたが、毛細血管が多く線維化傾向を示す肉芽組織の壁より成る部位も観察された。また、部位によって全例で壁内および周囲結合組織内に軽度のリンパ球浸潤がみられた。しかし、1 例 (No. 18) では、この慢性炎症性細胞浸潤がやや多く、壁内に好酸球の浸潤が観察された。

埋植後 8 週の結果

・[純 Ni] : Ni 埋植した 5 匹中 1 匹は術後 1 週で死亡しており、また、屠殺時 8 週で、埋植材料の無いものが 1 匹あった。Ni 埋植 8 週後は、4 週後と同様の組織所見を示し、嚢胞様構造は真皮直下に観察された。壁の壊死層は拡大し、形成された肉芽組織も壊死に陥った所見が認められた。肉芽組織の壊死により、多量の出血が確認された。

・壊死層に連続し肉芽組織層、癒痕層がみられ、この部位にヘモジデリンの沈着、およびヘモジデリンを含有したマクロファージが観察された。

・[純 Ti] : Ti の埋植では、1 匹の死亡例 (No. 9) が確認された。材料は、毛細血管が消退した癒痕組織により被包されており、わずかにリンパ球浸潤が観察された。

・[Ti/Ni 合金] : Ti 埋植群とほぼ同様

の組織所見で、材料は、癒痕組織により被包されており、炎症細胞浸潤も殆ど観察されなかった。術後4週でみられた皮膚側と腹側での被膜結合組織の厚さに著しい相違は観察されなかった。しかし、1例(No. 15)では、材料を被包した線維性結合組織に毛細血管が未だ多く観察され(No. 13)、軽度のリンパ球浸潤が認められた。

・[Ti-6Al-4V 合金]: 埋植材料は、癒痕組織によって被包されており、この壁に軽度のリンパ球と好酸球の浸潤を示すものが3例(No. 16、18、19)認められた。

埋植後 16 週の結果

・[純 Ni]: Ni 埋植した5匹中4匹に埋植材料の消失がみられた。埋植材料の確認された1例(No. 3)の組織所見は、4週後と8週後のものと相違はみられなかった。埋植材料の消失した1例において、解剖時に暗赤色の色素沈着が皮下に認められた。この色素沈着は、結合組織に沈着したヘモジデリンによるものであることが組織標本で確認された。また、この症例では真皮内に角化物を含む重層扁平上皮に覆われた角化嚢胞様の構造物が認められた。

・[純 Ti]: 材料は、癒痕組織により被包されており、わずかにリンパ球浸潤が観察された。

・[Ti/Ni 合金]: Ti 埋植群とほぼ同様の組織所見が観察された。

・[Ti-6Al-4V 合金]: Ti-6Al-4V の埋植では、1匹の死亡例(No. 19)が確認さ

れた。Ti および Ti/Ni 合金埋植群とほぼ同様の組織所見が観察された。また、被覆壁に散在性に軽度のリンパ球と好酸球の浸潤を示すものが1例(No. 16)認められた。

【合金材料からの溶出試験】

各材料からの Ni 溶出実験データでは、1週より3週で増加する傾向はあるが、Ti/Ni 材料では、全体的に微量に留まり、3週では、純 Ni 材料の1/6(食塩水)、及び1/80(乳酸)程度であった。

各材料からの Ti, V, Al 溶出実験データ(3週後)では、Ti の溶出は、溶出条件によっては、Ti-6Al-4V が一番多い傾向があり、生理食塩水では、Ti/Ni 合金の40倍程度であった。一方、Al の溶出は、Ti-6Al-4V でも認められなかった。また、V の溶出も、Ti-6Al-4V でも非常に微量であった。

【チタン・アレルギー関連例】

米国の MAUDE 不具合情報から、「titanium」または、「Ti-6Al」を含み、「allerg」も共存する条件で検索抽出し、その中で実際に Ti アレルギーに関するものは、14件あった。なお、「titan」では、ノイズを拾うのみで、「titanium」以外では、Ti に関するものはなかった。以下、報告順に概要を列記する。

○ペースメーカー(1998)

摘出物とともに情報を受けた。機器は患者の苦情(ポケットの傷みと Ti アレルギー)によって交換された。信号捕獲損失もあった。

○ペースメーカー(1998)

患者は機器によるTiアレルギーだと報告した。患者は医師からはステンレスだと言われていたが、Tiだと知っていたら埋植しなかったと述べた。企業の情報取得努力は実らなかった。機器が埋め込まれたままか否かは不明。

○埋植型注入ポンプ(2001)

Tiアレルギーによって、摘出された。摘出されたが、企業への分析には送られなかった。

○動脈瘤クリップ(2003)

患者は2002年にクリップの埋植を受けた。2週後に首に発疹ができ、全身に広がった。神経外科医と皮膚科医は、殆ど全てのアレルギーではないとしたが、抗高血圧薬物療法とを考えると共に、Tiクリップを皮膚炎の原因と考えている。

○人工歯根(2003)

患者は4個のTiインプラントを左の上顎に埋植した。6ヶ月後に具合が悪くなった。急性型のめまいと診断された。顔と顎に、発疹、吹き出物、痛みがあった。口腔外科医は、Tiアレルギーは知られていないので、機器が原因ではないと判断した。MRI、CT-スキャン、多くの血液検査、脳波検査、感染、血流、めまいテストを行ったが原因不明であった。患者は、めまいを再発し、数回意識不明になっており、膨張と顎の痛みは、よりひどくなった。埋植前は異常が無かった。口腔外科医は、皮膚科医によるTiアレルギーテストには時間の無駄と同意しなかった。患者はインプラントの除去を要求し、医師はTiアレルギーの経験がないことから

同意しなかったが、最後は除去された。患者は軽快した。一時的な目眩、小さい膨張、および痛みはあるが、運転は可能になった。摘出物は冷蔵庫に保存されたままである。骨はインプラントに侵入していなかった。医師は、Tiアレルギーを信じなかったが、インターネットでは、Tiで同様な問題を抱えている人がいると書かれている例もある。

○軟組織固定用アンカー(2004)

医師は、アンカーを用いて患者にアキレス腱修復を行った。患者は手術後に痛みを感じ、神経科医を訪れた。神経科医はTiアレルギーを疑った。医師は、Tiが不活性であるため、原因は縫合糸にあると感じ、縫合糸の情報を得たいと願った。

○ペースメーカー(2004)

患者は、ケースに用いられているTiへの明白なアレルギー症状があったため、ペースメーカーを摘出された。これまでの調査ではアレルギー反応を確認できなかった。

○人工歯根(2004)

患者は、8つのTi製人工歯根を埋植していた。口は炎症を起こして痛くなっていた。患者は、アレルギー専門医によるテストを受け、Tiアレルギーが疑われたが、実証できなかった。患者は除去を希望したが、保険が効かないため、諦めた。

○ペースメーカー(2004)

患者がNiアレルギーだと分かり、医師はさらにTiアレルギーを疑った。局所発赤とかゆみがペースメーカーポケットの周りにあった。血液検査では感染には陰性であった。

○ステント(2005)

手術後に患者が右側顔麻痺と、頸痛と、若干の発声困難に陥ったと報告された。しかし、これらの兆候は24時間以内に軽快した。追加診療の際、患者には、一過性脳虚血発作があった。1カ月後におけるフォローアップでは、患者には混乱、歩行不安定、幻覚症状、失見当、および微妙な運動機能の損失があった。医師の意見では卒中であろうとされた。この患者は、Ti アレルギー検査で陽性であった。

○骨接合材(2005)

患者は、2003年にTiバーをひざに埋植した。患者は、Ti アレルギーと思っていたが、外科医は確認しておらず、患者は体内の合金の存在を懸念している。患者には、酸化物、バリウム、およびラテックスとの反応があった。医師は彼女のアレルギーを決定できていない。

○ステント(2005)

報告者は、彼女の夫がTi/Ni製ステントにかかわる治験にかかわったこと、その治験で彼の左の頸動脈にステントの1つが埋植されたことを報告した。約2週間後に、患者は幻覚症状を感じ始めた。患者は多くのテストを受け、脊椎穿刺での白血球数100を除いて、すべてが陰性であった。血液検査で、患者がTiにアレルギー反応を持っていることが分かった。ステントを埋植した外科医は、摘出に専門的技術を持っていないと妻に述べた。研究プロトコルには、この機器がTiに敏感な人に使用されるべきでないとして述べている。患者はTiアレルギーであるかどうかの事前のテストはされていなかった。

○生検部位マーカー(2006)

生検部位マーカーのロット・ナンバは知られていない。使用された金属マーカーはTi製であった。患者の皮膚科医はアレルギー反応の原因を決定できなかった。患者からマーカーは取り外された。

○生検部位マーカー(2006)

アレルギー専門医は、マーカーを設置した患者が紅斑とかゆみを生じた、と報告した。専門医は、生検部位マーカーのモデル番号やロット・ナンバを知ることができなかった。患者には、マーカー設置5週間後に、初期の反応があり、さらに2週後に次の反応があった。プレドニゾン等が処方され、かゆみ等は静まった。アレルギーテストが実行できるように、Ti製マーカー、一個が専門医に送られたが、テストは陰性であった。さらに、追加テストが行われる予定である。

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

1) 軟X線観察

純金属の埋植後1週において、大腿骨窩洞部骨髓腔に新生骨梁と考えられる軟X線不透過層が観察された。また、試料と皮質骨との隣接面には結合組織と考えられる軟X線透過層が観察された。埋植後2週において、骨髓腔に形成された新生骨梁は埋植後1週と比べて減少が認められた。埋植後4週において、骨髓腔に形成された新生骨梁はほとんど観察されず、外骨膜側に新生骨と考えられる軟X線不透過層が観察された。

Ti-Zr基合金の埋植後1週において、大

腿骨窩洞部骨髓腔に新生骨梁と考えられる軟 X 線不透過域が観察され、試料と皮質骨との隣接面には結合組織と考えられる軟 X 線透過層が観察された。埋植後 2 週において骨髓腔に形成された新生骨梁は埋植後 1 週と比べて減少が認められ、埋植後 4 週において骨髓腔に形成された新生骨梁はほとんど観察されず、外骨膜側に新生骨と考えられる軟 X 線不透過層が観察された。

埋植後いずれの期間においても、金属材料の種類によって軟 X 線撮影像に明らかな相違は認められなかった。

2) 病理組織検索

試料埋植後 1 週における純金属および Ti-Zr 基合金の HE 染色像は、大腿骨窩洞部骨髓腔は内骨面から連続した新生骨梁の形成が認められ、金属材料との隣接面は結合組織層が観察された。この新生骨梁は不規則な石灰化がみられ、膜内骨化の過程を示す所見であった。隣接面の皮質骨は、外骨膜側に軟骨形成がみられ、窩洞遠位部より軟骨内骨化の像が観察された。いずれの試料においても炎症所見は観察されなかった。

試料埋植後 2 週における純金属および Ti-Zr 基合金の HE 染色像は、骨髓腔内に形成された新生骨周囲に破骨細胞が観察され、1 週のものとは明らかな骨量の減少が認められた。外骨膜側は骨化が進行しており、軟骨は殆ど観察されなかった。

試料埋植後 4 週における純金属および

Ti-Zr 基合金の HE 染色像は、骨髓腔内に形成された新生骨は減少し、窩洞部と金属材料間に薄い骨組織が観察された。外骨膜面に添加された骨は、成熟した骨組織への発達が認められた。

埋植後いずれの期間においても、金属材料の種類によって病理所見に明らかな相違は認められなかった。

次に、骨髓腔に形成された新生骨梁について、HE 標本のデジタル画像を用いて窩洞部から長軸方向に占有した最大の長さを測定した。埋植後 1 週では、密な骨梁の形成がみられたのに対し、埋植後 2 週では多くの標本において骨組織の吸収が進んでおり、散在した残存骨梁での測定であることから、必ずしも占有骨組織量を表しているものではないが、埋植後の経過で顕著な骨組織の減少が示唆された。埋植後いずれの期間においても、金属材料間に新生骨量の有意な差は認められなかった。

3) 引抜強度

大腿骨に埋植した金属試料の引抜速度 1.0 mm/min における荷重変位曲線を求めた。荷重の最大値を大腿骨からの引抜強度として試料を評価した。純金属試料では、Ti の引抜強度と比べて、Zr の引抜強度は同程度で、Nb の引抜強度は高く、Al の引抜強度は低い傾向が認められた。Ti-Zr 基合金試料では、材料間に有意な差は認められなかった。

化は認められず、3mol%Ag を添加した合金で強さの低下が認められた。しかしなが

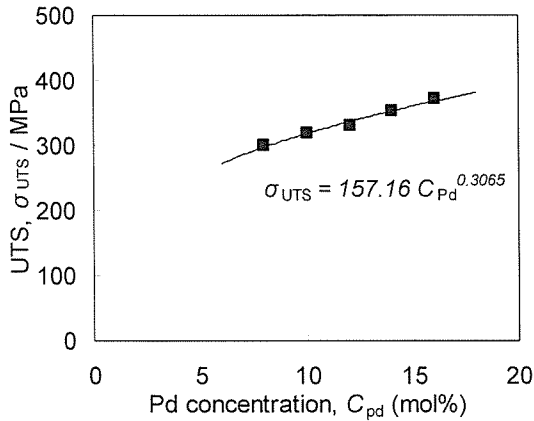


図5 二元系合金の最大引張強さのPd 濃度依存性

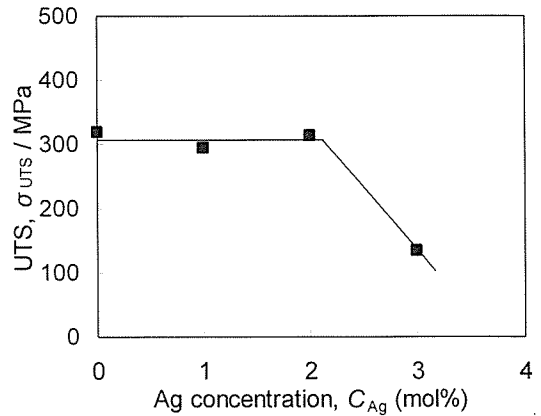


図6 三元系合金の最大引張強さのAg 濃度依存性

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) 力学的性質の評価

各合金の最大引張強さ (UTS) と破断伸び (ϵ_r) を表2に示す。

図5に二元系合金の最大引っ張り強さを示す。Pd の添加濃度が増加するのに従って、最大引張強さが約 300 MPa から約 370 MPa まで増加しているのが認められた。

図6に三元系合金の最大引張強さの Ag 濃度依存性を示す。Ag 添加による固溶強

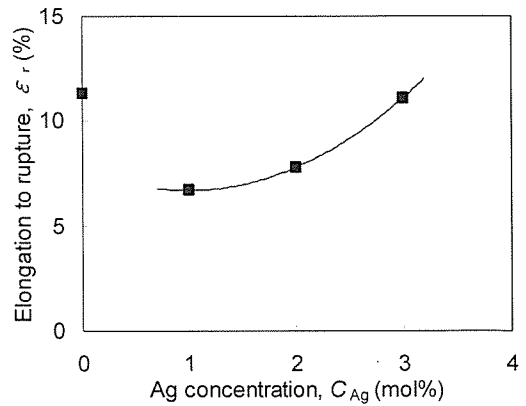


図7 三元系合金の破断伸びのAg 濃度依存性

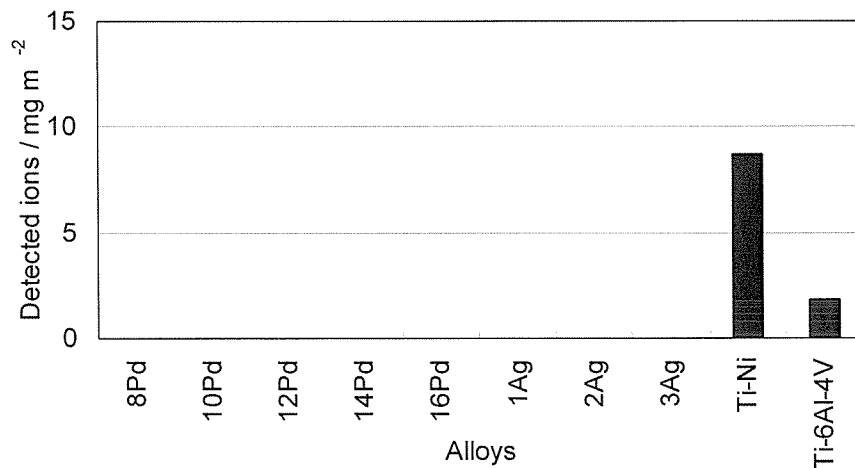


図8 各合金の 0.9%NaCl 水溶液中での溶出試験の結果(37°C, 3週間).

ら、図7に示したように、Ag 添加の主たる目的であった延性の改善は認められ、3%のAg 添加で二元系合金と同じレベルの延性を得ている。

2) 溶出試験による耐食性の評価

0.9%NaCl 水溶液中での3週間溶出試験の結果を図10に示す。比較材のTi-Ni 超弾性合金とTi-6Al-4V 合金からはそれぞれ 8.7 mg m^{-2} 、 1.8 mg m^{-2} のイオン溶出が認められたが、本研究で開発した合金からはいずれもICPの検出限界範囲内での溶出量は認められなかった。また外観上も溶解の痕跡は認められなかった。

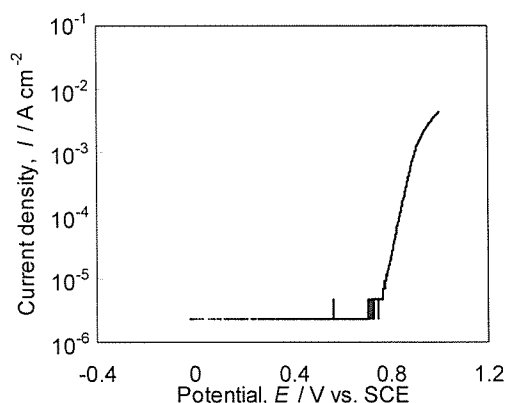


図9 0.9%NaCl 水溶液中での12Pd合金のアノード分極曲線

3) アノード分極試験による耐食性の評価

本研究の範囲でもっともPd濃度の高い12Pd合金のアノード分極の結果を図8に示す。試料を溶液に浸漬後、自然電極電位に安定するのと確認した後、 -1.0 V vs. SCE から 1.0 V vs. SCE まで掃引したが、およそ 0.8 V vs. SCE 付近までアノード電流が計測されなかった。

4) 血小板粘着試験

開発したAu-Pd合金の血小板粘着試験のSEM観察した。5minインキュベーションした試料では、8Pd合金から12Pd合金までは、血小板の粘着は少なかった。14Pd合金と16Pd合金で粘着量の増加が認められた。20minインキュベーションした試料でも同様の傾向が見られた。

比較材のステンレス鋼では、8Pd合金から12Pd合金に比べ血小板の粘着がやや多く、また一般に生体適合性が良好な純Tiの場合、フィブリン・ネットワークの形成がとくに顕著であった。

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

1) その結果、該当する症例は10例であった。

男性3例、女性7例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。

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結果、本邦ではインプラント機器による皮膚科的な不具合事例であり、金属のアレルギーが確認できた症例は8例である。いずれも、ニッケルかクロムに陽性であった。

3) 金属パッチテスト試料の検討結果

金属のパッチテスト試料を示す。錯体は配位結合や水素結合によって形成さ

れた分子性化合物の総称である。狭義には、金属原子を中心として、周囲に配位子が結合した構造を持つ化合物である。モル数を一定にした条件でパッチテストを行うとニッケル錯体は3症例全例が陽性であり、硫酸ニッケル 2.5%白色ワセリンが 59 歳女性では陰性になることが多く、錯体の方が、感度が高い可能性がある。しかしチタンの金属アレルギーの症例は経験できず、今後、検討を加えたいと思う。

ニッケル、クロム、コバルト、銅などによる皮膚不具合については、これらの金属のパッチテスト試料がすぐに決定されており、ヒトにおける安全性評価は確率されている。一方、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報告が極めて稀な金属については、アレルギーを証明する確実な評価方法が確立できていない。したがって、今後もこれらの金属についてのパッチテスト試料及び貼布濃度について検討していく必要がある。

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

まず、本研究は中川真美子(大学院生)、山田貴亮(藤田保健衛生大学)との共同研究で遂行されている。

THP-1 細胞を用いたアレルギー評価方法ではニッケルとコバルトは CD54 が顕著に多く、水銀とクロムは CD86 が多いが、後者は前者にくらべて活動性が低い。

さらに人末梢単球を用いた試験におい

ては、被験者 A および B とともにニッケルでは CD54 と CD86 の発現量が閾値を超えて高く、SLS は両者の発言量は低い結果であった。

5) 日本国内の皮膚科的症例の集積と解析

日本全国における大学病院皮膚科および日本接触皮膚炎学会会員に宛てて、インプラント機器による皮膚科的不具合事例の有無と、症例の報告を依頼したところ、現在 16 施設から皮膚障害事例の経験があり協力を申し出ていただいた。現在、さらに、詳細な問診票を送っているところである。

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

以下の 11 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 29SNP を選択し、タイピングを行った。

- SERPINE1 (5SNP)
- CYP2C9 (3SNP)
- プロトロンビン (6SNP)
- 凝固因子第 7 (1SNP)
- 凝固因子第 9 (1SNP)
- 凝固因子第 10 (6SNP)
- γ -グルタミルカルボキシラーゼ (1SNP)
- VAMP8 (2SNP)
- TGF β 1 (1SNP)
- TGF β RI (1SNP)
- TGF β RII (2SNP)

SNP タイピングの結果をまとめた。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（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）を対象としてタイピングを行った。また、パンヌス形成の原因を探るための対象遺伝子（VAMP8、TGF β 1、TGF β RI、TGF β RII）のタイピング結果を表2に示した。どちらも、昨年度までに行った日本人の健常人100名分のDNAを用いて行った結果をアレル頻度で示し、対照データとした。今年度のデータは、人工心臓弁置換手術をかつて受けた患者10名分（人工弁機能不全が認められる患者2名、不具合が今のところ認められない患者8名）であったため、アレル頻度ではなく全てのデータを示した。

SERPINE1 の c.49G>A、CYP2C9 の c.1075A>C と c.269T>C、凝固因子第7 (F7) の c.525C>T の4SNPは健常人100名ではmutantが検出されているが、今回の患者10名からは検出されず、全てWild Typeであった。一方、健常人100名において全てWild Typeであった凝固因子第10 (F10) の c.502+2115~2116 と c.502+2531A>G、日本人でのSNP報告がこれまでにないTGF β RIのc.1125A>C、TGF β RIIのc.946A>Tとc.1606T>Cの5SNPは、患者10名においても全てWild Typeであった。その他の20SNPについては健常人、患者の両者からSNPが確認された。

9. 人工関節用 UHMWPE の疲労特性評価手法の開発

1) 加速酸化

加速酸化前後の酸化度の測定結果をした。

ガンマ線照射をしていないサンプル A、B、H はいずれの加速酸化の方法でも酸化度に変化せず、高い抗酸化能を有していることがわかった。これに対し、ガンマ線照射を行ったサンプルではいずれも酸化が進行することがわかった。また、加速酸化の方法としては、Method A より Method B の方が材料にとってより厳しい条件であることがわかった。

Method A で加速酸化を行った場合、窒素中でガンマ線照射を行ったサンプル D の酸化度は空気中でガンマ線照射を行ったサンプル C より低く、ガンマ線滅菌を不活性ガス中で行うことに一定の効果があることがわかった。しかし、Method B で加速酸化を行った場合は逆に高い酸化度を示しており、生体中で酸化劣化が進行する可能性があることが示唆された。

2) 引張疲労試験

滅菌、加速酸化ともに行っていない UHMWPE の引張疲労試験を行った。その結果、その大きなクリープ変形のために疲労試験機のアクチュエータの可動域 ($\pm 25\text{mm}$) を超えてしまうことがわかった。可動域を超えてしまった場合は一度サンプルを取り外し、クロスヘッド位置を調整した上で試験を再開した。図3に引張疲労試験の結果を示す。ただし、変位はクロスヘッドの移動分を考慮に入れその変化が滑らかになるよう、加工した。

これより、以下のような結果が得られた。

(1) 2000 サイクル程度までは試験片のクリープ変形の進行速度が大きいいため荷重制御がうまくできず、荷重の目標値に達していない。

(2) 試験片のクリープ変形の進行速度は10000 サイクル程度で落ち着くものの、300 万サイクルを過ぎても安定には達しない。

(3) 300 万サイクルでも破断しない。

3) CCT 試験

滅菌、加速酸化ともに行っていない UHMWPE の CCT 試験片による疲労試験を行った。破断面の写真は、破断後の試験片の初期クラック近傍のひずみが大きく、正確な初期クラック長さの測定が困難であることがわかった。また、初期クラックを試験片の中央部に製作するため、向きや長さの調整が困難であることがわかった。

4) ECT 試験

ECT 試験では、初期クラック近傍において試験中に応力がほとんど加わらないため変形が少なく、試験後の破断面観察によって初期クラック長の測定が容易に行えることがわかった。初期クラック付近の破断面の例と、破断面観察で計測した初期クラック長から計算された試験開始時の K 値 K_0 と破断までのサイクル数で整理した ECT 試験の結果を求めた。酸化度測定で酸化が認められなかったサンプル A、B、H は互いにほぼ同様の結果で、いずれも右下がりの直線上に分布した。 $K_0 < 1$ の場合に 10 万サイクルでも破断せず、こ

れらの材料では、 $K_{th}=1$ と推定された。

これに対し、酸化度測定で酸化が認められたサンプル C、D では $K_0=0.26$ でも比較的 low サイクルで破断に至っており、疲労特性が大幅に低下していた。なお、結果には含めていないが、試験機への取り付け中に破断してしまうサンプルも散見され、大きな材料劣化が示唆された。10 万サイクルの試験で破断しなかった試験片はなく、 K_{th} の推定はできなかった。

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

曝露前の細胞生存率

培養フラスコで培養細胞を継代培養し、一定の細胞数となったところで、培養プレート上で被験物質への曝露を行ったが、培養プレートに細胞を移す時点での細胞生存率は、常に 90% を上回っていた。

細胞生存の評価

図 10(A)(B) に 0、0.5、1.0、1.5、2.0 μM の DBT 曝露によるアストロサイトの生存率及び上清中 LDH 濃度について示し、図 10(C)(D) に 0、0.125、0.25、0.5 μM の DBT 曝露によるアストロサイトの生存率及び上清中 LDH 濃度について示した。0、0.5、1.0、1.5、2.0 μM の DBT 曝露においてはトリパンブルー色素排除法による生存率の検討で、全ての曝露群で対照群に比べて有意な生存率の低下を示した。また 1.0 μM 曝露群は、0.5 μM 曝露群に比べ、1.5 μM 曝露群は 0.5 μM 曝露群及び 1.0 μM 曝露群に比べ、2.0 μM 曝露群は他の全ての曝露群と比べ有意な生存率の低下を示した。上清中 LDH 濃度については、

全ての群で対照群に比べ有意な平均値の上昇を示した。2.0 μ M 曝露群では、対照群及び他の全ての曝露群に比べ有意な平均値の上昇が見られた。低濃度の 0、0.125、0.25、0.5 μ M の DBT 曝露による生存率について、0.5 μ M 曝露群は、対照群及び他の曝露群に比べて有意な生存率の低下が見られた。上清中 LDH 濃度についても、0.5 μ M 曝露群で、対照群及び他の曝露群に比べ有意な平均値の上昇が認められた。

OT、PLLA5000、及び、PLLA3000 曝露によるアストロサイトの生存率、上清中 LDH は、共に対照群と曝露群の間で有意性を示さなかった。

図 11(A) (B) に 0、10、20、50 μ g/ml の S3 曝露によるアストロサイトの生存率及び上清中 LDH 濃度について、(C) (D) に 0、2.5、5、10 μ g/ml の S3 曝露によるアストロサイトの生存率及び上清中 LDH 濃度について示した。0、10、20、50 μ g/ml の S3 曝露により、生存率について、全ての曝露群で対照群に比べて有意な生存率の低下を示した。さらに、20 μ g/ml 曝露群、50 μ g/ml 曝露群で 10 μ g/ml 曝露群と比べ有意な生存率の低下を示した。上清中 LDH 濃度については、全ての曝露群で対照群に比べ有意な平均値の上昇を示した。50 μ g/ml 曝露群では、対照群及び 10 μ g/ml 曝露群、20 μ g/ml 曝露群に比べて有意な平均値の上昇が見られた。低濃度の 0、2.5、5、10 μ g/ml における S3 曝露によるアストロサイトの生存率について、10 μ g/ml 曝露群で、対照群及び 2.5 μ g/ml 曝露群、5 μ g/ml 曝露群に比べて有意な生存率の低下が見られた。上清

中 LDH 濃度については、10 μ g/ml 曝露群で、対照群及び他の曝露群に比べて有意な平均値の上昇が認められた。

ゲル層オリゴマー、及び、弾性形状維持層オリゴマー曝露によるアストロサイトの生存率、上清中 LDH は、共に対照群と曝露群の間で有意性を示さなかった

上清グルタミン酸濃度

DBT 曝露によるアストロサイトの上清中グルタミン酸濃度について図 12 に 1 時間後と 2 時間後の値を示した。曝露直後では対照群と曝露群で有意性を認めなかった (data not shown)。1 時間後では対照群との有意性は認められなかったが、2 時間後に曝露群で対照群に比べて有意な濃度の上昇を示した。OT、PLLA5000 及び PLLA3000 曝露によるアストロサイトの上清中グルタミン酸濃度は、3 時間後及び 6 時間後、共に有意性を示さなかった。S3 曝露によるアストロサイトの上清中グルタミン酸濃度について 1 時間後と 2 時間後について図 13 に示した。1 時間後では対照群との有意性は認められなかったが、2 時間後に曝露群で対照群に比べて有意な濃度の低下を示した。なお曝露直後では対照群と曝露群で有意性を認めなかった (data not shown)。

ゲル層オリゴマー、及び、弾性形状維持層オリゴマー添加によるアストロサイトの上清中グルタミン酸濃度について 3 時間後と 6 時間後を図 14 に示した。曝露直後では対照群と曝露群で有意性を認めなかった (data not shown)。ゲル層オリゴマーに関しては、3 時間後及び 6 時間後、

曝露群で対照群に比べ有意に高い値を示した。また、弾性形状維持層オリゴマーに関しては、3時間後では対照群との有意な差はなかったが、2時間後に曝露群で対照群に比べて有意な濃度の低下を示した。

細胞増殖

DBT 曝露によるアストロサイトの増殖評価について図 15 に示した。TetraColor ONE の取り込み実験及び生存率共に、全ての観察時点で対照群に比べ曝露群が有意に低い値を示した。

OT 曝露によるアストロサイトの増殖評価について図 16 に示した。OT に関しては生存率に有意な差はなかったが、TetraColor ONE の取り込み実験で 5 日目と 7 日目に曝露群が対照群より有意に低い平均値を示した。

11. 脊椎固定器具の力学的安全性評価手法の開発

ASTM F1717-04 に基づく実験の結果を表 3 に示す。荷重 100N の場合、変位は $1.65 \pm 0.18\text{mm}$ で、荷重 200N の場合、変位は $3.63 \pm 0.46\text{mm}$ であった。荷重が大きくなるほど変位も大きくなり、さらに誤差も大きくなった。

表 3 実験結果

荷重	変位量 [mm]	S. D.
100N	1.65	0.18 (N=5)
200N	3.63	0.46 (N=5)

有限要素解析の結果、荷重が 50N (実験の 100N に相当) の場合、スクリーネジと UHMWPE 間の摩擦係数が 0.3 の場合、変位は 1.46mm、摩擦係数が 0.6 の場合では 1.45mm であった。また、荷重が 100N (実験の 200N に相当) の場合、変位は 3.16mm (摩擦係数は 0.3) であった。実験結果と比較すると、いずれも誤差範囲内に収まっており、本研究で用いた有限要素モデルの妥当性が示された。

数値シミュレーションによる脊椎固定器具の疲労寿命推定の結果、Model-A (スクリーネジのみの場合) と Model-B (結合アームを組み合わせた場合) とでは疲労寿命が変化した。図 17 に示すように、Model-A では荷重が 300N まで疲労寿命は 10^7 回を越えるが、荷重が 400N の時、約 10^4 回まで低下した。一方、Model-B では、図 18 に示すように、荷重が 300N の時に疲労寿命が約 10^4 回まで低下した。これは、結合アームからの荷重によって生じるモーメントが、スクリーネジのみの場合よりも大きく、スクリーネジに大きな応力がかかるためである。シミュレーションの結果、図 19 に示すように、スクリーネジの根本部分で疲労破壊の生じる危険性が示された。

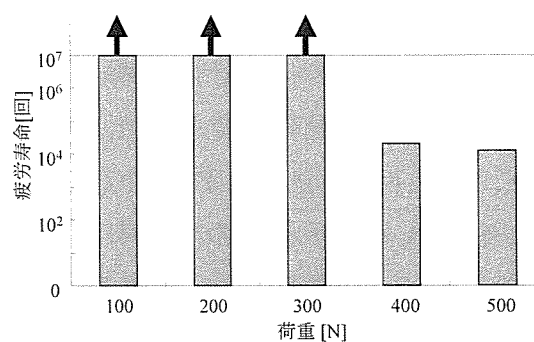


図 17 疲労寿命推定結果 (Model-A)

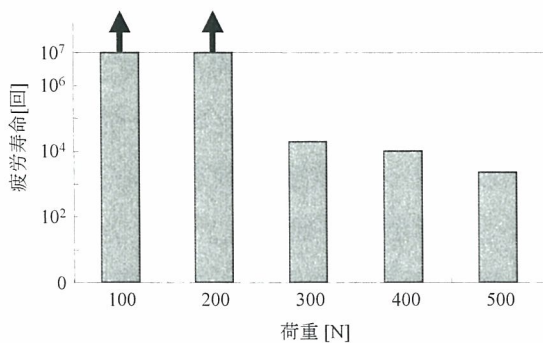


図 18 疲労寿命推定結果 (Model-B)

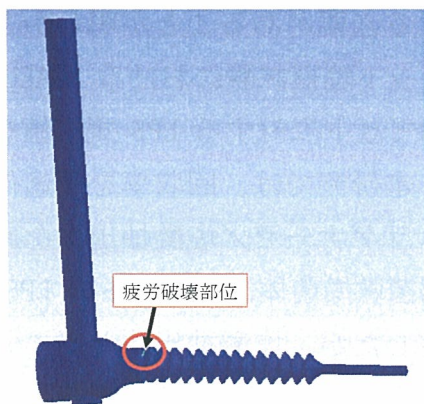


図 19 スクリューネジ - 結合アームの疲労強度推定分布

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

肉眼所見と組織学的所見（トルイジンブルー染色）を提示する。

【欠損放置群】

欠損作成後 6 ヶ月

欠損作成後 12 ヶ月

欠損放置群では、6 ヶ月で肉眼的には表面がやや膨潤しており、組織学的には表面は軟骨組織ではなく線維組織のままであった。12 ヶ月後には肉眼的には表面

の不整が改善していた。12 ヶ月の組織標本はまだできていない。

【担体 SZ のみ】

欠損作成後 6 ヶ月

欠損作成後 12 ヶ月

担体のみの充填群では 6 ヶ月後は肉眼的にも組織学的にも欠損放置群とほぼ同様であったが、12 ヶ月後には組織学的には表面の線維組織はあるものの、かなり改善していた。

【担体+骨髄細胞】

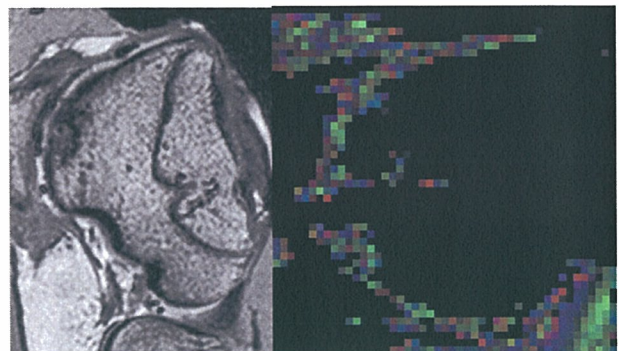
欠損作成後 6 ヶ月

欠損作成後 12 ヶ月

担体+細胞移植群では、6 ヶ月から組織学的には表面は線維組織であるが整であり、12 ヶ月後には線維組織が減少し、深部から軟骨組織ができていた。

MRI 像

【担体のみ充填】

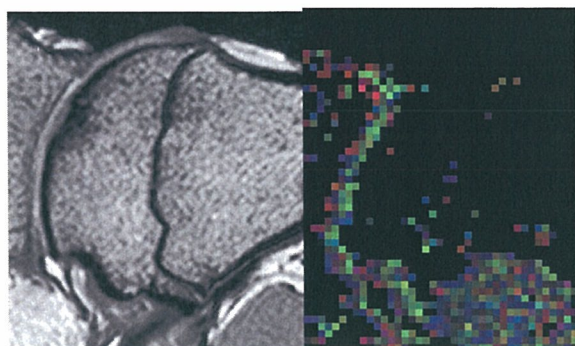


3DFLASH

Diffusion

3DFLASH では修復組織の表面が不整であり、diffusion では信号が一定せず、線維方向が一定していないことが伺えた。

【担体＋細胞移植群】



3DFLASH

Diffusion

3DFLASH では修復組織は表面が滑らかである。Diffusion では修復組織は緑にそまっており、線維の走行が一定であることが伺えた。

D. 考察

1. 感染因子含有材料の in vivo 動態評価手法の開発

敗血症時に見られるエンドトキシンショックとは、腹膜炎や急性胆管炎などの経過中に悪寒、発熱、発汗などと共に、血管平滑筋の弛緩による急激な血圧低下や末梢循環不全が発生する状態を意味する。エンドトキシンショックからの回復は困難であるが、たとえショックから回復したとしても、肺、腎臓、肝臓、心臓や消化器粘膜の障害、更には中枢神経系の障害が同時又は続発する多臓器不全症を引き起こす症例が見られる。このように、多量のエンドトキシンが循環血液中に入ると、発熱の他、様々な組織や臓器に影響を与えることが明らかになっているが、血管投与以外の非経口的ルートにより LPS を投与した時の生体影響は詳細に検討されていない。そこで本研究では、

医用材料に混在する菌体成分の生体に対する実際のリスク強度を正確に判定し、適用例毎に科学的根拠に基づいた LPS 規格値を設定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を評価した。

本研究 3 年間の成果として、皮膚に適用する創傷被覆基材には、特段、LPS 規格値を設定する必要はないが、皮下、腹腔内及び骨再生用材料には適切な LPS 規格値を設ける必要があることが明らかとなった。ラット埋植試験における NOAEL 値に基づいてヒトに対する LPS 規格値を試算した。本研究では、回収率を最適化した精製コラゲナーゼ／塩酸抽出法を適用して大腸菌乾燥菌体添加シートの LPS 含量を測定したが、塩酸抽出法とガイドライン法により定量した際の実測値及びそれらの値から誘導したヒトに対する LPS 許容値も合わせて表記した。医療機器や医用材料の特性に合わせて LPS 規格値を設定する試みは初めてのことであり、今後、安全係数の設定法などに関して議論を深めて行く予定である。

昨年度の本研究において、CAP-18/LL-37 類縁体の 1 つである 18-mer LLKKK アナログは非常に高い抗 LPS 活性を示し、CAP-18 ファミリーと同様に抗菌・抗 LPS 活性を持つ抗生物質であるポリミキシン B よりも遙かに強力な抗リムルス活性を示すことが明らかとなった。また、同アナログは院内感染の主な原因菌である黄色ブドウ球菌や緑膿菌に対しても低濃度で抗菌活性を示した。抗菌剤の徐放

基材として使用した酸処理ゼラチンはメンブランフィルター濾過を施すことによりラット埋植試験における生体適合性が向上したことから、同材料を抗菌剤担体として緑膿菌に対するラット in vivo 抗菌試験を実施した。その結果、18-mer LLKKK アナログは in vivo においても in vitro と同等の抗菌力を発現することが確認された。また、病理組織学的診断の結果、抗菌剤非添加の陽性対照群に観察された急性炎症反応は抗菌剤を添加することにより緩和される傾向が認められたことから、18-mer LLKKK アナログは抗菌・抗 LPS 剤として有益であることが明らかになった。

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、炭酸カルシウム、L-Alanine、Amino acid mixture が3分間暴露と10分間暴露とで異なった結果を与えた理由については分からない。

放射線照射（5kGy）した *Bacillus pumilis* の場合は、炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、L-アラニン、D-アラニン、Panvitan、アミノ酸混合液、ピルビン酸ナトリウム、グルコースに損傷回復効果が認められた。

可溶性でんぷんならびに活性炭は何れの場合も損傷回復効果は認められなかった。

電子線滅菌された *Bacillus pumilis* の場合は、炭酸カルシウムの場合を除いて、何れの薬剤も損傷回復能を示した。その中で特にグルコース、Panvitan、アミノ

酸混合液添加で損傷回復能が示された。

3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

医療機器の感作性試験のためには抽出物を得る必要があり、極性溶媒として生理食塩水、非極性溶媒として植物性油を用いて抽出し、そのまま動物試験に用いてきた。

医療用具のガイドラインを参考に、各医療機器の厚さや形状から、6 cm²の表面積当たり溶媒量は1 ml として抽出した。医療材料をアセトン、綿実油、生理食塩水で抽出した。生理食塩水での抽出液には前述の T80 を添加してから塗布した。いずれの材料とも抽出溶媒に係わらず反応性を増強させることはなく、これらの医療材料の皮膚感作性はないと判断した。また、この市販製品を用いて感作が起こったという症例報告は現在までない。しかし、本抽出条件が長期間埋植する医療機器について適用できるかどうかはよくわかっていない。今後は、溶媒の他にもこうした抽出条件の違いによる反応性の変化を見る必要があるかもしれない。

抽出液のように化学物質が混合して併用された場合、あるいは他の化学物質を使用している場合、別の感作性物質の反応性が影響を受ける可能性がある。今回は、プラスチック等の劣化防止や化粧品の日焼け防止成分として使用される紫外線吸収剤 EMC について、界面活性剤 SLS と比較して検討した。In vitro の h-CLAT における試験濃度を決定するため、細胞毒性試験を行った。感作性を有しない DMSO 及び DMF、強い感作性強度を持つ DNCB

は IC 50 値が低く、中程度の HCA は IC 50 値は高くなった。紫外線吸収剤 EMC は SLS と同程度の IC50 値を示した。細胞毒性強度と感作性強度の間には明確な関係は認めなかった。

LLNA において EMC は低い SI 値しか示さず、感作性はないと予想された。THP-1 細胞の CD54 及び CD86 発現量の変化を見たところ、CD54 発現量は増加したが、CD86 は変化なかった。h-CLAT では CD54 が 200%以上、CD86 が 150%以上の発現量となるものを感作性物質と判断するよう推奨しているが、DNCB や NiSO₄ については陽性反応となるが、EMC はいずれの濃度でもこれ以上の値にはならず、感作性は認めなかった。しかし、設定値を 150%と下げた場合には、CD54 発現量から陽性と判断する事になる。試験物質の水溶性や施設間のばらつきがあり設定値については、今後のバリデーションにより確立されるものと思われる。また、感作性が陽性か陰性かの判断だけでなく、相対的な強度比較ができるよう検討が必要である。

化粧品基準では EMC の配合量の上限が決められており、化粧品の種類によって異なるが 10~20%とされている。そこで、10% EMC 溶液を塗布した後、HCA を適用し、リンパ節の反応性を測定した。試験の結果、EMC による感作性反応の増強効果は認めなかった。一方、SLS については反応を増加させることがわかった。一方、SLS で前処理すると、25%HCA による反応が増加し 50%HCA による反応性に近くなった。すなわち、一定の感作性反応を起こす濃度が低くなったことから、SLS が

HCA の皮膚浸透量を増加させたためと考えた。以上のように、化学物質によっては混合あるいは併用して適用すると、他の試験物質の反応性に影響することが示唆された。

ウシコラーゲンなどはヒトにとっては異種タンパク質であるため、アレルギー等の健康影響が懸念される。現在、動物を用いた即時型アレルギーの評価法はないが、血清抗体価から評価できるのではないかと考えられている。そこで、血清抗体価を指標として医療機器のアレルギー性の有無を評価した。陽性対照タンパク質 OVA は IgE のみならず IgG 抗体価の著しい上昇を起こした。しかし、IgG は一般的な免疫機能の促進によって増加するもので、アレルギーとは直接関係がないため、総 IgG 抗体価はあくまでも参考として考えるものである。これと比べて、BSA は多量に投与しても IgE 抗体産生は少なく、アレルギー性はないか、ごく弱いと考えられた。FBS は多種成分の混合物であるが、BSA より IgE 産生が増加する傾向が認め、BSA にも影響を及ぼすものがあると考えられる。再生医療の発展に伴い、細胞と材料を組み合わせた医療機器も将来は使用される可能性があるが、細胞培養には FBS を混合した培地を用いることが通例である。従って、量的なものが関係するが FBS の製品への残存はできるだけ避け、自己血清での培養にする等の注意が必要かもしれない。

市販の手術用ゴム手袋抽出液投与群の IgE 抗体価は対照群と差はなかった。天然ゴム製品によるアレルギーの原因物質は

製品に残存するゴムタンパク質であるが、近年のゴム製品では水での洗浄を繰り返すなどして残存タンパク質の量を減らすよう改良がされている。よって、本製品についてもこうした処理が十分されている事から、溶出してくるタンパク質が少なく、反応を示さなかったのではないかと思われる。

インテグランはウシ真皮より得られたアテロコラーゲンを綿上に紡糸加工し、ポリエポキシ化合物により化学架橋処理されたもので、スポンゼルは動物の骨、皮膚、じん帯または腱を酸またはアルカリで処理して得られた粗コラーゲンを水で加熱抽出して製したものである。これらの抽出液投与群の総 IgE 抗体価は溶媒対照群と有意な差は認められなかった。止血用ゼラチンスポンジの抽出液を投与した動物 1 匹で総 IgE が高いものが見られたが、この原因は不明である。今回の結果からは、市販の医療材料についてはアレルギーを起こす可能性は少ないと判断した。

今回は 1 つの限られた試験方法での結果である。アレルギーの評価指標としての抗体価についても、総 IgE だけでなく特異的 IgE の検出や定量が試験物質のアレルギー性を特定し強度を比較する上で重要と思われる。抽出法においても、今回の条件では試料重量及び抽出液中の抽出物の絶対量が少なく、結果的に動物に反応を起こす量に至らないということで陰性の判定が出ている可能性もある。いずれにしても、医療機器を対象とする即時型アレルギー性の検出には、測定指標

以外にも抽出法が大きな検討要因となる。

4. Ti-Ni 合金材料の安全性評価手法の開発

【埋植した合金材料の検討】

○肉眼観察、体重、臓器重量変化

Ni 埋植群では、動物の外見、開背部の肉眼での観察、組織切片での肥厚状況から、病理観察を待つまでもなく、埋植早期から炎症が激しく起こっていることが明白であり、埋植長期(8週以上)では、Ni 材料が体外に排出されてしまった例もあったと考えられる。そのため、16 週後では、1 匹を除いて他の全てでは、体内に Ni 材料が存在しない状態になってしまい、外見でも膨隆していなかったと思われる。8 週後でも 1 匹で材料の消失が見られていた。ラットの Ni 材料に対する回復力の強さに敬服すると共に、Ni の毒性をあらためて知らされた思いがする。

なお、16 週での Ni 群のデータには集計や統計的な処理を施していないが、Ni の体外排出の時期が明確でなく、かつ、排出時期が同一とは考えにくいことから、集計困難と見なしたためである。

Ni 群以外の体重変化については群間に差は認められないが、Ni 群では、他群に比べて総じて体重増加が抑制されている。特に、体内に Ni が残留しているラットでは体重増加が停止、ないしは減少している。一方、Ni が体外に排出されたラットでは、他の群に匹敵する増加量を示しているものもあった。Ni が体内にあることによって、大きな悪影響を及ぼすことを示している。

臓器/体重比については、16 週後での Ni 群以外の群間では、Ti 群の肝臓が他群に比べて有意に小さい結果を与えていたが、肝臓重量が他群に比べて小さいことがこの結果につながっている。8 週時においても、有意差は認められないが、Ti 群は、Ti/Ni 群と Ti-6Al-4V 群より、やや小さかった。理由は明らかではない。

金属材料側の観点から見ると、Ni 群では埋植周辺組織の炎症によって、大きな膨らんだ嚢胞様の組織で囲まれてしまっており、血性滲出物中に浸った状態にあったと推察される。ホルマリン固定によって材料表面上は厚い組織で覆われ、回収後も容易には被覆を除去できなかった。他方、体外に排出された Ni 材料は、結果的に排水溝で洗浄されてしまったこと、ホルマリン固定を経ていないこと、から、金属光沢を有し、表面に組織は全く観察されなかった。

一方、Ti/Ni 合金群では、16 週後でも、金属光沢がそのまま残っており、肉眼では周辺に炎症の徴候は見られなかった。これは、純 Ti 群、Ti-6Al-4V 合金群でも同様であった。摘出されたホルマリン固定後のこれらの材料は、薄くまばらに表面が組織で覆われているものの、金属面も出ており、炎症があまり顕著ではないことの表れと思われる。

○埋植後の組織変化

埋植後 4 週の結果

純 Ni の埋植では、壊死を生じる強い組織反応が観察されたが、純 Ti、Ti/Ni 合金および Ti-6Al-4V の埋植では、いずれも線維化を示す結合組織によって被包さ

れており、炎症細胞浸潤も殆どの症例で軽度であり、組織障害性は極めて弱いものと示唆された。しかし、Ti-6Al-4V 群の 1 例で結合組織性被膜にリンパ球と共に好酸球の浸潤が観察され、この症例のみがアレルギー性変化を生じたものと考えられる。

埋植後 8 週の結果

純 Ni の埋植では、強い組織損傷が継続してみられたが、純 Ti および Ti/Ni 合金の埋植では、いずれも癒痕組織による被包がなされており、組織障害性は無いものと示唆される。Ti-6Al-4V の埋植でも癒痕組織による被包がなされていたが、3 例にリンパ球と好酸球の浸潤が観察され、軽度のアレルギー性変化を示すものと考えられる。

埋植後 16 週の結果

純 Ni の消失については、術後 8 週での組織の壊死の拡大に伴う嚢胞様構造の上皮下への広がり、消失例でみられた角化嚢胞様の所見と合わせ考え、純 Ni による強い組織破壊で壊死が皮膚にまで及び、皮膚潰瘍となり、材料の放出後に治癒したものと理解される。

純 Ti および Ti/Ni 合金の埋植では、術後 4 週および 8 週のものとは相違はみられなかった。Ti-6Al-4V の埋植でも同様であり、1 例にリンパ球と好酸球の浸潤が観察され、Ti-6Al-4V の埋植ではアレルギーを誘発する可能性が示唆された。

成書には、生体内からの Ni の体外排出について述べられており、「感作成立後に再び Ni が表皮にくると、killer T cell がその表皮細胞を攻撃して殺し、液化