

THP-1 細胞は ATCC から購入し、FBS 10%、penicillin G 100 units/ml、streptomycin 100 µg/ml 及び 2-mercaptoethanol 55 µmol/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 容量のスクリュウキャップ付きガラス瓶に入れ、表面積 6 cm<sup>2</sup> 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)<sup>7-10)</sup>

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。<sup>13)</sup> 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

##### 6-2. ATP 量

Yamashita らの方法<sup>12)</sup>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<sup>13)</sup>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×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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>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<sup>3,4)</sup>

##### 7-1. 細胞毒性試験

THP-1 細胞を FBS-RPMI で希釈して 4×10<sup>5</sup> cells/ml とし、50 µl 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 µl(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 µl 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 IC<sub>50</sub>

( $\mu\text{g/ml}$ )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  $1 \times 10^6$  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 IC<sub>50</sub> 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  $\mu\text{l}$  に再懸濁して、50  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$ 、FITC 標識抗 CD54 抗体 3  $\mu\text{l}$  または FITC 標識マウス IgG1, $\kappa$  (原液を 5 倍希釈したもの) 3  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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<sup>14)</sup>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  $\mu\text{g/ml}$  rat-monoclonal anti-mouse IgE antibody の 0.1mol/l 炭酸緩衝液(pH 9.6)溶液を 100  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  を加えて、室温で 1 時間静置した。各穴を洗浄後、TMB 溶液 100  $\mu\text{l}$  を加えて暗所で 15 分間静置し、2 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 100  $\mu\text{l}$  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( $\mu\text{g/ml}$ )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 穴プレートの各穴に 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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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( $\mu\text{g/ml}$ )を求めた。

## C. 研究結果

### 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 AOO (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。AOO(1:4)及びオリーブ油塗布群でわずかにリ

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(表 1)。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 AOO(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(表 1)。

#### 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。AOO を基準に ATP 量の SI 値を算出したところ、50%PG と 1% PL92 は AOO 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(表 2)。

HCA を AOO、DMF、DMSO、または 1% T80 溶液に溶解させて試験し、反応性を比較した。ATP 量を指標として見ると、HCA の AOO 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(表 3)。

#### 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(表 4)。

#### 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-AOO 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(図 1)。

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(図 2)。

##### 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 を塗布したものの、AOO 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(表 5)。

#### 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(表 6)。

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。NiSO<sub>4</sub> は IC<sub>50</sub> 値で著しく発現量が増加し、CD54 は 684% となった(図 3、図 4)。

#### 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(図 5)。OVA は総 IgG 抗体価も上昇させた(図 6)。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)(図 5)。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 cm<sup>2</sup> 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 抗体価を図 7 に示した。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、他の同試料、ゴム製品、コラー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。

#### D. 考察

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油を用いて抽出し、そのまま動物試験に用いてきた。<sup>2)</sup> 日本の医療用具のガイドライン<sup>1)</sup>では、生体に生涯にわたって埋め込む機器についてのリスクはこうした溶媒では抽出されるものが少なく十分に評価できないとして、有機溶媒を用いて徹底的に抽出を行い、濃縮して試験に用いる方法が提案されている。

試験物質を耳に塗布する LLNA では、適用のしやすさなどから AOO (4:1) が塗布溶媒として一般的に用いられている。試験物質の感作性の有無は溶媒との対比によって判定することから、溶媒の皮膚への浸透性及び溶媒自身によるリン

パ節活性化反応の程度が結果に影響する。まず、植物油による抽出を考え、オリーブ油を塗布した場合にリンパ節の活性化が起こるかどうか検討した。アセトン、AOO(4:1)、AOO(1:4)及びオリーブ油について比較した結果、AOO(1:4)及びオリーブ油がわずかにリンパ節重量及び ATP 量で高い値を示すが、これらの中で有意な差はなかった(表 1)。次に、感作性物質が抽出された系として、各抽出溶媒に HCA を含有させて試験した。溶媒間で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わずかに値は高くなる傾向があり、AOO(4:1)を溶媒とした時が最も高い SI 値を示した(表 1)。HCA は常温で液体であり、高濃度含有させた今回の試験では溶媒の揮発性の影響はないと考えられるが、試験物質が粉末のような場合、アセトンを溶媒として用いると、塗布後すぐにアセトンが揮発してしまい、試験物質の皮膚への浸透を助けることがないばかりか、試験物質が皮膚から取れてしまう可能性もある。一方、オリーブ油はリンパ節活性化を起こさないと考えられ、そのまま塗布に用いることが可能であるが、粘性が高く、正確な量を塗布するのに時間がかかるといった欠点がある。アセトンにオリーブ油を添加した AOO は、オリーブ油の非揮発性及び粘性という性質がアセトンの溶解性と合わさって、試験物質を容易に塗布させることができ、かつ皮膚上に長くとどめておく事ができる良い溶媒と思われた。

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、LLNA を行うには、これに界面活性剤を添加して表面張力を下げたり、糊剤を添加して付着させたり、有機溶媒を混合させたりするような工夫が必要である。しかし、こうした処理によって溶媒対照群としての反応性が変化し、SI 値に影響を受ける可能性もある。ここでは、こうした溶液の LLNA での反応性を比較するとともに、HCA をこれらの溶媒で試験した時の反応性について検討した。

AOO を基準にすると、50%PG と 1% PL92 の SI 値は低いか同程度で、残りの溶媒は SI 値が 1.0 よりも大きく、SLS 溶液が最も高い値を示した(表 2)。糊剤 CMC は水への溶解性が悪く、だまになりやすいため調製が困難であった。ま

た、CMC 溶液は粘性のため粒状になり、塗布が困難であった。したがって、水溶液を塗布するための添加剤として CMC を選択するのは不適当と思われた。SLS 添加溶液は非常に塗布しやすいものの、刺激性があり、高濃度では LLNA で偽陽性の反応を起こす事もあるとされている。<sup>15)</sup> 1% ではそうした陽性反応を起こす事はないが、<sup>14)</sup> 溶媒対照群としての値は若干上がることがわかった。Ryan らは水溶性感作性物質の溶媒として低刺激性の非イオン界面活性剤 PL92 溶液を選択し、DMSO や DMF を用いた場合と比較した。<sup>16)</sup> しかし、PL92 溶液を用いた場合の感作性物質の反応性は有機溶媒よりも低くなったとしている。また、試験上、PL92 は非常に粘性が高く、採取に苦労した。

HCA を AOO、DMF、DMSO、または 1% T80 溶液に溶解させて試験し、反応性を比較した。HCA の AOO 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(表 3)。DMSO 自体は他の物質の皮膚への浸透性を高める作用があるが、<sup>17)</sup> 100% 溶液ではリンパ節活性化も高まるので、使用する際にはある程度希釈することが望ましい。前述のように、水と混和した DMSO や DMF 溶液による反応は AOO と変わらず、これらに多少溶解するような水溶性物質の塗布溶媒としては使用できるが、抽出物が希釈されてしまうため注意が必要である。できるだけ高い SI 値を得るには、対照とする溶媒群の値が小さい方が有利である。1% T80 溶液は耳への塗布が容易でリンパ節を活性化させることなく試験できるため、今回用いた中では最も適切ではないかと考えた。ただし、感作性物質の反応を上昇させるには、水溶性物質を皮膚にのせておくだけでなく、皮膚中への浸透性を促進することが重要になってくる。水溶性物質の塗布溶媒の選択や水系抽出液の塗布方法の最適化には、今後、水溶性感作性物質での検討を増やす必要がある。

医療用具のガイドライン<sup>1,2)</sup>を参考に、各医療機器の厚さや形状から、6 cm<sup>2</sup> 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、<sup>18)</sup> 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、<sup>4)</sup> DNCB や NiSO<sub>4</sub> 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。<sup>19)</sup> 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。<sup>5,6)</sup> 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、<sup>20)</sup> 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ことから、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。

## E. 結果

医療機器の抽出に用いられる植物油が LLNA によるリンパ節活性化反応に影響があるかどうか検討した。アセトン、AOO(4:1)、AOO(1:4)及びオリーブ油について比較した結果、AOO(1:4)及びオリーブ油塗布群は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。それぞれの溶媒に HCA を溶解して試験したところ、AOO(4:1)を溶媒としたときに最も SI 値が高くなった。生理食塩水を抽出液として用いたときのマウスへの塗布方法として、界面活性剤、糊剤の添加、及び有機溶媒混合法を検討した。溶媒対照群として SLS 溶液は若干値が上がるものの他の方法では大きさ差はなかった。HCA を各種溶に加えて塗布したところ、DMSO 単独での発光量が他のものよ

り大きくなり、結果としてHCAのDMSO溶液でSI値は低くなった。粘性、入手のしやすさから考えると、今回試験した中では、水溶液にT80を添加して塗布する方法が適切と思われた。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、溶媒群と反応性に差はなく、これらの医療材料の皮膚感作性はないと判断した。

複数の化学物質を併用したときの感作性反応を調べた。EMCを前処理した場合、感作性物質のリンパ節活性化反応は変化なかった。SLSを前処理すると、低濃度での感作性反応が増強されることがわかった。皮膚浸透量を増加させるような物質を併用あるいは混合した場合、他の試験物質の反応に影響することが示唆された。

タンパク質及びタンパク製医療機器の即時型アレルギー性を評価した。生理食塩水による抽出液をアジュバントとともに腹腔内に注射した後、血清中の総IgE抗体価を測定した。陽性タンパク質OVAは著しい抗体価の上昇を示したが、BSAによる上昇率は少なかった。FBSに関しては若干の総IgE抗体価の上昇を示し、アレルギー性が疑われた。試験した医療機器に関しては総IgE抗体価が増加するものではなく、即時型アレルギーを起こす可能性は少ないと評価した。

## F. 参考文献

1. 厚生省薬務局医療機器開発課監修. 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 1995 解説. 薬事日報社, 東京 (1996)
2. ISO 10993-12:2002 Biological evaluation of medical devices-Part 12: Sample preparation and reference materials
3. Ashikaga, Y., Yoshida, M., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., Toyoda, H. *Toxicol. in Vitro*, 20, 767-773 (2006)
4. Sakaguchi, H., Ashikaga, Y., Miyazawa, M., Yoshida, Ito, Y., Yoneyama, K., M., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., Suzuki, H. *Toxicol. in Vitro*, 20, 774-784 (2006)
5. Dearman, R.J., Kimber, I. *Toxicol. Lett.*, 120, 181-186 (2001)
6. Dearman, R.J., Skinner, R.A., Herouuet, C., labay, K., Debruyne, E., Kimber, I. *Fd. Chem. Toxicol.* 41, 1509-1516 (2003)
7. Kimber, I., Basketter, D.A. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 165-169 (1992)
8. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W., Basketter, D.A. *Toxicology* 93, 13-31 (1994)
9. Dean, J.H., Twerdok, L.T., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 258-273 (2001)
10. OECD, 2002. Guidelines for testing of chemicals. Guideline 429. skin sensitisation: local lymph node assay
11. Takeyoshi, Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M., Kimber, I. *Toxicol. Lett.*, 191, 203-208 (2001)
12. Yamashita, K., Idehara, K., Fukuda, N., Yamagishi, G., Kawada, N. *AATEX*, 11, 136-144 (2005)
13. Takeyoshi, M., Noda, S., Yamasaki, K., *Exp. Anim.*, 53, 171-173 (2004)
14. Hilton, J., Dearman, R.J., Basketter, D.A., Kimber, I. *Toxicol. Lett.*, 73, 43-53 (1994)
15. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274-286 (2001) Hatao, M., Hariya, T., Katsumura, Y., Kato, S. *Toxicology* 98, 15-22 (1995)
16. Ryanm C.A., Cruse, L.W., Skinner, R.A., Dearman, R.J., Kimber, I., Gerberick, G.F. *Fd. Chem. Toxicol.*, 40, 1719-1725 (2002)
17. Scheuplein, R., Ross, L. *J. Soc. Cosmetic Chemists* 21, 853-873 (1970)
18. 鈴木正人監修. 新有用性化粧品の開発. シーエムシー出版. 東京 (2004)
19. 厚生労働省告示第158号 (2001)
20. 赤澤 晃. カレントセラピー 17, 104-108 (1999)

## G. 研究発表

1. 学会発表  
五十嵐良明、劉 麗、鹿庭正昭、土屋利江. Local

lymph node assay におけるアイソトープを用いない各種エンドポイントの比較. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会(2006)  
大森崇、出原賢治、小島肇、寒水孝司、有馬和範、後藤浩彦、花田智彦、五十嵐良明、猪田健人、金澤由基子、小阪忠司、牧栄二、森本隆史、篠田直樹、武吉正博、田中正志、浦谷衛、宇佐美雅仁、山中淳、米田知史、吉村功、湯浅敦子.  
皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA 法)バリデーション研究. 日本動物実験代替法学会第 20 回大会(2006)

Idehara K., Omori T., Kojima H., Sozu T., Arima K., Goto H., Hanada T., Ikarashi Y., Inoda T., Kanazawa Y., Kosaka T., Maki E., Morimoto T., Shinoda S., Shinoda N., Takeyoshi M., Tanaka M., Uratani M., Usami M., Yamanaka A., Yoneda T., Yoshimura I., Yuasa A. Validation of LLNA-DA assay for assessing skin sensitization potential. 46th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2007)



表 1. アセトンとオリーブ油の比率が異なる溶媒を用いて LLNA を行った時の HCA の反応性

Chemical	Vehicle	Lymph node weight		ATP content	
		(mg)	SI	(RLU)	SI
—	Acetone	6.8 ± 0.5	-	69930 ± 18659	-
	Acetone:Olive oil (AOO (4:1))	6.9 ± 1.4	-	65919 ± 26164	-
	Acetone:Olive oil (AOO (1:4))	7.7 ± 1.0	-	79692 ± 7635	-
	Olive oil	7.2 ± 0.6	-	76785 ± 5682	-
HCA	Acetone	9.9 ± 0.8	1.5	125723 ± 32172	1.8
	Acetone:Olive oil (AOO (4:1))	11.0 ± 1.0	1.6	136883 ± 13302	2.1
	Acetone:Olive oil (AOO (1:4))	10.1 ± 2.2	1.3	148641 ± 38187	1.9
	Olive oil	10.9 ± 2.7	1.5	136019 ± 43285	1.8

表 2. LLNA における有機溶媒混合液、界面活性剤及び糊剤添加水溶液のリンパ節活性化反応

Chemical	Lymph node weight		ATP content		
	(mg)	SI	(RLU)	SI	SI
AOO (4:1)	6.1 ± 0.74	-	45649 ± 6678	-	-
50% PG	5.8 ± 1.19	0.95	34788 ± 6795	0.76	0.76
50% DMF	7.6 ± 1.97	1.26	54425 ± 22528	1.19	1.19
50% DMSO	7.4 ± 1.40	1.21	55668 ± 12681	1.22	1.22
1% SLS	7.7 ± 1.03	1.27	74001 ± 27516	1.62	1.62
1% PL92	7.1 ± 0.49	1.16	44160 ± 7514	0.97	0.97
1% T80	6.4 ± 1.40	1.06	52654 ± 6060	1.15	1.15
1% CMC	6.9 ± 1.13	1.13	48001 ± 15353	1.05	1.05

表 3. HCA を各種溶媒に溶解して塗布した時の反応性

Chemical	Vehicle	Lymph node weight		ATP content		
		(mg)	SI	(RLU)	SI	SI
—	AOO	6.0 ± 1.0	-	63466 ± 21514	-	-
	DMF	6.4 ± 0.5	-	67121 ± 3197	-	-
	DMSO	4.8 ± 4.4	-	82906 ± 28225	-	-
	T80	6.3 ± 1.0	-	66085 ± 17402	-	-
HCA	AOO	13.4 ± 5.5	2.2	205086 ± 92579	3.2	3.2
	DMF	14.0 ± 2.5	2.2	213443 ± 41395	3.2	3.2
	DMSO	18.6 ± 15.6	3.9	172898 ± 46510	2.1	2.1
	T80	13.4 ± 2.1	2.1	215685 ± 58430	3.3	3.3

表 4. 医療機器の抽出液の LLNA による結果

(a) アビテン

Chemical	Solvent	Lymph node weight		ATP content	
		(mg)	SI	(RLU)	SI
-	Acetone	7.3 ± 1.12	-	75054 ± 23310	-
	oil	6.5 ± 1.02	-	66497 ± 16192	-
	1% T80-saline	4.8 ± 1.59	-	37945 ± 14650	-
Extract	Acetone	5.0 ± 1.37	0.69	40689 ± 14410	0.54
	oil	5.6 ± 1.70	0.87	56798 ± 27193	0.85
	1% T80-saline	5.4 ± 0.47	1.12	43662 ± 9821	1.15

(b) インテグラン

Chemical	Solvent	Lymph node weight		ATP content	
		(mg)	SI	(RLU)	SI
-	Acetone	6.0 ± 0.77	-	52059 ± 6132	-
	oil	8.2 ± 1.63	-	83303 ± 16480	-
	1% T80-saline	4.6 ± 0.62	-	46557 ± 15052	-
Extract	Acetone	5.6 ± 1.11	0.92	50290 ± 6429	0.97
	oil	7.4 ± 0.68	0.90	56374 ± 15894	0.68
	1% T80-saline	5.7 ± 1.20	1.25	56717 ± 25434	1.22

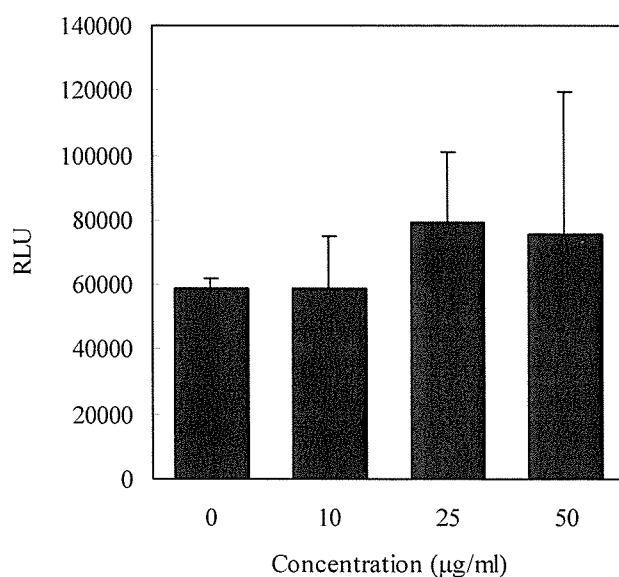
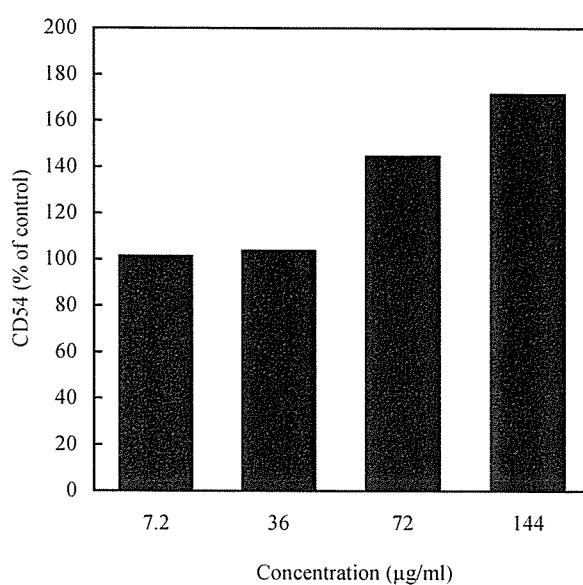
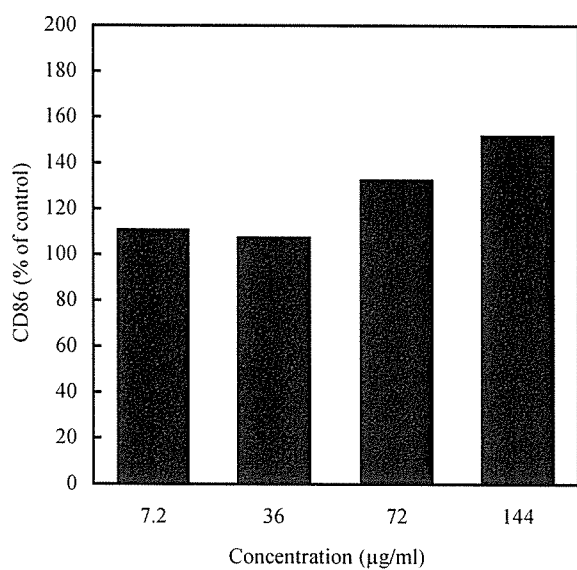


図 1. LLNA による EMC の結果

(a) SLS



(b) EMC

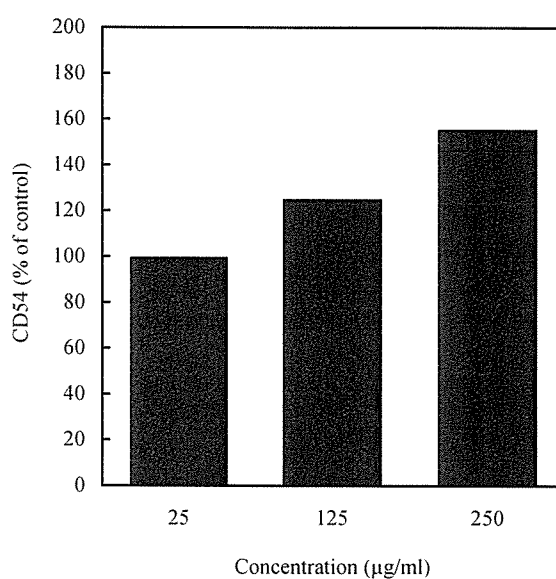
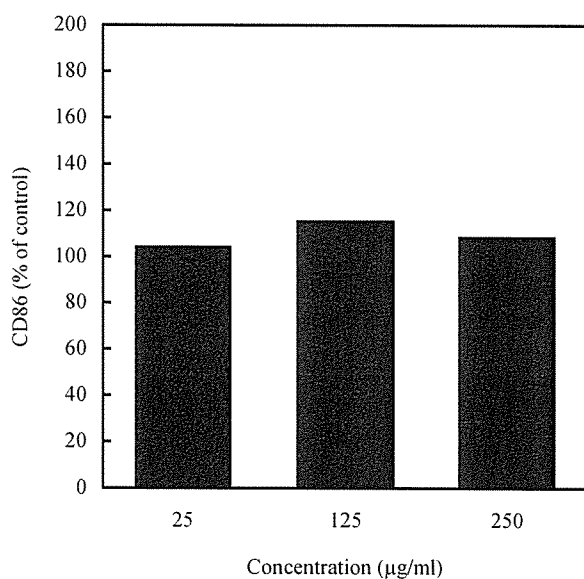


図 2. EMC 及び SLS による CD54 及び CD86 発現量の変化

表 5. EMC の前処理が HCA による皮膚感作性反応に及ぼす影響

Pre-treatment	Chemical	Lymph node weight		ATP content	
		(mg)	SI	(RLU)	SI
—	AOO	7.5 ± 3.1	-	97720 ± 20733	-
	25% HCA	11.3 ± 2.2	1.51	154531 ± 79985	1.58
	50% HCA	16.2 ± 2.6	2.16	224143 ± 66611	2.29
AOO	AOO	7.4 ± 1.7	-	76349 ± 31312	-
	25% HCA	9.9 ± 3.1	1.33	196145 ± 70231	2.57
	50% HCA	14.7 ± 2.4	1.98	196191 ± 57791	2.57
1% SLS in H <sub>2</sub> O	AOO	6.9 ± 1.7	-	81083 ± 28895	-
	25% HCA	12.8 ± 2.5	1.86	153936 ± 43552	1.90
	50% HCA	13.3 ± 3.4	1.93	202619 ± 53263	2.50
10% EMC in AOO	AOO	7.6 ± 1.6	-	85242 ± 46905	-
	25% HCA	10.8 ± 2.1	1.43	163753 ± 37288	1.92
	50% HCA	12.7 ± 2.2	1.68	222993 ± 54002	2.62

表 6. 紫外線吸収剤、界面活性剤及び溶媒の細胞毒性

Chemical	IC50 (µg/ml)	Chemical	IC50 (µg/ml)
Sensitizer		UV absorber	
DNCB	3.4	EMC	250
HCA	50.5	EAB	150
TMA	850	ES	70
Formalin	170	EDB	160
NiSO <sub>4</sub>	130	BMB	123
		HMB	61
Solvent		DHB	63
DMSO	2.4	THB	65
DMF	2.7		
PG	0.85		
Detergent		Others	
SLS	72	MS	660
T80	780		
PL92	39		

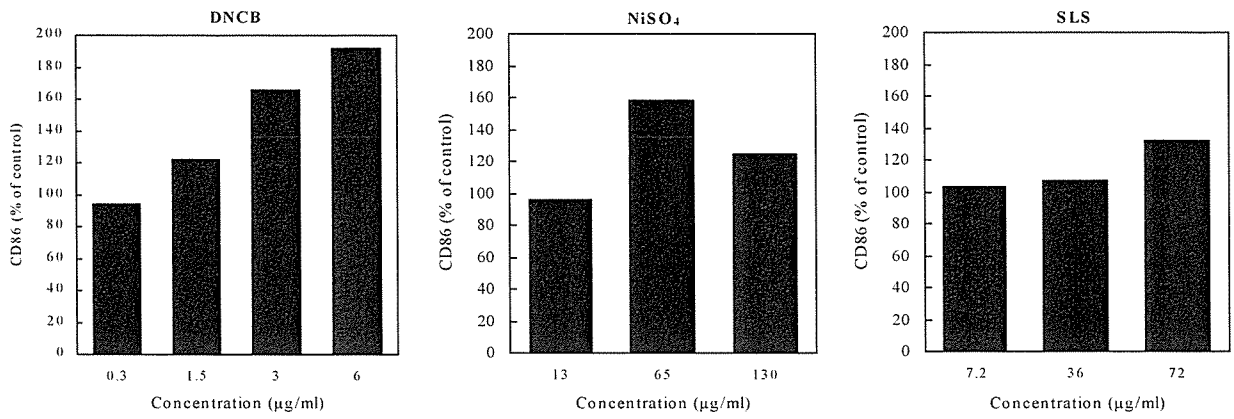


図 3. DNCB、NiSO<sub>4</sub> 及び SLS の CD86 相対発現量の変化

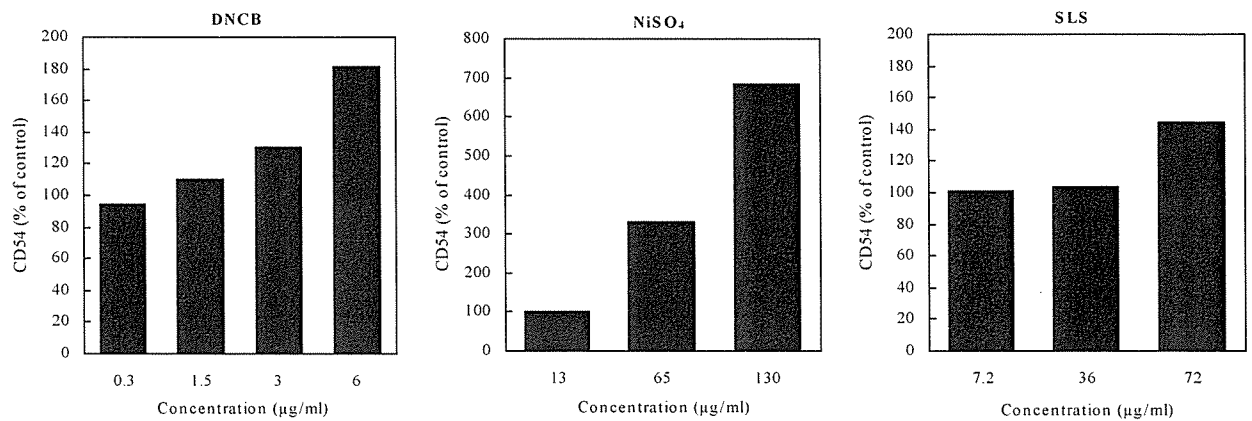


図 4 . DNCB、NiSO<sub>4</sub> 及び SLS の CD54 相対発現量の変化

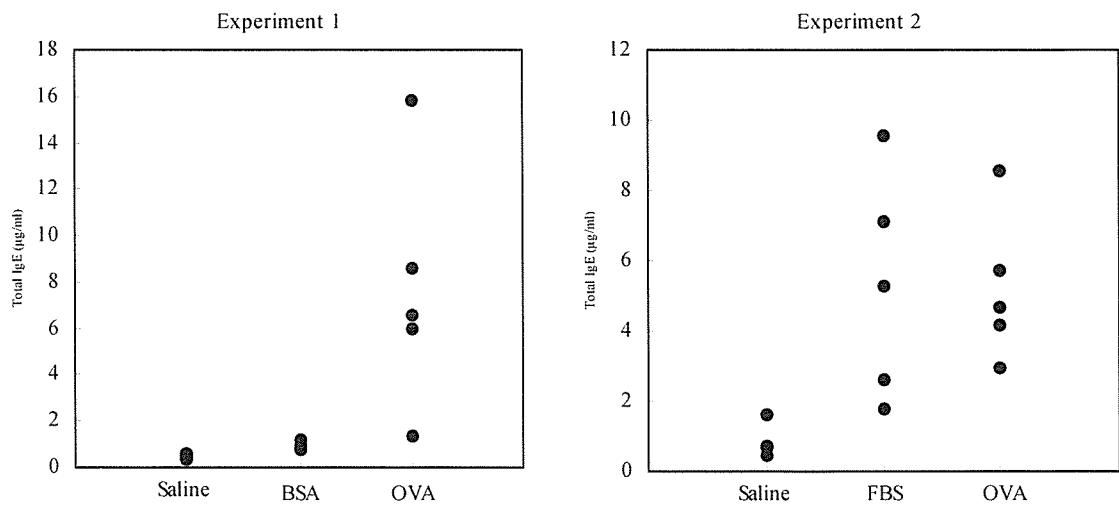


図 5. 各種タンパク質による血清 IgE 抗体価の変化

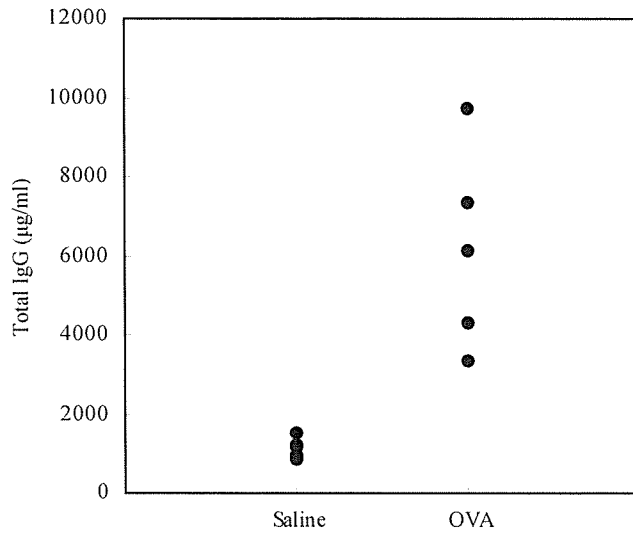


図 6. OVA 投与による血清 IgG 抗体価の上昇

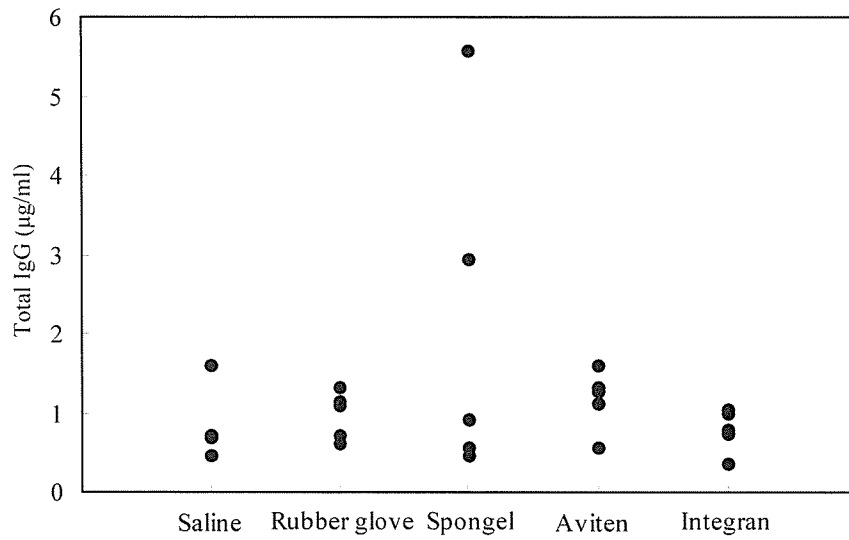


図 7. 医療材料の抽出物を投与したときの血清総 IgE 抗体価

## 4. 金属材料の生物学的安全性評価手法の開発

佐藤 道夫

平成18年度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)  
分担研究報告書

## 金属材料の安全性評価手法の開発

(医療機器・医療材料の安全性評価手法の開発に関する研究)

分担研究者	佐藤 道夫	国立医薬品食品衛生研究所 療品部
協力研究者	小園 知	神奈川歯科大学 高次口腔科学研究所
	伊佐間和郎	国立医薬品食品衛生研究所 療品部
	小林 郁夫	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所

**研究要旨：** 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。動物に埋植する金属材料円板(Ti/Ni, Ti, Ni)の製造を行い、Ti-6Al-4V合金を対照として、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。対照として捉えていたTi-6Al-4V合金では、チタン(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を、今回の埋植方法で検出できる可能性が示唆された。また、米国の医療機器不具合報告から、Tiアレルギーに関係するものを抽出し、整理した。

### A. 研究目的

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<sup>1)</sup>、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<sup>2)</sup>、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。



## B. 研究方法

### 【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、14mmφ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<sup>3)</sup>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、病理検査は、神奈川歯科大学で行った。pentobarbital sodium(30mg/kg)麻酔下で背部正中を3cm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<sup>4)</sup>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<sup>5)</sup>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。

## C. 研究結果

### 【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週後から既に背部に膨隆が見られ、【図1-1】に示すように、4週後には顕著になっていた。しかし、16週後には大部分(4/5)が膨隆していなかった。8週後の開背部写真を【図1-2】に示す。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を【図1-3】に示すが、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、【図1-4】に示すように、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、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。

【図1-5】に、4週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群の炎症が際立っていた。

4週後での体重変化は、Ni群とTi-6Al-4V合金群に有意差があり、8週後では、Ni群とTi群に有意差があった。4、8週後共に、Ni群以外の群間の差はなかった。16週後は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【図1-6】。

臓器/体重比については、4週後では差はなく、8週後の肝臓でNi群がやや他群に比べて小さかった(Ni群 $\leftrightarrow$ Ti/Ni群間、Ni $\leftrightarrow$ 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【図1-7】。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【図2-1】。この血性滲出物【図2-2】を含有した壁は、内側に線維素の析出した層【図2-3】がみられ、連続して崩壊した好中球を含む壊死層【図2-4】、肉芽組織層【図2-5】、線維化(瘢痕)層【図2-6】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【図2-7】。

・[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【図2-8】、軽度のリンパ球浸潤が観察された【図2-9】。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【図2-10】。

・[Ti/Ni合金]：埋植材料は、線維化した結合組織(瘢痕組織)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【図2-11、12】。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【図2-13】。

・[Ti-6Al-4V合金]：埋植材料は、Ti/Ni合金埋植群と同様に瘢痕化した結合組織によって被包された所見【図2-14】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【図2-15】。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【図2-16】。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【図2-17、18】、壁内に好酸球の浸潤が観察された【図2-19、20】。

### 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【図3-1】。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【図3-2、3】。肉芽組織の壊死により、多量の出血が確認された【図3-4】。壊死層に連続し肉芽組織層、瘢痕層がみられ【図3-5】、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【図3-6】。

・[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【図3-7、8】、わずかにリンパ球浸潤が観察された【図3-9、10】。

・[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【図3-11、12】。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【図3-14】。

・[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【図3-15、16】、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【図3-17、18】。

#### 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【図4-1、2】。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【図4-3】。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【図4-4、5】。

・[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【図4-6、7】

・[Ti/Ni合金]：Ti埋植群とほぼ同様の組織所見が観察された【図4-8、9】。

・[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【図4-10、11】。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【図4-12、13】。

#### 【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【図5-1、2】。

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【図5-3】、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【図5-4】。また、Vの溶出も、Ti-6Al-4Vでも非常に微量であった【図5-5】。

#### 【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であった。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