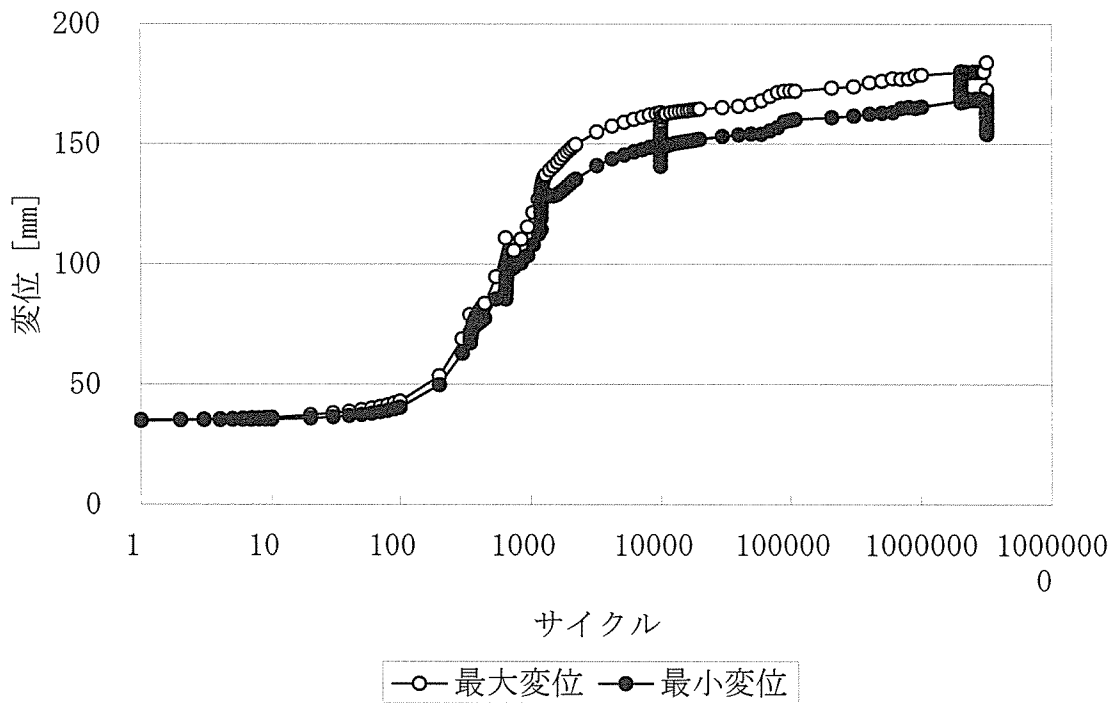


(a) 荷重値の推移



(b) 変位の推移

図3 引張疲労試験結果 (a) 荷重値の推移 (b) 変位の推移。

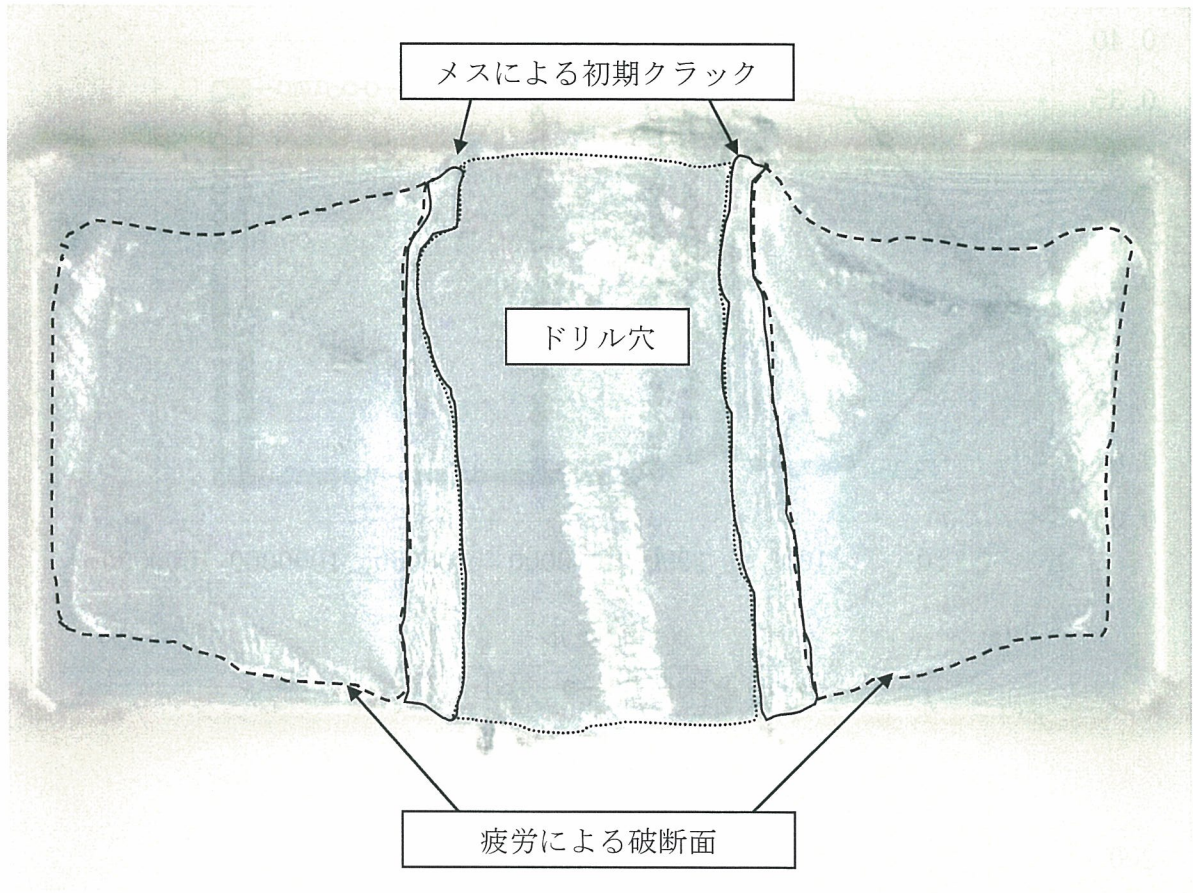


図4 CCT試験片の破断面写真。変形が大きく、初期クラックの測定が困難であった。写真サイズは約8mmx6mm。(全体、x40)

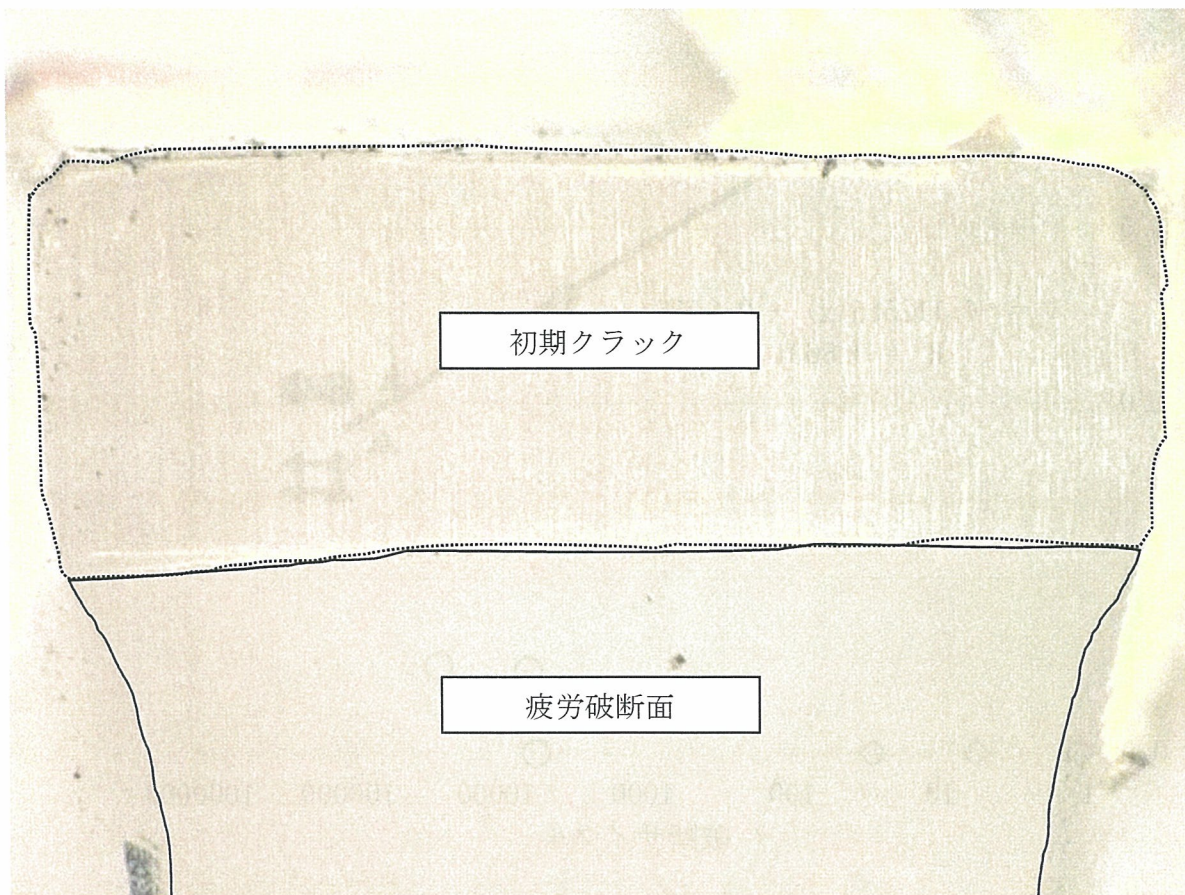


図5 ECT試験片の破断面写真。初期クラックの長さを容易に測定可能である。写真サイズは約4mmx3mm。(初期クラック付近、x80)

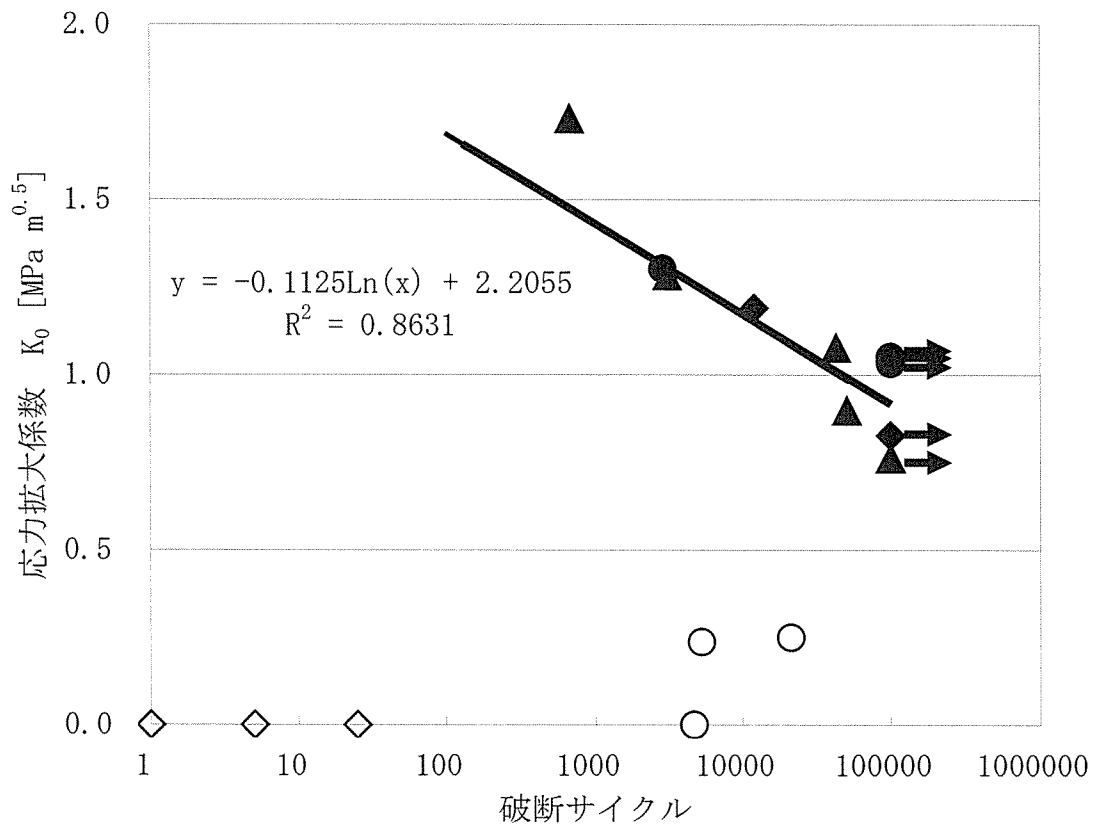


図6 ECT試験による疲労特性試験結果。矢印(→)は10万サイクルの試験終了時まで破断しなかったことを示す。近似曲線は酸化劣化していなかったサンプルA、B、Hのうち、10万サイクルまで破断しなかった5サンプルと極めて短期間で破断した1サンプルを除いた5サンプルから算出した。

- : サンプルA (Virgin)
- ◆ : サンプルB (EOG滅菌)
- ▲ : サンプルH (VEPE、EOG滅菌)
- : サンプルC (空气中ガンマ線滅菌)
- ◇ : サンプルD (窒素中ガンマ線滅菌)

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

角田 正史

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

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

分担研究者 角田 正史 北里大学助教授

ジブチルスズ (DBT)、オクチル酸スズ (OT)、人工硬膜、スズを高濃度含んだポリ乳酸ラクチドポリマー膜、スズを含まないポリ乳酸ラクチドポリマー膜、ポリ乳酸ラクチドオリゴマー (弾性形状維持及びゲル状) を、マウスのアストロサイト系細胞であるCRL-2534を用いて、細胞の生存率、上清中のグルタミン酸、細胞増殖を指標にして、毒性をin vitroで評価した。DBTは0.5 μ Mのレベルで細胞死が起きるなど強い毒性を示した。人工硬膜ではスズを高濃度含んだポリ乳酸ラクチドポリマー膜が細胞生存率の低下、グルタミン酸濃度の低下を示し、大量のスズの毒性を示した。OTは細胞増殖の抑制のみを示した。

A. 研究目的

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 は脳内に溶け出し、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もあるため、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、スズを高濃度に含む 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出来るが、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、比較的長期間に曝露し、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 low 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。

B. 研究方法

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 < 10 ppm)、テーラーメイ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 = 590 ppm) 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75µg/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2.5×10⁵cells/well、グルタミン酸放出量に関しては6wellのplateに各1.0×10⁶cells/well、細胞増殖評価に関しては、24wellのplateに各1.0×10⁴cells/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、2.0µM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、0.5µM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、100µM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、50µg/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、10µg/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測定を試料として採取し、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、0.25µM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、100µM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、50µg/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、5µg/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) (Nacalai tesque) 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

C. 研究結果

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1(A)(B)に0、0.5、1.0、1.5、2.0 μ M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1(C)(D)に0、0.125、0.25、0.5 μ M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 μ M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 μ M

曝露群は、0.5 μ M 曝露群に比べ、1.5 μ M 曝露群は0.5 μ M 曝露群及び1.0 μ M 曝露群に比べ、2.0 μ M 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 (表 1)。

図 2 (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 PLLA オリゴマー、及び、弾性形状維持層 PLLA 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 (表 2)。

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 3 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 (表 3)。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 3 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 PLLA オリゴマー、及び、弾性形状維持層 PLLA 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 4 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 PLLA 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 PLLA 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つ

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 6 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 7 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。

D. 考察

毒性評価に培養細胞を使う手法は、その簡便性で有用とされているが、神経毒性に関しては、確立されているものは少ない。今回、実際の神経系細胞由来の培養細胞として、アストロサイト系細胞である CRL-2534 を用いた。CRL-2534 は、生後 8 ヶ月のマウスの小脳の培養から、自然に形質変換し確立された培養系で、type III のアストロサイトである (Alliot and Pessac, 1984)。この細胞について毒性評価に使用できるかを検討した。

そのために、まず細胞死に関して検討することとし、トリパンブルー色素排除法に加えて、細胞突起を有する形態から顕微鏡によるカウントが困難である可能性を考え、培養上清中の LDH 濃度についても細胞の生存の指標として使用した。曝露前には、90% 以上の細胞生存率が得られ良好な細胞培養の状態であった。また、細胞死以外に機能面の指標を検討することとして、グルタミン酸の培養上清中の放出量 (Alliot et al, 1996) を検討した。さらに、低濃度での増殖抑制の可能性を考え、DBT、OT について細胞の増殖評価も検討した。増殖評価は、細胞

に TetraColor ONE を添加することにより生成され放出されたホルマザン量が、生細胞に比例することを原理に、上清中ホルマザン量を TetraColor ONE の取り込みとして評価し、増殖の結果である生細胞数を評価して行った。

本研究では、以前に DBT (Tsunoda et al., 2006) 及び TBT (Nakano et al., 2004) の毒性を評価したマクロファージ系細胞の J774.1 細胞への曝露実験をふまえて、アストロサイト系細胞に対する DBT の曝露濃度を決定した。一方、OT に関しては、触媒として使用された場合の濃度の高さと、神経毒性の報告がないことから、曝露濃度は DBT に比べて高値に設定した。また、PLLA に関しては、スズとの相互作用を考慮して、Nacalai 社製の製品に加えて、スズを含まないもの、大量に含むもの、さらに、形態の違うものとして、ゲル状の PLLA オリゴマー、及び、弾性形状が維持されている PLLA オリゴマーを比較した。

DBT は、細胞の生存率及び上清中 LDH を検討した実験で 0.5 μ M 曝露で対照群に比べ有意な差を示し毒性が示された。DBT に対する感受性が高いとされるマクロファージ系細胞 J774.1 の DBT の生存率の有意な低下と同じ濃度 (Tsunoda et al., 2006) で有意な差が認められたことから、アストロサイトは DBT に対して、マクロファージと同様の高い感受性を持つと言える。さらに、細胞生存率実験で生存率の低下を示さなかった 0.25 μ M で細胞上清中のグルタミン酸量の増加を示した。これは、細胞が機能障害 (グルタミン酸受容体機能障害) をきたし、グルタミン酸を細胞外へ大量に放出したか、上清中のグルタミン酸を取り込む機能が損なわれたため起こった可能性が考えられる。また、増殖評価でも 0.25 μ M で細胞増殖の抑制を示した。以

上から、CRL-2534 を用いた評価系で、少なくとも DBT については、上清グルタミン酸測定による評価及び細胞増殖の評価は、細胞生存率と同様の有用な指標として評価できると考える。

一方、OT は 100 μ M の濃度でも細胞の生存、機能面に影響はなかった。しかし、100 μ M では、細胞増殖を抑制することが示されたため、毒性が全くないわけではないと考えられる。

PLLA についての実験においては、PLLA5000 及び PLLA3000 で、細胞の生存、機能面の両方で毒性を示さなかった。しかし、S3 に関しては、細胞の生存率及び上清中 LDH について 10 μ g/ml でも有意性が認められ、細胞の生存への影響が示された。また、細胞の生存率の低下を示さなかった 5 μ g/ml でグルタミン酸量の低下を示した。S3 が毒性を示したことは、大量のスズの影響か、PLLA が大量のスズの存在下でスズとの相互作用により毒性を強めた可能性がある。上清中グルタミン酸の低下は、細胞が機能障害をきたし、グルタミン酸の細胞外への放出機構が損なわれたため起こった可能性がある。

ゲル層 PLLA オリゴマー及び弾性形状維持層 PLLA オリゴマーに関しては、50 μ g/ml の濃度においても細胞の生存に影響を生じさせなかったが、グルタミン酸量では 50 μ g/ml の濃度において、ゲル層 PLLA オリゴマーで有意な上昇、弾性形状維持層 PLLA オリゴマーで有意な低下が示された。このことから、機能面からの検討を行うことで、神経毒性の評価がより信頼性の高いものとなることが示唆された。また、グルタミン酸産生の評価で、ゲル層 PLLA オリゴマーが 3 時間後で有意なグルタミン酸量の増加を示したことから、弾性形状維持層 PLLA オリゴマーに比べて毒性が強い可能性が示唆された。

考える。この形態の違いによる毒性変化の可能性は、他の材料の評価においても注意すべき点かもしれない。

今回の実験結果から、DBT は 0.5 μ M より細胞死、0.25 μ M より機能変化、増殖抑制が示された。DBT dichloride の分子量が 303.84 であることを考慮すると、0.5 μ M = 1.52 \times 10⁻² μ g/ml となる。人工硬膜製品は、生体内に埋入後、頭蓋内で加水分解され髄液中に溶解する。最も分解が進むのは埋入後 3 ヶ月であり、この期間では 28 日間で約 30% が溶解されることが明らかになっている。製品の使用限度量は 2g とされており、その中のスズ濃度は 10ppm 未満であること、髄液は 1 日に 500ml ~ 600ml 産生され交換されている (小林, 1985) ことを考えると、溶出する DBT 濃度はアストロサイトに影響を及ぼす濃度よりはるかに低く、実際の臨床適用では DBT による影響は想定しにくいと考える。また、OT、PLLA 各種についても同様に実際の臨床における適用での影響は想定しにくいと考える。

E. 結論

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残留濃度等を考慮すれば、現時点における人工硬膜の使用で大きな危険を伴うことはない と考える。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。

謝辞

本研究を終えるにあたり、終始懇切なご指導をいただきました北里大学医学部代謝蛋白学研究室の高橋正身教授、板倉誠講師、北里大学医学部組織培養センターの浜野美恵子さんに深甚なる謝意を表します。

参考文献

- Alliot, F. and Pernard, B.(1984) Astrocytic cell clones derived from established cultures of 8-day postnatal mouse cerebella. *Brain Research*, 306, 283-291.
- Alliot, F., Marty, M.C., Cambier, D. and Pessac, B.(1996) A spontaneously immortalized mouse microglial cell line expressing CD4. *Developmental Brain Research*,95,140-143.
- Aoyagi, K. and Takahashi, M.(2001) Pituitary adenylate cyclase -activating polypeptide enhances Ca^{2+} -dependent neurotransmitter release from PC12 cells and cultured cerebellar granule cells without affecting intracellular Ca^{2+} mobilization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286,646-651.
- 荒川泰昭(2000) 有機スズの生体機能への侵襲 -免疫系・脳神経系・内分泌系- *Biological Trace Element Research*,11,259-286.
- Boyer, I.J.(1989) Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology*, 55,253-298.
- Comment, C.E., Blaylock, B.L., Germolec, D.R., Pollock, P.L., Kouchi, Y., Brown, H.W., Rosenthal, G.J. and Luster, M.I.(1992) Thymocyte injury after in vitro chemical exposure : potential mechanisms for thymic atrophy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 262, 1267-1273.
- Gebremedhin, D., Yamaura, K., Zhang, C., Bylund, J., Koehler, R.C. and Harder, D.R.(2003) Metabotropic glutamate receptor activation enhances the activities of two types of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in rat hippocampal astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 23, 1678-1687.
- 筏義人(1993) 生物的特性高分子材料 高分子素材 : 日本化学会編 第4版 実験化学講座 29 高分子材料,丸善,東京,pp.418-422.
- 小林清史(1985) 髄液の生理 : 精神神経系疾患の臨床生化学,金剛出版,東京,pp.17-23.
- Koga, T., Kozaki, S. and Takahashi, M.(2002) Exocytotic release of alanine from cultured cerebellar neurons. *Brain Research*, 952, 282-289.
- Matthias, K., Kirchhoff, F., Seifert, G., Huttmann, K., Matyash, M., Kettenmann, H. and Steinhauser, C. (2003) Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct Astrocyte Populations in the Mouse Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 23, 1750-1758.
- 宮本享,山田圭介,織田祥史,石川正恒,岡本新一郎,山形専,平井収,上村喜彦,橋本研二,橋本信夫,菊池晴彦(2001) 組織置換型人工硬膜の多施設間共同臨床実験 -GM927の有用性に関する検討- *脳神経外科ジャーナル*,10,337-383.
- Mizuhashi,S.,Ikegaya,Y.,Nishiyama, N. and Matsuki,N.(2000) Cortical astrocytes exposed to tributyltin undergo morphological changes in vitro. *Japanese Journal of Pharmacology*,84,339-346.
- Nakano, K., Tsunoda, M. and Konno, N.(2004) Tributyltin(TBT) increases TNF α mRNA expression and induces apoptosis in the murine macrophage cell line in vitro. *Environmental Health and Preventive Medicine*,9,266-271.
- Tsunoda, M., Aizawa, Y., Konnn, N., Kimura, K. and Sugita-Konishi, Y.(2006) Subacute administration of tributyltin chloride modulates neurotransmitters and their metabolites in discrete brain regions of maternal mice and their F1 offspring. *Toxicology and Industrial Health*, 22,15-25.
- Tsunoda, M., Konno, N., Nakano, K. and

Liu, Y.(2004) Altered metabolism of dopamine in the midbrain of mice treated with tributyltin chloride via subacute oral exposure. Environmental Sciences, 11, 4, 209-219.

Tsunoda, M., Yamamoto, K., Ito, K., Inoue, Y., Miki, T., Kudo, Y., Satoh, T. and Aizawa, Y.(2006) Dibutyltin(DBT) dichloride inhibits cytokine productions in murine macrophage cell line, J774.1. Biological Trace Element Research, 17, 417-422.

和田攻(1985) 金属とヒト - エコトキシコロジーと臨床 - 朝倉書店, 東京 pp.286-300.

Whalen, M.M. and Loganathan, B.G. (2001) Butyltin exposure causes a rapid

decrease in cyclic AMP levels in human lymphocytes. Toxicology and Applied Pharmacology, 171, 141-148.

Yamada, K., Miyamoto, S., Nagata, I., Kikuchi, H., Ikeda, Y., Iwata, H. and Yamamoto, K.(1997) Development of a dural substitute from synthetic bioabsorbable polymers. Journal of Neurosurgery, 86,1012-1017.

F. 研究発表 :

特になし。

G. 知的所有権の取得状況 :

特になし

表 1. OT、PLLA5000、PLLA3000 を曝露したアストロサイト系細胞の生存率及び上清中 LDH 濃度

(A) OT

曝露濃度	0 μ M	25 μ M	50 μ M	75 μ M	100 μ M
生存率 (%)	89.0 \pm 0.7	87.8 \pm 0.7	89.48 \pm 0.68	88.6 \pm 1.7	89.5 \pm 1.1
LDH 濃度 (%control)	100.0 \pm 5.5	101.7 \pm 2.7	97.9 \pm 2.6	106.7 \pm 1.3	108.1 \pm 4.4

(B) PLLA5000

曝露濃度	0 μ g/ml	10 μ g/ml	20 μ g/ml	50 μ g/ml
生存率 (%)	87.8 \pm 1.2	87.2 \pm 1.1	84.2 \pm 2.0	81.0 \pm 3.6
LDH 濃度 (%control)	100.0 \pm 25.0	124.6 \pm 49.1	159.4 \pm 59.0	128.6 \pm 43.1

(C) PLLA3000

曝露濃度	0 μ g/ml	10 μ g/ml	20 μ g/ml	50 μ g/ml
生存率 (%)	82.0 \pm 3.4	82.4 \pm 0.8	81.6 \pm 1.6	79.0 \pm 1.1
LDH 濃度 (%control)	100.0 \pm 24.2	114.0 \pm 29.2	121.4 \pm 30.7	111.1 \pm 25.9

注) 平均値 \pm 標準誤差で示す。

表 2. ゲル層 PLLA オリゴマー、弾性形状維持層 PLLA オリゴマーを曝露したアストロサイト系細胞の生存率及び上清中 LDH 濃度

(A) ゲル層 PLLA オリゴマー

曝露濃度	0 μ g/ml	10 μ g/ml	20 μ g/ml	50 μ g/ml
生存率 (%)	94.6 \pm 1.1	93.4 \pm 0.5	94.5 \pm 0.6	92.2 \pm 0.6
LDH 濃度 (%control)	100.0 \pm 8.4	113.2 \pm 4.8	113.7 \pm 5.2	115.9 \pm 3.5

(B) 弾性形状維持層 PLLA オリゴマー

曝露濃度	0 μ g/ml	10 μ g/ml	20 μ g/ml	50 μ g/ml
生存率 (%)	99.0 \pm 0.4	98.6 \pm 0.2	98.4 \pm 0.2	98.2 \pm 0.6
LDH 濃度 (%control)	100.0 \pm 1.7	103.5 \pm 3.3	107.5 \pm 3.5	103.0 \pm 3.6

注) 平均値 \pm 標準誤差で示す。

表 3. OT、PLLA5000、 PLLA3000 を曝露したアストロサイト系細胞の上清中グルタミン酸濃度

(A) OT

曝露時間	0hr	3hr	6hr
グルタミン酸濃度 (μ M)	0.123 \pm 0.032	0.123 \pm 0.032	0.208 \pm 0.048

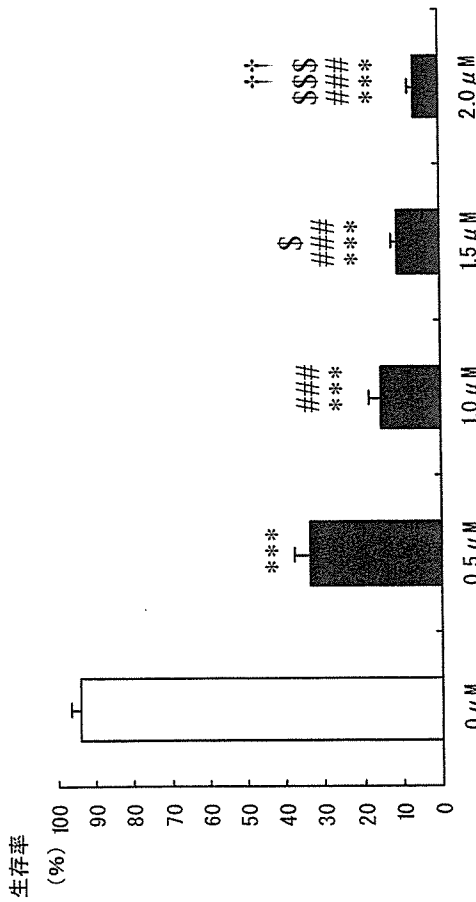
(B) PLLA5000

曝露時間	0hr	3hr	6hr
グルタミン酸濃度 (μ M)	0.173 \pm 0.021	0.188 \pm 0.020	0.214 \pm 0.012

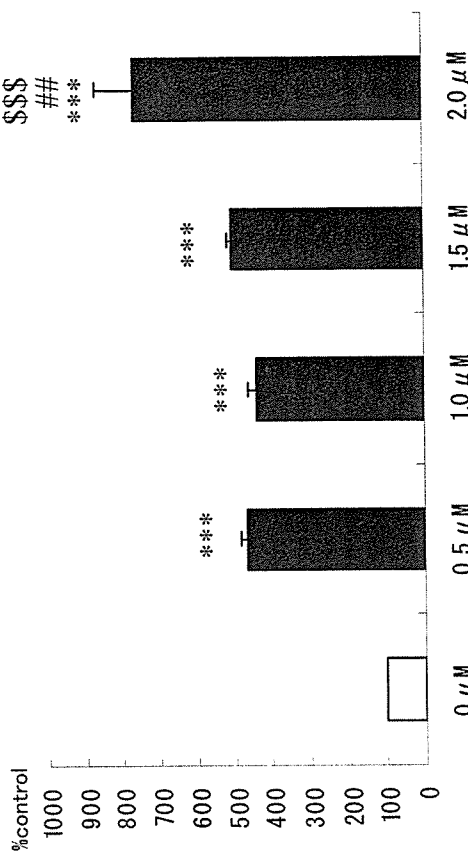
(C) PLLA3000

曝露時間	0hr	3hr	6hr
グルタミン酸濃度 (μ M)	0.166 \pm 0.022	0.130 \pm 0.018	0.214 \pm 0.012

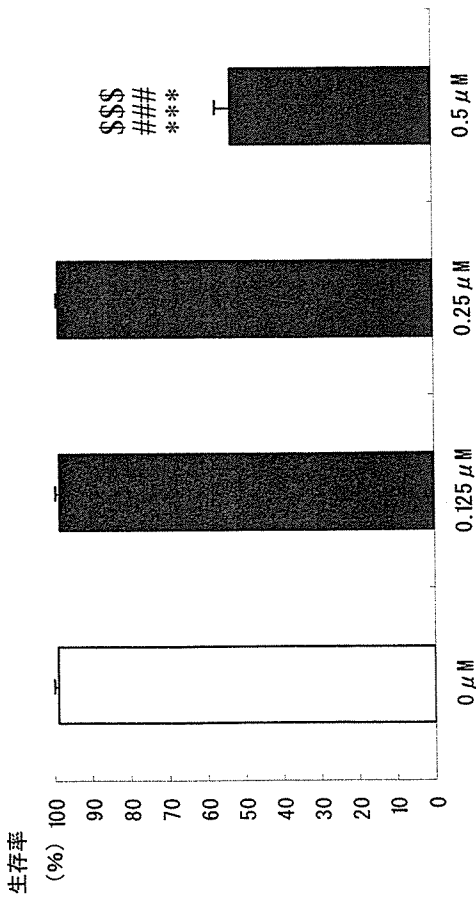
注) 平均値 \pm 標準誤差で示す。



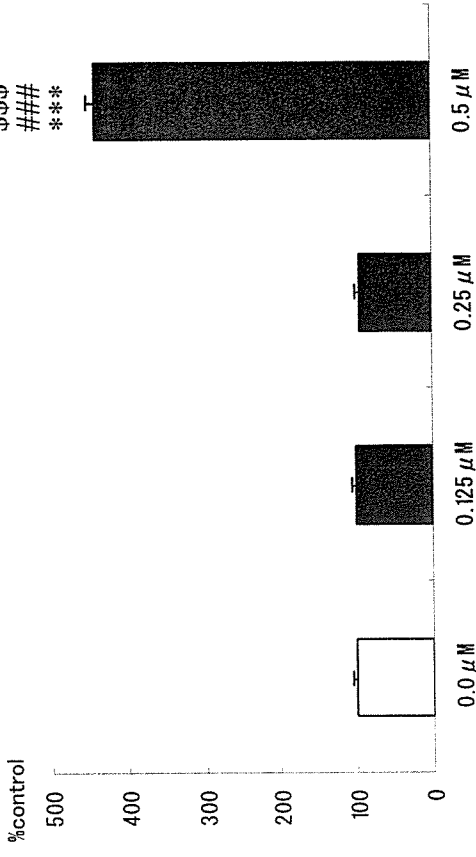
(A)生存率



(B)LDH濃度



(C)生存率(Low Dose)



(D)LDH濃度(Low Dose)

図1. DBTを曝露したアストロサイト系細胞の生存率及び上清中LDH濃度

注) 平均値±標準誤差で示す。 ***: p<0.001 (0.0 μMとの比較)、 ##: p<0.01、 ###: p<0.001 (0.5 μMとの比較)
 \$: p<0.05、 \$\$\$: p<0.001 (1.0 μMとの比較)、 †: p<0.01 (1.5 μMとの比較)

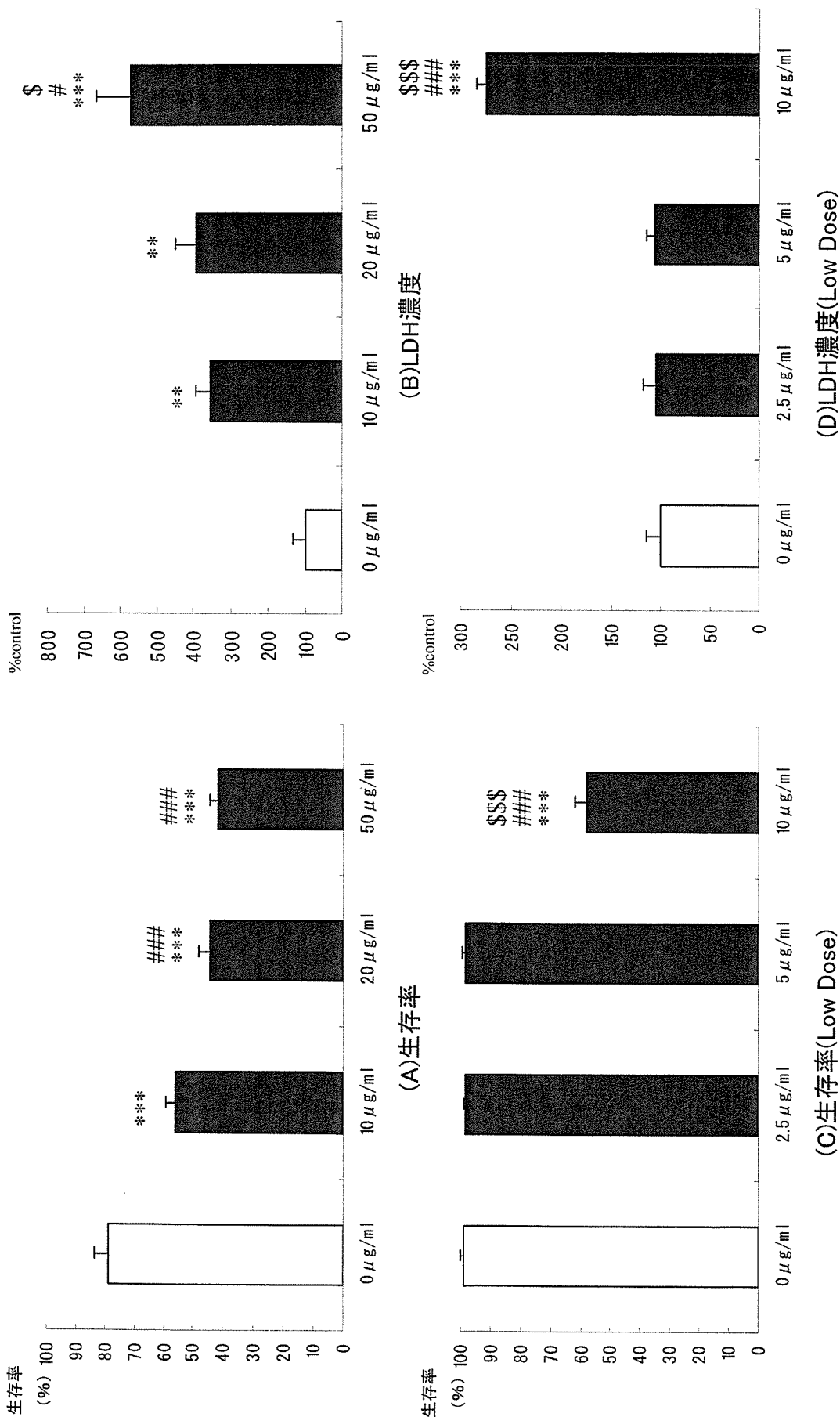
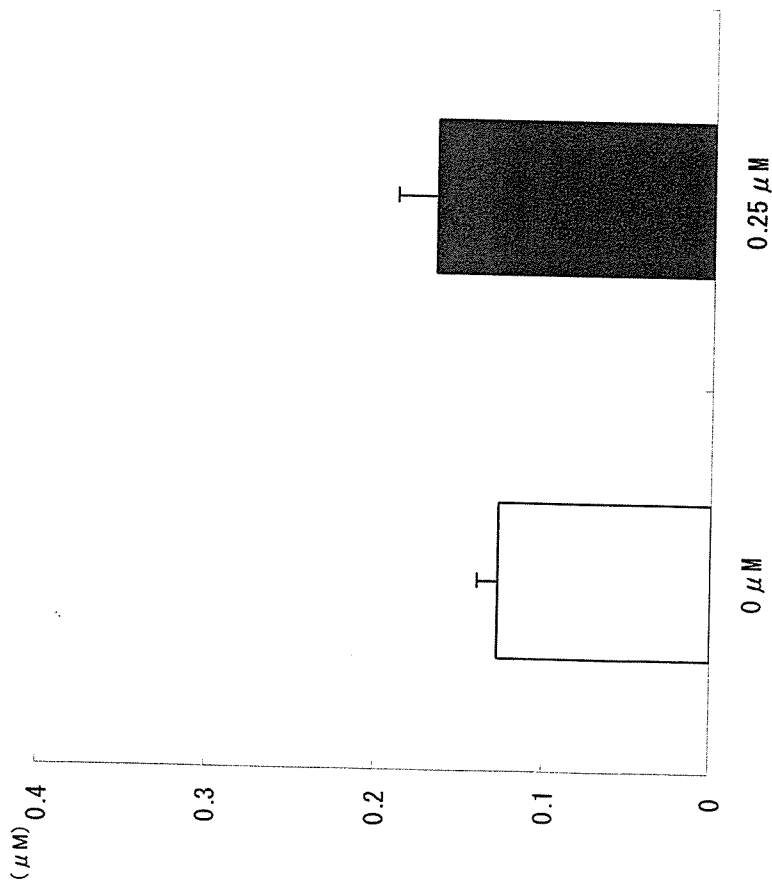
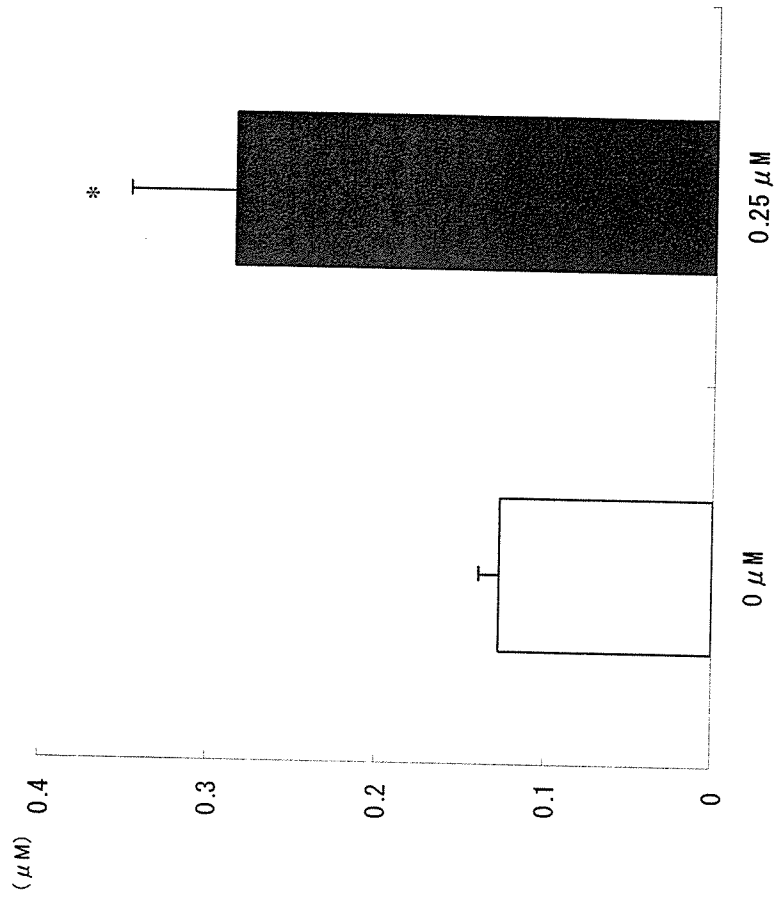


図2. S3を曝露したアストロサイト系細胞の生存率及び上清中LDH濃度

注) 平均値±標準誤差で示す。**: p<0.01、***: p<0.001 (0 μg/mlとの比較)、#: p<0.05、###: p<0.001 (10 μg/mlとの比較)、\$: p<0.05 (20 μg/mlとの比較)、\$\$\$: p<0.001 (5 μg/mlとの比較)



(A)1時間後



(B)2時間後

図3. DBTを曝露したアストロサイト系細胞の上清中グルタミン酸濃度

注) 平均値±標準誤差で示す。*: $p < 0.05$ (0.00 μMとの比較)